

马尾松 *PmMYB169* 基因亚细胞定位及其超表达烟草低磷抗性分析

李慧平¹ 王庆竹^{1,2} 汤玮玮¹ 文晓鹏¹

1. 贵州大学农业生物工程研究院/生命科学学院/山地植物资源保护与
保护种质创新教育部重点实验室, 贵阳 550025;
2. 贵州大学林学院, 贵阳 550025

摘要 为探讨马尾松 *PmMYB169* 基因耐低磷胁迫功能,在前期克隆 *PmMYB169* 全长序列的基础上,构建 pBWA(V)HS-*PmMYB169*-G_{Lo}sgfp 载体,在烟草中对 *PmMYB169* 基因进行亚细胞定位;通过农杆菌介导的叶盘法转化烟草,分析转基因植株对低磷胁迫的抗性。结果表明:*PmMYB169* 基因在细胞核中行使功能;遗传转化获得 22 株转基因植株,对表达量较高的 3 个株系(Line-2、Line-11、Line-16)进行耐低磷分析显示,低磷胁迫下转基因烟草中磷含量、生物量、Apase 活性、POD 活性及 SOD 活性均显著高于野生型,而正常磷及高磷条件下两者并无明显差异,因此,超表达 *PmMYB169* 基因显著提高了植株的耐低磷能力。

关键词 马尾松; MYB 转录因子; 亚细胞定位; 转基因烟草; 低磷胁迫

中图分类号 Q 785 : S 791.248 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)04-0058-07

磷素在植物整个生命活动中具有重要的作用,但土壤中的有效磷浓度较低,加上该元素在土壤中极易被固定,致使植物出现缺磷现象,严重影响了植物的生长发育^[1-2]。为了促进缺磷环境下植物的生长,过度施用磷肥导致生产成本增加的同时还对环境产生不利的影响。因此,发掘及利用低磷诱导的相关基因对提高植物耐低磷能力具有重要作用。MYB 类转录因子在生物与非生物胁迫中有重要作用,在大豆中,MYB 类转录因子受低磷诱导^[3]。*PHR1* 属于 MYB 类转录因子,有学者将大豆 *GmPHR1* 基因转入来源物种大豆中,证实该基因能够在转基因材料中得到高效表达,通过进一步分析在缺磷条件下各耐低磷品种的基因表达量,发现在耐低磷品种中,*GmPHR1* 呈现快速诱导及高表达量模式,而在对低磷敏感的品种中则呈现出相反的模式^[4]。在磷缺乏的条件下,MYB 类转录因子可以调控一些磷诱导相关基因的表达^[5-7],高亲和磷转运基因家族 *PHT1* 就是其中之一,Ren 等^[8]将 *BnPHR1* 转入拟南芥及油菜中,发现高亲和磷转运基因 *ATPT2* 及 *BnPT2* 的表达量得到提高。*At-*

MYB62 也是一个与低磷相关的转录因子,Devaiah 等^[9]研究发现,*AtMYB62* 参与磷信号转导,对磷转运相关基因具有调控作用,能够调节植物在低磷环境下的响应机制。此外,过氧化物酶(POD)及超氧化物歧化酶(SOD)等作为组成植物保护酶系统中的成员之一,在抵抗磷饥饿环境时高效清除植物体内自由基,以降低缺磷对植物带来的伤害。吴艳等^[10]将马尾松 *PmPAP1* 基因遗传转化烟草,发现在低磷胁迫下转基因烟草中 POD 与 SOD 活性得到了相应的提高,植株表现出了明显的耐低磷能力。

为了发掘马尾松应答低磷胁迫的 MYB 类转录因子,笔者所在课题组前期对马尾松耐低磷种质进行了转录组分析^[11],克隆了马尾松基因 *PmMYB169* 的全长序列,初步分析表明该基因可能在耐低磷胁迫方面发挥重要作用,推测 *PmMYB169* 对磷吸收转运方面有一定作用^[12]。本研究通过 *PmMYB169* 进行亚细胞定位,并将该基因转化烟草,通过对高表达的转基因株系进行低磷胁迫处理,进一步探讨 *PmMYB169* 的功能,旨在为解析该基因的耐低磷机制提供科学依据。

收稿日期: 2018-03-08

基金项目: 国家重点研发项目(2017YFD0600303-4); 国家自然科学基金项目(201660185)

