

5 个枳 BOR 基因的克隆与缺硼胁迫下的表达分析

颜廷帅^{1,2} 罗 庆¹ 彭抒昂¹

1. 华中农业大学园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070; 2. 国家缓控释肥工程技术研究中心, 山东临沂 276700

摘要 以柑橘砧木枳 [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] 为材料, 克隆 BOR 基因家族 5 个成员 (*PtrBOR1*、*PtrBOR2*、*PtrBOR3*、*PtrBOR4*、*PtrBOR5*), 并用 qRT-PCR 技术检测了基因在缺硼胁迫下的表达。结果表明: 5 个 BOR 基因的 ORF 长度分别为 2 145、2 133、2 211、1 998 和 2 034 bp; 氨基酸多序列比对发现 *PtrBOR1*、*PtrBOR2* 和 *PtrBOR3* 具有细胞极性定位和内吞降解的氨基酸保守位点; 系统进化分析可将 *PtrBORs* 编码蛋白分为 2 个亚群, *PtrBOR1*、*PtrBOR2* 和 *PtrBOR3* 编码蛋白属于一个亚群, *PtrBOR4* 和 *PtrBOR5* 编码蛋白属于另一个亚群。qRT-PCR 的结果表明, *PtrBOR4* 在叶中表达量最高, 其余 *PtrBORs* 在根中表达量最高; 缺硼胁迫下 *PtrBORs* 表达量均发生变化, 且各成员表达模式各不相同, *PtrBOR1*、*PtrBOR2* 和 *PtrBOR3* 在根中表达量升高, *PtrBOR1*、*PtrBOR2* 和 *PtrBOR4* 在茎中表达量升高, *PtrBOR1* 在叶中表达量升高, *PtrBOR1* 和 *PtrBOR2* 都在至少 2 个组织中表达量升高。

关键词 枳; 缺硼胁迫; BOR 基因家族; qRT-PCR

中图分类号 S 666 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)05-0009-09

柑橘主产区缺硼现象比较普遍, 缺硼造成柑橘叶脉木栓化、新梢顶枯, 果实产量与品质下降, 造成严重的经济损失, 影响柑橘产业的健康发展^[1]。柑橘树体主要从土壤中吸收硼, 土壤和植物体中的硼以硼酸分子的形式存在, 硼酸的膜渗透系数为 $8 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ^[2], 如此高的渗透系数使得长期以来人们认为植物主要以被动运输的形式吸收和运输硼; 然而, 生理研究表明植物体可能存在其他硼吸收和运输的方式, 代谢抑制剂和冷害抑制根部硼的吸收^[3]; 低硼培养条件下向日葵根部共质体的硼浓度高于培养基中的硼浓度^[4]。

随后发现了一系列转运硼的蛋白, 主要分布于 MIP 基因家族和 BOR 基因家族。BOR 基因家族硼运输蛋白的研究在模式植物拟南芥较深入; *AtBOR1* 促进硼向木质部的装载^[5]; *AtBOR2* 运输根部共质体的硼到质外体, 促进根部细胞壁硼糖复合物的形成, 从而保证根部延长区细胞的正常伸长^[6]; *AtBOR4* 增强拟南芥对高硼胁迫的耐受性^[7]。在其他植物中如水稻^[8-9]、葡萄^[10]、大麦^[11]、小麦^[12]、油菜^[13]也发现 BOR 基因家族编码的蛋白具有转运硼的作用。MIP 基因家族中也发现了与硼吸收和运

输有关的蛋白; MIP 家族的 NIP 亚族拟南芥 *AtNIP5* 具有吸收硼进入根部细胞的作用^[14], *AtNIP6* 具有优先运输硼至生长的嫩芽组织的作用^[15]; MIP 家族的 PIP 亚族大麦 *Hv-PIP1;3* 和 *Hv-PIP1;4* 在酵母细胞中的表达增加了酵母细胞对硼的敏感性^[16]。

柑橘砧木枳 *PtrNIP5* 和 *PtrNIP6* 在烟草中的超表达增加了硼在烟草中的积累量^[17], 柑橘品种大翼橙 *CmBOR1* 在拟南芥中超表达增强了拟南芥对硼缺乏的耐受性^[18]。关于柑橘 BOR 基因家族成员在硼吸收和运输中的作用的研究较少。本研究以柑橘砧木枳为材料, 克隆 BOR 基因家族成员, 并运用 qRT-PCR 技术测定缺硼胁迫下 BOR 基因家族成员的表达量, 从而筛选出响应缺硼胁迫的基因, 为进一步研究 BOR 基因家族成员在硼转运过程中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

试验材料为在蛭石中生长 3 个月的枳幼苗。

植物 RNA 提取试剂 TaKaRa RNAiso Rea-

收稿日期: 2015-11-24

基金项目: 高等学校博士学科点专项 (20130146110020)

颜廷帅, 硕士。研究方向: 果树分子生理。E-mail: yanaiyanzhi@163.com

通信作者: 彭抒昂, 博士, 教授。研究方向: 果树生理生态。E-mail: shuangpeng428@126.com

gent、第 1 链 cDNA 反转录试剂盒 PrimeScript RT reagent kit(Perfect Real Time)、qPCR 试剂 SYBR Prime Ex-Taq TM II (Perfect Real Time)和克隆载体 pMD18-T 均购自大连宝生物工程有限公司; PCR 试剂 $2\times Taq$ PCR MasterMix 和 Marker 购自北京庄盟生物公司; GenClean 胶回收试剂盒购自上海捷瑞生物公司; 大肠杆菌 DH5 α 感受态购自北京全式金生物公司; 引物合成于武汉天一辉远生物公司。

