

苹果全基因组 *PIN* 成员鉴定及 *MdPIN15* 的克隆和在腋芽萌发中的表达分析

刘小杰, 樊 胜, 李国防, 檀 鸣, 默 宁, 马娟娟, 张 东, 韩明玉*

(西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨凌 712100)

摘 要: 从苹果金冠基因组中鉴定得到 18 个生长素输出载体蛋白 PIN-formed (PIN), 对其进行理化特性、基因结构、系统进化和启动子元件分析。结果表明, *MdPIN* 基因家族中, 含有 1~14 个外显子, 0~13 个内含子; *MdPIN* 蛋白的保守基序数量在 3~10。苹果 PIN 和拟南芥 PIN 等蛋白高度同源, 且根据其进化树分为 G1、G2 和 G3 亚组; 18 个 *MdPIN* 在不同基因型苹果的不同器官中表达具有明显差异。以‘长富 2 号’为材料, 从其腋芽中克隆得到一个候选基因 *MdPIN15*, 其开放阅读框为 1 869 bp, 编码 622 个氨基酸。实时定量 PCR 表明, *MdPIN15* 在梢尖部位表达量最高, 其次是腋芽, 在花芽中表达量最低; 外源 GR24 和 Lovastatin (LVS) 处理降低 *MdPIN15* 的表达量; 6-BA 和去茎尖处理提高了 *MdPIN15* 的表达量。*MdPIN15* 在介导细胞分裂素 (CK)、生长素 (IAA) 和独脚金内酯 (SL) 等激素调控腋芽萌发有重要作用。

关键词: 苹果; *PIN*; 腋芽萌发; 生物信息学; 基因表达

中图分类号: S 661.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2017) 11-2041-14

Genome-wide Identification of *PIN* Gene Family, Cloning and Expression Analysis of *MdPIN15* During Axillary Bud Burst in *Malus*

LIU Xiaojie, FAN Sheng, LI Guofang, TAN Ming, MO Ning, MA Juanjuan, ZHANG Dong, and HAN Mingyu*

(College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: A total of 18 Auxin efflux carrier protein PIN were identified from the apple genome. We further systematically analyzed its physical and chemical characteristics, gene structures, evolutionary relationships and promoter elements. Results showed that the *MdPIN* gene family contained 1–14 exons and 0–13 introns; 3–10 conserved motifs existed in the *MdPIN* proteins; *MdPIN* and *AtPIN* proteins were highly homologous and they could be classified into G1, G2 and G3 according to its homology. Tissue-specific expressions indicated that 18 *MdPIN* genes had significantly different expression patterns in different organs or tissues of different genotypes. A candidate gene *MdPIN15* was separated and cloned from axillary bud of Nagafu 2. The open reading frame was 1 869 bp, and it encoded 622 amino acids.

收稿日期: 2017–06–05; **修回日期:** 2017–11–13

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-28); 陕西省科技统筹项目 (2015NY114, 2016KTZDNY01-10); 中央高校基本科研业务费项目 (2452015291); 国家苹果改良中心杨凌分中心项目; 陕西省果业发展协同中心项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: hanmy@nwsuaf.edu.cn)

Real-time quantitative PCR showed that the the highest transcription level of *MdPIN15* was found in the shoot tips, the second in the axillary buds, and the lowest in the flower buds. Exogenous GR24 and Lovastatin (LVS) treatments reduced *MdPIN15* expression, while it was increased by exogenous 6-BA and decapitation treatments. It seems to be possible that *MdPIN15* could play a vital role in the axillary bud burst mediated by cytokinin (CK), indole-3-acetic acid (IAA) and strigolactone (SL).

Keywords: apple; *PIN*; buds burst; bioinformatic; gene expression

果树的分枝发育是影响产量的关键因素(李亚栋 等, 2009), 腋芽萌发是影响分枝发育的关键, 其中生长素扮演着重要的角色(Benamins & Scheres, 2008; Zhao, 2010; Gallavotti, 2013), 尤其是调控顶端分生组织和侧生组织的发育(Viaene et al., 2013; Band et al., 2014; Pan et al., 2015), 而生长素的极性运输(PAT)是调控的主要方式(Tanaka et al., 2006; Vienen et al., 2013)。在生长素渠道假说中, 生长素由腋芽向主茎输出是腋芽萌发必需的, 然而在顶端优势下, 这个渠道被主茎的极性运输所阻碍, 导致腋芽不萌发, 去茎尖可使腋芽往主茎的生长素极性运输渠道打开, 促使腋芽萌发(Bennett et al., 2006; Balla et al., 2011)。近年来研究发现细胞分裂素(CK)和独脚金内酯(SL)等对植物的分枝发育也起着极为重要的作用(Ongaro & Leyser, 2008; McSteen, 2009; Assuero & Tognetti, 2010; Wang & Li, 2011), 在调控腋芽萌发过程中, SL 抑制腋芽的萌发, 而 CK 促进腋芽的萌发(Bennett et al., 2006; Dun et al., 2009; Leyser, 2009)。PIN-former (PIN) 是植物特有的生长素输出载体蛋白, 极性定位在木质部薄壁组织细胞质膜上(Friml, 2010)。拟南芥突变体 *pin* 表现出极性运输缺陷(Blakeslee et al., 2005), 导致胚胎发育异常、花芽发育异常和侧生器官发育不正常等。迄今为止, 已有许多 *PIN* 的同源基因已经在双子叶植物和单子叶植物中被克隆分离出来, 并证实了它们参与顶端分生组织和侧生分生组织的形成与发育过程(Friml et al., 2002; Friml, 2010; 刘凤栾 等, 2014; 李运合 等, 2016)。全基因组 *PIN* 成员鉴定已经在水稻(Wang et al., 2009)、玉米(Forestan et al., 2012)、杨树(Carraro et al., 2012; Liu et al., 2014)、番茄(Pattison & Catala, 2012)、烟草(Xie et al., 2017)、拟南芥(Paponov et al., 2005; Krecek et al., 2009)和高粱(Shen et al., 2010; Balzan et al., 2014)中有报道, 在水稻(*OsPIN1*)、番茄(*SlPIN1*)和烟草(*NtPIN1*)中调控着植物的分枝发育(腋芽萌发和分蘖)(Xu et al., 2005; Pattison & Catala, 2012; Xie et al., 2017)。Zhang 等(2015)研究表明 *MdPIN9* 在苹果砧木矮化中发挥作用, An 等(2017)分离出了苹果的 *PIN1* 基因, 与拟南芥 *PIN1* 同源性最高, 在苹果根系生长发育中起着重要的作用。苹果 *PIN* 家族成员参与植物其他生理过程尚不清楚, 尤其是 *MdPIN* 调控苹果腋芽萌发的研究尚未见报道。

本研究中系统地鉴定苹果 *PIN* 家族成员, 分析其进化关系、基因结构、基因特性和组织表达; 并锁定关键候选调控腋芽萌发基因 *MdPIN15*, 对其进行克隆, 研究不同处理[6-BA、Lovastatin (LVS, 一种细胞分裂素合成抑制剂)、GR24 和去顶]和不同组织(花、茎、叶、根、腋芽、果实和芽)中其表达量的变化规律。通过对苹果 *PIN* 成员的系统鉴定, 有助于后续研究调控植物发育的分子机理; 同时研究 *MdPIN15* 在介导细胞分裂素(CK)、生长素(IAA)和独脚金内酯(SL)等激素调控腋芽萌发的机制, 丰富了调控分枝发育的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料处理

试验于 2016 年 6—7 月在陕西省杨凌示范区五泉苹果试验基地进行。供试材料为‘长富 2 号’苹果/T337/八棱海棠 1 年生 (株行距 $0.8\text{ m} \times 1\text{ m}$, 密度为 $3\,504\text{ 株} \cdot \text{hm}^{-2}$) 和 6 年生 (株行距 $1.5\text{ m} \times 3\text{ m}$, 密度为 $1\,805\text{ 株} \cdot \text{hm}^{-2}$) 植株。

