

黄瓜生长素响应因子*CsARF10* 亚家族 3 个基因的克隆与表达分析

郭勤卫, 李季, 崔利, 张停林, Kere George Mbira, 陈劲枫*

(南京农业大学园艺学院, 葫芦科作物育种与种质创新实验室, 南京 210095)

摘要: 利通过蛋白序列同源比对和 PCR 技术从黄瓜中克隆获得了 3 条生长素响应因子 *ARF10* 基因序列, 分别命名为 *CsARF10a*、*CsARF10b* 和 *CsARF10c*。系统发育进化树分析发现 *CsARF10a* 与番茄 *SLARF10* 基因进化距离较近, 而 *CsARF10b* 和 *CsARF10c* 与拟南芥 *AtARF10* 相似性更高; 启动子分析显示 *CsARF10* 家族基因具有多样化的激素应答元件, 荧光定量 PCR 结果也证明黄瓜幼苗在不同 NAA 浓度处理以及其他激素的处理下, *CsARF10* 家族基因呈现不同的表达模式; 荧光定量 PCR 结果还显示 *CsARF10* 家族基因在黄瓜幼苗的根、茎、叶及雄花中都具有较高的转录水平; *CsARF10a*、*b*、*c* 在黄瓜果实发育的早期具有相同的表达趋势, 但 *CsARF10a* 的转录水平较高, 而 *CsARF10b* 和 *CsARF10c* 表达量较低。

关键词: 黄瓜; *CsARF10*; 基因克隆; 序列分析; 表达分析

中图分类号: S 634.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 06-1071-10

Cloning and Expression Analysis of Cucumber *CsARF10* Genes Subfamily

GUO Qin-wei, LI Ji, CUI Li, ZHANG Ting-lin, Kere George Mbira, and CHEN Jin-feng*

(College of Horticulture, Laboratory of Cucurbit Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Three *ARF10* genes (*Auxin-Respond-Factor*) named *CsARF10a*, *CsARF10b* and *CsARF10c*, were screened from the cucumber genome database by protein homology BLAST and cloned from 8419s-1 by polymerase chain reaction (PCR). In present study, phylogenetic reconstruction indicated that the *CsARF10a* has closer relation with *SLARF10*, while *CsARF10b* and *CsARF10c* have higher similarity with *AtARF10*. Promoter prediction showed that the promoters consist of diversified multiple hormone response elements. The real-time quantitative PCR (RT-qPCR) analysis proved that the expression of cucumber *ARF10* genes could be regulated by different phytohormones or concentrations of 1-naphthylacetic acid (NAA) and performed different expression patterns. It was also seen that *CsARF10* gene subfamily had high transcriptional levels either in roots, stems, leaves or in male flowers; In additional, the qPCR results showed that although the expression of *CsARF10* genes have similar transcriptional trend, the *CsARF10a* had high expression level while mRNA of *CsARF10b* and *CsARF10c* were relatively low.

Key words: cucumber; *CsARF10*; gene cloning; homologous analysis; expression analysis

收稿日期: 2013-01-18; **修回日期:** 2013-04-12

基金项目: 国家重点基础研究发展计划‘973’项目(2012CB113904); 国家‘863’项目(2012AA100202); 教育部博士点基金项目(20120097122237); 南京农业大学青年科技创新基金项目(KJ2012013)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: jfchen@njau.edu.cn)

生长素响应因子 ARF (Auxin response factor) 是一类调控生长素应答基因表达的转录因子, 能特异性激活或抑制下游生长素应答基因的表达, 在植物生长发育的多个过程中都有重要功能 (Tiwari et al., 2003; 刘振华 等, 2011)。ARF 家族是以多基因的形式存在的, 在拟南芥、水稻和番茄中分别鉴定出了 23、25 和 17 个 ARF 家族成员 (Remington et al., 2004; Wang et al., 2007; Kumar et al., 2011)。ARF 家族基因具有保守的功能结构域和显著的序列特征。同一物种中的 ARF 成员之间和不同物种之间的 ARF 基因具有一定的同源性 (Remington et al., 2004; Wang et al., 2007)。ARF 家族蛋白多数包含 3 个特定的结构域, 一个 N - 端的 DNA 结合结构域 (DBD), 一个中间非保守域, 作为激活结构域 (AD) 或抑制结构域 (RD) 和一个 C - 端的二聚作用结构域 (CTD) (Tiwari et al., 2003)。ARF 家族基因还具有时空表达特异性。拟南芥中, 大部分 *AtARF* 家族基因在根、茎、叶、花、果实和种子等营养器官中都有特异性表达 (Ulmasov et al., 1999; Okushima et al., 2005)。如 *AtARF7* 在幼苗、根以及发育的胚中特异表达 (Okushima et al., 2005), *AtARF8* 在幼苗以及发育的花和果实中有特异性表达 (Goetz et al., 2006), 而 *AtARF12-15* 和 *AtARF20-22* 只有在胚发生及种子发育时期特异性表达 (Okushima et al., 2005)。水稻中, 多数 *OsARF* 基因在根, 茎秆, 叶片和幼穗中都有特异性表达, 如 *OsARF23* 在胚性愈伤组织和幼穗等胚性组织中有特异性表达, 但 *OsARF20* 在幼苗中未检测到表达 (Wang et al., 2007)。番茄中, *SLARF* 家族基因也具有时空表达特异性, 如 *SLARF10* 在果实发育阶段表达水平较高, 在授粉后 30 d 表达水平达到最高 (Kumar et al., 2011)。ARF 家族基因受到复杂的网络调控, 拟南芥 *AtARF8* 受到光的诱导 (Tian et al., 2004), 而 *AtARF19* 受到外源生长素和乙烯的诱导 (Li et al., 2006)。水稻 *OsARF1* 和 *OsARF23* 受到外源生长素的诱导, 而 *OsARF5*、*OsARF14* 和 *OsARF21* 则受到外源生长素的抑制 (Waller et al., 2002; Wang et al., 2007)。

