

‘云香’水仙 *NtNAC2* 基因的克隆及功能分析

肖瑶宇, 刘 洋, 李全超, 李 琳, 陈晓静*

(福建农林大学 园艺学院, 福州 350002)

摘 要: 该研究选用多花水仙新品种‘云香’为材料, 采用 RT-PCR 技术克隆得到 *NtNAC2*, 其开放阅读框为 936 bp, 编码 311 个氨基酸。生物信息学分析显示, *NtNAC2* 在 N 端含有 NAM 保守结构域, 与单子叶植物芦笋、番红花和石斛等具有较近的进化关系。实时荧光定量检测显示, 花瓣和副冠中 *NtNAC2* 基因的表达量随花器官发育逐渐上升, 衰败期达到峰值; 在 ABA、MeJA、SA、H₂O₂、50 °C、NaCl 和 PEG 胁迫处理下, 水仙根和叶中 *NtNAC2* 基因的表达量上调, 且表现出时空表达特异性。为进一步鉴定其功能, 构建植物表达载体转化烟草, 获得 10 株转基因烟草, 经半定量 RT-PCR 检测 *NtNAC2* 在转基因植株中过表达。高盐和干旱胁迫处理后转基因植株根长为野生型的 2~3 倍, 叶片失水率低于 30%, 存活率高于 60%。研究表明, ‘云香’水仙 *NtNAC2* 的过量表达提高了转基因烟草的抗旱性和耐盐性, 可作为水仙抗逆分子育种的重要候选基因。

关键词: ‘云香’水仙; NAC 转录因子; 非生物胁迫; 功能分析

中图分类号: Q785; Q786 文献标志码: A

Cloning and Functional Identification of *NtNAC2* Gene from *Narcissus tazetta* ‘Yunxiang’

XIAO Yaoyu, LIU Yang, LI Quanchao, LI Lin, CHEN Xiaojing*

(College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: In this study, we used the new species *Narcissus tazetta* ‘Yunxiang’ as the experimental material. A NAC gene was cloned by RT-PCR and named *NtNAC2*, which contains 936 bp open reading frame encoding 311 amino acids. Bioinformatics analysis showed that *NtNAC2* gene is a member of NAC family, which contains a typical NAM conserved domain located in the N-terminal region and a close evolutionary relationship grouped with monocotyledonous *Asparagus officinalis*, *Crocus sativus*, *Dendrobium catenatum*. The quantitative real-time PCR detection showed that the relative expression level of *NtNAC2* gene in petal and corona increased gradually with the development of floral organs, and reached the peak in the senescence period. The expression profiles of *NtNAC2* in root and leaf were analyzed, it was inducible under ABA, MeJA, SA, H₂O₂, 50 °C, PEG and NaCl treatments, and the spatio-temporal and tissue expression difference of root and leaf was reflected. In order to further identify its abiotic stress function, we successfully constructed the plant over-expression vector and finally obtained 10 strains of transgenic tobacco by GUS and molecular detection. The over-expression of *NtNAC2* in transgenic tobacco was detected by semi-quantitative RT-PCR. The roots of transgenic plants are 2 to 3 times that of wild type, the

收稿日期: 2018-07-21; 修改稿收到日期: 2018-10-27

基金项目: 福建省种业创新与产业化工程(K8114001B)

作者简介: 肖瑶宇(1992-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事花卉遗传育种研究。E-mail: 1029015058@qq.com

* 通信作者: 陈晓静, 教授, 博士生导师, 主要从事园艺植物遗传育种研究。E-mail: 915177245@qq.com

water loss rate of leaves is less than 30% and the survival rate is higher than 60% under the salt and drought stress. These results showed that the expression of *NtNAC2* gene can increase the tolerance of tobacco to high salt and drought, so it can be used as an effective candidate gene for *N. tazetta* resistance molecular breeding.

Key words: *Narcissus tazetta* ‘Yunxiang’; NAC transcription factor; abiotic stress; functional identification

植物经常遭受非生物胁迫,如高盐和干旱等,这极大地限制了生长发育,促使植物进化出一系列生理和分子机制以适应非生物胁迫^[1-2]。为更好地应对逆境胁迫,以转录因子作为研究目标,通过分子育种方法来提高抗逆性成为研究热点。据报道称,大约7%的植物基因组编码序列被分配到转录因子(TF),其中NAC(NAM、ATAF、CUC)转录因子是植物特有的、数量最大的转录因子家族之一^[3]。目前,已经发现在拟南芥中有117个、水稻中151个、大豆和烟草中各有152个^[4-7],这些NAC转录因子有相似的结构,N端具有高度保守的DNA结合结构域,分成5个亚结构域(A~E),C端存在可变的转录激活结构域^[8]。

大量研究表明,一些过表达的NAC基因可直接或间接调节相关应答基因的表达,增强转基因植物对干旱、高盐和低温胁迫的耐受性。如拟南芥ATAF1在干旱、高盐、ABA、MeJA、机械损伤和灰霉病菌感染诱导下表达,过表达转基因株系主根缩短,从而增强耐旱性^[9];水稻SNAC1分别转入水稻、小麦、棉花植株中,过表达转基因植株对外源ABA高度敏感,结实率增加,抗旱性和耐盐性都有所提高^[10-12];小麦TaNAC29和鹰嘴豆CarNAC6转入拟南芥,促进侧根生长,增加存活率,从而明显提高转基因植物对盐和干旱胁迫的耐受性^[13-14];小麦TaRNAC1在根中高水平表达,过表达植株在PEG处理下,生物量和谷物增多,表现出更高的脱水耐受性^[15];玫瑰花瓣中RhNAC2、RhNAC3通过调控渗透相关基因表达,进而增强耐旱性^[16-17];香蕉MusaSNAC1通过提高干旱胁迫下保卫细胞中的H₂O₂含量来诱导气孔关闭,减少水分损失,从而提高过表达株系的耐旱性^[18];南瓜CmNAC1在根、茎、叶和下胚轴等不同组织部位都表达,能响应高盐、低温、干旱、ABA和H₂O₂胁迫,过表达转基因拟南芥对高盐、干旱、低温胁迫的耐受性增加^[19];胡杨PeNAC036能被干旱、盐诱导强烈表达,过表达转基因拟南芥蒸腾速率降低,抗旱性增强^[20]。上述可见,NAC转录因子已应用于各种草本、木本植物,从而使植物对非生物胁迫的耐受性得到定向改良。

中国水仙NAC转录因子的研究报道相对较少,李梦思等^[21]克隆了‘云香’水仙*NtNAC3153*,表达分析发现*NtNAC3153*在ABA、高盐和高温胁迫下能被诱导,可能参与抗逆调控,尚缺乏生物学功能验证。

中国水仙作为十大传统名花之一,主要分布在福建漳州,冬季开花常作为年宵花卉,极具观赏价值和经济价值。近年来漳州城市化发展,传统农业格局发生变化,打破粮食和花卉轮作机制,分配给水仙种植面积不断减少,导致水仙花产量快速下滑,出口额也呈下降趋势,严重制约水仙花产业的发展。水仙多为三倍体,传统杂交育种培育抗性新品种困难^[22]。为解决这一困境,可采用分子育种发掘水仙抗逆相关NAC基因展开抗逆机理研究,提高抗逆性,使其能在干旱、滩涂、盐碱等贫瘠的荒地中正常生长,是水仙扩大种植面积、提高产量、提升品质的关键环节。‘云香’水仙是选育的新品种,对干旱和高盐具有很强的适应性^[22]。因此选择‘云香’水仙为实验材料,通过RT-PCR克隆获得一条新的NAC基因*NtNAC2*,以期通过生物信息学分析、组织及逆境胁迫下表达分析,探讨*NtNAC2*基因的生物学功能,进一步构建载体转化烟草,在高盐、干旱胁迫条件下对*NtNAC2*基因进行功能初探,旨在筛选NAC候选基因,转化中国水仙,以期为提高水仙抗逆性奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料及其处理

