

烟草*NtNAC1*基因的克隆及其在烟草中的抗旱功能分析

徐小艳¹, 姚新转¹, 吕立堂^{1,2,*}, 赵德刚^{1,3,*}

¹贵州大学生命科学学院/农业生物工程研究院, 山地植物资源保护与种质创新省部共建教育部重点实验室, 贵阳550025

²贵州大学茶学院, 贵阳550025

³贵州省农业科学院, 贵阳550006

摘要: NAC转录因子在植物信号转导及非生物损伤过程中起重要作用。本实验从烟草cDNA文库中克隆了*NtNAC1*基因, cDNA编码区全长861 bp, 编码286个氨基酸。进化树分析结果显示, *NtNAC1*基因编码的氨基酸序列与马铃薯同源性最高。农杆菌介导的遗传转化获得37株转基因烟草, 用20% PEG6000处理转基因和野生型植株7 d。结果显示, 转基因植株的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)的酶活性都高于野生型, 丙二醛(MDA)和脯氨酸(Pro)含量都低于野生型。RT-PCR分析结果显示, *NtNAC1*基因以及*NtNAC*基因表达高于野生型, 脯氨酸合成的2个关键酶吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS)和鸟氨酸- δ -氨基转移酶(δ -OAT)基因表达低于野生型。选取T₀代转基因和野生型种子, 对苗期根系进行耐旱性分析。结果发现, 在300 mmol·L⁻¹甘露醇胁迫下, 转基因根系比野生型长, 野生型根系的生长明显受到抑制。这表明转*NtNAC1*基因的表达可能提高了植株的抗旱能力。

关键词: *NtNAC1*基因; 克隆; 抗氧化酶; 抗旱性

干旱是限制作物生长和产量提高的重要胁迫因子。干旱胁迫会使作物叶片活性氧(reactive oxygen species, ROS)积累增多, 光合速率下降, 影响植株生长发育(王兰兰等2006; 张云华等2005)。

NAC转录因子是近年来发现的具有多种生物功能的植物特有的转录调控因子, 在其他真核生物中尚未发现该家族成员(刘美英等2010)。前人从矮牵牛中克隆得到了第一个NAC转录因子NAM(Souer等1996)。该转录因子在植物生长发育过程中起着非常重要的作用, 通过不同的时空表达, 调节胚胎发育、侧根的发育、顶端分生组织的形成和植物的衰老等。除此之外, NAC转录因子在抵御多种生物和非生物胁迫的过程中发挥着重要作用。从拟南芥中分离到3个NAC基因*ANAC072*、*ANAC055*和*ANAC019*, 它们的表达受干旱的诱导, 过量表达3个基因都可以增强植株的耐旱能力(Tran等2004)。*SNTNAC1*水稻抗旱耐盐基因主要在气孔的保卫细胞中被诱导表达, 植物在干旱胁迫情况下, 该基因的表达会促进气孔关闭但不影响光合速率, 从而提高其抗旱性; 在生殖生长期受到干旱胁迫时, 过量表达*SNTNAC1*转基因植株较野生型植株的结实率高22%~34% (朱峰等2016)。目前在烟草方面, Cho和Hong (2006)克隆了*NtHSP70-1*基因, 并已验证该基因提高了烟草的抗旱性; 超量表

达*NtHAK1*、*NtTIP1*基因增强了烟草在干旱逆境中的耐受力(张祎等2017; 夏宗良等2013)。对NAC转录因子的生物信息学分析较多, 但对烟草中NAC转录因子的生物学功能验证尚缺乏。本研究构建*NtNAC1*基因的植物表达载体, 遗传转化烟草, 分析转基因植株抵御干旱胁迫的能力, 为继续研究*NtNAC1*基因生物学功能及其参与的信号转导途径提供参考价值; 为筛选和培育安全的优质耐旱烟草新种质以及作物抗逆性的改良提供重要的参考价值。

1 材料与方法

1.1 实验材料

烟草(*Nicotiana tabacum* L. 'Xanthin')种子由本实验室保存; *NtNAC1*基因序列从烟草K326基因文库中获得; PCR相关引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成; 试剂盒购自苏州科铭生物技术有限公司; 其他试剂均购自成都金山化学试剂有限公司。

收稿 2017-11-09 修定 2018-05-16

资助 国家转基因生物新品种培育科技重大专项子课题任务(2014ZX08010-003)、国家自然科学基金(31160149)和贵州茶产业技术创新中心(黔科中引地[2017]4005)。

* 共同通讯作者: 吕立堂(lvilitang@163.com)、赵德刚(dgzhaog@gzu.edu.cn)。

1.2 *NtNAC1*基因的克隆与载体构建

利用已报道的烟草NAC转录因子,在GenBank数据库中进行BlastP搜索,获得烟草同源基因的cDNA及氨基酸。根据获得的cDNA序列利用Premier 5.0软件设计引物(AP-F: 5' GTTTATGGGCAGAA-GGAGCAG 3'; AP-R: 5' CCTGGGTGATTTGCC-TTGTTT 3'),进行反转录得到cDNA模板。用高保真酶PrimerSRAR HS DNA Polymerase进行基因扩增,PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测,将扩增出的*NtNAC1*目的条带切下回收,目的片段与pMD19-T Vector载体连接,转化至大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态细胞,在LB固体选择培养基上(Kan 100 mg·L⁻¹+Rif 100 mg·L⁻¹) 37°C培养,挑取阳性克隆,由上海英潍捷基生物技术公司测序。用HindIII和XbaI双酶切质粒载体pSH737,同时用KpnI和EcoRI双酶切人工合成的两端含有KpnI和EcoRI双酶切位点的表达序列,用T₄DNA连接酶连接,即获得表达载体pSH-*NtNAC1*,该载体的构建参考邹冰杰(2016)的方法。

1.3 *NtNAC1*基因cDNA编码产物同源序列比对

采用National Center for Biotechnology Information (NCBI)网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的多序列比对程序对cDNA序列BLAST分析。使用NCBI的ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)分析基因开放阅读框(ORF),借助Clustal X2和MEGA 5.0软件进行系统进化树分析。

1.4 *NtNAC1*基因以农杆菌介导法转化烟草与分子鉴定

取长势良好的烟草无菌苗叶片,切成1~2 cm²的叶盘。将含有pSH-*NtNAC1*的农杆菌菌液浸染外植体6~8 min,共培48 h后转入含有卡那霉素(Kan 100 mg·L⁻¹+Tim 100 mg·L⁻¹)的筛选培养基上,愈伤组织分化为2~3 cm的抗性芽后切下置于生根培养基上生根。待生根完全后,炼苗并移栽至花盆(蛭石:营养土=1:3)中培养。成活后取烟草幼苗叶片,用植物DNA提取试剂盒(购自北京自天根生化科

