

# 一个响应土壤缺铁拟南芥突变体的分离及鉴定<sup>①</sup>

王立赛<sup>1,2</sup>, 闫明科<sup>1,2</sup>, 王 晗<sup>1</sup>, 沈仁芳<sup>1</sup>, 兰 平<sup>1\*</sup>

(1 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; 2 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘 要:** 铁是植物生长发育必需的一种微量元素, 但土壤中植物可直接吸收利用的铁非常有限。缺铁使作物生长受限, 进而影响人类膳食健康。植物体能够通过调节一系列基因表达的变化来响应缺铁, 但目前对该调控系统的研究仍不完善。*CYP82C4(At4g31940)*是拟南芥中一个强烈响应缺铁的基因, 本研究将该基因启动子连接荧光素酶报告基因 *LUC2* 并转化拟南芥, 进一步通过 T-DNA 的随机插入得到一个响应缺铁信号的突变体库。通过筛选该突变体库, 我们得到一个强烈响应缺铁信号的突变体 L22-8。和野生型相比, 正常情况下 L22-8 地上部和地下部内源 *CYP82C4* 的表达量均显著增高, 缺铁处理时其地上部表达量仍高于野生型, 而地下部则不明显。定量结果显示 *FIT*, *bHLH38* 和 *bHLH39* 等植物铁代谢关键调控因子的表达发生了显著变化, 但植株总铁、磷、锌的含量较野生型并没有显著区别, 表明该 T-DNA 的插入虽影响了植株对缺铁胁迫的响应, 但并不直接作用于植株对铁的吸收、转运上。反向 PCR 分析发现 L22-8 的 T-DNA 插入位点位于 *At3g51950* 和 *At3g51960* 之间, 且这两个基因的转录表达在正常生长条件下均略低于 Col-0。基因互补实验发现仅有 *At3g51960* 能部分互补 L22-8 的荧光信号, 表明 *At3g51960* 基因的表达影响了 *CYP82C4* 对缺铁胁迫的响应。本研究进一步扩展了植物吸收利用铁分子调控网络, 为分子育种工作提供了指导。

**关键词:** 土壤; 缺铁胁迫; 突变体鉴定; 分子调控

中图分类号: Q945.1 文献标识码: A

铁是动植物生长必需的、需求量最大的微量营养元素<sup>[1]</sup>, 在高等植物的光合作用和呼吸作用等多种生命活动中起非常重要的作用<sup>[2]</sup>, 同时也是许多功能蛋白的重要辅助因子<sup>[3]</sup>。植物缺铁会导致作物产量和品质的降低, 危害人体的营养健康, 如人体贫血的一个常见原因就是铁元素的缺乏。虽然铁在地壳中的含量丰富, 但因为铁元素大多以  $\text{Fe}^{3+}$  的形式存在, 在中性和碱性土壤中的溶解度极低, 从而限制了土壤中铁的有效性, 使得植物生长易受缺铁的限制<sup>[4-5]</sup>, 随着土壤盐碱化程度加剧, 植物缺铁现象愈发普遍。因此, 阐明植物体内铁平衡机制、通过育种工作提高植物体内铁含量有益于促进农业发展和人体健康<sup>[6-7]</sup>。植物在长期的进化过程中, 演化出一套完整的铁吸收、转运的分子调节系统。根据植物对铁吸收机制的不同, 分为两大类: 非禾本科植物所采用的机理 I, 及禾本科植物所采用的机理 II<sup>[8]</sup>。其中机理 I 又可分为 3 个组成部分, 即  $\text{H}^+$ -ATPase 泵系统、 $\text{Fe}^{3+}$  还原系统和  $\text{Fe}^{2+}$  转运系统。一些  $\text{H}^+$ -ATPase(HA)基因, 如拟南芥中的 *AHA2* 基因的表达, 能通过  $\text{H}^+$ -ATPase 作用将

$\text{H}^+$  分泌到质外体<sup>[9]</sup>。功能缺失突变体的分析发现 *AHA2* 是引起缺铁诱导根际酸化的主要成员<sup>[10]</sup>。 $\text{H}^+$  的分泌可以降低土壤 pH, 提高土壤中铁等营养元素的溶解性<sup>[11]</sup>, 通过根细胞质膜上的铁离子螯合还原酶 (ferric-chelate reductase oxidase, FRO) 和与之偶联的 NADPH 脱氢酶, 如拟南芥中的  $\text{Fe}^{3+}$  螯合还原酶 *FRO2* 将  $\text{Fe}^{3+}$  还原为  $\text{Fe}^{2+}$ <sup>[12]</sup>, 再通过一系列铁转运蛋白 (iron-regulated transporter, IRT), 如拟南芥中的 *IRT1* 将还原的  $\text{Fe}^{2+}$  转运到细胞内<sup>[13]</sup>, 之后通过其他的一些转运载体运送到植物各个细胞器或器官中供机体利用。采用机理 II 的禾本科植物可在根部合成高铁载体 (Phytosiderophores, PS) 如麦根酸类物质 (mugineic acid, MA) 并分泌到土壤中, 这类物质对  $\text{Fe}^{3+}$  具有很高的亲和性, 可以促进低铁环境下根际铁的活化。 $\text{Fe}^{3+}$ -PS 螯合物经 *YS1* (YELLOW STRIPE 1) 和 *YSL* (YELLOW STRIPE1-like) 转运载体吸收至胞内, 再释放出  $\text{Fe}^{3+}$  供代谢利用<sup>[14]</sup>。

近年来的转录组和分子遗传学分析鉴定得到了一系列与植物铁吸收利用相关的基因和蛋白, 如非禾

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0200308)和国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2015CB150501)资助。

\* 通讯作者(plan@issas.ac.cn)

