

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2018.50705

唐宽刚, 任美艳, 张文君, 庞新跃, 薛敏, 王茅雁. 沙冬青 *AmNAC6* 基因的克隆与功能初步分析[J]. 植物科学学报, 2018, 36(5): 705-712  
Tang KG, Ren MY, Zhang WJ, Pang XY, Xue M, Wang MY. Cloning and preliminary functional analysis of *AmNAC6* from *Ammopiptanthus mongolicus*[J]. *Plant Science Journal*, 2018, 36(5): 705-712

## 沙冬青 *AmNAC6* 基因的克隆与功能初步分析

唐宽刚, 任美艳, 张文君, 庞新跃, 薛敏, 王茅雁\*

(内蒙古农业大学生命科学学院, 呼和浩特 010018)

**摘要:** 以强抗逆植物沙冬青 (*Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f.) 为材料, 克隆获得一个 NAC 转录因子基因 *AmNAC6* 的全长 cDNA, 并对其序列特征、蛋白质亚细胞定位和表达模式进行了分析。研究表明, *AmNAC6* 基因的编码蛋白由 304 个氨基酸组成, 具有 NAC 家族典型的结构特征, 亚细胞定位实验证实该蛋白分布于细胞核内。表达图谱分析结果显示, 在室内培养的沙冬青幼苗中, *AmNAC6* 的转录水平受干旱、高盐、低温和高温胁迫的影响, 其中在干旱诱导下该基因的转录水平上调较为明显; 野外生长植株的嫩叶中, 该基因的转录水平在中秋和初冬略低于其他季节, 春季则低于其在侧根、嫩枝、花蕾和未成熟果荚中的转录水平。此外, 本研究还将 *AmNAC6* 基因成功地构建到植物表达载体。

**关键词:** 沙冬青; NAC 转录因子; 亚细胞定位; 表达分析; 载体构建

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2018)05-0705-08

## Cloning and preliminary functional analysis of *AmNAC6* from *Ammopiptanthus mongolicus*

Tang Kuan-Gang, Ren Mei-Yan, Zhang Wen-Jun, Pang Xin-Yue, Xue Min, Wang Mao-Yan\*

(College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

**Abstract:** The full-length cDNA of a NAC transcription factor gene (*AmNAC6*) was cloned from *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f., a plant with high tolerance to abiotic stresses, with the sequence characteristics, protein subcellular localization, and expression patterns of *AmNAC6* then analyzed. Results showed that *AmNAC6* encoded a 304 amino acid residue protein, which exhibited typical structural features of the NAC transcription factor family. Subcellular localization confirmed the nuclear distribution of the *AmNAC6* protein. Expression analysis demonstrated that the transcription level of *AmNAC6* in laboratory-cultured *A. mongolicus* seedlings changed during drought, salt, cold, and heat stress treatments, with the drought-induced expression more obvious than that under the other three treatments. In the young leaves of wild plants, the transcription levels were slightly lower in mid-autumn and early winter than in other seasons. The transcription level of the gene in young leaves was obviously lower than that in lateral roots, young branches, flower buds, and immature pods in spring. Moreover, the plant expression vector of *AmNAC6* was successfully constructed, laying a foundation for further functional analyses.

收稿日期: 2018-04-23, 退修日期: 2018-06-09。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31560299); 内蒙古自然科学基金重大项目(2012ZD02); 内蒙古自然科学基金项目(2014MS0326)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31560299), Major Project of Natural Science Fund of Inner Mongolia Autonomous Region (2012ZD02), and Inner Mongolia Natural Science Foundation (2014MS0326)。

作者简介: 唐宽刚(1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向为植物逆境分子生物学(E-mail: tangkuangang@163.com)。

\* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: wangmaoyan@163.com)。

**Key words:** *Ammopiptanthus mongolicus*; NAC transcription factor; Subcellular localization; Expression analysis; Vector construction

干旱、高盐、低温和高温等非生物胁迫严重影响植物的生长发育和作物生产。当植物感受到这些逆境胁迫时,会通过细胞内特异而复杂的转导途径将胁迫信号传递到相关转录因子,导致其表达水平或活性发生变化,进而对其靶基因的转录水平进行调节,使植物体形成相应的抗逆保护机制<sup>[1]</sup>。植物细胞对内部生长发育信息的响应最终也需要通过特异转录因子来调节。因此,有关转录因子的研究在植物抗逆性和发育生物学领域倍受重视。

