

三个拟南芥 NAC 同源基因突变体的 ABA 响应及下游基因表达分析

卢嘉宝¹, 李晓云^{1*}, 刘旭², 李晓玲¹, 李逸豪¹, 李玲¹

(1. 华南师范大学 生命科学学院, 中国广东 广州 510631; 2. 华南植物园 中国科学院, 中国广东 广州 510520)

摘要: 在获得拟南芥 NAC 同源基因 (*NAC019*, *NAC055* 和 *NAC072*) 双突变体和三突变体纯系的基础上, 进一步分析它们对 ABA 响应的生理差异及其 ABA 诱导相关下游基因的表达变化, 深入探讨它们与 ABA 响应的关系。结果表明, 在种子绿胚建成的过程中, *NAC055* 和 *NAC072* 基因与 ABA 响应相关; 在根生长方面, 三者对 ABA 响应中作用不明显。经 ABA 处理后, 突变体 *nac072* 和 *nac055nac072* 与野生型比较, *RAB18*, *RD29A* 和 *RD29B* 基因表达上调显著, 推测在 ABA 响应的基因表达调控过程中, *NAC072* 和 *NAC055* 起负调控协同作用, 而 *NAC019* 则发挥拮抗作用。

关键词: NAC; 拟南芥; 突变体; ABA 响应

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2015)02-0114-05

Study on the Response to Applying ABA and Expression Changes of ABA Induced Relative Genes in *Arabidopsis* Mutants of Three NAC Homologous Genes

LU Jia-bao¹, LI Xiao-yun^{1*}, LIU Xu², LI Xiao-lin¹, LI Yi-hao¹, LI Ling¹

(1. College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, Guangdong, China; 2. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Science, Guangzhou 510650, Guangdong, China)

Abstract: The double and triple mutants of three *Arabidopsis* NAC homologous genes (*NAC019*, *NAC055* and *NAC072*) have been obtained previously. To reveal the relationship between the NAC genes and ABA response, the response to ABA and downstream genes were further analyzed in NAC mutants. In the process of seed cotyledon greening, the *NAC055* and *NAC072* genes were found associated with ABA response. In terms of seedling root elongation, three NAC genes were seen not associated with the ABA response. Compared with the wild type, the gene expression of *RAB18*, *RD29A* and *RD29B* increased significantly in *nac072* and *nac055nac072* mutants after ABA treatment. These results suggested that *NAC072* and *NAC055* negative regulated synergistically in the process of expression regulation of ABA response genes, whereas *NAC019* antagonized *NAC072* and *NAC055*.

Key words: NAC; *Arabidopsis*; mutants; ABA response

(*Life Science Research*, 2015, 19(2): 114~118)

NAC (NAM, ATAF, CUC) 转录因子是特异存在于植物中, 具有多种生物功能的一类新型转录因子。NAC 转录因子的 N 端含有高度保守的 NAC 结构域, 用于结合 DNA, 调节转录活性, C 端

是高度变异转录激活区^[1]。NAC 转录因子具有诸多方面的功能, 如参与植物次生生长、激素信号传导, 以及在与生物胁迫和非生物逆境中发挥作用^[2,3]。从拟南芥中分离到 3 个不同的 NAC 基因

收稿日期: 2014-08-19; 修回日期: 2014-10-23

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (S2012010009516)

作者简介: 卢嘉宝 (1991-), 女, 广东广州人, 硕士研究生; * 通讯作者: 李晓云 (1982-), 女, 广东湛江人, 博士, 主要从事植物抗逆与激素调节机制研究, Tel: 020-85211378, E-mail: xiaoyun5893@163.com。

