

苹果锚蛋白基因 ANK 家族生物信息学鉴定分析

许瑞瑞¹, 张世忠², 宿红艳³, 刘春香¹, 曹慧^{1,*}, 束怀瑞^{2,*}

(¹潍坊学院生物与农业工程学院, 山东省高校生物化学与分子生物学重点实验室, 山东潍坊 261061; ²山东农业大学园艺科学与工程学院, 国家苹果工程技术研究中心, 作物学国家重点实验室, 山东泰安 271018; ³鲁东大学, 山东烟台 264025)

摘要: 利用生物信息学方法对苹果 ANK 基因家族成员及分类鉴定, 同时对其染色体定位、系统进化关系及芯片表达特性进行了分析。苹果 MdANK 家族包含 351 个基因, 根据蛋白结构域差异分为 16 个类别, ANK-M 类型最为庞大, 有 143 个 ANK 蛋白; 苹果的 17 条染色体均有 ANK 家族基因分布, 其中第 2 条染色体上分布最多, 有 36 个 ANK 基因。MdANK 编码的蛋白在 72 ~ 2 429 个氨基酸范围内, 等电点在 4.30 ~ 11.13 之间。芯片分析发现, 在苹果果实成熟时期及砧木接穗互作过程中, 多数 MdANK 基因的表达都有不同程度变化。

关键词: 苹果; ANK; 基因家族; 生物信息学

中图分类号: S 661.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 06-1021-12

Bioinformatics Analysis of ANK Gene Family in Apple

XU Rui-rui¹, ZHANG Shi-zhong², SU Hong-yan³, LIU Chun-xiang¹, CAO Hui^{1,*}, and SHU Huai-rui^{2,*}

(¹College of Biological and Agricultural Engineering, Weifang University, Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology in Universities of Shandong, Weifang, Shandong 261061, China; ²College of Horticulture Science and Technology, Shandong Agricultural University, National Research Center for Apple Engineering and Technology, Tai'an, Shandong 271018, China; ³Ludong University, Yantai, Shandong 264025, China)

Abstract: ANK (ankyrin repeat) containing proteins comprise a large protein family, which play important roles in plant growth, development, and signal transduction, no ANK genes have been reported in apple. In this study, MdANK gene family, gene classification, chromosome location, sequence alignment, conserved structure domains and expression profiles of MdANKs were predicted and analyzed with bioinformatics methods, alignment of amino acid sequences and phylogenetic analysis. The results showed that MdANK family contained 351 genes, which was further divided into 16 types and the largest group is the ANK-M type contains 143 proteins. Phylogenetic analysis revealed that MdANK genes in apple could be divided into 15 subfamilies (from A to O) according to the phylogenetic analysis tree by MEGA 5. A total of 112 MdANK genes were mapped to 17 chromosomes, whereas 22 MdANK genes were not mapped to any particular chromosome. For example, Chr 2 encompasses the largest number of 36 MdANK genes, while the lowest number (Chr 6, 7 and 8) contained 6 MdANK genes. MdANK proteins contained

收稿日期: 2012-12-24; **修回日期:** 2013-05-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31000307); 山东省优秀中青年奖励基金项目 (BS2010NY004); 山东省自然科学基金项目 (Y2007D60, ZR2009DQ003); 潍坊学院博士科研基金项目 (2012BS15)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: hrshu@sdau.edu.cn; hui5232@163.com)

from 72 to 2 429 amino acids and the isoelectric point is from 4.30 to 11.13. Expression analysis showed that the expression levels of most *MdANK* genes were altered during the ripening process and rootstock-scion interactions process. Our data will provide very useful information for cloning and functional analysis of members of this gene family in apple.

Key words: apple; ANK; gene family; bioinformatics

锚蛋白重复序列 (ankyrin repeat, ANK) 是生物体广泛存在的一类蛋白结构。ANK 最早在酵母细胞周期调节因子 Swi6/Cdc10 及果蝇信号蛋白中发现 (Breden & Nasmyth, 1987), 随后在蛋白骨架中发现 24 个氨基酸残基的 ANK 序列 (Lux et al., 1990)。典型的锚蛋白重复序列由 33 个氨基酸残基组成, 数量不等的 ANK 单元串联起来, 形成大的 ANK 结构域。大部分 ANK 蛋白的功能与蛋白互作相关 (Michaely & Bennett, 1992; Bork, 1993), 并在不同功能的蛋白中被发现 (Mosavi et al., 2004), 在动物及酵母细胞周期的调节、转录等方面扮演着重要的角色 (Sedgwick & Smerdon, 1999)。在模式植物拟南芥 (*Arabidopsis*) 中第一个被发现的 ANK 蛋白编码基因是 AKR (Zhang et al., 1992), 它受光信号调控, 在细胞分化和生长过程中起到调节功能。随后越来越多的植物 ANK 蛋白功能被报道。拟南芥中 ANK 蛋白 BOPI 参与叶的形态建成 (Ha et al., 2004); 拟南芥 EMB506 含有 5 个 ANK 结构域, 可以与 AKPR 蛋白相互作用, 在胚胎发育过程中起着重要的作用 (Albert et al., 1999); 拟南芥 XBAT32, 编码泛素连接酶, 通过乙烯信号转导途径参与侧根的形成 (Nodzson et al., 2004; Lyzenga et al., 2012)。另外, 它的同源基因 XBAT35 编码蛋白也具有泛素连接酶活性并参与乙烯信号转导途径 (Carvalho et al., 2012)。据报道, ANK 蛋白 LIANK 在百合花粉管的萌发和花粉管的生长过程中起至关重要的作用 (Huang et al., 2006)。

研究发现, 锚蛋白还参与植物对生物胁迫和非生物胁迫信号的响应。例如, 拟南芥 AKR2 参与生物胁迫和非生物胁迫过程中抗氧化物质的代谢 (Yan et al., 2002); ACD6 和 NPR1 参与水杨酸信号转导, 对生物胁迫起到重要作用 (Cao et al., 1997; Lu et al., 2003, 2005); 水稻 XB3 参与 XA21 介导的植物免疫过程 (Wang et al., 2006); 辣椒 CaKR1 可同时响应生物胁迫和非生物胁迫过程 (Seong et al., 2007)。

