

黄娟,荣玉萍,孟子烨,等.苦荞转录因子 *FtNAC15* 基因的克隆及表达分析[J].江西农业大学学报,2019,41(6):1183-1191.



苦荞转录因子 *FtNAC15* 基因的克隆及表达分析

黄娟¹,荣玉萍¹,孟子烨¹,唐彬¹,章洁琼²,夏忠敏³,陈庆富^{1*}

(1.贵州师范大学 荞麦产业技术研究中心,贵州 贵阳 550001;2.贵州省农作物技术推广总站,贵州 贵阳 550001;3.贵州省土壤肥料工作总站,贵州 贵阳 550001)

摘要:为研究NAC转录因子在苦荞中的功能,从苦荞发育种子中克隆了一个NAC家族基因,其开放阅读框全长1 098 bp,编码365个氨基酸,将其命名为 *FtNAC15*。基因结构分析表明:*FtNAC15* 基因由3个外显子和2个内含子组成。氨基酸序列多重比对和进化关系分析表明:*FtNAC15* 蛋白与水稻 ONAC003、拟南芥 ANAC010 和 ANAC073 亲缘关系较近,属于NAC家族转录因子家族中同一亚组。基因上游启动子序列顺势作用元件分析表明:该基因启动子中的顺式作用元件可以分为5类,即启动子核心元件、节律和光照响应元件、转录因子结合位点、非生物胁迫响应元件和激素响应元件。表达分析表明:*FtNAC15* 基因在种子发育的成熟期和干旱胁迫下上调表达,表明其参与调控荞麦种子发育和响应干旱胁迫。

关键词:苦荞;NAC转录因子;克隆;表达

中图分类号:S517 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2019)06-1183-09

Cloning and Expression of *FtNAC15* Transcription Factor in *Fagopyrum tataricum*

HUANG Juan¹, RONG Yu-ping¹, MENG Zi-ye¹, TANG Bin¹,
ZHANG Jie-qiong², XIA Zhong-min³, CHEN Qing-fu^{1*}

(1. Research Center of Buckwheat Industry Technology, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China; 2. Guizhou Provincial Agricultural Technology Extension Station, Guiyang 550001, China; 3. Soil and Fertilizer Institute of Guizhou, Guiyang 550001, China)

Abstract: To study the function of NAC transcription factor in Tartary buckwheat, a NAC family gene was

收稿日期:2019-08-19 修回日期:2019-10-25

基金项目:国家自然科学基金项目(31760419)、贵州省科技计划项目(黔科合基础[2016]1107、黔科合 LH 字[2017]7364 号,黔科合成果[2019]4252 号,黔科合平台人才[2017]5726-19,黔科合 LH 字[2016]7214 号)、2019 年省级农业产业发展资金(黔财农[2019]68 号)和贵州师范大学资助博士科研项目(11904/0516031)

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (31760419), Guizhou Provincial Science and Technology Foundation (QianKeHeJichu[2016]1107, QianKeHeLH[2017]7364, QianKeHeChengGuo[2019]4252, QianKeHePingTaiRenCai[2017]5726-19, QianKeHeLH[2016]7214, 2019 Provincial Agricultural Industry Development Fund (QianCaiNong[2019]68), and Initial Fund for Doctor Research in Guizhou Normal University (11904/0516031)

作者简介:黄娟(1988—),女,助理研究员,博士,主要从事荞麦分子育种研究,orcid.org/0000-0003-3072-4352, huang200669@163.com; *通信作者:陈庆富,教授,博士,orcid.org/0000-0002-8083-3584, cqf1966@163.com。

cloned from the developing seeds of *Fagopyrum tataricum*. The length of the open reading frame was 1 098 bp, and the number of amino acids was 365. Hereafter it was named *FtNAC15*. Gene structure analysis showed that *FtNAC15* was composed of three exons and two introns. Multiple amino acid sequence alignment and evolutionary relationship analyses showed that *FtNAC15* protein was closely related to ONAC003 in rice, ANAC010 and ANAC073 in *Arabidopsis thaliana*, and was classified to the same subgroup of NAC transcription factor family. Cis-acting elements in the promoter of *FtNAC15* were predicted and divided into five categories: promoter core elements, rhythm and light response elements, transcription factor binding sites, abiotic stress response elements and hormone response elements. Furthermore, expression analysis showed that *FtNAC15* was up-regulated in the mature stage of seed development and under drought stress, indicating that it was involved in seed development regulation and drought stress response of *Fagopyrum tataricum*.

