

北美鹅掌楸 NAC 基因的克隆与表达分析

杨颖, 李火根^①

(南京林业大学南方现代林业协同创新中心, 江苏 南京 210037)

摘要: 基于鹅掌楸(*Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg.)转录组信息,对北美鹅掌楸(*L. tulipifera* Linn.)NAC(*NAM*、*ATAF1/2* 及 *CUC2*)家族基因的结构和功能进行研究。采用 RACE 技术从北美鹅掌楸叶片中克隆出 16 个 *LtNAC* 基因的开放阅读框(ORF),编号为 *LtNAC01* 至 *LtNAC16*。16 个 *LtNAC* 基因的 ORF 长度为 561 ~ 1 830 bp,编码 187 ~ 610 个氨基酸。根据理论等电点(pI),在 *LtNAC* 基因编码的 16 个 *LtNAC* 蛋白中,9 个为碱性蛋白质,7 个为酸性蛋白质。根据蛋白质疏水性(GRAVY),16 个 *LtNAC* 蛋白中,13 个为亲水蛋白质,3 个为两性蛋白质。蛋白质二级结构预测结果显示:16 个 *LtNAC* 蛋白均以无规则卷曲为主要构成元件, α 螺旋、延伸链和 β 转角则散布于整个蛋白质中。系统进化分析结果表明:北美鹅掌楸 16 个 *LtNAC* 基因可能并不参与细胞壁的生物合成,其中,*LtNAC02*、*LtNAC03* 和 *LtNAC04* 基因可能参与北美鹅掌楸的胁迫响应。*LtNAC03*、*LtNAC07*、*LtNAC08*、*LtNAC09*、*LtNAC11*、*LtNAC12*、*LtNAC14*、*LtNAC15* 和 *LtNAC16* 基因的相对表达量与北美鹅掌楸叶片衰老程度呈现相关性,推测该 9 个 *LtNAC* 基因可能参与调控叶片衰老。

关键词: 北美鹅掌楸; *LtNAC* 基因; 叶片衰老; qRT-PCR

中图分类号: Q943.2; S792.21 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2015)03-0001-09
DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2015.03.01

Cloning of NAC gene from *Liriodendron tulipifera* and its expression analysis YANG Ying, LI Huogen^① (Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2015, 24(3): 1-9

Abstract: Based on the transcriptome data of *Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg., structure and function of NAC (*NAM*, *ATAF1/2* and *CUC2*) family genes from *L. tulipifera* Linn. were researched. Open reading frame (ORF) of 16 *LtNAC* genes was cloned from leaf of *L. tulipifera* by RACE technology with Nos. from *LtNAC01* to *LtNAC16*. Length of ORF of 16 *LtNAC* genes is 561-1 830 bp, and 187-610 amino acids are encoded. According to theoretical isoelectric point (pI), there are 9 basic proteins and 7 acidic proteins in 16 *LtNAC* proteins encoded by *LtNAC* genes. According to grand average of hydropathicity (GRAVY), there are 13 hydrophilic proteins and 3 hydrophobic proteins in 16 *LtNAC* proteins. The predicting result of secondary structure of *LtNAC* protein shows that random coil is main component in all of 16 *LtNAC* proteins, and α helix, extended strand and β turn distribute widely in the whole protein. The result of phylogenetic analysis shows that 16 *LtNAC* genes of *L. tulipifera* may not participate in cell wall biosynthesis, in which, *LtNAC02*, *LtNAC03* and *LtNAC04* genes may participate in stress response of *L. tulipifera*. Relative expression of *LtNAC03*, *LtNAC07*, *LtNAC08*, *LtNAC09*, *LtNAC11*, *LtNAC12*, *LtNAC14*, *LtNAC15* and *LtNAC16* genes is related to leaf senescence progression of *L. tulipifera*, and it is predicted that the nine *LtNAC* genes may participate in regulating leaf senescence progression.

Key words: *Liriodendron tulipifera* Linn.; *LtNAC* gene; leaf senescence; qRT-PCR

收稿日期: 2015-05-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31470660; 31170621); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

作者简介: 杨颖(1988—),女,江苏南京人,博士研究生,主要从事森林遗传学等方面的研究。

^①通信作者 E-mail: hgli@njfu.edu.cn

植物 *NAC* (*NAM*, *ATAF1/2* 及 *CUC2*) 基因家族是植物特有的、最大的转录因子基因家族。该基因家族成员有一个共同的、保守的 DNA 结合结构域, 即 N 端的 *NAC* 保守结构域; 相反, 其 C 端(通常包含转录激活结构域)的长度与序列组成高度变异。最早的研究发现 *NAC* 基因的功能与顶端分生组织(SAM)及子叶中的器官分离有关^[1-2]。随后的研究表明:*NAC* 基因家族对于植物器官边界的建成^[3-5]、叶缘形态发育^[3,6-8]、细胞次生壁合成^[9-12]、叶片衰老^[13-17]以及植物对生物和非生物胁迫的响应^[18-19]等多个生物学阶段的基因表达具有重要的调控作用。

叶片衰老是叶片发育的重要阶段,其生物学意义是将营养物质从正在衰老的器官中转移到仍在生长的组织中,最终转移到发育中的种子中^[20]。在营养生长阶段,叶片延长绿叶期意味着将会产生更多的营养物质,然而,在种子成熟阶段延迟衰老将导致农作物产量下降,这对营养物质的转移至关重要^[21]。*NAC* 基因家族是调控叶片衰老的一个重要的转录因子家族。在大麦(*Hordeum vulgare* Linn.)^[21]、柳枝稷(*Panicum virgatum* Linn.)^[22]和拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.]^[14]中均发现多个调控叶片衰老的 *NAC* 基因,它们对植物叶片衰老起到正向或负向的调控作用。

目前,关于植物 *NAC* 基因对林木叶片衰老的调控机制的研究还未见报道。北美鹅掌楸(*Liriodendron tulipifera* Linn.)是原产北美东部的落叶大乔木,属于古老的被子植物,在植物进化研究中占据举足轻重的地位,因此,研究北美鹅掌楸 *NAC* 基因对叶片衰老的调控作用具有非常重要的意义。

