

平榛 NAC 转录因子的分离及表达特性分析

赵天田¹ 陈 新^{1,2} 刘庆忠² 王贵禧¹ 梁丽松¹ 马庆华¹

(¹ 中国林业科学研究院林业研究所/林木遗传育种国家重点实验室 北京 100091; ² 山东省果树研究所 泰安 271000)

摘要: NAC 转录因子是近十年来新发现的具有多种生物功能的植物特异转录因子, 在植物生长发育、激素调节和抵抗逆境等方面发挥着重要的作用。本研究基于 Solexa 技术对平榛花芽转录组文库进行分析, 结合 RACE-PCR 扩增, 从平榛中克隆了一个与 NAC 类基因同源的 cDNA 序列 *ChNAC1*, 该序列长度为 1154bp, 具有长度为 876bp 的完整开放阅读框架, 推测编码蛋白含有 291 个氨基酸, 具有 N-末端同源性较高且十分保守的 NAC 结构域和一个位于 C-末端的高度可变区域。qRT-PCR 分析表明, *ChNAC1* 可以在 4℃ 低温胁迫条件下上调表达, 在 4h 时出现表达峰值。组织表达分析结果表明, *ChNAC1* 在雄花序中表达最高, 其次是花芽、树皮和种子。推测 *ChNAC1* 可能参与植物响应低温反应过程。*ChNAC1* 基因的克隆及表达分析为进一步阐明和探讨平榛 NAC 转录因子的功能奠定了基础。

关键词: 平榛; NAC; 低温; 时空表达

Cloning and Expression Profiling Analysis of a Transcription Factor *ChNAC1* in Hazelnut (*Corylus heterophylla* Fisch.)

ZHAO Tian-tian¹, CHEN Xin^{1,2}, LIU Qing-zhong², WANG Gui-xi¹, LIANG Li-song¹, MA Qing-hua¹

(¹ State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding/Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091; ² Shandong Institute of Pomology, Taian 271000)

Abstract: NAC transcription factors are a family of functionally diverse proteins. These plant-specific NAC domain genes play an important role in response to various stresses. A cDNA encoding the NAC-like gene homologue was isolated from hazelnut (*Corylus heterophylla* Fisch.) by RACE-PCR and designated *ChNAC1* (GenBank Accession No. HQ639415). Sequence analysis showed that cDNA of *ChNAC1* was 1154 bp long and contained a single open reading frame. The predicted ChNAC1 protein has 291 amino acids with an estimated molecular mass of 33.31 kD and an isoelectric point of 6.66 kD. qRT-PCR analysis showed that the expression of *ChNAC1* was induced by low temperature and peaked at 4 h after exposed to low temperatures of 4℃. The transcripts of *ChNAC1* appeared in many hazelnut tissues including male inflorescence, bark, flower bud and seeds, but mostly accumulated in male inflorescence. These results suggest that *ChNAC1* may function in cold stress signal transduction pathway.

Key words: Hazelnut; NAC; Low temperature; Temporal-Spatial expression

NAC 转录因子是近十年来新发现的植物特有的转录调控因子。1997 年 Aida 等^[1]首先报道了 NAC 结构域, 发现在矮牵牛 *NAM* 基因、拟南芥 *AT-AFI12* 和 *CUC2* 基因编码蛋白的 N 端包含一段保守的氨基酸序列, 取三基因首字母命名为 NAC。第一

个 NAC 转录因子是由 Souer 等^[2]于 1996 年从矮牵牛中克隆得到的, 随后在拟南芥、水稻、小麦、大豆等物种中相继发现, 目前在拟南芥中共发现了 105 个 NAC 成员, 而水稻中则发现了 75 个^[3]。

NAC 转录因子在植物的生长发育、器官建成

收稿日期: 2011-09-01 修回日期: 2011-12-24

资助基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划 (2006BAD01A1701); 国家林业局“948”项目 (2008204208); 中国林科院林业所重点项目 (ZD200913)

作者简介: 赵天田, 博士, 主要从事经济林研究。E-mail: 187174239@qq.com

通讯作者: 王贵禧, 研究员, 博士生导师, 主要研究方向为果品生物学。E-mail: wanggx0114@126.com; 陈新, 博士, 主要研究方向为果树分子生物学。E-mail: chenxin201186@163.com

