

研究报告

Research Report

灯盏花 *ARCI* 基因的克隆及序列分析

陈莫^{1,2} 张薇³ 胡彦如⁴ 谢世清^{1,2} 范伟² 杨生超^{1,2*}

1 云南农业大学农学与生物技术学院, 昆明, 650201; 2 西南中药材种质创新与利用国家地方联合工程研究中心, 昆明, 650201; 3 红河学院, 蒙自, 661100; 4 中国科学院西双版纳热带植物园, 昆明, 650223

* 通讯作者, shengchaoyang@163.com

摘 要 本研究对灯盏花 *ARCI* 基因进行克隆及序列分析。根据实验室前期预测灯盏花的序列设计引物, 以灯盏花花蕾为材料提取 RNA 作为模板, 通过反转录(RT-PCR)扩增得到 cDNA, 作为 PCR 扩增的模板, 将扩增的 *ARCI* 基因连接到 pMD19-T 上, 阳性克隆经 PCR 检测后进行测序结果分析, 得到 2 199 bp 的核酸序列。序列分析结果表明, 该基因存在 2 个结构域, 不存在内含子, 编码 733 个氨基酸, 其核酸序列的同源性达到 64% 以上, 氨基酸序列同源性达 61%。本研究首次从灯盏花中克隆出 *ARCI* 基因, 为后期研究该基因提供理论基础。

关键词 灯盏花, *ARCI* 基因, RT-PCR, 基因克隆, 序列分析

Cloning and Sequence Analysis of *ARCI* Gene from *Erigeron breviscapus*

Chen Mo^{1,2} Zhang Wei³ Hu Yanru⁴ Xie Shiqing^{1,2} Fan Wei² Yang Shengchao^{1,2*}

1 College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming, 650201; 2 National and Local Joint Engineering Research Center on Gemplasm Utilization & Innovation of Chinese Medicinal Materials in Southwest, Kunming, 650201; 3 Honghe University, Mengzi, 661100; 4 Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming, 650223

* Corresponding author, shengchaoyang@163.com

DOI: 10.13271/j.mpb.015.004389

Abstract In this research, we cloned and analyzed the sequence of *ARCI* gene from *Erigeron breviscapus*. We designed the primers based on the sequences predicted in previous experiment. We used *Erigeron breviscapus* buds as materials to extract RNA to be a template, obtained cDNA through RT-PCR amplification, and connected the amplified *ARCI* gene into pMD19-T. We used PCR to detect the positive clone and obtained 2 199 bp nucleic acid sequence. The results of sequence analysis showed that the *ARCI* gene had two domains without intron, encoding 733 amino acids. The homology of the nucleic acid sequence was more than 64% and the amino acid sequence was 61%. The *ARCI* gene was cloned from *Erigeron breviscapus* for the first time in this research, which might provide a theoretical basis for further study of this gene.

Keywords *Erigeron breviscapus*, *ARCI* gene, RT-PCR, Gene cloning, Sequence analysis

自交不亲和(self-incompatibility, SI)是指在同一时期正常开花的雌雄同株的植物, 当自身的花粉落到自生的柱头上时花粉不能正常萌发, 最终导致授粉失败的现象。自交不亲和有助于抑制自交, 促进杂交, 有效地防止了生物多样性的减少。按遗传控制方式分为孢子体型自交不亲和和配子体型自交不亲和, 其中, 孢子体型自交不亲和主要存在于十字花科、旋花科、菊科。孢子体型自交不亲和信号传导通路中涉及一系列信号传递元件。

ARC1 (arm repeat containing 1) 臂重复蛋白是孢子体型自交不亲和过程中信号传递路径中的一个中间受体, 参与自交不亲和信号的传递。芸薹属植物的

ARC1 (arm repeat containing 1) 臂重复蛋白是孢子体型自交不亲和过程中信号传递路径中的一个中间受体, 参与自交不亲和信号的传递。芸薹属植物的

基金项目 本研究由国家自然科学基金项目(81760692; 81503184)和 2016 云南省中青年学术和技术带头人后备人才项目共同资助

引用格式 Chen M., Zhang W., Hu Y.R., Xie S.Q., Fan W., and Yang S.C., 2017, Cloning and sequence analysis of *ARCI* gene from *Erigeron breviscapus*, Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding), 15(11): 4389-4395 (陈莫, 张薇, 胡彦如, 谢世清, 范伟, 杨生超, 2017, 灯盏花 *ARCI* 基因的克隆及序列分析, 分子植物育种, 15(11): 4389-4395)