Keywords: *Fagopyrum tataricum*; NAC transcription factor; cloning; expression

NAC 转录因子是一类植物特有的转录因子,广泛参与植物生长发育的各个阶段,如调控植物花发育^[1]、果实/种子发育与成熟^[2]、衰老^[3],响应生物和非生物胁迫^[4-6]等。所有 NAC 家族转录因子都含有保守的 NAM 结构域,该结构域位于氨基酸序列氮端,长约 150 个氨基酸,由 A、B、C、D、E 5 个亚结构域组成,碳端的序列变异程度较大,一般含有转录因子的转录激活域,这些变异决定了不同 NAC 转录因子功能上的差异^[7]。

荞麦(*Fagopyrum* Mill)是一种特色小杂粮作物,其栽培种有甜荞(*F. esculentum*)和苦荞(*F. tataricum*)两种,因其耐瘠薄的特性,在我国北方、西北、西南等环境相对恶劣的地区具有较大的种植面积,北方产区以甜荞为主,南方产区以苦荞为主^[8]。近年来,荞麦由于其突出的营养保健功能越来越为大家所重视,荞麦中必需氨基酸、黄酮和类黄酮、膳食纤维等营养物质的含量均高于普通禾本科作物,富含 D-干性肌醇等营养成分^[9],在降“三高”、抗氧化等方面具有突出的功效。荞麦的分子生物学起步较晚,目前的研究大多集中在芦丁合成与调控通路中的相关基因功能研究上^[10],2017 年苦荞基因组测序的完成^[11]大大推进了荞麦分子生物学的发展,数个全基因组水平上鉴定某一基因家族的研究得以报道^[12-13],NAC 家族转录因子也在苦荞全基因组水平上得到鉴定^[14-15],苦荞中共有 72 个 NAC 家族基因,根据其系统进化关系可以分为 9 个亚家族,这些基因在苦荞的不同组织以及苦荞种子发育的不同时期存在差异表达。然而荞麦中 NAC 家族转录因子基因功能的研究未见报道,根据报道和已有转录组数据挑选并克隆了一个 NAC 家族基因,将其命名为 *FtNAC15*,对其编码区序列(CDS)、氨基酸序列、基因结构、启动子序列等进行了一定的生物信息学分析,同时,对 *FtNAC15* 在种子发育不同时期和干旱胁迫下的表达进行了分析,为进一步验证该基因的上下游调控网络、基因功能提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

所选材料为米苦荞 11(*Fagopyrum tataricum*),种于贵州师范大学荞麦产业技术研究中心实验基地,常规大田管理。不同发育时期种子的取样方式与之前的报道^[16]一致,即分别于灌浆前期、灌浆期和成熟期进行取样,取回的样品在冰上剥壳,然后剔除差异较大的种子,保存于-80℃冰箱备用。对于干旱胁迫处理,将米苦荞 11 种置于营养钵中,让其在 16/8 h 光周期、25℃温度下萌发,萌发后 7 d 用 15% 的 PEG 处理,分别于处理后 0、1、3、6 h 进行取样,每次取样做 3 个生物学重复,保存于-80℃冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 苦荞 *FtNAC15* 基因的克隆 从苦荞基因组测序预测的 CDS 序列中,获得 *FtNAC15* 的基因序列,利用 oligo 7 软件设计一对基因特异性引物,上游引物为 FtNAC15F(AACTGCGCGCAAATAGGTCAA),下游引物为 FtNAC15R(TCATCTTTTAGCTCTACGGTCTG),于生工生物工程(上海)股份有限公司合成引物。RNA 提取采用天根生化科技(北京)有限公司的多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒,按照试剂盒的说明书进行操作。cDNA 第一链采用宝日医生物技术(北京)有限公司的 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthe-

sis Kit,按照试剂盒的说明书进行操作。以米苦荞种子发育不同时期的混合 cDNA 为模板,以 FtNAC15F 和 FtNAC15R 为引物,利用宝日医生物技术(北京)有限公司的热启动型 TaKaRa Ex Taq[®] 对目的基因进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为:TaKaRa Ex Taq HS (5 U/ μ L) 0.25 μ L,10 $\times$ Ex Taq Buffer (Mg^{2+} plus) (20 mmol/L) 5 μ L,dNTP Mixture (2.5 mmol/L each) 4 μ L,cDNA 模板 2 μ L,上下游引物各 2 μ L,灭菌水 34.75 μ L,总体系 50 μ L。PCR 反应程序为:98 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;98 $^{\circ}$ C 变性 10 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。用 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳^[17]对 PCR 产物进行检测,片段大小正确后用生工生物工程(上海)股份有限公司的柱式 DNA 胶回收试剂盒进行胶回收,回收产物连接至天根生化科技(北京)有限公司的 pGM-T 载体,转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,挑选阳性单克隆,经菌液 PCR 鉴定后送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.2.2 苦荞 *FtNAC15* 基因的生物信息学分析 对测序得到的正确序列进行生物信息学分析,首先用 DNAMAN v6 软件分析其开放阅读框,预测其编码的氨基酸序列,利用在线网站 BDGP (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) 预测该基因的转录起始位点,利用在线网站 ExPASy (https://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool) 预测蛋白等电点和分子量,利用在线网站 WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) 对蛋白质进行亚细胞定位,利用在线网站 BLASTP (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) 将蛋白序列与 NCBI 非冗余蛋白库(NR)进行比对,然后利用在线网站 BankIt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/>) 将 *FtNAC15* 基因序列提交到 GenBank。最后根据已公布的苦荞基因组数据,利用本地 python 程序调取 *FtNAC15* 基因对应的 DNA 序列,利用在线网站 GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 对 *FtNAC15* 的基因结构进行预测和分析。