本文以北美鹅掌楸为研究对象,通过挖掘北美鹅掌楸转录组信息,采用 RACE 技术分离克隆 *NAC* 家族基因,同时,利用 qRT-PCR 技术进行基因定量表达分析,以初步分析 *LtNAC* 基因的功能,以期为鹅掌楸属(*Liriodendron* Linn.)植物叶片衰老调控及候选基因筛选提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料均采自南京林业大学下蜀实习林场鹅掌楸种源试验林。于2014年5月采集成年北美鹅掌楸刚刚开始黄化的叶片(ES)作为基因克隆材料;为

研究叶片不同衰老阶段的基因表达,同年9月,采集成年北美鹅掌楸相同冠层、相同方位不同生长阶段的叶片,包括嫩叶(LY)、完全展开未衰老叶片(LEN)、衰老早期叶片(LE)以及衰老后期叶片(LL)4种类型的叶片,其中嫩叶为完全张开且中脉长度5~6 cm的叶片;完全展开未衰老叶片为中脉长度9~10 cm的绿色叶片;衰老早期叶片为叶表黄化面积小于25%且中脉长度9~10 cm的叶片;衰老后期叶片为叶表黄化面积大于50%且中脉长度9~10 cm的叶片。每种类型叶片各取3枚,液氮速冻后,带回实验室并于-80℃保存。

1.2 基因克隆

1.2.1 引物设计 作者所在实验室前期已利用 Illumina 测序平台对鹅掌楸[*L. chinense* (Hemsl.) Sarg.]的花瓣和叶片进行转录组测序,通过拼接共获得87 841 unigene,并进行功能注释^[23]。从 Pfam 的注释结果中搜索包含 *NAC* 结构域的序列。Liang 等^[24]利用454测序平台开发了北美鹅掌楸转录组数据库(<http://ancangio.uga.edu/content/liriodendron-tulipifera>),其 unigene 的序列平均长度为478 bp。为获得北美鹅掌楸 *NAC* 家族基因信息,将已经搜索到的鹅掌楸 *NAC* 结构域序列与北美鹅掌楸转录组数据库进行 BLAST 比对,获得目的基因片段序列信息,根据目的基因片段序列设计 RACE 引物。

1.2.2 RNA 提取及克隆 采用 RNA Prep Pure Tissue Kit 试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]克隆全长目的基因。5' RACE 反转录使用 TaKaRa 5'-Full RACE Kit with ATP 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司],3' RACE 反转录使用 TaKaRa 3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]。用 Thermo Scientific Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]合成第1链 cDNA 并用于全长开放阅读框(ORF)的扩增。具体操作步骤参照各试剂盒说明书。

1.3 *LtNAC* 基因的生物信息学分析

采用 ExPASy 提供的在线工具 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)对预测的北美鹅掌楸 *NAC* 基因编码的蛋白质进行一级结构分析。利用在线工具 SOPMA 对北美鹅掌楸 *NAC* 基因编码的蛋白质进行二级结构分析(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)^[25],并预测其 α 螺旋、延伸链、 β 转角和无规则卷曲等在整

体结构中所占的比例。采用在线分析软件 TMHMM Server v. 2. 0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 进行蛋白质跨膜区预测。

从拟南芥蛋白质数据库 (TAIR, <http://www.arabidopsis.org/>) 中下载拟南芥所有 105 个 *NAC* 家族成员 (ANAC001 至 ANAC105) 的蛋白质序列。同时, 从 GenBank 下载 23 个其他物种中已验证功能的 *NAC* 蛋白序列, 包括水稻 (*Oryza sativa* Linn.) 的 OsNAP (NP_912423)、OsNAC4 (BAA89798)、OsNAC5 (BAA89799)、OsNAC6 (BAA89800) 和 OsNAC9, 大麦的 NAM-B1 (ACL31422.1), *Bambusa emeiensis* L. C. Chia et H. L. Fung 的 BeNAC1 (ADP69102.1), *Ipomoea nil* (Linn.) Roth 的 InNAP (BAO57486.1), *Medicago truncatula* Gaertn. 的 MtNAM (AFI56799.1), *Petunia × hybrida* E. Vilm. 的 NAM (CAA63102), *Solanum lycopersicum* Linn. 的 GOBLET (HM210879.1) 以及 *Populus trichocarpa* Torr. et A. Gray ex Hook. 的 PtrWND1A (NAC068, XM_002317023)、PtrWND1B

(NAC063, XM_002300464)、PtrWND2A (NAC065, XM_002320861)、PtrWND2B (NAC061, XM_002302636)、PtrWND3A (NAC050, XM_002322362)、PtrWND3B (NAC037, XM_002318252)、PtrWND4A (NAC038, XM_002329829)、PtrWND4B (NAC046, XM_002304392)、PtrWND5A (NAC025, XM_002310261)、PtrWND5B (NAC039, XM_002327730)、PtrWND6A (NAC055, XM_002327206) 和 PtrWND6B (NAC060, XM_002325955) 12 个 *NAC* 蛋白质序列。将北美鹅掌楸 *LtNAC* 基因编码的蛋白质保守结构域序列和上述 *NAC* 蛋白质保守结构域序列一起进行系统进化分析。利用 Clustal X (version 1.83) 软件进行蛋白质序列的多序列比对。利用 MEGA 6.0 软件、采用 neighbor-joining (NJ) 法构建无根的系统进化树, bootstrap test 值设为 1 000。

1.4 *LtNAC* 基因的 qRT-PCR 分析

采用 Primer 5.0 软件设计 qRT-PCR 的 *LtNAC* 基因和内参基因的引物, 引物序列见表 1。

表 1 北美鹅掌楸 *LtNAC* 基因和内参基因的引物序列

Table 1 Primer sequence of *LtNAC* gene and internal control gene from *Liriodendron tulipifera* Linn.

