

王会文, 范军强, 路晓明, 等. 白菜型冬油菜 *NAC* 基因家族鉴定及表达分析[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(5): 1315-1329.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.05.019

白菜型冬油菜 *NAC* 基因家族鉴定及表达分析

王会文^{1,2}, 范军强^{1,2}, 路晓明^{1,2}, 曾 瑞^{1,2}, 武军艳^{1,2}, 刘丽君², 马 骊²,
蒲媛媛^{1,2}, 孙万仓^{1,2}, 李学才^{1,2}

(1. 甘肃农业大学农学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 省部共建干旱生境作物学国家重点实验室, 甘肃 兰州 730070)

摘要: *NAC* (*NAM*, *ATAF1/2*, *CUC2*) 是植物特有的一类转录因子基因家族, 其家族成员在参与响应低温、干旱等非生物胁迫过程发挥重要作用。本研究基于白菜型冬油菜陇油 7 号全基因组测序结果, 共鉴定出 119 个 *NAC* 家族成员, 系统进化结果显示, 所有 *NAC* 转录因子基因聚类为 8 个亚族, 在 10 条染色体上呈不均匀分布; *BraNAC* 蛋白在细胞核、细胞质、叶绿体、线粒体等细胞器中都有分布; 启动子作用元件分析结果显示, *BraNAC* 家族成员广泛参与低温胁迫响应、干旱胁迫响应、机械损伤响应、胚胎发育和内源激素调控等进程; 对 *BraNAC* 基因在低温胁迫下白菜型冬油菜生长锥中的表达预测结果表明, 大部分 *BraNAC* 基因通过上调表达使白菜型冬油菜适应低温环境。在低温和干旱胁迫下, 选择 11 个 *BraNAC* 基因在 2 个耐寒性不同的白菜型冬油菜品种的幼苗中进行表达分析, 发现 *BraNAC* 家族基因受不同逆境胁迫诱导, 并且在不同处理时间与植物不同组织中存在表达特异性。本研究扩展了植物 *NAC* 基因家族成员信息, 为鉴定和筛选抗逆基因提供参考。

关键词: 白菜型冬油菜; *NAC* 转录因子; 家族分析; 非生物胁迫; 表达分析

中图分类号: S565.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)05-1315-15

Identification and expression analysis of *NAC* gene family in *Brassica rapa* L.

WANG Hui-wen^{1,2}, FAN Jun-qiang^{1,2}, LU Xiao-ming^{1,2}, ZENG Rui^{1,2}, WU Jun-yan^{1,2}, LIU Li-jun²,
MA Li², PU Yuan-yuan^{1,2}, SUN Wan-cang^{1,2}, LI Xue-cai^{1,2}

(1. College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. State Key Laboratory of Aridland Crop Science, Lanzhou 730070, China)

Abstract: *NAC* (*NAM*, *ATAF1/2*, *CUC2*) is a plant-specific transcription factor gene family, and its family members play an important role in response to abiotic stresses such as low temperature and drought. In this study, a total of 119 *NAC* family genes were identified based on the whole genome sequencing results of *Brassica rapa* L. Longyou 7. Phylogenetic analysis showed that all *NAC* transcription factor genes were clustered into eight subfamilies and were unevenly distributed on ten chromosomes. The *BraNAC* proteins were located in the nucleus, cytoplasm, chloroplast, mitochondrion and other organelles. The analysis of promoter elements showed that *BraNAC* family members were widely involved in low temperature stress response, drought stress response, mechanical damage response, embryonic development and endogenous hormone regulation. The expression prediction of *BraNAC* genes in the growth cones of *Brassica rapa* L. under low temperature stress showed that most *BraNAC* genes adapted to low temperature environment by up-regulating expression. Under low temperature and drought stress, 11 *BraNAC* genes were selected for expression analysis in the seedlings of two *Brassica rapa* L. varieties with different cold tolerance, and it was

found that the *BraNAC* family genes were induced by different stresses and had tissue and time expression specificity. In this study, the information of plant *NAC* gene family members is expanded, which provides reference for identification and screening of stress resistance genes.

Key words: *Brassica rapa* L.; *NAC* transcription factor; family analysis; abiotic stress; expression analysis

收稿日期: 2022-03-06

基金项目: 甘肃农业大学干旱生境作物学重点实验室主任基金项目
(GSCS-2020-Z1); 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-
12); 国家自然科学基金项目(31860388, 31960435)

作者简介: 王会文(1998-), 男, 甘肃成县人, 硕士研究生, 研究方向
为作物遗传育种。(E-mail) 2569615823@qq.com

通讯作者: 李学才, (E-mail) 348930135@qq.com

气候变化是当今人类面临的重大风险挑战,荒漠化不仅威胁着全球生态环境,而且对各个国家和地区的经济产生重大影响。中国北方大多数地区为干旱半干旱气候,冬季寒冷干燥,这种气候和人类活动的影响更容易使土地荒漠化^[1],21 世纪以来,全球土地荒漠化现象正在日益加剧,在中国北方地区尤其明显。陇油系列白菜型冬油菜可以在寒冷干旱的恶劣环境中正常越冬^[2],拥有丰富的抗逆基因,使油菜的分布范围更加广泛,可以在北纬 48° 的阿勒泰等地区种植^[3]。与此同时,白菜型冬油菜增加了中国北方地区的复种指数,提高了当地土地利用率和粮油产量^[4],使油菜不仅可以作为传统的油料作物,还可以作为冬季覆盖作物。在北方干旱寒冷区域大面积种植冬油菜可以增加土壤覆盖率,同时有效防止土地沙漠化,减少沙尘天气^[5],对改善生态环境具有重要作用。随着生物信息学的不断发展和对白菜型冬油菜基因组测序的完成,挖掘白菜型冬油菜中储存的基因信息,以阐明植物生长发育机制、各种逆境胁迫机理,并利用其丰富的抗逆基因增强作物抵御环境胁迫的能力,为今后培育适应性更强的品种提供理论依据。

植物在长期适应外界多变的环境过程中,自身形成了响应逆境胁迫的防御体系,其本质就是通过内部的基因表达,使植物在复杂的环境中调节体内生化代谢途径和生长发育进程来适应外界环境变化^[6]。转录因子作为蛋白质,可以与目的基因启动子或增强子的区域相互作用来调控基因的表达^[7],从而发挥其生物学功能。*NAC*(*NAM*, *ATAF1/2*, *CUC2*) 是植物特有的最大的转录因子基因家族之一,*NAC* 蛋白结构由高度保守的 N 端和可变的 C 端(TR)组成,N 端分为 A、B、C、D、E 5 个亚结构域^[8],不同亚结构域发挥着不同的作用。其中,C、D 高度保守,负责与目标靶基因的 DNA 序列识别并结合,B、E 则保守性较弱,和 C 端功能相似,一起促成其功能的多样性;亚结构域 A 可以形成二聚体,和 DNA 结合有关^[9]。*NAC* 转录因子蛋白通常与植物细胞内膜结合在一起,当植物受到外界不利环境信号刺激后,与 *NAC* 转录因子蛋白结合的受控蛋白被水解,然后 *NAC* 蛋白进入细胞核^[10]。*NAC* 蛋白结构域 N 端的亚结构域可形成二聚体,与 DNA 结合形成稳定的结构,调控靶基因启动子区基因的表达^[9]。*NAC* 转录因子的这种调节方式可以使植物迅速对外界环境作出反应,有利于为植物的生长发育创造良好的内部环境。*NAC* 家族成员广泛分布在植物中,成员多达 100

个以上^[11-13]。*NAC* 蛋白结构域 C 端具有高度可变的转录调控区,在不同的条件下具有不同的转录特性,从而激活或抑制不同的转录过程^[14],为其参与调控植物的生长发育、器官衰老、果实成熟、各种非生物胁迫防御等提供条件^[15]。

在番茄中,*NAC* 转录因子基因 *SINAMI* 与合成乙烯的 2 个关键基因 *SLACS2* 和 *SLACS4* 的启动子结合并激活其表达^[16],促进了乙烯的合成,而 *SINAMI* 突变体则延迟番茄的成熟;*PdeNAC* 是赤松纤维素合成酶合成的关键基因,促进了赤松次生细胞壁的形成和管胞分化,增加了烟草和拟南芥次生细胞壁的沉积^[17];拟南芥转录因子基因 *NAC103* 在种子萌发和幼苗生长过程中被上调^[18],其编码蛋白质对脱落酸敏感,并正向调节多个脱落酸(ABA)应答下游基因,提高了拟南芥种子的发芽率。在调控植株衰老过程中,*ANAC087* 和 *ANAC046* 具有协同作用,通过控制拟南芥根冠程序性死亡来促进植株的衰老,*ANAC087* 通过核酸酶 *BFN1* 降解根部细胞的染色质^[19],*ANAC046* 通过内含子顺式作用元件和相关蛋白质的修饰主动调控细胞程序性死亡。马铃薯 *StNAC053* 基因在拟南芥中过量表达,上调相关基因,增强了超氧化物歧化酶(*SOD*)、过氧化氢酶(*CAT*)和过氧化物酶(*POD*)的活性,增加了转基因拟南芥对干旱的耐受力^[20];最近研究发现,辣椒 *CaNAC55* 基因的表达受 ABA 的抑制^[21],而在水稻中,*NAC* 转录因子 *ONAC066* 能抑制合成脱落酸基因的表达,积累更高的可溶性糖、氨基酸含量,提高水稻对稻瘟病和白叶枯病的抗性^[22],表明 *NAC* 家族基因与 ABA 代谢基因具有拮抗作用,并且 *NAC* 家族基因在生物胁迫中也发挥作用。迄今为止,白菜型冬油菜 *NAC* 转录因子家族在白菜型冬油菜中还未见报道。

