

雷 雨,张雪芳,罗鑫磊,等. 不同成熟期桃品种 *NAC* 基因遗传多样性研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(22):46-49.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.22.011

不同成熟期桃品种 *NAC* 基因遗传多样性研究

雷 雨,张雪芳,罗鑫磊,刘咲頔,熊 怡,冯 涛
(天津农学院园艺园林学院,天津 300384)

摘要:从 11 个桃品种嫩叶中分别提取基因组 DNA,根据 GDR 数据库中 *NAC* 基因序列信息,设计特异引物,PCR 扩增,对产物克隆测序。然后,使用 DNAMAN 软件进行核苷酸和氨基酸序列比对,使用 ORF Finder 获得开放阅读框和推导氨基酸序列,使用 CDD 工具进行蛋白质结构域分析,利用 Blastp 工具搜索同源蛋白,采用 Mega 软件绘制系统进化树。结果发现,*NAC* 蛋白第 16~140 位存在 1 个 *NAC* 结构域,N 端比较保守,C 端则多样性比较高;核苷酸变异有 SNP 和 Indel 2 类,津柳早红和小白桃在第 3 外显子区 SNP 和 Indel 变异数量非常多,说明这 2 个品种的 *NAC* 基因结构具有独特性。蛋白比对发现,桃 *NAC* 与梅同源性最高,其次是鸭梨;进化树体现了物种的亲缘关系。结果表明,参试品种 *NAC* 基因存在比较丰富的遗传多样性,在保守区内的氨基酸变异可能影响蛋白的功能。

关键词:桃;*NAC* 转录因子;成熟期;保守区;系统进化树

中图分类号: S662.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)22-0046-04

NAC 转录因子是一类植物特有的转录调控因子,1996 年 Souer 等首先从矮牵牛中克隆得到^[1],随后在拟南芥、水稻、小麦、大豆等中相继发现。研究表明,*NAC* 转录因子在植物的生长发育、形态建成、激素调节以及对生物和非生物逆境的抗性等方面发挥作用^[2]。*NAC* 转录因子最主要的结构特点是 N 端含有高度保守的 *NAC* 结构域,由约 150 个氨基酸残基组成;C 末端通常有简单的重复氨基酸序列,富含丝氨酸,苏氨酸、脯氨酸和谷氨酸,或者酸性氨基酸残基,具有转录激活功能。

有研究者指出 *NAC* 转录因子调控植物生殖器官成熟和衰老。2006 年,Uauy 等从小麦中分离了 NAM-B1,功能分析显示,它在野生小麦中加速植株衰老,促进叶片中营养物质向籽粒流动^[3]。2011 年,Balazadeh 等从拟南芥中分离了 ORS1,超表达 ORS1 转化拟南芥,加速了转化体衰老^[4]。2013 年,Zhou 等从水稻中鉴定出 OsNAP,发现它调控叶片衰老^[5]。2014 年,Kim 等在拟南芥上发现 *NAC* 有调控衰老的功能^[6]。2013 年,Pirone 等利用桃 Contender × Ambra 和 NJWeeping × Bounty F₂ 代分离群体、SNP 检测、遗传图谱构建、QTL 定位、对候选基因的 Sanger 测序等技术,结合检测等位基因在子代中的分离比例等,认为 *NAC* 基因在控制桃果实成熟期中发挥重要作用^[7]。笔者前期克隆了小白桃和它的

早熟芽变品种津柳早红的 *NAC* 基因,发现二者核酸序列有多处差异,尤其是后者中核苷酸变异形成终止密码子,导致翻译提前终止(未发表资料)。那么,在其他不同成熟期的桃品种中,*NAC* 基因结构是否存在多样性?为了解答这个问题,笔者从 11 个桃品种中克隆了 *NAC* 基因,希望通过分析其结构,能找到一些 *NAC* 发挥功能的线索。

1 材料与方法

1.1 材料

2014 年 6 月从天津学香果蔬有限公司(位于天津市西青区杨柳青镇大柳滩村)桃资源圃采集津柳早红、万寿红等 11 个桃品种(表 1)的嫩叶,液氮速冻,带回实验室置于 -80℃ 超低温冰箱中保存备用。

