江西农业大学学报　2025,47(4)　　http://xuebao.jxau.edu.cn
Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis　　https://doi.org/10.3724/aauj.2025080

杨梅,李延红,付艺萍,等.枳和甜橙中*AUX/LAX*和*PIN*基因家族全基因组鉴定及在缺硼与生长素处理下的表达分析[J].江西农业大学学报,2025,47(4):932-946.
YANG M,LI Y H,FU Y P,et al.Genome-wide identification,bioinformatics analysis and expression analysis under boron deficiency and auxin application conditions of *AUX/LAX* and *PIN* gene families in citrus[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2025,47(4):932-946.

枳和甜橙中*AUX/LAX*和*PIN*基因家族全基因组鉴定及在缺硼与生长素处理下的表达分析

杨　梅[1,2],李延红[1],付艺萍[1],魏清江[3],周高峰[1*]

(1.赣南师范大学 生命科学学院/国家脐橙工程技术研究中心,江西 赣州 341000;2.海南大学 热带农林学院,海南 儋州,571737;3.江西农业大学 农学院,江西 南昌 330045)

摘要:【目的】AUX/LAX(Auxin resistant 1/like AUX1)和PIN(Pin-formed)是高等植物生长素极性运输的主要载体蛋白。旨在鉴定柑橘中*AUX/LAX*和*PIN*基因家族的数量,预测蛋白的理化性质,进行生物信息学分析以及其在缺硼和生长素处理条件下的表达分析。【方法】以枳和甜橙为研究对象,进行了全基因组鉴定与生物信息学分析,并分析了其在缺硼与激素处理下的表达分析。【结果】从枳和甜橙基因组数据库中均鉴定出4个*AUX/LAX*家族成员,而*PIN*基因家族成员的数量分别为10个和9个。枳与甜橙中*AUX/LAX*基因家族编码的蛋白均为碱性不稳定疏水蛋白,而*PIN*基因编码蛋白多为碱性稳定疏水蛋白,且AUX/LAX和PIN蛋白亚细胞定位主要在质膜上。进化与基因结构分析表明,枳与甜橙*AUX/LAX*基因家族系统发育树分为2个亚组,而*PIN*可分为3个亚组,同一亚族成员之间基因结构相似。基因保守基序分析表明,*PIN*基因家族的保守基序无论在出现位置还是在出现次数上的一致性均优于*AUX/LAX*。顺式作用元件分析表明,2个基因家族基因都含有激素响应、非生物与生物胁迫、生长发育与次生代谢以及光合相关元件。在缺硼条件下,枳根系中*AUX/LAX*基因家族基因的表达量在处理各时期均无显著变化,但红橘中*CsLAX2*和*CsLAX3*基因分别在处理后的40 d和80 d显著下调表达;枳中*CitPIN5b*、*CitPIN5c*、*CitPIN5d*和*CitPIN8*的表达量在处理前期(10 d和20 d)显著上调表达,而*CitPIN2*、*CitPIN5b*、*CitPIN5d*在处理40 d时显著下调表达,而在红橘中,仅*CsPIN1a*在处理10 d时表达量显著下调,*CsPIN3*和*CsPIN5c*在处理40 d时显著下调表达。在施用生长素处理的枳根系中,*AUX/LAX*基因家族基因的表达量在处理各时期均无显著变化,但红橘中*CsLAX2*在处理的40 d,*CsLAX3*在全部时期均显著下调表达;枳中*CitPIN2*、*CitPIN5c*和*CitPIN5d*的表达量在处理后期(40 d和80 d)显著上调表达,而红橘中*CsPIN2*、*CsPIN3*在处理后期下调表达,但*CsPIN3*在处理10 d时显著上调表达。【结论】枳和甜橙*AUX/LAX*和*PIN*基因家族成员之间在数量、结构、预测蛋白特性等方面相似,但其表达量在响应缺硼与生长素处理时存在显著差异。研究结果可为进一步探究柑橘*AUX/LAX*和*PIN*基因家族在逆境胁迫响应和生长发育调控中的分子机制提供依据。

关键词:柑橘;生物信息学;生长素;植物营养;基因表达
中图分类号:S666.406　　**文献标志码:**A　　**开放科学(资源服务)标识码(OSID):**
文章编号:1000-2286(2025)04-0932-15
CSTR:32399.14.aauj.2025080

收稿日期:2024-10-06　　**修回日期:**2025-04-26
基金项目:国家自然科学基金项目(32160680、31960573)
Project supported by the National Natural Science Foundation of China(32160680,31960573)

作者简介:杨梅,博士生,orcid.org/0009-0009-7039-300X,yangmei_208@163.com;*通信作者:周高峰,副教授,主要从事果树栽培与营养研究,orcid.org/0000-0003-3407-2697,zhougaofeng428@163.com。

©《江西农业大学学报》编辑部,开放获取CC BY-NC-ND协议

Genome-wide identification, bioinformatics analysis and expression analysis under boron deficiency and auxin application conditions of *AUX/LAX* and *PIN* gene families in citrus

YANG Mei[1,2], LI Yanhong[1], FU Yiping[1], WEI Qingjiang[3], ZHOU Gaofeng[1*]

(1.College of Life Sciences, National Navel Orange Engineering Research Center, Gannan Normal University, Ganzhou, Jiangxi 341000, China; 2.College of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Danzhou, Hainan 570228, China; 3.College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: [**Objective**] Auxin resistant 1/like AUX1 (AUX/LAX) and Pin-formed (PIN) are the main carrier proteins for the polar transport of auxin. The aim of this study is to investigate the number of *AUX/LAX* and *PIN* gene families in citrus, the physicochemical properties of the predicted proteins and bioinformatics analysis, and their expression patterns analysis under boron deficiency and auxin application conditions. [**Method**] The genome-wide identification and bioinformatics analysis were conducted in *Citrus trifoliata* (also known as *Poncirus trifoliata*) and *Citrus sinensis*, and their expression patterns under boron deficiency and auxin application conditions were analysed. [**Result**] The results showed that 4 *AUX/LAX* family members were identified from the genomic databases of both *Citrus trifoliata* and *Citrus sinensis*, while the number of *PIN* gene family members was 10 and 9, respectively. The physical and chemical properties of predicted proteins showed that the proteins encoded by *AUX/LAX* gene family in *Citrus trifoliata* and *Citrus sinensis* were alkaline unstable hydrophobic proteins, while the proteins encoded by *PIN* gene were mostly alkaline stable hydrophobic proteins, and the subcellular location of *AUX/LAX* and *PIN* proteins was mainly in the plasma membrane. Phylogenetic analysis showed that *AUX/LAX* gene families were divided into 2 subgroups and *PIN* was divided into 3 subgroups, with similar gene structure among members of the same subfamily. Analysis of gene conserved motifs showed that *PIN* gene family conserved motifs were better than *AUX/LAX* in both location and frequency of occurrence in both *Citrus trifoliata* and *Citrus sinensis*. Cis-acting element analysis showed that *AUX/LAX* and *PIN* gene families contained elements related to hormone response, abiotic and biological stress, growth and development, secondary metabolism, and photosynthesis in both *Citrus trifoliata* and *Citrus sinensis*. Under boron deficiency conditions, there was no significant change in the expression of *AUX/LAX* gene family gens in the root of trifoliate orange at all treatment periods, but *CsLAX2* and *CsLAX3* genes of red tangerine were significantly down-regulated at 40 and 80 days of treatment, respectively; The expression of *CitPIN5b*、*CitPIN5c*、*CitPIN5d* and *CitPIN8* genes in the root of trifoliate orange were significantly up-regulated in early stages (10 and 20 days), but *CitPIN2*、*CitPIN5b*、*CitPIN5d* genes were significantly down-regulated at 40 days of treatment. However, in the root of red tangerine, only *CsPIN1a* expression was significantly down-regulated after 10 days, while *CsPIN3* and *CsPIN5c* expression were significantly down-regulated after 40 days of treatment. Under auxin application conditions, there was no significant change in the expression of *AUX/LAX* gene family gens in the root of trifoliate orange at all treatment periods, but the expression of *CsLAX2* gene was significantly down-regulated after 40 days, and *CsLAX3* were significantly down-regulated at all treatment periods in the root of red tangerine; The expression of *CitPIN2*、*CitPIN5c* and *CitPIN5d* genes in the root of trifoliate orange were significantly up-regulated in later stages (40 and 80 days), while the expression of *CsPIN2* and *CsPIN3* genes in the root of red tangerine were significantly down-regulated in later stages, only *CsPIN3* genes was significantly up-regulated after 10 days of treatment. [**Conclusion**] *AUX/LAX* and *PIN* gene family members are similar in quantity, structure and predictive protein properties, but their expression levels are significantly different in response to boron deficiency and auxin application treatment. This study provides a basis for further exploring the molecular mechanisms of *AUX/LAX* and *PIN* gene families in response to stress and regulation of growth and development in citrus.

