

草地早熟禾 NAC 基因鉴定及非生物胁迫下 表达模式分析

朱瑞婷,牛奎举,张然,马晖玲

(甘肃农业大学草业学院,草业生态系统教育部重点实验室,甘肃省草业工程实验室,中-美草地畜牧业
可持续发展研究中心,甘肃 兰州 730070)

摘要:草地早熟禾(*Poa pratensis*)是世界上广泛应用的草坪草种,其抗逆基因的挖掘对抗逆新品种的选育具有重要意义。NAC 基因家族是植物特有的转录因子之一,在植物逆境响应中起到重要作用。以二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)的 NAC 蛋白序列为请求序列,从草地早熟禾转录组数据库序列比对分析得到 15 个草地早熟禾 PpNACs 基因的 cDNA 全长序列,具有完整的开放阅读框。运用生物信息学方法预测早熟禾 NAC 家族成员的理化性质和保守结构域,发现 15 个 PpNACs 转录因子都是酸性蛋白,除 PpNAC16 外都属于不稳定蛋白,疏水性蛋白,具有相似的结构,通过聚类分析可将 15 个 PpNACs 成员分为 3 类。荧光定量 PCR 结果显示,在重金属胁迫下显著上调表达的基因有 PpNAC10、PpNAC18、PpNAC19 和 PpNAC24,在盐胁迫过程下显著上调表达的基因有 PpNAC10 和 PpNAC24,在干旱胁迫下显著上调表达的基因有 PpNAC1、PpNAC6、PpNAC10 和 PpNAC13,在低温胁迫下显著上调表达的基因有 PpNAC1、PpNAC10 和 PpNAC18,在高温胁迫下显著上调表达的基因有 PpNAC20。其中,PpNAC10 在重金属、盐、干旱和低温胁迫下均被显著诱导上调表达,PpNAC18 在重金属、干旱和低温胁迫下均被显著诱导上调表达,PpNAC10 和 PpNAC18 可作为草地早熟禾逆境胁迫响应的候选基因。

关键词:草地早熟禾;NAC 基因家族;非生物胁迫;基因表达

中图分类号:S688.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2021)04-0026-10

DOI: 10.13817/j.cnki.cyyep.2021.04.004



生存环境对植物生长具有重要影响^[1],其中,干旱、高盐、低温、高温、重金属等是抑制植物生长发育的主要非生物胁迫因素。干旱胁迫会限制植物生长,改变植物渗透平衡^[2]。重金属会破坏植物细胞中的蛋白质结构,产生有害物质^[3]。盐胁迫会破坏质膜的完整性从而抑制植物生长^[4]。高温胁迫会影响植物的生理代谢,对植物生长造成一定的损害^[5]。在长期演变过程中,植物自身形成了一套复杂的防御系统来抵御不

良环境的伤害,在这些防御方法中,转录因子家族在植物响应外界环境胁迫的转录调控中起到了关键作用^[6]。

转录因子是一类通过与胁迫相关基因的特异顺式作用元件相结合从而激活或抑制靶基因转录的 DNA 结合蛋白,参与植物在非生物胁迫下的响应^[7]。NAC 家族是植物特有的一类转录因子,具有不同的生物学功能。NAC 家族在 N 端具有保守的 NAC 结构域,大约有 150 个氨基酸,C 端为高度变异的转录激活区^[8]。其功能涉及植物生长发育、激素调控和胁迫响应等重要方面^[9]。目前在很多植物中已经鉴定出大量 NAC 家族成员,如石榴(*Punica granatum*)^[10]、果梅(*Prunus mume*)^[11]、苦荞(*Tartary buckwheat*)^[12]、西瓜(*Citrullus lanatus*)^[13]等。不同物种间家族成员的数量与功能存在重要差异,但大量的 NAC 转录因子

收稿日期:2020-09-21;修回日期:2020-11-09

基金项目:省青年科技基金计划(20JR10RA550)

作者简介:朱瑞婷(1995-),女,甘肃天水人,在读硕士。

E-mail:1258151161@qq.com

牛奎举为通讯作者。

E-mail:niukj@gsau.edu.cn

在非生物胁迫反应中起到调控作用^[14-17]。如玉米 (*Zea mays*) *ZmNAC84* 在烟草中的过表达可增强耐旱性^[18], 过表达 *OsNAC5* 可以增强水稻 (*Oryza sativa*) 的耐盐性^[19], 低温胁迫下番茄 (*Solanum lycopersicum*) *SINAMI* 的过表达减轻了番茄在遭受低温胁迫后的氧化损伤^[20]。

草地早熟禾 (*Poa pratensis*) 是禾本科早熟禾属植物, 广泛分布于北温带冷湿润地区, 是一种多年生冷季型禾草, 叶形美观, 具根状茎, 是优良的草坪草。草地早熟禾喜凉爽湿润的气候, 耐寒性较强, 但抗旱性较差^[21]。随着全球性气候、生态和环境问题日益严重, 尤其是全球变暖的加剧, 干旱、高盐、高温、重金属污染已经成为制约农业发展的主要因素^[22], 提高草坪草的抗逆性是目前草坪研究中的热点问题。草坪草抗逆基因的鉴定对了解其响应逆境胁迫的分子机制和抗逆新品种的选育具有重要意义。有关非生物胁迫下草坪草 NAC 基因表达模式分析的报道较少, 草地早熟禾 NAC 基因尚未被完全鉴定。本课题组前期进行了草地早熟禾抗旱、抗寒、耐镉转录组分析, 发现 NAC 基因家族基因参与草地早熟禾的逆境胁迫响应。本研究以前期组装的草地早熟禾转录组数据库为基础, 对具有全长 cDNA 的草地早熟禾 NAC 基因进行鉴定并分析其不同胁迫下的表达模式, 为草地早熟禾 NAC 基因家族的分子调控机理研究提供理论依据, 有助于优良基因资源的挖掘和新品种培育。

1 材料和方法

1.1 供试材料与生长条件

试验材料为草地早熟禾品种巴润, 由北京克劳沃公司提供。采用砂培法种植, 将清洗干净的沙子等量的装入直径为 9 cm、高度为 17 cm 的育苗钵中, 种子直接播种后于生长室中培养。培养条件为: 白天温度为 25℃, 时间为 16 h, 光照强度为 6 000 lx, 夜晚温度为 20℃, 时间为 8 h, 湿度为 50%。播种 20 d 后, 用 Hoagland 营养液培育, 持续培养 4 周, 在此期间每隔 5 d 换 1 次营养液和蒸馏水。

