

月季切花 *RhNAC4* 启动子表达特性分析

张晓 蒋桂梅 姜新强 高俊平 张常青*

(中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100193)

摘要 为解析月季失水诱导 SNAC 类转录因子 *RhNAC4* 的转录调控特性,利用染色体步移的方法分离了 *RhNAC4* 的启动子,并构建含 *GUS* 报告基因的载体转化拟南芥,分析了 *RhNAC4* 的启动子表达特性。结果表明:1)在月季中分离得到 *RhNAC4* 基因 5'端上游 1 753 bp 的启动子序列;2)*RhNAC4* 启动子序列中具有与发育、激素响应、非生物胁迫和生物胁迫等相关的顺式作用元件;3)获得了 *RhNAC4* 启动子驱动 *GUS* 基因的转基因拟南芥植株,*GUS* 染色表明 *RhNAC4* 基因在植株不同的生长发育阶段和花器官中都有表达;4)失水胁迫、赤霉素、1-氨基环丙烷 1-羧酸和甘露醇处理能够诱导 *RhNAC4* 的启动子活性,而盐和脱落酸处理对启动子活性的影响不显著。总之,月季切花失水胁迫诱导的 SNAC 类转录因子 *RhNAC4* 基因启动子含有逆境相关调控元件,其启动子在植株不同发育阶段和失水、乙烯等条件下具有转录活性。研究结果有助于解析 *RhNAC4* 参与月季切花失水胁迫耐性的作用机理。

关键词 月季切花; *RhNAC4* 启动子; 顺式作用元件; 转录活性

中图分类号 S 685.12

文章编号 1007-4333(2014)01-0059-08

文献标志码 A

Expression patterns of the promoter of rose *RhNAC4* gene in *Arabidopsis*

ZHANG Xiao, JIANG Gui-mei, JIANG Xin-qiang, GAO Jun-ping, ZHANG Chang-qing*

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract This study was aimed to investigate the transcriptional regulation of *RhNAC4*, a SNAC transcription factor gene induced by dehydration in rose petals (*Rosa hybrida* L. 'Samantha'). The promoter sequence of *RhNAC4* was isolated by genomic walking. The transcription activities of *RhNAC4* promoter were investigated in Pro^{*RhNAC4*}::GUS transgenic *Arabidopsis*. The results indicated that the 1 753 bp promoter sequence of *RhNAC4* was isolated from rose. The promoter contained different regulatory *cis*-acting elements, including development-, hormone- and abiotic or biotic stress- related *cis*-elements. We generated Pro^{*RhNAC4*}::GUS transgenic *Arabidopsis*, and the histochemical GUS staining revealed that the *RhNAC4* promoter had transcription activities at the development stages of seedlings or floral organs in transgenic *Arabidopsis*. The transcription activities of *RhNAC4* promoter were induced under different treatments, including dehydration, GA₃, ACC and mannitol. It was evident that the *RhNAC4* promoter contained stress-related *cis*-elements and had transcription activities during the developmental stages and under dehydration, ethylene etc. These results could contribute to the understanding the role of *RhNAC4* involved in the dehydration tolerance of rose petals.

Key words cut rose; *RhNAC4* promoter; *cis*-element; transcription activity

月季(*Rosa hybrida* L.)是全球最重要的观赏作物之一。月季切花的销售量和销售额在全球花卉

贸易中居所有切花之首^[1-2]。但是月季切花在采后流通中损耗巨大,极易出现僵花、僵蕾和开放异常

收稿日期:2013-05-03

基金项目:国家自然科学基金项目(31171992);北京市科技新星计划(2009B51)

第一作者:张晓,硕士研究生,E-mail:zhangxiao_1028@163.com

通讯作者:张常青,副教授,主要从事观赏植物采后与逆境生理研究,E-mail:chqzhang@cau.edu.cn

等。失水胁迫是导致月季切花长途运输损耗的主要原因^[3],由此造成的损失占到切花采后流通损耗的70%以上。因此,系统研究月季切花失水胁迫耐性调节的分子机理,对月季切花的采后保鲜技术的研发等具有理论和实践意义。

