

文章编号: 1000-8551(2018)04-0646-08

青花菜转录因子基因 *BoNAC1* 的克隆与表达分析

蒋明^{1,*} 张慧娟¹ 张志仙² 陈珍¹ 管铭¹ 刘洁¹ 陈孝赏²¹台州学院生命科学学院, 浙江 椒江 318000; ²台州市农业科学研究院, 浙江 临海 317000

摘要: 为明确青花菜 NAC 转录因子基因的序列特征和表达特点, 本研究以青花菜为试验材料, 在克隆 *BoNAC1* 转录因子基因的基础上, 采用 RT-qPCR 研究该基因的表达, 以明确其在核盘菌和根肿菌侵染下的表达模式。结果表明, *BoNAC1* 含 2 个内含子, 长度分别为 1 832 bp 和 670 bp, 编码区全长为 1 035 bp, 编码 344 个氨基酸, 含 1 个 NAM 结构域; 系统发育树分析结果表明, *BoNAC1* 与来自芸薹属的 NAC 亲缘关系最近, 并与其他十字花科 NAC 聚为一组, 而与豆科、蔷薇科 NAC 的亲缘关系相对较远, 在系统发育树上处于不同的分支。基因表达分析结果表明, *BoNAC1* 的表达受核盘菌的诱导, 在 12 h 和 24 h 时的表达量最高, 分别为对照的 6.28 倍和 7.03 倍; *BoNAC1* 的表达还受根肿菌的诱导, 15 d 和 20 d 时的表达量最高, 分别为对照的 4.23 倍和 4.11 倍, 表明该基因可能参与核盘菌和根肿菌的应答反应。本试验对青花菜 *BoNAC1* 基因的克隆与表达分析, 为 *BoNAC1* 基因的功能鉴定和生产应用奠定了理论基础。

关键词: NAC; 青花菜; 表达; 核盘菌; 根肿菌

DOI: 10.11869/j.issn.100-8551.2018.04.0646

青花菜 (*Brassica oleracea* var. *italica*) 为十字花科 (Cruciferae) 芸薹属一、二年生草本植物, 又名西兰花、绿花菜、意大利花菜和木立花椰菜等^[1]。青花菜以绿色花球为主要食用部位, 花球富含维生素 C、膳食纤维、硫代葡萄糖苷 (glucoraphin) 和异硫氰酸盐 (isothiocyanate) 等, 具有抑菌、抗癌和预防糖尿病等作用^[2-4]。浙江是我国青花菜的主产省, 常年种植面积达 1.5 万 hm^2 , 花球产量达 30 万 t, 青花菜已成为出口创汇重要的蔬菜作物之一^[5]。随着种植面积的逐年扩大, 青花菜病害的发生也逐渐严重, 目前生产中以菌核病和根肿病 2 种病害最为常见^[6-7]。菌核病由核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 引起, 整个生育期均可发生, 危害叶片、茎和花球, 造成产量和品质下降^[8-10]; 而根肿病则由芸薹根肿菌 (*Plasmodiophora brassicae*) 引起的, 发病时根部肿大变形, 导致吸水吸肥困难, 花球劣变, 造成产量下降^[11-12]。我国不是青花菜的原产地, 种质资源十分缺乏, 抗病材料更为稀缺, 利用分子手段发掘抗病相关基因, 将为青花菜抗病品种的培育

提供重要靶基因^[6,13]。

植物与病原菌协同进化过程中, 形成了独特的防卫系统以抵御病原物的侵染, 在这一过程中, 大量的防卫基因^[14]、信号转导基因^[15]和转录因子基因^[16-17]均参与其中。研究表明, 与抗病反应相关的植物转录因子有碱性螺旋-环-螺旋 (basic helix-loop-helix, bHLH)、C2H2 锌指蛋白 (C2H2 zinc finger protein)、AP2/乙烯响应因子 (APETALA2/ethylene-responsive factor, AP2/ERF)、碱性亮氨酸拉链 (basic-leucine zipper, bZIP)、WRKY 和 NAC 等^[15]。其中的 NAC 转录因子是植物特有的一类调控蛋白, NAC 的 3 个字母分别来自碧冬茄 (*Petunia hybrida*) NAM (no apical meristem)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) ATAF1/ATAF 2 和 CUC2 (cup-shaped cotyledon) 转录因子的首字母^[18-20]。研究表明, NAC 转录因子是植物先天免疫 (innate immune system)、基础抗性 (basal defense) 和系统获得抗性 (systemic acquired resistance) 系统中的重要

