

DOI:10.11686/cyxb2025088

<http://cyxb.magtech.com.cn>

李凤, 郭绪虎, 曹慧芬, 等. 藜麦 NAC 转录因子 CqNAC66 响应干旱和盐胁迫的功能研究. 草业学报, 2026, 35(8): 170—181.

LI Feng, GUO Xu-hu, CAO Hui-fen, *et al.* Functional analysis of quinoa NAC transcription factor CqNAC66 in response to drought and salt stress. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(8): 170—181.

藜麦 NAC 转录因子 CqNAC66 响应干旱和盐胁迫的功能研究

李凤^{1,2*}, 郭绪虎^{1,2}, 曹慧芬¹, 孔祥睿¹, 杨冬雪¹, 张东旭^{1,2}, 张永芳^{1,2}

(1. 山西大同大学农学与生命科学学院, 山西 大同 037009; 2. 山西大同大学设施农业技术研发中心, 山西 大同 037009)

摘要:为探究藜麦 NAC 家族成员 *CqNAC66* 基因的抗旱耐盐功能, 本研究对 *CqNAC66* 进行亚细胞定位, 并将 *CqNAC66* 基因导入本氏烟草中进行过表达, 比较野生型和转基因株系在干旱 (20% PEG-6000) 和盐 (200 mmol·L⁻¹ NaCl) 胁迫下的形态及生理响应。结果表明, *CqNAC66* 转录因子定位在细胞核中; 过表达 *CqNAC66* 能够显著降低烟草植株的离体叶片失水率; 在干旱和盐胁迫下, 过表达 *CqNAC66* 能够显著降低烟草的萎蔫指数, 并显著提高烟草叶片的表面积和地上部鲜重; 过表达 *CqNAC66* 能够显著提高烟草叶片的叶绿素相对含量 (SPAD 值) 和过氧化物酶活性, 显著降低丙二醛含量。综上所述, *CqNAC66* 在烟草中的异源表达能够显著提高烟草植株的抗旱性和耐盐性, *CqNAC66* 可能通过保持植株的叶绿素稳定, 调节植物的抗氧化酶系统, 缓解胁迫造成的细胞氧化损伤来提高转基因烟草抵抗干旱和盐胁迫的能力。

关键词:藜麦; *CqNAC66*; 抗旱; 耐盐; 功能验证

Functional analysis of quinoa NAC transcription factor CqNAC66 in response to drought and salt stress

LI Feng^{1,2*}, GUO Xu-hu^{1,2}, CAO Hui-fen¹, KONG Xiang-rui¹, YANG Dong-xue¹, ZHANG Dong-xu^{1,2}, ZHANG Yong-fang^{1,2}

1. College of Agronomy and Life Sciences, Shanxi Datong University, Datong 037009, China; 2. Protected Agricultural Technology Development Center, Shanxi Datong University, Datong 037009, China

Abstract: This research explored the function of quinoa (*Chenopodium quinoa*) NAC family member, *CqNAC66* involved in drought resistance and salt tolerance. *CqNAC66* was subcellularly localized in this study, and transgenic lines of *Nicotiana benthamiana* overexpressing *CqNAC66* were obtained to compare the morphological and physiological responses of wild-type (WT) and transgenic plants after exposure to drought (20% PEG-6000) and salt (200 mmol·L⁻¹ NaCl) stress. The results showed that *CqNAC66* protein was subcellularly localized in the nucleus. Overexpression of *CqNAC66* significantly decreased the water loss rates of excised leaves of tobacco plants. Under drought and salt stress treatment, overexpression of *CqNAC66* in tobacco plants significantly decreased the leaf wilting index, and significantly increased the leaf surface area and aboveground fresh weight. In addition, overexpression of *CqNAC66* significantly increased the relative content of chlorophyll (SPAD) and the

收稿日期: 2025-03-20; 改回日期: 2025-07-01

基金项目: 山西省基础研究计划 (自由探索类) 面上项目 (202303021221167) 和山西大同大学博士科研启动基金项目 (2017-B-18) 资助。

作者简介: 李凤 (1988—), 女, 山西大同人, 博士, 副教授。E-mail: LF_sxdt dx@163.com。

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: LF_sxdt dx@163.com

activities of peroxidase, and significantly decreased the content of malondialdehyde in leaves of the studied tobacco plants. In conclusion, the heterologous expression of *CqNAC66* in *N. benthamiana* improved the drought and salt tolerance of plants and *CqNAC66* appeared to improve the resistance of transgenic tobacco by maintaining the stability of chlorophyll, regulating the plant antioxidant enzyme system and alleviating the cellular oxidative damage caused by stress.

Key words: quinoa; *CqNAC66*; drought resistance; salt tolerance; functional verification

干旱和盐胁迫是影响农作物产量和品质的重要限制因素,严重制约农业发展^[1-2]。藜麦(*Chenopodium quinoa*, $2n=4x=36$)为一年生苋科藜属作物,原产于南美洲安第斯山地区,是一类营养丰富的双子叶假谷物。作为印加土著居民的主要传统食物,藜麦已有 7000 多年的种植历史,被古代印加人称为“粮食之母”^[3]。藜麦种子无麸质且营养丰富,是一种单体植物即可满足人体基本营养需求的食物。更重要的是,藜麦能够在极端气候环境及土壤条件下生长,对于土壤盐渍、干旱、霜冻等逆境胁迫表现突出的抗性^[3]。藜麦在抗旱、耐盐防御响应中会产生一系列涉及多信号途径的应答反应,例如藜麦盐泡细胞中 Na^+ 和 Cl^- 的离子转运、盐分的隔离或外排^[4]、根尖细胞的钾保持^[5]、有机渗透调节物质的积累^[4,6-7]、气孔关闭的调节^[8-9]、主根的生长^[10]、抗氧化酶活性的增强^[11]及胁迫应答相关基因的表达^[12-13]等,这些均受到复杂的基因调控。其中,转录因子作为一类重要的调节蛋白,通过与胁迫应答基因启动子上的顺式作用元件相结合来激活下游目标基因的表达,实现转录水平上的调控。NAC (NAM、ATAF1/2 和 CUC2) 家族是植物中最大的转录因子家族之一,其命名源于矮牵牛(*Petunia* × *atkinsiana*) NAM(no apical meristem)、拟南芥 ATAF1/2(*Arabidopsis thaliana* transcription activation factor 1/2) 和 CUC2(cup-shape cotyledon 2) 基因^[14]。NAC 调控植物抗旱和耐盐性的分子机制研究已在拟南芥、水稻(*Oryza sativa*)、大豆(*Glycine max*) 和玉米(*Zea mays*) 等植物中报道^[14]。藜麦是异源四倍体作物,遗传背景比较复杂,相较于拟南芥和水稻等模式植物,藜麦抗旱及耐盐的理论基础研究仍相对滞后。