不同的转录因子参与植物对失水胁迫的应答,如 WRKY、MYB、AP2/EREBP、NAC、zinc finger、MADS 等^[4]。其中,NAC 是植物所特有的一类转录因子,广泛参与植物生长发育和对外界不良环境的响应等^[5]。已有研究表明,NAC 类转录因子中的 SNAC 亚家族成员在植物响应外界非生物和生物胁迫的分子调控过程中发挥着非常重要的作用^[6]。通过启动子的分离和表达特性分析来研究基因转录调控机制是基因功能研究的重要方面^[7-9]。近年来,在拟南芥、水稻、杨树和大豆等模式植物中都分离了 NAC 类基因的启动子序列,同时对不同 NAC 亚家族成员的功能及调控机制研究进行了分析^[10-11]。在这些转录因子基因的启动子区域中,除了核心调控序列外,还包含多个与逆境、激素和组织特异性表达等相关的顺式作用元件,如 ABA 响应元件(ABRE)、MYB 结合元件和 MYC 结合元件等。如拟南芥的 NAC 转录因子基因 ANAC072(*RD26*),其表达受干旱、ABA、茉莉酸(JA)和高盐诱导,而在基因的启动子区域中也包含有 MYC、W-BOX(WRKY BOX)、MYB、ABRE 和 DRE 等与逆境胁迫密切相关的重要调节元件^[12];水稻的 *OsNAC6* 基因启动子区域中也发现存在多个与逆境相关的顺式作用元件,包括 W-BOX、ABRE 和 GCC-BOX 等,基因的表达受伤害和病原菌等诱导^[13]。综合分析不同植物 NAC 转录因子基因的启动子特性,一般认为 NAC 类基因的转录调控路径之一是通过与 MYB、MYC 类转录因子的结合来实现的;同时 NAC 类转录因子基因启动子其他顺式作用元件的广泛存在也表明 NAC 类基因的表达方式受发育和内外因子的复杂调控^[6]。由于 NAC 类转录因子家族成员众多且功能多样,同时不同植物 NAC 基因转录调控特性有差异,因此人们对其如何精准的调控植物的生长发育和对外界环境的响应机理认识还远远不够。特别是在园艺作物月季切花中,关于胁迫

诱导相关 NAC 家族启动子功能的研究未见报道。

为了充分了解月季花朵开放中关键 NAC 成员在切花失水胁迫耐性和开放衰老方面的作用,我们前期通过 SSH(Suppression subtractive hybridization)差减文库的方法获得了 12 个与月季花瓣失水胁迫相关的月季 NAC 转录因子 ESTs (Expressed Sequence Tags) 序列,其中 *RhNAC4* (GenBank 登录号:JK619941)的表达受失水胁迫所诱导,并且复水后表达量下降,暗示着其可能参与了月季切花失水胁迫这一生物学进程^[4]。本研究拟通过染色体步移技术克隆 *RhNAC4* 的上游转录调控序列并分析其包含的顺式作用元件;通过将 *RhNAC4* 启动子与含有报告基因 *GUS* 的载体异源转入拟南芥中,利用 *GUS* 染色分析其在转基因拟南芥中的诱导活性,解析月季切花失水胁迫诱导的 SNAC 类转录因子基因 *RhNAC4* 的转录调控特性。旨在进一步阐明 *RhNAC4* 参与月季切花失水胁迫耐性的作用机理。

1 材料与方法

1.1 试验材料

切花月季‘萨蔓莎’(*Rose hybrid L. ‘Samantha’*)的花材取自北京市昌平区沙河月季生产基地。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) Columbia 野生型为本实验室保存。大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 α 、农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 GV3101 为本实验室保存。

1.2 试验方法

1.2.1 月季 *RhNAC4* 启动子的克隆

选取生长健壮的月季顶端未完全展开的幼嫩叶片,采用 CTAB 法提取月季基因组 DNA^[14]。用 High-Tail PCR^[15]的方法克隆 *RhNAC4* 启动子序列。在 *RhNAC4* 已知 EST 序列的 5'端设计 3 条反向引物 SP1、SP2 和 SP3。利用 5 条 LAD 简并引物和 *RhNAC4* 基因的特异引物进行 3 轮 PCR 扩增,将获得的产物纯化,连接到 T-easy 载体 (Promega) 后转化大肠杆菌 DH5 α 。菌液 PCR 检测结果显示含有插入片段后,测序获得启动子序列。试验中所用引物如表 1 所示。

表 1 月季 *RhNAC4* 启动子克隆引物Table 1 Primer sequences for isolation of rose *RhNAC4* promoter

