

# 野生二粒小麦 ARF 家族基因的鉴定和盐胁迫下的表达分析

马博<sup>1</sup>, 杜旭冉<sup>1</sup>, 武郅忠<sup>1</sup>, 郭荣娣<sup>1</sup>, 罗爽<sup>1</sup>, 聂小军<sup>1,2</sup>

(1. 西北农林科技大学农学院, 陕西杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学作物抗逆与高效生产全国重点实验室, 陕西杨凌 712100)

**摘要:** 生长素响应因子(auxin response factor, ARF)是调控植物生长发育的关键转录因子之一, 通过与生长素响应元件结合, 参与生长素相关信号通路, 在植物的器官建成、信号传导以及逆境响应等方面发挥着重要作用。为探究野生二粒小麦盐胁迫响应 ARF 基因及其与盐胁迫的关系, 利用 Blast 和 HMM-search 相结合的方法在全基因组水平鉴定了野生二粒小麦的 ARF 家族基因, 并对其启动子及耐盐性进行分析。结果表明, 在野生二粒小麦中鉴定出 22 个 ARF 基因, 其分布于 2A、2B、3A、3B、5A、5B、6A、6B、7A 和 7B 染色体上; 利用系统进化树可将 22 个 ARF 家族成员分成 3 个亚家族。通过启动子顺式元件预测, 野生二粒小麦 ARF 基因启动子主要包含与生长发育、激素响应、光响应及逆境响应相关 4 类顺式作用元件。经过遗传变异分析, 在四倍体小麦的驯化过程中, ARF 家族成员的遗传多样性降低, 发生了明显的遗传瓶颈效应。在转录组数据中检测到 17 个成员响应盐胁迫, 在盐胁迫下 *TdARF* 主要呈现下调表达。 *TdARF* 可为小麦耐盐育种的候选基因。

**关键词:** 野生二粒小麦; ARF 基因家族; 遗传变异; 盐胁迫; 表达特性

中图分类号: S512.1+9; S330

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2025)11-1441-10

## Identification of Gene Family of ARF Transcription Factors in Wild Emmer Wheat and Analysis of Their Expression under Salt Stress

MA Bo<sup>1</sup>, DU Xuran<sup>1</sup>, WU Zhizhong<sup>1</sup>, GUO Rongdi<sup>1</sup>, LUO Shuang<sup>1</sup>, NIE Xiaojun<sup>1,2</sup>

(1. College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. National Key Laboratory for Crop Stress Resistance and High-Efficient Production, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Auxin response factor (ARF) is one of the key transcription factors that regulate plant growth and development. By binding to auxin response elements and participating in auxin related signaling pathways, ARF plays an important role in plant organ formation, signal transduction and stress response. To identify and mine ARF genes in response to salt stress in wild emmer wheat, we used a combination of Blast and HMM-search to identify ARF family genes at the genome-wide level in wild emmer wheat. The results showed twenty-two ARF genes were identified in wild emmer wheat, which are distributed on 2A, 2B, 3A, 3B, 5A, 5B, 6A, 6B, 7A, and 7B chromosomes. The 22 ARF family members were divided into three subgroups by phylogenetic tree. The prediction of promoter cis-elements showed that the promoter of ARF gene in wild emmer wheat mainly contain four types of cis-acting elements related to growth and development, hormone response, light response, and stress response. The analysis of genetic variation showed that the ARF family had a significant genetic bottleneck benefit with decreased genetic diversity during the domestication of emmer wheat. Seventeen *TdARF* were detected in the transcriptome data in response to salt stress. qPCR analysis showed that *TdARF* was mainly down-regulated under salt stress. It is suggested that *TdARF* may be used as candidate genes for wheat salt tolerance breeding.

收稿日期: 2024-12-02 修回日期: 2024-12-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (U22A20457)

第一作者 E-mail: 2079723465@qq.com (马博)

通讯作者 E-mail: small@nwsuaf.edu.cn (聂小军)

**Keywords:** Wild emmer; ARF gene family; Genetic variation; Salt stress; Expression profile

ARF 是植物重要的转录因子,在植物的生长发育中发挥重要作用<sup>[1-3]</sup>。迄今为止,已有多个物种的 ARF 基因被鉴定,包含玉米、香蕉、番茄、大豆等<sup>[4-7]</sup>。大多数 ARF 包含三个主要结构域:位于氮端的 B3 型 DNA 结合结构域(DBD)、作为激活结构域(AD)或抑制结构域(RD)的 MR 区域及位于碳端的 PB 结构域<sup>[8]</sup>。DBD 是一种植物特异性的 B3 结构域,可与 AuxRE 元件结合<sup>[9]</sup>。MR 区域的氨基酸组成和长度决定了 ARF 是激活因子还是抑制因子。AD 区域通常富含谷氨酰胺、亮氨酸(L)和丝氨酸(S)残基,而 RD 区域则以甘氨酸(Q)、亮氨酸(L)、丝氨酸(S)和脯氨酸(P)残基为主<sup>[10]</sup>。碳端的 PB 结构域促进 ARF 与 Aux/IAA 的异二聚化或 ARF 蛋白的同源二聚化,进而增强蛋白间的相互作用。然而,PB 结构域并非普遍存在于所有 ARF 成员中。例如,在水稻中,OsARF2、OsARF3、OsARF13、OsARF14、OsARF15 和 OsARF20 缺少 PB 结构域<sup>[11]</sup>;在番茄中,SlARF3、SlARF6B、SlARF16B、SlARF17 和 SlARF24 也存在类似现象<sup>[12]</sup>。

ARF 参与植物的各项生理生长活动。拟南芥中, *AtARF7* 和 *AtARF19* 可以调节细胞分裂、影响侧根形成,突变体的侧根数量显著减少<sup>[13]</sup>。在水稻中沉默 *OsARF16* 后,主根、侧根和根毛对生长素的敏感性丧失<sup>[14]</sup>。在番茄开花期, *SlARF1*、*SlARF9*、*SlARF11*、*SlARF15* 和 *SlARF16* 呈现高表达水平,可能参与番茄花器官的形成<sup>[15]</sup>。在蓝莓中, *VcARF2-1*、*VcARF4-1*、*VcARF8-4* 和 *VcARF9-1* 的表达水平随着果实的发育而降低, *VcARF16-1* 的表达水平随着果实的成熟而升高<sup>[16]</sup>。ARF 家族基因均参与甜瓜果实发育,其中 *CmARF6-like*、*CmARF5*、*CmARF9*、*CmARF17*、*CmARF1*、*CmARF4* 和 *CmARF18* 在甜瓜所有组织中均有表达<sup>[17]</sup>。