孢子体型自交不亲和的信号传递路径是从花粉外被上的 SCR 配体与 SRK 受体的胞外域相结合,从而激活胞内结构域。同时 MLPK 也被 SRK 激酶域磷酸化,磷酸化的 SRK、MLPK,通过某些基序与 *ARCI* 相互作用,使 *ARCI* 磷酸化(朱利泉和周燕, 2015),最后通过磷酸化、泛素化的形式将信号传递到下游包括 EXO70A1 和 MOD 等信号元件上,最终导致自交不亲和的发生。*ARCI* 在信号传递中作为关键元件之一决定信号的传递与否。芸薹属中 *ARCI* 作为 SRK 下游的受体(Gu et al., 1998)。随着对 *ARCI* 不断的深入研究,在拟南芥中分离出 *ARCI* 基因,并将 *ARCI* 和 *SCRb-SRKb* 基因对共同转化进自交亲和的生态型拟南芥中导致其自交不亲和的结果加强(Indriolo et al., 2014)。但是,关于孢子体型自交的研究大多集中在十字花科芸薹属植物上,其他科的植物的研究较为稀少。

灯盏花(*Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz.) 属菊科飞蓬属多年生草本植物,以全株入药,对治疗心脑血管疾病有显著功效,云南的资源总量约占全国总产量的 97%,是云南省重点开发的天然药物品种。赵峥等(2013)通过对灯盏花的有性生殖研究证明灯盏花具有自交不亲和性。Zhang 等(2015)通过对自交和杂交处理后的花序进行比较转录组分析,MLPK、*ARCI*、*CaM*、*Exo70A1* 等自交不亲和相关的差异表达基因被筛选出,这些基因可能参与灯盏花的自交不亲和反应。本研究利用 RT-PCR 克隆了 *ARCI* 基因,再利用 MEGA 等多种生物信息学工具对 *ARCI* 基因开放阅读框、同源性及系统进化树进行分析,意在分析菊科自交不亲和信号传递路径中相关蛋白的功能作用,为菊科自交不亲和信号传递机理的研究提供理论基础。

1 结果与分析

1.1 总 RNA 的提取及检测

以灯盏花花蕾为材料提取总 RNA,更换新的 1× TAE 缓冲液,0.1%的琼脂糖凝胶进行短时间的电泳检测,结果表明 28S rRNA、18S rRNA 和 5S rRNA 的条带清晰,且 28S 的量接近 18S 的 2 倍(图 1),说明提取的 RNA 具有完整性, A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 之间,证明 RNA 的纯度可以用于后续进一步的研究。

1.2 RT-PCR 扩增

cDNA 为模板是通过总 RNA 反转录得到,用 P1 和 P2 对 *ARCI* 进行 PCR 扩增。扩增产物经凝胶电泳

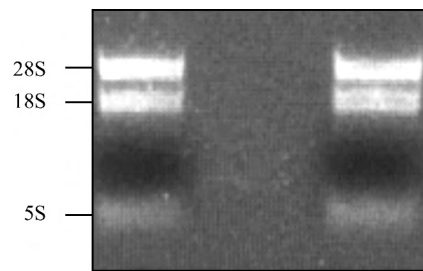


图 1 灯盏花花蕾总 RNA 凝胶电泳

Figure 1 Total RNA gel electrophoresis of *Erigeron breviscapus* buds

检测大约 2 200 bp (图 2),且上下无杂带,大小与目标基因一致,可能是 *ARCI* 基因片段,需一步鉴定。

1.3 阳性克隆的鉴定

将扩增出来的产物经回收、纯化后连接到 pMD19-T 克隆载体上,转化大肠杆菌 DH5 α ,并涂于氨苄抗性的 LB 培养基上,过夜,从转化的培养基上随机挑取 5 个克隆并进行 PCR 扩增检测,其大小约为 2 200 bp (图 3),与 RT-PCR 结果一致,表明这些克隆可能为阳性克隆,挑其中两个单克隆进行摇菌,提取质粒送测序。

