

杜梨不定根形成相关基因 *PbARRO-1* 的克隆及定量表达分析

王文成, 马春晖, 王 然, 高雅楠, 李晓宁, 李鼎立

(青岛农业大学 园艺学院, 青岛市园艺植物遗传改良与育种重点实验室, 山东 青岛 266109)

摘 要:以杜梨叶片为试材, 采用同源序列和 RACE 技术克隆了梨 *ARRO*(adventitious rooting related oxygenase) 基因, 并进行了基因的生物信息学和时空表达分析, 以期对梨属植物不定根产生研究提供帮助。结果表明: *PbARRO-1* 基因开放读码框全长 831 bp, 编码 276 个氨基酸, 相对分子量为 30.535 9 kD, 等电点 pI 为 5.53; 推导氨基酸序列同源性分析显示该基因与苹果、梅花、毛果杨等具有较高同源性, 其中苹果达到 92%。荧光实时定量 PCR 分析表明, 该基因在秋子梨根、茎、叶中均有表达, 叶片中表达量初期较高, 后期较低; 茎中表达量则呈现先升高后降低的趋势, 在第 15 天达到峰值, 推测 *PbARRO-1* 基因与茎上不定根的形成密切相关。

关键词:杜梨; 不定根; *PbARRO*; 基因克隆; 表达分析

中图分类号:S 661.204⁺.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)12-0097-06

砧木对果树生产至关重要, 可有效提高果树对逆境的适应性和提升果实品质, 同时矮化砧木的矮化作用还是省力化栽培的有效手段。我国是梨属植物(*Pyrus* spp.) 的起源中心之一, 种质资源非常丰富, 现阶段我国梨种苗繁育过程中使用的砧木基本来自野生资源种子培育获得的实生苗^[1-3], 砧木基因型差异较大, 直接导致了砧木和种苗的一致性较差, 限制了梨产业的发展。原因主要是我国梨野生资源无性繁殖中不定根再生能力差, 而引进的西方梨砧木品种或资源亦因根再生或亲和性的问题难以广泛应用, 故如何解决砧木无性繁殖中根再生问题成为梨属植物砧木研究亟待解决的问题之一。现阶段, 对梨属植物无性繁殖研究主要集中在扦插^[4-5]、压条和组织培养^[6-7]等方面, 内容包括培养基质的优化^[6,8]、生长调节剂种类的选择和配比^[9], 以及一些

添加剂的应用^[10]等, 这些研究改良和促进了繁殖技术发展, 但效果依旧不理想, 根再生能力差依旧困扰着梨砧木的无性繁殖育苗。

基因工程技术可以实现基因的定向转移, 是快速解决生产问题的有效手段。不定根发生相关加氧酶基因(adventitious rooting related oxygenase, *ARRO*) 是不定根发生起始阶段的特异表达基因, 对不定根发生的起始阶段有重要作用^[11-13], Southern blot 显示该基因存在种属特异性^[13], 且其功能和表达受基因型影响^[14-15]。现在 *ARRO* 基因仅在少数植物中进行了克隆, 与不定根再生之间的关系仍不是很清楚, 为进一步确定 *ARRO* 基因的功能, 解决梨砧木繁殖问题, 该研究克隆了杜梨 *ARRO* 基因, 并进行了生物信息学和表达分析, 以期初步确定杜梨 *ARRO* 基因功能, 为梨属植物不定根研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试杜梨(*Pyrus betuli folia* Bunge.) 由青岛农业大学现代农业示范园梨种质资源圃提供。*ARRO-1* 基因的时空表达分析采用具有高效再生能力的秋子梨(*Pyrus ussuriensis*) 为试材^[6], 其中继代培养基为 MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+IBA 0.3 mg·L⁻¹+30 g·L⁻¹蔗糖+7 g·L⁻¹琼脂; 不定根诱导培养基为 1/2MS+IBA 0.5 mg·L⁻¹+蔗糖 30 g·L⁻¹+琼

第一作者简介:王文成(1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向为果树种质资源与分子育种。E-mail:2542633288@qq.com.

责任作者:李鼎立(1979-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为果树种质资源与分子育种。E-mail:qauldl@163.com.

