



网络出版日期:2019-07-09

doi:10.7606/j.issn.1004-1389.2019.08.014

网络出版地址:<http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20190708.0933.034.html>

梭梭 *HaNAC2* 的表达分析和抗逆功能鉴定

宗兴风¹, 刘栓栓¹, 刘 豪¹, 姚正培¹, 王 波¹, 任燕萍¹, 张 桦^{1,2}

(1. 新疆农业大学 农学院, 乌鲁木齐 830052; 2. 新疆农业大学 干旱区荒漠研究所, 乌鲁木齐 830052)

摘要 NAC 是植物特有的转录因子家族之一, 具有高度保守的 NAC 结构域, 在植物生长发育和胁迫应答等过程中发挥着重要的调节功能。利用 qRT-PCR 技术对梭梭 *HaNAC2* 在不同胁迫处理下的表达模式进行分析, 并通过叶盘法转化烟草, 在干旱、高温及高盐胁迫处理下对转 *HaNAC2* 基因烟草进行抗逆性分析。结果表明 *HaNAC2* 可响应模拟地表高温、模拟干旱、高盐胁迫, 以及植物生长素(IAA)、脱落酸(ABA)处理, 过表达 *HaNAC2* 的转基因烟草在干旱、高温及高盐胁迫处理下具有更强的抗旱性、耐热性和耐盐性。

关键词 NAC 转录因子; 梭梭; 表达分析; 抗逆性

中图分类号 Q786

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2019)08-1317-09

NAC(NAM, ATAF1/2, CUC2)是植物中特有的转录因子家族, 其名称来源于第一个被克隆的矮牵牛的 NAM(no apical meristem)以及随后在拟南芥中发现的 ATAF1、ATAF2 和 CUC(cup-shaped cotyledon)的首字母缩写^[1-3]。目前, 已经在拟南芥中发现 117 个 NAC 家族成员, 水稻中则发现 151 个, 它们均具有一个高度保守的 N 端 DNA 结合域, 以及一个多样化的 C 端转录调控域^[4]。研究发现 NAC 转录因子在植物多个生长发育过程中发挥重要作用, 如促进种子萌发^[5]、参与侧根的形成^[6-7]、延缓植物叶片衰老^[8]以及调控纤维素合成^[9]、次生壁生长^[10-11]等。Ei 等^[12]从水稻中克隆得到一个与调控衰老和抽穗相关的基因 *OsY37* (*Oryza sativa* Yellow37, ONAC011), 并在 *OsY37* 转基因水稻和拟南芥植株中发现 *OsY37* 是水稻生育期抽穗和衰老的正调控因子。张海娟等^[13]发现蕓菁中 *BcNAC2* 基因在嫩角果中具有较高的表达丰度, 组织原位杂交显示在胚囊中 *BcNAC2* 表达较高, 故推测该 NAC 转录因子可能与种子或胚的形成发育有关。同时, NAC 转录因子还参与植物对各种非生物与生物胁迫的应答过程, 棉花 *GhATAF1* 基因可同时响应脱落酸(ABA)、低温、盐胁迫及黄萎病菌的诱导, 过表达 *GhATAF1* 不仅可以增强棉花对

盐胁迫的耐受性还会增加棉株对黄萎病菌和灰霉病菌的易感性^[14]。大麦 NAC 转录因子 *HvNAC6* 可以通过外源 ABA 处理增强野生型植株对于活体营养病原体白粉病的抗性^[15]。三七 (*Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen) 转录因子 *PnNAC1* 可响应茉莉酸甲酯、乙烯利、水杨酸和过氧化氢几种逆境相关信号分子, 并参与三七对茄腐镰刀菌和人参链格孢的防卫反应^[16]。

梭梭 [*Haloxylon ammodendron* (C. A. Mey.) Bunge] 是重要的荒漠建群种, 在长期不断适应极端气候条件的生长进化过程中, 产生了极强的抗干旱、抗高温、抗严寒、耐盐碱等特性^[17], 形成了其独特的抗逆分子机制。因此, 研究梭梭 NAC 转录因子对分析梭梭抗逆分子机制和选育优良抗逆材料及荒漠化治理具有重要意义。植物生态适应性分子机制研究与应用前期通过梭梭干旱胁迫后转录组测序结果, 克隆得到梭梭 *HaNAC2* 基因(登录号为 KU534094), 其编码的 *HaNAC2* 蛋白定位于细胞核中, 同源分析结果显示 *HaNAC2* 属于 XND I 亚组, 且 *HaNAC2* 启动子包含多个与干旱诱导相关的 MYB 结合位点与逆境胁迫响应元件, 说明该基因可能受到干旱、温度和盐等非生物胁迫的诱导^[18-19]。本试验在此基础上, 在不同非生物胁迫下分析 *HaNAC2* 基

收稿日期:2019-03-12 修回日期:2019-03-25

基金项目:国家自然科学基金(31760214)。

第一作者:宗兴风,女,硕士研究生,从事梭梭生态适应性研究。E-mail:582526923@qq.com

通信作者:张 桦,女,教授,主要从事植物生态适应性分子机制研究与应用。E-mail:hazelzhang@163.com

因的表达模式，并在干旱、高温和盐胁迫下对 *HaNAC2* 转基因烟草的抗逆性进行分析，为进一步了解梭梭 NAC 转录因子在植物抵御逆境胁迫中的作用机制提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 试验所用的梭梭种子采自于新疆吉木萨尔县野生梭梭，烟草为普通烟草。

1.1.2 主要试剂 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、 $10\times Taq$ Buffer、2/15K marker、T₄DNA 连接酶、植物基因组 DNA 提取试剂盒均购于北京全式金生物公司；Trizol 试剂购于天根生化科技有限公司；SYBR Premix 荧光定量 PCR 试剂盒购于 life 公司；*Nco* I、*Spe* I 限制性内切酶及反转录试剂盒均购于 TaKaRa 公司；琼脂糖凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购于天根公司。共生培