ARF10 是 ARF 家族中的重要一员。番茄中 *SLARF10* 对叶的形态建成和果实早期发育起着重要作用, 对含有 *SLARF10* 片段的转基因番茄分析发现, 转基因番茄长出细小的叶片、萼片、花瓣, 形状不正常的果实 (Hendelman et al., 2012)。*ARF10* 也存在一定程度的功能冗余性, 对拟南芥中 *arf10-2* 与 *arf16-2* 突变体的分析发现, *AtARF10* 和 *AtARF16* 都参与了根冠细胞的分化, 但单一突变都无明显表型; 只有当根尖细胞同时缺失 *ARF10* 和 *ARF16* 后, 这些细胞才会丧失分化发育的能力, 无法合成淀粉粒以及迅速伸长和脱落, 最终导致植物根向地性生长缺陷。同时研究表明非编码小分子 RNA160 (miR160) 在 *AtARF10* 转录后的调控过程中起重要作用 (Wang et al., 2005; Liu et al., 2010)。

前期的研究对黄瓜 ARF 基因家族中的 9 个代表基因进行了初步的生物信息学及表达分析 (王垒 等, 2011), 但未对各个 ARF 亚家族基因进行深入研究。本研究中通过对黄瓜 *CsARF10* 亚家族 3 个基因进行克隆、序列结构分析及时空表达分析, 初步探索了黄瓜 *CsARF10* 亚家族基因的差异表达模式及功能, 试图明确黄瓜 *CsARF10* 亚家族基因在黄瓜生长发育, 特别是果实发育过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

黄瓜单性结实自交系 ‘EC1’ 和非单性结实自交系 ‘8419s-1’ 由南京农业大学葫芦科作物遗传与种质创新实验室提供。2012 年春, 材料苗期在光照培养箱中培养, 光周期为 14 h/10 h, 昼夜温度为 28 °C/20 °C。

1.2 *CsARF10* 亚家族基因的克隆及测序

根据拟南芥 *AtARF10* 的核酸序列, 从黄瓜基因组数据库 (<http://www.cucumber.genomics.org.cn>)

下载同源性最高的 3 个序列, 为 *Csa015176*、*Csa011935*、*Csa020560*, 分别命名为 *CsARF10a*、*CsARF10b*、*CsARF10c*。根据以上基因的 CDS 序列设计 PCR 扩增引物 (表 1)。提取 ‘8419s-1’ 黄瓜幼果总 RNA, 并反转录为 cDNA, 作为模板对 *CsARF10a*、*b*、*c* 基因片段进行 PCR 扩增。反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 150 s, 34 个循环; 72 °C 10 min。将含有目标片段的阳性单克隆送至南京金斯瑞生物工程技术有限公司分别测序验证。

表 1 PCR 克隆引物序列

Table 1 Primers sequence for cloning *CsARF10* gene family

基因 Gene	上游引物 (5'-3') Forward primer	下游引物 (5'-3') Reverse primer
<i>CsARF10a</i>	GGGTTTATTACATTGGG	ACATTCTTGGGTTCAATTT
<i>CsARF10b</i>	AATTGGCTTTGATTGAGATGAT	CAAGGAAATGAAGGACCTGATA
<i>CsARF10c</i>	TGGAGGACCTTTGGTTTAA	TAGACTTCCGCAAGATGAG

1.3 *CsARF10* 亚家族基因的生物信息学鉴定

采用 DNAMAN (v7.0) 软件对预测的黄瓜 *CsARF10* 亚家族蛋白序列和拟南芥 *AtARF10* 蛋白序列, 番茄 *SlARF10* 蛋白序列和水稻 *OsARF10* 蛋白序列作进化树分析, 并对黄瓜 *CsARF10* 亚家族蛋白序列与拟南芥 *AtARF10* 蛋白序列, 番茄 *SlARF10* 蛋白序列和水稻 *OsARF10* 蛋白序列进行同源比对分析 (*CsARF10a*、*b*、*c*、*AtARF10*、*SlARF10*、*OsARF10* 的 GenBank 登录号分别为 *Csa015176*、*Csa011935*、*Csa020560*、NP-180402.1、NP-001058399.1、NP-001234796.1)。

从基因数据库中分别提取 *CsARF10a*、*b*、*c* 基因的开放阅读框上游启动子序列, 分别命名为 *pCsARF10a*、*b*、*c*, 然后采用在线工具 plantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcar/html/>) 对其进行顺式作用元件分析。

采用在线工具 GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 对 *CsARF10a*、*b*、*c* 的基因结构进行分析。

1.4 *CsARF10* 亚家族基因表达分析

选取 ‘8419s-1’ 苗龄为 3 周 (两叶一心期) 的幼苗, 分别用 5、10 和 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NAA 处理 3 h 后取样; 分别用 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6-BA, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GA₃, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ABA 和 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乙烯处理, 9 h 后, 取叶片为试验样品; 并以 0 h 的叶片为试验对照, 液氮速冻保存, 用于 *CsARF10* 亚家族基因的表达分析。

在 ‘8419s-1’ 苗期, 选取生长状态一致的植株, 分别取根、茎、叶、雌花和雄花, 液氮速冻保存, 用于 *CsARF10* 亚家族基因的表达分析。

用于田间试验的材料, 待光照培养箱中的黄瓜长至 2 叶 1 心期, 移栽至南京农业大学江浦园艺农场, 按常规田间管理。在 ‘EC1’ 和 ‘8419s-1’ 开花前 1 d, 对雌花进行夹花。在开花当天, 对 ‘8419s-1’ 的雌花进行夹花和授粉处理, 而 ‘EC1’ 只进行夹花处理。分别取开花后 0、2、4 和 6 d 的子房作为样品, 液氮速冻保存, 用于 *CsARF10* 亚家族基因的表达分析。

