

引用格式:

杨长耀, 陈岳文, 杨俊枫, 粟芳, 向孝华, 吴心怡, 李佳轩, 常媛媛, 卢晓鹏. 柑橘扩张蛋白(EXP)基因家族的鉴定及其在橙类汁胞膨大中的表达模式[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2024, 50(5): 27–37.

YANG C Y, CHEN Y W, YANG J F, SU F, XIANG X H, WU X Y, LI J X, CHANG Y Y, LU X P. Identification of the citrus expansin(EXP) gene family and its expression patterns during orange juice sac expansion[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2024, 50(5): 27–37.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



柑橘扩张蛋白(EXP)基因家族的鉴定及其在橙类汁胞膨大中的表达模式

杨长耀^{1,2}, 陈岳文^{1,2}, 杨俊枫^{1,2}, 粟芳³, 向孝华³,
吴心怡^{1,2}, 李佳轩^{1,2}, 常媛媛^{1,2}, 卢晓鹏^{1,2*}

(1.湖南农业大学园艺学院, 湖南 长沙 410128; 2.国家柑橘改良中心长沙分中心, 湖南 长沙 410128; 3.洪江市农业农村局, 湖南 洪江 418116)

摘要:以柑橘属橘类(克里曼丁橘)、橙类(甜橙)、柚类(晚白柚)为研究对象,应用生物信息学方法对柑橘扩张蛋白(EXP)基因家族成员进行鉴定,对其进化发育、结构特征、顺式作用元件和共线性进行分析;研究‘黔阳冰糖橙’和‘纽荷尔脐橙’汁胞膨大变化过程中 EXP 基因的表达模式。结果从橙类(甜橙)、橘类(克里曼丁橘)、柚类(晚白柚)中分别鉴定出 30、32 和 26 个扩张蛋白成员;橙类、橘类和柚类分别含有 7 对、8 对和 5 对片段重复,橘类和柚类分别含有 1 对串联重复,推测在 EXP 基因进化过程中以片段重复为主;监测膨大期不同品种甜橙果实发现,‘纽荷尔脐橙’单个汁胞体积显著大于‘黔阳冰糖橙’的,且随着果实的膨大,单个汁胞体积差异逐渐增加;基因表达分析结果显示, *CsEXPA6*、*CsEXPA9*、*CsEXPA12*、*CsEXPA15* 在甜橙果实汁胞组织中高度表达;果实膨大期 *CsEXPA6* 和 *CsEXPA15* 在‘纽荷尔脐橙’汁胞中的表达量显著高于‘黔阳冰糖橙’的, *CsEXPA6*、*CsEXPA15* 的表达与汁胞体积呈极显著正相关,推测 *CsEXPA6*、*CsEXPA15* 可能通过调控汁胞膨大影响果实大小。

关键词: 柑橘; 扩张蛋白; 基因家族; 果实大小; 汁胞; 膨大期

中图分类号: S666; Q786

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2024)05-0027-11

Identification of the citrus expansin(EXP) gene family and its expression patterns during orange juice sac expansion

YANG Changyao^{1,2}, CHEN Yuewen^{1,2}, YANG Junfeng^{1,2}, SU Fang³, XIANG Xiaohua³,
WU Xinyi^{1,2}, LI Jiaxuan^{1,2}, CHANG Yuanyuan^{1,2}, LU Xiaopeng^{1,2*}

(1.College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2.National Center for Citrus Improvement(Changsha), Changsha, Hunan 410128, China; 3.Bureau of Agriculture and Rural Affairs, Hongjiang, Hunan 418116, China)

Abstract: In this study, three oranges, tangerine(Clementine), orange(sweet orange) and pummelo(Wanbaiyou) were used raw material to identify EXP family members with bioinformatics methods. Their evolutionary development, structural characteristics, cis-acting elements, collinearity and the expression patterns of EXP in the process of juice sac expansion of ‘Qianyang bingtang orange’ and ‘Newhall navel orange’ were analyzed. The results revealed that 32, 30 and 26 dilatorin members were identified from tangerine(Clementine), orange(sweet orange) and pummelo(Wanbaiyou), respectively. The results of collinearity analysis showed that oranges, tangerines and pummelos contained 7 pairs, 8 pairs and 5 pairs of fragment repeats, respectively, while oranges and pomelo contained 1 pair of tandem repeats, respectively, speculating that fragment repeat events played a major role in the evolution of the EXP gene. The monitoring of sweet

收稿日期: 2023-12-08

修回日期: 2024-10-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(32172520); 国家柑橘产业技术体系(CARS-26)

作者简介: 杨长耀(2000—), 男, 湖南怀化人, 硕士研究生, 主要从事果实品质形成与调控研究, 1620895610@qq.com; *通信作者, 卢晓鹏, 博士, 副教授, 主要从事果实品质形成与调控研究, xl678@hunau.edu.cn

orange fruits at the expansion phase among different varieties showed that the individual juice sac volume of 'Newhall navel orange' was significantly larger than that of 'Qianyang bingtang orange'. Furthermore, as the fruits expansion, the difference in individual juice sac volume gradually increased. Gene expression analysis showed that *CsEXPA6*, *CsEXPA9*, *CsEXPA12* and *CsEXPA15* were highly expressed in the juice sac tissues of orange fruits. The expression levels of *CsEXPA6* and *CsEXPA15* in the juice sacs of 'Newhall navel orange' were significantly higher than those of 'Qianyang bingtang orange' during the fruit expansion stage, and the expressions of *CsEXPA6* and *CsEXPA15* were significantly positively correlated with the increase of juice cell volume, suggesting that *CsEXPA6* and *CsEXPA15* might affect fruit size formation by regulating juice sac expansion.

Keywords: citrus; expansin protein; gene family; fruit size; juice sac; expansion phase

典型的扩张蛋白(expansin, EXP)长度为 250 ~ 275 个氨基酸, 包含 2 个结构域, 其 N 端有 1 个信号肽^[1]。结构域 I 是 1 个氨基末端结构域, 大约有 120~135 个氨基酸残基, 结构和序列与糖苷水解酶家族 45(GH45)蛋白质的催化结构域同源; 结构域 II 是 1 个约 90~120 个氨基酸残基的羧基端结构域, 与 G2As 同源^[2]。植物中的扩张蛋白家族分为 4 个亚家族, 即 α -EXP(EXPA)、 β -EXP(EXPB)、EXP-like A(EXLA)、EXP-like B(EXLB), 4 个家族成员的双结构域结构、信号肽和基因内含子相似^[3]。

植物的 EXP 已经被证明参与多个发育过程, 如种子萌发、花粉管生长、果实软化和果实发育, 其中 EXP 参与的细胞壁松动在果实增大方面有重要作用。拟南芥中的 *AtEXPA4* 和 *AtEXPB5* 在花粉管发育中发挥重要作用, 能够响应细胞壁的快速扩张, 影响花粉管生长^[4]。草莓中的 FaEXPA2 蛋白与存在于细胞壁中的不同多糖聚合物的相互作用可影响草莓果实软化速率^[5]。在番茄不同组织中, EXP 基因在不同组织中表现出特异性表达, *EXP4* 和 *EXP7* 仅在青色果实细胞分裂和膨大阶段高度表达^[6]。在甘薯和葛根的块根组织中, *IbEXPA2*^[7]和 *PtEXP1*^[8]在膨大期高度表达。*FtEXPA12* 和 *FtEXPA19* 在苦荞大果实中的表达量显著高于小果果实的, 且其在果实发育阶段可响应吲哚-3-乙酸(IAA)信号, 从而调控果实大小^[9]。水稻 *EXPLA1* 与 *GW2* 相互作用, 负向调控细胞分裂和扩张, 从而调控水稻种子大小^[10]。

