

梅梅, 王斯彤, 刘怡菲, 等. 天女木兰 PIN 基因家族的鉴定及在种子萌发过程中的表达[J]. 沈阳农业大学学报, 2025, 56(1): 29-39.

MEI M, WANG S T, LIU Y F, et al. Identification of PIN genes family and their expression during seed germination in *Magnolia sieboldii* K. Koch[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2025, 56(1): 29-39.

天女木兰 PIN 基因家族的鉴定及在种子萌发过程中的表达

梅梅^{1,2}, 王斯彤¹, 刘怡菲¹, 虞家昕³, 张芷瑞¹, 陆秀君^{4*}

(1. 辽宁省林业科学研究院, 沈阳 110032; 2. 辽宁冰砬山森林生态系统定位观测研究站, 辽宁 西丰 112400;

3. 辽宁省林业发展服务中心, 沈阳 110031; 4. 沈阳农业大学 林学院, 沈阳 110161)

摘要: [目的] 天女木兰 (*Magnolia sieboldii* K. Koch) 是我国重点保护的具有观赏、芳香和药用价值的珍稀濒危野生木本资源植物, 有广阔的应用前景。该树种无性繁殖困难, 故以种子繁殖为主, 但是种子具深休眠特性, 种胚发育不完全致使种子萌发和出苗困难, 极大限制了开发进程。PIN 基因家族编码生长素跨细胞膜外向转运蛋白, 与种子发育和萌发有关。[方法] 通过分析 PIN 基因家族结构和功能, 探究生长素在种子后熟过程中转运调节机制, 为深入研究天女木兰种子发育调控机制提供参考。利用生物信息技术, 基于天女木兰基因组数据, 进行全基因组 *MsPINs* 基因家族鉴定, 研究 *MsPINs* 基因家族的分子结构、在种子萌发期的时空表达和基因功能; 并通过基因染色体信息获取 *MsARF5* 候选靶基因 *MsPIN1b* 的启动子序列, 利用基因克隆和酵母单杂交等技术, 探究 *MsARF5* 与 *MsPIN1b* 启动子之间的调控关系。[结果] 生物信息学和表达分析表明天女木兰基因组中有 22 个 *MsPINs* 基因, 分布在 13 条染色体上; 其中 9 个基因在种子萌发过程中差异表达, *MsPIL3*、*MsPILS2* 和 *MsPILS6* 在休眠解除阶段呈上调表达, *MsPIN1a~1c*、*MsPIN6* 在种子萌发过程中呈上调表达, *MsPILS3* 在休眠解除过程波动变化; 序列分析和酵母单杂交试验表明 *MsPIN1b* 的启动子序列有多个 *MsARF5* (生长素响应因子 5) 识别元件, 并能与 *MsARF5* 结合。[结论] 综上所述, PIN 基因家族成员参与天女木兰种子发育和萌发过程。

关键词: 天女木兰; 生长素; *MsPIN1b*; 表达模式; 酵母单杂交

中图分类号: S722

文献标识码: A

文章编号: 1000-1700(2025)01-0029-11

Identification of PIN Genes Family and Their Expression During Seed Germination in *Magnolia sieboldii* K. Koch

MEI Mei^{1,2}, WANG Sitong¹, LIU Yifei¹, YU Jiabin³, ZHANG Zhirui¹, LU Xiujuan^{4*}

(1. Liaoning Academy of Forestry Science, Shenyang 110032, China; 2. Liaoning Bingla Mountain Forest Ecosystem Positioning Observation Station, Xifeng Liaoning 112400, China; 3. Liaoning Forestry Development Service Center, Shenyang 110122, China; 4. College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: [Objective] *Magnolia sieboldii* K. Koch is a rare and endangered wild woody plant resource in China that exhibits ornamental, aromatic, and medicinal values, and has broad prospects for development and application. The asexual reproduction of this tree species is challenging, primarily due to the difficulty in sowing propagation. The seeds exhibit deep dormancy characteristics, and incomplete embryo development impedes seed germination and emergence, significantly constraining the development and application process. Auxin efflux carrier proteins, which are linked to seed development and germination, are encoded by the PIN gene family and

收稿日期: 2024-09-20 修回日期: 2024-12-30

基金项目: 辽宁省博士科研启动基金计划项目(2022-BS-051); 国家自然科学基金项目(32101508); 辽宁省农业科学院院长基金项目(2022BS0704)

第一作者: 梅梅(1989-), 女, 博士, 高级工程师, 从事种子休眠机理研究, E-mail: meim302@sina.com

通信作者: 陆秀君(1966-), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 从事种子休眠机理和苗木栽培生理研究, E-mail: lxjsyau@126.com

carry auxin across the cell membrane. **[Methods]**By analyzing the structure and function of the PIN gene family, this study explores the transport regulation mechanism of auxin during seed after-ripening, providing a reference for in-depth research on the regulatory mechanisms of *M. sieboldii* K. Koch seed development. Using bioinformatics techniques and based on the genome data of *M. sieboldii* K. Koch, a genome-wide identification of the *MsPINs* gene family was conducted, studying the molecular structure, spatiotemporal expression during seed germination, and gene functions of the *MsPINs* gene. **[Results]**The results indicate: The *M. sieboldii* K. Koch genome has 22 *MsPINs* genes spread across 13 chromosomes, according to bioinformatics and expression research. Nine of these genes exhibit variable expression throughout the germination process. *MsPIN1a-1c* and *MsPIN6* are upregulated during seed germination, *MsPILS3* exhibits variable variations during the dormancy release process, and *MsPIL3*, *MsPILS2*, and *MsPILS6* are upregulated during the dormancy release stage. The promoter sequence of *MsPIN1b* contains several *MsARF5* (Auxin Response Factor 5) recognitions, according to sequence analysis and yeast one-hybrid tests. **[Conclusion]**These findings suggest that *M. sieboldii* K. Koch seed growth and germination are mediated by members of the PIN gene family.

Key words: *Magnolia sieboldii* K. Koch; auxin; *MsPIN1b*; expression pattern; yeast one hybrid

天女木兰 (*Magnolia sieboldii* K. Koch) 是木兰科 (Magnoliaceae) 木兰属 (*Magnolia*) 落叶小乔木, 国家重点三级保护野生植物, 被收录于 INCU 濒危物种红色目录 v3.1 (<https://www.iucnredlist.org/>), 也是中国东北地区唯一的野生木兰属植物。天女木兰是观叶、观花、观果、观形的著名观赏树种; 同时又具有芳香和药用价值, 花可入药, 叶含油量为 2%, 可以提取香精油, 种子内含油率达 39%^[1-2]。因此, 天女木兰是一种具有广阔开发前景的珍稀野生木本资源植物。天女木兰种子存在形态生理性的深休眠^[2], 萌发困难, 天然更新不足, 导致种质资源日趋濒危。由于难于无性繁殖, 天女木兰人工栽培仍以种子繁殖为主, 所以, 解除种子休眠是人工栽培需要攻克的主要难题。通过低温湿沙层积, 天女木兰种子萌发时间可缩短至 90 d, 萌发率可达 80% 以上^[3]。在层积催芽过程中, 种子中的植物激素生长素 (IAA) 和脱落酸 (ABA) 发生变化, 通过其信号转导途径调节种子的休眠解除和萌发过程^[4-5]。

