

新疆野苹果 NAC 基因分析及抗腐烂病基因筛选

周童^{1,2}, 李小双^{1,3}, 刘晓洁^{1,4}, 丁雨^{1,4}, 文雪静^{1,4}, 张道远^{1,3*}

(¹中国科学院新疆生态与地理研究所·荒漠与绿洲生态国家重点实验室, 乌鲁木齐 830011; ²石河子大学生命科学学院, 新疆石河子 832003; ³中国科学院吐鲁番沙漠植物园, 新疆吐鲁番 838008; ⁴中国科学院大学, 北京 100049)

摘要:【目的】探明新疆野苹果(*Malus sieversii*)中NAC基因资源,筛选潜在的抗腐烂病NAC基因。【方法】以模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的NAC蛋白为种子构建隐马可夫模型,从新疆野苹果转录组数据库中鉴定NAC转录因子,利用ProtParam及qRT-PCR等手段对其理化性质、亚细胞定位、保守基序、系统进化及腐烂病菌感染后的表达谱进行分析。【结果】从新疆野苹果中鉴定到165个NAC基因,根据蛋白系统进化关系分为12个亚组,且MsNACs在各亚组间分布不均。蛋白理化性质分析结果表明,MsNACs大多属酸性,且多为亲水性蛋白。保守基序分析结果表明,大多数MsNAC转录因子拥有由7个保守基序组成的完整NAC结构域,少数存在亚结构域的缺失。膜结合域分析结果表明,有18个MsNACs蛋白具有膜结合域,且大多定位于细胞核,少数定位于内质网、线粒体等其他细胞器。表达分析结果表明,34个MsNACs在腐烂病菌感染后差异表达,可根据表达模式分为A、B、C三个亚簇,其中MsNAC073和MsNAC102表达变化剧烈,分别在5 dpi下调近6倍和上调近140倍。【结论】基于新疆野苹果转录组数据,首次对MsNAC家族基因进行鉴定、分类和表达量分析,为新疆野苹果抗病响应关键NAC基因的功能研究奠定了基础,也为其他物种中抗病基因的筛选提供了参考。

关键词:新疆野苹果;NAC转录因子;苹果腐烂病;抗病基因

中图分类号:S661.1

文献标志码:A

文章编号:1009-9980(2020)08-1111-11

Identification, classification and expression analysis of NAC transcriptional factor genes in *Malus sieversii* during canker disease response

ZHOU Tong^{1,2}, LI Xiaoshuang^{1,3}, LIU Xiaojie^{1,4}, DING Yu^{1,4}, WEN Xuejing^{1,4}, ZHANG Daoyuan^{1,3*}

(¹Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences/State Key Laboratory of Desert and Oasis Ecology, Urumqi 830011, Xinjiang, China; ²College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang, China; ³Turpan Desert Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Turpan 838008, Xinjiang, China; ⁴University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: 【Objective】The work aimed at identification and analysis of NAC gene family in order to explore the potential canker-resistance gene resources in *Malus sieversii*, the ancestor of domestic apple. 【Methods】The sequences of AtNACs were downloaded from the PlantTFDB v4.0 database to establish Hidden Markov Model (HMM) for identifying the MsNACs from the full-length transcriptome database of *M. sieversii*. MEME suite.11.2 was used to analyze the conserved motif with the maximum search value (7). Phylogenetic tree of MsNACs and AtNACs was generated by MEGA 6.0 with neighbor-joining (NJ) method. The physicochemical properties, membrane-bound domain and subcellular localization of MsNACs were analyzed by ProtParam, TMHMM and WoLF PSORT software, separately. The qRT-PCR was used to validate the MsNACs gene expression patterns under the infection of canker pathogen (*Cytospora mali*). 【Results】165 MsNACs of *M. sieversii* were obtained, which differed from each other in molecular weight (MW), theoretical isoelectric point (IP) and hydrophobicity. The maxi-

收稿日期:2019-12-30 接受日期:2020-05-15

基金项目:中国科学院西部之光项目(2016-QNXZ-B-17);国家重点研发计划(2016YFC0501505)