收稿日期: 2017-06-16 接受日期: 2017-09-19

基金项目: 台州市科技计划项目 (162ny14) 浙江省公益性技术应用研究计划项目 (2016C32091)

作者简介: 蒋明, 男, 副教授, 主要从事植物发育生物学及其分子调控研究。E-mail: jiangming1973@139.com

* 通讯作者: 同第一作者。

组分,在生物胁迫反应中起着重要作用^[20]。目前,NAC在青花菜中的研究尚未见相关报道,本研究在青花菜中克隆1个NAC基因,利用RT-qPCR开展表达研究,旨在明确其在核盘菌和根肿菌侵染下的表达模式,为该基因的功能鉴定与生产应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

青花菜材料 Bo0112 由台州学院生命科学院分子生物学实验室栽植,两叶一心期时用于病原菌的接种;核盘菌采自浙江临海上盘青花菜基地,收集病株上的菌核,置于取样袋备用;根肿菌采自温岭青花菜基地,将根部肿块置于取样袋带回实验室。苗期采集健康叶片,置于-80℃冰箱备用;核盘菌菌核带回实验室后,用大量的无菌水冲洗表面,在超净工作台上将菌核切成小块,接种到马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA)上,置于22℃的培养箱中培养,待菌丝长满整个培养基表面时,用直径为5 mm的无菌打孔器在菌落边缘切取琼脂块,接种至叶片正面(两叶一心期),对照采用同样大小的PDA培养基。采集处理0、6、12、24、36和72 h时的叶片,置于-80℃冰箱备用。青花菜带菌肿块用研棒研碎,用多层无菌纱布过滤,用无菌水稀释成 3×10^8 cfu·mL⁻¹的菌液,接种参照张小丽等^[21]的方法,对照用等量的无菌水,接种后0、5、10、15、20和25 d时采集病根,用于RNA的提取。

从NCBI下载BoNAC1的同源序列,包括白菜(*Brassica rapa*) (登录号:XP_009129548.1)、甘蓝型油菜(*Brassica napus*) (CDY35197.1)、亚麻荠(*Camelina sativa*) (XP_010438442.1)、荠菜(*Capsella rubella*) (XP_006284018.1)、天蓝遏蓝菜(*Noccaea caerulea*) (JAU26470.1)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) (NP_567811.1)、琴叶拟南芥(*Arabidopsis lyrata* subsp. *lyrata*) (XP_002867445.1)、梅(*Prunus mume*) (XP_008235662.1)、桃(*Prunus persica*) (XP_007201869.1)、野草莓(*Fragaria vesca* subsp. *vesca*) (XP_004289955.1)、赤豆(*Vigna angularis*) (XP_017413932.1)和野大豆(*Glycine soja*) (KHN48920.1)。

1.2 DNA、RNA提取和cDNA的合成

青花菜叶片DNA的提取采用试剂盒法,新型植物基因组DNA快速提取试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,操作步骤参照试剂说明书;分别以

核盘菌侵染0、6、12、24、36和72 h的叶片及根肿菌侵染0、5、10、15、20和25 d时的根为材料,利用TRIzol法提取RNA;cDNA第一链的合成试剂盒购自日本TaKaRa公司,操作步骤参照说明书。

1.3 *BoNAC1* 基因克隆

用于基因克隆的上、下游引物分别为BoNAC1UP1:5'-ATGGGTTTGAAAGATATCGGATCC-3'和BoNAC1DN1:5'-TCACTGGAAAGCCGAGGAGATTC-3'。PCR在S1000梯度PCR仪(Bio-Rad美国)上进行,分别加入2 μL 10 × PCR Buffer、0.4 U的Taq DNA酶(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)、0.4 μL 10 mmol·L⁻¹的dNTP mix[生工生物工程(上海)股份有限公司]、0.35 μL 20 μmol·L⁻¹的上游引物、0.35 μL 20 μmol·L⁻¹的下游引物、40 ng模板DNA或cDNA,加无菌ddH₂O至终体积20 μL。PCR反应程序:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,58.5℃退火90 s,72℃延伸135 s,33个循环;72℃延伸10 min。

PCR产物全部用于电泳,利用上海碧云天生物技术生产的DNA凝胶回收试剂盒回收目的基因,操作步骤参照说明书。采用T₄连接酶将回收产物与pGEM-T easy载体(promega)连接,用热激法(42℃,90 s)将连接产物导入DH5α感受态细胞(北京全式金生物技术有限公司)。经平板培养、蓝白斑筛选、挑单菌落和摇菌,取0.5 μL菌液用作PCR检测的模板,最后各挑3份阳性菌液测序。