1.2 枳幼苗的缺硼胁迫处理

选取生长一致的枳幼苗转入 1/2 Hoagland 和 Arnon(全浓度)溶液, 于光周期 16 h 光照/8 h 黑暗和昼 28 $^{\circ}\text{C}$ /夜 22 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温箱中培养。待枳幼苗长出新根后, 进行缺硼胁迫处理: 将枳幼苗随机分为 2 组, 分别移入含有 0 mg/L(缺硼, -B)和 0.25 mg/L(对照, Control)的 1/2 Hoagland 和 Arnon(全浓度)溶液培养 0、1/4、1/2、1、3、7 d 后采样, 采样部位分别为根、茎和叶, 迅速置于液氮速冻, 储存于超低温冰箱(-80 $^{\circ}\text{C}$)备用。

1.3 总 RNA 的提取及第 1 链 cDNA 的合成

参照 TaKaRa RNaiso Reagent 说明书提取总

RNA。参照 PrimeScript RT reagent Kit(Perfect Real Time)说明书合成第 1 链 cDNA。

1.4 引物设计及基因 ORF 序列的克隆

以 *AtBOR1*(NCBI 登录号: [NM-180138](#))为查询序列, 运用甜橙基因组数据库([citrus.hzau.edu.cn/orange/index.php](#))的 BLASTP 程序进行检索。搜索得到甜橙 *BOR* 基因家族的全部 5 个基因, 命名为 *CsBOR1* ([Cs5g05540](#))、*CsBOR2* ([orange1.1t01735](#))、*CsBOR3* ([Cs9g01620](#))、*CsBOR4* ([Cs1g13310](#))和 *CsBOR5* ([Cs1g13320](#))。根据甜橙 *BOR* 基因家族的转录本序列, 运用软件 Primer Premier 5.0 设计引物, 用于枳 *BOR* 基因 ORF 序列的克隆, 引物序列如表 1 所示。根据 $2\times Taq$ PCR MasterMix 的说明书扩增枳 *BOR* 基因, 所用的 25 μL 反应体系如下: $2\times$ MasterMix 12.5 μL , 上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)0.5 μL , 下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)0.5 μL , 模板 cDNA 1 μL , 加水至终体积 25 μL 。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min, 34 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 30 min。PCR 反应结束后, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后用 EB 染色 5 min, 使用凝胶成像系

表 1 基因克隆及 qPCR 引物序列

Table 1 Primers used in gene cloning and qPCR

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	用途 Description
PtrBOR1-F	ATGGAAGAAACATTTGTTCCCTTC	DNA 扩增
PtrBOR1-R	TTAGCATGGAGATGAACCGTACT	DNA amplification
PtrBOR2-F	CAGAACAATGGAAGAAACATTTGT	DNA 扩增
PtrBOR2-R	AACTCCTGGAAAGTAGATAGATCG	DNA amplification
PtrBOR3-F	ATGGAGGAAAGCTTTGTGCCATTT	DNA 扩增
PtrBOR3-R	CTAGCCACTTTTACCTAGATTAGATG	DNA amplification
PtrBOR4-F	ATGCCTAATATGACTGCTCTCACTTT	DNA 扩增
PtrBOR4-R	TTACTCTATTTCAACAATACCTTCTGGAT	DNA amplification
PtrBOR5-F	ATGGAGAACATGAAAACCCCATTT	DNA 扩增
PtrBOR5-R	TTAAGAATAAAGAAACCAGAATAC	DNA amplification
qPtrBOR1-F	CGGCACTTTGTGGTATCATC	qPCR
qPtrBOR1-R	ATGGACAGCAAGAAAAGCAA	qPCR
qPtrBOR2-F	ATTCTGCCAAGTTTTTC	qPCR
qPtrBOR2-R	GCACCCATCTGTGTCTCT	qPCR
qPtrBOR3-F	TTTTGACCATAGTGTTCATCC	qPCR
qPtrBOR3-R	TAACTGGTGCTTCAGGGTTG	qPCR
qPtrBOR4-F	CTACAGCTCTTGTGGCATTG	qPCR
qPtrBOR4-R	TGCCAGAAGAAACAGCATAAGA	qPCR
qPtrBOR5-F	GCTTACTTGCTGTCCGAGT	qPCR
qPtrBOR5-R	GGAGCATCCTTTCCAGAAC	qPCR
β -Actin-F	CCGACCGTATGAGCAAGGAAA	qPCR
β -Actin-R	TTCCTGTGGACAATGGATGGA	qPCR

统拍照。根据 GenClean 胶回收试剂盒说明书回收 PCR 产物并与 pMD18-T 载体连接,热激法转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,筛选阳性克隆交由武汉天一辉远生物工程有限公司测序。

1.5 生物信息学分析

运用 TMHMM Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测蛋白质跨膜区域,ExPASy ProtParam tool (<http://www.expasy.org/prosite/>)预测蛋白质分子质量和等电点,ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)进行多序列氨基酸比对和一致性分析,MEGA 5.0 软件的 Neighbor-Joining 算法构建蛋白质系统进化树。

