

# 向日葵 ARF 基因家族鉴定及其在花发育中的功能分析

邓玉萍, 王倩, 张敏慧, 王茜, 陈静, 杨军, 邹建

(西华师范大学生命科学学院西南野生动植物资源保护教育部重点实验室, 四川南充 637002)

**摘要:** 生长素响应因子是一类生长素响应转录因子, 在花发育调控中发挥重要作用, 但在向日葵花发育中的作用尚未见报道。基于本实验室前期构建的向日葵转录组数据, 筛选到 39 个向日葵 ARF 基因, 分属于 5 个类群, 且同一类群成员具有相似的基因结构、保守结构域和保守基序。组织特异性表达模式分析发现, 其中 20 个 ARF 基因可能与向日葵花发育调控相关。分析这 20 个 ARF 基因在光雾山野生葵(WT)和花分生组织决定与花器官分化缺陷突变体 *cb1* (*cb1*, *crazy broccoli 1*) 中的表达差异, 发现 *gene33195*、*gene34899*、*gene58924*、*gene2145* 和 *gene16681* 在 WT 花发育 St2 至 St4 时期(花原基起始期、花器官开始形成期和减数分裂期)高水平表达, 在花发育后期几乎不表达; 它们在 *cb1* 中表达水平被上调, 且与 WT 花发育早期峰值水平相当。另一个 ARF 基因 *gene70445* 在 *cb1* 突变体的整个花发育时期的表达水平均远高于 WT。这些结果说明, 这 6 个 ARF 基因在花分生组织转变和花器官发生中发挥关键作用。启动子顺式作用元件分析发现, 这 6 个基因的启动子区存在多个 AP2/ERF、MIKC\_MADS 和 LFY 识别元件, 说明它们在向日葵花分生组织转变和花器官发生调控中, 可能受到 AP2/ERF、MIKC\_MADS 和 LFY 家族基因的调节。本研究为深入探究向日葵 ARF 基因在花发育调控中的功能和分子机制提供重要线索, 也为向日葵新品种选育提供参考。

**关键词:** 向日葵; ARF 基因家族; 生物信息学; 花发育; 表达分析

## Identification of the Sunflower ARF Gene Family and Prediction Analysis of its Function in Flower Development

DENG Yuping, WANG Qian, ZHANG Minhui, WANG Qian, CHEN Jing, YANG Jun, ZOU Jian

(Key Laboratory of Southwest China Wildlife Resource Conservation (Ministry of Education), College of Life Science, China West Normal University, Nanchong 637002, Sichuan)

**Abstract:** Auxin response factors (ARFs) are a family of transcription factors that play an important role in flower development through responding to auxin signaling. However, their importance in flower development remains elucidated in sunflower. In this study, 39 ARF family members were identified in sunflower through transcriptome data analysis, and they were categorized into five subfamilies. These members shared similar gene structures, conserved domains and functional motifs. The tissue specific expression pattern analysis showed that 20 ARFs are likely involved in flower development regulation. Through analyzing the transcriptional profiles at various stages during flower development between WT, and the *cb1* (*crazy broccoli 1*) mutant, which exhibits defects in meristem determinacy and floral organ differentiation, five ARF genes (*gene33195*, *gene34899*, *gene58924*, *gene2145* and *gene16681*) showed significant expression changes during flower development. These genes were found to be highly expressed from St2 to St4 in WT but barely expressed in later stages. Their

收稿日期: 2024-02-23 网络出版日期: 2024-09-19

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240223009>

第一作者研究方向为植物遗传发育, E-mail: 2623126933@qq.com

通信作者: 邹建, 研究方向为植物遗传育种, E-mail: zoujian@cwnu.edu.cn

**基金项目:** 四川省自然科学基金(2022NSFC0163, 2023NSFC0226); 西华师范大学博士科研启动专项项目(18Q039); 西华师范大学创新团队项目资助(KCXTD2023-7)

**Foundation projects:** Sichuan Natural Science Foundation (2022NSFC0163, 2023NSFC0226); Doctoral Scientific Research Startup Found of China West Normal University (18Q039); Supported by the Innovation Team Funds of China West Normal University (KCXTD2023-7)

expression was up-regulated in *cb1* mutant, corresponding to the peak level at early stages of flower development in WT. Another *ARF* gene, *gene70445* presented higher expressing levels during whole flower development in *cb1* mutants than WT plants. We also found that the promoter regions of these six *ARF* genes contained *cis*-acting elements recognized by AP2/ERF, MIKC\_MADS and LFY, suggesting that they might be regulated by AP2/ERF, MIKC\_MADS and LFY family genes during meristem transformation and floral organogenesis. The obtained results could provide important clue for further exploring the biological function and molecular regulatory mechanisms of *ARF* genes in flower development of sunflower, becoming valuable in future sunflower varieties breeding.

**Key words:** sunflower (*Helianthus annuus* L.); *ARF* gene family; bioinformatics; flower development; expression analysis

向日葵(*Helianthus annuus* L.)为菊科(Asteraceae)一年生草本作物,是世界四大油料作物之一<sup>[1]</sup>,在我国的农业生产、油料及饲料加工产业中具有重要地位<sup>[2]</sup>。研究向日葵发育调控机制,筛选挖掘其潜在增产基因是改良向日葵农艺性状,提高其产量的重要途径。

花发育是被子植物生命周期中的重要进程,对于种子产生和物种延续具有重要意义,并与作物的产量密切相关。该过程受诸多内外因素的影响<sup>[3]</sup>,其中生长素(IAA, auxin)在植物花发育过程中发挥重要作用,如维持花原基形成和花器官分化中干细胞的活性,调节花器官形态及数量,影响生殖活力等<sup>[4-8]</sup>。在拟南芥中,生长素合成基因 *YUC1*、*YUC2*、*YUC4* 和 *YUC6* 的功能缺失将导致叶片和花器官生长素组织特异性缺乏,使得花发育受到不同程度的影响<sup>[5]</sup>。生长素的功能发挥离不开生长素响应因子和转录调控因子的相互作用<sup>[9]</sup>。在生长素信号转导途径中,生长素与受体 TIR1/AFBs 结合,并通过转录抑制子 Aux/IAA 蛋白的泛素化调节来调控生长素响应因子 ARF 的活性<sup>[10]</sup>。在低浓度生长素条件下, Aux/IAAs 与 ARF 二聚化,与共抑制因子 TPL 协同抑制 ARF 蛋白的活性<sup>[11]</sup>,从而抑制下游生长素响应基因的表达。随着生长素水平的升高,生长素与 SCF<sup>TIR1/AFBs</sup> 复合体识别并结合<sup>[12]</sup>,招募特异性靶标 Aux/IAAs,再通过泛素化降解 Aux/IAAs,以释放并激活 ARF 蛋白,ARF 蛋白通过特异性识别生长素响应元件(AuxREs)TGTCTC<sup>[13]</sup>,激活或抑制生长素响应相关基因的表达,从而调控植物生长发育过程。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)*AtARF3* 基因失活导致其花被数量增加,雄蕊和花药减少<sup>[14]</sup>。水稻(*Oryza sativa*)*OsARF1* 沉默导致植株矮小,并伴随着开花显著延迟或不育,甚至出现无花个体<sup>[15]</sup>,*OsARF12*、*OsARF6*、*OsARF17* 和 *OsARF25* 任意基因

被沉默时,其花器官呈现出雄蕊花丝延长失败,导致柱头明显增大<sup>[16]</sup>。*SLARF14-RNAi* 转基因番茄(*Solanum lycopersicum*)植株的花器官呈现出易衰败死亡的特征,其雌蕊柱头和子房异常发育并表现出严重的授粉障碍<sup>[17]</sup>。因此,ARF 基因家族成员在生长素调控植物花发育进程中发挥着重要作用。

