



马杰茹,武小娟,王沛捷,李楠,马宇,杨恩泽,马艳红,聂虎帅. 彩色马铃薯 ARF 基因家族的鉴定与表达分析[J]. 中国农业大学学报,2025,30(07):105-118.
MA Jieru, WU Xiaojuan, WANG Peijie, LI Nan, MA Yu, YANG Enze, MA Yanhong, NIE Hushuai. Screening and expression analysis of ARF gene related to anthocyanin synthesis in colored potatoes[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2025, 30(07): 105-118.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.07.09

彩色马铃薯 ARF 基因家族的鉴定与表达分析

马杰茹 武小娟 王沛捷 李楠 马宇 杨恩泽 马艳红 聂虎帅*

(内蒙古农业大学 农学院, 呼和浩特 010019)

摘要 为鉴定参与彩色马铃薯花青素合成相关的 ARF 基因,基于马铃薯转录组测序数据,利用生物信息学方法对其基因家族成员进行理化性质、系统进化、保守基序、启动子顺式作用元件等进行分析,并通过qRT-PCR验证9个与花青素合成相关的 $StARFs$ 基因在不同生长时期的紫肉和白肉马铃薯中的表达模式。结果表明:筛选得到55个 $StARFs$ 基因,可分为4个亚族;同一亚族成员呈现出相似的保守基序和保守结构域,表明其具有相似的功能。启动子顺式元件预测结果显示,其中9个 $StARFs$ 均含有激素响应作用元件,5个 $StARFs$ 含有MYB结合位点响应元件。此外,7个 $StARFs$ 在黄皮白肉马铃薯‘大西洋’中高表达,在‘华颂66’中低表达;2个 $StARFs$ 在紫皮紫肉马铃薯‘华颂66’中高表达,在‘大西洋’中低表达。这9个 $StARFs$ 基因极有可能参与马铃薯块茎花青素的生物合成过程。

关键词 彩色马铃薯;花青素; ARF 转录因子;生物信息学;表达模式

中图分类号 S184

文章编号 1007-4333(2025)07-0105-14

文献标志码 A

Screening and expression analysis of ARF gene related to anthocyanin synthesis in colored potatoes

MA Jieru, WU Xiaojuan, WANG Peijie, LI Nan, MA Yu, YANG Enze,

MA Yanhong, NIE Hushuai*

(College of Agriculture, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China)

Abstract To screen the ARF genes related to anthocyanin synthesis in colored potatoes, based on the transcriptome sequencing data of potatoes, bioinformatics methods were used to analyze the physicochemical properties, phylogenetic evolution, conserved motifs, and cis-acting elements of the promoter of the gene family members. The expression patterns of nine $StARFs$ genes related to anthocyanin synthesis in different growth stages of purple-flesh and white-flesh potatoes were verified by qRT-PCR. The results showed that: A total of 55 $StARFs$ genes were screened and divided into four subfamilies. Members of the same subfamily have similar conserved motifs and domains, which indicate their similar functions. The results of the prediction of the cis-elements of the promoters showed that, nine $StARFs$ contained hormone response elements, and five $StARFs$ contained MYB binding site response elements, which might cooperate with MYB genes to regulate anthocyanin synthesis. The qRT-PCR results showed that seven $StARFs$ among the nine $StARFs$ were highly expressed in the yellow-skin white-flesh potato ‘Atlantic’ and lowly expressed in ‘Huasong 66’; the other two $StARFs$ were highly expressed in the purple-skin purple-flesh potato ‘Huasong 66’ and lowly expressed in ‘Atlantic’. The nine $StARFs$ genes were highly likely to be involved in the biosynthesis process of anthocyanin in potato tubers.

Keywords colored potatoes; anthocyanin; ARF transcription factor; bioinformatics; expression pattern

收稿日期: 2025-01-06

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金(2024QN03070);内蒙古农业大学基本科研业务费专项(BR22-11-16)

第一作者: 马杰茹(ORCID:0009-0001-2941-4085),硕士研究生,E-mail: 1535073435@qq.com

通讯作者: 聂虎帅(ORCID:0000-0001-6814-0972),讲师,主要从事马铃薯品质性状调控机制研究,E-mail: niehs@cau.edu.cn

马铃薯是茄科茄属植物,原产于热带美洲的山地,现广泛种植于全球温带地区^[1]。马铃薯具有食用、经济、工业和药用等多方面的价值,如马铃薯块茎含有多多种维生素和无机盐,可用于防治坏血病以及刺激人体的造血机能^[2]。马铃薯除了有黄色和白色品种外,还有粉红色、红色和紫色等颜色鲜艳的彩色品种^[3]。彩色马铃薯不仅具有普通马铃薯包含的所有营养物质,如淀粉、蛋白质、多种微量元素等必需成分和适度的脂肪外,还富含类黄酮物质,如儿茶素、表儿茶素及花青素等多种功效物质^[4]。近年来,随着人们生活质量的提高,彩色马铃薯的需求日益增长^[3],但目前我国富含花青素的马铃薯优良种质资源匮乏,如何选育出花青素含量更高,更稳定的彩色马铃薯是亟待解决的问题。

花青素是一类重要的次生代谢产物,具有较强的抗氧化能力,是植物在生物/非生物逆境胁迫诱导下作为胁迫保护剂的一类重要的天然色素^[4]。同时,花青素也能够清除人体内自由基,起到抗炎、抗癌、保护心血管和延缓衰老等作用,对改善人体健康具有重要意义^[5-6]。花青素的合成过程和修饰作用在细胞质和内质网中进行,通过转运蛋白运输到液泡中储存^[7]。花青素的生物合成过程受到多种因素的调控,包括结构基因的表达、转录因子的调节以及环境因素和植物激素的影响等^[8-9]。生长素参与调节次生代谢途径,如苯丙醇、类黄酮和花青素代谢^[10]。近年来,越来越多的与花青素合成相关的ARF转录因子被鉴定出来。在水稻中,生长素具有上调小RNA (small auxin-up RNA, SAUR) 的功能,SAUR39通过负向调节生长素合成和转运,正调控花青素合成相关基因的表达模式,进而促进花青素的积累^[11-12]。龙须草中,生长素浓度在一定范围内的变化可增强花青素 3-O-葡萄糖苷和花青素 3-O-芦丁糖苷的生成,进一步增加了花青素的积累^[13]。在紫粒小麦研究中发现,籽粒发育过程中内源生长素含量所呈现出的变化趋势与花青素积累变化趋势一致,且生长素信号传导途径相关基因和花青素合成相关基因的表达水平趋势也是相同的^[14]。使用不同浓度的生长素处理苦荞麦毛状根,结果表明适宜浓度生长素能够促进矢车菊素 3-O-葡萄糖苷以及矢车菊素-3-O-芸香糖苷 2 种花青素的累积,进一步研究表明低浓度生长素更有利于促进花青素合成^[15]。苹果果实发育

过程中,MdARF2可结合花青素合成结构基因(如MdDFR)启动子上的生长素反应元件 AuxREs,调控基因的转录,从而影响苹果花青素的合成^[16]。

生长素响应因子(Auxin response factor, ARF)是生长素信号传导的重要组分,是一类能响应植物生长素信号的转录因子,对生长素响应因子的研究有利于揭发植物生长发育调控机制^[17-18]。在植物细胞中,有 3 类蛋白参与生长素信号传导,包括生长素受体蛋白 TIR1/AFB、AUX/IAA 蛋白和生长素响应因子^[19]。ARF 具备与生长素响应元件(AuxREs)结合的能力,通过激活或抑制生长素响应基因(如Aux/IAA、GH3和SAUR等)的表达,影响植物的生长发育^[20]。绝大多数ARF蛋白具有 3 个结构域:位于N末端高度保守的B3型DNA结合结构域、具有转录激活或抑制活性的中间Auxin_resp结构域、以及位于C端的Aux/IAA结构域;其中,Aux/IAA结构域调节ARF与AuxRE的结合,并对下游生长素响应基因的表达模式进行调控^[21-22]。目前,在许多植物中鉴定得到ARF基因,并对其功能进行了系统分析。在拟南芥中,AtARF3功能缺失突变体表现出根尖分生组织变小、主根变短的表型^[23];定点突变拟南芥AtARF1和AtARF2这2个基因后,突变植株不仅表现出叶片早衰的情况,而且还会出现雌蕊及花器官生长异常现象^[21]。向日葵ARF家族成员的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^[24]。玉米ZmARF10基因在干旱胁迫和ABA处理后表达量显著升高^[25]。在小麦的穗发育进程里,尤其是在花器官(雄蕊与雌蕊均包含在内)的发育过程中,TaARF14基因发挥着至关重要的作用^[26]。在马铃薯中,StARF2基因的缺失会导致转基因马铃薯块茎形成的推迟、块茎中抗坏血酸、可溶性糖和可溶性蛋白含量均下降^[27];过表达StARF5基因会使马铃薯匍匐茎数量增加、结薯数目增多,进而促使单株产量增加;此外,过表达StARF5同时促进了转基因马铃薯块茎中淀粉、可溶性糖和蛋白质的积累^[27]。目前,马铃薯StARFs基因功能研究多集中在块茎大小及品质方面^[27-29],ARF转录因子调控彩色马铃薯块茎花青素合成的研究鲜有报道。本研究基于不同颜色马铃薯块茎转录组表达谱,采用生物信息学方法对马铃薯中ARF基因家族成员进行鉴定。全面分析StARFs理化性质、

