

文章编号: 0427-7104(2012)04-0507-08

水稻 *OsNAP* 基因的功能分析及其在 育种价值方面的研究

唐雪蓉^{1,2}, 张如奎², 陈旭², 吴秀菊¹, 明风²

(1. 东北农业大学 生命科学学院, 哈尔滨 150030;
2. 复旦大学 生命科学学院 植物科学研究所 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433)

摘 要: NAC 转录因子是植物特异的转录因子. 本研究通过从水稻日本晴(*Oryza sativa* L.) 的基因组中克隆到一个与拟南芥衰老相关的基因 *AtNAP*(*Atlg69490*) 的同源基因 *OsNAP*. *OsNAP* 的 ORF 为 1 179 bp, 推测其编码蛋白含有 392 个氨基酸, 等电点为 8.55, 分子质量为 42.195 ku. 为进一步研究 *OsNAP* 的功能, 利用显性抑制元件 SRDX 构建其 pCAMBIA1304-35S: *OsNAP*-SRDX 表达载体, 通过农杆菌浸染方法将其转化水稻中花 11 品种. T₁ 代转基因植株通过潮霉素、RealtimePCR、和 Western blot 鉴定, 筛选出 4 个 *OsNAP* 高表达的阳性植株. 在种子成熟期, 观察到 T₁ 代转基因 4 号植株较野生型相比有明显的延缓衰老的表型, 其他农艺性状如单株分蘖数、单株总粒数、单穗饱和粒数、千粒重、结实率等都优于野生型. 实验证明抑制 *OsNAP* 基因的表达能够延缓水稻叶片衰老并可以提高产量, 具有潜在的育种价值.

关键词: NAC 转录因子; SRDX 技术; 中花 11; 水稻; 产量

中图分类号: Q 943.2 **文献标志码:** A

NAC 转录因子是近十几年来发现的一类具有多种生物功能的植物特异性的转录因子, 广泛存在于陆生植物中. 1997 年 Aida 等人首次报道了 NAC 结构域, 其在矮牵牛 NAM、拟南芥 ATAF1/2 和 CUC2 编码蛋白的 N 端都包含一段保守的氨基酸序列^[1], 人们将含有 NAC 结构域的蛋白统称为 NAC 转录因子^[2]. 随后又相继在水稻^[3]、拟南芥^[4]、小麦^[5]、大豆^[6]、玉米^[7]、番茄^[8]、花生^[9] 等作物中克隆到 NAC 基因.

NAP 基因属于 NAC 转录因子家族成员, 最早被发现是其作为对于花瓣和雄蕊形成起重要的作用的 *AP3* 的靶基因, 并且是对花器官分生组织形成与分化起作用的相关基因的同源基因. 研究表明 *AP3* 异位表达时, *NAP* 的表达谱和表型暗示其在雄蕊和花瓣的细胞分化与延伸的生长过渡过程中起作用^[10]. NAC 转录因子家族成员中已经有一部分基因在很多植物物种中被证明是衰老调控的基因. 其中 *AtNAP* (*Atlg69490*) 在拟南芥中被证明在叶片衰老过程中起重要作用. Gan^[11] 等研究表明当过表达 *AtNAP* 基因时可以加快拟南芥的叶片衰老; 在两个 T-DNA 插入突变体中, 拟南芥叶片的衰老显著延缓. Uauy^[5] 等在小麦中, 通过图位克隆的方法克隆到一个与小麦衰老相关的基因 *NAMB1*, 此基因属于 NAC 家族与拟南芥中 NAM 的相似性很高, 能加速小麦的衰老而且能够增加营养物质从叶子到发育麦茬中的再分配, 从而增加小麦中营养物质含量.

研究转录因子家族成员的功能时可能会发现它们存在功能冗余的情况, 嵌合抑制沉默技术 (CRES-T 技术) 不仅可以应用于研究转录因子的靶基因的沉默, 也可应用于克服转录因子家族成员由于功能冗余而造成的实验局限^[12]. Ohta^[13] 等找到一段 ERF 转录抑制因子的抑制序列, 这段序列在很多植物的抑制因子中都存在, 对该序列进一步改进发现了一段 12 个氨基酸序列 SRDX(LDLDLELRIGFA). 若 SRDX 与转录激活因子

收稿日期: 2011-12-15
基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项 (2009ZX08009—061B), 转基因生物新品种培育科技重大专项 (2011ZX08009 - 001), 转基因生物新品种培育重大专项资助
作者简介: 唐雪蓉 (1987—), 女, 硕士研究生; 明风, 女, 副教授, E-mail: fming@fudan.edu.cn; 吴秀菊, 女, 副教授, E-mail: xiuju_w@163.com. 两人为共同通讯作者.

