

油茶两个响应干旱 NAC 转录因子的克隆、亚细胞定位及自激活检测

赵娜红¹, 曹瑞兰¹, 苏文娟¹, 谢荟清¹, 曾进², 刘娟^{1*}

(1. 江西农业大学 林学院, 南昌 330045; 2. 湖北科技学院 核技术与化学生物学院, 湖北咸宁 437100)

摘要: 干旱胁迫是影响油茶生长发育、产量和品质的一类主要的非生物胁迫。NAC 转录因子在植物响应干旱、盐碱等非生物胁迫反应中具有重要的调控作用。为探究 NAC 转录因子在油茶响应干旱胁迫中的调控机制, 以两年生油茶苗为材料, 通过 TA 克隆得到 *CoNAC5* 与 *CoNAC79* 的 CDS 序列, 对其进行生物信息学分析、亚细胞定位及自激活分析。采用 qRT-PCR 检测 *CoNAC5* 与 *CoNAC79* 基因表达的组织特异性及 PEG 模拟干旱和 ABA 处理下的表达模式。结果表明: (1) 基因结构分析显示, *CoNAC5* 与 *CoNAC79* 的 CDS 长分别为 1 044 bp 和 990 bp, 分别编码 348 和 330 个氨基酸, 理论等电点分别为 8.86 和 8.57, 蛋白的不稳定系数分别为 41.35 和 37.47, 均无跨膜结构域, 分别与柿子和荔枝的同源性最高。亚细胞定位显示 *CoNAC5* 与 *CoNAC79* 均定位在细胞核上。(2) 酵母自激活检测显示, *CoNAC5* 与 *CoNAC79* 全长蛋白和 N 端结构域无自激活活性, 但 C 端结构域均具有自激活活性。(3) *CoNAC5* 与 *CoNAC79* 表达具有明显的组织特异性, 主要在根和种仁中高表达; PEG 模拟干旱和外源施加 ABA 处理油茶苗发现, *CoNAC5* 和 *CoNAC79* 表达量均显著高于对照; *CoNAC79* 的表达量在 ABA 处理 48 h 后下降, 而在 PEG 处理下显著高于对照。综上认为 *CoNAC5* 与 *CoNAC79* 其 N 端可能存在抑制区域, 从而阻碍了全长序列的转录; 油茶两个 NAC 基因可能通过 ABA 合成途径间接参与干旱胁迫响应过程; 在胁迫持续发生时, *CoNAC79* 还可能通过其他途径直接参与干旱胁迫响应过程。该研究的结果为进一步探究 NAC 在油茶响应干旱胁迫过程中的作用提供了科学依据。

关键词: 克隆, 干旱胁迫, 亚细胞定位, 酵母自激活, ABA 途径

中图分类号: Q943

文献标识码: A

Cloning, subcellular localization, and self-activation detection of two NAC transcription factors in response to drought for *Camellia oleifera*

ZHAO Nahong¹, CAO Ruilan¹, SU Wenjuan¹, XIE Huiqing¹, ZENG Jin², LIU Juan^{1*}

(1. College of Forestry, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2. School of Nuclear Technology and Chemical Biology, Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, Hubei, China)

Abstract: Water deficiency was an important factor for the development, yield and quality of *Camellia oleifera*. NAC transcription factors are widely involved in drought and salt-stress induced signal transduction in plants. Explored the role of NAC transcription factors in the drought stress responded of *C. oleifera* uses two-year oil tea seedlings as materialls. The CDS sequences of *CoNAC5* and *CoNAC79* were obtained from through TA cloning. Bioinformatics,

基金项目: 江西省自然科学基金(20232BAB205054); 江西省林业局油茶研究专项(YCYJZX[2023]114 号); 湖北科技学院科研启动金(BK202328)。

第一作者: 赵娜红(1997-), 硕士, 研究方向为油茶抗旱分子机制, (E-mail)zhaonahong2021@163.com。

***通信作者:** 刘娟, 博士, 副教授, 研究方向为林木遗传改良、林木抗逆分子机制, (E-mail)

liu_juan1122@163.com。

subcellular localization and self-activation were performed. qRT-PCR was used to determine the tissue specificity of *CoNAC5* and *CoNAC79* gene expression and the expression PEG and ABA at different treatment times. The results were as follows: (1) Gene structure analysis showed that *CoNAC5* and *CoNAC79* were 1 044 bp and 990 bp in length, respectively, encoding 348 and 330 amino acids. Their theoretical Isoelectric points are 8.86 and 8.57, respectively. The instability coefficients of the proteins were 41.35 and 37.47, respectively. No transmembrane domain was found between the two genes, the highest homology with persimmon and lychee respectively. Subcellular localization showed that both *CoNAC5* and *CoNAC79* were located in the nucleus. (2) Yeast transcriptional activation activity analysis revealed that *CoNAC5* and *CoNAC79* did not have self-activation activity in the full-length proteins and N-terminal domain. However, the C-terminal domain exhibited self-activating activity. (3) The expression of *CoNAC5* and *CoNAC79* has significant tissue specificity and mainly expressed in roots and kernels; When PEG simulated drought and exogenous ABA treated *C. oleifera* seedlings, the expression levels of *CoNAC5* and *CoNAC79* were significantly higher than the control; Furthermore, the expression level of *CoNAC79* decreased after 48 h under ABA treatment, but significantly higher than the control under PEG treatment. In summary, it is believed that there may be an inhibitory region at the N-terminus of *CoNAC5* and *CoNAC79*, which hinders the transcription of the full-length sequence; indicating that the two NAC genes in *C. oleifera* may be probably involved in ABA-mediated drought stress response; *CoNAC79* can also participate in the drought stress response through ABA-independent signaling pathway. This study provided a scientific basis for further exploring the role of NAC in the response of *C. oleifera* to drought stress.

Key words: cloning, drought stress, subcellular localization, yeast self-activation, ABA pathway

油茶(*Camellia oleifera*), 隶属于山茶科(Theaceae)山茶属(*Camellia* L.), 是我国特有的木本食用油料树种。茶油单不饱和脂肪酸高达 80%, 具有很高的保健价值。油茶在我国已有 2 000 多年的栽培历史, 主要种植在我国长江流域及其以南的山地、丘陵地区(丁少净等, 2017)。干旱胁迫是影响植物生长发育的一类主要非生物胁迫。我国南方地区虽然降雨量充沛, 但是降雨量在不同季节分配极度不均匀, 5—6 月多雨, 8—10 月常出现季节性高温干旱天气(何方, 2011)。民间俗语“7 月干球, 8 月干油”, 指在每年农历 7 到 9 月是油茶果实膨大和种子油脂积累的关键时期, 而此时油茶主产区常出现持续干旱高温, 导致油茶产量及出油率大幅降低(吴少强等, 2022)。当受到干旱胁迫时, 植物会产生应答机制来减弱或消除水分缺失造成的伤害, 这一过程产生涉及多个基因、多种信号途径及代谢产物, 其转录调控起承上启下的作用(张幸媛等, 2021)。