基因结构、蛋白质保守基序、基因染色体定位、系统进化树、启动子顺式作用元件等,并通过RNA-seq分析及qRT-PCR验证,筛选与花青素合成相关的*StARFs*,以期为深入研究*ARF*基因家族在调控马铃薯块茎花青素合成中的分子机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

以紫皮紫肉马铃薯‘华颂66’(HS 66)和黄皮白

肉马铃薯‘大西洋’(DXY)的块茎为供试材料(图1)。供试材料均种植于内蒙古自治区呼和浩特市内蒙古农业大学科技园(111°40′33″E, 40°46′45″N, 海拔1 244 m),分别于块茎形成期(2023-07-01, S_1)、块茎膨大期(2023-07-15, S_2)、及块茎成熟期(2023-09-01, S_3)进行取样,3次重复,用于转录组测序及后期表达模式验证。基于马铃薯‘HS 66’和‘DXY’块茎形成期(S_1)、膨大期(S_2)、成熟期(S_3)转录组表达谱为基础数据来源。



图1 成熟期‘华颂66’和‘大西洋’马铃薯块茎

Fig. 1 The tubers of the mature varieties ‘Huasong 66’ and ‘Atlantic’ potato

1.2 马铃薯差异*ARF*转录因子筛选

基于上述转录组测序结果,以功能注释“Auxin response factor”为关键词进行筛选,初步获得马铃薯*ARF*转录因子候选基因;利用TextPad软件查找其所对应的核苷酸序列,用NCBI-ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)找出与其对应的最长的氨基酸序列,并利用NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)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和Auxin_resp这2个保守结构域的基因作为马铃薯*StARF*基因家族成员,并利用DNAMAN软件进行氨基酸多序列比对,剔除多余或重复基因。

1.3 马铃薯*ARF*蛋白理化性质及亚细胞定位预测

利用ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)在线网站对马铃薯*StARFs*转录因子的氨基酸数目、相对分子质量、理论等电点、亲疏水性

等理化性质进行分析;利用Cell-PLOC2.09 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLOC-2/>)对筛选到的马铃薯*StARFs*蛋白进行亚细胞定位预测。

1.4 *StARF*基因家族系统发育分析

选取7个不同物种(拟南芥、水稻、大豆、大麻、番茄、葡萄、苹果)中与*StARF*同源性较高且功能已知的氨基酸序列,利用MEGA11.0软件,根据Okushima^[30]对拟南芥*ARF*的分类方法,将马铃薯及其他物种的*ARF*蛋白进行多序列比对分析,采用邻接法(NJ, neighbor-joining),设置校验参数(bootstrap)为1 000,其余参数为默认值,构建系统发育树。使用在线网站EvolView (<https://www.evolgenius.info/evolview>)美化进化树。

1.5 马铃薯*StARF*基因染色体定位

根据基因ID在马铃薯转录组数据基因注释文件中提取*ARF*家族成员染色体定位信息,整理后通过TBtools软件绘制染色体定位图。

1.6 StARF 基因表达模式分析

基于转录组数据,比较‘华颂66’块茎形成期(H₁) vs ‘大西洋’块茎形成期(D₁)、‘华颂66’块茎膨大期(H₂) vs ‘大西洋’块茎膨大期(D₂)、‘华颂66’块茎成熟期(H₃) vs ‘大西洋’块茎成熟期(D₃)3个时期中差异表达基因。将|log₂(Fold Change)|>0, P<0.05作为差异显著性标准,并使用TBtools绘制差异表达热图。

1.7 差异表达 StARF 蛋白结构及启动子分析

利用SOMPA(<http://npsa-bi.inra.fr/page=NPSA/>)网站预测StARFs的二级结构;使用TMHMM-2.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>)预测蛋白质跨膜区域;使用SignalP-4.1(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-4.1>)预测StARFs蛋白质的信号肽。使用TBtools软件基于基因组序列与结构注释文件,提取马铃薯StARFs基因上游2000 bp序列作为启动子区域。运用PlantCare数据库(<https://www.plantcare.co.uk/>)对启动子区域内顺式作用元件进行预测,使用TBtools软件将启动子预测结果可视化作图。

1.8 StARF 基因保守基序及保守结构域分析

利用在线分析网站MEME(<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)对筛选出的9个与马铃薯块茎花青素合成相关的StARFs蛋白进行保守基序预测,利用NCBI的CD-search在线工具分析ARF蛋白的保守结构域,使用TBtools软件进行可视化分析。

1.9 差异表达 StARF 基因实时荧光定量 PCR 验证

针对筛选出的9个与马铃薯块茎花青素合成相关的StARFs基因,采用Primer Premier 5.0软件设计特异性引物,以Actin为内参基因,并委托上海生工(Sangon,上海)进行引物合成(表1)。利用Trizol法提取不同马铃薯品种不同时期块茎总RNA,采用微量紫外分光光度计检测纯度和浓度,通过1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA质量。使用FastKing RT Kit(With gDNase) cDNA第一链合成试剂盒(KR116-02)反转录合成cDNA,使用MonAmp™ SYBR® Green qPCR Mix(MQ10201S)试剂进行实时荧光定量PCR(qRT-PCR)反应,反应体系为2×miRcute Plus miRNA PreMix(SYBR&ROX)试剂10 μL、cDNA模板1.2 μL、上游引物(10 μmol/L)

表1 马铃薯花青素合成相关ARF基因qRT-PCR引物序列
Table 1 Primer sequences for qRT-PCR of ARF genes related to anthocyanin synthesis in potatoes

基因名称 Gene name	序列(5'→3') Sequence
StARF6-3	TCTATTCCTTACGCTACCTCTACCTTC GCAAGAAACCTGATTCATCTACACAAC
StARF6-6	TGCCTTATGCTACCTCTGCCTTC AGACACCTGATTCATCTACACAACCTTG
StARF9-1	AAGAGATTGGTTGCTGGCGATG GATTGAGGTATAGGGCTTTGCTGAC
StARF11-1	TCCAACCAGGAACTGATTGAAAGAC TCAACCAGAAGGCGAATATGTAGAAC
StARF11-3	TGTCGTGTTCTACATATTGCCTTC ATCCATCAATCTAACTACACCAACTCC
StARF17-2	GTCCGAGTGAGGTTGATGAAGTTAC CTCCTCCATTGTTTCGCATCTGAC
StARF18	TCCTCCTGTTTCAGACCATCCTTG CCTTGCGTCCCTCTATAAATATGC
StARF19-3	GCTCACAGTGGCGTAATCTTCAG AGGAGTCACGACAGGCTCAATATC
StARF22-6	AGGCAGCATTCAAGACAATCTAACC GACCAGTATCGAGTACACCAAGTTC
Actin	CCTTGATGCTAGTGGTTCG GCTCATAGTCAAGAGCCAC

0.4 μL 、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)0.4 μL 、ddH₂O 8 μL 。反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 35 s,40个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。试验采取3次技术重复及3次生物学重复,利用 $2^{-\Delta\text{CT}}$ 法计算其相对表达量^[31],并通过SPSS 26.0软件进行表达量差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 马铃薯 ARF 转录因子家族成员筛选

基于紫肉马铃薯‘华颂66’与白肉马铃薯‘大西洋’块茎发育不同时期的测序结果,从中筛选获得64个注释为“Auxin response factor”的候选 ARF 转录因子。其中,62个 StARFs 蛋白均具有 B3 结构域

和 Auxin_resp 结构域,初步说明它们属于马铃薯 StARFs 基因家族成员。通过多序列比对后,剔除7个相似度为100%的重复序列,最终获得了55个马铃薯 StARFs 基因家族成员,并根据转录组数据功能注释文件对其进行分别命名。

