

谷子转录因子 *SiNAC18* 通过 ABA 信号途径 正向调控干旱条件下的种子萌发

窦祎凝¹, 秦玉海^{1,2}, 闵东红², 张小红², 王二辉², 刁现民¹,
贾冠清¹, 徐兆师¹, 李连城¹, 马有志¹, 陈明¹

(¹中国农业科学院作物科学研究所/农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程/农业部麦类生物学与作物遗传育种重点实验室, 北京 100081;
²西北农林科技大学农学院/旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西杨凌 712100)

摘要:【目的】谷子 (*Setaria italica* L.) 具有显著耐旱性。研究旨在通过反向遗传学方法分析并鉴定在干旱条件下影响植物萌发过程的重要调控因子, 为研究作物干旱条件下种子萌发的调控机制创造条件。【方法】使用 ClustalX 2.0 和 MEGA 5.05 软件对谷子 *SiNAC18* 蛋白序列及其同源序列进行多序列比对, 并构建系统进化树; 利用 real-time PCR 方法检测 *SiNAC18* 在不同胁迫条件下的表达模式; 通过瞬时转化的方法分析 *SiNAC18* 蛋白亚细胞定位; 在拟南芥中过表达 *SiNAC18*, 分析 *SiNAC18* 的生物学功能; 分析 *SiNAC18* 在转基因拟南芥中可能控制的下游基因。【结果】*SiNAC18* 全长 1 074 bp, 编码由 357 个氨基酸组成的亲水性蛋白, 分子量约为 38.8 kD; 系统进化树分析表明 *SiNAC18* 属于 NAC 转录因子家族第 I 组的 NAP 亚组, 与拟南芥基因 *AtNAC29* 同源性最高; 氨基酸序列比对结果显示, *SiNAC18* 与其他物种包括水稻、拟南芥、大豆和玉米中同源性最高的 NAC 类转录因子蛋白的 N 端都具有 A、B、C、D 和 E 这 5 个保守结构域, 蛋白 C 端具有高度多态性, 证明 *SiNAC18* 的 N 端序列与其结合下游基因启动子元件相关; real-time PCR 结果显示, *SiNAC18* 在干旱 (PEG)、ABA、高盐 (NaCl) 及过氧化氢 (H₂O₂) 处理条件下的表达量明显上升; 亚细胞定位结果表明 *SiNAC18* 蛋白定位于细胞核中; 基因功能分析结果显示, 在 ABA 和 PEG 胁迫处理下, *SiNAC18* 转基因拟南芥与野生型种子的萌发率存在明显差异: 在正常生长条件下, 野生型拟南芥 WT 和 *SiNAC18* 转基因拟南芥的萌发率基本一致, 在 PEG 浓度为 10% 和 15% 的 MS 培养基上, *SiNAC18* 转基因拟南芥的萌发率显著高于 WT。在 2 和 5 μmol·L⁻¹ ABA 处理条件下, 转基因拟南芥的萌发率显著低于 WT; 下游基因表达分析结果显示, ABA 信号途径相关基因 *AtRD29A*, 脯氨酸合成相关基因 *AtP5CR* 和 *AtPRODH* 以及过氧化物酶基因 *AtPRX34* 在 *SiNAC18* 转基因株系中的表达量高于 WT 中的表达量, 表明 *SiNAC18* 通过调控这些下游基因影响转基因植物在干旱条件下的萌发率。【结论】谷子 NAC 类转录因子基因 *SiNAC18* 可能通过 ABA 信号途径、氧化胁迫调控等途径正向调控植物在干旱条件下的萌发过程。

关键词: 谷子; NAC 类转录因子; 种子萌发; 干旱胁迫; ABA 信号途径

Transcription Factor *SiNAC18* Positively Regulates Seed Germination Under Drought Stress Through ABA Signaling Pathway in Foxtail Millet (*Setaria italica* L.)

DOU YiNing¹, QIN YuHai^{1,2}, MIN DongHong², ZHANG XiaoHong², WANG ErHui², DIAO XianMin¹,
JIA GuanQing¹, XU ZhaoShi¹, LI LianCheng¹, MA YouZhi¹, CHEN Ming¹

(¹Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Key Facility For Crop Gene Resource and Genetic Improvement/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Triticeae Crop, Ministry of Agriculture, Beijing 100081; ²College of Agronomy, Northwest A&F University/State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Yangling 712100, Shaanxi)

收稿日期: 2017-02-15; 接受日期: 2017-04-05

基金项目: 国家转基因生物新品种培育科技重大专项 (2016ZX08002002)、中国农业科学院科技创新工程

联系方式: 窦祎凝, E-mail: 1614520157@qq.com. 秦玉海, E-mail: 263820084@qq.com. 窦祎凝和秦玉海为同等贡献作者。通信作者陈明, Tel: 010-82108750; E-mail: chenming02@caas.cn

Abstract: 【Objective】 Foxtail millet (*Setaria italica* L.) has strong tolerance to drought stress. The objective of this research is to screen key regulatory factors affecting the germination process under drought conditions in plants through reverse genetics method, which will contribute for further research of regulation mechanism of seed germination under drought condition. 【Method】 Multiple sequence alignment of SiNAC18 protein sequences and millet homologous sequences were made by using ClustalX 2 and MEGA 5.05 softwares, and the phylogenetic tree was constructed. The expression patterns of *SiNAC18* under the stress condition were analyzed using the real-time PCR method. SiNAC18 protein subcellular localization was analyzed by transient transfection method. Biological function of *SiNAC18* was analyzed by using overexpression of *SiNAC18* in *Arabidopsis thaliana*. The expression of downstream genes of *SiNAC18* was analyzed by real-time PCR. 【Result】 The length of *SiNAC18* is 1 074 bp encoding a hydrophilic protein with polypeptide of 357 amino acids, and its molecular weight is about 38.8 kD. Phylogenetic tree analysis indicated that SiNAC18 belongs to NAP subgroup of group I in the NAC transcription factors family and has the highest homology with *Arabidopsis* gene AtNAC29. The amino acid sequence alignment results show that the N-terminal of SiNAC18 and the highest homology transcription factors of SiNAC18 in other species, including rice, *Arabidopsis thaliana*, soybean and maize, has A, B, C, D and E five conserved domains. The C-terminal of the protein has a high degree of polymorphism, demonstrating that the N-terminal sequence of SiNAC18 is associated with its downstream promoter. Real-time PCR results showed that *SiNAC18* were induced by drought (PEG), high salt (NaCl) and hydrogen peroxide (H₂O₂) treatment. Subcellular localization results showed that SiNAC18 protein is localized in the nucleus. Gene function analysis showed that in the ABA and PEG stress treatments, the germination rate of *SiNAC18* transgenic *Arabidopsis thaliana* and wild type seed was significantly different. Under normal growth conditions, germination rate of the wild type *Arabidopsis* WT and *SiNAC18* transgenic *Arabidopsis* was the same, and when the concentration of PEG was increased to 10% and 15% on MS medium, the germination rate of *SiNAC18* transgenic *Arabidopsis* was significantly higher than WT. Under the conditions of 2 and 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of ABA treatment, the germination rate of *SiNAC18* transgenic *Arabidopsis* was significantly lower than that of WT. Analysis results showed that the expression of downstream genes of ABA related genes *AtRD29A*, proline synthesis related genes *AtP5CR* and *AtPRODH* and peroxidase gene *AtPRX34* in *SiNAC18* transgenic plants was higher than that in WT, which suggesting that *SiNAC18* affects the germination rate of transgenic plants under drought conditions by affecting the expression of those downstream genes. 【Conclusion】 NAC like transcription factor gene *SiNAC18* positively regulates the germination of plants under drought conditions through ABA and oxidative stress response signaling pathway in foxtail millet.

