麦类作物学报 2026,46(10):1303－1312
Journal of Triticeae Crops doi: 10.7606/j.issn.1009-1041.2026.10.04

网络出版时间:2026-09-03
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/61.1359.S.20260903.1104.012

TaNAC2 基因对小麦低温耐受性和农艺性状的影响

郝淑女[1,2],于宛可[2],罗 佳[1,2],马 新[1,2],杨柏松[2],王 含[2],杨淑颖[2],张慧慧[2],王 豆[2],房智羽[2],刘舍章[2],张茹萱[1,2],马守才[1],孙果忠[2]

(1.西北农林科技大学农学院,陕西杨凌 712100; 2.作物分子育种国家工程研究中心,中国农业科学院作物科学研究所,北京 100081)

摘 要:NAC转录因子在协调植物生长发育和逆境胁迫反应中发挥着重要的调控作用。为探究*TaNAC2*基因在小麦低温胁迫响应和生长发育中的功能,本研究构建了以Fielder为转化受体的*TaNAC2*转基因和基因编辑株系,在培养箱和温室环境下进行了低温胁迫耐受性、生长发育和农艺性状的比较。结果表明,在－5 ℃低温胁迫处理10 h后,与Fielder相比,其T_3代转基因株系OE8、OE11、OE14的*TaNAC2*基因相对表达水平均极显著提高($P<0.01$),相对电导率显著降低($P<0.05$);幼苗的存活率和冻害指数分别升高降低,但均无显著差异。T_4代基因编辑株系GE45(aabbdd)的*TaNAC2*基因相对表达水平显著降低($P<0.05$),幼苗的存活率降低,相对电导率和冻害指数升高,此3个竹理指标也均无显著差异;GE91(aaBBDD)的*TaNAC2*基因相对表达水平、相对电导率、幼苗存活率和冻害指数均与Fielder相近。在温室盆栽条件下,与Fielder相比,除OE11的播种至抽穗天数显著降低($P<0.05$)外,OE8、OE14、GE45、GE91的株高、分蘖、穗粒数等农艺性状均无显著差异。综上所述,*TaNAC2*基因正向调控小麦的低温胁迫耐受性,但对农艺性状无明显影响。

关键词:小麦;*TaNAC2*;低温胁迫;农艺性状;基因过表达;基因编辑

中图分类号:S512.1; S330 **文献标识码**:A **文章编号**:1009-1041(2026)10-1303-10

Effect of the *TaNAC2* Gene on Freeze Tolerance and Agronomic Traits of Wheat

Hao Shunü[1,2], Yu Wanke[2], Luo Jia[1,2], Ma Xin[1,2], Yang Baisong[2], Wang Han[2], Yang Shuying[2], Zhang Huihui[2], Wang Dou[2], Fang Zhiyu[2], Liu Hanzhang[2], Zhang Ruxuan[1,2], Ma Shoucai[1], Sun Guozhong[2]

(1. College of Agriculture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. National Engineering Research Center for Crop Molecular Breeding, Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: NAC transcription factors are pivotal in regulating plant growth, development, and stress responses. This study aims to investigate the role of the *TaNAC2* gene in wheat's adaptation to low-temperature stress and its growth development. To achieve this, we developed *TaNAC2* gene overexpression and gene-edited lines using Fielder as the transformation recipient. Subsequently, we evaluated cold stress tolerance, growth development, and agronomic traits in both controlled incubator and greenhouse. The results showed that after 10 hours of low-temperature stress treatment at －5 ℃, compared to Fielder, the relative expression level of *TaNAC2* genes in the T_3 overexpression lines OE8, OE11, and OE14 was significantly increased($P<0.01$), while relative conductivity was significantly reduced($P<0.05$); seedling survival rates increased and frost damage indices decreased, but neither showed significant differences. In the T_4-generation gene-edited line GE45(aabbdd), the relative expression level of the *TaNAC2* gene was significantly reduced($P<0.05$); seedling survival rate

收稿日期:2026-04-06 修回日期:2026-06-19
基金项目:国家重大科技专项(2023ZD0402402);财政部和农业农村部小麦产业技术体系项目(CARS-03);国家重点研发计划项目(2021YFD1200600)
第一作者 E-mail:haoshunv514@126.com(郝淑女); 18963109926@163.com(于宛可)
通讯作者 E-mail:sunguozhong@caas.cn(孙果忠); mashoucai@nwsuaf.edu.cn(马守才)

decreased, and relative conductivity and frost injury index increased, but none of these showed significant differences; in GE91(aaBBDD), the relative expression level of the *TaNAC2* gene, relative conductivity, seedling survival rate, and frost injury index were all similar to Fielder. Under greenhouse pot conditions, compared with Fielder, except that the days from sowing to heading of OE11 were significantly reduced($P<0.05$), there were no significant differences in plant height, tiller number, and spikelet number of OE8, OE14, GE45, and GE91. In summary, the *TaNAC2* gene positively regulates wheat's tolerance to low-temperature stress, but has no obvious effect on agronomic traits.
Keywords: *Triticum aestivum* L.; *TaNAC2*; Low temperature stress; Agronomic traits; Gene over expression; Gene editing

作为最大的植物特异性转录因子家族之一，NAC(NAM、ATAF1/2、CUC2)转录因子家族在植物生长发育、生物和非生物胁迫调控以及作物改良中发挥着重要作用[1-4]。NAC 的结构多样性为进化和功能分化提供了基础。NAC 蛋白通常包含高度保守的 N 端结构域和高度多样的 C 端转录激活/抑制结构域，这使得不同亚家族具有多种生物学功能[5-6]。NAC 结构域的 N 端进一步分为 5 个亚结构域 A～E，其中 A、C 和 D 亚结构域参与 DNA 结合，而 B 和 E 亚结构域参与蛋白质互作[6-7]。NACs 可通过结合靶基因启动子区调控序列，与其他转录因子相互作用，或者改变染色质结构等机制调控基因表达[8]。

NAC 基因广泛参与小麦耐旱、耐盐、种子休眠、氮吸收与代谢等的调控。研究表明，抗旱小麦品种中，在籽粒中特异表达的 5 个 *NAC* 基因参与干旱胁迫的响应[9]。*TaNAC071-A* 通过调节水分利用效率、应激反应基因表达、ABA 信号传导和侧根发育来增强小麦的抗旱性[10]。*TaSNAC8-6A* 的有利等位基因 $TaSNAC8\text{-}6A^{In\text{-}313}$ 通过 ABA 依赖途径增强抗旱性，主要表现为侧根发育增强和水分利用效率提高[11]。过表达 *TaNAC29* 可上调应激响应基因显著增强转基因拟南芥的耐盐性[12]。*TaNAC074* 与小麦穗发芽抗性相关，其过表达会显著降低种子休眠程度[13]。TaNAC2 蛋白通过与 TaLBD41 的互作来响应硝酸盐的利用，进而调控小麦的氮素吸收和代谢[14]。*TaNAC-A18* 的有利等位基因通过调控淀粉和贮藏蛋白的合成提高千粒重[15]。胚乳特异性转录因子 TaNAC019 通过结合 *TaGlu-1* 和淀粉代谢基因的启动子，调控麦谷蛋白和淀粉积累相关基因的表达，从而影响小麦籽粒的品质和产量[16]。