NAC019、*NAC055* 和 *NAC072*, 干旱诱导其表达, 能与 NACRE(NAC response elements)的核心元件 CACG 和 MYC-Like 元件 CATGT 的 DNA 体外结合^[4]。*NAC072* 被报道参与 ABA 介导的逆境信号传导途径, 超量表达显著增强转基因植株 ABA 敏感性, 瞬时表达激活多 CACG 元件启动子活性^[5]。*NAC019* 在 ABA 信号传导中也起正向的调节作用^[6]; *NAC019* 和 *NAC055* 在 JA 和 ABA 的信号传导途径之间存在交叉对话^[7]。

拟南芥 *NAC072*(*RD26*), *NAC019* 和 *NAC055* 编码蛋白氨基酸序列同源性高, 且其表达模式和遗传功能类似。目前这 3 个胁迫相关 NAC 亚类基因之间关系不清楚。本文构建突变株 *NAC019*、*NAC055*、*NAC072* 的双突变和三突变植株, 通过不同突变植株的 ABA 生理响应和 ABA 信号途径相关基因表达变化, 分析三者之间的功能关系及其参与 ABA 信号的可能角色。为揭示 ABA 介导下, NAC 转录因子与 ABA 信号的关系, 及认识 ABA 信号转导中转录因子可能的调节机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

野生型拟南芥 Col 由实验室保存, 纯种单基因突变体 *nac055*、*nac019* 和 *nac072* 种子购于拟南芥资源中心 (*Arabidopsis* Biological Resource Center), 由本实验室筛选与保存。

1.2 方法

1.2.1 植物培养

拟南芥种子用 75% 的乙醇溶液(含 0.5% TritonX-100)浸泡 2 min, 用无水乙醇快速漂洗后, 撒到 1/2 MS 培养基上。4 °C 放置 2 d, 然后在光照培养箱中(昼夜温度为 22 °C / 20 °C, 光照周期为 16 h / 8 h, 平均湿度为 40%~60%)培养 6 d。将其移栽到由泥炭土、珍珠岩按 3:1(V/V)比例拌匀的培养土中培养。培养土预先用营养液(1/4 MS)浇透待用。用镊子将幼苗移栽到湿润的土上, 盖上一层保鲜膜, 培养 2~3 d 幼苗, 揭开保鲜膜。在植株抽苔及抽苔后 1~2 周, 以 1/4MS 营养液浇透培养土。培养过程中视情况适当浇水。

1.2.2 拟南芥突变体杂交

按照表 1, 分别将开花的突变体(作为父本)与未开花且雄蕊未成熟的突变体(作为母本)杂交, 经两次种植分离并 PCR 鉴定后, 获得

nac019nac055、*nac019nac072* 和 *nac055nac072* 双杂交纯合体。同理, 将开花的 *nac072* 与未开花且雄蕊未成熟的拟南芥 *nac019nac055* 进行杂交。待荚果成熟后单独收种子, 经 3 次种植分离并 PCR 鉴定后, 获得三突变体 *nac019nac055nac072*。

表 1 拟南芥 NAC 突变体的杂交
Table 1 Hybridization of NAC mutants in *Arabidopsis*

Female parent	Male parent		
	<i>nac019</i>	<i>nac055</i>	<i>nac019nac055</i>
<i>nac019</i>		<i>nac019nac055</i>	
<i>nac072</i>	<i>nac019nac072</i>	<i>nac055nac072</i>	<i>nac019nac055nac072</i>

1.2.3 杂交株鉴定

利用三引物 PCR 法筛选纯合体, RT-PCR 分别对拟南芥突变体(*nac055nac072*、*nac019nac072*、*nac019nac055* 和 *nac019nac055nac072*) 纯合子进行基因表达鉴定。

所用的特异性引物组合为: N019-ORF-F 和 N019-ORF-R, LBa1 和 N019-ORF-R, N055-ORF-F 和 N055-ORF-R, N055-ORF-F 和 LBa1, RD26-F 和 RD26-R, RD26-F 和 LBa1 (表 2); PCR 程序: 94 °C 变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 70 s(有 LBa1 时: 70 s; 若全长 R+F: 1 min 40 s), 38 个循环, 72 °C 延伸 10 min; 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