养基：MS 培养基；筛选培养基：MS 培养基 + Kan (250 mg/L) + Cef (500 mg/L)；生根培养基：MS 培养基 + Cef (500 mg/L)。

1.1.3 菌株与质粒 大肠杆菌 *DH5α* 感受态细胞、pEASY-T1 Simple 克隆载体购于北京全式金生物公司；农杆菌菌株 *EHA105* 和 pCAMBIA 1304 均为新疆农业大学农学院植物生物技术实验室保存。

1.1.4 引物设计与合成 根据已知的 *HaNAC2* 基因 555 bp 的 ORF 序列，用 Primer 5.0 设计梭梭 *HaNAC2* 荧光定量引物和 18S rRNA、*HaACT7* 内参基因^[20] 引物用于实时荧光定量 PCR，两端加有 *Nco* I 和 *Spe* I 酶切位点的特异性引物 *HaNAC2*-1304-F/R 和潮霉素引物 HPT - F/R 用于构建植物表达载体与转基因烟草阳性检测。引物合成与测序均由新疆昆泰瑞生物技术有限公司完成。引物序列如表 1 所示。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物名称 Primer name	引物序列 (5'→3') Primer sequence	用途 Application
<i>HaNAC2</i> -F	GTTTGGGTATTGGAAAAGGAAGG	荧光定量引物 Realtime fluorescence quantitative primer
<i>HaNAC2</i> -R	CGACAAGGGCATACTCATACATG	
18SrRNA-F	CTCTGCCGTTGCTCTGATGAT	内参基因引物 Reference gene primer
18SrRNA-R	CCTTGGATGTGGTAGCCGTTTC	
<i>HaACT7</i> -F	TTGAACCCCAAGGCTAACAGAG	内参基因引物 Reference gene primer
<i>HaACT7</i> -R	ACGACCAGCAAGATCCAAACGG	
<i>HaNAC2</i> -1304-F	CATGCC <u>ATGG</u> AATTCCCTAAATC	基因特异性引物 Specificity primer
<i>HaNAC2</i> -1304-R	<u>CACTAG</u> TGTCAACTGATGGCCC	
HPT - F	CGATTGTGTACGCCGACAGTC	潮霉素抗性基因引物 Hygromycin resistance gene primer
HPT - R	CGATGTAGGAGGGCGTGGATATG	

注：CCATGG *Nco* I 酶切位点；ACTAGT *Spe* I 酶切位点。

Note: CCATGG *Nco* I restriction site; ACTAGT *Spe* I restriction site.

1.2 试验方法

1.2.1 胁迫处理 模拟地表高温胁迫：选用正常生长的 1 a 生梭梭幼苗与同化枝约 10 cm 的梭梭幼苗分别进行不同处理。对 1 a 生梭梭幼苗进行模拟地表高温胁迫，用加热线在梭梭幼苗接触土壤处控温进行高温胁迫，以 30 °C 为对照，分别在 40 °C 和 55 °C 高温胁迫 24 h 后恢复 30 °C，胁迫 0 h、2 h、12 h、24 h 和恢复 30 °C 后第 3 天、第 6 天、第 15 天时取样；模拟干旱胁迫、高盐胁迫及植物生长素 (IAA)、脱落酸 (ABA) 处理：将同化枝约 10 cm 的梭梭幼苗的根系分别浸没于质量分数为 20% PEG6000 溶液、200 mmol/L NaCl 溶液、

20 μmol/L IAA 溶液及 100 μmol/L ABA 溶液中，25 °C 分别处理 0 h、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h 时取梭梭同化枝。取样后液氮速冻，-80 °C 保存。

1.2.2 pCAMBIA1304- *HaNAC2* 植物表达载体构建 以 *HaNAC2* 基因的克隆质粒为模板，用设计好的带酶切位点引物 *HaNAC2*-1304-F/R 进行 PCR，胶回收后与 pEASY-T1 Simple 连接，转化大肠杆菌感受态细胞，挑取阳性克隆，待测序正确后，扩大培养提取质粒。用 *Nco* I 和 *Spe* I 限制酶分别对该目的基因质粒和 pCAMBIA1304 载体质粒进行双酶切，切胶回收酶切产物，将 *HaNAC2* 目的片段与 pCAMBIA1304 载体片段

用 T₄ DNA 连接酶连接,转化 *DH5α* 大肠杆菌感受态细胞,转化后的菌液涂布在含有 Kan 抗生素的 LB 固体培养基上,经菌液 PCR 鉴定和双酶切鉴定后的阳性克隆送新疆昆泰瑞公司测序。

1.2.3 农杆菌介导法转化烟草获得阳性植株
取 *EHA105* 农杆菌菌液在含 Rif 的 YEB 固体培养基上划线活化,挑取单菌落扩大培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 时,用预冷的 CaCl₂ 制备农杆菌感受态。利用热激法将 pCAMBIA1304-*HaNAC2* 重组质粒转入农杆菌感受态细胞中,转化后的菌液涂布于含有 50 μg/mL Kan 和 50 μg/mL Rif 的 YEB 平板上,28 ℃ 倒置培养 24~36 h。挑取生长出的单菌落至 1 mL 含有 50 μg/mL Kan 和 50 μg/mL Rif 的 YEB 液体培养基,28 ℃ 震荡培养后菌液 PCR 鉴定筛选出阳性菌落。

经阳性鉴定的农杆菌进行根癌农杆菌培养,通过农杆菌侵染转化预培养的烟草叶片,置于共生培养基上 28 ℃ 避光条件下共培养 2 d。之后转移到筛选培养基上,25 ℃ 光照条件下进行筛选培养,待烟草不定芽长出后,小心切下小芽继续放在筛选培养基中进行继续培养。待不定芽长到 4 cm 以上或 5 片叶时,将烟草从筛选培养基转移到烟草生根培养基上进行生根培养。当转基因烟草幼苗根系长大健全后,进行炼苗移栽。获得 T₀ 代转基因烟草植株,提取基因组 DNA,以 *HaNAC2-1304-F/R* 特异性引物和 HPT -F/R 潮霉素引物进行 PCR,筛选出 T₀ 代阳性转基因烟草植株。