55个 StARFs 蛋白均具有 B3 保守结构域、生长素响应保守结构域(Auxin_resp 保守结构域)或生长素响应超家族保守结构域(Auxin_resp superfamily 保守结构域),说明 B3 和 Auxin_resp 结构域是 StARF 蛋白组成中最核心的保守结构域。55个 StARFs 中有24个包含 AUX_IAA 保守结构域,与 AUX_IAA 相比,B3 和 Auxin_resp 结构域更为保守,这些高度保守的结构域,是 ARF 蛋白实现功能的关键位点(图2)。

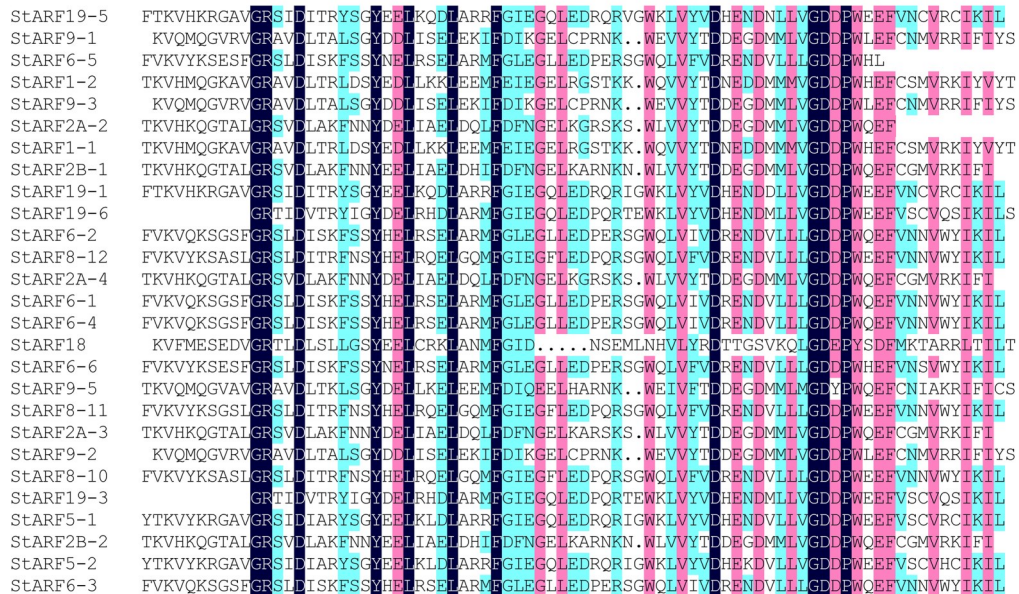


图2 马铃薯 ARF 蛋白 AUX_IAA 结构域序列比对

Fig. 2 Sequence comparison of AUX_IAA domain of potato ARF protein

2.2 马铃薯 ARF 转录因子家族成员理化性质及亚细胞定位分析

55个 StARFs 蛋白质的组成氨基酸数在499~1167,分子质量最高和最低的转录因子分别为 StARF19-6,131.35 kU 和 StARF11-3,56.53 kU; pI 5.08~8.20,其中 StARF2A-1、StARF2A-4、StARF3-1、StARF3-2、StARF22-4、StARF22-5、StARF22-6、StARF4-1、StARF4-2 的 pI>7,为碱性蛋白质;而其余46个 StARFs 的 pI<7,为酸性蛋白质,占整个马铃薯 ARF 家族的83.63%。亲疏水性及亚细胞定位预测结果显示,55个 ARF 均位于

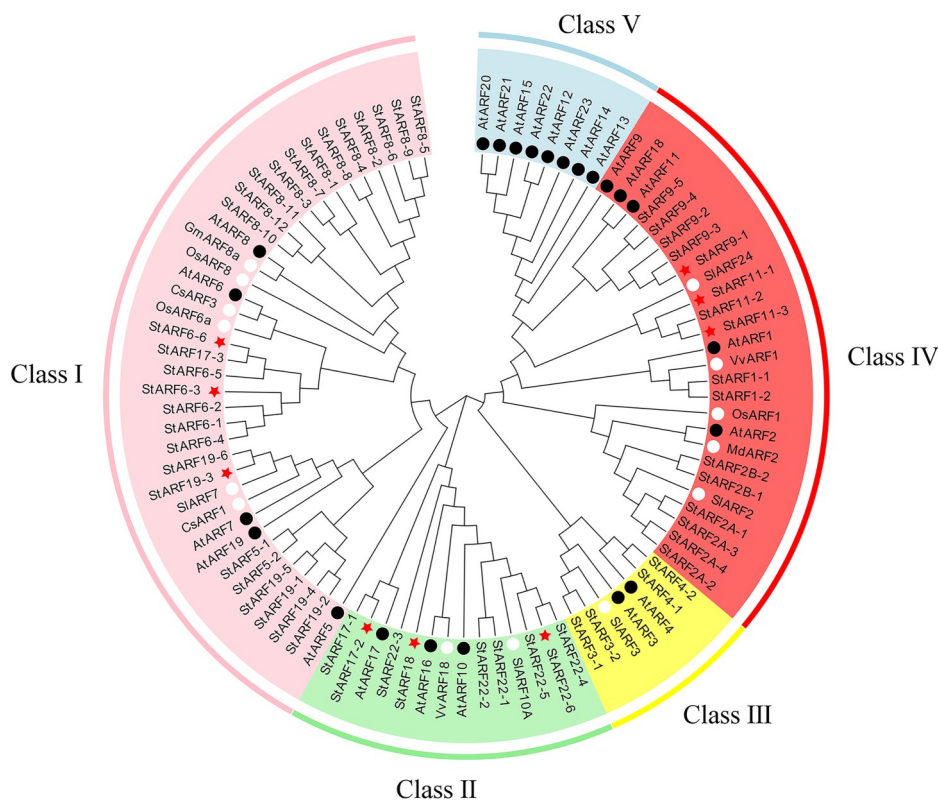
细胞核;总平均疏水指数均为负数,具有较强的亲水性,为亲水性蛋白。

2.3 马铃薯 ARF 转录因子进化分析

将马铃薯 StARFs、拟南芥 AtARFs、苹果 MdARFs、番茄 SlARFs、葡萄 VvARFs、水稻 OsARFs、大豆 GmARFs 和大麻 CsARFs 分为5个亚族(从I~V),除了 Class V 中无马铃薯 ARF 成员以外,其余4个亚族都同时含有马铃薯和拟南芥 ARF 成员(图3)。在 Class I、II 和 III 中,StARF19-3、StARF19-6 与番茄 SlARF7, StARF22-5 与番茄 SlARF10A, StARF3-1、StARF3-2 与番茄 SlARF3 亲缘关系紧密,序列相似程度均高达

90%以上。在 Class IV 中,马铃薯 *StARF2B-2*、*StARF2B-1*、*StARF2A-2*、*StARF2A-1*、*StARF2A-3*、

StARF2A-4 与 *MdARF2* 聚为一类,推测可能与 *MdARF2* 具有相同的功能。



St、At、Md、Sl、Vv、Os、Gm 和 Cs 分别代表马铃薯、拟南芥、苹果、番茄、葡萄、水稻、大豆和大麻 ARF 蛋白。

St, At, Md, Sl, Vv, Os, Gm and Cs represent the ARF proteins of *Solanum tuberosum*, *Arabidopsis thaliana*, *Malus domestica*, *Solanum lycopersicum*, *Vitis vinifera*, *Oryza sativa*, *Glycine max* and *Cannabis sativa*, respectively.

图3 马铃薯和其他物种 ARF 蛋白系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the ARF protein system in potato and other species