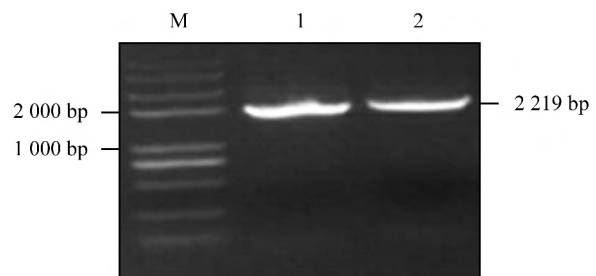


图 2 *ARCI* 基因 RT-PCR 电泳检测

注: M: DNA marker; 1,2: RT-PCR 产物

Figure 2 Electrophoresis detection of *ARCI* gene RT-PCR products

Note: M: DNA marker; 1,2: RT-PCR products

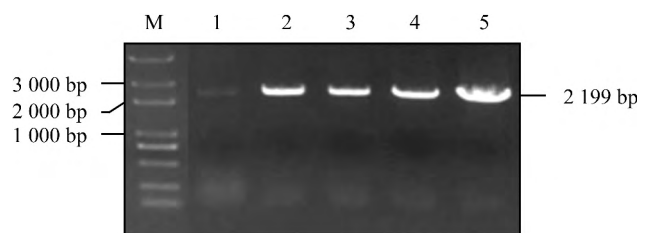


图 3 *ARCI* 基因重组质粒 PCR 电泳检测

注: M: DNA marker; 1~5: 阳性克隆

Figure 3 Electrophoresis detection of *ARCI* gene recombinant plasmid PCR products

Note: M: DNA marker; 1~5: Positive clones

1.4 序列分析

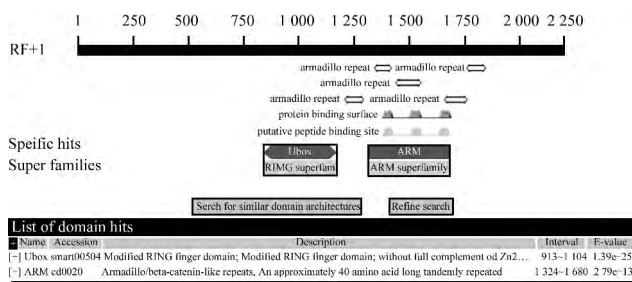
测序结果显示 基因组 DNA 和 cDNA 作为模板扩增出的序列都是 2 199 bp 的长度,编码 733 个氨基酸(图 4),说明不存在内含子区域。*ARC1* 存在一个 U-box 超家族结构域(913~1 104 bp)和由 5 个重复的 ARM Repeats 构成的 ARM 超家族结构域(1 324~1 680 bp),两个结构域都属于超家族类型(图 5)。通过多序列比对(图 6)发现,733 个氨基酸中有 467 个是保守的,约占 64%,非保守氨基酸有 266 个,这表明克隆的片段为 *ARC1* 基因的高度保守区域,它与朝鲜蓟、马铃薯、番茄、普通烟草、美花烟草的氨基酸序列同源性分别为 81%、68%、68%、69%和 69% (牛义岭等, 2016)。进一步证明了 *ARC1* 在空间上是保守的蛋白。为分析 *ARC1* 的进化情况,在 NCBI Blast *ARC1* 蛋白并选取朝鲜蓟、野生大豆、甘蓝、蒺藜苜蓿、毛果杨、木薯、棉花、咖啡、马铃薯、普通烟草、番茄、美花烟草、野生烟草、茸毛烟草 14 个物种的 14 条 *ARC1* 氨基酸序列,通过 Clustal Omega 进行多序列比对并制作进化树(图 7)。使用 Swiss model 预测了 *ARC1* 蛋白的三维结构(图 8)。

