

## 过表达*LeNLP4*转录因子提高番茄抗低温胁迫能力

左衍秋, 马娜娜, 梁晓庆, 岳萌萌, 孟庆伟\*

山东农业大学生命科学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东泰安271018

**摘要:** NAC (NAM-ATAF1,2-CUC2)转录因子在植物胁迫响应中起重要作用。为了探讨*LeNLP4*基因在番茄抗低温胁迫中的功能, 分离了番茄*LeNLP4*转录因子基因, 并获得转基因*LeNLP4*番茄植株。荧光定量PCR分析表明, *LeNLP4*的表达受低温诱导。与野生型植株相比, 在4℃胁迫下转基因植株具有较高的生长量和光系统II (PSII)最大光化学效率( $F_v/F_m$ )、过氧化氢( $H_2O_2$ )和超氧阴离子( $O_2^-$ )清除速率、抗坏血酸过氧化物酶(APX)和超氧化物歧化酶(SOD)活性, 以及较低的丙二醛(MDA)含量和相对电导率(REC)。过表达株系中*SICBF1*的表达高于野生型。上述结果表明, *LeNLP4*的过表达提高了转基因番茄抗低温胁迫能力。

**关键词:** 番茄; 低温胁迫; *LeNLP4*; *SICBF1*; 活性氧

## Overexpression of *LeNLP4* Transcription Factor Improved the Chilling Tolerance of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

ZUO Yan-Qiu, MA Na-Na, LIANG Xiao-Qing, YUE Meng-Meng, MENG Qing-Wei\*

State Key Laboratory of Crop Biology, College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China

**Abstract:** NAC (NAM-ATAF1,2-CUC2) family members play important roles in various environmental responses. In order to investigate the function of *LeNLP4* under chilling stress, *LeNLP4* was isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum*) and transgenic plants were obtained. qRT-PCR confirmed that the expression of *LeNLP4* was induced by chilling stress. Compared with the wild type (WT), transgenic tomato plants have higher growth increment and the maximal photochemistry efficiency of photosystem II ( $F_v/F_m$ ), higher capability for scavenging hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and superoxide radical ( $O_2^-$ ), higher ascorbate peroxidase (APX) and superoxide dismutase (SOD), and lower malondialdehyde (MDA) content and the relative electric conductivity (REC) under chilling treatment. Expression level of *SICBF1* in transgenic lines was higher than that in WT. These results indicated that overexpression of *LeNLP4* enhanced chilling tolerance of transgenic tomato plants.

**Key words:** tomato; chilling stress; *LeNLP4*; *SICBF1*; reactive oxygen species

植物在正常代谢过程中不可避免地遭受各种环境因子的胁迫, 例如低温、高温和干旱等。在长期的进化过程中植物形成了响应胁迫信号和提高自身抗性的应变机制, 它们通过调节相关基因的表达, 使植物产生一系列生理生化反应, 在体内建立新的物质和能量代谢平衡, 适应环境胁迫(Nakashima等2009)。转录调控承载着上游信号的感知和下游特异蛋白质的表达, 是整个复杂信号网络的重要组成部分(Lata和Prasad 2011)。在对植物响应和抵抗环境胁迫的研究中, 已经发现了大量的转录因子(Shinozaki等2003; Tran等2004), NAC (NAM-ATAF1,2-CUC2)是其中比较重要的一类转录因子。

Souer等(1996)从矮牵牛(*Petunia hybrida*)中克隆了第一个NAC转录因子NAM, 其突变体芽顶端分生组织发育异常, 在幼苗期逐渐死亡。Aida等(1997)在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中发现了3个基因, 分别是NAM、CUC2和ATAF1/2。CUC2基因的功能与NAM基因相似, 与植物的发育相关; ATAF1/2基因与植物逆境应答相关。经过大量的序列比对发现, NAC基因只存在于植物中(Ooka等

收稿 2013-11-21 修定 2014-03-20

资助 国家重点基础研究发展计划(2009CB118505)和国家自然科学基金(31171474和31371553)。

\* 通讯作者(E-mail: qwmeng@sdau.edu.cn; Tel: 0538-8249606)。

2003)。NAC转录因子最主要的结构特点是N-端含有高度保守的NAC结构域,它由大约150个高度保守的氨基酸残基组成,可结合DNA和其他蛋白(Ooka等2003)。NAC转录因子C-端是转录激活区(transcriptional activation region, TAR),具有高度的多样性,该区的特点是一些氨基酸重复出现的频率较高,如丝氨酸、苏氨酸、脯氨酸、谷氨酸等(Olsen等2005)。NAC蛋白的N-端包含A、B、C、D、E五个亚结构域,其中,B和E亚结构域保守性不强,A、C、D亚结构域高度保守,C和D亚结构域中包含有核定位信号,有些NAC蛋白在C-端区域具有跨膜基序,当它们以完整的膜结合形式存在时是非活性的,其功能激活需要特异蛋白酶将其从膜上释放(Kim等2006, 2007)。通过转录因子调控功能基因的表达是植物低温胁迫应答的关键环节,这其中包括MYB、bZIP、AP2、Zn指、CBF和NAC类转录因子家族等(Carabelli等1993; Shinozaki等2003; Tran等2004)。