和激素调节等方面发挥着重要作用^[1-2,4]。另外, NAC 转录因子也参与植物的非生物胁迫应答^[5-7], 近年来陆续有 NAC 响应低温胁迫的研究报道, 甘蔗 *SsNAC23* 参与冷胁迫响应^[8], 2007 年在拟南芥中发现一类新的 NAC 转录因子 *LOVI* 响应低温的同时又调控开花过程^[9], 冷胁迫能诱导水稻 *SNAC2* 基因表达, 其转基因植株显著提高对冷和盐胁迫的抗性^[10]; 小麦 *NAC8* 在低温条件下也上调表达^[11], 然而目前关于 NAC 的研究主要集中在草本植物的报道上, 木本植物的 NAC 基因克隆少见报道。

平榛 (*Corylus heterophylla* Fisch.) 为桦木科 (Betulaceae) 榛属 (*Corylus*) 植物, 在我国野生资源丰富, 主要特性是抗寒性强, 可抗冬季 -48℃ 的极端低温, 而世界上广泛栽培的欧榛 (*Corylus avellana* L.) 和我国发展的平欧杂种榛 (*Corylus heterophylla* Fisch. × *Corylus avellana* L.) 的抗寒能力远不如平榛, 花芽在冬季易遭受冻害。因此, 本研究基于对平榛花芽转录组测序结果的分析获得一个和 NAC 基因高度同源的克隆, 并采用 RACE-PCR 技术克隆了该平榛 NAC 基因全长, 并对该基因的时空表达特性进行分析, 旨在为进一步研究平榛 NAC 基因的功能、探讨平榛抗寒的分子机制提供理论依据, 并为今后利用基因工程技术培育抗寒榛子新品种提供可操作基因, 研究结果也将为深入探讨木本植物冷适应的机理提供更多的数据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

为研究在人工可控条件下 NAC 基因的表达, 萌芽前从取样地 (河北省围场县) 带土挖回基因型一致的根蘖苗, 栽植在温室, 培育苗龄 2~3 个月的无性系, 放入光照箱中 (光照强度 100 μmol/m² · s, 光照时间 16h/8h, 昼夜温度 25℃/21℃, 湿度 80%~90%) 适应 2h 以上, 然后进行 4℃ 低温胁迫处理, 分别在处理 0h、2h、4h、8h、24h 后采集叶位相同的叶片, 用于研究 NAC 基因响应低温的表达模式。

选择在冷适应时期 (2010 年 11 月 20 日) 从中国林科院林业研究所榛子资源圃 (北京) 采集平榛花芽、雄花序、树皮, 于 2010 年 8 月 28 日采集成熟的种子, 所有样品迅速液氮保存, 用于检测不同器官 NAC 基因的差异表达。

1.2 方法

1.2.1 平榛 RNA 的提取和平榛 NAC 转录因子的克隆 研究材料的总 RNA 提取采用 CTAB 法^[12], 并用 DNase I (TaKaRa) 处理以去除基因组 DNA 的污染。应用 Clontech 公司的 SMART™ RACE 试剂盒反转录得到第一链用于基因 RACE 扩增, 本实验室前期采用 Solexa Sequencing 技术对寒冬时期平榛花芽的转录本进行了高通量测序, 组装得到了 4 万多条 Unigene, 通过分析文库筛选得到一条类似 NAC 基因的序列, Unigene 编号为 36466, 设计扩增 3' 方向的引物 P1 (5'-TCGGAGCACGTGGT-GTCCCGGAG-3') 和 5' 方向的引物 P2 (5'-TG-CAACGGCGACATCTGATTACTGC-3'), 按照 Race 试剂盒 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 说明书进行 cDNA 末端快速扩增。拼接两段序列后设计引物 NACQ5 (5'-GAGAGAGCTATCGACGAGC-3') 和 NACQ3 (5'-CGCACAGGCACACTCATAG-3') 扩增全长序列。