1.2.4 转基因烟草阳性植株的筛选与表达分析
收获 T₁ 代转基因烟草种子,种植于土中,提取基因组 DNA 和总 RNA,DNA 继续采用“1.2.3”的方法进行 PCR 鉴定阳性植株,将总 RNA 反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板,用 *HaNAC2-F/R* 和 *HaACT7-F/R* 引物进行半定量 PCR,分析 T₁ 代植株中 *HaNAC2* 基因的表达情况。

1.2.5 胁迫处理后表型观察
用野生型烟草与“1.2.3”和“1.2.4”中鉴定的 *HaNAC2* 转基因烟草植株种子进行正常条件下与模拟干旱条件下的发芽试验,分别将野生型与 *HaNAC2* 转基因烟草种子点在铺有滤纸的培养皿中进行发芽培养,每个株系 100 粒种子。正常条件下发芽的对照组用蒸馏水保持培养皿中的滤纸湿润,模拟干旱的处理组每天用质量分数为 20% PEG6000 保持培养皿中的滤纸湿润,观察统计每天的发芽率,3 个

生物学重复。

挑选正常生长至 6 周龄大小长势均一的野生型和 *HaNAC2* 转基因烟草幼苗,进行浇足水后不再浇水的自然干旱胁迫,观察烟草植株和根系表型变化;取相同部位大小均一的野生型和 *HaNAC2* 转基因烟草叶片,于 48 ℃ 光照培养箱中进行高温胁迫处理,观察烟草叶片表型变化并统计叶片失水率情况;将长势均一的野生型和 *HaNAC2* 转基因烟草幼苗根系浸于 250 mmol/L NaCl 溶液中进行盐胁迫处理,观察胁迫后烟草植株表型变化。

1.2.6 生理指标测定
取野生型和 *HaNAC2* 转基因烟草幼苗叶片,在质量分数为 20% PEG6000 溶液和 48 ℃ 光照培养箱中进行模拟干旱与高温胁迫处理,观察胁迫后野生型和 *HaNAC2* 转基因烟草叶片表型变化。分别在胁迫 0 h、6 h、12 h、24 h 后取其叶片,以 0 h 为未胁迫对照,参考李合生^[21]的酸性茚三酮法和蒽酮法测定脯氨酸和可溶性糖的质量分数,进行 3 个生物学重复。