然而 ARF 家族成员在向日葵花发育过程中的生物学功能和分子调控机制暂未见报道。本研究基于生物信息学分析对向日葵 ARF 家族成员进行筛选鉴定,并通过分析向日葵 ARF 基因在花发育进程中的组织表达模式,鉴定花发育相关的 ARF 基因,随后利用向日葵花器官发育缺陷突变体 *cb1* 分析鉴定到花分生组织转变和花器官分化调控相关的 ARF 家族成员,以期为深入探究 ARF 家族基因在向日葵花发育调控中的分子机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本研究以四川野外繁育的向日葵地方种质资源光雾山野生葵(WT, GW Mountain Wild)及其航天诱变突变体 *cb1* (*cb1*, *crazy broccoli 1*) 为试验材料。*cb1* 是基于光雾山野生葵航天向日葵突变体库筛选得到的一个花分生组织决定与花器官分化缺陷突变体。以上两种材料于 2023 年 4 月初育苗,4 月下旬移栽至西华师范大学生命科学学院试验田(中国四川省南充市, 30°49'N, 106°4'E)。WT 和 *cb1* 突变体的种植数量均大于 1000 株,行距 1 m,株距 0.5 m。分别在幼苗生长期和临近花期追肥,实时监控,及时进行病虫害防治,以保证植株的健康生长。

### 1.2 向日葵 ARF 转录因子家族成员的鉴定及理化性质分析

本研究基于本实验室构建的向日葵转录组数据库(NCBI 登录号为 PRJNA1083261),筛选获得

ARF 基因同源序列, 并利用 NCBI 的 CCD 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 和 SMART 在线分析工具 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析蛋白的保守结构域, 剔除不含 ARF 基因家族特征结构域的基因, 保留至少具有 B3、Auxin\_resp 这 2 个保守结构域的基因作为向日葵 ARF 基因家族成员。

利用 Prot Param 在线网站 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析 ARF 蛋白的基本理化性质; 在 Plant-mPLoc 网站 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 预测 ARF 蛋白的亚细胞定位。

### 1.3 ARF 蛋白的系统发育分析

从 TAIR 数据库 (<https://www.arabidopsis.org/>) 下载拟南芥 ARF 蛋白序列, 利用在线工具 NCBI 的 CD-search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 分析拟南芥和向日葵 ARF 蛋白的保守结构域。通过 ClustalW 进行序列比对。利用 MEGA7.0 软件, 采用邻接法 (NJ, neighbor-joining), 设置校验参数 (bootstrap) 为 1000, 构建系统发育树。

### 1.4 ARF 基因的染色体分布及基因结构分析

从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库获取向日葵基因组注释文件 gff3 文件和 ARF 基因在染色体组中的位置信息, 使用 TBtools 软件进行可视化分析染色体分布。利用 gff3 文件使用 TBtools 可视化分析 ARF 家族的基因结构。

### 1.5 ARF 蛋白的保守结构域及保守基序分析

利用 NCBI 的 CD-search 在线工具分析 ARF 蛋白的保守结构域; 利用 MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 在线数据库分析 ARF 蛋白的保守基序, 最后使用 TBtools 软件进行可视化分析。利用 DNAMAN 软件进行多序列比对。

### 1.6 ARF 基因的组织表达模式分析

基于本实验室构建的向日葵转录组数据库, 提取向日葵在根、茎、叶、幼根、幼茎、幼叶、花和果实不同的 St2~St8 时期 [St2: 花原基起始期, St3: 花器官开始形成期, St4: 减数分裂期, St5: 花粉成熟期, St6: 小花开放期, St7: 果实灌浆期 (胚胎发育期), St8: 种子饱满期 (胚胎发育完成)] 的表达数据 (TPM, transcripts per million), 利用 TBtools 绘制热图分析 39 个 ARF 基因的组织表达模式。

### 1.7 向日葵 WT 和 *cb1* 突变体的表型分析

取向日葵 WT 和 *cb1* 植株 St2 至 St6 共 5 个花发育时期的花盘, 分析其形态差异。用尖嘴镊除去花

盘周围的萼片, 并用刀片对花盘分别进行横切和纵切, 将 St2 与 St3 时期的花盘置于体式显微镜下进行拍照观察, 而 St4、St5 和 St6 时期花盘较大, 置于黑色幕布上用相机拍照观察。

### 1.8 ARF 基因在 WT 和 *cb1* 突变体中的表达分析

取向日葵幼根、幼茎、幼叶、根、茎、叶和花发育 St2 至 St6 时期的花组织材料, 取样植株数量 > 50, 各组织均为混合样品, 以避免个体之间的差异所带来的实验误差。使用植物 RNA 提取试剂盒 E.Z.N.A.® Plant RNA Kit (OMEGA, 美国) 提取总 RNA。利用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒 (TaKaRa, 中国) 合成 cDNA 为模板, 参照 TB Green® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa, 中国), 在 SYBR Green Supermix 上的 Bio CFX96d 定量 PCR 扩增仪上进行 RT-PCR 扩增 (Bio-Rad, 美国)。程序如下: 95℃ 预变性 30s; 95℃ 变性 5s, 60℃ 退火及延伸 30s, 40 个循环。以向日葵 *HaeF1A* 基因 (*HaeF1A*, *Helianthus annuus Elongation Factor 1 Alpha*) 作为内参基因, 使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析各基因的相对表达量, 3 次生物学重复计算标准误差。ARF 基因及内参 *HaeF1A* 引物见表 1。

### 1.9 ARF 基因启动子顺式作用元件预测

从 NCBI 下载向日葵 ARF 基因起始密码子上游区域 2000 bp 的启动子序列, 利用 PlantTFDB (<http://planttfdb.gao-lab.org/prediction.php>) 分析其顺式作用元件, 最后利用 TBtools 和 GraphPad Prism 5 进行数据可视化。

## 2 结果与分析

### 2.1 向日葵 ARF 转录因子家族成员的鉴定及理化性质分析

基于本实验室前期构建的向日葵转录组数据库和 NCBI 在线数据库筛选获得 39 个向日葵 ARF 候选基因。保守结构域分析结果显示, 23 个 ARF 基因编码的蛋白具有 B3、Auxin\_resp 和 Aux\_IAA 保守结构域 (表 2); 其余 16 个具有 B3 和 Auxin\_resp 保守结构域。理化性质分析结果显示, 39 个 ARF 蛋白质长度在 270 aa~1096 aa 之间, 分子质量在 30.94~122.74 kDa 之间, 等电点在 5.38~9.21 之间。在这些蛋白中, 除 *gene68026*、*gene16681*、*gene31333*、*gene2145* 和 *gene5350* 的编码蛋白外, 其余 34 个 ARF 蛋白为酸性蛋白。此外, 亲疏水性预测分析和亚细胞定位预测分析结果显示, 39 个 ARF 蛋白均为定位于细胞核基质中的亲水性蛋白。

表 1 向日葵 *ARF* 基因表达分析的实时荧光定量引物Table 1 RT-qPCR primers of *ARF* genes for expression analysis in sunflower

