

落叶松生长素受体基因*LkTIR1*的克隆及功能分析

李爱, 于雪, 冯涛, 李慧, 于玮玮, 彭立新*

天津农学院园艺园林学院, 天津300384

摘要: 以本实验室前期建立的落叶松(*Larix kaempferi*)转录组数据库为基础, 利用RT-PCR从落叶松中克隆获得一个1 725 bp的生长素受体基因全长编码序列, 命名为*LkTIR1*。蛋白结构特性分析发现*LkTIR1*编码574个氨基酸, 蛋白分子质量为64 397 Da, 等电点为6.97, 为亲水性蛋白。蛋白二级结构主要包括 α -螺旋、 β -折叠和环肽链。功能结构域分析显示该蛋白包含6个富含亮氨酸重复基序和1个F-box蛋白结构域, 推测其属于F-box基因家族。多重序列比对和系统进化分析表明*LkTIR1*所编码的氨基酸与裸子植物火炬松(*Pinus taeda*)亲缘关系最近。同时, 通过构建植物表达载体, 利用浸花法转化模式植物拟南芥的功能研究发现, 过量表达落叶松*LkTIR1*的转基因拟南芥叶片显著变大, 叶片数目明显增多, 这表明落叶松生长素受体基因*LkTIR1*在植物的生长发育过程中起着重要的调节作用。

关键词: 落叶松; 生长素受体; *LkTIR1*; 拟南芥

生长素(吲哚-3-乙酸, IAA)是最早发现的一类植物激素, 在植物体内含量甚微, 主要集中在生长旺盛的部位, 如正在生长的茎尖和根尖, 正在展开的幼叶、胚、嫩果和种子等。生长素具有促进细胞的分裂与分化、根的分化、器官的伸长生长和愈伤组织生长, 以及吸收和调运养分, 引起叶片的扩大和气孔的开放等生理效应(吴道铭等2014)。生长素所诱导的生理效应是通过生长素与细胞中的生长素受体结合后实现的, 当生长素与受体结合后, 可活化一些转录因子, 这些转录因子进入细胞, 促进专一基因的表达(刘瑞娥等2011)。

在先前的研究中生长素受体的研究重点是生长素结合蛋白(auxin-binding protein 1, ABP1), 直到2005年转运抑制响应蛋白(transport inhibitor response 1, TIR1)被确定为植物生长素受体, 引起了科学界的高度关注(Dharmasiri等2005; Kepinski和Leyser 2005)。生长素通过与TIR1直接结合来促进Aux/IAA-SCF^{TIR1}的互作, 即Aux/IAA蛋白通过泛素化途径水解, 释放出被Aux/IAA蛋白结合的ARF蛋白。释放出的ARF可形成有活性的ARF-ARF二聚体, 进一步调控相关基因的表达, 由此可见, TIR1在生长素信号转导过程中起着十分重要的作用。相关研究发现番茄(*Solanum lycopersicum*)中*SITIR1*基因可调控果实的发育进程, *SITIR1*基因的过表达可诱导单性结实(Ren等2011); 水稻(*Oryza sativa*) *OsTIR1*基因通过与miRNA393相互作用而调节旗叶倾角和根系生长(Bian等2012); *MaTIR1*基因主要参与了桑树(*Morus multicaulis*)枝条扦插过程中不定根和侧根的形成。然而, 目前对于*TIR1*基因的

研究主要集中于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(Bian等2012)、番茄(Ren等2011)、烟草(*Nicotiana tabacum*) (Tian等2011)、黄瓜(*Cucumis sativus*) (Cui等2013)、茶树(*Camellia sinensis*) (曹红利等2015)和桑树(唐壮等2014)等被子植物。而对裸子植物, 生长素受体的研究还甚为稀少。

落叶松作为针叶树种的典型代表, 是我国主要的用材树种, 具有十分重要的经济价值。落叶松中生长素受体基因*TIR1*的分离和功能分析对于从分子水平阐释落叶松生长发育的分子调控机制具有重要意义。该研究利用本实验室构建的落叶松转录组数据库(未发表)中的*TIR1*基因序列设计特异引物, 以落叶松的新鲜针叶为试材克隆*TIR1*基因的全长编码序列, 并分析其分子结构特征, 同时构建35S::*LkTIR1*植物表达载体对基因的功能进行深入分析, 从而为进一步研究生长素在落叶松生长发育中的作用机制提供依据。

材料与方法

1 材料

日本落叶松[*Larix kaempferi* (Lamb.) Carr.]种植于辽宁大孤家林场, 取二十年生落叶松的新鲜叶片于液氮中保存备用。拟南芥的种子在4°C春

收稿 2015-10-30 修定 2015-12-28

资助 国家自然科学基金青年项目(31300564)和天津市应用基础与前沿技术计划(14JJCQNJC15000、14JCYBJC30100和15JCQNJC15100)。