1.6 PtrBORs 的表达分析

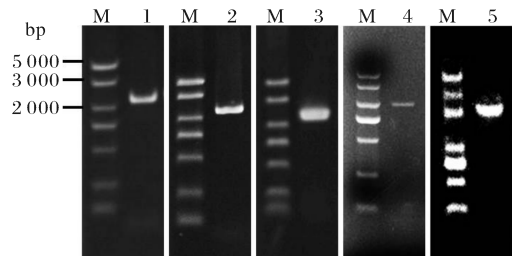
以 β -Actin 为内参,用 Primer Premier 5.0 设计定量引物,引物序列列表 1。以稀释 5 倍的 cDNA 为 qPCR 反应的底物,按照 SYBR Premix Ex Taq II 说明书,采用 10 μ L 反应体系;SYBR Premix Ex Taq II 5 μ L,上游引物(10 μ mol/L)0.4 μ L,下游引物(10 μ mol/L)0.4 μ L,cDNA 0.5 μ L,加水至终体积 10 μ L。于罗氏 LightCycler 480 仪器中进行 qPCR 反应,程序设定为:95 $^{\circ}$ C 30 s;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 0 s;50 $^{\circ}$ C 30 s。每个样品的 cDNA 扩增反应进行 4 次独立重复,PtrBORs 相对表达水平用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行计算,最后利用 SPSS 16.0 中 Duncan's 多重比较法进行显著性分析($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 枳 BOR 基因家族成员的克隆及测序

甜橙基因组与枳基因组具有高度同源性,在甜

橙基因组中检索到 5 个 BOR 基因,BOR 基因家族成员在枳中也有 5 个,BOR 基因家族成员 PCR 扩增产物的电泳如图 1,片段大小均介于 2 000~3 000 bp。PtrBOR1、PtrBOR2、PtrBOR3、PtrBOR4 和 PtrBOR5 的 ORF 长度分别为 2 145、2 133、2 211、1 998 和 2 034 bp。分别与甜橙数据库 CsBOR1 (Cs5g05540)、CsBOR2 (orange1.lt01735)、CsBOR3 (Cs9g01620)、CsBOR4 (Cs1g13310) 和 CsBOR5 (Cs1g13320) 的 ORF 序列进行相似性比对,相似性分别为 99%、99%、99%、79% 和 99%。



M:Marker; 1:PtrBOR1 PCR 产物; 2:PtrBOR2 PCR 产物; 3:PtrBOR3 PCR 产物; 4:PtrBOR4 PCR 产物; 5:PtrBOR5 PCR 产物。M:Marker; 1:PCR product of PtrBOR1; 2:PCR product of PtrBOR2; 3:PCR product of PtrBOR3; 4:PCR product of PtrBOR4; 5:PCR product of PtrBOR5.

图 1 PtrBORs PCR 扩增产物电泳图

Fig.1 PtrBORs amplified by RT-PCR

2.2 枳 BOR 基因家族的生物信息学分析

图 2 所示为 PtrBORs 蛋白质跨膜结构预测,黑色方框为蛋白质可能的跨膜区域。跨膜结构预测表明 PtrBOR1、PtrBOR3 和 PtrBOR4 蛋白质跨膜结构数相同,都为 10;PtrBOR2 蛋白质跨膜结构数最少,为 9;PtrBOR5 蛋白质跨膜结构数最多,为 12。