作者简介:周童,男,在读硕士研究生,研究方向:植物抗逆分子机制。Tel:13980569720, E-mail:zhoutong.cn@outlook.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel:0991-7885315, E-mail:zhangdy@ms.xjb.ac.cn

mum MW was 95.86 ku (859 aa) and the minimum was 6.77 ku (58 aa). These MsNACs were divided into 12 subgroups (I – XII) according to the phylogenetic analysis, and AtNACs and MsNACs were both included in each subgroup. However, the proportion of MsNACs and AtNACs in subgroups were dramatically different. The 113 of 165 MsNACs had integral NAC domain and the others had one or more subdomains missed. Conserved motifs analysis showed that NAC domains of MsNACs were composed of 7 conserved motifs. We identified 5 subdomains A (composed of motif 1), B (composed of motif 5), C (composed of motif 4 and 3), D (composed of motif 2 and 7), E (composed of motif 6). In addition, membrane-bound domain analysis showed that 18 of 165 MsNACs had the membrane bound domain, which belonged to subgroup III (1), VII (1), VIII (6), IX (9) and X (1). Subcellular location analysis indicated that most of the MsNACs were located in nucleus while the other MsNACs were located in different organelles such as chloroplast (MsNAC034), endoplasmic reticulum (MsNAC046) and cytoplasm (MsNAC025). Thirty-four *MsNACs* were significantly differentially expressed under the infection of the *C. mali* pathogen based on the RNA-seq data, and were predominantly clustered into 3 clades. The clade A *MsNACs* (6) showed increased expression levels at 1-2 dpi and were decreased at 5 dpi. The the clade B *MsNACs* (20) were highly expressed at 0 dpi and were down-regulated at 1-5 dpi. On the contrary, clade C *MsNACs* (8) were up-regulated in the late stage of infection (5 dpi). Furthermore, 12 *MsNACs* were selected to validate their expression patterns by qRT-PCR, and were consistent with RNA-seq profiles. On the 5th day post infection, *MsNAC073* (homologous with *AtNTL9*, AT4G35580) were decreased by 6-fold, while *MsNAC102* (homologous with *AtSMB*, AT1G79580) were increased by 140-fold compared with the control. 【Conclusion】 In general, the *MsNACs* played important roles during the response to canker infection in *M. sieversii*. The research could lay a foundation for further functional studies of the *MsNACs*, and provide a reference for screening disease-response NAC genes in other species.

Key words: *Malus sieversii*; NAC transcriptional factor; Apple tree *Cytospora* canker (*Cytospora mali*); Resistance genes

NAC 转录因子是一类植物特有的转录因子,得名于 NAM(NO APICAL MERISTEM)、ATAF(AC-TIVATION FACTOR1)及 CUC2(CUP-SHAPED COTYLEDON2)等 3 个较早发现的家族成员的首字母^[1-2]。NAC 转录因子因其数目众多且功能复杂多样,备受人们关注。大量的研究证实 NAC 转录因子参与植物抗病^[3-4]、抗盐、抗旱等抗逆过程^[5-6],且在植物分生组织发育^[1-2]、次生细胞壁合成^[7-9]、叶片衰老^[10]等生长发育过程中也发挥了关键的调控作用。近年来,随着高通量测序技术的发展,利用基因组或转录组数据对一个物种中所有 NAC 家族基因进行鉴定和筛选已成为靶定抗逆关键基因的主流方法。目前,基于组学数据已从多种植物中鉴定出了丰富的 NAC 基因资源,如从草莓(*Fragaria × ananassa*)、梅(*Prunus mume*)及亚洲梨(*Pyrus pyrifolia*)中就分别鉴定出 112、113 及 185 个 NAC 基

因^[11-13]。

新疆野苹果(*Malus sieversii*)是现代栽培苹果(*Malus domestica*)的祖先,主要分布在天山野果林^[14]。作为天山野果林建群树种的新疆野苹果,被列为中国濒危二级重点保护植物和国家具有生物多样性国际意义的优先保护物种^[15-16]。新疆野苹果是我国西部地区的重要砧木资源,经长期环境驯化形成了耐寒、耐旱、抗虫等优良的抗逆性状,此外新疆野苹果还对黑心病、火疫病及青霉病等多种生物胁迫具有较强抗性,为栽培苹果的遗传改良提供了丰富的种质资源^[17-20]。然而受综合因素影响,近十年来新疆野苹果林遭受了毁灭性的生态危害,大面积的野苹果纯林衰败甚至死亡,而包括腐烂病在内的病虫害爆发是野苹果林大面积死亡的重要原因之一^[21]。苹果树腐烂病(apple tree *Cytospora* canker)是由苹果壳囊孢属(*Cytospora mali*),即苹果黑