引物 Primer	序列 Sequence(5'-3')
LAD1	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCVNVNNGGAA
LAD2	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBNBNNNGGTT
LAD3	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCHNVNNNCCAC
LAD4	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCVNVNNNCCAA
LAD5	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBDBNBNNGGTT
AC1	ACGATGGACTCCAGAG
SP1	GGATGATGAAACAGGGCACG
SP2	CTCATCAGTTGGGTGGAACCTAAA
SP3	AAAACCAGGAGGAAGTCCAGAGC

1.2.2 月季 *RhNAC4* 启动子调控元件分析

将获得的 *RhNAC4* 启动子序列提交到植物顺式调控元件在线数据库 PLACE^[16] (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) 和 PlantCARE^[17] (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行调控元件预测和分析。

1.2.3 Pro_{RhNAC4}:GUS 载体构建和拟南芥遗传转化

根据 *RhNAC4* 启动子序列和过表达载体 pBI121^[19] 的多克隆位点,在启动子两端分别设计带有 *Hind* III 和 *Xba* I 酶切位点的引物, NAC4-*Hind* III-F (5'-ACCAAGCTTATCAACCGCCTCCAA-TCAGAGTTG-3') 和 NAC4-*Xba* I-R (5'-GC-TCTAGATGGCCTCCATGTTGTGGTCTGC-3')。用 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切 PCR 扩增获得的片段和 pBI121 载体,回收并纯化酶切片段和载体后进行连接反应,连接产物转化大肠杆菌。经菌液 PCR 和测序鉴定后得到重组质粒 pBI121-*RhNAC4*。用热击转化法将 pBI121-*RhNAC4* 质粒转入农杆菌菌株 GV3101。

拟南芥转化采用花序浸蘸法^[18]。在含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 MS 培养皿中筛选得到 T0 代转基因植株。取培养 3 周的转基因拟南芥幼苗的叶片约 0.1 g,采用 Kasajima^[14] 的方法提取 DNA,PCR 验证获得的阳性植株。采用 *RhNAC4* 启动子特异引物 NAC4-*Hind* III-F 和 NAC4-*Xba* I-R,PCR 扩增

程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;30 个 PCR 循环为 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min 和 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min。将经 PCR 验证的转基因株系进行筛选,获得 T3 代纯合体。拟南芥培养环境室条件为 16 h 光照/8 h 黑暗,温度 22~25 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 60%~70%。

1.2.4 激素和非生物胁迫处理

在 MS 固体培养基上,拟南芥 T3 代转基因植株种子播种 12 d 后,分别转移到含有 ABA (100 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、ACC (50 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、GA₃ (50 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、NaCl (125 mmol/L) 和甘露醇 (200 mmol/L) 的 MS 固体培养基上。培养 4 d 后,取样进行 GUS 染色和酶活性测定。在失水胁迫处理试验中,将 16 d 大的拟南芥幼苗平置在干燥滤纸上 3 h。在 MS 培养基中正常生长的植株作为对照样本。每个处理 12 株拟南芥,6 株进行 GUS 染色,6 株进行 GUS 酶活测定,3 次生物学重复。

1.2.5 转基因植株 GUS 染色和酶活性检测

取不同苗龄的 T3 代转基因植株的叶片、根和花等器官分别放入 2 mL 试管中,加入 200 μL GUS 组织化学染色液 (75.5 mmol/L sodium phosphate pH 7.0,0.1% Triton X-100,0.05 mmol/L K3/K4 FeCN,10 mmol/L EDTA,20% methanol(v/v),50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronic acid)。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中放置 3~10 h 后,用 70% 的酒精脱色 2~3 次至显现白色透明。选取染色部位和染色时间一致的植株,在体式显微镜 (Olympus SEX16) 下