供试材料为水仙新品种‘云香’,2017年10月初选取大小一致的3年生种球于4℃冷藏1个月,消毒处理后水培10d,待嫩叶长至3~4cm,滤纸吸干鳞茎球和根部表面水分后,进行不同处理。外源激素处理:分别用0.1mmol/L ABA、0.1mmol/L MeJA和2mmol/L SA溶液浸泡种球根部,同时以雾喷方式喷洒嫩叶。非生物胁迫处理:分别用10mmol/L H₂O₂、20% PEG6000和250mmol/L NaCl溶液浸泡种球根部,以及置于50℃的高温光照培养箱。以未经处理(0h)为对照,处理期间在特

定时间点(1、3、6、12、24 和 48 h)分别采集根和叶。2017 年 10 月中旬,开始水培种球至开花,期间分别采集根、叶、鳞茎等组织部位,以及花器官整个发育时期的花瓣和副冠。每个处理设定 3 次重复,具体取样方式参照温秀萍等^[23]的方法,低温 -80 °C 储存。

储存的样品加入液氮研磨匀浆处理后,用 EZ-NA Plant RNA Kit(OMEGA)试剂盒提取样品总 RNA,并通过 1%琼脂糖电泳检测其完整性和纯度。用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(TaKaRa)反转录试剂盒去除基因组 DNA 污染,合成第一链 cDNA。Free dH₂O(TaKaRa)稀释浓度至 10 μmol/L,存于 -20 °C,用于后续 PCR 试验。

1.2 方法

1.2.1 *NtNAC2* 基因全长 cDNA 克隆及载体构建

基于‘云香’水仙转录组数据中 NAC 序列,经 NCBI Blastp 筛选可能与抗性相关的 NAC 序列,遵循引物设计原则,用 Primer 6.0 和 Oligo7.0 软件设计 2 条特异性引物 *NtNAC2*-F 和 *NtNAC2*-R(表 1)。以花瓣和副冠混样 cDNA 为模板参照孙申申等^[24]的方法克隆基因,将 PCR 退火温度调整为 56 °C。植物表达载体的构建采用 In-Fusion HD Cloning Kit(TaKaRa)试剂盒,根据说明书参数设计 2 条带酶切位点的引物 *NtNAC2*-V-F 和 *NtNAC2*-V-R(表 1),以测序正确的质粒 *NtNAC2* 为模板进行 RT-PCR 扩增,同时在 37 °C 条件下,以 *Spe* I 和 *Asc* I(NEB)双酶切 pMDC140 载体,电泳检测胶回收纯化后,使用 5X In-Fusion HD Enzyme Premix 连接得到 2 × 35S :: *NtNAC2*-GUS 融合

蛋白。

1.2.2 生物信息学分析 利用 VectorNTI、ProtParam、TMHMM、SignalP、NetPhos、PONDRVL3、SOPM、SWISS-MODEL、MEGA 6.0 和 Blastp 等生物学软件及在线网站对 *NtNAC2* 蛋白的基本理化性质、跨膜区、信号肽、磷酸化位点、固有无序序列位置、二级和三级结构等进行分析,以及基于氨基酸序列的同源比对和系统进化树(NJ)的构建。

1.2.3 *NtNAC2* 基因的表达分析 采用 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪进行 qRT-PCR,分析 *NtNAC2* 在不同处理下的表达规律和不同器官、不同花发育时期的表达量。设计实时荧光定量表达检测引物 *NtNAC2*-Q-F 和 *NtNAC2*-Q-R(表 1),内参选用高度保守 *NtActin*-F 和 *NtActin*-R,先进行 PCR 检测引物的准确性。qRT-PCR 扩增体系参照 SYBR® Premix Ex Taq™(TaKaRa)试剂盒参数选取 25 μL 反应体系,反应程序:预变性 95 °C 30 s;95 °C 5 s,60 °C 30 s,72 °C 20 s,36 个循环数。65~95 °C 每隔 0.5 °C 分析溶解曲线,检测引物的专一性。以 H₂O 为阴性对照,4 孔重复,采用 2^{-ΔΔC_t}法计算相对表达量,DPS V7.5 软件分析数据的单因素方差,Sigmaplot 软件绘图。

1.2.4 *NtNAC2* 基因转化烟草与分子检测 采用农杆菌介导法^[25]转化烟草,将双酶切验证及测序正确的重组质粒经冻融法转化到根癌农杆菌 GV1301 菌株中,侵染切成 1~2 cm² 烟草叶盘(组培苗龄 5~6 周)。暗培养 3 d 后置于含抗生素 10 mg/L Hyg(潮霉素)的 MS 培养基上筛选抗性芽,选取生长良好的抗性芽转入抗生素减半的 1/2 MS 生根培

表 1 引物及其序列

Table 1 The sequences of all primers used in this study

引物名称 Name	正/反向引物序列(5'→3') Forward/Reverse primer sequence	用途 Application	退火温度 Annealing temperature/°C
<i>NtNAC2</i> -F <i>NtNAC2</i> -R	CGTCTCTCTAAACTCAACCCCT CTTCAACCTTTCAGCACTTC	基因克隆 Gene cloning	56
<i>NtNAC2</i> -Q-F <i>NtNAC2</i> -Q-R	GGATGAATGGGTTGTGAGTAG TGTGTGTTGAAGAAGGGAGTCG	实时荧光定量 PCR qRT-PCR	
<i>NtActin</i> -F <i>NtActin</i> -R	TGCCCAGAAGTGCTATTCCAG GTTGACCCACCACTAAGAACAATG	实时荧光定量 PCR 内参 qRT-PCR Actin	60
<i>NtNAC2</i> -V-F <i>NtNAC2</i> -V-R	CGACTCTAGAA <u>CTAGT</u> CGTCTCTCTAAACTCAACCCCT TAGAGTCGAGG <u>CGCGCC</u> TTC AACCTTTCAGCACTTC	表达载体构建 Construction of vector	
<i>TbActin</i> -F <i>TbActin</i> -R	CTATTCTCCGCTTTGGACTTGGCA ACCTGCTGGAAGGTGCTGAGGGAA	半定量 PCR 内参 RT-PCR Actin	

注:下划线为酶切位点

Note: Underlined sequences are the enzyme digest sites

培养基诱导生根,约 50 d 后进行炼苗移栽。选用 TransDirect Plant Tissue PCR Kit(TRAN)试剂盒提取抗性烟草植株 DNA,用于 PCR 检测,获得的阳性植株幼叶用 GUS 染色,并在显微镜下观察显色结果。进一步提取阳性株系总 RNA,烟草内参引物选用 *TbActin-F* 和 *TbActin-R*(表 1),RT-PCR 检测 *NtNAC2* 是否过表达。