选取 1 年生生长势一致的植株 90 株, 随机分为 15 个区组 (每区组 6 株), 进行 5 种处理 (每处理 3 个区组重复), 根据前人 (Brewer et al., 2009; Roman et al., 2016) 的研究和预试验结果, 在腋芽萌发 2 周前 (2016 年 6 月 13 日) 进行处理: ①去茎尖 + 喷施 $3\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ LVS (Lovastatin, 细胞分裂素合成抑制剂); ②喷施 $3\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA; ③去茎尖 + 喷施 $30\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GR24 (人工合成的独脚金内酯类似物); ④去茎尖; ⑤喷施清水作为对照。处理部位从顶端第一簇完全展开的嫩叶往下从第 1 个腋芽开始至第 6 个腋芽共 5 个, 用手动喷雾器对挑选腋芽喷施, 使腋芽湿润但没有液滴凝聚下落, 以保证处理有效。处理大约两周后, 统计萌芽率和测量腋芽长度。

采集 6 年生植株不同组织材料用于苹果组织特异性分析, 主要包括花、叶片 (成熟叶片)、花芽 (短枝顶端, 肥大饱满)、腋芽 (直径 $1\sim 2\text{ mm}$) 果实 (直径 3 cm 左右) 和梢尖 (新梢顶端, 直径 $3\sim 4\text{ mm}$), 把所有采集材料均放在液氮冷冻处理, 于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2 *MdPIN* 的鉴定与系统进化分析

在 TAIR 网站 (<http://www.arabidopsis.org/>) 下载拟南芥 *PIN* 基因家族的数据, 从中选取 8 个拟南芥 *PIN* 蛋白 (Paponov et al., 2005)。在苹果全组基因 Blastp (https://www.rosaceae.org/tools/ncbi_blast) 进行搜索后 (Fan et al., 2017), 去除重复序列, 最终鉴定出了 18 个 *PIN* 基因, 根据其在染色体的位置情况依次命名。下载拟南芥和番茄 *PIN* 蛋白序列 (Pattison & Catala, 2012) 构建系统进化树, 利用 MEGA5.10 (Saitou & Nei, 1987) 软件, 选用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ), 校验参数为 Bootstrap = 1 000, 缺口设置 “complete deletion”, 模式采用 “poisson correction”。

1.3 外显子与内含子结构和保守基序分析

在‘金冠’苹果全基因组数据库中下载苹果 *PIN* 基因外显子和内含子分布数据的 gff3 文件, 用在线基因结构显示系统 (GSDS2.0) (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 绘制 *PIN* 基因结构示意图。利用 MEME (<http://meme.nbcr.net/meme/>) 工具鉴定 18 个 *MdPIN* 的蛋白的保守基序, 参数设置基序数量 10 个, 其余参数在默认条件下。

1.4 基因表达分析和启动子顺式作用元件分析

从 GEO 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>; 登录号: GSE42873) 下载得到 7 个不同基因型 (M67、M74、M20、GD、X8877、M14 和 M49) 的不同组织 (花、幼果、果、梢尖、根和叶) 的基因表达量 (陈鸿飞 等, 2016), 并利用 HEML1.0 软件绘制图。从苹果基因组中找出 *MdPIN* 基因转录起始位置上游 $1\,500\text{ bp}$ 的序列, 并利用 PlantCARE 数据库 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>), 参考 (Fan et al., 2017) 进行顺式作用元件分析。

1.5 引物设计和 PCR 反应体系

采用 CTAB 法 (Gambino et al., 2008) 提取不同发育时期腋芽和不同组织部位的总 RNA。取完

整性较良好的总 RNA, 经过 RNase-Free DNase 处理之后, 以去除含有的苹果 DNA。使用 Clontech SMARTTM Libray 试剂盒合成 cDNA, 严格按照产品说明书操作。结合苹果转录组测序的结果, 采用 Primer premier 5.0 软件, 分别设计用于 *MdPIN15* 开放阅读框 (ORF) cDNA 扩增的上、下游引物 (*MdPIN15F*: 5'-ATGATCACATTATCCGACTTCTACC-3'); (*MdPIN15R*: 5'-TCATAGCCCCAACA AAATGTAGTA-3')。以苹果腋芽的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应体系为 50 μ L (其中 Primer STAR HS polymerase enzyme 酶 1 μ L, dNTP 1 μ L, 缓冲液 10 μ L, cDNA 2 μ L, 上、下游引物各 2 μ L, 所用引物浓度为 10 μ mol \cdot L⁻¹, ddH₂O 32 μ L)。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 36 个循环; 72 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min。用琼脂糖凝胶电泳将 PCR 扩增产物经过分离后, 选取片段相似的目的条带, 试剂盒回收(天根生化科技有限公司), 连接到载体 pMD19-T (购于宝生物工程有限公司), 并转化到感受态大肠杆菌 DH5 α (天根生化科技有限公司)。利用菌液 PCR 鉴定, 得到阳性克隆, 选取 PCR 验证并正确的阳性克隆, 送上海桑尼生物科技有限公司进行测序。

1.6 基因表达特性分析

利用实时荧光 qRT-PCR 分析 *MdPIN15* 在 ‘长富 2 号’ 苹果不同组织 (梢尖、叶、花、果实、腋芽和花芽) 以及不同外源处理下的基因表达情况。利用 Primer premier 6.0 软件, 根据得到的 *MdPIN15* 设计特异引物 *MdPIN15F*: 5'-ATTTTACCACGGCGGGCAAGG-3'; *MdPIN15R*: 5'-CTT CCCGCCATTGTTGTCCT-3', 并利用 Fan 等 (2016) 的苹果 EF-1 α (GenBank 登录号 DQ341381) 内参基因特异性引物 EF-1 α -F: 5'-ATTCAAGTATGCCTGGGTGC-3'; EF-1 α -R: 5'-CAG TCAGCCTG TGATGTTCC-3'。以上述反转录 cDNA 为模板, 用 SYBR[®] Premix Ex TaqTM (Tli RNaseH Plus) 试剂盒在 Bio-RAD IQ5 上进行 qRT-PCR 反应。反应体系为 20 μ L (其中 SYBR Premix EX Taq 为 10 μ L, cDNA 为 2 μ L, 上、下游引物各 0.8 μ L, 所用引物浓度为 10 μ mol \cdot L⁻¹, ddH₂O 为 6.4 μ L)。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 复性 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 40 个循环 (樊胜 等, 2016), 均设置 3 次重复, 基因表达数据分析采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 方法 (Livak & Schmittgen, 2001)。

2 结果与分析

2.1 苹果全基因组 *PIN* 基因的鉴定

利用生物信息学方法, 从苹果基因组中鉴定获得 18 个 *PIN* 基因家族成员, 根据它们的染色体位置, 将其中 16 个 *MdPIN* 基因依次命名为 *MdPIN1* ~ *MdPIN16*, 将没有定位到染色体上的命名为 *MdPIN17* 和 *MdPIN18*。

从表 1 可分析得出, *MdPIN* 的 CDS 序列在 507 ~ 2 154 bp 之间, 其中 *MdPIN4* 的 CDS 序列最短, *MdPIN13* 的 CDS 序列最长。*MdPIN* 蛋白氨基酸长度在 168 (*MdPIN4*) ~ 717 (*MdPIN13*) 之间。*MdPIN* 分子量在 19.04 ~ 77.97 kD, 其中 *MdPIN13* 的分子量最大, *MdPIN4* 分子量最小。*MdPIN* 蛋白的等电点在 6.51 (*MdPIN16*) ~ 9.81 (*MdPIN4*) 之间, 其中 17 个 *MdPIN* 蛋白呈碱性, 只有 *MdPIN16* 蛋白呈酸性, 说明 *MdPIN* 蛋白的酸碱性差异较小。在 18 个苹果 *PIN* 蛋白家族中, 有 6 个不稳定性指数 > 40, 说明它们属于不稳定性蛋白。*MdPIN* 蛋白亲水指数在 -0.607 (*MdPIN4*) ~ 0.793 (*MdPIN5*) 之间, 其中 *MdPIN4* 蛋白的亲水指数最小, 其亲水性最强, *MdPIN5* 的蛋白亲水指数最大, 其疏水性最强。

