

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00913

ANAC092 参与调控花药发育的功能初探

李捷^{1,2,3}, 陈旭^{2,3}, 罗莉琼^{2,3}, 于晶¹, 明凤^{2,3}

1. 上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234;
2. 复旦大学生命科学学院植物科学研究所, 上海 200433;
3. 复旦大学遗传工程国家重点实验室, 上海 200433

摘要: NAC 家族转录因子是高等植物特有的一类转录因子, 功能广泛, 这类蛋白在植物次生生长、细胞分裂、植物衰老、尤其在激素和信号途径起关键调控作用。ANAC092 已报道参与侧根发育, 并与衰老相关。为研究 ANAC092 基因在花药发育过程中的功能, 文章构建了拟南芥 ANAC092 启动子的 GUS 载体, 结合原位杂交分析结果表明, ANAC092 在花药发育过程中时序性表达, 在花药发育的 8~11 期绒毡层表达, 其中在 9~10 期的表达量达到最高值, 与 AMS(Aborted microspores)的表达时期有重合。构建 ANAC092 过表达体系, 筛选出转基因纯合株系。与野生型相比, 过表达 ANAC092 转基因植株中花粉数量减少, 花粉粒的长度增加。qRT-PCR 结果表明, 过表达株系中与花粉发育相关的基因 *SPL*、*EMS1*、*DYT1*、*AMS* 的表达量上调。结合生物信息学分析表明, ANAC092 启动子序列中有 7 个 AMS 的结合位点, 因此推测 ANAC092 可能位于 AMS 的下游而参与花药发育过程。

关键词: 花药发育; 拟南芥; ANAC092; AMS

Functions of ANAC092 involved in regulation of anther development in *Arabidopsis thaliana*

LI Jie^{1,2,3}, CHEN Xu^{2,3}, LUO Li-Qiong^{2,3}, YU Jing¹, MING Feng^{2,3}

1. College of Life and Environmental Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China;
2. Institute of Plant Biology, School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China;
3. State Key Laboratory of Genetic Engineering, Fudan University, Shanghai 200433, China

Abstract: NAC family is a class of transcription factors that have been typically found in plant with various functions. This type of genes plays a key regulatory role in secondary plant growth, cell division, senescence, especially in the hormone and signaling pathways. ANAC092 was reported to function in relation to lateral root development and senescence. The promoter and *in situ* hybridization analyses showed that ANAC092 was expressed temporally in the process of anther development. The gene was expressed in tapetum at stages 8–11 of anther development and reached the highest amount at stages 9–10, which was overlapped with the expression period of AMS (Aborted microspores). In this study, we constructed

收稿日期: 2013-03-27; 修回日期: 2013-05-02

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项(编号: 2011ZX08009-001)和上海市自然科学基金项目(编号: 12ZR1402300)资助

作者简介: 李捷, 硕士, 研究方向: 植物遗传学。E-mail: lj0122@yahoo.cn

通讯作者: 于晶, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 植物系统进化、植物生态学。E-mail: yujing@shnu.edu.cn;

明凤, 博士, 副教授, 博士生导师, 研究方向: 植物非生物逆境胁迫相关基因的分离与功能的研究、花色与花调控机制的研究。E-mail: fming@fudan.edu.cn

网络出版时间: 2013-6-3 11:41:36

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130603.1141.002.html>

ANAC092 over-expression system, and identified homozygous transgenic lines. Compared with the wild type, the number of pollen grains in the transgenic line was decreased significantly, but the length of pollen grain was increased. qRT-PCR analysis showed that the expression of genes related to pollen development, e.g., *SPL*, *EMS1*, *DYT1*, and *AMS* was increased in the over-expression plants. Bioinformatics results showed that *ANAC092* promoter sequence possessed seven *AMS* binding sites. All the results showed that *ANAC092* is possibly located in the downstream of *AMS* and plays an important role in the process of pollen development.

Keywords: anther development; *Arabidopsis*; *ANAC092*; *AMS*

NAC 家族转录因子是高等植物所特有的一类转录因子, 以二聚体形式与 DNA 结合启动下游基因的表达。其命名来源于最初发现的 3 个基因——矮牵牛 (*Petunia hybrid*) *NAM* 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) *ATAF1/2* 和 *CUC2* 的首字母^[1]。近 10 多年来, 已在多种植物中发现 NAC 家族转录因子, 水稻 (*Oryza sativa* L.) 和拟南芥中已发现有 151 个^[2]和 117 个^[3] NAC 家族的成员。

NAC 转录因子具有诸多方面的功能, 如参与植物次生生长期^[4], 在细胞分裂^[5]和植株衰老^[6,7]中发挥作用, 参与激素调控和信号转导^[8,9], 矿质元素营养^[10]和农作物品质改良^[8], 植物的防御反应^[11]以及在非生物逆境中发挥作用^[12]。大量的证据表明, 在病原体侵染等生物损伤^[13]及高盐、干旱、低温、ABA 等非生物胁迫^[9,14]应答过程中, NAC 转录因子也起着激活或抑制目标基因表达的功能。

拟南芥 *ANAC092* (又被称为 *AtNAC2* 或 *ORE1*) 最早被报道参与乙烯和激素信号途径。*ANAC092* 过表达促进侧根发育, 乙烯前体 ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) 能够诱导 *ANAC092* 的表达, 侧根数目明显增多^[15]。Kim 等^[16]发现 *ANAC092* 的突变体植株生长期延长, 衰老延迟, 进一步发现 *ANAC092* 与 *EIN2* 协同作用正调控植株的衰老, 并且受 *miRNA164* 的负调控, 三者共同作用调控植株的衰老。进一步研究表明, 拟南芥 *ANAC092* 过表达体系中, 170 个基因表达上调, 其中 46% 的基因与衰老相关, 这表明 *ANAC092* 可能是通过诱导下游一些衰老相关的基因来参与调控衰老网络^[17]。