图 3 所示为多序列氨基酸比对,黑框所示为 AtBOR1 蛋白极性定位的保守酪氨酸(Y)位点^[19],

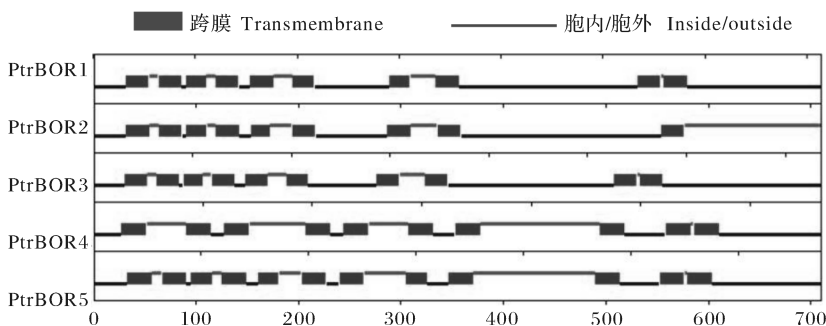


图 2 PtrBORs 的跨膜结构

Fig.2 The transmembrane regions of PtrBORs

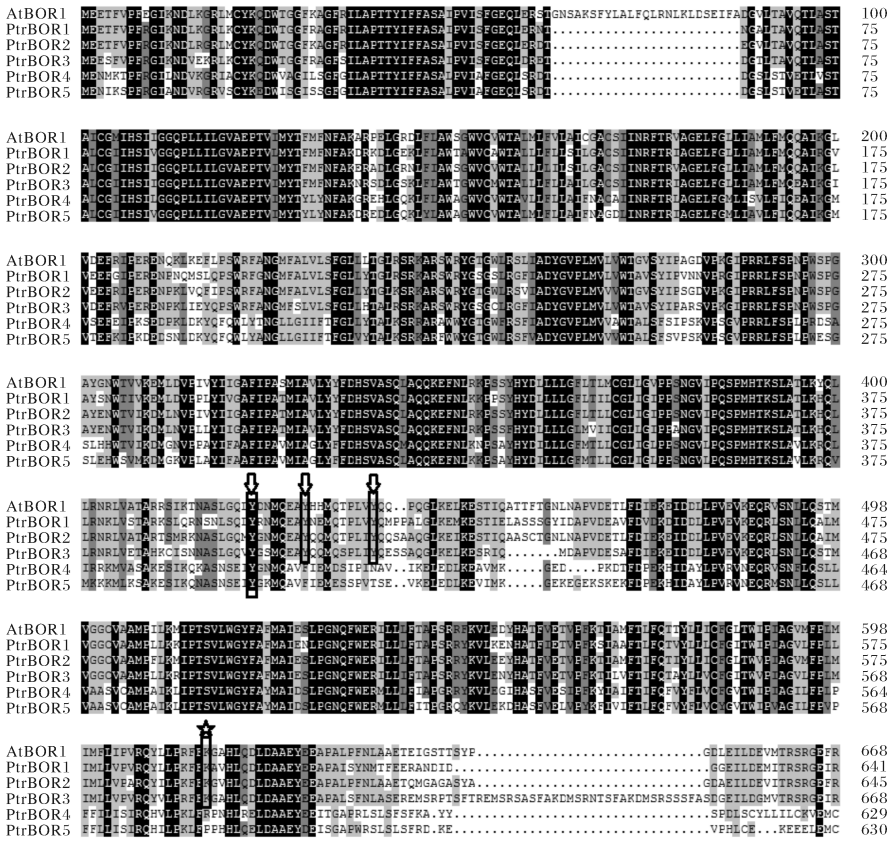


图 3 PtrBORs 与 AtBOR1 蛋白多序列氨基酸比对

Fig.3 Multiple sequence alignments of PtrBOR proteins and AtBOR1 protein

PtrBOR1、PtrBOR2 和 PtrBOR3 蛋白均具有此保守位点；黑框和星号所示为 AtBOR1 蛋白内吞、降解的保守赖氨酸(K)位点^[20]，PtrBOR1、PtrBOR2 和 PtrBOR3 蛋白均具有此保守位点。

PtrBORs 蛋白的特征描述如表 2。PtrBORs 分布在不同的染色体上，其中 PtrBOR4 和 PtrBOR5

同在 1 号染色体，PtrBOR2 未知，PtrBOR1 和 PtrBOR3 分别位于 5 号和 9 号染色体；PtrBOR1、PtrBOR2 和 PtrBOR3 蛋白分子质量大于 PtrBOR4、PtrBOR5；PtrBORs 蛋白质等电点基本一致；PtrBOR1、PtrBOR2 和 PtrBOR3 蛋白质氨基酸序列长

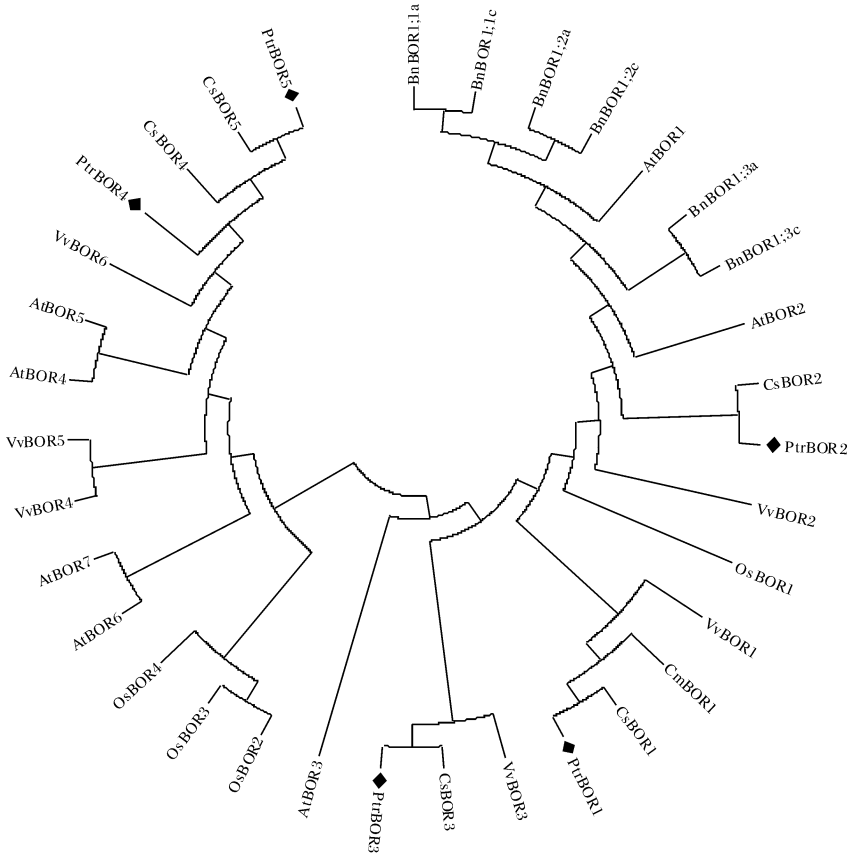
表 2 PtrBORs 蛋白的特征描述

Table 2 Description of PtrBOR proteins in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.