技有限公司)提取DNA进行PCR检测(*NtNAC1* F: 5' GTTTATGGGCAGAAAGGAGCAG 3'; *NtNAC1* R: 5' CCTGGGTGATTTGCCTTGTTT 3')。

PCR反应扩增体系及条件:正反向引物(10 μmol·L⁻¹)各0.8 μL、DNA模板(500 ng·μL⁻¹) 2.0 μL、PlexTaq 10 μL、ddH₂O 6.4 μL,总体积为20 μL。混匀后,于PCR System 9700 (美国)型仪上进行扩增反应,扩增条件为95°C预变性30 s; 94°C预变性10 s, 55°C退火30 s, 72°C延伸20 s, 35个循环后4°C保存。反应完毕后取4.0 μL扩增产物在含核酸染料的1.2%琼脂糖凝胶中电泳,于凝胶成像系统下检测结果。

1.5 烟草的干旱胁迫处理

挑取饱满的烟草种子,75%乙醇浸泡30 s,30% H₂O₂浸泡10 min,无菌水冲洗4~5遍,接种于MS培养基上进行种子萌发。挑选长势大小一致的幼苗小心地转移至分别加有0、100、200和300 mmol·L⁻¹甘露醇的MS培养基上继续生长,培养皿竖直放置于培养室,观察幼苗在模拟干旱胁迫条件下根的生长发育情况,设置3个重复,2周后拍照。

选取5~6叶期(炼苗移栽后14 d)、长势及大小一致的转基因植株及野生型,将20% PEG6000溶液从植株根部浇灌进营养土(蛭石:营养土=1:3)中,浇灌7 d,每天200 mL。剪取相同部位叶片于液氮冷冻后放于-80°C保存待用。

种子的萌发及无菌苗的生长皆在组织培养室中进行,温度为(22±2)°C,相对湿度为55%~70%,光周期为16 h光照/8 h黑暗,光照强度27~54 μmol·m⁻²·s⁻¹。

1.6 荧光定量PCR

取用干旱胁迫后的转基因和野生型烟草同一部位的叶片提取RNA,以cDNA为RT-PCR模板,根据*NtNAC1*基因序列设计RT-PCR扩增引物(F: 5' GTTTATGGGCAGAAAGGAGCAG 3'; R: 5' CCTGGGTGATTTGCCTTGTTT 3'),定量分析基因的相对表达量。以烟草*actin*基因作为内参(F: 5' TGGT-TAAGGCTGGATTTGCT 3'; R: 5' TGCATCCTTT-GACCCATAC 3')对各样本进行扩增。从NCBI数据库中找到已报道的烟草相关基因*NtNAC* (F: 5' CTGATAAGCCAGTGGGAAAGC 3'; R: 5' CA-C AATACCCAATCGTCAAGC 3')、*δ-OAT* (F: 5'



图1 转化载体pSH-*NtNAC1*结构

Fig.1 Structure of transformation vector pSH-*NtNAC1*

GGCACGTTCTGGTCGATTGC 3'; R: 5' CTCCGG-CCTGAATGCAAAGC 3')和*P5CS* (F: 5' GTTG-GTCGTCAGCGGCTTAG 3'; R: 5' AGTCATACA-GAGCCATAAGGCCATTC 3')基因序列。利用SYBR Green实时定量PCR染料法, 分别对相关基因的表达进行分析。参照ABI公司的仪器使用说明(7500 Real Time PCR System), 按照 $\Delta\Delta C_T$ 法计算和分析基因的表达水平。Real-time PCR的反应体系参考姚新转等(2017)方法。

1.7 转基因烟草生理指标测定

1.7.1 酶活性及氧化途径相关产物含量测定

取胁迫第7天的T₁代转基因和野生型烟草相同部位叶片, 用试剂盒(均购自苏州科铭生物技术有限公司)测定过氧化物酶(peroxidase, POD)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)酶活性以及丙二醛(malondialdehyde, MDA)和脯氨酸(proline, Pro)含量, 实验操作参考试剂盒说明书。

1.7.2 光合指标测定

用L1-6400XT便携式光合作用测量系统, 选取生长状况一致、相同部位的成熟叶片, 于晴天的上午10:00~14:00测定净光合速率(net photosynthetic rate, P_n)、蒸腾速率(transpiration rate, T_r)、胞间二氧化碳浓度(carbon dioxide density, C_i)、气孔导度(stomatal conductance, G_s)各指标。转基因和野生型各测定3个株系, 每叶位测定3次。

1.8 实验数据统计学分析

数据分析使用Excel 2010软件, 分别计算均值及标准误差并绘制图表。采用SPSS 19.0统计软件进行差异显著性分析。

2 实验结果

2.1 *NtNAC1*基因序列同源性比对与进化树分析结果

克隆得到的*NtNAC1*序列与数据库CDS序列一致, *NtNAC1* cDNA序列进行Blastp分析, 结果显示, 其蛋白结构域与马铃薯(*Solanum tuberosum*, XP006341060.1)和辣椒(*Capsicum annuum* XP0165-42547.1)相似性分别为78%和72%, 与番薯花(*Ipomoea nil* XP019187513.1)相似性为55% (图2)。选取有代表性的10种物种蛋白序列进行系统进化树分析, 结果显示, *NtNAC1*蛋白与马铃薯和辣椒有较高的同源性(图3)。

2.2 转*NtNAC1*基因植株的获得

以农杆菌介导的烟草遗传转化共获得37棵抗性植株。提取转基因和野生型植株的DNA, 以*NtNAC1*基因引物进行PCR扩增。转基因植株中都分别扩增出预期的*NtNAC1*目的条带, 野生型未扩增出目的条带。表明已获得*NtNAC1*基因的烟草植株, 收获T₀代转基因植株的种子以作后续实验。