基金项目:山东省高等学校科技计划资助项目(J14LF05); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金资助项目(BS2011NY007); 国家自然科学基金青年基金资助项目(31401832); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(CARS-29)。

收稿日期:2017-02-07

脂 $7.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。培养条件: pH 5.8, 室温 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光照时长 $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$, 光照强度 $3\,000 \text{ lx}$ 。根据秋子梨不定根再生过程, 分别在 0、5、10、15、20、25 d 选取再生过程中的根、茎、叶, 液氮冻存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 杜梨的总 RNA 提取与 cDNA 第 1 条链的合成 植物总 RNA 的抽提采用北京原平皓生物技术有限公司“EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒”进行, Nano Drop 2000 超微量分光光度计 (Thermo Fisher Scientific) 测定和调整 RNA 浓度。cDNA 合成参照 MBI 公司 Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 使用说明书进行, 反应体系为 $20 \mu\text{L}$ 。

1.2.2 杜梨 ARRO-1 基因 cDNA 全长的克隆 杜梨 ARRO-1 基因的克隆采用同源序列克隆和 RACE 技术相结合的方法。首先依据已经登陆 GenBank 植物 ARRO-1 基因序列的保守区来进行引物设计, 主要参考蔷薇科植物苹果和梅花的全长 cDNA 序列, 其中苹果 (AJ225045.1)、梅花 (AB218719.1)。引物由生工生物工程股份有限公司合成, 分别为 SgL: tcggagatgaaatcagtggtca, SgR: caccagcttgtagttttgtgga。杜梨 ARRO-1 5' 端和 3' 端的克隆采用 Roche 5/3 RACE kit 方法进行, 5' 端引物为 SP1: GTGGGATCATGTGGTTCA, SP2: TCTGAATTGTGGGTTTGT; 3' 端引物为: GTGGGATCATGTGGTTCA。

1.2.3 *PbARRO-1* 基因的生物信息学分析 杜梨 *PbARRO-1* 基因全长 cDNA 序列分析采用 Blast 程序比对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); 开放阅读框采用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 在线查找分析; 利用 Conserved Domains (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 进行蛋白质的保守结构域分析; 利用 Prot Param tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白质理化性质; 利用 CBS Prediction Servers (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) 对编码蛋白质的信号肽、蛋白质导肽进行分析; 利用 Gen Script (<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 进行亚细胞定位预测; 利用 DNA star 软件进

行蛋白质二级结构分析; 利用 SWISS-MODEL (<https://www.swissmodel.expasy.org/interactive>) 进行蛋白质三级结构预测; 利用 DNA MAN V6 软件进行多重序列比较和系统进化树的构建; 其它植物 ARRO 基因氨基酸序列来自 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)。

1.2.4 *PbARRO-1* 的表达分析 通过实时荧光定量 PCR 技术对秋子梨试管苗不同部位和不定根再生不同发育时期 *PbARRO-1* 基因的表达情况进行分析, 引物序列为 RT-L: GCGGGCAGTGGGTACATG, RT-R: GCCCCAAAGCTTCGTAGAGA。基因的相对表达量按 LIVAK 等^[16]的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 *PbARRO-1* 基因序列及推导氨基酸序列

经同源引物扩增和 RACE 获取 5' 端和 3' 端后, 利用 Lasergene 拼接后获得一条 1 050 bp 的核酸序列 (图 1), Blastn 分析发现该基因与苹果 ARRO 基因高度同源。Conserved Domains 保守结构域分析表明 *PbARRO-1* 推导的氨基酸序列属于 2OG-Fe(II) 加氧酶家族基因, 包含 DIOX-N、2OG-FeII-Oxy 2 个结构域, 分别属于 DIOX-N、2OG-FeII-Oxy 超家族。DIOX-N 的结构域位于 21~110 位置, 2OG-FeII-Oxy 结构域位于 164~264 位置。ORF finder 分析表明, 该基因开放读码框 ORF 区为 831 bp, 命名为 *PbARRO-1*, 编码 276 个氨基酸, 其中起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TGA (图 2)。