植物育性是影响产量的关键因素, 而花药的发育直接影响植物的育性和育种^[18]。高等植物的花药发育过程一般可分为 2 个阶段: 第 1 阶段是花药的

形态建成, 包括小孢子母细胞的形成和小孢子母细胞经过减数分裂形成四分体小孢子; 第 2 阶段为花粉的形成, 包括四分体小孢子的释放、小孢子有丝分裂形成花粉、花药组织衰退、花粉囊破裂以及花粉粒释放^[19]。在整个花药发育过程中有大量的基因在花药各组织中表达, 据不完全统计仅特异性表达的基因有 3 500 个^[20], 而其中 60~100 个基因为花药发育所必需, 这些必需基因中任何一个发生突变都会导致雄性不育^[21]。因此研究花药花粉特异基因的克隆、表达、调控, 对雄性不育的分子机理探讨有重要意义^[22]。

Wijeratne 等^[23]对花药发育早期的两个关键基因的突变体 *spl/nzz* 和 *ems1/exs* 进行了基因芯片研究, 发现突变体中大量的转录因子差异表达。其中 *ANAC092* 在两个突变体中的表达量都明显下降, 暗示其可能参与了花药发育通路, 因此本研究以此基因为着眼点, 构建了拟南芥 *ANAC092* 启动子的 GUS 载体, 结合原位杂交, 发现该基因在花药发育的 8~11 期绒毡层表达, 其中在 9~10 期的表达量达到最高值, 与 *AMS* 的表达时期重叠。过表达 *ANAC092* 转基因植株中花粉数量减少, 花粉粒的长度增加, 包括 *AMS* 在内的花粉发育相关的基因表达上调。结合生物信息分析, 推测 *ANAC092* 可能位于 *AMS* 的下游, 分子机理需要进一步深入研究得以揭示。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

野生型拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*): 生态型 Columbia (Col), Landsberg erecta (Ler) 由本实验室保

存, 拟南芥 *spl*、*ems1*、*ams* 突变体由复旦大学生命科学学院马红老师惠赠。

1.1.2 质粒和菌株

pSPT19 载体购自 Roche, pCR-Blunt、pCAMBIA-1304(含 CaMV 35S 组成型启动子)、融合 GUS 报告基因的 pCAMBIA1300、大肠杆菌 DH5 α 菌株及农杆菌 GV3101 菌株均由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 qRT-PCR 分析

用 TRIzol 提取拟南芥野生型植株的叶片、茎、花、根的总 RNA, 并用逆转录酶合成 cDNA 第一条链, 目的基因 *ANAC092* 和内参 *Atactin* 的 qRT-PCR 引物见表 1; 花发育相关基因 *SPL*、*EMS1*、*DYT1*、*TPD1*、*MSI*、*AMS1* 的 qRT-PCR 引物参照文献[24]。荧光染料采用 SYBR Premix Ex Taq(Perfect Real Time code : DRR041 TaKaRa 生物公司)。qRT-PCR 反应体系为 20 μ L, 包括 : 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 cDNA 8.4 μ L。采用 iCycleriQTM real-time quantitative PCR 仪(Bio-RAD), 每次实验每个样品重复 3 次用于 qRT-PCR 检测, 通过标准曲线确定目的基因与 *Atactin* 检测的线性范围, 目的基因的相对表达水平通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析。

1.2.2 启动子的克隆及载体的构建

提取拟南芥叶片的基因组 DNA, 设计带酶切位

点的引物(表 1), 利用 PCR 扩增分别克隆得到 *ANAC092* 基因起始密码子前 1 888 bp 和 1 500 bp 的启动子片段, 将目的片段克隆到改造后加入 GUS 的 pCAMBIA1300 载体中。构建好的载体测序正确后转化 GV3101, 花序法侵染拟南芥, 并筛选获得转基因株系。

1.2.3 GUS 活性的组织化学检测

拟南芥中 GUS 报告基因的表达测定参照钟晓丽等[25]方法并略有改进。将拟南芥组织浸入含 X-Gluc 的溶液中, 37 $^{\circ}$ C 保温过夜, 之后用 70%乙醇浸泡除去叶绿素, 以野生型拟南芥组织作为对照。

1.2.4 原位杂交

选取 *ANAC092* mRNA 中跨越内含子的 245 bp 的高特异性的片段为探针, 以克隆的 *ANAC092* ORF 片段为模板, 设计原位杂交探针引物(表 1), 回收克隆的目的片段, *EcoR* 和 *Xba* 双酶切后与同样双酶切的 pSPT19 载体连接。探针制备方法参照 Roche DIG RNA labeling Kit(SP6/T7)。选取尚未完全开放的拟南芥花序, 4%多聚甲醛固定, 参照 Wang 等[26]方法进行脱水包埋、切片、杂交。

1.2.5 *ANAC092* 表达载体的构建和转化

以拟南芥叶片 RNA 为模板, 设计目的基因引物 *ANAC092ORF*-F/R(表 1), 克隆得到 *ANAC092* 的 ORF 片段。目的基因扩增后, 扩增产物通过 *Hind* 和 *Pst* 双酶切后, 连接 pCRBlunt 载体构建亚克隆载体

表 1 实验所用引物(阴影部分示酶切位点)

