

# 芒果 *MiPIN1* 启动子克隆及上游调控因子筛选

温雨兴<sup>1,2</sup>, 王燕莹<sup>1,2</sup>, 蔡彬彬<sup>2</sup>, 曾程颖<sup>2</sup>, 李运合<sup>2\*</sup>

1. 闽南师范大学菌物产业工程技术中心, 福建漳州 363000; 2. 闽台特色园林植物福建省高校重点实验室/闽南师范大学生物科学与技术学院, 福建漳州 363000

**摘要:** 不定根的诱导是植物无性繁殖成功的关键环节。前期研究表明, 生长素极性运输载体基因 *MiPIN1* 在芒果子叶切段不定根形成中起着重要作用, 但其上游调控机制尚不明确。本研究首先通过 FPNI-PCR 法分离到一段长度为 2112 bp 的 *MiPIN1* 基因启动子序列, 该启动子区域包含光反应、MYB 结合、脱落酸反应、低温响应等多种顺式作用元件。随后构建 pAbAi-MiPIN1 诱饵载体, 并确定其在酵母系统中的自激活抑制浓度为 500 ng/mL AbA。进一步构建芒果子叶切段不定根形成的酵母 cDNA 文库, 并利用酵母单杂交系统筛选到 62 个与 *MiPIN1* 启动子结合的上游候选蛋白, 包括生长素结合蛋白 ABP19a-like、锌指蛋白 CCCH、myb 308 蛋白、8-羟基香叶醇脱氢酶、叶绿素结合蛋白 LCHII 等。GO 和 KEGG 富集分析显示, 这些蛋白主要参与细胞进程、代谢过程、刺激响应、生物调节等生物过程, 并涉及次生代谢物的生物合成、能量代谢、氨基酸代谢、脂类代谢和碳水化合物等新陈代谢途径。本研究为系统解析芒果不定根形成的分子调控网络奠定基础。

**关键词:** 芒果; *MiPIN1*; 不定根; 酵母单杂交; 启动子

中图分类号: S667.7

文献标志码: A

## Isolation of the *MiPIN1* Promoter and Screening of Its Upstream Regulators in Mango

WEN Yuxing<sup>1,2</sup>, WANG Yanying<sup>1,2</sup>, CAI Binbin<sup>2</sup>, ZENG Chengying<sup>2</sup>, LI Yunhe<sup>2\*</sup>

1. Engineering Technological Center of Mushroom Industry, Minnan Normal University, Zhangzhou, Fujian 363000, China; 2. Key Laboratory of Landscape Plants with Fujian and Taiwan Characteristics, Fujian Province University / School of Biological Science and Biotechnology, Minnan Normal University, Zhangzhou, Fujian 363000, China

**Abstract:** The induction of adventitious roots (AR) is a key step for successful clonal propagation in plants. Previous studies have shown that the auxin polar transport carrier *MiPIN1* plays an important role in AR formation from mango cotyledon segments, yet its upstream regulatory mechanisms remain unclear. In this study, a 2112 bp promoter sequence of *MiPIN1* isolated using FPNI-PCR. Bioinformatic analysis revealed that the promoter region contained various *cis*-acting elements, including those involved in light response, MYB binding, abscisic acid response, and low-temperature stress. A bait vector, pAbAi-MiPIN1, was constructed, and the minimal concentration of Aureobasidin A (AbA) required to suppress autoactivation in the yeast system was determined to be 500 ng/mL. Furthermore, a yeast cDNA library was constructed from mango cotyledon segments during AR formation. Using the yeast one-hybrid (Y1H) system, 62 upstream proteins that potentially bind to the *MiPIN1* promoter were identified, including auxin-binding protein ABP19a-like, zinc finger protein CCCH, MYB308, 8-hydroxygeraniol dehydrogenase, and chlorophyll a-b binding protein LHCII. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses indicated that the proteins were mainly involved in biological processes such as cellular processes, metabolism, response to stimuli, and biological regulation. They were also enriched in metabolic pathways related to secondary metabolite biosynthesis, energy metabolism, and the metabolism of amino acids, lipids, and carbohydrates. The findings

收稿日期 2025-09-12; 接受日期 2025-10-18

基金项目 国家重点研发计划专项 (No. 2018YFD1000500); 闽南师范大学校长基金项目 (No. KJ2020004)。

作者简介 温雨兴(2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物分子生物学。\*通信作者 (Corresponding author): 李运合 (LI Yunhe), E-mail: liyunhe16@163.com。

would lay a foundation for unraveling the molecular regulatory network underlying adventitious root formation in mango.

**Keywords:** mango; *MiPIN1*; adventitious roots; yeast one-hybrid; promoter

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2026.01.015

无性繁殖是当前园艺植物商业化规模繁育的核心方法, 全球超过 70% 的园艺植物工厂化生产依赖于外植体生根途径实现再生植株的培育<sup>[1]</sup>, 因此, 不定根的有效诱导已成为无性繁殖成功与否的关键环节。然而, 很多园艺树种尤其是木本植物, 由于其内在生理特性的限制, 不定根发生能力较弱, 致使此类材料至今仍难以实现高效的工厂化无性繁殖<sup>[2-4]</sup>。因而, 深入阐明不定根形成的分子与生理机制, 对推动园艺植物育苗技术的发展具有重要的理论价值与应用前景。

植物不定根的形成受到遗传背景、生理状态、物理环境和化学信号等多种因素的协同调控, 目前普遍认为, 生长素在该过程中发挥核心作用<sup>[4]</sup>。研究显示, 生长素通过极性运输形成局部浓度梯度, 从而激活下游信号通路, 调控细胞分化与增殖, 并促进根原基的启动与发育<sup>[5-6]</sup>。

生长素极性运输主要由三类转运蛋白家族介导: 输入载体 AUXIN-RESISTANT1 (AUX1) / LIKE-AUX1 (LAX)、输出载体 PIN-FORMED (PIN) 以及兼有输入和输出功能的 ATP-binding cassette B (ABCB) 家族蛋白<sup>[7]</sup>。其中, PIN 家族蛋白在细胞膜上的不对称分布为生长素的定向运输提供了结构基础, 对植物形态建成和器官发生具有关键调控功能<sup>[8-9]</sup>。多种植物中均已鉴定出 PIN 基因家族成员, 其数量因物种而异<sup>[10]</sup>。利用 CRISPR/Cas9 技术敲除水稻 (*Oryza sativa*) *OsPIN1b* 基因后, 植株芽和主根生长受阻, 不定根数量显著减少, 表明该基因在维持体内生长素稳态和不定根数目方面具有重要作用<sup>[11]</sup>。除水稻外, PIN 基因在桃 (*Prunus persica*)、山茶 (*Camellia sinensis*)、苹果 (*Malus domestica*)、橄榄 (*Canarium album*) 和杧果 (*Mangifera indica*) 中均被证实参与不定根形成过程。桃 *PpARF4* 可激活 *PpPIN1* 表达, 促进生长素运输与不定根发生<sup>[12]</sup>; 茶树 *CsIPIN3* 的功能验证表明其影响生长素积累与不定根发育<sup>[13]</sup>; 苹果 *MdFLP* 转录因子通过上调 *MdPIN3* 和 *MdPIN10* 的表达, 显著增加不定根数量<sup>[14]</sup>; 橄榄 *OePIN* 基因家族的动态表达谱显示其在 ROS 调节下对外植体生长素的运输和分布产生影响<sup>[15]</sup>。