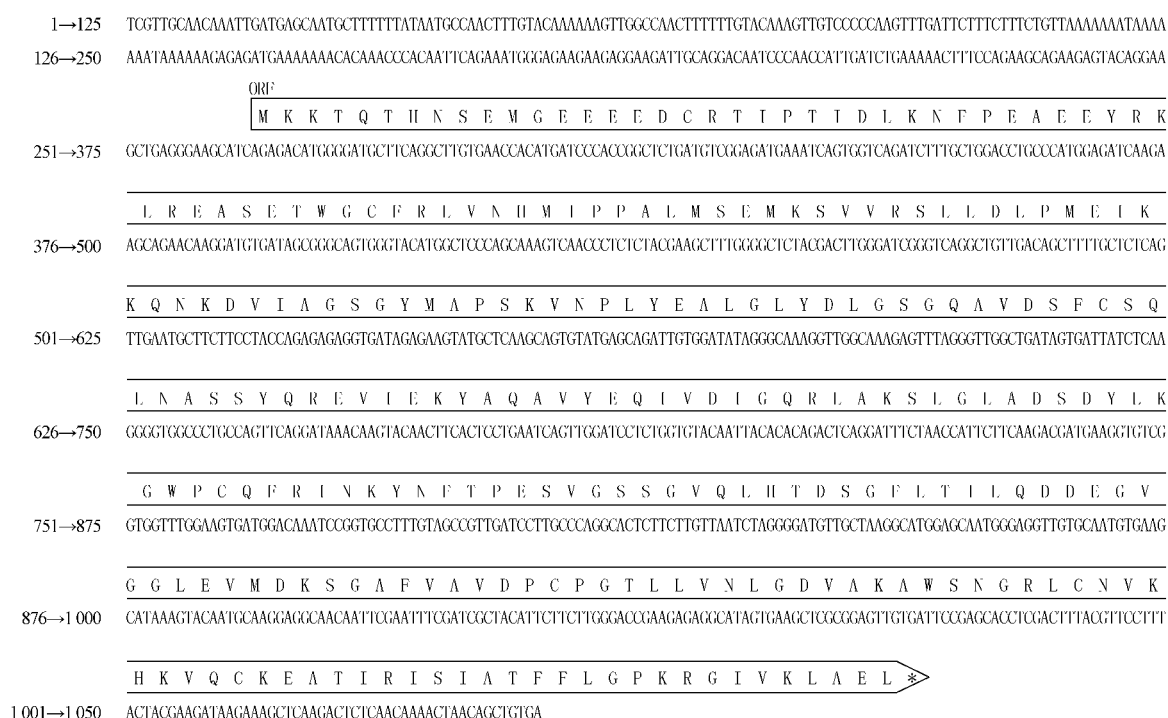
2.2 *PbARRO* 基因编码蛋白质理化性质分析

用 Prot Param tool 在线软件对 *PbARRO-1* 基因编码蛋白质的理化性质进行预测, 其化学式为 $\text{C}_{1\,349}\text{H}_{2\,143}\text{N}_{363}\text{O}_{413}\text{S}_{15}$, 总数原子数为 4 283, 分子量为 30.535 9 kD, 氨基酸残基数为 278, 理论等电点 pI 为 5.53, 带负电荷的残基 (天冬氨酸 Asp+谷氨酸 Glu) 数为 36, 带正电荷的残基 (精氨酸 Arg+赖氨酸 Lys) 数为 31, 不稳定指数 (II) 为 4.08, 表明 *PbARRO* 编码的蛋白质稳定, 脂肪系数为 85.83, 总平均疏水性为 -0.261。



图 1 *PbARRO-1* 的结构域分析

Fig. 1 Analysis of conserved domain of *PbARRO-1* gene

图2 *PbARRO* 基因的 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *PbARRO*2.3 *PbARRO-1* 基因编码蛋白质结构分析

利用 Lasergene 对 *PbARRO-1* 基因推导的氨基酸进行了分析(图 3),发现该基因的 α 螺旋、 β 折叠、扭曲结构、无规则卷曲、柔性区域等基本上均匀分布,结果同时显示该蛋白质为可溶性蛋白质,且存在跨膜结构。采用 Target P1.1 Server 预测 *PbARRO* 的导肽结果,发现该氨基酸序列不存在叶绿体转运