ARF 基因的启动子区域包含多种响应非生物胁迫的顺式作用元件,使 ARF 参与各种胁迫响应<sup>[18-19]</sup>。在水稻中,有 9 个 ARF 基因 (*OsARF2*、*OsARF4*、*OsARF10*、*OsARF14*、*OsARF16*、*OsARF18*、*OsARF19*、*OsARF22* 和 *OsARF23*) 对干旱胁迫表现出响应,而 *OsARF11* 和 *OsARF15* 则与盐胁迫相关<sup>[20-21]</sup>。在拟南芥中过表达甘薯的 *IbARF5* 可以显著增强植株对盐胁迫和干旱胁迫的抗性,提高抗逆相关标志物如脯氨酸和脱落酸

(ABA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)的活性<sup>[19]</sup>。在番茄中,敲除 *SlARF2* 和 *SlARF4* 基因的突变体在干旱条件下具有较低的丙二醛含量以及较高的抗氧化物质、SOD 和 CAT 活性<sup>[22]</sup>。

野生二粒小麦 (*Triticum dicoccoides*) 是现代四倍体和六倍体小麦的祖先供体种<sup>[23]</sup>,具有遗传资源丰富、蛋白含量高、籽粒大、耐逆性强的优良特性,是小麦改良的重要遗传资源库<sup>[24]</sup>。目前,已有多种遗传资源在野生二粒小麦中被鉴定,例如与抗逆相关的转录因子 NAC 家族(如 TRIDC5AG007610)、miRNA-mRNA 调控网络(如 miR9663/*MDAR2*)、与抗条锈病相关的 QTL 位点、与 ABA 通路相关的 PYL 基因家族等<sup>[25-27]</sup>。前人研究发现,部分野生二粒小麦的种质具有极强的耐盐性<sup>[28]</sup>,但对其相关基因的挖掘和利用较少。本研究以野生二粒小麦为研究对象,在全基因组水平对 ARF 家族成员进行系统鉴定,结合 RNA-seq 和 qPCR 技术明确其在盐胁迫下的表达特性,为小麦遗传改良提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 野生二粒小麦 ARF 家族成员的鉴定

从 Ensembl Plants 数据库 (<https://plants.ensembl.org/index.html>) 下载小麦和野生二粒小麦的全基因组序列文件。从 InterPro 数据库 (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/text/>) 中获取 ARF 家族的特征文件,包括 PF0650 (Auxin\_resp 结构域)、PF02362 (B3 结构域) 和 PF02309 (PB 结构域)。以拟南芥的 ARF 家族序列为探查序列,在小麦和野生二粒小麦的蛋白序列中进行 BLAST 比对,同时利用 hmmsearch 工具在本地蛋白数据库中进行检索。将两种方法筛选出的候选基因去冗余后,提交 NCBI-CDD 数据库 (<https://www.omicsclass.com/article/310>) 进一步验证。将同时具有 Auxin\_resp、B3 和 PB 结构的基因视为 ARF 家族成员,根据基因在染色体上的位置对其进行命名。

### 1.2 ARF 家族成员特性分析

对 1.1 中筛选出的 ARF 蛋白序列通过 TTools (v2.112) 的 Protein Parameter Calc 插件进行蛋白理化特性预测。在 Cell-PLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc/>) 中进行亚

细胞定位预测。野生二粒小麦 ARF 家族基因的物理位置信息从 Ensemble Plant (<https://plants.ensembl.org/index.html>) 获取,用 MG2Cv2.1 ([http://mg2c.iask.in/mg2c\\_v2.1/](http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.1/)) 对基因在染色体上的分布进行可视化。

### 1.3 ARF 家族成员的进化和结构分析

在 MEGA11 中,将拟南芥、小麦和野生二粒小麦的 ARF 家族成员蛋白利用 ClustalW 进行多序列比对,通过最大似然法(maximum likelihood, ML)构建系统进化树,均使用默认参数。建树文件上传 iTOL (<https://itol.embl.de/>) 进行可视化。利用 MEME 工具对 ARF 家族的蛋白进行保守序列(motif)分析,设置最佳基序宽度为 6~20,最大基序数为 10。从注释文件中提取 ARF 家族成员的外显子物理位置信息,并在本地生成作图文件。将构建的作图文件上传至 iTOL (<https://itol.embl.de/>) 进行可视化。

### 1.4 ARF 家族成员启动子序列与在盐胁迫下的表达分析

利用 TBtools(v2.112)提取野生二粒小麦的 ARF 基因上游 2 000 bp 作为启动子序列,并在 PlantCARE (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 上进行顺式作用元件预测,删除预测结果中标注为未知的元件,并根据相关文献对元件类型进行分类和整理<sup>[29]</sup>。

根据已报道的两种耐盐性相反的野生二粒小麦品系 A5(耐盐型)和 C2(敏感型)的转录组数据初步检测 ARF 在盐胁迫下的表达模式<sup>[26]</sup>,数据的可视化分析在 R 4.2.2 环境下完成。

选取野生二粒小麦材料 W3,在 1/2 霍格兰培养液中培养至三叶期后,采用 250 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl 进行胁迫处理;在处理 0、3、6、12 和 24 h 时分别采集根系和倒二叶组织,使用天根 RNA simple 总 RNA 提取试剂盒提取 RNA。使用艾科瑞 Evo M-MLV 反转录预混试剂盒进行 cDNA 合成。qPCR 采用艾科瑞 SYBR Green Pro Taq 预混型 qPCR 试剂盒进行,利用 Quant Studio 3 Real-Time PCR 系统(Thermo,美国)进行反应,PCR 程序为:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 34 s,共 40 个循环;以真核转录起始因子(eukaryotic translation initiation factor, eIF)作为内参,用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算相对表达量。