基因 Gene	正向引物序列(5'-3') Forward primer sequences(5'-3')	反向引物序列(5'-3') Reverse primer sequences(5'-3')
<i>gene64257</i>	TCTGACTACCGGGTGGAGTA	AGCGCGTCTAATCCAACAC
<i>gene68557</i>	GCGCTCGGGTGATCTATTTTC	GGGCATGTGAGCTTCGATTT
<i>gene68106</i>	AACCTCCGGCCCAAGAATTA	CAGCCCCGTTGTGAGAAGATG
<i>gene16614</i>	CCTTGCCGGAGTTTGTAAG	CTCAAGCGAACCCACTGATG
<i>gene47563</i>	CAAGTCAACGGTCAACAGCA	ACACTTGATTGCGGCTTTGT
<i>gene49293</i>	TCTTTCTGCACTCGGGATGT	CCAATGGATACCACCACCT
<i>gene70445</i>	CGGTTTCTTCGGTTCATGCT	GGCTTACTCGTTCACGTTT
<i>gene9534</i>	ACCTTCAACAACAGCAGCAG	GTGGCAACAGTTGTTCTGT
<i>gene34899</i>	AAAGCCATCGTGGATGTTG	TTGCATGGCTGTTGCTTCTT
<i>gene23770</i>	GAGGATTCCAAGTGGCGTTC	TTTCGGTGCAACTGGTTGAG
<i>gene58924</i>	TGAATGCCTACCTCCCTTGG	AGCAAATGCCTTCTGGGTTG
<i>gene16681</i>	CATGCTTGTGCTGGACCTTT	ACTAAACTCGCCAGAACCCA
<i>gene5350</i>	CTATGCAACATCGCGTGCTA	CCACGACCTCATCATAGGCT
<i>gene2145</i>	ACAAATTCTCGCTGGGAACG	ACACCATCCCCTTTACCGT
<i>gene33195</i>	GCTAGCCTTGTGATTTCGCA	CGATAGACCTCCCAACCGAA
<i>gene64801</i>	TTGACGACCGTTGGAGTAA	CCGACACAAAGATCGCCATT
<i>gene75869</i>	CACAAATAGAGGGCGGTTGG	CTCGTACCGCTAAGTGGACT
<i>gene56407</i>	AACCTTGACGCAATCTGACG	GTTTGAACCGGAGGATCTGC
<i>gene68026</i>	ATAGAGGACAGCCTCGGAGA	TTCGGATGCCAACCTTAGT
<i>gene14118</i>	CCTCGTCCAGAGAGAGTGT	ACCGGAAGCGGATTTATTGC
<i>HaeFlA</i>	AGCCCAAGAGACCCTCAGACAAG	CCCTGATGGTCCGAAGGTAACAA

表 2 向日葵 *ARF* 家族基因基本信息Table 2 Basic information of *ARF* family genes in sunflower

基因 Gene	基因 ID Gene ID	蛋白长度(aa) Protein length	分子量(kDa) Molecular weight	等电点 PI	亚细胞定位 Subcellular localization	亲水系数 GRAVY	保守结构域 Conserved domain
<i>gene31334</i>	LOC110872732	369	41.34	5.91	细胞核	-0.491	B3 ,Auxin_resp
<i>gene64801</i>	LOC110904658	630	70.24	6.27	细胞核	-0.364	B3 ,Auxin_resp
<i>gene31333</i>	LOC110872731	407	45.27	8.36	细胞核	-0.408	B3 ,Auxin_resp
<i>gene30880</i>	LOC110872467	622	70.01	6.39	细胞核	-0.452	B3 ,Auxin_resp
<i>gene64257</i>	LOC110904291	643	71.15	6.27	细胞核	-0.401	B3 ,Auxin_resp
<i>gene56407</i>	LOC110900998	636	70.87	5.62	细胞核	-0.257	B3 ,Auxin_resp
<i>gene70410</i>	LOC110913015	655	72.05	6.79	细胞核	-0.390	B3 ,Auxin_resp
<i>gene20979</i>	LOC110941009	667	73.85	5.46	细胞核	-0.377	B3 ,Auxin_resp ,Aux_IAA
<i>gene70445</i>	LOC110913044	503	56.12	5.97	细胞核	-0.413	B3 ,Auxin_resp
<i>gene7473</i>	LOC110924766	657	72.45	6.79	细胞核	-0.506	B3 ,Auxin_resp ,Aux_IAA
<i>gene33195</i>	LOC110873708	862	95.68	5.38	细胞核	-0.508	B3 ,Auxin_resp ,Aux_IAA
<i>gene2145</i>	LOC110870922	573	63.97	8.76	细胞核	-0.419	B3 ,Auxin_resp

表 2 (续)

基因 Gene	基因 ID Gene ID	蛋白长度(aa) Protein length	分子量(kDa) Molecular weight	等电点 PI	亚细胞定位 Subcellular localization	亲水系数 GRAVY	保守结构域 Conserved domain
<i>gene35115</i>	LOC110877733	539	59.64	6.18	细胞核	-0.446	B3 ,Auxin_resp
<i>gene27221</i>	LOC110867964	626	70.26	6.38	细胞核	-0.541	B3 ,Auxin_resp ,Aux_IAA
<i>gene64296</i>	LOC110904319	757	84.08	6.10	细胞核	-0.470	B3 ,Auxin_resp ,Aux_IAA
<i>gene68026</i>	LOC110911772	604	67.38	7.20	细胞核	-0.469	B3 ,Auxin_resp
<i>gene57466</i>	LOC110898684	759	83.77	6.17	细胞核	-0.472	B3 ,Auxin_resp
<i>gene23770</i>	LOC110864445	633	70.71	6.14	细胞核	-0.504	B3 ,Auxin_resp ,Aux_IAA
<i>gene21961</i>	LOC110941533	808	90.36	6.27	细胞核	-0.600	B3 ,Auxin_resp ,Aux_IAA
<i>gene5350</i>	LOC110913846	270	30.94	9.21	细胞核	-0.525	B3 ,Auxin_resp
<i>gene58924</i>	LOC110899475	647	72.87	5.54	细胞核	-0.452	B3 ,Auxin_resp ,Aux_IAA
<i>gene68106</i>	LOC110911810	843	93.28	5.95	细胞核	-0.428	B3 ,Auxin_resp ,Aux_IAA
<i>gene16614</i>	LOC110937214	840	92.83	6.16	细胞核	-0.403	B3 ,Auxin_resp
<i>gene60964</i>	LOC110908143	783	85.83	6.49	细胞核	-0.496	B3 ,Auxin_resp
<i>gene77736</i>	LOC110921231	809	90.56	6.09	细胞核	-0.595	B3 ,Auxin_resp ,Aux_IAA
<i>gene16681</i>	LOC110937249	566	63.13	8.09	细胞核	-0.480	B3 ,Auxin_resp
<i>gene75869</i>	LOC110925580	654	72.71	6.22	细胞核	-0.641	B3 ,Auxin_resp ,Aux_IAA
<i>gene14118</i>	LOC110935887	801	89.10	5.92	细胞核	-0.606	B3 ,Auxin_resp ,Aux_IAA
<i>gene4811</i>	LOC110911065	774	86.62	6.21	细胞核	-0.590	B3 ,Auxin_resp ,Aux_IAA
<i>gene68557</i>	LOC110912077	805	90.15	5.95	细胞核	-0.466	B3 ,Auxin_resp ,Aux_IAA
<i>gene44140</i>	LOC110886230	1014	112.10	5.72	细胞核	-0.481	B3 ,Auxin_resp ,Aux_IAA
<i>gene47563</i>	LOC110890145	777	87.34	5.84	细胞核	-0.515	B3 ,Auxin_resp ,Aux_IAA
<i>gene49293</i>	LOC110891065	644	72.39	5.71	细胞核	-0.507	B3 ,Auxin_resp ,Aux_IAA
<i>gene63042</i>	LOC110909189	851	95.07	5.77	细胞核	-0.526	B3 ,Auxin_resp ,Aux_IAA
<i>gene34899</i>	LOC110877618	970	107.52	5.93	细胞核	-0.564	B3 ,Auxin_resp ,Aux_IAA
<i>gene75575</i>	LOC110915653	775	86.70	5.98	细胞核	-0.464	B3 ,Auxin_resp ,Aux_IAA
<i>gene9534</i>	LOC110929007	968	107.38	6.33	细胞核	-0.534	B3 ,Auxin_resp ,Aux_IAA
<i>gene50913</i>	LOC110894082	1096	122.74	6.05	细胞核	-0.657	B3 ,Auxin_resp ,Aux_IAA
<i>gene8442</i>	LOC110928437	1052	118.35	6.53	细胞核	-0.679	B3 ,Auxin_resp ,Aux_IAA