1.2 植物处理

选择长势一致的幼苗, 对其进行 6 组处理, 每组处理 4 个重复, 第 1 组为对照: 正常营养液栽培; 第 2 组为盐处理: 200 mmol/L NaCl 溶液栽培; 第 3 组为干旱

处理: 15% PEG-6000 溶液栽培; 第 4 组为低温处理: 0℃ 培养; 第 5 组为高温处理: 38℃ 培养; 第 6 组为重金属处理: 3 mmol/L CdCl₂ 溶液栽培。处理时间 6、24、48 h、7 d, 每次取样 4 次重复, 取其叶片, 迅速放入液氮中冷冻后保存于 -80℃。

1.3 全长草地早熟禾 NAC 基因的鉴定

二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon*) NAC 蛋白序列可根据文献提供的登录号在 NCBI 上搜索获得 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)^[23]。在 BioEdit 软件中, 将本实验室已有和报道的 5 个草地早熟禾转录组数据库作为本地数据库^[24-28], 以二穗短柄草 NAC 蛋白序列作为请求序列, Program 选择: 'tblastn', Expectation Value 选择 E⁻²⁰, 搜索本地草地早熟禾数据库。将所得到的序列通过 NCBI 网站中的 blastX 进行搜索比对, 获得候选序列。

1.4 序列分析及构建系统进化树

通过 ExPASy 在线网站上的 Prot Param 工具对草地早熟禾 NAC 家族基因的理化性质进行初步预测, 包括基因的大小、分子量、等电点、不稳定指数、亲水性的平均值和脂肪指数。通过 MEME 网站 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 对草地早熟禾 NAC 基因的保守基序进行分析。根据在线网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>) 预测草地早熟禾 NAC 基因的编码蛋白序列, 采用邻近法在 MEGA 7.0 软件上对 PpNACs 进行聚类分析。

1.5 荧光定量 PCR (qRT-PCR)

RNA 提取使用天根公司植物 RNA 提取试剂盒, RNA 反转录使用 Prime Script RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒, 第 1 步去除基因组 DNA 反应, 第 2 步为反转录合成 cDNA, 稀释 20 倍作为模板。使用 NCBI 在线网站 Prime-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 进行引物设计 (表 1)。利用天根荧光定量试剂盒进行 qRT-PCR 分析, 20 μL 反应体系如下: 模板 5 μL, 引物 2 μL, ddH₂O 3 μL, 2 × SuperReal PreMix Plus 10 μL。荧光定量 PCR 的条件为: 95℃ 预变性 15 min, 40 个循环的 PCR 扩增, 包括 95℃ 变性 10 s 和 58℃ 退火 30 s。内参基因为 ACT, 每个样品设 3 次技术重复, 基因的相对表达量使用 2^{-ΔΔCT} 法计算^[29]。

表 1 定量 PCR 引物

Table 1 Primers used for qRT-PCR

基因名称	正向引物(5'~3')	反向引物(5'~3')	产物长度/bp
<i>PpNAC1</i>	CCCCTCGTCGATGATGTTCC	CTGAGGTCCACGAACAGGTC	141
<i>PpNAC2</i>	TACTCCTCCGACGGTAGCAA	GGGTCCGGTGAGTGATGGAAG	128
<i>PpNAC6</i>	GAGAATGGTAACCAGGCGGG	TCATCTGGAGTTGCTGCGTT	176
<i>PpNAC9</i>	ACACCAAATCGGGAACCCTG	CGTAAGAATCACCGCCACCT	189
<i>PpNAC10</i>	GTGGTACTTCTTCTCCCCGC	CAGTTGGTCTTCTCGCCCTT	186
<i>PpNAC11</i>	CATCCCAATCGACGAGCTGA	GCTTGTGCAAACCTTGGGAG	163
<i>PpNAC13</i>	AGTCATCGGGGTCAAGAGGA	CGCTGAATTCGTTCCCTCAGC	176
<i>PpNAC16</i>	AAGGACTTGGGTCCCTCAGA	GCCAAATAGCCCATCCCCTAA	114
<i>PpNAC17</i>	AGGCGACAGAACTGATTGGG	GGCCAAGCCACTTTTCTTG	122
<i>PpNAC18</i>	CGACGTCGACCTCAACAAGA	CATGCCACGAGTAACCCTT	199
<i>PpNAC19</i>	CTGAGCACCAACGAGTGGA	CTTCCAGTAGCCGACTTGG	96
<i>PpNAC20</i>	TTCAACGCCACCAATCCGTA	TGCGGAAATCTTCCACCTC	143
<i>PpNAC21</i>	TGCATCAGGCACT GCCAATA	ATCGCATCCAGCAAGGTTGA	111
<i>PpNAC23</i>	TCGGAAGTGATCAGAACGGC	CCCTCGTCAGCCCTACTTTG	143
<i>PpNAC24</i>	TCATGAACGAGTACCGCCTC	ACCTTGCACAGAACCACCTC	82
ACT	TGTTGGATTCTGGTGATGGTGTCT	AGGATGGCGTGCGGAAGG	73

1.6 数据分析

采用 SPSS 23.0 软件进行 T 检验,并用 Graph-Pad Prism 8 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 草地早熟禾 NAC 基因家族的生物信息学分析

2.1.1 草地早熟禾 NAC 转录因子的鉴定 根据二穗短柄草的 NAC 蛋白序列,在 BioEdit 软件中搜索本地草地早熟禾数据库,通过搜索比对得到 15 个草地早

熟禾 NAC 全长 cDNA 序列,具有完整的 ORF 序列,根据草地早熟禾拉丁名将其命名为 *PpNACs*(表 2)。结果表明,15 个草地早熟禾 NAC 基因中分子量在 61 184.22(*PpNAC18*)~163 713.04(*PpNAC20*),等电点在 4.89~5.04,都属于酸性蛋白;不稳定系数除了 *PpNAC16* 外都大于 40,属于不稳定蛋白;亲水性系数在 0.705~1.022,属于疏水性蛋白(大于零表示疏水性蛋白,小于零表示亲水性蛋白,在±0.5 之间为两性蛋白)。