冻害是全球冬小麦生产的主要限制因素之一[17]。作为 NAC 家族成员之一，*TaNAC2* 已被证实参与小麦对非生物逆境的调控。过表达 *TaNAC2-5A* 基因可提高拟南芥的抗寒性和抗旱性[18]，促进小麦根系生长和硝酸盐吸收[19]。在经低温胁迫处理的小麦茎和幼穗中 *TaNAC2* 基因表达水平显著上调，说明该基因参与小麦对低温逆境胁迫的应答[20-21]。

NAC 家族成员在不同植物和环境条件下存在功能差异。在拟南芥中，过表达 *MlNAC5* 可增强其抗旱和抗寒能力，但会导致植株矮化[22]。因此，阐明 *TaNAC2* 在整合生长发育和应答低温胁迫中的作用，对于培育高产抗寒的小麦品种具有重要意义。本研究利用基因过表达(gene overexpression，OE)和基因编辑(gene editing，GE)技术对 *TaNAC2* 基因进行功能解析，以明确 *TaNAC2* 基因对小麦低温胁迫耐受性和农艺性状的影响，为合理利用 *TaNAC2* 基因进行小麦品种抗寒性改良提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

小麦品系中麦 8444 为本实验室选育，株高约 40 cm，播种至抽穗约 35 d，适合于培养箱生长[23]，可用于 *TaNAC2* 基因的克隆和表达特性分析。小麦品种 Fielder 作为构建 *TaNAC2* 基因过表达和基因编辑株系的转化受体。

1.2 方法

1.2.1 小麦幼苗的低温胁迫及 *TaNAC2* 基因扩增

(1)低温胁迫处理。挑选均匀一致的中麦 8444 种子，播种在装有营养土(购自 Pindstrup 公司，丹麦)的花盆中，培养箱的生长环境为 22 ℃、

14 h 光照,15 ℃、10 h 黑暗,相对湿度 80%,光合光子通量密度为 450 μmol·m^{-2}·s^{-1}。当幼苗生长至二叶一心(GS13,Zadoks scale[24])期时,进行低温胁迫处理。首先,按 1.5 ℃/h 的速率降温至 4 ℃,在 4 ℃条件下低温驯化 1 d。接着将温度降至−5 ℃进行 12 h 胁迫处理。低温胁迫结束后,以 1.5 ℃/h 的速率升温至 4 ℃并培养 1 d,然后从 4 ℃升至常温条件。

(2)*TaNAC2* 基因扩增。分别在低温胁迫 0、1、6 和 12 h 后,剪取中麦 8444 第二片叶,使用 Biozol RNA 提取试剂盒(百瑞极生物科技有限公司,北京)提取总 RNA,通过 EasyScript® All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMixfor qPCR 试剂盒(全式金生物技术有限公司,北京)合成 cDNA。每个处理 3 个生物学重复,每个重复 3 株。

从 Ensemble Plants 网站(http://plants.ensembl.org/Triticum_aesti vum/)下载中国春(RefSeq V1.1)的*TaNAC2* 基因的 CDS 序列(TraesCS5A02G468300.1 为 *TaNAC2A*,TraesCS5B02G480900.1 为 *TaNAC2B*,TraesCS5D02G481200.1 为 *TaNAC2D*)。利用 Primer 5.0 软件设计 *TaNAC2* 基因编码区的保守引物 NAC2-RT-F/NAC2-RT-R,以小麦 *Actin* 作为内标,设计引物 Actin-F/Actin-R(表 1)。PCR 扩增体系为 10 μL:包括模板 cDNA 1 μL,2×PerfectStart® Green qPCR SuperMix 5 μL,上、下游引物(10 μmol·L^{-1})各 0.3 μL,ddH_2O 3.4 μL;qRT-PCR 反应程序:94 ℃预变性 30 s;94 ℃变性 5 s,60 ℃退火 30 s,40 个循环;溶解曲线阶段收集荧光信号。采用 CFX96 实时荧光定量 PCR 仪(BIORAD,美国)进行 qRT-PCR 反应,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量[25]。

1.2.2　转基因及基因编辑株系的遗传转化和筛选

(1)过表达植株的遗传转化及筛选。利用包含限制酶切位点的引物 TaNAC2-CDS-F/R 扩增 *TaNAC2* 基因的开放阅读框序列并克隆到载体 pBWA(V)BU-*TaNAC2*-OE 中(图 1)。以 Fielder 为受体,委托中国农业科学院作物科学研究所王珂研究员进行小麦遗传转化。利用 *TaNAC2* 基因的 CDS 和 pBWA(V)BU-*TaNAC2*-OE 载体上的序列设计引物 TaNAC2-F/TaNAC2-R,PCR 扩增检测 *TaNAC2* 转基因后代(*TaNAC2*-OE)的阳性植株,直至筛选到遗传稳定的纯合 T_2 代株系,T_2 株系结实的 T_3 代种子用于后续的耐寒性和农艺性状评价。采用 CTAB 法提取转基因后代植株叶片的 DNA。以基因组 DNA 为模板,利用 2×Phanta® Max Master Mix(南京诺唯赞生物技术有限公司)进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系 25 μL:包括模板 DNA 1 μL,2×Phanta® Max Master Mix 12.5 μL,上、下游引物各 1 μL,ddH_2O 9.5 μL,引物浓度为 10 μmol·L^{-1}。PCR 反应程序:95 ℃预变性 3 min;95℃变性 15 s,58 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,35 个循环;72 ℃充分延伸 5 min,12 ℃保温。PCR 产物经过 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