本研究拟利用白菜型冬油菜基因组测序数据和生物信息学手段挖掘并分析白菜型冬油菜 *NAC* 基因家族成员的基本信息、系统进化、共线性复制关系,通过对 2 个不同品种白菜型冬油菜在低温胁迫下生长锥中 *BraNAC* 家族基因表达量的预测,并应用实时荧光定量 PCR 技术对 2 个耐旱性、抗寒性不同的白菜型冬油菜幼苗中候选 *BraNAC* 基因的表达量进行检测,然后筛选抗逆基因,以期后续全面解析白菜型冬油菜 *NAC* 基因家族成员对多种逆境胁迫响应的机制奠定基础,同时,一些 *BraNAC* 成员可以作为候选基因,为增强油菜的耐旱性和抗寒性提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用的白菜型冬油菜试验材料陇油 7 号和 Lenox 由甘肃农业大学油菜课题组提供。陇油 7 号和 Lenox 均为白菜型冬油菜,其中,陇油 7 号具有强抗寒性和抗旱性,而 Lenox 的抗寒性和抗旱性较弱。

1.2 试验设计

试验在 2021 年 3 月至 10 月进行,将陇油 7 号和 Lenox 种子种植在花盆中,每盆 4 株,使种子在室外自然条件下生长,待植株长到 5~6 叶期,分别对 2 种材料进行胁迫处理。低温处理,将植株移入 4 ℃ 低温培养箱(光照 14 h,黑暗 10 h),同时对同一批次的幼苗进行干旱胁迫处理(18%聚乙二醇),处理后 0 h(CK)、1 h、4 h、6 h、12 h、24 h、48 h 收集幼苗的根和叶,立即放入液氮中速冻,之后保存于-80 ℃ 冰箱中备用,每个处理 3 次生物学重复。

1.3 白菜型冬油菜 NAC 家族成员的生物信息学分析

1.3.1 白菜型冬油菜全基因组的鉴定 白菜型冬油菜陇油 7 号基因组序列文件由甘肃农业大学油菜课题组提供;用 Pfam 数据库(<http://pfam.xfam.org>)下载 NAM 隐马尔可夫结构模型 PF02365,使用 HMMER 搜索可能存在的 NAC 转录因子家族序列,并除去冗余。利用在线软件 SMART(<https://www.omicsclass.com/article/681>)和 NCBI CDD(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)对已获取的 NAC 蛋白进行结构域预测,最终得到含有保守 BraNAC 结构域的基因序列。同时,使用在线软件 ExPASy(<http://web.expasy.org/protparam/>)对所有家族成员氨基酸序列的氨基酸数量、相对分子质量、等电点、亲水性、脂肪指数等进行预测。利用 Plant-mPLoc(<https://www.omicsclass.com/article/1438>)预测 NAC 家族蛋白质的亚细胞定位。

1.3.2 NAC 基因家族系统进化树 基于已有候选基因家族蛋白质氨基酸序列全长,利用相邻接(Neighbor-joining)法在 MEGA7 软件中构建进化树,参数为默认值。

1.3.3 NAC 基因的染色体定位、共线性关系和启动子顺式作用元件分析 用所得 NAC 家族信息绘制基因在染色体上的位置图,同时用 TBtools 绘制共线性图;提取白菜型冬油菜候选 BraNAC 基因上游 1 500 bp 启动子序列,利用 PlantCARE([\[bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/\]\(http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/\)\)数据库分析顺式作用元件,并绘制相关图表。](http://</p></div><div data-bbox=)

1.3.4 白菜型冬油菜 NAC 基因结构及保守模型分析 利用已有白菜型冬油菜 NAC 基因家族 DNA 和蛋白质编码区(CDS)序列,使用 GSDS(<http://gsds.gao-lab.org/>)绘制内含子-外显子结构图;根据 NAC 基因 ID 从基因组注释文件中提取注释信息,搜索获得的家族成员的蛋白质结构域,利用 MEME 在线软件(<http://meme-suite.org>)分析 BraNAC 家族的保守基序,参数设置为在有序列中最多找到 15 个、motif 长度为 6~50 个氨基酸。使用 TBtools 软件绘制基因结构和保守模型图。

1.3.5 低温胁迫下 BraNAC 家族的表达预测 利用白菜型冬油菜陇油 7 号和 Lenox 的生长锥中 BraNAC 基因在冷胁迫时的表达数据,筛选出 BraNAC 家族基因的表达量,使用 TBtools 软件绘制热图。

1.3.6 RNA 提取及荧光定量 PCR 样品使用天根生化科技(北京)有限公司 RNAPrep pure Plant Kit 植物总 RNA 提取试剂盒提取 RNA,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 条带,利用 PrimeScript RTreagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司产品]进行反转录,得到单链 cDNA,置于-20 ℃ 冰箱保存备用。利用实时荧光定量 PCR 技术检测 BraNAC 基因的表达情况,所用引物见表 1。各个样品检测重复 3 次,所得的数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算分析,以 Actin 内参基因作为对照。利用 TBtools 软件绘制表达热图。

2 结果与分析

2.1 白菜型冬油菜家族成员的鉴定

利用生物信息学分析方法从白菜型冬油菜全基因组中进行 BLAST 比对,除去冗余,通过结构域确认,最终得到 119 个 NAC 家族成员,根据 *E-value* 值从小到大的顺序,依次命名为 BraNAC001~BraNAC119(表 2)。BraNAC 家族蛋白的相对分子质量、氨基酸数、脂肪指数等分析结果显示,BraNAC 家族基因编码的氨基酸数量差异明显,最多的是 BraNAC027,可编码 658 个氨基酸,最少的是 BraNAC036,仅编码 142 个氨基酸;脂肪指数为 43.68~84.04,表明脂肪链在蛋白质氨基酸序列中所占比重较高,蛋白质均为脂溶性蛋白质;等电点最小的是 BraNAC023 编码的蛋白质(4.47),最大的是 BraNAC083 编码的蛋白质(9.54),既有酸性氨基酸,又有

碱性氨基酸;亲水性指数为-6.060~-0.280,为亲水性蛋白质;相对分子质量为16 529.18~71 967.59;亚细胞定位预测结果表明,BraNAC 家族蛋白质成员在细胞中分布广泛,大部分分布在细胞核、细胞质和叶绿体中,BraNAC006、BraNAC015、BraNAC021、BraNAC067、Bra-

NAC083 定位在线粒体中,BraNAC050、BraNAC108 定位在质膜上,BraNAC119 定位在高尔基体中。在液泡、过氧化物体和细胞骨架中都发现了 BraNAC 家族蛋白,表明白菜型冬油菜 NAC 转录因子家族成员可能在不同亚细胞结构中具有不同的功能。

表 1 实时荧光定量 RT-qPCR 引物序列

Table 1 Sequences of primers used for RT-qPCR analysis

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
<i>BraNAC097</i>	GCCTTGAAGACCAGACGACGAAC	TTCCCCTTGAGAATTGTCTCTGAGC
<i>BraNAC082</i>	GAGGTGAGACAGGAGACTGAGGTTC	GAGCAGCCGGAGGAGTAGATGG
<i>BraNAC072</i>	CGGCCGTTGGAGACTGTCTTGAC	CGGTTAAATGCTACGAGGTCTCTGTC
<i>BraNAC068</i>	AGACTGGGTCCTGTCTAGAGTGTTC	TGGAGGAAGAGAAGCGGAGACTG
<i>BraNAC066</i>	GTGTCCTCCTCCTCCTCCGTTAC	CTGGTGGCAGCAGCAGATGATG
<i>BraNAC035</i>	CCCGACGTGCAAGAGGATGAC	CCCATTTAGGCTCGCTCTGAACC
<i>BraNAC034</i>	AAACCGCTGGAGGCAAGAAGATAC	GTTGGAGAAGCAGGGCAGCTAAG
<i>BraNAC027</i>	CTTCTTCTTCTGCTGCTCTCTG	CTGCCACTGCTACCATCACAACC
<i>BraNAC015</i>	TGACGAAGACGACAACAAGAGTGC	GAAGACGCTGAAGCAGAACAACAAC
<i>BraNAC117</i>	AGTCCGAGCTTATCACCGAGTCTAG	AGGGCATTAGGGTTTGTGGATGTG
<i>BraNAC012</i>	CTTCTTCTTCTGCTGCTCTCTG	CTGCCACTGCTACCATCACAACC
<i>Actin</i>	AGTCCGAGCTTATCACCGAGTCTAG	AGGGCATTAGGGTTTGTGGATGTG

表 2 BraNAC 基因编码的蛋白质理化性质

Table 2 Physical and chemical properties of protein encoded by BraNAC gene

基因	基因 ID	编码的蛋白质性质					
		氨基酸数	相对分子质量	等电点	亲水性指数	脂肪指数	亚细胞定位
<i>BraNAC001</i>	Brapa05T000333	279	32 226.15	8.18	-0.778	65.59	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC002</i>	Brapa05T001143	252	29 136.97	9.09	-0.871	60.67	细胞核、细胞质
<i>BraNAC003</i>	Brapa05T002931	333	38 933.20	7.13	-0.720	63.27	细胞核
<i>BraNAC004</i>	Brapa05T003848	343	38 303.14	6.18	-0.523	68.19	细胞核、质膜
<i>BraNAC005</i>	Brapa05T003847	301	34 544.90	7.14	-0.733	70.60	细胞核、细胞质
<i>BraNAC006</i>	Brapa05T003383	456	51 355.42	5.69	-0.780	70.00	叶绿体、线粒体
<i>BraNAC007</i>	Brapa05T003173	274	31 405.26	8.96	-0.831	62.59	细胞核
<i>BraNAC008</i>	Brapa05T003180	327	37 787.17	6.23	-0.835	61.38	细胞核、液泡
<i>BraNAC009</i>	Brapa05T002929	351	38 609.47	7.12	-0.630	59.74	细胞核
<i>BraNAC010</i>	Brapa05T002038	578	64 816.15	4.99	-0.529	66.82	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC011</i>	Brapa05T002035	546	61 128.18	4.86	-0.566	64.80	叶绿体、细胞核
<i>BraNAC012</i>	Brapa05T002092	636	71 884.31	5.96	-0.705	63.29	细胞核、液泡
<i>BraNAC013</i>	Brapa05T002762	245	28 034.19	4.89	-0.751	57.71	细胞核
<i>BraNAC014</i>	Brapa05T002692	307	34 881.15	6.26	-0.716	58.47	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC015</i>	Brapa04T002582	256	39 262.06	8.29	-0.774	61.29	细胞核、线粒体
<i>BraNAC016</i>	Brapa04T001966	317	35 838.04	8.34	-0.743	60.28	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC017</i>	Brapa04T003186	277	32 046.00	8.20	-0.793	67.51	过氧化物体、细胞质
<i>BraNAC018</i>	Brapa04T001340	289	33 069.48	6.08	-0.556	69.48	细胞核、细胞质
<i>BraNAC019</i>	Brapa10T000683	329	37 615.22	5.58	-0.798	71.95	细胞质、细胞核
<i>BraNAC020</i>	Brapa10T001095	496	56 839.18	5.50	-0.717	66.79	细胞核、细胞质
<i>BraNAC021</i>	Brapa10T000532	278	31 645.60	5.91	-0.724	55.86	细胞核、线粒体
<i>BraNAC022</i>	<i>Brapa10T000541</i>	433	47 840.34	4.68	-0.482	73.44	细胞核、细胞质
<i>BraNAC023</i>	Brapa10T000184	554	62 069.80	4.47	-0.605	68.61	叶绿体、液泡
<i>BraNAC024</i>	Brapa10T000812	276	31 236.33	9.27	-0.634	66.01	叶绿体、细胞外基质

