

# 苹果愈伤组织超表达 *MdNAC029* 促进花青苷积累

安建平<sup>1</sup>, 宋来庆<sup>2</sup>, 赵玲玲<sup>2</sup>, 由春香<sup>1</sup>, 王小非<sup>1,\*</sup>, 郝玉金<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东泰安 271018; <sup>2</sup>烟台市农业科学研究院, 山东烟台 265599)

**摘要:** 以‘光辉’海棠 (*Malus spectabilis* ‘Guanghui’) 与‘王林’苹果 (*Malus × domestica* ‘Orin’) 杂交后代中分离出来的红肉苹果果实为试验材料, 克隆得到 1 个 NAC (NAM, ATAF1/2, CUC2) 转录因子基因, 命名为 *MdNAC029*。该基因开放阅读框 (ORF) 为 843 bp, 编码含有 280 个氨基酸的蛋白。保守结构域分析显示, *MdNAC029* 蛋白在 N 端包含 1 个保守的 NAC 结构域。基因表达分析显示该基因在红肉苹果果实中表达量较非红肉果实高。在‘王林’苹果愈伤组织中超表达 *MdNAC029*, 其花青苷积累显著增加, 表明 *MdNAC029* 在调控花青苷积累过程中发挥重要作用。对 *MdMYB1* 启动子序列进行分析, 发现其序列包含 1 个 *MdNAC029* 转录因子的结合位点。同时, 烟草瞬时表达试验显示, *MdNAC029* 能够激活 *MdMYB1* 基因的表达。由此推测, *MdNAC029* 可能通过直接促进 *MdMYB1* 基因的表达, 正向调节花青苷的积累。

**关键词:** 苹果; NAC 转录因子; *MdMYB1*; 花青苷

**中图分类号:** S 661.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2018) 05-0845-10

## Overexpression of *MdNAC029* Promotes Anthocyanin Accumulation in Apple Calli

AN Jianping<sup>1</sup>, SONG Laiqing<sup>2</sup>, ZHAO Lingling<sup>2</sup>, YOU Chunxiang<sup>1</sup>, WANG Xiaofei<sup>1,\*</sup>, and HAO Yujin<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, State Key Laboratory of Crop Biology, Tai'an, Shandong 271018, China; <sup>2</sup>Yantai Academy of Agricultural Sciences, Yantai, Shandong 265599, China)

**Abstract:** The apple NAC (NAM, ATAF1/2, CUC2) gene *MdNAC029* was cloned by using PCR technology from the red flesh apple that was separated from the cross between ‘Guanghui’ (*Malus spectabilis*) and ‘Orin’ (*Malus × domestica*). The open reading frame (ORF) of *MdNAC029* contained 843 bp, encoding a protein of 280 amino acid residues. Conserved domain analysis showed that *MdNAC029* contained a conserved NAC domain. The transcriptional analysis indicated that the expression of *MdNAC029* was higher in the red flesh apple than non-red flesh apple. The *MdNAC029*-overexpressing apple calli exhibited increased anthocyanin content, suggesting that *MdNAC029* might play an important

**收稿日期:** 2017-10-20; **修回日期:** 2018-04-13

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (31601742); 教育部创新团队支持计划项目 (IRT15R42); 山东省现代农业产业技术体系项目 (SDAIT-06-03)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: haoyujin@sdau.edu.cn; xfwang2004@163.com)

role in regulating anthocyanin accumulation. The sequence of *MdMYB1* promoter region was analyzed and a putative NAC-DNA binding motif was found. Meanwhile, the transient expression assays were performed in *Nicotiana benthamiana* leaves. And the results showed that *MdNAC029* could induce the expression of *MdMYB1*. It is speculated that *MdNAC029* up-regulates anthocyanin accumulation by directly promoting the transcript of *MdMYB1*.

**Keywords:** apple; NAC transcription factor; *MdMYB1*; anthocyanin

NAC (NAM, ATAF1/2, CUC2) 是植物中最大的转录因子家族之一, 广泛分布于陆生植物中。第 1 个 NAC 转录因子是从矮牵牛中克隆得到 (Souer et al., 1996), 随后在拟南芥、水稻等物种中相继发现。目前在拟南芥和水稻中已分别鉴定了 117 和 151 个 NAC 转录因子 (Kim et al., 2010; Nuruzzaman et al., 2010)。NAC 转录因子家族成员的共同特点是在 N 端包含保守的 NAC 结构域, 在 C 端具有高度变异的调控区 (Olsen et al., 2005)。作为转录因子, NAC 蛋白能够通过结合下游靶基因的 CACG 序列调节下游靶基因的表达, 进而影响植物生长发育过程 (Olsen et al., 2005; 李伟等, 2011)。NAC 转录因子一般通过形成 NAC 蛋白同源或异源二聚体的形式发挥生物学功能 (李鹏等, 2010; 李伟等, 2011)。不同的 NAC 转录因子具有不同的蛋白结构, 其在蛋白结构上的差异导致不同的 NAC 蛋白具有不同的生物学功能 (Ooka et al., 2003; Ernst et al., 2004)。

