

研究报告

Research Report

美国红枫 *ArARF18* 基因的克隆及表达分析

李建一¹ 王志昆¹ 韩璇¹ 朱文鹏¹ 崔金腾^{1,2,3*} 赵和文^{1*}

1 北京农学院园林学院, 北京, 102206; 2 城乡生态环境北京实验室, 北京, 102206; 3 北京市乡村景观规划设计工程技术研究中心, 北京, 102206

* 共同通信作者, cuijinteng@163.com; zhaohewen6@sina.com

摘要 本研究采用不同浓度 IBA 处理红花槭(*Acer rubrum* L.)插条进行嫩枝扦插,通过根系表型性状及生化指标进行了分析,300 mg/L IBA 处理组的花红槭插条生根效果最好,一级根数量、二级根数量、平均根尖总数及平均根长均显著优于其他处理。300 mg/L IBA 处理组的 IAAO 和 PPO 活性较高,POD 活性较低,以上均有利于根系生长。因此,IBA 300 mg/L 浓度较适宜红花槭嫩枝扦插生根。对红花槭 *ArARF18* 基因进行了克隆和表达分析,*ArARF18* 基因 ORF 长度为 2 112 bp, 编码 703 个氨基酸。300 mg/L IBA 处理组 *ArARF18* 基因表达量显著高于 CK 组。运用生物信息学方法发现 *ArARF18* 氨基酸序列包含 B3, Auxin_resp family 和 AUX_IAA family 三个 ARF 家族结构域。本研究可为深入探究植物生长素信号转导通路相关转录因子的研究提供理论和实验依据。

关键词 红花槭; 生长素响应因子; *ArARF18*; 生物信息学

Cloning and Expression Analysis of *ArARF18* Gene in *Acer rubrum* L.

Li Jianyi¹ Wang Zhikun¹ Han Xuan¹ Zhu Wenpeng¹ Cui Jinteng^{1,2,3*} Zhao Hewen^{1*}

1 College of Landscape Architecture, Beijing University of Agriculture, Beijing, 102206; 2 Beijing Laboratory of Urban and Rural Ecological Environment, Beijing, 102206; 3 Beijing Engineering Research Center of Rural Landscape Planning and Design, Beijing, 102206

*Co-Corresponding authors, cuijinteng@163.com; zhaohewen6@sina.com

DOI: 10.13417/j.gab.040.003189

Abstract This research adopts the different concentration of IBA treatment the *Acer rubrum* L. to twig cutting, cutting through the root phenotypic traits and biochemical index was analyzed, and 300 mg/L IBA treatment group of *A. rubrum* cuttings rooting effect is best, primary root number, secondary average root number, root and total average root length were significantly higher than other processing. The 300 mg/L IBA group showed higher activity of IAAO and PPO and lower activity of POD, all of which were favorable for root growth. Thus, the concentration of 300 mg/L IBA was more suitable for cutting rooting of *A. rubrum*. *ArARF18* gene was cloned and expressed in *Acer rubrum*. The ORF length of *ArARF18* gene was 2 112 bp, encoding 703 amino acids. *ArARF18* gene expression was significantly higher in the 300 mg/L IBA group than in the CK group. Three ARF family domains, B3, Auxin_resp family and AUX_IAA family, were found by bioinformatics. It provides theoretical and experimental basis for the in-depth study of auxin signal transduction pathway related transcription factors.

Keywords *Acer rubrum* L.; Auxin response factor; *ArARF18*; Bioinformatics

美国红枫,即红花槭(*Acer rubrum* L.)属于槭树科 是一类优质的彩叶观赏树种。近年来,彩叶乔木在园林槭属植物,其树干直挺,其叶常在秋季变为红色,色 绿化中受到越来越多重视,因此对红花槭引种的适应彩艳丽,果实具翅,且树冠冠幅较大,遮阳效果良好, 种适合冷凉气候, 在中国北方其叶的变色效果比较

基金项目:本研究由城乡生态环境北京实验室项目(PXM2019_014207_000012)、2019 年北京高等学校高水平人才交叉培养实培计划深化项目(PXM2020_014207_000009)、学位与研究生教育改革与发展项目(2018YJS047)和科技创新服务能力建设 - 基本科研业务费(追加)(PXM2018_014207_000063)共同资助

引用格式:Li J.Y., Wang Z.K., Han X., Zhu W.P., Cui J.T., and Zhao H.W., 2021, Cloning and expression analysis of *ArARF18* gene in *Acer rubrum* L., *Jiyinzuxue yu Yingyong Shengwuxue* (Genomics and Applied Biology), 40(9-10 combined issue): 3189-3198. (李建一, 王志昆, 韩璇, 朱文鹏, 崔金腾, 赵和文, 2021, 美国红枫 *ArARF18* 基因的克隆及表达分析, 基因组学与应用生物学, 40(第 9-10 期合刊): 3189-3198.)

好。由于通过种子繁育出的苗木难以保持原来的性状,因此需要采用营养繁殖的方式进行繁育。但插条不易生根,扦插苗的根系发育和抗逆性较弱,不利于种苗的产业化发展(Liao, 2017)红花槭的根系发育对其整体生长具有重要影响,但目前国内外对于其根系发育机理方面的研究甚少。因此研究红花槭根系发育技术的分子调控机理,具有重要的科学和实践意义。

根系是维持植物正常生长发育的重要组成部分,具有吸收、合成、固着、储藏和繁殖等功能。根系发生与发育受植物内部和外部共同影响,生长素在此过程中发挥了重要的作用(Ljung, 2013)。生长素是一类小分子化合物,在植物体内主要是以吲哚乙酸(IAA)形式存在。AUX/LAXs 蛋白家族是目前已知的最主要的生长素输入载体。生长素能够调控根的生长发育、细胞分裂和分化。YUC, PIN, ARF 和 IAA 是生长素信号转导途径的重要组分,能够影响生长素的分布及生长素的动态平衡,进而调控根的生长发育(Zhao et al., 2013)。生长素原初反应基因 *Aux/IAA* 作为生长素信号转导过程中起负调控作用,能够抑制生长素响应因子(ARF)的表达(康书静等, 2014)。前人从拟南芥中得到 29 种 *Aux/IAA* 基因,其中大多能被生长素诱导,且突变体在重力感应、侧根形成及根的延长等方面表现出显著变化。ARF 作为转录因子参与调控生长素的应答(吴蓓等, 2005)。生长素早期响应基因启动子区有响应元件 TGTCTC 序列,ARF 能够与其特异性结合,并且能与 *Aux/IAA* 蛋白结合,形成异二聚体。生长素通过促使 *AUX/IAA* 蛋白降解,激活 ARF,诱导 *CRL1* 表达,最终促使不定根发生(Inukai et al., 2005)。由此可见,在激素诱导下 ARF 转录因子在植物根系生长发育过程中发挥了重要的调控作用。

目前对林木根系生长发育相关基因的研究较少(李少锋等, 2011)。本研究采用不同浓度吲哚丁酸(IBA)处理红花槭的嫩枝并进行扦插,通过转录组测序分析 ARF 转录因子家族基因,对外源激素诱导条件下差异表达转录因子 *ArARF18* 进行克隆并进行相关生物信息学分析,为生长素对红花槭不定根生长发育研究奠定基础,为深入探究植物激素信号转导通路上基因研究提供理论依据。

1 结果与分析

1.1 红花槭根系表型性状的观察与测定

经过对生根数量的统计,发现不同 IBA 浓度对红

花槭插条生根数量影响明显,各处理生根数量差异较大。统计各个处理组红花槭插条发现(图 1),外源激素 IBA 处理组的生根情况明显优于对照组。300 mg/L 处理的插条生根数量最多,不定根生长最密集且一致性较好。