李慧平, 硕士研究生. 研究方向: 分子细胞生物学. E-mail: lhpzxf@163.com

通信作者: 文晓鹏, 博士, 教授. 研究方向: 林木生物技术与遗传育种. E-mail: xpwensc@hotmail.com

1 材料与amp;方法

1.1 材料

本研究所用烟草材料以及表达载体 pCAMBIA1301 由贵州大学农业生物工程研究院保存; 亚细胞定位表达载体由武汉伯远生物科技有限公司提供; 马尾松 *PmMYB169* 基因 (GenBank 注册号为 KY195915) 由贵州省农业生物工程重点实验室前期克隆并注册。

1.2 pBWA(V)HS-*PmMYB169*-GLogsfp 载体构建

根据所设计的上游引物 *PmMYB169*F: CAGT-CACCTGCAAAACAACATGAATCCAAGGTGGCCCTA 及下游引物 *PmMYB169*R: CAGTCACCTGCAAAATA-CACATATGTAGAGCATATGAAA 扩增出所需的片段, 将扩增的目的片段进行胶回收, 检测无误后将去掉终止密码的 *PmMYB169* 连接到表达载体 pBWA(V)HS-GFP 上, 取 5~10 μ L 连接产物转化大肠杆菌感受态 DH5 α , 转化涂 (卡纳霉素) 抗性平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h, 进行菌斑 PCR 鉴定并测序, 最后提取测序结果正确的质粒进行酶切验证, 构建成功的载体命名为 pBWA(V)HS-*PmMYB169*-GLogsfp, 将其与空载用于后续亚细胞定位研究。

1.3 植物亚细胞定位

采用电转化法将构建好的载体质粒转入农杆菌 LB4404, 30 $^{\circ}$ C 培养 2 d。用接种环将农杆菌从固体培养皿上刮下, 接种于 10 mL YEB 液体培养基中, 170 r/min 培养 1 h; 4 000 r/min, 离心 4 min, 去上清收集菌液, 用 10 mmol/L MgCl $_2$ (含 120 μ mol/L AS) 悬浮液重悬菌体, 调 D_{600} 至 0.6 左右。挑选生长状况良好的烟草植株, 用去枪头的 1 mL 注射器从烟草叶片下表皮注射, 并做好标注, 将注射完成的烟草植株弱光培养 2 d, 取标记的农杆菌注射烟草叶片制作成玻片, 激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.4 烟草遗传转化及转基因植株鉴定

采用叶盘法将已经构建好的植物表达载体 pCAMBIA1301-*PmMYB169* 遗传转化野生型烟草。为了降低试验污染率, 直接选取长势良好的野生型烟草组培苗, 将叶片切成叶盘, 放入调好 D 值的农杆菌重悬液中进行浸染, 5~6 min 后取出叶盘置于无菌滤纸上, 将多余的菌液吸干后, 将其取下置于共培培养基 (MS+0.1 mg/L 萘乙酸+1.0 mg/L 6-苄氨基嘌呤+3%蔗糖+0.8%琼脂, pH 5.8~6.0)

上, 在恒温培养箱中 28 $^{\circ}$ C 避光培养 3 d 后便移到筛选培养基 (MS+0.1 mg/L 萘乙酸+1.0 mg/L 6-苄氨基嘌呤+30 mg/L 潮霉素+100 mg/L 替门汀+3%蔗糖+0.8%琼脂, pH 5.8~6.0) 中, 待筛选培养基内的抗性芽长到 2 cm 时便可将其切下转移到生根培养基 (MS+100 mg/L 替门汀+3%蔗糖+0.8%琼脂, pH 5.8) 中进行生根培养, 28 d 左右提取烟草 RNA 进行 PCR 检测, 鉴定抗性植株。PCR 扩增体系 (10 μ L): 2 \times Master Mix 5 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, cDNA 模板 0.5 μ L, ddH $_2$ O 3.5 μ L。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s; 60 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 7 min; 35 个循环, 4 $^{\circ}$ C 保存。取 5 μ L 反应结束后的扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 琼脂糖胶的浓度为 1.0%, 所用引物序列为:

上游引物 MYB169-F: ATGAATCCAAGGTGGC-CCTACTCTG; 下游引物 MYB169-R: TCACATAT-GATGACGATATGAAAATGGAGAGTGCG。

1.5 抗性植株 *PmMYB169* 基因的表达分析

采用 primer 5.0 设计内参及荧光引物, 并用 ABI 公司的 CFX ConnectTM Real-Time System 实时荧光定量 PCR 仪将鉴定得到的抗性植株 cDNA 进行 qRT-PCR 扩增, 每个反应进行 3 次生物学重复, 扩增完成后对 *PmMYB169* 基因的表达量进行计算分析, 计算方法为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。qRT-PCR 反应体系 (10 μ L): cDNA 1.0 μ L; 上下游引物各 0.25 μ L; PowerUp SYBR Green Master Mix 5.0 μ L; 剩余的用 ddH $_2$ O 补齐。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 10 min; 94 $^{\circ}$ C 15 s; 59 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 1 min; 40 个循环。qRT-PCR 引物如下:

Nt β -actin1-F: TCCGCGACGGTGTCTCACA
Nt β -actin1-R: CGCGACAATTTCCCGTTCAGC
Nt β -actin2-F: CAAGGAAATCACCGCTTTGG
Nt β -actin2-R: AAGGGATGCGAGGATGGA
MYB169-qRTF: CGCAFTCTAATCTTCCACAACAAC
MYB169-qRTR: GCCTCTAAATCTGAGTCACCCC

1.6 烟草低磷胁迫处理及相关生理生化指标测定

经过阳性检测后挑选表达量较高的 3 株转基因株系进行低磷胁迫处理, 将长势一致的抗性强苗转入处理好的基质 ($V_{\text{石英砂}}: V_{\text{蛭石}}=1:1$) 中, 基质用 Hoagland 全营养液浇透, 每隔 5 d 换 1 次全营养液, 1 个月对抗性苗进行低磷胁迫, 低磷营养液的配制参照张雪洁等^[13]的方法, 处理设 4 个磷浓度, 分别为无磷 (0 mmol/L, P_1)、低磷 (0.1 mmol/L, P_2)

正常磷(1 mmol/L, P_3)以及高磷(10 mmol/L, P_4), P_1 、 P_2 、 P_3 、 P_4 营养液每隔 5 d 换 1 次, 在实验过程中, 利用 KCl 来补充缺少的 K^+ , 每个处理重复 3 次。60 d 后, 取不同处理植株的叶片及根部组织, 采用苏州科铭生物技术有限公司的试剂盒测定叶片过氧化物酶(POD)及超氧化物歧化酶(SOD)活性, 参照阳显斌^[14]的方法测定根系酸性磷酸酶(APase)活性, 每个测定指标重复 3 次。

1.7 烟草生物量及磷含量测定

将处理 2 个月后的阳性植株的地上部分及根系分开, 地上部分 105 °C 杀青 30 min 后与根系一起置于 75 °C 下烘至恒定质量, 用电子天平分别称量植株地上部和地下部干质量。此外, 分别将每株烘干后的地上部分及其根系混合粉碎(叶片及根分别取 40 mg 与 20 mg 混合)后参照王慧^[15]的方法测定总磷含量, 取 20 mg 未经过烘干的植株叶片测定无机磷含量^[15]。每个指标重复测定 3 次。

1.8 统计分析

试验中所有数据用 SPSS 21.0 及 Excel 2010 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 *PmMYB169* 基因亚细胞定位

将 pBWA(V) HS-*PmMYB169*-GLogfp 表达载体与作为对照的载体 pBWA(V) HS-GFP 转化到烟草叶片中进行瞬时表达, 经激光共聚焦显微镜观

察, 结果显示: *PmMYB169* 在烟草叶片细胞核上表达(图 1), pBWA(V) HS-*PmMYB169*-GLogfp 融合蛋白发出的荧光只集中在细胞核上, 而对照的绿色蛋白荧光分布于整个细胞, 说明 *PmMYB169* 蛋白定位在细胞核。

