

决明 *Aux/IAA* 和 *ARF* 基因家族鉴定、表达及蛋白互作分析

冯 昭¹, 刘世鹏¹, 吕蕊花¹, 吕瑞华¹, 胡晓晨², 张明英², 毛仁俊^{3*}, 张 岗^{2*}

(1. 陕西中医药大学医学技术学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西中医药大学药学院, 陕西省中医药管理局“秦药”研发重点实验室, 陕西 咸阳 712046; 3. 延安大学生命科学学院, 陕西 延安 716000)

摘要: 植物生长素早期响应基因家族 (auxin/indole-3-acetic acid, *Aux/IAA*) 及其与生长素响应转录因子 (auxin response factor, *ARF*) 的互作是调控植物生长发育的重要方式。本文基于药用植物决明 (*Senna tora* L.) 全基因组数据鉴定到 28 个 *StoIAA* 和 24 个 *StoARF* 成员, 分别归为 10 个和 8 个亚家族。系统发育树和共线性分析发现, 决明与大豆 (*Glycine max*)、蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 的 *IAA*、*ARF* 同源基因均存在密切的进化关系, 且基因片段重复事件主导了 *StoIAA* 和 *StoARF* 的扩张。基因结构分析显示, 绝大多数 *StoIAAs* 和 *StoARFs* 含有特征保守结构域。转录组数据分析显示, *StoIAAs* 和 *StoARFs* 在叶、根和种子中均有表达, 部分成员具有组织表达特异性。*StoIAA* 和 *StoARF* 启动子区域多含有与胁迫响应、生长发育、激素诱导、次生代谢等相关的作用元件。基因表达分析显示许多 *StoIAAs* 和 *StoARFs* 能够迅速响应干旱和盐胁迫, 且在两种胁迫条件下表现出相似的表达模式。酵母双杂交实验证实 *StoARF8* 和 *StoARF10* 分别与多个 *StoIAA* 蛋白之间同时存在不同程度的互作。以上研究结果为进一步开展决明 *Aux/IAA* 和 *ARF* 基因家族的生物学功能分析提供基础。

关键词: 决明; *Aux/IAA*; 生长素响应转录因子; 激素; 蛋白互作

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)03-0751-13

Identification, expression and protein interaction analysis of *Aux/IAA* and *ARF* gene family in *Senna tora* L.

FENG Zhao¹, LIU Shi-peng¹, LÜ Rui-hua¹, LÜ Rui-hua¹, HU Xiao-chen², ZHANG Ming-ying², MAO Ren-jun^{3*}, ZHANG Gang^{2*}

(1. College of Medical Technology, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China; 2. Key Laboratory for Research of "Qin Medicine" of Shaanxi Administration of Chinese Medicine, College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China; 3. College of Life Science, Yan'an University, Yan'an 716000, China)

Abstract: The early response of plant auxin gene family *Aux/IAA* (auxin/indole-3-acetic acid) and its interaction with auxin response factor (*ARF*) are important pattern to regulate plant growth and development. This work identified 28 *StoIAA* and 24 *StoARF* members based on the whole genome data of the medicinal plant *Senna tora* L., which were classified into 10 and 8 subfamilies, respectively. Phylogenetic tree and collinearity analysis showed that *S. tora* has close evolutionary relationship with the *IAA* and *ARF* homologous genes of *Glycine max*, *Medicago truncatula*, and the segment duplication events dominate the expansion of *StoIAA* and *StoARF*. Gene structure analysis showed that the vast majority of *StoIAA* and *StoARF* contain characteristic conserved domain. Transcriptome data showed that *StoIAAs* and *StoARFs* were expressed in leaves, roots and seeds, some members

收稿日期: 2023-05-25; 修回日期: 2023-08-15.

基金项目: 陕西省教育厅专项科研项目 (23JK0401, 21JK0989); 陕西中医药大学校级科研课题 (2021GP07); 陕西省自然科学基金 (2021JQ-636); 陕西中医药大学学科创新团队 (2019-QN01).

*通讯作者 Tel: 86-29-38185165, E-mail: jay_gumling2003@aliyun.com;

Tel: 86-911-2332030, E-mail: mrjnwsuaf@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0666

had tissue specific expression. The *StoIAA* and *StoARF* promoter region most contain functional elements related to stress response, growth and development, hormone induction and secondary metabolism. In addition, gene expression analysis showed that many *StoIAAs* and *StoARFs* can quickly respond to drought and salt stress and exhibited same expression patterns under both stress condition. The yeast two-hybrid experiment confirmed that *StoARF8* and *StoARF10* exhibit varying degrees of interaction with multiple *StoIAA* proteins, respectively. The above results provide a basis for further biological functional analysis of the Aux/IAA and ARF gene family of *S. tora*.

Key words: *Senna tora*; *Aux/IAA*; auxin response factor; hormone; protein interaction

植物生长素 (auxin, Aux) 在植物生长发育和环境胁迫生理适应方面发挥重要作用,其种类繁多,吲哚-3-乙酸 (3-indoleacetic acid, IAA) 就是一种典型的植物生长激素^[1]。生长素通过调节早期响应基因,如 *Aux/IAA* 基因、生长素响应因子 (ARF) 和生长素上调小 RNA (small auxin upregulated RNA, SAUR) 等^[2]发挥作用。其中, *Aux/IAAs* 和 *ARFs* 对于生长素介导转录调控至关重要,在生长素缺乏的情况下, *Aux/IAA* 能与 *ARFs* 蛋白互作调控基因表达^[3]。研究证实, *Aux/IAA* 参与调控植物体生长发育进程,例如,敲除拟南芥 *IAA3/SHY2* 影响生长素平衡和侧根形成^[4]。TIR1/AFB2 与 AtIAA2、AtIAA6、AtIAA9 或 AtIAA17 能够形成特殊的传感复合物,经生长素处理能够调节植物茉莉酸平衡和不定根的起始发育^[5]。*Aux/IAA* 基因还参与多种逆境胁迫响应,如水稻 *OsIAA9*、*OsIAA20* 受干旱和盐胁迫诱导表达^[6],干旱条件下,大豆 *GmIAA47*、*GmIAA49* 在生殖阶段叶片的转录水平显著增加^[7]。

Aux/IAA 蛋白主要含有四个保守结构域。结构域 I 含有一个保守的亮氨酸重复基序 (LxLxLx motif),与一种联合抑制蛋白 TOPLESS (TPL) 共同介导依赖生长素的转录抑制过程^[8]。结构域 II 作为生长素降解区,通过泛素降解降低 *Aux/IAA* 蛋白的稳定性^[9]。III/IV 区域内包含一个羟基末端的 PB1 (Phox 和 Bem1) 基序, *Aux/IAA* 不直接与目标基因生长素反应元件 (AuxRE) 结合,但可通过该结构域与 ARF 蛋白互作参与调控下游基因表达。ARF 蛋白通常包含一个 N 端高度保守的 DNA 结合结构域 (DNA-binding domain, DBD)、中间区域 (middle region, MR) 和 C 端二聚体结构域 (C-terminal domain, CTD)^[2]。DBD 赋予 ARFs 特异性结合许多生长素响应基因的 TGTCTC 元件,MR 为非保守区域,有转录激活或抑制作用^[10],CTD 参与 *Aux/IAAs* 和 *ARFs* 的二聚化^[11]。*ARF* 基因功能多样,拟南芥 AtARF7 和 AtARF19 通过调节单个或部分重叠的目标基因,对生长素调节的植物发育过程至关重要^[12]。另有证据表明,在生长素调控次级代谢产物的生物合成过程中, *Aux/IAA*-ARF 信号通路介导并发挥关键作用^[13,14]。

决明 (*Senna tora* L.) 为豆科决明属草本植物,其成熟干燥种子作中药材决明子药用历史悠久,主治目赤涩痛,羞明多泪,头痛眩晕,大便秘结^[15]。决明中含有甾体化合物、大黄酚、大黄素等活性成分,还有人体必需的微量元素,具有抗菌、降血压、降血脂、抗血小板凝集、保肝等功效^[16,17]。决明原产于我国,喜光照,稍耐旱,不耐寒,主要分布在安徽、四川、广东及陕西等省适生区^[18]。然而,过度开发和环境污染已严重影响药用植物生态农业的发展,抗逆新品种的培育和提高药材品质是解决该问题的关键。本草基因组学从基因组水平研究中药,为次生代谢产物的生物合成和基因组辅助分子育种提供重要基础^[19]。虽然 *Aux/IAA* 和 *ARF* 在许多物种中得以鉴定,但其在药用植物中的研究仍较匮乏。本研究利用决明基因组数据^[20]开展 *Aux/IAA* 和 *ARF* 基因家族鉴定、表达和蛋白互作等研究,旨在为进一步明确其在决明次生代谢调控及药材品质形成中的生物学功能奠定基础。

材料与方法

决明 *IAA* 和 *ARF* 成员鉴定 决明全基因组注释文件和文件下载自 NABIC (http://nabic.rda.go.kr/Species/Senna_tora2)。已报道的拟南芥 *IAA* 和 *ARF* 基因序列下载自 TAIR 数据库 (<http://www.arabidopsis.org/>),用作参考序列查询决明。蒺藜苜蓿和大豆 *IAA* 与 *ARF* 蛋白序列分别下载自 <https://www.mdpi.com/article/10/3390/ijms221910494/s1> 和 SoyBase (<https://www.soybase.org/>)。根据 *Aux/IAA* 和 *ARF* 家族结构域的主要特性对经双向 BLAST 比对后获得的成员进一步筛选,并利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 和 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>) 检测所有生成的非冗余蛋白序列中是否存在特征结构,最终确定决明 *IAA* 和 *ARF* 成员及蛋白序列。

