

# 原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者（需亲笔）签名： 罗真真 2022 年 5 月 25 日

# 学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权南京农业大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编学位论文。

保密☒，在2年解密后适用本授权书。本学位论文属于不保密☐.

（请在以上方框内打“√”）

学位论文作者（需亲笔）签名： 罗真真 2022 年 5 月 25 日

导师（需亲笔）签名： 陈爱群 2022 年 5 月 25 日

# 目 录

|                                                     |     |
|-----------------------------------------------------|-----|
| 摘 要.....                                            | I   |
| ABSTRACT.....                                       | III |
| 英文缩略符及中英文对照表.....                                   | VII |
| 第一章 文献综述.....                                       | 1   |
| 1 引言 .....                                          | 1   |
| 2 植物磷营养研究进展 .....                                   | 2   |
| 2.1 植物对低磷胁迫的适应性 .....                               | 2   |
| 2.2 缺磷转录系统的研究进展 .....                               | 2   |
| 3 植物类黄酮研究进展 .....                                   | 3   |
| 3.1 植物类黄酮的生物学功能与逆境生理 .....                          | 3   |
| 3.2 植物类黄酮合成调控研究进展 .....                             | 4   |
| 4 植物菌根共生研究进展 .....                                  | 5   |
| 4.1 植物菌根共生与逆境生理 .....                               | 5   |
| 4.2 菌根共生调控研究进展 .....                                | 5   |
| 5 植物磷素吸收利用与类黄酮合成、菌根共生存在交互作用 .....                   | 6   |
| 5.1 类黄酮对植物磷素吸收利用的调控 .....                           | 6   |
| 5.2 丛枝菌根系统中的磷素吸收利用 .....                            | 7   |
| 5.3 类黄酮对植物菌根共生的调控 .....                             | 7   |
| 6 研究的意义和技术路线 .....                                  | 8   |
| 6.1 研究目的和意义 .....                                   | 8   |
| 6.2 技术路线图 .....                                     | 9   |
| 第二章 <i>NtLZ3</i> 和 <i>NtLZ5</i> 克隆、生信分析和表达模式分析..... | 11  |
| 1 引言 .....                                          | 11  |
| 2 材料和方法 .....                                       | 11  |
| 2.1 实验材料与试剂 .....                                   | 11  |
| 2.2 <i>NtLZ3</i> 和 <i>NtLZ5</i> 的表达模式分析.....        | 12  |
| 2.3 <i>NtLZ3</i> 和 <i>NtLZ5</i> 基因的克隆.....          | 12  |
| 2.4 <i>NtLZ3</i> 和 <i>NtLZ5</i> 基因的生物信息学分析.....     | 13  |
| 2.5 <i>NtLZ3</i> 和 <i>NtLZ5</i> 基因的亚细胞定位.....       | 13  |

|                                                                  |                                                       |           |
|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------|
| 2.6                                                              | <i>NtLZ3</i> 和 <i>NtLZ5</i> 基因的转录活性分析.....            | 13        |
| 2.7                                                              | <i>NtLZ3</i> 和 <i>NtLZ5</i> 的组织表达模式分析.....            | 14        |
| 2.8                                                              | LC-MS 采集条件.....                                       | 14        |
| 2.9                                                              | 菌根真菌的接种实验.....                                        | 14        |
| 2.10                                                             | 丛枝菌根侵染指标统计.....                                       | 14        |
| 2.11                                                             | 烟草 RNA 的提取以及 cDNA 的合成.....                            | 14        |
| 2.12                                                             | 数据统计分析.....                                           | 14        |
| 3                                                                | 结果与分析.....                                            | 15        |
| 3.1                                                              | <i>NtLZ3</i> 和 <i>NtLZ5</i> 的发现.....                  | 15        |
| 3.2                                                              | <i>NtLZ3</i> 和 <i>NtLZ5</i> 的表达模式分析.....              | 17        |
| 3.3                                                              | <i>NtLZ3</i> 和 <i>NtLZ5</i> 基因的克隆.....                | 19        |
| 3.4                                                              | <i>NtLZ3</i> 和 <i>NtLZ5</i> 的生物信息学分析.....             | 19        |
| 3.5                                                              | <i>NtLZ3</i> 和 <i>NtLZ5</i> 基因的亚细胞定位分析.....           | 22        |
| 3.6                                                              | <i>NtLZ3</i> 和 <i>NtLZ5</i> 基因的转录活性分析.....            | 22        |
| 3.7                                                              | <i>NtLZ3</i> 和 <i>NtLZ5</i> 的组织表达模式分析.....            | 23        |
| 4                                                                | 讨论.....                                               | 24        |
| <b>第三章 <i>NtLZ3</i> 和 <i>NtLZ5</i> 沉默对烟草磷素吸收利用和类黄酮合成的影响.....</b> |                                                       | <b>27</b> |
| 1                                                                | 引言.....                                               | 27        |
| 2                                                                | 材料和方法.....                                            | 27        |
| 2.1                                                              | 实验材料与试剂.....                                          | 27        |
| 2.2                                                              | <i>NtLZ3</i> -VIGS 载体和 <i>NtLZ5</i> -VIGS 载体的构建.....  | 28        |
| 2.3                                                              | 利用 VIGS 系统创建沉默材料以及对应沉默材料的鉴定.....                      | 28        |
| 2.4                                                              | 烟草磷含量测定.....                                          | 28        |
| 2.5                                                              | 烟草黄酮含量测定.....                                         | 29        |
| 2.6                                                              | 烟草类黄酮代谢通路关键基因 qRT-PCR 分析.....                         | 29        |
| 2.7                                                              | 菌根真菌的接种实验.....                                        | 29        |
| 2.8                                                              | 丛枝菌根侵染指标统计.....                                       | 29        |
| 2.9                                                              | 数据统计分析.....                                           | 30        |
| 3                                                                | 结果与分析.....                                            | 30        |
| 3.1                                                              | <i>NtLZ3</i> 和 <i>NtLZ5</i> 沉默对烟草磷素吸收利用和类黄酮合成的影响..... | 30        |
| 3.2                                                              | <i>NtLZ5</i> 沉默对烟草菌根共生体系的影响.....                      | 34        |
| 4                                                                | 讨论.....                                               | 36        |

|                                                            |    |
|------------------------------------------------------------|----|
| 第四章 <i>NtLZ3</i> 和 <i>NtLZ5</i> 过表达对烟草磷素吸收利用和类黄酮合成的影响..... | 39 |
| 1 引言 .....                                                 | 39 |
| 2 材料和方法 .....                                              | 39 |
| 2.1 实验材料与试剂 .....                                          | 39 |
| 2.2 构建 <i>NtLZ3</i> 和 <i>NtLZ5</i> 过表达载体.....              | 39 |
| 2.3 <i>NtLZ3</i> 和 <i>NtLZ5</i> 过表达材料的创制.....              | 40 |
| 2.4 <i>NtLZ3</i> 和 <i>NtLZ5</i> 过表达材料阳性苗的鉴定.....           | 40 |
| 2.5 烟草总磷含量的测定 .....                                        | 40 |
| 2.6 烟草类黄酮含量测定 .....                                        | 40 |
| 3 结果与分析 .....                                              | 41 |
| 3.1 <i>NtLZ3</i> 和 <i>NtLZ5</i> 过表达材料的鉴定.....              | 41 |
| 3.2 <i>NtLZ3</i> 和 <i>NtLZ5</i> 过表达对烟草类黄酮含量的影响.....        | 42 |
| 3.3 <i>NtLZ3</i> 和 <i>NtLZ5</i> 过表达对烟草总磷含量的影响.....         | 44 |
| 4 讨论 .....                                                 | 45 |
| 全文结论.....                                                  | 47 |
| 创新点.....                                                   | 49 |
| 参考文献.....                                                  | 51 |
| 附 录.....                                                   | 61 |
| 在读期间发表的论文.....                                             | 77 |
| 致 谢.....                                                   | 79 |

# 烟草中参与磷素调控类黄酮合成的候选转录因子的 功能鉴定

## 摘 要

磷是植物生长发育所需的三大营养元素之一，由于磷在土壤中容易被固定且移动性较低，使得植物长期处于低磷或缺磷环境中，影响植物的生长发育。为了应对低磷胁迫的土壤环境，植物进化出了各种各样的适应机制，包括与丛枝菌根真菌建立共生关系、改变根系构型和增加类黄酮等信号物质等。黄酮类化合物是植物中重要的次生代谢产物，参与植物应对多种环境胁迫过程。在低磷胁迫下能够促进植物体内总黄酮化合物的合成和积累，但其中的分子机制尚不健全。低磷条件下更利于植物形成菌根共生系统，以帮助其更加有效地吸收磷营养。有研究发现，低浓度的类黄酮可以刺激丛枝菌根真菌孢子萌发并且促进菌丝分支，表明类黄酮可能参与丛枝菌根的共生过程。这些结果表明植物磷素吸收利用与类黄酮合成、菌根共生可能存在交互作用，但是其分子机制还有待进一步深入研究。

烟草是世界范围内的主要经济作物，烟叶中含有丰富的黄酮类化合物，并且类黄酮也是影响烟草品质的关键因素。另一方面烟草与丛枝菌根真菌建立共生体对其品质和产量的发展具有重要意义。本课题组前期通过 EMS 诱变筛选获得了一个磷高效型烟草纯合突变体（低磷条件下突变体磷含量显著高于野生型而黄酮类物质含量显著低于野生型烟草），通过转录组分析突变体与野生型之间的差异表达基因，初步筛选到可能参与磷素调控类黄酮合成的 2 个候选转录因子 *NtLZ3* 和 *NtLZ5*，通过生物信息学分析、表达模式分析、基因沉默和基因过表达对磷素吸收利用和类黄酮合成等几个方面对 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 的功能进行深入研究，有望通过本研究为提高烟草应对低磷胁迫的能力提供新的思路。主要研究结果如下：

1. 生物信息学分析发现，*NtLZ3* 位于烟草基因组第 19 号染色体上，编码一个由 291 个氨基酸组成的蛋白质；*NtLZ5* 位于第 12 号染色体上，编码一个由 422 个氨基酸组成的蛋白质。系统进化树分析和氨基酸序列分析发现 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 是 R2R3 型 MYB 家族转录因子。表达模式分析发现 *NtLZ3* 在烟草根部和叶片受缺磷诱导表达下调，在接种丛枝菌根真菌的根中表达量显著上调；*NtLZ5* 在根部受缺磷诱导上调，而在叶片和接种 AM 真菌的根中受到缺磷下调表达。

2. 亚细胞定位结果表明 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 均定位在细胞核中。通过对 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 进行转录激活活性分析，结果表明 *NtLZ3* 具有酵母转录激活活性，*NtLZ5* 不具

有酵母转录激活活性。*NtLZ3* 和 *NtLZ5* 的时空表达模式分析发现, *NtLZ3* 在盛花期和苗期均在叶片中表达量最高, 而 *NtLZ5* 在苗期时主要在茎中表达量最高, 进入盛花期后, 在花、雄蕊、雌蕊中表达量较高。

3. 通过 VIGS 技术创制 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 沉默株系, 并进行正常供磷 (0.5mM Pi, +P) 和低磷 (10 $\mu$ M Pi, -P) 处理, 结果表明在正常供磷条件下与空载相比, *ntlz3* 沉默株系叶片中的类黄酮含量显著增加, 总磷含量显著下降。而在低磷条件下 *ntlz3* 沉默株系中的类黄酮和总磷含量与空载对照相比无明显差异。对类黄酮代谢通路关键基因进行定量分析发现, *ntlz3* 沉默显著增强了 *Nt4CL* 基因的表达。另一方面与空载相比, 正常供磷条件下 *ntlz5* 沉默导致叶片中类黄酮和总磷含量显著降低。而在低磷条件下 *ntlz5* 沉默株系中类黄酮含量和总磷含量与空载相比无显著差异。对 *ntlz5* 沉默株系进行 AM 真菌接种实验, 结果显示 *ntlz5* 沉默并不影响菌根的侵染效率和丛枝的丰度。

4. 利用农杆菌介导的烟草转基因技术, 获得了 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 过表达转基因材料。在正常供磷处理条件下 *NtLZ5* 过表达材料与野生型相比烟草叶片总磷和类黄酮含量显著增加, 而根部总磷和类黄酮含量与野生型相比无明显差异。对类黄酮代谢通路关键基因进行定量分析, 结果显示与野生型相比 *NtLZ5* 过表达材料中 *NtCHS*, *NtCHI*, *NtPAL*、*Nt4CL* 基因表达水平发生显著变化。另一方面, 正常供磷条件下 *NtLZ3* 过表达也能够显著增加烟草根部类黄酮含量, 对应根部磷含量显著降低。在低磷条件下 *NtLZ3* 过表达材料与野生型相比根部类黄酮含量显著降低, 根部磷含量显著升高, 而叶片总磷和类黄酮含量与野生型相比无明显差异。对类黄酮代谢通路关键基因进行定量分析发现, *NtLZ3* 过表达影响 *NtANS*、*Nt4CL* 基因表达水平。

综上所述, 本研究从生物信息学分析、表达模式分析、亚细胞定位分析、创制过表达和沉默株系等方面对 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 在磷素吸收利用和类黄酮合成中可能发挥的功能进行研究, 初步结果发现, *NtLZ3* 可能是烟草应对低磷胁迫的关键转录因子, 与前期实验室得到的磷高效突变体 (低磷条件下突变体磷含量显著高于野生型而黄酮类物质含量显著低于野生型烟草) 相对应, 有可能是影响突变体表型的转录因子; 而 *NtLZ5* 可能正调控烟草类黄酮合成和磷素吸收。该研究为烟草应对低磷胁迫以及类黄酮合成提供了新的思路, 具有较为重要的意义。

**关键词:** 烟草; 磷素; 类黄酮; 菌根共生; *NtLZ3*; *NtLZ5*

# **FUNCTIONAL IDENTIFICATION OF CANDIDATE TRANSCRIPTION FACTORS INVOLVED IN PHOSPHORUS-REGULATED FLAVONOID SYNTHESIS IN TOBACCO**

## **ABSTRACT**

Phosphorus is one of the three major nutrients required for plant growth and development. Because phosphorus is easily fixed in the soil and has low mobility, plants are kept in a low-phosphorus or phosphorus-deficient environment for a long time, which affects the growth and development of plants. In order to cope with the soil environment of low phosphorus stress, plants have evolved a variety of adaptive mechanisms, including forming symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi, changing root architecture, and increasing signaling substances such as flavonoids. Flavonoids are important secondary metabolites in plants and participate in the process of plants responding to various environmental stresses. Under low phosphorus stress, it can promote the synthesis and accumulation of total flavonoids in plants, but the molecular mechanism is not yet perfect. Under low phosphorus conditions, it is more favorable for plants to form a mycorrhizal symbiotic system to help them absorb phosphorus nutrients more efficiently. Studies have found that low concentrations of flavonoids can stimulate spore germination of arbuscular mycorrhizal fungi and promote mycelial branching, indicating that flavonoids may be involved in the symbiotic process of arbuscular mycorrhizal fungi. These results indicate that plant phosphorus absorption and transport may interact with flavonoid synthesis and mycorrhizal symbiosis, but the molecular mechanism needs to be further studied.

