

柑橘抗逆基因 *NAC83* 的克隆与表达分析

郭文芳*, 刘德春*, 杨 莉, 庄 霞, 张涓涓, 王书胜, 刘 勇**

(江西农业大学农学院, 南昌 330045)

摘 要: 以柚 [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.]、枳 [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] 和柠檬 [*C. limon* (L.) Burm. f.] 实生苗为试材, 使用电子克隆和 RT-PCR 的方法从中克隆到 3 个新的 NAC 蛋白基因, 分别命名为 *CmNAC83*、*PtNAC83* 和 *CINAC83*; 并用 qRT-PCR 技术检测了该基因在 ABA、干旱、低温和高盐胁迫处理下的时空表达。结果显示: *CmNAC83*、*PtNAC83* 和 *CINAC83* 的 cDNA 序列全长均为 841 bp, 都含有 750 bp 的开放阅读框(ORF), 编码 249 个氨基酸; 推测其蛋白分子质量分别为 24.18、28.00 和 28.15 kD, 等电点分别是 9.02、9.31 和 9.30, 且均含有 NAC 家族的 N 端保守结构域; 系统进化树分析表明, 该 3 个蛋白均属于 SENU5 亚族, 与苹果 NAC22 亲缘关系较近。实时定量 qRT-PCR 分析显示, *NAC83* 基因能被 ABA、干旱、低温和高盐胁迫诱导表达, 且在不同的柑橘种类中存在表达差异。可见柚 *CmNAC83*、枳 *PtNAC83* 和柠檬 *CINAC83* 是 NAC 基因家族的成员, 可能在柑橘响应非生物胁迫的过程中起了重要作用。

关键词: 柚; 枳; 柠檬; *NAC83*; 基因克隆; 基因表达

中图分类号: S 666

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2015) 03-0445-10

Cloning and Expression Analysis of New Stress-resistant *NAC83* Gene from *Citrus*

GUO Wen-fang*, LIU De-chun*, YANG Li, ZHUANG Xia, ZHANG Juan-juan, WANG Shu-sheng, and LIU Yong**

(College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: In the present study, three novel NAC genes, *CmNAC83*, *PtNAC83* and *CINAC83*, were cloned by in silico cloning and RT-PCR approaches from seedlings of pomelo [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.], trifoliolate orange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] and lemon [*Citrus limon* (L.) Burm. f.]. The expression patterns of these genes were analyzed by Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) under the stress of ABA, drought, cold and salt. The results showed that the full length of cDNA sequence of all the three genes were 841 bp and the open reading frame (ORF) were 750 bp which encoded three polypeptides of 249 amino acids. The molecular weight of the three proteins were 24.18, 28.00 and 28.15 kD, with isoelectric point about 9.02, 9.31 and 9.30 respectively. The three novel proteins contained N-terminal conserved domains of NAC family. The phylogenetic analysis showed that the three proteins have the highest similarity with NAC22 from *Malus × domestica*, and its belongs to the SENU5 subfamily in NAC

收稿日期: 2014-12-19; **修回日期:** 2015-02-12

基金项目: 国家自然科学基金(地区科学基金)项目(31260468); 江西省青年自然科学基金项目(20114BAB214006); 江西省自然科学基金项目(20142BAB204008); 江西省教育厅科技计划项目(GJJ14292); 江西农业大学科学研究基金项目(CX201101)

* 共同第一作者

** 通信作者 Author for correspondence (E-mail: liuyongjxau@163.com)

family. The qRT-PCR analysis indicated that the expressions of three *NAC83* genes were induced by stress of ABA, drought, cold and salt, but they were differently expressed in different citrus species. The results of this paper suggested that *CmNAC83*, *PtNAC83* and *CiNAC83* were new members of the NAC gene family, and they might play important roles in citrus in response to abiotic stress.

Key words: pomelo; trifoliate orange; lemon; *NAC83*; cloning; expression analysis

柑橘的抗逆性是一个多基因控制的数量性状, 单独转化个别抗逆基因往往效果不显著。而转录因子在植物信号传递与胁迫应答中能够调控下游功能基因的表达, 且一个转录因子可以调控多个与同类性状有关的基因表达, 是植物逆境应答反应的关键环节 (Nakashima & Yamaguchi-Shinozaki, 2006)。因此, 目前对转录因子的研究是提高植物抗性育种工作的重点之一。

近年来, AP2/EREBP、MYB、NAC、WRKY 和 bZIP 等转录因子在植物逆境中的响应机制被广泛研究 (Xu et al., 2011), 其中 NAC 转录因子是目前发现的数量最大的植物转录因子家族之一 (Singh et al., 2002)。通过基因组测序发现, 拟南芥基因组中有 117 个 NAC 家族转录因子, 水稻中有 151 个, 葡萄中有 79 个, 白杨中有 163 个, 大豆和烟草中各有 152 (Rushton et al., 2008; Hu et al., 2010; Nuruzzaman et al., 2010; Le et al., 2011)。根据生物信息学对转录组测序数据分析, 推测有 20% ~ 25% 的 NAC 基因对至少一种或几种胁迫有响应作用 (Fujita et al., 2004; Kawaaura et al., 2008)。前人的研究也不断证实了许多 NAC 转录因子在植物抵御逆境胁迫中起着重要作用, 如 Jiang 和 Deyholos (2006) 分析了拟南芥 *NAC* 基因家族对高盐胁迫的响应机制, 从盐胁迫处理后的拟南芥植株根部组织中发现 33 个 *NAC* 基因的表达发生改变, 其中 26 个上调表达, 7 个下调表达; 茄子 *SmNAC1* 在受 GA、低温和高盐诱导后表达上调, 且在根中优先表达 (邵帅 等, 2014); 毛白杨 *PtoNAC157* 能响应低温、高盐、干旱和 ABA 胁迫, 在幼根、茎和叶中均有表达, 且在茎中的表达量最高 (张杰伟 等, 2014); 从小麦中分离得到 *TaNAC* 基因受干旱诱导强烈表达, 过量表达 *TaNAC* 的转基因烟草表现出明显优于野生型对照的抗旱功能 (刘美英 等, 2010); 玉米 NAC 结合膜转录因子基因 *ZmNTL1* 转化到拟南芥植株, 发现在盐胁迫条件下过表达株系种子萌发率高于野生型, 根系也较长, 土培植株的存活率也高于野生型, 说明 *ZmNTL1* 与植物抗盐性密切相关 (王敏, 2013); Oliveira 等 (2011) 对柑橘数据库中 NAC 转录因子进行分析, 鉴定出 45 个含有 NAC 结构域的蛋白, 其中 *CsNAC1* 与逆境胁迫响应有关; 曹银川 (2010) 从‘暗柳’甜橙的红肉突变体‘红暗柳’中克隆到 NAC 转录因子家族的几个成员, 分析表明, *citNAC* 和 *citNAC1* 都是衰老上调基因, *citNAC2* 是一个抗病相关基因, 它的表达能够阻止发病相关基因的表达。