表 1 参试品种及其特性

| 代号 | 品种名 | 类型 | 成熟期 | 其他特性 |
|------|-----------|-----|---------|-----------|
| 1 | 未来 1 号 | 油桃 | 6 月中旬 | 特大果,无花粉 |
| 2 | 瑞光 | 油桃 | 7 月中下旬 | |
| 3 | 红脆 | 普通桃 | 8 月上中旬 | |
| 4 | 未来 3 号 | 油桃 | 6 月中旬 | |
| 5 | 中油 5 号 | 油桃 | 6 月中下旬 | |
| 6 | 早蟠 | 蟠桃 | 6 月初 | |
| 7 | 红芙蓉 | 油桃 | 8 月下旬 | |
| 8 | 潍坊甜油桃 3 号 | 油桃 | 9 月上旬 | 黄肉,无花粉 |
| 9 | 万寿红 | 油桃 | 10 月上中旬 | |
| 10 | 小白桃 | 普通桃 | 6 月中旬 | |
| 11 | 津柳早红 | 普通桃 | 6 月上旬 | 小白桃芽变,特早熟 |
| Ref* | Lovell | 普通桃 | | |

注:标“*”品种核苷酸和氨基酸序列来自 GDR 数据库(<https://www.rosaceae.org/>)。

1.2 基因组 DNA 提取

采用北京康为世纪生物科技有限公司的复杂植物基因组 DNA 提取试剂盒基因组 DNA。使用 Nanodrop 2000 检测核酸纯度和浓度。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测核酸完整性、洁净度

收稿日期:2016-04-26

基金项目:天津市应用基础与前沿技术研究计划一般项目(编号:14JCYBJC30100);天津市科技型中小企业技术创新资金(编号:14ZXCXC00063);天津市高等学校科技发展基金(编号:20130617);国家大学生创新创业训练计划(编号:201410061007);天津市 2014 年度“131”创新型人才培养工程;天津市高校第二批“优秀青年教师资助计划”。

作者简介:雷 雨(1994—),男,内蒙古乌兰察布人,主要从事果树分子生物学研究。E-mail:1014582131@qq.com。

通信作者:冯 涛,农学博士,副教授,主要从果树生物技术研究。E-mail:tkfg@163.com。

和有无其他类型核酸污染。保留纯度和浓度符合要求的样品,分别于-20℃保存。

1.3 NAC 基因的 PCR 扩增及测序

从 GDR 数据库 (<https://www.rosaceae.org>) 获取桃 NAC 基因序列信息,对 5' UTR、外显子区和 3' UTR,用 Primer Premier 5 设计特异引物,委托上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应体系 25 μL 包括 10 × Ex Taq buffer 2.5 μL, dNTP Mixture 1.5 μL(2.5 mmol/L),模板 cDNA 1 μL,上下游引物各 1 μL(20 μmol/L),Ex Taq DNA 聚合酶 0.2 μL(5 U/μL),其余用 PCR 级纯水补充。反应程序:95℃预变性 5 min;35 个循环(94℃变性 30 s,59℃退火 45 s,72℃延伸 2 min);最后 72℃延伸 8 min。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,目的条带回收、纯化(Takara 胶回收试剂盒),连接至 pMD18-T 载体,热激法转化大肠杆菌 DH5α,挑取阳性单克隆、摇菌,选取阳性克隆,送上海生工生物工程有限公司测序。

1.4 核酸序列比对和生物信息学分析

使用 DNAMAN 5.2 软件进行核酸序列比对,结合参考基因组中 NAC 基因序列,区别各品种 NAC 基因的外显子区和内含子区;使用 ORF Finder 在线工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 获得开放阅读框和推导氨基酸序列;使用 NCBI 中的 CDD 工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 进行蛋白质结构域分析。

1.5 NAC 同源蛋白及其系统进化分析

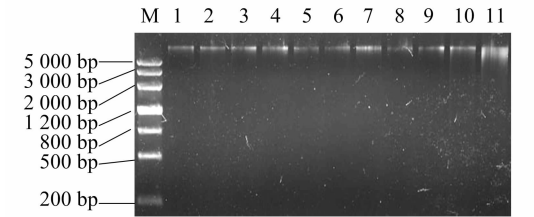
利用 NCBI 中的 Blastp 工具 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 搜索同源蛋白序列;使用 DNAMAN 进行序列比对;使用 Mega 4.1 软件绘制系统进化树。

2 结果与分析

2.1 NAC 基因的克隆及测序

根据 GDR 数据库中桃 NAC 基因(ppa008301m)mRNA 序列设计特异引物对:Forward primer 为 ATCCCTCTCTTTCTTTC TCTC,Reverse primer 为 ACCCCTACTCGATTCTCCAC。以各品种基因组 DNA 为模板,分别进行 PCR 扩增,电泳检测得到