2.3 干旱胁迫对转*NtNAC1*基因烟草根系生长的影响

对在含有不同浓度甘露醇的MS培养基上生长2周后的T₀代阳性植株进行根系长度统计。结果如图4显示, 野生型植株与转基因植株在不同甘露醇浓度下根的长度有所不同。未做干旱胁迫时, 野生型与转基因植株根长并无明显差别; 甘露醇胁迫后, 转基因与野生型植株的根系生长均受到一定程度的抑制。随着甘露醇浓度增加, 植株根长变短。3个不同甘露醇浓度处理下, 转基因植株的根长均显著高于野生型, TP-1在100和300 mmol·L⁻¹甘露醇处理下根系最长; 300 mmol·L⁻¹甘露醇处理下, TP-9根系最长。在甘露醇胁迫下, 相较于转基因, 野生型植株根系的生长受到更明显的抑制($P < 0.05$)。结果表明超量表达*NtNAC1*基因能显著提高烟草根系对于干旱胁迫的耐受能力。

2.4 干旱胁迫对转*NtNAC1*基因烟草植株表型的影响

正常生长14 d后(5~6叶期), 转*NtNAC1*基因烟草植株和野生型植株的生长状态良好, 叶片鲜活、生长旺盛, 表型无明显差异(图5-A)。在干旱胁迫7 d后, 野生型植株叶片失水萎焉, 叶片发黄皱缩; 转基因植株的生长虽受到抑制, 但程度远小于野生型, 仅少部分老叶轻微萎焉, 大部分叶片仍保持正常鲜活状态(图5-B)。

2.5 干旱胁迫对烟草中*NtNAC1*及相关抗旱基因表达的影响

干旱胁迫7 d后, 转基因烟草TP-2和TP-19植株的*NtNAC1*相对表达量分别是野生型的2.2和2.5倍, 差异显著(图6-A); *P5CS*基因相对表达量是野生型的40%和20% (图6-B); δ -OAT基因相对表达量是野生型的80%和70% (图6-C); *NtNAC*基因相对表达量是野生型的1.3和2.7倍(图6-D)。这表明该基因可能参与在干旱胁迫过程中烟草体内的渗透调节过程, 提高植物抗旱性。