尽管扩张蛋白已在越来越多的物种中被鉴定, 但有关柑橘中该蛋白家族的研究较少。为探究 EXP 家族与果实大小发育的关系及其作用机制, 本研究以拟南芥 EXP 蛋白序列为参考序列, 结合 LINUX 筛选结构完整、保守的含有隐马尔科夫模型(F03330)和(PF01357)的柑橘 EXP 成员; 采用 MEGA、TB-tools、Plant CARE 等对柑橘 EXP 基因进行序列特征、系统发育关系、基因结构、蛋白质基序和顺

式作用元件等基本分析; 通过 qRT-PCR 初步分析甜橙中 *CsEXP* 成员在'黔阳冰糖橙'和'纽荷尔脐橙'果实汁胞膨大中的表达模式, 以期更深入地理解 EXP 在柑橘汁胞膨大和整体果实膨大过程中的生物学功能, 为进一步调控柑橘果实大小形成提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

以种植于湖南省洪江市沙湾乡溪口村柑橘园内'黔阳冰糖橙'和'纽荷尔脐橙'为材料, 每个品种挑选长势一致的 3 棵十年生植株, 设 3 个生物学重复。2022 年, 在果实膨大期的 7 月 30 日、8 月 30 日、9 月 30 日和 12 月 1 日采集果实样品, 每个品种随机挑取 30 个果实, 使用游标卡尺测量果实横径, 最终采集 18 个大小居中的果实。在采集果实当天分离果实汁胞, 所有采集的组织在液氮中迅速冷冻后于 -80 °C 储存, 以供后续 RNA 提取使用。

1.2 方法

1.2.1 果实单个汁胞体积的测量

使用精密量筒, 加入蒸馏水, 放入去除囊衣的囊瓣, 使其完全浸没水中, 记录水刻度变化, 计算单囊瓣体积。按公式(1)计算平均单个汁胞体积。每个果实挑选 3 个囊瓣, 每个品种各测 15 个果实。

$$V_s = V/N \times 1000 \quad (1)$$

式中: V_s 为平均单个汁胞体积; V 为单囊瓣体积; N 为对应单囊瓣汁胞数量。

1.2.2 *CsEXP*、*CgEXP*、*CcEXP* 家族成员的鉴定及相关分析

从华中农业大学甜橙基因组数据库(<http://citrus.hzau.edu.cn/>)下载甜橙、晚白柚、克里曼丁橘蛋白序列 fasta 文件, 从 TAIR-Home Page(<https://>

www.arabidopsis.org/)下载 36 个 AtEXP 蛋白序列,运用 TB-tools 软件 Two Sequence Files 程序比对甜橙、晚白柚、克里曼丁橘蛋白序列,从 Pfam 数据库(<http://pfam.xfam.prg>)下载 EXP 的隐马尔科夫模型(F03330)和(PF01357)文件,然后运用 LINUX 虚拟机系统,采用 hmmsearch 搜索工具对甜橙的 EXP 成员进行筛选(设定阈值 $E < 10^{-5}$),确认候选基因的结构完整性和结构保守性,剔除冗余序列,得到 CsEXP、CgEXP、CcEXP 蛋白序列,最后根据它们的染色体位置排列顺序对所获得的 CsEXP、CgEXP、CcEXP 基因进行命名。

从华中农业大学甜橙基因组数据库(<http://citrus.hzau.edu.cn/>)下载甜橙、晚白柚、克里曼丁橘 gff 文件,并使用 MEME(<https://meme-suite.Org/meme/tools/meme>)^[11]工具在线分析 CsEXP、CgEXP、CcEXP 蛋白序列保守基序数量、长度和序列信息,最高基序选择 20。采用 TB-tools 软件 Gene Structure View(Advanced)程序进行结构可视化分析。

对 EXP 蛋白序列进行多重序列比对后,将甜橙、晚白柚、克里曼丁橘的 EXP 蛋白序列导入 MEGA5.0,运用 CLUSTALW 比对后构建系统进化树,其中参数设置为默认参数。下载进化树 nwk 文件,使用进化树美化网站(<https://evolgenius.info/evolview-v2>)进行进化树美化。

1.2.3 CsEXP、CgEXP、CcEXP 家族基因启动子顺式作用元件分析

采用 TB-tools 提取甜橙、晚白柚、克里曼丁橘基因组中 EXP 家族基因上游 2 000 bp 的 DNA 序列,从中提取 CsEXP、CgEXP、CcEXP 家族基因的启动子序列,采用在线预测网站 Plant CARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)预测 CsEXP、CgEXP、CcEXP 启动子区域顺式作用

元件,预测结果采用 Microsoft Excel 进行统计。

1.2.4 CsEXP、CgEXP、CcEXP 家族基因的共线性分析

采用 TB-tools 分析 CsEXP、CgEXP、CcEXP 在进化过程中可能发生的基因复制事件,并筛选重复基因对信息;根据蛋白序列的相似性,通过 TB-tools 绘制甜橙、晚白柚、克里曼丁橘和拟南芥 EXP 基因的共线性关系图。

1.2.5 CsEXP 家族基因的不同组织表达谱统计

从华中农业大学甜橙基因组数据库(<http://citrus.hzau.edu.cn/>)下载甜橙 30 个 CsEXP 基因成员在种子、根、叶、花后 142 d 果实中的 FPKM 值,运用 Excel 进行统计,并采用 TB-tools 软件 HeatMap 程序生成热图。依据 FENG 等^[12]的转录组数据,统计 30 个 CsEXP 成员在第二生理落果期(盛花后 50 d)、膨大期(80、120、155、180 d)和成熟期(220 d)汁胞组织中的 FPKM 值,使用 TB-tools 软件 HeatMap 程序生成热图。依据 HUANG 等^[13]的转录组数据,统计 30 个 CsEXP 成员在花后 45 d(细胞分裂期)和花后 142 d(果实膨大期)的冰糖橙和‘纽荷尔脐橙’果实的 FPKM 值,运用 TB-tools 软件 HeatMap 程序生成热图。

1.2.6 CsEXP 家族基因在甜橙果实汁胞膨大过程中的表达模式分析

采用植物 RNA 提取试剂盒(SteadyPure, 艾科瑞生物科技有限公司)提取汁胞总 RNA,用酶标仪测定 RNA 的纯度与浓度,并用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。利用反转录试剂盒(Evo M-MLV, 艾科瑞生物科技有限公司)进行逆转录反应。参考 STRAZZER 等^[14]的引物序列设计原则对 CsEXPA6、CsEXPA9、CsEXPA10、CsEXPA12、CsEXPA15、CsEXPA17 进行引物设计及 real-time PCR 分析,以柑橘 Actin 作内参基因(表 1)。real-time PCR 扩增程序为:95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 5 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 15 s, 40 个循环; 72 °C 延伸 15 s, 16 °C 保存。