(2)基因编辑植株的遗传转化及筛选。利用 SnapGene 6.0.2 软件对比分析 *TaNAC2* 同源基因的序列差异,通过在线程序 CRISPR-P V2.0(http://crispr.hzau.edu.cn/)设计能够靶向 3 个 *TaNAC2* 同源基因的 sgRNA 作为基因编辑靶点,PAM 序列为 CCGCGAGTGGTACTTCTTCACCC。以 pTaWOX-Cas-sgRNA 为载体构建靶向 *TaNAC2* 的基因编辑载体(图 2),委托中国农业科学院作物科学研究所王珂研究员进行小麦遗传转化。首先使用 Bar 试纸对 *TaNAC2* 基因编辑植株(*TaNAC2* gene-editing,*TaNAC2*-GE)进行初筛,得到 Bar 阳性株系,然后根据 *TaNAC2* 基因组序列,在编辑靶点两侧设计鉴定 *TaNAC2-5A*、*TaNAC2-5B*、*TaNAC2-5D* 基因的特异性引物 TaNAC2-5AF/TaNAC2-5AR、TaNAC2-5BF/TaNAC2-5BR、TaNAC2-5DF/TaNAC2-5DR。DNA 提取、PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳的步骤同上,PCR 扩增条带纯化后进行测序,用 SnapGene 6.0.2 软件分析 *TaNAC2* 基因编辑植株的序列突变类型。上述株系结实的 T_4 代种子用于后续的耐寒性和农艺性状评价。

1.2.3　转基因及基因编辑后代的低温耐受性分析

分别将小麦 *TaNAC2* 转基因植株 OE8、OE11、OE14 的 T_3 代株系和基因编辑植株 GE45、GE91 的 T_4 代株系以及 Fielder 的种子种于花盆,培养条件和低温胁迫处理同 1.2.1。

(1)*TaNAC2* 基因表达水平测定。在−5 ℃低温胁迫处理 10 h 后,参照 1.2.1 的方法,取小麦幼苗第二片叶,利用 qRT-PCR 检测 *TaNAC2* 基因表达水平,所用引物见表 1。