表 2 15 个全长草地早熟禾 NAC 转录因子理化性质分析

Table 2 Analysis of physicochemical properties of 15 full-length NAC transcription factors in *Poa pratensis*

基因编号	氨基酸长度/ aa	分子量/ Da	等电点	不稳定系数	脂肪族氨基 酸指数	蛋白质疏 水性
<i>PpNAC1</i>	948	76 762.29	5.00	53.27	18.78	0.946
<i>PpNAC2</i>	1161	96 757.41	5.00	57.45	28.85	0.966
<i>PpNAC6</i>	1464	119 993.79	5.01	48.66	29.71	0.775
<i>PpNAC9</i>	780	63 907.26	5.04	56.42	17.44	0.886
<i>PpNAC10</i>	876	71 390.25	5.01	53.28	18.61	0.954
<i>PpNAC11</i>	1158	95 422.06	4.96	63.63	23.75	1.019
<i>PpNAC13</i>	774	64 320.45	5.03	64.78	20.67	1.006
<i>PpNAC16</i>	1293	105 106.08	5.04	39.96	32.10	0.808
<i>PpNAC17</i>	1275	107 016.4	5.03	43.27	26.12	0.705
<i>PpNAC18</i>	753	61 184.22	5.10	51.27	27.22	0.893
<i>PpNAC19</i>	846	69 796.69	5.02	58.91	22.34	1.022
<i>PpNAC20</i>	2016	16 3713.04	4.89	40.89	25.00	0.856
<i>PpNAC21</i>	1662	137 550.48	4.95	45.47	24.37	0.764
<i>PpNAC23</i>	768	61 948.65	5.07	48.45	23.18	0.926
<i>PpNAC24</i>	912	73 385.86	5.01	48.45	16.78	0.865

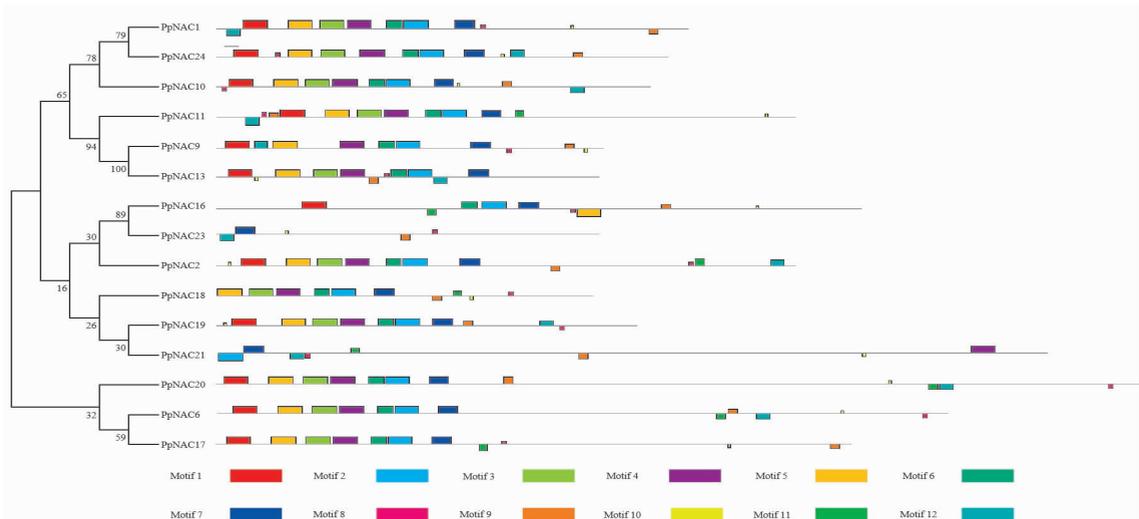


图 1 草地早熟禾 NAC 基因的基序结构和聚类分析

Fig. 1 Motif composition and cluster analysis of NAC genes in *Poa pratensis*

2.1.2 PpNACs 基因的 motif 分析和聚类分析 采用 MEME 网站在线预测草地早熟禾 NAC 基因的保守结构域,可知 15 个 NAC 家族基因一共由 12 种 motif 组成(图 1)。其中,motif 2 和 motif 7 在所有草地早熟禾 NAC 基因中都存在。草地早熟禾 NAC 基因由多种 motif 组成,除 *PpNAC16*、*PpNAC18*、*PpNAC21* 和 *PpNAC23* 外都具有 motif 1-7。Motif 1 在 80% 的 PpNACs 中存在,Motif 2 和 motif 6 在 87% PpNACs 中存在。

对 15 个 NAC 家族基因进行聚类分析,可分为 3 大类,第 1 类包括 *PpNAC1*、*PpNAC9*、*PpNAC10*、*PpNAC11*、*PpNAC13*、*PpNAC24*,都含有 motif 1-7;第 2 类包括 *PpNAC2*、*PpNAC16*、*PpNAC18*、*PpNAC19*、*PpNAC21*、*PpNAC23*,都含有 motif 2 和 motif 7;第 3 类包括 *PpNAC6*、*PpNAC17* 和 *PpNAC20*,都含有 motif 1-7、motif 9 和 motif 11。

2.2 草地早熟禾 NAC 基因家族表达模式分析

2.2.1 重金属胁迫下 NAC 基因的表达 *PpNAC9* 和 *PpNAC16* 随着时间的增大,呈现逐渐上升的趋势,在 7 d 时达到最大值,分别是对照的 6.53 倍和 8.27 倍;*PpNAC1*、*PpNAC2* 在 6 h 时表达量显著增大,随后呈现下降又上升的趋势;*PpNAC23* 在 48 h 时表达量显著增大,在其他时间段无显著性变化;*PpNAC10* 和 *PpNAC18* 在 7 d 时表达量达到最大,分别是对照的 223.33 倍和 99.72 倍;*PpNAC1*、*PpNAC2*、*PpNAC10*、*PpNAC11*、*PpNAC13*、*PpNAC16*、*PpNAC17*、*PpNAC19*、*PpNAC24* 在 4 个时间段内均有