目前, 只有拟南芥和水稻中的 ANK 基因家族被鉴定出来并做了系统的生物信息学分析, 在果树尤其是苹果中未见相关研究报道。2010 年 ‘金冠’ 苹果全基因组测序完成后 (Velasco et al., 2010), 苹果 RING finger 家族 (Li et al., 2011)、MdGLRs 基因家族 (罗华 等, 2012)、WRKY 转录因子家族 (许瑞瑞 等, 2012) 及 DREB (Zhao et al., 2012) 转录因子也已通过生物信息学方法鉴定出来, 并进行了全基因组分析和基因功能的预测, 苹果基因功能数据库对苹果基因进行了广泛的家族分类 (张世忠 等, 2012)。另外, ANK 基因家族在拟南芥和水稻中的研究已有报道 (Becerra et al., 2004; Huang et al., 2009), 这为该家族的分类及功能分析提供了理论依据。作者拟从 ‘金冠’ 苹果全基因组出发, 利用生物信息学方法, 鉴定苹果 ANK 家族基因, 分析基因结构域序列保守性及其家族进化关系, 并通过分析基因表达谱筛选出在苹果果实成熟时期和砧木接穗互作过程中表达有不同程度变化的 *MdANK* 基因, 以期为研究 ANK 在苹果生长发育和砧木接穗互作中的作用奠定一定的理论基础。

1 文献数据来源与分析方法

首先, 从 GDR (Genome Database for Rosaceae) 数据库下载 ‘金冠’ 苹果全基因组序列 (Jung et al., 2008), 构建本地 blast (Basic Local Alignment Search Tool) 数据库, 以拟南芥和水稻 ANK 家

族基因序列执行本地 blast (1e-003) 搜索 (Mount, 2007); 然后, 利用苹果功能基因组数据库蛋白结构域搜索工具 CD (conserved domain) 搜索含有 ANK 结构域 (PF00023 或 SM00248) 的基因 (张世忠 等, 2012)。合并上述两部分结果, 利用 perl 程序筛选, 去掉重复序列, 所得结果利用 PFAM (Protein Family) 及 NCBI-CDD (Conserved Domains) 工具进行蛋白结构预测 (Mistry & Finn, 2007; Marchler-Bauer et al., 2012), 删除不含 ANK 结构域的基因, 同时利用 ExPASy Proteomics Server (<http://expasy.org/>) 对所有 ANK 基因氨基酸序列进行分子量、等电点预测 (Artimo et al., 2012)。

利用 PFAM 搜索 ANK 蛋白结构, 使用 DOG2.0 (Domain Graph, version 2.0) 进行蛋白结构绘制 (Ren et al., 2009)。

从 GDR 数据库下载苹果基因组信息文件 (assembly gff3 file), 利用 Perl 程序选取 ANK 基因的染色体位置信息, 并利用 MapDraw 程序进行染色体定位作图 (刘仁虎和孟金陵, 2003)。通过 MUSCLE 进行序列比对 (Edgar, 2004), 再利用 MEGA5 构建进化树, 进化树生成算法采用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ), 校验参数 Bootstrap 重复 1 000 次 (Tamura et al., 2011)。

从 EBI (The European Bioinformatics Institute) 芯片数据库中下载果实发育芯片数据 (E-MEXP-2451) 和砧木接穗互作芯片数据 (E-GEOD-4762) 及相应的探针序列 (A-GEOD-11164 和 A-GEOD-3715), 分别构建探针序列的本地 blast 数据库, 利用苹果 ANK 基因 CDS 序列进行比对, 选取完全匹配探针代表该 ANK 基因 (Kapushesky et al., 2010)。利用 Perl 从芯片数据中选取代表 ANK 基因的探针及表达量。采用 Cluster3.0 进行芯片聚类, Java Treeview 查看芯片聚类结果并作图。

2 苹果 ANK 基因家族成员鉴定及分类

利用生物信息学方法, 从‘金冠’苹果全基因组鉴定到 351 个 ANK 家族基因成员 (表 1), 通过蛋白序列的 PFAM 及 SMART 结构域搜索分析, 均含有 ANK 结构域 (<http://www.applegene.org/mdank.txt>)。苹果 ANK 基因编码的蛋白在 72 (MDP0000589579, 属于 ANK-M 亚家族) ~ 2 429 (MDP0000163211, 属于 ANK-BPA 亚家族) 个氨基酸范围内, 等电点在 4.30 (MDP0000218990, 属于 ANK-M 亚家族) ~ 11.13 (MDP0000697244, 属于 ANK-M 亚家族) 之间。

表 1 拟南芥、水稻和苹果 ANK 蛋白的分类及数量

Table 1 The classification and numbers of ANK in *Arabidopsis*, *Oryza sativa* and *Malus × domestica*

序号 Number	亚家族 Subfamily	类型 Description	苹果 <i>Malus × domestica</i>	水稻 <i>Oryza sativa</i>	拟南芥 <i>Arabidopsis</i>
1	ANK-M	Proteins with only ankyrin repeats	143	73	18
2	ANK-TM	Ankyrin-transmembrane proteins	83	37	40
3	ANK-TPR	Protein with TPR or PPR repeats	4	22	1
4	ANK-RF	Ring finger protein	8	9	5
5	ANK-ZF	Zinc finger protein	15	7	6
6	ANK-BTB	Proteins with BTB domain	8	6	7
7	ANK-IQ	Calmodulin binding motif-containing protein	12	4	4
8	ANK-PK	Protein kinases	18	4	7
9	ANK-BPA	ARF GTPase-activating domain-containing protein	5	3	4
10	ANK-IT	Potassium channels	10	0	1
11	ANK-SBP	Protein with SBP doamins	5	0	0
12	ANK-GPCR	Protein with GPCR_chapero_1 doamins	9	0	0
13	ANK-MS	Protein with Motile_Sperm doamins	3	1	0
14	ANK-KinesinR	Protein with Kinesin-relat doamins	7	0	0
15	ANK-UBN2	Protein with UBN2_3 doamins	5	0	0
16	ANK-O	Proteins with other domains	26	10	13
总数 Total			351	175	105

结构域分析结果显示, 143 个 ANK 蛋白只含有 ANK 重复, 其它多数 ANK 蛋白包含多个结构域。根据蛋白结构域的差异, 将苹果 ANK 蛋白分为 16 类 (图 1), 分别是 ANK-M (仅包含 ANK

