

小麦耐盐相关 NAC 转录因子的生物信息与表达分析

王伟伟, 罗政辉, 邹景伟, 张玉杰, 钮力亚, 王志, 王奉芝, 赵振杰, 于亮

(沧州市农林科学院/河北省旱碱麦重点实验室, 河北沧州 061001)

摘要: NAC 转录因子对植物逆境胁迫具有重要作用。为了解小麦耐盐相关 NAC 转录因子的生物学信息, 对耐盐品种沧麦 6005 和盐敏感品种科农 9204 进行转录组测序, 筛选耐盐相关 NAC 转录因子, 并对其进行生物信息学分析; 对供试材料进行盐胁迫处理, 提取根部分生组织 RNA, 反转录为 cDNA, 对重点候选基因进行 qRT-PCR 分析。结果表明, 共筛选出 28 个耐盐相关 NAC 转录因子, 其中 10 个的等电点呈碱性, 其余等电点呈酸性, 且均为亲水性蛋白; 亚细胞定位主要定位在细胞核; 蛋白质二级结构以无规则卷曲和 α -螺旋为主。经共线性分析, 小麦和水稻的 NAC 转录因子含有多对共线性关系, 表明小麦与水稻亲缘关系较近。NAC 转录因子启动子区域含有多与激素响应和逆境胁迫诱导相关顺式作用元件, 其中 *TaNAC24* 含有顺式调控元件结合位点最多, 共有 51 个。盐胁迫处理后, 9 个重要基因中, 4 个基因表达量显著上调, 5 个基因表达量显著下调, 与转录组测序结果一致, 这些基因可能介导了小麦的抗盐性。

关键词: 小麦; 盐胁迫; NAC; 转录因子; 生物信息学分析

中图分类号: S512.1; S330

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2025)03-0287-13

Bioinformatics and Expression Analysis of Salt Tolerance Related NAC Transcription Factors in Wheat

WANG Weiwei, LUO Zhenghui, ZOU Jingwei, ZHANG Yujie, NIU Liya,

WANG Zhi, WANG Fengzhi, ZHAO Zhenjie, YU Liang

(Cangzhou Academy of Agricultural and Forestry Sciences/Hebei Key Laboratory of Dryland Wheat, Cangzhou, Hebei 061001, China)

Abstract: NAC transcription factors play an important role in plant response to stress. In order to further understand the biological functions of salt-tolerant NAC transcription factors in wheat, the transcriptome of salt-tolerant material Cangmai 6005 and salt-sensitive material Kenong 9204 were sequenced. NAC transcription factors related to salt tolerance were screened and bioinformatics analyzed. RT-PCR was used to identify the key candidate genes by reverse transcription of cDNA and RNA extracted from the roots under salt stress. The results showed that among the 28 NAC transcription factors, 10 had alkaline isoelectric points and the others had acidic isoelectric points, and all of them were hydrophilic proteins. The protein secondary structure is mainly irregular curl and α -helix. In the collinearity analysis, there were many pairs of collinearity in wheat and rice, indicating that the close relationship between wheat and rice. The promoter region of NAC transcription factor contains many cis-regulatory elements related to hormone response and stress induction, among which *TaNAC24* has the most (51) cis-regulatory element binding sites. The results of RT-qPCR showed that the expression levels of four genes were significantly up-regulated and five genes were significantly down-regulated after salt stress treatment, which was consistent with the results of transcriptome

收稿日期: 2024-03-19

修回日期: 2024-04-17

基金项目: 河北省自然科学基金专项 (C2023205050); 河北省耐盐碱作物种业科技创新团队项目 (23327501D)

第一作者 E-mail: wangww1002@163.com (王伟伟)

通讯作者 E-mail: yuliang168168@126.com (于亮)

sequencing. These genes may mediate the response of wheat to salt stress.

Keywords: Wheat; Salt Stress; NAC; Transcription factors; Bioinformatics analysis

小麦(*Triticum aestivum* L.)是人类蛋白质和碳水化合物的重要来源^[1]。作物产量受多种生物和非生物因素的影响^[2];盐胁迫是重要非生物限制因素之一^[3]。目前,中国超过 20%的耕地受盐渍化影响,严重威胁国家粮食安全^[4-5]。培育耐盐品种是利用与控制土壤盐渍化发生最经济有效的方法。

NAC(NAM、ATAF1/2 和 CUC2)蛋白家族是最大的植物特异性转录因子家族之一,N 端的保守结构域由 150 个氨基酸构成,C 端有一个变异的转录调控区域^[6],其成员在植物生长、发育和逆境胁迫反应中发挥着重要作用^[7]。NAC 转录因子首次在矮牵牛(*Petunia hybrid* Vilm.)^[8]中被发现,目前已在甜菜(*Beta vulgaris* L.)^[9]、玉米(*Zea mays* L.)^[10]、白菜(*Brassica rapa*)^[11]等 17 种植物中被鉴定与分析。Mao 等^[12]研究认为,过表达*TaNAC071-A* 基因的小麦通过提高水分利用效率和增加其他抗逆基因的表达量显著增强抗旱性,而敲除*TaNAC071-A* 基因的小麦抗旱性显著降低。Guo 等^[13]研究发现,*TaNAC2L* 基因可以通过调节逆境应答基因的表达改善小麦植株的耐热性。Zhang 等^[14]报道*TaNAC069* 基因对小麦抗叶锈病具有正调控作用。但 NAC 转录因子与小麦耐盐性的关系少见报道。

利用转录组学信息挖掘作物抗性基因的方法已被广泛应用^[15]。Jiang 等^[16]通过转录组测序,鉴定到 445 个转录因子与花生抗寒性显著相关。Amirbakhtiar 等^[17]对伊朗耐盐小麦品种 Arg 的叶片进行了研究,共筛选到 4 290 个差异表达基因。Zhu 等^[18]以不同铅浓度处理下的金丝草为试验材料,通过转录组测序技术,筛选出 17 个铅胁迫抗性基因。目前,关于 NAC 家族成员对盐胁迫下的效应及机制研究相对较少。

本研究拟基于转录组测序技术筛选小麦抗盐胁迫相关的 NAC 转录因子,并对其进行生物信息、理化性质、共线性和启动子元件分析等,并对盐胁迫下重点候选基因的表达进行 RT-PCR 分析,以揭示小麦耐盐机制,为耐盐品种的选育提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为小麦耐盐品种沧麦 6005 和盐敏

感品种科农 9204,由沧州市农林科学院作物遗传育种研究所提供。

1.2 试验方法

1.2.1 小麦材料培养

选取 30 粒饱满、均匀、无病虫害小麦种子,消毒后置于发芽盒中,盐胁迫处理加入 200 mmol · L⁻¹NaCl 溶液 15 mL,对照加入 15 mL 蒸馏水,在培养箱中恒温 20 °C,12 h 黑暗、12 h 光照培养 10 d。3 次重复。

1.2.2 转录组测序

取 1.2.1 中培养 10 d 的小麦根组织 5 g,液氮研磨,用天根 RNAsimple 试剂盒按照说明书提取总 RNA,超低温冰箱保存备用。将部分总 RNA 送至联川生物公司进行转录组测序。

1.2.3 NAC 蛋白质理化性质分析

基于 1.2.2 中的测序结果,在 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)网站下载小麦盐胁迫相关 NAC 转录因子信息。通过在线软件 ExPASy-ProtParam tool(<https://web.expasy.org/prot-param/>)分析小麦盐胁迫相关 NAC 家族转录因子氨基酸残基数、分子质量、脂肪系数、等电点和蛋白质亲水性等理化性质。

1.2.4 亚细胞定位和蛋白质结构预测

利用在线工具 WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>)对 NAC 蛋白质亚细胞定位预测。利用 SOPMA(https://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.html)分析 NAC 转录因子的二级结构,通过 SWISS-MODEL (<https://www.swissmodel.expasy.org>)预测其蛋白质三级结构。

1.2.5 小麦 NAC 蛋白保守基序分析

通过在线数据库 MEME (<http://meme-suite.org/>)预测小麦 NAC 家族成员的保守基序,保守基序的数目选择 10,其它参数均采用默认值。