2 讨论

ARC1 是植物体内是一个非常保守的蛋白,涉及孢子体型自交不亲和信号转导通路中信号的传输,据报道 *ARC1* 基因在甘蓝中的结构也不存在内含子结构(张贺翠等, 2011)。甘蓝中 *ARC1* 蛋白包含一个 U-box 超家族结构域和 3 个 ARM Repeats 构成的 ARM 超家族结构域。BLAST 发现甘蓝 *ARC1* 蛋白与灯盏花 *ARC1* 蛋白整体结构很相似,与灯盏花 ARM 超家族结构域相比,甘蓝要少两个 ARM Repeats 结构,11 个氨基酸,U-box 是一种高度保守的蛋白,编码约 70 个氨基酸残基,广泛存在于真核生物体内,具有 E3 泛素化连接酶功能,能够促进下游底物蛋白的泛素化降解(Koegl et al., 1999)。U-box 的氨基酸序列和 $\beta\beta\alpha\beta$ 折叠构象与典型 Ring-finger 具有相似性,且疏水氨基酸和芳香族氨基酸残基都存在相同的裸露区域,其中 U-box 功能域的稳定性主要依靠盐键和氢键,而不是典型的螯合锌结构(朱利泉和周燕, 2015)。*ARC1* C 末端的 ARM 臂重复区与 SRK 激酶结构域相互作用在体外实验中被证实,两者之间通过磷酸化作用来维系。在芸薹属植物的自交不亲和研究中,发现 *ARC1* 蛋白作为信号传递过程中 SRK 的下游受体(施松梅等, 2016)。而 *ARC1* 在孢子体型

```
atggcatcagctgctatcttttcatcattacgcccggagccgttcaccgctgtagacgcc
M A S A A I F S S L R R S R S P S L D A
tttttagcaccggtagatcttgaaaacgacgtcgctggacttctcaaaccttaacaaca
F L A P V D L E N D V A G L L K T L T T
atctcatcacagctcatcacatcttttccaacaaaacgctgctggttcagagaaaaac
I S S Q L I T S F S N K T L S F Q K K N
acaaaatctttgcttaggaaaatccagcttttttcatcttgggtgattcatttcaagat
T K S L L R K I Q L F Y I L L D S F Q D
tcacgcagcagtgagtcacaaagtcacaaacctaccgtcaacggtgttttggctttaaagag
S S T G E S K S N L P S T V V L C F K E
ttgtaccttttgccttataggtctaaaatctgtctgattattgtgcacaaatctagtaag
L Y L L L Y R S K I L L D Y C A Q S S K
ttatggcttttgccttaaaacccatcaatttctggccattttcatgactcttgatcaagaa
L W L L L Q N P S I S G H D L D L Q E
atttcaaccccttttagatgtgttccctgttaccagtttagaagatataatttagtattgat
I S T L L D V F P V T S L E D I I S I D
gttatagaacaaatgactgtttaaagggtcaatcaagaaaagatgataaattgtttata
V I E Q I D L L K G Q S L R K L D K L F I
gatacccatgatgaaaattcaagattgatgtgttttaagatgttagatgatattgggtgt
D T H D E N S R L M L F K M L D D I G C
ggaaagattccaactttacaagaatttcattgttttttgaagaagttgggaattata
G K I P T L Q E F H D F F V K K L G I I
gatgtcggggttcgaggttgaaattgagttatttggagaacaaatagtttagtcagag
D A R A C R I E I E Y L E E Q I V S H E
agtgtactcttgaaacatcaagttcaactctgtgtgtttatagctatgattaggtattgt
S D L E P S S S I L G G F I A M I R Y C
agggttctgtgttgcggttcgatgaagatgaagttgaagctctcaagggtgaaaagg
R F L L F G F D E D E V E A L K G M K R
gtcaaaagagggttaggaaaaggggtgtgttgaaagagattcggtactgttattgtga
V K R G G R K K G L I S K E I A D T F V
agcattcctaaggatttttggcccggttctgttagattgtgatgtggtcctgttatt
S I P K D F C C P I S L D L M M D P V I
atctgcagctggcagactttttagatagaggatcgatttctaggtggattgaagggtgcat
I S T G Q T F D R G S I S R W I E E G H
tgtaattgtccaaagactgggcaagttctgtgtgcacaagaatctgtgtccaaatagggca
C N C P K T G Q V L V H K N L V P N R A
cttagaaatctgattatgcaatgggtgtatggctcataagataccttatactcctccagaa
L R N L I M Q W C M A H K I P Y T P P E
agtttgaccctggatccgaatcatttctggcagctccggctagccggggcggtgag
S L D P G S E S F L A A P A S R A A V E
gctaataaggcaactgttcggcttctgattcaacagtttgaaaatgggtcagaatgtggg
A N K A T V R L L I Q Q F E N G S E C G
aaggcaatgtctgcagctgaaatccgtttatggcaaaaacaggagagaaaacccgtgga
K A I A A R E I R L L A K T G R E N R G
tttatagctgaatcggtgtgtgattcctcatttgaagagtttgccttcttcacgaagtcgc
F I A E S G V I P H L K S L L S S R S A
gtgacacagggagaatgcggtgactgcaattttgaatcttctgactatgataaaagaataaa
V A Q E N A V T A I L N L S I Y E K N K
acaataattatggacgaagacggtgtgttgagatcgatgtgagcggtttaaagatttggg
T I I M D E D G C L R S I V S L R F G
catacttgaaagcaaaagaaaatgcagctgtgctgtgttttagtctttctacagttcat
H T I E A K E N A A A L F S L S T V H
gattacaagacaatgatagcagatgaggaaggtgcgttatctacatgacaggtttatta
D Y K T M I A D E E G A L S T L A G L L
aaagatggaacccaagaggcaagaaaagacgctgtttaccgcctgttttaattcttcaacg
K D G T P R G K K D A V T A L F N L S T
catcacgaaaactgtgtgaacatgattgaaaatgggggtgtttaaagcttttagtcgatgcc
H T A N C V N M I E N G A G A L V D A
ttggaatgtgaaaatgtgctgaagaagcttccggtgcgttggcgttaatagtcagacaa
L E C E N V A E E A S G A L A L I V R Q
cctgtcgtgtcccaagccgtcggaatgaggaaaagttgtgtgctgattgattggagta
P V G A Q A V G N E E K V V I G L I G V
atgaggtgtgggacacctagaggttaagaaaacgcagtgccggtgtgctgagctttgt
M R C G T P R G K E N A V A A L L E L C
cggagttgtggggcgacacccacccgaacgtgtcttgaaagctccggtgattggcgggtctg
R S G G A H T T E R V L K A P A L A G L
atacaagcttgtgtttactgggacaaaacgggacagggaggaagcagcatcactggca
I Q S L L F T G T K R A R R K A A S L A
cgtgttttccacgtgtgtgtcattatgatacgtgtgacatttcaattgttttcttaggg
R V F Q R C C H Y D T L H F N G F R L G
tatggttttgcggaaactctactactgaaaatagatgtcgggttttccagcagagaca
Y G F A G N S T T G N I D S G F S A E T
gtttcgggttcaatgtctatgtctgttttcgggtttcatag
V S V S M S M S V S V S -
```