Keywords: citrus; bioinformatics; auxin; plant nutrition; gene expression

【研究意义】生长素是高等植物的一种重要激素，调控包括细胞的伸长和分裂、根的生长和侧根的形成等植物的生长发育过程[1-2]。生长素的合成主要集中在植物生长活跃的部位，如发育的种子、茎尖、根尖和幼叶等，合成后的生长素不是停留在固定位置，而是运输到其他部位发挥作用[3]。生长素在植物体内运输分为非极性被动运输和极性主动运输[4]。生长素具有极性运输的特性，这保证了植物组织间生长素浓度的差异，从而为植物的发育和分化提供了保障，这也是生长素有别于其他激素的显著特征[5]。生长素极性运输主要通过生长素转运蛋白系统进行，AUX/LAX 和 PIN 是生长素转运的主要蛋白，共同参与调控生长素的极性运输，这些载体蛋白通过调控生长素的进入和退出细胞，实现了生长素在植物体内的定向运输。AUX/LAX 是生长素输入载体蛋白，属于氨基酸转运蛋白中的 AAAP 亚家族[6]。ATAUX1 是最早被发现的输入载体，在根的表皮细胞、中柱细胞及韧皮部细胞表达，后又发现与其高度同源蛋白 AT-LAX1/2/3[7]。【前人研究进展】Bennett 等[8]在克隆拟南芥 *AUX1* 基因时发现，其突变体 aux1 具有严重的根向重力性的表现，后证明 AUX1 在促进生长素由重力感知到重力响应部位移动的过程中发挥重要作用，根的向重力弯曲程度主要取决于输入载体生长素浓度梯度[9]。除了 AUX 外，其它成员在根向重力反应中没有起到作用，虽然 LAX2 和 LAX3 在小柱细胞中表达，却没有在相关组织中进行响应及表达，其突变体也没出现任何根向性缺陷的表型[6]。另外 AUX/LAX 在调控胚胎发育[7]、叶片发育[10]、侧根和根毛发育[11]等方面起着重要作用。PIN 是生长素输出载体蛋白，参与了植物生长素运输和分布调控，影响了植物的根系生长、侧根分化、维管束发育等重要生理过程[12]。前人研究发现拟南芥中该基因突变体花序上无叶和花等器官，形状类似大头针，因此得名 pin1（pin-formed 1）突变体，随后证明 pin1 的缺失会导致生长素极性运输障碍，形成针状花絮[13]。后继研究发现拟南芥中存在 8 个 PIN 蛋白，由于中间亲水环长短不同，将 PIN 蛋白分为 2 个亚家族，即长亲水环的“长”PIN 蛋白和“短”亲水环的短 PIN 蛋白，2 种蛋白在细胞定位和功能上不同[14]。

【本研究切入点】课题组和前人的研究表明，植物激素在柑橘响应缺硼胁迫中具有重要作用，柑橘能通过植物激素进行生长调节以适应缺硼胁迫，这其中最显著的激素是生长素[15-16]。Li 等[16]研究结果表明，缺硼处理的枳根系中生长素转运蛋白基因的表达受到了抑制，从而使地上部合成的生长素不能转运到根系中，最终导致地上部生长素的积累，地下部生长素含量的降低。Zhou 等[15]发现在缺硼导致的柑橘叶脉爆裂中发现，差异表达的长链非编码 RNA 的靶基因有 37 个与生长素合成、转运和信号转导相关基因。但上述研究不足以阐明硼与生长素代谢的关系，以及硼在生长素的合成、运输和分布等方面的调控机制。【拟解决的关键问题】本研究以枳和甜橙为研究对象进行生长素运输载体蛋白 *AUX/LAX* 和 *PIN* 全基因组成员鉴定，再对其基因理化性质、基因结构、系统进化、保守结构域、顺式元件及其在缺硼与激素处理下的表达分析，以期为下一步探明柑橘通过生长素响应缺硼胁迫的机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 柑橘 *AUX/LAX* 和 *PIN* 基因家族的鉴定与理化性质分析

以拟南芥基因组数据库中（https://www.arabidopsis.org/）已知的 4 个 AUX/LAX 和 8 个 PIN 蛋白氨基酸序列作为参考，对枳和甜橙基因组数据库 CPBD（Citrus Pan-genome to Breeding Database，http://citrus.hzau.edu.cn/index.php）进行比对搜索，获得相似性高的序列。参考的枳和甜橙的基因组版本分别为 Poncirus trifoliata v1.0 和 Citrus sinensis v3.0。设置 BLAST 程序 E 值为 $1e^{-10}$ 进行比对，弃去所有氨基酸数量少及可信值低于 30% 的候选基因，筛选出枳与甜橙中候选基因。再从 CPBD 数据库中的 Genome Browser（http://Poncirus trifoliata.hzau.edu.cn/jbrowse2）中获得候选基因的完整氨基酸序列，并通过 NCBI Conserved Domains Search（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi）进行保守结构域的查找，参考拟南芥中的 AUX/LAX 和 PIN 蛋白的保守结构域进行筛选[6,17]，最终确定基因家族成员。

利用 ExPASy（https://web.expasy.org/compute_pi/）在线工具获得拟南芥、枳和甜橙中 3 个基因各成员的等电点、氨基酸的长度、分子量。利用 TBtools 中 Protein Paramter Calc 功能进行不稳定系数，脂溶性以及亲水性等预测；利用 Wolf PSORT（WoLF PSORT：Protein Subcellular Localization Prediction，https://wolfpsort.hgc.jp/）进行亚细胞定位预测。

1.2 柑橘 *AUX/LAX* 和 *PIN* 基因家族进化树构建及蛋白结构域分析

将 TAIR（http://www.arabidopsis.org/）网站中下载拟南芥 AUX/LAX 和 PIN 蛋白氨基酸序列与鉴定的枳和甜橙中的 AUX/LAX 和 PIN 蛋白氨基酸序列导入 MEGA7.0 软件，使用 ClustalW 模式比对序列，参数为默

认;使用邻接法(Neighbor-Joining)进行发育树构建。将AUX/LAX和PIN蛋白氨基酸序列导入在线网站MEME(https://meme-suite.org/meme/doc/meme.html),分析AUX/LAX和PIN蛋白质保守基序(选择20个保守基序),利用NCBI中Batch CD-Search工具分析枳和甜橙AUX/LAX和PIN蛋白结构域,并通过TBtools处理得到可视化图形。基因定位及染色体结构图绘制,利用TBtools找出拟南芥、枳和甜橙中*AUX/LAX*和*PIN*基因所在染色体长度及基因所在位置,可视化出拟南芥、枳和甜橙中基因定位及染色体结构图。

1.3　柑橘*AUX/LAX*和*PIN*基因家族基因启动子顺式元件分析

提取枳和甜橙*AUX/LAX*和*PIN*基因家族的基因上游2 000 bp的启动子序列,利用PlantCARE(https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/)工具分析其顺式作用元件,并利用TBtool可视化。

1.4　柑橘*AUX/LAX*和*PIN*基因家族基因的表达分析

本试验以枳(*Citrus trifoliata* L.)和红桔(*Citrus reticulata* Blanco.)2种柑橘实生幼苗作为试验材料。催种按照Zhou等[18]方法进行催种育苗,将发芽后的种子种到蛭石中,待苗长到4~5片叶时,用营养液水培方法在温室中进行水培处理,设置对照(全营养液培养,CK)以及缺硼(不添加硼酸的营养液,BD)和对照添加生长素(CI)2个处理,其中IAA添加浓度0.06 mg/L。营养液的配置参照Zhou等[18]方法进行,以Hoagland和Aron营养液配方为主要依据并做适当的修改,使用0.5 mol H_2SO_4和1 mol NaOH调营养液pH值为6.0~6.5。在试验处理10,20,40,80 d后分别取根部样品,每个处理随机取3株样品,即3个生物学重复,将样品液氮速冻,于-80 ℃保存待用。

利用筛选出的枳与甜橙的候选基因,使用Primer 5设计的引物,内参为枳的*β-actin*基因(表1)。采

表1　基因实时荧光定量PCR引物

Tab.1　Primers for real-time fluorescence quantitative PCR of genes

基因名称 Gene name	CPBD基因ID CPBD gene ID	正向引物 Forward primer (5′-3′)	反向引物 Reverse primer (5′-3′)
β-actin	actin	CCGACCGTATGAGCAAGGAAA	TTCCTGTGGACAATGGATGGA
CitAUX	Pt4g022040.1	GTTTTGTTGACACTTCCATACTCAT	GACATTCTCTTTCTCTTTTCTGCTT
CitLAX1	Pt6g013420.1	TTCACCGTCTACATCATCCCAT	AAAACCAACCACAAATACCCAC
CitLAX2	Pt8g001790.1	TCACTTTGCCGTATTCATTTTC	TTCTCCCTTTCTTTCCTTGTCC
CitLAX3	Pt5g008650.1	TGAAATGGAAAGAGAAGAAGAGG	AAAATGAATATGGCAGTGTGAGT
CsAUX	Cs_ont_7g001220.2	ATCATCCCTGCTTTAGCCCATA	CCAAACCCAACCACTAGTACCC
CsLAX1	Cs_ont_6g015250.1	TTCACCGTCTACATCATCCCAT	AAAACCAACCACAAATACCCAC
CsLAX2	Cs_ont_8g027620.1	ACTTTGCCGTATTCATTTTCCC	TTCTCCCTTTCTTTCCTTGTCC
CsLAX3	Cs_ont_3g009750.1	ATTGAAATGGAAAGAGAAGAAGAGG	AAAATGAATATGGCAGTGTGAGTAG
CitPIN1a	Pt1g010310.1	TCATCTCATCCAACGACCCTT	AAACAACCCCTTGTGCTCAAC
CitPIN1b	Pt6g005220.1	CTCCACTCTGCCCAACACTC	CAATCAACATCCTGGCTCCT
CitPIN2	Pt1g022280.1	GCTCTACCGCTTCTCCTGTT	AGATTCCTTTCCCCATTCAC
CitPIN3	Pt2g019110.1	CTGAGCTACACCCAAAAGCTAC	AGAGACCAAACAAGTCCAATG
CitPIN5a	PtUn015450.1	TGGCTATTGGTGCTATTGCTA	CTGCGTGGAGTCCATATTCTT
CitPIN5b	PtUn035030.1	ATGATTGTGTCCCTTCCTTTGA	GGTTTTTATCTCCCTCCCTTTT
CitPIN5c	PtUn020810.1	ATTTCACTCTTCCTTTATTCACC	TTCCCTTTTTACTACACATGCCC
CitPIN5d	PtUn020780.1	AATGGCTGTTGATCTTGTGGT	AGGCCTGCTGGAACTTGTTAC
CitPIN6	Pt5g007030.1	CCTGGTGGGAGAATGGTGTG	TGGCTGCTGCTTCCTTTGAT
CitPIN8	Pt6g002370.1	CTCTCTCTTTCAACTTTGCCTAAC	CTCTGTAACACAACTATCTGTGCG
CsPIN1a	Cs4g012240.1	TCATCTCATCCAACGACCCTTA	AACAACCCCTTTTGCTCAACTT
CsPIN1b	Cs6g005760.1	CTCTCCACTCTGCCCAACACT	AATCAACATCCTGGCTCCTCT
CsPIN2	Cs4g025100.1	GAGCTCTACCGCTTCTCCTGTT	ATTCCTTTCCCCATTCACTTTG
CsPIN3	Cs2g012750.1	TCATCCGCAACCCTAACACATA	GCTGAACATAGCCATTCCAAGT
CsPIN5a	Cs6g023470.1	TGGCTATTGGTGCTATTGCTA	CTGCGTGGAGTCCATATTCTT
CsPIN5b	Cs6g023630.1	TTGTGTACTCTCACCAATACTCTTG	GGATTGAAATACAGATGATTGAACC
CsPIN5c	Cs6g023600.1	GGTTGGGAAGATGTTTACAAAGTTAT	TAGTGAATAGAGGAAGAGTGAAATAGCA
CsPIN6	Cs3g007910.1	AAGGAAGCAGCAATCAACCAG	GGACCAGAGAACCCCTAACAC
CsPIN8	Cs6g001790.1	TTGGTACAATTTATTGCTGTTCCT	AATGTGCGTAGTCCTTACTCTCG

