

学校编码: 10384
学号: 21620141152464

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

烟草基因 *Nt21* 与 *Nt92* 的功能初探

A Preliminary Study on the Function Analysis of *Nt21* and
Nt92 Gene in *Nicotiana tabacum*

陈晓芬

指导教师姓名: 陈亮 教授

专 业 名 称: 发育生物学

论文提交日期: 2017 年 5 月

论文答辩时间: 2017 年 5 月

学位授予日期: 2017 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2017 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作 权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
缩略词.....	V
第一章 前言	1
1.1 烟草.....	1
1.1.1 烟草的进化与分类.....	1
1.1.2 烟草的基因组.....	3
1.1.3 烟草腺毛.....	4
1.1.4 腺毛分泌物（西柏烷烃）	4
1.2 转录因子.....	8
1.2.1 MYB 转录因子	9
1.2.2 WRKY 转录因子	12
1.3 DUF 基因家族的相关研究.....	13
1.4 本研究的目的是和意义.....	14
第二章 材料与方法	15
2.1 实验材料.....	15
2.1.1 烟草材料.....	15
2.1.2 载体质粒与菌株.....	15
2.1.2.1 载体质粒	15
2.1.2.2 载体图谱	16
2.1.2.3 菌株	17
2.1.3 主要酶类、试剂盒及仪器.....	17
2.1.3.1 酶类	17
2.1.3.2 试剂盒	18
2.1.3.3 抗生素	18
2.1.3.4 其他试剂	19
2.1.3.5 仪器	19
2.2 实验方法.....	20
2.2.1 烟草材料的生长和处理.....	20
2.2.1.1 烟草无菌苗的获得——种子的消毒	20
2.2.1.2 组织表达谱的取样	21
2.2.1.3 烟草幼苗的激素处理方法	21
2.2.2 基本培养基的配制.....	22
2.2.3 烟草叶片的瞬时转化.....	23
2.2.3.1 本氏烟的栽培	23

2.2.3.2 本氏烟的瞬时转化方法	23
2.2.3.3 相关溶液的配制	24
2.2.4 激光共聚焦扫描观察	24
2.2.5 农杆菌介导的烟草遗传转化	24
2.2.6 GUS 组织化学分析	25
2.2.6.1 GUS 染色液的配制	25
2.2.6.2 组织染色步骤	26
2.2.7 扫描电镜观察	26
2.2.7.1 具体步骤	26
2.2.7.2 固定液的配制	27
2.2.8 罗丹明染色	27
2.2.9 生物信息学分析	27
2.2.10 烟草基因组 DNA 的提取	28
2.2.10.1 具体步骤	28
2.2.10.2 溶液配制	28
2.2.11 烟草总 RNA 的提取	29
2.2.12 RNA 样品中基因组 DNA 的去除	30
2.2.13 cDNA 第一链的合成	30
2.2.14 PCR 技术	31
2.2.14.1 普通 taq 酶 PCR	31
2.2.14.2 高保真酶 PCR	32
2.2.14.3 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)	32
2.2.14.4 荧光定量 PCR 及普通 PCR 检测所用引物	34
2.2.15 DNA 片段的回收	35
2.2.15.1 DNA 的凝胶回收	35
2.2.15.2 PCR/酶切产物的回收	36
2.2.16 DNA 的酶切	36
2.2.17 DNA 片段的去磷酸化	36
2.2.18 DNA 片段加 A 尾	37
2.2.19 DNA 连接反应	37
2.2.20 Gateway 克隆系统	37
2.2.20.1 BP 反应	37
2.2.20.2 LR 反应	38
2.2.21 In-Fusion 无缝连接	39
2.2.22 质粒的提取	40
2.2.23 感受态的制备	41
2.2.23.1 大肠杆菌热激化感受态	41
2.2.23.2 农杆菌热激化感受态的制备	42
2.2.24 感受态细胞的转化	42
2.2.24.1 大肠杆菌感受态细胞的转化	42
2.2.24.2 农杆菌感受态细胞的转化	42
2.2.25 烟草遗传转化载体的构建	43
2.2.25.1 组织定位表达载体的构建	43
2.2.25.2 过表达、亚细胞定位载体的构建	43