枳是柑橘中常用的砧木, 抗逆性强, 而柚和柠檬是大规模栽培的柑橘种类, 抗逆性相对较弱; 若能从抗逆性强的柑橘种类中克隆一些抗逆转录因子基因导入到柑橘栽培品种中, 较转入其他外源抗性功能基因更容易获得抗性较强的柑橘新品种。本研究从枳、柚和柠檬中克隆得到 3 个新的 *NAC* 家族基因, 并使用实时定量 PCR 技术对其在低温、高盐、干旱等逆境胁迫和 ABA 处理下的时空表达模式做出初步分析, 以期对柑橘抗逆分子育种提供候选基因资源和理论依据。

1 材料与方法

1.1 试材及其处理

2013 年 10 月将柚 [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.]、枳 [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] 和柠檬 [*C. limon*

(L.) Burm. f.] 种子分别播种于含有 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂, $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, pH 5.8 的 MT 培养基中, 置于江西农业大学农学院园艺系实验室培养箱 ($25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 16 h 光照, 12 000 lx, 8 h 黑暗) 中培养。待幼苗长到约 25 cm 时, 移植到 Hoagland 培养液中预培养 5 d, 然后分别移到 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中低温培养, 或移到含有 $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA, 含有 20% PEG6000, 含有 $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的 Hoagland 液体培养基中常温培养。每个物种的每个因素处理 20 ~ 25 个植株, 均以室温 ($25 \text{ }^{\circ}\text{C}$) 下不加处理的 Hoagland 液体培养植株作对照, 分别在处理后 0、1、3、6、12 和 24 h 取其叶片, 液氮速冻, 置于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱储存备用。

1.2 柚、枳和柠檬 RNA 提取及 cDNA 合成

采用 Trizol 总 RNA 提取试剂盒 (Invitrogen, 美国) 分别提取柚、枳和柠檬叶片总 RNA。用 DNase I (Promega, 美国) 去除剩余的基因组 DNA, 用核酸蛋白仪检测总 RNA 的浓度, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。以总 RNA 为模板, 采用 Prime ScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒 (TaKaRa, 日本) 合成 cDNA, 存于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱作为基因克隆和实时定量 PCR 的模板备用。

1.3 *CmNAC83*、*PtNAC83* 和 *CiNAC83* 基因克隆

通过检索 HarvEST-Citrus 数据库 (<http://harvest.ucr.edu/>) 找到与植物 NAC 家族基因同源性很高的表达序列标签 (EST) 序列, 数据库自动将这些 EST 序列拼接成一条一致性序列。基于该一致性序列使用引物设计软件 Primer5 设计合成一对基因特异性引物 QS: 5'TGCAAAGACTTTT CGGTTA3'; QA: 5'CGCCAATTACTTGTACAGA3', 同时分别使用柚、枳和柠檬叶片第一链 cDNA 为模板与 PCR 扩增试剂 TIANGEN[®] 2× Taq PCR MasterMix 进行 PCR 扩增, 获得 *CmNAC83*、*PtNAC83* 和 *CiNAC83* 基因全长序列。PCR 扩增程序如下: $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $51 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 再延伸 10 min; $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。分别将 PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离, 利用 DNA 回收试剂盒 (天根生化科技有限公司) 将 PCR 目的片段经回收、纯化, 与 pMD[®]18-T 载体 (TaKaRa) 连接, 转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α (TIANGEN), 蓝白斑筛选, 经菌液 PCR 鉴定均为阳性克隆后送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

1.4 *CmNAC83*、*PtNAC83* 和 *CiNAC83* 的实时定量 PCR

利用 BIO-RAD CFX96 实时荧光定量 PCR 仪对柚、枳和柠檬各胁迫取样点的 cDNA 模板进行荧光相对定量分析。荧光染料 SYBR[®]Premix Ex TaqTM 购买于大连宝生物公司; 3 个目的基因的扩增引物均为 NAC-F: 5'TTGGGATTTGCCAGGTGATG3'、NAC-R: 5'GCCTTCCAATAACCAGACCC3'; 均以柑橘 *Actin* 基因为内参基因, *Actin* 的扩增引物为 Actin-F: 5'ACTCATCGTACTCAGCCTTTG3'、Actin-R: 5'TGCACCCTGTTCTTCTTACTG3'。qRT-PCR 反应采用 $25 \text{ } \mu\text{L}$ 反应体系, $12.5 \text{ } \mu\text{L}$ SYBR[®] Premix Ex Taq、 $0.5 \text{ } \mu\text{L}$ PCR Forward Primer、 $0.5 \text{ } \mu\text{L}$ PCR Reverse Primer、 $9.5 \text{ } \mu\text{L}$ ddH₂O、 $2 \text{ } \mu\text{L}$ cDNA 模板。qRT-PCR 反应程序采用两步法, 程序如下: $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s; $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环。每处理样品设 3 个生物学重复。利用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 *CmNAC83*、*PtNAC83* 和 *CiNAC83* 的 cDNA 序列分析

通过电子克隆和 RT-PCR 方法, 分别从柚、枳和柠檬中克隆到 *CmNAC83* (GenBank 登录号:

KM268906)、*PtNAC83* (KM589037) 和 *CINAC83* (KM589038) 3 个新基因。测序和生物信息学分析结果表明:3 个新基因 cDNA 序列全长均为 841 bp, 含有 750 bp 的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF), 编码 249 个氨基酸的蛋白质; 预测蛋白分子量依次分别为 28.14、28.00 和 28.15 kD, 等电点分别为 9.02、9.31 和 9.30; 碱基序列比对结果(图 1)显示, 3 个基因序列的相似性达到 99.37%, 有 16 个碱基位点存在差异。