Tobacco is a major economic crop worldwide, and tobacco leaves are rich in flavonoids, and flavonoids are also a key factor affecting tobacco quality. On the other hand, the establishment of symbionts between tobacco and arbuscular mycorrhizal fungi is of great significance to the development of quality and yield. Our research group obtained a phosphorus-efficient tobacco homozygous mutant (under low phosphorus conditions, the phosphorus content of the mutant was significantly higher than that of wild-type tobacco and the flavonoid content was significantly lower than that of wild-type tobacco) through EMS mutagenesis screening. The differentially expressed genes between wild-type and wild-type were analyzed, and two candidate transcription factors *NtLZ3* and *NtLZ5* that may be

involved in phosphorus regulation of flavonoid synthesis were initially screened. Through bioinformatics analysis, expression pattern analysis, gene silencing and overexpression of phosphorus The functions of *NtLZ3* and *NtLZ5* were deeply studied in the aspects of absorption and flavonoid synthesis. This study is expected to provide new ideas for improving the ability of tobacco to cope with low phosphorus stress. The main findings are as follows:

1. Bioinformatics analysis found that *NtLZ3* is located on chromosome 19 of the tobacco genome, encoding 291 amino acids; *NtLZ5* is located on chromosome 12, encoding 422 amino acids. Phylogenetic tree analysis and amino acid sequence analysis revealed that *NtLZ3* and *NtLZ5* were R2R3-type MYB family transcription factors. Expression pattern analysis showed that *NtLZ3* was down-regulated in tobacco roots and leaves under phosphorus deficiency, and significantly up-regulated in roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi; *NtLZ5* was up-regulated in roots by phosphorus deficiency, but was up-regulated in leaves and roots inoculated with AM fungi. Expression is down-regulated by phosphorus deficiency.

2. The results of subcellular localization showed that both *NtLZ3* and *NtLZ5* were localized in the nucleus. By analyzing the transcriptional activation activity of *NtLZ3* and *NtLZ5*, the results showed that *NtLZ3* has yeast transcriptional activation activity, and *NtLZ5* don't have yeast transcriptional activation activity. The spatiotemporal expression pattern analysis of *NtLZ3* and *NtLZ5* found that *NtLZ3* was expressed at the highest level in leaves at both flowering and seedling stages, while *NtLZ5* was mainly expressed at the highest level in stems at seedling stage. high expression level.

3. The *NtLZ3* and *NtLZ5* silenced lines were created by VIGS technology, and treated with normal phosphorus supply (0.5mM Pi, +P) and low phosphorus (10μM Pi, -P), the results showed that under normal phosphorus supply conditions, the cells were in phase with empty cells. Compared with the *ntlz3* lines, the flavonoid content in leaves was significantly increased, and the total phosphorus content was significantly decreased. However, the flavonoids and total phosphorus contents of *ntlz3* lines were not significantly different from those of the empty control under low phosphorus conditions. Quantitative analysis of key genes in the flavonoid metabolic pathway found that *ntlz3* significantly enhanced the expression of *Nt4CL* genes. Silencing of *ntlz5* under normal phosphorus supply conditions resulted in significantly lower flavonoid and total phosphorus contents in leaves compared with no load. However, the content of flavonoids and total phosphorus in the *ntlz5* lines under

low phosphorus conditions were not significantly different from those in the blank. The AM fungal inoculation experiment was performed on *ntlz5* lines, and the results showed that *ntlz5* did not affect the infection efficiency of mycorrhiza and the abundance of arbuscules.

4. Using *Agrobacterium*-mediated tobacco transgenic technology, *NtLZ3* and *NtLZ5* overexpression transgenic materials were obtained. Compared with the wild type, *NtLZ5* overexpression material significantly increased the contents of total phosphorus and flavonoids in tobacco leaves under normal phosphorus supply conditions, but there was no significant difference in the contents of total phosphorus and flavonoids in roots. Quantitative analysis of key genes in the flavonoid metabolic pathway showed that the expression levels of *NtCHS*, *NtCHI*, *NtPAL* and *Nt4CL* genes in *NtLZ5* overexpressed materials changed significantly compared with wild type. On the other hand, overexpression of *NtLZ3* under normal phosphorus supply conditions can also significantly increase the content of flavonoids in roots, corresponding to a significant decrease in the content of phosphorus in roots. Compared with the wild type, the *NtLZ3* overexpression material significantly decreased the root flavonoid content and significantly increased the root phosphorus content under low phosphorus conditions. Quantitative analysis of key genes in the flavonoid metabolic pathway showed that overexpression of *NtLZ3* affected the expression levels of *NtANS* and *Nt4CL*.

In conclusion, this study investigated the possible functions of *NtLZ3* and *NtLZ5* in phosphorus absorption and flavonoid synthesis from the aspects of bioinformatics analysis, expression pattern analysis, subcellular localization analysis, and creation of overexpressed and silenced lines. Preliminary results found that *NtLZ3* may be a key transcription factor in tobacco response to low phosphorus stress, which is in agreement with the phosphorus efficient mutant obtained in the previous laboratory (under low phosphorus conditions, *dng* phosphorus content is significantly higher than that of HD and the flavonoid content is significantly lower than that of HD). It may be a transcription factor affecting the mutant phenotype; while *NtLZ5* may positively regulate tobacco flavonoid synthesis and phosphorus absorption. This study provides a new idea for tobacco to cope with low phosphorus stress and flavonoid synthesis, which is of great significance.

**KEY WORDS:** Tobacco; Phosphorus; Flavonoids; Mycorrhizal symbiosis; *NtLZ3*; *NtLZ5*

## 英文缩略符及中英文对照表

| 英文缩写               | 英文名称                                   | 中文名称          |
|--------------------|----------------------------------------|---------------|
| Amp                | Ampicillin                             | 氨苄青霉素         |
| Kan                | Kanamycin                              | 卡那霉素中文名称      |
| ddH <sub>2</sub> O | Double distilled water                 | 双蒸馏水          |
| DNA                | Deoxyribonucleic acid                  | 脱氧核糖核酸        |
| CDS                | Coding domain sequence                 | 基因编码序列        |
| PCR                | Polymerase chain reaction              | 聚合酶链式反应       |
| cDNA               | Complementary DNA                      | 互补 DNA        |
| AS                 | Acetosyringone                         | 乙酰丁香酮         |
| rpm                | Revolutions per minute                 | 转/分钟          |
| LB                 | Luria-bertani medium                   | LB 培养基        |
| PH                 | Pondus hydrogenii                      | 氢氧离子浓度指数      |
| bp                 | Base pair                              | 碱基对           |
| Rif                | Rifampin                               | 利福平           |
| WT                 | Wild type                              | 野生型           |
| qRT-PCR            | Quantitative reverse transcription-PCR | 实时荧光定量 PCR    |
| CHI                | Chalcone isomerase                     | 查尔酮异构酶        |
| CHS                | Chalcone synthase                      | 查尔酮合成酶        |
| 4CL                | 4-coumaroyl:CoA-ligase                 | 4-香豆酸 CoA 连接酶 |
| FLS                | Flavonol synthase                      | 黄酮醇合成酶        |
| F3H                | Flavonoid-3-hydroxylase                | 黄烷酮-3-羟化酶     |
| MYB                | v-myb an myeloblastosis viral          | MYB 转录因子      |
| ANS                | Anthocyanidin synthase                 | 花青素合成酶        |

# 第一章 文献综述

## 1 引言

无机磷是植物生长发育所必需的大量营养元素，它不仅在 DNA、RNA、ATP 和磷脂中起到结构作用，还在一些植物重要的生理过程中起到调节作用，其中包括植物的光合作用、呼吸作用、蛋白质活化和能量代谢等生理过程（Akiyama *et al.*, 2002）。磷通常由磷转运蛋白吸收，以无机磷的形式被植物细胞和组织吸收、同化利用（Balzergue *et al.*, 2013）。在自然环境中植物面对逆境胁迫时会利用适应性机制完成生命过程，这是生物适应自然环境的表现，植物面对的逆境胁迫主要为缺素、高温、缺水等情况。植物对于磷素的吸收和利用主要是以无机磷的形式，由于土壤中的磷化学反应固定率高、扩散速度较慢以及有效性较低，使得作物生长的大部分土壤环境低磷或缺磷。在这种情况下，一部分植物与菌根真菌形成共生体，以帮助其更加有效地吸收磷营养（Harrison *et al.*, 2002）。菌根真菌帮助宿主植物吸收土壤中的水分和营养元素，同时作为交换宿主植物可以为菌根真菌提供生命活动所必需的糖分和脂肪酸（Dickson *et al.*, 2007）。植物与菌根共生系统的建立受到复杂的分子机制调控，在菌根共生体系中报导了许多受菌根共生诱导表达并且能够在菌根共生系统中转运磷元素的磷酸盐转运蛋白（Harrison *et al.*, 1995）。

类黄酮是植物根系分泌物的重要组成成分，在植物与根际微生物互作过程中起着重要的作用（Akiyama *et al.*, 2010）。植物在面对外界环境胁迫时类黄酮的合成代谢途径被显著激活，黄酮类物质大量积累。有研究表明磷素养分的缺乏会诱导拟南芥黄酮类化合物代谢途径中的下游花青素合成途径基因的表达显著上调，使得拟南芥叶片中花青素大量积累而呈现出紫叶的状态（Nilsson *et al.*, 2012）。研究发现类黄酮还影响植物与菌根真菌共生系统的建立，寄主植物根部释放的低浓度类黄酮可以促进菌根真菌孢子的萌发和菌丝的生长分支（Baier *et al.*, 2010）。黄酮类化合物可以通过调节植物-微生物的相互作用来促进或抑制植物的生长，也可以作为固氮豆科植物-根瘤菌共生中的信号即作为为根瘤菌的特异性化学引诱剂（Cesco *et al.*, 2020）。反过来菌根真菌也可以通过影响类黄酮代谢通路关键基因的表达来影响寄主植物分泌类黄酮的种类、分泌量和性质（Parniske *et al.*, 2008）。

本章将会从植物磷素吸收利用与类黄酮合成、菌根共生这三个方面进行讨论，意为引出本篇论文讨论的研究观点，明确作用机制并充分利用该优势提高植物抵抗外界低磷胁迫的能力。

## 2 植物磷营养研究进展

### 2.1 植物对低磷胁迫的适应性

磷素作为植物生长必需的营养元素之一，是机体进行基本生物功能的一个重要结构元素（Chen *et al.*, 2011）。它不仅是核酸、磷脂和 ATP 等生物大分子的关键组成成分，也是影响机体进行呼吸作用、能量储存和转移、信号转导和控制关键酶反应等过程的重要营养元素（Harrison *et al.*, 2015）。由于磷单质具有很强的化学活性并且容易与环境介质中的物质反应，土壤中的磷在酸性条件下会迅速与阳离子形成不溶性复合物，所以土壤中的大多数磷是分布不均匀并且不易获得的，植物生长发育过程中易缺磷。磷通常以磷酸盐的形式存于大自然中，这些磷酸盐在溶解度上有很大的差异，这些磷酸盐随着时间的改变往往从微溶状态转变为难溶状态。此外自然界中磷循环的速度非常缓慢，土壤中大部分的磷很难可以浸出，土壤中的磷难以满足植物的生长需求。植物磷营养的缺乏会损害生物大分子的生成和各种其他生物过程，更可能导致严重的细胞损伤和机体生长迟缓等状况（Hassan *et al.*, 2011）。

在低磷或缺磷的情况下，植物为提高自身获取和使用磷的效率，在形态建成、生理生化以及分子生物学等方面形成一套适应性机制，主要包括：通过改变自身根系的结构、刺激根系的生长；黄酮类化合物花青素的积累；与菌根真菌建立共生关系，增强植物与菌根真菌的共生；高亲和磷酸盐转运蛋白基因的表达增强，利用复杂的分子调控网络控制植物对磷的吸收、转运和再利用。研究发现植株中同时具有高亲和磷酸盐转运系统和低亲和的磷酸盐转运系统（Parniske *et al.*, 2005）。在形态学方面，由于植物根系处于干旱和营养匮乏等不断变化的环境中，所以植物根系在缺磷状态下会发生根系形态结构的变化，侧根和根毛生长变得旺盛，根冠比发生改变；除了根系形态的改变，植物也会调整自身的生理生化进程，例如分泌酸性磷酸酶等，活化土壤有机磷；最后在分子生物学方面，植物在受到缺磷胁迫时，可以影响缺磷相关转录因子，这些转录因子正向或负向调控下游缺磷相应基因，以此影响植物磷素稳态。

现如今提倡绿色农业，磷肥的过量使用会导致环境污染，研究从植物自身方面应对缺磷状况，降低农业磷肥使用量，推动我国绿色农业可持续发展。

### 2.2 缺磷转录系统的研究进展

植物在缺磷环境中可以在转录水平上调控众多基因的表达以便在生理代谢、形态学等方面做出相关的适应性调整。植物在面对低磷胁迫时做出的一系列形态发育和生理生化的应答反应，很大程度上受到转录因子的调控，在这个过程中大量基因的表达上调或者受到抑制。迄今为止，在植物中发现越来越多转录因子响应植物缺磷信号，

并且参与维持植物体内磷素的动态平衡过程。其中主要有 WRKY、MYB、PHR 和 ZAT 等家族。植物在缺磷状态下同时受到正向和负向调控转录因子的共同作用，PHT 家族属于高亲和力磷转运蛋白，在低磷胁迫条件下其表达明显上调，在低磷胁迫下在磷吸收和转运中起关键作用（Wang *et al.*, 2021）。一些 WRKY 转录因子例如拟南芥中的 *WRKY45*、马尾松中的 *WRKY164* 和水稻中的 *WRKY74* 对植物缺磷胁迫有积极作用，正调控植物对磷的吸收利用（Chen *et al.*, 2011）；一些 WRKY 转录因子在应对低磷胁迫时也会起到负调控作用，拟南芥中的 *AtWRKY42* 和 *AtWRKY6* 与缺磷基因 *AtPHO1* 相结合可以抑制 *AtPHO1* 的表达，以此负调控拟南芥对磷的吸收转运（Harrison *et al.*, 1995）。研究发现拟南芥的 R2R3 型 MYB 转录因子 *AtMYB62* 在其过表达状态下显著提升了拟南芥对磷素的吸收利用（Floss *et al.*, 2013）。Harrison 等人发现低磷条件下拟南芥 MYB 转录因子 *PHR1* 基因可以通过正向调控 *PT1* 和 *PT2* 基因的表达来增强对磷的吸收利用。在植物的缺磷胁迫的适应性机制中植物受到多个磷饥饿诱导基因的控制，多个转录因子家族与植物应答缺磷胁迫有关，从分子水平上可以提高植物的胁迫耐受性，并以此促进作物产业发展，具有重要的现实意义。