NAC 转录因子是植物特异性转录因子, 其启动子区富含低温、缺水、损伤等逆境响应元件(Han et al., 2015)。大量研究已证实, NAC 转录因子参与植物对干旱、冷害、低氧等非生物胁迫响应(Bu et al., 2008)。例如, *OsNAC2/OsNAC6* 基因的过表达植株显著增强了水稻(*Oryza sativa*)对干旱、盐分以及稻瘟病的耐受力, 其中干旱胁迫下过表达 *OsNAC9* 植株的籽粒产量可提高 30%(Liu et al., 2016)。Hu 等(2018)发现水稻 *OsNAC1* 能显著提高花期的抗旱性, 过表达植株结实率提高 22%~34%, 且育性提高 17%~24%。Takasaki 等(2010)通过对水稻干旱胁迫诱导, 发现 *OsNAC5* 在过表达水稻中上调表达, 并通过上调胁迫诱导基因 *OsLEA3* 增强过表达植株的抗旱性。众多研究表明, 脱落酸 ABA 作为一种植物胁迫激素, 是植物应对干旱胁迫响应并及时优化水分利用效率的重要调控因子(Huang et al., 2016), 而 NAC 转录因子被认为是 ABA 信号途径中的重要转录激活调控因子(Wang et al., 2016)。例如, Chen 等(2014)发现过表达水稻 *OsNAC* 可通过 ABA 介导的气孔关闭以降低叶片失水率, 显著提高水稻抗旱性。Shang 等(2020)发现 *GhirNAC2* 通过调控 *GhNCED3a/3c* 的表达, 控制 ABA 的生

物合成和气孔关闭，从而在棉花(*Gossypium hirsutum*)抗旱性中发挥积极作用。

课题组前期基于二倍体油茶基因组数据，利用生物信息学手段分析鉴定了油茶 NAC 基因家族成员并对部分成员开展干旱胁迫下表达模式分析(曹瑞兰等，2021)。进一步对转录组数据分析发现 ATNAC3 亚组的 *CoNAC5*、*CoNAC79* 在干旱胁迫下表达量均上调，而系统发育分析发现同组的拟南芥 *AtNAC019*、*AtNAC055*、*AtNAC072* 基因，被证实参与逆境胁迫过程(Tran et al., 2004; Jiang et al., 2009)，因此推测 *CoNAC5*、*CoNAC79* 可能参与油茶干旱胁迫调控过程，但是其转录活性和调控机制尚不清楚。本研究采用 TA 克隆获得 *CoNAC5* 和 *CoNAC79* 的 CDS 序列，通过生物信息学、亚细胞定位、酵母自激活和荧光定量 PCR 分析，拟探讨以下问题：(1)两个油茶 NAC 基因的结构、进化关系及其亚细胞定位；(2)自激活活性及其具体的激活区域；(3)两个油茶 NAC 基因在不同组织和干旱胁迫下表达模式差异及其可能参与干旱响应的信号途径。本研究旨在为深入探究油茶响应干旱胁迫分子调控网络提供参考，为油茶抗逆分子育种计划提供候选基因。

1 材料与方法

1.1 试验材料、生长条件以及胁迫处理

选取长势一致的两年生“长林 18”油茶嫁接苗为试验材料，在江西农业大学林学院校内实践基地(28°46' N、115°55' E)温室大棚开展盆栽试验。采用水培法，将油茶根部浸润在 30%聚乙二醇(PEG6000)溶液中模拟干旱；ABA 处理则采用叶面喷施法，在油茶叶面喷洒浓度为 200 ng·mL⁻¹ 的 ABA 溶液。分别于 12、24、36、48 h 采集各处理和对照的嫩叶，每个处理设置 3 次重复。采集根、茎、叶、花、幼果、种仁各部位材料，置于液氮中速冻，-80 °C 保存备用。

1.2 *CoNAC5* 与 *CoNAC79* 基因的克隆

基于油茶全基因组数据(https://github.com/Hengfu-Yin/CON__genome__data)，获得 *CoNAC5*、*CoNAC79* 基因序列，利用 SnapGene 软件进行基因特异性引物设计(表 1)。总 RNA 采用 TaqPure®Universal Plant Total RNA Isolation Kit Vazyme Cat(RC411-01，诺唯赞)试剂盒提取，方法按照说明书。1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量，Eppendorf μCuvette® G1.0 核酸蛋白测定仪检测 RNA 浓度。使用 HiScriPT III All-in-one RT-SuperMix Perfect for qPCR(R333，诺唯赞)试剂盒反转录合成 cDNA，按说明书描述的方法操作。以获得的 cDNA 为模板，KL-*CoNAC5*-F/R 与 KL-*CoNAC79*-F/R 为引物(表 1)，利用 Ex Premier™ DNA Polymerase Dye plus(TaKaRa，大连)高保真酶，进行 PCR 扩增。反应程序：95 °C 10 min，95 °C 30 s，59~62 °C 30 s，72 °C 2 min，30 个循环；72 °C 5 min，4 °C 保温。将 PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测，目的条带回收纯化后将其连接至 pMD19-T 克隆载体，并转大肠杆菌 DH5α 中，PCR 检测出阳性克隆，委托生工生物工程(上海)股份有限公司测序并比对测序结果，保菌并使用 EasyPure Plasmid MiniPrep Kit(EM101-01，全式金)质粒小提试剂盒提取质粒。

表 1 试验所用引物

Table 1 Primers used in the experiment

引物名称	引物序列 (5'-3')	用途
Primer name	Primer sequence (5'-3')	Purpose
KL- <i>CoNAC5</i> -F	ATGGGAGTTACAGAAACCGACCCG	基因克隆
		Gene clone
KL- <i>CoNAC5</i> -R	GGATTTAGGCTTCGACAGTAA	基因克隆
		Gene clone
KL- <i>CoNAC79</i> -F	ATGGGAGTTTCCGATACGAAC	基因克隆
		Gene clone