通过对不同处理组的一级根数量、二级根数量及平均根尖总数的数据进行方差分析结果表明,IBA 300 mg/L 处理组一级根数量显著高于其他处理组(图 2A),IBA 100 mg/L 处理组一级根数量少于其它 IBA 处理组,对照组一级根数量很少。IBA 300 mg/L 处理组二级根数量最高,且显著高于其它 IBA 处理组,对照组二级根数量为零(图 2B)。IBA 300 mg/L 处理组平均根尖总数显著高于其他处理组(图 2C),IBA 100 mg/L 处理组平均根尖总数显著低于其它 IBA 处理组。综合一级根数量、二级根数量及平均根尖总数可以发现 IBA 300 mg/L 处理组生根情况最优。

对不同 IBA 处理组的插条平均根长进行统计分析(图 3),IBA 处理组插条的平均根长均显著高于对照组,IBA 300 mg/L 处理组插条的平均根长显著高于其他 IBA 处理组。平均根长同一级根数量、平均根尖总数的分析结果一致,IBA 300 mg/L 处理组均优于其他处理组。

1.2 红花槭根系 IAAO, PPO 和 POD 酶活性的测定

不同 IBA 浓度对红花槭插条根系 IAAO, PPO, 和 POD 酶活性的影响见图 4。IBA 300 mg/L 处理组的 IAAO 活性显著高于其他处理组(图 4A)。IAAO 是分解代谢植物内源激素 IAA 的关键酶,IBA 300 mg/L 处理组的 IAAO 活性最高,并且 IBA 300 mg/L 处理组一级根数量、二级根数量及平均根尖总数均显著高于其他处理组,插条正处于根系伸长期,可能不需要过多的 IAA 供应即可正常生长。

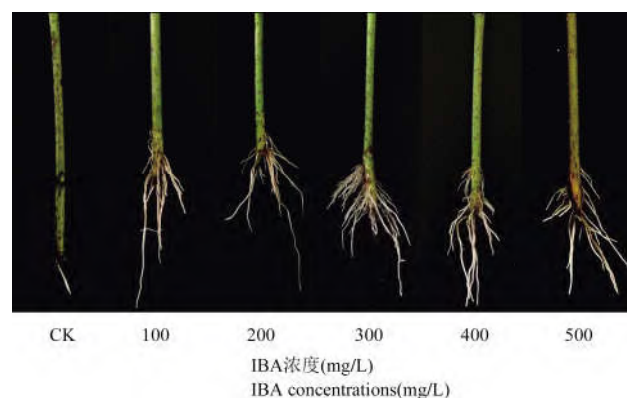


图 1 不同 IBA 浓度处理红花槭插条的生根情况观察
Figure 1 Rooting of *Acer rubrum* cuttings treated with different IBA concentrations

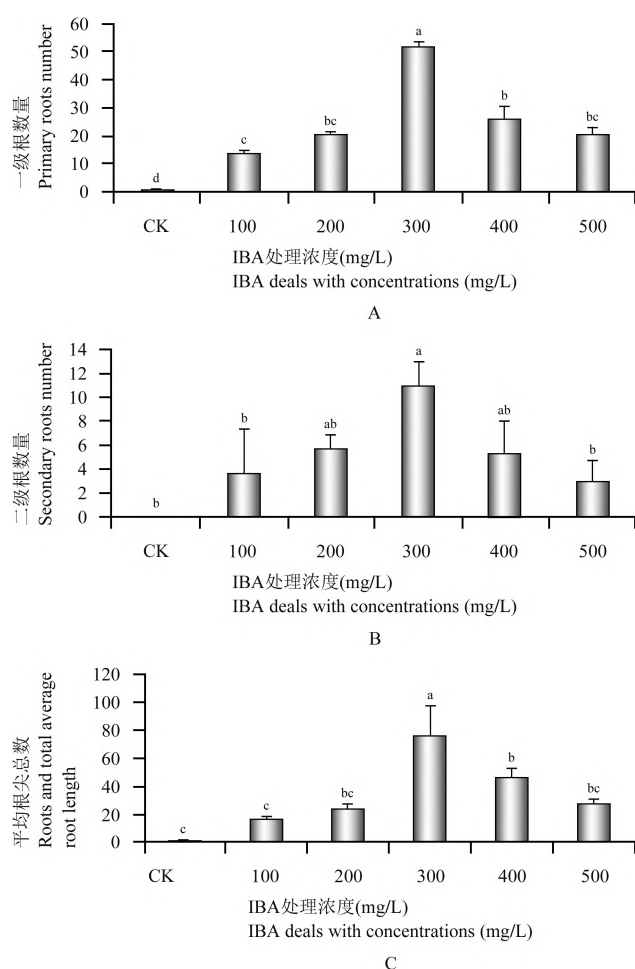


图2 不同 IBA 浓度对红花槭根系的一级根数量、二级根数量及平均根尖总数的影响

注: 使用单因素方差分析, Duncan (D), $P < 0.05$

Figure 2 Effect of different IBA concentrations on the number of primary and secondary roots and the total number of average root tips in *Acer rubrum* root system

Note: One-way ANOVA was used, Duncan (D), $P < 0.05$

POD 是一种植物体内的氧化酶, 同时有抑制植物细胞生长的作用。IBA 300 mg/L 处理组的 POD 活性显著低于其他 IBA 处理组, 该处理组根系中 POD 活性较低, 更利于生根, 表型分析结果也与其一致(图4B)。PPO 是可以将根系中的酚类等抑制物质氧化, IBA 300 mg/L 处理组的 PPO 活性显著高于其他 IBA 处理组, 说明该组根系中的酚类抑制物质较少, 有利于根系生长, 对根系生长有一定的促进作用。

1.3 红花槭转录组分析

通过转录组测序分析, 经组装后得到 128 412 个 Unigene, 其中, 总长度为 77 123 779 bp, 平均长度为 600 bp, N50 为 859 bp, GC 含量为 38.16%。使用 Transdecoder 检测出 31 385 个 CDS, 预测出 1 417 个编码

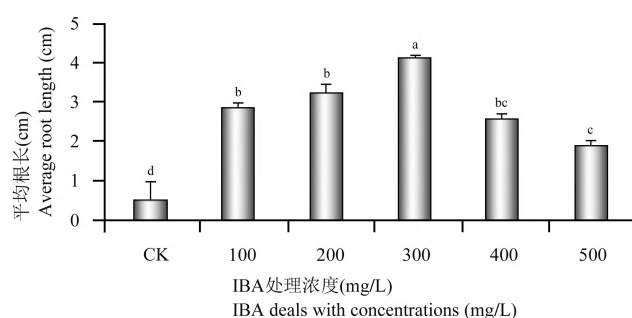


图3 不同 IBA 浓度对红花槭根系的平均根长的影响

注: 使用单因素方差分析, Duncan(D), $P < 0.05$

Figure 3 Effect of different IBA concentrations on root length of *Acer rubrum* cuttings