NAC(NAM、ATAF、CUC)类转录因子是植物所特有的转录因子大家族,其编码基因最早是从矮牵牛(*Petunia hybrid* Vilm)中克隆获得,因其突变体不能形成正常的茎尖分生组织且子叶发生融合而命名为NAM(No apical meristem)<sup>[2]</sup>。随后,在拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)和水稻(*Oryza sativa* L.)等植物中发现NAM的同源基因并证实其主要参与植物的生长发育过程,如分生组织和边界器官的形成、侧根发育、植株衰老和花发育等<sup>[3,4]</sup>。有些NAC基因则参与植物的抗病防卫反应,如水稻OsNAC6对抵抗稻瘟病起正调节作用,拟南芥ATAF1可增强对白粉病的抗性,而大麦(*Hordeum vulgare* L.)HvSNAC1可提高对叶斑病的抗性<sup>[3,5-7]</sup>。已经证实,NAC家族在植物响应和抵抗非生物胁迫中也发挥重要作用<sup>[1,8]</sup>,如拟南芥NAC家族中的ANAC019/NAC019、ANAC055、ANAC072/RD26、AtNAC2和ANAC096等成员不仅受干旱、高盐、低温和(或)高温胁迫的诱导,而且可以显著提高转基因植物对这些非生物逆境的抗性<sup>[4,9-11]</sup>;在水稻和大豆(*Glycine max* (L.) Merr.)NAC家族中至少有20%~30%的成员参与对不同非生物胁迫和ABA等激素的响应<sup>[12,13]</sup>,其中一些成员,如水稻的SNAC1、OsNAC10和OsNAP以及大豆的GmNAC11和GmNAC20在抵抗干旱、高盐和(或)低温等逆境胁迫中具有重要的正调节作用<sup>[1,14,15]</sup>。此外,已从玉米(*Zea mays* L.)、小麦(*Triticum aestivum* L.)和油菜(*Brassica napus* L.)等植物中鉴定获得具有抗逆功能的NAC基因<sup>[1,16]</sup>。然而,目前的研究仅针对一些物种NAC家族中的少数成员,有关强抗逆植物的NAC

基因鲜有报道。

沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f.)属于豆科沙冬青属旱生灌木,主要分布于我国内蒙古、宁夏和甘肃的沙漠或荒漠地带,是分布区内唯一的常绿阔叶植物<sup>[17]</sup>。该物种具有很强的抗寒、抗旱、耐热、耐盐碱、耐风沙和耐瘠薄等抗逆特性,受到研究人员的关注。近年来,已通过RNA-Seq技术从沙冬青中筛选到大量逆境响应基因,其中包括许多NAC基因<sup>[18-21]</sup>,然而至今已克隆的AmNAC基因仅有2个<sup>[22]</sup>。本研究以我们前期从沙冬青转录组中鉴定到的AmNAC6基因进行克隆、蛋白质亚细胞定位和表达分析,构建其植物表达载体,旨在为后续深入研究该基因的功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 沙冬青胁迫处理及取样

采用沙培法将沙冬青幼苗培养1个月,然后进行4种胁迫处理:(1)干旱处理:将幼苗浇足水分,然后停止浇水,分别在停水后第2(水分正常,对照)、6、8、10、11、12、13 d取样。(2)盐胁迫处理:幼苗停止浇水5 d后,用350 mol/L的NaCl溶液浇足1次,分别在处理前(0 h,对照)和处理后的2、6、12、24、48 h取样。(3)低温处理:将盆栽苗放入低温光照培养箱中,依次在4℃下处理24 h、0℃下处理12 h和-6℃下处理12 h(共48 h),取样时间同盐胁迫处理,用4℃预冷的自来水漂洗根部沙土。(4)高温处理:将盆栽苗放入装有自来水的白磁盘中,然后放入光照培养箱中进行42℃胁迫处理,取样时间同盐胁迫处理时间,用42℃预热的自来水漂洗根部沙土。野外样品取自蒙草抗旱公司野生植物园(呼和浩特市南郊)。取样时间为2016年7月至2017年6月,每月1次,于每月初从野外生长的沙冬青植株上剪取嫩叶为样品。另于2017年春季从野外植株上剪取花蕾、嫩叶、嫩枝和侧根及未成熟的果荚。将上述所有样品用锡箔纸包裹,在液氮中速冻后保存于-76℃。

### 1.2 总RNA提取与cDNA合成

采用Trizol法从冻存样品中提取总RNA,再用

RNase-Free DNase I (Takara) 去除其中残存的基因组 DNA。取 3.0 μg 纯化的 RNA 用 M-MLV (Promega) 逆转录酶合成 cDNA 第一链, 保存于 -20℃。

### 1.3 基因克隆与蛋白特征分析

以上述 cDNA 为模板, 采用 *AmNAC6* 编码区特异引物 5'-GATCTAGACTCTTTATTCTCTTTCTC-CATCG-3' (上游, 添加 *Xba* I 酶切位点) 和 5'-GCCGGGTTTCAGTAATTGTTCCAC-3' (下游, 添加 *Sma* I 酶切位点) 进行 PCR 扩增。25 μL 反应体系中含 ddH<sub>2</sub>O 18.25 μL, 10 × LA *Taq* 酶缓冲液 2.5 μL, dNTP 混合物 (2.5 mmol/L) 2.0 μL, 上、下游引物各 0.5 μL (10 μmol/L), cDNA 1 μL, LA *Taq* 酶 0.25 μL (5 U/μL)。扩增程序为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 45 s, 60℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 共 32 个循环; 最后于 72℃ 延伸 10 min; 4℃ 保存。将 PCR 产物回收, 然后与 pMD19-T 载体连接并转化 DH5α, 将阳性克隆送测序。