表 2 鉴定 NAC 突变体的引物
Table 2 Primers used in NAC mutants identification

Primer name	Primer sequence (5'~3')
N019-ORF-F	GGA <u>AGATCT</u> ATGGGTATCCAAGAAACTGACC
N019-ORF-R	AAGGTGACCTCACATAAACCCAAACCCACCA
RD26-F	TGCTCTAGAGCAATGGGTGTTAGAGAGAAAGATCC
RD26-R	CGCGGATCCGCGTTCACCCATCAGTAACCTCACAT
N055-ORF-F	GGAAGATCTATGGGTCTCCAAGAGCTTGACC
N055-ORF-R	AAGGTGACCTCAAATAAACCCGAACCCACTAG
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGCCATCG
18S-F	ATT CCT AGT AAG CGC GAG TCA TCA G
18S-R	CAA TGA TCC TTC CGC AGG TTC AC

注: 下划线标记序列为酶切位点。

Notes: Underline tag indicated the enzyme digestion location.

1.2.4 基因表达检测

按照文献^[8]方法从 Col 和纯合突变体植株提取总 RNA。用 TaKaRa RTase M-MLV 反转录合成 cDNA, 参考 TaKaRa 公司 RTase M-MLV 反转录试剂使用说明, 利用特异引物(表 2), 通过 PCR 和 DNA 凝胶电泳检测相应的 cDNA。

1.2.5 种子绿胚统计

种子经常规消毒后, 分别点种在含有 0、0.5、1、2 μmol/L ABA 的 1/2 MS 固体培养基上(不含

0.8% 的蔗糖), 放于光照培养箱中 4 °C 春化 4 d。然后在 22 °C 培养第 7 d, 开始统计绿胚率, 以绿胚长出绿色子叶为准。重复 3 次。

1.2.6 根生长统计

种子消毒后播种于 1/2 MS 培养基, 4 °C 放置 4 d 后, 放于光照培养箱中培养。长出两片叶子(约 3 d)后, 移至分别含有 0、15、30 μmol/L ABA 的 1/2 MS 固体培养基上(含 0.8 % 的蔗糖), 平板垂直培养 7 d, 测量幼苗的主根长度。用 SonyFll6 数码相机拍摄主根的生长, 计算主根增长率: 主根伸长率(%)= 处理的主根长 / 对照的主根长 × 100%。

1.2.7 数据统计

数据结果通过 Spss 13.0 分析。

2 结果与分析

2.1 杂交双突变体和三突变体的筛选与检测

通过 RT-PCR 方法, 对拟南芥野生型 Col 和 NAC 突变体 *nac019*、*nac055*、*nac072*、*nac055nac072*、*nac019nac072*、*nac019nac055* 和 *nac019nac055nac072* 进行鉴定, 根据突变体植株中不能表达所缺失的相应突变基因, 确认三者的单基因突变体 *nac019*、*nac055*、*nac072* 以及三者的杂交突变体 *nac019nac055*、*nac055nac072*、*nac055nac072* 和 *nac019nac055nac072*(图 1)为纯合突变体, 可用于进行后续的生理实验以及基因表达量的检测。

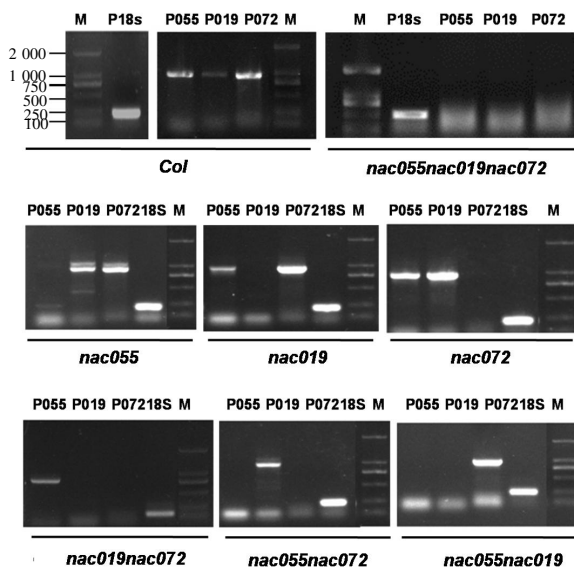


图 1 拟南芥 NAC 突变体的分子鉴定
Fig.1 Schematic molecular identification of NAC mutants in Arabidopsis