作者简介: 王立赛(1990—), 女, 山东德州人, 硕士研究生, 主要从事植物营养分子生物学研究。E-mail: 1527951097@qq.com

<http://soils.issas.ac.cn>

本科植物铁吸收的重要调控基因 *FIT* 和 *FER*。*FER* 首次在番茄中被鉴定出来,其编码一个 bHLH 转录调控因子<sup>[15]</sup>;当环境中铁浓度过低时表达增强,过高时则在转录后水平上受到抑制<sup>[16]</sup>。拟南芥中的 *FIT*(*FER*-like iron deficiency-induced transcription factor)是番茄 *FER* 基因的同源基因,主要在根部受缺铁胁迫诱导表达,且只在缺铁胁迫下,才能激发上下游基因的相互作用<sup>[7]</sup>。*FIT* 可以与 bHLH 蛋白家族 (*AtbHLH38*、*AtbHLH39*、*AtbHLH100*、*AtbHLH101*) 形成异源二聚体,有效诱导 *IRT1* 和 *FRO2* 基因的表达,从而提高植物对缺铁胁迫的耐受性<sup>[17-18]</sup>。有研究证实, bHLH 转录调控因子 *ROREYE*(*PYE*) 在缺铁条件下对根的生长起重要作用, *PYE* 负调控植物体内铁平衡相关基因的表达<sup>[19]</sup>。*bHLH34*、*bHLH104* 与 *bHLH105* 能够形成同源二聚体或异源二聚体,激活 *bHLH38/39/100/101* 和 *PYE* 的转录表达,进而激活下游铁吸收及转运相关基因的表达, *bHLH104* 与 *bHLH105* 可与铁吸收负调控因子 *E3* 泛素连接酶 *BTS* 相互作用,以此防止植物对铁的过量吸收<sup>[6,20-21]</sup>。虽然前期研究已经得到了 *FIT* 等众多铁代谢相关的调控基因和蛋白,但仍有很多响应土壤铁含量变化的基因功能未被阐明,特别是一些用来维持植物体内铁稳态的负调控因子,仍需进一步探索<sup>[3,7,14]</sup>。

*CYP82C4* 编码细胞色素 P450 (*CYTOCHROME*P450) 蛋白,能够强烈响应缺铁胁迫。细胞色素 P450 基因家族成员 *CYP82C4*、*CYP82C3*(*At4g31950*)、*CYP71B5*(*At3g53280*) 均属缺铁胁迫上调基因,且拟南

芥 *CYP82C4* 基因在缺铁胁迫下响应最为强烈,有研究表明 *CYP82C4* 基因通过其启动子部位的 IDE1-like 序列 (iron deficiency-responsive element) 响应铁缺乏的早期反应<sup>[22]</sup>。为寻找到更多早期响应缺铁胁迫的调控因子,本文以模式植物拟南芥为研究材料,首先分离出 *CYP82C4* 基因的启动子,再连接报告基因 *LUC2*, 构建成 pCAMBIA2300-*ProCYP82C4::LUC2* 基因表达载体,通过转化拟南芥得到 T-DNA 随机插入突变体库,然后通过确定突变体的 T-DNA 插入位点,找到影响 *CYP82C4* 基因转录表达的上游基因。探索可能存在的调控 *CYP82C4* 基因表达的新的调控因子,并探讨新调控因子的基因功能。旨在完善植物缺铁响应的分子调控网络,并为促进植物高效利用土壤中元素打下理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料与突变体库的建立

供试材料为拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.) Columbia -0 生态型 (Col-0)。以拟南芥 Col-0 基因组 DNA 为模板,扩增目的基因启动子 (1149bp),所用引物: *ProCYP82C4* F:5'-AACTGCAGGGTTTCTCTGATTGGAAATTG-3', R:5'-ACGCGTCGACGATTGAAGAGTAGTGTCTGTC-3', 两条引物 5' 端分别带有 *Pst* 与 *Sal* 酶切位点。如图 1, PCR 产物经酶切后连接 pCAMBIA2300-*LUC2* 载体,构成目的基因表达载体 pCAMBIA2300-*ProCYP82C4::LUC2*。实验中所用酶均为 Thermo Scientific 产品。

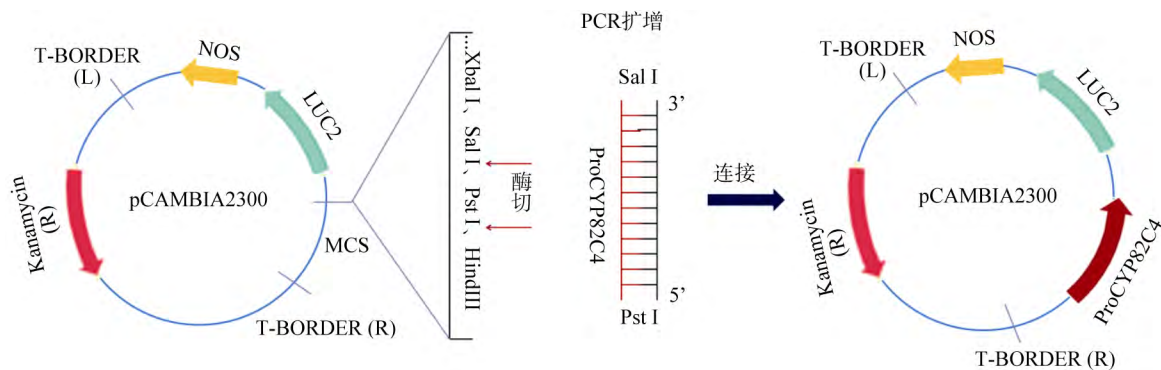


图 1 载体构建

Fig. 1 Vector construction

通过农杆菌转化法得转基因株系,抗性(卡那霉素, Kanamycin)筛选得到单拷贝纯合株系,通过荧光观察从中选取一到两株符合 *CYP82C4* 缺铁表达特性的稳定表达株系作为母本,再次进行 T-DNA 插入突变,筛选过程中寻找特殊荧光变化的株系,构建突变体库。

### 1.2 材料处理与方法

**1.2.1 种子处理及培养条件** 拟南芥种子表面消毒:首先使用 75% 酒精洗涤 2~3 min;再经 Tween (0.5%, v/v), NaClO (0.5%, v/v) 的混合水溶液震荡洗涤 10 min,最后使用灭菌超纯水洗 5~6 遍。播种前 4 ℃ 春化 1~2 d,根据不同实验项目播种到正常或缺铁培

