

平邑甜茶生长素响应因子*MhARF2*基因克隆与表达分析

姜倩倩^{1*}, 曹慧¹, 张保仁¹, 张慧玲²

¹潍坊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梁山县农业局, 山东济宁272600

摘要: 采用RT-PCR技术克隆得到平邑甜茶(*Malus hupehensis*)生长素响应因子基因*MhARF2*, 该基因开放阅读框(ORF) 2 532 bp, 编码843个氨基酸残基。基因结构分析表明, *MhARF2*包含13个内含子和14个外显子; 进化分析表明, *MhARF2*属于ARF2成员, 与苹果(*Malus domestica*)、白梨(*Pyrus bretschneideri*)、甜樱桃(*Prunus avium*) ARF2具有较高的同源性; *MhARF2*含有ARF家族特有的B3 DNA结合域、CTD结构域和Auxin-resp结构域; *MhARF2*定位于细胞核; *MhARF2*启动子区域含有光响应元件、生长素应答元件和MeJA响应元件、ABA响应元件等多个顺式作用元件。qRT-PCR结果表明, *MhARF2*在平邑甜茶叶、根、茎、花和果实中均表达, 其中叶片中表达水平最高, 根次之。30 mg·L⁻¹ IAA处理下, *MhARF2*在根中的转录水平受到诱导, 6 h时最高; 在100 mmol·L⁻¹ NaCl和200 mmol·L⁻¹甘露醇处理下, 根系中*MhARF2*转录水平随胁迫时间的延长先上升后降低, 这说明*MhARF2*可能参与调控平邑甜茶生长素信号转导以及渗透胁迫响应的过程。

关键词: 平邑甜茶; *MhARF2*; 基因克隆; 序列分析; 表达分析

生长素(indole-3-acetic acid, IAA)作为一种重要的植物激素, 参与植物整个生命周期的调控, 如细胞增殖、组织分化、器官发生及环境信号的应答等(Ljung 2013; 刘广超和丁兆军2018; Bouzroud等2018)。生长素响应因子(auxin response factor, ARF)是植物特有的一类转录因子, 通过特异结合IAA响应基因(如Aux/IAA、SAUR、GH3)启动子区域的IAA响应元件(auxin response elements, AuxRE) TGTCTC/TGTCCC/TGTCAC而调控基因的表达(Roosjen等2017; Luo等2018)。迄今为止, 已完成了多个物种ARF基因家族的鉴定, 如在拟南芥、水稻和小麦中分别鉴定了23、25和61个ARF (Wang等2007; Chandler 2016; 孙仁玮等2018)。

ARF2是植物体中乙烯、光照、油菜素内酯(brassinosteroid, BR)与IAA信号系统整合的重要节点, 在细胞分裂、雌雄配子体发育、侧根形成、茎和叶的生长、叶片与花的衰老等过程中具有重要作用(Okushima等2005; Vert等2008; 冯媛媛等2012; Ren等2017; Liu等2018)。此外, ARF2还通过脱落酸(abscisic acid, ABA)信号途径参与植物生长发育及逆境胁迫响应的过程。研究表明, 在拟南芥中, ARF2及其调控的同源异型基因*HB33*调节ABA反应(Wang等2011); ARF2-ANT-COR15A基因级联调控ABA信号介导的拟南芥种子的抗旱性

(Meng等2015); ARF2与PLTs和PINs协同作用于ABA介导的根尖分生组织活性的调控(Promchuea等2017); 在低钾条件下, ARF2通过负调控K⁺转运蛋白基因*HAK5*的表达响应低钾胁迫(Zhao等2016)。

目前, 关于苹果ARF的研究较少, 李慧峰等(2015)从苹果基因组数据库中鉴定得到29个ARF成员。王意程等(2017)从红肉苹果‘紫红3号’中克隆了*MdARF3*基因, 并分析其可能参与生长素介导的花青苷积累过程。安建平等(2018)克隆了*MdARF5*基因, 推测*MdARF5*可能通过直接抑制*MdMYB1*的表达负调节花青苷的积累, 但尚未见苹果ARF2的报道。平邑甜茶(*Malus hupehensis*)是苹果常用砧木, 具有无融合生殖特点, 是果树根系研究的优良材料(杨洪强和范伟国2012), 对平邑甜茶ARF2转录因子的研究将为阐明苹果的生长发育以及根系应答环境胁迫的调控机制提供理论依据。本研究克隆了平邑甜茶*MhARF2*全长cDNA及启动子序列, 并对其结构特征、系统进化、亚细胞定位预测及表达模式进行了分析, 为ARF2在苹果中的深入研究奠定了基础。

