

• 药材与资源 •

基于全基因组半夏 *ARF* 基因家族鉴定及其温度、脱落酸调控下表达模式分析

宋腾达^{1,3}, 周省委^{1,3}, 王雅洁¹, 顾旭鹏^{1,3}, 初雷霞^{1,3}, 万 婕², 董 宁^{1,3}, 乔 璐^{1,3}, 高启国⁵, 杨林林^{1,3,4*}, 董诚明^{1,3}, 冯卫生^{1,4}

1. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046
2. 河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450046
3. 河南省道地药材生态种植工程技术研究中心, 河南 郑州 450046
4. 河南省中药开发工程技术研究中心, 河南 郑州 450046
5. 河南太龙药业股份有限公司, 河南 郑州 450000

摘要: 目的 对半夏生长素响应因子 (auxin response factors, *ARF*) 基因 (*PlARF*) 进行全基因组鉴定及不同温度和脱落酸 (abscisic acid, ABA) 调控下的表达模式解析, 以期解析 *PlARF* 的生物学功能提供理论依据。方法 基于已发表的半夏全基因组数据, 利用生物信息学方法对 *PlARF* 基因家族成员进行鉴定, 并系统分析其理化性质、染色体定位、系统进化关系、保守结构域、基因结构及启动子顺式作用元件; 采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 技术, 分析半夏在高温 (35 °C)、低温 (20 °C) 及 ABA 处理下的 *PlARF* 表达特征。结果 共鉴定出 22 个 *PlARF* 基因 (*PlARF1* ~ *PlARF22*), 分为 3 个亚家族; 编码氨基酸长度为 202~1 205 aa, 相对分子质量为 23 177.42~135 132.80, 等电点 (pI) 为 5.38~9.59。基因结构分析显示, 所有成员基因均含有 B3 保守结构域; 启动子顺式作用元件预测显示, *PlARF* 基因启动子区分布温度响应元件和 ABA 响应元件。基因组共线性分析显示, 片段复制事件在 *PlARF* 基因家族进化中起关键作用。qRT-PCR 结果显示, 所有 *PlARFs* 基因在高温 (35 °C) 胁迫下表达量显著上调, 低温 (20 °C) 胁迫对大部分基因无显著影响; ABA 处理可诱导 *PlARF* 基因表达水平升高。结论 从全基因组水平系统鉴定了半夏 *ARF* 基因家族, 揭示了不同 *PlARF* 成员对温度胁迫及 ABA 处理的表达模式差异, 为进一步阐释 *PlARF* 在半夏“高温倒苗”生理过程中的潜在功能奠定基础。

关键词: 半夏; 生长应答因子; *PlARF*; 基因组鉴定; 表达分析

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)21-7916-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.21.021

Genome-wide identification of *ARF* gene family in *Pinellia ternata* and characterization of its expression patterns in response to temperature and abscisic acid regulation

SONG Tengda^{1,3}, ZHOU Shengwei^{1,3}, WANG Yajie¹, GU Xupeng^{1,3}, CHU Leixia^{1,3}, WAN Jie², DONG Ning^{1,3}, QIAO Lu^{1,3}, GAO Qiguo⁵, YANG Linlin^{1,3,4}, DONG Chengming^{1,3}, FENG Weisheng^{1,4}

1. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China
2. First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China
3. Henan Provincial Ecological Planting Engineering Technology Research Center of Authentic Medicinal Materials, Zhengzhou 450046, China
4. Engineering and Technology Center for Chinese Medicine Development of Henan Province, Zhengzhou 450046, China
5. Henan Tailong Pharmaceutical Co., Ltd., Zhengzhou 450000, China

收稿日期: 2025-05-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82104329, 32401226); 河南省重点研发专项 (251111310500, 231111312700, 241111310200); 中国博士后科学基金特别资助项目 (2014T170252); 河南省国际科技合作项目 (242102521056); 河南省科技攻关 (242102310549); 河南中医药大学科研苗圃工程资助项目 (MP2024-56)

作者简介: 宋腾达, 男, 硕士研究生, 研究方向为药用植物生理与生态学。E-mail: 15083026878@163.com

***通信作者:** 杨林林, 男, 博士, 副教授, 从事药用植物生态学研究。E-mail: yangll-hatcm@hactcm.edu.cn

Abstract: Objective To perform genome-wide identification of auxin response factor (*ARF*) genes (*PtARF*) in *Pinellia ternata* and analyze their expression patterns under different temperature stress and abscisic acid (ABA) treatments, aiming to provide a theoretical basis for deciphering the biological functions of *PtARF*. **Methods** Based on the published whole-genome data of *Pinellia ternata*, members of the *PtARF* gene family were identified using bioinformatic methods. Systematic analyses were conducted on their physicochemical properties, chromosomal locations, phylogenetic relationships, conserved domains, gene structures, and promoter cis-regulatory elements. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was employed to analyze the expression profiles of *PtARF* genes in *P. ternata* under high-temperature (35 °C), low-temperature (20 °C), and abscisic acid (ABA) treatments. **Results** A total of 22 *PtARF* genes (*PtARF1* to *PtARF22*) were identified and classified into three subfamilies. The encoded proteins ranged from 202 to 1 205 amino acids (aa) in length, with relative molecular masses between 23 177.42 and 135 132.80 and isoelectric points (pI) ranging from 5.38 to 9.59. Gene structure analysis revealed that all members contain the conserved B3 DNA-binding domain. Prediction of promoter cis-regulatory elements indicated the spread presence of temperature-responsive and abscisic acid (ABA)-responsive elements in the promoter regions of *PtARF* genes. Genomic collinearity analysis demonstrated that segmental duplication events played a crucial role in the evolution of the *PtARF* gene family. qRT-PCR results showed that the expression levels of all *PtARF* genes were significantly up-regulated under high-temperature (35 °C) stress. In contrast, low-temperature (20 °C) stress had no significant impact on most genes. ABA treatment induced elevated expression levels of *PtARF* genes. **Conclusion** This study comprehensively identified the ARF gene family in *P. ternata* at the whole-genome level, revealing distinct expression patterns among different *PtARF* members in response to temperature stress and ABA treatment. These findings provide molecular insights for elucidating the potential functions of *PtARFs* in *Pinellia ternata*'s high-temperature-induced seedling wilt process.