2.4 马铃薯 ARF 基因染色体定位

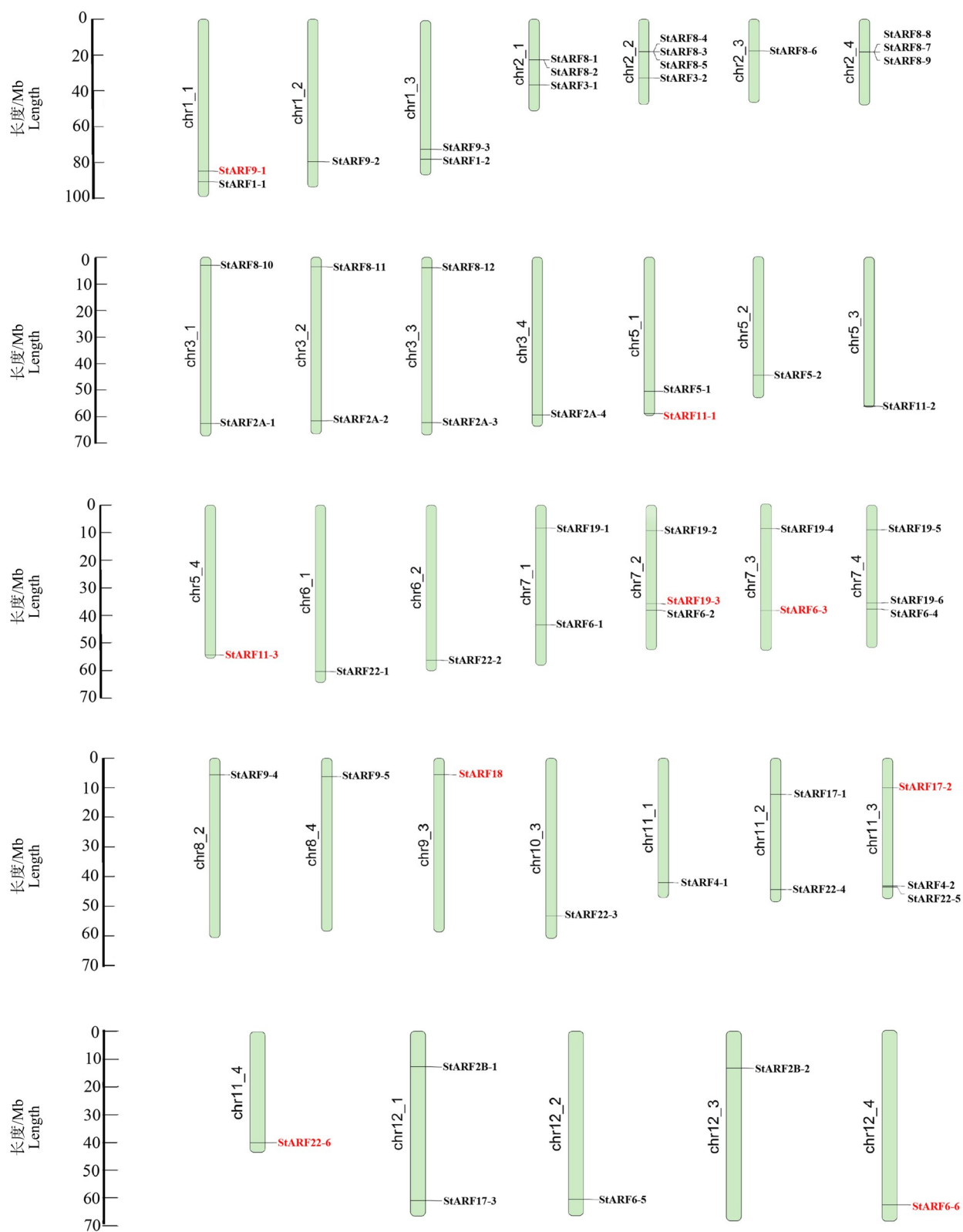
由图4可知,55个马铃薯 *StARFs* 基因除了在4号染色体没有分布外,在其余11条染色体(1、2、3、5、6、7、8、9、10、11、12)上均有分布。其中, *StARF18* 和 *StARF22-3* 分别位于9和10号染色体的单倍型3; *StARF22-1* 和 *StARF22-2* 分别位于6号染色体的单倍型1、2; *StARF9-4* 和 *StARF9-5* 分别位于8号染色体的单倍型2、4; *StARF9-1*、*StARF9-2*、*StARF1-2* 等5个马铃薯 *StARFs* 基因位于1号染色体的单倍型1、2、3; 其他基因以等位基因的形式分别位于2、3、5、7、11、12号染色体的4个单倍型上。

2.5 不同颜色马铃薯差异基因的表达模式分析

由图5可知,以 $|\log_2(\text{Fold Change})| > 0$, $P < 0.05$ 为标准,9 606个基因在2个品种3个时期的表达存在差异。而在‘华颂66’(H₁) vs ‘大西洋’(D₁)块茎形成期中,有13 089个基因上调表达,19 061个

基因下调表达;在‘华颂66’(H₂) vs ‘大西洋’(D₂)块茎膨大期中,有9 976个基因上调表达,10 518个下调表达;‘华颂66’(H₃) vs ‘大西洋’(D₃)块茎成熟期中,12 985个基因上调表达,17 009个基因下调表达。

由图6可知, *StARF6-3*、*StARF6-6*、*StARF11-3*、*StARF17-2*、*StARF18*、*StARF19-3*、*StARF22-6* 等30个 *StARFs* 在‘大西洋’中高水平表达; *StARF9-1*、*StARF11-3*、*StARF2A-2*、*StARF4-1* 等25个 *StARFs* 在‘华颂66’中高水平表达。其中 *StARF9-1* 和 *StARF11-3* 在3个时期的‘大西洋’块茎中表达量均为0; *StARF17-2*、*StARF18*、*StARF22-6* 在3个时期的‘华颂66’块茎中表达量均为0; *StARF6-3*、*StARF6-6*、*StARF11-1* 和 *StARF19-3* 在‘华颂66’和‘大西洋’表达量的差异均达到极显著水平。综上所述,以上9个 *StARFs* 均与花青素合成有关。

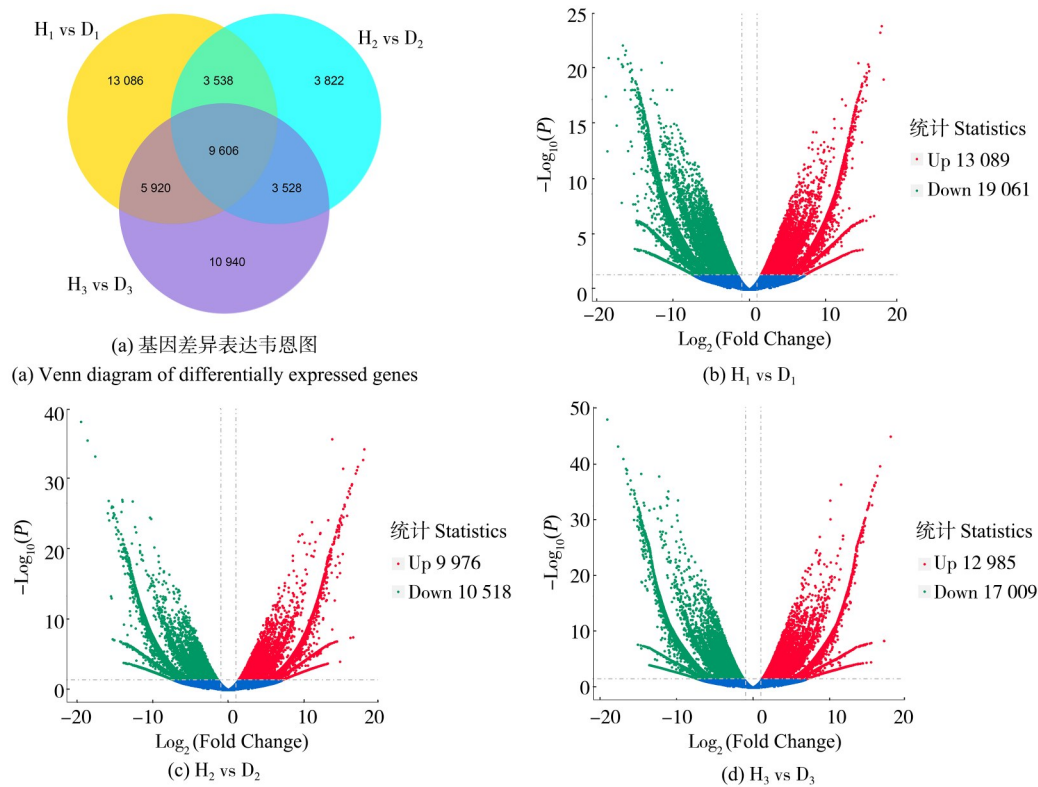


红色为与花青素合成相关的 *StARFs*

Red font is *StARFs* related to anthocyanin synthesis

图 4 马铃薯 *ARF* 家族成员染色体定位图

Fig. 4 Chromosome Mapping of *ARF* family members in potatoes



H, ‘华颂 66’; D, ‘大西洋’。1、2、3 分别为块茎形成期、膨大期、成熟期。下同。
H, ‘Huasong 66’; D, ‘Atlantic’. 1, 2 and 3 are the forming stage, swelling stage and maturity stage of tubers, respectively. The same below.