### 3 植物类黄酮研究进展

#### 3.1 植物类黄酮的生物学功能与逆境生理

类黄酮也叫做黄酮类化合物，类黄酮作为植物中分布广泛的次生代谢产物，广泛参与植物的生长发育、生物与非生物逆境胁迫等生理活动。目前已发现超过 9000 余种黄酮类化合物，主要分为查尔酮类、黄酮醇类、黄酮类、黄烷酮类和花青素等大类（Barros *et al.*, 2000）。核心的黄酮类化合物结构由 15 个碳原子组成，其基本骨架是由两个苯环通过三个碳原子互相联结而成的二苯基色原酮(C6-C3-C6)。类黄酮具有多种生理生化功能，例如参与植物生长发育过程中的防御和抗逆机制（王立萍等, 2015）；调节植物生长素运输；提高植物对营养元素氮素、磷素的利用率（Cesco *et al.*, 2020）；参与植物抵御外界紫外线和病原体攻击；影响烟草香气品质等（邢文等, 2015）。

在遭遇如强烈的紫外辐射、高盐、低温和金属毒性等逆境胁迫时，植物的类黄酮合成代谢途径被显著激活，黄酮类物质大量积累，所以认为黄酮类物质是植物为抵御环境胁迫而出现的一种保护性物质（Cesco *et al.*, 2020）。研究发现在拟南芥受到低温胁迫时，其叶片中的黄酮醇和花青素含量会急剧升高而呈现出紫色的状态，该表型也被作为其是否受环境胁迫的重要指标（Birt *et al.*, 2013）。植物叶表层细胞黄酮类物质的积累可以降低组织细胞的凝固点，以此提高植株对低温的耐受力（Liu *et al.*, 2010）。贾宏昉等发现野生型烟草在缺磷状态下，缺磷烟草叶片中总黄酮含量显著升高，类黄

酮代谢通路关键基因 *CHS*、*CHI*、*F3H*、*F3'H* 和 *FLS* 的表达水平显著增加(Jia *et al.*, 2015), 结果表明黄酮类物质参与植物缺磷胁迫过程。

### 3.2 植物类黄酮合成调控研究进展

在植物的次生代谢途径中, 类黄酮的代谢途径目前研究比较明确, 其主要通过苯丙烷代谢途径和黄酮类代谢途径形成的多酚类化合物。类黄酮合成首先是通过莽草酸途径得到 L-苯丙氨酸, 然后进入苯丙烷类代谢途径, 依次由苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)、肉桂酸 4 羟化酶(cinnamate 4-hydroxylase, C4H)、4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4-coumarate: coenzyme A ligase, 4CL) 连续的催化, 最终形成类黄酮合成的底物: 4-香豆酰辅酶 A (4-Coumaroyl-CoA), 4-香豆酸-CoA 通过查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS) 进入类黄酮合成代谢途径, 再由查耳酮异构酶(chalcone isomerase, CHI) 等其他途径基因的调控, 最终形成不同种类的黄酮类化合物。同时类黄酮的骨架可以通过糖基化、丙二酰化、甲基化、羟化、酰化、戊烯化或聚合来修饰, 最终形成黄酮化合物的多样性(单丽伟等, 2012)。

植物类黄酮的合成受到外界环境因素和自身转录因子的调控, 研究发现葡萄在遮光处理下果皮的黄酮醇浓度显著降低, 黄酮醇代谢通路关键基因的转录水平显著降低。一方面外界温度、CO<sub>2</sub> 浓度、环境营养元素浓度和种类等都会影响植物类黄酮的合成; 另一方面类黄酮代谢通路基因的表达受到多种转录因子的调控(安秀红, 2013)。植物类黄酮的合成代谢主要受 R2R3-MYB 蛋白、bHLH 蛋白、WDR 蛋白的调节, 其中 MYB 家族中的三个亚组分别被确定为植物花青素、黄烷醇和黄酮醇代谢途径的典型激活剂。MYB 转录因子家族在植物应对生物和非生物胁迫、生长发育、代谢和细胞分化等多个方面起到了重要作用, 例如银杏中 *GbMYBF2* 转录因子负调控黄酮类化合物的合成(Xu *et al.*, 2014)。bHLH 蛋白可以调节植物花器官生长发育、表皮细胞分化和黄酮类化合物合成; R2R3 型的 MYB 转录因子参与类黄酮生物合成途径中的苯丙烷代谢途径, 可以激活植物中花青素生物合成途径中的结构基因; WDR 在细胞凋亡、蛋白质运输、转录机制中发挥作用(Li *et al.*, 2015)。其中类黄酮生物合成受到 R2R3-MYB 蛋白 MYB11、MYB12 和 MYB111 的调控, MYB11、MYB12 和 MYB111 可以激活类黄酮生物合成关键基因 *CHS*、*CHI*、*F3H*、*F3'H* 和 *FLS* 的表达(Salloum *et al.*, 2018)。

## 4 植物菌根共生研究进展

### 4.1 植物菌根共生与逆境生理

丛枝菌根真菌（AMF）广泛分布于自然界，可以与陆地生态系统中 80%以上的植物根系形成共生体。丛枝菌根真菌作为自然生态系统的重要组成部分，它们对植物的生长和生产有很大的影响。AMF 共生可以促进寄主植物的生长、提高产量、促进寄主植物吸收和利用土壤中的氮磷钾等营养元素，在缺磷条件下菌根真菌的作用更为明显；另一方面植物可以将光合作用产物输送给真菌供其生长（Akiyama *et al.*, 2000）。植物主要通过两种形式吸收营养，一是通过自身根毛直接吸收土壤中的养分，这也是大部分植物吸收养分的主要途径。二是植物与土壤中的微生物形成共生体来更有效地从土壤中吸收养分。菌根的形成最先开始于植物和丛枝菌根真菌之间共生信号的交流，菌根真菌的菌丝受到植物根系分泌的信号分子独脚金内酯刺激进而发育产生分枝并分泌信号分子即菌根因子，与此同时菌根真菌自身会分泌脂质几丁寡糖促使形成菌根。根据植物中菌根真菌的定殖位置和生长形态可以将其分为内生菌根、外生菌根和内外生菌根（Brundrett *et al.*, 2017）。

研究表明植物与菌根真菌共生体的生成可以显著提高宿主植物抵抗外界生物或非生物胁迫的能力（Parniske *et al.*, 2008）。研究发现菌根共生体系的的形成促进植物的生长发育，可以增强宿主植物对水胁迫和盐碱胁迫等非生物胁迫的耐受性以及具备对传播土壤疾病的病原体的抗性功能（Cavagnaro *et al.*, 2001）。植物释放的独脚金内酯可以刺激菌根真菌释放菌根因子进而产生分支，最终促进菌根共生，而磷营养和氮营养的缺乏会刺激植物产生独脚金内酯，所以植物在处于磷素缺乏的状态时能够促进菌根共生的形成（Lopez-Raez *et al.*, 2008）。

### 4.2 菌根共生调控研究进展

植物与丛枝菌根真菌建立共生体系涉及一系列的信号分子识别与交流，这个过程受到植物和真菌的调控。人们通过分子生物学等技术在研究丛枝菌根发育过程中的信号通路及代谢途径的分子机制取得了突破性的成果。植物可以通过菌根共生系统提高自身应对生物和非生物胁迫的能力，植物与菌根真菌共生系统的形成不仅受到外界环境因素的影响同时也受到自身因素的影响，植物激素、类黄酮、温度、水分等都会对共生效果产生影响（Bonfante *et al.*, 2000），而类黄酮与植物菌根真菌孢子的萌发和菌丝的生长有关（Akiyama *et al.*, 2000）。化学信号也参与植物与菌根真菌的共生，真菌可以通过释放的一些易挥发的有机复合物改变根系构型，进而影响寄主植物的防御系统。同时从植物分子生物学方面，菌根共生涉及到极其复杂的分子调控网络，越来越

多的基因被报道参与到菌根信号转导途径中,例如 *DMI* 基因, *GRAS* 基因家族、*NUP*、*NENA*、部分菌根诱导表达的磷酸盐转运蛋白基因和一些位于环丛枝膜上对于菌根共生体系中营养交换至关重要的蛋白转运体。研究发现 *GRAS* 转录因子家族在菌根共生过程中发挥了重要的作用,作为 *GRAS* 家族转录因子的 *NSP1* 和 *NSP2* 在蒺藜苜蓿根瘤共生过程中发挥了作用,可以调控菌根共生 (Delaux *et al.*, 2013)。而磷酸盐蛋白转运基因 *PT4* 对于丛枝结构的正常发育和维持非常重要,此基因经常被用来作为鉴定 AM 是否共生成功的标记基因 (Cesco *et al.*, 2020)。MYB 转录因子 *PHR* 家族成员参与植物应对缺磷胁迫过程,*PHR* 转录因子可以通过 *P1BS* 元件调控菌根共生相关基因,研究发现在磷饥饿的条件下 *PHR2* 可以促进植物与菌根真菌建立互利互惠的共生关系 (Hinsinger *et al.*, 2011)。

## 5 植物磷素吸收利用与类黄酮合成、菌根共生存在交互作用

### 5.1 类黄酮对植物磷素吸收利用的调控

磷是植物生长所需的三大营养元素之一,由于磷在土壤中移动性很低,容易被固定,所以作物生长易缺磷。类黄酮可以通过影响土壤微生物活性、土壤 pH 值从而间接影响土壤中磷的循环,同时黄酮类化合物也可以作为金属螯合剂占据磷结合位点提高土壤磷的有效利用性 (Barker *et al.*, 2013)。例如在紫花苜蓿根系分泌物中发现的一种异黄酮能够溶解磷酸铁,从而使苜蓿更加有效利用土壤中的磷 (Paszkowski *et al.*, 2002)。植物在面对缺磷胁迫时类黄酮含量发生改变,例如贾宏昉等对野生型烟草进行缺磷处理,发现处理过后与野生型相比缺磷处理烟草叶片中类黄酮含量显著升高,类黄酮代谢途径关键结构基因 *CHS*、*CHI*、*F3H*、*F3'H* 和 *FLS* 的表达显著上调,结果表明黄酮类物质参与植物缺磷胁迫过程 (Jia H, 2015)。植物应对缺磷胁迫存在复杂的分子调控机制,例如在低磷环境下烟草中过表达 *NtMYB12* 显著增加了转基因烟草中黄酮醇的浓度,增强了黄酮醇生物合成途径基因 *NtCHS*、*NtCHI* 和 *NtFLS* 的表达,同时增加了 *Ph1* 家族 *NtPT1* 和 *NtPT2* 的表达从而增加了烟草总磷浓度,以此增强了烟草对低磷的耐受性 (Li *et al.*, 2013)。

作为 MYB 亚家族的磷信号转导途径关键转录因子 *PHRI* 参与调控植物类黄酮的合成, *PHRI* 作为植物缺磷信号转导途径的中心调控因子,在缺磷条件下 *phrI* 突变体与野生型拟南芥相比基本不积累花青素,对应磷浓度与野生型拟南芥相比也显著降低,推测 *PHRI* 可以促进花青素的合成以此促进磷的吸收利用 (Rubio *et al.*, 2001)。

## 5.2 丛枝菌根系统中的磷素吸收利用

由于土壤中磷的低可用性，为了缓解低磷胁迫部分植物会选择与菌根真菌形成共生系统来提高对磷的吸收利用 (Hata *et al.*, 2010)。植物外部磷水平控制根系形态和分支，在缺磷状态下植物与丛枝菌根真菌更容易成功建立共生体系。植物与丛枝菌根真菌共生系统的建立是植物能够适应陆地环境的关键，是植物从环境中高效获取各类营养的途径。共生体系的建立离不开独角金内酯和菌根诱导的磷酸盐转运蛋白基因，在高磷酸盐水平下生长的植物的根系分泌物失去了刺激菌根真菌的能力，并且缺乏独角金内酯最终影响植物与菌根共生体系的建立 (Zhu *et al.*, 2021)。研究发现菌根真菌的存在能改变土壤的理化性质，将宿主植物不能够直接利用的土壤中的磷转化成植物可以利用的形态，促进土壤生态系统中磷素的循环和重复利用 (Lanfranco *et al.*, 2013)。在丛枝菌根真菌与宿主植物的共生系统中，磷酸盐转运蛋白基因负责位于两者在共生界面磷素的吸收和转运，而菌根真菌可以影响磷酸盐转运蛋白基因的表达来影响植物对磷素的吸收和利用，在菌根真菌外生菌丝中存在的磷酸盐转运蛋白可以负责吸收土壤中的磷元素，通过菌丝间的转运由外生菌丝吸收的磷最终选择流向共生界面。磷酸盐转运蛋白在菌根真菌丛枝膜的特定区域积累，并通过  $H^+$ -ATPases 产生的  $H^+$  能量梯度，使植物能够通过  $H^+$  能量梯度获得从菌根真菌中吸收的磷 (Harrison *et al.*, 1995)。研究发现植物缺磷信号转导途径与菌根信号转导途径存在交互作用，在植物种菌根共生体系中报导了许多受菌根共生诱导表达并且转运磷元素的磷酸盐转运蛋白，例如 MtPT4、OsPT11、StPT3、SbPT11 等 (Yang *et al.*, 2012)。Volpe 等人发现在不接种菌根真菌时，苜蓿 MtPT4 参与调控早期根系对磷信号的响应，进而影响苜蓿的根系构型 (Volpe *et al.*, 2016)。

## 5.3 类黄酮对植物菌根共生的调控

植物在周围的土壤(即根际土壤)中产生和释放大量的次生代谢物，而类黄酮不仅存在于植物内部更是植物根系分泌物的重要组成成分。在根际中黄酮类化合物可以根据非生物和生物信号而特异性合成和释放。类黄酮在许多植物与微生物相互作用过程中起着重要作用，其中最著名的是可以作为豆科作物和根瘤菌的共生信号，豆科作物根系通过分泌类黄酮来激活根瘤菌分泌出结瘤因子，然后豆科植物通过蛋白受体感应结瘤因子来调节结瘤基因的表达进而建立共生关系 (Copper, 2004)。黄酮类化合物已被证明能刺激或抑制根瘤菌 *Nod* 基因的表达，刺激菌根真菌孢子萌发和菌丝分支，还可以介导植物间的化感作用，促进植物吸收土壤养分。此外类黄酮与丛枝菌根真菌孢子的萌发和植物根系内真菌菌丝的生长有一定联系，研究发现低磷可以诱导甜瓜根系

分泌 C-糖基黄酮，在低磷条件下 C-糖基黄酮可以调控丛枝菌根与甜瓜的共生（Akiyama *et al.*, 2002）。而不同物种分泌的类黄酮对菌根共生系统的影响不同，在胡萝卜幼苗中合成的黄酮类化合物能够刺激菌根真菌的菌丝生长，但是在豌豆的菌根共生体系中，黄酮类化合物却会抑制同种真菌菌丝的生长（Staehelin *et al.*, 2013）。所以研究以类黄酮调控为基础，建立健康稳定的菌根共生体系是将来实现可持续绿色农业的重要研究发展方向（Linderman, 1994）。

