

菜薹 *BrNAP* 克隆及其在采后叶片衰老中的功能分析

李钰卓^{1,*}, 刘柯^{1,*}, 袁璐¹, 曹丽雯¹, 王挺进¹, 甘苏生^{2,**}, 陈丽萍^{1,**}

(¹ 浙江大学农业与生物技术学院园艺系, 杭州 310058; ² 康奈尔大学植物科学学院植物生物学系, 纽约州伊萨卡 14853)

摘要: 在菜薹 (*Brassica rapa* var. *parachinensis*) 中克隆 *BrNAP1* 并分析其功能。*BrNAP1* 编码区全长 813 bp, 编码 270 个氨基酸, 具有 NAP 转录因子特有的保守结构域, 属于 NAP 亚家族成员。*BrNAP1* 表达量与叶片衰老程度呈正相关且受 ABA 诱导表达上调。亚细胞定位试验表明 *BrNAP1* 定位于细胞核。互补试验显示 *BrNAP1* 能使拟南芥 *atnap* 滞绿表型回复至野生型, 过表达则能引起采后叶片早衰。双荧光素酶试验表明 *BrNAP1* 能够激活 *BrSAG113* 表达。这些说明 *BrNAP1* 是菜薹采后叶片衰老的正调控基因。

关键词: 菜薹; 采后; 叶片衰老; *BrNAP1*; 功能分析; 脱落酸

中图分类号: S 634.5

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2021) 01-0060-13

Cloning and Functional Analyses of *BrNAP* in Postharvest Leaf Senescence in Chinese Flowering Cabbage

LI Yuzhuo^{1,*}, LIU Ke^{1,*}, YUAN Lu¹, CAO Liwen¹, WANG Tingjin¹, GAN Susheng^{2,**}, and CHEN Liping^{1,**}

(¹Department of Horticulture, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; ²Plant Biology Section, School of Integrative Plant Science, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA)

Abstract: This research revealed the cloning and functional analyses of *AtNAP* orthologous gene named *BrNAP1* in Chinese flowering cabbage (*Brassica rapa* var. *parachinensis*). The coding region of *BrNAP1* is 813 bp in length and encodes 270 amino acids. It has a unique conserved domain of NAP transcription factors and belongs to the NAP subfamily. *BrNAP1* expression increases with the progression of leaf senescence and can be induced by ABA treatment. Subcellular localization experiment revealed that *BrNAP1* is a nuclear protein. Complementary experiments showed that *BrNAP1* can restore the *Arabidopsis atnap* phenotype to the wild type. Overexpression of *BrNAP1* causes precocious leaf senescence. *BrNAP1* transcriptionally induced the activity of *BrSAG113* in dual-luciferase assay. These results suggested that *BrNAP1* has the *AtNAP*-like function and is a positive regulator gene of leaf senescence in Chinese

收稿日期: 2020 - 06 - 08; 修回日期: 2020 - 07 - 27

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2019YFD1000300)

* 同等贡献作者

** 通信作者 Author for correspondence (E-mail: chenliping@zju.edu.cn, sg288@cornell.edu)

flowering cabbage.

Keywords: Chinese flowering cabbage; postharvest; leaf senescence; *BrNAP1*; functional analysis; abscisic acid

前人对菜薹 (*Brassica rapa* var. *parachinensis*) 采后的研究大多集中在包装 (王惠惠 等, 2014; 罗政 等, 2019)、温湿度调节 (陈羽白 等, 2003)、保鲜剂 (张法梅 等, 2009; 贾志伟 等, 2019) 等采后实用处理技术上, 也对其采后木质化等品质性状进行了研究 (宋康华 等, 2019), 但对菜薹采后叶片衰老调控机制仅有少量报道 (Fan et al., 2018a; Tan et al., 2019), 有许多潜在转录因子的作用尚不清楚。

NAP (NAC-Like, Activated by AP3/PI) 为 NAC 转录因子家族 Group I 的重要成员, 在 N 端具有 5 个高度保守的亚结构域, TAR 区具有 NAP 亚家族特有的保守结构域, 在植物的生长发育、胁迫响应以及叶片衰老过程中起关键作用 (Ooka et al., 2003; Dagmara et al., 2015)。Guo 和 Gan (2006) 发现, 拟南芥 *AtNAP* 与叶片衰老过程紧密相关, 过表达会导致叶片早衰, *atnap* 突变体叶片衰老则明显延缓。Zhang 和 Gan (2012) 进一步发现, *AtNAP* 通过特有的 ABA-*AtNAP*-SAG113 PP2C 模式调控拟南芥叶片衰老, *AtNAP* 激活靶基因 *SAG113* 表达, 继而抑制叶片气孔闭合, 导致水分加快流失并因此触发叶片衰老。水稻中 *OsNAP* 的表达与 ABA 和非生物胁迫相关 (Chen et al., 2014), 其过表达植株衰老加快, 且内源 JA 含量升高 (Zhou et al., 2013), 水稻 *psl-D* 突变体 (*PSI* 编码 *OsNAP*) 中 ABA 生物合成相关基因表达量显著降低, Liang 等 (2014) 研究认为 *OsNAP* 可能通过反馈调节的形式调控 ABA 的生物合成从而调控叶片衰老。Fan 等 (2015) 的研究表明, 陆地棉 *GhNAP* 是 *AtNAP* 的同源基因, 在棉花叶片自然衰老与黑暗诱导衰老过程中均上调表达, *GhNAPi* 转基因陆地棉植株叶片衰老延缓, 棉花的质量与产量得到一定提升。在鹰嘴豆、竹子中同样克隆获得了 NAP 基因, 它们在叶片衰老过程中均起正向调控作用, 且受 ABA 诱导表达上调 (Peng et al., 2009; Chen et al., 2011)。目前关于 NAP 转录因子的研究大多集中在农作物叶片与果实, 在采后叶片衰老中的调控作用却鲜有报道。

本研究中参考 *Brassica rapa* Chiifu-401 基因库具体序列, 从菜薹中分离获得拟南芥 *AtNAP* 同源基因, 根据生物信息及基因表达模式分析候选 *BrNAP1* 为衰老正调控基因, 通过亚细胞定位进行转录因子特性分析, 并构建拟南芥 *BrNAP1* 互补与过表达植株以及开展双荧光素酶试验进行功能研究。以期全面了解菜薹采后叶片衰老机制提供理论依据, 同时为其贮藏保鲜与遗传改良提供新途径。

1 材料与amp;方法

1.1 材料及其处理

以 ‘油青四九’ 菜薹 (*Brassica rapa* var. *parachinensis*), 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) Col-0 野生型以及拟南芥滞绿突变体 *atnap* (SALK_005010) 为试验材料。拟南芥种子播种于 MS 固体培养基中, 置于 4 °C 冰箱 2 d 后转入 22 °C 培养箱中萌发, 7 d 后移栽至盆钵中, 于 22 °C 培养箱中培养, 光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗, 湿度为 60%。

以生长 35 d 左右的菜薹植株作为试验材料, 取基部起的第 4 叶, 即 Fan 等 (2018b) 按株高 14 cm 左右收割后基部起第 1 叶进行 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ABA 喷施至叶片上有明显水滴, 对照喷施等量 ddH₂O。处理后将菜薹叶片放置于铺有湿润滤纸的培养皿中, 22 °C 黑暗处理 0、1、3 和 5 d, 用

于表型观察、生理指标测定以及 RNA 提取。每个样品为 3 片叶混合。拟南芥植株生长 25 d 左右，分离第 5、6 节位叶片于铺有湿润滤纸的培养基中黑暗培养 0、3 和 5 d，用于衰老表型的观测以及 RNA 的提取，每个样品为 2 片叶混合。每处理均设置 3 次生物学重复。