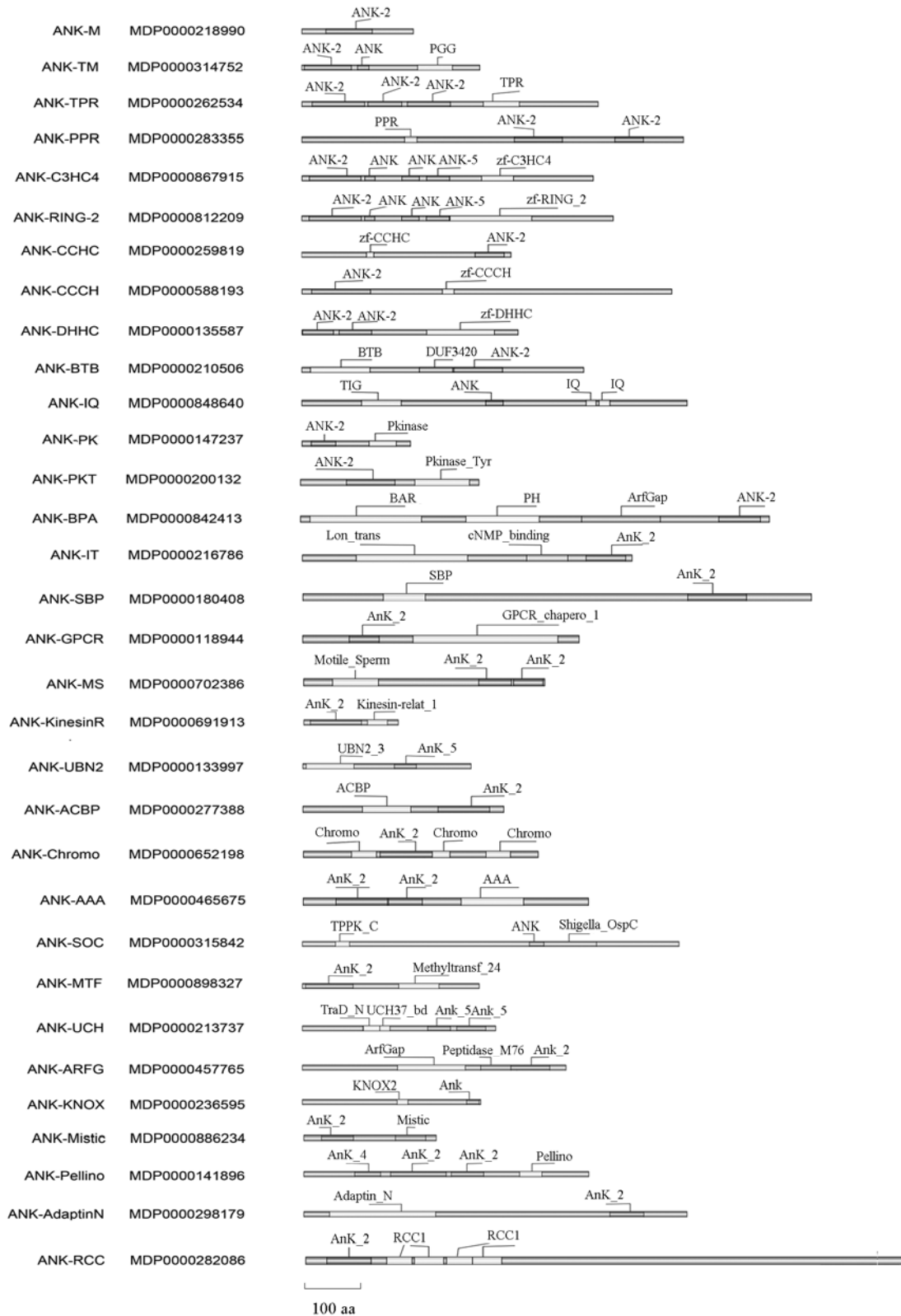


图 1 ANK 家族蛋白质结构

Fig. 1 Structure of representative ANK protein from each subfamily

结构域)、ANK-TM(跨膜蛋白)、ANK-TPR(TPR/PPR 结构域蛋白,包括 ANK-TPR 和 ANK-PPR)、ANK-RF(指环蛋白,又进一步分为 ANK-C3HC4、ANK-RING_2 及 ANK-CCHC)、ANK-ZF(锌指蛋白,包括 ANK-CCCH 和 ANK-DHHC)、ANK-BTB(BTB 结构域蛋白)、ANK-IQ(钙离子结合蛋白)、ANK-PK(激酶蛋白,包含 ANK-PKT)、ANK-BPA(GTP 水解酶活性结构域蛋白)、ANK-IT(钾离子通道蛋白)、ANK-SBP(SBP 结构域蛋白)、ANK-GPCR(GPCR 分子伴侣结构域蛋白)、ANK-MS(Motile_Sperm 结构域蛋白)、ANK-KinesinR(驱动蛋白相关结构域蛋白)、ANK-UBN2(UBN2_3 结构域蛋白)及 ANK-O(其他结构域,包括 ANK-ACBP、ANK-Chromo、ANK-AAA、ANK-SOC、ANK-MTF、ANK-UCH、ANK-ARFG、ANK-KNOX、ANK-Mistic、ANK-Pellino、ANK-AdoptinN 及 ANK-RCC)。其中苹果 ANK-M 亚家族基因最多,有 143 个成员,与水稻类似,有 73 个水稻 ANK-M 蛋白,而拟南芥中只有 18 个 ANK-M 蛋白;其次是 ANK-TM,苹果中有 83 个成员,水稻中有 37 个成员,有 40 个拟南芥 ANK-TM 蛋白,是拟南芥中成员最多的亚家族;ANK-SBP、ANK-GPCR、ANK-KinesinR 和 ANK-UBN2 是苹果中特有的亚家族;而 ANK-IT 苹果中有 10 个成员,拟南芥中 1 个基因,水稻中未发现 ANK-IT 蛋白;苹果和水稻中分别有 3 个和 1 个 ANK-MS 蛋白,拟南芥中未发现 ANK-MS 亚家族蛋白成员(表 1)。

3 苹果 ANK 基因染色体定位分析

利用染色体定位工具,分析‘金冠’苹果基因组信息,得到 329 个苹果 ANK 的染色体定位信息(图 2),有 22 个 ANK 基因没有找到染色体定位信息。17 条染色体均有 MdANK 分布,其中第 2 条染色体最多,有 36 个基因;其次是第 17(34 个)和第 9、15 条(30 个)条染色体,而第 6、7、8 条染色体的最少只有 6 个。

4 苹果 ANK 基因系统进化分析

为了方便对苹果 ANK 蛋白的特征及进化进行分析,首先对所预测到的 351 个 *MdANK* 基因的进化关系进行评估。从系统进化树中可看出,所有苹果 ANK 共分为 15 类(A~O),其中 B 类 ANK 成员最多,有 84 个基因;其次是 A 类和 H 类,分别有 79 和 40 个基因;J 类基因最少,只有 2 个 ANK 成员(图 3)。

