

· 热带作物 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240148



主持人: 张洪亮, 徐 冉

木薯生长素响应因子 *MeARF* 的克隆及 互作蛋白的筛选

吴竞远[#], 唐璐芝, 朱彬彬, 赵惠萍^{*}

(海南大学 热带农林学院/海南省耐盐作物生物技术重点实验室, 海南 海口 570228 中国)

摘要: 为了解析木薯(*Manihot esculenta*)中生长素响应因子(Auxin response factor, ARF)的功能和作用机理, 本研究首先克隆了一个 *MeARF* 基因, 然后通过生物信息学分析, 构建了进化树明确了其亲缘关系。蛋白结构分析发现, 该蛋白含有保守的 B3 结构域(B3 DNA binding domain, B3)和 Phox and Bem1p(PB1)结构域。通过分析 *MeARF* 在不同组织的表达量, 发现 *MeARF* 在木薯的侧芽表达量较高。本研究还构建了 pGADT7-*MeARF* 的基因表达载体, 然后通过酵母双杂交实验筛选木薯的 cDNA 文库, 最终筛选到了与植物生长发育和免疫相关的候选蛋白。结果表明, *MeARF* 可能参与了木薯的生长发育和免疫。

关键词: 生长素响应因子; 木薯; 蛋白结构; 酵母双杂交; 候选蛋白

中图分类号: Q78

文献标志码: A

文章编号: 1674-7054(2025)04-0495-09

吴竞远, 唐璐芝, 朱彬彬, 等. 木薯生长素响应因子 *MeARF* 的克隆及互作蛋白的筛选 [J]. 热带生物学报, 2025, 16(4): 495-503. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240148

木薯(*Manihot esculenta*)原产于巴西, 系大戟科木薯属作物, 在当今世界广泛栽培, 是世界三大薯类作物之一。木薯因其独特的特性被称为“淀粉之王”, 具有耐贫瘠、高产、四季可收的特点, 并广泛应用于食品、饲料和能源等领域。植物激素作为植物体内微量而高效的小分子有机化合物, 参与调控了植物的各种生理过程。生长素(Auxin)作为一种重要的植物激素, 在植物的生长发育中起到重要作用。相关研究表明, 生长素是通过其信号通路的各个组分来传递信号, 进而使下游基因表达。而 ARF(Auxin response factor)作为生长素信号通路的响应因子, 在生长素信号通路中扮演转录因子的角色, 可以与特定的启动子序列结合, 从而激活下游基因的转录, 因此 ARF 对于生长素信号通路具有重要意义, 但是对于 ARF 的功能以及作用机理的研究尚不完善。ARF 在植物的生长发育及逆境胁迫中发挥了非常重要的作用。相

关研究表明, 在拟南芥中, ARF17 可以通过结合 *GPI-anchored lipid transfer protein4(LTPG4)* 基因启动子上的 AuxRE(Auxin response element)元件, 调控其表达进而影响花粉管的生长^[1]。另外, 拟南芥激活型生长素响应因子 ARF6/8/7/19 可以促进不定根的再生^[2]。有研究表明, ARF 还参与植物的向性运动。在拟南芥中, 重力或光触发的生长素不对称分布诱导了 ARF7 和 ARF19 在下胚轴中对 *Small Auxin-Up RNA19(SAUR19)* 亚家族基因的不对称表达, 从而导致了向地性和向光性反应过程中的弯曲生长^[3]; ARF7 与 *PR-1 homolog (PRH1)* 基因的启动子结合进而调控 *PRH1* 的转录表达, 从而影响拟南芥侧根的发育^[4]。在番茄中, SIARF3 可以通过调控苹果酸代谢过程相关基因的表达, 促进果实中有机酸的积累, 最终影响果实的风味品质^[5]。OsARF18 可以通过抑制水稻根的伸长, 从而影响水稻的株高^[6]。OsARF4 通过生长

收稿日期: 2024-09-16

修回日期: 2024-12-01

基金项目: 海南省研究生创新课题(Qhys2023-248, Qhys2023-232, Qhyb2023-97)

[#]第一作者: 吴竞远(2000—), 男, 海南大学热带农林学院 2022 级硕士研究生。E-mail: wjy2034524282@163.com

^{*}通信作者: 赵惠萍(1994—), 女, 讲师。研究方向: 作物遗传育种。E-mail: 996427@hainanu.edu.cn

素和油菜素类固醇途径调节水稻叶片倾斜,进而影响其光合效率和谷物产量^[7]。此外,miR167d-ARF 模块可以调控花朵开放和柱头大小^[8]。*GhARF2* 在棉花纤维伸长过程中具有较高的表达模式, *GhARF2b* 过表达可以抑制棉纤维的伸长^[9]。*ARF* 基因广泛参与了对植物生长发育的调控。*ARF* 还参与了植物的逆境胁迫。在水稻中, *OsARF17* 在植物对不同类型植物病毒的防御中起着至关重要的作用,这些病毒利用独立进化的病毒蛋白来靶向生长素信号传导的这一关键成分,并促进感染^[10]。*ARF* 还参与植物翻译后的调控过程从而参与植物免疫,在拟南芥中过表达 *microRNA167*, 调控其靶点 *ARF6* 和 *ARF8*, 进而调控水杨酸的含量,从而增强了对丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, *Pst* DC3000)的防御^[11]。此外, *ZmARF4* 的过表达可促进磷从根部向叶片的再动员和转运,进而增强了玉米对磷胁迫的耐受性^[12]。在大豆中, *ARF16* 激活 *Myelocytomatosis protein2* (*MYC2*), 通过下调脯氨酸的生物合成来降低耐盐性^[13]。

在本研究中,团队获得了 1 个 *MeARF* 基因 (Manes.18G015400.1), 并对该基因进行了生物信息学分析,以及验证了其在木薯不同组织中的相关表达量,同时还筛选了 *MeARF* 的相关互作蛋白,旨在为进一步解析 *MeARF* 的功能和作用机理奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料及培养条件 本研究使用的木薯品种为‘华南 124’,培养方法为盆栽,固体培养基由蛭石和营养土 3 : 1 的比例混合制成,截取 2 ~ 3 个芽点的木薯茎秆,将其插入在培养基中培养,置于温室中培养,培养温度为 28 ℃,湿度为 80%。