基因名称	序列(5'→3')
<i>ANAC092</i> (qRT-PCR)	F: TCTTCCCCAAACAGCTAAGAACGA R: GGCTGGTTCCATTTCGGTTAATGTG
<i>Atactin</i> (qRT-PCR)	F: GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG R: AACGACCTTAATCTTCATGCTGC
<i>ANAC092</i> ORF	F: GTGAAGCTTATGGATTACGAGGCATCA R: CTCTGCAGAAATCCAAACGCAATC
<i>ANAC092</i> (pro1888)	F: TAGAATTCTCCGACGACCCGAGTAAT R: GGGAGCTCTTTATCCTAATAGGGTTTCT
<i>ANAC092</i> (pro1500)	F: TAGAATTCTTCCGACGACCCGAGT R: GGGAGCTCTTTATCCTAATAGGGTTTCT
<i>ANAC092</i> (原位杂交探针)	F: GGGAATTCTCGTTTAGAAGGCAAAT R: AAATCTAGATGGTCGGAGAAGCAGG
<i>HPT</i>	F: CGATTGTGTACGCCCGACAGTC R: CGATGTTAGGAGGGCGTGGATATG
<i>ANAC092</i> (RT-PCR)	F: ATGGATTACGAGGCATCA R: AAATCCAAACGCAATC
<i>Atactin</i> (RT-PCR)	F: TGGTTGGTATGGGACAAAAAG R: AGGTAATCAGTAAGGTCACGG

pCRBlunt-ANAC092。用 *Hind* 和 *Pst* 酶切后连接到载体 pHB, 构建载体经过 *Hind* 和 *Pst* 双酶切正确鉴定后, 由上海博尚生物科技有限公司进行测序。利用农杆菌转化法, 采用花序法将 pHB-ANAC092 表达载体转化拟南芥。

1.2.6 转基因植株的 PCR 鉴定

提取转基因拟南芥基因组进行潮霉素基因的检测, 潮霉素抗性基因 *HPT* 的引物, 目的基因 *ANAC092* ORF 和内参 *Atactin* 的 RT-PCR 引物序列见表 1。

1.2.7 花药的细胞学观察

将 GUS 染色后的拟南芥花序放入 FAA 固定液 (50%乙醇、0.9 mol/L 冰醋酸、3.7%甲醛) 中, 4 过夜。材料经过不同浓度乙醇脱水后进行透蜡、包埋和切片。常规脱水、透明、封片后, 在显微镜下观察^[27]。花粉活性的亚历山大染色取上午 10:00 左右刚刚露白的花朵, 将花药置于 Alexander 染色液中, 常温避光染色 30 min~1 h, 压片, 显微观察。

1.2.8 花粉扫描电镜观察

取野生型和转基因植株的新鲜成熟花粉直接撒在粘有双面胶的样品托上, 真空喷镀, 置于 JEOL-JSM-6380LV 扫描电子显微镜下进行观察。

2 结果与分析

2.1 *ANAC092* 在 *spl*、*ems1* 突变体中表达量的验证

根据 Wijeratne 等^[23]芯片分析结果, *ANAC092* 基因在花药发育第 5 期的 *spl* 和 *ems1* 突变体中表达量

下调。分别选取野生型和突变体 *spl* 和 *ems1* 中长度 0.5 mm 左右花序的花药提取 RNA, 利用 qRT-PCR 分析突变体中 *ANAC092* 的表达量, 结果与芯片结果一致, 突变体 *spl* 和 *ems1* 中 *ANAC092* 的表达量与野生型相比显著性下调 (图 1A)。

2.2 *ANAC092* 基因的器官与组织水平的表达模式确定

同时分析了 *ANAC092* 基因在拟南芥中不同器官的表达情况。结果表明, *ANAC092* 基因在茎生叶中表达量最高, 在根、莲座叶、开放的花中的表达量基本一致 (图 1B)。

为进一步确定该基因的组织水平表达, 构建了启动子融合 *GUS* 基因的表达载体, 分别克隆了 *ANAC092* 启动子前 1 888 bp 和已有报道 1 500 bp^[28] 的启动子片段, 转化拟南芥, 并获得表达量高的转基因株系。在生长期中, *ANAC092* 基因主要在根和叶中表达, 但 1 888 bp 的启动子片段在根和叶中的 GUS 染色 (图 2:D~F) 要弱于 1 500 bp 的启动子片段 (图 2:A~C), 这可能是由于 1 888 bp 启动子的前 388 bp 序列中存在一定的抑制元件。对于 1 500 bp 启动子片段, 在花药中没有 GUS 染色 (图 2H), 在萼片和柱头有明显蓝色 (图 2I)。1 888 bp 启动子片段在拟南芥花序的不同发育时期内呈现时序性表达 (图 2:G, J), 即在花粉发育特定时期中有表达。进一步的切片分析表明, 在绒毡层内有明显的 GUS 显色 (图 2K)。

为了进一步确定 *ANAC092* 基因在花粉发育不同时期的表达部位, 对拟南芥花药发育不同时期进行了原位杂交分析。原位杂交结果表明 *ANAC092* 在花药的绒毡层有时序性表达, 在早期减数分裂过程

