

番茄 NAC 转录因子 *SINAC80* 的克隆及表达分析

刘 辉¹, 王涛涛², 张俊红², 欧阳波², 李汉霞²

(1. 中国热带农业科学院 橡胶研究所, 农业部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室, 海南 儋州 571737;

2. 华中农业大学 园艺林学学院, 园艺植物生物学教育部重点实验室, 湖北 武汉 430070)

摘要:为进一步明确该基因的分子特征及表达特性,通过 RT-PCR 从番茄中克隆了低温响应 NAC 转录因子 *SINAC80*,该基因开放阅读框 1 023 bp,编码 340 个氨基酸。*SINAC80* 蛋白相对分子量为 38.19 kDa,等电点为 5.27,N-端具有典型的 NAC 保守结构域,包含 A、B、C、D、E 5 个亚结构域。实时荧光定量 PCR (qPCR) 分析表明,*SINAC80* 在番茄各组织中均有表达,以在绿果和衰老叶中的表达量最高,在红熟果中的表达量最低。对启动子区序列进行预测分析发现,*SINAC80* 启动子区含有许多响应激素 (ABA、GA、SA 及 ETH) 和逆境 (低温、脱水及盐胁迫) 的顺式作用元件,如 ERELEE4、GARE1OSREP1、LTRE1HVBLT49、GT1GMSCAM4、MYB1AT、MYCATERD1、MYCATRD22、WBOXNTERF3 及 WRKY71OS 等。qPCR 分析结果也证实该基因的表达受低温、干旱、高盐、甲基紫精、ABA 及乙烯处理诱导。这些结果表明,*SINAC80* 可能在番茄非生物逆境应答中发挥重要调控作用。

关键词:番茄;NAC 转录因子;基因克隆;表达分析;非生物胁迫

中图分类号:Q78;S641.2 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2015)01-0077-07

doi:10.7668/hbxb.2015.01.013

Cloning and Expression Analysis of a NAC Transcription Factor *SINAC80* in Tomato

LIU Hui¹, WANG Tao-tao², ZHANG Jun-hong², OUYANG Bo², LI Han-xia²

(1. Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture, Danzhou 571737, China; 2. College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University, Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, Wuhan 430070, China)

Abstract: To further understand the molecular characterization and expression patterns of *SINAC80*, we cloned this gene from tomato. *SINAC80* contains an open reading frame of 1 023 bp encoding a protein of 340 amino acids. The molecular weight and isoelectric point of *SINAC80* protein was 38.19 kDa and 5.27, respectively. *SINAC80* contains a typical NAC domain in the N-terminal, which consists of five subdomains (A to E). Quantitative Real-time PCR (qPCR) analysis showed that *SINAC80* was expressed in all tested tomato tissues, with the highest in green fruits and old leaves, and the lowest in red ripe fruits. Promoter sequence analysis indicated that there were many cis-acting regulatory elements involved in response to hormones (ABA, GA, SA and ETH) and abiotic stresses (cold, dehydration and salt stresses), such as ERELEE4, GARE1OSREP1, LTRE1HVBLT49, GT1GMSCAM4, MYB1AT, MYCATERD1, MYCATRD22, WBOXNTERF3, WRKY71OS, and etc. The qPCR analysis also demonstrated that the expression of *SINAC80* was induced by cold, drought, salt, methyl viologen, ABA and ethephon treatments. These results suggest that *SINAC80* may play important roles in regulating abiotic stress responses in tomato.

Key words: Tomato; NAC transcription factor; Gene cloning; Expression analysis; Abiotic stress

NAC (NAM、ATAF1、2 和 CUC2) 转录因子是植物特有的一类转录因子,其蛋白 N 端具有一个高度

收稿日期:2014-09-28

基金项目:国家自然科学基金项目(31301789);国家高技术研究发展计划(“863”计划)项目(2012AA100104)

作者简介:刘 辉(1986-),男,安徽亳州人,助理研究员,博士,主要从事植物逆境分子生物学研究。

通讯作者:李汉霞(1958-),女,湖北洪湖人,教授,主要从事蔬菜遗传育种及分子生物学研究。

保守的 NAC 结构域,由约 150 个氨基酸组成,可分为 A、B、C、D 和 E 5 个亚结构域;蛋白 C 端具有高度的多样性,具有转录激活或转录抑制活性,为转录调控区^[1]。植物中 NAC 家族成员数量庞大,大豆、水稻、杨树及香蕉基因组中分别含有 152, 151, 163, 167 个 NAC 转录因子^[2-5]。NAC 转录因子在植物生长发育进程中发挥着重要的调控作用,包括植物次生细胞壁的形成、根、茎、叶、花和种子等组织器官的发育、形态建成及衰老等^[6]。如棉花 NAC 转录因子 GhXND1 负调控木质部发育。拟南芥中超量表达 *GhXND1* 显著降低了细胞壁合成相关基因的表达,包括 *CesA4*、*CesA7*、*CesA8*、*CCoAoMT*、*F5H*、*FRA8* 及 *IRX9* 等;同野生型相比,转基因植株木质部导管细胞数目及束间纤维细胞壁的厚度明显降低^[7]。

