

研究报告 Original Papers

甜菜NAC转录因子鉴定及其在水分胁迫下的表达分析

徐晓阳, 李国龙, 孙亚卿, 张少英*

内蒙古农业大学甜菜生理研究所, 呼和浩特010018

摘要: 植物特异性NAC转录因子是植物特有的、最大的转录因子家族之一, 在响应植物干旱胁迫反应等过程中发挥着重要作用。本研究以NAC保守结构域序列为检索序列通过HMM和BLAST在甜菜(*Beta vulgaris*)基因组数据中进行同源性搜索, 对甜菜NAC转录因子基因(*BvNAC*)家族成员进行鉴定。利用ExPASy、MEGA 6.0、Mapinspect、GSDS 2.0、MEME等生物信息学分析工具对甜菜NAC转录因子家族成员进行蛋白质氨基酸组分和理化性质分析、系统进化关系分析、基因染色体定位及蛋白质结构域序列保守性预测; 通过RNA-seq和qRT-PCR分析甜菜NAC基因在水分胁迫下的表达情况。结果表明: 甜菜NAC家族基因共有52个成员, 其中50个在9条染色体上不均等分布, 2个目前尚未定位; 其编码的蛋白所含氨基酸残基数从48到711不等, 其中17个为碱性蛋白质, 4个为亲水性蛋白质; 系统进化分析将52个成员分为2类, I类有38个成员, II类有14个成员; NAC保守域分析表明同类成员有相近的保守元件, 而外显子和内含子数目具有高变异性; 在干旱胁迫下甜菜NAC家族成员中共有23个基因上调表达。研究结果为揭示甜菜耐旱分子机理和发掘甜菜耐旱基因提供了理论依据。

关键词: 甜菜; *BvNAC*; 干旱胁迫; 基因表达

NAC (NAM、ATAF和CUC)转录因子家族是植物特有的一类转录因子, 也是目前发现最大的转录因子家族之一。目前大量该转录因子基因已陆续在模式植物拟南芥、烟草及主要粮食作物水稻、玉米中被克隆, 少部分基因的功能已被明确, 如参与植物水分胁迫调控、盐分胁迫调控、参与植物对温度胁迫的应答等(王凤涛等2010; 李国龙等2011)。据Wu等(2010年)推测有20%~25%的NAC基因对至少一种胁迫有应答反应, 在拟南芥中, 过表达*ATAF1*可提高转基因拟南芥对贫瘠的耐受性; *ANAC019*、*ANAC055*和*ANAC072*的表达均受到干旱、高盐或ABA的诱导, 过表达可提高转基因植株对干旱的耐受性(Tran等2004), 而且*ANAC019*和*ANAC055*的表达与生物胁迫有关(Bu等2008)。在水稻中, *OsNAC6*对贫瘠、低温、高盐和ABA均有应答反应, 过量表达*OsNAC6*和*ONAC045*均可提高转基因水稻对干旱和高盐的耐受性(Nakashima等2007; Zheng等2009)。这些研究表明, NAC转录因子在植物的逆境胁迫调控中发挥着重要作用。

干旱是影响植物生长发育的主要逆境因子。前人研究多种植物发现NAC转录因子直接或通过调控参与干旱应答基因的表达, 在植物抗旱中起

重要作用(孙利军等2012)。王瑞芳等(2014)研究表明, 在逆境中NAC基因受诱导, 可介导生长素信号传递, 促进侧根生长, 提高根系吸水能力, 抵御干旱胁迫。代婷婷等(2018)研究烟草*NAC4*基因表明, 在干旱胁迫下, *NAC4*基因调控吡咯啉-5-羧酸合成酶基因和鸟氨酸- δ -氨基转移酶基因上调表达, 提高植株超氧化物歧化酶、过氧化氢酶活性, 降低丙二醛含量, 进而提高植株抗旱能力。李文等(2015)从19个花生野生种中分离得到11类*NAC4*的DNA序列, 其中*Aw1NAC4*、*Aw2NAC4*与栽培种核苷酸序列同源性最高。*AhNAC4* (HM776131.1)编码的蛋白属于干旱胁迫响应的转录因子, 全长为1 244 bp, 区长度为1 050 bp, 含有2个内含子。Redillas等(2012)研究表明, 水稻NAC结构域家族成员*OsNAC9*干旱时过表达, 作物产量均提高30%左右, 有效地提高了转基因水稻的抗旱性。代婷婷等(2018)明确干旱胁迫时烟草中, *NAC4*基因上调表达, 提高烟草抗旱性。前人对拟南芥的研究表明

收稿 2019-01-09 修订 2019-03-30

资助 现代农业产业技术体系(CARS-170201)和内蒙古自然科学基金(2017MS0306)。

* 通讯作者(syzh36@aliyun.com)。

ATAF1、*ANAC019*、*ANAC055*和*ANAC072/RD26*参与植物对干旱的应答,能够改善拟南芥对干旱胁迫的应答(Wu等2010; Tran等2010; Lu等2006)。

甜菜是中国重要的糖料作物和经济作物之一,主要种植在水资源相对匮乏,伴随周期性或难以预期的干旱天气的北方地区,产量受水分胁迫制约(张木清和陈如凯2005)。迄今为止,尽管在许多植物中NAC转录因子与抗旱相关的基因已被克隆并进行了相关功能的鉴定,但对甜菜抗旱相关的NAC转录因子研究还鲜见报道。因此,通过发掘干旱诱导的甜菜NAC转录因子,可为改造抗逆甜菜新材料和加速甜菜抗旱新品种培育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

选取本研究组筛选的甜菜(*Beta vulgaris* L.)强抗旱品种‘HI0466’,于2017年11月栽培于内蒙古农业大学甜菜生理研究所人工气候室中(光周期16 h,室温25°C)。待幼苗长至6片真叶时停止浇水进行干旱处理,选取干旱处理4、6和10 d,干旱处理10 d后恢复给水的复水(RW)处理组和正常每2 d浇水一次的对照(CK)组的叶片经液氮速冻后存于-80°C冰箱,用于甜菜总RNA的提取及RNA-seq测序分析。

1.2 总RNA的提取和cDNA的合成

取-80°C冰箱中保存的甜菜叶片,采用TRIzol法提取不同干旱处理样品中的总RNA,以纯化好的RNA为模板根据AMV反转录试剂盒合成cDNA,存于-80°C备用。

1.3 甜菜NAC基因的生物信息学分析

1.3.1 甜菜NAC家族成员系统进化特征分析

利用基于“隐马尔可夫模型”(hidden Markov model, HMM)下载自Pfam蛋白家族数据库(<http://pfam.xfam.org/>)的保守性NAC结构域序列在甜菜基因数据集RefBeet-1.1和RefBeet-1.2 (<http://bvseq.molgen.mpg.de/Genome/Download/index.shtml>)中进行BLASTP搜索。将所有可以编码完整NAC结构域的都归为BvNAC家族基因,并确保其非冗余。将SMART分析(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)作为二次检验的标准,确保每一条蛋白质序列都仅包

含一条保守性NAC结构域。使用在线软件ExPASy (<http://www.expasy.org/tools>)中Prot-Param工具分析BvNAC蛋白的氨基酸组分和理化性质。利用ClusterW在默认设置下对来自甜菜和拟南芥的NAC家族蛋白氨基酸序列进行同源性分析。利用MEGA 6.0软件中的NJ法构建甜菜NAC家族基因与拟南芥NAC家族基因的系统进化树。