将 FtNAC15 与拟南芥、水稻、橡胶、金丝小枣中最为同源的 NAC 蛋白一起,利用 clusterX2.1 进行氨基酸多重序列比对,将 50% 以上一致序列用黑色标注出来。然后用 MegaX 软件构建进化树,采用的方法为邻接法,设置重复次数(bootstrap)为 1 000 次。利用本地 python 程序从苦荞基因组中调取 *FtNAC15* 基因 ATG 上游 2 099 bp 的启动子序列,利用在线软件 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 预测启动子中的顺式作用元件。

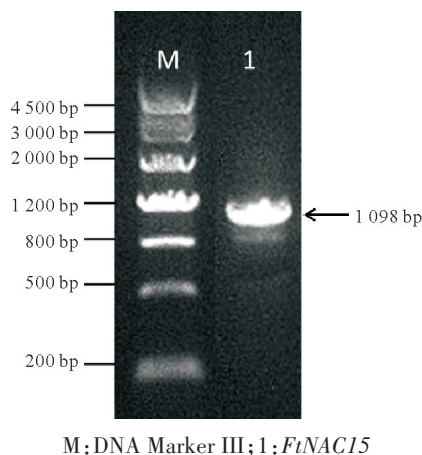
1.2.3 苦荞 *FtNAC15* 基因的表达分析 将种子发育和干旱胁迫的转录组数据利用 hisat2 软件比对到苦荞参考基因组上,利用 htseq 软件进行 reads 计数,利用 Cufflinks 软件计算基因的 FPKM 值,利用 R 语言的 DESeq2 包分析差异基因。查找 *FtNAC15* 在种子发育和干旱胁迫的转录组数据中的表达情况,然后利用 Excel 进行作图。

2 实验结果

2.1 苦荞 *FtNAC15* 基因的克隆

以苦荞发育时期种子 cDNA 为模板,FtNAC15F 和 FtNAC15R 为基因特异性引物,进行 PCR 扩增得到一条大小约 1 100 bp 的条带(图1)。将其连入 T 载体进行测序,测序结果显示该片段大小为 1 139 bp,利用 DNAMAN 对该序列进行分析,发现其含有 1 098 bp 的开放阅读框,编码 365 个氨基酸(图2)。利用在线网站 BDGP 预测该基因的转录起始位点,发现位于翻译起始密码子 ATG 上游第 13 个碱基 A 即为该基因的转录起始位点。利用在线网站 ExPASy 对该蛋白等电点和分子量进行分析,其等电点为 6.21,分子量为 41.6。利用在线网站 WoLF PSORT 对该蛋白进行亚细胞定位分析,将其定位于细胞核中。

将氨基酸序列与 NCBI 非冗余蛋白库(NR)进行比对,发现其含有 NAC 家族转录因子特有的 NAM 保守结构域,与橡



M:DNA Marker III;1:*FtNAC15*

图1 苦荞 *FtNAC15* 基因 PCR 扩增结果

Fig.1 PCR amplification result of *FtNAC15* in *Fagopyrum tataricum*

胶(*Hevea brasiliensis*) HbNAC10蛋白(XP_021655883.1)最为相似,比对得分为341分,一致性为69.80%;其次与金丝小枣(*Ziziphus jujuba*) ZjNAC73(XP_015875144.1)蛋白最为相似,比对得分为337分,一致性为74.15%。将该基因命名为*FtNAC15*, GenBank 登录号为MN136229。

```

1  AACTGCGCGCAAAATAGGTCAATCGATTAAATTGATCCTCTGAAATGTTAGATATATGCTCGATAATGAACCACAGAGATGCGGATATGATGA
1  M L D I C S I M N H R D A D M M

91  GATTGATGGATGATAATCCAATCGCGGATGAGAGGAAATAGAGATTGAGATAGCGAGATCTGATGATAATATCGCGATTAAATCCTCCGA
17  R L M D D N P I G D E R E I E I Q I A R S D D N I A I N P P

181  CCAGTAGTAGCAATCTTGTTATAGAGAAAACGCTTGTAGGTGAGCTTCGGACCATGCTTGCACCTTCTTGGCGCCATCACATCCCCCTTA
47  T S S S N L V I E K T L V G E L R T I A C T S C G H H I P L

271  ATGATCATCAGGAGGGAATATTGCATGATTGCGCGGGATGCCGGCTGGGGTGAAGTTCGATCCGACCGACGTTGAGATATTGGAGCACT
77  N D H Q E G I L H D L P G M P A G V K F D P T D V E I L E H

361  TAGCTGCGAAGGTGCACTCAGATTGCGGAAAATGTCATCCGTTGATTGATGAATTCATTCTACTCTGGACGGTGAAAAATGGAATTTGCT
107  L A A K V H S D S R K L H P L I D E F I H T L D G E N G I C

451  ATACTCATCCCGAGAAGCTACCTGGAGTGAGCAAGATGGCCTAATACGCCATTTTTTCCATCGCCCATCAAAGGCATACACGACGGGAA
137  Y T H P E K L P G V S K D G L I R H F F H R P S K A Y T T G

541  CAAGGAAGCGGAGGAAGGTGAGCTGCGACGAGGATGAAAGCGGTGAGACCATGCGCACAGACCGGAAAAACCCGCGCAGTTGTATCCA
167  T R K R R K V S C D E D E S G E T R W H K T G K T R A V V S

631  ATGGTATGGTCATAGGATTCAAGAAGATTCTAGTACTCTACACCAACTACGGCAGGCAAGAAAGCCTGAGAAGACCAACTGGGTTATGC
197  N G M V I G F K K I L V L Y T N Y G R Q R K P E K T N W V M

721  ACCAGTACCACATTGGTCAATCCGAGGACGAGAAGGAAGGTGAGCTTGTCTTTTCCAAAGTCTTTTACCAACGCGCCTAGACATGGAT
227  H Q Y H I G Q S E D E K E G E L V L S K V F Y Q T Q P R H G

811  CTCAGTTGCTTCAAGGAACCGATAAATATCCAATACACACAACAACGCGCGCCACAAACGCCAACATTTCACATGTTGGATCTT
257  S Q V A F K E P I N I Q Y T Q Q Q R P P Q T P T F Q H V G S

901  CTAATGTTGTGGTGAGGAATAACAATGACATTAGTCTCGAGTATTATCATCAACAACAACAACCGGGATATATTTGTTTGGTGACC
287  S N V V V R N N N D I S L E Y Y H Q Q Q Q Q P G Y I S F G D

991  ATGATCAATGTGTTATTTGGTCGAGAGCGGATGTGCTTGCACATCATCACTTGGTTCCAAACTTGGGAGTGAGGGGTGACCATGATGTGT
317  H D Q C V I G R E S D V L A H H H L V P N L G V R G D H D V

1081  CTTCTTTGTTAGTAACGAGCAAGAGCAGTTTGAAGCAGACCGTAGAGCTAAAAAGATGA
347  S S F V S N E Q E Q F E A D R R A K R *