融合,即使在原始激活区域存在时也会改变成为主要抑制因子,这些主要的抑制因子不仅能够抑制其自身靶基因的转录,而且会抑制其他成员相应靶基因的表达,因此克服了基因冗余,起到很好的显性抑制作用^[14]. SRDX 的显性抑制功能在双子叶植物拟南芥和单子叶植物水稻中已经得到了很好的验证^[15].

水稻是我国目前种植面积最广的农作物之一,而叶片又是水稻最重要的营养器官,水稻籽粒中有 2/3 以上的干物质是开花后通过光合作用获得的,因此叶片的功能及衰老对水稻产量有重要影响^[16]. 实践研究表明叶片每推迟 1 天衰老,产量可提高 1%左右^[17]. 基于以上研究基础,本研究拟通过克隆得到水稻 NAP 基因并与显性抑制元件 SRDX 融合,转化水稻中花 11,意在通过减缓植株的衰老,进而延长水稻营养生长时间,最终得以提高产量.

1 材料和方法

1.1 材料

水稻日本晴(*Oryza sativa* L.)种子,粳稻中花 11 种子,大肠杆菌 DH5 α ,农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 菌株,植物表达载体 pCAMBIA1304(含 CaMV 35S 组成型启动子)均为本实验室保存. PCR 引物、各种限制性内切酶,以及 T₄DNA 连接酶等均购自 TaKaRa 公司. DNA 序列测定由上海博尚生物技术有限公司完成.

1.2 方法

1.2.1 水稻基因组的提取与 OsNAP 基因的获得

取水稻日本晴叶片,用 SDS 法^[18]提取水稻叶片基因组,根据 NCBI 上推测的 OsNAP(NM_187534)的基因序列设计引物(见表 1)进行扩增,将扩增产物通过 *Nco* I / *Spe* I 双酶切后连接到 pCAMBIA1304 载体. 构建载体经过 *Nco* I / *Spe* I 双酶切鉴定正确后,送上海博尚生物技术有限公司进行测序.

表 1 实验所用引物
Tab. 1 Primers used in experiment

基因名称	引物(5'-3')	Gene Bank 序列号	片段长度/bp
OsNAP	F: TACCATGGTTCTGTCTGAACCCGG	NM_187534	1 363
	R: CGACTAGTGTTCATCCCCATGTTAGAG		
OsNAP-SRDX	F: GTCAGATCTGATGGTTCTGTCTGAACCCG	NM_187534	1 399
	R: CGACTAGTTCAAGCGAAACCCAAACGG AGTTCTAGATCCAGATCCAGGTTTCATCCCCATGTTAGAG		
OsActin	F: CTGCGATAATGGAACCTGGT	NC_008394. 4	80
	R: ACAATGCTGGGGAAGACA		
OsNAP Realtime	F: GGATGACTGGGTGCTGTGCC	NM_187534	255
	R: CAGGTCGAAATGGAAGGGA		
HPT	F: CGATTTGTGTA CGCCGACAGTC	AF_234300. 1	1 026
	R: CGATGTAGGAGGGCGTGATATG		

1.2.2 聚类分析及 OsNAP 基因编码蛋白质的序列分析

对本研究所获得的 OsNAP 基因,采用 Clustal X^[19]进行氨基酸序列相似性分析;利用 Mega4. 1 软件,Neighbour-Joining 法^[20]进行 NAC 成员的系统进化分析;利用 <http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam> 网站进行基因编码区序列、分子质量和等电点分析.

1.2.3 pCAMBIA1304-35S: OsNAP-SRDX 表达载体的构建与转化

以 OsNAP 的 ORF 为基础,在 C 端加一段 SRDX 序列,设计目的基因引物,其中反向引物加上 SRDX 序列(见表 1). 利用水稻日本晴基因组扩增得到 NAP-SRDX,将扩增产物通过 *Spe* I / *Bgl* II 双酶切后连接到 pCAMBIA1304 载体. 构建载体经过 *Spe* I / *Bgl* II 双酶切鉴定正确后,送上海博尚生物技术

有限公司进行测序. 利用农杆菌介导法转化水稻中花 11 愈伤组织, 水稻愈伤组织经过诱导、筛选、分化和生根, 获得 9 棵 T_0 代转基因植株, 继续培养获得 T_1 代转基因种子.

1. 2. 4 转基因植株的潮霉素检测

提取转基因水稻基因组进行潮霉素基因的检测, 潮霉素抗性基因 *HPT* 的引物见表 1.