1.2.2 ChNAC1 基因编码蛋白质的序列分析 本研究利用 ExPASy 软件 (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 分析 *ChNAC1* 基因编码蛋白质的氨基酸组成、理论分子量和等电点; 利用 TM-HMM2.0 软件 (<http://genome.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) 进行蛋白质序列的跨膜区分析; 利用 SignalP3.0 软件 (<http://genome.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 进行蛋白序列的信号肽分析; 利用 Sub-Loc1.0 (<http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/Sub-Loc>) 软件进行蛋白质的亚细胞定位分析; 利用 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> 网站进行蛋白质结构功能域分析; 利用 DNAMAN 软件 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) 进行氨基酸序列同源分析。

1.2.3 qRT-PCR 分析基因的时空表达 根据 cDNA 序列设计一对特异的引物: 设计特异引物 NAC-QR5 (5'-ATGGATGCCACCCTGGACAA-3') 和 NAC-QR3 (5'-GCACCCACCAACAAATGTGC-3'), 获得的扩增片段长度为 162bp。以平榛 *Actin* 基因 (GenBank accession number HQ677569) 为稳定内参, 设计其特异引物 *Actin-F* (5'-TGGTCAAGGCTGGGTTTGC-3') 和 *Actin-R* (5'-CTGACCCATCCCAACCATGA-3'), 获得的扩增片段为 101bp, 进行相对荧光定量分析。反应在 ABI7500 实时定量 PCR 仪上进行, 方法参照《美国应用生物系统公司 7300/7500 实时定量 PCR 仪相对定量实验入门指南》和荧光定量试剂盒

SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit (TaKaRa) 说明书。每个试验设 4 次重复,利用 ABI 7500 PCR 仪 Sequence Detection software 软件 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法) 和 Origin6.2 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 平榛 *ChNAC1* cDNA 全长的获得及序列分析

通过分析采用 Solexa Sequencing 技术对寒冬时期平榛花芽转录本进行的高通量测序结果,发现 unigene36466 疑似 NAC,基因片段序列与 Meng 等^[13]报道的棉花冷调节基因 *NAC2* 和 *NAC3* 均具有较高的同源性(相似性分别是 85% 和 90%),设计末端扩增的特异引物 P1 和 P2,以平榛花芽的 cDNA 为模板,经 RACE-PCR 扩增和产物克隆、测序后,分别得到长度为 422bp 的 3'末端和 986bp 的 5'末端(图 1,条带 1 和条带 2)。5'RACE 是根据 3'RACE 扩增到的非编码区设计的,5'RACE 扩增片段与 unigene 片段和 3'RACE 扩增片段均有一段完全重叠的区域,说明克隆到的是基因的 5'端和 3'端,最终扩增获得一条长度为 1053bp 的包含开放阅读框的 cDNA 全长序列。Blast 比对发现,该 cDNA 序列与 *NAC* 基因同源,命名为 *ChNAC1*,GenBank 登录号为 HQ639415。利用 NCBI 提供的 ORF Finder 进行分析发现,*ChNAC1* 全长 1154bp,包含一个长度为 876bp 的开放读码框,5'非翻译区长 99bp,3'非翻译区长

183bp。其 ORF 编码一个含 291 个氨基酸的蛋白质,ProtParam 预测 *ChNAC1* 所编码蛋白的分子量为 33.31kD,理论等电点(pI)为 6.66。

通过 TMHMM2.0 和 SignalP3.0 软件分析,发现 *ChNAC1* 蛋白不含有跨膜区和信号肽。经 <http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc> 网站进行亚细胞定位分析,发现该蛋白为细胞核内蛋白;在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> 网站进行蛋白质结构功能域分析,发现该蛋白序列的第 10~135 区域含有 NAM 结构域(图 2),属于 NAC 转录因子家族中的保守结构域。