Key words: foxtail millet (*Setaria italica* L.); NAC transcription factors; seed germination; drought stress; ABA signaling pathway

0 引言

【研究意义】种子的萌发率对于农业生产非常重要,提高种子萌发率,可以降低人力、物力和财力的消耗,提高粮食亩产。作物种子萌发率受种子休眠及萌发机制相互作用的制约,同时也受环境条件的影响。其中,水分是影响种子萌发的主要因素之一,种子萌发并开始生长时,需要吸收大量水分达到吸胀状态以保障发芽。提高干旱胁迫条件下作物的萌发率,有助于维持产量稳定,保障农业的可持续发展。目前,对于调控作物种子萌发率的分子机制研究较少。另外,谷子起源于中国,具有耐旱等突出特性,是中国重要的粮食作物,是单子叶作物抗逆功能研究的重要模式作物^[1]。NAC转录因子家族是一个植物特有的转录因子超级家族^[2],许多NAC转录因子响应非生物胁迫^[3]。因此,研究谷子种子萌发期抗逆相关基因的调控途径,对提高作物的抗逆性具有重要意义。【前人研究进展】

在种子休眠过程中起关键作用的内源信号分子是脱落酸(abscisic acid, ABA)和赤霉素(gibberellin acid, GA)^[4],其中ABA促进种子脱水耐性和种子休眠的获得,抑制种胚萌发;而GA解除种子休眠,促进萌发,种子休眠或萌发取决于这两种激素的平衡调控。ABA是调控植物干旱胁迫响应的主要植物激素,当植物感受到土壤水分亏缺后,引起ABA合成大量增加^[5],从而减弱和植物生长有关的新陈代谢活动,同时抑制种子萌发^[6]。NAC转录因子家族的成员在N端具有一个高度保守的DNA结合区(NAC结构域),大约包含150个氨基酸残基,NAC结构域含有A、B、C、D、E 5个亚结构域,C端区域高度变异^[7]。NAC转录因子家族可以特异地结合CGT(G/A)和CACG顺式作用元件,调节下游目标基因的表达^[8]。NAC转录因子和多种生物过程相关,包括细胞分裂、顶端分生组织发育、次生壁形成、侧根形成、叶片衰老和响应多种生物胁迫和非生物胁迫^[2,9]。NAC转录因子调控植物

抗逆反应的研究较多^[10]。NAC 家族的一些成员在模式植物如拟南芥, 作物如大豆、水稻、小麦和玉米中被发现, 在干旱胁迫信号途径中发挥重要作用。过表达拟南芥 NAC 基因 *ANAC019*、*ANAC055* 和 *ANAC072* 提高了转基因植物的抗旱性^[11]。NAC 转录因子参与水稻非生物胁迫的响应, 比如过表达 *OsNAC9*、*OsNAC5* 或者 *OsNAP* 提高了转基因水稻的抗寒性和耐盐性^[12]。在一些转基因水稻中, ABA 在 NAC 转录因子调节非生物胁迫的信号通路中发挥重要作用^[12]。水稻中有许多 ABA 信号途径依赖型的 NAC 转录因子, 例如 *OsNAC5*、*OsNAC6* 和 *OsNAC10* 通过调节特异的目标基因提高了转基因植株的抗旱性^[2,9]。【本研究切入点】目前, 关于 ABA 相关的抗逆调控信号途径研究较多, 但是, 关于干旱条件下调节作物种子萌发过程的机制研究较少。谷子具有抗旱、耐瘠薄的特点, 但对谷子抗逆的分子机制仍然了解较少^[13-14]。中国农业科学院作物科学研究所马有志研究员课题组通过对谷子干旱、低氮、低钾转录组测序, 分析发现许多谷子抗逆基因响应谷子胁迫处理, 其中 *SiNAC18* 响应干旱胁迫较强^[15]。【拟解决的关键问题】从谷子转录组测序结果中挑选了干旱显著表达上调的 NAC 类转录因子基因 *SiNAC18* (*Si003116*, *XM_004967871*), 通过在拟南芥中过表达 *SiNAC18* 并分析其生物学功能, 同时对其参与的信号途径进行分析, 为揭示谷子干旱条件下影响种子萌发的调控途径创造条件。

1 材料与方法

试验于 2016 年在中国农业科学院作物科学研究所完成。

1.1 试验材料

所用谷子品种为龙谷 25, 由中国农业科学院作物科学研究所刁现民研究员课题组提供。拟南芥野生型种子 (*Columbia-0*)、植物表达载体 *pBI121* 和绿色荧光蛋白标记载体 *16318hGFP* 由中国农业科学院作物科学研究所马有志研究员课题组保存。高保真 DNA 聚合酶 PrimeSTAR HS DNA Polymerase、In-Fusion HD Cloning System 试剂盒购于宝生物工程 (TaKaRa)。利福平、氨基青霉素、卡那霉素和完全培养基混合物 (MS 粉) 等购自北京拜尔迪生物技术有限公司。琼脂糖凝胶回收试剂盒、植物总 RNA 提取试剂盒、FastQuant RT Super Mix 反转录试剂盒和 Real Master Mix (SYBR Green) 试剂盒均购自天根生化科技 (北京) 有限公司。试验所用引物合成及测序

工作由北京奥科鼎盛生物科技有限公司完成。

1.2 谷子 *SiNAC18* 的生物信息学分析

在 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) 中用谷子 *SiNAC18* 的蛋白序列进行 BLASTP 比对, 得到与其同源性较高的其他物种的基因序列后用 ClustalX 2.0 软件进行多序列比对; 根据拟南芥 NAC 家族分组标准搜索与谷子和水稻同源性最高的基因, 用 MEGA 5.05 软件以相邻法 (Bootstrap 设为 1000) 构建系统进化树。

1.3 *SiNAC18* 的表达模式分析

取长势一致的谷子幼苗分别进行 ABA (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、NaCl (100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、干旱 (6% PEG-6000) 等处理。取未处理 (0 h) 和处理 1、6、12、24 和 48 h 的整个植株以及未处理的材料, 用液氮速冻后放置 -80°C 冰箱保存。用植物总 RNA 提取试剂盒提取谷子的 RNA, 用 FastQuant RT Super Mix 反转录试剂盒合成 cDNA。使用 RealMaster Mix (SYBR Green) 试剂盒和实时荧光定量 PCR 仪 (ABI7500) 进行 real-time PCR 反应。以 *SiActin* (*Si001873m.g*) 为内参基因 (表 1)。采用三步法反应程序, 95°C 15 min; 95°C 5 s, 60°C 20 s, 72°C 30 s 后收集荧光信号, 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法根据各样品在特定荧光阈值下的 Ct 值计算基因在不同样品中的相对表达量。

1.4 *SiNAC18* 蛋白亚细胞定位

扩增 *SiNAC18* 的编码序列, 构建 *p16318hGFP-SiNAC18* 融合表达载体, 以谷子叶片为材料参考 YOO 等^[16]的方法进行原生质体的制备和转化, 室温避光培养 16 h 以上, 使用激光共聚焦显微镜 (Zeiss LSM700) 观察 *SiNAC18* 蛋白亚细胞定位情况。