转录因子 NAC 在结构上主要由位于 N 末端有较高保守性的 NAC 区和位于 C 末端相对多样性的转录激活区(transcription activation region, TAR) 组成,其中 NAC 区可以进一步分为 A、B、C、D 和 E 五个亚区, C 亚区含有与 DNA 连接有关的 DNA 结合区(DNA binding domain, DBD), D 亚区则含有与细胞核定位有关的核定位信号区(nuclear localization signal, NLS)^[1,15]。转录因子 NAC 不仅在植物生长发育过程中起着重要的调节作用,还参与多种生物及非生物胁迫的抗逆反应^[16]。有研究表明, NAC 基因主要通过激活胁迫应答相关基因的表达^[17-18], 调节 Na^+/K^+ 平衡及基因的表达量^[19], 促进有机渗透调节物质的积累^[17, 20-21], 调节气孔关闭^[17, 20, 22], 调控植株根系发育^[17, 23-24]等方式来响应干旱及盐胁迫, 提高植株的抗逆性。NAC019/055/072 属于 AtNAC3 亚家族, 是 NAC 转录因子家族的重要成员。拟南芥 ANAC019、ANAC055 和 ANAC072(RD26) 蛋白序列同源性高, 其基因的表达模式和功能类似^[25]。有研究表明, 这 3 个密切相关的拟南芥 NAC 蛋白能够响应各种非生物胁迫和激素的处理^[14]。例如, ANAC019/055/072 能够被干旱、高盐和脱落酸(abscisic acid, ABA) 所诱导, 过表达 ANAC019/055/072 会提高转基因拟南芥的抗旱能力, 并且这 3 个蛋白能与干旱诱导基因 *ERD1*(early responsive to dehydration stress) 的启动子区域(包含 MYC-like 序列 CATGTG) 特异性结合^[26]。此外, ANAC019/055 参与植物防御响应中茉莉酸(jasmonic acid, JA) 和 ABA 信号转导途径之间的交叉对话^[27], ANAC019/055 还能在 EIN2 和 EIN3 下游发挥功能^[28], 而 EIN2 和 EIN3 是增强植物盐胁迫抗性的乙烯信号通路的正调控因子^[29]。NAC072 则与依赖 ABA 的防御响应相关, ANAC019/055/072 基因含有 ABRE 基序, 能够响应外源 ABA 的诱导^[27]。

本研究前期工作^[1]鉴定出藜麦含有 90 个 NAC 转录因子成员, 其中 *CqNAC66* 为 AtNAC3 亚家族成员, 与拟南芥 ANAC019/055/072 同属一个亚家族, 编码区为 897 bp, 编码 298 个氨基酸。*CqNAC66* 在藜麦根和叶片的表达量较高, 在茎部表达量较低; 盐胁迫处理下藜麦根部 *CqNAC66* 的表达量明显上升^[1]。目前, 藜麦抗逆基因的研究主要集中在基因表达方面, 基因功能验证方面的研究较少, 且藜麦高效稳定的遗传转化体系还未建立, 基于藜麦的功能基因研究受到较大的阻力, 因此本研究构建该基因的过表达载体, 通过对本氏烟草(*Nicotiana*

benthamiana)进行遗传转化,测定干旱和盐胁迫下 *CqNAC66* 转基因植株的形态和生理指标,来探究藜麦 *CqNAC66* 响应干旱和盐胁迫的功能,为藜麦抗逆分子育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以本氏烟草为背景材料进行遗传转化。工程菌为大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 α 和农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 GV3101。过表达载体 pART-CAM 购自陕西博瑞德公司。NovoRec[®] Plus One Step PCR Cloning Kit 购自苏州近岸蛋白质科技股份有限公司。植物基因组 DNA 提取试剂盒 TransDirect Plant Tissue PCR Kit 购自北京全式金生物科技股份有限公司。植物 RNA 提取试剂盒 RNeasy Plant Mini Kit 和荧光定量 PCR 试剂盒 2 $\times$ QuantiTect SYBR Green PCR mix 购自德国 QIAGEN 公司,反转录试剂盒 SuperScript[™] III Reverse Transcriptase Kit 购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 *CqNAC66* 过表达载体的构建和转基因烟草的获得 含有 *Xho* I 和 *Xba* I 酶切位点的 *CqNAC66* 的 CDS 序列由北京擎科公司合成,所获得的基因片段连接至过表达载体 pART-CAM 的多克隆位点处。构建好的重组质粒 pCAM-*CqNAC66* 经过测序验证之后转入农杆菌菌株 GV3101 中,采用叶盘法^[30]对本氏烟草进行农杆菌介导的 *CqNAC66* 过表达遗传转化。再生植株生成后,切取部分叶片提取基因组 DNA,用于 PCR 验证的基因特异引物如表 1 所示,扩增的目的片段长度是 305 bp,退火温度为 56 $^{\circ}\text{C}$ 。此外,提取烟草叶片的 RNA,并反转录成 cDNA。烟草内参基因为 β -*actin* gene(JQ256516.1),引物由 ABI 公司的 Primer Express Software v 2.0 设计,由华大基因公司合成,具体序列如表 1 所示,退火温度为 59 $^{\circ}\text{C}$,循环次数设定为 40 个循环,*CqNAC66* 基因的相对表达量通过 $2^{-\Delta\Delta C_t[31]}$ 的方法进行计算。

表 1 本研究所使用的引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

名称 Name	序列 Sequences (5'-3')	用途 Purposes
<i>CqNAC66</i> -F ₁	TCGCAAGACCCCTTCCTCTAT	<i>CqNAC66</i> 转基因烟草 PCR 鉴定 PCR identification of <i>CqNAC66</i> transgenic tobacco plants
<i>CqNAC66</i> -R ₁	CGTGACCCGTTTGGGTATTT	
β - <i>actin</i> -F	CTCCGTCTTGACTTGGCAGG	<i>CqNAC66</i> 转基因烟草 qPCR 鉴定 qPCR identification of <i>CqNAC66</i> transgenic tobacco plants
β - <i>actin</i> -R	ACAATTTCCCGCTCAGCTGA	
<i>CqNAC66</i> -F ₂	GAGTGCGGCAAAGCCTACAA	
<i>CqNAC66</i> -R ₂	ACCCGGTAAAGGCGAATTCA	
<i>CqNAC66</i> -EGFP-F	CATTTGGAGAGGACACGCATGGGAGTTCAAGAGAAAGATCC	克隆 <i>CqNAC66</i> Cloning of <i>CqNAC66</i>
<i>CqNAC66</i> -EGFP-R	TCGCCCTTGCTCACCATGAACCTGTCTGTATCCGTATCCGAAT	