腐皮壳菌(*Valsa mali*)引起的枝干皮层腐烂病害,严重危害我国乃至世界苹果的农业生产,每年造成大量的经济损失。因此,加快新疆野苹果腐烂病相关研究,对于抢救性保护新疆野苹果这一宝贵的天然经济林基因资源库和新疆天山野果林有重要意义。

笔者以已获得的腐烂病病原菌侵染(0、1、2、5 d)后新疆野苹果全长转录组为基础,对新疆野苹果NAC家族基因进行鉴定、分类及表达分析,并进一步利用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)对NAC基因在腐烂病菌侵染后的表达特征进行验证和分析,以期新疆野苹果中的抗腐烂病相关NAC家族基因资源的进一步挖掘、研究和利用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料及处理

试验材料采自新疆伊犁新源县野果林1号样地,选取健康新疆野苹果枝条截断为15 cm长枝段,保湿处理带回实验室。枝条以清水洗净,用体积分数70%的乙醇浸泡10 min,再用无菌水冲洗、晾干并以划布轮刺伤法^[22]刺伤枝条以便接菌。用打孔器(直径5 mm)在培养3 d的腐烂病菌EG11(*C. mali*)^[23]菌落边缘打孔,取菌饼长有菌丝一面贴合在刺伤部位接菌,接种PDA培养基作为对照,接菌部位包裹浸湿的无菌脱脂棉,再用封口膜包扎保湿,25℃暗培养5 d。转录组测序采样时间点分别为侵染后0、1、2、5 d(计作0 dpi、1 dpi、2 dpi、5 dpi)。三代全长转录组测序采用PacBio测序技术获得25.71 G高质量转录组数据,总共获得48 428个unigenes,其中转录因子总数为3 877个。本研究对NAC转录因子家族进行分析。

1.2 新疆野苹果NAC转录因子家族基因检索与鉴定

自植物转录因子数据库v4.0(<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/>)下载拟南芥NAC转录因子蛋白序列,利用Hmmer 3.0软件建立隐马尔可夫模型,利用Hmsearch自新疆野苹果转录组数据库中检索出候选NAC蛋白候选序列。去除冗余后(identification > 98%),利用SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)逐一一对候选序列中是否存在NAC结构域进行验证,去除不含NAC结构域的候选序列,最终得到新疆野苹果NAC蛋白的序列信息。

1.3 新疆野苹果NAC转录因子蛋白质理化性质、膜结合域及亚细胞定位预测

利用ProtParam (<https://web.expasy.org/prot->

param/)预测NAC转录因子的理化性质;利用TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>)和SMART查找NAC转录因子的潜在膜结合域;利用WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp>)对拥有膜结合域的NAC转录因子的亚细胞定位进行预测;利用cNLS Mapper(http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi)查找MsNACs中的核定位信号。

1.4 新疆野苹果NAC转录因子家族基因系统进化分析

引入拟南芥NAC转录因子蛋白序列,用于新疆野苹果NAC转录因子家族系统进化分析。利用MEGA 6.0软件对新疆野苹果NAC结构域及拟南芥NAC结构域序列进行多重比较分析,采用相邻连接法(Neighbor-joining, NJ)构建系统发育树,对构建的树进行自检(bootstrap),重复设定为1 000。利用iTOL (<https://itol.embl.de/>)对系统进化树进行修饰。

1.5 新疆野苹果NAC转录因子NAC结构域保守基序分析

利用MEME suite.11.2 (<http://meme-suite.org>)在线平台对新疆野苹果NAC蛋白的NAC结构域的保守基序(motif)进行分析,最大motif检索数值设定为7,其余参数保持默认。

1.6 野苹果NAC转录因子家族基因在腐烂病胁迫下的基因表达特征分析

根据腐烂病病原菌侵染后新疆野苹果转录组数据,利用Rstudio绘制腐烂病侵染后MsNACs的表达模式热图。用柱式植物总RNA抽提纯化试剂盒(Sangon Biotech, B518631, 中国)提取腐烂病侵染后树皮的总RNA,用PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser(TAKARA, RR047A, 日本)反转录合成cDNA,随后用TB Green Premix Ex Taq (TaKaRa, RR420A, 日本)进行qRT-PCR验证,内参基因为*MsEF1-α*,引物序列如表1所示。qRT-PCR反应体系为稀释20倍的cDNA模板1.6 μL,上下游引物各0.8 μL、2×TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 10 μL、ddH₂O 6.8 μL。采用两步法PCR,反应程序为95℃预热30 s,95℃变性5 s、58~61℃30 s,共40个循环,95℃10 s,65℃5 s,60℃读取荧光值。定量仪器为CFX96实时荧光定量PCR仪(BIO-RAD, 美国),每种样品进行3次生物