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence (5'→3')	引物 Primer	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
LtNAC01 F	CGATCGCCGATGTTGATCT	LtNAC09 R	CACCCCTTGCAAGTCACAT
LtNAC01 R	CGGTCCCGAAGACTGAAGAA	LtNAC10 F	GATGAAGCAGGCGGTAGCA
LtNAC02 F	ATTCATGTTTGTGTTGACGAA	LtNAC10 R	CGGTCTCTACCGGACCCATT
LtNAC02 R	ACCGCAGGCAGAACATTATCA	LtNAC11 F	TTGCCTCCTGGGTTTCAGATT
LtNAC03 F	CCCATGTGAGTGGGCTGATT	LtNAC11 R	GAATGATCAAAGCGGGCAAAA
LtNAC03 R	AGCACGTGTAAGTTCGAGTCCCT	LtNAC12 F	ATCCAAGCCTTGCCCTGTCT
LtNAC04 F	CCCAAGGGTGAGAAAACGAA	LtNAC12 R	CCACTCATTTCTCTCCGAATTCC
LtNAC04 R	CCCAATCGTCCAGCCTTAAG	LtNAC13 F	GATTGGGATGATGATGTGG
LtNAC05 F	GCCACCAGGGTTCAGGTTCTA	LtNAC13 R	AATGAATCACAACTATCCC
LtNAC05 R	CACCAAGGTCCCATGAGAAAAG	LtNAC14 F	CTAAAGAATGTCTCATGACTAAAATGCA
LtNAC06 F	AAGTTGACCCTATTACGCC	LtNAC14 R	GCATACACGTAACATCCAAGTTGTC
LtNAC06 R	TGATACTTGGGCGGAGC	LtNAC15 F	AAGCTTTGTGGAGGCGAAATT
LtNAC07 F	GCATCCGGCCTAGATAAGCA	LtNAC15 R	CCCTTTGCCGGTAACTTTT
LtNAC07 R	TCCCCTTTGAAGGCTTTCCT	LtNAC16 F	CTCAGAATGAATGGGTGA
LtNAC08 F	GTGGGAGGCAAGGAATGCT	LtNAC16 R	CCTCACAAGTCTCGAAAAG
LtNAC08 R	TCGCCTTCCAGTACCCTGAT	Actin F	GATGGGCAGGTGATCACGAT
LtNAC09 F	GGGCTGAGCAGGCACTTCT	Actin R	TCTCATGGATTCCAGCAGCTT

对于各 RNA 样本, cDNA 第 1 条链的合成采用第 1 链 cDNA 合成试剂盒 (美国 Invitrogen 公司), 实验步骤参照说明书。使用 1 μ g 总 RNA 进行反转录, 得到 20 μ L 产物 cDNA, 作为 qRT-PCR 扩增反应的模板。qRT-PCR 使用光学 96 孔平板在 7500 型实时荧光定

量 PCR 仪 (美国 ABI 公司) 中进行。采用单一 PCR 扩增法: 样本和内对照分别在独立的反应孔中进行扩增。使用 *actin* 作为内对照, 每个样本和内对照使用 3 个重复反应孔进行扩增。反应体系参照试剂盒说明书进行 qRT-PCR 扩增和检测。20.0 μ L 的反应体系

包括 10.0 μL SYBRMIX、10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 正向引物和反向引物各 0.5 μL 、0.8 μL 第 1 链 cDNA 模板 (40 ng) 及 8.2 μL ddH₂O。反应条件如下: 50 $^{\circ}\text{C}$, 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 20 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 60 s; 共 40 个循环。反应结束后通过熔解曲线鉴定产物的特异性。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算各基因的相对表达量。

2 结果和分析

2.1 *LtNAC* 基因的克隆与序列分析

利用 RACE 技术从北美鹅掌楸叶片中共克隆出 16 个包含完整 ORF 的 *NAC* 基因, 分别命名为 *LtNAC01* 至 *LtNAC16*, ORF 长度为 561 ~ 1 830 bp, 编码 187 ~ 610 个氨基酸。

北美鹅掌楸 *LtNAC* 家族基因编码的 16 个 *LtNAC* 蛋白的理化性质见表 2。由表 2 可以看出: 其中 9 个 *LtNAC* 蛋白的理论等电点 (pI) 大于 7, 属于碱性蛋白质; 另外 7 个 *LtNAC* 蛋白的 pI 值小于 7, 属于酸性蛋白质。*LtNAC16* 和 *LtNAC08* 蛋白的氨基酸数目较少, 分别为 187 和 190, 二者的理论相对分子质量也较小, 分别为 21 811.9 和 21 667.3。*LtNAC02* 蛋白的氨基酸数目最多 (610), 其理论相对分子质量也最大, 为

表 2 北美鹅掌楸 *LtNAC* 家族基因编码的 *LtNAC* 蛋白的理化性质¹⁾
Table 2 Physical-chemical property of *LtNAC* protein encoded by *LtNAC* family gene from *Liriodendron tulipifera* Linn.¹⁾

蛋白质 Protein	N	MW	pI	I	GRAVY
<i>LtNAC01</i>	313	35 191.8	8.83	55.46	-0.688
<i>LtNAC02</i>	610	68 011.5	4.69	67.77	-0.527
<i>LtNAC03</i>	581	64 433.7	4.77	68.98	-0.471
<i>LtNAC04</i>	300	34 450.0	8.39	59.53	-0.764
<i>LtNAC05</i>	289	32 813.1	6.40	67.13	-0.595
<i>LtNAC06</i>	428	48 434.0	5.34	61.94	-0.881
<i>LtNAC07</i>	256	28 928.6	9.41	60.86	-0.676
<i>LtNAC08</i>	190	21 667.3	5.21	71.84	-0.489
<i>LtNAC09</i>	442	49 769.5	6.21	57.58	-0.925
<i>LtNAC10</i>	357	40 342.2	6.81	70.50	-0.677
<i>LtNAC11</i>	244	27 741.3	9.55	57.54	-0.789
<i>LtNAC12</i>	275	31 528.4	7.66	58.15	-0.776
<i>LtNAC13</i>	262	29 934.8	8.01	58.62	-0.653
<i>LtNAC14</i>	469	52 566.4	7.72	70.30	-0.466
<i>LtNAC15</i>	264	29 743.9	7.69	66.78	-0.530
<i>LtNAC16</i>	187	21 811.9	9.34	57.63	-0.896

¹⁾ N: 氨基酸数目 Number of amino acids; MW: 理论相对分子质量 Theoretical relative molecular weight; pI: 理论等电点 Theoretical isoelectric point; I: 脂肪族氨基酸指数 Aliphatic amino acid index; GRAVY: 蛋白质疏水性 Grand average of hydropathicity.