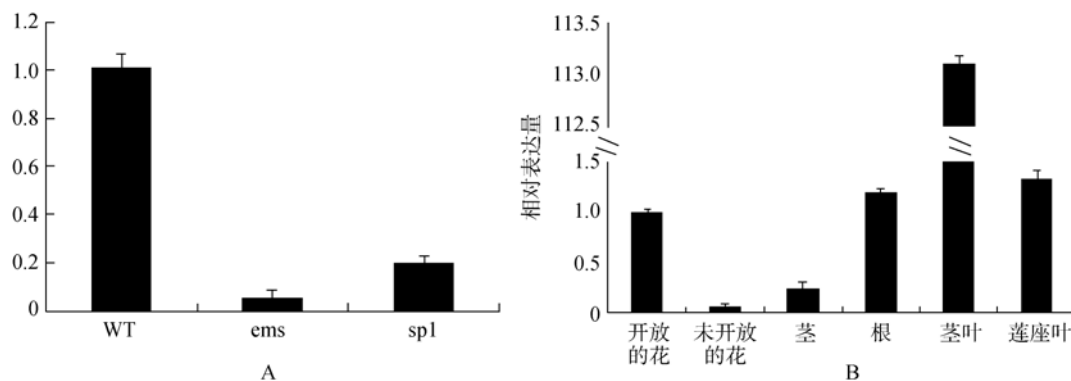


图 1 *ANAC092* 的表达量分析

A: *ANAC092* 在花药发育突变体 *ems1* 和 *spl* 中的表达量分析; B: *ANAC092* 在拟南芥不同器官中的表达量分析。

中没有明显表达(图 3A), 主要在 8~11 期表达(图 3 : B~D), 其中在 9~10 期的表达量达到最高值(图 3C), 在花粉中也有大量表达。随着花粉粒的成熟和绒毡层的降解, *ANAC092* 的表达量逐渐降低(图 3D)。

2.3 转基因株系的获得与分子及表型鉴定

为进一步研究该基因功能, 构建了 *ANAC092* 基因的过表达(组成型启动子 CaMV 35S)载体, 转化到农杆菌 GV3101, 采用花序浸染法浸染野生型拟南芥。通过潮霉素筛选, 得到 21 个抗性转基因植株, PCR 分析证明外源基因成功整合到了转基因植株的

基因组中(图 4A), 选取高表达的 22 号株系和低表达的 13 号株系继续培养, 获得 T3 植株用于后续研究。同时分析了 *anac092* 突变体, 在突变体中 *ANAC092* 的表达量较野生型降低(图 4C), 但表型和野生型没有差别, 因此未在后续研究中对其进行评价。

挑选表达量高的 22 号(OX22)和低表达量的 13 号(OX13)株系进行正常培养, 并观察生长与发育相关性状。转基因过表达株系与野生型在株高、果荚长度和果荚的不育程度没有明显的差别, 但衰老表型较野生型明显, 与先前的研究结果一致^[16](图 4B)。