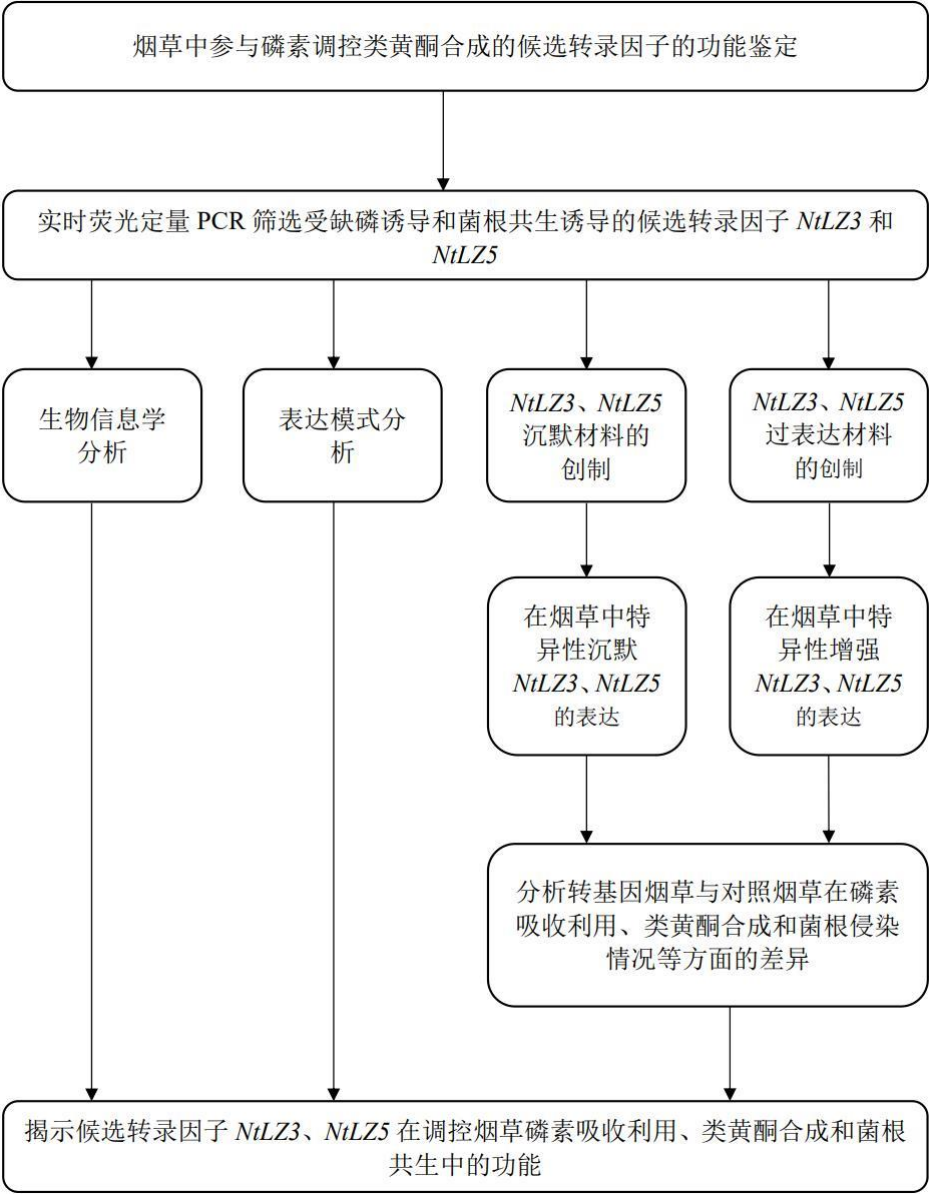
研究发现在磷胁迫下一些能够促进菌根共生的黄酮类化合物被刺激诱导合成（Akiyama *et al.*, 2002）。反过来菌根共生系的建立也会影响植物根系分泌物的合成，影响植物根系类黄酮的合成，菌根真菌通过促进黄酮类化合物的合成增强对寄主的保护作用。

## 6 研究的意义及技术路线

### 6.1 研究目的和意义

目前国内提倡绿色农业发展，所以在农业生产中减少化肥使用而选择其他方法提高作物对磷素的吸收利用效率成为首选。而在低磷条件下，植物类黄酮合成和菌根共生对提高植物对磷素的吸收利用有很大作用。并且植物磷素吸收利用与类黄酮合成、菌根共生存在交互现象，所以从植物分子生物学角度研究其分子调控机制，研究是否存在影响植物磷素吸收利用与类黄酮合成、菌根共生的关键转录因子具有重要现实意义。到目前为止，还未发现关于烟草中同时影响植物磷素吸收利用与类黄酮合成、菌根共生的关键转录因子。前期实验室经 EMS 诱变筛选获得的一个磷高效型烟草纯合突变体（低磷条件下突变体磷含量显著高于野生型而黄酮类物质含量显著低于野生型烟草），通过转录组分析突变体烟草与野生型烟草之间的差异表达基因，初步筛选到可能参与磷素调控类黄酮合成的 2 个候选转录因子 *NtLZ3* 和 *NtLZ5*，探究其是否是影响植物磷素吸收利用与类黄酮合成、菌根共生的关键转录因子，为提高作物的磷素养分吸收效率和培养磷高效的作物新品种提供了新可行途径。

## 6.2 技术路线图



## 第二章 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 克隆、生信分析和表达模式分析

### 1 引言

植物在低磷胁迫下会产生一系列生理生化反应，其中转录因子发挥了重要作用。例如低磷条件下烟草中 *NtMB12* 过表达可以提高烟草中黄酮醇的浓度并且增加烟草总磷浓度以此来增强烟草对低磷胁迫的耐受性 (Zhao *et al.*, 2020)。在烟草应对低磷胁迫时，复杂的分子调控网络起到重要作用，一些转录因子受缺磷特异性诱导。有研究表明缺磷信号转导途径与菌根信号转导途径存在交互作用，在植物与菌根共生体系中报导了许多受菌根共生诱导表达并且转运磷的磷酸盐转运蛋白，例如基因 *PT4* 的发现 (Javot *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2012)。Volpe 等人发现在不接种菌根真菌时，苜蓿 *MtPT4* 参与调控早期根系对磷信号的响应，进而影响苜蓿的根系构型 (Volpe *et al.*, 2016)。而在前期实验室经 EMS 诱变筛选获得的一个磷高效型烟草纯合突变体（低磷条件下突变体磷含量显著高于野生型烟草而黄酮类物质含量显著低于野生型烟草），通过转录组分析突变体与野生型之间的差异表达基因，初步筛选到可能参与磷素调控类黄酮合成的 2 个候选转录因子 *NtLZ3* 和 *NtLZ5*，并对 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 进行克隆验证、生信分析和表达模式分析。

### 2 材料和方法

#### 2.1 实验材料与试剂

植物材料：野生型烟草品种红花大金元 (HD) 和突变体烟草 (*dng*) 由本实验室繁种获得。

实验菌株和载体：大肠杆菌 DH5 $\alpha$  购于南京诺维赞生物公司，pEASY-Blunt 载体源于南京全式金生物公司。

实验试剂：本实验中所有限制性内切酶购于塔克拉公司，而 Trizol RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒及实时荧光定量试剂盒、同源重组试剂盒、高保真酶购于南京诺维赞生物公司，引物合成和测序公司为擎科生物有限公司。抗生素中的卡那霉素在南京净阳公司购买获得，质粒提取、胶回收等分子试剂盒均在 OMEGA 购买获得，pHK-35S-GLosGFP 载体购于伯远公司。

植物培养基质：实验中所用到的烟草沙培培养基质成分为黄沙混合石英砂，比例为 1:1，使用之前均经过高温高压 (121  $^{\circ}\text{C}$ , 20 min) 灭菌处理。

2.2 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 的表达模式分析

通过转录组分析突变体与野生型烟草之间的差异表达基因，初步筛选到可能参与磷素调控类黄酮合成的 2 个候选转录因子 *NtLZ3* 和 *NtLZ5*。对其设计特异性引物。以正常供磷（0.5mMPi, +P）和低磷（10μMPi, -P）处理的红花大金元叶片和根部 cDNA 为模板，利用实时荧光定量验证 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 是否受缺磷诱导；同时取接种菌根真菌 35 天的红花大金元根部样本 cDNA 为模板，利用实时荧光定量验证 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 是否受菌根共生诱导（具体操作参照附录六）；以正常供磷处理的突变体烟草 *dng* 和野生型烟草 HD 根部样本 cDNA 为模板，利用实时荧光定量验证 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 是否在 HD 和 *dng* 中差异表达。定量引物设计参照如下：

表 2-1 引物序列

Table 2-1 Primer sequence

| 引物名称              | 引物序列                   |
|-------------------|------------------------|
| Primer name       | Primer Sequence        |
| <i>NtLZ3</i> -q-F | GGTAACAAATGGGCAGCCA    |
| <i>NtLZ3</i> -q-R | ATCTGCAGGAGGAGTACTCAA  |
| <i>NtLZ5</i> -q-F | GAGTTCAGTCCCTAAATTAGCA |
| <i>NtLZ5</i> -q-R | ATTTGAGACCACTTGTTCCC   |

2.3 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 基因的克隆

首先对本氏烟草种子进行发苗处理，大概长至 3 叶一心时提取烟草叶片总 RNA 并反转录合成 cDNA。在 NCBI 网站中设计 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 基因的特异性扩增引物，以红花大金元的 cDNA 为模板进行 PCR 片段扩增，对 PCR 产物进行纯化回收后连接 pEASY-Blunt 载体并热激转化到大肠杆菌 DH5α 中（具体方法参照附录三），挑取阳性单克隆测序验证，验证后保菌待用。

表 2-2 引物序列

Table 2-2 Primer sequence

| 引物名称                | 引物序列                  |
|---------------------|-----------------------|
| Primer name         | Primer Sequence       |
| <i>NtLZ3</i> -CDS-F | GAGAAATGGGAAGGCCTCCT  |
| <i>NtLZ3</i> -CDS-R | CACATCCATGGACTTCGTCCA |
| <i>NtLZ5</i> -CDS-F | GGCCAGCATTGCAATATCAC  |
| <i>NtLZ5</i> -CDS-R | TCCAGTGTTGAGACAACGGA  |

## 2.4 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 基因的生物信息学分析

利用网络在线软件 Prot Param (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 基因的氨基酸的组成、分子结构和理化性质；利用 Plant TFDB (PlantTFDB - Plant Transcription Factor Database @ CBI, PKU ([gao-lab.org](http://gao-lab.org))) 软件分析 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 基因的氨基酸序列；利用在线软件 MeMe (<http://meme-suite.org>) 进行保守结构域的预测，利用 EvolView (<https://evolgenius.info/evolview-v2/#login>) 和 MEGA7 进行 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 基因的系统进化树分析。

## 2.5 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 基因的亚细胞定位

以 pHK-35S-GLosGFP 为基础载体构建目标基因的植物表达融合载体，根据 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 基因序列，设计带有 Eco31I 酶切位点引物，以 Blunt-*NtLZ3*、Blunt-*NtLZ5* 为模板进行 PCR 扩增，获取目的片段并测序验证正确后进行产物回收。对 pHK-35S-GLosGFP 使用 Eco31I 进行单酶切，验证其切开后回收，将 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* CDS 序列利用 T4 连接酶连接切开后 pHK-35S-GLosGFP 的转化至 DH5 $\alpha$  (具体方法参照附录三)，筛选阳性克隆并测序验证。最后将验证后重组载体电转入农杆菌 EHA105 中 (具体方法参照附录五)，保菌备用。接下来步骤具体参照农杆菌介导的本氏烟草叶片瞬时表达-注射法 (具体方法参照附录八)；拟南芥原生质体亚细胞定位法，最后用激光共聚焦显微镜进行观察分析。

## 2.6 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 基因的转录活性分析

根据 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 基因序列，设计带有 EcoRI 和 BamHI 的酶切位点引物，以 Blunt-*NtLZ3*、Blunt-*NtLZ5* 为模板进行特异性 PCR 片段扩增，获取所需目的片段并测序验证正确后进行产物回收。对 pGBKT7 使用 EcoRI 和 BamHI 两种内切酶进行双酶切，验证其切开后回收，将 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 的 CDS 序列利用同源重组的办法连接切开后后的 pGBKT7 并转化至 DH5 $\alpha$  (具体方法参照附录三)，筛选阳性克隆并测序验证。将构建好载体转入酵母 Y2H Gold 菌株，将 pGBKT7-*NtLZ3*、pGBKT7-*NtLZ5*、阴性对照 pGBKT7 分别涂布于 SD/-Trp 和 SD/-Trp/-His 的酵母缺陷型培养基上，观察菌落生长情况并拍照。

若酵母在 SD/-Trp/-His 培养基上不能够正常生长，则该基因编码的蛋白在酵母中不具有转录激活活性即不会自激活；若酵母在 SD/-Trp/-His 培养基上可以正常生长，则该基因编码的蛋白在酵母中具有酵母转录激活活性。

## 2.7 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 的组织表达模式分析

将红花大金元烟草进行正常供磷（0.5mM Pi, +P）沙培处理，在红花大金元苗期时挑选长势一致的上、中、下部叶以及根和茎，在红花大金元花期时挑选长势一致的上、中、下部叶和根、茎、花、雌蕊和雄蕊（各组织 3 个生物学重复）进行采样，将采样获得的所有 RNA 组织样品提取 RNA 并反转录合成 cDNA 置于-80℃备用。最后用实时荧光定量 PCR 方法验证 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 在烟草不同组织器官的表达情况。

## 2.8 LC-MS 采集条件

LC-MS 数据采集主要包括液相色谱（Liquid Chromatography, LC）以及串联质谱（Tandem Mass Spectrometry, MS）。

液相条件：色谱柱：HITACHZ C18；

流动相：A 相为 0.2%乙酸的纯净水；B 相为乙腈；

洗脱梯度：0 min 水/乙腈（95:5 V/V，11.0 min 为 5:95 V/V，12.0 min 为 5:95 V/V，12.1 min 为 95:5 V/V，15.0 min 为 95:5 V/V）；

流速：0.5ml/min，柱温为 30℃，进样量为 2μl。

## 2.9 菌根真菌的接种实验

将长势一致的苗期红花大金元进行接种菌根真菌处理并低磷培养 35 天后采样。温室条件：光照 28℃14 小时，黑暗 24℃10 小时。

## 2.10 丛枝菌根侵染指标统计

具体方法见附录九

## 2.11 烟草 RNA 的提取以及 cDNA 的合成

具体方法见附录一

## 2.12 数据统计分析

利用 Excel 等软件对实验数据进行统计和分析，用 GraphPad Prism8 软件进行作图。

### 3 结果与分析

#### 3.1 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 的发现

前期实验室通过 EMS 诱变筛选获得的一个磷高效型烟草纯合突变体，对突变体烟草 *dng* 和野生型烟草 HD 进行正常供磷（0.5mM Pi, +P）和低磷（10 $\mu$ M Pi, -P）处理。通过测定 *dng* 和 HD 的叶片和根部总磷含量发现，在正常供磷条件下 *dng* 与 HD 相比叶片和根部总磷含量无显著差异；在低磷处理条件下，与 HD 相比 *dng* 叶片和根部总磷含量显著升高。为了研究突变体烟草磷吸收利用效率差异的原因，对野生型烟草 HD 和突变体烟草 *dng* 进行了 LC-MS 全成分检测分析。对成功检测到 210 种化学成分进行了次生代谢物的分类，主要分为苯丙烷类、醌类、鞣质、萜类、甾体及其甙和生物碱五大类，进一步分析发现 83% 的苯丙烷类物质都具有显著性差异。由于类黄酮是烟草中重要的次生代谢产物，通过分析黄酮类化合物的检测数据，结果发现与野生型烟草 HD 相比突变体烟草 *dng* 中有 9 种代表性黄酮类次生代谢物含量显著减少，这 9 种代表性黄酮类次生代谢物显著影响烟草品质和产量，表明类黄酮可能参与提升烟草磷素吸收利用。为了更加深入研究突变体表型出现的原因，对突变体烟草 *dng* 和野生型烟草 HD 进行转录组分析，结果发现部分转录因子在 *dng* 与 HD 中差异表达，从中挑选出在突变体烟草 *dng* 和野生型烟草 HD 中差异表达明显的 *NtMYB306.1* 和 *NtMYB61* 并将其命名为 *NtLZ3* 和 *NtLZ5*，对 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 进行进一步研究，验证其是否影响烟草磷素吸收利用和类黄酮合成。

