

黄瓜果实中 *ARF* 和 *Aux/IAA* 基因 对外源激素的应答

王 垒, 陈劲枫*, 娄丽娜, 娄群峰, 贾 利

(南京农业大学 作物遗传与种质资源创新国家重点实验室, 南京 210095)

摘 要: 以非单性结实黄瓜自交系‘6429’为试验材料, 对当天开花的果实进行 CPPU、Spd、NAA、2, 4-D 和 IAA 等 5 种生长物质处理, 以清水为对照, 选取 9 个 *ARF* 基因 (*Csa019264*、*Csa019265*、*Csa009209*、*Csa009210*、*Csa021954*、*Csa012237*、*Csa012805*、*Csa015176*、*Csa010564*) 和 5 个 *Aux/IAA* 基因 (*Csa003118*、*Csa012115*、*Csa016715*、*Csa006680*、*Csa018571*) 设计特异引物, 取开花当天与花后第 2、4 天的果实及其茎、叶作 RT-PCR 分析。结果显示, 9 个 *ARF* 基因的表达水平显示出了很大的差异, *Csa012805* 在所有激素处理后的果实中都有较高水平的表达而清水处理中未检测到; 5 个 *Aux/IAA* 基因中的 4 个在 6 种处理后的果实及茎叶中都有表达, 推测是组成型表达基因, *Csa016715* 在激素处理后的果实中比清水处理的未发育果实中的表达水平高。推测 *Csa012805* 和 *Csa016715* 这 2 个基因对黄瓜果实膨大起促进作用。

关键词: 单性结实; *ARF*; *Aux/IAA*; 表达; 果实发育

中图分类号: Q786 文献标志码: A

Expression Analysis about Some *ARF* and *Aux/IAA* Family Members in Fruits of Cucumber with Exogenous Hormones

WANG Lei, CHEN Jinfeng*, LOU Lina, LOU Qunfeng, JIA Li

(State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The fruits of just after flowering were treated by shimizu, CPPU, Spd, NAA, 2, 4-D and IAA, nine *ARF* genes *Csa019264*, *Csa019265*, *Csa009209*, *Csa009210*, *Csa021954*, *Csa012237*, *Csa012805*, *Csa015176*, *Csa010564* and five *Aux/IAA* genes *Csa003118*, *Csa012115*, *Csa016715*, *Csa006680*, *Csa018571* were used to do RT-PCR analysis in the non-parthenocarpic inbred line ‘6429’. The results indicated that mRNA levels of nine *ARF* genes showed significant difference. But the transcripts of four *Aux/IAA* genes can be found in all the samples, which are maybe constitutive genes. *Csa012805* and *Csa016715* had more transcripts in the fruits after hormone treatment than that in the fruits after fresh water treatment. Therefore, it could be speculated that these genes may play a positive role in promoting fruit development of cucumber.

Key words: parthenocarpy; *ARF*; *Aux/IAA*; expression; fruit development

单性结实是指子房不经过授粉或别的刺激而发育成果实的现象^[1]。单性结实性是保护地黄瓜专用

新品种选育的主要目标性状之一。

天然单性结实黄瓜开花当天子房的生长素含量

①收稿日期: 2010-09-08; 修改稿收到日期: 2011-05-17

基金项目: 国家 973 项目 (2009CB11900F01); 国家自然科学基金重点项目 (30830079)

作者简介: 王 垒 (1986-), 男 (汉族), 硕士研究生, 主要从事蔬菜遗传育种与生物技术研究。E-mail: 2008104049@njau.edu.cn