以上所有试验处理均每次 5 株, 3 次重复。

采用荧光定量 PCR 技术分析 *CsARF10* 亚家族基因的时空表达变化。首先, 采用 Trizol 试剂盒 (Invitrogen 公司) 提取各个黄瓜材料的总 RNA, 用 DNase I 除去基因组 DNA 后, 用反转录试剂盒 (TaKaRa 公司) 进行反转录得到 cDNA 用于基因的特异表达分析, 方法参考试剂盒说明书; 然后, 根据 *CsARF10a*、*b*、*c* 基因序列, 利用 PRIMER (v6.0) 设计表达分析所用的特异引物 (表 2), 通过标准曲线和溶解曲线检测, 所有引物具有较高的扩增效率和较高的特异性。用 SYBR Green I 试

剂盒 (Bio-Rad 公司) 进行实时荧光定量 PCR 分析。20 μL 反应体系为: SYBR[®] Premix (2 \times) 10.0 μL , 上游引物 (2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.0 μL , 下游引物 (2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.0 μL , cDNA 1.0 μL , ddH₂O 7.0 μL , 每样本 3 次技术重复。荧光定量 PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 进行 40 个循环, 在 65 $^{\circ}\text{C}$ 延伸步骤收集荧光信号, 重复 3 次; 最后, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行定量数据分析。

表 2 定量 RT-PCR 靶标基因及内参基因引物序列

Table 2 Primers sequence of target genes and reference gene used in quantitative RT-PCR

基因 Gene	上游引物 (5'-3') Forward primer	下游引物 (5'-3') Reverse primer
<i>CsARF10a</i>	AAAGATCCGATTCCGGTGAAG	GAGCGAATGTCCTGGAAGA
<i>CsARF10b</i>	GGTCTACCAGAAGGCTCTGC	TCGAGAGTGCCTCTACATC
<i>CsARF10c</i>	CAGCTGCTCTGGAGATACGA	ATGACAAACCAGAACCGTCA
<i>Actin</i>	TTCTGGTGATGGTGTGAGTC	GGCAGTGGTGGTGAACATG

2 结果与分析

2.1 黄瓜 *CsARF10* 亚家族基因克隆

以 '8419s-1' 黄瓜幼果为材料, 提取 RNA 并反转录为 cDNA, 以此作为模板, 通过 PCR 方法分别扩增 *CsARF10a*、*b*、*c* 基因片段, 经克隆后测序, 表明与黄瓜基因组数据库中 *Csa015176*、*Csa011935*、*Csa020560* 的 CDS 序列大小一致, 但存在个别的碱基差异, 与其序列比对发现, 其一致性分别为 99.9%、99.6%、99.8%, 但不存在氨基酸序列的差异。

2.2 *CsARF10* 亚家族进化树分析及蛋白结构分析

利用 DNAMAN (v7.0) 软件对 *CsARF10a*、*b*、*c* 与拟南芥的 *AtARF10*, 番茄的 *SlARF10* 和水稻的 *OsARF10* 氨基酸序列进行系统进化分析 (图 1)。结果显示 *CsARF10a* 与番茄 *SlARF10* 基因进化距离较近, 而 *CsARF10b* 和 *CsARF10c* 与拟南芥 *AtARF10* 相似性更高。



图 1 *CsARF10a*、*b*、*c* 与拟南芥 *AtARF10*, 番茄的 *SlARF10* 和水稻的 *OsARF10* 氨基酸序列系统发育树分析

Fig. 1 Phylogenetic tree of the amino acid sequences of *CsARF10a*, *b*, *c*, *AtARF10*, *SlARF10* and *OsARF10*

将 *CsARF10a*、*b*、*c* 与拟南芥 *AtARF10*、番茄 *SlARF10* 和水稻 *OsARF10* 的蛋白序列进行同源序列比对, 并分析其保守的功能结构域。图 2 显示, *CsARF10a*、*b*、*c*, 具有一个 N-端的 DNA 结合功能域 (DBD), 一个中间非保守结构域和一个 C-端的 AUX/IAA 二聚作用结构域 (CTD), 具有典型的 ARF 蛋白功能结构。