Note: One-way ANOVA was used, Duncan (D), $P < 0.05$

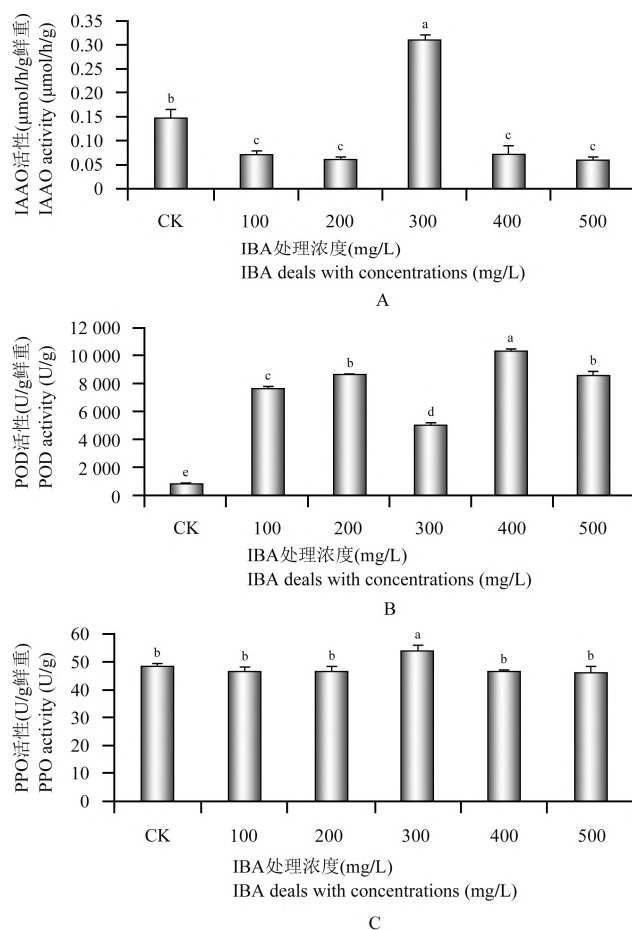


图4 不同 IBA 浓度对红花槭根系 IAAO, PPO 和 POD 酶活性的影响

注: 使用单因素方差分析, Duncan(D), $P < 0.05$

Figure 4 Effects of different IBA concentrations on activities of IAAO, PPO and POD enzyme in *Acer rubrum* root

Note: One-way ANOVA was used, Duncan(D), $P < 0.05$

转录因子的 Unigene。

ARF 家族基因在植物激素信号转导通路上起关键作用。通过 KEGG 数据库中关于 ARF 的植物激素

信号转导通路(图 5), 结合转录组文库注释和差异分析, 结果表明, *ARF* 家族上调差异基因共 14 个, 对 UniGene 拼接完整的 *ARF* 家族基因序列进行分析, 发现 *ArARF18* 可能对红花槭嫩枝扦插生根的起到一定的调控作用。

1.4 红花槭 *ArARF18* 基因的 qPCR 表达分析

对对照组和 IBA 300 mg/L 处理组根系中 *ArARF18* 基因进行荧光定量 PCR 分析, *ArARF18* 基因在对照组和 IBA 300 mg/L 处理组中均有表达, IBA 300 mg/L 处理组的表达量显著高于对照组(图 6), 与转录组测序结果一致。结果表明 *ArARF18* 可能在红花槭生根过程中起到了调控根系生长的作用。

1.5 红花槭 *ArARF18* 基因的克隆

使用 ORFfinder 在线软件预测 *ArARF18* 基因最大开放阅读框(open reading frame, ORF), 基于基因序列设计引物, 进行基因克隆并测序(图 7), 测序结果与转录组数据库中 UniGene 序列比对结果高度一致, 获得 *ArARF18* 基因全长 cDNA 序列。使用 NCBI 蛋白质数据库进行 Blastp 比对, 结果表明 *ArARF18* 基因编码的氨基酸序列与漾濞槭中的一个未注释蛋白高

度相似(Yang et al., 2019)。*ArARF18* 基因的 ORF 序列全长为 2 112 bp, 编码 703 个氨基酸(图 8)。

通过 Motif Search 工具对 *ArARF18* 氨基酸序列进行 ARF 家族功能区分析(图 9), 结果表明 *ArARF18* 蛋白存在 B3, Auxin_resp family 和 AUX_IAA family 三个结构域, 三个结构域所在位置分别为第 117~218 位、第 288~371 位和第 614~654 位。

通过 Phytozome v12.1 数据库选取鼠耳芥(*Arabidopsis thaliana*)、苹果(*Malus domestica*)、柑橘(*Citrus sinensis*)、蓖麻(*Ricinus communis*)中与 *ArARF18* 蛋白具有同源性的 ARF 家族蛋白序列。用 DNAMAN 进行序列分析, 从比对结果可以看出, 三个结构域的位置相似度较高, 可以判断 *ArARF18* 为 ARF 家族成员(图 10)。

1.6 红花槭 *ArARF18* 蛋白的氨基酸理化性质分析

利用在线软件 ProtParam 对 *ArARF18* 蛋白进行理化性质预测分析。*ArARF18* 分子式为 $C_{3426}H_{5303}N_{963}O_{1037}S_{36}$, 分子量为 77.73 kD, 等电点 pI 值为 6.75。*ArARF18* 蛋白由 703 个氨基酸残基组成, 其中包含亲水氨基酸(polar amino acids)423 个,

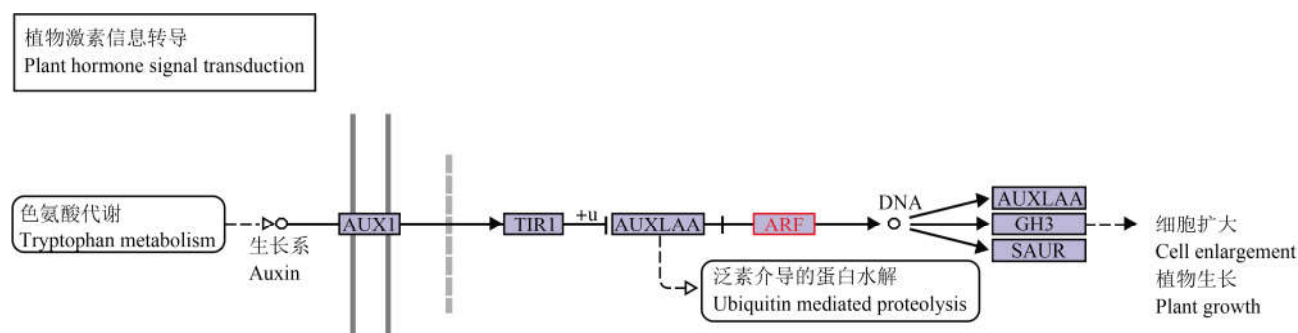


图 5 植物激素信号转导通路

Figure 5 Plant hormone signal transduction pathway diagram

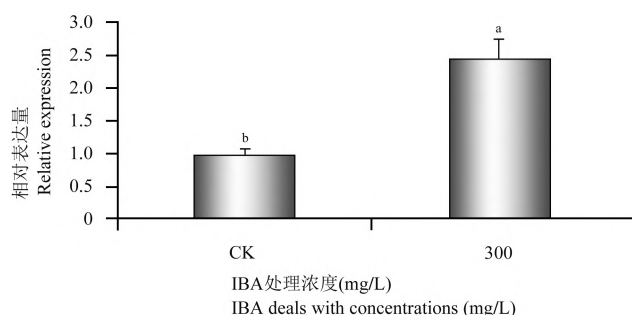


图 6 *ArARF18* 基因的表达量分析

注: 使用单因素方差分析, Duncan(D), $P < 0.05$

Figure 6 Expression analysis of *ArARF18* in different treatments

Note: One-way ANOVA was used, Duncan(D), $P < 0.05$

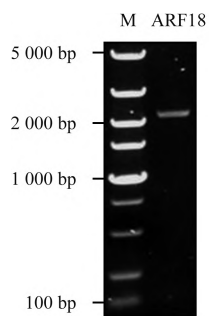
图7 *ArARF18* 基因扩增产物的琼脂糖电泳检测

Figure 7 Agarose electrophoresis of *ArARF18* gene amplification products

占总数的 60.10%，疏水氨基酸 (hydrophobic amino acids) 280 个，占氨基酸总数的 39.80%，不稳定系数为 50.15，大于阈值，亲水性氨基酸多于疏水性氨基酸，总平均亲水性为 -0.424，根据理化性质判断，其属于不稳定的亲水蛋白。