### 1.5 野生二粒小麦 ARF 基因的遗传学分析

基于四倍体小麦的重测序数据对 ARF 基因进行遗传变异分析<sup>[30]</sup>,包括野生二粒小麦、栽培四倍体小麦和硬粒小麦种群。利用 VCFtools-0.1.16 计算 ARF 在 3 个种群间的分化指数(Fst)、核苷酸多样性( $\pi$ )和中性测验指数(Tajima's D),设置滑动窗口为 1 kb,对相关遗传参数进行统计,并用 R 4.2.2 完成可视化。

## 2 结果与分析

### 2.1 野生二粒小麦 ARF 家族成员的分布及理化性质分析

结合 BLAST、HMMER 工具查找,通过在 NCBI-CDD 中进行序列验证,在野生二粒小麦中共鉴定到 22 个 ARF 家族成员(表 1),其氨基酸数量为 640~1 174 aa,不稳定指数为 50.51~73.82,等电点为 5.63~7.99,亲水性均小于 0,表明野生二粒小麦的 ARF 蛋白是弱酸至碱性的亲水蛋白。22 个 ARF 蛋白均被定位在细胞核中。22 个基因不均匀分布在 2A、2B、3A、3B、5A、5B、6A、6B、7A 和 7B 染色体上,其中 3A、3B、7A 和 7B 染色体上各分布有 3 个成员,2A、2B、6A 和 6B 染色体上各分布有两个成员,在 5A 和 5B 染色体上各有 1 个成员(图 1)。

### 2.2 ARF 家族成员进化树的构建及其基因结构和启动子顺式作用元件分析

对拟南芥、小麦和野生二粒小麦中共 81 个 ARF 蛋白利用最大似然法构建系统进化树(图 2),将 81 个 ARF 蛋白共分为 7 个亚群,Group 1~Group 7 依次包含 26、16、22、11、2、3 和 1 个蛋白。其中野生二粒小麦的 ARF 成员主要分布于 Group 1、Group 2、Group 3、Group 4。对野生二粒小麦 ARF 成员构建进化树(图 3A),22 个基因分为 3 个亚组,亚组 I 包含 *TdARF11*、*TdARF12*、*TdARF14*、*TdARF16*、*TdARF19* 和 *TdARF22* 共 6 个成员,亚组 II 包含 *TdARF1*、*TdARF3*、*TdARF5*、*TdARF6*、*TdARF7*、*TdARF8*、*TdARF9* 和 *TdARF10* 共 8 个成员,亚组 III 包含 *TdARF2*、*TdARF4*、*TdARF13*、*TdARF15*、*TdARF17*、*TdARF18*、*TdARF20* 和 *TdARF21* 共 8 个成员。

在野生二粒小麦的 ARF 蛋白结构中,检测到 10 个 motifs(图 3B),motif 1、motif 2 和 motif 5 存在于所有成员中,motif 3 存在于除 *TdARF20* 以外其他蛋白中,推测 motif 1、motif 2、motif 3 和

表 1 野生二粒小麦 ARF 家族成员的性质

Table 1 Features of the ARF gene family in wild emmer wheat

基因 ID Gene ID	名称 Name	氨基酸数量 Number of amino acid	理论 PI Theoretical pI	不稳定指数 Instability index	亲水性 Hydrophilic	亚细胞定位 Subcellular localization
TRIDC2AG045060	TdARF1	640	5.99	55.56	-0.425	细胞核 Nucleus
TRIDC2AG069310	TdARF2	955	5.78	59.09	-0.555	细胞核 Nucleus
TRIDC2BG047610	TdARF3	723	7.99	58.59	-0.494	细胞核 Nucleus
TRIDC2BG074990	TdARF4	950	5.81	60.06	-0.561	细胞核 Nucleus
TRIDC3AG021740	TdARF5	760	6.15	50.51	-0.493	细胞核 Nucleus
TRIDC3AG062500	TdARF6	801	6.41	56.87	-0.650	细胞核 Nucleus
TRIDC3AG063650	TdARF7	793	6.04	62.08	-0.680	细胞核 Nucleus
TRIDC3BG026190	TdARF8	758	6.15	52.73	-0.494	细胞核 Nucleus
TRIDC3BG070170	TdARF9	799	6.3	56.37	-0.650	细胞核 Nucleus
TRIDC3BG071360	TdARF10	808	6.03	61.59	-0.618	细胞核 Nucleus
TRIDC5AG005850	TdARF11	891	5.78	64.02	-0.474	细胞核 Nucleus
TRIDC5BG006630	TdARF12	895	5.96	65.19	-0.414	细胞核 Nucleus
TRIDC6AG014880	TdARF13	1 147	6.41	62.98	-0.538	细胞核 Nucleus
TRIDC6AG018730	TdARF14	928	5.63	73.82	-0.495	细胞核 Nucleus
TRIDC6BG020370	TdARF15	1 143	6.34	61.35	-0.530	细胞核 Nucleus
TRIDC6BG024760	TdARF16	930	5.76	71.79	-0.452	细胞核 Nucleus
TRIDC7AG019880	TdARF17	1 066	5.95	72.31	-0.600	细胞核 Nucleus
TRIDC7AG058040	TdARF18	1 140	6.18	64.09	-0.605	细胞核 Nucleus
TRIDC7AG064340	TdARF19	909	5.88	70.76	-0.469	细胞核 Nucleus
TRIDC7BG009870	TdARF20	1 101	6.63	71.45	-0.623	细胞核 Nucleus
TRIDC7BG050660	TdARF21	1 124	6.19	65.09	-0.627	细胞核 Nucleus
TRIDC7BG057850	TdARF22	898	6.01	70.61	-0.463	细胞核 Nucleus