5 果实成熟和砧木接穗互作时期 *MdANK* 基因的表达

通过查询 EBI 网站的芯片数据库,搜索出了苹果不同发育时期中 ANK 基因的表达变化情况。在果实成熟时期芯片中鉴定到 179 个基因表达(表 2, <http://www.applegene.org/mdank.txt>),利用 Cluster3.0 软件,采用层次聚类算法(Hierarchical Clustering Algorithms)进行芯片聚类,结果如图 4, A 所示,由左向右依次对应的是苹果栽培品种‘Honey Crisp’(HC)和‘Crispps Pink’(CP)的 3 个时期:果实成熟期(week-0)、果实成熟前 2 周(week-2)、果实成熟前 4 周(week-4),且每个时期都有 4 次重复的结果,依次是 GSM618107-GSM618110、GSM618111-GSM618114、GSM618115-GSM618118、GSM618119-GSM618122、GSM618123-GSM618126 和 GSM618127-GSM618130。在果实成熟过程中,品种间 ANK 基因表达类似,无显著差异。部分基因在果实成熟过程中表达量下调,其中 10 个基因下调明显(MDP0000167308、MDP0000886234、MDP0000842413、MDP0000183373、MDP0000248694、MDP0000263295、MDP0000216106、MDP0000255080、ANK-IT、ANK-TM、