图 4 灯盏花 *ARC1* 基因片段的核苷酸序列及推测的氨基酸序列
Figure 4 Nucleic acid sequences and deduced amino acid sequences of *ARC1* gene fragment from *Erigeron breviscapus*

图5 *ARC1* 的保守区Figure 5 Conservative domains of *ARC1*

自交不亲和的研究主要集中在十字花科芸薹属的植物中,在其他的孢子体型自交不亲和的植物中研究较少。张薇从灯盏花中克隆出 *SRK* 基因,与菊科中自交不亲和的牛津千里光(登录号: AJ704376.1) *SRK* 基因的相似性高达 85%,本研究也在灯盏花中克隆出 *ARC1* 基因,根据前人的观点 存在关系的两个基因在进化上是协同进化的,推测 *ARC1* 基因在菊科的自交不亲和中可能存在某种关系,很有可能与灯盏花的自交不亲和性相关,若能证实这样的关系将有助于对菊科植物的自交不亲和的研究,其结果还有待进一步研究。通过多序列比对发现 *ARC1* 蛋白是存在保守性的,发现与菊科朝鲜蓟的相似性高达 81%,系统进化树分析也得到相似的结果,朝鲜蓟与灯盏花的亲缘关系最近,由于灯盏花和朝鲜蓟都是属于菊科的,两个基因的同源性较高。本研究对灯盏花中 *ARC1* 基因的克隆研究,为研究菊科自交不亲和和信号传递分子机制提供了理论基础,同时也为丰富孢子体植物的自交不亲和研究奠定了一定的基础。

3 材料与方

3.1 材料来源

灯盏花植株采自云南省红河州千山生物科技有限公司的灯盏花种植基地,经云南农业大学农学与生物技术学院杨生超教授鉴定为菊科飞蓬属灯盏花 (*Erigeron breviscapus* Vant.) Hand.-Mazz,取即将盛开的花蕾去掉花瓣提取总 RNA。胶回收试剂盒(Easy Pure Quick Gel Extraction Kit),大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 感受态细胞购于(全式金)公司。Taq DNA Polymerase, cDNA 合成试剂盒, pMD19-T Simple Vector 均购自 TaKaRa(宝生物)公司。限制性内切酶都是购于(Thermo)公司,DNA 用 SDS 法提取,RNA 用水饱和酚法提取。

3.2 引物的设计与合成

经分析已经测序的灯盏花转录组数据,找出保

守性较高的结构域,在实验室前期结果,预测目的基因的长度大小约为 2 200 bp。根据引物设计原则,利用 Primer 5.0 设计 P1、P2 引物,用于扩增灯盏花的 *ARC1* 基因片段,引物由华大基因公司合成。P1 5'-ATGGCATCAGCTGCTATCTTT-3',P2 5'-CTATGA AACCGAAACAGACATAGAC-3'。

