

DOI: 10.11686/cyxb2024404

http://cyxb.magtech.com.cn

邹苇鹏, 刘怡, 翟佳兴, 等. 紫花苜蓿 *MsNAC053* 基因克隆及其对非生物胁迫的响应分析. 草业学报, 2025, 34(9): 121-133.

ZOU Wei-peng, LIU Yi, ZHAI Jia-xing, et al. Cloning of *MsNAC053* from alfalfa and analysis of its transcript profile in response to abiotic stresses. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(9): 121-133.

紫花苜蓿 *MsNAC053* 基因克隆及其对非生物胁迫的响应分析

邹苇鹏, 刘怡, 翟佳兴, 周思懿, 官祉祎, 岑慧芳*, 朱慧森*, 许涛

(山西农业大学草业学院, 山西 太谷 030801)

摘要: NAC (NAM, ATAF1/2, CUC1/2) 转录因子是植物特有的转录因子, 在调控植物生长发育、激素信号转导及胁迫响应等过程中发挥重要作用。紫花苜蓿是世界范围内重要的豆科牧草之一, 营养丰富, 品质优良。为探究紫花苜蓿 *NAC053* 基因功能, 利用 SnapGene 及 NCBI 设计特异性引物并利用 PCR 技术克隆 *MsNAC053* 基因, 利用生物信息学软件分析其蛋白质理化性质、二级结构和亚细胞定位情况等, 并使用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析 *MsNAC053* 基因在紫花苜蓿不同组织中的表达模式及对不同非生物胁迫的响应情况, 利用农杆菌介导法将 DNA 酶切及连接构建的亚细胞定位载体导入烟草叶片进行亚细胞定位。结果表明: *MsNAC053* 基因编码区全长 903 bp, 编码 300 个氨基酸, 其蛋白相对分子量为 34.62 kDa, 脂溶指数为 73.82, 理论等电点为 7.05, 平均亲水性为 -0.604, 不稳定系数为 47.28, 为不稳定的亲水性蛋白, 不具备跨膜结构, 具有响应冷胁迫及脱落酸等的顺式作用元件。亚细胞定位结果显示其定位于细胞核中, 系统进化树和氨基酸序列分析表明 *MsNAC053* 与蒺藜苜蓿、长柔毛野豌豆等豆科植物亲缘关系较近。qRT-PCR 结果表明, *MsNAC053* 基因表达具有组织特异性, 在幼叶中表达量最高, 在子叶中表达量最低; 干旱、盐及脱落酸 (ABA) 处理均能诱导 *MsNAC053* 基因的表达, 表明 *MsNAC053* 基因参与紫花苜蓿应对干旱、盐胁迫响应。本研究为紫花苜蓿抗逆分子育种提供了理论依据及候选基因。

关键词: 紫花苜蓿; NAC 转录因子; 基因克隆; 表达分析; 非生物胁迫

Cloning of *MsNAC053* from alfalfa and analysis of its transcript profile in response to abiotic stresses

ZOU Wei-peng, LIU Yi, ZHAI Jia-xing, ZHOU Si-yi, GONG Zhi-yi, CEN Hui-fang*, ZHU Hui-sen*, XU Tao
College of Grassland Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China

Abstract: The NAC (NAM, ATAF1/2, CUC1/2) transcription factors are plant-specific regulators that play critical roles in plant growth and development, hormone signaling, and stress responses. Alfalfa (*Medicago sativa*), one of the most important leguminous forage crops worldwide, is renowned for its high nutritional value and quality. To investigate the function of the *MsNAC053* gene in alfalfa, specific primers were designed using SnapGene and NCBI to clone *MsNAC053* through polymerase chain reaction (PCR) technology. The physicochemical properties, secondary structure, and subcellular localization of the protein were analyzed through bioinformatics tools. And the tissue-specific expression patterns of *MsNAC053* and its responses to abiotic stresses were analyzed through

收稿日期: 2024-10-17; 改回日期: 2024-12-25

基金项目: 国家自然科学基金 (32071872, 31402131), 山西省中央引导地方科技发展资金项目 (YDZJSX2022B006), 山西重点研发计划课题 (202102140601006-3) 和山西农业大学博士科研启动专项 (2021BQ01) 资助。

作者简介: 邹苇鹏 (1999-), 男, 四川德阳人, 在读硕士。E-mail: 2015389003@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: cenhuifangqk@163.com; zhuhuisen@126.com

quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The subcellular localization analysis were conducted by introducing vector into tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves via *Agrobacterium*-mediated transformation. The results showed that the coding region of *MsNAC053* was 903 bp, encoding 300 amino acids, with a predicted molecular weight of 34.62 kDa, an aliphatic index of 73.82, a theoretical isoelectric point (pI) of 7.05, a grand average hydropathicity of -0.604 , and an instability coefficient of 47.28, categorizing it as an unstable hydrophilic protein without transmembrane regions. *Cis*-acting elements responsive to low-temperature (LTR) and abscisic acid responsiveness (ABRE) were identified. Subcellular localization confirmed that *MsNAC053* was localized in nucleus. Phylogenetic and amino acid sequence analyses revealed close evolutionary relationships between *MsNAC053* and other NAC proteins from leguminous species such as *Medicago truncatula* and *Vicia villosa*. qRT-PCR demonstrated tissue-specific expression of *MsNAC053*, with the highest expression level in young leaves and the lowest expression level in cotyledons. Drought, salt, and ABA treatments significantly upregulated the expression level of *MsNAC053*, indicating that it plays a role in response to drought and salt stresses. In summary, the results of this study provides both theoretical insights and a candidate gene for molecular breeding of stress-resistant alfalfa varieties.

Key words: alfalfa; NAC transcription factor; gene cloning; expression analysis; abiotic stress

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)是豆科苜蓿属多年生草本植物,是世界范围内种植面积最广的豆科牧草,其营养价值丰富,草质优良,适口性好,是优良的高蛋白饲草,在畜牧业生产中具有重要地位^[1-2]。紫花苜蓿在生态修复中也发挥一定作用,大面积种植紫花苜蓿能够改良土壤、调节气候和改善农业生产及生态环境。在紫花苜蓿生产过程中如果受到高温、寒冷、盐及干旱等非生物胁迫,容易导致饲草品质降低、产量下降,加剧草畜平衡矛盾,制约畜牧业可持续发展。因此,利用分子育种技术筛选抗逆性强、产量高、营养价值高、适口性好的优良紫花苜蓿新品种对于扩大紫花苜蓿栽培面积,促进我国草牧业发展具有重要意义。

NAC转录因子是高等植物特有的转录因子,因其所编码的蛋白在N端有一段150 bp左右被称NAC结构域的NAM保守序列而得名^[3]。NAC转录因子在调控植物生长发育及胁迫响应过程中具有重要作用,如调控顶端分生组织的形成^[4]、果实的成熟^[5]和增强植物对干旱、寒冷及盐碱等非生物胁迫及病虫害等生物胁迫的抗性^[6-8]等。目前,NAC转录因子的功能在蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)^[9]、大豆(*Glycine max*)^[10]、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[11]等多种模式植物中报道。研究发现,短日照条件下,拟南芥ATAF1基因直接靶向调控下胚轴伸长的关键转录因子AtCDF1、AtCDF5且抑制其表达,负调控光敏色素互作因子AtPIF表达,导致拟南芥下胚轴缩短^[11]。草莓(*Fragaria×ananassa*)FaRIF是果实发育前期成熟的关键调控因子,通过控制脱落酸(abscisic acid, ABA)生物合成及信号传导、细胞壁的降解及修复等途径调控果实软化、色素和糖积累等相关过程^[5]。水稻(*Oryza sativa*)OsNAC2基因可以直接与OsLEA3及OsSAPK1的启动子区域特异性结合,通过脱落酸信号途径调控水稻对干旱及盐胁迫的抗性^[12]。干旱条件下过表达甘蓝(*Brassica oleracea*)BoNAC19基因的拟南芥植株中抗氧化酶和花青素含量降低,活性氧积累量增多^[13]。Zhang等^[14]在黄麻(*Corchorus capsularis*)中过表达黄麻CcNAC1基因,转基因植株中3-酮酯酰-CoA合酶(3-ketoacyl-CoA synthase, KCS)基因相对表达量升高,转基因植株提前开花,抗旱性增强。在拟南芥中过表达玉米(*Zea mays*)ZmNAC074基因可以增强转基因植株对干旱和盐胁迫的耐受性^[7]。在紫花苜蓿中过表达*MsNAC047*基因提高了转基因植株对盐碱胁迫的抗性^[15]。