1.3.2 甜菜NAC家族成员的染色体定位

通过对甜菜基因组数据集RefBeet-1.1的搜索确定BvNAC家族基因所在的位置。利用Mapinspect软件绘制BvNAC家族基因的染色体定位图。

1.3.3 基因结构分析和保守性模体鉴定

使用在线工具GSDS 2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)绘制BvNAC家族基因的外显子-内含子分布图。使用在线工具MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>)统计分析BvNAC家族蛋白序列中的保守性模体,模体数量上限设为13,其他值均设为默认值。

1.4 甜菜NAC基因表达分析

RNA-seq测序用生长栽培于内蒙古农业大学甜菜生理研究所人工气候室中(光周期16 h,室温25°C)的‘HI0466’植株,培养至6片真叶停止浇水做干旱处理,取干旱处理4、6和10 d以及RW、CK的植株叶片进行RNA-seq测序分析。根据甜菜NAC家族基因序列设计引物(表1),以干旱处理4、6和

表1 荧光定量PCR扩增引物序列

Table 1 Primers used for qRT-PCR amplification

引物名称	引物序列(5'→3')
<i>BvNAC-twas</i>	CCGTTCAATTGCACTGCCAC
<i>BvNAC-twas</i>	AGCCCAATCGAAACTACCCG
<i>BvNAC-hdfh</i>	GAACCTTCTGCTCCGTGTT
<i>BvNAC-hdfh</i>	TGCTACTGCTGCTTTCGTCT
<i>BvNAC-guiw</i>	ATCTTGTGCATGGTGAGAGC
<i>BvNAC-guiw</i>	AAGGTCAAAATCGTGGGGCT
<i>BvNAC-sgnn</i>	GAACAGCATTAGACCCAACAGAGT
<i>BvNAC-sgnn</i>	GCACTGGTTTCCTTCTCCTTCA
<i>BvNAC-hzcx</i>	TCCATTTCCCGATGACCCATT
<i>BvNAC-hzcx</i>	AGCAACCTCAACCTTCCCTTT
<i>BvNAC-kjzy</i>	GCCCAAGACCCAATAAACTC
<i>BvNAC-kjzy</i>	GCTCAACTAACAAAGCCAAAG
<i>BvActin F</i>	CCAAGGCAAACAGGGAAAAG
<i>BvActin R</i>	CCATCACCAGAGTCAAGCACA

10 d以及RW、CK的甜菜叶片提取RNA并反转录成cDNA。将稀释16倍的cDNA作为实时荧光定量PCR反应的模板进行扩增,每个样品重复3次。相对表达量的计算用 $2^{-\Delta C_t}$ 法。根据甜菜水分胁迫条件下获得的转录组学数据,分析所有*BvNAC*基因在水分胁迫条件下的表达模式,将基因表达水平标准化为Z值(Z-score)后用HemI (Heatmap Illustrator, version 1.0.1; <http://hemi.biocuckoo.org/>)作图。

2 实验结果

2.1 甜菜NAC家族基因分子特征

对在甜菜数据库检索到的52条*BvNAC*家族基因进行序列分析,表明52个*BvNAC*基因编码的蛋白质平均含有353个氨基酸。氨基酸数量最多的是*Bv_enjh*蛋白,编码一个含有711个氨基酸残基的假定蛋白,全长cDNA为2 136 bp,预测分子质量为80.40 kDa,理论等电点为5.95;氨基酸数量最少的是*Bv_wkcm*蛋白,编码一个含有48个氨基酸残基的假定蛋白,全长cDNA为669 bp,预测分子质量为5.63 kDa,理论等电点为3.61。52条*BvNAC*编码的蛋白质等电点变化范围为3.61 (*Bv_wkcm*)~9.95 (*Bv_aktr*),其中仅有17个编码氨基酸为碱性氨基酸,其余编码氨基酸均为酸性氨基酸;根据亲水性指数介于-0.5~0.5为两性蛋白(GRAVY为负值表示亲水性,正值表示疏水性)的原则(王占军等2014),发现仅有*Bv_ueac*、*Bv_guiw*、*Bv_tgus*与*Bv_znkf*为亲水性蛋白,其余均为两性蛋白(表2)。

2.2 甜菜NAC基因的生物信息学分析

2.2.1 甜菜NAC家族基因的鉴定与系统发育分析

通过对甜菜基因组数据进行NAC保守性结构域的搜索,共得到52条仅包含有一条NAC保守性结构域的蛋白序列,即为甜菜NAC家族成员,命名为*BvNAC*基因家族。将*BvNAC*转录因子家族蛋白序列与拟南芥105个NAC转录因子家族蛋白序列用NJ法构建系统进化树(图1),并根据*BvNAC*家族成员与拟南芥NAC家族成员的进化关系将*BvNAC*转录因子家族成员进行功能分类。

根据Ooka等(2003)对拟南芥和水稻NAC家族基因系统进化树分组的方法,将甜菜NAC家族按

蛋白的NAC结构域序列相似性分成两大组,第I大组又分为13个亚家族,第II大组分为5个亚家族,且第II大组只有3个亚家族中含有*BvNAC*家族基因(图1)。分入I大组第II亚家族的*BvNAC*家族基因最多,为9个;第I大组第Ic、If、Ig、Ii、Ik和Im 6个亚家族的*BvNAC*家族基因最少,均为1个。

2.2.2 甜菜NAC家族保守域序列分析

对*BvNAC*蛋白序列进行保守性模体预测,经分析共得到13个保守性模体,其中模体2、4、1、5、6分别代表NAC类转录因子A、B、C、D、E亚结构域。所有*BvNAC*家族成员均含有3~8个模体,且所有*BvNAC*家族成员均含有模体5(图2)。根据系统进化树的分组和保守型模体分析可将所有*BvNAC*家族基因分成两大组:第I大组基因序列相对保守,除*Bv_mhnx*、*Bv_noy*和*Bv_tzwj*外的基因蛋白序列均含有模体1、模体2、模体3、模体4、模体5、模体6。而分析显示第II大组基因序列不保守,模体8仅存在于第II大组的*Bv_rpmu*、*Bv_ekgh*、*Bv_hisu*和*Bv_detz*中,模体9仅存在于第I大组的*Bv_jkxz*、*Bv_twas*、*Bv_zihs*、*Bv_zfhk*和第II大组*Bv_tdfd*、*Bv_enjh*中,模体10仅存在于第II大组的*Bv_rpmu*、*Bv_ekgh*和*Bv_tdfd*中,模体12仅存在于第I大组*Bv_zihs*和*Bv_zfhk*。上述结果与系统进化树的分组结果相互验证,且与拟南芥和水稻中的分组类似(Ooka等2003)。

2.2.3 甜菜NAC家族基因染色体定位分析

染色体定位(图3)发现,52个*BvNAC*成员中的50个在甜菜9条染色体均有分布。其中第VI条染色体上分布最多,分布有10个基因;其次为第I条和第IV条,分别分布有8个和9个基因;在第III条和第VII条染色体上分布的基因最少,分别只有2个基因。除此之外,*Bv_dyzk*和*Bv_twpc*尚未明确定位。

2.2.4 甜菜NAC家族内含子和外显子结构分析

甜菜NAC家族基因外显子和内含子数目具有高变异性(1~7个外显子)(图4)。52个*BvNAC*成员中含有3个外显子的最多,为31个,占59.6%;其次为含有4个外显子有11个*BvNAC*成员,占21.2%;而含有2个外显子和含有7个外显子的*BvNAC*成员最少,均为1个,分别是*Bv_twpc*和*Bv_tdfd*。位于同一分支的基因普遍具有相似的外显子-内含子组织结