2.2 NAC 突变体的 ABA 生理响应

野生型(对照)和用 0.5 μmol/L ABA 浓度处理的突变株系的种子在培养 7 d 正常萌发, 经 1 μmol/L 和 2 μmol/L ABA 处理的种子萌发 7 d, 大部分缺乏绿胚, 没有出现绿叶(图 2)。经 0.5 μmol/L ABA 处理后, 突变体 *nac055*、*nac055nac072*、*nac019nac055* 的种子绿胚率比野生型高 16%~22%, 其中 *nac055* 种子的绿胚率最高(图 2), 说明 NAC055 在种子萌发过程中对外源 ABA 响应较强, 缺失 NAC055 基因突变体植株(如 *nac055*、*nac055nac072*、*nac019nac055*)的 ABA 敏感性较弱。

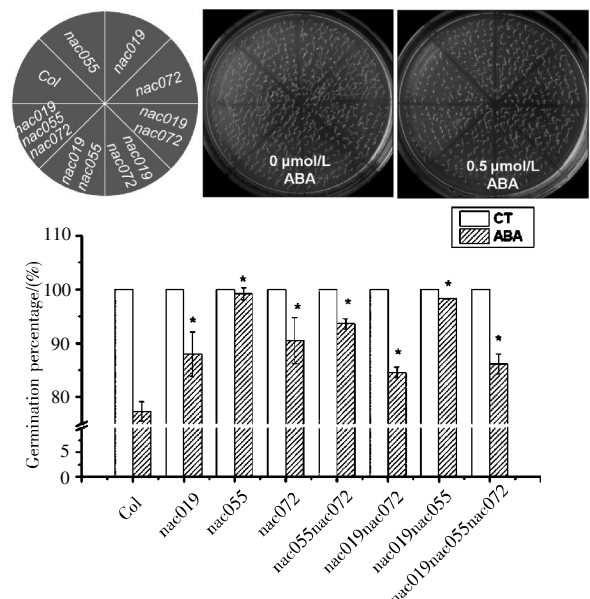


图 2 ABA 处理对 NAC 突变体萌发率的影响
Fig.2 Effect of exogenous ABA on germination rate in NAC mutants of Arabidopsis

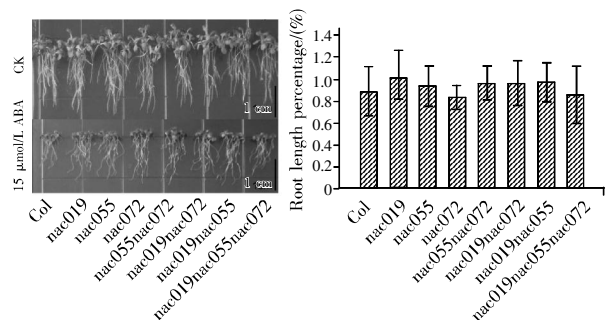


图 3 ABA 处理对 NAC 突变体根生长的影响
Fig.3 Effect of exogenous ABA on root growth in NAC mutants of Arabidopsis