大量研究表明, NAC 转录因子的生物学功能涉及到植物生长发育 (杨晓娜等, 2014), 非生物胁迫响应 (Nakashima et al., 2012; 王瑞芳等, 2014), 信号转导 (Kim et al., 2007) 及次生代谢调控 (Zhong et al., 2006) 等方面。Guo 和 Gan (2006) 研究发现拟南芥 NAC 转录因子 *AtNAP/AtNAC029* 参与叶片衰老, 超量表达 *AtNAP/AtNAC029* 会造成植物早熟性衰老。在水稻中也发现, *OsNAC5* 参与调控叶片的衰老 (Perotto et al., 2009)。NAC 家族成员在植物逆境胁迫应答中也发挥着重要作用。在水稻中超量表达 *SNAC2* 可提高其抗冷性 (Hu et al., 2008)。超量表达 *OsNAC6* 和 *SNAC1* 提高了水稻对干旱和高盐的耐受性 (Nakashima et al., 2007; Zheng et al., 2009)。此外, NAC 转录因子在植物次生物质代谢中也发挥重要的调控作用。Ko 等 (2007) 的研究结果表明, *ANAC012* 在木质部纤维发育过程中发挥负调控作用, 过量表达 *ANAC012* 导致木质部纤维次生壁变薄。最近的研究表明, 红肉桃 NAC 转录因子 *PpNAC1* 能够通过激活 *PpMYB10.1* 基因表达促进红肉桃着色 (Zhou et al., 2015)。

自从植物 NAC 转录因子发现以来, 其研究主要集中在拟南芥、水稻等模式植物 (李鹏等, 2010)。作为多年生木本植物苹果, NAC 转录因子的功能研究尚未见报道。

本试验中从红肉苹果中鉴定并分离了 1 个 NAC 基因 *MdNAC029*。通过转基因分析发现 *MdNAC029* 在调节花青苷积累过程中发挥重要作用。烟草瞬时表达试验表明, *MdNAC029* 可能通过激活 *MdMYB1* 基因的表达影响苹果花青苷积累, 这为揭示 NAC 转录因子调节花青苷积累提供了理论基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

试验材料是从‘光辉’海棠 (*Malus spectabilis*) 与‘王林’苹果 (*Malus × domestica*) 杂交后代中分离出来的红肉和非红肉苹果果实。取自山东省烟台市农业科学院果树试验站, 取样时间为

2016年8月1日。取样后用液氮速冻保存备用。

‘王林’苹果愈伤组织在继代培养基( $MS + 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 2,4\text{-D} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}$ )中室温( $24 \text{ }^\circ\text{C}$ )暗处培养, 并且每隔 15 d 更新继代 1 次培养基, 用来进行遗传转化。

本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 用来进行瞬时表达试验。

## 1.2 RNA 的提取与基因克隆

红肉苹果果实、苹果幼苗及愈伤组织的 RNA 提取采用天根生化科技有限公司的 Plus 植物总 RNA 提取试剂盒 (DP437)。以提取的 RNA 为模板, 按照 Clontech SMART<sup>TM</sup> Library 试剂盒说明书进行反转录, 合成 cDNA 第 1 链。

根据在苹果基因组数据库 (<https://www.rosaceae.org/>) 中检索到的序列设计引物 *MdNAC029*-F/R (表 1), 以红肉苹果果实的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应程序为:  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  预变性 5 min,  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 30 s,  $56 \text{ }^\circ\text{C}$  退火 30 s,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 1 min, 32 个循环;  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  后延伸 5 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳并回收目的条带, 连接到克隆载体 pMD18-T 进行测序。

## 1.3 实时荧光定量 PCR 分析

以 *MdActin* (GenBank accession number: CN938024) 为内参基因, 使用康为世纪科技有限公司的 Ultra SYBR Mixture 试剂盒和 BIO-RAD IQ5 仪器进行实时荧光定量 PCR 分析。所有 PCR 均设 3 个重复。PCR 反应体系:  $2 \times \text{UltraSYBR Mixture } 10.0 \mu\text{L}$ , cDNA  $1.0 \mu\text{L}$ , 加去离子水至  $20 \mu\text{L}$ 。PCR 反应程序:  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  预变性 10 min;  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 15 s,  $56 \text{ }^\circ\text{C}$  退火 15 s,  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 15 s, 40 个循环, 每次循环第 2 步进行荧光采集。最后采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法 (宋来庆 等, 2016) 进行定量数据分析。所用引物见表 1。