1.5 *SiNAC18* 转基因植株的获得

通过 In-Fusion® HD Cloning Kit 克隆试剂盒 (Clontech) 将扩增得到的 *SiNAC18* cDNA 序列参考 CLOUGH 等^[17]的方法, 插入到带有 CaMV 35S 启动子的 *pBI121* 表达载体上, 采用农杆菌转化法转入 GV3101 农杆菌感受态, 转化拟南芥。在含卡那霉素 ($50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 MS 培养基上对收获的拟南芥种子进行筛选, 经筛选和扩繁后, 选择纯合的 T_3 代种子用于表型鉴定试验。

1.6 *SiNAC18* 转基因拟南芥种子萌发期抗逆性鉴定

将拟南芥野生型 (WT) 及 *SiNAC18* 转基因株系 OE1 和 OE2 的种子首先用 70% 的酒精处理 2 min, 无菌水漂洗 3 次, 每次 2 min, 然后用 1% 的次氯酸钠溶液处理 12 min, 期间颠倒离心管数次, 无菌水漂洗 3

次后,将种子点播于 MS 培养基、PEG-6000 浓度为 10%和 15%的 MS 培养基,ABA 浓度为 2 和 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MS 培养基上,低温春化 3 d 后,将培养皿置于温度 22 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 65%,16 h 光照/8 h 黑暗的条件下进行培养。每隔 12 h 统计萌发率。

1.7 胁迫相关基因在 *SiNAC18* 转基因植株中的表达分析

用植物总 RNA 提取试剂盒提取 *SiNAC18* 转基因拟南芥的 RNA,用 FastQuant RT Super Mix 反转录试剂盒

合成 cDNA。根据相关文献报道,选择胁迫相关基因 *AtPIP2A*、*AtP5CR*、*AtPRODH*、*AtPRX34* 和 *AtRD29A*,设计引物,以 *AtActin* (*AT3G15260m.g*) 为内参基因(表 1),使用 RealMaster Mix (SYBR Green) 试剂盒和实时荧光定量 PCR 仪 (ABI7500) 进行 RT-PCR 反应。采用三步法反应程序,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 后收集荧光信号,40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法根据各样品在特定荧光阈值下的 Ct 值计算基因在不同样品中的相对表达量。

表 1 *SiNAC18* 相关引物

Table 1 *SiNAC18* related primers

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'-3')	用途 Function	退火温度 Tm ($^{\circ}\text{C}$)
N18	F1:ATGCAGCTGGATGACTGGG R1:TCATATTCTGTCCGGCAGAT	基因克隆 Gene cloning	53
N18	F2:ATCTCTAGAGGATCCATGCAGCTGGATGAC R2:GCTCACCATGGATCCGCATATTCTGTCCGG	构建 GFP 载体 Vector construction of GFP	65
N18	F3:GACTCTAGAGGATCCATGCAGCTGGATGAC R3:ACCACCCGGGATCCTCATATTCTGTCCGG	构建 pBI121 载体 Vector construction of pBI121	62
N18	F4:TCGCACAAGAGGCGATTTCAT R4:GGCTCAAACAGGGAGAAGGT	实时定量 PCR Real-time PCR	55
<i>AtPIP2A</i>	F:CGATGGCTACAGCACAGGGAC R:TACCATGAACACGGCAAATCC	实时定量 PCR Real-time PCR	60
<i>AtP5CR</i>	F:CGCGGTGGGGAAGATATTGA R:GCTAACCATCGTTGCAGCTC	实时定量 PCR Real-time PCR	60
<i>AtP5CS2</i>	F:TACAGTTCCAAGGCCTGCAC R:CAGCACCAAGTCCGAACCTA	实时定量 PCR Real-time PCR	55
<i>AtPRODH</i>	F:GATCTGCTGCGGTGGGAATA R:TGGAGGATTGTGTCTTCCGC	实时定量 PCR Real-time PCR	55
<i>AtPRX34</i>	F:CCAAACCTCTTCGTGGACTATGC R:AACTCTGGTCGCTCTGGAT	实时定量 PCR Real-time PCR	55
<i>AtRD29A</i>	F:ACGGGATTTGACGGAGAACC R:CCGTCTTTGGTCTCTTCCC	实时定量 PCR Real-time PCR	58
<i>SiActin</i>	F:GGCAAACAGGGAGAAGATGA R:GAGGTTGTCCGTAAGGTCACG	谷子内参基因 Internal control gene in <i>Setaria italica</i>	60
<i>AtActin</i>	F:TGTTCCCATCAGAACCCTGA R:CACCTGTCTTTGGGTCAACAA	拟南芥内参基因 Internal control gene in <i>Arabidopsis thaliana</i>	60

2 结果

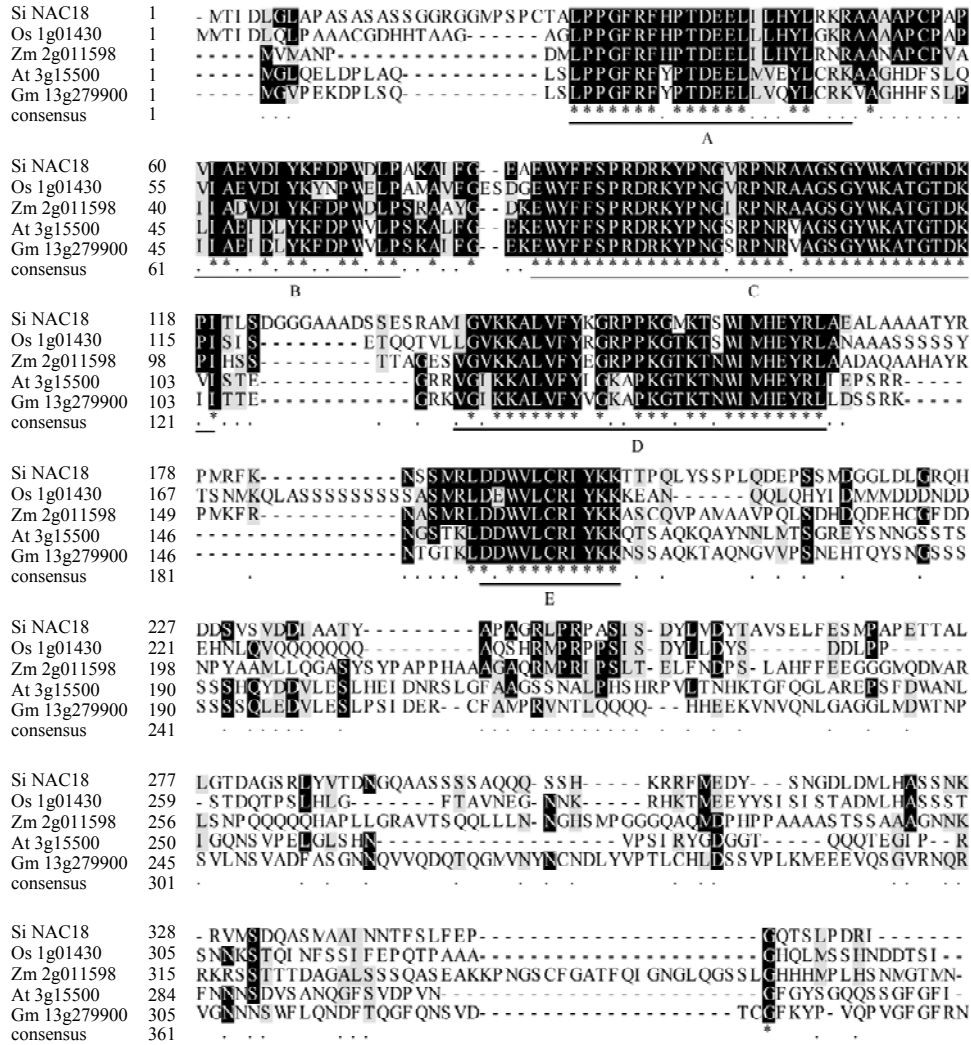
2.1 *SiNAC18* 生物信息学分析

谷子基因 *SiNAC18* 全长 1 074 bp, 编码由 357 个氨基酸组成的亲水性蛋白, 分子量约为 38.8 kD。NAC

家族蛋白具有称为 NAC 结构域(矮牵牛 NAM 结构域和拟南芥 ATAF1、ATAF2 和 CUC2 结构域)^[18]的共有序列,其位于 N-末端区域并被分为 5 个亚结构域(A—E)^[19-20]。在 Phytozome 中寻找和 *SiNAC18* 同源性最高的其他物种包括水稻、拟南芥、大豆和玉米中