显著性变化(图 2)。

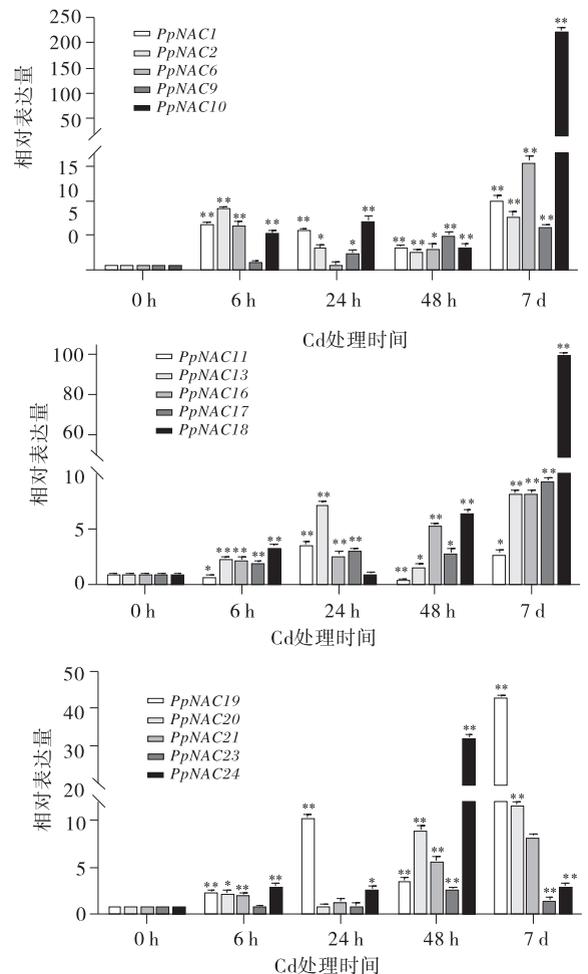


图 2 重金属胁迫下 NAC 基因的表达分析

Fig. 2 Relative expression level of NAC genes under heavy metal treatment

注:竖线表示标准误,*表示差异显著($P < 0.05$),**表示差异极显著($P < 0.01$)。下同

2.2.2 盐胁迫下 NAC 基因的表达 *PpNAC9* 和 *PpNAC13* 在四个时间段内都有显著性变化, *PpNAC9*、*PpNAC10*、*PpNAC11*、*PpNAC16*、*PpNAC18*、*PpNAC19*、*PpNAC20*、*PpNAC23* 在 7 d 时表达量达到最大值, *PpNAC10* 在 7 d 时表达量是对照的 50.88 倍, *PpNAC24* 在 6 h 时表达量显著增大, 在 48 h 时表达量达到最大, 是对照的 36.33 倍。 *PpNAC1*、*PpNAC13*、*PpNAC17* 在 6 h 是表达量显著性增大, 随后呈现先下降后上升的趋势, 响应短期胁迫和长期胁迫(图 3)。

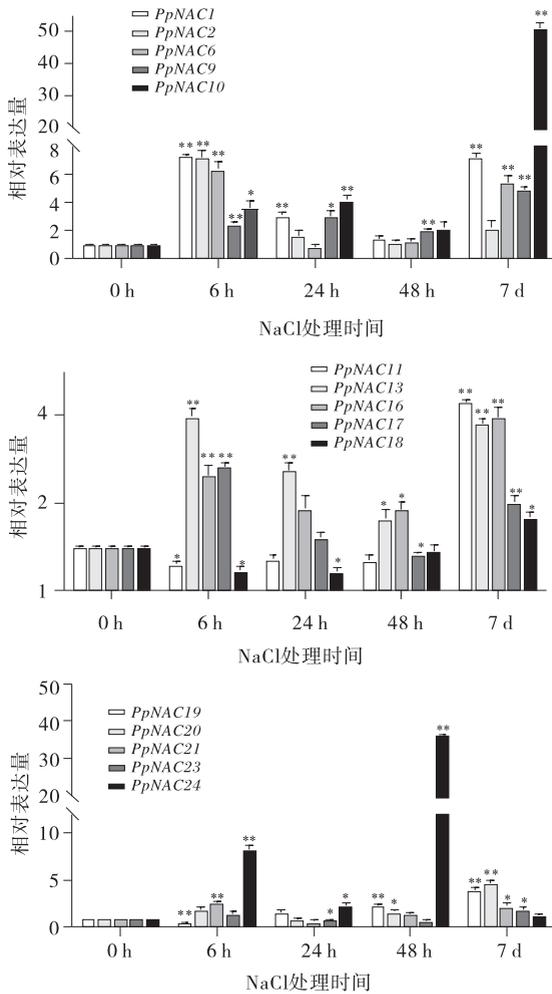


图 3 盐胁迫下 NAC 基因的表达分析

Fig. 3 Relative expression level of NAC genes under salt treatment

2.2.3 干旱胁迫下 NAC 基因的表达 *PpNAC9*、*PpNAC11*、*PpNAC17* 在干旱胁迫 48 h 内变化不大, 在 7 d 时表达量有明显的增大, 响应长期干旱胁迫。 *PpNAC1* 和 *PpNAC13* 在 0~48 h 内呈现先上升后下降趋势, 在 48 h~7 d 呈现上升趋势且在 7 d 时表达

量达到最大, 分别是对照的 94.08 倍和 80.30 倍。在干旱胁迫下 *PpNAC2* 和 *PpNAC24* 在 6 h 时表达量显著增大, 达到最大值, 而其他基因在 7 d 时表达量达到最大值(图 4)。