1.2 RNA 的提取 取约 0.3 g 的木薯侧芽放于加入液氮的研钵中进行迅速研磨,将研磨好的样品使用 CTAB 裂解细胞的方法提取 RNA(注意使用无酶 EP 管,在冰上进行实验),之后用分光光度计测定 RNA 的浓度,将所得的 RNA 放置于-80 ℃保存。

1.3 反转录 使用反转录试剂盒(YEASEN, 11151ES10/11151ES60)将 RNA 反转录为 cDNA。配置反转录体系(表 1)于 1.5 mL 无酶离心管,在

37 ℃ 水浴条件下反应 5 min 用于 cDNA 合成及 gDNA 的消化,最后在 85 ℃ 水浴的条件下放置 30 s,由此来终止反应,将所得反应产物放置于-80 ℃保存。

表 1 反转录体系

Tab. 1 The reverse transcription system

组分 Component	体积/ μ L Volume / μ L
RNase-free Water	12
4×Hifair® AdvanceFast One-Step RT SuperMix	5
gDNA Remover Mix	1
mRNA	2

1.4 基因克隆 通过开放数据库 Phytozome(<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>)查找木薯 *MeARF* 的相关信息,发现 *MeARF* 的 CDS 区域长度为 2 861 bp; 由于 *MeARF* 全长过大,本研究以 cDNA 为模板对 *MeARF* 进行了分段克隆并送测序后,合成全长大小为 2 861 bp 的目的片段,并连上 pEASY-Blunt3 载体(Transgen, CB301-01),然后以 Blunt3-*MeARF* 为模板进行片段的扩增。PCR 反应体系 20 μ L, 包括 Mix(Vazyme, P112-03)10 μ L, ddH₂O 8 μ L, 正向引物 0.5 μ L, 反向引物 0.5 μ L, 模板 1 μ L(PCR 反应程序如表 2 所示)。

表 2 PCR 反应程序设置

Tab. 2 Setup of PCR reaction program

名称 Name	温度/ $^{\circ}$ C Temperature/ $^{\circ}$ C	时间/min Time /min
预变性(Initial denaturation)	95	3.0
变性(Degeneration)	95	0.5
退火(Annealing)	55	0.5
延伸(Extension)	72	3.0
循环次数(Number of cycles)		36
最终延伸(Final extension)	72	5.0

1.5 进化树构建 通过开放数据库 Phytozome 查找木薯 *MeARF* 的氨基酸序列,将该序列进行 Blast 比对,得到不同物种中与 *MeARF* 同源性较高的氨基酸序列,将这些序列输入 MEGA11 软件上绘制成进化树。

1.6 蛋白结构分析 通过 Uniprot 在线数据库(<https://www.uniprot.org/id-mapping/>)和 SWISS-

MODEL 网站 (<https://swissmodel.expasy.org/>) 进行 *MeARF* 蛋白结构的预测分析。

1.7 荧光定量 PCR 使用 Primer5 软件进行定量引物的设计, 设计了前端引物 Q*MeARF*-F 和后端引物 Q*MeARF*-R。以 cDNA(木薯的茎、叶柄、叶片、侧芽和须根)为模板, 用荧光定量 PCR 仪进行扩增, PCR 程序如表 3 所示。反应体系为: ddH₂O 6.5 μL, cDNA 0.2 μL, 前端引物 0.4 μL, 后端引物 0.4 μL, SYBR 荧光染料(Vazyme, Q111-02)7.5 μL。

1.8 诱饵载体的构建 使用(<https://crm.vazyme.com/cetool/singlefragment.html>)网站设计特异性引物 *MeARF*-AD-F/R, 酶切位点选择 *Nde* I 和 *Eco*R I, 以 Blunt3-*MeARF* 质粒为模板, 进行 PCR 扩增, 回收目的片段, 酶切 pGADT7 载体并进行胶回收, 通过同源连接的方法进行目的基因和线性载体的连接, 转入大肠杆菌感受态细胞 DH5α(Zomanbio, ZK206), 在氨苄抗性的固体培养基培养 10 h, 挑取单菌落, 并以挑取的菌落为模板

表 3 荧光定量 PCR 程序

Tab. 3 The fluorescence quantitative fluorescence PCR procedure

名称 Name	温度/℃ Temperature/℃	时间/s Time/s
预变性(Initial denaturation)	95	30
变性(Degeneration)	95	15
退火(Annealing)	55	15
延伸(Extension)	72	20
循环次数(Number of cycles)	45	

进行 PCR 验证, 将得到的阳性克隆对应的菌液加入到相应抗性的液体 LB 中, 置于摇床中进行培养 (37 ℃, 150 r·min⁻¹), 提取质粒, 并进行双酶切验证, 送测序, 将测序的结果与 Phytozome 网站上的 *MeARF* 序列进行校对, 与目的片段的序列一致, 则完成相关基因表达载体的构建。本研究引物合成均由华大基因公司完成(表 4)。

表 4 引物碱基序列

Tab. 4 Primer base sequences

引物名称 Primer	碱基序列(5'–3') Base sequence(5'–3')
Q <i>MeARF</i> -F	ATGATGATGGGTTCTGTTG
Q <i>MeARF</i> -R	GCTCCGAGTTTATTGTCTT
<i>MeARF</i> -AD-F	GTACCAGATTACGCTCATATGATGCATTTTAAACAGAAGCACATGA
<i>MeARF</i> -AD-R	ATGCCCACCCGGGTGGAATTCTCAAGCACGGCTACCTTCTGT
pGBKT7-F	GTAATACGACTCACTATAGGGCGA
pGBKT7-R	TTTTCGTTTAAAAACCTAAGAGTC

