

黑龙江八一农垦大学生创新训练项目计划 申请书

项目编号	_____		
项目名称	芸豆 <i>PvNAC52</i> 调控植物盐碱胁迫反应的分子机理		
项目负责人	马钧杨	联系电话	13555436660
所在学院	农学院		
学号	20204011614	专业班级	2020 级农学 (5) 班
指导教师	于崧		
E-mail	byndys@163.com		
申请日期	2022 年 6 月 14 日		
项目期限	一年期		

黑龙江八一农垦大学

填写说明

1. 本申请书所列各项内容均须实事求是，认真填写，表达明确严谨，简明扼要。
2. 申请人可以是个人，也可为创新团队，首页只填负责人。“项目编号”一栏不填。
3. 本申请书为大 16 开本（A4），左侧装订成册。可网上下载、自行复印或加页，但格式、内容、大小均须与原件一致。
4. 负责人所在学院认真审核，经初评和答辩，签署意见后，将申请书（一式两份）报送项目管理办公室。

一、基本情况

项目名称	芸豆 <i>PvNAC52</i> 调控植物盐碱胁迫反应的分子机理						
所属学科	学科一级门：农学 学科二级类：作物学						
项目来源	<input type="checkbox"/> A、学生自主选题，来源于自己对课题的长期积累与兴趣 <input checked="" type="checkbox"/> B、学生来源于教师科研项目选题 <input type="checkbox"/> C、学生承担社会、企业委托项目选题 <input type="checkbox"/> D、拔尖专项 <input type="checkbox"/> E、竞赛专项 <input type="checkbox"/> F、研修专项						
申请金额	1.00 万元	项目期限	一年期	拟申报项目级别		省级	
负责人	马钧杨	性别	男	民族	汉族	出生年月	2002 年 6 月
学号	20204011614	联系电话	宅：0459-6819181 手机：13555436660				
指导教师	于崧	联系电话	宅：0459-6819181 手机：18249667966				
项目简介	<p>本研究以芸豆“龙芸 14”为材料，构建 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHCO_3 和 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 芸豆叶片组织转录组，从转录组数据中共筛选 8 个盐碱相关 NAC 转录因子，通过生物信息学对这 8 个基因进行分析，同时利用 qRT-PCR 进行验证，在其中选取 4 个表达量较高且正向表达的基因进一步验证。本项目将以 <i>PvNAC52</i> (<i>Phvul.005G084500</i>) 基因为目的基因，通过转基因技术手段，将 <i>PvNAC52</i> 基因转入拟南芥中，从生理及分子水平方面鉴定该基因应对盐碱胁迫的功能，同时利用酵母双杂交和酵母单杂交技术分析该蛋白的转录激活能力和与顺式作用元件结合的能力。本研究将明确 NAC 转录因子在响应盐碱胁迫中的</p>						

	作用，为 NAC 转录因子在逆境下的功能研究提供理论依据，并为芸豆抗逆育种提供新的基因资源。
负责人曾经参与科研的情况	参与国家重点研发计划子课题“芸豆机械化轻简高效生产技术优化与集成”（2020YFD1001402-03）；黑龙江省博士后面上基金项目“芸豆响应盐碱胁迫关键 microRNAs 的鉴定及其调控机制解析”（LBH-Z19195）。
指导教师承担科研课题情况	主持国家重点研发计划子课题“芸豆机械化轻简高效生产技术优化与集成”（2020YFD1001402-03）；主持黑龙江省自然科学基金项目“芸豆响应盐碱胁迫相关 microRNAs 的鉴定及其调控机制解析”（QC2017022）；主持黑龙江省博士后面上基金项目“芸豆响应盐碱胁迫关键 microRNAs 的鉴定及其调控机制解析”（LBH-Z19195）；主持黑龙江省科技厅指导项目“耐盐碱芸豆、绿豆品种的筛选与评价”（2014BAD07B05-H13）等。
指导教师对本项目的支持情况	<ol style="list-style-type: none"> 1、项目实施过程中资源上的支持：包括实验室资源、经费资源等。 2、项目实施过程中技术上的指导：包括文献查、试验设计、平台搭建、数据分析、论文撰写及投稿等。 3、项目组成员组织协调上的支持：包括任务分配、人员组成、成果分配等。 4、项目经费适用上的支持及监管：实验费用支出、劳务费发放等。