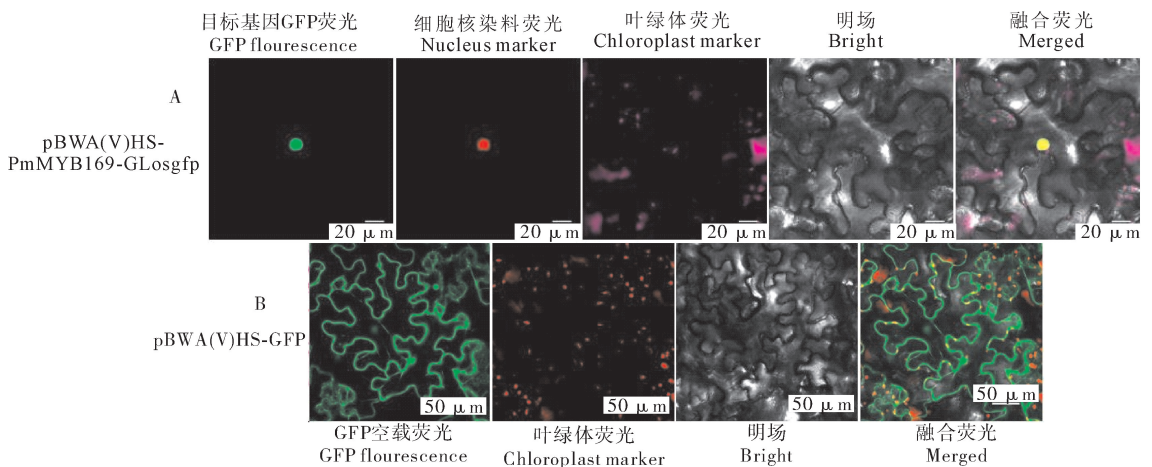
2.2 烟草转基因植株的获得

野生型烟草通过叶盘法进行转化后(图 2), 利用 *PmMYB169* 基因特异引物对筛选到的烟草苗 cDNA 进行 PCR 扩增检测, 结果表明, 有 22 株烟草抗性苗可以扩增出与阳性对照相一致的特异性条带(图 3), 而野生型烟草中没有扩增出条带, 说明外源基因成功整合到烟草中。

对这些转基因植株中 *PmMYB169* 基因的表达进行 qRT-PCR 检测, 选择表达量较高的 3 个转基因株系进行后续实验, 这 3 个株系分别为 Line-2、Line-11、Line-16(图 4)。

2.3 低磷胁迫对烟草磷含量及生物量的影响

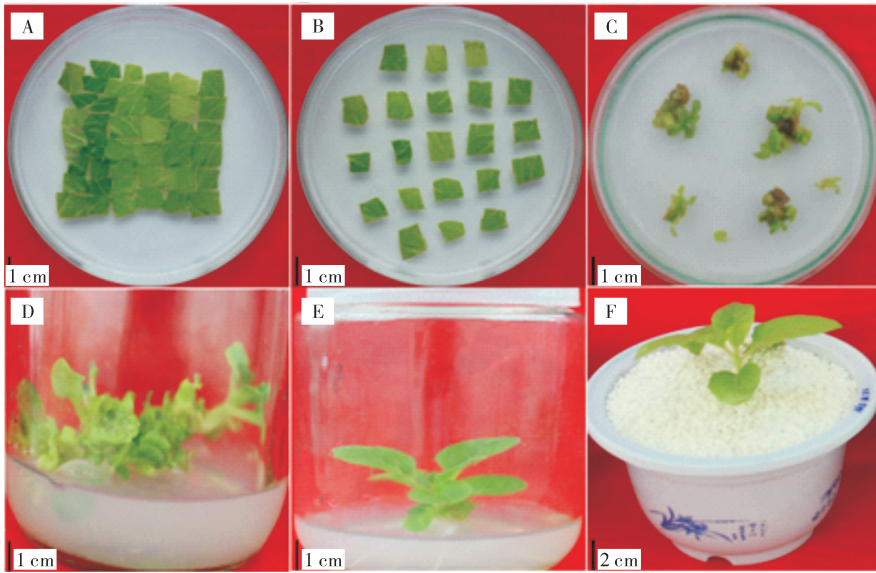
将转基因及野生型烟草在不同浓度磷中处理 45 d 后发现, 对同一株烟草地上部分与根部等量混合样的总磷及叶片无机磷含量测定表明, 在正常磷及高磷处理下, 转基因与野生型烟草中磷含量(图 5)无显著差异, 两者的生物量(图 6)也无显著性差异, 但在无磷及低磷条件下, 与野生型烟草相比, 转基因烟草(Line-2、Line-11、Line-16)总磷含量分别提高了 1.42 倍、1.55 倍、1.50 倍。无机磷含量也均高于野生型(WT), 分别为 1.40 倍、1.39 倍、1.41



A: pBWA(V)-*PmMYB169*-GLogfp; B: pBWA(V)-GFP.