肽(CTP),线粒体目标肽(MTP)和分泌途径信号肽(SP)。使用 Signal P 3.0 预测 *PbARRO* 为非分泌蛋白质,说明该蛋白质在细胞质中合成后,不能进行蛋白质转运。Sub Loc v1.0 进行亚细胞定位,推测 *PbARRO* 蛋白质最可能定位于细胞质上。利用 SWISS-MODEL 对 *PbARRO-1* 蛋白质进行了三级结构预测,结果见图 4。

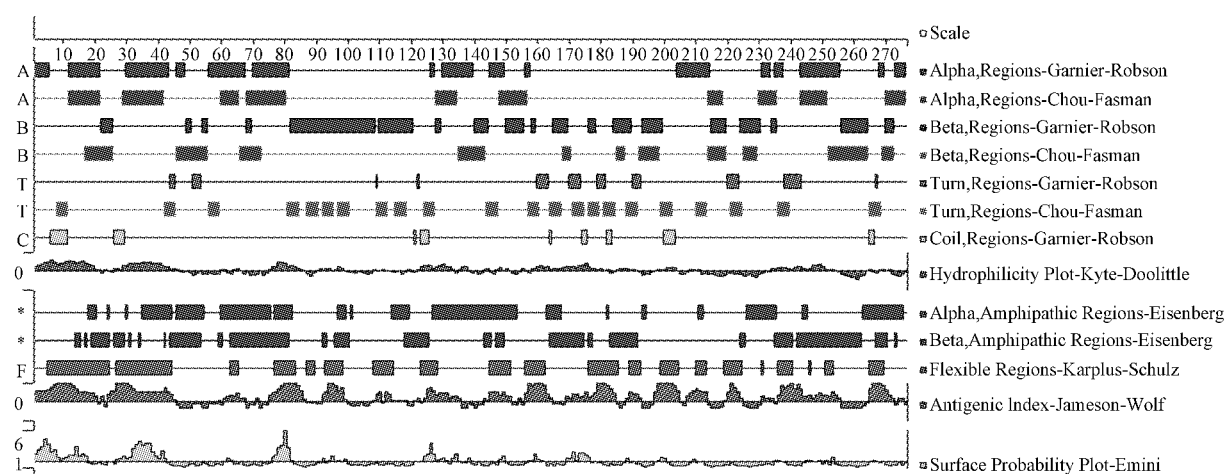
图3 *PbARRO-1* 蛋白质二级结构分析Fig. 3 Analysis of protein secondary structure of *PbARRO-1*



Fig. 4 The tertiary structure of PbARRO-1 protein was predicted with SWISS-MODEL

根据 *PbARRO-1* 基因编码的氨基酸序列进行同源性分析,结果其氨基酸序列和苹果(*Malus domestica*)、梅花(*Prunus mume*)、可可树(*Theobroma cacao*)、毛果杨(*Populus trichocarpa*)、牡丹(*Paeonia suffruticosa*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)等具有较高的同源性,氨基酸序列同源性为 59%~92%。将上述植物的 ARRO 序列进行多重对比(图 5),构建系统进化树(图 6),结果显示 *PbARRO-1* 基因的氨基酸序列与苹果的同源性最高,达到 92%,其次为梅花、可可树,同源性分别为 73%、70%,而与马铃薯、拟南芥的亲缘关系比较远。