NAC 类转录因子, 用 ClustalX 2.0 对 *SiNAC18* 及其同源序列进行比对分析, 发现这些蛋白 N 端都具有 A、B、C、D 和 E 这 5 个保守结构域, 蛋白 C 端具有高度多态性 (图 1), 证明 *SiNAC18* 的 N 端序列与其结

合下游基因启动子元件相关。根据 OOKA 等^[21]的报道, NAC 转录因子家族可分为 I 和 II 两个大组, 其中 I 组又分为 14 个亚组, II 组分为 4 个亚组。根据拟南芥和水稻中 NAC 转录因子家族的分类结果, 选择每



黑色下划线标记为 NAC 转录因子 N 端保守域 A、B、C、D 和 E (A: LPPGFRFPPTDEEYL; B: ADYKPWLP; C: EWYFFSPDRKYPNGRPNR; D: GKKALVFYGPKGKTWIMHEYRL; E: LDWVLCRIYKK)。黑色阴影表示保守区, *标注保守氨基酸
The NAC conserved sequence A, B, C, D, E is underlined. (A: LPPGFRFPPTDEEYL; B: ADYKPWLP; C: EWYFFSPDRKYPNGRPNR; D: GKKALVFYGPKGKTWIMHEYRL; E: LDWVLCRIYKK). Black shading indicates conserved domain, and * labelled for conserved amino acid

图 1 *SiNAC18* 与其他物种同源 NAC 类蛋白的氨基酸序列比对

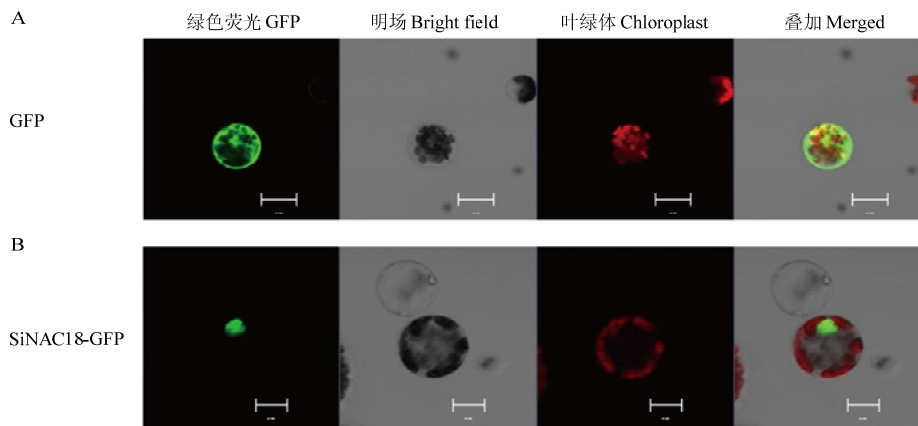
Fig. 1 Multiple alignment of amino acid sequence of *SiNAC18* and homologous NAC like proteins from other plant species

个亚组中同源性最高的蛋白, 构建物种间系统进化树, 结果显示, *SiNAC18* 属于第 I 组的 NAP 亚组, 与拟南芥基因 *AtNAC29* 同源性最高。

2.2 *SiNAC18* 亚细胞定位

将 p16318hGFP-*SiNAC18* 融合表达载体和 GFP

空载体质粒转化到谷子原生质体中, 在激光共聚焦显微镜下观察 *SiNAC18*-GFP 融合蛋白的亚细胞定位情况。结果显示, GFP 空对照蛋白在细胞核、细胞质和细胞膜中均有表达 (图 2-A), 而 *SiNAC18*-GFP 融合蛋白只在细胞核中显示绿色荧光, 表明 *SiNAC18*



A: 对照 GFP; B: 融合蛋白 SiNAC18-GFP A: Control GFP; B: Fusion protein SiNAC18-GFP

图 2 SiNAC18 蛋白亚细胞定位

Fig. 2 Subcellular localization of SiNAC18

蛋白定位在胞核中 (图 2-B)。

2.3 *SiNAC18* 表达模式分析

用 ABA ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、NaCl ($100 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、 H_2O_2 ($100 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、干旱 (6% PEG-6000) 等不同胁迫条件处理谷子幼苗, 液体 MS 培养基处理作为对

照, 通过 real-time PCR 检测谷子幼苗中 *SiNAC18* 的表达情况 (图 3), 结果显示, *SiNAC18* 在 ABA 处理条件下表达量明显提高, 在处理 24 h 表达量达到处理前的 9 倍; *SiNAC18* 在 NaCl 处理条件下表达也上调, 在处理 24 h 表达量达到处理前的 5 倍; 在过氧化氢