表2 甜菜NAC家族基因信息
Table 2 The information of BvNAC family genes

基因	登录号	基因长度/bp	氨基酸长度/aa	分子质量/kDa	理论等电点	亲水性指数
<i>detz</i>	LOC104895913	1 065	282	3.21	8.80	-0.963
<i>enjh</i>	LOC104895917	2 136	711	80.40	5.95	-0.616
<i>pzjj</i>	LOC104895915	705	234	26.99	6.98	-0.899
<i>yqjt</i>	LOC104908882	852	254	29.31	5.61	-1.209
<i>rpmu</i>	LOC104908401	1 164	387	43.51	4.73	-0.665
<i>ekgh</i>	LOC104901118	1 167	388	43.55	5.25	-0.698
<i>tdfd</i>	LOC104902338	1 530	509	57.61	6.46	-1.056
<i>aktr</i>	LOC104903447	501	166	19.15	9.95	-1.028
<i>hisu</i>	LOC104900619	540	179	20.87	9.62	-1.004
<i>twpc</i>	—	732	264	30.26	5.98	-0.895
<i>ktgn</i>	LOC104901573	576	191	21.88	4.86	-0.694
<i>wkcm</i>	LOC104895420	669	48	5.63	3.61	-0.846
<i>wshi</i>	LOC104895419	627	208	24.71	4.91	-0.736
<i>ndxy</i>	LOC104902625	1 236	411	46.30	6.44	-0.730
<i>tzwj</i>	LOC104898318	1 203	282	32.95	5.57	-0.958
<i>qoku</i>	LOC104902599	1 041	346	39.64	6.70	-0.973
<i>zihs</i>	LOC104895537	1 077	358	40.39	8.12	-0.651
<i>zfhk</i>	LOC104895551	1 086	361	40.88	7.24	-0.692
<i>xrgj</i>	LOC104892637	1 068	355	40.90	5.97	-0.813
<i>rapp</i>	LOC104903714	1 392	292	33.49	6.07	-0.800
<i>strk</i>	LOC104893665	1 050	349	40.36	6.19	-0.940
<i>cmip</i>	LOC104895128	1 206	401	45.71	5.23	-0.739
<i>uozo</i>	LOC104888686	1 206	401	46.44	6.01	-1.101
<i>fpfn</i>	LOC104892061	1 098	365	42.24	6.52	-0.834
<i>dyzk</i>	LOC104883369	963	320	36.17	6.51	-0.592
<i>yzgr</i>	LOC104900945	1 335	444	49.47	6.05	-0.551
<i>pjnp</i>	LOC104894023	1 086	361	40.68	5.87	-0.782
<i>cugw</i>	LOC104891476	1 215	404	43.94	7.13	-0.589
<i>gzxk</i>	LOC104893997	1 017	338	38.48	6.09	-0.762
<i>gcaa</i>	LOC104886693	1 008	335	37.19	8.68	-0.639
<i>noyn</i>	LOC104906228	264	87	10.29	5.38	-0.991
<i>hdjh</i>	LOC104897497	912	303	33.98	8.43	-0.891
<i>pfsa</i>	LOC104900768	1 026	341	38.46	8.36	-0.755
<i>qeij</i>	LOC104891597	1 233	410	46.04	7.41	-0.926
<i>twas</i>	LOC104891602	1 095	364	41.06	8.97	-0.737
<i>hzcx</i>	LOC104890529	912	303	34.57	7.62	-0.639
<i>esaw</i>	LOC104898084	1 287	428	48.63	5.66	-0.590
<i>xzdt</i>	LOC104906205	1 164	387	43.81	7.99	-0.522
<i>sgnn</i>	LOC104906153	1 011	336	38.85	7.63	-1.000
<i>jkxz</i>	LOC104896989	1 557	518	58.50	6.68	-0.899
<i>kjzy</i>	LOC104903839	897	298	33.99	7.10	-0.534
<i>ueac</i>	LOC104905776	1 164	387	43.71	8.70	-0.447
<i>nige</i>	LOC104885897	1 182	393	44.13	8.54	-0.519
<i>usim</i>	LOC104888129	1 914	637	71.14	5.63	-0.535
<i>gzwx</i>	LOC104892958	807	329	37.52	5.43	-0.573
<i>offi</i>	LOC104903965	1 056	351	40.13	5.26	-0.736
<i>mhnx</i>	LOC104907698	1 809	496	55.76	5.16	-0.505
<i>oxms</i>	LOC104907701	726	241	27.62	5.43	-0.684
<i>guiw</i>	LOC104907296	1 623	540	59.95	4.57	-0.404
<i>tgus</i>	LOC104890605	1 044	347	37.80	4.65	-0.432
<i>znkf</i>	LOC104909031	1 557	518	57.86	4.78	-0.488
<i>xiqu</i>	LOC104907290	1 206	401	45.05	5.44	-0.674