决明 *IAA* 和 *ARF* 蛋白序列分析 使用 ExPASy 的 ProParam 工具 (<http://web.expasy.org/protparam/>),分析 *StoIAA* 和 *StoARF* 蛋白的理化性质,包括蛋白分子量 (MW)、理论等电点 (pI)、亲水性总平均值 (GRAVY)。

利用 ClustalX 分别对 StoIAA 和 StoARF 氨基酸序列进行多序列比对。使用 MEGA-X 的邻接法 (NJ), 设置 1 000 bootstrap 重复, 构建决明 IAA 和 ARFs 系统发育树。利用 TBtools 软件^[21], 分析 *StoIAA* 和 *StoARF* 基因的外显子-内含子结构。使用 MEME 在线网站 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 对成员的保守基序 (motifs) 进行分析。

基因重复事件与共线性分析 使用 MescanX (multiple collinearity scan toolkit) 工具对决明种内 IAA 和 ARF 基因重复事件以及决明与拟南芥、蒺藜苜蓿、大豆种间的 IAA、ARF 基因共线性关系分别进行分析。结果均通过 TBtools 中 Advanced Circos 功能进行展示。

启动子顺式元件分析 使用 TBtools 软件提取 CDS 上游 2 kb 基因组 DNA 序列, 提交至 PlantCare 数据库 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行顺式作用元件预测。

植物材料与处理方法 以采自陕西中医药大学药用植物园的决明种子为试材, 经陕西中医药大学张雨曲博士鉴定为药用豆科植物决明 (*Senna tora* L.)。

选取大小均匀的决明种子, 经表面消毒处理后, 平铺于 2% 的水琼脂平板, 28 °C 暗培养条件下催芽 24~48 h。随后将发芽的幼苗移至装有土壤混合物 (珍珠岩:蛭石体积比为 2:1) 的培养袋, 置光照培养箱 (上海一恒仪器 MGC-BP) 中培养 (22 °C, 光照强度 9 000 lx, 16 h/8 h 光暗交替), 每袋种 4 株, 每 5~7 天加入适量霍格兰营养液^[22]。约 15~20 天, 幼苗长至 4 叶期, 选取长势一致的植株, 用 200 mmol·L⁻¹ 氯化钠+霍格兰营养液进行盐胁迫处理, 用 30% PEG6000+霍格兰营养液进行干旱胁迫处理, 对照组用霍格兰营养液浇灌, 处理植株 0、3、6、12 和 24 h 后收集根; 所有样本均迅速用液氮冷冻, -80 °C 保存备用。

表达分析 决明根、叶、幼嫩种子和成熟种子全转录组数据 (SAMN09657134) 下载自 NCBI Sequence Read Archive (SRA) 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>), 使用 TBtools-RNAseq 界面化转录组数据分析功能, 先后经 FastQC 质控、Trimmomatic 去除接头和 Kallisto 分析转录水平数据。

使用 RNA 提取试剂盒 (TIANGEN, 中国) 提取决明根总 RNA, SMARTScribeTM 反转录酶 (TaKaRa) 合成制备模板 cDNA, 进行目的基因的 qRT-PCR 分析。使用 20 μL 反应体系, 包含 1 μL cDNA 模板、0.5 μL 上下游引物、10 μL SYBR 预混液及 8 μL DEPC 水。使用 ABI 7300 进行 qPCR 反应, 程序为: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 35 s, 共进行 40 个循环。使用 *StoActin* 作为内参基因, 通过 2^{-ΔΔCT} 方法^[23] 计算表达量, 统计分析采

用 SPSS19.0 软件进行威尔克森符号秩检验 (Wilcoxon signed-rank test), 特异性引物见表 1、2。

蛋白互作分析及酵母双杂交验证 通过 STRING (<https://www.string-db.org/>) 在线数据库, 分析决明 Aux/IAA 和 ARF 蛋白的互作网络。由于 ARF 作为转录因子, 所以将候选基因 *StoARF* 的 CDS 全长序列与 pGADT7 (active domain, AD) 载体经同源重组, 构建猎物蛋白载体 *StoARF*-pGADT7, 转入酵母菌 Y187, 同样, 将 *StoIAA* 的 CDS 全长序列与 pGBKT7 (binding domain, BD) 经同源重组构建诱饵蛋白载体 *StoIAA*-pGBKT7, 转入酵母菌 Y2H (yeast 2 hybrid), 目的基因特异性引物见表 2, 线性化载体与目的基因 PCR 产物同源重组反应体系按照 ClonExpress[®] II One Step Cloning Kit 说明书计算。两种酵母菌经杂交后筛选单克隆, 利用不同缺陷型培养基观察是否存在自激活现象, 选择无自激活现象的 StoIAAs 进行互作验证。将 *StoARF*-pGADT7 与 *StoIAA*-pGBKT7 共转至酵母菌株 Y2H, 由于 pGADT7 含有亮氨酸 (Leu), pGBKT7 含有色氨酸 (Trp), 所以融合成功的酵母菌可在 SD/-Trp/-Leu 二缺平板上生长, 经重组单克隆筛选, 将繁育菌液分别滴加于 SD-Leu/-Trp 缺陷型培养基 (DDO)、SD-Leu/-Trp/-His 缺陷型培养基 (TDO)、SD-Leu/-Trp/-His/-Ade 缺陷型培养基 (QDO)+X-α-gal 平板, 观察互作关系。

结果

1 决明 IAA 和 ARF 成员的鉴定

以拟南芥和蒺藜苜蓿 IAA、ARF 序列作为参考序列, 在决明基因组中搜索获得 30 个 StoIAA 和 24 个 StoARF 成员, 通过 Pfam 和 SMART 分析结构域后, 确定了 28 个 StoIAA 和 24 个 StoARF 成员, 基于染色体分布, 分别命名为 StoIAA1-StoIAA28 (表 3) 和 StoARF1-StoARF24 (表 4)。StoIAA 氨基酸长度从 85 aa (StoIAA13) 到 356 aa (StoIAA7) 不等, 平均长度为 229 aa; StoARF 的平均氨基酸长度为 802 aa, StoIAAs 的预测 MW 从 9.39 kDa 到 38.61 kDa 不等, pI 从 4.81 到 10.00 不等 (表 3)。而 StoARFs 的预测 MW 从 27.69 kDa 到 152.80 kDa, pI 从 5.23 到 8.69 (表 4)。所有 StoIAAs 和 StoARFs 预测的 GRAVY 为负值, 表明 StoIAAs 和 StoARFs 是亲水蛋白。

2 决明 IAA 和 ARFs 的系统进化和多序列比对

系统进化分析结果显示, 决明中 Aux/IAA 基因家族和 ARF 基因家族也分别分为 10 个亚家族 (I-X) 和 8 个亚家族 (I-VIII) (图 1A、B), 与拟南芥^[24]、蒺藜苜蓿^[25] 和大豆^[26,27] 相同。在 Aux/IAA 的 10 个亚家族中, VIII 和 IX 包含以上 3 个物种 Aux/IAA 成员, 其他 8 个亚家族中均包含以上所有 4 个物种的 Aux/IAA 成员 (图 1A), 表

Table 1 Primers used for quantitative real-time PCR (qRT-PCR) in this study. *StoIAAs*: Auxin/indole-3-acetic acid (*Aux/IAA*) gene from *S. tora* (*Sto*); *StoARFs*: Auxin response factor gene (*ARF*) from *Sto*