生长素通过细胞膜上生长素输出载体 PIN-formed (PIN) 蛋白家族以极性运输的方式在植物中运输。目前, 对于 *PIN1* 基因功能研究主要集中于胚早期发育、维管组织分化及茎尖分生组织等方面。例如, 拟南芥 PIN 蛋白家族共有 8 个成员^[6], 主要通过不同 *PIN* 基因的表达模式以及 PIN 蛋白在特定细胞表面的定位决定生长素在植物组织中的分布。由输入载体所介导的生长素逆浓度梯度跨膜运输, 能够阻止生长素被动扩散至邻近细胞中, 从而保证生长素在不同植物靶组织和靶细胞中维持适宜浓度^[7-9]。在拟南芥胚胎发育过程中, *PIN1*、*PIN3*、*PIN4* 和 *PIN7* 共 4 个 PIN 家族成员在胚中表达, 促进生长素的外排运输^[10-11]。*pin1/pin3/pin4* 突变体的胚胎子叶融合并且胚根短^[12]。从幼苗时期开始, PIN 蛋白起着维持根尖分生组织活性的作用, *PIN1*、*PIN2*、*PIN3*、*PIN4* 和 *PIN7* 协同作用驱动生长素定向运输形成了根尖生长素的回流通路, 是调控根尖发育的重要信号^[13-14]。生长素响应因子 (ARF) 是受 IAA 调节的转录因子, *MsARF5* 具有促进维管组织形成、调控种子发育、形态休眠解除和促使种子萌发的功能, 参与 *PIN* 基因转录的调节^[15]。对天女木兰种子萌发的研究发现, *MsPIN1* 与 *MsARF5* 表达呈正相关^[16], 参与种胚的生长素运输, 因此推测 *MsARF5* 可能通过调节 *PIN1* 等靶基因参与到生长素介导的天女木兰种子形态休眠解除过程。

因此, 本研究以具有形态生理休眠特性的天女木兰为材料, 利用生物信息学、基因克隆、酵母单杂交等技术研究 *MsPINs* 基因家族的分子结构、在种子萌发期的时空表达、基因功能及与 *MsARF5* 的相互作用, 揭示了 *MsPIN* 基因在种子萌发过程中的作用, 为深入研究天女木兰种子发育调控机制和探索提高种子繁殖能力的措施提供参考和依据。

1 材料与方法

1.1 天女木兰 PIN 家族的生物信息学鉴定

天女木兰的全基因组序列从 NGDC 数据库 (National Genomics Data Center, <https://ngdc.cncb.ac.cn/bioproject/browse/PRJCA009763>) 获得^[17]。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 所有 PINs 蛋白质序列从 Tair 网站 (<https://www.arabidopsis.org/>) 获得, 与天女木兰 *MsPINs* 蛋白质进行 BLAST 比对, 初步获得潜在的 *MsPINs* 蛋白序列。依据从 Pfam

数据库(<http://pfam.xfam.org/>)中获得的 PINs 结构域(PF03547),使用 MEME Suite(版本 4.12.0)进行基序分析,去冗余后初步得到 MsPINs 成员。将所有推测的 MsPINs 蛋白质序列上传至 CDD-Search,依据保守结构域进行手动校正,最终获得天女木兰中 MsPINs 基因家族成员。使用 MEGA-X 通过(maximum likelihood, ML)构建系统进化树,参数 Bootstrap method 值设为 1 000。根据 PINs 基因在天女木兰染色体上的位置和与拟南芥 PINs 系统进化树构建结果,对确认的 MsPINs 进行重新命名。使用 ExPASy ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)工具预测蛋白质理化参数。

1.2 种子采集与处理

采集沈阳市植物园内栽培的天女木兰自然成熟的种子,去除红色假种皮,清水吸胀 24 h,0.2% KMnO₄溶液表面消毒 30 min,清水洗净,平铺于垫有灭菌纱布的培养皿中,4 °C 条件储藏,定期喷洒蒸馏水保湿。每 7 d 取样 1 次(共取样 10 次),移至 25 °C、16 h·d⁻¹光照条件下培养,直至种子发芽^[16]。调查不同低温储藏时间下种子萌发率及萌发时间。取不同休眠状态的种子,休眠种子(层积 0 d,记 D0)、非休眠种子(4 °C,35 d,记 D35)和萌发种子(25 °C,28 d,记 M28)用于核酸提取,每组处理种子鲜重 5 g,并进行 3 次生物学重复。

1.3 核酸提取与 RNA 反转录

种子去种皮,液氮研磨后提取核酸。总 RNA 提取方法参见试剂盒说明书(RNAprep Pure Plant Kit,康为世纪),1.2% 琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 完整性,Nanodrop 2000 检测 RNA 浓度及纯度。DNA 提取采用试剂盒法(NuClean Plant Genomic DNA Kit,康为世纪),通过凝胶电泳检测纯度。

基于基因组预测数据,利用 Primer Premier 5 设计 RNA 荧光定量检测引物,各个目的片段产物长度为 150~300 bp(表 1)。采用 SYBR Green 嵌合荧光法(SuperReal PreMix Color SYBR Green,天根生化科技)进行 qPCR 反应,方法参照说明书,以 *Actin7* 为内参^[18],将 20 μL 反应体系置于 BIO-RAD 实时荧光定量 PCR 仪(CFX Connect),每个样品 3 次重复测定,通过 ΔΔCt 法计算天女木兰种子萌发过程中 MsPINs 相对表达量^[19]。

表 1 *MsPINs* 基因的 qPCR 引物
Table 1 qPCR primers for *MsPINs*

基因名称 Gene name	引物序列 Primers sequence	基因名称 Gene name	引物序列 Primers sequence
<i>MsPIN1a</i> <i>evm.model.HIC_ASM_6.1588</i>	F: GCTCGCTCCATCGTCTCC R: TCACGCGCAACTTCCCAT	<i>MsPIN1b</i> <i>evm.model.HIC_ASM_14.1170</i>	F: CCAAGGACAGCAGGAGCC R: CTGGTTGGAGGCATGGCA
<i>MsPIN1c</i> <i>evm.model.HIC_ASM_14.1677</i>	F: GCCGAGCCGAGGATATT R: CGCTGGAGCTCCACACAA	<i>MsPIN3</i> <i>evm.model.HIC_ASM_18.1844</i>	F: CGATCTTCGCCGTCCTC R: TCTTCTGCAGCGTGTCCG
<i>MsPIN6</i> <i>evm.model.HIC_ASM_1.3205</i>	F: GACCCACTTCGCACCGAA R: AGAGATTGGATGCGCGGG	<i>MsPILS2</i> <i>evm.model.HIC_ASM_1.324</i>	F: TTCTGGTGTCTCCGCTGG R: CCCCAACAAAATGGCGC
<i>MsPILS3</i> <i>evm.model.HIC_ASM_0.294</i>	F: ACGCACTTCCACTGCAA R: GCACCAAAGCGTGAGTGC	<i>MsPILS4</i> <i>evm.model.HIC_ASM_0.295</i>	F: CGCCTGCGCTTGTGGG R: TGGCCATTGCAGGTGAA
<i>MsPILS6</i> <i>evm.model.HIC_ASM_7.43</i>	F: CAGCGAGTCAGGCAGGAG R: AAGCTTCCGTCCACTCGC	<i>ACT7</i>	F: TCAACCCCAAAAGCAAACAGA R: CCGCAAGATCCAAACGAA
<i>MsARF5</i> <i>evm.model.HIC_ASM_3.2992</i>	F: TTGCCATCATCCGTTCTCT R: TCTGCGTTTACCTGACTGCTCT		