利用 DNAMAN 软件预测蛋白的分子量和等电点; 在 EXPASY (<http://www.expasy.org/tool>) 网站预测蛋白的亲/疏水性。利用 CD-Search 软件分析蛋白质保守结构域; 利用 Clustal X 和 GeneDoc 程序进行蛋白质多序列比对; 利用 PSORT II Prediction (<http://psort.hgc.jp/form2.html>) 网站预测蛋白亚细胞定位。利用 MEGA7 软件构建进化树, 选取物种的序列信息见表 1。

表 1 参与构建进化树的 NAC 蛋白序列信息

Table 1 NAC proteins used in the construction of the phylogenetic tree and their accession numbers

物种 Species	NAC 蛋白 NAC protein	序列号 Accession No.
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> L.	ATAF1	CAA52771.1
	AtCUC1	NP_188135.1
	AtNAC058	NP_188469.1
	AtNAP	O49255.1
	AtNAM	NP_175696.1
大豆 <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	GmNAC1	AAY46121.1
	GmNAC2	AAY46122.1
	GmNAC5	AAY46125.1
	GmNAC11	ACC66315.1
水稻 <i>Oryza sativa</i> L.	GmNAC35	ACC66316.1
	OsNAC2	BAC53811.1
玉米 <i>Zea mays</i> L.	OsNAC6	BAA89800.1
	ZmNAM1	NP_001288411.1
沙冬青 <i>Ammopiptanthus mongolicus</i>	ZmNAM2	CAH56058.1
	<i>AmNAC1</i>	-
	<i>AmNAC2</i>	-

### 1.4 蛋白质亚细胞定位

以 1.3 中测序验证的 pMD19-*AmNAC6* 质粒 DNA 为模板, 利用引物 5'-TTTCTAGATCCT-CAATATGGAGTCC-3' (上游, 添加 *Xba* I 酶切位点) 和 5'-ACCCGGGGTAATTGTTCCACAAGTGG-3' (下游, 添加 *Sma* I 酶切位点) 进行 PCR 反应 (扩增条件同 1.3), 扩增出 *AmNAC6* 的编码区片段 (突变掉终止密码子)。将该片段与 pMD-19T 载体连接并转化 DH5α, 获得阳性克隆。从阳性克隆中提取质粒 DNA, 采用内切酶 *Xba* I 和 *Sma* I (Takara) 酶切后回收目的片段。同时用这 2 种酶将植物瞬时表达载体 pBI-GFP 进行酶切和回收, 然后用 T4 DNA 连接酶将二者连接、转化并进行质粒酶切鉴定。再从阳性克隆中提取构建好的质粒 DNA, 利用 PEG 介导法对沙冬青无菌苗子叶原生质体进行转化, 然后在荧光倒置显微镜 (Eclipse TI-U, NIKON) 下采用 488 nm 激发光源进行观察。沙冬青无菌苗的培养及其子叶原生质体的分离、纯化与转化按照楠迪娜<sup>[23]</sup>的方法进行。

### 1.5 半定量 RT-PCR

将 1.2 中合成的 cDNA 稀释 5 倍作为模板, 以沙冬青 *AmACTIN* 作为内参基因, 对 cDNA 模板量进行均一化。用均一化的 cDNA 模板和 *AmNAC6* 特异性引物进行 PCR 扩增。15 μL 扩增体系中包含: 10 × 缓冲液 1.5 μL, dNTP 混合物 (2.5 mmol/L) 1.2 μL, 上、下游引物各 0.3 μL (10 μmol/L), cDNA 模板 1 μL, *Taq* 酶 0.15 μL (5 U/μL), ddH<sub>2</sub>O 10.55 μL。PCR 程序为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.6 植物表达载体构建

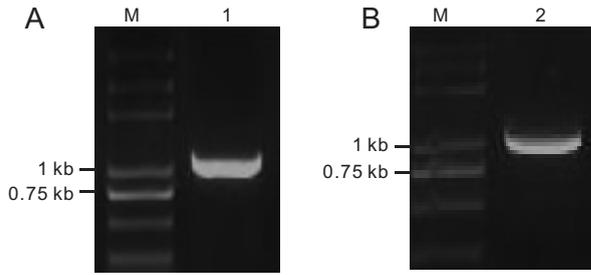
采用 *Xba* I 和 *Sma* I 内切酶将 *AmNAC6* 编码区片段从 1.3 中的克隆载体上酶切下来, 同时采用这 2 种酶对植物表达载体 pCAMBIA3300 (p3300-35ST) 进行双酶切。将酶切产物中目的片段回收并连接后转化。将单克隆用 *AmNAC6* 编码区引物进行菌落 PCR 检测, 然后采用 *Xba* I 和 *Sma* I 进行质粒酶切鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 *AmNAC6* 基因 cDNA 的克隆及其编码蛋白分析

本研究采用的 *AmNAC6* 全长 cDNA 序列来自

本实验室前期对沙冬青转录组的测序结果<sup>[21]</sup>。其完整编码区长 912 bp, 通过 RT-PCR 方法从沙冬青 cDNA 中扩增到该目的片段(图 1: A)。将此片段与克隆载体连接后转化, 经检测获得阳性克隆(图 1: B)。将阳性克隆进行测序和序列比对, 证实获得了碱基无错配的 *AmNAC6* 编码区的 cDNA 片段。



M: DNA marker; 1, 2: RT-PCR and PCR product.