观察 GUS 表达部位并拍照记录。共处理 4 个株系的材料,每株系分别取 12 个植株进行染色。

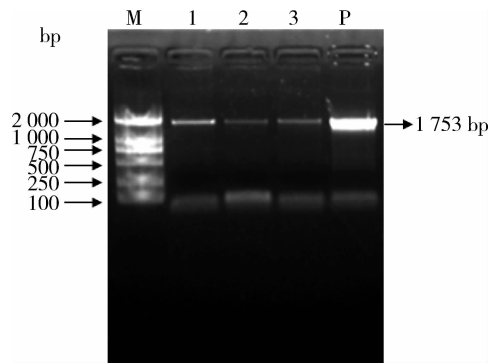
转基因拟南芥的 GUS 酶活性测定按照 Li 等^[19]的方法进行。将激素和非生物胁迫处理后的拟南芥植株放入 1.5 mL 试管中,加入 300 μ L 拟南芥 GUS 提取液(50 mmol/L sodium phosphate (pH 7.0), 10 mmol/L Na_2 -ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA, pH 8.0), 0.1% sodium lauryl sarcosine, 0.1% Triton X-100, 10 mM β -mercaptoethanol), 在冰上用匀浆机将组织磨碎。4 $^{\circ}\text{C}$ 8 000 r/min 离心 10 min, 上清液转入新的 1.5 mL 试管中。在 1.5 mL 试管中加 160 μ L 的 1 mmol/L MUG (4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide hydrate) 溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min 后加入 40 μ L 的提取的上清液, 迅速充分混匀。之后, 立刻取出 100 μ L 反应混合液加入到 900 μ L 的反应终止液(0.2 mol/L Na_2CO_3) 中, 作为酶促反应的起始点(0 点)。剩余的混合液反应 15 min 后, 加入 900 μ L 终止液终止反应。用分光光度计在激发波长 365 nm、发射波长 455 nm 下, 测定反应前后不同处理样品的荧光值。同时取 100 μ L 上清液, 用考马斯亮蓝法测定样品蛋白含量^[20], 计算单位时间内的 GUS 酶活性。共处理 4 个株系, 每个株系分别取 6 个植株进行 GUS 酶活性的测定, 应用 PASW 18 对数据进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 月季 *RhNAC4* 转录因子基因启动子的克隆

为了分离克隆月季 *RhNAC4* 的上游启动子序列, 采用 High-Tail PCR 的方法进行序列扩增。以月季幼嫩叶片的基因组总 DNA 为模板, 设计步移引物 SP1、SP2 和 SP3(表 1) 进行三轮 PCR 扩增 *RhNAC4* 基因的上游序列, 得到了一条长度约为 1 750 bp 的 DNA 片段。经回收纯化连接测序该片段序列, 并与已知 *RhNAC4* 基因进行序列比对, 表明克隆获得了在 *RhNAC4* 基因起始密码子 ATG 上游的片段, 序列长度为 1 753 bp。进一步利用 *RhNAC4* 特异引物在 3 个不同月季样本的 DNA 中进行扩增测序确认, 在 3 个不同的 DNA 样本中均能得到长度序列一致的片段(图 1)。结果表明获得的上游序列是 *RhNAC4* 转录因子基因的上游启动

子序列。



M. 2 000 bp DNA 分子量标准; 1~3. 3 个独立的月季 DNA 样本;
P. 含有月季 *RhNAC4* 启动子的质粒对照
M. 2 000 bp DNA marker; 1~3. Three rose genomic DNA;
P. Plasmids of *RhNAC4* promoter

图 1 月季 *RhNAC4* 启动子的 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR product of *RhNAC4* promoter

2.2 月季 *RhNAC4* 启动子顺式作用元件分析

进一步利用植物顺式作用元件数据库 PLACE^[16] 和 PlantCARE^[17] 分析克隆得到的 *RhNAC4* 启动子序列, 结果如图 2 所示。 *RhNAC4* 启动子序列包含的顺式作用元件可分为 5 类: 启动子核心元件类、发育相关类、激素响应类、非生物胁迫和生物胁迫相关类和其他类别。 *RhNAC4* 启动子除包含大多数高等植物启动子具有的保守元件(TATA-box 和 CAAT-box) 外, 还包含有植物生长、发育及与外界环境密切相关的其他作用元件, 比如与叶肉细胞发育相关的 CACTFTPPCA1(-664 ~ -661, -312 ~ -307) 元件和开花时间相关的 CARGATCONSENSUS(-116 ~ -107) 元件; 激素响应类元件包括 GA 响应元件 GAREAT(-975 ~ -969) 以及参与生长素和水杨酸调节的元件 ASF1MOTIFCAMV(-1 635 ~ -1 631, -1 305 ~ -1 301)。同时, 一些非生物胁迫和生物胁迫相关的元件也存在于 *RhNAC4* 的启动子中, 比如干旱响应元件 MYBCORE(-955 ~ -950, -543 ~ -538)、WBOXATNPR1(-435 ~ -431, -283 ~ -279)、乙烯响应元件 ERELEE4(-85 ~ -78) 等, 病程响应元件 SEBFCONSSTPR10A(-1 546 ~ -1 540) 等。除此之外, *RhNAC4* 启动子还包含一些与蔗糖信号相关的一些元件, 如 SREATMSD(-502 ~