表 1 扩张蛋白基因 qRT-PCR 引物

Table 1 Primers for expansin gene qRT-PCR analysis

基因名称	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
CsEXPA6	TTTATGGTGGGGGTGATGCC	CTCAAACAAGCCCCACAGC
CsEXPA9	TGGCAACCGATGTCGAGAAA	GACCACTTAGGAGGGGCAAC
CsEXPA10	TTGGAAAGCTGGCAACATGC	CCCAATCCGACCCATTGGA
CsEXPA12	TGCTTGTGGGTACGGGAATC	TACCCGGGTTACACCATTGC
CsEXPA15	CCCCCTCCAGCACTTTGACAT	CGCACACGGGATCCTGATTA
CsEXPA17	GCAGCGTCGATTTTGTGAT	AAGAACCCCAACAACCTGGCA
Actin	GGCTCCAACAATCACATT	GCAAGGTCATCACATAAGG

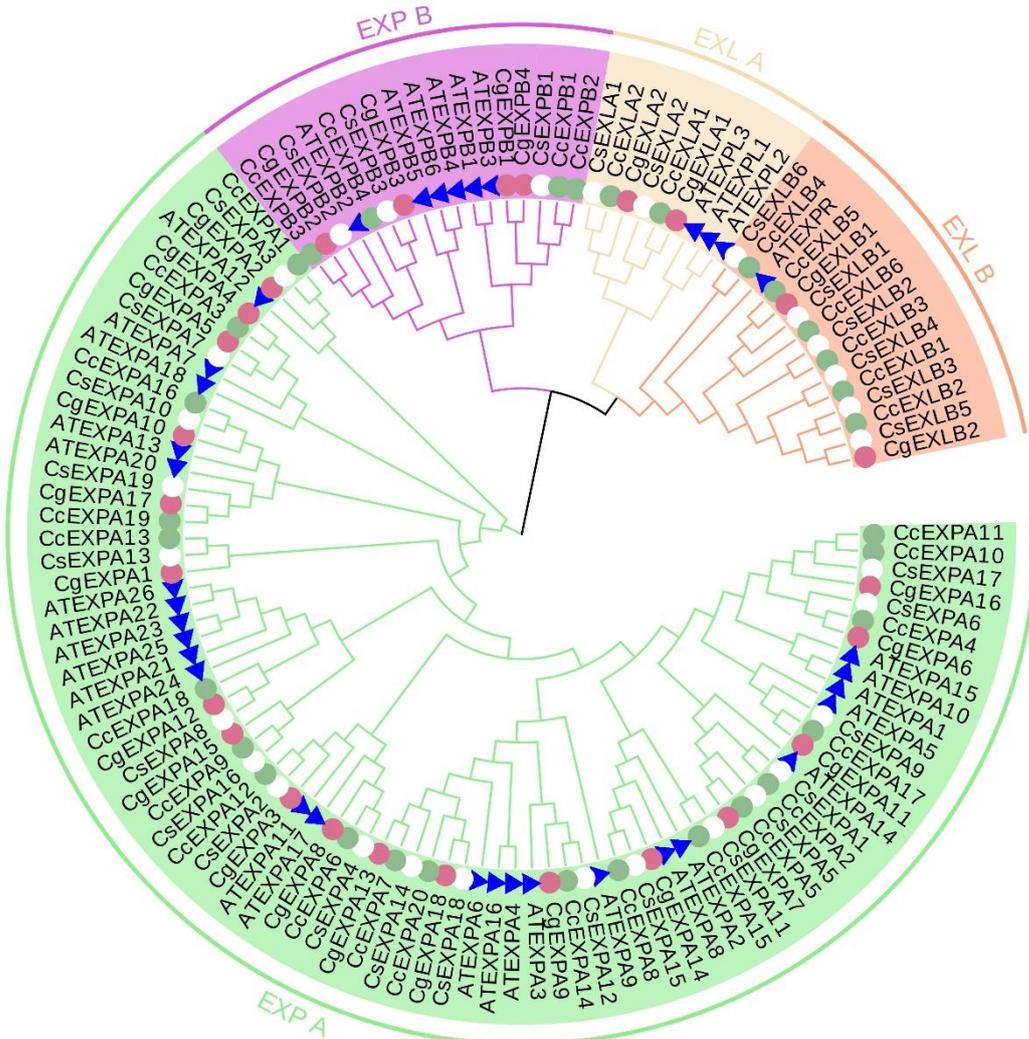
1.2.7 数据分析与图片处理

采用 Graphpad Prism 8.0 软件的 Correlation 程序计算 2 组数据之间的相关系数; 采用 Linear regression 程序分析 2 个变量之间的线性关系; 采用 Adobe Photoshop CS6 软件进行图片处理; 采用 Excel 2016 进行统计; 采用 Graphpad Prism 8.0 软件绘图; 采用 SPSS 23.0 对数据进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 EXP 家族成员鉴定结果以及系统发育关系

从图 1 可以看出,不同物种的 EXP 家族成员的数量不同,在甜橙、克里曼丁橘、晚白柚中分别鉴定出 30、32、26 个 EXP 家族成员,扩增蛋白家族分为 4 个亚家族,即 EXP A、EXP B、EXLA 和 EXLB,其中,EXP A 亚家族成员数量最多,其次是 EXP B 成员,EXLA 和 EXLB 成员数量较少。



白色圆形标记表示甜橙的蛋白; 深绿色圆形标记表示克里曼丁橘的蛋白; 浅紫罗兰圆形标记表示晚白柚的蛋白; 蓝色三角形标记表示拟南芥的蛋白。

图 1 柑橘属的 88 个扩张蛋白与拟南芥的 36 个扩张蛋白间的系统发育树

Fig.1 The phylogenetic tree among 88 expansins from *Citrus* and 36 expansins from *Arabidopsis*

比较 3 个柑橘品种 EXP 成员的理化性质(表 2), 甜橙 CsEXP 家族的理论等电点为 4.91~9.96, 蛋白相对分子质量为 24 853.72~29 282.27, 蛋白序列长度 239~270 aa。在克里曼丁橘中, CcEXP 家族理论等电点为 5.07~9.96, 蛋白相对分子质量为

23 434.69~30 561.82, 蛋白序列长度为 213~273 aa。在晚白柚中, CgEXP 家族理论等电点为 5.13~9.90, 蛋白相对分子质量为 24 853.72~29 330.31, 蛋白序列长度为 239~270 aa。预测的亚细胞定位表明, 橙类、橘类、柚类的扩张蛋白都位于细胞壁中。