前期研究已证实, 生长素输出载体基因 *MiPIN1* 在杧果子叶切段的不定根形成过程中具有关键作用, 然而其上游调控因子及具体分子机制尚不明确<sup>[16-18]</sup>。本研究以粤西 1 号杧果 (*Mangifera indica* L. Yuexi 1) 子叶为试验材料, 克隆 *MiPIN1* 的启动子序列, 构建酵母单杂交诱饵载体及 cDNA 文库, 并通过酵母单杂交系统筛选与该启动子互作的上游调控因子, 为解析杧果不定根形成的分子调控网络奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

粤西 1 号杧果果实取自闽南师范大学生科院植物园 (福建漳州), 按照 LI 等<sup>[16]</sup>的方法进行消毒及不定根诱导。子叶切段长度为 2 cm, 平放在只含 0.7% 琼脂的培养基上, 置于 28 °C 黑暗条件下培养。Y1H Gold、DH5 $\alpha$  感受态购自上海唯地生物技术有限公司; 快速质粒小提试剂盒和凝胶回收试剂盒购自诺唯赞生物科技有限公司, *Bst*B I、*Bbs* I 限制性内切酶购自 Biolabs; *Sac* I、*Xho* I、*Sma* I、OK Clon DNA Ligation Kit II 购自湖南艾科瑞生物工程有限公司; PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase 购自 TaKaRa 公司, SuperScript<sup>™</sup> III 和 Advantage 2 Polymerase Mix 购自 Thermo Scientific; 金担子素 A (AbA) 和缺陷型培养基购自 Coolaber 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 *MiPIN1* 启动子序列的分离及顺式作用元件分析** 本研究以粤西 1 号杧果嫩叶为材料, 采用 CTAB 法提取 DNA。随后通过 FPN1-PCR 法克隆启动子序列<sup>[19]</sup>。根据已获得的 *MiPIN1* 基因序列信息设计 3 条特异引物 *MiPIN1*-SP1~3 (表 1)。以杧果 DNA 为模板, 将 9 条简并引物 FPN 分别与 *MiPIN1*-SP1 配对, 进行第一轮 PCR 扩增; 以此轮产物为模版, 使用引物 FSP1 与 *MiPIN1*-SP2 进行第二轮 PCR; 再将第二轮产物稀释 50 倍作为模板, 以 FSP2 和 *MiPIN1*-SP3 为引物进行第三轮扩增。对第三轮 PCR 产物中符合预期大小的特异性条带进行割胶回收并测序。

表 1 本研究所用引物  
Tab. 1 Primers used in this study

| 引物名称<br>Primer name | 引物序列 (5'-3')<br>Primer sequence (5'-3') | 用途<br>Application      |
|---------------------|-----------------------------------------|------------------------|
| MiPIN1-SP1          | ATAAGCAGAGGAATCCCCATAACCAGAGTG          | <i>MiPIN1</i> 启动子第一轮克隆 |
| MiPIN1-SP2          | ACGGAAGTTCATGGCGTAAGGATTGTTAGT          |                        |
| MiPIN1-SP3          | ACATACAGAGGAATCACCGCCGTCAAAAC           |                        |
| MiPIN1-SP4          | GAGTCGAGCTTAGACCAACTCATGTT              |                        |
| MiPIN1-SP5          | TTTGAAGAATCCGGCCAAAAATGAG               |                        |
| MiPIN1-SP6          | TTAAACCCAAGCAATTTGAGCGACA               |                        |
| MiPIN1-F            | TGCGAGTTTGTAGATGGT                      | <i>MiPIN1</i> 启动子全长验证  |
| MiPIN1-R            | AAGATGGCGACGAAAC                        |                        |
| pAbAi-MiPIN1-F      | AAAAGCTTGAATTCGTTCAAACCAGATCAAGGGACC    | <i>MiPIN1</i> 诱饵载体构建   |
| pAbAi-MiPIN1-R      | GAGCACATGCCTCGATTTTITACAGGATTTTGTGAAGAT |                        |
| pGADT7-F (T7)       | TAATACGACTCACTATAGGGC                   | 酵母阳性克隆 PCR 及测序         |
| pGADT7-R (3'AD)     | AGATGGTGCACGATGCACAG                    |                        |

由于首轮 FPNI-PCR 所获启动子序列长度不足，依据初步测序结果重新设计引物 MiPIN1-SP4~6（表 1），并依上述相同流程进行第二轮扩增。将两轮结果拼接后，最终获得 *MiPIN1* 基因上游启动子序列信息，设计特异引物 MiPIN1-F 和 MiPIN1-R 进行验证，其中 MiPIN1-R 位于 *MiPIN1* 基因开放阅读框(ORF)内。利用 Plantcare（<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>）在线分析网站对该启动子进行顺式作用元件预测，并通过 TBtools 软件对预测结果进行可视化处理。

1.2.2 杧果 cDNA 文库构建 参照 LI 等<sup>[16]</sup>的方法，杧果子叶诱导不定根培养 0、6 h 和 1、4、7、10 d，在各时间点取子叶切段近轴端 2 mm 厚切面提取总 RNA，并采用磁珠法对 RNA 进行分离纯化。以纯化的 mRNA 为模板，使用武汉金开瑞生物工程有限公司的核蛋白酵母双杂交建库试剂盒，按说明书流程合成 cDNA。使用同源重组酶法将经 *Sma* I 酶切线性化的 pGADT7 载体连接至 cDNA，重组产物转化至 DH10B 感受态细胞，构建大肠杆菌 cDNA 文库。

取转化后的菌液加入 LB 培养基至 5 mL，37 °C 震荡培养 2 h 后，加入无菌甘油至终浓度 20% (V/V)，混匀后于-80 °C 保存，即获得初级大肠杆菌 cDNA 文库。为鉴定大肠杆菌 cDNA 文库的质量，进行如下分析：将菌液进行 10<sup>4</sup> 倍稀释，取 0.1 mL 涂布于含相应抗生素 LB 平板，培养后统计菌落数以计算文库滴度。计算公式为：

滴度 (cfu/mL) = 平均菌落数/0.1 mL × 10<sup>4</sup>；同时随机挑取 20 个单克隆，提取质粒并进行 PCR 扩增，以检测插入片段长度及文库阳性率。

将上述大肠杆菌文库质粒大量提取后，转化至 Y187 酵母感受态细胞，涂布于 SD/-Leu 固体培养基，30 °C 培养 3 d。将平板于 4 °C 静置 3 h 后，每板加入 5 mL 预冷的保菌培养基，收集转化子，即获得酵母 cDNA 文库，将其分装后保存于-80 °C 冰箱。最后对酵母 cDNA 文库进行滴度检测，将保存的菌液稀释 10<sup>4</sup> 倍，取 0.1 mL 涂布于 SD/-Leu 平板 30 °C 培养相应时间后统计菌落数，并按上述公式计算酵母文库滴度。

1.2.3 诱饵载体的构建及自激活检测 (1) 诱饵载体 pAbAi-MiPIN1 构建。根据 1.2.1 中所分离的 *MiPIN1* 启动子序列，设计用于连接 pAbAi 载体的引物（表 1），以杧果 DNA 为模板，使用高保真 DNA 聚合酶 PrimeSTAR<sup>®</sup> Max 扩增目标片段，将扩增产物与经 *Sac* I 和 *Xho* I 双酶切的 pAbAi 载体连接，转化至 DH5α 大肠杆菌感受态细胞，筛选阳性克隆并测序。