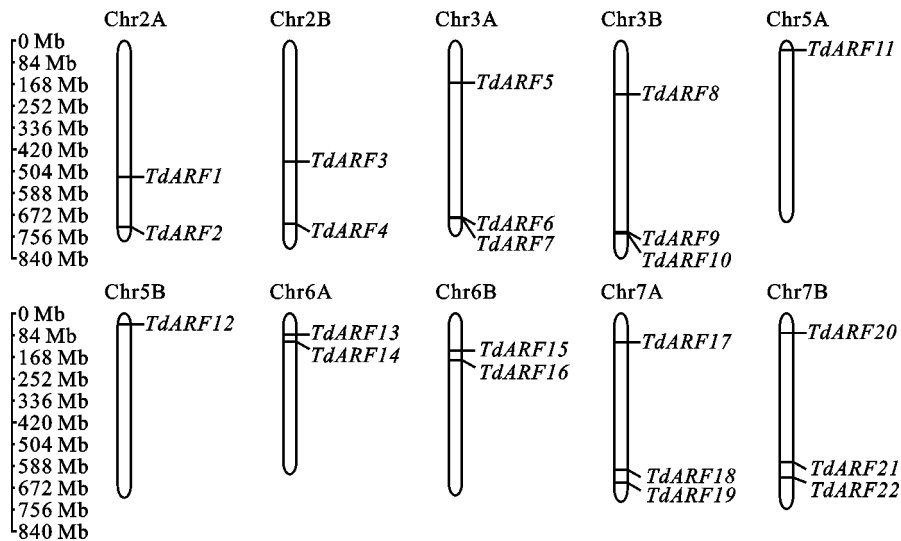


图 1 野生二粒小麦 ARF 基因的染色体定位

Fig. 1 Chromosomal mapping of ARF gene members in wild emmer wheat

motif 5 为 ARF 蛋白的关键组成。ARF 家族基因包含 13~15 个外显子(图 3C),其中 15 个成员包含 14 个外显子,4 个成员包含 13 个外显子,2

个成员包含 15 个外显子。亚组 I 的成员均包含 14 个外显子;亚组 II 中,只有 *TdARF6* 和 *TdARF9* 包含 15 个外显子,其他成员均包含 14



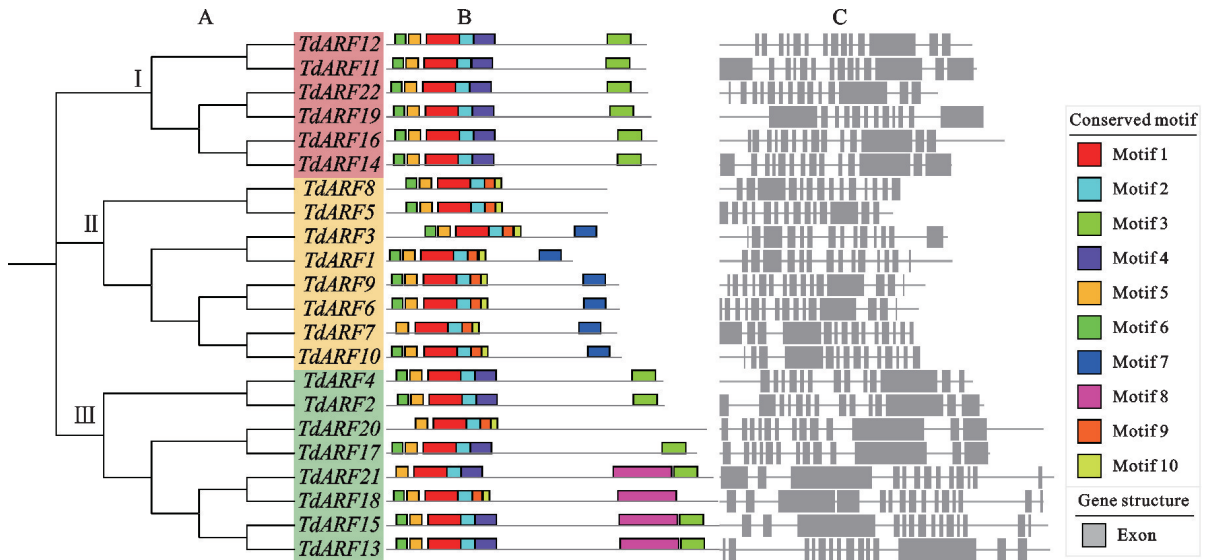


图 3 野生二粒小麦 ARF 基因系统进化(A)、motif(B)和基因结构(C)分析

Fig. 3 Phylogenetic tree(A)、motif identification(B) and gene structure analysis(C) of ARF gene family in wild emmer wheat

	3-AF1 binding site	A-box	AAAC-motif	ABRE	ACE	AE-box	ARE	ATC-motif	ATCT-motif	AuxRR-core	Box 4	Box III	CAAT-box	CAT-box	CCAAT-box	CGTCA-motif	chs-CMA1a	chs-Unit 1 m1	circadian	G-box	G-Box	Gap-box	GARE-motif	GATA-motif	GC-motif	GCN4_motif	GT1-motif	I-box	LAMP-element	LTR	MBS	MRE	O2-site	P-box	RY-element	Sp1	TATA-box	TATC-box	TC-rich repeats	TCA-element	TCCC-motif	TCT-motif	TGA-element	TGACG-motif						
<i>TdARF9</i>	2	5								1	16	1	1	3					5	1			2	1									1	6	12		1						1	3						
<i>TdARF8</i>			5	1			1			2	1	33	2	5	1				4	4			1	1							1					40		2	1					5						
<i>TdARF7</i>	2	3						1		2	26		3						1				3	1	1					2			2	3	7			1					1	3						
<i>TdARF6</i>	2	3									11	1	2						1	1				4	1							1			5	7		2					1	2						
<i>TdARF5</i>			10				1		1	1	33	1	3						7	4					1				1		3			2	2		44							3						
<i>TdARF4</i>	3	3					2		1		14	1	2						2				2	2							2				1	4	3	1						2						
<i>TdARF3</i>	6						4	1		1	11	1	2						3	2			1	1							1				5	1								2						
<i>TdARF22</i>	3	1	1						1	2	17		1											1	1						1				1	1		3	10		1	2			1					
<i>TdARF21</i>	1	3		1	2						18	3	2	2					5					2							2				1	1	1		4	6		1	1			1	2			
<i>TdARF20</i>	3	6									9	1	4						9				1	6	1	3				1				1	1		5	8		1					1	4				
<i>TdARF2</i>	2	4							1	1	13	2	2						2				1	4	2	1	1				1			2		2	1		1							2				
<i>TdARF19</i>	1	2					2			4	17	1	2						1	2				1	3	1	1	1	1	2	1			1	1	4	11		1							2				
<i>TdARF18</i>	2	4					1				2	1	2	2					1	3				1	3	1	1	1	2	1				1	1	4	20		2	1						2				
<i>TdARF17</i>	3	4							1		2	1	2	4					2	1				5	1	1	1							1	1	27	1	1								1	4			
<i>TdARF16</i>	1	3	5				1	2	1	1	19	1	4						3	2			1	2	1	1	1	1					1		1	17		1	2							4				
<i>TdARF15</i>		3					2				16		1						4					1										2			16										1	1		
<i>TdARF14</i>	1	1	6				1	3			20		6						4	2	1	2		1	1	1							1		1	15										6				
<i>TdARF13</i>	2	1					2			1	13	1	1						3																1	1	1											1		
<i>TdARF12</i>			2							1	20	1												1	2		2								6	4			1	2	1	3								
<i>TdARF11</i>	1		3				1				24	2							1					2										4		1	1			8	1		2							
<i>TdARF10</i>			2					1	3		25	1							2	1			1	3										1	1	2		3												
<i>TdARF1</i>	2		3				1				17	1	3	1	1				2	1			1	1	2	1								1	1															3