1. 2. 5 转基因植株的 Realtime PCR 检测

用 TRIzol 提取水稻野生型和转基因植株的叶片总 RNA, 并用逆转录酶合成 cDNA 第一链. 目的基因 *OsNAP* 和内参 *OsActin* 的 Realtime PCR 引物如表 1 所示. 荧光染料采用 SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time code; DRR041 TaKaRa 生物公司). Realtime PCR 反应体系为 20 μ L: SYBR 10 μ L, 10 mmol/L PCR 正向引物 0. 8 μ L, 10 mmol/LPCR 反向引物 0. 8 μ L, 模板 cDNA8. 4 μ L. 采用 iCycler iQTM real-time quantitative PCR 仪(Bio-RAD), 每次实验每个样品重复 3 次用于 Realtime-PCR 检测, 通过标准曲线确定目的基因与 *OsActin* 检测的线性范围, 目的基因 *OsNAP* 的相对表达水平通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析^[21].

1. 2. 6 转基因植株的 Western blot 检测

采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测转基因植株蛋白水平含量. 样品蛋白 OD₅₉₅ 一般大于 0. 4 以保证每个泳道蛋白上样量为 10 μ g. 电泳结束后在半干式转膜仪(Bio-Rad)上进行转移. 封闭后加一抗(NAP 特异抗体, Abgent), 二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, Proteintech Group)杂交. 实验结果的显色检测采用 HRP 显色液检测试剂盒(Invitrogen 公司).

1. 2. 7 转基因植株农艺性状的分析

将 T_1 代成熟的转基因植株与野生型各 10 株进行收种, 使用 Nikon Coolpix 995 拍照. 晾晒 2 d 后统计株高、分蘖长、单株分蘖数、单分蘖的总穗粒数、单株饱和穗粒数、单株总粒重、总穗粒数、单株粒重、千粒重、结实率等产量性状指标进行统计分析.

2 结果与分析

2. 1 水稻 *OsNAP* 基因的获得与序列分析

从水稻日本晴(*Oryza sativa* L.) 中克隆得到了与 *AtNAP* 同源的 *OsNAP* 基因, 开放阅读框(ORF) 的长度为 1 179 bp. 推测 *OsNAP* 编码 392 个氨基酸残基, 在 <http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam> 网站预测了 *OsNAP* 蛋白的等电点与分子质量: *OsNAP* 的等电点为 8. 55, 分子质量大小为 42. 195 ku. 从 NCBI 数据库中得到与侧生器官发育密切相关的 *CUC* 基因, 与分生组织的器官原基的形成密切相关的 *NAM* 基因, 与胁迫相关的 *ATAF* 基因, 将这些基因氨基酸序列与 *OsNAP* 进行氨基酸序列同源比对. 发现 *OsNAP* 与其他 NAC 家族成员一样具有保守的 5 个区域(图 1), 为 NAC 家族基因.

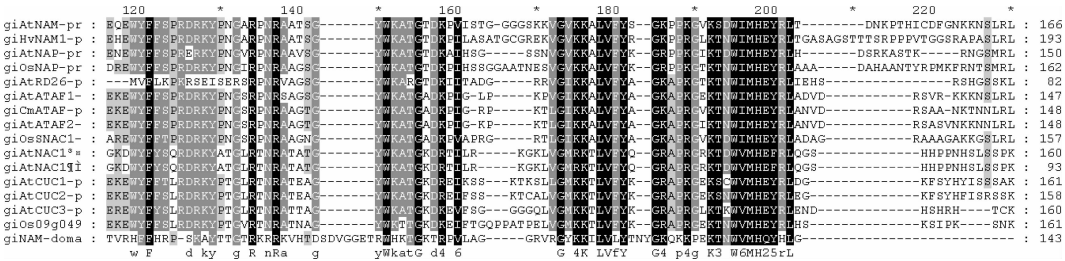


图 1 水稻 *OsNAP* 推测的氨基酸序列与其他物种相似序列的比较

Fig. 1 Multiple alignment of amino acids sequences of *OsNAP* and other NAC transcription factors

黑色部分表示氨基酸序列完全一致; 灰色部分表氨基酸序列相似. 序列来源: NCBI 的 Protein ID: AtNAM: 拟南芥 NAM(AAD17314); HvNAM: 大麦 NAM(ABI94357. 1); AtNAP: 拟南芥 NAP(NP_564966); AtRD26: 拟南芥 RD26 (NP_001078452)At-ATAF1: 拟南 ATAF1(NP_171677); CmATAF: 黄瓜 ATAF(ABM88941. 1); AtATAF2: 拟南芥 ATAF2(NP_680161. 1); OsSNAC1: 水稻 SNAC1(ABD52007. 1); AtNAC1: 拟南芥 NAC1(NP_188135. 1); AtCUC1: 拟南芥 CUC1(ACB31158. 1); AtCUC2: 拟南芥 CUC2(NP_2002206); AtCUC3: 拟南芥 CUC3(NP_177768. 1).