Gene	Gene ID	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Size/bp
<i>StoIAA1</i>	Sto01g002110	ACTGGATGCTTGCTGGGG	TCCAAGCAGCACTCGCAA	150
<i>StoIAA2</i>	Sto01g002120	ATTGTTGATGCCGCGGT	GGCCACCCCAAACTTGA	95
<i>StoIAA3</i>	Sto01g003090	TGGGATGGCTCCAATTCG	GCAACAACAACACCACGCT	133
<i>StoIAA4</i>	Sto02g036010	GTTAGGCCGACGGAAGGG	CGCCGCATACCCAGAGAG	124
<i>StoIAA5</i>	Sto03g064360	GCTAAGCCACCTGCAGCT	TCCTCCTCCTGTCTCGCC	126
<i>StoIAA6</i>	Sto03g064380	GCAGCATGGGAGGCATCA	AGGGTGCTTGTGGCCACT	89
<i>StoIAA7</i>	Sto05g123870	GTCCCCAGGCCTACTCA	TCTCGAGTGC GGCTTTG	119
<i>StoIAA8</i>	Sto06g204060	GGAGCTCAGCCAACTCG	AGCTGGTGC ACTGCCATT	120
<i>StoIAA9</i>	Sto08g232830	GGTTGGCCACCAAGTTCGA	TCACAAAACGTTGC GCCG	89
<i>StoIAA10</i>	Sto08g235250	CAGCAGCAACCACCCACT	AGGCTGCCCCCTACTTGA	142
<i>StoIAA11</i>	Sto08g238370	GCTGTGCCTCTTCCTCCC	GATCTGCCCCACGACAG	134
<i>StoIAA12</i>	Sto08g238390	CCAACCCTCCTGCCAAGG	TGGAGTCCATCCATGCT	149
<i>StoIAA13</i>	Sto08g239310	TGAACCCGATGCAGCCAG	AGCATCCAGTCTCCCTCT	144
<i>StoIAA14</i>	Sto08g252470	ACCTCAAAGCCACCGAGC	GAAACCCCTCTTGGCCCC	107
<i>StoIAA15</i>	Sto09g281850	GTCCTGTGGTGGGATGGC	TCCCAGCAAGCTTGTCCAC	126
<i>StoIAA16</i>	Sto09g282170	TTGGGCTTCTGGCTGTG	AGCCTCTCTTAGATCCAGCCA	117
<i>StoIAA17</i>	Sto09g282820	ATGGTGGTGACGACGGTG	TCCCCTCCTCCTCCTCT	84
<i>StoIAA18</i>	Sto09g282850	CCAAAGCGGGCACGAAAC	TCCGATCCCTTTGGTGCG	118
<i>StoIAA19</i>	Sto09g310410	TCCTCTGTGTCCCTCGAAGA	TCCCCCTCGAGAAGCCA	81
<i>StoIAA20</i>	Sto10g348320	GCTACGGCTCGGGTTACC	AACCAGCGTCAATGGCGT	140
<i>StoIAA21</i>	Sto11g355830	ACTGTGCAACCTGAAGCCT	CCAATGCACTGAGTTTGGCA	91
<i>StoIAA22</i>	Sto12g391490	CGATTCGGCCCCCTCCTTC	ATCCCACCACTCTCGCCT	102
<i>StoIAA23</i>	Sto12g391500	GATGCTCTTCCGCCTCC	TCTGCCCTCCTGAAGCA	106
<i>StoIAA24</i>	Sto13g437070	GTGACTCCATGCTCACCGA	AGTGTTACGTTGGCCCC	113
<i>StoIAA25</i>	Sto13g437970	TTGGATGCTTGTGCGCGA	TGCATGGCTCTTGGTGCA	108
<i>StoIAA26</i>	Sto13g438000	GGGATGGCCACCTGTGAG	GCACCAGCCATGCTCACT	96
<i>StoIAA27</i>	Sto13g440900	ACCATTCTCTTGGGGACGG	GGAACATCCCCAACACGA	104
<i>StoIAA28</i>	Sto13g443170	GGATGGCCACCTGTTTCA	AGGAGCTCCATCCATGCT	102
<i>StoARF1</i>	Sto02g025950	GGGGTCAACCAAGGAGGC	GCAGCCCTACGATTCCC	136
<i>StoARF2</i>	Sto02g051230	GGAGCTGCGTGTGGAGT	GCA GTGGCCAGAACACCA	102
<i>StoARF3</i>	Sto02g052010	CCACCCTTCTGTCAGG	CTGGTGTGCTAACCCCC	146
<i>StoARF4</i>	Sto03g060360	TGGCATGCATGTGCTGGA	GCTGCAACTGTCTCGCTG	92
<i>StoARF5</i>	Sto03g087170	CCTGTGCTGGTCCCCTTG	ACGCCTCCACCTGTCTA	87
<i>StoARF6</i>	Sto04g089020	GCGGACCAGCATATGCCT	GCTCCGGAACCAACGTCA	124
<i>StoARF7</i>	Sto04g116880	ACAATCCAAGGGCCAGCC	CTCGCACTCCAGACTCC	130
<i>StoARF8</i>	Sto05g119260	TCAGTACCTCGCAGGGCT	CTCTTCGGCTGACCACGG	140
<i>StoARF9</i>	Sto05g122210	CTGCCGCTATCCTTCGT	AGGTGCATCGGCGGATTC	139
<i>StoARF10</i>	Sto05g157220	ACCGGCTCAAGAAGGGGA	GTTGAAGCGGCAACCTGC	141
<i>StoARF11</i>	Sto05g157230	GGGTATCCGGCGAGCAA	GCTATTTGTGGCAGCGGC	115
<i>StoARF12</i>	Sto06g173650	AGGCAGAGCAAGCAGGTG	CTGCTCGACCAACAGCCA	82
<i>StoARF13</i>	Sto06g192810	ACGACGTTGAATCGCGGT	GTCGACAAGAGGTCCCGC	119
<i>StoARF14</i>	Sto07g215360	AATGGTGGCGGCTTCTCC	GACGTCCTTGGCCGAGAC	105
<i>StoARF15</i>	Sto07g215710	GGGCGGCTGAAGACTGTT	AAGCAGATGCCGCCTTGG	137
<i>StoARF16</i>	Sto08g237050	CGCCGGCCCTTCTGTAA	AAGGCAGCGACCTGTTC	84
<i>StoARF17</i>	Sto08g240730	ACAGAGGAACGCCAAGGC	TGAATCCCCCGCAACGAG	83
<i>StoARF18</i>	Sto08g255920	GGCTGTAACCTCCGCGGT	GCTCTCACAGACGAGGCC	99
<i>StoARF19</i>	Sto08g260200	CTGGGCATCTGGGGCTTC	ATTGCCCTGCTCCAGCTG	93
<i>StoARF20</i>	Sto09g302520	CTGCTGGGACTCGTGTGG	TCAACTGGGGTGGCAAGC	117
<i>StoARF21</i>	Sto12g377610	GACGACTGGGTGGAGCAC	GGCGAATCCCCACACACA	104
<i>StoARF22</i>	Sto13g414350	GCCCCGATGATCCTCTGC	ACATGTCCAATGGCGGCA	144
<i>StoARF23</i>	Sto13g425100	GCTTCGGGTTTGGCTCCT	GCTGCTCAAAGTGGCCCT	145
<i>StoARF24</i>	Sto13g430430	CGTGTTCGGGTGGATCCT	TGTGGCTGCCCTAACTGC	80

明 *Aux/IAA* 成员分化早于物种分化。

ARF 的 8 个亚家族中, 绝大多数 *StoARFs* 含有由一个植物特异性 B3 结构域和一个 *ARF* 结构域共同组成的保守 DBD。根据中间区域 (MR) 的氨基酸序列特

征, 亚家族 III-V 中的 *StoARF3*、4、7、8、10、11、19、20、24 的 MD 区域富含谷氨酰胺 (Q)、丝氨酸 (S) 和亮氨酸 (L), 而亚家族 I 中的 *StoARF2*、5、6、12、13、16、22 的 MR 则多含有丝氨酸、原氨酸 (P)、亮氨酸和甘氨酸 (G)。

Table 2 Primer sequences used for vector construction for yeast 2 hybrid (Y2H) analysis

Gene	Restriction enzyme	Primer sequence
<i>StoARF8</i>	<i>EcoR</i> I	For: TGGCCATGGAGGCCGAATTCATGGCTTTCGTGGAAGACAAGATT
	<i>BamH</i> I	Rev: CGCTGCAGGTCGACGGATCCCTATATGAAGCCACCCGACATGGA
<i>StoARF10</i>	<i>EcoR</i> I	For: TGGCCATGGAGGCCGAATTCATGAGGCTCTCTTCATCTGGACT
	<i>BamH</i> I	Rev: CGCTGCAGGTCGACGGATCCCTCAACTACCAGATTCATGCAATTCA
<i>StoIAA2</i>	<i>EcoR</i> I	For: GCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGACTCTTGGACTTGAGATC
	<i>BamH</i> I	Rev: CAGCTCGAGCTCGATGGATCTCACTTCGTTTTGCCCTTCAAAGATCC
<i>StoIAA5</i>	<i>EcoR</i> I	For: GCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGCCGCTTTGGGATTGA
	<i>BamH</i> I	Rev: CAGCTCGAGCTCGATGGATCTTAGCTTCTGCTTTTGCATTTTTTC
<i>StoIAA8</i>	<i>EcoR</i> I	For: GCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGTCTACGCCAGTGTTAGTT
	<i>BamH</i> I	Rev: CAGCTCGAGCTCGATGGATCCTAGCTCCTGCTCTTGGATT
<i>StoIAA10</i>	<i>EcoR</i> I	For: GCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGGCAAAGGGTCAAGCTC
	<i>BamH</i> I	Rev: CAGCTCGAGCTCGATGGATCTTAGCACCCAAATGCATCTACCC
<i>StoIAA13</i>	<i>EcoR</i> I	For: GCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGATGGGTACCAATTGG
	<i>BamH</i> I	Rev: CAGCTCGAGCTCGATGGATCCTACCCCAAGGTACATCT
<i>StoIAA17</i>	<i>EcoR</i> I	For: GCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGGGAAGGAAGAATTGGGAG
	<i>BamH</i> I	Rev: CAGCTCGAGCTCGATGGATCTTACTCCAAGGGACATC
<i>StoIAA20</i>	<i>EcoR</i> I	For: GCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGAGAAAAGCTCCGATAAGTTTTC
	<i>BamH</i> I	Rev: CAGCTCGAGCTCGATGGATCTTAATTACGACTTTTGCACCT
<i>StoIAA21</i>	<i>EcoR</i> I	For: GCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGATTCTAACACTTCCAGCTTTG
	<i>BamH</i> I	Rev: CAGCTCGAGCTCGATGGATCTTAGGTGTAGCTAGAAGAACAA
<i>StoIAA27</i>	<i>EcoR</i> I	For: GCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGGCAAACCCTCTGCTTC
	<i>BamH</i> I	Rev: CAGCTCGAGCTCGATGGATCCTATACCTGGGTGATCCTTAG
<i>StoIAA28</i>	<i>EcoR</i> I	For: GCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGAGTGGGAAAGATATGAAGG
	<i>BamH</i> I	Rev: CAGCTCGAGCTCGATGGATCTCATATGGCGCAGGCCAATCCTT

Table 3 Analysis of physical and chemical properties of *StoIAA* gene family. CDS: Coding sequece; pI: Isoelectric point