1.2.5 烟草种子根长试验 将鉴定的 T_0 代阳性转基因烟草于 26 °C 温室中继续培养,14 h 光照/10 h 黑暗,70% 相对湿度,每隔 3 d 浇水 1 次,每 14 d 补充所需养分,直至收获 T_1 代种子,同时观察不同生长时期植株表型性状。挑选颗粒饱满的烟草种子,75% 乙醇浸泡 30 s,10% H_2O_2 震荡 10 min 消毒处理后,将转基因 T_1 代种子接种到含有 Hyg 的 1/2 MS 培养基,对照组野生型接种于 1/2 MS 培养基,培养至种子萌发。选取长势较一致的幼苗分别转移到含 10 μ mol/L ABA、150 mmol/L NaCl、150 mmol/L 甘露醇的 1/2 MS 培养基中垂直培养 7 d,以不添加任何物质的 1/2 MS 培养基为对照,每个处理均设置 3 个重复,观察和统计根系生长状况。

1.2.6 烟草的高盐和干旱胁迫处理 为进一步鉴定 *NtNAC2* 转基因烟草在非生物胁迫下的耐受性,将潮霉素筛选得到的 T_1 代幼苗移栽至直径 15 cm 花盆,营养土(泥炭土:蛭石=3:1)培养 8 周后,分别进行高盐和干旱处理,以野生型植株做对照。高盐处理之前控水 10 d,用 400 mmol/L NaCl 连续胁迫处理 4 周,每 3 d 浇灌 200 mL,统计存活率,每个株系统计 20 株。干旱胁迫处理 4 周后再复水 1 周,观测植株表型;采集苗龄 8 周的嫩叶立即称重(鲜重,FW),于 25 °C 室温自然干燥,每隔 30 min 对叶片进行称重(干重,IW),连续观测 3 h,最后在 80 °C 下完全干燥称量(完全干重,DW),按照下列公式计算叶片相对失水率。

$$RWC = \frac{IW - DW}{FW - DW} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 *NtNAC2* 基因的克隆及序列分析

采用 RT-PCR 克隆方法,以‘云香’水仙花为材料扩增 NAC 基因全长 cDNA,琼脂糖凝胶电泳检测得到长度约为 1 000 bp 的目的条带(图 1)。Vector NTI 序列分析显示,全长 1015 bp,其完整的 ORF 为 936 bp,编码 311 个氨基酸多肽,命名为 *NtNAC2*(GenBank 登录号为 MF417802)。

2.2 *NtNAC2* 蛋白生物信息学分析

生物信息学分析表明,*NtNAC2* 编码蛋白分子式为 $C_{1550}H_{2368}N_{422}O_{475}S_{21}$,分子量为 35.19 kD,等电点为 5.84,脂肪系数为 54.65,总平均亲水性为 -0.648,不稳定系数为 32.74,推测其属于亲水性稳定蛋白。无明显跨膜和信号肽现象,推测 *NtNAC2* 不是膜蛋白且为非分泌型蛋白。丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸磷酸化修饰位点数分别为 16、12、4 个,说明 *NtNAC2* 蛋白以丝氨酸修饰为主,苏氨酸或酪氨酸为辅的磷酸化修饰方式。*NtNAC2* 蛋白 C 端具有较长的无序结构序列,以非折叠形式存在。蛋白二级结构主要由 52.24% 不规则卷曲组成,还包括 21.15% α -螺旋、19.87% 延伸链、6.73% β -转角结构。同源建模预测 *NtNAC2* 蛋白三级结构,与抗性相关的水稻 SNAC1 蛋白三级结构相似,推测 *NtNAC2* 蛋白具有相似功能,参与抗逆性调控。

在 NCBI Blastp 数据库中与其他植物的 NAC 氨基酸序列进行同源比对,结果表明,NAC 蛋白氨基酸种类、长度不一致,但它们相似性较高,*NtNAC2* 同芦笋(XP_020276002.1)、葡萄(CAN80239.1)、大豆(ALA09294.1)、拟南芥(Q9FKA0.1)和‘云香’水仙(APX42143.1)的相似性分别为 70%、74%、76%、50% 和 58%。利用 DNAMAM 对 *NtNAC2* 进行多序列比对(图 2),发现 *NtNAC2* 蛋白氨基端含有 NAM 保守结构域(8~133 个氨基酸残基),由 A~E 等 5 个子域组成,表明 *NtNAC2* 是 NAC 转录因子家族新成员。系统进化树聚为两大类(图 3),*NtNAC2* 与 I 类单子叶植物芦笋(*Asparagus officinalis*)、番红花(*Crocus sativus*)、石斛(*Dendrobium catenatum*)和桃红蝴蝶兰(*Phalaenopsis equestris*)等亲缘关系近,与 II 类双子叶植物鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、黄麻(*Corchorus capsularis*)和博落回(*Macleaya cordata*)等亲缘关系相对较远,符合植物学分类结果,同时也说明 *NtNAC2* 在进化过程中存在物种差异性。

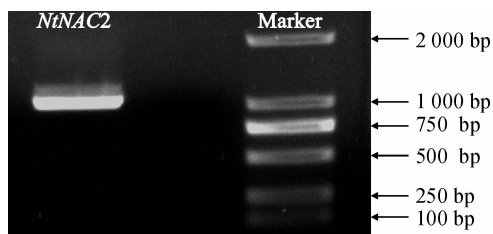
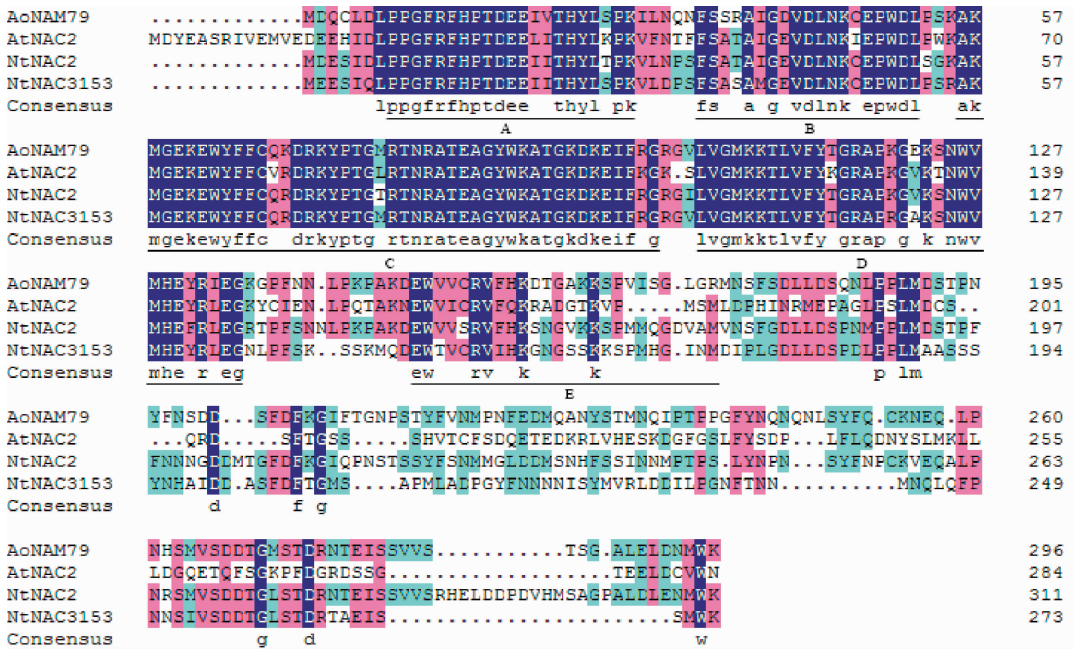