GRAVY :Grand average of hydro pathicity

## 2.2 ARF 蛋白的系统发育分析

为分析 39 个向日葵 ARF 蛋白之间的进化关系,本研究构建了拟南芥和向日葵系统发育树(图 1)。根据 Okushima 等<sup>[18]</sup>的分类方法,39 个向日葵 ARF 蛋白可分为 5 个类群。其中类群 I 含有 *gene47563*、*gene63042*、*gene68557*、*gene75575* 等 13 个成员,其中 *gene20927* 和 *gene33195* 与拟南芥 AtARF5 高度同源;类群 II 含有 *gene16681*、*gene68026*、*gene2145*、*gene57466*、*gene64296* 和 *gene60964* 共 6 个成员,其

中 *gene2145*、*gene68026* 和 *gene16681* 与拟南芥 AtARF3 亲缘关系较近;类群 III 含有 *gene7473*、*gene70410*、*gene56407*、*gene64257* 等 8 个成员,其中 *gene70410* 和 *gene7473* 与拟南芥 AtARF10 高度同源;类群 IV 含有 *gene75869*、*gene58924*、*gene27221*、*gene23770*、*gene49293* 等 9 个向日葵 ARF 家族成员,其中 *gene49293* 和拟南芥 AtARF1 高度同源;类群 V 含有 *gene31334*、*gene31333* 和 *gene5350* 共 3 个成员(图 1)。

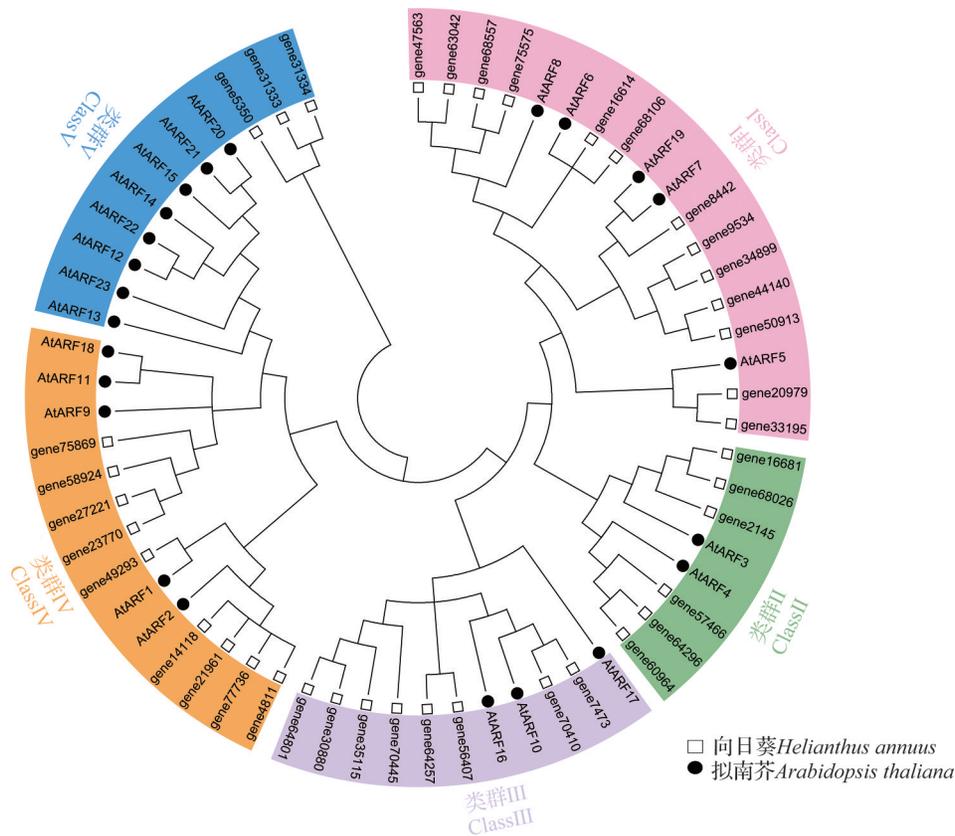


图1 向日葵和拟南芥ARF蛋白的系统发育分析

Fig.1 Phylogenetic analysis of ARF proteins in sunflower and *Arabidopsis thaliana*

### 2.3 ARF基因的染色体分布和基因结构分析

基于向日葵基因组注释信息,对向日葵ARF基因进行了染色体定位,结果见图2A。除1号和11号染色体外,其余15条染色体上均有ARF基因分布。其中,8号、13号、14号和15号染色体均分布有4个ARF基因;2号、4号、6号和7号染色体均分布有3个ARF基因;3号、5号、9号和16号染色体上均分布有2个ARF基因;10号、12号和17号染色体只分布有1个ARF基因。这些结果说明向日葵ARF基因在向日葵染色体组中呈现分散分布。

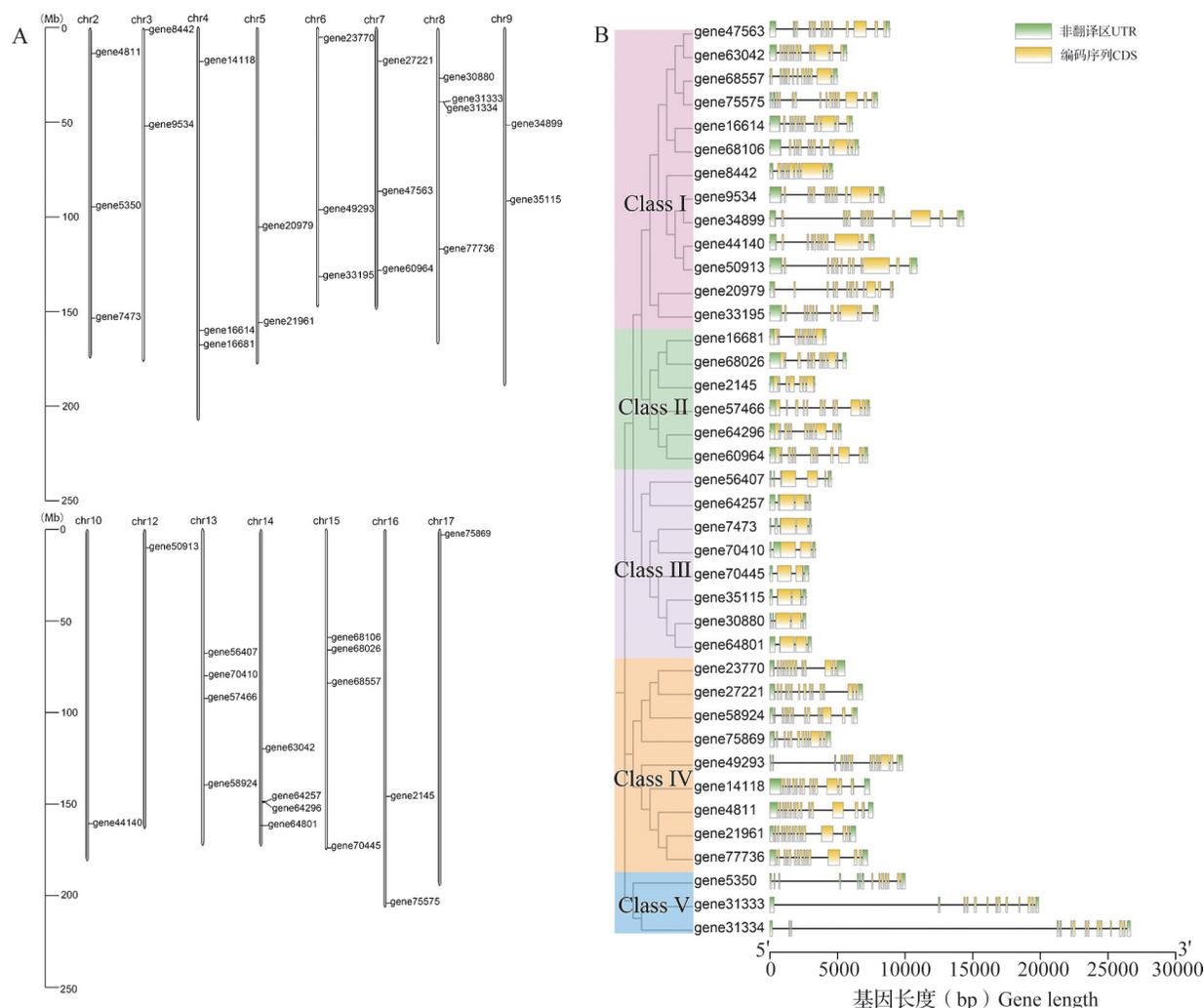
分析ARF基因的外显子/内含子结构(图2B),结果显示,ARF基因家族成员含有4~16个外显子,3~15个内含子。类群I含有外显子11~15个,内含子10~14个;类群II含有外显子7~13个,内含子6~12个;类群III含有外显子4~6个,内含子3~5个;类群IV含有外显子12~15个,内含子11~15个;类群V含有外显子13~14个,内含子12~13个。类群III基因较短,类群V基因较长,同一类群的ARF基因结构相似,不同类群差异较大。