表 2 甜橙扩张蛋白基因的理化性质

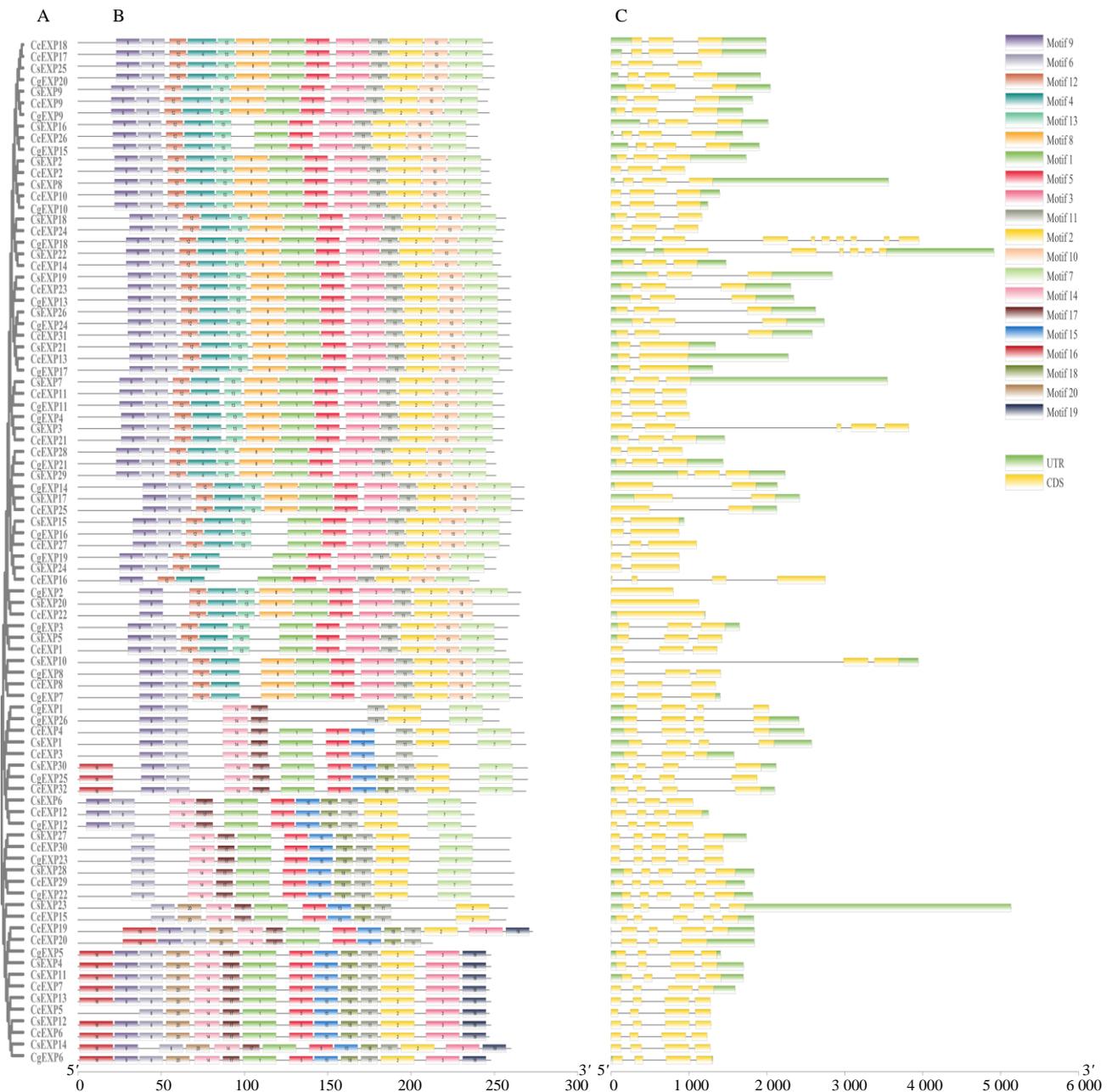
Table 2 Physicochemical properties of expansin genes in sweet orange					
基因名称	基因序列号	理论等电点	蛋白相对分子质量	蛋白序列长度/aa	亚细胞定位
<i>CsEXPA1</i>	Cs_ont_2g035700	9.49	26 252.73	248	细胞壁
<i>CsEXPA2</i>	Cs_ont_3g001790	9.10	27 552.26	256	细胞壁
<i>CsEXPA3</i>	Cs_ont_4g014790	9.96	28 555.66	258	细胞壁
<i>CsEXPA4</i>	Cs_ont_5g005880	9.42	27 973.76	256	细胞壁
<i>CsEXPA5</i>	Cs_ont_5g015260	9.32	26 521.90	248	细胞壁
<i>CsEXPA6</i>	Cs_ont_5g039920	8.64	26 232.42	247	细胞壁
<i>CsEXPA7</i>	Cs_ont_5g040880	8.98	29 027.03	267	细胞壁
<i>CsEXPA8</i>	Cs_ont_6g000330	8.88	28 281.26	260	细胞壁
<i>CsEXPA9</i>	Cs_ont_6g000940	9.45	26 122.52	241	细胞壁
<i>CsEXPA10</i>	Cs_ont_6g006890	8.39	29 282.27	268	细胞壁
<i>CsEXPA11</i>	Cs_ont_6g013130	8.90	27 719.33	257	细胞壁
<i>CsEXPA12</i>	Cs_ont_6g017260	9.81	27 930.80	260	细胞壁
<i>CsEXPA13</i>	Cs_ont_6g022250	6.66	29 155.71	265	细胞壁
<i>CsEXPA14</i>	Cs_ont_7g000150	9.47	28 038.80	261	细胞壁
<i>CsEXPA15</i>	Cs_ont_7g003010	8.07	27 005.18	254	细胞壁
<i>CsEXPA16</i>	Cs_ont_7g021640	7.55	27 505.37	251	细胞壁
<i>CsEXPA17</i>	Cs_ont_7g026650	9.20	26 578.70	250	细胞壁
<i>CsEXPA18</i>	Cs_ont_8g002460	9.53	28 048.00	260	细胞壁
<i>CsEXPA19</i>	Cs_ont_8g029180	8.35	27 729.38	251	细胞壁
<i>CsEXPB1</i>	Cs_ont_2g021550	8.43	28 903.88	269	细胞壁
<i>CsEXPB2</i>	Cs_ont_5g001250	5.13	24 853.72	239	细胞壁
<i>CsEXPB3</i>	Cs_ont_9g023090	5.65	28 649.15	270	细胞壁
<i>CsEXLA1</i>	Cs_ont_8g028440	9.09	28 445.83	260	细胞壁
<i>CsEXLA2</i>	Cs_ont_8g028680	8.44	28 387.31	262	细胞壁
<i>CsEXLB1</i>	Cs_ont_3g031700	5.93	27 514.16	248	细胞壁
<i>CsEXLB2</i>	Cs_ont_5g043130	5.08	27 118.56	248	细胞壁
<i>CsEXLB3</i>	Cs_ont_5g043150	5.07	27 042.84	248	细胞壁
<i>CsEXLB4</i>	Cs_ont_5g043170	4.91	27 151.98	248	细胞壁
<i>CsEXLB5</i>	Cs_ont_5g043190	5.05	28 271.01	260	细胞壁
<i>CsEXLB6</i>	Cs_ont_7g012060	5.07	27 943.41	258	细胞壁

2.2 EXP 基因结构分析

通过在线 MEME 软件对基序进行分析,进一步研究 EXP 蛋白的特征区域,结果显示 motif6 和 motif11 这 2 个基序在所有扩张蛋白成员中表现出高度保守性(图 2-B)。在同一个亚家族中,基序的类型、排列和数量都表现出相似性。在 EXPA 亚家族成员中,都含有 motif1、motif2、motif3、motif4、motif5、motif6、motif9、motif10、motif11,而与 EXP A 亚家族相比,motif14、motif16、motif17 是 EXP B、EXL A、EXL B 这 3 个亚家族独有的基序,

而 motif19 和 motif20 这 2 个基序仅存在于 EXL B 亚家族中。

外显子/内含子结构分析显示,柑橘 EXP 家族内含子为 0~9 个。整体而言,同一个亚家族具有相似的内含子类型特征,EXPA 亚家族的大多数成员包含 2 个内含子,但也存在一些例外,如 CgEXPA14 含有 5 个内含子,CsEXPA15 含有 9 个内含子。EXP B 成员都具有 3 个内含子,除 CcEXPB1 含有 2 个内含子外,EXL A 成员都有 4 个内含子,EXL B 成员内含子数量为 3~4 个。



A 柑橘基因组 88 种扩张蛋白的系统发育关系; B 柑橘基因组扩张蛋白的不同基序组成, 保守的图案用不同颜色的方框表示, 底部数字代表蛋白序列长度; C 柑橘基因组扩张蛋白的基因结构, 底部数字代表基因转录本长度。