表中数字代表响应元件在基因启动子中的数量。

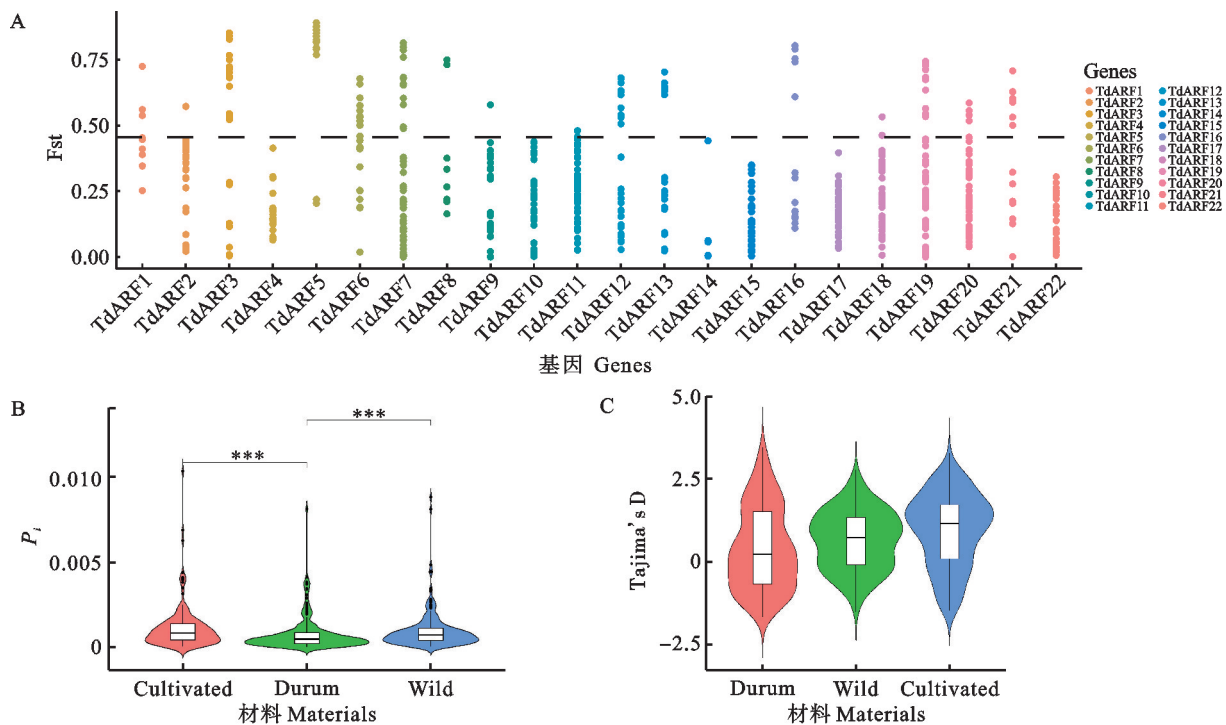
Numbers in the table mean the quantity of response elements in the gene promoter.

图 4 野生二粒小麦 ARF 基因启动子的顺式作用元件分析

Fig. 4 Analysis of cis-acting elements of ARF gene promoters in wild emmer wheat

被人为选择的可能性较低(图 5A)。栽培四倍体小麦与硬粒小麦之间的  $F_{st}$  最高,为 0.325,其次是野生二粒小麦与硬粒小麦间的  $F_{st}$ (0.290),栽培四倍体小麦和野生二粒小麦间的  $F_{st}$ (0.194)最低。野生二粒小麦和栽培四倍体小麦的核苷酸多样性分别为  $0.978 \times 10^{-3}$  和  $1.12$

$\times 10^{-3}$ ,硬粒小麦的核苷酸多样性为  $0.779 \times 10^{-3}$ ,前两者中 ARF 基因具有较高的遗传多样性(图 5B)。在野生二粒小麦和栽培四倍体小麦中,ARF 的中性测验指数在正值集中;硬粒小麦中,ARF 的中性测验指数在负值集中(图 5C)。



A: ARF 的遗传分化分析,  $F_{st}$  表示每个 SNP 的分化指数; Cultivated 表示栽培四倍体小麦, Durum 表示硬粒小麦, Wild 表示野生二粒小麦; B: 群体间的 ARF 核苷酸多样性 ( $\pi$ ) 分析,  $P_i$  表示核苷酸多样性, \* \* \*  $P < 0.001$ ; C: ARF 在群体中的中性测验指数的分布, Tajima's D 表示中性测验指数。

A: Genetic differentiation analysis of ARFs, with  $F_{st}$  representing the differentiation index of each SNP; Cultivated represents cultivated tetraploid wheat, Durum represents durum wheat, Wild represents wild emmer wheat; B: Analysis of nucleotide diversity ( $\pi$ ) of ARF among populations,  $P_i$  indicates nucleotide diversity, \* \* \*  $P < 0.001$ ; C: Distribution of neutral test index of ARF in the population, Tajima's D denotes the neutral test index.