名称 Name	氨基酸长度 Protein length	染色体 Chr	分子质量/ku M	等电点 pI	一致性/% Identity			
					PtrBOR2	PtrBOR3	PtrBOR4	PtrBOR5
PtrBOR1	714	5	79.81	9.11	78	75	55	55
PtrBOR2	710	未知 Unknown	79.30	9.09		80	58	57
PtrBOR3	736	9	82.40	9.14			57	58
PtrBOR4	665	1	74.96	8.49				81
PtrBOR5	677	1	76.49	9.11				

蛋白质系统进化树如图 4 所示,枳 BOR 蛋白家族主要分为 2 个亚群,PtrBOR1、PtrBOR2 和 PtrBOR3 属于一个亚群,与 CsBOR1、CsBOR2、CsBOR3 和 AtBOR1、AtBOR2、AtBOR3 编码蛋白进

化关系较近;PtrBOR4 和 PtrBOR5 编码蛋白属于另一个亚群,与 CsBOR4、CsBOR5 和 AtBOR4、AtBOR5、AtBOR6、AtBOR7 编码蛋白进化关系较近。



图中所用序列的登录号如下 Accession numbers used in phylogenetic tree are as follows: AtBOR1 (NC_003071), AtBOR2 (NP_191786), AtBOR3 (NP_187296), AtBOR4 (NP_172999), AtBOR5 (NP_177619), AtBOR6 (NP_197925), AtBOR7 (NP_194977), OsBOR1 (AK070617), OsBOR2 (DQ421408), OsBOR3 (AK072421), OsBOR4 (DQ421409), CsBOR1 (Cs5g05540), CsBOR2 (orange1.1 t01735.1), CsBOR3 (Cs9g01620), CsBOR4 (Cs1g13310), CsBOR5 (Cs1g13320), BnBOR1; 1a (GU827651), BnBOR1; 1c (GU827652.1), BnBOR1; 2a (GU827656.1), BnBOR1; 2c (GU827655.1), BnBOR1; 3a (GU827654.1), BnBOR1; 3c (GU827653.1), VvBOR4 (XP_002281778), VvBOR5 (XP_002282436), VvBOR1 (XP_002282501.1), VvBOR3 (XP_002263974), VvBOR2 (XP_002272575), VvBOR6 (XP_002285279), CmBOR1 (EF581174).

图 4 BOR 蛋白系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of BOR proteins

2.3 PtrBORs 在不同组织中的表达和缺硼胁迫条件下的表达模式

1) *PtrBORs* 在不同组织中的表达。为了确定 *PtrBORs* 在不同组织中的表达情况,用 qRT-PCR 的方法测定了这些基因在根、茎和叶中的相对表达量(图 5)。结果显示:*PtrBOR1* 在根中表达量极显著高于茎和叶,茎中表达量显著高于叶(图 5A);*PtrBOR2* 在根中表达量最高,茎和叶中表达量无显著性差异(图 5B);*PtrBOR3* 在根中表达量极显著

高于茎和叶,茎中表达量次之,叶中表达量最低(图 5C);*PtrBOR4* 在叶中表达量极显著高于根和茎,根和茎中表达量无显著性差异(图 5D);*PtrBOR5* 在根中表达量极显著高于茎和叶,茎中表达量次之,叶中表达量最低(图 5E)。

2) *PtrBORs* 在缺硼胁迫下的表达模式。为了确定 *PtrBORs* 在缺硼胁迫下的表达情况,用 qRT-PCR 的方法测定了缺硼胁迫下这些基因在根、茎和叶中的相对表达量(图 6)。结果显示:*PtrBOR1* 在