(2) 自激活检测。将经 *Bbs* I 酶线性化的 PAbAi-MiPIN1 质粒转化至 Y1H Gold 酵母感受态细胞，并在 SD/-Ura 平板上筛选阳性克隆，用于制备 pAbAi-MiPIN1 酵母感受态细胞。为确定该诱饵菌株的最低 AbA 抑制浓度，首先采用点板法在 0~500 ng/mL 的 AbA 浓度区间内进行初筛，以确定有效抑制的大致范围。随后，为模拟高通量文库筛选的真实条件，将空载 pGADT7 质粒转

入该诱饵感受态中，分别涂布于 SD/-Leu、SD/-Leu/AbA 平板上进行严格验证。最终，根据涂板后的菌落生长情况，判定其最低抑制浓度。

**1.2.4 酵母单杂交文库筛选** 从 SD/-Ura 平板挑取 Y1H Gold pAbAi-MiPIN1 酵母菌落，制备感受态细胞，取 25  $\mu$ g 文库质粒转化 600  $\mu$ L 上述感受态细胞，以 pAbAi-p53+pGADT7-p53 为阳性对照，pAbAi-p53+pGADT7 为阴性对照。将转化产物涂布于 SD/-Leu/AbA 平板，30  $^{\circ}$ C 培养 3~4 d 后，挑取阳性克隆点种至新的 SD/-Leu/AbA 平板进行复筛。将复筛阳性菌株接种于液体培养基振荡培养过夜，使用酵母小量抽提试剂盒（金开瑞）抽提质粒。以所提质粒为模板进行 PCR 扩增，琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。对扩增处预期条带的样品送通用引物测序，测序结果通过 NCBI 数据库进行比对分析。

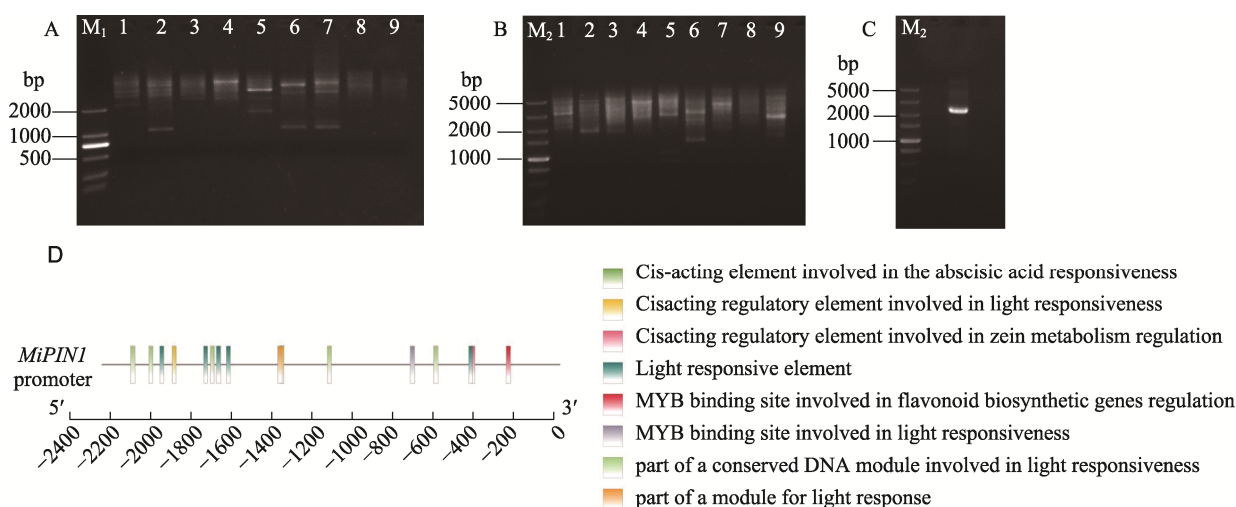
## 2 结果与分析

### 2.1 *MiPIN1* 启动子的分离及顺式作用元件分析

参照 FPNI-PCR 方法进行扩增，第一轮 PCR 经琼脂糖凝胶电泳分析，在约 1000 bp 处观察到

特异条带（图 1A，泳道 2）。回收该条带并测序，得到一段长度为 1106 bp 的序列。基于该序列信息，进一步设计上游特异引物 MiPIN1-SP4、MiPIN1-SP5 和 MiPIN1-SP6，进行三轮 PCR 延伸扩增，选取清晰条带进行割胶回收并测序，得到一段长度为 1341 bp 的序列（图 1B，泳道 6）。将 2 次所得序列进行拼接，去除 2 个片段之间及与 *MiPIN1* ORF 重叠的碱基，最终得到起始密码子上游一段长度为 2112 bp 的 *MiPIN1* 启动子序列。为验证该序列，使用特异性引物 MiPIN1-F、MiPIN1-R 进行 PCR 扩增，琼脂糖凝胶电泳显示条带略大于 2000 bp（图 1C）。经测序确认其长度约为 2268 bp，与 *MiPIN1* 的 ORF 有 156 bp 重叠，测序结果和拼接序列一致，表明启动子序列验证成功。

由图 1D 可知，*MiPIN1* 启动子中含有参与光反应的顺式作用调节元件 Box 4、AE-box、G-box，参与光反应的 MYB 结合位点 MRE，参与脱落酸反应的顺式作用元件 ABRE，参与低温响应的顺式作用元件 LTR、厌氧诱导所必需的调节元件 ARE 等。



A、B: *MiPIN1* 启动子序列分离；C: *MiPIN1* 全长验证；D: *MiPIN1* 启动子元件分析；

M<sub>1</sub>: DL2000 DNA marker, M<sub>2</sub>: DL5000 DNA marker。

A and B: Isolation of the *MiPIN1* promoter sequence; C: Validation of the full-length *MiPIN1* coding sequence;

D: Analysis of *cis*-acting elements in the *MiPIN1* promoter; M<sub>1</sub>: DL2000 DNA marker, M<sub>2</sub>: DL5000 DNA marker。

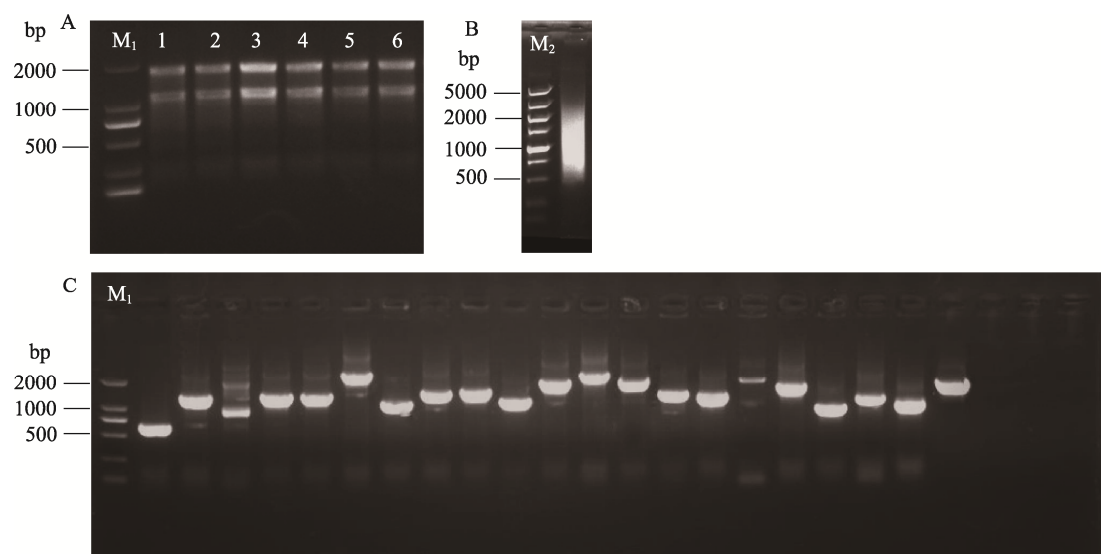
图 1 *MiPIN1* 启动子分离胶图及顺式作用元件分析

Fig. 1 Electrophoretic analysis of isolated *MiPIN1* promoter and its *cis*-acting elements