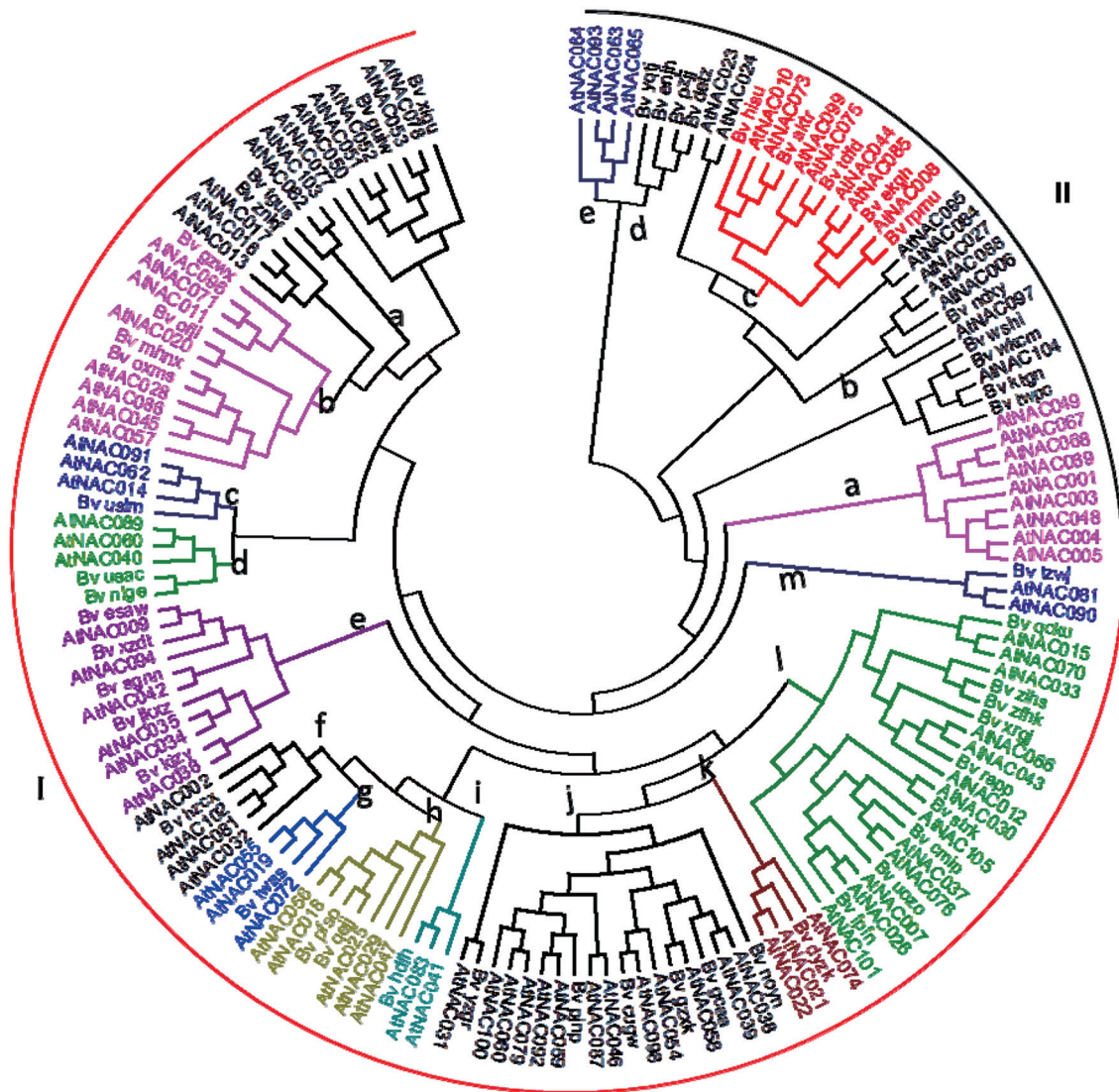


图1 NAC系统进化分析和分组

Fig.1 Phylogenetic profiling and groups of NAC family

I、II (红、黑色弧线)代表NAC家族被分成2个大组,不同小写字母代表两大组中的不同亚族。

构,但仍有部分分支上基因外显子-内含子数量变异性较大。

2.3 甜菜NAC家族基因在干旱条件下的表达分析

通过对52个BvNAC家族基因在干旱胁迫条件下RNA-seq分析(图5),表明A组中大部分基因对水分胁迫有响应,但表达量变化不大;B组中基因随干旱胁迫时间增加表达量显著降低甚至不响应;C组中大部分基因随干旱胁迫时间增加表达量显著增加。为进一步分析BvNAC家族基因在干旱胁迫

条件下的响应情况,通过RNA-seq分析结果表明,干旱胁迫下NAC家族成员有23个基因表达量上调,9个基因表达量下调,20个基因表达无显著变化(图6)。为了进一步明确23个上调表达基因在水分胁迫下表达情况的准确性,选取了其中6个基因利用qRT-PCR进行进一步验证其在水分胁迫下的表达情况,结果(图7)表明, *Bv_twas*、*Bv_hdfh*、*Bv_sgnn*、*Bv_guiw*、*Bv_hzcx*和*Bv_kjzy*随干旱胁迫时间的增加表达量均有不同程度增加,其中*Bv_hdfh*

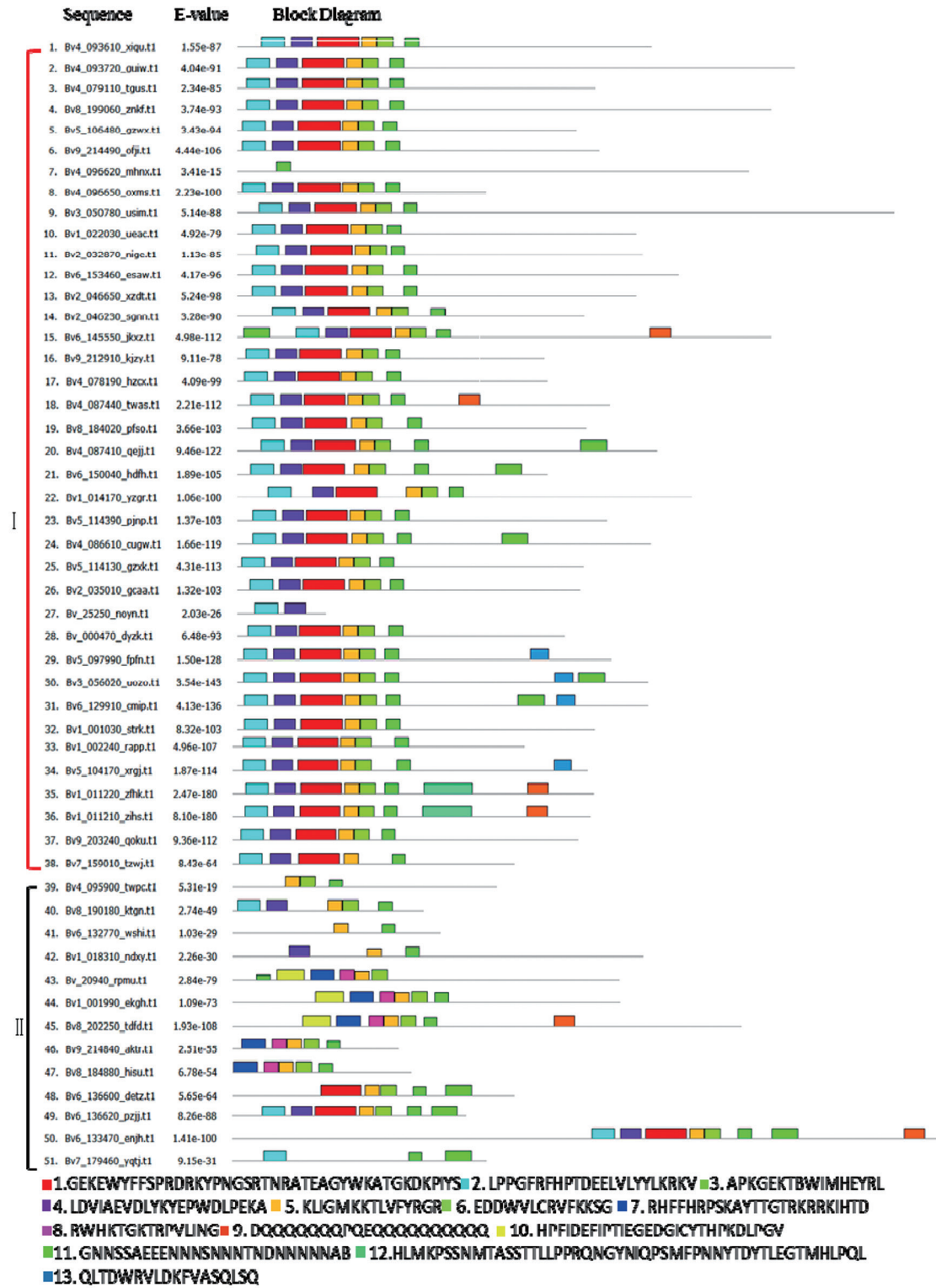


图2 甜菜NAC转录家族蛋白保守性模体分布
Fig.2 Distribution of conserved motifs for BvNAC family proteins