续表2 Continued2

基因	基因 ID	编码的蛋白质性质					
		氨基酸数	相对分子质量	等电点	亲水性指数	脂肪指数	亚细胞定位
<i>BraNAC025</i>	Brapa10T001452	340	38 441.02	6.04	-0.335	78.21	细胞质、细胞核
<i>BraNAC026</i>	Brapa10T001175	336	38 275.38	6.27	-0.632	60.62	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC027</i>	Brapa10T003048	658	69 438.43	4.90	-0.813	43.68	细胞核、细胞质
<i>BraNAC028</i>	Brapa10T003049	644	71 967.59	4.94	-0.765	54.86	细胞核、细胞质
<i>BraNAC029</i>	Brapa10T003051	566	64 741.94	6.88	-0.916	57.17	细胞核
<i>BraNAC030</i>	Brapa10T003050	456	50 876.70	5.37	-0.651	63.66	过氧化物体、细胞核
<i>BraNAC031</i>	Brapa10T003114	285	32 254.72	6.91	-0.617	61.58	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC032</i>	Brapa02T001748	546	61 866.03	6.01	-0.686	66.04	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC033</i>	Brapa02T001475	170	19 835.71	9.39	-6.060	67.71	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC034</i>	Brapa02T000251	314	35 663.27	8.85	-0.693	62.07	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC035</i>	Brapa02T000293	278	31 593.48	5.46	-0.712	54.82	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC036</i>	Brapa02T000298	142	16 529.18	9.47	-0.613	74.08	细胞质、细胞核
<i>BraNAC037</i>	Brapa02T000471	247	28 061.57	9.18	-0.741	63.89	细胞核、细胞质
<i>BraNAC038</i>	Brapa02T002483	260	29 621.95	9.11	-0.506	73.88	叶绿体、细胞质
<i>BraNAC039</i>	Brapa02T000139	551	61 396.23	4.68	-0.519	70.94	叶绿体、液泡
<i>BraNAC040</i>	Brapa02T002626	349	40 278.41	6.99	-1.005	55.85	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC041</i>	Brapa02T000773	336	38 296.33	6.47	-0.650	59.70	细胞核、细胞质
<i>BraNAC042</i>	Brapa02T003698	376	42 862.43	5.97	-0.872	64.10	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC043</i>	Brapa02T003428	294	33 814.72	5.53	-0.670	59.97	细胞核、细胞质
<i>BraNAC044</i>	Brapa02T004527	364	41 774.82	5.23	-0.944	52.75	细胞核、过氧化物体
<i>BraNAC045</i>	Brapa02T004593	265	30 331.34	8.15	-0.602	60.38	细胞核、细胞质
<i>BraNAC046</i>	Brapa02T004480	325	37 140.06	8.17	-0.637	64.80	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC047</i>	Brapa03T002266	272	31 445.46	8.43	-0.711	65.88	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC048</i>	Brapa03T000829	336	37 943.85	6.10	-0.595	60.30	细胞核
<i>BraNAC049</i>	Brapa03T000382	280	31 859.98	6.46	-0.670	59.64	叶绿体、细胞核
<i>BraNAC050</i>	Brapa03T000385	587	66 249.33	5.65	-0.280	84.04	质膜、细胞核
<i>BraNAC051</i>	Brapa03T001012	392	44 224.43	5.25	-0.352	78.80	叶绿体、液泡
<i>BraNAC052</i>	Brapa03T004408	281	32 308.11	8.23	-0.584	69.00	细胞核、细胞骨架
<i>BraNAC053</i>	Brapa03T000164	560	62 366.84	4.50	-0.644	67.20	液泡、叶绿体
<i>BraNAC054</i>	Brapa03T004843	286	32 888.06	6.89	-0.644	61.71	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC055</i>	Brapa03T000564	248	28 245.73	9.36	-0.842	64.03	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC056</i>	Brapa03T000775	490	56 259.68	5.20	-0.740	67.67	细胞质、细胞核
<i>BraNAC057</i>	Brapa03T005522	351	40 254.11	5.85	-0.714	68.63	细胞质、细胞核
<i>BraNAC058</i>	Brapa03T005428	297	33 395.31	7.73	-0.629	64.38	细胞核、细胞外基质
<i>BraNAC059</i>	Brapa03T004486	327	37 181.11	8.15	-0.652	63.52	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC060</i>	Brapa03T003728	308	34 136.59	6.95	-0.386	60.23	细胞核、细胞质
<i>BraNAC061</i>	Brapa03T003739	295	33 554.64	8.56	-0.677	63.39	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC062</i>	Brapa03T003603	293	33 836.33	9.31	-0.782	64.13	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC063</i>	Brapa03T003598	303	34 929.35	8.89	-0.815	63.04	细胞核、细胞质
<i>BraNAC064</i>	Brapa03T006051	370	42 892.10	5.76	-0.870	58.73	细胞核、细胞质
<i>BraNAC065</i>	Brapa03T003867	299	34 033.03	6.25	-0.764	57.73	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC066</i>	Brapa03T003474	421	47 580.32	5.63	-0.795	68.86	细胞核、细胞质
<i>BraNAC067</i>	Brapa03T003473	431	48 451.30	5.84	-0.746	70.42	叶绿体、线粒体
<i>BraNAC068</i>	Brapa08T000019	321	36 004.51	5.35	-0.560	67.73	细胞核、细胞外基质
<i>BraNAC069</i>	Brapa08T000818	537	60 045.03	4.78	-0.486	68.25	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC070</i>	Brapa08T003167	388	45 189.94	5.91	-0.957	60.62	过氧化物体、细胞核
<i>BraNAC071</i>	Brapa08T000870	286	32 945.86	5.71	-0.640	61.68	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC072</i>	Brapa06T000169	372	41 885.03	8.72	-0.759	60.30	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC073</i>	Brapa06T000168	315	35 408.36	5.85	-0.582	63.43	细胞核、细胞质