培养基上, 生长于恒温培养箱中(22 °C, 60  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ , 16 h 光照, 8 h 黑暗)。正常及缺铁处理培养基: ES 培养基(5 mmol/L  $\text{KNO}_3$ , 2 mmol/L  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 2 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ , 2.5 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 70  $\mu\text{mol}/\text{L}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 14  $\mu\text{mol}/\text{L}$   $\text{MnCl}_2$ , 0.2  $\mu\text{mol}/\text{L}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 1  $\mu\text{mol}/\text{L}$   $\text{ZnSO}_4$ , 0.5  $\mu\text{mol}/\text{L}$   $\text{CuSO}_4$ , 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$   $\text{NaCl}$ , 40  $\mu\text{mol}/\text{L}$   $\text{Fe-EDTA}$ , 10 g/L 蔗糖, 0.918 g/L MES, 8 g/L 琼脂, 用 1 mmol/L  $\text{NaOH}$  调节 pH 至 5.5; 缺铁处理(即 ES 培养基中除不添加  $\text{Fe-EDTA}$ , 添加 100  $\mu\text{mol}/\text{L}$  Ferrozine 螯合培养基中的多余铁元素, 其他均一致), 121 °C 高温灭菌 20 min。种子抗性筛选培养基用 1/2MS(Duchefa Biochemie 公司)+ Kanamycin (50 mg/L)。

**1.2.2 荧光检测及筛选** 将在正常培养基上生长 10 d 的拟南芥幼苗分别转移至正常和缺铁培养基表面继续培养 3 d, 均匀喷洒荧光底物 D-Luciferin(1 mmol/L D-Luciferin+0.01% TritonX-100)处理 3 min 后, 通过化学发光仪(Tanon-5200, 中国)拍摄荧光信号。

**1.2.3 转录水平基因表达量检测** 将在正常培养基上生长 10 d 的拟南芥幼苗移至正常和缺铁培养基上继续生长 3 d, 地上部与地下部分开取材。用 Trizol 法提取样品 RNA, 并使用 Nanodrop2000 及电泳检测 RNA 浓度及质量。采用 PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa) 将 RNA 反转录为 cDNA, 用于基因转录表达的半定量及定量检测。用 TaqMix 酶(康维)进行半定量的 PCR 扩增检测, 用实时定量 PCR 仪(Thermo PIKOREAL96)对基因表达进行定量检测, 内参基因选用 *Tubulin*(*At5g19770*), 基因相对表达量用  $2^{-\text{Ct}}$  公式计算。半定量、定量检测所需引物: *LUC2-RT-S*: 5'-CCAGCTAACGACATCTACAACG-3', *LUC2-RT-A*: 5'-GTAGTCGGTCTTGCTATCCATG-3'; *Tublin-F*: 5'-GTGCTGAAGGTGGAGACGAT-3', *Tublin-R*: 5'-AACACGAAGACCGAACGAAT-3'。同时将 *FIT*, *IRT1*, *FRO2*, *bHLH38*, *bHLH39* 作为缺铁处理的标记基因。

**1.2.4 甲基化分析** 通过在线甲基化分析及引物设计软件(MethPrimer)分析插入 T-DNA 片段最可能发生甲基化的片段并设计引物。取正常培养基上生长 10 d 的 Col-0 及 L22-8 拟南芥幼苗用 CTAB 法提取 DNA 经甲基化变性试剂盒 EZDNA Methylation-Gold kit 对 Col-0 和 L22-8 基因组 DNA 进行亚硫酸氢盐变性, 并用软件设计的引物扩增。扩增条带经凝胶回收(Axygen AxyPrep DNA Gel Extraction Kit)后连接 pEASY-Blunt Zero 克隆载体, 分别取 Col-0 和 L22-8 的 6 个克隆进行测序分析。引物序列: *ProCYP82C4-Fb*: 5'-TTTAATTTTAAAAGTTTAATATTGGTGA-3', *ProCYP82C4-Rb*: 5'-CAAAATCCATACATA-

AACTACTTTTT-3'。

**1.2.5 插入位点的鉴定** 根据 pCAMBIA2300 载体选取 EcoR 与 EcoR 同时酶切 Col-0 与 L22-8 株系 DNA, 通过 T4 连接酶将酶切片段连接成环, 在 pCAMBIA2300 载体上设计引物扩增环状 DNA 片段得 L22-8 特异条带, 扩增引物: p2300-LB-S: 5'-TGCCTCGTCCTGGAGTTCAT-3', p2300-LB-A: 5'-AGCGTTGGCTACCCGTGATA-3'。胶回收(Axygen AxyPrep DNA Gel Extraction Kit)目标片段连接到 pEASY-Blunt Zero 克隆载体, 测序后比对确定 T-DNA 插入位点。

**1.2.6 植物总磷、总铁、总锌含量测定** 将在正常培养基上生长 21 d 的拟南芥幼苗转移至正常及缺铁培养基继续生长 5 d, 取地上部, 105 杀青 30 min, 70 °C 烘干至恒重, 用  $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$  消煮<sup>[23]</sup>至澄清的消解液, 用电感耦合等离子发射光谱仪(ICP)对 P、Fe、Zn 元素含量进行检测。总共进行 3 个生物学重复。

**1.2.7 数据处理** 应用 Excel 2007 进行数据的处理并统计分析, TTEST 检测以  $P < 0.01$  为极显著差异, 用 “\*\*” 表示, 以  $P < 0.05$  为显著差异, 用 “\*” 表示。图表用 Origin 8.0 生成。