表 1 *MdPIN* 基因家族
Table 1 The *PIN*-FORMED gene family in apple

基因 Gene	基因组登录号 Gene locus	染色体位置 Location	编码区长 度/ bp CDS	氨基酸数 量/aa Peptide	基因链 Strand	分子量/ kD MW	平均亲水 指数 GRA	等电点 pI	不稳定 系数 II
<i>MdPIN1</i>	MDP0000156440	chr1: 25674851..25677285	1 794	597	-	64.40	0.228	9.00	35.18
<i>MdPIN2</i>	MDP0000254504	chr3: 21138470..21152476	1 431	476	-	53.81	- 0.468	9.44	59.29
<i>MdPIN3</i>	MDP0000125862	chr3: 22250253..22253974	1 782	560	-	59.78	- 0.042	9.63	48.25
<i>MdPIN4</i>	MDP0000144113	chr3: 24035431..24036310	507	168	-	19.04	- 0.607	9.81	44.94
<i>MdPIN5</i>	MDP0000297331	chr4: 19946884..19949328	1 080	359	+	39.56	0.793	7.67	38.70
<i>MdPIN6</i>	MDP0000379186	chr4: 22611614..22621637	1 464	486	-	54.34	0.157	8.02	39.07
<i>MdPIN7</i>	MDP0000301913	chr4: 22628975..22638019	1 233	400	-	44.36	0.390	8.70	41.71
<i>MdPIN8</i>	MDP0000183540	chr5: 2981195..2981941	747	248	-	28.07	0.276	8.69	26.76
<i>MdPIN9</i>	MDP0000200231	chr6: 23865310..23868488	1 887	628	+	68.95	- 0.054	9.45	37.28
<i>MdPIN10</i>	MDP0000250518	chr9: 2797194..2803901	1 848	615	-	66.38	0.178	9.16	22.26
<i>MdPIN11</i>	MDP0000784665	chr12: 8283326..8285702	1 797	598	+	64.55	0.166	9.10	36.18
<i>MdPIN12</i>	MDP0000322329	chr12: 31293609..31302381	1 875	624	+	69.65	0.131	9.42	39.03
<i>MdPIN13</i>	MDP0000497581	chr13: 1551980..1558585	2 154	717	-	77.97	0.021	8.8	37.01
<i>MdPIN14</i>	MDP0000887093	chr13: 30911269..30911850	582	193	-	21.66	- 0.420	9.62	45.78
<i>MdPIN15</i>	MDP0000138035	chr14: 28405053..28408137	869	622	-	67.76	0.087	8.97	35.20
<i>MdPIN16</i>	MDP0000234528	chr16: 183650..187894	1 875	624	+	67.79	0.087	6.51	34.27
<i>MdPIN17</i>	MDP0000119864	unanchored: 3256305..3259465	1 890	629	-	67.84	0.089	9.20	46.16
<i>MdPIN18</i>	MDP0000274728	unanchored: 33552230..33557972	1 566	521	-	57.11	0.308	9.20	39.56

2.2 苹果全基因组 *PIN* 基因结构与等位进化分析

利用在线数据库对鉴定得到的 18 个 *MdPIN* 基因进行系统进化树的构建、内含子、外显子和保守基序分析。结果（图 1）表明，18 个 *MdPIN* 基因含有 1~14 个外显子，0~13 个内含子，其中，*MdPIN14* 和 *MdPIN8* 没有内含子。

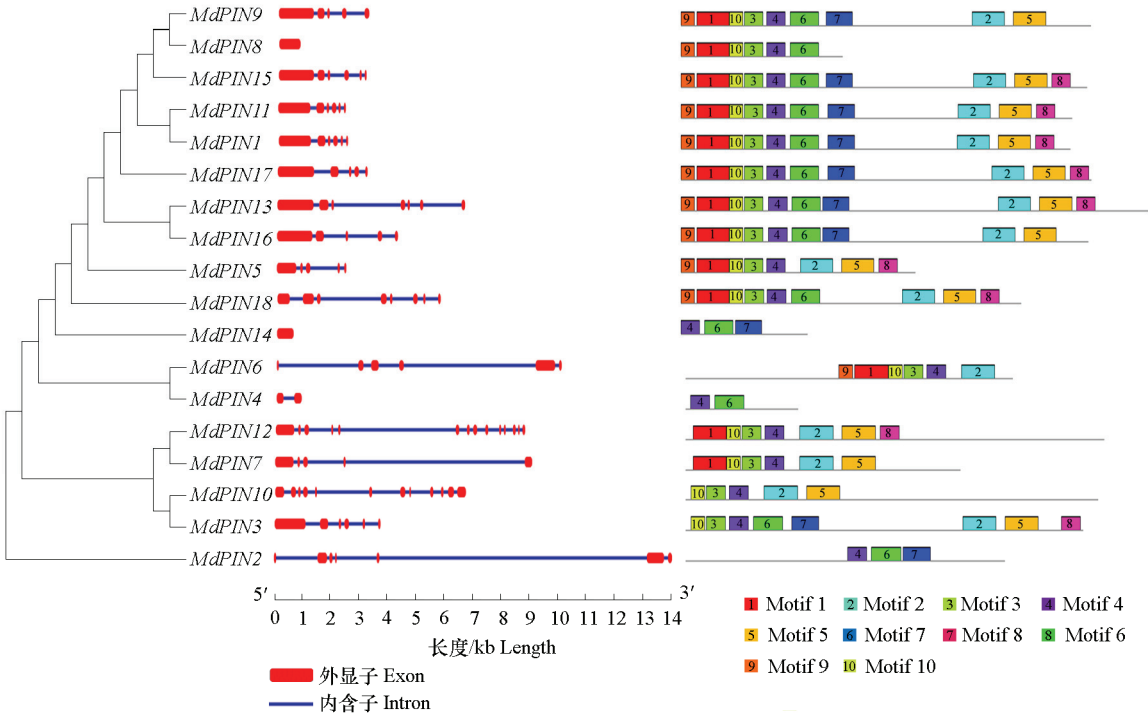


图 1 *MdPIN* 的基因结构
Fig. 1 Characterization of apple *PIN* genes

保守基序分析表明，18 个 *MdPIN* 基因的保守基序数量在 2 到 10 不等，其中 *MdPIN4* 保守基序数量最少，只有 2 个，*MdPIN15*、*MdPIN11*、*MdPIN1*、*MdPIN17* 和 *MdPIN13* 保守基序数量最多为 10 个。

表 2 保守基序序列鉴定
Table 2 Motif sequences identified

基序 Motif	长度/aa Length	序列 Sequence
1	50	YGSVKWWKIFTDQCSGINRFVALFAVPLLSFHFISTNDPYNMNTRFIAA
2	50	VAKKHQMPPASVMTRLILIMVWRKLRNPNTYSSLLGVAWSLISYKWNK
3	29	LEWSITLFSLSLTPNTLVMGIPLLKMGY
4	29	LMVQIVVLQCHWYTLMLFMFEYRGARLL
5	50	DAGLGMAFMFSLGLFMALQPKIIACGNSVAGFAMAVRFLTGPVMAAASIA
6	44	TAASIVSFKVSDSDVSLDGRDFLETDAEIGDDGKLHVKVRKSNA
7	41	GLSSTTPRPSNLNAEIYSLQSSRNPTPRGSSFNHTDFYSM
8	29	LHVAIVQAALPQGIVPFVFAKEYNVHPDI
9	21	MISWHDLYKVLTAVVPLYVAM
10	21	DTLQKLIVLAVLGVWTKVSKR