续表2 Continued2

基因	基因 ID	编码的蛋白质性质					
		氨基酸数	相对分子质量	等电点	亲水性指数	脂肪指数	亚细胞定位
<i>BraNAC074</i>	Brapa06T001731	464	51 345.70	5.71	-0.417	80.06	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC075</i>	Brapa06T000913	393	45 328.19	5.49	-0.873	67.76	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC076</i>	Brapa06T003261	309	34 924.60	5.57	-0.427	76.31	细胞骨架、细胞核
<i>BraNAC077</i>	Brapa06T002813	457	50 782.23	5.51	-0.466	70.98	细胞质、细胞核
<i>BraNAC078</i>	Brapa06T002221	347	39 900.31	5.26	-0.838	54.73	细胞核、细胞质
<i>BraNAC079</i>	Brapa06T003797	290	33 340.05	5.41	-0.723	59.10	细胞核、细胞质
<i>BraNAC080</i>	Brapa06T003594	416	47 193.86	5.85	-0.867	63.80	细胞核
<i>BraNAC081</i>	Brapa06T002359	250	28 713.50	6.45	-0.627	61.24	细胞核、细胞质
<i>BraNAC082</i>	Brapa06T002387	344	38 640.16	4.81	-0.552	75.32	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC083</i>	Brapa01T000927	241	27 769.92	9.54	-0.528	65.93	细胞核、线粒体
<i>BraNAC084</i>	Brapa01T000865	344	39 313.65	5.44	-0.787	62.94	细胞核、细胞质
<i>BraNAC085</i>	Brapa01T000241	371	42 877.04	5.87	-0.838	65.42	细胞核、细胞质
<i>BraNAC086</i>	Brapa01T004433	480	55 453.65	5.36	-0.711	65.58	细胞核、细胞质
<i>BraNAC087</i>	Brapa01T003893	307	25 591.96	8.63	-0.807	62.83	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC088</i>	Brapa01T004377	345	38 426.93	6.15	-0.607	60.75	细胞核、细胞质
<i>BraNAC089</i>	Brapa01T004376	357	40 824.68	6.39	-0.730	72.41	细胞核、细胞质
<i>BraNAC090</i>	Brapa01T004069	538	60 794.91	4.49	-0.677	64.07	叶绿体、细胞核
<i>BraNAC091</i>	Brapa01T004070	441	49 920.03	5.70	-0.809	70.79	细胞质、细胞核
<i>BraNAC092</i>	Brapa01T004071	421	47 733.62	5.63	-0.738	71.62	叶绿体、细胞质
<i>BraNAC093</i>	Brapa01T004507	293	33 137.39	6.27	-0.551	70.82	细胞核、细胞质
<i>BraNAC094</i>	Brapa01T003702	351	38 603.46	8.14	-0.612	58.58	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC095</i>	Brapa01T003706	363	41 575.45	8.72	-0.825	58.04	细胞核、液泡
<i>BraNAC096</i>	Brapa01T003484	300	34 165.25	6.01	-0.762	60.43	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC097</i>	Brapa01T001779	300	33 776.94	7.66	-0.585	64.07	细胞核、细胞骨架
<i>BraNAC098</i>	Brapa01T003731	303	33 965.54	6.97	-0.389	67.29	细胞核、细胞骨架
<i>BraNAC099</i>	Brapa09T000547	340	39 550.98	5.97	-0.894	60.53	过氧化物体、细胞核
<i>BraNAC100</i>	Brapa09T003496	564	62 569.59	4.63	-0.459	66.88	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC101</i>	Brapa09T001251	317	35 736.00	8.77	-0.715	61.83	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC102</i>	Brapa09T000060	224	25 391.19	6.32	-0.797	56.07	细胞核、质膜
<i>BraNAC103</i>	Brapa09T005076	402	46 472.23	6.13	-0.964	58.73	细胞核、过氧化物体
<i>BraNAC104</i>	Brapa09T006237	328	37 328.35	6.02	-0.545	66.89	细胞骨架、细胞核
<i>BraNAC105</i>	Brapa09T005528	279	32 124.74	8.96	-0.677	70.90	细胞核、细胞核
<i>BraNAC106</i>	Brapa09T002733	416	47 322.93	6.25	-0.634	61.18	细胞核、液泡
<i>BraNAC107</i>	Brapa09T005876	332	38 448.26	5.15	-1.010	54.88	细胞核、过氧化物体
<i>BraNAC108</i>	Brapa09T005998	449	50 579.08	6.00	-0.540	68.78	细胞核、质膜
<i>BraNAC109</i>	Brapa07T000264	361	41 997.96	5.51	-0.818	64.52	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC110</i>	Brapa07T000396	285	32 718.74	9.34	-0.629	74.56	细胞质、细胞核
<i>BraNAC111</i>	Brapa07T001628	509	56 793.95	5.31	-0.663	69.86	细胞核、细胞质
<i>BraNAC112</i>	Brapa07T001918	293	33 904.28	5.86	-0.732	68.91	细胞核、细胞质
<i>BraNAC113</i>	Brapa07T002150	288	33 222.45	5.63	-0.643	61.94	细胞核、细胞质
<i>BraNAC114</i>	Brapa07T002156	335	38 211.63	7.73	-0.690	59.97	细胞核
<i>BraNAC115</i>	Brapa07T003651	270	31 282.61	6.40	-0.672	65.70	细胞质、细胞核
<i>BraNAC116</i>	Brapa07T003238	271	31 367.66	6.21	-0.628	67.64	细胞核、细胞质
<i>BraNAC117</i>	Brapa07T003857	324	37 319.37	5.95	-0.843	57.47	细胞核、叶绿体
<i>BraNAC118</i>	Brapa07T002504	312	36 238.85	5.72	-0.801	59.10	细胞核、质膜
<i>BraNAC119</i>	Brapa07T001964	343	38 933.52	5.58	-0.657	69.94	细胞质、高尔基体

2.2 *BraNAC* 家族基因系统进化分析

由图 1 可知,119 个白菜型冬油菜 *NAC* 家族成员被分为 8 个亚族。各亚族基因数目不一,第Ⅷ亚家族成员最少,仅包括 5 个基因,分支也较少,说明第Ⅷ亚家族基因同源性强;第Ⅵ和第Ⅰ亚家族数目最多,各包括 25 个家族成员,第Ⅰ亚家族分支数比第Ⅵ亚家族多,说明第Ⅰ亚家族的结构较为多样;

BraNAC040 在亚家族Ⅱ中的一级分支上,该基因可能行使亚家族Ⅱ的最基本功能;并且各个亚家族之间各级分支数、各分支基因数目不相同,表明每一个亚家族在同源结构域相同的情况下,还存在一些短的特异序列,这些序列可能为 *BraNAC* 家族功能多样性奠定结构基础。

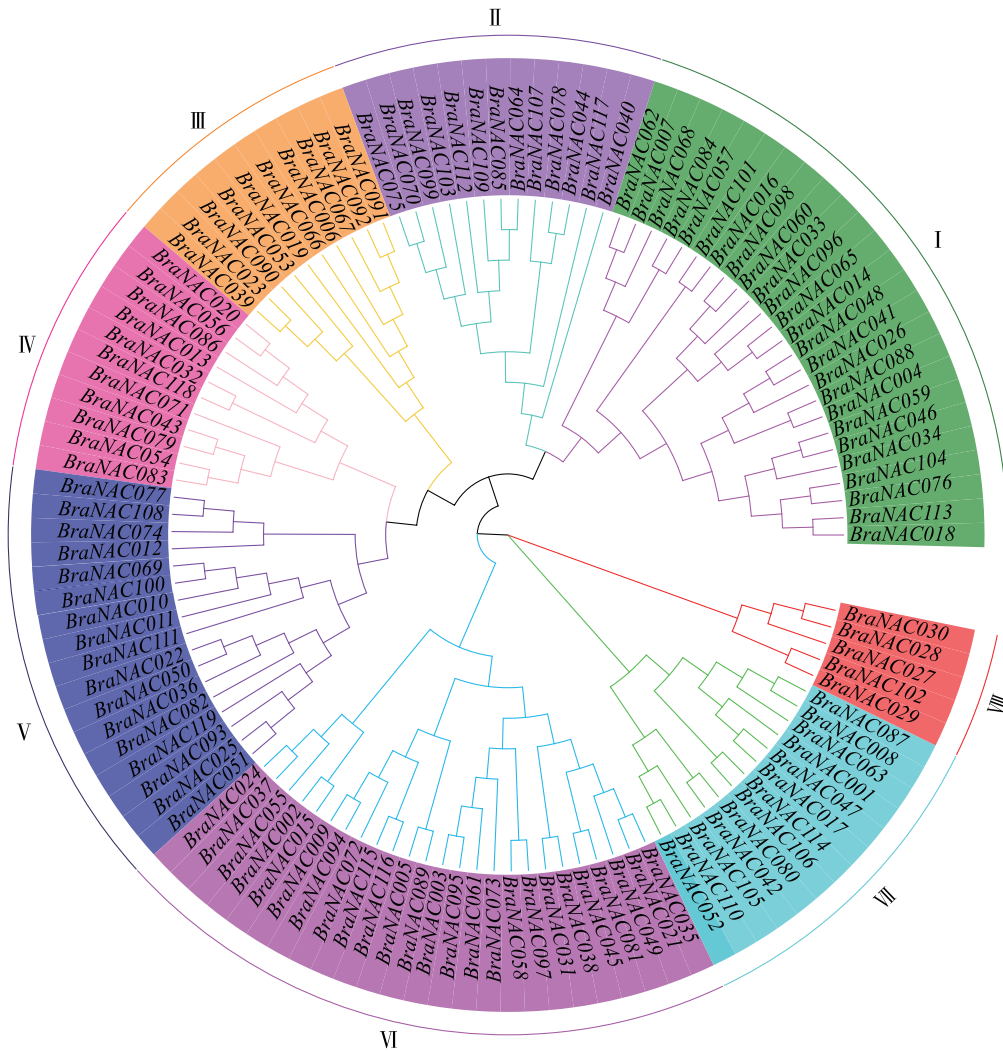


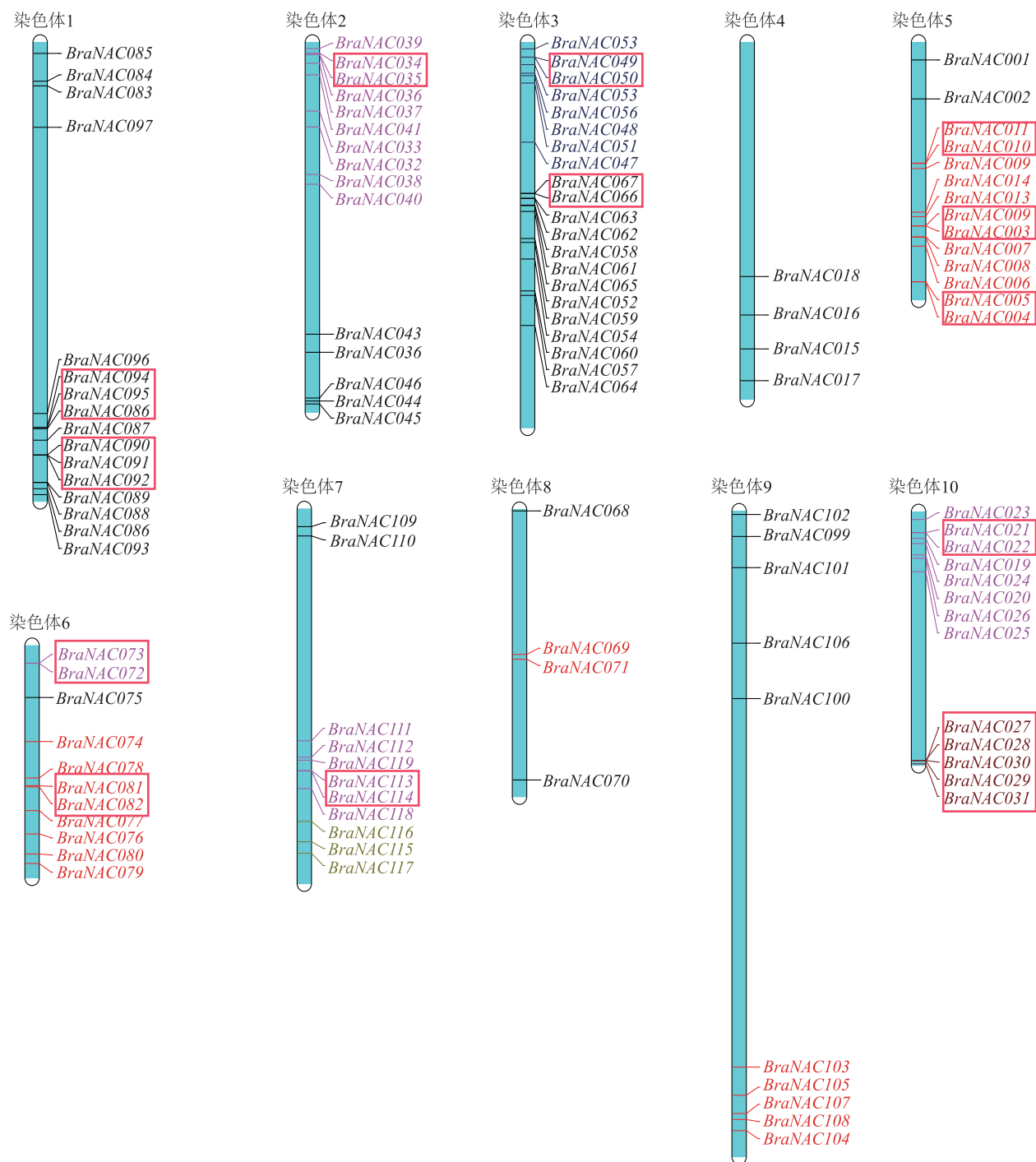
图 1 *BraNAC* 基因家族系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of *BraNAC* gene family