提取菜薹叶片 DNA 和总 RNA (TIANGEN 试剂盒)；使用反转录试剂盒 (TaKaRa) 合成 cDNA 第 1 链用于后续试验。

1.2 基因克隆及其生物信息分析

以菜薹 cDNA 为模板，参考 *Brassica rapa* Chiifu-401 基因库 (<http://brassicadb.org/brad/index.php>)，利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异引物 (表 1)，用于 PCR 扩增。50 μ L PCR 反应体系：2 \times PrimeStaR Max Premix 25 μ L，10 μ mol \cdot L⁻¹ 上、下游引物各 1.5 μ L，cDNA 1 μ L，ddH₂O 21 μ L。PCR 反应程序为：94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min；94 $^{\circ}$ C 变性 30 s，62 $^{\circ}$ C 退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s；40 个循环后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将 PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳分离，回收目的片段。将纯化后的 DNA 片段与克隆载体 (pEASY-Blunt Zero Cloning Vector) 连接，通过热激法将连接产物转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。挑取阳性克隆送至生物公司进行测序分析。

根据克隆所得 *Bra003998* 与 *Bra004385* 编码区全长基因序列，通过 NCBI 中的 ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 对两个基因的开放读码区进行分析；通过 ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对蛋白质基本理化参数进行分析；通过 NCBI 中的 BLAST 程序 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对序列的相似性进行分析；通过 DNAMAN 软件对序列进行多重比对；通过 HNN (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html) 在线对蛋白质二级结构进行分析。

表 1 本研究中所用的引物
Table 1 All primers used in this study

名称 Name	上游引物 (5'-3') Forward primer	下游引物 (5'-3') Reverse primer
<i>Bra003998</i>	CTCCAATTCTACTACTCCCTCCAGGATT	TCATACGCTGAAACAGCTTCATTTTATAAT
<i>Bra004385</i>	TTTCTAACATTCATAAACCTTGAAAACAC	TACGTTTGAACATGCTGAGCAGCTTAATAT
<i>BrNAP1</i> -GFP	AGCTCGGTACCCGGGATGGACATGAATCC CAACAC	CATGTCGACTCTAGAAAACAGAAACATAC TAGCCT
<i>BrActin1</i> -qPCR	CGCTTAACCCGAAAGCTAAC	TACGCCACTAGCGTAAAG
<i>Bra003998</i> -qPCR	CGCTGTTTCGGGTATTGG	CCTCATTTCTTCTATCTGCTTCGT
<i>Bra004385</i> -qPCR	CCCAACTACTACTCCCTCCA	GACGCCTACGTTACTCGAACCC
<i>BrSAG113</i> -qPCR	TTACGAGTTAGCCAAGACCGAA	TAAACGCCGAGAAGTGATAT
<i>BrSGR1</i> -qPCR	GTTGGGGTCCGCTTTGGGAA	AATCGAGCTAACCTGCGGGA
<i>BrABI5</i> -qPCR	ACGTTTGGGGAGATGACGCT	CCACCGCCGTAACAAACACC
<i>BrPAO</i> -qPCR	CAGCTTCAGCGACTCACC	TCGCCGTGCTTCTTCGAT
<i>AtActin2</i> -qPCR	TCTCCCCTATGTATGTCGC	GTCACGTCCAGCAAGGTCAA
<i>AtSAG113</i> -qPCR	CTCTGTCGTAACGGCAAAGC	GTCTGCTGATTACATACGGCTTC
<i>AtSGR1</i> -qPCR	AACCAACTCAATACGCATCACA	CAACAGAACAAAACGCCACTAA
<i>AtPAO</i> -qPCR	CTTTCCACAACCCTTTACGC	GCAAGTGTCATTCTCATCCAA
<i>BrNAP1</i> -SK	GCGGCCGCTCTAGAACTAGTGATGGAC ATGAATCCCAACAC	GGTCGACGGTATCGATAAGCTCTAAAAC GAAACATACTAG
Pro- <i>BrSAG113</i> -LUC	GTCGACGGTATCGATAAGCTTTCCAAA CTCAAAAATAATAGTTGT	CGCTCTAGAACTAGTGGATCCGCGATCGT TCAAACCGATCAACAC

1.3 生理指标测定

采用浸提法测量叶片叶绿素含量与相对电导率，使用 PAM 荧光仪进行叶片荧光参数 F_v/F_m 测定，

撕取叶片下表皮置于缓冲液 (5 mmol · L⁻¹ KCl, 50 mmol · L⁻¹ CaCl₂, 10 mmol · L⁻¹ MES 缓冲液, 使用 Tris-HCl 将 pH 值调至 5.6) 中, 充分光照 3 h, 使气孔完全张开, 制片后在 10 × 40 倍显微镜下观察气孔开闭情况并拍摄照片, 利用 ImageJ 软件记录气孔开放情况。

1.4 实时荧光定量 PCR 分析

以反转录所得的 cDNA 为模板, 使用 SYBR premix ExTaq 试剂盒 (TaKaRa) 进行 qRT-PCR 反应。菜薹中基因表达量测定以 *BrActin1* 为内参, 拟南芥以 *AtActin2* 为内参。相关引物序列如表 1 所示。使用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法 (Livak & Schmittgen, 2001) 对基因相对表达量进行分析。试验设置 3 次技术性重复与 3 次生物学重复, 采用 LSD 法进行方差分析。

1.5 亚细胞定位

根据基因序列设计相关引物 (表 1), 将不含终止密码子的 *BrNAP1* 开放阅读框克隆至 pCambia1300-GFP 载体, 得到 BrNAP1-GFP 融合表达载体, 转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 并对阳性克隆进行 PCR 以及测序验证。将构建好的表达载体与 pCambia1300-GFP 空载分别转入 GV3101 农杆菌中。农杆菌菌液培养至 OD₆₀₀ = 0.8 左右, 用侵染液重悬菌液至 OD₆₀₀ = 0.8 左右, 用 1 mL 注射器将菌液注射在含有红色荧光蛋白表达的转基因烟草叶片背部, 培养 2 d 后在共聚焦显微镜下进行荧光观察。

1.6 转基因拟南芥的获得与筛选

采用 Gateway 方法 (Nakagawa et al., 2009) 进行表达载体构建, 以带有目的基因 *Bra004385* 的质粒为模板, 添加 attB 接头的基因特异性引物进行 PCR 反应。上游引物: 5'-GGGGACAAGTTTGTCA CAAAAAGCAGGCTTTTCTAACATTTTCATAAACCT-3', 下游引物: 5'-GGGGACCACTTTGTACA AGAAAGCTGGGTACGTTTGAACATGCTGAGCA-3' (下划线部分为 attB1 接头)。PCR 体系与程序同基因克隆。将 3.5 μ L 回收产物与 0.5 μ L pDONRTM vector 以及 1 μ L BP ClonaseTM II enzyme mix 混合, 25 °C 反应 12 h。反应产物转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。挑取阳性克隆测序验证正确后用 *Nru* I (切断 *Kan* 基因, 避免干扰后续试验) 进行酶切后回收。将 3.5 μ L 回收产物与 0.5 μ L pMDC32 vector 以及 1 μ L LR ClonaseTM II enzyme mix 混合后 25 °C 反应 12 h, 反应产物同样转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 阳性克隆测序正确后进行酶切验证。将正确的载体通过冻融法转入农杆菌 GV3101 菌株。