项目组 主要成员	姓名	学号	学院	专业班级	联系电话	项目分工
	候军军	20204011346	农学院	2020 级农学 3 班	13209287993	异源表达拟南芥植株获得
	姜秋阳	20204011616	农学院	2020 级农学 5 班	15045327031	异源表达株系与野生型生理指标分析
	徐婷婷	20204011104	农学院	2020 级农学 1 班	15636221170	亚细胞定位 酵母双杂交
指导教师	姓名	工号	学院/单位	职称	联系电话	电子邮件
	于崧	002864	农学院	副教授	18249667966	byndys@163.com

二、 立项依据（可加页）

1. 研究目的

植物的非生物胁迫包括干旱胁迫、低温胁迫、盐碱胁迫、高温胁迫及重金属胁迫等，在不同的理化因素逆境条件下植物会相应的产生抗性。盐碱是影响植物生长的主要环境因子之一，可导致经济作物的严重减产。且盐碱土分布在世界各地，全球盐碱土面积有近 10 亿 hm^2 。在我国，盐碱土的分布也较为广泛，尤其在东北地区的松嫩平原，面积已经达到 373 万 hm^2 ，约占我国盐碱总面积的 9%，并且盐碱土面积正以每年约 1.4% 的速度增加。盐碱胁迫可对植物造成大量的影响，如植株不能正常生长、矮小、黄化、萎蔫等，给农作物的经济带来大量损失，引起了人们的广泛关注。盐碱胁迫会使土壤中 pH 升高，会影响植株的正常新陈代谢，包括呼吸，离子交换，以及对营养元素的吸收等。盐碱胁迫也会使细胞内水分缺失，导致活性氧的积累，如 H_2O_2 和超氧化物，而超氧化物过多会干扰植株细胞的正常生长，甚至细胞死亡。同时盐碱胁迫会影响植物的光合作用，影响植物的光能利用率，降低对营养物质的同化力。

NAC (NAM, ATAF1/2, CUC2) 转录因子是最大的转录因子家族之一，是植物中特有的转录因子。NAC 家族具有保守的 N 末端，含有相似的 DNA 结合结构域，但 C 末端高度

多样化，不包含任何已知的蛋白结构域。近年来，越来越多的 NAC 家族成员信息被鉴定，例如拟南芥 (*Arabidopsis*) 中有 117 个 NAC 基因，大豆 (*Glycine max*) 中有 152 个，水稻 (*Oryza sativa*) 中有 151 个，葡萄 (*Vitis vinifera*) 中有 79 个，烟草 (*Nicotiana tabacum*) 中有 152 个，芸豆 (*Phaseolus vulgaris*) 中有 106 个。同时有大量的研究表明，NAC 转录因子在植物的生长发育过程中、抗逆反应过程中、应对各种胁迫过程中也发挥着举足轻重的作用。

芸豆是可以食用的豆科植物，是蝶形花亚科菜豆属一年生草本植物，学名为普通菜豆。芸豆籽粒中营养丰富，含有丰富的蛋白质、脂肪、碳水化合物、膳食纤维等，除供人们食用之外，在药用方面也存在超高的价值，如提高免疫力等。近年来，芸豆渐渐进入人们的视野，我国的种植面积也不断扩大，然而芸豆为盐碱敏感作物，土壤盐碱严重制约了芸豆的生长发育。

为了深入了解芸豆对盐碱胁迫的响应机制，以及相应的转录因子参与盐碱胁迫的响应机制奠定基础，本研究利用生物信息学分析并结合转录组数据深入解析盐碱胁迫对芸豆叶片差异表达基因，研究其中差异表达显著基因的表达特征、调控机理并在拟南芥中验证，这为发掘耐盐碱胁迫的基因，培育耐盐碱的芸豆新品种具有重要意义。