图 1 ‘云香’水仙 *NtNAC2* 基因的克隆
Fig. 1 Cloning of *NtNAC2* gene in ‘Yunxiang’

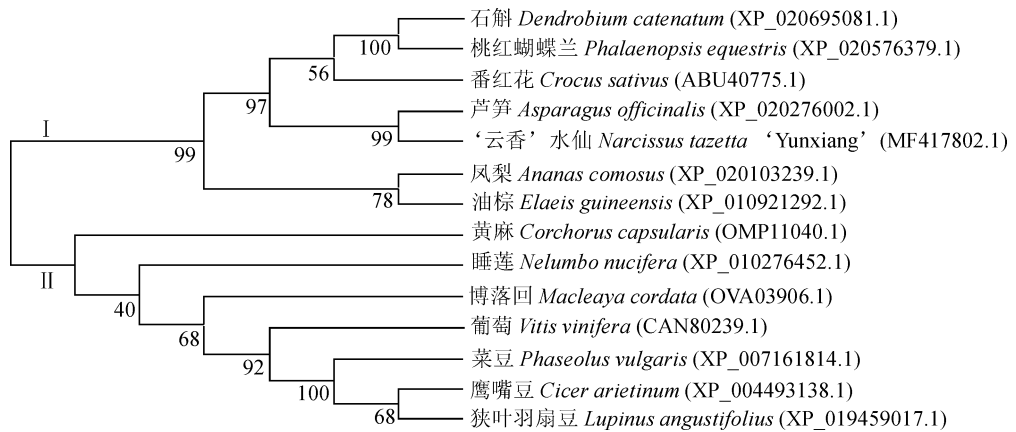


AoNAM79. 芦笋(XP_020276002. 1); AtNAC2. 拟南芥(Q9FKA0. 1); NtNAC3153. ‘云香’水仙(APX42143. 1); A~E. NAM 保守结构域

图 2 NtNAC2 与其他 NAC 氨基酸序列多重比对

AoNAM79. *Asparagus officinalis* (XP_020276002. 1); AtNAC2. *Arabidopsis thaliana* (Q9FKA0. 1); NtNAC3153. *Narcissus tazetta* ‘Yunxiang’ (APX42143. 1); A~E. NAM conserved domain

Fig. 2 Alignments of NAC domain between NtNAC2 and other NAC proteins



分支上的数字表示 Bootstrap 重复 1 000 次的可信度

图 3 NtNAC2 与其他物种的 NAC 蛋白系统进化树

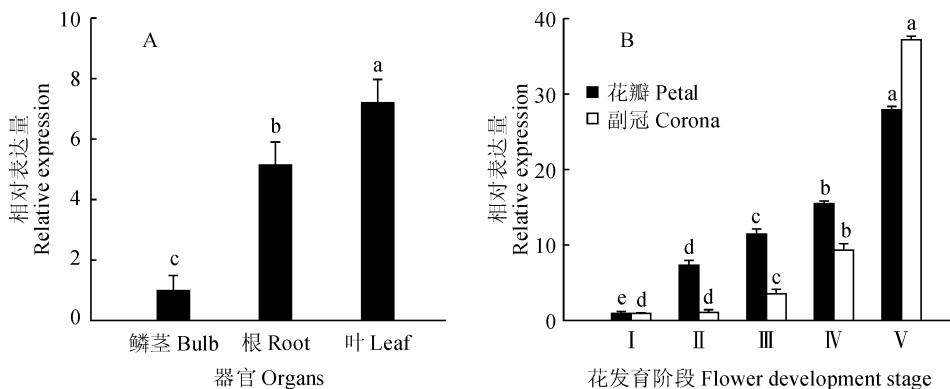
The number on the branches show the reliability of the bootstrap replication 1 000

Fig. 3 Phylogenetic relationship of NtNAC2 with other NAC members

2.3 NtNAC2 基因组织器官和时空表达分析

采用 qRT-PCR 技术分析发现 *NtNAC2* 基因在根和叶中高表达,显著高于鳞茎,具有一定的组织器官特异性(图 4,A)。花瓣和副冠是形成水仙花最主要的器官,定量分析显示, *NtNAC2* 在花发育阶段花瓣和副冠的表达量逐渐升高,衰败期达到峰值,分别为花苞期的 27.94 倍和 37.24 倍;同一发育阶

段不同器官的表达量存在差异,花苞期到盛花期花瓣的表达量高于副冠,而衰败期相反,副冠表达量高于花瓣(图 4,B)。结合水仙花开花形态学观测,发现副冠和花瓣 *NtNAC2* 的表达量与水仙花生长发育形态变化紧密相关,始花期花瓣先于副冠开放,而衰败期花瓣发生萎蔫,副冠仍然挺立(图 5),推测 *NtNAC2* 可能参与‘云香’水仙花花瓣的发育,同时



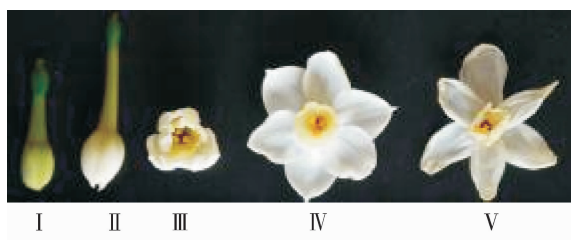
I. 花苞期; II. 花蕾期; III. 始花期; IV. 盛花期; V. 衰败期; 不同小写字母表示差异达 0.05 显著水平, 下同

图 4 ‘云香’水仙 *NtNAC2* 基因在不同器官(A)和花发育时期(B)的表达分析

I. Bud; II. Alabastrum; III. First flowering date; IV. Full flowering date; V. Last flowering date;

Different normal letters mean the significant difference at 0.05 level, the same as below

Fig. 4 Expression of *NtNAC2* in different organs (A) and flower development stages (B) of ‘Yunxiang’



花发育阶段 Flower development stage

图 5 ‘云香’水仙花发育阶段的表型

Fig. 5 Phenotypic in the development stage of ‘Yunxiang’

延缓副冠的衰老。

2.4 *NtNAC2* 基因在激素和非生物胁迫下的表达分析

为探讨 *NtNAC2* 基因是否响应激素和非生物胁迫,以未经胁迫处理(0 h)为参照,设定 *NtNAC2* 的表达量为 1, qRT-PCR 分析对照和不同处理下的转录水平。结果显示(图 6),不同胁迫处理下,同一组织叶或根中 *NtNAC2* 的表达量随处理时间的增加不同程度显著上调;同一胁迫处理时间点, *NtNAC2* 在根中的表达量高于叶片,除 50 °C 处理 6、12 和 24 h 时根中表达量低于叶片,这可能与处理方法有关,根部浸泡在处理液中,最先且最直接感受到胁迫处理。