2.2 *ChNAC1* 与其他相关 NAC 转录因子的氨基酸序列比对

NAC 转录因子的 N-端为高度保守的 NAC 结构域,由大约 150 个氨基酸残基组成,该区域可以结合 DNA 和其他蛋白^[1]。而 C-端为转录激活功能区,具有高度的多样性^[4,14-15]。利用 NAC 保守结构域检索 NCBI 与 *ChNAC1* 相关的蛋白如苹果 *NAC* (*Malus domestica*, ADL36795)、棉花 *NAC2* (*Gossypium hirsutum*, ACI15342)、棉花 *NAC3* (*Gossypium hirsutum*, ACI15344)、大豆 *NAC* (*Glycine max*, ACD39369)、鹰嘴豆 *NAC5* (*Cicer arietinum*, ACS94038)、番茄 *NAC* (*Solanum tuberosum*, ABS89270)、矮牵牛、油菜 *NAC* (*Brassica napus*, AAP35054)、小麦 *NAC* (*Triticum aestivum*, ADE34581)、玉米 *NAC* (*Zea mays*, ABY67929) 进行比对,从多重比对结果可以看出(图 3),*ChNAC1* N 端与其他植物的 NAC 氨基酸序列的一致性最高,存在 5 个高度保守的亚结构域 A、B、C、D、E,但是在 C-端序列上存在很大的差异。

2.3 *ChNAC1* 的时空表达分析

利用 qRT-PCR 的方法检测平榛叶片 *ChNAC1* 在不同逆境条件下的表达情况。图 4 的结果表明,*ChNAC1* 可以被低温诱导,4h 达到表达峰值,是对照的 15 倍以上;24h 已经下降为对照的 2 倍,暗示 *ChNAC1* 基因可能在响应低温胁迫中起作用。

为验证克隆得到的 *NAC* 基因是否具有组织表达特异性,采用荧光定量 PCR 技术对 4 个器官(皮、芽、雄花序、种子)的表达进行了分析,结果表明 *NAC1* 主要在冬季暴露器官雄花序和花芽中表达,雄花序中的表达量几乎是树皮的 2 倍,表达量最低的是种子,仅是雄花序表达量的 1/3,推测 *NAC1* 在雄花序和花芽越冬过程中扮演着重要的角色(图 5)。

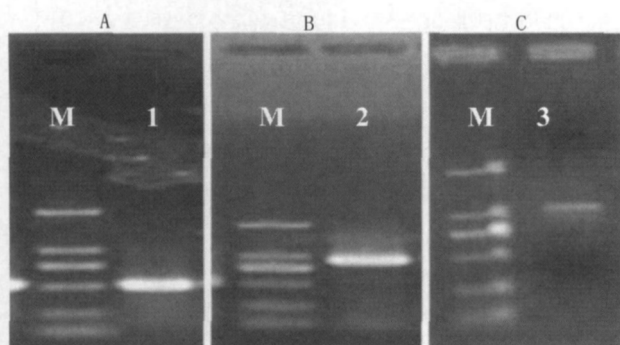


图 1 *ChNAC1* 基因 cDNA 的 RT-PCR 产物琼脂糖电泳分析鉴定

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis of *ChNAC1* gene fragments in *Corylus heterophylla*

条带 1: *ChNAC1* 3' RACE 扩增产物;条带 2: *ChNAC1* 5' RACE 扩增产物;条带 3: *ChNAC1* cDNA 全长的电泳检测结果;M: DNA 标准分子量 DL2000,自上而下 2000bp、1000bp、750bp、500bp、250bp、100bp