* 通讯作者(E-mail: lovelee@mail.nankai.edu.cn)。

化3 d, 经表面消毒后播种于营养土中, 放在拟南芥培养箱培养, 培养条件为22°C, 16 h光照/8 h黑暗, 湿度65%。

2 落叶松RNA的提取及cDNA的合成

利用改良的CTAB法提取落叶松针叶总RNA (Li等2013), 提取的总RNA采用1%的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 并用超微量分光光度计Nano-Drop2000 (Thermo, USA)测定总RNA的浓度和纯度。以提取的落叶松总RNA为模板, 用M-MLV逆转录酶(Promega, USA)逆转录获得第一链cDNA。

3 落叶松*LkTIR1*引物设计及PCR扩增

根据本实验室先前建立的落叶松转录组数据库中的序列信息, 搜索落叶松*LkTIR1*基因相应邻接片段(contigs), 邻接片段经过进一步组装获得*LkTIR1*基因的全长编码序列。根据拼接获得的*LkTIR1*基因开放阅读框(ORF)设计上游引物*LkTIR1*-F (5'-GACGTCGACATGGTGGTGAGAAGGATGAGC-3')和下游引物*LkTIR1*-R (5'-GATGGTACCTTACATAGTGCATATGAAATGTG-3')。为方便后期表达载体的构建, 在上游引物的5'端引入*SalI*酶切位点(下划线部分), 在下游引物的5'端引入*KpnI*酶切位点(下划线部分)。以落叶松cDNA为模板, 利用*TransStart[®] FastPfu* DNA聚合酶(全式金, 北京)对目的基因进行PCR扩增。进一步利用琼脂糖凝胶回收试剂盒(TaKaRa, 日本)回收PCR扩增得到目的片段。回收目的片段与pEASY-Blunt载体连接, 转化*Trans1-T1 Phage Resistant*感受态细胞, 转化产物涂布在含有50 mg·L⁻¹氨苄霉素LB平板筛选转化子。挑取白色单菌落摇菌, 提取质粒后用PCR扩增和*SalI/KpnI*双酶切鉴定阳性克隆, 构建的重组质粒命名为pEASY-Blunt-*LkTIR1*。阳性克隆送往上海生工有限公司测序。

4 落叶松*LkTIR1*生物信息学分析

利用NCBI数据库中的BLAST工具对*LkTIR1*序列同源性进行分析; 氨基酸多重序列比对由MEGA 5.0软件的Clustal W工具完成, 并进一步采用Neighbor-Joining (NJ)法构建系统进化树。利用ProtParam在线分析软件(<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)预测*LkTIR1*蛋白的等电点、氨基酸组成和相对分子质量等理化性质; 利用Predictprotein在线分析软件(<http://www.predictprotein.org/>)

预测*LkTIR1*蛋白的二级结构; 利用SWISS-MODEL同源建模法(<http://swissmodel.expasy.org/>)模拟*LkTIR1*蛋白的三级结构。

5 35S::*LkTIR1*植物表达载体的构建

利用*SalI/KpnI*将阳性克隆质粒pEASY-Blunt-*LkTIR1*和植物表达载体pRi-101-AN (宝生物, 大连)双酶切, 回收相应的酶切片段, 在T₄连接酶(全式金, 北京)的作用下25°C连接10 min。连接产物利用化学转化法转化农杆菌(LBA4404)感受态细胞, 涂布于含50 mg·L⁻¹卡那霉素和链霉素的YEB平板上, 30°C培养48 h, 挑单菌落摇菌培养, 提取质粒进行PCR和双酶切鉴定, 构建的植物表达载体命名为35S::*LkTIR1*。

6 农杆菌转化拟南芥

将-20°C保存的含有植物表达载体35S::*LkTIR1*的农杆菌接种于10 mL YEB培养基中(50 mg·L⁻¹卡那霉素和50 mg·L⁻¹链霉素), 28°C 200 r·min⁻¹活化过夜。1:100稀释菌体后培养至OD₆₀₀=1.2~1.6, 离心收集菌体, 重悬于等体积5%蔗糖(转化缓冲液)中, 利用浸花法转化野生型拟南芥植株。转化后的植株于拟南芥培养箱(22°C, 16 h光照/8 h黑暗, 相对湿度65%)中培养至收获种子。

7 转基因植株的筛选与鉴定

转基因拟南芥种子采用70%乙醇消毒后播种于MS固体培养基中(含50 mg·L⁻¹卡那霉素), 待长出4片真叶后挑取绿色根系发达的植株移栽入营养土中种植。抗性植株进一步以RNA为模板, 利用*LkTIR1*-F (5'-ATGGTGGTGAGAAGGATGAGC-3')和*LkTIR1*-R (5'-TTACATAGTGCATATGAAATGTG-3')为特异引物进行RT-PCR鉴定。不同株系的阳性转基因植株连续自交至T₃代观察表型变化。

实验结果

1 落叶松*LkTIR1*基因全长序列的获得

本研究中, 利用Illumina/Solexa高通量测序技术对落叶松转录组进行测序分析。通过深入数据挖掘共得到3个*TIR1*基因片段(C656736、C793334和Scaffold8734), 经过进一步序列拼接获得一个2 446 bp的独立基因(unigene)。根据所获得的独立基因序列信息设计特异引物, 采用RT-PCR技术在