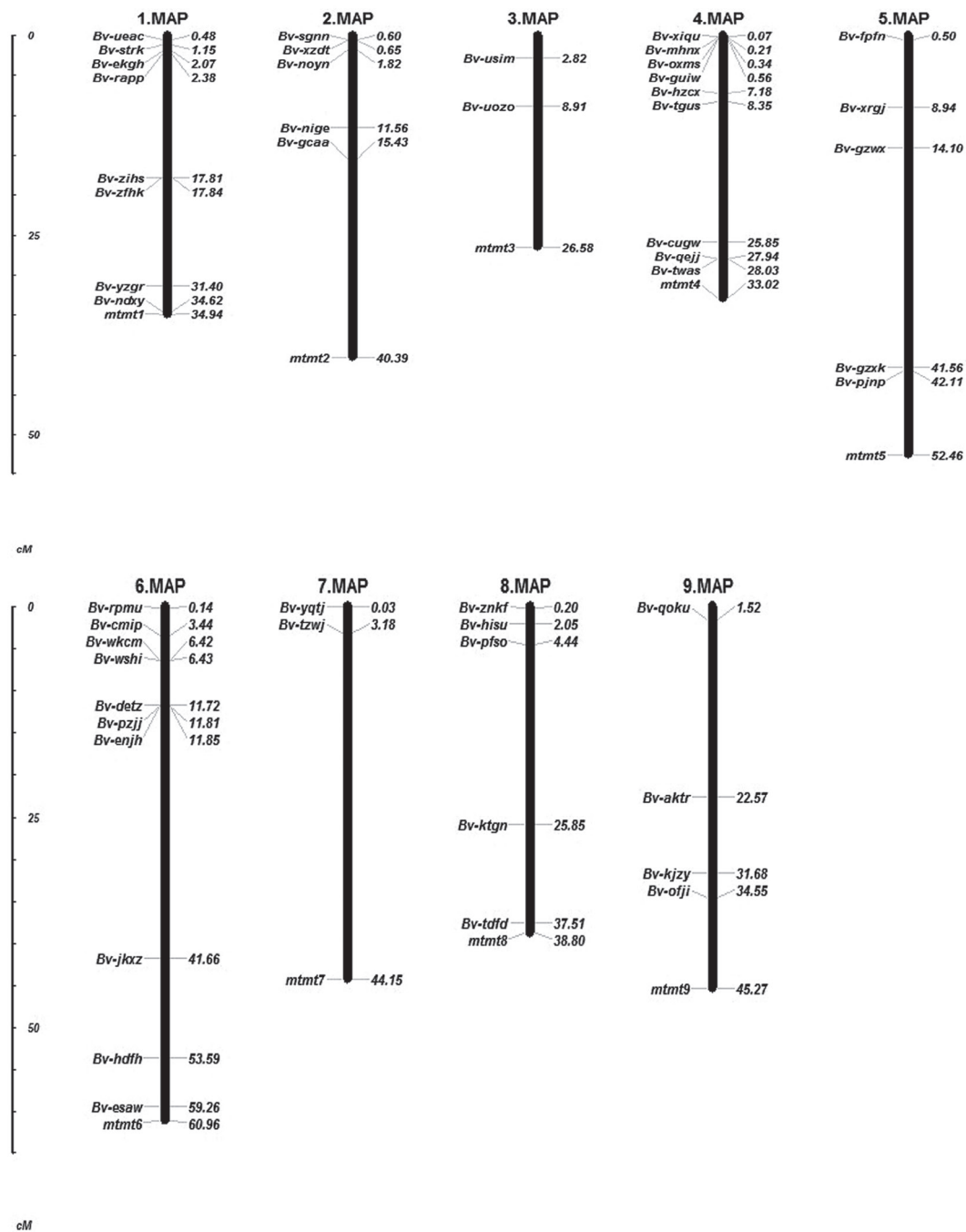


图3 甜菜NAC家族基因在染色体上的分布

Fig.3 Distribution of the BvNAC family genes on chromosomes

与*Bv_sgmn*表达量增加最为显著; *Bv_guiw*与*Bv_twas*在干旱胁迫4 d时表达量显著增加, 而在干旱胁迫6和10 d时表达量又出现降低趋势, 但仍高于对照; 而*Bv_hzcx*与*Bv_kjzy*在干旱胁迫处理下表达

量出现先升高后降低的趋势, 复水处理后表达量降为最低。qRT-PCR的检验结果与RNA-seq的结果基本一致, 从而验证了RNA-seq结果的可靠性, 23个上调表达基因初步认定为抗旱相关候选基因。

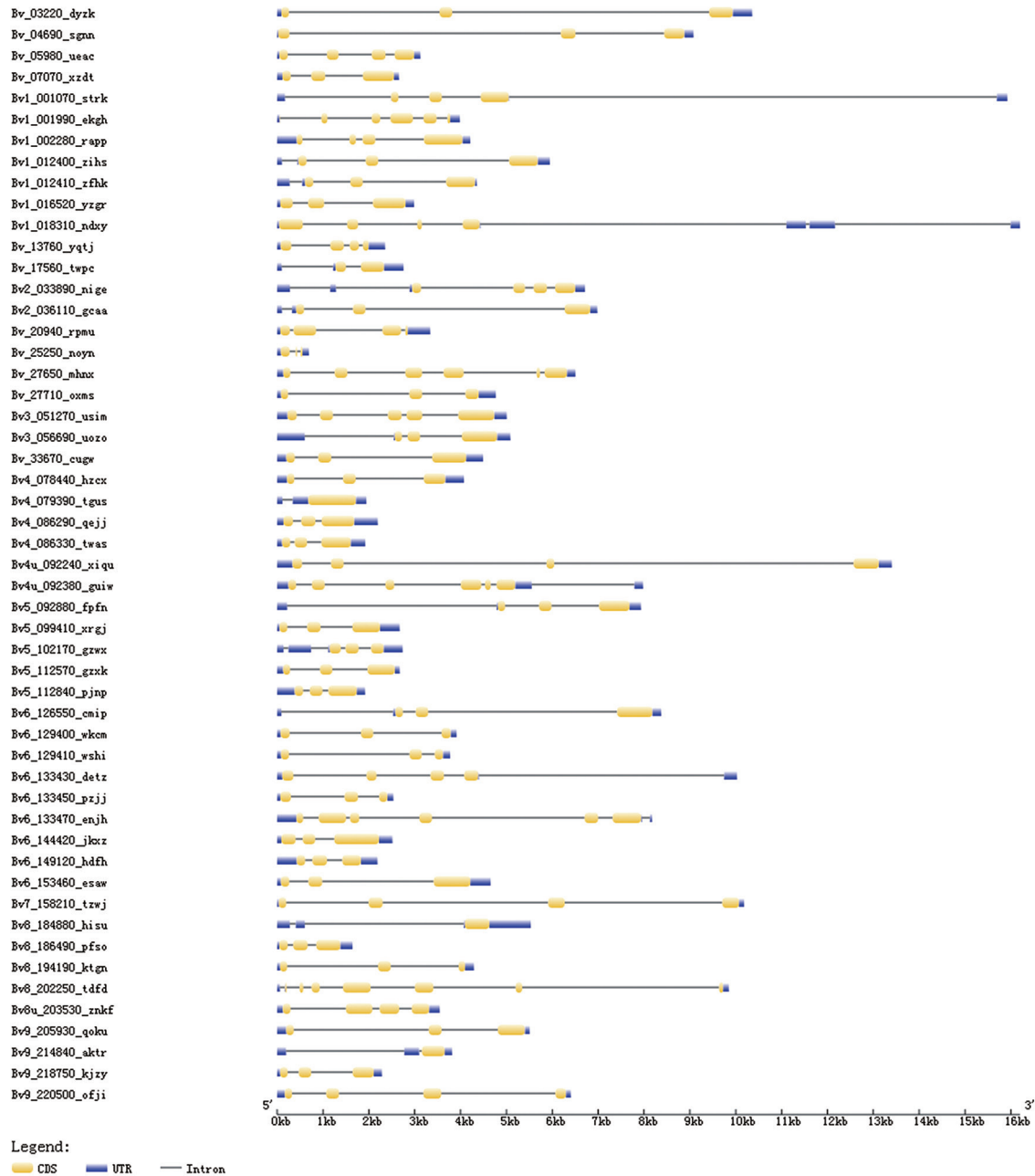


图4 甜菜NAC基因内含子和外显子结构

Fig.4 Intron and exon structures of *BvNAC* genes

3 讨论

NAC转录因子是目前发现的植物中最大的转录因子家族之一,其家族成员数量庞大,最初由 Souer等(1996)人在矮牵牛中发现,接着在拟南芥、水稻、玉米、棉花和白菜(Nuruzzaman等2010;

