

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201903056

梁芳, 张燕, 牛苏燕, 等. 蝴蝶兰 *PhNAC1* 基因序列分析及对低温胁迫的响应 [J]. 广西植物, 2020, 40(6): 845–853.LIANG F, ZHANG Y, NIU SG, et al. Sequence analysis of *PhNAC1* gene from *Phalaenopsis* and its response to cold stress [J]. *Guihaia*, 2020, 40(6): 845–853.

蝴蝶兰 *PhNAC1* 基因序列分析及对低温胁迫的响应

梁芳, 张燕, 牛苏燕, 袁秀云, 崔波*

(郑州师范学院 生物工程研究中心, 郑州 450044)

摘要: 为探讨 NAC 转录因子在蝴蝶兰低温胁迫响应中的分子调控机理, 该研究以蝴蝶兰的叶片为材料, 运用 RT-PCR 及 RACE 技术克隆得到一条蝴蝶兰的 NAC 转录因子基因完整的 cDNA 序列, 命名为 *PhNAC1* (GenBank 登录号 MF797909), 并分析了其在两种低温条件下的表达模式。结果表明: *PhNAC1* 基因 cDNA 序列全长 1 442 bp, ORF 全长 942 bp, 编码 313 个氨基酸。预测其蛋白分子量为 35.22 kDa, 等电点为 6.95, 属于稳定亲水性蛋白。二级结构预测表明, 无规则卷曲和延伸链为该蛋白的主要结构元件, 与三级结构预测结果基本相符。*PhNAC1* 编码的氨基酸序列与其他已登录的兰科植物 NAC 蛋白进行同源序列比对, 表明与小兰屿蝴蝶兰 (XP_0205763790) 亲缘关系较近, 序列一致性达 97%, 其次为铁皮石斛 (XP_020695081), 一致性为 84%。实时荧光定量 PCR 分析表明, *PhNAC1* 基因在营养器官和生殖器官中均有表达, 在蕊柱中的表达量最高。在 11 °C/6 °C 低温条件下, *PhNAC1* 基因的转录表达水平在前 5 天随着处理时间逐渐升高, 到第 7 天开始下降; 在 4 °C 低温条件下, *PhNAC1* 基因的表达水平在处理 0.5 h 时表达量有所下降, 1 h 后表达量上升至对照水平, 之后无明显变化, 在处理 24 至 48 h 又逐渐升高, 推测 *PhNAC1* 基因参与蝴蝶兰低温胁迫响应。

关键词: 蝴蝶兰, NAC 转录因子, 表达特性, 低温胁迫, 序列分析

中图分类号: Q785; Q786 文献标识码: A

文章编号: 1000-3142(2020)06-0845-09

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Sequence analysis of *PhNAC1* gene from *Phalaenopsis* and its response to cold stress

LIANG Fang, ZHANG Yan, NIU Suyan, YUAN Xiuyun, CUI Bo*

(Bioengineering Research Center, Zhengzhou Normal University, Zhengzhou 450044, China)

Abstract: NAC transcription factors are involved in many processes of plant development, which play an important role in stress response. The NAC transcription factor named *PhNAC1* (GenBank accession No. MF797909) was cloned from

收稿日期: 2019-06-08

基金项目: 河南省科技攻关计划项目 (182102110369); 河南省高等学校重点科研项目 (18A210005, 18B210015); 郑州师范学院科技创新团队支持计划项目 [Supported by the Key Science and Technology Program of Henan (182102110369); Key Research Program in High School of Henan (18A210005, 18B210015); Aid Program for Science and Technology Innovative Research Team of Zhengzhou Normal University]。

作者简介: 梁芳 (1982-), 女, 湖北郧西人, 博士, 讲师, 主要从事花卉分子生物学研究, (E-mail) liangfang@zznu.edu.cn。

* 通信作者: 崔波, 博士, 教授, 主要从事花卉育种研究, (E-mail) cuibo@zznu.edu.cn。

the leaves of *Phalaenopsis* using RT-PCR and RACE method. The full-length of *PhNAC1* was 1 442 bp, which contained a 942 bp ORF that encoding a protein with 313 amino acids residues. The molecular weight of the putative protein was 35.22 kDa and the theoretical pI was 6.95, a hydrophilic and unstable protein. Prediction of secondary structure showed that the random coil and extended strand were the main structural elements of the protein, which conformed to the prediction of tertiary structure. Amino acid sequence alignment and phylogenetic tree analysis between the protein of *PhNAC1* and NACs from other Orchids showed that *PhNAC1* was close to *Phalaenopsis equestris* (XP_020576379) with the sequence identity of 97%, followed by the *Dendrobium catenatum* (XP_020695081) with 84%. The qRT-PCR analysis indicated that the *PhNAC1* gene was expressed in both of the vegetative and reproductive organs, and the expression level was the highest in the column. Under the cold stress of 11 °C/6 °C, the expression level of *PhNAC1* gene was increased significantly with treatment time in leaves during the first five days, and then decreased at the 7th day. Under the cold stress of 4 °C, the expression level was decreased slightly at 0.5 h, then recovered and remained to the initial level at 1 h after treatment, whereas the expression level was increased obviously after treating for 24, 48 h, indicating that *PhNAC1* may be involved in cold stress response of *Phalaenopsis*. This research will be useful for study of molecular mechanism of NAC transcription factor in cold stress response in *Phalaenopsis* species.