落叶松mRNA中扩增该独立基因序列并进行测序分析,结果显示RT-PCR扩增序列与转录组测序拼接得到的序列相似度达100%,证实了该序列的准确性。利用ORF Finder对该独立基因的ORF进行分析发现该独立基因包含一个1 725 bp的ORF,编码574个氨基酸的蛋白质(图1)。BLAST比对分析发现此蛋白序列与火炬松(*Pinus taeda*)的TIR1同源性高达90%,与拟南芥、蓖麻(*Ricinus communis*)和葡萄(*Vitis vinifera*)等物种的TIR1蛋白的序列相似性都在60%以上,将其命名为LkTIR1, GenBank登记号为KF515234。

2 LkTIR1蛋白理化特征分析

为揭示LkTIR1基因编码的氨基酸序列基本特性,利用ProtParam工具对LkTIR1的氨基酸序列进行分析,发现该蛋白质分子质量为64 397 Da,等电

点为6.97,不稳定系数为45.74,属于不稳定蛋白。氨基酸组成中亮氨酸(Leu)含量最高,共81个,占14.1%;带负电荷的氨基酸(Asp+Glu)共计65个,占11.32%;带正电荷的氨基酸(Arg+Lys)共计64个,占11.15%;亲水性氨基酸237个,占41.29%;疏水氨基酸265个,占46.17%(表1)(Kyte和Doolittle 1982)。LkTIR1蛋白的亲疏水性分析显示组成该蛋白质的氨基酸总平均疏水指数(grand average of hydrophobicity, GRAVY)为-0.038,证实了该蛋白是亲水性蛋白,其中亲水性最高的氨基酸是第252位的谷氨酸(E)(图2-A)。

3 LkTIR1蛋白功能结构域及高级结构特征分析

利用InterProScan 5对LkTIR1蛋白功能结构域分析发现该蛋白序列包含6个富含亮氨酸重复序(leucine-rich repeat, LRR; 104~128、129~154、

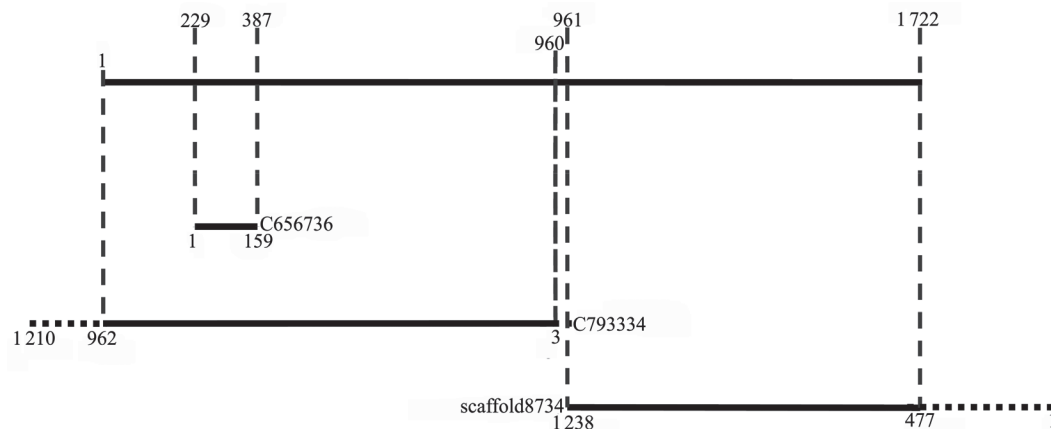


图1 基于日本落叶松转录组测序数据的LkTIR1基因cDNA序列拼接

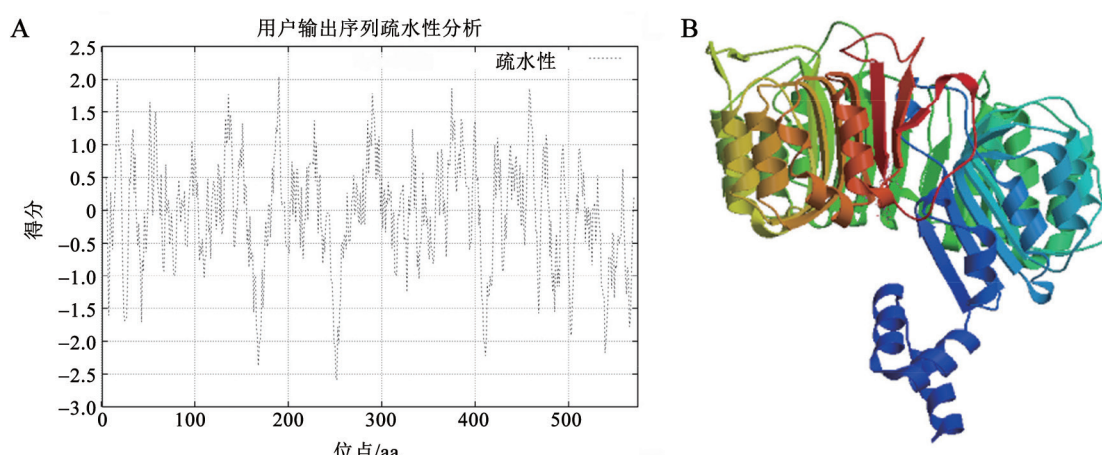
Fig.1 Sequence assembly of LkTIR1 cDNA by the contigs detected by *L. kaempferi* transcriptome sequencing