全基因组转录组分析发现约 20%~25% 的 NAC 转录因子参与了至少一种非生物胁迫应答过程^[1],这表明 NAC 转录因子在植物非生物逆境响应调控网络中起着重要作用。近年来,通过正向和反向遗传学等手段分离鉴定了一系列调控植物非生物逆境应答的 NAC 转录因子。这些 NAC 转录因子多为植物抗性的正调控因子,即超量表达能提高植株的抗性,如拟南芥 ANAC096^[8]、水稻 SNAC1^[9]、OsNAP^[10]、番茄 LeNLP4^[11]、玫瑰 RhNAC2^[12] 和 RhNAC3^[13] 等。此外,还有一些 NAC 转录因子负调控植物的抗逆性,如拟南芥 NTL4^[14] 和番茄 SISRNI^[15] 等。NTL4 能够通过结合 ROS 生物合成途径相关基因启动子区的顺式作用元件,激活相应基因的表达。拟南芥中超量表达 *NTL4* 会上调 ROS 合成相关基因的表达,促进 ROS 的积累,从而加速干旱胁迫下叶片的衰老;而 *ntl4* 突变体中的 ROS 水平降低,延缓了叶片衰老,提高了植株对干旱的抗性^[14]。

番茄基因组中含有 102 个 NAC 转录因子^[16],其中,至少 18 个受低温胁迫诱导^[17]。本研究从番茄中克隆了其中的一个-Unigene SGN-U240637,对其编码蛋白进行生物信息学分析,并利用实时荧光定量 PCR (qPCR) 分析该基因在番茄不同组织及低温、干旱、高盐和氧化胁迫下的表达模式,为揭示该基因在番茄生长发育及非生物逆境应答中的生物学功能奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料与处理

本研究以栽培番茄 (*Solanum lycopersicum*) LA4024 为试验材料。2014 年 3 月中旬播种于穴盘

中,营养基质为蛭石:珍珠岩:园土 = 1:1:1 (体积比)。自然条件下生长 14 d 后,移栽至直径 8 cm 营养钵内。生长 21 d 后进行不同逆境胁迫及激素处理。低温处理:植株置于 4 ℃ 人工气候箱中;干旱处理:植株洗去基质,吸除表面水分后分散放在干燥滤纸上,室温条件下自然脱水模拟干旱胁迫;高盐处理:营养钵基部浸于 400 mmol/L NaCl 溶液中;ABA (脱落酸)、ETH (乙烯) 及氧化胁迫处理:叶面喷施 100 μmol/L ABA、10 mmol/L 乙烯或 100 μmol/L 甲基紫精 (MV) 溶液。各处理材料均处于光照强度 150 μmol/(m²·s),光照时间 16 h 条件下。在处理 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 h 采集第 2 片叶,每时间点取 6 株混样,液氮速冻后 -80 ℃ 冰箱保存备用。

根、茎、嫩叶、成熟叶、衰老叶、花、绿熟果和红熟果等组织样品于同一时间点采自 6 株番茄植株,所有样品液氮速冻,充分研磨后用于 RNA 提取。

1.2 总 RNA 提取、反转录及目标基因的克隆

总 RNA 提取参照 Invitrogen 公司 TRIzol 试剂盒说明书进行。采用 TaKaRa 公司的 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 合成第一链 cDNA。

以 Unigene SGN-U240637 序列为探针,在 Tomato gene models CDS (ITAG release 2.40, <http://solgenomics.net/tools/blast/>) 进行 Blast, 获得该基因全长序列 (Solyc08g077110.2.1)。根据该序列,利用 Primer 3 (<http://primer3.ut.ee/>) 设计包含完整开放阅读框的特异性引物 (左引物: 5'-TCTCGTTCGTACACATCTTTCTCT-3'; 右引物: 5'-CGCGAACTAGACTCAGAGACA-3')。以 LA4024 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增目标基因。反应体系: 2.5 μL 10 × Ex Taq Buffer, 2 μL dNTP (2.5 mmol/L each), 0.5 μL 左、右引物 (10 μmol/L), 2 μL cDNA 模板, 0.3 μL Pyrobest™ DNA Taq (5 U/μL), 17.5 μL ddH₂O。PCR 扩增程序: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 58 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1.5 min, 32 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物电泳回收后连接到 pMD18-T 载体,转化 Trans5α 感受态细胞 (北京全式金生物技术有限公司),经菌落 PCR 鉴定,选取阳性克隆送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