表 1 基因克隆和载体构建所用到的引物序列

Table 1 Primers used for gene expression analysis and vector construction in this study

引物名称 Primer name	序列 (5'-3') Sequence
MdNAC029	F: ATGGAGGCAAAACGAAGCTC; R: CGGTCCAAACCACGGTTGGT
MdNAC029 (qRT)	F: AGCATCCGGGCAAAGCTTATCTGGA; R: CGGTCCAAACCACGGTTGGTGGTTA
Actin (qRT)	F: AGGCGCGCAAATTACCCAATCC; R: AGGCGCGCAAATTACCCAATCC
MdMYB1 (qRT)	F: GAAAGAGCTGCATATCCCAG; R: CTATCTTCTTTTGAATGATTC
MdDFR (qRT)	F: GTTGAGGGAGATAGGGTTGAG; R: GGTAATGTAAAACAATAGAGAGG
MdUFGT (qRT)	F: GGAAGTGGTTTTGTCCGCTG; R: CATTATTATTGAGCAACGAACAGC
MdF3H (qRT)	F: GCCGATCACCTACCCGAG; R: GTACAAGAAGTGGGAAGGC
MdCHI (qRT)	F: GCTACAAATGCGGTGATAG; R: CGCCTCCACTACAACCTCC
MdCHS (qRT)	F: GGCAAGTGCTGTCGGATT; R: CCCAAAGAAATAACCACAAG
MdMYB1 (LUC)	F: AAAGGACCCTGAACACGTGGGAACCG; R: TTATGCATAGAAGTTGCTCAAGTTTAT
MdMYB1 (LUC-mut)	F: AAAGGACCCTGAAAACCTGGGAACCG; R: TTATGCATAGAAGTTGCTCAAGTTTAT

## 1.4 超表达载体构建及苹果愈伤组织转化和鉴定

利用引物中引入的 *Bam*H I 和 *Pst* I 酶切位点, 将 *MdNAC029* 从 pMD18-T 载体切除回收, 并对 pCAMBIA-1300 进行同样酶切, 将两者在  $16 \text{ }^\circ\text{C}$  连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 鉴定阳性单菌落。成功构建 *MdNAC029*-pCAMBIA-1300 超表达载体。

用 *MdNAC029*-pCAMBIA-1300 转化农杆菌 LBA4404。取 10 d 左右生长状态良好的苹果愈伤组织与转化的农杆菌室温孵育 20 min。将愈伤组织纱布过滤并吸干表面的菌液，置于继代培养基上培养 1~2 d。随后将苹果愈伤组织转移至筛选培养基（继代培养基 + 100 mg · L<sup>-1</sup> 潮霉素 + 500 mg · L<sup>-1</sup> 头孢霉素）。

PCR 检测得到的阳性转基因愈伤组织，在筛选培养基上继代 3 代以上。

### 1.5 苹果愈伤组织着色试验

选择生长状态一致的野生型 (WT) 和转基因 (*MdNAC029*-L1 和 *MdNAC029*-L2) 苹果愈伤组织进行着色试验。将愈伤组织放置到持续光照（光子通量密度约为 100 μmol · s<sup>-1</sup> · m<sup>-2</sup>）、16 °C 培养箱内进行培养，观察着色情况。

使用花青苷提取液（95% 无水乙醇 + 1.5 mol · L<sup>-1</sup> HCl）在暗处提取苹果愈伤组织内的花青苷。使用分光光度计检测吸光度。花青苷含量 OD = (A<sub>530</sub> - A<sub>620</sub>) - 0.1 × (A<sub>650</sub> - A<sub>620</sub>)。着色试验重复 3 次，花青苷含量取 3 个平行试验的平均值。

### 1.6 烟草瞬时表达试验

本氏烟草叶片用来进行瞬时表达试验。将 *MdNAC029* 的 ORF 序列连接到 pGreen II 62-SK 载体 (*MdNAC029*-pGreen 62-SK)，*MdMYB1* 结合位点序列和突变位点序列（在引物上突变）分别连接 pGreen 0800-LUC (*MdMYB1*-pGreen 0800-LUC 和 *MdMYB1*-mut-pGreen 0800-LUC)。重组载体转化农杆菌并注射烟草叶片。烟草植株培养 3 d 后，使用荧光素酶和活体成像系统检测不同组合农杆菌注射烟草叶片的荧光强度 (An et al., 2017)。

烟草瞬时表达试验重复 3 次，荧光强度是基于 3 个平行试验的平均值。

### 1.7 统计学分析

使用 R (3.0.2) 软件 *t*-test 进行统计学分析。\* *P* < 0.05 表示差异显著；\*\* *P* < 0.01 表示差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 苹果 *MdNAC029* 的克隆