Protein	Gene ID	CDS length / bp	Protein length / aa	Molecular mass / kDa	pI	Subcellular localization
StoIAA1	Sto01g002110	642	213	23.68	8.44	Cytoplasmic
StoIAA2	Sto01g002120	567	188	20.88	7.62	Nuclear
StoIAA3	Sto01g003090	747	248	27.10	6.97	Nuclear
StoIAA4	Sto02g036010	558	185	19.78	10.00	Cytoplasmic
StoIAA5	Sto03g064360	624	207	22.88	8.82	Cytoplasmic
StoIAA6	Sto03g064380	711	236	26.50	6.54	Cytoplasmic
StoIAA7	Sto05g123870	1 071	356	38.61	7.15	Cytoplasmic
StoIAA8	Sto06g204060	1 068	355	38.24	7.61	Nuclear
StoIAA9	Sto08g232830	717	238	26.17	8.63	Cytoplasmic
StoIAA10	Sto08g235250	528	175	19.20	5.69	Chloroplast
StoIAA11	Sto08g238370	711	236	26.35	6.51	Chloroplast
StoIAA12	Sto08g238390	732	243	26.97	8.52	Nuclear
StoIAA13	Sto08g239310	258	85	9.39	4.88	Nuclear
StoIAA14	Sto08g252470	729	242	26.36	8.62	Nuclear
StoIAA15	Sto09g281850	912	303	33.25	6.02	Nuclear
StoIAA16	Sto09g282170	831	276	30.70	5.91	Nuclear
StoIAA17	Sto09g282820	492	163	18.56	4.81	Nuclear
StoIAA18	Sto09g282850	588	195	21.56	8.70	Cytoplasmic
StoIAA19	Sto09g310410	1 032	343	38.09	6.47	Nuclear
StoIAA20	Sto10g348320	828	275	29.88	8.22	Chloroplast
StoIAA21	Sto11g355830	654	217	24.83	5.74	Nuclear
StoIAA22	Sto12g391490	603	200	22.08	5.36	Nuclear
StoIAA23	Sto12g391500	945	314	34.91	4.96	Nuclear
StoIAA24	Sto13g437070	771	256	27.89	6.01	Nuclear
StoIAA25	Sto13g437970	399	132	14.74	7.65	Chloroplast
StoIAA26	Sto13g438000	570	189	21.26	5.42	Chloroplast
StoIAA27	Sto13g440900	429	142	15.72	6.21	Chloroplast
StoIAA28	Sto13g443170	588	195	22.00	5.24	Chloroplast

从系统发育树可以看出,除了较为特殊的亚家族 VIII 以外, *StoARFs* 与 *StoIAAs* 类似,在系统发育关系上与 *MtARFs* 和 *GmARFs* 更加靠近。

3 基因结构与 motif 分析

StoIAAs 和 *StoARFs* 的外显子/内含子分布结果显示,除了 *StoIAA13* 和 *StoIAA17* 只含有 1 个内含子外,其他

Table 4 Analysis of physical and chemical properties of *StoARF* gene family

Protein	Gene ID	CDS length / bp	Protein length / aa	Molecular mass / kDa	pI	Subcellular localization
StARF1	Sto02g025950	1 992	663	72.48	6.33	Nuclear
StARF2	Sto02g051230	2 991	996	112.02	8.1	Plasma membrane
StARF3	Sto02g052010	3 072	1 023	114.51	7.96	Nuclear
StARF4	Sto03g060360	3 297	1 098	122.46	6.02	Nuclear
StARF5	Sto03g087170	2 598	865	96.38	6.22	Nuclear
StARF6	Sto04g089020	2 694	897	99.46	6.32	Nuclear
StARF7	Sto04g116880	4 104	1 367	152.80	6.2	Nuclear
StARF8	Sto05g119260	2 805	934	103.22	5.23	Nuclear
StARF9	Sto05g122210	1 920	639	71.13	8.69	Chloroplast
StARF10	Sto05g157220	750	249	27.69	6.19	Chloroplast
StARF11	Sto05g157230	2 166	721	79.47	6.32	Nuclear
StARF12	Sto06g173650	2 118	705	78.73	5.78	Nuclear
StARF13	Sto06g192810	2 493	830	92.89	5.77	Nuclear
StARF14	Sto07g215360	2 025	674	75.72	8.58	Nuclear
StARF15	Sto07g215710	2 409	802	88.52	6.59	Nuclear
StARF16	Sto08g237050	2 226	741	82.31	6.2	Nuclear
StARF17	Sto08g240730	2 028	675	74.04	6.85	Nuclear
StARF18	Sto08g255920	1 821	606	66.74	6.74	Nuclear
StARF19	Sto08g260200	3 207	1 068	117.49	6.07	Nuclear
StARF20	Sto09g302520	2 547	848	94.61	6.06	Nuclear
StARF21	Sto12g377610	2 019	672	74.22	6.94	Nuclear
StARF22	Sto13g414350	1 857	618	68.91	5.87	Nuclear
StARF23	Sto13g425100	2 016	671	73.84	7.29	Nuclear
StARF24	Sto13g430430	2 670	889	98.82	5.87	Nuclear

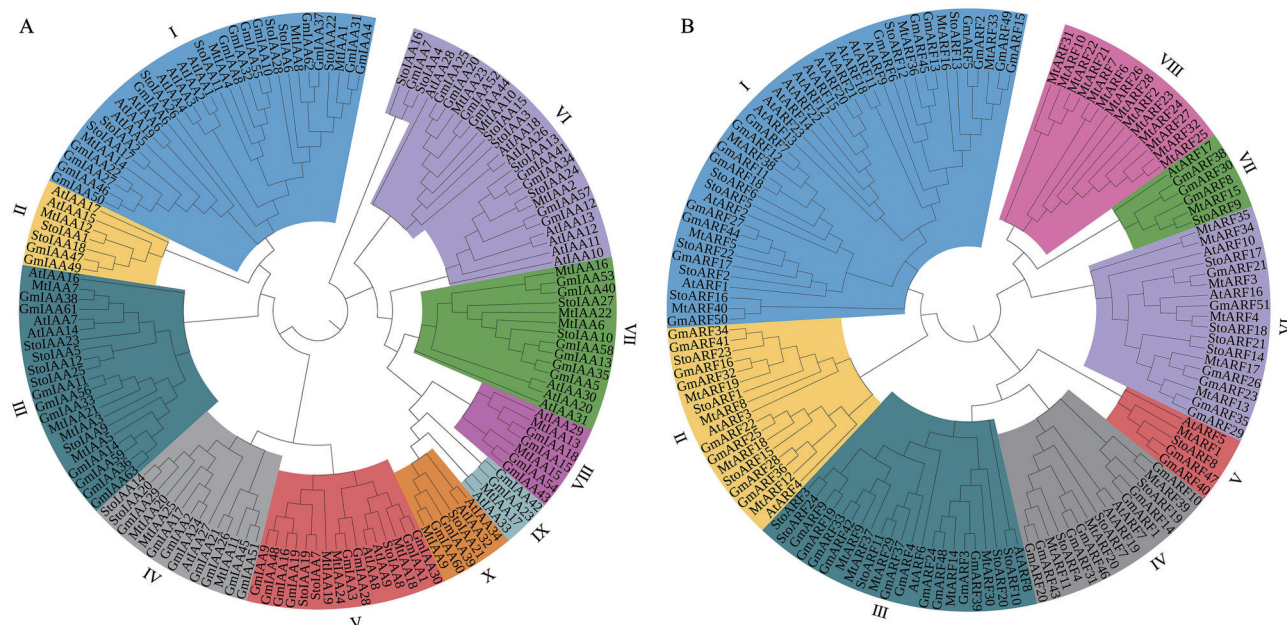


Figure 1 Phylogenetic analyses of IAA (A) and ARF (B) proteins among *S. tora* (Sto), *A. thaliana* (At), *M. truncatula* (Mt) and *G. max* (Gm)

StoIAAs 含有 2~5 个内含子。而 *StoARFs* 则含有 1~20 个内含子, 其中 *StoARF18* 仅含 1 个内含子, *StoARF17* 含有 2 个内含子, *StoARF14* 和 *StoARF21* 含有 3 个内含子, *StoARF9* 含有 4 个内含子, *StoARF10* 含有 7 个内含子, *StoARF1* 和 *StoARF11* 含有 9 个内含子, 其他 *StoARFs* 均含有 10~20 个内含子。

保守基序分析表明, 大多数 *StoIAAs* (24 个) 含有 4 个

保守 motif, 其他 *StoIAAs* (4 个) 只含有 2 个 motif, 其中 *StoIAA10* 和 *StoIAA27* 缺少 motif 1 和 motif 4, *StoIAA13* 和 *StoIAA25* 缺少 motif 3 和 motif 4。在 *StoARFs* 中共鉴定到 10 个保守 motif, motif 3 和 7 构成 B3 结构域, motif 1、5、6、9 构成 ARF 结构域, CTD 结构域则由 motif 4 和 10 组成。B3 结构域和 ARF 结构域共同构成了一个保守的 DBD 结构。有 18 个 *ARF* 成员含有全部的

3个保守结构域, *StoARF10* 缺少 ARF 结构域, *StoARF11* 缺少 B3 结构域, *StoARF1*、*StoARF9*、*StoARF18*、*StoARF23* 均缺少 CTD 结构域。

4 *StoIAA* 和 *StoARF* 基因的共线性分析

进一步分析 *StoIAAs* 和 *StoARFs* 的共线关系, 图2结果表明, 部分 *StoIAAs* 和 *StoARFs* 基因在决明基因组中存在基因重复事件。在 *Aux/IAA* 基因家族中, 共存在12对片段重复基因对, 分别是 *StoIAA1/18*、*StoIAA2/17*、*StoIAA3/15*、*StoIAA7/19*、*StoIAA8/19*、*StoIAA14/16*、*StoIAA14/20*、*StoIAA10/27*、*StoIAA11/26*、*StoIAA12/25*、*StoIAA13/24*、*StoIAA16/20*。*ARF* 基因家族中则存在 *StoARF1/23*、*StoARF5/6*、*StoARF14/17*、*StoARF14/21*、*StoARF17/21*、*StoARF18/21* 共6对片段重复基因对, 决明 *Aux/IAA* 和 *ARF* 基因家族中均未发现基因串联重复事件, 说明两个家族的基因复制方式是由片段重复事件主导的。