1.4 基因表达分析

根据测序结果,设计基因定量表达引物,引物序列分别为BoNAC1UP2:5'-AGCGATGAAGAGTTGGTTTGT CAC-3'和BoNAC1DN2:5'-TGCATTCAGCTTTGCCACA TCAGG-3'。以肌动蛋白基因为内标,引物序列分别为ACTUP:5'-TCTCGATGGAAGAGCTGGTT-3'和ACTDN:5'-GATCCTTACCAGGGAGGTT-3'。PCR采用LightCycler® 96实时定量PCR仪(瑞士罗氏有限公司),分别加入10 μL 2 × Master Mix、各0.2 μL上游/下游引物(浓度为20 μmol·L⁻¹)、2 μL cDNA、7.6 μL ddH₂O;PCR程序:95℃预变性10 min;95℃变性15 s,55℃退火15 s,40个循环;72℃延伸30 s。RT-qPCR重复3次,相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[22]。

1.5 生物信息学分析

蛋白质的分子量和等电点预测采用ProtParam在线工具,网址为<http://web.expasy.org/protparam>^[23];结构域的预测利用SMART在线工具,网址为<http://smart.embl-heidelberg.de>;Clustal X 1.81软件^[24]用于NAC序列的对齐;Mega 3.1^[25]用以构建系统发育树,

建树方法为邻接法(Neighbor-Joining) ,重复检测的次数设置为 1 000。

2 结果与分析

2.1 *BoNAC1* 的克隆与序列分析

分别以基因组 DNA 和 cDNA 为模板进行 PCR 扩增 经电泳、回收、连接、转化和测序 ,获得相应的核苷

酸序列。测序结果表明 ,*BoNAC1* 的基因组 DNA 序列全长为 3 537 bp ,具有 2 个内含子 ,长度分别为 1 832 bp 和 670 bp ,3 个外显子的长度分别为 211、266 和 558 bp(图 1) 。*BoNAC1* 的编码区全长为 1 035 bp ,编码 344 个氨基酸 ,经 ProtParam 在线工具预测 ,*BoNAC1* 的分子量为 39. 3 kDa ,等电点为 5. 60; 经 SMART 在线工具预测 ,发现在蛋白质的 11 ~ 151 位氨基酸具一个 NAM 结构域(图 2) 。



注: 方块表示外显子; 线条表示内含子。

Note: Blocks indicate exons. Lines indicate introns.

图 1 *BoNAC1* 基因的结构

Fig. 1 Gene structure of *BoNAC1*

```

1 ATGGGTTTGAAGATATCGGATCCAGATTGCCACCGGGGTTTCGGTTTCATCCAAGCGATGAAGAGTTGGTTTGTCACTATCTTTGCAAA
1 M G L K D I G S R L P P G F R F H P S D E E L V C H Y L C K
91 AAGATAAGGGCCAATACGACCAAGGCGATGTTGAGGATGATGACACTGATGAAGCCTGAATGGTGCCTACTGATCTTGTGGAGATTGAC
91 K I R A K Y D Q G D V E D D D T D E A L N G A T D L V E I D
181 TTGCATATTTGTGAGCCGTGGCAGCTTCTCTGATGTGGCAAAGCTGAATGCAAAAGAATGGTATTCTTCAGTTTCCGCGATAGAAAATAT
61 L H I C E P W Q L P D V A K L N A K E W Y F F S F R D R K Y
271 GCGACTGGATATCGTACAAATAGAGCGACAATAAGCGGATACCTGGAAAGCAACAGGTAAGATCGGACGGTGAATGGATCCACGACAAGC
91 A T G Y R T N R A T I S G Y W K A T G K D R T V M D P R T S
361 CAATTGGTAGGGATGAGGAAGACACTGGTCTTCTACAGAAACAGAGCACCAAATGGGATCAAACTACTTGGATCATGCACGAGTCCCGT
121 Q L V G M R K T L V F Y R N R A P N G I K T T W I M H E F R
451 CTTGAGTGTCTAACATGCCACCTAAGGAAGACTGGGTTTGTGCAGAGTGTTCACAAAGGCAGAGACTCAACACTACGAGACAATAAC
151 L E C P N M P P K E D W V L C R V F N K G R D S T L R D N N
541 AATGAACATCAGACGCAAGATTGAAGTTAATGACGCTCCGGATCTTAATTACAATATTCAGTCGCAGCCTCTACTATCATCCCTCCT
181 N E H Q T Q R F E V N D A P D L N Y N I Q S Q P L L S S P P
631 TCCACCACCATCGACCCCTCCACACCATCATGATCAGCGGGAGCAGCTAATGAAGCAGCCTTCAAGGAGACCCGACCATCCCTATCATCAC
211 S T T I D P P H H H D Q R E Q L M K Q P S R S T D H P Y H H
721 AATGTCAACATCAAACCGTAGCATGTGGTGGGAGCAGATGATGATGGTTCGATGTCGTCATCGTCAAGCCATGGCCCTGATCAGCAG
241 N C Q H Q T V A C G W E Q M M I G S M S S S S H G P D H E
811 TCCTTGCTAAACTTGCTTTACGCCGACAACAACAACAGTGTCAACATCACTGATGATAATTATGGACATAACTATGGGAAGATATTGCTG
271 S L L N L L Y A D N N N S V N I T D D N Y G H N Y G K I L L
901 TCCTCAGACATCAGAGTTTGGATCATGACAAGACGTTGATGGCGTCATCATCCGATGGTGGTATGGTCTCTGATCTTACATGGAATGT
301 S S D I T S L D H D K T C M A S S S D G G M V S D L H M E C
991 GGTGGCTTGTAGTTTCGAGACCGAGAATCTCCTCGCTTTCAGTGA
331 G G L S F E T E N L L A F Q *