Shiriga等2014; Shang等2013)中分别发现含有117、151、152、145和204个NAC转录因子基因,其中在模式植物拟南芥和水稻中的研究较多。已发现NAC家族在多种生物学过程中起作用,包括茎尖分生组织的形成(Takada等2001)、花发育(Sablowski和Meyerowitz 1998)、细胞分裂(Kim等

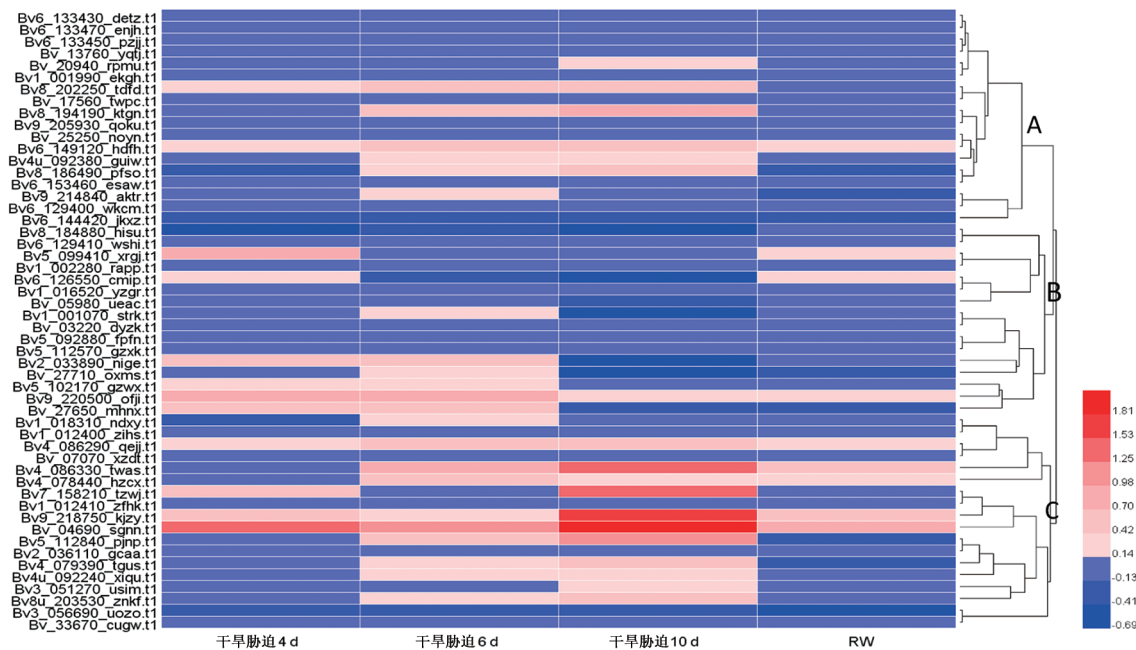


图5 BvNAC家族基因在干旱胁迫下的表达模式分析

Fig.5 Analysis of expression patterns of BvNAC family genes under drought stress

图中不同颜色代表基因在不同干旱胁迫时间下的表达量。

2007)、叶衰老(Breeze等2011)、次生壁的形成以及生物和非生物胁迫响应等(Christianson等2010; Nakashima等2012)。Huang等(2012)对菊花的44个NAC基因进行了表达模式分析,发现有32个基因对2种逆境胁迫处理产生应答,10个基因对5种逆境胁迫产生应答,其中CINAC17和CINAC21对6种胁迫产生应答。Liu等(2014)对蓖麻的32个NAC基因进行了分析,发现部分基因对非生物胁迫产生反应,一些则在次生生长组织中表达。小麦TaNAC67基因对干旱、高盐、ABA和低温胁迫产生应答,过量表达的TaNAC67基因提高转基因拟南芥对干旱、盐胁迫和冷冻胁迫的抗性(Mao等2014),胡杨NAC基因能够被干旱和高盐胁迫诱导,而对ABA的响应较弱,过量表达的NAC基因提高转基因拟南芥的抗旱能力(Wang等2013)。华中农业大学熊立仲教授研究小组克隆了一个水稻抗旱耐盐基因SoNAC1,该基因是NAC类型的转录因子,其主要在气孔的保卫细胞中被诱导表达,干旱胁迫时促进气孔关闭,但是并不影响光合速率,因而抗旱性大为提高,在生殖生长期严重干旱的情况下,过量表

达SoNAC1的转基因植株坐果率较对照提高22%~34%;在营养生长期,转基因植株也表现出很强的抗旱性(Hu等2006)。

本实验系统进化树研究表明52个BvNAC基因被分成16个亚家族,根据各亚家族分支长短我们推测第II亚家族为原始祖先。根据基因的保守性模体分析及染色体定位分析结果推测基因重复可能在BvNAC基因家族的扩增和进化中发挥了重要作用,最终导致BvNAC基因在数量上、结构上和功能上的多样性。通过RNA-seq分析,发现52个BvNAC家族成员中有23个在干旱胁迫处理后上调表达,占44.2%,其中Bv-pfso、Bv-qejj、Bv-twas、Bv-hzcx、Bv-sgmn和Bv-jkxz集中分布于ATAF1和ONAC022亚类,该亚类目前发现和植物抗逆性密切相关;此外Bv-guiw、Bv-tgus、Bv-znkf和Bv-xiqu属于NAC2亚类,该亚类相关基因目前也发现和植物抗逆性密切相关,由此推测BvNAC家族成员在甜菜应对干旱胁迫中发挥着重要作用。通过qRT-PCR验证分析发现,被挑选出的6个BvNAC家族基因在干旱胁迫中均表现出明显上调表达,与RNA-

