DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.03043

玉米生长素响应因子家族基因的表达模式分析

李文兰 李文才 孙琦 于彦丽 赵勐 鲁守平 李艳娇 孟昭东*

山东省农业科学院玉米研究所 / 小麦玉米国家工程实验室 / 农业部黄淮海北部玉米生物学与遗传育种重点实验室, 山东济南 250100

摘要: 生长素响应因子(auxin response factor, ARF)是一类重要的转录因子, 通过特异性地结合生长素响应元件调节下游靶基因的转录, 参与诸多植物生长发育过程的调控。玉米中有许多 *ARF* 家族基因, 但其表达模式有待深入研究。本研究分析了玉米 *ARF* 家族基因在不同组织器官中的表达, 发现除 *ARF10*、*ARF16* 和 *ARF34* 组成型表达外, 其余 32 个 *ARF* 基因的表达水平在生殖器官中要明显高于营养器官。对 *ARF* 基因启动子区的顺式作用元件分析显示, 28 个 *ARF* 基因的启动子区含有逆境胁迫相关顺式元件, 实时定量 PCR 分析结果显示, 多个 *ARF* 基因分别响应冷、热、盐和渗透胁迫。研究结果不仅暗示了 *ARF* 家族基因在玉米生殖生长和非生物逆境胁迫响应中的重要性, 也为全面解析 *ARF* 基因在玉米中的生物学功能提供有用信息。

关键词: *ARF*; 表达; 逆境胁迫; 玉米

A study of expression pattern of auxin response factor family genes in maize (*Zea mays* L.)

LI Wen-Lan, LI Wen-Cai, SUN Qi, YU Yan-Li, ZHAO Meng, LU Shou-Ping, LI Yan-Jiao, and MENG Zhao-Dong*

Maize Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences / National Engineering Laboratory of Wheat and Maize / Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Maize in Northern Yellow-Huai Rivers Plain, Ministry of Agriculture, Jinan 250100, Shandong, China

Abstract: Auxin response factors (ARFs) are important transcription factors which control the expression of target genes by binding specifically to auxin response elements, and are involved in a series of developmental processes in plant species. In maize genome, dozens of *ARF* genes are encoded, however, there is little known on their expression patterns. In this study, the analysis on the expression level of *ARF* genes in diverse tissues and organs revealed that expression level of 32 *ARF* genes were higher in reproductive organs than that in vegetative organs, except *ARF10*, *ARF16*, and *ARF34* constitutively expressed. The predicted results of *cis*-acting elements showed that the promoter regions of 28 *ARF* genes harbored the *cis*-regulatory elements related to abiotic stresses. Real-time quantitative PCR results indicated that expression of several *ARF* genes showed a response to cold, heat, and osmotic stresses, respectively. The results highlighted the importance of *ARF* family genes in reproductive growth and abiotic stress response, and provided useful information for the comprehensive analysis of the biological function of *ARF* genes in maize.

Keywords: auxin response factor; expression; abiotic stress; maize (*Zea mays* L.)

生长素响应因子(auxin response factor, ARF)是植物所特有的一类转录因子^[1], 通过特异性地结合生长素响应元件(AuxREs)调节下游靶基因的转录, 参与诸多植物生长发育过程的调控, 例如向性运动、顶端优势、干旱胁迫响应等。研究 *ARF* 基因的

表达模式对于全面了解玉米 *ARF* 基因家族的生物学功能具有重要意义。

生长素信号转导过程涉及早期响应基因(*AUX/IAA*、*GH3* 和 *SAUR* 基因家族等)和与 AuxREs 相互作用的 *ARF* 家族基因^[2]。ARF 蛋白结合到生长

本研究由山东省自然科学基金项目(ZR2019BC107)资助。

This study was supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2019BC107).

* 通信作者(Corresponding author): 孟昭东, E-mail: mengzhd@126.com

第一作者联系方式: E-mail: liwenlantutu@126.com

Received (收稿日期): 2020-07-07; Accepted (接受日期): 2020-11-13; Published online (网络出版日期): 2020-12-15.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.s.20201214.1748.004.html>

素调控基因启动子区的生长素响应元件(5'-TGTCTC-3')上,抑制或激活这些基因的转录^[3],从而影响植物的生长发育。拟南芥、水稻、二穗短柄草、鹰嘴豆和丹参等多种植物中的 *ARF* 基因已有相关研究^[4-9]。拟南芥中第一个被发现的 *ARF* 转录因子是 *ARF1*,是以人工合成的生长素响应元件为诱饵,通过活性很高的酵母单杂系统克隆得到的^[3]。*ARF1* 蛋白包括 665 个氨基酸, N 端包含 1 个 DNA 结合结构域;中间的一段区域富含脯氨酸,丝氨酸和苏氨酸含量也较高^[3],与其他富含脯氨酸结构域的转录抑制子和转录激活子序列类似^[4],该区域可能是转录抑制或转录激活结构域; C 端与 *Aux/IAA* 基因编码蛋白的结构域 III 和 IV 有类似结构^[3,10]。拟南芥中有 22 个基因编码 *ARF* 蛋白^[11],其中 *MP/ARF5* 参与胚胎发生与维管形成^[12]; *NPH4/ARF7* 参与植物向光性和向重力性^[13]; *ARF19* 控制叶扩展和侧根生长,并与 *NPH4/ARF7* 表现出功能冗余性^[14-15]; *ARF6* 和 *ARF8* 参与花成熟调控,且呈现功能冗余性^[16]。此外,马铃薯 *ARF6* 参与顶端休眠,调控与顶端分生组织连接维管束的发育^[17];水稻 *OsARF1* 受生长素诱导,参与胚芽鞘的向性运动^[18];番茄 *DRI2* 也是 *ARF* 家族基因,参与种子发育、幼苗生长和果实成熟^[19]。