KL- <i>CoNAC79</i> -R	CTGTTTGGGTTTCGGCAGTGA	基因克隆 Gene clone
CZ- <i>ECoNAC5</i> -F	cccttgctcaccatggtaccCTGTCTGAAGCCTAAATCCTCCTTGC TGG	亚细胞定位 Subcellular localization
CZ- <i>ECoNAC5</i> -R	tctctctcgagctttcgcgagctcgATGGGAGTTACAGAAACCGACC CGCTTTC	亚细胞定位 Subcellular localization
CZ- <i>ECoNAC79</i> -F	cccttgctcaccatggtaccCTGCCGAAACCCAAACAGTCCAGG	亚细胞定位 Subcellular localization
CZ- <i>ECoNAC79</i> -R	tctctctcgagctttcgcgagctcgATGGGAGTTTCCGATACGAACC CGC	亚细胞定位 Subcellular localization
CZ- <i>BDCoNAC5</i> -F	cctgatatggccatggaggccgaattcATGGGAGTTACAGAAACCG ACCCGC	酵母自激活 Yeast self activation
CZ- <i>BDCoNAC5</i> -R	tatcgggccgctgcaggtcgacggatccCTGTCTGAAGCCTAAATCCT CCTTGCTGGGTC	酵母自激活 Yeast self activation
CZ- <i>BDCoNAC79</i> -F	gcatatggccatggaggccgaattcATGGGAGTTTCCGATACGAAC CCGCTTACCCAG	酵母自激活 Yeast self activation
CZ- <i>BDCoNAC79</i> -R	gctgcaggtcgacggatccCTGCCGAAACCCAAACAGTCCAGG CTGAAA	酵母自激活 Yeast self activation
CZ- <i>CoNAC5</i> -1, 417-F	catggaggccgaattcATGGGAGTTACAGAAACCGACCC	结构域的酵母自激活分析 Structural domain yeast self activation analysis
CZ- <i>CoNAC5</i> -1, 417-R	gcaggtcgacggatccGAGTCTATATTCATGCATGATCCAATT GGTCT	结构域的酵母自激活分析 Structural domain yeast self activation analysis
CZ- <i>CoNAC5</i> -417, 1044-F	catggaggccgaattcTCCGAACCTCCCAAGAAAAATGGAAG	结构域的酵母自激活分析
CZ- <i>CoNAC5</i> -417, 1044-R	gcaggtcgacggatccCTGTCTGAAGCCTAAATCCTCCTTG	结构域的酵母自激活分析 Structural domain yeast self activation analysis
CZ- <i>CoNAC79</i> -1, 417-F	catggaggccgaattcATGGGAGTTTCCGATACGAACCC	结构域的酵母自激活分析 Structural domain yeast self activation analysis
CZ- <i>CoNAC79</i> -1, 417-R	catggaggccgaattcATGGGAGTTTCCGATACGAACCC	结构域的酵母自激活分析 Structural domain yeast self activation analysis
CZ- <i>CoNAC79</i> -417, 990-F	catggaggccgaattcTATGAGCAAACAGCCAAACATGGAAG	结构域的酵母自激活分析 Structural domain yeast self activation analysis
CZ- <i>CoNAC79</i> -417, 990-R	gcaggtcgacggatccTCACTGCCGAAACCCAAACAGT	结构域的酵母自激活分析 Structural domain yeast self activation analysis
DL- <i>CoNAC5</i> -F	TCAGAGCGGACACACAACCTC	qPCR
DL- <i>CoNAC5</i> -R	AAATCCTCCTTGCTGGGTCG	qPCR

DL- <i>CoNAC79</i> -F	AACTCGGGGTTGTTTCAGCA	qPCR
DL- <i>CoNAC79</i> -R	CACTGCCGAAACCCAAACAG	qPCR
<i>EF</i> -1 α -F	TCAGCATTGTCGTCATCGGA	内参基因 Reference gene
<i>EF</i> -1 α -R	ACGTTTCGATCACACGCTTGTC	内参基因 Reference gene

注: **F**. 正向引物; **R**. 反向引物。
 Note: **F**. Forward primer; **R**. Reverse primer.

1.3 *CoNAC5* 与 *CoNAC79* 生物信息分析

利用 ExPasy-ProtParam 对测序正确的 *CoNAC5* 与 *CoNAC79* 基因编码氨基酸序列的理化性质进行在线分析, 利用 DNAMAN 软件将油茶 *CoNAC5* 与陆地棉(*Gossypium hirsutum*, XP_016732489.2)、君迁子(*Diospyros lotus*, XP_052206324.1)、柿子(*Diospyros kaki*, AZL_19402.1)、胡桃(*Juglans regia*, XP_018851445.1)等序列, *CoNAC79* 与荔枝(*Litchi chinensis*, UKF_18671.1)、猕猴桃(*Actinidia chinensis*, QQG_64095.1)、柑橘(*Citrus reticulata*, AYC_35383.1)、马铃薯(*Solanum tuberosum*, ATD_50216.1)等序列进行比对, 并利用 TBtools 软件构建进化树和保守基序。

1.4 EGFP-*CoNAC5* 与 EGFP-*CoNAC79* 载体构建及亚细胞定位

使用 snapgene 软件设计同源重组引物 CZ-*ECoNAC5*-F/R 和 CZ-*ECoNAC79*-F/R(表 1), 以油茶 cDNA 为模板进行扩增, 利用 ClonExpress® Ultra One Step Cloning Kit(C115, 诺唯赞)同源重组酶, 构建 EGFP-*CoNAC5* 与 EGFP-*CoNAC79* 植物表达载体。提取含有增强绿色荧光蛋白 EGFP 的植物表达载体质粒, 在 37 °C 下 *kpn* I 酶切 1 h, 纯化后使用同源重组酶, 50 °C 下连接 15 min, 转化至大肠杆菌 DH5 α , 并涂布在含有卡纳抗性和氨苄抗性的 LB 培养基上。挑选单菌落进行 PCR 验证, 将阳性克隆委托生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 比对测序结果并保菌。对含有 EGFP-*CoNAC5* 与 EGFP-*CoNAC79* 载体的大肠杆菌提取质粒, 并转化到 GV3101 农杆菌中, 将农杆菌注射到健康生长的烟草叶片中, 培养 2 d, 用激光共聚焦显微镜(FV3000, Olympus)观察 EGFP 在烟草细胞中的分布情况。

1.5 pGBKT7-*CoNAC5* 与 pGBKT7-*CoNAC79* 载体构建

使用 CZ-BDCoNAC5-F/R 和 CZ-BDCoNAC79-F/R 引物(表 1), 以油茶 cDNA 为模板, 构建 pGBKT7-*CoNAC5* 与 pGBKT7-*CoNAC79* 载体。提取 pGBKT7 载体质粒, 在 37 °C 下使用 *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切 1 h, 纯化后使用同源重组酶在 50 °C 下连接 15 min, 转化大肠杆菌 DH5 α 中, 并涂布在含有卡纳霉素的新鲜 LB 固体培养基上, 对单菌落进行 PCR 检验并送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 比对测序结果并保菌。

1.6 酵母的转化及酵母自激活活性分析

使用质粒提取试剂盒, 从测序正确的大肠杆菌中提取 pGBKT7-*CoNAC5* 与 pGBKT7-*CoNAC79* 质粒, 并转化到 Y2HGold 酵母菌株中, 涂布在 SD/-Leu-Trp 固体培养基上, 并放置于 28 °C 培养箱 2~3 d, 以 pGADT7 为阴性对照, pGADT7-T, pGBKT-P53 为阳性对照, PCR 检测阳性单菌落后保存 pGBKT7-*CoNAC5* 与 pGBKT7-*CoNAC79* 酵母菌株。

挑取成功转化的 pGBKT7-*CoNAC5* 与 pGBKT7-*CoNAC79* 酵母单克隆菌株, 稀释重悬, 将菌液浓度 OD600 调整到 0.02、0.002 和 0.000 2, 吸取 5 μ L 浓度梯度点涂于 SD/-Leu-Trp 和 SD/-Leu-Trp-His-Ade 酵母培养基上, 在 28 °C 培养箱中培养 2~3 d, 观察诱饵菌株的生长状况。

1.7 *CoNAC5* 与 *CoNAC79* 结构域的酵母自激活分析

CoNAC5 与 *CoNAC79* 是典型的 ATNAC3-NAC 转录因子, 在 N 端均含有一段保守结构域且在 C 端具有转录激活活性。本研究以位于 *CoNAC5* 与 *CoNAC79* N 端 1~417 构建 pGBKT7-N 载体, 以 417~1 044 bp、417~990 bp 构建 C 端 pGBKT7-C 载体, 并分别转到 Y2H 酵母菌中进行筛选和检测。挑取转化成功的 pGBKT7-*CoNAC5*-N 与 pGBKT7-*CoNAC5*-C 以及 pGBKT7-*CoNAC79*-N 与 pGBKT7-*CoNAC79*-C 酵母单菌落, 稀释重悬, 调整菌液浓度并点涂观察。