1.9 酵母感受态细胞的制备 取–80 ℃ 保存的 AH109 菌株, 划线于 YPDA 固体平板上, 置于 28 ℃ 培养 2 ~ 3 d; 挑取平板上生长的酵母单菌落, 置于 5 mL 的 YPDA 液体中, 28 ℃ 摇床培养 8 ~ 10 h; 吸取一定量的 AH109 菌液, 置于 50 mL 的 YPDA 溶液中进行转摇, 调节初始 OD₆₀₀ 值为 0.2 ~ 0.3, 之后置于 28 ℃ 培养 3 ~ 5 h, 使 OD₆₀₀ 值到达 0.6 左右; 将菌液分装在 50 mL 离心管中, 4 000 r·min⁻¹, 低速离心 10 min, 去上清; 每管加入 20 mL 的 ddH₂O 重悬, 4 000 r·min⁻¹, 低速离心 10 min, 去上清; 加入 2 mL 的 1×TE/LiAC 重悬, 完成酵母感受态细胞的制备。

1.10 酵母转化 将 ssDNA, 木薯 pGBKT7 文库质粒, pGADT7-*MeARF* 质粒各 10 μL 混合于 2 mL

离心管中, 做 8 ~ 10 组; 每管加入 200 μL 的酵母感受态细胞; 加 600 μL 的 PEG/LiAC, 上下颠倒混匀, 在 28 ℃ 摇床培养 1 h; 加入 70 μL 的 DMSO (Solarbio, D8370–100), 42 ℃ 水浴热激 30 min; 12 000 r·min⁻¹ 离心 30 s, 去上清; 沉淀用 300 uL 的 1×TE 重悬后涂布于 SD-Trp-Leu(Coolaber, PM2220)和 SD-Trp-Leu-Ade-His(Coolaber, PM2110) 固体培养基上, 放置于 28 ℃ 的培养箱中进行培养。

1.11 候选蛋白的获得 将转化后的酵母在 28 ℃ 培养箱培养 3 d, 挑取在 SD-Trp-Leu-Ade-His 固体培养基上生长的酵母单菌落于 5 mL 的 SD-Trp-Leu-Ade-His 液体培养基中, 在 28 ℃ 的摇床中培养; 3 d 后, 提取酵母质粒, 分别使用

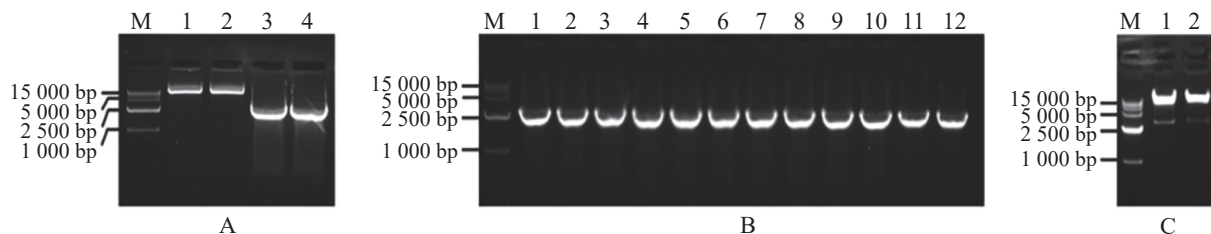
MeARF-AD-F/R 和 pGBKT7-F/R 引物对质粒进行扩增,将阳性克隆对应的目的片段进行回收,把回收的片段送测序。使用开放数据库 Phytozome 对测序的结果进行比对分析,最终得到与 MeARF 相互作用的候选蛋白。

2 结果与分析

2.1 序列扩增及载体构建

扩增 *MeARF* 片段,

同时将 pGADT7 载体质粒用 *Nde* I 和 *Eco*R I 进行酶切,电泳条带大小符合预期实验结果(图 1-A);挑取单菌落进行菌落 PCR,电泳结果表明存在条带清晰单一的阳性克隆(图 1-B);提取质粒进行双酶切验证,酶切位点选择 *Nde* I 和 *Eco*R I,结果表明,酶切后的条带大小约为 2 800 bp,符合目的片段的大小(图 1-C)。将质粒送序列检测后结果一致,最终完成相关表达载体的构建。



M. DL 15 000 DNA Marker; A. pGADT7 载体的酶切(1 ~ 2), *MeARF* 基因的扩增(3 ~ 4); B. 菌落 PCR 验证(1 ~ 12); C. pGADT7-*MeARF* 双酶切验证结果(1 ~ 2)。

M. DL 15 000 DNA Marker; A. Digestion of the pGADT7 vector (1-2), amplification of the *MeARF* gene (3-4); B. Verification of colony PCR(1-12); C. The enzyme-digested product of pGADT7-*MeARF* (1-2).

图 1 *MeARF* 片段扩增以及构建基因表达载体 pGADT7-*MeARF*

Fig. 1 Amplification of the *MeARF* fragments and constructing the expression vector of pGADT7-*MeARF*

2.2 生物信息学分析

2.2.1 构建 *MeARF* 蛋白的进化树 选取 26 个不同物种与 *MeARF* 同源性较高的氨基酸序列,将这些序列与 *MeARF* 的氨基酸序列一起输入到 MEGA 软件上绘制成进化树(图 2)。结果表明,大戟科橡胶树属的橡胶树中的 HbARF 与 *MeARF* 的亲缘关系较近,用 DNAMAN 软件比对二者的氨基酸序列,置信度为 86.73%。

2.2.2 *MeARF* 蛋白结构分析 为了解析 *MeARF* 的功能,本研究首先分析了 *MeARF* 的蛋白结构。发现 *MeARF* 的结构域包含一个位于 N 端 156~258 aa 的 B3 结构域(B3 DNA binding domain, B3),该区域与结合元件 AuxRE(Auxin-responsive element, AuxRE)有关。该蛋白的 C 端含有一个位于 839~923 aa 处的 PB1 结构域(Phox and Bem1p, PB1),能够与 Aux/IAA(Auxin/indoleacetic acid, Aux/IAA)互作,稳定 ARF 的二聚体并促进其结合 DNA(图 3)。