图 1 *AmNAC6* 编码区 RT-PCR 扩增 (A) 和菌落 PCR 检测图 (B)

Fig. 1 Electrophoresis patterns of *AmNAC6* coding region by RT-PCR (A) and colony PCR (B)

通过生物信息学分析, 本研究预测到 *AmNAC6* 的编码蛋白包含 304 个氨基酸残基, 分子质量为 34.27 kD, 等电点为 7.57, 平均疏水性为 -0.615, 不含跨膜结构域, 可能为亲水性蛋白。在 GenBank 中进行 BLAST 比对分析, 发现 *AmNAC6* 蛋白在拟南芥和大豆中分别与 *AtNAC058* 和 *GmNAC35* 蛋白的相似性最高(序列一致性分别为 63% 和 93%)。通过与拟南芥、水稻和大豆等植物中已知的 NAC 蛋白进行序列比对, 发现这些蛋白在 N 端高度保守, 而在 C 端则保守性较低; 在 *AmNAC6*

蛋白的 N 端含有 1 个保守的 NAC 结构域, 长度为 124 aa, 其中又包含 A、B、C、D、E 共 5 个亚结构域, 在每个亚结构域中有个别残基与其它物种不同(图 2)。此外, 利用 cNLS Mapper 软件预测到在 C 和 E 亚结构域中各含有一个核定位信号(Nuclear localization signal, NLS)序列, 分别用 NLS1(RDRKYATGLRTNR)和 NLS2(VGMRKTLV-FYCGRAPKGR)标出(图 2)。

本研究采用 *AmNAC6* 蛋白序列与拟南芥、水稻、玉米和大豆的 16 个 NAC 蛋白序列(表 1)构建进化树, 结果显示这些蛋白可以聚为 2 组(图 3)。其中组 I 包含 *AtNAM*、*AtCUC1*、*GmNAC35* 等 9 个成员, 它们多数属于 NAM 亚族。组 II 包含 *AtNAP*、*GmNAC11*、*OsNAC6* 等其余 8 个 NAC 蛋白, 其中多数属于 ATAF1 和 NAP 亚族。*AmNAC6* 被聚在组 I, 且与大豆 *GmNAC35* 聚在同一个分支, 表明二者进化关系最近。此外, *AtNAC058*、*GmNAC5* 和 *OsNAC2* 也与 *AmNAC6* 具有较近的同源性(图 3)。

## 2.2 *AmNAC6* 编码蛋白的亚细胞定位分析

研究表明, *AmNAC6* 编码的蛋白属于转录因子, 推测在其氨基酸序列中含有 2 个核定位信号(图 2), 因此应定位于细胞核内。为了验证该推论, 本研究将 *AmNAC6* 的编码区片段构建到植物瞬时表达载体 pBI-GFP 中, 形成融合蛋白表达载体 pBI-*AmNAC6*-GFP(图 4: A)。同时培养沙冬青无菌苗, 采用其幼嫩子叶制备原生质体, 然后用构建好的瞬时表达载体对其进行转化并进行荧光显微观察。结果表明, 利用空载体 pBI-GFP 转化的原

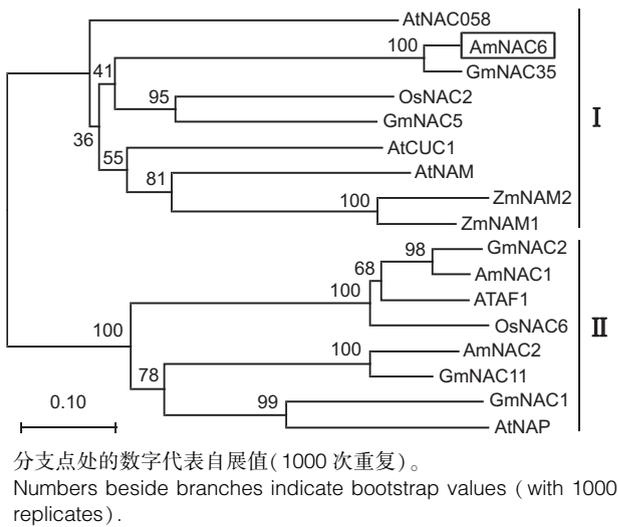


黑框表示 NAC 结构域; A ~ E 表示其中的 5 个亚结构域。

Black rectangular box shows NAC domain; A - E indicate five conserved subdomains in NAC domain.