<i>CmNAC83</i> KM268906	TGCAAGACTTTTCGGTTACAGTGAAGATTAAAGATTAAATGGAGAAGATCATTTTATGAAGAAATGGTGTGCT	72
<i>PtNAC83</i> KM589037	TGCAAGACTTTTCGGTTACAGTGAAGATTAAAGATTAAATGGAGAAGATCATTTTATGAAGAAATGGTGTGCT	72
<i>CINAC83</i> KM589038	TGCAAGACTTTTCGGTTACAGTGAAGATTAAAGATTAAATGGAGAAGATCATTTTATGAAGAAATGGTGTGCT	72
Consensus	tgcaagacttttcggttacagtgaagattaagattaatggagaagatc attttatgaagaatggtgtgct	
<i>CmNAC83</i> KM268906	GAGACTGCCTCCGGGATTCGGTTTCATCCCTACGGACGAAGAAGCTTGTGTTCAGTACTTGAAGCGCAAGAT	144
<i>PtNAC83</i> KM589037	GAGACTGCCTCCGGGATTCGGTTTCATCCCTACGGACGAAGAAGCTTGTGTTCAGTACTTGAAGCGCAAGAT	144
<i>CINAC83</i> KM589038	GAGACTGCCTCCGGGATTCGGTTTCATCCCTACGGACGAAGAAGCTTGTGTTCAGTACTTGAAGCGCAAGAT	144
Consensus	gagactgcctccgggattccggtt catcctacggacgaagaacttgtgttcagtacttgaagcgcaagat	
<i>CmNAC83</i> KM268906	TTTTCGCTGCCCTTGCCCGCTTCCATAAATTCCTGAAGTTGATGTTTGCAAGTCTGATCCTTGGGATTTGCC	216
<i>PtNAC83</i> KM589037	TTTTCGCTGCCCTTGCCCGCTTCCATAAATTCCTGAAGTTGATGTTTGCAAGTCTGATCCTTGGGATTTGCC	216
<i>CINAC83</i> KM589038	TTTTCGCTGCCCTTGCCCGCTTCCATAAATTCCTGAAGTTGATGTTTGCAAGTCTGATCCTTGGGATTTGCC	216
Consensus	tttgcctgccccttgcccgttcataaattcctgaagttgatgtttgcaagctctgatccttgggatttgcc	
<i>CmNAC83</i> KM268906	AGGTGATGTGGCGCAAGAGAGGATATTTTTCAGCACAAGGGAAGCTAAGTACCCAAACGGGAACAGATCGAA	288
<i>PtNAC83</i> KM589037	AGGTGATGTGGCGCAAGAGAGGATATTTTTCAGCACAAGGGAAGCTAAGTACCCAAACGGGAACAGATCGAA	288
<i>CINAC83</i> KM589038	AGGTGATGTGGCGCAAGAGAGGATATTTTTCAGCACAAGGGAAGCTAAGTACCCAAACGGGAACAGATCGAA	288
Consensus	aggtgatgtggcgcaagagaggtattttttcagcacaaggggaagctaagtacccaaacgggaacagatcgaa	
<i>CmNAC83</i> KM268906	CAGGGCCACGGGCTCTGGTTATTTGAAGGCAACTGGGCTTGACAAGCAAAATTCGCACTTCCAGGGGCAACCA	360
<i>PtNAC83</i> KM589037	CAGGGCCACGGGCTCTGGTTATTTGAAGGCAACTGGGCTTGACAAGCAAAATTCGCACTTCCAGGGGCAACCA	360
<i>CINAC83</i> KM589038	CAGGGCCACGGGCTCTGGTTATTTGAAGGCAACTGGGCTTGACAAGCAAAATTCGCACTTCCAGGGGCAACCA	360
Consensus	cagggccacgggctctggttatgtgaaggcaactgggcttgacaagcaaatcgcaactccaggggcaacca	
<i>CmNAC83</i> KM268906	AATCTGGGAATGAAAAAAGCTCTCGTTTATATAGAGGCAAGCCACCACACGGCTCTAGGACTGATTTGGAT	432
<i>PtNAC83</i> KM589037	AATCTGGGAATGAAAAAAGCTCTCGTTTATATAGAGGCAAGCCACCACACGGCTCTAGGACTGATTTGGAT	432
<i>CINAC83</i> KM589038	AATCTGGGAATGAAAAAAGCTCTCGTTTATATAGAGGCAAGCCACCACACGGCTCTAGGACTGATTTGGAT	432
Consensus	aat gtgggaatgaaaa aactctcgtttttatagaggcaagccaccacacggctctaggactgattggat	
<i>CmNAC83</i> KM268906	CATGCATGAATACCGCTTGTACTGCTGCCAATGCCCTCAAAAGAAAAAAGCTTCCCGACACCCAGCTGT	504
<i>PtNAC83</i> KM589037	CATGCATGAATACCGCTTGTACTGCTGCCAATGCCCTCAAAAGAAAAAAGCTTCCCGACACCCAGCTGT	504
<i>CINAC83</i> KM589038	CATGCATGAATACCGCTTGTACTGCTGCCAATGCCCTCAAAAGAAAAAAGCTTCCCGACACCCAGCTGT	504
Consensus	catgcatgaataccgccttgttactgctgccaatgcccctcaaaagaaaaaactt gccagaccc agctgt	
<i>CmNAC83</i> KM268906	GGCAACGGACAATTTGGGTTCTATGCCGATCTTTTGAAGAAAAGAGGAGCCAAAGAGTGAGGATGAGGAAAC	576
<i>PtNAC83</i> KM589037	GGCAACGGACAATTTGGGTTCTATGCCGATCTTTTGAAGAAAAGAGGAGCCAAAGAGTGAGGATGAGGAAAC	576
<i>CINAC83</i> KM589038	GGCAACGGACAATTTGGGTTCTATGCCGATCTTTTGAAGAAAAGAGGAGCCAAAGAGTGAGGATGAGGAAAC	576
Consensus	ggcaacggacaatttgggttctatgccgatcttttgaagaaaagaggagccaaagagtgaagtgaggaaac	
<i>CmNAC83</i> KM268906	GTGCACCAAAATTTGAGGAACCGGGCTTAACGGCCGCAAGCCGGTTTATGATTTTATGAGAAAGAGGGA	648
<i>PtNAC83</i> KM589037	GTGCACCAAAATTTGAGGAACCGGGCTTAACGGCCGCAAGCCGGTTTATGATTTTATGAGAAAGAGGGA	648
<i>CINAC83</i> KM589038	GTGCACCAAAATTTGAGGAACCGGGCTTAACGGCCGCAAGCCGGTTTATGATTTTATGAGAAAGAGGGA	648
Consensus	gtgcacc aaattggaggaaacc gggctaacgggcc aagccggttttt ttttatgagaaaggagga	
<i>CmNAC83</i> KM268906	AAGGGCTGACTTGAACCTTGTCCCAACTTCATCTTCTCAGGCTCAAGTGGAGTCACTGAAGTTTCTTCAAA	720
<i>PtNAC83</i> KM589037	AAGGGCTGACTTGAACCTTGTCCCAACTTCATCTTCTCAGGCTCAAGTGGAGTCACTGAAGTTTCTTCAAA	720
<i>CINAC83</i> KM589038	AAGGGCTGACTTGAACCTTGTCCCAACTTCATCTTCTCAGGCTCAAGTGGAGTCACTGAAGTTTCTTCAAA	720
Consensus	aagggtgacttgaaccttg tccaacttcattctcctcagg tcaagtggagtcactgaagtttcttcaaa	
<i>CmNAC83</i> KM268906	TGAATCAGACGATCATGAAGAGAGTAGTTGCAATAGCTTCCCTTACTTTAGAAGAAAACAGCAGTAAACATT	792
<i>PtNAC83</i> KM589037	TGAATCAGACGATCATGAAGAGAGTAGTTGCAATAGCTTCCCTTACTTTAGAAGAAAACAGCAGTAAACATT	792
<i>CINAC83</i> KM589038	TGAATCAGACGATCATGAAGAGAGTAGTTGCAATAGCTTCCCTTACTTTAGAAGAAAACAGCAGTAAACATT	792
Consensus	tgaatcagacgatcatgaagagagtagttgcaatagcttcccttactttagaagaaaacagcagtaaacatt	
<i>CmNAC83</i> KM268906	TTCAATAATTCTCTCTTTTAAATTAGTGTCTGTACAAGTAATTTGGCG	841
<i>PtNAC83</i> KM589037	TTCAATAATTCTCTCTTTTAAATTAGTGTCTGTACAAGTAATTTGGCG	841
<i>CINAC83</i> KM589038	TTCAATAATTCTCTCTTTTAAATTAGTGTCTGTACAAGTAATTTGGCG	841
Consensus	ttcaataatttctctctttttaaattagtggtctgtacaagtaattggcg	