1.2.2 藜麦 *CqNAC66* 的亚细胞定位 以重组载体 pCAM-*CqNAC66* 为模板,通过 PCR 的方法克隆目的基因,引物序列见表 1,其中下划线标记序列为与载体同源的序列,退火温度为 56 $^{\circ}\text{C}$,扩增长度为 932 bp。采用同源重组的方法将所扩增出的基因片段连接至 pCAM-EGFP 质粒的 *Xho* I 和 *Eco*R I 多克隆位点处,测序验证后将重组载体导入农杆菌 GV3101 中,并将检测成功的菌液注射到烟草倒三叶和倒四叶中进行侵染,黑暗过夜后正常培养 2 d,之后切取侵染区域,撕表皮制片,并用 FV3000 激光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司)进行观察。

1.2.3 植物材料的处理和取样 将过表达 *CqNAC66* 和野生型的烟草种子播于 MS 培养基(4.54 g MS 粉+30 g 蔗糖+7 g 琼脂粉)上,置于 22~24 $^{\circ}\text{C}$,16 h 光照/8 h 黑暗,相对湿度 50%~70% 的 MGC-350HP-2 气候箱(上海一恒科学仪器有限公司)中生长 2 周,之后将幼苗移栽到营养土壤与蛭石的混合基质中(营养土:蛭石=2:1)培养

2周。分别配制20%的PEG-6000和200 mmol·L⁻¹的NaCl胁迫溶液,随机挑取生长良好且一致的植株进行胁迫处理。将处理3 d后的烟草植株进行形态鉴定和相关形态指标的测定,并采集鲜样用于生理指标的测定。每个样品采集自3株独立的植株,进行3次生物学重复。

1.2.4 相关形态和生理指标的测定 参照前人研究^[32]统计植株的萎蔫程度分级(图1),并根据公式

$$\sum \frac{\text{萎蔫级数} \times \text{该级株数}}{\text{最高萎蔫级数} \times \text{总株数}}$$
 计算植株的萎蔫指数;利用Yaxin-1241叶面积仪(北京雅欣理仪科技有限公司)获取

烟草叶片的表面积;使用千分称测定烟草植株的地上部鲜重;完整剪下正常生长的*CqNAC66*转基因烟草和野生型烟草的第2片完全展开叶,立即测定质量 m_0 ,之后分别于叶片离体后0.5、1、2、3、4、5、6 h测定质量 m_x ,并根据公式 $(m_0 - m_x)/m_0 \times 100\%$ 计算离体叶片的失水率,具体方法参照前人研究^[33];使用SPAD-502 Plus叶绿素仪(日本Konica Minolta公司)测定烟草第3片完全展开叶的相对叶绿素含量(soil and plant analyzer development, SPAD)并避开叶脉,重复测定3次。采用愈创木酚法测定过氧化物酶(peroxidase, POD)活性,采用硫代巴比妥酸法测定丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量^[34]。

1.3 数据处理

采用Excel软件处理数据和作图,使用SPSS 25.0软件,通过单因素方差分析(one-way ANOVA)和Tukey HSD法分析显著性差异($\alpha=0.05$)。



图1 烟草植株的萎蔫程度分级

Fig. 1 Grading of wilting degree of tobacco plants

A: 0级,植株无任何萎蔫症状 Grade 0, no wilting symptoms on the plant; B: 1级,植株叶片出现轻微萎蔫 Grade 1, slight wilting symptoms on the plant's leaves; C: 2级,植株叶片萎蔫明显,叶柄轻微变软 Grade 2, obvious wilting symptoms on the plant's leaves and slight softening of the petioles; D: 3级,植株叶片萎蔫较严重,叶柄明显变软 Grade 3, severe wilting on the plant's leaves and obvious softening of the petioles; E: 4级,植株叶片萎蔫严重,叶柄严重变软 Grade 4, extremely severe wilting on the plant's leaves and severe softening of the petioles.

2 结果与分析

2.1 *CqNAC66*的亚细胞定位

2.1.1 pCAM-*CqNAC66*-EGFP的构建和农杆菌GV3101的转化 根据*CqNAC66*基因和pCAM-EGFP载体序列设计特异性PCR引物,以pCAM-*CqNAC66*载体为模板进行PCR扩增,1.0%琼脂糖电泳检测获得大小为932 bp的条带,与预期目的片段相符合(图2A)。切胶回收后将*CqNAC66*与过表达载体pCAM-EGFP相连接,转化到大肠杆菌后挑单克隆进行菌落PCR鉴定后并测序,如此完成重组载体pCAM-*CqNAC66*-EGFP的构建(图2B)。将测序正确的质粒转化农杆菌(图2C),用于烟草的瞬时转化。

2.1.2 *CqNAC66*的亚细胞定位 本研究利用农杆菌介导法,在本氏烟草中分别瞬时表达*CqNAC66*-GFP融合蛋白以及GFP蛋白。通过共聚焦显微镜进行观察,结果发现*CqNAC66*-GFP融合蛋白的绿色荧光信号仅存在于细胞核处,但GFP蛋白的绿色荧光信号弥散于整个细胞质中(图3)。