从 ABA 处理对根生长影响的来看, 发现各突变体对 ABA 敏感性均没有显著性差异, 推测它们在根生长对 ABA 响应中的作用不明显。

2.3 NAC 突变体的 ABA 相关下游基因表达检测
RD29A、RAB18、RD29B 基因皆是 ABA 介导

的信号途径中的重要关键基因。为了认识 NAC 转录因子成员参与 ABA 介导的信号途径情况,我们分析 ABA 处理后的 NAC 突变体体内 *RD29A*、*RAB18*、*RD29B* 的表达变化。结果表明,经 ABA 处理后野生型和 NAC 突变植株的 *RD29A*、*RAB18* 和 *RD29B* 表达量显著上调(图 5)。但在突变体中的 3 个基因表达模式大致相同,即 NAC 三突变体 *nac019nac055nac072* 以及 NAC 双突变

nac019nac072、*nac019nac055* 植株中 *RD29A*、*RAB18* 和 *RD29B* 的诱导表达与野生型无显著差异,而单突变体 *nac072* 和双突变体 *nac055nac072* 比野生型显著上升,双突变体 *nac055nac072* 的表达变化最显著,推测 *NAC072* 和 *NAC055* 在 ABA 响应下游基因调控中可能发挥负调节作用,*NAC072* 的作用更大,而 *NAC019* 可能拮抗前两者。

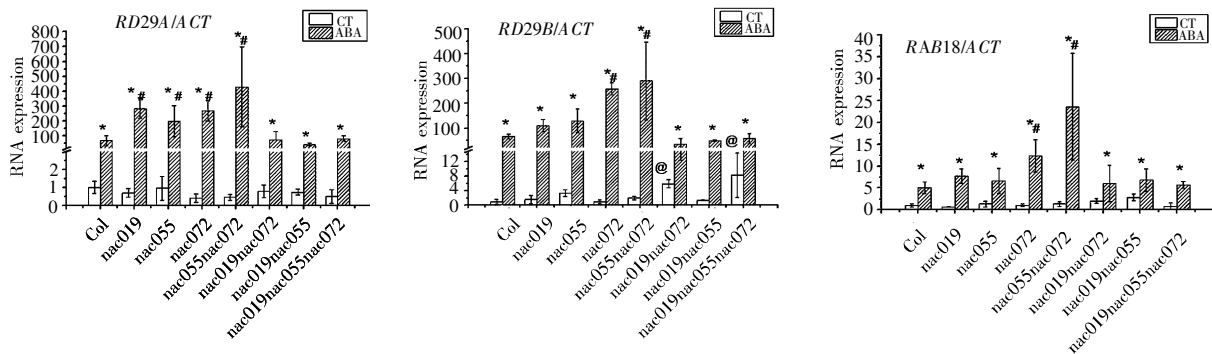


图 4 NAC 突变体 ABA 相关下游基因表达的变化

Fig.4 Expression changes of ABA induced relative genes in NAC mutants of *Arabidopsis*

3 讨论

NAC 转录因子是特异性存在于植物中的一类转录因子,家族成员多,模式植物拟南芥含有 110 多个 NAC 家族成员,单子叶植物水稻中存在 120 多个 NAC 同源基因^[9]。NAC 转录因子在不同发育时期和多种环境因素诱导下,激活特定目的蛋白发挥着各种重要生物功能,主要涉及对植物体生长发育的调控和环境胁迫影响^[1]。本文的研究结果表明,*nac055*、*nac055nac072*、*nac019nac055* 突变体在 0.5 $\mu\text{mol/L}$ ABA 处理后,萌发率高于野生型,其中 *nac055* 萌发率最高,如 *nac055*、*nac055nac072* 和 *nac019nac055* 突变体 ABA 敏感性弱。推测 *NAC055* 在种子萌发过程中对 ABA 响应发挥重要作用,缺失 *NAC055* 的突变体,已知 *NAC055* 拟南芥过表达植株存在较强的抗旱性,为 ABA、盐和干旱显著诱导^[4],其可能与 *NAC019* 共同作用 JA 途径^[7]。目前关于 *NAC055* 参与 ABA 种子萌发具体机制并不清楚,与其他两个成员相比,可能与其特殊的组织表达模式和调控方式相关,需要进一步深入研究。但其单突变体的生理报道缺乏。ABA 处理拟南芥根生长的实验结果发现,各突变体与野生型相比在 ABA 敏感性方面均不存在显著差异,说明三者根生长的 ABA 响应中不发挥主要作用。