表1 LkTIR1蛋白的氨基酸组成及含量

Table 1 Amino acid composition of LkTIR1 protein

氨基酸	数量	百分比/%	氨基酸	数量	百分比/%
丙氨酸(Ala, A) [*]	38	6.6	亮氨酸(Leu, L) [*]	81	14.1
精氨酸(Arg, R) [#]	38	6.6	赖氨酸(Lys, K) [#]	26	4.5
天冬酰胺(Asn, N)	18	3.1	甲硫氨酸(Met, M) [*]	15	2.6
天冬氨酸(Asp, D) [#]	33	5.7	苯丙氨酸(Phe, F) [*]	24	4.2
半胱氨酸(Cys, C)	22	3.8	脯氨酸(Pro, P) [*]	25	4.4
谷氨酰胺(Gln, Q) [#]	15	2.6	丝氨酸(Ser, S) [#]	48	8.4
谷氨酸(Glu, E) [#]	32	5.6	苏氨酸(Thr, T) [#]	28	4.9
甘氨酸(Gly, G)	32	5.6	色氨酸(Trp, W) [*]	8	1.4
组氨酸(His, H) [#]	17	3.0	酪氨酸(Tyr, Y) [*]	14	2.4
异亮氨酸(Ile, I) [*]	18	3.1	缬氨酸(Val, V) [*]	42	7.3

[#]: 亲水氨基酸; ^{*}: 疏水氨基酸。

图2 *LkTIR1*蛋白疏水性分析(A)及三级结构预测(B)Fig.2 The hydrophobicity analysis (A) and tertiary structure prediction (B) of *LkTIR1*

337~367、368~392、428~451 和477~501 aa), 并且N端含有一个F-box蛋白结构域(6~40 aa), 属于F-box基因家族。利用Predictprotein在线分析软件对*LkTIR1*蛋白进行二级结构预测, 结果显示: 落叶松*LkTIR1*蛋白具有3种二级结构, 其中 α -螺旋结构占37.46%, β -折叠结构占5.23%, 环肽链占57.32%。同时, 采用SWISS-MODEL同源建模法预测落叶松*LkTIR1*蛋白的三级结构, 通过模板比对分析发现, 落叶松*LkTIR1*蛋白与拟南芥生长素受体转运抑制响应蛋白TIR1 (PDB数据库编号: 3c6o.1.B)的序列相似度为66.96%。因此以拟南芥TIR1蛋白为模板, 对*LkTIR1*的三级结构进行预测, 结果如图2-B所示。

4 *LkTIR1*蛋白同源性及系统进化分析

落叶松、火炬松、拟南芥、大豆(*Glycine max*)、杨树(*Populus trichocarpa*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)和葡萄等物种的*LkTIR1*氨基酸序列的多重序列比对结果显示落叶松*LkTIR1*的氨基酸序列与火炬松同源性最高(90%), 与拟南芥、葡萄和蓖麻的同源性为66%, 与苹果(*Malus domestica*)和香瓜(*Cucumis melo*)的同源性为64%, 与杨树、马铃薯、梅(*Prunus mume*)和大豆等的同源性为63% (图3)。在此基础上, 利用MEGA 5.0软件的NJ法构建系统进化树, 对不同物种*LkTIR1*氨基酸序列进行系统进化分析发现19个物种的TIR1主要分为两大类。*LkTIR1*与同为裸子植物的火炬松TIR1处于同一分枝, 进化距离最近; 与苹果、梅和葡萄等木

本植物、大豆、马铃薯和模式植物拟南芥的进化距离相对较近; 与杨树进化距离相对较远; 与单子叶植物玉米(*Zea mays*)和水稻等的进化距离最远 (图4)。

5 35S::*LkTIR1*表达载体的构建及转基因植株的鉴定

为进一步探究落叶松*LkTIR1*基因的功能, 利用植物表达载体PRi-101-AN构建35S::*LkTIR1*正义表达载体。阳性重组克隆经*Sal*I和*Kpn*I双酶切和特异PCR扩增后获得约1.7 kb目的片段, 这表明落叶松*LkTIR1*基因已成功构建入植物转基因表达载体中(图5-A)。进一步采用浸花法感染野生型拟南芥植株, 正常培养至收获种子, 记作T₀代。将T₀代种子在含有卡那霉素的培养基上进行抗性筛选, 未成功转基因的拟南芥长至两片子叶开始白化死亡, 而成功转基因的拟南芥植株生长健壮, 转化效率约为2.23%。获得的T₁代转基因种子抗性筛选发现T₂代植株出现3:1的分离, 而T₃代转基因拟南芥则全部为阳性植株(图6-A和B)。由此推断外源*LkTIR1*基因可能以单拷贝的形式整合到了拟南芥染色体中, 经过3代可以稳定遗传。为深入分析外源*LkTIR1*基因在转基因植株中的整合和表达情况, 随机选取5株抗性拟南芥进行RT-PCR扩增检测均得到约1.7 kb的目的片段, 证实了其35S::*LkTIR1*阳性转基因植株(图5-B)。35S::*LkTIR1*转基因拟南芥与对照组植株在相同的培养条件下, 观察表型变化发现35S::*LkTIR1*转基因拟南芥在生活的不同