## 2 结果与分析

### 2.1 L22-8 的发现及检测

在转基因筛选单拷贝纯合株系过程中发现突变体 L22-8。如图 2A 显示, L22-8 表现为在正常生长

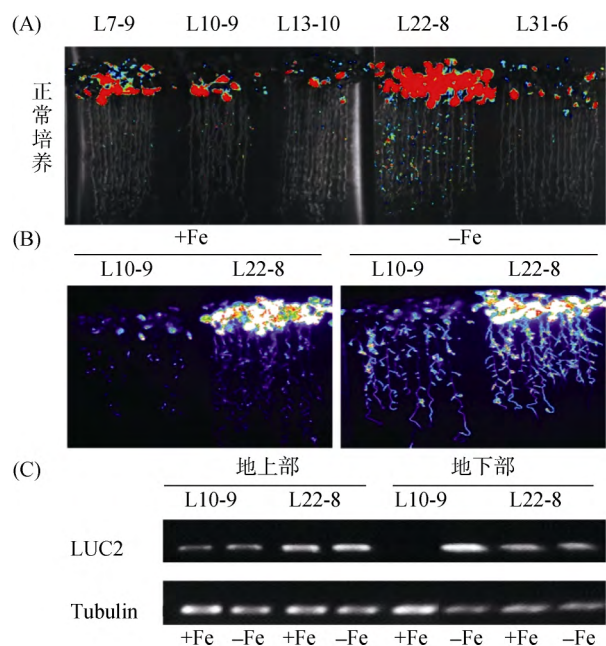


图 2 突变体的获得及进一步验证  
Fig. 2 Mutant discovery and further validation

条件下荧光信号强烈高于其他纯合株系(如 L10-9 等)。进一步分析发现,L22-8 在缺铁处理下虽然仍会被强烈诱导,但无论在正常生长条件下还是缺铁处理下 L22-8 荧光信号均强烈高于 L10-9(图 2B)。半定量检测结果表明,外源基因 *LUC2* 转录表达在正常和缺铁处理下的地上部与正常生长条件下的地下部均明显高于 L10-9(图 2C)。

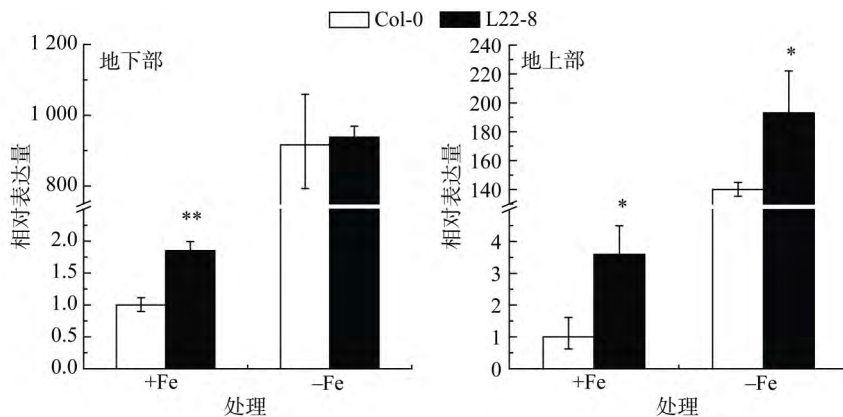
### 2.2 突变体内源基因 *CYP82C4* 的表达差异

为确定突变体 L22-8 内源基因 *CYP82C4* 是否发生变化,我们使用实时定量 PCR 对 *CYP82C4* 转录表达进

行了检测。图 3 显示,地下部 *CYP82C4* 基因的表达量表现为,正常生长条件下,L22-8 高于 Col-0,但缺铁处理下,L22-8 与 Col-0 没有表现出显著差异。地上部 *CYP82C4* 基因的表达量表现为,无论正常生长条件下还是缺铁处理下,L22-8 均显著高于 Col-0。

### 2.3 几种响应缺铁胁迫标记基因的定量检测

为确定缺铁响应标记基因的表达在 L22-8 中是否发生改变,通过实时定量 PCR 方法对植株地下部几种响应铁缺乏主要的标记基因的转录表达进行了检测。结果如图 4 显示,突变体 L22-8 缺铁处理下



(\* , \*\* 代表 t-test 检验的显著性差异, \* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$ , 下同)