Key words: *Phalaenopsis*, NAC transcription factor, expression pattern, cold stress, sequence analysis

基因的转录调控控制着植物生长发育的许多重要生理过程,如逆境应答、信号转导、形态建成等。转录因子通过与特异的目的基因启动子区相结合,激活或抑制目的基因的转录效率,从而使植物对外界刺激做出响应。近年来,NAC、MYB、WRKY、AP2/EREBP等转录因子在植物逆境中的响应机制被广泛研究(Scarpece et al., 2013; Xue et al., 2014; Guan et al., 2014; Butt et al., 2017)。其中,NAC转录因子是目前发现数量最大的植物特有的转录因子家族之一(Olsen et al., 2005)。最早在矮牵牛 *NAM*、拟南芥 *ATAF1/2* 和 *CUC2* 基因编码蛋白的 N 端发现一段高度保守的氨基酸序列,以此 3 个基因的首字母命名为 NAC 结构域,并将包含 NAC 结构域的蛋白称为 NAC 转录因子。NAC 转录因子的研究多集中在被子植物。通过对拟南芥和水稻的 NAC 转录因子进化分析,NAC 结构域可分为两组 18 个亚组,NAC 结构域高度保守,仅有少数氨基酸差异,在 NAC 蛋白 C 端转录激活区有 13 个保守基序(Ooka et al., 2003)。

NAC 转录因子参与植物生长发育诸多过程,包括胚的发育(Larsson et al., 2011; Zhao et al., 2011)、侧根形成(Hao et al., 2011)、叶片衰老(Jia et al., 2018)、果实成熟(Kou et al., 2012)、激素信号传递和调控(Wang et al., 2014)等。此外,NAC

转录因子在植物逆境应答过程中起着关键作用(Shao et al., 2015)。现已在许多植物中分离到 NAC 基因证明其能提高植物对低温胁迫的抗性,如水稻 *SNAC2* (Hu et al., 2008)、小麦 *TaNAC8* (Xia et al., 2010)、*TaNAC2* (Mao et al., 2012) 和 *TaNAC47* (Zhang et al., 2015)、芒草 *MINAC5* (Yang et al., 2015) 和 *MINAC9* (Zhao et al., 2016)、苜蓿 *MfNAC3* (Qu et al., 2016) 等。虽然与抗逆相关的 NAC 转录因子在拟南芥和水稻中研究较为深入,但在兰花中的研究还见之甚少,仅见 Mita et al. (2006) 报道蕙兰 (*Cymbidium faberi*) *CyNAC1* 转录因子参与高温(25~30 °C)导致幼嫩花芽的坏死过程,发现在变异的抗高温植株中,该基因表达量明显比野生型低。关于兰科植物在低温胁迫过程中 NAC 转录因子的相关研究目前尚未见报道。

蝴蝶兰 (*Phalaenopsis amabilis*) 是世界著名的高档花卉,在我国各地广泛栽培。原产于热带亚热带地区,性喜暖畏寒,生长适温为 18~28 °C,温度过高或过低均会限制蝴蝶兰的生长。因此,低温是影响蝴蝶兰生长的重要环境因子之一。我国北方地区蝴蝶兰均在现代化温室内种植,冬春季节温度较低时需对温室进行加温,因此导致生产成本升高,耗能巨大制约了蝴蝶兰产业的健康发展。因此,研究蝴蝶兰抗冷的生理生化机制,培育

抗冷性新品种,对于蝴蝶兰产业的健康可持续发展具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 材料与处理

所用材料为蝴蝶兰栽培品种“大辣椒”(*Phalaenopsis* hybrid ‘Big Chili’),由郑州师范学院生物工程研究所提供。两种低温处理条件:将 5 叶期的蝴蝶兰植株置于植物人工光照培养箱(美国, PERCIVAL E-41H02)内 27 °C/22 °C 预培养 15 d,使所有的实验苗 $F_v/F_m \geq 0.79$ 。实验采用模拟自然状态逐步降温法,分为两个阶段,第一阶段低温驯化:昼夜温度 20 °C/16 °C 处理 3 d,16 °C/11 °C 处理 3 d;第二阶段 11 °C/6 °C 低温处理 7 d。其他培养条件:光暗比 12 h/12 h,光强为 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,相对湿度 70% ~ 90%。取样方法:以 27 °C/22 °C 预培养结束取样为对照,昼夜温度 11 °C/6 °C 处理第 1、2、3、5、7 天取样。另外 4 °C 低温处理,用蝴蝶兰 3 叶期瓶苗,置于 4 °C 冰箱内分别于 0、0.5、1、2、4、8、12、24 和 48 h 取样。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成 各样品总 RNA 的提取采用多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒。对提取的总 RNA 经检测合格后,用 M-MLV 反转录酶对其进行反转录合成单链 cDNA 第一链,用于 *PhNAC1* 基因的克隆;用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒反转录成 cDNA 第一链,用于实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测目的基因表达量。

1.2.2 *PhNAC1* 基因全长的扩增及 ORF 的预测与验证 利用 DNAMAN 和 Primer 5.0 软件,以 GenBank 中已登录的 JF831198 (铁皮石斛, *Dendrobium candidum*)、KC954544 (铁皮石斛, *Dendrobium officinale*) 和 AB257312 (蕙兰, *Cymbidium* hybrid) 为模板,设计 1 对简并引物 PhNAC1-F 和 PhNAC1-R (表 1),用于扩增蝴蝶兰 *NAC* 基因中间保守片段。将得到的中间保守序列经 BLAST 比对正确后,分别设计 1 对 5' 端特异引物 (GSP5-1、GSP5-2) 和 3' 端特异引物 (GSP3-1、GSP3-2)。对中间保守区片段、5'-RACE 扩增片段和 3'-RACE 扩增片段进行分析比对并拼接,通过 BLAST 对得