### 2.4 ARF蛋白的保守结构域和保守基序分析

保守结构域分析结果表明,23个向日葵ARF蛋

白同时具有B3、Auxin\_resp和Aux\_IAA结构域,包括类群I中12个成员,类群IV中的9个成员,类群II和类群III各1个成员(图3A)。另外的16个ARF蛋白只含有B3和Auxin\_resp结构域,包括类群V中的3个成员,类群II中5个成员,类群I中1个成员和类群III中7个成员(图3A)。分析ARF蛋白的保守结构域特征,发现3个结构域中具有多个高度保守的氨基酸位点,如中心功能区Auxin\_resp结构域的苯丙氨酸(F, phenylalanine)、甘氨酸(G, glycine)、丝氨酸(S, serine)和色氨酸(W, tryptophan);与Aux\_IAA结构域相比,B3和Auxin\_resp的结构域更为保守(图3C)。这些高度保守的结构域,特别是高度保守的氨基酸,可能是ARF蛋白实现功能的关键位点。

进一步分析保守结构域的保守基序发现, Motif1和Motif2属于B3结构域,这两个基序在除gene5350以外,其余ARF蛋白均存在; Motif4、Motif5、Motif9、Motif13和Motif14属于Auxin\_resp结构域,其中Motif4、Motif5、Motif9和Motif13分布于全部ARF蛋白, Motif14分布于36个ARF蛋白,在类群V的ARF成员中没有分布(图3B)。



A: 染色体定位; B: 基因结构

A: Chromosomal localization; B: Gene structure

图2 向日葵 ARF 基因的染色体定位和基因结构

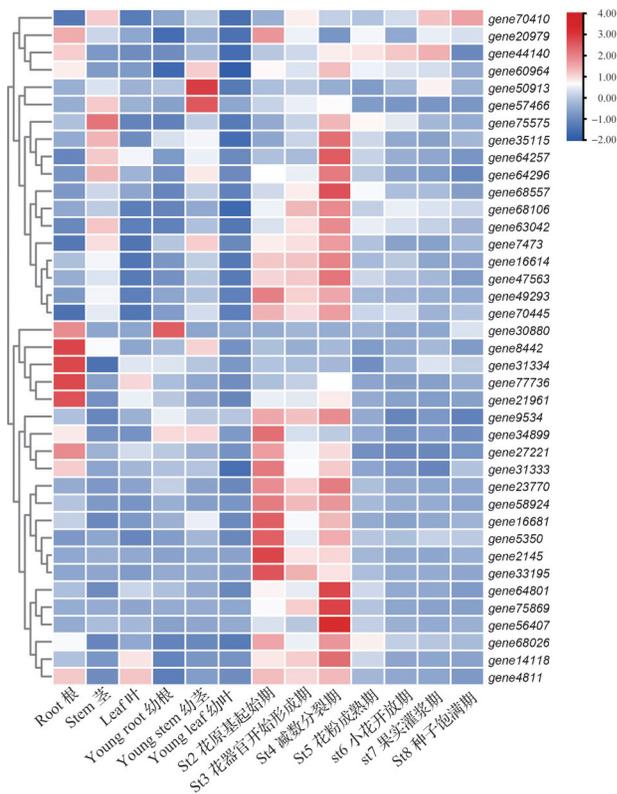
Fig.2 Chromosomal localization and gene structure of ARF genes in sunflower

### 2.5 ARF 基因的组织特异性表达模式分析

为进一步筛选与花发育相关的向日葵 ARF 基因,本研究分析了 39 个 ARF 基因在野生型向日葵不同组织中的表达情况(图 4)。结果显示,不同 ARF 基因在不同组织器官中表达水平存在明显差异。其中, *gene30880* 在幼根中高表达, *gene50913* 和 *gene57466* 在幼茎中高表达, *gene21961*、*gene77736*、*gene31334* 和 *gene8442* 在根中高表达,其余 32 个基因中 20 个基因在花发育时期高水平表达,而另外 12 个基因未观察到组织表达特异性。此外,20 个在花发育时期高水平表达的 ARF 基因,主要集中在向日葵花发育 St2~St4 时期高水平表达。其中, *gene16681*、*gene5350*、*gene2145*、*gene33195*、*gene34899* 和 *gene49293* 在 St2 达到表达峰值, *gene23770*、*gene58924*、*gene95343*、

*gene70445* 和 *gene68026* 在 St2、St3 和 St4 均具有较高的表达水平, *gene14118*、*gene56407*、*gene64801*、*gene75809*、*gene68557*、*gene64257*、*gene16614*、*gene68106* 和 *gene47563* 在 St4 达到表达峰值。表达峰值在 St2 的 6 个 ARF 基因随着花的发育期表达水平呈现逐渐降低的趋势,但在花发育后期几乎不表达;表达峰值在 St4 的 9 个 ARF 基因,在 St2 至 St4 时期其表达水平呈现升高趋势,尤其在 St3 至 St4 时期迅速升高,随后快速降低到较低的水平。这些结果说明这 20 个 ARF 基因可能在向日葵花发育过程中发挥作用,其中 *gene16681*、*gene5350*、*gene2145*、*gene33195*、*gene34899* 和 *gene49293* 可能主要在花发育早期发挥作用。





St2: Flower primordium initiation stage; St3: Flower organ formation stage; St4: Meiosis stage; St5: Pollen maturation stage; St6: Florets opening stage; St7: Fruit filling stage; St8: Seed full stage;

The same as below

图4 ARF基因在野生型向日葵不同组织部位的表达分析  
Fig.4 Expression analysis of ARF genes in different tissues of wild-type sunflower

## 2.6 向日葵 WT 和 *cb1* 突变体的表型分析

典型向日葵的头状花序由外轮不育的舌状花和内轮可育的管状花两类小花组成。向日葵花分生组织决定与花器官分化缺陷突变体 *cb1* 的花瓣、雄蕊、雌蕊、子房等花器官缺失,花序由重复的苞片和分生组织构成,整体形态与花椰菜相似(图5)。因此 *cb1* 向日葵突变体适合用于分析和鉴定花分生组织转变和花器官发生相关的 ARF 基因。