为了研究植物 PIN 基因的进化关系，利用苹果、拟南芥和番茄的 36 个 PIN 蛋白序列构建系统进化树，PIN 蛋白根据进化关系可以分为 3 个组，分别为 G1、G2 和 G3，在每个亚组内，基因数布较均匀，分别含有 9、14 和 13 个（图 2）。

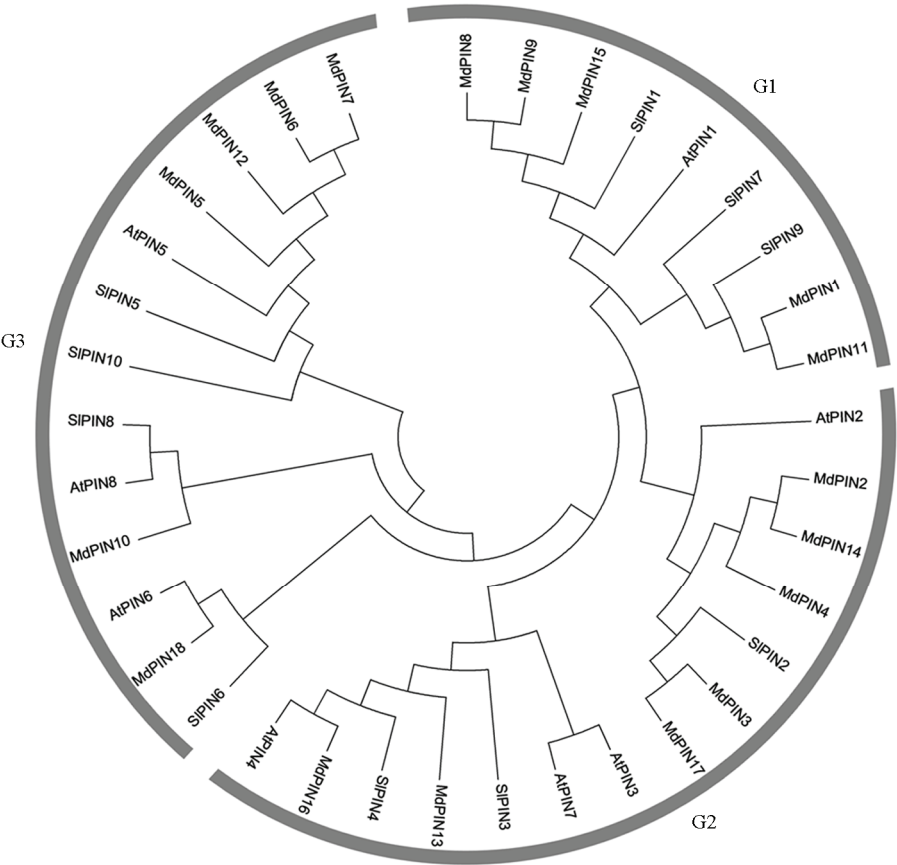


图 2 苹果、拟南芥和番茄 PIN 基因的系统进化分树
Fig. 2 Phylogenetic analysis of *Malus × domestica* (Md), *Arabidopsis thaliana* (At) and *Solanum lycopersicum* (Sl)

2.3 *MdPIN* 基因家族启动子元件分析

为了研究 *MdPIN* 对各种反应的应答的潜在作用, 用 *MdPIN* 转录起始位置上游 1 500 bp 的序列查找富含的各类顺式作用元件。从表 3 中发现有光信号元件和胁迫响应元件, 此外还发现与霉素、乙烯、生长素、茉莉酸甲酯、水杨酸和脱落酸有关的顺式作用元件, 其中 *MdPIN7* 没有顺式作用元件, *MdPIN8* 只有 1 个与赤霉素相关的顺式作用元件, 其余成员基因的顺式作用元件数量在 2 (*MdPIN3*) ~ 22 (*MdPIN5*) 之间, 其中与茉莉酸甲酯相关的顺式作用元件数量最多, 除 *MdPIN2*、*MdPIN10*、*MdPIN12* 和 *MdPIN13* 基因有与分生组织相关的顺式作用元件, 其余基因均没有。这些存在的调控元件说明 *MdPIN* 基因家族成员不仅受到光、热等外界环境的影响, 还受到多种激素的影响, 通过参与植物体内的生物学过程来共同调控苹果生长发育。

表 3 *MdPIN* 基因启动子的顺式作用元件
Table 3 Predicted *cis*-elements in the promoter of the *MdPIN* genes

基因 Gene	茉莉酸甲 酯相关 MeJA- related	胁迫相关 Stress- related	赤霉素相关 Gibberellin- related	水杨酸相关 Salicylic acid-related	生长素相关 Auxin- related	脱落酸相关 Absciscic acid-related	分生组织相关 Meristem- related	乙烯相关 Ethylene- related	光信号相关 Circadian- related
<i>MdPIN1</i>	2	5	1	—	1	1	—	—	—
<i>MdPIN2</i>	—	1	1	2	—	—	3	—	—
<i>MdPIN3</i>	—	—	—	—	—	2	—	—	—
<i>MdPIN4</i>	2	—	—	—	—	—	—	—	1
<i>MdPIN5</i>	10	3	—	—	2	4	—	1	2
<i>MdPIN6</i>	—	4	1	—	—	1	—	—	1
<i>MdPIN7</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>MdPIN8</i>	—	—	1	—	—	—	—	—	—
<i>MdPIN9</i>	—	2	3	1	—	—	—	—	—
<i>MdPIN10</i>	—	4	2	2	1	—	1	1	—
<i>MdPIN11</i>	—	4	2	2	—	—	—	—	—
<i>MdPIN12</i>	2	1	—	4	—	—	1	1	2
<i>MdPIN13</i>	—	1	3	1	—	2	1	1	1
<i>MdPIN14</i>	3	3	3	3	1	—	—	—	—
<i>MdPIN15</i>	2	4	4	1	—	—	—	—	4
<i>MdPIN16</i>	—	2	—	—	1	—	—	—	—
<i>MdPIN17</i>	2	4	1	—	—	2	—	—	2
<i>MdPIN18</i>	10	5	—	4	—	—	—	—	—

2.4 *MdPIN* 基因家族在不同器官中表达分析

为了探究苹果 *PIN* 基因家族在不同器官中的表达量, 从 GEO 数据库下载 7 个基因型 (M67、M74、M20、GD、X8877、M14 和 M49) 苹果的不同器官的基因表达量。从图 3 中发现 *MdPIN9* 和 *MdPIN15* 基因在不同组织器官中的表达量显著高于其他家族成员的表达量, 其余成员表达量很低或几乎不表达, 其中 *MdPIN1*、*MdPIN2*、*MdPIN4* 和 *MdPIN13* 表达量在茎、根中表达量最低, *MdPIN9* 在花、茎和叶中表达量最高, *MdPIN15* 在 M74 花中和 M49 叶中表达最高, 其次是在 X8877 茎中。前人研究表明, *AtPIN1* 在调控花芽的发育和侧生器官的发育、数量、大小起着很重要的作用 (Okada et al., 1991)。根据本试验研究结果, *MdPIN15* 与 *AtPIN1* 同源性最高 (图 2), 为进一步研究 *MdPIN15* 调控苹果发育和侧生器官的发生的机理和功能提供指导意义。