2.2 *CqNAC66*过表达载体的构建及转基因烟草的获得

本研究通过化学合成法克隆*CqNAC66*的CDS序列(图4A),并将其连接到表达载体pART-CAM上,完成重

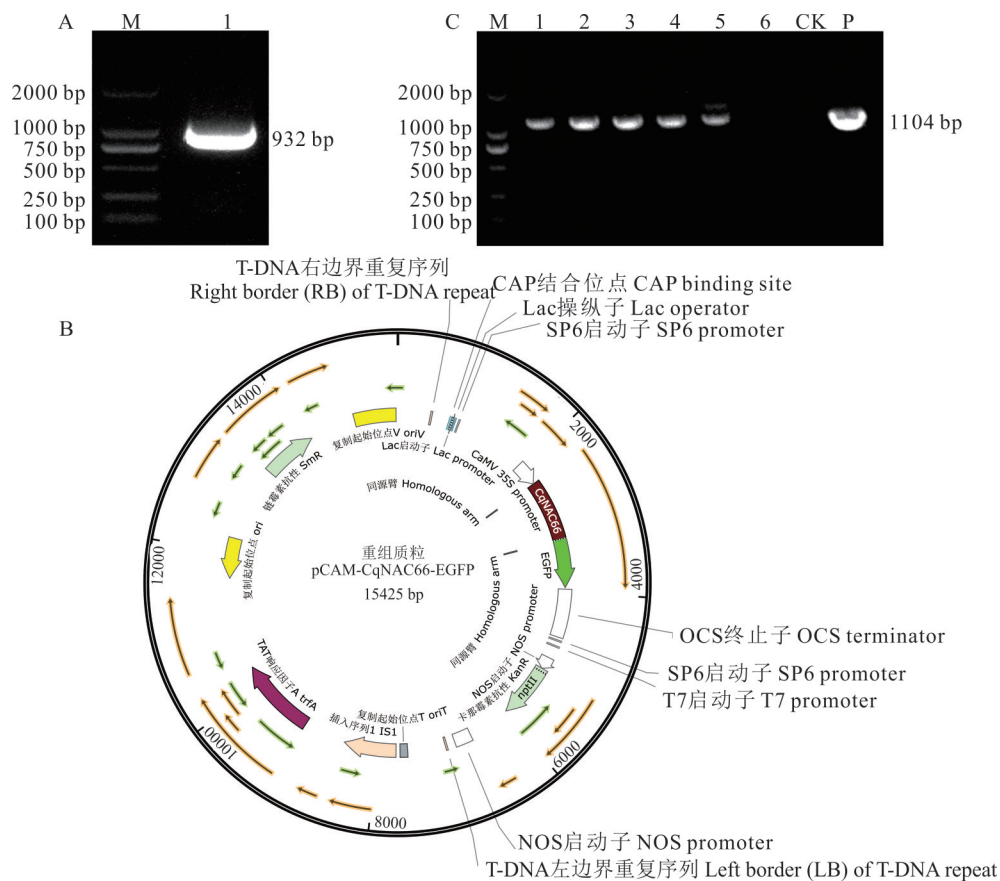


图2 重组质粒 pCAM-CqNAC66-EGFP 的构建和农杆菌 GV3101 的转化

Fig. 2 Vector construction of pCAM-CqNAC66-EGFP and transformation of *A. tumefaciens* GV3101

A: *CqNAC66* 的 PCR 扩增电泳图 The electrophoretic gel images of PCR amplification of *CqNAC66*; M: DL2000; 1: 扩增样本 Amplification sample; B: pCAM-CqNAC66-EGFP 重组载体的图谱 The map of pCAM-CqNAC66-EGFP recombinant vector; C: 转 *CqNAC66* 农杆菌菌落 PCR 的扩增电泳图 The electrophoretic gel images of PCR amplification of *CqNAC66* in *A. tumefaciens*; 1~6: 扩增样本 Amplification samples; CK: 空白对照 (ddH₂O) Blank control (ddH₂O); P: 阳性对照 Positive control.

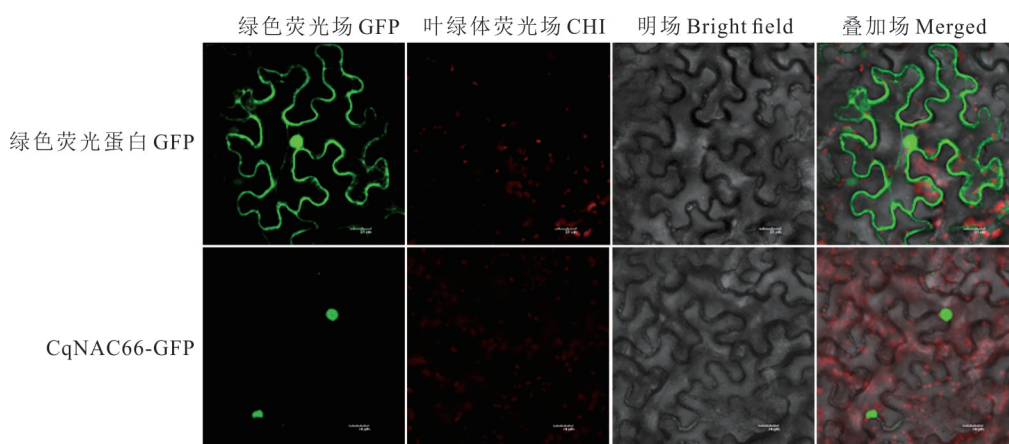


图3 CqNAC66 的亚细胞定位

Fig. 3 Subcellular localization of CqNAC66

CqNAC66-GFP 融合蛋白和 GFP 蛋白在本氏烟草中进行瞬时表达, 转化后的叶片用共聚焦显微镜进行观察。第 1 列的细胞是在 GFP 荧光信号下进行观察; 第 2 列为相同细胞在叶绿体荧光通道下进行观察; 第 3 列为明场下进行观察; 第 4 列为上述 3 列的融合叠加图像。Bar=20 μm。The CqNAC66-GFP fusion and free GFP (green fluorescent protein) were transiently expressed in transgenic *N. benthamiana* plants, and the transformed leaves were observed by confocal microscopy. Images in the first column show cells with GFP signal. Images in the second column show the same cells under chloroplast fluorescence channels (CHI). Images in the third column show the bright field view of the same cells, and the images in the fourth column are the overlays of the bright-field and fluorescent images.

对再生幼苗进行PCR鉴定,特异性条带为305 bp(图5A),与预期目的片段相符合,说明 *CqNAC66* 外源基因已整合到烟草植株的基因组DNA中,获得20株阳性植株。将阳性植株移栽生长后,挑选8个转基因株系进行qPCR检测,发现 *CqNAC66* 在转基因烟草中成功表达(图5B),结合 *CqNAC66* 的表达量和植株生长表型,本研究确定 *CqNAC66-15* 和 *CqNAC66-17* 株系作为后续用于 *CqNAC66* 基因功能验证的试验材料。