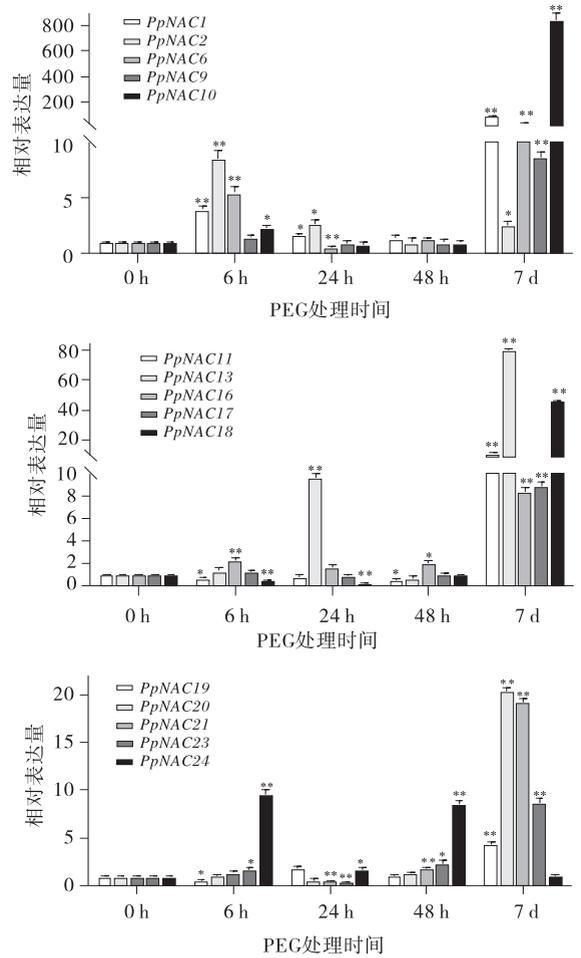


图 4 干旱胁迫下 NAC 基因的表达分析

Fig. 4 Relative expression level of NAC genes under drought treatment

2.2.4 低温胁迫下 NAC 基因的表达 在低温胁迫下, *PpNAC2* 和 *PpNAC13* 在 6 h 表达量显著增大, 24 h 持续增大达到最大值, 48 h 呈现下降趋势, 表达水平受到抑制, 7 d 又出现上升趋势。 *PpNAC1* 和 *PpNAC10* 的表达量呈现先上升后下降的趋势, 在 24 h 达到峰值, 分别是对照的 66.38 倍、98.46 倍。 *PpNAC17* 的表达量随时间的增大表现出上升趋势。 *PpNAC21* 的表达量与对照相比在短期处理时表现出显著增大, 在长期处理时表现出显著减小。低温胁迫下 *PpNAC1*、*PpNAC6*、*PpNAC10*、*PpNAC13*、*PpNAC16*、*PpNAC17* 的表达量均高于对照(图 5)。

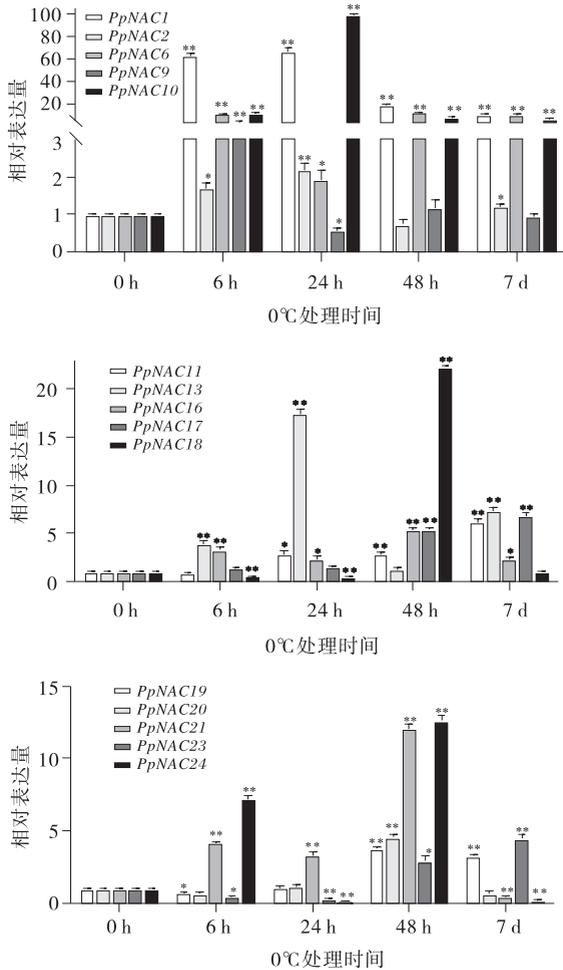


图 5 低温胁迫下 NAC 基因的表达分析

Fig. 5 Relative expression level of NAC genes under low temperature treatment

2.2.5 高温胁迫下 NAC 基因的表达 研究表明,该家族大部分成员在高温 7 d 时的表达水平较高。在高温胁迫下, *PpNAC16* 的表达量均具有显著性变化,表达水平上调。随着高温处理时间的增大, *PpNAC17*、*PpNAC19* 和 *PpNAC20* 的表达持续上调,在 7 d 时处于较高的表达水平,分别是对照的 5.85 倍、5.35 倍和 11.63 倍(图 6)。

3 讨论

在其他高等植物如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、水稻中, NAC 转录因子的功能已被阐明,具有相似结构域的蛋白质具有相同或相似的生物学功能^[30],已有文献报道,构建进化树预测其功能的方法可应用于其他物种^[21],因此,通过对草地早熟禾和二穗短柄草 NAC 基因家族的系统进化树分析,有助于预测同一亚族的 PpNACs 基因的功能。已知的 NAC 基因家族成员参与植物的生长发育和不同胁迫反应,揭示了