PsARROMGVHLLDLDGQQ..SRLLEACENGGCFIVNNH..SRLNLSGWSFFLILAK	58
ScARROMTEIENSVVHLDGDFRQ..SSNLIWACENGGCFILNCHILVSNLNNHVFILFLILAK	64
TcARROMDIAQRIRHLDSDGQQ..YBLLKKSGGPGCFILNHRF..PLELGMNMYVRLILDMER	62
PcARROMGKSGVHLDLHDGQQ..YBARRPCVSGGCFIVNNH..SLPLMAARRVRLILDMER	61
MdARROMGEGEDCRTHHLDKRRVDAEYRRLERENSHDGGCFIVNNH..FPPLGEMHVSRLILDMER	68
PmARROMGGEGDMIIHLDQKRLDAEYRRLERENSHDGGCFILNHR..PLALNLMARVRLILDMER	67
AcARROMGLNGVITDILDEEVSUNILNG..SLERENSHDGGCFIVNNH..SLSLNMMHVFILFLIPYV	66
PbARRO	MMRTQTNNSEMGEZEDCRTHHLDKRRVDAEYRRLERENSHDGGCFILNHR..FPPLGEMHVSRLILDMER	78
Consensus	e ip idl fp q Y KLEeeseegcfivnh i plalm emk vrralldmpeik	
PsARRO	QRVTVAGSGVAFKFNKSYEALGLHMASSGEGFCMDLDPFCEQITLTVKPHNELAMHIGLNRKEMHVS.	137
ScARRO	KPNHVLASGVAFKFNKSYEALGLHMASSCFEDLDECTQCFPTKTHKPLANGHLMHILNRSLSLHFN.	143
TcARRO	RPHCVLASGVAFKFNKSYEALGLHMASSCHNCSGLDTPSCTDCHYCHHILHMLGAKLAEHVS.	141
PcARRO	KPNHVLASGVAFKFNKSYEALGLHMASSCHETPCSGLDTPYGVVEMTHPHHGLAMTANKLAEHVS.	140
MdARRO	KQKCTVAGSGVAFKKNVHYEALGLHMLGSGGKESFCRRLASVQVTVKQAVYEQIVIGKRLKGLADS	148
PmARRO	QQKCTVAGSGVAFKKNVHYEALGLHMLGSGEPANTFCSKEDASHKPLTSVAVQVQIVIGHKRLAESLGENV	147
AcARRO	VSRITVAGSGVAFKFNKSYEALGLHMASSPHDPCDLDAALQKINLVYKNGINGLATVAKRLKLSVAVET	146
PbARRO	KQKCTVAGSGVAFKFNKSYEALGLHMLGSGKESFCRRLASVQVTVKQAVYEQIVIGHKRLAESLADS	158
Consensus	krnkdviaqsgynapskvnplyealqlqym s qav fcsqldasp qre lkyqaei elindig klacsqgl	
PsARRO	MLESGVCCFRINKKSYFPGSGFVHHTSCFSLTILQCEHSGLDVEKQKQVAVDGMHVSQALGLDAVHS	215
ScARRO	VSEHNGCCFRINKKSYFPGVSGSVHTHSCFSLTILQCEHSGLDVKKNSQGVAVDGMHVSQALGLDGVHS	222
TcARRO	VYCKNGCCFRINKKSYFPGVSGSVHTHSCFSLTILQCEHSGLDVKKNSQGVAVDGLSGALGLDAVHS	220
PcARRO	MLESGVCCFRINKKSYFPGSGFVHHTSCFSLTILQCEHSGLDVKKNSQGVAVDGMHVSQALGLDAVHS	219
MdARRO	VYLNKNGCCFRINKKSYFPGSGSVCHHTSCFSLTILQCEHSGLDVKKNSQGVAVDGMHVSQALGLDAVHS	227
PmARRO	VYLNKNGCCFRINKKSYFPGSGSVCHHTSCFSLTILQCEHSGLDVKKNSQGVAVDGMHVSQALGLDAVHS	226
AcARRO	QFFRNGCCFRINKKSYFPGSVHKLVTHTSCFSLTILQCEHSGLDVKKNSQGVAVDGLSGALGLDAVHS	226
PbARRO	VYLNKNGCCFRINKKSYFPGSGSVCHHTSCFSLTILQCEHSGLDVKKNSQGVAVDGMHVSQALGLDAVHS	237
Consensus	d fkgwpcqfrinkynfcpesvqsgvgqhtdsgfilitqgdenvgqlwvnds q fvavdp pcslvnlqdv aww	
PsARRO	NGRLGVKHHVQVGHVPSHSGVSGHRRG.LVAAEELVIAENHLLFVPTTDFSRIRISSSHAGENHLLVRAHA	294
ScARRO	NGRLGVKHHVGHVPSHSGVSGHRRDT.AVEPTFELVIAENHLLFVPTTDFSRIRISLSTVAGETLLMRLNL	301
TcARRO	NGRLGVKHHVGHVPSHSGVSGHRRG.LVAFPEPFLVIAENHLLFVPTTDFSRIRISLSTVAGETLLMRLNL	299
PcARRO	NGRLGVKHHVGHVPSHSGVSGHRRG.LVAFPEPFLVIAENHLLFVPTTDFSRIRISLSTVAGETLLMRLNL	297
MdARRO	NGRLGVKHHVGHVPSHSGVSGHRRG.LVAFPEPFLVIAENHLLFVPTTDFSRIRISLSTVAGETLLMRLNL	307
PmARRO	NGRLGVKHHVGHVPSHSGVSGHRRG.LVAFPEPFLVIAENHLLFVPTTDFSRIRISLSTVAGETLLMRLNL	306
AcARRO	NGRLGVKHHVGHVPSHSGVSGHRRG.LVAFPEPFLVIAENHLLFVPTTDFSRIRISLSTVAGETLLMRLNL	305
PbARRO	NGRLGVKHHVGHVPSHSGVSGHRRG.LVAFPEPFLVIAENHLLFVPTTDFSRIRISLSTVAGETLLMRLNL	276
Consensus	ngrlgvkhvhwgkcatirvsiatfllqpkd veappeled ehprlyvntfyedyrklristklqageal i r	
PsARRO	IKKQ	298
ScARRO	301
TcARRO	299
PcARRO	297
MdARRO	307
PmARRO	S...	307
AcARRO	LEK.	308
PbARRO	276
Consensus		