目前,已从拟南芥(Delessert等2005)、大豆(*Glycine max*) (Hao等2011)、水稻(*Oryza sativa*) (Hu等2006)、甘蔗(*Saccharum sp.*) (Nogueira等2005)等植物中分离鉴定了许多与抗逆相关的NAC转录因子。研究表明,拟南芥*LOVI*基因能增强植株的抗冻能力,这可能缘于*LOVI*能促进抗冻相关基因如*COR15A* (*cold regulated 15A*)和*KINI* (*cold induced 1*)的表达(Yoo等2007)。来自水稻的*SNAC2*基因受到干旱、高盐、低温、机械损伤以及ABA的诱导表达,其过表达植株耐冷、抗盐并能抵御干旱。基因表达分析揭示,*SNAC2*蛋白诱导了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(Hu等2008)。由于低温胁迫的众多方面都受到转录调控,因此许多转录因子被选为作物抗寒工程中的目标工具,但是目前NAC转录因子在低温胁迫中的研究主要集中在拟南芥和水稻中,对番茄NAC转录因子的研究较少。本研究通过在番茄中过表达*LeNLP4*,研究了NAC基因在低温胁迫中的作用。

## 材料与amp;方法

### 1 植物材料的处理

以番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.) ‘中蔬6

号’为试材。种子浸种催芽生根后分别播于塑料盆中,以蛭石为基质, Hoagland营养液培养,放置于温室[温度(25±4) °C,光照强度约850 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,相对湿度80%左右]中生长。生长8周的番茄在光照强度为200 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>的培养箱中,4 °C下低温处理12 h,取样后液氮冷冻,保存于-80 °C备用。

### 2 测定项目与测定方法

#### 2.1 番茄*LeNLP4*基因的克隆及载体构建与植物转化

根据NCBI中已知的序列号AK323042.1,设计分别带有*SalI*酶切位点引物FULLF (5'-CTGTTGT-TTCTCTGGTGGGT-3')及带有*SmaI*酶切位点引物FULLR (5'-CTAACCTCGACGAATGAGT-3')。利用PCR扩增番茄*LeNLP4*基因全长,将得到的基因构建成PBI121-*LeNLP4*载体,并转化到大肠杆菌DH5α感受态细胞中,经酶切和测序验证后,用冻融法转化导入农杆菌LBA4404感受态中。以‘中蔬6号’番茄叶片作为转化材料,用农杆菌介导的叶盘法进行转化,浸染后的愈伤组织经卡那霉素筛选,挑选新生抗性愈伤组织进行分化、生根、炼苗,最后移栽到花盆中培养(Ma等2013)。

#### 2.2 PCR和荧光定量PCR

取T<sub>1</sub>代番茄相同叶位的叶片,用CTAB微量法提取转基因番茄叶片中的总DNA,以此为模板,进行PCR和荧光定量PCR检测。PCR检测所用引物为:35S (5'-GACGCACAATCCCCTATCC-3')和FULLR (5'-CTAACCTCGACGAATGAGT-3'),按照天根生化科技(北京)有限公司RNA提取试剂盒说明书提取总RNA。将2 μg RNA在70 °C下变性5 min,加入1 μL反转录酶和1 μL RNA酶抑制剂,按照TaKaRa反转录试剂盒的方法获得cDNA。采用伯乐生命医学产品(上海)有限公司生产的实时荧光定量分析仪(Bio-Rad CFX96TM)和天根生化科技(北京)有限公司的SYBR Real Master Mix进行荧光定量分析。所用程序为:95 °C变性30 s;95 °C 5 s,58 °C 10 s,72 °C 10 s,40个循环。所用引物为:内参引物EF-1αF (5'-GGAAGTGGAGGAGCC-TAAG-3')和EF-1αR (5'-CAACACCAACAGCA-ACAGTCT-3');目标基因引物QRTPCR (5'-GGT-AACAACAACCTCCAAAG-3')和QRTPCR (5'-CTGAAAATGGCTAGCTATG-3');检测*SICBF1*表达量所用引物CBF1F (5'-ATCATCTTCTTCTCA-

TCGTCATC-3')和CBF1R (5'-TCCTTGTCTTCTT-ATTTGGTTCTC-3')。EF-1 $\alpha$ 是内参基因,其GenBank注册号为X144491。

### 2.3 LeNLP4蛋白的亚细胞定位

根据LeNLP4基因的开放阅读框(open reading frame, ORF)设计特异引物,以构建好的表达载体质粒DNA为模板,进行PCR反应,获得LeNLP4基因的ORF,构建pBI122-LeNLP4-GFP重组载体。挑取带有pBI122-LeNLP4-GFP质粒的农杆菌单克隆接入YEP液体培养基(含有50 mg·L<sup>-1</sup>利福平和50 mg·L<sup>-1</sup>卡那霉素)中,用重悬液侵染在MS固体培养基上培养24 h (28 °C)后的洋葱内表皮细胞,在黑暗中培养24 h后用激光共聚焦显微镜(LSM 510 META, ZEISS, 德国)观察绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)的荧光(Han等2012)。

### 2.4 番茄幼苗鲜重和叶绿素含量测定

将T<sub>1</sub>代种子在含卡那霉素的MS培养基上培养2周[温度(25±2) °C,光照强度800  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,湿度80%],然后将幼苗转移到4 °C光照培养箱内(12 h光照/12 h黑暗,光照强度200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )培养4 d,测定番茄幼苗的鲜重和叶绿素含量。重复3次,结果以平均值±标准误差表示。