1.2.6 小麦 NAC 的基因结构和染色体定位分析

通过小麦基因组数据库 WheatOmics1.0 下载小麦 NAC 家族成员全长、CDS 序列及基因起始和终止物理位置;通过网站 GSDS2.0(

gsds.gao-lab.org/) 预测小麦 NAC 家族成员的基因结构; 通过在线网站 MG2C2.1 (http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.1/) 分析小麦 NAC 家族成员在染色体分布。

1.2.7 小麦 NAC 的系统发育及共线性分析

通过小麦基因组数据库 WheatOmics1.0 下载小麦 NAC 蛋白序列。利用 MEGA-X 软件进行 NAC 蛋白的多序列比对, 并采用邻接法(NJ) 构建系统发育进化树。其中, 校验参数 Bootstrap 设置为 1 000, 替换模型设置为 P-distance。利用 TBtools 软件中 MCSanX 对小麦与拟南芥和水稻之间的 NAC 基因进行共线性分析, 结果用 TBtools 软件可视化。

1.2.8 小麦 NAC 家族成员顺式元件分析

利用在线数据库 Phytozome 下载 NAC 基因

CDS 上游 2 000 bp 的 DNA 序列, 提交至 PlantCARE 数据库 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) 进行启动子顺式作用元件的预测, 利用 TBtools 做启动子元件可视化分析。

1.2.9 小麦 NAC 基因在盐胁迫下及不同组织部位的表达分析

在 WheatOmics 1.0 网站中下载小麦 NAC 基因在不同组织部位下的表达数据, 利用 TBtools 软件对基因表达量作可视化分析。用 primer 5 设计在多个组织中出现的 NAC 基因引物(表 1)。对 1.2.2 中提取的小麦根组织 RNA, 应用南京诺唯赞生物科技有限公司的 HiScript II IRT SuperMix 试剂盒合成 cDNA, 参照 Zhao 等^[34] 的方法进行 qRT-PCR。

表 1 NAC 基因荧光定量 PCR 引物

Table 1 Primers for fluorescent quantitative PCR of NAC genes

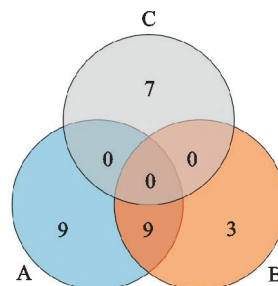
基因 Gene	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer
<i>TaNAC8</i>	GTTTGTGTTGATGCGTGCAAG	CTCTCACCTCCAATTCATCCC
<i>TaNAC9</i>	GTTTCAGTGTGTGTGTGAGCTTC	TGGGTGCAACTTGTAGATGTGCG
<i>TaNAC10</i>	GTGAGCTTCTCCCTCCTCTTC	CTGAAGAAGTACCACTCGCAGT
<i>TaNAC12</i>	GGATCGTCGTGTGTTGTTGTT	CTCTCACCTCCAATTCATCCC
<i>TaNAC13</i>	TGTGTGAGCTTCTCCCATCTTC	GGTCCCATGGATCGAACTTGTA
<i>TaNAC18</i>	GCTACCTACAGTCGATGAGCTC	TGGTTCCATCTCAGAATGGTGG
<i>TaNAC21</i>	TCTCCAAAAGTTCGAGCTCCTC	CAGGCTTGAAGAAGATCTGGT
<i>TaNAC22</i>	AGACGCTGCTCCATTTCTAACA	CTGCAGTACAATCCCTTTCCCT
<i>TaNAC24</i>	GTGAAGAACCAGAGAGCTTGGA	ACACAGCAAGCTAGCTAGATCC
<i>TaGAPDH</i>	TAAGGGTGGTGCCAAGAAGGT	AGCAAGAGGAGCAAGGCAGT

2 结果与分析

2.1 转录组测序结果分析

基于转录组测序结果, 在小麦中共筛选到 28 个与耐盐相关的 NAC 转录因子, 将其依次命名为 *TaNAC1* ~ *TaNAC28*。在沧麦 6005 中, 盐胁迫处理与对照间有 18 个差异表达基因; 在科农 9204 中, 盐胁迫处理与对照间有 12 个差异表达基因; 沧麦 6005 与科农 9204 对照间有 7 个差异表达基因(图 1)。与对照比较, *TraesCS2B02G118500*、*TraesCS2B02G119000*、*TraesCS3B02G371200*、*TraesCS4A02G131000* 和 *TraesCS5B02G142100* 共 5 个基因在沧麦 6005 和科农 9204 的盐胁迫处理后均下调表达; *TraesCS2B02G119100*、*TraesCS2D02G100900*、*TraesCS2D02G101400* 和 *TraesCS4D02G175700* 共 4

个基因均上调表达, 这 9 个基因作为重点候选基因进行后续研究。



A: 沧麦 6005 盐胁迫与对照比较; B: 科农 9204 盐胁迫与对照比较; C: 沧麦 6005 对照与科农 9204 对照比较。

A: Cangmai 6005 under salt stress compared with control; B: Kenong 9204 under salt stress treatment compared with control; C: Cangmai 6005 control compared with Kenong 9204 control.

图 1 差异表达基因的维恩图

Fig. 1 Venn diagram of differentially expressed genes

2.2 NAC 成员蛋白质理化性质分析

蛋白质理化性质分析结果(表 2)表明,28 个小麦 NAC 成员的氨基酸残基数为 254~695,分子质量为 27.54~77.06 kD,等电点为 4.84~9.48,其中 10 个 NAC 蛋白呈碱性,其余 18 个 NAC 蛋白

均呈酸性;28 个 NAC 的脂肪系数为 55.58~75.32,表明其热稳定性存在差异;28 个 NAC 蛋白亲水性均为负值,表明其均为亲水性蛋白。除 TaN-AC16 和 TaNAC28 蛋白外,其他 NAC 蛋白携带的正负电荷数相近,表明 28 个蛋白总体呈现电中性。

表 2 NAC 家族蛋白质理化性质

Table 2 Physicochemical properties of proteins of NAC family

蛋白 Protein	基因 ID Gene ID	氨基酸残基数 Amino acid residue number	分子量 Molecular weight/kD	等电点 Isoelectric point	负电荷残基数 Asp+Glu	正电荷残基数 Arg+Lys	脂肪系数 Aliphatic index	亲水指数 Gravy
TaNAC1	TraesCS1A02G261800	392	42.48	6.22	43	39	60.54	-0.538
TaNAC2	TraesCS1B02G272600	387	41.91	6.52	41	39	60.54	-0.510
TaNAC3	TraesCS1B02G274300	301	33.09	8.96	32	38	65.28	-0.545
TaNAC4	TraesCS2A02G101400	353	39.02	5.46	47	38	60.57	-0.532
TaNAC5	TraesCS2A02G101900	348	38.31	8.66	32	36	66.55	-0.504
TaNAC6	TraesCS2A02G102000	357	38.40	6.52	34	31	63.56	-0.418
TaNAC7	TraesCS2A02G338300	355	38.22	7.21	37	37	64.14	-0.412
TaNAC8	TraesCS2B02G118500	352	38.81	5.44	46	37	63.27	-0.494
TaNAC9	TraesCS2B02G119000	350	38.35	7.29	33	33	62.83	-0.505
TaNAC10	TraesCS2B02G119100	356	38.28	6.56	34	31	64.30	-0.383
TaNAC11	TraesCS2B02G627200	317	35.02	6.01	36	31	62.59	-0.582
TaNAC12	TraesCS2D02G100900	353	39.05	5.34	47	37	61.98	-0.524
TaNAC13	TraesCS2D02G101400	355	38.17	6.52	34	31	64.76	-0.385
TaNAC14	TraesCS2D02G324700	353	38.08	6.86	38	37	65.33	-0.397
TaNAC15	TraesCS3A02G245900	336	36.51	8.83	34	39	62.29	-0.660
TaNAC16	TraesCS3A02G269900	586	62.89	9.48	62	79	56.40	-0.657
TaNAC17	TraesCS3A02G375400	255	27.72	5.67	34	30	58.67	-0.647
TaNAC18	TraesCS3B02G371200	312	34.82	5.91	40	37	58.49	-0.601
TaNAC19	TraesCS3B02G407600	254	27.62	5.61	34	29	59.65	-0.617
TaNAC20	TraesCS3D02G367900	256	27.54	5.60	33	28	58.83	-0.572
TaNAC21	TraesCS4A02G131000	354	38.39	9.23	31	39	61.89	-0.500
TaNAC22	TraesCS4D02G175700	357	38.75	9.08	31	38	60.25	-0.527
TaNAC23	TraesCS5A02G049100	305	33.40	9.21	27	35	65.54	-0.355
TaNAC24	TraesCS5B02G142100	354	39.59	6.26	40	36	64.55	-0.696
TaNAC25	TraesCS5D02G059700	302	33.18	9.21	27	35	67.78	-0.363
TaNAC26	TraesCS5D02G420800	364	40.41	6.02	44	39	55.58	-0.659
TaNAC27	TraesCS6A02G208900	532	58.68	5.08	79	49	75.32	-0.536
TaNAC28	TraesCS7D02G295100	695	77.06	4.84	112	70	66.10	-0.682