玉米有 35 个 *ARF* 基因^[20],基因结构和进化关系等已有相关分析,但其表达模式还有待深入研究。关于 *ARF* 基因在玉米不同组织器官中的表达模式以及在冷、热、盐和渗透胁迫下的表达模式还未见详细报道。Liu 等^[20]通过全基因组序列分析,找到了 35 个玉米 *ARF* 基因,并对基因结构和进化关系等进行了分析。本研究拟通过分析 *ARF* 基因在玉米不同组织器官中的表达模式以及在冷、热、盐和渗透胁迫下的表达模式,探究 *ARF* 基因在玉米生长发育和逆境胁迫响应过程中的作用,为全面解析玉米 *ARF* 基因的生物学功能提供有用信息。

1 材料与方法

1.1 试验材料与生长条件

试验所用的玉米材料是 B73 自交系。分别取材播种后 14 d (V3 时期)的初级根、第 2 片叶、整个幼苗植株、播种后 25 d (V5 时期)的中部茎秆和播种后 34 d (V7 时期)的整个幼嫩雄花序及雌花序,用于实时定量 PCR 分析。逆境胁迫试验所用的材料在光照培养箱中进行长日照培养(16 h 光照/8 h 黑暗),生长 14 d。冷胁迫处理是将幼苗置于 4℃ 培养箱中进行处理,

热胁迫处理是将幼苗置于 40℃ 培养箱中进行处理,盐胁迫处理是利用 250 mmol L⁻¹ 的 NaCl 对幼苗进行处理,渗透胁迫处理是利用 15% PEG-6000 对幼苗进行处理。每种胁迫处理均在处理 0、1、2、4 和 8 h 后,收集对照植株和处理植株的第 2 片叶用于实时定量 PCR 分析。

1.2 RNA 提取和实时定量 PCR 分析

利用天根的多糖多酚总 RNA 提取试剂盒提取各样品的总 RNA,按照反转录试剂盒说明书完成 cDNA 的合成和纯化。实时定量 PCR 分析利用 Bio-Rad CFX96 实时定量检测系统(Bio-Rad, Hercules, CA, USA),引物序列见表 1, *18S rRNA* 基因作为内参基因,根据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算基因相对表达量。对于胁迫处理下玉米幼苗的 qRT-PCR 分析,将各处理 0 h 各基因表达量设为 1,并以此对照计算其在其他时间点的相对表达量。实验数据通过 SPSS18.0 软件进行差异性分析。

1.3 利用转录组数据对 *ARF* 基因进行表达分析

利用从 MaizeGDB 数据库获得的玉米 *ARF* 基因的 ID 号在 Genevestigator 网站(<http://www.genevestigator.com/gv/>)搜索 *ARF* 基因在不同组织器官中的转录表达数据,然后利用 Genevestigator 网站的系统软件对转录组表达数据进行分析,获得 *ARF* 基因在不同组织器官中的表达模式热点分布图^[21]。

1.4 启动子区顺式作用元件分析

利用 Gramene 网站(http://ensembl.gramene.org/Zea_mays/Info/Index)搜索确定玉米 *ARF* 家族基因起始密码子上游 1500 bp 的启动子区序列,利用 PlantCare 数据库(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)的顺式作用元件分析工具,对玉米 *ARF* 家族基因启动子区序列进行顺式作用元件分析^[22]。

2 结果与分析

2.1 玉米 *ARF* 家族基因在不同组织器官中的表达分析

为探究生长素响应因子 *ARF* 家族成员在玉米中的表达模式,我们利用实时定量 PCR 方法对 *ARF* 基因在 6 种不同组织器官(根、茎、叶、幼苗、幼嫩雄花序和幼嫩雌花序)中的表达量进行了检测(图 1)。*ARF10*、*ARF16* 和 *ARF34* 在玉米中组成型表达, *ARF1* 在茎、幼苗和雄花序中高表达, *ARF28* 在叶和雌花序中高表达,而剩余的 30 个基因均在雄花序和雌花序