前期研究分析紫花苜蓿MsNAC转录因子家族挖掘到对干旱、盐胁迫响应较强的*MsNAC053*等候选转录因子。因此,本研究根据已有的紫花苜蓿转录组数据库中NAC053转录本序列,在紫花苜蓿中克隆*MsNAC053*基因,并利用生物信息学软件对紫花苜蓿*MsNAC053*基因编码的蛋白质进行分析,同时分析*MsNAC053*基因的组织特异性表达模式及对不同非生物胁迫的响应情况,为紫花苜蓿NAC基因研究及后续利用分子育种技术培育抗逆的紫花苜蓿新种质创造理论条件。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于2024年3—9月在山西农业大学草业学院开展。选取颗粒饱满、大小一致的‘中苜1号’紫花苜蓿种子种植于营养土:蛭石=1:1的混合基质中,置于光照培养箱培养,培养条件:相对湿度为60%,昼夜温度均为25℃,日照条件为16 h光照/8 h黑暗。

1.2 *MsNAC053* 基因克隆

在已发表的紫花苜蓿转录组数据库中找到*MsNAC053*转录本序列,在‘中苜1号’紫花苜蓿基因组数据库进行比对,得到*MsNAC053*基因的目的序列。利用SnapGene及NCBI Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)及Primer 6.0进行引物设计及引物特异性检验^[16],引物序列见表1。利用RNA提取试剂盒(0416-50,北京华越洋生物科技有限公司)提取‘中苜1号’紫花苜蓿总RNA,并利用Nanodrop 2000对提取的RNA进行浓度及完整性检测,使用PrimerScript™RT reagent kit with gDNA Eraser(Code No. RR047A, TakaRa)将RNA反转录合成cDNA,并以此cDNA为模板,利用Tks高保真酶进行PCR扩增,PCR反应体系参考说明书。PCR扩增程序为94℃预变性2 min;94℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸1 min;30个循环;72℃延伸5 min。扩增产物用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,目的片段回收后连接克隆载体pTOPO001,并转入大肠杆菌DH5α,菌液PCR鉴定后送至生工生物工程有限公司(上海)进行测序。

1.3 生物信息学分析

对紫花苜蓿*MsNAC053*基因及其编码蛋白进行生物信息学预测,表2为生物信息学预测分析所用软件及网址。

1.4 *MsNAC053* 亚细胞定位分析

以含*MsNAC053*基因的质粒为模板,利用无缝克隆技术构建以pBWA(V)HS为骨架的35S::*MsNAC053*-GFP表达载体,35S::GFP为空白对照载体,分别转化到农杆菌GV3101中,注射一月龄烟草(*Nicotiana tabacum*)叶片后暗培养48 h,在共聚焦显微镜(Leica STELLARIS 5,德国)下观察烟草叶片中GFP荧光信号的分布情况,确定目的基因表达部位。

1.5 *MsNAC053* 基因表达模式分析

试验选取4周龄‘中苜1号’紫花苜蓿幼苗,将其转移至1/2 Hoagland营养液培养48 h后分别进行干旱(15% PEG-6000)、盐胁迫(250 mmol·L⁻¹ NaCl)和脱落酸(abscisic acid, ABA, 100 μmol·L⁻¹)处理,分别在处理0、2、4、8、12、24和48 h时取相同部位的叶片,置于液氮速冻处理后转移至-80℃冰箱保存备用,每个处理设置3次生物学重复,分析*MsNAC053*基因对干旱胁迫、盐胁迫和ABA处理的响应情况。取4周龄‘中苜1号’紫花苜蓿幼茎(从顶端数第1~2节间)、老茎(从基部数第2~3节间)、幼叶(从顶端数第2~3枚完全展开叶)、老叶(从顶端数第9片叶)、花、种子萌发后的子叶和真叶(种子萌发长出的第一片真叶)为材料进行组织特异性表达分析,每个部位3次生物学重复。提取各样品RNA,将其反转录成cDNA后为模板,利用特异性引物qNAC053-F/qNAC053-R进行实时荧光定量PCR(qRT-PCR)反应,以紫花苜蓿*MsACTIN*为内参基因,使用TakaRa RR420Q定量PCR试剂盒(日本)进行qRT-PCR反应,反应程序按照说明书设置,相对表达量以2^{-ΔΔC_t}法^[12]计算。

1.6 数据处理及分析

利用Excel 2019和GraphPad Prism 10.0处理数据和制作图表,用SPSS 23.0进行单因素方差分析。

表1 *MsNAC053* 基因PCR及荧光定量PCR引物

Table 1 The primer sequence of *MsNAC053* gene in PCR and qRT-PCR

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
NAC053-F	ATGGCATCAATGGAGGACATCAAC
NAC053-R	TTAAAAATTCAGGATATTAGTGTAAGCACTCC
qNAC053-F	ACGCATAATCGGGTTGAGGAAG
qNAC053-R	TAGGCAAGGGGCTATTGTCAGG
ACTIN-F	CAAAAGATGGCAGATGCTGAGGAT
ACTIN-R	CATGACACCAGTATGACGAGGTCG

表2 生物信息学分析所用软件信息

Table 2 Information on the software used for bioinformatics analysis

软件名称 The name of software	分析项目 The item analyzed	网址 Website
NCBI-Blast	序列比对 Sequence alignment	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
Evolview	系统进化树美化 Phylogenetic tree beautification	https://www.evolgenius.info/evolview/
SMART	保守结构域分析 Conservative domain analysis	https://smart.embl.de/
NCBI-conserved domain	保守结构域分析 Conservative domain analysis	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/
PlantCARE	顺式作用元件分析 <i>Cis</i> -acting element analysis	https://bioinformatics.psb.ugent.be/
Expasy	蛋白理化性质分析 The characteristic analysis of physical and chemical of protein	https://www.expasy.org/
TMHMM	蛋白跨膜结构分析 Protein transmembrane structure analysis	https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/
SOPMA	蛋白二级结构分析 Secondary structure analysis of protein	https://npsa-prabi.ibcp.fr/
Swiss-Model	蛋白三级结构分析 Tertiary structure analysis of protein	https://swissmodel.expasy.org/
Cell-Ploc 2.0	亚细胞定位分析 Subcellular localization analysis	http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/
SignalP 5.0	蛋白信号肽分析 Signal peptide analysis of protein	https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/
NetPhos 3.1	蛋白磷酸化位点分析 Phosphorylation site analysis of protein	https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/
NetGlycate 1.0	蛋白糖基化位点分析 Glycosylation site analysis of protein	https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetGlycate-1.0/
DNAMAN 7.0	序列比对 Sequence alignment	本地软件 Local software
MEGA 6.0	系统进化树构建 Phylogenetic tree construction	本地软件 Local software
SnapGene	序列比对 Sequence alignment	本地软件 Local software
TBtools	系统进化树美化 Phylogenetic tree beautification	本地软件 Local software