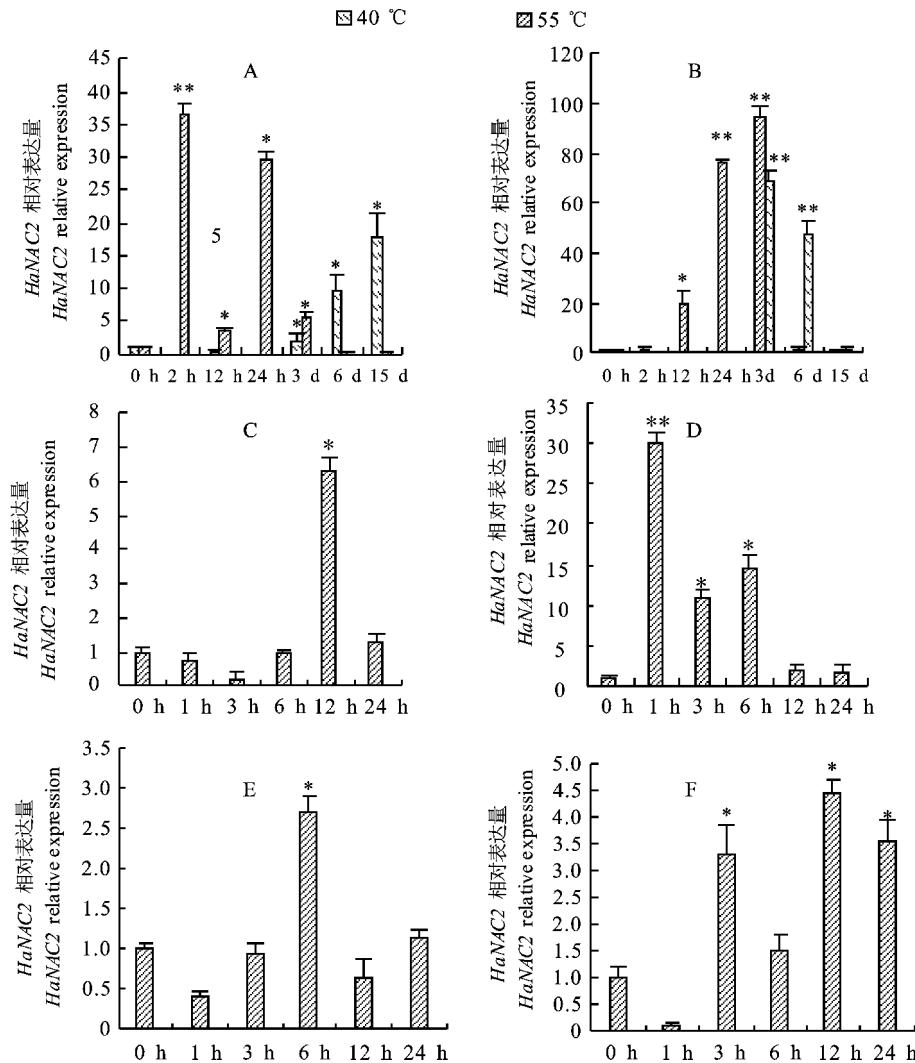
2 结果与分析

2.1 实时荧光定量 PCR 分析 *HaNAC2* 表达模式

实时荧光定量 PCR 分析梭梭 *HaNAC2* 基因在模拟地表高温胁迫、质量分数为 20% PEG6000 溶液模拟干旱胁迫、200 mmol/L NaCl 高盐胁迫、20 μmol/L IAA 及 100 μmol/L ABA 处理下的表达模式。在根中 40 ℃ 的胁迫 24 h 无明显表达,在恢复 30 ℃ 后 *HaNAC2* 的表达量在第 3 天开始上调,15 d 达到最大;55 ℃ 胁迫 2 h 达到最大,在恢复 30 ℃ 第 6 天到胁迫前水平,根中 *HaNAC2* 对 55 ℃ 的地表高温响应更迅速(图 1-A)。在同化枝中 40 ℃ 和 55 ℃ 胁迫后 *HaNAC2* 的表达量在胁迫后恢复第 3 天达到最大值,之后表达量下调又恢复到胁迫前水平,同化枝中 *HaNAC2* 对 40 ℃ 的地表高温响应更迅速(图 1-B)。在质量分数为 20% PEG6000 溶液模拟干旱胁迫下,随着胁迫时间的增加, *HaNAC2* 在胁迫 12 h 时表达量达到最大,之后恢复到胁迫前水平(图 1-C);在 200 mmol/L NaCl 溶液的高盐胁迫下,随着胁迫时间的增加, *HaNAC2* 在胁迫 1 h 时表达量达到最大,之后表达量下调(图 1-D);在 20 μmol/L IAA 溶液处理下,随着处理时间的增

加, *HaNAC2* 的表达量在 6 h 达到最大,之后恢复到处理前水平(图 1-E);在 100 $\mu\text{mol/L}$ ABA 溶液处理下,随着处理时间的增加, *HaNAC2* 在 1 h 表达量下调,之后表达量上调,在 12 h 达到最

大(图 1-F)。结果表明 *HaNAC2* 基因均能响应模拟地表高温胁迫、模拟干旱胁迫、高盐胁迫及 IAA、ABA 处理。



A. 模拟地表高温胁迫(根) Simulated surface heat stress(root); B. 模拟地表高温胁迫(同化枝) Simulated surface heat stress(branch); C. 模拟干旱胁迫 Simulated drought stress; D. 高盐胁迫 High salt stress; E. IAA 处理 IAA Treatment; F. ABA 处理 ABA treatment; * 代表差异达显著水平($P < 0.05$) Represents significant difference ($P < 0.05$); ** 代表差异达极显著水平($P < 0.01$) Represents extremely significant difference($P < 0.01$)

图 1 不同胁迫处理下 *HaNAC2* 的表达模式

Fig. 1 Expression pattern of *HaNAC2* under different stress treatments

2.2 植物表达载体构建及转化

为了研究梭梭 *HaNAC2* 基因在植物抵御逆境胁迫中的作用,构建 pCAMBIA1304- *HaNAC2* 植物表达载体,通过 *Nco* I 和 *Spe* I 双酶切鉴定(图 2),测序成功的重组质粒转入 *EHA105* 农杆菌中进行验证,叶盘法转化烟草叶片。

2.3 转基因烟草阳性植株筛选与表达分析

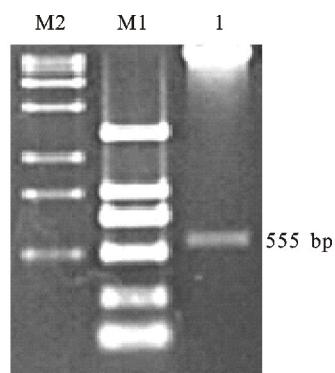
以 pCAMBIA1304- *HaNAC2* 重组质粒为阳

性对照(+),野生型烟草 DNA 和水做阴性对照(-),用特异性引物 *HaNAC2-1304-F/R* (555 bp)和潮霉素引物 *HPT-F/R*(812 bp)对 T0 代和 T1 代 *HaNAC2* 转基因烟草进行阳性筛选,结果显示 T0 代烟草中都转入了 *HaNAC2* 基因,T1 代烟草中筛选出 1、2、5、7 阳性株系(图 3)。用 *HaNAC2-F/R* 和 *HaACT7-F/R* 为引物对 4 个 T1 代阳性转基因烟草中 *HaNAC2* 的表达进行

半定量分析,结果发现4个T1代阳性转基因烟草株系中1、2、5表达量较高(图4)。

2.4 *HaNAC2* 转基因烟草胁迫后表型分析

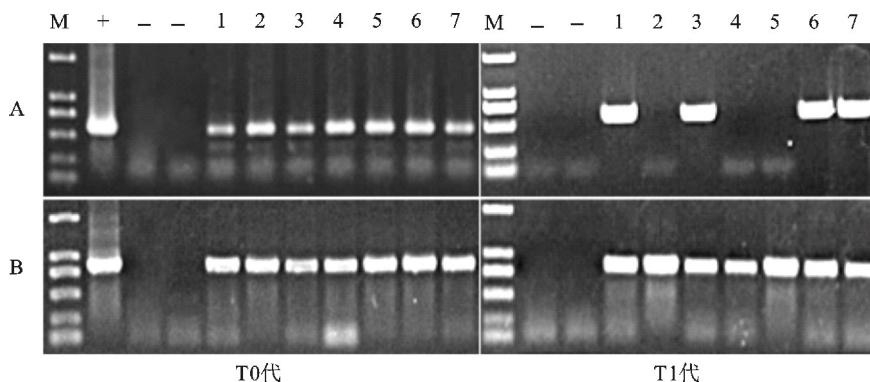
取T1代 *HaNAC2* 转基因烟草中表达量较高的L1、L2、L5株系的种子与野生型烟草种子,在正常条件下和质量分数为20%PEG6000模拟干旱胁迫下进行萌发,并统计其发芽率,结果发现在正常条件下 *HaNAC2* 转基因烟草较野生型烟草萌发时间推迟,且发芽率低于野生型烟草(图5-A),而在质量分数为20%PEG6000模拟干旱胁迫下 *HaNAC2* 转基因烟草萌发时间提前,且发芽率显著高于野生型烟草(图5-B)。6周龄的野生型烟草和 *HaNAC2* 转基因烟草幼苗在干旱胁迫8 d后野生型烟草比转基因烟草明显萎蔫(图5-C),且 *HaNAC2* 转基因烟草相比野生型烟