图 2 *AmNAC6* 与其他植物 NAC 蛋白 N 端的多序列比对图

Fig. 2 N-terminal sequence alignments of *AmNAC6* with NAC proteins from other plant species



分支点处的数字代表自展值(1000次重复)。Numbers beside branches indicate bootstrap values (with 1000 replicates).

图 3 *AmNAC6* 与其他植物 NAC 蛋白构建的系统进化树  
Fig. 3 Phylogenetic tree of *AmNAC6* and other NAC proteins from different plant species

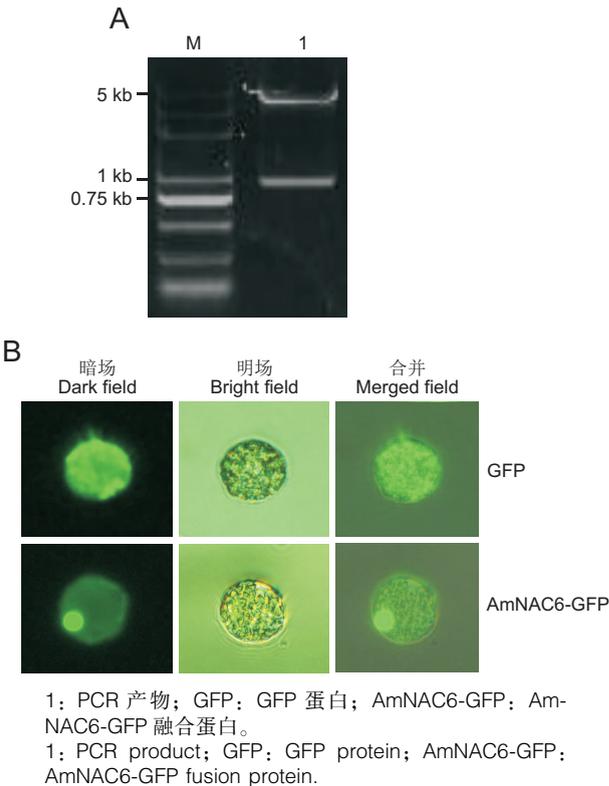


图 4 *AmNAC6* 瞬时表达载体酶切鉴定 (A) 及其亚细胞定位观察 (B)  
Fig. 4 *AmNAC6* transient expression vector digestion identification (A) and its subcellular localization observation (B)

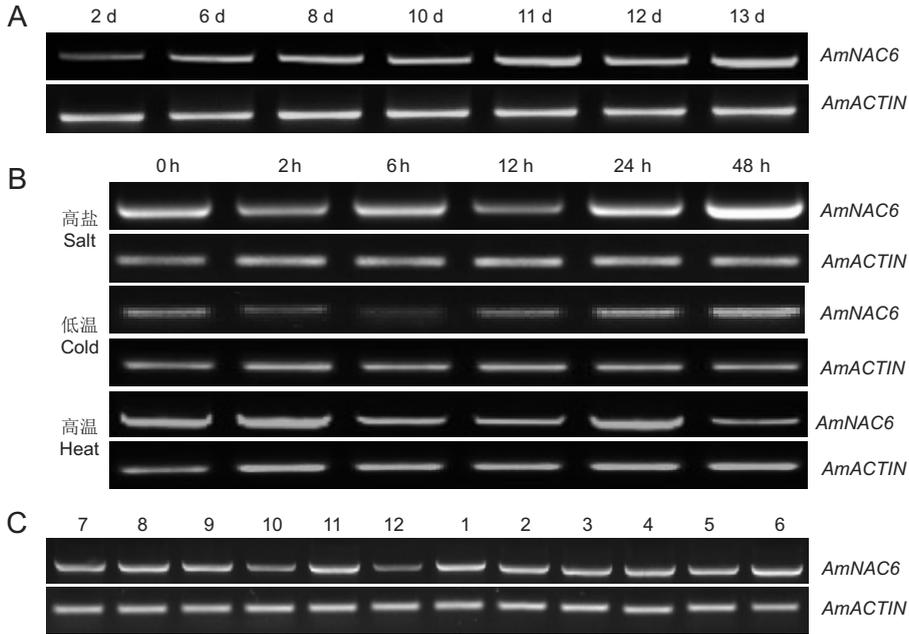
生质体中绿色荧光信号几乎分布于整个细胞中，而用融合表达载体 pBI-*AmNAC6*-GFP 转化的原生质