烟草 <i>Nicotiana tobacum</i> NNAC1	..MDCSANYKSDVGSVSGCESSR..ETLGCASGNPFC	35
马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i> XP_006341060.1	..MVCSSANYKFDSESLSCFCESSR..ETLGCASGIPGG	35
番茄 <i>Solanum pennellii</i> XP_015087871.1	..MVCSSANYKCDSESLSCFCESSR..ETLGCASCPGG	35
茄子 <i>Solanum lycopersicum</i> XP_004246464.1	..MVCSSATYKCDSESLSCFCESSR..ETLGCASCPGG	35
辣椒 <i>Capsicum annuum</i> XP_016342547.1	..MVCSSANYKFDSESLSCFCESSR..ETLGCASGDFGD	35
番薯花 <i>Ipomoea nil</i> XP_019187513.1	..MDVCAFNRKLVSENVSHFLLGFG..KLPDFADNSATD	35
咖啡豆 <i>Coffea canephora</i> XP_CDP06646.1	..MDICCFHDMFVSEDEVSECALSL..GPPENMDHMK	35
菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i> XP_AGV54156.1	MQLDMSS.....DD	10
木豆 <i>Cajanus cajan</i> KYP70788.1	..MDTSSNINVH.....DD	12
柑橘 <i>Citrus clementina</i> XP_006429064.1	..MDTSSPCERATSKALF.....G	17
枣 <i>Ziziphus jujuba</i> XP_015899517	..MDVSSHWDRLKSGVDSFEGQLQSFVNFQWDDTEHD	37
Consensus	m	
烟草 <i>Nicotiana tobacum</i> NNAC1	FEVNDGHHFSESLNFDGED...LIDKDNSTLLEEDS	71
马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i> XP_006341060.1	FEASDVRHFTESLNFDGED...LIVKEDNSTLLEEDS	71
番茄 <i>Solanum pennellii</i> XP_015087871.1	FEVSDGHHFTESLNFDGED...LIVKEDNSTLLEEDS	71
茄子 <i>Solanum lycopersicum</i> XP_004246464.1	FEVSDGHHFTESLNFDGED...LIVKEDNSTLLEEDG	71
辣椒 <i>Capsicum annuum</i> XP_016342547.1	FEASDVAHHTESLNFDGED...FVNGEDFSTSEEDGC	71
番薯花 <i>Ipomoea nil</i> XP_019187513.1	FDVNDGNHESKFNFDGED...LSDTTANHLKSDQY	71
咖啡豆 <i>Coffea canephora</i> XP_CDP06646.1	EYDNGNRLTEFLHGNKQKSSVAVPSPDNGIGTSAR	74
菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i> XP_AGV54156.1	NFVSNVGRTHESLNFDQAG...SVHVPQNDICSES	45
木豆 <i>Cajanus cajan</i> KYP70788.1	NFVSNVGRTHESLNFDQAG...SADASEGIDKSNVS	47
柑橘 <i>Citrus clementina</i> XP_006429064.1	GLVNDVGNSEVLSFDQSE...CNTSDGGV.VSHVE	51
枣 <i>Ziziphus jujuba</i> XP_015899517	GLVNDVGNSEVLSFDQSE...MEHANSNGVNSIMD	72
Consensus	1 1	
烟草 <i>Nicotiana tobacum</i> NNAC1	EE.DIDR..NGTGITDSEKQ..KSAFEGSSMTPFSELV	107
马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i> XP_006341060.1	EE.DMDANDTDAGSTDSEKQ..KSSPFGSALSTPFAELV	110
番茄 <i>Solanum pennellii</i> XP_015087871.1	EE.DMHANDACTGSTDSEKQ..KSSPFGSISLTPFAELV	109
茄子 <i>Solanum lycopersicum</i> XP_004246464.1	EE.DMHANDACTGSTDSEKQ..KSSPFGSSMSTPFAELV	109
辣椒 <i>Capsicum annuum</i> XP_016342547.1	EE.DMHN.DTDVQ...VEKQKSSPFGSAMSTPFAELV	105
番薯花 <i>Ipomoea nil</i> XP_019187513.1	EE...NTSDSHSSSLASKKQVBSAFEFSSKSSVSNELI	107
咖啡豆 <i>Coffea canephora</i> XP_CDP06646.1	FVGYKESHGNEKRLKLNKQVBSAFEFSSKSSSADVL	114
菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i> XP_AGV54156.1	EE.NLCAINRQETSV.NMCKKSAFETFNITLIFSSSD	84
木豆 <i>Cajanus cajan</i> KYP70788.1	EEKMCEAVKQKQETRL.NMCKKSAFET...ISSSSD	81
柑橘 <i>Citrus clementina</i> XP_006429064.1	EG..FEDLKLDDGP.GCKSCQVAFEF.PTAKISFSANV	87
枣 <i>Ziziphus jujuba</i> XP_015899517	ERNCGSSITELGKS.SQRTKSAFEGFNMTIFRHSS	111
Consensus	e 1 k fp	
烟草 <i>Nicotiana tobacum</i> NNAC1	YGKKEQEVDA.....STDLFVARSISLFTALK	136
马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i> XP_006341060.1	HGREKEQADAK.....STDLFVARSISLFTALK	139
番茄 <i>Solanum pennellii</i> XP_015087871.1	HERKEQADSK.....STDLFVARSISLFTALK	138
茄子 <i>Solanum lycopersicum</i> XP_004246464.1	HE.REQEQADAK.....STDLFVARSISLFTALK	137
辣椒 <i>Capsicum annuum</i> XP_016342547.1	HG.REQEQADAK.....STDLFVARSISLFTALK	133
番薯花 <i>Ipomoea nil</i> XP_019187513.1	QRENEQMDAT.....SAQFP.SRTKSLFSAPR	135
咖啡豆 <i>Coffea canephora</i> XP_CDP06646.1	DMEERHKEDELTPGDSVENGHQSANCYFRSISLFTALK	154
菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i> XP_AGV54156.1	EEANTA.....VTDSLQGFQAHQYRSISLFTALK	116
木豆 <i>Cajanus cajan</i> KYP70788.1	MEADTS.....VAEALYEHSAHQYRSISLFTALK	113
柑橘 <i>Citrus clementina</i> XP_006429064.1	EQDEDELKLT..AFEQMFSDPFRSISLFTALK	125
枣 <i>Ziziphus jujuba</i> XP_015899517	GKPEFN.....ATKGLFSGDSPHNACTRSISLFTALK	144
Consensus	p 1	
烟草 <i>Nicotiana tobacum</i> NNAC1	VSAHKGSRERCGKPPKRLSVAWADVDYDFEAWSEVENK	176
马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i> XP_006341060.1	VSAHKGSRERCGKPPKRLSVAWADVDYDFEAWSEVENK	179
番茄 <i>Solanum pennellii</i> XP_015087871.1	VSAHKGSRERCGKPPKRLSVAWADVDYDFEAWSEVEIK	178
茄子 <i>Solanum lycopersicum</i> XP_004246464.1	VSAHKGSRERCGKPPKRLSVAWADVDYDFEAWSEVEIK	177
辣椒 <i>Capsicum annuum</i> XP_016342547.1	VSAHKGSRERCGKPPKRLSVAWADVDYDFEAWSEVSK	173
番薯花 <i>Ipomoea nil</i> XP_019187513.1	VSAHKGSRERCGKPPKRLSVAWADVDYDFEAWSEAVN	175
咖啡豆 <i>Coffea canephora</i> XP_CDP06646.1	VSAHKGSRERCGKPPKRLSVAWADVDYDFEAWSEVSS	194
菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i> XP_AGV54156.1	VSAHKGSRERCGKPPKRLSVAWADVDYDFEAWSETVRS	156
木豆 <i>Cajanus cajan</i> KYP70788.1	VSAHKGSRERCGKPPKRLSVAWADVDYDFEAWSETVR	152
柑橘 <i>Citrus clementina</i> XP_006429064.1	VSAHKGSRERCGKPPKRLSVAWADVDYDFEAWSETVNR	165
枣 <i>Ziziphus jujuba</i> XP_015899517	VSAHKGSRERCGKPPKRLSVAWADVDYDFEAWSEHTVKG	184
Consensus	sa kgsre g k l v wa dvyd p sh	
烟草 <i>Nicotiana tobacum</i> NNAC1	..GQRHRSNDRKSGRNRKSGNSRSGSKS..KDRKQGR	212
马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i> XP_006341060.1	..VQRHRSNDRKSGRNRKSGNSRSGSKS..KDRKQGR	215
番茄 <i>Solanum pennellii</i> XP_015087871.1	..GQRHRSNDRKSGRNRKSGNSRSGSKS..KDRKQGR	214
茄子 <i>Solanum lycopersicum</i> XP_004246464.1	..GQRHRSNDRKSGRNRKSGNSRSGSKS..KDRKQGR	213
辣椒 <i>Capsicum annuum</i> XP_016342547.1	..VHRHRSNDRKSGRNRKSGNSRSGSKS..KDRKQGR	209
番薯花 <i>Ipomoea nil</i> XP_019187513.1	KPQRHRSNDRKSGRNRKSGNSRSGSKS..KDRKQGR	213
咖啡豆 <i>Coffea canephora</i> XP_CDP06646.1	K.FQRYRNDNRKSGRNRKSGNSRSGSKS..KDRKQGR	231
菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i> XP_AGV54156.1	..NRKQGRSK..KPFERNGRKGKSGNSRSGSKS..KDRKQGR	194
木豆 <i>Cajanus cajan</i> KYP70788.1	..NRKQGRSK..KPSDRNGRKGKSGNSRSGSKS..KDRKQGR	190
柑橘 <i>Citrus clementina</i> XP_006429064.1	..SKKQGRSK..KPSDRNGRKGKSGNSRSGSKS..KDRKQGR	204
枣 <i>Ziziphus jujuba</i> XP_015899517	..GKKQGRSK..KPSDRNGRKGKSGNSRSGSKS..KDRKQGR	221
Consensus	k kq k	
烟草 <i>Nicotiana tobacum</i> NNAC1	HGESA.KRSYHHEEDNHITTCSSFHSLGDNITAHSSGLQA	251
马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i> XP_006341060.1	HGEST.RRSYHHEEDNHITTCSSFHSLGDNITAHSSGLQA	254
番茄 <i>Solanum pennellii</i> XP_015087871.1	HGEST.RRSYHHEEDNHITTCSSFHSLGDNITAHSSGLQA	253
茄子 <i>Solanum lycopersicum</i> XP_004246464.1	HGEST.RRSYHHEEDNHITTCSSFHSLGDNITAHSSGLQA	252
辣椒 <i>Capsicum annuum</i> XP_016342547.1	HGEST.RRSYHHEEDNHITTCSSFHSLGDNITAHSSGLQA	248
番薯花 <i>Ipomoea nil</i> XP_019187513.1	YGSS.KRGEYPLDNN.....SIVVSSCELTQ	239
咖啡豆 <i>Coffea canephora</i> XP_CDP06646.1	GGRS.NRSEKPVDE.....GNQCFSGPHR	257
菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i> XP_AGV54156.1	LSGTS.GLCYKSMDSK.....IKVFAATFEDA	221
木豆 <i>Cajanus cajan</i> KYP70788.1	LSGTF.SLCYKSYD.....ASSTFEDA	211
柑橘 <i>Citrus clementina</i> XP_006429064.1	IGSSSRCKYKMGAR.....GVLQPLPGLIND	232
枣 <i>Ziziphus jujuba</i> XP_015899517	FEVSS.DRSSKPEFAC.....VRIYEAANNEDD	248
Consensus	g	
烟草 <i>Nicotiana tobacum</i> NNAC1	STVYDIDGTFDFGCGSFFRFSVITLFEFVAF	285
马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i> XP_006341060.1	GAMVDIDGTFDFGCGSFFRFSVITLFEFVAF	288
番茄 <i>Solanum pennellii</i> XP_015087871.1	GAMVDIDGTFDFGCGSFFRFSVITLFEFVAF	287
茄子 <i>Solanum lycopersicum</i> XP_004246464.1	GAMVDIDGTFDFGCGSFFRFSVITLFEFVAF	286
辣椒 <i>Capsicum annuum</i> XP_016342547.1	GTVDYDIDGTFDFGCGSFFRFSVITLFEFVAF	282
番薯花 <i>Ipomoea nil</i> XP_019187513.1	GIVDLIDGTFDFGCGSFFRFSVITLFEFVAF	272
咖啡豆 <i>Coffea canephora</i> XP_CDP06646.1	NAIDFDVGS.FDFGCGSFFRFSVITLFEFVAF	290
菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i> XP_AGV54156.1	LDVRSQDS.....NCGSFFRFSVITLFEFVAF	250
木豆 <i>Cajanus cajan</i> KYP70788.1	FDVRSQDS.....NCGSFFRFSVITLFEFVAF	240
柑橘 <i>Citrus clementina</i> XP_006429064.1	FEVAGPDS.....CGSFFRFSVITLFEFVAF	260
枣 <i>Ziziphus jujuba</i> XP_015899517	ITVGSDFDFG...SYCGSFFRFSVITLFEFVAF	279
Consensus	cg sf k s h a	