Key words: *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit.; auxin response factors; *PtARF*; genomic identification; expression analysis

半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit.的干燥块茎^[1],是一种中国传统大宗药材。半夏含有氨基酸、黄酮类、有机酸类^[2]化合物以及多种微量元素,具有燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结^[1]等功效。目前半夏需求量日益增加,但是半夏种植体系还不成熟,“高温倒苗”现象^[3]会导致其生长停滞,使药用及外观品质下降。高温会降低半夏光合速率,减小叶绿素荧光参数,破坏细胞水分平衡,使细胞膜受损,影响细胞功能^[4],进而影响半夏产的品质与产量,成为制约半夏临床综合应用的重要因素。马聪吉等^[5]研究发现半夏组培苗在 35 °C 下培养 7 d,倒苗率达到 80%以上。高温(>30 °C)会抑制其光合作用,同时加速呼吸消耗,导致能量收支失衡,体内养分积累减少,块茎发育受阻。植物受非生物胁迫时,转录因子作为生物体内的重要调控系统,可以通过特异性的与靶基因启动子结合,控制下游靶基因表达的上调和下降^[6],同时能够识别和结合靶基因上的特定 DNA 序列和招募特定结构的蛋白质,进而促进下游反应^[7-8],影响植物的生长发育和次生代谢产物的合成,以应对自身受到的非生物胁迫。但是目前有关半夏生长应答因子(auxin response factors, *ARF*)转录因子参与响应环境胁迫调控其生长发育及药材品质形成的相关研究鲜有报道。

ARFs 是一类与生长素响应基因启动子特异性

结合的转录因子,在生长素信号传导和植物生长发育调控中发挥核心作用。它们通过识别 DNA 上的生长素响应元件(AuxRE,如 TGTCTC 序列),激活或抑制下游靶基因的表达,从而调控植物的器官建成、环境适应等多种生理过程^[9]。*ARF* 蛋白包含 3 个结构域,分别是 N 端的 DNA 结合结构域(DNA-binding domain, DBD)、中间的转录调控结构域(modulatory regulatory domain, MRD)和 C 端的二聚化结构域(C-terminal domain, CTD)^[10]。DBD 负责与生长素响应基因启动子区域的特定 DNA 序列相结合,MRD 决定了 *ARF* 是作为转录激活因子还是抑制因子,CTD 则参与 *ARF* 蛋白之间的相互作用,形成同源或异源二聚体,或与 AUX/IAA 蛋白形成异源二聚体来行使相应功能^[11]。*ARF* 家族作为植物生长素信号转导的关键调控元件,在调控植物生长发育及逆境响应过程中发挥重要作用。近年来随着生物信息学的不断发展,越来越多植物的 *ARF* 被鉴定和分析,在不同植物中鉴定出的 *ARF* 基因数目也有所不同。例如拟南芥 23 个 *ARF*、颠茄 41 个 *ARF*、甘草 10 个 *ARF*、向日葵 39 个 *ARF* 和苹果 29 个 *ARF* 基因^[12-16]。已有研究表明,*ARF* 家族成员通过调节下游基因表达^[17],参与植物对高温等非生物胁迫的响应过程。陈月琴团队^[18]研究发现 *OsARF3* 与蛋白互作能够有效的控制由水稻高温引起的白叶枯病,李文兰等^[19]研究发现玉米 *ARF* 基

因响应热胁迫表达。在高温环境下, *ARF* 家族基因的表达变化可能通过影响生长素信号转导途径, 调控半夏细胞伸长、分裂与分化, 进而影响其生长发育进程, 同时还可能与其他激素信号通路协同作用, 共同介导半夏对高温胁迫的响应。因此, 深入研究高温胁迫下半夏 *ARF* 家族基因(*PtARF*)的表达特性及其调控机制, 不仅有助于揭示半夏倒苗现象的分子机制, 还能为通过调控 *PtARF* 家族基因表达、缓解高温胁迫对半夏生长发育的不利影响, 保障半夏优质高产提供理论依据与研究基础。本研究以半夏全基因组数据为依据, 采用生物信息学方法, 筛选 *PtARF* 生长应答因子家族成员, 分析其序列理化性质、保守基序和结构域、基因结构信息、染色体定位及启动子作用元件预测采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 检测方法研究半夏在不同温度处理后、脱落酸(abscisic acid, ABA)处理不同时间下相对表达量并分析其表达模式, 为深入挖掘半夏生长应答因子的功能和调控机制提供参考。

1 材料与仪器

1.1 材料

实验用材料来自于本课题组组培室, 经河南中医药大学药学院董诚明教授鉴定为天南星科植物半夏 *P. ternate* (Thunb.) Breit.

1.2 仪器与试剂

QuantStudio5 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、CL-32L 型高压蒸汽灭菌锅(日本 ALP 公司)、411C-1 型多酚多糖植物总 RNA 提取试剂盒(北京庄盟国际生物基因科技有限公司)、HiScript[®] III RT SuperMix for qPCR (gDNA wiper) 试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)、PowerTrack[™] SYBR Green Master Mix 试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、MS 培养基(北京索莱宝科技有限公司)。

2 方法

2.1 样品处理

取用半夏幼苗, 在培养箱中进行培养, 使用 MS 培养基培养幼苗, 湿度 45%、光强 20 000 lx, 分别设置正常温度(25 ℃)、低温(20 ℃)、高温(35 ℃) 3 个处理组, 每组 20 瓶, 每瓶 1 株。于第 7 天采集半夏块茎, 将其存放于-80 ℃冰箱保存, 用于分析 *PtARF* 基因在半夏不同温度下的表达情况。

将半夏幼苗在培养箱中进行培养, 湿度 45%、

光强 20 000 lx, 设置 MS 培养基和 ABA (5 mg/L) 2 个处理组, 每组 20 瓶, 每瓶 1 株。于第 0、24、48 h 采集半夏块茎, 将其存放于-80 ℃冰箱保存, 用于分析 *PtARF* 基因在 ABA 处理下的表达情况。

2.2 *PtARF* 家族的鉴定和生物信息学分析

2.2.1 *PtARF* 基因家族成员的鉴定与理化性质分析 半夏全基因组数据和注释文件^[20]从国家生物信息中心 (<https://ngdc.cncb.ac.cn/>) 下载项目编号: PRJCA016404, 登录号: GWHCBHK00000000。拟南芥 *ARF* 家族蛋白序列数据集来自 tair 数据库 (<https://www.arabidopsis.org/>)。利用 TBtools^[21]将半夏和拟南芥双向 blast 筛选出半夏中的 *ARF* 蛋白序列, 然后通过 Pfam 数据库 (<http://pfam-legacy.xfam.org/>) 利用隐马尔可夫模型(hiddenmarkov model, HMM)对半夏基因组中的 *ARF* 蛋白序列进一步筛选。在 HMM 配置文件中, 参数为默认值, 截止值为 0.01, 最后去除 2 种方法中的重复转录本后, 获得候选基因。使用 TBtools 软件的 Protein Paramter Calc 工具对 *PtARF* 转录因子家族的基础理化性质进行分析。

2.2.2 *PtARF* 基因家族蛋白质系统进化分析 将获得的 22 个 *PtARF* 蛋白序列, 通过 TBtools 软件 One Step Build a ML Tree 工具和拟南芥 *ARF* 蛋白序列进行比对, Bootstrap Mumber 值设为 5 000, 其余参数为默认值; 采用最大似然法(maximum likelihood, ML)构建发育树, 并利用 iTOL (<https://itol.embl.de/>) 在线工具进一步对系统发育树进行美化。

2.2.3 *PtARF* 基因保守基序和基因结构分析及顺式作用元件预测 使用 MEME 数据库 (<https://meme-suite.org/meme/>) 对 *PtARF* 蛋白保守基序进行预测。通过 NCBI 网站 CDD 工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) 预测 *PtARF* 蛋白结构域。

通过 TBtools 软件使用基因组序列和结构注释文件分别提取各个 *PtARF* 基因上游各 2 000 bp 序列作为启动子区域, 然后将得到的序列用 PlantCare 网站 (<https://www.plantcare.co.uk/>) 进行启动子顺式作用元件预测; 最后使用 TBtools 软件将蛋白保守基序、保守结构域和启动子预测结果进行可视化处理。