2.3 *BraNAC* 基因家族染色体定位

由图 2 可以看出,*BraNAC* 家族基因在 10 条染色体上都有分布,且在每条染色体上的数目各不相同。其中,3 号染色体上分布的 *BraNAC* 基因数最多,有 21 个;在 4 号和 8 号染色体上分布的 *BraNAC* 基因数最

少,各有 4 个;9 号染色体最长,含有 10 个 *BraNAC* 家族成员。在 1 号、2 号、3 号、5 号、6 号、7 号、10 号染色体上含有较多 *BraNAC* 基因,距离较近。有 31 个 (占比:26.05%) 基因形成了 13 个串联基因簇,表明串联重复在 *BraNAC* 家族的扩展中发挥着重要作用。



矩形表示串联重复基因。

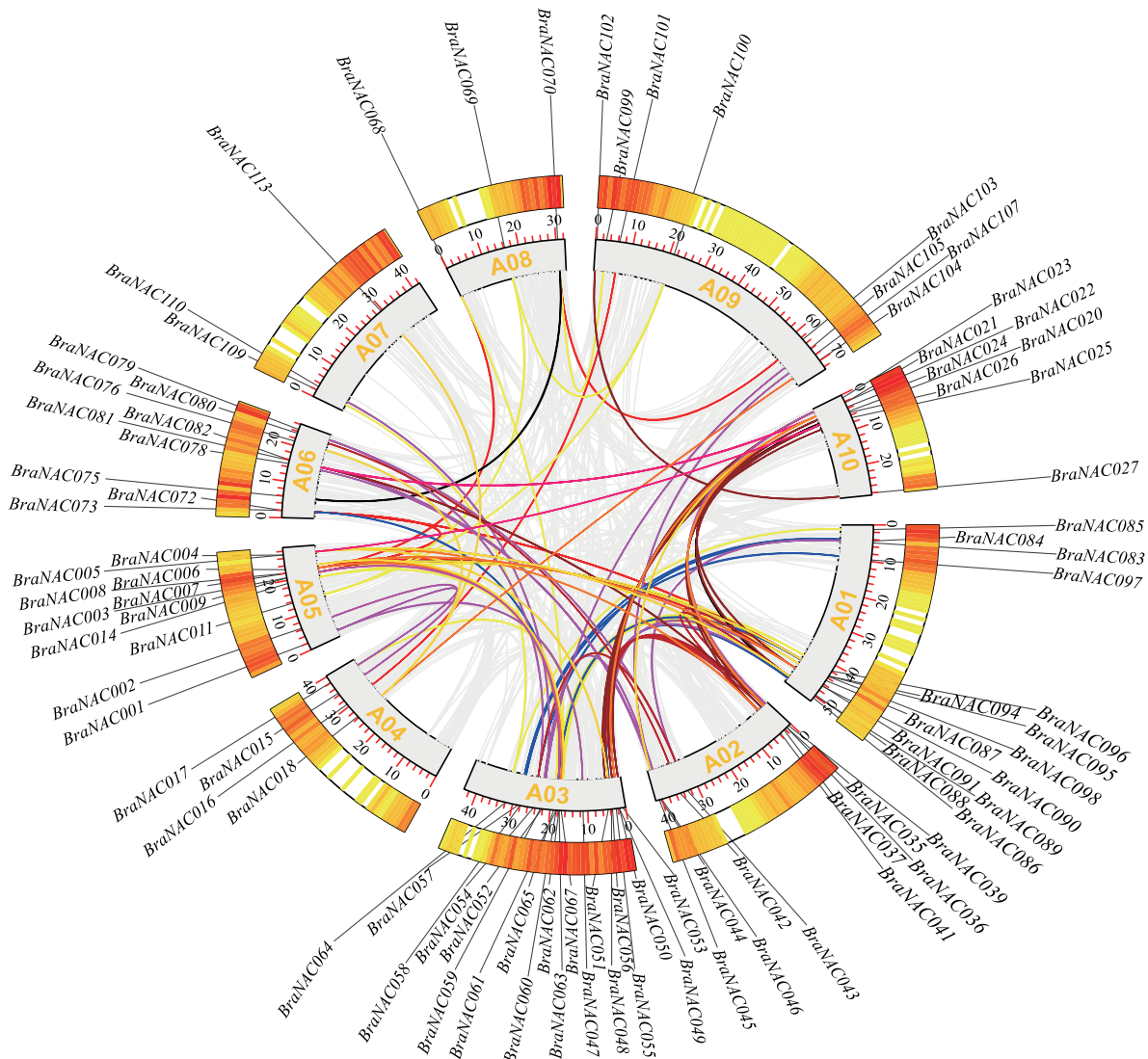
图 2 *BraNAC* 家族成员在染色体上的位置

Fig.2 Position of *BraNAC* family members on chromosomes

2.4 *BraNAC* 基因家族共线性复制关系分析

基因复制在生物体进化中发挥重要作用,复制的基因为植物个体的生理和形态变化奠定基础^[23]。为了探究白菜型冬油菜 *NAC* 家族基因的串联重复关系,通过序列比对筛选 *BraNAC* 基因家族存在串

联重复的基因,结果如图 3 所示。对 119 个 *BraNAC* 家族成员进行复制鉴定,发现 10 条染色体上有 91 个 *BraNAC* 家族基因发生了 87 对片段复制。表明 *BraNAC* 基因在进化过程中发生了一定规模的复制事件,导致 *BraNAC* 家族成员迅速扩张。



A01~A10 表示 1 号染色体~10 号染色体。

图 3 *BraNAC* 基因家族片段复制关系

Fig.3 The replication relationship of *BraNAC* gene family fragments

2.5 *BraNAC* 基因家族蛋白质保守结构域、顺式作用元件和基因结构分析

为了明确 *BraNAC* 基因家族蛋白质的结构特点,分析了保守结构域,结果如图 4 所示,不同亚家族含有不同的保守结构域数目和种类,并且保守结构域的序列长度各不相同。除第Ⅷ亚家族的成员含有 6 个保守结构域之外,其他各个亚家族结构域的数目都是 4 个, Motif 1、Motif 2、Motif 3、Motif 4、Motif 5、Motif 7、Motif 8 在亚家族Ⅰ~Ⅶ当中的数目较多,结构相对保守,表明这些结构域在 *BraNAC* 基因家族功能的发挥方面具有重要作用;而第Ⅷ亚家族保守结构域的数量增多,种类与其他各个亚家族不同。分析白菜型冬油菜上游 1 500 bp 启动子序列,如图 4 所示,大多数

BraNAC 家族成员上游主要有 LTR、MBS、WUN-motif、GCN4_motif、CAAT-box、G-box、ABRE、TGA-element、GARE-motif 等顺式作用元件,各个启动子的具体特征见表 3。通过对 *BraNAC* 家族基因的结构分析(图 4)发现,不同亚家族外显子和内含子数量存在差异,同一组内的数目相近。*BraNAC036* 没有内含子,其他成员含有 2~6 个,亚家族Ⅰ和Ⅷ的内含子长度相比于其他亚家族明显增加,猜测这 2 个亚家族某些生物学功能可能发生了变化;亚家族Ⅰ、Ⅱ、Ⅵ和Ⅶ的外显子数目都是 3 个,亚家族Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ外显子有 4~6 个;亚家族Ⅷ外显子平均数达到了 8 个,与基因的保守性结构域相吻合,表明亚家族Ⅷ的 *BraNAC* 成员在进化过程中可能发生了功能分化。