通过 SOPMA 在线分析软件进行 *ArARF18* 蛋白的二级结构预测，结果显示该蛋白的二级结构由 α 螺旋 (α -helix, 19.35%)、延伸链 (extended strand, 15.22%)、 β 转角 (β -turn, 3.56%) 和无规则卷曲 (random coil, 61.88%) 构成。

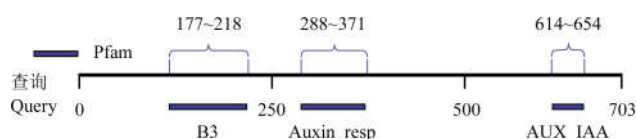
```

1  ATGATTACTTTTCATGGACTCAAAAGAGAAAATAAAAGACATGGACAAGTGCTTGGACTCTCAACTATGGCACGCCTGCGCCGGTGGGATG
   M I T F M D S K E K I K D M D K C L D S Q L W H A C A G G M
91  GTGCAATGCCCGCGGTGAACACCAGAGTCTTCTATTTCCCTCAAGGCCACGCCGAGCAGCTTGTGGGCTGTAGACTTCAGGAACTGC
   V Q M P P V N T R V F Y F P Q G H A E H A C G P V D F R N C
181 CAGAGAATTCACCTTACATTCTCTGCAGAGTCTCAAACATCAAATTCATGGCTGATCCTGAAACAGATGAAGTTTTTGCCAAAATTAAG
   Q R I P P Y I L C R V S N I K F M A D P E T D E V F A K I K
271 TTGACCCCAATAAGCAACAACGAGCCTGGTTTTTGATGACGATACAATTCACAACACCGAGCAAGATAAACCGCCGCTGTTTTGCTAAGACA
   L T P I S N N E P G F D D D T I H N T E Q D K P P S F A K T
361 TTAACACAATCGGATGCGAACAATGGTGGTGGATTCTCTGTTCCGAGGTATTGTGCGGAGACGATTTTCCCGAGATTGGATTACTCGGCG
   L T Q S D A N N G G G F S V P R Y C A E T I F P R L D Y S A
451 GATCCACCTGTACAGACGATTCTCGCGAAGGATGTTACGGCGAGACATGGAAGTTTAGGCATATTTACAGAGGGACGCCGAGGAGACAT
   D P P V Q T I L A K D V H G E T W K F R H I Y R G T P R R H
541 TTGTTGACAACTGGGTGGAGTACTTTTGTCAACCATAAGAAGCTTGTAGCTGGGGATTCAATTGTGTTTTTGAGAGCAGAGACCGGAGAT
   L L T T G W S T F V N H K K L V A G D S I V F L R A E S G D
631 CTTTGTGTCGGAATTCGACGTGCAAGAGAGGGGTGCGAGGTGGACGGAGGTTTCTTCCGGGTGGAACGGGAATTCGATATCGCCTTAT
   L C V G I R R A K R G V G G F E V S S G W N G N C V S P Y
721 GGGGGCTTTTTCGGCTTTTTTTAGGGAGGAAGAGAACAAGTTGATGAGAAATGGCAATGGAAATGGAAATGGTCCGAGTTCGAGTAATGGT
   G G F S A F F R E E E N K L M R N G N G N G N G P S S S N G
811 AATGGTAGTTTGAATGGGAAAGGAAAGTGAGGCCTGAATCTGTCAATTGAAGCTGCAACGCTTGCCGCAAAATCGACAGCCGTTTGAAGTC
   N G S L I G K G K V R P E S V I E A A T L A A N R Q P F E V
901 GTGTTCTACCTCGAGCTAGTACTCCGAGTTCGTGTCAAGGCTTCCATGGTGAAAGCAGCATCGCAGATCCGGTGGTGTCTGGGATG
   V F Y P R A S T P E F C V K A S M V K A A S Q I R W C Y S P Y
991 AGATTTAAGATGGCCTTCGAAACAGAGGATGCTTCAAGGATTAGTTGGTTTATGGGAATATATCCTCTGTTCCAGGTTTCTGATGCTCTC
   R F K M A F E T E D A S R I S W F M G T I S S V Q V S D A L
1081 TATGGCCTGATTCACCTTGGAGGCTTCTTCAGGTTACATGGGATGAACCGGATTTGCTGCAAAATGTGAAACGCGTTAGCCCGTGGCTG
   Y W P D S P W R L L Q V T W D E P D L L Q N V K R V S P W L
1171 GTGGAATTGGTATCAACATGCCCGCCTTCCATCTATACCCTTTCGCCCTAGGAAGAAGATGAGATTTCCACAGCATCCGGATTTTC
   V E L V S N M P A F H L S T L S P P R K K M R F P Q H C G F
1261 CCCCTTGACGGCCAAATTCGAATGCCGTCAATTTCCCGGCAACCTCCTTGGGCACAATAATAGCCCTTTGGGTGTCTACCCGATAACAAC
   P L D G Q I P M P S F P G N L L G H N N S P F G C L P D N N
1351 ACTCCTGCTGGCATGCAAGGAGCCAGGCATGCTCACTATGGTCTATCTTATCAGATATCCATCTCAATAAACTGCAGTCAGGTCTGTTT
   T P A G M Q G A R H A H Y G L S L S D I H L N K L Q S G L F
1441 TCGGCCGATCCAGCCGCTTGAATGCACTGCAGCTCCACCTAAAGGGCCTCCAATAGCCCAATCATAAGAAATCCTAGCATTAGTGAG
   S A G I Q P L D C T A A P P K R A S N S P I I Q N P S I S E
1531 AATGTTTCTTGCTTGTACCAACATGGCACACTCTACACAGACTTCAAAGAAAATGATGGTTTAAAGACACCCCATCTTGTCTTTTCGGC
   N V S C L L T M A H S T Q T S K K N D G L K T P H L V L F G
1621 CAACAAATCTTACAGAGCAGCAATCTCTCAGCTGCTTGGCGATACAGTTTCTCCGTTCTTACCGGAAATAGTTTCATCAGAAGGG
   Q Q I L T E Q Q I S L S C S G D T V S P V L T G N S S S E G
1711 AATTTATATAAAATGGCAAACTTTTTCAGATAATTCGTGTTCTGCAATTCATCAACAAGGCCTATCTGACCGATCATTACGGAAGGTTT
   N L Y K M A N F S D N S G S A I H Q Q G L S D R S F S E G F
1801 CATTGGTACAAGGATAATCATCGTCAAGAAACAGATCCCAATTTGGAGACCGGTCAT TGTAAGTGTTCATGGAATCCGAGGATGTAGGT
   H W Y K D N H R Q E T D P N L E T G H C K V F M E S E D V G
1891 CGAACTCTTAACCTTTTCGTTCTTGGTTCTTACGATGAATGTACAAAAGCTAGCGAACATGTTTGGCATTGAGAATCCGAGACACTG
   R T L N L S L L G S Y D E L Y K K L A N M F G I E N S E T L
1981 AGCCATGTACTCTATCGTGATTAACAGTGCACTCAAGCACATCGGCGATCAACCATTCACTGACTTCATGAAAACACTAGGAGGTTG
   S H V L Y R D I T G V K H I G D Q P F S D F M K T T R R L
2071 ACAATTCTAATGGATTCAAGCAGTGACAATGTAGGAATATAG
   T I L M D S S S D N V G I *