68 011.5。

蛋白质疏水性 (GRAVY) 的分析结果显示: 16 个 *LtNAC* 蛋白的 GRAVY 值均为负值, 其中 13 个 *LtNAC* 蛋白的 GRAVY 值小于 -0.5, 为亲水蛋白质; 只有 *LtNAC03*、*LtNAC08* 和 *LtNAC14* 蛋白的 GRAVY 值大于 -0.5, 分别为 -0.471、-0.489 和 -0.466, 为两性蛋白质。

2.2 *LtNAC* 基因编码的蛋白质二级结构预测

利用 SOPMA 程序对 16 个北美鹅掌楸 *LtNAC* 家族基因编码的 *LtNAC* 蛋白的二级结构进行预测, 结果见表 3。由表 3 可以看出: 16 个 *LtNAC* 蛋白均以无规则卷曲为主要构成元件, 其中 *LtNAC03* 蛋白的二级结构中无规则卷曲所占比例最少, 仅 39.59%; *LtNAC04* 蛋白的二级结构中无规则卷曲所占比例最高, 达到 61.00%; α 螺旋、延伸链和 β 转角则散布于整个 *LtNAC* 蛋白中。

蛋白质跨膜区预测研究结果显示: 16 个 *LtNAC* 蛋白中, *LtNAC02* 和 *LtNAC03* 蛋白包含跨膜基序 (TM, transmembrane motif), 且 TM 都存在于 C 端。

表 3 北美鹅掌楸 *LtNAC* 家族基因编码的 *LtNAC* 蛋白二级结构的预测结果

Table 3 Predicting result of secondary structure of *LtNAC* protein encoded by *LtNAC* family gene from *Liriodendron tulipifera* Linn.

蛋白质 Protein	不同构成元件所占比例/% Percentage of different components			
	α 螺旋 α helix	延伸链 Extended strand	β 转角 β turn	无规则卷曲 Random coil
<i>LtNAC01</i>	14.06	22.68	8.63	54.63
<i>LtNAC02</i>	21.80	20.82	9.67	47.70
<i>LtNAC03</i>	31.50	18.24	10.67	39.59
<i>LtNAC04</i>	16.00	17.67	5.33	61.00
<i>LtNAC05</i>	18.34	27.34	8.30	46.02
<i>LtNAC06</i>	24.53	18.69	8.64	48.13
<i>LtNAC07</i>	20.70	23.05	10.16	46.09
<i>LtNAC08</i>	18.42	18.95	9.47	53.16
<i>LtNAC09</i>	23.98	18.10	8.14	49.77
<i>LtNAC10</i>	21.85	19.61	6.44	52.10
<i>LtNAC11</i>	15.16	24.59	6.97	53.28
<i>LtNAC12</i>	17.82	22.18	6.55	53.45
<i>LtNAC13</i>	18.39	19.54	7.66	54.41
<i>LtNAC14</i>	22.16	23.24	11.35	43.24
<i>LtNAC15</i>	14.39	22.35	7.58	55.68
<i>LtNAC16</i>	16.67	29.57	11.83	41.94

2.3 *LtNAC* 基因编码的蛋白质的聚类分析

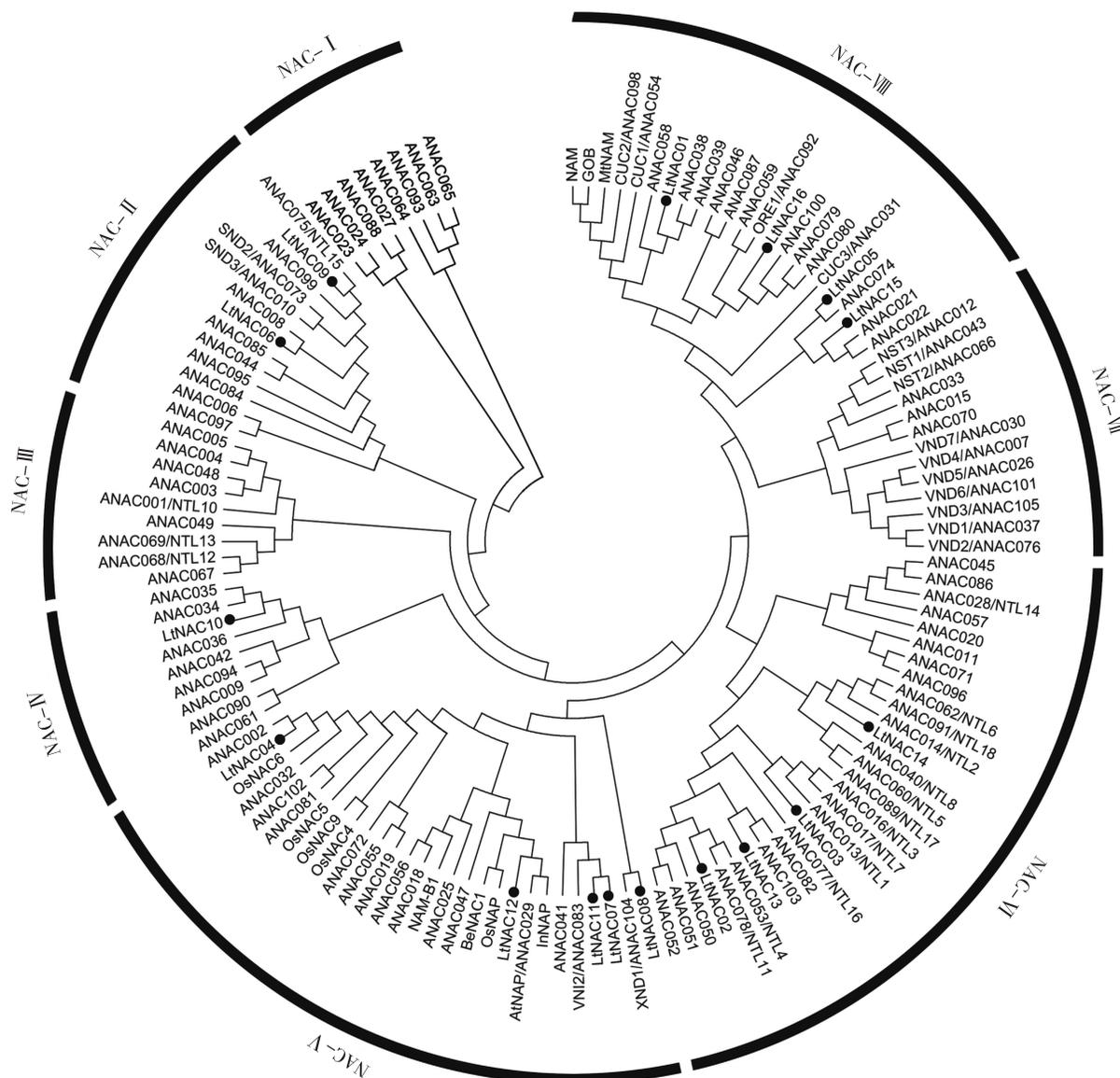
对北美鹅掌楸 16 个 *LtNAC* 基因编码的 *LtNAC* 蛋白与拟南芥及 23 个其他物种中功能已知的 *NAC* 蛋