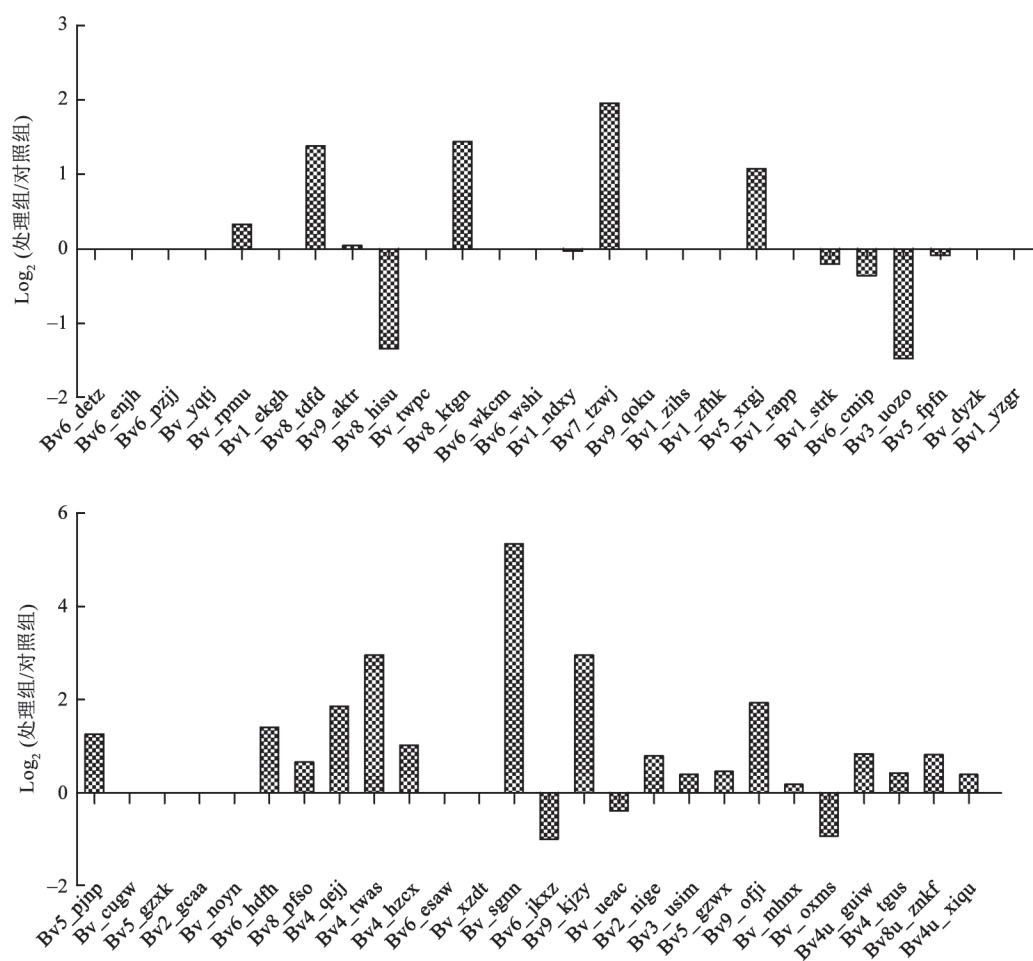


图6 干旱胁迫下甜菜NAC基因的表达谱

Fig.6 Expression profile of NAC genes in sugar beet under drought stress

图中各基因表达量为干旱胁迫4 d、6 d、10 d和RW的总表达量。

seq结果基本一致,初步推测BvNAC家族23个上调表达基因可能参与了甜菜干旱胁迫下生长发育的调控,其中*Bv-twas*与拟南芥中调控抗旱性的*ANAC019*、*ANAC055*和*ANAC072*基因亲缘关系较近,推测*Bv-twas*可能与提高甜菜对干旱胁迫的耐受性关系更为密切,可作为改良甜菜耐旱性的候选基因。

参考文献(References)

- Breeze E, Harrison E, McHattie S, et al (2011). High-resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis* leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *Plant Cell*, 23 (3): 873–894
- Bu QY, Jiang HL, Li CB, et al (2008). Role of the *Arabidop-*

sis thaliana NAC transcription factors ANAC019 and ANAC055 in regulating jasmonic acid-signaled defense responses. *Cell Res*, 18 (5): 756–767

- Christianson JA, Dennis ES, Llewellyn DJ, et al (2010). Ataf NAC transcription factors: regulators of plant stress signaling. *Plant Signal Behav*, 5 (4): 428–432
- Dai TT, Yao XZ, Lv LT, et al (2018). Cloning and drought-resistant function analysis of *NAC4* gene in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *J Agric Biotechnol*, 26 (5): 764–773 (in Chinese with English abstract) [代婷婷, 姚新转, 吕立堂等(2018). 烟草*NAC4*基因的克隆及其抗旱功能分析. *农业生物技术学报*, 26 (5): 764–773]
- Hu HH, Dai MQ, Yao JL, et al (2006). Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103 (35): 12987–12992

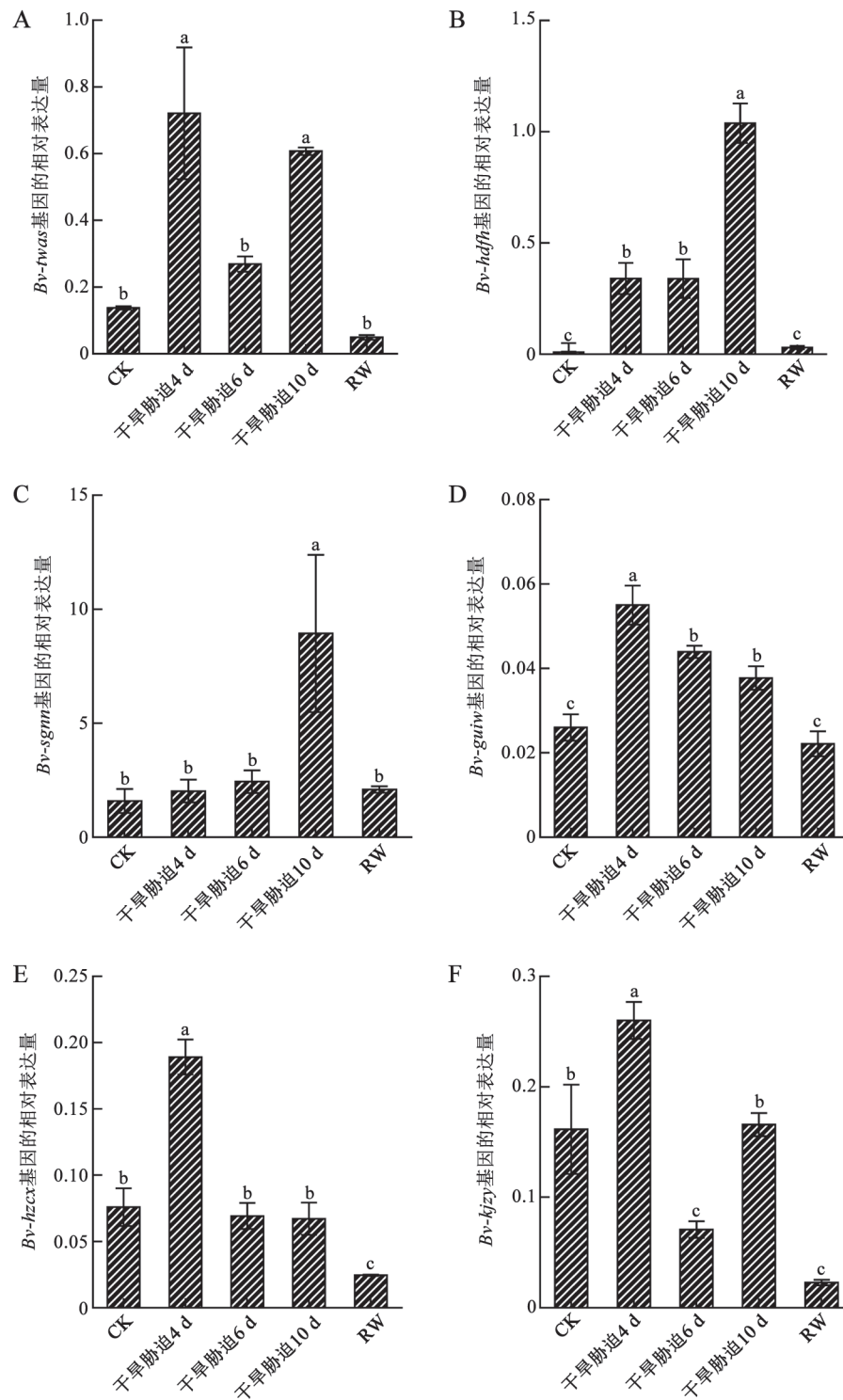


图7 干旱胁迫下6个甜菜NAC家族基因的表达分析

Fig.7 Expression analysis of 6 genes of BvNAC family under drought stress
不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