表1 新疆野苹果 *MsNACs* 定量引物
Table 1 qRT-PCR Primers for *MsNACs*

基因名称 Gene name	正向引物序列(5'-3') Forward primer sequence	反向引物序列(5'-3') Reverse primer sequence
MsEF1- α	CGACCACCACTGGTCATCTT	GCTCGGCCTTAAGCTTGTC
MsNAC024	TCAATTAGCCCCTGAGGAATAC	GGTTCTTTCGCTCACCTTGC
MsNAC026	AGAAACCGCTTACCAGAGC	TTTCACGGATGACCTCGCTG
MsNAC040	TTTATCCCCCTCCCTGTCTCC	TTTCTGAAGTTTCCAAAATCCCCA
MsNAC048	GCAACTCTAGTGGTAGCGCA	CTGTGTCTTGGGTCCAGTCC
MsNAC060	CCCGGGATCGAAAGTATCCA	ACAAGGGTCTTTCGGTATCCTT
MsNAC063	TTCACGCAACTGAGAATGCTT	TTCACCACAATCTCCTCATTCA
MsNAC073	TGGCGGCATCTCATCTGATT	GCTGAGGTGGCTGAGGTG
MsNAC075	TCACGGCTCGAGACAACAAA	CAGAGAACGAAATCCCTTTGAGG
MsNAC077	GCTGTCTTGCAATTTCCGGG	AGCACCACTGCCCGTATAAA
MsNAC081	ACCAATCAAGAGCGGCCAAT	TGAAAGCTCGGCCATCTCAG
MsNAC104	AAGTAAGGACGTTCCAGCGTT	TTTGCTGGAGGAAGAGGGTT
MsNAC119	AACGTTGGTGTGAAGAAGGC	CTCTGTGGTGGTTGTTGGTG

学重复,3次技术重复。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析试验数据,使用 Excle 2010 软件制图。

2 结果与分析

2.1 新疆野苹果 NAC 转录因子的鉴定及理化性质分析

利用构建的 NAC 转录因子的隐马可夫模型,从新疆野苹果转录组数据库中初步检索出 170 条候选蛋白序列,随后利用 SMART 数据库逐一鉴定 NAC 结构域并剔除冗余,最终得到 165 个 *MsNACs*,依次命名为 MsNAC001~165。利用 Prot-param 对新疆野苹果 NAC 蛋白的理化性质进行预测,发现 165 个新疆野苹果 NAC 转录因子在分子量、理论等电点及亲水性等方面均有不同程度的差异(表 2)。其中 MsNAC003 氨基酸数目最多有

859 个,其分子质量为 95.86 ku;而 MsNAC150 的氨基酸数目最少,仅有 58 个,其分子质量为 6.77 ku。就理论等电点而言,所有 MsNAC 蛋白的理论等电点介于 4.59~10.05,其中有 104 个 NAC 蛋白的理论等电点处于酸性范围,表明其所含酸性氨基酸较多。就疏水性而言,MsNACs 的疏水性介于 -0.054~-1.029,其中亲水性蛋白有 150 个,两性蛋白仅 15 个。此外根据预测结果,有 127 个 NAC 蛋白的不稳定系数高于 40,表明大部分的 NAC 蛋白为不稳定蛋白。

2.2 新疆野苹果 NAC 转录因子家族系统进化分析

利用 MEGA 6.0(NJ)对鉴定出的 165 个新疆野苹果 NAC 蛋白及 104 个拟南芥 NAC 蛋白序列进行多重比较,并构建系统进化树,以对新疆野苹果的 NAC 家族基因进行分类。结果表明新疆野苹果