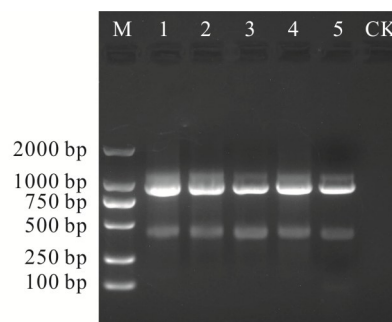
2 结果与分析

2.1 *MsNAC053* 基因的克隆与序列分析

以紫花苜蓿 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 获得大小约 900 bp 的条带, 与‘中苜 1 号’基因组及转录本数据预测 *MsNAC053* 基因片段长度相近(图 1)。测序结果表明, 实际扩增片段长度为 903 bp, 编码 300 个氨基酸(图 2)。结合前期研究基础, 发现该基因定位于紫花苜蓿染色体第 53 顺位, 因此将其命名为 *MsNAC053*^[16]。

2.2 *MsNAC053* 生物信息学分析

对 *MsNAC053* 基因编码的蛋白质进行理化性质分析, 结果表明, *MsNAC053* 蛋白分子式为 C₁₅₄₇H₂₄₁₆N₄₁₆O₄₅₈S₁₄, 相对分子质量为 34.62 kDa, 脂溶指数为 73.82, 理论等电点(theoretical protein isoelectric, pI)为 7.05^[16], 带负电荷精氨酸和赖氨酸残基(arginine+lysine, Arg+Lys)有 39 个, 带正电荷天冬氨酸和谷氨酸残基(aspartic acid+glutamic acid, Asp+Glu)39 个, 其中含量最高的氨基酸为亮氨酸(leucine, Leu), 占 9.0%, 其次为赖氨酸(lysine, Lys), 占 8.3%, 丝氨酸(serine, Ser)占 7.3%, 谷氨酸(glutamic acid, Glu)占 7.0%, 具体见表 3。*MsNAC053* 蛋白平均亲水性为 -0.604, 不稳定系数为 47.28, 表明 *MsNAC053* 为不稳定的亲水性蛋白。利用 SMART 及 NCBI-conserved domain 预测紫花苜蓿 *MsNAC053* 蛋白

图1 紫花苜蓿 *MsNAC053* 基因 PCR 扩增结果Fig. 1 PCR amplification results of *MsNAC053* gene in alfalfa

1~5 为以不同紫花苜蓿叶片 cDNA 为模板扩增 *MsNAC053* 的基因结果。1~5 were the amplification results of *MsNAC053* gene with cDNAs of different leaves from alfalfa as templates; CK: 对照 Control; M: 2000 bp 分子量标记 2000 bp marker.

```

1      ATGGCATCAATGGAGGACATCAACATGTGTACTGAACAAATTACACTTCCAGGATTCAGATTTACCCACAGAAGAAGAACTCCTTGAT
1      M A S M E D I N M C T E Q I T L P G F R F H P T E E E L L D
91     TTCTATCTTAAGAATATGGTTGTTGGCAAAAACCTCGTTATGATGTCATTGGTTTTCTAAATATCTATCACCATGATCCTTGTGACTTG
31     F Y L K N M V V G K K L R Y D V I G F L N I Y H H D P C D L
181    CCAGTTTGTCAAAGGTTGGGAAAGAGAATGGTATTTTTTCGTGCCAAGGGACAAAAACATGGTAGTGGAGGAAGGCCTAATCGCACACA
61     P G L S K V G E R E W Y F F V P R D K K H G S G G R P N R T
271    ACTGAGAAAGGTTTCTGGAAGCCACCGGTTCCGACCGGAAATCGTGACGTTATCGGATCCGAAACGCATAATCGGGTTGAGGAAGACG
91     T E K G F W K A T G S D R K I V T L S D P K R I I G L R K T
361    TTGGTTTTCTATGAGGGAAGAGCTCCAAGAGGAACCAAGACTGATTGGGTTATGAATGAATACCGTTTACCTGACAATAGTCCCTTGCCT
121    L V F Y E G R A P R G T K T D W V M N E Y R L P D N S P L P
451    AAGGACATAGTATTATGCAAGATATATAGAAAGGCAACTTCGTTGAAAGTGCTTGAACAAAGAGCAGCAGAAGAAGAAGAGATGAAACAA
151    K D I V L C K I Y R K A T S L K V L E Q R A A E E E E M K Q
541    ATGGTGGTTCCCTACATCTTCCCACTTCTTCTTACGGACACAATCTCTTAACTACACACAACAGACCAACACGTCCTGTCCTG
181    M V G S P T S S P P S S S T D T I S F N Y T Q Q D Q H V S M
631    CCCTTATGTTTTCAACAAGTCATTCCTAAGAAAGAATCTGAACATGAAATAATTAAGTGAAGACATGGTTTCTTGTCAAGTCATGAA
211    P L L F Q Q V I P K K E S E H E I I K T E D M V S L S S H E
721    AAAATTGTGAAAGATAATAAAAAGGCTTGTGGAACATCTTTGCAATTGCCCTTAGGGAAGGACAATGTACCTGAACTTCAGTTACCTATA
241    K I V K D N K K A C G T S L Q L P L G K D N V P E L Q L P I
811    GCTGCAGATTGGACCAAGATACATTTTGGGCTCAGCTTAATAGTCCTTGGCTACAAAACCTGGAGTGCTTACACTAATATCTGAATTTT
271    A A D W T Q D T F W A Q L N S P W L Q N W S A Y T N I L N F
901    TAA
301    *
    
```

图 2 紫花苜蓿 *MsNAC053* 基因编码区序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 2 The full length coding sequence of *MsNAC053* gene and its amino acid sequence of alfalfa

保守结构域,发现其包含 NAM 超家族结构域,属于 NAC 家族(图 3A)。对 *MsNAC053* 蛋白进行跨膜结构预测分析,发现 *MsNAC053* 蛋白不存在跨膜结构域,没有跨膜转运功能(图 3B)。利用 ExPasy 在线软件对 *MsNAC053* 蛋白进行亲疏水性分析,发现第 88、89 位天冬氨酸、精氨酸和第 213 位亮氨酸的亲水性和疏水性预测值分别为 -2.589 和 1.378(图 3C),因此推测 *MsNAC053* 蛋白应为亲水性蛋白。利用 NetPhos 3.1 和 NetGlycate 1.0 在线软件预测 *MsNAC053* 蛋白的磷酸化位点和糖基化位点,结果表明,*MsNAC053* 蛋白含有 16 个丝氨酸(serine, Ser)位点,11 个苏氨酸(threonine, Thr)位点,3 个酪氨酸(tyrosine, Tyr)位点以及 2 个糖基化位点(图 3D, E)。利用 SignalP 5.0 对 *MsNAC053* 蛋白进行信号肽预测分析,发现 *MsNAC053* 蛋白不存在信号肽,属于非分泌蛋白(图 3F)。*MsNAC053* 蛋白二级结构预测分析表明,该蛋白的二级结构由 α -螺旋、延伸链、 β -转角和无规则卷曲构成,其中无规则卷曲和 α -螺旋结构分别占 58.80% 和 25.91%(图 3G)。利用 Swiss-Model 在线软件预测 *MsNAC053* 蛋白的三级结构,发现其与大豆 *GmNAC6* 蛋白三级结构相似,相似度为 84.3%(图 3H, I)。

表 3 紫花苜蓿 *MsNAC053* 氨基酸组成分析

Table 3 Amino acid composition analysis of *MsNAC053* in alfalfa

氨基酸 Amino acid	数目 Number	含量 Content (%)	氨基酸 Amino acid	数目 Number	含量 Content (%)
丙氨酸 Alanine (Ala, A)	11	3.7	赖氨酸 Lysine (Lys, K)	25	8.3
精氨酸 Arginine (Arg, R)	14	4.7	甲硫氨酸 Methionine (Met, M)	10	3.3
天冬酰胺 Asparagine (Asn, N)	13	4.3	苯丙氨酸 Phenylalanine (Phe, F)	12	4.0
天冬氨酸 Asparticacid (Asp, D)	18	6.0	脯氨酸 Proline (Pro, P)	20	6.6
半胱氨酸 Cysteine (Cys, C)	4	1.3	丝氨酸 Serine (Ser, S)	22	7.3
谷氨酰胺 Glutamine (Gln, Q)	14	4.7	苏氨酸 Threonine (Thr, T)	20	6.6
谷氨酸 Glutamicacid (Glu, E)	21	7.0	色氨酸 Tryptophan (Trp, W)	7	2.3
甘氨酸 Glycine (Gly, G)	16	5.3	酪氨酸 Tyrosine (Tyr, Y)	9	3.0
组氨酸 Histidine (His, H)	7	2.3	缬氨酸 Valine (Val, V)	15	5.0
异亮氨酸 Isoleucine (Ile, I)	16	5.3	吡咯酮氨酸 Pyrrolysine (Pyl, O)	0	0.0
亮氨酸 Leucine (Leu, L)	27	9.0	硒代胱氨酸 Selenocysteine (Sec, U)	0	0.0