M1. 2K Marker; M2. 15K Marker; 1. pCAMBIA1304-*HaNAC2* 重组质粒 pCAMBIA1304- *HaNAC2* recombinant plasmid

图2 重组质粒双酶切鉴定

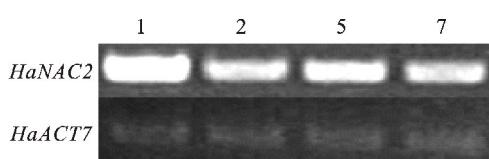
Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by double enzyme digestion



A. *HaNAC2*-1304-F/R 引物 *HaNAC2*-1304-F/R primer; B. HPT -F/R 引物 HPT -F/R primer; M. 2K Marker 2K Marker; +. 阳性对照 Positive control; -. 阴性对照 Negative control; 1~7. *HaNAC2* 转基因植株 *HaNAC2* transgenic plants

图3 *HaNAC2* 转基因烟草阳性筛选

Fig. 3 Positive screening of *HaNAC2* transgenic tobacco



1、2、5、7 编号同图3 Numbers 1,2,5 and 7 are the same as Fig. 3

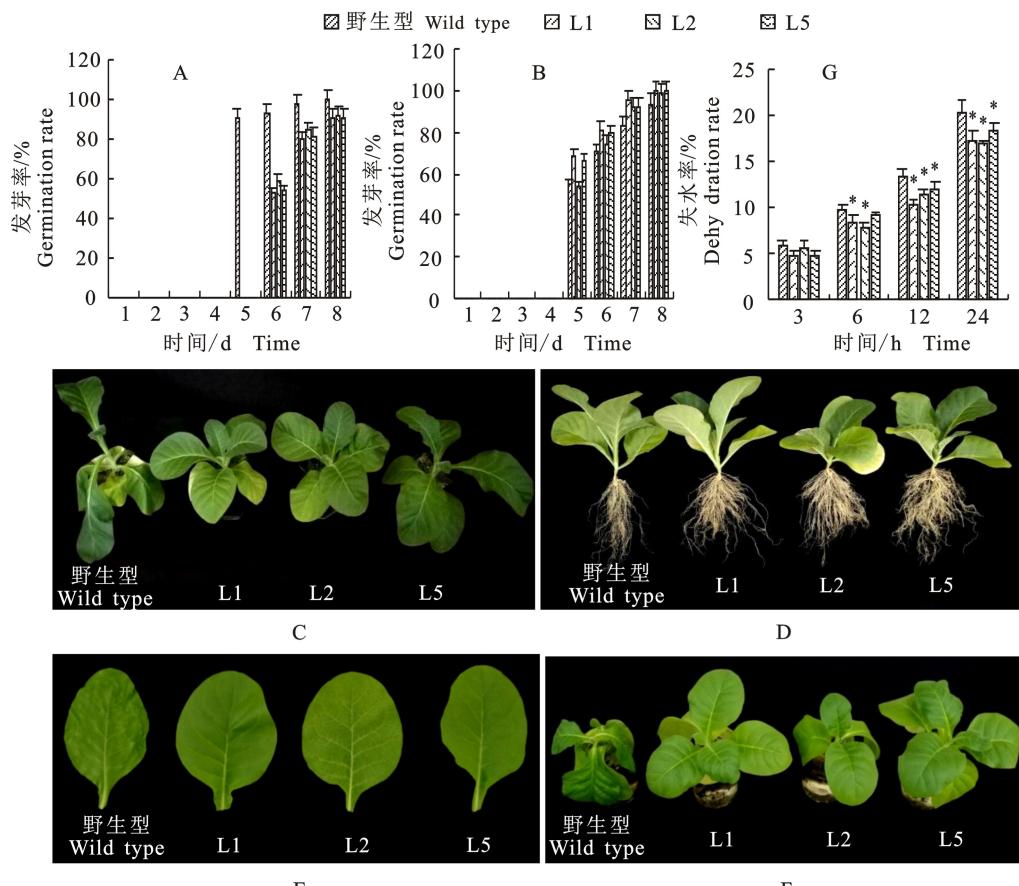
图4 *HaNAC2* 转基因烟草半定量 PCR 分析

Fig. 4 RT-PCR analysis of *HaNAC2* transgenic tobacco
草具有更发达的侧根(图5-D);48℃高温培养箱中胁迫处理8 h后,野生型烟草叶片较 *HaNAC2* 转基因烟草叶片明显萎蔫(图5-E),且随着高温胁迫时间的增加野生型烟草叶片的失水率显著高于 *HaNAC2* 转基因烟草叶片(图5-G);250 mmol/L NaCl溶液中盐胁迫处理8 h后,野生型

烟草植株明显萎蔫,而 *HaNAC2* 转基因烟草萎蔫程度较轻(图5-F)。综上所述, *HaNAC2* 转基因烟草在干旱、高温、盐胁迫下的表型变化都明显优于野生型烟草,表明 *HaNAC2* 转基因烟草比野生型烟草具有更强的抗旱性、耐热性与耐盐性。