2. 2 *OsNAP* 与 NAC 家族成员的系统进化分析

为研究 *OsNAP* 在植物 NAC 转录因子家族的进化地位, 利用 Mega 4. 1^[22] 软件, 采用邻接法

(Neighbor-Joining)^[20],将 *OsNAP* 与 NAC 家族已报道的核苷酸序列进行聚类分析(图 2). *CarNAC3*, *GmNAC1* *AtNAP*, *OsNAP*, *AtNAM*, *AtNAC2*, *HvNAM1*, *NAM-BI* 聚在一簇属于 NAP 亚家族; *AtRD26*, *OsSNAC1*, *AtATAF2*, *AtATAF1*, *CmATAF* 聚在一簇属于 ATAF 亚家族; *AtNAC1*, *AtCUC3*, *AtCUC1* 和 *AtCUC2* 聚在一簇属于 NAM 亚家族. *OsNAP* 与 *AtNAP*, *CarNAC3*, *GmNAC1* 亲缘关系很近,推测 *OsNAP* 可能与这些基因的功能相似.

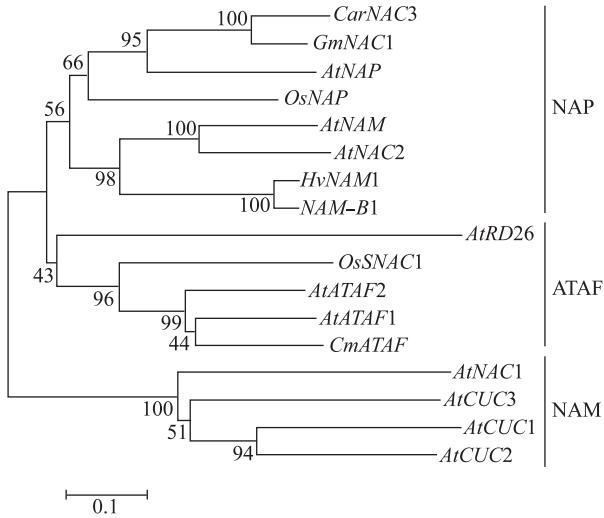


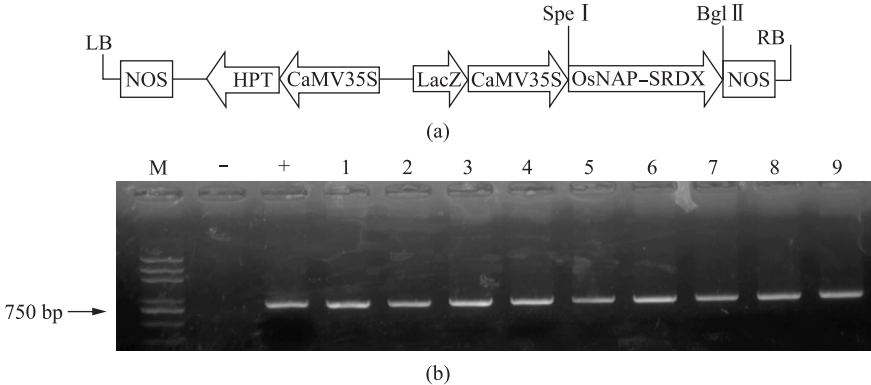
图 2 不同物种中 NAC 基因家族成员的系统进化树

Fig. 2 Evolutionary analysis of NAC transcription factor

CarNAC3: 鹰嘴豆 NAC3(AC040486); *GmNAC1*: 大豆 NAC1(AAY46121.1); *AtNAP*: 拟南芥 NAP(NP_564966); *OsNAP*: 水稻 NAP(AAN64999.1); *AtNAM*: 拟南芥 NAM((AAD17314)); *AtNAC2*: 拟南芥 NAC2(BAB20600.1); *HvNAM1*: 大麦 NAM1 (ABI94357.1); *NAM-BI*: 小麦 NAM-BI (ABI15896.1); *AtRD26*: 拟南芥 RD26 (NP_001078452); *OsSNAC1*: 水稻 SNAC1(ABD52007.1); *AtATAF2*: 拟南芥 ATAF2(NP_680161.1); *AtATAF1*: 拟南芥 ATAF1(NP_171677); *CmATAF*: 黄瓜 ATAF(ABM88941.1); *AtNAC1*: 拟南芥 NAC1(NP_188135.1); *AtCUC3*: 拟南芥 CUC3(NP_177768.1); *AtCUC1*: 拟南芥 CUC1(ACB31158.1); *AtCUC2*: 拟南芥 CUC2(NP_2002206).