```

起始密码子(ATG)和终止密码子(TGA)用下划线标记,黑色方框标注的是*FtNAC15*的转录起始位点

The translation initiation codon (ATG) and termination codon (TGA) were underlined the black box indicates the transcription initiation site of *FtNAC15*

图2 *FtNAC15*的核酸与氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide and amino acid sequence of *FtNAC15*

根据已公布的苦荞基因组数据^[11],利用本地python程序调取*FtNAC15*基因对应的DNA序列,该序列全长3 447 bp。对*FtNAC15*的基因结构进行分析,结果如图3所示,该基因由3个外显子和2个内含子组成,3个外显子长度分别为240,193,665 bp,2个内含子长度分别为77 bp和2 272 bp。

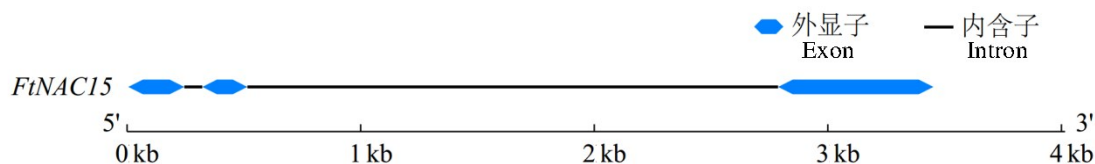
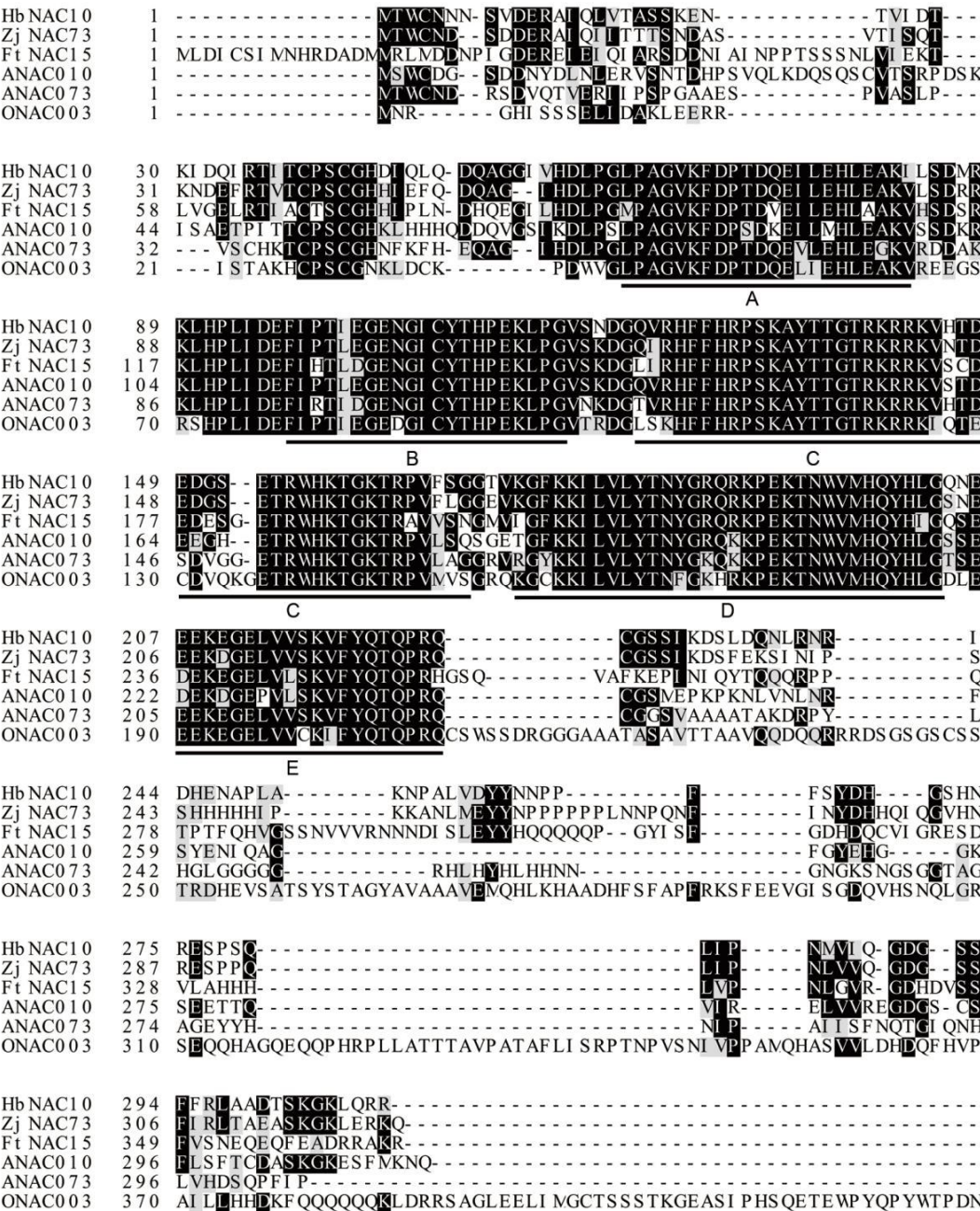