* 通讯作者: 陈劲枫, 教授, 博士生导师, 主要从事蔬菜遗传育种与生物技术。E-mail: jfchen@njau.edu.cn

是非单性结实的 2 倍,说明黄瓜天然单性结实与子房中的高含量 IAA 有关^[2]。生产上也常用生长素类似物诱导黄瓜单性结实。同时近年来一些研究证实生长调节物质多胺 Spd 和细胞分裂素 CPPU 也可以较好地诱导黄瓜单性结实^[3,4]。其中生长素被认为是调控子房发育形成果实的最主要激素^[5]。这些研究主要体现在植物生长物质对单性结实的诱导效率和果实的形态方面,鉴于单性结实的复杂性,关于这些诱导单性结实的物质是如何调控黄瓜单性结实的分子机制的研究尚未见报道。在其他作物中研究发现生长素的转录调控受 Aux/IAA (Auxin/indole 3-acetic acid) 蛋白和转录因子 ARF (Auxin response factor) 家族的影响, Aux/IAA 能和 ARFs 形成杂合二聚体,在生长素的作用下, Aux/IAA 被降解,从而调动生长素信号途径,启动果实发育^[6,7]。将番茄中的 IAA9 基因反义抑制后,植株获得了单性结实特性^[8]。最近研究也证实在拟南芥和番茄中 ARF 基因家族中 ARF8 的突变和 ARF7 的负调控均可以导致在没有授粉受精的情况下果实开始发育从而产生单性结实果实^[9-11]。

本研究根据基因的同源性研究 ARF 基因家族和 Aux/IAA 家族在外源生长物质诱导黄瓜单性结实过程中的表达特点,以期明确黄瓜单性结实形成的分子机理,从而为黄瓜单性结实品种的选育及黄瓜果实品质的改良提供理论基础,同时为其他瓜类和茄果类蔬菜的单性结实研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

以选育的黄瓜非单性结实自交系‘6429’为材料,于 2009 年秋季,定植在南京农业大学江浦园艺农场。

1.2 方法

1.2.1 处理 黄瓜幼苗期取茎;在盛花期取叶片;对次日将开的花进行束花隔离,第 2 天对子房做 6 种处理:(1)不授粉+清水,取第 0、2、4 天果实样;(2)不授粉+100 mg/L 的 CPPU;(3)不授粉+1 mmol/L 的 spd;(4)不授粉+100 mg/L 的 NAA;(5)不授粉+15 mg/L 的 2,4-D;(6)不授粉+3 000 mg/L 的 IAA;取样时间为激素处理后的第 2、4 天,取样后经液氮处理并于-70℃保存备用。

1.2.2 总 RNA 提取及反转录 按改良 CTAB 法提取 RNA,并参照 TAKARA 公司的 DNase I 试剂盒说明书消除微量 DNA 污染。参照全式金公司反

转录试剂盒说明书进行反转录反应。

1.2.3 ARF 和 Aux/IAA 家族成员基因确认和 PCR 引物设计 检索黄瓜基因组数据库得到 18 个 ARF 基因和 28 个 Aux/IAA 基因,选取 9 个 ARF 基因和 5 个 Aux/IAA 基因用 Primer 5.0 设计特异引物,引物委托上海英杰生命技术有限公司 (Invitrogen Biotechnology CO., Ltd) 合成。首先对每个基因设计一对特异引物,用琼脂糖检测该引物扩增带的特异性并测序,选择与本实验要求相符的引物(表 1)。

1.2.4 PCR 扩增 优化的 PCR 反应体系总体积为 20 μL,各成分为 10×buffer 2.0 μL, dNTP mix 1.5 μL, 10 mmol/L 正反向引物各 1 μL, Taq 酶 0.2 μL, 2.5 mmol/L MgCl₂ 2 μL, cDNA 模板 1 μL, 无菌去离子水补足到 20 μL。PCR 反应扩增程序为 94℃预变性 5 min, 94℃变性 30 s, 退火 30 s(退火温度见表 1), 最后 72℃延伸 7 min, 31 个循环,每个 RT-PCR 分析重复 3 次。PCR 扩增平台期的确定是半定量 PCR 成功的关键,为了保证 RT-PCR 扩增中 cDNA 模板量的一致性及确定目标基因的相对表达量,对于内参 Actin 进行了 22、25、28、31 和 34 个循环的扩增,选择最佳循环次数。试验以黄瓜肌动蛋白 Actin(AB010922)为内标, Actin 引物序列为 5'-TGACGCAGATAATGTTTGAGA-3' 和 5'-AGAGATGGCTGGAATAGAACT-3'。