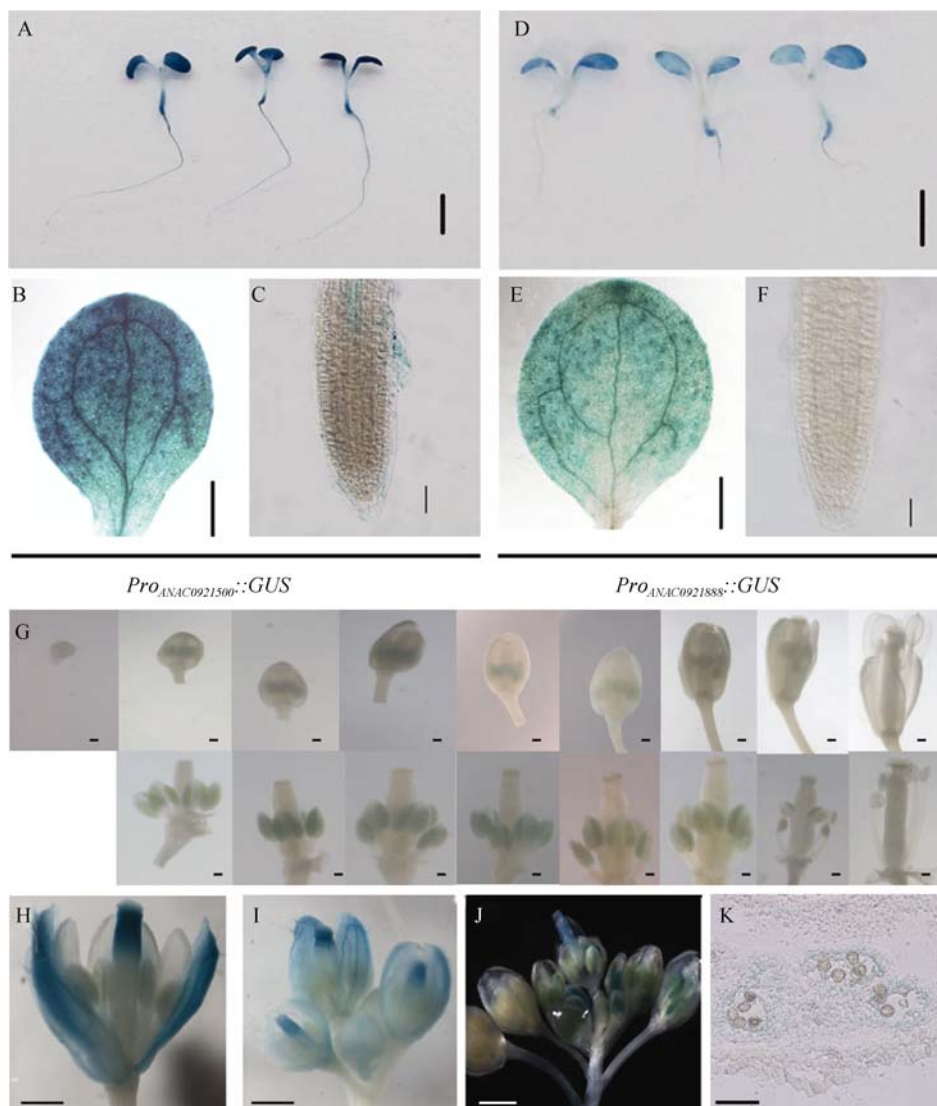


图 2 *ProANAC0921500::GUS* 和 *ProANAC0921888::GUS* 转基因株系在拟南芥不同组织中的 GUS 染色

A~C : 4 d 龄的 *ProANAC0921500::GUS* 转基因拟南芥根和叶的染色; D~F : 4 d 龄的 *ProANAC0921888::GUS* 根和叶的染色; G : 不同花发育时期 *ProANAC0921888::GUS* 的染色; H~I : *ProANAC0921500::GUS* 转基因拟南芥的染色; J~K : *ProANAC0921888::GUS* 转基因拟南芥整个花序和切片。其中 A、D 图 bar=0.5 cm; C、F、K 图 bar=20 μ m; G 图 bar=200 μ m; H、I、J 图 bar=500 μ m。

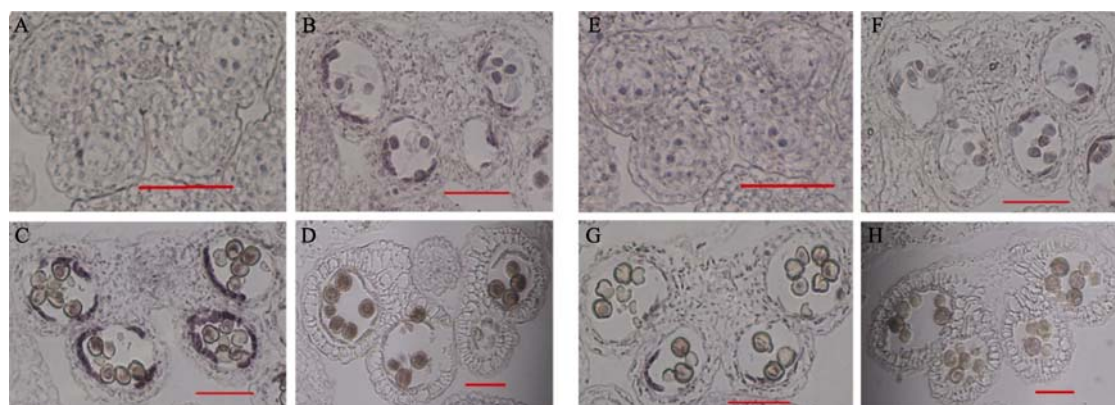


图 3 *ANAC092* 在花药发育不同时期表达的原位分析

A、E：花药发育 7 期；B、F：花药发育 8 期；C、G：花药发育 10 期；D、H：花药发育 11 期。bar=10 μm；E~H：SP6 阴性对照。



图 4 转基因株系 RT-PCR 鉴定和转基因株系表型分析

A：过表达株系 RT-PCR 鉴定。数值 1~22 为转基因株系编号，WT 为野生型拟南芥；B：转基因株系表型分析；C：*ANAC092* 突变体的 RT-PCR 鉴定。

2.4 转基因株系的花粉发育特征研究

由于 *ANAC092* 在花粉发育过程中时序性表达, 推测其参与拟南芥的花粉发育过程。通过对转基因株系 OX13、OX22 与野生型植株的花药活性进行亚历山大染色发现, 野生型花粉和转基因株系的花粉都被染成紫红色, 表明过表达 *ANAC092* 对花粉粒的活性没有影响, 但 OX13、OX22 转基因株系的花粉数量明显要少于野生型(图 5A)。通过扫描电镜的观察, 转基因株系 OX13、OX22 与野生型之间在花粉表面结构并无差异(图 5B), 但花粉粒长度有显著性的增加(图 5 : B, C)。

2.5 *ANAC092* 转基因株系和 *ams* 突变体中花药发育相关基因的表达

为进一步阐明 *ANAC092* 与花药发育的相关性, 本研究利用 qRT-PCR 方法分析了已知花药发育相关基因的表达情况。过表达株系中与花药发育相关的

基因 *SPL*、*EMS1*、*DYT1*、*AMS* 的表达量上调(图 6A), 综合芯片的结果, 推断 *ANAC092* 可能在 *SPL*、*EMS1*、*DYT1* 的下游^[29], 过表达株系中 *SPL*、*EMS1*、*DYT1* 表达量的上调可能是由于 *ANAC092* 对其的反馈作用。*MS1* 只在四分体时期的绒毡层有短暂的表达^[30], 由于取材为 *ANAC092* 较高表达的 9~11 期, 因此在花药发育后期 *MS1* 的表达量几乎为 0。*TPD1* 的表达量和野生型相比没有太大的差别。

同时, 本研究发现在 *ams* 突变体中 *ANAC092* 基因的表达量显著受到抑制, *AMS* 上游的 *DYT1* 在突变体中表达量没有显著性变化(图 6B)。基于上述结果, *ANAC092* 可能是位于 *AMS* 基因的下游。

根据 Xu 等^[31]的实验结果, *AMS* 与下游基因的结合序列为 CANNTG。分析 *ANAC092* 启动子(1 888 bp)序列, 发现有 7 个 *AMS* 可能的结合位点(图 7), 这些结果表明, *ANAC092* 可能位于 *AMS* 下游, 参与调控花药发育过程。