2.2.4 *PtARF* 基因家族染色体定位及种内种间共线性分析 根据半夏基因组注释信息提取每个 *PtARF* 基因在染色体上的位置信息, 通过 TBtools 软件中 Gene Location Visualize (Advanced) 功能进行可视化作图。利用 TBtools 软件获得半夏染色体 ID 及长

度信息,使用 TBtools 插件 One Step MCScanX 得到 *PtARF* 基因之间的共线性文件,并在 Advanced Circos 工具中可视化处理。利用使用 TBtools 将半夏和拟南芥全基因组进行比对获得种间共线性关系,并进行可视化处理。

2.3 *PtARF* 基因表达模式分析及 qRT-PCR 验证

根据启动子作用元件预测结果,筛选出 11 个与温度响应元件相关联的 *PtARF* 基因,以及这 11 个 *PtARF* 基因中含有 ABA 响应模块的 7 个 *PtARF* 基因进行 qRT-PCR 验证,引物序列信息见表 1。每个样品做 3 个生物学重复。分析其不同温度和 ABA 处理下半夏块茎中的表达量

变化趋势。首先使用 411C-1 型多酚多糖植物总 RNA 提取试剂盒提取半夏块茎总 RNA,然后使用 HiScript[®]III RT SuperMix for qPCR (gDNA wiper) 试剂盒进行反转录得到 cDNA,最后使用 QuantStudio5 实时荧光定量 PCR 仪进行表达模式分析,荧光定量反应体系 20 μ L: dd H₂O 7 μ L; PowerTrack[™] SYBR Green Master Mix 10 μ L; 上、下引物各 1 μ L; cDNA 1 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 40 个循环数。内参基因为 *Pt18sRNA*^[22],引物序列信息见表 1。每个样品做 3 个生物学重复。

表 1 *PtARF* 基因引物序列

Table 1 Primer sequences of *PtARF* genes

基因名称	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')
<i>PtARF2</i>	CAGCAGCGGCGGAGAAG	GCAGCAGAGCAGCAGAAGC
<i>PtARF5</i>	AAAGTCATCCGAAACCGCATACC	TTACAATCCAAGAGCAAGTCCTTCAG
<i>PtARF7</i>	CGGCTGCTTGCTCTGTAGAAC	GATGTGGAGACGGATGAAGTGTATG
<i>PtARF8</i>	AGAGAACGGAGGCGAGTGATG	GGACAAGGGTGAAGATGGGAATG
<i>PtARF10</i>	CCCTGACCTTGCTGACTTTGGAATAG	CGGTACAATCTTGAGTCCTGGTTC
<i>PtARF11</i>	GGGAACCGAGACTGGGATATTGAG	CAACAACAGCAACCTCTACAACAAC
<i>PtARF12</i>	ATATGCGTGTCAACTTCCTTACAGG	GCTTGTGCTGGACCTCTTGTTG
<i>PtARF13</i>	CAGCAGACAGCACAGATGGTAAC	CTGGCGACTCTGTTCTCTTCATTAG
<i>PtARF16</i>	CGATGCTTCAACCTGTTCAATGTG	GCAACGTCTACGCCGAAGTATG
<i>PtARF17</i>	ATGTCGCTCGTCGTCACC	CCATCACCTGCTCAACAGTTCAC
<i>PtARF21</i>	ATCCACAGCCCGCCCAAC	TTCCAAGCAGCAGAAGCCAAC
<i>Pt18sRNA</i>	CGCATATAAATAAACGGAGGAA	GACGCTTCTACAGACTACA

2.4 数据处理

利用 Microsoft Excel 2021 软件统计 qRT-PCR 数据,通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法计算基因相对表达水平情况,并用 GraphPad 软件进行单因素方差分析及绘制柱状图。使用 TBtools 2.0 软件作热图。

3 结果与分析

3.1 *PtARF* 基因家族系统进化分析

采用 ML 构建系统发育树,结果如图 1 所示,根据蛋白结构将其分为 3 个亚家族, *PtARF* 基因在 I、II、III 个亚家族中均有分布,在 I 家族分布有 9 个 *PtARF* 成员: *PtARF5*~7、10~13、15、22,与拟南芥 *AtARF5*~8、19 基因同源;在 II 家族有 7 个成员: *PtARF2*~4、8、14、18、19,与拟南芥 *AtARF3*、4、10、16、17 基因同源;在 III 家族有 6 个成员: *PtARF1*、9、17、20、21,与拟南芥 *AtARF1*、9、13~15、18、

20~23 基因同源。

3.2 *PtARF* 家族成员及理化性质分析

根据对半夏和拟南芥双向 blast 和 Pfam 数据库中隐马尔可夫模型筛选结果,去除冗余,共从半夏全基因组中鉴定到 22 个 *PtARF* 基因,分别命名为 *PtARF1*~*PtARF22*。根据 TBtools 对 *PtARF* 蛋白质理化性进行预测,结果如表 2 所示, *PtARF9* 基因编码氨基酸数量最少为 202 个, *PtARF15* 基因编码氨基酸数量最多为 1 205 个;相对分子质量分布在 23 177.42 (*PtARF9*) ~ 135 132.80 (*PtARF15*)。除 *PtARF4*、*PtARF9*、2 个蛋白质等电点大于 7.00,其余 20 个 *PtARF* 蛋白 (占比 91.0%) 均小于 7.00,同时所有蛋白的亲水性系数均小于 0,说明该家族蛋白质大多为酸性、亲水性蛋白。蛋白质脂肪系数在 64.45 (*PtARF16*) ~ 80.63

(*PtARF11*), 所有 *PtARF* 蛋白不稳定系数均大于 40, 说明 *PtARF* 家族蛋白质为不稳定蛋白。脂肪系数越高, 蛋白稳定性越好, 越有利于其在不同环境中发挥功能^[23]。

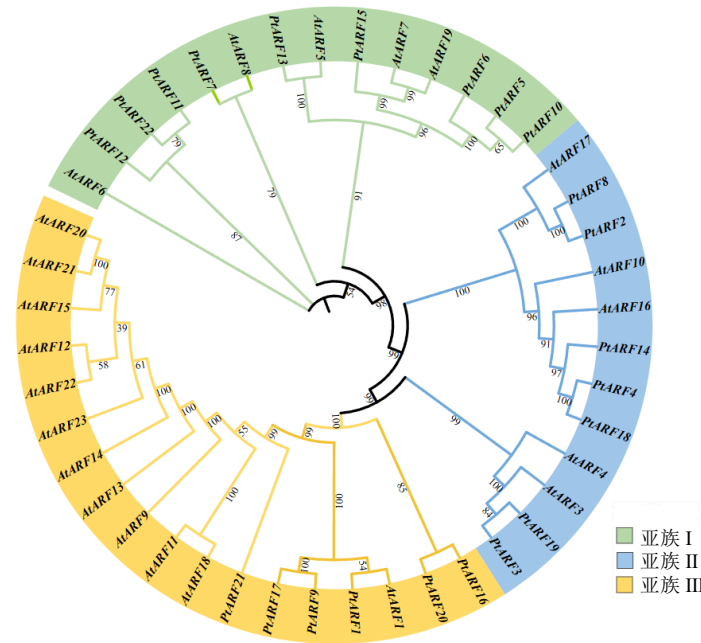


图 1 半夏、拟南芥 *ARF* 蛋白系统进化树
Fig. 1 Phylogenetic tree of *ARF* proteins from *Pinellia ternata* and *Arabidopsis thaliana*