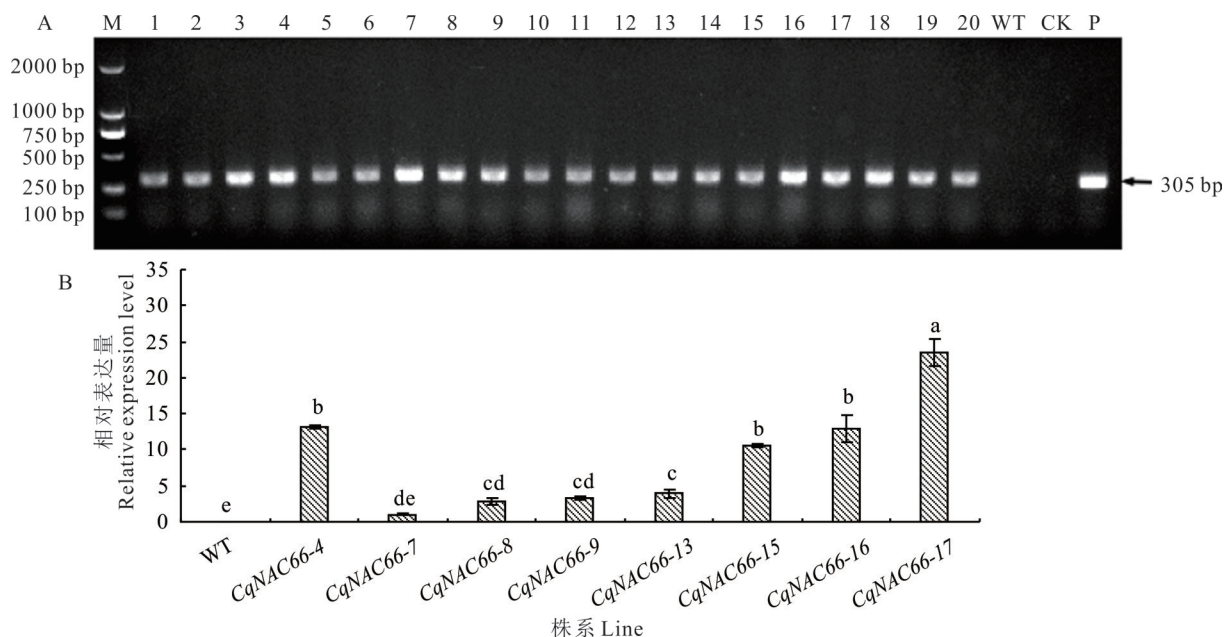


图5 *CqNAC66* 转基因烟草的分子鉴定

Fig. 5 The molecular identification of *CqNAC66* transgenic tobacco plants

A: *CqNAC66* 转基因烟草的PCR鉴定 The PCR identification of *CqNAC66* transgenic tobacco; M: DL2000; 1~20: T_0 代株系 T_0 generation lines; WT: 阴性对照(野生型) Negative control (wild type); CK: 空白对照(ddH₂O) Blank control (ddH₂O); P: 阳性对照(*CqNAC66*转基因农杆菌菌液) Positive control (*CqNAC66* transgenic *A. tumefaciens*); B: 转基因烟草的 *CqNAC66* 表达量检测 Detection of *CqNAC66* expression levels in transgenic tobacco; 不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著,下同 Different lowercase letters indicate significant differences at $P < 0.05$ level, the same below.

2.3 *CqNAC66* 转基因烟草对干旱和盐胁迫的耐受性

2.3.1 烟草植株的表型分析 为了确定 *CqNAC66* 是否参与烟草对干旱和盐胁迫的响应过程,本研究对烟草植株的离体叶片失水率进行测定,并进行逆境胁迫下植株的表型分析。结果显示,在正常生长条件(CK)下,野生型(WT)和 *CqNAC66* 转基因植株的长势一致,在干旱(20%PEG-6000)和盐(200 mmol·L⁻¹ NaCl)胁迫处理3 d后,野生型烟草的叶片出现萎蔫,叶柄变软,植株生长受到明显抑制,而过表达植株 *CqNAC66-15* 和 *CqNAC66-17* 株系的萎蔫程度较浅,与CK相比植株的生长未受到显著抑制(图6)。

当植物遭遇干旱、盐胁迫后,水分亏缺严重,细胞失去紧张,叶片和茎的幼嫩部分下垂,引起萎蔫现象。因此,通过将萎蔫指数作为评估植物抗旱、耐盐性的重要指标。本研究结果表明,干旱胁迫下,WT叶片发生萎蔫,其萎蔫指数显著高于CK;转基因株系 *CqNAC66-15* 和 *CqNAC66-17* 虽出现了萎蔫,但萎蔫指数较低。盐胁迫下,WT叶片萎蔫指数显著高于CK,而 *CqNAC66* 转基因株系未出现萎蔫现象(图7)。本研究对烟草植株叶片的表面积进行测定,结果表明,在干旱和盐胁迫下,WT的叶片生长受到抑制,与CK相比分别显著下降了62.49%和38.45% ($P < 0.05$),而 *CqNAC66-15* 和 *CqNAC66-17* 株系叶片的表面积与CK相比无显著差异。干旱和盐胁迫下,WT植株的地上部鲜重与CK相比分别显著下降了63.82%和38.59% ($P < 0.05$),其地上部生长被显著抑制,而 *CqNAC66-15* 和 *CqNAC66-17* 的地上部鲜重与CK相比无显著差异。在离体0~2 h, *CqNAC66* 转基因植株的叶片与WT相比无显著差异;离体3~6 h之后, *CqNAC66* 转基因植株的离体叶片失水率极显著低于WT ($P < 0.01$)。

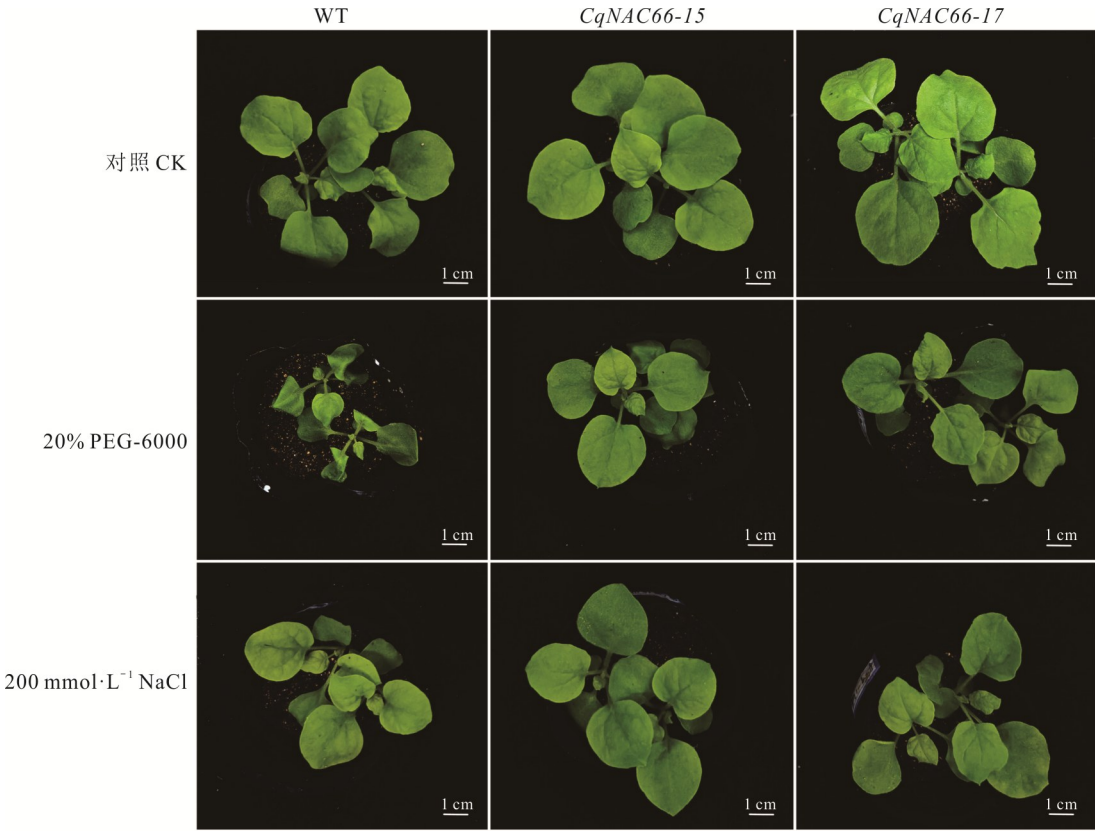


图 6 干旱和盐胁迫处理下野生型和 *CqNAC66* 转基因烟草株系的表型

Fig. 6 Phenotypes of wild type (WT) and *CqNAC66* transgenic tobacco lines under drought and salt stress treatment