在 ABA 诱导下,1~3 h 内 *NtNAC2* 的表达量急剧上升,1 h 时在叶片中达到峰值,为对照的 6.18 倍;3 h 时在根中达到峰值,为对照的 15.92 倍。在 MeJA 诱导下, *NtNAC2* 的表达量出现下降-上升-下降的趋势,处理 12 h 时叶片中的表达量迅速上调为对照的 4.58 倍,24 h 时根中表达量出现峰值为对照的 7.49 倍。在 SA 诱导下,3 h 时叶和根中

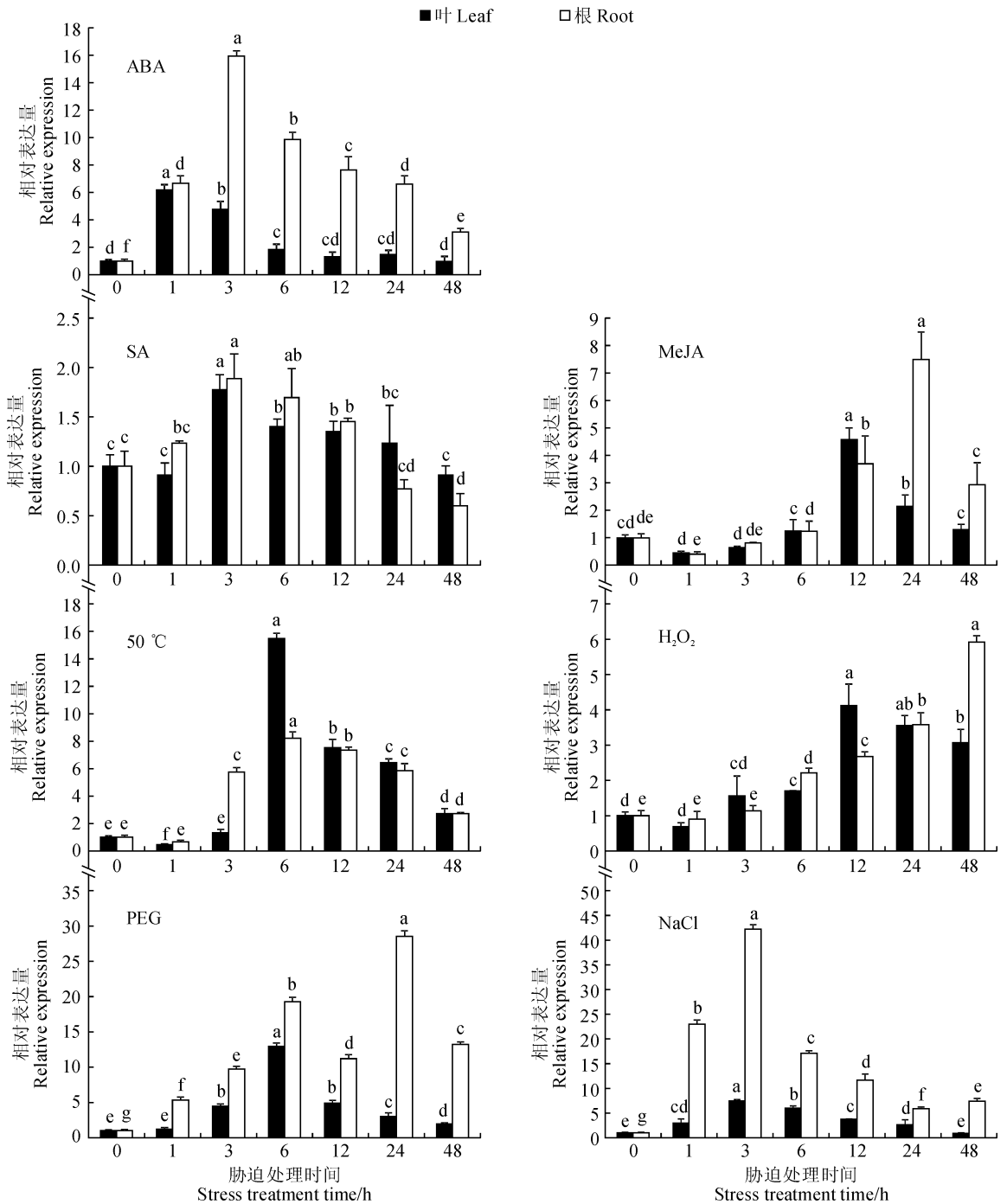
NtNAC2 的表达峰分别为对照的 1.77 倍和 1.88 倍,上调表达量与其他胁迫处理相比较小。

在 H_2O_2 胁迫下,1 h 时 *NtNAC2* 的表达量低于对照水平,12 h 时在叶片达到峰值为对照的 4.12 倍,根中的表达峰出现较迟,48 h 时上调为对照的 5.92 倍。在 50 °C 和 NaCl 胁迫下,叶片和根中 *NtNAC2* 转录水平均在同一时间点达到峰值,高温处理 6 h 时达到峰值,分别为对照的 15.48 倍和 8.21 倍;高盐胁迫 3 h 达到峰值,叶片上调 7.44 倍,而根中上调达 42.24 倍。在 PEG 胁迫下, *NtNAC2* 的转录水平均在 3 h 后出现表达峰,6 h 时叶片中最高表达量为 12.95 倍,24 h 时根中显著上调为对照的 28.51 倍。

上述表明, *NtNAC2* 在叶和根中的表达受 ABA、MeJA、 H_2O_2 、50 °C、NaCl、PEG 诱导,SA 受诱导程度较低,且具有时空和组织表达特异性,推测 *NtNAC2* 可能在‘云香’抗逆境胁迫方面发挥重要作用,并受 ABA、MeJA、SA 等激素调控。

2.5 *NtNAC2* 转基因烟草植株的鉴定

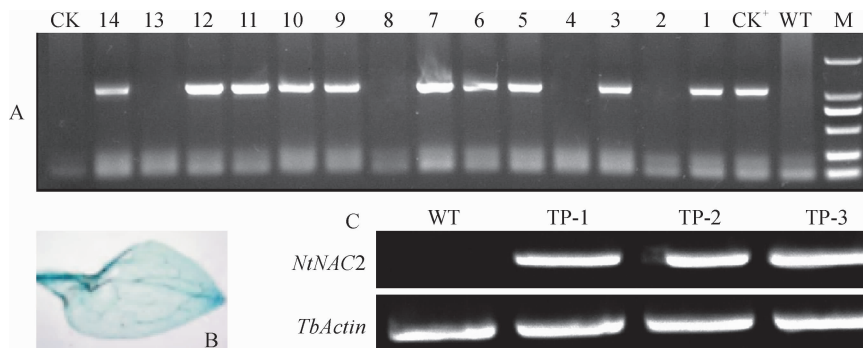
随机选择 Hyg 筛选出 14 株抗性植株,提取 DNA 稀释到同一浓度进行 PCR 扩增,有 10 个泳道扩增出约 1 000 bp 特异性条带,与目的条带重组质粒的长度一致,获得 10 株阳性株系(图 7,A)。阳性株系 GUS 染色呈现蓝色,维管束部分颜色较深(图 7,B),这表明‘云香’*NtNAC2* 基因已成功导入烟草中。选取条带最明亮的 7、11、12 株系,3 个株系重新命名为 TP-1、TP-2 和 TP-3。以野生型烟草为对照,进一步提取总 RNA 进行半定量 RT-PCR 检测,发现 *NtNAC2* 在转基因烟草中过量表达(图 8,C)。