1.3 生物信息学分析

采用 DNAMAN 4.0 软件分析 *SINAC80* 基因序列的开放阅读框,并推导出其编码的氨基酸序列。通过对番茄基因组数据库 (SGN, <http://solgenomics.net/>, SL2.40) 进行比对,确定 *SINAC80* 在染色体上的位置,获取其相应基因组 DNA 序列,并利用在线软件 SoftBerry (

ry. phtml) 对基因组 DNA 序列外显子和内含子构成进行分析。利用在线数据库 Compute pI/Mw (http://web.expasy.org/compute_pi/)、Prosite (<http://prosite.expasy.org/>)、NetGlycate 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGlycate/>) 和 NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 预测蛋白分子量、等电点、蛋白保守结构域、糖基化和磷酸化位点。蛋白疏水性/亲水性、跨膜结构域及亚细胞定位预测分别采用在线软件 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>)、TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 和 ProtComp v. 9.0 (<http://linux1.softberry.com/berry>)。以 *SINAC80* 氨基酸序列为探针,通过 NCBI BlastP 程序,获取其他植物 NAC 氨基酸序列,并利用 MEGA 5.1 软件中 Neighbor-Joining 算法构建系统进化树。

1.4 实时荧光定量 PCR 分析

利用 Primer 3 设计 *SINAC80* 实时荧光定量 PCR 引物(左引物:5'-CGTGGCAGCCTAGTGATCAA-3';右引物:5'-AACCCACGTAGCTTCCATG-3')。以番茄 *EF1a* 作为内参基因^[18],左、右引物序列分别为 5'-CGTGGTTATGTTGCCTCAAA-3'和 5'-ACAGCAATGTGGGAAGTGTG-3'。实时荧光定量 PCR 反应体系和程序参照宝生物工程(大连)有限公司 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)试剂盒说明书在 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪进行,每个反应均设置 3 次重复。采用公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量^[19]。

1.5 启动子区顺式作用元件分析

通过比对分析,从番茄基因组数据库(SGN, release v2.50)中获取 *SINAC80* 基因起始密码子上游 1 000 bp 的启动子区序列。利用在线软件 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) 对启动子区的顺式作用元件进行分析^[20]。

2 结果与分析

2.1 *SINAC80* 的克隆及序列分析

以番茄 Unigene SGN-U240637 序列为探针对 NCBI 数据库进行 Blastn 分析,获得该基因的全长 cDNA 序列(GenBank 登录号:XM_004245832.1)。为验证该序列的可靠性,设计特异引物并通过 PCR 从加工番茄 LA4024 cDNA 中扩增出了与预期片段大小一致的条带(图 1)。测序结果表明,该产物序列与 XM_004245832.1 一致性为 100%。在陈秀玲等^[16]对番茄基因组中的 NAC 家族转录因子进行鉴定及生物信息学分析时,将该基因命名为 *SINAC80*,本研究继续沿用该名。*SINAC80* 位于番茄第 8 条染

色体 61034993 ~ 61036810 区段。该基因基因组 DNA 序列包含 4 个外显子和 3 个内含子。

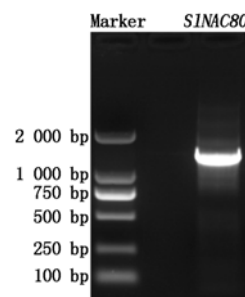


图 1 番茄 *SINAC80* 基因 PCR 扩增

Fig. 1 Amplification of *SINAC80* gene by PCR in tomato

SINAC80 开放阅读框 1 023 bp,编码 340 个氨基酸,蛋白相对分子量为 38.19 kDa,等电点为 5.27。*SINAC80* 蛋白 N-端具有一个由 151 个氨基酸组成的 NAC 保守结构域,包含 A、B、C、D、E 5 个亚结构域(图 2)。由此推断,番茄 *SINAC80* 属于 NAC 家族转录因子。同时,*SINAC80* 蛋白还含有 3 个糖基化位点和 25 个磷酸化位点。糖基化位点分别位于第 59,72,249 位氨基酸。磷酸化位点中丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸磷酸化位点数分别为 12,6,7 个(图 2)。

生物信息学预测结果表明,*SINAC80* 不含跨膜结构域,可能定位于细胞核,其氨基酸序列的疏水性/亲水性如图 3 所示。依据氨基酸预测分值越高疏水性越强,分值越低亲水性越强的规律,可以看出,第 37 位氨基酸具有最高的分值 1.9 即最强的疏水性;第 333 和 334 位氨基酸具有最低的分值 -3.1 即最强的亲水性。*SINAC80* 大部分氨基酸具有亲水性,推测该蛋白属于亲水性蛋白。