选用处于盛花期的拟南芥, 将花序浸没在侵染液 (OD₆₀₀ = 0.5) 1 min, 期间轻轻旋转保证与菌液充分接触。侵染植株在较高湿度下黑暗培养 2 d 后正常培养至收获种子。将种子均匀播撒在含有 HygB (25 μ g · mL⁻¹) 的 MS 固体培养基上, 根据幼苗根长以及叶片生长状态挑选具有 HygB 抗性的候选转基因植株并移栽至钵钵中培养。提取抗性植株 DNA 进行检测, 阳性植株进行表达量鉴定。

1.7 双荧光素酶试验

将目的基因 *BrNAP1* 的 CDS 全长克隆至 pGreen II 0029 62-SK 载体, 将 *BrSAG113* 启动子克隆至 pGreen II 0800-LUC (firefly luciferase) 载体, 得到相应阳性质粒后, 将质粒转入含有 pSoup 辅助质粒的农杆菌 GV3101 中。农杆菌菌液培养至 OD₆₀₀ = 0.8 ~ 1.0, 用侵染液重悬菌液至 OD₆₀₀ = 0.8。将 BrNAP1-SK 和 Pro-*BrSAG113*-LUC 按 10 : 1 体积比混合, 常温下静置 2 h 后用 1 mL 注射器将菌液注射于烟草叶片背部, 注射 2 d 后用 Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) 试剂盒检

测荧光素酶活性。转录因子对下游基因的转录调控效应通过 LUC 与内参荧光 REN(*renilla luciferase*) 比值判断。试验采用 6 个生物学重复，并技术重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 菜薹 *BrNAP* 的克隆及其生物信息分析

在菜薹中克隆获得白菜基因库中被注释为 NAP 的两个基因 *Bra003998* 与 *Bra004385*，cDNA 长度分别为 920 和 1 038 bp。*Bra003998* 编码区全长 720 bp，编码 239 个氨基酸；*Bra004385* 编码区全长 813 bp，编码 270 个氨基酸。通过 ExPASy ProtParam 进行在线预测分析，*Bra003998* 蛋白分子质量为 27.64 kD，理论等电点为 6.46，分子式为 C₁₂₃₂H₁₈₉₈N₃₃₈O₃₅₉S₁₄，不稳定系数 32.94；*Bra004385* 蛋白分子质量为 31.27 kD，理论等电点为 6.40，分子式为 C₁₃₉₅H₂₁₄₅N₃₇₇O₄₁₂S₁₅，不稳定系数 36.93。两者均属于稳定蛋白。

对氨基酸序列进行多重比对(图 1)显示：*Bra003998* 与 AtNAP 相似度达 72.96%，*Bra004385* 为 80.00%。*Bra004385* 在 N 端具有 A~E 高度保守的 5 个亚区，其中 C 亚区具有与 DNA 连接的有关区域 DBS，D 亚区具有与细胞核定位有关的 NLS 区，TAR 区还具有 NAP 亚家族成员特有的保守结构域；*Bra003998* 则缺少 A 亚区。结构域分析表明菜薹 *Bra004385* 具备 NAP 转录因子特点，为 NAP 亚家族成员。

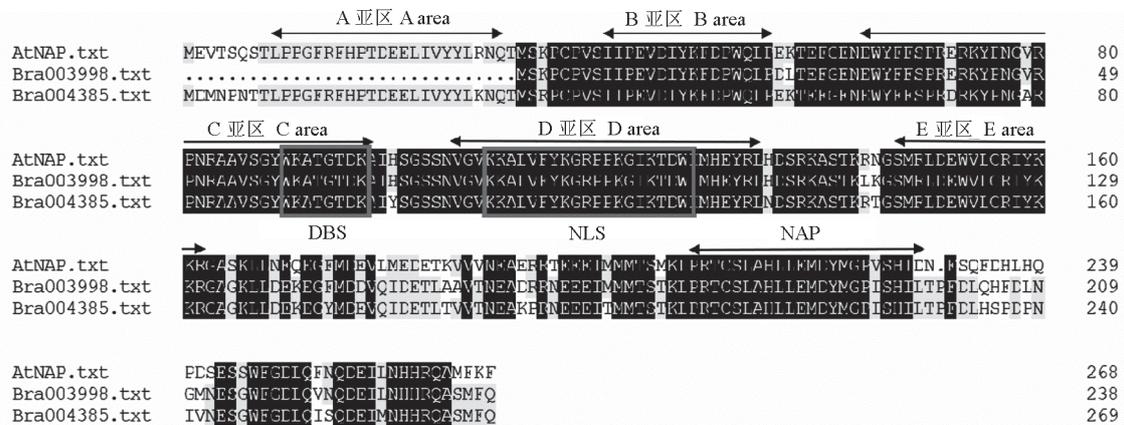


图 1 AtNAP, Bra003998 与 Bra004385 氨基酸序列比对图

Fig. 1 Amino acid sequence alignment of AtNAP, Bra003998 and Bra004385

2.2 *BrNAP* 表达模式及其在菜薹采后叶片衰老过程中的作用分析

在植物叶片衰老过程中，叶片的黄化程度能够直观地反应叶片的衰老程度，如图 2 所示，随着贮藏时间延长，菜薹采后叶片黄化程度升高；生理指标测定表明，叶绿素含量与 F_v/F_m 与衰老进程呈负相关，贮藏 5 d 时，叶绿素含量不足 0 d 的三分之一；相对电导率随着叶片衰老程度升高不断增大，贮藏 5 d 时约为 60%。ABA 处理后菜薹采后叶片加速黄化，相关生理指标变化加剧，衰老加快。

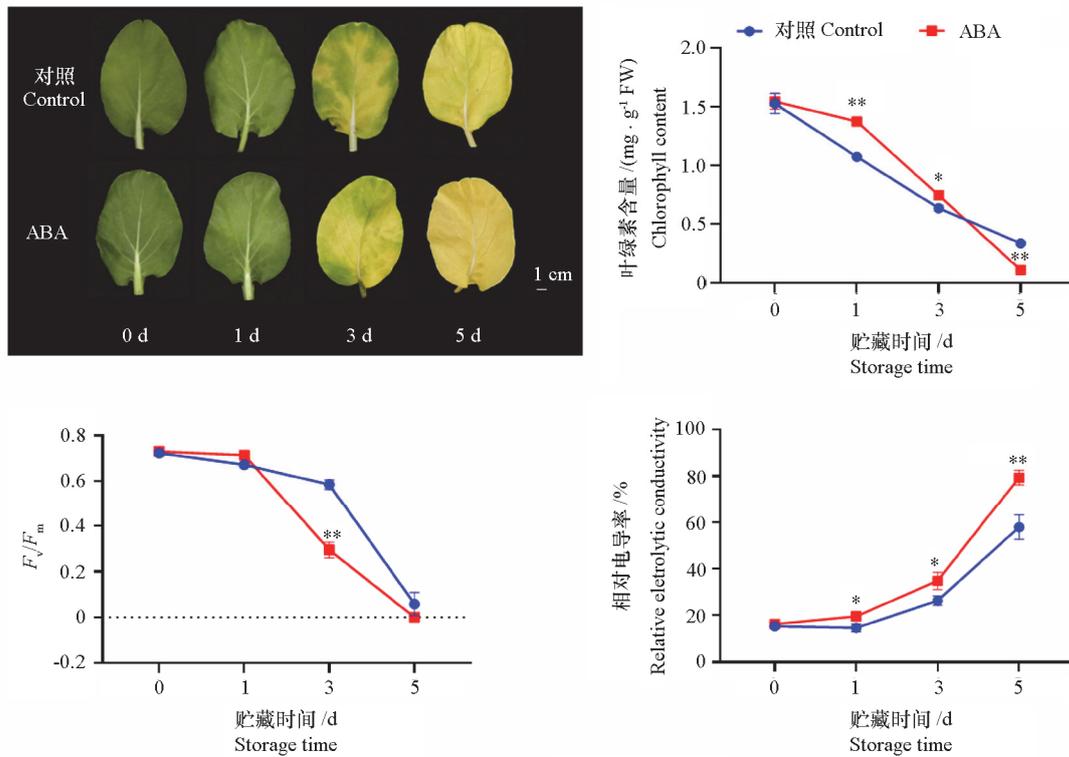


图 2 菜薹采后黑暗贮藏下叶片黄化表型及生理指标变化

Fig. 2 Phenotypal and physiological changes in leaves of Chinese flowering cabbage after harvest or ABA treatment in the dark
 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