2.2.25.3 RNAi 抑制表达载体的构建	44
2.2.26 转基因植株鉴定	45
2.2.27 酵母自激活实验	45
2.2.27.1 原理	45
2.2.27.2 载体构建	46
2.2.27.3 自激活实验	46
2.2.28 数字基因表达谱测序 (DGE)	48
2.2.28.1 样品制备	48
2.2.28.2 测序流程	48
2.2.28.3 分析流程	50
第三章 <i>Nt21</i> 基因的功能研究	51
3.1 <i>Nt21</i> 生物信息学分析	51
3.1.1 <i>Nt21</i> 的分子遗传进化	51
3.1.2 <i>Nt21</i> 基因及蛋白序列的分析	53
3.2 <i>Nt21</i> 亚细胞定位分析	55
3.2.1 <i>Nt21</i> 亚细胞定位载体的构建	55
3.2.2 <i>Nt21</i> 蛋白的定位	55
3.3 <i>Nt21</i> 蛋白的自激活活性检测	56
3.3.1 BD 载体的构建 (pGBKT7- <i>Nt21</i> F)	56
3.3.2 <i>Nt21</i> 蛋白自激活活性检测	57
3.3.2.1 <i>Nt21</i> 全长自激活活性检测	57
3.3.2.2 <i>Nt21</i> 蛋白自激活结构域验证	57
3.4 <i>Nt21</i> 的表达模式分析	59
3.4.1 <i>Nt21</i> 启动子区顺式作用元件的预测	59
3.4.2 <i>Nt21</i> 的组织表达模式分析	60
3.4.2.1 qRT-PCR 分析 <i>Nt21</i> 的组织表达模式	60
3.4.2.2 <i>Nt21</i> 组织定位表达载体的构建	61
3.4.2.3 <i>Nt21</i> 启动子融合 <i>GUS</i> 表达的转基因烟草鉴定	62
3.4.2.4 <i>Nt21</i> 的组织表达模式	63
3.4.2.5 ABA 处理下 <i>Nt21</i> 的表达模式	63
3.5 <i>Nt21</i> 转基因烟草的表型分析	64
3.5.1 <i>Nt21</i> 表达载体的构建	64
3.5.1.1 <i>Nt21</i> 过表达载体的构建 (pCXSN-HA- <i>Nt21</i>)	64
3.5.1.2 <i>Nt21</i> 干扰表达载体的构建 (pH7GWIWG2(II)- <i>Nt21</i>)	65
3.5.2 <i>Nt21</i> 转基因烟草的鉴定	66
3.5.2.1 <i>Nt21</i> 过表达转基因烟草的鉴定	66
3.5.2.2 <i>Nt21</i> RNAi 干扰转基因烟草的鉴定	67
3.5.3 转基因烟草中 <i>Nt21</i> 的表达水平	67
3.5.3.1 qRT-PCR 检测 T ₀ 代过表达转基因烟草中 <i>Nt21</i> 的表达水平	67
3.5.3.2 qRT-PCR 检测 T ₀ 代 RNAi 转基因烟草中 <i>Nt21</i> 基因的表达水平	68
3.5.4 转基因烟草中烷烃类合成相关 <i>Maker</i> 基因的检测	69
3.5.4.1 qRT-PCR 检测 T ₀ 代过表达转基因烟草中 <i>CYC/CYP</i> 的表达水平	69