图3 *FtNAC15*基因结构

Fig.3 Gene structure of *FtNAC15*

2.2 多重序列比对与系统发育关系分析

将*FtNAC15*与拟南芥、水稻、橡胶、金丝小枣中最为同源的NAC蛋白一起,进行氨基酸多重序列比对,结果如图4所示,这些NAC蛋白氮端的氨基酸较为保守,碳端的氨基酸差异较大。氮端含有NAC家族蛋白典型的NAM结构域,可以细分为5个亚结构域A~E,其长度分别为22、21、48、32和20个氨基酸。碳端序列具有较大的变异,不存在十分保守的亚结构域。



Hb:橡胶;Zj:金丝小枣;A:拟南芥;O:水稻;黑色线段划线标注了NAC蛋白氮端NAM结构域的5个亚结构域(A~E);黑色背景标注的是保守氨基酸

Hb: *Hevea brasiliensis*, Zj: *Ziziphus jujube*, A: *Arabidopsis thaliana*, O: *Oryza sativa*. Black lines underlined five sub-domains of NAM domain at the N terminal of NAC protein (A~E). Black background represents the conserved amino acids

图4 *FtNAC15* 及其同源蛋白的氨基酸多重序列比对

Fig.4 Multiple amino acid sequences alignment of *FtNAC15* and the homologous proteins

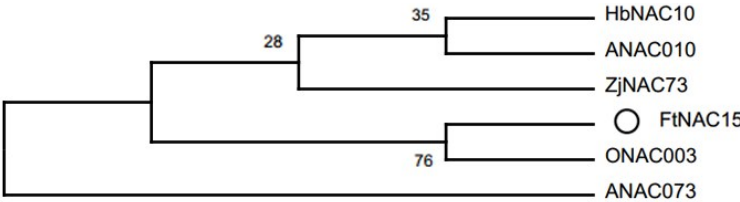


图5 *FtNAC15* 及其同源蛋白的系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of *FtNAC15* and the homologous proteins

利用 MEGAX 构建 NAC 蛋白的系统发育树,结果可以分为 3 个分支(图 5):第 1 分支由 HbNAC10、ANAC010 和 ZJNAC73 组成;第 2 分支由 FtNAC15 和 ONAC003 组成,表明 FtNAC15 与水稻 ONAC003 亲缘关系最近;第 3 分支由 ANAC073 组成。

2.3 启动子顺式作用元件分析

从苦荞基因组中调取 FtNAC15 翻译起始位点 ATG 上游 2 099 bp 的启动子序列,对启动子序列中的顺式作用元件进行预测和分析,结果如表 1 所示。(1)*FtNAC15* 基因 ATG 上游 120 bp 内含有 5 个真核生物转录起始所必需的 TATA 框。(2)*FtNAC15* 启动子序列中含有 34 个控制转录起始频率的 CAAT 框。(3)*FtNAC15* 基因启动子序列中含有 1 个昼夜节律控制元件(circadian)和 15 个光照响应元件(1 个 AT1-motif、2 个 GATA-motif、1 个 GA-motif、1 个 G-box、3 个 GT1-motif、1 个 ATCT-motif、2 个 Box 4、1 个 TCCC-motif 和 3 个 TCT-motif)。(4)*FtNAC15* 基因启动子序列中含有 6 个转录因子结合位点,即 2 个与 WRKY 家族转录因子结合的 W box 和 4 个与 MYB 家族转录因子结合的 MYB。(5)*FtNAC15* 基因启动子序列中含有 4 个非生物胁迫响应元件,即一个干旱和渗透胁迫诱导元件 DRE1、一个损伤诱导元件 WRE3、一个低温响应元件 LTR 和一个厌氧诱导元件 ARE。(6)*FtNAC15* 基因启动子序列中含有 5 个激素响应元件,即 2 个茉莉酸