2. 研究内容

2.1 转录组学分析

植物具备各种各样的能力响应盐碱胁迫生境，但其机制十分复杂，除了大量的生理、生物化学方面的变化，还有与之相关联的分子层面的响应，其中植物胁迫应激表达基因包括早期响应基因和延迟响应基因。应用 Illumina 高通量测序平台，对 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHCO_3 胁迫后不同时间点的芸豆幼苗叶片进行转录组测序，然后对测序结果进行相关生物信息学分析。

2.2 芸豆耐盐碱相关基因筛选

筛选芸豆盐碱胁迫相关基因，并对结果进行实时 qRT-PCR 验证，明确相关差异表达基因的功能及其在芸豆对盐碱逆境调节中的相关作用，得出的结果结合生理响应进行分析，明确芸豆响应盐碱胁迫的综合机制。

2.3 异源表达拟南芥植株获得

通过对芸豆耐盐碱叶片的转录组学分析及 qRT-PCR 验证，找出耐盐碱基因，将其在拟南芥中表达，利用浸花法获得拟南芥植株，并筛选出 T₃ 代纯合子。

2.4 亚细胞定位

亚细胞定位是查找生物大分子在细胞内的具体存在的位置，如在核内、胞质内或者细胞膜上存在。本实验主要利用此方法来定位芸豆 NAC 转录因子。

2.5 异源表达株系与野生型生理指标分析

分析对比野生型拟南芥和异源表达株系拟南芥在不同胁迫下的生理指标、表型、萌发率、细胞膜损伤情况等，以此分析 PvNAC 的功能。

2.6 酵母双杂交

利用酵母双杂技术验证假设的蛋白互作或者定义互相作用的结构域，探究植物的生长发育、胁迫应答等信号转导途径等。

3. 国、内外研究现状和发展动态

3.1 NAC 转录因子研究进展

NAC 基因组成了植物特异性转录因子的一个大的家族，其命名是矮牵牛基因 *NAM* 和拟南芥基因 *ATAF* 和 *CUC2* 的首字母缩略词，这三个基因是最初发现的含有特定 NAC 基因。利用植物基因组全测序，鉴定出多个作物中含有 NAC 转录因子。NAC 蛋白在植物的各种生物学过程中发挥着至关重要的角色，许多 NAC 家族成员被证实能够参与植物的逆境反应。

3.1.1 NAC 转录因子对盐碱胁迫的响应

盐碱胁迫是植物所遭受的主要非生物胁迫之一，在长期的进化中，植物形成了一套自己的应对环境逆境机制，超量表达和基因敲除等是现在研究 NAC 转录因子和非生物胁迫关系的主要方法。Cao 等实验将大豆 *GsNAC019* 转化拟南芥，分析转基因植株与野生型在萌发期、苗期、成熟期的不同。研究发现，在碱处理下萌发期的转基因株系萌发率明显高于野生型；苗期的根长与成熟期的表型都可以观察到转基因株系明显好于野生型，证明了 *GsNAC019* 可以提高水稻的耐碱性。Nakashima 等实验通过 qRT-PCR 和叶绿素荧光值的测量对比了过表达 *OsNAC6* 拟南芥与野生型拟南芥的区别，表明了 *OsNAC6* 基因可以提高水稻的耐盐性。Li 等的实验将大豆 *GmNAC15* 基因超表达，并通过与对照对比，对其进行

实时定量分析、化学组织染色、叶绿素测量以及一些生理指标测量等发现 *GmNAC15* 基因可以提高大豆耐盐性。还有大量的研究表明 NAC 转录因子在盐碱胁迫中起着关键作用，比如说 *GhNAC79* 增加的棉花的盐敏感性；*CarNAC6* 过表达在盐胁迫下会促进应鹰嘴豆根系生长；转 *Os01g66120/OsNAC2/OsNAC6* 和 *Os11g0300/OsNAC10* 基因的水稻能够提高植物对旱和盐的耐受性；*CmNAC1* 基因可以提高南瓜耐盐性等。