### 2.2 杧果酵母 cDNA 文库构建

提取杧果子叶切段在不同不定根形成时期的 RNA，经琼脂糖凝胶电泳检测显示 RNA 质量好（图 2A）。以纯化的 mRNA 为模板合成双链

cDNA，电泳检测显示其分子量分布均匀，浓度和纯度数据符合建库要求（图 2B）。将均一化处理后的双链 cDNA 与经 *Sma* I 酶线性化的 pGADT7 载体通过同源重组酶连接，重组产物转化至 DH10B



A: 芒果 RNA 提取, 1~6 泳道分别为培养 0、6 h 和 1、4、7、10 d; B: 双链 cDNA 纯化;

C: 文库鉴定 PCR 产物电泳检测; M<sub>1</sub>: DL2000 DNA marker, M<sub>2</sub>: DL5000 DNA marker。

A: RNA extraction from mango, lanes 1-6 represent 0 h, 6 h, 1 d, 4 d, 7 d, and 10 d of culture, respectively; B: Purification of double-stranded cDNA; C: Electrophoretic analysis of library insert PCR products. M<sub>1</sub>: DL2000 DNA marker, M<sub>2</sub>: DL5000 DNA marker。

图 2 芒果 cDNA 文库构建

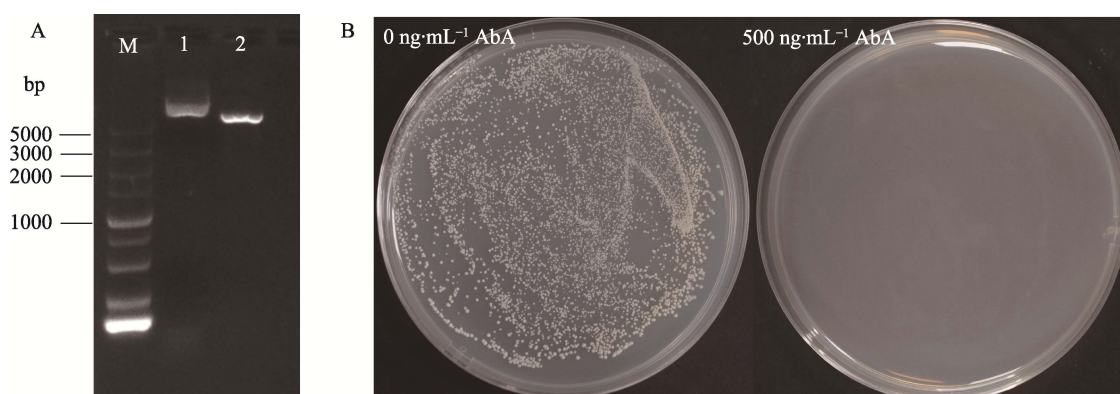
Fig. 2 Construction of a cDNA library from mango

大肠杆菌感受态细胞中, 成功构建初级 cDNA 文库, 该大肠杆菌文库的滴度为  $4.78 \times 10^7$  cfu/mL。随机挑取克隆进行 PCR 鉴定, 结果显示 80% 以上克隆的插入片段长度大于 750 bp (图 2E), 文库阳性率超过 90%。进一步将文库质粒转化至酵母宿主 Y187 酵母感受态细胞, 获得酵母 cDNA 文库, 其滴度为  $1.72 \times 10^7$  cfu/mL。

### 2.3 诱饵菌株的获得与自激活检测

将经 *Bbs* I 酶线性化的 pAbAi-MiPIN1 诱饵载体质粒转化 Y1H Gold 酵母感受态细胞, 挑取单克隆落于 SD/-Ura 液体培养基培养, 制备诱饵

感受态细胞。为检验诱饵菌株的自激活特性并确定筛选浓度, 将空载 pGADT7 质粒转入该诱饵菌株后, 并分别涂布于含有 0、500 ng/mL AbA 的 SD/-Leu 平板进行验证。结果显示, 转化子在无 AbA 的 SD/-Leu 平板上正常生长, 表明诱饵质粒成功转入且对宿主菌无毒害作用; 而在 500 ng/mL AbA 的平板上, 菌株生长完全抑制 (图 3)。鉴于酵母 cDNA 文库筛选对选择压力的要求更为严格, 最终确定使用 500 ng/mL 的 AbA 浓度进行后续实验, 以确保筛选条件的高度严谨性, 从而有效减少假阳性克隆的干扰。



A: PAbAi-MiPIN1 质粒酶切, 泳道 1 为酶切质粒, 泳道 2 为未酶切质粒, M: DL5000 DNA marker; B: AbA 抑制浓度测定。

A: Restriction enzyme digestion of the pAbAi-MiPIN1 plasmid, lane 1: Digested product, lane 2: Uncut plasmid; M: DL5000 DNA marker; B: AbA inhibitory concentration assay.