图 5 野生二粒小麦的 ARF 基因分析

Fig. 5 Genetic variation of ARF genes in wild emmer wheat

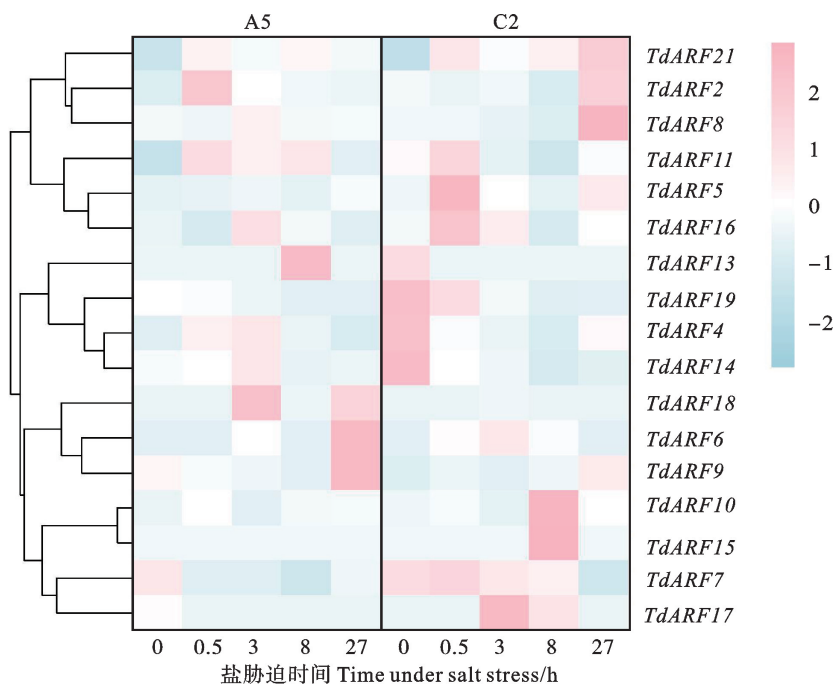


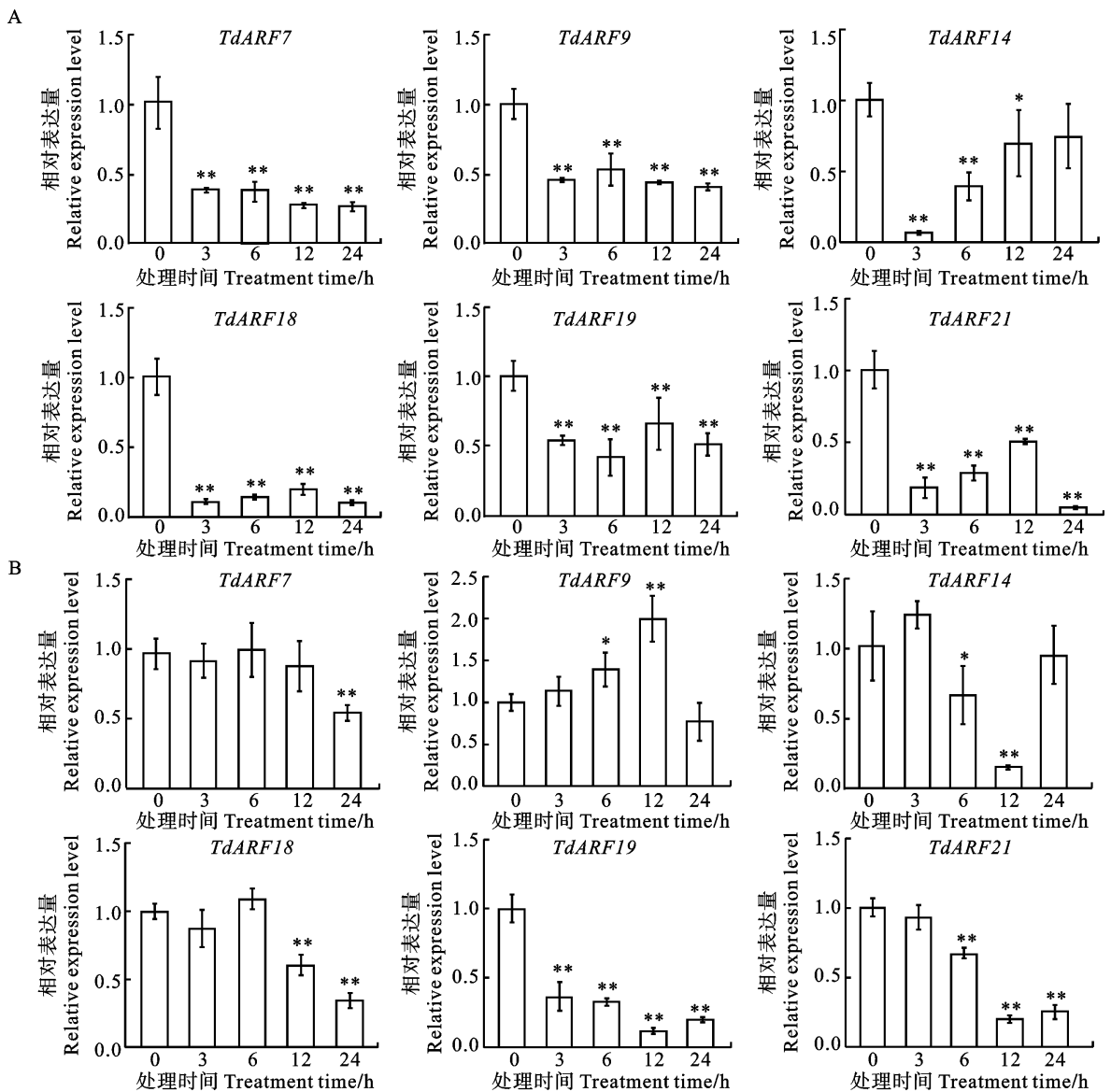
图 6 野生二粒小麦 ARF 基因在盐胁迫下表达模式

Fig. 6 Expression patterns of ARF gene in wild emmer wheat under salt stress

### 2.4 野生二粒小麦 ARF 家族成员盐胁迫下的表达

基于耐盐品系 A5 和盐敏感品系 C2 在盐胁迫下的转录组数据,分析 ARF 在野生二粒小麦中的表达模式<sup>[35]</sup>,发现有 17 个 ARF 成员的表达在盐胁迫与对照间存在显著差异(图 6),其中在品系 A5 中,上调表达的成员有 *TdARF2*、*TdARF4*、*TdARF5*、*TdARF6*、*TdARF8*、*TdARF9*、*TdARF10*、*TdARF11*、*TdARF13*、*TdARF14*、*TdARF16*、*TdARF18* 和 *TdARF21*,下调的成员有 *TdARF7*、*TdARF15*、*TdARF17* 和 *TdARF19*;在品系 C2 中,上调表达的成员有 *TdARF2*、*TdARF5*、*TdARF6*、*TdARF8*、*TdARF9*、*TdARF10*、*TdARF11*、*TdARF15*、*TdARF16*、*TdARF17*