```

图8 *ArARF18* 基因的最长 ORF

Figure 8 The longest ORF of *ArARF18* gene

图9 *ArARF18* 氨基酸序列的家族保守结构域分析Figure 9 Conserved domain of *ArARF18* amino acid

1.7 *ArARF18* 系统进化分析

从 Phytozome v12.1 数据库中,对双子叶植物鼠耳芥、可可树(*Theobroma cacao*)、柑橘、蓖麻、苹果、葡萄(*Vitis vinifera*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、千穗谷(*Amaranthus hypochondriacus*)、耧斗菜(*Aquilegia coerulea*),对单子叶植物如玉米(*Zea mays*)、水稻(*Oryza sativa*)、菠萝(*Ananas comosus*),对石松纲植物江南卷柏(*Selaginella moellendorffii*),苔藓植物(*Physcomitrella patens*)和绿藻纲植物团藻(*Volvox carteri*)的全基因组进行 BLASTP 比对,检索 *ArARF18* 蛋白的同源序列,利用 MEGA5.2 邻接法进行系统进化树分析(图 11)。根据进化树可知,红花槭与柑橘、千穗谷、鼠耳芥等双子叶植物有较近的同源关系,体现了较近的亲缘关系,并且与柑橘的可信度达到了 100。

2 讨论

通过实生播种方式进行红花槭(*Acer rubrum*)的扩繁难以保持母本的原有性状,在保持树种优良性状的前提下,扦插繁殖是最佳选择。吲哚丁酸(IBA)能够促进细胞分化和分裂,促进插条不定根的形成,常被运用于植物扦插繁殖中。本研究对红花槭进行嫩枝扦插,对根外部形态观察发现红花槭的生根方式是皮部生根。使用不同浓度的外源激素 IBA 溶液对红花槭一年生嫩枝插条进行浸泡处理,发现 IBA 300 mg/L 处理后的嫩枝插条一级根数量、二级根数量、平均根尖总数及平均根长均显著优于其他处理组。红花槭嫩枝插条在 IBA 300 mg/L 中浸泡 1 h 是一种比较适宜的扦插处理方式。

本研究对 IBA 处理后插条根系的吲哚乙酸氧化酶(IAAO)、过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)活性进行了分析。IAAO 通过氧化植物体内的 IAA (吲哚乙酸),对 IAA 水平进行调节,从而影响植物的生长发育。红花槭插条经 IBA 处理后 IAAO 活性在 300 mg/L IBA 处理组中显著高于对照组,对照组显著高于其他处理组,IAAO 在特定激素浓度处理条件下才会发挥作用,进而促进不定根生长,过高的激素浓度或是过低的激素浓度可能会抑制的 IAAO 活性。Nag 等(2001)发现在绿豆根系表达期也发现了类

似的现象,IAAO 活性较高,促使体内 IAA 含量降低以促进根的伸长。POD 是调控植物体内生理代谢活动的氧化酶,同时对植物的生长发育起着重要的作用。郝木征等(2016, 园林科技, (1): 19-21)研究红花槭硬枝扦插生根过程中的 POD 活性,发现在插条根系形成时,POD 的活性降到相对较低的程度,以便促进不定根的生长发育。本研究也发现 POD 活性在 300 mg/L IBA 处理组中较其他处理组低,但显著高于对照组,说明较低的 POD 活性能够促进不定根生长。PPO 是一种能催化各种酚类氧化的酶。前人发现 PPO 能催化酚类物质与 IAA 缩合而形成一种“IAA-酚类复合物”,这种复合物具有促进不定根形成的作用(巩文琼, 2011)。本研究表明 PPO 在 300 mg/L IBA 处理组中 PPO 活性显著高于其他组别,说明较高的 PPO 活性能够促进不定根的生长。

基于以上表型性状和酶活性的分析,选取对照组和 300 mg/L 处理组插条根系进行转录组测序。结合转录组文库注释和差异分析结果,得到 ARF 家族上调差异基因共 14 个,对其中 Unigene 拼接完整的 *ArARF18* 基因进行了 qPCR 表达分析,*ArARF18* 基因在 300 mg/L 处理组中表达量显著高于对照组。另外, Liu 等(2015)研究表明 ARF18 能够调节角果果皮的细胞生长。说明 *ArARF18* 基因对插条生根可能有一定的调控作用。本试验克隆了 *ArARF18* 基因,该基因的 ORF 序列全长为 2 112 bp,编码 703 个氨基酸。对该基因的 DNA 序列及其编码蛋白的氨基酸序列进行分析,发现其具有典型的 ARF 家族蛋白的三个保守结构域,并与鼠耳芥、柑橘、蓖麻、苹果的同源蛋白序列进行比对,三个结构域位置比对率很高。*ArARF18* 分子式为 $C_{342}H_{5303}N_{963}O_{1037}S_{36}$, 分子量为 77.73 kD, 等电点 pI 值为 6.75, 为不稳定的亲水性蛋白。预测到 *ArARF18* 蛋白包含 α 螺旋(19.35%)、延伸链(15.22%)、 β 转角(3.56%)和无规则卷曲(61.88%), 在三个保守结构域中蛋白质的二级结构较为复杂,均包含四种结构类型,保守结构域以外的部分无规则卷曲占比最大。对 *ArARF18* 蛋白及各种同源序列进行系统进化分析,发现其与柑橘、千穗谷和拟南芥亲缘关系较近。

本研究采用不同浓度 IBA 处理红花槭插条进行嫩枝扦插,通过根系表型性状及生化指标进行了分析,综合筛选出 IBA 300 mg/L 浓度较适宜红花槭嫩枝扦插生根。对红花槭 *ArARF18* 基因进行了克隆和表达分析,运用生物信息学方法预测了 ORF 和编码的氨基酸,推测其生物学功能。为深入探究植物生长素信号转导通路相关转录因子的研究提供理论和实验依据。