2.3 NAC 亚细胞定位及蛋白结构分析

亚细胞定位预测结果(表 3)表明,NAC 转录因子主要定位在细胞核,细胞质、叶绿体、线粒体和氧化物酶体也有少量的定位,说明小麦在受到盐胁迫时,NAC 转录因子发挥作用的位置可能是细胞核。

NAC 蛋白的二级结构以无规则卷曲和 α 螺旋

为主,无规则卷曲所占比例为 42.29%~70.10%, α -螺旋所占比例为 15.36%~34.40%,延长链所占比例为 9.80%~21.13%, β -转角所占比例为 2.33%~8.63%(表 3)。蛋白三级结构预测结果(图 2)表明,NAC 蛋白的三维结构在数据库中与水稻同源性高达 85.38%。由此可以推测该家族基因可能行使相同或相似功能。

表 3 NAC 蛋白二级结构及亚细胞定位
Table 3 Predicted secondary structure and subcellular localization of NAC proteins

蛋白 Protein	α -螺旋 α -helix/%	延长链 Extended strand/%	β -转角 β -turn/%	无规则卷曲 Random coil/%	亚细胞定位 Subcellular localization
TaNAC1	17.35	10.97	6.63	65.05	细胞核 Nuclear
TaNAC2	16.28	11.63	5.94	66.15	细胞核 Nuclear
TaNAC3	13.62	13.95	2.33	70.10	细胞核 Nuclear
TaNAC4	27.48	13.03	4.25	55.24	细胞质 Cytoplasmic
TaNAC5	18.68	12.07	3.45	65.80	细胞核 Nuclear
TaNAC6	17.09	9.80	4.20	68.91	细胞核 Nuclear
TaNAC7	20.85	13.52	5.63	60.00	细胞核 Nuclear
TaNAC8	22.73	16.48	6.82	53.98	细胞质 Cytoplasmic
TaNAC9	21.43	11.14	3.43	64.00	细胞核 Nuclear
TaNAC10	17.42	10.67	5.62	66.29	细胞核 Nuclear
TaNAC11	31.86	12.62	3.79	51.74	细胞核 Nuclear
TaNAC12	24.36	17.28	7.93	50.42	细胞核 Nuclear
TaNAC13	20.28	11.55	5.35	62.82	细胞核 Nuclear
TaNAC14	24.93	11.33	4.53	59.21	细胞核 Nuclear
TaNAC15	24.40	21.13	8.63	45.83	细胞核 Nuclear
TaNAC16	15.36	16.21	5.97	62.46	叶绿体 Chloroplasts
TaNAC17	23.14	12.94	6.67	57.25	线粒体 Mitochondria
TaNAC18	35.26	10.90	3.85	50.00	细胞核 Nuclear
TaNAC19	23.23	12.20	5.51	59.06	线粒体 Mitochondria
TaNAC20	26.56	10.55	5.47	57.42	线粒体 Mitochondria
TaNAC21	18.36	13.56	3.95	64.12	细胞核 Nuclear
TaNAC22	19.61	10.64	2.80	66.95	细胞核 Nuclear
TaNAC23	30.82	15.41	4.26	49.51	过氧化物酶体 Peroxisomal
TaNAC24	18.36	17.80	2.82	61.02	细胞核 Nuclear
TaNAC25	26.82	13.91	4.97	54.30	过氧化物酶体 Peroxisomal
TaNAC26	23.63	15.93	7.69	52.75	细胞核 Nuclear
TaNAC27	34.40	16.73	6.58	42.29	线粒体 Mitochondria
TaNAC28	26.04	12.09	4.60	57.27	细胞核 Nuclear

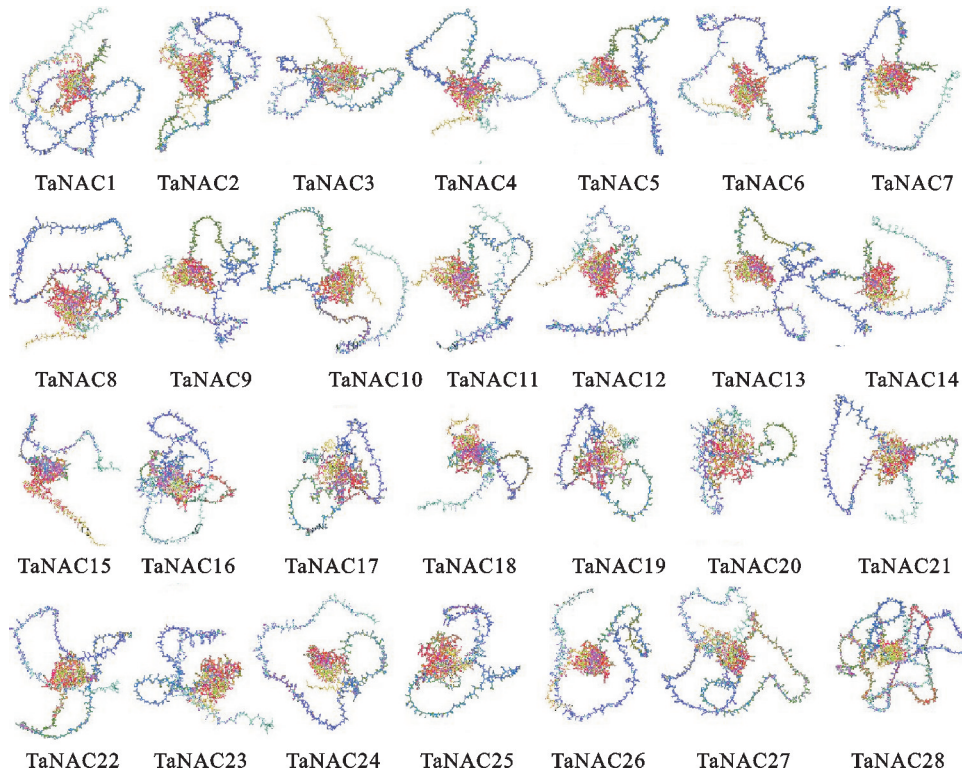


图 2 小麦 NAC 蛋白三级结构预测

Fig. 2 Prediction of tertiary structure of wheat NAC proteins

2.4 小麦 NAC 家族成员保守 Motif 分析

NAC 蛋白 Motif 分析结果(图 3)表明,28 个 NAC 成员中保守基序的数目为 1~10 个,其中 TaNAC5、TaNAC6、TaNAC9、TaNAC10、TaNAC13 共 5 个蛋白存在 10 个 Motif;除 TaNAC16 外,其他 NAC 蛋白均含有基序 Motif3 和 Motif7。此外,不同的蛋白具有相同的保守基序,但基序的位置存在差异,说明 NAC 转录因子在进化过程中存在着内部的分化,这可能是基因功能

多样性的来源。

2.5 小麦 NAC 基因结构和染色体定位分析

基因结构分析结果(图 4)表明,28 个 NAC 基因的外显子数为 1~7,内含子数为 0~7,除 TaNAC19 外,其余 27 个 NAC 基因均含 UTR 区。NAC 基因在小麦染色体上分布表现,A 染色体组上 11 个,D 染色体组上 8 个,B 染色体组上 9 个基因(图 5)。表明 NAC 家族基因分布不具有染色体偏爱性。