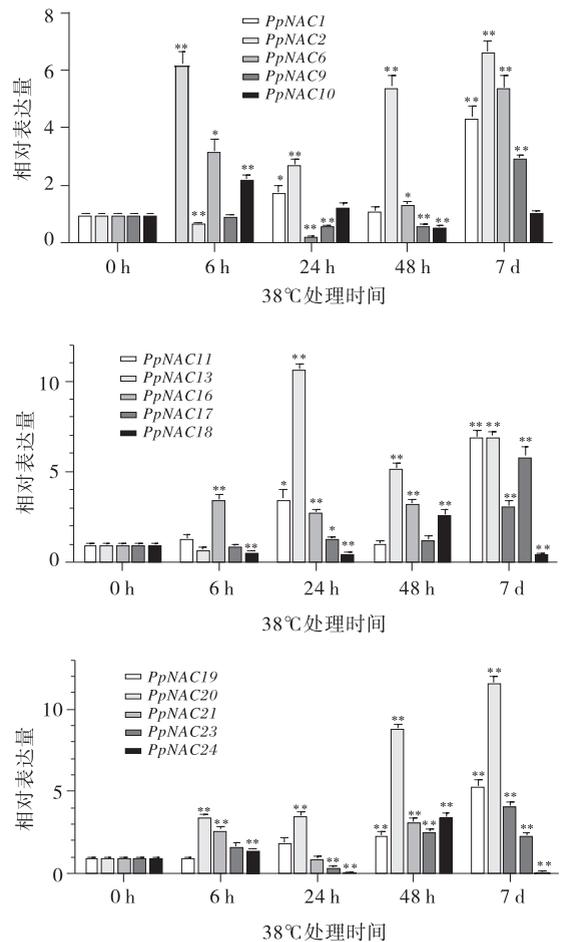


图 6 高温胁迫下 NAC 基因的表达分析

Fig. 6 Relative expression level of NAC genes under high temperature treatment

NAC 基因的序列多样化导致功能的多样化^[31],为草地早熟禾 NAC 基因家族的鉴定提供了坚实的基础。草地早熟禾可用于草坪草的种植和提高城市绿化覆盖率,但耐寒性强,抗旱性较差。NAC 基因家族具有高度保守的结构域,对植物的非生物胁迫应答过程具有重要的作用。本试验从草地早熟禾转录组数据库中鉴定出 15 个全长 cDNA 序列的 NAC 基因。PpNACs 家族成员的等位点在 4.89~5.04,与李伟^[32]克隆所得 PpNACs 基因的等位点为 5.30 相一致,都属于酸性蛋白;与二穗短柄草和水稻 NAC 基因家族成员数目相差较大,可能是在进化过程中出现了丢失,也可能是由于转录组数据库有限而导致 NAC 基因家族成员的不完整性。根据 NAC 基因的保守结构域分析发现, PpNACs 家族基因在 N 端含有基本的 NAC 结构域, NAC 结构包括 N 端的 DNA 结合区和 C 端的转录激活区, N 端大约有 150 个氨基酸残基,分为 A~E 5 个亚结构域, A、C、D 结构域为主要的亲水区, E 结构域

为主要的疏水区,在 PpNACs 转录因子家族成员中都含有 E 结构域,都属于疏水性蛋白。

在重金属胁迫下,PpNACs 基因随着胁迫时间的延长呈现不同的趋势,而在此胁迫过程中 *PpNAC10*、*PpNAC18*、*PpNAC19* 和 *PpNAC24* 为高表达。研究表明,水稻中 NAC 基因参与铜胁迫过程^[33],在西瓜中 NAC 基因家族在缓解镉胁迫中可能具有重要作用^[34],关于 NAC 基因家族在重金属胁迫中的研究很少,初步推测 *PpNAC10*、*PpNAC18*、*PpNAC19* 和 *PpNAC24* 在镉胁迫过程中起到重要作用。PpNACs 基因在盐胁迫下大部分呈现上升下降再上升的趋势,而且在第 7 d 时都表现为上调,*PpNAC10* 和 *PpNAC24* 在盐胁迫过程中表现出高表达量,出现的峰值时间不同,分别在 7 d 和 48 h。研究表明,过表达 *ONAC045* 可提高水稻的耐盐性^[35],在拟南芥中过表达 *CiNAC3* 表现出更强的耐盐性^[36]。因此,*PpNAC10* 和 *PpNAC24* 基因可作为研究草地早熟禾耐盐性的候选基因。在干旱胁迫下,所有 PpNACs 基因在不同的时间响应程度不同,表达量均有不同程度的增加,在第 7 d 时表达量具有显著差异性(除 *PpNAC24* 外),均高于对照。*PpNAC1*、*PpNAC6*、*PpNAC10*、*PpNAC13* 基因在 7 d 表现出高表达量,而在拟南芥中超量表达 NAC 基因可提高其抗旱性^[37]。在干旱胁迫下水稻 *O5NAC095* 基因的表达量增加,通过减少体内水分的丧失提高水稻的抗旱性^[38]。同样在本试验干旱胁迫下所有基因的表达量都有所增加,因此推测这些基因参与草地早熟禾对干旱胁迫的调控,*PpNAC1*、*PpNAC6*、*PpNAC10*、*PpNAC13* 可能在抗旱性方面起到重要作用。

在低温胁迫下,PpNACs 基因具有不同的表达趋势,有的基因在胁迫过程中表现为全部上调,如 *PpNAC1*、*PpNAC6*、*PpNAC10*、*PpNAC16* 和 *PpNAC17*;有的基因在胁迫过程中的表达趋势为先上升后下降再上升,如 *PpNAC2* 和 *PpNAC13*;有的基因则表现为先上升后下降再上升又下降的趋势,如 *PpNAC6*、*PpNAC9*、*PpNAC16*、*PpNAC21* 和 *PpNAC24*。在高温胁迫下,除 *PpNAC20* 外的其他基因表达量的变化在 10 倍以内。PpNACs 基因表达量的变化趋势具有多样性,如 *PpNAC1*、*PpNAC16* 和 *PpNAC20* 在胁迫过程中都表现为上调;*PpNAC16*、*PpNAC23* 和 *PpNAC24* 在胁迫过程中为上升下降上升

下降趋势。由此发现在高低温胁迫下 *PpNAC1* 和 *PpNAC16* 都表现为上调,*PpNAC24* 都呈现“M”趋势,它们在温度胁迫下具有相同的变化趋势,可能是受到相同的分子调控,参与相同的调控路径。在茶树 (*Camellia sinensis*) 中 *CsNAC1* 和 *CsNAC2* 响应温度胁迫并有复杂的调控机制^[39]。本试验表明 PpNACs 基因响应高温和低温胁迫,不同基因响应高低温胁迫程度不同,体现了 PpNACs 基因在温度胁迫下具有复杂的调控性。研究发现,低温胁迫下番茄中 *SlNAMI* 基因的过表达会提高渗透物的含量,降低超氧阴离子的含量,提高植株的抗寒性^[20]。*PpNAC1* 和 *PpNAC10* 在 24 h 表现为高表达量,*PpNAC18* 在 48 h 表现为高表达量,它们可以作为草地早熟禾对低温胁迫下调控的候选基因。研究发现在番茄中抑制 *SlNAC1* 的表达影响热激蛋白的积累,转基因植株的抗性降低,*SlNAC1* 在番茄耐高温中起到正调控作用^[40],本研究中 *PpNAC20* 在高温胁迫下为高表达,它可能在耐高温过程中起到重要作用。

