



小麦 *Ta*NAC5 基因克隆及表达分析

胡 伟, 颜 彦, 韦运谢, 铁韦韦, 侯晓婉

(中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 海口 571101)

摘 要: NAC 转录因子在植物对非生物逆境胁迫的应答过程中发挥着重要作用。该研究利用 RACE 技术从小麦中克隆了 1 个 NAC 基因 *Ta*NAC5(HQ650113.1)。序列分析显示, *Ta*NAC5 基因开放阅读框(ORF)924 bp, 编码 307 个氨基酸。多序列比对和进化树分析显示, *Ta*NAC5 基因所编码的蛋白具有 NAC 家族蛋白的保守结构域, 与玉米 *Zm*NAC5 有较近的亲缘关系。实时荧光定量 PCR 分析显示, *Ta*NAC5 基因的表达显著受渗透胁迫、低温胁迫、乙烯和双氧水诱导, 而受高盐胁迫和 ABA 抑制。研究表明, *Ta*NAC5 参与非生物逆境胁迫及相关信号分子的应答。

关键词: 小麦; NAC; 克隆; 表达

中图分类号: Q785; Q786

文献标志码: A

Clone and Expression of *Ta*NAC5 Gene in Wheat

HU Wei, YAN Yan, WEI Yunxie, TIE Weiwei, HOU Xiaowan

(Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Haikou 571101, China)

Abstract: NAC transcription factor plays an important role in the response of abiotic stresses. In the present study, we isolated a NAC gene designated *Ta*NAC5 from wheat. *Ta*NAC5 ORF is 924 bp, which encodes 307 amino acids. Comparison of amino acid sequences and phylogenetic analysis indicated that *Ta*NAC5 contains the conserved domains of NAC family and has close relationship with *Zm*NAC5. Real-time quantitative polymerase chain reaction (QPCR) assay revealed that *Ta*NAC5 expression was induced after osmotic stress, low temperature, ethylene and H₂O₂ treatments, but inhibited after salt stress and ABA treatments. These results suggested that *Ta*NAC5 participates in the response of abiotic stresses and related signaling molecules.

Key words: wheat; NAC; clone; expression

非生物逆境胁迫是影响植物生长发育以及作物产量和品质的重要环境因子^[1]。植物对逆境胁迫的应答主要是通过对胁迫信号的感知和转导, 促进胁迫相关基因的表达和蛋白质的合成, 导致生理生化变化和代谢物的合成, 从而降低胁迫所导致的伤害。这些重要的功能蛋白包括: 分子伴侣、渗透调节蛋白、离子通道蛋白、转运蛋白、保护蛋白和解毒蛋白等^[2]。这些功能蛋白的表达依赖特异的转录因子对其调控。所以, 转录因子在植物对非生物逆境胁迫

的应答过程中起着至关重要的作用^[2]。

NAC(NAM, ATAF and CUC)是植物中特有的一类转录因子。大多数 NAC 转录因子含有一个保守的 N 端 DNA 结合域、一个核定位信号和一个 C 端可变结构域^[2]。1996 年 Souer 等^[3]从矮牵牛中克隆到第一个 NAC 基因, 随后在拟南芥、水稻、小麦、大麦、马铃薯、油菜等物种中都有发现。NAC 是一个具有较多成员的家族, 在拟南芥中有 105 个成员, 在水稻中有 140 个成员。NAC 家族基因的功能

收稿日期: 2014-07-22; 修改稿收到日期: 2014-10-31

基金项目: 海南省自然科学基金(314122); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项基金(ITBB140204, 1630052014003, ITBB140206); 海南省重大科技专项(ZDZX2013023-1)

作者简介: 胡 伟(1982—), 男, 助理研究员, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: huwei2010916@126.com

主要是参与调控植物生长发育、激素响应以及生物与非生物胁迫的应答。植物对非生物逆境胁迫的应答是一个复杂的过程,涉及到转录水平、翻译水平、翻译后水平等多个层次,多种信号转导途径的调控^[4]。目前,NAC 家族基因的功能在模式植物拟南芥和水稻中的研究较为深入,但是在其它植物中对非生物逆境胁迫应答过程中的作用及机理还有待于进一步研究^[2]。虽然,小麦中多个 NAC 家族基因已被克隆,但是小麦 NAC 家族基因对非生物逆境胁迫及相关信号分子应答的机理尚不清楚^[5-6]。