表 1 实时定量 PCR 的引物序列

Table 1 Primer sequences for real-time quantitative PCR

基因名 Gene name	基因号 Gene accession	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'–3')
ARF1	Zm00001	arf1-s	CGTGTATATGTATCCTTCC
	d030803	arf1-a	ATTGTCTTCTGAGTACCA
ARF2	Zm00001	arf2-s	AAACGACTCTGGGTATGT
	d031064	arf2-a	CTGAAGGACTTGTGTCTG
ARF3	Zm00001	arf3-s	AACGGCATCTCTAACTAC
	d031522	arf3-a	ACGAATCTATGGAATTGAAC
ARF4	Zm00001	arf4-s	AGTTCCGATGGCAGTGTT
	d032683	arf4-a	CGAGGAACCGATGCAGAT
ARF5	Zm00001	arf5-s	CGCAACAACAACAGGCATG
	d001879	arf5-a	GGGCTAAAAAGGGACTGGTT
ARF6	Zm00001	arf6-s	AATCTCAGCAGCAGTTAA
	d001945	arf6-a	CTTGGGACTCTTGGTTTA
ARF7	Zm00001	arf7-s	CTAGTGACGCCCTGTACC
	d003601	arf7-a	AGTAATAGACACGCTCGC
ARF8	Zm00001	arf8-s	GTAGTTGAAGTGGATAATTGTT
	d041056	arf8-a	TCTGGAGAAGGCTGATTA
ARF9	Zm00001	arf9-s	TCTGAACCTCTGGTATCC
	d041056	arf9-a	AACAATTATCCACTTCAACTAC
ARF10	Zm00001	arf10-s	TGAACTCGAAATCAGCTGC
	d042267	arf10-a	AACTCCAACCTCCACTTGC
ARF11	Zm00001d	arf11-s	ATGTTACAGGGAATGGGAATG
	043431	arf11-a	CAACAGTTTGTAGGAGCAGACG
ARF12	Zm00001d	arf12-s	ATGGTAGACTTGATAGGA
	043922	arf12-a	CATATTCACAGTTCCAGTA
ARF13	Zm00001d	arf13-s	CAAGGCAATCACAATCTG
	049295	arf13-a	CTGTCTGTTCCATCCAAA
ARF14	Zm00001d	arf14-s	AATGACCGTTCTACTCCAATCA
	050781	arf14-a	CTATCTCAATGCCAAACAATCT
ARF15	Zm00001d	arf15-s	ATGAGGTCTTCGCCAGGAT
	051172	arf15-a	GGACTGTGTCTCAGCGTCTTG
ARF16	Zm00001d	arf16-s	AGAACATTGCTGATAGAT
	053819	arf16-a	TTGTGTATGACCTTGAAT
ARF17	Zm00001d	arf17-s	CCGTATATCCAAGGGTTTTG
	014013	arf17-a	ATGTGGGGTCTCTTTATGTCA
ARF18	Zm00001d	arf18-s	GCAGCAGATGGGGAAGCA
	014377	arf18-a	AACTCGACCGAACCGACG
ARF19	Zm00001d	arf19-s	AGAGGACGGCGGCAAGAT
	014507	arf19-a	TGCTCGCCCTCGGGTAGT
ARF20	Zm00001d	arf20-s	CCACCAATGAAGCAAGAA
	015243	arf20-a	GATAGACAACATCTGACACAT
ARF21	Zm00001d	arf21-s	AACAGAACAGCATTCACT
	014690	arf21-a	TGATTCACTGGAAGAGATG
ARF22	Zm00001d	arf22-s	GCTTTCGCCAGCCTCA
	016838	arf22-a	CCGGTGTCACCACCGATG

(续表 1)

基因名	基因号	引物名称	引物序列
Gene name	Gene accession	Primer name	Primer sequence (5'-3')
ARF23	Zm00001d	arf23-s	CTGAGAGGACGGTGAGCAA
	000358	arf23-a	CGCGACAGCCGAGAGGT
ARF24	Zm00001d	arf24-s	GCCACTTTCAAGTCAGATT
	036593	arf24-a	TTGGATTGTGCTCTCAGA
ARF25	Zm00001d	arf25-s	CCCTCTTCTGTTCTTATGTTT
	038698	arf25-a	TACTTCTTCACGGTTGGT
ARF26	Zm00001d	arf26-s	GCATTCGCCCTCTTCTGTT
	038698	arf26-a	AGGCTCGCTTCCATTTACA
ARF27	Zm00001d	arf27-s	TTCCATCTCAATCCTCAT
	039006	arf27-a	TCTATCCTCTTTCTTATTACAC
ARF28	GRMZM2	arf28-s	TTATGGTTCCAATACAAGAA
	G075715	arf28-a	CTCATTCTTATTCTTAGC
ARF29	Zm00001d	arf29-s	TTCAAGATCAGGGTTCAG
	011953	arf29-a	GATTCAACCGTCAGAGAA
ARF30	Zm00001d	arf30-s	CAAGTTCTTCAACATCAG
	045026	arf30-a	ATCCTGTATTATGGTTCAA
ARF31	Zm00001d	arf31-s	ACTCGCTGGGAAGAGGGCT
	023659	arf31-a	CCTTTTGTCTGCTTCACCAC
ARF32	Zm00001d	arf32-s	AGCTGGTGCGGGGCAAC
	025871	arf32-a	CCTGCAAGGCCTCAATGAC
ARF33	Zm00001d	arf33-s	AGTTGAATGCTCTTGGA
	026540	arf33-a	GTGAATCTGTGCTTCTTG
ARF34	Zm00001d	arf34-s	ATGCTGGGTTGTTTGGTT
	026590	arf34-a	GCGGCTAGAAAGTGAAT
ARF35	Zm00001d	arf35-s	ATGATATTGGAGCAGATG
	026687	arf35-a	AAGAGCATTATGGTGTTT
18S rRNA		18S-s	AAACGGCTACCACATCCAAG
		18S-a	CCTCCAATGGATCCTCGTTA

中优势表达。从整体空间表达上看，各基因的表达量高低呈现生殖器官>营养器官。玉米花序发育涉及小穗对原基、小穗原基、花器官原基等各类原基发育起始过程，在这些原基起始部位都存在生长素积累和转运^[23]。作为生长素响应因子，*ARF*基因在雌花序和雄花序中高水平表达，暗示*ARF*基因参与花序发育调控过程。

2.2 转录组数据库中玉米 *ARF* 家族基因在不同组织器官中的表达分析

为进一步了解玉米 *ARF* 家族基因的表达模式，我们利用 Genevestigator 数据库中的转录组数据对 *ARF* 家族基因在更多不同组织器官(41 个组织器官)中的表达模式进行了分析，共获得 31 个玉米 *ARF* 基因(未获得 *ARF9*、*ARF19*、*ARF26* 和 *ARF28* 这 4 个

基因的表达信息)的表达信息，结果如图 2 所示。除了花粉，*ARF10*、*ARF16* 和 *ARF34* 在所检测的其余组织器官中均有表达，这与实时定量 PCR 结果基本吻合。