对菜薹采后叶片下表皮气孔进行观察 (图 3) 发现, 在黑暗贮藏过程中, 气孔开闭程度先减小, 贮藏 1 d 时开度最小, 气孔平均面积不足 $20 \mu\text{m}^2$; 而后随叶片衰老, 气孔开度不断增大。ABA 喷施

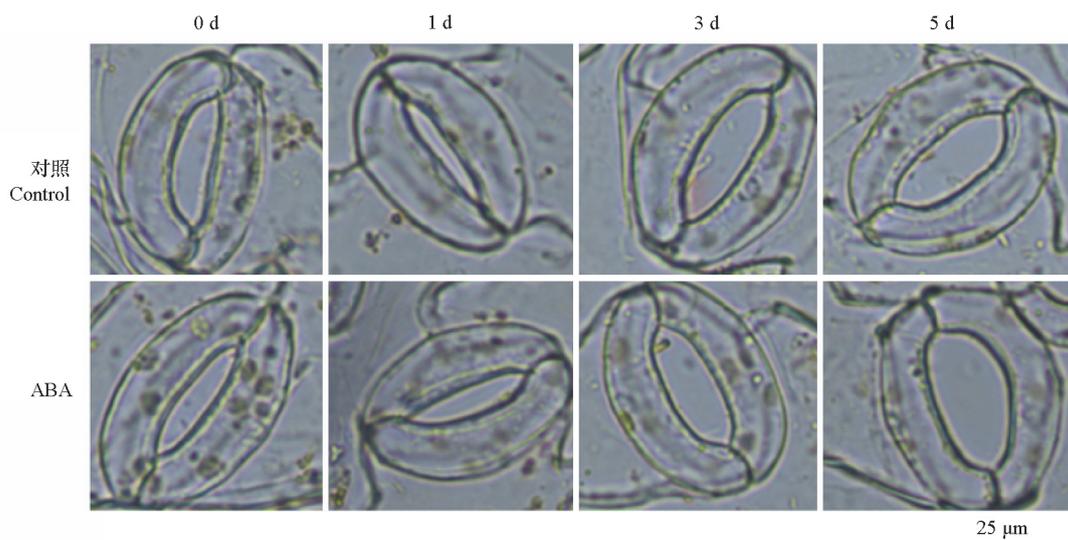


图 3 菜薹采后叶片黑暗贮藏 0~5 d 气孔形态变化情况

Fig. 3 Changes of stomatal aperture of Chinese flowering cabbage after harvest or ABA treatment in the dark

能够影响气孔开放程度，短时间内叶片气孔开度显著减小，后持续增大，与叶片衰老进程呈正相关，贮藏 5 d 时，叶片气孔开度显著大于未喷施处理，平均面积约为 $70 \mu\text{m}^2$ 。

测定衰老相关基因的表达（图 4）发现，随着贮藏时间的延长，*BrSGR1* 与 *BrPAO* 的相对表达量大致呈上升趋势，贮藏 5 d 时约为 0 d 的 20 倍，ABA 处理后表达上调；拟南芥 *AtNAP* 靶基因 *AtSAG113* 的同源基因 *BrSAG113* 随着叶片衰老表达量不断升高，且 ABA 能够诱导其表达上调，除 3 d 外均与未喷施处理差异显著。另外发现，ABA 信号转导途径相关基因 *BrABI5* 的相对表达量与衰老进程呈正相关，ABA 喷施后 1 和 3 d 时表达量低于对照，但在 5 d 时则显著高于对照。

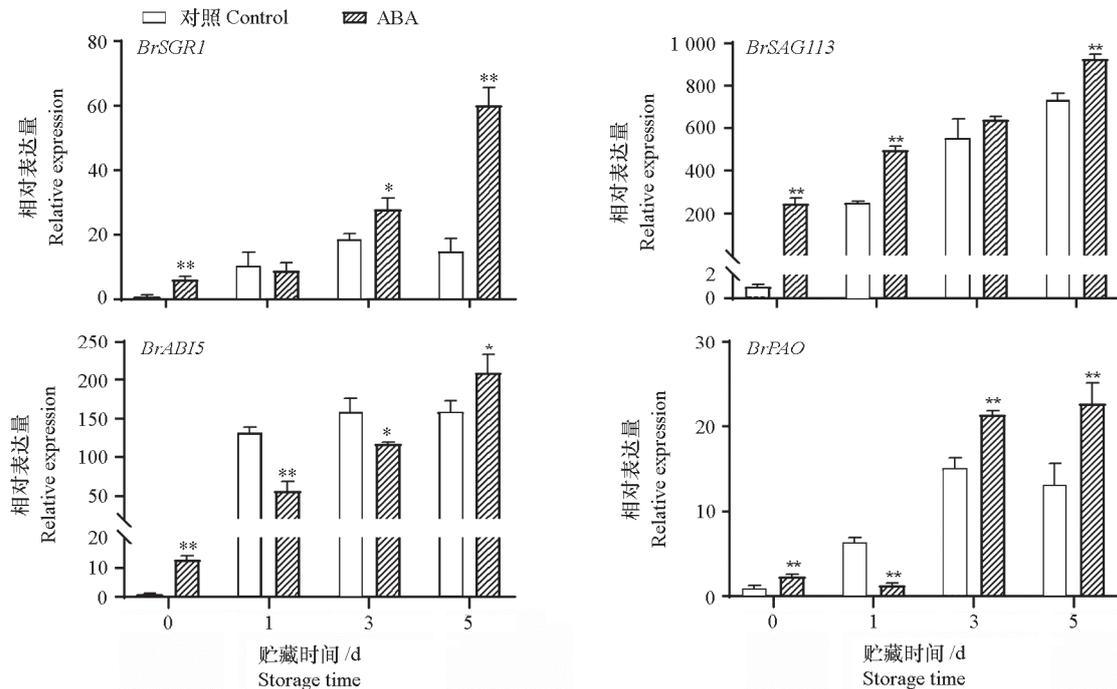


图 4 菜薹采后叶片黑暗贮藏下衰老相关基因相对表达量变化情况

Fig. 4 Changes of relative expression of SAGs in postharvest leaves of Chinese flowering cabbage in the dark

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

进一步探究 *Br003998* 与 *Bra004385* 的表达模式，如图 5 所示，随着菜薹采后叶片黑暗贮藏时间的延长，*Bra003998* 的相对表达量呈先上升后下降趋势，喷施 ABA 当天表达量迅速上调，约为对照的 5 倍，但在后续贮藏过程中基本不变。*Bra004385* 随着菜薹采后叶片衰老程度加深，相对表达量不断升高，贮藏 5 d 时达到 0 d 的 115.6 倍；ABA 喷施处理后，较短时间内相对表达量升高，贮藏 1 d 时稍有变化，而后表达量升高，5 d 时显著高于未喷施 ABA 的对照。上述结果表明在菜薹采后叶片中，*Bra004385* 的表达量与衰老进程呈正相关并能够被 ABA 诱导而上调表达。结合两个基因的生物信息学分析，*Bra004385* 候选为菜薹采后叶片衰老的正调控基因，命名为 *BrNAP1*，并进行后续的功能研究。