3.1.2 NAC 转录因子对干旱胁迫的响应

Liu 等实验 qRT-PCR 分析表明，玉米 *ZmNAC33* 在干旱、高盐度和脱落酸(ABA)胁迫诱导中表达量较高，启动子分析在 *ZmNAC33* 的启动子区域发现了多种与胁迫相关的顺式作用元件，并且 *ZmNAC33* 转基因拟南芥在萌发阶段的发芽率高于外源 ABA 和渗透胁迫下的野生型，干旱胁迫下过表达系的存活率和抗氧化酶活性均高于野生型，这些结果表明，*ZmNAC33* 在植物耐旱性方面具有正向调控作用。He 等实验将玉米 *ZmNAC071* 基因过表达拟南芥，通过与野生型拟南芥的萌发率实验、根长实验、组织化学染色、生理指标测定以及表达量分析等发现，在甘露醇胁迫下过表达拟南芥植株的萌发率更低，根长更短，ROS 积累量更多等。由此可以发现 *ZmNAC071* 基因过表达增加了对干旱的敏感性。Jin 等实验对梨的 *PbeNAC1* 基因过表达拟南芥，通过对过表达拟南芥与野生型拟南芥对比，分析该基因对脱水的响应，该实验对两种类型拟南芥分别做了表型观察，在脱水情况下过表达株系明显好于野生型，后又通过失水率测定、组织化学染色以及 ROS 关键基因表达量分析等实验，了解过表达株系的失水率更低，ROS 积累量也更少，同时关键基因下表达量更高，由此得知 *PbeNAC1* 可以提高梨的耐旱性。Wang 等实验利用过表达 *ThNAC13* 拟南芥与野生型拟南芥对比实验，通过萌发率实验、根长实验、SOD 测量、POD 测量等确定了 *ThNAC13* 对干旱具有耐受性。除此之外还有大量研究表明 NAC 转录因子响应干旱胁迫，如 *PwNAC2* 通过多种信号通路增强了植物对干旱的耐受性；香蕉 NAC 转录因子 *MusaSNAC1* 通过调节气孔关闭和 H_2O_2 含量来获得耐旱性；*ShNAC1* 过表达增加番茄的耐旱性；巨桉大部分 SNAC 类基因都对干旱胁迫上调表达；*MdSNAC1* 基因能够增强转基因番茄株系对干旱胁迫的抗性；*VvNAC08* 基因的过表达提高了转基因拟南芥的耐旱性；*GhirNAC2* 在棉花抗旱性中发挥积极作用；NAC 转录因子 *JUNGBRUNNEN1* 增强了番茄的耐旱性。

3.1.3 NAC 转录因子对低温胁迫的响应

Yan 等通过分析 PvNACs 表达量发现多条 PvNAC 基因在低温胁迫下表达量升高；彭辉的实验验证了 *CarNAC1*、*CarNAC4*、*CarNAC6* 基因的表达在不同时间点受到低温的诱导；任美艳的实验表明 *AmNAC4* 在沙冬青幼苗根中受低温处理的诱导，并验证该基因在野外 11、12 和 1 月份生长的沙冬青成株幼叶中的表达量高于其他月份，表明该基因与环境温度的变化密切相关，以此推测 *AmNAC4* 在低温中发挥重要作用；黄磊的实验表明在冷害处理后 *ONAC09* 嵌合抑制子叶片积累了更多的超氧阴离子及 H_2O_2 ，活性氧相关 SOD 酶及 CAT 酶活性在冷害处理前后均显著低于野生型， H_2O_2 合成相关基因表达量在冷害处理后显著高于野生型，冷害相关基因表达量在冷害处理后则显著低于野生型，这表明 *ONAC095* 增加了水稻对低温的敏感性，同时 *ONAC131* 也增加水稻对低温敏感性；番茄 *SINAC1* 基因可以被冷、热、高盐、渗透刺激诱导表达，过表达 *SINAC1* 的株系通过提高过氧化物歧化酶，过氧化氢酶和保持较高的光化学效率等机制来提高植株对寒冷的耐受性；An 等实验发现了 *MdNAC029* 的过表达降低了苹果愈伤组织和拟南芥的耐寒性；Hou 等实验表明冷胁迫后，*CaNAC064* 沉默辣椒叶片萎蔫更严重，MDA 含量和冷害指数更高，脯氨酸含量更低，ROS 积累更多，并且在冷胁迫下，过表达的拟南芥 *CaNAC064* 的 MDA 含量、冷害指数和相对电解质泄漏含量均低于 WT 植株，同时根据酵母双杂交和 BIFC 结果显示 *CaNAC064* 与低温诱导的植物细胞单倍蛋白酶蛋白相互作用，因此得出结论，*CaNAC064* 会正向调控植物的耐寒性。