图 5 马铃薯差异基因表达分析

Fig. 5 Analysis of differential expression genes of potato

2.6 马铃薯 ARF 蛋白结构及启动子预测分析

由图 7 可知,上述 9 个花青素合成相关 StARFs 蛋白的二级结构以无规则卷曲为主,除 StARF11-3 不规则卷曲占比为 44.69% 外,其余 8 个基因无规则卷曲占比均>60%,其次是 α-螺旋和延伸链,β 折叠占比最小,为 4.21%~12.97%。9 个 StARFs 蛋白均无跨膜结构位点和信号肽。

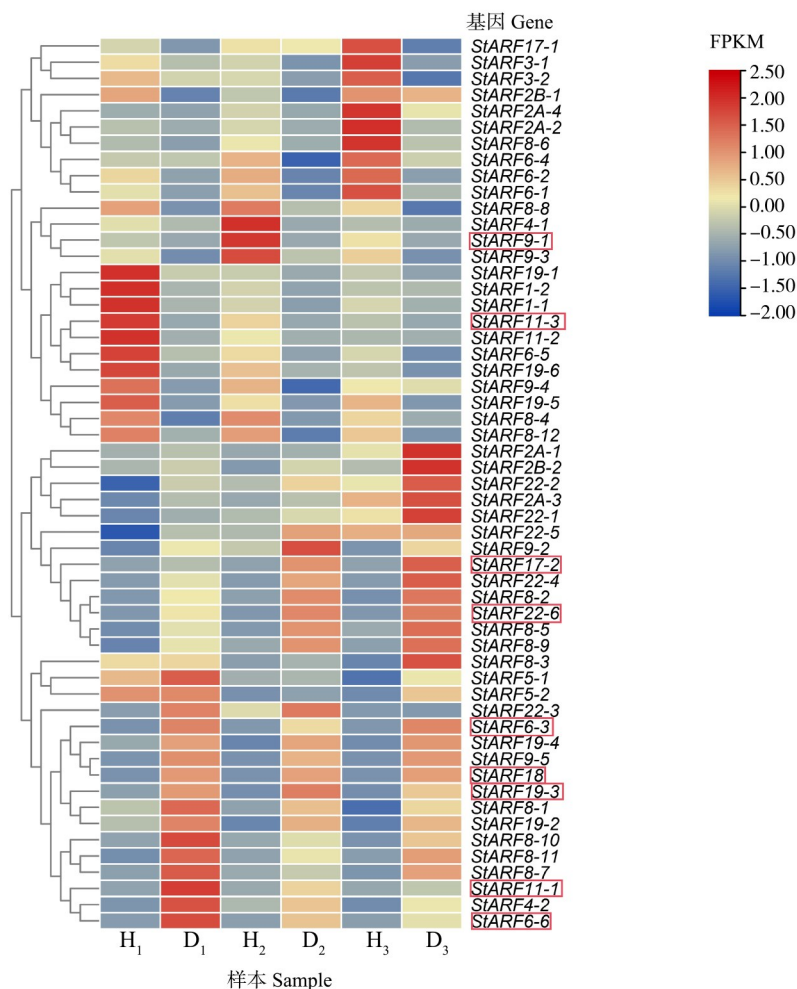
启动子预测结果表明(图 8),9 个 StARFs 转录因子响应多种非生物逆境胁迫过程。在每个 StARF 启动子中,光响应元件的含量极为丰富,占比高达 75%,其数量相较于其他响应元件具有显著优势。而 MYB 转录因子结合位点占比为 5.3%,推测 StARF 可能受 StMYB 转录因子调控,进而发挥不同的功能。此外,9 个 StARFs 基因的启动子区域分别包含了多个光、茉莉酸甲酯、赤霉素以及水杨酸响应元件,推测这些基因可能在响应生物和非生物逆境胁迫过程中扮演着重要角色。

2.7 马铃薯 ARF 蛋白保守基序及保守结构域预测

由图 9 可知,motif 1、motif 2 和 motif 10 归属于 B3

结构域,在 9 个 ARF 蛋白中,除了 motif 2 在 StARF11-3 蛋白中未出现,其余 8 个 ARF 蛋白均有该基序分布。motif 5 和 motif 7 属于 Auxin_resp 结构域以及 Auxin_resp superfamily,它们在 9 个马铃薯 ARF 蛋白里均有分布,但 StARF9-1 中不含有 motif 7。StARF11-3 包含 6 个保守基序,StARF17-2 含有 8 个保守基序,StARF11-1 与 StARF9-1 均含有 9 个保守基序,其余 5 个 StARFs 均具备 10 个保守基序。值得注意的是,9 个马铃薯 ARF 蛋白都拥有 6 个相同的基序,分别为 motif 1、5、6、7、9、10,表明这 9 个马铃薯 StARFs 存在相似的分子功能。

对 9 个 ARF 蛋白质保守结构域分析结果显示,同一类群蛋白质保守结构域在组成与排布上存在相似性(图 9(b))。以具体类群为例,Class I 里的 StARF6-3、StARF6-6 以及 StARF19-3,Class II 中的 StARF18,还有 Class IV 中的 StARF9-1,均包含 B3、Auxin_resp 和 AUX_IAA 结构域。而处于同一分支的 StARF11-1 和 StARF11-3 都具有 B3 和 Auxin_resp superfamily,充分说明它们之间相似度较高,可能具有相似的分子功能。



红色框为与花青素合成相关的 *StARFs*。

The red boxes are *StARFs* associated with anthocyanin synthesis.

图 6 马铃薯 *ARF* 基因家族不同品种不同时期的表达模式

Fig. 6 Expression patterns of *ARF* gene family in different varieties and periods

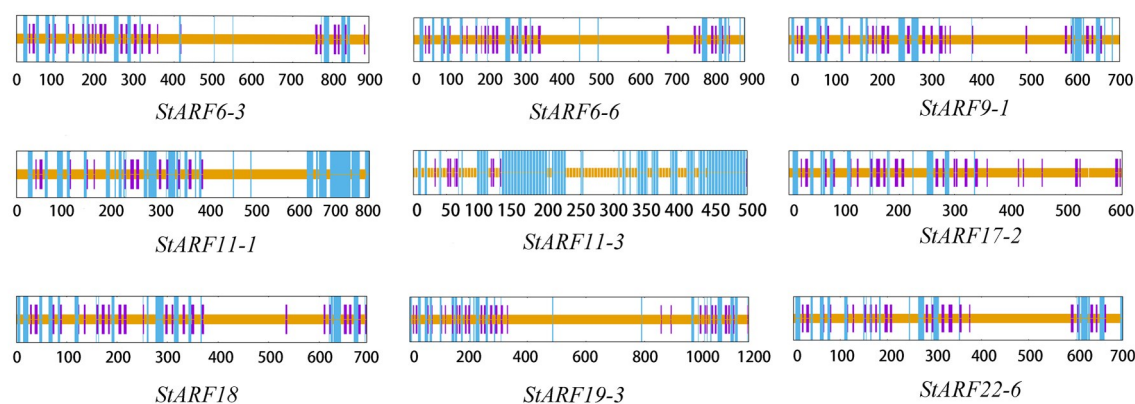


图 7 花青素合成相关的 9 个 *StARFs* 蛋白二级结构

Fig. 7 The secondary structures of 9 *StARFs* proteins related to anthocyanin synthesis

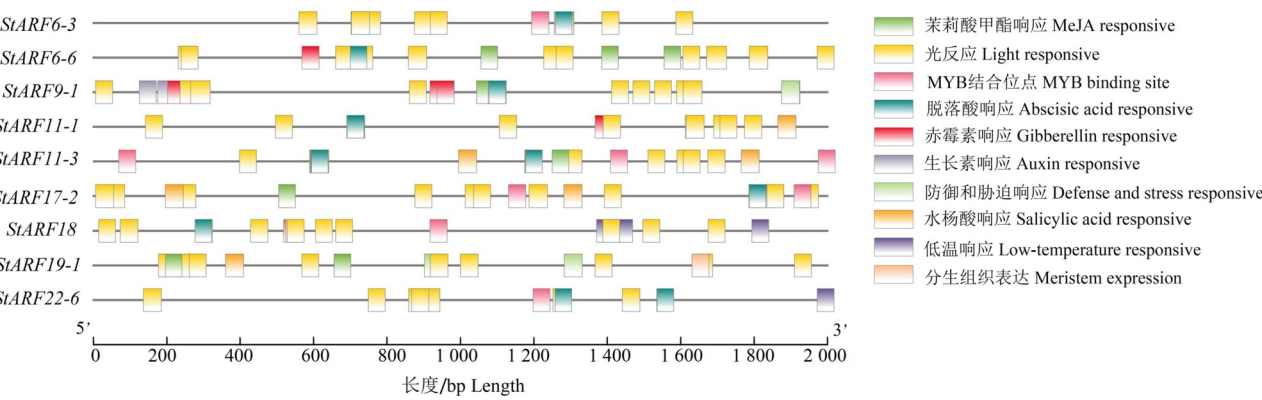


图8 马铃薯 *StARFs* 基因顺式作用元件分析
Fig. 8 Analysis of cis-acting elements of potato *StARFs* gene