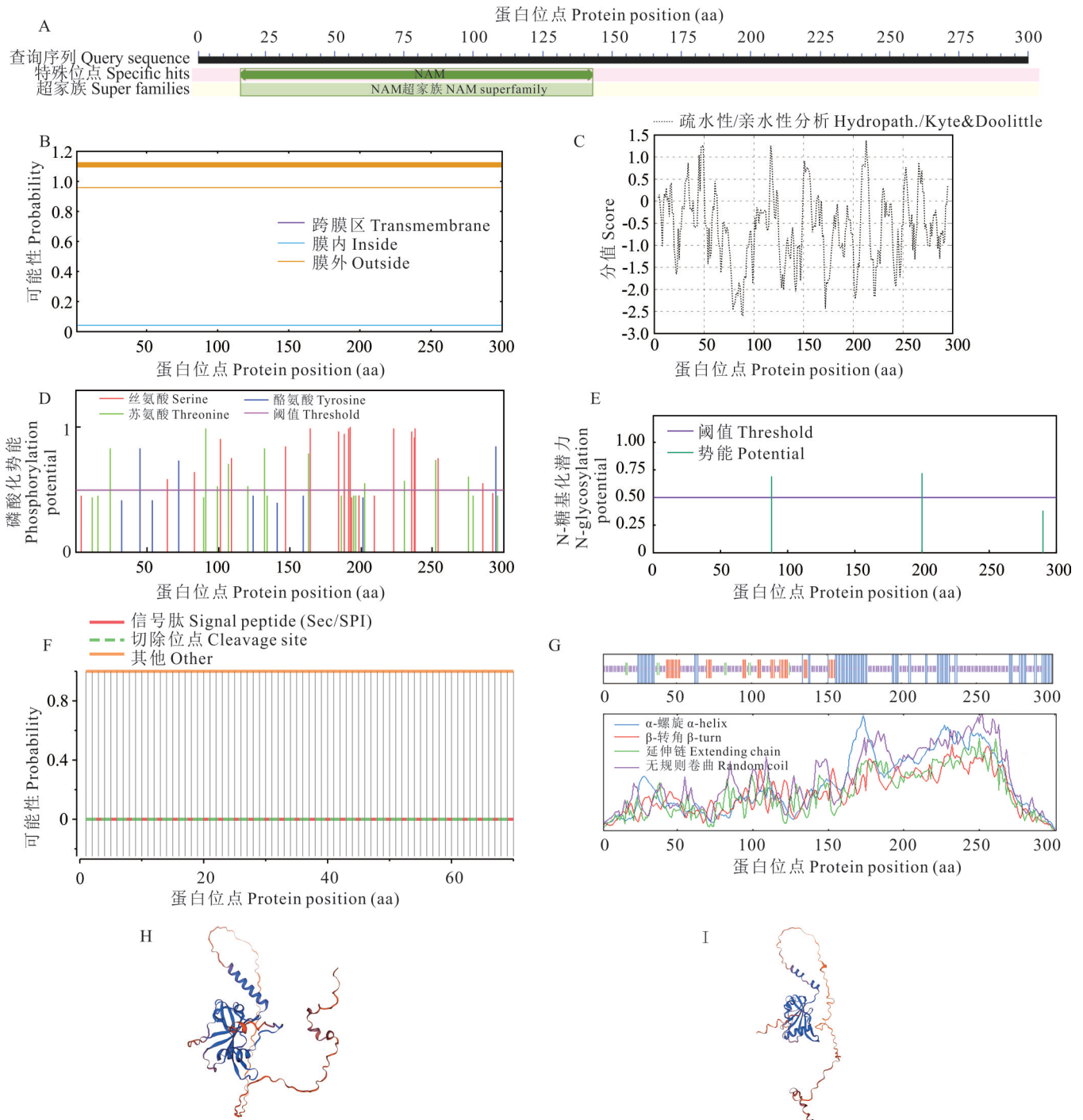


图3 紫花苜蓿 MsNAC053 蛋白结构分析

Fig. 3 Structural analysis of MsNAC053 protein in alfalfa

A: 保守结构域预测 Conserved domain prediction; B: 跨膜结构预测 Transmembrane structure prediction; C: 亲疏水性分析 Hydrophilic analysis; D: 磷酸化位点预测 Phosphorylation site prediction; E: N-糖基化位点预测 N-glycosylation sites prediction; F: 信号肽预测 Signal peptide prediction; G: 二级结构预测 Secondary structure prediction; H: 紫花苜蓿 MsNAC053 蛋白三级结构预测 Tertiary structure prediction of MsNAC053 protein in alfalfa; I: 大豆 GmNAC6 蛋白三级结构预测 Tertiary structure prediction of GmNAC6 protein in soybean.

2.3 NAC053 系统进化分析

利用 MEGA 6.0 与 Evolveview 将 MsNAC053 蛋白与在 NCBI-blast 上比对到的其他物种 NAC 蛋白序列构建系统进化树(图 4),其中包括蒺藜苜蓿 MtNAC6(XP_003607287.1),长柔毛野豌豆 VvNAC6(XP_058735158.1),豌豆 PsNAC6(XP_050898103.1),鹰嘴豆 CaNAC6(ACS94039.1),红车轴草 TpNAC6(XP_045825358.1),白车轴

草 TrNAC6(WJX44999.1), 百脉根 LjNAC6(XP_057456729.1), 相思子 ApNAC22(XP_027361228.1), 毒羊豆 GbNAC6(XP_061362427.1), 野大豆 GsNAC22(XP_028186389.1), 大豆 GmNAC6(NP_001236900.2), 密花豆 SsNAC94(TKY67790.1), 刺毛黧豆 MpNAC35(RDX62130.1), 木豆 CcNAC22(XP_020214708.1), 绿豆 VrNAC35(XP_014493331.1), 赤豆 VaNAC6(XP_017432427.1), 豇豆 VuNAC22(XP_027909063.1), 蔓花生 AiNAC32(XP_016187883.1), 结果表明, 紫花苜蓿 MsNAC053 与蒺藜苜蓿 MtNAC6 的同源性最高, 其次为长柔毛野豌豆 VvNAC6 和豌豆 PsNAC6。将紫花苜蓿 MsNAC053 的氨基酸序列与其他几种双子叶植物的 NAC 氨基酸序列进行同源比对, 发现不同物种 NAC 氨基酸序列在 N 端都拥有 5 个保守的亚结构域, 即 NAM 结构域(图 5), 说明紫花苜蓿 MsNAC053 蛋白属于 NAC 转录因子家族, 并且与豆科植物 NAC 蛋白序列同源性更高, 亲缘关系更近。