用 OminiPlant RNA Kit 全能型植物 RNA 提取试剂盒 DNase I(康为世纪 CW2598S,RLS)提取根中 RNA,采用 qPCR RT Master Mix 试剂盒(东洋纺,上海)合成 cDNA。采用 Roche Light Cycler 480 进行荧光定量 PCR 反应。反应体系为:FastStart Essential DNA Green Master(Roche,Switzerland)5 μL、cDNA 模板 1 μL、正反向引物各 0.5 μL、ddH_2O 3 μL。反应条件如下:预变性 95 ℃ 1 min;95 ℃ 20 s,60 ℃ 20 s,72 ℃ 30 s 共 42 个循环。每个样品重复测定 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析基因的相对表达量[19]。

1.5 数据分析

除非特别说明,图表中的数据代表 3 个单独植株(生物学重复)的平均值。采用 Excel 2019 进行数据统计和处理。SPSS 21.0 进行差异显著性分析,不同处理间数据差异性比较采用 Duncan's 法检验(P<0.05)。使用 Excel 2019 和 Origin 2019 绘制图表。

2 结果与分析

2.1 柑橘 *AUX/LAX* 和 *PIN* 基因家族的鉴定与理化性质分析

以拟南芥基因组数据库中已知的拟南芥的 4 个 AUX/LAX 和 8 个 PIN 蛋白氨基酸序列作为参考,对枳和甜橙基因组数据库进行比对搜索,获得相似性高的序列。如表 2 所示,从枳和甜橙基因组数据库中均

表 2 柑橘 *AUX/LAX* 和 *PIN* 基因家族鉴定与预测蛋白质理化性质

Tab.2 *AUX/LAX* and *PIN* gene families identified in *Citrus trifoliata* and *Citrus sinensis*, and molecular details of their predicted proteins

基因名称 Putative gene name	基因编号 CPBD gene ID	开放阅读框/bp ORF	预测蛋白 Predicted protein			拟南芥同源序列 Arabidopsis homolog	一致性 Identity
			氨基酸数量/aa Length	等电点 pI	分子量/ku MW		
枳和甜橙中 *AUX/LAX* 基因家族 *AUX/LAX* genes in *Citrus trifoliata* and *Citrus sinensis*							
CitAUX1	Pt4g022040.1	1 428	475	8.26	53.30	*AtAUX1*(AT2G38120.1)	88.81%
CitLAX1	Pt6g013420.1	1 467	488	8.59	54.78	*AtLAX1*(AT5G01240.2)	83.12%
CitLAX2	Pt8g001790.1	1 491	496	8.59	55.87	*AtLAX2*(AT2G21050.1)	85.92%
CitLAX3	Pt5g008650.1	1 401	466	8.91	52.57	*AtLAX3*(AT1G77690.1)	88.06%
CsAUX1	Cs_ont_7g001220.2	1 428	475	8.00	53.36	*AtAUX1*(AT2G38120.1)	86.86%
CsLAX1	Cs_ont_6g015250.1	1 467	488	8.59	54.82	*AtLAX1*(AT5G01240.2)	83.54%
CsLAX2	Cs_ont_8g027620.1	1 491	496	8.95	55.89	*AtLAX2*(AT2G21050.1)	85.92%
CsLAX3	Cs_ont_3g009750.1	1 401	466	8.98	52.64	*AtLAX3*(AT1G77690.1)	87.85%
枳和甜橙中 *PIN* 基因家族 *PIN* genes in *Citrus trifoliata* and *Citrus sinensis*							
CitPIN1a	Pt1g010310.1	1 830	609	8.95	66.22	*AtPIN1*(AT1G73590.1)	71.91%
CitPIN1b	Pt6g005220.1	1 770	589	8.51	63.71	*AtPIN1*(AT1G73590.1)	63.64%
CitPIN2	Pt1g022280.1	1 830	609	8.98	66.43	*AtPIN2*(AT5G57090.1)	74.43%
CitPIN3	Pt2g019110.1	1 983	660	8.19	72.11	*AtPIN3*(AT1G70940.1)	77.14%
CitPIN5a	PtUn015450.1	1 047	348	6.98	38.17	*AtPIN5*(AT5G16530.1)	75.78%
CitPIN5b	PtUn035030.1	1 047	348	6.98	38.17	*AtPIN5*(AT5G16530.1)	75.78%
CitPIN5c	PtUn020810.1	1 026	341	8.57	37.52	*AtPIN5*(AT5G16530.1)	69.97%
CitPIN5d	PtUn020780.1	882	293	7.65	32.32	*AtPIN5*(AT5G16530.1)	65.55%
CitPIN6	Pt5g007030.1	1 626	541	9.28	59.32	*AtPIN6*(AT1G77110.1)	68.03%
CitPIN8	Pt6g002370.1	561	186	10.20	19.83	*AtPIN8*(AT5G15100.1)	68.87%
CsPIN1a	Cs4g012240.1	1 818	605	9.03	66.04	*AtPIN1*(AT1G73590.1)	72.36%
CsPIN1b	Cs6g005760.1	1 770	589	8.51	63.76	*AtPIN1*(AT1G73590.1)	63.79%
CsPIN2	Cs4g025100.1	1 944	647	9.16	69.78	*AtPIN2*(AT5G57090.1)	78.18%
CsPIN3	Cs2g012750.1	1 977	658	7.24	71.84	*AtPIN3*(AT1G70940.1)	78.25%
CsPIN5a	Cs6g023470.1	1 047	348	6.98	38.08	*AtPIN5*(AT5G16530.1)	76.06%
CsPIN5b	Cs6g023630.1	957	318	8.58	35.03	*AtPIN5*(AT5G16530.1)	70.52%
CsPIN5c	Cs6g023600.1	948	315	8.41	34.61	*AtPIN5*(AT5G16530.1)	69.91%
CsPIN6	Cs3g007910.1	1 626	541	9.28	59.36	*AtPIN6*(AT1G77110.1)	68.55%
CsPIN8	Cs6g001790.1	1 068	355	9.54	38.72	*AtPIN8*(AT5G15100.1)	61.96%

CPBD:柑橘基因组数据库 Citrus Pan-genome to Breeding Database,http://citrus.hzau.edu.cn/index.php。

鉴定出4个*AUX/LAX*基因家族成员,而*PIN*基因家族成员的数量分别为10个和9个,并根据其与拟南芥中相对应的基因的同源性对其命名。在枳和甜橙中,*AUX/LAX*基因家族成员预测蛋白的氨基酸数量均在466~496,成员之间差异不大。枳的分子量在52.57−55.87 ku,甜橙的分子量在52.64~55.89 ku,两者无显著差异。2个物种在氨基酸数量和分子量方面,*CitLAX3*、*CsLAX3*基因最低,而*CitLAX2*、*CsLAX2*基因最高。枳的理论等电点范围为8.26~8.91,而甜橙为8.00~8.98,两者无显著差异。与拟南芥同源序列的相似度均大于83%。如表3所示,*CitAUX/LAX*和*CsAUX/LAX*基因家族编码蛋白质均不具有不稳定系数大于40的特征,它们的亲水系数分布在0.363~0.473,表明其均属于碱性不稳定的疏水性蛋白质。*AUX/LAX*基因家族的所有基因都定位于质膜中。上述结果表明,枳和甜橙中*AUX/LAX*基因家族编码的蛋白质具有相似的理化性质。

如表2所示,枳中*CitPIN*基因家族成员预测蛋白的氨基酸数量为186~660个,甜橙为315~658个;分子量枳的介于19.83~66.22 ku,甜橙的介于34.61~71.84 ku,拥有氨基酸数量最少、分子量最低的基因分别是*CitPIN8*和*CsPIN5c*,最低值则是*CitPIN2*和*CsPIN3*。理论等电点范围枳在6.98~9.28,甜橙为6.98~9.54,除CitPIN5a、CitPIN5b、CsPIN5a的等电点小于7,属于酸性蛋白,其他均为碱性蛋白。如表3所示,两物种中除

表3　柑橘*AUX/LAX*和*PIN*基因家族基因预测蛋白质理化性质分析

Tab.3　Physicochemical properties of *AUX/LAX* and *PIN* gene families predicted proteins in *Citrus trifoliata* and *Citrus sinensis*

基因名称 Gene name	基因编号 CPBD gene ID	预测蛋白 Predicted protein			
		不稳定系数 Instability index	脂肪族氨基酸指数 Aliphatic index	平均疏水指数 GRAVY	亚细胞定位 Subcellular localization
枳和甜橙中*AUX/LAX*基因家族 *AUX/LAX* genes in *Citrus trifoliata* and *Citrus sinensis*					
CitAUX1	Pt4g022040.1	35.36	101.01	0.461	质膜
CitLAX1	Pt6g013420.1	30.68	95.39	0.408	质膜
CitLAX2	Pt8g001790.1	32.96	95.52	0.386	质膜
CitLAX3	Pt5g008650.1	32.04	101.05	0.473	质膜
CsAUX1	Cs_ont_7g001220.2	36.04	100.19	0.450	质膜
CsLAX1	Cs_ont_6g015250.1	33.23	92.34	0.363	质膜
CsLAX2	Cs_ont_8g027620.1	33.02	97.47	0.407	质膜
CsLAX3	Cs_ont_3g009750.1	33.02	101.05	0.464	质膜
枳和甜橙中*PIN*基因家族 *PIN* genes in *Citrus trifoliata* and *Citrus sinensis*					
CitPIN1a	Pt1g010310.1	36.34	90.81	0.086	质膜
CitPIN1b	Pt6g005220.1	31.96	98.96	0.274	质膜
CitPIN2	Pt1g022280.1	45.62	94.00	0.186	质膜
CitPIN3	Pt2g019110.1	38.08	88.36	0.049	质膜
CitPIN5a	PtUn015450.1	29.64	116.40	0.827	液泡
CitPIN5b	PtUn035030.1	29.64	116.40	0.827	液泡
CitPIN5c	PtUn020810.1	39.97	114.18	0.802	液泡
CitPIN5d	PtUn020780.1	39.34	109.90	0.686	液泡
CitPIN6	Pt5g007030.1	34.74	100.80	0.339	质膜
CitPIN8	Pt6g002370.1	41.90	138.76	1.004	叶绿体
CsPIN1a	Cs4g012240.1	37.34	91.08	0.080	质膜
CsPIN1b	Cs6g005760.1	30.99	98.96	0.271	质膜
CsPIN2	Cs4g025100.1	47.20	94.00	0.190	质膜
CsPIN3	Cs2g012750.1	36.25	88.36	0.064	质膜
CsPIN5a	Cs6g023470.1	28.13	116.40	0.819	液泡
CsPIN5b	Cs6g023630.1	39.99	116.40	0.715	液泡
CsPIN5c	Cs6g023600.1	35.08	114.18	0.662	液泡
CsPIN6	Cs3g007910.1	34.33	109.90	0.339	质膜
CsPIN8	Cs6g001790.1	36.55	100.80	0.694	质膜