图 1 *PmMYB169* 基因亚细胞定位结果

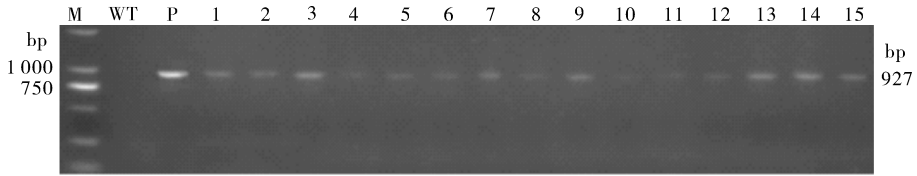
Fig.1 The results of subcellular localization of *PmMYB169* gene



A:共培养阶段; B:筛选培养阶段; C:抗性愈伤; D:诱导抗性芽; E:诱导不定根; F:转基因植株。A:Co-culture stage; B:The stage of selective culture; C:Resistance callus; D:Induction of resistant buds; E:Induction of adventitious roots; F:Transgenic plants.

图 2 转基因烟草的获得

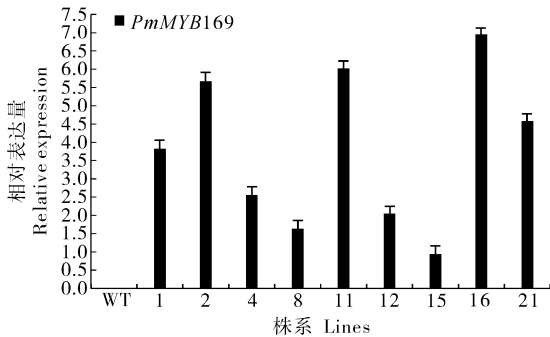
Fig.2 The acquisition of transgenic tobacco



M:Marker; WT:野生型; P:阳性对照(重组质粒); 1~15:转基因植株。M:Marker; WT:Wild type; P:Positive control (recombination plasmid); 1-15: Transgenic lines.

图 3 转基因烟草 PCR 检测

Fig.3 The PCR identification of transplanted tobacco



WT:野生型;1~21:转基因植株。WT:Wild type; 1-21:Transgenic lines.

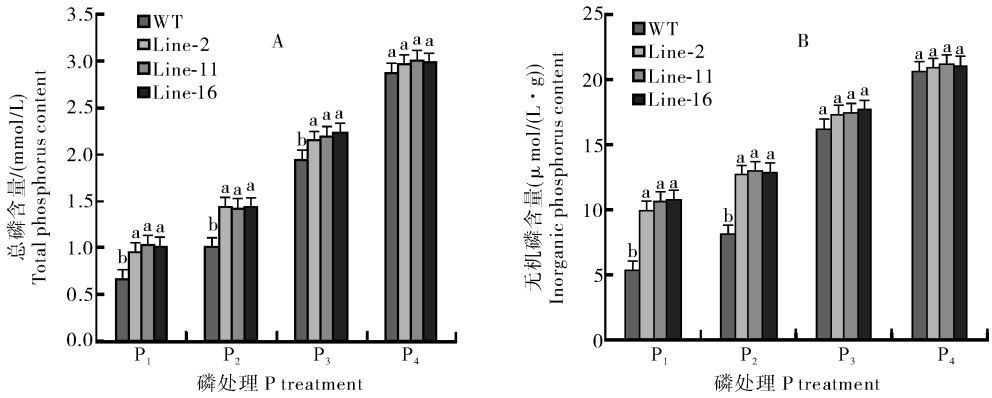
图 4 转基因烟草中 *PmMYB169* 基因的相对表达水平

Fig.4 The relative expression levels of *PmMYB169* gene in wild type and transgenic tobacco

此外,低磷对植株生物量作用也十分显著,在无磷及低磷条件下转基因烟草(Line-2、Line-11、Line-16)根部干质量比野生型平均增高 1.44 倍、1.55 倍,无磷时地上部分干质量与总干质量比野生型平均增高 1.19 及 1.25 倍,而低磷则增高 1.50 及 1.51 倍,低磷环境下转基因烟草生长明显优于野生型。初步说明在烟草中转入 *PmMYB169* 基因后促进了植株对磷的吸收及利用,从而增加植株的耐低磷能力。