2.3 pCAMBIA1304-35S: OsNAP-SRDX 载体的构建与转基因植株的分子鉴定

将 *OsNAP* 与显性抑制元件 *SRDX* 组成融合基因,将扩增产物通过 *Spe* I / *Bgl* II 双酶切后连接到 pCAMBIA1304 载体. 构建完成的 pCAMBIA1304-35S: *OsNAP-SRDX* 载体通过农杆菌介导的方法转化水稻中花 11,获得 9 株 T₀ 代独立转化个体. 对转基因植株提取基因组(方法如 1.2.1),pCAMBIA1304 载体具有 *HPT* 标记基因(图 3(a)),用潮霉素特异性引物进行扩增,转基因 9 个植株全部为阳性植株,均扩增出特异条带(图 3(b)).



M: 5 000 marker; -: 阴性对照; +: 阳性对照; 1~9: pCAMBIA1304-35S: *OsNAP-SRDX* 转基因植株的植株标号.

图 3 植物表达载体 pCAMBIA1304-35S: *OsNAP-SRDX* 构建与转基因植株分子鉴定

Fig. 3 The construction of pCAMBIA1304-35S: *OsNAP-SRDX* vector and molecular identification of the transformants

(a) 植物表达载体 pCAMBIA1304-35S: *OsNAP-SRDX* 结构图;(b) T₁ 代转基因植株的潮霉素鉴定

2.4 转基因植株的 RNA 与蛋白水平的鉴定

采用 Realtime-PCR 方法对转基因植株进行鉴定. 选取上述的 9 个转基因植株, 对生长两周左右幼嫩的叶片进行取样, 提取总 RNA(方法如 1. 2. 5). 用 *OsNAP* 的 Realtime 引物(见表 1)进行 Realtime-PCR 分析鉴定目的基因的表达量(图 4(a)), 3、4、6 和 9 号植株目的基因的表达量均高于野生型(WT). 进一步对所有植株提取可溶性蛋白, 进行 Western blot 杂交鉴定. Western blot 结果表明转基因植株和野生型都具有预测的 49 ku 大小的蛋白片段(图 4(b)), 总 *OsNAP* 蛋白量转基因植株较野生型具有一定程度的升高.

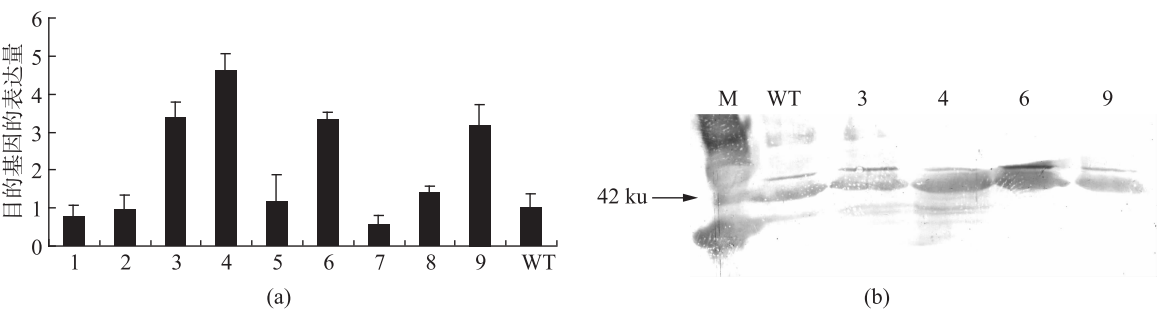


图 4 转基因植株 RNA 和蛋白水平检测

Fig. 4 Realtime and Western blot analysis of transgenic plants

(a) 转基因植株 RNA 水平检测, 1~9 为转基因植株; (b) 转基因植株的 Western blot 检测, 3、4、6、9 为 Realtime 结果中 NAP 高表达的 4 个转基因植株.

2.5 转基因植株的农艺性状分析

对 4 个转基因植株的 T_1 代在种子成熟时期进行观察, 相比野生型, 转基因植株具有明显的延缓衰老的表型(图 5(a)), 并且每穗穗粒数也有一定程度的增加(图 5(b)), 这为产量的分析提供了依据. 随后对 4 个转基因植株和野生型水稻的农艺性状如株高、分蘖长、单株分蘖数、单株总粒数、单株总粒重、单株饱和粒数、千粒重、结实率进行了统计与分析(表 2, 见第 512 页). 通过显著性分析得到 4 号转基因植株在单株总粒重、单株饱和穗粒数、千粒重和结实率性状上, 较野生型相比分别增加了 23. 70%, 10. 97%, 10. 01% 和 6. 20%. 此外 9 号植株在千粒重上也较野生型增加了 1. 26%, 其他性状较野生型相比无明显差异. 以上结果说明转基因 4 号和 9 号植株的农艺性状要优于野生型. 3 号和 6 号植株与野生型差异不大. 这可能与 SRDX 技术的应用有关, SRDX 技术可能造成突变体及多突变体的表型同样会出现野生型的表型^[23]. 以上实验结果证明, 抑制 *OsNAP* 的表达, 可以延缓植株叶片的衰老, 最终对于提高产量有重要作用.