白构建系统进化树, 选用保守的 N 端的 NAC 保守结构域对 NAC 蛋白进行多序列比对及系统进化分析, 结果见图 1。由图 1 可以看出: 144 个 NAC 蛋白被划分为 NAC-I、NAC-II、NAC-III、NAC-IV、NAC-V、NAC-VI、NAC-VII 和 NAC-VIII 8 类, 8 类中分别包含 0、2、0、1、5、4、0 和 4 个 LiNAC 蛋白。其中, NAC-VII 类被认为与细胞壁生物合成的转录调控有关, 而北美鹅掌楸 16 个 LiNAC 基因编码的 LiNAC 蛋白均未出现在

NAC-VII 类中, 说明北美鹅掌楸 LiNAC 基因可能未参与细胞壁的生物合成。

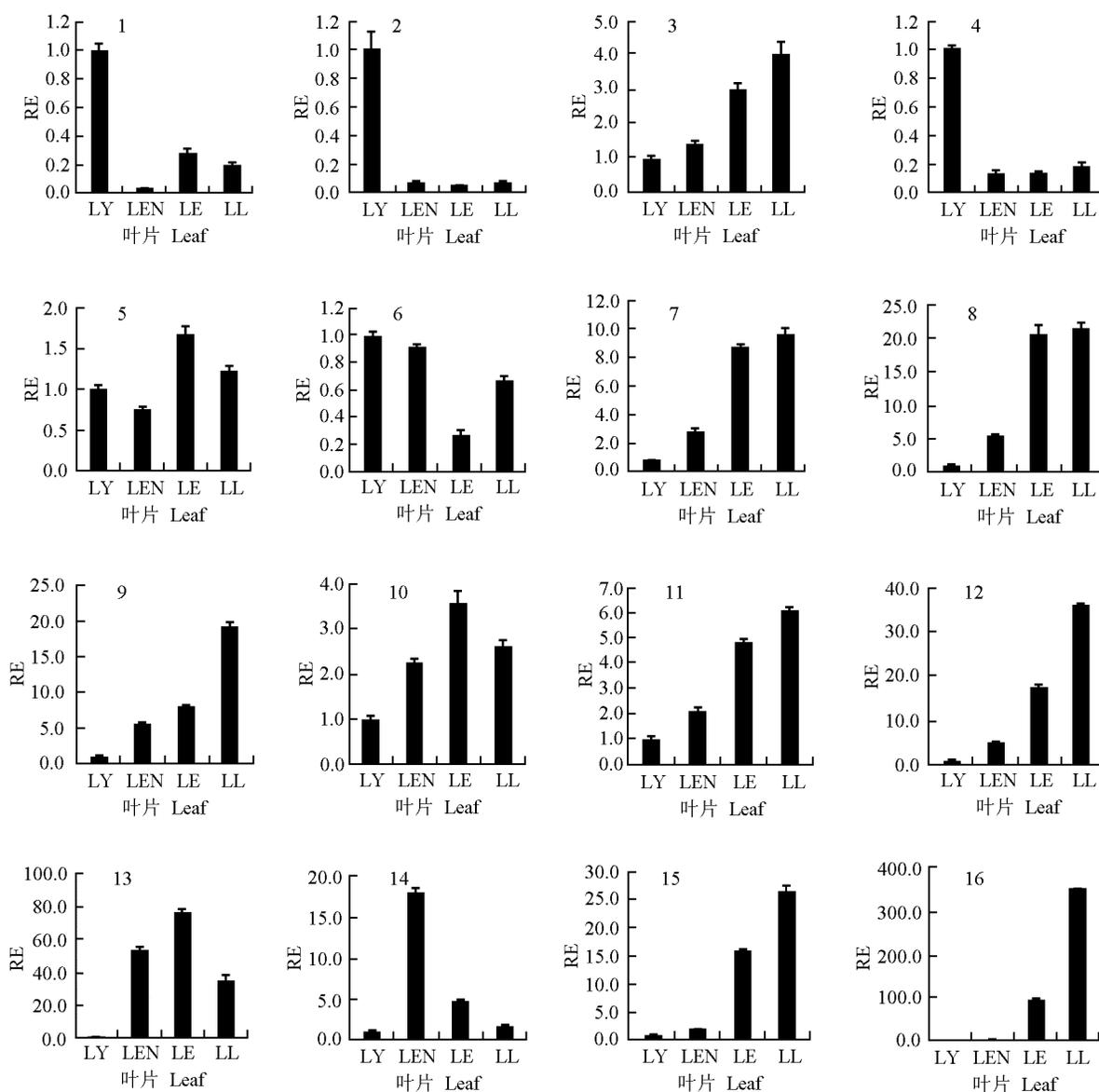
2.4 LiNAC 基因在叶片不同生长阶段的表达分析

北美鹅掌楸 16 个 LiNAC 基因在叶片不同生长阶段的相对表达量见图 2。由图 2 可以看出: 北美鹅掌楸 LiNAC03、LiNAC07、LiNAC08、LiNAC09、LiNAC11、LiNAC12、LiNAC15 和 LiNAC16 基因在嫩叶、完全展开未衰老叶片、衰老早期叶片和衰老后期叶片中的相对



图中涉及 16 个北美鹅掌楸 NAC 蛋白 (LiNAC01 至 LiNAC16)、105 个拟南芥 NAC 蛋白 (ANAC001 至 ANAC105) 和 23 个其他物种已知的 NAC 蛋白, 其中, 16 个 LiNAC 蛋白用“●”标出 Proteins in this figure include 16 NAC proteins from *L. tulipifera* (from LiNAC01 to LiNAC16), 105 NAC proteins from *A. thaliana* (from ANAC001 to ANAC105) and 23 known NAC proteins from other plants, in which, 16 LiNAC proteins are marked with “●”.