2.4 低磷胁迫对 APase、SOD、POD 活性的影响

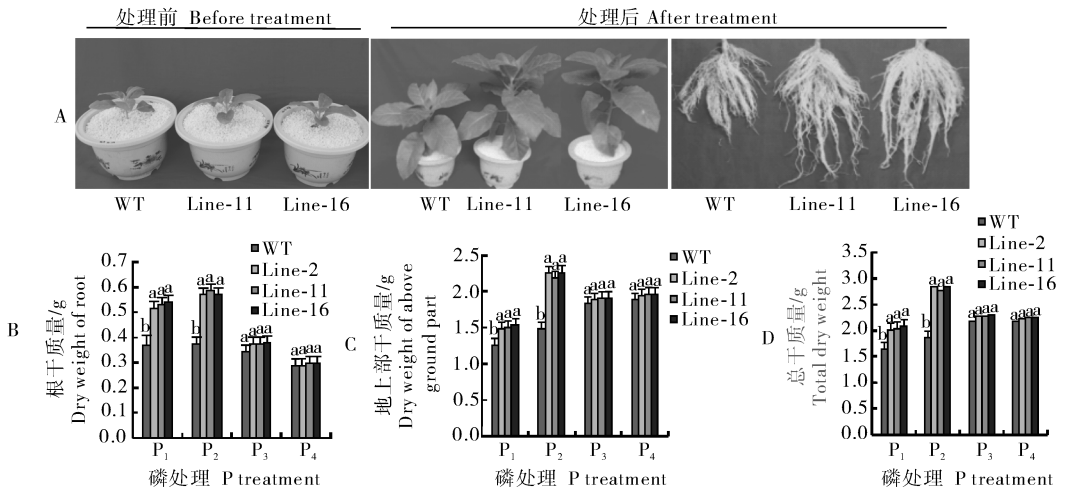
将烟草植株经过低磷胁迫后,对烟草根系中酸性磷酸酶(APase)、叶片中过氧化物酶(POD)及超氧化物歧化酶(SOD)活性测定显示,在缺磷情况下转基因及野生型烟草酸性磷酸酶(APase)、过氧化



A: 总磷含量; B: 无机磷含量, P₁、P₂、P₃、P₄的磷浓度分别为 0、0.1、1.0 及 10 mmol/L, 下同。A: The content of total P; B: The content of inorganic P; The phosphorus concentrations of P₁、P₂、P₃ and P₄ are 0, 0.1, 1.0 mmol/L and 10 mmol/L, respectively. The same below.

图 5 低磷胁迫对烟草磷含量的影响

Fig.5 Effect of low phosphorus stress on phosphorus content in transgenic tobacco



A: 低磷胁迫处理 60 d 转基因植株表型; WT: 野生型; Line-11 及 Line-16: 转基因植株; B: 根干质量; C: 地上部分干质量; D: 总干质量。A: Phenotypes of transgenic tobacco of low phosphorus stress treatment; WT: Wild type, Line-11 and Line-16: Transgenic plants; B: Dry weight root; C: Dry weight of above ground part; D: Total dry weight.

图 6 低磷胁迫对烟草生物量的影响

Fig.6 The effect of low phosphorus stress on the biomass of tobacco

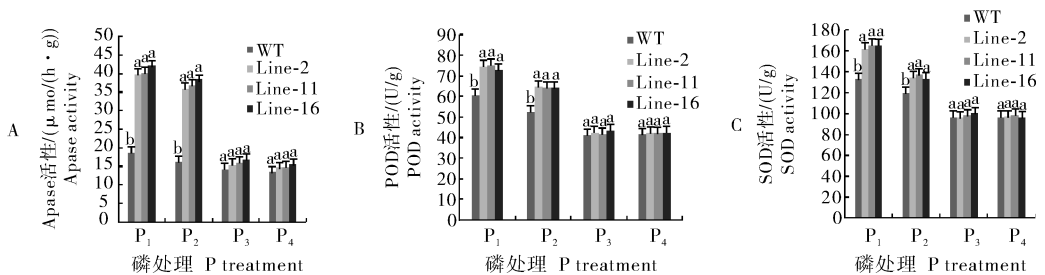


图 7 低磷胁迫对烟草 Apase、POD 及 SOD 的影响

Fig.7 Effects of low phosphorus stress on Apase, POD and SOD in transgenic tobacco

物酶(POD)及超氧化物歧化酶(SOD)活性显著增加,且转基因烟草中这3种酶活性都高于野生型。无磷处理时转基因烟草的 Apase、POD、SOD 活性比野生型平均增高 2.176 倍、1.23 倍及 1.22 倍,低磷处理则平均增加了 2.29 倍、1.22 倍及 1.13 倍。而磷充足时,转基因及野生型烟草中的 Apase、

POD、SOD 活性无显著差异,初步表明,在低磷胁迫下,转基因烟草的抗氧化活性提高,清除植株体内自由基能力增强,降低了缺磷对植株带来的伤害,同时也提高了酸性磷酸酶活性,促进植株对磷的吸收及利用能力。