2.2 *SINAC80* 转录因子的系统进化分析

以 *SINAC80* 氨基酸序列为探针,通过 BlastP 从 NCBI 数据库中获得其他植物 NAC 蛋白序列。利用 MEGA 5.1 软件构建系统进化树发现,这些 NAC 转录因子可明显分为三大类。*SINAC80* 与马铃薯 NAC72-like (XP_006352840.1)、NAC78-like (XP_006361176.1)、番茄 NAC78-like isoform 2 (XP_004241972.1) 及矮牵牛 Nam-like protein 11 (AAM34774.1) 归为一类(图 4)。其中,*SINAC80* 与马铃薯 NAC72-like 同源性最高,相似性达 94%;与马铃薯 NAC78-like、番茄 NAC78-like isoform 2 及矮牵牛 Nam-like protein 11 的相似性分别为 90%,81%,79%,表明该类 NAC 转录因子在茄科植物中相对较保守。拟南芥中与 *SINAC80* 同源性最高的 NAC 转录因子为 ANAC11 (NP_174529.2),相似性为 74%。

```
1 ATGGCAGGAACATCATTGCTCCGGGATTCGATTTCATCCTACTGATGAGGAATTAGTT
1 M A G ① S L P P G F R F H P ① D E E L V
61 GGATATTACCTGAAAAGGAAAAGTATGGAAGTTGGAAGTTATCCAGTG
21 G Y Y L K R K T D G L E I E L E V I P V
121 ATTGATTGTACAAATTTGATCCATGGAACTTCCAGAGAAATCTTCTTGCCTAAACGT
41 I D L Y K F D P W E L P E K S F L P ① R
181 GACCTCGAGTGGTTTTCTCTGCTCGGGACAAGAAGTATCCGAATGGGTCAAGAAGT
61 D L E W F F F C P R D ① K ① ① P N G S R ①
241 AATCGAGCAACTAAATCTGGATACTGGAAAGCCACAGGAAAGACAGGAAAGTTGTGTG
81 N R A T K S G ① W K A ① G K D R K V V C
301 CATCCAGCAGTTGTTGGCTATCGAAAAACATTGGTTTTCTATCGTGAAGAGCTCCGCTT
101 H P A V V G Y R K T L V F Y R G R A P L
361 GGGGATAGAACGGATTGGGTAATGCACGAGTATCGTCTTTGTGATGATGTTACTCAGGGT
121 G D R T D W V M H E Y R L C D D V T Q G
421 ACTCCTAGTTTTTCAGGGGCTTTTGCACCTTTGCTGTGCATAAAGAGAAACGATGTTTCA
141 T P ① F Q G P F A L C R V I K R N D V ①
481 TTGAAGACGAAAGATGTTGGAGGAGTTAAGCAAGTTGGATCTAGTACAAGTACAACAAGT
161 L K T K D V G G V K Q V G S ① T ① ① T ①
541 GGAGCATTTACCTTAGTAAACGAACCAACCAATGCTCTTTCTGATGAAACGCCAACTCAA
181 G A F T L V N E P P N A L ① D E T P T Q
601 AGTGCAATGAGCAACGATAGCAACTACTCGACTCCTATTGCTTCTCCATATCAGACA
201 S A ① M S N D ① N Y S T P I A ① P Y Q T
661 ACACAATTCGGGGATTATGAGTCTGCAATAGGGGCTAATTCGCAACCTCTGGATGTCC
221 ① Q F G D ① E S A I G A N S A N L W M S
721 TCCGCTATGATTCTTGATTCTAAGGAATGCTCCTCAGGGACAGAATGTATCTAATTAC
241 S A M I L D ① ① K ① E C P Q G Q N V S N Y
781 TGCCACAGTATGACTTCTCGAGCATGACCCCGTGGCAGCCTAGTGATCAATCTGAGTTC
261 C P Q ① D F S S M T P W Q P S D Q S E F
841 ACATCAAATTCAACTTTCCCGAGTTTTAGAGGGGAGGTTGAACCTTCTGGTGACTTAAGT
281 T S N S T F P S F R G E V E L S G D L S
901 AGCTTTGGCTGCATGTCTCCTTACTCGATTGATGGAAGCTACGTGGGGTTATATGGCAAC
301 S F G C M ① P ① S I H G S Y V G L Y G N
961 GAGGACATGACATGAAGTTTTCAATCAGAACGATTCAAACAGGAATCCAAATCTCTTC
321 E D M T ① E V F N Q N D ① N R N P N L F
1021 TGA
341 *
```

灰色背景部分代表 NAC 结构域;下划线标注部分为 A、B、C、D 和 E 等 5 个亚结构域;□标识糖基化位点;○标识磷酸化位点。

Gray background represents the NAC domain;Underline indicates subdomains of A,B,C,D and E;

Letters in square represent the glycosylation sites;Letters in circle indicate the phosphorylation sites.