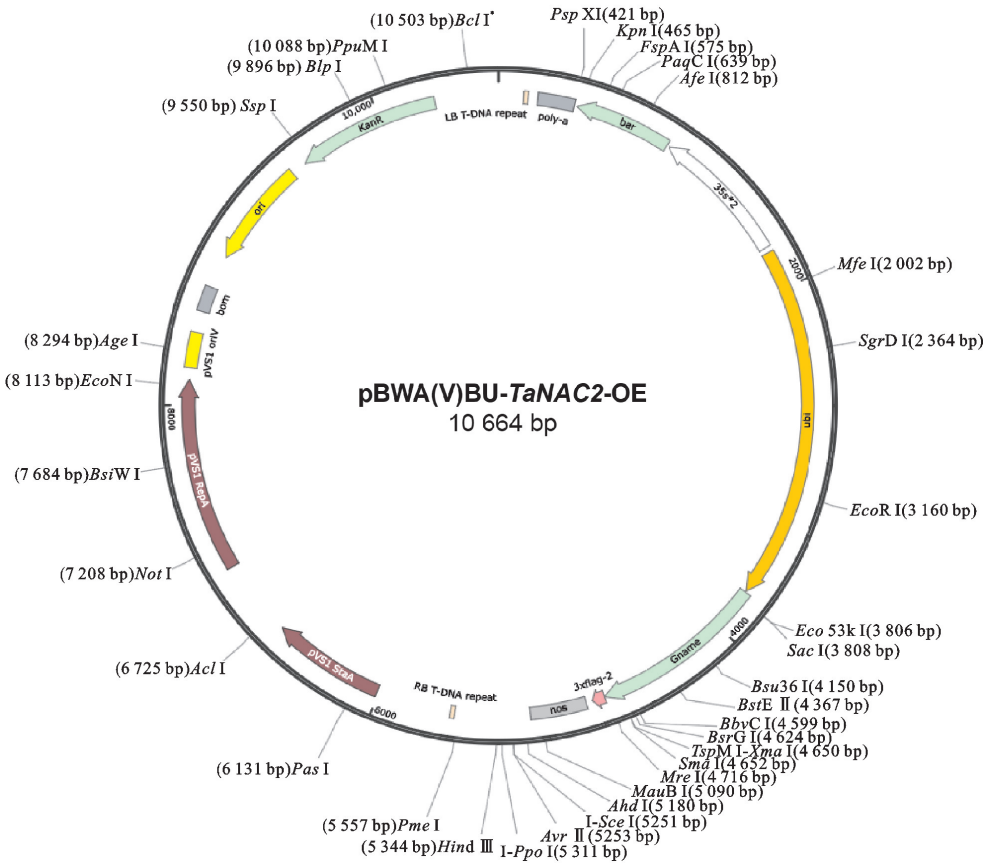


图 1 pBWA(V)BU-*TaNAC2*-OE 载体

Fig. 1 pBWA(V)BU-*TaNAC2*-OE vector

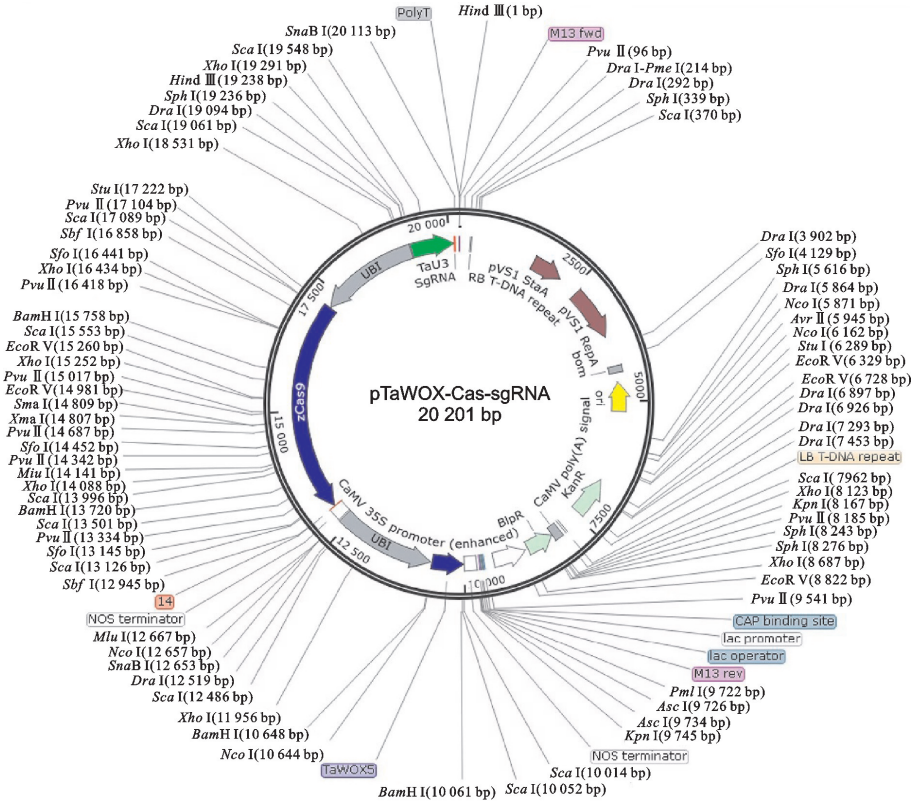


图 2 pTaWOX-Cas-sgRNA 载体图

Fig. 2 pTaWOX-Cas-sgRNA vector

表 1　本研究所用引物及用途

Table 1　Primers used in this study and their purposes

引物 Primer	序列 Sequence(5′－3′)	用途 Purpose
Actin-F	ATGGAAGCTGCTGGAATCCAT	qRT-PCR 的内标 The internal standard of qRT-PCR
Actin-R	CCTTGCTCATACGGTCAGCAATAC	
NAC2-RT-F	GACGACATCCAGAGCATGTACA	*TaNAC2* 基因在中麦 8444 叶片中的表达 *TaNAC2* gene expression in Zhongmai 8444 leaves
NAC2-RT-R	AAGAGGGAGGAGTAGAGCAG	
TaNAC2-CDS-F	TTTGGAGAGAACACGGGGGACTATGCCGGCGGTGAGGAGGAG	*TaNAC2* 基因的 CDS 扩增 CDS amplification of the *TaNAC2* gene
TaNAC2-CDS-R	AACGATCGGGGAAATTCGAGCTTTAGAACGGGGCCGGCATGC	
TaNAC2-F	TTTAGCCCTGCCTTCATACGCT	*TaNAC2* 基因过表达后代筛选 Screening of *TaNAC2*-OE offspring
TaNAC2-R	GTGGCCATCATCTCCTGGTG	
TaNAC2-5AF	CAGCTTTCTACAGACGGACA	*TaNAC2-5A* 基因编辑后代筛选 Screening of gene-edited progeny of *TaNAC2-5A*
TaNAC2-5AR	GAGGCGATACTCATGCATGA	
TaNAC2-5BF	CGACTAACAAATCAGCGGAC	*TaNAC2-5B* 基因编辑后代筛选 Screening of gene-edited progeny of *TaNAC2-5B*
TaNAC2-5BR	TTAACCCCCTTAGGCGCCTT	
TaNAC2-5DF	CAACTCTCTTCCAAGTTTCGA	*TaNAC2-5D* 基因编辑后代筛选 Screening of gene-edited progeny of *TaNAC2-5D*
TaNAC2-5DR	ACCATGTCCGACGCGGCGTG	
TaNAC2-RT2-F	GGACCTCAGCTACGATGACA	*TaNAC2* 过表达后代的基因表达 Expression of *TaNAC2* in *TaNAC2*-OE offspring
TaNAC2-RT2-R	GAGACGGGGCGAGGCGAAGA	
TaNAC2-RT45-F	CGACCTCTACCGCTTCGAC	*TaNAC2* 编辑后代的基因表达 Expression of *TaNAC2* in *TaNAC2*-GE offspring
TaNAC2-RT45-R	TGAAGAAGTACCACTCGCGG	
TaNAC2-RT91-F1	CTGCCGGCTCTACAACAAGA	
TaNAC2-RT91-R1	GGCTCCATCATCGTCTCCTC	

(2)相对电导率测定。低温胁迫结束后在 4 ℃生长 1 h，剪取小麦幼苗第二片叶，用去离子水冲洗叶片 3 次，以吸水纸吸干表面水分，将叶片剪成 1 cm 小段放入含 20 mL 去离子水的离心管中，在 25 ℃、180 r·min^{-1} 振荡 3 h，以超纯水为对照，室温环境下用电导率仪 DDS-11A(上海雷磁仪器有限公司)测定溶液电导率；将离心管放入沸水中水浴 15 min，冷却至室温后测定煮沸电导率。相对电导率＝(溶液电导率/煮沸电导率)×100%。

(3)存活率和冻害指数。正常条件下生长 5 d 后，调查小麦幼苗的冻害程度。根据叶片冻害数量将植株冻害程度分为 4 级：1 级，无叶片冻伤；2 级，1 片叶冻伤；3 级，2 片叶冻伤；4 级，3 片叶冻伤(植株冻死)。存活率和冻害指数计算如下：

$$R_{PS}=(N_{PS}/N_T)\times 100\%$$

$$F_I=\sum(N_i\times L_i)/(N_t\times L_{max})\times 100\%$$

R_{PS}、N_{PS}、N_T 及 F_I 分别指存活率、存活株数、总株数及冻害指数；N_i 为第 i 级冻害小麦幼苗数量；L_i 为第 i 级冻害级别值(1、2、3、4)；N_t 为小麦幼苗总数；L_{max} 为冻害最高级别值 4。

1.2.4　过表达及基因编辑后代的农艺性状测定

将 Fielder、*TaNAC2*-OE T_3 代和 *TaNAC2*-GE 的 T_4 代的种子种植在花盆中，每个材料 15 盆，每盆 1 株，栽培基质为营养土。温室生长条件为自然光，辅以 LED 灯光照至 16 h，黑暗 8 h；温度为 15～25 ℃。调查记载主茎的抽穗期、株高、分蘖数、穗长、穗粒数等性状。

1.3　数据分析

利用 Excel 2019 进行数据分析，用 SPSS-AU 进行独立性 t 检验分析。

2　结果与分析

2.1　低温胁迫下小麦幼苗*TaNAC2* 基因的表达

利用 qRT-PCR 检测－5 ℃低温胁迫处理后中麦 8444 幼苗的 *TaNAC2* 基因表达水平。结果(图 3)表明，随着低温胁迫时间的延长，小麦幼苗中 *TaNAC2* 基因表达量逐渐增加，在胁迫 1、6 和 12 h 时，*TaNAC2* 基因的表达量均较 0 h 极显著升高。

2.2　*TaNAC2* 转基因和基因编辑后代的筛选

以 TaNAC2-F/TaNAC2-R 为引物通过 PCR 扩增检测 *TaNAC2*-OE 的 T_0～T_2 代。结果显示，T_2 代单株中 2～7、9～12、14～16 号植株均扩增出与阳性对照大小一致的条带，与预期片段一