将从‘光辉’海棠与‘王林’苹果杂交后代中分离出来的红肉和非红肉苹果果实进行转录组测序，分析红肉和非红肉苹果果实（图 1, A）中 44 个 NAC 基因的表达差异（图 1, B），并从中筛选出 1 个（序列号：MDP0000481448）在红肉苹果果实中相对表达量最高的 NAC 基因。

实时荧光定量 PCR 结果也显示，MDP0000481448 在红肉苹果果实中的表达量显著高于非红肉苹果果实（图 1, C）。

通过 NCBI 序列比对分析发现，MDP0000481448 与拟南芥 *AtNAC029*/*AtNAP* 同源性最高。因此，将此基因命名为 *MdNAC029*。

对拟南芥 *AtNAC029* 和苹果 *MdNAC029* 的氨基酸序列进行比对分析（图 1, D）结果显示，*MdNAC029* 蛋白在 N 端包含一个保守的 NAC 结构域。



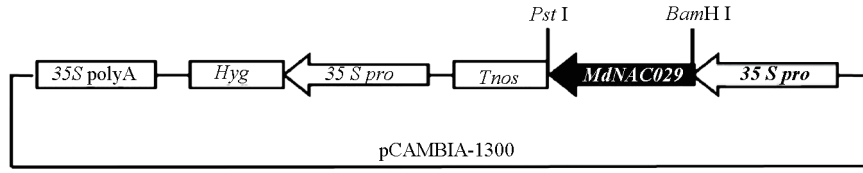


图 3 *MdNAC029*-pCAMBIA-1300 结构示意图

Fig. 3 Schematic diagram of the *MdNAC029*-pCAMBIA-1300 construct

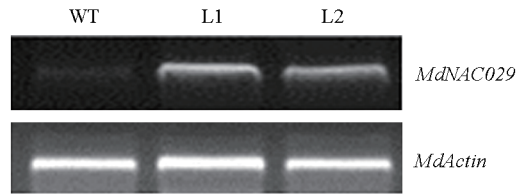


图 4 *MdNAC029* 转基因苹果愈伤组织鉴定

Fig. 4 Identification of *MdNAC029* transgenic apple calli

对获得的两个 *MdNAC029* 转基因苹果愈伤组织株系 L1 和 L2 进行持续光照处理, 10 d 后转基因苹果愈伤组织积累较多花青苷 (图 5, A、B)。实时荧光定量 PCR 检测花青苷合成相关基因的表达, 结果显示, 超表达 *MdNAC029* 明显促进了 *MdMYB1* 和花青苷合成结构基因的表达 (图 5, C)。

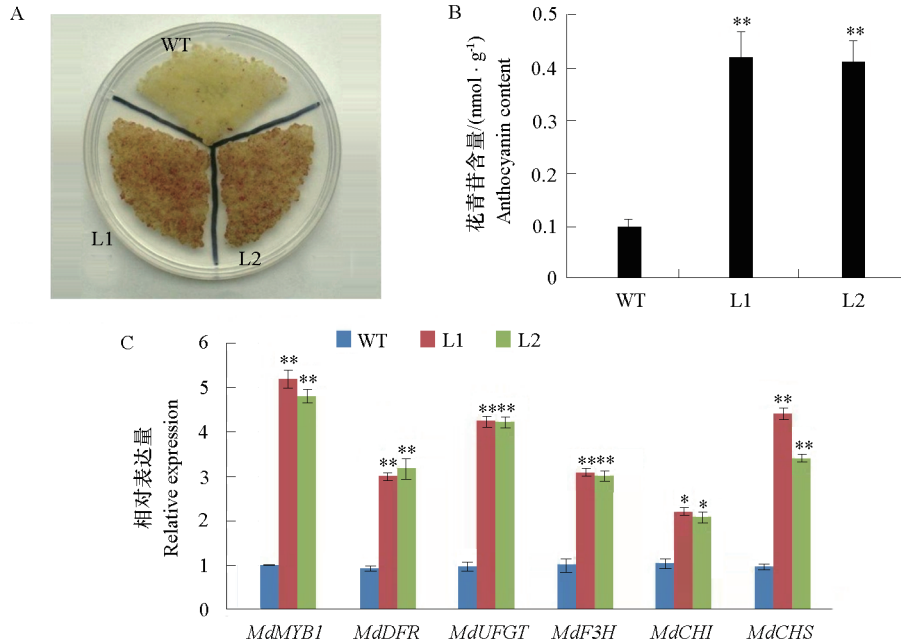


图 5 野生型 (WT) 和 *MdNAC029* 转基因株系 (L1 和 L2) 苹果愈伤组织花青苷积累 (A、B) 和相关基因的表达 (C)

Fig. 5 Phenotypes of wild-type (WT) and transgenic (L1 and L2) apple calli on the anthocyanin accumulation (A, B) and the expression levels of anthocyanin biosynthetic genes (C)