体中绿色荧光集中于细胞核(图 4: B)。这一实验结果证实 *AmNAC6* 的表达产物定位于细胞核中。

### 2.3 *AmNAC6* 基因的表达分析

本研究为了揭示 *AmNAC6* 对干旱、高盐、低温和高温胁迫的响应过程，采用半定量 RT-PCR 方法分析了该基因在 4 种胁迫处理不同时间点的表达变化规律(图 5)。结果显示，在处理前(0 h 或 2 d, 对照)，该基因有较高水平的表达；干旱处理 6 ~ 8 d 后，随着沙土开始变得干燥，其表达量比对照(2 d)有所增加，但此时幼苗外观基本正常；当干旱延长至 10 ~ 13 d 时，该基因的表达量基本维持在与处理 8 d 后相近的水平或有上升(图 5: A)，此时幼苗显现轻微至中度失水症状。在盐胁迫处理期间，*AmNAC6* 的表达量呈波浪式变化，即在处理 2、12 h 后其表达量比处理前降低，而在处理 6、24 h 和 48 h 后其表达量与处理前接近或有明显增加。在低温处理 2 ~ 6 h 后，*AmNAC6* 的表达量比处理前明显降低，之后又开始回升，在处理 48 h 后略高于处理前水平。高温处理 2、24 h 后，*AmNAC6* 的表达量比处理前略有增加，但在其他时间点均比处理前明显降低(图 5: B)。研究结果表明，*AmNAC6* 对 4 种胁迫处理均有响应，但在不同胁迫处理下其表达变化趋势和幅度存在差异，其中以干旱胁迫诱导其表达上调较为明显。

沙冬青生长于降水稀少、土壤沙化和冬寒夏热等恶劣环境。为了进一步了解 *AmNAC6* 对于逆境胁迫、尤其是低温胁迫的响应，本研究对其在不同季节野外生长植株嫩叶中的转录水平进行了检测。结果显示，其转录本的积累在全年 12 个月基本维持在较高水平。以 7 月初(昼/夜气温约为 31°C/18°C)为对照，其转录水平除在 10 月初(昼/夜气温约 14°C/1°C)和 12 月初(昼/夜气温约 0°C/-9°C)有所降低外，在其他月份(昼/夜气温约 32°C/20°C 至 -3°C/-15°C)均无明显变化。如以不同季节作比较，该基因在秋、冬季的转录水平总体略低于春、夏两季(10 月初和 12 月初较低)(图 5: C)。此外，本研究还检测了 *AmNAC6* 在野外生长植株不同器官中的转录水平。结果表明，该基因在所检测的 5 种器官中均有表达，但在侧根、嫩枝和未成熟果荚中表达量较高，其次是花蕾，而在嫩叶中表达量较低(图 6)。

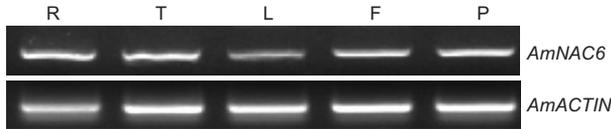


A: 干旱处理下 *AmNAC6* 的表达; B: 高盐、低温和高温处理下 *AmNAC6* 的表达; C: 不同月份野外植株嫩叶中 *AmNAC6* 的表达。

A: Expression level of *AmNAC6* under drought stress treatment; B: Expression levels of *AmNAC6* under salt, cold, and heat stress treatments; C: Expression levels of *AmNAC6* in young leaves of wild-growing plants in different months.

图 5 *AmNAC6* 在不同胁迫条件下的表达变化

Fig. 5 Changes in the expression of *AmNAC6* under different stress conditions



R: 侧根; T: 细枝; L: 嫩叶; F: 花蕾; P: 未成熟果荚。

R: Lateral roots; T: Twigs; L: Young leaves; F: Flower buds; P: Immature pods.

图 6 *AmNAC6* 在沙冬青不同器官中的转录水平

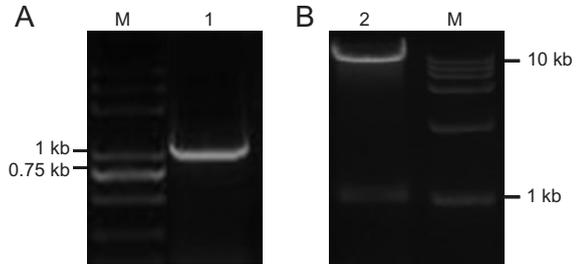
Fig. 6 Transcription levels of *AmNAC6* in different organs of *A. mongolicus*

## 2.4 *AmNAC6* 植物表达载体的构建

本研究从含有 *AmNAC6* 克隆载体的大肠杆菌阳性克隆中提取质粒 DNA 并进行双酶切, 获得 *AmNAC6* 的编码区 cDNA 片段。同时将植物表达载体 p3300-35ST 的质粒 DNA 进行双酶切, 获得其大片段。将 2 种片段进行连接并转化后获得单克隆。将单克隆进行菌落 PCR 检测和质粒酶切鉴定, 均得到预期大小的产物, 表明载体 p3300-35S-*AmNAC6* 构建成功(图 7)。

## 3 讨论

研究表明, NAC 转录因子最显著的结构特征



A: 菌落 PCR 检测; 1: PCR 产物。B: 质粒酶切鉴定; 2: 酶切产物。

A: Colony PCR detection; 1: PCR product. B: Plasmid enzyme digestion; 2: Digestion product.