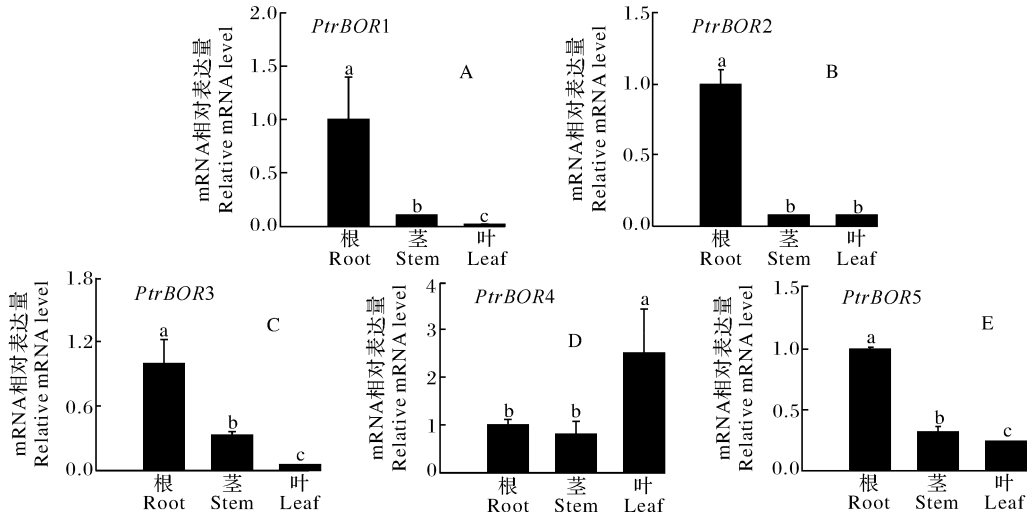


图 5 *PtrBORs* 在枳根、茎、叶中的表达

Fig.5 Relative transcription levels of *PtrBORs* in roots, stems and leaves

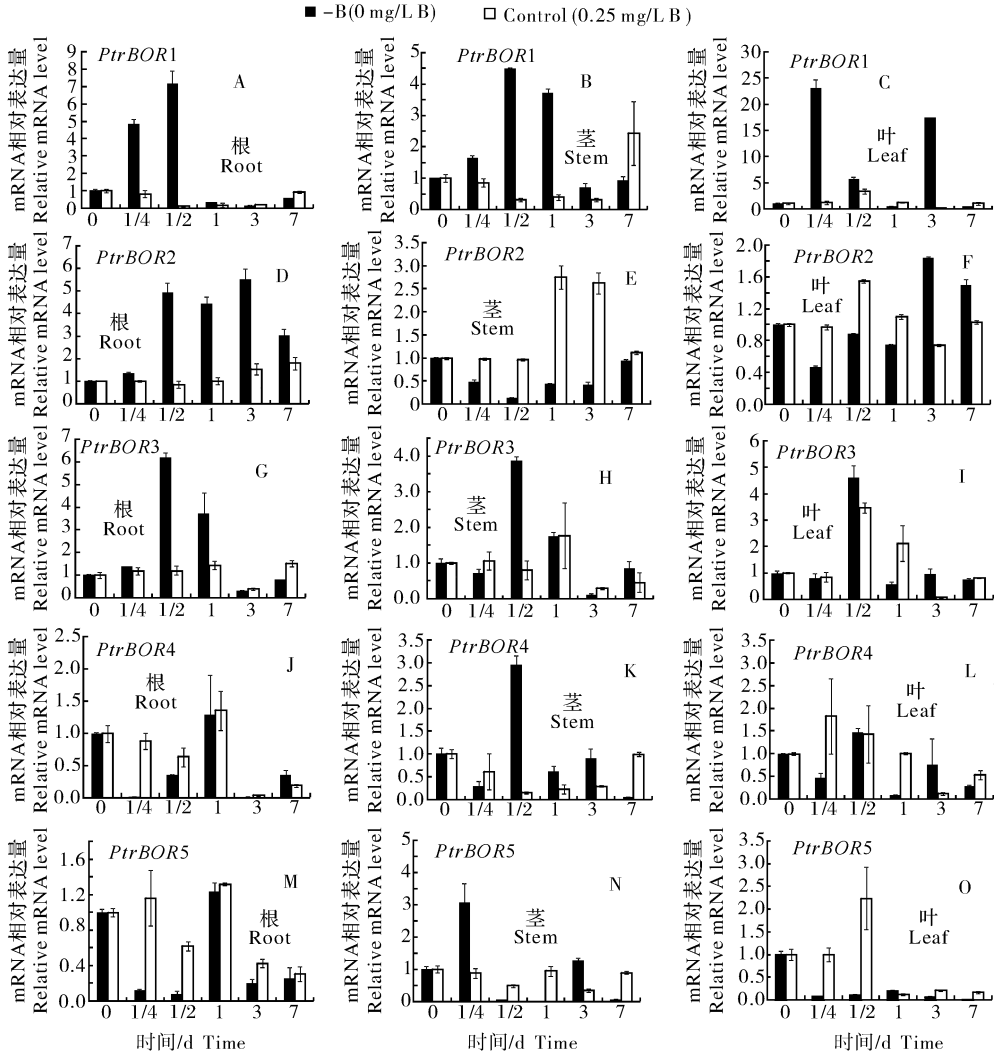


图 6 *PtrBORs* 在缺硼胁迫下的表达

Fig.6 Relative transcription levels of *PtrBORs* under B-deficiency

根中1/4 d时表达量升高,1/2 d时表达量达到最大值,为对照的57.69倍,后期表达量与对照差异不大(图6A);*PtrBOR1*在茎中1/2 d时表达量升高,为对照的14.44倍,1 d时表达量降低但仍高于对照,其余时间表达量与对照差异不大(图6B);*PtrBOR1*在叶中1/4 d时表达量升高,为对照的19.76倍,1/2 d后降低至与对照差异不大,3 d时表达量升高(图6C)。

*PtrBOR2*在根中1/2 d时表达量显著升高,一直持续到7 d时表达量仍显著高于对照(图6D)。*PtrBOR2*在茎中1/4 d时表达量降低,持续到3 d时表达量仍显著低于对照(图6E)。*PtrBOR2*在叶中各个时期与对照的差异均不大(图6F)。

*PtrBOR3*在根中1/2 d时表达量升高至最高,为对照的5.15倍,1 d时表达量仍高于对照,其他时期表达量与对照差异不大(图6G)。*PtrBOR3*在茎中1/2 d表达量升高,为对照的4.81倍,其余时间与对照差异不大(图6H)。*PtrBOR3*在叶中各个时期与对照的差异均不大(图6I)。

*PtrBOR4*在根中1/4 d时表达量降低,其余时间表达量与对照差异不大(图6J)。*PtrBOR4*在茎中1/2 d表达量升高,7 d表达量降低(图6K)。*PtrBOR4*在叶中各个时期与对照的差异均不大(图6L)。

*PtrBOR5*在根中1/4 d和1/2 d时表达量降低,其余时间表达量与对照差异不大(图6M)。*PtrBOR5*在茎中1/2 d时表达量降低,1 d时表达量仍降低,3 d时表达量升高至与对照差异不大,7 d时表达量降低(图6N)。*PtrBOR5*在叶中1/4 d和1/2 d时表达量降低(图6O)。

*PtrBOR1*在叶中前期和后期表达量升高,*PtrBOR1*在根中和茎中表达量也升高,但与根和茎中*PtrBOR1*升高的时期不同。*PtrBOR2*、*PtrBOR3*和*PtrBOR4*在叶中各个时期表达量变化均不大,而在根和茎中这3个基因表达量均表现出变化。*PtrBOR5*在叶中前期表达量降低,与根中反应完全相同,与茎中表达量降低的时期不同。