本研究从小麦中克隆了一个 NAC 转录因子基因,并对其在逆境胁迫以及多种信号分子处理下的表达模式进行了探讨,为进一步研究 NAC 基因的抗逆功能及其参与的信号转导途径奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材 料

实验所用小麦品种为‘中国春’(*Triticum aestivum* L. cv. Chinese Spring),种子由中国热带农业科学院热带生物技术研究所有保存。

1.2 方 法

1.2.1 目的基因的获得 小麦种子在无菌水中发芽生长 10 d 后,提取叶片 RNA,反转录 cDNA 后进行基因克隆。搜索 DFCI 小麦数据库 EST 序列信息(<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>),发现一个 cDNA 片段与 NAC 家族基因具有较高一致性,但其 3' 端缺失。为了从小麦中克隆该基因的 cDNA 全长,根据该 EST 序列信息设计 3'-RACE 扩增引物(5'-TCAGTAATAACAGTGCCAGCAACA-3')。利用 RACE 扩增试剂盒(Clontech 公司)获得 3'-RACE 扩增片段,对 3'-RACE 扩增片段和原 EST 序列进行拼接,得到一个具有完整开放阅读框的 cDNA 序列。然后根据该 cDNA 序列设计 1 对引物(5'-GTGTTTCCTCTCTCATCGCATCA-3', 5'-TTGCCTAGAAGTGGTTCCAAGT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 扩增产物回收、连接、转化、鉴定、测序后,将该 cDNA 序列命名为 *Ta*NAC5。PCR 扩增反应程序为 94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,50 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 60 s,循环 35 次。

1.2.2 生物信息学分析 序列比对和保守结构预测利用 BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>);开放阅读框预测利用 ORFfinder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)和 GENSCAN(<http://genes.mit.edu/GENSCAN>。

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>);多序列比对利用 DNAMAN 软件;进化树构建利用 MEGA 软件。

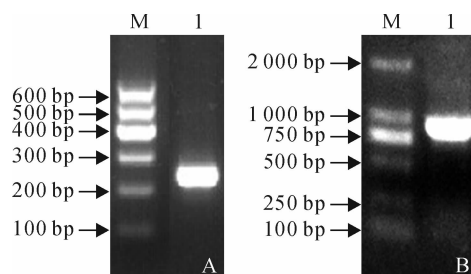
1.2.3 基因表达分析 生长 10 d 的小麦幼苗,用 20% PEG-6000、200 mmol/L NaCl、4 °C 低温、100 μmol/L ABA、100 μmol/L 乙烯、10 mmol/L H₂O₂ 分别处理(PEG-6000、NaCl、ABA、乙烯和 H₂O₂ 均购自上海生工生物工程有限公司),在处理 2、6、12、24 h 取叶片样品,利用 RNA simple Total RNA Kit(Tiagen 公司)提取叶片总 RNA。为避免基因组 DNA 污染,在 RNA 提取过程中对基因组 DNA 进行消化。利用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas 公司)将提取的总 RNA 反转录成 cDNA,反转录反应程序为 65 °C 预变性 5 min,42 °C 变性 60 min,70 °C 退火 5 min。以 cDNA 第一链为模板。

实时荧光定量 PCR 采用 SYBR Premix *Ex* Taq 试剂盒(TaRaKa 公司),按照操作说明在 Mx 3005P 荧光定量 PCR 仪(吉泰生物科技有限公司)上进行,以小麦 *Actin* 基因为内参,引物为 TaACT-INF(5'-GTCGGTGAAGGGGACTTACA-3')和 TaACTINR(5'-TTCATACAGCAGGCAAGCAC-3')。参考 TaKaRa 实时荧光定量标准说明书进行引物设计,为了保证引物的特异性,引物设计在非保守区域,PCR 产物的长度维持在 300 bp 以内,并进行测序验证。所用引物为 *Ta*NAC5F(5'-CGCCACTGCCACCTCTCA-3')和 *Ta*NAC5R(5'-GCACCACCTCACCACCCA-3'),所有引物由上海生工生物工程有限公司合成。荧光定量 PCR 反应程序为 95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 7 s,55 °C 退火 10 s,72 °C 延伸 20 s,循环 40 次。定量分析采用 2^{-ΔΔC_T} 法^[7]: $\Delta\Delta C_T = (C_{T,Target} - C_{T,Actin})_{Time\ x} - (C_{T,Target} - C_{T,Actin})_{Time\ 0}$ 。实时荧光定量 PCR 反应在同一个反应程序和反应体系下扩增目的基因和内参基因,每样品 3 个重复,并在同样反应条件下进行一次生物学重复验证。