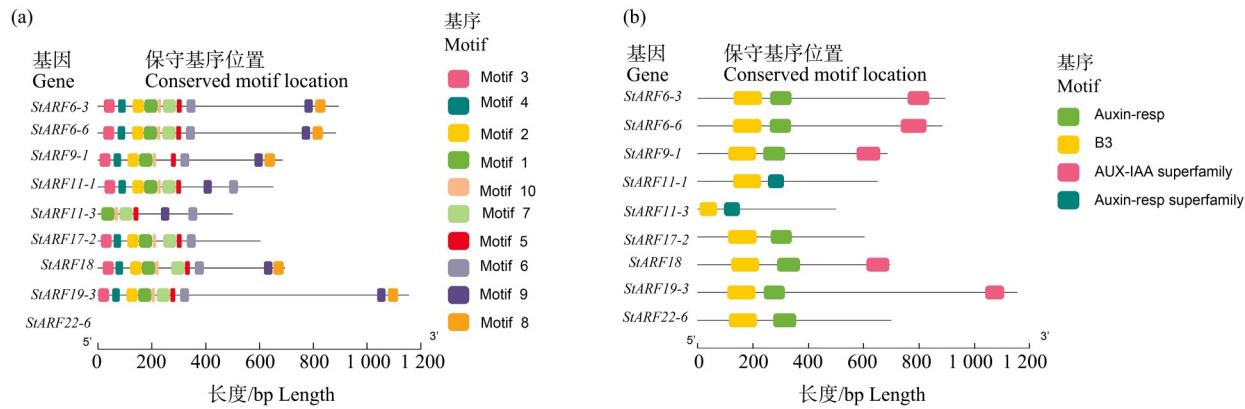


图9 马铃薯 *StARFs* 基因保守基序 (a) 和保守结构域 (b) 分析
Fig. 9 Analysis of conserved motifs (a) and domains (b) of *StARFs* genes in potato

另外，*StARF17-2* 和 *StARF22-6* 均具备 B3 和 Auxin_resp 结构域，却不含有 AUX_IAA 结构域。

2.8 马铃薯 ARF 转录因子表达模式的分析

由图 10 可知，‘大西洋’各时期块茎均检测不到花青素，而‘华颂 66’花青素含量由形成期到成熟期呈现出先升高后下降的趋势。在 9 个 *StARFs* 中，除

StARF9-1 和 *StARF11-3* 外，其余 7 个 *StARFs* 在‘大西洋’中的表达均高于‘华颂 66’，且 qRT-PCR 结果与转录组测序结果趋势一致；其中，*StARF9-1* 在‘华颂 66’各时期的表达模式与花青素含量变化趋势完全一致，可能是调控马铃薯块茎中花青素合成的关键基因，见图 11。

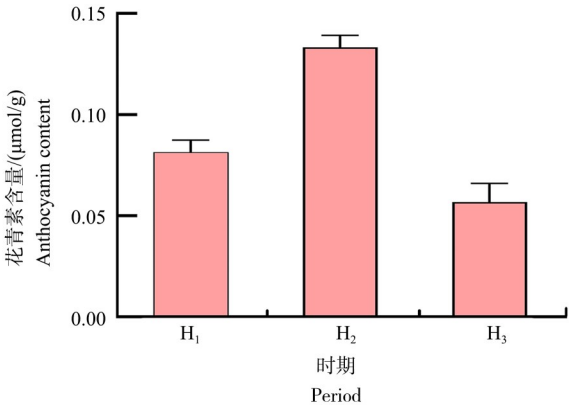
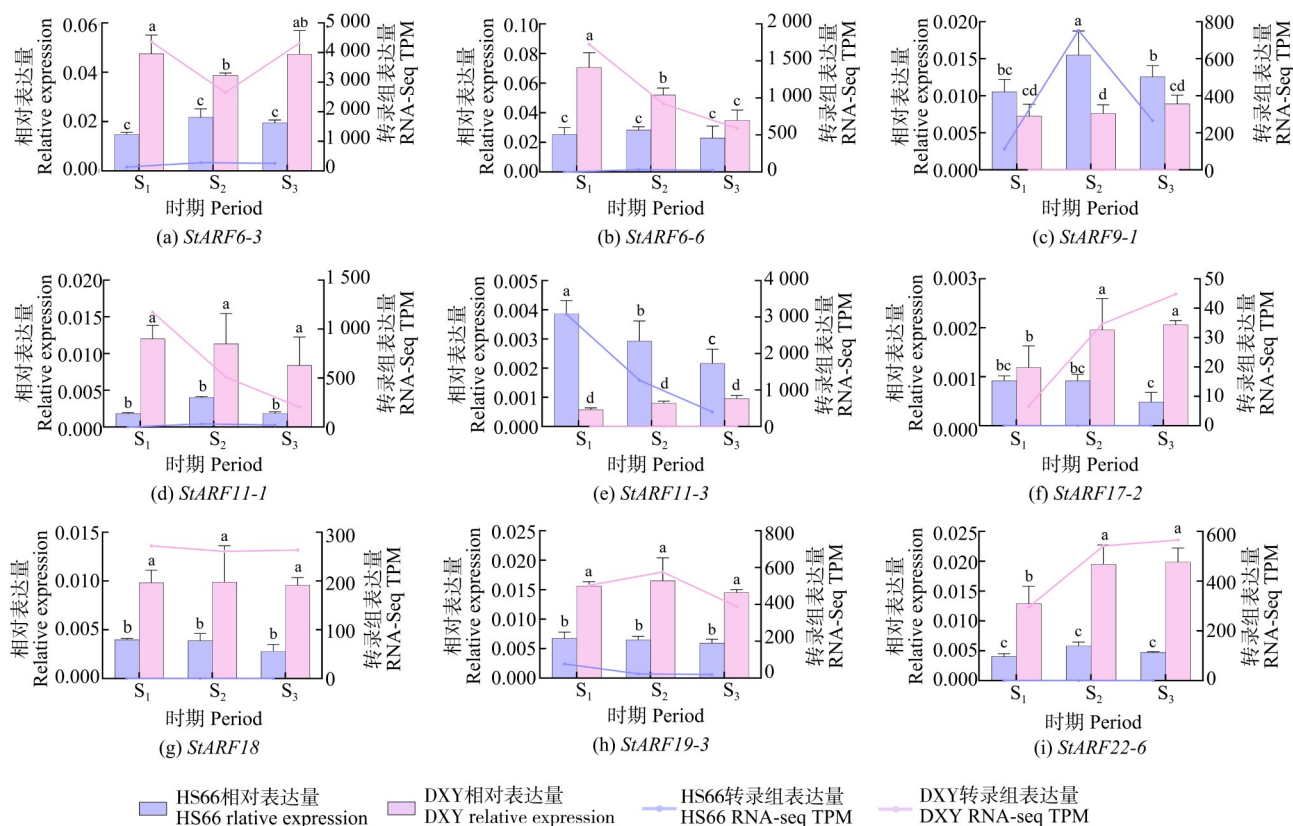


图10 不同时期‘华颂 66’花青素含量
Fig. 10 Anthocyanin content of ‘Huasong 66’ in different periods



S₁, S₂, S₃ 分别为块茎形成期、膨大期、成熟期。

S₁, S₂ and S₃ are tuber formation stage, swelling stage and maturity stage, respectively.

图 11 不同时期 *StARF*s 基因的表达量

Fig. 11 Expression of *StARF*s genes at different stage

3 讨论

生长素作为一类重要的植物激素,参与调控植物生长发育的各个过程^[32]。生长素响应因子 ARF 在生长素信号传导通路中扮演着不可或缺的角色^[33]。Wang 等^[34]研究表明,ARF 转录因子对植物花青素的生物合成具有调控作用。本研究以不同颜色马铃薯块茎转录组数据为基础,从中筛选出 55 个 ARF 转录因子。55 个 *StARF*s 蛋白分别由 499~1 167 个氨基酸组成,相对分子质量在 56.53~131.35 kU,包括 9 个酸性蛋白质和 46 个碱性蛋白质,亲水性指数均为负值,属于不稳定、易降解的亲水性蛋白。系统进化关系分析发现,马铃薯与番茄的 ARF 序列相似程度高达 90%,推测马铃薯与番茄 ARF 可能具有相似的功能。苹果花青素积累调控机制研究中,*MdARF2* 已被证实可通过降低花青素合成相关基因的表达水平,负向调节苹果中花青素的积累^[34],马铃薯 *StARF2B-1*、*StARF2B-2* 与