表 1 *FtNAC15* 启动子序列中的顺式作用元件
Tab.1 Cis-acting elements in the promoter sequence of *FtNAC15*

元件名称 Cis-acting elements	序列 Sequence	数目 Number	功能 Function	分类 Classification
TATA-box	TATATA;TATATTTATATTT; TATAAATA;TATA;	5	TATA 框,转录起始必须元件	启动子核心元件
CAAT-box	CAAAAT;CAAT;CCAAT	34	CAAT 框,转录增强元件	
circadian	CAAAGATATC	1	昼夜节律控制元件	节律;光照响应元件
AT1-motif	AATTATTTTTTATT	1	光照响应元件	
GATA-motif	AAGGATAAGG;GATAGGA	2	光照响应元件	
GA-motif	ATAGATAA	1	光照响应元件	
G-box	TACGTG	1	光照响应元件	
GT1-motif	GGTTAA	3	光照响应元件	
ATCT-motif	AATCTAATCC	1	光照响应元件	
Box 4	ATTAAT	2	光照响应元件	
TCCC-motif	TCTCCCT	1	光照响应元件	
TCT-motif	TCTTAC	3	光照响应元件	
W box	TTGACC	2	WRKY 转录因子结合位点;响 应损失和病原	转录因子结合位点
MYB	TAACCA;CAACAG;CAACTG;AACCTAA	4	MYB 转录因子结合位点	非生物胁迫响应元件
DRE1	ACCGAGA	1	干旱和渗透胁迫诱导元件	
WRE3	CCACCT	1	损伤诱导元件	
LTR	CCGAAA	1	低温响应元件	
ARE	AAACCA	1	厌氧诱导元件	
CGTCA-motif	CGTCA	1	响应茉莉酸甲酯	激素响应元件
P-box	CCTTTTG	1	赤霉素响应元件	
TCA-element	CCATCTTTTT	1	响应水杨酸	
TGACG-motif	TGACG	1	响应茉莉酸甲酯	
ABRE	ACGTG	1	响应脱落酸	

甲酯响应元件 CGTCA-motif 和 TGACG-motif、1 个赤霉素响应元件 P-box、1 个水杨酸响应元件 TCA-element 和 1 个脱落酸响应元件 ABRE。

2.4 *FtNAC15* 在种子发育过程中的表达分析

种子作为苦荞的食用器官,大量基因参与其发育过程中的调控,包括 NAC、MYB、WRKY 等转录因子。为了明确 *FtNAC15* 是否也参与调控苦荞种子发育过程,在苦荞种子发育转录组数据^[16]中查找 *FtNAC15* 的表达情况,发现 *FtNAC15* 在苦荞种子发育过程中存在较高水平的表达,FPKM 值为 195~484。同时,*FtNAC15* 在苦荞种子灌浆前期和灌浆期表达较为稳定,在种子成熟期表达水平上调 1 倍,表明 *FtNAC15* 更多参与了成熟期种子的调控(图 6)。

2.5 *FtNAC15* 在干旱胁迫下的表达分析

NAC 家族转录因子广泛参与植物的生物与非生物胁迫,如干旱、高温、盐渍等。为了明确 *FtNAC15* 是否响应苦荞干旱胁迫,在苦荞干旱胁迫转录组数据中查找 *FtNAC15* 的表达情况,发现 *FtNAC15* 在苦荞干旱胁迫过程中存在较高水平的表达,FPKM 值为 109~318。与对照(0 h)相比,*FtNAC15* 在 PEG 处理 1 h 和 6 h 后表达量无明显变化,在 PEG 处理 3 h 后表达水平上调 1 倍,表明 *FtNAC15* 响应苦荞干旱胁迫(图 7)。