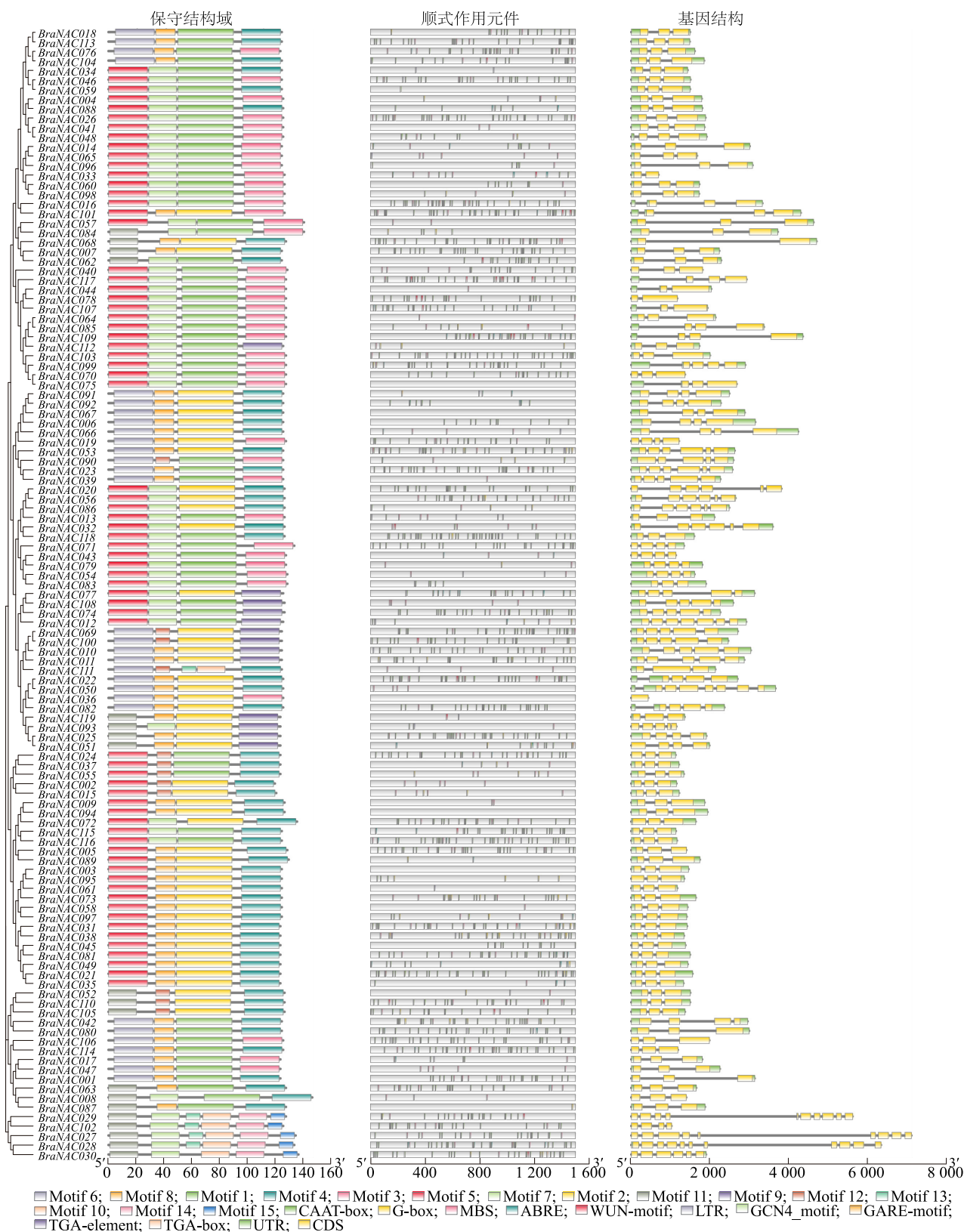
图 4 白菜型油菜 *BraNAC* 家族保守结构域、顺式作用元件和基因结构Fig.4 The conserved domains, cis-acting elements and gene structure of *BraNAC* family in *Brassica rapa* L.

表 3 白菜型冬油菜 NAC 基因家族顺式作用元件

Table 3 Cis-acting elements of the NAC gene family in *Brassica rapa* L.

顺式作用元件	编码主要蛋白质的碱基序列	作物种类	主要功能
LTR	CCGAAA	大麦	参与低温响应的顺式作用元件
MBS	CAACTG	拟南芥	参与干旱诱导的反应元件
WUN-motif	AAATTTCTCT	甘蓝	损伤反应元件
GCN4_motif	TGAGTCA	水稻	参与胚乳表达的顺式调控元件
CAAT-box	CAAAAT	烟草、豌豆、拟南芥	启动子和增强子区域中常见的顺式作用元件
G-box	CACGTG	豌豆	参与光反应性的顺式作用调节元件
ABRE	CACGTG	拟南芥	参与脱落酸反应的顺式作用元件
TGA-element	AACGAC	甘蓝	生长素反应元件
GARE-motif	TCTGTTG	甘蓝	赤霉素反应元件

2.6 低温胁迫下白菜型冬油菜 *BraNAC* 基因的表达分析

为了进一步了解白菜型冬油菜 NAC 家族基因在非生物胁迫下的表达模式,根据 *BraNAC* 基因在低温胁迫下的表达,分析 2 个不同品种白菜型冬油菜 *BraNAC* 基因在生长锥中的表达。由图 5 可知,在低温胁迫下,不同品种和不同处理时长 *BraNAC* 基因的表达变化不同,*BraNAC097*、*BraNAC073*、*BraNAC095*、*BraNAC001*、*BraNAC061*、*BraNAC014*、*BraNAC033*、*BraNAC005*、*BraNAC115*、*BraNAC058*、*BraNAC003* 在陇油 7 号和 Lenox 中上调表达,*BraNAC034*、*BraNAC051*、*BraNAC052*、*BraNAC025*、*BraNAC057*、*BraNAC118* 下调表达;冷处理初期,在陇油 7 号中上调表达的 *BraNAC* 家族基因少于 Lenox,随着胁迫时间的增加,在陇油 7 号中上调表达的 *BraNAC* 家族基因明显多于 Lenox。表明大部分 *BraNAC* 基因可能通过上调表达使白菜型冬油菜适应低温环境。

2.7 *BraNAC* 家族基因的表达分析

基于系统发育和 *BraNAC* 家族基因表达数据,选择了 11 个白菜型冬油菜 NAC 基因,分析低温和干旱胁迫下其在根和叶中的表达变化,对 2 种抗逆性不同的白菜型冬油菜分别进行低温处理和干旱处理,利用实时荧光定量 PCR 来检测 *BraNAC* 基因的表达水平。由图 6A 可知,低温胁迫下,白菜型冬油

菜的根中大多数基因表达量在处理 24 h 达到最大,如 *BraNAC012* 和 *BraNAC027* 在陇油 7 号处理 24 h 时表达水平明显升高,而在 Lenox 中变化不明显,*BraNAC066* 表达量在陇油 7 号中变化不明显,而在 Lenox 中表达上调。在低温胁迫的叶中(图 6B),大多数基因在 Lenox 中的表达水平明显高于陇油 7 号,如 *BraNAC068* 在处理 48 h 后表达量明显升高,且在 Lenox 中变化更明显,*BraNAC035* 在 Lenox 中处理 24 h 后具有很高表达量,*BraNAC066* 和 *BraNAC015* 在 Lenox 中处理 4 h 后具有很高表达量,*BraNAC034* 在处理 48 h 后表达水平明显升高,而在陇油 7 号中表达下调;因此,*BraNAC012*、*BraNAC027* 和 *BraNAC068* 可能在植物抗寒方面起到正调控作用,相反,*BraNAC035*、*BraNAC015*、*BraNAC066* 和 *BraNAC034* 可能与植物抗寒性呈负调控关系。

由图 7A 可以看出,在干旱胁迫下,白菜型冬油菜根中 *BraNAC034*、*BraNAC012*、*BraNAC027* 和 *BraNAC015* 的表达量在干旱处理 4 h、6 h、24 h 后在陇油 7 号中与对照相比明显上调,但在 Lenox 中变化不明显。图 7B 显示,*BraNAC066* 的表达量在陇油 7 号干旱处理 4 h 明显升高,*BraNAC012* 的表达量在陇油 7 号干旱处理 6 h、48 h 明显升高,在 Lenox 中变化不明显;干旱处理 6 h,*BraNAC068* 在陇油 7 号中的表达明显上调;干旱处理 1 h 后,*BraNAC072* 的表达量在 Lenox 中明显升高,在陇油 7 号中没有明显变化;其他 *BraNAC* 基因干旱处理后在 2 个白菜型冬油菜品种中表达变化不明显。因此 *BraNAC012*、*BraNAC015*、*BraNAC068*、*BraNAC066*、*BraNAC027*、*BraNAC034* 可能在植物抗旱方面发挥正调控的功能,*BraNAC072* 可能与植物抗旱性呈负相关关系。

3 讨论

本研究利用白菜型冬油菜陇油 7 号基因组测序数据,经鉴定得到 119 个 *BraNAC* 家族成员,聚类为 8 个亚家族,保守结构域分析结果表明,第Ⅷ亚家族的保守结构域数量增多,种类与其他各个亚家族不同。基因结构分析结果显示,亚家族 I~Ⅶ的外显子数目都是 3~6 个,而亚家族Ⅷ外显子平均数达到 8 个,与基因的保守性结构域数目增多相吻合,可能在功能上出现了分化。顺式作用元件分析结果显示,*BraNAC* 基因含有与冷胁迫、干旱胁迫、机械损伤、