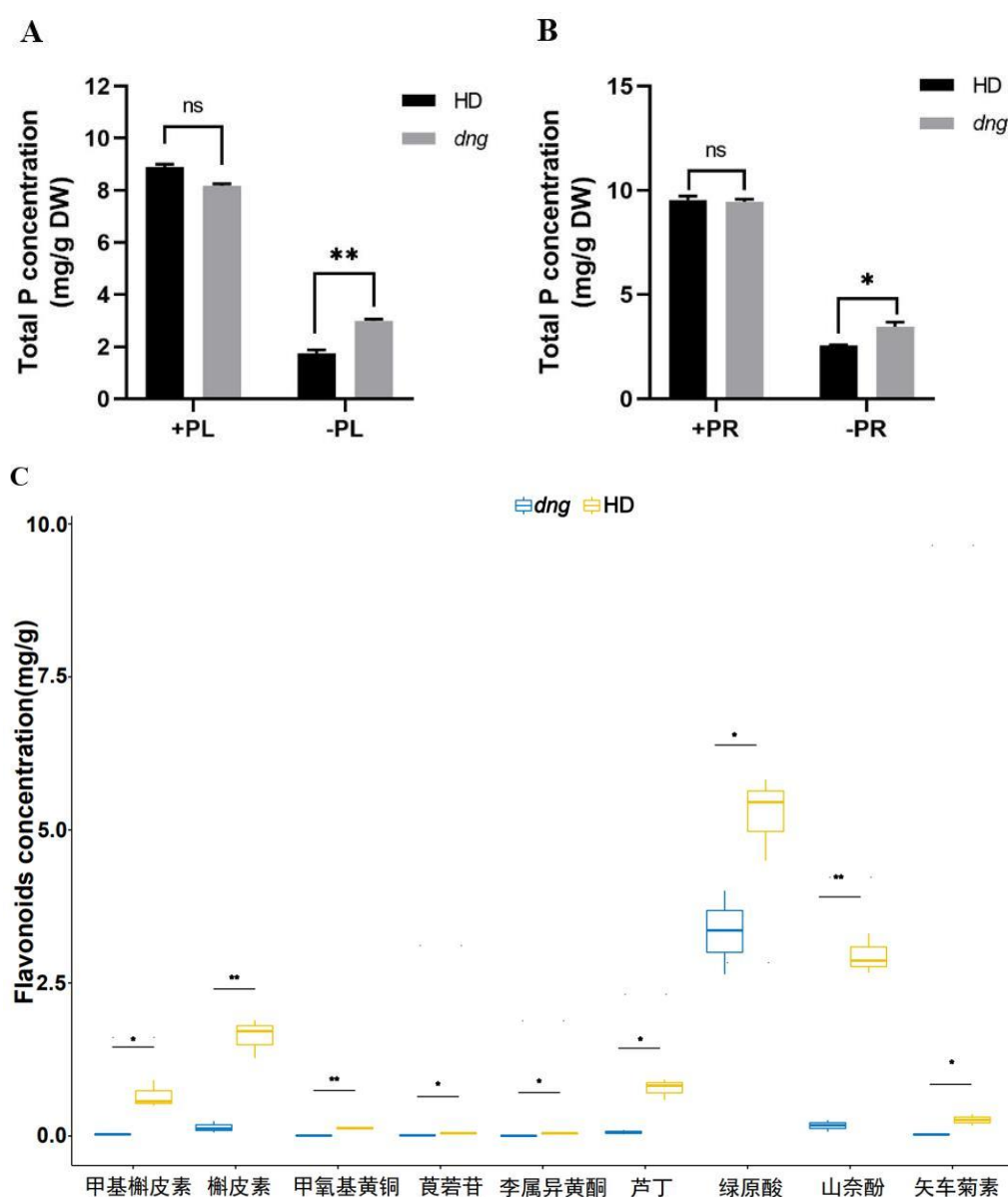


图 2-1 正常供磷和低磷处理下野生型烟草 HD 和突变体 *dng* 磷含量和类黄酮含量分析

Fig. 2-1 Analysis of Phosphorus Content and Flavonoid Content in HD and *dng* under Normal Phosphorus Supply and Low Phosphorus Treatment

注:A: HD 和 *dng* 叶片磷含量分析图。B: HD 和 *dng* 根部磷含量分析图 (+P 和 -P 分别为正常供磷和缺磷处理)。C: HD 和 *dng* 差异黄酮类物质含量分析。数值代表 3 个生物学重复的平均值 $\pm$ SD( $n = 3$ )。L: 叶片; R: 根系; \*为存在显著性差异; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , ns 表示无显著性差异。

Note: A: Analysis of phosphorus content in HD and *dng* leaves. B: Analysis of phosphorus content in HD and *dng* roots (+P and -P are normal phosphorus supply and phosphorus deficiency treatments, respectively). C: HD and *dng* differential flavonoid content analysis. Values represent the mean  $\pm$  SD of 3 biological replicates ( $n = 3$ ). L: Leaf; R: Root; \* means significant difference; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , ns means no significant difference.

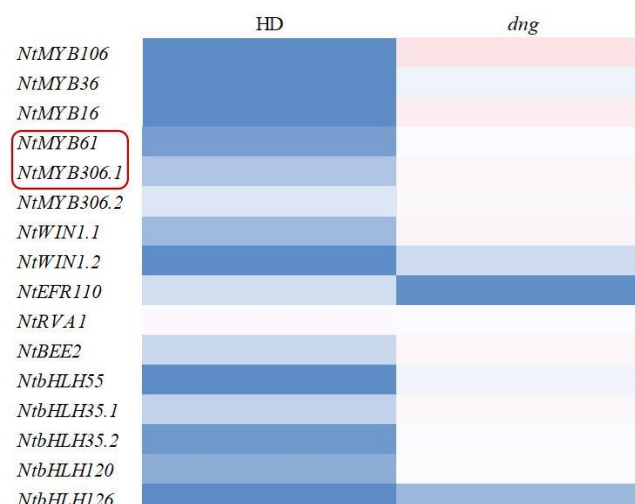


图 2-2 野生型烟草 HD 和突变体 *dng* 转录组分析

Fig. 2-2 Transcriptome analysis of wild-type tobacco HD and *dng*

### 3.2 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 的表达模式分析

在前期的实验研究中初步筛选到可能参与磷素调控类黄酮合成的 2 个候选转录因子 *NtLZ3* 和 *NtLZ5*。为验证 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 是否是影响烟草磷素吸收利用和菌根共生的转录因子，以正常供磷（0.5mM Pi, +P）和低磷（10μM Pi, -P）处理的红花大金元叶片和根部 cDNA 以及接种菌根真菌 35 天的红花大金元根部 cDNA 模板，以及正常供磷（0.5mM Pi, +P）处理的 HD 和 *dng* 根部 cDNA 为模板利用实时荧光定量检测 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 的表达。表达模式分析发现 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 均在野生型烟草和突变体烟草中表达差异明显，结果与前期转录组分析吻合，*NtLZ3* 在烟草根部和叶片受缺磷诱导表达下调，在接种丛枝菌根真菌的根中表达量显著上调；*NtLZ5* 在根部受缺磷诱导上调，而在叶片和接种 AM 真菌的根中受到缺磷下调表达。结果表明 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 可能是影响烟草磷素吸收利用、类黄酮合成和菌根共生的转录因子。

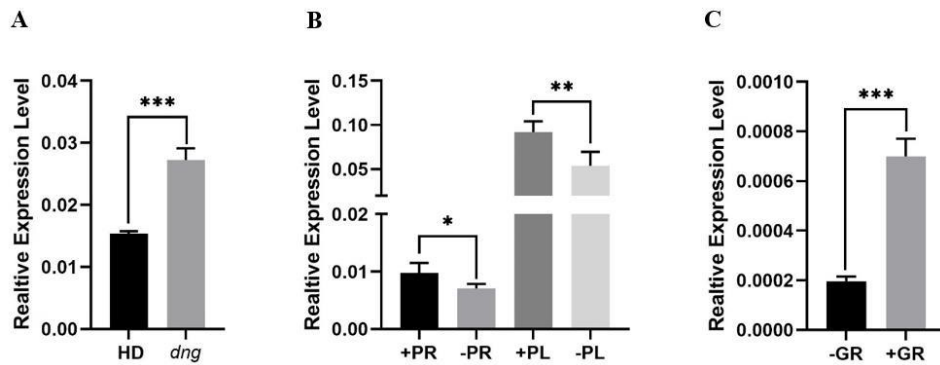


图 2-3 *NtLZ3* 的表达分析

Fig. 2-3 Expression analysis of *NtLZ3*

注:A: *NtLZ3* 在 HD 和 *dng* 差异表达分析图。B: *NtLZ3* 受缺磷诱导分析图 (+P 和 -P 分别为正常供磷和缺磷处理)。C: *NtLZ3* 菌根诱导分析图 (+G 和 -G 分别为接种和不接种菌根真菌处理)。数值代表 3 个生物学重复的平均值 $\pm$ SD(n = 3)。L: 叶片; R: 根系; \*为存在显著性差异; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

Note: A: Analysis of differential expression of *NtLZ3* in HD and *dng*. B: Analysis of the induction of phosphorus deficiency in *NtLZ3* (+P and -P are normal phosphorus supply and phosphorus deficiency treatment, respectively). C: Analysis of mycorrhizal induction of *NtLZ3* (+G and -G: Inoculation or not with AM fungi). Values represent the mean  $\pm$  SD of 3 biological replicates (n = 3). L: Leaf; R: Root; \* means significant difference; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

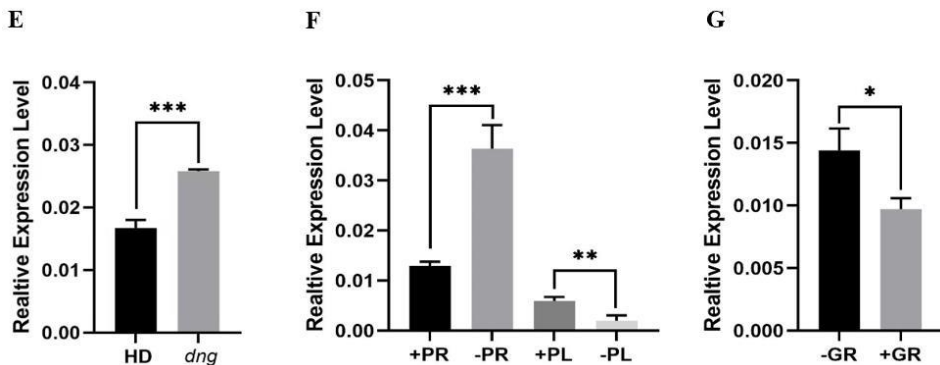


图 2-4 *NtLZ5* 的表达分析

Fig. 2-4 Expression analysis of *NtLZ5*

注:E: *NtLZ5* 在 HD 和 *dng* 差异表达分析图。F: *NtLZ5* 受缺磷诱导分析图。G: *NtLZ5* 菌根诱导分析图。数值代表 3 个生物学重复的平均值 $\pm$ SD(n = 3)。L: 叶片; R: 根系; \*为存在显著性差异; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

Note: A: Analysis of differential expression of *NtLZ5* in HD and *dng*. B: Analysis of the induction of phosphorus deficiency in *NtLZ5*. B: Analysis of mycorrhizal induction of *NtLZ5*. Values represent the mean  $\pm$  SD of 3 biological replicates (n = 3). L: Leaf; R: Root; \* means significant difference; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

3.3 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 基因的克隆

为了探究 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 是否影响烟草磷素吸收利用、类黄酮合成和菌根共生，本研究对挑选出的转录因子 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 以红花大金元 cDNA 为模板进行特异性扩增，其中 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* CDS 分别是 876bp 和 1269bp，连接 pEASY-Blunt 载体转化大肠杆菌，测序正确后保菌备用。

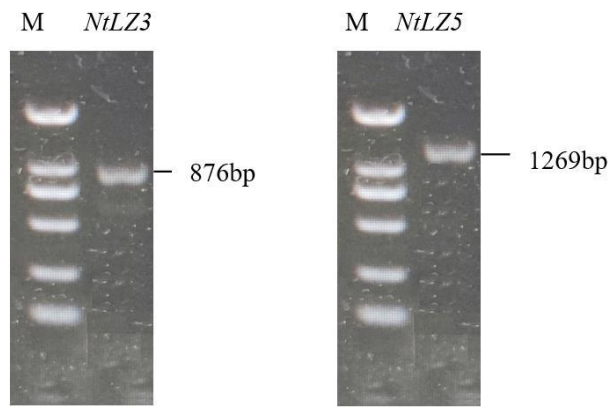


图 2-5 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 的 PCR 扩增电泳图

Fig. 2-5 Electrophoresis of PCR amplification *NtLZ3* 和 *NtLZ5*

注：M：DNA Marker

Note: M: DNA Marker

3.4 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 的生物信息学分析

我们利用在线网站分析了 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 的基本理化性质，*NtLZ3* 基因编码 291 个氨基酸，其位于烟草基因组第 19 号染色体上，基本分子量约为 32.9kDa，PI 值为 7.08，为亲水性蛋白；*NtLZ5* 基因编码 422 个氨基酸，其位于烟草基因组第 12 号染色体上，基本分子量约为 47.6kDa，PI 值为 8.01，为亲水性蛋白。

表 2-3 基本理化性质分析

Table2-3 Analysis of basic physical and chemical properties

| 基因命名         | 氨基酸数     | 染色体位置               | 分子量              | PI   | 疏水性分析                |
|--------------|----------|---------------------|------------------|------|----------------------|
| name         | AA count | Chromosome position | Molecular weight | PI   | Hydrophobic analysis |
| <i>NtLZ3</i> | 291      | Chr19               | 32.9kDa          | 7.08 | 亲水性蛋白                |
| <i>NtLZ5</i> | 422      | Chr12               | 47.6kDa          | 8.01 | 亲水性蛋白                |

### 3.4.1 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 基因的氨基酸序列分析

我们利用 NCBI 和 Plant TFDB 等网站下载与 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 基因同源性较高的拟南芥、烟草和大豆等植物基因家族氨基酸序列。利用 MEME 和 DNAMAN8 软件将其与 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 基因编码氨基酸序列进行多序列比对。结果表明 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 基因中含有典型的 R2R3 型 MYB 家族转录因子的保守结构域。*NtLZ3* 和 *NtLZ5* 基因的氨基酸序列分析结果与其它植物中 MYB 家族成员在功能结构域上保守性很高，所以推测 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 基因可能具有与拟南芥、烟草和大豆等植物 MYB 家族基因成员相似的生物学功能。