### 2.3 *MdNAC029* 转录因子直接激活 *MdMYB1* 基因的表达

通过对 *MdMYB1* 启动子序列进行分析, 发现其序列包含 1 个 *MdNAC029* 转录因子的潜在结合位点 (图 6; 图 7, A)。

为了验证 *MdNAC029* 对 *MdMYB1* 基因的调控作用, 构建 *MdNAC029*-pGreen 62-SK, *MdMYB1*-pGreen 0800 LUC (结合位点) 及 *MdMYB1*-mut-pGreen 0800-LUC (突变结合位点) 载体, 转化农杆菌并混合注射烟草叶片。烟草植株培养 3 d 后, 使用荧光素酶和活体成像系统检测不同组合农杆菌注射烟草叶片的荧光强度。结果显示, 混合注射 *MdNAC029*-pGreen 62-SK 和 *MdMYB1*-pGreen 0800 LUC 菌液能够激活 *MdMYB1* 基因的表达 (图 7, B)。但是当突变了 *MdMYB1* 启动子上的 *MdNAC029* 的结合位点后, *MdMYB1* 的表达明显受到抑制 (图 7, C)。以上结果表明, *MdNAC029* 能够通过直接激活 *MdMYB1* 基因的表达促进花青苷积累。

```
TCTTCATCTCTACTGCAGTGCCTAGAAATGGTTCATGTATAACAGTATCAGTTCGTGCATCAGTGGTTC AATTGCAGTGC
TCAGAAATCGTTCGAAGGTSTAAGGTGACATAAATCCCCCTATTCTGTTCGAAATCTTCAATTTCTTAGATTAAAGRTA
TTCARTTTTAGGGATATAGGCTTGAAGAATCAATTAGGGATTTACAAAATGATTAAAGGGATTTGGGTGTTTGTCTGTTC
CATTTTTKAACACRACATCAGTTCCTACTAYTCTTTCAATTTCCCTCAATTTCTGAGCAACCAACAAGTAGCATTATTGACA
ACATACTGAGCTCCTCGTGTCAACCATTTTGAAAGAATCCTAATAAAGATTTATAGGCAAATTTATGCCCTAGAAAAAAT
TAATAAAAAGGACCTGAACACGTGGGAACCGRCCGTTTGTAACAGACTGAGATAGGTCCGGTTCATTTCTTAWAAAC
CCAACACCCGCTATGTTTCMATTTATAAACGGGTCCGGTCTGGTCCCTCCAACTTGAGCCCGGCTCGACTTGTGCCCACTC
CTAACTAAACCATATAAAAAACCAAGATTTCCCTTTTCATCTTTCACACATATCACGTTACTTTCCAACAACAATCAACAAT
CACAACAAATAATCAACCATCAAGATCATATATCACGTCACTAATAAAGACAACCTTCAYAAGGGTTGTCGTAGYTCTCTA
CWKGAAATCCAATTGTCTAGCATTGTAACCCTAAGTTACRGACACAAACATAAACTTGAGCAACTTCTATGCATAAGAAT
CTRGGGTTTTGGACTAACTCAACAGAACCTAACAAGAAATAATATTCTGGACYGCTTAACGGAATCCAACGAAGACAAGG
TTTCGGACCACTCAACGGAACAAATAAGGGAAAGGGATATAAACCATTCAACGAAATCCATCTTTAGAAATACGCATAGTC
YCCAATACGGAYTAACCAAGTGAGAACATACGCCATCTGATAGCGTGGTCCCGCAAGACAGATAACCAAGTAGGACCAC
CGATGGTATAATGTGACCAAGTAAGCAGTGACCCTAAATGTMGATTAACCAACRTGGAGTTAAATTAACAAGGCTGAACCA
CCTATGAAAATAATGTAAGCCTGAAATCTTAGGWWGAGAATTCTTGCTCTAGGGGACAAATGATTTTCGTAYGCCYAAGTG
TTTTTTTAGTGACAGTAACTAAGATTTGAGTACAGAGACATTAAGTCTGAGATTGACTCTTGTGAAAGCTTAGTGAGTTGAA
GCACGTAGGCCAATATATTAGCAATGTGTTAGGTGTAGCGTCTAAACTTCCGTAGGAGAGTTTTGTACAGCAATATAGT
GGGGGTGCCGCAAAATGCAGACAGTAGCAATAAATTACGGGCTAGGATTTCTCCTCTCTTTTTTTCGTTCCATTCCATCCA
TTCTCTCACATTTCTTTATTTTGTCTTTCTATTTCTATAAAAAATTAATAGAAGATGTTTCATGTAACCTGACCGTGACTATTC
AAATAGGAGGGGAATGAAGAAGAGGGAAAAAAGAGAGGAGAGAATCTACTCCATAAATTACAAGCAAACAMYTTTTTT
TTTTTTTGACAAAGCAGAAGCAAAAMAAACACTTGAAAAAGCAGCGAAAGCATGATAAAGGTATCTTATGGTGGTCAAA
GATGTGTGTTGTAACCTAGTTACACGATTCTGCATTCACATTCATAGAATGTGCTTTTGAATATTATATTACAGCTAGAGAAT
TTTATGCCCTGGGATTGATTTCCCTTGCAATGTTGTCGTGCAGAAATGTTAGCTTTTCTATATATYAGTGTGTGTGTGTGT
GTGTATTTACAAGTTAGACTGGTAGCTAWTAACAACCTGTTGGAATGTTTTAACTGTTCAGTGTGTTGCTCTGTGGATATC
AGACATGCACGTCACTGGCCTTGTAAGATTAATTAGGCCGATGGTATCCATAGCGTTAAYGTCATGGCAAACACACTCTAA
TTATATATAATGGTAGCTAGGTGTCTTTCTGGAGTGTATGAAGTGGGTAGCAGGCAAAAGAWWAGCTAAGCTTAGCTGTCT
AGCAGATAAGAG
```