图 3 内源基因 *CYP82C4* 相对表达量检测

Fig. 3 Relative expression level of endogenous gene *CYP82C4*

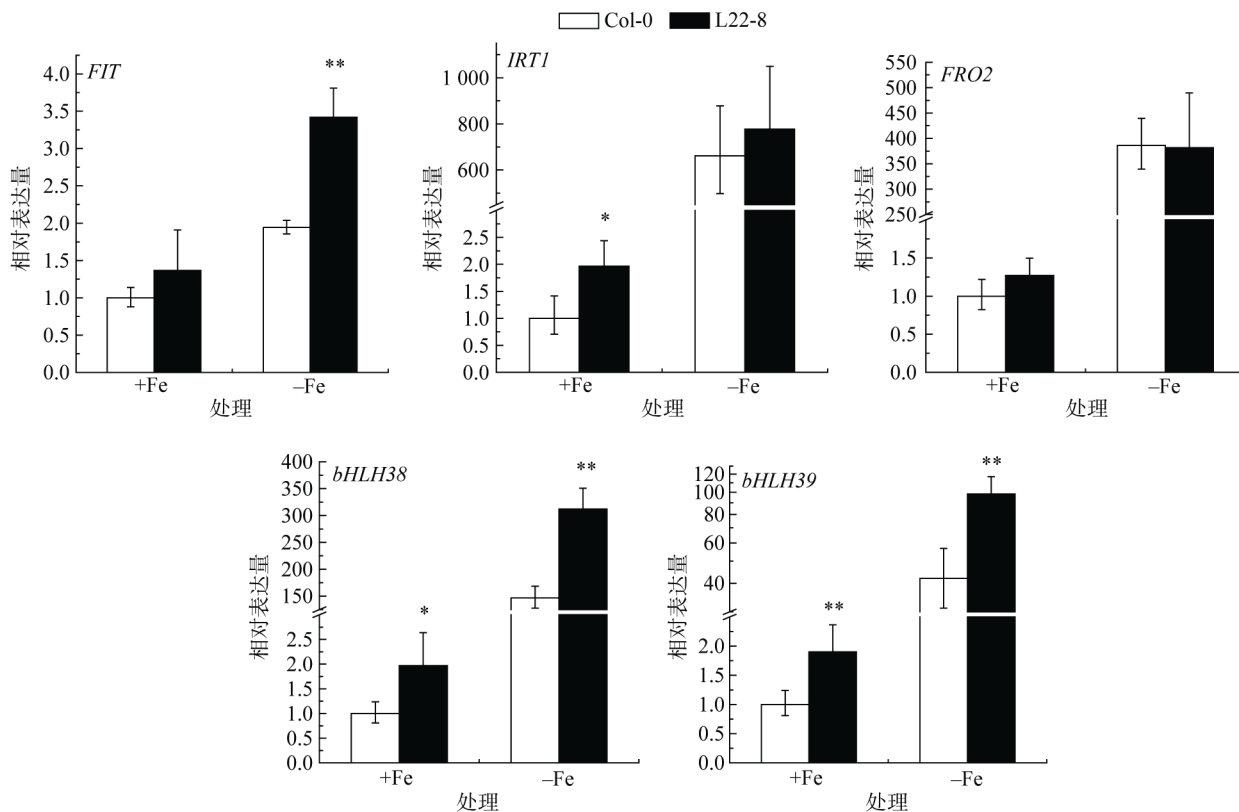


图 4 Fe Marker 基因的检测

Fig. 4 Detection of Fe-responsive marker genes



*FIT* 的表达量明显高于 Col-0，而在缺铁处理条件下受 *FIT* 调控的铁吸收相关 Marker 基因 *IRT1* 与 *FRO2* 在 L22-8 中的表达量没有发生显著差异。在正常生长条件下，L22-8 中 *FIT* 与 *FRO2* 的表达量均没有表现出与 Col-0 的显著不同，仅 *IRT1* 的表达量略高于 Col-0。但无论在正常生长条件还是缺铁处理下，L22-8 株系中与 *FIT* 互作的转录因子 *bHLH38* 和 *bHLH39* 的表达量，均明显高于 Col-0。

2.4 突变体 P、Fe、Zn 元素的测定

L22-8 株系 *CYP82C4* 基因及响应缺铁胁迫标记基因表达量的改变可能影响植株对铁元素的吸收及积累。因为 P、Zn 元素对 Fe 元素起拮抗作用，我们同时对 L22-8 及 Col-0 地上部总 Fe、总 P、总 Zn 含量进行了测定。如图 5 结果表明，无论在正常生长条件下还是缺铁处理下，突变体 L22-8 株系的总 Fe、P、

Zn 含量与野生型相比均没有表现出显著性差异，说明突变体虽影响了某些响应缺铁胁迫基因的表达，但并不影响植株对环境中铁元素的积累。

2.5 甲基化对荧光信号的影响分析

从前面的研究结果得知，L22-8 虽影响到内源基因 *CYP82C4* 及几种铁响应 Marker 基因的转录表达，但在元素测定上并未表现出差异，而 DNA 甲基化对基因的表达起到一定调控作用<sup>[24]</sup>。为确定 L22-8 荧光信号的变化是否与 T-DNA 中 *CYP82C4* 基因启动子的甲基化改变有关，我们对该启动子序列进行了甲基化分析。图 6 测序比对结果表明，在软件分析的可能发生甲基化的 5 个 CpG 位点中，L22-8 基本与 Col-0 测序结果一致，均未发现有甲基化发生。表明，L22-8 荧光信号的增强不是由甲基化变化导致。

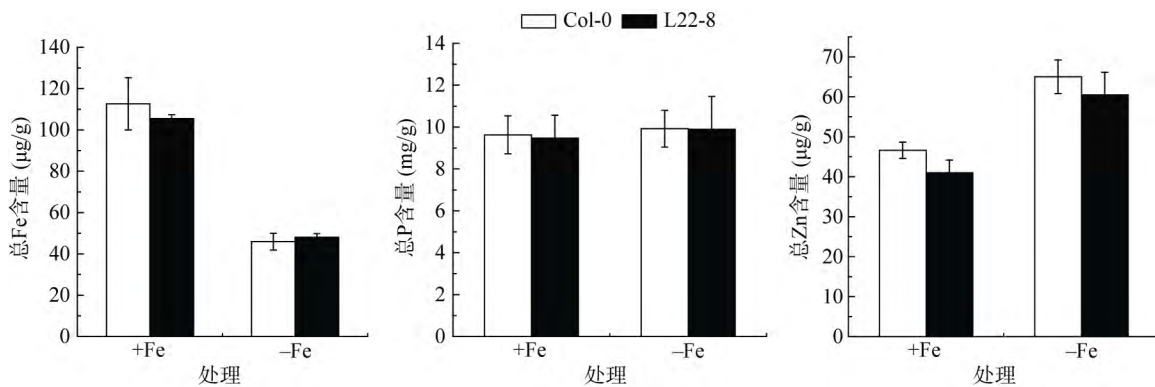


图 5 总 Fe、P、Zn 元素含量检测  
Fig. 5 Detection of total contents of Fe, P and Zn elements

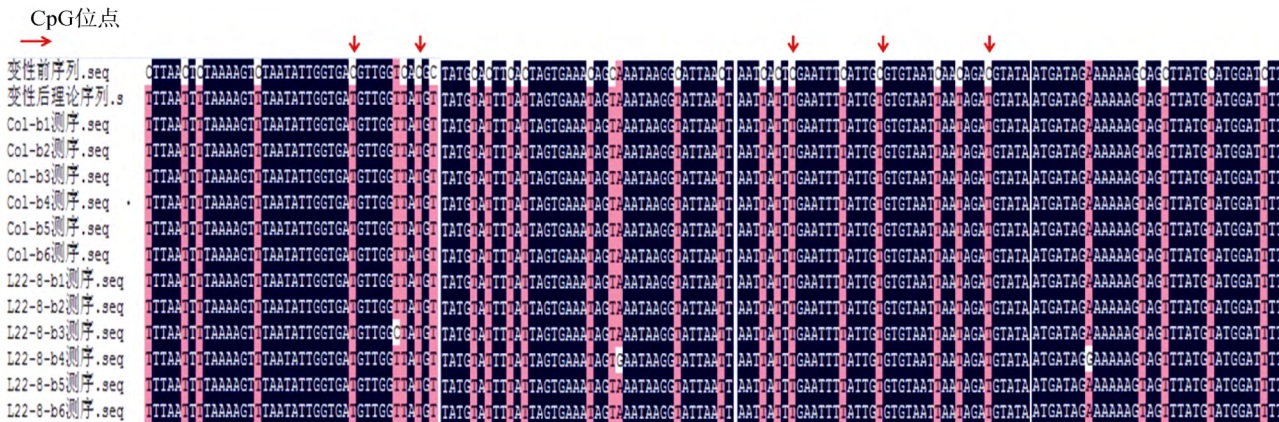


图 6 甲基化分析  
Fig. 6 Methylation analysis

2.6 突变体 L22-8 株系 T-DNA 插入位点的鉴定及相关基因表达检测

运用反向 PCR 方法，鉴定了突变体 L22-8 株系的 T-DNA 插入位点。图 7A 显示，T-DNA 插入于 *At3g51950* 和 *At3g51960* 之间。为了确定 T-DNA 插入