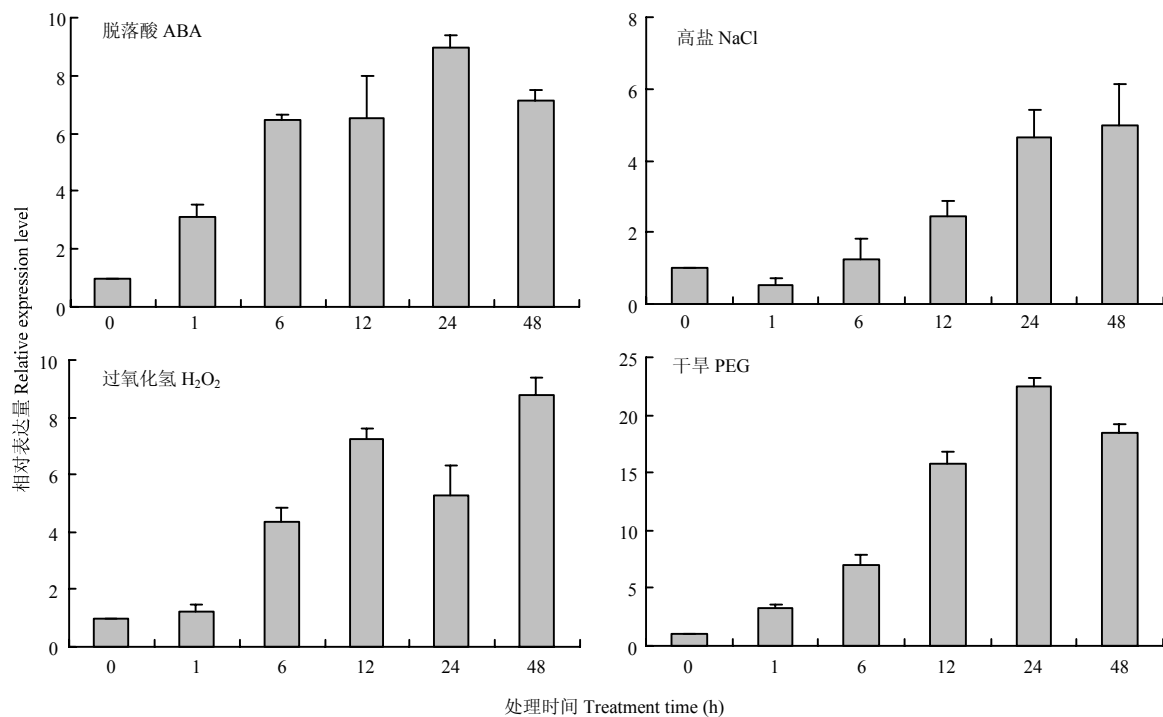


图 3 不同处理条件下 *SiNAC18* 表达谱

Fig. 3 Expression profile of *SiNAC18* under various stress treatment conditions

(H_2O_2) 处理下, 处理 48 h 后表达量是处理前的 9 倍; 在 PEG-6000 处理情况下, *SiNAC18* 表达量上升, 在 24 h 时表达量最高, 达到处理前的 22 倍。结果表明, *SiNAC18* 在谷子受 ABA、高盐、过氧化氢、干旱等非生物胁迫处理下诱导表达。

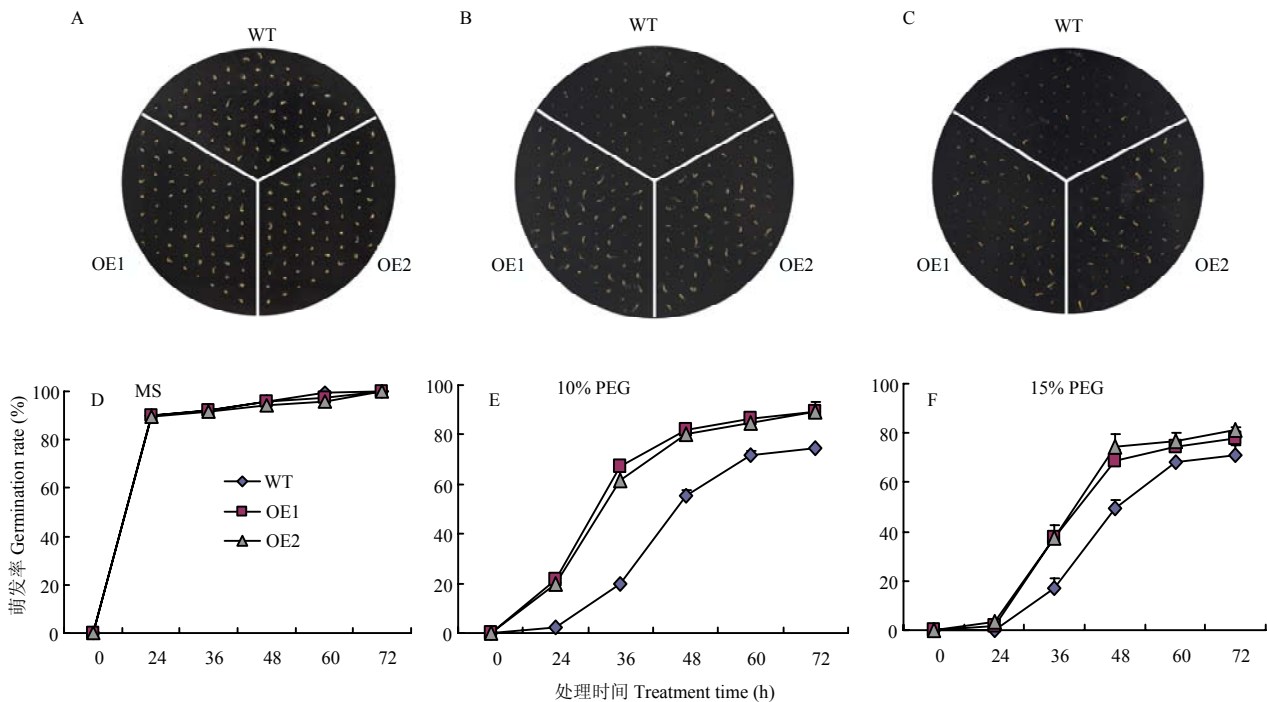
2.4 转 *SiNAC18* 拟南芥种子萌发期抗旱性

将 *SiNAC18* 转基因拟南芥种子在 ABA、NaCl、 H_2O_2 和 PEG 胁迫处理下进行抗性分析, 结果显示, 在 ABA 和 PEG 胁迫处理下, *SiNAC18* 转基因拟南芥与野生型种子的萌发率存在明显差异; 在高盐和 H_2O_2 胁迫下, 转基因植株与野生型植株相比差异不显著。在 MS 培养基上, 野生型拟南芥 WT 和转 *SiNAC18* 拟南芥种子的萌发速率基本一致 (图 4-A、4-D); 但是在 PEG-6000 浓度为 10% 的 MS 培养基上, 转基因株系 OE1 和 OE2 种子在 36 h 时萌发率为 60%, 是 WT (20%) 的 3 倍; 到第 3 天时, 转基因株系 OE1 和 OE2 (85%) 的萌发率比 WT (75%) 高 10% (图 4-B、4-E); 在 PEG-6000 浓度为 15% 的 MS 培养基上, 转基因株系 OE1 和 OE2 的萌发率仍然显著高于 WT (图

4-C、4-F), 结果表明, 转 *SiNAC18* 基因拟南芥在种子萌发期相对于 WT 有较强的抗旱性, *SiNAC18* 正向调控植物在干旱条件下的种子萌发过程。另一方面, ABA 处理结果显示在 MS 培养基上, WT 种子和转基因 *SiNAC18* 株系 OE1 和 OE2 的种子萌发率基本一致 (图 5-A、5-D); 在 ABA 浓度为 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MS 培养基上, 种子萌发被抑制, 在 6 d 后 WT (100%) 种子萌发率显著高于转基因株系 OE1 和 OE2 (60%) (图 5-B、5-E); 在 ABA 浓度为 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MS 培养基上, 在 5 d 后转基因株系 (15%) 的种子萌发率比 WT (40%) 更低 (图 5-C、5-F), 结果表明转 *SiNAC18* 基因拟南芥相对于 WT 增强了对 ABA 的敏感性, *SiNAC18* 正向调控植物 ABA 信号途径。