```

注: 阴影部分为 NAM 结构域。

Note: The NAM domain is highlighted in shade.

图 2 青花菜 *BoNAC1* 的编码区及推导的氨基酸序列

Fig. 2 Coding sequence and deduced amino acid sequence of *BoNAC1* from broccoli

2.2 系统发育分析

从 NCBI 数据库中下载了 *BoNAC1* 的同源序列 ,物种包括白菜、甘蓝型油菜、亚麻荠、芥菜、天蓝遏蓝菜、拟南芥、琴叶拟南芥、梅、桃、野草莓、赤豆和野大豆等。利用 Clustal X 对齐 NAC 序列 ,由图 3 可知 ,*BoNAC1* 与甘蓝型油菜的相似性最高 ,达 98% ,仅有少量氨基酸存在差异 ,其中在 +39 位始甘蓝型油菜的 NAC 有 10 个残基的缺失; 与白菜的相似性次之 ,为 97% 。*BoNAC1* 与

野大豆和赤豆的相似性最低 ,分别为 76% 和 75% ,序列上存在大量的插入/缺失现象 ,如自 +35 位起 2 种豆科植物的 NAC 均有 12 个氨基酸残基的缺失。利用 MEGA 软件计算遗传距离和生成系统发育树 ,结果表明 ,13 种植物的平均遗传距离为 0. 330 ,*BoNAC1* 与甘蓝型油菜和白菜 NAC 的遗传距离最小 ,均为 0. 033 ,与野草莓的遗传距离最大 ,为 0. 580 ,与梅的遗传距离次之 ,为 0. 551。13 种植物的 NAC 在系统发育树上聚



图 3 *BoNAC1* 及其同源序列的比较

Fig. 3 Comparisons of *BoNAC1* and its homologous sequences

为 3 组,支持率均达到 100%。I 组均来自十字花科植物,II 组为豆科(Leguminosae)植物,III 组为梅、桃和草莓,它们均为蔷薇科(Rosaceae)植物,III 组中,同属的梅和桃聚于同一分支(图 4)。

2.3 *BoNAC1* 的表达分析

以核盘菌侵染 0、6、12、24、36 和 72 h 的叶片 cDNA 为材料,进行 RT-qPCR 检测,结果表明,*BoNAC1* 的表达受核盘菌的诱导。与 CK 相比,6~72 h 的表达