2 结果与分析

2.1 黄瓜 ARF 家族和 Aux/IAA 家族序列分析

根据拟南芥和水稻的 ARF 和 Aux/IAA 家族的蛋白序列,利用序列同源性检索黄瓜基因组数据库,对得到的黄瓜 ARF 和 Aux/IAA 基因经序列分析、构建系统进化树及在 NCBI 上比对,分别选取与单性结实基因 ARF7、ARF8 和 IAA9 序列同源性高并处于同一进化枝且有代表性的 9 个 ARF 和 5 个 Aux/IAA 基因。9 个 ARF 基因分别是 Csa019264、Csa019265、Csa009209、Csa009210、Csa021954、Csa012237、Csa012805、Csa015176、Csa010564, 5 个 Aux/IAA 基因分别是 Csa003118、Csa012115、Csa016715、Csa006680、Csa018571(表 2)。

2.2 黄瓜 ARF 和 Aux/IAA 基因家族成员在果实中的诱导表达分析

3 次半定量 RT-PCR 分析结果稳定(图 1)显示:CPPU 诱导黄瓜 ARF 家族基因 Csa019264、Csa012805、Csa015176 的表达,上调 ARF 家族 Csa019265

和 *Aux/IAA* 家族 *Csa003118* 和 *Csa016715* 的表达; Spd 诱导 *ARF* 家族成员 *Csa019264*、*Csa021954*、*Csa012805* 的表达和 *Aux/IAA* 家族 *Csa016715* 的表达; NAA 诱导 *Csa019264*、*Csa012237*、*Csa012805*、*Csa015176*、*Csa016715* 的表达; 2, 4-D 诱导 *Csa021954*、*Csa012237*、*Csa012805*、*Csa015176*、*Csa010564* 的表达, 上调 *Aux/IAA* 家族 *Csa016715*, 抑制了 *Csa009210* 的表达; IAA 诱导 *Csa019264*、*Csa021954*、*Csa012237*、

015176、*Csa016715* 的表达; 2, 4-D 诱导 *Csa021954*、*Csa012237*、*Csa012805*、*Csa015176*、*Csa010564* 的表达, 上调 *Aux/IAA* 家族 *Csa016715*, 抑制了 *Csa009210* 的表达; IAA 诱导 *Csa019264*、*Csa021954*、*Csa012237*、

表 1 14 个基因半定量 RT-PCR 分析的引物序列、退火温度和扩增产物

Table 1 Six genes analyzed by semi RT-PCR and their primer sequences, annealing temperature, and product size

基因 Gene	引物 Primer(5'→3')	退火温度 Annealing temperature/ °C	产物大小 Product size/bp
<i>Csa019264</i>	5'-CATCAGGTTTGGT CAGG-3' 5'-GGAGGTAGGTTCCGGTAA-3'	53.2	208
<i>Csa019265</i>	5'-TACTTTCTCCCGAGGACTTT-3' 5'-GACGGTAATCCCGAAACAT-3'	50.8	121
<i>Csa009209</i>	5'-TTGTTTCGT TACTCCAGT-3' 5'-TGTTTGAAGGGTCATTTGT-3'	52.0	206
<i>Csa009210</i>	5'-AGCCCATTTATACCGCCTCA-3' 5'-TGCCCAACAATCCACTACTCAAAG-3'	54.2	852
<i>Csa021954</i>	5'-TTTTAGTCCTCAGGCTCCG-3' 5'-ATGCAAGTCCCTCGCAAT-3'	53.8	499
<i>Csa012237</i>	5'-GGTAGATGCGTCCCAAAG-3' 5'-AGAAAGGCAAGCCGAGGT-3'	52.3	661
<i>Csa012805</i>	5'-TACTAAGAGTACAATGGGATG-3' 5'-CTGAGCCACGGATAAAGGT-3'	51.4	636
<i>Csa015176</i>	5'-CAGAATGTGAAGCGTGT-3' 5'-GACCGAAAGGTTGAGTGT-3'	50.9	753
<i>Csa010564</i>	5'-GGTGGAGTGTCTTTGTTAGT-3' 5'-AGAATTTGAAGCAGCAGTA-3'	54.0	695
<i>Csa003118</i>	5'-GAAACGCCA ACGACTATCT-3' 5'-TTCGCTCTT GCTCTGCTT-3'	53.0	163
<i>Csa012115</i>	5'-TGTGAGCCAAGGGAAGTT-3' 5'-AGCAGGAGCATTGTTGTG-3'	52.5	187
<i>Csa016715</i>	5'-AGAAGATGGGATTTGAAGAG-3' 5'-GATCAGCGGTGAGGACAG-3'	53.5	249
<i>Csa006680</i>	5'-ACTTCAACCGACGATCAAT-3' 5'-GCATTTGGAGGTATCAGAGTT-3'	54.0	126
<i>Csa018571</i>	5'-AATCTGATGGAACAACCC-3' 5'-AGAAGAGCTACGCAGCAAT-3'	54.0	113