3 讨论

R2R3-MYB 基因是 MYB 家族基因中数量最多的一类,本研究中的 *PmMYB169* 属于这一类转录因子^[12]。*R2R3-MYB* 在植物中具有重要作用,参与包括次生代谢、环境胁迫及信号转导应答等生命活动^[16]。在植株生长过程中,各种环境因子都会对植物产生影响,*R2R3-MYB* 基因也会受到这些环境因子的诱导,如干旱、盐胁迫、ABA 等^[17],但关于低磷环境影响的研究较少。

在低磷条件下,为了减轻缺磷对自身带来的伤害,植物会发生一系列生理生化变化来响应磷饥饿信号^[18],徐向华等^[19]通过对马尾松进行低磷胁迫研究发现,在低磷环境中,马尾松针叶保护酶 POD 及 SOD 活性增加,说明保护酶系统调节是马尾松在适应低磷胁迫环境中重要的生理响应机制之一。本研究同时对转基因烟草及野生型烟草植株进行低磷胁迫,发现在低磷环境中野生型与转基因烟草植株中的 POD 及 SOD 活性都有所增加,且转基因植株中这 2 种保护酶活性都高于野生型,可以减轻低磷环境对植株带来的伤害,表现出了较好的耐低磷能力。

酸性磷酸酶活性改变也是植物适应低磷环境的一种机制,在缺磷状态下,植物为了自身的生长发育,分泌更多的酸性磷酸酶,促进土壤中难溶的有机磷水解,释放出磷酸基团,供植物自身吸收利用^[20-21]。梁翠月等^[22]对大豆子叶中酸性磷酸酶活性的研究表明大豆子叶中磷的水解和转运与子叶酸性磷酸酶的活性提高有关。此外,在菜豆^[23]、水稻^[24]等植物中超表达紫色酸性磷酸酶基因后,使转基因植株根系的酸性磷酸酶活性得到显著提高。本研究将 *PmMYB169* 基因转入烟草后,通过低磷胁迫后发现,在低磷环境中转基因植株酸性磷酸酶活性高于野生型烟草,转入 *PmMYB169* 基因后,植株中酸性磷酸酶活性的提高促进了植株对介质中磷的吸收及植株体内磷的循环利用。

植物在低磷环境下会产生一些响应机制来降低环境对自身的伤害^[18]。本研究转入 *PmMYB169*

基因后,转基因烟草植株的保护酶(POD、SOD)以及酸性磷酸酶活性得到提高,不仅减少低磷环境对植株的伤害,也提高了植株对磷的吸收及利用能力,初步确定 *PmMYB169* 基因具有提高植株耐低磷胁迫的能力。烟草的亚细胞定位研究结果证实马尾松 *PmMYB169* 基因在细胞核中发挥作用,为进一步解析 *PmMYB169* 基因的功能提供了新信息。为深入探讨 *PmMYB169* 基因在低磷环境中的精确调控元件及作用位点,还需要对该基因的功能做进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 王保明,陈永忠,王湘南,等. 植物低磷胁迫响应及其调控机制[J]. 福建农林大学学报,2015,44(6):567-575.
- [2] 叶思诚,谭晓凤,袁军. 植物低磷适应机制研究进展[J]. 经济林研究,2012,30(2):128-133.
- [3] HERNÁNDEZ G, RAMÍREZ M, VALDÉS-LÓPEZ O, et al. Phosphorus stress in common bean: root transcript and metabolic responses[J]. Plant physiology, 2007, 144(2): 752-767.
- [4] 吴冰,李喜焕,刘翠,等. 大豆 MYB 转录因子 *GmPHR1* 转化及功能研究[J]. 大豆科学,2013,32(3):303-305.
- [5] YANG X J, FINNEGAN M. Regulation of phosphate starvation responses in higher plants[J]. Annals of botany, 2010, 105:513-526.
- [6] 丁广大,陈水森,石磊,等. 植物耐低磷胁迫的遗传调控机理研究进展[J]. 植物营养与施肥学报,2013,19(3):733-744.
- [7] RUBIO V, LINHARES F, SOLANO R, et al. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae[J]. Genes development, 2001, 15(16): 2122-2133.
- [8] REN F, GUO Q Q, CHANG L L, et al. *Brassica napus* PHR1 gene encoding a MYB-like protein functions in response to phosphate starvation[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e44005.
- [9] DEVAIAH B N, MADHUVANTHI R, KARTHIKEYANA S, et al. Phosphate starvation responses and gibberellic acid biosynthesis are regulated by the MYB62 transcription factor in *Arabidopsis*[J]. Molecular plant, 2009, 2(1): 43-58.
- [10] 吴艳,刘小翠,彭磊,等. 马尾松 *PAP1* 基因在烟草上的遗传转化及功能分析[J]. 农业生物技术学报,2017, 25(6): 1023-1032.
- [11] FAN F H, CUI B W, ZHANG T, et al. The temporal transcriptional response of *Pinus massoniana* seedlings to phosphorus deficiency[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e105068.
- [12] 刘沛宇,刘小翠,杨鹏,等. 马尾松 *PmMYB169* 基因的克隆及表达分析[J]. 西南大学学报,2017,39(3):48-54.
- [13] 张雪洁,谭晓凤,袁军,等. 低磷胁迫对油茶叶绿素荧光参数的影响[J]. 经济林研究,2012,30(2):48-51.
- [14] 阳显斌. 小麦磷高效利用品种筛选及其生理特征研究[D]. 雅