图2 NtNAC1蛋白与其他物种的蛋白质序列同源比对
 Fig.2 Homologous analysis of NtNAC1 protein sequences with other species
 黑色表示相同残基。

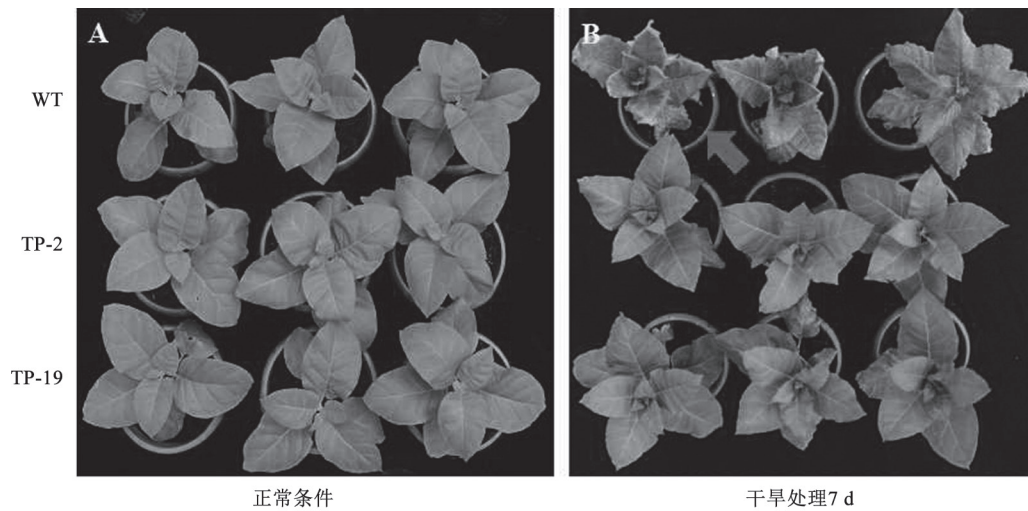


图5 正常条件与干旱胁迫处理下烟草植株生长变化

Fig.5 Changes of growth of tobacco plant under normal condition and drought stress

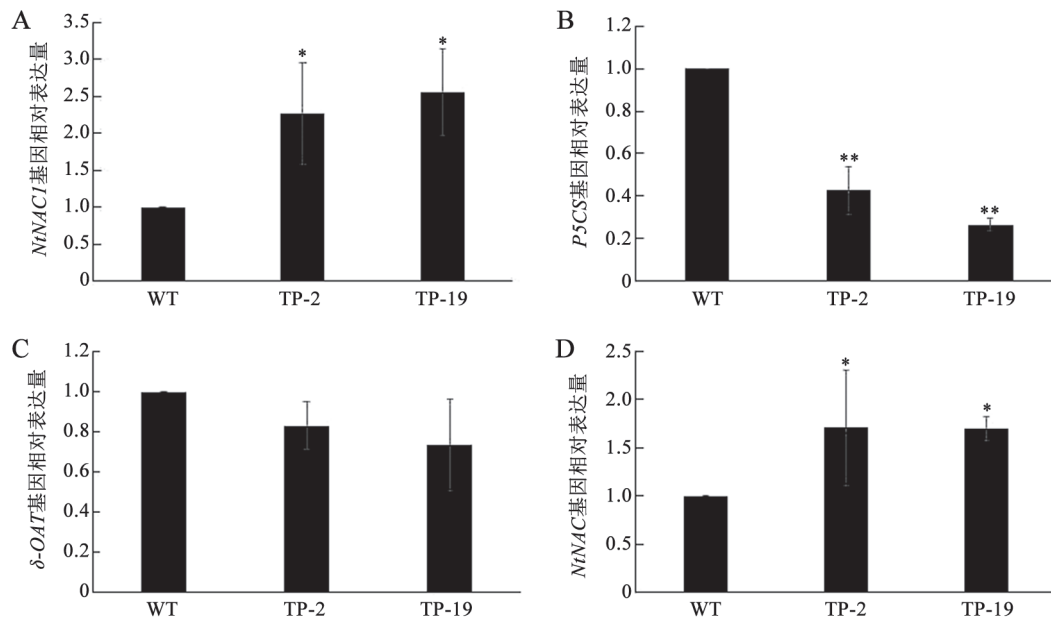


图6 干旱胁迫对转基因烟草相关抗旱基因表达的影响

Fig.6 Effect of drought stress on expression of drought resistance genes in transgenic tobacco