CitPIN2、CitPIN8 和 CsPIN2 不稳定系数大于 40，属于不稳定蛋白，其他基因不稳定系数小于 40，属于稳定蛋白。蛋白质亚细胞定位定位发现，枳中 CitPIN5a、CitPIN5b、CitPIN5 和 CitPIN5d 以及甜橙中 CsPIN5a、CsPIN5b 和 CsPIN5c 定位于液泡，CitPIN8 定位于叶绿体，其他基因则定位于质膜中。以上结果表明，不同于 *AUX/LAX* 基因家族，枳与甜橙的 *PIN* 基因家族成员的蛋白特性存在显著的种间及成员间差异。

2.2 柑橘 *AUX/LAX* 和 *PIN* 基因家族进化树的构建与基因结构分析

利用邻接法对枳、甜橙和拟南芥 3 个物种构建进化树及进行聚类分析。由图 1 可知，*AUX/LAX* 基因家族中分支最少，只有 2 个分支，2 个分支基因聚类数目一致。其中 *CitAUX*、*CsAUX* 与 *AtAUX*，*CitLAX1*、*CsLAX1* 与 *AtLAX1* 均被聚类到一起。*PIN* 基因家族可聚类到 3 个分支，其中 Group Ⅰ有 13 个基因聚类在一起，是 3 个分支中聚类数目最多的一支，Group Ⅱ次之，有 11 个基因聚类，Group Ⅲ最少，*CitPIN8*、*CsPIN8* 与 *AtPIN8* 被聚类到 Group Ⅲ。进一步基因结构分析表明，枳与甜橙 *AUX/LAX* 基因家族成员外显子数量相似，均为 8~9 个，显著多于拟南芥外显子数量的 6~8 个。枳、甜橙 *AUX/LAX* 基因家族成员与拟南芥 *AUX/LAX* 基因家族成员相同的外显子数量较多，表明 *AUX/LAX* 基因在进化过程中具有高度保守的特征。枳 *PIN* 基因家族外显子数量为 1~8 个，甜橙为 4~8 个，而拟南芥外显子数量介于 5~9 个。Group Ⅰ分支中基因结构较为相似，外显子数目在 7~10，除 *CitPIN2* 拥有 8 个外显子，*ATPIN2* 拥有 9 个外显子，其他基因均拥有 7 个外显子；Group Ⅱ类分支中外显子有 4~5 个，*CsPIN5b* 和 *CsPIN5d* 由 4 个外显子组成，*ATPIN5*、*CitPIN5a*、*CitPIN5d* 以及 *CsPIN5a* 含有 5 个外显子。上述结果表明，*AUX/LAX* 家族基因在进化过程中具有高度保守的特征，而家族基因在物种之间有显著差异。

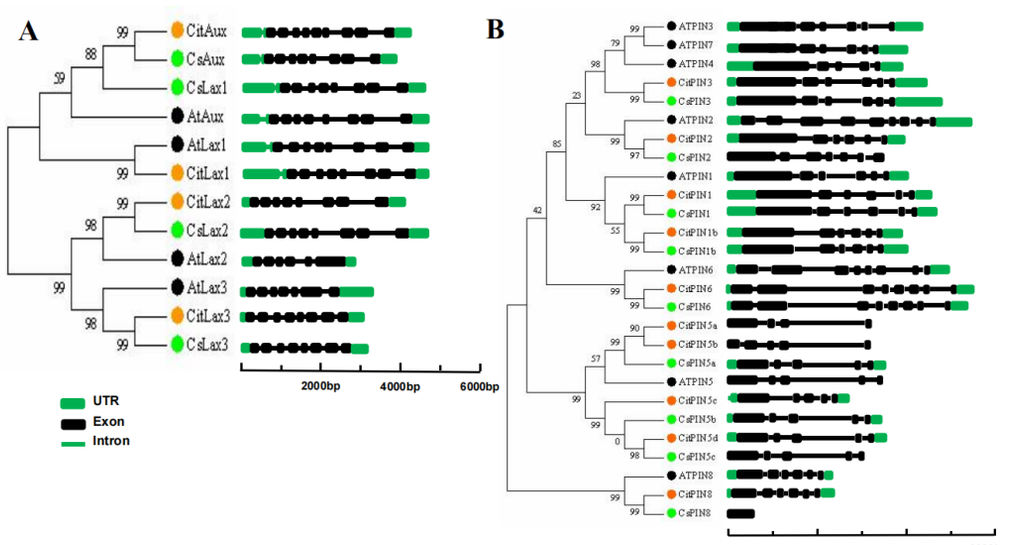
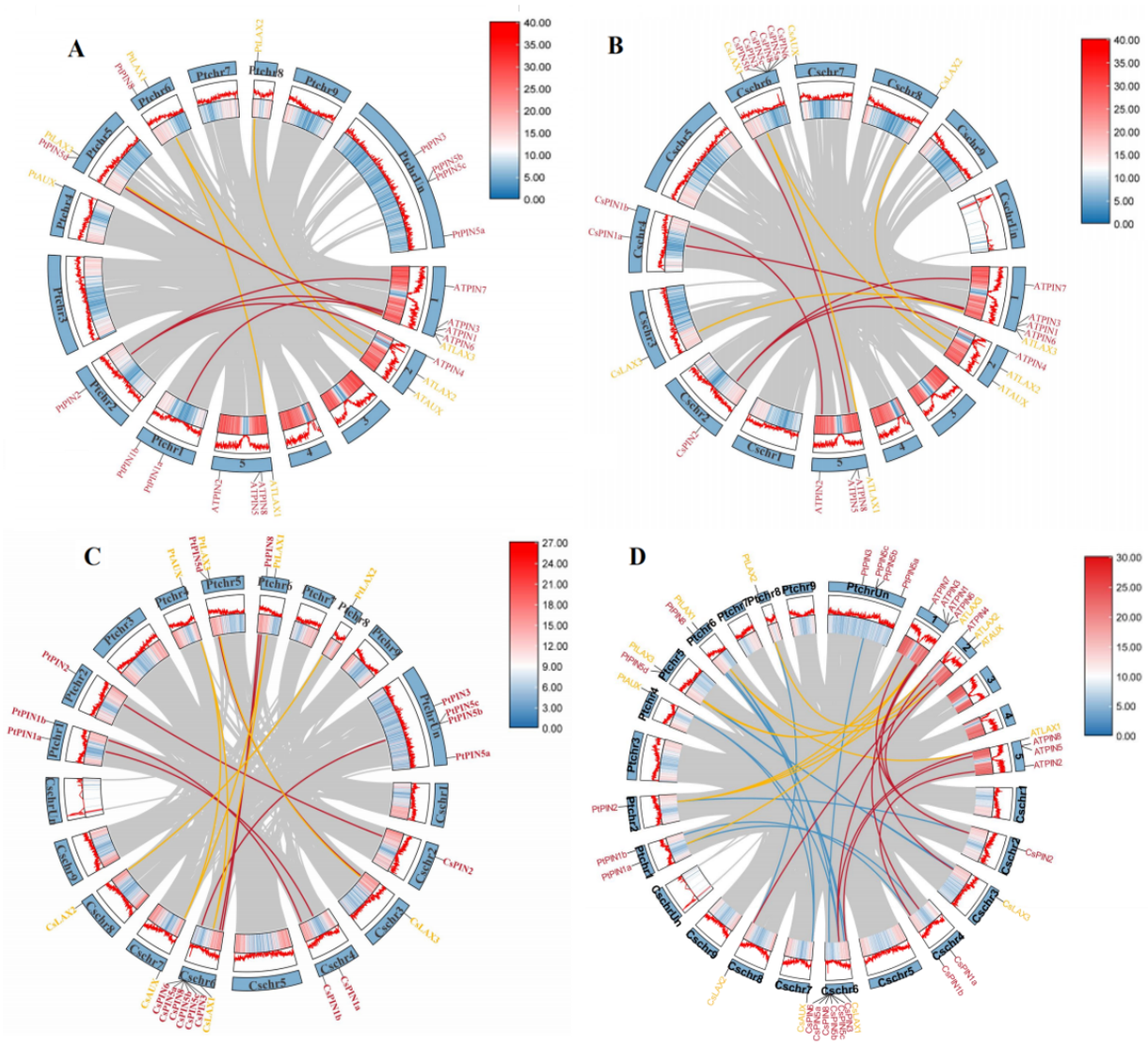


图 1 枳、甜橙与拟南芥 *AUX/LAX* 和 *PIN* 基因家族基因结构分析

Fig.1 Gene structure of *AUX/LAX* and *PIN* gene families in *Citrus trifoliata* (Cit), *Citrus sinensis* (Cs) and *Arabidopsis thaliana* (At)

2.3 柑橘 *AUX/LAX* 和 *PIN* 基因家族染色体定位及共线性分析

由图 2 可知，枳 *AUX/LAX* 基因家族成员分布在 4、5、6 和 8 号染色体上，而甜橙则分布在 3、6、7 和 8 号染色体上。枳 *PIN* 基因家族成员染色体分布最多的是 CitChrUn 染色体，有 4 条染色体，而甜橙中则在 6 号染色体分布最多。为了解物种间系统发育关系，分别对枳与拟南芥，甜橙与拟南芥以及枳与甜橙进行共线分析。结果表明，枳与拟南芥中 *PIN* 和 *AUX/LAX* 基因家族成员中各有 5 对和 4 对共线区域，甜橙与拟南芥中 *PIN* 和 *AUX/LAX* 基因家族成员中均有 4 对共线区域。在枳和甜橙中 *PIN* 及 *AUX/LAX* 基因家族成员中各存在 6 对和 5 对共线区域。拟南芥 8 个 PIN 基因（*AtPIN1*–*AtPIN8*）分布于不同的染色体上，未形成紧密串联排列的基因簇。因此拟南芥 PIN 基因家族成员中不存在典型的串联重复事件，其基因扩张主要来源于全基因组重复和片段复制，而非染色体局部串联复制。而在枳 *PIN* 基因家族成员在 CitChrUn 染色体存在 1 对串联重复，甜橙 *PIN* 基因家族成员在 CsChr6 染色体存在 1 对串联重复。



（A）拟南芥–枳间的共线性分析；（B）拟南芥–甜橙间的共线性分析；（C）枳–甜橙间的共线性分析；（D）拟南芥–枳–甜橙间的共线性分析。

（A）Collinearity analysis of At and Cit，（B）Collinearity analysis of At and Cs，（C）Collinearity analysis of Cit and Cs，（D）Collinearity analysis of At，Cit，and Cs.