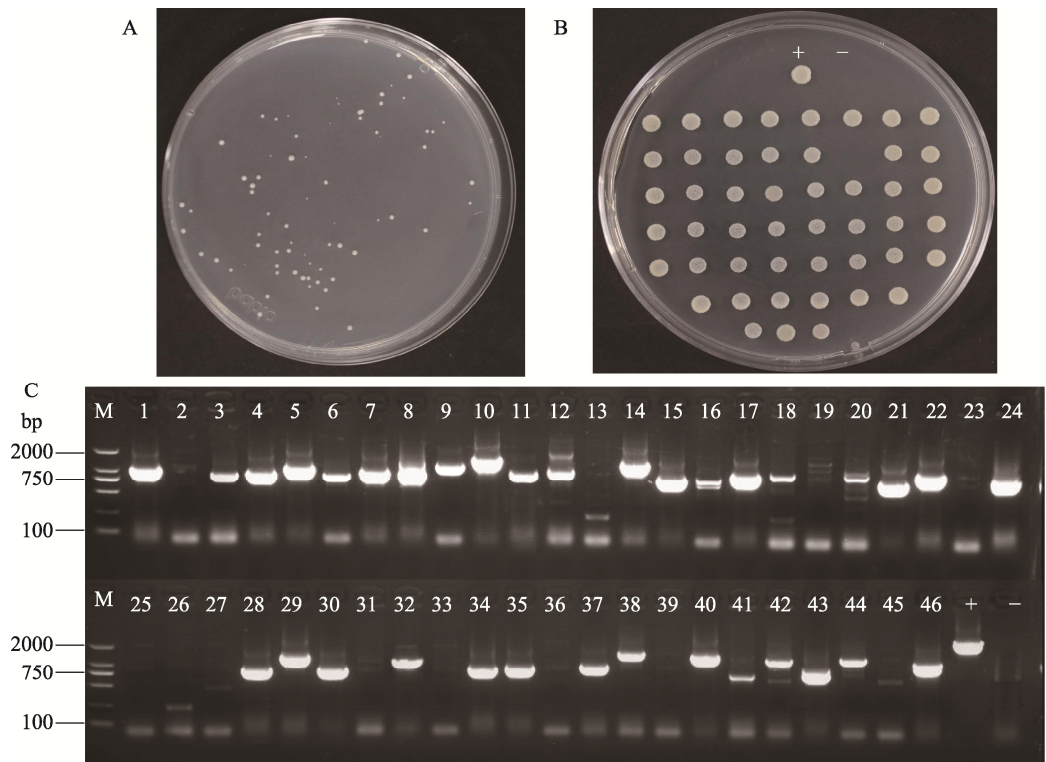
图 3 *MiPIN1* 启动子载体质粒酶切和诱饵自激活检测

Fig. 3 Digestion of *MiPIN1* promoter plasmid and AbA inhibitory concentration determination

2.4 文库质粒转化及阳性克隆筛选

将文库质粒转化至 pAbAi-MiPIN1 诱饵菌株感受态细胞中,在含有 500 ng/mL AbA 的 SD/-Leu 缺陷平板上进行 2 次筛选,获得阳性克隆,阳性对照 (pAbAi-p53+pGADT7-p53) 在该条件下正常生长,阴性对照 (pAbAi-p53+pGADT7) 则不生长,说明激活了报告基因,有互作现象产生(图 4A, 图 4B)。提取阳性克隆得到猎物质粒,使用通用引物 pGADT7-F (T7) 和 pGADT7-R (3'AD)

进行 PCR 反应,结果显示插入片段分布在 500~2000 bp 之间,表明猎物质粒携带基因片段大小各异(图 4C)。将所有符合条件的扩增条带进行测序,并通过 NCBI 数据库进行比对,最终筛选出 62 个可能与 *MiPIN1* 启动子互作的蛋白,包括生长素结合蛋白 ABP19a-like、CCCH 型锌指蛋白、MYB308、叶绿素 a-b 结合蛋白 LHCII、8-羟基香叶醇脱氢酶等多个已知功能蛋白,以及 8 个未知蛋白(表 2)。



A: SD/-Leu/AbA ( 500 ng/mL ) 培养基初筛到的部分克隆; B: SD/-Leu/AbA ( 500 ng/mL ) 培养基复筛到的阳性克隆;  
C: 部分阳性克隆 PCR 产物电泳检测; M: DL2000 DNA marker。  
A: Clones from the primary screening on SD/-Leu/AbA (500 ng/mL) medium; B: Positive clones from the rescreening on SD/-Leu/AbA (500 ng/mL) medium; C: Electrophoretic analysis of PCR products from selected positive clones; M: DL2000 DNA marker.

图 4 文库质粒转化及阳性克隆筛选

Fig. 4 Library transformation and screening of positive clones

表 2 酵母单杂交文库获得与 *MiPIN1* 启动子结合的蛋白

Tab. 2 *MiPIN1* promoter-binding proteins identified by yeast one-hybrid screening

| 编号<br>No. | 蛋白注释<br>Protein description                                                | NCBI 登录号<br>NCBI accession number |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| 1         | 生长素结合蛋白 ABP19a LOW QUALITY PROTEIN: auxin-binding protein ABP19a-like      | XP_044464178.1                    |
| 2         | 锌指 CCCH 结构域蛋白 1 zinc finger CCCH domain-containing protein 1-like          | XP_044491878.1                    |
| 3         | myb 308 蛋白 myb-related protein 308                                         | XP_044488236.1                    |
| 4         | LHCII 1 型叶绿素 a-b 结合蛋白 chlorophyll a-b binding protein of LHCII type 1-like | XP_044497084.1                    |
| 5         | 8-羟基香叶醇脱氢酶 8-hydroxygeraniol dehydrogenase-like                            | XP_044484784.1                    |
| 6         | 40S 核糖体蛋白 S7 40S ribosomal protein S7                                      | XP_044467396.1                    |
| 7         | 40S 核糖体蛋白 S8 40S ribosomal protein S8-like                                 | XP_044502964.1                    |
| 8         | 40S 核糖体蛋白 S11 40S ribosomal protein S11-like                               | XP_044471489.1                    |

续表 2 酵母单杂交筛库获得与 *MiPIN1* 启动子结合的蛋白  
Tab. 2 *MiPIN1* promoter-binding proteins identified by yeast one-hybrid screening (continued)