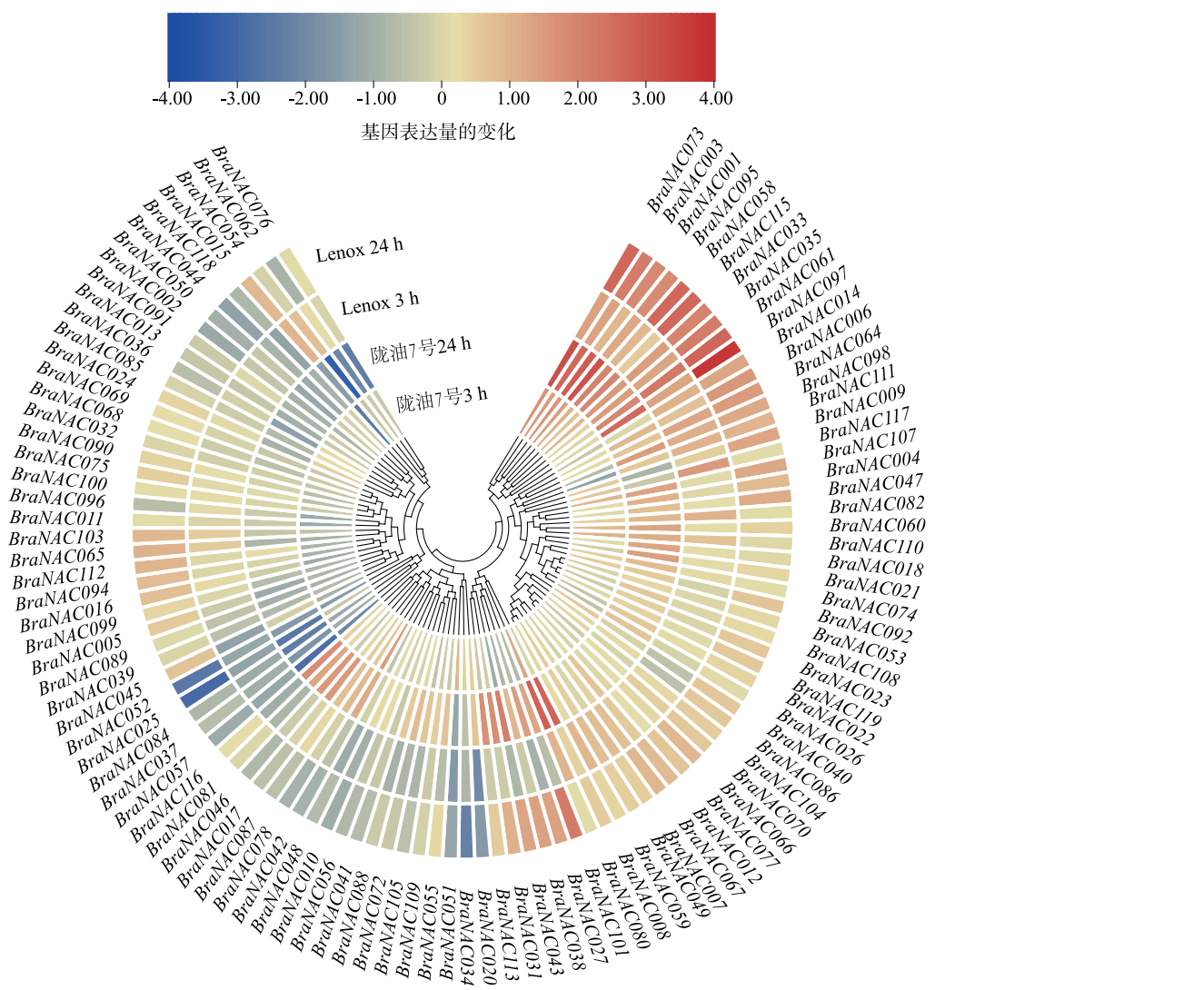


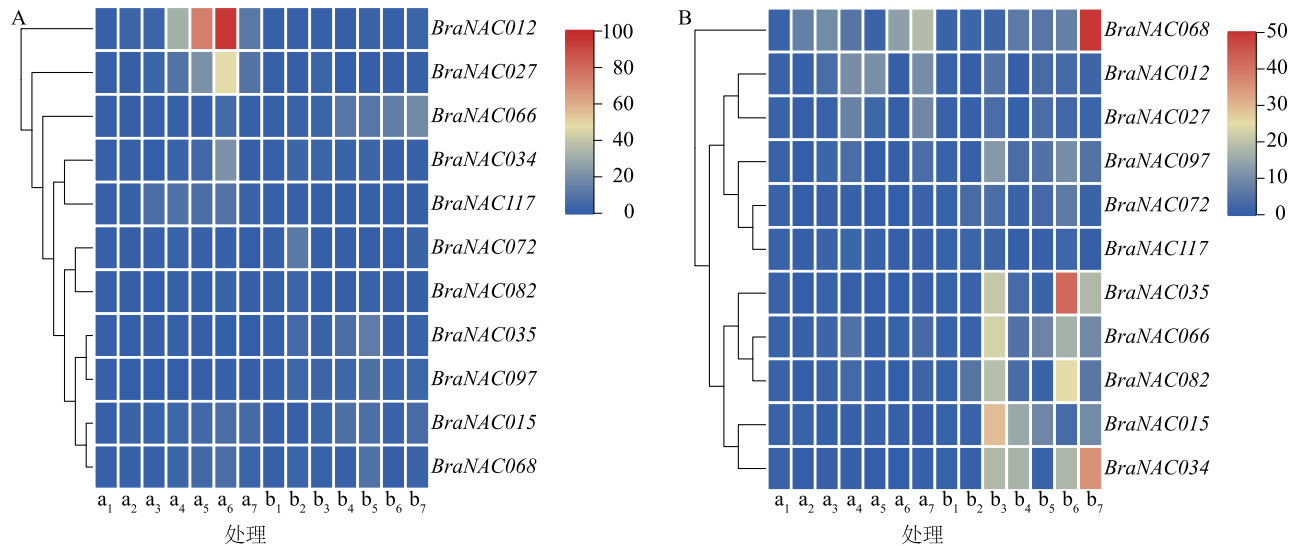
图5 低温胁迫下 *BraNAC* 家族成员在生长锥中的表达分析

Fig.5 Expression analysis of *BraNAC* family members under low temperature stress in growth cones

胚胎发育和内源激素调控等相关的响应元件,与前人的研究结果^[7]一致。亚细胞定位结果表明,*BraNAC* 蛋白在细胞核、细胞质、叶绿体、线粒体中都有分布,与之前研究结果^[24]相比,在细胞中分布较为广泛,表明 *BraNAC* 基因在进化过程中可能发生了功能扩张事件。

低温和干旱是限制植物生长发育的重要气候因子^[25-30],大量研究表明,*NAC* 转录因子家族在植物响应寒冷^[31]和干旱^[6]信号途径中发挥作用。在干旱胁迫下,*MINAC12* 大量表达的转基因拟南芥与野生型相比,气孔孔径减小,活性氧(ROS)和丙二醛(MAD)积累减少,同时超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化氢酶等几种抗氧化酶的活性显著增

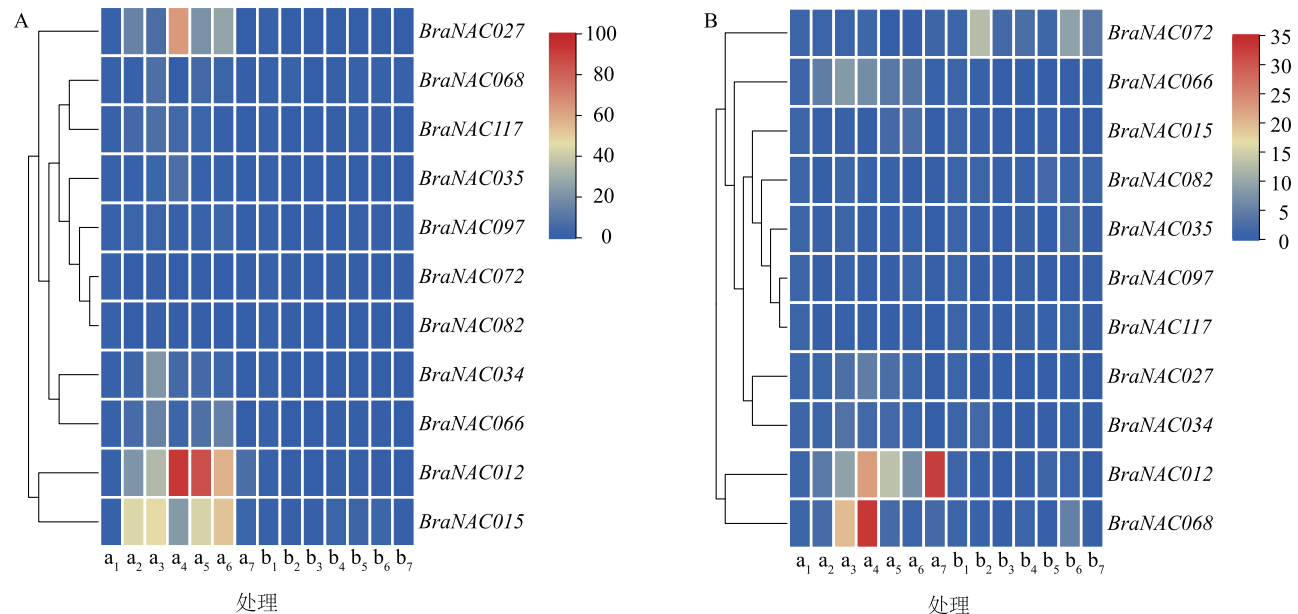
强^[32],增强了转基因拟南芥对干旱的耐受性。前人研究表明,当对白菜型冬油菜进行干旱胁迫时,*CAT*、*SOD*、*POD* 活性与抗旱性呈正相关^[33],且不同抗旱品种的 *CAT*、*SOD*、*POD* 活性变化不一样,在抗旱性弱的品种中各酶活性一般在相对较短的时间内变化较快。本研究利用 2 个抗性不同的白菜型冬油菜品种,筛选抗逆基因,结果发现,*BraNAC012*、*BraNAC015*、*BraNAC068*、*BraNAC066*、*BraNAC027*、*BraNAC034* 都在陇油 7 号中干旱处理 4 h 后或者更长的时间后明显大量表达,这些基因可能在 *Lenox* 中处理很短的时间内大量表达,增强了白菜型冬油菜 *CAT*、*SOD* 和 *POD* 的活性,同时,降低 ROS 的含量,表现为植株对干旱的适应。低温通过影响植物体内



a_1 、 a_2 、 a_3 、 a_4 、 a_5 、 a_6 、 a_7 分别表示陇油 7 号的根部对照、陇油 7 号的根部低温处理 1 h、陇油 7 号的根部低温处理 4 h、陇油 7 号的根部低温处理 6 h、陇油 7 号的根部低温处理 12 h、陇油 7 号的根部低温处理 24 h、陇油 7 号的根部低温处理 48 h。 b_1 、 b_2 、 b_3 、 b_4 、 b_5 、 b_6 、 b_7 分别表示 Lenox 的根部对照、Lenox 的根部低温处理 1 h、Lenox 的根部低温处理 4 h、Lenox 的根部低温处理 6 h、Lenox 的根部低温处理 12 h、Lenox 的根部低温处理 24 h、Lenox 的根部低温处理 48 h。