ArARF18	-----	0
AT2G28350.1	-----	0
orange1.lg005482m	-----	0
MDP0000750392	MREGHTPNXKKXDRHAWRQPDVTLGLKGWQSPTSLVLGLPPSLGLEPNVGAKPTDPRAL	60
Rc30078.m002329	-----	0
Consensus	-----	
ArARF18	-----	0
AT2G28350.1	-----	0
orange1.lg005482m	-----	0
MDP0000750392	SSQLSPEQQTVDSYMRFIDADDSPSSFPSEAFSSVNFAXAGEELRALDFRRTWKVVRP	120
Rc30078.m002329	-----	0
Consensus	-----	
ArARF18	---MITFMDSEKIKD-----MDPCLDSQLWHACAGCMVQMFVNITVFYFDQ	45
AT2G28350.1	-----MEQEKSLDPQLWHACAGSMVQMFVNITVFYFPAQ	34
orange1.lg005482m	---MITVMSAKDAMKKN-----PTGESCLDSQLWHACAGCMVQMFVNITVFYFPAQ	49
MDP0000750392	SPQIFNFSPTAELLRARGIGISRRKLKEGDRCLDFQLWHACAGCMVQMFVNITVFYFPAQ	180
Rc30078.m002329	---MITFMEAKERVKEK-----EMECLDSQLWHACAGCMVQMFVNITVFYFDQ	47
Consensus	ld qlwhacag mvq p n vfyf q	
ArARF18	3HAEHACCPVDFRNCQRIFFYLICRVSNIKFMADPEIDEVFANIKLTFISN-----NEP	99
AT2G28350.1	3HDEHAEZPPDF-HAIRVDTILICRVSVYKFLADAETDEVFAKITLLILFG-----NDL	87
orange1.lg005482m	3HDEHARCNVFLPNFN-IIPSMIFCRVTAIKFLADAETDEVYAPIRLIALKSNCFDDFEDV	108
MDP0000750392	3HAEHACCPVDFRNCQRIFFYLICRVAAIKFMADPEIDEVFANIKLTFISN-----VEA	234
Rc30078.m002329	3HDEHACSGVDFRNFRLPPYLICRVSGIKFMADPEIDEVFANIKLTFISN-----KEN	101
Consensus	gh eha i crv f ad etdev a i l	
ArARF18	3FDDD---TTHNTE-----QDKP-SFAKTLTQSDANNGG3FSVPFYCAETIFPRLDYS	149
AT2G28350.1	DLENDAVLGLTPPSSDGNNGKKEKPSFAKTLTQSDANNGG3FSVPFYCAETIFPRLDYS	147
orange1.lg005482m	3FDON---CGISNES-----SEKPSFAKTLTQSDANNGG3FSVPFYCAETIFPRLDYS	159
MDP0000750392	SYEDDGIIGGNGSE-----TPDKPSFAKTLTQSDANNGG3FSVPFYCAETIFPRLDYS	288
Rc30078.m002329	3MEDEEEGVINGGEG-----QENKPSFAKTLTQSDANNGG3FSVPFYCAETIFPRLDYS	156
Consensus	kp sfaktltqsdanngggfsvprycaetifprldys	
ArARF18	ADPPVQTILAKDVHGEIWKFFHIYRGTPRRHLLTTGWSIFVNKKLVAGDSIVFLRAESG	209
AT2G28350.1	AEPPVQIVAKDVHGEIWKFFHIYRGTPRRHLLTTGWSIFVNKKLVAGDSIVFLRSBSG	207
orange1.lg005482m	AEPVQVITILAKDVHGEIWKFFHIYRGTPRRHLLTTGWSIFVNKKLVAGDSIVFLRAESG	219
MDP0000750392	ADPPVQTILAKDVHGEIWKFFHIYRGTPRRHLLTTGWSIFVNKKLVAGDSIVFLRAESG	348
Rc30078.m002329	ADPPVQTILAKDVHGEIWKFFHIYRGTPRRHLLTTGWSIFVNKKLVAGDSIVFLRAESG	216
Consensus	a ppvqt akd hge wki hiyrgtprrrhllttgws ifvn kkl gdsivflr e g	
ArARF18	DLCVGIRRAKRG-VCCGPEVTSQ---WNQHCVSFYGCFCAFFREENKLMNCONONONP	265
AT2G28350.1	DLCVGIRRAKRG-VCLGSNAASD-----NPVP3FSGFLRDEESTTTTSLMMMKRN	256
orange1.lg005482m	DLCVGIRRAKRGGLGCGSDYVGVNSGGGHCFFPGGYSGYMRDENKSSRNSSSD---	276
MDP0000750392	DLCVGIRRAKRG-SGSGPESSSGWNPMGHCNCTVPYGGFSAFLREDENNLMNNGNINISNS	407
Rc30078.m002329	DLCVGIRRAKRG-VCCGPEVTSQ---AGCHCVMPYCGFNSFFREDONKLSNCONONPGE	273
Consensus	dlc girrak g g g p g r	
ArARF18	SSSNGNSLIGKGVPEPESVTEAATLAAAGQFEVVYPRASTPEFVKAAMVKAASQIR	325
AT2G28350.1	G---NNQNAATQMRVVEAFAVARAACCGFEVVYPRASTPEFVKAADVRSAMRIR	314
orange1.lg005482m	-----LRGMRAESVTEAATLAAAGQFEVVYPRASTPEFVKAASAKVAAAMQIQ	326
MDP0000750392	N-----GSLVGKGVPEPESVTEAATLAAAGQFEVVYPRASTPEFVKAASLVAALQIR	462
Rc30078.m002329	N-----ALTGKGVPEPESVTEAATLAAAGQFEVVYPRASTPEFVKAAMVKAASQIR	327
Consensus	g v e v ea aa q fevv yprastpef vka v a i	
ArARF18	WCSGMRFKMAFETELSRISWFMGTISSVQVSDALVWPSPWRLLQVWDEPDLLQNVKR	385
AT2G28350.1	WCSGMRFKMAFETELSRISWFMGTISSVQVSDALVWPSPWRLLQVWDEPDLLQNVKR	371
orange1.lg005482m	WCSGMRFKMAFETELSRISWFMGTISSVQVSDALVWPSPWRLLQVWDEPDLLQNVKR	386
MDP0000750392	WCSGMRFKMAFETELSRISWFMGTISSVQVSDALVWPSPWRLLQVWDEPDLLQNVKR	522
Rc30078.m002329	WCSGMRFKMAFETELSRISWFMGTISSVQVSDALVWPSPWRLLQVWDEPDLLQNVKR	387
Consensus	wc gmrkmafetel sriswfmgt vqv wp spwrllqv wdepdlqnvr	
ArARF18	VSPWLVELVSNMFAHLSPTISPFKRLMPFHPDFPLDS---QIPMFSPCNLLTHMNSP	442
AT2G28350.1	VSPWLVELVSNMFAHLSPTISPFKRLMPFHPDFPLDS---QIPMFSPCNLLTHMNSP	432
orange1.lg005482m	VSPWLVELVSNMFAHLSPTISPFKRLMPFHPDFPLDS---QIPMFSPCNLLTHMNSP	412
MDP0000750392	VSPWLVELVSNMFAHLSPTISPFKRLMPFHPDFPLDS---QIPMFSPCNLLTHMNSP	578
Rc30078.m002329	VSPWLVELVSNMFAHLSPTISPFKRLMPFHPDFPLDS---QIPMFSPCNLLTHMNSP	443
Consensus	vspwlvelv n p hl s r k r p f p f n	
ArARF18	F3CLPDIINTPAGVQCARAHY3LSL-SLHLNKLQSLFSA3--IQILDCTAALPKRASN	499
AT2G28350.1	YLSNDNNNAPAGVQCARAHY3LSL-SLHLNKLQSLFSA3--IQILDCTAALPKRASN	492
orange1.lg005482m	F3CLISDN-IPAGVQCARAHY3LSL-SLHLNKLQSLFSA3--IQILDCTAALPKRASN	497
MDP0000750392	F3CLPDI-TPAGVQCARAHY3LSL-SLHLNKLQSLFSA3--IQILDCTAALPKRASN	633
Rc30078.m002329	F3CLPDI-TPAGVQCARAHY3LSL-SLHLNKLQSLFSA3--IQILDCTAALPKRASN	499
Consensus	pag qgar a s l	
ArARF18	SPITIQNFISISNVSCLLTMAHSIQISKND---GLKIPHLVLFQQLITLQQIQLSSSGD	556
AT2G28350.1	HYQARSDENSENISCSTLTMGNPAMVQDKKSVGSVTHQFVLFGQQLITLQQIQLSSSGD	548
orange1.lg005482m	ANFMSETGNKSNISCLTMTGNPTQSFKDNI---EVKIPHLVLFQQLITLQQIQLSSSGD	554
MDP0000750392	NMVIHKFTISISNVSCLLTMSHFTPTSKKPD---DKKIPHLVLFQQLITLQQIQLSSSGD	690
Rc30078.m002329	GPITIVKSMSESVCVLTMASTQNSGKPD---NVKIPHLVLFQQLITLQQIQLSSSGD	556
Consensus	s sc ltm k lfcq il q	