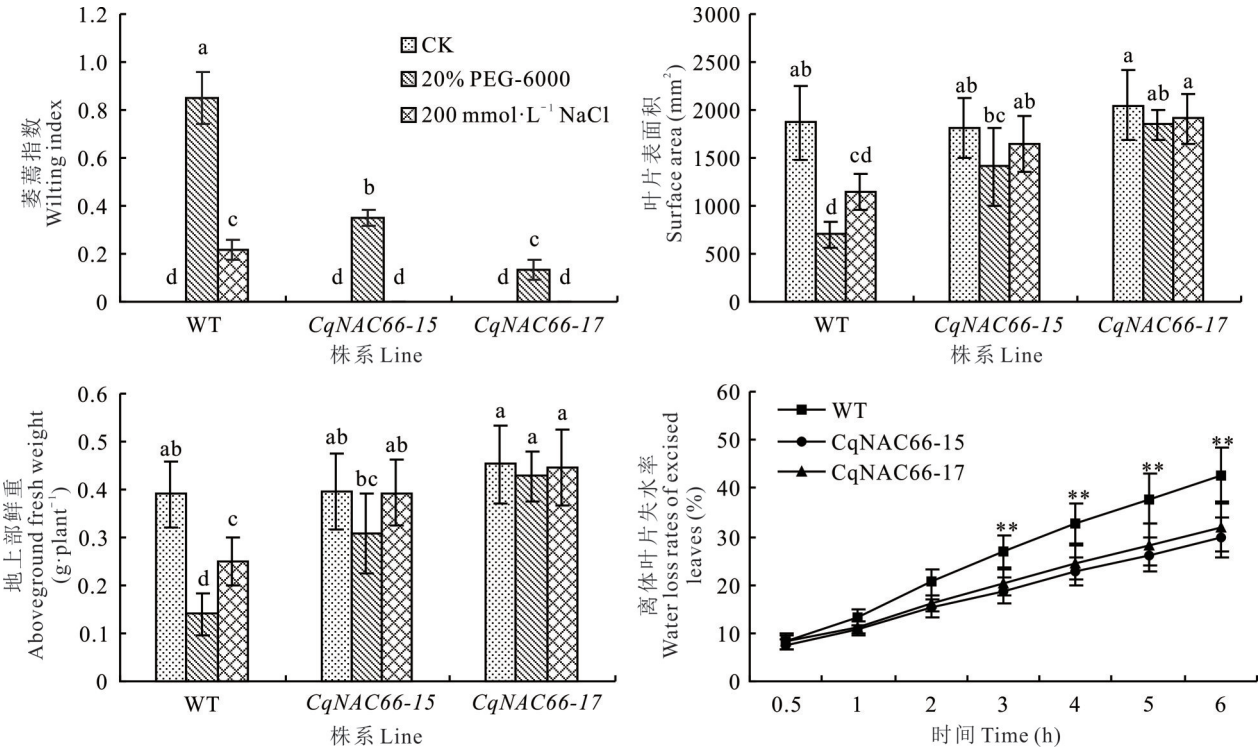


图 7 干旱和盐胁迫处理下野生型和 *CqNAC66* 转基因烟草株系形态指标的变化

Fig. 7 Changes of morphological indices of wild type (WT) and *CqNAC66* transgenic tobacco lines under drought and salt stress treatment

每个处理统计自 9 株独立的烟草植株 Each treatment was statistically analyzed from 9 independent tobacco plants; **: $P < 0.01$.

2.3.2 烟草叶片的生理指标分析 在干旱(20% PEG-6000)和盐(200 mmol·L⁻¹ NaCl)胁迫下,WT叶片SPAD值与CK相比分别显著下降了23.96%和35.26%($P<0.05$),而2种胁迫处理下的*CqNAC66*转基因植株SPAD值与CK相比无显著差异(图8)。在干旱和盐胁迫下,WT叶片内的POD活性与CK相比仅轻微上升,无显著差异;而2种胁迫处理后*CqNAC66*转基因植株与CK相比POD活性显著上升,其中*CqNAC66-15*株系分别升高40.40%和36.61%($P<0.05$),*CqNAC66-17*株系分别升高49.64%和52.41%($P<0.05$)。此外,在干旱和盐胁迫下,WT叶片的MDA含量与CK相比分别显著升高227.50%和178.15%;而2种胁迫处理后的*CqNAC66*转基因植株的MDA含量与CK相比无显著差异。

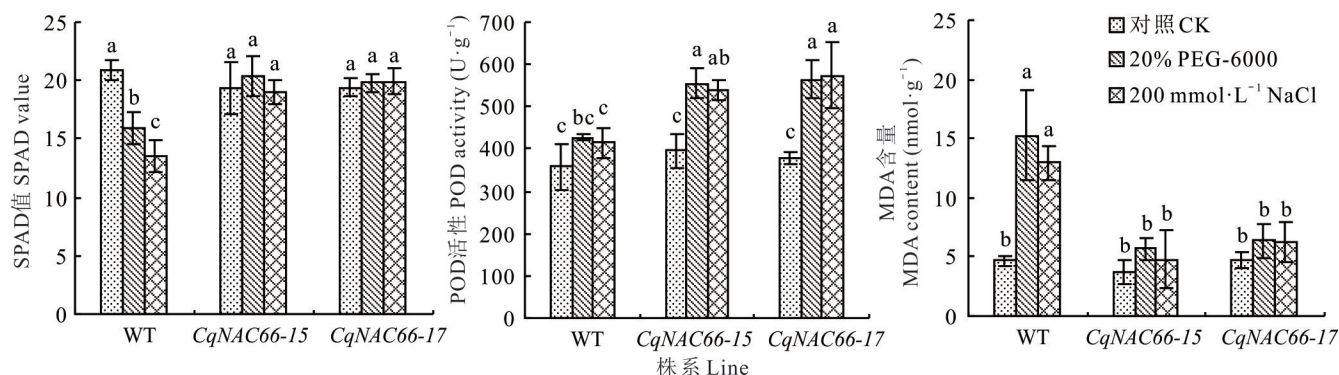


图8 干旱和盐胁迫处理下野生型和*CqNAC66*转基因烟草株系的生理指标的变化

Fig. 8 Changes of physiological indices of wild type (WT) and *CqNAC66* transgenic tobacco lines under drought and salt stress treatment