-497)和 TATCCAOSAMY(-501~ -496)。上述分析结果表明:*RhNAC4* 启动子序列具有真核生

物基因启动子的基本结构特征,并且 *RhNAC4* 可能参与植物的发育、抗病和防御响应等生物学进程。



启动子核心元件 (General cis-elements)	TATA-BOX	tataaat	CAAT	caat
发育相关类元件 (Development related)	CACTFPPCA1	caactfppca1	CARGATCONSENSUS	cargatconsensus
激素响应类元件 (Hormone related)	GAREAT	gareat	ASF1MOTIFCAMV	asf1motifcamv
非生物胁迫和生物胁迫类元件 (Abiotic and biotic stress related)			MYBCORE	mybcore
			WBOXATNPRL	wboxatnp1
			ERELEE4	erelee4
			SEBFCONSSTP10A	sebfconsstp10a
其他类别元件 (Others)	SREATMSD	sreatmsd	TATCCAOSAMY	tatcca

不同的顺式作用元件及位置用颜色框图显示

The colorful boxes show different regulatory cis-acting elements

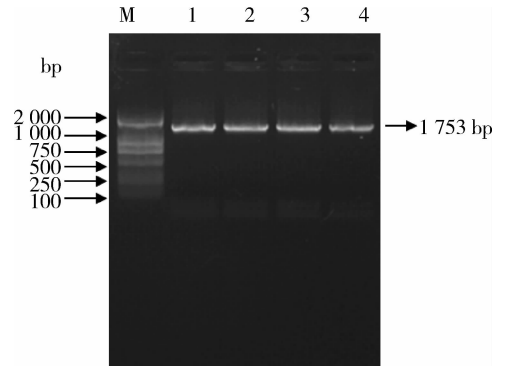
图 2 月季 *RhNAC4* 启动子序列

Fig. 2 The rose *RhNAC4* promoter sequence

2.3 月季 *RhNAC4* 启动子发育时空表达特性分析

为了在模式植物拟南芥中验证月季 *RhNAC4* 基因的表达调控模式,首先构建了 Pro_{RhNAC4}:GUS 的遗传载体转化拟南芥。分离转基因拟南芥基因组 DNA,经 PCR 验证后确认获得了含有 *RhNAC4* 启动子的转基因拟南芥植株(图 3)。

为了检测 *RhNAC4* 启动子在植物生长和发育过程中的表达活性,分析了 Pro_{RhNAC4}:GUS 转基因拟南芥植株在整个生长周期的 GUS 染色表型。结果表明:在 7 d 的幼苗中,在子叶中有较强的 GUS 活性,在真叶叶脉维管束中也有明显着色(图 4(a)和(b));在 14 d 的幼苗中,GUS 染色部位多集中在子叶和侧根原基上(图 4(c)和(d));而 21 d 的幼苗 GUS 活性部位与 14 d 的幼苗区别不大,在子叶和根中较强(图 4(e))。在花序发育的早期阶段,花药

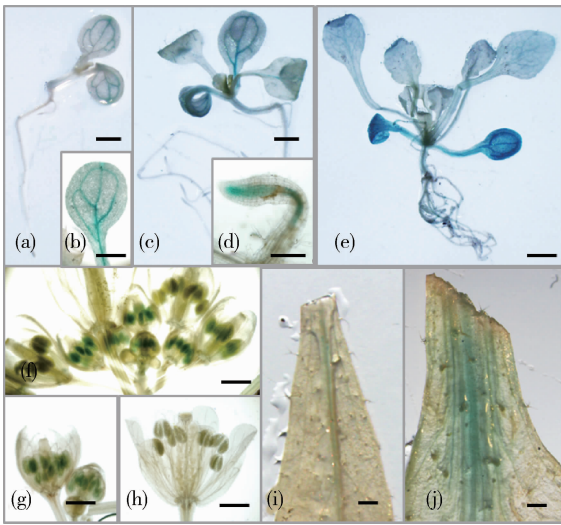


M. 2 000 bp DNA 分子量标准;1~4. 4 个独立的 T3 代拟南芥转基因株系。

M. 2 000 bp DNA marker; 1 - 4. Four independent lines of Arabidopsis transform.

图 3 Pro_{RhNAC4}:GUS 转基因拟南芥中 *RhNAC4* 启动子 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR analysis of transformed *Arabidopsis* of Pro_{RhNAC4}:GUS ants



(a) 7 d 植株;(b) 7 d 子叶;(c) 14 d 植株;(d) 侧根原基;(e) 21 d 植株;(f) 花;(g) 未开放花;(h) 完全开放花;(i) 30 d 叶片;(j) 50 d 叶片。

(a) 7-day-old plants; (b) 7-day-old cotyledons; (c) 14-day-old plants; (d) Lateral root; (e) 21-day-old plants; (f) Flowers; (g) Immature flower; (h) Mature flower; (i) Leaves in 30-day-old plants; (j) Leaves in 50-day-old plants. Bars=1 mm.