Note: PsARRO. *Paesia suffruticosa* (KJ620008); StARRO. *Solanum tuberosum* (XP_006365007.1); TcARRO. *Theobroma cacao* (XP_007049001.1); PtARRO. *Populus trichocarpa* (XP_002317640.2); MdARRO. *Malus domestica* (CAA12386.1); PmARRO. *Prunus mume* (BAE48659.1); AtARRO. *Arabidopsis thaliana* (NP_172865). The same below.

Fig. 5 Multiple alignments between the deduced amino acid sequence of *PbARRO-1* and other plant *ARRO*

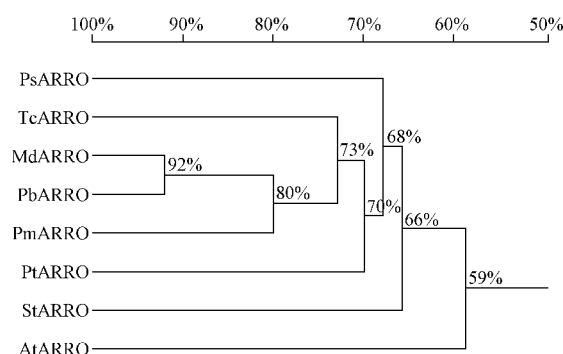


图6 植物 ARRO 基因推导的氨基酸序列的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of the deduced amino acid sequence of plant ARRO

2.5 *PbARRO-1* 基因在秋子梨不定根诱导过程中的时空表达分析

为更好进行 *PbARRO-1* 基因的功能分析,利用青岛农业大学梨育种实验室构建的秋子梨高效再生体系进行了该基因的时空表达分析。结果表明 *PbARRO-1* 基因在秋子梨试管苗根、茎、叶中均有表达,但相对表达量存在差异,由高到低分别为茎、根和叶(图 7)。

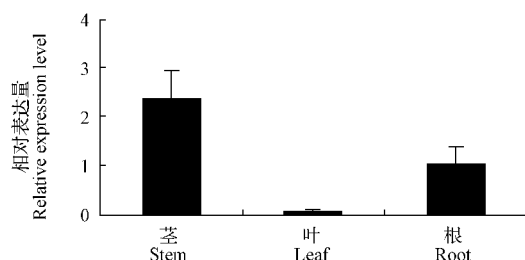


图7 *PbARRO-1* 基因在秋子梨试管苗根、茎、叶中的相对表达量

Fig. 7 Relative expression level of *PbARRO-1* gene in roots, stems, leaves of *Pyrus ussuriensis*

对秋子梨不定根诱导过程中 *PbARRO-1* 基因的相对表达量分析表明, *PbARRO-1* 基因在不定芽茎中相对表达量呈现先升高后降低的趋势,其中在 5、10、15 d 表达量最高,正是不定根根原基形成和快速生长期,说明该基因与秋子梨的不定根再生密切相关(图 8),后期随着根生长的减缓,基因表达量逐渐降低;叶片中则与茎中不同,趋势表现为前期较高,后期较低的趋势,在诱导 5 d 时表达量达到最高水平(图 9)。