M: DNA marker DL2000. 1: Amplification product of 3' RACE; 2: Amplification product of 5' RACE; 3: Electrophoresis result of *ChNAC1* full-length cDNA

```

1      ACATGGGGAAGCGCCGCCAAAGTCTAGTCCACAGACAGACAGAGAAGAGAGAGCTATC
61     GACGAGCGGAGCAAAAAGAAGCGTGTGAAAAGACAAAAATGACCGCGGAGTTACAGTTA
1      M T A E L Q L
121    CCTCCTGGGTTTCAGGTTCATCCAACGGACGACGAGCTTGTGATGCACTACCTGTGCCGA
8      P P G F R F H P T D D E L V M H Y L C R
181    AAATGTGCGTCGCAGTCAATCGCCGTGCCGATTATTGCCGAAATCGATCTCTACAAATAC
28     K C A S Q S I A V P I I A E I D L Y K Y
241    GATCCCTGGGAGCTTCCAAGAATGCCTTGTACGGAGAAAAGGAGTGGTACTTCTTTTCG
48     D P W E L P R M A L Y G E K E W Y F F S
301    CCGAGGGACCGGAAATACCCGAACGGTTCGAGGCCGAACCGAGCGGCGGGGACGGGGTAC
68     P R D R K Y P N G S R P N R A A G T G Y
361    TGGAAGCGACCGGAGCTGATAAGCCTATCGGGCATCCGAAGCGATGGGGATCAAGAAG
88     W K A T G A D K P I G H P K A M G I K K
421    GCGTTGGTGTCTATGCCGAAAAGCCCCAAAGGAGAGAAAATACTGGATCATGCAT
108    A L V F Y A G K A P K G E K T N W I M H
481    GAGTATCGGCTGGCCGATGTGGATCGCTCGGCTCGCAAAAAGAACAGCTTAAGGCTGGAC
601    ATCAACCTGCAAAAATGAGCGATTTCGAAATGGAGGACAAGAAGCCGAAAATCTGACA
168    I N L Q K M S D S E M E D K K P E N L T
661    ATTGGCGGGGCCACGTCTGCAATACTTTCTGGCCCGCGCGACGCGGACGGCAGCTGGG
188    I G G A T S A I L S G P A A T R T A A G
721    GATGATTACGTGTATTTGACACTTCGATTTCAGTCCGAGGTTGCACACGGATTTCGAGT
208    D D Y V Y F D T S D S V P R L H T D S S
781    TGCTCGGAGCACGTGGTGTGCGCGGAGTTCAGTGCAGAGTGCAGAGCCCAAGTGC
228    C S E H V V S P E F T C E V Q S E P K C
841    TGGGAAAAGACCATAGACTACCCTTTAATTACATGGATGCCACCCTGGACAATGGGTTTC
248    W E K T I D Y H F N Y M D A T L D N G F
901    GGCGCACAGTTTCAGAGCAGTAATCAGATGTCGCCGTTGCAGGATATGTTTCATGTACATG
268    G A Q F Q S S N Q M S P L Q D M F M Y M
961    CAGAAGCCCTTTTAAAGGTTGGGTCTGCCCCAAAGACATTTGGGGCTGGCACATTGCACA
288    Q K P F *
1021   TTTGTTGGTGGGTGCATCGCGCGGTAACACGAGACAAAAGTCTATGAGTGTGCCTGTGC
1081   GAGAGCATGGATAATTGAGAATTAGAACGTAGAAAAATATAAATTGTATTGACCAAAAAA
1141   AAAAAAAAAAAAAAAAAA

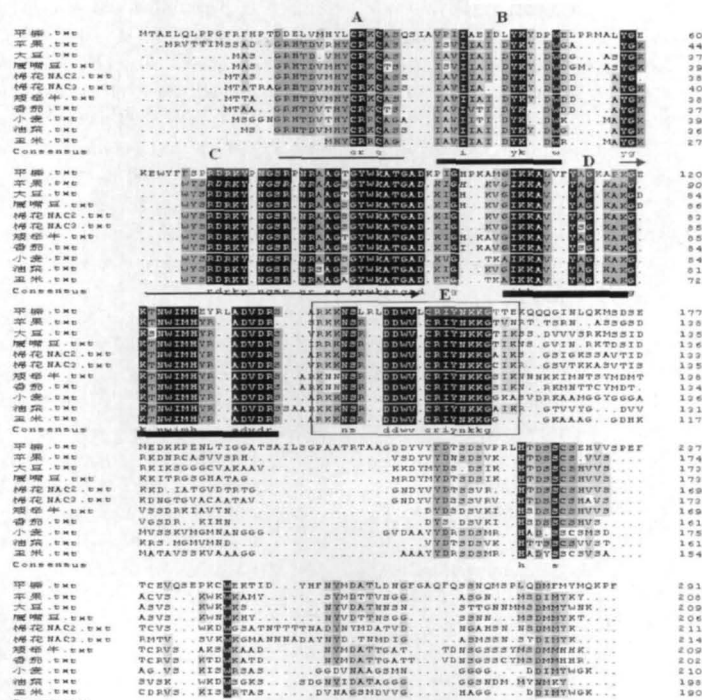
```

图2 *ChNAC1* 基因的 cDNA 序列及推导的蛋白序列Fig. 2 cDNA sequence and putative amino acid sequence of *ChNAC1*