图 2　枳、甜橙与拟南芥 *AUX/LAX* 和 *PIN* 基因染色体定位及片段重复分析

Fig.2　Chromosomal localization and fragment duplication analysis of *AUX/LAX* and *PIN* gene families in *Citrus trifoliata*（Cit），*Citrus sinensis*（Cs）and *Arabidopsis thaliana*（At）

2.4　柑橘 *AUX/LAX* 和 *PIN* 基因家族基序及保守结构域分析

为分析枳和甜橙 *AUX/LAX* 和 *PIN* 基因家族成员编码蛋白质的保守结构，使用在线工具 MEME 对其蛋白序列进行分析，分别发现有 13 和 17 个不同的基序（图 3）。保守基序分析表明，枳、甜橙和拟南芥 AUX/LAX 基因家族成员共有的 motif 是 motif 8，是核心保守域的残基，并且其在各个成员中出现次数最多，介于 1~5 次，在拟南芥中 motif 8 在 ATLAX2 中则出现了 5 次。枳和甜橙 *PIN* 基因家族编码蛋白质中共同保守基序为 motif 5，Group Ⅰ中基序高度保守，N 端以 Motif 9 开头，C 端以 Motif 7 结束，中间 Motif 顺序具有相似性，Group Ⅱ、Group Ⅲ保守基序虽与第一亚族相比较无规律，但是 2 个亚族保守基序出现顺序也具有一定的相似性。PIN 保守基序从 N 端到 C 端均具有一段保守基序，这一段保守基序是跨膜结构域，并且两端和中间部分的长度有一定的区别，这是由于 PIN 亲水环长度不一致，亲水环的不一致保证了 PIN 功能的多样性。

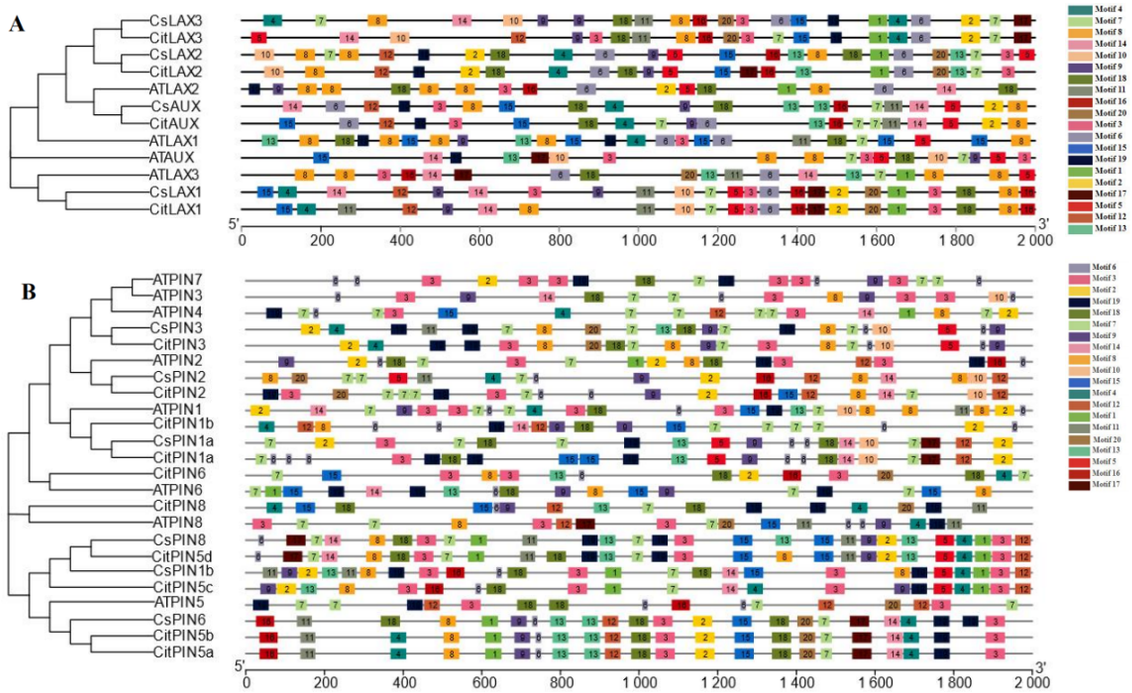


图 3 枳、甜橙与拟南芥 *AUX/LAX* 和 *PIN* 基因家族基序及保守结构域差异分析

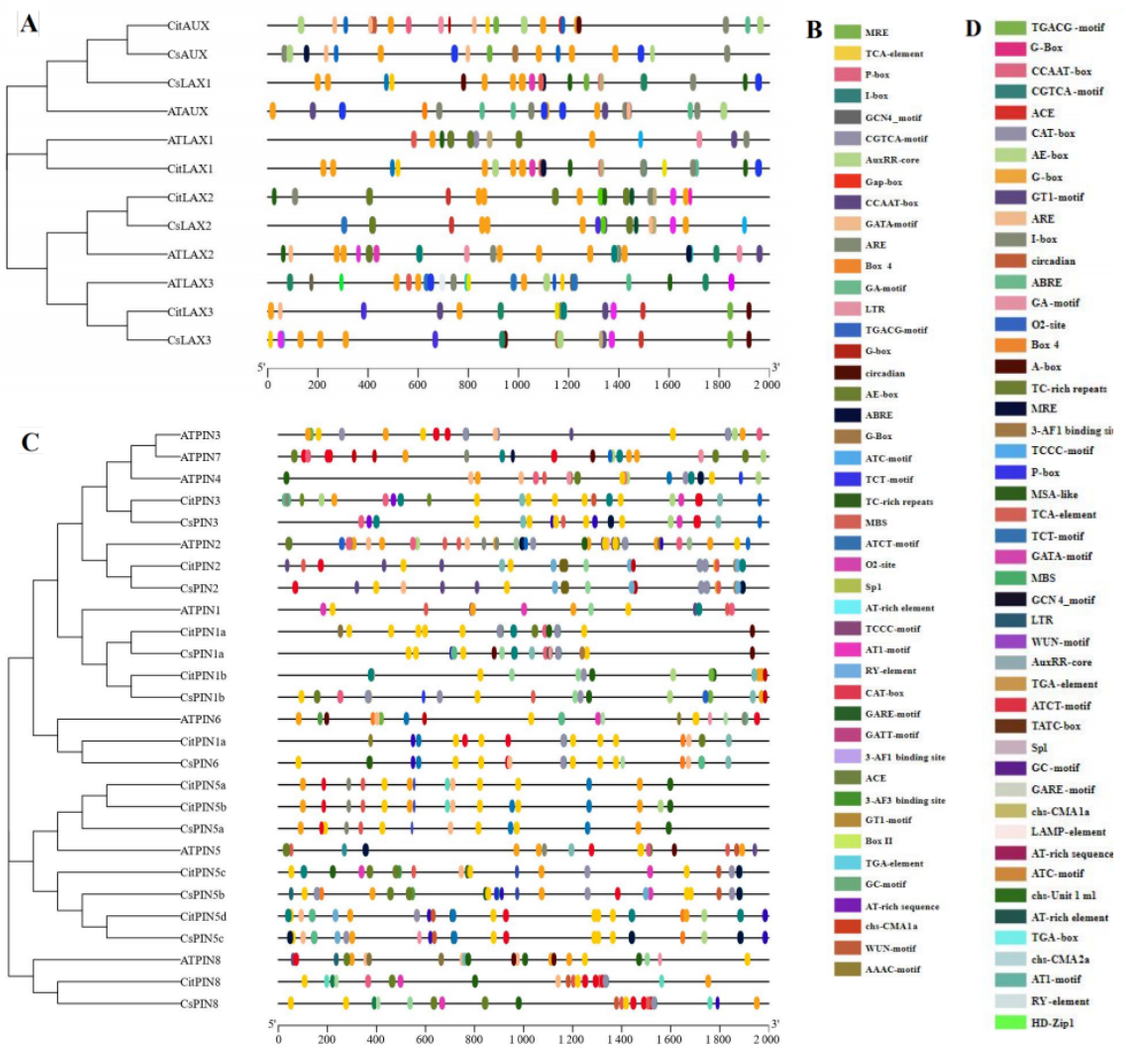
Fig.3 Differential analysis of *AUX/LAX* (A) and *PIN* (B) gene families motifs and conserved domains in *Citrus trifoliata* (Cit), *Citrus sinensis* (Cs) and *Arabidopsis thaliana* (At)