RD29A、*RD29B*、*RAB18* 基因是最常选择的拟南芥胁迫相关下游 Marker 基因,它们快速响应各种非生物胁迫和 ABA 的诱导作用^[10,11],反映植物在胁迫条件下基因表达的响应强度。*RD29A* 是不依赖型 ABA 的相关下游基因^[10]。其在无内源 ABA 时亦应答干旱等非生物胁迫,ABA 处理可诱导该基因大量表达,能快速反应胁迫处理的强度;*RD29B* 是经典的拟南芥 ABA 依赖型下游诱导基因,其启动子具有两个重要的 ABA 应答顺式作用原件 ABRE,在无内源 ABA 时,不能或显著减弱对胁迫应答的诱导表达^[11],其表达差异准确反应 ABA 信号的强度,是研究 ABA 诱导基因表达的必需下游 Marker 基因。拟南芥 *RAB18* 是富含 Gly (33%)的脱水相关蛋白,ABA 处理可以诱导该基因大量表达^[11];一般情况下,ABA 处理后 *RAB18* 基因表达变化与 *RD29A* 和 *RD29B* 变化趋势相同,三者共同反应 ABA 响应的下游基因表达强度。

对突变体 ABA 相关下游基因表达分析的结果发现,相比野生型和其他突变体植株,*nac055nac072* 在 ABA 处理后,*RD29A*、*RD29B* 和 *RAB18* 诱导表达量上升趋势最明显,而 *nac072* 次之,ABA 处理下 *NAC072* 对 *RD29B* 和 *RAB18* 表达抑制贡献最大,当其与 *NAC055* 同时缺失后,下游基因的诱导上升趋势变化最大。这说明 *NAC072* 和 *NAC055* 可能在对 *RD29B* 和 *RAB18*

基因响应 ABA 诱导表达调节中发挥协同作用,对基因表达都起抑制作用。已知 *NAC072* (也称为 *RD26*) 参与 ABA 的信号途径,*NAC072* 和 *NAC055* 都为 ABA 诱导显著上调,其过表达拟南芥植株对 ABA 超敏感^[9]。说明 *NAC072* 是一个 ABA 信号正调控者的角色,但在本研究中,其单双缺失突变体都表现出对 ABA 诱导下游基因的抑制作用,可能预示着其参与 ABA 信号的复杂形式。另外,*NAC* 三突变体 *nac019nac055nac072* 以及双突变 *nac019nac072*、*nac019nac055* 植株中 *RD29A*、*RAB18* 和 *RD29B* 的诱导表达与野生型无明显差异,在多突变体影响 ABA 诱导下游基因表达中 *NAC019* 的作用与 *NAC072* 和 *NAC055* 相反。其可能拮抗 *NAC072* 和 *NAC055* 对 ABA 诱导下游基因的抑制作用。已知 *NAC019* 和 *NAC055* 转录因子在 JA 信号途径中相互协同^[7],而三者基因的过表达拟南芥均表现出相同的抗性增强表型^[4],说明三者胁迫条件下可能发生基因功能冗余并协同作用,但也并不排除特定条件下同源蛋白间拮抗作用的发生,如同源基因间的竞争性蛋白互作和 DNA 结合等^[12]。目前关于三者如何参与 ABA 下游基因表达调控研究还处于起步阶段,很多问题悬而未决,还需大量研究证实。

参考文献 (References):