收稿 2018-04-20 修定 2019-01-09

资助 国家自然科学基金(31301733)和潍坊学院博士基金(2012BS18)。

* 通讯作者(jiangqq5238@163.com)。

1 材料与方法

1.1 材料

以具6~8片真叶的平邑甜茶[*Malus hupehensis* (Pamp) Rehd. var. *pinyiensis* Jiang]幼苗为材料, 分离*MhARF2* cDNA序列并进行表达分析。选取生长健壮、长势一致的植株, 分别用200 mL的30 mg·L⁻¹ IAA、100 mmol·L⁻¹ NaCl和200 mmol·L⁻¹甘露醇进行浇灌处理, 对照用等量去离子水灌溉, 每隔24 h浇灌1次, 每3株为1组处理, 每处理重复3次, 分别在处理0、6、12、24、48和72 h取根系。组织表达分析供试材料为长势一致的5年生盆栽平邑甜茶幼树, 取新生根系(2017年4月10日)、一年生枝(茎)(2017年4月30日)、叶(初展叶, 2017年4月10日)、花(盛花期, 2017年4月10日)和果实(2017年9月25日)。上述样品于液氮中速冻, -80°C保存备用。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株DH5 α 和DL-2000 Plus Marker购自北京全式金生物科技有限公司, dNTP、Taq DNA Polymerase、pMD[®] 18-T vector和PrimeScript[™] 1st Strand cDNA Synthesis Kit购自宝生物工程(大连)有限公司, 质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒为天根生化科技(北京)有限公司产品。引物合成及测序由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。

1.2 基因克隆

采用改进CTAB法提取平邑甜茶根系总RNA (Ran等2016), 用反转录试剂盒PrimeScript[™] 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Code No. 6210A)合成cDNA。根据苹果*ARF2*基因序列, 设计特异引物(MhARF2-F/MhARF2-R, 表1)扩增cDNA全长序列。PCR反应

条件为: 94°C预变性5 min; 94°C变性50 s, 56.9°C退火50 s, 72°C 2 min 30 s, 30个循环; 72°C延伸10 min。PCR产物回收后, 连接到pMD18-T载体上, 构建重组质粒转化*E. coli* DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性克隆并测序。

以平邑甜茶根系DNA为模板, 采用引物MhARF2-F/MhARF2-R扩增gDNA序列。PCR反应条件为: 94°C预变性5 min; 94°C变性50 s, 56.9°C退火50 s, 72°C 4 min, 30个循环; 72°C延伸10 min。在苹果功能基因组数据库(<https://www.rosaceae.org/node/1>)查找*MdARF2*的启动子序列, 设计特异引物P-MhARF2-F/P-MhARF2-R, 以根系DNA为模板进行PCR扩增, 克隆*MhARF2*上游启动子序列(1 800 bp)。PCR反应条件为: 94°C预变性5 min; 94°C 50 s, 54.5°C 50 s, 72°C 1 min 30 s, 30个循环; 72°C延伸10 min。

1.3 序列分析

利用NCBI的BLAST P程序进行同源序列比对; DNAMAN软件分析ORF和氨基酸序列; ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)计算该基因编码蛋白的等电点和分子量; 运用SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)预测氨基酸序列的二级结构; 使用Clustal X软件进行氨基酸序列比对, 采用MEGA 6.0软件包中的邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统发育树, 校验参数Bootstrap重复1 000次。利用Pfam 26.0 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>)和Conserved Domains Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>)进行蛋白保守域分析。利用PSORT (<http://psort.hgc.jp/form.html>)和SoftBerry ProtComp 9.0 (<http://linux1.softberry.com/berry>。

表1 引物的用途及序列

Table 1 Application of primers and sequences

引物名称	引物序列(5'→3')	用途
MhARF2-F	ATGACGTCATCGGAGGTTTCGATAAG	ORF和gDNA序列扩增
MhARF2-R	CTATGCATATGGAAGTGGTTGAGACT	
P-MhARF2-F	TATAATCATTTTATTTGGGTGATTAAGG	启动子扩增
P-MhARF2-R	TTCTTCAAAGAGCTCAGCACAG	
RQ-MhARF2-F	CCCGCTGAGTTCATTGTTTC	荧光定量PCR
RQ-MhARF2-R	CCAGGCATCGCAGGGTCTA	
<i>Md18S</i> -F	TGAATACAAATTATTGGTGGGAA	
<i>Md18S</i> -R	CCTTTGGTTTTTCGCATCTC	

phtml)进行亚细胞定位分析。利用PlantCARE在线软件(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)进行启动子序列分析。利用GSDS 2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/index.php>)构建基因结构示意图(Hu等2015)。

1.4 *MhARF2*基因的表达分析

以RQ-*MhARF2*-F/RQ-*MhARF2*-R为实时荧光定量PCR (qRT-PCR)的引物,选取*Md18S* RNA为内参基因(表1),采用三步法进行qRT-PCR分析。所用仪器为Bio-Rad iQ5荧光定量PCR仪(USA),所有qRT-PCR反应均设3次重复。PCR反应体系为: SYBR Green Master I 10 μ L, 上、下游引物($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各1 μ L, 模板1 μ L, 加去离子水至20 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性45 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 s, 52.6 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40个循环; 最后退火至55 $^{\circ}\text{C}$, 每隔7 s上升0.5 $^{\circ}\text{C}$, 至95 $^{\circ}\text{C}$, 共81个循环。试验结果用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法对数据进行相对定量分析, 其中 $\Delta\Delta\text{C}_T = (\text{C}_{T \text{ Target}} - \text{C}_{T \text{ 18S}})_{\text{待测样本}} - (\text{C}_{T \text{ Target}} - \text{C}_{T \text{ 18S}})_{\text{校准样本}}$, $\text{C}_{T \text{ Target}}$ 和 $\text{C}_{T \text{ 18S}}$ 分别是目标基因和内参基因的 C_T 值(Schefe等2006)。