3.5.4.2 qRT-PCR 检测 T ₀ 代 RNAi 转基因烟草中 <i>CYC/CYP</i> 的表达水平	70
3.5.5 <i>Nt21</i> 转基因烟草叶片的显微观察	72
3.6 <i>Nt21</i> 过表达转基因植株的数字表达谱分析 (DGE)	73
3.6.1 RNA 样品质检	73
3.6.2 GO 富集分析	74
3.6.3 KEGG pathway 分析	78
第四章 <i>Nt92</i> 基因功能研究	79
4.1 <i>Nt92</i> 生物信息学分析	79
4.1.1 DUF868 家族特征及序列分析	79
4.1.2 烟草 DUF868 基因	81
4.1.3 <i>Nt92</i> 基因及蛋白序列的分析	82
4.2 <i>Nt92</i> 亚细胞定位分析	83
4.2.1 <i>Nt92</i> 亚细胞定位表达载体的构建	83
4.2.2 <i>Nt92</i> 蛋白的定位	84
4.3 <i>Nt92</i> 蛋白的自激活活性检测	85
4.3.1 BD 载体的构建 (pGBKT7- <i>Nt92</i>)	85
4.3.2 <i>Nt92</i> 蛋白自激活活性检测	85
4.4 <i>Nt92</i> 的表达模式分析	86
4.4.1 <i>Nt92</i> 启动子区顺式作用元件的预测	86
4.4.2 <i>Nt92</i> 的组织表达模式分析	88
4.4.2.1 qRT-PCR 分析 <i>Nt92</i> 的组织表达模式	88
4.4.2.2 <i>Nt92</i> 组织定位表达载体的构建	88
4.4.2.3 <i>Nt92</i> 启动子融合 <i>GUS</i> 表达的转基因烟草鉴定	89
4.4.2.4 <i>Nt92</i> 的组织表达模式	90
4.5 <i>Nt92</i> 转基因的表型分析	91
4.5.1 <i>Nt92</i> 表达载体的构建	91
4.5.1.1 <i>Nt92</i> 过表达载体的构建 (pCXSN-Myc- <i>Nt92</i>)	91
4.5.1.2 <i>Nt92</i> 干扰表达载体的构建 (pH7GWIWG2(II)- <i>Nt92</i>)	92
4.5.2 <i>Nt92</i> 转基因烟草植株的鉴定	92
4.5.2.1 <i>Nt92</i> 过表达转基因烟草的鉴定	92
4.5.2.2 <i>Nt92</i> RNAi 干扰转基因烟草的鉴定	93
4.5.3 转基因烟草中 <i>Nt92</i> 的表达水平	94
4.5.3.1 qRT-PCR 检测 T ₀ 代过表达转基因烟草中 <i>Nt92</i> 的表达水平	94
4.5.3.2 qRT-PCR 检测 T ₀ 代 RNAi 干扰转基因烟草中 <i>Nt92</i> 的表达水平	94
4.5.4 转基因烟草中烷烃类合成相关 <i>Maker</i> 基因的检测	95
4.5.4.1 qRT-PCR 检测 T ₀ 代过表达转基因烟草中 <i>CYC/CYP</i> 的表达水平	95
4.5.4.2 qRT-PCR 检测 T ₀ 代 RNAi 转基因烟草中 <i>CYC/CYP</i> 的表达水平	97
4.6 <i>Nt92</i> 过表达转基因植株的数字表达谱分析 (DGE)	98
4.6.1 GO 富集分析	98
4.6.2 KEGG-pathway 分析	100
第五章 讨论	105

5.1 <i>Nt21</i> 基因功能分析	105
5.1.1 <i>Nt21</i> 的组织表达特异性	105
5.1.2 <i>Nt21</i> 蛋白的定位	106
5.1.3 <i>Nt21</i> 蛋白的自激活验证	110
5.1.4 <i>Nt21</i> 转基因植株的表型分析	112
5.1.5 <i>Nt21</i> 过表达转基因植株的数字表达谱	112
5.2 <i>Nt92</i> 基因功能分析	118
5.2.1 <i>Nt92</i> 的组织表达特异性	118
5.2.2 <i>Nt92</i> 蛋白的定位与自激活验证	118
5.2.3 <i>Nt92</i> 转基因植株的表型分析	118
5.2.4 <i>Nt92</i> 过表达转基因植株的数字表达谱	119
第六章 总结	120
6.1 <i>Nt21</i>	120
6.2 <i>Nt92</i>	121
致谢	122
参考文献	123