### 2.5 番茄成苗H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>染色和O<sub>2</sub><sup>-</sup>染色

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的染色:染色溶液为0.1 mg·mL<sup>-1</sup> 3,3'-二氨基联苯胺(diaminobezidine, DAB),用50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-醋酸(pH 5.0)溶解。将叶片浸泡在染色液中,25 °C黑暗培养过夜;放于固定液(乙醇:乳酸:甘油=3:1:1)中煮沸10 min,冷却,将叶片转入新鲜的固定液中;室温下过夜,拍照。

O<sub>2</sub><sup>-</sup>的染色:将叶片浸泡在25 mg·mL<sup>-1</sup>磷酸缓冲液(pH 7.6)溶解的0.1 mg·mL<sup>-1</sup>氮蓝四唑(nitroblue tetrazolium, NBT)溶液中,25 °C黑暗培养16 h;放于固定液中煮沸10 min,冷却,将叶片转入新鲜的固定液中;室温下过夜,拍照。实验进行3次生物学重复。

### 2.6 抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性的测定

取0.5 g叶片放于预冷的研钵中,加1 mL磷酸缓冲液,冰浴中研磨成浆,加缓冲液至终体积5 mL。取2 mL于10 500×g下离心10 min,上清液即

为APX及SOD粗提液。APX酶活性测定参照Mishra等(1993)的方法,以每分钟氧化1  $\mu\text{mol}$ 抗坏血酸(ascorbate, AsA)的酶量为1个酶活单位。SOD活性的测定参照Bartoli等(2000)的方法。酶活性的测定每处理重复3次,结果以平均值±标准误差表示。

### 2.7 电解质外渗量测定及膜脂过氧化程度分析

膜透性参照Sun等(2010)的方法测定,打取直径0.8 cm的叶圆片,放入带塞的试管中,用去离子水漂洗3次,加去离子水15 mL,置真空泵中抽气30 min,放振荡器上振荡3 h,取下静置,摇匀后测定初电导。沸水煮30 min,冷却至室温,平衡10 min,测定终电导。相对电导率(relative electronic conductance, REC) (%)=[(初电导-空白)/(终电导-空白)]×100。

丙二醛(malondialdehyde, MDA)的测定参照赵世杰等(2002)方法,将0.5 g材料剪碎,加入2 mL 10%三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)和少量石英砂,研磨,再加8 mL 10% TCA研磨至匀浆,4 000×g离心10 min,上清为提取液。2 mL上清液(对照为2 mL蒸馏水)中加入2 mL 0.6%硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)溶液,混匀,沸水浴15 min,迅速冷却后离心。取上清液,测定532、600、450 nm波长下的消光度。每处理重复3次,结果以平均值±标准误差表示。

### 2.8 叶绿素荧光参数的测定

叶绿素荧光参数的测定参考Kooten和Snel(1990)的方法,采用Hansatech公司生产的脉冲调制式便携荧光仪FMS2测定。处理过程中F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>在暗中适应15 min后测定。F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>=(F<sub>m</sub>-F<sub>0</sub>)/F<sub>m</sub>,其中,F<sub>0</sub>为初始荧光,F<sub>m</sub>为最大荧光。每处理重复3次,每重复测定5株,结果以平均值±标准误差表示。

## 实验结果

### 1 LeNLP4基因及其编码蛋白序列分析

由测序结果可知,我们获得的基因cDNA全长为1 595 bp,在第120个核苷酸处为起始密码子ATG,在1 335个核苷酸处为终止密码子TGA,编码区为1 221 bp,推断其编码蛋白应包含406个氨基酸残基。利用DNAMAN软件将该基因编码的氨基酸序列与GenBank中其他植物氨基酸序列进行比对,结果显示该蛋白与矮牵牛、毛果杨、拟南芥、葡



葡和蓖麻的高度同源(图1), 并具有一个保守的NAC结构域和转录激活结构域, 这表明我们获得了一个NAC转录因子, 我们将该基因命名为*LeNLP4*, 并在GenBank中注册, 注册号为JQ513289。

### 2 *LeNLP4*蛋白的亚细胞定位

将去掉终止密码子的*LeNLP4*的ORF连接到GFP的N-端, 构建了p35S-*LeNLP4*-GFP表达载体。将构建好的载体提取质粒进行酶切鉴定并测序, 确保连入的片段没有移码和突变后, 将质粒转化农杆菌LBA4404, 利用农杆菌侵染洋葱表皮细胞后在激光共聚焦显微镜下观察绿色荧光。在细胞核中观察到*LeNLP4*-GFP融合蛋白发出绿色荧光(图2), 这表明*LeNLP4*蛋白定位于细胞核中。

### 3 转*LeNLP4*番茄的鉴定及表达分析

利用PCR和荧光定量PCR对转基因株系进行筛选, 野生型(WT)中未出现扩增条带, T<sub>1</sub>代转基因株系可见明显的目的条带(图3-A), 说明该基因已整合到番茄基因组中; 荧光定量PCR结果显示, 转基因株系S1、S2、S3、S4、S5、S6中*LeNLP4*的表达量分别是野生型的19.8、15.9、13.4、17.3、