约 1 400 bp 片段(图 1、图 2)。将上述产物克隆测序,分别获得各品种 NAC 基因的核苷酸序列。



M—DNA marker; 1~11 为不同品种 DNA 扩增结果。图 2 同
图 1 各品种基因组 DNA 电泳

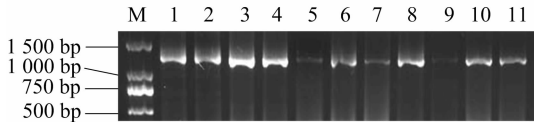


图 2 各品种 NAC 基因电泳

2.2 NAC 基因的结构及其遗传多样性

将 NAC 基因的 DNA 和 cDNA 序列进行比对,分析 ORF 和保守区。结果显示,各品种的 NAC 基因编码氨基酸 157 ~ 385 个,在氨基酸序列第 16 ~ 140 位存在 1 个 NAC 结构域,确认了 NAC 基因身份。DNA 和 cDNA 序列比对发现,它由 5' UTR 区、3 个外显子区、2 个内含子区和 3' UTR 区组成;在各区域均存在一定数量的变异(表 2);变异分为 SNP 和 Indel 2 类;第 1 外显子区有 1 处 SNP,但它为同义突变,没有引起氨基酸序列变化;第 2 外显子区存在 3 处 SNP,其中津柳早红品种(代号 11)的第 470 位核苷酸为 C,其他 10 个品种均为 A,该 SNP 使氨基酸 126 位的赖氨酸变为精氨酸(K→R)(图 3-B),其余 2 处未引起氨基酸序列变化。第 3 外显子区变异最多(图 3-A),非同义突变数量也最多,其中品种 8 在 1 052 ~ 1 150 位有一段 99 bp 的插入序列,引起插入 33 个氨基酸残基;津柳早红在 559 ~ 560 位有 TT 缺失,造成移码突变,另外在 569 位有 SNP,由 T 变 G,出现终止密码子,导致翻译终止(图 3-C)。津柳早红和小白桃(代号 10)在第 3 外显子区 SNP 和 Indel 变异数量非常多(图 3-A),说明这 2 个品种的 NAC 基因结构具有独特性。

表 2 参试品种核苷酸和氨基酸变异情况

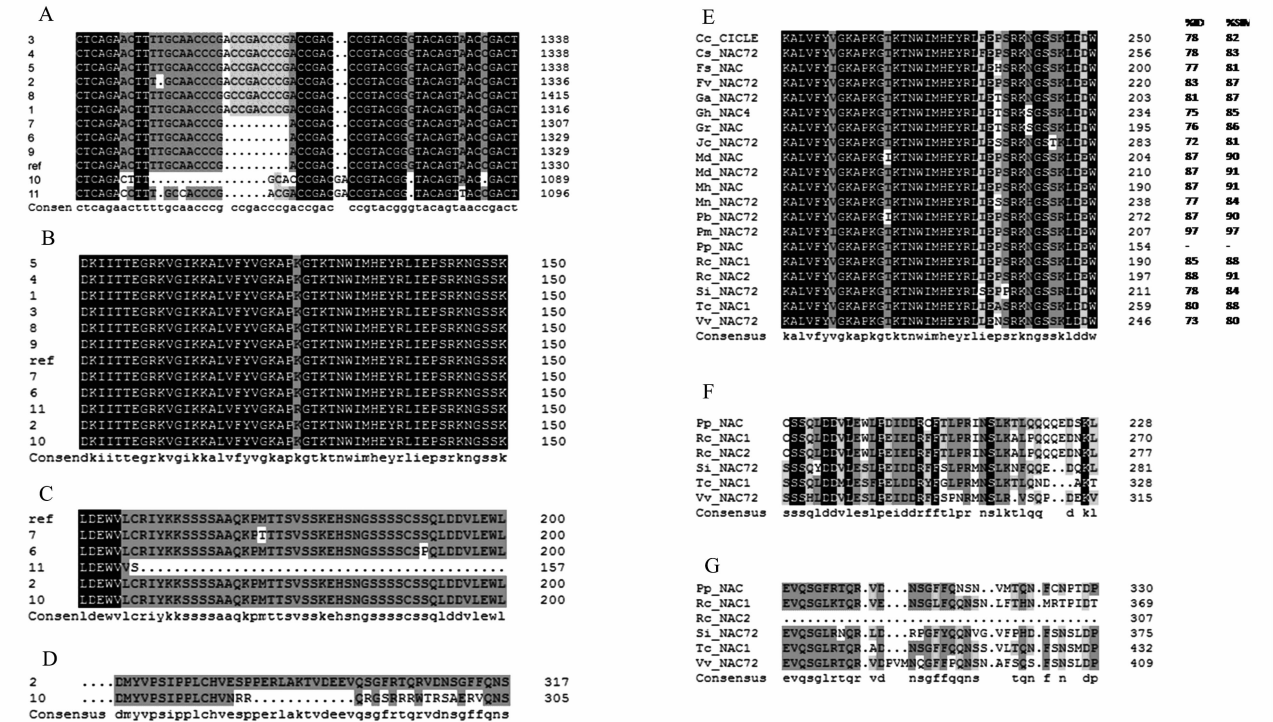
| 区域 | 范围 (bp) | 变异类型 | 数量 | 涉及品种代号 | 氨基酸变化 | 氨基酸变异类型 |
|---------|---------------|-------|----|-----------|-------|---------|
| 5'UTR | 1 ~ 113 | SNP | 5 | 1,5,9,10 | | |
| 第 1 外显子 | 114 ~ 295 | SNP | 1 | 2 | 无 | |
| 第 1 内含子 | 296 ~ 400 | Indel | 1 | 10,11 | | |
| 第 2 外显子 | 401 ~ 668 | SNP | 3 | 2,11 | 1 | K→R |
| 第 2 内含子 | 669 ~ 769 | Indel | 1 | 10,11 | | |
| 第 3 外显子 | 770 ~ 1 482 | Indel | 16 | 8,10,11 | 16 | 移码,终止子 |
| | | SNP | 8 | 6,7,10,11 | 6 | |
| 3'UTR | 1 483 ~ 1 858 | | | | | |