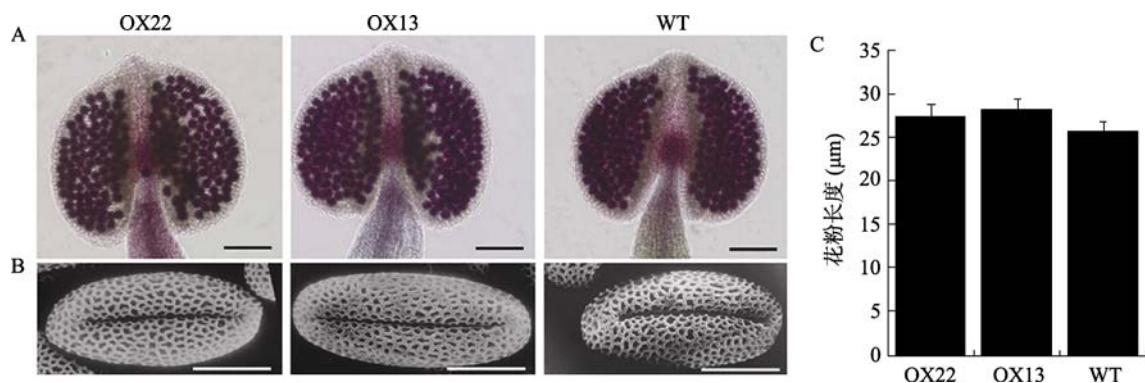


图 5 转基因株系花粉的染色观察和花粉粒长度的分析

A : 花粉粒的染色(bar=50 μm); B : 花粉粒扫描电镜图(bar=10 μm); C : 花粉粒长度统计分析。

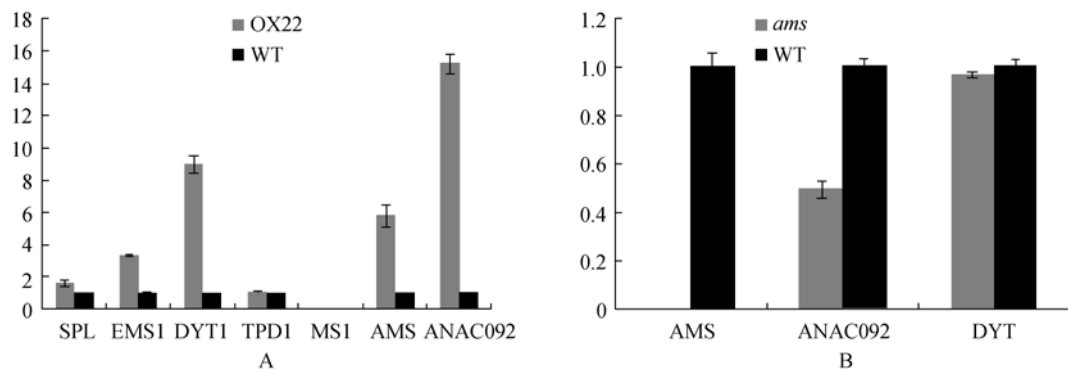


图 6 花药发育相关基因 qRT-PCR 分析

A : *ANAC092* 过表达株系 9~12 期花药发育相关基因表达; B : *ams* 突变体中 *ANAC092* 基因的表达量分析。

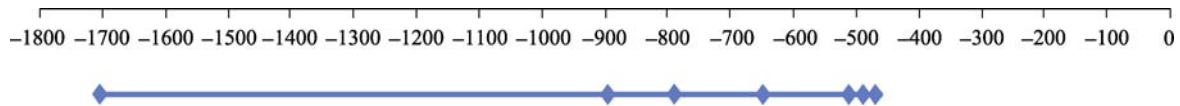


图 7 *ANAC092* 启动子(1 888 bp)序列中与 AMS 结合元件的分析

3 讨论

3.1 *ANAC092* 可能参与拟南芥花粉发育

根据芯片的结果, *ANAC092* 在 *spl* 和 *ems1* 突变体中的表达量大量下调, 本研究通过 qRT-PCR 分析 *spl* 和 *ems1* 突变体中花药发育第 5 期前后 *ANAC092* 的表达, 也证明了这个结果。本文也分析了该基因的突变体, 但并没有发现明显的花粉发育异常的表现, 可能是由于 NAC 家族基因存在功能冗余现象。利用基因工程技术获得 *ANAC092* 过表达转基因株系, 转基因株系的花粉活性没有改变, 但花粉数量明显减少。通过花粉外壁的扫描电镜结果表明, 过表达转基因株系的花粉表面无差异, 花粉粒的长度有所增加。另外在过表达株系花药发育的 9~11 期, qRT-PCR 分析了一些与花药发育相关的关键基因的表达量, 结果表明过表达株系中 *SPL*、*EMS1*、*DYT1* 和 *AMS* 的表达量和野生型相比都有所增高。因此, 我们推测 *ANAC092* 基因可能参与了花药的发育过程。

3.2 *ANAC092* 在根和花中表达的调控机制不同

本研究分别克隆了 *ANAC092* 起始密码子前 1 500 bp 和 1 888 bp 启动子序列, 发现两段序列在花和根中的表达模式不同, 在根中 1 500 bp 启动子序列 GUS 染色明显较 1 888 bp 启动子序列染色深, 暗示在根中前 388 bp 启动子序列存在抑制因子的结合序列。在花中, 1500 bp 启动子序列 GUS 染色只在花萼和柱头有明显的染色, 与 Balazadeh 等^[28]的报道一致; 对于 1 888 bp 启动子序列 GUS 染色在花药中表现出明显的时序性表达, 说明 *ANAC092* 可能参与花药发育过程。*ANAC092* 在花药中时序性表达结果通过原位杂交实验也得到进一步的证实。本研究发现不同长度的 *ANAC092* 启动子片段在营养器官和生殖器官表达不同的现象, 这种差异性值得进一步探究, 揭示启动子中不同片段所起到作用的关键元件必将具有一定的科学意义以及应用前景。