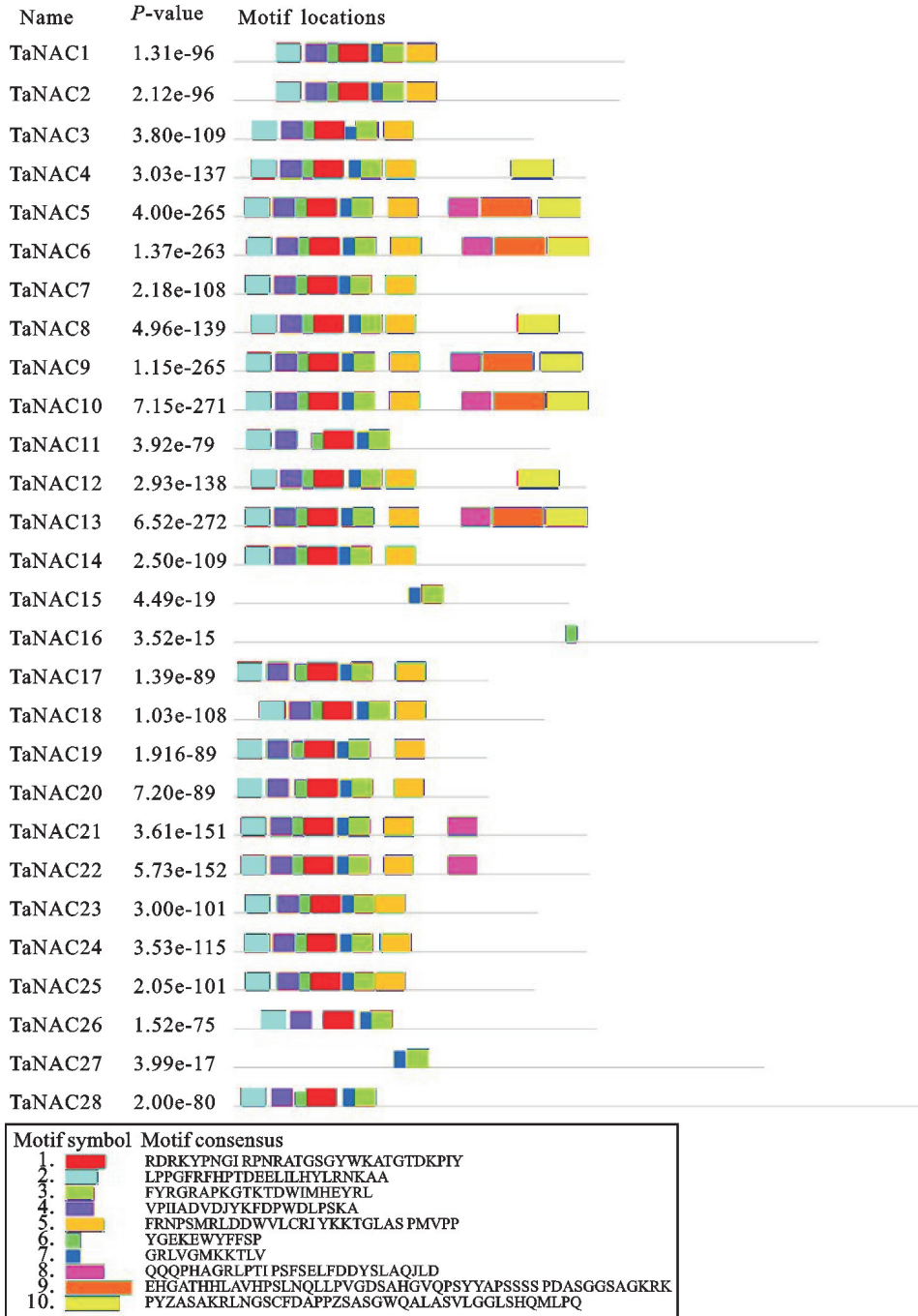


图 3 NAC 蛋白保守基序分析

Fig. 3 Conserved motif analysis of NAC proteins

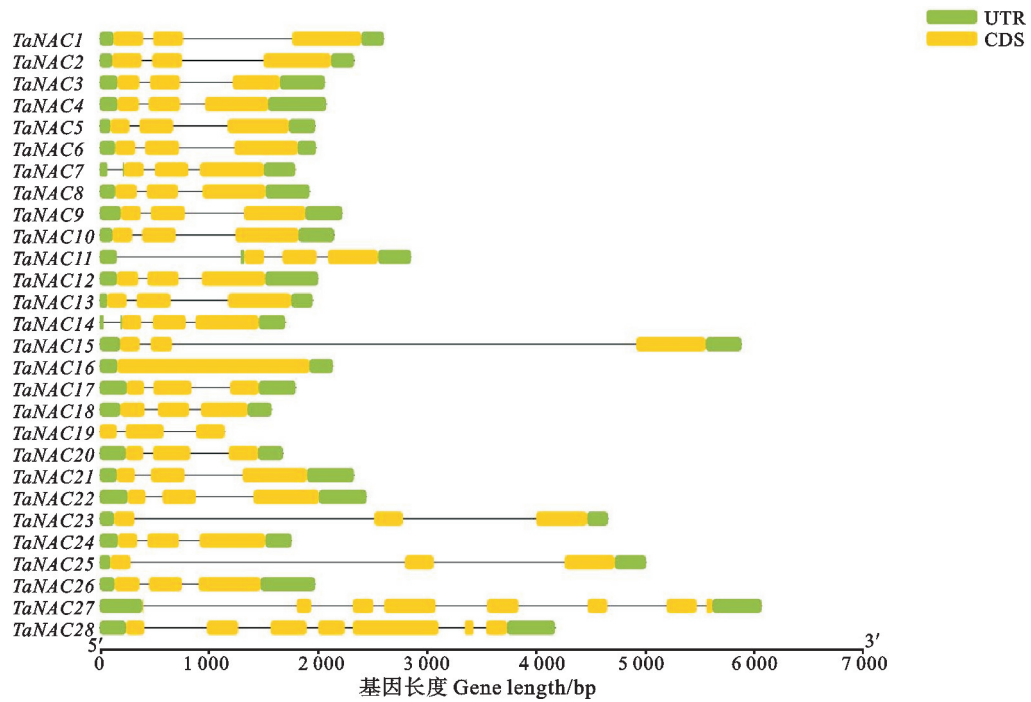


图 4 小麦 NAC 基因结构分析

Fig. 4 Structure analysis of NAC genes in wheat



图 5 小麦 NAC 基因染色体定位分析

Fig. 5 Chromosome location analysis of NAC genes in wheat

2.6 小麦 NAC 基因的系统发育及共线性分析

基于系统发育树进化关系(图 6),可将 28 个 NAC 基因分成 5 组,第 5 组数量最多,有 10 个,第 1 组只有 1 个,第 2 组、第 3 组和第 4 组分别分布 2、6 和 9 个基因。

共线性分析结果(图 7)表明,28 个 NAC 转录因子间有 14 对存在共线性。28 个 NAC 转录因子与小麦参考基因组间鉴定出 53 对共线性关系。推测小麦 NAC 家族基因有 67 对参加了大片的复制。