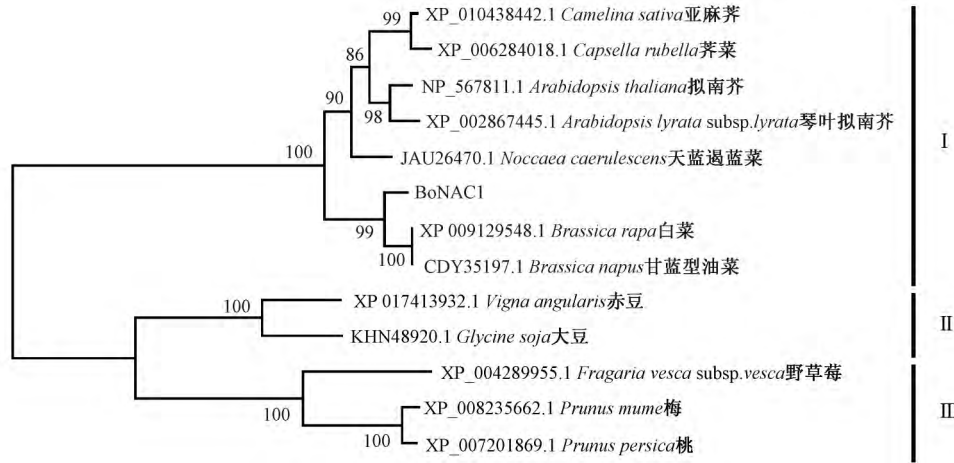
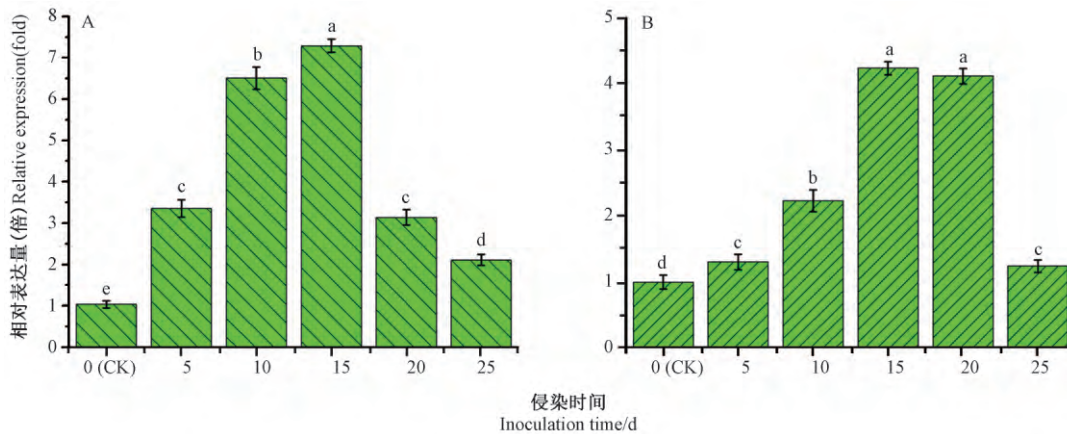


图4 用邻接法构建的 BoNAC1 及其同源序列的系统发生树

Fig. 4 Phylogenetic tree of BoNAC1 and its homologous sequences by using Neighbor-Joining method

差异均达到显著水平,表达量为 CK 的 2.03 ~ 7.03 倍,表达量呈先升高后降低的趋势,12 h 和 24 h 时的表达量最大,分别为 CK 的 6.28 倍和 7.03 倍,36 h 时则降至 CK 的 3.03 倍(图 5-A)。以根肿菌侵染 0、5、10、15、20 和 25 d 时的根 cDNA 为材料,进行 RT-qPCR

检测,结果表明,BoNAC1 的表达受根肿菌的诱导,表达量也呈先升高后降低的趋势,5 ~ 25 d 的表达量为 CK 的 1.23 ~ 4.23 倍,其中,15 d 和 20 d 时的表达量最高,分别为 CK 的 4.23 倍和 4.11 倍,25 d 时的表达量降至 CK 的 1.23 倍(图 5-B)。



注:不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

Note: Different lowercase letters mean significant difference at 0.05 level.

图5 核盘菌(A)和根肿菌(B)侵染下 BoNAC1 在叶片中的表达量

Fig. 5 Expression of BoNAC1 in leaves inoculationd by Sclerotinia sclerotiorum (A) and Plasmodiophora brassicae (B)

3 讨论

NAC 在高等植物中以家族形式存在,成员数量众多,是最大的植物特异转录因子之一,它们结构多样、功能各异,在植物生长、发育、生物胁迫和非生物胁迫中起着重要作用^[26]。柳枝稷(*Panicum virgatum*)中有 251 个 NAC 成员,可分为 19 组^[27];大豆(*Glycine max*)

中有 139 个 NAC 成员,在系统发育树上聚为 17 组^[28];硬粒小麦(*Triticum turgidum* var. *durum*)中有 168 个 NAC 成员^[29],而拟南芥^[30]、水稻(*Oryza sativa*)^[30]、葡萄(*Vitis vinifera*)^[31]与大麦(*Hordeum vulgare*)^[32]中各有 105、75、74 和 82 个 NAC 成员,它们在进化树上可分为 8 组。芸薹属植物中也有 NAC 鉴定的报道,Wang 等^[33]从甘蓝型油菜中鉴定出 60 个 NAC,并鉴定出 2 个新成员 *BnaNAC19* 和 *BnaNAC82*。