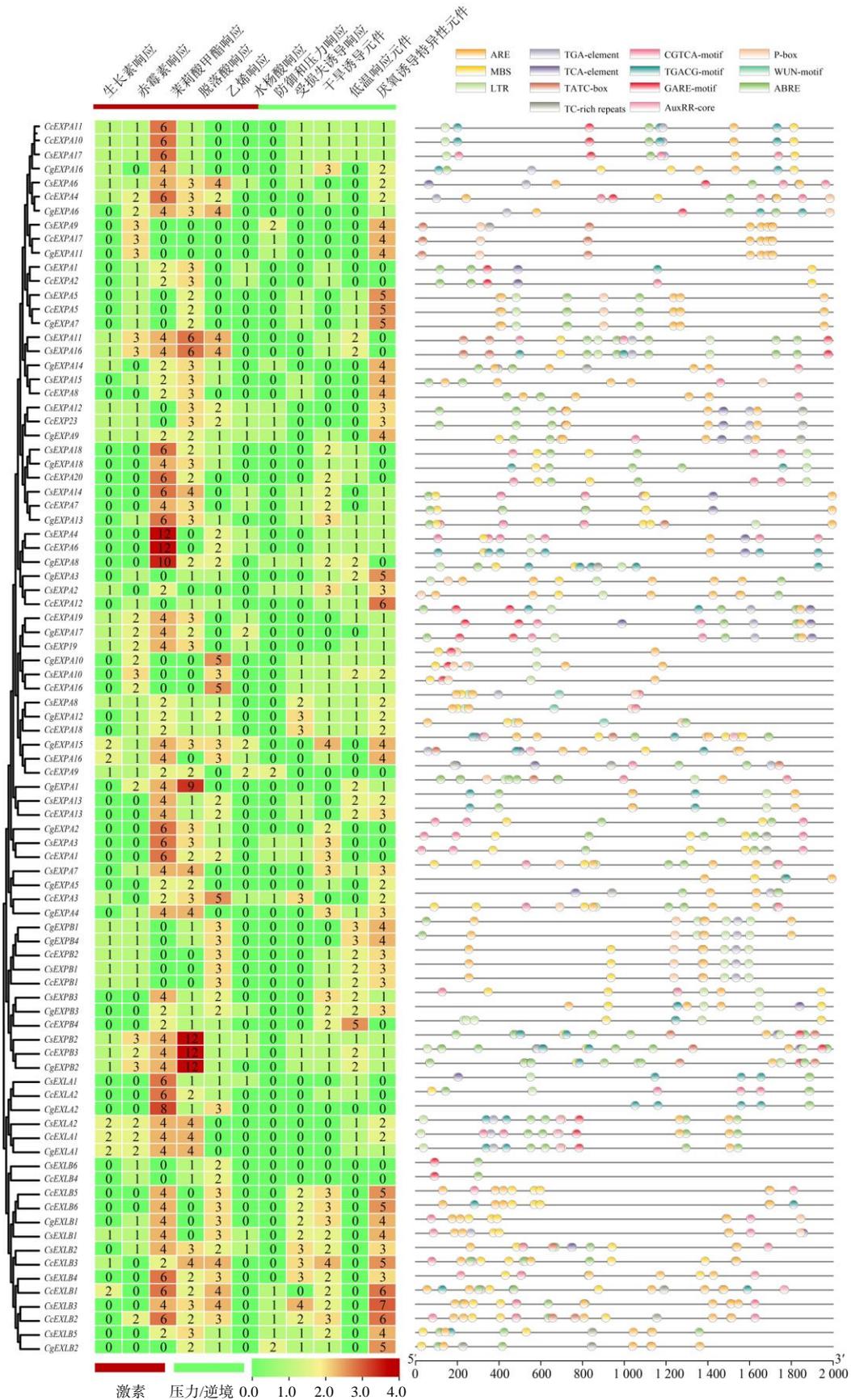
图 2 柑橘基因组扩张蛋白的系统发育关系、基序组成和基因结构

Fig.2 Phylogenetic relationship, motif composition, and gene structure of expansin in citrus genome

2.3 顺式作用元件分析

本研究鉴定了 *CsEXP*、*CcEXP*、*CgEXP* 成员的上游 2 kb 区域的顺式调控元件。结果(图 3)表明, 其启动子上游区域广泛存在 6 种激素响应元件, 包括茉莉酸甲酯响应(MeJA)、脱落酸响应(ABRE)、赤霉素响应(GA)、乙烯响应(ERE)、生长素响应(TGA-element AuxRR-core) 元件; 橙类、橘类和柚类 EXP 家族中, ABRE 元件和 MeJA 元件最为丰富,

如, *CsEXPB2* 含有 12 个 ABRE 元件, *CcEXPA6* 含有 12 个 MeJA 元件, *CgEXPB2* 含有 12 个 ABRE 元件; 在橙类、柚类和橘类中分别含有 46、54、38 个 ERE 元件; 而赤霉素响应元件和生长素响应元件在橙类和橘类中的数量较柚类的多。其次, 检测到 3 种非生物胁迫响应元件, 即厌氧诱导特异性元件(ARE)、干旱诱导元件(MBS)和低温响应元件(LTR)等其他非生物胁迫响应元件。



左边网格的颜色和数字表示这些 EXP 基因中不同顺式作用元件的数量；右边彩色块表示不同类型的顺式作用元件及其在每个 EXP 基因中的位置；右侧底部刻度线上的数字代表基因启动子序列长度。

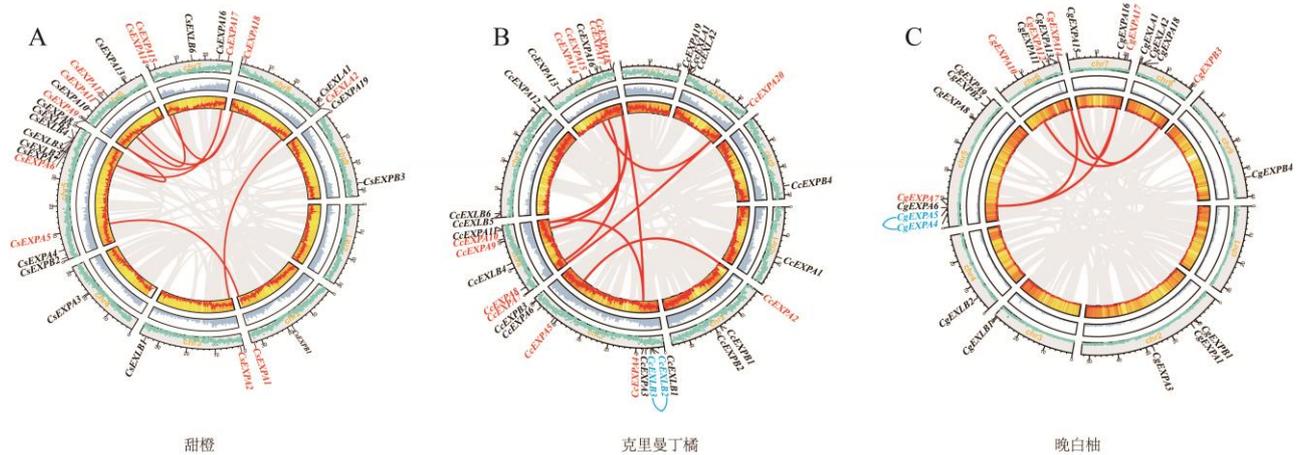
图 3 EXP 基因中顺式作用元件的数量和类型

Fig.3 The number and type of cis-acting elements in the EXP gene

2.4 甜橙、晚白柚、克里曼丁橘与拟南芥 EXP 基因的共线性分析

共线性分析结果表明,甜橙类 EXP 家族中没有发现串联重复;在橘类 EXP 家族中鉴定出 1 对(CcEXLB2/CcEXLB3)串联重复;在柚类 EXP 家族中也鉴定出 1 对(CgEXPA4/CgEXP5)串联重复。另外,