图 6 *NtNAC2* 基因在激素和非生物胁迫下的相对表达Fig. 6 The relative expression of *NtNAC2* gene under phytohormone and abiotic stress

2.6 *NtNAC2* 过表达烟草在模拟逆境胁迫下的根长分析

选择野生型以及 3 个 (TP-1、TP-2 和 TP-3) T₁ 代转基因烟草株系, 鉴定苗期根系的抗旱性和耐盐性。根长分析显示, 在正常生长条件下 (1/2 MS), 野生型和转基因植株的根长没有显著性差异, 转基因 TP-3 株系根系最长。逆境胁迫下野生型与转基因植株根长均受到不同程度的抑制, 生长迟缓 (图

8, A)。在 ABA 处理下, 转基因株系响应外源 ABA, 其中 TP-3 根系受抑制最严重, 为野生型的 0.34 倍; 在 NaCl 和甘露醇胁迫下, 转基因株系根系发育较野生型良好, 而 TP-3 根系最长, 分别为野生型的 3.18 倍和 2.09 倍 (图 8, B)。结果表明, 过表达 *NtNAC2* 能显著提高烟草根系对 ABA 的敏感性, 以及对干旱和高盐胁迫的耐受性。

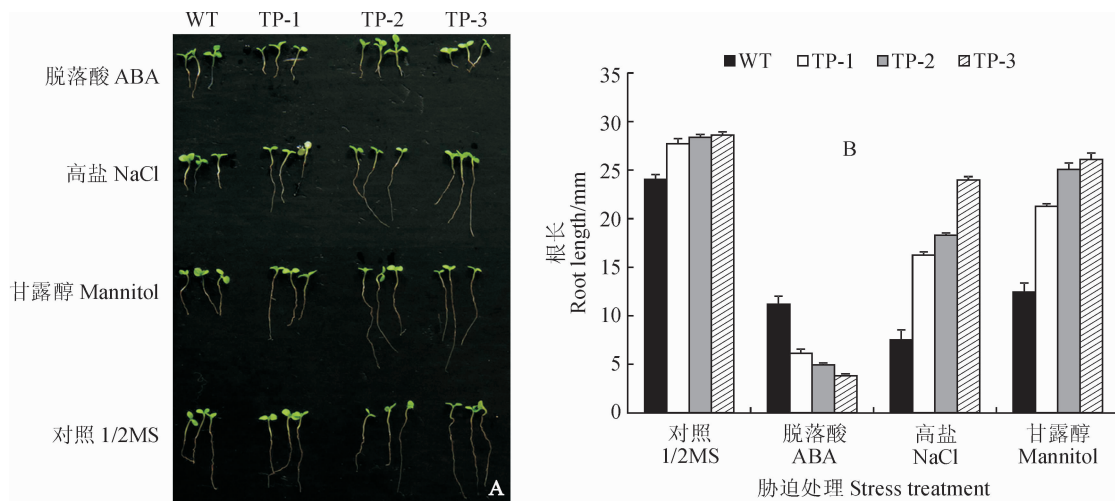


A. PCR; B. GUS 染色; C. 半定量 RT-PCR; M. DL2000; WT. 野生型; CK⁺. 重组质粒; 1~14. Hyg 筛选转基因烟草植株; CK⁻. 阴性对照(H₂O); TP-1, TP-2 和 TP-3. 代表转水仙 *NtNAC2* 基因烟草株系; 下同

图 7 转基因烟草植株的检测

A. PCR; B. GUS stain; C. Semi-quantitative RT-PCR; M. DL2000; WT. Wild tobacco; CK⁺. Recombinant plasmid; 1~14. Screening transgenic tobacco plant by Hyg; CK⁻. Negative control(H₂O); TP-1, TP-2 and TP-3 are *NtNAC2* transgenic tobacco plants. The same as below

Fig. 7 Detection of the transgenic tobacco lines



A. 不同胁迫处理 7 d 后根系的表型; B. 根长

图 8 *NtNAC2* 基因过表达烟草株系的根长分析

A. Phenotype of roots after 7 days of different stress treatments; B. Root length

Fig. 8 Assays of root length of *NtNAC2* over-express transgenic tobacco lines

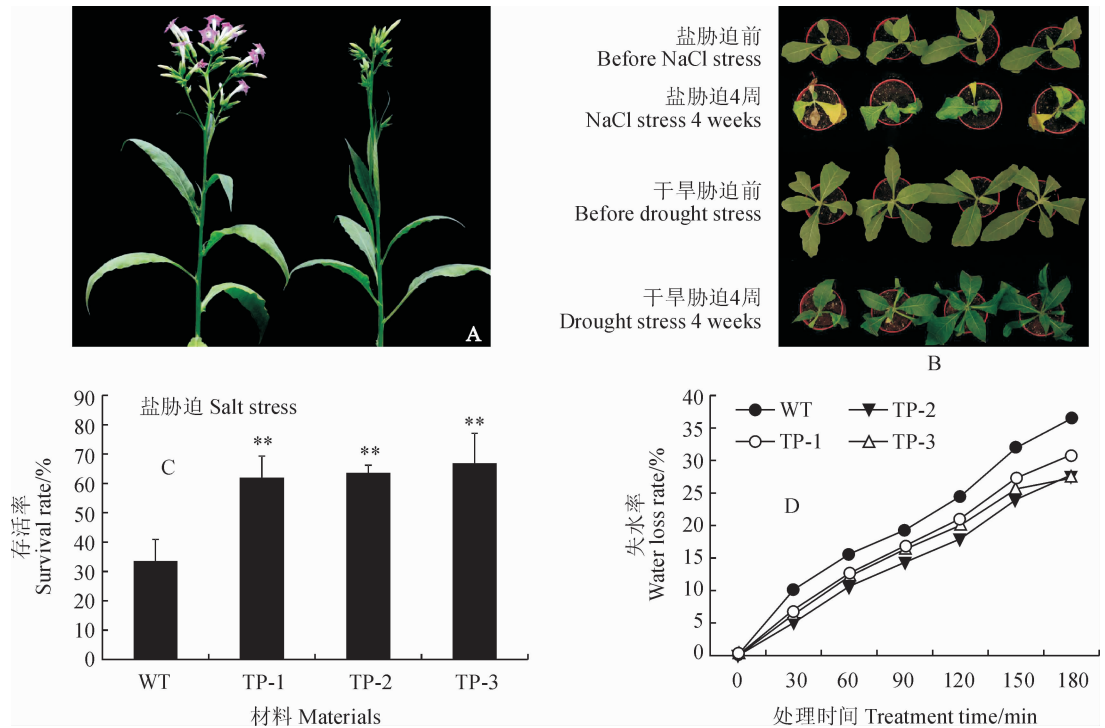
2.7 *NtNAC2* 过表达烟草在干旱和高盐胁迫下的表达分析

过表达 *NtNAC2* 转基因烟草 T₀ 代在充足的水肥条件下, 营养生长期, 野生型和转基因烟草没有发现差异; 生殖生长期, 转基因烟草花期整体提前约 1 周(图 9, A)。T₁ 代转基因烟草植株经 4 周高盐处理, 大部分植株叶片皱缩、枯黄, 野生型存活率仅为 33%, 而转基因株系存活率仍高于 60%; 干旱处理 4 周后, 土壤含水量降至 7% 左右, 植株叶片萎蔫, 转基因株系生长状态相对较好, 复水 1 周后, 野生型和转基因株系均存活, 但转基因株系长势更旺盛(图 9, B 和 C)。叶片经 3 h 脱水处理, 失水率随