1.8 qRT-PCR 引物设计及其验证

通过 snapgene 软件设计 qPCR 引物 DL-*CoNAC5*F/R 与 DL-*CoNAC79*F/R, 内参为 *EF1 α 1*(表 1)。采用 25 μ L 反应体系: ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(Q711-02, 诺唯赞) 12.5 μ L, cDNA 模板 2.5 μ L, 10 μ mol·L⁻¹ 上下游引物各 1.5 μ L, ddH₂O 9 μ L。荧光定量仪反应程序: 95 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 5 s; 65 $^{\circ}$ C 5 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s。每个样品进行 3 次生物学重复。反应完成后, 用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 对 *CoNAC5* 与 *CoNAC79* 基因的表达量进行计算。

1.9 数据处理

使用 SPSS 22.0 软件的 Duncan 法进行显著性分析, Origin 2021 软件作图。

2 结果与分析

2.1 *CoNAC5*、*CoNAC79* 基因的克隆

提取油茶叶片总 RNA, 纯化后获得 mRNA, 反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板扩增 *CoNAC5*、*CoNAC79* 序列, 得到约 1 000bp 的扩增产物(图 1), 切胶回收。将纯化后的片段连接至 pMD19-T 载体上, 挑取阳性克隆摇菌, 将菌液送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序结果比对得出 *CoNAC5*、*CoNAC79* 序列长度为 1 044 bp 和 990 bp, 片段长度与 PCR 扩增反应结果(图 1)相符。

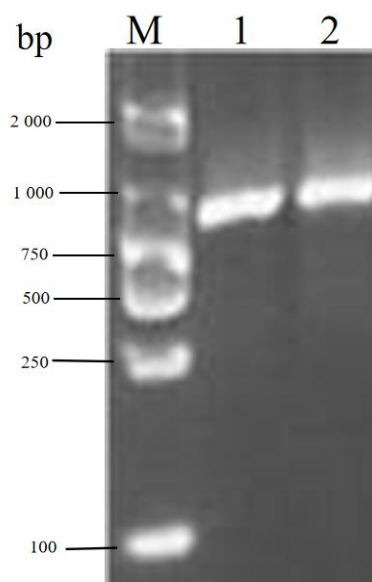


图 1 油茶 *CoNAC5*、*CoNAC79* 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of *CoNAC5* and *CoNAC79* genes in *Camellia oleifera*

2.2 *CoNAC5* 与 *CoNAC79* 基因的生物信息学分析

通过在线分析网站 Expasy-ProtParam 分析 *CoNAC5* 和 *CoNAC79* 蛋白的理化性质, *CoNAC5* 编码氨基酸数量 348, 相对分子量为 39 114.92 Da, 理论等电点为 8.86, 呈碱性; 带正负电残基的数量分别为 35 和 40, 分子式 C₁₇₄₃H₂₆₇₃N₄₈₃O₅₂₅S₁₀, 蛋白的不稳定系数 41.35,

为不稳定蛋白；脂溶性指数为 65.29，平均亲水系数为-0.617，为亲水性蛋白。CoNAC79 编码氨基酸数量 330，相对分子量 37 198.71 Da，理论等电点 8.57，呈碱性；带正负电残基的数量分别为 34 和 37，分子式 $C_{1670}H_{2535}N_{453}O_{499}S_8$ ，蛋白的不稳定系数 37.47，为稳定性蛋白；脂溶性指数 62.72，平均亲水系数-0.605，为亲水性蛋白。

2.2.1 CoNAC5 与 CoNAC79 系统发育进化树、保守基序分析 将 CoNAC5、CoNAC79 氨基酸序列与多个同源氨基酸构建进化树，发现其分别与柿子和荔枝聚在同一分支，同源性比较高。CoNAC5 和 CoNAC79 都具有保守基序，通过 Snapgene 软件构建进化树和保守基序(图 2)。

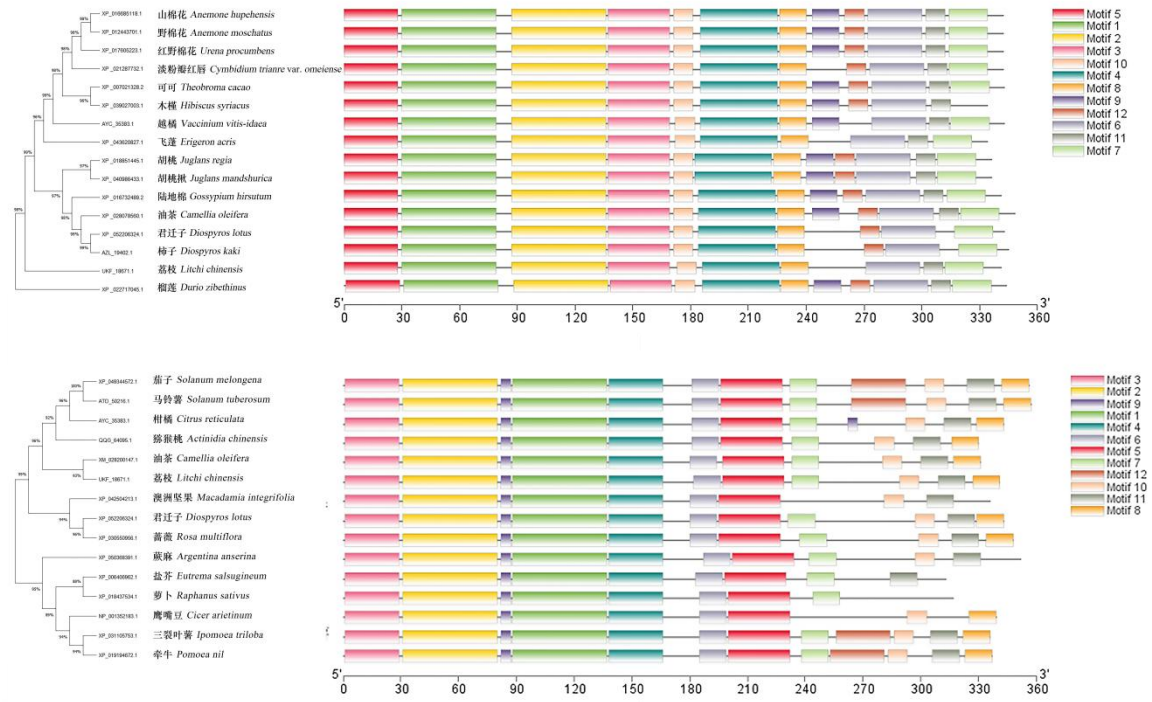


图 2 CoNAC5 与 CoNAC79 系统发育进化树和保守基序分析

Fig. 2 Phylogenetic evolution tree and conservative sequence analysis of CoNAC5 and CoNAC79