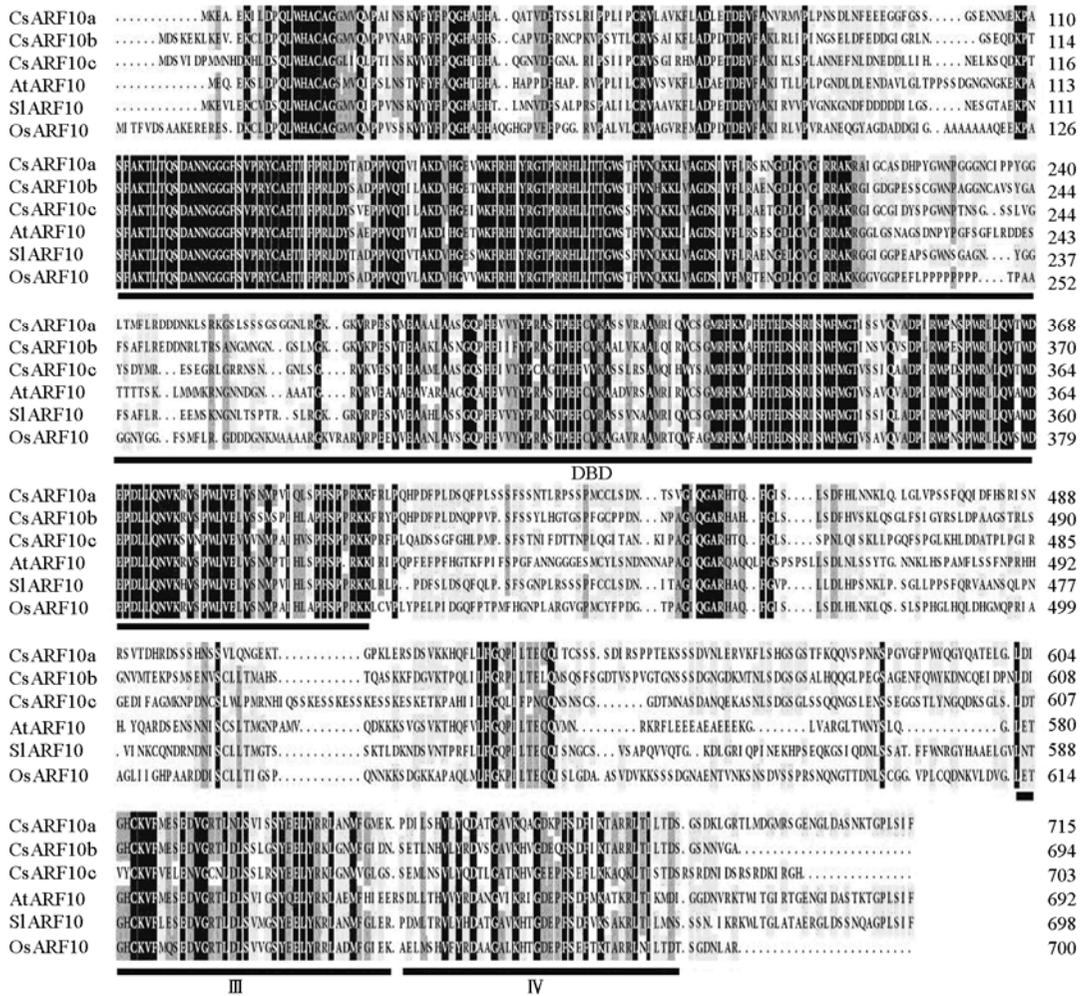


图 2 CsARF10a、b、c、AtARF10、SlARF10 和 OsARF10 蛋白序列比对

实线标注的为 ARF10 基因的保守结构域, DBD 代表 DNA 结合结构域, III 和 IV 组成 CTD 结构域, 分别与 AUX/IAA 中的 III 和 IV 具有一定的同源性, 中间区域在 DBD 与 CTD 之间。

Fig. 2 Alignment of the amino acid sequences of CsARF10a, b, c, AtARF10, SlARF10 and OsARF10

The DNA-binding domain and C-terminal AUX/IAA dimerization domains III and IV are overlined with solid lines. A variable middle region is between the DBD and CTD domains.

2.3 CsARF10 亚家族基因的启动子和基因组结构分析

CsARF10a、b、c 启动子 (pCsARF10a、b、c) 序列分析表明, pCsARF10a、b、c 具有调控真核基因转录的基本元件, 如 TATA 框, CAAT 框等, 还分别具备了一些与组织特异性或激素及胁迫诱导等相关的调控元件 (表 3)。

表 3 pCsARF10a、b、c 序列中与组织特异性或激素及胁迫诱导相关的 cis 元件

Table 3 The putative cis-elements of tissue-specific and stress-induced in the promoter of CsARF10a, b, c genes

启动子 The promoter	应答元件类型 The type of cis-elements	数量 Number
pCsARF10a	ABA 响应 The abscisic acid responsiveness	1
	低氧胁迫响应 The anaerobic stress responsiveness	3
	防御和胁迫响应 The defense and stress responsiveness	1
	赤霉素响应 The gibberellin responsiveness	4
	干旱胁迫 The drought stress responsiveness	2
	光响应 The light responsiveness	5

续表 3

启动子 The promoter	应答元件类型 The type of cis-elements	数量 Number
<i>pCsARF10b</i>	胚乳形态建成 The endosperm expression responsiveness	1
	昼夜节律调节 The circadian control responsiveness	1
	水杨酸诱导 The salicylic acid responsiveness	1
	茉莉酸甲酯诱导 The MeJA-responsiveness	2
	低温胁迫 The low-temperature responsiveness	2
	ABA诱导 The abscisic acid responsiveness	1
	防御和胁迫响应 The defense and stress responsiveness	1
	赤霉素诱导 The gibberellin responsiveness	3
	低氧胁迫 The anaerobic responsiveness	4
	水杨酸诱导 The salicylic acid responsiveness	1
	干旱胁迫 The drought stress responsiveness	1
	热胁迫 The heat stress responsiveness	1
	乙烯诱导 The ethylene responsiveness	1
	生长素响应 The auxin responsiveness	1
	真菌诱导响应 The fungal elicitor responsive	1
光响应 The light responsiveness	2	
<i>pCsARF10c</i>	昼夜节律调节 The circadian control responsiveness	2
	低氧胁迫 The anaerobic responsiveness	3
	低温胁迫 The low-temperature responsiveness	1
	防御和胁迫响应 The defense and stress responsiveness	3
	热胁迫 The heat stress responsiveness	1
	真菌诱导 The fungal elicitor responsive	1
	茉莉酸甲酯诱导 The MeJA-responsiveness	3
	水杨酸诱导 The salicylic acid responsiveness	3
	赤霉素诱导 The gibberellin responsiveness	1
	光响应 The light responsiveness	4
	胚乳形态建成 The endosperm expression responsiveness	7
	根的形态建成 the root-specific expression responsiveness	2
	叶的形态建成 The leaf morphology development	2
	分生组织特异性激活响应 The meristem specific activation responsiveness	2
	昼夜节律调节 The circadian control responsiveness	1