图 6 *MdMYB1* 启动子序列

下划线标注表示潜在 NAC 结合位点。

Fig. 6 Promoter sequence of *MdMYB1*

The underline represents the potential NAC binding site.

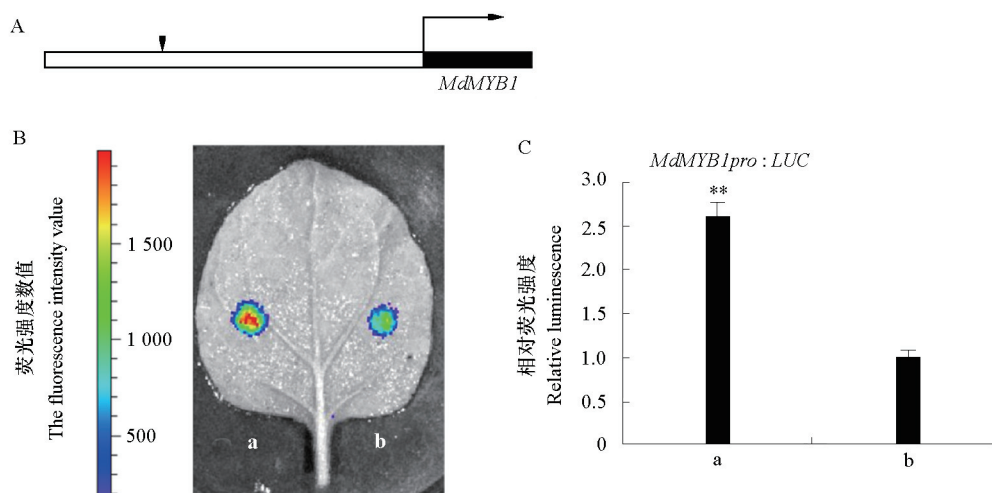


图 7 瞬时试验显示 *MdNAC029* 促进 *MdMYB1* 基因表达

A: 图示 *MdMYB1* 启动子包含 1 个潜在的 *MdNAC029* 的结合位点; B: 烟草叶片瞬时表达试验; C: 发光强度定量分析。  
a 表示 *MdNAC029*-pGreen 62-SK 和 *MdMYB1*-pGreen 0800 LUC 菌液共同注射; b 表示 *MdNAC029*-pGreen 62-SK 和 *MdMYB1*-mut-pGreen 0800 LUC 菌液共同注射。

Fig. 7 Transient expression assays showing that *MdNAC029* promotes the expression of *MdMYB1*

A: Schematic diagram of the *MdMYB1* promoter showing the potential *MdNAC029* binding sites; B: Representative images of *Nicotiana benthamiana* leaves 72 h after infiltration were shown; C: Quantitative analysis of luminescence intensity.  
a: Co-injection of *MdNAC029*-pGreen 62-SK and *MdMYB1*-pGreen 0800 LUC;  
b: Co-injection of *MdNAC029*-pGreen 62-SK and *MdMYB1*-mut-pGreen 0800 LUC.