3 讨论

3.1 枳中BOR基因家族成员

BOR基因家族成员较少,在拟南芥基因组和水稻基因组中分别有7个和4个成员^[18]。本研究在

甜橙基因组检索到了5个BOR基因,并在枳中进行了克隆验证。*PtrBORs*编码的BOR蛋白与来自植物的其他BOR蛋白类似,具有9~12个跨膜区,且分子质量都较大。拟南芥*AtBOR1*蛋白保守K位点,是泛素化蛋白质内吞降解的识别位点,*PtrBOR1*、*PtrBOR2*和*PtrBOR3*蛋白均具有保守K位点,可能表明蛋白质降解的途径与*AtBOR1*蛋白类似^[20]。*PtrBOR1*、*PtrBOR2*和*PtrBOR3*蛋白也具有与拟南芥*AtBOR1*蛋白相同的极性位点相关的3个保守Y位点,可能极性定位于细胞膜^[19]。*PtrBOR4*和*PtrBOR5*蛋白没有保守K位点,只有1个保守Y位点,蛋白质降解途径和细胞膜定位可能与*AtBOR1*蛋白不同。

3.2 枳中BOR基因在硼转运过程中具有重要作用

BOR基因参与的硼运输主要在特定组织起作用,如拟南芥*AtBOR1*和*AtBOR2*在硼向木质部过程中起作用^[7-8],*AtBOR4*主要在地上部表达参与硼毒害胁迫下的调节^[7]。目前已证明具有硼运输的BOR基因所编码的蛋白质为定位于细胞膜上的主动运输蛋白,且全部外运硼至细胞外,BOR基因通过调节硼在植物体内的运输维持硼稳态。本试验中*PtrBORs*主要在某一部位表达,在其他部位表达量较低,表明枳中参与硼运输的BOR基因可能主要在硼吸收、运输和分配的某一环节中起作用。

*PtrBOR1*的组织表达特异性与拟南芥^[5]、油菜^[13]、葡萄^[10]、大翼橙^[18]和水稻^[8]中BOR1基因相同,*PtrBOR2*的组织表达特异性与拟南芥*AtBOR2*相同^[6],*PtrBOR4*的组织表达特异性与拟南芥*AtBOR4*相同^[7],这表明BOR基因的组织表达特异性不因植物种类的变化而变化,枳中BOR蛋白与其他物种中相应的BOR蛋白可能有相同的功能。*PtrBORs*在各组织中均有表达,除*PtrBOR4*在叶中表达量最高外,其他*PtrBORs*均在根中表达量最高。

缺硼胁迫前期根中*PtrBOR1*表达量显著升高,响应缺硼胁迫,中期和后期根中*PtrBOR1*的表达量变化与对照相比变化不大,与拟南芥和大翼橙BOR1基因在缺硼胁迫下表达量的变化相同,这表明缺硼前期*PtrBOR1*可能以转录调节为主,后期*PtrBOR1*与拟南芥*AtBOR1*同为转录后调节^[21]。茎和叶中*PtrBOR1*表达量急剧升高,这与大翼橙*CmBOR1*的表达量变化相同^[18],而拟南芥茎中

AtBOR1 表达量在缺硼胁迫下则无显著变化^[21]。*PtrBOR1* 可能具有与拟南芥 *AtBOR1* 类似的功能, 缺硼胁迫下主动运输硼到木质部。

拟南芥 *AtBOR2* 在硼由共质体向质外体的运输过程中起重要作用, 缺硼胁迫下 *AtBOR2* 蛋白在根部的积聚量增加^[6], 而根中 *PtrBOR2* 表达量在中期和后期升高, 表明根中 *PtrBOR2* 与 *AtBOR2* 在缺硼胁迫下的反应相同且缺硼胁迫下在根硼运输过程中起重要作用。缺硼后期茎中 *PtrBOR2* 表达量上升, 表明 *PtrBOR2* 可能在硼向地上部的运输过程中起作用。

缺硼胁迫下根、茎和叶中 *PtrBOR1* 表达量均上升, *PtrBOR2* 根和茎中 *PtrBOR2* 表达量上升, 表明 *PtrBOR1* 和 *PtrBOR2* 可能参与缺硼胁迫下硼转运的调节。