## 2.7 ARF 基因在 WT 和 *cb1* 突变体中的表达分析

为进一步探究 ARF 基因在向日葵花发育中的功能,分析了以上 20 个向日葵花发育相关 ARF 基因在 WT 和 *cb1* 突变体中的表达情况(图6)。结果显示 *gene33195*、*gene34899*、*gene58924*、*gene2145*、*gene70445* 和 *gene16681* 的表达水平在 WT 和 *cb1* 中存在较大差异。其中 *gene33195*、*gene34899*、

*gene58924* 和 *gene16681* 的表达水平在 WT 花发育 St2 至 St6 时期呈现出持续降低的趋势,但在花发育后期几乎不表达,在 *cb1* 突变体中始终维持较高水平的表达,且与野生型峰值期 St2 时期的表达水平相当。*gene2145* 在 WT 花发育过程中的表达从 St2 至 St6 逐渐降低,但其在 *cb1* 突变体各个时期中的表达均被上调,且各时期均高于 WT 的表达水平。另外,在花发育的 5 个时期中,*gene70445* 在 *cb1* 突变体中的表达被强烈上调,且远高于 WT 中的表达水平。研究结果还显示,其余 14 个 ARF 基因在 WT 和 *cb1* 突变体整体上的表达水平无明显差异。本研究的结果再次说明 *gene33195*、*gene34899*、*gene58924*、*gene2145*、*gene70445* 和 *gene16681* 可能与向日葵花发育早期的分生组织转变和花器官发育密切相关。

## 2.8 ARF 基因启动子顺式作用元件预测

为了探究花分生组织转变和花器官发生相关的向日葵 ARF 基因的上游调控基因,预测 6 个向日葵 ARF 基因的启动子区域内的顺式作用元件(图7)。结果在 6 个 ARF 基因上有 2000 bp 启动子区域共分析到 19 个转录因子家族基因的识别元件。其中,*gene16681*、*gene2145* 和 *gene70445* 启动子区域具有 AP2/ERF、MIKC\_MADS 和 Dof 等转录因子家族识别的顺式作用元件,*gene34899* 和 *gene58924* 启动子区域存在 AP2/ERF 和 LBD 等的识别元件,*gene33195* 启动子区域存在 MIKC\_MADS 和 Dof 等的识别元件。

根据已有的报道,AP2/ERF、MIKC\_MADS 和 LFY 是调节花发育的主要转录因子<sup>[19-24]</sup>。梳理后分析发现,具有 AP2/ERF 转录因子识别元件的基因包括 *gene16681*、*gene2145*、*gene34899*、*gene58924* 和 *gene70445*,且在 *gene34899* 最多,达 35 个;能够被 MIKC\_MADS 转录因子识别的基因包括 *gene16681*、*gene2145*、*gene70445* 和 *gene33195*,其中 *gene70445* 有 12 个元件,*gene16681* 有 10 个元件;只有 *gene70445* 具有 2 个 LFY 识别元件(图7)。分析结果说明 *gene33195*、*gene34899*、*gene58924*、*gene2145*、*gene70445* 和 *gene16681* 在调控向日葵花发育过程中,其表达活性可能受到 AP2/ERF、MIKC\_MADS 和 LFY 等转录因子的调节。

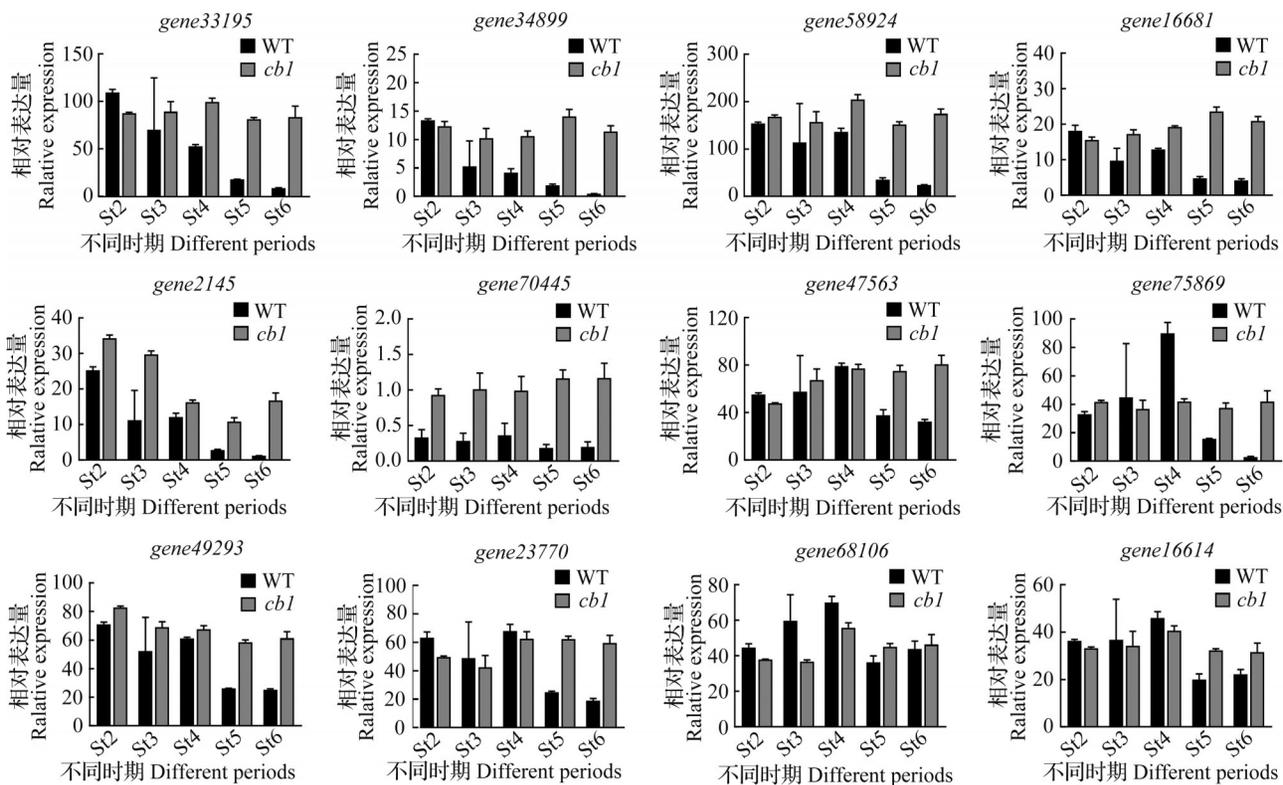


A: WT向日葵和 *cb1* 突变体的花盘; B: WT向日葵和 *cb1* 突变体花序纵向剖面图

A: Flower disk of wild-type and *cb1* mutant; B: Longitudinal view on inflorescence of wild-type and *cb1* mutant

图5 向日葵野生型和 *cb1* 花发育形态对比

Fig.5 Morphology comparison of flower developmental between wild-type and *cb1* mutant in sunflower



(图6)