3.1.4 NAC 转录因子对植物生长发育的影响

Cao 等实验将 *CmNAC1* 异源表达拟南芥，分析了在各个胁迫下其与野生型的萌发、长势，发现异源表达拟南芥无论萌发率、长势、根长、根表面积等都要远远优于野生型，这些结果都说明 *CmNAC1* 是植物表型发育的重要调控因子。Liu 等实验将 *TsNAC1* 过表达拟南芥，通过 Western-blot 分析转录水平，培养基法分析萌发率，以及分析野生型与过表达株系的鲜重和干重等方法，得出结论 *TsNAC1* 的过表达抑制了植物的生长。Yang 等将 *ZmNAC84-3* 和 *ZmNAC84-6* 过表达，利用亚历山大染色区分正常花粉和败花粉，后用 DAPI 染色对成熟花粉进行染色，得出结论 *ZmNAC84* 基因会影响花粉发育。不仅如此，还有大量研究表明 NAC 转录因子参与植物生长发育，如过表达 *ShNAC1* 加速了转基因番

茄黑暗诱导的叶片衰老；*NAC15* 基因在杨树木质部高度表达，可能是转基因烟草木材形成中发挥重要作用的潜在候选基因；*GmNAC109* 参与了生长素信号通路，有助于调控毛状根的形成；*BrNAC041* 参与 ABA 对 GA 在白菜叶片衰老过程中的拮抗作用；苹果 NAC 转录因子 *MdNAC52* 通过 *MdMYB9* 和 *MdMYB11* 调控花青素和原花青素的生物合成；在低温、甘露醇和 NaCl 处理后，*CaNAC035* 的基因沉默会抑制辣椒幼苗的生长等。

3.2 酵母双杂交

酵母双杂交系统是在真核模式生物酵母中进行的，研究活细胞内蛋白质相互作用，对蛋白质之间微弱的、瞬间的作用也能够通过报告基因的表达产物敏感的检测到，它是一种具有高灵敏度的研究蛋白质之间关系的技术。1989 年，Fields 发表了真核转录调控的特点，首次建立了酵母双杂交技术，酵母双杂交技术可以用来鉴定蛋白质互作。其原理是基于酵母中的 GAL4 转录因子有两个结构域，一个是位于 N 端的 DNA 结合域（BD），一个是位于 C 端的转录激活域（AD），当这两个结构域分开时，各自保留原有的功能，DNA 结合域单独存在时，能结合 DNA 但无法激活转录，转录激活域单独存在时具有转录激活动能，但无法结合到 DNA 的正确位置上，也不能激活转录，只有当这两个结构域以某种方式在空间上足够靠近，才能发挥转录激活活性。Brace 等在蛋白质分选的过程中发现，细胞在分化的本质上是蛋白与蛋白之间发生互相作用形成复合体来进行完成各种活动，单独的蛋白质是无法完成的。蛋白质-蛋白质相互作用实质上是从 DNA 复制，转录，剪接和翻译，到分泌，细胞周期控制，中间代谢，细胞宏观结构和酶复合物形成等所有细胞过程中固有的。

酵母双杂在验证假设的蛋白互作或者定义互相作用的结构域，在探究植物的生长发育、胁迫应答等信号转导途径中的作用至关重要。目前利用酵母双杂交技术也已经证实了一些 NAC 转录因子家族成员能通过与其它蛋白互作参与到植物的信号调控网络中，例如 Wei 等利用酵母双杂交和双分子荧光互补实验证实了香蕉中 *MaNAC1* 和 *MaNAC2* 蛋白能够与乙烯信号组件 *MaEIL5* 蛋白发生互作，推测可能 *MaNACs* 可能通过与 *MaEIL5* 互作进而调控香蕉果实的成熟；Krestine 等利用酵母双杂交技术，以 RING-H2 蛋白为 bait，从拟南芥 cDNA 文库中钓出响应 ABA 的 NAC 蛋白。同时酵母双杂交也能分析 NAC 转录因子的转录激活区和抑制区。Teruyuki 等利用酵母双杂交技术分析了 *ANAC078* 蛋白转录激