参 考 文 献

- [1] 王南南, 彭抒昂, 刘永忠. 柑橘硼营养研究现状与展望[J]. 华中农业大学学报, 2015, 34(4): 137-143.
- [2] RAVEN J A. Short-and long-distance transport of boric acid in plants[J]. New phytologist, 1980, 84(2): 231-249.
- [3] DORDAS C, CHRISPEELS M J, BROWN P H. Permeability and channel-mediated transport of boric acid across membrane vesicles isolated from squash roots[J]. Plant physiology, 2000, 124(3): 1349-1362.
- [4] STANGOULIS J C R, REID R J, BROWN P H, et al. Kinetic analysis of boron transport in Chara[J]. Planta, 2001, 213(1): 142-146.
- [5] TAKANO J, NOGUCHI K, YASUMORI M, et al. *Arabidopsis* boron transporter for xylem loading[J]. Nature, 2002, 420(6913): 337-340.
- [6] MIWA K, WAKUTA S, TAKADA S, et al. Roles of BOR2, a boron exporter, in cross linking of rhamnogalacturonan II and root elongation under boron limitation in *Arabidopsis*[J]. Plant physiology, 2013, 163(4): 1699-1709.
- [7] MIWA K, FUJIWARA T. Role of overexpressed BOR4, a boron exporter, in tolerance to high level of boron in shoots[J]. Soil science and plant nutrition, 2011, 57(4): 558-565.
- [8] NAKAGAWA Y, HANAOKA H, KOBAYASHI M, et al. Cell-type specificity of the expression of *OsBOR1*, a rice efflux boron transporter gene, is regulated in response to boron availability for efficient boron uptake and xylem loading[J]. The plant cell, 2007, 19(8): 2624-2635.
- [9] TANAKA N, URAGUCHI S, SAITO A, et al. Roles of pollen-specific boron efflux transporter, *OsBOR4*, in the rice fertilization process[J]. Plant and cell physiology, 2013, 54(12): 2011-2019.
- [10] PÉREZ-CASTRO R, KASAI K, GAINZA-CORTÉS F, et al. *VvBOR1*, the grapevine ortholog of *AtBOR1*, encodes an efflux boron transporter that is differentially expressed throughout reproductive development of *Vitis vinifera* L.[J]. Plant and cell physiology, 2012, 53(2): 485-494.
- [11] SUTTON T, BAUMANN U, HAYES J, et al. Boron-toxicity tolerance in barley arising from efflux transporter amplification[J]. Science, 2007, 318(5855): 1446-1449.
- [12] LEAUNGTHITIKANCHANA S, FUJIBE T, TANAKA M, et al. Differential expression of three *BOR1* genes corresponding to different genomes in response to boron conditions in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. Plant and cell physiology, 2013, 54(7): 1056-1063.
- [13] SUN J, SHI L, ZHANG C, et al. Cloning and characterization of boron transporters in *Brassica napus*[J]. Molecular biology reports, 2012, 39(2): 1963-1973.
- [14] TAKANO J, WADA M, LUDEWIG U, et al. The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5; 1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation[J]. The plant cell, 2006, 18(6): 1498-1509.
- [15] TANAKA M, WALLACE I S, TAKANO J, et al. NIP6; 1 is a boric acid channel for preferential transport of boron to growing shoot tissues in *Arabidopsis*[J]. The plant cell, 2008, 20(10): 2860-2875.
- [16] FITZPATRICK K L, REID R J. The involvement of aquaglyceroporins in transport of boron in barley roots[J]. Plant, cell & environment, 2009, 32(10): 1357-1365.
- [17] 安吉翠. 柑橘硼运输基因 *CiNIP5* 和 *CiNIP6* 的克隆和功能鉴定[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
- [18] CAÑON P, AQUEA F, DE LA GUARDIA A R, et al. Functional characterization of *Citrus macrophylla* BOR1 as a boron transporter[J]. Physiologia plantarum, 2013, 149(3): 329-339.
- [19] YOSHINARI A, KASAI K, FUJIWARA T, et al. Polar localization and endocytic degradation of a boron transporter, BOR1, is dependent on specific tyrosine residues[J]. Plant signaling & behavior, 2012, 7(1): 46-49.
- [20] KASAI K, TAKANO J, MIWA K, et al. High boron-induced ubiquitination regulates vacuolar sorting of the BOR1 borate transporter in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of biological chemistry, 2011, 286(8): 6175-6183.
- [21] TAKANO J, MIWA K, YUAN L, et al. Endocytosis and degradation of BOR1, a boron transporter of *Arabidopsis thaliana*, regulated by boron availability[J]. PNAS, 2005, 102(34): 12276-12281.

Cloning five *BOR* genes of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and analyzing their expression under boron deficiency

YAN Tingshuai^{1,2} LUO Qing¹ PENG Shu'ang¹

1.Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2.National Engineering Research Center for Slow/Controlled Release Fertilizers, Linshu 276700, Shandong Province, China

Abstract Five *BOR* gene family members were cloned from seedlings of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) with RT-PCR and the expression patterns of these genes were analyzed with qRT-PCR (real-time quantitative PCR) under the boron deficiency. The results showed that the open reading frame (ORF) of *PtrBOR1*, *PtrBOR2*, *PtrBOR3*, *PtrBOR4* and *PtrBOR5* was 2 145, 2 133, 2 211, 1 998 bp and 2 034 bp, respectively. The result of multiple sequence alignment of amino acid showed that *PtrBOR1*, *PtrBOR2* and *PtrBOR3* had the conserved endocytosis degradation and polar orientation residues. The phylogenetic tree classified *PtrBOR* proteins into two subgroups including one subgroup of *PtrBOR1*, *PtrBOR2* and *PtrBOR3* proteins and another subgroup of *PtrBOR4* and *PtrBOR5* proteins. The result of qRT-PCR analyses showed that *PtrBOR4* was expressed mainly in leaves, while other *PtrBORs* were expressed mainly in roots. The expression of *PtrBORs* varied differently under the boron deficiency. The expression of *PtrBOR1*, *PtrBOR2* and *PtrBOR3* was upregulated in roots. The expression of *PtrBOR1*, *PtrBOR2* and *PtrBOR4* was upregulated in stems. The expression of *PtrBOR1* was upregulated in leaves. The expression of *PtrBOR1* and *PtrBOR2* was upregulated in two types of tissues at least.

Keywords *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.; boron deficiency; *BOR* gene family; qRT-PCR

(责任编辑:张志钰)