3 结论与讨论

低温逆境使植物遭受胁迫,它限制作物的产量、影响植物的自然分布,开展抗寒基因挖掘对于生产具有重要的意义。目前对于非生物胁迫的响应已经有很多报道,主要放在 DREB、MYC、MYB、锌指蛋白、bZIP 等^[16-21];关于 NAC 转录因子的研究报道很少,关于 NAC 的基因功能及其对下游调节子的调控尚不清楚,Hegedus 等^[22]研究发现 NAC 可以和其他的 NAC 蛋白互作,另有报道 NAC 和 RHA2a protein、ANAC 两个蛋白相互作用^[23];SNAC2 蛋白可以诱导许多胁迫相关基因的表达,包括过氧化物酶、热激蛋白和鸟氨酸转氨酶基因等。拟南芥的一些 NAC 基因受到 miRNA164 的调控,包括 CUC1、CUC2、NAC1、At5g07680 和 At5g61430^[24]。miRNA164 还能直接介导 NAC1、At5g07680 和 At5g61430mRNA 的切割^[25]。最近发现,来自苔藓的 miR1223 和

miR1218 能分别介导大豆 GmNAC2 和 Gm-NAC3mRNA 的降解^[26],这说明 miRNA 介导的 NAC 基因 mRNA 降解是一种普遍存在的调控机制,并且这种机制在进化上较为保守,通过以上研究不难发现 NAC 基因表现复杂性和独特性^[27]。榛子已成为华北、东北和西北地区重点发展的经济树种,但是在我国北方地区,冬季气温低、时间长,而且早春和晚秋的霜冻危害普遍存在,轻者使榛子雄花序和雌花芽发生冻害而减产,严重时造成 1~2 年生枝条受冻甚至整株死亡。本文从平榛花芽转录组文库得到的 4 万多条 unigene 中挑选出该条 EST 序列,通过 RACE 技术克隆得到了 NAC 基因全长,平榛 NAC 基因在不同低温胁迫处理时间与不同空间中的表达模式结果显示其转录水平上在应对逆境胁迫应答上发挥作用,对于明确 NAC 基因在平榛中的功能具有重要的意义。平榛 NAC 基因的功能分析及精细调控将是下一步研究的重点。

图3 *ChNAC1* 与其他相关序列的氨基酸序列比对Fig.3 Sequences alignment of *Corylus heterophylla* and other plants NAC transcription factors

五个亚结构域(A到E)分别用双箭头标出1磅实线——、2磅实线——、箭头线——、4.5磅实线——、方框□表示

The location of the five highly conserved amino acid motifs (A-E) is shown by different lines above the sequences

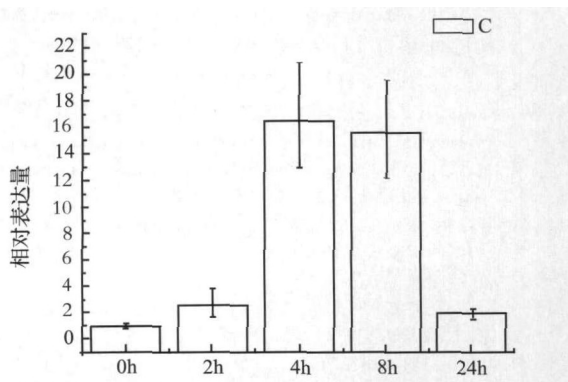
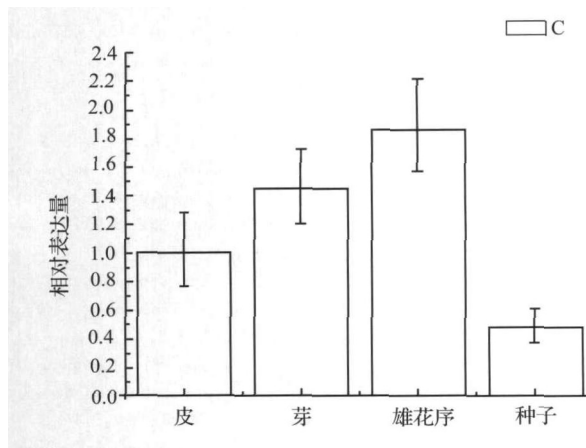
图4 平榛叶片 *NAC1* 基因在低温胁迫不同处理时间的荧光定量 PCR 分析