但是,青花菜中有关 NAC 的研究尚未见报道,本研究从青花菜中克隆到 1 个 NAC 基因,该基因编码 344 个氨基酸。大多数 NAC 基因都含有 3 个外显子,少数为 1 个外显子^[34]。本研究中克隆到的 *BoNAC1* 含 3 个外显子;绝大多数 NAC 含 1 个 NAM 结构域,少数含 2 个 NAM 结构域,*BoNAC1* 含 1 个 NAM 结构域^[34]。*BoNAC1* 是从青花菜中克隆的首个 NAC 转录因子基因,由于该物种的全基因组尚未测定,其 NAC 成员的数量目前未知。*BoNAC1* 与甘蓝型油菜和白菜的 NAC 相似性最大,它们均含有 1 个 NAM 结构域,推测它们具有相似的功能。

在抗病反应中,植物通过水杨酸(salicylic acid, SA)、茉莉酸(jasmonic acid, JA)和乙烯(ethylene, ET)等信号分子激活防卫基因的表达,而大量转录因子则参与防卫基因的表达调控^[35]。已有研究表明,NAC 参与植物抗病反应,*BnaNAC19* 和 *BnaNAC82* 在烟草中表达会引起过敏性细胞死亡^[34]。番茄(*Lycopersicon esculentum*) NAC 基因 *SISRN1* 的表达受灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)和丁香假单胞菌番茄致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)的诱导,表达量是对照的 6~8 倍^[36]。水稻 *ONAC122* 和 *ONAC131* 的表达受 SA、茉莉酸甲酯(methyl jasmonate)和 ET 前体氨基环丙烷羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid)的诱导,它们在水稻中的沉默导致对稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)抗性的降低^[37]。辣椒(*Capsicum annuum*) *CaNAC1* 基因的表达受地毯草黄单胞菌大豆致病变种(*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*)、番茄斑点病菌(*X. campestris* pv. *vesicatoria*)和菜豆细菌性斑点病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*)的诱导^[38]。本研究中 *BoNAC1* 的表达受核盘菌和根肿菌的诱导,表明该基因与这 2 种病菌的抗性反应相关。但是 *BoNAC1* 在抗病反应中的调控作用还不明确,此外,青花菜其他 NAC 成员是否参与抗病反应,仍有待进一步研究。

本试验中青花菜 *BoNAC1* 基因的克隆与表达分析,为 *BoNAC1* 基因的功能鉴定和生产应用奠定了理论基础。进一步的研究可通过构建植物表达载体,获得 *BoNAC1* 超表达与抑制表达植株,研究它们在菌核病和根肿病侵染下的抗性,明确该基因在抗病反应中的生物学功能。