2.2.2 CoNAC5、CoNAC79 同源序列比对 通过 MEGA7.0 软件，选用邻接法，对 CoNAC5 与 CoNAC79 的同源氨基酸序列进行多序列比对，运用 BLASTp 程序搜索油茶 CoNAC5、CoNAC79 氨基酸序列的同源序列，发现与 CoNAC5 相似度最高的分别为柿子(*Diospyros kaki*, AZL_19402.1)其次为君迁子(*Diospyros lotus*, XP_052206324.1)和陆地棉(*Gossypium hirsutum*, XP_016732489.2)，相似度分别达到 82.48%、79.53%和 78.75%；与 CoNAC79 相似度最高的为荔枝(*Litchi chinensis*, UKF_18671.1.1)其次为猕猴桃(*Actinidia chinensis*, QQG_64095.1)和柑橘(*Citrus reticulata*, AYC_35383.1)相似度分别达到 84.22%、80.46%和 80.29% (图 3)。

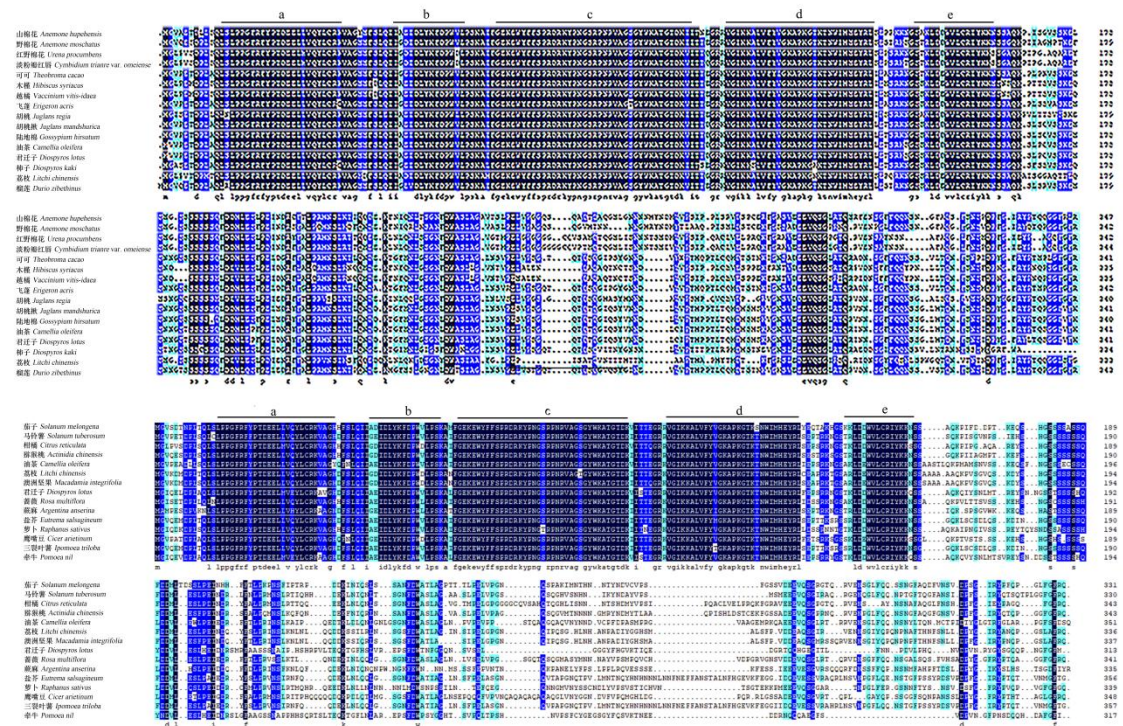


图 3 CoNAC5 与 CoNAC79 同源序列比对

Fig. 3 Homologous sequence alignment between CoNAC5 and CoNAC79

2.3 CoNAC5、CoNAC79 基因的亚细胞定位

构建 EGFP-CoNAC5 和 EGFP-CoNAC79 表达载体，以 35S: CoNAC5-EGFP 和 35S: CoNAC79-EGFP 为核定位标记，并将其注射到烟草原生质体中。结果在烟草原生质体的细胞核中检测到绿色荧光，其在相同位置与核定位标记共表达，证明 CoNAC5 与 CoNAC79 蛋白均定位在细胞核中(图 4)。

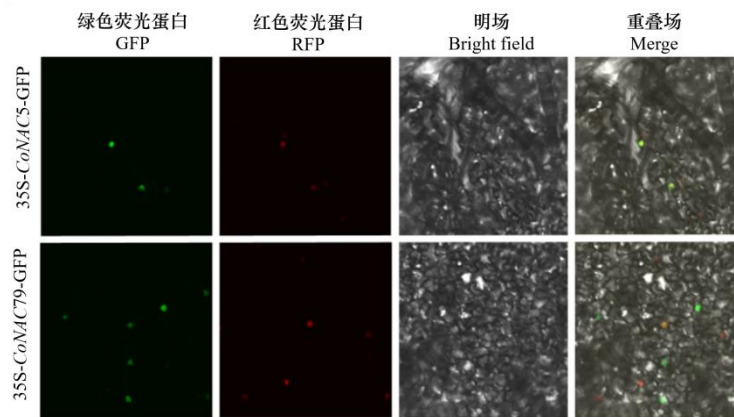


图 4 CoNAC5 与 CoNAC79 亚细胞定位

Fig. 4 Subcellular localization of CoNAC5 and CoNAC79

2.4 CoNAC5、CoNAC79 基因的自激活活性测定

NAC 转录因子含有保守的 N 端 DNA 结合结构域和 C 端激活结构域。将 CoNAC5、CoNAC79 的 CDS 序列分别克隆到 PGBKT-7 载体中，并转化到 Y2H 酵母菌中，阳性对照：pGADT7-T，pGBKT7-P53，AD 与 BD 空载转入酵母菌作为阴性对照，所有这些酵母菌在 SD/-Leu-Trp 培养基上生长良好，但只有阳性对照在 SD/-Leu-Trp-His-Ade 生长良好(图 5)。

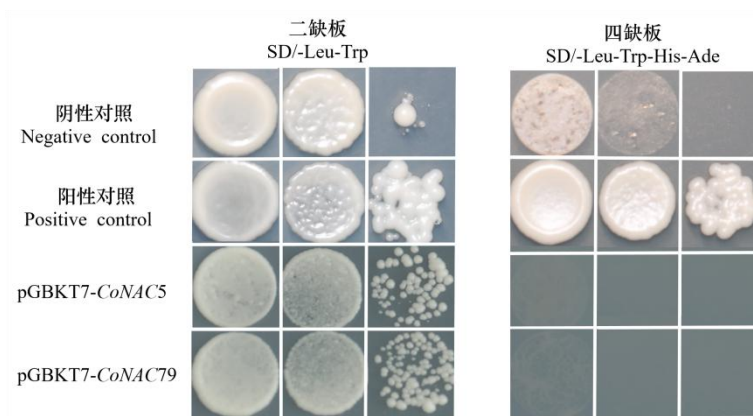


图 5 *CoNAC5* 与 *CoNAC79* 自激活活性测定

Fig. 5 Determination of *CoNAC5* and *CoNAC79* self-activation activity

2.5 *CoNAC5* 与 *CoNAC79* 结构域自激活分析

含有 pGBKT7-*CoNAC5*-N 与 pGBKT7-*CoNAC5*-C 以及 pGBKT7-*CoNAC79*-N 与 pGBKT7-*CoNAC79*-C 载体质粒的酵母菌在 SD/-Leu-Trp 均能正常生长，但含有 pGBKT7-*CoNAC5*-N 与 pGBKT7-*CoNAC79*-N 载体质粒的酵母菌在 SD/-Leu-Trp-His-Ade 无法正常生长，说明 *CoNAC5* 与 *CoNAC79* 的 N 端不存在转录激活活性；含有 pGBKT7-*CoNAC5*-C 与 pGBKT7-*CoNAC79*-C 载体质粒的酵母菌在 SD/-Leu-Trp-His-Ade 可以正常生长，说明 *CoNAC5* 与 *CoNAC79* 的 C 端存在转录激活活性(图 6)。