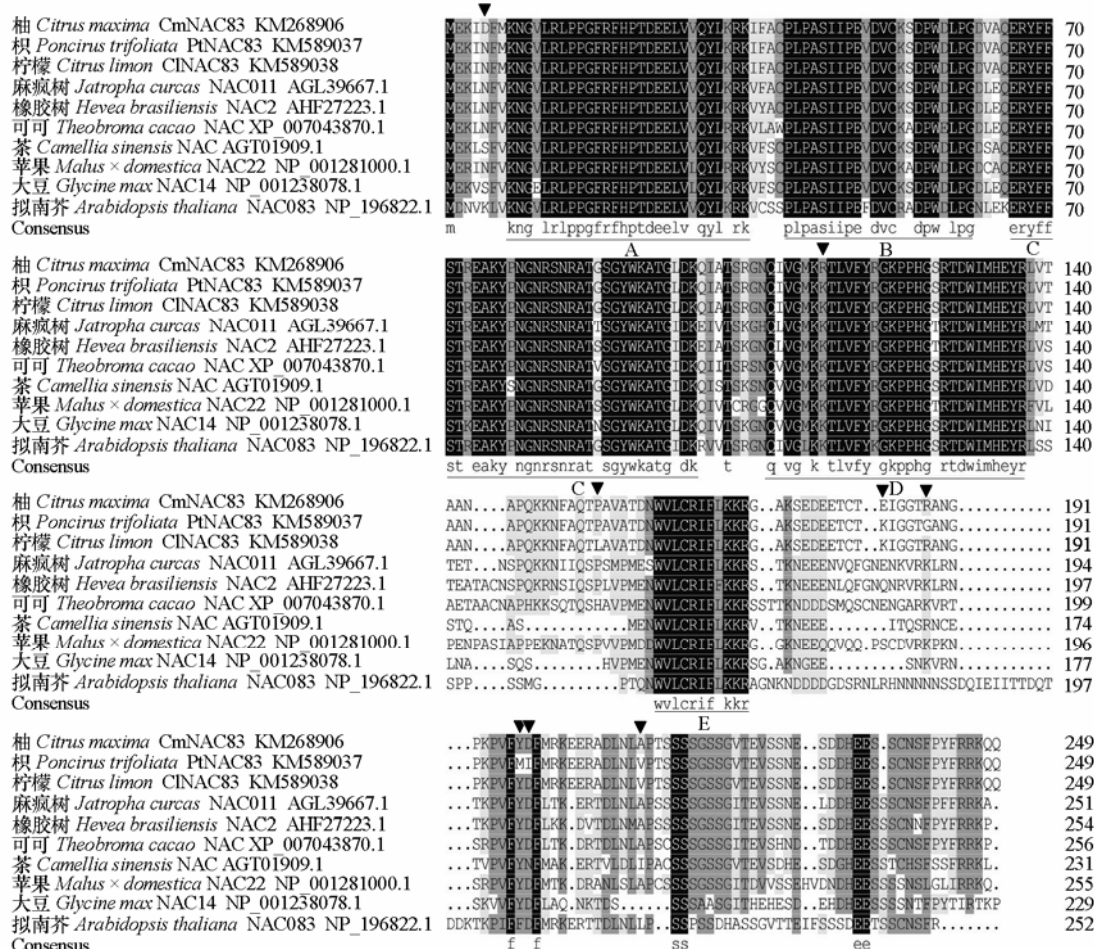
图 1 柚 *CmNAC83*、枳 *PtNAC83* 和柠檬 *CINAC83* 碱基序列比对

Fig. 1 Alignment of predicted base sequence of *CmNAC83* of *Citrus maxima*, *PtNAC83* of *Poncirus trifoliata* and *CINAC83* of *Citrus limon*

2.2 *CmNAC83*、*PtNAC83*、和 *CINAC83* 的同源性及进化分析

借助 NCBI 数据库将碱基序列翻译成氨基酸序列, 用 DNAMAN 对 *CmNAC83*、*PtNAC83* 和

CmNAC83、*PtNAC83* 和 *CiNAC83* 编码的氨基酸序列具有较高的同源性。以柚 *CmNAC83* 基因为例, 利用 NCBI 中的 Blast 程序对 *CmNAC83* 编码蛋白与其它已知植物中 NAC 结构域蛋白进行同源性分析, 结果表明蛋白 CmNAC83 与麻疯树 NAC011 (GenBank 序列号 AGL39667.1)、橡胶树 NAC2 (AHF27223.1)、可可 NAC (XP_007043870.1)、茶 NAC (AGT01909.1)、苹果 NAC22 (NP_001281000.1)、大豆 NAC14 (NP_001238078.1) 和拟南芥 NAC083 (NP_196822.1) 等 NAC 蛋白同源性依次为 77%、76%、74%、74%、71%、67% 和 62%。证明克隆出的 3 个基因属于植物 NAC 转录因子家族。



A - E are the conserved domains of these proteins.