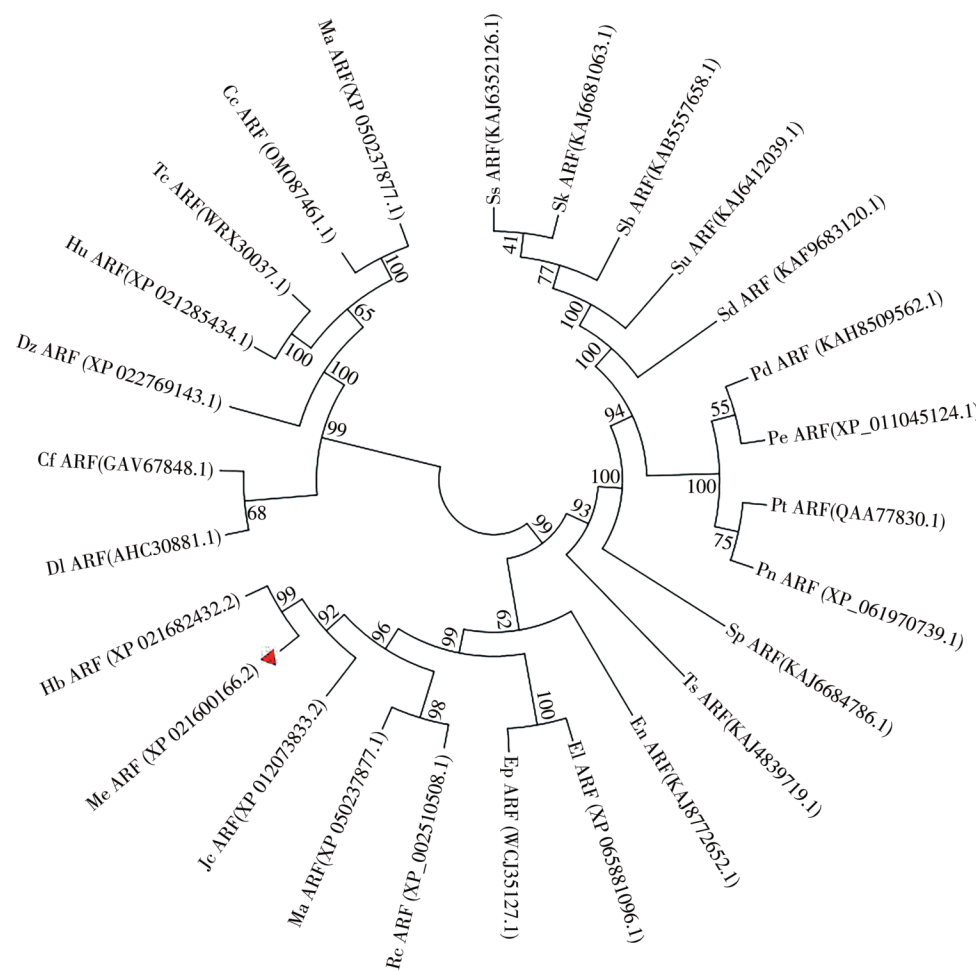
2.2.3 *MeARF* 在各个组织的表达量分析 为了分析 *MeARF* 在木薯不同组织中的表达情况,本研究利用在线数据绘制图 4-A。结果发现, *MeARF* 在有组织的胚胎发生结构和侧芽的表达量较高;并且相关研究表明生长素可以调控植物胚胎的发

育并促进侧芽的萌发^[14-15],这些结果进一步说明了 *MeARF* 与生长素之间的联系。

为了验证 *MeARF* 在木薯不同组织中的表达情况,本研究测定了 *MeARF* 在木薯茎、叶柄、叶片、侧芽和须根的表达量,结果发现 *MeARF* 在木薯侧芽的表达量最高,在木薯叶片的表达量最低,这个结论与在线数据库的结果类似,进一步说明了 *MeARF* 在木薯的不同组织都存在表达(图 4-B)。

2.3 pGADT7-*MeARF* 表达载体筛选木薯 pGBKT7 文库 为探讨 pGBKT7-*MeARF* 进行酵母双杂交筛选 pGADT7 文库的可能性,本研究首先进行了 pGBKT7-*MeARF* 的自激活实验,通过观察 pGBKT7 与 pGBKT7-*MeARF* 两种组合分别在 SD-Trp 和 SD-Trp-Ade-His 固体培养基的生长情况来判断 pGBKT7-*MeARF* 是否有自激活现象。实验采用了 4 种浓度梯度稀释接种在培养基上。实验结果表明, pGBKT7 与 pGBKT7-*MeARF* 两种组合均在 SD-Trp 固体培养基上生长;而在 SD-Trp-Ade-His 固体培养基上,只有 pGBKT7-*MeARF* 组合的酵母生长(图 5)。这些现象说明了 pGBKT7-*MeARF* 存在自激活现象,可以单独激活下游基因的表达。

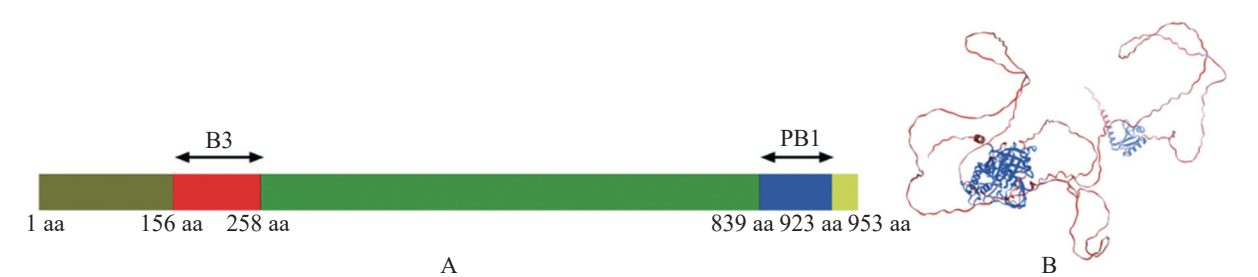
由于 pGBKT7-*MeARF* 存在自激活现象,本实验采用 pGADT7-*MeARF* 作为诱饵蛋白对木薯的