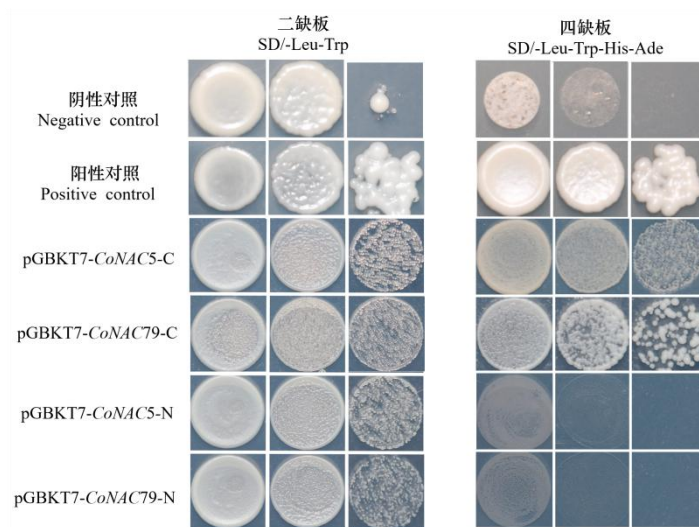


图 6 *CoNAC5* 与 *CoNAC79* 结构域自激活分析

Fig. 6 Analysis of *CoNAC5* and *CoNAC79* domain self-activation

2.6 *CoNAC5* 与 *CoNAC79* 的表达模式分析

不同组织表达特异性分析发现(图 7)，*CoNAC5* 与 *CoNAC79* 在油茶根、茎、叶、花、幼果和种仁 6 个组织中都有表达，其中均在根和种仁中表达较高，在花中表达最低。*CoNAC5* 在根中的表达量是花的 111 倍，是茎的 90 倍，是叶的 28 倍，是幼果的 14 倍，是种仁的 1.2 倍。*CoNAC79* 在种仁中的表达量是花的 580 倍，是茎的 480 倍，是叶的 81 倍，是幼果的 70 倍，是根的 5 倍。

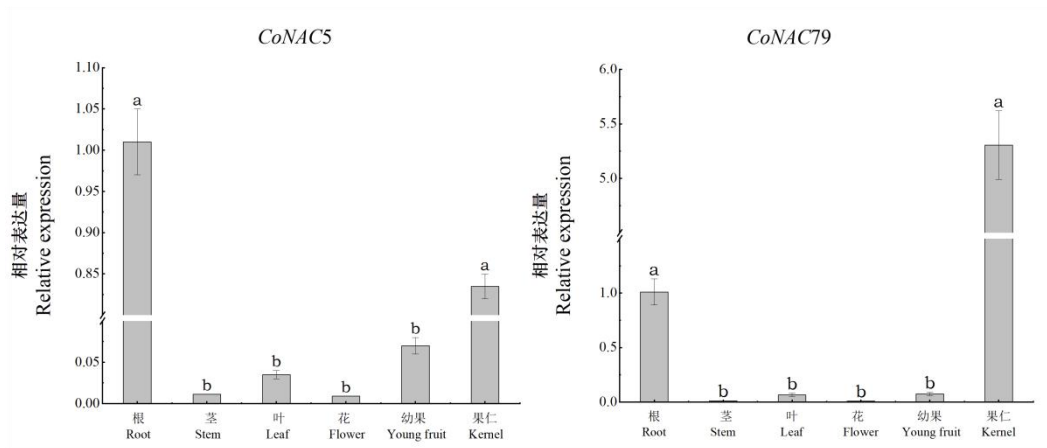


图 7 *CoNAC5* 与 *CoNAC79* 在油茶各组织的特异性表达

Fig. 7 Tissue-specific expression of *CoNAC5* and *CoNAC79* in *Camellia oleifera*

在 PEG 模拟干旱胁迫中, 不同时间段下 *CoNAC5* 和 *CoNAC79* 的表达与对照相比, 均存在显著差异(图 8)。PEG 处理 36 h, *CoNAC5* 的表达量是对照的 76 倍, 48 h 时依然呈现高表达, 为对照的 12 倍。PEG 处理 36 h, *CoNAC79* 的表达量是对照的 180 倍, 48 h 时为对照的 6.8 倍(图 8)。在 ABA 处理下, *CoNAC5* 与 *CoNAC79* 的表达在 24 h 出现显著上调, 分别为对照的 1.4 倍和 1.7 倍。ABA 处理 36 h 后, 两者的表达量均呈现高表达, 分别为对照的 11 倍和 12 倍。48 h 后, *CoNAC5* 的表达量增长幅度有所下降, 为对照的 3.3 倍, 而 *CoNAC79* 的表达量出现下调趋势, 为对照的 0.85 倍, 但两者没有显著差异。

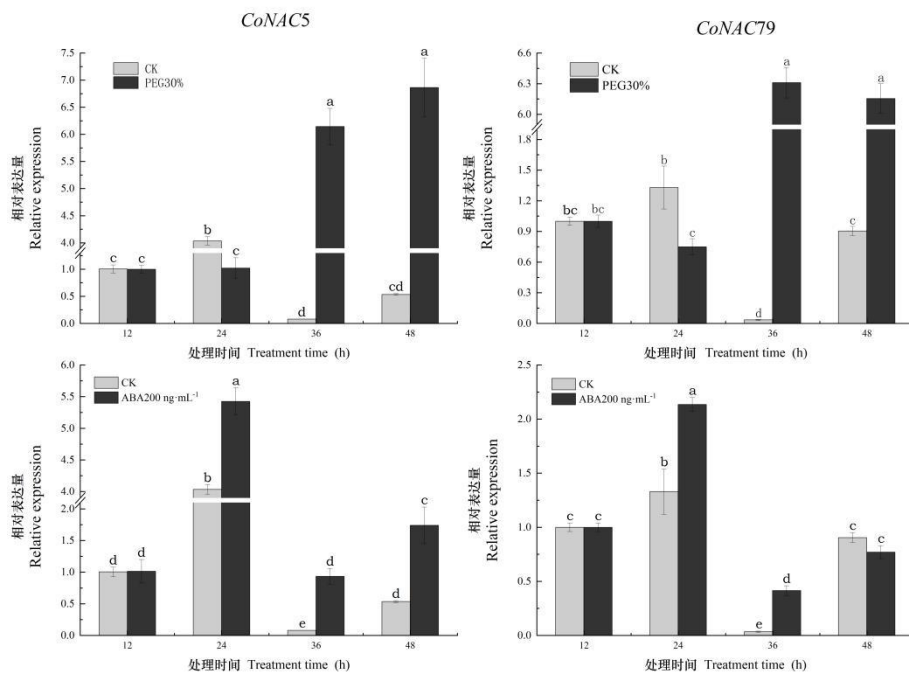


图 8 PEG 与 ABA 处理下 *CoNAC5* 与 *CoNAC79* 在油茶中的表达

Fig. 8 Expression of *CoNAC5* and *CoNAC79* under PEG and ABA treatment for *Camellia oleifera*