表 1 引物序列及用途

Table 1 Sequence and usage of primers

引物名称 Primer name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	用途 Use
PhNAC1-F PhNAC1-R	TTCMGDTTCCACCCNACSGA GCATGATCCAGTYGGTCTTAWBCCCYT	58	中间保守区片段的克隆 Cloning of conserved fragment
GSP5-1 GSP5-2	TCGGTCGGGTGAAACTGAA GTGCCGTGATAATCTCTTCGTCGGT	56	5'-RACE
GSP3-1 GSP3-2	ATTTATAGGGGCGAGGAGTTC GGGCATAAGACCAACTGGATCATGC	56	3'-RACE
ORF-F ORF-R	TCTCGTGTAGCCGCAGAT AAACCAACCACCCATATCC	55	ORF 的克隆 Cloning of ORF
PhNAC1-qF PhNAC1-qR	ATCTGAACAAGTGGCAGCCT ATCCTTACCAGTTGCCCTTCC	58	荧光定量 PCR 引物 Primers of quantitative real-time PCR
Actin-F Actin-R	GTTCTTTCCCTATATGCTAGTGCC GAAGGATGGCATGAGGAAGTG	58	荧光定量内参基因引物 Primers of reference gene for quantitative real-time PCR

到的基因全长进行同源性比对,确定得到的基因为 *NAC* 基因。在 ORF 区两端设计特异引物 ORF-F 和 ORF-R 对 ORF 序列进行验证。

1.2.3 *PhNAC1* 基因的生物信息学分析 蝴蝶兰 *PhNAC1* 基因蛋白结构域、理化性质、亲疏水性、磷酸化位点、以及蛋白质的二级和三级结构等采用

在线软件进行分析。此外,核苷酸与氨基端序列的同源性用 DNAMAN 软件进行比对分析,并用 Clustal X 和 MEGA 构建系统进化树。

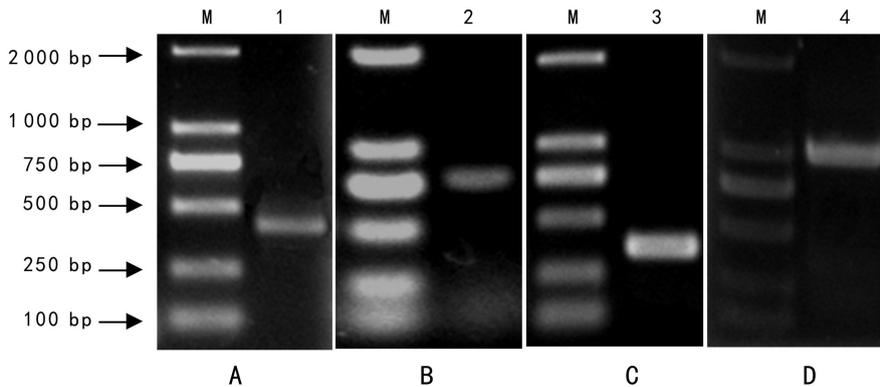
1.2.4 *PhNAC1* 基因的表达特性分析 取蝴蝶兰的根、叶(第 2 片)、花葶、花芽、萼片、翼瓣、唇瓣及蕊柱,迅速投入液氮中速冻后 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,用于 *PhNAC1* 基因在不同组织中的表达分析。低温胁迫处理均取第 2 片成熟叶,每个取样点有三个生物学重复,每个重复由三株不同植株混合而成。

根据得到的 ORF 序列,设计 qRT-PCR 引物 *PhNAC1*-qF 和 *PhNAC1*-qR,以蝴蝶兰 *Actin* 基因作为内参基因。采用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒进行 qRT-PCR,反应体系为 $25\text{ }\mu\text{L}$,反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s(40 个循环),反应在 Eppendorf Mastercycler 荧光定量 PCR 仪上进行,每个样品重复 3 次,同时做阴性对照。基因相对表达量用公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 来计算(Vandesompele et al., 2002)。

2 结果与分析

2.1 *PhNAC1* 基因全长的扩增

以蝴蝶兰叶片 cDNA 为模板,以引物 *PhNAC1*-F 和 *PhNAC1*-R 进行中间片段的扩增,得到约 350 bp 的保守片段(图 1:A),经 BLASTn 比对分析表明克隆的片段为 *NAC* 基因片段。根据该片段序列,利用引物 GSP3-1 和 GSP3-2 进行 3'-RACE 扩增,得到大小约 780 bp 目的片段(图 1:B),利用引物 GSP5-1 和 GSP5-2 进行 5'-RACE 扩增,得到大小约 320 bp 目的片段(图 1:C)。将测序得到的中间保守区片段、5'-RACE 扩增片段及 3'-RACE 扩增片段进行分析拼接,得到全长为 1 442 bp 的基因序列,其中包括一个完整的长为 942 bp ORF,编码 313 个氨基酸。对 ORF 区进行克隆验证,得到 997 bp 的片段(图 1:D),与全长部分序列完全相