2.5 ABA、胁迫响应相关基因在转 *SiNAC18* 植株中的表达

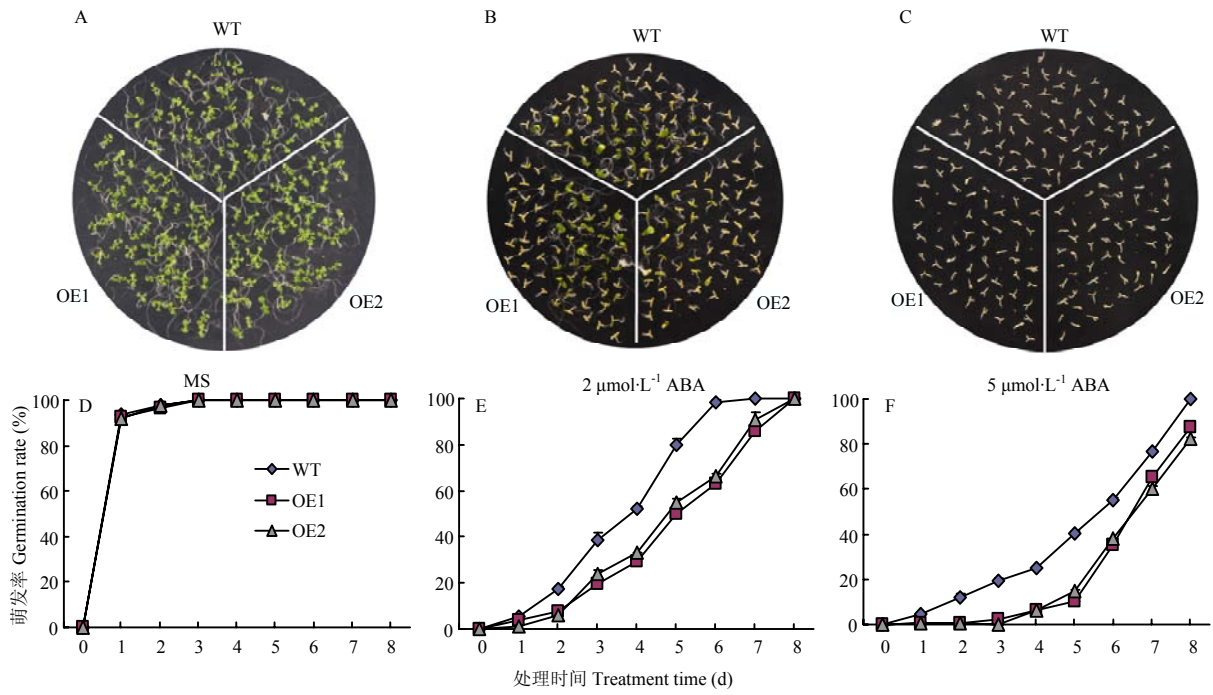
为研究 *SiNAC18* 在种子萌发期提高转基因株系抗旱能力的机制, 选取了部分 ABA 及胁迫响应相关基因, 检测这些基因在转基因株系和野生型 WT 中的表达差异 (图 6)。结果显示, ABA 信号途径相关基因



A、D: 种子在 MS 对照条件下的萌发率; B、E: 种子在 MS+10%PEG 处理条件下的萌发率; C、F: 种子在 MS+15%PEG 处理条件下的萌发率
A, D: Seed germination rates under condition of MS; B, E: Seed germination rates under condition with MS+10%PEG; C, F: Seed germination rates under condition with MS+15%PEG

图 4 *SiNAC18* 转基因拟南芥种子在不同浓度 PEG-6000 处理下的萌发率

Fig. 4 Seed germination rates of *SiNAC18* transgenic lines under different concentrations of PEG-6000 treatment conditions



A、D: 种子在 MS 对照条件下的萌发率; B、E: 种子在 MS+2 μmol·L⁻¹ ABA 处理条件下的萌发率; C、F: 种子在 MS+5 μmol·L⁻¹ ABA 处理条件下的萌发率
 A, D: Seed germination rates under condition of MS; B, E: Seed germination rates under condition with MS+2 μmol·L⁻¹ ABA; C, F: Seed germination rates under condition with MS+5 μmol·L⁻¹ ABA

图 5 *SiNAC18* 转基因拟南芥种子在不同浓度 ABA 处理下的萌发率

Fig. 5 Seed germination rates of *SiNAC18* transgenic lines under different concentrations of ABA treatment conditions

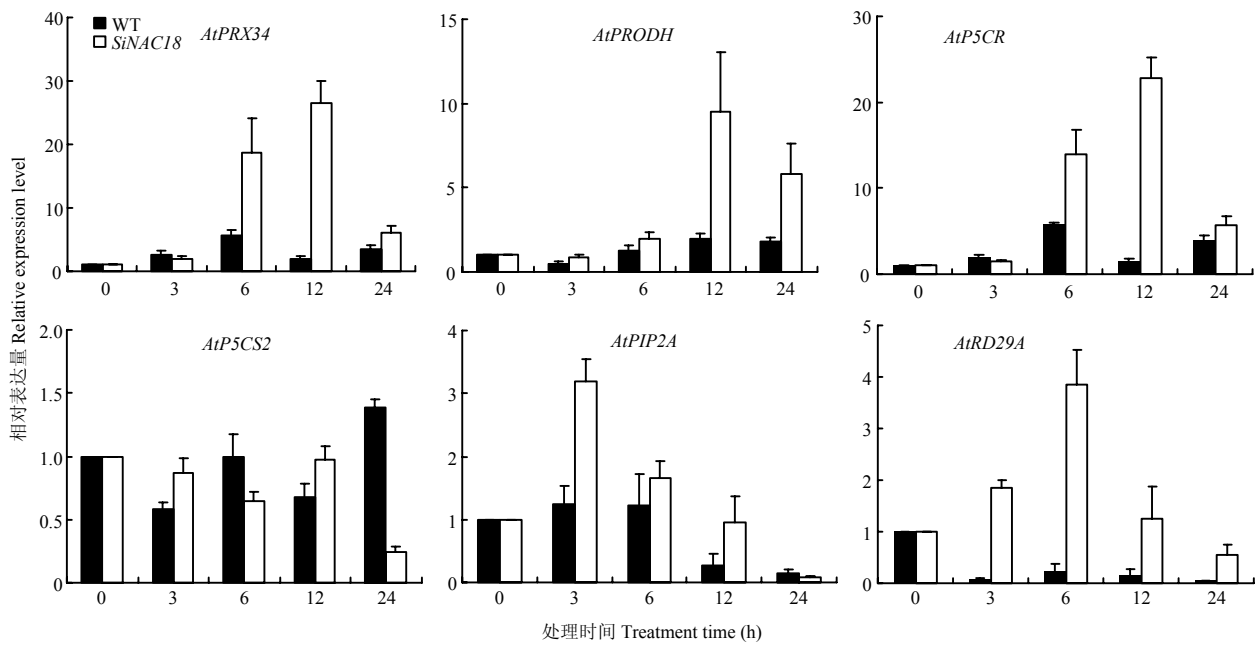


图 6 在 PEG 处理条件下 WT 和 *SiNAC18* 转基因植株中下游基因表达分析

Fig. 6 Expression analyses of downstream genes in WT and *SiNAC18* transgenic plants under PEG stress conditions

AtRD29A 在转基因株系中的表达量比 WT 要高, 表明 *SiNAC18* 通过激活 ABA 相关信号通路基因影响种子萌发期的干旱胁迫抗性; 在转基因株系中, 脯氨酸合成相关基因 *AtP5CR* 和 *AtPRODH* 的表达量明显高于在 WT 中的表达量, 表明转 *SiNAC18* 拟南芥通过激活 *AtP5CR* 和 *AtPRODH* 的表达来合成脯氨酸抵抗干旱胁迫; 过氧化物酶基因 *AtPOD* 在转基因株系中的表达量也高于 WT 中的表达量, 证明氧化胁迫相关基因也受 *SiNAC18* 调控; 水通道蛋白基因 *AtPIP2A* 在转基因株系中的表达量比 WT 要高, 表明 *SiNAC18* 通过调控水分运输抵抗种子萌发期的干旱胁迫; 脯氨酸合成相关基因 *AtP5CS2* 在转基因植株和野生型中的表达量没有规律变化。