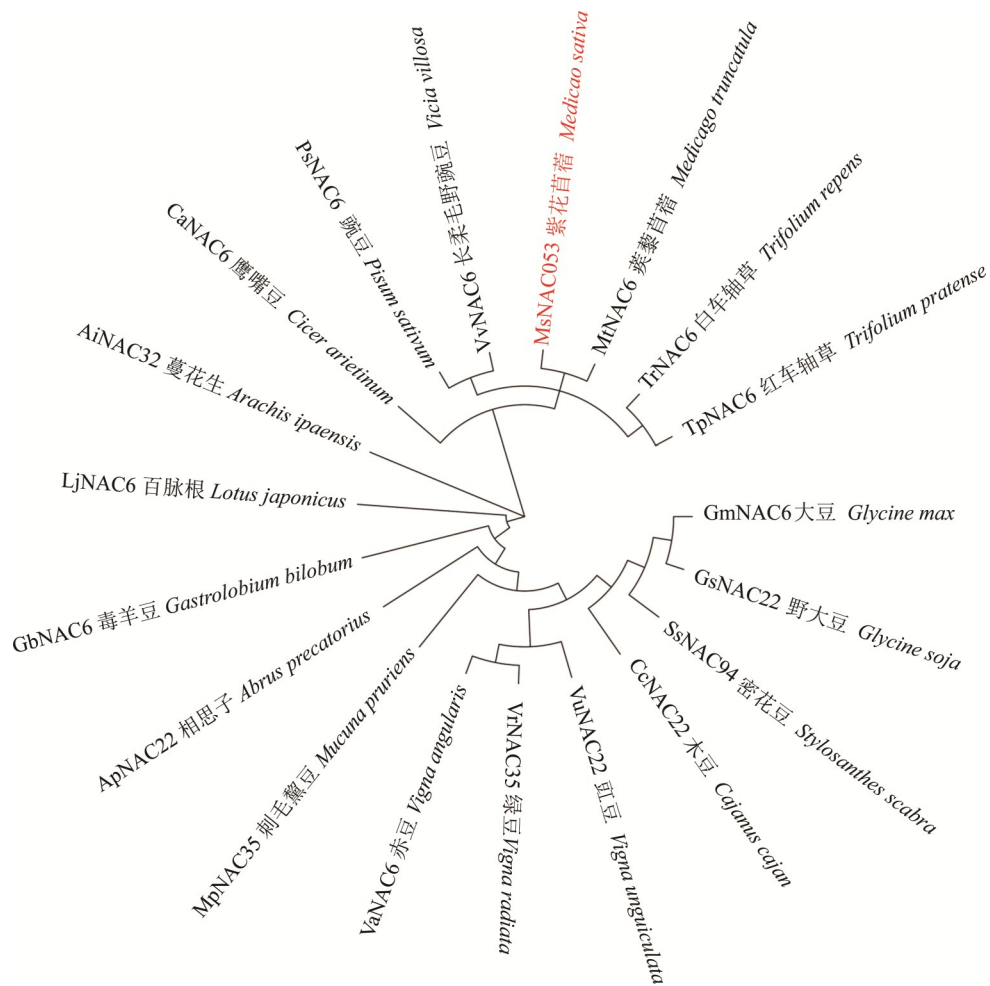


图 4 紫花苜蓿 MsNAC053 蛋白系统发育分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of MsNAC053 protein in alfalfa

2.4 MsNAC053 启动子顺式作用元件及基因结构分析

利用 PlantCARE 及 TBtools 对 MsNAC053 进行启动子区域顺式作用元件预测及基因结构分析, MsNAC053 启动子区域含有大量的顺式作用元件(图 6), 如 CAAT-box、ARE、LTR、ABRE 和 GT1-motif 等, 其中 LTR 元件与低温响应有关, GT1-motif 是光响应元件, CGTCA-motif 是茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)响应元件, ABRE 则与脱落酸响应相关, 表明 MsNAC053 可能在植物响应逆境胁迫过程中发挥重要作用。MsNAC053 基因共含有 3 个外显子及 2 个内含子, 全长 2650 bp, 编码区全长 903 bp(图 7)。

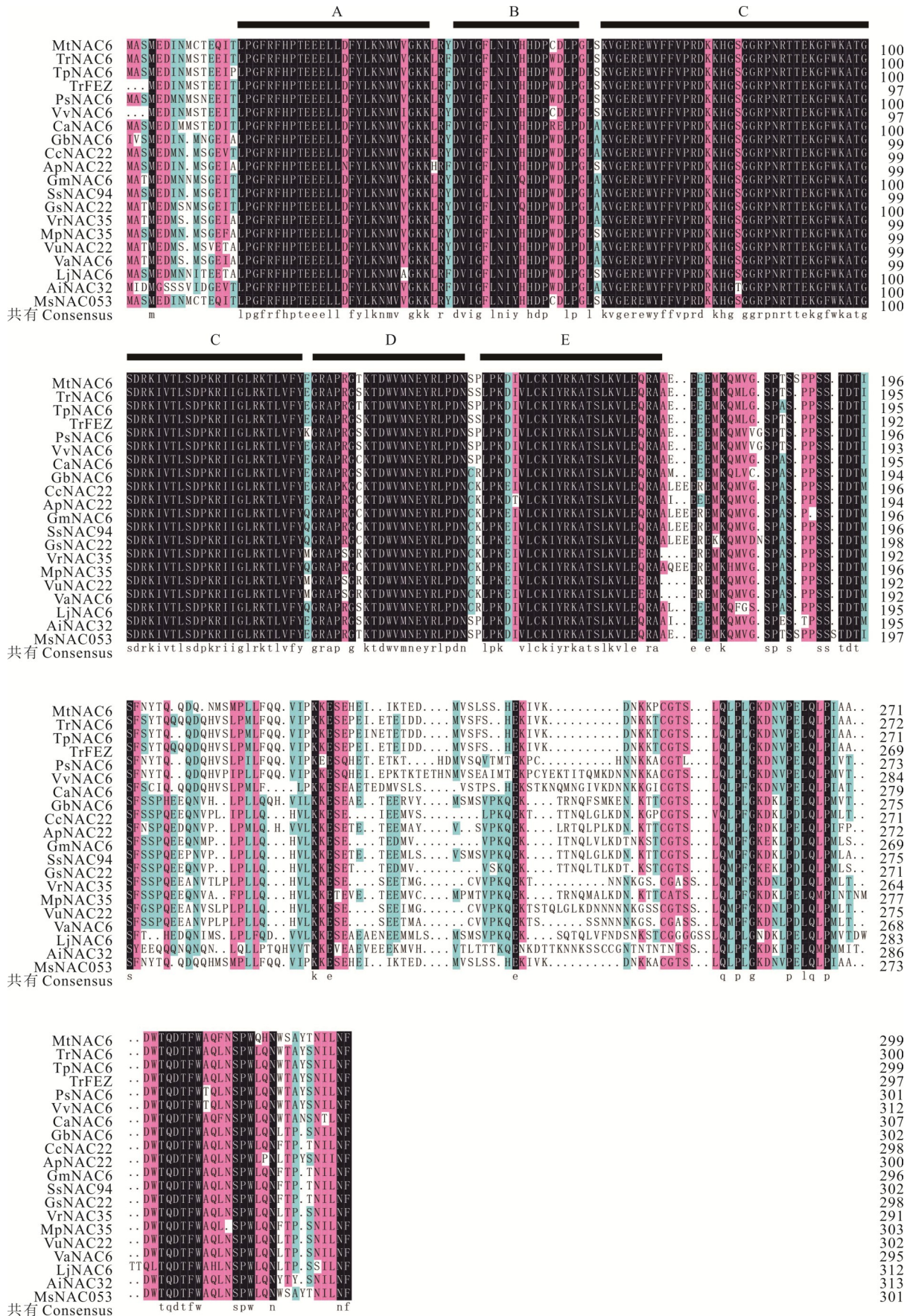


图5 紫花苜蓿 MsNAC053 与其他豆科植物 NAC 氨基酸序列比对分析

Fig. 5 Analysis of amino acid sequence alignment of MsNAC053 with NAC proteins from other leguminous plants

A~E 分别代表 5 个保守 NAM 亚结构域。A-E represent the 5 conserved NAM subdomains.