表 2 黄瓜 9 个 *ARF* 和 5 个 *Aux/IAA* 的具体信息

Table 2 Nine *ARF* and five *Aux/IAA* genes in cucumber

基因 Gene	染色体 Chromosome	基因组位置 Genome location	氨基酸大小 Amino acid length	同源基因(拟南芥) Homologous gene (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	相似性 Similarity /%
<i>Csa019264</i>	5	17872678~ 17874998	213	<i>ARF8</i>	86
<i>Csa019265</i>	5	17885461~ 17895443	647	<i>ARF8</i>	90
<i>Csa009209</i>	2	5977902~ 5980983	172	<i>ARF7</i>	90
<i>Csa009210</i>	2	5986480~ 5991712	862	<i>ARF7</i>	75
<i>Csa021954</i>	1	16164257~ 16169437	831	<i>ARF6</i>	96
<i>Csa012237</i>	6	11587055~ 11594085	1102	<i>ARF7</i>	61
<i>Csa012805</i>	5	16166488~ 16172179	680	<i>ARF9</i>	94
<i>Csa015176</i>	6	8831082~ 8833936	716	<i>ARF10</i>	99
<i>Csa010564</i>	5	11524295~ 11533110	677	<i>ARF1</i>	97
<i>Csa003118</i>	5	18461507~ 18463184	222	<i>IAA3</i>	94
<i>Csa012115</i>	6	22164432~ 22172966	404	<i>IAA9</i>	92
<i>Csa016715</i>	7	12221383~ 12223605	230	<i>IAA7</i>	97
<i>Csa006680</i>	2	1445103~ 1446156	197	<i>IAA4</i>	99
<i>Csa018571</i>	2	17733510~ 17737848	427	<i>IAA9</i>	78

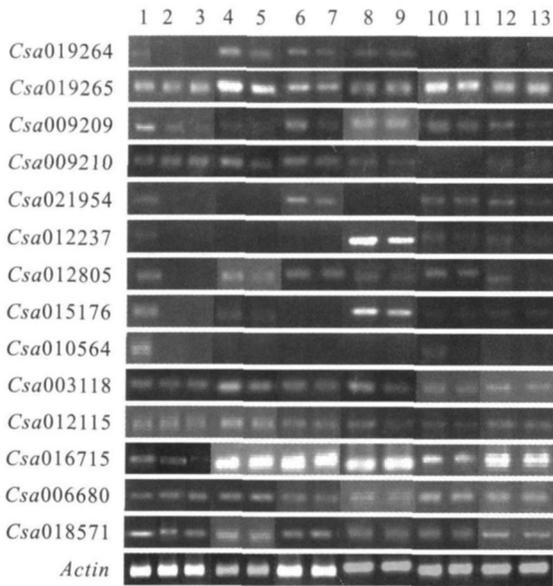


图1 *ARF* 和 *Aux/IAA* 家族成员在
黄瓜果实中的 RT-PCR 扩增

1. 处理前子房; 2, 3. 清水处理后第 2, 4 天的果实; 4~ 13 分别
表示 CPPU、Spd、NAA、2, 4-D、IAA 处理后的第 2, 4 天果实