利用在线工具 GSDS 对 *CsARF10a*、*b*、*c* 基因结构进行预测分析 (图 3)。*CsARF10a*、*c* 都含有 4 个外显子和 3 个内含子, 但是外显子和内含子的长度有区别, *CsARF10b* 含有 3 个外显子和 2 个内含子, 推测 *CsARF10b* 可能是由于在进化过程中内含子断裂造成 3'端有一外显子丢失形成的。

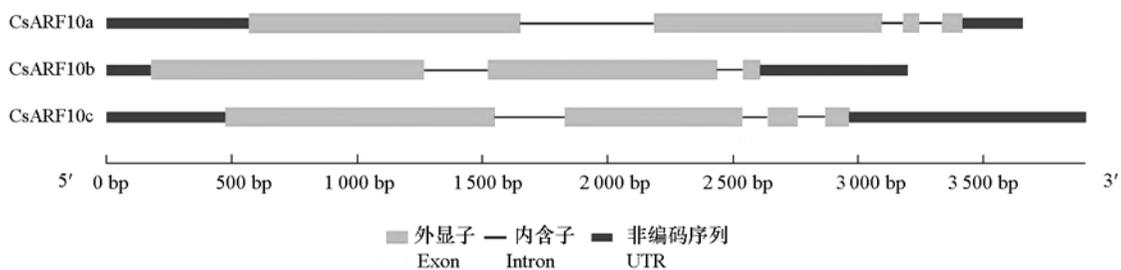


图 3 *CsARF10a*、*b*、*c* 基因结构
Fig. 3 The genomic structure of *CsARF10a*, *b*, *c* genes

2.4 *CsARF10* 亚家族基因的特异性表达

2.4.1 在不同组织器官中的表达

实时荧光定量 PCR 分析 *CsARF10a*、*b*、*c* 基因在黄瓜根、茎、叶、雌花和雄花中的表达模式, 结果 (图 4) 表明在各个器官中都有表达。*CsARF10a* 在根中表达水平最高, 其次为雌花和叶, 在茎

中表达最低, 略低于雄花的表达量, 但差异不显著, 根中表达量约为茎的 1.31 倍; *CsARF10b*、*c* 在雄花中表达水平最高, 其次为茎、根和叶, 在雌花中表达最低, 雄花中表达量分别约为雌花的 8.68 和 17.03 倍; *CsARF10a* 在黄瓜的各营养器官中的表达量均显著高于 *CsARF10b*、*c* 的表达量 (图 4)。说明 *CsARF10a*、*b*、*c* 的表达具有组织特异性。

2.4.2 激素应答表达

图 5 显示: *CsARF10a* 在 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 处理后, 受诱导表达, 表达量约为对照 (0 h) 的 1.86 倍, 在 10 和 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 处理后, 表达受到抑制, 表达量低于对照。 *CsARF10b*、

c 基因在 5、10 和 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 处理下, 表达均受到抑制, 其表达量均低于对照, 但各表达量的变化有差异, 其中 *CsARF10c* 在 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 处理下, 表达量降低到极低, 约为对照的 1/20。

图 6 显示: *CsARF10a* 在 ABA 和 6-BA 处理后, 基因均受到诱导表达, 其表达量分别约为对照的 1.25 倍和 5.5 倍, 在 GA_3 和乙烯处理后, 基因的表达受到抑制, 其中乙烯处理后, 表达量最低, 对照的表达水平约为其表达量的 3.26 倍。 *CsARF10b* 在 ABA、 GA_3 、乙烯和 6-BA 处理后, 表达均受抑制, 显著低于对照, 其中, ABA 处理后, 表达量最低, 对照的表达量约为其表达量的 3.69 倍。

CsARF10c 在 ABA、 GA_3 和乙烯处理后, 表达受到抑制, 表达水平极显著地低于对照, 对照的表达量分别约为其表达量的 11.71 倍、3.88 倍和 7.22 倍, 在 6-BA 处理后, 基因受到诱导表达, 表达量显著高于对照, 约为对照的 2.7 倍。

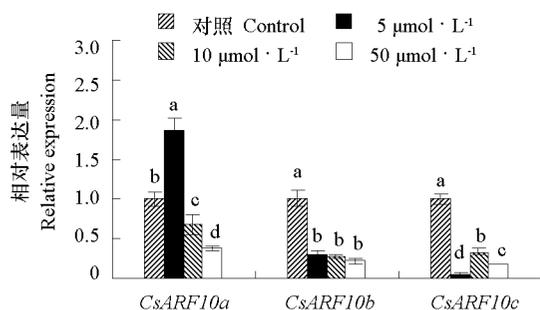


图 5 黄瓜幼苗经不同浓度 NAA 处理后 *CsARF10a*、*b*、*c* 基因的相对表达量

分别以 *CsARF10a*、*b*、*c* 各自对照的表达量为 1。

Fig. 5 The expression of *CsARF10a*, *b*, *c* genes after spraying the different densities of NAA

The expression of *CsARF10a*, *b*, *c* genes at $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ were as control.

2.4.3 在黄瓜果实发育初期的表达分析

‘EC1’为黄瓜单性结实自交系, ‘8419s-1’为非单性结实自交系。本试验中研究了黄瓜的 3 种果实发育模式: 正常的授粉受精的果实发育模式, 如 ‘8419s-1’授粉处理; 天然的单性结实果实发育模式, 如 ‘EC1’夹花处理; 坐果失败的果实发育模式, 即化瓜, 如 ‘8419s-1’夹花处理。

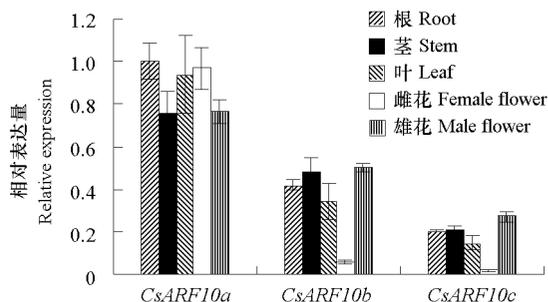


图 4 *CsARF10a*、*b*、*c* 在黄瓜不同器官中的表达

以在根中的表达量为 1。

Fig. 4 The expression of *CsARF10a*, *b*, *c* genes in different organs
The expression of *CsARF10a* in root as 1.