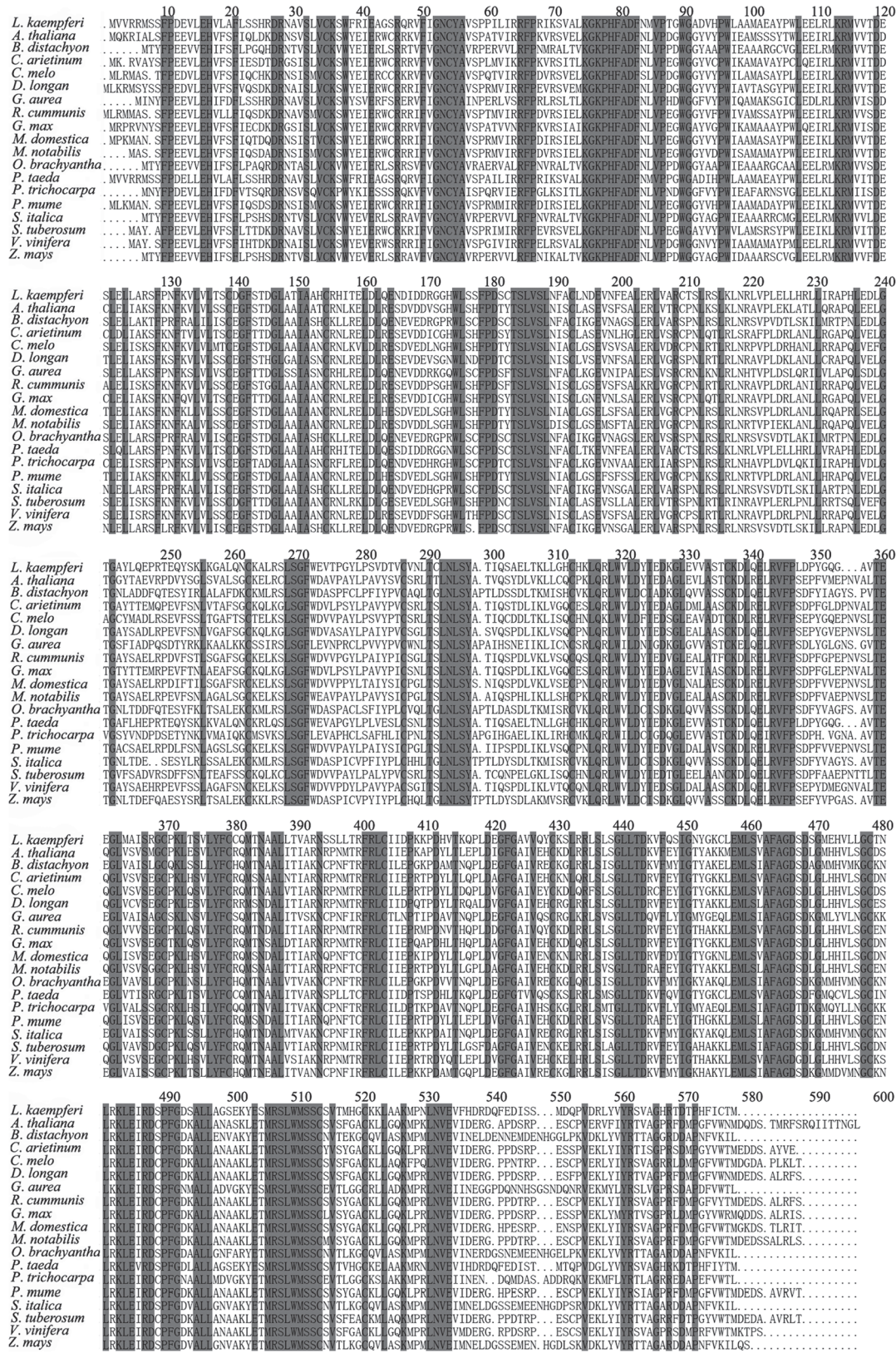


图3 落叶松LkTIR1蛋白与其他物种中TIR1蛋白的氨基酸序列比对分析
 Fig.3 Alignment of amino acid sequences of LkTIR1 with other plant species