2.3 桃 NAC 同源蛋白及其系统进化分析

Blastp 检索同源蛋白,发现结果中绝大多数属于 NAC 类成员。桃 NAC 基因与梅同源性最高,为 97%,其次是鸭梨 NAC,为 89%。其他同源性较高的来自于苹果、月季、湖北海棠、草莓等物种。将 score 值最高的 19 个同源蛋白序列(表 3)下载到本地,进行同源性分析(图 3-E)。桃 NAC(ref 品

种)与 19 种植物同源性在 72% ~ 97% 之间。

这些 NAC 同源蛋白比对结果显示,在 NAC 结构域保守性较高(图 3-E),在它之外则多态性较高。将桃各品种 NAC 氨基酸序列比对结果与其他物种同源序列比对结果结合起来分析发现:这些物种在 126 位(按照 ref 品种序列)赖氨酸高度保守,而津柳早红品种突变为精氨酸(图 3-B、图



A—供试品种核苷酸序列比对(部分1); B—供试品种氨基酸序列比对(部分1); C—供试品种氨基酸序列比对(部分2); D—供试品种氨基酸序列比对(部分3); E—同源蛋白比对结果(部分1), ID—一致性, SIM 相似性; F—同源蛋白比对结果(部分1); G—同源蛋白比对结果(部分3)