3.3 *ANAC092* 可能是 *AMS* 的下游基因

AMS 属于 bHLH 家族 MYC 亚家族转录因子^[31], 该亚家族转录因子参与细胞周期的调控^[32]。拟南芥中 *ams* 突变体绒毡层发育异常, 小孢子从四分体分离后即被降解, 不能形成成熟的花粉^[31], Xu 等^[30]对 *AMS* 如何参与花粉的发育过程进行了研究, 发现 *ams* 突变体中绒毡层发育和花粉壁形成的相关基因差异表达明显。本研究通过 qRT-PCR 分析花药发育 5~9 期 *ams* 突变体中 *ANAC092* 的表达量, 发现 *ams* 突变体中 *ANAC092* 较野生型下调近一半。启动子分析表明, *ANAC092* 启动子上面有 7 个 AMS 结合位点。从花药发育过程中的表达模式看, *ANAC092* 在花药发育过程中在绒毡层时序性表达, 在早期减数分裂过程中没有明显表达, 在 8~11 期表达, 其中在 9~10 期前后的表达量达到最高值, 随着花粉粒的成熟和绒毡层的降解 *ANAC092* 的表达量逐渐降低, 这与 *AMS*(花药发育 5-14 期表达)的表达模式有重叠。以上结果暗示, *ANAC092* 可能是 *AMS* 基因下游参与花粉壁发育途径中的一个关键因子, *ANAC092* 基因的过量表达, 导致了花粉壁形成滞后, 最后反应在花粉数减少, 长度增加影响了花粉发育的进程。但二者是否是直接的上下游关系, 还需要进一步的实验验证。

参考文献(References):

- [1] Souer E, Van Houwelingen A, Kloos D, Mol J, Koes R. 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*, 1996, 85(2): 159-170. DOI
- [2] Nuruzzaman M, Manimekalai R, Sharoni AM, Satoh K, Kondoh H, Ooka H, Kikuchi S. Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene*, 2010, 465 (1-2): 30-44. DOI
- [3] Hu RB, Qi GA, Kong YZ, Kong DJ, Gao QA, Zhou GK. Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biol*, 2010, 10: 145. DOI

- [4] Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M. Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: An analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell*, 1997, 9(6): 841–857. [DOI](#)
- [5] Zhong RQ, Richardson EA, Ye ZH. The MYB46 transcription factor is a direct target of SND1 and regulates secondary wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2007, 19(9): 2776–2792. [DOI](#)
- [6] Guo Y, Cai Z, Gan S. Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Cell Environ*, 2004, 27(5): 521–549. [DOI](#)
- [7] Guo YF, Gan SS. AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *Plant J*, 2006, 46(4): 601–612. [DOI](#)
- [8] Hu HH, Dai MQ, Yao JL, Xiao BZ, Li XH, Zhang QF, Xiong LZ. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(35): 12987–12992. [DOI](#)
- [9] Nakashima K, Tran LSP, Van Nguyen D, Fujita M, Maruyama K, Todaka D, Ito Y, Hayashi N, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *Plant J*, 2007, 51(4): 617–630. [DOI](#)
- [10] Uauy C, Distelfeld A, Fahima T, Blechl A, Dubcovsky J. A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science*, 2006, 314(5803): 1298–1301. [DOI](#)
- [11] Bu QY, Jiang HL, Li CB, Zhai QZ, Zhang J, Wu XQ, Sun JQ, Xie Q, Li CY. Role of the *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factors ANAC019 and ANAC055 in regulating jasmonic acid-signaled defense responses. *Cell Res*, 2008, 18(7): 756–767. [DOI](#)
- [12] Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, 9(4): 436–442. [DOI](#)
- [13] Selth LA, Dogra SC, Rasheed MS, Healy H, Randles JW, Rezaian MA. A NAC domain protein interacts with tomato leaf curl virus replication accessory protein and enhances viral replication. *Plant Cell*, 2005, 17(1): 311–325. [DOI](#)
- [14] Takasaki H, Maruyama K, Kidokoro S, Ito Y, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Nakashima K. The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. *Mol Genet Genomics*, 2010, 284(3): 173–183. [DOI](#)
- [15] He XJ, Mu RL, Cao WH, Zhang ZG, Zhang JS, Chen SY. AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. *Plant J*, 2005, 44(6): 903–916. [DOI](#)
- [16] Kim JH, Woo HR, Kim J, Lim PO, Lee IC, Choi SH, Hwang D, Nam HG. Trifurcate feed-forward regulation of age-dependent cell death involving *miR164* in *Arabidopsis*. *Science*, 2009, 323(5917): 1053–1057. [DOI](#)
- [17] Balazadeh S, Wu AH, Mueller-Roeber B. Salt-triggered expression of the ANAC092-dependent senescence regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav*, 2010, 5(6): 733–735. [DOI](#)
- [18] Shao SQ, Li BY, Zhang ZT, Zhou Y, Jiang J, Li XB. Expression of a cotton MADS-box gene is regulated in anther development and in response to phytohormone signaling. *J Genet Genom*, 2010, 37(12): 805–816. [DOI](#)
- [19] Goldberg RB, Beals TP, Sanders PM. Anther development: basic principles and practical applications. *Plant Cell*, 1993, 5(10): 1217–1229. [DOI](#)
- [20] Sanders PM, Bui AQ, Weterings K, McIntire KN, Hsu YC, Lee PY, Truong MT, Beals TP, Goldberg RB. Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. *Sex Plant Reprod*, 1999, 11(6): 297–322. [DOI](#)
- [21] Wilson ZA, Morroll SM, Dawson J, Swarup R, Tighe PJ. The *Arabidopsis* MALE STERILITY1 (*MS1*) gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-finger family of transcription factors. *Plant J*, 2001, 28(1): 27–39. [DOI](#)
- [22] 侯磊, 肖月华, 李先碧, 王文锋, 罗小英, 裴炎. 棉花洞 A 雄性不育系花药发育的 mRNA 差别显示. 遗传学报, 2002, 29(4): 359–363. [DOI](#)
- [23] Wijeratne AJ, Zhang W, Sun YJ, Liu WL, Albert R, Zheng ZQ, Oppenheimer DG, Zhao DZ, Ma H. Differential gene expression in *Arabidopsis* wild-type and mutant anthers: insights into anther cell differentiation and regulatory networks. *Plant J*, 2007, 52(1): 14–29. [DOI](#)
- [24] Zhang W, Sun YJ, Timofejeva L, Chen CB, Grossniklaus U, Ma H. Regulation of *Arabidopsis* tapetum development and function by *dysfunctional tapetum1* (*dyl1*) encoding a putative bHLH transcription factor. *Development*, 2006, 133(16): 3085–3095. [DOI](#)
- [25] 钟晓丽, 张丞, 崔永兰, 沈英嘉, 张永明, 杨仲南. 一个水稻高效表达启动子 Os252 的分离. 生物工程学报, 2007, 23(5): 836–840. [DOI](#)
- [26] Wang JW, Ming F, Pittman J, Han YY, Hu J, Guo B, Shen DL. Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) gene encoding a temperature-dependent chloroplast omega-3 fatty acid desaturase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340(4): 1209–1216. [DOI](#)
- [27] 李正理. 植物制片技术 (第二版). 北京: 科学出版社, 1987. [DOI](#)
- [28] Balazadeh S, Siddiqui H, Allu AD, Matallana-Ramirez LP, Caldana C, Mehrnia M, Zanol MI, Köhler B, Mueller-Roeber B. A gene regulatory network controlled by the NAC transcription factor ANAC092/AtNAC2/ORE1 during salt-promoted senescence. *Plant J*, 2010, 62(2): 250–264. [DOI](#)