在拟南芥中分析得到35对与决明 *Aux/IAA* 存在共线性关系的同源基因对, 而决明 *Aux/IAA* 基因家族与同为豆科的大豆有74对共线性基因, 为拟南芥的2倍, 与蒺藜苜蓿间也存在37对同源基因对。而对于决明 *ARF* 基因家族而言, 在蒺藜苜蓿和大豆中分别存在31对和61对同源基因对, 远远高于拟南芥中的19对(图3)。

5 *StoIAA* 和 *StoARF* 基因启动子区顺式作用元件分析

为了解 *StoIAA* 和 *StoARF* 的潜在调节作用, 对二者上游2 kb的启动子序列进行分析。从图4可以看出, 响应光照 (Box 4)、厌氧环境 (ARE)、脱落酸 (ABRE)、赤

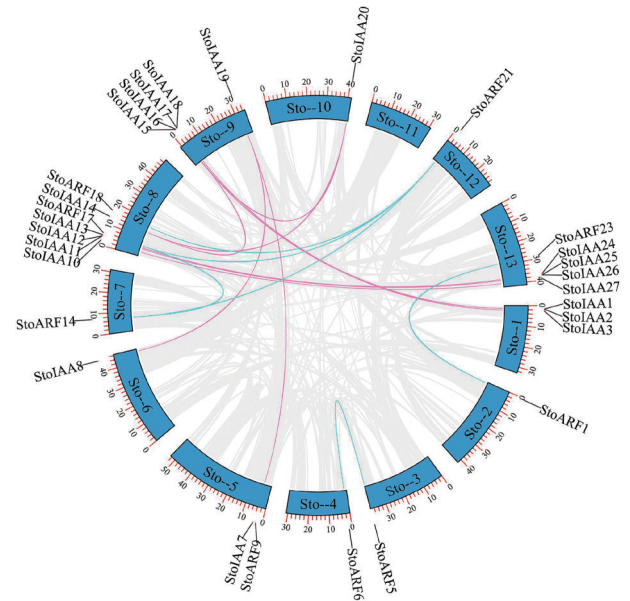


Figure 2 Segmental duplication analysis of *Aux/IAA* and *ARF* genes in *Sto*. Pink curves represent the *StoIAA* gene pairs; green curves represent *StoARF* gene pairs

霉素 (gibberellin)、茉莉酸甲酯 (CGTCA-motif) 等生长激素反应元件在 *StoIAA* 和 *StoARF* 启动子区大量富集, 同时, 响应逆境胁迫和参与生长发育相关的顺式元件如干旱 (MBS)、低温 (LTR)、分生组织生长 (CAT-box)、昼夜节律 (circadian) 广泛分布于多个成员的启动子区。18个 *StoIAAs* (64.3%) 和16个 *StoARFs* (66.7%) 含有与响应干旱相关的顺式元件, 13个 *StoIAAs* (46.4%) 和12个 *StoARFs* (50%) 含有与低温胁迫相关的顺式元件。

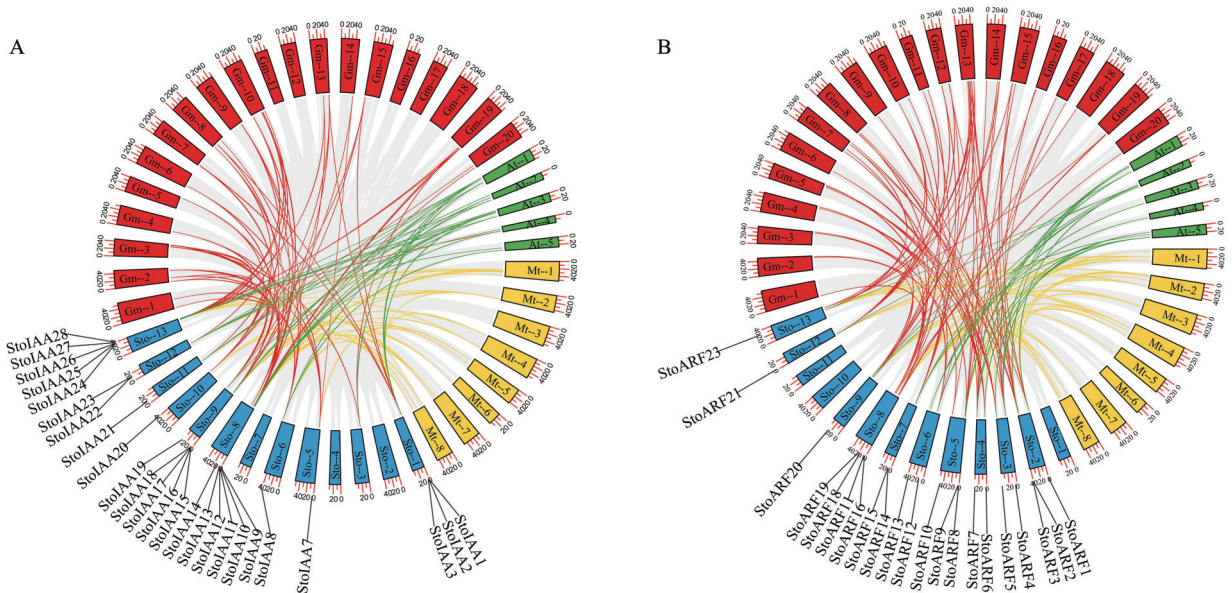


Figure 3 Synteny analysis of *IAA* (A) and *ARF* (B) gene families of *Sto* and *At*, *Mt* and *Gm*. The green, yellow, red and blue rectangles represent the chromosomes of *A. thaliana*, *M. truncatula*, *G. max* and *S. tora*, respectively; the green, yellow and red curves represent the collinear gene pairs between *A. thaliana*, *M. truncatula* and *G. max* with *S. tora* respectively

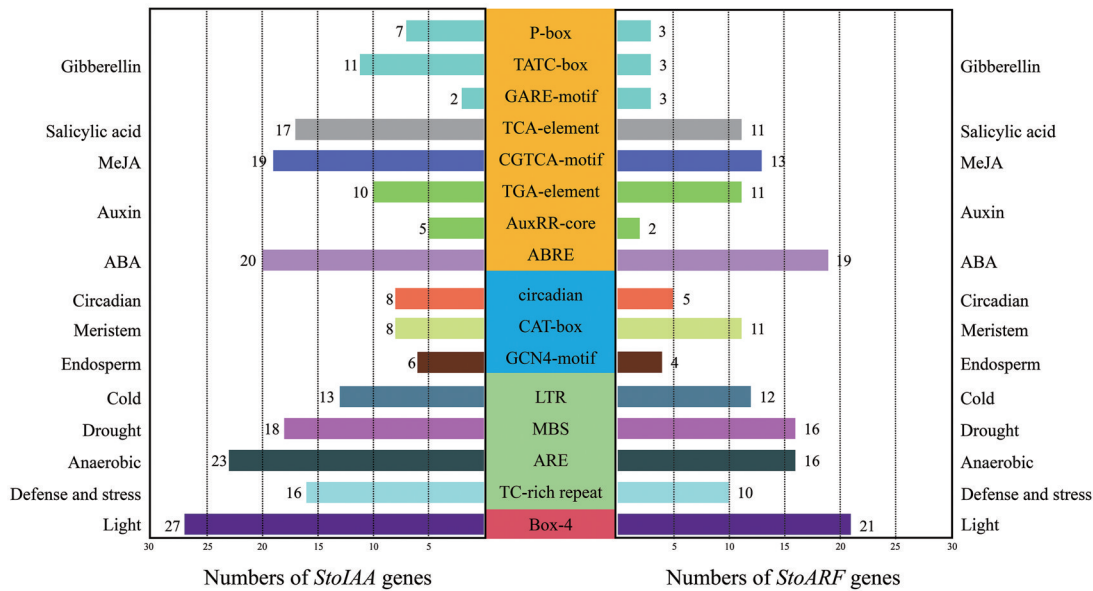


Figure 4 Number of putative *cis*-regulatory elements in promoter region of *IAA* and *ARF* genes in *S. tora*

6 StoIAAs 和 StoARFs 表达模式分析

利用决明根、叶、幼嫩种子和成熟种子 4 个组织的转录组数据分析 *StoIAAs* 和 *StoARFs* 的时空表达模式 (图 5)。总体而言, *StoIAAs* 和 *StoARFs* 在根和叶中的表达偏高。*StoIAA8*、*StoIAA17*、*StoIAA21*、*StoIAA24* 和 *StoARF2*、*StoARF5*、*StoARF22* 在所有检测组织中表达均偏高。个别基因具有明显的组织表达特异性, 如 *StoIAA2*、*StoIAA11*、*StoIAA12*、*StoIAA26* 以及 *StoARF9* 仅在叶片中表达, *StoARF7* 只在根中表达。另外, 成熟