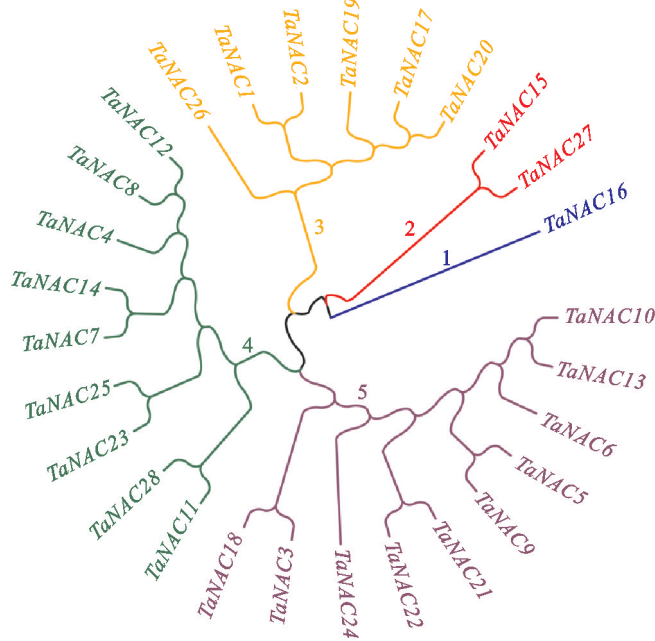
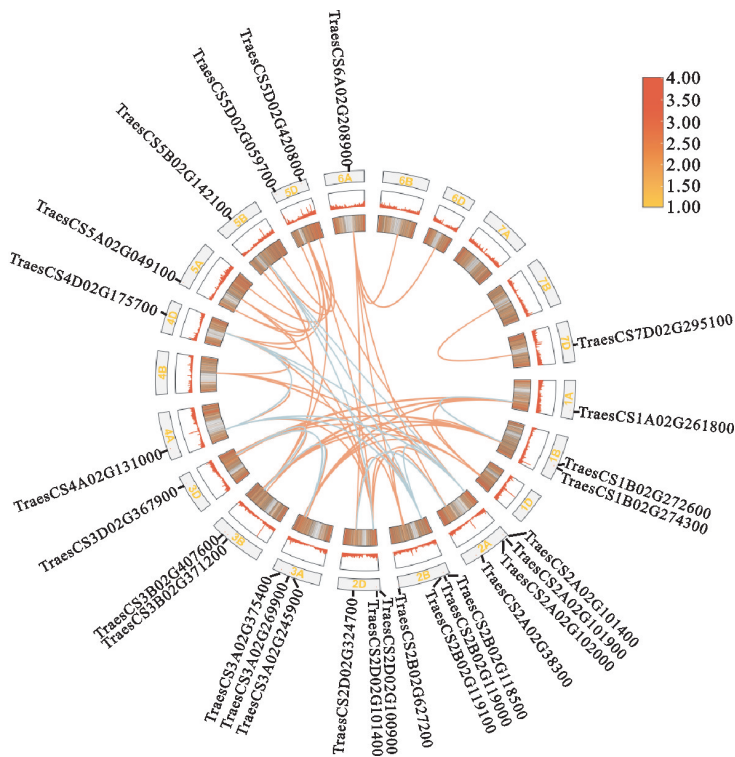


图 6 小麦 NAC 基因系统发生树
Fig. 6 Phylogenetic tree of the NAC gene in wheat



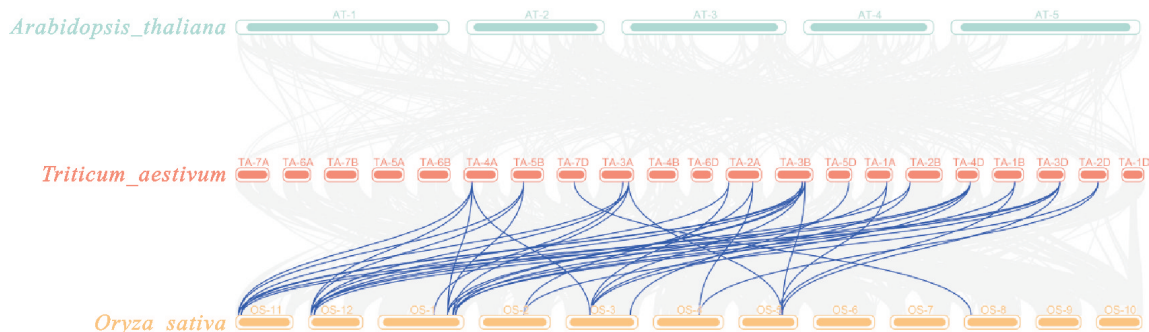
绿色线代表 28 个 NAC 转录因子间的共线性关系;红色线代表 28 个 NAC 转录因子与小麦参考基因组间的共线性关系。
Green lines represent collinearity between the 28 NAC transcription factors; Red lines represent collinearity between the 28 NAC transcription factors with the reference genome of wheat.

图 7 小麦盐胁迫 NAC 基因种间共线性分析
Fig. 7 Interspecific covariance analysis of the NAC gene under salt stress in wheat

对 28 个小麦 NAC 转录因子与拟南芥、水稻 NAC 进行共线性分析,结果(图 8)表明,小麦 NAC 与拟南芥间不存在共线性关系。小麦与水稻间存在较多的 NAC 共线性关系,其中小麦 3B 染色体上存在的共线性关系对最多,5D 和 7D 染色体上仅存在 1 对共线性关系。

2.7 小麦 NAC 家族基因 GO 富集分析

GO 富集分析结果(图 9)表明,28 个 NAC 转录因子主要与分子功能和生物进程有关。分子功能包括 DNA 结合转录因子的活性和转录因子活性等,生物进程主要包括对细胞大分子生物合成过程的调控和核酸诱导转录的调控等。



蓝色线表示不同物种间的同源 NAC 基因对;灰色线代表不同物种基因组的共线性关系。

Blue lines indicate the syntenic NAC gene pairs among different species; Gray lines indicate collinearity of genomes of different species.

图 8 小麦盐胁迫与水稻及拟南芥 NAC 基因的共线性分析

Fig. 8 Synteny analysis of NAC gene among wheat under salt stress, rice and Arabidopsis

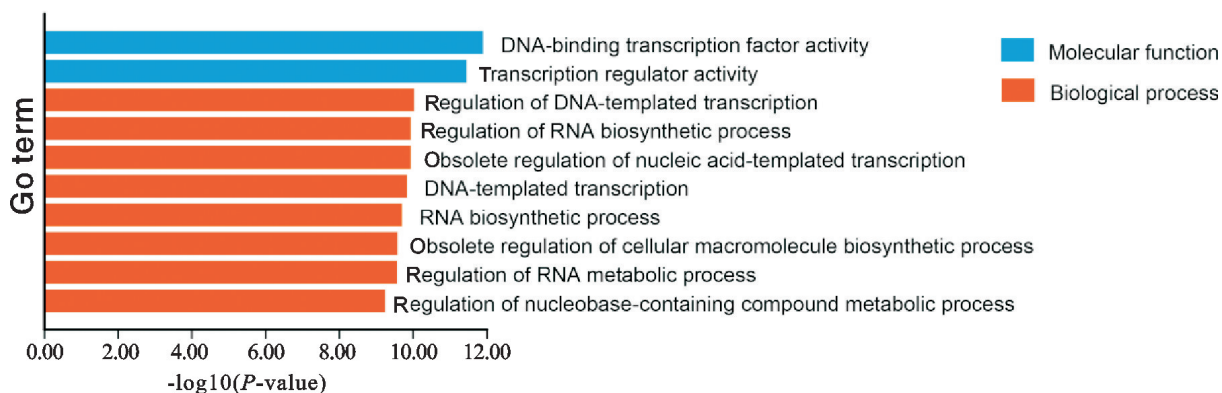


图 9 小麦 NAC 基因 GO 富集分析

Fig. 9 GO enrichment analysis of NAC gene in wheat

2.8 小麦 NAC 基因启动子的顺式作用元件分析

对小麦 NAC 基因上游 2 000 bp 序列启动子顺式作用元件分析结果(图 10)表明,小麦 NAC 基因存在 15 种与生长发育和胁迫响应相关的作用元件,生长发育相关元件包括厌氧诱导元件(ARE)、分生组织表达元件(CAT-Box)、昼夜节律调控元件(circadain)、缺氧特异性诱导元件(GC-motif)、胚乳表达元件(GCN4-motif)、参与栅栏叶肉细胞分化元件(HD-Zip1)和种子特异性元件(RY-element)共 7 种。存在 4 种与激素相关的作用元件,包括脱落酸响应元件(ABRE)、生长素响应元件(AuxRR-Core、TGA-element)、赤

霉素响应元件(GARE-motif、P-box、TATC-box)和茉莉酸甲酯响应元件(CGTCA-motif、TGACG-motif)。8 种与胁迫响应相关的元件分别为光反应作用元件(ACE 和 SP1 等)、低温诱导元件(LTR)、干旱响应元件(MBS)、致病性响应元件(MYB)、茉莉酸信号转导元件(MYC)、水杨酸(TCA-element)、防御应激反应元件(TC-rich repeats),机械损伤元件(Wun-motif)。其中,TaN-AC24 含有元件结合位点最多,共有 51 个结合位点;TaNAC16、TaNAC19 和 TaNAC21 含有元件结合位点最少,共有 24 个结合位点。这表明 NAC 基因可能参与多种非生物胁迫。