是否影响到侧翼基因的转录表达，对侧翼基因的表达进行了实时定量 PCR 检测。图 7B 显示，正常生长情况下 L22-8 的 *At3g51950* 和 *At3g51960* 两个基因的表达量显著降低，而缺铁处理下未发生显著性改变，且发现两个基因均不响应缺铁胁迫。

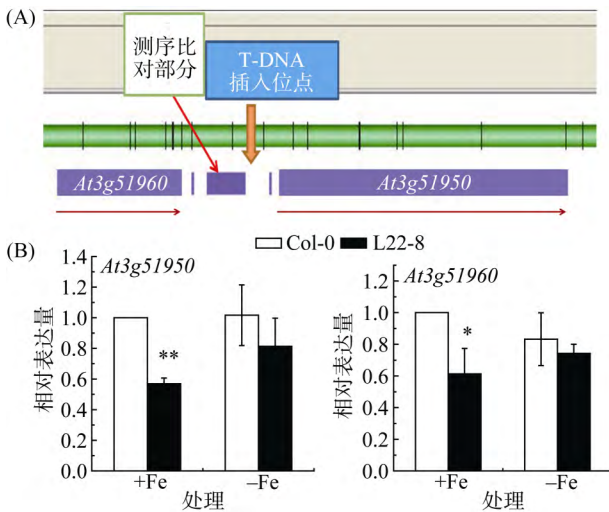


图 7 L22-8 株系 T-DNA 插入位点的确定及侧翼基因表达的定量检测

Fig. 7 T-DNA insertion site in L22-8 and quantitative detection of flanking gene expression

2.7 互补实验纯合株系的获得与荧光检测

为确定导致 L22-8 荧光信号变化的基因,分别转化 L22-8 获得两个基因的单拷贝纯合互补株系,记为 L5-1~6、L6-1~6,并进行荧光检测。结果如图 8 所示, At3g51950 基因的多数互补株系荧光信号强烈,表明该基因未产生互补作用; At3g51960 基因互补株系的荧光信号明显弱于 L22-8 株系,起到部分互补作用。表明 L22-8 株系可能通过影响侧翼基因 At3g51960 的作用进而影响到目标基因 CYP82C4 的表达。

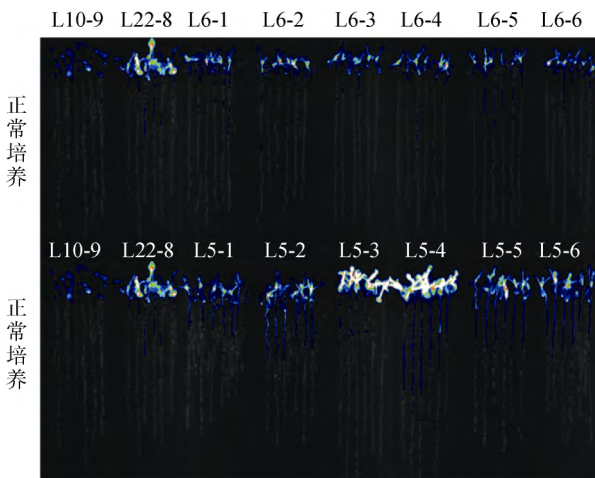


图 8 正常生长条件下侧翼基因互补株系的荧光检测

Fig. 8 Fluorescence detection of complementary strains of flanking genes under normal conditions

3 讨论

为促进植物对土壤中铁元素的吸收、利用,近年已实践应用了多种措施,如新的铁螯合剂的使用,不

同耕作措施的实施及基因改造等<sup>[22]</sup>。植物铁调控机制的研究表明,除了众多缺铁响应基因参与植物铁平衡调控外,许多调控植物生长的信号分子也参与调控缺铁过程,如:乙烯、NO、生长素、茉莉酸等<sup>[25-28]</sup>,植物体内拥有一个十分复杂的铁平衡调控网络。尽管我们已经在植物铁吸收、运输等分子机制方面取得重要的进展,但植物体内应该存在有新的调控因子并需要我们的探索,特别是负调控因子的探索。例如虽然我们已知 FIT 是正调控缺铁胁迫的核心调控因子,但受 FIT 调控响应缺铁胁迫的基因仅占众多铁响应基因的一部分<sup>[7,29]</sup>,仍有很多铁响应基因的调控因子尚不清晰。