图 10 *ArARF18* 与鼠耳芥、柑橘、蓖麻、苹果的同源蛋白序列比对

注: 红框: B3 结构域; 蓝框: Auxin_resp family 结构域; 绿框: AUX_IAA family 结构域。黑色、红色、蓝色部分: 同源性=100%, >=75%, >=50%; *AtARF18*: 红花槭 *ARF18*; *AT2G28350.1*: 鼠耳芥 (*AT2G28350.1*); *orange1.lg005482m*: 柑橘 (*orange1.lg005482m*); *MDP0000750392*: 苹果(*MDP0000750392*); *Rc30078.m002329*: 蓖麻(*Rc30078.m002329*)

Figure 10 Comparison of amino acid sequences of *ArARF18* with *Arabidopsis thaliana*, *Citrus sinensis*, *Ricinus communis* *Malus domestica*, homologous protein

Note: The red box: B3 conserved domain; The blue box: Auxin_resp family conserved domain; The green box: AUX_IAA family conserved domain; The part of black, red, green shadow respectively represent the homology: =100%, >=75%, >=50%; *ArARF18*: *Acer rubrum*; *AT2G28350.1*: *Arabidopsis thaliana*; *orange1.lg005482m*: *Citrus sinensis*; *MDP0000750392*: *Malus domestica*; *Rc30078.m002329*: *Ricinus communis*

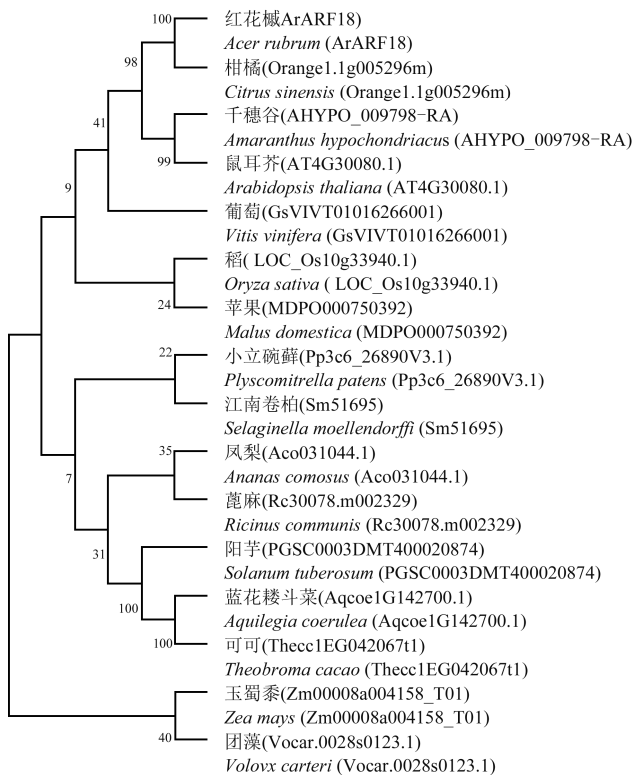


图 11 *ARF18* 蛋白的进化树分析

注: 采用邻接法构建系统进化树

Figure 11 The phylogenetic tree analysis of *ARF18* protein

Note: The phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining method

3 材料与方法

3.1 实验材料

在北京农学院园林学院实践基地温室进行扦插实验,选取红花槭“秋日梦幻”品种当年生嫩枝枝条,剪截成 10 cm 插条,上口平切、下口斜切,顶部留半片叶,速蘸 0.5%高锰酸钾溶液消毒,晾 1 min,将枝条分别浸泡在清水、IBA 100 mg/L、IBA 200 mg/L、IBA 300 mg/L、IBA 400 mg/L、IBA 500 mg/L 的溶液中 1 h,浸泡深度 3 cm,扦插深度 3 cm,扦插密度 5 cm×5 cm。以上 6 组处理,每组插条数量为 150 根。

棚顶铺设双层遮阳网,每天 8:00~17:00 时喷灌系统打开,每 30 min 喷 10 s,根据天气增减喷水频率,控制温度 25~28 ℃,湿度 85%~95%。在扦插后第 30 天对全部插条进行数据统计。

3.2 红花槭插条根系表型性状的观察与测定

本试验对各处理组插条的一级根数量、二级根数量、平均根尖总数和平均根长进行测定。每个处理组选取长势相对一致并且有代表性的 5 根插条进行数量统计,同时记录每根插条的一级根数量、二级根数量以及平均根尖总数。在各处理组中随机抽取 5 个插条,使用直尺测量一级根长度求和并除以 5,得到平均根长。

3.3 红花槭扦插根系 IAAO, PPO 和 POD 酶活性的测定

本试验每个处理组设置 6 个生物学重复,使用苏州科铭的过氧化物酶(Peroxidase, POD)试剂盒、多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)试剂盒、吲哚乙酸氧化酶(IAAO)活性测定试剂盒完成测定。

3.4 红花槭转录组测序及差异表达分析

对 CK 组、IBA 300 mg/L 处理组的插条根系进行 RNA 提取并建库测序。从总 RNA 中富集出单链 mRNA 经反转录得到双链 cDNA, 而后对其进行高通量测序分析。进行 *de novo* 转录组测序研究,即对所得测序读长片段进行 *de novo* 组装,进而得到该物种的单一基因序列集 (unigenes) 数据 (岳桂东等, 2012), 并对测序结果进行差异表达分析。

3.5 红花槭 *ArARF18* 基因的表达量测定及克隆

使用(EASYspin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒, 艾德莱)提取根系样品的总 RNA, 用(荧光反转录试剂盒, 全式金)合成 cDNA, 最后将 cDNA 模板浓度调节至基本一致。内参基因选用 *GAPDH* 基因, 使用 Primer3 Plus 设计荧光定量 PCR 引物(表 1)。

PCR 体系(20 μ L)为:cDNA 模板 1 μ L, Primer F (10 μ mol/L) 0.4 μ L, Primer R (10 μ mol/L) 0.4 μ L, 2 $\times$ TransStart Top Green qPCR SuperMix 10 μ L, Nuclease-free Water 8.2 μ L。PCR 程序设置:94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 94 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 退火 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。

根据已构建的红花槭转录组文库测序结果中 *ArARF18* Unigeng 序列, 使用 Primer3 Plus 设计扩增 *ArARF18* 基因全长的特异性引物 *ArARF18*-F 和 *ArARF18*-R。

使用(EASYspin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒, 艾德莱)提取根系的总 RNA, 用(TransScript FirstStrand-cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒, 全式金)对总 RNA

进行反转录得到 cDNA 模板。PCR 体系 (25 μ L) 为: ddH₂O 9.5 μ L, cDNA 模板 1 μ L, Primer F (10 μ mol/L) 1 μ L, Primer R (10 μ mol/L) 1 μ L, 2 $\times$ Taq PCRMaster Mix 12.5 μ L。PCR 程序设置:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 退火 61 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 2 min 40 s, 32 个循环; 延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min; 保温 4 $^{\circ}$ C。PCR 终产物经琼脂糖凝胶电泳检验后, 切胶回收目的片段, 进行目的基因克隆及测序。