3 讨论

NAC 转录因子是植物中特有的转录因子, 也是植物中数量最大的转录因子家族之一 (Chen et al., 2022)。NAC 转录因子不仅参与调控植物生长发育的过程, 而且在响应逆境胁迫中扮演着重要角色 (Sun et al., 2020)。本研究克隆油茶 NAC 转录因子 *CoNAC5* 与 *CoNAC79*,

属于 ATNAC3 亚组, 分别与柿子和荔枝的同源性最高, 且 N 端均具有 NAC 转录因子特有的 NAM 结构域。亚细胞定位结果表明 CoNAC5 与 CoNAC79 蛋白均定位在细胞核上, 属于核蛋白, 表明 CoNAC5 与 CoNAC79 作为转录因子可能调控细胞核中靶基因的转录过程, 符合转录因子的特征。

研究发现 NAC 蛋白常通过与其他蛋白互作的形式来参与非生物胁迫(Hao et al., 2011)。确定不同蛋白间相互作用常采用酵母双杂技术, 其中为降低酵母双杂筛选时假阳性概率, 首先要确定诱饵蛋白本身是否具有转录激活功能。若诱饵蛋白具有转录活性, 就能单独激活下游启动子调节的报告基因, 从而造成假阳性。本研究发现 CoNAC5 与 CoNAC79 两个蛋白没有转录激活能力, 进一步比较 C 端和 N 端结构域, 发现其两个蛋白的 C 端都含有转录激活区域, 而 N 端没有激活活性。这可能是由于 CoNAC5 与 CoNAC79 蛋白的 N 端存在转录激活的抑制区域, 从而干扰了 C 端激活域及其全长蛋白的转录效应。Hao 等(2010)研究大豆的 3 个 NAC 基因的转录激活能力, 发现在 N 端存在 NARD 抑制结构域, 封闭了其 C 端激活域的作用。且众多研究也进一步证实, 转录因子 NAC 蛋白转录激活能力可能取决于 N 端的抑制区域与 C 端激活结构域相互作用(Narberhaus et al., 1995; Huang et al., 2011)。此外, 在 G-box、MYB、HRT 和 ERF 等转录因子中也发现了对全长序列自激活活性具有抑制作用的抑制结构域(Liu et al., 1997; Raventos et al., 1998; Jin et al., 2000; Ohta et al., 2001)。这些转录抑制区可能通过与启动子结合而阻止其他转录因子与该启动子结合, 或与其他转录因子相互作用, 从而抑制其他因子的作用。如 Hao 等(2010)的研究进一步证实大豆的 NAC 基因 N 端抑制结构域可以阻碍 WRKY、Dof 等其他转录因子的转录。因此, 油茶 CoNAC5 与 CoNAC79 蛋白可能通过其 N 端抑制区域与其他转录因子相互作用或顺式作用元件结合, 从而影响下游功能基因的转录和表达。此外, 油茶 CoNAC5 与 CoNAC79 全长序列不存在转录自激活活性, 未来可以利用酵母双杂文库构建和筛选可能的互作蛋白, 深入探究油茶两个 NAC 基因的功能。

植物受到逆境胁迫时, 常通过调控细胞内激素含量, 诱导一系列抗逆相关的基因表达来提高抗性(Mao et al., 2016)。ABA 作为触发植物对逆境胁迫应答反应的传递体, 在调节植物抗逆性方面发挥着重要作用(Aslam et al., 2021)。研究发现 NAC 转录因子可能通过与 ABA 响应元件结合来参与干旱胁迫响应(Fujita et al., 2004; Wang et al., 2021)。Jensen 等(2010)研究发现 *AtNAC019*(AtNAC3 亚组)是 ABA 应答的正调控因子, 过表达 *AtNAC019* 显著提高了转基因植株对外源 ABA 敏感性。Yu 等(2021)发现在过表达云杉 *PwNAC11*(与 *AtNAC019* 近缘)的转基因拟南芥对外源 ABA 具有高敏感性, 进一步发现该基因能通过与 ABA 响应元件(ABREs)结合来激活下游 *ERD1* 基因表达, 从而提高植株对干旱胁迫的耐受性。在本研究中, CoNAC5 与 CoNAC79 基因在系统发育进化树中属于 AtNAC3 亚组, 与 *AtNAC019* 为同源基因。PEG 模拟干旱胁迫处理在 36 h 和外源施加 ABA 处理油茶 24 h 后, 均显著诱导了 CoNAC5 与 CoNAC79 基因的高表达且两个 NAC 基因在外源施加 ABA 处理下更早启动高表达, 说明这两个 NAC 基因可能通过参与 ABA 信号途径参与干旱胁迫过程。此外, 随着处理时间的增加, 不同处理下两个 NAC 基因表达模式存在差异。CoNAC5 的表达量在 PEG 和 ABA 处理下在 36 和 48 h 均显著高于对照, CoNAC79 的表达量在 PEG 处理 36 和 48 h 以及 ABA 处理 36 h, 均显著高于对照, 但是在 ABA 处理 48 h 后与对照无显著差异。这可能是由于在胁迫的不同阶段, NAC 基因也可能通过非 ABA 合成依赖的方式直接参与干旱胁迫响应过程。在云杉的 NAC 研究中, *PwNAC11* 也可以通过直接与 ABA 非依赖的 *DREB2A* 基因相互作用, 从而激活下游 *ERD1* 基因表达, 直接参与干旱胁迫响应(Yu et al. 2021)。由此推测, 两个油茶 NAC 参与干旱胁迫的调控途径可能存在差异。CoNAC5 可能主要通过参与 ABA 合成的方式间接响应干旱胁迫, 而 CoNAC79 可能存在参与 ABA 合成间接或非依赖 ABA 合成直接参与干旱胁迫响应过程, 但是具体调控机制尚不清楚。

4 结论

本研究从油茶 cDNA 中成功克隆了 *CoNAC5* 与 *CoNAC79* 基因,亚细胞定位试验证实两个蛋白均定位于细胞核上,为典型的核蛋白。酵母杂交试验发现两个蛋白的 N 端不具有转录自激活活性,而 C 端均具有转录自激活活性,这可能是由于 N 端存在阻碍全长序列下两个 NAC 基因转录激活的抑制区段。荧光定量 PCR 结果证实, *CoNAC5* 与 *CoNAC79* 在干旱胁迫下和 ABA 处理下高表达,但是随着处理时间的持续,不同处理下的基因表达趋势存在差异,推测 *CoNAC5* 可能通过参与 ABA 合成途径间接参与干旱胁迫响应,而 *CoNAC79* 可以通过 ABA 合成的方式间接或非 ABA 依赖途径的方式直接调控干旱响应过程,但是具体调控机制尚不清楚,后续可从酵母双杂文库筛选互作蛋白、过表达或基因敲除等方式进一步研究其功能。

参考文献:

- ASLAM, WASEEM M, ZHANG Q, et al., 2021. Identification of ABC transporter G subfamily in white lupin and functional characterization of L.albABGC29 in phosphorus use[J]. *Bmc Genomics*, 22(1):1-14.
- BU QY, JIANG HL, LI CB, et al., 2008. Role of the *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factors ANAC019 and ANAC055 in regulating jasmonic acid-signaled defense responses[J]. *Cell Res*, 18(7):756-767.
- CHEN X, WANG YF, BO L, et al., 2014. The NAC family transcription factor OsNAP confers abiotic stress response through the ABA pathway[J]. *Plant Cell Physiol*, 55(3):604-619.
- CHEN ZY, YAN XQ, TANG MH, et al., 2022. Molecular characterization and drought resistance of GmNAC3 transcription factor in *Glycine max* (L.) Merr[J]. *Int J Mol Sci*, 23(20): 12378.
- CAO RL, LI ZQ, OUYANG WT, et al., 2021. Identification of *NAC* gene in *Camellia oleifera* and analysis of its response to drought stress[J]. *J Jiangxi Agric Univ*, 43(6): 1357-1370.[曹瑞兰, 李知青, 欧阳雯婷, 等, 2021. 油茶 *NAC* 基因鉴定及对干旱胁迫响应分析[J]. 江西农业大学学报, 43(6): 1357-1370.]
- DING SJ, ZHONG QP, YUAN TT, et al., 2017. Effects of drought stress on *Camellia oleifera* flower-bud growth and production[J]. *J Nanjing For Univ (Nat Sci Ed)*, 41(5): 197-202.[丁少净, 钟秋平, 袁婷婷, 等, 2017. 干旱胁迫对油茶花苞生长及产量的影响[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 41(5): 197-202.]
- FUJITA M, FUJITA 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.
- HAN XM, FENG ZQ, XING DN, et al., 2015. Two NAC transcription factors from *Caragana intermedia* altered salt tolerance of the transgenic *Arabidopsis*[J]. *BMC Plant Biol*, 15(1): 1-12.
- 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(2): 302-313.
- HAO YJ, SONG QX, CHEN HW, et al., 2010. Plant NAC-type transcription factor proteins contain a NARD domain for repression of transcriptional activation[J]. *Planta*, 232: 1033-1043.
- HE F, 2011. Study of overall arrangement for construction China's industrial system of non-wood forest I: woody edible oils[J]. *J Cent S Univ For Technol*, 31(3): 1-7.[何方, 2011. 中国现代经济林产业体系建设布局研究I——木本食用油料篇[J]. 中南林业科技大学学报, 31(3): 1-7.]
- HUANG L, ZHANG HJ, LI DY, et al., 2016. Rice NAC transcription factor ONAC095 plays opposite roles in drought and cold stress tolerance[J]. *BMC Plant Biol*, 16: 1-18.
- HU HH, DAI MQ, YAO JL, et al., 2018. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC)

- transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(35): 1987-12992.
- HUANG C, ORBAN T, JASTRZEBSKA B, et al., 2011. Activation of G protein-coupled receptor kinase 1 involves interactions between its N-terminal region and its kinase domain[J]. *Biochemistry-USA*, 50(11): 1940-1949.
- JENSEN M, KJAERGAARD T, NIESEN M, et al., 2010. The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: structure-function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling[J]. *Biochem J*, 426(2): 183-196.
- JIANG HL, LI HM, BU QY, et al., 2009. The RHA2a-interacting proteins ANAC019 and ANAC055 may play a dual role in regulating ABA response and jasmonate response[J]. *Plant Signal Behav*, 4(5): 464-466.
- JIN H, COMINELLI E, BAILEY P, et al., 2000. Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*[J]. *EMBO J*, 19(22): 6150-6161.
- LIU YC, SUN J, WU YR, et al., 2016. *Arabidopsis ATAF1* enhances the tolerance to salt stress and ABA in transgenic rice[J]. *J Plant Res*, 129: 955-962.
- LIU ZB, HABEN G, GUILFOYLE TJ, et al., 1997. A G-box-binding protein from soybean binds to the E1 auxin-response element in the soybean GH3 promoter and contains a proline-rich repression domain[J]. *Plant Physiol* 115(2): 397-407.
- MAO HD, LI JY, HAN R, et al., 2016. ZmNAC55, a maize stress-responsive NAC transcription factor, confers drought resistance in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol Biochem*, 105: 55-66.
- NARBERHAUS F, LEE HS, SCHMITZ RA, et al., 1995. The C-terminal domain of NifL is sufficient to inhibit NifA activity[J]. *J Bacteriol*, 177(17): 5078-5087.
- OHTA M, MATSUIA K, HIRATSUA K, et al., 2001. Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression[J]. *Plant Cell*, 13(8): 1959-1968.
- RAVENTOS D, SKRIVER K, SCHLEIN M, et al., 1998. HRT, a novel zinc finger, transcriptional repressor from barley[J]. *J Biol Chem* 273(36): 23313-23320.
- SHANG XG, YU YJ, LIU HQ, et al., 2020. A cotton NAC transcription factor GhirNAC2 plays positive roles in drought tolerance via regulating ABA biosynthesis[J]. *Plant Sci*, 296: 110498.
- SUN L, LIU LP, WANG YZ, et al., 2020. NAC103, a NAC family transcription factor, regulates ABA response during seed germination and seedling growth in *Arabidopsis*[J]. *Planta*, 252: 1-11.
- TAKASAKI H, MARUYAMA K, SATOSHI K, et al., 2010. The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice[J]. *Mol Genet Genomics: MGG*, 284: 173-183.
- TRAN LAM-SON P, NAKAHIMA 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[J]. *Plant Cell*, 16(9): 2481-2498.
- WANG JF, WANG YP, ZHANG J, et al., 2021. The NAC transcription factor CINAC68 positively regulates sugar content and seed development in watermelon by repressing ClINV and ClGH3.6[J]. *Hortic Res-England*, 8(1): 214-214.
- WANG YX, LIU ZW, WU ZJ, et al., 2016. Transcriptome-wide identification and expression analysis of the NAC gene family in tea plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze][J]. *PLoS ONE*,

11(11): e0166727.

WU SQ, TANG CJ, ZHENG TH, et al., 2022. Spatio-temporal characteristics of drought in Jiangxi based on index of continuous days without available precipitation[J]. Resour Environ Yangtze Basin, 31(4): 903-914.[吴少强, 汤崇军, 郑太辉, 等, 2022. 基于连续无有效降雨日数指标的江西省干旱时空分布特征[J]. 长江流域资源与环境, 31(4): 903-914.]

YU MX, LIU JI, DU BS, et al., 2021. NAC transcription factor PwNAC11 activates *ERD1* by interaction with ABF3 and DREB2A to enhance drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. Int J Mol Sci, 22(13): 6952.

ZHANG XY, TIAN YH, QIN YZ, et al., 2021. The role of miR169 family members in the processes of growth, development and abiotic stress response in plants[J]. J Plant Genet Resour, 22(4): 900-909.[张幸媛, 田宇豪, 秦玉芝, 等, 2021. miR169 在植物生长发育与非生物胁迫响应中的作用[J]. 植物遗传资源学报, 22(4): 900-909.]