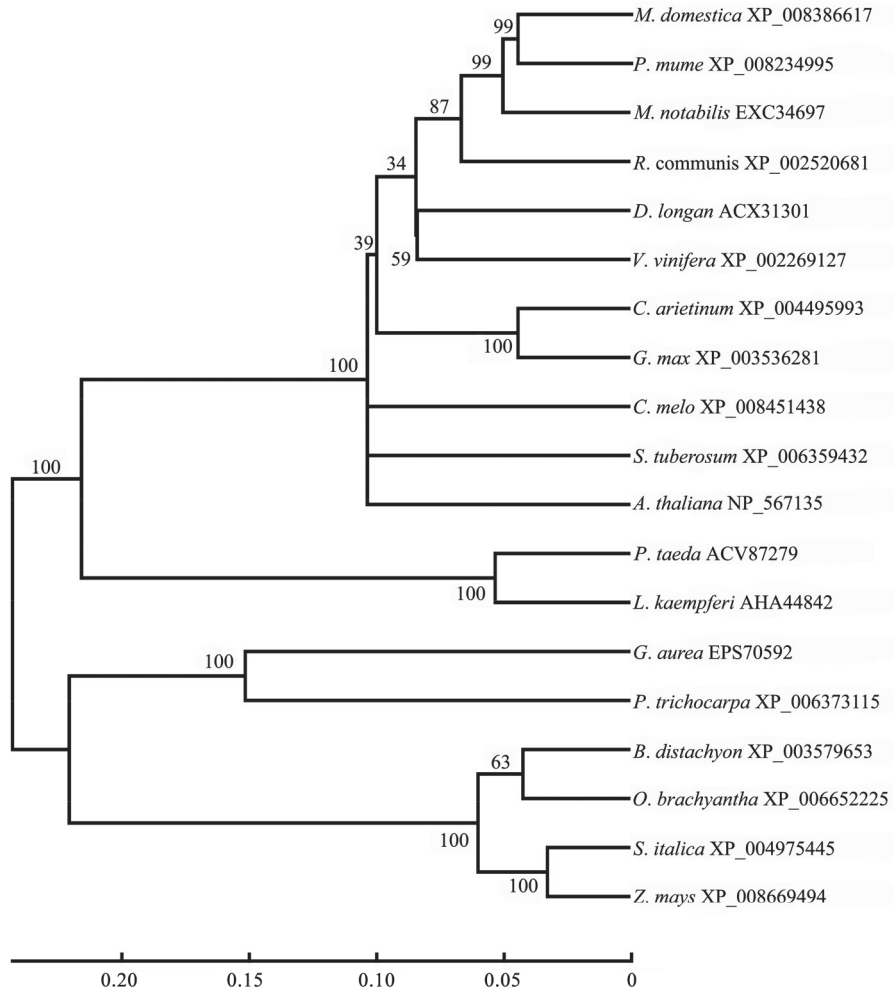


图4 不同物种中*TIR1*同源基因系统进化分析

Fig.4 Phylogenetic tree analysis of *TIR1* homologene in different plant species

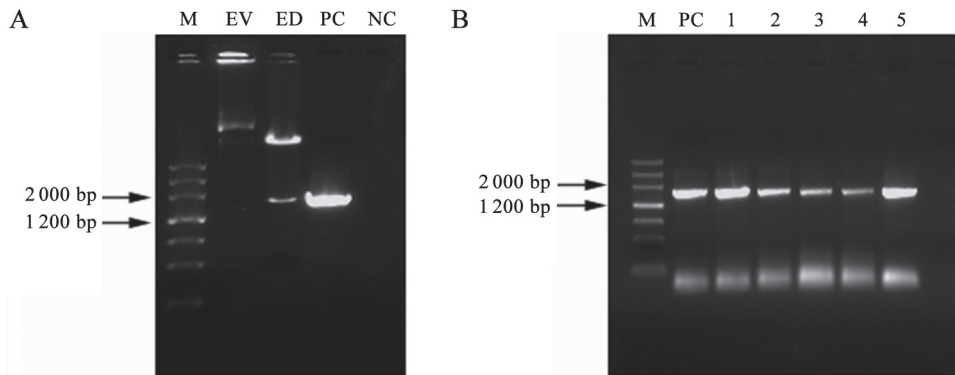


图5 35S::*LkTIR1*表达载体的酶切鉴定和转基因拟南芥中*LkTIR1*基因的扩增分析

Fig.5 Identification of 35S::*LkTIR1* digested by restriction enzyme and PCR analysis of *LkTIR1* in transgenic *Arabidopsis* plants

A为35S::*LkTIR1*表达载体酶切鉴定(EV: 35S::*LkTIR1*表达载体; ED: 35S::*LkTIR1*表达载体*SaI*和*KpnI*双酶切; PC: 阳性对照; NC: 阴性对照); B为35S::*LkTIR1*转基因拟南芥RT-PCR扩增鉴定(PC: 阳性对照; 1~5: 不同株系转基因拟南芥)。



图6 35S::LkTIR1转基因拟南芥的筛选(A和B)和不同发育时期转基因植株与对照组表型特征分析(C~E)
Fig.6 The screening of 35S::LkTIR1 transgenic *Arabidopsis* (A and B) and phenotype characterization of 35S::LkTIR1 plants and vector control in different developmental stages (C~E)