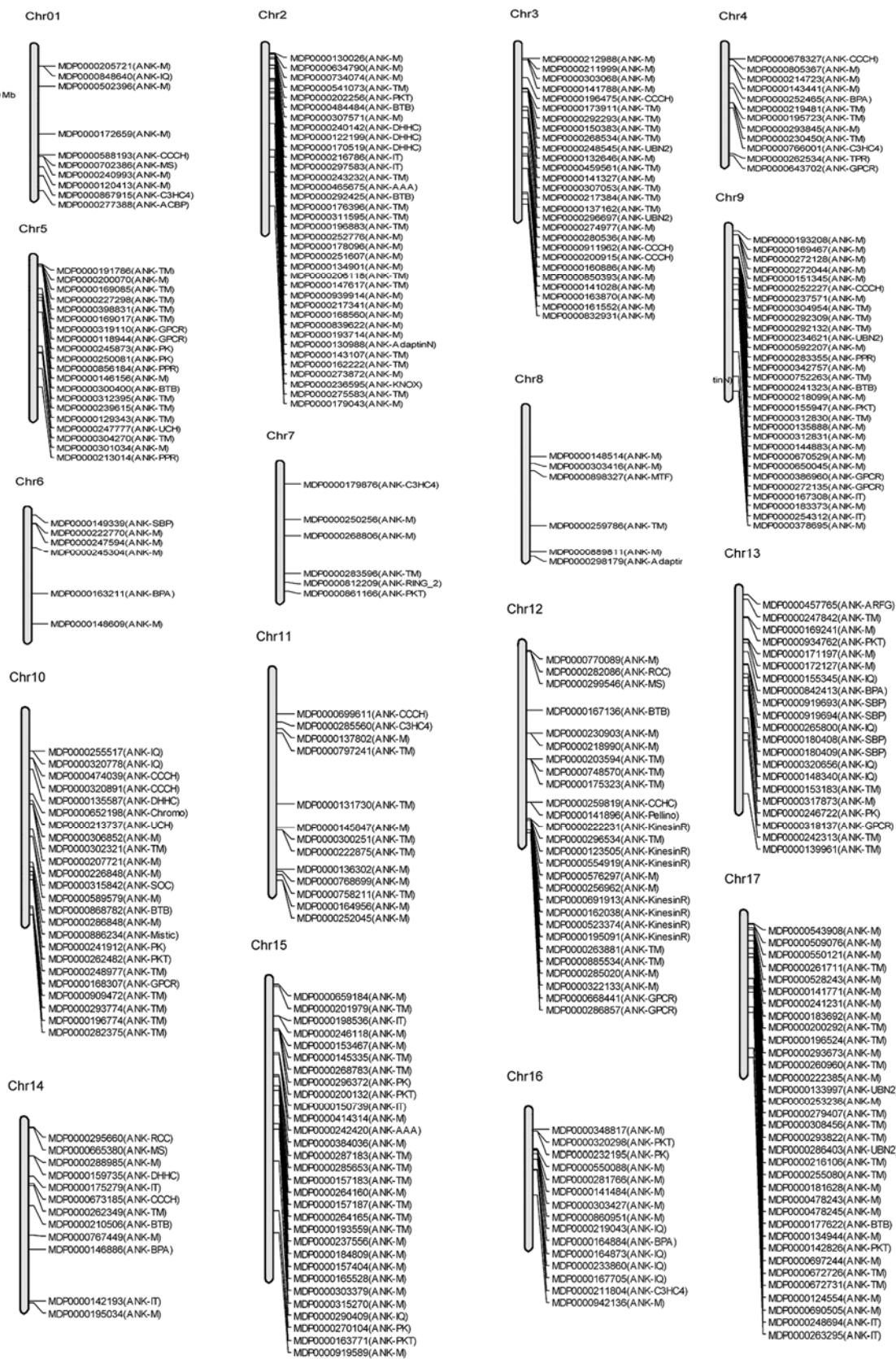


图2 苹果 ANK 基因在染色体上的位置

Fig. 2 The chromosome location of the ANK gene in apple

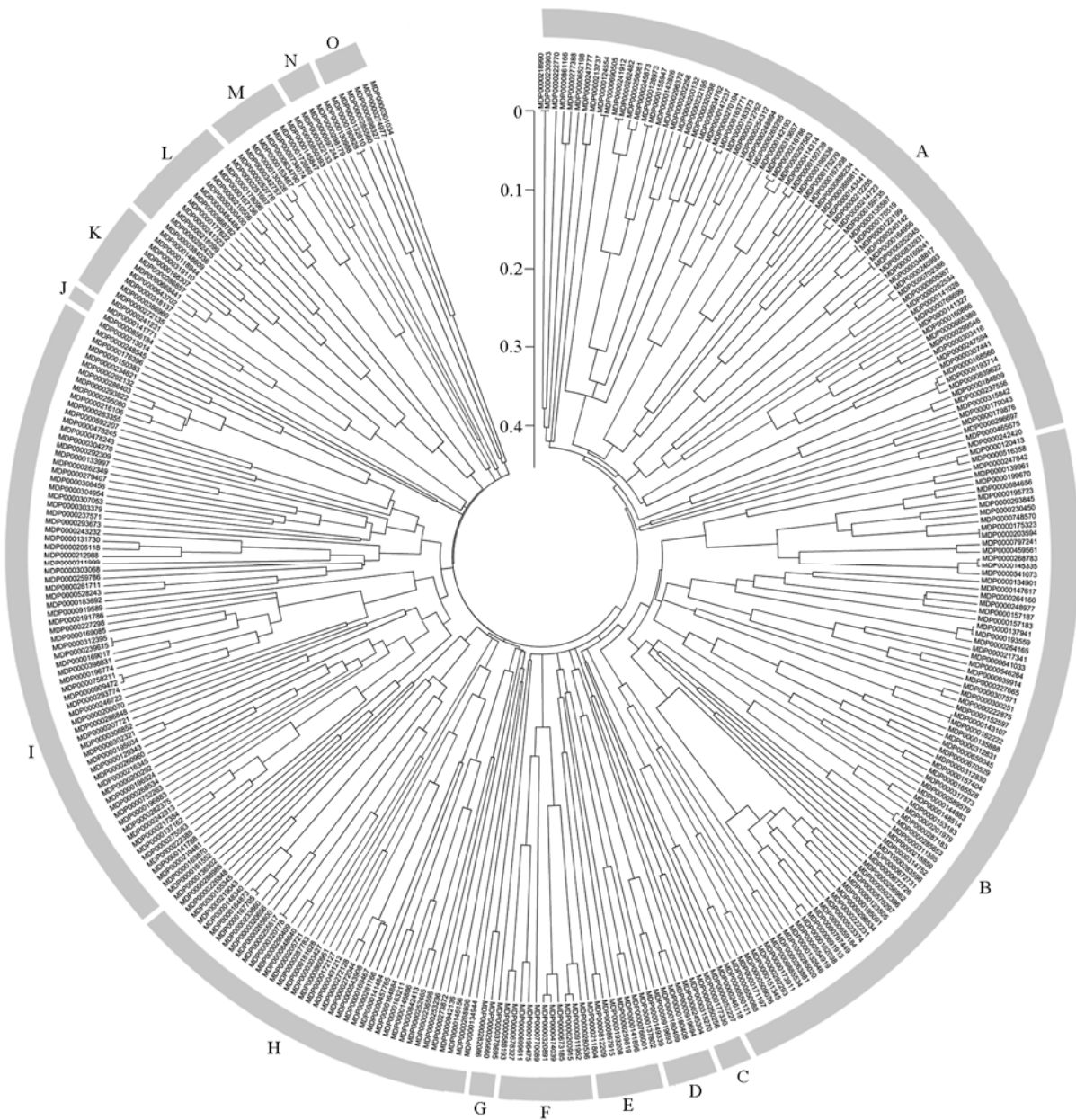


图 3 苹果 ANK 基因家族的系统进化树

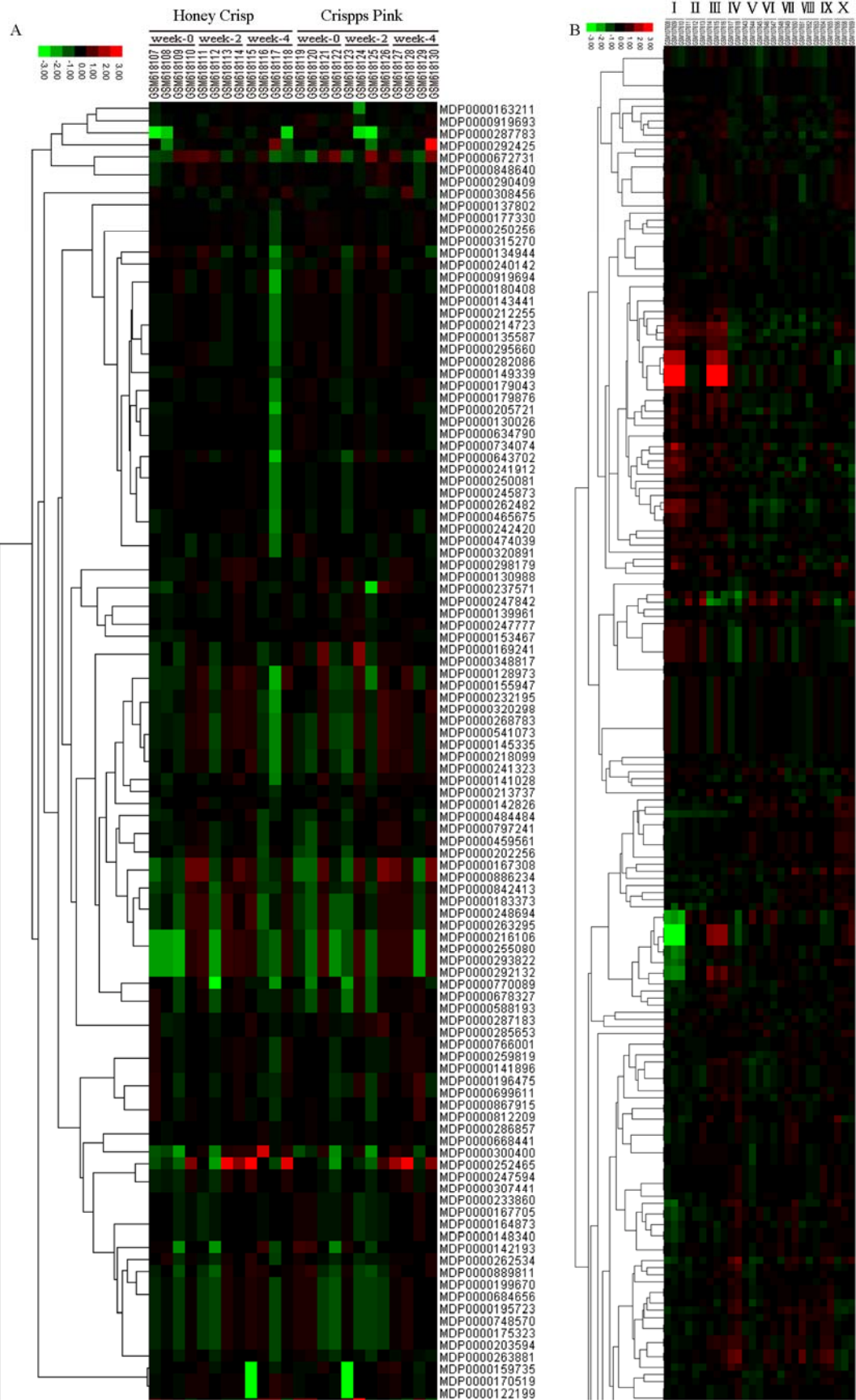
每 0.1 刻度单位代表每个氨基酸的替换率。

Fig. 3 The unrooted neighbor joining phylogenetic tree of ANK gene family in apple

The scale bar represents 0.1 substitutions per amino acid position.