4 结论

本研究以青花菜基因组 DNA 和 cDNA 为材料,利

用 PCR 法从青花菜中克隆到 1 个 NAC 转录因子基因 *BoNAC1*,并利用生物信息学方法进行了序列分析、多重比对和系统发育分析,同时,利用 RT-qPCR 研究了其在核盘菌和根肿菌诱导下的表达模式。结果表明,*BoNAC1* 的基因组 DNA 全长为 3 537 bp,具 2 个内含子,编码区全长 1 035 bp,编码 344 个氨基酸,编码蛋白具 1 个 NAM 结构域。*BoNAC1* 与十字花科植物 NAC 的序列差异小,在系统发育树上聚为一组,与豆科和蔷薇科 NAC 的序列差异较大,处于不同的分支。*BoNAC1* 的表达受核盘菌和根肿菌的诱导,与对照相比,表达量显著增加,表明该基因参与青花菜-核盘菌/根肿菌的互作,但其在抗病反应中的功能尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 蔡永华,唐筱春,王秀珍. 青花菜保护地无公害栽培技术[J]. 农业工程技术·温室园艺, 2008(5): 36-36
- [2] Ravikumar C. Therapeutic potential of *Brassica oleracea* (Broccoli) - A Review [J]. International Journal of Drug Development & Research, 2015, 7(2): 9-10
- [3] 蒋明,刘青娥,管铭,张雪,陈雅,左诗璇. 青花菜锌指蛋白基因 *BoCCCH1* 的克隆和表达分析[J]. 核农学报, 2016, 30(3): 444-450
- [4] 章燕如,许鑫,祝琦,周秀倩,俞可可,龚秀,蒋明. 青花菜 *BoBURP2* 基因的克隆与表达分析[J]. 福建农业学报, 2016, 31(9): 933-938
- [5] 顾宏辉,虞慧芳,许映君,陈纪算,汪炳良,王建升,毛培成,赵振卿,盛小光,王巍. 青花菜海绿的选育及特征特性[J]. 浙江农业科学, 2014(1): 52-53
- [6] 蒋明,张志仙,潘小翠,管铭. 青花菜抗病防卫基因 *BoSGT1* 的克隆、序列分析与诱导表达[J]. 浙江大学学报(理学版), 2015, 42(4): 453-458
- [7] 张小丽,李占省,方智远,李宝聚,柴阿丽,孙继峰,杨丽梅,庄木,张扬勇,张黎黎,樊艳燕,孙培田,刘玉梅. 青花菜与甘蓝近缘野生种 'B2013' 杂交后代对根肿病抗性的遗传分析[J]. 2014, 41(11): 2225-2230
- [8] 杨树明,杨春波,王子钰. 青花菜主要病害的发生与综合防治[J]. 吉林蔬菜, 2011(6): 70-71
- [9] 王亦菲,黄剑华,陆瑞菊,孙月芳,周润梅,周志疆,谢祝捷,刘成洪. 利用油菜单倍体茎尖筛选抗菌核病变异体[J]. 核农学报, 2002, 16(6): 355-359
- [10] 刘娜,蔡丛希,孙勃,张志明,汪俏梅. 核盘菌侵染拟南芥的过程及其芥子油苷的变化[J]. 核农学报, 2011, 25(2): 382-390
- [11] 王靖,黄云,李小兰,黎怀忠. 十字花科根肿病研究进展[J]. 植物保护, 2011, 37(6): 153-158
- [12] 张小丽,柴阿丽,刘玉梅,方智远,李宝聚,李占省. 青花菜根肿病苗期抗性鉴定技术的建立[J]. 植物保护学报, 2017, 44(1): 110-114

- [13] 章燕如,俞可可,龚秀,周秀倩,祝琦,许鑫,朱欣,吕奕,蒋晓颖,蒋明. 青花菜 *BoBURP1* 基因的克隆与表达分析[J]. 福建农业学报, 2016, 31(9): 933-938
- [14] Burdon J J, Thrall P H. Co-evolution of plants and their pathogens in natural habitats[J]. *Science*, 2009, 324(5928): 755-756
- [15] Tsuda K, Somssich I E. Transcriptional networks in plant immunity[J]. *New Phytologist*, 2015, 206(3): 932-947
- [16] Alves M S, Dadalto S P, Gonçalves A B, de Souza G B, Barros V A, Fietto L G. Transcription factor functional protein-protein interactions in plant defense responses[J]. *Proteomes*, 2014, 2(1): 85-106
- [17] Dangl J L, Jones J D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection[J]. *Nature*, 2001, 411(6839): 826-833
- [18] Souer E, van Houwelingen A, Kloos D, Mol J, Koes R. 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
- [19] Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M. Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant[J]. *Plant Cell*, 1997, 9(6): 841-857
- [20] Nuruzzaman M, Sharoni A M, Kikuchi S. Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 248
- [21] 张小丽,刘玉梅,方智远,杨丽梅,庄木,张扬勇,李占省,吕红豪. 青花菜及近缘种属种质资源抗根肿病鉴定[J]. 植物遗传资源学报, 2016, 17(6): 1106-1115
- [22] Walker J M. The Proteomics Protocols Handbook[M]. New York: Humana Press, 2005
- [24] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876-4882
- [25] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5(2): 150-163
- [26] Olsen A N, Ernst H A, Leggio L L, Skriver K. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse[J]. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(2): 79-87
- [27] Yan H, Zhang A, Ye Y, Xu B, Chen J, He X, Wang C, Zhou S, Zhang X, Peng Y, Ma X, Yan Y, Huang L. Genome-wide survey of switchgrass NACs family provides new insights into motif and structure arrangements and reveals stress-related and tissue-specific NACs[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 3056
- [28] Hussain R M, Ali M, Feng X, Li X. The essence of NAC gene family to the cultivation of drought-resistant soybean (*Glycine max* L. Merr.) cultivars[J]. *BMC Plant Biology*, 2017, 17(1): 55
- [29] Saidi M N, Mergby D, Brini F. Identification and expression analysis of the NAC transcription factor family in durum wheat (*Triticum turgidum* L. ssp. *durum*) [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2017, 112: 117-128
- [30] Ooka H, Satoh K, Doi K, Nagata T, Otomo Y, Murakami K, Matsubara K, Osato N, Kawai J, Carninci P, Hayashizaki Y, Suzuki K, Kojima K, Takahara Y, Yamamoto K, Kikuchi S. Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana* [J]. *DNA Research*, 2003, 10(6): 239-247
- [31] Wang N, Zheng Y, Xin H, Fang L, Li S. Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in *Vitis vinifera* [J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(1): 61-75
- [32] Ahmadi J. Identification, phylogenetic analysis of NAC transcription factor family in barely and expression pattern of HvNAC involved at salinity [J]. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 2017, 10(2): 45-57
- [33] Wang B, Guo X, Wang C, Ma J, Niu F, Zhang H, Yang B, Liang W, Han F, Jiang Y Q. Identification and characterization of plant-specific NAC gene family in canola (*Brassica napus* L.) reveal novel members involved in cell death [J]. *Plant Molecular Biology*, 2015, 87(4/5): 395-411
- [34] 邹嘉欣,吕楠,朱梦丽,朱乾坤,王万军. NAC 家族生物信息学分析[J]. 生物技术通讯, 2015, 26(1): 68-73
- [35] 孙利军,李大勇,张慧娟,宋凤鸣. NAC 转录因子在植物抗病和抗非生物胁迫反应中的作用[J]. 2012, 34(8): 993-1002
- [36] Liu B, Ouyang Z, Zhang Y, Li X, Hong Y, Huang L, Liu S, Zhang H, Li D, Song F. Tomato NAC transcription factor SlSRN1 positively regulates defense response against biotic stress but negatively regulates abiotic stress response [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e102067
- [37] Sun L, Zhang H, Li D, Huang L, Hong Y, Ding X S, Nelson R S, Zhou X, Song F. Functions of rice NAC transcriptional factors, ONAC122 and ONAC131, in defense responses against *Magnaporthe grisea* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2013, 81(1/2): 41-56
- [38] Oh S K, Lee S, Yu S H, Choi D. Expression of a novel NAC domain-containing transcription factor (CaNAC1) is preferentially associated with incompatible interactions between chili pepper and pathogens [J]. 2005, 222(5): 876-887