3 讨论

干旱是限制作物产量的一个主要的非生物胁迫因素, 抗旱相关转录因子能够参与下游基因的表达调控和信号传导, 激活许多下游抗逆功能基因表达, 从而综合提高植物的抗逆性。迄今发现的与抗旱相关的转录因子主要有 DREB、MYC/MYB、bZIP、WRKY 和 NAC 类等基因家族。NAC 转录因子家族是一个植物特有的转录因子超级家族, 调节下游一系列基因的表达来参与植物各种生理生化活动, 在调节植物的生长, 响应逆境胁迫中发挥重要作用^[2,9]。本研究从谷子中克隆了一个 NAC 类转录因子基因 *SiNAC18*, 并对其表达模式进行分析, 结果表明, *SiNAC18* 在谷子中受 ABA、高盐、过氧化氢、干旱等胁迫处理的诱导表达 (图 3)。大量研究表明过表达抗旱相关转录因子可以提高植物生长期的抗旱性, 如转 *SNAC1* 水稻在营养生长期表现出明显的耐旱和抗盐性, 同时转 *SNAC1* 水稻对脱落酸 (ABA) 更敏感, 气孔关闭更快使得水分丧失减少, 而光合速率并没有显著差异^[22]。

目前, 关于植物抗旱性的研究大多集中在营养生长及生殖生长时期, 对种子萌发期抗旱性的分子机制研究较少。ABA 是种子萌发与休眠调控过程中起关键作用的内源信号分子, 在种子吸水阶段 ABA 的含量是种子能否完成萌发的决定因素^[23], 拟南芥中 CYP707A2 蛋白的合成可以促进 ABA 降解, 促进种子萌发^[24]。也有研究证明, 在 ABA 存在的条件下, 拟南芥干旱诱导蛋白 *AtDi19-3* 的突变体与野生型相比种子萌发和子叶绿化速率更高, *AtDi19-3* 突变体显示更大的干旱耐受性, 表明 *AtDi19-3* 可以以 ABA 依赖性方式参与植物对干旱胁迫的反应^[25]。本研究中, 根

据表达模式分析的结果, 对 *SiNAC18* 转基因拟南芥进行抗性分析, 结果显示, 在 ABA 和 PEG 胁迫处理下, *SiNAC18* 转基因拟南芥的萌发率与野生型拟南芥相比存在差异, 在 NaCl 和 H₂O₂ 胁迫下, 转基因植株无明显表型。在干旱处理条件下, *SiNAC18* 转基因株系比野生型 WT 的萌发率高 (图 4), 表明转 *SiNAC18* 拟南芥在种子萌发期相对于 WT 有较强的抗旱性。干旱条件下提高作物的萌发率, 可以保证作物的出苗率, 从而维持产量的稳定。另一方面, ABA 处理结果显示, WT 种子萌发率高于转基因株系 OE1 和 OE2 (图 5), 表明转 *SiNAC18* 拟南芥相对于 WT 增强了对 ABA 的敏感性, *SiNAC18* 正向调控植物 ABA 信号途径, *SiNAC18* 通过调控植物 ABA 信号途径影响植物在种子萌发期的抗旱性, 进一步分析 *SiNAC18* 调控的下游网络对于了解植物在萌发期的抗旱机制具有重要意义。

本研究中的表达模式分析结果显示 *SiNAC18* 受高盐、干旱等胁迫的诱导表达, 然而转 *SiNAC18* 拟南芥只对干旱胁迫表现耐性, 而对高盐及 H₂O₂ 胁迫没有表现耐性。由干旱和高盐等造成的水分胁迫可以诱导许多基因的表达^[26-27], 然而不是所有基因都能对胁迫抗性产生影响, 有些基因只是植物遭受胁迫时所作出的受害反应。因此, 即使这些基因受胁迫诱导表达它们对植物的抗旱反应也不能产生影响。另外, 盐胁迫主要表现为离子毒害和渗透胁迫^[28]两个方面, 干旱胁迫主要表现为渗透胁迫^[29]。因此, 高盐及干旱胁迫在作用机制方面有所不同, 转 *SiNAC18* 拟南芥只表现抗旱性没有表现耐盐性说明 *SiNAC18* 在植物抗旱及耐盐响应中发挥不同的作用, 或者在耐盐响应 *SiNAC18* 需要通过其他基因共同发挥作用, 因此, 转 *SiNAC18* 拟南芥对干旱及高盐胁迫抗性的存在差异。

当植物受到高盐或干旱等非生物胁迫时, 会激活 ABA 依赖途径和非依赖途径两种信号途径来抵御不良环境的影响^[18]。有研究报道拟南芥 G 蛋白 β 亚基突变体 *agb1-2* 相对于野生型拟南芥可以增强种子萌发期对 ABA 的敏感性, 同时提高植物耐旱性, 进一步研究证明 *AGB1* 通过下调 *AtMPK6*、*AtVIP1* 和 *AtMYB44* 级联参与调控拟南芥中的 ABA 信号传导途径和耐旱性^[30]。为了研究 *SiNAC18* 在种子萌发期提高转基因株系抗旱能力的机制, 选取了响应 ABA 及胁迫的相关基因, 检测各个基因在转基因株系和野生型 WT 中的表达情况 (图 6)。结果显示, ABA 信号途径相关基因 *AtRD29A*、脯氨酸合成相关基因 *AtP5CR* 和 *AtPRODH*、过氧化物酶基因 *AtPRX34* 在转基因株系中

的表达量明显高于在 WT 中的表达量。研究发现 ABA 可以促进 *AtP5CR* 的表达^[31], *AtRD29A* 和 *AtP5CR* 的启动子区存在 ABRE 结合元件。同时, 过氧化物酶基因 *AtPRX34* 通过 H₂O₂ 和生长素之间的相互作用调节植物的生长与发育^[32]。以上结果表明 *SiNAC18* 可以通过调控下游基因包括 ABA 相关信号通路基因、氧化胁迫相关基因的表达提高干旱条件下作物的萌发率。

本研究初步证明谷子 *SiNAC18* 在干旱胁迫响应过程中发挥重要作用, 可能通过正向调控植物 ABA 信号途径、氧化胁迫调控等途径影响植物种子萌发期的抗旱性, 从而保障种子的正常生长, 有助于维持作物在干旱条件下产量的稳定。

4 结论

从谷子中克隆得到了一个 NAC 类转录因子基因 *SiNAC18*。该基因受多种胁迫处理如干旱和 ABA 等的诱导表达, 其蛋白定位于细胞核。在拟南芥中过表达该基因提高了种子萌发期对干旱胁迫的抗性以及对 ABA 的敏感性。响应 ABA 及胁迫的相关基因在转 *SiNAC18* 基因株系中的表达量高于在 WT 中的表达量, 表明 *SiNAC18* 可能通过 ABA 信号途径、氧化胁迫调控等途径来提高转基因拟南芥在干旱条件下的种子萌发率。