为了进一步分析柚 CmNAC83、枳 PtNAC83 和柠檬 CINAC83 蛋白的进化关系, 利用 MEGA6 软件的邻接法对搜索到的 21 个 NAC 类蛋白序列作进化树分析 (图 3), CmNAC83、PtNAC83 和 CINAC83 聚集在同一支进化树中, 证明三者亲缘关系较近。可见氨基酸进化与植物进化基本一致。另外, 参照 Ooka 等 (2003) 对 NAC 类转录因子的分类方法将这些基因分为 ATAF、OsNAC3、NAM、SENU5 等 4 个亚族, 分析结果显示该 3 个蛋白均与苹果 NAC22 (NP_001281000.1)、麻疯树 NAC011 (AGL39667.1)、拟南芥 NAC083 (NP_196822.1) 等亲缘关系较近, 且都属于 SENU5 亚族。

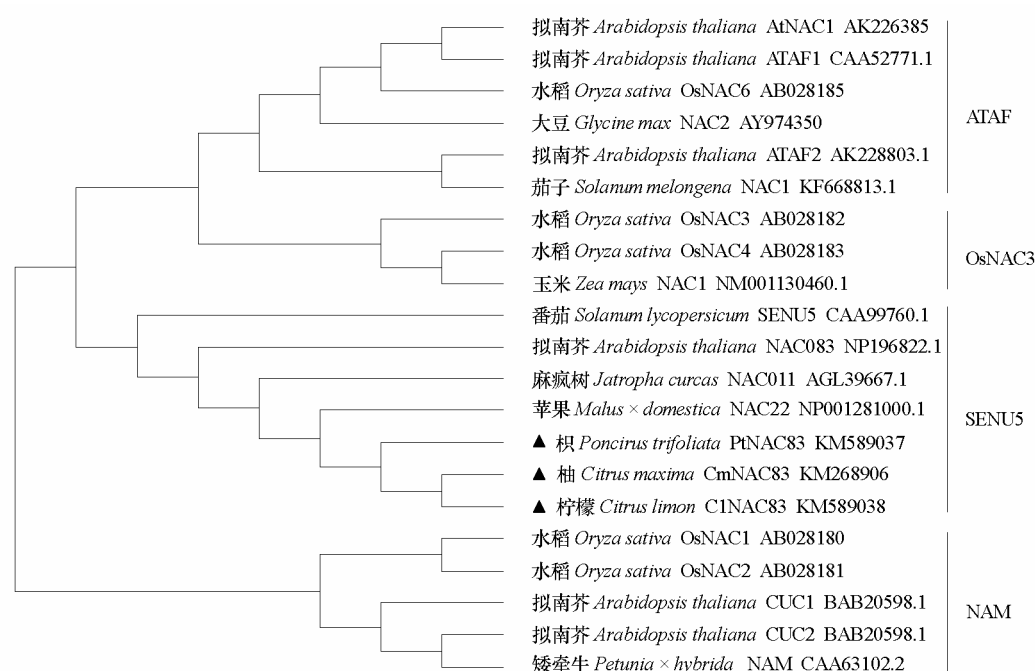


图 3 CmNAC83、PtNAC83 和 CINAC83 与其它植物 NAC 蛋白系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of close homologues of the CmNAC83, PtNAC83, CINAC83 and other NAC proteins

2.3 CmNAC83、PtNAC83 和 CINAC83 的蛋白序列分析及三维结构预测

ProtParam 在线分析显示: 柚 CmNAC83 蛋白分子式为 $C_{1240}H_{1926}N_{356}O_{375}S_{10}$, 由 20 种基本的氨基酸组成, 其中含量最高的氨基酸是丝氨酸 Ser (8.0%), 含量最低的氨基酸是组氨酸 His (1.6%) 和色氨酸 Trp (1.6%), 酸性氨基酸 (Asp + Glu) 总数为 31 个, 碱性氨基酸 (Arg + Lys) 总数为 37 个, 预测相对分子量约为 28.14 kD, 理论等电点为 9.02, 总平均亲水性 (GRAVY) 为 -0.738, 不稳定指数 45.12, 推测其属于不稳定亲水性蛋白。枳 PtNAC83 蛋白由 20 种基本的氨基酸组成, 其分子式为 $C_{1237}H_{1933}N_{353}O_{369}S_{11}$, 其中含量最高的氨基酸是 Ser (8.0%) 和 Lys (8.0%), 含量最低的氨基酸是 His (1.6%) 和 Trp (1.6%), 酸性氨基酸 (Asp + Glu) 总数为 28 个, 碱性氨基酸 (Arg + Lys) 总数为 37 个, 预测相对分子量约为 28.00 kD, 理论等电点为 9.31, 总平均亲水性 (GRAVY) 为 -0.666, 不稳定指数 38.98, 推测其属于稳定亲水性蛋白。柠檬 CINAC83 蛋白由 20 种基本的氨基酸组成, 其分子式为 $C_{1244}H_{1940}N_{356}O_{372}S_{10}$, 其中含量最高的氨基酸是 Ser (8.0%) 和 Lys (8.0%), 含量最低的氨基酸是 His (1.6%) 和 Trp (1.6%), 酸性氨基酸 (Asp + Glu) 总数为 29 个, 碱性氨

基酸 (Arg + Lys) 总数为 38 个, 预测相对分子量约为 28.15 kD, 理论等电点为 9.30, 总平均亲水性 (GRAVY) 为 -0.706, 不稳定指数 40.84, 推测其属于不稳定亲水性蛋白。

通过 PROFsec 在线预测 CmNAC83、PtNAC83 和 CINAC83 蛋白的二级结构, 结果表明: CmNAC83 蛋白含 4.42%螺旋结构, 16.87%折叠和 78.71%环状结构; PtNAC83 蛋白含 4.8%螺旋结构, 19.7%折叠和 75.5%环状结构; CINAC83 蛋白含 5.2%螺旋结构, 20.1%折叠和 74.7%环状结构。