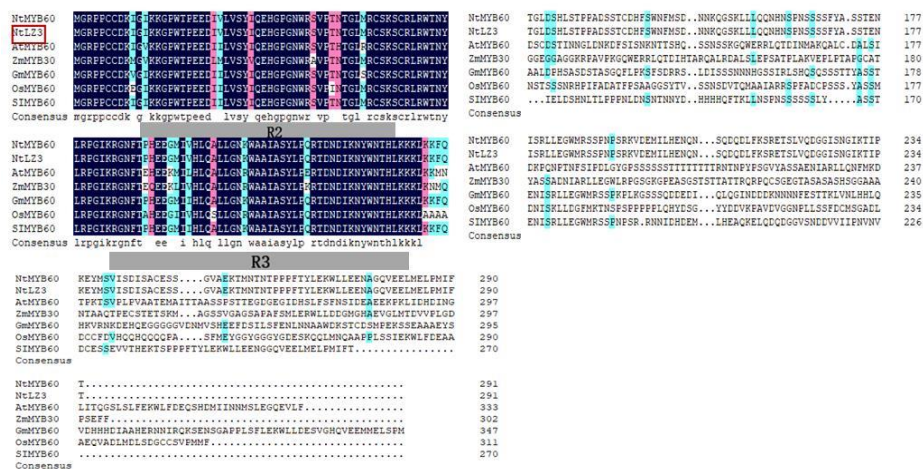


图 2-6 *NtLZ3* 基因的氨基端序列分析

Fig. 2-6 Amino acid sequence analysis of *NtLZ3*

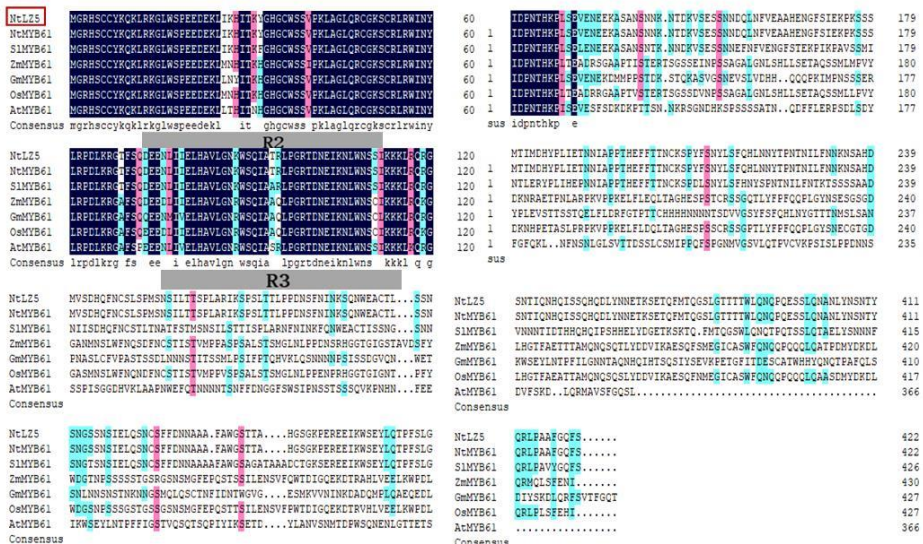


图 2-7 *NtLZ5* 基因的氨基端序列分析

Fig. 2-7 Amino acid sequence analysis of *NtLZ5*

3.4.2 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 基因保守基序分析和系统进化树分析

为了研究 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 基因的进化关系，利用 NCBI、MEME、MEGA 网站对 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 基因以及与其同源性较高的拟南芥、水稻和大豆等植物 MYB 家族基因进行系统发生进化树分析和保守基序分析，保守基序分析结果显示 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 基因与拟南芥等物种 MYB 家族基因都含有 motif1 和 motif2，而 motif1 和 motif2 包含 R2R3 型 MYB 家族基因的 R2 和 R3 保守片段，说明 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 基因进化上具有保守性。系统进化树分析结果显示 *NtLZ3* 与 *NtMYB60* 的亲缘关系最近，*NtLZ5* 与 *NtMYB61.1* 的亲缘关系最近。

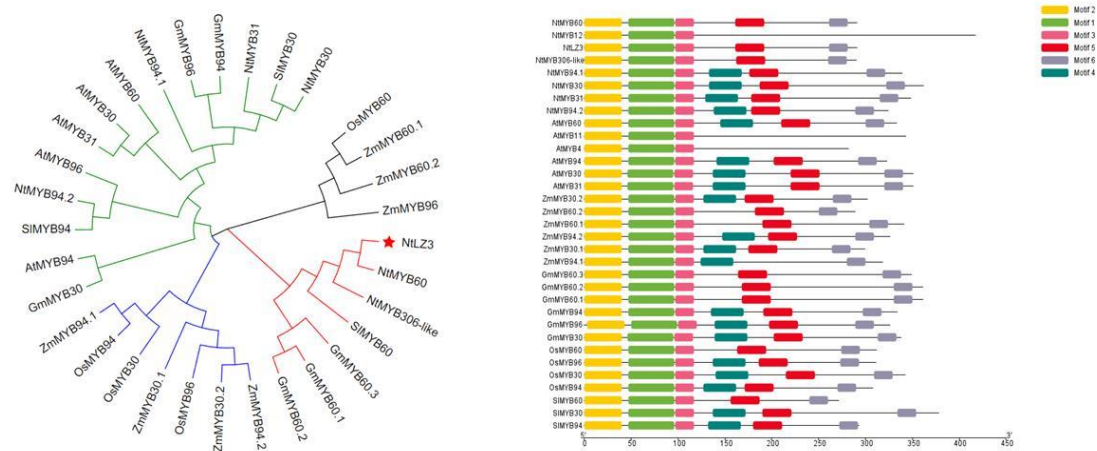


图 2-8 *NtLZ3* 基因的系统进化树以及 motif 分析

Fig. 2-8 Phylogenetic tree and motif analysis of *NtLZ3*

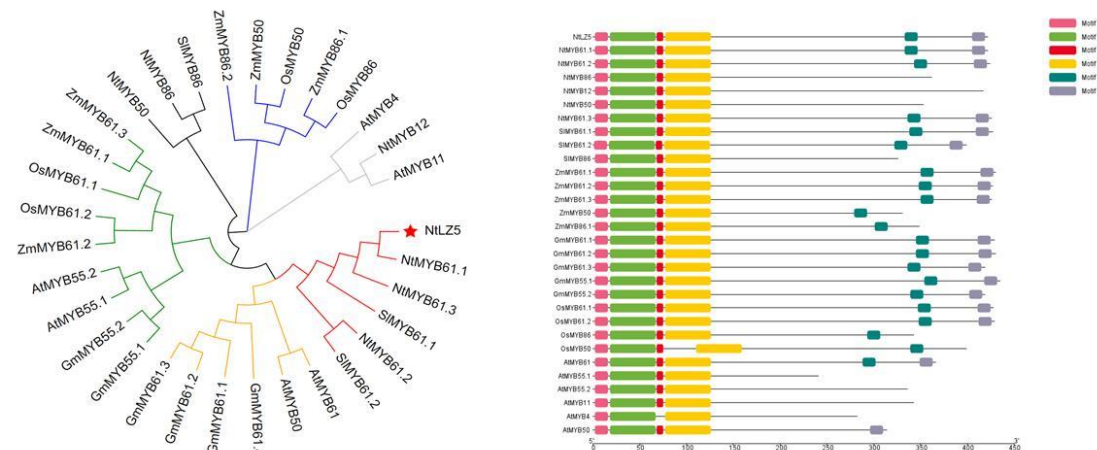


图 2-9 *NtLZ5* 基因的系统进化树以及 motif 分析

Fig. 2-9 Phylogenetic tree and motif analysis of *NtLZ5*

3.5 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 基因的亚细胞定位分析

本研究利用农杆菌所介导的本氏烟瞬时表达系统和拟南芥原生质体表达系统，对 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 的亚细胞定位情况进行了分析。以 pHK-35S-GLos-GFP 作为对照，通过激光共聚焦显微镜观察发现 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 蛋白定位均在细胞核内，属于核定位基因。

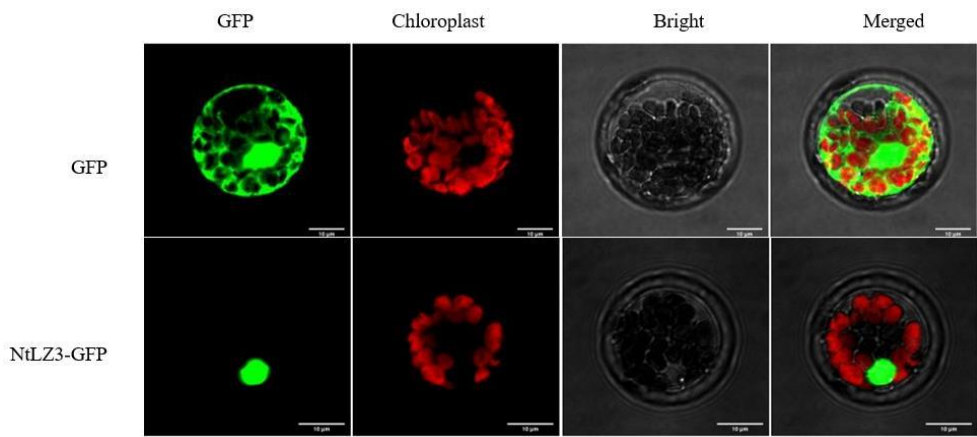


图 2-10 *NtLZ3* 的亚细胞定位分析

Fig. 2-10 Analysis of subcellular localization of *NtLZ3*

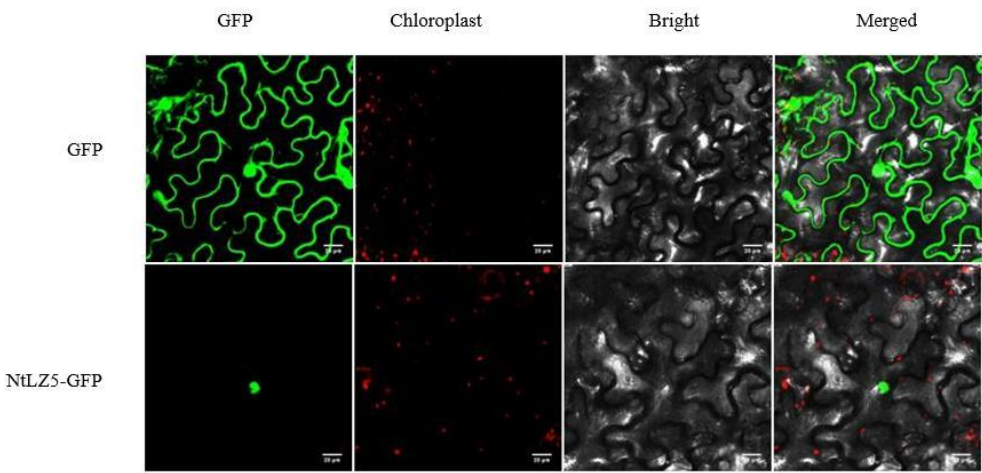


图 2-11 *NtLZ5* 的亚细胞定位分析

Fig. 2-11 Analysis of subcellular localization of *NtLZ5*

3.6 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 基因的转录活性分析

为了验证 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 的转录活性，将 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 基因的编码区序列片段连接到酵母 GAL4 融合表达载体 pGBKT7 上构建重组载体，然后再转入酵母 Y2H Gold 菌株，在 SD/-His 平板上检验 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 的转录激活活性。在 SD/-Trp/-

His 的酵母平板上连接 pGBKT7 的 NtLZ3 可以正常生长，表明 NtLZ3 具有转录激活活性。而连接 pGBKT7 的 NtLZ5 在 SD/-Trp/-His 酵母平板上不能正常生长，并不能使得缺陷型酵母菌株自身合成组氨酸从而在 SD/-Trp/-His 的培养基上生长，表明 NtLZ5 不具有转录激活活性。

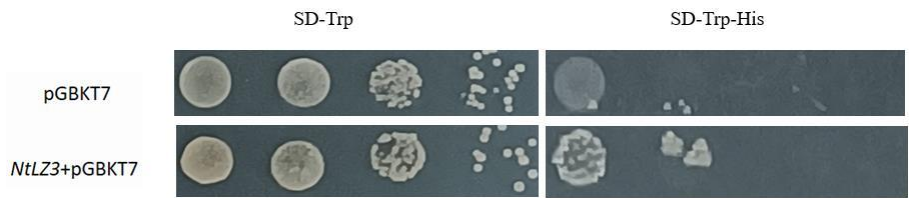


图 2-12 NtLZ3 基因的酵母转录激活活性分析

Fig. 2-12 Transcriptional activation of NtLZ3 in yeast

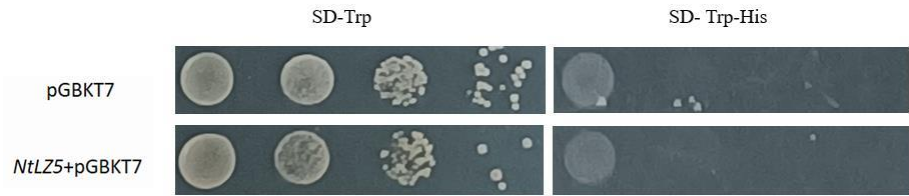


图 2-13 NtLZ5 基因的酵母转录激活活性分析

Fig. 2-13 Transcriptional activation of NtLZ5 in yeast

### 3.7 NtLZ3 和 NtLZ5 的组织表达模式分析

为了更加彻底的研究 NtLZ3 和 NtLZ5 在烟草中的功能，在正常供磷沙培条件下，检测红花大金元中苗期和盛花期时烟草不同组织器官中 NtLZ3 和 NtLZ5 的表达水平。NtLZ3 和 NtLZ5 的组织表达模式分析发现，NtLZ3 在盛花期和苗期均在叶中表达量最高，而 NtLZ5 苗期时主要在茎中高表达，进入盛花期后，在花、雄蕊、雌蕊中表达量较高（图 3-5）。

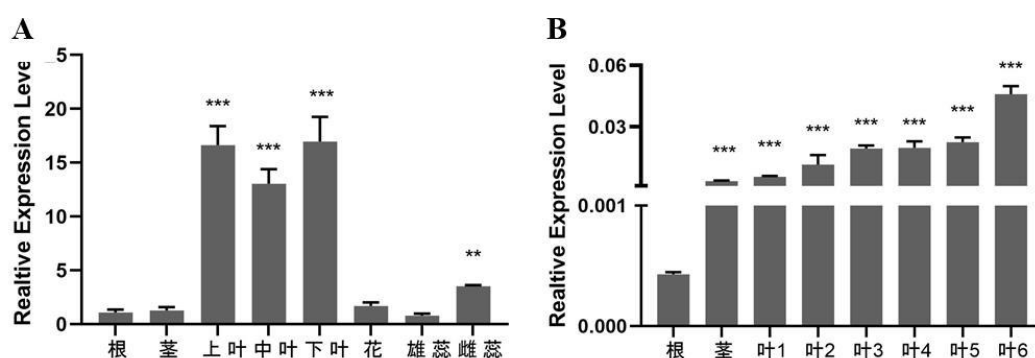


图 2-14 *NtLZ3* 组织表达模式分析

Fig. 2-14 Analysis of tissue expression pattern of *NtLZ3*

注：A：*NtLZ3* 盛花期组织表达模式。B：*NtLZ3* 苗期组织表达模式。其中数值为 3 个生物学重复的平均值±SD (n=3)。

\*表示存在显著性差异；\*\*P<0.01，\*\*\*P<0.001。

Note: A: tissue expression pattern of *NtLZ3* in full bloom stage. B: tissue expression pattern of *NtLZ3* in seedling stage.