图 1 北美鹅掌楸 LiNAC 蛋白与拟南芥 NAC 蛋白及 23 个其他物种已知 NAC 蛋白的系统进化分析
 Fig. 1 Phylogenetic analysis on LiNAC protein from *Liriodendron tulipifera* Linn., NAC protein from *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh. and 23 known NAC proteins from other plants



RE: 相对表达量 Relative expression. LY: 嫩叶 Young leaf; LEN: 完全展开未衰老叶片 Fully expanded and non-senescent leaf; LE: 衰老早期叶片 Leaf at the early stage of senescence; LL: 衰老后期叶片 Leaf at the late stage of senescence.

1: *LtNAC01* 基因 *LtNAC01* gene; 2: *LtNAC02* 基因 *LtNAC02* gene; 3: *LtNAC03* 基因 *LtNAC03* gene; 4: *LtNAC04* 基因 *LtNAC04* gene; 5: *LtNAC05* 基因 *LtNAC05* gene; 6: *LtNAC06* 基因 *LtNAC06* gene; 7: *LtNAC07* 基因 *LtNAC07* gene; 8: *LtNAC08* 基因 *LtNAC08* gene; 9: *LtNAC09* 基因 *LtNAC09* gene; 10: *LtNAC10* 基因 *LtNAC10* gene; 11: *LtNAC11* 基因 *LtNAC11* gene; 12: *LtNAC12* 基因 *LtNAC12* gene; 13: *LtNAC13* 基因 *LtNAC13* gene; 14: *LtNAC14* 基因 *LtNAC14* gene; 15: *LtNAC15* 基因 *LtNAC15* gene; 16: *LtNAC16* 基因 *LtNAC16* gene.

图2 北美鹅掌楸 16 个 *LtNAC* 基因在叶片不同生长阶段的相对表达量
Fig. 2 Relative expression of sixteen *LtNAC* genes at different growth stages of leaf of *Liriodendron tulipifera* Linn.

表达量呈逐渐升高的趋势,推测这些基因可能正向调控植物叶片的衰老。而 *LtNAC14* 基因在完全展开未衰老叶片、衰老早期叶片和衰老后期叶片中的相对表达量呈逐渐下降的趋势,推测该基因可能是叶片衰老的负向调控因子。

3 讨论

对北美鹅掌楸 NAC 预测蛋白质理化特征的分析结果显示:16 个 *LtNAC* 蛋白的 GRAVY 值均为负值,

其中 81.25% *LtNAC* 蛋白的 GRAVY 值小于 -0.5,与王洋等^[26]对大豆 [*Glycine max* (Linn.) Merr.] 的研究结果一致,152 条大豆 NAC 蛋白的 GRAVY 平均值均为负值,且大多数小于 -0.5。北美鹅掌楸全基因组范围内 NAC 家族理化性质是否也具有相同特征尚待进一步研究。

Ooka 等^[27]将拟南芥以及水稻全部 NAC 蛋白分为 2 个大类,分别包含 14 和 4 个亚类。Shen 等^[28]将 11 种植物的 1 232 个 NAC 蛋白分成 8 类。本研究中 144 个 NAC 蛋白序列共聚成 8 类,目前在不同植物 NAC 蛋白的系统进化研究中,NAC 蛋白被聚成不同数目的类别,它们均受到所分析的蛋白数目、采用的算法和软件以及选用的是保守结构域还是全长氨基酸序列进行比对等因素的影响。本研究采用的是使用较普遍的 NAC 保守结构域及 NJ 法进行系统进化分析,结果显示具有相同功能的基因编码的蛋白趋向于划分在同一类中。根据系统进化分析结果,胁迫应答 NAC 基因 (*SNAC*),包括水稻 *OsNAC4*、*OsNAC5*、*OsNAC6* 和 *OsNAC9* (*SNAC1*) 以及拟南芥 *ANAC019*、*ANAC055* 和 *ANAC072* 基因编码的蛋白被归到 NAC-V 类中。Ricachenevsky 等^[29]认为该类基因参与胁迫应答的功能在不同物种中可能是保守的。在本研究中,*LtNAC04* 基因与 *SNAC* 基因编码的蛋白聚为一类,因而,从系统进化关系上预测,*LtNAC04* 基因有可能与胁迫应答有关。*LtNAC* 蛋白跨膜区预测研究表明:*LtNAC02* 和 *LtNAC03* 蛋白包含 TM 螺旋。植物 NAC 家族一些成员 C 端含有 1 个至多个 α 螺旋的跨膜基序,这些 C 端含有跨膜基序的 NAC 基因被称为 NTL (NTM1-like)。全基因组研究结果表明:拟南芥中有至少 13 个 NTL (NTLs)、水稻中有 5 个 NTL (*OsNTLs*)、马铃薯 (*Solanum tuberosum* Linn.) 中有 14 个 NTL^[18]、大豆中有 11 个 NTL^[30],这些 NTL 被发现参与植物的胁迫响应^[18]。根据系统进化分析结果,大多数拟南芥 NTL 聚集在 NAC-VI 类中;少数聚集在 NAC-III 和 NAC-IV 类中;北美鹅掌楸 *LtNAC02* 和 *LtNAC03* 蛋白也聚集在 NAC-VI 类中,据此预测 *LtNAC02* 和 *LtNAC03* 基因也可能参与北美鹅掌楸的胁迫响应。

植物组织自然衰老过程的主要作用是在种子日渐饱满的过程中完成营养物质的转移。植物 NAC 基因对叶片衰老的调控作用包括正向调控作用和负向调控作用,正向调控基因如拟南芥的 *AtNAP*^[14]、