Fig.4 RT-PCR analysis is performed by using of total RNA isolated from treated leaves at different time points

Actin 作为内参, 试验重复 4 次。The *Actin* gene was used as the control for the normalization of RNA loading amount in RT-PCR reaction. The experiment was repeated four times

参考文献

- [1] Aida M, Ishida T, Fukaki H et al. Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: analysis of the cup-shaped cotyledon mutant [J]. *Plant Cell*, 1997, 9(6): 841-857
- [2] Souer E, Houwelingen A. The no apical meristem gene of petunia is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries [J]. *Cell*, 1996, 85: 159-170
- [3] 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

图5 平榛 *NAC1* 基因在不同器官的表达模式Fig.5 *NAC1* expression in different tissues of *Corylus heterophylla*

- [4] Xie Q, Frugis G, Colgan D et al. *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development [J]. *Gene Dev*, 2000, 14: 3024-3036
- [5] Hegedus D, Yu M, Baldwin D et al. Molecular characterization of *Brassica napus* NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 53: 383-397
- [6] Tran L S, 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: 2481-2498
- [7] 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: 863-876
- [8] Nogueira F T S, Schlögl P S, Camargo S R, et al. SsNAC23, a member of the NAC domain protein family, is associated with cold, herbivory and water stress in sugarcane [J]. Plant Sci, 2005 169(1): 93-106
- [9] Yoo S Y, Kim Y, Kim S Y, et al. Control of flowering time and cold response by a NAC-domain protein in *Arabidopsis* [J]. PLoS ONE 2007 7: 642
- [10] Hu H H, Jun Y, Yu J F, et al. Characterization of transcription factor gene *SNAC2* conferring cold and salt tolerance in rice[J]. Plant Mol Biol 2008 67: 169-181
- [11] Xia N, Zhang G, Sun Y F, et al. *TaVAC8* a novel NAC transcription factor gene in wheat responds to stripe rust pathogen infection and abiotic stresses[J]. Physiol Mol Plant Pathol 2010 74: 394-402
- [12] Chang S, Puryear J, Cairney J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees[J]. Plant Mol Biol Rep 1993 11(2): 1-13
- [13] Meng C M, Cai C P, Zhang T Z, et al. Characterization of six novel NAC genes and their responses to abiotic stresses in *Gossypium hirsutum* L[J]. Plant Sci 2009 176: 352-359
- [14] 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
- [15] Tao R, Feng Q, Morris T J. HRT gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus[J]. Plant Cell 2000 12: 1917-1926
- [16] Seki M, Kamei A, Yamaguchi-Shinozaki K, et al. Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection[J]. Curr Opin Biotechnol 2003 14: 194-199
- [17] Michael F T. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms[J]. Plant Mol Biol 1999 50: 571-599
- [18] Mukhopadhyay A, Vij S, Tyagi A K. Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco [J]. Proc Natl Acad Sci, 2004 101: 6309-6314
- [19] Zhu J K. Salt and drought stress signal transduction in plants[J]. Annu Rev Plant Biol 2002 53: 247-273
- [20] Kim S, Kang J Y, Cho D I, et al. ABF2, an ABRE binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance[J]. Plant J 2004, 40: 75-87
- [21] Kim S. The role of ABF family bZIP class transcription factors in stress response[J]. Physiol Plant 2006 126: 519-527
- [22] Hegedus D, Yu M, Baldwin D, et al. Molecular characterization of *Brassica napus* NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress [J]. Plant Mol Biol 2003, 53: 383-397
- [23] Greve K, Cour T L, Jensen M K, et al. Interactions between plant *RING-H2* and plant-specific NAC (*NAM1/2/CUC2*) proteins: RING-H2 molecular specificity and cellular localization [J]. Biochem J 2003 371: 97-108