2 实验结果

2.1 *MhARF2*基因克隆及启动子序列分离

以平邑甜茶根系cDNA为模板,用引物*MhARF2*-F/*MhARF2*-R进行PCR扩增,获得特异性条带。测序结果显示,*MhARF2* cDNA全长2 532 bp, 编码843个氨基酸残基。以根系DNA为模板,用引物*MhARF2*-F/*MhARF2*-R扩增得到4 124 bp的gDNA序列;用引物P-*MhARF2*-F/P-*MhARF2*-R扩增得到1 800 bp的*MhARF2*上游启动子序列。

2.2 *MhARF2*基因序列及结构分析

利用ProtParam分析*MhARF2*编码蛋白的分子量为93 943.46 Da, 等电点为6.30, 分子式 $\text{C}_{4097}\text{H}_{6386}\text{N}_{1192}\text{O}_{1268}\text{S}_{41}$ 。SOPMA分析结果表明,*MhARF2*的

二级结构含有47.09%的不规则卷曲、24.08%的 α 螺旋、19.69%的延伸链和9.13%的 β 转角。通过PSORT和SoftBerry ProtComp 9.0进行亚细胞定位预测,结果表明*MhARF2*定位于细胞核。利用GSDS 2.0进行基因结构分析,结果表明*MhARF2*包含13个内含子和14个外显子(图1)。

2.3 *MhARF2*结构域分析与氨基酸同源性分析

多数ARF蛋白由3种典型结构域组成: 一个N端的B3类DNA结合域(DNA binding domain, DBD)、一个中间的MR结构域-抑制结构域或激活结构域和一个保守的C端二聚化结构域(carboxy-terminal dimerization domain, CTD) (Li等2016; 李艳林等2017)。Pfam和SMART分析结果显示,*MhARF2*氨基酸序列的160~261位为B3 DNA结合域, 702~813位是CTD结构域。在DNA结合域和CTD结构域中间的MR区域中, 285~369位是生长素应答因子功能结构域(Auxin_resp domain), 说明*MhARF2*结构域符合ARF家族的典型特征(图2, 红色字体标注)。

将*MhARF2*序列提交NCBI-BLAST P进行同源对比, 结果发现: *MhARF2*与苹果(*Malus domestica*)预测蛋白MdARF2-like (XP_008392710.1)同源性最高, 达99%, 与白梨(*Pyrus bretschneideri*)预测蛋白PbARF2-like (XP_009373632.1)、甜樱桃(*Prunus avium*) PaARF2B (XP_021814726.1)、桃(*Prunus persica*) PpARF2 (XP_007210901.1)和山杏(*Prunus sibirica*) PsARF2 (AVD68940.1)同源性分别为98%、88%、87%和87%。应用DNAMAN进行氨基酸序列比对分析, 结果表明, *MhARF2*与苹果、白梨等近缘物种在保守区域的同源性很高(图2, 黑色区域所示)。

2.4 *MhARF2*进化分析

利用MEGA 6.0软件将*MhARF2*与拟南芥23个AtARF蛋白及其他物种45个ARF2蛋白进行系统发育分析。结果表明, *MhARF2*与拟南芥AtARF2及

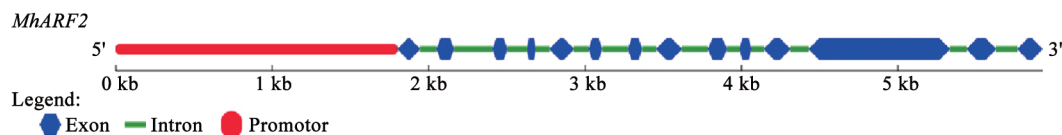


图1 *MhARF2*基因结构分析

Fig.1 Gene structure analysis of *MhARF2*



图2 MhARF2保守域分析及氨基酸序列同源比对

Fig.2 Conserved domains analysis and sequence alignment of MhARF2

MhARF2: 平邑甜茶(*M. hupehensis*); XP_008392710.1: 苹果(*M. domestica*); XP_009373632.1: 梨(*P. bretschneideri*); XP_021814726.1: 樱桃桃(*P. avium*); XP_007210901.1: 桃(*P. persica*); AVD68940.1: 山杏(*P. sibirica*); XP_006436945.1: 柑橘(*C. clementina*); NP_851244.1: 拟南芥(*A. thaliana*).

其他45个ARF2蛋白聚为一类, 并与苹果MdARF2蛋白在同一分枝(图3), 说明MhARF2属于ARF2成员, 可能与其他物种ARF2具有相似的功能。

2.5 MhARF2转录活性预测

对MhARF2中间MR结构域的氨基酸组成进行分析, 结果发现该结构域丝氨酸、亮氨酸、脯氨酸和甘氨酸的比例为34%, 而谷氨酰胺、丝氨酸和亮氨酸的比例为21%, 表明MhARF2可能是转录抑制子。

2.6 MhARF2启动子序列分析

克隆MhARF2转录起始位点上游1 800 bp的启动子序列, 利用PlantCARE软件进行顺式作用元件分析。结果表明,MhARF2启动子区域含有8个光响应元

件、2个MeJA响应元件、1个生长素应答元件、1个ABA响应元件, 此外还含有1个厌氧诱导调控元件、1个真菌诱导响应元件、1个高温胁迫响应元件和1个乙烯响应元件(表2)。这表明, MhARF2的转录可能受到光、厌氧、激素和逆境胁迫等因素的诱导。