测定时间延长而升高, 在 3 h 时野生型失水率达 36%, 而转基因烟草失水率低于 30%, 其叶片失水率更低、保水性能更好(图 9, D)。结果表明, 过表达 *NtNAC2* 降低逆境胁迫产生的损害, 增强了烟草对盐 and 干旱的耐受性。

3 讨论

NAC 转录因子主要参与植物生长发育、衰老、激素信号转导和逆境胁迫响应等过程^[26-27]。在本研究中, 从‘云香’水仙中克隆了 1 个新基因 *NtNAC2*, 编码的蛋白序列由 A~E 等 5 个亚结构域组成 NAM 保守结构, 其中子域 A、C、D 高度保守, 而



A. 植株开花表型;B. 干旱和高盐胁迫处理后的植株表型;C. 盐胁迫后存活率;D. 叶片失水率;

WT. 野生型;TP. 过表达转基因株系; * * 表示转基因株系与野生型相比的极显著性差异

图 9 *NtNAC2* 过表达烟草株系在盐和干旱胁迫下耐受性分析

A. Phenotype of plant flowering;B. Phenotype of plants under stress treatment;C. Survival rate after salt stress;

D. Leaf water loss rate

WT. Wild tobacco;TP. Over-expression of transgenic lines; Asterisks indicated the significant difference from WT

Fig. 9 Tolerance analysis of *NtNAC2* over-express lines under salt and drought stress

子域 B、E 相对变化,符合典型 NAC 转录因子的特点^[7-8],由此推断 *NtNAC2* 是 NAC 转录因子家族的新成员。一些研究表明,序列相似性高的 NAC 可能具有相同的生物学功能,多序列比对 *NtNAC2* 与抗逆胁迫相关的‘云香’水仙 *NtNAC3153*、拟南芥 *AtNAC2* 相似性达 55%,其中‘云香’水仙 *NtNAC3153* 能被 ABA、高盐和高温等诱导^[21];拟南芥 *AtNAC2* 在根和花中高水平表达,能被 ABA、高盐诱导上调表达,过表达促进转基因拟南芥侧根发育,从而提高耐盐性^[28],推测 *NtNAC2* 可能也具有与之相似的生物学功能。

为了进一步证明上述推测,对‘云香’水仙进行外源激素和非生物胁迫处理,发现叶和根中 *NtNAC2* 转录水平受 ABA、MeJA、SA、 H_2O_2 、50 °C、NaCl 和 PEG 胁迫诱导上调表达,且具有时空和组织表达特异性。这类似于其他抗逆境胁迫相关 NAC 基因在叶和根中的表达特性。如,小麦 *TaNAC29* 经 ABA、 H_2O_2 、NaCl、PEG 胁迫处理后,叶和根中差异表达及上调^[13,29];紫花苜蓿 *MsNAC2*、*MsNAC3* 在 ABA、4 °C、PEG 和 NaCl 胁迫处理下

也表现出叶、根组织特异性且诱导表达^[30-31];野生大豆 *GsNAC20* 在 4 °C、干旱、盐胁迫下根和叶中转录水平差异显著^[32]。上述 NAC 转录因子基因均已被证实为逆境响应调控基因,由此表明 *NtNAC2* 可能参与逆境响应,并可能受激素调控。

由于中国水仙遗传转化存在周期长的问题,故选择生长周期较短的模式植物烟草作为遗传转化受体,快速鉴定 *NtNAC2* 在干旱和盐胁迫下的耐受性。植物的根系主要用来吸收水分和养分,提高根系的抗旱性能更合理的分配水分,减少干旱造成的损害,提高植物在非生物胁迫下的存活率^[33]。模拟逆境胁迫幼苗根系,外源 ABA、NaCl 和甘露醇抑制了烟草植株根系伸长,高盐和干旱胁迫苗龄 4 周烟草,植株叶片枯黄萎蔫,但相较于野生型的根长和表型,*NtNAC2* 过表达烟草根长明显更长,叶片长势佳、失水率低,植株存活率高,抗旱和耐盐性明显提高。这一结果与众多的研究保持一致,如,水稻 *OsNAC045*^[34]、水稻 *OsNAC063*^[35]、小麦 *TaNAC47*^[36]、陆地棉 *GhSNAC3*^[37]、烟草 *NtNAC2*^[38] 过表达促进了转基因植物的根系发育,表型性状优良,

提高了对干旱、盐胁迫的耐受性。此外,正常生长条件下,*NtNAC2* 过表达烟草花期提前 1 周,与小麦 *TaNAC2*、陆地棉 *GhNAC79* 过表达转基因拟南芥植株花期提前 3~5 d 类似^[39-40],该现象也与 *NtNAC2* 在花瓣和副冠中时空表达分析一致,可能参与调控烟草花发育过程,是否参与调控‘云香’水仙花期,仍有待进一步试验研究。

参考文献:

- [1] NAKASHIMA K, TAKASAKAI H, MIZOI J, *et al.* NAC transcription factors in plant abiotic stress responses [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, **1819**(2): 97-103.
- [2] NURUZZAMAN H, SHARONI A M, KIKUCHI S. Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, **4**: 248.
- [3] UDVARDI M K, KAKAR K, WANDREY M, *et al.* Legume transcription factors: global regulators of plant development and response to the environment[J]. *Plant Physiology*, 2007, **144** (2): 538-549.
- [4] RUSHTON P J, BOKOWIEC M T, HAN S, *et al.* Tobacco transcription factors: novel insights into transcriptional regulation in the solanaceae[J]. *Plant Physiology*, 2008, **147** (1): 280-295.
- [5] NURUZZAMAN M, MANIMEKALAI R, SHARONI A M, *et al.* Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice[J]. *Gene*, 2010, **465** (1-2): 30-44.
- [6] LE D T, NISHIYAMA R, WATANABE Y, *et al.* Genome-wide survey and expression analysis of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress[J]. *DNA Research*, 2011, **18** (4): 263-276.
- [7] PURANIK S, SAHU P P, SRIVASTAVA P S, *et al.* NAC proteins: regulation and role in stress tolerance[J]. *Trends in Plant Science*, 2012, **17** (6): 369-381.
- [8] OOKA H, SATOH K, DOI K, *et al.* Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana* [J]. *DNA Research*, 2003, **10** (6): 239-247.
- [9] WU Y R, DENG Z Y, LAI J B, *et al.* Dual function of *Arabidopsis* ATAF1 in abiotic and biotic stress responses[J]. *Cell Research*, 2009, **19** (11): 1 279-1 290.
- [10] 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 of the United States of America*, 2006, **103** (35): 12 987-12 992.
- [11] SAAD A S, LI X, LI H P, *et al.* A rice stress-responsive NAC gene enhances tolerance of transgenic wheat to drought and salt stresses[J]. *Plant Science*, 2013, **203-204**(35): 33-40.
- [12] LIU G Z, LI X L, JIN S X, *et al.* Overexpression of rice NAC Gene SNAC1 improves drought and salt tolerance by enhancing root development and reducing transpiration rate in transgenic cotton[J]. *Plos One*, 2014, **9** (1): e868951.
- [13] HUANG Q J, WANG Y, LI B, *et al.* TaNAC29, a NAC transcription factor from wheat, enhances salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. *BMC Plant Biology*, 2015, **15**: 268.
- [14] LIU Y M, YU X W, LIU S S, *et al.* A chickpea NAC-type transcription factor, CarNAC6, confers enhanced dehydration tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2017, **35** (1): 83-96.
- [15] CHEN D, CHAI S, MCINTYRE C L, *et al.* Overexpression of a predominantly root-expressed NAC transcription factor in wheat roots enhances root length, biomass and drought tolerance[J]. *Plant Cell Reporter*, 2018, **37** (2): 225-237.
- [16] DAI F, ZHANG C Q, JIANG X Q, *et al.* RhNAC2 and RhEX-PA4 are involved in the regulation of dehydration tolerance during the expansion of rose petals[J]. *Plant Physiology*, 2012, **160** (4): 2 064-2 082.
- [17] JIANG X Q, ZHANG C Q, LU P T, *et al.* RhNAC3, a stress-associated NAC transcription factor, has a role in dehydration tolerance through regulating osmotic stress-related genes in rose petals[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2014, **12** (1): 38-48.
- [18] NEGI S, TAK H, GANAPATHI T R. A banana NAC transcription factor (MusaSNAC1) impart drought tolerance by modulating stomatal closure and H₂O₂ content[J]. *Plant Molecular Biology*, 2018, **96** (4-5): 457-471.
- [19] CAO H S, WANG L, NAWAZ M A, *et al.* Ectopic expression of pumpkin NAC transcription factor CmNAC1 improves multiple abiotic stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, **8**: 2 052.
- [20] LU X, ZHANG X, DUAN H, *et al.* Three stress-responsive NAC transcription factors from *Populus euphratica* differentially regulate salt and drought tolerance in transgenic plants [J]. *Physiologia Plantarum*, 2018, **162** (1): 73-97.
- [21] 李梦思, 赵潇俐, 吴用, 等. ‘云香’水仙 NAC 基因克隆及表达分析[J]. 热带作物学报, 2017, **38**(2): 313-319.
- LI M S, ZHAO X L, WU Y, *et al.* Cloning and expression analysis of NAC gene from *Narcissus tazetta* var. *chinesis*