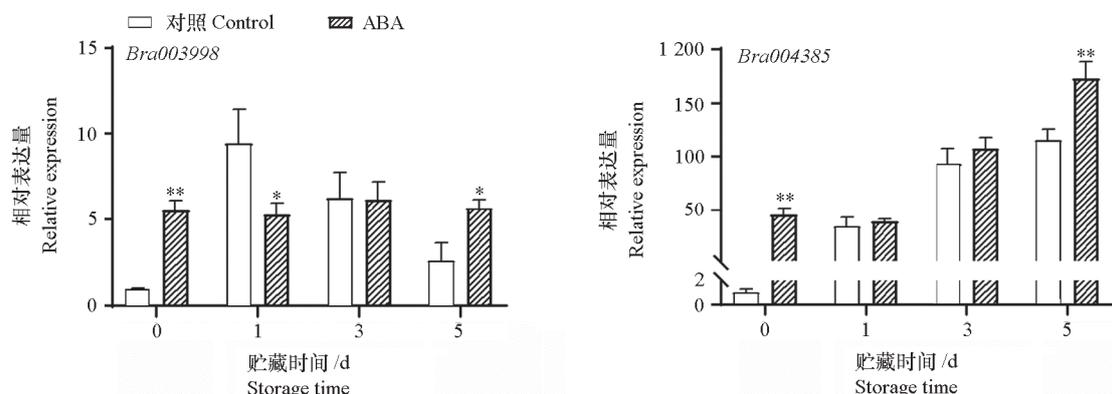


图 5 菜薹采后叶片黑暗贮藏下 *Bra003998*、*Bra004385* 表达模式分析
 Fig. 5 The postharvest expression patterns and ABA-inducibility of *Bra003998* and *Bra004385* in the dark
 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.3 BrNAP1 蛋白的亚细胞定位

将 BrNAP1-GFP 融合载体在烟草叶片中瞬时表达。如图 6 所示，表达空载中的 GFP 蛋白时，GFP 荧光分布在整个细胞中，当 BrNAP1-GFP 融合蛋白在核内表达 mCherry 的烟草叶片中瞬时表达时，在细胞核中观察到橙色荧光信号，表明 BrNAP1 定位于细胞核。

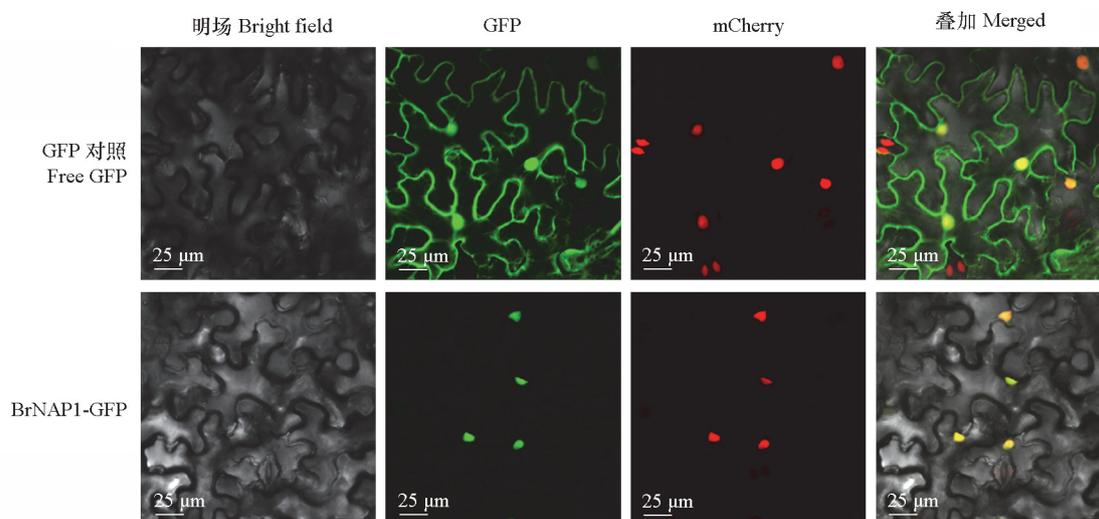


图 6 菜薹 BrNAP1 蛋白在烟草叶片表皮中的亚细胞定位
 Fig. 6 Subcellular localization of BrNAP1 in tobacco leaf epidermis cells

2.4 BrNAP1 可回复拟南芥 *atnap* 突变体滞绿表型至野生型

试验中获得 7 个拟南芥互补转基因株系，选取 *atnap* + *BrNAP1-1* 与 *atnap* + *BrNAP1-3* 进行后续试验，发现 *BrNAP1* 能够回复 *atnap* 突变体的滞绿表型至野生型，互补植株离体叶片黑暗诱导衰老过程中叶片加速衰老（图 7）。

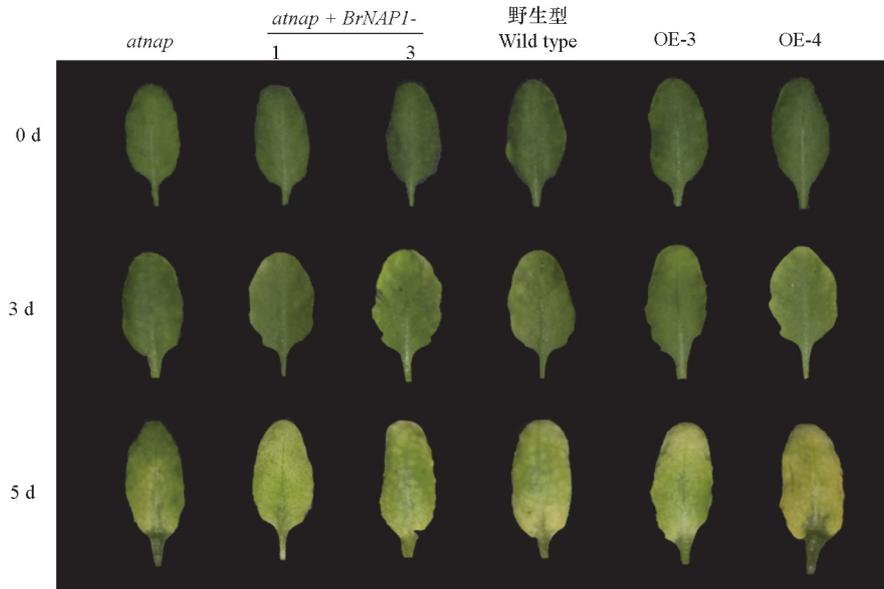


图 7 拟南芥 *BrNAP1* 互补 (*atnap + BrNAP1-1* 和 *atnap + BrNAP1-3*) 及过表达植株 (OE-3 和 OE-4) 叶片衰老表型分析
Fig. 7 Leaf senescence in transgenic *Arabidopsis* plants that either are complemented with *BrNAP1* (in *atnap*) or overexpressing *BrNAP1* (in wild type)

对拟南芥 *BrNAP1* 互补植株离体叶片进行叶绿素含量测定发现, 互补植株叶片叶绿素含量随着黑暗诱导衰老的程度的推进不断下降(图 8)。黑暗处理 3 d 时, *atnap + BrNAP1-1* 与 *atnap + BrNAP1-3* 互补株系的叶片叶绿素含量显著低于对照 *atnap* 植株, 说明在拟南芥 *atnap* 缺失突变体中, 转入菜薹 *BrNAP1* 能够加速叶片衰老黄化。