| 编号<br>No. | 蛋白注释<br>Protein description                                                                                         | NCBI 登录号<br>NCBI accession number |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| 9         | 60S 核糖体蛋白 L28-2 60S ribosomal protein L28-2-like                                                                    | XP_044464275.1                    |
| 10        | 组蛋白 H2B.3 histone H2B.3                                                                                             | XP_044482448.1                    |
| 11        | 导向蛋白 5 dirigent protein 5-like                                                                                      | XP_044476675.1                    |
| 12        | 膜联蛋白 D2 蛋白 annexin D2-like                                                                                          | XP_044469169.1                    |
| 13        | 水通道蛋白 TIP1-1 aquaporin TIP1-1                                                                                       | XP_044507616.1                    |
| 14        | 多聚泛素 4 polyubiquitin 4                                                                                              | XP_044495953.1                    |
| 15        | 病程相关蛋白 PR-1 pathogenesis-related protein PR-1-like                                                                  | XP_044472451.1                    |
| 16        | 通用胁迫蛋白 PHOS32 universal stress protein PHOS32                                                                       | XP_044473883.1                    |
| 17        | 铁硫簇组装蛋白 1 iron-sulfur cluster assembly protein 1-like                                                               | XP_044487686.1                    |
| 18        | 质体热激蛋白 90-5 heat shock protein 90-5, chloroplastic-like                                                             | XP_044493783.1                    |
| 19        | Rac GTP 结合蛋白 5 rac-like GTP-binding protein 5                                                                       | XP_044490365.1                    |
| 20        | 2S 白蛋白种子贮藏蛋白 2S albumin seed storage protein-like                                                                   | XP_044463967.1                    |
| 21        | WD-40 重复结构域蛋白 MSI4 WD-40 repeat-containing protein MSI4                                                             | XP_044464485.1                    |
| 22        | 油菜素内酯响应性 RING 蛋白 1 brassinosteroid-responsive RING protein 1-like                                                   | XP_044504257.1                    |
| 23        | 染色体结构维持蛋白 1 structural maintenance of chromosomes protein 1                                                         | XP_044492940.1                    |
| 24        | 线粒体含五肽重复序列蛋白 At4g01030 pentatricopeptide repeat-containing protein At4g01030, mitochondrial-like                    | XP_044494109.1                    |
| 25        | 跨膜 emp24 结构域蛋白 p24delta9 transmembrane emp24 domain-containing protein p24delta9-like                               | XP_044490171.1                    |
| 26        | 细胞质 60S 核糖体亚基生物发生因子 REI1 同源蛋白 1 cytoplasmic 60S subunit biogenesis factor REI1 homolog 1-like                       | XP_044463884.1                    |
| 27        | NTM1 蛋白 9 异构体 X2 protein NTM1-like 9 isoform X2                                                                     | XP_044477706.1                    |
| 28        | 端粒重复序列结合蛋白 5 异构体 X2 telomere repeat-binding protein 5-like isoform X2                                               | XP_044482755.1                    |
| 29        | BTB/POZ 和 MATH 结构域蛋白 4 异构体 X1 BTB/POZ and MATH domain-containing protein 4 isoform X1                               | XP_044506223.1                    |
| 30        | 卤酸脱卤酶样水解酶结构域蛋白 At4g01030 异构体 X2 haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein At4g39970 isoform X2 | XP_044477222.1                    |
| 31        | WD40 重复结构域蛋白 HOS15 异构体 X2 WD40 repeat-containing protein HOS15 isoform X2                                           | XP_044470022.1                    |
| 32        | 丝氨酸消旋酶 serine racemase                                                                                              | XP_044476383.1                    |
| 33        | 过氧化物酶 39 peroxidase 39-like                                                                                         | XP_044465711.1                    |
| 34        | 质体 ATP 硫酸化酶 1 ATP sulfurylase 1, chloroplastic-like                                                                 | XP_044487110.1                    |
| 35        | 肉桂酰辅酶 A 还原酶 1 cinnamoyl-CoA reductase 1-like                                                                        | XP_044510773.1                    |
| 36        | 双功能环氧化物水解酶 2 bifunctional epoxide hydrolase 2-like                                                                  | XP_044503554.1                    |
| 37        | 谷氨酰胺合成酶根瘤同工酶 glutamine synthetase nodule isozyme                                                                    | XP_044478717.1                    |
| 38        | 木质素形成相关阴离子过氧化物酶 lignin-forming anionic peroxidase-like                                                              | XP_044477994.1                    |
| 39        | 质体 $\omega$ -3 脂肪酸去饱和酶 omega-3 fatty acid desaturase, chloroplastic-like                                            | XP_044509553.1                    |
| 40        | 3-磷酸莽草酸 1-羧乙烯基转移酶 2 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase 2-like                                             | XP_044503673.1                    |
| 41        | 肽-N(4)-(N-乙酰- $\beta$ -葡萄糖氨基)天冬酰胺酰胺酶 peptide-N(4)-(N-acetyl-beta-glucosaminy) asparagine amidase                    | XP_044483024.1                    |
| 42        | 胍质合成酶 5 异构体 X1 callose synthase 5 isoform X1                                                                        | XP_044469462.1                    |
| 43        | 溶酶体 $\beta$ -葡萄糖苷酶异构体 X3 lysosomal beta glucosidase-like isoform X3                                                 | XP_044461925.1                    |
| 44        | 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Aurora-1 异构体 X2 serine/threonine-protein kinase Aurora-1 isoform X2                                     | XP_044463381.1                    |
| 45        | 质体甘油醛-3-磷酸脱氢酶 B 异构体 X2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B, chloroplastic isoform X2                         | XP_044474720.1                    |
| 46        | 光系统 I O 亚基 photosystem I subunit O                                                                                  | XP_044505032.1                    |
| 47        | 转录起始因子 IIA 亚基 2 transcription initiation factor IIA subunit 2                                                       | XP_044510278.1                    |
| 48        | DNA 指导的 RNA 聚合酶 II 亚基 4 DNA-directed RNA polymerase II subunit 4                                                    | XP_044469091.1                    |
| 49        | 线粒体输入受体 TOM9-2 亚基 mitochondrial import receptor subunit TOM9-2                                                      | XP_044491961.1                    |

续表 2 酵母单杂交筛库获得与 *MiPIN1* 启动子结合的蛋白

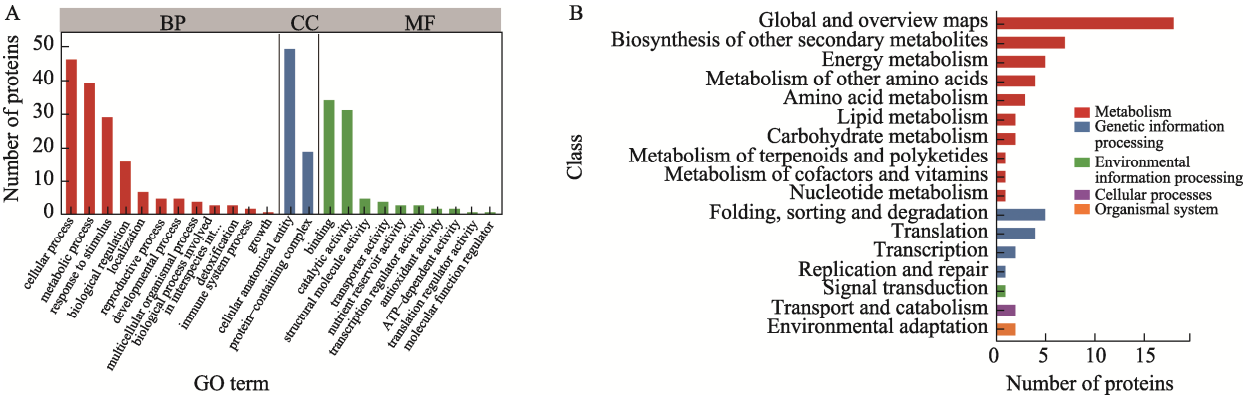
Tab. 2 *MiPIN1* promoter-binding proteins identified by yeast one-hybrid screening (continued)

| 编号<br>No. | 蛋白注释<br>Protein description                                                      | NCBI 登录号<br>NCBI accession number |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| 50        | 推测的失活贮藏蛋白 9 probable inactive patatin-like protein 9                             | XP_044480946.1                    |
| 51        | 推测的谷胱甘肽 S-转移酶 probable glutathione S-transferase                                 | XP_044497796.1                    |
| 52        | 推测的肉桂醇脱氢酶 1 probable cinnamyl alcohol dehydrogenase 1                            | XP_044487696.1                    |
| 53        | 推测的木葡聚糖内转葡糖基酶/水解酶 5 probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 5 | XP_044501598.1                    |
| 54        | 未表征的 N-乙酰转移酶 p20 uncharacterized N-acetyltransferase p20                         | XP_044498314.1                    |
| 55        | 未知蛋白 uncharacterized protein                                                     | XP_044478945.1                    |
| 56        | 未知蛋白 uncharacterized protein                                                     | XP_044461067.1                    |
| 57        | 未知蛋白 uncharacterized protein                                                     | XP_044484263.1                    |
| 58        | 未知蛋白 uncharacterized protein                                                     | XP_044478860.1                    |
| 59        | 未知蛋白 uncharacterized protein                                                     | XP_044484263.1                    |
| 60        | 未知蛋白 uncharacterized protein                                                     | XP_044500293.1                    |
| 61        | 未知蛋白 uncharacterized protein                                                     | XP_044489575.1                    |
| 62        | 未知蛋白 uncharacterized protein                                                     | XP_044494382.1                    |

2.5 候选互作蛋白分析

对上述 62 个候选互作蛋白进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。GO 功能分析发现这些蛋白显著富集于细胞进程、代谢过程、刺激响应、生物调节等生物过程(图 5A)。KEGG 分析显示,

候选蛋白主要参与次生代谢物的生物合成、能量代谢、氨基酸代谢、脂类代谢和碳水化合物等;此外还涉及遗传信息处理途径,如蛋白质的翻译、折叠、分类与降解等;同时在信号转导、运输、环境适应等功能类别中也具有显著代表性(图 5B)。



A: *MiPIN1* 启动子结合候选蛋白的 GO 功能分析; B: *MiPIN1* 启动子结合候选蛋白的 KEGG 富集分析。  
A: Gene Ontology (GO) function analysis of candidate *MiPIN1* promoter-binding proteins. B: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of candidate *MiPIN1* promoter-binding proteins.