表 2 *PtARF* 蛋白理化性质分析

Table 2 Analysis of physical and chemical properties of <i>PtARF</i> proteins						
基因 ID	氨基酸长度/aa	相对分子质量	等电点	不稳定性系数	脂肪系数	亲水平均系数
<i>PtARF1</i>	691	76 137.82	5.91	58.93	68.77	-0.491
<i>PtARF2</i>	964	102 593.20	5.62	48.40	75.25	-0.325
<i>PtARF3</i>	733	80 115.91	6.38	55.10	68.21	-0.412
<i>PtARF4</i>	379	41 711.71	8.25	46.69	74.09	-0.226
<i>PtARF5</i>	1 135	125 890.20	5.89	68.40	75.02	-0.572
<i>PtARF6</i>	1 130	125 842.20	5.99	66.65	74.58	-0.562
<i>PtARF7</i>	809	90 837.57	5.95	61.28	74.44	-0.431
<i>PtARF8</i>	590	64 331.51	6.33	47.00	69.22	-0.297
<i>PtARF9</i>	202	23 177.42	9.59	75.12	73.81	-0.580
<i>PtARF10</i>	1 122	122 546.80	6.36	59.47	74.50	-0.536
<i>PtARF11</i>	759	84 022.93	6.45	64.44	80.63	-0.384
<i>PtARF12</i>	218	23 237.17	5.78	60.00	69.31	-0.528
<i>PtARF13</i>	1 044	115 680.90	5.45	62.55	74.61	-0.432
<i>PtARF14</i>	696	76 122.04	6.18	49.01	74.57	-0.314
<i>PtARF15</i>	1 205	135 132.80	6.44	76.30	74.23	-0.663
<i>PtARF16</i>	705	78 876.45	6.61	52.05	64.45	-0.614
<i>PtARF17</i>	823	90 832.19	5.76	55.75	67.29	-0.452
<i>PtARF18</i>	685	74 389.79	5.38	45.33	75.72	-0.359
<i>PtARF19</i>	307	32 996.94	5.65	61.63	73.39	-0.342
<i>PtARF20</i>	684	76 433.99	6.42	56.01	65.44	-0.588
<i>PtARF21</i>	726	80 010.87	5.89	51.45	68.53	-0.495
<i>PtARF22</i>	915	100 829.40	5.82	67.73	76.70	-0.389

3.3 *PtARF* 家族保守基序、结构域、启动子顺式作用元件及基因结构分析

为了阐明 *PtARF* 转录因子结构多样性和进化关系,结果如图 2 所示,结果表明 *ARF* 基因家族大多数成员的结构比较复杂,筛选的 22 个 *PtARF* 基因结构,所有 *PtARF* 基因 UTR 数量为 0~3 个, CDS 的数量为 2~16 个。利用 MEME 在线数据库对 *PtARF* 蛋白进行保守基序分析,共得到 10 个保守基序(图 3),其中 18 个 *PtARF* 含有 7~10 个 motifs, 19 个 *PtARF*

都含有 motif2、motif3、motif5 和 motif7,表明这 4 个 motifs 为 *PtARF* 蛋白结构域中非常重要的保守基序。所有 *PtARF* 蛋白均含有 B3 保守结构域,这说明 B3 是 *PtARF* 蛋白组成中最核心的保守结构域,20 个 *PtARF* 蛋白含有 Auxin_resp 保守结构域,证明 Auxin_resp 结构域是 *PtARF* 蛋白的重要组成部分。部分 *PtARF* 蛋白不含有 AUX_IAA superfamily 保守结构域,它们可能具有相同的蛋白功能,*PtARF19* 蛋白含有 Auxin_resp superfamily 保守结构域。

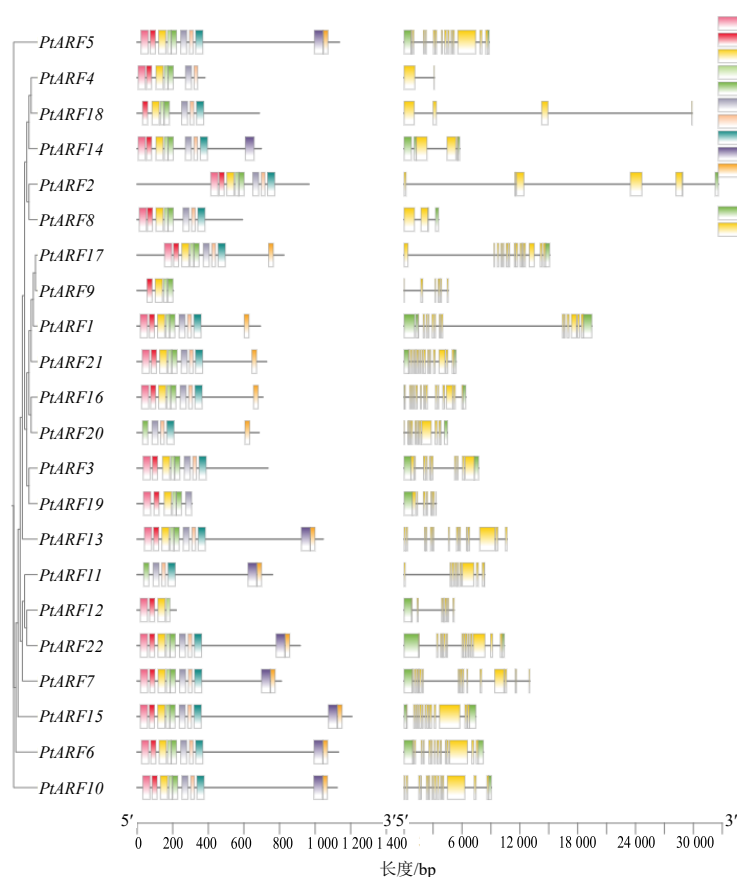


图 2 *PtARF* 转录因子保守基序和基因结构分析

Fig. 2 Analysis of conserved motifs and gene structures of *PtARF* transcription factors

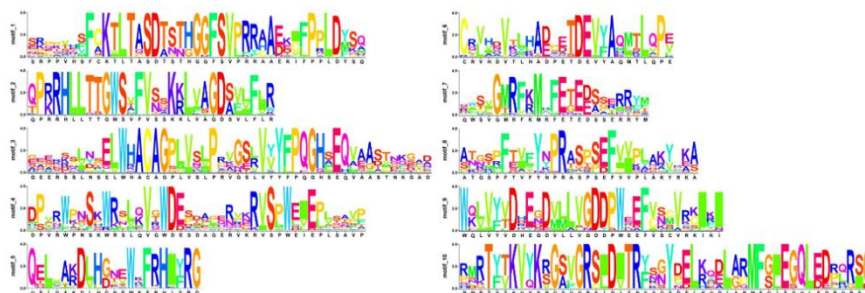


图 3 Motifs 氨基酸分布情况

Fig. 3 Motifs amino acid distribution

启动子预测结果显示（图 4），*PtARF* 转录因子参与了 8 个非生物胁迫过程，所有 *PtARF* 转录因子共包括 382 个顺式元件，包括生长素响应元件、ABA 响应元件、低温响应元件、光响应元件等。每个 *PtARF* 启动子中都有大量的光响应性元件，占有顺式元件的 60.47%，其数量远远超过其他响应元件，其次是 ABA 响应元件，占有顺式元件的 13.09%，此外，由于含有光、ABA、赤霉素、低温和水杨酸响应元件的 *PtARF* 基因构成了这些基因的很大一部分，推测这些基因可