22.8、10.9倍(图3-B)。这表明我们获得了过表达*LeNLP4*的转基因番茄, 选取S1、S2和S4这3个株系进行后续生理生化指标的分析。

### 4 低温对*LeNLP4*和*SICBF1*表达的影响

荧光定量PCR分析表明, 低温处理下, 番茄*LeNLP4*的表达量随着处理时间的延长先升高后降低, 在处理12 h时达到最高(图4-A), 说明*LeNLP4*的表达受低温诱导。

由于*CBF1*在低温信号通路中是一个非常重要的基因, 我们对S2和野生型中*SICBF1*的表达情况进行了分析, 结果显示, 不管是在正常条件下还是低温胁迫下, S2中的*SICBF1*转录物水平都要高于野生型(图4-B)。这说明过表达*LeNLP4*上调了*SICBF1*转录物的积累, 因此提高了转基因植株的低温抗性。

### 5 *LeNLP4*过表达对番茄幼苗生长的影响

低温处理下, 野生型与转基因植株的生长均受到抑制, 但是转基因株系总体生长状况好于野生型。低温抑制了番茄幼苗的生长和叶中叶绿素生物合成, 与野生型相比, 转基因幼苗鲜重明显要

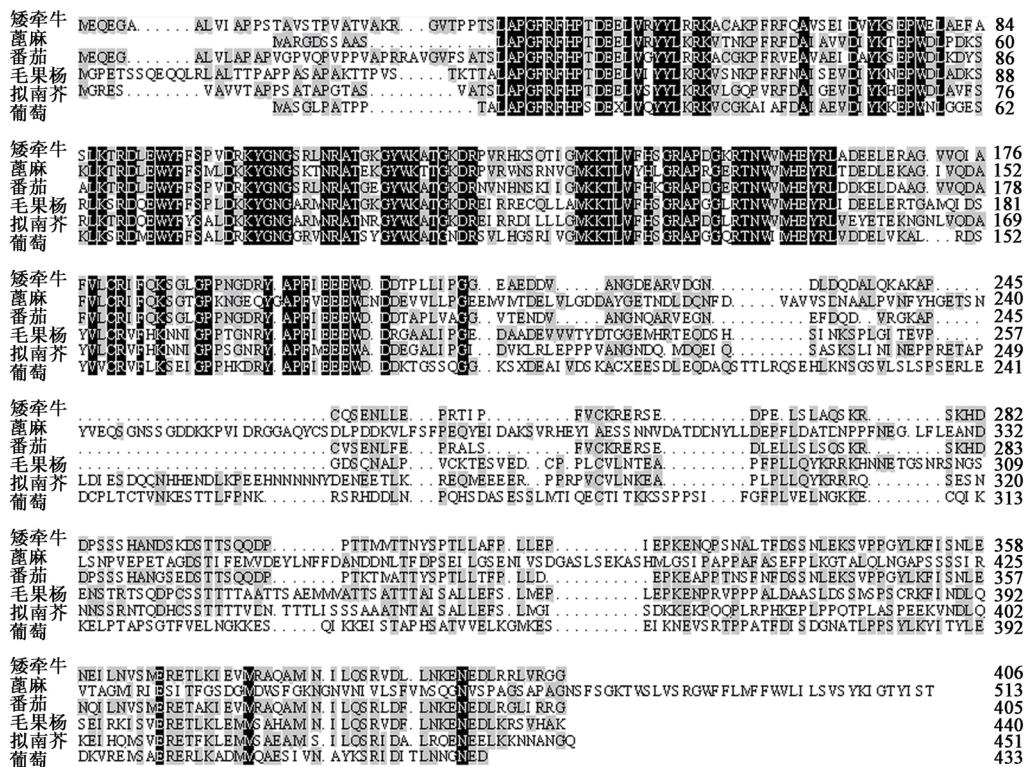
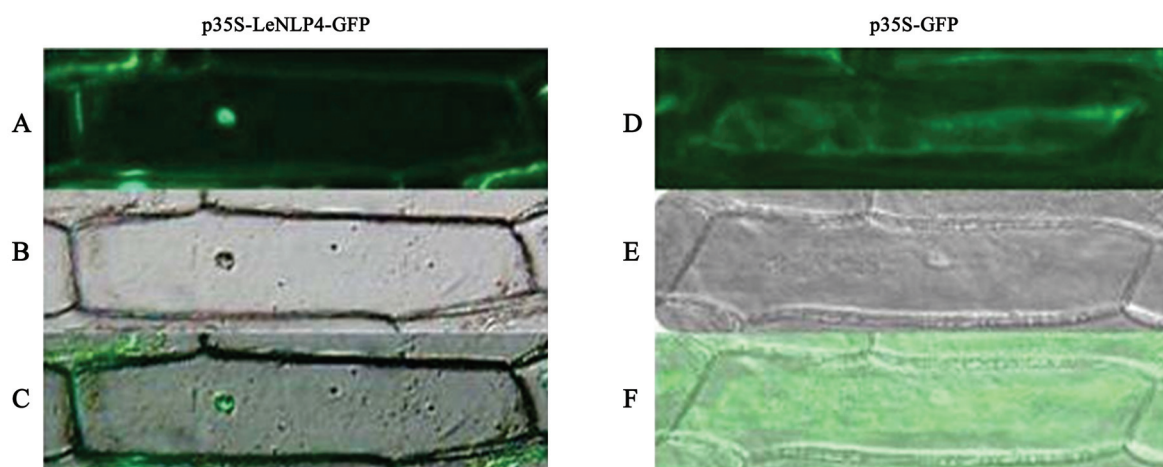