和 *TdARF21*,下调的成员有 *TdARF4*、*TdARF7*、*TdARF13*、*TdARF14*、*TdARF18* 和 *TdARF19*; *TdARF2*、*TdARF5*、*TdARF6*、*TdARF8*、*TdARF9*、*TdARF10*、*TdARF11*、*TdARF16* 和 *TdARF21* 在 A5 和 C2 中均上调表达, *TdARF7* 和 *TdARF18* 在 A5 和 C2 中均下调表达; *TdARF4*、*TdARF13*、*TdARF14* 和 *TdARF18* 在 A5 中上调,而在 C2 中下调表达; *TdARF4* 和 *TdARF13* 在 A5 中下调,而在 C2 中上调表达。为了验证 ARFs 对盐胁迫响应的表达模式,筛选出 FPKM(每百万比对片段数归一化到每千碱基转录本长度)较高的 6 个成员进行 qPCR 验证。由图 7 可知,盐胁迫 3~24 h, *TdARF7*、*TdARF9*、*TdARF18*、*TdARF19* 和 *TdARF21*



\* 和 \*\* 表示较 0 h 表达差异显著 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

\* and \*\* indicate significant difference relative to 0 h expression at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

图 7 盐胁迫下野生二粒小麦 ARF 基因在根(A)和叶(B)中的 qPCR 检测

Fig. 7 qPCR of ARF genes in root(A) and leaf(B) of wild emmer wheat under salt stress

在根系中均显著下调表达;而 *TdARF14* 在 3 h 时表达量最低,但是随着处理时间的延长,表达量逐渐上升,24 h 与 0 h 时显著差异。相对根系,ARFs 在叶片中表达变化较为迟缓,随盐胁迫时间推移,*TdARF19* 呈现下调表达且下降速度最快,其他基因在处理 6~12 h 时开始出现显著差异表达,*TdARF9* 呈现上调表达,并在处理 12 h 时表达水平达到最高。

### 3 讨论

ARF 在调控植物的生长发育和抵抗各种非生物胁迫中发挥重要作用。本研究在野生二粒小麦中鉴定出 22 个 ARF 基因,发现其分布于 2A、2B、3A、3B、5A、5B、6A、6B、7A 和 7B 染色体上。蛋白特性分析发现野生二粒小麦 ARF 蛋白是一种位于细胞核内的弱酸至碱性的亲水蛋白,这与人研究结果一致<sup>[31]</sup>。在系统发育树中,野生二粒小麦的 ARF 成员分布于 Group 1、Group 2、Group 3 和 Group 4 中,与六倍体小麦的 ARF 成员交替出现,但未形成明显的分组。相比之下,拟南芥的 ARF 成员主要集中在 Group 3、Group 5、Group 6 和 Group 7,其中 Group 5、Group 6 和 Group 7 仅包含拟南芥的 ARF 成员,而 Group 3 中的拟南芥成员则形成独立分支,表明野生二粒小麦、六倍体小麦和拟南芥的 ARF 成员在进化上存在一定的关系,而在小麦和短柄草中也出现相似的结果<sup>[31]</sup>;野生二粒小麦 ARF 基因的内含子和外显子分布模式相似,外显子均被多个内含子分隔开,这种分布模式与小麦的 ARF 基因结构相似。

ARF 在四倍体小麦中核苷酸多样性较为丰富,有 16 个成员经历了人为选择。ARF 在栽培四倍体小麦与硬粒小麦之间的分化指数最大,其次是野生四倍体与硬粒小麦之间的分化指数,栽培四倍体与野生二粒小麦之间的遗传分化指数最小。ARF 在栽培四倍体和野生二粒小麦中的核苷酸多样性差异不显著,但二者显著高于硬粒小麦。栽培四倍体和野生二粒小麦的中性测验指数集中于正值,硬粒小麦的中性测验指数集中于负值,表明 ARF 在栽培四倍体小麦驯化过程中未经历显著的遗传瓶颈或选择压力,但是这种选择压力使 ARF 在群体中开始积累低频变异,这种低频变异并未成为优势变异位点,导致了 ARF 在栽培四倍体中具有较高的遗传多样性,但硬粒

小麦在驯化和改良过程中经历了较强烈的选择压力或者发生了种群扩张,部分低频变异的频率增加,并逐渐成为主要的单倍型,使 ARF 的遗传多样性降低。这种同质化趋势也在其他转录因子(如 NAC)中被检测到<sup>[24]</sup>。

除转录调控外,ARF 基因的启动子上含有大量与光响应、生理进程、植物激素和抵御胁迫相关的元件,使 ARF 基因广泛参与植物激素的串扰以及非生物胁迫反应,这在猕猴桃和油棕中已得到验证<sup>[32-33]</sup>。在盐胁迫下,野生二粒小麦的 ARF 在耐盐与盐敏感品系的转录组数据中展现了不同的表达模式。qPCR 检测发现,根系中 ARF 基因对盐胁迫较为敏感,主要表现为下调表达;在叶片中,除 *TdARF9* 呈现上调外,其他 5 个被测成员呈现下调趋势,但在叶片中的响应相对较为迟缓,相似的下调表达也在油棕中被检测到<sup>[33]</sup>。与转录组数据相比,*TdARF9*、*TdARF14*、*TdARF18* 和 *TdARF19* 的表达模式和其在 C2 品系中表达模式相似,*TdARF7* 的表达模式和其在 A5 品系中表达模式相似;ARF 在野生二粒小麦中具有丰富的遗传变异位点,并且不同的品系中具有不同的遗传背景,这一点也许是造成相同的转录因子在不同的品系中表达模式存在差异的主要原因,类似的结果也在之前的研究中被发现<sup>[30]</sup>。表达模式存在差异的 ARF 成员将成为下一步的研究目标,这些关键位点也许是与野生二粒小麦耐盐性相关的重要遗传资源。

本研究可为后续 ARF 基因功能挖掘提供参考,为小麦的遗传改良提供了基因资源。

#### 参考文献:

- [1]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.
- [2]QIAO L Y,ZHANG W P,LI X Y,*et al.* Characterization and expression patterns of auxin response factors in wheat [J]. *Frontiers in Plant Science*,2018,9:1395.
- [3]HARDTKE C S, BERLETH T. The *Arabidopsis* gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development [J]. *EMBO Journal*,1998,17(5):1405.
- [4]XING H Y,PUDAKE R N,GUO G G,*et al.* Genome-wide identification and expression profiling of auxin response factor(ARF) gene family in maize [J]. *BMC Genomics*,2011,12:178.
- [5]HU W,ZUO J,HOU X W,*et al.* The auxin response factor gene family in banana:Genome-wide identification and expression analyses during development,ripening,and abiotic stress [J]. *Frontiers in Plant Science*,2015,6:742.