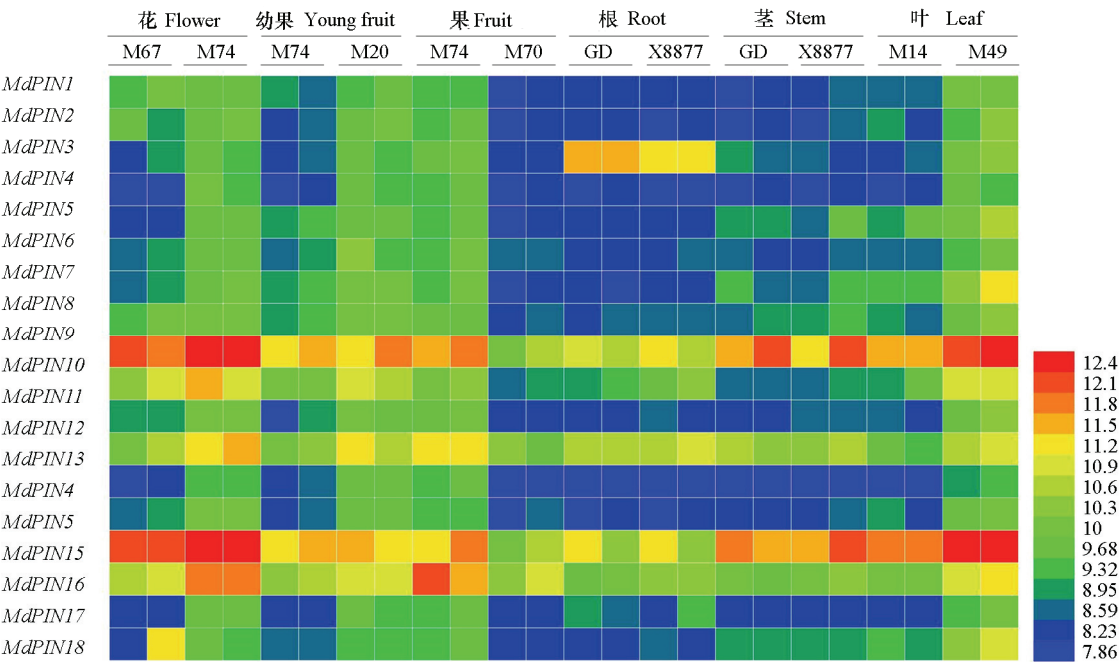


图3 *MdPIN* 在苹果不同基因型 (M14、M20、M49、M67、M74、GD 和 X8877) 不同器官的表达
Fig. 3 The expression levels of *MdPIN* genes in the different organs of different genotypes (M14, M20, M49, M67, M74, GD and X8877) in apple

2.5 *MdPIN15* 的克隆

以一年生‘长富2号’苹果腋芽的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 获得 1 800 bp 左右含有完整开放读码框的 cDNA 序列 (图 4), 该电泳条带与预测的引物扩增片段的大小一致, 测序结果表明该片段长为 1 869 bp, 编码 622 个氨基酸。

2.6 *MdPIN15* 在‘长富2号’苹果不同器官中的表达分析

MdPIN15 在花、梢尖、叶、花芽、腋芽和根中都有表达 (图 5), 其中在梢尖中表达量最高, 其次是腋芽中, 在花芽中表达量最低, 在梢尖、根、花、花芽、腋芽和果实的表达量分别是叶的 4.65 倍、2.21 倍、1.31 倍、0.56 倍、3.97 倍和 3.13 倍。

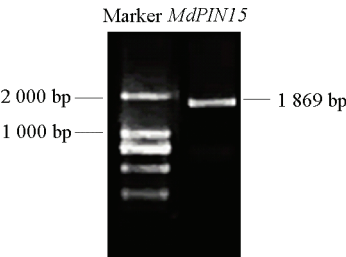


图4 *MdPIN15* PCR 扩增产物电泳检测
Fig. 4 PCR product of *MdPIN15* in *Malus × domestica*

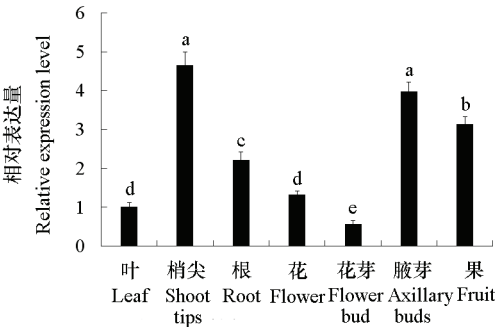


图5 ‘长富2号’苹果不同器官中 *MdPIN15* 的相对表达量
Fig. 5 Relative expression levels of *MdPIN15* in different organs of Nagafu 2 apple

2.7 不同处理对腋芽的萌发率和长度的影响

6-BA 和去茎尖处理后, 腋芽的长度显著增加 (图 6), 分别为对照的 6.30 倍和 6.32 倍, 腋芽的萌发率也显著提高 (表 4), 分别为对照的 4.25 倍和 4.20 倍。GR24 和 LVS 处理去茎尖植株后, 腋芽的长度与去茎尖对照相比, 显著抑制了腋芽的长度 (图 6), 腋芽的萌发率也显著降低, 并且 LVS 处理去茎尖植株后, 腋芽几乎不萌发, 为去茎尖对照的 0.02 倍 (表 4)。

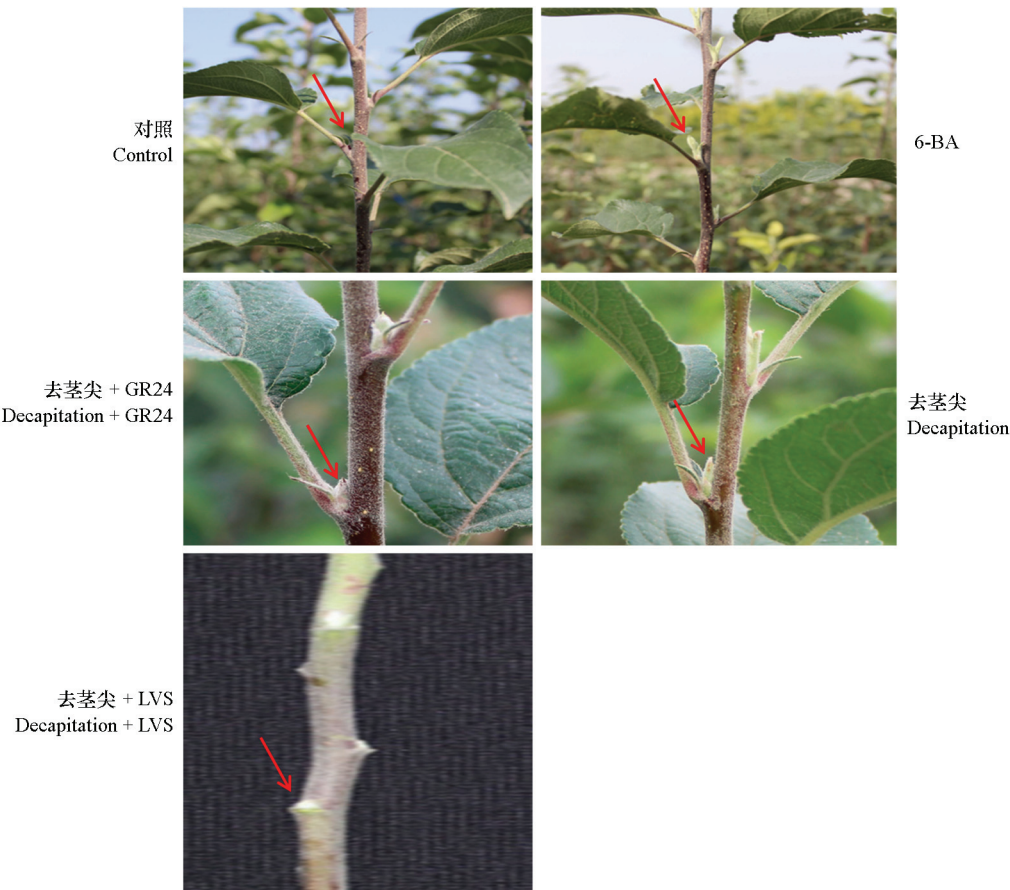


图 6 不同处理腋芽的萌发表型
Fig. 6 Phenotypes of axillary bud burst with different treatments