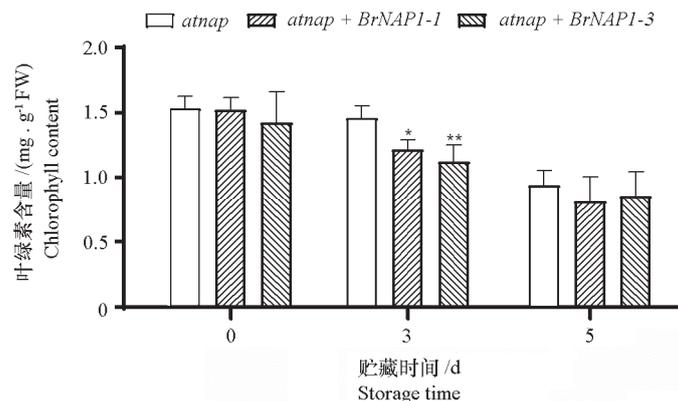


图 8 拟南芥 *BrNAP1* 互补植株叶片叶绿素含量变化
Fig. 8 Chlorophyll contents changes in *BrNAP1* complementary *Arabidopsis* lines
* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

利用 qRT-PCR 技术进行基因表达量分析(图 9), 互补植株中 *BrNAP1* 显著上调, 衰老相关基因 *AtSGR1*、*AtPAO* 呈上升趋势, 拟南芥 *AtNAP* 靶基因 *AtSAG113* 表达量上调。黑暗贮藏 5 d 时 *atnap + BrNAP1-1* 中 *AtSAG113* 的表达量约为 *atnap* 的 7 倍, 说明 *BrNAP1* 在拟南芥中同样可以诱导 *AtSAG113* 表达。上述结果表明菜薹 *BrNAP1* 在拟南芥 *atnap* 突变体中具有 *AtNAP* 相似功能, 能够上调衰老相

关基因及其靶基因的表达从而加速叶片衰老, 回复 *atnap* 滞绿表型至野生型。

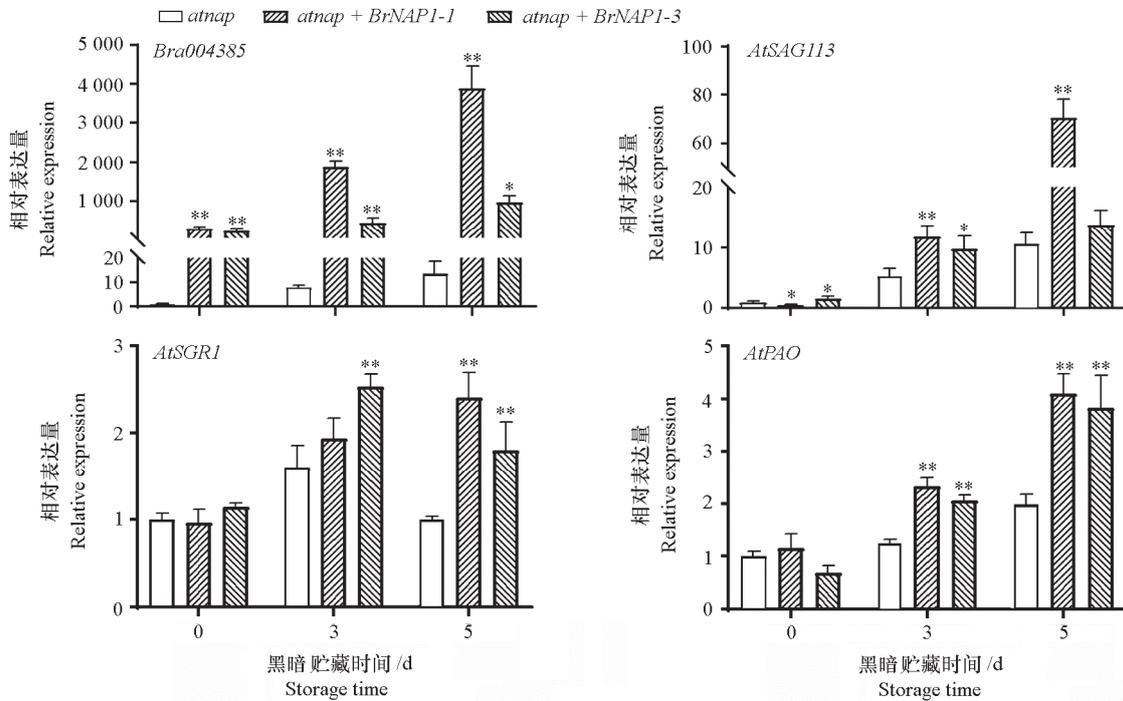


图 9 *BrNAP1* 互补转基因株系叶片衰老相关基因表达量测定

Fig. 9 Expression of some SAGs in *BrNAP1* complementary *Arabidopsis* lines

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.5 过表达 *BrNAP1* 引起采后叶片早衰

试验中获得 6 个拟南芥过表达株系, 选取 OE-3 与 OE-4 株系 (图 7) 进行后续试验。叶绿素含量变化情况表明, 过表达植株离体叶片随着黑暗贮藏时间的延长, 叶绿素含量不断下降 (图 10)。黑暗诱导 3 d 和 5 d 时过表达株系 OE-3 与 OE-4 的叶绿素含量均低于野生型对照, 说明在拟南芥中过表达菜薹 *BrNAP1*, 能够加速叶片衰老。

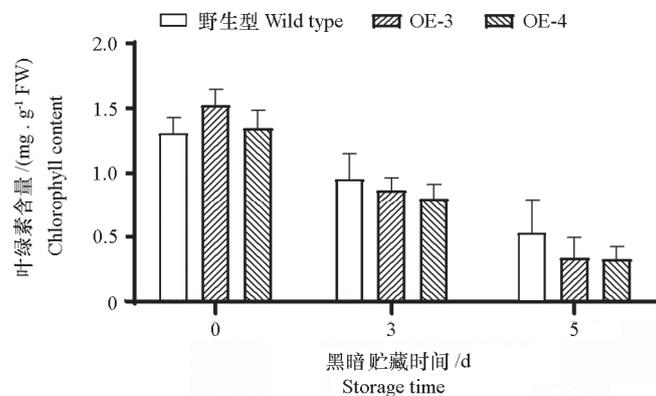


图 10 拟南芥 *BrNAP1* 过表达植株叶片叶绿素含量变化

Fig. 10 Chlorophyll contents changes in in transgenic *Arabidopsis* overexpressing *BrNAP1*

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

qRT-PCR 结果 (图 11) 表明, OE-3 和 OE-4 株系中衰老相关基因 *AtSGR1* 与 *AtPAO* 表达量显著上调, 拟南芥 *AtNAP* 靶基因 *AtSAG113* 表达量同样明显上升, 贮藏 3 d 与 5 d 时为野生型对照的 2 倍左右。综合转基因互补植株与过表达植株基因表达情况, *BrNAP1* 能够回复 *atnap* 突变体延衰表型并加速野生型拟南芥离体叶片黑暗诱导下衰老, 与 *AtNAP* 功能相似, 为菜薹中 *AtNAP* 同源基因, 是采后叶片衰老的正调控基因。