图1 *LeNLP4*推导的氨基酸序列与其他植物NLP4氨基酸序列的比对

Fig.1 Alignments of the deduced amino acid sequence of *LeNLP4* and other NLP4

图2 *LeNLP4*蛋白在洋葱表皮细胞中的定位Fig.2 Localization of *LeNLP4* protein in onion epidermal cells

D、E、F: 转化pBI122-GFP对照载体; A、B、C: 转化pBI122-*LeNLP4*-GFP。A和D: 荧光; B和E: 白视野; C和F: 融合。

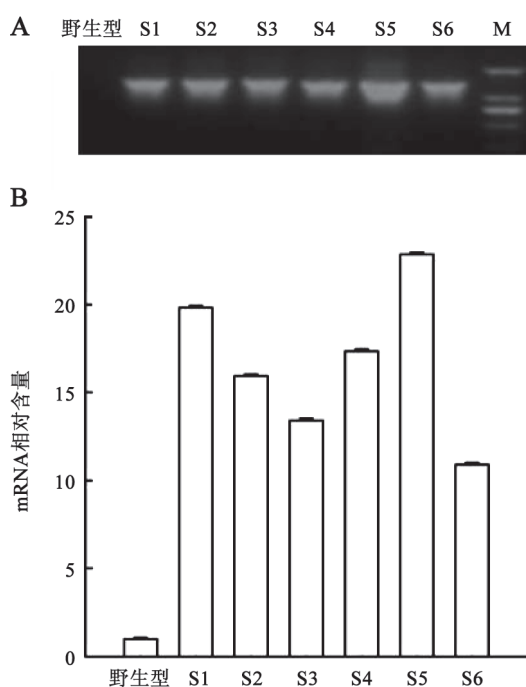
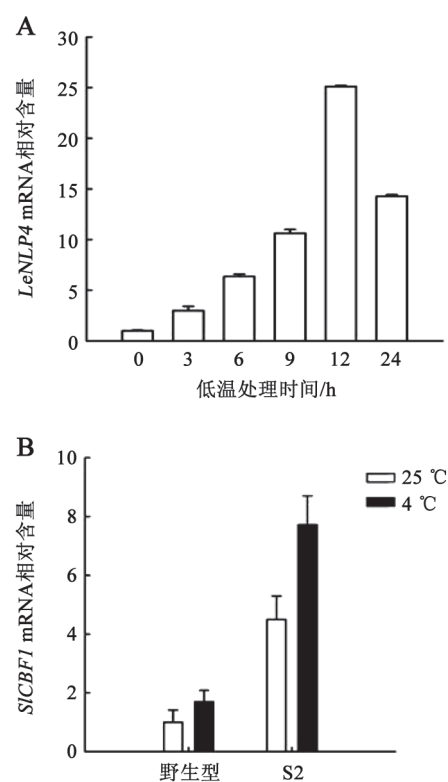


图3 转基因番茄的PCR及qRT-PCR验证

Fig.3 Identification of transgenic tomato plants by PCR and qRT-PCR

A: 转基因番茄植株的PCR检测。M: 2 kb DNA ladder, 分子量由高到低为2 000、1 000、750、500、250和100 bp; S1~S6: 转基因番茄株系。B: 转基因番茄植株的荧光定量PCR检测。

高(图5-B), 但二者叶片叶绿素含量差别不大(图5-A)。以上结果表明, *LeNLP4*过表达提高了低温胁迫下番茄幼苗的生长量。

图4 低温处理下*LeNLP4*和*SICBF1*在番茄叶片中的表达Fig.4 The expression of *LeNLP4* and *SICBF1* in tomato leaves under chilling treatment

## 6 *LeNLP4*过表达减轻低温胁迫下光系统II (PSII)的光抑制

$F_v/F_m$ 是衡量光合作用过程中PSII潜在最大光

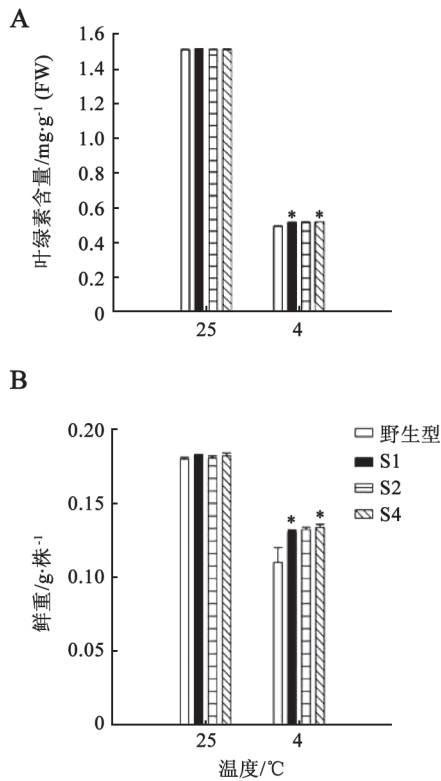


图5 正常温度(25 °C)与低温(4 °C)下番茄植株的叶绿素含量及鲜重

Fig.5 Chlorophyll content and fresh weight of tomato plants under normal growth condition (25 °C) and chilling stress (4 °C)