能在响应这些胁迫方面发挥重要作用，可以作为未来验证这些基因功能的理论基础。

3.4 *PtARF* 基因染色体定位和种内及种间共线性分析

根据半夏基因组注释文件信息可知，半夏一共具有 13 条染色体，对 *PtARF* 基因家族成员进行染色体定位分析（图 5），发现 22 个 *PtARF* 基因不均匀的分布在 11 条染色体上，LG09、LG13 染色体上没有 *PtARF* 基因，LG07 染色体上分布的 *PtARF* 基

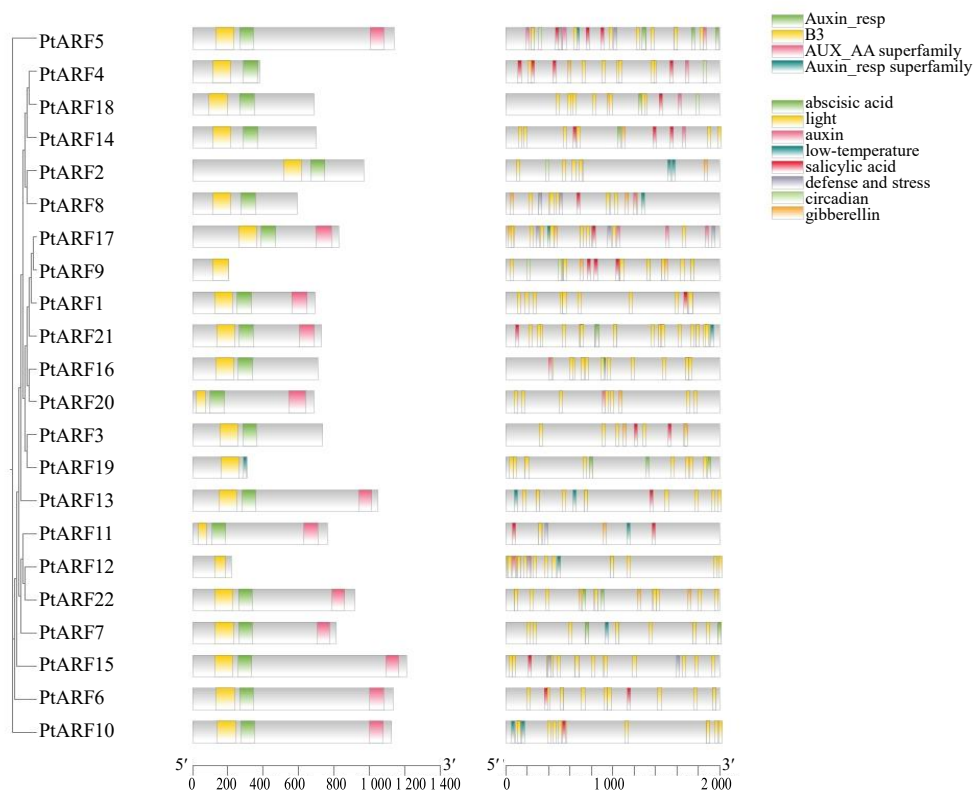


图 4 *PtARF* 转录因子保守结构域分析及顺式作用元件预测

Fig. 4 Elements analysis of conserved domain of *PtARF* transcription factors and prediction of cis-acting elements

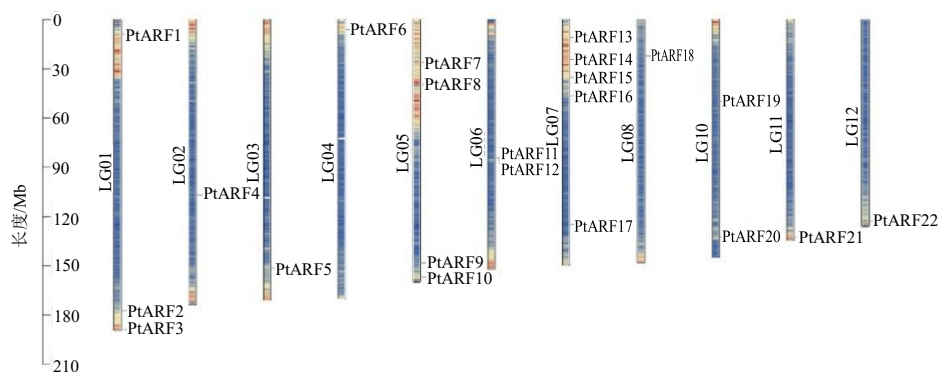


图 5 *PtARF* 基因家族的染色体定位

Fig. 5 Chromosomal location of *PtARF* gene family

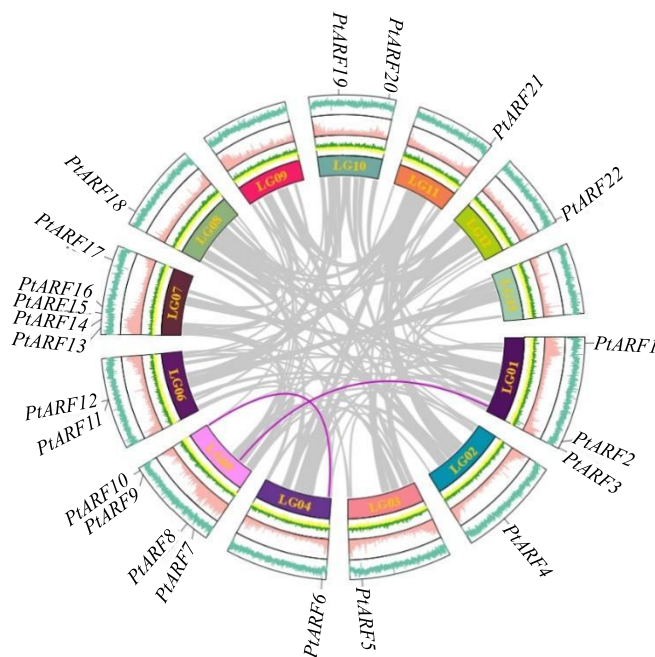
因最多为 5 个, LG05 染色体上分布 2 个 *PtARF* 基因, LG01 染色体上有 3 个 *PtARF* 基因, LG06、LG10 染色体上有 2 个 *PtARF* 基因, 其余 6 条染色体上各分布 1 个 *PtARF* 基因。同时鉴定出 *PtARF* 基因的一组同源基因簇, 为 *PtARF11* 与 *PtARF12*。基因扩增的主要方式为串联重复和片段复制。为验证 *PtARF* 中的基因扩张机制, 使用 TBtools 软件进行共线性分析, 在 *PtARF* 中共鉴定出 2 对基因间存在共线性关系 (图 6) 为片段性复制事件。Circos 图结果表明 *PtARF* 共存在 2 对共线性基因: *PtARF2* 与 *PtARF8*、*PtARF6* 与 *PtARF10*, 各对共线性基因位于不同的染色体上, 属于片段复制事件, 预测其可能具有相似的功能和调控机制^[24]。