1.4 PCR 克隆启动子

根据 *MsPIN1b* 的基因组全长 DNA 序列,通过 TBtools 软件检索基因上游 2 000 bp 序列,使用 PlantCare 数据库(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)预测 *MsPIN1b* 启动子中的顺式作用元件。以天女木兰种子 DNA 为模板,通过平末端高保真 DNA 聚合酶[2×EasyPfu PCR SuperMix(-dye),全式金] PCR 扩增,PCR 产物通过凝胶电泳和浓度检测后,进行目的条带纯化回收,用于诱饵载体构建。以天女木兰 cDNA 为模板克隆 *MsARF5* 基因序列,用于猎物载体构建。

1.5 诱饵载体和猎物载体的构建

将 *MsPIN1b* 基因启动子序列 *MsPIN1b*-pro(1~1 500 bp)和 *MsPIN1b*-proJD(1~700 bp)两段,分别构建诱饵载体,均通过 KpnI 和 XhoI 酶切位点连接至 pAbAi 载体上。分别命名为 pAbAi-*MsPIN1b*-pro、pAbAi-*MsPIN1b*-proJD。通过 NdeI 和 XhoI 酶切位点将 *MsARF5* 连接至 PGADT7 上游载体上,构建猎物载体,命名为 pGADT7-

MsARF5。将构建的诱饵载体和猎物载体转化大肠杆菌 DH5 α , 通过提取质粒、酶切和测序等步骤对质粒进行验证。

1.6 酵母自激活检验及酵母单杂筛选

将诱饵质粒 pAbAi-*MsPIN1b*-pro、pAbAi-*MsPIN1b*-proJD、阳性对照质粒 pAbAi-p53 分别转入酵母菌 Y1H 酵母感受态细胞中, 并涂布于酵母 SD/-Trp 培养基, 30 °C 培养箱培养 4~5 d。挑取酵母单菌落为模板, 分别以 pAbAiF/R 通用引物进行 PCR 阳性菌株检测。菌落 PCR 验证后, 稀释 10, 100, 1 000 倍, 取 10 μ L 菌液点种到平板 SD/-Leu、SD/-Leu/Aba 上, 30 °C 培养箱培养 3 d, 观察菌斑生长情况, 进行酵母自激活检验。根据自激活检验结果制备诱饵感受态细胞, 与猎物载体 pGADT7-*MsARF5* 进行共转化验证^[20]。

2 结果与分析

2.1 天女木兰 *MsPINs* 家族的生物信息学鉴定

从天女木兰基因组中共鉴定出 22 个 PIN 蛋白基因家族成员, 根据注释结果和与拟南芥 PIN 家族成员比对结果命名(表 2)。其中 14 个蛋白被命名为 MsPIN 蛋白, 8 个蛋白因其包含 PIN 蛋白的结构域, 但基因结构略有不同, 根据注释结果被命名为 MsPILS1~MsPILS8。22 个 PIN 家族成员分布于 13 条染色体中, 例如, 0 号染色体上 4 个, 1 号和 4 号染色体上分别有 3 个(图 1)。对鉴定到的 22 个天女木兰 PIN 基因的理化性质分析表明(表 2), 氨基酸数目为 123~638 个, 蛋白质分子质量为 13.44~69.25 kD, 其中 MsPIN13 分子质量最小, MsPIN2a 分子质量最大, 等电点为 6.0~10.05。所有 PIN 家族成员均为疏水性蛋白。

表 2 天女木兰 *MsPINs* 基因家族的理化性质

Table 2 Physical and chemical properties of *MsPINs* gene family in *M. sieboldii* K. Koch

基因名称 Gene name	染色体 Chr	序列 ID Sequence ID	基因组位置 Genomic location	氨基酸数量 Amino acid number	蛋白质分子质量/kD Molecular mass	等电点 pI	亲水性 Average of hydropathicity (GRAVY)
<i>MsPIN1a</i>	6	evm.model.HIC_ASM_6.1588	76779430-76783637	614	66.80	9.24	0.138
<i>MsPIN1b</i>	14	evm.model.HIC_ASM_14.1170	50222646-50233489	611	66.75	6.61	0.168
<i>MsPIN1c</i>	14	evm.model.HIC_ASM_14.1677	69938333-69946961	624	67.53	9.04	0.144
<i>MsPIN2a</i>	11	evm.model.HIC_ASM_11.151	3637391-3643660	638	69.25	9.52	0.154
<i>MsPIN2b</i>	4	evm.model.HIC_ASM_4.1126	38228295-38230248	129	14.04	10.05	0.229
<i>MsPIN3</i>	18	evm.model.HIC_ASM_18.1844	76117442-76123738	636	69.07	8.11	0.153
<i>MsPIN5</i>	2	evm.model.HIC_ASM_2.3496	133165855-133184919	478	52.59	9.75	0.162
<i>MsPIN6</i>	1	evm.model.HIC_ASM_1.3205	133666320-133675999	549	60.27	9.23	0.313
<i>MsPIN9</i>	2	evm.model.HIC_ASM_2.1675	43362955-43373817	456	51.66	9.05	0.000
<i>MsPIN10</i>	3	evm.model.HIC_ASM_3.2205	87186412-87190566	237	26.21	9.10	0.137
<i>MsPIN11</i>	4	evm.model.HIC_ASM_4.44.3	935245-938587	483	53.97	8.93	0.389
<i>MsPIN12</i>	4	evm.model.HIC_ASM_4.689	20597891-20598805	205	22.41	9.57	0.162
<i>MsPIN13</i>	5	evm.model.HIC_ASM_5.1736	77679411-77723857	123	13.44	9.76	0.491
<i>MsPIN14</i>	9	evm.model.HIC_ASM_9.841	23514031-23518990	253	28.47	9.93	0.057
<i>MsPILS1</i>	12	evm.model.HIC_ASM_12.2388.3	86050670-86070973	448	48.64	9.43	0.566
<i>MsPILS2</i>	1	evm.model.HIC_ASM_1.324	8074219-8101118	449	49.31	6.00	0.668
<i>MsPILS3</i>	0	evm.model.HIC_ASM_0.294	7040527-7057219	422	45.29	8.08	0.672
<i>MsPILS4</i>	0	evm.model.HIC_ASM_0.295	7110949-7120744	420	45.42	9.57	0.634
<i>MsPILS5</i>	1	evm.model.HIC_ASM_1.2487.1	113048638-113067801	466	51.81	8.55	0.395
<i>MsPILS6</i>	7	evm.model.HIC_ASM_7.43	1450009-1487154	413	45.02	8.40	0.699
<i>MsPILS7</i>	0	evm.model.HIC_ASM_0.297	7141878-7160796	441	47.53	9.54	0.721
<i>MsPILS8</i>	0	evm.model.HIC_ASM_0.299	7185113-7195815	417	44.92	9.11	0.642