时期植株的叶片大小较对照组(vector control)显著变大, 叶片数目明显增多(图6-C~E)。结果表明, 过量表达落叶松生长素受体基因LkTIR1可促进拟南芥的营养生长, 这说明落叶松LkTIR1基因在植物的生长和发育过程中起着至关重要的作用。

讨 论

生长素是最早被发现且最为重要的一类植物激素, 研究发现生长素在调控植物生长发育和环境胁迫等方面扮演着重要的角色(司马晓娇和郑炳松2015; Fujii等2000)。生长素作为一种信号分子通过信号转导途径诱导植株产生相应的生理效应, 因此分离和鉴定生长素的受体显得尤为重要(Gan等2013; Dudits等1991)。本研究中成功克隆出落

叶松生长素受体基因LkTIR1。LkTIR1属于F-box基因家族成员之一, 分子结构特征分析发现落叶松LkTIR1含有6个LRR和1个F-box蛋白结构域, 这些功能结构域在不同物种中具有相对较高的保守性。但对其整条氨基酸序列的同源性分析和系统进化研究显示, 落叶松LkTIR1与裸子植物火炬松的亲缘关系最近, 而与其他被子植物, 例如拟南芥、大豆、杨树和葡萄等物种的亲缘关系较远, 表明落叶松LkTIR1在进化上相对较为保守。

2005年, TIR1被确定为植物生长素受体后为生长素信号调节的认识奠定了基础(Yu等2015)。前人的研究发现TIR1基因参与了侧根的形成, At-TIR1基因的过量表达能增加植株对生长素的敏感性导致侧根数增加, 而抑制TIR1基因的表达可导

致侧根数量明显减少(Chen等2011)。番茄中过量表达*SITIR1*基因可促进植株单性结实和叶片增大等表型变化(Ren等2011)。在先前的研究中,通过对转录组数据的深入分析发现在落叶松生长旺盛的时期, *LkTIR1*基因的表达量也相对较高, RPKM值为705.91, 暗示了该基因可能参与了落叶松生长发育的调控。为进一步阐释落叶松生长素受体基因*LkTIR1*的功能, 本研究构建转基因表达载体, 在模式植物拟南芥中对*LkTIR1*的功能进行了详细探讨。研究结果显示*LkTIR1*过表达可使转基因拟南芥表现出叶片明显增大, 叶片数目显著增多的性状, 这表明落叶松*LkTIR1*可调控植物的营养生长, *LkTIR1*的高表达可使植物叶片等地上器官增大变多, 从而提高生物量。

植物的生长包括细胞分裂使细胞数目增多和细胞伸长使细胞体积增大两个方面(王保2009)。35S::*LkTIR1*转基因植株叶片较对照组明显变大, 可能是通过生长素与其受体结合后激活了一系列的胞内信号转导途径, 从而促进了细胞的分裂或伸长生长而实现的。但是落叶松*LkTIR1*作为生长素的受体如何调控细胞分裂或生长仍不是很清楚, 因此我们下一步将重点研究*LkTIR1*的调控网络及作用机制, 这为揭示生长素受体*LkTIR1*在落叶松生长发育过程中的作用具有重要意义。同时来源于木本植物的*LkTIR1*基因在草本植物中过表达可显著提高植株的营养器官的生长, 暗示了该基因在农业生产中具有巨大的应用价值, 可利用该基因通过基因工程手段获得高产的作物或能源植物等。