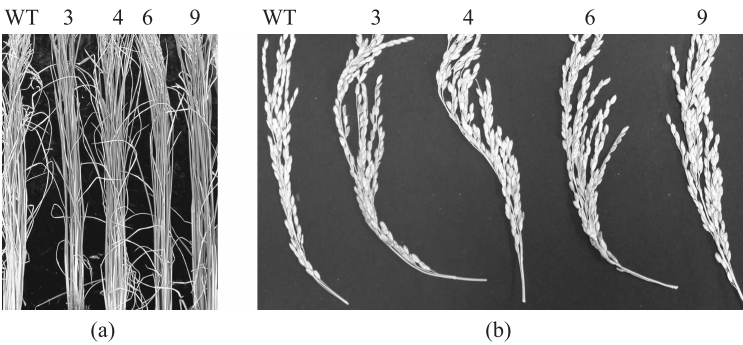


图 5 T_1 代转基因植株与野生型表型

Fig. 5 Phenotype of transgenic plants and wild type(WT)

(a) 转基因植株与野生型种子成熟期表型; (b) 转基因植株与野生型单穗表型. 3、4、6、9 为 *OsNAP* 高表达的 4 个转基因植株.

表 2 NAP-SRDX 4 个植株农艺性状分析
Tab. 2 Agronomic characters analysis of transgenic plants

植株	株高/cm	分蘖长/cm	每株分蘖数	每穗穗粒数	每株总穗粒数	结实率/%	每株饱和穗粒数	总粒重/g	千粒重/g
中花 11	109.80	21.56	13.14	110.69	1 784.35	78.28%	1 432.32	31.39	22.98
SRDX-3	111.10	21.13	15.26	112.39	1 907.63	79.05%*	1458.45	33.23	22.835
△	0.011 84	−0.019 94	0.161 339	0.015 358	0.06 909	0.01 868	0.018 243	0.009 417	−0.00 631
SRDX-4	113.38	21.65	16.35	126.57	1957.29	82.41%*	1589.45*	38.83*	25.28*
△	0.032 559	0.004 174	0.244 292	0.143 464	0.09 692	0.06 198	0.109 703	0.23 701	0.100 087
SRDX-6	113.20	20.75	13.08	111.14	1641.04	77.43%	1271.13	29.68	22.84
△	0.030 965	−0.03 757	−0.00 457	0.004 065	−0.08 031	−0.00 219	−0.11 254	−0.09 842	−0.00 609
SRDX-9	110.20	21.83	13.51	115.38	1 600.36	78.34%	1 236.26	28.14	23.27**
△	0.003 643	0.012 523	0.028 158	0.042 371	−0.103 11	0.009 02	−0.136 88	−0.145 35	0.012 62

注：* $P<0.05$, ** $P<0.01$, △表示与野生型相比较的增加或减少。

3 讨 论

本研究是从水稻日本晴(*Oryza sativa* L)中克隆到与拟南芥衰老相关基因 *AtNAP*(*Atlg69490*)的同源基因 *OsNAP*(NM_187534). 在 NAC 保守结构域中包含 5 个亚结构域(A、B、C、D、E), 其中亚结构域 A、C、D 高度保守, B 和 E 保守性不强^[24]. 通过 Clustal X^[19] 软件将 *OsNAP* 与从 NCBI 上获得的 NAC 家族其他成员的氨基酸序列进行比对(图 1), 发现 *OsNAP* 同样存在 5 个保守的亚区域, 得出 *OsNAP* 属于 NAC 转录因子家族, 其中 E 亚结构域高度保守, 这与之前的研究 B 和 E 亚结构域在组 II 中不保守, 而在组 I 中保守, 尤其在 NAP、*AtNAC3*、*ATAF* 和 *OsNAC3* 亚组中 E 亚结构域高度保守^[2]一致. 聚类树分析(图 2)得到与 *OsNAP* 基因最同源的基因为 *AtNAP*, 此外与 *CarNAC3*、*GmNAC1*、*AtNAM* 等 NAP 亚家族基因亲缘关系也很近. Peng 等^[25]研究发现 *CarNAC3* 受 ABA、Et、IAA 诱导而受 6-BA 抑制, 并且响应干旱胁迫. 推测 *OsNAP* 和这些基因具有相似的功能, 有关 *OsNAP* 基因是否具有增强宿主非生物胁迫耐性的研究正在进行中.