2.2 天女木兰 *MsPINs* 蛋白家族的系统进化分析

利用天女木兰和拟南芥 PIN 蛋白基因家族成员构建系统进化树(图 2)。从基因家族的数量上看, 天女木兰 PIN 家族蛋白数量多于 PIN 蛋白根据进化关系可以分为 4 个大类。其中 MsPIN1a/1b/1c、MsPIN2a/2b、MsPIN3 和 MsPIN6 与拟南芥 AtPIN1~AtPIN4、AtPIN6、AtPIN7 聚为一类(Class I), 属于经典型 PIN 蛋白类; MsPIN5 和

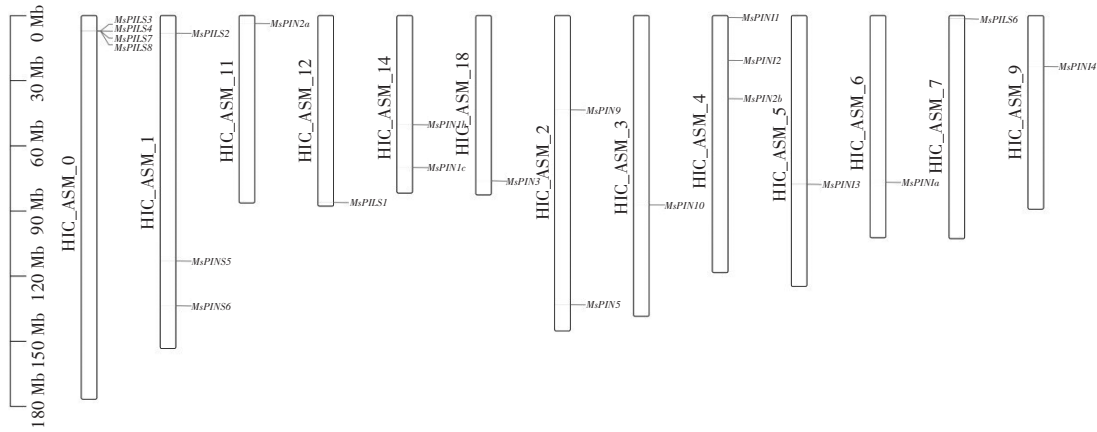


图1 天女木兰MsPIN蛋白基因家族在染色体上的位置

Figure 1 The chromosome location of the MsPIN gene family in *M. sieboldii* K. Koch

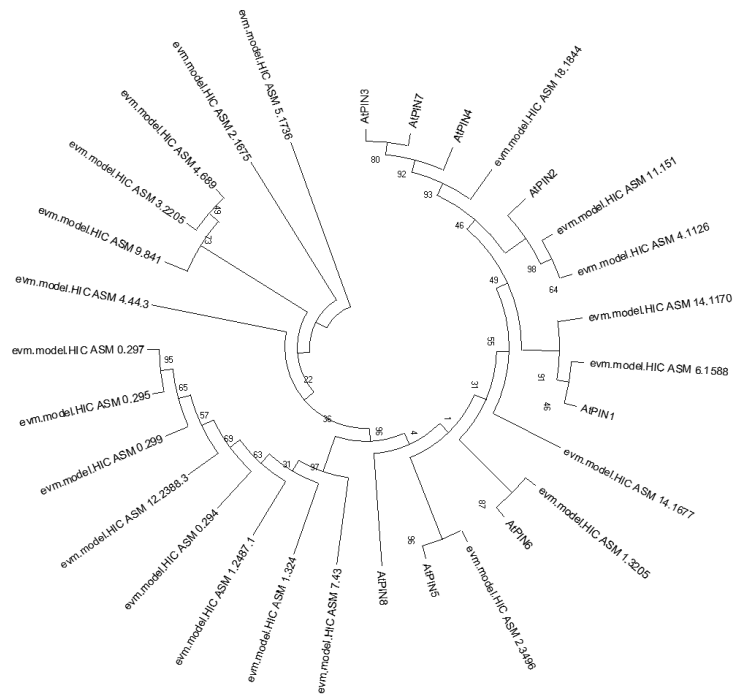


图 2 天女木兰与拟南芥PIN蛋白家族系统进化树分析

Figure 2 Phylogenetic analysis of PINs protein family in *M. sieboldii* K. Koch and *A. thaliana*

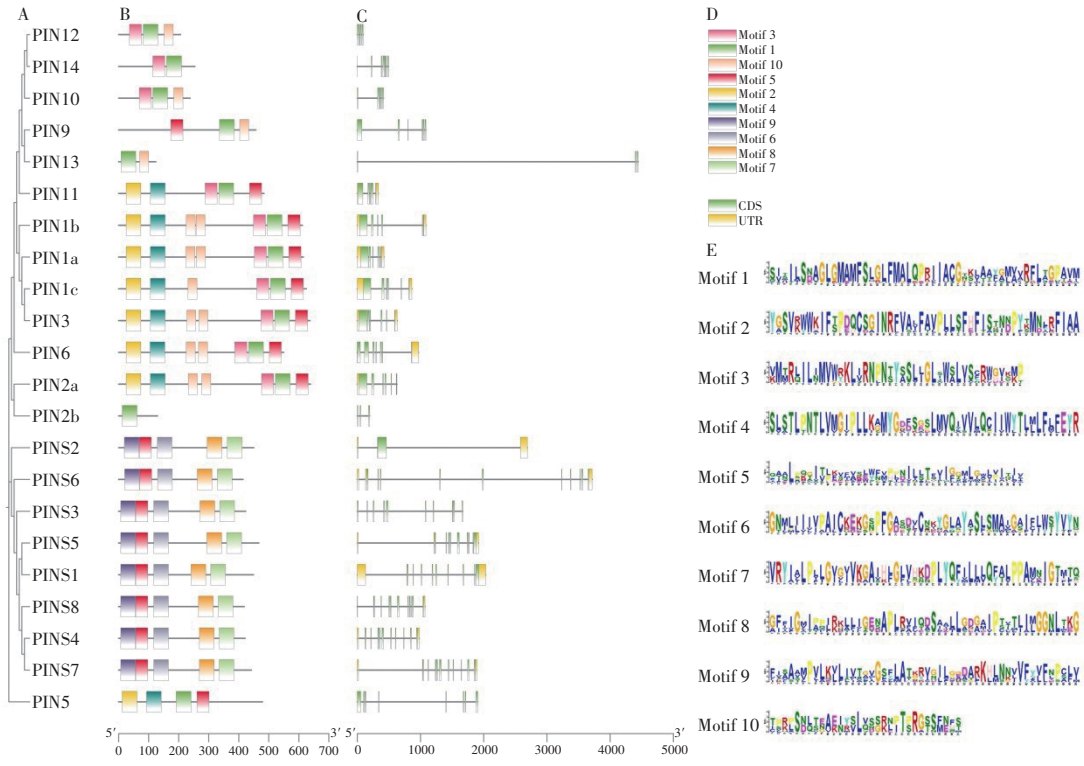
MsPILS1~MsPILS8 与拟南芥 AtPIN5 和 AtPIN8 聚为一类(Class II),属于非经典型 PIN 蛋白类;MsPIN9~MsPIN12 和 MsPIN14 聚为一类(Class III),MsPIN13 单独形成一支,虽然包含 PIN 蛋白结构域,但与其他家族成员结构差异较大(Class IV)。