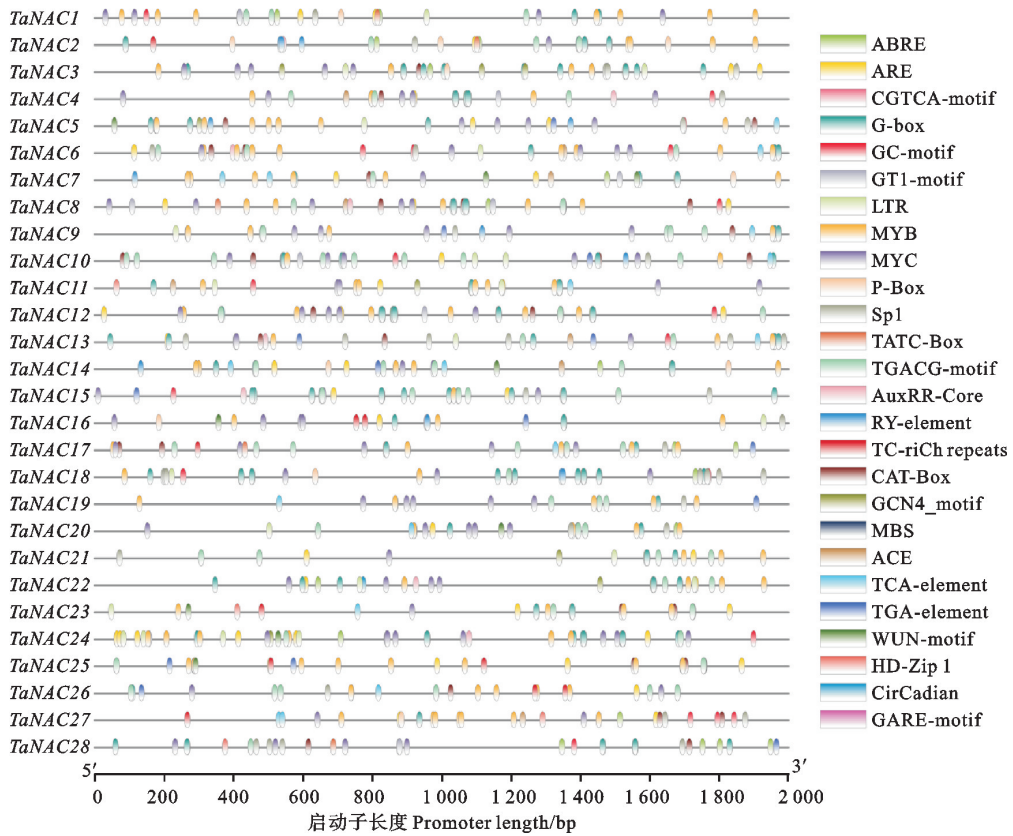


图 10 小麦 NAC 基因启动子元件分析

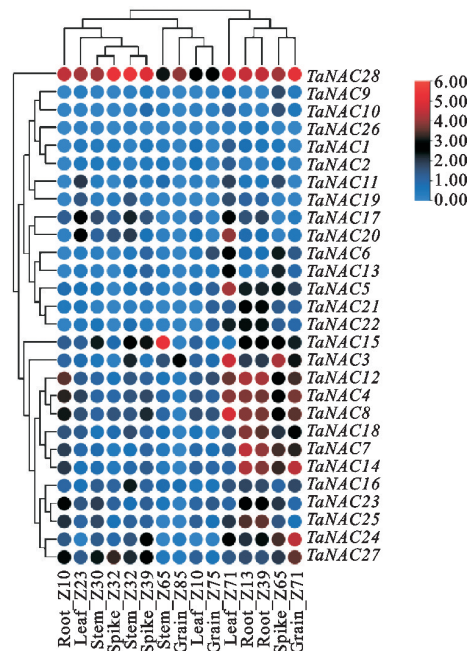
Fig. 10 Analysis of promoter elements of the wheat NAC gene

2.9 小麦 NAC 基因在不同组织中的表达分析

基于小麦基因组数据库 Wheat Omics 1.0 中小麦 NAC 基因在不同发育时期组织部位的基因表达量数据,发现 *TaNAC14* 在根中表达量最高, *TaNAC15* 在茎中表达量最高, *TaNAC4* 在叶中表达量最高, *TaNAC3* 在穗中表达量最高, *TaNAC28* 在籽粒中表达量最高(图 11)。按照 NAC 基因在不同组织的表达情况, *TaNAC* 可以分为 3 类,第 1 类在特定组织中表达(*TaNAC24* 等),第 2 类在多个组织中表达(*TaNAC28* 等),第 3 类在所有组织中表达量均较低(*TaNAC26* 等)。综上,小麦 NAC 基因可能与小麦生长发育及抗胁迫有关。

2.10 小麦盐胁迫相关 NAC 基因表达分析

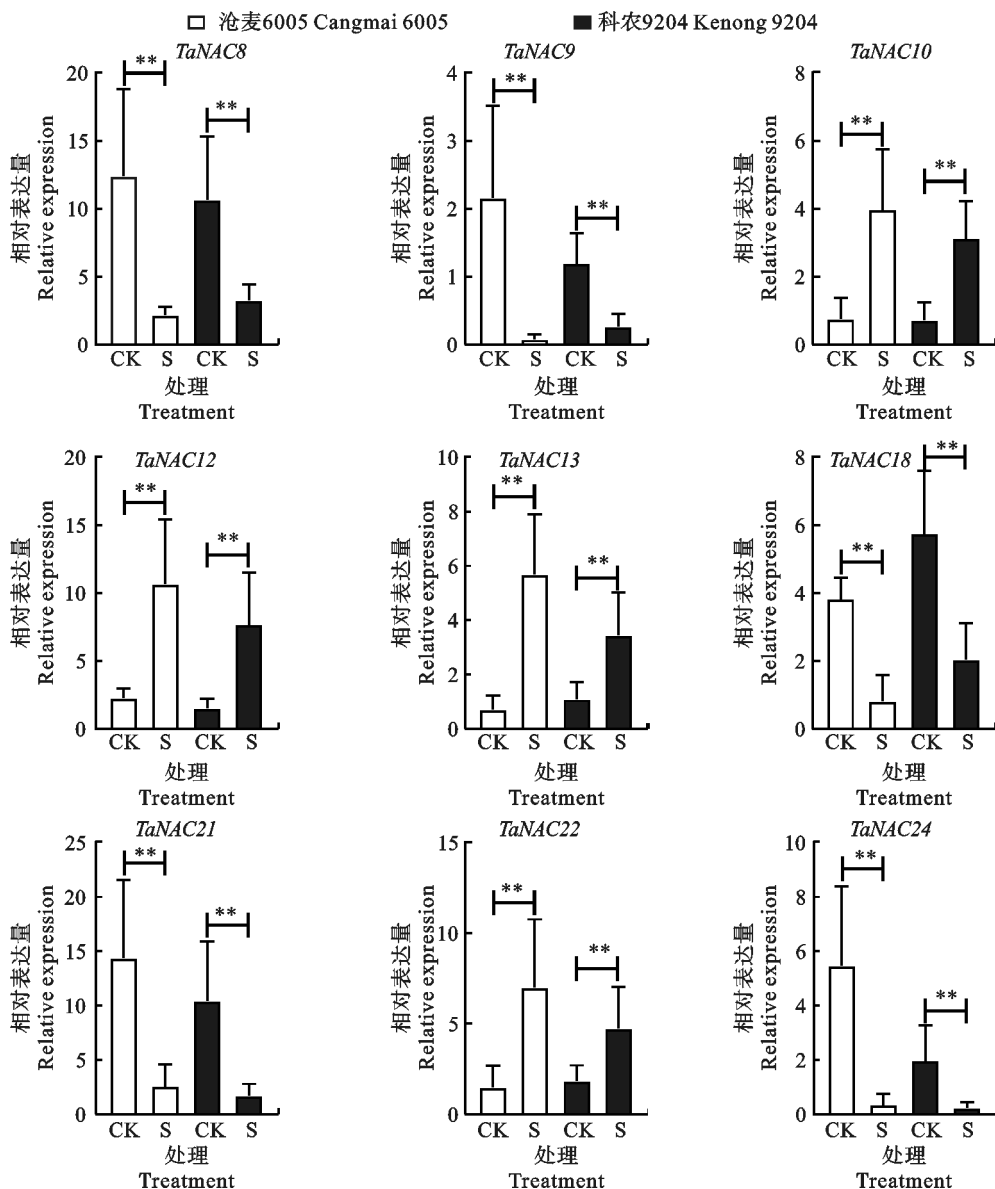
qRT-PCR 结果(图 12)表明,在盐胁迫处理下, *TaNAC8*、*TaNAC9*、*TaNAC18*、*TaNAC21* 和 *TaNAC24* 基因表达量显著下调($P < 0.01$),推测其在盐胁迫下起负调控作用; *TaNAC10*、*TaNAC12*、*TaNAC13* 和 *TaNAC22* 基因表达量显著上调,推测其在盐胁迫下起正调控作用。上述结果与转录组测序结果一致。