ATAF1^[31]、*ORE1* 和 *ORS1* (*ORE1 SISTER1*)^[32],小麦 (*Triticum aestivum* Linn.) 的 *NAM-BI*^[17],水稻的 *OsNAC5*^[33] 及 *Bambusa emeiensis* ‘Viridiflavus’ 的 *BeNAC1*^[15] 等;负向调控基因如 *JUB1*^[34] 和 *VNI2*^[35]。本研究中北美鹅掌楸 *LtNAC03*、*LtNAC07*、*LtNAC08*、*LtNAC09*、*LtNAC11*、*LtNAC12*、*LtNAC15* 和 *LtNAC16* 基因的相对表达量与叶片衰老程度呈正相关,为叶片衰老的正向调控候选因子;*LtNAC14* 基因的相对表达量与叶片衰老程度呈负相关,为叶片衰老的负向调控候选因子。在拟南芥的 109 个 NAC 基因家族成员中,其中约 20% 的基因在衰老叶片中表达^[13]。在本研究中,北美鹅掌楸的 16 个 *LtNAC* 基因中有 9 个基因被认为是与叶片衰老有关的候选基因,所占比例远高于拟南芥。这是由于本实验克隆获得的北美鹅掌楸 *LtNAC* 基因均基于鹅掌楸叶片和花瓣转录组数据库,而在这 2 个组织中不表达的 *LtNAC* 基因无法克隆获得,因此推测实际上与叶片衰老相关的 *LtNAC* 基因所占比例应低于 50%。

已有的研究结果显示:不同植物的 NAC 基因可能作用于不同的信号传导途径中,处于同一信号传导途径中的 NAC 基因也可能处于上、下游的不同位置,这些都可能是由于聚类上的分化导致的。如,在拟南芥 Ethylene-insensitive2 (EIN2) 介导的叶片衰老代谢途径中,信号传递分子 *EIN3* 直接结合 *ORE1* 和 *AtNAP* 的启动子并激活表达,且 *ORE1* 和 *AtNAP* 作用于 2 条不同但交叉的信号传导途径^[36]。Garapati 等^[31]认为, *ATAF1* 基因是 ABA 和 H_2O_2 介导的衰老代谢途径的上游调控因子,通过激活衰老调控 NAC 转录因子 *ORE1* 和抑制叶绿素维持关键因子 *GLK1* 的表达使叶片向衰老转变。Hollmann 等^[20]认为,在冬季大麦叶片中 *HvNAC026* 是衰老相关的 N 元素再利用代谢途径的重要调控基因,然而,同样是衰老相关的基因,*HvNAC001*、*HvNAC005* 和 *HvNAC013* 则可能并不参与 N 元素的回收再利用。北美鹅掌楸 9 个与叶片衰老相关的 *LtNAC* 基因被聚为多个类别。在 9 个 *LtNAC* 基因中,*LtNAC12* 基因与许多已知的叶片衰老调控基因(如 *AtNAP*、*InNAP*、*BeNAC1*、*OsNAP* 及 *NAM-BI*) 聚在一起,它们都是经过功能验证并在植物叶片衰老过程中起重要调控作用的基因。所以,*LtNAC12* 基因也可能在北美鹅掌楸叶片衰老的过程中起到重要的调控作用。

参考文献:

- [1] SOUER E, Van HOUWELINGEN A, KLOOS D, et al. 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.
- [2] AIDA M, ISHIDA T, TASAKA M. Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: interaction among the *CUP-SHAPED COTYLEDON* and *SHOOT MERISTEMLESS* genes[J]. *Development*, 1999, 126: 1563–1570.
- [3] CHENG X, PENG J, MA J, et al. *NO APICAL MERISTEM (MnNAM)* regulates floral organ identity and lateral organ separation in *Medicago truncatula*[J]. *New Phytologist*, 2012, 195: 71–84.
- [4] AIDA M, TASAKA M. Genetic control of shoot organ boundaries[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, 9: 72–77.
- [5] RAST M I, SIMON R. The meristem-to-organ boundary: more than an extremity of anything[J]. *Current Opinion in Genetics and Development*, 2008, 18: 287–294.
- [6] NIKOVICS K, BLEIN T, PEAUCELLE A, et al. The balance between the *MIR164A* and *CUC2* genes controls leaf margin serration in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2006, 18: 2929–2945.
- [7] KAWAMURA E, HORIGUCHI G, TSUKAYA H. Mechanisms of leaf tooth formation in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2010, 62: 429–441.
- [8] BEN-GERA H, SHWARTZ I, SHAO M R, et al. ENTIRE and GOBLET promote leaflet development in tomato by modulating auxin response[J]. *The Plant Journal*, 2012, 70: 903–915.
- [9] ZHOU J, ZHONG R, YE Z H. *Arabidopsis* NAC domain proteins, VND1 to VND5, are transcriptional regulators of secondary wall biosynthesis in vessels[J]. *PLoS One*, 2014, 9: e105726.
- [10] MITSUDA N, SEKI M, SHINOZAKI K, et al. The NAC transcription factors NST1 and NST2 of *Arabidopsis* regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence[J]. *The Plant Cell*, 2005, 17: 2993–3006.
- [11] MITSUDA N, IWASE A, YAMAMOTO H, et al. NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2007, 19: 270–280.
- [12] ZHONG R, YE Z H. Complexity of the transcriptional network controlling secondary wall biosynthesis[J]. *Plant Science*, 2014, 229: 193–207.
- [13] GUO Y, CAI Z, GAN S. Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2004, 27: 521–549.
- [14] GUO Y, GAN S. AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence[J]. *The Plant Journal*, 2006, 46: 601–612.
- [15] CHEN Y, QIU K, KUAI B, et al. Identification of an NAP-like transcription factor BeNAC1 regulating leaf senescence in bamboo (*Bambusa emeiensis* ‘Viridiflavus’)[J]. *Physiologia Plantarum*, 2011, 142: 361–371.
- [16] LIANG C, WANG Y, ZHU Y, et al. OsNAP connects abscisic acid and leaf senescence by fine-tuning abscisic acid biosynthesis and directly targeting senescence-associated genes in rice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111: 10013–10018.
- [17] UAUY C, DISTELFELD A, FAHIMA T, et al. A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat[J]. *Science*, 2006, 314: 1298–1301.
- [18] SINGH A K, SHARMA V, PAL A K, et al. Genome-wide organization and expression profiling of the NAC transcription factor family in potato (*Solanum tuberosum* L.)[J]. *DNA Research*, 2013, 20: 403–423.
- [19] FANG Y, YOU J, XIE K, et al. Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2008, 280: 547–563.
- [20] HOLLMANN J, GREGERSEN P L, KRUPINSKA K. Identification of predominant genes involved in regulation and execution of senescence-associated nitrogen remobilization in flag leaves of field grown barley[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65: 3963–3973.
- [21] CHRISTIANSEN M W, GREGERSEN P L. Members of the barley NAC transcription factor gene family show differential co-regulation with senescence-associated genes during senescence of flag leaves[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65: 4009–4022.
- [22] PALMER N A, DONZE-REINER T, HORVATH D, et al. Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) flag leaf transcriptomes reveal molecular signatures of leaf development, senescence, and mineral dynamics[J]. *Functional and Integrative Genomics*, 2015, 15: 1–16.
- [23] YANG Y, XU M, LUO Q, et al. De novo transcriptome analysis of *Liriodendron chinense* petals and leaves by Illumina sequencing[J]. *Gene*, 2014, 534: 155–162.
- [24] LIANG H, AYYAMPALAYAM S, WICKETT N, et al. Generation of a large-scale genomic resource for functional and comparative genomics in *Liriodendron tulipifera* L.[J]. *Tree Genetics and Genomes*, 2011, 7: 941–954.
- [25] GEORJON C, DELÉAGE G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments[J]. *Computer Applications in the Biosciences: CABIOS*, 1995, 11: 681–684.
- [26] 王洋, 柏锡. 大豆 NAC 基因家族生物信息学分析[J]. *大豆科学*, 2014, 33(3): 325–333.
- [27] OOKA H, SATOH K, DOI K, et al. Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*[J]. *DNA Research*, 2003, 10: 239–247.
- [28] SHEN H, YIN Y, CHEN F, et al. A bioinformatic analysis of NAC genes for plant cell wall development in relation to lignocellulosic bioenergy production[J]. *BioEnergy Research*, 2009, 2: 217–232.
- [29] RICACHENEVSKY F K, MENGUER P K, SPEROTTO R A.