在这 3 类植物中都鉴定出了多对片段重复,在甜橙类中发现了 7 对片段重复,如 CsEXPA1/CsEXPA5、CsEXPA6/CsEXPA9 等(图 4-A),在橘类中鉴定出 8 对片段重复,如 CcEXPA2/CcEXPA5、CcEXPA4/ CcEXPA11 等(图 4-B),而在柚类中发现了 5 对片段重复,如 CgEXPA6/CgEXPA11、CgEXPA6/CgEXPA16 等(图 4-C)。



A、B、C 分别表示采用多重共线扫描工具(MCScanX)和 TB-tools 可视化软件对甜橙、克里曼丁橘、晚白柚扩张蛋白基因的染色体间关系进行分析,背景中的灰色线表示基因组内的共线块,而红色线表示共扩张基因对;串联复制的基因用蓝色弧线标记;使用 GraphPad Prism 8 将结果可视化。

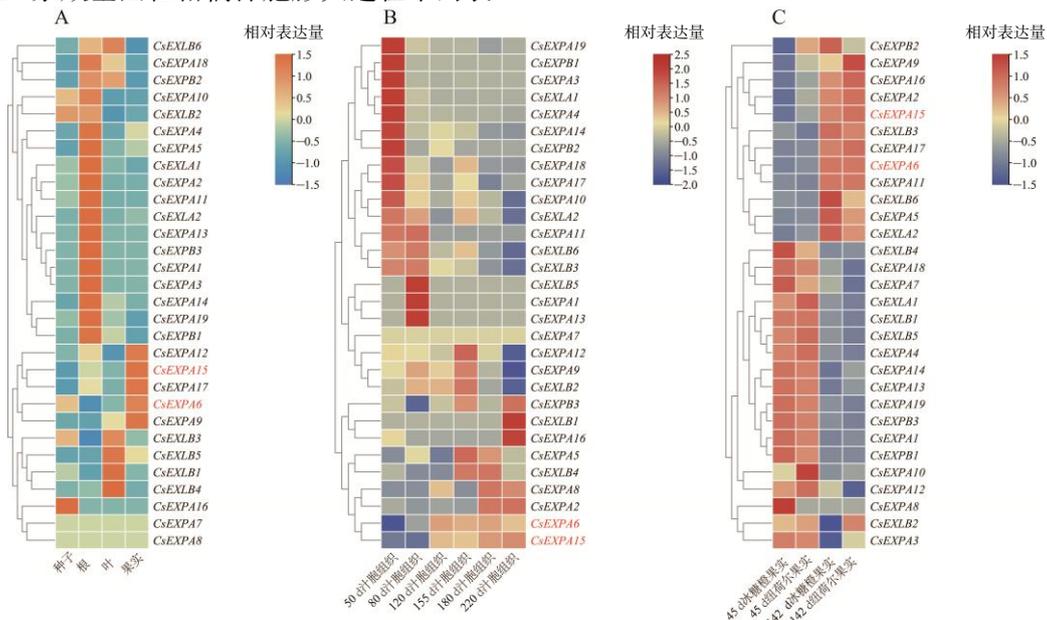
图 4 来自柑橘属物种的扩张蛋白基因的染色体间关系

Fig.4 The chromosomal relationships of expansin genes from species within Citrus

2.5 CsEXP 家族基因在甜橙汁胞组织发育过程中的表达谱分析

CsEXP 家族基因在柑橘汁胞膨大过程中的表

达模式有明显差异。在 30 个 CsEXP 基因中,有 15 个基因在根中高度表达(图 5-A),5 个 EXLB 基因在叶中高度表达,有 5 个基因(CsEXPA6、CsEXPA9、



A 为 CsEXP 基因家族在甜橙 4 种不同组织中的表达谱; B 为 CsEXP 基因家族在‘奉节 72-1 脐橙’汁胞组织动态发育过程中的表达谱^[12]; C 为 CsEXP 基因家族在冰糖橙和‘纽荷尔脐橙’汁胞组织中的表达谱^[13]。图例色阶变化表示基因相对表达量的高低,蓝色表示低值,红色表示高值。

图 5 CsEXP 基因的表达谱

Fig.5 The expression profiles of CsEXP genes

CsEXPA12、*CsEXPA15*、*CsEXPA17*) 在果实中高度表达(图 5-A)。在汁胞膨大旺盛期(8 月), *CsEXPA6*、*CsEXPA15* 的表达量均显著高于细胞分裂期(6 月)的(图 5-B), 与汁胞膨大趋势一致。*CsEXPA6* 和 *CsEXPA15* 在‘纽荷尔脐橙’汁胞膨大前期和膨大旺盛期表达量均显著高于冰糖橙的(图 5-C)。

2.6 ‘黔阳冰糖橙’与‘纽荷尔脐橙’汁胞膨大差异比较

果实膨大发育过程中, ‘纽荷尔脐橙’的果实、囊瓣和汁胞均显著大于‘黔阳冰糖橙’的。在 7 月, 这 2 种橙子的外观差异不大, 但随着时间推移, 他们之间的差异逐渐增加(图 6)。从表 3 可知, 7、8、9、12 月, ‘纽荷尔脐橙’的单果质量均显著大于‘黔阳冰糖橙’的, 在成熟期 12 月, 比‘黔阳冰糖橙’的大 21.14%。‘纽荷尔脐橙’和‘黔阳冰糖橙’的果实内部囊瓣数量没有显著差异, 但‘纽荷尔脐橙’的横径和纵径显著大于‘黔阳冰糖橙’的。与果实大小差异相一致, ‘纽荷尔脐橙’囊瓣体积显著大于‘黔阳冰糖橙’的。‘纽荷尔脐橙’单个汁胞体积也显著高于‘黔阳

冰糖橙’的, 成熟期‘纽荷尔脐橙’单个汁胞体积较‘黔阳冰糖橙’大 23.37%。因单个汁胞体积大小影响单个囊瓣体积大小, 可见, 单个汁胞体积是‘纽荷尔脐橙’果实大于‘黔阳冰糖橙’果实的主要原因。

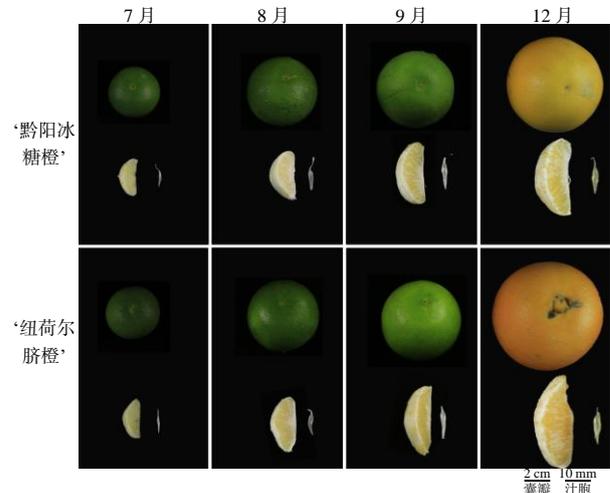


图 6 ‘黔阳冰糖橙’与‘纽荷尔脐橙’果实、囊瓣和汁胞的表型

Fig.6 The phenotypic of fruit, segments, and juice sacs of ‘Qianyang bingtang orange’ and ‘Newhall navel orange’