2 结果与分析

2.1 *Ta*NAC5 基因的克隆及生物信息学分析

在 DFCI 小麦数据库中发现一个与小麦 NAC 家族基因具有较高一致性的 EST 序列,但其 3' 端缺失。因此,首先利用 RACE 技术从小麦中克隆了其 3'-cDNA 序列 246 bp(图 1,A)。将扩增的 3' 端序列与原序列拼接得到该基因 cDNA 全长序列,并利用 PCR 扩增,扩增片段为 972 bp(图 1,B),其

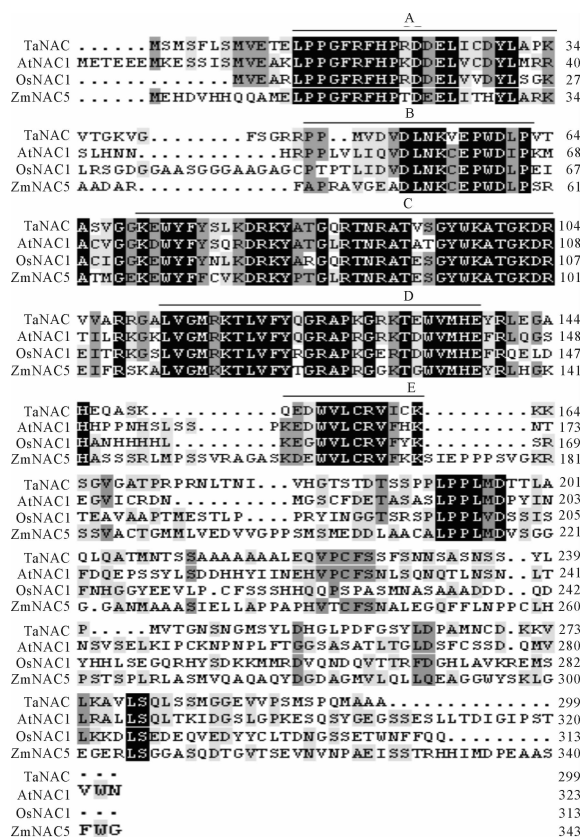
图1 *TaNAC5* 基因的克隆

A. RACE 产物电泳图; M. DNA marker; 1. 3'-RACE 产物;

B. *TaNAC5* 基因的 cDNA 全长电泳图; M. DNA marker;1. *TaNAC5* 基因的 cDNA 全长 PCR 扩增产物Fig. 1 Cloning of *TaNAC5*

A. The agarose gel electrophoresis of RACE products;

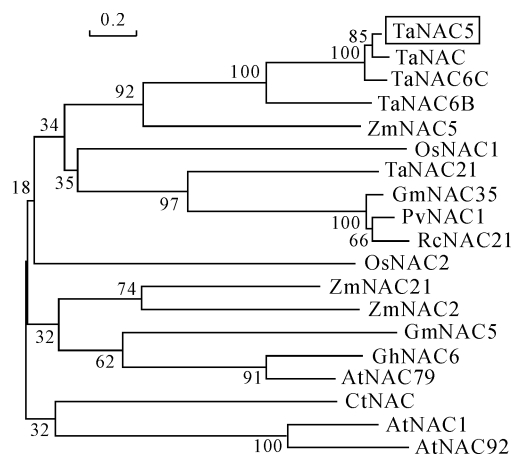
M. DNA marker; 1. 3'-RACE product; B. The agarose gel

electrophoresis of full length of *TaNAC5* cDNA; M. DNAmarker; 1. Amplification of full length of *TaNAC5* cDNA图2 *TaNAC5* 与其它物种 NAC 家族基因的氨基酸序列比对A~E 表示 NAC 家族蛋白保守区; *TaNAC*. 小麦 (AGV08300); *AtNAC1*. 拟南芥 (NP_175997); *OsNAC1*. 水稻 (BAD26221); *ZmNAC5*. 玉米 (NP_001147770)Fig. 2 Comparison of the amino acid sequences of *TaNAC5* and other NAC proteinsThe locations of the 5 highly conserved amino acid motifs (A~E) are shown. *TaNAC*. *Triticum aestivum* (AGV08300); *AtNAC1*. *Arabidopsis thaliana* (NP_175997); *OsNAC1*. *Oryza sativa* (BAD26221); *ZmNAC5*. *Zea mays* (NP_001147770)