图 7 *AmNAC6* 植物表达载体鉴定图谱

Fig. 7 Confirmation of the plant expression vector of *AmNAC6*

是其 N 端含有 1 个高度保守的 NAC 结构域, 其中又包含 A ~ E 5 个保守度不同的亚结构域, 分别与结合靶序列 DNA 和核定位有关。其 C 端则保守性较低, 含有转录激活区等功能域<sup>[3, 5]</sup>。本研究克隆的 *AmNAC6* 基因的编码蛋白在 N 端也含有 1 个典型的 NAC 结构域, 其中也包含上述 5 个亚结构域, 而其 C 端区域呈现高度的变异性。此外, 其 NAC 结构域的 C 和 E 亚域中分别具有 1 个核定位

信号。进一步利用沙冬青原生质体表达体系进行亚细胞定位分析, 证实 *AmNAC6* 蛋白定位于细胞核内。这些研究结果表明, *AmNAC6* 属于沙冬青 *NAC* 家族成员, 它是继 *AmNAC1* 和 *AmNAC2* 之后报道的新的沙冬青 *NAC* 基因<sup>[22]</sup>。

*NAC* 家族成员众多, 在拟南芥、水稻和大豆基因组中分别具有 117、151 和 152 个 *NAC* 基因<sup>[5, 12]</sup>, 这些基因可被进一步划分为不同的组或亚族。属于同一个亚族的基因通常具有相似的功能, 例如 *NAM* 亚族的基因主要参与植物的生长发育过程, 而 *ATAF* 亚族的基因多数与植物响应逆境胁迫有关<sup>[3]</sup>。本研究表明 *AmNAC6* 蛋白与 *NAM* 亚族编码蛋白亲缘关系较近, 在该亚族中它又与大豆 *GmNAC35* 关系最近, 其次是大豆 *GmNAC5*、水稻 *OsNAC2* 和拟南芥 *AtNAC058*。目前尚未见到 *GmNAC35* 和 *AtNAC058* 基因的相关报道, 而 *GmNAC5* 和 *OsNAC2* 基因的功能则较为明确。*GmNAC5* 在未成熟种子和根中表达量较高, 将其过量表达可引起转基因大豆侧枝增多、株型改变, 使转基因烟草的叶片变得狭长。此外, 该基因受机械损伤、高盐和低温胁迫的诱导, 暗示其可能与相关胁迫信号途径有关<sup>[24]</sup>。*OsNAC2* 在叶鞘、根、花梗和花序中高表达, 可促进侧枝形成、抑制株高、促进叶片衰老<sup>[25]</sup>。此外, 该基因受 ABA、干旱和高盐胁迫的诱导, 对耐旱性和耐盐性起负调节作用<sup>[26]</sup>。本研究表明, 室内培养的沙冬青幼苗中, *AmNAC6* 对干旱、高盐、低温和高温胁迫均有较明显的响应, 而在野外生长植株的嫩叶中, 其表达量在不同月份或不同季节并无明显差异, 只在中秋(10月初)和初冬(12月初)时略有降低。此外, 该基因在野外生长植株的不同器官中均有较明显的表达。因此, 本研究推测 *AmNAC6* 可能在室内培养沙冬青幼苗响应各种胁迫处理和野外生长植株适应恶劣自然环境中均发挥一定作用。野外植株由于一直生存于干旱缺水和冬寒夏热等逆境中, *AmNAC6* 基因的表达模式可能已经转变为组成型表达, 从而有利于其适应野外逆境和维持生长发育。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Wang HY, Wang HL, Shao HB, Tang XL. Recent advances in utilizing transcription factors to improve plant abiotic stress tolerance by transgenic technology [ J ]. *Front in Plant Sci*, 2016, 7: 67.
- [ 2 ] Souer E, van Houwelingen A, Kloos D, Mol J, Koes R. The no apical 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: 159-170.
- [ 3 ] 李伟, 韩蕾, 钱永强, 孙振元. 植物 *NAC* 转录因子的种类、特征及功能 [ J ]. *应用与环境生物学报*, 2011, 17(4): 596-606.
- [ 4 ] Li W, Han L, Qian YQ, Sun ZY. Characteristics and functions of *NAC* transcription factors in plants [ J ]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2011, 17(4): 596-606.
- [ 4 ] He XJ, Mu RL, Cao WH, Zhang ZG, Zhang JS, Chen SY. *AtNAC2*, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development [ J ]. *Plant J*, 2005, 44(6): 903-916.
- [ 5 ] Nuruzzaman M, Sharoni AM, Kikuchi S. Roles of *NAC* transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants [ J ]. *Front Microbiol*, 2013, 4: 248.
- [ 6 ] Wu YR, Deng ZY, Lai JB, Zhang YY, Yang CP, et al. Dual function of *Arabidopsis ATAF1* in abiotic and biotic stress responses [ J ]. *Cell Res*, 2009, 19(11): 1279-1290.
- [ 7 ] McGrann GRD, Steed A, Burt C, Goddard R, Lachaux C, et al. Contribution of the drought tolerance-related stress-responsive *NAC1* transcription factor to resistance of barley to *Ramularia* leaf spot [ J ]. *Mol Plant Pathol*, 2015, 16(2): 201-209.
- [ 8 ] Nakashima K, Takasaki H, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. *NAC* transcription factors in plant abiotic stress responses [ J ]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1819(2): 97-103.
- [ 9 ] Tran LSP, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, et al. Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible *NAC* transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter [ J ]. *Plant Cell*, 2004, 16: 2481-2498.
- [ 10 ] Xu ZY, Kim SY, Hyeon DY, Kim DH, Dong T, et al. The *Arabidopsis* *NAC* transcription factor *ANAC096* cooperates with bZIP-type transcription factors in dehydration and osmotic stress responses [ J ]. *Plant Cell*, 2013, 25(11): 4708-4724.
- [ 11 ] Guan Q, Yue X, Zeng H, Zhu J. The protein phosphatase RCF2 and its interacting partner *NAC019* are critical for heat stress-responsive gene regulation and thermotolerance in *Arabidopsis* [ J ]. *Plant Cell*, 2014, 26(1): 438-453.