运用 TMHMM Server v.2.0 预测 CmNAC83、PtNAC83 和 CINAC83 蛋白均无跨膜区域。用 SignalP 3.0 Server 分析结果说明该 3 个蛋白均不含信号肽。接着用 PSORT WWW Server 中的 PSORT II Prediction 工具进行细胞定位, 结果表明: CmNAC83 蛋白在细胞核中的可能性为 73.9%, 在线粒体中的可能性为 17.4%, 在细胞质中的可能性为 4.3%, 在细胞骨架上的可能性为 4.3%; PtNAC83 和 CINAC83 蛋白在细胞核中可能性为 65.6%, 在线粒体中可能性为 21.7%, 在细胞质和细胞骨架的可能性均为 4.3%。前面已分析得到 3 个蛋白均不含有跨膜区域和信号肽, 不能穿过膜结构, 所以该蛋白在线粒体中的可能性为零。因此推测该 3 个蛋白存在于细胞核中的可能性极大, 很可能是一种转录因子。

以上二级结构预测结果表明 3 个蛋白的二级结构极为相似, 因此以 CmNAC83 蛋白为例, 搜索到其同源模型拟南芥 NAC19 (*Arabidopsis thaliana* NAC domain-containing protein 19) 蛋白, 利用网站 Expasy 中 Swiss Model 程序同源建模, 推测该蛋白的三维结构模型如图 4。由结构的相似性可以推知 3 个蛋白与拟南芥 NAC19 蛋白有相似的生物学功能。

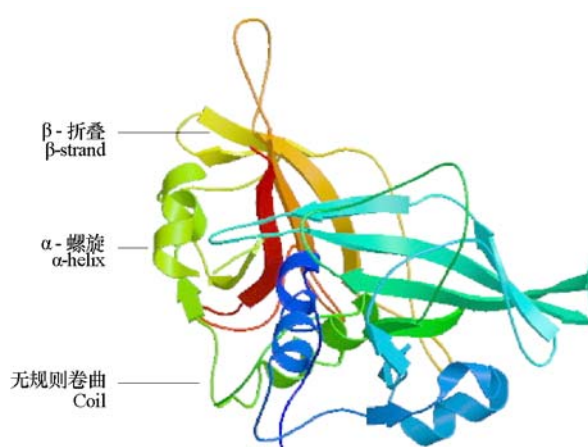


图 4 CmNAC83 蛋白三维结构预测模型

Fig. 4 Predicted 3D structure model of protein CmNAC83

2.4 CmNAC83、PtNAC83、CINAC83 的荧光定量表达分析

如图 5 所示: 在 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 胁迫下, 柚 CmNAC83、枳 PtNAC83 和柠檬 CINAC83 在叶片中均有表达; 处理 1 h 时柚 CmNAC83 相对表达量急剧上升达到最大值, 可见 ABA 可以诱导 CmNAC83 在柚叶片中迅速表达, 整体呈先迅速上升后逐渐下降的趋势; 枳 PtNAC83 表达量变化幅度相对平稳; 柠檬 CINAC83 表达在前 12 h 随时间推移逐渐增强, 在 12 h 时达到最大峰值。

20% PEG6000 模拟干旱胁迫下, 3 个基因在叶片中均有表达; 柚 CmNAC83 表达量呈先上升后下降的趋势, 在 3 h 时达到最大峰值; 枳 PtNAC83 在前 12 h 随时间推移表达下调, 整体变化幅度相对较平缓; 柠檬 CINAC83 在胁迫 1 h 时表达量降到最低值, 12 h 时表达量急剧上升至最高峰值, 整体呈先略微下降后上升趋势, 变化幅度较大。

4°C 低温胁迫下, 3 个基因在叶片中均有表达; 柚 CmNAC83 整体表达均较强, 在 12 h 时表达量略低于对照; 枳 PtNAC83 表达量均低于对照, 整体呈下调趋势; 柠檬 CINAC83 相对表达量分别在 1 h、3 h 期间达到最高峰值和最低峰值, 整体呈先上升后逐渐下降趋势。

$250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫下, 柚 CmNAC83 表达量在 24 h 内均高于对照, 整体呈上调趋势, 在 12 h 时达到最大值; 枳 PtNAC83 表达量变化幅度均较小, 基本呈先略微升高后逐渐下降的趋势; 柠檬 CINAC83 表达量变化趋势较明显, 1 h、12 h 时分别达到最低峰值和最高峰值, 整体呈先略微下

降后上升的趋势。

总之, ABA、干旱、低温、高盐处理后, *CmNAC83*、*PtNAC83* 和 *CiNAC83* 表达量均发生改变; 且柚和柠檬中变化趋势较明显, 枳中变化幅度较平缓。初步证实 *CmNAC83*、*PtNAC83* 和 *CiNAC83* 是可被逆境胁迫诱导表达的转录因子, 且在不同物种发育过程中所起作用存在一定差异。