表 4 不同处理对腋芽长度和萌芽率的影响

Table 4 The influence of different treatments on the axillary buds length and germination rate

处理 Treatment	腋芽长度/mm Axillary buds length	萌发率/% Axillary buds germination rate
对照 Control	3.63 ± 0.51 b	23.5 ± 2 b
6-BA	22.87 ± 0.95 a	99.8 ± 5 a
去茎尖 Decapitation	22.94 ± 0.88 a	98.8 ± 4 a
去茎尖 + LVS Decapitation + LVS	3.18 ± 0.35 b	2.0 ± 0.1 c
去茎尖 + GR24 Decapitation + GR24	2.77 ± 0.22 b	20.8 ± 1.6 b

注: 不同小写字母为 0.05 水平差异显著。下同。
Note: The small letters show significant difference at 5% level. The same blow

2.8 *MdPIN15* 在腋芽萌发中的表达分析

在外源 6-BA 处理、去茎尖处理以及 LVS 和 GR24 处理的去茎尖植株的腋芽萌发过程中, *MdPIN15* 的表达量与其对照相比有明显的变化(图 7~ 图 9)。外源 6-BA 处理之后, *MdPIN15* 表达量呈上升趋势, 均明显高于对照, 在 4 h 处理后表达量上升趋势增大, 48 h 时表达量达最大值, 随后表达量稍微降低, 48、96 和 144 h 时的表达量分别是对照的 2.2 倍、2.19 倍和 2.41 倍。此外还发现, 处理 144 h 后腋芽开始萌发, 早于对照萌发(图 7)。外源 CK 合成抑制剂(LVS)处理去茎尖植株 4 h 后, 其表达量均明显低于去茎尖对照, 在 48 h 与去茎尖处理差异最显著, 其表达量是去茎尖对照的 39%(图 8)。外源 GR24 处理茎尖植株后, *MdPIN15* 的表达量在 72 h 时明显低于去茎尖对照, 处理 72 和 120 h 其表达量分别为去茎尖对照的 61%和 65%(图 9)。

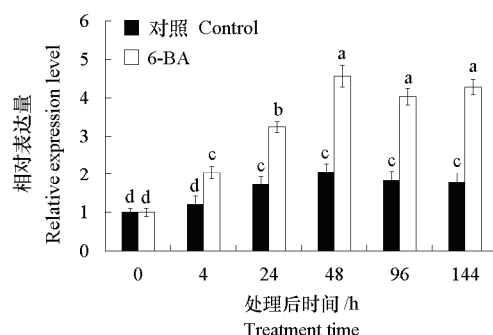


图 7 不同时期 6-BA 处理后的 *MdPIN15* 相对表达量

Fig. 7 Relative expression levels of *MdPIN15* in the axillary buds treated with 6-BA at different times

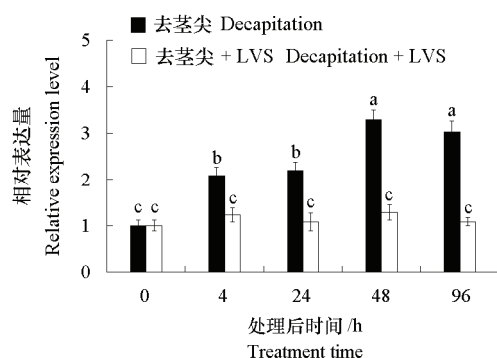


图 8 不同时期细胞分裂素合成抑制剂抑制处理后的 *MdPIN15* 相对表达量

Fig. 8 Relative expression levels of *MdPIN15* in the axillary buds treated with inhibitor of CK synthesis at different times

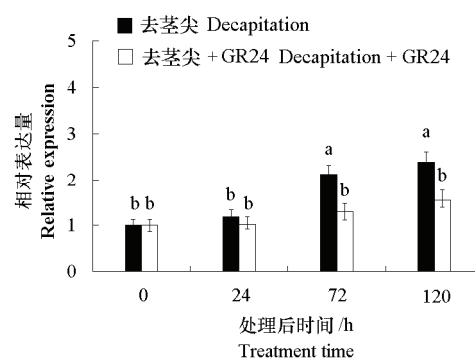


图 9 不同时期 GR24 处理后的 *MdPIN15* 相对表达量

Fig. 9 Relative expression levels of *MdPIN15* in the axillary buds treated with GR24 at different times

3 讨论

生长素极性运输在植物生长发育、繁殖等生理过程中扮演着重要的角色, 尤其是在植物的形态建成、维管分化、组织的伸长和光形态建成过程中起着重要的功能 (Bennett et al., 2016), *PIN* 家族成员的鉴定、系统进化以及表达研究和调控水稻、拟南芥等模式植物发育的机制研究较为清楚, 而在苹果中前人报道较少, 前人筛选出 13 个苹果 *PIN* 家族 (Zhang et al., 2015), 但并没有进行系统完整的生物学分析。本研究中共鉴定了 18 个苹果 *PIN* 家族成员, 丰富了家族成员数量, 并系统分析了 *PIN* 家族成员的进化关系, 基因结构, 启动子作用元件和组织特异性表达。从苹果基因组中共鉴定出 18 个编码生长素输出载体的 *PIN* 成员, 均高于拟南芥和番茄中的 *PIN* 成员数量 (Paponov et al., 2005; Krecek et al., 2009; Pattison & Catala, 2012), 与拟南芥和番茄 *PIN* 的同源性高, 说明起源于同一个祖先。*PIN* 蛋白根据亲水区的长短可分为长 *PIN* 蛋白和短 *PIN* 蛋白, 而主要参与生长素的极性运输为定位在质膜的长蛋白 (Bennett et al., 2014)。本研究中克隆得到的 *MdPIN15* 属于长蛋白, 表明其在极性运输中可能起着极其重要的作用。研究还发现, 位于相同的进化组中的基因结构相似, 不同的进化组中基因结构呈多样性, 可能与 *PIN* 结构域的进化密切相关。苹果 *PIN* 基因启动子上富含赤霉素、乙烯、生长素、茉莉酸甲酯、水杨酸和脱落酸等激素响应元件, 本研究中 6-BA 处理能显著诱导 *MdPIN15* 的表达量, 而 GR24 处理减少了 *MdPIN15* 的表达量, 而乙烯, 脱落酸等是否能诱导 *MdPIN15* 以及其他 *MdPIN* 家族成员的表达量尚未清楚, 这些作用元件是如何调控 *MdPIN* 的表达量以及具体的调控模式需要进一步深入研究。