\*表示相同处理浓度或时间不同植株间差异显著( $P < 0.05$ ); 图6~8同此。

能转换效率, 常被作为光抑制或者其他胁迫条件下对PSII复合体伤害的量度。与野生型相比, 低温处理过程中转正义基因株系 $F_v/F_m$ 下降比较缓慢(图6)。这表明 $LeNLP4$ 的过表达减轻了低温下PSII的光抑制程度, 转基因植株的PSII反应中心受伤害较轻。

### 7 低温处理对MDA含量和REC的影响

低温处理前, 野生型与转基因株系中的MDA含量及REC无明显差别; 处理12 h后, 野生型中的明显增加, MDA含量增加了2倍, REC为39.46%, 转基因株系的变化较小(图7)。

### 8 $LeNLP4$ 过表达提高了抗氧化能力

分别用DAB和NBT染色检测番茄叶片中 $H_2O_2$ 和 $O_2^-$ 的积累, 结果表明, 在正常条件下, 只检测到少量的褐色物质, 但4 °C低温处理12 h以后, 所有株系的叶片都由于 $H_2O_2$ 积累而产生了较多深褐色的物质, 转基因株系叶片中的褐色物质比野生型中的少(图8-A); NBT染色的结果与DAB染色相似(图8-B)。另外, 由图8-C和D可见, 未经低温处理的转基因株系中SOD和APX活性均明显高于野生型; 低温胁迫后, 转基因株系和野生型中SOD和APX的活性均有下降, 但前者仍然明显高于后者。

## 讨论

NAC转录因子在植物中普遍存在, 该转录因

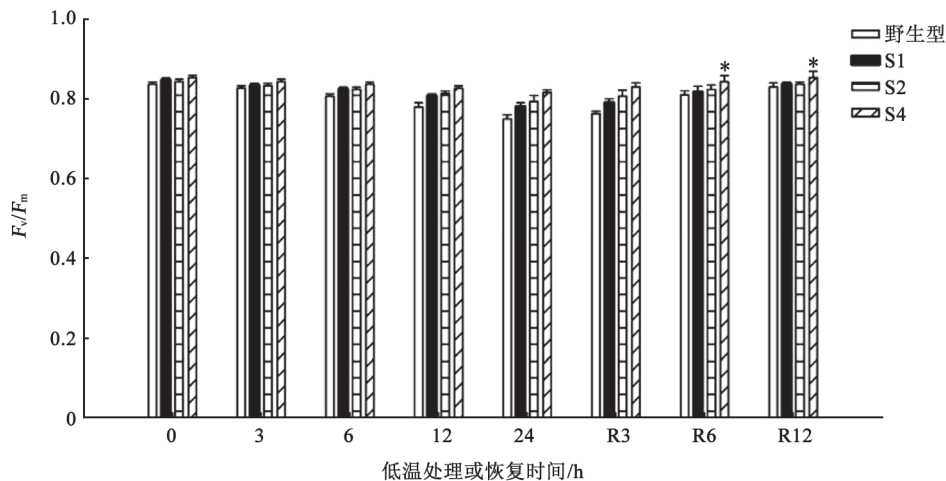


图6 低温处理下转基因和野生型番茄 $F_v/F_m$ 的变化

Fig.6 Changes of  $F_v/F_m$  in transgenic plants and WT tomatoes under chilling treatment  
R3、R6、R12分别为处理后恢复3、6、12 h。