图 5 *MiPIN1* 启动子结合候选蛋白的 GO 和 KEGG 富集分析

Fig. 5 GO and KEGG enrichment analyses of candidate proteins binding to *MiPIN1* promoter

3 讨论

不定根发生是植物无性繁殖的核心过程,深入阐明其调控机制对植物工厂化育苗技术的发展具有重要应用价值。前期研究表明,粤西 1 号芒果子叶切段在 0.7%的琼脂培养基上黑暗培养 4 周,不定根只在近轴端切面上形成,且该过程无需外源激素和其他营养元素的参与,有效排除了多种外源因子的干扰,从而为不定根发生机制研

究提供了一个理想的实验体系<sup>[16-18]</sup>。生理学实验表明这种不定根形成与生长素极性运输密切相关<sup>[18, 20]</sup>,在拟南芥中过表达 *MiPIN1* 显著提高不定根数目<sup>[18]</sup>,表明 *MiPIN1* 作为生长素极性运输载体,在该过程中起关键作用,因此解析其上游调控网络具有重要的理论意义。

为系统筛选 *MiPIN1* 的上游调控因子,本研究构建了杧果子叶不定根发生过程的 cDNA 文

库, 并利用酵母单杂交技术进行筛选。酵母单杂交技术是一种用于验证蛋白质与 DNA 相互作用的经典方法, 其原理是将目的 DNA 片段作为诱饵整合至含报告基因的质粒载体中, 文库蛋白则构建到表达 GAL4 AD 的载体中<sup>[21]</sup>。二者若发生互作, 即可启动报告基因表达, 从而依据酵母的生长状况筛选出潜在的 DNA 结合蛋白。该技术已被广泛应用于研究植物表达调控中, 例如在橡胶树中鉴定出 HbWRKY1 作为 *HbMVD1* 启动子的调控因子控制天然橡胶的生物合成<sup>[22]</sup>, 以及在草莓中发现 FaWRKY48 通过调控 *FaNCED1* 影响果实成熟<sup>[23]</sup>。本研究中以 *MiPIN1* 启动子片段作为诱饵, 与文库中编码转录因子的 cDNA 进行互作检测, 共获得 62 个可能与 *MiPIN1* 启动子互作的蛋白, 包括生长素结合蛋白 ABP19a-like、CCCH 型锌指蛋白、MYB308、8-羟基香叶醇脱氢酶及叶绿素 a-b 结合蛋白 LHCII 等。

在筛选获得的候选因子中, ABP19a-like 属于生长素结合蛋白家族, 该家族成员最早发现于桃茎尖, 可响应光周期并参与发育调控<sup>[24-25]</sup>。CCCH 型锌指蛋白广泛参与植物发育及激素信号转导, 例如 OsC3H10 增强水稻抗旱性, 拟南芥中 H1Z1 影响根形态建成, 而 C3H14 则通过 WRKY33 参与抗病反应<sup>[26-28]</sup>; 月季 RcC3H 家族成员在根部高表达, 也表明其在根系发育中可能发挥作用<sup>[29]</sup>。MYB 类转录因子在调控根系发育中具有重要作用, 其功能部分通过直接调控 PIN 家族基因的表达实现。在拟南芥中, FLP(MYB124)与 MYB88 可结合 *PIN3* 和 *PIN7* 的启动子, 调控根尖重力响应细胞中 *PIN* 基因的时空特异性表达, 进而影响根的向地性<sup>[30]</sup>; 苹果 MdFLP 通过激活 *MdPIN3* 和 *MdPIN10* 表达促进不定根发生<sup>[14]</sup>, 石榴 PgFLP 则可结合 *PgPIN10* 启动子并调节不定根重力定角<sup>[31]</sup>, 表明 MYB 转录因子在 *PIN* 基因调控方面功能保守。此外, 其他 MYB 成员也广泛参与根系发育调控, 如银腺杨 *PagMYB180* 通过 ROS/PCD 途径调控不定根发生<sup>[32]</sup>; 大青杨 *PuMYB40* 响应低磷信号并依赖生长素途径促进不定根形成<sup>[33]</sup>。本研究通过酵母单杂体系筛选到一个可与 *MiPIN1* 启动子结合的 MiMYB308 蛋白。基于其在 *PIN* 基因调控中的保守功能, 并结合生物信息学分析发现 *MiPIN1* 启动子区存在 MYB 结合位点, 因此推测 MiMYB308 可能通过直接结合该位点调控 *MiPIN1* 的表达。

综上, 本研究系统筛选了 *MiPIN1* 的上游调控因子, 并初步揭示了以 *MiPIN1* 为核心的不定根发生分子网络。后续需通过点对点验证、遗传转化及功能分析等试验, 进一步揭示这些因子在不定根形成中的具体作用与机制, 为完善芒果不定根发生的调控理论提供依据。

## 参考文献

- [1] ROUT G R, MOHAPATRA A, JAIN S M. Tissue culture of ornamental pot plant: a critical review on present scenario and future prospects[J]. *Biotechnology Advances*, 2006, 24(6): 531-560.
- [2] PIJUT P M, WOESTE K E, MICHLER C H. Promotion of adventitious root formation of difficult-to-root hardwood tree species[J]. *Horticultural Reviews*, 2011, 38: 213-251.
- [3] VERSTRAETEN I, BEECKMAN T, GEELEN D. Adventitious root induction in *Arabidopsis thaliana* as a model for *in vitro* root organogenesis[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2013, 959: 159-175.
- [4] LAKEHAL A, BELLINI C. Control of adventitious root formation: insights into synergistic and antagonistic hormonal interactions[J]. *Physiologia Plantarum*, 2019, 165(1): 90-100.
- [5] PACURAR D I, PERRONE I, BELLINI C. Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting[J]. *Physiologia Plantarum*, 2014, 151(1): 83-96.
- [6] MUHAMED A, LATA S, GYAN S S, MARTIN Š, JÁN J. Auxin signaling, transport, and regulation during adventitious root formation[J]. *Current Plant Biology*, 2024, 40: 100385.
- [7] HAMMES U Z, MURPHY A S, SCHWECHHEIMER C. Auxin transporters—a biochemical view[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2022, 14(2): a039875.
- [8] CRISTIAN F, SILVIA F, SERENA V. The maize PIN gene family of auxin transporters[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2012, 3(16): 16.
- [9] MARHAVA P. Recent developments in the understanding of PIN polarity[J]. *The New Phytologist*, 2022, 233(2): 624-630.
- [10] YANG C H, WANG D D, ZHANG C, KONG N N, MA H L, CHEN Q. 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.
- [11] WANG H H, OUYANG Q Q, YANG C, ZHANG Z Y, HOU D Y, LIU H, XU H W. Mutation of *OsPIN1b* by CRISPR/Cas9 reveals a role for auxin transport in modulat-