图 2 *SINAC80* cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 2 cDNA sequence and its deduced amino acid sequence of *SINAC80*

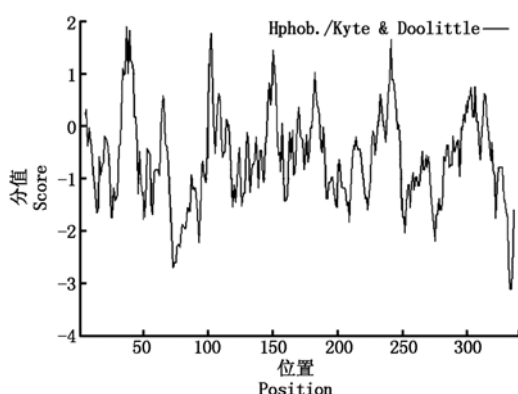


图 3 番茄 *SINAC80* 蛋白疏水性/亲水性预测

Fig. 3 Predication of hydrophobicity/hydrophilicity of tomato *SINAC80* protein

2.3 *SINAC80* 启动子区的顺式作用元件分析

对 *SINAC80* 起始密码子上游 1 000 bp 的启动子区序列进行顺式作用元件分析发现, *SINAC80* 启动子序列中除含有 TATA-box 和 CAAT-box 等基本转录元件外,还存在多种激素响应元件,包括 ABA 响

应元件 DPBFCOREDCDC3、MYB1AT 和 MYCCONSUSAT;赤霉素应答元件 GARE1OSREP1 和 WRKY71OS;乙烯应答元件 ERELEE4 和 WBOXNTERF3;水杨酸应答元件 GT1CONSENSUS 等(表 1)。这些激素响应顺式作用元件的存在表明, *SINAC80* 可能受相应激素的诱导表达。同时, *SINAC80* 启动子区域还存在许多与生物及非生物胁迫应答相关的顺式作用元件,其中与抗病相关的顺式作用元件有 3 种 5 个,包括 1 个 BIHD1OS、2 个 GT1GMSCAM4 及 2 个 WRKY71OS 元件;与非生物逆境应答相关的顺式作用元件包括脱水响应元件 ACGTATERD1、MYB1AT、MYB2AT、MYBCORE、MYCATERD1 和 MYCATRD22;盐胁迫应答元件 GT1GMSCAM4;低温应答元件 LTRE1HVBLT49 和 MYCCONSUSAT;氧化胁迫应答元件 CURECORECR 及伤害诱导元件 WBOXNTERF3 等(表 1)。这些生物及非生物胁迫应答元件的存在暗示 *SINAC80* 可能参与了番茄生物及非生物胁迫应答。

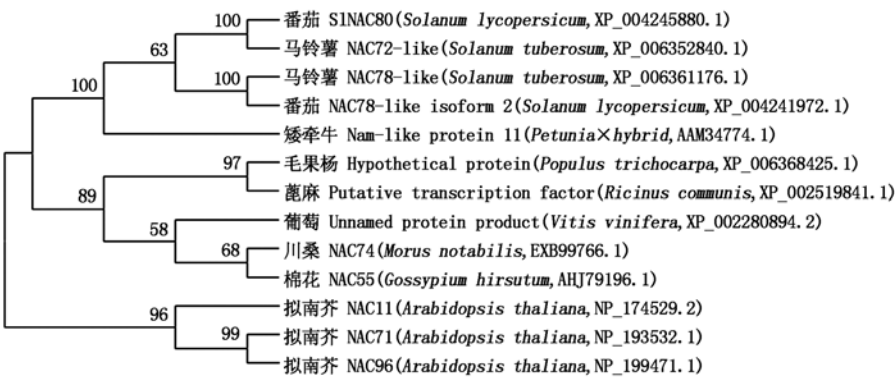


图 4 *SINAC80* 与其他植物 NAC 蛋白的系统进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of *SINAC80* and other plant NACs

表 1 *SINAC80* 启动子区顺式作用元件预测分析

Tab. 1 Putative cis-acting regulatory elements in the *SINAC80* promoter

元件名称 Cis-element name	序列(5' - 3') Sequence	个数 Number	功能 Function
ACGTATERD1	ACGT	2	脱水响应元件
BIHD1OS	TGTCA	1	抗病应答
CURECORECR	GTAC	8	铜离子及氧化胁迫应答
DPBFCOREDCDC3	ACACNNG	1	组织特异性及 ABA 应答
ERELEE4	AWTTCAAA	1	乙烯应答元件
GARE1OSREP1	TAACAGA	1	赤霉素响应元件
GT1CONSENSUS	GRWAAW	13	水杨酸诱导表达
GT1GMSCAM4	GAAAAA	2	病原菌及盐胁迫诱导表达
LTRE1HVBLT49	CCGAAA	1	低温应答元件
MYB1AT	WAACCA	2	MYB 识别位点;脱水及 ABA 应答
MYB2AT	TAACGT	1	MYB 识别位点;脱水应答
MYBCORE	CNGTTR	6	MYB 识别位点;脱水应答
MYCATERD1	CATGTG	1	MYC 识别位点;衰老及脱水应答
MYCATRD22	CACATG	1	MYC 识别位点;脱水应答
MYCCONSUSAT	CANNTG	4	MYC 识别位点;ABA 及低温应答
WBOXNTERF3	TGACY	1	伤害及乙烯应答
WRKY71OS	TGAC	2	WRKY 结合位点;病原菌及赤霉素应答