M. DL2000 DNA 标记; 1. 中间保守片段; 2. 3'-RACE 片段; 3. 5'-RACE 片段; 4. 开放阅读框。

M. DL2000 DNA marker; 1. Conserved region; 2. 3'-RACE region; 3. 5'-RACE region; 4. ORF.

图 1 蝴蝶兰 *PhNAC1* 基因的扩增

Fig. 1 Amplification of *PhNAC1* gene in *Phalaenopsis*

同。经 BLAST 分析,所得的核苷酸序列与小兰屿蝴蝶兰 (*Phalaenopsis equestris*, XP_020576379) 一致性为 98%,与小野芭蕉 (*Musa acuminata*) *NAC79* 基因序列一致性为 79%,通过比对分析表明克隆的基因为 *NAC* 家族基因。将该基因命名为 *PhNAC1*, GenBank 登录号 MF797909。

2.2 *PhNAC1* 基因的生物信息学分析

2.2.1 *PhNAC1* 蛋白的基本性质及空间结构分析

通过对 *PhNAC1* 基因推导的氨基酸序列进行分析,

表明该蛋白属于植物特有的 *NAC* 转录因子家族。CDD 数据库分析结果表明,该蛋白第 8 至第 134 个氨基酸为 *NAC* 结构域。生物信息分析结果表明 *PhNAC1* 蛋白属于亲水性蛋白,该蛋白分子质量约为 35.22 kDa、理论等电点 pI 为 6.95,分子式为 $C_{1563}H_{2375}N_{417}O_{477}S_{18}$;正负电荷残基总数均为 35。在组成 *PhNAC1* 蛋白的 20 种氨基酸中, Ser 所占的比例最高,为 10.2%, His 和 Cys 所占比例最低,仅为 1.6%。该蛋白脂肪指数 56.10,不稳定性指数

为 33.53, 属于稳定蛋白。PhNAC1 蛋白序列中存在 41 个潜在的磷酸化位点, 包括 21 个 Ser 位点、14 个 Thr 位点和 6 个 Tyr 位点。对 PhNAC1 蛋白进行二级结构预测, 结果表明该蛋白二级结构由 α 螺旋(Hh)、伸展链(Ee)和无规则卷曲(Cc)组成, 其中无规则卷曲占 70.6%, 伸展链占 27.48%, α 螺旋仅占 1.92%。

采用 SWISS-MODEL 同源建模的方法, 以 4dul.1 (拟南芥 ANAC019) 为模型对 PhNAC1 进行蛋白质三级结构建模(图 2), 结果表明 PhNAC1 与 4dul.1 相似性为 56.33%, 推测 PhNAC1 是与胁迫响应相关的 NAC 转录因子。

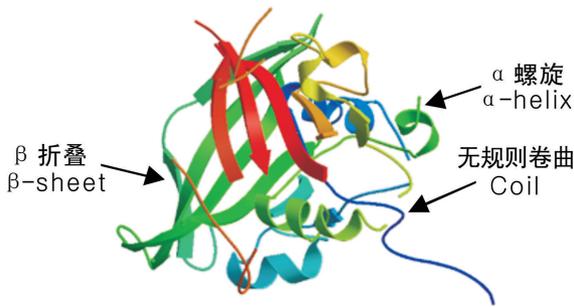


图 2 PhNAC1 蛋白的三级结构预测

Fig. 2 Putative tertiary structure of PhNAC1 protein

2.2.2 *PhNAC1* 基因同源性与系统进化分析 将蝴蝶兰 *PhNAC1* 基因编码的氨基酸序列 (AXF50252) 与已登录到 NCBI 上的其他 4 种兰科植物的 NAC 蛋白进行序列比对分析(图 3), PhNAC1 与小兰屿蝴蝶兰 (*Phalaenopsis equestris*, XP_020576379) 的氨基酸序列一致性最高为 97%, 均为 313 个氨基酸, 二者仅有 8 个氨基酸的差异; 其次为铁皮石斛 (*Dendrobium catenatum*, XP_020695081), 二者序列一致性为 84%; 与深圳拟兰 (*Apostasia shenzhenica*, PKA66962) 和杂交兰 (*Cymbidium hybrid*, BAF36563) 的一致性较低, 分别为 51% 和 32%。将 PhNAC1 氨基酸序列经 BLAST 比对, 选择序列一致性较高的 15 种植物, 利用 NJ 法构建无根系统进化树(图 4), 显示蝴蝶兰与小兰屿蝴蝶兰、铁皮石斛、深圳拟兰亲缘关系最近, 其次为番红花 (*Crocus sativus*, ABU40776), 与其他植物的亲缘关系较远。

2.3 *PhNAC1* 基因的表达特性分析

由图 5 可知, *PhNAC1* 基因在蝴蝶兰的营养器官和生殖器官中均有表达, 在蕊柱中的表达水平最高, 明显高于其他组织, 在根、叶和翼瓣中表达水平最低。在 11 °C/6 °C 低温条件下, *PhNAC1* 基因的转录表达水平在处理 1、2、3、5 d 逐渐升高, 处理第 7 天明显下降(图 6:A); 在 4 °C 低温条件下, *PhNAC1* 基因的表达水平在处理 0.5 h 表达量下降, 处理 1 h 后表达量上升至对照水平, 之后无明显变化, 在处理 24 h 和 48 h 后又明显升高(图 6:B)。