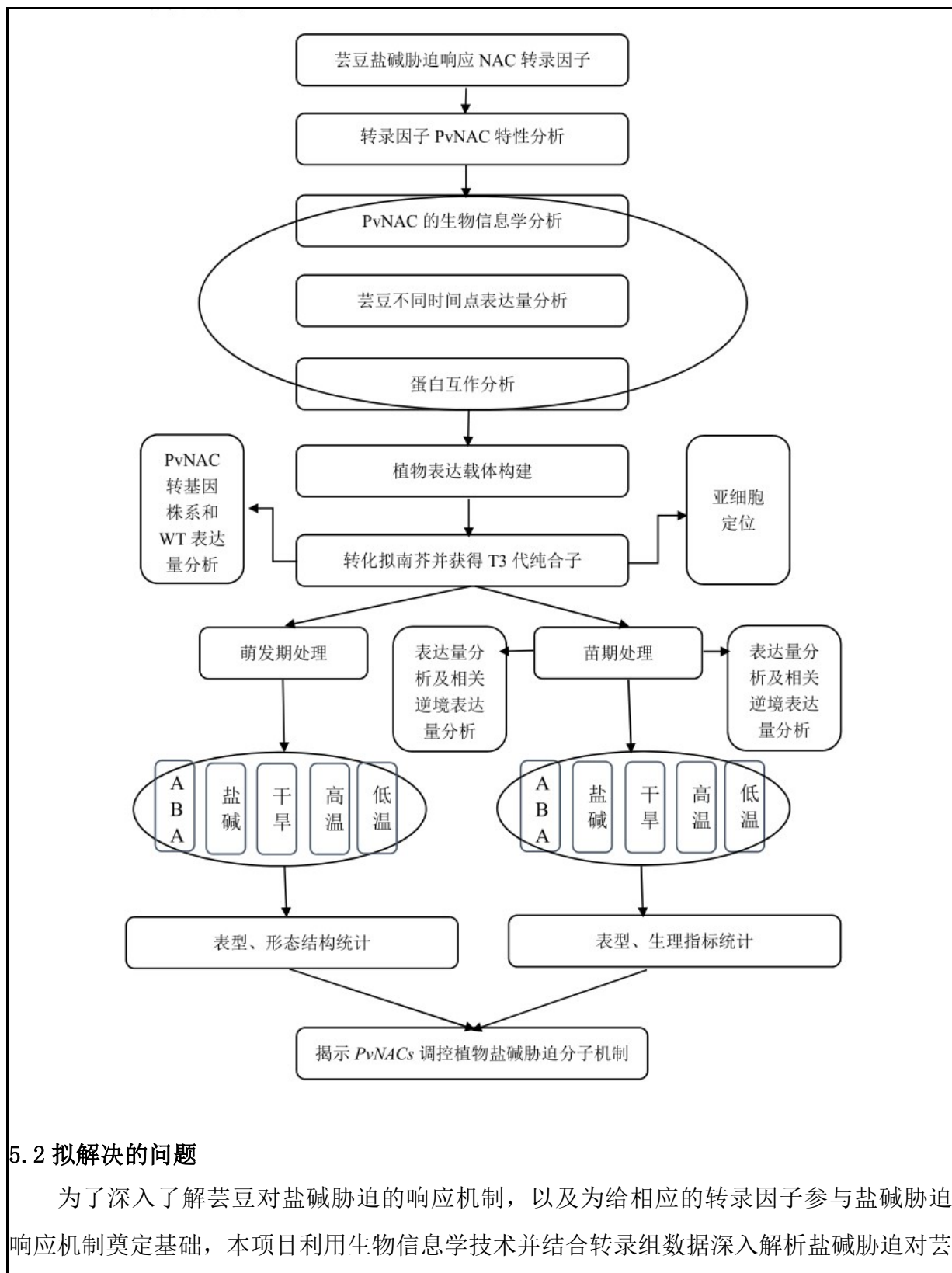
活域，确定其转录激活区位于第 161-399 个氨基酸之间；Hao 等利用酵母分析系统证明了黄豆 *GmNAC20* 蛋白中由 35 个氨基酸组成的转录抑制区，称为 NARD，NARD 存在于许多 NAC 家族基因中，它的存在能够降低转录因子的激活活性，NARD 区域与转录激活区之间的相互作用最终决定 NAC 家族蛋白对下游基因的表达是起激活作用还是抑制作用。