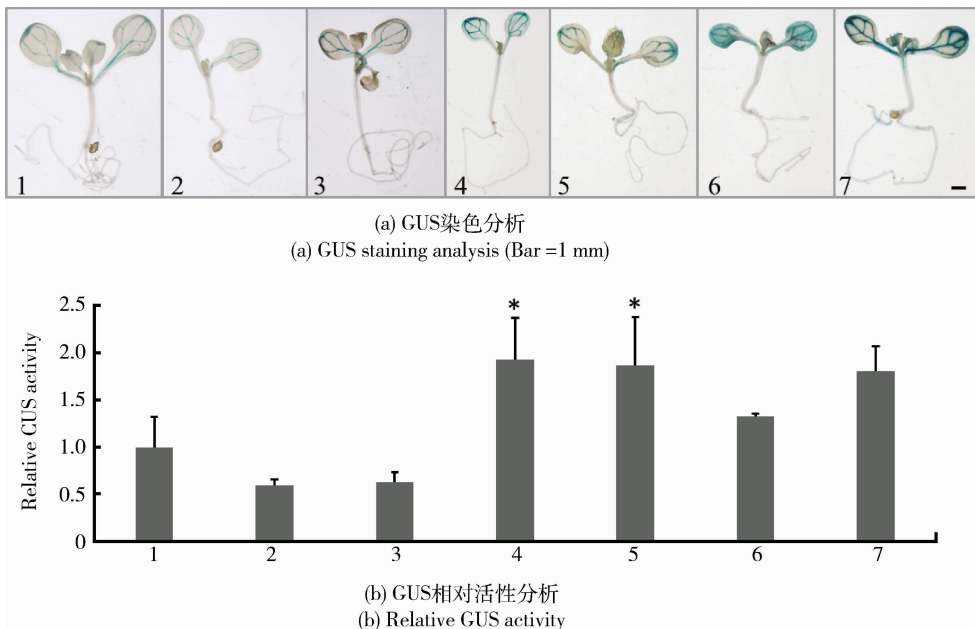
图4 $Pro_{RhNAC4}:GUS$ 转基因拟南芥中 GUS 的组织化学定位

Fig. 4 Histochemical localization of GUS expression driven by the *RhNAC4* promoter in transgenic *Arabidopsis*

GUS 活性表达很强(图 4(f)和(g));当花瓣完全展开后,颜色变浅(图 4(h)),而在其他花器官中的 GUS 染色不明显。在叶片发育过程中,30 d 的拟南芥莲座叶 GUS 染色不明显,基本检测不到(图 4(i));植株 50 d 时,莲座叶的 GUS 染色主要集中在叶脉的维管束中(图 4(j))。上述结果表明,*RhNAC4* 的启动子在拟南芥中的表达活性在不同的发育阶段和不同器官部位都具有时空特异性。

2.4 月季 *RhNAC4* 启动子的诱导表达特性分析

RhNAC4 启动子中含有 GA、ACC 和干旱胁迫相关的顺式作用元件。为了进一步研究这些顺式作用元件在 *RhNAC4* 启动子中的转录调节特性,我们分析了 $Pro_{RhNAC4}:GUS$ 转基因拟南芥幼苗中在激素(ABA、 GA_3)和非生物胁迫(失水、NaCl、ACC 和甘露醇)处理下的 GUS 活性。在 $50 \mu\text{mol/L } GA_3$ 、3 h 失水胁迫、 $50 \mu\text{mol/L ACC}$ 和 200 mmol/L 甘露醇处理下,与对照比较,转基因植株幼苗都有明显的 GUS 染色,且 GUS 活性强的部位主要集中在叶脉的维管束中,在根中表达较弱。 125 mmol/L NaCl 和 $100 \mu\text{mol/L ABA}$ 处理,转基因拟南芥幼苗没有明显的 GUS 染色(图 5(a))。进一步用荧光分光光度计对上述处理的幼苗样本进行 GUS 酶活性的测



1. 对照;2. NaCl 处理;3. 脱落酸处理;4. 赤霉素处理;5. 失水处理;6. 甘露醇处理;7. ACC 处理。

1. Control; 2. 125 mmol/L NaCl ; 3. $100 \mu\text{mol/L ABA}$; 4. $50 \mu\text{mol/L } GA_3$; 5. 3 h Dehydration; 6. $200 \text{ mmol/L Mannitol}$; 7. $50 \mu\text{mol/L ACC}$.