2.7 MhARF2的表达分析

对平邑甜茶不同组织MhARF2的表达水平进行qRT-PCR分析。结果表明, MhARF2在平邑甜茶的叶、根、茎、花和果实中均有表达, 为组成型表达, 且在叶片中表达量最高, 根次之, 果实中最低(图4)。

因平邑甜茶在生产中主要作为苹果的砧木, 其根系对逆境胁迫的适应能力很大程度上决定了

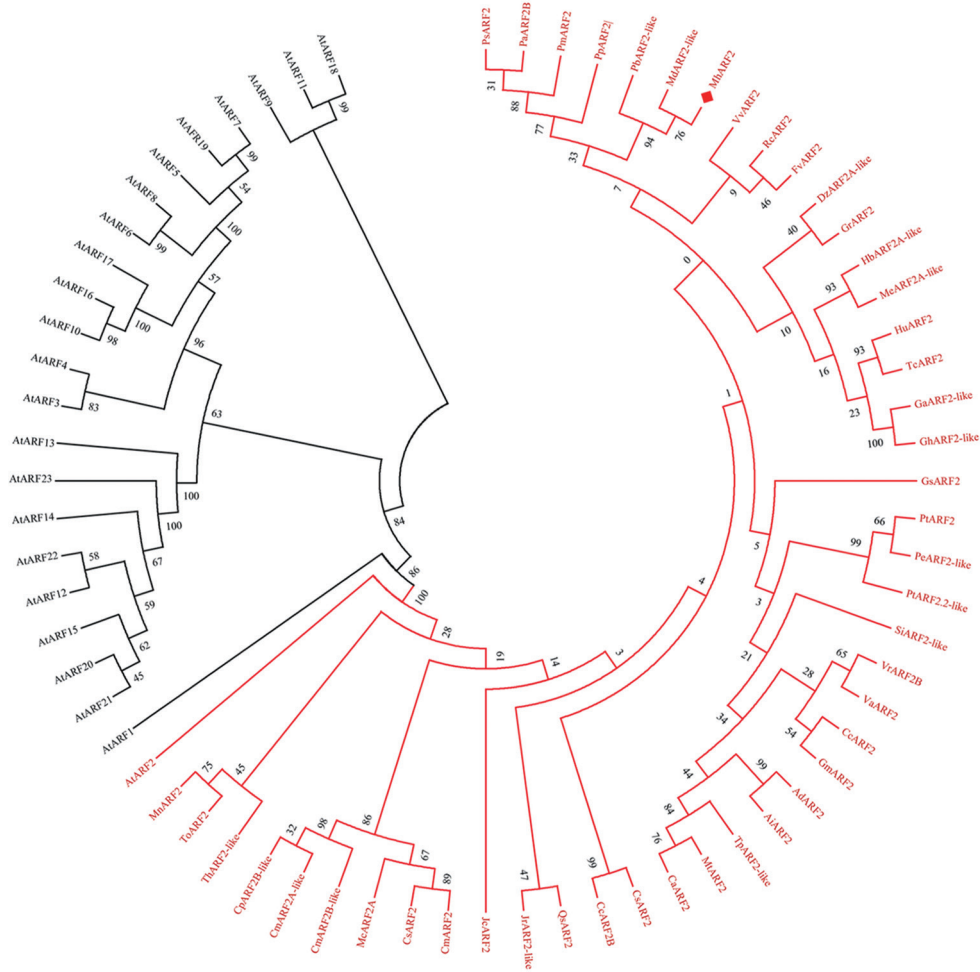


图3 MhARF2蛋白的系统发育分析

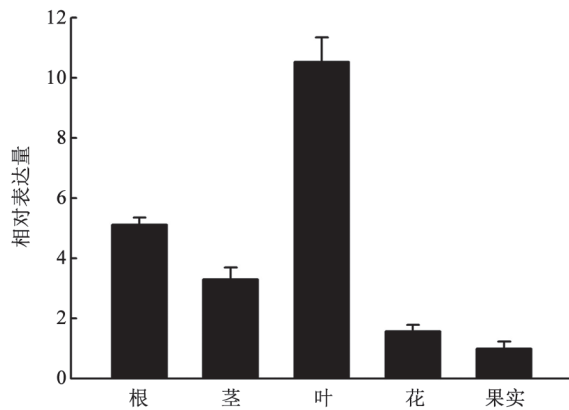
Fig.3 Phylogenetic analysis of MhARF2

22个AtARFs蛋白标注为黑色, AtARF2及其他46个ARF2蛋白标注为红色。分析所用各物种ARF氨基酸序列为: 拟南芥*A. thaliana* AtARF1 (AT1G59750)、AtARF2 (AT5G62000)、AtARF3 (AT2G33860)、AtARF4 (AT5G60450)、AtARF5 (AT1G19850)、AtARF6 (AT1G30330)、AtARF7 (AT5G20730)、AtARF8 (AT5G37020)、AtARF9 (AT4G23980)、AtARF10 (AT2G28350)、AtARF11 (AT2G46530)、AtARF12 (AT1G34310)、AtARF13 (AT1G34170)、AtARF14 (AT1G35540)、AtARF15 (AT1G35520)、AtARF16 (AT4G30080)、AtARF17 (AT1G77850)、AtARF18 (AT3G61830)、AtARF19 (AT1G19220)、AtARF20 (AT1G35240)、AtARF21 (AT1G34410)、AtARF22 (AT1G34390)、AtARF23 (AT1G43950); 苹果MdARF2-like (XP_008392710.1)、梨PbARF2-like (XP_009373632.1)、甜樱桃PaARF2B (XP_021814726.1)、桃PpARF2 (XP_007210901.1)、梅PmARF2 (XP_008239553.1)、葡萄VvARF2 (XP_002284543.1)、山杏PsARF2 (AVD68940.1)、月季RcARF2 (XP_024168835.1)、山黄麻ToARF2 (PON97460.1)、野草莓FvARF2 (XP_004297494.1)、哥伦比亚锦葵HuARF2 (XP_021285529.1)、可可TcARF2 (XP_017973154.1)、棉花GrARF2 (XP_012467386.1)、橡胶树HbARF2A-like (XP_021673394.1)、木薯MeARF2A-like (XP_021617041.1)、川桑MnARF2 (EXB76510.1)、栓皮栎QsARF2 (POE79214.1)、麻风树JcARF2 (XP_012090599.1)、胡桃JrARF2-like (XP_018832743.1)、甜橙CsARF2 (NP_001275789.1)、克莱门柚CcARF2B (XP_006436945.1)、榴莲DzARF2A-like (XP_022730402.1)、毛白杨PtARF2.2-like (APR63913.1)、毛果杨PtARF2 (XP_002318767.1)、树棉GaARF2-like (KHG08457.1)、陆地棉GhARF2-like (XP_016709650.1)、苦瓜McARF2A (XP_022134641.1)、甜瓜CmARF2 (XP_008464365.1)、笋瓜CmARF2B-like (XP_022987152.1)、胡杨PeARF2-like (XP_011042961.1)、西葫芦CpARF2B-like (XP_023516566.1)、黄瓜CsARF2 (XP_004138020.1)、南瓜CmARF2A-like (XP_022921607.1)、绿豆VrARF2B (XP_014508669.1)、木豆CcARF2 (XP_020233544.1)、赤豆VaARF2 (XP_017438505.1)、红车轴草TpARF2-like (PNY08067.1)、鹰嘴豆CaARF2 (XP_004503803.1)、蔓花生AdARF2 (XP_015955707.1)、蒺藜苜蓿MtARF2 (XP_003630583.2)、玉米GmARF2 (XP_003532359.1)、野大豆GsARF2 (KHN09718.1)、塔里哈花生AiARF2 (XP_020974886.1)、醉蝶花ThARF2-like (XP_010547792.1)、芝麻SiARF2-like (XP_011073189.1)。

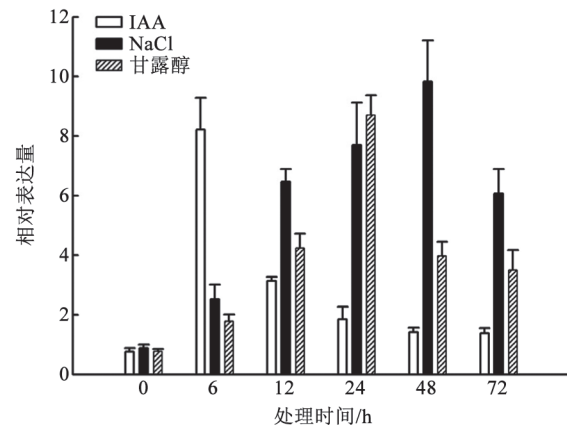
表2 *MhARF2*启动子顺式作用元件分析Table 2 *Cis*-acting regulatory elements analysis of *MhARF2* promoter

元件名称	与起始密码子距离/bp	元件序列	功能注释
ACE	1 369	ACGTGGA	光响应元件
ATCC-motif	1 374	CAATCCTC	光响应元件
Box 4	688, 1 221, 1 306	ATTAAT	光响应元件
Box I	1 554, 1 564	TTTCAA	光响应元件
CG-motif	648	CCATGGGG	光响应元件
G-Box	678	CACGTA	光响应元件
GAG-motif	364	AGAGAGT	光响应元件
Sp1	935, 1 645	CC(G/A)CCC	光响应元件
CGTCA-motif	341, 1 144	CGTCA	MeJA响应元件
TGACG-motif	309, 341	TGACG	MeJA响应元件
TGA-element	750	AACGAC	生长素应答元件
ABRE	677	TACGTG	ABA响应元件
ARE	966, 1 267	TGGTTT	厌氧诱导调控元件
Box-W1	530	TTGACC	真菌诱导响应元件
HSE	1 604	AAAAAATTC	高温胁迫响应元件
ERE	1 553	ATTCAA	乙烯响应元件
CAT-box	896	GCCACT	分生组织表达调控元件
EIRE	335	TTCGACC	激发子响应元件
GC-motif	705	CCCCCG	缺氧特异性诱导增强元件
Skn-1_motif	588, 961	GTCAT	胚乳表达调控元件