在本试验中同时分析了 PpNACs 基因在重金属、高盐、干旱、高温和低温胁迫下的表达情况,15 个 PpNACs 基因具有不同的表达模式,这些基因参与多种信号传导途径,为确定基因功能提供了重要信息^[41-42]。试验发现 *PpNAC10* 在重金属、高盐、干旱和低温胁迫下为高表达,*PpNAC18* 在重金属、干旱和低温胁迫下为高表达,*PpNAC10* 和 *PpNAC18* 在多种非生物胁迫下表现突出,因此可将 *PpNAC10* 和 *PpNAC18* 作为候选基因进行功能验证。

4 结论

根据二穗短柄草的蛋白序列和草地早熟禾转录组数据,通过生物信息学分析得到 15 个 PpNACs 基因全长 cDNA 序列,具有完整的开放阅读框。15 个 PpNACs 转录因子都是酸性蛋白,除了 *PpNAC16*,其他都属于不稳定蛋白,疏水性蛋白。PpNACs 成员通过聚类分析可分为 3 类,Motif 分析发现大部分 PpNACs 基因家族成员具有 motif 1、2、3、4、5、6、7,具有相似的结构。通过 qRT-PCR 分析草地早熟禾在不同非生物胁迫下的表达水平发现,15 个 PpNACs 基因均能响应不同的非生物胁迫,具有不同的表达模式,与重金属胁迫相关的基因有 *PpNAC10*、*PpNAC18*、*PpNAC19* 和 *PpNAC24*;与耐盐性相关的基因有 *PpNAC10* 和

PpNAC24; 与抗旱性相关的基因有 *PpNAC1*、*PpNAC6*、*PpNAC10* 和 *PpNAC13*; 与耐寒性相关的基因有 *PpNAC1*、*PpNAC10* 和 *PpNAC18*; 与耐高温相关的基因有 *PpNAC20*, 综上发现 *PpNAC10* 和 *PpNAC18* 在多种抗逆过程中起到重要作用, 可作为后续功能验证试验的候选基因。

参考文献:

- [1] ZHU J K. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants[J]. *Cell*, 167(2): 313–324.
- [2] 贾东峰. 苹果 NAC 转录因子调控干旱胁迫响应和矮化性状的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [3] 秦耀旭, 张关元, 刘司奇, 等. 植物重金属胁迫相关 miRNA 的研究进展[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(9): 2855–2861.
- [4] 张强, 刘宁芳, 向佐湘, 等. 盐碱胁迫对草地早熟禾生长和生理代谢的影响[J]. *草业学报*, 2017, 26(12): 67–76.
- [5] 袁慧敏, 王革伏, 樊佳茹, 等. 高温对番茄幼苗生长和花芽分化的影响[J]. *西北植物学报*, 2019, 39(10): 1768–1775.
- [6] 王计平, 史华平, 毛雪, 等. 转录因子网络与植物对环境胁迫的响应[J]. *应用生态学报*, 2006, 17(9): 186–192.
- [7] KHAN S A, LI M Z, WANG S M, *et al.* Revisiting the Role of Plant Transcription Factors in the Battle against Abiotic Stress[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(6): 1634.
- [8] AIDAM. Genes Involved in Organ Separation in Arabidopsis: An Analysis of the cup-shaped cotyledon Mutant [J]. *The Plant Cell*, 1997, 9(6): 841–857.
- [9] 刘旭, 李玲. 植物 NAC 转录因子的研究进展[J]. *生命科学*, 2008, 12(4): 297–302.
- [10] 李圣龙, 王传铭, 李晓静. 石榴 NAC 转录因子家族的生物信息学分析[J/OL]. *分子植物育种*: 1-21 [2019-12-31]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20191207.1812.016.html>.
- [11] 姚丹, 倪晓鹏, 侍婷, 等. 果梅 NAC 基因家族的鉴定及组织表达分析[J]. *核农学报*, 2019, 33(2): 226–239.
- [12] 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.
- [13] 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): 247–248.
- [14] 申玉华, 徐振军, 杨晓坡, 等. 紫花苜蓿 NAC 转录因子 MsNAC1 基因的克隆、生物信息学分析及非生物逆境胁迫下的表达分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2014, 15(6): 1312–1319.
- [15] 段奥其, 冯凯, 刘洁霞, 等. 芹菜 NAC 转录因子基因 AgNAC1 的克隆及其对非生物胁迫的响应[J]. *园艺学报*, 2018, 45(6): 1125–1135.
- [16] 于兴旺. 鹰嘴豆 NAC 转录因子 CarNAC4、CarNAC5 和 CarNAC2 参与逆境胁迫响应的功能分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- [17] 杨选文. 南荻 3 个抗逆相关 NAC 转录因子的功能研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2015.
- [18] YANG Q, ZHANG H P, LIU C, *et al.* A NAC Transcription Factor ZmNAC84 affects Pollen Development Through the Repression of ZmRbohH Expression in Maize[J]. *Journal of Plant Biology*, 2018, 61(6): 366–373.
- [19] TAKASAKI H, MARUYAMA K, KIDOKORO S, *et al.* The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice[J]. *Molecular Genetics Genomics*, 2010, 284(3): 173–183.
- [20] LI X D, ZHUANG K Y, LIU Z M, *et al.* Overexpression of a novel NAC-type tomato transcription factor, SlNAM1, enhances the chilling stress tolerance of transgenic tobacco[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2016, 204: 54–65.
- [21] 李伟, 韩蕾, 巨关升, 等. 草地早熟禾转录因子 PpNAC 的克隆和表达载体的构建[C]// 中国观赏园艺研究进展. 宁夏: 中国园艺学会观赏园艺专业委员会, 国家花卉工程技术研究中心, 2011: 99–104.
- [22] XU C P, HUANG B R. Proteins and Metabolites Regulated by Trinexapac-ethyl in Relation to Drought Tolerance in Kentucky Bluegrass[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2012, 31(1): 25–37.
- [23] ZHU G R, CHEN G X, ZHU J T, *et al.* Molecular Characterization and Expression Profiling of NAC Transcription Factors in *Brachypodium distachyon* L [J]. *Plos One*, 2015, 10(10).
- [24] 鲜靖苹, 王勇, 马晖玲. 外源 NO 缓解草地早熟禾镉胁迫的转录组分析[J]. *草地学报*, 2019, 27(6): 1467–1476.
- [25] 赵春旭, 马祥, 董文科, 等. 低温胁迫下不同青海野生草地早熟禾的转录组比较分析[J]. *草地学报*, 2020, 28(2): 305–318.
- [26] XIAN J P, WANG Y, NIU K J, *et al.* Transcriptional regulation and expression network responding to cadmi-