图5 $Pro_{RhNAC4}:GUS$ 转基因拟南芥植株在激素和非生物胁迫诱导下 GUS 活性分析

Fig. 5 Activity of *RhNAC4* promoter in response to hormone treatments and various abiotic stresses in $Pro_{RhNAC4}:GUS$ transgenic *Arabidopsis* plants

定,结果如图 5(b)所示。50 $\mu\text{mol/LGA}_3$ 和 3 h 失水胁迫处理显著提高了 GUS 酶活性,50 $\mu\text{mol/L ACC}$ 处理也促进了 GUS 在植株中的积累;在 NaCl 和外源 ABA 处理条件下,GUS 酶活性与对照比较没有升高。上述结果说明 *RhNAC4* 启动子活性受赤霉素、乙烯和失水胁迫处理诱导。

3 讨 论

基因的表达特性分析是基因功能解析的重要内容,基因启动子的表达诱导分析对于了解基因的作用机制具有非常重要的作用。本研究分离了月季 *RhNAC4* 上游的启动子序列,该序列含有多个与发育相关的重要调控元件,说明 *RhNAC4* 的表达参与了植物发育相关进程(图 2)。*RhNAC4* 启动子序列中的具有多个含多拷贝的顺式作用元件,如 MYB、MYC 和 W-BOX 等。这些元件一般都参与非生物胁迫和生物胁迫相关转录因子的互作,表明该基因可能参与了不同逆境胁迫信号的响应。另外,*RhNAC4* 启动子序列中还含有多个激素响应类元件,如生长素和赤霉素响应元件等。这表明 *RhNAC4* 可能也参与了不同激素的信号交叉,可能受到多种外界因子的诱导表达。

植物对于干旱胁迫环境响应的信号转导途径可分为依赖 ABA 的途径和不依赖 ABA 的途径^[21]。依赖 ABA 的途径需要植物激素 ABA 的参与,参与这一途径相关基因的启动子区域中含有 ABA 响应元件 ABRE,如拟南芥中的 *RD29B*^[22-23]。不依赖 ABA 的信号途径的基因的启动子区域中多含有保守的 DNA 结合序列 A/GCCGAC^[24]。在本试验中的月季切花 *RhNAC4* 的启动子区域中,未发现响应 ABA 的顺式作用元件 ABRE(图 2);同时,失水处理 3 h 可以诱导 GUS 基因的表达,说明 *RhNAC4* 可能通过不依赖于 ABA 的信号转导途径参与植物对失水胁迫的应答。而在添加了 GA、ACC 后,诱导了 GUS 表达的升高(图 4),说明 *RhNAC4* 的表达调控可能参与赤霉素和乙烯的信号途径。这个结果与 *RhNAC4* 启动子序列中包含 GA 响应元件 GAREAT 和乙烯响应元件 ERELEE4 相一致。

NAC 类转录因子是植物特有的一大类调节蛋白,不同亚组结构有差异、参与植物的不同生物学进程,在植物生长发育方面具有非常重要的作用。已有研究表明:拟南芥中多个 NAC 类转录因子参与了植株的衰老进程,如 *JUNGBRUNNEN1*