3 讨论

转录因子*CqNAC66*是藜麦*AtNAC3*亚家族的重要成员,与*ANAC019/055/072*同源性较高,而*ANAC019*、*ANAC055*和*ANAC072*这3个同源基因能够响应各种逆境胁迫^[14],过表达这些基因能够显著提高植株对逆境胁迫的耐受性^[14, 26–27]。前期研究^[1]通过对*CqNAC66*蛋白的结构进行分析,发现在*CqNAC66*蛋白的D亚区处存在一个潜在的核定位信号,这表明*CqNAC66*的亚细胞定位可能在细胞核处。本研究的烟草瞬时表达试验进一步表明*CqNAC66*是一个核蛋白,定位在细胞核处,这与其他研究的NAC转录因子亚细胞定位结果一致^[35–36]。

通过比较干旱和盐胁迫处理后植株的萎蔫指数、叶片表面积及地上部鲜重等形态指标,结果表明WT发生显著萎蔫,且植株的生长受到显著抑制,而*CqNAC66*转基因株系在遭受胁迫后的萎蔫指数较低,且生长受抑制程度不显著,说明*CqNAC66*在烟草中的异源表达能够显著提高植株的抗旱性和耐盐性。叶绿素是植物进行光合作用重要色素,其含量直接影响植物的光合效率和生长状态。SPAD值是叶绿素的相对含量,可评估植物对逆境的响应程度和耐受性^[37]。本研究中WT在干旱和盐胁迫处理下SPAD值显著下降,说明胁迫后WT叶片的叶绿素合成和积累受到影响,进而影响植株的光合作用效率;而*CqNAC66*转基因植株在胁迫处理下SPAD值未发生显著变化,说明胁迫条件下转基因植株叶片内的叶绿素未发生分解。当植物遭遇环境压力时,会导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)在体内过量积累,植物可以通过激活抗氧化酶活性来维持细胞ROS稳态,帮助植物抵御不良影响^[38]。因此,POD活性可以作为衡量植物生长发育和抗逆性的指标。MDA是膜脂氧化的最终分解产物,其含量可以反映植物在逆境条件下的受伤害程度^[39]。在本研究中,*CqNAC66*转基因烟草叶片在胁迫处理后呈高水平的POD活性和低水平的MDA含量也反映了转录因子*CqNAC66*的导入能够激活烟草植株的抗氧化途径,增强抗氧化酶活性,降低细胞的氧化损伤,从而提高烟草的抗旱性和耐盐性。此外离体叶片失水率的测定结果也表明过表达*CqNAC66*能够显著降低烟草离体叶片的失水率,增强烟草植株的抗逆性。本研究转基因植株对逆境胁迫的形态和生理响应结果与前人研究类似^[40–41]。*CqNAC66*转录因子响应藜麦干旱和盐胁迫抗

性机制仍需进一步深入研究。

4 结论

本研究对藜麦 CqNAC66 转录因子进行亚细胞定位,并以 CqNAC66 转基因烟草为材料,探讨其抗旱、耐盐功能,结果发现,藜麦 CqNAC66 转录因子定位于细胞核中,CqNAC66 在烟草中过表达能够显著降低干旱和盐胁迫下植株的萎蔫程度及生长受抑制程度,并且 CqNAC66 通过保持叶绿素稳定,提高抗氧化酶活性,减少细胞氧化损伤来提高转基因烟草的抗旱耐盐能力。本研究为藜麦的抗逆机制挖掘奠定基础,也为其他植物的抗逆分子育种提供基因资源。

参考文献 References:

- [1] Li F, Guo X, Liu J, *et al.* Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of the NAC transcription factor in *Chenopodium quinoa*. *Genes*, 2019, 10(7): 500.
- [2] Shu L, Li L H, Cao Y N, *et al.* Cloning and functional analysis of NAC069 gene in canola (*Brassica napus*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2024, 32(12): 2701–2714.
舒琳, 李龙辉, 曹亚男, 等. 甘蓝型油菜 NAC069 基因的克隆与功能分析. *农业生物技术学报*, 2024, 32(12): 2701–2714.
- [3] Jarvis D E, Ho Y S, Lightfoot D J, *et al.* The genome of *Chenopodium quinoa*. *Nature*, 2017, 542(7641): 307–312.
- [4] Böhm J, Messerer M, Müller H M, *et al.* Understanding the molecular basis of salt sequestration in epidermal bladder cells of *Chenopodium quinoa*. *Current Biology*, 2018, 28(19): 3075–3085.
- [5] Bazihizina N, Vita F, Balestrini R, *et al.* Early signalling processes in roots play a crucial role in the differential salt tolerance in contrasting *Chenopodium quinoa* accessions. *Journal of Experimental Botany*, 2022, 73(1): 292–306.
- [6] Derbali W, Manaa A, Goussi R, *et al.* Post-stress restorative response of two quinoa genotypes differing in their salt resistance after salinity release. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 164: 222–236.
- [7] Hirich A, Allah R C, Jacobsen S E, *et al.* Using deficit irrigation with treated wastewater in the production of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) in Morocco. *Revista Científica UDO Agrícola*, 2012, 12(3): 570–583.
- [8] Jacobsen S E, Liu F, Jensen C R. Does root-sourced ABA play a role for regulation of stomata under drought in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Scientia Horticulturae*, 2009, 122(2): 281–287.
- [9] Estrada Y, Fernández-Ojeda A, Morales B, *et al.* Unraveling the strategies used by the underexploited amaranth species to confront salt stress: Similarities and differences with quinoa species. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 604481.
- [10] Alvarez-Flores R, Nguyen-Thi-Truc A, Peredo-Parada S, *et al.* Rooting plasticity in wild and cultivated Andean *Chenopodium* species under soil water deficit. *Plant and Soil*, 2018, 425(1): 479–492.
- [11] Liu W Y, Yang F R, Xie Z J, *et al.* Evaluation of drought tolerance and physiological response to drought stress of different varieties of quinoa seedlings. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2021, 39(6): 10–18.
刘文瑜, 杨发荣, 谢志军, 等. 不同品种藜麦幼苗对干旱胁迫的生理响应及耐旱性评价. *干旱地区农业研究*, 2021, 39(6): 10–18.
- [12] Li L L, Jiang Q Y, Niu F J, *et al.* Research progress on salt tolerance mechanisms in quinoa. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2016, 18(2): 31–40.
李丽丽, 姜奇彦, 牛凤娟, 等. 藜麦耐盐机制研究进展. *中国农业科技导报*, 2016, 18(2): 31–40.
- [13] Hou L Y, Dong Y H, Li Y L, *et al.* Research progress and prospect of drought resistance of quinoa. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2021, 49(11): 22–28.
侯丽媛, 董艳辉, 李亚莉, 等. 藜麦抗旱性研究进展与展望. *江苏农业科学*, 2021, 49(11): 22–28.
- [14] Ma X Q, Yin Y H, Feng J X, *et al.* Research progress of NAC transcription factors in plant. *Plant Physiology Journal*, 2021, 57(12): 2225–2234.
马雪祺, 阴艳红, 冯婧娴, 等. 植物 NAC 转录因子研究进展. *植物生理学报*, 2021, 57(12): 2225–2234.
- [15] Fan K, Li F, Chen J H, *et al.* Asymmetric evolution and expansion of the NAC transcription factor in polyploidized cotton. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 47.
- [16] Lu H Q, Li N, Jiang K X, *et al.* Research advances on NAC transcription factors regulating plant development and stress responses. *Plant Physiology Journal*, 2024, 60(2): 271–283.
陆海芹, 李娜, 蒋凯旋, 等. NAC 转录因子调控植物生长发育和胁迫应答的研究进展. *植物生理学报*, 2024, 60(2):

271—283.