为探索 *PtARF* 基因的潜在进化线索, 利用 TBtools 中 One Step MCScanX 工具将模式植物拟南芥和水稻分别与半夏的种间共线性分析 (图 7), 结果表明半夏仅 *PtARF3*、15、21 这 3 个基因与拟南芥有共线性, 而半夏与水稻之间有 12 个 *ARF* 基因有共线性, 说明半夏和水稻的 *ARF* 基因家族相比拟南芥具有更近的同源进化关系。在生物进化过程中有一些共同的同源基因在不同物种中被保留下

来, 维持了共线性, 反映了基因的保守性^[25], 说明了被保留的 *ARF* 基因维持着生物体的重要功能, 为 *PtARF* 中的对应基因功能预测提供科学依据。在模式植物中未找到相应共线性的 *PtARF* 基因可能是 *ARF* 家族为了适应生长发育过程中各种胁迫进化形成的基因, 行使新的功能。

3.5 *PtARF* 基因表达模式分析

为进一步探究 *PtARF* 基因在不同温度处理下的表达模式, 选取 11 个含有温度响应模块的 *PtARF* 基因, 进行 qRT-PCR 验证。以 20 °C 处理组为低温组、25 °C 处理组为对照组、35 °C 处理组为高温组, 结果如图 8 所示。在低温条件下 (20 °C), *PtARF2*、*PtARF5*、*PtARF7*、*PtARF10*、*PtARF11*、*PtARF12*、*PtARF13* 和 *PtARF21* 基因与在常温处理 (25 °C) 条件下的相对表达量无明显差异, 表明低温对这 8 个基因的表达模式无影响; *PtARF8*、*PtARF16* 和 *PtARF17* 基因的相对表达量低于对照, 并且具有显著性差异 ($P < 0.05$)。在高温条件下 (35 °C), 仅 *PtARF8* 与常温 (25 °C) 条件下的相对表达量无明显差异, 说明其表达模式不受高温影响。高温下 11 个 *PtARF* 基因的相对表达量均显著高于对照组, *PtARF2*、*PtARF5*、*PtARF7*、*PtARF10*、*PtARF11*、



紫线代表 *PtARF* 有共线性; 黄色和绿色表示 GC 偏移量, G 大于 C 为绿色, G 小于 C 则为黄色; 粉色直方图代表基因密度; 蓝色为 GC 含量占比; LG01~13 为染色体名称。

Purple line indicates that *PtARF* has collinearity; Yellow and green indicate the offset of GC content; If G is greater than C, it is green, if G is less than C, it is yellow; Pink histogram is the gene density; Blue is the proportion of GC content; LG01—13—chromosome name.

图 6 *PtARFs* 基因在基因组上的分布及共线性分析

Fig. 6 Distribution and collinearity analysis of *PtARFs* genes on genome

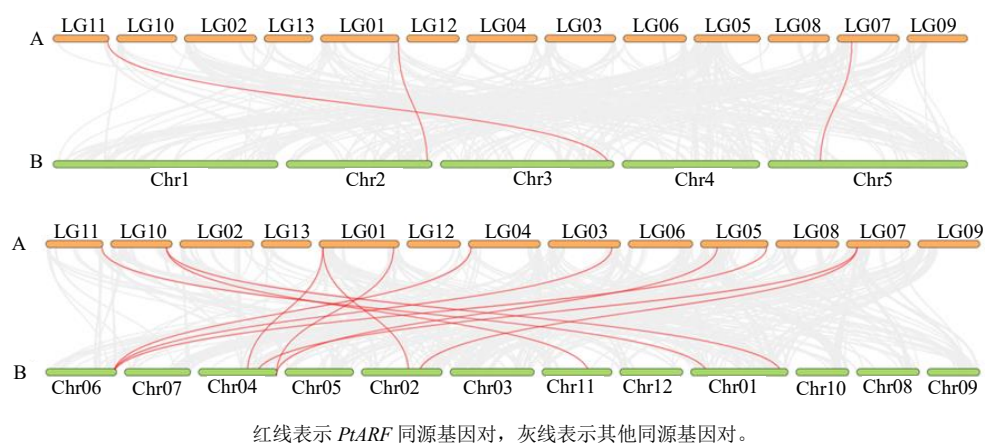
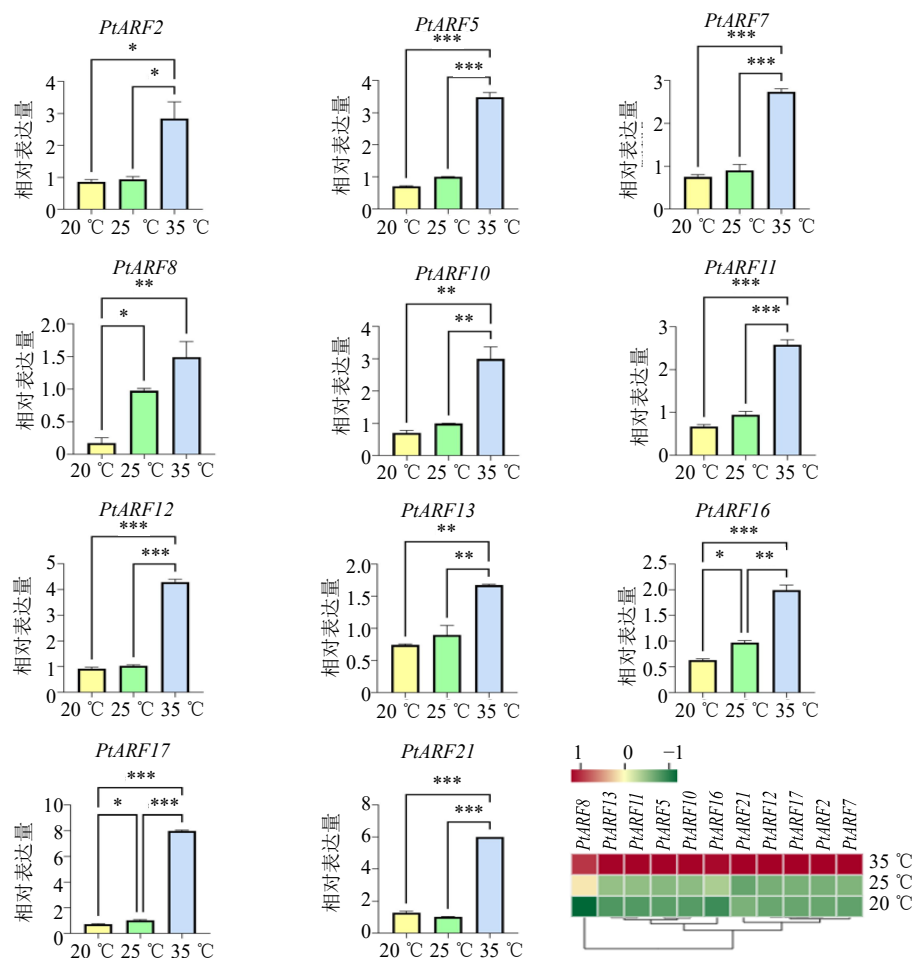