2.3 天女木兰MsPINs蛋白基因家族的motif序列和基因结构分析

对鉴定到的 22 个天女木兰 PIN 蛋白家族成员的保守基序分析表明,MsPINs 基因家族中的保守基序数量为 1~7 个不等(图 3B),其中 Class I 中,除 MsPIN2b 有部分缺失外,其余 7 个 MsPINs 的保守基序数量均为 6~7 个,结构相似;Class II 中 MsPILS1~MsPILS8 保守基序数量均为 7 个,且排列方式一致,MsPIN5 包含 4 个保守基序,但差异较大;MsPIN10、MsPIN12 和 MsPIN14 结构相似,包含 2~3 个保守基序,与 Class I 成员 3' 端相似,MsPIN11 与 Class I 成员结构相似,包含 5 个 motif,为中间段 motif 缺失,MsPIN9 包含 3 个 motif,保守基序排列方式不同。

对鉴定到的 22 个天女木兰 PIN 蛋白家族成员进行系统进化树和基因结构分析,结果表明(图 3C),22 个 MsPINs 基因外显子数在 3~11,内含子数在 2~10,其中 MsPILS4、MsPILS6~8 的内含子数量最多,为 10 个,

MsPILS1、MsPILS3、MsPILS5 有 9 个内含子；MsPIN2b、MsPIN13 和 MsPILS2 内含子数量最少，为 2 个，MsPIN1a~1c、MsPIN2a、MsPIN3 和 MsPIN9 内含子数量均为 9 个。



A. Systematic analysis; B. Motif sequence analysis; C. Gene structure; D. Logo map of 10 conservative sites predicted by MEME; E. Bar

图3 天女木兰MsPIN蛋白家族的基因结构分析

Figure 3 Gene structure of MsPIN gene family in *M. sieboldii* K. Koch

2.4 种子萌发过程MsPINs基因家族表达模式

天女木兰种子不同萌发情况，休眠种子(D0)，非休眠未萌发种子(D35)和萌发种子(M28)的MsPINs的表达模式如图4。仅有9个家族成员在种子休眠解除及萌发过程差异表达。其中MsPIL3、MsPILS2和MsPILS6聚为一类，在休眠解除阶段呈上调表达；MsPIN1a~1c、MsPIN6聚为一类，在种子萌发过呈上调表达，它们可能行使相似功能；MsPILS3在休眠解除过程波动变化；9个差异基因中仅MsPILS4在休眠解除和萌发过程下调表达，其功能有待进一步研究。

2.5 MsPIN1b启动子顺式作用元件分析

PINs 基因家族是生长素信号转导的下游基因，其表达受到转录因子 MsARF5 的调控。由 MsPINs 差异基因和 MsARF5 表达模式结果可知，MsPIN1a~1c 与 MsARF5 表达模式相一致，是 MsARF5 的候选靶基因。根据前期预试验结果，MsPIN1a 和 MsPIN1c 启动子序列在生长素相关顺式作用元件附近序列均存在自激活现象，因此对 MsPIN1b 上游 1 500 bp 序列进行克隆，并进行启动子顺式作用元件分析，构建酵母单杂交诱饵载体，验证其与 MsARF5 蛋白互作关系。

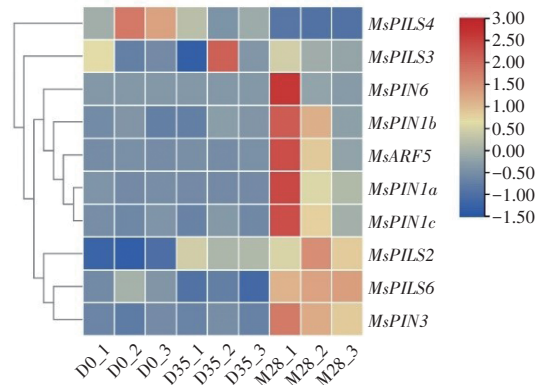


图4 MsPINs在天女木兰种子萌发过程的表达模式

Figure 4 Expression patterns of MsPINs during seed germination of *M. sieboldii* K. Koch

通过预测分析, *MsPIN1b* 上游启动子区域包含多个必备核心元件 CAAT-box、TATA-box, 多个激素响应元件 ABRE、CGTCA-motif、MYB、TGACG-motif, 厌氧诱导所必需的顺式调控元件 ARE, 光响应元件 ATCT-motif、GT1-motif 等(图 5)。为了验证转录因子 MsARF5 蛋白与 *MsPIN1b* 的转录激活作用, 关注了 *MsPIN1b* 上游参与激素响应元件的分布, 主要集中在启动子序列 500~700 bp, 为防止诱饵载体的自激活现象, 同时克隆全长启动子 *MsPIN1b-pro* 和截短启动子 1~700 bp 的 *MsPIN1b-proJD* 片段。