- [17] Zhang X M, Cheng Z H, Zhao K, *et al.* Functional characterization of poplar *NAC13* gene in salt tolerance. *Plant Science*, 2019, 281: 1—8.
- [18] Mao H D, Li S M, Chen B, *et al.* Variation in cis-regulation of a NAC transcription factor contributes to drought tolerance in wheat. *Molecular Plant*, 2022, 15(2): 276—292.
- [19] Wang J Y, Wang J P, Yuan H A. *Populus euphratica* NAC protein regulating Na^+/K^+ homeostasis improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 2013, 521(2): 265—273.
- [20] Hong Y B, Zhang H J, Huang L, *et al.* Overexpression of a stress responsive NAC transcription factor gene *ONAC022* improves drought and salt tolerance in rice. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 4.
- [21] Huang L, Hong Y B, Zhang H J, *et al.* Rice NAC transcription factor *ONAC095* plays opposite roles in drought and cold stress tolerance. *BMC Plant Biology*, 2016, 16(1): 203.
- [22] Mao Y, Xu J, Wang Q, *et al.* A natural antisense transcript acts as a negative regulator for the maize drought stress response gene *ZmNAC48*. *Journal of Experimental Botany*, 2021, 72(7): 2790—2806.
- [23] He X J, Mu R L, Cao W H, *et al.* *AtNAC2*, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. *The Plant Journal*, 2005, 44(6): 903—916.
- [24] Wang M, Ren L T, Wei X Y, *et al.* NAC transcription factor *TwNAC01* positively regulates drought stress responses in *Arabidopsis* and Triticale. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 877016.
- [25] Lu J B, Li X Y, Liu X, *et al.* Study on the response to applying ABA and expression changes of ABA induced relative genes in *Arabidopsis* mutants of three *NAC* homologous genes. *Life Science Research*, 2015, 19(2): 114—118.
卢嘉宝, 李晓云, 刘旭, 等. 三个拟南芥 *NAC* 同源基因突变体的 ABA 响应及下游基因表达分析. *生命科学研究*, 2015, 19(2): 114—118.
- [26] Tran L S P, Nakashima K, Sakuma Y, *et al.* 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. *The Plant Cell*, 2004, 16(9): 2481—2498.
- [27] Fuertes-Aguilar J, Matilla A J. Transcriptional control of seed life: New insights into the role of the NAC family. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(10): 5369.
- [28] Podzimska-Sroka D, O'Shea C, Gregersen P L, *et al.* NAC transcription factors in senescence: From molecular structure to function in crops. *Plants*, 2015, 4(3): 412—448.
- [29] Peng J, Li Z, Wen X, *et al.* Salt-induced stabilization of *EIN3/EIL1* confers salinity tolerance by deterring ROS accumulation in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*, 2014, 10(10): e1004664.
- [30] Wang G L, Fang H J. *Plant genetic engineering* (2nd Edition). Beijing: Science Press, 2014.
王关林, 方宏筠. *植物基因工程* (第2版). 北京: 科学出版社, 2014.
- [31] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402—408.
- [32] Liu F J, Guo L W, Gao L P, *et al.* Effect of temperature and humidity on quality of celery in circulation process. *Academic Periodical of Farm Products Processing*, 2011(3): 14—19.
刘凤娟, 郭李维, 高丽朴, 等. 温度和湿度对芹菜流通过程中品质的影响. *农产品加工·学刊*, 2011(3): 14—19.
- [33] Hao X R, Jiang Y, Wang Y Q, *et al.* Overexpression of poplar *PtoXTH34* gene to enhance drought resistance of tobacco. *Journal of Beijing Forestry University*, 2025, 47(1): 63—71.
郝玄瑞, 姜妍, 王宇倩, 等. 杨树 *PtoXTH34* 基因过表达提高烟草抗旱性. *北京林业大学学报*, 2025, 47(1): 63—71.
- [34] Gao J F. *Experimental guidance for plant physiology*. Beijing: Higher Education Press, 2006.
高俊凤. *植物生理学实验指导*. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [35] Lin R Z, Zhao W S, Meng X B, *et al.* Rice gene *OsNAC19* encodes a novel NAC-domain transcription factor and responds to infection by *Magnaporthe grisea*. *Plant Science*, 2007, 172(1): 120—130.
- [36] Fan K, Bibi N U, Gan S Y, *et al.* A novel NAP member GhNAP is involved in leaf senescence in *Gossypium hirsutum*. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(15): 4669—4682.
- [37] Wu X, Zhang Y N, Zhao N, *et al.* Overexpression of *PeAnn1* from *Populus euphratica* negatively regulates drought resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Beijing Forestry University*, 2020, 42(6): 14—25.
武霞, 张一南, 赵楠, 等. 过表达胡杨 *PeAnn1* 负调控拟南芥的抗旱性. *北京林业大学学报*, 2020, 42(6): 14—25.

- [38] Zhang B. Soybean transcription factor GmMYC2L is involved in the regulation of plant salt tolerance. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2024, 40(7): 1182–1190.
张斌. 大豆转录因子 GmMYC2L 参与植物耐盐性调控. *江苏农业学报*, 2024, 40(7): 1182–1190.
- [39] Zhou X Y, Jiang Q X, Jia H L, *et al.* Cloning and salt-tolerance functional analysis of alfalfa *MsBBX20* gene. *Acta Prataculturae Sinica*, 2024, 33(10): 55–73.
周昕越, 蒋庆雪, 贾会丽, 等. 紫花苜蓿 *MsBBX20* 基因克隆及耐盐功能分析. *草业学报*, 2024, 33(10): 55–73.
- [40] Tang X H, Qu Z C, Li S W, *et al.* Cloning and physiological function analysis of potato transcription factor *StNAC043* gene. *Journal of China Agricultural University*, 2023, 28(10): 66–74.
唐鑫华, 曲自成, 李世伟, 等. 马铃薯转录因子 *StNAC043* 基因的克隆及其生理功能分析. *中国农业大学学报*, 2023, 28(10): 66–74.
- [41] Ma J, Wang L Y, Dai J X, *et al.* The NAC-type transcription factor CaNAC46 regulates the salt and drought tolerance of transgenic *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 11.