2.5 *HaNAC2* 转基因烟草胁迫后生理指标分析

在质量分数为20%PEG6000模拟干旱胁迫下和48℃高温胁迫下测定各株系烟草的生理指标,结果显示 *HaNAC2* 转基因烟草中脯氨酸和可溶性糖质量分数逐渐升高且上升幅度明显高于野生型烟草(图6)。脯氨酸和可溶性糖的质量分数与植物对逆境胁迫的抵抗能力正相关,说明梭梭 *HaNAC2* 基因提高了烟草的抗旱性与耐热性。



A. 正常条件下的发芽率 Germination rate under normal condition; B. 模拟干旱条件下的发芽率 Germination rate under simulated drought conditions; C. 干旱胁迫下植株表型变化 Phenotypic changes of plants under drought stress; D. 干旱胁迫后根系生长情况 Root growth after drought stress; E. 高温胁迫下叶片表型变化 Phenotypic changes of leaves under high temperature stress; F. 高盐胁迫下植株表型变化 Phenotypic changes of plants under high salt stress; G. 高温胁迫下叶片失水率 Leaf water loss rate under high temperature stress

图 5 *HaNAC2* 转基因烟草表型鉴定

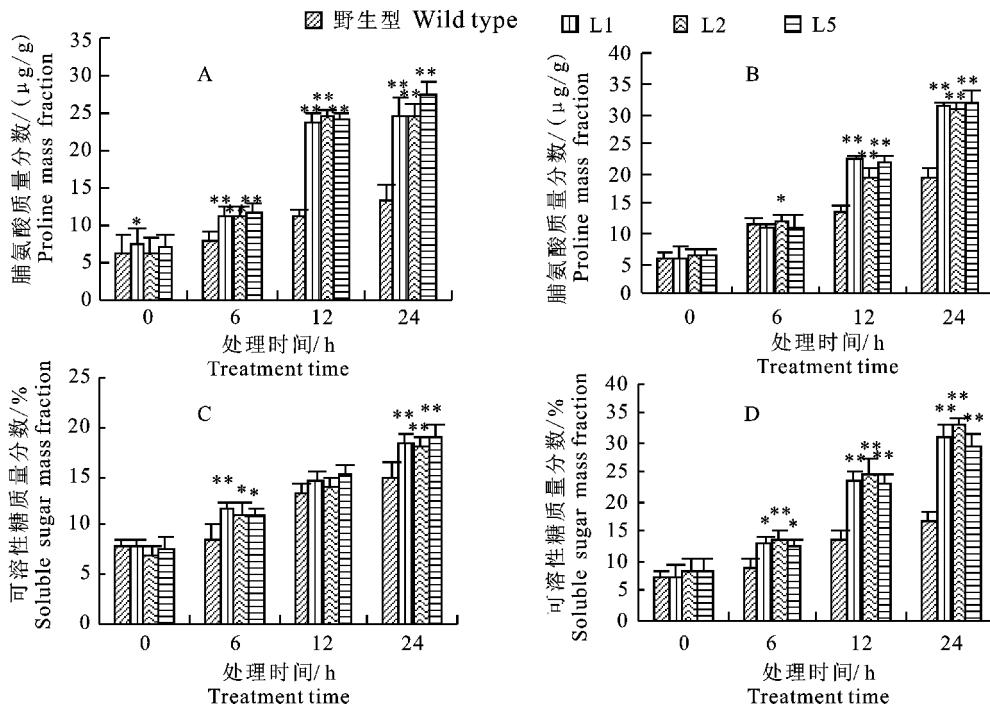
Fig. 5 Phenotypic identification of *HaNAC2* transgenic tobacco

3 讨论与结论

经过长期进化的过程,植物遇逆境胁迫时会从分子、细胞、生理和生化水平上做出适应性调整,以抵御和适应外部环境因子的胁迫,因此形成了高效的胁迫应答机制,此过程中转录因子发挥着关键的调控作用^[22]。非生物胁迫往往会引起植物体内生理指标的变化,如脯氨酸质量分数、可溶性糖质量分数都可以作为衡量植物抗逆性的生理指标。脯氨酸和可溶性糖为小分子的渗透调节物质,在维持植物体内水分平衡方面起到重要作用,植物在正常生长时脯氨酸质量分数较少,当干旱、高温胁迫时植物中的脯氨酸质量分数则显著增加^[23],脯氨酸有保护胁迫下细胞内大分子稳定性的作用^[24];赵江涛等^[25]在研究可溶性糖的生理作用时发现,其参与干旱胁迫时的渗透调节过

程、复水后的生理恢复和修复过程;脯氨酸和可溶性糖的质量分数与植物对逆境胁迫的抵抗能力正相关。

作为植物中最大的转录因子家族之一,NAC家族中的大多数成员都是诱导型表达的转录因子,植物不同生长发育阶段、病原体侵染、高盐、干旱、低温、植物激素刺激和机械损伤等生物与非生物胁迫都可诱导其表达^[26]。甘蓝中 *BoNAC019* 可能通过诱导ABA分解代谢基因和降低ABA质量分数而参与调控植物的抗旱性, *BoNAC019* 基因可响应干旱、盐、ABA及H₂O₂等非生物胁迫处理^[27]。鹰嘴豆 *CarNAC4* 受干旱、高盐、高温、低温及ABA、IAA、MeJa 和 H₂O₂ 的诱导表达,过表达 *CarNAC4* 的转基因拟南芥植株抗旱性与耐盐性得以提高^[28]。研究发现一些梭梭 *HaNACs* 在模拟干旱及盐胁迫下具有多样的表



A. 干旱胁迫下脯氨酸质量分数 Proline mass fraction under drought stress; B. 高温胁迫下脯氨酸质量分数 Proline mass fraction under high temperature stress; C. 干旱胁迫下可溶性糖质量分数 Soluble sugar mass fraction under drought stress; D. 高温胁迫下可溶性糖质量分数 Soluble sugar mass fraction under high temperature stress