图 7 半夏与拟南芥 (A) 和水稻 (B) 基因共线性分析

Fig. 7 Collinearity analysis of *P. ternate*, *A. thaliana* (A), and *O. sativa* (B) genes图 8 *PtARF* 基因不同温度下的表达模式Fig. 8 Expression pattern of *PtARF* genes under different temperature conditions

PtARF13、*PtARF16* 的相对表达量达相对对照组上调 2 倍；*PtARF12*、*PtARF17* 和 *PtARF21* 基因的相

对表达量相对对照组上调 4 倍左右，具有极显著差异 ($P < 0.001$)。这说明高温显著上调了 *PtARF* 基因

表达, *PtARF* 基因对高温表现出高度敏感性; 虽然 *PtARF* 基因家族成员在结构上有一定相似, 但是在不同温度诱导下不同基因的表达模式却有所不同。

从 11 个 *PtARF* 基因中筛选出含有 ABA 响应模块的 7 个 *PtARF* 基因, 针对 ABA 处理组开展 qRT-PCR 验证实验。结果如图 9 所示, 随着 ABA 处理时间的延长, *PtARF5*、*PtARF7*、*PtARF10*、*PtARF12* 及 *PtARF13* 的表达量呈现先上升后下降的动态变化趋势, 但其表达水平在整个处理周期内始终高于对照组。*PtARF8* 和 *PtARF21* 的表达量显著上调。相较于对照组, *PtARF* 基因在处理 24 h 后的表达量上调幅度达 1~2 倍。其中, *PtARF5*

和 *PtARF21* 基因的相对表达量与对照组相比存在非常显著差异 ($P < 0.01$)。qRT-PCR 结果表明, ABA 胁迫能够显著诱导大部分 *PtARF* 基因表达上调。这一现象可归因于半夏在逆境条件下, 需通过调控相关基因的表达水平, 启动一系列生理生化响应机制, 以维持体内稳态并适应胁迫环境。随着胁迫时间的持续, 半夏体内激活反馈调节机制: 当 *ARF* 基因表达量达到阈值, 植物启动抗逆防御反应并逐渐适应胁迫环境后, 为防止过度应激对自身造成损伤, 半夏会通过负反馈调节机制主动下调生长应答因子的表达水平, 从而实现生理平衡的动态调控。

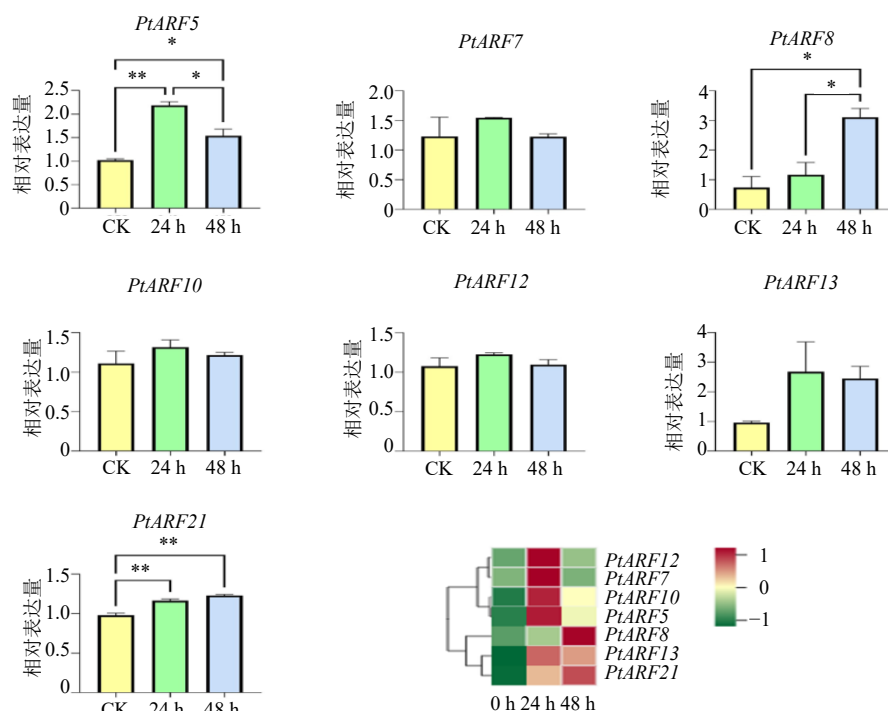


图 9 *PtARF* 基因 ABA 处理不同时间下的表达模式

Fig. 9 Expression patterns of *PtARF* gene under abscisic acid treatment for different durations

4 讨论

应答因子是一类特异性结合生长素响应基因启动子的转录因子, 调节植物的花、叶及果实等器官的生长发育。近年来, 越来越多植物的 *ARF* 被鉴定和分析, 截至目前已从拟南芥中鉴定出 23 个 *ARF* 基因、从水稻中鉴定出 25 个 *ARF* 基因、大豆中 51 个 *ARF* 基因以及从玉米中鉴定出 31 个 *ARF* 基因, 而本实验从半夏中共鉴定出 22 个 *ARF* 基因, 与其他植物并不相同, 说明同一基因家族在不同植物中的基因数量有所不同; 半夏基因组大小为 2.05 Gb^[20], 分别是水稻 (441 Mb)^[26]、番茄 (850 Mb)、

拟南芥 (146 Mb) 的 4.6、2.4、14 倍左右, 但是 *ARF* 基因家族成员数量与基因组大小之间并未呈现出明显线性对应关系。这种现象的原因可能是 *ARF* 基因家族在各谱系中经历了不均衡的扩张, 这些共同作用导致了基因数量与基因组大小之间不成比例的格局。保守结构域分析表明, 所有 *PtARF* 蛋白均含有 B3 保守结构域, 这说明 B3 是 *PtARF* 蛋白组成中最核心的保守结构域, 这与 Wang 等^[27]的结果一致, 20 个 *PtARF* 蛋白含有 Auxin_resp 保守结构域, 证明 Auxin_resp 结构域是 *PtARF* 蛋白的重要组成部分。这与 *ARF* 蛋白通过识别生长素响应元