- [29] Wilson ZA, Zhang DB. From *Arabidopsis* to rice: pathways in pollen development. *J Exp Bot*, 2009, 60(5): 1479–1492. [DOI](#)
- [30] Xu J, Yang CY, Yuan Z, Zhang DS, Gondwe MY, Ding ZW, Liang WQ, Zhang DB, Wilson ZA. The *ABORTED MICROSPORES* regulatory network is required for post-meiotic male reproductive development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 2010, 22(1): 91–107. [DOI](#)
- [31] Sorensen AM, Kröber S, Unte US, Huijser P, Dekker K, Saedler H. The *Arabidopsis* *ABORTED MICROSPORES (AMS)* gene encodes a MYC class transcription factor. *Plant J*, 2003, 33(2): 413–423. [DOI](#)
- [32] Collier HA, Grandori C, Tamayo P, Colbert T, Lander ES, Eisenman RN, Golub TR. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(7): 3260–3265. [DOI](#)

•综合信息•

“2013 年全国植物生物学大会”将在南京召开

为充分展示我国植物生物学研究的最新成果和进展,促进我国植物生物学研究和科研人员之间的交流与合作,定于 2013 年 10 月 8 日~11 日在南京召开“2013 年全国植物生物学大会”。会议将邀请植物生物学领域专家学者作学术研究报告,真诚邀请国内外同行参加本次大会。大会主题:植物科学促进农业创新

主办单位:

中国作物学会、中国细胞生物学学会、中国遗传学会、中国植物生理与分子生物学会、中国植物学会

承办单位:

南京农业大学、中国农科院作物科学研究所、

大会主席:

许智宏、李家洋、武维华、翟虎渠

大会副主席:

万建民、邓兴旺、孙大业、朱玉贤、朱健康、陈晓亚、张启发、周光宏、林鸿宣、薛勇彪

大会学术委员会委员:

马红、孙蒙祥、左建儒、任海云、巩志忠、刘春明、刘耀光、何祖华、何奕骥、李凝、吴平、张大兵、张立新、张宪省、宋纯鹏、杨维才、种康、唐纪良、钱前、黄三文、梁志清、黎家、薛红卫、瞿礼嘉

大会组委会主席:万建民、丁艳锋

会议地点

江苏省会议中心(钟山宾馆)(南京玄武区中山东路 307 号)

大会主要内容

1. 特邀报告

大会将邀请植物生物学领域专家学者作学术研究报告。

2. 专题报告

大会设置专题分会场,专题报告人将从大会邀请和提交的论文摘要中选择部分论文作为大会口头报告。

3. 大会设专题征集论文摘要

植物发育生物学、植物细胞功能、基因组学与全基因组关联分析、植物信号传导、生物与非生物胁迫适应机理、作物分子集合育种、表观遗传学、植物代谢与调控。

会议征稿及论文摘要截止时间:8 月 25 日。

会议注册方式:

请登陆大会网址 www.ncpb2013.net 了解详细信息,并在线注册。本次会议限额 800 人,不接受现场注册,注册以收到注册费先后为序,额满为止。