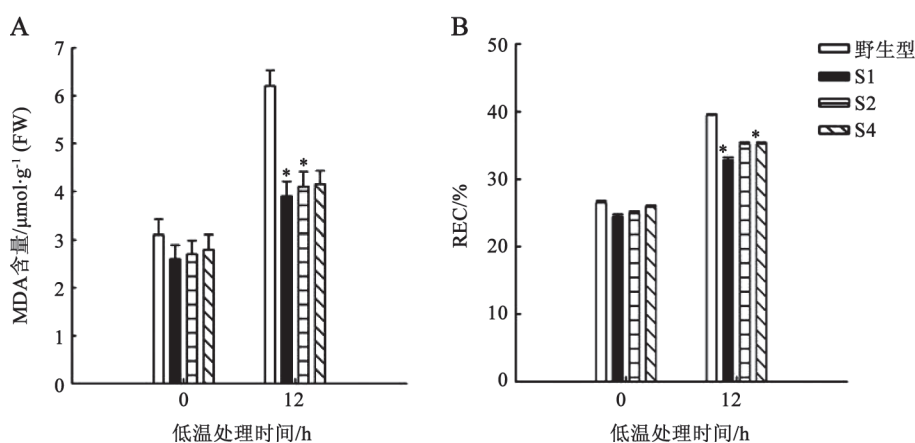


图7 低温处理下番茄叶中MDA含量和REC的变化

Fig.7 Changes of MDA content and REC in tomato leaves under chilling treatment

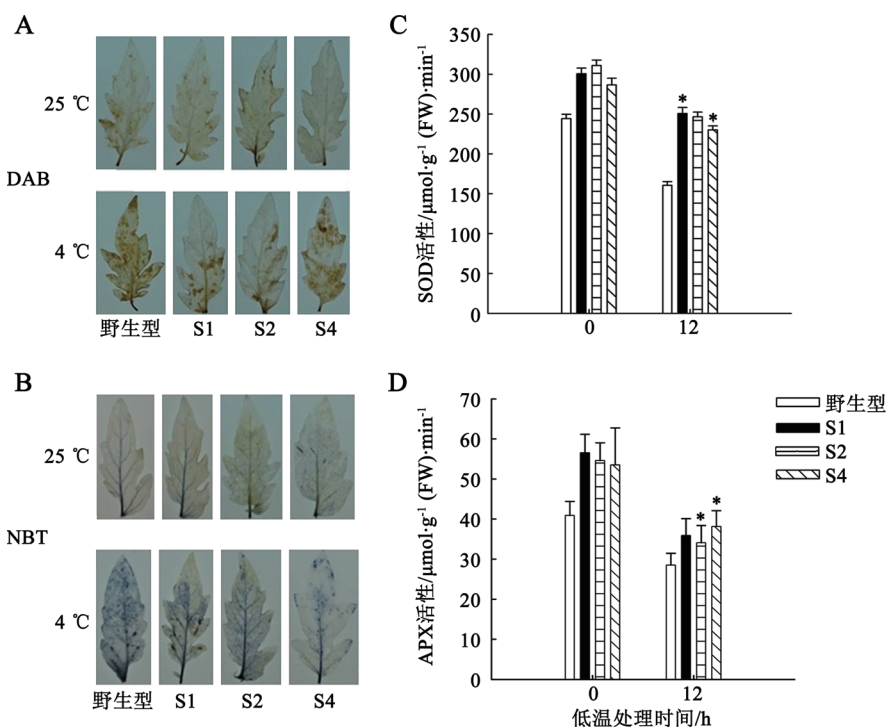


图8 低温处理下番茄叶片的DAB、NBT染色和SOD、APX活性

Fig.8 DAB and NBT staining and activities of SOD and APX of tomato leaves under chilling treatment

子的表达受干旱、高盐、低温、机械损伤以及ABA的诱导。本研究中,我们从番茄中克隆了*LeNLP4*转录因子(图1),该蛋白在细胞核中发挥其转录激活活性(图2),并且该转录因子的表达受低温诱导(图4-A)。根据系统进化树分析,*LeNLP4*转录因子属于NAC转录因子中的NAC2家族,在转基因植株中过量表达*NAC*基因能显著地提高转基因

植株对非生物胁迫如高盐、干旱和低温等的耐性(He等2005; Mao等2012; Yoo等2007; Hu等2008; Hao等2011; Ma等2013)。我们的研究结果也表明,过表达*LeNLP4*基因明显地提高了转基因植株的耐冷性。

植物在进行呼吸和光合电子传递时体内会产生生活性氧(reactive oxygen species, ROS),为维持正



常的生理机能,植物必须及时清除体内多余的ROS。有研究表明,植物体内产生的ROS可以作为信号分子调控许多生理过程,例如细胞程序性死亡、非生物胁迫响应、病原菌抵抗和系统信号转导(Foyer等1997)。但是,低温胁迫下由于细胞内的各种代谢反应失衡,进而导致ROS的大量产生。低温条件下植物叶片光活性的下降与低温对叶绿体及PSII反应中心的影响密切相关,伤害膜蛋白导致细胞损伤,降低光合效率,使植物生长受到抑制(Yabuta等2002)。我们的结果表明,低温胁迫提高了番茄叶中 $H_2O_2$ 和 $O_2^-$ 水平,引起膜脂过氧化,导致细胞膜结构受损,抑制光化学能力和植物生长(图5~8)。叶绿体中的SOD可以直接将植物细胞内的 $O_2^-$ 歧化生成 $H_2O_2$ ,植物体内高水平的APX可以有效地清除 $H_2O_2$ ,减轻ROS对植物细胞的伤害,进而维持较高的光合速率。过表达*EcNAC1*转录因子可降低 $H_2O_2$ 和 $O_2^-$ 含量,维持非生物胁迫条件下ROS代谢的平衡(Ramegowda等2012)。另外,我们的结果还表明,低温胁迫下,与野生型相比,转正义基因的植株有较高的APX和SOD的活性(图8-C和D),较低的 $H_2O_2$ 和 $O_2^-$ 含量(图8-A和B)。低温处理后,野生型和转正义基因株系的REC和MDA含量增加,但野生型增加的幅度更大(图7),表明过表达*LeNLP4*减轻了低温引起的膜质过氧化膜结构的破坏和PSII的光抑制(图6),提高了番茄耐低温能力。

CBF转录因子是一类受低温诱导的反式作用因子,它可以与CRT/DRE顺式作用元件特异性结合,激活启动子中具有这一调控元件的冷诱导和脱水诱导基因的表达,诱导抗寒及抗旱的发生(Stocking等1997)。Ma等(2013)研究表明,过表达*SINAC1*可能通过上调*CBF1*的表达提高了番茄植株耐低温胁迫能力。过表达株系中*SICBF1*的表达高于野生型(图4-B),我们推测*LeNLP4*转录因子可能通过上调*SICBF1*的表达激活了下游冷响应基因,进而提高过表达番茄*LeNLP4*转录因子植株的低温抗性。

总之,*LeNLP4*的过表达提高了番茄幼苗的鲜重和叶绿素含量、APX和SOD活性,降低了REC和MDA含量、 $H_2O_2$ 及 $O_2^-$ 积累,降低低温胁迫对光合机构的破坏及ROS水平,有助于提高番茄的抗低温