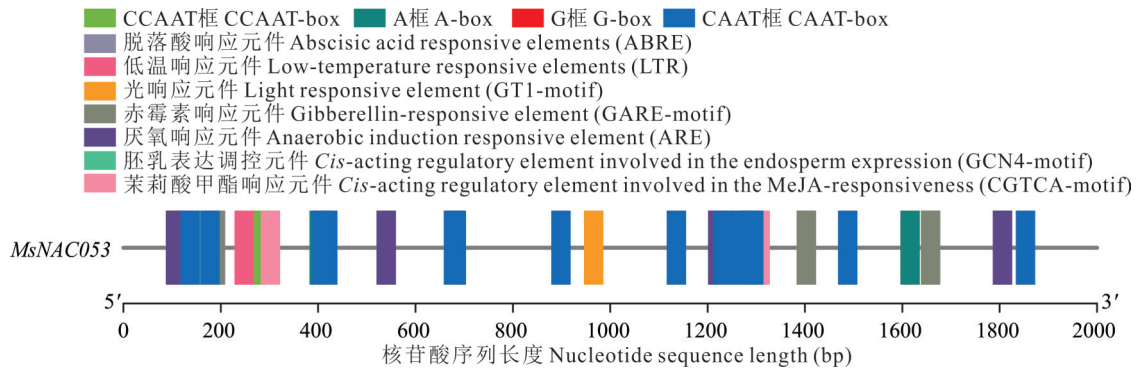


图 6 紫花苜蓿 *MsNAC053* 启动子顺式作用元件分析

Fig. 6 *Cis*-acting elements analysis of *MsNAC053* promoter region in alfalfa

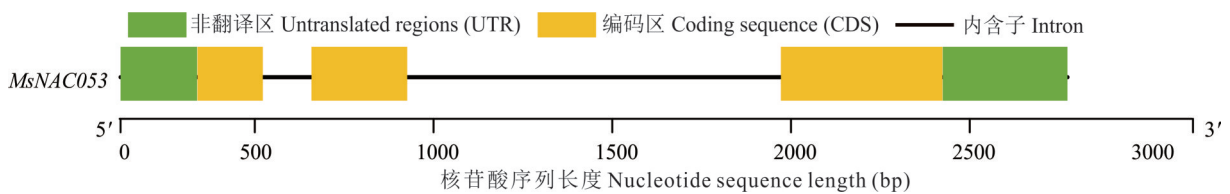


图 7 紫花苜蓿 *MsNAC053* 基因结构分析

Fig. 7 Gene structure analysis of *MsNAC053* in alfalfa

2.5 紫花苜蓿 *MsNAC053* 亚细胞定位分析

利用 Cell-Ploc 2.0 对 *MsNAC053* 编码的蛋白质进行亚细胞定位预测分析,结果显示其可能定位于细胞核中。为进一步确认 *MsNAC053* 在细胞中的定位情况,构建 35S::*MsNAC053*-GFP 表达载体,将其注射至一月龄烟草叶片中暗培养 48 h 后,利用共聚焦显微镜进行观察,发现 35S::*MsNAC053*-GFP 表达载体荧光信号分布在细胞核中(图 8),35S::*GFP* 载体荧光信号散布在整个细胞中,说明 *MsNAC053* 蛋白在细胞核中表达,可能在细胞核中发挥相应功能,与 Cell-Ploc 2.0 预测结果一致。

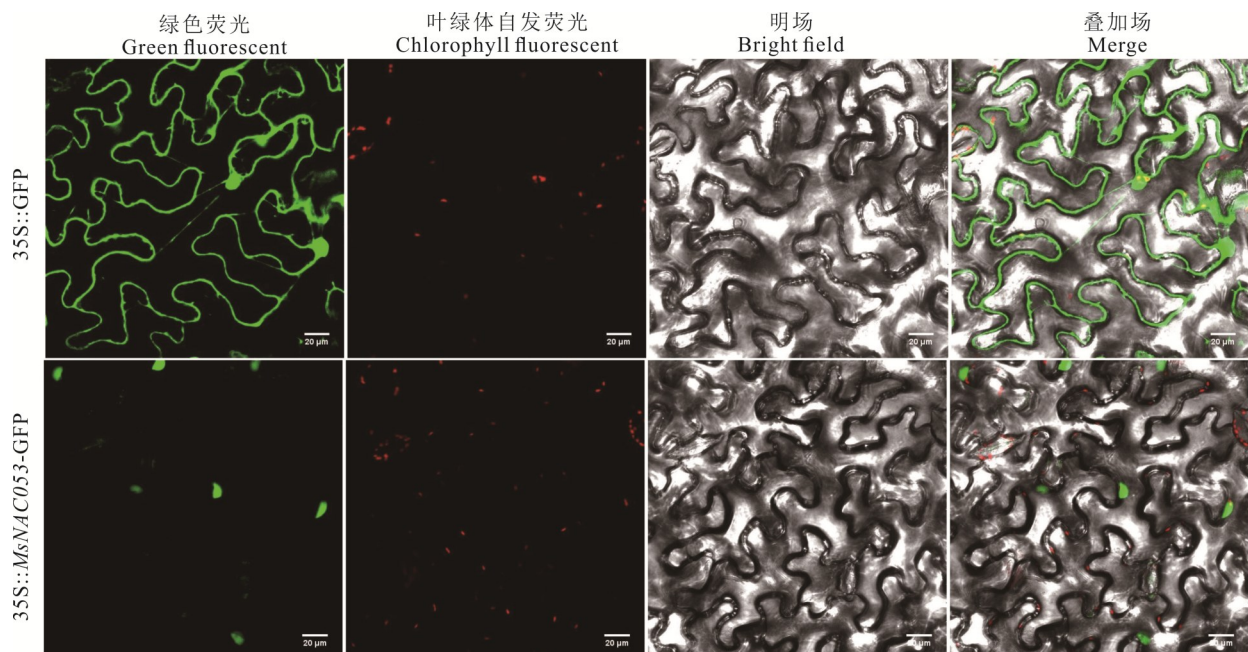


图 8 *MsNAC053* 蛋白亚细胞定位分析

Fig. 8 Subcellular localization analysis of *MsNAC053* protein

2.6 *MsNAC053* 基因表达模式分析

利用 PEG-6000、NaCl 及 ABA 分别对紫花苜蓿幼苗进行处理,结果显示 PEG-6000 模拟干旱胁迫下,*MsNAC053* 基因相对表达量随处理时间的延长呈升高的趋势,在 4 h 时达到峰值,为 0 h 的 18.86 倍(图 9);在 NaCl 模拟盐胁迫下,随着胁迫处理时间的延长,*MsNAC053* 基因表达量呈先上升后下降再上升的趋势,在 12 h 表达量达到峰值,为 0 h 的 68.85 倍;在脱落酸(ABA)处理下,*MsNAC053* 基因表达趋势与盐胁迫类似,随着处理时间的延长,*MsNAC053* 基因表达量呈先上升后下降再上升的趋势,在 12 h 时 *MsNAC053* 基因表达量最高,为 0 h 的 24.81 倍。以上结果表明,*MsNAC053* 基因参与紫花苜蓿响应干旱、盐胁迫及脱落酸(ABA)处理,表明 *MsNAC053* 基因可能在调控紫花苜蓿响应干旱、盐等非生物胁迫中发挥重要作用。另外,组织特异性表达模式分析结果表明 *MsNAC053* 基因在紫花苜蓿幼叶中表达量最高,其次为顶芽和老叶,在子叶中表达量最低。