Fig. 1 RT-PCR amplified products for the detection of *ARF*
genes and *Aux/IAA* family members in fruits of cucumber

1. The ovary before treatment; 2, 3. The fruits of two and four
days after shimizu treatment; 4~ 13 indicates the fruits of two and
four days after CPPU, Spd, NAA, 2, 4-D, IAA treatment

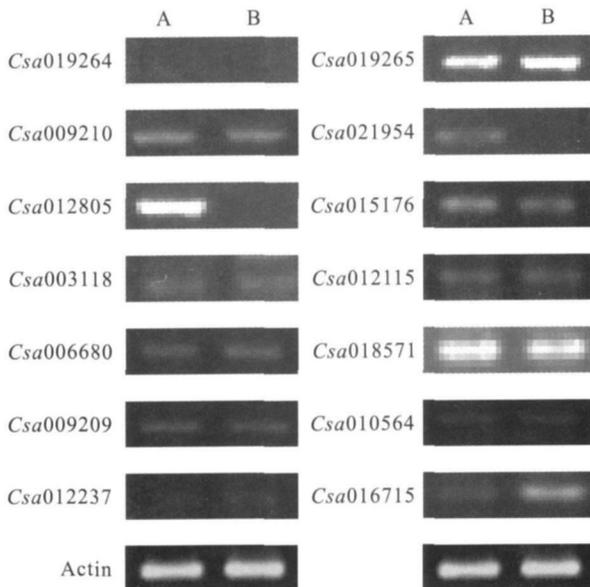


图2 *ARF* 与 *Aux/IAA* 在黄瓜茎叶中的 RT-PCR 扩增
A. 茎; B. 叶

Fig. 2 RT-PCR amplified products for the detection
of nine *ARF* genes and five *Aux/IAA* genes
in stem and leaf of cucumber

A. Stem; B. Leaf

Csa012805、*Csa015176* 的表达, 同样上调 *Aux/IAA* 家族 *Csa016715* 的表达水平。其中基因 *Csa012237* 受 NAA 诱导效果较好, 这 5 种生长调节剂均上调了基因 *Csa016715* 的表达水平; NAA、IAA、2, 4-D 虽然同为生长素但对黄瓜 *ARF* 家族的诱导效果却不相同; *Csa012805* 和 *Csa016715* 均被 5 种生长物质所诱导上调, 推测这 2 个基因对黄瓜果实膨大起促进作用。

2.3 黄瓜 *ARF* 和 *Aux/IAA* 家族成员在茎叶中的表达

由图 2 可以看出, 在茎叶中未检测到 *ARF* 家族基因 *Csa019264* 的表达, *Csa019265* 和 *Csa018571* 在茎叶中表达水平较高, 在叶片中未检测到 *Csa021954* 和 *Csa012805* 的表达, *Csa012237* 在茎叶中表达极微弱, *Csa010564* 在茎叶中表达水平也较低, 预示着这个基因家族的成员在功能上已经出现了高度分化。 *Aux/IAA* 基因家族基因的表达特点较为类似且都有较高水平的表达, 推测其功能存在冗余现象或者是组成型表达基因。

3 讨论

植物授粉受精后子房中的内源植物激素水平明显提高, 这些激素包括生长素和细胞分裂素等, 内源激素水平的提高启动了子房的生长发育。其中生长素被认为是调控子房发育形成果实的最主要激素。生长素信号传导途径中的 *Aux/IAA* 和 *ARF* 等 2 类转录因子也被证实与单性结实有关。对这 2 类转录因子家族对单性结实所起作用的研究在其他作物正蓬勃开展。黄瓜是世界重要的蔬菜作物之一, 黄瓜的单性结实性也是很重要的经济性状, 鉴于单性结实的复杂性, 对这 2 类转录因子对黄瓜单性结实分子调控机理方面的研究未见报道。黄瓜基因组测序计划已于 2009 年底完成^[12], 其基因组数据库也相应建立, 这为从全基因组范围内研究 *ARF* 和 *Aux/IAA* 等 2 类转录因子对黄瓜单性结实的贡献提供了便利。