3 讨论

干旱是影响植物生长发育的重要非生物因素,在植物对干旱的适应过程中,抗旱相关基因的表达具有重要作用(车永梅等2018)。分离和鉴定干旱应答的相关基因及揭示其调控机制是研究植物抗逆性的重点。NAC转录因子是植物所特有的一类重要调控因子,在调节植物生长发育过程以及非生物胁迫反应中起着重要作用(胡蝶等2011; Shao等

2015)。Han等(2014)的研究发现*NtNAC2*受高浓度的盐诱导,主要在烟草根、茎和花中表达。表明*NtNAC2*参与植物的非生物胁迫响应过程。本实验克隆了一个NAC转录因子*NtNAC2*,研究该基因在植物干旱胁迫过程中的作用。结果发现,在干旱胁迫下过表达*NtNAC2*的植株幼苗的根系生长受抑制程度显著小于野生型植株(图4),并且植株叶片能维持正常条件下的表型(图5),这一结果与刘洋等(2016)一致。表明超量表达*NtNAC1*基因能显著

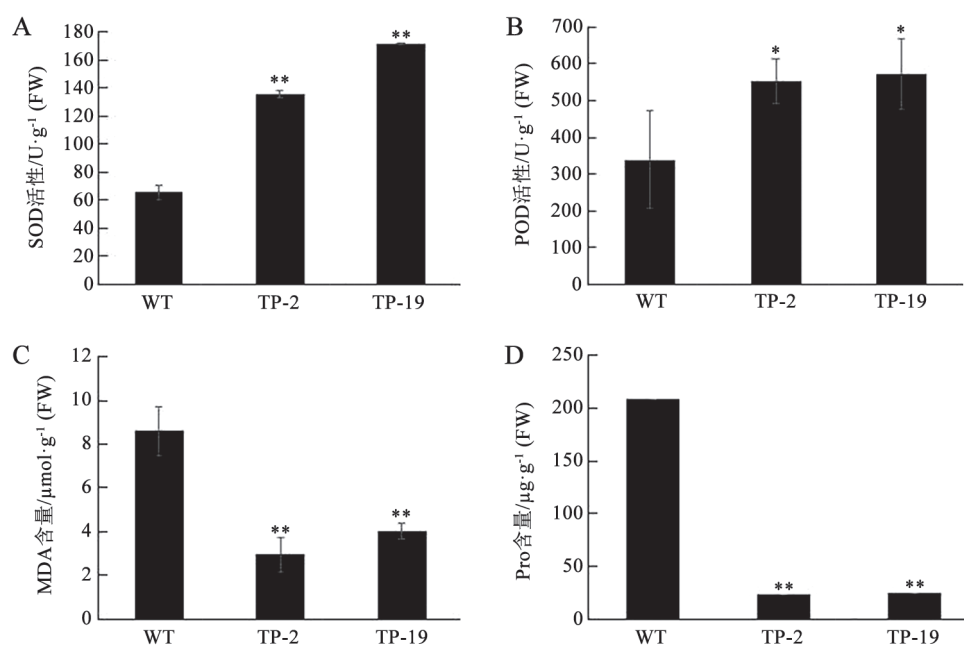


图7 干旱胁迫对转基因烟草植株SOD、POD活性及MDA、Pro含量的影响

Fig.7 Effects of drought stress on SOD, POD activities and MDA and Pro contents in transgenic tobacco

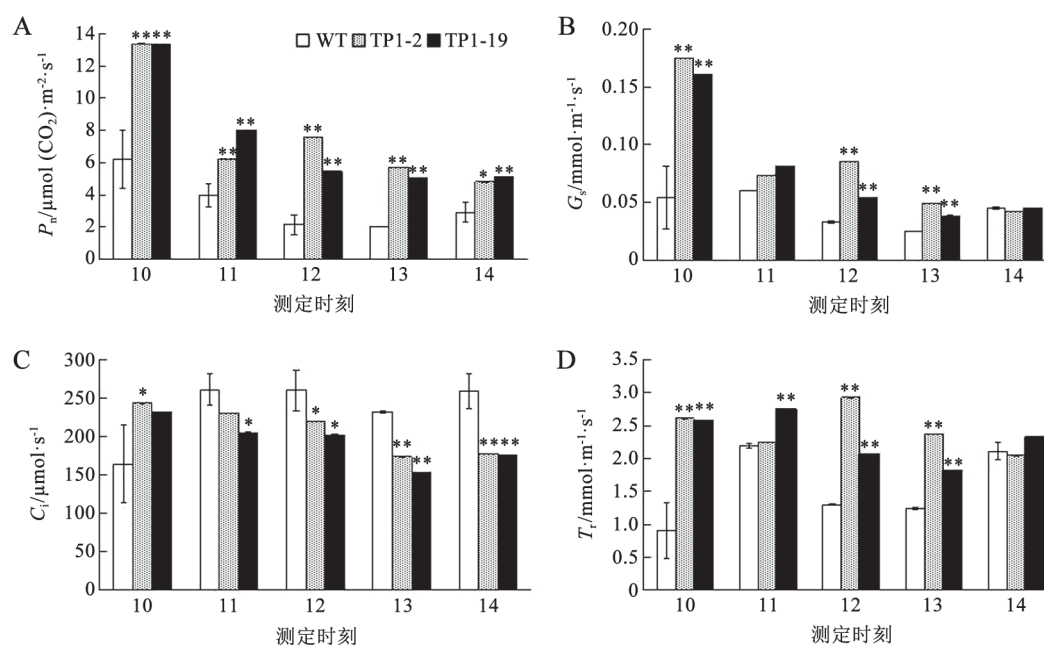


图8 干旱胁迫对转基因烟草光合特性的影响

Fig.8 Effect of drought stress on photosynthetic characteristics of transgenic tobacco

提高烟草幼苗根系对干旱胁迫的耐受能力,可以有效提高植物对水分的合理分配,降低干旱产生的损害,增加植株干旱胁迫下的生存率。

*NtNAC1*基因在调控植物抗逆境方面起重要作用,并引起相应基因如 δ -OAT、*P5CS*和*NtNAC*的

变化。本实验结果发现*NtNAC1*和*NtNAC*基因在植物遭受干旱胁迫下基因表达均上调。脯氨酸合成的2个关键酶基因*P5CS*、 δ -OAT表达下调,与结果中脯氨酸含量较少一致。