ARF1 和 *ARF2* 在花药中优势表达，这与定量结果显示其在雄花序中优势表达是一致的。此外，除了 *ARF1* 和 *ARF2*，其余 29 个玉米 *ARF* 基因在雌花序发育(pistil, ovary, ear, spikelet)和种子发育过程(embryo, endosperm, embryo sac, embryo-surrounding region, basal endosperm transfer layer)中均有较高的表达量。这与实时定量 PCR 结果显示 *ARF* 基因在生殖器官发育过程中优势表达也是一致的。然而，与定量结果显示 *ARF* 基因在茎中低表达(除了 *ARF1* 和 *ARF10*)相反，有 29 个 *ARF* 基因(除 *ARF2* 和 *ARF3*) 在茎中具有较高的表达水平。这可能是由于取材时

图 1 玉米 ARF 家族基因在不同组织器官中的表达水平

Fig. 1 Expression patterns of ARF genes in different tissues and organs

R: 根; ST: 茎; L: 叶; S: 幼苗; T: 雄花序; E: 雌花序。图柱上的不同字母代表 Duncan's multiple range tests 的显著差异 ($P < 0.05$)。

R: root; ST: stem; L: leaf; S: seedling; T: tassel; E: ear. Values marked with different letters indicate significant differences at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range tests.

图 2 利用转录组数据获得的玉米 *ARF* 家族基因在不同组织器官中的表达水平

Fig. 2 Expression profile of *ARF* genes in different tissues of maize by Genevestigator analysis

图中每个基因在所有检测组织器官中的表达量设为 100%，颜色的深浅代表表达百分率。

The relative expression of each gene in all detected tissues and organs was set at 100%, and the shade of color represents the percentage of relative expression levels.

期和试验材料不同所造成的结果差异。结合转录组数据和实时定量 PCR 结果，我们可以推测 *ARF* 基因在玉米生长发育和生殖器官发育过程中均发挥着重要的作用。

2.3 玉米 *ARF* 家族基因的顺式作用元件分析

为更好了解玉米 *ARF* 家族基因在逆境胁迫响应

过程中的作用，我们对玉米 *ARF* 家族基因起始密码子上游 1500 bp 的启动子区进行顺式作用元件分析 (表 2)，除转录和光响应相关必需顺式作用元件，在玉米 *ARF* 家族基因的启动子区找到大量顺式作用元件，根据功能可分为：植物激素响应相关顺式作用元件 (Element A)、生长发育相关顺式作用元件

表 2 玉米 *ARF* 家族基因启动子区的顺式作用元件Table 2 Putative cis-acting elements identified from the promoter regions of *ARF* genes in maize

基因 Gene	元件 A Element A	元件 B Element B	元件 C Element C
<i>ARF1</i>	ABRE ¹ , AuxRR-core ¹ , CGTCA-motif ² , P-box ² , TGA-element ² , TGACG-motif ²		MBS ¹
<i>ARF2</i>	ABRE ³ , CGTCA-motif ³ , P-box ¹ , TGACG-motif ³	CAT-box ²	
<i>ARF3</i>	ABRE ³ , CGTCA-motif ⁴ , GARE-motif ⁴ , P-box ¹ , TGACG-motif ⁴	CAT-box ²	TCA-element ² , LTR ¹
<i>ARF4</i>	ABRE ¹ , CGTCA-motif ⁴ , P-box ¹ , TGACG-motif ⁴	GCN4_motif ¹	LTR ¹ , MBS ¹
<i>ARF5</i>	ABRE ¹ , CGTCA-motif ⁴ , GARE-motif ⁴ , TGA-element ¹ , TGACG-motif ⁴	CAT-box ³	TCA-element ¹ , LTR ²
<i>ARF6</i>	ABRE ² , CGTCA-motif ⁴ , TGA-element ¹ , TGACG-motif ⁴	CAT-box ² , RY-element ¹	MBS ¹
<i>ARF7</i>	ABRE ² , CGTCA-motif ⁴ , TGA-element ¹ , TGACG-motif ⁴	CAT-box ¹	LTR ³ , MBS ¹
<i>ARF8</i>	ABRE ² , CGTCA-motif ³ , GARE-motif ⁴ , TGACG-motif ³		LTR ¹ , MBS ¹ , TC-rich repeats ¹
<i>ARF9</i>	ABRE ² , CGTCA-motif ³ , GARE-motif ⁴ , TGACG-motif ³		LTR ¹ , MBS ¹ , TC-rich repeats ¹
<i>ARF10</i>	ABRE ¹ , CGTCA-motif ⁶ , TGACG-motif ⁶		
<i>ARF11</i>	ABRE ² , CGTCA-motif ² , TGA-element ¹ , TGACG-motif ²	CAT-box ²	TCA-element ¹
<i>ARF12</i>	ABRE ¹ , CGTCA-motif ⁴ , TGACG-motif ⁴	CAT-box ¹	MBS ²
<i>ARF13</i>	ABRE ² , CGTCA-motif ² , P-box ¹ , TGACG-motif ²		TC-rich repeats ¹
<i>ARF14</i>	ABRE ² , TGA-element ¹		TCA-element ²
<i>ARF15</i>	CGTCA-motif ³ , TGA-element ¹ , TGACG-motif ³		LTR ¹ , MBS ¹
<i>ARF16</i>	ABRE ¹ , AuxRR-core ¹ , CGTCA-motif ² , TGACG-motif ²	CAT-box ³	
<i>ARF17</i>	ABRE ¹ , CGTCA-motif ⁴ , TGA-element ¹ , TGACG-motif ⁴	RY-element ¹	MBS ¹ , TCA-element ¹
<i>ARF18</i>	ABRE ² , CGTCA-motif ⁴ , P-box ¹ , TGACG-motif ⁴		MBS ¹
<i>ARF19</i>	P-box ¹	CAT-box ¹	LTR ¹ , MBS ¹ , TCA-element ¹
<i>ARF20</i>	ABRE ³ , CGTCA-motif ⁴ , TGA-element ¹ , TGACG-motif ⁴		LTR ¹ , TCA-element ¹
<i>ARF21</i>	ABRE ⁷ , CGTCA-motif ² , TGACG-motif ²		MBS ¹
<i>ARF22</i>	ABRE ⁶ , CGTCA-motif ² , GARE-motif ⁴ , TGACG-motif ²	CAT-box ¹	
<i>ARF23</i>	ABRE ⁴ , AuxRR-core ¹ , CGTCA-motif ⁴ , TGA-element ² , TGACG-motif ⁴	CAT-box ¹	LTR ¹ , MBS ² , TCA-element ¹
<i>ARF24</i>	ABRE ³ , CGTCA-motif ² , GARE-motif ⁴ , P-box ² , TGACG-motif ²		MBS ¹ , TCA-element ¹
<i>ARF25</i>	ABRE ¹ , CGTCA-motif ⁴ , P-box ¹ , TGACG-motif ⁴	CAT-box ³	LTR ¹ , TC-rich repeats ¹
<i>ARF26</i>	ABRE ¹ , CGTCA-motif ⁴ , P-box ¹ , TGACG-motif ⁴	CAT-box ³	LTR ¹ , TC-rich repeats ¹
<i>ARF27</i>	ABRE ⁴ , GARE-motif ⁴	RY-element ¹	
<i>ARF28</i>	ABRE ¹ , CGTCA-motif ² , GARE-motif ⁴ , TGACG-motif ²	CAT-box ²	MBS ² , TCA-element ²
<i>ARF29</i>	ABRE ³ , AuxRR-core ¹ , CGTCA-motif ⁴ , TGACG-motif ⁴	CAT-box ¹	LTR ¹
<i>ARF30</i>	ABRE ⁶ , CGTCA-motif ⁴ , TGACG-motif ⁴	circadian ¹	MBS ² , TC-rich repeats ¹
<i>ARF31</i>	ABRE ¹ , CGTCA-motif ² , TGACG-motif ²	circadian ¹	LTR ²
<i>ARF32</i>	ABRE ⁵ , CGTCA-motif ⁴ , TGACG-motif ⁴	CAT-box ¹ , GCN4_motif ⁴ , RY-element ³	TCA-element ¹
<i>ARF33</i>	ABRE ⁴ , CGTCA-motif ³ , GARE-motif ⁴ , TGA-element ¹ , TGACG-motif ³	CAT-box ⁴ , RY-element ¹	
<i>ARF34</i>	ABRE ¹ , GARE-motif ⁴ , TGA-element ¹	CAT-box ²	LTR ¹
<i>ARF35</i>	ABRE ³		MBS ¹