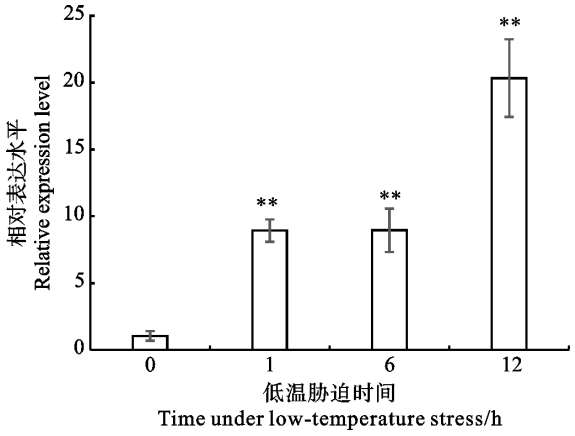
致，而 8 和 13 号植株未见该条带（图 4）。最终筛选到遗传稳定的 T_2 代纯合转基因株系*TaNAC2*-OE8、*TaNAC2*-OE11、*TaNAC2*-OE14。

利用 TaNAC2-5AF/R、TaNAC2-5BF/R、TaNAC2-5DF/R 引物对*TaNAC2* 基因编辑的 T_0～T_3 代进行靶点序列 PCR 扩增及序列比对，筛选 *TaNAC2* 基因编辑阳性株系。在 T_3 代获得 A、B、D 基因组单碱基插入导致翻译提前终止的基因编辑株系*TaNAC2*-GE45，A 基因组双碱基缺失导致翻译提前终止的基因编辑株系*TaNAC2*-GE91（图 5）。

2.3 *TaNAC2* 转基因和基因编辑后代的低温耐受性评价

由表 2 可知，*TaNAC2* 转基因株系 OE8、OE11、OE14 的 T_3 代中，*TaNAC2* 基因相对表达水平均较 Fielder 极显著升高（$P<0.01$），相对电导率较 Fielder 显著降低（$P<0.05$），其 T_3 代存活率略升高，冻害指数有降低，均未有显著差异。

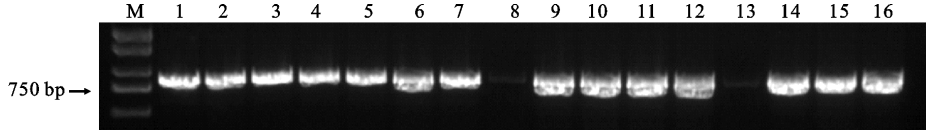
在 −5 ℃胁迫处理 10 h 后，T_4 代*TaNAC2* 基因编辑株系 GE45 的*TaNAC2* 基因相对表达水平较 Fielder 显著降低（$P<0.05$），存活率较 Fielder 降低，相对电导率和冻害指数升高，但生理指标均无显著差异。GE91 株系的*TaNAC2* 基因相对表达水平、相对电导率、存活率和冻害指数均与 Fielder 相近。低温处理前、后小麦见图 6。



* *：$P<0.01$。

图 3 低温胁迫下小麦幼苗中*TaNAC2* 基因的表达

Fig. 3 Expression of *TaNAC2* gene in wheat seedlings uder low-temperature stress

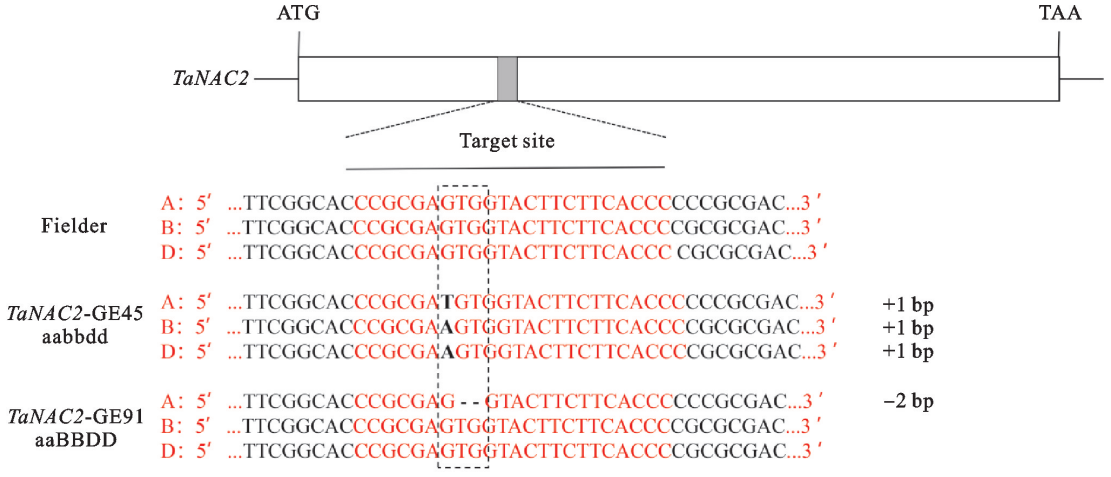


M：2 000 bp marker；1：质粒（阳性对照）；2～16：*TaNAC2*-OE 的 T_2 代单株。

M：2 000 bp marker；1：Plasmid (positive control)；2—16：T_2 plants of *TaNAC2*-OE.

图 4 *TaNAC2* 基因过表达植株的 PCR 检测

Fig. 4 PCR detection of *TaNAC2* overexpression plants



Fielder、*TaNAC2*-GE45、*TaNAC2*-GE91 株系的靶点突变类型，红色字体代表 sgRNA 序列，黑色加粗代表碱基插入，黑色虚线代表碱基缺失。

Target mutation types of Fielder, *TaNAC2*-GE45, and *TaNAC2*-GE91 lines. Red fonts indicate the sgRNA sequence, black bold indicates base insertions, and black dashed line indicates base deletions.