[1] 刘旭,李玲.植物 NAC 转录因子的研究进展[J]. 生命科学研究

- 究 (The research progress of NAC transcriptin factors in plant), 2008, 12(4): 297-302.
- [2] LI X L, YANG X, HU Y X, *et al.* A novel NAC transcription factor from Suaeda liaotungensis K. enhanced transgenic *Arabidopsis* drought, salt, and cold stress tolerance[J]. Plant Cell Reports, 2014, 33(5): 767-778.
- [3] LIU X, HONG L, LI X, *et al.* Improved drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* over-expressing a NAC transcriptional factor from *Arachis hypogaea L*[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2011, 75(3): 100614-100618.
- [4] TRAN LSP, NAKASHIMA K, SAKUMA 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(9):2481-2498.
- [5] FUJITA M, FUJITA Y, MARUYAMA K, *et al.* A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway[J]. Plant Journal, 2004, 39(6): 863-876.
- [6] JENSEN M K, KJAERGAARD T, NIELSEN M M, *et al.* The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: structure-function relationships and determinants of AtNAC019 stress signaling[J]. Biochemical Journal, 2010, 426(2): 183-196.
- [7] JIANG H, LI H, BU Q, *et al.* The RHA2a-interacting proteins AtNAC019 and AtNAC055 may play a dual role in regulating ABA response and jasmonate response[J]. Plant Signaling & Behavior, 2009, 4(5): 464-466.
- [8] CHEN Y, LI L, HU P, *et al.* Relationship between drought resistance and *AhNCED1* expression in peanut varieties from four provinces in China[J]. Journal of Food, Agriculture & Environment, 2014, 12(2): 509-514.
- [9] OOKA H, SATHO K, DOI K, *et al.* Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*[J]. DNA Research, 2003, 10(6): 239-247.
- [10] XIONG L, LEE H, ISHITANI M, *et al.* Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the *LOS6/ABA1* locus in *Arabidopsis* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(10): 8588-8596.
- [11] HALLOUIN M, GHELIS T, BRAULT M, *et al.* Plasmalemma abscisic acid perception leads to *RAB18* expression via phospholipase D activation in *Arabidopsis* suspension cells[J]. Plant Physiology, 2002, 130(1): 265-272.
- [12] SONG S, QI T, WASTERNAK C, *et al.* Jasmonate signaling and crosstalk with gibberellin and ethylene[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2014, 24(7): 112-119.

中文核心期刊《生命科学研究》2015 年征稿征订启事

《生命科学研究》是由中华人民共和国新闻出版署、科技部批准创办的,国内外公开发行的反映生命科学领域中最新研究成果的综合性学术期刊。本刊已经进入包括北大《中文核心期刊要目总览》(2011 版)、中国科学引文索引数据库(CSCD)、中国科技论文统计源期刊数据库、中国核心期刊(遴选)数据库、中国期刊网、美国《化学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》等国内外多家重要检索数据库。本刊为双月刊,国内公开刊号为 CN43-1266Q,国际标准刊号为 ISSN1007-7847, CODEN:SKYAFL。本刊主要刊登国内外生命科学领域中的具有创造性的学术论文及少量反映国内外重大进展或热点问题的快讯或综述性文章,覆盖的主要学科是:生物化学与分子生物学、发育生物学、细胞生物学、生物技术、遗传学、植物学、动物学、微生物学、解剖学、生理学、基因工程、农业工程、病理学、毒理学、药理学、免疫学、基础医学等等。开设“研究进展与综述”、“研究论文”等栏目。本刊诚邀反映国内外生命科学相关领域最新研究成果的中英文论文,国家自然科学基金等国家级科研课题资助论文将优先发表。

地 址:长沙市湖南师范大学生命科学学院 1 号楼 105 室《生命科学研究》编辑部,邮编:410081

投稿网址: <http://smkx.hunnu.edu.cn>

E-mail: smkxyj@vip.126.com; life@hunnu.edu.cn

电 话:0731-88872616; 传 真:0731-88872616

《生命科学研究》每期定价 18 元,全年 108 元。国内邮发代号:42-172,国外发行代号:DK43008。

欢迎投稿! 欢迎订阅! 欢迎发布广告!