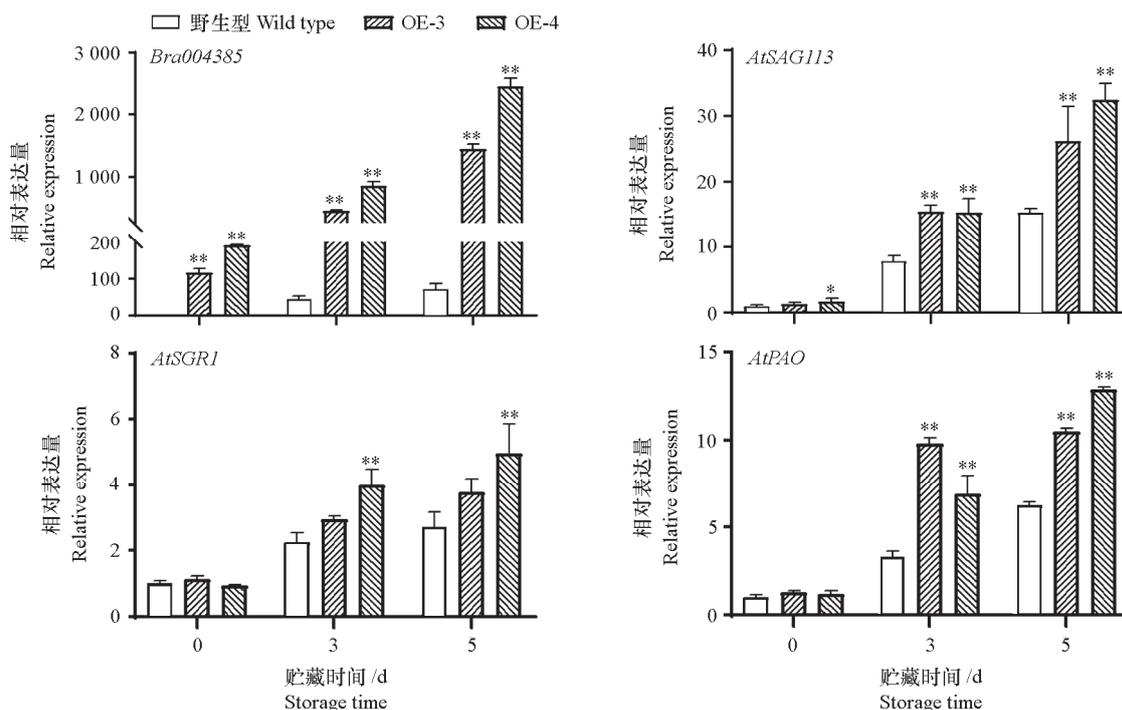


图 11 *BrNAP1* 过表达转基因株系叶片衰老相关基因表达量测定
Fig. 11 Expression of some SAGs in transgenic *Arabidopsis* overexpressing *BrNAP1*
* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.6 *BrNAP1* 激活 *BrSAG113* 表达

在拟南芥中, *AtNAP* 通过激活靶基因 *AtSAG113* 表达调控叶片衰老 (Zhang & Gan, 2012)。本试验中发现, 拟南芥 *BrNAP1* 互补与过表达植株中 *AtSAG113* 表达量均显著上调, 且在菜薹采后叶片衰老过程中 *BrNAP1* 与 *BrSAG113* 的表达呈正相关, 因此候选 *BrSAG113* 为 *BrNAP1* 下游基因。通过双荧光素酶试验进行分析发现, 含 *BrNAP1* 转录因子的载体与含 *BrSAG113* 启动子区域的载体共转后, LUC 与 REN 的比值显著高于对照, 说明 *BrNAP1* 具有转录活性并能够激活 *BrSAG113* 表达 (图 12)。

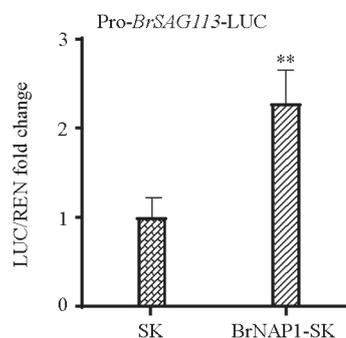


图 12 *BrNAP1* 转录激活 *BrSAG113* 表达
Fig. 12 *BrNAP1* transcriptionally induced the activity of *BrSAG113* in dual-luciferase assay
* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

3 讨论

菜薹在采后贮藏运输过程中叶片衰老黄化是影响其品质的主要原因。本试验中以菜薹作为研究对象, 寻找能够调控采后叶片衰老的 NAP 新成员, 在菜薹中克隆获得被注释为 NAP 的两个基因 *Bra003998* 与 *Bra004385*。通过氨基酸序列比对发现, *Bra003998*、*Bra004385* 与 NAP 转录因子同源性高, 其中 *Bra004385* 与 *AtNAP* 同源性高达 80%。*Bra004385* 在 N 端具有 A~E 高度保守的 5 个亚结构域, 在 TAR 区还具有 NAP 亚家族特有的保守结构域, 与 *AtNAP*、*OsNAP* 等 NAP 成员类似 (Guo & Gan, 2006; Zhou et al., 2013), 具备 NAP 亚家族特点, *Bra003998* 则在 N 端缺少 A 亚区。试验证明 *Bra004385* 属于 NAP 亚家族, 推测其可能与拟南芥 *AtNAP* 等具有相似功能。

前人研究发现, 拟南芥 *AtNAP* 在幼嫩叶片中基本无表达, 但在衰老叶片中表达量显著上升 (Guo & Gan, 2006), 同样在水稻、陆地棉、金鱼藤等叶片中, *OsNAP*、*GhNAP*、*ApNAP* 的表达量也随叶片衰老进程不断增加 (樊金萍和赵然, 2014; Fan et al., 2015)。本研究中发现菜薹采后叶片衰老过程中 *Bra003998* 的表达量呈先升高后下降趋势, 与衰老进程并不完全一致; *Bra004385* 的表达量则与叶片衰老进程呈正相关, 且 ABA 喷施后表达显著上调, 与 *AtNAP*、*OsNAP*、*CarNAC3* 等 NAP 亚家族成员表达情况一致 (Peng et al., 2009; Zhang & Gan, 2012; Liang et al., 2014)。结合生物信息分析, 候选 *Bra004385* 为叶片衰老的正调控基因, 命名为 *BrNAP1*, 亚细胞定位试验表明其定位于细胞核。

通过构建拟南芥互补与过表达植株对 *BrNAP1* 进行功能分析。*BrNAP1* 能够在一定程度上回复 *atnap* 突变体的滞绿表型, 离体叶片黑暗处理过程中衰老相关基因 *AtSGR1*、*AtPAO* 以及 *AtNAP* 靶基因 *AtSAG113* 表达量上调, 叶片加速衰老, 与拟南芥 *OsNAP*、*GhNAP* 互补植株结果 (Guo & Gan, 2006; Fan et al., 2015) 相似。过表达 *BrNAP1* 能够诱导拟南芥离体叶片衰老相关基因表达量显著上调, *AtNAP* 靶基因 *AtSAG113* 表达量同样明显上升, 与在水稻中过表达 *OsNAP* 促进叶绿素降解, 加速叶片衰老进程的结果 (Zhou et al., 2013) 一致, 进一步说明菜薹 *BrNAP1* 为衰老正调控基因。推测 *BrNAP1* 在调控菜薹叶片采后衰老过程中起重要作用。

拟南芥中, *AtNAP* 通过 ABA-*AtNAP*-*SAG113* PP2C 模式调控叶片衰老 (Zhang & Gan, 2012)。本研究中菜薹 *BrSAG113* 与 *BrNAP1* 表达量变化趋势一致且受 ABA 诱导表达上调, 拟南芥中异位表达 *BrNAP1* 同样能够增加 *AtSAG113* 的表达量, 双荧光素酶试验进一步表明 *BrNAP1* 能够激活 *BrSAG113* 表达, 但 *BrNAP1* 缺失突变体对 ABA 的敏感性如何, *BrNAP1* 在菜薹采后叶片衰老过程中的具体调控机制还需进一步探究。