图 6 *HaNAC2* 转基因烟草生理生化指标

Fig. 6 Physiological and biochemical indexes of *HaNAC2* transgenic tobacco

达模式,它们可能参与盐和干旱胁迫应答、调节过程,其中 *HaNAC1* 的过表达使转基因马铃薯的抗旱性与耐盐性提高,*HaNAC1* 可能是通过调节一些与胁迫响应相关基因的表达,调控激素表达水平变化从而提高马铃薯的抗旱性^[29-31]。本研究分析发现在模拟地表高温、模拟干旱、高盐及 IAA 和 ABA 胁迫处理下 *HaNAC2* 基因的表达量显著上调,且过表达梭梭 *HaNAC2* 的转基因烟草在干旱和高温、高盐胁迫下具有更强的抗旱、耐热与耐盐的表型,在受到干旱、高温逆境胁迫后,*HaNAC2* 基因过表达烟草叶片中积累了大量的脯氨酸和可溶性糖,其质量分数显著高于野生型烟草,表明 *HaNAC2* 的过表达导致渗透调节物质质量分数的增加,使植株维持较为稳定的渗透势,从而抵御干旱和高温胁迫的损伤。同时发现转 *HaNAC2* 基因烟草有更发达的根系,推测 *HaNAC2* 基因可能与侧根发育有关。由于一个特定的 NAC 转录因子往往同时涉及多个发育或应对多个逆境因子胁迫过程^[32],预示着 *HaNAC2* 可能参与多种信号传递,并与侧根发育和干旱、高温及盐逆境响应有关。

参考文献 Reference:

- [1] SINGH K B, FOLEY R C, LUIS ONATE-SÁNCHEZ. Transcription factors in plant defense and stress responses [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5(5): 430-436.
- [2] SOUER E, 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.
- [3] AIDA M, ISHIDA T, FUKAKI H, et al. Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant [J]. *The Plant Cell*, 2004, 329 (7457): 86-87.
- [4] LINDEMOSE S, O'SHEA C, JENSEN M, et al. Structure, function and networks of transcription factors involved in abiotic stress responses [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(3): 5842-5878.
- [5] PARK J, KIM Y S, KIM S G, et al. Integration of auxin and salt signals by the NAC transcription factor NTM2 during seed germination in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2011, 156(2): 537-549.
- [6] ZÉLICOURTA D E, DIET A, MARION J, et al. Dual involvement of a *Medicago truncatula* NAC transcription factor in root abiotic stress response and symbiotic nodule senescence [J]. *The Plant Journal*, 2012, 70(2): 220-230.
- [7] LI J, GUO G, GUO W, et al. miRNA164-directed cleavage of ZmNAC1 confers lateral root development in maize (*Zea*

- mays L.) [J]. *BMC Plant Biology*, 2012, 12: 220.
- [8] YANG S D, SEO P J, YOON H K, et al. The *Arabidopsis* NAC transcription factor VNL2 integrates abscisic acid signals into leaf senescence via the COR/RD genes [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(6): 2155-2168.
- [9] HUANG D B, WANG S G, ZHANG B C, et al. A gibberellin-mediated DELLA-NAC signaling cascade regulates cellulose synthesis in rice [J]. *Plant Cell*, 2015, 27(6): 1681-1696.
- [10] KO J H, YANG S H, PARK A H, et al. ANAC012, a member of the plant-specific NAC transcription factor family, negatively regulates xylary fiber development in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Journal*, 2007, 50(6): 1035-1048.
- [11] KUBO M, UDAGAWA M, NISHIKUBO N, et al. Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation [J]. *Genes & Development*, 2005, 19(16): 1855-1860.
- [12] EL MANNAI Y, AKABANE K, HIRATSUKA K, et al. The NAC transcription factor gene *OsY37* (ONAC011) promotes leaf senescence and accelerates heading time in rice [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(10): 2165.
- [13] 张海娟, 吴剑锋, 胡 帅, 等. 芜菁 NAC 转录因子 *BcNAC2* 基因的分离及其表达 [J]. 园艺学报, 2011, 38(6): 1089-1096.
- ZHANG H J, WU J F, HU SH, et al. Isolation and expression analysis of *BcNAC2*, a NAC transcription factor gene in turnip [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2011, 38(6): 1089-1096.
- [14] HE X, ZHU L, XU L, et al. *GhATAF1*, a NAC transcription factor, confers abiotic and biotic stress responses by regulating phytohormonal signaling networks [J]. *Plant Cell Reports*, 2016, 35(10): 2167-2179.
- [15] CHEN Y J, PERERA V, CHRISTIANSEN M W, et al. The barley HvNAC6, transcription factor affects ABA accumulation and promotes basal resistance against powdery mildew [J]. *Plant Molecular Biology*, 2013, 83(6): 577-590.
- [16] 王国东, 李金晶, 白智伟, 等. 三七 NAC 转录因子基因 *PnNAC1* 的克隆及表达特性分析 [J]. 华北农学报, 2017, 32(4): 91-97.
- WANG G D, LI J J, BAI ZH W, et al. Cloning and expression analysis of a NAC transcription factor gene *PnNAC1* from *Panax notoginseng* [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2017, 32(4): 91-97.
- [17] 何江峰, 房永雨, 赵小庆, 等. 梭梭的研究进展 [J]. 畜牧与饲料科学, 2015, 36(12): 94-98.
- HE J F, FANG Y Y, ZHAO X Q, et al. Research progress on *Haloxylon* [J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2015, 36(12): 94-98.
- [18] 方 辉, 张 桦, 姚正培, 等. 梭梭 *HaNAC2* 基因克隆、表 达分析及亚细胞定位 [J]. 分子植物育种, 2015, 13(10): 2369-2379.
- FANG H, ZHANG H, YAO ZH P, et al. Cloning, expression analysis and subcellular localization of *HaNAC2* gene in *Haloxylon ammodendron* [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2015, 13(10): 2369-2379.
- [19] 李志强. 梭梭干旱转录组测序和分析及 SNAC 亚组基因的克隆 [D]. 乌木鲁齐: 新疆农业大学, 2016.
- LI ZH Q. Sequencing, analysing of *Haloxylon ammodendron* transcriptome and cloning of SNAC subfamily under drought [D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2016.
- [20] WANG B, DU H, YAO Z, et al. Validation of reference genes for accurate normalization of gene expression with quantitative real-time PCR in *Haloxylon ammodendron* under different abiotic stresses [J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2018, 24(3): 455-463.
- [21] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 184.
- LI H S. Principle and Technology of Plant Physiological and Biochemical Experiments [M]. Beijing: Higher Education Press, 2000: 184.
- [22] 刘 辉, 李德军, 邓 治. 植物应答低温胁迫的转录调控网络研究进展 [J]. 中国农业科学, 2014, 47(18): 3523-3533.
- LIU H, LI D J, DENG ZH. Advances in research of transcriptional regulatory network in response to cold stress in plants [J]. *Scientia Agricultural Sinica*, 2014, 47(18): 3523-3533.
- [23] SINGH K B, OCAMPO B, ROBERTSON L D. Diversity for abiotic and biotic stress resistance in the wild annual *Cicer* species [J]. *Genetic Resources & Crop Evolution*, 1998, 45(1): 9-17.
- [24] 许详明, 叶和春, 李国凤. 脯氨酸代谢与植物抗渗透胁迫的研究进展 [J]. 植物学通报, 2000, 17(6): 536-542.
- XU X M, YE H CH, LI G F. Progress in synthesis and metabolism of proline and its relationship with osmotolerance of plants [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2000, 17(6): 536-542.
- [25] 赵江涛, 李晓峰, 李 航, 等. 可溶性糖在高等植物代谢调节中的生理作用 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34(24): 6423-6425.
- ZHAO J T, LI X F, LI H, et al. Physiological role of soluble sugar in metabolic regulation of higher plants [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2006, 34(24): 6423-6425.
- [26] 康桂娟, 曾日中, 聂智毅, 等. 植物 NAC 转录因子的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2012, 11: 21-26.
- KANG G J, ZENG R ZH, NIE ZH Y, et al. Research progress of plant NAC transcription factors [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2012, 11: 21-26.
- [27] WANG J F, LIAN W, CAO Y, et al. Overexpression of *BoNAC019*, a NAC transcription factor from *Brassica oleracea*