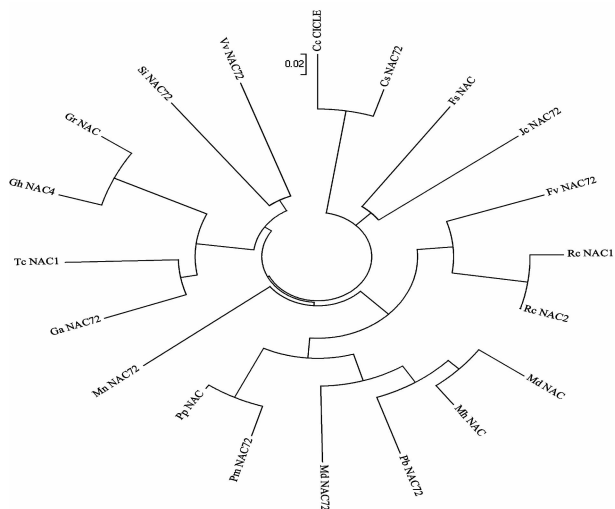
图3 供试品种和同源蛋白的核苷酸和氨基酸序列比对

表3 NAC 同源蛋白所属物种缩写与学名、中文名

| 缩写 | 学名 | 中文名 | GenBank 登录号 | 基因名称 |
|----|------------------------------------|-------|----------------|-------|
| Pp | <i>Prunus persica</i> | 桃 | | NAC |
| Pm | <i>P. mume</i> | 梅 | XP_008226676.1 | NAC72 |
| Fv | <i>Fragaria vesca subsp. vesca</i> | 野草莓亚种 | XP_004291667.1 | NAC72 |
| Re | <i>Rosa chinensis</i> | 月季 | AKC88481.1 | NAC1 |
| Pb | <i>Pyrus × bretschneideri</i> | 鸭梨 | XP_009378492.1 | NAC72 |
| Md | <i>Malus domestica</i> | 苹果 | ADL36797.1 | NAC |
| Re | <i>R. chinensis</i> | 月季 | AKC88482.1 | NAC2 |
| Mh | <i>M. hupehensis</i> | 湖北海棠 | AGS08760.1 | NAC |
| Md | <i>M. domestica</i> | 苹果 | XP_008345087.1 | NAC72 |
| Mn | <i>Morus notabilis</i> | 川桑 | XP_010089503.1 | NAC72 |
| Cs | <i>Citrus sinensis</i> | 橙 | XP_006464708.1 | NAC72 |
| Tc | <i>Theobroma cacao</i> | 可可 | XP_007021328.1 | NAC |
| Cc | <i>C. clementina</i> | 克莱门柚 | XP_006451940.1 | CICLE |
| Ga | <i>Gossypium arboreum</i> | 树棉 | KHG15675.1 | NAC72 |
| Fs | <i>Fagus sylvatica</i> | 欧洲水青冈 | CDQ51996.1 | NAC |
| Gr | <i>G. raimondii</i> | 雷蒙德氏棉 | XP_012458602.1 | NAC72 |
| Gh | <i>G. hirsutum</i> | 陆地棉 | ACH15345.1 | NAC4 |
| Vv | <i>Vitis vinifera</i> | 葡萄 | XP_002284668.1 | NAC72 |
| Jc | <i>Jatropha curcas</i> | 麻风树 | XP_012070612.1 | NAC72 |
| Si | <i>Sesamum indicum</i> | 胡麻 | XP_011095243.1 | NAC72 |

3-E),且其他参试品种均为赖氨酸;在191位丝氨酸高度保守,而早蟠品种为脯氨酸(图3-C、图3-F),且其他参试品种均为丝氨酸;在291~318位高度保守,而小白桃品种氨基酸中发生突变较多(图3-D、图3-G)。

Mega 4.1 生成系统进化树(图4),各物种 NAC 分为 3 组,桃 NAC 与梅、鸭梨、栽培苹果、湖北海棠、野草莓亚种、月季、川桑等聚为一组;可可、树棉、雷蒙德氏棉、陆地棉、葡萄、胡麻等为一组;橙、克莱门柚、麻风树、欧洲水青冈等为一组。桃 NAC 与梅 NAC72 聚为一小支,与同源性分析结果一致。进化树体现了亲缘关系的远近,如雷蒙德氏棉、陆地棉聚为一支,橙、克莱门柚聚为一支,蔷薇科果树及木本观赏植物形成一组等。



3 讨论

前人研究发现,NAC 蛋白 N 端含有 NAC 结构域,氨基酸序列比较保守,C 端则含有转录激活区,多样性比较高。本研究对不同果实成熟期的桃品种 NAC 蛋白氨基酸序列比对结果符合上述规律:在第 1、2 外显子区核苷酸变异少,其中多数是同义突变,不引起氨基酸序列变化;第 3 外显子区多样性非常丰富,而且引起的氨基酸序列变化比较多。本研究比对 20 个物种的 NAC 同源蛋白,发现 N 端氨基酸序列比较保守,而 C 端多样性较高,与前人在其他物种上的研究结论一致。津柳早红品种 NAC 蛋白翻译提前终止,导致转录激活区部分缺失,可能会影响其生物学功能或效能,进而引起果实提早成熟,但是需要进一步试验验证。小白桃在 C 端存在一段特殊的氨基酸序列,有别于其他参试桃品种,具有独特性。