图 5 *TaNAC2* 基因编辑靶点及基因编辑株系中的靶标突变类型

Fig. 5 *TaNAC2* gene editing targets and types of mutations in gene-edited lines

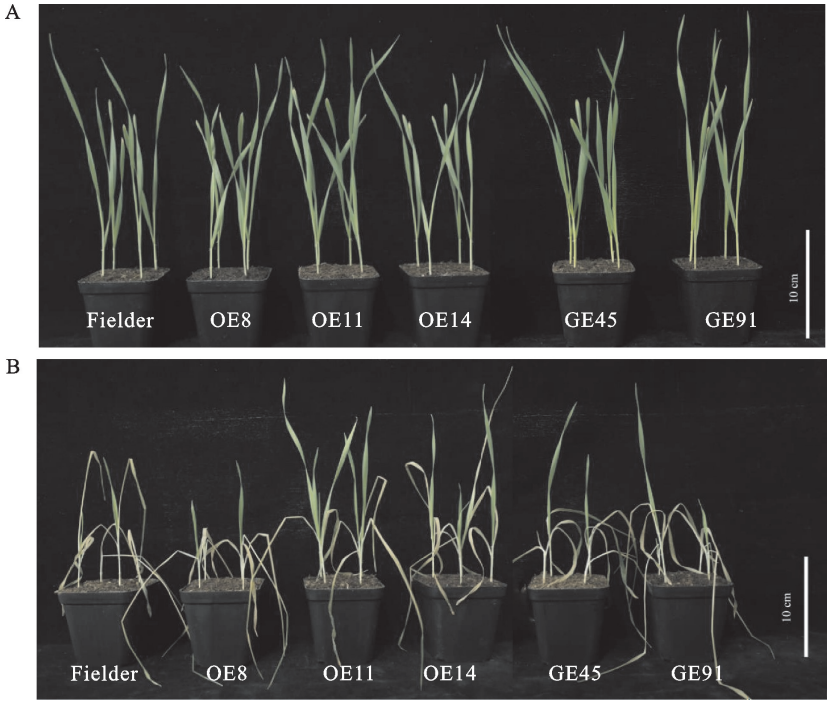
表 2　*TaNAC2* 转基因和基因编辑株系的低温耐受性指标

Table 2　Low-temperature tolerance index of *TaNAC2* transgenic and gene-edited lines

材料 Material	*TaNAC2* 基因相对表达水平 Relative expression level of *TaNAC2*	相对电导率 Relative conductivity/%	存活率 Survival rate/%	冻害指数 Freeze index
Fielder	1.00±0.07	80.29±3.99	21.00±12.37	94.69±3.09
OE8	10.61±1.58**	68.59±7.07*	34.38±4.42	91.41±1.10
OE11	7.70±0.65**	59.15±8.35*	51.20±7.14	87.20±1.78
OE14	5.70±0.43**	70.79±3.26*	41.67±23.57	89.58±5.89
GE45	0.66±0.20*	84.50±3.12	7.25±3.18	98.44±2.21
GE91	1.03±0.13	80.59±1.92	25.00±8.84	93.75±2.21

*：$P<0.05$；**：$P<0.01$。下同。

*: $P<0.05$; **: $P<0.01$. The same in table 3.



A：低温处理前；B：低温处理后常温恢复 5 d。

A: Before low-temperature treatment; B: Recovery at normal temperature for 5 days after low-temperature treatment.

图 6　低温胁迫后*TaNAC2* 转基因和基因编辑株系幼苗

Fig. 6　*TaNAC2* transgenic and gene-edited lines after low-temperature stress

2.4　*TaNAC2* 转基因和基因编辑后代的农艺性状及表型

由表 3 及图 7 可知，*TaNAC2* 转基因株系 OE11 的 T_3 代中，播种至抽穗天数较 Fielder 显著缩短（$P<0.05$），株高、分蘖数、小穗数、穗长、穗粒数较 Fielder 均无显著性差异；*TaNAC2* 转基因株系 OE8、OE14 的 T_3 代中，播种至抽穗的天数、株高、分蘖数、小穗数、穗长、穗粒数较 Fielder 均无显著性差异；T_4 代 *TaNAC2* 基因编辑株系 GE45、GE91 的播种至抽穗天数、株高、分蘖数、小穗数、穗长、穗粒数较 Fielder 均无显著性差异。这说明 *TaNAC2* 基因过表达和基因编辑均没有对 Fielder 的农艺性状产生明显影响。

3　讨论

NAC 是植物特有的转录因子，广泛参与植物的生长发育[14-15]和逆境响应[26-27]。拟南芥、水稻、小麦等植物中均有多个 *NAC* 基因被报道。因此，明确 NAC 转录因子调控小麦低温耐受性和生长发育的协同效应，对培育高产耐寒的小麦品种具有重要的参考价值。

表 3 温室生长条件下*TaNAC2* 基因过表达和基因编辑株系的农艺性状

Table 3 Agronomic traits of *TaNAC2* transgenic and gene-edited wheat lines under greenhouse growth conditions

材料 Material	播种至抽穗天数 The interval from emergence to heading/d	株高 Plant height/cm	单株分蘖数 Tiller number per plant	每穗小穗数 Spikelet number per spike	穗长 Spike length/cm	穗粒数 Kernels per spike
Fielder	60.47±1.31	71.01±2.81	5.40±1.54	14.67±1.19	8.92±0.73	38.20±3.37
OE8	59.53±1.50	72.33±3.75	5.60±1.85	14.80±1.28	8.94±0.61	39.33±5.52
OE11	59.25±1.68*	71.64±4.57	6.25±2.33	15.38±0.93	9.06±0.63	40.00±4.83
OE14	60.00±2.42	70.54±3.66	5.69±1.96	13.75±2.11	8.80±1.00	36.53±4.70
GE45	59.80±2.93	73.58±5.16	6.40±1.70	15.47±1.09	9.35±0.53	40.53±4.13
GE91	60.43±2.17	66.57±7.57	4.79±1.48	14.29±1.59	8.91±0.78	36.38±7.11



图 7 *TaNAC2* 基因过表达和基因编辑株系表型

Fig. 7 Phenotype of *TaNAC2* gene-overexpressing and gene-edited lines

3.1 过表达*TaNAC2* 基因对小麦苗期低温耐受性的影响

NAC 基因已被证实广泛参与植物的低温耐受性调控。研究发现，水稻*ONAC095* 基因正向调控水稻的耐寒性，该基因敲除系表现为冷响应基因下调表达[26]；在拟南芥中，过表达小麦的*TaNAC2-5A* 和南荻(*miscanthus lutarioriparius*)的*MlNAC5* 基因可提高植株耐寒性[18,22]。本研究中，在−5 ℃低温胁迫下，*TaNAC2* 基因过表达株系 OE8、OE11、OE14 的存活率升高，冻害指数降低；基因编辑株系*TaNAC2*-GE91 的存活率和冻害指数与 Fielder 无差异，而 A、B、D 三个基因组突变的*TaNAC2*-GE45 株系存活率降低，冻害指数升高。这一现象与小麦转录因子 TaNAC47 的研究结果一致[28]。拟南芥 CBF(c-repeat binding factor)转录因子家族的研究结果表明，冷驯化后的*cbfs* 三突变体对冷胁迫显著敏感[29]。本研究表明*TaNAC2* 在 A、B、D 基因组上的 3 个同源拷贝功能高度保守，共同正向调控小麦低温耐受性，单拷贝缺失不影响低温耐受性。本研究中低温处理后*TaNAC2* 过表达和基因编辑株系的植株存活率与相对电导率呈负相关，这与冬小麦相关研究结果一致[30]。在本研究中，*TaNAC2*-OE8 的转录本水平(10.61 倍)高于 OE11(7.70 倍)，但其低温存活率(34.38%)反而低于 OE11(51.20%)。其与 Yu 等[31]发现*stch4* 突变体中 CBFs 转录因子的转录本水平升高，但蛋白水平却下降的结论相似，说明了转录本丰度与蛋白功能在冷响应中的不协调性，后续需结合蛋白表达进一步解析*TaNAC2* 转录后的调控机制。