件(AuxRE)调控下游基因的功能机制一致。然而, *PtARF19* 等部分成员缺失典型的 AUX/IAA 二聚化结构域, 暗示其可能通过非经典途径参与生长素信号传递或与其他转录因子互作, 这为后续功能分化研究提供了线索。*PtARF1~PtARF22* 不均匀的分布在 11 条染色体上, 在 *PtARF* 中共鉴定出 2 对基因间存在共线性关系为全片段性复制事件, 并无串联重复事件。通过种间共线性研究拟南芥和半夏以及水稻和半夏的同源进化关系, 结果显示半夏与拟南芥和拟南芥和水稻之间分别有 3 个和 12 个 *ARF* 基因有共线性, 说明半夏和拟南芥的 *ARF* 基因家族相比拟南芥具有更近的同源进化关系, 这与二者同属单子叶植物的分类地位一致, 进一步佐证了 *ARF* 基因在单子叶植物进化过程中的保守性, 生物进化过程中部分共同的同源基因在不同物种中被保留下来。启动子预测结果分析, 含有光、ABA、赤霉素、低温和水杨酸响应元件的 *PtARF* 基因占大部分, 说明这些基因可能在响应非生物胁迫过程中发挥重要作用。高温下 *PtARF* 基因的表达量显著高于对照组, 说明高温显著上调了 *PtARF* 基因表达, *PtARF* 基因对高温表现出高度敏感性。研究表明, 高温会使半夏中超氧化物歧化酶下降, 过氧化物酶先升后降^[28], *PtARF* 基因表达量的上升可能影响了这些酶的表达, 从而参与半夏高温胁迫响应的调控。另外 *PtARF* 基因可能通过参与生长素信号转导途径, 使半夏体内的激素水平发生变化, 从而调节其生长发育和对高温的适应。例如, ABA 含量通常会增加, ABA 可以促进气孔关闭, 减少水分散失, 提高植株的抗旱性, 间接增强对高温的适应能力。*ARF* 家族在高温下表达上调是半夏在长期进化过程中形成的一种适应性机制。这种机制有助于半夏在面临高温等不利环境条件时, 保持一定的生存和繁殖能力, 从而增加其在自然环境中的适应性和竞争力。*PtARF12/17/21* 在高温和 ABA 下的持续高表达, 可能通过介导生长素信号与胁迫激素 ABA 的交互作用, 影响块茎休眠或细胞程序性死亡, 参与倒苗调控。后续需通过基因沉、过表达验证其功能。ABA 和高温胁迫都使 *ARF* 表达量上调, 可能共同增强了半夏对胁迫的适应能力, 通过调节相关生理过程, 如促进根系生长以吸收更多水分, 或增强抗氧化酶活性来清除自由基。有助于半夏在面临高温、ABA 等不利环境条件时, 保持一定的生存和繁殖能力, 从而增加其在自然环境中的适应性和竞争力。

综上所述, 本研究从全基因组层面对 *PtARF* 基因家族进行了全面的生物信息学分析, 共鉴定出 22 个 *PtARF* 基因, 分为 3 个亚家族。编码的氨基酸长度在 202~1 205 aa, 蛋白质相对分子质量为 23 177.42~135 132.80, 等电点为 5.38~9.59。所有 *PtARF* 基因均含有 B3 保守结构域。表达模式分析显示 *PtARF* 基因在不同环境中表达特征有所不同。本研究在为进一步研究半夏生长应答因子的功能和调控机制, 发掘调控半夏倒苗的潜在基因对半夏的生产具有重要意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 119
- [2] 周亚丽, 杨萍, 李喜香, 等. 半夏化学成分与药理作用研究进展及其质量标志物(Q-Marker)预测 [J]. 中草药, 2024, 55(14): 4939-4952.
- [3] 黄文静, 孙晓春, 李铂, 等. 干旱胁迫诱导半夏倒苗的细胞程序性死亡研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(10): 2020-2025.
- [4] Chen F F, Li Q J, Su Y, *et al.* Chitosan spraying enhances the growth, photosynthesis, and resistance of continuous *Pinellia ternata* and promotes its yield and quality [J]. *Molecules*, 2023, 28(5): 2053.
- [5] 马聪吉, 张智慧, 王丽, 等. 不同温度对半夏倒苗的影响 [J]. 云南农业科技, 2021, 18(6): 11-13.
- [6] Lee T I, Young R A. Transcription of eukaryotic protein-coding genes [J]. *Annu Rev Genet*, 2000, 34: 77-137.
- [7] Xiong H B, Lu D D, Li Z Y, *et al.* The DELLA-ABI4-HY5 module integrates light and gibberellin signals to regulate hypocotyl elongation [J]. *Plant Commun*, 2023, 4(5): 100597.
- [8] Lu L N, Zhai X G, Li X L, *et al.* Met1-specific motifs conserved in OTUB subfamily of green plants enable rice OTUB1 to hydrolyse Met1 ubiquitin chains [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 4672.
- [9] Singh V K, Rajkumar M S, Garg R, *et al.* Genome-wide identification and co-expression network analysis provide insights into the roles of auxin response factor gene family in chickpea [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10895.
- [10] Roosjen M, Pague S, Weijers D. Auxin response factors: Output control in auxin biology [J]. *J Exp Bot*, 2018, 69(2): 179-188.
- [11] Okushima Y, Overvoorde P J, 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(2): 179-188.

- 444-463.
- [12] Liscum E, Reed J W. Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development [J]. *Plant Mol Biol*, 2002, 49(3/4): 387-400.
- [13] 周省委, 陈璐, 顾旭鹏, 等. 颠茄生长素应答因子 ARF 基因家族的全基因组鉴定及表达特征分析 [J]. 中草药, 2024, 55(21): 7419-7434.
- [14] 关思静, 高静, 徐蓉蓉, 等. 甘草生长素反应因子 (ARF) 基因家族的鉴定及表达分析 [J]. 中国农学通报, 2021, 37(29): 20-27.
- [15] 邓玉萍, 王倩, 张敏慧, 等. 向日葵 *ARF* 基因家族鉴定及其在花发育中的功能分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2024, 25(11): 1967-1979.
- [16] 李慧峰, 冉昆, 何平, 等. 苹果生长素响应因子 (ARF) 基因家族全基因组鉴定及表达分析 [J]. 植物生理学报, 2015, 51(7): 1045-1054.
- [17] Kato H, Mutte S K, Suzuki H, *et al.* Design principles of a minimal auxin response system [J]. *Nat Plants*, 2020, 6(5): 473-482.
- [18] Lei M Q, He R R, Zhou Y F, *et al.* The long noncoding RNA ALEX1 confers a functional phase state of ARF3 to enhance rice resistance to bacterial pathogens [J]. *Mol Plant*, 2025, 18(1): 114-129.
- [19] 李文兰, 李文才, 孙琦, 等. 玉米生长素响应因子家族基因的表达模式分析 [J]. 作物学报, 2021, 47(6): 1138-1148.
- [20] Xue T, Jia H F, Wang M, *et al.* A chromosome-level *Pinellia ternata* genome assembly provides insight into the evolutionary origin of ephedrine and acrid raphide formation [J]. *Med Plant Biol*, 2024, 3(1): 253.
- [21] Chen C J, Chen H, Zhang Y, *et al.* TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Mol Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [22] 杨金荣, 崔婉宁, 张瑜, 等. 基于转录组数据的半夏 AP2/ERF 基因家族鉴定及逆境响应分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(5): 176-184.
- [23] 李海伦. 甜瓜 TCP 转录因子基因家族鉴定与表达分析 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2022.
- [24] 刘汶泽, 周省委, 张韶珂, 等. 颠茄 WRKY 转录因子基因家族全基因组鉴定及光、温调控下表达模式分析 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49(21): 5843-5855.
- [25] 马少杰, 郭海洋, 尹江, 等. 毛果杨 MYC 基因家族生物信息学及转录组表达分析 [J]. 分子植物育种, 2024: 1-18.
- [26] Burr B. Mapping and sequencing the rice genome [J]. *Plant Cell*, 2002, 14(3): 521-523.
- [27] Wang S K, Bai Y H, Shen C J, *et al.* Auxin-related gene families in abiotic stress response in *Sorghum bicolor* [J]. *Funct Integr Genomics*, 2010, 10(4): 533-546.
- [28] 薛建平, 丁勇, 张爱民, 等. 高温胁迫下半夏倒苗前后保护酶活力的变化 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(7): 3-6.

[责任编辑 时圣明]