本研究发现黄瓜中 *ARF* 家族成员在果实中的表达特点有很大差异, 预示着这些 *ARF* 基因已经高度分化可能具有不同的功能。所选的 5 个 *Aux/IAA* 基因家族成员表达特点比较类似, 可能在功能上存在冗余现象。

本试验选用被前人研究证实具有较好诱导单性结实的 5 种生长调节剂及较适浓度来处理非单性结实“6429”的子房, 在被诱导发育的果实中, *ARF* 家

族成员对 CPPU、Spd、NAA、2, 4-D 和 IAA 的诱导显示出了不同的响应特点, NAA、2, 4-D 和 IAA 虽然同为生长素类调节剂能引起类似的生理反应, 但在诱导生长素响应因子 ARF 的表达水平上显示了明显的差别, 这说明他们诱导基因表达的分子机制是有区别的。但这 5 种生长调节剂均诱导了 ARF 家族成员 *Csa012805* 的表达, 以及上调了 *Aux/IAA* 基因 *Csa016715* 的表达。由此推测, 生长素信号传

导途径中的这 2 个转录因子的高水平表达, 可能对下游基因的表达起激活作用, 与其他信号途径交织起来共同调控果实的发育及形态建成。下一步将对 *Csa012805* 和 *Csa016715* 进行 RNAi 和过表达进行功能验证, 以期从分子水平上揭示黄瓜单性结实的调控机理, 从而为黄瓜单性结实的育种奠定理论基础同时为其他作物单性结实研究提供参考。

参考文献:

- [1] GUSTAFSON FG. Parthenocarpy: natural and artificial[J]. *The Botanical Review*, 1942, 8: 598– 654.
- [2] KIM IS, OKUBO H, FUJIEDA K. Endogenous levels of IAA in relation to parthenocarpy in cucumber (*Cucumis sativus* L.)[J]. *Scientia Horticulturae*, 1992, 52: 1– 8.
- [3] 于杰. 黄瓜单性结实与多胺代谢的关系及多胺调控研究[D]. 江苏扬州: 扬州大学, 2003.
- [4] 叶青静. 黄瓜果实发育相关基因的克隆其表达调控的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2003.
- [5] PANDOLFINI T, MOLESINI B, SPENA A. Molecular dissection of the role of auxin in fruit initiation[J]. *Trends in Plant Science*, 2007, 12(8): 327– 329.
- [6] DHARMOSIRI N, ESTELLE M. Auxin signaling and regulated protein degradation[J]. *Trends in Plant Science*, 2004, 9(6): 302– 308.
- [7] LEYSER O. Dynamic integration of auxin transport and signaling[J]. *Current Biology*, 2006, 16(11): 424– 433.
- [8] WANG H, JONES B, LI ZH G, et al. The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis[J]. *Plant Cell*, 2005, 17: 2 676– 2 692.
- [9] GOETZ M, VIVIAN SMITH A, JOHNSON S D, et al. Auxin response factor8 is a negative regulator of fruit initiation in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(8): 1 873– 1 886.
- [10] GOETZ M, HOOPER L C, JOHNSON S D, et al. Expression of aberrant forms of auxin response factor8 stimulates parthenocarpy in *Arabidopsis* and tomato[J]. *Plant Physiology*, 2007, 145(2): 351– 366.
- [11] JONG M, DE WOLTERS ARTS M, FERON R, et al. The *Solanum lycopersicum* auxin response factor 7 (*SlARF7*) regulates auxin signaling during tomato fruit set and development[J]. *The Plant Journal*, 2009, 57: 160– 170.
- [12] HUANG S W, LI R Q, ZHANG ZH H, et al. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L.[J]. *Nature Genetics*, 2009, 41: 1 275– 1 281.