栽培品种的抗性, 因此利用qRT-PCR技术分析了不同处理下平邑甜茶根系中*MhARF2*表达水平的变化。结果(图5)显示, 在 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA处理下, *MhARF2*相对表达水平迅速升高, 在处理6 h时达到最高, 为初始值的10.8倍, 此后逐渐降低, 但仍高于初始水平。在 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl处理下, *MhARF2*相对表达水平先升高后降低, 处理48 h达到最高。在 200

图4 *MhARF2*组织表达分析Fig.4 Tissue-specific expression analysis of *MhARF2*

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇处理下, *MhARF2*相对表达水平先升高后降低, 在处理24 h时达到最高(图5)。上述结果表明, *MhARF2*对逆境胁迫的响应因胁迫方式的不同而发生变化, 其表达受NaCl和甘露醇胁迫的显著诱导, 表达丰度可能与平邑甜茶根系应答渗透胁迫密切相关。

图5 IAA、NaCl和甘露醇处理下*MhARF2*的表达分析Fig.5 Expression analysis of *MhARF2* under IAA, NaCl and mannitol treatments

3 讨论

本研究克隆了平邑甜茶*MhARF2*基因, 并对其结构特征、系统进化、亚细胞定位预测及表达模式进行了分析, 为阐明ARF2调控苹果IAA信号转导途径及逆境响应的过程奠定了基础。结构域分析发现, *MhARF2*具有3个ARF蛋白典型的结构域(DBD结合域、CTD结构域和中间非保守结构域), 表明其属于ARF家族成员。研究表明, MR中间结构域的氨基酸组成往往决定ARF的生物学功能, 中间区域富含谷氨酰胺、丝氨酸和亮氨酸, 即起转录激活作用; 若富含其他氨基酸(如丝氨酸、脯氨酸和甘氨酸等), 则起转录抑制作用(Chandler 2016)。本研究分析发现, *MhARF2*的MR中间结构域富含丝氨酸、亮氨酸、甘氨酸和脯氨酸, 由此推测*MhARF2*可能是转录抑制子, 这与拟南芥中的研究结果一致(Schruff等2006)。亚细胞定位预测结果表明, *MhARF2*定位于细胞核, 这也与拟南芥AtARF2亚细胞定位的结果一致(Schruff等2006)。氨基酸序列分析表明, *MhARF2*与苹果MdARF2、白梨PbARF2-like、甜樱桃PaARF2B等具有较高的同源性。系统发育分析表明, *MhARF2*与拟南芥等46个物种的ARF2处于同一分支, 在进化关系上非常接近。在拟南芥中, ARF2与多种表型相关, 并参与植物的生长发育和逆境胁迫的调控过程(Zhao等2016; Ren等2017; Liu等2018)。由于序列的同源性往往决定功能的相似性, 上述分析结果预示*MhARF2*可能与拟南芥及其他物种ARF2具有相似的功能。前人研究表明, ARF2在植物的生长发育过程中具有重要作用, ARF2突变能引起生长素相关的多效性表型变化(Vert等2008; Ren等2017; Liu等2018)。如拟南芥*arf2*突变体表现多种表型, 包括开花期延迟、莲座叶变大、育性改变、花器官脱落、角果开裂延迟、种子大小与重量增加等, 推测ARF2可能通过负调节与细胞生长和衰老相关的信号通路下游的基因转录来实现(Okushima等2005; Ellis等2005; Schruff等2006; Hughes等2008); ARF2通过增加IAA敏感性来降低IAA信号的抑制, 从而延迟拟南芥叶片的衰老, 具有正调节叶片衰老的作用(Lim等2010)。此外, ARF2属于组成型表达基因, 在大

部分组织器官中均能检测到, 如番茄*SlARF2*在所有组织中均表达, 但花中表达量最高, 其转录水平受IAA、乙烯和赤霉素的调控(Ren等2017)。本研究qRT-PCR分析结果表明, *MhARF2*在平邑甜茶的叶、根、茎、花和果实中均有表达, 且在叶片中表达量最高, 根次之, 这表明*MhARF2*同样具有组成型表达的特点, 暗示其广泛参与平邑甜茶各器官生长发育、形态建成等的重要生物学功能。另有研究表明, ARF2参与调控拟南芥叶片展开的过程, 在叶片形成过程中, 叶片远轴面特异表达的生长素通路下游响应因子ARF2、ARF3和ARF4直接抑制WOX1和PR5在远轴面区域的表达。MP (MonOPTEROS)和ARF2/3/4的共同作用使WOX1和PR5在叶片中间区域特异表达, 从而使叶片能够展开(Guan等2017)。由于本研究选择的叶片正值初展叶时期, 这可能是叶片中*MhARF2*表达水平最高的原因。