3 讨论

我国东方梨砧木的繁殖一直是制约梨产业健康发展的重要限制因子之一,特别是一些适应性强、具

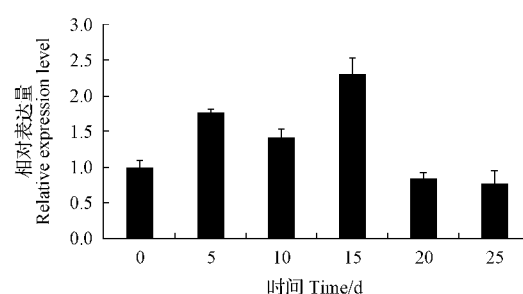


图8 *PbARRO-1* 基因在秋子梨茎中的相对表达量

Fig. 8 Relative expression level of *PbARRO-1* in stem of *Pyrus ussuriensis*

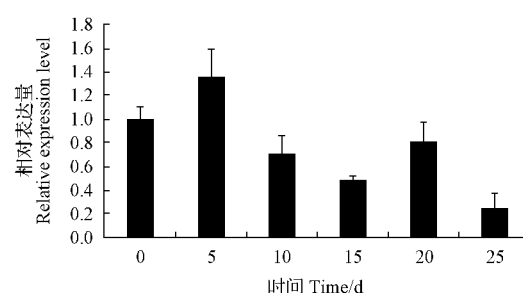


图9 *PbARRO-1* 基因在秋子梨叶中的相对表达量

Fig. 9 Relative expression level of *PbARRO-1* in leaves of *Pyrus ussuriensis*

有矮化效果的砧木资源,因其无性繁殖系数低导致其难以在生产上广泛应用^[2]。

不定根发生相关加氧酶基因 *ARRO-1* 与植物不定根的产生关系密切,属于 2-ODD 基因家族,已在多种木本植物中进行了克隆。研究发现 *ARRO-1* 基因定位在细胞质膜上,编码一种依赖含氧酸的双加氧酶,这种双加氧酶参与羟基化和环氧化催化反应,并参与各种不同的生物合成途径^[17],推测其在木本植物不定根产生的起始阶段具有重要作用^[12],该基因的克隆为木本植物不定根诱导提供了新的途径。该研究在梨属植物中克隆到一个新的 *ARRO-1* 基因,该基因存在结构域 DIOX-N, 2OG-FeII-Oxy, 与苹果^[13-14]、牡丹^[18]相同,氨基酸序列的同源性分析显示该基因与苹果 *ARRO-1* 基因亲缘关系最近,在序列结构上推测梨和苹果 *PbARRO-1* 基因存在功能的相似性。木本植物不定根的诱导过程中^[18] *ARRO-1* 基因呈上调表达^[11-14], BUTLER 等^[13] 研究发现其在生长素 IBA 和 IAA 的诱导下响应明显,但 2,4-D 则不明显,但 LI 等^[14] 则发现在 IBA 和 NAA 诱导上调表达明显,而 IAA 则不明显,显示该基因功能存在种属特异性,推测基因的功能可能和激素的动态平衡有关,但其是否仅与植物内源激素的动态平衡相关

仍待探讨。该研究发现梨 *ARRO-1* 基因在 IBA 的诱导下,在秋子梨试管苗茎和叶中前期表达量较高,且在茎中随根的诱导再生过程表达水平逐渐提高,推测 *ARRO-1* 基因的上调表达促进了茎上不定根的产生,该结果和牡丹试管苗茎中 *PsARRO-1* 基因表达不同,后者试管苗茎中基因的表达量相对平稳。