- 安;四川农业大学,2011.
- [15] 王慧. 拟南芥 *WRKY45* 转录因子参与响应低磷胁迫的实验证据[D]. 北京:中国农业大学,2014.
- [16] 乔孟,于延冲,向凤宁. 拟南芥 R2R3-MYB 类转录因子在环境胁迫中的作用[J]. 生命科学,2009,21(1):145-150.
- [17] JUN C, SEO J S, HAN S W, et al. Overexpression of *At-MYB44* enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Plant physiology*, 2008, 146(2):623-635.
- [18] 唐伟,王永雄. 豆科植物低磷胁迫的适应机制[J]. 草业科学, 2014,31(8):1538-1548.
- [19] 徐向华,丁贵杰. 马尾松适应低磷胁迫的生理生化响应[J]. 林业科学,2006,42(9):24-28.
- [20] MA X F, TUDOR S, BUTLER T, et al. Transgenic expression of phytase and acid phosphatase genes in alfalfa(*Medicago sativa*) leads to improved phosphate uptake in natural soils[J]. *Molecular breeding*, 2012, 30:377-391.
- [21] TRAN H T, HURLEY B A, PLAXTON W C. Feeding hungry plants: the role of purple acid phosphatases in phosphate nutrition[J]. *Plant science*, 2010, 179:14-27.
- [22] 梁翠月,廖红,严小龙,等. 酸性磷酸酶参与大豆子叶磷转运和利用[J]. 植物生理学报,2011,47(1):69-74.
- [23] LIANG C Y, SUN L L, YAO Z F, et al. Comparative analysis of *PvPAP* gene family and their functions in response to phosphorus deficiency in common bean[J]. *PLoS One*, 2012(5): e38160.
- [24] TIAN J L, WANG C, ZHANG Q, et al. Overexpression of *Os-PAP10a*, a root-associated acid phosphatase, increased extracellular organic phosphorus utilization in rice[J]. *Journal of integrative plant biology*, 2012, 54(9):631-639.

Subcellular localization and low phosphorus tolerance analyses of masson pine (*Pinus massoniana*) *PmMYB169* gene in over-expression transgenic tobacco

LI Huiping¹ WANG Qingzhu^{1,2} TANG Weiwei¹ WEN Xiaopeng¹

1. *Institute of Agro-Bioengineering/College of Life Sciences/Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), Guizhou University, Guiyang 550025, China;*
2. *College of Forestry, Guizhou University, Guiyang 550025, China*

Abstract MYB transcription factors play an important role in the response under low phosphorus stress. To further confirm the role of *PmMYB169* cloned from masson pine (*Pinus massoniana*) in the response under low phosphorus stress, the pBWA(V)HS-*PmMYB169*-G₁₀sgfp vector was constructed and subcellular localization of *PmMYB169* was conducted in tobacco. Then, *PmMYB169* was transformed into tobacco via *Agrobacterium*-mediated method, and the tolerances of over-expressed-*PmMYB169* transgenic lines to low phosphorus stress were analyzed. The results showed that the *PmMYB169* had function in the nucleus, and 22 transgenic lines were obtained. The phosphorus contents, biomass and activities of Apase, POD and SOD were significantly higher than those of the wild type under low phosphorus stress. There is no significant differences among the normal and higher phosphorus treatments. It is indicated that over-expression of *PmMYB169* significantly increase the response ability of plants under low phosphorus stress.

Keywords *Pinus massoniana*; MYB transcription factor; subcellular location; transgenic tobacco; low-phosphorus tolerance

(责任编辑:张志钰)