3.3 总 RNA 的提取

提取灯盏花花蕾总 RNA 是按照水饱和酚法提取,取 1 g 的新鲜的花蕾材料放入 1.5 mL 的离心管中,加入液氮,迅速研磨成粉,加 700 μ L 的 RNA 提取液覆盖粉末,然后加 560 μ L 的水饱和酚覆盖,放置通风橱融化,加 70 μ L 的 2 mol/L NaCl,混匀,加 140 μ L 的氯仿,混匀,4 $^{\circ}$ C,10 000 r/min,20 min,取上清到另一个新的 1.5 mL 的离心管中,加等体积的 600 μ L 的异丙醇,4 $^{\circ}$ C,11 000 r/min,20 min,小心倒掉上清,加 350 μ L 的 70%的乙醇,4 $^{\circ}$ C,11 000 r/min,20 min,弃上清,通风橱干燥 10 min,加 35 μ L 的灭菌的 ddH $_2$ O 水,溶解,测浓度,电泳检测,-80 $^{\circ}$ C 保存,备用。根据吸光度值鉴定所提 RNA 的纯度及浓度,以备后续实验。

3.4 RT-PCR 扩增

按照试剂盒说明书进行 cDNA 第一链合成。PCR 反应体系 dNTP 3 μ L、10 $\times$ PCR Buffer 5 μ L、P1 (10 μ mol/L)、P2 (10 μ mol/L)各 2.5 μ L、cDNA 1 μ L 和 Taq DNA 聚合酶 0.25 μ L,加水补足 50 μ L。PCR 反应 94 $^{\circ}$ C 3 min 94 $^{\circ}$ C 30 s、60 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 2 min,30 个循环 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,10 $^{\circ}$ C 结束,PCR 扩增产物用浓度为 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,目的片段回收和纯化按照回收试剂盒说明书进行。

将回收产物、pMD19-T 载体和 Solution I 按照 5.0 0.3 5.0 混匀,于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。加 50 μ L 感受态大肠杆菌细胞到连接液中,冰浴 30 min 42 $^{\circ}$ C 37 s;冰浴 2 min。加入 1 mL 无抗生素的液体 LB 培养基,摇菌 50 min (37 $^{\circ}$ C, 180 r/min),将菌液涂板到氨苄的 LB 固体培养基上,37 $^{\circ}$ C 过夜,挑单菌落,经 PCR 检测后提质粒送生工测序。

3.5 *ARC1* 基因生物信息学分析

将获得的序列通过 DNAMAN6.0 翻译成氨基酸序列,利用 Blast 搜索 NCBI 上的核苷酸数据库和氨基酸数据库中近缘物种的 *ARC1* 序列信息及保守区分析,Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org/>)分析预测 *ARC1* 蛋白的三维结构。并运用 Clustal Omega

[illegible]

```

A  SIFDKNKGRIMDEVGCLTLVVGVLIFGHTTEARENAAATLFSLSAVHDYKKQIAKEDGAV
B  SIFDKNKGRIMDEVGCLTLVVGVLIFGHTTEARENAAATLFSLSAVHDYKKQIAKEDGAV
C  SIFDKNKGRIIDEVGCLALIVGVLRFGHTTEARENAAATLFSLSAVHDYKKQIAKEDGAV
D  SIFDKNKGRIIDEVGCLALIVGVLRFGHTTEARENAAATLFSLSAVHDYKKQIAKEDGAV
E  SIYEKNTIIMDEDGCLRSIVSVLRFGHTIEAKENAAAALFSLSTVHDYKTMIADEEGAL
F  SIYDKNKSRIVEEDGCLRAIVGVLRFGHTIESRENAAATLFSLSAVHDYKKRIADEDGAL
   ***:***  *:***  ***  :*,**  *****  *:*****:*****:*****  **,*:**

A  EALAGLLREGSPRGKKDAVTALFNLSTHTENCARMIELGAILTALVGALGSEGVAEEAAGA
B  EALAGLLREGSPRGKKDAVTALFNLSTHTENCARMIESGAILTALVGALGSEGVAEEAAGA
C  EALAGLLREGSPRGKKDAVTALFNLSTHTDNCARMIECGAVTALVGALGSEGVAEEAAGA
D  EALAGLLREGSPRGKKDAVTALFNLSTHTDNCARMIESGAVTALVGALGSEGVAEEAAGA
E  STLAGLLKDGTPRGKKDAVTALFNLSTHTANCVNMIENGVVKALVDALECEENVAAEEASGA
F  ETLAGLLTDGTPRGKKDAVTAVFNLSTHTANCVKMIIEYGVVRALVTALKCDGIAEEAAGA
   .:*****  *:*****:*****  **,***  *:  ***  **  .:*****:**

A  LALIVRQPIGAAAVGNEEMAVAGLIGMMRCGTPRGKENAVAALLELCRGGGAAATERVLK
B  LALIVRQPIGAAAVGNEEMAVAGLIGMMRCGTPRGKENAVAALLELCRGGGAAATERVLK
C  LALIVRQQVGATAVGNEETAVAGLIAMMRCGTPRGKENAVAALLELCRGGGAAATERVLK
D  LALIVRQQVGATAVGNEEMAVAGLIAMMRCGTPRGKENAVAALLELCRGGGAAATERVLK
E  LALIVRQPVGAQAVGNEEKVVIIGLIGVMRCGTPRGKENAVAALLELCRSGGAHTTERVLK
F  LALIVRQPVGAQAVGNEEAADVGLIGMMRCGTPRGKENAVAALLELCRSGGAHTTERVLK
   *****  **:*****  .*  ***  .:*****:*****  **,***  :*****

A  APALASLLQTLLFTGTKRARRKAASLARVFQRCHE-ASMHYGGLGVGYAFAGNSATVR-D
B  APALASLLQTLLFTGTKRARRKAASLARVFQRCHE-ASMHYGGLGVGYAFAGNSATVR-D
C  APSLASLLQTLLFTGTKRARRKAASLARVFQRCHE-ASVHYSGFGVGYAFSGNSAAAR-D
D  APSLASLLQTLLFTGTKRARRKAASLARVFQRCHE-AAVHYSGFGVGYAFAGNSAAAR-D
E  APALAGLIQSLLFTGTKRARRKAASLARVFQRCCHYDTLHFNGFRLGYGFAGNSTTGNID
F  APSLAGLIQSLLFTGTKRARRKAASLARVFQR-CHYDSLHFNGLRLGYGFAGNSTAGNLD
   **:***  .:*****:*****  *  :*:*.  :*:***:***:  .  *

A  STFAG-DVSVSMSISVPVL
B  STFAG-DVSVSMSISVPVL
C  STFPG-DVSVSRISVPVL
D  STFPG-DVSVSMSISVPVL
E  SGFSAETVSVSMSVSVS
F  SGFPAETVSVSMSVSVS
   *  *  .  *****  *:***  *