植株在正常情况下体内的活性氧清除系统使

细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)保持在较低的水平,不会对植物造成伤害(张炜等2017)。一旦受到干旱胁迫,会导致植物细胞ROS含量急剧上升,积累大量自由基,引起膜质的过氧化,导致膜系统的破坏,对细胞组分和结构造成氧化损伤(Gill和Tuteja 2010)。植物体内的SOD和POD对清除自由基起重要作用,其活性与抗旱性成正相关关系(周瑞莲和王刚1997),因此可以用SOD和POD的活性反应植物的抗旱能力。本研究结果表明*Nt-NAC1*基因表达受干旱的强烈诱导,SOD和POD酶活性比野生型显著提高,增强了烟草对活性氧的清除能力。MDA含量反映了膜脂过氧化程度,本研究测得转基因MDA含量显著低于野生型,这与贺晓岚(2016)的丙二醛含量与植物的抗逆性呈负相关趋势基本一致,有效缓解干旱胁迫对膜系统的伤害。脯氨酸是植物体内的重要渗透调节物质,干旱胁迫下脯氨酸含量增加有利于维持渗透调节,增强根系吸水,增强细胞膜系统的稳定性,清除活性氧,其在植物中的积累量可作为植物抗逆境胁迫能力强弱的依据(王宝增2011)。本研究测得转基因植株的Pro含量显著低于野生型,与刘延波等(2014)的干旱胁迫下植物脯氨酸结果相反,可能是因为转基因植株受干旱的胁迫影响较小,并未积累过多脯氨酸。以上结果表明转*NtNAC1*基因可通过增强植株的活性氧清除能力、及时修复细胞损伤的功能,提高植株对干旱胁迫的抵抗能力。

干旱胁迫下提高植物水分利用效率(WUE)是增强植物抗旱性的重要途径,前人研究认为,提高植株水分利用效率是通过提高净光合速率和诱导气孔关闭而降低气孔导度,干旱胁迫下诱导叶片气孔开度受抑或气孔关闭,因而水分耗散减少,最终植物保水能力和对干旱的耐受性提高(陈娟等2006;郭贵华等2014)。本研究发现,干旱胁迫下,转基因植株的净光合速率显著高于野生型,说明转基因较野生型烟草植株具有更好维持水分的能力来应对干旱。

综上所述,*NtNAC1*基因的过量表达提高了转基因烟草的抗旱性,为作物逆境胁迫提供了重要候选基因,对培育抗旱烟草新品种创造了新的育种材料。目前,NAC转录因子的研究尚处于基因克隆、结构鉴定、表达分析等层面上,只有极少

一部分NAC转录因子的功能得到明确的验证(胡蝶等2011)。本研究不仅表明了转*NtNAC1*基因的表达在模拟干旱胁迫条件下减少了环境胁迫对细胞造成的损伤,提高了植株的抗逆能力,并且从生物学功能方面验证了NAC转录因子在植株抗逆性方面的功能,对利用转录因子提高作物的抗逆性提供重要的参考价值。

参考文献(References)

- Che YM, Sun YJ, Lu SC, et al (2018). At WRKY40 functions in drought stress response in arabidopsis thaliana. *Plant Physiol Commun*, 54 (3): 456–464 (in Chinese with English abstract) [车永梅, 孙艳君, 卢松冲等(2018). At-WRKY40参与拟南芥干旱胁迫响应过程. *植物生理学报*, 54 (3): 456–464]
- Chen J, Pan KW, Gu B (2006). Physiological function and mechanism of abscisic acid in plants under stress. *Plant Physiol J*, 42 (6): 1176–1182 (in Chinese with English abstract) [陈娟, 潘开文, 辜彬(2006). 逆境胁迫下植物体内脱落酸的生理功能和作用机制. *植物生理学通讯*, 42 (6): 1176–1182]
- Cho EK, Hong CB (2006). Over-expression of tobacco *NTHSP70-1* contributes to drought stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep*, 25 (4): 349–358
- Gill SS, Tuteja N (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem*, 48 (12): 909–930
- Guo GH, Liu HY, Li GH, et al (2014). Analysis of physiological characteristics about ABA alleviating rice booting stage drought stress. *Sci Agri Sin*, 47 (22): 4380–4391 (in Chinese with English abstract) [郭贵华, 刘海艳, 李刚华等(2014). ABA缓解水稻孕穗期干旱胁迫生理特性的分析. *中国农业科学*, 47 (22): 4380–4391]
- Han QQ, Qiao P, Song YZ, et al (2014). Structural analysis and tissue-specific expression patterns of a novel salt-inducible nac transcription factor gene from *Nicotiana tabacum* cv. xanthi. *J Hort Sci Biotech*, 89 (6): 700–706
- He XL, Wang JW, Li WX, et al (2016). Cloning of *6-SFT* gene from *leymus racemosus* and analysis of tolerance to drought and cold stresses in transgenic tobacco. *Acta Agron Sin*, 42 (3): 389–398 (in Chinese with English abstract) [贺晓岚, 王建伟, 李文旭等(2016). 大赖草*6-SFT*基因的克隆及其转基因烟草抗旱和抗寒性分析. *作物学报*, 42 (3): 389–398]
- Hu D, Liu H, Chen DM, et al (2011). Cloning and sequence analysis of the NAC transcription factor *NtNAC8* from tobacco. *J Huaihua Univ*, 30 (5): 33–37 (in Chinese with English abstract) [胡蝶, 刘洪, 陈东明等(2011). 烟草中NAC转录因子*NtNAC8*的克隆与序列分析. *怀化学院学报*, 30 (5): 33–37]