### 3 讨论

NAP/NAC029 转录因子在植物生长发育过程中发挥重要作用。其广泛参与到花和种子发育 (Sablowski & Meyerowitz, 1998; Meng et al., 2007), 根系形态建成 (de Ze'licourt et al., 2012), 叶片和果实的衰老等过程 (Guo & Gan, 2006; Kou et al., 2012; Liang et al., 2014)。此外, NAP/NAC029 也响应多种胁迫。例如, NAP/NAC029 被发现能够响应干旱胁迫 (Sakuraba et al., 2015)。最近的研究也显示, NAP/NAC029 负调控植物的盐胁迫响应 (Seok et al., 2017)。但是, NAP/NAC029 在调节花青苷积累过程中的作用及其潜在的分子机制还不清楚。本研究中, 通过转录组测序分析, 分离出在红肉苹果中表达量最高的 NAC 转录因子基因 *MdNAC029*, 并通过转基因技术验证了在苹果愈伤组织中过量表达 *MdNAC029* 基因促进花青苷积累。

在苹果中, *MdMYB1* 转录因子在调控花青苷积累过程中发挥关键作用。它能够通过激活下游花青苷合成相关基因, 如二羟基黄酮醇还原酶 (dihydroflavonol 4-reductase, DFR), 类黄酮 3-O-糖基转移酶 (UDP glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase, UFGT), 黄酮醇 3-羟化酶 (flavanone 3-hydroxylase, F3H), 查尔酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI) 和查尔酮合成酶 (chalcone synthase, CHS), 调控花青苷积累 (Honda et al., 2002; Espley et al., 2007)。对转基因苹果愈伤组织进行基因表达分析, 发现超表达 *MdNAC029* 显著促进 *MdMYB1* 基因及其下游花青苷合成相关基因的表达。作为转录因子, NAC 转录因子能够通过结合下游靶基因的 CACG 序列调节基因的表达。通过对 *MdMYB1* 基因的启动子序列进行分析, 发现其序列包含 1 个 *MdNAC029* 转录因子的潜在结合位点。通过烟草瞬时表达试验验证了 *MdNAC029* 确实可以直接激活 *MdMYB1* 基因的表达。



综上, 本研究在苹果中首次鉴定了 1 个 NAC 转录因子参与花青苷积累。并且通过生理和生化手段验证了 *MdNAC029* 可能通过直接激活 *MdMYB1* 的表达促进花青苷积累。后期拟将通过酵母单杂交试验 (Y1H) 和电泳凝胶迁移率试验 (EMSA), 进一步验证 *MdNAC029* 蛋白与 *MdMYB1* 启动子的结合。

## References

- An J P, Qu F J, Yao J F, Wang X N, You C X, Wang X F, Hao Y J. 2017. The bZIP transcription factor MdHY5 regulates anthocyanin accumulation and nitrate assimilation in apple. *Horticulture Research*, 4: 17023.
- de Ze'licourt A, Diet A, Marion J, Laffont C, Ariel F, Moison M. 2012. Dual involvement of a *Medicago truncatula* NAC transcription factor in root abiotic stress response and symbiotic nodule senescence. *The Plant Journal*, 70: 220 - 230.
- Ernst H A, Olsen A N, Skriver K, Larsen S, Leggio L L. 2004. Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors. *EMBO Reports*, 5: 297 - 303.
- Espley R V, Hellens R P, Putterill J, Stevenson D E, Kutty-Amma S, Allan A C. 2007. Red coloration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10. *The Plant Journal*, 49: 414 - 427.
- Guo Y F, Gan S S. 2006. AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *The Plant Journal*, 46: 601 - 612.
- Honda C, Kotoda N, Wada M, Kondo S, Kobayashi S, Soejima J, Zhang Z, Tsuda T, Moriguchi T. 2002. Anthocyanin biosynthetic genes are coordinately expressed during red coloration in apple skin. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40: 955 - 962.
- Hu H, You J, Fang Y, Zhu X, Qi Z, Xiong L. 2008. Characterization of transcription factor gene *SNAC2* conferring cold and salt tolerance in rice. *Plant Molecular Biology*, 67 (1 - 2): 169 - 181.
- Kim H S, Park B O, Yoo J H, Jung M S, Lee S M, Han H J, Kim K E, Kim S H, Kim C O, Yun D J. 2007. Identification of a calmodulin-binding NAC protein as a transcriptional repressor in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 36292 - 36302.
- Kim S G, Lee S, Seo P J, Kim S K, Kim J K, Park C M. 2010. Genome-scale screening and molecular characterization of membrane-bound transcription factors in *Arabidopsis* and rice. *Genomics*, 95: 56 - 65.
- Ko J H, Yang S H, Park A H, Lerouxel O, Han K H. 2007. ANAC012, a member of the plant-specific NAC transcription factor family, negatively regulates xylary fiber development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 50: 1035 - 1048.
- Kou X, Watkins C B, Gan S S. 2012. *Arabidopsis* AtNAP regulates fruit senescence. *Journal of Experimental Botany*, 63: 6139 - 6147.
- Li Peng, Huang Geng-qing, Li Xue-bao. 2010. Plant NAC transcription factors. *Plant Physiology and Molecular Biology*, 46 (3): 294 - 300. (in Chinese)
- 李 鹏, 黄耿青, 李学宝. 2010. 植物 NAC 转录因子. *植物生理学通讯*, 46 (3): 294 - 300.
- Li Wei, Han Lei, Qian Yong-qiang, Sun Zhen-yuan. 2011. Characteristics and functions of NAC transcription factors in plants. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 17 (4): 596 - 606. (in Chinese)
- 李 伟, 韩 蕾, 钱永强, 孙振元. 2011. 植物 NAC 转录因子的种类、特征及功能. *应用与环境生物学报*, 17 (4): 596 - 606.
- Liang C, Wang Y, Zhu Y, Tang J, Hu B, Liu L. 2014. OsNAP connects abscisic acid and leaf senescence by fine-tuning abscisic acid biosynthesis and directly targeting senescence-associated genes in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111: 10013 - 10018.
- Meng Q, Zhang C, Gai J, Yu D. 2007. Molecular cloning, sequence characterization and tissue-specific expression of six *NAC-like* genes in soybean. *Journal of Plant Physiology*, 164: 1002 - 1012.
- Nakashima K, Takasaki H, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2012. NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Gene Regulatory Mechanisms*, 1819 (2): 97 - 103.
- Nakashima K, Tran L S, Van Nguyen D, Fujita M, Maruyama K, Todaka D, Ito Y, Hayashi N, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2007. Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *The Plant Journal*, 51: 617 - 630.