```

图6 灯盏花 *ARC1* 氨基酸序列与其他植物 *ARC1* 氨基酸序列多重比较

注: A: 普通烟草; B: 美花烟草; C: 马铃薯; D: 番茄; E: 灯盏花; F: 刺菜蓟

Figure 6 Multiple comparison on amino acid sequences of *ARC1* in *Erigeron breviscapus* and other plantsNote: A: *Nicotiana tabacum*; B: *Nicotiana glauca*; C: *Solanum tuberosum*; D: *Solanum lycopersicum*; E: *Erigeron breviscapus*; F: *Cynara cardunculus*

进行多序列的同源比对及系统进化树分析。

作者贡献

陈莫和张薇是本研究的实验设计和研究执行人, 陈莫、胡彦如和范伟完成数据分析, 论文初稿的写作, 谢世清参与实验设计, 实验结果分析, 杨生超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

本研究由国家自然科学基金项目(81760692;

81503184)和 2016 云南省中青年学术和技术带头人后备人才项目共同资助。

参考文献

- Gu T., Mazzurco M., Sulaman W., Matias D.D., and Goring D.R., 1998, Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the S-locus receptor kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(1): 382-387
- Indriolo E., Safavian D., and Goring D.R., 2014, The *ARC1* E3 ligase promotes two different self-pollen avoidance traits in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 26(4): 1525-1543
- Koegl M., Hoppe T., Schlenker S., Ulrich H.D., Mayer T.U., and