2.5 柑橘 *AUX/LAX* 和 *PIN* 基因家族基因顺式作用元件分析

对枳和甜橙 *AUX/LAX* 和 *PIN* 基因家族基因起始位点上游 2 000 bp 基因序列进行顺式元件分析，并对其进行分类。*AUX/LAX* 和 *PIN* 基因家族基因上游中分别有 46 和 50 个顺式作用元件，这些元件除了常见的转录与调控顺式作用元件 CAAT-box 和 TATA-box 外，还包括激素响应、防御和胁迫响应、生物与非生物胁迫响应、生长发育及代谢以及光响应相关元件。*AUX/LAX* 基因家族各基因中都含有 2 种以上激素相关元件，说明 *AUX/LAX* 基因家族基因能同时响应多种激素。除拟南芥 *AtLAX1* 和枳 *CitLAX2* 外，其他基因都含有胁迫与防御相关响应元件。其中 CitAUX 中有 3 种顺式元件分别是低温诱导的 LTR、干旱诱导的 ABRE 元件和抵御胁迫的 TC-rich repeats；CsAUX 中含有干旱诱导元件，缺氧胁迫必需诱导元件和抵御胁迫诱导元件，拥有的防御胁迫顺式元件是所有基因中最多的。枳和甜橙中均有多个与生长发育和代谢相关的顺式元件，其中 *CitLAX3* 和 *CsLAX3* 上含有 3 种与生长发育和代谢相关元件，但拟南芥中 *ATAUX* 和 *ATLAX2* 上则没有。另外，*AUX/LAX* 基因家族基因中含有大量光响应元件，其中拟南芥中的 *ATLAX2* 和 *ATLAX3*，枳中 *CitAUX* 和 *CitLAX1* 以及甜橙中 *CsLAX1* 和 *CsLAX3* 含有元件最多（图 4A）。*PIN* 基因家族基因所有基因都含有与激素、防御胁迫和光合响应相关元件，其中枳、甜橙与拟南芥的 *PIN2* 基因含均有最多数量的激素响应元件。拟南芥中的 *ATPIN2*，枳中的 *CitPIN5d* 和甜橙中的 *CsPIN5c* 含有的光合元件最多，说明这几个基因在响应激素和光合中起到主导作用。*CitPIN8*、*CsPIN8* 中除了含有上述元件外，还拥有其他基因没有的顺式元件，HD-zip1 元件。另外在顺式作用原件的数量上，枳中基因家族成员光合响应顺式元件数量显著高于甜橙（图 4B）。总之，顺式元件分析结果表明，枳和甜橙的 *AUX/LAX* 及 *PIN* 基因家族启动子区均富集激素、胁迫、光响应及生长发育相关顺式作用元件，其中 *AUX/LAX* 基因具备多激素协同响应特性，且枳的光响应元件数量显著多于甜橙。

2.6 柑橘 *AUX/LAX* 和 *PIN* 基因家族基因在缺硼胁迫与施用生长素条件下的表达分析

由图 5 可知，枳根系中 *AUX/LAX* 基因家族基因在 BD 和 CI 处理下的各个时段，其基因的表达量与对应时期的 CK 相比均无显著差异。但在红橘根系中 *CsLAX2* 基因的表达量在 BD 和 CI 处理的第 40 天均显著下降；*CsLAX3* 基因的表达量在 BD 处理的第 80 天，CI 处理的全部时期均显著下降。上述结果表明，*CsLAX2* 和 *CsLAX3* 基因是 BD 处理和 CI 处理的红橘根中的关键响应基因，且具有类似的表达趋势。如图 6 所示，在 BD 处理的枳根系中，与同期 CK 相比，枳 *PIN* 基因家族中的 *CitPIN2* 基因的表达量在处理 40 d 时显



图中的顺式作用元件:激素响应,生长素应答元件(TGA-element、AuxRR-core、GATA-motif);脱落酸响应元件(ABRE);茉莉酸响应元件(CGTCA-motif、TGACG-motif);赤霉素响应元件(GARE-motif、P-box、TATC-box)和水杨酸响应元件(TCA-element)。防御和胁迫响应,干旱胁迫型元件(MBS);低温诱导型元件(LTR);厌氧必需诱导元件(ARE);缺氧特异性诱导(GC-motif);防御和胁迫反应元件(TC-rich repeats、CCAAT-box)和创伤反应元件(WUN-motif)。生长发育调控与代谢,昼夜节律控制(Circadian);胚乳表达顺式元件(GCN4-motif);种子形成有关(RY-element)和参与叶绿体中层细胞分化元素(HD-Zip 1)。光响应,光响应元件或光响应元件的一部分(MRE、ACE、AE-box、CAT-box、AAAC-motif、GA-motif、ATCT-motif、ATC-motif、Box4、G-box、Box Ⅱ 、GATA-motif、GATT-motif、GT1-motif、I-box、sp1、TCT-motif、chs-CMA2a、chs-CMA1a、AT1-motif、TCCC-motif、3-AF1 binding site MRE、chs-Unit 1 m1、LAMP-element、Gap-box)。转录与调控,转录与调控响应元件(CAAT-box、TATA-box、3-AF3 binding site 、A-box、AT-rich sequence、AT-rich element)。

The cis-acting elements and their biological functions.Hormone response: auxin response elements (TGA-element, AuxRR-core, GATA-motif), abscisic acid response element (ABRE), jasmonic acid response element (CGTCA-motif, TGACG-motif), gibberellin response element (GARE-motif, P-box, TATC-box), and salicylic acid response element (TCA-element). Defense and stress response: drought stress response element (MBS), low temperature stress response element (LTR), essential induction elements for anaerobic conditions (ARE), hypoxia-specific induction (GC-motif), defense and stress response element (TC-rich repeats, CCAAT-box) and Trauma response element (WUN-motif). Growth and development regulation and metabolism: circadian rhythm control (Circadian), endosperm expresses cis elements (GCN4-motif), related to seed formation (RY-element), and differentiation of middle layer cells in chloroplasts element (HD-Zip 1). Photoresponse: photoresponse element or a part of photoresponse element (MRE, ACE, AE-box, CAT-box, AAAC-motif, GA-motif, ATCT-motif, ATC-motif, Box4, G-box, Box Ⅱ, GATA-motif, GATT-motif, GT1-motif, I-box, sp1, TCT-motif, chs-CMA2a, chs-CMA1a, AT1-motif, TCCC-motif, 3-AF1 binding site MRE, chs-Unit 1 m1, LAMP-element, Gap-box). Transcription and regulation: transcription and regulation of response elements (CAAT-box, TATA-box, 3-AF3 binding site, A-box, AT-rich sequence, AT-rich element).

图 4　枳、甜橙与拟南芥*AUX/LAX*(A,B)和*PIN*(C,D)基因家族启动子顺式作用元件差异分析

Fig.4　Differential analysis of cis-acting elements in the promoters of *AUX/LAX* (A, B) and *PIN* (C, D) gene families in *Citrus trifoliata* (Cit), *Citrus sinensis* (Cs), and *Arabidopsis thaliana* (At)

著下降，但在80 d时显著上升；*CitPIN5b*基因的表达量在处理前期的10 d和20 d时显著上升，但后期的40 d时显著下降；*CitPIN5c*基因的表达量在处理20 d时显著上升；*CitPIN5d*基因的表达量在处理10，20，80 d时显著上升，但在40 d时显著下降；*CitPIN8*基因的表达量在处理前期的10 d和20 d时显著上升，但后期无显著差异。在CI处理的枳根系中，与同期CK相比，枳*PIN*基因家族中的*CitPIN2*、*CitPIN5d*基因的表达量在处理80 d时显著上升；*CitPIN5c*基因的表达量在处理40 d和80 d时显著上升。以上结果表明，*CitPIN5b*、*CitPIN5c*、*CitPIN5d*和*CitPIN8*基因是枳早期响应BD处理的关键基因，其中*CitPIN5c*和*CitPIN5d*也对CI处理敏感。在BD处理的红橘根系中，与同期CK相比，红橘*PIN*基因家族中的*CsPIN1a*基因的表达量在处理10 d时显著下降；*CsPIN3*和*CsPIN5c*基因的表达量在处理40 d时显著下降。在CI处理的红橘根系中，与同期CK相比，红橘*PIN*基因家族中的*CsPIN2*基因的表达量在处理80 d时显著下降；*CsPIN3*基因的表达量在处理10 d时显著上升，但在处理40 d时显著下降。其中*CsPIN3*基因对BD处理和CI处理响应最为强烈。综上所述，枳和红橘根中*AUX/LAX*基因家族成员对缺硼和生长素处理均存在显著差异；枳和红橘*PIN*基因家族多个成员对缺硼和生长素处理响应强烈，但在不同处理时期差异较大。

	10 d			20 d			40 d			80 d		
	CK	BD	CI	CK	BD	CI	CK	BD	CI	CK	BD	CI
CitAUX	0.00	-0.20	-0.37	0.00	-0.08	0.39	0.00	1.59	0.24	0.00	0.69	0.43
CitLAX1	0.00	0.50	0.26	0.00	-0.40	-0.25	0.00	0.24	-0.32	0.00	-1.42	-0.02
CitLAX2	0.00	-0.23	0.38	0.00	-0.64	-0.71	0.00	0.67	-0.02	0.00	-0.73	0.17
CitLAX3	0.00	-0.27	-0.63	0.00	0.76	-0.56	0.00	-1.13	0.30	0.00	-0.88	-1.63
CsAUX	0.00	0.47	-0.21	0.00	-0.93	0.07	0.00	0.06	0.52	0.00	0.11	-0.45
CsLAX1	0.00	0.34	-0.26	0.00	-0.88	-0.63	0.00	-0.09	-0.02	0.00	-0.70	-1.06
CsLAX2	0.00	1.56	-0.40	0.00	-0.66	0.74	0.00	-2.68	-2.43	0.00	0.05	0.68
CsLAX3	0.00	-1.83	-3.32	0.00	0.15	-2.21	0.00	-1.95	-2.18	0.00	-2.52	-2.23

-4 -2 0 1 2

2月大枳和红橘幼苗水培处理80 d，CK，对照；BD，缺硼；CI，CK + IAA，施用生长素。

2-month-old trifoliate orange and red tangerine seedlings were grown in hydroponics and treated for another 80 days. CK, Control; BD, boron deficiency; CI, CK + IAA, auxin application.