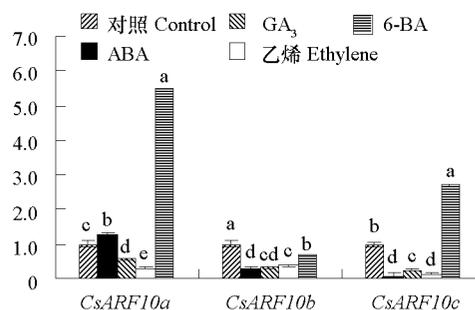


图 6 黄瓜幼苗经 ABA、 GA_3 、乙烯和 6-BA 处理后 *CsARF10a*、*b*、*c* 基因的相对表达量

分别以 *CsARF10a*、*b*、*c* 各自对照 (未经激素处理的样品) 的表达量为 1。

Fig. 6 The expression of *CsARF10a*, *b*, *c* genes after spraying the $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of ABA, GA_3 , ethylene and 6-BA

The expression of *CsARF10a*, *b*, *c* genes at $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ were as control.

CsARF10a 基因在单性结实黄瓜随发育时间的推移, 表达量逐渐升高随后再降低, 处理第 4 天表达量最高, 约为对照的 4.3 倍。在正常授粉受精的正常瓜中表达量的变化趋势与单性结实黄瓜的相同, 但各时期均较低, 处理第 4 天的表达水平约为对照的 3.46 倍。在坐果失败的化瓜中, 随发育时间推移表达量逐渐升高, 处理第 6 天表达量最高, 约为对照的 3.65 倍, 且分别是同期单性结实黄瓜和正常瓜的 2.85 倍和 4.68 倍 (图 7)。

CsARF10b 在单性结实黄瓜中, 随发育时间的推移, 表达量先降低后逐渐升高, 处理第 4 天表达量最高, 约为对照的 3.28 倍, 之后再降低。在正常瓜中, 随发育时间的推移, 其表达量逐渐升高, 处理第 4 天最高, 约为对照的 1.54 倍, 之后再降低, 处理第 6 天基本恢复到对照的水平。在化瓜中, 随发育时间推移表达量逐渐升高, 处理后第 4 天表达量最高, 约为对照表的 1.84 倍, 之后略有降低, 在处理第 6 天约为对照的 1.79 倍, 分别是同期单性结实黄瓜和正常瓜的 5.77 倍和 1.72 倍 (图 7)。

CsARF10c 基因在不同处理下黄瓜果实各发育时期其相对表达量与 *CsARF10b* 基因在相同条件下的变化趋势相同。但在处理第 4 天, *CsARF10b* 的表达量在坐果失败的化瓜和正常授粉受精的正常瓜中的表达量低于单性结实黄瓜的表达量, 而 *CsARF10c* 正好与之相反 (图 7)。

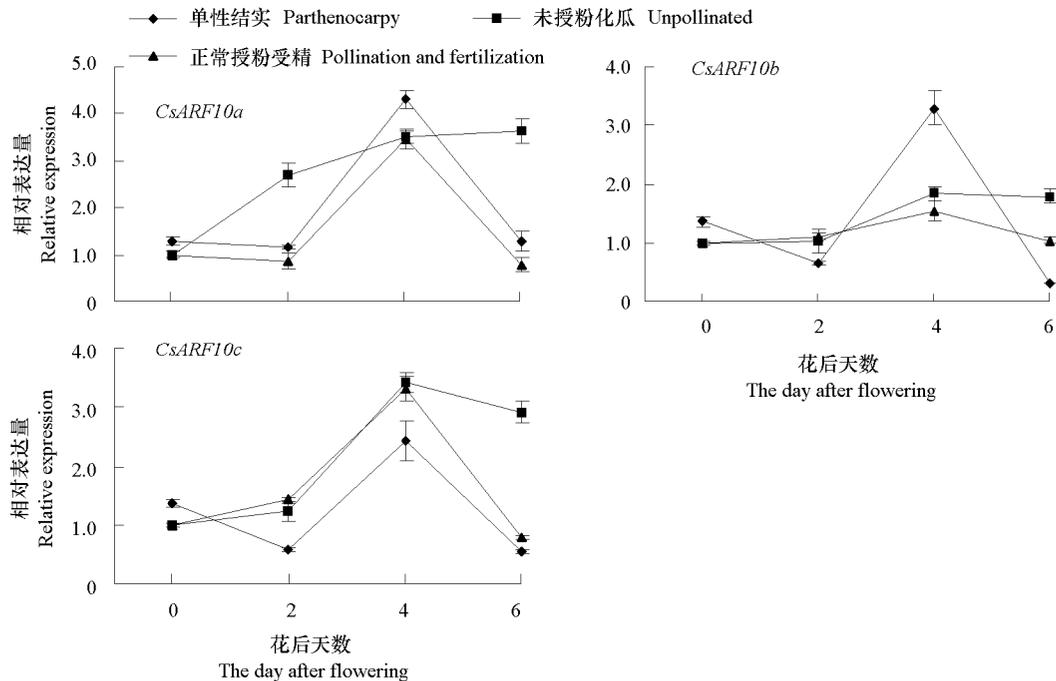


图 7 *CsARF10a*、*b*、*c* 在黄瓜果实发育不同时期的相对表达

分别以开花当天未授粉的果实中的表达量为 1。

Fig. 7 The expression of *CsARF10a*, *b*, *c* genes in the different stages of cucumber fruit development

The expression of *CsARF10a*, *b*, *c* genes in the un-pollinated fruits at 0 day as 1.