- [6] WU J, WANG F Y, CHENG L, *et al.* Identification, isolation and expression analysis of auxin response factor (ARF) genes in *Solanum lycopersicum* [J]. *Plant Cell Reports*, 2011, 30(11):2059.
- [7] HA C V, LE D T, NISHIYAMA R, *et al.* The auxin response factor transcription factor family in soybean: Genome-wide identification and expression analyses during development and water stress [J]. *DNA Research*, 2013, 20(5):511.
- [8] LI Y H, HAN S, QI Y H. Advances in structure and function of auxin response factor in plants [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2023, 65(3):617.
- [9] LI S B, XIE Z Z, HU C G, *et al.* A review of auxin response factors (ARFs) in plants [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7:47.
- [10] ULMASOV T, HAGEN G, GUILFOYLE T J. Dimerization and DNA binding of auxin response factors [J]. *Plant Journal*, 1999, 19(3):309.
- [11] SHEN C J, WANG S K, BAI Y H, *et al.* Functional analysis of the structural domain of ARF proteins in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(14):3971.
- [12] ZOUINE M, FU Y Y, CHATEIGNER-BOUTIN A L, *et al.* Characterization of the tomato ARF gene family uncovers a multi-levels post-transcriptional regulation including alternative splicing [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1):e84203.
- [13] ZHANG H M, ZHU J H, GONG Z Z, *et al.* Abiotic stress responses in plants [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2022, 23(2):104.
- [14] SHEN C J, WANG S K, ZHANG S H, *et al.* OsARF16, a transcription factor, is required for auxin and phosphate starvation response in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2013, 36(3):607.
- [15] KUMAR R, TYAGI A K, SHARMA A K. Genome-wide analysis of auxin response factor (ARF) gene family from tomato and analysis of their role in flower and fruit development [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2011, 285(3):245.
- [16] LI X Y, ZHANG X Y, SHI T R, *et al.* Identification of ARF family in blueberry and its potential involvement of fruit development and pH stress response [J]. *BMC Genomics*, 2022, 23(1):329.
- [17] WU B, WANG L, PAN G Y, *et al.* Genome-wide characterization and expression analysis of the auxin response factor (ARF) gene family during melon (*Cucumis melo* L.) fruit development [J]. *Protoplasma*, 2020, 257(3):979.
- [18] KANG C, HE S Z, ZHAI H, *et al.* A sweetpotato auxin response factor gene (*IbARF5*) is involved in carotenoid biosynthesis and salt and drought tolerance in transgenic Arabidopsis [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9:1307.
- [19] VERMA S, NEGI N P, PAREEK S, *et al.* Auxin response factors in plant adaptation to drought and salinity stress [J]. *Physiologia Plantarum*, 2022, 174(3):e13714.
- [20] ZHOU J L, WANG X F, JIAO Y L, *et al.* Global genome expression analysis of rice in response to drought and high-salinity stresses in shoot, flag leaf, and panicle [J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 63(5):591.
- [21] JAIN M, KHURANA J P. Transcript profiling reveals diverse roles of auxin-responsive genes during reproductive development and abiotic stress in rice [J]. *The FEBS Journal*, 2009, 276(11):3148.
- [22] CHEN M Y, ZHU X Y, LIU X J, *et al.* Knockout of auxin response factor SlARF4 improves tomato resistance to water deficit [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(7):3347.
- [23] PENG J H, RONIN Y, FAHIMA T, *et al.* Domestication quantitative trait loci in *Triticum dicoccoides*, the progenitor of wheat [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(5):2489.
- [24] RUI Z S, PAN W Q, ZHAO Q L, *et al.* Genome-wide identification, evolution and expression analysis of NAC gene family under salt stress in wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides* L.) [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 230:123376.
- [25] TENE M, ADHIKARI E, COBO N, *et al.* GWAS for stripe rust resistance in wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) population: Obstacles and solutions [J]. *Crops*, 2022, 2(1):42.
- [26] YANG G, PAN W Q, CAO R, *et al.* Multi-omics reveals the key and specific miRNA-mRNA modules underlying salt tolerance in wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides* L.) [J]. *BMC Genomics*, 2022, 23(1):724.
- [27] LEI P Z, WEI X L, GAO R T, *et al.* Genome-wide identification of PYL gene family in wheat: Evolution, expression and 3D structure analysis [J]. *Genomics*, 2021, 113(2):854.
- [28] FENG K W, CUI L C, LV S Z, *et al.* Comprehensive evaluation of wild and cultivated emmer wheat (*Triticum turgidum* L.) genotypes response to salt stress [J]. *Plant Growth Regulation*, 2018, 84(2):261.
- [29] SHE K J, PAN W Q, YAN Y, *et al.* Genome-wide identification, evolution and expression analysis of OSCA gene family in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(21):13027.
- [30] YANG G, PAN Y, PAN W Q, *et al.* Combined GWAS and eGWAS reveals the genetic basis underlying drought tolerance in emmer wheat (*Triticum turgidum* L.) [J]. *New Phytologist*, 2024, 242(5):2115.
- [31] GIDHI A, KUMAR M, MUKHOPADHYAY K. The auxin response factor gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.): Genome-wide identification, characterization and expression analyses in response to leaf rust [J]. *South African Journal of Botany*, 2021, 140:312.
- [32] SU L Y, XU M, ZHANG J D, *et al.* Genome-wide identification of auxin response factor (ARF) family in kiwifruit (*Actinidia chinensis*) and analysis of their inducible involvements in abiotic stresses [J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2021, 27(6):1261.
- [33] JIN L F, YARRA R, ZHOU L X, *et al.* The auxin response factor (ARF) gene family in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): Genome-wide identification and their expression profiling under abiotic stresses [J]. *Protoplasma*, 2022, 259(1):47.