Asterisks denote significant differences. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

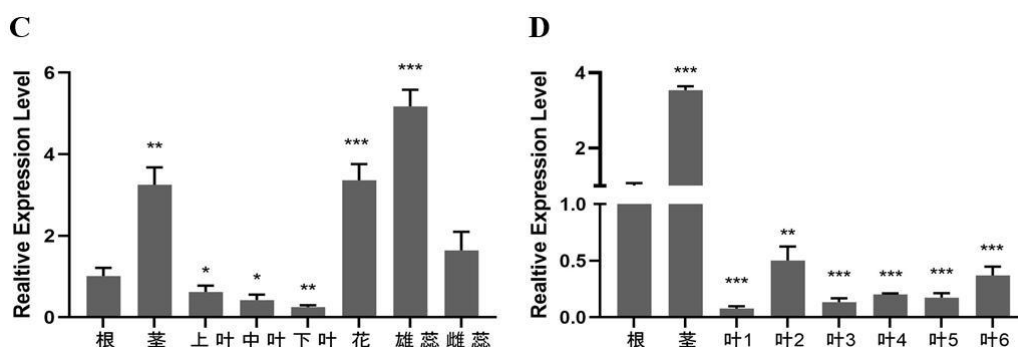


图 2-15 *NtLZ5* 组织表达模式分析

Fig. 2-15 Analysis of tissue expression pattern of *NtLZ5*

注：C：*NtLZ5* 盛花期组织表达模式。D：*NtLZ5* 苗期组织表达模式。其中数值为 3 个生物学重复的平均值±SD (n=3)。

\*表示存在显著性差异；\*P<0.05，\*\*P<0.01，\*\*\*P<0.001。

Note: C: tissue expression pattern of *NtLZ5* in full bloom stage. D: tissue expression pattern of *NtLZ5* in seedling stage.

Values are the means of three biological replicates with SDs. Asterisks denote significant differences. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

## 4 讨论

在植物的生长发育中经常受到各类环境胁迫，当植物受到外界环境胁迫时，植物体内会产生一系列信号传递来激发植物的防御系统。黄酮类化合物可抵抗各种非生物和生物胁迫，例如促进植物对氮、磷等营养元素的吸收；参与调控侧根的形成和根毛

的发育；参与种子的保护和萌发等（Akiyama *et al.*, 2000）。在这个过程中 MYB 转录因子通过直接或间接调控抗逆基因的表达来提高植物的抗逆能力。研究发现 R2R3-MYB 家族中的 *NtMYB12* 在应对低磷胁迫时起到重要作用，而 *AtMYB12* 调控拟南芥根部类黄酮的合成（Floss *et al.*, 2013）。而在前期实验室经 EMS 诱变筛选获得的一个磷高效型烟草纯合突变体，发现低磷条件下突变体磷含量显著高于野生型而且黄酮类物质是野生型烟草和突变体烟草之间最显著的差异代谢物。通过转录组分析突变体与野生型烟草之间的差异表达基因，初步筛选到可能参与磷素调控类黄酮合成的 2 个候选转录因子 *NtLZ3* 和 *NtLZ5*。以红花大金元 HD 和突变体 *dng* 为试验材料，通过实时荧光定量 PCR 技术对 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 进行表达分析发现 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 都受缺磷诱导和菌根共生诱导并且在 HD 和 *dng* 中差异表达明显，克隆获得 *NtLZ3* 和 *NtLZ5*。通过在线网站进行简单分析，*NtLZ3* 基因编码 291 个氨基酸，位于烟草基因组第 19 号染色体上；*NtLZ5* 基因编码 422 个氨基酸，位于烟草基因组第 12 号染色体上，*NtLZ3* 和 *NtLZ5* 均为亲水性蛋白。将 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 基因与其它同源性较高的拟南芥、水稻和大豆等植物 MYB 家族基因进行氨基酸序列分析、进化树分析和保守基序分析，发现 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 是保守性很强的 R2R3 型 MYB 转录因子。

R2R3 型 MYB 转录因子广泛参与植物次生代谢调控、胁迫应答、组织发育等生命过程，并且响应各种生物和非生物胁迫。Ban 等发现在苹果果皮中特异性表达的 *MdMYB1* 调控果皮的花青素合成，越来越多的研究发现 R2R3 型 MYB 转录因子通过影响苯丙烷类代谢途径影响类黄酮的生物合成（Ban *et al.*, 2019）。植物在缺磷或低磷状态下易在叶片、茎组织部位积累花青素，而作为 MYB 亚家族的磷信号转导途径关键转录因子 PHRI 参与调控植物类黄酮的合成和有益菌根真菌的共生，使得植物在缺磷时可以主动与菌根真菌建立共生关系，并且促进花青素的合成以此促进磷的吸收利用（Chen *et al.*, 2020; Walder *et al.*, 2015）。

*NtLZ3* 和 *NtLZ5* 同时受缺磷诱导和菌根共生诱导，同时 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 属于 R2R3 型 MYB 家族转录因子。为了更好地研究 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 的生物学功能，利用酵母转录激活活性分析、亚细胞定位技术研究其功能，亚细胞结果表明 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 均定位于细胞核，属于核转录因子。转录因子作为调控植物适应外界生物和非生物逆境胁迫的重要因子，其结构上应该至少应包含 1 个或一个以上的转录调控的结构域，可以用来激活或抑制相关抗逆基因的转录。酵母转录激活活性实验表明 *NtLZ3* 具有酵母转录激活活性，而 *NtLZ5* 不具有酵母转录激活活性。*NtLZ3* 在盛花期和苗期均在叶中高表达，预测 *NtLZ3* 主要在叶中发挥功能，*NtLZ5* 苗期时主要在茎中高表达，进入烟草盛花期时在花、雄蕊、雌蕊中表达量较高。种种结论为我们后续进一步探究 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 功能打下基础。

# 第三章 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 沉默对烟草磷素吸收利用和类黄酮合成的影响

## 1 引言

为了鉴定某基因的具体功能，一般采取降低对应基因的表达来进行。其中 TRV 病毒诱导的特异性基因沉默技术（Virus induced gene silencing, VIGS）作为研究植物基因组的重要工具被大家所广泛使用。VIGS 技术是利用病毒载体携带目的基因来诱导植物出现基因沉默使特定基因的表达水平降低（Lucioli *et al.*, 2003），其本质是利用植物对病毒入侵的防御机制，该技术成本低、效率高、实验周期短、操作简单。现如今 VIGS 技术已然成为一种快速高通量的基因功能鉴定技术，经常用于基因功能研究中。

*NtLZ3* 和 *NtLZ5* 都受菌根共生诱导和缺磷诱导并且在野生型烟草和突变体烟草中差异表达明显，而且氨基酸序列分析和 motif 分析发现 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 是保守性很强的 R2R3 型 MYB 转录因子，越来越多的研究发现 R2R3 型 MYB 转录因子可以通过影响植物苯丙烷类代谢途径进而影响类黄酮的生物合成。这些证据表明 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 可能参与低磷胁迫，并且与烟草类黄酮合成有一定联系。就目前情况来说，*NtLZ3* 和 *NtLZ5* 的具体功能未可知。为了详细研究该基因的功能，本章节利用 VIGS 技术特异性沉默 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 获得相应转基因材料，通过正常供磷（0.5mM Pi, +P）和缺磷（10μM Pi, -P）沙培处理和接种丛枝菌根真菌处理，验证其是否是影响烟草磷吸收利用、类黄酮合成和菌根共生的关键转录因子。

## 2 材料和方法

### 2.1 实验材料与试剂

植物材料：本氏烟草（*Nicotiana benthamiana*）来自本实验室内部。

实验菌株和载体：大肠杆菌 DH5α 购于南京诺维赞生物公司，GV3101 农杆菌购自唯地生物技术有限公司，农杆菌 TRV1、农杆菌 PDS、农杆菌 TRV2 来自南京大学生科院，pEASY-Blunt 载体源于江苏南京全式金生物公司。

实验试剂：参考第二章 2.1

植物培养基质：本实验所用烟草沙培培养基质成分为黄沙混合石英砂，比例为 1:1，使用之前均经过高温高压（121 °C，20 min）灭菌处理。

2.2 *NtLZ3*-VIGS 载体和 *NtLZ5*-VIGS 载体的构建

为更加快速研究 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 的生物学功能，利用 VIGS 技术创建 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 的沉默材料。从 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 的 ATG 开始选取 350bp 左右，设计含有 EcoRI 和 KpnI 酶切位点的正向和反向引物，选取 EcoRI 和 KpnI 作为酶切位点。以 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 的克隆载体为模板，扩增对应片段后连接 pEASY-Blunt 克隆载体后测序验证。选择利用同源重组的方法将目的片段连接 pTRV2 载体，经测序验证正确后，将含有目的片段的 pTRV2 重组载体导入农杆菌 GV3101 备用。

表 3-1 引物序列

Table 3-1 Primer sequence

| 引物名称              | 引物序列                                            |
|-------------------|-------------------------------------------------|
| Primer name       | Primer Sequence                                 |
| <i>NtLZ3</i> -q-F | GTGAGTAAGGTTACCGAATTCGCTCAAGAAATTCCAAACAGGTTT   |
| <i>NtLZ3</i> -q-R | GAGACGCGTGAGCTCGGTACCTAATACCGTTGCTAATTCCTCCATC  |
| <i>NtLZ5</i> -q-F | GTGAGTAAGGTTACCGAATTCCTTCTTTAACTACTCTTCCTCCTGAT |
| <i>NtLZ5</i> -q-R | GAGACGCGTGAGCTCGGTACCTACCCAATGAACCTTGTGTCATGA   |
| NtActin-q-F:      | TTCCGATGCCCTGAAGTCCT                            |
| NtActin-q-R:      | TCTGCCTTTGCAATCCACAT                            |

2.3 利用 VIGS 系统创建沉默材料以及对应沉默材料的鉴定

利用烟草下表皮注射技术（具体操作步骤见附录八），选取生长至 3-4 叶长势一致本氏烟草为注射对象，设立阳性对照 pTRV2-PDS，阴性对照 pTRV2 空载体和实验组 pTRV2- *NtLZ3*、pTRV2- *NtLZ5*。对获得的 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 沉默材料进行正常供磷（0.5mM Pi，+P）和低磷（10μM Pi，-P）处理。

利用 NCBI 设计 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 的特异性引物，引物序列第二章表 2.1，利用实时荧光定量 PCR 鉴定 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 的表达水平。

2.4 烟草总磷含量测定

采取烟草根部并用超纯水洗净和烟草叶部，用吸水纸擦干残留液体。采取植株样于干净信封中，于烘箱中烘干磨粉，消煮后利用钼蓝比色法测烟草总磷含量。具体方法见附录十二。

2.5 烟草类黄酮含量测定

对烟草目的基因沉默材料进行正常供磷（0.5mM Pi，+P）和低磷（10μM Pi，-P）处理处理 4 周天后，分地上部和地下部单株采样，冷冻干燥 48 小时，测黄酮含量具体方法见附录七。

2.6 烟草类黄酮代谢通路关键基因 qRT-PCR 分析

为研究 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 对烟草类黄酮代谢通路关键基因表达的影响，从 NCBI 下载烟草类黄酮代谢通路基因序列，设计特异性 qRT-PCR 引物，利用 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 沉默株系和空载对照株系 cDNA 为模板对类黄酮代谢通路关键基因的表达进行分析。

表 3-2 qRT-PCR 引物  
Table 3-2 Primers for qRT-PCR

| 引物名称        | 引物序列                   |
|-------------|------------------------|
| Primer name | primer sequence        |
| NtActin-F:  | TTCCGATGCCCTGAAGTCCT   |
| NtActin-R:  | TCTGCCTTTGCAATCCACAT   |
| NtCHS-q-F   | GAGTCCTTGTTGTTTGTTCAG  |
| NtCHS-q-R   | AGTAAGTGGAATGTAAGCCC   |
| NtPAL-q-F   | CAACTTCCAAGGCACTCCTATC |
| NtPAL-q-R   | CAGTGAGATTAGAGGGCAAACC |
| Nt4CL-q-F   | GCGCTTCATATTTAGGAGCC   |
| Nt4CL-q-R   | CCTTCACTTTGCCCACAAG    |
| NtCHI-q-F   | GTCAGGCCATTGAAAAGCTC   |
| NtCHI-q-R   | CTAATCGTCAATGCCCAAC    |
| NtANS-q-F   | TGGCGTTGAAGCTCATACTG   |
| NtANS-q-R   | GGAATTAGGCACACACTTTGC  |

2.7 菌根真菌的接种实验

将注射 TRV2 空载的阴性对照材料以及 *ntlz3* 和 *ntlz5* 的沉默材料接种菌根真菌 35 天后采样。

2.8 丛枝菌根侵染指标统计

具体方法见附录九

## 2.9 数据统计分析

利用 Excel 软件对实验数据进行统计和分析，利用 GraphPad Prism8 进行作图。

## 3 结果与分析

### 3.1 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 沉默对烟草磷素吸收利用和类黄酮合成的影响

#### 3.1.1 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 沉默效果鉴定

八氢番茄红素脱氢酶基因 (*PDS*) 作为农杆菌侵染是否成功的报告基因，该基因突变会导致烟草叶片白化，因此被用来做 VIGS 系统的阳性对照。在本研究中，为鉴定 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 是否是影响烟草磷吸收利用和类黄酮合成的转录因子，利用烟草子叶下表皮注射技术获得对应的沉默材料。将 *ntlz3* 和 *ntlz5* 沉默植株和空载阴性对照烟草进行正常供磷 (0.5mM Pi, +P) 和低磷 (10μM Pi, -P) 处理，其中设立 10 个生物学重复，4 周后观察烟草表型。结果显示，pTRV2-*PDS* 阳性对照植株叶片显白色，证明 VIGS 系统建立并侵染成功。其中 pTRV2-*NtLZ3* 和 pTRV2-*NtLZ5* 植株相较于空载对照，植株大小变大。同时提取烟草对应阳性对照变白新叶部位 RNA，利用实时荧光定量技术检测 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 的表达情况。结果显示，相较于空载阴性对照株系，*ntlz3* 和 *ntlz5* 沉默植株中对应基因的表达量显著降低。同时正常供磷处理中空载阴性对照烟草中 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 的表达水平高于低磷处理中空载对照烟草。