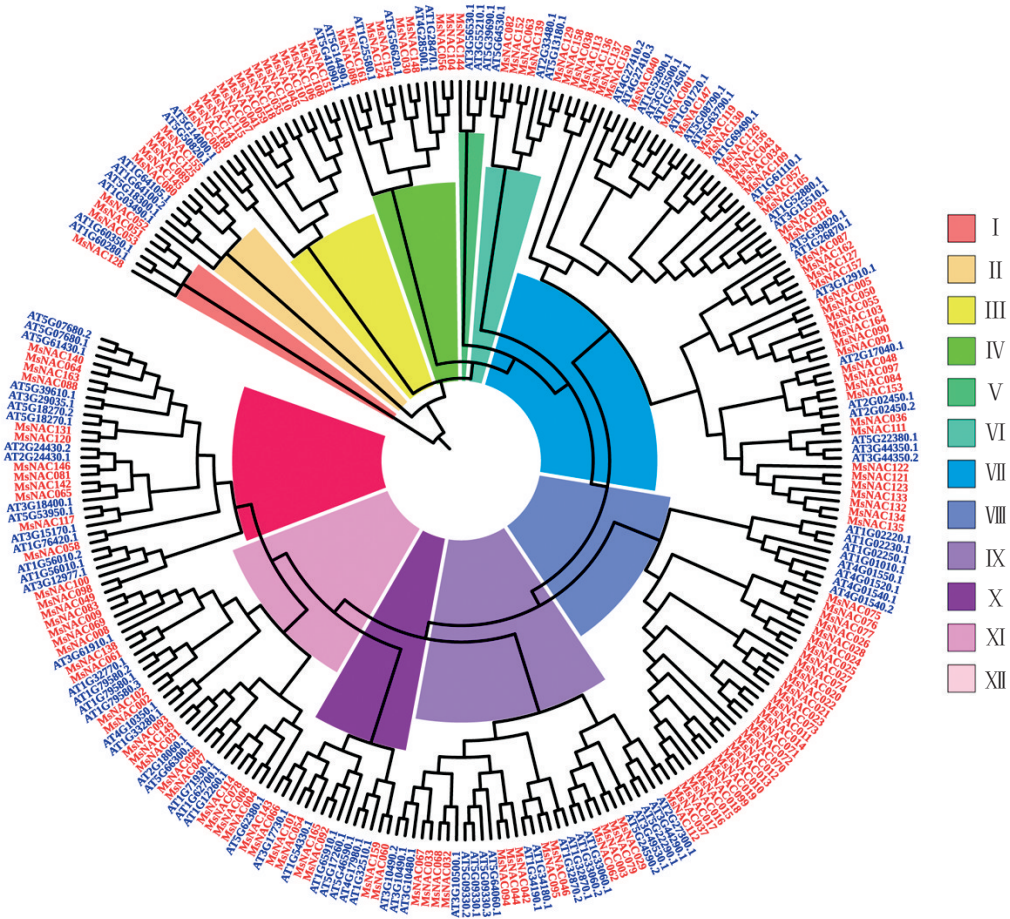
表2 新疆野苹果 NAC 转录因子的统计信息

Table 2 The summary of the characterization of *MsNACs*

统计数 Statistics	蛋白大小 Protein size/aa	分子量 Molecular mass/ku	理论等电点 Isoelectric point	不稳定系数 Instability index	脂肪酸系数 Aliphatic index	平均疏水性 Grand average of hydropathicity
最小值 Minimum	58	6.77	4.59	23.81	49.34	-1.029
最大值 Maximum	859	95.86	10.05	66.88	89.87	-0.054
平均值 Mean	361.59	40.93	6.71	46.00	64.59	-0.693
四分之一位数 Quarter	273	31.18	5.37	40.59	59.07	-0.806
中位数 Median	354	40.24	6.40	45.52	63.51	-0.695
四分之三位数 Three quarters	420	47.39	7.86	50.96	68.68	-0.595

和拟南芥的总计 269 个 NAC 蛋白可被分为 I~XII 等 12 个亚族(图 1)。进一步分析发现,MsNACs 和 AtNACs 在 12 个亚组中均有分布,表明 NAC 蛋白在种间具有一定的保守性;但 NAC 蛋白在两个物

种亚组中的分布比例不尽相近,如 III 亚组中 MsNACs 的比率为 9.1%,而拟南芥仅为 1.9%;而在 XII 亚组中 AtNAC 的比率为 15.4%,而 MsNAC 的比率仅为 3.0%(表 3)。



I~XII代表野苹果 NAC 转录因子的不同亚族,下同。各亚族由不同背景的颜色标示出来。拟南芥 *AtNAC* 基因和新疆野苹果 *MsNAC* 基因分别用红色和蓝色标记。

I~XII represent the different subfamily of the NAC transcription factor of *M. sieversii*, the same below. The subsets are marked by colors from different backgrounds. *AtNACs* and *MsNACs* were respectively labeled in red and blue.