图 5 *MsPIN1b* 基因启动子的顺式作用元件分析

Figure 5 The cis-acting element analysis of *MsPIN1b* gene promoter

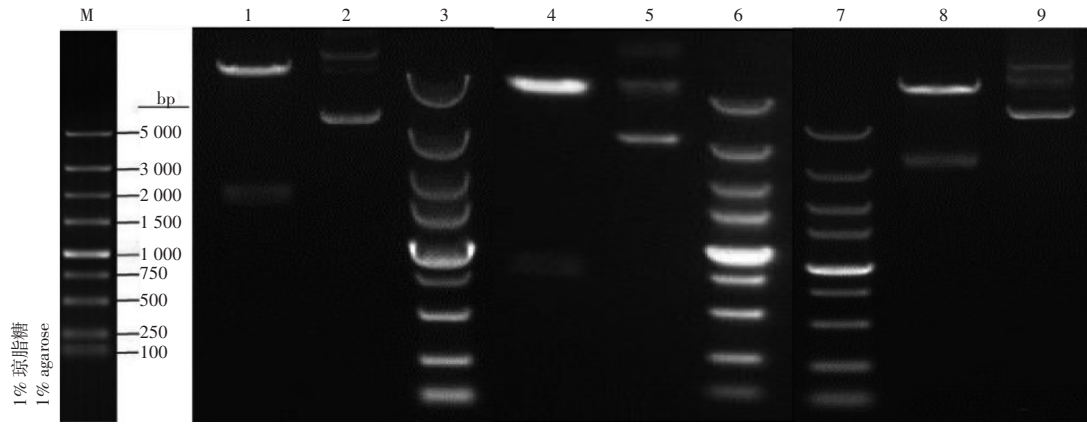
2.6 诱饵质粒和猎物质粒构建及诱饵自激活检测

将构建的诱饵质粒 pAbAi-*MsPIN1b-pro*、pAbAi-*MsPIN1b-proJD* 和猎物载体 pGADT7-*MsARF5* 进行酶切验证和测序验证(图 6), 根据酶切验证电泳图谱和测序结果证明质粒构建成功。诱饵质粒 pAbAi-*MsPIN1b-pro* 和 pAbAi-*MsPIN1b-proJD* 线性化回收后, 转化 Y1H Gold 感受态, 涂布 SD/-Ura 平板, 从 URA 平板挑单斑做感受态, 将猎物空载 pGADT7 转化诱饵感受态诱饵, 涂布 SD/-Leu 能生长说明质粒成功转入宿主菌且对宿主菌无毒性(图 7)。Y1H Gold(pAbAi-*MsPIN1b-pro*) 菌株涂布不同浓度 SD/-Leu Aba 平板均能生长, 说明诱饵激活了报告基因 AbAr(AUR-C), 自激活很强, 不能得到最低的抑制浓度; Y1H Gold(pAbAi-*MsPIN1b-proJD*) 菌株涂布 SD/-Leu/Aba 平板得到最低 AbA 抑制浓度为 800 ng·mL⁻¹, 因此, 选择 Y1H Gold(pAbAi-*MsPIN1b-proJD*) 菌株进行下一步互作验证试验。

2.7 MsARF5 与 MsPIN1b 启动子互作关系验证

将猎物质粒 pGADT7-*MsARF5* 转化诱饵 pAbAi-*MsPIN1b-proJD* 菌株感受态, 转化后涂布 SD/-Leu、SD/-

Leu/Aba 平板,SD/-Leu、SD/-Leu/Aba 800 ng·mL⁻¹均有菌落生长,说明猎物成功转入宿主,并且激活了报告基因 AbAr 的表达,同时进行了阴性对照和阳性对照,证明结果可靠有效。说明通过酵母单杂交点对点验证,重组诱饵 pAbAi-*MsPIN1b*-proJD 不能自激活 Y1H Gold 酵母报告基因的最低 Aba 浓度均为 800 ng·mL⁻¹,和猎物 pGADT7-*MsARF5* 之间有相互作用。



泳道 M、3、6、7. DNA Marker 5000;泳道 1. 质粒 pAbAi-*MsPIN1b*-pro 酶切产物;泳道 2. 质粒 pAbAi-*MsPIN1b*-pro;
泳道 4. 质粒 pAbAi-*MsPIN1b*-proJD 酶切产物;泳道 5. 质粒 pAbAi-*MsPIN1b*-proJD;泳道 8. 质粒 pGADT7-*MsARF5* 酶切产物;
泳道 9. 质粒 pGADT7-*MsARF5*
Lanes M, 3, 6, 7. DNA Marker 5000; Lane 1. Plasmid pAbAi-*MsPIN1b*-pro digestion product; Lane 2. Plasmid pAbAi-*MsPIN1b*-pro;
Lane 4. Plasmid pAbAi-*MsPIN1b*-proJD digestion products; Lane 5. Plasmid pAbAi-*MsPIN1b*-proJD; Lane 8. Plasmid pGADT7-*MsARF5* digestion products; Lane 9. Plasmid pGADT7-*MsARF5*

图 6 诱饵载体和猎物载体线性化产物的琼脂糖凝胶电泳图

Figure 6 Agarose gel electrophoresis of linearized product of bait carrier and prey carrier

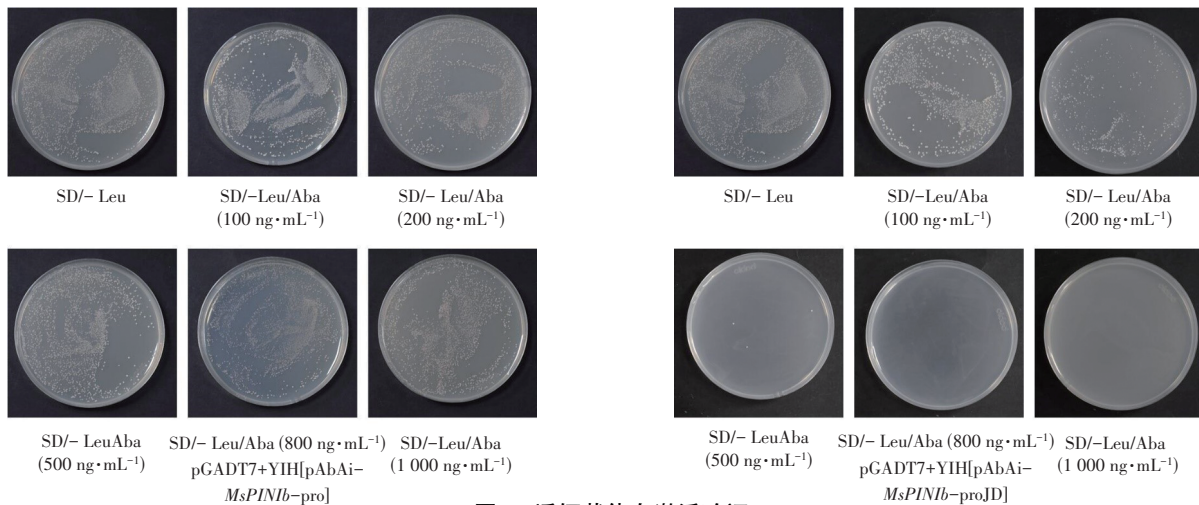


图 7 诱饵载体自激活验证

Figure 7 Bait vector self-activation verification

3 讨论与结论

3.1 天女木兰PIN基因家族的进化

在植物体内,生长素通过极性运输实现其在植物不同局部组织的浓度,从而调控植物的生长发育^[11]。自 AtPIN1 最早被奠定以来,PIN1 蛋白的精细三维结构及其底物识别和转运机制逐渐清晰^[21]。此后,拟南芥陆续鉴定了 8 个 PIN 基因家族成员(AtPIN1~AtPIN8),功能各有不同。不同植物中 PIN 基因家族成员的数目差异较大,如在水稻(*Oryza sativa*)^[22]、大豆(*Glycine max*)^[23]、棉花(*Gossypium hirsutum*)^[24]、甘蓝型油菜(*Brassica napus*)^[25]、马铃薯(*Solanum tuberosum*)^[26] 和芜菁(*Brassica campestris* L.)^[27] 中分别发现了 12, 23, 17, 29, 10, 13 个

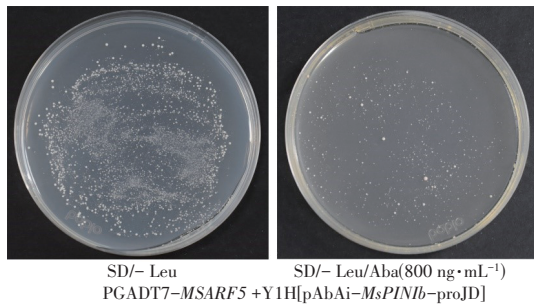
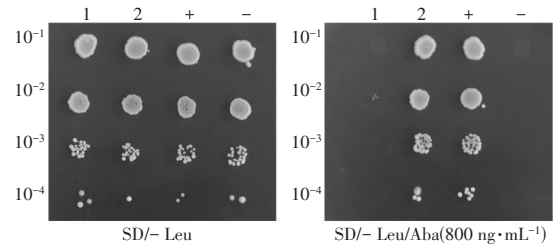