ANK-TM、ANK-TM、ANK-TM 亚家族), 部分基因在果实成熟过程中表达上调, 包括 MDP0000268534、MDP0000150383、MDP0000176396、MDP0000196524、MDP0000243232、MDP0000206118、MDP0000260960 及 MDP0000131730 (以上 8 个均为 ANK-TM 亚家族) 等基因。

在苹果砧木接穗互作相关的芯片结果中(图 4, B), 搜索到 312 个基因的表达(详见 <http://www.applegene.org/mdank.txt>), 利用 Cluster3.0 软件, 采用层次聚类算法(Hierarchical Clustering Algorithms)进行芯片聚类。不同砧穗组合间存在差异, 每种组合有 2~3 次的重复结果, 其中 MDP0000176396、



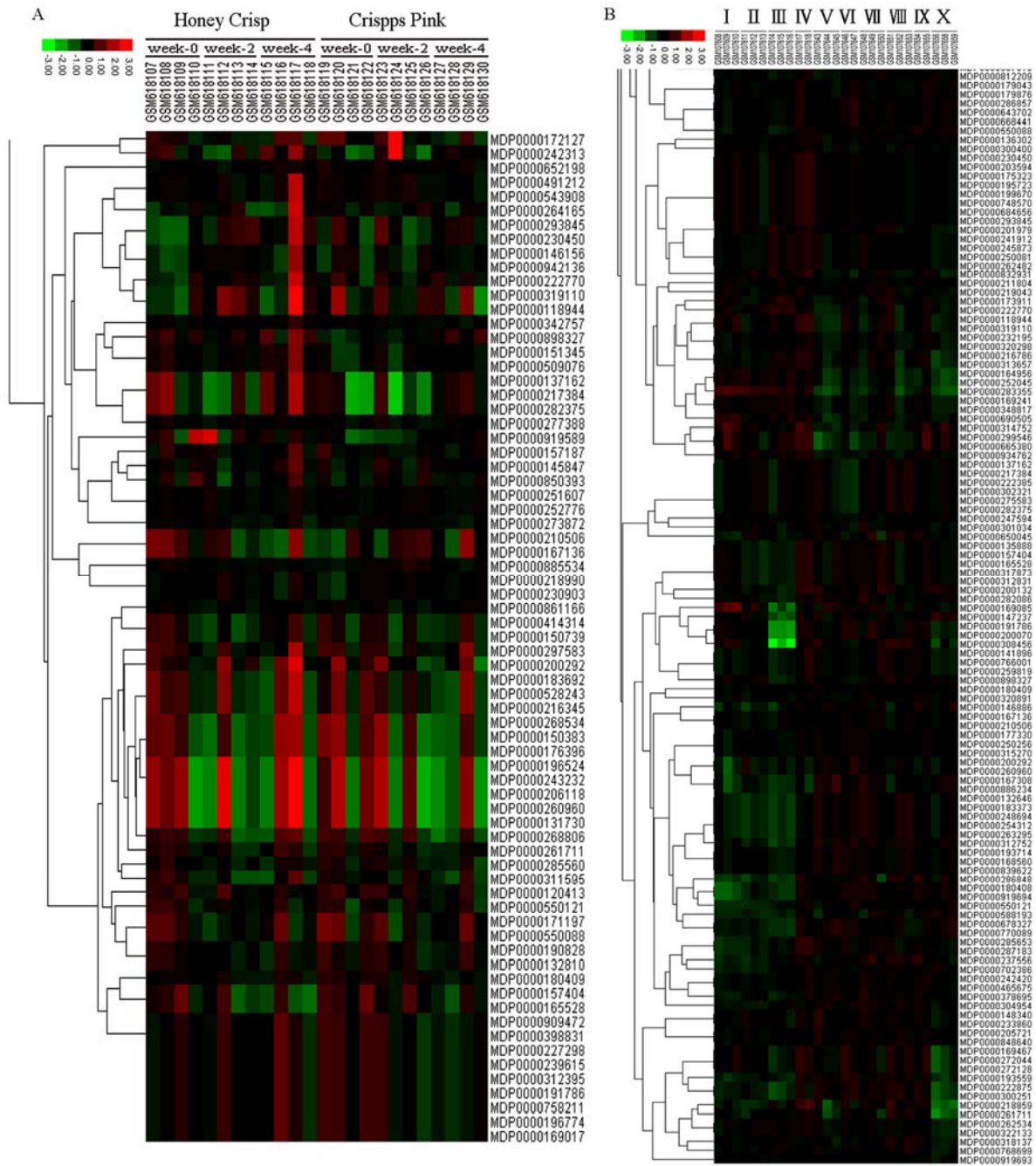


图 4 苹果 ANK 基因芯片分析

A: 苹果 ANK 基因在果实成熟过程中的表达谱; B: 苹果 ANK 基因在砧木接穗互作过程中的表达谱。
红色代表上调, 绿色代表下调, 黑色代表差异不明显, 深浅代表强弱表达信号。

I. Ambrosia/B9; II. Gala/B9; III. Melrose/B9; IV. Gala/B9; V. Gala/G30; VI. Gala/M111;
VII. Gala/M27; VIII. Gala/M7; IX. Gala/M9; X. Gala/Supporter.

Fig. 4 The microarray analysis of the ANK genes in apple

A. Expression profile of *MdANK* during fruit development in apple; B. Expression profile of *MdANK* in apple during rootstock-scion interactions process. The color of red, green and black represent down-regulation, up-regulation and no significant changes, respectively.

The various shades of red and green represent the different of expression signal values.

I. Ambrosia/B9; II. Gala/B9; III. Melrose/B9; IV. Gala/B9; V. Gala/G30; VI. Gala/M111;
VII. Gala/M27; VIII. Gala/M7; IX. Gala/M9; X. Gala/Supporter.