植物 *ARRO-1* 基因的克隆和表达分析为梨属植物不定根基因工程研究提供了新的方向,该研究完成了杜梨 *ARRO-1* 基因的克隆,并对其不定根诱导过程中的相对表达量进行了分析,发现该基因对生长素 IBA 响应,且在不定根根原基形成和快速生长期表达量最高,研究的开展为梨属植物砧木无性繁殖的研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 李志霞,聂继云,李静,等. 梨产业发展分析与建议[J]. 中国南方果树,2014,43(5):144-147.
- [2] 张绍铃. 梨学[M]. 北京:中国农业出版社,2013.
- [3] 沙守峰,张绍铃,李俊才. 梨矮化砧木的选育及其应用研究进展[J]. 北方园艺,2009(8):140-143.
- [4] 薛明超,马春晖,李鼎立,等. 不同梨砧木嫩枝扦插繁殖技术研究[J]. 中国果树,2015(3):227-227.
- [5] 徐凌飞,刘亚杰,李慧,等. 梨矮化砧木云南榉梓硬枝扦插繁殖试验[J]. 北方园艺,2011(17):54-55.
- [6] 王德芬,张梅,李鼎立,等. 秋子梨叶片高效再生体系的构建[J]. 北方园艺,2016(4):97-101.
- [7] 周佳红,邢才华,曹慧,等. 秋子梨茎段薄层细胞培养再生初探[J]. 北方园艺,2015(6):95-98.
- [8] 王乔春,SVENSSON M. 培养基种类对梨试管苗茎增殖的影响[J]. 四川农业大学学报,1993(1):77-81.
- [9] 杨芳. 秋子梨组织培养与离体保存的研究[D]. 北京:中国农业大学,2007.
- [10] 付镇芳,孟颖光,张朝红,等. ‘砀山酥’梨叶片再生体系的建立[J]. 北方园艺,2011(14):98-101.
- [11] SMOLKA A, WELANDER M, OLSSON P, et al. Involvement of the *ARRO-1* gene in adventitious root formation in apple[J]. Plant Science, 2009, 177(6):710-715.
- [12] 贺丹,李睿,纪思羽,等. 牡丹不定根形成相关基因 *PsARRO-1* 的克隆及表达分析[J]. 植物生理学报,2014(8):1151-1158.
- [13] BUTLER E D, GALLAGHER T F. Characterization of auxin-induced *ARRO-1* expression in the primary root of *Malus domestica* [J]. Journal of Experimental Botany, 2000, 51(351):1765-1766.
- [14] LI T Y, WANG Y, ZHANG X Z, et al. Isolation and characterization of *ARRO-1* genes from apple rootstocks in response to auxin treatment[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2012, 30(6):1408-1414.
- [15] SEDIRA M, BUTLER E, GALLAGHER T, et al. Verification of auxin-induced gene expression during adventitious rooting in rol B-transformed and untransformed apple Jork[J]. Plant Science, 2005, 168(5):1193-1198.
- [16] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [J]. Method, 2001, 25(4):402-408.
- [17] 吴静. 牡丹不定根形成相关基因 *PSARRO-1* 的克隆与序列分析[D]. 郑州:河南农业大学,2010.
- [18] KLERK G J D, KEPPEL M, BRUGGE J T, et al. Timing of the phases in adventitious root formation in apple microcuttings[J]. Journal of Experimental Botany, 1995, 46(289):965-972.

Cloning and Expression Analysis of Adventitious Rooting Related Gene *PbARRO-1* of *Pyrus betuli folia* Bunge.

WANG Wencheng, MA Chunhui, WANG Ran, GAO Yanan, LI Xiaoning, LI Dingli

(College of Horticulture, Qingdao Agricultural University/Qingdao Key Laboratory of Genetic Improvement and Breeding in Horticultural Plants, Qingdao, Shandong 266109)

Abstract: The leaves of *Pyrus betuli folia* were used as the materials, a novel adventitious rooting related oxygenase gene (*ARRO* gene) was cloned by Homology-based and RACE technology, and then analyzed with bioinformatics methods and quantitative real-time RT-PCR technology. The study laid a foundation for adventitious root formation studying. The results showed that the open reading frame of *PbARRO-1* was 831 bp and encodes 276 amino acids, the molecular weight and isoelectric point of the protein was 30.535 9 kD and 5.53 respectively. Amino acid sequence homology analysis showed that the deduced amino acid sequence of *PbARRO-1* gene had 92% homologies with *Malus domestica* and 80% homologies with *Prunus mume*. Quantitative real-time RT-PCR analysis indicated that *PbARRO-1* gene expressed in roots, stems, leaves of *Pyrus ussuriensis*, in leaves its expression level was higher at early stage and lower in later stage; in stems its expression level increased at first and then decreased, and reached peak value at 15 days. The conclusion inferred that *PbARRO-1* gene was closely related to root induction.

Keywords: *Pyrus betuli folia*; adventitious rooting; *PbARRO-1*; gene cloning; expression analysis