References

- Chen X, Wang Y F, Lv B, Li J, Luo L Q, Lu S C, Zhang X, Ma H, Ming F. 2014. The NAC family transcription factor *OsNAP* confers abiotic stress response through the ABA pathway. *Plant and Cell Physiology*, 55 (3): 604 - 619.
- Chen Yubai, Lin Haiying, Zhao Huahai, Dai Xuefei. 2003. Experimental study on the effect of vacuum pre-cooling of Chinese cabbage. *Journal of Agricultural Engineering*, (5): 161 - 165. (in Chinese)
- 陈羽白, 林海英, 赵华海, 戴雪飞. 2003. 菜薹真空预冷效果的试验研究. *农业工程学报*, (5): 161 - 165.
- Chen Y X, Qiu K, Kuai B K, Ding Y L. 2011. Identification of a NAP-like transcription factor *BeNAC1* regulating leaf senescence in bamboo (*Bambusa emeiensis* 'Viridiflavus'). *Physiologia Plantarum*, 142 (4): 361 - 371.
- Dagmara P S, Charlotte O, Per G, Karen S. 2015. NAC transcription factors in senescence: From molecular structure to function in crops. *Plants*, 4 (3): 412 - 448.
- Fan Jinping, Zhao Ran. 2014. Cloning and expression pattern analysis of the *ApNAP* gene in *Asarina procumbens*. *Journal of Plant Science*, 32 (3):

- 251 - 258. (in Chinese)
- 樊金萍, 赵 然. 2014. 金鱼藤中 *ApNAP* 基因的克隆和表达模式分析. *植物科学学报*, 32 (3): 251 - 258.
- Fan K, Bibi N, Gan S S, Li F, Yuan S N, Ni M, Wang M, Shen H, Wang X D. 2015. A novel NAP member GhNAP is involved in leaf senescence in *Gossypium hirsutum*. *Journal of Experimental Botany*, 66 (15): 4669 - 4682.
- Fan Z Q, Tan X L, Chen J W, Liu Z L, Kuang J F, Lu W J, Shan W, Chen J Y. 2018a. BrNAC055, a novel transcriptional activator, regulates leaf senescence in Chinese flowering cabbage by modulating reactive oxygen species production and chlorophyll degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (36): 9399 - 9408.
- Fan Z Q, Tan X L, Shan W, Kuang J F, Lu W J, Chen J Y. 2018b. Characterization of a transcriptional regulator BrWRKY6 that associates with gibberellin-suppressed leaf senescence of Chinese flowering cabbage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (8): 1791 - 1799.
- Guo Y F, Gan S S. 2006. AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *Plant Journal*, 46 (4): 601 - 612.
- Jia Zhiwei, Sun Manli, Chang Jinmei, Song Kanghua, Zhang Lubin. 2019. Effect of melatonin treatment on the preservation of the flower stalk of *Brassica campestris* L. ssp. *chinesis* var. *utilis* Tsen et Lee after harvest under low temperature. *Journal of Tropical Crops*, 40 (7): 1413 - 1420. (in Chinese)
- 贾志伟, 孙曼丽, 常金梅, 宋康华, 张鲁斌. 2019. 菜薹采后褪黑素处理的低温保鲜效果分析. *热带作物学报*, 40 (7): 1413 - 1420.
- Liang C Z, Wang Y Q, Zhu Y N, Tang J Y, Hu B, Liu L C, Ou S J, Wu H K, Sun X H, Chu J F, Chu C C. 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 (27): 10013 - 10018.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25: 402 - 408.
- Luo Zheng, Guo Yuanyuan, Chen Feiping, Gong Xiaobo, Chen Yulong. 2019. Study on the effect of high oxygen modified packaging (HOMP) on inhibiting the activity of key enzyme phenylalaninammonio-nialyase of cabbage lignification. *Food Research and Development*, 40 (8): 27 - 31. (in Chinese)
- 罗 政, 郭媛媛, 陈飞平, 宫晓波, 陈于陇. 2019. 高氧气调包装抑制菜薹木质化关键酶苯丙氨酸酶的研究. *食品研究与开发*, 40 (8): 27 - 31.
- Nakagawa T, Ishiguro S, Kimura T. 2009. Gateway vectors for plant transformation. *Plant Biotechnology*, 26 (3): 275 - 284
- Ooka H, Satoh K, Doi K, Nagata T, Otomo Y, Murakami K, Matsubara K, Osato N, Kawai J, Carninci P, Hayashizaki Y, Suzuki K, Kojima K, Takahara Y, Yamamoto K, KiKuchi S. 2003. Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research*, 10 (6): 239 - 247.
- Peng H, Cheng H Y, Chen C, Yu X W, Yang J N, Gao W R, Shi Q H, Zhang H, Li J G, Ma H. 2009. A NAC transcription factor gene of Chickpea (*Cicer arietinum*), CarNAC3, is involved in drought stress response and various developmental processes. *Journal of Plant Physiology*, 166 (17): 0 - 1945.
- Song Kanghua, Jia Zhiwei, Chang Jinmei, Sun Manli, Zhang Lubin. 2019. Lignification induced by ethephon and related gene expression in postharvest flowering Chinese cabbage at low temperature. *Acta Horticulturae Sinica*, 46 (4): 775 - 782. (in Chinese)
- 宋康华, 贾志伟, 常金梅, 孙曼丽, 张鲁斌. 2019. 低温下乙烯对采后菜薹木质化及相关基因表达的影响. *园艺学报*, 46 (4): 775 - 782.
- Tan X L, Fan Z Q, Kuang J F, Lu W J, Reiter R J, Lakshmanan P, Su X G, Zhou J, Chen J Y, Shan W. 2019. Melatonin delays leaf senescence of Chinese flowering cabbage by suppressing ABFs-mediated abscisic acid biosynthesis and chlorophyll degradation. *Journal of pineal research*, 67 (1): e12570.
- Wang Huihui, Chen Yulong, Xu Yujuan, Wu Jijun, Xiao Gengsheng, Wang Weimin. 2014. Effect of super atmospheric oxygen packaging on the quality of fresh-cut flowering cabbages. *Chinese Journal of Food*, 14 (2): 161 - 170. (in Chinese)
- 王惠惠, 陈于陇, 徐玉娟, 吴继军, 肖更生, 王维民. 2014. 高氧气调包装对鲜切菜薹品质的影响. *中国食品学报*, 14 (2): 161 - 170.
- Zhang Famei, Liu Shaoqun, Su Wei, Zhu Shijiang. 2009. Effects of application of methyl jasmonate on storability of harvested *Brassica chinensis* var. Tsai-tai. *Journal of Agricultural Engineering*, 25 (S1): 87 - 91. (in Chinese)
- 张法梅, 刘少群, 苏 蔚, 朱世江. 2009. 茉莉酸甲酯处理对菜薹耐贮性的影响. *农业工程学报*, 25 (S1): 87 - 91.
- Zhang K W, Gan S S. 2012. An Abscisic Acid-AtNAP transcription factor-SAG113 protein phosphatase 2C regulatory chain for controlling dehydration in senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology*, 158 (2): 961 - 969.
- Zhou Y, Huang W, Liu L, Chen T Y, Zhou F, Lin Y J. 2013. Identification and functional characterization of a rice NAC gene involved in the regulation of leaf senescence. *BMC Plant Biology*, 13 (1): 132 - 132.