- Liu MY, Ye XF, Tang YM, et al (2010). Effects of *TaNAC* on drought resistance in transgenic tobaccos. *Acta Tabac Sin*, 16 (6): 82–88 (in Chinese with English abstract) [刘美英, 冶晓芳, 唐益苗等(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 Y, Yao XZ, Lü LT, et al (2016). Cloning of *SbSKIP* gene from sorghum (*Sorghum bicolor*) and analysis of drought-resistant function in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Chin J Agric Biotechnol*, 24 (10): 1500–1511 (in Chinese with English abstract) [刘洋, 姚新转, 吕立堂等(2016). 高粱*SbSKIP*基因的克隆及其在烟草中的抗旱功能分析. 农业生物技术学报, 24 (10): 1500–1511]
- Liu YB, Xiang Y, Qing LJ, et al (2014). Improvement of drought tolerance in transgenic tobacco expressed maize *ZmSDD1* by reducing stomatal density. *Plant Physiol J*, 50 (12): 1889–1898 (in Chinese with English abstract) [刘延波, 项阳, 秦利军等(2014). 转玉米*ZmSDD1*基因烟草降低气孔密度提高抗旱性. 植物生理学报, 50 (12): 1889–1898]
- Shao H, Wang H, Tang X (2015) NAC transcription factors in plant multiple abiotic stress responses: progress and prospects. *Front Plant Sci*, 6: 902
- Souer E, Van AH, Kloos D, et al (1996). The no apical meristem gene of petunia is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell*, 85 (2): 159
- Tran LSP, Nakashima K, Sakuma Y, et al (2004). 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. *Plant Cell*, 16 (9): 2481–2498
- Wang BZ (2011). Proline and plant stress resistance. *Biol Teach*, 36 (11): 4–5 (in Chinese with English abstract) [王宝增(2011). 脯氨酸与植物的抗逆性. 生物学教学, 36 (11): 4–5]
- Wang LL, Zhang LJ, Chen G (2006). Physiological responses of sweet potato callus to drought stress. *J Shenyang Norm Univ (Nat Sci)*, 25 (4): 143–148 (in Chinese with English abstract) [王兰兰, 张立军, 陈贵(2006). 甘薯愈伤组织对干旱胁迫的生理反应研究. 干旱地区农业研究. 沈阳师范大学学报(自然科学版), 25 (4): 143–148]
- Xia ZL, Li JQ, Liu JJ, et al (2013). Cloning of an aquaporin gene *NtTIP1* from tobacco and its expression under drought stress. *J Henan Agric Univ*, 47 (5): 509–513 (in Chinese with English abstract) [夏宗良, 李军旗, 刘剑君等(2013). 烟草水通道蛋白*NtTIP1*基因的克隆及其在干旱胁迫下的表达分析. 河南农业大学学报, 47 (5): 509–513]
- Yao XZ, Liu Y, Zhao DG (2017). Cloning of *SbSKC1* encoding Na^+ transporter protein from Sorghum and its function of salt resistance in tobacco. *Acta Agron Sin*, 43 (2): 190–200 (in Chinese with English abstract) [姚新转, 刘洋, 赵德刚(2017). 高粱 Na^+ 转运蛋白基因*SbSKC1*的克隆及其在烟草中的抗盐功能鉴定. 作物学报, 43 (2): 190–200]
- Zhang Y, Qin LJ, Zhao D, et al (2017). Improvement of drought-stress in *NtHAK1*-overexpressing *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol J*, 53 (8): 1444–1452 (in Chinese with English abstract) [张祎, 秦利军, 赵丹等(2017). 超量表达*NtHAK1*基因提高烟草干旱胁迫能力. 植物生理学报, 53 (8): 1444–1452]
- Zhang YH, Zhang KC, Ruan L, et al (2005). Research progress of plant adaptation to drought. *J Anhui Agric Sci*, 33 (8): 1480–1481 (in Chinese with English abstract) [张云华, 张宽朝, 阮龙等(2005). 植物干旱适应的研究进展. 安徽农业科学, 33 (8): 1480–1481]
- Zhu F, Chen XR, Qian K, et al (2016). Bioinformatics analysis of NAC 1 transcription factors related to biotic stresses. *Jiangsu Agric Sci*, 44 (10): 43–49 (in Chinese with English abstract) [朱峰, 陈孝仁, 钱坤等(2016). 生物胁迫相关NAC1转录因子的生物信息学分析. 江苏农业科学, 44 (10): 43–49]
- Zou BJ, Lü LT, Zhao DG (2016). Effect of overexpression of *AtBAS1* gene regulated vascular development in *Nicotiana tabacum* L. *Genom Appl Biol*, 35 (6): 1487–1492 (in Chinese with English abstract) [邹冰杰, 吕立堂, 赵德刚(2016). 超量表达拟南芥油菜素内酯基因*BAS1*对烟草维管组织发育的影响. 基因组学与应用生物学, 35 (6): 1487–1492]

Cloning of *NtNAC1* gene from *Nicotiana tabacum* and its analysis of drought-resistant function

XU Xiao-Yan¹, YAO Xin-Zhuan¹, LÜ Li-Tang^{1,2,*}, ZHAO De-Gang^{1,3,*}

¹College of Life Sciences and Institute of Agro-Bioengineering, the Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), Guizhou University, Guiyang 550025, China

²College of Tea Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China

³Guizhou Academy of Agricultural Science, Guiyang 550006, China

Abstract: NAC transcription factor plays an important role in plant signal transduction and abiotic damage. In this study, the *NtNAC1* gene was cloned from the cDNA library of tobacco, and the coding region was 861 bp in length, encoding 286 amino acids. The phylogenetic tree analysis showed that the amino acid sequence encoded by *NtNAC1* gene was the highest homologous to potato and 37 strains of transgenic tobacco obtained by *Agrobacterium tumefaciens* were treated with 20% PEG6000 for 7 days. The results showed that the activities of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) in transgenic plants were higher than those in wild type. The contents of MDA and proline were lower than those of wild type. The results showed that the expression of *NtNAC1* and *NtNAC* gene were higher than wild type by RT-PCR analysis, and the pyrroline-5-carboxylic acid synthase (P5CS) and ornithine- δ -aminotransferase (δ -OAT) were lower than wild type. The T₀ transgenic and wild type seeds were selected to analyze the drought tolerance of seedling roots. The results showed that under the condition of 300 mmol·L⁻¹ mannitol, the transgenic plant roots were more inhibited than wild type roots. The results showed that the expression of *NtNAC1* gene could increase the drought tolerance of plant.

Key words: *NtNAC1* gene; cloning; enzyme activity; drought resistance

Received 2017-11-09 Accepted 2018-05-16

This work was supported by the National Key Projects on the Cultivation of New Varieties of Genetically Modified Organisms (2014ZX08010-003), the National Natural Science Foundation of China (31160149) and the Guizhou Tea Industry Technology Innovation Center (Qianke Zhongyindi [2017] 4005).

*Co-corresponding authors: Lü LT (lvlitang@163.com), Zhao DG (dgzhao@gzu.edu.cn).