2.4 *SINAC80* 组织表达特性

qPCR 分析结果表明, *SINAC80* 在番茄根、茎、花、果及不同发育阶段叶片等组织中均有表达, 其中在绿果中的表达量最高, 其次是衰老叶。以根中的表达量为对照, 绿果和衰老叶中该基因的表达量分别为根中表达量的 5.8, 3.1 倍, 暗示 *SINAC80* 可能在番茄果实发育及叶片衰老中发挥作用。茎和花中该基因的表达量也略高于根。根、嫩叶及成熟叶中该基因表达水平基本一致。*SINAC80* 在红熟果中的表达量极低, 仅为根中表达量的 1/10 (图 5)。

2.5 非生物胁迫及激素处理下 *SINAC80* 的表达特性

经 4 ℃ 低温处理 3 h 后, *SINAC80* 的表达均较处理前明显上调, 处理 48 h 时, 该基因的表达量最高, 为处理前的 2.9 倍 (图 6-A)。*SINAC80* 对干旱的响应十分迅速。植株脱水 1 h 时, 该基因的表达量就升到了最大值, 较处理前上调了 8.4 倍。随后该基因的表达急剧下降, 并表现出波动起伏的表达

模式, 但表达量均高于处理前 (图 6-B)。在盐胁迫处理的前 6 h, *SINAC80* 的表达基本没有变化。而在处理 12 h 时, 该基因的表达急剧上升至最大值, 为处理前的 5.3 倍。随后, 该基因的表达量又快速回落, 但仍高于处理前 2 倍以上 (图 6-C)。ABA 处理

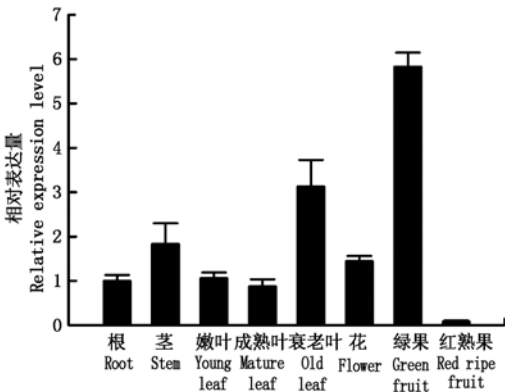


图 5 *SINAC80* 在番茄不同组织的表达

Fig. 5 Expression of *SINAC80* in different tomato tissues

下,*SINAC80* 的表达呈双峰模式,2 次峰值分别出现在处理 1,12 h 时,均较处理前上调 2.8 倍左右(图 6-D)。ETH 处理条件下,*SINAC80* 的表达均呈先升高后回落趋势。处理 6 h 时,该基因表达量达到最大值,为处理前的 4.3 倍;此后迅速回落至处理前水平(图 6-E)。MV 诱导的氧化胁迫下,*SINAC80* 的

表达自处理 6 h 开始升高,12 h 时,表达量达到最大值,为处理前的 4.7 倍(图 6-F)。以上结果表明,*SINAC80* 基因的表达受低温、干旱、高盐、氧化胁迫及逆境相关信号分子 ABA 和 ETH 的诱导,其中以脱水诱导表达最为迅速和强烈。