An 等 (2017) 发现 *PIN* 参与苹果根的发育, 而对于 *PIN* 调控苹果腋芽萌发的研究尚未报道, 本研究中以 ‘长富 2 号’ 苹果腋芽为材料克隆得到 *MdPIN15* 基因, 该基因含有 1 869 bp 开放阅读框, 编码 622 个氨基酸。前人研究表明, 拟南芥 *PIN1* 调控其维管组织的分化和胚胎器官的形成 (Benková et al., 2003; Reinhardt et al., 2003), 烟草 *PIN4* 调控腋芽的萌发, 过表达促进腋芽的萌发 (Xie et al., 2017), 豌豆 *PIN1* 促进有活性的腋芽与主茎维管束的连接, 从而进一步促使腋芽中的生长素输出以促进腋芽萌发 (Balla et al., 2011), 水稻 *PIN1* 调控根的数量和分蘖的数量 (Xu et al., 2005), 番茄 *PIN1* 调控分枝的发育 (Pattison & Catala, 2012)。根据系统进化分析表明, 拟南芥 *PIN1*、番茄 *PIN1* 和苹果 *PIN15* 高度同源, 而且聚为一类。说明可能有着相似的功能, 在植物腋芽的萌发中起着重要的作用。组织特异性分析表明, *MdPIN15* 在茎、腋芽和果实中表达量高, 暗示了 *MdPIN15* 在调控苹果主茎、腋芽萌发和果实发育中的作用。为了进一步研究探索 *MdPIN15* 的调控作用, 以 6-BA、CK 抑制剂、GR24 和去茎尖处理, 分析不同外源处理对 *MdPIN15* 在腋芽萌发过程的表达模式。前人研究表明, 外源 CKs 处理未萌发的腋芽, 可使其萌发, 本研究与其前人研究结果一致, 说明 CKs 在调控腋芽萌发中起着重要的作用 (Kalousek et al., 2010; Dun et al., 2012)。IAA 和 CKs 存在拮抗作用, CKs 通过促进腋芽生长素向主茎中的运输, 从而促进腋芽的萌发, 此外, CK 还抑制 SLs 信号转导以及 BRC1 的丰度 (Dun et al., 2012; Rameau et al., 2015; Roman et al., 2016)。本研究结果表明, 外源 6-BA 处理后促进腋芽的萌发, *MdPIN15* 表达量上调。前人研究表明 SLs 和 BRC1 抑制腋芽的萌发 (Crawford et al., 2010), GR24 处理会促进内源 SLs 合成, 减少 *PIN* 在木质部质膜的丰度, 进而降低主茎中生长素极性运输的能力 (Crawford et al., 2010; Shinohara et al., 2013), 本研究表明外源 GR24 处理后, 抑制腋芽萌发, 腋芽中 *MdPIN15* 的表达量下调, 说明 *MdPIN15* 很有可能响应 SL 信号、IAA 信号和 BRC1 来共同调控腋芽萌发, 然而其机理有待深入研究。去茎尖处理, 促进腋芽的萌发, 可能是由于主茎的运输能力增强, 增强了腋芽输出生长素的运输能力, 而且

CKs 的含量上调 (Roman et al., 2016), 从处理后表达量的变化趋势可以发现, 在 48 h 表达量出现最高峰, 可能植物响应外源处理需要一定的时间, 此外, 还发现萌发后 (144 h), 其表达量下降, 可能是植物腋芽萌发需要将腋芽中的生长素输出, 在萌发的过程, 其表达量上升, 萌发后表达量下降维持在一定水平, 腋芽中的生长素含量变低, 因此 *MdPIN15* 表达量会出现下调。综上所述, 腋芽萌发是一个复杂的过程, 受到多种激素、环境因子和转录因子的调控。*MdPIN15* 以及其他 *PIN* 家族基因如何调控介导多种激素和下游转录因子调控腋芽的机理尚未清楚, 因此需要进一步研究。

References

- An Jian-ping, Liu Xin, Li Hao-hao, You Chun-xiang, Shu Jing, Wang Xiao-fei, Hao Yu-jin. 2017. The molecular cloning and functional characterization of MdPIN1 in apple. *Journal of Integrative Agriculture*, 16 (5): 1103 – 1111.
- Assuero S G, Tognetti J A. 2010. Tillering regulation by endogenous and environmental factors and its agricultural management. *Am J Plant Sci Biotechnol*, 4 (1): 35 – 48.
- Balla J, Kalousek P, Reinöhl V, Friml J, Procházka S. 2011. Competitive canalization of PIN-dependent auxin flow from axillary buds controls pea bud outgrowth. *Plant J*, 65 (4): 571 – 577.
- Balzan S, Johal G S, Carraro N. 2014. The role of auxin transporters in monocots development. *Front Plant*, 5 (393): 393.
- Band L R, Wells D M, Fozard J A, Ghetiu T, French A P, Pound M P, Wilson M H, Yu L, Li W, Hijazi H I, Oh J, Pearce S P, Perez-Amador M A, Yun J, Kramer E, Alonso J M, Godin C, Vernoux T, Hodgman T C, Pridmore T P, Swarup R, King J R, Bennett M J. 2014. Systems analysis of auxin transport in the *Arabidopsis* root apex. *Plant Cell*, 26: 862 – 875.
- Benjamins R, Scheres B. 2008. Auxin: the looping star in plant development. *Annu Rev Plant Biology*, 59: 443 – 465.
- Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G, Friml J. 2003. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, 115 (5): 591 – 602.
- Bennett T, Brockington S F, Rothfels C, Graham S W, Stevenson D, Kutchan T, Rolf M, Thomas P, Wong G K, Leyser O, Glover B J, Harrison C J. 2014. Paralogous radiations of PIN proteins with multiple origins of noncanonical PIN structure. *Mol Biol Evol*, 31: 2042 – 2060.
- Bennett T, Hines G, van Rongen M, Waldie T, Sawchuk M G, Scarpella E, Ljung K, Leyser O. 2016. Connective auxin transport in the shoot facilitates communication between shoot apices. *PLoS Biol*, 14 (4): e1002446.
- Bennett T, Sieberer T, Willett B, Booker J, Luschnic G, Leyser O. 2006. The *Arabidopsis* MAX pathway controls shoot branching by regulating auxin transport. *Curr Biol*, 16 (6): 553 – 563.
- Blakeslee J J, Peer W A, Murphy A S. 2005. Auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology*, 8 (5): 494 – 500.
- Brewer P B, Dun E A, Ferguson B J, Rameau C, Beveridge C A. 2009. Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 150: 482 – 493.
- Carraro N, Tisdale-Orr T E, Clouse R M, Knoller A S, Spicer R. 2012. Diversification and expression of the PIN, AUX/LAX, and ABCB families of putative auxin transporters in *Populus*. *Front Plant*, 3 (17): 17.
- Chen Hong-fei, Shao Hong-xia, Fan Sheng, Ma Juan-juan, Zhang Dong, Han Ming-yu. 2016. Identification and phylogenetic analysis of the POLYGALACTURONASE gene family in apple. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (10): 1863 – 1877. (in Chinese)
- 陈鸿飞, 邵红霞, 樊胜, 马娟娟, 张东, 韩明玉. 2016. 苹果全基因组多聚半乳糖醛酸酶基因家族的鉴定及进化分析. *园艺学报*, 43 (10): 1863 – 1877.
- Crawford S, Shinohara N, Sieberer T, Williamson L, George G, Hepworth J, Müller D, Domagalska M A, Leyser O. 2010. Strigolactones enhance competition between shoot branches by dampening auxin transport. *Development*, 137: 2905 – 2913.
- Dun E A, Brewer P B, Beveridge C A. 2009. Strigolactones: discovery of the elusive shoot branching hormone. *Trends in Plant Science*, 14 (7): 364 – 372.
- Dun E A, Germain A D S, Rameau C, Beveridge C A. 2012. Antagonistic action of strigolactone and cytokinin in bud outgrowth control. *Plant Physiol*, 158: 487 – 498.