3 讨论与结论

NAC 转录因子是一类数量巨大的植物转录因子, 在植物的生长发育调控及抗逆响应中发挥重要的作用 (Sun et al., 2018; Singh et al., 2016)。Liu et al. (2019) 报道 NAC 转录因子参与高温诱导的荔枝花序败育。Wang et al. (2014) 首次报道西瓜 NAC 转录因子 CcNAC1 和 CcNAC2 参与光信号途径和生长激素信号途径。通过抑制 ABA 信号通路相关基因, 过表达 *ONAC066* 可以提高水稻对稻瘟病和白叶枯病的抗性 (Liu et al., 2018)。本文从蝴蝶兰中通过同源克隆的方法得到一个 NAC 转录因子基因 *PhNAC1*, 对该基因编码的氨基酸序列进行分析, 发现在 N 端具有 NAC 结构域, 该结构域是 NAC 转录因子特有的结构域。运用生物信息学方法对 PhNAC1 蛋白进行分析预测, PhNAC1 是一种稳定的亲水性蛋白, 具有多个潜在的磷酸化位点。将 PhNAC1 蛋白与其他已登录的兰科植物 NAC 蛋白序列进行比较, 发现都具有高度保守的 N 端和多变的 C 端, N 端含有 A、B、C、D、E 5 个典型亚结构域 (Puranik et al., 2012)。进化分析表明, PhNAC1 与小兰屿蝴蝶兰的亲缘关系最近, 仅有 8 个氨基酸的差异, 序列一致性达到 97%。三级空间结构预测表明, PhNAC1 与拟南芥 ANAC019 的相似度最高, 推测 PhNAC1 是与胁迫响应相关的 NAC 转录因子 (Jenson et al., 2010)。