表 3 ‘黔阳冰糖橙’与‘纽荷尔脐橙’果实、囊瓣和汁胞的表型性状

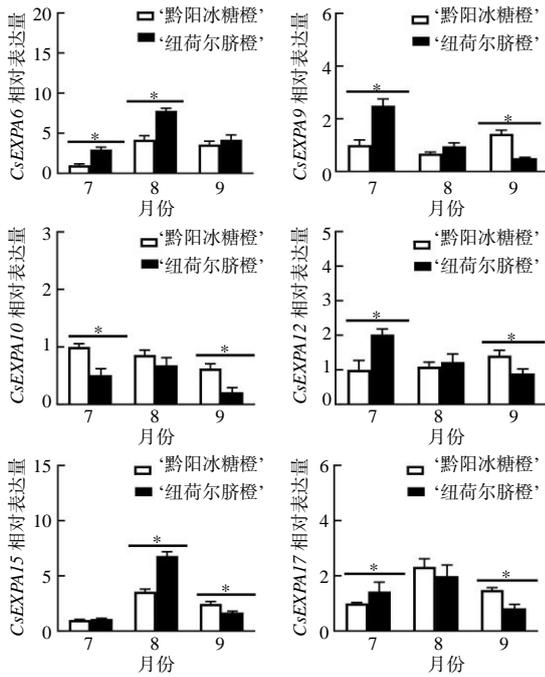
Table 3 The phenotypic traits of fruit, segments, and juice sacs of ‘Qianyang bingtang orange’ and ‘Newhall navel orange’							
品种	月份	单果质量/g	横径/mm	纵径/mm	果实囊瓣数量/个	单个囊瓣体积/cm ³	单个汁胞体积/mm ³
‘黔阳冰糖橙’	7	33.84±2.91	40.65±1.31	39.47±39.47	9.94±0.90	1.26±0.23	2.90±0.64
	8	69.81±7.74	51.58±1.99	50.37±50.37	9.89±1.23	4.25±0.65	8.13±0.92
	9	106.04±6.96	59.58±1.69	59.23±59.23	10.11±0.47	6.72±0.71	12.79±1.15
	12	157.68±9.89	65.66±2.34	65.13±65.13	10.06±0.68	10.58±1.41	17.51±4.45
‘纽荷尔脐橙’	7	42.28±5.78*	42.63±2.14*	44.94±44.94*	8.88±1.11	1.89±0.22*	4.47±1.32*
	8	87.30±12.94*	55.66±2.18*	56.49±56.49*	9.72±0.83	5.30±0.65*	9.63±1.50*
	9	116.07±16.53*	59.54±2.76*	62.77±62.77*	10.12±0.86	7.82±0.88*	14.43±1.66*
	12	191.02±21.63*	70.50±2.40*	71.10±71.10*	9.63±0.89	12.56±2.00*	21.59±3.22*

***表示某一指标在同一月份不同品种之间的差异有统计学意义(P<0.05)。

2.7 6 个 *CsEXP* 基因在甜橙汁胞膨大过程中的表达模式验证和相关性分析

基于家族成员在转录组中的表达丰度以及‘黔阳冰糖橙’和‘纽荷尔脐橙’之间的表达差异, 本研究挑选了 6 个 *CsEXP* 基因验证其与汁胞膨大之间的关系。qRT-PCR 结果(图 7)表明, *CsEXPA6* 和 *CsEXPA15* 表达模式类似, 均在果实发育过程中的汁胞膨大前期表达量低, 汁胞膨大旺盛期(8 月)表达量最高, 随后又下降; 在 7、8 月汁胞膨大过程中, *CsEXPA6* 和 *CsEXPA15* 在‘纽荷尔脐橙’汁胞中的相对表达量高于‘黔阳冰糖橙’的。*CsEXPA9* 和 *CsEXPA12* 的相对表达量在‘黔阳冰糖橙’汁胞膨大

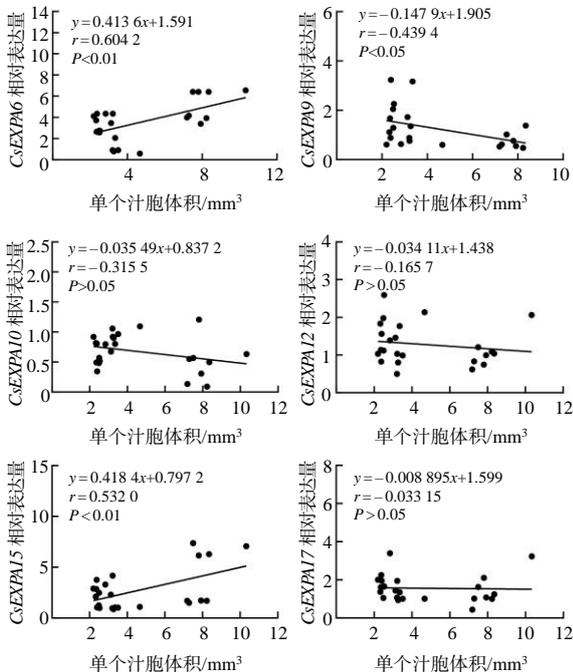
过程中变化不大, 而在‘纽荷尔脐橙’汁胞膨大过程中呈持续下调趋势; 7 月和 9 月, *CsEXPA9* 和 *CsEXPA12* 在‘纽荷尔脐橙’汁胞中的相对表达量显著高于‘黔阳冰糖橙’的。7 月, *CsEXPA17* 在‘纽荷尔脐橙’汁胞中的相对表达量显著高于‘黔阳冰糖橙’的。*CsEXPA10* 的相对表达量在汁胞膨大过程中持续下调, 在‘纽荷尔脐橙’汁胞中的相对表达量低于‘黔阳冰糖橙’的。EXP 基因表达和汁胞体积相关性分析结果(图 8)表明, *CsEXPA6* 和 *CsEXPA15* 在‘黔阳冰糖橙’和‘纽荷尔脐橙’的相对表达量与汁胞体积变化呈极显著正相关, *CsEXPA9* 的相对表达量与汁胞体积变化呈显著负相关。



“*”表示基因相对表达量在同一月份不同品种之间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。

图7 6个CsEXP基因在‘黔阳冰糖橙’与‘纽荷尔脐橙’汁胞膨大过程中的相对表达量

Fig.7 Relative expression levels of the six CsEXP genes in the juice sacs expansion process of ‘Qianyang bingtang orange’ and ‘Newhall navel orange’



$P < 0.05$ 示显著相关; $P < 0.01$ 示极显著相关。

图8 ‘黔阳冰糖橙’与‘纽荷尔脐橙’汁胞体积与EXP基因表达量的相关性

Fig.8 Correlation analysis between juice sacs size and EXP gene expression levels of ‘Qianyang bingtang orange’ and ‘Newhall navel orange’