Contents

Abstract(In Chinese)	I
Abstract(In English)	III
Abbreviation	V
Chapter1 Introduction	1
1.1 Tobacco	1
1.1.1 Evolution and classification of tobacco	1
1.1.2 Tobacco genome	3
1.1.3 Tobacco glandular trichome.....	4
1.1.4 Glandular trichome secretions	4
1.2 Transcription factor	8
1.2.1 MYB transcription factor	9
1.2.2 WRKY transcription factor	12
1.3 The research of DUF families	13
1.4 The purpose and significance of this study	14
Chapter2 Materials and methods	15
2.1 Materials	15
2.1.1 Tobacco materials	15
2.1.2 Vectors and strains	15
2.1.2.1 Plasmid vectors.....	15
2.1.2.2 Vector maps	16
2.1.2.3 Bacteria.....	17
2.1.3 Main Enzymes, kits and apparatus.....	17
2.1.3.1 Enzymes	17
2.1.3.2 Kits	18
2.1.3.3 Antibiotic	18
2.1.3.4 Other reagents.....	19
2.1.3.5 Apparatuses	19
2.2 Methods	20
2.2.1 Growth and treatments of tobacco	20
2.2.1.1 Acquisition of tobacco aseptic seedlings.....	20
2.2.1.2 The sampling tissue expression profile	21
2.2.1.3 Hormone treatment of tobacco seedlings	21
2.2.2 The basic medium	22
2.2.3 The transient transformation for tobacco leaves	23
2.2.3.1 N.benthamiana planting.....	23

2.2.3.2 The method of transient transformation for <i>N.benthamiana</i>	23
2.2.3.3 Preparation of related solutions	24
2.2.4 Confocal	24
2.2.5 Tobacco transformation mediated by <i>agrobacterium tumefaciens</i>	24
2.2.6 GUS histochemical analysis	25
2.2.6.1 GUS Dyeing Solution	25
2.2.6.2 GUS staining steps	26
2.2.7 Observation through Scanning Electron Microscope	26
2.2.7.1 Specific steps	26
2.2.7.2 Fixing solution	27
2.2.8 Rhodamine staining	27
2.2.9 Bioinformatics Analysis	27
2.2.10 Extraction of tobacco total DNA	28
2.2.10.1 Specific steps	28
2.2.10.2 Preparation of related solutions	28
2.2.11 Extraction of tobacco total RNA	29
2.2.12 DNA digestion in RNAs samples	30
2.2.13 Synthesis of cDNA	30
2.2.14 PCR	31
2.2.14.1 General PCR	31
2.2.14.2 PCR with High fidelity Enzyme	32
2.2.14.3 Real-time PCR (qRT-PCR)	32
2.2.14.4 PCR primers	34
2.2.15 Recycling the DNA fragments	35
2.2.15.1 DNA fragments extracted from gel	35
2.2.15.2 Recycling the digested or PCR product	36
2.2.16 DNA cut by the restriction endonucleases	36
2.2.17 Dephosphorylation of DNA fragments	36
2.2.18 Plus A to the tail of DNA	37
2.2.19 DNA ligation	37
2.2.20 Gateway cloning system	37
2.2.20.1 BP reaction	37
2.2.20.2 LR reaction	38
2.2.21 In-Fusion seamless connection	39
2.2.22 Plasmid miniprep	40
2.2.23 Competent cell Preparation	41
2.2.23.1 Competent cell Preparation for <i>E.coli</i>	41
2.2.23.2 Competent cell Preparation for <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	42
2.2.24 Competent cell transduction	42
2.2.24.1 <i>E.coli</i> transduced by heat shock	42
2.2.24.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> by heat shock	42
2.2.25 Construction of tobacco genetic transformation vector	43
2.2.25.1 Construction of tissue localization expression vector	43
2.2.25.2 Construction of over-expression and subcellular localization vector	43