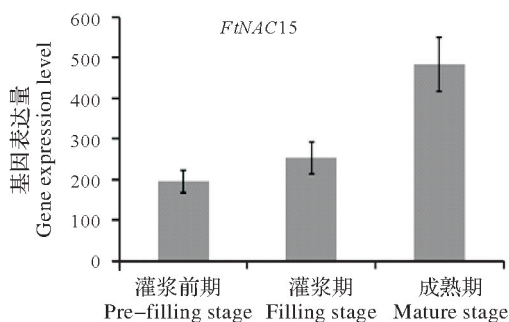


图6 *FtNAC15* 在种子发育过程中的表达

Fig.6 Expression of *FtNAC15* during seed development process

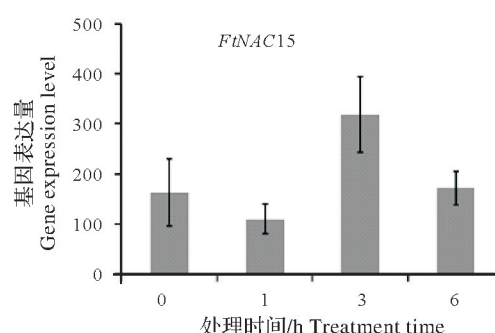


图7 *FtNAC15* 在干旱胁迫下的表达

Fig.7 Expression of *FtNAC15* under drought stress

3 讨论与结论

FtNAC15 是从苦荞中克隆的一个 NAC 家族基因,其开放阅读框全长 1 098 bp,编码 365 个氨基酸,GenBank 登录号为 MN136229。*FtNAC15* 基因由 3 个外显子和 2 个内含子组成,*FtNAC15* 氨基酸序列与橡胶 *HbNAC10* 和金丝小枣 *ZjNAC73* 最为相似。

NAM 结构域是 NAC 家族转录因子特有的保守域,最初 NAM 结构域由 A、B、C 和 D 4 个保守的亚结构域组成,后来发现在 *AtNAM* 中,紧跟着 D 亚结构域还存在一个 E 结构域,D 和 E 结构域共同形成了 *AtNAM* 的 DNA 结合域,后来普遍将 NAM 划分为 5 个结构域^[18]。Ooka 等^[19]对拟南芥和水稻全基因组 NAC 转录因子进行了系统的分析,将拟南芥和水稻的 NAC 分成了 2 个大的亚家族,组 I 和组 II,组 I 有 14 个亚组,组 II 有 2 个亚组。在 NAM 结构域的 5 个亚结构域(A~E)中,A、C、D 亚结构域在所有 18 个亚组中都较为保守,然而 B、E 亚结构域在不同亚组中的变异程度十分大。其中,ONANC003 属于组 II 的第 2 亚组,ONANC003、ANAC010、ANAC073、*FtNAC15*、*HbNAC10* 和 *ZjNAC73* 6 个 NAC 蛋白均属于这一亚组(图 5),虽然该亚组 NAC 蛋白的 B、E 结构域与所有 NAC 蛋白相比,序列变异很大,然而在该亚组内部,B、E 结构域的氨基酸残基十分保守(图 4),推测这一亚组 NAC 蛋白可能具有更为相似的功能。

启动子顺式作用元件是指与结构基因串联的特定 DNA 序列,是转录因子的结合位点,它通过与反式作用因子结合来调控基因的转录。对 *FtNAC15* 基因上游 1 099 bp 启动子序列的顺式作用元件进行了预测和分析,该区段内共有 70 个顺式作用元件,根据其功能可以分为 5 类,第 1 类是真核生物转录必需的启动子核心元件(TATA 框和 CAAT 框),其作用是控制真核生物转录起始和频率。第 2 类是

节律和光照响应元件(circadian、AT1-motif、GATA-motif、GA-motif、G-box、GT1-motif、ATCT-motif、Box 4、TCCC-motif和TCT-motif),其作用是响应外界光周期、光照,调控昼夜节律和生物钟。第3类是WRKY和MYB转录因子结合位点,表明这两类转录因子可能结合在*FtNAC15*基因的启动子区,从而调控*FtNAC15*的转录。第4类是非生物胁迫响应元件(DRE1、WRE3、LTR、ARE),根据这几个元件特有的功能,说明*FtNAC15*基因可能受到干旱、渗透压、损伤、低温、厌氧等不良环境的诱导。第5类是激素响应元件(CGTCA-motif、TGACG-motif、P-box、TCA-element、ABRE),说明*FtNAC15*基因的表达可能受到茉莉酸甲酯、赤霉素、水杨酸和脱落酸几种激素的调控。第3、4、5类顺式作用元件都与植物的逆境胁迫有一定关系,这一结论表明*FtNAC15*基因可能会通过以上几种途径来响应荞麦非生物胁迫。

植物NAC家族具有多样的功能,调控种子/果实发育进程已有大量报道,如Liu等^[20]鉴定了黄瓜全基因组的91个NAC转录因子,其中30个NAC转录因子在黄瓜发育过程中存在差异表达,Gao等^[2]通过VIGS抑制了土豆一个NAC转录因子,*NOR-like1*的表达后,土豆成熟起始延迟了14 d,表明*NOR-like1*负调控土豆果实的成熟过程。*FtNAC15*在成熟期的苦荞种子中上调表达(图6),表明其可能也参与调控种子成熟过程。水稻ONAC003的表达受干旱、高温、高盐、脱落酸的诱导,其过表达株系在高温、干旱和氧胁迫下的抗性增强,表明ONAC003调控水稻非生物胁迫过程^[21],*FtNAC15*与水稻ONAC003的亲缘关系最近,归到NAC基因家族的同一亚组(图5),并且该基因在干旱胁迫后表达量上调(图7),表明其可能与水稻ONAC003有相似的功能,*FtNAC15*基因是否也受到高温、高盐等其他生物胁迫的诱导,还需进一步研究。本研究结果加深了NAC家族转录因子对荞麦种子发育与抗逆作用的认识,为荞麦分子育种提供了理论依据和候选基因资源。

参考文献:

- [1] Hendelman A, Stav R, Zemach H, et al. The tomato NAC transcription factor SINAM2 is involved in flower-boundary morphogenesis[J]. J Exp Bot, 2013, 64(18): 5497-5507.
- [2] Gao Y, Wei W, Zhao X, et al. A NAC transcription factor, *NOR-like1*, is a new positive regulator of tomato fruit ripening[J]. Horticulture Res, 2018, 5: 75.
- [3] Tak H, Negi S, Gupta A, et al. A stress associated NAC transcription factor MpSNAC67 from banana (*Musa xparadisica*) is involved in regulation of chlorophyll catabolic pathway[J]. Plant Physiol Biochem, 2018, 132: 61-71.
- [4] He K, Zhao X, Chi X, et al. A novel Miscanthus NAC transcription factor MINAC10 enhances drought and salinity tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. J Plant Physiol, 2019, 233: 84-93.
- [5] Yong Y, Zhang Y, Lyu Y. A stress-responsive NAC transcription factor from *Tiger Lily* (LINAC2) interacts with LIDREB1 and LIZHFD4 and enhances various abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(13): 3225.
- [6] Perochon A, Kahla A, Vranic M, et al. A wheat NAC interacts with an orphan protein and enhances resistance to *Fusarium* head blight disease[J]. Plant Biotechnol J, 2019, 17(10): 1892-1904.
- [7] 黄娟, 邓娇, 朱丽伟, 等. 植物种子发育相关NAC家族转录因子研究进展[J]. 种子, 2017, 36(11): 51-55.
Huang J, Deng J, Zhu L W, et al. Progress of NAC transcription factor related to plant seed development[J]. Seed, 2017, 36(11): 51-55.
- [8] 陈庆富. 荞麦生产状况及新类型栽培荞麦育种研究的最新进展[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), 2018, 36(3): 1-7.
Chen Q F. The status of buckwheat production and recent progresses of breeding on new type of cultivated buckwheat[J]. Journal of Guizhou Normal University (Natural Sciences), 2018, 36(3): 1-7.
- [9] 唐晓慧, 钟灵允, 汤焘, 等. 6种香料植物提取物对荞麦立枯病菌的抑制作用[J]. 江西农业大学学报, 2018, 40(1): 89-95.
Tang X H, Zhong L Y, Tang T, et al. Inhibitory effects of six kinds of spice plant extracts on *Rhizoctonia solani* in buckwheat[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2018, 40(1): 89-95.

- [10] Huang Y, Wu Q, Wang S, et al. FtMYB8 from tartary buckwheat inhibits both anthocyanin/Proanthocyanidin accumulation and marginal trichome initiation[J]. BMC Plant Biol, 2019, 19(1): 263.
- [11] Zhang L, Li X, Ma B, et al. The Tartary buckwheat genome provides insights into rutin biosynthesis and abiotic stress tolerance[J]. Mol Plant, 2017, 10(9): 1224-1237.
- [12] Liu M, Sun W, Ma Z, et al. Genome-wide identification of the SPL gene family in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) and expression analysis during fruit development stages[J]. BMC Plant Biol, 2019, 19(1): 299.
- [13] Liu M, Wen Y, Sun W, et al. Genome-wide identification, phylogeny, evolutionary expansion and expression analyses of bZIP transcription factor family in tartary buckwheat[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 483.
- [14] Liu M, Ma Z, Sun W, et al. Genome-wide analysis of the NAC transcription factor family in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) [J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 113.
- [15] 荣玉萍, 张文香, 邓娇, 等. 苦荞 NAC 基因家族的生物信息学分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2019, 45(3): 273-280.
- Rong Y P, Zhang W X, Deng J, et al. Bioinformatics analysis of NAC gene family in tartary buckwheat[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2019, 45(3): 273-280.
- [16] Huang J, Deng J, Shi T, et al. Global transcriptome analysis and identification of genes involved in nutrients accumulation during seed development of rice tartary buckwheat (*Fagopyrum Tararicum*) [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 11792.
- [17] 汪燕, 喻武鹏, 廖凯, 等. 荞麦属植物 RLKs 基因序列分析与亲缘关系研究[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), 2018, 36(4): 30-35.
- Wang Y, Yu W J, Liao K, et al. Analysis of RLKs gene sequence and phylogenetic relationship in genus *Fagopyrum* [J]. Journal of Guizhou Normal University (Natural Sciences), 2018, 36(4): 30-35.
- [18] Duval M, Hsieh T F, Kim S Y, et al. Molecular characterization of AtNAM: a member of the *Arabidopsis* NAC domain superfamily[J]. Plant Mol Biol, 2002, 50(2): 237-248.
- [19] Ooka H, Satoh K, Doi K, et al. Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana* [J]. DNA Res, 2003, 10(6): 239-247.
- [20] Liu X, Wang T, Bartholomew E, et al. Comprehensive analysis of NAC transcription factors and their expression during fruit spine development in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. Horticulture Res, 2018, 5(1): 31.
- [21] Fang Y, Liao K, Du H, et al. A stress-responsive NAC transcription factor SNAC3 confers heat and drought tolerance through modulation of reactive oxygen species in rice [J]. J Exp Bot, 2015, 66(21): 6803-6817.