- [24] Rhoades M W, Reinhart B J, Lim L P, et al. Prediction of plant microRNA targets[J]. Cell 2002 110: 513-520
- [25] Mallory A C, Dugas D V, Bartel D P, et al. MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs [J]. Curr Biol 2004 14: 1035-1046
- [26] Talmor-Neiman M, Stav R, Frank W, et al. Novel microRNAs and intermediates of micro-RNA biogenesis from moss [J]. Plant J, 2006 47: 25-37
- [27] 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
- ~~~~~
- (上接第 258 页)
- [3] 张景萍, 吴珍岭. 几种植物中谷胱甘肽过氧化物酶活性测定[J]. 广西农业科学 2004 3(35): 177-178
- [4] Criqui M C, Jamet E, Parmentier Y, et al. Isolation and characterization of a plant cDNA showing homology to animal glutathione peroxidases[J]. Plant Mol Biol 1992 18(3): 623-627
- [5] Li W, Feng H, Fan J, et al. Molecular cloning and expression of a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase homolog in *Oryza sativa* [J]. Biochim Biophys Acta 2000 1493(1-2): 225-230
- [6] Sugimoto M, Sakamoto W. Putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene from *Arabidopsis thaliana* induced by oxidative stresses [J]. Gene Genet Syst 1997 72(5): 311-316
- [7] Depege N, Drevet J, Boyer N. Molecular cloning and characterization of tomato cDNAs encoding glutathione peroxidase-proteins [J]. Eur J Biochem 1998 253(2): 445-451
- [8] Miao Y, Lv D, Wang P, et al. An *Arabidopsis* glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses [J]. Plant Cell 2006 18(10): 2749-2766
- [9] 戚元成, 张世敏, 王丽萍, 等. 谷胱甘肽转移酶基因过量表达能加速盐胁迫下转基因拟南芥的生长[J]. 植物生理与分子生物学学报 2004 30(5): 517-522
- [10] 苗雨晨, 白玲, 苗琛, 等. 植物谷胱甘肽过氧化物酶研究进展[J]. 植物学通报 2005 22(3): 350-356
- [11] Amtmann A, Bohnert H J, Bressan R A. Abiotic stress and plant genome evolution search for new models [J]. Plant Physiol, 2005 138(1): 127-130
- [12] Wong C E, Li Y, Whitty B R, et al. Expressed sequence tags from the Yukon ecotype of *Thellungiella* reveal that gene expression in response to cold, drought and salinity shows little overlap [J]. Plant Mol Biol 2005 58(4): 561-574
- [13] Amtmann A. Learning from Evolution: *Thellungiella* generates new knowledge on essential and critical components of abiotic stress tolerance in plants [J]. Mol Plant 2009 2(1): 3-12
- [14] 朱春利, 张登峰, 刘颖慧, 等. 玉米液泡膜焦磷酸酶基因 *Zm-VPPI* 的克隆及逆境下的表达分析[J]. 植物遗传资源学报, 2011 12(1): 107-112
- [15] 吴学闯, 曹新有, 陈明, 等. 大豆 C3HC4 型 RING 锌指蛋白基因 *GmRZFPI* 克隆与表达分析[J]. 植物遗传资源学报 2010, 11(3): 343-348, 359
- [16] 周立敬, 周宜君, 高飞, 等. 拟南芥谷胱甘肽过氧化物酶的生物信息学分析[J]. 中央民族大学学报 2010 19(2): 11-17
- [17] Chen S, Vaghchhipawala Z, Li W, et al. Tomato phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits cell death induced by Bax and oxidative stresses in yeast and plants [J]. Plant Physiol, 2004 135(3): 1630-1641
- [18] Ramos J, Matamoros M A, Naya L, et al. The glutathione peroxidase gene family of *Lotus japonicus*: characterization of genomic clones, expression analyses and immunolocalization in legumes [J]. New Phytol 2009 181(1): 103-114
- [19] Ran Q, Gu M, Remmen H V, et al. Glutathione peroxidase 4 protects cortical neurons from oxidative injury and amyloid toxicity [J]. J Neurosci Res 2006 84(1): 202-208
- [20] Navrot N, Collin V, Gualberto J, et al. Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses [J]. Plant Physiol 2006 142(4): 1364-1379
- [21] Herbet S, de Labrouhe D T, Drevet J R, et al. Transgenic tomatoes showing higher glutathione peroxidase antioxidant activity are more resistant to an abiotic stress but more susceptible to biotic stresses [J]. Plant Sci 2011 180(3): 548-553