2.2.25.3 Construction of RNA interference vector.....	44
2.2.26 Identification of transgenic plants.....	45
2.2.27 Yeast self-activation experiment.....	45
2.2.27.1 Principle.....	45
2.2.27.2 Vector Construction.....	46
2.2.27.3 Self-activation experiment.....	46
2.2.28 DGE.....	48
2.2.28.1 Sample Preparation.....	48
2.2.28.2 Sequencing process.....	48
2.2.28.3 Analysis process.....	50
Chapter3 Reaserch on the Function of <i>Nt21</i>.....	51
3.1 Bioinformatics Analysis of <i>Nt21</i>.....	51
3.1.1 Molecular genetic evolution of <i>Nt21</i>	51
3.1.2 Gene and protein sequence analysis of <i>Nt21</i>	53
3.2 Analysis of <i>Nt21</i> subcellular localization.....	55
3.2.1 Construction of subcellular localization vector for <i>Nt21</i>	55
3.2.2 <i>Nt21</i> Protein localization.....	55
3.3 <i>Nt21</i> Examination of self-activation activity in <i>Nt21</i> protein.....	56
3.3.1 Construction of BD vector(pGBKT7- <i>Nt21F</i>).....	56
3.3.2 Self-activation experiment of <i>Nt21</i> protein.....	57
3.3.2.1 Self-activation verification in ful-length of <i>Nt21</i> protein.....	57
3.3.2.2 Verification of activation domain in <i>Nt21</i> protein.....	57
3.4 Analysis of expression pattern for <i>Nt21</i>.....	59
3.4.1 Prediction of ci-acting elements in the <i>Nt21</i> promoter region.....	59
3.4.2 Analysis of tissue expression pattern for <i>Nt21</i>	60
3.4.2.1 Tissue expression pattern analyzed by qPCR.....	60
3.4.2.2 Construction of tissue localization expression vector for <i>Nt21</i>	61
3.4.2.3 Identification of P _{<i>Nt21</i>} :: <i>GUS</i> transgenic tobacco.....	62
3.4.2.4 Expression pattern of <i>Nt21</i>	63
3.4.2.5 Expression pattern of <i>Nt21</i> under ABA treatment.....	63
3.5 Phenotypic Analysis of <i>Nt21</i> transgenic tobacco.....	64
3.5.1 Construction of expression vectors for <i>Nt21</i>	64
3.5.1.1 Construction of over-expression vector (pCXSN-HA- <i>Nt21</i>).....	64
3.5.1.2 Construction of RNAi expression vector(pH7GWIWG2(II)- <i>Nt21</i>).....	65
3.5.2 Identification of <i>Nt21</i> transgenic tobacco.....	66
3.5.2.1 Identification of <i>Nt21</i> over-expression transgenic tobacco.....	66
3.5.2.2 Identification of <i>Nt21</i> RNAi transgenic tobacco.....	67
3.5.3 Expression level of <i>Nt21</i> in transgenic tobacco.....	67
3.5.3.1 Expression level of <i>Nt21</i> in over-expression transgenic tobacco.....	67
3.5.3.2 Expression level of <i>Nt21</i> in RNAi transgenic tobacco.....	68
3.5.4 Expression level of Marker gene in transgenic tobacco.....	69
3.5.4.1 Expression level of <i>CYC/CYP</i> in over-expression transgenic tobacco..	69
3.5.4.2 Expression level of <i>CYC/CYP</i> in RNAi transgenic tobacco.....	70

3.5.5 Microscopic Observation on leaves from <i>Nt21</i> transgenic tobacco.....	72
3.6 DGE of over-expression transgenic tobacco	73
3.6.1 QC of RNA sample	73
3.6.2 GO enrichment analysis	74
3.6.3 KEGG pathway analysis	78
Chapter4 Reaserch on the Function of <i>Nt92</i>	79
4.1 Bioinformatics analysis of <i>Nt92</i>.....	79
4.1.1 Family characteristics and sequence analysis of DUF868.....	79
4.1.2 DUF868 gene in tobacco.....	81
4.1.3 Gene and protein sequence analysis of <i>Nt92</i>	82
4.2 Analysis of <i>Nt92</i> subcellular localization.....	83
4.2.1 Construction of subcellular localization vector for <i>Nt92</i>	83
4.2.2 <i>Nt92</i> protein localization.....	84
4.3 Examination of self-activation activity in <i>N92</i> protein	85
4.3.1 Construction of BD vector (pGBKT7- <i>Nt92</i>)	85
4.3.2 Self-activation experiment of <i>Nt92</i> protein	85
4.4 Analysis of expression pattern for <i>Nt92</i>.....	86
4.4.1 Prediction of ci-acting elements in the <i>Nt92</i> promoter region.....	86
4.4.2 Analysis of expression pattern for <i>Nt92</i>	88
4.4.2.1 Tissue expression pattern analyzed by qPCR.....	88
4.4.2.2 Construction of tissue localization expression vector for <i>Nt92</i>	89
4.4.2.3 Identification of P _{<i>Nt92</i>} ::GUS transgenic tobacco.....	89
4.4.2.4 Tissue expression pattern of <i>Nt92</i>	90
4.5 Phenotypic Analysis of <i>Nt92</i> transgenic tobacco	91
4.5.1 Construction of expression vectors for <i>Nt92</i>	91
4.5.1.1 Construction of over-expression vector(pCXS _N -Myc- <i>Nt92</i>)	91
4.5.1.2 Construction of RNAi expression vector(pH7GWIWG2(II)- <i>Nt92</i>).....	92
4.5.2 Identification of <i>Nt92</i> transgenic tobacco	92
4.5.2.1 Identification of <i>Nt92</i> over-expression transgenic tobacco	92
4.5.2.2 Identification of <i>Nt92</i> RNAi transgenic tobacco	93
4.5.3 Expression level of <i>Nt92</i> in transgenic tobacco	94
4.5.3.1 Expression level of <i>Nt92</i> in over-expression transgenic tobacco	94
4.5.3.2 Expression level of <i>Nt92</i> in RNAi transgenic tobacco	94
4.5.4 Expression level of Marker gene in transgenic tobacco	95
4.5.4.1 Expression level of <i>CYC/CYP</i> in over-expression transgenic tobacco..	95
4.5.4.2 Expression level of <i>CYC/CYP</i> in RNAi transgenic tobacco	97
4.6 DGE of over-expression transgenic tobacco	98
4.6.1 GO enrichment analysis	98
4.6.2 KEGG pathway analysis	100
Chapter5 Discussion	105
5.1 Functional Analysis of <i>Nt21</i>	105