ORF 924 bp, 编码 307 个氨基酸。保守结构域分析表明该基因编码的蛋白具有一个 NAM 结构域, 属于 NAM 亚家族。BLASTX 分析表明该基因编码的氨基酸序列与其它物种大麦 (AM500855. 1)、二穗短柄草 (XP_003577546)、粗山羊草 (EMT22193) 中 NAC 家族蛋白具有较高的一致性, 分别为 97%、83%、81%。多序列比对分析表明, 该基因编码的氨基酸序列与其它物种中 NAC 蛋白氨基酸序列具有较高一致性, 并且含有 5 个保守结构域 (图 2)。进化树分析表明, *TaNAC5* 与小麦 *TaNAC*、*TaNAC6B*、*TaNAC6C* 聚在同一枝上, 并与玉米 *ZmNAC5* 有较近的亲缘关系 (图 3), 因此将该基因命名为 *TaNAC5*。

2.2 *TaNAC5* 基因在非生物逆境胁迫下的表达分析

为了研究 *TaNAC5* 基因对非生物逆境胁迫的

图3 *TaNAC5* 与其他物种中 NAC 家族成员系统发育进化树

标尺代表碱基替换率; 分支上的数字表示 Bootstrap 验证中 1 000 次重复计算的值; *TaNAC* (AGV08300), *TaNAC6C* (AET10460), *TaNAC6B* (AET10459), *TaNAC21* (EMS52427). 小麦: *ZmNAC5* (NP_001147770), *ZmNAC21* (NP_001148231), *ZmNAC2* (ACG42560).

玉米: *OsNAC1* (BAD26221), *OsNAC2* (BAC53811). 水稻: *GmNAC35* (ACC66316), *GmNAC5* (AAX85982). 大豆: *PvNAC1* (AAK84883). 芸豆: *RcNAC21* (XP_002529954). 蓖麻: *GhNAC6* (ACI15343). 棉花: *AtNAC79* (XP_002871283), *AtNAC1* (NP_175997), *AtNAC92* (XP_002868706). 拟南芥: *CtNAC* (ACM90162). 橙子

Fig. 3 Phylogenetic tree of *TaNAC5* and NAC proteins from other species

The numbers on the branches indicate the value of bootstraps according to 1 000 replication; *TaNAC* (AGV08300), *TaNAC6C* (AET10460), *TaNAC6B* (AET10459), *TaNAC21* (EMS52427).

Triticum aestivum; *ZmNAC5* (NP_001147770), *ZmNAC21* (NP_001148231), *ZmNAC2* (ACG42560). *Zea mays*; *OsNAC1* (BAD26221), *OsNAC2* (BAC53811). *Oryza sativa*; *GmNAC35* (ACC66316), *GmNAC5* (AAX85982). *Glycine max*; *PvNAC1* (AAK84883). *Phaseolus vulgaris*; *RcNAC21* (XP_002529954). *Ricinus communis*; *GhNAC6* (ACI15343). *Gossypium hirsutum*; *AtNAC79* (XP_002871283), *AtNAC1* (NP_175997), *AtNAC92* (XP_002868706). *Arabidopsis thaliana*; *CtNAC* (ACM90162). *Citrus trifoliata*