Isolation and Expression Analysis of Broccoli Transcription Factor Gene *BoNAC1*

JIANG Ming^{1,*} ZHANG Huijuan¹ ZHANG Zhixian² CHEN Zhen¹
GUAN Ming¹ LIU Jie¹ CHEN Xiaoshang²

(¹College of Life Science, Taizhou University, Jiaojiang, Zhejiang 318000;

²Taizhou Academy of Agricultural Research, Linhai, Zhejiang 317000)

Abstract: To investigate sequence characteristics and expression features of the *Brassica oleracea* var. *italica* NAC transcription factor gene, in this study, broccoli was used as the experimental materials a NAC transcription factor gene designated *BoNAC1* was isolated *Brassica oleracea* var. *italica* by using PCR method, and analyzed by Real-time quantitative PCR to clarify its expression patterns inoculationd by *Sclerotinia sclerotiorum* and *Plasmodiophora brassicae*. The results indicated that the *BoNAC1* contained two introns and their lengthis 1 832 bp and 670 bp respectively, and encoded 344 amino acids with a NAM domain. The results of phylogenetic tree indicated *BoNAC1* has a close relationship with NACs from other *Brassica* plants, and they grouped with NACs from other Cruciferae plants, however, a far relationship was observed between *BoNAC1* and NACs from Leguminosae and Rosaceae plants, and they clustered in different clades. Expression analysis revealed *BoNAC1* was induced by *Sclerotinia sclerotiorum*, and the highest expression levels were detected after 12 h and 24 h incubation, and the fold changes were 6.26 and 7.03 as high as that of the control; Furthermore, the expression of *BoNAC1* also induced by *Plasmodiophora brassicae*, and the highest expression levels were observed after 15 d and 20 d incubation, and the fold changes were 4.23 and 4.11 as compared to the control, indicting that this gene was involved in response to both *Sclerotinia sclerotiorum* and *Plasmodiophora brassicae* interactions. Cloning and expression analysis of *BoNAC1* in this study, which can provide the theoretical basis for understanding the gene function identification and its application in the future.

Keywords: NAC, broccoli, expression, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Plasmodiophora brassicae*