- Huang H, Wang Y, Wang SL, et al (2012). Transcriptome-wide survey and expression analysis of stress-responsive *NAC* genes in *Chrysanthemum lavandulifolium*. *Plant Sci*, 193–194 (3): 18–27
- Kim YS, Kim SG, Park JE, et al (2007). A membrane-bound *NAC* transcription factor regulates cell division in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18 (1): 3132–3144
- Li GL, Wu HX, Wen L, et al (2011). Study on screening of drought resistance assessment indices and comprehensive evaluation of sugarbeet during seedling stage. *Agric Res Arid Areas*, 29 (4): 69–74 (in Chinese with English abstract) [李国龙, 吴海霞, 温丽等(2011). 甜菜苗期抗旱鉴定指标筛选及其综合评价. *干旱地区农业研究*, 29 (4): 69–74]
- Li W, Wan Q, Liu FZ, et al (2015). Allelic variation of transcription factor genes *NAC4* in *Arachis* species. *Acta Agron Sin*, 41 (1): 31–41 (in Chinese with English abstract) [李文, 万千, 刘凤珍等(2015). 花生转录因子基因*NAC4*的等位变异分析. *作物学报*, 41 (1): 31–41]
- Liu TM, Zhu SY, Tang QM, et al (2014). Identification of 32 full-length *NAC* transcription factors in ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaud) and characterization of the expression pattern of these genes. *Mol Genet Genomics*, 289 (4): 675–684
- Lu PL, Chen NZ, An R, et al (2006). A novel drought-inducible gene, *ATAFI*, encodes a *NAC* family protein that negatively regulates the expression of stress-responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 63 (2): 289–305
- Mao XG, Chen SS, Li A, et al (2014). Novel *NAC* transcription factor TaNAC67 confers enhanced multi-abiotic stress tolerances in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 9 (1): e84359
- Nakashima K, Tran LP, Nguyen DV, et al (2007). Functional analysis of a *NAC*-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *Plant J*, 51 (4): 617–630
- Nakashima K, Takasaki H, Mizoi J, et al (2012). *NAC* transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochim Biophys Acta*, 1819 (2): 97–103
- Nuruzzaman M, Manimekalai R, Sharoni AM, et al (2010). Genome-wide analysis of *nac* transcription factor family in rice. *Gene*, 465 (1): 30–44
- Ooka H, Tatoh K, Doi K, et al (2003). Comprehensive analysis of *NAC* family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res*, 10 (6): 239–247
- Redillas MC, Jeong JS, Kim YS, et al (2012). The overexpression of *OsNAC9* alters the root architecture of rice plants enhancing drought resistance and grain yield under field conditions. *Plant Biotechnol J*, 10 (7): 792–805
- Sablowski RWM, Meyerowitz EM (1998). A Homolog of *NO APICAL MERISTEM*, is an immediate target of the floral homeotic genes *APETALA3/PISTILLATA*. *Cell*, 92 (1): 93–103
- Shiriga K, Sharma R, Kumar K, et al (2014). Genome-wide identification and expression pattern of drought-responsive members of the *NAC* family in maize. *Meta Gene*, 2 (1): 407–417
- Shang HH, Li W, Zou CS, et al (2013). Analyses of the *NAC* transcription factor gene family in *Gossypium raimondii* ulbr: chromosomal location, structure, phylogeny, and expression patterns. *J Integr Plant Biol*, 55 (7): 663–676
- Souer E, Houwelingen AV, Kloos D, et al (1996). The *NO APICAL MERISTEM* gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell*, 85 (2): 159–170
- Sun LJ, Li DY, Zhang HJ, et al (2012). Functions of *NAC* transcription factors in biotic and abiotic stress responses in plants. *Hereditas*, 34 (8): 993–1002 (in Chinese with English abstract) [孙利军, 李大勇, 张慧娟等(2012). *NAC*转录因子在植物抗病和抗非生物胁迫反应中的作用. *遗传*, 34 (8): 993–1002]
- Takada S, Hibara K, Ishida T, et al (2001). The *CUP-SHAPED COTYLEDON1* gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development*, 128 (7): 1127–1135
- Tran LP, Nakashima K, Sakuma Y, et al (2004). 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. *Plant Cell*, 16 (9): 2481–2498
- Tran LP, Nishiyama R, Yamaguchi-Shinozaki K, et al (2010). Potential utilization of *nac* transcription factors to enhance abiotic stress tolerance in plants by biotechnological approach. *GM Crops*, 1 (1): 32–39
- Wang FT, Lin RM, Xu SC (2010). Cloning and characterization of three *NAC*-like transcription factor genes in wheat. *Genomics Appl Biol*, 29 (4): 639–645 (in Chinese with English abstract) [王凤涛, 蔺瑞明, 徐世昌(2010). 小麦3个*NAC*转录因子基因克隆与功能分析. *基因组学与应用生物学*, 29 (4): 639–645]
- Wang JY, Wang JP, Yuan H (2013). A *Populus euphratica* *NAC* protein regulating Na^+/K^+ homeostasis improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 521 (2): 265–273
- Wang RF, Hu YS, Gao WR, et al (2014). Functions of *NAC* transcription factors family in stress responses in plants. *Plant Physiol J*, 50 (10): 1494–1500 (in Chinese with English abstract) [王瑞芳, 胡银松, 高文蕊等(2014). 植物*NAC*转录因子家族在抗逆响应中的功能. *植物生理学报*, 50 (10): 1494–1500]

- Wang ZJ, Jin L, Xu ZD, et al (2014). Bioinformatics analysis of gene *LEC1* from *Jatropha curcas*. *J Biol*, 31 (4): 68–72 (in Chinese with English abstract) [王占军, 金伦, 徐忠东等(2014). 麻风树*LEC1*基因的生物信息学分析. *生物学杂志*, 31 (4): 68–72]
- Wu YR, Deng ZY, Lai JB, et al (2010). Dual function of *Arabidopsis ATAF1* in abiotic and biotic stress responses. *Cell Res*, 1279–1290
- Zhang MQ, Chen RK (2005). *Crop Drought Resistance Molecular Physiology And Genetic Improvement*. Beijing: Science Press, 22–23 (in Chinese) [张木清, 陈如凯 (2005). 作物抗旱分子生理与遗传改良. 北京: 科学出版社, 22–23]
- Zheng X, Chen B, Lu G, et al (2009). Overexpression of a *nac* transcription factor enhances rice drought and salt tolerance. *Biochem Biophys Res Commun*, 379 (4): 985–989

Identification of NAC transcription factors in sugar beet and their expression analyses under water stress

XU Xiao-Yang, LI Guo-Long, SUN Ya-Qing, ZHANG Shao-Ying*

Sugar Beet Physiological Research Institute, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China

Abstract: Plant-specific NAC transcription factors are one of the plant-specific and largest family of transcription factors and play an important role in response of plant to drought stress. In this study, the NAC conserved domain sequence was used as a search sequence to search for the homologous in sugar beet (*Beta vulgaris*) genome data by HMM and BLAST, and sugar beet NAC transcription factor family members were identified by using bioinformatics analysis tools such as ExPASy, MEGA 6.0, Mapinspect, GSDS 2.0, and MEME to analyze protein amino acid composition and physicochemical properties, phylogenetic relationship analysis, gene chromosomal localization, and protein domain sequence conservation prediction of beet NAC transcription factor family members. The expression of sugar beet NAC gene under water stress was analyzed by RNA-seq and qRT-PCR. The results showed that there were 52 members of sugar beet NAC family gene, 50 of which were unevenly distributed on 9 chromosomes, and 2 were not currently located. The encoded protein contained amino acid residues ranging from 48 to 711, of which 17 were basic proteins, four are hydrophilic proteins. The phylogenetic analysis divided 52 members into 2 categories, class I had 38 members, and class II had 14 members. NAC conserved domain analysis indicated that similar members had similar conserved elements, while the number of neutrons and introns had high variability. Under water stress, 23 genes were up-regulated in the NAC family members of sugar beet.

Key words: sugar beet (*Beta vulgaris*); *BvNAC*; drought stress; gene expression

Received 2019-01-09 Accepted 2019-03-30

This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-170201), and Inner Mongolia Natural Science Foundation (2017MS0306).

*Corresponding author (syzh36@aliyun.com).