References

- [1] 李志江, 刁现民. 谷子分子标记与功能基因组研究进展. 中国农业科技导报, 2009, 11(4): 16-22.
- LI Z J, DIAO X M. Research progress on molecular marker and functional genomic of foxtail millet, *Setaria italica* Beauv. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2009, 11(4): 16-22. (in Chinese)
- [2] PURANIK S, SAHU P P, SRIVASTAVA P S, PRASAD M. NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 2012, 17: 369-381.
- [3] NURUZZAMAN M, SHARONI A M, KIKUCHI S. Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 248.
- [4] BRADY S M, MCCOURT P. Hormone cross-talk in seed dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2003, 22: 25-31.
- [5] SAUTER A, DAVIES W J, HARTUNG W. The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: The fate of the hormone on its way from root to shoot. *Journal of Experimental Botany*, 2001, 52: 1991-1997.
- [6] BOURSIAIC Y, LERAN S, CORRATGE-FAILLIE C, GOJON A, KROUK G, LACOMBE B. ABA transport and transporters. *Trends in Plant Science*, 2013, 18: 325-333.
- [7] OLSEN A N, ERNST H A, LO LEGGIO L, SKRIVER K. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in Plant Science*, 2005, 10: 79-87.
- [8] BADIS G, BERGER M F, PHILIPPAKIS A A, TALUKDER S, GEHRKE A R, JAEGER S A, CHAN E T, METZLER G, VEDENKO A, CHEN X Y, KUZNETSOV H, WANG C F, COBURN D, NEWBURGER D E, MORRIS Q, HUGHES T R, BULYK M L. Diversity and complexity in DNA recognition by transcription factors. *Science*, 2009, 324: 1720-1723.
- [9] NAKASHIMA K, TAKASAKI H, MIZOI J, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms*, 2012, 1819: 97-103.
- [10] SAKURABA Y, KIM Y S, HAN S H, LEE B D, PAK N C. The *Arabidopsis* transcription factor NAC016 promotes drought stress responses by repressing AREB1 transcription through a trifurcate feed-forward regulatory loop involving NAP. *The Plant Cell*, 2015, 27: 1771-1787.
- [11] TRAN L S P, NAKASHIMA K, SAKUMA Y, SIMPSON S D, FUJITA Y, MARUYAMA K, FUJITA M, SEKI M, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. 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. *The Plant Cell*, 2004, 16: 2481-2498.
- [12] CHEN X, WANG Y F, LV B, LI J, LUO L Q, LU S C, ZHANG X, MA H, MING F. The NAC family transcription factor OsNAP confers abiotic stress response through the ABA pathway. *Plant and Cell Physiology*, 2014, 55: 604-619.
- [13] ZHANG G Y, LIU X, QUAN Z W, CHENG S F, XU X, PAN S K, XIE M, ZENG P, YUE Z, WANG W L, TAO Y, BIAN C, HAN C L, XIA Q J, PENG X H, CAO R, YANG X H, ZHAN D L, HU J C, ZHANG Y X, LI H N, LI H, LI N, WANG J Y, WANG C C, WANG R Y, GUO T, CAI Y J, LIU C Z, XIANG H T, SHI Q X, HUANG P, CHEN Q C, LI Y R, WANG J, ZHAO Z H, WANG J. Genome sequence of foxtail millet (*Setaria italica*) provides insights into grass evolution and biofuel potential. *Nature Biotechnology*, 2012, 30: 549-554.
- [14] BENNETZEN J L, SCHMUTZ J, WANG H, PERCIFIELD R, HAWKINS J, PONTAROLI A C, ESTEP M, FENG L, VAUGHN J N, GRIMWOOD J, JENKINS J, BARRY K, LINDQUIST E, HELSTEN U, DESHPANDE S, WANG X W, WU X M, MITROS T, TRIPLETT

- J, YANG X H, YE C Y, MAURO-HERRERA M, WANG L, LI P H, SHARMA M, SHARMA R, RONALD P C, PANAUD O, KELLOGG E A, BRUTNELL T P, DOUST A N, TUSKAN G A, ROKHSAR D, DEVOS K M. Reference genome sequence of the model plant *Setaria*. *Nature Biotechnology*, 2012, 30: 555-561.
- [15] MIN D H, XUE F Y, MA Y N, CHEN M, XU Z S, LI L C, DIAO X M, JIA G Q, MA Y Z. Characteristics of PP2C gene family in foxtail millet (*Setaria italica*). *Acta Agronomica Sinica*, 2013, 39: 2135.
- [16] YOO S D, CHO Y H, SHEEN J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: A versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols*, 2007, 2: 1565-1572.
- [17] CLOUGS J H, BENT A F. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 1998, 16: 735-743.
- [18] 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. *The Plant Cell*, 1997, 9: 841-857.
- [19] KIKUCHI K, UEGUCHI-TANAKA M, YOSHIDA K T, NAGATO Y, MATSUSOKA M, HIRANO H Y. Molecular analysis of the NAC gene family in rice. *Molecular and General Genetics*, 2000, 262: 1047-1051.
- [20] DUVAL M, HSIEH T F, KIM S Y, THOMAS T L. Molecular characterization of AtNAM: A member of the *Arabidopsis* NAC domain superfamily. *Plant Molecular Biology*, 2002, 50: 237-248.
- [21] OOKA H, SATOH K, DOI K, NAGATA T, OTOMO Y, MURAKAMI K, MATSUBARA K, OSATO N, KAWAI J, CARNINCI P, HAYASHIZAKI Y, SUZUKI K, KOJIMA K, TAKAHARA Y, YAMAMOTO K, KIKUCHI S. Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research*, 2003, 10: 239-247.
- [22] HU H H, DAI M Q, YAO J L, XIAO B Z, LI X H, ZHANG Q F, XIONG L Z. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103: 12987-12992.
- [23] DEBEAUJON I, KOORNNEEF M. Gibberellin requirement for *Arabidopsis* seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. *Plant Physiology*, 2000, 122: 415-424.
- [24] PRESTON J, TATEMATSU K, KANNO Y, HOBO T, KIMURA M, JIKUMARU Y, YANO R, KAMIYA Y, NAMBARA E. Temporal expression patterns of hormone metabolism genes during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds: A comparative study on dormant and non-dormant accessions. *Plant and Cell Physiology*, 2009, 50: 1786-1800.
- [25] QIN L X, LI Y, LI D D, XU W L, ZHENG Y, LI X B. *Arabidopsis* drought-induced protein Di19-3 participates in plant response to drought and high salinity stresses. *Plant Molecular Biology*, 2014, 86: 609-625.
- [26] INGRAM J, BARTELS D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1996, 47: 377-403.
- [27] XIONG L M, LEE H J, ISHITANI M, ZHU J K. Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277: 8588-8596.
- [28] HASEGAWA P M, BRESSAN R A, ZHU J K, BOHNERT H J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 2000, 51: 463-499.
- [29] SUBBARAO G V, CHAUHAN Y S, JOHANSEN C. Patterns of osmotic adjustment in pigeonpea-its importance as a mechanism of drought resistance. *European Journal of Agronomy*, 2000, 12: 239-249.
- [30] XU D B, CHEN M, MA Y N, XU Z S, LI L C, CHEN Y F, MA Y Z. A G-protein beta subunit, AGB1, negatively regulates the ABA response and drought tolerance by down-regulating AtMPK6-related pathway in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 2015, 10(1): e0116385.
- [31] YOSHIBA Y, KIYOSUE T, KATAGIRI T, UEDA H, MIZOGUCHI T, YAMAGUCHISHINOZAKI K, WADA K, HARADA Y, SHINOZAKI K. Correlation between the induction of a gene for Delta(1)-Pyrroline-5-Carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic-stress. *The Plant Journal*, 1995, 7: 751-760.
- [32] ZHANG S C, WU J L, YUAN D K, ZHANG D W, HUANG Z G, XIAO L T, YANG C W. Perturbation of auxin homeostasis caused by mitochondrial FtSH4 gene-mediated peroxidase accumulation regulates *Arabidopsis* architecture. *Molecular Plant*, 2014, 7: 856-873.

(责任编辑 李莉, 岳梅)