选取的物种为麻风树、橡胶树、蓖麻、续随子、一年生山黧、美洲黑杨、毛白杨、胡杨、黑杨、银白杨、白时钟花、簕箕柳、乌登柳、尖叶紫柳、小垫柳、长梗柳、紫红柳、哥伦比亚锦葵、黄麻、可可、南欧大戟、龙眼、哥伦比亚古柯、长蒴黄麻、土瓶草、榴莲。

The selected species were *Jatropha curcas*, *Hevea brasiliensis*, *Ricinus communis*, *Euphorbia lathyris*, *Mercurialis annua*, *Populus deltoids*, *Populus tomentosa*, *Populus euphratica*, *Populus nigra*, *Populus alba*, *Turnera subulata*, *Salix suchowensis*, *Salix udensis*, *Salix koriyanagi*, *Salix brachista*, *Salix dunnii*, *Salix purpurea*, *Herrania umbratica*, *Corchorus capsularis*, *Theobroma cacao*, *Euphorbia peplus*, *Dimocarpus longan*, *Erythroxylum novogranatense*, *Corchorus olitorius*, *Cephalotus follicularis*, *Durio zibethinus*.

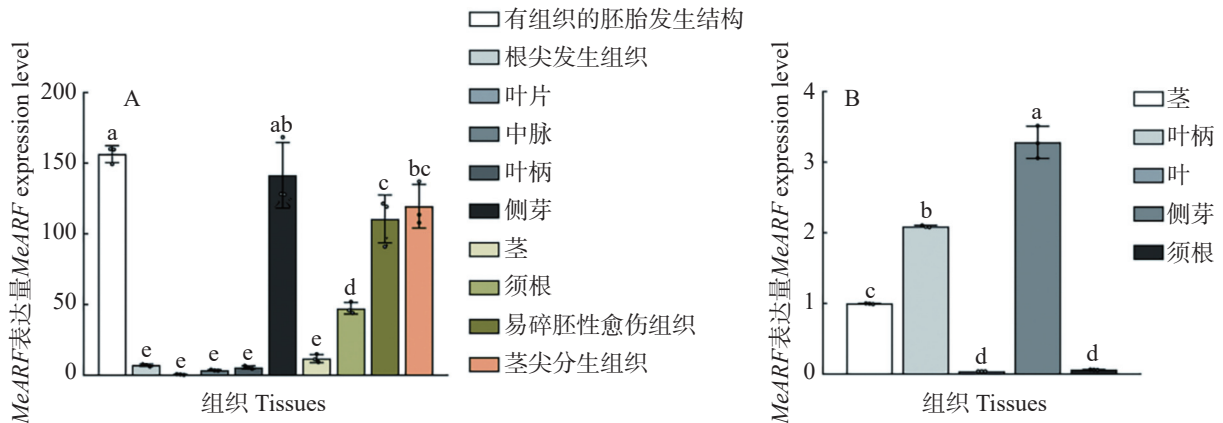
图 2 构建 ARF 进化树
Fig. 2 Construction of the evolutionary tree of ARF



A. MeARF 保守蛋白结构域分析; B. MeARF 蛋白三维结构预测。
A. Domain analysis of MeARF conserved protein; B. Predicting the 3D structure of MeARF protein.

图 3 MeARF 蛋白结构分析
Fig. 3 Structural analysis of the MeARF protein

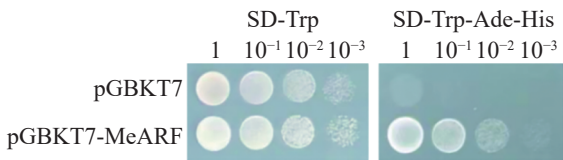
pGBKT7 文库进行筛选, 发现在 SD-Trp-Leu 固体培养基上均有酵母生长, 在 SD-Trp-Leu-Ade-His 固体培养基上一共得到了 12 个单菌落, 把这些单菌落在 SD-Trp-Leu-Ade-His 固体培养基上划线保



A. TCOD expression 在线数据库中, *MeARF* 在有组织的胚胎发生结构、根尖分生组织、叶片、中脉、叶柄、侧芽、茎、须根、易碎胚性愈伤组织和茎尖分生组织中的表达量; B. *MeARF* 在木薯茎、叶柄、叶片、侧芽和须根中的表达情况; 3 个生物学重复, 不同的字母表示显著性差异 ($P < 0.05$)。

A. TCOD expression Online database for the relative expression of *MeARF* in organized embryogenic structures, root apical meristem, leaf, midvein, petiole, lateral bud, stem, fibrous root, friable embryogenic callus and shoot apical meristem; B. The relative expression of *MeARF* in stem, petiole, leaf, lateral bud and fibrous root. The figure shows three biological replicates; and different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

图 4 *MeARF* 在木薯不同组织的表达量
Fig. 4 Expression profiling of *MeARF* in different tissues of cassava



pGBKT7 与 pGBKT7-*MeARF* 两种组合的酵母在 SD-Trp 和 SD-Trp-Ade-His 固体培养基的生长情况, 实验采用了 4 种浓度梯度 (1、10⁻¹、10⁻²、10⁻³) 来进行稀释。

The growth of yeast strains pGBKT7 and pGBKT7 *MeARF* in SD-Trp and SD-Trp-Ade-His solid media at four concentration gradients (1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³) for dilution was observed.