NAC 转录因子家族转录因子成员之间同源性很高, 表现出基因冗余性. 因此当采用基因敲除、RNA 反义、RNA 干涉等技术对基因的生物学术功能进行鉴定和分析时, 经常会由于同源基因的功能补偿作用而失败^[26]. 为进一步研究 *OsNAP* 的功能, 本研究采用了显性嵌合抑制技术(SRDX 技术). SRDX 技术的最大优点是可以克服基因冗余性的影响, 可用于鉴定转录因子的功能^[14]. 本研究通过构建 pCAMBIA1304-35S: *OsNAP*-SRDX 融合载体使其即使在其他转录因子存在冗余的情况下也会得到显性抑制, 从而进一步验证基因的功能. *NAP* 基因与 SRDX 融合转化水稻中花 11 可以显著延缓植株衰老的表型. 这与 Gan 等^[11]之前的研究 *atnap* 突变体具有延迟拟南芥叶片衰老的表型相一致, 说明本研究运用 SRDX 技术可以使 *NAP* 基因在存在冗余基因的情况下也起到了明显的抑制. 但是 SRDX 技术也同样存在弊端, 因为通过 SRDX 技术转录因子家族的冗余基因都得到抑制, 对于冗余基因的调控机制研究尚不清楚, 还有待进一步研究.

已有研究表明 NAC 转录因子参与植物生长发育的多种过程中如生殖发育、激素响应和生物非生物胁迫应答, 此外在细胞程序性死亡, 衰老中同样起着作用^[27]. 衰老可以看作是植物生长发育的最后阶段, 在这个阶段营养被重新分配, 以大量的细胞死亡和营养循环为特点, 叶片衰老被看作是程序性死亡, 在衰老过程中会伴随着光合器官的衰退和代谢水平下降以及许多酶的降解与合成等反应^[28], 潜在的分子机制还未被研究. 通过抑制或下调 *OsNAP* 基因的表达可以减慢植株衰老, 从而延长水稻营养生长时间, 并且提高产量. T₁ 代转基因植株(图 5)较野生型相比出现明显的延缓衰老的表型为后续的生产研究提供依据. 对 4 个转基因植株与野生型进行的农艺性状分析(表 2), 得出转基因 4 号植株在单株分蘖数、单株总粒重、单株总粒数、单穗饱和穗粒数、千粒重、结实率等农艺性状上都优于野生型, 并且在与产量密切相关

的农艺性状如饱和穗粒数、结实率和千粒重等均显著性提高,9号植株在千粒重上也较野生型显著提高.证明该基因在水稻分子育种中具有潜在的应用价值,遗传稳定性仍需要进一步观察与验证.

参考文献:

- [1] Aida M, Ishida T, Fukaki H, *et al.* Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: An analysis of the cup-shaped cotyledon mutant[J]. *Plant Cell*, 1997, **9**: 841-857.
- [2] Ooka H, Satoh K, Doi K, *et al.* Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*[J]. *DNA Res*, 2003, **10**: 239-247.
- [3] Kaneda T, Taga Y, Takai R, *et al.* The transcription factor OsNAC4 is a key positive regulator of plant hypersensitive cell death[J]. *EMBO J*, 2009, **28**: 926-936.
- [4] Duval M, Hsieh T F, Kim S Y, *et al.* Molecular characterization of AtNAM: A member of the *Arabidopsis* NAC domain superfamily[J]. *Plant Mol Biol*, 2002, **50**: 237-248.
- [5] Uauy C, Distelfeld A, Fahima T, *et al.* A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat[J]. *Science*, 2006, **314**: 1298-1301.
- [6] Phan Tran L S, Quach T N, Guttikonda S K, *et al.* Molecular characterization of stress-inducible *GmNAC* genes in soybean[J]. *Mol Gen Genet*, 2009, **281**(6): 647-664.
- [7] Wang Y W, Pan J B, Han J, *et al.* Cloning of NAC transcription factor fragment in maize remote sensing [J]. *RSETE*, 2011, **29**: 6690-6691.
- [8] Yang R C, Deng C T, Yang B O, *et al.* Molecular analysis of two salt-responsive NAC-family genes and their expression analysis in tomato[J]. *Mol Biol Rep*, 2011, **38**: 857-863.
- [9] Liu X, Zhang B Y, Hong L, *et al.* Molecular characterization of *Arachis Hypogaea* NAC 2(AhNAC2) reveals it as a NAC-Like protein in peanut[J]. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2010, **24**: 2066-2070.
- [10] Robert W M, Sablowski, Elliot M, *et al.* A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3 PISTILLATA[J]. *Cell*, 1998, **92**(1): 93-103.
- [11] Guo Y F, Gan S S. AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence [J]. *Plant J*, 2006, **46**: 601-612.
- [12] Hiratsu K, Ohta M, Matsui K, *et al.* The SUPERMAN protein is an active repressor whose carboxy-terminal repression domain is required for the development of normal flowers[J]. *FEBS Letters*, 2002, **514**: 351-354.
- [13] Ohta M, Matsui K, Hiratsu K, *et al.* Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression[J]. *Plant Cell*, 2001, **13**: 1959-1968.
- [14] Heyl A, Ramireddy E, Brenner W G, *et al.* The transcriptional repressor ARR1-SRDX suppresses pleiotropic cytokinin activities in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 2008, **147**: 1380-1395.
- [15] Hiratsu K, Matsui K, Koyama T, *et al.* Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain in *Arabidopsis*[J]. *Plant J*, 2003, **34**: 733-739.
- [16] Falqueto A R, Cassol D, Magalhaes A M, *et al.* Physiological analysis of leaf senescence of two rice cultivars with different yield potential[J]. *Pesq Agropec Bras*, 2009, **44**(7): 695-700.
- [17] 陆定志,潘裕才,马跃芳,等. 杂交水稻抽穗结实期间叶片衰老的生理生化研究[J]. 中国农业科学, 1988, **21**(3): 21-26.
- [18] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19**(6): 1349.
- [19] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting matrix choice[J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22**(22): 4673-4680.
- [20] Saitou N, Nei M. The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Mol Biol Evol*, 1987, **4**: 406-425.
- [21] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402-408.