ABRE: 脱落酸响应元件; AuxRR-core 和 TGA-element: 生长素响应元件; CGTCA-motif 和 TGACG-motif: 茉莉酸甲酯响应元件; GARE-motif 和 P-box: 赤霉素响应元件; CAT-box: 分生组织相关响应元件; circadian: 生物钟相关响应元件; GCN4_motif: 胚乳表达相关元件; RY-element: 种子特异调控响应元件; LTR: 低温响应元件; MBS: 干旱胁迫响应元件; TC-rich repeats: 防御胁迫响应元件; TCA-element: 水杨酸响应元件。肩标数字代表每个顺式作用元件在 *ARF* 基因启动区的拷贝数。

ABRE: ABA-responsive element; LTR: low temperature-responsive element; MBS: MYB binding site involved in drought-inducibility. The shoulder number represents the number of copies of each cis-acting element in the *ARF* gene promoter region.

(Element B)和逆境胁迫相关顺式作用元件(Element C)。Element A中的脱落酸响应元件(ABRE)分布于除*ARF15*和*ARF19*之外的每一个*ARF*基因启动子区,茉莉酸甲酯响应元件(CGTCA-motif, TGACG-motif, MeJA-responsive element)分布在除*ARF14*、*ARF19*、*ARF27*、*ARF34*和*ARF35*之外的30个*ARF*基因启动子区,赤霉素响应元件P-box (gibberellin-responsive element)和GARE-motif (gibberellin-responsive element)分别位于*ARF1*、*ARF2*、*ARF3*、*ARF4*、*ARF13*、*ARF18*、*ARF19*、*ARF24*、*ARF25*、*ARF26*和*ARF3*、*ARF5*、*ARF8*、*ARF9*、*ARF22*、*ARF24*、*ARF27*、*ARF28*、*ARF33*、*ARF34*的启动子区,生长素响应元件AuxRR-core和TGA-element分别位于*ARF1*、*ARF16*、*ARF23*、*ARF29*和*ARF1*、*ARF5*、*ARF6*、*ARF7*、*ARF11*、*ARF14*、*ARF15*、*ARF17*、*ARF20*、*ARF23*、*ARF33*和*ARF34*的启动子区。Xing等^[24]分析了31个*ARF*基因启动子区的生长素响应元件,与本文结果基本吻合。Element B中的分生组织相关响应元件(CAT-box)位于*ARF2*、*ARF3*、*ARF5*、*ARF6*、*ARF7*、*ARF11*、*ARF12*、*ARF16*、*ARF19*、*ARF22*、*ARF23*、*ARF25*、*ARF26*、*ARF28*、*ARF29*、*ARF32*、*ARF33*和*ARF34*的启动子区,种子特异调控响应元件(RY-element)分布在*ARF6*、*ARF17*、*ARF27*、*ARF32*和*ARF33*的启动子区,生物钟相关响应元件(circadian)只分布在*ARF30*和*ARF31*的启动子区,胚乳表达相关元件(GCN4_motif)只分布在*ARF4*和*ARF32*的启动子区。Element C中的低温响应元件(low temperature-responsive element, LTR)位于*ARF3*、*ARF4*、*ARF5*、*ARF7*、*ARF8*、*ARF9*、*ARF15*、*ARF19*、*ARF20*、*ARF23*、*ARF25*、*ARF26*、*ARF29*、*ARF31*和*ARF34*的启动子区,干旱胁迫响应元件(MYB binding site involved in drought-inducibility, MBS)位于*ARF1*、*ARF4*、*ARF6*、*ARF7*、*ARF8*、*ARF9*、*ARF12*、*ARF15*、*ARF17*、*ARF18*、*ARF19*、*ARF21*、*ARF23*、*ARF24*、*ARF28*、*ARF30*和*ARF35*的启动子区,防御胁迫响应元件(TC-rich repeats)位于*ARF8*、*ARF9*、*ARF13*、*ARF25*、*ARF26*和*ARF30*的启动子区,水杨酸响应元件(TCA-element)位于*ARF3*、*ARF5*、*ARF11*、*ARF14*、*ARF17*、*ARF19*、*ARF20*、*ARF23*、*ARF24*、*ARF28*和*ARF32*的启动子区。其中,植物激素响应相关顺式作用元件最多,每个*ARF*基因都含有2~15个;生长发育相关顺式作用元件分布在23个*ARF*基因的启动子区,主要包括RY-element、GCN4-motif和circadian