3 结论与讨论

不同 EXP A 亚家族之间在基因内含子外显子结构和基序模式等方面具有一定的保守性。在红枣^[15]、苹果^[16]、猕猴桃^[17]等 EXP A 亚家族中,大多数成员含有 2 个内含子,且在同一个亚家族的基因具有相似的基序。本研究中,在甜橙、克里曼丁橘和柚类扩张蛋白的所有成员都具有 motif6 和 motif11 这 2 个保守基序,内含子数量为 0~9 个,其结构和进化特征与其他物种扩张蛋白基因家族一致^[18-19],进一步证实了它们之间密切的进化关系。

由串联复制或与复制相关的片段复制引起的基因复制是导致家族扩张的主要因素^[9]。在大豆扩张蛋白家族中,68%的基因参与片段重复,14.7%的基因参与串联重复^[20]。在甜菜扩张蛋白家族中发现 72 对串联重复基因对和 268 对片段重复基因对^[21]。本研究中,在甜橙类、橘类和柚类中分别鉴定出 7 对、8 对和 5 对片段重复,在橘类和柚类中分别鉴定出 1 对串联重复,且大部分的片段重复基因对来自 EXP A 亚家族,这可能是 EXP A 亚家族在种内扩张的一个重要原因。

EXP 家族成员在汁胞膨大过程中的作用存在差异。苹果中的 *MdEXPA16* 和 *MdEXPA20* 主要在果实中高度表达,而在其他组织中表达量较低,其可能在果实发育中发挥重要作用^[16]。红枣中的 *ZjEXP* 在不同发育阶段和组织中呈现不同的表达模式,尤其是在果实发育阶段高度表达^[15]。甜椒的 *CaEXPA14* 和 *CaEXPA19* 的转录丰度与细胞的相对扩增率呈显著正相关^[22]。芋球茎中的 *CeEXPA11*、*CeEXPA13* 和 *CeEXPA23* 的表达量随发育进程不断增加,可能对芋球茎的膨大发挥了重要作用^[23]。本研究结果表明, *CsEXPA6* 和 *CsEXPA15* 基因在柑橘果实中高度表达,且随着汁胞的膨大,它们的表达量显著增加,推测它们可能主要参与了果实发育;果实膨大旺盛期,‘纽荷尔脐橙’果肉组织中 *CsEXPA6* 和 *CsEXPA15* 的相对表达量高于‘黔阳冰糖橙’的,并且 *CsEXPA6* 和 *CsEXPA15* 在这 2 个品种之间的相对表达量与单个汁胞体积大小呈极显著正相关,推测它们可能通过调控细胞扩增参与了汁胞膨大的调节,从而影响了果实的大小。

参考文献:

- [1] YENNAWAR N H, LI L C, DUDZINSKI D M, et al. Crystal structure and activities of EXPB1(Zea m 1), a β -expansin and group-1 pollen allergen from maize[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(40): 14664–14671.
- [2] SAMPEDRO J, COSGROVE D J. The expansin superfamily[J]. Genome Biology, 2005, 6(12): 242.
- [3] HEPLER N K, BOWMAN A, CAREY R E, et al. Expansin gene loss is a common occurrence during adaptation to an aquatic environment[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2020, 101(3): 666–680.
- [4] LIU W M, XU L A, LIN H, et al. Two expansin genes, *AtEXPA4* and *AtEXPB5*, are redundantly required for pollen tube growth and *AtEXPA4* is involved in primary root elongation in *Arabidopsis thaliana*[J]. Genes, 2021, 12(2): 249.
- [5] VALENZUELA-RIFFO F, MORALES-QUINTANA L. Study of the structure and binding site features of FaEXPA2, an α -expansin protein involved in strawberry fruit softening[J]. Computational Biology and Chemistry, 2020, 87: 107279.
- [6] BRUMMELL D A, HARPSTER M H, DUNSMUIR P. Differential expression of expansin gene family members during growth and ripening of tomato fruit[J]. Plant Molecular Biology, 1999, 39(1): 161–169.
- [7] 蔡兆琴, 龙婷晞, 肖冬, 等. 甘薯扩展蛋白 *IbEXPA2* 基因克隆和表达分析[J]. 分子植物育种, 2023, 21(5): 1401–1407.
- [8] 郭丽君, 羽健宾, 李钰婷, 等. 氯吡脞对葛根 *Ptexp1* 基因表达的影响及其与产量品质形成的关系[J]. 分子植物育种, 2021, 19(3): 840–848.
- [9] SUN W J, YU H M, LIU M Y, et al. Evolutionary research on the expansin protein family during the plant transition to land provides new insights into the development of Tartary buckwheat fruit[J]. BMC Genomics, 2021, 22(1): 252.
- [10] CHOI B S, KIM Y J, MARKKANDAN K, et al. GW2 functions as an E3 ubiquitin ligase for rice expansin-like 1[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(7): 1904.
- [11] 杨光彬, 王瑾, 陈恺琳, 等. 辣椒 MADS-box 基因家族的鉴定及表达分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2023, 49(5): 558–566.
- [12] FENG G Z, WU J X, XU Y H, et al. High-spatiotemporal-resolution transcriptomes provide insights into fruit development and ripening in *Citrus sinensis*[J]. Plant Biotechnology Journal, 2021, 19(7): 1337–1353.
- [13] HUANG D Q, ZHAO Y H, CAO M H, et al. Integrated systems biology analysis of transcriptomes reveals candidate genes for acidity control in developing fruits of sweet orange(*Citrus sinensis* L. Osbeck)[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 486.
- [14] STRAZZER P, SPELT C E, LI S J, et al. Hyperacidification of *Citrus* fruits by a vacuolar proton-pumping P-ATPase complex[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 744.
- [15] HOU L, ZHANG Z Y, DOU S H, et al. Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of the expansin gene family in Chinese jujube(*Ziziphus jujuba* Mill.)[J]. Planta, 2019, 249(3): 815–829.
- [16] ZHANG S Z, XU R R, GAO Z, et al. A genome-wide analysis of the expansin genes in *Malus × Domestica*[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2014, 289(2): 225–236.
- [17] WU Z Y, LI M, ZHONG Y P, et al. Overexpression of *AcEXPA23* promotes lateral root development in kiwifruit[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(14): 8026.
- [18] LI K, MA B, SHEN J J, et al. The evolution of the expansin gene family in *Brassica* species[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2021, 167: 630–638.
- [19] İNCİLİ Ç Y, ARSLAN B, ÇELİK E N Y, et al. Comparative bioinformatics analysis and abiotic stress responses of expansin proteins in Cucurbitaceae members: watermelon and melon[J]. Protoplasma, 2023, 260(2): 509–527.
- [20] ZHU Y, WU N, SONG W, et al. Soybean(*Glycine max*) expansin gene superfamily origins: segmental and tandem duplication events followed by divergent selection among subfamilies[J]. BMC Plant Biology, 2014, 14: 93.
- [21] FARIS ABDULKHADUM AL-MAMOORI D, CELIK ALTUNOGLU Y, HORUZ E, et al. Investigation of the expansin gene family in sugar beet(*Beta vulgaris*) by the genome-wide level and their expression responses under abiotic stresses[J]. Biologia Futura, 2023, 74(3): 295–307.
- [22] MAYORGA-GÓMEZ A, NAMBEESAN S U. Temporal expression patterns of fruit-specific α -EXPANSINS during cell expansion in bell pepper(*Capsicum annuum* L.)[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 241.
- [23] 李必聪, 李慧英, 肖遥, 等. 芋扩展蛋白基因家族的全基因组鉴定及其在球茎膨大中的表达分析[J]. 浙江农业学报, 2023, 35(7): 1604–1616.

责任编辑: 毛友纯

英文编辑: 柳正