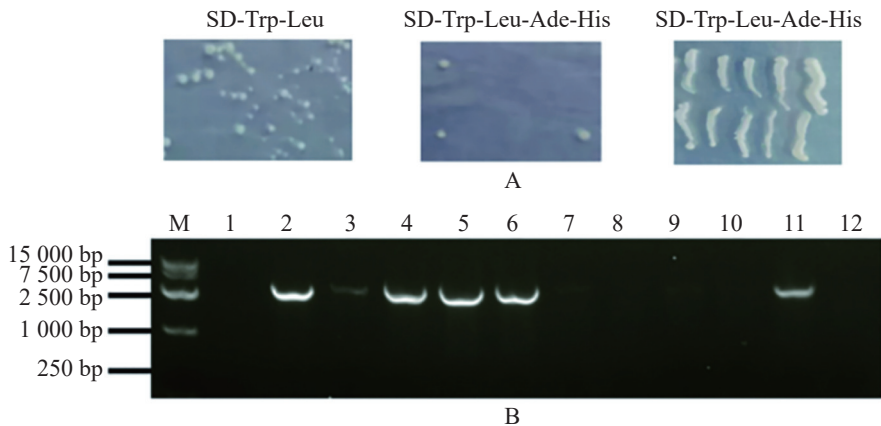
图 5 pGBKT7-*MeARF* 自激活验证

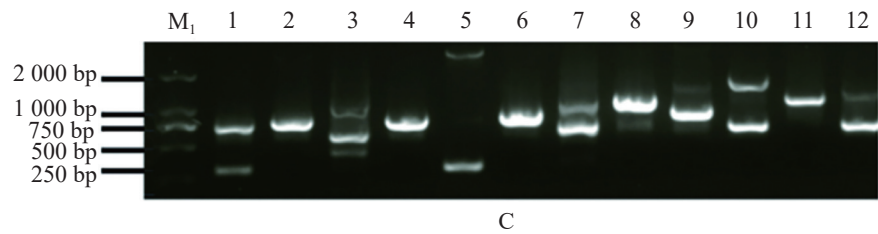
Fig. 5 The self-activation validation of pGBKT7-*MeARF*

存, 发现其可以在 SD-Trp-Leu-Ade-His 固体培养基上正常生长 (图 6-A)。挑取这些单菌落, 摇菌, 提取酵母质粒, 使用 *MeARF*-AD-F/R 引物进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳结果表明存在 6 个阳

性克隆 (图 6-B); 另外, 使用 pGBKT7-F/R 引物进行菌落进行扩增, 共得到 8 个单一条带 (孔道 3 含有 3 条单一条带) (图 6-C)。选择对应的目的条带进行切胶回收, 并将回收的片段送测序。

2.4 筛库结果 对测序的结果进行比对, 最终得到了 7 个候选蛋白 (表 5), 分别是线粒体相关的 NADH 脱氢酶 [泛醌]-铁硫蛋白 8-a (Manes.15G163400.1)、依赖钠的磷酸盐转运蛋白 (Manes.14G035900.1)、多聚泛素 4 (Manes.14G035900.1)、GTP 酶激活蛋白 REN1 (Manes.02G146100.1)、木薯生长素应答蛋白 IAA8 (Manes.05G187100.1)、溶质载体家族 35 (Manes.17G049400.1)、富含亮氨酸的重复蛋白, 一些含有 F-box 的蛋白质 (Manes.05G050000.1)。使用数据库中的 *E* 值和置信度来反映比对结果的可靠性, 结果表明这 7 个测序结





M₁. DL 2 000 DNA Marker; M. DL 15 000 DNA Marker; A. 酵母在 SD-Trp-Leu 和 SD-Trp-Leu-Ade-His 固体培养基上的生长情况, 以及将 SD-Trp-Leu-Ade-His 固体培养基上生长的单菌落进行划线保存; B. 通过提取酵母单菌落的质粒, 并以酵母质粒为模板, 用 *MeARF* 的特异性引物扩增得到的阳性克隆; C. 用 pGBKT7 通用引物扩增得到候选互作基因的条带。

M₁. DL 2 000 DNA Marker; M. DL 15 000 DNA Marker; A. Yeast growth on SD-Trp-Leu and SD-Trp-Leu-Ade-His solid media, and single colonies grown on SD-Trp-Leu-Ade-His solid medium; B. Positive clone amplified by *MeARF* specific primers using the yeast plasmid as a template; C. Bands of candidate interacting genes with pGBKT7 universal primers.

图 6 pGADT7-*MeARF* 筛选木薯 pGBKT7 文库
Fig. 6 Screening of the cassava pGBKT7 library by using pGADT7-*MeARF*

表 5 序列比对结果

Tab. 5 Results of the sequence alignment

基因ID Gene ID	基因注释 Gene annotation	E值 E value	置信度/% Confidence level/%
Manes.15G163400.1	NADH DEHYDROGENASE [UBIQUINONE] IRON-SULFUR PROTEIN 8-A, MITOCHONDRIAL-RELATED	0	99.77
Manes.14G035900.1	SODIUM-DEPENDENT PHOSPHATE TRANSPORTERS	1.01E-20	100.00
Manes.04G111000.1	POLYUBIQUITIN 4	0	98.23
Manes.02G146100.1	RHO GTPASE-ACTIVATING PROTEIN REN1	2.64E-01	96.00
Manes.05G187100.1	AUXIN-RESPONSIVE PROTEIN IAA8	0	99.54
Manes.17G049400.1	SOLUTE CARRIER FAMILY 35	0	100.00
Manes.05G050000.1	LEUCINE RICH REPEAT PROTEINS, SOME PROTEINS CONTAIN F-BOX	2.65E-02	93.00

果与候选蛋白序列比对的置信度都在 90% 以上, *E* 值接近或者等于 0, 这些结果表明了序列比对的准确性。

3 讨论

ARF 作为生长素信号通路的重要组成部分, 在植物的生长发育以及逆境胁迫中发挥着重要作用^[2, 10]。已经有 27 个 *ARF* 基因在木薯中被鉴定^[16], 但其在木薯发育及逆境胁迫的研究较少。本研究通过对其蛋白结构以及在木薯中各组织中的相对表达量的分析, 并筛选到相关互作蛋白, 为这一基因的功能研究提供研究基础。

为了探究 *MeARF* 的功能, 本研究首先通过构建进化树的方法, 发现大戟科橡胶树属的橡胶树中的 HbARF 与 *MeARF* 的亲缘关系较近。ARF 结构的多样性, 影响了其功能的差异性, 进而影响生长素的作用^[17-19], 因此深入对 ARF 的蛋白结构进行研究, 有利于更好解析生长素在植物中的作