- Nuruzzaman M, Manimekalai R, Sharoni A M. 2010. Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene*, 465: 30 - 44.
- Olsen A N, Ernst H A, Leggio L L, Skriver K. 2005. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in Plant Science*, 10 (2): 79 - 87.
- Ooka H, Satoh K, Doi K, Nagata T, Otomo Y, Murakami K, Matsubara K, Osato N, Kawai J, Carninci P. 2003. Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research*, 10: 239 - 247.
- Perotto R A, Ricachenevsky F K, Duarte G L, Boff T, Lopes K L, Sperb E R, Grusak M A, Fett J P. 2009. Identification of up-regulated genes in flag leaves during rice grain filling and characterization of OsNAC5, a new ABA-dependent transcription factor. *Planta*, 230 (5): 985 - 1002.
- Sablowski R W, Meyerowitz E M. 1998. A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA. *Cell*, 92: 93 - 103
- Sakuraba Y, Kim Y S, Han S H, Lee B D, Paek N C. 2015. The *Arabidopsis* transcription factor NAC016 promotes drought stress responses by repressing AREB1 transcription through a trifurcate feed-forward regulatory loop involving NAP. *Plant Cell*, 27: 1771 - 1787.
- Seok H Y, Woo D H, Nguyen L V, Tran H T, Tarte V N, Mehdi S M. 2017. *Arabidopsis* AtNAP functions as a negative regulator via repression of AREB1 in salt stress response. *Planta*, 245: 329 - 341.
- Song Lai-qing, An Jian-ping, Su Ling, Zhao Ling-ling, Wang Xiao-fei. 2016. Ectopic Expression of apple G protein coupled-receptor gene *MdGCR1* decrease drought resistance of transgenic tobacco. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (11): 2081 - 2088. (in Chinese)
- 宋来庆, 安建平, 苏玲, 赵玲玲, 王小非. 2016. 异位表达苹果 G 蛋白偶联受体基因 *MdGCR1* 降低烟草的抗旱性. *园艺学报*, 43 (11): 2081 - 2088.
- Souer E, Houwelingen V A, Kloos D, Mol J, Koes R. 1996. The no apical meristem gene of petunia is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordial boundaries. *Cell*, 85: 159 - 170.
- Wang Rui-fang, Hu Yin-song, Gao Wen-rui, Zhang Yi-xin, Song Xing-shun. 2014. Functions of NAC transcription factors family in stress response in plants. *Plant Physiology Journal*, 50 (10): 1494 - 1500. (in Chinese)
- 王瑞芳, 胡银松, 高文蕊, 张宜欣, 宋兴舜. 2014. 植物 NAC 转录因子家族在抗逆响应中的功能. *植物生理学报*, 50 (10): 1494 - 1500.
- Yang Xiao-na, Tian Yun, Lu Xiang-yang. 2014. The control functions of NAC transcription factors in plant growth and development. *Chemistry and Bioengineering*, 32 (1): 1 - 5. (in Chinese)
- 杨晓娜, 田云, 卢向阳. 2014. NAC 转录因子在植物生长发育中的调控作用. *化学与生物工程*, 32 (1): 1 - 5.
- Zheng X, Chen B, Lu G, Han B. 2009. Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379: 985 - 989.
- Zhong R, Demura T, Ye Z H. 2006. SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 18 (11): 3158 - 3170.
- Zhou H, Lin-Wang K, Wang H, Gu C, Dare A P, Espley R V, He H, Allan A C, Han, Y. 2015. Molecular genetics of blood-fleshed peach reveals activation of anthocyanin biosynthesis by NAC transcription factors. *The Plant Journal*, 82: 105 - 121.