- um stress in a Cd-tolerant perennial grass *Poa pratensis* [J]. *Chemosphere*, 2020, 250(4):126158.
- [27] NIU K J, MA H L. The positive effects of exogenous 5-aminolevulinic acid on the chlorophyll biosynthesis, photosystem and calvin cycle of Kentucky bluegrass seedlings in response to osmotic stress[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2018(155):260–271.
- [28] BUSHMAN B S, AMUNDSEN K L, WARNKE S E, *et al.* Transcriptome profiling of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) accessions in response to salt stress[J]. *Bio Med Central*, 2016, 17(1):48.
- [29] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR [J]. *Methods*, 2002, 25(4):402–408.
- [30] LIN R M, ZHAO W S, MENG X B, *et al.* Rice gene OsNAC19 encodes a novel NAC-domain transcription factor and responds to infection by *Magnaporthe grisea* [J]. *Plant Science*, 2007, 172(1):120–130.
- [31] PINHEIRO G L, MARQUES C S, COSTA M D, *et al.* Complete inventory of soybean NAC transcription factors; Sequence conservation and expression analysis uncover their distinct roles in stress response[J]. *Gene*, 2009, 444(1–2):1–23.
- [32] 李伟. 草地早熟禾转录因子基因 PpNAC 的克隆和表达分析[D]. 北京:中国林业科学研究院, 2011.
- [33] FANG Y J, YOU J, XIE K B, *et al.* Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific stress responsive genes of NAC transcription factor family in rice [J]. *Molecular Genetics Genomics*, 2008, 280:547–563.
- [34] 王志伟, 李涵, 邹甜, 等. 镉胁迫下西瓜的转录组测序分析[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2018, 44(5):506–513.
- [35] SONG S Y, CHEN Y, CHEN J, *et al.* Physiological mechanisms underlying OsNAC5-dependent tolerance of rice plants to abiotic stress[J]. *Planta*, 2011, 234(2):331–345.
- [36] HAN X M, FENG Z P, XING D D, *et al.* Two NAC transcription factors from *Caragana intermedia* altered salt tolerance of the transgenic *Arabidopsis* [J]. *BMC plant biology*, 2015, 15(1):208.
- [37] WANG J Y, WANG J P, HE Y. A *Populus euphratica* NAC protein regulating Na⁺/K⁺ homeostasis improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Gene*, 2013, 521(2):265–273.
- [38] HUANG L, HONG Y B, ZHANG H J, *et al.* Rice NAC transcription factor ONAC095 plays opposite roles in drought and cold stress tolerance[J]. *Bio Med Central*, 2016, 16(1):203.
- [39] 王永鑫, 刘志薇, 吴致君, 等. 茶树中 2 个 NAC 转录因子基因的克隆及温度胁迫的响应[J]. *西北植物学报*, 2015, 35(11):14–22.
- [40] 梁晓庆. 高温胁迫下番茄 SINAC1 基因的功能分析[D]. 泰安:山东农业大学, 2015.
- [41] LIU T K, SONG X M, DUAN W K, *et al.* Genome-wide analysis and expression patterns of NAC transcription factor family under different developmental stages and abiotic stresses in Chinese cabbage[J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2014, 32:1041–1056.
- [42] PURANIK S, SAHU P P, SRIVASTAVA P S, *et al.* NAC proteins; regulation and role in stress tolerance [J]. *Trends in Plant Science*, 2012, 17(6):369–381.

Identification of NAC gene family and analysis of its expression pattern under abiotic stress in *Poa pratensis*

ZHU Rui-ting, NIU Kui-ju, ZHANG Ran, MA Hui-ling

(College of Pratacultural Science, Gansu Agricultural University, Key Laboratory of Grassland Ecosystem, Ministry of Education, Pratacultural Engineering Laboratory of Gansu Province, Sino-U. S. Centers for Grassland Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China)

Abstract: *Poa pratensis* is a turfgrass species widely used in the world, and the mining of its resistance genes

is of great significance to the genetic breeding of new varieties. The NAC gene family is one of plant-specific transcription factors and plays an important role in plant stress response. In this study, the NAC protein sequence of *Brachypodium distachyon* was used as the request sequence, and the sequence analysis of the *P. pratensis* transcriptome database obtained 15 full-length cDNA sequences of PpNACs gene of *P. pratensis* with complete open reading frame. Using bioinformatics methods to predict the physicochemical properties and conserved domains of the NAC gene family of *P. pratensis*, it was found that the 15 PpNACs genes were all acidic proteins, except *PpNAC16*, which were unstable and hydrophobic protein, which had similar structure. The 15 PpNACs members could be divided into three categories by cluster analysis. Fluorescence quantitative PCR results showed that the genes that were significantly up-regulated under heavy metal stress were *PpNAC10*, *PpNAC18*, *PpNAC19* and *PpNAC24*; the genes that were significantly up-regulated during salt stress were *PpNAC10* and *PpNAC24*; and the genes that were significantly up-regulated under drought stress were *PpNAC1*, *PpNAC6*, *PpNAC10* and *PpNAC13*; the genes significantly up-regulated under low temperature stress were *PpNAC1*, *PpNAC10* and *PpNAC18*; and the genes up-regulated under high temperature stress were *PpNAC20*. Among them, *PpNAC10* was significantly up-regulated under heavy metal, salt, drought and low temperature stress, *PpNAC18* was significantly up-regulated under heavy metal, drought and low temperature stress. Therefore, *PpNAC10* and *PpNAC18* could be used as candidate genes of meadow grass in response to abiotic stress.

Key words: *Poa pratensis*; NAC gene family; abiotic stress; gene expression

《草原与草坪》编辑部网络采编办公系统正式运行

各位作者及审稿专家:

您好! 为提高稿件处理和办公效率,《草原与草坪》编辑部已从 2021 年 7 月开始启用网络采编办公系统。

作者投稿采用新的网络平台(<http://cyycp.ijournals.cn>),请尽量不要使用原电子邮件投稿,特此公告,望作者和审稿专家予以支持与合作。

在使用网络采编办公系统中您有任何疑问、意见和建议,请您电话 0931-7631885 或者发邮件到 cyycp@gsau.edu.cn。

《草原与草坪》编辑部