- [12] Le DT, Nishiyama R, Watanabe Y, Mochida K, Yamaguchi-Shinozaki K, *et al.* Genome-wide survey and expression analysis of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress[J]. *DNA Res*, 2011, 18: 263–276.
- [13] Nuruzzaman M, Sharoni AM, Satoh K, Moumeni A, Venuprasad R, *et al.* Comprehensive gene expression analysis of the NAC gene family under normal growth conditions, hormone treatment, and drought stress conditions in rice using near-isogenic lines (NILs) generated from crossing Aday Selection (drought tolerant) and IR64 [J]. *Mol Genet Genomics*, 2012, 287: 389–410.
- [14] Jeong JS, Kim YS, Baek KH, Jung H, Ha SH, *et al.* Root-specific expression of *OsNAC10* improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought condition[J]. *Plant Physiol*, 2010, 153: 185–197.
- [15] Hao YJ, Wei W, Song QX, Chen WH, Zhang YQ, *et al.* Soybean NAC transcription factors promote abiotic stress tolerance and lateral root formation in transgenic plants [J]. *Plant J*, 2011, 68(2): 302–313.
- [16] Wang JY, Wang JP, He-Yuan. A populus euphratica NAC protein regulating  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  homeostasis improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Gene*, 2013, 521(2): 265–273.
- [17] 林清芳, 王茅雁, 刘佳杰, 赵欢欢, 王存芳. 沙冬青细胞与分子生物学研究进展[J]. *植物遗传资源学报*, 2010, 11(6): 793–797.  
Lin QF, Wang MY, Liu JJ, Zhao HH, Wang CF. Research progress of cell and molecular biology of *Ammopiptanthus* [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2010, 11(6): 793–797.
- [18] Liu M, Shi J, Lu C. Identification of stress-responsive genes in *Ammopiptanthus mongolicus* using ESTs generated from cold-and drought-stressed seedlings [J]. *BMC Plant Biol*, 2013, 13: 88.
- [19] Pang T, Ye CY, Xia XL, Yin WL. *De novo* sequencing and transcriptome analysis of the desert shrub, *Ammopiptanthus mongolicus*, during cold acclimation using Illumina/Solexa[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 488.
- [20] Wu YQ, Wei W, Pang XY, Wang XF, Zhang HL, *et al.* Comparative transcriptome profiling of a desert evergreen shrub, *Ammopiptanthus mongolicus*, in response to drought and cold stresses [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 671–687.
- [21] Gao F, Wang JY, Wei SJ, Li ZL, Wang N, *et al.* Transcriptomic analysis of drought stress responses in *Ammopiptanthus mongolicus* leaves using the RNA-Seq technique[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124382.
- [22] 庞新跃, 任美艳, 武雅琪, 薛敏, 唐宽刚, 等. 蒙古沙冬青 *AmNAC1* 和 *AmNAC2* 的表达分析与植物表达载体构建 [J]. *分子植物育种*, 2018, 16(13): 4285–4293.  
Pang XY, Ren MY, Wu YQ, Xue M, Tang KG, *et al.* Expression analysis and plant expression vector construction of *AmNAC1* and *AmNAC2* from *Ammopiptanthus mongolicus*[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(13): 4285–4293.
- [23] 楠迪娜. 沙冬青原生质体分离与蛋白质亚细胞定位分析技术的建立[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2016.
- [24] 金杭霞. 大豆转录因子 GmNAC2 和 GmNAC5 功能验证 [D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- [25] Mao CJ, Lu SC, Lü B, Zhang B, Shen JB, *et al.* A rice NAC transcription factor promotes leaf senescence via ABA biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 2017, 174: 1747–1763.
- [26] Shen JB, Lü B, Luo LQ, He JM, Mao CJ, *et al.* The NAC-type transcription factor OsNAC2 regulates ABA-dependent genes and abiotic stress tolerance in rice [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40641.

(责任编辑: 周媛)