MDP0000262349、MDP0000279407、MDP0000303379 及 MDP0000304270（分别为 ANK-TM、ANK-TM、ANK-TM、ANK-M、ANK-TM 亚家族）在 Ambrosia/B9 及 Melrose/B9 组合时表达量较高；而 MDP0000211999、MDP0000212988、MDP0000131730、MDP0000206118、MDP0000243232、MDP0000216345、MDP0000528243、MDP0000641033、MDP0000146156 及 MDP0000942136（分别为 ANK-M、ANK-M、ANK-TM、ANK-TM、ANK-TM、ANK-TM、ANK-M、ANK-M、ANK-M、ANK-M 亚家族）等在 Ambrosia/B9 组合中表达量较低；MDP0000191786、MDP0000200070 及 MDP0000308456（分别为 ANK-TM、ANK-M、ANK-TM 亚家族）在 Melrose/B9 组合中表达量较低。

6 讨论

ANK 蛋白能够参与蛋白互作，响应多种生物和非生物胁迫反应，能够调控植物的生长发育等过程。ANK 基因在植物中分布较广，蛋白种类及数量物种间存在着较大差异。随着植物基因组研究的深入，对基因家族的研究已成为现今植物基因功能研究的重点之一。其中，拟南芥 ANK 基因家族有 105 个成员，水稻中有 175 个成员，而在苹果中找到了 351 个 ANK 蛋白。为方便与已报道的物种中 ANK 家族的比较，各物种中亚家族的划分及蛋白数量统计见 <http://www.applegene.org/mdank.txt>。

已有研究表明拟南芥、水稻、百合、辣椒等物种中的 ANK 蛋白的一些家族成员参与了光信号调控、叶的形态建成、胚胎发育、侧根的形成以及对生物胁迫和非生物胁迫信号的响应等 (Zhang et al., 1992; Cao et al., 1997; Albert et al., 1999; Yan et al., 2002; Ha et al., 2004; Nodzon et al., 2004; Lu et al., 2005; Wang et al., 2006; Seong et al., 2007; Lyzenga et al., 2012)，根据系统进化树分析结果进行 ANK 基因同源性的比较，预测苹果 ANK 蛋白家族的某些成员也具有类似的功能，具体还需要试验的验证。我们推测：苹果中 ANK 蛋白数量更多，结构与功能更加多样性，有可能参与植物中更多、更复杂的生理生化功能。首先苹果中 ANK 蛋白的数量远远高于水稻和拟南芥中的数量；其次，苹果中亚家族数量也明显多与前两者，其中拟南芥和水稻中没有亚家族 ANK-SBP、ANK-GPCR、ANK-KinsinR 和 ANK-UBN2；最后，苹果中仅含有 ANK 结构域的蛋白达 143 个，远高于拟南芥和水稻中的成员数量。

本研究结果还显示，有部分 *MdANK* 基因在果实发育过程中的表达量有不同程度的变化，并且发现变化明显的基因多属于 ANK-IT 和 ANK-TM 亚家族，说明这两个亚家族在果实发育过程可能起着更重要的作用，它们如何参与苹果果实的发育成熟，其具体功能还有待进一步研究。另外，还找到 321 个 *MdANK* 基因在苹果砧木接穗互作过程中表达量有变化，说明不同砧穗组合时引起了不同的 *MdANK* 基因成员表达量变化，其中变化明显的基因多数是 ANK-TM 和 ANK-M 亚家族，它们可能间接影响嫁接苗的生长，其具体通过哪些基因影响，如何影响的还有待进一步深入研究。

为了能更好的了解苹果中 ANK 基因家族的结构和功能，以‘金冠’苹果全基因组序列为背景，对苹果中 351 个 *MdANK* 进行鉴定和分析。本研究为苹果中 ANK 蛋白的功能研究提供有力数据。苹果中 ANK 蛋白如何与其它蛋白互作，调控果实生长发育以及如何参与逆境信号的传导将成为今后果树研究的重点，将为苹果优质高产奠定理论基础。

References

- Albert S, Despres B, Guilleminot J, Bechtold N, Pelletier G, Delseny M, Devic M. 1999. The EMB 506 gene encodes a novel ankyrin repeat containing protein that is essential for the normal development of *Arabidopsis* embryos. *Plant Journal*, 17: 169 - 179.
- Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E. 2012. ExpASY: SIB

- bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Research*, 40: 597 - 603.
- Becerra C, Jahrmann T, Puigdomenech P, Vicent C M. 2004. Ankyrin repeat-containing proteins in *Arabidopsis*: Characterization of a novel and abundant group of genes coding ankyrin-transmembrane proteins. *Gene*, 340: 111 - 121.
- Bork P. 1993. Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: Mobile modules that cross phyla horizontally. *Proteins*, 17: 363 - 374.
- Breedon L, Nasmyth K. 1987. Similarity between cell-cycle genes of budding yeast and fission yeast and the Notch gene of *Drosophila*. *Nature*, 329: 651 - 654.
- Cao H, Glazebrook J, Clarke J D, Volko S, Dong X. 1997. The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, 88: 57 - 63.
- Carvalho S D, Saraiva R, Maia T M, Abreu I A, Duque P. 2012. XBAT35, a novel *Arabidopsis* RING E3 ligase exhibiting dual targeting of its splice isoforms, is involved in ethylene-mediated regulation of apical hook curvature. *Molecular Plant*, 5: 1295 - 1309.
- Edgar R C. 2004. MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5: 113 - 131.
- Ha C M, Jun J H, Nam H G, Fletcher J C. 2004. BLADE-ON-PETIOLE1 encodes a BTB/POZ domain protein required for leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, 45: 1361 - 1370.
- Huang J, Chen F, Del Casino C, Autino A, Shen M, Yuan S, Peng J, Shi H, Wang C, Cresti M, Li Y. 2006. An ankyrin repeat-containing protein, characterized as a ubiquitin ligase, is closely associated with membrane-enclosed organelles and required for pollen germination and pollen tube growth in lily. *Plant Physiology*, 140: 1374 - 1383.
- Huang J, Zhao X, Yu H, Ouyang Y, Wang L, Zhang Q. 2009. The ankyrin repeat gene family in rice: Genome-wide identification, classification and expression profiling. *Plant Molecular Biology*, 71: 207 - 226.
- Jung S, Staton M, Lee T, Blenda A, Svancara R, Abbott A, Main D. 2008. GDR (Genome Database for Rosaceae): Integrated web-database for Rosaceae genomics and genetics data. *Nucleic Acids Research*, 36: D1034 - D1040.
- Kapushesky M, Emam I, Holloway E, Kurnosov P, Zorin A, Malone J, Rustici G, Williams E, Parkinson H, Brazma A. 2010. Gene expression atlas at the European Bioinformatics Institute. *Nucleic Acids Research*, 38: D690 - D698.
- Li Y, Wu B, Yu Y, Yang G, Wu C, Zheng C. 2011. Genome-wide analysis of the RING finger gene family in apple. *Molecular Genetics Genomics*, 286: 81 - 94.
- Liu Ren-hu, Meng Jin-ling. 2003. MapDraw: A microsoft excel macro for drawing genetic linkage maps based on given genetic linkage data. *Hereditas (Beijing)*, 25: 317 - 321. (in Chinese)
- 刘仁虎, 孟金陵. 2003. MapDraw, 在 Excel 中绘制遗传连锁图的宏. *遗传*, 25: 317 - 321.
- Lu H, Liu Y, Greenberg J T. 2005. Structure-function analysis of the plasma membrane-localized *Arabidopsis* defense component ACD6. *Plant Journal*, 44: 798 - 809.
- Lu H, Rate D N, Song J T, Greenberg J T. 2003. ACD6, A novel ankyrin protein, is a regulator and an effector of salicylic acid signaling in the *Arabidopsis* defense response. *Plant Cell*, 15: 2408 - 2420.
- Luo Hua, Hu Da-gang, Zhang Lian-zhong, Hao Yu-jin. 2012. Bioinformatics and expression analysis of apple MdGLRs genes family. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (3): 425 - 435. (in Chinese)
- 罗 华, 胡大刚, 张连忠, 郝玉金. 2012. 苹果 MdGLRs 家族基因生物信息学鉴定和表达分析. *园艺学报*, 39 (3): 425 - 435.
- Lux S E, John K M, Bennett V. 1990. Analysis of cDNA for human erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue-differentiation and cell-cycle control proteins. *Nature*, 344: 36 - 42.
- Lyzenga W J, Booth J K, Stone S L. 2012. The *Arabidopsis* RING-type E3 ligase XBAT32 mediates the proteasomal degradation of the ethylene biosynthetic enzyme, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 7. *Plant Journal*, 71: 23 - 34.
- Marchler-Bauer A, Zheng C, Chitsaz F, Derbyshire M K, Geer L Y, Geer R C, Gonzales N R, Gwadz M, Hurwitz D I, Lanczycki C J, Lu F, Lu S, Marchler G H, Song J S, Thanki N, Yamashita R A, Zhang D, Bryant S H. 2012. CDD: Conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic Acids Research*, doi: 10.1093/nar/gks1243.
- Michaelis P, Bennett V. 1992. The ANK repeat: A ubiquitous motif involved in macromolecular recognition. *Trends in Cell Biology*, 2: 127 - 129.
- Mistry J, Finn R. 2007. Pfam: A domain-centric method for analyzing proteins and proteomes. *Methods Molecular Biology*, 396: 43 - 58.