越来越多的证据表明, ARF2蛋白在植物逆境胁迫调控过程中也具有重要作用。研究表明, ARF2可直接结合到K⁺转运蛋白基因*HAK5*的启动子, 并在K⁺充足的条件下抑制*HAK5*的表达; 低钾处理后ARF2则会被磷酸化, 从而消除其与*HAK5*启动子的DNA结合活性, 解除对*HAK5*的转录抑制作用, 利于拟南芥耐受低钾胁迫(Zhao等2016)。ARF2、ANT和COR15A形成ABA介导的信号通路, 调控拟南芥种子的抗旱性(Meng等2015)。本文通过对*MhARF2*启动子顺式作用元件分析显示, 其启动子上含有多个光响应元件、MeJA响应元件和生长素应答元件、ABA响应元件、乙烯响应元件、真菌诱导响应元件等多个顺式作用元件, 暗示其可能参与IAA等激素调控的生长发育及逆境胁迫的调控过程。qRT-PCR结果进一步表明, *MhARF2*的表达受到IAA、NaCl和甘露醇胁迫的诱导, 这说明*MhARF2*参与IAA信号转导途径及渗透胁迫的调控过程, 但具体调控机制有待于进一步研究。

对平邑甜茶*MhARF2*生物信息学分析及qRT-PCR的结果, 为进一步阐释*MhARF2*的生物学功能奠定了基础。后续将进一步开展*MhARF2*转录激活活性分析、靶基因鉴定和转基因功能验证及表型分析等工作, 从而明确*MhARF2*在生长发育及逆境胁迫等过程中的调控机制。

参考文献(References)

- An JP, Song LQ, Zhao LL, et al (2018). Cloning and functional characterization of an auxin response factor gene *MdARF5* in apple. *Sci Agr Sin*, 51 (7): 1345–1352 (in Chinese with English abstract) [安建平, 宋来庆, 赵玲玲等(2018). 苹果生长素响应因子*MdARF5*的克隆与功能鉴定. *中国农业科学*, 51 (7): 1345–1352]
- Bouzroud S, Gouiaa S, Hu N, et al (2018). Auxin Response Factors (ARFs) are potential mediators of auxin action in tomato response to biotic and abiotic stress (*Solanum lycopersicum*). *PLoS One*, 13 (2): e0193517
- Chandler JW (2016). Auxin response factors. *Plant Cell Environ*, 39 (5): 1014–1028
- Ellis CM, Nagpal P, Young JC, et al (2005). Auxin response factor1 and auxin response factor 2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 132 (20): 4563–4574
- Feng YY, Hou P, Li YN, et al (2012). Bioinformatic analysis and subcellular localization of *Solanum lycopersicum* ARF2. *Prog Biochem Biophys*, 39 (1): 51–58 (in Chinese with English abstract) [冯媛媛, 侯佩, 李颖楠等(2012). 番茄ARF2蛋白的生物信息学分析与亚细胞定位. *生物化学与生物物理进展*, 39 (1): 51–58]
- Guan C, Wu B, Yu T, et al (2017) Spatial auxin signaling controls leaf flattening in *Arabidopsis*. *Current Biol*, 27 (19): 2940–2950
- Hu B, Jin J, Guo AY, et al (2015). GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*, 31 (8): 1296–1297
- Hughes R, Spielman M, Schruff MC, et al (2008). Yield assessment of integument-led seed growth following targeted repair of auxin response factor 2. *Plant Biotechnol J*, 6 (8): 758–769
- Li HF, Ran K, He P, et al (2015). Genome-wide identification and expression analysis of auxin response factor (ARF) gene family in apple. *Plant Physiol J*, 51 (7): 1045–1054 (in Chinese with English abstract) [李慧峰, 冉昆, 何平等(2015). 苹果生长素响应因子(ARF)基因家族全基因组鉴定及表达分析. *植物生理学报*, 51 (7): 1045–1054]
- Li SB, Xie ZZ, Hu CG, et al (2016) A review of auxin response factors (ARFs) in plants. *Front Plant Sci*, 7: 47
- Li YL, Gao ZH, Song J, et al (2017). Auxin response factor (ARF) and its functions in plant growth and development. *Plant Physiol J*, 53 (10): 1842–1858 (in Chinese with English abstract) [李艳林, 高志红, 宋娟等(2017). 植物生长素响应因子ARF与生长发育. *植物生理学报*, 53 (10): 1842–1858]
- Lim PO, Lee IC, Kim J, et al (2010). Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. *J Exp Bot*, 61 (5): 1419–1430
- Liu GC, Ding ZJ (2018). Auxin regulates plant growth and development by mediating various environmental cues. *Chinese Bull Bot*, 53 (1): 17–26 (in Chinese with English abstract) [刘广超, 丁兆军(2018). 生长素介导环境信号调控植物的生长发育. *植物学报*, 53 (1): 17–26]
- Liu Z, Miao L, Huo R, et al (2018). ARF2-ARF4 and ARF5 are essential for female and male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 59 (1): 179–189
- Ljung K (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, 140 (5): 943–950
- Luo J, Zhou JJ, Zhang JZ (2018). Aux/IAA gene family in plants: molecular structure, regulation, and function. *Int J Mol Sci*, 19 (1): 259–276
- Meng LS, Wang ZB, Yao SQ, et al (2015). The ARF2-ANT-COR15A gene cascade regulates ABA-signaling-mediated resistance of large seeds to drought in *Arabidopsis*. *J Cell Sci*, 128 (21): 3922–3932
- Okushima Y, Mitina I, Quach HL, et al (2005). AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator. *Plant J*, 43 (1): 29–46
- Promchuea S, Zhu Y, Chen Z, et al (2017). ARF2 coordinates with PLETHORAs and PINs to orchestrate ABA-mediated root meristem activity in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol*, 59 (1): 30–43
- Ran K, Yang HQ, Sun XL, et al (2016). A rapid and simple protocol for isolation of functional RNA from different tissues of multiple fruit trees. *Acta Hort*, 1110: 163–170
- Ren Z, Liu R, Gu W, et al (2017). The *Solanum lycopersicum* auxin response factor SlARF2 participates in regulating lateral root formation and flower organ senescence. *Plant Sci*, 256: 103–111
- Roosjen M, Paque S, Weijers D (2017). Auxin response factors: output control in auxin biology. *J Exp Bot*, 69 (4): 179–188
- Schefe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, et al (2006). Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel ‘gene expression’s CT difference’ formula. *J Mol Med*, 84: 901–910
- Schruff MC, Spielman M, Tiwari S, et al (2006). The AUXIN RESPONSE FACTOR 2 gene of *Arabidopsis* links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. *Development*, 133 (2): 251–261
- Sun RW, Liu YJ, Wang X, et al (2018). Bioinformatics identification of auxin response factor genes and expression profiles under drought stress in wheat. *J Plant Genet Resour*, 19 (1): 122–134 (in Chinese with English abstract) [孙仁玮, 刘永杰, 王翔等(2018). 小麦ARF基因家族生物信息学分析及在干旱胁迫下的表达特性研究. *植物遗传资源学报*, 19 (1): 122–134]