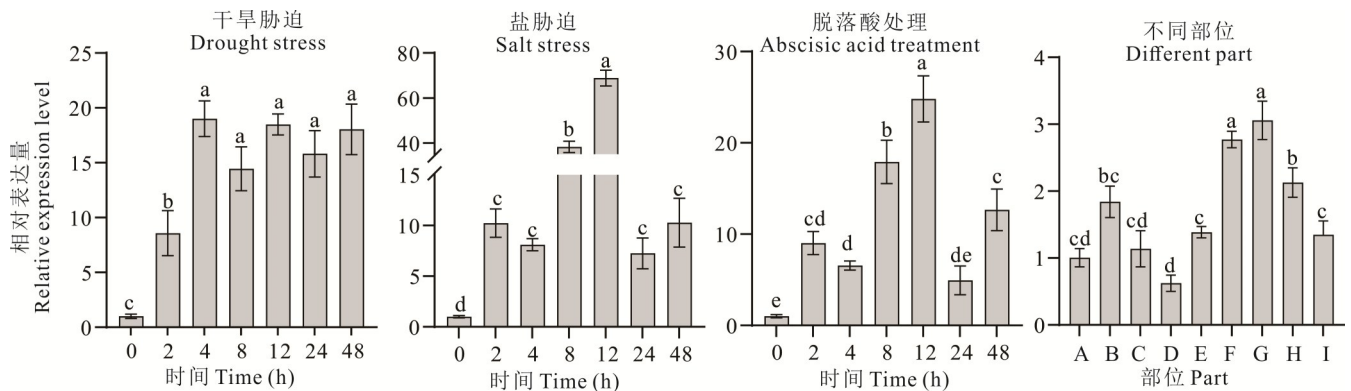


图9 紫花苜蓿 *MsNAC053* 基因组织特异性及不同处理响应模式分析

Fig. 9 Analysis of tissue specificity of *MsNAC053* gene in alfalfa and different treatment response patterns

A: 幼茎 Young stem; B: 老茎 Old stem; C: 根 Root; D: 子叶 Cotyledon; E: 真叶 True leaf; F: 顶芽 Terminal bud; G: 幼叶 Young leaf; H: 老叶 Old leaf; I: 花 Flower. 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$) Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

3 讨论

NAC 作为陆生植物特有的转录因子,在调控植物生长发育、激素信号转导及胁迫响应中发挥重要作用。目前,已在大量植物中鉴定到 NAC 基因,如紫花苜蓿^[16]、拟南芥^[11]、小麦 (*Triticum aestivum*)^[17]、辣椒 (*Capsicum annuum*)^[18] 等。前期在紫花苜蓿基因组中分析 NAC 转录因子家族,挖掘到对干旱、盐胁迫响应较强的 *MsNAC053* 等候选转录因子基因,因其在紫花苜蓿染色体上排在第 53 顺位,因此将其命名为 *MsNAC053*^[16]。但在序列相似性比对过程中,发现它与大豆、蒺藜苜蓿等的 NAC6 相似性较高,这可能与基因在不同植物中的命名方式不同相关。

3.1 *MsNAC053* 的生物信息学鉴定

本研究从紫花苜蓿中克隆出 *MsNAC053* 基因,其编码序列全长 903 bp,共编码 300 个氨基酸,与蒺藜苜蓿、长柔毛野豌豆等豆科植物的 NAC6 序列相似性较高,都拥有 NAM 结构域,因此,推测 *MsNAC053* 基因属于 NAC 基因家族,发挥 NAC 基因的生物学功能^[19]。本研究发现, *MsNAC053* 基因由 3 个外显子及 2 个内含子构成, Li 等^[20] 在向日葵 (*Helianthus annuus*) 中也发现了大多数 *HaNACs* 基因拥有 3 个外显子及 2 个内含子,说明 NAC 基因在不同物种中相对保守。同时, *MsNAC053* 启动子区域存在低温响应元件 LTR、脱落酸响应元件 ABRE 及赤霉素 (gibberellins, GA) 响应元件 GARE-motif 等激素及胁迫响应元件,暗示 *MsNAC053* 可能参与低温胁迫及这些激素的调控过程,利用 qRT-PCR 验证发现,紫花苜蓿 *MsNAC053* 响应脱落酸 (ABA) 处理,表达量显著高于对照。赤霉素及脱落酸 (ABA) 能够调控植物生长发育与胁迫响应, Zhou 等^[21] 发现紫花苜蓿 *MsNAC51* 基因启动子区域含有 ABRE、GA 元件,说明紫花苜蓿 *MsNAC51* 基因可能响应 ABA、GA 调控过程,干旱胁迫下 *MsNAC51* 基因相对表达量随处理时间上调,本研究结果与此一致,水稻 *OsNAC3* 基因启动子区域也含有 ABRE 元件,本研究结果与

*OsNAC3*基因在ABA处理下表达模式一致^[9]。因此,推测*MsNAC053*基因也可能通过ABA信号转导途径在紫花苜蓿响应干旱及盐胁迫过程中发挥作用。现已鉴定到大豆*GmNA-C6*^[10]、棉花(*Gossypium* spp.)*GhirNAC2*^[22]蛋白定位于细胞核中,本研究结果与此一致,表明*MsNAC053*蛋白主要在细胞核中发挥相应功能。

3.2 *MsNAC053*基因响应干旱、盐等非生物胁迫

干旱、盐碱是限制我国草业发展的主要因素,紫花苜蓿作为我国最重要的豆科牧草之一,挖掘抗旱相关基因,并利用分子生物学手段选育抗旱耐盐的紫花苜蓿新品种对于促进草牧业发展具有重要作用。据报道,*NAC*基因对不同非生物胁迫有响应。本研究对紫花苜蓿进行干旱及盐胁迫处理,发现*MsNAC053*基因表达量随胁迫时间延长总体呈上升趋势,与甘蓝*BoNAC019*^[13]在盐胁迫下的表达模式相似。另外,工业大麻(*Cannabis sativa*)*CsNAC062*^[23]在干旱胁迫下相对表达量显著上调,本研究结果与此一致。在脱落酸(ABA)处理下,拟南芥*ANAC103*基因^[24]和油茶(*Camellia sinensis*)*CsNAC9*基因^[25]相对表达量随处理时间的延长而升高,与*MsNAC053*基因在脱落酸(ABA)处理下表达模式一致。黄花菜(*Heimerocallis citrina*)*HcNAC35*基因受干旱、盐胁迫调控,过表达*HcNAC35*转基因西瓜(*Citrullus lanatus*)耐盐性明显优于野生型西瓜^[26]。酵母杂交试验发现卷丹(*Lilium lancifolium*)*LlNAC2*基因与*LIDREB1*及*LIZFHD4*存在相互作用并对脱落酸(ABA)敏感,转基因拟南芥对寒冷、干旱、盐胁迫耐受性增强^[27]。水稻*OsNAC15*与*OsNCED1*、*OsNCED2*和*OsNCED5*的启动子相互作用,促进水稻九顺式环氧类胡萝卜素双加氧酶(9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, *NCED*)合成从而催化脱落酸(ABA)合成,增强水稻的抗旱性及耐盐性^[28]。同时脱落酸(ABA)处理下*MsNAC053*基因表达模式与盐胁迫处理下的表达模式相似,推测紫花苜蓿*MsNAC053*可能结合下游脱落酸(ABA)合成关键基因的启动子,催化合成脱落酸(ABA),调控紫花苜蓿抗旱性及耐盐性。*MsNAC053*基因具有组织特异性,该基因在紫花苜蓿幼叶中表达量最高,其次为顶芽和老叶,在子叶中表达量最低,该结果与黄花苜蓿(*Medicago falcata*)*MfNAC63*^[29]、山荆子(*Malus baccata*)*MbNAC25*^[6]的组织特异性表达情况基本一致,均在幼叶中表达量最高,在茎中表达量相对较低,说明紫花苜蓿*MsNAC053*基因可能在紫花苜蓿不同部位发挥不同的调控作用。本研究为后续深入研究*MsNAC053*基因功能提供了理论依据,为紫花苜蓿抗逆新种质创制奠定了基础。

4 结论

本研究克隆了紫花苜蓿*MsNAC053*基因,共编码300个氨基酸,是不稳定亲水碱性蛋白,含NAM保守结构域,不具备跨膜结构,属*NAC*基因家族。蛋白亚细胞定位于细胞核,具有响应脱落酸和茉莉酸甲酯等的顺式作用元件ABRE、CGTCA-motif。*MsNAC053*在幼叶中表达量最高,在子叶中表达量最低。*MsNAC053*基因与蒺藜苜蓿*MtNAC6*亲缘关系最近。*MsNAC053*基因对紫花苜蓿应对干旱、盐胁迫和脱落酸处理均有响应,表明*MsNAC053*基因可能是紫花苜蓿抗逆育种的关键候选基因。