种子中表达的基因均在幼嫩种子中表达, 且大多数在幼嫩种子中的表达水平高于成熟种子。

在模拟盐胁迫和干旱条件下, 处理后 30 天的植株侧根生长受到明显抑制。两个基因家族所有成员在根中的表达分析表明 (图 6), 在干旱条件下, 大多数的 *StoIAA* 在处理 3~12 h 表达显著上调, 如 *StoIAA8* 在处理 3 h 转录达到峰值, 随后稍有下降, 但 24 h 内一直保持高于对照组 6 倍以上的转录水平。*StoIAA16*、*StoIAA22* 转录水平在处理 6 h 达到峰值。*StoARF5*、

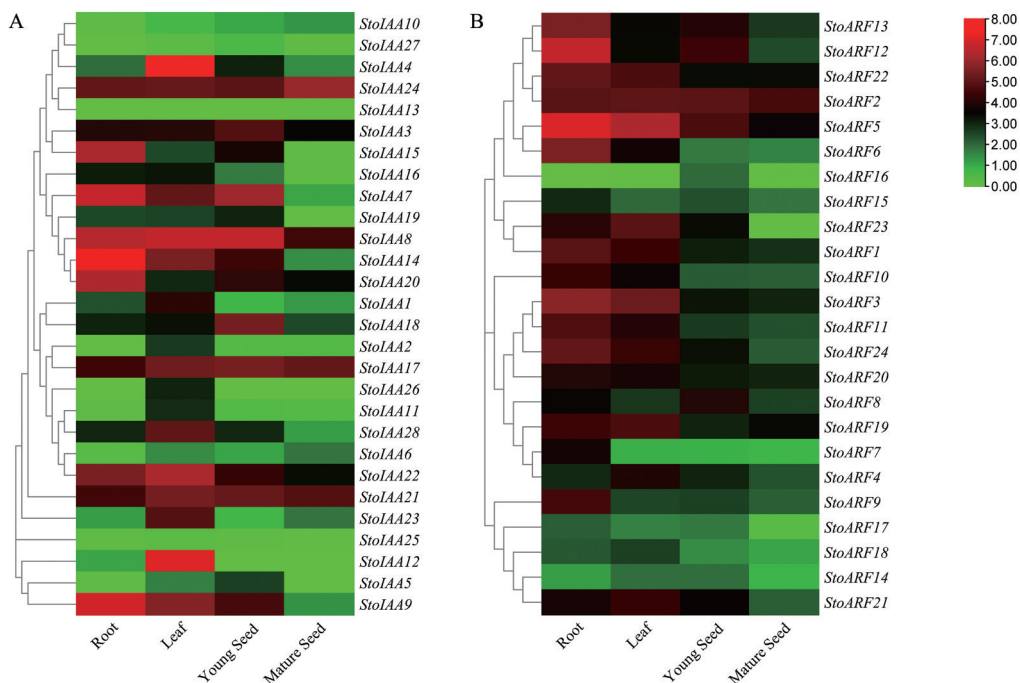


Figure 5 Heatmap of *StoIAAs* (A) and *StoARFs* (B) expression in different tissues and development stages

StoARF6、*StoARF8* 等在干旱处理后 3~24 h 也表现出高于对照组 6~8 倍的转录水平, 表明这些基因能够在干旱胁迫下迅速表达。相较于干旱胁迫, 较少的 *StoIAAs* 和 *StoARFs* 参与了盐胁迫的响应, 值得注意的是, 个别基因在盐胁迫条件下, 表现出与干旱胁迫相同的表达模式, 如 *Aux/IAA* 家族中的 *StoIAA8*、*StoIAA16* 和 *ARF* 家族中的 *StoARF5*、*StoARF6*、*StoARF8*、*StoARF10*。

7 *StoIAA* 和 *StoARF* 蛋白互作及验证

蛋白互作网络分析结果表明, 16 个 *StoIAAs* 和 12 个 *StoARFs* 蛋白之间均存在互作关系。其中, *StoARF8*、

10、19、24 作为转录激活子与大部分 *StoIAAs* 之间存在强烈互作关系。多个蛋白如 *StoARF10* 与 5 个 *StoIAAs* 之间存在很高的协同表达相关性、*StoIAA12* 与 2 个 *StoIAAs* 和 1 个 *StoARF* 之间也存在很高的协同表达相关性。

为了进一步验证候选蛋白的互作关系, 依据 STRING 蛋白网络互作预测结果, 锁定转录激活蛋白 *StoARF8*、*StoARF10*, 酵母双杂交结果显示, *StoARF8* 和 *StoARF10* 蛋白与 10 个 *StoIAAs* 间存在不同程度的互作关系 (图 7)。在 20 个两两杂交结果中, 11 对 *StoARFs-StoIAAs*

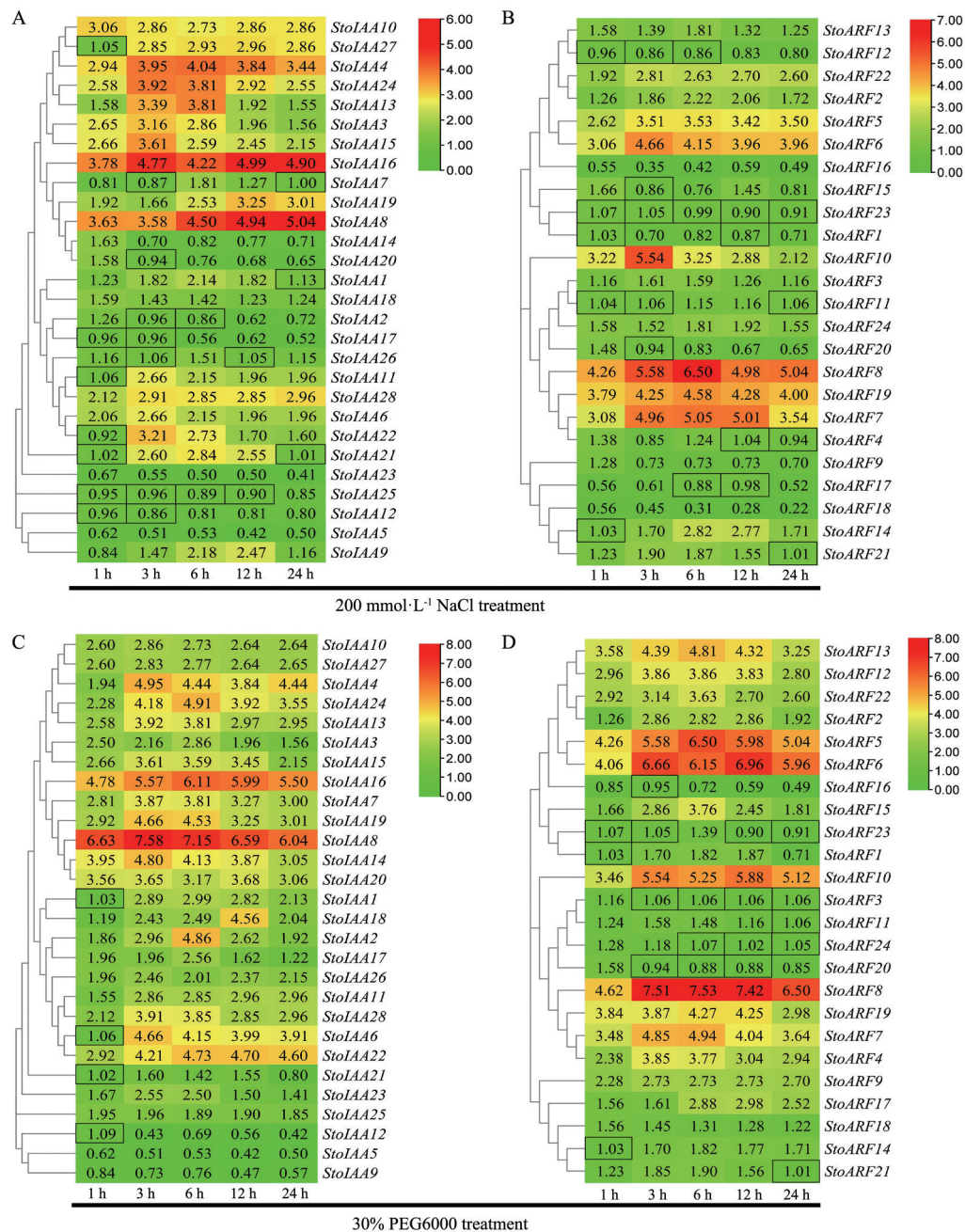


Figure 6 Expression analysis of *StoIAAs* (A, C) and *StoARFs* (B, D) in response to salinity (A, B) and drought (C, D) treatment. $n = 40$, $\bar{x} \pm s$. $P < 0.05$ indicates significant differences, values with borders represent no significant differences