等;逆境胁迫相关顺式作用元件主要分布在29个*ARF*基因的启动子区,主要包括MBS、LTR和TC-rich repeats等。每个*ARF*基因的启动子区都包含多个顺式作用元件,表明玉米*ARF*基因在植物激素响应、生长发育和逆境胁迫响应等方面均发挥重要作用。

2.4 玉米 *ARF* 家族基因在冷、热、盐和渗透胁迫条件下的表达分析

顺式作用元件分析显示有29个玉米*ARF*基因启动子区包含逆境胁迫相关顺式作用元件。为进一步研究玉米*ARF*家族基因在逆境胁迫响应过程中的作用,我们选取了9个在叶片中表达量较高的*ARF*基因(*ARF7*、*ARF10*、*ARF15*、*ARF16*、*ARF18*、*ARF19*、*ARF32*、*ARF34*和*ARF35*),利用实时定量荧光PCR方法检测玉米*ARF*家族基因在冷、热、盐及渗透胁迫下的表达量变化(图3)。在冷胁迫处理下,所有被检测*ARF*基因的表达模式都是类似的,在处理1 h时表达量迅速上升,随后降到较低水平,处理4 h后又开始上升。在热胁迫处理下,*ARF16*基因1 h时表达量达到峰值,是未处理时的25倍,随后又逐渐下降,而其余8个*ARF*基因的表达量则是随着时间逐渐上升。在盐胁迫处理下,多数*ARF*基因的表达量变化不大(除了*ARF10*在处理4 h时表达量达到峰值后又开始下降外),比较有趣的一点是,*ARF35*的表达量在处理迅速下降并维持在较低水平,暗示该基因可能是通过与其他*ARF*基因相反的途径参与盐胁迫调控过程。在渗透胁迫处理下,*ARF15*、*ARF18*和*ARF19*的表达量是先上升后下降,在处理8 h时表达量达到峰值;*ARF10*、*ARF32*、*ARF34*和*ARF35*的表达模式是相似的,处理1 h时表达量达到峰值,随后下降并维持在较低水平;*ARF7*和*ARF16*的表达量变化不大。这些结果表明,*ARF*基因涉及参与多种逆境胁迫响应过程。

3 讨论

作为重要的植物激素,生长素几乎参与了植物生长发育的每个阶段。而*ARF*基因作为生长素响应因子,通过特异性地结合生长素响应元件调节下游靶基因的转录,参与诸多植物生长发育过程^[2]。根据标记基因表达情况可将*ARF*家族分为3类:一类(Clade A)具有转录激活功能,一类(Clade B)具有转录抑制功能,一类(Clade C)既不具有转录激活功能也不具有转录抑制功能^[25]。这3类*ARF*基因的功能分类与进化关系是一致的^[26]。结合不同数据库分析得

图 3 玉米 *ARF* 家族基因在不同逆境胁迫下的表达水平

Fig. 3 Transcriptional patterns of *ARF* genes under different stress treatments

A: 冷胁迫处理; B: 热胁迫处理; C: NaCl 胁迫处理; D: 渗透胁迫处理。

A: cold stress treatment; B: hot stress treatment; C: NaCl stress treatment; D: osmotic stress treatment.

到的转录组数据和实时定量PCR结果可以看出, Clade C主要在幼嫩雄花序中优势表达, 而Clade A和Clade B则主要在幼嫩花序中高水平表达, 有的在幼嫩雌花序中优势表达, 有的在雄花序中优势表达。不管*ARF*基因通过转录激活(Clade A)还是转录抑制(Clade B), 又或者通过别的调控途径(Clade C), 都会通过参与调控生长素相关基因影响玉米花序发育过程。