图5 枳（Cit）和红橘（Cs）根中*AUX/LAX*基因在缺硼胁迫与施用生长素条件下的表达分析

Fig.5 Expression pattern analysis of *AUX/LAX* gene in trifoliate orange (Cit) and red tangerine (Cs) root under boron deficiency stress or auxin application conditions

	10 d			20 d			40 d			80 d		
	CK	BD	CI	CK	BD	CI	CK	BD	CI	CK	BD	CI
CitPIN1a	0.00	1.39	0.40	0.00	0.20	-0.21	0.00	0.32	-0.13	0.00	-0.52	-1.23
CitPIN1b	0.00	0.65	0.75	0.00	0.23	0.64	0.00	-0.55	-0.35	0.00	0.54	-0.10
CitPIN2	0.00	-0.23	0.89	0.00	0.36	1.26	0.00	-3.67	1.43	0.00	2.28	2.33
CitPIN3	0.00	1.13	0.46	0.00	0.22	-0.06	0.00	0.58	-0.50	0.00	0.01	-0.22
CitPIN5a	0.00	1.74	1.71	0.00	0.31	0.17	0.00	1.60	-0.93	0.00	1.33	1.69
CitPIN5b	0.00	2.96	0.59	0.00	3.72	0.22	0.00	-3.44	0.38	0.00	-1.29	0.81
CitPIN5c	0.00	1.98	0.00	0.00	3.97	-0.22	0.00	-1.96	3.50	0.00	0.45	2.95
CitPIN5d	0.00	3.02	0.13	0.00	4.79	-0.21	0.00	-3.51	1.79	0.00	3.10	3.89
CitPIN6	0.00	0.63	-0.82	0.00	-0.81	-0.48	0.00	1.39	0.67	0.00	0.78	-0.49
CitPIN8	0.00	2.07	-0.50	0.00	3.05	-0.34	0.00	0.88	1.18	0.00	1.34	-0.51
CsPIN1a	0.00	-2.87	0.73	0.00	-0.09	0.71	0.00	-0.75	-1.18	0.00	-1.10	-1.84
CsPIN1b	0.00	-0.42	0.58	0.00	1.04	0.77	0.00	-0.58	1.91	0.00	0.90	-0.08
CsPIN2	0.00	-0.79	0.85	0.00	1.85	0.15	0.00	1.42	1.22	0.00	-0.89	-2.76
CsPIN3	0.00	0.32	4.09	0.00	-1.44	-1.01	0.00	-6.34	-5.87	0.00	1.78	-1.15
CsPIN5a	0.00	0.00	-0.89	0.00	0.00	0.06	0.00	0.73	1.61	0.00	-1.44	-0.95
CsPIN5b	0.00	1.32	0.13	0.00	1.80	1.38	0.00	-1.79	-0.20	0.00	1.85	0.13
CsPIN5c	0.00	1.49	-0.29	0.00	1.97	1.41	0.00	-2.13	-0.54	0.00	1.32	-0.39
CsPIN6	0.00	0.68	0.60	0.00	-0.43	0.24	0.00	-0.90	-0.65	0.00	0.89	-0.04
CsPIN8	0.00	-0.75	-1.39	0.00	-0.69	0.68	0.00	-1.22	-0.61	0.00	1.25	-0.16

-7 -5 -3 -1 0 1 3 5

图6 枳（Cit）和红橘（Cs）根中*PIN*基因在缺硼胁迫与施用生长素条件下的表达分析

Fig.6 Expression pattern analysis of *PIN* gene in trifoliate orange (Cit) and red tangerine (Cs) root under boron deficiency stress or auxin application conditions

3　讨论与结论

生长素的转运在植物生长发育的众多方面扮演着关键角色,这一过程是由特定的内流和外排载体所介导的。在高等植物中,AUX/LAX 和 PIN 蛋白是生长素极性运输的主要载体[6,12]。本研究对枳和甜橙中的生长素极性运输蛋白进行了全基因组鉴定与生物信息学分析。植物中的 AUX/LAX 基因家族成员数量各异。在模式植物拟南芥中,该基因家族包含 4 个成员(*AtAUX1*、*AtLAX1*、*AtLAX2* 和 *AtLAX3*)[7],在水稻中成员数量为 5 个[20-21]。本研究从枳和甜橙基因组数据库中均鉴定出 4 个 *AUX/LAX* 家族成员,其数量与拟南芥相同。但是在其他一些物种中,*AUX/LAX* 家族成员数量显著高于拟南芥,如在山核桃和毛竹的基因组中,已鉴定出的 *AUX/LAX* 基因家族成员数量均为 8 个[22-23]。前人的研究表明,多倍化和基因组局部复制是造成基因家族成员在物种中扩张的主要动力,因此基因家族成员的数量和基因组大小和倍性密切相关。比如在毛竹中,共线性分析发现毛竹进化史上的染色体复制事件在毛竹 *PheAUX1/LAX* 候选基因家族成员扩增中发挥重要作用[23]。在枳和甜橙基因组数据库中鉴定出相同数量的 *AUX/LAX* 基因家族成员,但 *PIN* 基因家族成员的数量却不相同,分别为 10 个和 9 个,而拟南芥 *PIN* 基因家族成员的数量为 8 个。枳和甜橙中没有鉴定出拟南芥 *AtPIN4* 和 *AtPIN7* 的同源基因,但在枳中鉴定出 *CitPIN5* 的 4 个相似的同源基因(*CitPIN5a*、*CitPIN5b*、*CitPIN5c* 和 *CitPIN5d*),在甜橙中鉴定出 *CsPIN5* 的 3 个相似的同源基因(*CsPIN5a*、*CsPIN5b* 和 *CsPIN5c*)。研究发现,不同物种 *PIN* 基因家族成员的数量是不同的,且多数物种中鉴定出 *PIN* 基因家族成员数量均大于枳和甜橙。如苹果中鉴定出 *PIN* 基因家族成员数量是 13 个[24]、桃中是 15 个[25]、玉米中是 14 个[26]、烟草中是 29 个[14],烟草中是被鉴定出 *PIN* 基因家族成员的数量最多的物种。这一结果表明 *PIN* 基因在物种间进化过程中不稳定,基因发生丢失、新功能化或者变异,从而导致某些基因行使多种功能。枳和甜橙中 *PIN* 基因家族成员的数量显著少于其他物种的原因有待进一步的研究。筛选出的枳和甜橙中 *AUX/LAX* 基因家族成员与拟南芥同源序列的相似度均大于 83%,但 *PIN* 基因家族成员与拟南芥同源序列的相似度介于 60%~80%。进一步的氨基酸序列长度分析表明,枳和甜橙中的 *PIN* 基因家族成员预测蛋白的氨基酸数量为 186~660 个和 315~658 个,成员间的氨基酸序列长度差异显著。类似的发现在其他物种中也被报道,如苹果 *PIN* 基因家族成员中最小的是 357 个氨基酸,最长是 660 个氨基酸[24]。拟南芥 *PIN* 家族成员的氨基酸序列长度也存在较大差异[27-28]。

预测蛋白质理化性质分析表明,枳和甜橙 *AUX/LAX* 基因家族所有成员编码的蛋白都定位于质膜上,与毛竹研究一致[23],但与山核桃有一定的区别[22]。此外,枳和甜橙中的 AUX/LAX 编码蛋白都是不稳定碱性疏水蛋白。PIN 中拟南芥、枳和甜橙蛋白定位主要在质膜,部分基因定位于液泡和叶绿体中,研究结果与茶树研究一致[29]。PIN 蛋白的分布与功能有一定的关系,PIN 蛋白分布在细胞膜和叶绿体中,起到扩散生长素的作用[29],在液泡中,PIN 可能起到平衡生长素在细胞内外运输稳态的作用[26]。另外,PIN 蛋白大多属于碱性疏水稳定蛋白,与苹果、白脉根研究结果一致[24,30]。进化关系和基因结构分析显示,*AUX/LAX* 基因家族成员被分为 2 个分支,并且 2 个亚类中外显子个数差异不大;*PIN* 基因家族成员被划分为 3 个分支,其中 Group I 中基序高度保守,外显子数量无明显差异,Group II、Group III 保守基序虽与第一亚族相比较无规律,但是 2 个亚族保守基序出现顺序也具有一定的相似性。进一步进行共线分析发现,在 *AUX/LAX* 和 *PIN* 基因家族中,拟南芥与枳、甜橙 2 个柑橘种类都存在共线区域,其中枳 *AUX/LAX* 基因家族成员与拟南芥存在 5 对共线区域,甜橙则与拟南芥存在 4 对共线区域,说明 AUX/LAX 基因在进化过程中发生了大量复制现象。顺式作用元件分析表明,枳和甜橙的 *AUX/LAX* 和 *PIN* 基因家族中含有大量与生物功能相关的顺式元件,涵盖了激素响应、防御与胁迫响应、生长发育以及光响应方面的元件,表明其广泛参与植物生物学过程。其中激素响应元件除了含有生长素元件外,*AUX/LAX* 和 *PIN* 基因家族还含有脱落酸、赤霉素以及水杨酸等多种激素诱导元件,与前人在其他物种中的研究结论一致[23,25-26,30]。因此 *AUX/LAX* 和 *PIN* 基因家族成员能同时响应生长素与其他激素的调节,参与植物生长发育以及生长素与其他激素之间的协同与拮抗作用[10],也证明生长素存在与其他激素的交互过程,从而调节植物的生长发育过程[31]。

课题组前期的研究表明，生长素参与柑橘响应缺硼胁迫，但其机制尚不清楚[15-16]。本研究的结果发现，在BD条件下，枳根系中生长素极性运输载体蛋白*AUX/LAX*基因家族基因的表达量在处理各时期均无显著变化，但红橘中*CsLAX2*和*CsLAX3*基因分别在处理的40 d和80 d显著下调表达；枳中*CitPIN5b*、*CitPIN5c*、*CitPIN5d*和*CitPIN8*的表达量在处理前期（10 d和20 d）显著上调表达，但*CitPIN2*、*CitPIN5b*、*CitPIN5d*却在处理40 d时显著下调表达，而在红橘中仅*CsPIN1a*的表达量在处理10 d，*CsPIN3*和*CsPIN5c*在处理40 d时显著下调表达（图5和6）。因此本研究的基因表达分析结果表明：相同基因家族成员对缺硼胁迫的响应不同。本研究中枳根系中*CitPIN5c*、*CitPIN8*等基因的表达量在BD胁迫下显著上调表达，而*CitPIN2*却显著下调表达。前人在研究低硼胁迫下拟南芥根中*PIN1*和*PIN2*的表达分析结果中也发现*PIN1*在低硼下上调表达而*PIN2*下调表达[32]。本研究基因表达结果还表明：相同基因在不同缺硼处理时期的表达趋势不同。本研究中枳根系中*CitPIN5b*、*CitPIN5d*的表达量在处理前期（10 d和20 d）显著上调表达，但却在处理40 d时显著下调表达。这可能是因为缺硼处理后期地上部生长素合成受抑制[15]。这一现象同样出现在拟南芥缺硼试验中，Lin等[33]研究表明，拟南芥缺硼2 d后根尖中*AtPIN2*基因上调表达，而Camacho-Cristóbal等[34]对拟南芥进行缺硼处理5 h后发现*AtPIN2*基因下调表达。相同基因在不同处理时间段的表达趋势不一致或出现波动的原因可能与根中生长素含量在不同时间段含量变化不同有关[16,33]。另外该基因表达分析结果还表明：不同物种中相同或相似基因对缺硼胁迫的响应是不同的。本研究中红橘根中*CsPIN5c*在BD处理时显著下调表达，但其同源基因*CitPIN5c*的表达量在处理前期显著上调表达；枳根系中*AUX/LAX*基因家族基因在BD胁迫的各个时段，其基因的表达量与对应时期的CK相比均无显著差异，但在红橘根系中*CsLAX2*基因的表达量在BD胁迫处理下显著下降。课题组前期的研究表明，枳和红橘对缺硼的耐受能力有显著差异[35]，*AUX/LAX*基因在其根系中的差异表达可能是主要原因之一。