Root: 根; Stem: 茎; Leaf: 叶; Spike: 穗; Grain: 籽粒; Z10: 一叶期; Z13: 三叶期; Z23: 分蘖早期; Z30: 起身期; Z32: 拔节早期; Z39: 拔节晚期; Z65: 开花中期; Z71: 花后 2d; Z75: 花后 10d; Z85: 花后 30d. Z10: First leaf stage; Z13: Trefoil stage; Z23: Early tillering stage; Z30: Erecting stage; Z32: Early jointing stage; Z39: Late jointing stage; Z65: Metaphase of flower; Z71: 2 days after flower; Z75: 10 days after flower; Z85: 30 days after flower.

图 11 小麦 NAC 基因的时空表达模式分析

Fig. 11 Spatio-temporal expression pattern analysis of NAC gene in wheat



CK:对照;S:盐处理。* * : $P < 0.01$ 。

CK:ContraI; S:Nad stress. * * : $P < 0.01$ 。

图 12 小麦 9 个重要 NAC 基因在盐胁迫下的表达分析

Fig. 12 Expression analysis of 9 NAC genes in wheat under salt stress

3 讨论

NAC 转录因子已在多种作物中被鉴定出,在植物生长发育(调节细胞壁生长、侧根生长和叶片衰老)、次生代谢物合成和逆境胁迫中扮演重要角色^[19-20]。Yuan 等^[21]认为,在干旱胁迫条件下,ONAC066 基因的过表达可提高水稻对干旱和氧化胁迫的耐受性。Wang 等^[22]鉴定出 96 个 *IiNAC* 基因,这些基因主要与板蓝根生长发育和非生物胁迫反应有关。Yang 等^[23]研究发现, *GmNAC12* 在干旱胁迫下的表达量显著上调 10

倍以上,与野生型大豆相比, *GmNAC12* 过表达系的存活率提高了 57% 以上,而 *GmNAC12* 的敲除系生存率下降了至少 46%,推测 *GmNAC12* 基因可以正向调节大豆对干旱胁迫的耐受性。Xia 等^[24]报道,干旱和盐胁迫强烈诱导 *GhNAC3* 的表达, *GhNAC3* 的过表达增强了拟南芥对干旱胁迫的耐受性,降低了对 ABA 的敏感性。Li 等^[25]研究表明, *MdNAC29* 的过表达降低了苹果植株、愈伤组织和烟草的耐旱性,并在干旱胁迫下表现出较高的相对电导率、丙二醛含量和较低的叶绿素含量,推测 *MdNAC29* 是抗旱性的负调控因子。

Hou 等^[26]验证了 *CaNAC064* 基因对辣椒抗寒性有正向调节作用。Saimi 等^[27]研究得出, *Gh-NAC2-A06* 通过影响干旱胁迫相关基因 (*Gh-SAP12-D07*、*GhNCED1-A01* 和 *GhLEA14-A11* 等) 的表达, 负向调节棉花对干旱胁迫的耐受性。上述研究均证明, NAC 转录因子在响应植物逆境胁迫中发挥重要作用。

本研究通过转录组测序技术鉴定出 28 个与小麦耐盐相关的 NAC 转录因子。对 28 个 NAC 转录因子进行蛋白理化性质分析, 发现 18 个 NAC 蛋白呈酸性, 10 个 NAC 蛋白呈碱性, 28 个蛋白均为亲水性蛋白。这与黄旼柳等^[28]对辣椒 NAC 转录因子研究结果类似。小麦耐盐相关 NAC 转录因子主要定位为细胞核, 推测 NAC 转录因子调控盐胁迫抗性的位置为细胞核。这与荣梦茹等^[29]对苜蓿 NAC 转录因子的定位一致。28 个小麦耐盐 NAC 蛋白二级结构主要以无规则卷曲和 α 螺旋为主, 这与闫艺薇等^[30]对大蒜 NAC 蛋白结构分析结果一致。小麦 NAC 家族成员中保守基序的数目及种类存在差异, 不同蛋白具有相同的保守基序, 但基序的位置存在差异, 推测 NAC 转录因子在进化过程中存在着内部的分化, 这可能是基因功能多样性的来源。大多数小麦 NAC 转录因子含有 3 个外显子, 这与 Jiang 等^[31]对芥菜 NAC 转录因子的分析结果一致。在小麦 NAC 家族中共检测到 67 对基因参加了大片的复制, 推测大片段复制为基因进化的主要模式。陈国户等^[32]发现, 白菜 NAC 转录因子家族在进化中发生了基因大片段复制。小麦和拟南芥之间不存在共线性关系, 小麦和水稻间存在较多的共线性关系, 表明小麦和禾本科作物水稻亲缘关系较近, NAC 基因的扩增可能发生在小麦、拟南芥和水稻分化之前。

启动子的顺式作用元件分析表明, 小麦 NAC 家族基因的表达调控机制较为复杂, 存在 7 种与植物生长发育相关的作用元件, 包括 ARE、CAT-Box、circadain、GC-motif、GCN4-motif、HD-Zip1 和 RY-element; 存在 4 种与激素相关的作用元件, 包括 ABRE、AuxRR-Core、TGA-element、GARE-motif、P-box、TATC-box 和 CGTCA-motif、TGACG-motif; 有 8 种与胁迫响应相关的元件, 为 ACE 和 SP1、LTR、MBS、MYB、MYC、TCA-element、TC-rich repeats, Wun-motif。Li 等^[33]发现石刁柏 (*Asparagus officinalis*) NAC

转录因子启动子区域也存在光反应元件、激素响应元件、植物生长发育元件和应激元件。28 个小麦 NAC 转录因子在不同发育时期、不同组织部位均存在特异性表达, 推测该基因家族在小麦生长发育中发挥功能。

对小麦 9 个重要 NAC 转录因子在盐胁迫后的表达进行分析发现, 在对照和盐胁迫处理下, *TaNAC8*、*TaNAC9*、*TaNAC18* 和 *TaNAC10* 基因在科农 9204 中的表达量均显著高于在沧麦 6005 中表达量, 推测上述 4 个基因在盐胁迫下起负调控作用; *TaNAC12*、*TaNAC13*、*TaNAC21*、*TaNAC22* 和 *TaNAC24* 基因在科农 9204 中的表达量均显著低于沧麦 6005 中表达量, 推测上述 5 个基因在盐胁迫下起正调控作用。Wang 等^[34]认为, 过表达 *StNAC053* 基因的拟南芥品系对盐和干旱胁迫处理的耐受性显著提高, 推测 *StNAC053* 基因正向调节马铃薯对盐胁迫的耐受性。Xu 等^[35]发现, *TaNAC29* 基因通过增强抗氧化系统减少 H_2O_2 的积累和膜损伤, 并参与调节非生物应激反应信号通路, 从而赋予小麦盐胁迫耐受性。

参考文献:

- [1] MISHRA S, CHAUDHARY R, PANDEY B, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of the GRAS gene family under abiotic stresses in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 18705.
- [2] BRDAR M, KRALJEVIĆ-BALALIĆM, KOBILJSKI B. The parameters of grain filling and yield components in common wheat (*Triticum aestivum* L.) and durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum) [J]. *Open Life Sciences*, 2008, 3(1): 75.
- [3] GAO Y, LU Y, WU M, *et al.* Ability to remove Na^+ and retain K^+ correlates with salt tolerance in two maize inbred lines seedlings [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1716.
- [4] REHMAN A, WANG N, PENG Z, *et al.* Identification of C_2H_2 subfamily ZAT genes in *Gossypium* species reveals *GhZAT34* and *GhZAT79* enhanced salt tolerance in *Arabidopsis* and cotton [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 184: 967.
- [5] ZHANG Y, LI D, ZHOU R, *et al.* Transcriptome and metabolome analyses of two contrasting sesame genotypes reveal the crucial biological pathways involved in rapid adaptive response to salt stress [J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 66.
- [6] 宋洁琼, 初若雯, 赵晶莹, 等. NAC 转录因子在植物响应盐胁迫中的作用 [J]. *生物学通报*, 2023, 58(8): 1.
- [7] SONG J Q, CHU R W, ZHAO J Y, *et al.* Role of NAC transcription factors in plant response to salt stress [J]. *Bulletin of Biology*, 2023, 58(8): 1.
- [8] BIAN Z, GAO H, WANG C. NAC transcription factors as positive or negative regulators during ongoing battle between pathogens and our food crops [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 22(1): 81.
- [9] SOUER E, VAN HOUWELINGEN A, KLOOS D, *et al.* The noapical meristem gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem

- and primordia boundaries [J]. *Cell*, 1996, 85(2):159.
- [9]胡仲远,吕小龙,张明方,等.西瓜 NAC 转录因子家族成员的鉴定及表达分析[J].中国瓜菜,2019,32(8):247.
HUZ Y, LV X L, ZHANG M F, et al. Global expressions landscape of NAC transcription factor family and their responses to abiotic stresses in *Citrullus lanatus* [J]. *China Cucurbits and Vegetables*, 2019, 32(8):247.
- [10]李德龙,周军,王大玮,等.苹果 NAC 转录因子的克隆与全基因组生物信息学分析[J].基因组学与应用生物学,2017,36(6):2507.
LI D L, ZHOU J, WANG D W, et al. Cloning and whole genomes bioinformatics analysis of NAC transcription factor genes in apple [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2017, 36(6):2507.
- [11]徐晓阳,李国龙,孙亚卿,等.甜菜 NAC 转录因子鉴定及其在水分胁迫下的表达分析[J].植物生理学报,2019,55(4):444.
XU X Y, LI G L, SUN Y Q, et al. Identification of NAC transcription factors in sugar beet and their expression analyses under water stress [J]. *Plant Physiology Journal*, 2019, 55(4):444.
- [12]MAO H, LI S, CHEN B, et al. Variation in *Cis*-regulation of a NAC transcription factor contributes to drought tolerance in wheat [J]. *Molecular Plant*, 2022, 15(2):276.
- [13]GUO W, ZHANG J, ZHANG N, et al. The wheat NAC transcription factor *TaNAC2L* is regulated at the transcriptional and post-translational levels and promotes heat stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8):e0135667.
- [14]ZHANG Y, GENG H, CUI Z, et al. Functional analysis of wheat NAC transcription factor, *TaNAC069*, in regulating resistance of wheat to leaf rust fungus [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12:604797.
- [15]曲硕,刘芳,孙浩文,等.大豆胞囊线虫病抗性相关 WRKY 转录因子生信分析与功能预测[J/OL].分子植物育种,2023. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230524.1527.024.html>.
QU S, LIU F, SUN H W, et al. Bioinformatics analysis and functional prediction of WRKY transcription factors associated with soybean cystitis resistance [J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, 2023. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230524.1527.024.html>.
- [16]JIANG C, ZHANG H, REN J, et al. Comparative transcriptome-based mining and expression profiling of transcription factors related to cold tolerance in peanut [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(6):1921.
- [17]AMIRBAKHTIAR N, ISMAILI A, GHAFARI M R, et al. Transcriptome analysis of bread wheat leaves in response to salt stress [J]. *PLoS One*, 2021, 16(7):e0254189.
- [18]ZHU C, YU J, CAO S, et al. Transcriptomics-based analysis of genes related to lead stress and their expression in the roots of *Pogonatherum crinitum* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13:1066329.
- [19]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.
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.
- [20]杨晨旭,哈斯巴根,杜超.植物 NAC 转录因子结构和功能研究进展[J/OL].分子植物育种,2023. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230403.1809.023.html>.
YANG C X, KHASBAGAN, DU C, et al. Research progress on the structure and function of plant NAC transcription factors [J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, 2023. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230403.1809.023.html>.
- [21]YUAN X, WANG H, CAI J, et al. Rice NAC transcription factor ONAC066 functions as a positive regulator of drought and oxidative stress response [J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1):278.
- [22]WANG Z, ZHANG Z, WANG P, et al. Genome-wide identification of the NAC transcription factors family and regulation of metabolites under salt stress in *Isatis indigotica* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 240:124436.
- [23]YANG C, HUANG Y, LV P, et al. NAC transcription factor *GmNAC12* improved drought stress tolerance in soybean [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(19):12029.
- [24]XIA L, SUN S, HAN B, et al. NAC domain transcription factor gene *GhNAC3* confers drought tolerance in plants [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2023, 195:114.
- [25]LI S, JING X, TAN Q, et al. The NAC transcription factor *MdNAC29* negatively regulates drought tolerance in apple [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14:1173107.
- [26]HOU X M, ZHANG H F, LIU S Y, et al. The NAC transcription factor *CaNAC064* is a regulator of cold stress tolerance in peppers [J]. *Plant Science*, 2020, 291:110346.
- [27]SAIMI G, WANG Z, LIUSUI Y, et al. The functions of an NAC transcription factor, *GhNAC2-A06*, in cotton response to drought stress [J]. *Plants*, 2023, 12(21):3755.
- [28]黄耿柳,张锐,贺迎骁,等.辣椒 NAC 家族成员鉴定及其编码基因在 NaCl 胁迫下的表达分析[J].植物资源与环境学报,2023,32(4):12.
HUANG T L, ZHANG R, HE Y X, et al. Identification of NAC family members of *Capsicum annuum* and analysis on expressions of their coding genes under NaCl stress [J]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2023, 32(4):12.
- [29]荣梦茹,余如刚,韦英铭,等.紫花苜蓿耐盐性相关 NAC 转录因子的挖掘及表达分析[J].草地学报,2024,32(4):1055.
RONG M R, YU R G, WEI Y M, et al. Excavation and expression analysis of NAC transcription factors related to salinity resistance of *Medicago sativa* [J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2024, 32(4):1055.
- [30]闫艺薇,田洁.大蒜 NAC 基因家族的鉴定与低温表达分析[J].中国农业科技导报,2023,25(4):67.
YAN Y W, TIAN J. Identification and expression analysis of NAC gene family under low temperature in *Allium sativum* L. [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2023, 25(4):67.
- [31]JIANG L, SUN Q, WANG Y, et al. Genome-wide identification and characterization of NAC genes in *Brassica juncea* var. *tumida* [J]. *PeerJ*, 2021, 9:e11212.
- [32]陈国户,庞小可,李广,等.白菜 NAC 基因家族全基因组鉴定及其应答春化反应的表达分析[J].南京农业大学学报,2022,45(4):656.
CHEN G H, PANG X K, LI G, et al. Genome-wide identification of NAC gene family in *Brassica rapa* and its expression analysis of response to vernalization [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2022, 45(4):656.
- [33]LI C, ZHANG J, ZHANG Q, et al. Genome-wide identification and analysis of the NAC transcription factor gene family in garden *Asparagus* (*Asparagus officinalis*) [J]. *Genes*, 2022, 13(6):976.
- [34]WANG Q, GUO C, LI Z, et al. Potato NAC transcription factor *StNAC053* enhances salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(5):2568.
- [35]XU Z, GONGBUZHAXI, WANG C, et al. Wheat NAC transcription factor *TaNAC29* is involved in response to salt stress [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2015, 96:356.