- Vert G, Walcher CL, Chory J, et al (2008). Integration of auxin and brassinosteroid pathways by auxin response factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105 (28): 9829–9834
- Wang D, Pei K, Fu Y, et al (2007). Genome-wide analysis of the auxin response factors (ARF) gene family in rice (*Oryza sativa*). *Gene*, 394: 13–24
- Wang L, Hua D, He J, et al (2011). *Auxin Response Factor2* (ARF2) and its regulated homeodomain gene *HB33* mediate abscisic acid response in *Arabidopsis*. *PLoS Genet*, 7 (7): e1002172
- Wang YC, Xu HF, Wang N, et al (2017). Molecular cloning and expression analysis of an auxin signaling related gene *MdARF3* in red flesh apple. *Acta Horti Sin*, 44 (4): 633–643 (in Chinese with English abstract) [王意程, 许海峰, 王楠等(2017). 红肉苹果愈伤组织生长素信号相关基因*MdARF3*的克隆与表达分析. *园艺学报*, 44 (4): 633–643]
- Yang HQ, Fan WG (2012). Advances in research of apple root system architecture and its regulation. *Acta Horti Sin*, 39 (9): 1673–1678 (in Chinese with English abstract) [杨洪强, 范伟国. 苹果根系构型及其调控研究进展. *园艺学报*, 39 (9): 1673–1678]
- Zhao S, Zhang ML, Ma TL, et al (2016). Phosphorylation of ARF2 relieves its repression of transcription of the K⁺ transporter gene *HAK5* in response to low potassium stress. *Plant Cell*, 28 (12): 3005–3019

Cloning, sequence and expression analysis of an auxin response factor gene *MhARF2* in *Malus hupehensis*

JIANG Qian-Qian^{1,*}, CAO Hui¹, ZHANG Bao-Ren¹, ZHANG Hui-Ling²

¹Weifang University, Key Laboratory of Biochemistry & Molecular Biology in Universities of Shandong, Weifang, Shandong 261061, China

²Liangshan County Bureau of Agriculture, Jining, Shandong 272600, China

Abstract: The auxin response factor gene *MhARF2* was cloned by RT-PCR technology from *Malus hupehensis*. The open reading frame (ORF) of *MhARF2* was 2 532 bp and encoding a putative protein with 843 amino acids. The gene structure analysis showed that *MhARF2* was consisted of 13 introns and 14 exons. Phylogenetic analysis showed that *MhARF2* was a member of ARF2, and had high homology with ARF2 sequence of *Malus domestica*, *Pyrus bretschneideri* and *Prunus avium*. *MhARF2* contained the B3 DNA-binding domain, CTD domain, and Auxin-resp domain, which were specific to the ARF family. And *MhARF2* was localized in the nucleus. *MhARF2* promoter region contained multiple cisacting elements, such as light response elements, auxin response elements, MeJA response elements, and ABA response elements. *MhARF2* was expressed in leaves, roots, stems, flowers and fruits, and the expression level was the highest in leaves, and followed by roots. Under 30 mg·L⁻¹ IAA treatment, the expression level of *MhARF2* in the root of *M. hupehensis* was induced, and the highest level was at 6 h. However, the expression levels of *MhARF2* under 100 mmol·L⁻¹ NaCl and 200 mmol·L⁻¹ mannitol treatment were changed with time extension, which were both firstly raised and then dropped. These results indicated that *MhARF2* might be involved in the regulation of auxin signal transduction and osmotic stress response in *M. hupehensis*.

Key words: *Malus hupehensis*; *MhARF2*; gene cloning; sequence analysis; expression analysis

Received 2018-04-20 Accepted 2019-01-09

This work was supported by the Natural Science Foundation of China (31301733) and Weifang University Doctoral Fund (2012BS18).

*Corresponding author (jiangqq5238@163.com).