参考文献

- Bian H, Xie Y, Guo F, Han N, Ma S, Zeng Z, Wang J, Yang Y, Zhu M (2012). Distinctive expression patterns and roles of the miRNA393/TIR1 homolog module in regulating flag leaf inclination and primary and crown root growth in rice (*Oryza sativa*). *New Phytol*, 196 (1): 149–161
- Cao H, Yue C, Zhou Y, Wang L, Hao X, Zeng JM, Yang Y, Wang X (2015). Cloning and expression analysis of auxin receptor gene *CsTIR1* in tea plant (*Camellia sinensis*). *J Tea Sci*, 35 (1): 45–54 (in Chinese with English abstract) [曹红利, 岳川, 周艳华, 王璐, 郝心愿, 曾建明, 杨亚军, 王新超(2015). 茶树生长素受体基因*CsTIR1*的克隆与表达分析. *茶叶科学*, 35 (1): 45–54]
- Chen ZH, Bao ML, Sun YZ, Yang YJ, Xu XH, Wang JH, Han N, Bian HW, Zhu MY (2011). Regulation of auxin response by miR393-targeted *transport inhibitor response protein 1* is involved in normal development in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 77 (6): 619–629
- Cui L, Zhang T, Li J, Lou Q, Chen J (2013). Cloning and expression analysis of *Cs-TIR1/AFB2*: the fruit development-related genes of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Acta Physiol Plant*, 36 (1): 139–149
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435 (7041): 441–445
- Dudits D, Bögre L, Györgyey J (1991). Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *J Cell Sci*, 99 (3): 473–482
- Fujii N, Kamada M, Yamasaki S, Takahashi H (2000). Differential accumulation of *Aux/IAA* mRNA during seedling development and gravity response in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Mol Biol*, 42 (5): 731–740
- Gan D, Zhuang D, Ding F, Yu Z, Zhao Y (2013). Identification and expression analysis of primary auxin-responsive *Aux/IAA* gene family in cucumber (*Cucumis sativus*). *J Genet*, 92 (3): 513–521
- Kepinski S, Leyser O (2005). The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435 (7041): 446–451
- Kyte J, Doolittle RF (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, 157 (1): 105–132
- Li A, Song WQ, Chen CB, Zhou YN, Qi LW, Wang CG (2013). DNA methylation status is associated with the formation of heterosis in *Larix kaempferi* intraspecific hybrids. *Mol Breeding*, 31 (2): 463–475
- Liu RE, Hu CG, Sun YQ (2011). Advances in plant auxin response factors. *Plant Physiol J*, 47 (7): 669–679 (in Chinese with English abstract) [刘瑞娥, 胡长贵, 孙玉强(2011). 植物生长素反应因子研究进展. *植物生理学报*, 47 (7): 669–679]
- Ren Z, Li Z, Miao Q, Yang Y, Deng W, Hao Y (2011). The auxin receptor homologue in *Solanum lycopersicum* stimulates tomato fruit set and leaf morphogenesis. *J Exp Bot*, 62 (8): 2815–2826
- Sima X, Zheng B (2015). Advances in primary auxin-responsive *Aux/IAA* gene family: a review. *J Zhejiang A&F Univ*, 32 (2): 313–318 (in Chinese with English abstract) [司马晓娟, 郑炳松(2015). 植物生长素原初响应基因*Aux/IAA*研究进展. *浙江农林大学学报*, 32 (2): 313–318]
- Tang Z, Du W, Li XY, Cheng JL (2014). Cloning and expression analysis of Mulberry *TIR1* Gene in various organs and in rooting process of cuttings. *Sci Seric*, 40 (5): 790–796 (in Chinese with English abstract) [唐壮, 杜伟, 李小玉, 程嘉翎(2014). 桑树*TIR1*基因的克隆及在组织器官和扦插生根过程的表达分析. *蚕业科学*, 40 (5): 790–796]
- Tian Y, Zhang C, Yang H, Lu X, Fang J, Li P, Qing X (2011). Molecular cloning and characterization of a *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1)* from *Nicotiana tabacum*. *Russ J Plant Physiol*, 58 (1): 149–156
- Wang B (2009). Isolation and functional characterization of *BrARGOS* gene from Chinese cabbage. *Sci Agr Sin*, 42 (6): 2068–2075 (in Chinese with English abstract) [王保(2009). 大白菜*BrARGOS*基因的分离与功能分析. *中国农业科学*, 42 (6): 2068–2075]
- Wu DM, Cao HP, Shen H (2014). Response of auxin and its transporter to aluminum stress in plants. *Plant Physiol J*, 50 (8): 1135–1143 (in Chinese with English abstract) [吴道铭, 曹华苹, 沈宏(2014). 生长素及其运输蛋白对植物铝胁迫的响应. *植物生理学报*, 50 (8): 1135–1143]
- Yu H, Zhang Y, Moss BL, Bargmann BOR, Wang R, Prigge M, Nemhauser JL, Estelle M (2015). Untethering the TIR1 auxin receptor from the SCF complex increases its stability and inhibits auxin response. *Nat Plants*, 1 (3): 1–8

Cloning and functional characterization of auxin receptor gene *LkTIR1* in *Larix kaempferi*

LI Ai, YU Xue, FENG Tao, LI Hui, YU Wei-Wei, PENG Li-Xin*

College of Horticulture Landscape, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China

Abstract: Based on the *Larix kaempferi* transcriptome database previously established in our laboratory, the cDNA sequence of an auxin receptor gene named *LkTIR1* was obtained by using RT-PCR technique. The length of *LkTIR1* open reading frame (ORF) was 1 725 bp, encoding 574 amino acid residues. The molecular weight and theoretic isoelectric point of LkTIR1 protein were 64 397 Da and 6.97, respectively. The secondary structure of LkTIR1 contained α -helixes, β -sheets and loops. The LkTIR1 was predicted to contain six leucine-rich-repeat (LRR) domains and one F-box domain, implying it is belonged to F-box gene family. In addition, LkTIR1 protein had the highest sequence similarity (about 90%) and the closest genetic relationship to *Pinus taeda*. To elucidate the function of *LkTIR1*, 35S::*LkTIR1* overexpression vector was constructed and transformed to *Arabidopsis* via dip flower. Compared with the empty vector control lines, the *LkTIR1* overexpressed transgenic plants had remarkably enlarged leaves, and significantly increased leaf numbers, suggesting a key role of *LkTIR1* in plant growth and development regulation.

Key words: *Larix kaempferi*; auxin receptor; *LkTIR1*; *Arabidopsis*

Received 2015-10-30 Accepted 2015-12-28

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31300564), and Tianjin Research Program of Application Foundation and Advanced Technology (Grant Nos. 14JCQNJC15000, 14JCYBJC30100 and 15JCQNJC15100).

*Corresponding author (E-mail: lovelee@mail.nankai.edu.cn).