本文通过分离 CYP82C4 基因的启动子,再连接报告基因 LUC2 构成基因的表达载体 pCAMBIA2300-Pro CYP82C4::LUC2 以转化拟南芥,进而通过 T-DNA 随机插入得到了一个响应缺铁信号的拟南芥突变体库;通过筛选突变体库我们得到了一个强烈响应缺铁信号的株系 L22-8;根据对突变体 T-DNA 插入位点的确定,进一步探讨影响 CYP82C4 基因表达可能存在的新的调控因子。通过筛选突变体找到突变基因并进行基因功能研究的正向遗传学方法是将表型与其潜在的基因联系起来的最成功的策略之一<sup>[30]</sup>,是发现基因、研究基因功能非常有效的手段。而 T-DNA 插入突变筛选突变体库的方法,因其 T-DNA 序列已知,具有插入突变体易定位的优点,且带有报告基因 LUC2 的 T-DNA 则更易筛选检测<sup>[31]</sup>。2016 年 Shinde 等<sup>[32]</sup>研究中就运用正向遗传学方法筛选突变体,用 LUC2 作为报告基因,取得良好的研究结果,亦适用于本研究。本研究通过筛选 T-DNA 插入突变体库,发现了突变体 L22-8,并证明由于 T-DNA 的插入影响了目标基因 CYP82C4 的表达,使得 L22-8 在正常生长条件下就表现出缺铁反应,且在缺铁处理条件下发现 L22-8 地下部 CYP82C4 基因的表达量未发生变化,但地上部的表达量却显著高于 Col-0。我们推测这可能是由于缺铁处理下 CYP82C4 在地下部的本底表达量就已经很高,使得地下部未表现出差异,而在表达量变化较低的地上部则能表现出显著性差异,或可能由于 T-DNA 的插入影响了 L22-8 的地下部对缺铁胁迫的部分响应,降低了变化幅度。此外,通过实验证明由于 T-DNA 的插入影响了几种关键缺铁响应标记基因的转录表达,如 bHLH38 和 bHLH39 等。而 FIT 可与 AtbHLH38、AtbHLH39 等形成异源二聚体,有效地诱导 IRT1 和 FRO2 基因的表达<sup>[17-18]</sup>,由本研究结果推测 CYP82C4 基因可能在 bHLH38、bHLH39 与 FIT 形成异源二聚体的过程中发挥作用,参与调控

因子之间的信号传导。研究结果分析得知 L22-8 株系中受 FIT 调控的下游铁吸收相关基因 *IRT1* 与 *FRO2* 的表达量并没有表现出明显的不同,仅正常生长条件下 L22-8 的 *IRT1* 表达量表现为略高于 Col-0。地上部总铁含量与野生型没有显著差异,暗示基因组中可能存在 *CYP82C4* 的互作基因,共同参与对缺铁胁迫的调控。结合已有的研究结果<sup>[20]</sup>进一步证明,*CYP82C4* 基因并不是响应缺铁胁迫的关键基因,这也是本研究中并未发现 L22-8 出现显著异常表型的原因之一。转基因互补实验证明侧翼基因 *At3g51960* 对 L22-8 株系的荧光信号起到一定的互补作用,影响到 *CYP82C4* 基因的表达。*At3g51960* 基因又名 *BZIP24*, 属 BZIP 家族,在盐胁迫环境中会被诱导表达。BZIP 家族中 BZIP19、BZIP23 与 BZIP24 同属 BZIP 家族中的 F 组,启动子具有相同的结构域<sup>[33]</sup>。有研究表明 *BZIP19*、*BZIP23* 基因在响应缺锌胁迫时会显著被诱导,但未发现 *BZIP24* 对缺锌胁迫的明显响应<sup>[34]</sup>。缺铁时植物通过提高 *IRT1* 的表达间接性增强植株对 Zn 的积累,过量的 Zn 会导致植株的生理性 Fe 缺乏<sup>[35-36]</sup>。本研究结果表明,基因组中可能存在 *BZIP24* 的互作基因影响了其对缺锌胁迫的响应,而锌信号的变化导致 *BZIP24* 基因表达发生变化,从而间接对 *CYP82C4* 响应缺铁胁迫造成影响,即其并不直接对 *CYP82C4* 基因响应缺铁胁迫起上游调控作用。这可能导致了研究结果中 L22-8 插入位点虽影响了侧翼基因的表达,但侧翼基因在实验中的培养时间内对缺铁胁迫并没有明显响应的现象。

综上所述,我们筛选到了一个强烈响应缺铁信号的突变体 L22-8,并进一步分析发现,可能是 T-DNA 的插入导致锌信号响应基因 *BZIP24* 的表达发生变化,而进一步引起 L22-8 对缺铁信号的响应,但具体的作用方式和机制还需后续实验进一步探索。

#### 参考文献:

- [1] 周晓今,陈茹梅,范云六. 植物对铁元素吸收、运输和储存的分子机制[J]. 作物研究, 2012, 26: 605-610
- [2] Saleeba J A, Guerinot M L. Induction of ferric reductase activity in response to iron deficiency in *Arabidopsis*[J]. *Biomaterials*, 1995, 8: 297-300
- [3] Kobayashi T, Nishizawa N K. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2012, 63: 131-152
- [4] 吴慧兰,王宁,凌宏清. 植物铁吸收、转运和调控的分子机制研究进展[J]. 植物学通报, 2007, 24(6): 779-788
- [5] 颜路明,郭祥泉. 盐碱胁迫对香樟幼苗离子吸收与分配的影响[J]. 土壤, 2015, 47(6): 1176-1180
- [6] Li X L, Zhang H M, Ai Q, et al. Two bHLH transcription factors, bHLH34 and bHLH104, regulate iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Physiology*, 2016, 4: 2478-2493
- [7] Colangelo E P, Guerinot M L. The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response[J]. *Plant Cell*, 2004, 16: 3400-3412
- [8] 李俊成,于慧,杨素欣,等. 植物对铁元素吸收的分子调控机制研究进展[J]. 植物生理学报, 2016, 52(6): 835-842
- [9] Santi S, Cesco S, Varanini Z, et al. Two plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase genes are differentially expressed in iron-deficient cucumber plants[J]. *Plant Physiology And Biochemistry*, 2005, 43(3): 287-292
- [10] Santi S, Schmidt W. Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in *Arabidopsis* roots[J]. *New Phytologist*, 2009, 183(4): 1072-1084
- [11] 王媛华,段增强,汤英,等. 不同施肥处理对碱性设施土壤酸化的影响[J]. 土壤, 2016, 48(2): 349-354
- [12] Robinson N J, Procter C M, Connolly E L, et al. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils[J]. *Nature*, 1999, 397(6721): 694-697
- [13] Eide D, Broderius M, Fett J, et al. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93: 5624-5628
- [14] Nozoye T, Nagasaka S, Kobayashi T, et al. Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286: 5446-5454
- [15] Ling H Q, Bauer P, Berczky Z, et al. The tomato fer gene encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99(21): 13938-13943
- [16] Brumbarova T, Bauer P. Iron-mediated control of the basic helix-loop-helix protein FER, a regulator of iron uptake in tomato[J]. *Plant Physiol.*, 2005, 137: 1018-1026
- [17] Yuan Y X, Wu H L, Wang N, et al. FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in *Arabidopsis*[J]. *Cell Research*, 2008, 18: 383-397
- [18] Wang N, Cui Y, Liu Y, et al. Requirement and functional redundancy of Ib subgroup bHLH proteins for iron deficiency responses and uptake in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Molecular Plant*, 2013, 6: 503-513
- [19] Long T A, Tsukagoshi H, Busch W, et al. The bHLH transcription factor POPEYE regulates response to iron deficiency in *Arabidopsis* roots[J]. *Plant Cell*, 2010, 22: 2219-2236
- [20] Selote D, Samira R, Matthiadis A, et al. Iron-binding E3 ligase mediates iron response in plants by targeting basic helix-loop-helix transcription factors[J]. *Plant Physiology*, 2015, 167: 273-286
- [21] Zhang J, Liu B, Li M S, et al. The bHLH transcription factor bHLH104 interacts with IAA-LEUCINE RESISTA-