- [22] Kumar S, Tamura K, Jacobsen I B, *et al.* MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software [J]. Tempe, AZ: *Arizona State University*, 2001.
- [23] Eklund DM, Ståldal V, Valsecchi I, *et al.* The *Arabidopsis thaliana* STYLISH1 protein acts as a transcriptional activator regulating auxin biosynthesis[J]. *Plant Cell*, 2010, **22**: 349-363.
- [24] Ernst H A, Olsen A N, Skriver K, *et al.* Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors[J]. *EMBO Rep*, 2004, **5**: 297-303.
- [25] Peng H, Cheng H Y, Chen C, *et al.* A NAC transcription factor gene of chickpea(*Cicer arietinum*), CarNAC3, is involved in drought stress response and various developmental processes[J]. *Plant Physiol*, 2009, **166**: 1934-1945.
- [26] 刘 坤,李付广,张雪妍,等. EAR 型转录抑制子和嵌合抑制子沉默技术研究进展及应用[J]. *分子植物育种*, 2010, **8**(12): 1-9.
- [27] Olsen A N, Ernst H A, Leggio L L, *et al.* NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse[J]. *Trends Plant Sci*, 2005, **10**: 79-87.
- [28] Balazadeh S, Siddiqui H, Allu A D, *et al.* A gene regulatory network controlled by the NAC transcription factor ANAC092/AtNAC2/ORE1 during salt-promoted senescence[J]. *Plant J*, 2010, **62**: 250-264.

Characterization of *OsNAP* from *Oryza sativa* L. and Its Application in Molecular Breeding

TANG Xue-rong^{1, 2}, ZHANG Ru-kui², CHEN Xu², WU Xiu-ju¹, MING Feng²

(1. *School of Life Science, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China*;

2. *State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Plant Biology,
School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China*)

Abstract: NAC transcription factor is unique to plant. *OsNAP*, the homolog of senescence-related gene *AtNAP* (Atlg69490) was isolated from rice(*Oryza sativa* L.). The open reading frame(ORF) of *OsNAP* was 1179bp in length, which encoded a 392 amino acids sequence with isoelectric point of 8.55 and molecular mass of 42.195 ku. In order to explore the function of *OsNAP*, the SRDX technology(improvement of CRES-T) was used. We construct the pCAMBIA 1304-35S: *OsNAP*-SRDX expression vector and transfer it into rice zhonghua11 callus by *Agrobacterium tumefaciens*. After analysis of hygromycin screened, Realtime PCR and Western blot, 4 transgenic rice lines was carried on to valuate the function in further research. The T₁ transgenic rice line shows significantly senescence delayed phenotype compared with wild type. Further statistical agronomic characters such as number of panicles, number of total spikelets, number of filled spikelets, the mass of 1 000 grains, filling rate are better than the wild type. The results suggested that suppressing the expression of *OsNAP* can delay the senescence of rice leaf and improve the yield and it has potential breeding role in the future.

Keywords: NAC transcription factor; SRDX; ZhongHua 11; *Oryza sativa* L.; yield