用。当前的研究普遍认为, ARF 蛋白主要包括 3 个结构域: N 端的 DNA 结合域 (DNA binding domain, DBD)、中间区域 (Middle region, MR) 和 C 端 PB1 结构域^[17]。DNA 结合域主要负责与生长素响应元件结合, 其与顺式作用元件的相互作用是通过植物特有的 B3 亚结构域发生的^[18]。MR 结构域作为 ARF 功能的决定因素, 其参与了生长素感知、蛋白质可用性控制和 DNA 结合调节的过程中, 还具有作为相互作用枢纽的潜在作用^[19]。PB1 结构域具有稳定 ARF 与 DNA 的结合和与 Aux/IAA 相互作用的双重功能^[20]。本研究通过对 *MeARF* 蛋白的三维结构进行分析, 发现了 *MeARF* 蛋白含有 B3 和 PB1 两个结构域, 但是对于 *MeARF* 的 B3 结构域是否可以与下游的生长素响应元件结合还尚不清楚。通过在线数据库预测, 发现 *MeARF* 在木薯的很多部位都存在表达, 其中, *MeARF* 在有组织的胚胎发生结构和侧芽的表达量较高, 说明 *MeARF* 可能参与木薯胚胎和侧

芽的发育, 这为这一基因的功能研究提供了潜在的基础。

ARF 作为转录因子, 通过与一系列蛋白互作在植物中发挥作用。相关研究发现, 生长素响应因子 ARF 与 Ethylene response factor108(ERF108) 相互作用, 介导棉花纤维次生细胞壁的生物合成^[21]。还有研究表明, 植物激素油菜素内酯、生长素和赤霉素通过 Brassinazole resistant(BZR)-ARF-Phytochrome-interacting factor(PIF)/DELLA 的协同作用调控拟南芥中光形态建成相关的下胚轴伸长^[22]。另外, ARF2 与 Ethylene-insensitive3-like1(EIL1) 之间的相互作用可增强 EIL1 的活性, 从而促进木瓜成熟过程中相关基因的表达^[23]。在拟南芥中, ARF4 能够通过竞争 ARF5 与 IAA12 结合来调控芽再生过程^[24]。MeARF 作为一个转录因子, 其可能存在于一个巨大的互作网络中, 本研究通过酵母双杂交实验获得了 7 个互作蛋白, 其中一部分是与植物生长发育相关的蛋白, 包括了线粒体相关的 NADH 脱氢酶 [泛醌]-铁硫蛋白 8-a、GTP 酶激活蛋白 REN1、木薯生长素应答蛋白 IAA8 和富含亮氨酸的重复蛋白, 一些含有 F-box 的蛋白质。其中, 对于模式植物拟南芥, 其线粒体中的 NADH 脱氢酶亚基可以挽救 *slow growth3* (*slo3*) 突变体的生长缺陷以及种子的发育缺陷^[25]。另外, Rho GTP 酶激活蛋白 REN1 可以通过抑制拟南芥花粉管中的 Formin homology5(FH5) 来控制顶端肌动蛋白聚合^[26]。在杨树中, ARF7.2 的 MR 和 PB1 结构域分别负责其与 DELLA 或 Aux/IAA 蛋白的相互作用, 进而调节杨树形成层的发育^[27]。而 MeARF 也包含了 PB1 结构域, 因此推测 MeARF 蛋白可能通过 PB1 结构域与 AUX/IAA8 的相互作用。大豆中存在一种具有 C 端 leucine-rich repeat (LRR) 结构域的 F-BOX 蛋白 (F-BOX proteins with C-terminal LRR domains, FBXL), 其可以显著提高大豆的种子产量、豆荚数、每株种子数、株高^[28]。另外, 本研究还筛选到了与植物胁迫相关的蛋白, 比如多聚泛素 4。之前的研究表明, 在不同的胁迫下 (渗透胁迫、生理盐水胁迫和冷冻胁迫), 水稻中的多聚泛素启动子基因存在差异表达^[29]。除此之外, 筛库还获得了一些目前在植物中研究较少的蛋白, 如依赖钠的磷酸盐转运蛋白、溶质载体家族 35, 它们在植物中的功能以及作用机理还有待进

一步研究。

综上所述, 本研究通过分析 MeARF 的蛋白结构域 (DBD、MR 和 PB1 结构域) 及其在木薯不同组织中的相对表达量, 并获得了 7 个与 MeARF 相互作用的候选蛋白, 可为后续进一步解析 MeARF 在木薯中的功能和作用机理奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] 钱双杰. 拟南芥生长素响应因子 ARF17 调控 *LTPG4* 对花粉管伸长影响 [D]. 上海: 上海师范大学, 2024. doi: 10.27312/d.cnki.gshsu.2024.001030.
- [2] 温绍廷. 生长素调控拟南芥不定根再生的分子机制研究 [D]. 上海: 上海师范大学, 2021. doi: 10.27312/d.cnki.gshsu.2021.000501.
- [3] WANG X Y, YU R B, WANG J J, et al. The asymmetric expression of *SAUR* genes mediated by ARF7/19 promotes the gravitropism and phototropism of plant hypocotyls[J]. *Cell Reports*, 2020, 31(3): 107529.
- [4] ZHANG F, TAO W Q, SUN R Q, et al. Correction: PRH1 mediates ARF7-LBD dependent auxin signaling to regulate lateral root development in *Arabidopsis thaliana* [J]. *PLoS Genetics*, 2022, 18(3): e1010125.
- [5] 臧鹏跃. 番茄 *SlARF3* 对果实大小、可溶性糖以及有机酸影响的初步研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2021. doi: 10.27327/d.cnki.gshnu.2021.000095.
- [6] 徐富贵. *OsARF18* 调控水稻根系发育和磷素吸收的机制研究 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2021. doi: 10.27117/d.cnki.ghenu.2021.000173.
- [7] QIAO J Y, ZHANG Y J, HAN S Q L, et al. *OsARF4* regulates leaf inclination via auxin and brassinosteroid pathways in rice[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 979033.
- [8] ZHAO Z X, YIN X X, LI S, et al. miR167d-*ARFs* module regulates flower opening and stigma size in rice[J]. *Rice*, 2022, 15(1): 40.
- [9] ZHANG X F, CAO J F, HUANG C C, et al. Characterization of cotton ARF factors and the role of GhARF2b in fiber development[J]. *BMC Genomics*, 2021, 22(1): 202.
- [10] ZHANG H H, LI L L, HE Y Q, et al. Distinct modes of manipulation of rice auxin response factor OsARF17 by different plant RNA viruses for infection[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(16): 9112–9121.
- [11] CARUANA J C, DHAR N, RAINA R. Overexpression of *Arabidopsis microRNA167* induces salicylic acid-dependent defense against *Pseudomonas syringae* through the regulation of its targets *ARF6* and *ARF8*[J]. *Plant Direct*, 2020, 4(9): e00270.
- [12] LI J, WU F K, HE Y F, et al. Maize transcription factor *ZmARF4* confers phosphorus tolerance by promoting root morphological development[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(4): 2361.
- [13] WANG C F, LI X M, ZHUANG Y B, et al. A novel miR160a-GmARF16-GmMYC2 module determines soybean salt tolerance and adaptation[J]. *New Phytologist*, 2024, 241(5): 2176–2192.