- ing rice architecture and root gravitropism[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(16): 8965.
- [12] LIU J J, GAO L L, ZHANG R X, GAO A Q, ZAMITH K O, ZHENG B B, HAN Y P. ARF4 acting upstream of LBD16 promotes adventitious root formation in peach[J]. Horticultural Plant Journal, 2025, 11(1): 145-161.
- [13] HU S K, LIU X Q, XUAN W, MEI H L, LI J J, CHEN X, ZHAO Z, ZHAO Y X, ANBURA J, RAJIV P, LI X H. Genome-wide identification and characterization of PIN-FORMED (PIN) and PIN-LIKES (PILS) gene family reveals their role in adventitious root development in tea nodal cutting (*Camellia sinensis*)[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 229: 791-802.
- [14] WANG Z H, LI J L, MAO Y F, ZHANG M M, WANG R, HU Y L, MAO Z Q, SHEN X. Transcriptional regulation of *MdPIN3* and *MdPIN10* by MdFLP during apple self-rooted stock adventitious root gravitropism[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 1-14.
- [15] VELADA I, CARDOSO H, PORFIRIO S, PEIXE A. Expression profile of PIN -Formed auxin efflux carrier genes during IBA-Induced in vitro adventitious rooting in *Olea europaea* L.[J]. Plants, 2020, 9(2): 185.
- [16] LI Y H, ZOU M H, FENG B H, HUANG X, ZHANG Z, SUN G M. Molecular cloning and characterization of the genes encoding an auxin efflux carrier and the auxin influx carriers associated with the adventitious root formation in mango (*Mangifera indica* L.) cotyledon segments[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2012, 55: 33-42.
- [17] LI, Y H, ZHANG H N, WU Q S, MUDAY G K. Transcriptional sequencing and analysis of major genes involved in the adventitious root formation of mango cotyledon segments[J]. PLANTA, 2017, 245(6): 1193-1213.
- [18] LI Y H, MO Y W, WANG S B, ZHANG Z. Auxin efflux carriers, *MiPINs*, are involved in adventitious root formation of mango cotyledon segments[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2020, 150: 15-26.
- [19] WANG Z, YE S F, LI J J, ZHENG B, BAO M Z, NING G G. Fusion primer and nested integrated PCR (FPNI-PCR): a new high-efficiency strategy for rapid chromosome walking or flanking sequence cloning[J]. BMC Biotechnology, 2011, 11(1): 109-120.
- [20] LI Y H, CHEN Q Z, XIAO J N, CHEN Y F, LI X J, STAEHELIN C, HUANG X L. Characteristics of adventitious root formation in cotyledon segments of mango (*Mangifera indica* L. cv. Zihua): two induction patterns, histological origins and the relationship with polar auxin transport[J]. Plant Growth Regulation, 2008, 54(2): 165-177.
- [21] SUN Y, LI Y, HUANG G P, WU Q, WANG L. Application of the yeast one-hybrid technique to plant functional genomics studies[J]. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 2017, 31(6): 1087-1092.
- [22] 文连璇, 杨署光, 史敏晶, 邓小敏, 晁金泉. 橡胶树 *HbMVD1* 基因启动子克隆及转录调控因子筛选[J]. 热带作物学报, 2025, 46(8): 1785-1794.
- WEN L X, YANG S G, SHI M J, DENG X M, CHAO J Q. Cloning of the *HbMVD1* gene promoter and screening of transcription regulatory factors in rubber tree[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2025, 46(8): 1785-1794. (in Chinese)
- [23] VALENZUELA-RIFFO F, DELGADO C, MORALES-QUINTANA L, FIGUEROA C R. The strawberry transcription factor FaWRKY48 transactivates the *FaNCED1* promoter as revealed by yeast-one hybrid and *Nicotiana benthamiana* transfection assays[J]. Scientia Horticulturae, 2024, 323: 112545.
- [24] OHMIYA A. Characterization of ABP19/20, sequence homologues of germin-like protein in *Prunus persica* L.[J]. Plant Science, 2002, 163(4): 683-689.
- [25] 任浩然, 傅晓东, 支秋娟, 李卉, 吴思琳, 刘金义, 王长泉. 月季生长素结合蛋白基因 RcABP19 的克隆及表达特征分析[J]. 植物生理学报, 2019, 55(7): 983-992.
- REN H R, FU X D, ZHI Q J, LI H, WU S L, LIU J Y, WANG C Q. Cloning and expression profile analysis of auxin binding protein gene *RcABP19* in *Rosa chinensis*[J]. Plant Physiology Journal, 2019, 55(7): 983-992. (in Chinese)
- [26] SO Y S, JAE S S, SEUNG W B, JU K K. Overexpression of *OsC3H10*, a CCCH-Zinc finger, improves drought tolerance in rice by regulating stress-related genes[J]. Plants, 2020, 9(10): 1298.
- [27] ZHANG M, BÓDI Z, MACKINNON K, ZHONG S L, ARCHER N, MONGAN N P, SIMPSON G G, FRAY R G. Two zinc finger proteins with functions in m6A writing interact with HAKAI[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 1127.
- [28] WANG D, XU H, HUANG J Y, KONG Y Z, ABUQAMAR S, YU D Q, LIU S Y, ZHOU G K, CHAI G H. The *Ara-bidopsis* CCCH protein C3H14 contributes to basal defense against *Botrytis cinerea* mainly through the WRKY33-dependent pathway[J]. Plant, Cell & Environment, 2020, 43(7): 1792-1806.
- [29] LI C H, FANG Q X, ZHANG W J, LI Y H, ZHANG J Z, CHEN S, YIN Z G, LI W J, LIU W D, YI Z, MU Z S, DU J D. Genome-wide identification of the CCCH gene family in rose (*Rosa chinensis* Jacq.) reveals its potential functions[J]. Biotechnology & Bioindustry, 2021, 35(1): 517-526.
- [30] WANG H Z, YANG K Z, ZOU J J, ZHU L L, XIE Z D,

- MORITA M T, TASAKA M, FRIML J, GROTEWOLD E, BEECKMAN T. Transcriptional regulation of *PIN* genes by FOUR LIPS and MYB88 during *Arabidopsis* root gravitropism[J]. Nature Communications, 2015, 6: 8822.
- [31] WANG Z H, LI J J, WANG C Z, FENG L J, YIN Y L. Molecular cloning and functional characterization of FOUR LIPS in pomegranate, a protein involved in regulating the gravitropic set-point angle of adventitious roots[J]. Journal of Plant Biology, 2022, 65(5): 377-387.
- [32] TONG B T, LIU Y L, WANG Y C, LI Q Z. PagMYB180 regulates adventitious rooting via a ROS/PCD-dependent pathway in poplar[J]. Plant Science, 2024, 346: 112115.
- [33] WANG H Z, PAK S, YANG J, WU Y, LI W L, FENG H, YANG J L, WEI H R, LI C H. Two high hierarchical regulators, *PuMYB40* and *PuWRKY75*, control the low phosphorus driven adventitious root formation in *Populus ussuriensis*[J]. Plant Biotechnology Journal, 2022, 20(8): 1561-1577.