综上所述，本研究从枳和甜橙基因组数据库中均鉴定出4个*AUX/LAX*家族成员，而*PIN*基因家族成员的数量分别为10个和9个。枳与甜橙中*AUX/LAX*基因家族编码的蛋白均为碱性不稳定疏水蛋白，而*PIN*基因编码蛋白多为碱性稳定疏水蛋白，且AUX/LAX和PIN蛋白亚细胞定位主要在质膜上。进化与基因结构分析表明，枳与甜橙*AUX/LAX*基因家族系统发育树分为2个亚组，而*PIN*则分为3个亚组，同一亚族成员之间基因结构相似。基因保守基序分析表明，*PIN*基因家族的保守基序无论在出现位置还是在出现次数上的一致性均优于*AUX/LAX*。顺式作用元件分析，2个基因家族基因都含有激素响应、非生物与生物胁迫、生长发育与次生代谢以及光合相关元件。枳和甜橙*AUX/LAX*和*PIN*基因家族成员之间在数量、结构、预测蛋白特性等方面相似，但其表达量在响应缺硼与生长素处理时存在显著差异。本研究为进一步探究柑橘*AUX/LAX*和*PIN*基因家族在逆境胁迫响应和生长发育调控中的分子机制提供了理论依据。

参考文献 References：

[1] BOHN-COURSEAU I.Auxin：a major regulator of organogenesis[J].Comptes rendus biologies，2010，333(4)：290-296.

[2] PEER W A，MURPHY A S.Flavonoids and auxin transport：modulators or regulators[J].Trends in plant science，2007，12(12)：556-563.

[3] LJUNG K，BHALERAO R P，SANDBERG G.Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth[J].The plant journal，2001，28(4)：465-474.

[4] KERR I D，BENNETT M J.New insight into the biochemical mechanisms regulating auxin transport in plants[J].Biochemical journal，2007，401(3)：613-622.

[5] VANNESTE S，FRIML J.Auxin：a trigger for change in plant development[J].Cell，2009，136(6)：1005-1016.

[6] PÉRET B，SWARUP K，FERGUSON A，et al.*AUX/LAX* genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during *Arabidopsis* development[J].The plant cell，2012，24(7)：2874-2885.

[7] SWARUP K，BENKOVÁ E，SWARUP R，et al.The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence[J].Nature cell biology，2008，10(8)：946-954.

[8] BENNETT M J, MARCHANT A, GREEN H G, et al.*Arabidopsis AUX1* gene: a permease-like regulator of root gravitropism [J].Science, 1996, 273(5277): 948-950.

[9] SWARUP R, PÉRET B.AUX/LAX family of auxin influx carriers-an overview[J].Frontiers in plant science, 2012, 3(225): 1-11.

[10] DE SMET I, TETSUMURA T, DE RYBEL B, et al.Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*[J].Development, 2007, 134(4): 681-690.

[11] MARCHANT A, BHALERAO R P, CASIMIRO I, et al.AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling[J].The plant cell, 2002, 14(3): 589-597.

[12] ZAŽÍMALOVÁ E, KŘEČEK P, SKŮPA P, et al.Polar transport of the plant hormone auxin-the role of PIN-FORMED (PIN) proteins[J].Cellular and molecular life sciences, 2007, 64(13): 1621-1637.

[13] OKADA K, UEDA J, KOMAKI M K, et al.Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation[J].The plant cell, 1991, 3(7): 677-684.

[14] XIE X, QIN G, SI P, et al.Analysis of *Nicotiana tabacum PIN* genes identifies *NtPIN4* as a key regulator of axillary bud growth[J].Physiologia plantarum, 2017, 160(2): 222-239.

[15] ZHOU G F, ZHANG L P, LI B X, et al.Genome-wide identification of long non-coding RNA in trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf) leaves in response to boron deficiency[J].International journal of molecular sciences, 2019, 20(21): 5419.

[16] LI Q H, LIU Y Z, PAN Z Y, et al.Boron deficiency alters root growth and development and interacts with auxin metabolism by influencing the expression of auxin synthesis and transport genes[J].Biotechnology biotechnological equipment, 2016, 30(4): 661-668.

[17] KŘEČEK P, SKŮPA P, LIBUS J, et al.The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters[J].Genome biology, 2009, 10: 249.

[18] ZHOU G F, WEI Q J, LI B X, et al.Establishment and optisimization of a hydroponic system for root morphological and nutritional analysis of citrus[J].Scientia agricola, 2020, 77(4): e20180261.

[19] 陈叶丹,赵小艳,黑晶莹,等.筇竹钾离子通道*QtSKOR1*基因的克隆及表达分析[J].江西农业大学学报,2024,46(3):572-581.
CHEN Y D, ZHAO X Y, HEI J Y, et al.Cloning and expression analysis of *QtSKOR1* gene of *Qiongzhuea tumidinoda* potassium ion channel[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2024, 46(3): 572-581.

[20] ZHAO H, MA H, YU L, et al.Genome-wide survey and expression analysis of amino acid transporter gene family in rice (*Oryza sativa* L.)[J].PLoS one, 2012, 7(11): e49210.

[21] YU C L, SUN C D, SHEN C, et al.The auxin transporter, OsAUX1, is involved in primary root and root hair elongation and in Cd stress responses in rice (*Oryzasativa* L.)[J].The plant journal, 2015, 83(5): 818-830.

[22] YANG Y, WANG J, XU Y, et al.Genome-wide identification and expression analysis of *AUX/LAX* family genes in Chinese hickory (*Carya cathayensis* Sarg.) under various abiotic stresses and grafting[J].Frontiers in plant science, 2023, 13: 1060965.

[23] 杨乐,张康,李龙.毛竹*AUX1/LAX*候选基因家族鉴定与表达分析[J].西北林学院学报,2022,37(1):89-95.
YANG L, ZHANG K, LI L.Identification and expression analysis of *AUX1/LAX* gene family in Moso Bamboo[J].Journal of northwest forestry university, 2022, 37(1): 89-95.

[24] 方森,宋雪莲,韩轩轩,等.苹果*PIN*家族基因鉴定及在不定根形成中的表达分析[J].果树学报,2023,40(9):1789-1799.
FANG S, SONG X L, HAN X X, et al.Identification and expression analysis of *PIN* gene family during adventitious root formation in apple[J].Journal of fruit tree, 2023, 40(9): 1789-1799.

[25] 谭彬,杨丽萍,陈立川,等.桃*PIN*蛋白基因家族鉴定及其在不同树型桃中的表达分析[J].农业生物技术学报,2020,28(10):1747-1760.
TAN B, YANG L P, CHEN L C, et al.Identification and expression analysis of *PIN* gene family in different tree architectures of peach (*Prunus persica*)[J].Journal of agricultural biotechnology, 2020, 28(10): 1747-1760.

[26] 赵彦敏,孟亚轩,刘齐光,等.玉米*PIN*基因家族的鉴定和表达分析[J].分子植物育种,2024,22(18):5954-5965.

ZHAO Y M, MENG Y X, LIU Q G, et al.Identification and expression analysis of the *PIN* gene family in *Zea mays*[J].Molecular plant breeding, 2024, 22(18): 5954-5965.

[27] DING Z J, WANG B J, MORENO I, et al.ER-localized auxin transporter PIN8 regulates auxin homeostasis and male gametophyte development in *Arabidopsis*[J].Nature communications, 2012, 3(1): 941.

[28] SIMON S, SKŮPA P, VIAENE T, et al.PIN6 auxin transporter at endoplasmic reticulum and plasma membrane mediates auxin homeostasis and organogenesis in *Arabidopsis*[J].New phytologist, 2016, 211(1): 65-74.

[29] 刘玉飞, 庞丹丹, 李友勇等.茶树*PIN*基因家族的鉴定及表达分析[J].分子植物育种, 2020, 18(23): 7700-7710.
LIU Y F, PANG D D, LI Y Y, et al.Identification and expression analysis of *PIN* gene family in *Camellia sinensis*[J].Molecular plant breeding, 2020, 18(23): 7700-7710.

[30] 吕赟, 丘日光, 杨仕梅, 等.百脉根*PIN*基因家族的鉴定与分析[J].河南农业科学, 2019, 48(8): 39-48.
LYU Y, QIU R G, YANG S M, et al.Identification and analysis of *PIN* gene family in *Lotus cornicultus*[J].Henan agricultural science, 2019, 48(8): 39-48.

[31] SAINI S, SHARMA I, KAUR N, et al.Auxin: a master regulator in plant root development[J].Plant cell reports, 2013, 32(6): 741-757.

[32] LI K, KAMIYA T, FUJIWARA T.Differential roles of *PIN1* and *PIN2* in root meristem maintenance under low-B conditions in *Arabidopsis thaliana*[J].Plant and cell physiology, 2015, 56(6): 1205-1214.

[33] LIN T, ZHU H, HUANG Q, et al.PIN2/3/4 Auxin carriers mediate root auxin inhibition under conditions of boron deprivation in *Arabidopsis*[J].The plant journal, 2023, 115(5): 1357-1376.

[34] CAMACHO-CRISTÓBAL J J, MARTÍN-REJANO E M, HERRERA-RODRÍGUEZ M B, et al.Boron deficiency inhibits root cell elongation via an ethylene/auxin/ROS-dependent pathway in *Arabidopsis* seedlings[J].Journal of experimental botany, 2015, 66(13): 3831-3840.

[35] ZHOU G F, PENG S A, LIU Y Z, et al.The physiological and nutritional responses of seven different citrus rootstock seedlings to boron deficiency[J].Trees-structure and function, 2014, 28: 295-307.

（责任编辑：刘玉香）