MdARF2 进化分析聚于同一分支(图 3),推测 *StARF2B-1* 和 *StARF2B-2* 也参与花青素合成调控。染色体定位分析结果表明,*StARF* 基因在不同染色体上的数量分布较为均匀,平均每条染色体上含有 1~4 个 *StARF* 基因(图 4)。55 个 *StARF*s 基因中有 24 个 ARF 蛋白含有 B3、Auxin_resp 和 AUX_IAA 结构域。部分亲缘关系较近的 ARF 蛋白表现出不同于其他成员的 AUX_IAA 结构域缺失现象,生长素/吲哚乙酸(AUX/IAA)蛋白常与 ARF 蛋白 C 端的 AUX_IAA 结构域结合,形成异源二聚体,参与生长素信号传导,从而影响植物生长发育等一系列生理进程^[35]。根据不同时期不同颜色马铃薯 *StARF*s 的表达模式分析发现,部分 *StARF*s 在 2 个品种不同时期表达水平差异显著,30 个 *StARF*s 在‘大西洋’中高表达,25 个在‘华颂 66’中高表达。以 $|\log_2(\text{Fold Change})| > 0$, $P < 0.05$ 作为差异显著性标准,筛选出紫色马铃薯薯肉中 2 个和白色马铃薯薯肉中 7 个显著高表达的 ARF 转录因子。

分析这9个 *StARF*s 基因及其编码蛋白质结构结果表明,二级结构主要以无规则卷曲为主,9个 *StARF*s 蛋白均无跨膜结构位点和信号肽,这一结果与吴娟等^[36]分析彩色马铃薯 *ERF* 基因家族的结果类似。马铃薯 *StARF*s 基因上游启动子序列主要包括激素响应、生长与发育、胁迫响应三大类。推测9个马铃薯 *StARF*s 受到外界刺激或环境因素影响时,表达模式会发生变化,进而调控花青素的生物合成。另外,对保守基序和保守结构域的分析发现,亲缘关系相近的成员呈现出相似的保守基序,表明在物种进化过程中 ARF 存在一定的保守性;分析保守结构域发现,同一类群蛋白质的保守结构域在组成与排布上存在一定相似性,相较 AUX_IAA 结构域而言,B3 和 Auxin_resp 这2个结构域的保守度更高,这些高度保守的结构域,是 ARF 蛋白实现功能的关键位点^[37]。马铃薯 ARF 蛋白若缺失 AUX_IAA 结构域,其生理功能可能会受到影响。

本研究发现,在紫肉‘华颂66’马铃薯和白肉‘大西洋’马铃薯中,9个 *StARF*s 基因的表达在不同品种中存在显著差异,且同一个基因在同一马铃薯块茎发育的不同时期表达水平也不相同,*StARF6-3*、*StARF6-6*、*StARF11-1*、*StARF17-2*、*StARF18*、*StARF19-3* 和 *StARF22-6* 在花青素含量为0的白肉‘大西洋’马铃薯块茎中高表达;而 *StARF9-1* 和 *StARF11-3* 在花青素含量较高的紫肉‘华颂66’马铃薯块茎中表达显著高于白肉的‘大西洋’。*StARF9-1* 在‘华颂66’块茎中的表达模式变化趋势与花青素含量变化趋势一致,且启动子区域含有 MYB 结合位点响应元件,推测 *StARF9-1* 可能与乙烯响应因子(ERF)类似,通过与 MYB 转录因子共同作用,进而调控花青素合成关键的结构基因,影响花青素的合成代谢^[38]。今后应就 *StARF9-1* 调控紫肉马铃薯块茎花青素的合成方面继续深入研究,明确其调控机制。

4 结 论

通过对马铃薯全基因组分析,共筛选到55个马铃薯 ARF 基因,这些基因在系统发育上分为4个亚族,且在基因结构和蛋白质基序上表现出高度保守性,通过分析基因在不同时期不同品种中的表达模式,筛选出与马铃薯块茎中花青素合成有关的9个 *StARF*s; RNA-seq 分析和 qRT-PCR 验证结果发

现, *StARF9-1* 的表达模式与花青素含量变化趋势完全一致;因此,推测 *StARF9-1* 可能是参与马铃薯块茎花青素合成的关键基因。

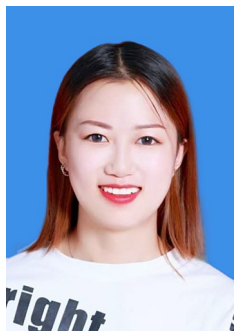
参考文献 References

- [1] Huang X H, Han B. The magic of genomics in creating hybrid potato[J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(8): 1237-1238
- [2] Gumul D, Areczuk A, Berski W, Juszczak L, Khachatryan G. Selected physicochemical properties of starch isolated from colored potatoes (*Solanum tuberosum* L.) as compared to starch from yellow flesh potatoes [J]. *Starch-Stärke*, 2022, 74(3-4): 158-166
- [3] 郭赵娟, 吴焕章. 彩色马铃薯营养价值与主要品种[J]. 现代农业科技, 2008(17): 107, 109
Guo Z J, Wu H Z. Nutritional value and main varieties of colored potato [J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2008(17): 107, 109 (in Chinese)
- [4] Brown C R, Culley D, Yang C P, Durst R, Wroldstad R. Variation of anthocyanin and carotenoid contents and associated antioxidant values in potato breeding lines [J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2005, 130(2): 174-180
- [5] Wu Y Q, Huang X, Zhang S S, Zhang C H, Yang H Y, Lyu L F, Li W L, Wu W L. Small RNA and degradome sequencing reveal the role of blackberry miRNAs in flavonoid and anthocyanin synthesis during fruit ripening[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 213: 892-901
- [6] Echeverry C, Arredondo F, Martinez M, Abin-Carriquiry J A, Midiwo J, Dajas F. Antioxidant activity, cellular bioavailability, and iron and calcium management of neuroprotective and noneuro protective flavones [J]. *Neurotoxicity Research*, 2015, 27(1): 31-42
- [7] 张丽, 范维娟, 郑臻颖, 杨俊, 康乐, 王红霞. 花青素糖基化、甲基化和酰基化修饰的研究现状[J]. 分子植物育种, 2023, 21(7): 2378-2387
Zhang L, Fan W J, Zheng Z Y, Yang J, Kang L, Wang H X. Research progress of anthocyanin glycosylation, methylation and acylation modification in plants[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2023, 21(7): 2378-2387 (in Chinese)
- [8] An J P, Wang X F, Li Y Y, Song L Q, Zhao L L, You C X, Hao Y J. EIN3-LIKE1, MYB1, and ETHYLENE RESPONSE FACTOR3 act in a regulatory loop that synergistically modulates ethylene biosynthesis and anthocyanin accumulation[J]. *Plant Physiology*, 2018, 178(2): 808-823
- [9] Simões C, Brasil Bizarri C H, da Silva Cordeiro L, Carvalho de Castro T, Machado Coutada L C, Ribeiro, Albarello N, Mansur E. Anthocyanin production in callus cultures of *Cleome rosea*: Modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC-DAD/ESIMS [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, 47(10): 895-903.
- [10] 李鲁华, 王忠妮, 任明见, 徐如宏. 谷类作物中植物激素调控花青素合成的研究进展[J]. 山地农业生物学报, 2022, 41(4): 62-66
Li L H, Wang Z N, Ren M J, Xu R H. Research advances of anthocyanin synthesis regulated by phytohormone in cereal crops [J]. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 2022, 41(4): 62-66 (in Chinese)
- [11] Kant S, Rothstein S. Auxin-responsive SAUR39 gene modulates auxin