本研究中，基因过表达和基因编辑株系的*TaNAC2* 表达水平存在显著差异，但存活率和冻伤指数均无显著差异。这说明小麦中可能存在其他 NAC 家族成员或代谢通路对*TaNAC2* 的缺失/过表达有补偿效应。已知植物中存在 CBF 依赖和非依赖两种类型的低温信号调控通路。一些 NAC 转录因子，如 GmNAC20[32]、MaNAC1[33]、PbeNAC1[34]等，可以通过 CBF-COR 信号级联调

节植物耐低温反应；还有一些 NAC 转录因子，如 NAC63[35]、SNAC2[36]、NAC20[32] 等，可以通过 CBF 非依赖途径参与植物冷响应。因此，*TaNAC2* 是通过上述哪种途径调控小麦耐低温特性需要进一步探索。

3.2 *TaNAC2* 基因对小麦生长发育调控的环境依赖性分析

植物在生长发育的不同阶段均会遭受干旱、高温、寒冷、盐碱、养分缺乏等逆境胁迫，NAC 转录因子在协调植物发育和逆境胁迫反应中发挥着关键的调控作用[8]。本研究温室盆栽生长条件下，与 Fielder 相比，除 OE11 的播种至抽穗天数显著降低外，OE8、OE14、GE45、GE91 的株高、分蘖数、穗粒数等农艺性状均无显著差异。说明 *TaNAC2* 对植物生长发育的表达调控可能具有环境依赖性；与低温胁迫条件下不同，在有利的生长环境条件下 *TaNAC2* 基因的作用降低。研究表明，*TaNAC2* 基因对小麦产量相关性状的影响主要与其调控逆境胁迫的耐受性有关。在低磷条件下，TaNAC2-5B 与 TaMPKKK18-3B、TaMPKK1.2-6B 和 TaMPK2-1D 形成一个 MAPK 调控模块，能够激活磷转运体基因 *TaPT2*、酸性磷酸酶基因 *TaAP1* 和根系发育相关基因 *TaPIN3* 的表达，提高小麦在低磷环境下的产量[37]。在低氮环境下，*TaNAC2-5A* 通过调控硝酸盐转运体基因 *TaNRT2.5-3B* 的表达来影响小麦籽粒硝酸盐的积累和种子活力[38]。在干旱胁迫条件下，*TaNAC2* 能够结合 *TaFAR5* 基因的启动子并调控其表达，参与角质层蜡质的合成，提高小麦的抗旱能力[39]。在人工气候室条件下，*TaNAC2* 参与负调控小麦分蘖数和根中细胞分裂素氧化酶 *TaCKX* 的活性；而在田间条件下，其表达模式和调控功能则有所不同[40]。因此，未来还需要在多个田间环境条件下进行 *TaNAC2* 基因功能的验证。

4　结论

本研究采用转基因过表达和基因编辑技术手段研究了 *TaNAC2* 基因对小麦低温耐受性和农艺性状的影响。在 −5 ℃ 胁迫处理 12 h 过程中，中麦 8444 幼苗中 *TaNAC2* 基因表达量随着胁迫时间的延长而极显著上升。在 −5 ℃ 胁迫处理 10 h 后，T_3 代基因过表达株系 OE8、OE11、OE14 的 *TaNAC2* 基因相对表达水平均极显著提高，相对电导率显著降低；幼苗的存活率升高，冻害指数降低，但均无显著差异。T_4 代基因编辑株系 GE45（aabbdd）的 *TaNAC2* 基因相对表达水平显著降低，幼苗的存活率降低，相对电导率和冻害指数升高，但均无显著差异；GE91（aaBBDD）的 *TaNAC2* 基因相对表达水平、相对电导率、幼苗存活率和冻害指数均与对照接近。在温室盆栽条件下，与对照相比，除 OE11 的播种至抽穗天数显著降低外，OE8、OE14、GE45、GE91 的株高、分蘖数、穗粒数等农艺性状均无显著差异。综上，*TaNAC2* 基因正向调控小麦的低温胁迫耐受性，其在 A、B、D 基因组上的 3 个同源拷贝功能高度保守且存在冗余，单个拷贝缺失不影响低温耐受性；其对小麦生长发育的调控具有环境依赖性。本研究结果可为合理利用 *TaNAC2* 基因进行小麦品种改良提供依据。

参考文献：

[1]Baranwal V K, Khurana P. Genome-wide analysis, expression dynamics and varietal comparison of NAC gene family at various developmental stages in *Morus notabilis* [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2016, 291(3): 1305.

[2]Nuruzzaman M, Sharoni A M, Satoh K, *et al*. NAC transcription factor family genes are differentially expressed in rice during infections with rice dwarf virus, rice black-streaked dwarf virus, rice grassy stunt virus, rice ragged stunt virus, and rice transitory yellowing virus [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 676.

[3]Lu M, Sun Q P, Zhang D F, *et al*. Identification of 7 stress-related NAC transcription factor members in maize (*Zea mays* L.) and characterization of the expression pattern of these genes [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 462(2): 144.

[4]Han K J, Zhao Y, Sun Y H, *et al*. NACs, generalist in plant life [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(12): 2433.

[5]Singh S, Koyama H, Bhati K K, *et al*. The biotechnological importance of the plant-specific NAC transcription factor family in crop improvement [J]. *Journal of Plant Research*, 2021, 134(3): 475.

[6]Olsen A N, Ernst H A, Leggio L L, *et al*. NAC transcription factors: Structurally distinct, functionally diverse [J]. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(2): 79.

[7]Mohanta T K, Yadav D, Khan A, *et al*. Genomics, molecular and evolutionary perspective of NAC transcription factors [J]. *PLoS One*, 2020, 15(4): e0231425.

[8]Xiong H Y, He H D, Chang Y, *et al*. Multiple roles of NAC transcription factors in plant development and stress responses [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2025, 67(3): 510.

[9]Guérin C, Roche J, Allard V, *et al*. Genome-wide analysis, expansion and expression of the NAC family under drought and heat stresses in bread wheat (*T. aestivum* L.) [J]. *PLoS One*, 2019, 14(3): e0213390.

[10]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 [J]. *Molecular Plant*, 2022, 15(2): 276.

[11]Mao H D, Li S M, Wang Z X, *et al*. Regulatory changes in *TaSNAC8-6A* are associated with drought tolerance in wheat seedlings [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(4): 1078.