用实时荧光定量 PCR 对 *PhNAC1* 基因在蝴蝶兰各个组织中的表达特性进行了研究, 发现 *PhNAC1* 基因在蝴蝶兰的根、叶及各个花器官组织

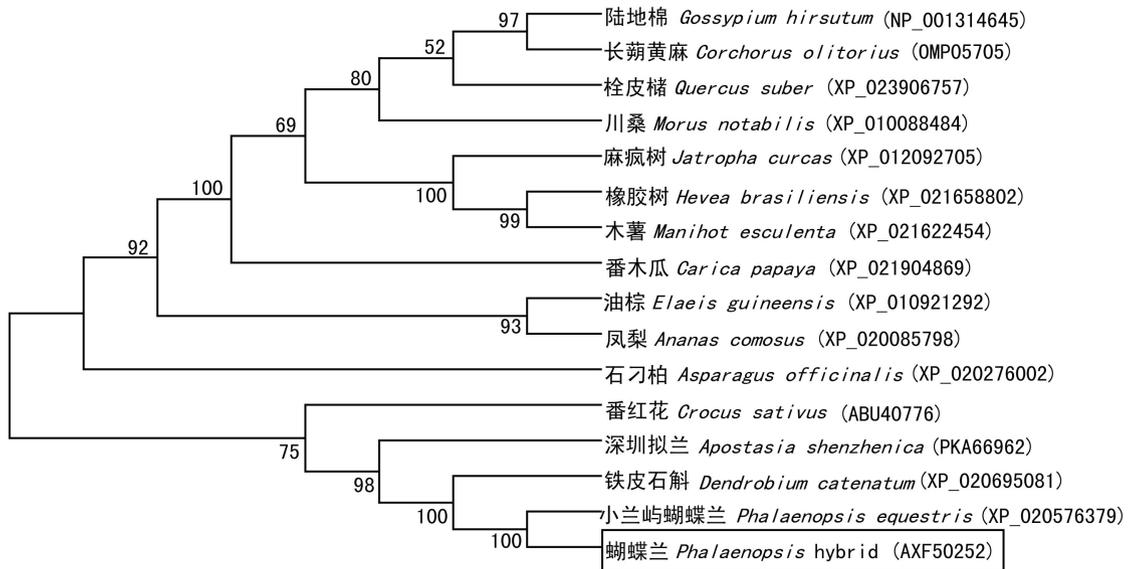
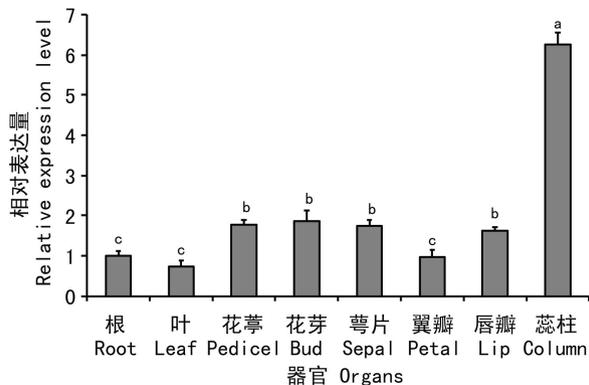
XP_020576379M	1
XP_020695081MSM	3
PKA66962	MKYGDINTSHAKLLPHVPSTARIFVPNKKNPLLFKALLPLPWLFLKCPLLHLFFLKLAM	60
BAF36563MS	2
AXF50252M	1
Consensus		
XP_020576379	DESLDLPFGFRFHPTDEEIIITHYLSPKVANHGAFATAIAGEVDLNKCEPWDLPSKAKLGE	61
XP_020695081	DESELPFGFRFHPTDEEIIITHYLPKVVNHGAFARAAGEVDLNKCEPWDLPSKAKLGE	63
PKA66962	DESLHLPFGFRFHPTDEEIIITHYLCPKLLHHG.FTATAMGEVDLNKCEPWDLPSKAKMGE	119
BAF36563	TSSVHLPFGFRFHPTDEELIITHYLRNRAASSP.CPASIAEVDIYKFDPWDLPEKAAFGD	61
AXF50252	DESLDLPFGFSFHPTDEEIIITHYLSPKVANHGAFATAIAGEVDLNKCEPWDLPSKAKLGE	61
Consensus	s lppgf fhptdee i hyl a evd k pwdlp ka g	
XP_020576379	KEWYFFCQRDRKYPTGMRTNRATDSGYWKATGKDKEIYRGRGVLIGMKKTLVFYRGRAPK	121
XP_020695081	KEWYFFCQRDRKYPTGMRTNRATESGYWKATGKDREIYRGR.LLIGMKKTLVFYRGRAPK	122
PKA66962	KEWYFFYSKDRKYPTGTRTNRAATECGYWKATGKDKEIYRGGKILIGMKKTLVFYRGRAPK	179
BAF36563	REWYFFTDRKYPTGNRPNRAAGSGYWKATGTDKPISSGS.ENIGVKKALVFYKGRPPK	120
AXF50252	KEWYFFCQRDRKYPTGMRTNRATDSGYWKATGKDKEIYRGRGVLIGMKKTLVFYRGRAPK	121
Consensus	ewyff drkyp g r nra gywkatg d i g ig kk lvfy gr pk	
XP_020576379	GVKTNWVMHEFRLEGKSYFSNLP.....KSAKDEWVSRVFHKNNPAQKKTMPMGGVV	174
XP_020695081	GVKTNWVMHEFRLEGKSSLNLP.....RSAKDEWVSRVFHKNSPALKKIPMPGVVV	175
PKA66962	GEKTNWVMHEFRVEGKATLSNLP.....KPTKEEWVCRVFHKS.....FGLKK	223
BAF36563	GLKTNWVMHEFRADANKSNSYKPIRLRDHSMRLDDVWLCRIYRKS.....NH	168
AXF50252	GHKTNWVMPEFRLEGKSYFSNLP.....KSAKDEWVSRVFHKNNPAQKKTMPMGGVV	174
Consensus	g ktnw m efr wv r k	
XP_020576379	SNLARVNSFTDELTDSPNLPPLTDTP..YFNSDMVDVDSFDVKAIMASSAPLNYY..SM	230
XP_020695081	SNLARVNSFTDELMDSKPLPPLTDSP..YFNSGAIDVDSFDVKSFMESSAPLNYYFSSM	233
PKA66962	SSLIRVNSFTSDLPDSPTLPPLTDQTPSAFNCADDGGS.DLNTLAGSGHLSSSY...S	278
BAF36563	LSPTEDDQEQEDPCGEETCFPAMQNQMMPMHGKMLQKVSSI SEFLQEYSPLLNLFDNQQ	228
AXF50252	SNLARVNSFTDELTDSPNLPPLTDTP..YFNSDMVDVDSFDVKTIMASSAPLNYY..SM	230
Consensus	m p n l	
XP_020576379	NNFPYSSNSLPSSSYQQQPIPYFSEAKGQQYCKAEQFS.....NQSMVVSQDTGD	279
XP_020695081	NNLPYSSNPPPCSSY.QQQFPYSTAMQGHQYCKAEQFS.....NQSMISQDTGD	281
PKA66962	...FSSAVNVGSP...APAFIRRRCAAEQLS.....NQSMISQETG.	314
BAF36563	EIPRFDSNLLGHPLLSQSMINQNQDSGGNGYFLPQLSQAESPVSIGAKRQRMDCTNEE	288
AXF50252	NNFPYSSNSLPSSSYQQQPIPYFSEAKGQQYCKAEQFS.....NQSMVVSQDTGD	279
Consensus	s q s q m	
XP_020576379	RNTEISSVISKIDMASCASYG.....GGAVMDLASMWGC.....	313
XP_020695081	RNTETSSVISKIDMASCASYG.....GGGVIDLANLWRC.....	315
PKA66962	..ISTTTDRNRTDMASCASYGSFVPPAAALQDVADMWRW.....	352
BAF36563	SNGTSHSSKKQNDLNMFPNFSSQFDGSGYGLLSQPFFSQQLLMNSNTGSLH	339
AXF50252	RNTEISSVISKIDMASCASYG.....GGAVMDLANMWGC.....	313
Consensus	d	

A-E 下划线部分分别代表 NAC 结构域中 5 个保守的亚结构域。

Conserved submain A-E were shown by underline in the NAC domain.

图 3 *PhNAC1* 基因编码氨基酸与其他兰科植物 NAC 蛋白序列比对

Fig. 3 Alignments of conserved domain between *PhNAC1* and NAC proteins of other Orchidaceae plants

图4 *PhNAC1* 与其他 NAC 蛋白系统进化树Fig. 4 Phylogenetic tree of *PhNAC1* and some other NAC proteins

不同字母表示 0.05 水平上显著性差异。下同。

Different letters mean significant differences at 0.05 level. The same below.