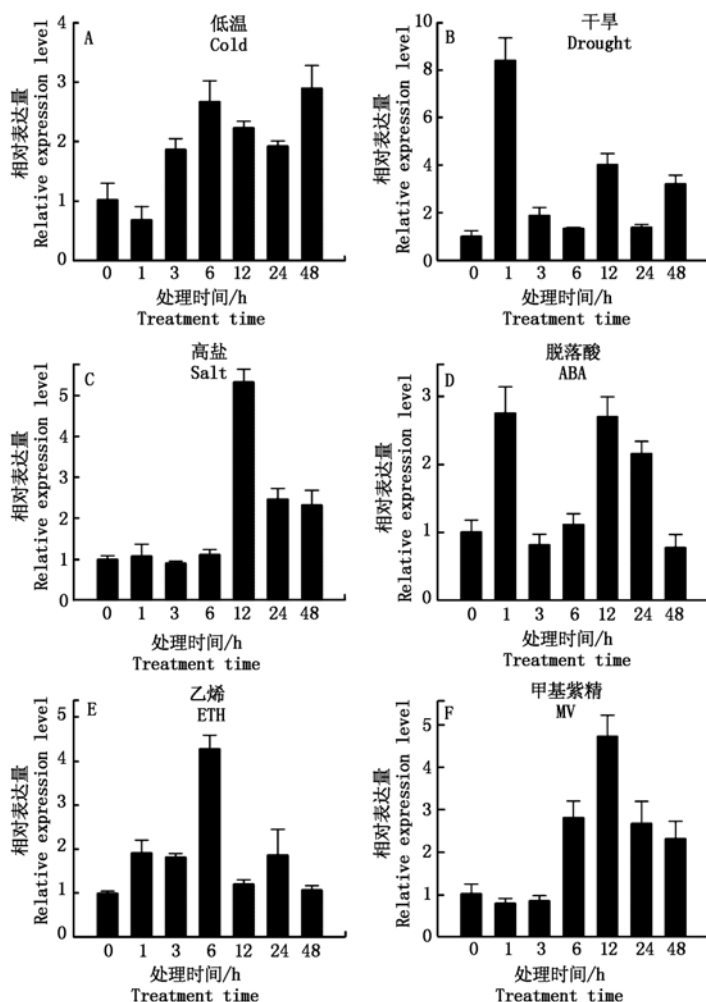


图 6 低温(A)、干旱(B)、高盐(C)、ABA(D)、ETH(E)及MV(F)胁迫下 *SINAC80* 的表达模式

Fig. 6 Expression patterns of *SINAC80* in response to cold (A), drought (B), salt (C), ABA (D), ETH (E) and MV (F) treatments

3 讨论与结论

NAC 转录因子在植物生长发育、生物及非生物逆境应答中发挥重要调控作用^[21-22]。本研究克隆的 *SINAC80* 蛋白 N 端具有典型的由 A、B、C、D、E 等亚结构域构成的 NAC 保守结构域,表明该基因属于 NAC 转录因子家族成员。序列比对及系统进化分析表明,*SINAC80* 与马铃薯和矮牵牛等茄科植物中的 NAC 转录因子处于同一分支,与拟南芥、葡萄及棉花等其他植物的 NAC 转录因子同源性也较高。这些转录因子在 NAC 结构域,尤其是 A、B、C、D、E 5 个亚结构域处非常保守,而在 C-端转录激活区序

列差异较大,同源性较低,这与前人研究报道的 NAC 蛋白 C-端高度多样化一致^[1,23]。与 *SINAC80* 亲缘关系较近的这些 NAC 转录因子均属于功能未知的蛋白,鉴定 *SINAC80* 的生物学功能将有助于该类基因功能的揭示。

组织表达谱分析表明,*SINAC80* 在番茄衰老叶和绿果中表达量较高,暗示该基因可能在番茄衰老和果实发育中发挥作用。目前,已在其他植物中分离鉴定了一些调控组织器官衰老的 NAC 转录因子,如拟南芥 *NTL4*^[14] 和水稻 *OsNAP*^[22]。超量表达 *NTL4* 和 *OsNAP* 均加速了转基因植株叶片的衰老^[14,24]。ETH 和 MV 处理均能诱导叶片衰老,诱导表达分析

也发现 ETH 和 MV 处理后 *SINAC80* 的表达明显上调,这进一步表明 *SINAC80* 可能与组织衰老有关。

SINAC80 的表达受低温、干旱、高盐和 ABA 诱导,表明 *SINAC80* 可能通过 ABA 依赖的途径参与番茄非生物胁迫应答。基因的诱导表达与启动子区的顺式作用元件密切相关。在 *SINAC80* 启动子区含有许多激素、生物及非生物胁迫应答元件,如 ERELEE4、GARE10SREPI、LTRE1HVBLT49、MYB1AT、GT1GMSCAM4、MYBCORE、MYCATERD1、MYCATRD22、WBOXNTERF3 和 WRKY71OS 等。*SINAC80* 受激素及非生物胁迫诱导表达可能与这些顺式作用元件的存在有关。转录因子能够调控下游基因的表达,同时,其表达也受到其他转录因子的调控。在 *SINAC80* 启动子区还存在一些 MYB、MYC 及 WRKY 等转录因子的结合位点,如 MYB1AT、MYB2AT、MYBCORE、MYCATERD1、MYCATRD22、MYCCONSUSAT 及 WRKY71OS 等。这些位点的存在暗示 *SINAC80* 的表达可能受 MYB、MYC 及 WRKY 转录因子的调控。此外,在 *SINAC80* 蛋白中含有许多糖基化和磷酸化位点,其蛋白活性可能还受翻译后修饰水平调控。