- Fan S, Zhang D, Lei C, Chen H, Xing L, Ma J, Han M. 2016. Proteome analyses using itraq labeling reveals critical mechanisms in alternate bearing *Malus prunifolia*. *Journal of Proteome Research*, 15 (10): 3602 – 3616.
- Fan S, Zhang D, Xing L, Qi S, Du L, Wu H, Shao H, Li Y, Ma J, Han M. 2017. Phylogenetic analysis of IDD gene family and characterization of its expression in response to flower induction in *Malus*. *Molecular Genetics and Genomics*, 292 (4): 755.
- Fan Sheng, Zhang Lan-qing, Liu Ke, Lei Chao, Chen Xin, Yao Dian-cheng, Zhang Dong, Han Ming-yu. 2016. Cloning and expression of the flowering regulation transcription factor gene *MdSPL6* in *Malus × domestica*. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (11): 2089 – 2098. (in Chinese)
- 樊 胜, 张岚清, 刘 柯, 雷 超, 陈 欣, 姚殿城, 张 东, 韩明玉. 2016. 苹果‘长富2号’开花调控转录因子 *MdSPL6* 基因的克隆和表达分析. *园艺学报*, 43 (11): 2089 – 2098.
- Forestan C, Farinati S, Varotto S. 2012. The maize PIN gene family of auxin transporters. *Frontiers in Plant Science*, 3 (3): 16.
- Friml J. 2010. Subcellular trafficking of PIN auxin efflux carriers in auxin transport. *European Journal of Cell Biology*, 89 (2): 231 – 235.
- Friml J, Wisniewska J, Benkova E, Mendgen K, Palme K. 2002. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature*, 415 (6873): 806 – 809.
- Gallavotti A. 2013. The role of auxin in shaping shoot architecture. *Journal of Experimental Botany*, 64 (9): 2593 – 2608.
- Gambino G, Perrone I, Griboaud I. 2008. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*, 19 (6): 520 – 525.
- Krecek P, Skupa P, Libus J, Naramoto S, Tejos R, Friml J, Zazimalova E. 2009. The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biol*, 10: 249.
- Leyser O. 2009. The control of shoot branching: an example of plant information processing. *Plant, Cell & Environment*, 32 (6): 694 – 703.
- Li Ya-dong, Zhang Qian, Sun Xue-hui, Lu Tie-gang. 2009. Mechanism for controlling plant branching development. *Journal of Agricultural Science and Technology*, (4): 1 – 9. (in Chinese)
- 李亚栋, 张 芊, 孙学辉, 路铁刚. 2009. 植物分枝发育的调控机制. *中国农业科技导报*, (4): 1 – 9.
- Li Yun-he, Sun Guang-ming, Zhang Hong-na, Liu Sheng-hui, Wu Qing-song. 2016. Isolation and expression analysis of the genes encoding polar auxin transporter *AcPINs* and *AcAUXs* in pineapple. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (10): 1916 – 1928. (in Chinese)
- 李运合, 孙光明, 张红娜, 刘胜辉, 吴青松. 2016. 菠萝生长素极性运输载体基因 *AcPINs* 和 *AcAUXs* 的分离与表达分析. *园艺学报*, 43 (10): 1916 – 1928.
- Liu B, Zhang J, Wang L, Li J, Zheng H, Chen J, Lu M. 2014. A survey of *Populus* PIN-FORMED family genes reveals their diversified expression patterns. *J Exp Bot* 65: 2437 – 2448.
- Liu Feng-luan, Kou Ya-ping, Chen Xiao-li, Gao Bin, Wang Ling, Zhao Liang-jun. 2014. Cloning and expression analysis of PIN1 and PIN2 encoding auxin efflux carriers in *Rosa canina*. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (5): 925 – 934. (in Chinese)
- 刘凤栾, 寇亚平, 陈晓丽, 高 彬, 王 玲, 赵梁军. 2014. 狗蔷薇生长素输出载体蛋白基因 PIN1 和 PIN2 的分离与表达分析. *园艺学报*, 41 (5): 925 – 934.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25 (4): 402 – 408.
- Okada K, Ueda J, Komaki M K, Bell C J, Shimura Y. 1991. Requirement of the auxin polar transport system in the early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *Plant Cell*, 3 (7): 677 – 684.
- Ongaro V, Leyser O. 2008. Hormonal control of shoot branching. *Journal of experimental botany*, 59 (1): 67 – 74.
- Pan X, Chen J, Yang Z. 2015. Auxin regulation of cell polarity in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 28: 144 – 153.
- Paponov I A, Teale W D, Trebar M, Blilou I, Palme K. 2005. The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *Trends in plant science*, 10 (4): 170 – 177.
- Pattison R J, Catala C. 2012. Evaluating auxin distribution in tomato (*Solanum lycopersicum*) through an analysis of the PIN and AUX/LAX gene families. *Plant J*, 70: 585 – 598.
- Rameau Catherine, Bertheloot Jessica, Leduc Nathalie, Andrieu Bruno, Foucher Fabrice, Sakr Soulaïman. 2015. Multiple pathways regulate shoot branching. *Frontiers in Plant Science*, 5: 741.

- Reinhardt D, Pesce E R, Stieger P, Mandel T, Baltensperger K, Bennett M, Traas J, Friml J, Kuhlemeier C. 2003. Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature*, 426 (6964): 255 – 260.
- Roman H, Girault T, Barbier F, Péron T, Brouard N, Pencik A, Novák J, Vian A, Sakr S, Lothie J, Gourriec J L, Leduc N. 2016. Cytokinins are initial targets of light in the control of bud outgrowth. *Plant Physiology*, 172 (1): 489 – 509.
- Shen C, Bai Y, Wang S, Zhang S, Wu Y, Chen M, Jiang D, Qi Y. 2010. Expression profile of PIN, AUX/LAX and PGP auxin transporter gene families in *Sorghum bicolor* under phytohormone and abiotic stress. *FEBS Journal*, 277 (14): 2954 – 2969.
- Shinohara N, Taylor C, Leyser O. 2013. Strigolactone can promote or inhibit shoot branching by triggering rapid depletion of the auxin efflux protein PIN1 from the plasma membrane. *PLoS Biol*, 11 (1): e1001474.
- Tanaka H, Dhonukshe P, Brewer P B, Friml J. 2006. Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63 (23): 2738 – 2754.
- Viaene T, Delwiche C F, Rensing S A, Friml J. 2013. Origin and evolution of PIN auxin transporters in the green lineage. *Trends in Plant Science*, 18 (1): 5 – 10.
- Wang J R, Hu H, Wang G H, Li J, Chen J Y, Wu P. 2009. Expression of PIN genes in rice (*Oryza sativa* L.): tissue specificity and regulation by hormones. *Mol Plant*, 2: 823 – 831.
- Wang Y, Li J. 2011. Branching in rice. *Current Opinion in Plant Biology*, 14 (1): 94 – 99.
- Xie Xiao-dong, Qin Guang-yong, Si Ping, Luo Zhao-peng, Gao Jun-ping, Xia Chen, Zhang Jian-feng, Pan Wei, Xia Qing-you, Lin Fu-cheng, Yang Jun. 2017. Analysis of *Nicotiana tabacum* PIN genes identifies NtPIN4 as a key regulator of axillary bud growth. *Physiologia Plantarum*, 160 (2): 222 – 239.
- Zhang He, An Hai Shan, Wang Yi, Zhang Xinzong, Han Zhenhai. 2015. Low expression of PIN gene family members is involved in triggering the dwarfing effect in M9 interstem but not in M9 rootstock apple trees. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37 (5): 1 – 18.
- Zhao Y. 2010. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual Review of Plant Biology*, 61: 49 – 64.

征 稿

《Horticultural Plant Journal》

（《园艺学报》英文版）征稿

《园艺学报》英文版《Horticultural Plant Journal》由中国科学技术协会主管，中国园艺学会、中国农业科学院蔬菜花卉研究所和中国农业科学技术出版社共同主办，于2015年7月创刊，国内统一连续出版物编号CN10-1305/S，国际标准连续出版物编号ISSN 2095-9885，Online ISSN 2468-0141，双月刊，大16开，与国际出版商Elsevier合作，在ScienceDirect网络出版平台实现全文开放存取（<http://www.sciencedirect.com/journal/horticultural-plant-journal>）。

办刊宗旨：准确、全面、及时地报道园艺学科领域重大研究成果和科研进展，反映学科研究水平和发展动向，为学术交流服务，为促进学科发展作贡献。

刊载范围：有关园艺作物种质资源、遗传育种、栽培技术、生理生化、生态、基因组学、生物技术、植物保护、采后处理与利用等原创性研究论文、研究简报及综述等。

欢迎投稿：投稿网址 <https://www.journals.elsevier.com/horticultural-plant-journal/>。同时请将纸质稿件（连同作者授权协议）挂号信寄至：北京中关村南大街12号，中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部（邮编100081）。联系电话：010-82109523；010-62192388。