图8 诱饵载体与猎物载体共转化验证

Figure 8 Co-transformation verification of bait vector and prey vector

1. PGADT7 + Y1H[pAbAi-*MsPIN1b*-proJD]; 2. PGADT7-*MsARF5* + Y1H[pAbAi-*MsPIN1b*-proJD];
+. PGADT7-rec-53 + Y1H[PabAi-P53]; -. PGADT7 + Y1H[PabAi-P53]图9 *MsARF5*与*MsPIN1b*启动子结合的酵母单杂交验证Figure 9 Yeast one-hybrid verification of *MsARF5* binding the promoter of *MsPIN1b*

PIN 家族成员。木本植物中苹果 (*Malus domestica* Borkh.) 18 个^[28]、茶树 (*Camellia sinensis*) 18 个^[29]、毛果杨 (*Populus trichocarpa*) 16 个^[30]、桃 (*Prunus persica*) 15 个^[31]。本研究中鉴定了天女木兰 PIN 家族成员 22 个, 进化分析显示存在几个相似结构的姐妹对, 推测成员间可能存在功能冗余的现象, 也可能是由基因突变形成的类别分支。如本研究中鉴定 *MsPIN1a~1c* 与拟南芥 *AtPIN1* 结构相似, 他们具有相似的功能域。在拟南芥、芜菁等植物中, *PIN1* 主要参与器官分化和维管发育等生物学功能, 在天女木兰中该基因数扩张为 3 个, 且表达模式一致, 推测其与种子后熟过程中的维管发育相关, 参与天女木兰种子萌发调控。

3.2 PIN 家族在天女木兰种子萌发过程中的作用

PIN 蛋白结构具有一定的保守性。蛋白结构分析表明, *MsPINs* 大多为碱性疏水蛋白, 除个别成员外, 包含 3~7 个保守基序, 绝大多数成员包含 Mem_trans、Mem_trans superfamily 或 YfdV superfamily 结构域^[32]。进化关系相近的蛋白可能具有相似的生物学功能。在拟南芥中, *PIN* 蛋白家族的生物学功能已有许多报道: *PIN1* 参与器官分化和维管发育等; *PIN2* 主要在根尖伸长区的皮层中表达, 参与调节根的向重力性; *PIN3* 主要在根冠和维管组织中表达, *PIN7* 的定位与 *PIN3* 部分重叠, *PIN4* 在根分生组织中表达, 作用和功能与 *PIN3* 类似; *PIN5* 参与下胚轴的生长; *PIN8* 除在花药中特异表达, 也参与侧根的发生^[14,33]。*PIN-LIKES* 蛋白主要参与生长素的极性运输, 具体功能还有待进一步研究。

基因的表达情况与其功能之间存在密切联系。在芜菁和普通白菜不同发育时期的下胚轴中, *BcPIN1~BcPIN5*、*BcPIN7*、*BcPIN8* 呈差异表达; 根据拟南芥中同源 *PIN* 蛋白的功能预测, 这 7 个基因编码的 *BcPINs* 可能定位于下胚轴和根, 并参与器官分化、维管组织发育、下胚轴生长等^[27]。前人研究表明, 不定根的诱导在不定根形成过程中起关键作用, 苹果中筛选发现 4 个 *PIN* 家族成员 (*MdPIN3*、*MdPIN4*、*MdPIN6* 和 *MdPIN11*) 受 IBA 诱导后显著上调表达, 其中 *MdPIN4* 在第 5 天表达量是对照的 2.9 倍, 推测 *MdPIN4* 在调控苹果砧木不定根形成中起着重要作用, 但该基因的具体生物学功能及调控机制仍需要进一步研究^[28]。本研究中筛选获得 9 个 *MsPINs* 成员在种子休眠解除和萌发过程差异表达。其中 *MsPIN1a~1c*、*MsPIN3*、*MsPIN6* 表达模式相近, 可能行使相似功能, 或存在相近的调控模式。寻找 *MsPINs* 上下游调控因子, 对了解生长素对天女木兰种子萌发的调控具有重要意义。

3.3 PINs 参与天女木兰的生长素调节功能

极性运输是生长素的一个重要特征。生长素的极性运输在生长素浓度梯度的建立和维持中具有重要的作用。对野生型拟南芥添加生长素极性运输的抑制剂能模拟 *pin1* 突变体的表型, 推测 *PIN1* 基因的主要作用是参与生长素的极性运输^[7]。进一步利用 *PIN1* 蛋白的抗体进行了蛋白质免疫荧光原位杂交试验, 发现 *PIN1* 蛋白定位于维管组织细胞的底部细胞膜上, *PIN1* 蛋白的这种极性定位符合以前对生长素外输载体在细胞中分布的推测^[21]。

已有研究证明 *MP/ARF5* 参与拟南芥花的形成、种子发育、维管束形成及细胞极性响应, 是生长素信号转导

的核心调控元件。局部组织生长素水平的严格控制可能依赖于生长素极性运输。拟南芥早期器官形成过程中 PIN1 极性变化上游的生长素和 MP/ARF5 一致,因此推测 MP/ARF5 可能是 PIN1 的上游调控转录因子,并获得验证^[34-35]。在天女木兰中 MsPIN1b 上游启动子区域包含了多个激素响应元件,通过酵母单杂交试验体外验证了 MsARF5 与 MsPIN1b 启动子的互作,推测 MsARF5-MsPIN1b 调控模块可能参与了天女木兰种子萌发过程胚根的生长。但试验中 MsPIN1b 启动子区域暂无已知的与生长素响应直接相关的顺式作用元件,因此可能存在尚未鉴定的顺式作用元件,有待进一步验证。

本研究从天女木兰基因组中鉴定得到 22 个天女木兰 PIN 基因家族成员,不均匀地分布于 13 条染色体上,其氨基酸长度在 123~638 aa 之间,蛋白质分子质量为 13.44~69.25 kD,等电点在 6.0~10.05 之间。种子萌发过程中,有 9 个家族成员差异表达,推测参与了天女木兰种子休眠解除和促进萌发的过程。其中 MsPIN1b 启动子上含有与激素、厌氧诱导和光响应相关的顺式作用元件,通过酵母单杂交点对点验证,证明生长素信号转导途径中 MsARF5 与 MsPIN1b 启动子之间有相互作用,说明 MsPIN1b 受 MsARF5 转录调控。因此,推测天女木兰存在 MsARF5-MsPIN1b 转录调控模块,并在天女木兰种子萌发过程中起着重要作用。

参考文献:

- [1] 何彦峰.我国木兰属植物研究进展[J].北方园艺,2010(3):186-190.
HE Y F.Research progress on *Magnolia* plants in China[J].Northern Horticulture,2010(3):186-190.
- [2] 李 澎,陆秀君,姚 飞,等.天女木兰种子休眠原因的初步探讨[J].种子,2006,25(2):36-39.
LI P,LU X J,YAO F,et al.Preliminary study on reasons of seed dormancy of *Magnolia sieboldii* K.Koch[J].Seed,2006,25(2):36-39.
- [3] 梅 梅.天女木兰种子萌发过程碳水化合物变化及相关差异蛋白的筛选[D].沈阳:沈阳农业大学,2015.
MEI M.Studies on the variations of carbohydrate and screening of its differential protein during seed germination in *Magnolia sieboldii* K.Koch[D].Shenyang: Shenyang Agricultural University,2015.
- [4] 陆秀君,梅 梅,刘月洋,等.GA₃和变温层积对天女木兰种子萌发及内源激素的影响[J].西北植物学报,2014,34(9):1828-1835.
LU X J,MEI M,LIU Y Y,et al.Effect of treatment with GA₃ and variable temperature stratification on germination and endogenous hormones of *Magnolia sieboldii* seeds[J].Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica,2014,34(9):1828-1835.
- [5] 李 涵,阎 君,吴 珏,等.低温诱导芹菜种子次生休眠及其调控机制[J].南京农业大学学报,2023,46(5):833-840.
LI H,YAN J,WU J,et al.Low temperature induced secondary dormancy of celery seeds and its regulatory mechanism[J].Journal of Nanjing Agricultural University,2023,46(5):833-840.
- [6] ADAMOWSKI M,FRIML J.PIN-dependent auxin transport:Action,regulation,and evolution[J].The Plant Cell,2015,27(1):20-32.
- [7] SASSI M,LU Y F,ZHANG Y H,et al.COPI mediates the coordination of root and shoot growth by light through modulation of PIN1- and PIN2-dependent auxin transport in *Arabidopsis*[J].Development,2012,139(18):3402-3412.
- [8] PALME K,GÄLWEILER L.PIN-pointing the molecular basis of auxin transport[J].Current Opinion in Plant Biology,1999,2(5):375-381.
- [9] VIAENE T,DELWICHE C F,RENSING S A,et al.Origin and evolution of PIN auxin transporters in the green lineage[J].Trends in Plant Science,2013,18(1):5-10.
- [10] 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.
- [11] FRIML J,BENKOVÁ E,BLILOU I,et al.AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*[J].Cell,2002,108(5):661-673.
- [12] BLILOU I,XU J,WILDWATER M,et al.The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots[J].Nature,2005,433:39-44.
- [13] KRECEK P,SKUPA P,LIBUS J,et al.The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters[J].Genome Biology,2009,10(12):249.
- [14] PAPONOV I A,TEALE W D,TREBAR M,et al.The PIN auxin efflux facilitators:Evolutionary and functional perspectives[J].Trends in Plant Science,2005,10(4):170-177.
- [15] MEI M,AI W F,LIU L,et al.Genome-wide identification of the auxin response factor (ARF) gene family in *Magnolia sieboldii* and functional analysis of MsARF5[J].Frontiers in Plant Science,2022,13:958816.

- [16] 梅 梅.天女木兰 MsARF5 在种子后熟胚胎发育中的功能及其作用机制[D].沈阳:沈阳农业大学, 2020.
MEI M.Functions and mechanisms of MsARF5 in embryo development of *Magnolia sieboldii* K. Koch during the seed after-ripening[D].Shenyang:Shenyang Agricultural University,2020.
- [17] LU X J,MEI M,LIU L,et al.The chromosome-scale genome of *Magnolia sieboldii* K.Koch provides insight into the evolutionary position of magnoliids and seed germination[J].Molecular Ecology Resources,2024:e14030.
- [18] WEI J,ZHANG X L,HOU Z,et al.High-quality total RNA extraction from *Magnolia sieboldii* K.Koch seeds:A comparative evaluation[J].Journal of Forestry Research,2019,30(1):371-379.
- [19] ELLIS M D,HOAK J M,ELLIS B W,et al.Quantitative real-time PCR analysis of individual flue-cured tobacco seeds and seedlings reveals seed transmission of tobacco mosaic virus[J].Phytopathology,2020,110(1):194-205.
- [20] WANG P,NOLAN T M,YIN Y H,et al.Identification of transcription factors that regulate ATG8 expression and autophagy in Arabidopsis[J].Autophagy,2020,16(1):123-139.
- [21] YANG Z S,XIA J,HONG J J,et al.Structural insights into auxin recognition and efflux by *Arabidopsis* PIN1[J].Nature,2022,609:611-615.
- [22] WANG J R,HU H,WANG G H,et al.Expression of PIN genes in rice (*Oryza sativa* L.):Tissue specificity and regulation by hormones[J].Molecular Plant,2009,2(4):823-831.
- [23] WANG Y Q,CHAI C L,VALLIYODAN B,et al.Genome-wide analysis and expression profiling of the PIN auxin transporter gene family in soybean (*Glycine max*)[J].BMC Genomics,2015,16:951.
- [24] HE P,ZHAO P,WANG L M,et al.The PIN gene family in cotton (*Gossypium hirsutum*):Genome-wide identification and gene expression analyses during root development and abiotic stress responses[J].BMC Genomics,2017,18(1):507.
- [25] 高 堃,华营鹏,宋海星,等.甘蓝型油菜 PIN 家族基因的鉴定与生物信息学分析[J].作物学报,2018,44(9):1334-1346.
GAO K,HUA Y P,SONG H X,et al.Identification and bioinformatics analysis of the PIN family gene in *Brassica napus*[J].Acta Agronomica Sinica,2018,44(9):1334-1346.
- [26] YANG C H,WANG D D,ZHANG C,et al.Comparative analysis of the PIN auxin transporter gene family in different plant species:A focus on structural and expression profiling of PINs in *Solanum tuberosum*[J].International Journal of Molecular Sciences,2019,20(13):3270.
- [27] 刘锐诚,梁雨薇,孙福辉,等.芜菁 PIN 基因家族的鉴定与生物信息学分析[J].分子植物育种,2023,21(2):349-359.
LIU R C,LIANG Y W,SUN F H,et al.Identification and bioinformatics analysis of PIN gene family in turnip[J].Molecular Plant Breeding,2023,21(2):349-359.
- [28] 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 Science,2023,40(9):1789-1799.
- [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] CARRARO N,TISDALE-ORR T E,CLOUSE R M,et al.Diversification and expression of the PIN,AUX/LAX,and ABCB families of putative auxin transporters in Populus[J].Frontiers in Plant Science,2012,3:17.
- [31] 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.
- [32] BENNETT T.PIN proteins and the evolution of plant development[J].Trends in Plant Science,2015,20(8):498-507.
- [33] 林雨晴,齐艳华.生长素输出载体 PIN 家族研究进展[J].植物学报,2021,56(2):151-165.
LIN Y Q,QI Y H.Advances in auxin efflux carrier PIN proteins[J].Chinese Bulletin of Botany,2021,56(2):151-165.
- [34] BHATIA N,BOZORG B,LARSSON A,et al.Auxin acts through MONOPTEROS to regulate plant cell polarity and pattern phyllotaxis[J].Current Biology:CB,2016,26(23):3202-3208.
- [35] KROGAN N T,MARCOS D,WEINER A I,et al.The auxin response factor MONOPTEROS controls meristem function and organogenesis in both the shoot and root through the direct regulation of PIN genes[J].The New Phytologist,2016,212(1):42-50.