通过表达分析,我们推测上调 *SINAC80* 的表达可能会加速植株的衰老,*SINAC80* 可能是番茄生物逆境应答的一个负调控因子。将通过基因工程技术验证该基因在番茄组织衰老及非生物逆境应答中的功能,并试图进一步揭示其调控的分子机制。

参考文献:

- [1] Puranik S, Sahu P P, Srivastava P S. NAC proteins: regulation and role in stress tolerance[J]. Trends in Plant Science, 2012, 17(6): 369–381.
- [2] Dung T L, Nishiyama R, Watanabe Y, 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 Research, 2011, 18(4): 263–276.
- [3] Nuruzzaman M, Manimekalai R, Sharoni A M, et al. Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice[J]. Gene, 2010, 465(1–2): 30–44.
- [4] Hu R B, Qi G, Kong Y Z, et al. Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in *populus trichocarpa*[J]. BMC Plant Biology, 2010, 10: 145.
- [5] Cenci A, Guignon V, Roux N, et al. Genomic analysis of NAC transcription factors in banana (*Musa acuminata*) and definition of NAC orthologous groups for monocots and dicots[J]. Plant Molecular Biology, 2014, 85(1–2): 63–80.
- [6] 杨晓娜, 田 云, 卢向阳. NAC 转录因子在植物生长发育中的调控作用[J]. 化学与生物工程, 2014, 31(1): 1–5, 25.
- [7] Li W, Huang G Q, Zhou W, et al. A cotton (*Gossypium hirsutum*) gene encoding a NAC transcription factor is involved in negative regulation of plant xylem development[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2014, 83C: 134–141.
- [8] Xu Z Y, Kim S Y, Hyeon D Y, 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.
- [9] Liu G Z, Li X E, Jin S X, et al. Overexpression of rice NAC gene *SNAC1* improves drought and salt tolerance by enhancing root development and reducing transpiration rate in transgenic cotton[J]. PLoS ONE, 2014, 9(1): e86895.
- [10] Chen X, Wang Y F, Lv B, et al. The NAC family transcription factor OsNAP confers abiotic stress response through the ABA pathway[J]. Plant and Cell Physiology, 2014, 55(3): 604–619.
- [11] 左衍秋, 马娜娜, 梁晓庆, 等. 过表达 *LeNLP4* 转录因子提高番茄抗低温胁迫能力[J]. 植物生理学报, 2014, 50(4): 501–509.
- [12] Dai F W, Zhang C Q, Jiang X Q, et al. RhNAC2 and RhEXPA4 are involved in the regulation of dehydration tolerance during the expansion of rose petals[J]. Plant Physiology, 2012, 160(4): 2064–2082.
- [13] Jiang X Q, Zhang C Q, Lu P T, et al. RhNAC3, a stress-associated NAC transcription factor, has a role in dehydration tolerance through regulating osmotic stress-related genes in rose petals[J]. Plant Biotechnology Journal, 2014, 12(1): 38–48.
- [14] Lee S, Seo P J, Lee H J, et al. A NAC transcription factor NTL4 promotes reactive oxygen species production during drought-induced leaf senescence in *Arabidopsis*[J]. Plant Journal, 2012, 70(5): 831–844.
- [15] Liu B, Ouyang Z, Zhang Y F, et al. Tomato NAC transcription factor SISRNI positively regulates defense response against biotic stress but negatively regulates abiotic stress response[J]. PLoS ONE, 2014, 9(7): e102067.
- [16] 陈秀玲, 王傲雪, 张珍珠, 等. 番茄 NAC 转录因子家族的鉴定及生物信息学分析[J]. 植物生理学报, 2014, 50(4): 461–470.
- [17] Liu H, Ouyang B, Zhang J H, et al. Differential modulation of photosynthesis, signaling, and transcriptional regulation between tolerant and sensitive tomato genotypes under cold stress[J]. PLoS ONE, 2012, 7(11): e50785.
- [18] Lovdal T, Lillo C. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress[J]. Analytical Biochemistry, 2009, 387(2): 238–242.
- [19] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [20] Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999 [J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(1): 297–300.
- [21] 邢国芳, 张雁明, 张魏斌, 等. 植物 NAC 转录因子的研究进展[J]. 山西农业科学, 2012, 40(4): 409–411, 423.
- [22] 张进艳, 陈 芳, 李 亮, 等. 水分胁迫下 16 个玉米 NAC 转录因子的序列特征和表达分析[J]. 山西农业科学, 2014, 42(4): 307–312.
- [23] 李 伟, 韩 蕾, 钱永强, 等. 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.
- [24] Zhou Y, Huang W F, Liu L, et al. Identification and functional characterization of a rice NAC gene involved in the regulation of leaf senescence[J]. BMC Plant Biology, 2013, 13: 132.