参考文献 References:

- [1] Wang S P, Liu J, Hong J, et al. Cloning and function analysis of *MsPPR1* in alfalfa under drought stress. *Acta Prataculturae Sinica*, 2023, 32(7): 49–60.
王少鹏, 刘佳, 洪军, 等. 紫花苜蓿*MsPPR1*基因的克隆及抗旱功能分析. *草业学报*, 2023, 32(7): 49–60.
- [2] Wang Y, Wang J, Li S X. Cloning of *MsBBX24* from alfalfa (*Medicago sativa*) and determination of its role in salt tolerance. *Acta Prataculturae Sinica*, 2023, 32(3): 107–117.
王园, 王晶, 李淑霞. 紫花苜蓿*MsBBX24*基因的克隆及耐盐性分析. *草业学报*, 2023, 32(3): 107–117.
- [3] Liu G S, Li H L, Grierson D, et al. NAC transcription factor family regulation of fruit ripening and quality: a review. *Cells*, 2022, 11(3): 525.
- [4] Ren Y, Huang Z Q, Jiang H, et al. A heat stress responsive NAC transcription factor heterodimer plays key roles in rice grain filling. *Journal of Experimental Botany*, 2021, 72(8): 2947–2964.
- [5] Martin-Pizarro C, Vallarino J G, Osorio S, et al. The NAC transcription factor FaRIF controls fruit ripening in strawberry. *The Plant Cell*, 2021, 33(5): 1574–1593.
- [6] Han D, Du M, Zhou Z, et al. Overexpression of a *Malus baccata* NAC transcription factor gene *MbNAC25* increases cold and

- salinity tolerance in *Arabidopsis*. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(4): 1198.
- [7] Qian Y X, Xi Y, Xia L X, *et al.* Membrane-bound transcription factor ZmNAC074 positively regulates abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(22): 16157.
- [8] Zhang M J, Hou X T, Yang H, *et al.* The NAC gene family in the halophyte *Limonium bicolor*: identification, expression analysis, and regulation of abiotic stress tolerance. Plant Physiology and Biochemistry, 2024, 208: 108462.
- [9] Ling L, Song L L, Wang Y J, *et al.* Genome-wide analysis and expression patterns of the NAC transcription factor family in *Medicago truncatula*. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2017, 23(2): 343–356.
- [10] Li M, Chen R, Jiang Q Y, *et al.* *GmNAC06*, a NAC domain transcription factor enhances salt stress tolerance in soybean. Plant Molecular Biology, 2021, 105(3): 333–345.
- [11] Li T T, Fang K, Tie Y, *et al.* NAC transcription factor ATAF1 negatively modulates the PIF-regulated hypocotyl elongation under a short-day photoperiod. Plant, Cell & Environment, 2024, 47(8): 3253–3265.
- [12] Shen J B, Lv B, Luo L Q, *et al.* The NAC-type transcription factor OsNAC2 regulates ABA-dependent genes and abiotic stress tolerance in rice. Scientific Reports, 2017, 7(1): 40641.
- [13] Wang J F, Lian W R, Cao Y Y, *et al.* Overexpression of *BoNAC019*, a NAC transcription factor from *Brassica oleracea*, negatively regulates the dehydration response and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*. Scientific Reports, 2018, 8(1): 13349.
- [14] Zhang G Y, Huang S Q, Zhang C, *et al.* Overexpression of *CcNAC1* gene promotes early flowering and enhances drought tolerance of jute (*Corchorus capsularis* L.). Protoplasma, 2020, 258(2): 337–345.
- [15] Li S Y. Study on genetic transformation of *MsNAC47* gene to alfalfa. Harbin: Harbin Normal University, 2023.
李思宇. *MsNAC47*基因对紫花苜蓿的遗传转化研究. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学, 2023.
- [16] Zou W P, Zhai J X, Li D N, *et al.* Identification of alfalfa NAC gene family and analysis of their expression patterns under abiotic stress. Acta Agrestia Sinica, 2024, 32(8): 2440–2458.
邹苇鹏, 翟佳兴, 李迪娜, 等. 紫花苜蓿 NAC 基因家族鉴定及在非生物胁迫下的表达模式分析. 草地学报, 2024, 32(8): 2440–2458.
- [17] Guerin C, Roche J, Allard V, *et al.* Genome-wide analysis, expansion and expression of the NAC family under drought and heat stresses in bread wheat (*T. aestivum* L.). PLoS One, 2019, 14(3): e0213390.
- [18] Diao W P, Snyder J, Wang S B, *et al.* Genome-wide analyses of the NAC transcription factor gene family in pepper (*Capsicum annuum* L.): chromosome location, phylogeny, structure, expression patterns, *cis*-elements in the promoter, and interaction network. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(4): 1028.
- [19] Satheesh V, Jagannadham P T K, Chidambaranathan P, *et al.* NAC transcription factor genes: genome-wide identification, phylogenetic, motif and *cis*-regulatory element analysis in pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(12): 7763–7773.
- [20] Li W H, Zeng Y L, Yin F L, *et al.* Genome-wide identification and comprehensive analysis of the NAC transcription factor family in sunflower during salt and drought stress. Scientific Reports, 2021, 11(1): 19865.
- [21] Zhou L, Shi K, Cui X R, *et al.* Overexpression of *MsNAC51* from alfalfa confers drought tolerance in tobacco. Environmental and Experimental Botany, 2023, 205: 105143.
- [22] Shang X G, Yu Y J, Zhu L J, *et al.* A cotton NAC transcription factor GhirNAC2 plays positive roles in drought tolerance via regulating ABA biosynthesis. Plant Science, 2020, 296: 110498.
- [23] Yang Y L, Zhang H X, Wang S S, *et al.* Cloning, bioinformatics analysis of transcription factor NAC62 in industrial hemp (*Cannabis sativa*) and its response analysis to drought stress. Journal of Agricultural Biotechnology, 2024, 32(1): 107–114.
杨宇蕾, 张涵雪, 王珊珊, 等. 转录因子 NAC62 在工业大麻中的克隆、生信分析及其干旱胁迫响应分析. 农业生物技术学报, 2024, 32(1): 107–114.
- [24] Sun L, Liu L P, Wang Y Z, *et al.* *NAC103*, a NAC family transcription factor, regulates ABA response during seed germination and seedling growth in *Arabidopsis*. Planta, 2020, 252(6): 95.
- [25] Kong J Y, Yang N, Luo W, *et al.* Identification of NAC transcription factor genes *CsNAC79* and *CsNAC9* in tea plant and their response to different abiotic stresses. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2024, 44(4): 572–581.
孔洁珂, 杨妮, 罗微, 等. 茶树 NAC 转录因子基因 *CsNAC79* 和 *CsNAC9* 鉴定及其对非生物胁迫的响应. 西北植物学报, 2024, 44(4): 572–581.
- [26] Cao L H, Wang J Y, Ren S J, *et al.* Genome-wide identification of the NAC family in *Hemerocallis citrina* and functional

- analysis of *HcNAC35* in response to abiotic stress in watermelon. *Frontiers in Plant Science*, 2024, 15: 1474589.
- [27] Yong Y B, Zhang Y, Lyu Y M. A stress-responsive NAC transcription factor from tiger lily (*LlNAC2*) interacts with *LlDREB1* and *LlZHFD4* and enhances various abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(13): 3225.
- [28] Ao C W, Xiang G J, Wu Y F, *et al.* *OsNAC15* regulates drought and salt tolerance in rice. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2024, 30(11): 1909–1919.
- [29] Xu Z. Cloning and characteristic analysis of *MfNAC63* gene in *Medicago falcata*. Hohhot: Inner Mongolia University, 2019.
徐哲. 黄花苜蓿 *MfNAC63* 基因的克隆及特性分析. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2019.