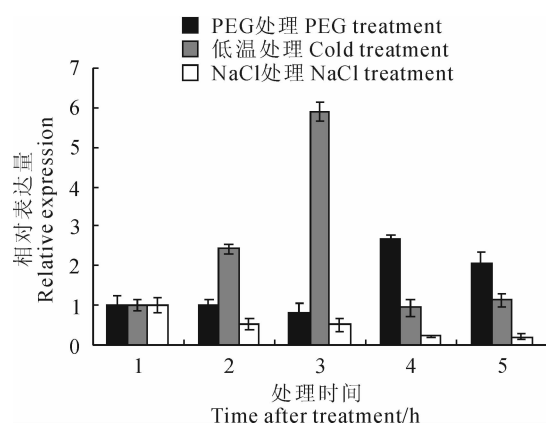


图4 *TaNAC5* 基因在不同非生物逆境胁迫下的实时定量 PCR 分析

Fig. 4 Quantitative real-time analysis of *TaNAC5* gene responding to various abiotic stresses

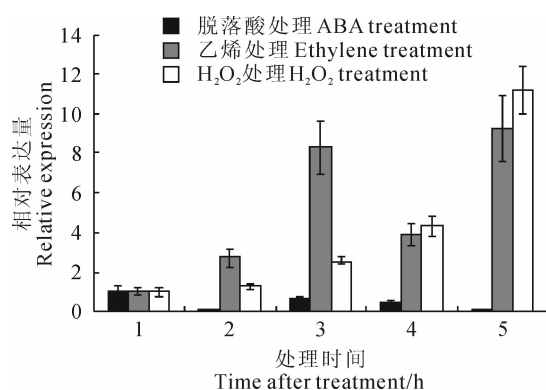


图5 *TaNAC5* 基因在不同信号分子处理下的实时定量 PCR 分析

Fig. 5 Quantitative real-time PCR analysis of *TaNAC5* gene responding to various signaling molecules treatments

响应,利用实时定量 PCR 检测 *TaNAC5* 基因在 PEG-6000、低温、NaCl 处理下的表达模式。结果(图 4)表明,PEG-6000 处理下 12 和 24 h, *TaNAC5* 基因表达受到显著诱导;低温处理下 2 和 6 h, *TaNAC5* 基因表达被显著诱导;高盐处理 2~24 h, *TaNAC5* 基因表达显著被抑制。这些结果说明,在渗透和低温胁迫下, *TaNAC5* 基因能够被诱导上调表达,而高盐胁迫抑制 *TaNAC5* 基因表达。

2.3 *TaNAC5* 基因在信号分子处理下的表达分析

为了研究信号分子对 *TaNAC5* 基因表达的调控,用 ABA、乙烯、双氧水处理小麦幼苗,利用实时荧光定量 PCR 分析检测 *TaNAC5* 基因表达。结果(图 5)表明,在 ABA 处理 2~24 h, *TaNAC5* 基因表达被显著抑制;在乙烯和双氧水处理 2~24 h, *TaNAC5* 基因表达被显著诱导。这些结果说明,

ABA 能够抑制 *TaNAC5* 基因表达,而乙烯和双氧水能够诱导 *TaNAC5* 基因表达。

3 讨论

NAC 转录因子是一个庞大的家族,在拟南芥、水稻、大豆等物种中都被报道存在超过 100 个成员。小麦遗传背景复杂(异源六倍体)、基因组大(17 Gb, 是水稻基因组的 40 倍)、基因组上重复序列多(85%),严重限制了小麦功能基因的分离和鉴定^[8]。所以,小麦中 NAC 家族基因的研究相对滞后,目前小麦中 NAC 家族成员的数目尚不明确,小麦中 NAC 家族基因的报道也非常有限。本研究从小麦中克隆了 1 个 NAC 家族基因,该基因编码的氨基酸序列具有 NAC 转录因子的基本特征,与其它物种中 NAC 家族成员具有较高的一致性,与玉米 ZmNAC5 有较近的亲缘关系。