图5 *PhNAC1* 基因在蝴蝶兰不同组织中的表达水平Fig. 5 Expression level of *PhNAC1* gene in different *Phalaenopsis* tissues

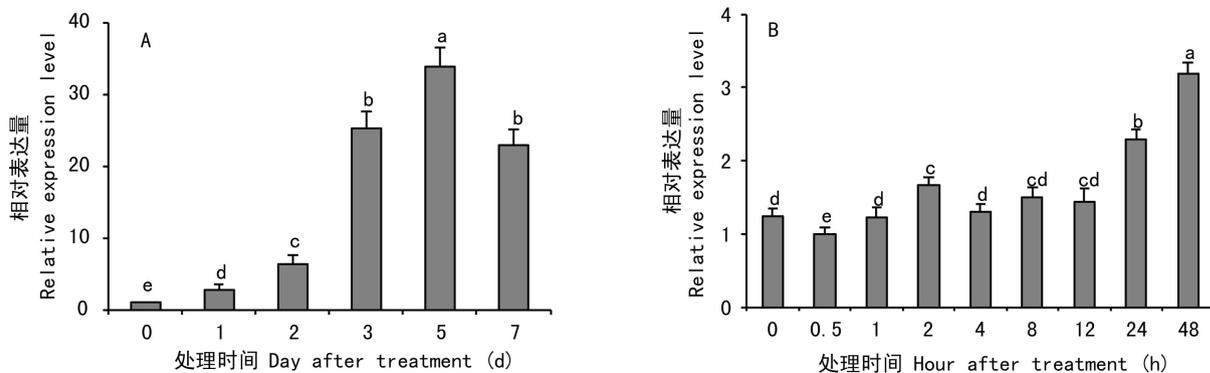
中均有表达,其中在蕊柱中的表达量明显高于其他部位和组织。蝴蝶兰的蕊柱(Column)是雄蕊和花柱、柱头完全愈合而成的一种柱状体,顶端着生一个花粉块。*PhNAC1* 基因在蕊柱中的高表达机理还有待进一步研究。*PhNAC1* 基因在低温胁迫条件下的表达分析表明,在 11 °C/6 °C 的昼夜温度条件下,该基因的表达水平随着处理时间逐渐升高,到第 5

天表达量是对照的 34 倍,第 7 天表达量开始下降。在 4 °C 低温条件下,处理 0.5 h 表达量有所下降,之后开始上升恢复到对照水平维持至 12 h,到 24 h 后表达量又开始上升,由此推测 *PhNAC1* 基因在蝴蝶兰低温胁迫响应中发挥作用。拟南芥和水稻全基因组表达谱研究表明,一些 NAC 基因受到高温、干旱、低温或病害中的一个或多个因素诱导表达。如拟南芥中的 *ANAC019*、*ANAC055*、*ANAC072* (RD26) 均对不同非生物胁迫有应答反应 (Fujita et al., 2004; Delessert et al., 2005; Fang et al., 2008); 在水稻中, *OsNAC6* 和 *SNAC2* 超量表达可以提高幼苗发育阶段对干旱、高盐和低温的耐受性 (Lu et al., 2007; Nuruzzaman et al., 2010)。

本研究首次克隆了蝴蝶兰的 NAC 基因 *PhNAC1*, 分析了其在两种低温条件下的表达模式,结果显示其在低温胁迫 24 h 后即开始上调表达,表明蝴蝶兰 *PhNAC1* 转录因子能够对低温做出积极响应,以及时调节下游冷相关基因的表达,减轻逆境对植物可能造成的伤害。

参考文献:

BUTT IH, YANG ZE, GONG Q, et al., 2017. GaMYB85, an



A. 11 °C/6 °C 处理; B. 4 °C 处理。

A. Treatment at 11 °C/6 °C; B. Treatment at 4 °C.

图 6 蝴蝶兰 *PhNAC1* 基因在两种低温胁迫条件下的表达特性

Fig. 6 Expression characteristics of *Phalaenopsis PhNAC1* gene under cold stress

R2R3 MYB gene, in transgenic *Arabidopsis* plays an important role in drought tolerance [J]. BMC Plant Biol, 17 (1): 142. Doi: 10.1186/s12870-017-1078-3.

DELESSERT C, KAZAN K, WILSON IW, et al., 2005. The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 43 (5): 745–757.

FANG Y, YOU J, XIE K, et al., 2008. Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice [J]. Mol Genet Genom, 280(6): 547–563.

FUJITA M, FUGITA Y, MARUYAMA K, et al., 2004. A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway [J]. Plant J, 39(6):863–876.

GUAN QM, YUE XL, ZENG HT, et al., 2014. The protein phosphatase RCF2 and its interacting partner NAC019 are critical for heat stress-responsive gene regulation and thermotolerance in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 26: 438–453.

HAO YJ, WEI W, SONG QX, et al., 2011. Soybean NAC transcription factors promote abiotic stress tolerance and lateral root formation in transgenic plants [J]. Plant J, 68: 302–313.

HU HH, YOU J, FANG Y, et al., 2008. Characterization of transcription factor gene *SNAC2* conferring cold and salt tolerance in rice [J]. Plant Mol Biol, 67(1–2): 169–181.

JENSEN MK, KJAERGAARD T, NIELSEN MM, et al., 2010. The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: Structure-function relationships and determinants of ANAC019 stress signaling [J]. Biochem J, 426 (2): 183–196.

JIA D, GONG X, LI M, et al., 2018. Overexpression of a novel apple NAC transcription factor gene, *MdNAC1*, Confers the dwarf phenotype in transgenic apple (*Malus domestica*)

[J]. Genes, 9(5): 229. Doi:10.3390/genes9050229.

KOU X, WATKINS CB, GAN S, 2012. *Arabidopsis* AtNAP regulates fruit senescence [J]. J Exp Bot, 63: 6139–6147.