能力,但*LeNLP4*与*CBF1*之间是否存在互作,尚有待进一步研究。

### 参考文献

- 赵世杰, 史国安, 董新纯(2002). 植物生理学实验指导. 北京: 中国农业科学技术出版社, 130~131
- Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M (1997). Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of *cup-shaped cotyledon* mutant. *Plant Cell*, 9: 841~857
- Bartoli CG, Pastori GM, Foyer CH (2000). Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiol*, 123: 335~343
- Carabelli M, Sessa G, Baima S, Morelli G, Ruberti I (1993). The *Arabidopsis Athb-2* and *-4* genes are strongly induced by far-red-rich light. *Plant J*, 4: 469~479
- Delessert C, Kazan K, Wilson IW, Van Der Straeten D, Manners J, Dennis ES, Dolferus R (2005). The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in *Arabidopsis*. *Plant J*, 43: 745~757
- Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF, Scott IM (1997). Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol Plantarum*, 100: 241~254
- Han QQ, Zhang JH, Li HX, Luo ZD, Ziaf K, Ouyang B, Wang TT, Ye ZB (2012). Identification and expression pattern of one stress-responsive NAC gene from *Solanum lycopersicum*. *Mol Biol Rep*, 39: 1713~1720
- Hao YJ, Wei W, Song QX, Chen HW, Zhang YQ, Wang F, Zou HF, Lei G, Tian AG, Zhang WK et al (2011). Soybean NAC transcription factors promote abiotic stress tolerance and lateral root formation in transgenic plants. *Plant J*, 68: 302~313
- He XJ, Mu RL, Cao WH, Zhang ZG, Zhang JS, Chen SY (2005). At-NAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. *Plant J*, 44: 903~916
- Hu HH, Dai MQ, Yao JL, Xiao BZ, Li XH, Zhang QF, Xiong LZ (2006). Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 12987~12992
- Hu HH, You J, Fang YJ, Zhu XY, Qi ZY, Xiong LZ (2008). Characterization of transcription factor gene *SNAC2* conferring cold and salt tolerance in rice. *Plant Mol Biol*, 67: 169~181
- Kim SY, Kim SG, Kim YS, Seo PJ, Bae M, Yoon HK, Park CM (2007). Exploring membrane-associated NAC transcription factors in *Arabidopsis*: implications for membrane biology in genome regulation. *Nucleic Acids Res*, 35: 203~213
- Kim YS, Kim SG, Park JE, Park HY, Lim MH, Chua NH, Park CM (2006). A membrane-bound NAC transcription factor regulates cell division in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18: 3132~3144
- Kooten OV, Snel JFH (1990). The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth Res*, 25: 147~150
- Lata C, Prasad M (2011). Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *J Exp Bot*, 62: 4731~4748



- Ma NN, Zuo YQ, Liang XQ, Yin B, Wang GD, Meng QW (2013). The multiple stress-responsive transcription factor *SINAC1* improves the chilling tolerance of tomato. *Physiol Plant*, 149: 474~486
- Mao XG, Zhang HY, Qian XY, Li A, Zhao GY, Jing RL (2012). TaNAC2, a NAC-type wheat transcription factor conferring enhanced multiple abiotic stress tolerances in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 63: 2933~2946
- Mishra NP, Mishra PK, Singhal GS (1993). Changes in the activities of anti-oxidant enzyme during exposure of intact wheat leaves to strong visible light at different temperatures in the presence of protein synthesis inhibitors. *Plant Physiol*, 102: 903~910
- Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K (2009). Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiol*, 149: 88~95
- Nogueira FS, Schlögl PS, Camargo SR, Fernandez JH, De Rosa VE Jr, Pompermayer P, Arruda P (2005). SsNAC23, a member of the NAC domain protein family, is associated with cold, herbivory and water stress in sugarcane. *Plant Sci*, 169: 93~106
- Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL, Skriver K (2005). NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends Plant Sci*, 10: 79~87
- Ooka H, Satoh K, Doi K, Nagata T, Otomo Y, Murakami K, Matsubara K, Osato N, Kawai J, Carninci P et al (2003). Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res*, 10: 239~247
- Ramegowda V, Senthil-Kumar M, Nataraja KN, Reddy MK, Mysore KS, Udayakumar M (2012). Expression of a finger millet transcription factor, *EcNAC1*, in tobacco confers abiotic stress-tolerance. *PLoS One*, 7: e40397
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol*, 6: 410~417
- Souer E, van Houwelingen 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 primordia boundaries. *Cell*, 85: 159~170
- Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF (1997). *Arabidopsis thaliana CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a *cis*-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 1035~1040
- Sun YL, Li F, Sui N, Sun XL, Zhao SJ, Meng QW (2010). The increase in unsaturation of fatty acids of phosphatidylglycerol in thylakoid membrane enhanced salt tolerance in tomato. *Photosynthetica*, 48: 400~408
- Tran LS, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, Maruyama K, Fujita M, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004). 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. *Plant Cell*, 16: 2481~2498
- Yabuta Y, Motoki T, Yoshimura K, Takeda T, Ishikawa T, Shigeoka S (2002). Thylakoid membrane-bound ascorbate peroxidase is a limiting factor of antioxidative systems under photo-oxidative stress. *Plant J*, 32: 915~925
- Yoo SY, Kim Y, Kim SY, Lee JS, Ahn JH (2007). Control of flowering time and cold response by a NAC-domain protein in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 2: e642