4. 创新点与项目特色

本项目首次将 *PvNAC52* 基因作为目的基因，通过转基因技术手段，将 *PvNAC52* 基因转入拟南芥中，从生理及分子水平方面鉴定该基因应对盐碱胁迫的功能，同时利用酵母双杂交和酵母单杂交技术分析该蛋白的转录激活能力和与顺式作用元件结合的能力。本项目结果将丰富 NAC 转录因子在盐碱胁迫中的作用研究，为 NAC 转录因子在逆境下的功能研究提供理论依据，并为芸豆抗逆育种提供新的基因资源。

5. 技术路线、拟解决的问题及预期成果

5.1 技术路线



5.2 拟解决的问题

为了深入了解芸豆对盐碱胁迫的响应机制，以及为给相应的转录因子参与盐碱胁迫响应机制奠定基础，本项目利用生物信息学技术并结合转录组数据深入解析盐碱胁迫对芸

豆叶片差异表达基因，研究其中差异表达显著基因的表达特征、调控机理并在拟南芥中验证，这为发掘芸豆抗逆基因，培育芸豆抗逆新品种具有重要意义。

5.3 预期成果

- (1) 明确芸豆 *PvNAC52* 转录因子在盐碱胁迫中的作用机理。
- (2) 发表期刊论文 1 篇。
- (3) 撰写结题报告 1 份。

6. 项目研究进度安排

2022 年 6 月——2022 年 8 月查阅资料、学习方法、进行前期实验

2022 年 9 月——2022 年 12 月实施试验方案、中期汇报、得到纯合种子、其他分子实验和生理分析、小论文撰写

2023 年 1 月——2023 年 3 月 完善实验、完善数据

2023 年 4 月——2023 年 6 月撰写结题报告，准备答辩

7. 已有基础

(1) 与本项目有关的研究积累和已取得的成绩

本研究通过 NaHCO_3 处理芸豆幼苗叶片得到了 NAC 基因转录组数据，通过对 NAC 各种功能的探究找到了与盐碱胁迫响应的芸豆 NAC 转录因子，并对其进行功能验证。

(2) 已具备的条件，尚缺少条件及解决方法

项目团队所在的课题组一直致力于开展主要农作物的逆境生理生态研究工作，理论研究和实验操作技术等方面积累丰厚。本项目申请者及成员所在单位具有作物生理生态、分子生物学等优越的试验硬件基础和研究条件，均可保障本项目的顺利实施。

三、 经费预算

开支科目	预算经费 (元)	主要用途	阶段下达经费计划 (元)	
			前半阶段	后半阶段
预算经费总额				
1. 业务费				
(1) 计算、分析、 测试费				
(2) 能源动力费				
(3) 会议、差旅费				
(4) 文献检索费				
(5) 论文出版费	5000	主要用于期刊论文发表版面费	0	5000
2. 仪器设备购置费				
3. 实验装置试制费				
4. 材料费	5000	主要用于试验材料、化学试剂、 玻璃仪器等费用	5000	0
学校拨款	0.00			
财政拨款	1.00 万			

四、 项目组成员签名



五、 指导教师意见

审核通过，同意申请。

导师（签章）：



2022 年 6 月 19 日

六、 院系推荐意见

盖章：

年 月 日

七、 学校推荐意见

盖章：

年 月 日