3 讨论

本研究中克隆了 3 个黄瓜 *ARF* 基因, 分别命名为 *CsARF10a*、*CsARF10b*、*CsARF10c*。系统进化树分析表明 *CsARF10a* 与番茄 *SlARF10* 基因进化距离较近, 而 *CsARF10b* 和 *CsARF10c* 与拟南芥 *AtARF10* 相似性更高; 蛋白序列比对证明 *CsARF10a*、*b*、*c* 与拟南芥 *AtARF10*、番茄 *SlARF10* 和水稻 *OsARF10* 具有相同且高度保守的功能结构域, 包括一个 DNA 结合结构域 (DBD)、一个 AUX/IAA

二聚化功能域(CTD)和一个中间区域,与前人的研究报道相符(Ulmasov et al., 1999; Tom & Gretchen, 2007; Hendelman et al., 2012)。此外,研究还发现 *CsARF10a*、*b*、*c* 的中间非保守域富含丝氨酸、脯氨酸、亮氨酸和甘氨酸残基,应属于抑制结构域(RD)。

ARF 家族基因的时空表达模式是多样化的,而 *ARF* 亚家族基因的表达差异性更明显(罗华等, 2012)。本研究中发现 *CsARF10a*、*b*、*c* 基因在各组织器官中有着明显的差异表达: *CsARF10a* 在根中表达水平最高,其次为雌花和叶,在茎中表达最低,其中根的略低于雄花的表达量,但差异不显著。*CsARF10b*、*c* 在雄花中表达水平最高,其次为茎、根和叶,在雌花中表达最低。有研究表明基因表达的组织特异性可能与内含子有关,如对钙粘蛋白基因表达的顺式调节元件的研究显示,钙粘蛋白基因在卵黄囊内的表达不依赖内含子-2,而晶状体和唾液腺中的表达完全依赖内含子-2 作为顺式调节元件(Stemmler et al., 2005)。本研究中发现 *CsARF10a*、*b*、*c* 的基因组结构是不同的,含有不同数量和大小的内含子,这可能是导致 *CsARF10a*、*b*、*c* 时空表达差异性的其中一个原因。许多研究认为启动子是调控基因时空特异性表达的主要原因,因为启动子包含很多顺式作用元件,例如激素应答相关的、光调节相关的、温度诱导相关的顺式作用元件,能够调控启动子下游的基因以特定的强度、在特定的时间和空间进行表达(张毅等, 2007)。因此,本研究中比较分析了 *CsARF10a*、*b*、*c* 基因的启动子序列,预测了 *CsARF10a*、*b*、*c* 基因的启动子区域存在有多种激素响应、胁迫响应、组织形态建成相关以及与植物的生理节律相关的作用元件,并且发现 *CsARF10a*、*b*、*c* 启动子的元件存在较大的差异;荧光定量 PCR 结果也显示 *CsARF10a*、*b*、*c* 基因在不同激素以及不同激素浓度的处理下呈现不同的表达模式,这些结果间接或直接的证明了启动子是调控 *CsARF10a*、*b*、*c* 基因差异性表达的另一个原因。此外,有研究发现 *ARF10* 在转录水平还能受到 microRNA 的调控,如在番茄中,miR160 在 *SLARF10* 诱导的叶形态变化和果实形态变化是必不可少的(Hendelman et al., 2012),因此在将来的研究中,计划从 microRNA 的角度对 *CsARF10a*、*b*、*c* 的表达调控模式进行进一步的研究。

ARF 家族基因在果实发育的过程中也发挥着重要的作用,拟南芥中, *AtARF8* 作为信号传导分子直接调控果实发育对生长素的反应,是拟南芥果实起始发育的负调控因子(Goetz et al., 2006)。番茄 *SLARF8* 的异常表达可导致番茄果实的单性结实(Goetz et al., 2007)。有报道表明 *ARF10* 参与调控了果实发育过程,在番茄中超量表达 *SLARF10* 基因,可以诱导单性果实的形成(Hendelman et al., 2012)。本试验中 *CsARF10* 亚家族基因的相对表达量在黄瓜果实发育的不同时期有显著的变化,尤其在果实处理第 6 天,坐果失败的化瓜中 *CsARF10* 亚家族基因的表达量显著高于单性结实黄瓜和正常授粉受精的正常瓜中 *CsARF10* 亚家族基因的表达量。而此时坐果失败的化瓜,单性结实黄瓜和正常授粉受精的黄瓜呈快速膨大的趋势。已有研究表明番茄中 *SLARF10* 基因能够间接的抑制细胞的伸长和种子的形成(Hendelman et al., 2012),因此推测黄瓜化瓜的果实之所以停止发育和膨大,可能与 *CsARF10* 基因持续性的大量表达有关,高水平的 *CsARF10* 可能会抑制了黄瓜果实细胞的伸长与膨大,从而导致化瓜。

有研究发现拟南芥 *AtARF10* 和 *AtARF16* 蛋白具有较高的相似性且在功能上有一定的冗余性(Okushima et al., 2005; Wang et al., 2005)。本研究发现 *CsARF10* 家族基因在各组织器官中都有表达,那么 *CsARF10a*、*b*、*c* 基因在功能上是否也存在一定的冗余性?此外,还发现 *CsARF10a* 在黄瓜的各器官中的表达量均显著高于 *CsARF10b*、*c*,那么 *CsARF10a* 是否在整个黄瓜 *CsARF10* 亚家族基因中行使着主要的功能?因此,计划在将来的研究中分别构建 *CsARF10a*、*b*、*c* 基因的超量表达及沉默表达的转基因植株,通过对转基因植物的表型及分子鉴定,进一步明确 *CsARF10a*、*b*、*c* 基因的功能,特别是在果实发育中的具体调控功能。