- kNACking on heaven's door: how important are NAC transcription factors for leaf senescence and Fe/Zn remobilization to seeds? [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4: 226.
- [30] LE D T, 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: 263–276.
- [31] GARAPATI P, XUE G P, MUNNÉ-BOSCH S, et al. Transcription factor *ATAF1* in *Arabidopsis* promotes senescence by direct regulation of key chloroplast maintenance and senescence transcriptional cascades[J]. *Plant Physiology*, 2015, 168: 1122–1139.
- [32] BALAZADEH S, KWASNIEWSKI M, CALDANA C, et al. ORS1, an H₂O₂-responsive NAC transcription factor, controls senescence in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Molecular Plant*, 2011, 4: 346–360.
- [33] SPEROTTO R A, BOFF T, DUARTE G L, et al. Identification of putative target genes to manipulate Fe and Zn concentrations in rice grains[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167: 1500–1506.
- [34] WU A, ALLU A D, GARAPATI P, et al. *JUNGBRUNNEN1*, a reactive oxygen species-responsive NAC transcription factor, regulates longevity in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2012, 24: 482–506.
- [35] YANG S, SEO P J, YOON H, et al. The *Arabidopsis* NAC transcription factor VNI2 integrates abscisic acid signals into leaf senescence via the *COR/RD* genes[J]. *The Plant Cell*, 2011, 23: 2155–2168.
- [36] KIM H J, HONG S H, KIM Y W, et al. Gene regulatory cascade of senescence-associated NAC transcription factors activated by ETHYLENE-INSENSITIVE2-mediated leaf senescence signalling in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65: 4023–4036.

(责任编辑:张明霞)

欢迎订阅 2016 年《植物资源与环境学报》

全国中文核心期刊 中国科技核心期刊
中国科学引文数据库核心期刊 RCCSE 中国核心学术期刊(A)
“中国期刊方阵”双效期刊 “江苏期刊方阵”优秀期刊

季刊, 单价 20 元, 邮发代号 28-213, 国内统一连续出版物号 CN 32-1339/S

《植物资源与环境学报》系江苏省·中国科学院植物研究所、江苏省植物学会等单位联合主办的学术期刊, 国内外公开发行。本刊为 BA、CA、CAB、Elsevier's、中国生物学文摘、中国环境科学文摘、中国科学引文数据库、万方数据——数字化期刊群、中国学术期刊(光盘版)和中文科技期刊数据库等国内外著名刊库收摘, 并被 Ulrich's 期刊指南等所收录。本刊在 2013 年荣获首届“江苏省新闻出版政府奖——报刊奖”及江苏省科学技术协会“精品科技期刊”称号, 在 2015 年荣获“第六届江苏省科技期刊金马奖——精品期刊奖”。

本刊围绕植物资源与环境两个中心命题, 报道我国植物资源的考察、开发利用和植物物种多样性保护, 自然保护区与植物园的建设和管理, 植物在保护和美化环境中的作用, 环境对植物的影响以及与植物资源和植物环境有关学科领域的原始研究论文、研究简报和综述等。凡从事植物学、生态学、自然地理学以及农、林、园艺、医药、食品、轻化工和环境保护等

领域的科研、教学、技术人员及决策者均可以从本刊获得相关学科领域的研究进展和信息。

本刊为季刊, 大 16 开本。每期定价 20 元, 全年 80 元, 全国各地邮局均可订阅。若错过征订时间或需补齐 1992 年至 2015 年各期者, 请直接与编辑部联系邮购。1992 年至 1994 年每年 8 元, 1994 年至 2000 年每年 16 元, 2001 年至 2005 年每年 24 元, 2006 年至 2008 年每年 40 元, 2009 年至 2011 年每年 60 元, 2012 年至 2015 年每年 80 元(均含邮资), 如需挂号另付邮挂费。

编辑部地址: 江苏省南京市中山门外 江苏省中国科学院植物研究所内(邮编 210014); 电话: 025-84347014; E-mail: zwzy@cnbg.net; QQ: 2219161478。投稿网址: <http://www.cnbg.net/Tg/Contribute/Login.aspx>。

欢迎订阅! 欢迎投稿!