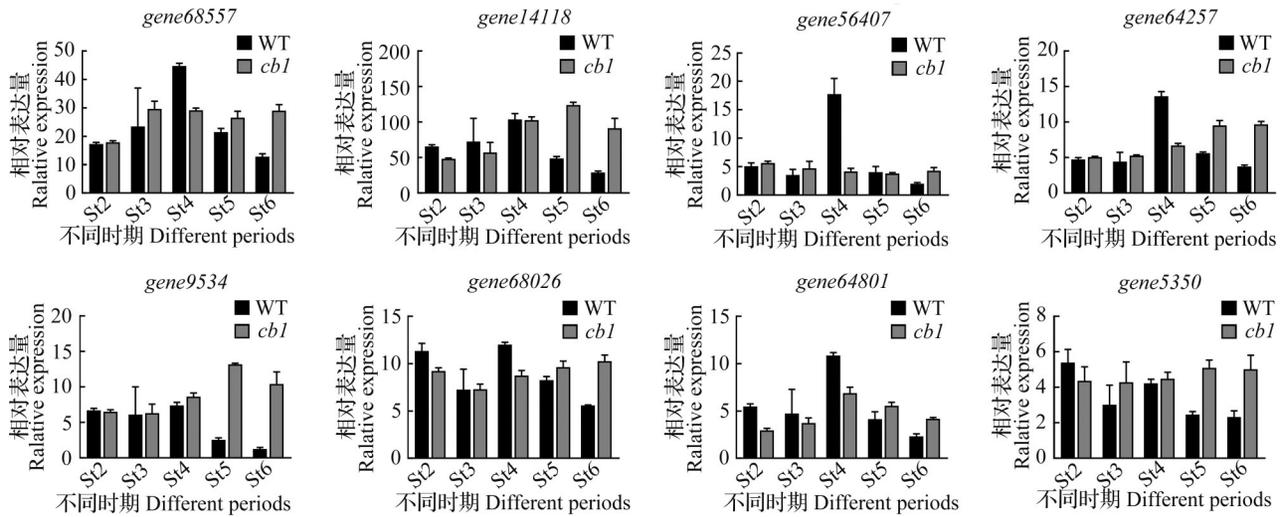
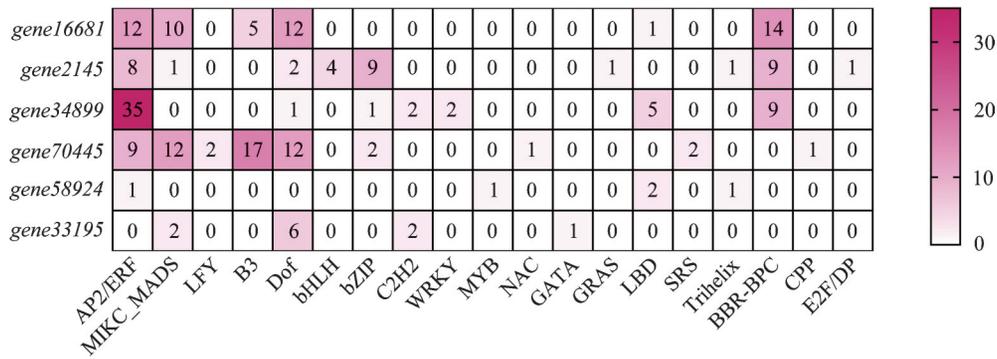


图6 向日葵 ARF 基因在 WT 和 *cb1* 突变体中的表达

Fig.6 Expression of ARF genes between WT and *cb1* flowers in sunflower



数字表示顺式作用元件的个数

Number represents the number of *cis*-acting elements

图7 向日葵 ARF 基因的顺式作用元件分析

Fig.7 *Cis*-acting analysis in the promoters of ARF genes

### 3 讨论

花发育作为生殖发育的关键进程之一,受到转录因子和植物激素等诸多因素的影响<sup>[3]</sup>。生长素作为重要的植物激素,在植物花发育过程中起着至关重要的作用,而 ARF 家族成员是生长素信号途径中的关键节点<sup>[10]</sup>。然而,在向日葵中花发育相关的 ARF 基因暂未被鉴定,其调控机制暂未见报道。

本研究基于向日葵转录组数据,筛选到 39 个向日葵 ARF 转录因子家族成员,分属于类群 I、类群 II、类群 III、类群 IV 和类群 V 共 5 个类群。其中 *gene16681*、*gene2145*、*gene33195*、*gene34899*、*gene49293* 和 *gene70445* 等 20 个 ARF 基因在花发育前期 St2 至 St4 时期高水平表达,说明这些基因可能在向日葵花发育早期发挥调控作用。在向日葵花分生组织决定与花器官分化缺陷突变体 *cb1* 的表达

情况表明基因 *gene33195*、*gene34899*、*gene58924*、*gene2145*、*gene70445* 和 *gene16681* 在 *cb1* 突变体中始终维持高水平的表达,并与它们在 WT 花发育早期的表达水平相当甚至更高。值得注意的是,这 6 个 ARF 基因在 WT 花发育后期几乎不表达,说明它们在 *cb1* 突变体中持续高表达可能与花器官分化障碍有关,在向日葵花分生组织转变和花器官发育过程中发挥重要作用。

已有的报道显示,拟南芥 ARF 家族成员 *AtARF2* 功能缺失导致其植株开花延迟,其雌蕊和花萼延长,雄蕊退化<sup>[25-26]</sup>。拟南芥 *AtARF5*、*AtARF6* 和 *AtARF8* 功能缺失显著降低花粉的育性<sup>[27-29]</sup>。在向日葵中,同源基因类群 IV 成员 *gene58924* 以及类群 I 的 *gene33195* 和 *gene34899* 在 WT 花器官发生时期高水平表达,随后表达水平逐渐降低,说明它们与拟南芥 *AtARF2*、*AtARF5*、*AtARF6* 和 *AtARF8* 具有相

似的功能,也参与调控生殖相关花器官的形成。*gene58924*、*gene33195*和*gene34899*在*cb1*中持续的异常高表达,可能与*cb1*分生组织决定异常及生殖器官的缺失密切相关。另外,拟南芥成员*AtARF17*突变导致花粉破裂形成雄性不育<sup>[30]</sup>,而其在向日葵中的同源基因*gene70445*在*cb1*突变体显著上调,可能与*cb1*生殖相关的花器官缺失相关。此外,拟南芥成员*AtARF3*决定花器官原基数量并影响原基的发育,其功能缺失导致萼片和花瓣等花被器官数量增加,雄蕊数量和花药形成减少,雌蕊结构混乱<sup>[31]</sup>。在WT中,*AtARF3*的高度同源基因*gene2145*和*gene16681*在St2高水平表达,从St2至St6逐渐降低,推测该基因具有调控早期花原基数量和花器官形成的作用。其在*cb1*突变体各个时期中的表达均被上调,且与WT的St2表达水平相当,推测*gene2145*和*gene16681*与*cb1*花分生组织转变有关。以上的结果说明,*gene33195*、*gene34899*、*gene58924*、*gene2145*、*gene70445*和*gene16681*等6个基因的异常表达会影响花分生组织决定和花器官发育。

在植物花发育过程中,AP2/ERF、MIKC\_MADS和LFY是花分生组织的干细胞活性维持和分生组织决定中的关键调控因子<sup>[19-24]</sup>。AP2通过识别调控*ARF3*基因参与花分生组织特性的建立和花器官形成的调控<sup>[19-20]</sup>。向日葵*gene16681*、*gene2145*、*gene34899*、*gene58924*和*gene70445*启动子区包含多个AP2转录因子识别元件,它们在调控向日葵花分生组织决定和花器官发生可能受到AP2的调节。MIKC\_MADS家族作为花器官发育调控关键因子,其成员*API*(*APETALA 1*)、*FUL*(*FRUITFUL*)和*CAL*(*CAULIFLOWER*)参与花分生组织决定<sup>[21]</sup>,而*SEPI-3*(*SEPALLATA 1-3*)、*AP3*(*APETALA 3*)和*PI*(*PISTILLATA*)参与调控花器官分化<sup>[22]</sup>。向日葵*gene33195*、*gene2145*、*gene70445*和*gene16681*启动子区包含多个MIKC\_MADS家族成员识别元件,它们在调控花分生组织转变和花器官分化可能也受到MIKC\_MADS家族成员的调节。*LFY*基因是植物花分生组织形成的关键基因<sup>[23-24]</sup>,而向日葵*gene70445*启动子区存在2个LFY识别元件,说明*gene70445*参与向日葵花分生组织转变和花器官分化可能还与*LFY*基因的调控相关。