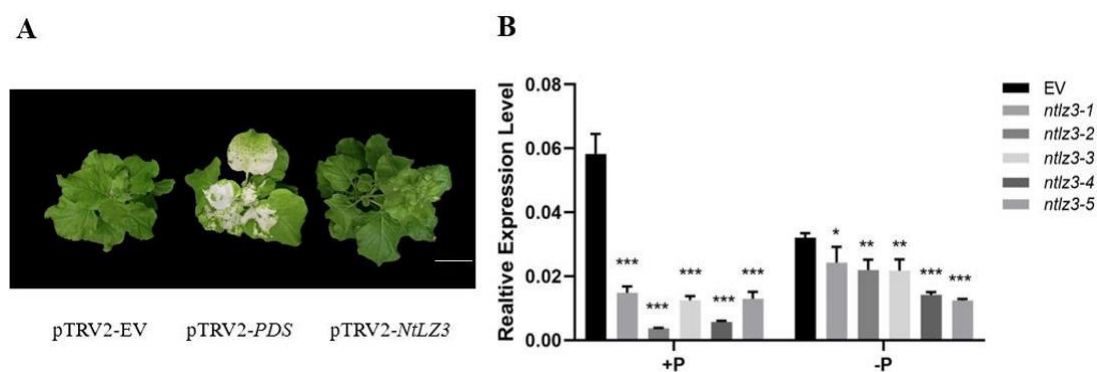


图 3-1 *NtLZ3*-VIGS 的表型 (A) 和沉默效果鉴定 (B)

Fig. 3-1 The phenotype (A) and qRT-PCR analysis(B) of *NtLZ3*-VIGS knockdown mutants

注: EV: 空载对照株系; *ntlz3*: *NtLZ3*-VIGS沉默株系; pTRV2-*PDS*: 阳性白化株系。B: 实时荧光定量检测空载对照植株 (EV) 和 *ntlz3*沉默株系叶中*NtLZ3*的相对表达水平, 10个生物学重复。图中标尺长度5cm。\*为存在显著性差异; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ 。

Note: EV: empty vector control plants; *ntlz3*: *NtLZ3*-VIGS silenced lines; pTRV2-*PDS*: positive albino lines. B: Real-time fluorescence quantitative detection of the relative expression levels of *NtLZ3* in the leaves of empty control plants (EV) and *NtLZ3*-VIGS silenced lines. Values are the means of ten biological replicates with SDs. Bars=5cm. Asterisks indicate significant differences; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ .

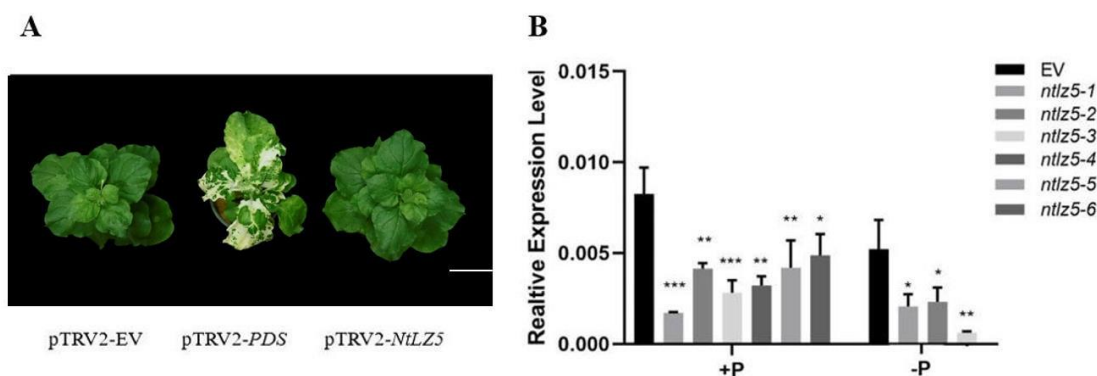


图 3-2 *NtLZ5*-VIGS 的表型 (A) 和沉默效果鉴定 (B)

Fig. 3-2 The phenotype(A) and qRT-PCR analysis(B) of *NtLZ5*-VIGS knockdown mutants

注: EV: 空载对照株系; *ntlz5*: *NtLZ5*-VIGS沉默株系; pTRV2-*PDS*: 阳性白化株系。B: 实时荧光定量检测空载对照植株 (EV) 和 *NtLZ5*-VIGS沉默株系叶中*NtLZ5*的相对表达水平, 9个生物学重复。图中标尺长度5cm。\*为存在显著性差异; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ 。

Note: EV: empty vector control plants; *ntlz5*: *NtLZ5*-VIGS silenced lines; pTRV2-*PDS*: positive albino lines. B: Real-time fluorescence quantitative detection of the relative expression levels of *NtLZ5* in the leaves of empty control plants (EV) and *NtLZ5*-VIGS silenced lines. Values are the means of nine biological replicates with SDs. Bars=5cm. Asterisks indicate significant differences; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ .

3.1.2 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 沉默对烟草叶片类黄酮含量的影响

为研究 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 是否影响烟草类黄酮合成, 对长势一致的具有 4-5 叶片的本氏烟草进行下表皮注射, 对其进行正常供磷 (0.5mM Pi, +P) 和低磷 (10μM Pi, -P) 处理 4 周后采取对应阳性对照变白新叶 RNA 样品, 鉴定目的基因沉默效果后检测总黄酮含量。结果表明在正常供磷条件下与空载相比 *ntlz3* 沉默株系叶片中的类黄酮含量显著增加。而在低磷条件下 *ntlz3* 沉默株系中的类黄酮与空载对照相比无明显差异。对类黄酮代谢通路关键基因进行定量分析发现, *NtLZ3* 沉默显著增强了 *Nt4CL* 基因的表达。推测 *Nt4CL* 基因可能参与影响 *ntlz3* 沉默株系中类黄酮的生物合成, *NtLZ3* 可能是调控烟草类黄酮合成的负调控转录因子。另一方面, 与空载对照相比, 正常供磷条件下 *NtLZ5* 沉默导致叶片中类黄酮显著降低。而在低磷条件下 *ntlz5* 沉默株系中类黄酮含量与空载对照相比无显著差异。通过实时荧光定量 PCR 探究 *NtLZ5* 对类黄酮代谢通路基因的影响, 发现 *NtLZ5* 沉默影响 *NtPAL*、*Nt4CL1*、*NtCHS*、*NtCHI* 的表达水平, 推测 *NtLZ5* 可能是通过影响 *NtPAL*、*Nt4CL*、*NtCHS*、*NtCHI* 基因的表达来调控烟草类黄酮的生物合成, 其可能是调控烟草类黄酮合成的正调控转录因子。

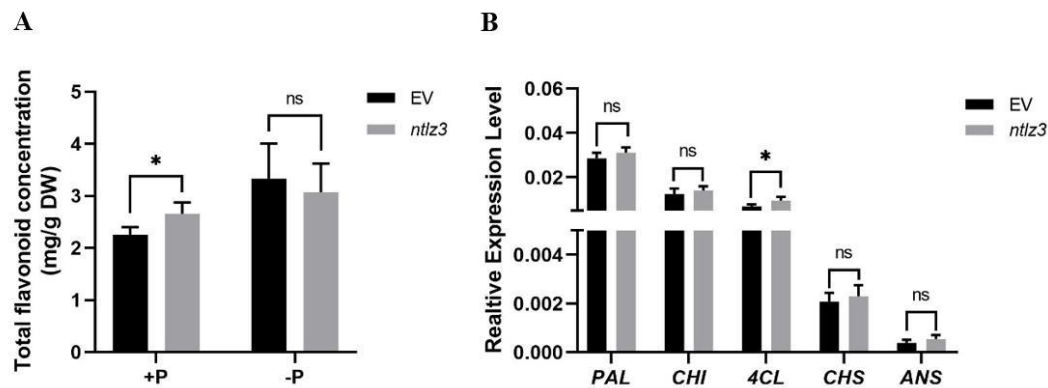


图 3-3 高低磷处理下 *NtLZ3* 沉默对烟草叶片类黄酮含量的影响

Figure 3-3 Effects of *NtLZ3* silencing on flavonoid content in tobacco leaves under high and low phosphorus treatments

A: *NtLZ3*沉默对烟草叶片总黄酮含量的影响。B: *NtLZ3*沉默对烟草类黄酮代谢通路关键基因的影响, 3个生物学重复。\*为存在显著性差异; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , ns表示无显著性差异。

Note: A: Effects of *NtLZ3* silencing on the content of total flavonoids in tobacco. B: Effects of *NtLZ3* silencing on key genes of tobacco flavonoid metabolic pathway. Values are the means of three biological replicates with SDs. Asterisks indicate significant differences; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , ns means no significant difference.

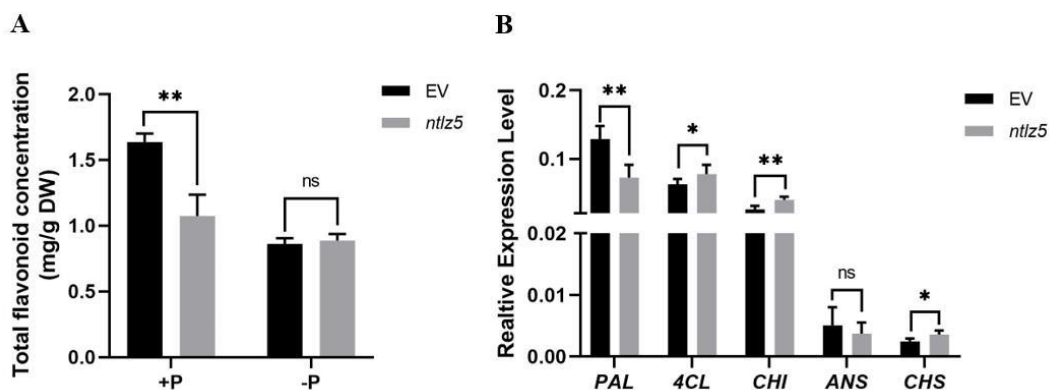


图 3-4 高低磷处理下 *NtLZ5* 沉默对烟草叶片类黄酮含量的影响

Figure 3-4 Effects of *NtLZ5* silencing on flavonoid content in tobacco leaves under high and low phosphorus treatments

注：A： *NtLZ5* 沉默对烟草总黄酮含量的影响。B： *NtLZ5* 沉默对烟草类黄酮代谢通路关键基因的影响，3个生物学重复。\*为存在显著性差异；\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ，ns 表示无显著性差异。

Note: A: Effects of *NtLZ5*-VIGS silencing on the content of total flavonoids in tobacco. B: Effects of *NtLZ5* silencing on key genes of tobacco flavonoid metabolic pathway. Values are the means of three biological replicates with SDs. Asterisks indicate significant differences; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , ns means no significant difference.

### 3.1.3 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 沉默对烟草叶片总磷含量的影响

第二章研究发现 *NtLZ3* 在烟草根部、叶片中受缺磷诱导下调；*NtLZ5* 在烟草根部中受缺磷诱导上调，在叶片中受缺磷诱导下调。为研究 *NtLZ3* 和 *NtLZ5* 是否影响烟草磷含量，对长势一致的具有 4-5 叶片的本氏烟草进行下表皮注射，正常供磷（0.5mM Pi, +P）和低磷（10 $\mu$ M Pi, -P）处理 4 周后采取对应阳性对照变白新叶 RNA 样品，鉴定沉默效果后检测样品总磷含量。结果表明正常供磷条件下与空载对照相比 *ntlz3* 沉默株系叶片总磷含量显著降低，在低磷条件下 *ntlz3* 沉默株系中的总磷含量与空载对照相比无明显差异。推测 *NtLZ3* 可能是调控烟草磷素吸收利用的正调控转录因子。而正常供磷条件下与空载对照相比 *ntlz5* 沉默株系叶片总磷含量显著降低，低磷条件下 *ntlz5* 沉默株系中的总磷含量与空载对照相比无明显差异，推测 *NtLZ5* 可能是调控烟草磷素吸收利用的正调控转录因子。

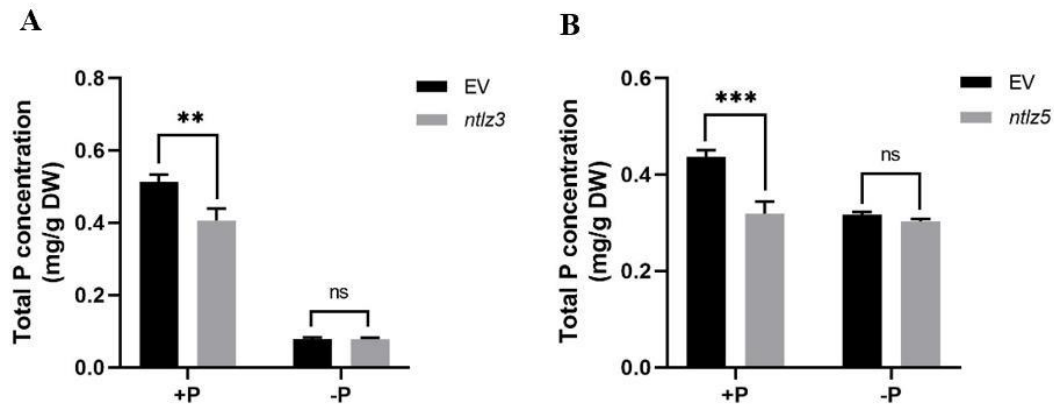


图 3-5 高低磷处理下 *NtLZ3* (A) 和 *NtLZ5* (B) 沉默对烟草叶片总磷含量的影响

Figure 3-5 Effects of *NtLZ3* (A) and *NtLZ5* (B) silencing on total phosphorus content in tobacco leaves under high and low phosphorus treatments

注: EV: 空载对照株系; *ntlz3*: *NtLZ3*-VIGS 沉默株系; *ntlz5*: *NtLZ5*-VIGS 沉默株系, 3 个生物学重复。\* 为存在显著性差异; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , ns 表示无显著性差异。

Note: EV: empty control line; *ntlz3*: *NtLZ3*-VIGS silenced line; *ntlz5*: *NtLZ5*-VIGS silenced line, 3 biological replicates. \* means significant difference; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , ns means no significant difference.

## 3.2 *NtLZ5* 沉默对烟草菌根共生体系的影响

### 3.2.1 *NtLZ5* 沉默效果鉴定

在前一章中由于 *NtLZ3* 在烟草根中表达水平较低, 所以选取根中表达量较高的 *NtLZ5* 验证是否影响烟草菌根共生体系的建立。在本研究中通过烟草子叶下表皮注射技术获得对应的基因沉默材料, 对其进行接菌和不接菌根真菌处理, 以此来验证 *NtLZ5* 是否是影响烟草菌根共生体系的转录因子。将 *ntlz5* 沉默植株和空载对照植株接种 AM 真菌, 低磷处理 35 天后观察烟草表型。结果显示, pTRV2-*PDS* 阳性对照植株叶片显白色, 证明 VIGS 系统建立成功。其中 *ntlz5* 沉默株系相较于空载对照植株相对较大。同时提取烟草根部 RNA, 利用实时荧光定量技术检测 *NtLZ5* 的表达情况。结果显示, 相较于空载对照, *ntlz5* 沉默株系中对应 *NtLZ5* 基因的表达量显著降低。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/688026056130007023>