(*JUB1*)^[10]、*ORS1*^[25] 和 *ANAP*^[26-27]。本研究中,*RhNAC4* 启动子驱动的 GUS 在拟南芥叶片的生长发育中 GUS 染色随着生长周期的延长 GUS 染色程度逐渐加深(图 3),表明 *RhNAC4* 可能参与了拟南芥叶片的衰老进程。但在拟南芥花器官中,在早期花发育阶段,GUS 染色主要集中在花药区域,当花完全开放后,染色程度减弱,这可能是由于 *RhNAC4* 的表达在拟南芥叶和花中存在组织特异性,具体原因还需要进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Zuker A, Tzfira T, Vainstein A. Genetic engineering for cut-flower improvement[J]. *Biotechnol Adv*, 1998, 16(1): 33-79
- [2] Dafny-Yelin M, Guterman I, Menda N, et al. Flower proteome: Changes in protein spectrum during the advanced stages of rose petal development[J]. *Planta*, 2005, 222(1): 37-46
- [3] Jin J, Shan N, Ma N, et al. Regulation of ascorbate peroxidase at the transcript level is involved in tolerance to postharvest water deficit stress in the cut rose (*Rosa hybrida* L) cv Samantha[J]. *Postharvest Bio Technol*, 2006, 40(3): 236-243
- [4] Dai F, Zhang C, Jiang X, et al. *RhNAC2* and *RhEXPA4* are involved in the regulation of dehydration tolerance during the expansion of rose petals[J]. *Plant Physiol*, 2012, 160(4): 2064-2082
- [5] Nakashima K, Takasaki H, Mizoi J, et al. NAC transcription factors in plant abiotic stress responses[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1819(2): 97-103
- [6] Puranik S, Sahu P P, Srivastava P S, et al. NAC proteins: regulation and role in stress tolerance[J]. *Trends Plant Sci*, 2012, 17(6): 369-381
- [7] Juven-Gershon T, Kadonaga J T. Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery [J]. *Develop Biol*, 2010, 339(2): 225-229
- [8] Li Y, Liu S, Yu Z, et al. Isolation and characterization of two novel root-specific promoters in rice (*Oryza sativa* L) [J]. *Plant Sci*, 2013, 207: 37-44
- [9] Tran L S P, Nakashima K, Sakuma Y, et al. Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the *early responsive to dehydration stress 1* promoter[J]. *Plant Cell*, 2004, 16(9): 2481-2498
- [10] Wu A, Allu A D, Garapati P, et al. *JUNGBRUNNEN1*, a reactive oxygen species-responsive NAC transcription factor, regulates longevity in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2012, 24(2): 482-506
- [11] Yang S, Seo P, Yoon H, et al. The *Arabidopsis* NAC transcription factor VNI2 integrates abscisic acid signals into leaf senescence via the *COR/RD* genes[J]. *Plant Cell*, 2011, 23

- (6):2155-2168
- [12] Fujita M, Fujita Y, Maruyama K, et al. A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway[J]. *Plant J*, 2004, 39(6):863-876
- [13] Nakashima K, Tran L S P, Nguyen D V, et al. Functional analysis of a NAC-type transcription factor *OsNAC6* involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice [J]. *Plant J*, 2007, 51(4):617-630
- [14] Kasajima I, Ide Y, Ohkama-Ohtsu N, et al. A protocol for rapid DNA extraction from *Arabidopsis thaliana* for PCR analysis [J]. *Pl Mol Bio Rep*, 2004, 22(1):49-52
- [15] Liu Y and Chen Y. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences[J]. *BioTechniques*, 2007, 43:649-656
- [16] Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database; 1999[J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(1):297-300
- [17] Lescot M, Dehais P, Thijs G, et al. Plant CARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(1):325-327
- [18] Clough S J and Bent A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant J*, 1998, 16(6):735-743
- [19] Li Y, Wu Z, Ma N, et al. Regulation of the rose *Rh-PIP2*; 1 promoter by hormones and abiotic stresses in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell Rep*, 2009, 28(2):185-96
- [20] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72(1/2):248-254
- [21] Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance[J]. *J Exp Bot*, 2007, 58(2):221-227
- [22] Choi Hyung-in, Hong Jung-hee, Ha Jin-ok, et al. ABFs, a family of ABA-responsive element binding Factors[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(3):1723-1730
- [23] Uno, Yuichi, Furihata Takashi, et al. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2000, 97(21):11632-11637
- [24] Fujita Y, Fujita M, Satoh R, et al. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(12):3470-3488
- [25] Balazadeh S, Kwasniewski M, Caldana C, et al. ORS1, an H₂O₂-Responsive NAC transcription factor, controls senescence in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Mol Plant*, 2011, 4(2):346-360
- [26] Zhang K and Gan S S. An abscisic acid-AtNAP transcription factor-SAG113 protein phosphatase 2C regulatory chain for controlling dehydration in senescing *Arabidopsis* leaves[J]. *Plant Physiol*, 2012, 158(2):961-969
- [27] Guo Y and Gan S. AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence[J]. *Plant J*, 2006, 46(4):601-612

责任编辑:王燕华