- Mosavi L K, Cammett T J, Desrosiers D C, Peng Z Y. 2004. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Science*, 13: 1435 - 1448.
- Mount D W. 2007. Using the basic local alignment search tool (BLAST) . *Cold Spring Harbor Protocols*, doi: 10.1101/pdb.top17.
- Nodzon L A, Xu W H, Wang Y, Pi L Y, Chakrabarty P K, Song W Y. 2004. The ubiquitin ligase XBAT32 regulates lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 40: 996 - 1006.
- Ren J, Wen L, Gao X, Jin C, Xue Y, Yao X. 2009. DOG 1.0: Illustrator of protein domain structures. *Cell Research*, 19: 271 - 273.
- Sedgwick S G, Smerdon S J. 1999. The ankyrin repeat: A diversity of interactions on a common structural framework. *Trends in Biochemical Science*, 24: 311 - 316.
- Seong E S, Cho H S, Choi D, Joung Y H, Lim C K, Hur J H, Wang M H. 2007. Tomato plants overexpressing CaKR1 enhanced tolerance to salt and oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 363: 983 - 988.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology Evolution*, 28: 2731 - 2739.
- Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar S K, Troggio M, Pruss D, Salvi S, Pindo M, Baldi P, Castelletti S, Cavaiuolo M, Coppola G, Costa F, Cova V, Dal Ri A, Goremykin V, Komjanc M, Longhi S, Magnago P, Malacarne G, Malnoy M, Micheletti D, Moretto M, Perazzolli M, Si-Ammour A, Vezzulli S, Zini E, Eldredge G, Fitzgerald L M, Gutin N, Lanchbury J, Macalma T, Mitchell J T, Reid J, Wardell B, Kodira C, Chen Z, Desany B, Niazi F, Palmer M, Koepke T, Jiwan D, Schaeffer S, Krishnan V, Wu C, Chu V T, King S T, Vick J, Tao Q, Mráz A, Stormo A, Stormo K, Bogden R, Ederle D, Stella A, Vecchietti A, Kater M M, Masiero S, Lasserre P, Lespinasse Y, Allan A C, Bus V, Chagne D, Crowhurst R N, Gleave A P, Lavezzo E, Fawcett J A, Proost S, Rouze P, Sterck L, Toppo S, Lazzari B, Hellens R P, Durel C E, Gutin A, Bumgarner R E, Gardiner S E, Skolnick M, Egholm M, Van de Peer Y, Salamini F, Viola R. 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nature Genetics*, 42: 833 - 839.
- Wang Y S, Pi L Y, Chen X, Chakrabarty P K, Jiang J, de Leon A L, Liu G Z, Li L, Benny U, Oard J. 2006. Rice XA21 binding protein 3 is a ubiquitin ligase required for full Xa21-mediated disease resistance. *Plant Cell*, 18: 3635 - 3646.
- Xu Rui-rui, Zhang Shi-zhong, Cao Hui, Shu Huai-rui. 2012. Bioinformatics analysis of WRKY transcription factor genes family in apple. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (10): 2249 - 2260. (in Chinese)
- 许瑞瑞, 张世忠, 曹 慧, 束怀瑞. 2012. 苹果 WRKY 转录因子家族基因生物信息学分析. *园艺学报*, 39 (10): 2249 - 2260.
- Yan J, Wang J, Zhang H. 2002. An ankyrin repeat-containing protein plays a role in both disease resistance and antioxidation metabolism. *Plant Journal*, 29: 193 - 202.
- Zhang H, Scheirer D C, Fowle W H, Goodman H M. 1992. Expression of antisense or sense RNA of an ankyrin repeat-containing gene blocks chloroplast differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 4: 1575 - 1588.
- Zhang Shi-zhong, Fu Ying, Zhou Bo, Jiang Ze-sheng, Xu Rui-rui, Shu Huai-rui. 2012. The construction and instruction manual of apple functional genomic database. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (11): 2245 - 2250. (in Chinese)
- 张世忠, 付 莹, 周 波, 姜泽盛, 许瑞瑞, 束怀瑞. 2012. 苹果功能基因组数据库的构建与使用. *园艺学报*, 39 (11): 2245 - 2250.
- Zhao T, Liang D, Wang P, Liu J, Ma F. 2012. Genome-wide analysis and expression profiling of the DREB transcription factor gene family in *Malus* under abiotic stress. *Molecular Genetics Genomics*, 287: 423 - 436.