5.1.1 Tissue expression specificity of <i>Nt21</i>	106
5.1.2 <i>Nt21</i> protein localization.....	106
5.1.3 Verification of Self-activation in <i>Nt21</i> protein	110
5.1.4 Phenotypic analysis of in <i>Nt21</i> transgenic plants	112
5.1.5 DGE of over-expression in <i>Nt21</i> transgenic tobacco.....	112
5.2 Functional Analysis of <i>Nt92</i>	118
5.2.1 Tissue expression specificity of <i>Nt92</i>	118
5.2.2 Localization and verification of Self-activation in <i>Nt92</i> protein.....	118
5.2.3 Phenotypic analysis of in <i>Nt92</i> transgenic plants	118
5.2.4 DGE of over-expression in <i>Nt92</i> transgenic tobacco.....	119
Chapter6 Conclusion	120
6.1 <i>Nt21</i>	120
6.2 <i>Nt92</i>	121
Acknowledgement.....	122
References	123

摘要

烟草, 不仅是我国乃至全世界最主要的经济作物之一, 还是分子生物学与细胞遗传研究的重要模式植物。烟草全身覆盖表皮毛, 表皮毛是植物抵御生物以及非生物胁迫的第一道防线; 根据有无分泌的腺体, 可分为分泌型腺毛与无分泌能力的表皮毛, 分泌型腺毛是烟草次生代谢发生的主要场所。烟叶腺毛分泌物是烟草香味物质的重要前体物, 不仅具有很高的经济价值 (香料、化妆品、药物、杀虫剂等), 而且是影响烟草品质 (香气、烟味、抗逆性等) 最主要的因素之一。目前, 对腺毛的基因组信息以及关于腺毛基因功能的研究报道较少。因此, 分离和克隆烟草叶片腺毛分泌、抗逆相关的基因并深入研究其生物学功能, 对于高分泌型、抗逆型、低毒型烟草新品种的培育具有十分重要的科学价值和实际意义。

在前期高通量测序的基础上, 对筛选得到的仅在分泌型腺毛中高表达的两个差异基因 *Nt21* 与 *Nt92* 的功能进行深入研究, 主要结果如下:

Nt21 基因编码 320 个氨基酸, 其 N 端含有 2 个高度保守的 MYB 结构域, 属于 R2R3-type MYB 转录因子。*Nt21* 蛋白定位于细胞质中, 具有自激活活性。而 *Nt21* 蛋白的 N 端 (1aa-112aa) 与 C 端 (113aa-320aa) 均无自激活现象, 推测 *Nt21* 蛋白的激活域可能受到破坏。在 *Nt21* 基因的上游存在许多与激素响应、逆境胁迫相关的顺式作用元件以及一个根组织特异表达的元件; ABA 处理野生型幼苗, 发现 2-12h 之间 *Nt21* 表达上调, 4h 时的达到最高的表达水平, 说明 *Nt21* 响应 ABA 并且可能参与胁迫应答。*Nt21* 在各个组织中均有不同程度的表达, 在幼根中的 GUS 活性与表达水平最高。此外, 过表达 *Nt21* 使得西柏烷烃合成的 Marker 基因 *CYC* 与 *CYP* 表达上调, 而抑制 *Nt21* 的表达使得 *CYC* 与 *CYP* 表达下调; 而且发现在 *Nt21* 过表达植株的叶片表面有类似颗粒状的沉积物形成; 同时, DGE 测序发现 *Nt21* 过表达植株中与香叶基芳樟醇合成酶基因 *TPS4* 高度同源的 *gene_79205* 显著下调。因此, 初步推测过表达 *Nt21* 使得 *gene_79205* 表达下调, 香叶基芳樟醇合成受阻, 类萜前体物 GGPP 富集, 二萜西柏烷烃类合成基因 *CYC* 与 *CYP* 表达上调, 西柏烷烃类化合物增多, 腺毛次生代谢活动增强, 导致分泌物在叶片表面富集形成颗粒状沉积物。

Nt92 基因编码 316 个氨基酸, 属于 DUF868 大家族, 其 C 端含有 1 个高度

保守的 DUF868 结构域，该结构域功能未知。Nt92 蛋白定位于细胞质中，无自激活活性。在 *Nt92* 的启动子区域中存在大量与激素响应、逆境胁迫相关的顺式作用元件。在 $P_{Nt92}::GUS$ 转基因植株的各组织器官均能检测到 *GUS* 的表达，且在成熟叶片中 *GUS* 活性最高，这与 qRT-PCR 的检测结果基本一致。与野生型对照相比，*Nt92* 过表达植株与 *Nt92* RNAi 植株在表型上均无显著差异。而 DGE 测序发现，在 *Nt92* 过表达植株中许多与逆境胁迫响应以及膜转运相关的基因差异表达，表明 *Nt92* 很可能与逆境胁迫应答以及细胞内物质（例如蛋白）的转运的密切相关。

关键词：烟草；*Nt21*；MYB；*Nt92*；DUF868

Abstract

Nicotiana, is one of the most important economic crops in our country and the world, but also an important model of molecular biology and cell genetic research. Tobacco is covered with epidermal hair, which is the first line of defense against biotic and abiotic stress. According to whether has glandular body, epidermal hair can be divided into secretory glandular trichome and no secretory of epidermal hair, glandular trichome is the main place for the occurrence of secondary metabolism in tobacco. The secretions of tobacco glandular trichome which is important precursors of tobacco flavoring substances, not only has high economic value (spices, cosmetics, drugs, insecticides, etc.), but also is one of the most important factors which affects the quality of tobacco (aroma, smoke, stress resistance). At present, there are few reports on the genomic information and function of glandular trichome. Therefore, it has a very important scientific value and practical significance to isolate, clone and study deeply biological function of genes about secretion and stress from glandular trichome in tobacco, and finally to cultivate the high secretion, stress resistance, low toxicity of new varieties of tobacco.

On the basis of previous high-throughput sequencing, the function of *Nt21* and *Nt92*, which are highly expressed only in secretory glandular trichome, were studied in detail. The main results are as follows:

The *Nt21* gene encodes 320 amino acids and contains two highly conserved MYB domains, belonging to the R2R3-type MYB transcription factor. Nt21 protein is located in the cytoplasm and has self-activating activity. However, neither the N-terminal (1aa-112aa) nor the C-terminal (113aa-320aa) of the Nt21 protein was self-activating, suggesting that the activation domain of the Nt21 protein was destroyed. There are many cis-acting elements associated with hormone response, stress, and a root-specific element expression in the upstream of the *Nt21* gene; ABA treatment of wild-type seedlings to be found *Nt21* genes upregulated between 2h and 12h, the highest expression levels at 4h, indicating *Nt21* responses to ABA and may

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库