- ‘Yunxiang’[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2017, **38**(2): 313-319.
- [22] 陈晓静. 福建 3 个产地水仙的核型分析. *植物资源与环境学报* [J], 2004, **13**(4): 28-31.
CHEN X J. Analysis of karyotypes of three localities of *Narcissus tazetta* var. *chinensis* in Fujian Province[J]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2004, **13**(4): 28-31.
- [23] 温秀萍, 孙申申, 杨菲颖, 等. ‘云香’水仙 *NtWRKY2* 基因的克隆及功能分析[J]. *西北植物学报*, 2017, **37**(7): 1 255-1 262.
WEN X P, SUN S S, YANG F Y, *et al.* Cloning and function analysis of *NtWRKY2* from *Narcissus tazetta* var. ‘Yunxiang’[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2017, **37**(17): 1 255-1 262.
- [24] 孙申申, 温秀萍, 杨菲颖, 等. ‘云香’水仙 ACC 合成酶基因 *NtACS1* 的克隆及遗传转化[J]. *西北植物学报*, 2017, **37**(2): 250-257.
SUN S S, WEN X P, YANG F Y, *et al.* Molecular cloning and its transformation of ACC synthase *NtACS1* gene from *Narcissus tazetta* var. ‘Yunxiang’[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2017, **37**(2): 250-257.
- [25] 律凤霞. 根瘤农杆菌介导外源基因转化烟草体系的优化[J]. *安徽农业科学*, 2010, **38**(19): 10 065-10 066.
LÜ F X. Optimization for agrobacterium tumefaciens-mediated transformation system for exogenous genes of tobacco [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, **38**(19): 10 065-10 066.
- [26] TRAN L, 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]. *Plant Cell*, 2004, **16**(9): 2 481-2 498.
- [27] SHAO H B, WANG H Y, TANG X L. NAC transcription factors in plant multiple abiotic stress responses: progress and prospects[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, **6**: 902.
- [28] HE X J, MU R L, CAO W H, *et al.* AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development[J]. *Plant Journal*, 2010, **44**(6): 903-916.
- [29] XU Z Y, WANG C Y, XUE F, *et al.* Wheat NAC transcription factor TaNAC29 is involved in response to salt stress [J]. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2015, **96**: 356-363.
- [30] 申玉华, 徐振军, 唐立红, 等. 紫花苜蓿 NAC 类转录因子基因 MsNAC2 的克隆及其功能分析[J]. *中国农业科学*, 2015, **48**(15): 2 925-2 938.
SHEN Y H, XU Z J, TANG L H, *et al.* Cloning and function analysis of the MsNAC2 gene with NAC transcription factor from alfalfa[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, **48**(15): 2 925-2 938.
- [31] 申玉华, 李雪梅, 乔晓慧, 等. 紫花苜蓿逆境响应转录因子 MsNAC3 基因克隆及表达分析[J]. *西北植物学报*, 2017, **37**(10): 1 919-1 925.
SHEN Y H, LI X M, QIAO X H, *et al.* Cloning and expression of the NAC transcription factor gene MsNAC3 gene with NAC transcription factor from *Medicago sativa* L. [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2017, **37**(10): 1 919-1 925.
- [32] HAO Y J, WEI W, SONG Q X, *et al.* Soybean NAC transcription factors promote abiotic stress tolerance and lateral root formation in transgenic plants[J]. *Plant Journal*, 2011, **68**(2): 302-313.
- [33] 杨再强, 邱译莹, 刘朝霞, 等. 土壤水分胁迫对设施番茄根系及地上部生长的影响[J]. *生态学报*, 2016, **36**(3): 748-757.
YANG Z Q, QIU Y X, LIU Z X, *et al.* The effects of soil moisture stress on the growth of root and above-ground parts of greenhouse tomato crops[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2016, **36**(3): 748-757.
- [34] ZHENG X N, CHEN B, LU G J, *et al.* Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, **379**(4): 985-989.
- [35] YOKOTANI N, ICHIKAWA T, KONDOU Y, *et al.* Tolerance to various environmental stresses conferred by the salt-responsive rice gene ONAC063 in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Planta*, 2009, **229**(5): 1 065-1 075.
- [36] ZHANG L N, ZHANG L C, XIA C, *et al.* The novel wheat transcription factor TaNAC47 enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, **6**: 1 174.
- [37] LIU Z J, LI F, WANG L G, *et al.* Molecular characterization of a stress-induced NAC gene, GhSNAC3, from *Gossypium hirsutum*[J]. *Journal of Genetics*, 2018, **97**(2): 1-10.
- [38] XU X Y, YAO X Z, LU L T, *et al.* Overexpression of the transcription factor *NtNAC2*, confers drought tolerance in tobacco[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2018, **36**(12): 1-10.
- [39] MAO X G, ZHANG H Y, QIAN X Y, *et al.* TaNAC2, a NAC-type wheat transcription factor conferring enhanced multiple abiotic stress tolerances in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, **63**(8): 2 933-2 946.
- [40] GUO Y N, PANG C Y, JIA X Y, *et al.* An NAM domain gene, GhNAC79, improves resistance to drought stress in upland cotton[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, **8**: 1 657.

(编辑: 宋亚珍)