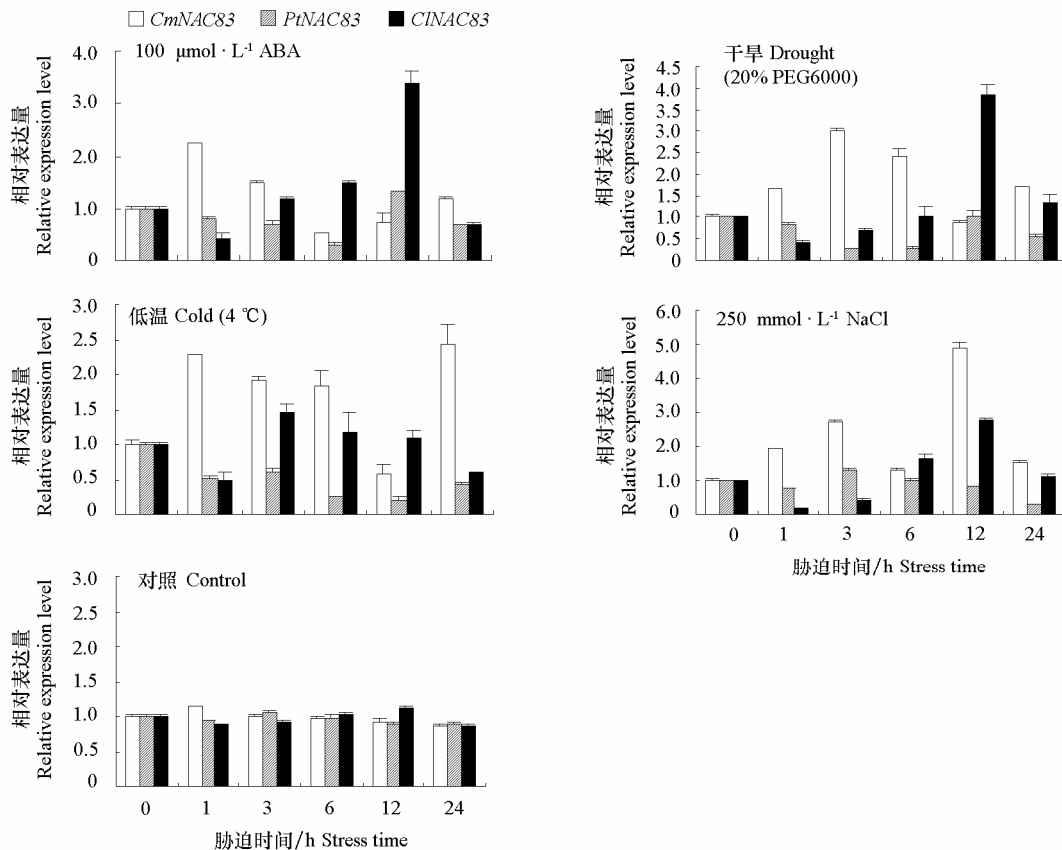


图 5 各胁迫处理后 NAC83 在柚、枳和柠檬叶中的表达

Fig. 5 Expression pattern of NAC83 in leaves of *Citrus maxima*, *Poncirus trifoliata* and *Citrus limon* under different stresses

3 讨论

本研究中从抗逆性不同的柑橘类植物柚、枳和柠檬中分离出了 3 个新的 NAC 转录因子基因 *CmNAC83*、*PtNAC83* 和 *CiNAC83*。氨基酸序列分析表明, 3 个新基因都编码 249 个氨基酸的完整开放阅读框, 其氨基酸序列均在 14 ~ 138 位上含有 NAC 转录因子家族保守的 NAM 结构域(柳展基 等, 2007), 因此推断该基因属于 NAC 转录因子家族成员。前人研究表明, NAC 转录因子的 N-端为高度保守的 NAC 结构域, 由大约 150 个氨基酸残基组成, 该区域可以结合 DNA 和其他蛋白, 而 C-端为转录激活功能区, 具有高度的多样性 (Olsen et al., 2005)。本试验中将克隆到的 3 个新基因的蛋白序列与其它已知物种的 NAC 蛋白序列比对发现, 这些转录因子在 NAC 结构域内序列非常保守, 尤其在 5 个亚结构域处保守性更强, 序列差异主要集中在转录激活功能区的 C-端, 且非保守区域的氨基酸序列差异较大, 由此说明 NAC83 蛋白既具有较高的保守性区域, 同时又具有较高的可变

性区域, 这种结构保证了 *NAC* 转录因子具有结合的专一性和激活功能上的多样性。系统进化分析显示该 3 个基因与苹果 *NAC22*、麻疯树 *NAC011*、拟南芥 *NAC083* 亲缘关系较近, 均属于 *NAC* 家族中的 *SENU5* 亚类, 根据前人研究推测其具有 *SENU5* 与植物逆境应答相关的功能。蛋白的稳定性预测分析发现, 枳 *PtNAC83* 属于稳定性蛋白, 而柚 *CmNAC83*、柠檬 *CINAC83* 均属于不稳定性蛋白。三者的氨基酸序列比对有 8 处位点存在差异, 这些氨基酸位点的差异是否是导致蛋白稳定性差异的主要原因需要进一步的研究证实。

已有研究表明, 不同的 *NAC* 基因在逆境胁迫中的表达模式不尽相同。吉璐 (2013) 研究发现芒属植物南荻 *MINAC* 基因在高盐、干旱、MeJA 和 SA 诱导下都上调; 在低温胁迫下 7 个 *MINAC* 基因转录水平上调, 3 个 *MINAC* 基因转录下调; 在 ABA 处理下 *MINAC4* 和 *MINAC10* 转录下调, 其余基因转录上调; 13 个 *MINAC* 基因除 *MINAC11* 外, 在伤害胁迫下表达量均提高。韩巧玲等 (2011) 发现大豆 *GmNAC2a* 对干旱、高温、低温、高盐、ABA 和乙烯等多种胁迫均有响应, 其中对低温响应最强烈, 表达量最高, 而对乙烯响应最迅速。Peng 等 (2010) 从鹰嘴豆中克隆到了 *NAC* 家族中 *SENU5* 亚类基因 *CarNAC1*, 在各个组织中都有表达, 且受干旱、高盐、低温和乙烯的强烈诱导表达。甜橙的 *CsNAC1* 能被低温、高盐和 ABA 诱导表达, 且在叶中较为优先表达; 其中受到低温、高盐胁迫时表达量整体呈逐渐上升趋势, 而在 ABA 胁迫时变化趋势没有明显规律 (Oliveira et al., 2011)。本研究中使用实时定量 PCR 的方法检测了柑橘在受到低温、干旱、高盐和 ABA 胁迫时 *NAC83* 基因的表达模式, 结果表明, 4 种胁迫处理后, *NAC83* 基因在柚、枳和柠檬中均有表达, 但存在差异。柚 *CmNAC83* 和柠檬 *CINAC83* 对低温、干旱、高盐和 ABA 等胁迫的响应都较敏感, 表达量均有明显变化, 且柚 *CmNAC83* 对逆境胁迫响应速度较为迅速, 其中在干旱和高盐胁迫时 *CmNAC83* 和 *CINAC83* 表达随时间推移呈逐渐上升趋势, 在低温胁迫时表达均较强, 这一表达模式与前人研究结果相似。而枳 *PtNAC83* 对 4 种胁迫的响应都不敏感, 表达量变化平缓。作者认为这与植物体自身对环境的耐受性差异有关, 枳本身对环境胁迫的耐受性较柚和柠檬要强, 因此在相同的逆境胁迫条件下枳中 *NAC83* 基因的应答响应不如柚和柠檬敏感。

由于本试验中使用的是特异引物, 结果只代表该 3 个基因的等位基因的表达情况, 并不能直接说明该 3 个基因的总表达水平, 因此将从该基因的蛋白质功能和上游启动子方面做进一步研究, 以期获得关于 *NAC83* 基因在柑橘中表达调控的更多信息。