Ooka 等认为在 NAC 保守结构域中包含 5 个亚结构域 (A、B、C、D、E), 其中 A、C、D 高度保守, B 和 E 保守性不强^[8]。前人研究发现, 在 NAC 蛋白中个别氨基酸突变会显著影响其生物学功能。在拟南芥 *cuc1* 突变体中, *cuc1-1* 蛋白在 123 位氨基酸处由赖氨酸突变为苏氨酸 (属于 D 亚结构域), 可能影响它核定位和 DNA 结合, 致使突变体不能形成茎顶端分生组织^[2,9]。本研究中, NAC 同源蛋白在 126 位 (按照 ref 品种序列) 赖氨酸高度保守 (属于 D 亚结构域), 而津柳早红品种为精氨酸; 在 191 位丝氨酸高度保守, 而早蟠品种为脯氨酸, 从类型上讲, 从极性氨基酸突变为非极性氨基酸, 性质变化比较大。因此, 这 2 处变异很有可能导致蛋白功能或效能的明显变化。

不同物种同源蛋白的系统进化树分析通常能获得与基于表型性状的植物分类学相同或相近的结果。张亮等研究了新疆栽培扁桃 CBF1 转录因子基因,在对不同植物 CBF 氨基酸序列进行系统进化树分析时发现,它与甜樱桃、梅亲缘关系最近,而且三者与野生扁桃、山桃、桃、光核桃、新疆桃等聚成一组^[10]。陈清等研究黑莓 *RuMYB10* 基因,系统进化树分析同源蛋白发现,同属悬钩子属的欧洲红树莓与 *RuMYB10* 分化时间很近;物种间 MYB 基本等同于物种分类地位;同属蔷薇科的苹果亚科、李(梅)亚科和蔷薇亚科各自聚为小枝后汇为一大类^[11]。本研究中,NAC 同源蛋白系统进化树也体现了植物

亲缘关系,桃 NAC 与梅 NAC72 聚为一小枝,雷蒙德氏棉、陆地棉聚为一枝,橙、克莱门柚聚为一枝,蔷薇科植物聚成一组等。

NAC 基因是桃果实成熟期性状的候选基因之一^[7]。Eduardo 等利用桃分离群体研究发现缓慢成熟性状是单基因控制,它与果实成熟期性状共分离,从 *NAC* 基因中开发了一个 SCAR 标记 (PSR2) 用于鉴定后代成熟性状^[12]。Nuñez - Lillo 等利用桃 F₂ 群体研究发现,*NAC* 与缓慢成熟性状共分离,认为 *NAC* 和 *ERF4* 是成熟期性状和果肉粉状性状的候选基因^[13]。

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(2): 159 – 170.
- [2] 柳展基, 邵凤霞, 唐桂英. 植物 NAC 转录因子的结构功能及其表达调控研究进展[J]. 西北植物学报, 2007, 27(9): 1915 – 1920.
- [3] 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(583): 1298 – 1301.
- [4] 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(2): 346 – 360.
- [5] Zhou Y, Huang W F, Liu L, et al. Identification and functional characterization of a rice NAC gene involved in the regulation of leaf senescence[J]. BMC Plant Biology, 2013, 13: 132.
- [6] 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(14): 4023 – 4036.
- [7] Pirona R, Eduardo I, Pacheco I, et al. Fine mapping and identification of a candidate gene for a major locus controlling maturity date in peach[J]. BMC Plant Biology, 2013, 13: 166.
- [8] 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(6): 239 – 247.
- [9] Takada S, Hibara K, Ishida T, et al. The CUP – SHAPED COTYLEDON1 gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation[J]. Development, 2001, 128(7): 1127 – 1135.
- [10] 张亮, 李疆, 帕提曼·阿布都热合曼, 等. 扁桃 AcCBF1 转录因子的克隆及表达分析[J]. 果树学报, 2015, 32(5): 763 – 768.
- [11] 陈清, 余昊唯, 汤浩茹, 等. 黑莓 *RuMYB10* 基因的克隆和表达[J]. 果树学报, 2012, 29(5): 747 – 754.
- [12] Eduardo I, Picañol R, Rojas E, et al. Mapping of a major gene for the slow ripening character in peach: co – location with the maturity date gene and development of a candidate gene – based diagnostic marker for its selection[J]. Euphytica, 2015, 205(2): 627 – 636.
- [13] Nuñez – Lillo G, Cifuentes – Esquivel A, Troggio M, et al. Identification of candidate genes associated with mealiness and maturity date in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] using QTL analysis and deep sequencing[J]. Tree Genetics & Genomes, 2015, 11(4): 86 – 98.