*ARF*基因参与了诸多生物学过程。拟南芥中的 $arf2$ 突变体花期、叶衰老和花脱落时间推迟^[27], 推测与之同源的玉米*ARF10*和*ARF29*也参与花发育和叶片发育, 而这2个基因都在幼嫩花序中优势表达, 也从侧面印证这一推测; *AtARF5*参与胚模式建成和维管组织形成^[12,28-29], 而作为同源基因的玉米*ARF6*在幼嫩花序和中柱中高表达, *ARF33*在幼嫩花序和果皮中高表达, 这也暗示这2个基因可能参与胚发育和微管形成; *AtARF6*调控花成熟^[16,30], 同源基因玉米*ARF16*和*ARF18*在幼嫩花序和胚中高表达, 可能参与花和果穗形成过程; *AtARF8*是果实起始发育的负调控因子^[16,30], 黄瓜*AtARF8*的同源基因*Csa019264*和*Csa019265*在单性结实和非单性结实品种的表达差异大^[31], 而玉米*AtARF8*的同源基因*ARF5*和*ARF34*在幼嫩花序和胚中高表达, 推测参与果穗的发育和形态建成。然而玉米*ARF*基因众多, 通过DAP-seq测序技术获得的顺式作用元件分析结果显示, *ARF*基因在Clade A、Clade B和Clade C组间的结合位点特异性和靶基因等差异不大^[32], 暗示基因功能冗余现象严

重, 这也是至今还未发现有表型的玉米 arf 突变体的原因^[25], 开展功能研究还需新的思路和方法。

随着玉米基因组测序完成, 高通量测序技术被广泛应用于基因功能研究。通过分析数据库收录的测序数据, 可以获得不同部位组织器官在不同发育时期、不同环境条件下的表达模式。Liu等^[20]通过EST数据库预测*ARF*基因主要在雄穗和果穗中表达, Gallavotti等^[26]通过数据库数据分析*ARF*基因在胚、幼嫩花序和成熟花序中优势表达, 而本文结合实时定量PCR方法和现有数据库更新的转录组数据分析了玉米*ARF*基因在不同组织器官的表达模式, 发现*ARF*基因主要在雄花序和雌花序中优势表达, 充分说明*ARF*基因在花序发育过程中发挥重要功能。

*ARF*基因在植物的生长发育过程中发挥了重要作用, 也参与了许多逆境胁迫响应过程。拟南芥*ARF5*参与维管形成, 而干旱条件下植株的维管合成能力加强, 暗示*ARF5*通过参与维管合成而影响植株的抗旱性^[6]; *ARF10*和*ARF16*通过控制根冠的发育来影响植株的抗旱性^[33]; 大豆*ARF*基因的表达量在水分胁迫下发生明显变化, 暗示*ARF*基因参与了大豆水分胁迫响应^[34]。玉米中的*ARF*基因在冷、热、盐和渗透胁迫处理下, 表达量均发生了明显变化, 这暗示*ARF*基因参与了玉米多种胁迫响应过程。

4 结论

玉米 *ARF* 基因家族的 *ARF10*、*ARF16* 和 *ARF34*

呈组成型表达, 其余 32 个 *ARF* 基因均在幼嫩雄花序和雌花序中高表达, 参与了玉米花序发育过程; 玉米 *ARF* 基因家族在冷、热、盐和渗透胁迫处理下表达量发生明显变化, 暗示玉米 *ARF* 基因家族参与了多种逆境胁迫响应过程。