LARSSON E, SITBON F, SUNDBLAD J, et al., 2011. NAC regulation of embryo development in conifers [J]. BMC Proceed, 5(7): 67. Doi: 10.1186/1753-6561-5-S7-P67.

LIU H, WANG CC, CHEN H, et al., 2019. Genome-wide transcriptome analysis reveals the molecular mechanism of high temperature-induced floral abortion in *Litchi chinensis* [J]. BMC Genomics, 20(1):127. Doi: 10.1186/s12864-019-5493-8

LIU Q, YAN SJ, HUANG WJ, et al., 2018. NAC transcription factor ONAC066 positively regulates disease resistance by suppressing the ABA signaling pathway in rice [J]. Plant Mol Biol, 98(4–5):289–302.

LU PL, CHEN NZ, AN R, et al., 2007. A novel drought-inducible gene, *ATAF1*, encodes a NAC family protein that negatively regulates the expression of stress-responsive gene in *Arabidopsis* [J]. Plant Mol Biol, 63(2): 289–305.

MAO X, ZHANG H, QIAN X, et al., 2012. TaNAC2, a NAC-type wheat transcription factor conferring enhanced multiple abiotic stress tolerances in *Arabidopsis* [J]. J Exp Bot, 63(8): 2933–2946.

MITA S, HENMI R, OHNO H, 2006. Enhanced expression of genes for ACC synthase, ACC oxidase, and NAC protein during high-temperature-induced necrosis of young inflorescences of *Cymbidium* [J]. Physiol Plant, 128: 476–486.

NURUZZAMAN M, MANIMEKALAI R, SHARONI MA, et al., 2010. Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice [J]. Gene, 465: 30–44.

OLSEN NA, ERNST AH, LEGGIO LL, et al., 2005. NAC transcription factors: Structurally distinct, functionally diverse [J]. Trends Plant Sci, 10(2): 80–88.

OOKAH, SATOH K, DOI K, et al., 2003. Comprehensive

- analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana* [J]. *DNA Res*, 10(6): 239–247.
- PURANIK S, SAHU PP, SRIVASTAVA PS, et al., 2012. NAC proteins: Regulation and role in stress tolerance [J]. *Trends Plant Sci*, 17(6): 369–381.
- QU YT, DUAN M, ZHANG ZQ, et al., 2016. Overexpression of the *Medicago falcata* NAC transcription factor MfNAC3 enhances cold tolerance in *Medicago truncatula* [J]. *Environ Exp Bot*, 129: 67–76.
- SCARPECI ET, ZANOR IM, MUELLER-ROEBER B, et al., 2013. Overexpression of AtWRKY30 enhances abiotic stress tolerance during early growth stages in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Mol Biol*, 83(3): 265–277.
- SHAO H, WANG H, TANG X, 2015. NAC transcription factors in plant multiple abiotic stress responses: Progress and prospects [J]. *Front Plant Sci*, 6: 902. Doi: 10.3389/fpls.2015.00902.
- SINGH S, GROVER A, NASIM M, 2016. Biofuel potential of plants transformed genetically with NAC family genes [J]. *Front Plant Sci*, 7: 22. Doi: 10.3389/fpls.2016.00022.
- SUN H, HU ML, LI JY, et al., 2018. Comprehensive analysis of NAC transcription factors uncovers their roles during fiber development and stress response in cotton [J]. *BMC Plant Biol*, 18(1): 150. Doi: 10.1186/s12870-018-1367-5.
- VANDESOMPELEJ, PRETER DK, PATTYN F, et al., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes [J]. *Genom Biol*, 3(7):1–11.
- WANG Z, RASHOTTE AM, DANE F, 2014. *Citrullus colocynthis* NAC transcription factors CcNAC1 and CcNAC2 are involved in light and auxin signaling [J]. *Plant Cell Rep*, 33(10): 1673–1686.
- XIA N, ZHANG G, SUN YF, et al., 2010. *TaNAC8*, a novel NAC transcription factor gene in wheat, responds to stripe rust pathogen infection and abiotic stresses [J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 74(5–6): 394–402.
- XUE Y, WANG YY, PENG HR, et al., 2014. Transcription factor MdCBF1 gene increases freezing stress tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. *Biol Plantarum*, 58(3): 499–506.
- YANG XW, WANG XY, JI L, et al., 2015. Overexpression of a *Miscanthus lutarioriparius* NAC gene *MINAC5* confers enhanced drought and cold tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Rep*, 34(6): 943–958.
- ZHAO P, WANG WJ, SUN MX, 2011. Characterization and expression pattern analysis of *DcNAC* gene in somatic embryos of *Dendrobium candidum* Wall Ex Lindl [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 107(1): 151–159.
- ZHAO X, YANG XW, PEI SQ, et al., 2016. The *Miscanthus* NAC transcription factor MINAC9 enhances abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Gene*, 586: 158–169.
- ZHANG LN, ZHANG LC, XIA C, et al., 2015. The novel wheat transcription factor *TaNAC47* enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants [J]. *Front Plant Sci*, 6: 1174. Doi: 10.3389/fpls.2015.01174.
- ZHOU Y, HUANG WF, LIU L, et al., 2013. Identification and functional characterization of a rice NAC gene involved in the regulation of leaf senescence [J]. *BMC Plant Biol*, 13: 132. Doi: 10.1186/1471-2229-13-132.

(责任编辑 何永艳)