3.6 红花槭数据统计分析及 *ArARF18* 基因的生物信息学分析

用 SPSS 17.0 软件对根系表型数据和酶活性数据进行单向方差分析, 使用 Duncan 法进行多重比较($P < 0.05$)。用 ORFfinder 在线软件预测基因的开放阅读框; 用 Motif Search 工具对 *ArARF18* 氨基酸序列进行 ARF 家族功能区分析; 对 Phytozome v12.1 数据库 ARF 同源基因序列, 用 DNAMAN 进行序列比对(黄东梅等, 2018); 利用在线软件 ProtParam 对 *ArARF18* 基因编码蛋白进行理化性质预测分析 (张焕欣等, 2019); 用 SOPMA 软件对 *ArARF18* 蛋白的二级结构进行预测; 利用 Phytozome v12.1 数据库的基因序列使用 MEGA5.2 邻接法进行系统进化分析。

作者贡献

李建一是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 李建一完成数据分析, 论文初稿的写作; 王志昆、韩璇和朱文鹏参与实验设计, 试验结果分析; 崔金腾和赵和文是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由城乡生态环境北京实验室项目(PXM-

表 1 *ArARF18* 基因的引物和荧光定量引物

Table 1 The primers and qPCR primers of *ArARF18* gene

引物名称	序列(5'-3')	用途
Primer name	Sequence(5'-3')	Usage
<i>ArARF18</i> -F	CGAGCTCATGATTACTTTCATGGACTCAAAAG	基因克隆引物
<i>ArARF18</i> -R	GCTCTAGAGCCTATATTCCTACATTGTCACTGCTT	Gene cloning primer
<i>GAPDH</i> -2F	GATGAGATTCCATGGGGCGA	荧光定量分析内参引物
<i>GAPDH</i> -2R	CTTGCTTGGGGCTGAGATGA	Fluorescence quantitative analysis of internal reference primers
<i>ArARF18</i> -3F	TGCAGCTCCACCTAAAAGGG	荧光定量分析引物
<i>ArARF18</i> -3R	GTGTGCCATGGTTAGCAAGC	Fluorescence quantitative analysis primer

2019_014207_000012)、2019 年北京高等学校高水平人才交叉培养实培计划深化项目(PXM2020_0142-07_000009)、学位与研究生教育改革与发展项目(2018-YJS047)和科技创新服务能力建设 - 基本科研业务费(追加)(PXM2018_014207_000063)共同资助。

参考文献

- Gong X.M., 2019, Research progress of introduction adaptability of woody color-leafed plants, *Anhui Nongye Kexue* (Journal of Anhui Agricultural Sciences), 47(6): 11-13. (龚雪梅, 2019, 木本彩叶植物引种适应性研究进展, *安徽农业科学*, 47(6): 11-13.)
- Gong W.Q., 2011, Studies on the cutting propagation technique and rooting mechanism of red maple (*Acer rubrum* L.), Thesis for M.S., Shandong Agricultural University, Supervisor: Cao B.H., pp.15-16. (巩文琼, 2011, 美国红枫扦插繁殖技术及生根机理研究, 硕士学位论文, 山东农业大学, 导师: 曹帮华, pp.15-16.)
- Huang D.M., Xu Y., Li J.Y., Lin F., Li Y.X., Li Y.J., Wei Q., and Song S., 2018, Cloning and sequence analysis of *MaARF19-1* gene in banana, *Jiyinzuxue yu Yingyong Shengwuxue* (Genomics and Applied Biology), 37(10): 4391-4397. (黄东梅, 许奕, 李敬阳, 林妃, 李艳霞, 李羽佳, 魏卿, 宋顺, 2018, 香蕉 *MaARF19-1* 基因的克隆及序列分析, *基因组学与应用生物学*, 37(10): 4391-4397.)
- Inukai Y., Sakamoto T., Ueguchi-Tanaka M., Shibata Y., Gomi K., Umemura I., Hasegawa Y., Ashikari M., Kitano H., and Matsuoka M., 2005, *Crown rootless1*, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an auxin response factor in auxin signaling, *Plant Cell*, 17(5): 1387-1396.
- Kang S.J., Qian Q., and Zhu L., 2014, Advances on molecular mechanism of auxin in rice root, *Zhongguo Daom (China Rice)*, 20(4): 1-8. (康书静, 钱前, 朱丽, 2014, 生长素对水稻根系生长发育调控的研究进展, *中国稻米*, 20(4): 1-8.)
- Liao Y.L., 2017, Advances on internal influence factors of adventitious rooting of forest trees, *Agricultural Science & Technology*, 18(7): 1168-1172.
- Liu J., Hua W., Hu Z.Y., Yang H., Zhang L., Li R.J., Deng L.B., Sun X.C., Wang X.F., and Wang H.Z., 2015, Natural variation in *ARF18* gene simultaneously affects seed weight and silique length in polyploid rapeseed, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112(37):5123-5132.
- Li S.F., Su X.H., and Zhang B.Y., 2011, Research progress in gene cloning in forest trees, *Zhiwu Xuebao* (Chinese Bulletin of Botany), 46(1): 79-107. (李少锋, 苏晓华, 张冰玉, 2011, 林木基因克隆研究进展, *植物学报*, 46(1): 79-107.)
- Ljung K., 2013, Auxin metabolism and homeostasis during plant development, *Development*, 140(5): 943-950.
- Nag S., Saha K., and Choudhuri M.A., 2001, Role of auxin and polyamines in adventitious root formation in relation to changes in compounds involved in rooting, *J. Plant Growth Regul.*, 20(2):182-194.
- Wu B., Wu J.Y., Cai L.T., Li Y.H., and Huang X.L., 2005, Auxin response factor, *Zhiwu Shenglixue Tongxun* (Plant Physiology Communications), 41(3): 273-278. (吴蓓, 吴建勇, 蔡刘体, 李运合, 黄学林, 2005, 生长素反应因子, *植物生理学通讯*, 41(3): 273-278.)
- Yang J., Wariss H.M., Tao L.D., Zhang R.G., Yun Q.Z., Hollingsworth P., Dao Z.L., Luo G.F., Guo H.J., Ma Y.P., and Sun W.B., 2019, Correction to: *De novo* genome assembly of the endangered *Acer yangbiense*, a plant species with extremely small populations endemic to Yunnan Province, China., *GigaScience*, 8(7): giz103.
- Yue G.D., Gao Q., Luo L.H., Wang J.Y., Xu J.H., and Yin Y., 2012, The application of high-throughput sequencing technology in plant and animal research, *Zhongguo Kexue: Shengming Kexue* (Science in China (Series C)), 42(2):107-124. (岳桂东, 高强, 罗龙海, 王军一, 许姣卉, 尹焯, 2012, 高通量测序技术在动植物研究领域中的应用, *中国科学: 生命科学*(C), 42(2):107-124.)
- Zhang H.X., Cao N., Yang H.D., Li G.Q., and Zhu F.H., 2019, Cloning and expression analysis of *CmCRL1* in melon, *Yuan-yi Xuebao* (Acta Horticulturae Sinica), 46(10):1989-1998. (张焕欣, 曹娜, 杨惠栋, 李国权, 朱方红, 2019, 甜瓜 *Cm-CRL1* 的克隆与表达分析, *园艺学报*, 46(10):1989-1998.)
- Zhao F.Y., Hu F., Zhang S.Y., Wang K., Zhang C.R., and Liu T., 2013, MAPKs regulate root growth by influencing auxin signaling and cell cycle-related gene expression in cadmium-stressed rice, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 20(8): 5449-5460.

(责任编辑 甘凤琼)