综上所述,向日葵ARF家族成员*gene16681*、*gene2145*、*gene33195*、*gene34899*、*gene49293*和*gene70445*可能在向日葵花分生组织转变和花器官决定过程中发挥着重要作用。在此过程中,这6个

基因可能受到AP2/ERF、MIKC\_MADS、LFY和家族基因的调控。本研究的研究结果,将为深入探究向日葵*ARF*基因在花发育调控中的功能和分子机制提供重要线索,也为向日葵新品种选育提供参考。

#### 参考文献

- [1] 张玲玲, 汤依娜, 唐思丽, 黄文菁, 林敏婷, 刘韵, 张建业. 向日葵花盘挥发油的GC-MS定性分析. 中国现代中药, 2017, 19(2):188-191  
Zhang L L, Tang Y N, Tang S L, Huang W J, Lin M T, Liu Y, Zhang J Y. GC-MS analysis of volatile oil from disc of *Helianthus annuus*. Modern Chinese Medicine, 2017, 19(2): 188-191
- [2] 郭树春, 张艳芳, 孙瑞芬, 李素萍, 于海峰, 刘腊青, 王洪波, 安玉麟. 向日葵核心种质资源基础类群划分研究. 华北农学报, 2017, 32(4):107-113  
Guo S C, Zhang Y F, Sun R F, Li S P, Yu H F, Liu L Q, Wang H B, An Y L. Analysis of classification and genetic relationship among core sunflower germplasm resources. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2017, 32(4):107-113
- [3] 周琴, 张思思, 包满珠, 刘国锋. 高等植物成花诱导的分子机理研究进展. 分子植物育种, 2018, 16(11):3681-3692  
Zhou Q, Zhang S S, Bao M Z, Liu G F. Advances on molecular mechanism of floral initiation in higher plants. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(11):3681-3692
- [4] Cheng Y, Zhao Y. A role for auxin in flower development. Journal of Integrative Plant Biology, 2007, 49(1):99-104
- [5] Cheng Y, Dai X, Zhao Y. Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. Genes and Development, 2006, 20(13):1790-9
- [6] Okada K, Ueda J, Komaki M K, Bell C J, Shimura Y. Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. Plant Cell, 1991, 3(7): 677-684
- [7] Reinhardt D, Mandel T, Kuhlemeier C. Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. Plant Cell, 2000, 12(4):507-518
- [8] Bennett S R M, Alvarez J, Bossinger G, Smyth D R. Morphogenesis in *pinoid* mutants of *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal, 1995, 8(4):505-520
- [9] Schmelz E A, Engelberth J, Alborn H T, O'donnell P, Tumlinson J H. Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100(18):10552-10557
- [10] Salehin M, Bagchi R, Estelle M. SCF<sup>TIR1/AFB</sup>-based auxin perception: Mechanism and role in plant growth and development. Plant Cell, 2015, 27(1):9-19
- [11] Szemenyei H, Hannon M, Long J A. TOPLESS mediates

- auxin-dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. *Science*, 2008, 319(5868):1384-1386
- [12] Guilfoyle T J. The PBI domain in auxin response factor and Aux/IAA proteins: A versatile protein interaction module in the auxin response. *Plant Cell*, 2015, 27(1):33-43
- [13] Hagen G, Guilfoyle T. Auxin-responsive gene expression: Genes, promoters and regulatory factors. *Plant Molecular Biology*, 2002, 49:373-385
- [14] Sessions A R, Nemhauser J L, Mccoll A, Roe J L, Zambryski P C. *ETTIN* patterns the *Arabidopsis* floral meristem and reproductive organs. *Development*, 1997, 124(22):4481-4491
- [15] Attia K A, Abdelkhalik A F, Ammar M H, Wei C, El-Shemy H A. Antisense phenotypes reveal a functional expression of *OsARF1*, an auxin response factor, in transgenic rice. *Current Issues in Molecular Biology*, 2009, 11(S1):29-34
- [16] Zhao Z X, Yin X X, Li S, Zhao, Peng Y T, Yan X L, Chen C, Hassan B, Zhou S X, Pu M, Zhao J H, Hu X H, Li G B, Wang H, Zhang J W, Huang Y Y, Fan J, Li Y, Wang W M. miR167d-ARFs module regulates flower opening and stigma size in rice. *Rice*, 2022, 15(1):1-15
- [17] 关晓溪, 许涛, 梅伟利, 李天来. 番茄 *SlARF14* 基因的 RNAi 载体构建及其在花器官中的功能初步鉴定. *沈阳农业大学学报*, 2015, 46(2):142-149
- Guan X X, Xu T, Mei W L, Li T L. Construction of *SlARF14* gene RNAi vector and identification of its role on floral organ. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2015, 46(2):142-149
- [18] Okushima Y, Overvoorde P J, Arima K, Alonso J M, Chan A, Chang C, Ecker J R, Hughes B, Lui Amy, Nguyen D, Onodera C, Quach H, Smith A, Yu G, Theologis A. 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(2):444-463
- [19] Jofuku K D, Den Boer B G, Van Montagu M, Okamoto J K. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell*, 1994, 6(9):1211-1225
- [20] Liu X, Dinh T T, Li D, Shi B, Li Y, Cao X W, Guo L, Pan Y Y, Jiao Y L, Chen X M. *AUXIN RESPONSE FACTOR 3* integrates the functions of *AGAMOUS* and *APETALA2* in floral meristem determinacy. *Plant Journal*, 2014, 80(4):629-641
- [21] Ferrándiz C, Gu Q, Martienssen R, Yanofsky M F. Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1* and *CAULIFLOWER*. *Development*, 2000, 127(4):725-734
- [22] Pelaz S, Ditta G S, Baumann E, Wisman E, Yanofsky M F. B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature*, 2000, 405(6783):200-203
- [23] Weigel D, Alvarez J, Smyth D R, Yanofsky M F, Meyerowitz E M. *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell*, 1992, 69(5):843-859
- [24] Huala E, Sussex I M. *LEAFY* interacts with floral homeotic genes to regulate *Arabidopsis* floral development. *Plant Cell*, 1992, 4(8):901-913
- [25] Okushima Y, Mitina I, Quach H L, Theologis A. *AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (ARF2)*: A pleiotropic developmental regulator. *Plant Journal*, 2005, 43(1):29-46
- [26] Ellis C M, Nagpal P, Young J C, Hagen G, Guilfoyle T J, Reed J W. *AUXIN RESPONSE FACTOR1* and *AUXIN RESPONSE FACTOR2* regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 2005, 132(20):4563-4574
- [27] Liu Z N, Miao L M, Huo R X, Song X Y, Johnson C, Kong L J, Sundaresan V, Yu X L. *ARF2-ARF4* and *ARF5* are essential for female and male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 2018, 59(1):179-189
- [28] Farcot E, Lavedrine C, Vernoux T. A modular analysis of the auxin signalling network. *PLoS ONE*, 2015, 10(3): e0122231
- [29] 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, Ecker J R, Reed J W. Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development*, 2005, 132:4107-4118
- [30] Wang B, Xue J S, Yu Y H, Liu S Q, Zhang J X, Yao X Z, Liu Z X, Xu X F, Yang Z N. Fine regulation of *ARF17* for anther development and pollen formation. *BMC Plant Biology*, 2017, 17(1):1-12
- [31] Sessions R A, Zambryski P C. *Arabidopsis* gynoecium structure in the wild and in *ettin* mutants. *Development*, 1995, 121(5):1519-1532