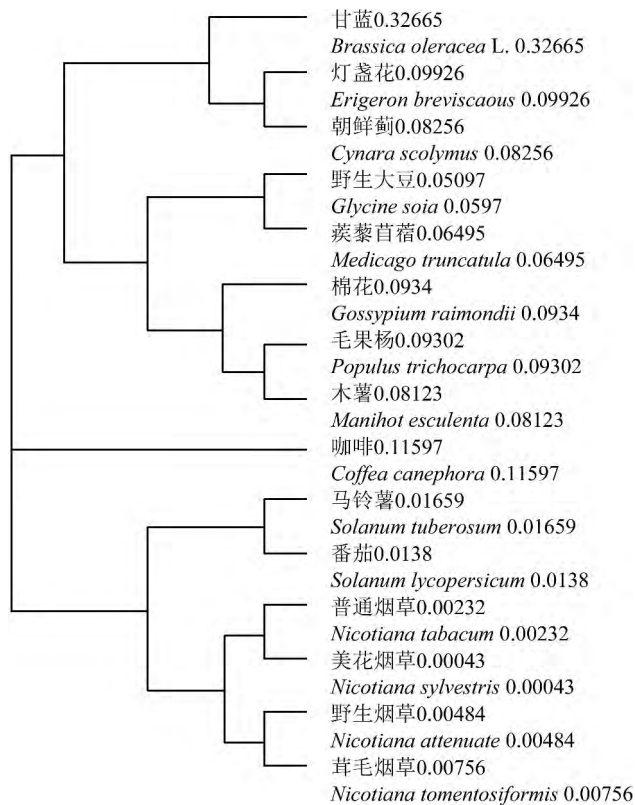


图 7 灯盏花与其他植物的 ARC1 氨基酸同源性序列分析
Figure 7 Homological analysis of amino acid sequences of ARC1 between *Erigeron breviscapus* and other plants



图 8 灯盏花 ARC1 蛋白的三级结构预测
Figure 8 Tertiary structure prediction of ARC1 protein from *Erigeron breviscapus*

Jentsch S., 1999, A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly, *Cell*, 96(5): 635-644
Niu Y.L., Jiang X.M., and Xu X.Y., 2016, Cloning and VIGS vector construction of GRAS transcription factors family gene *SIGLD1* from tomato, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Sheng-*

wuxue (*Genomics and Applied Biology*), 35(8): 2155-2160
(牛义岭, 姜秀明, 许向阳, 2016, 番茄 GRAS 转录因子家族基因 *SIGLD1* 的克隆及 VIGS 载体构建, *基因组学与应用生物学*, 35(8): 2155-2160)

Shi S.M., Gao Q.G., Lian X.P., Bi Y.L., Liu X.H., Pu Q.M., Liu G.X., Liu J., Ren X.S., Yang X.H., Zhu L.Q., and Wang X.J., 2016, Identification of interaction domain of SRK-ARC1-Exo70A1 and interaction strength analysis in *Brassica oleracea* var. *capitata* L., *Zhongguo Nongye Kexue* (*Scientia Agricultura Sinica*), 49(1): 14-26 (施松梅, 高启国, 廉小平, 毕云龙, 刘晓欢, 蒲全明, 刘贵喜, 柳菁, 任雪松, 杨晓红, 朱利泉, 王小佳, 2016, 结球甘蓝 SRK-ARC1-Exo70A1 互作域确定及作用强度, *中国农业科学*, 49(1): 14-26)

Zhang H.C., Yang K., Zhu L.Q., Yang Y.J., Xue L.Y., Yang H., Chang D.L., Gao Q.G., Ren X.S., Li C.Q., and Wang X.J., 2011, The interactions between the truncated fragments of ARM repeat containing (ARC1) from *Brassica oleracea* var. *acephala* L and kinase domain of S-receptor kinase (SRK) from *B. oleracea* var. *capitata* L tested by a yeast two-hybrid system, *Nongye Shengwu Jishu Xuebao* (*Journal of Agricultural Biotechnology*), 19(6): 988-995 (张贺翠, 杨昆, 朱利泉, 杨永军, 薛丽琰, 杨红, 常登龙, 高启国, 任雪松, 李成琼, 王小佳, 2011, 利用酵母双杂交系统鉴定羽衣甘蓝臂重复蛋白(ARC1)与结球甘蓝 S 位点受体激酶(SRK)激酶结构域的相互作用, *农业生物技术学报*, 19(6): 988-995)

Zhang W., Wei X., Meng H.L., Ma C.H., Jiang N.H., Zhang G.H., and Yang S.C., 2015, Transcriptomic comparison of the self-pollinated and cross-pollinated flowers of *Erigeron breviscapus* to analyze candidate self-incompatibility-associated genes, *BMC Plant Biol.*, 15: 248

Zhao Z., Wang D.K., Yang J.W., Wu D.C., and Yang S.C., 2013, Identification and anther development cytological studies of the male sterile individuals in *Erigeron breviscapus*, *Xibei Zhiwu Xuebao* (*Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*), 33(2): 287-294 (赵峰, 王定康, 杨建文, 吴道聪, 杨生超, 2013, 灯盏花雄性不育种质鉴定与花药发育的细胞学研究, *西北植物学报*, 33(2): 287-294)

Zhu L.Q., and Zhou Y., 2015, Protein elements and signal transduction process of self-Incompatibility in *Brassica oleracea*, *Zuowu Xuebao* (*Acta Agronomica Sinica*), 41(1): 1-14 (朱利泉, 周燕, 2015, 甘蓝自交不亲和性信号传导元件与传导过程, *作物学报*, 41(1): 1-14)