- [14] 马俊杰, 郭凤丹, 王兴军, 等. 生长素合成、运输和信号转导调控植物胚胎早期发育[J]. *植物生理学报*, 2019, 55(5): 547–557.
- [15] 吴元彩, 王东登, 郑旭阳, 等. 激素和蔗糖对番茄子叶节位侧芽萌发与生长的影响[J]. *南方农业学报*, 2024, 55(2): 509–519.
- [16] 庞祥宇. 木薯 *IAA/ARF* 基因家族预测、表达及功能分析[D]. 南宁: 广西大学, 2019.
- [17] LI Y H, HAN S Q L, QI Y. Advances in structure and function of auxin response factor in plants[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2023, 65(3): 617–632.
- [18] SWAMINATHAN K, PETERSON K, JACK T. The plant B3 superfamily[J]. *Trends in Plant Science*, 2008, 13(12): 647–655.
- [19] CANCE C, MARTIN-AREVALILLO R, BOUBEKEUR K, et al. Auxin response factors are keys to the many auxin doors[J]. *New Phytologist*, 2022, 235(2): 402–419.
- [20] FONTANA M, ROOSJEN M, CRESPO GARCÍA I, et al. Cooperative action of separate interaction domains promotes high-affinity DNA binding of *Arabidopsis thaliana* ARF transcription factors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(11): e2219916120.
- [21] WANG Y, LI Y, HE S P, et al. The transcription factor ERF108 interacts with AUXIN RESPONSE FACTORS to mediate cotton fiber secondary cell wall biosynthesis[J]. *The Plant Cell*, 2023, 35(11): 4133–4154.
- [22] LIU K, LI Y H, CHEN X N, et al. ERF72 interacts with ARF6 and BZR1 to regulate hypocotyl elongation in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(16): 3933–3947.
- [23] ZHANG T, LI W J, XIE R X, et al. CpARF2 and CpEIL1 interact to mediate auxin-ethylene interaction and regulate fruit ripening in papaya[J]. *The Plant Journal*, 2020, 103(4): 1318–1337.
- [24] 李秉贞. 生长素响应因子 ARF4 通过与 IAA12 互作调控拟南芥芽再生[D]. 泰安: 山东农业大学, 2020. doi: 10.27277/d.cnki.gsdnu.2020.000946.
- [25] HSIEH W Y, LIN S C, HSIEH M H. Transformation of *nad7* into the nuclear genome rescues the *slow growth3* mutant in *Arabidopsis*[J]. *RNA Biology*, 2018, 15(11): 1385–1391.
- [26] XU Y N, SHEN J F, RUAN H Q, et al. A RhoGAP controls apical actin polymerization by inhibiting formin in *Arabidopsis* pollen tubes[J]. *Current Biology*, 2024, 34(21): 5040–5053.
- [27] HU J, SU H L, CAO H, et al. AUXIN RESPONSE FACTOR7 integrates gibberellin and auxin signaling via interactions between DELLA and AUX/IAA proteins to regulate cambial activity in poplar[J]. *The Plant Cell*, 2022, 34(7): 2688–2707.
- [28] HINA A, KHAN N, KONG K K, et al. Exploring the role of *FBXL* gene family in Soybean: implications for plant height and seed size regulation[J]. *Physiologia Plantarum*, 2024, 176(1): e14191.
- [29] PERALES L, PEÑARRUBIA L, CORNEJO M J. Induction of a polyubiquitin gene promoter by dehydration stresses in transformed rice cells[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2008, 165(2): 159–171.

Cloning of *MeARF* and screening of interacting proteins in cassava

WU Jingyuan[#], TANG Luzhi, ZHU Binbin, ZHAO Huiping^{*}

(School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University/Hainan Key Biotechnology Laboratory for Salt-tolerant Crops, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: An attempt was made to analyze the function and mechanism of auxin response factor (ARF) in cassava. A *MeARF* gene was cloned from different tissues of cassava and analyzed by using bioinformatics, and an evolutionary tree was constructed to illustrate its homologous relationship. The analysis of the protein structure of *MeARF* found that the protein contained the conserved B3 domain (B3 DNA binding domain, B3) and PB1 domain (Phox and Bem1p, PB1). The analysis of the expression levels of *MeARF* in different tissues showed that the expression level of *MeARF* was relatively high in the lateral buds of cassava. Furthermore, the gene expression vector of pGADT7-*MeARF* was constructed, and the cDNA library of cassava was screened by yeast two-hybrid experiments. The candidate proteins related to plant growth, development and immunity were screened. The results indicate that *MeARF* might be involved in growth, development and immunity of cassava.

Keywords: auxin response factor; cassava; protein structure; yeast two-hybrid; candidate protein

(责任编辑: 潘学峰)