NAC 家族基因被报道广泛地参与植物对非生物逆境胁迫的应答,并且被认为是作物抗性育种较为重要的候选基因^[9]。拟南芥 ANAC019、ANAC055 和 ANAC072 被报道能够被干旱、高盐和 ABA 诱导,过表达 ANAC019、ANAC055 和 ANAC072 能够显著增强植物对于干旱胁迫的耐受性^[10]。水稻 SNAC1 和 OsNAC6 能够被干旱、低温、高盐和 ABA 诱导,过表达 SNAC1 和 OsNAC6 能够显著提高水稻对于干旱和高盐胁迫的耐受性^[2,11-12]。这些研究结果表明 NAC 家族基因在植物对非生物逆境胁迫应答的过程中发挥着重要作用。本研究利用实时荧光定量 PCR 对小麦 *TaNAC5* 基因对非生物逆境胁迫及相关信号分子的应答的分析表明, *TaNAC5* 受渗透、低温、乙烯和双氧水诱导,受高盐胁迫和 ABA 抑制。这些结果暗示着 *TaNAC5* 可能是小麦对于干旱和低温胁迫应答的正调控因子,并且该基因的表达也受逆境胁迫相关的信号分子调控。Xia 等研究表明小麦 *TaNAC74* 能够被 PEG-6000、NaCl、低温、ABA 和乙烯诱导^[13]。另外, Tang 等研究了脱水、高盐、低温和 ABA 处理条件下小麦 *TaNAC72a*、*TaNAC74a*、*TaNAC76* 和 *TaNAC713* 基因的表达情况,结果表明不同的小麦 NAC 成员对非生物逆境胁迫及 ABA 处理具有不同的表达模式(上调或者下调)^[14]。综上,小麦 NAC 家族基因对非生物逆境胁迫及相关信号分子的应答可能具有一定的复杂性。是否这些小麦 NAC 基因能够增强植物对非生物逆境胁迫的耐受性还需要进一步的功能鉴定。乙烯信

号和双氧水信号能够诱导一系列信号转导途径,在植物对非生物逆境胁迫的应答过程中发挥着重要作用^[4]。本研究发现 *TaNAC5* 受渗透、低温、乙烯和双氧水诱导,因此可以推测,*TaNAC5* 参与小麦对

渗透胁迫和低温胁迫的应答过程可能与乙烯信号和双氧水信号有关。本研究的结果为进一步鉴定 *TaNAC5* 基因在非生物逆境胁迫中的功能及其参与的信号转导途径奠定了基础。

参考文献:

- [1] UMEZAWA T, FUJITA M, FUJITA Y, *et al.* Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, **17**(2): 113–122.
- [2] HU H, DAI M, YAO J, *et al.* Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, **103**(35): 12 987–12 992.
- [3] SOUER E, VAN HOUWELINGEN A, KLOOS D, *et al.* 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**(2): 159–170.
- [4] HIRAYAMA T, SHINOZAKI K. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future [J]. *The Plant Journal*, 2010, **61**(6): 1 041–1 052.
- [5] WANG F T, LIN R M, XU S C. Cloning and characterization of three NAC-like transcription factor genes in wheat [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2010, **29**(4): 639–645 (in Chinese).
- [6] SHAN L W, SONG P, LIU X Y, *et al.* Cloning and expression analysis of wheat stress-responsive transcription factor gene *TaSNAC1* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2012, **20**(5): 489–496 (in Chinese).
- [7] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [J]. *Method*, 2001, **25**(4): 402–408.
- [8] BRENCHEY R, SPANNAGL M, PFEIFER M, *et al.* Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing [J]. *Nature*, 2012, **491**(7 426): 705–710.
- [9] PINHEIRO G L, MARQUES C S, COSTA M D, *et al.* Complete inventory of soybean NAC transcription factors; sequence conservation and expression analysis uncover their distinct roles in stress response [J]. *Gene*, 2009, **444**(1): 10–23.
- [10] TRAN L S P, 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]. *The Plant Cell*, 2004, **16**(9): 2 481–2 498.
- [11] OHNISHI T, SUGAHARA S, YAMADA T, *et al.* *OsNAC6*, a member of the NAC gene family, is induced by various stresses in rice [J]. *Genes and Genetic Systems*, 2005, **80**(2): 135.
- [12] NAKASHIMA K, TRAN L S P, VAN NGUYEN D, *et al.* Functional analysis of a NAC-type transcription factor *OsNAC6* involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice [J]. *The Plant Journal*, 2007, **51**(4): 617–630.
- [13] XIA N, ZHANG G, LIU X Y, *et al.* Characterization of a novel wheat NAC transcription factor gene involved in defense response against stripe rust pathogen infection and abiotic stresses [J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, **37**(8): 3 703–3 712.
- [14] TANG Y, LIU M, GAO S, *et al.* Molecular characterization of novel *TaNAC7* genes in wheat and overexpression of *TaNAC72a* confers drought tolerance in tobacco [J]. *Physiologia Plantarum*, 2012, **144**(3): 210–224.