- NT3 and modulates iron homeostasis in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2015, 27: 787–805
- [22] Murgia I, Tarantino D, Soave C, et al. *Arabidopsis* CYP82C4 expression is dependent on Fe availability and circadian rhythm, and correlates with genes involved in the early Fe deficiency response[J]. *Journal Plant Physiology*, 2011, 168: 894–902
- [23] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1999: 331–336
- [24] Xu W, Yang T Q, Dong X, et al. Genomic DNA methylation analyses reveal the distinct profiles in castor bean seeds with persistent endosperms[J]. *Plant Physiology*, 2016, 171(2): 1242–1258
- [25] Wu J J, Wang C A, Zheng L Q, et al. Ethylene is involved in the regulation of iron homeostasis by regulating the expression of iron-acquisition-related genes in *oryza sativa*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(2): 667–674
- [26] Chen W W, Yang J L, Qin C, et al. Nitric oxide acts downstream of auxin to trigger root ferric-chelate reductase activity in response to iron deficiency in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2010, 154(2): 810–819
- [27] Blum A, Brumbarova T, et al. Hormone influence on the spatial regulation of IRT1 expression in iron-deficient *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Signal Behavior*, 2014, 9(4): e28787
- [28] Maurer F, Mueller S, Bauer P. Suppression of Fe deficiency gene expression by jasmonate[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2011, 49(5): 530–536
- [29] Mai H J, Pateyron S, Bauer P. Iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana*: Transcriptomic analyses reveal novel FIT-regulated genes, iron deficiency marker genes and functional gene networks[J]. *BMC Plant Biology*, 2016, 16: 211
- [30] 陆才瑞, 邹长松, 宋国立. 高通量测序技术结合正向遗传学手段在基因定位研究中的应用[J]. *遗传*, 2015, 37(8): 765–776
- [31] 司晓娇. 盐芥突变体库的构建及突变体的筛选[D]. 济南: 山东师范大学, 2014: 14–16
- [32] Shinde S, Villamor J G, Lin W D, et al. Proline coordination with fatty acid synthesis and redox metabolism of chloroplast and mitochondria[J]. *Plant Physiology Preview*, 2016, 172(2): 1074–1088
- [33] Jakoby M, Weisshaar B, Droge-Laser W, et al. bZIP transcription factors in *Arabidopsis*[J]. *Trends in Plant Science*, 2002, 7: 106–111
- [34] Assuncao A G L, Herrero E, Lin Y F, et al. *Arabidopsis thaliana* transcription factors bZIP19 and bZIP23 regulate the adaptation to zinc deficiency[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107: 10296–10301
- [35] Sinclair S A, Kramer U. The zinc homeostasis network of land plants[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-gene regulatory mechanisms*, 2012, 1823: 1553–1567
- [36] Haydon M J, Kawachi M, Wirtz M, et al. Vacuolar nicotianamine has critical and distinct roles under iron deficiency and for zinc sequestration in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2012, 24: 724–737



## Screening and Characterization of an *Arabidopsis* Mutant in Response to Iron Deficiency

WANG Lisai<sup>1,2</sup>, YAN Mingke<sup>1,2</sup>, WANG Han<sup>1</sup>, SHEN Renfang<sup>1</sup>, LAN Ping<sup>1\*</sup>

(1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** Iron is an essential nutrient for plant growth, but also a limiting factor for crop production due to its low solubility and availability in soil. The expression of a variety of genes would be induced under iron deficiency, while to many of these genes, the mechanisms remains unclear. *CYP82C4* (*At4g31940*) is one of the iron starvation induced gene and regulated by *FIT* in *Arabidopsis*. In this study, the promotor of *CYP82C4* was linked to Luciferase to screen the T-DNA insertion mutant library for genes in response to iron deficiency in *Arabidopsis*. After screening, a line L22-8 was identified to remarkably intensify the fluorescence of *CYP82C4* in both iron sufficient and deficient conditions. Real time qPCR analysis showed that the expression levels of endogenous *CYP82C4* was increased in root and shoot under normal growth condition, and in shoot under iron deficiency condition, but not the shoot in shortage of iron. The expression of several Fe-marker genes, such as *FIT*, *bHLH38* and *bHLH39*, et al., were also significantly changed. These results indicated that the T-DNA insertion of L22-8 affected the molecular response of *Arabidopsis* to iron deficiency stress and *CYP82C4* may play an important role in the formation of heterodimer of *FIT* with *bHLH38* and *bHLH39*. The T-DNA insertion site of the L22-8 strain was detected to be located between *At3g51950* and *At3g51960* by reverse PCR, and the transcriptional expression of these two genes was slightly lower in mutant than Col-0 under normal conditions. Complementary analysis confirmed that *At3g51960* could partially recover the L22-8 fluorescence signal, suggesting its role in regulating the response of *CYP82C4* to iron deficiency stress. In addition, the contents of total Fe, P and Zn in shoot of L22-8 had no differences compared with Col-0, indicating that there maybe exist some other interactive genes of *CYP82C4* in *Arabidopsis*. Our results further extend the molecular regulation network of iron uptake and utilization in plant, and provide guidance for molecular breeding.

**Key words:** Soil; Iron-deficiency stress; Mutant characterization; Molecular regulation