References

- [1] 吴蓓, 吴建勇, 蔡刘体, 李运合, 黄学林. 生长素反应因子. 植物生理学通讯, 2005, 41: 273–278.
Wu B, Wu J Y, Cai L T, Li Y H, Huang X L. Auxin response factor. *Plant Physiol Commun*, 2005, 41: 273–278 (in Chinese).
- [2] Abel S, Theologis A. Early genes and auxin action. *Plant Physiol*, 1996, 111: 9.
- [3] Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle T J. Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant J*, 1999, 19: 309–319.
- [4] Liu Z B, Hagen G, Guilfoyle T J. A G-box-binding protein from soybean binds to the E1 auxin-response element in the soybean GH3 promoter and contains a proline-rich repression domain. *Plant Physiol*, 1997, 115: 397–407.
- [5] Wang D, Pei K, Fu Y, Sun Z, Li S, Liu H, Tang K, Han B, Tao Y Z. Genome-wide analysis of the auxin response factors (*ARF*) gene family in rice (*Oryza sativa*). *Gene*, 2007, 394: 13–24.
- [6] Singh V K, Rajkumar M S, Garg R, Jain M. Genome-wide identification and co-expression network analysis provide insights into the roles of auxin response factor gene family in chickpea. *Sci Rep*, 2017, 7: 10895.
- [7] Die J V, Gil J, Millan T. Genome-wide identification of the auxin response factor gene family in *Cicer arietinum*. *BMC Genomics*, 2018, 19: 301.
- [8] Zhou X, Wu X, Li T, Jia M, Liu X, Zou Y, Liu Z X, Wen F. Identification, characterization, and expression analysis of auxin response factor (*ARF*) gene family in *Brachypodium distachyon*. *Funct Integr Genomic*, 2018, 18: 709–724.
- [9] Xu Z, Ji A, Song J, Chen S. Genome-wide analysis of auxin response factor gene family members in medicinal model plant *Salvia miltiorrhiza*. *Biol Open*, 2016, 5: 848–857.
- [10] Wang S, Hagen G, Guilfoyle T J. ARF-Aux/IAA interactions through domain III/IV are not strictly required for auxin-responsive gene expression. *Plant Signal Behav*, 2013, 8: e24526.
- [11] Remington D L, Vision T J, Guilfoyle T J, Reed J W. Contrasting modes of diversification in the *Aux/IAA* and *ARF* gene families. *Plant Physiol*, 2004, 135: 1738–1752.
- [12] Hardtke C S, Berleth T. The *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J*, 1998, 17: 1405–1411.
- [13] Harper R M, Stowe-Evans E L, Luesse D R, Muto H, Tatematsu K, Watahiki M K, Yamamoto K, Liscum E. The NPH4 locus encodes the auxin response factor *ARF7*, a conditional regulator of differential growth in aerial *Arabidopsis* tissue. *Plant Cell*, 2000, 12: 757–770.
- [14] Okushima Y, Overvoorde P J, Aeima K, Alonso J M, Chan A, Chang C, Ecker J R, Hughes B, Lui A, Nguyen D. Functional genomic analysis of the *AUXIN RESPONSE FACTOR* gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of *ARF7* and *ARF19*. *Plant Cell*, 2005, 17: 444–463.
- [15] Wilmoth J C, Wang S, Tiwari S B, Joshi A D, Hagen G, Guilfoyle T J, Alonso J M, Ecker J R, Reed J W. NPH4/*ARF7* and *ARF19* promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. *Plant J*, 2005, 43: 118–130.
- [16] Nagpal P, Ellis C M, Weber H, Ploense S E, Barkawi L S, Guilfoyle T J, Hagen G, Alonso J M, Cohen J D, Farmer E E. Auxin response factors *ARF6* and *ARF8* promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development*, 2005, 132: 4107–4118.
- [17] Faivre-rampant O, Cardle L, Marshall D, Viola R, Taylor M A. Changes in gene expression during meristem activation processes in *Solanum tuberosum* with a focus on the regulation of an auxin response factor gene. *J Exp Bot*, 2004, 55: 613–622.
- [18] Waller F, Furuya M, Nick P. *OsARF1*, an auxin response factor from rice, is auxin-regulated and classifies as a primary auxin-responsive gene. *Plant Mol Biol*, 2002, 50: 415–425.
- [19] Jones B, Frasse P, Olmos E, Zegzouti H, Li Z G, Latche A, Pech J C, Bouzayen M. Down-regulation of *DR12*, an auxin response factor homolog, in the tomato results in a pleiotropic phenotype including dark green and blotchy ripening fruit. *Plant J*, 2002, 32: 603–613.
- [20] Liu Y, Jiang H Y, Chen W J, Qian Y X, Ma Q, Cheng B J, Zhu S W. Genome-wide analysis of the auxin response factor (*ARF*) gene family in maize (*Zea mays*). *Plant Growth Regul*, 2011, 63: 225–234.
- [21] Grennan A K. Genevestigator. Facilitating web-based gene expression analysis. *Plant Physiol*, 2006, 141: 1164–1166.
- [22] Lescot M, Dehais P G, Marchal K, Moreau Y, Peer Y V, Rouze P, Rombauts S. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucl Acids Res*, 2002, 30: 325–327.
- [23] Galli M, Liu Q, Moss B L, Malcomber S, Li W, Gaines C, Federici S, Roshkovan J, Meeley R, Nemhauser J L, Gallavotti A. Auxin signaling modules regulate maize inflorescence architecture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 13372–13377.
- [24] Xing H Y, Pudake R N, Guo G G, Xing G F, Hu Z R, Zhang Y R, Sun Q X, Ni Z F. Genome-wide identification and expression profiling of auxin response factor (*ARF*) gene family in maize. *BMC Genomics*, 2011, 12: 178.
- [25] Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle T J. Activation and repression of transcription by auxin response factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 5844–5849.
- [26] Matthes M S, Best N B, Robil J M, Malcomber S, Gallavotti A, Mcsteven P. Auxin evodevo: conservation and diversification of genes regulating auxin biosynthesis, transport, and signaling. *Mol Plant*, 2019, 12: 298–320.
- [27] Liu Z, Miao L, Huo R, Song X, Johnson C, Kong L, Sundaresan V, Yu X L. *ARF2-ARF4* and *ARF5* are essential for female and male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 2018, 59: 179–189.
- [28] Hardtke C S, Berleth T. The *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J*, 1998, 17: 1405–1411.
- [29] Wenzel C L, Schuetz M, Yu Q, Mattsson J. Dynamics of *MONOPTEROS* and *PIN-FORMED1* expression during leaf vein pattern formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2007, 49:

- 387–398.
- [30] Wu M F, Tian Q, Reed J W. Arabidopsis microRNA167 controls patterns of *ARF6* and *ARF8* expression, and regulates both female and male reproduction. *Development*, 2006, 133: 4211–4218.
- [31] 王垒, 陈劲枫, 娄丽娜, 娄群峰. 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*, 2011, 4: 717–724.
- Wang L, Chen J F, Lou L N, Lou Q F. Sequence characteristics of *ARF* gene family of cucumber and an expression analysis of some members during early development of fruits. *Acta Horti Sin*, 2011, 4: 717–724 (in Chinese with English abstract).
- [32] Galli M, Khakhar A, Lu Z, Chen Z, Sen S, Joshi T, Nemhauser J L, Schmitz R J, Gallavotti A. The DNA binding landscape of the maize *AUXIN RESPONSE FACTOR* family. *Nat Commun*, 2018, 9: 4526.
- [33] 王佳伟, 蔡文娟, 王凌健, 毛颖波, 陈晓亚. 生长素响应因子 *ARF10* 和 *16* 控制拟南芥根冠发育. 见: 中国遗传学会植物遗传与基因组学专业委员会 2005 年学术研讨会论文摘要集, 2005. p 15.
- Wang J W, Cai W J, Wang L J, Mao Y B, Chen X Y. Auxin response factors *ARF10* and *16* control root crown development in *Arabidopsis thaliana*. In: Genetics Society of China in plant Genetics and Genomics Professional Committee Conference Abstract Set, 2005. p 15 (in Chinese).
- [34] Ha C V, Le D T, Nishiyama R, Watanabe Y, Sulieman S, Tran U T, Mochida K, Dong N V, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran L S. The auxin response factor transcription factor family in soybean: genome-wide identification and expression analyses during development and water stress. *DNA Res*, 2013, 20: 511–524.