References

- Cao Yin-chuan. 2010. Cloning and expression analysis of citrus *NAC* transcription factors [M. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 曹银川. 2010. 柑橘 *NAC* 转录因子的克隆与表达分析 [硕士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Fujita M, Fujita Y, Maruyama K, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Tran L S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2004. A dehydration-induced *NAC* protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *Plant J*, 39: 863 - 876.
- Han Qiao-ling, Cao Xin-you, Chen Ming, Chen Yao-feng, Li Lian-cheng. 2011. Isolation and expression pattern analysis of *GmNAC2a* from soybean. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 31 (1): 8 - 13. (in Chinese)
- 韩巧玲, 曹新有, 陈 明, 陈耀锋, 李连城. 2011. 大豆转录因子 *GmNAC2a* 基因克隆及表达. *西北植物学报*, 31 (1): 8 - 13.
- Hu Rui-bo, Qi Guang, Kong Ying-zhen, Kong De-jing, Gao Qian, Zhou Gong-ke. 2010. Comprehensive analysis of *NAC* domain transcription factor gene family in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biology*, 10 (1): 145.
- Ji Lu. 2013. Cloning and function identification of stress resistance-related *NAC* transcription factors from *Giscanthus lularioriparius* (Poaceae) [Ph. D. Discussion]. Changsha: Hunan Agricultural University. (in Chinese)

- 吉 璐. 2013. 南荻抗逆相关 NAC 转录因子的克隆及功能鉴定[博士论文]. 长沙: 湖南农业大学.
- Jiang Y Q, Deyholos M K. 2006. Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed *Arabidopsis* roots reveals novel classes of responsive genes. *BMC Plant Bio*, 6 (1): 25.
- Kawaura K, Mochida K, Ogiwara Y. 2008. Genome-wide analysis for identification of salt-responsive genes in common wheat. *Funct Integr Genomics*, 8: 277 - 286.
- Le D T, Nishiyama R, Watanabe Y, Mochida K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran L S. 2011. Genome-wide survey and expression analysis of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress. *DNA Research*, 10: 1093.
- Liu Mei-ying, Ye Xiao-fang, Tang Yi-miao, Gao Shi-qing, Zhang Zhao, Zhao Chang-ping, Chen Xue-ping. 2010. Effects of *TaNAC* on drought resistance in transgenic tobaccos. *Acta Tabacaria Sinica*, 16 (6): 82 - 88. (in Chinese)
- 刘美英, 冶晓芳, 唐益苗, 高世庆, 张 朝, 赵昌平, 陈学平. 2010. *TaNAC* 提高转基因烟草的抗旱功能. *中国烟草学报*, 16 (6): 82 - 88.
- Liu Zhan-ji, Shao Feng-xia, Tang Gui-ying. 2007. The research progress of structure function and regulation of plant NAC transcription factors. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 27 (9): 1915 - 1920. (in Chinese)
- 柳展基, 邵凤霞, 唐桂英. 2007. 植物 NAC 转录因子的结构功能及其表达调控研究进展. *西北植物学报*, 27 (9): 1915 - 1920.
- Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2006. Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress-responsive gene expression in plants. *Plant Physiol*, 126: 62 - 71.
- Nuruzzaman M, Manimekalai R, Sharoni A M, Satoh K, Kondoh H, Ooka H, Kikuchi S. 2010. Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene*, 465: 30 - 44.
- Oliveira T M, Cidade L C, Gesteira A S. 2011. Analysis of the NAC transcription factor gene family in citrus reveals a novel member involved in multiple abiotic stress responses. *Tree Genetics & Genomes*, 7 (6): 1123 - 1134.
- Olsen A N, Ernst H A, Leggio L L, Skriver K. 2005. NAC transcription factors: Structurally distinct, functionally diverse. *Trends Plant Sci*, 10 (2): 79 - 87.
- Ooka H, Satoh K, Doi K, Nagata T, Otomo Y, Murakami K. 2003. Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research*, 10 (6): 239 - 247.
- Peng Hui, Xing-wang, Cheng Hui-ying, Shi Qing-hua, Zhang Hua, Li Jian-gui, Ma Hao. 2010. Cloning and characterization of a novel NAC family gene *CarNAC1* from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Molecular Biotechnology*, 44 (1): 30 - 40.
- Rushton P J, Bokowiec M T, Han S, Zhang H, Brannock J F, Chen X, Laudeman T W, Timko M P. 2008. Tobacco transcription factors: Novel insights into transcriptional regulation in the Solanaceae. *Plant Physiology*, 147: 280 - 295.
- Shao Shuai, Xu Ling-xian, Wang Shao-hui, Zhao Fu-kuan. 2014. Cloning and expression analysis of *SmNAC1* in *Solanum melongena*. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (5): 975 - 984. (in Chinese)
- 邵 帅, 徐岭贤, 王绍辉, 赵福宽. 2014. 茄子 *SmNAC1* 基因的克隆与表达分析. *园艺学报*, 41 (5): 975 - 984.
- Singh K B, Foley R C, Oñate-Sánchez L. 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 5 (5): 430 - 436.
- Wang Min. 2013. Functional analysis of *Zea mays* NAC membrane bound transcription factor *ZmNTL1* [M. D. Dissertation]. Lanzhou: Northwest Normal University. (in Chinese)
- 王 敏. 2013. 玉米 NAC 膜结合转录因子基因 *ZmNTL1* 的初步功能研究[硕士论文]. 兰州: 西北师范大学.
- Xu Zhao-shi, Chen Ming, Li Lian-cheng, Ma You-zhi. 2011. Functions and application of the AP2/ERF transcription factor family in crop improvement. *Journal of Integrative Plant Biology*, 53 (7): 570 - 585.
- Zhang Jie-wei, Chen Ya-juan, Ding Li-ping, Zhu Dan, Miao Ao-xue, Wei Jian-hua, Wang Hong-zhi. 2014. Molecular cloning and expression analysis of *PtoNAC157* from *Populus tomentosa*. *Plant Physiology Journal*, 50 (7): 995 - 1001. (in Chinese)
- 张杰伟, 陈亚娟, 丁莉萍, 朱 丹, 苗傲雪, 魏建华, 王宏芝. 2014. 毛白杨 *PtoNAC157* 基因的克隆与表达分析. *植物生理学报*, 50 (7): 995 - 1001.