[12]Xu Z Y, Gongbuzhaxi, Wang C Y, *et al*. Wheat NAC transcription factor TaNAC29 is involved in response to salt stress [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2015, 96: 356.

[13]Jiang H, Fang Y, Yan D, *et al*. Genome-wide association study reveals a NAC transcription factor TaNAC074 linked to pre-harvest sprouting tolerance in wheat [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2022, 135(9): 3265.

[14]Jing Y F, Shen C C, Li W J, *et al*. TaLBD41 interacts with TaNAC2 to regulate nitrogen uptake and metabolism in response to nitrate availability [J]. *New Phytologist*, 2024, 242(2): 641.

[15]Wang X L, Liu Y C, Hao C Y, *et al*. Wheat *NAC-A18* regulates grain starch and storage proteins synthesis and affects grain weight [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2023, 136(6): 123.

[16]Gao Y J, An K X, Guo W W, *et al*. The endosperm-specific transcription factor TaNAC019 regulates glutenin and starch accumulation and its elite allele improves wheat grain quality [J]. *The Plant Cell*, 2021, 33(3): 603.

[17]Zhang J B, Huan H J, Qiu C, *et al*. Accurate classification of wheat freeze injury severity from the color information in digital canopy images [J]. *PLoS One*, 2024, 19(8): e0306649.

[18]Mao X G, Zhang H Y, Qian X Y, *et al*. TaNAC2, a NAC-type wheat transcription factor conferring enhanced multiple abiotic stress tolerances in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(8): 2933.

[19]He X, Qu B Y, Li W J, *et al*. The nitrate-inducible NAC transcription factor TaNAC2-5A controls nitrate response and increases wheat yield [J]. *Plant Physiology*, 2015, 169(3): 1991.

[20]Yao D Y, Wang J, Peng W T, *et al*. Transcriptomic profiling of wheat stem during meiosis in response to freezing stress [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 13: 1099677.

[21]马 新, 王 娟, 姚丹妤, 等. 小麦幼穗在减数分裂期响应低温胁迫的转录组分析[J]. 麦类作物学报, 2025, 45(11): 1451.
Ma X, Wang J, Yao D Y, *et al*. Transcriptome analysis of wheat young spikes in response to low temperature stress at meiosis stage [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2025, 45(11): 1451.

[22]Yang X W, Wang X Y, Ji L, *et al*. Overexpression of a *Miscanthus lutarioriparius* NAC gene *MlNAC5* confers enhanced drought and cold tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Reports*, 2015, 34(6): 943.

[23]王 娟, 刘 翼, 姚丹妤, 等. 小麦生殖发育阶段对低温的敏感性鉴定[J]. 作物学报, 2022, 48(7): 1721.
Wang J, Liu Y, Yao D Y, *et al*. Identification on sensitivity of wheat to low temperature at reproductive stages [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2022, 48(7): 1721.

[24]Zadoks J C, Chang T T, Konzak C F. A decimal code for the growth stages of cereals [J]. *Weed Research*, 1974, 14(6): 415.

[25]Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402.

[26]HUANG L, HONG Y B, ZHANG H J, *et al*. Rice NAC transcription factor ONAC095 plays opposite roles in drought and cold stress tolerance [J]. *BMC Plant Biology*, 2016, 16(1): 203.

[27]Diao P F, Chen C, Zhang Y Z, *et al*. The role of NAC transcription factor in plant cold response [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2020, 15(9): 1785668.

[28]Zhang L, Zhang L, Xia C, *et al*. The novel wheat transcription factor TaNAC47 enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 6: 1174.

[29]Jia Y, Ding Y, Shi Y, *et al*. The *cbfs* triple mutants reveal the essential functions of *CBFs* in cold acclimation and allow the definition of CBF regulons in *Arabidopsis* [J]. *New Phytologist*, 2016, 212(2): 345-353.

[30]李卓夫, 李 莹, 王晓楠. 不同抗寒性冬小麦品种间冷冻后电导率与成活率比较分析[J]. 东北农业大学学报, 2014, 45(06): 1-5.
Li Z F, Li Y, Wang X N. Comparative analysis of electrolyte leakage and survival rate after freezing among winter wheat varieties with different cold tolerance [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2014, 45(06): 1-5.

[31]Yu H, Kong X, Huang H, *et al*. STCH4/REIL2 confers cold stress tolerance in *Arabidopsis* by promoting rRNA processing and CBF protein translation [J]. *Cell Reports*, 2020, 30(1): 229-242, e5.

[32]Hao Y J, Wei W, Song Q X, *et al*. Soybean NAC transcription factors promote abiotic stress tolerance and lateral root formation in transgenic plants [J]. *The Plant Journal*, 2011, 68(2): 302.

[33]Shan W, Kuang J F, Lu W J, *et al*. Banana fruit NAC transcription factor MaNAC1 is a direct target of MaICE1 and involved in cold stress through interacting with MaCBF1 [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2014, 37(9): 2116.

[34]Jin C, Li K Q, Xu X Y, *et al*. A novel NAC transcription factor, *PbeNAC1*, of *Pyrus betulifolia* confers cold and drought tolerance *via* interacting with *PbeDREBs* and activating the expression of stress-responsive genes [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1049.

[35]Duan A Q, Yang X L, Feng K, *et al*. Genome-wide analysis of NAC transcription factors and their response to abiotic stress in celery (*Apium graveolens* L.) [J]. *Computational Biology and Chemistry*, 2020, 84: 107186.

[36]Hu H H, You J, Fang Y J, *et al*. Characterization of transcription factor gene *SNAC2* conferring cold and salt tolerance in rice [J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 67(1): 169.

[37]Zhang Y Y, Li X Q, Guo L, *et al*. The MAPK regulatory module TaMPKKK18-3B/TaMPKK1. 2-6B/TaMPK2-1D/TaNAC2-5B regulates low-P stress response in *Triticum aestivum* [J]. *The Plant Journal*, 2025, 124(4): e70589.

[38]Li W J, He X, Chen Y, *et al*. A wheat transcription factor positively sets seed vigour by regulating the grain nitrate signal [J]. *New Phytologist*, 2020, 225(4): 1667.

[39]Liu Y L, Chen B, Qin Z, *et al*. TaFAR5-TaFAR3 module regulates cuticular wax biosynthesis and drought tolerance in wheat [J]. *New Phytologist*, 2025, 248(4): 1802.

[40]Szala K, Ogonowska H, Lugowska B, *et al*. Different sets of *TaCKX* genes affect yield-related traits in wheat plants grown in a controlled environment and in field conditions [J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 496.