- level in rice[J]. *Plant Signaling and Behavior*, 2009, 4(12): 1174-1175
- [12] Kant S, Bi Y M, Zhu T, Rothstein S J. *SAUR39* a small auxin-up RNA gene, acts as a negative regulator of auxin synthesis and transport in rice [J]. *Plant Physiology*, 2009, 151(2): 691-701
- [13] Park C H, AyeThwe A, Kim S J, Park J S, Arasu M V, Al-Dhabi N A, Park N I, Un P S. Effect of auxins on anthocyanin accumulation in hairy root cultures of Tartary buckwheat cultivar hokkai T10 [J]. *Natural Product Communications*, 2016, 11(9): 1283-1286
- [14] Li L H, Yang G P, Ren M J, Wang Z N, Peng Y S, Xu R H. Co-regulation of auxin and cytokinin in anthocyanin accumulation during natural development of purple wheat grains[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2021, 40(5): 1881-1893
- [15] Shi L, Li X, Fu Y, Li C J. Environmental stimuli and phytohormones in anthocyanin biosynthesis: A comprehensive review[J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, (2023-11-16). DOI: doi.org/10.3390/ijms242216415
- [16] Wang C K, Zhao Y W, Han P L, Yu J Q, Hao Y J, Xu Q, You C X, Hu D G. Auxin response factor gene *MdARF2* is involved in ABA signaling and salt stress response in apple[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2022, 21(8): 2264-2274
- [17] 宋顺, 黄东梅, 马蔚红, 王甲水, 周兆禧, 许奕. 生长素响应因子(ARF)与植物遗传育种[J]. 分子植物育种, 2018, 16(8): 2638-2645
- Song S, Huang D M, Ma W H, Wang J S, Zhou Z X, Xu Y. Auxin response factor (ARF) and plant genetic breeding[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(8): 2638-2645 (in Chinese)
- [18] 王其昕, 张凌馨, 钟妮娜, 熊王丹. 狗尾草ARF基因家族的鉴定与表达分析[J/OL]. 生物技术通报, 2024, 40(11):227-235
- Wang Q X, Zhang L X, Zhong N N, Xiong W D. Identification and expression analysis of the ARF gene family in *Setaria viridis* [J/OL]. *Biotechnology Bulletin*, 2024, 40(11): 227-235 (in Chinese)
- [19] 关晓溪, 胡海军, 吴亚男, 陆小燕. 生长素响应因子ARF研究进展[J]. 分子植物育种, 2016, 14(7): 1892-1897
- Guan X X, Hu H J, Wu Y N, Lu X Y. Research progress on auxin response factors ARF [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2016, 14(7): 1892-1897 (in Chinese)
- [20] Liu Y, Ma N, Gao Z Y, Hua Y G, Cao Y, Yin D P, Jia Q J, Wang D K. Systematic analysis of the ARF gene family in Fagopyrum dibotrys and its potential roles in stress tolerance[J]. *Genetica*, 2024, 152(4-6): 159-178
- [21] Ellis C M, Nagpal P, Young J C, Hagen G, Guilfoyle T J, Reed J W. Auxin response factor1 and auxin response factor 2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Development*, 2005, 132(20): 4563-4574
- [22] Guilfoyle T J, Hagen G. Auxin response factors[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10(5): 453-460
- [23] 张焕凯. 生长素响应因子ARF3通过组蛋白乙酰化修饰调控拟南芥顶端分生组织干细胞的维持[D]. 泰安: 山东农业大学, 2020
- Zhang H K. Auxin response factor ARF3 regulates the maintenance of stem cells in apical meristem of *Arabidopsis thaliana* through histone acetylation modification [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2020 (in Chinese)
- [24] 邓玉萍, 王倩, 张敏慧, 王茜, 陈静, 杨军, 邹建. 向日葵ARF基因家族鉴定及其在花发育中的功能分析[J/OL]. 植物遗传资源学报, 2024, 25(11): 1967-1979
- Deng Y P, Wang Q, Zhang M H, Wang Q, Chen J, Yang J, Zou J. Identification of the sunflower ARF gene family and prediction analysis of its function in flower development [J/OL]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2024, 25(11): 1967-1979 (in Chinese)
- [25] 曹丽茹, 叶飞宇, 李伟亚, 马晨晨, 庞芸芸, 梁小茵, 张新, 鲁晓民. 玉米生长素响应因子基因ZmARF10在干旱胁迫中的功能分析[J]. 华北农学报, 2024, 39(2): 1-10
- Cao L R, Ye F Y, Li W Y, Ma C C, Pang Y Y, Liang X H, Zhang X, Lu X M. Functional analysis of maize auxin response factor gene ZmARF10 under drought stress[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2024, 39(2): 1-10 (in Chinese)
- [26] 连少英, 张修引, 郭灿, 牛吉山, 姜晓君, 李磊, 张庆琛, 齐学礼, 倪永静. 小麦转录因子TaARF14基因的克隆及表达分析[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2024, 46(9): 74-84
- Lian S Y, Zhang X Y, Guo C, Niu J S, Jiang X J, Li L, Zhang Q C, Qi X L, Ni Y J. Cloning and expression analysis of wheat transcription factor gene TaARF14 [J]. *Journal of Southwest University: Natural Science Edition*, 2024, 46(9): 74-84 (in Chinese)
- [27] 杨程惠. 生长素响应基因StARF2和StARF5在马铃薯块茎发育中的功能分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022
- Yang C H. Functional analysis of auxin response genes StARF2 and StARF5 in potato tuber development [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2022 (in Chinese)
- [28] Song S W, Hao L Y, Zhao P, Xu Y, Zhong N Q, Zhang H J, Liu N. Genome-wide identification, expression profiling and evolutionary analysis of auxin response factor gene family in potato (*Solanum tuberosum* group phureja) [J/OL]. *Scientific Reports*, (2019-02-11). DOI:doi.org/10.1038/s41598-018-37923-7
- [29] Kolachevskaya O O, Lomin S N, Arkhipov D V, Romanov G A. Auxins in potato: Molecular aspects and emerging roles in tuber formation and stress resistance[J]. *Plant Cell Reports*, 2019, 38(6): 681-698
- [30] Okushima Y, Overvoorde P J, ARIMA K, Alonso J M, Chan A, Chang C, Ecker J R, Hughes B, Lui A, Nguyen D, Onodera C, Quach H, Smith A, Yu G X, Theologis A. Functional genomic analysis of the auxin response factor gene family members in *Arabidopsis thaliana*: Unique and overlapping functions of arf7 and arf19[J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(2): 444-463
- [31] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [32] Sun C Y, Fan K, Wang X, Liu H H, Guo N P, Liu W Y, Ye G X, Lin W W, Lin W X, Li Z W. The involvement of auxin response factor OsARF7 in positively regulating root development by mediating the expression of OsCR1 in rice (*Oryza sativa* L.) [J/OL]. *Plant Molecular Biology*, (2025-02-26). DOI:doi.org/10.1007/s11103-025-01570-0
- [33] Jin L F, Yarra R, Zhou L X, Cao H X. 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): 47-60
- [34] Wang C K, Han P L, Zhao Y W, Yu J Q, You C X, Hu D G, Hao Y J. Genome-wide analysis of auxin response factor (ARF) genes and functional identification of MdARF2 reveals the involvement in the regulation of anthocyanin accumulation in apple [J]. *New Zealand*

- Journal of Crop and Horticultural Science*, 2021, 49(2-3): 78-91
- [35] 梅梅, 王晓禹, 张晓林, 陆秀君. 植物生长素响应因子ARF研究进展[J]. 种子, 2017, 36(1): 47-54
- Mei M, Wang X Y, Zhang X L, Lu X J. Advances in plant auxin response factors[J]. *Seed*, 2017, 36(1): 47-54 (in Chinese)
- [36] 吴娟, 武小娟, 王沛捷, 谢锐, 聂虎帅, 李楠, 马艳红. 彩色马铃薯花青素合成相关ERF基因筛选及表达分析[J]. 生物技术通报, 2024, 40(9): 82-91
- Wu J, Wu X J, Wang P J, Xie R, Nie H S, Li N, Ma Y H. Screening and expression analysis of ERF genes related to anthocyanin synthesis in colored potato [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2024, 40 (9) : 82-91 (in Chinese)
- [37] 周省委, 陈璐, 顾旭鹏, 张韶珂, 初雷霞, 宋腾达, 万婕, 杨林林, 董诚明, 冯卫生. 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
- Zhou S W, Chen L, Gu X P, Zhang S K, Chu L X, Song T D, Wan J, Yang L L, Dong C M, Feng W S. Genome-wide identification and expression profile analysis of *Atropa belladonna* auxin response factor ARF gene family[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2024, 55 (21): 7419-7434 (in Chinese)
- [38] 刘菊, 张会灵, 张中华, 赵亚男, 张菊平. 乙烯响应因子(ERFs)在植物花青素合成中的调控作用[J]. 植物遗传资源学报, 2023, 24(3): 615-623
- Liu J, Zhang H L, Zhang Z H, Zhao Y N, Zhang J P. The regulation of ethylene responsive factors (ERFs) in plant anthocyanin synthesis [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(3): 615-623 (in Chinese)

责任编辑: 吕晓梅



第一作者简介: 马杰茹, 内蒙古农业大学农学院作物遗传育种专业硕士研究生。参与内蒙古自治区自然科学基金(2024QN03070)。曾在《江苏农业科学》和《西南农业学报》以共同第一作者发表论文2篇。2022—2023和2023—2024年获内蒙古自治区学业奖学金。



通讯作者简介: 聂虎帅, 中国农业大学农学博士、博士后, 现任内蒙古农业大学农学院讲师、种子科学与工程系副主任, 硕士生导师。研究方向: 马铃薯品质性状调控机制。主讲本科生《生物统计学》、《种子加工与贮藏》、研究生《农业信息学》等课程。主持中国博士后科学基金、内蒙古自治区自然科学基金青年基金、内蒙古自治区引进高层次人才科研支持等项目5项; 以第一作者或共同第一作者发表SCI论文9篇; 获国家发明专利授权3项; 荣获吉林省科学技术奖二等奖。