- eracea*, negatively regulates the dehydration response and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *Scientific Reports*, 2018;13349.
- [28] YU X W, LIU Y M, WANG S, et al. *CarNAC4*, a NAC-type chickpea transcription factor conferring enhanced drought and salt stress tolerances in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Reports*, 2016, 35(3):613-627.
- [29] 巩 楷, 陈虞超, 甘晓燕, 等. 梭梭 NAC 家族基因转录组鉴定及干旱和盐胁迫下的表达分析 [J]. 分子植物育种, 2017, 15(10):86-97.
- GONG L, CHEN Y CH, GAN X Y, et al. Transcriptome-wide identification and expression analysis of NAC gene family under drought and salt stress in *Haloxylon ammodendron* [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(10): 3920-3931.
- [30] 张 丽, 程永芳, 巩 楷, 等. 转化转录因子 *HaNAC1* 基因提高马铃薯的抗逆性 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(14): 4623-4631.
- ZHANG L, CHENG Y F, GONG L, et al. Stress resistance of potato enhanced by transcription factor *HaNAC1* gene [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(14): 4623-4631.
- [31] 杨文静, 巩 楷, 张 丽, 等. 马铃薯异源表达梭梭 *HaNAC1* 基因提高抗旱性的功能解析 [J]. 植物遗传资源学报, 2019, 20.
- YANG W J, GONG L, ZHANG L, et al. Stable transformation of *Haloxylon ammodendron* *HaNAC1* gene to improve drought resistance of potato [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20.
- [32] YOO S Y, KIM Y, KIM S Y, et al. Control of flowering time and cold response by a NAC-domain protein in *Arabidopsis* [J]. *PLoS One*, 2007, 2(7):1-10.

Expression Analysis of *HaNAC2* and Identification of Stress Resistance Function in *Haloxylon ammodendron*

ZONG Xingfeng¹, LIU Shuanshuan¹, LIU Hao¹, YAO Zhengpei¹,
WANG Bo¹, REN Yanping¹ and ZHANG Hua^{1,2}

(1. College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;

2. Institute of Desert in Drought Areas, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract NAC is one of the transcription factor families peculiar to plants, it contains highly conserved NAC domain, which plays an important regulatory role in plant growth, development and stress response. In this study, the expression patterns of *HaNAC2* in *Haloxylon ammodendron* under different stress treatments were analyzed by qRT-PCR, and through leaf disc method for tobacco transformation to analyze stress resistance of the *HaNAC2* transgenic tobacco under treatments of drought, high temperature and high salt stress. The results that *HaNAC2* could respond to simulated high temperature, showed drought, high salt stress, IAA and ABA treatments, tobacco transgenic overexpressing *HaNAC2* had stronger drought, heat and salt tolerance under drought, high temperature and high salt stress. Through the function analysis of *Haloxylon ammodendron HaNAC2*, it would provide a theoretical basis for further understand the function of NAC transcription factors and stress resistance mechanism in *Haloxylon ammodendron*.

Key words NAC transcription factor; *Haloxylon ammodendron*; Expression analysis; Stress resistance

Received 2019-03-12

Returned 2019-03-25

Foundation item The National Natural Science Foundation of China(No. 31760214).

First author ZONG Xingfeng, female, master student. Research area: ecological adaptability of *Haloxylon ammodendron*. E-mail:582526923@qq.com

Corresponding author ZHANG Hua, female, professor. Research area: molecular mechanism of plant ecological adaptability. E-mail:hezelzhang@163.com

(责任编辑:史亚歌 Responsible editor:SHI Yage)