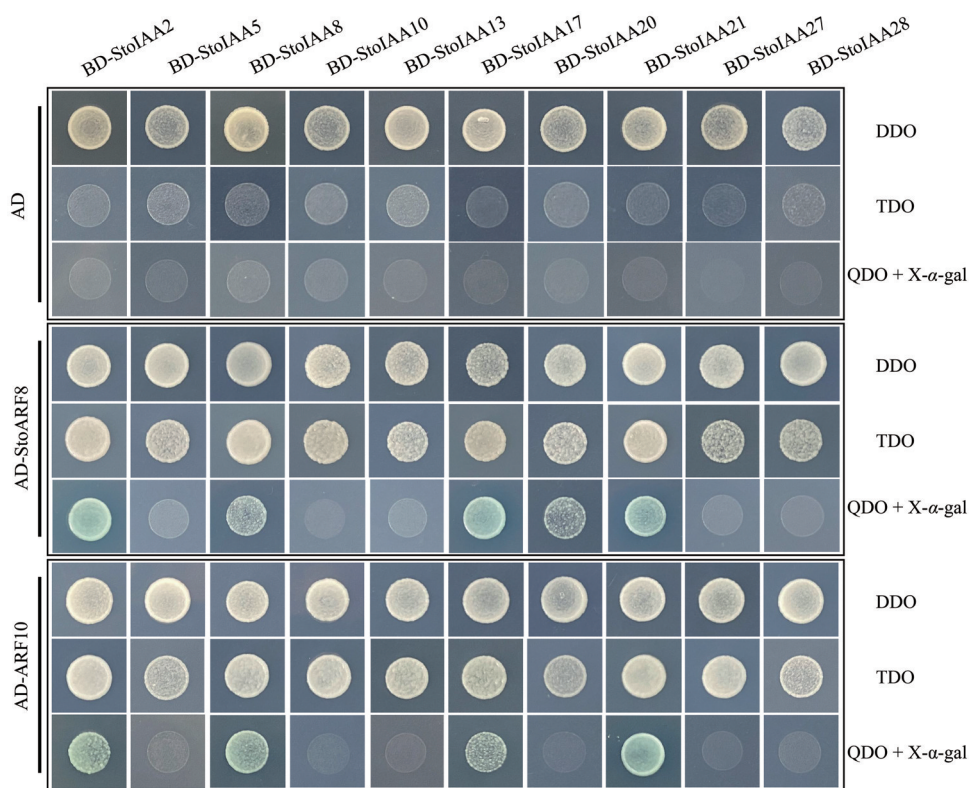


Figure 7 Y2H-based interactions between StoIAAs and StoARFs. AD: Active domain; BD: Binding domain; DDO: SD-Leu/-Trp medium; TDO: SD-Leu/-Trp/-His medium; QDO+X- α -gal: SD-Leu/-Trp/-His/-Ade+X- α -gal medium

组合间存在弱互作, 如 StoIAA5、StoIAA10、StoIAA13、StoIAA27、StoIAA28 与 StoARF8 和 StoARF10 的相互作用均较弱。另有 9 对组合间存在强相互作用, 其中 StoARF8 与 StoIAA2、StoIAA17、StoIAA21 之间, StoARF10 与 StoIAA2、StoIAA8、StoIAA21 之间的互作更为显著。

讨论

生长素在调控植物生长发育和生理过程中发挥的作用至关重要, 而 Aux/IAA 与 ARF 蛋白正是生长素信号传导过程中调节下游生化反应的关键^[3]。不同植物中 Aux/IAA 与 ARF 的成员数量也存在差异, 如拟南芥中含有 29 个 IAA 和 23 个 ARFs^[14,24], 水稻含有 31 个 IAA 和 25 个 ARFs^[28,12], 蒺藜苜蓿中鉴定到 25 个 IAA 和 40 个 ARFs 基因^[25], 而大豆中则分别存在 63 个 IAA 和 55 个 ARFs 成员^[26,27]。本研究在药用豆科植物决明中分别鉴定到 28 个 StoIAAs 和 24 个 StoARFs 成员, 同一亚家族的 StoIAAs 和 StoARFs 成员在基因结构、理化性质等方面存在一定的差异性, 如 ORF 长度、分子质量、等电点等特性, 不过这种基因家族内的差异在水稻^[12,28]、蒺藜苜蓿^[24]和二穗短柄草^[29]等许多物种中同样存在。这种家族内成员间广泛的差异性表明在多变的微环境条件下, 不

同的 StoIAAs 和 StoARFs 蛋白可能会共同发挥作用。

典型的 Aux/IAA 蛋白通常包含四个保守结构域 I-IV^[2]。决明 StoIAAs 蛋白均含有这 4 个结构域, 而 StoIAA10 和 StoIAA27 缺少结构域 I 和 IV, StoIAA13 和 StoIAA25 缺少结构域 I 和 II。缺少结构域 I 则无法与 TPL 蛋白结合, 从而失去对下游生长素调节基因的抑制作用, 而缺少结构域 II 则无法被 TIR1/AFB 蛋白识别, 则这些成员属于非典型 Aux/IAA 蛋白, 其在植物组织中的含量太低, 几乎无法影响植物的生长发育过程^[30]。组织表达结果证实缺失结构域 II 的 StoIAA10、StoIAA13、StoIAA25、StoIAA27 在所有检测组织中的表达水平远远低于其他典型 Aux/IAA 基因。非典型 Aux/IAA 较常见, 水稻 OsIAA4、OsIAA27、OsIAA28、OsIAA29 缺少结构域 I 和 II^[28], 大豆 GmIAA5、GmIAA6、GmIAA31、GmIAA35、GmIAA60 等成员缺少结构域 II^[31]。同时缺少结构域 I 和 II 的 StoIAA10 和 StoIAA27, 它们可能既不发挥转录抑制作用, 也不会生长素信号传导过程中被迅速降解, 推测可能参与了生长素调节的其他生物过程。

蛋白结构分析是解析基因在调节植物发育过程和响应环境胁迫发挥的潜在作用的重要基础。典型的 ARF 蛋白包含 DBD、MR 和 CTD 三个结构域, 其 CTD

结构域与 *Aux/IAA* 基因启动子区结合, 并受到 TIR1/AFB 受体的调节^[2]。基于拟南芥 *ARFs* 关于转录调节区 (TRR) 的分析, 含有 QSL-富集 MR 的 *StoARFs* 可能为转录激活子, 而 MR 含有 Q、S、L、G 的 *StoARFs* 一般则是转录抑制子。研究证实, 缺失 CTD 结构域的拟南芥 *AtARF3* 并非与传统 TIR1/AFB 信号通路中的元件结合, 而是独立于 TIR1/AFB 受体发挥功能^[32], 推测 *StoARFs* 中缺失 CTD 的成员, 尤其是与 *AtARF3* 同属同一进化分支并互为同源基因对的 *StoARF1* 可能也以不依赖生长素的方式发挥重要作用。

共线同源性结果显示 *Aux/IAA* 家族中分别存在 35 对 *AtIAA-StoIAA*、37 对 *MtIAA-StoIAA* 和 74 对 *GmIAA-StoIAA* 共线同源基因对, *ARF* 家族中分别存在 19 对 *AtARF-StoARF*、31 对 *MtARF-StoARF* 和 61 对 *GmARF-StoARF* 共线同源基因对, 该结果表明决明与同属豆科植物的大豆和蒺藜苜蓿的亲缘关系比拟南芥更为密切。另外, 决明种内分别存在 12 对 *StoIAAs* 和 6 对 *StoARFs* 片段重复基因对, 表明决明在进化过程中不仅与其他豆科植物共享基因复制事件, 也不断进行自身的基因复制过程^[33]。

多数 *StoIAAs* 和 *StoARFs* 在四个检测组织中都表现出不同的表达模式, 也有一些基因表现出了组织表达的特异性, 如 *StoIAA15*、*StoARF12*、*StoARF9* 主要在根中表达, *StoIAA4*、*StoIAA12*、*StoIAA23* 主要在叶片中表达。另外, 不论是 *IAAs* 还是 *ARFs*, 互为片段重复基因对的基因虽然表达水平高低有别, 但组织表达模式基本一致, 比如 *StoIAA1* 在叶片中具有丰富的表达, 但在其他三个检测的组织中表达量几乎可以忽略, 而与 *StoIAA1* 具有最近同源关系且互为片段重复基因对的 *StoIAA18* 同样特异性地在叶片组织中表达, 其他重复基因对 *StoIAA3* 和 *StoIAA15*、*StoIAA11* 和 *StoIAA26*、*StoIAA12* 和 *StoIAA25*、*StoARF1* 和 *StoARF23*、*StoARF5* 和 *StoARF6*、*StoARF1* 和 *StoARF23* 等也表现出非常相似的组织表达模式, 这也表明这些基因复制很可能源自基因组重复事件。

StoIAAs 和 *StoARFs* 的启动子区存在许多与激素调节或胁迫响应相关的顺式元件。盐胁迫条件下, 决明根中 *StoARF2*、*StoARF8*、*StoARF10*、*StoARF19*、*StoARF22* 以及超过一半的 *StoIAA* 在处理 24 h 内表达显著上调; 干旱处理下, *StoARF4*、*StoARF8*、*StoARF10*、*StoARF17*、*StoIAA2*、*StoIAA5*、*StoIAA12*、*StoIAA13*、*StoIAA17*、*StoIAA23*、*StoIAA24*、*StoIAA25* 等表达在处理前中期上调明显。这些基因中多含有与胁迫响应相关的顺式元件 MBS、TC-rich repeat 等。值得注意的是, 决明与蒺藜苜蓿很多存在同源进化关系的 *IAAs* 和 *ARFs* 基因在

响应这两种胁迫时表达趋势具有高度的相似性^[25], 说明启动子区的保守性也与进化关系有统一的联系。除此之外, 许多其他物种的 *IAAs* 和 *ARFs* 在干旱和盐等其他胁迫下也被显著诱导表达, 比如拟南芥 *AtIAA7*^[34], 水稻 *OsIAA20*、*OsARF16*^[35], 二穗短柄草 *BdARF5*、*BdARF12*^[29], 高粱 *SbIAA1*、*SbIAA26* 和 *SbARF3*^[36] 等。总之, *StoIAAs* 和 *StoARFs* 响应干旱、盐胁迫的表达结果充分证明了这些基因在参与决明应对和适应非生物胁迫过程中发挥了重要作用。