References

- Goetz M, Vivian-Smith A, Johnson S D, Koltunow A M. 2006. Auxin response factor 8 is a negative regulator of fruit initiation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 18 (8): 1873 - 1886.
- Goetz M, Vivian-Smith A, Johnson S D, Koltunow A M. 2007. Expression of aberrant forms of AUXIN RESPONSE FACTOR 8 stimulates parthenocarp in *Arabidopsis* and tomato. *Plant Physiology*, 145 (2): 351 - 366.
- Hendelman A, Buxdorf K, Stav R, Kravchik M, Arazi T. 2012. Inhibition of lamina outgrowth following *Solanum lycopersicum* AUXIN RESPONSE FACTOR10 (*SLARF10*) derepression. *Plant Molecular Biology*, 78: 561 - 576.
- Kumar R, Tyagi A K, Sharma A K. 2011. Genome-wide analysis of auxin response factor (ARF) gene family from tomato and analysis of their role in flower and fruit development. *Molecular Genetics and Genomics*, 285 (3): 245 - 260.
- Li Ji-sheng, Dai Xin-hua, Zhao Yun-de. 2006. A role for *auxin response factor19* in auxin and ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 140 (3): 899 - 908.
- Liu Xiao-dong, Huang Jian, Wang Yao, Khanna K, Xie Zhi-xin, Owen H A, Zhao Da-zhong. 2010. The role of *floral organs* in carpels, an *Arabidopsis* loss-of-function mutation in *MicroRNA160a*, in organogenesis and the mechanism regulating its expression. *The Plant Journal*, 62 (3): 416 - 428.
- Liu Zhen-hua, Yu Yan-chong, Xiang Feng-ning. 2011. Auxin response factors and plant growth and development. *Hereditas (Beijing)*, 33 (12): 1335 - 1346. (in Chinese)
- 刘振华, 于延冲, 向凤宁. 2011. 生长素响应因子与植物的生长发育. *遗传*, 33 (12): 1335 - 1346.
- 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.
- Okushima Y, Overvoorde P J, Arima K, Alonso J M, Chan A, Chang C, Ecker J R, Hughes B, Lui A, Nguyen D, Onodera C, Quach H, Smith A, Yu Gui-xia, Theologis A. 2005. Functional genomic analysis of the *AUXIN RESPONSE FACTOR* gene family members in *Arabidopsis thaliana*: Unique and overlapping functions of *ARF7* and *ARF19*. *The Plant Cell*, 17 (2): 444 - 463.
- Remington D L, Vision T J, Guilfoyle T J, Reed J W. 2004. Contrasting modes of diversification in the AUX/IAA and ARF gene families. *Plant Physiology*, 135 (3): 1738 - 1752.
- Stemmler M P, Hecht A, Kemler R. 2005. E-cadherin intron2 contains cis-regulatory elements essential for gene expression. *Development*, 132: 965 - 976.
- Tian Chang-en, Muto H, Higuchi K, Matamura T, Tatematsu K, Koshiba T, Yamamoto K T. 2004. Disruption and overexpression of *auxin response factor 8* gene of *Arabidopsis* affect hypocotyl elongation and root growth habit, indicating its possible involvement in auxin homeostasis in light condition. *The Plant Journal*, 40 (3): 333 - 343.
- Tiwari S B, Hagen G, Guilfoyle T. 2003. The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *The Plant Cell*, 15 (2): 533 - 543.
- Tom J G, Gretchen H. 2007. Auxin response factors. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 453 - 460.
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle T J. 1999. Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *The Plant Journal*, 19 (3): 309 - 319.
- Waller F, Furuya M, Nick P. 2002. *OsARF1*, an auxin response factor from rice, is auxin-regulated and classifies as a primary auxin responsive gene. *Plant Molecular Biology*, 50 (3): 415 - 425.
- Wang Dai-kai, Pei Ke-mei, Fu Ya-ping, Sun Zong-xiu, Li Su-jian, Liu He-qin, Tang Kan, Han Bin, Tao Yue-zhi. 2007. Genome-wide analysis of the auxin response factors (ARF) gene family in rice (*Oryza sativa*). *Gene*, 394 (1 - 2): 13 - 24.
- Wang Jia-wei, Wang Ling-jian, Mao Ying-bo, Cai Wen-juan, Xue Hong-wei, Chen Xiao-ya. 2005. Control of root cap formation by MicroRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17 (8): 2204 - 2216.
- Wang Lei, Chen Jin-feng, Lou Li-na, Lou Qun-feng. 2011. Sequence characteristics of ARF gene family of cucumber and an expression analysis of some members during early development of fruits. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (4): 717 - 724. (in Chinese)
- 王 垒, 陈劲枫, 娄丽娜, 娄群峰. 2011. 黄瓜ARF家族序列特征及部分成员在果实发育早期的表达分析. *园艺学报*, 38 (4): 717 - 724.
- Zhang Yi, Yin Hui, Li Dan, Zhu Wei-wei, Li Qiu-li. 2007. The cis-elements and transcription factors of plant environmental response promoters. *China Biotechnology*, 27 (7): 122 - 128. (in Chinese)
- 张 毅, 尹 辉, 李 丹, 朱巍巍, 李秋莉. 2007. 植物环境响应启动子的诱导元件及转录因子. *中国生物工程杂志*, 27 (7): 122 - 128.