图 6 低温胁迫下 *BraNAC* 基因在 2 个白菜型冬油菜品种根 (A) 和叶 (B) 中的表达量

Fig.6 Expression of *BraNAC* gene in roots (A) and leaves (B) of two *Brassica rapa* L. varieties under cold stress



a_1 、 a_2 、 a_3 、 a_4 、 a_5 、 a_6 、 a_7 分别表示陇油 7 号的根部对照、陇油 7 号的根部干旱处理 1 h、陇油 7 号的根部干旱处理 4 h、陇油 7 号的根部干旱处理 6 h、陇油 7 号的根部干旱处理 12 h、陇油 7 号的根部干旱处理 24 h、陇油 7 号的根部干旱处理 48 h。 b_1 、 b_2 、 b_3 、 b_4 、 b_5 、 b_6 、 b_7 分别表示 Lenox 的根部对照、Lenox 的根部干旱处理 1 h、Lenox 的根部干旱处理 4 h、Lenox 的根部干旱处理 6 h、Lenox 的根部干旱处理 12 h、Lenox 的根部干旱处理 24 h、Lenox 的根部干旱处理 48 h。

图 7 干旱胁迫下 *BraNAC* 基因在 2 个白菜型冬油菜品种根 (A) 和叶 (B) 中的表达量

Fig.7 Expression of *BraNAC* gene in roots (A) and leaves (B) of two *Brassica rapa* L. varieties under drought stress

的酶活性,减缓生理代谢过程,使细胞膜内外的渗透势发生改变^[31],降低植物生长速率,从而造成生长

缓慢,严重者可导致幼苗生长纤弱迟缓,叶片萎蔫、黄化,果实畸形等,最后导致农作物产量下降。在低温胁迫下,植物细胞会通过提高相关酶的活性或产生渗透调节物质来适应不利的环境^[34]。在辣椒中,*NAC* 家族基因 *CaNAC064* 的大量表达显著降低植株丙二醛(MDA)含量,增加渗透调节物质(Pro)含量,提高抗氧化酶活性,从而降低对低温胁迫的敏感性^[35]。本研究中,*BraNAC012*、*BraNAC027* 在超强抗寒材料陇油 7 号低温处理后表达量明显升高,而在弱抗寒材料 Lenox 中变化不明显。因此,*BraNAC012*、*BraNAC027* 可能在提高白菜型冬油菜响应低温胁迫相关蛋白质含量和渗透调节物质含量等方面发挥着重要作用。

本研究首次对白菜型冬油菜 *NAC* 家族进行全基因组鉴定和结构分析,发现了 119 个 *BraNAC* 家族成员,并预测了 11 个可能参与寒冷、干旱胁迫的候选基因。结果表明,*BraNAC012*、*BraNAC015*、*BraNAC068*、*BraNAC066*、*BraNAC027*、*BraNAC034* 可以作为候选基因,提高作物抗旱性,*BraNAC027* 和 *BraNAC012* 可以作为提高作物抗寒性的候选基因。同时,*BraNAC* 家族基因受不同逆境胁迫诱导,并且存在组织与时间表达特异性。本研究结果为今后全面解析白菜型冬油菜 *NAC* 基因的功能提供参考。

参考文献:

- [1] 张国龙. 人类活动与气候变化影响下全球荒漠化风险研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2020.
- [2] 孙万仓, 武军艳, 方彦, 等. 北方旱寒区北移冬油菜生长发育特性 [J]. 作物学报, 2010, 36(12): 2124-2134.
- [3] 陈姣荣, 孙万仓, 方彦, 等. 白菜型冬油菜在北方寒旱区的适应性分析 [J]. 干旱地区农业研究, 2012, 30(6): 17-22, 31.
- [4] 刘秦, 姚正良, 缪纯庆, 等. 寒旱区白菜型冬油菜适应性及利用研究 [J]. 干旱地区农业研究, 2018, 36(6): 56-62.
- [5] 王学芳, 孙万仓, 李孝泽, 等. 我国北方风蚀区冬油菜抗风蚀效果 [J]. 生态学报, 2009, 29(12): 6572-6577.
- [6] 王彬, 陈敏氢, 林亮, 等. 植物干旱胁迫的信号通路及相关转录因子研究进展 [J]. 西北植物学报, 2020, 40(10): 1792-1806.
- [7] 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.
- [8] SADHANA S, HIROYUKI K, KAUSHAL K, et al. The biotechnological importance of the plant-specific *NAC* transcription factor family in crop improvement [J]. Journal of Plant Research, 2021, 134(3): 475-495.
- [9] KIM S G, LEE S, RYU J, et al. Probing protein structural requirements for activation of membrane-bound *NAC* transcription factors in *Arabidopsis* and rice [J]. Plant Science, 2010, 178(3): 239-244.
- [10] ADDIE N O, HEIDI A E, LEILA L L, et al. DNA-binding specificity and molecular functions of *NAC* transcription factors [J]. Plant Science, 2005, 169(4): 785-797.
- [11] SAIDI M N, MERGBY D, BRINI F. Identification and expression analysis of the *NAC* transcription factor family in durum wheat (*Triticum turgidum* L. ssp. *durum*) [J]. Plant Physiology & Biochemistry Ppb, 2017, 112: 117-128.
- [12] ZHUO X, ZHENG T, ZHANG Z, et al. Genome-wide analysis of the *NAC* transcription factor gene family reveals differential expression patterns and cold-stress responses in the woody plant *Prunus mume* [J]. Genes, 2018, 9(10): 1-22.
- [13] DUDHATE A, SHINDE H, YU P, et al. Comprehensive analysis of *NAC* transcription factor family uncovers drought and salinity stress response in pearl millet (*Pennisetum glaucum*) [J]. BMC Genomics, 2021, 22(1): 1-15.
- [14] REMENYI A, SCHOLER H R, WILMANN S M. Combinatorial control of gene expression [J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2004, 11(9): 812-815.
- [15] 张慧珍, 白雪芹, 曾幼玲. 植物 *NAC* 转录因子的生物学功能 [J]. 植物生理学报, 2019, 55(7): 915-924.
- [16] GAO Y, FAN Z Q, ZHANG Q, et al. A tomato *NAC* transcription factor, *SlNAMI1*, positively regulates ethylene biosynthesis and the onset of tomato fruit ripening [J]. The Plant Journal, 2021, 108(5): 1317-1331.
- [17] KIM M H, TRAN T N A, CHO J S, et al. Wood transcriptome analysis of *Pinus densiflora* identifies genes critical for secondary cell wall formation and *NAC* transcription factors involved in tracheid formation [J]. Tree Physiology, 2021, 41(7): 1289-1305.
- [18] 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* [J]. Planta, 2020, 252(6): 1-11.
- [19] HUYSMANS M, BUONO R A, SKORZINSKI N, et al. *NAC* transcription factors *ANAC087* and *ANAC046* control distinct aspects of programmed cell death in the *Arabidopsis* columella and lateral root cap [J]. The Plant Cell, 2018, 30(9): 2197-2213.
- [20] 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): 1-18.
- [21] 吴荡, 刁卫平, 王述彬, 等. 辣椒 *CaNAC55* 基因克隆与表达分析 [J]. 西北植物学报, 2021, 41(7): 1120-1126.
- [22] QING L, SHI Y, WEN J H, et al. *NAC* transcription factor *ONAC066* positively regulates disease resistance by suppressing the ABA signaling pathway in rice [J]. Plant Molecular Biology, 2018, 98(4): 289-302.

- [23] KONG H, LANDHERR L L, FROHLICH M W, et al. Patterns of gene duplication in the plant *SKP1* gene family in angiosperms: evidence for multiple mechanisms of rapid gene birth[J]. *Plant Journal*, 2010, 50(5):873-885.
- [24] 赵艳青,杜建厂,王盼乔,等. 哈氏黄瓜 *NAC* 转录因子的鉴定及低温表达分析[J]. *园艺学报*, 2019, 46(7):1303-1319.
- [25] 田文仲,冯伟森,李俊红,等. 不同时期轻度干旱对小麦产量性状及旗叶抗氧化酶活性的影响[J]. *江苏农业科学*, 2021, 49(22):99-104.
- [26] 何汛锋,唐双勤,田雪飞,等. 芽期低温胁迫对早籼稻生长特性及产量的影响[J]. *南方农业学报*, 2020, 51(12):2911-2918.
- [27] 姚启伦,霍仕平,张俊军. 玉米自交系响应高温、干旱胁迫的关键基因及通路[J]. *江苏农业学报*, 2021, 37(1):29-37.
- [28] 朱俊杰,王天顺,牙禹,等. 莴笋叶片低温下积累花青素对光合作用的影响[J]. *南方农业学报*, 2021, 52(1):180-188.
- [29] 宋国英,刘国一,边巴卓玛. 模拟干旱胁迫下 7 个黑青稞品种的萌发特性与抗旱性评价[J]. *江苏农业科学*, 2021, 49(16):84-88.
- [30] 王德娟,隋立春,刘迪,等. 干旱胁迫下 DNDc 模型的红枣产量参数校正[J]. *江苏农业学报*, 2021, 37(3):812-816.
- [31] HUANG L, HONG Y, ZHANG H, et al. Rice *NAC* transcription factor *ONAC095* plays opposite roles in drought and cold stress tolerance[J]. *BMC Plant Biology*, 2016, 16(1):1-18.
- [32] YANG X, HE K, CHI X, et al. *MiNAC12* positively mediates abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Plant Science*, 2018, 277:229-241.
- [33] 张朋飞,武军艳,孙万仓,等. 干旱胁迫对白菜型冬油菜苗期生理特性的影响[J]. *西北农业学报*, 2015, 24(2):84-90.
- [34] MARQUES D N, REIS S D, SOUZA C D. Plant *NAC* transcription factors responsive to abiotic stresses[J]. *Plant Gene*, 2017, 11:170-179.
- [35] 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*, 2019, 291:1-10.

(责任编辑:陈海霞)