蛋白质相互作用对于研究许多生理过程十分重要, 如信号转导和基因表达调控。植物生长素响应是由 *ARF* 和 *Aux/IAA* 蛋白之间的相互作用介导的^[4]。在拟南芥 *Aux/IAA* 和 *ARF* 大规模的互作研究中, 发现所有蛋白成员之间均存在着复杂的互作关系^[37]。本研究通过蛋白互作网络分析, 得到了 16 个 *StoIAAs* 和 12 个 *StoARFs* 之间 152 条特异性互作关系。结合前期的结构分析、转录水平结果, 选择了 *StoARF8* 和 *StoARF10* 这两个转录激活子, 通过酵母双杂交技术, 验证它们与 10 个不存在自激活作用的 *StoIAAs* 蛋白的互作关系。在 20 个组合中鉴定到 10 个较强的 *StoARFs-StoIAAs* 互作, 10 个互作较弱, 与拟南芥中的研究具有一致性^[37], 说明不同的 *StoARFs* 和 *StoIAAs* 的互作强度不同。*StoARF8* 和 *StoARF10* 均含有 CTD 结构域, 为其与 *StoIAAs* 互作提供结构基础, 但 *StoIAA10* 和 *StoIAA27* 缺少结构域 I 和 IV, 即 PB1 结构域中只含有结构域 III, 却也可以与 *StoARF8*、*StoARF10* 发生互作, 说明 PB1 结构域缺失甚至不含有 PB1 结构域的 *Aux/IAA* 蛋白, 也可能具有与 *ARF* 互作的功能, 这种现象在山核桃 *Aux/IAA* 和 *ARF* 家族蛋白互作关系鉴定中同样存在^[38], 具体机制尚不清楚。

环境和遗传是中药材品质形成的两大重要因素, 遗传因素通过决定“代谢特质”与“形态特征”对药材品质形成发挥主导作用, 环境因子通过调控基因时空表达间接影响药材品质^[39]。药用植物生长发育过程自身涉及一系列细胞分化、物质转运、激素信号转导及转录调控等生命活动。本文基于决明全基因组注释和结构信息, 对决明 *Aux/IAA* 和 *ARF* 家族的功能基因进行发掘和鉴定, 为后续研究决明次生代谢产物合成与积累相关基因的调控网络奠定基础。

作者贡献: 冯昭是本研究的实验设计执行人并撰写论文初稿; 刘世鹏、吕瑞华负责实验和数据分析; 吕蕊花、胡晓晨、张明英参与数据分析和作图; 张岗和毛仁俊是项目的构思者及负责人, 指导实验、论文写作和修改。全体作者都已阅读并同意最终的文本。

利益冲突: 无任何利益冲突。

References

- [1] Li YY, Qi YH. Advances in biological functions of *Aux/IAA* gene family in plants [J]. Acta Bot Sin (植物学报), 2022, 57: 30-41.
- [2] Guilfoyle TJ, Hagen G. Auxin response factors [J]. Curr Opin Plant Biol, 2007, 10: 453-460.
- [3] Dreher KA, Brown J, Saw RE, et al. The Arabidopsis Aux/IAA protein family has diversified in degradation and auxin responsiveness [J]. Plant Cell, 2006, 18: 699-714.
- [4] Uberti-Manassero NG, Lucero LE, Viola IL, et al. The class I protein AtTCP15 modulates plant development through a pathway that overlaps with the one affected by CIN-like TCP proteins [J]. J Exp Bot, 2012, 63: 809-823.
- [5] Lakehal A, Chaabouni S, Cavel E, et al. A molecular framework for the control of adventitious rooting by TIR1/AFB2-Aux/IAA-dependent auxin signaling in *Arabidopsis* [J]. Mol Plant, 2019, 12: 1499-1514.
- [6] Lv BS, Yu QQ, Liu JJ, et al. Non-canonical AUX/IAA protein IAA33 competes with canonical AUX/IAA repressor IAA5 to negatively regulate auxin signaling [J]. EMBO J, 2020, 39: e101515.
- [7] Chen TY, Liu J, Yuan Y, et al. Bioinformatics analysis and expressed level of auxin response factor genes in *Scutellaria baicalensis* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 1770-1776.
- [8] Szemenyei H, Hannon M, Long JA. Topless mediates auxin-dependent transcriptional repression during *Arabidopsis embryogenesis* [J]. Science, 2008, 319: 1384-1386.
- [9] Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle TJ. Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain [J]. Plant Cell, 2004, 16: 533-543.
- [10] Liu KD, Yuan CC, Li HL, et al. Genome-wide identification and characterization of auxin response factor (ARF) family genes related to flower and fruit development in papaya (*Carica papaya* L.) [J]. BMC Genom, 2015, 16: 901.
- [11] Roosjen M, Paque S, Weijers D. Auxin response factors: output control in auxin biology [J]. J Exp Bot, 2018, 69: 179-188.
- [12] Okushima Y, Overvoorde PJ, Arima K, et al. Functional genomic analysis of the auxin response factor gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19 [J]. Plant Cell, 2005, 17: 444-463.
- [13] Zhu BQ, Xu XQ, Wu YW, et al. Isolation and characterization of two hydroperoxide lyase genes from grape berries: HPL isogenes in *Vitis vinifera* grapes [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39: 7443-7455.
- [14] Wang YC, Wang N, Xu HF, et al. Auxin regulates anthocyanin biosynthesis through the Aux/IAA-ARF signaling pathway in apple [J]. Hortic Res, 2018, 5: 59.
- [15] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2020 Ed. Vol 1. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 151.
- [16] Dong YJ, Jiang YQ, Liu Y, et al. Research progress on chemical composition and pharmacological effects of *Cassiae Semen* and predictive analysis on quality markers [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52: 2719-2732.
- [17] Au TS, Yang DJ, Zhang YO, et al. Differential expression of lipid metabolism related genes in HepG2 cells treated with neotrolactone [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2003, 38: 62-66.
- [18] Zhang XD, Song MY, Wang XP, et al. Response of growth and development of *Cassia Obtusifolia* to salt stress and evaluation of salt tolerance [J]. J Hebei Agric Sci (河北农业科学), 2018, 22: 6.
- [19] Chen SL, Song JY. Herbigenomics [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2016, 41: 3881-3889.
- [20] Kang SH, Pandey RP, Lee CM, et al. Genome-enabled discovery of anthraquinone biosynthesis in *Senna tora* [J]. Nat Commun, 2020, 11: 5875.
- [21] Chen C, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. Mol Plant, 2020, 13: 1194-1202.
- [22] Hoagland CR. The solution culture method for growing plants without soil [J]. California Agric Exp Circ, 1950, 347: 1-32.
- [23] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25: 402-408.
- [24] Overvoorde PJ, Okushima Y, Alonso JM, et al. Functional genomic analysis of the auxin/indole-3-acetic acid gene family members in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell, 2005, 17: 3282-3300.
- [25] Liu R, Guo ZF, Lu SY. Genome-wide identification and expression analysis of the Aux/IAA and auxin response factor gene family in *Medicago truncatula* [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22: 10494.
- [26] Vikash KS, Mukesh J. Genome-wide survey and comprehensive expression profiling of *Aux/IAA* gene family in chickpea and soybean [J]. Front Plant Sci, 2015, 6: 918.
- [27] Chien VH, Dung TL, Rie N, et al. The auxin-response factor transcription factor family in soybean: genome-wide identification and expression analyses during development and water stress [J]. DNA Res, 2013, 20: 511-524.
- [28] Jain M, Kaur N, Garg R, et al. Structure and expression analysis of early auxin-responsive Aux/IAA gene family in rice (*Oryza sativa*) [J]. Funct Integr Genom, 2006, 6: 47-59.
- [29] Zhao YD. Auxin biosynthesis and its role in plant development [J]. Annu Rev Plant Biol, 2010, 61: 49-64.
- [30] Zhou XJ, Wu XZ, Li TJ, et al. Identification, characterization, and expression analysis of auxin response factor (ARF) gene family in *Brachypodium distachyon* [J]. Funct Integr Genom, 2018, 18: 709-724.
- [31] Li H, Wang B, Zhang Q, et al. Genome-wide analysis of the auxin/indoleacetic acid (Aux/IAA) gene family in allotetraploid rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. BMC Plant Biol, 2017, 17: 204.

- [32] Kubeš M, Napier R. Non-canonical auxin signaling: fast and curious [J]. *J Exp Bot*, 2019, 70: 2609-2614.
- [33] Young ND, Debellé F, Oldroyd GE, et al. The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses [J]. *Nature*, 2011, 480: 520-524.
- [34] Mai YX, Wang L, Yang HQ. A gain-of-function mutation in *IAA7/AXR2* confers late flowering under short-day light in *Arabidopsis* [J]. *J Integr Plant Biol*, 2011, 53: 480-492.
- [35] Zhang AY, Yang X, Lu J, et al. *OsIAA20*, an Aux/IAA protein, mediates abiotic stress tolerance in rice through an ABA pathway [J]. *Plant Sci*, 2021, 308: 110903.
- [36] Wang SK, Bai YH, Shen CJ, et al. Auxin-related gene families in abiotic stress response in *Sorghum bicolor* [J]. *Funct Integr Genom*, 2010, 10: 533-546.
- [37] Piya S, Shrestha SK, Binder B, et al. Protein-protein interaction and gene co-expression maps of ARFs and Aux/IAAs in *Arabidopsis* [J]. *Front Plant Sci*, 2014, 5: 744.
- [38] Zhao L. Identification of Interactions between Aux/IAA and ARF Family Proteins in Chinese Hickory (*Carya cathayensis* Sarg.) and Their Potential Roles in Regulating Grafting Survival (山核桃 Aux/IAA 和 ARF 家族蛋白互作关系鉴定及其参与嫁接成活的作用初探) [D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2022.
- [39] Huang LQ, Guo LP, Hu J, et al. Molecular mechanism and genetic basis of geoh herbs [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2008, 33: 2303-2308.