图 1 新疆野苹果 NAC 基因家族系统进化分析和亚族分类

Fig. 1 Phylogenetic relationships and subfamily division of NAC gene family from *M. sieversii*

表 3 *MsNACs* 和 *AtNACs* 各亚家族统计分析

Table 3 Gene member counting of NAC gene subfamily in *M. sieversii* and *A. thaliana*

基因家族 Gene family	数据 Data	基因亚族 Gene subfamily											
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
<i>MsNACs</i>	数量 Number	4.0	5.0	15.0	8.0	1.0	6.0	43.0	28.0	15.0	8.0	17.0	5.0
	占比 Ratio/%	2.4	3.0	9.1	4.8	0.6	3.6	26.1	17.0	9.1	4.8	10.3	3.0
<i>AtNACs</i>	数量 Number	2.0	4.0	2.0	6.0	3.0	3.0	21.0	8.0	19.0	7.0	13.0	16.0
	占比 Ratio/%	1.9	3.8	1.9	5.8	2.9	2.9	20.2	7.7	18.3	6.7	12.5	15.4

2.3 新疆野苹果 NAC 家族蛋白保守基序的鉴定及分析

如图 2 所示,利用 MEME 11.2 对新疆野苹果 NAC 转录因子的 NAC 结构域进行分析,结果表明

MsNACs 的 NAC 结构域由 7 个较为保守的基序组成,其中基序 1 构成 A 亚结构域、基序 5 构成 B 结构域、基序 4 和基序 3 共同构成 C 亚结构域、基序 2 和基序 7 共同构成 D 结构域,基序 6 构成 E 亚结构域(图 3)。

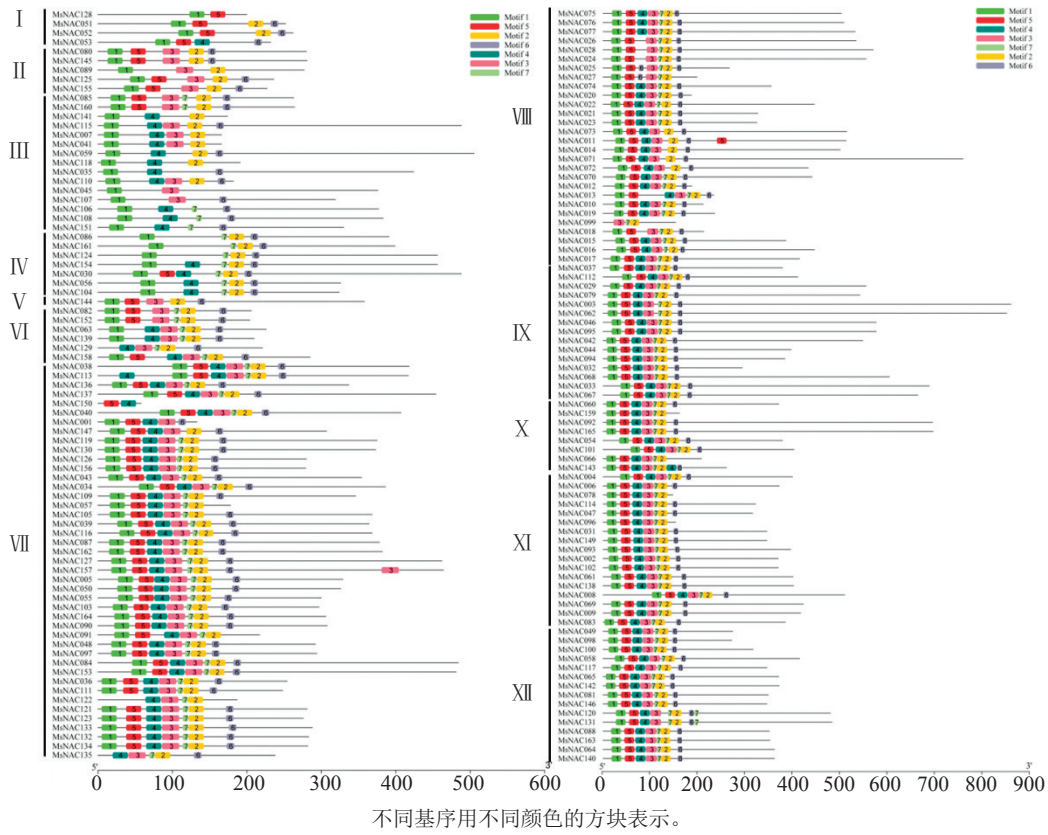
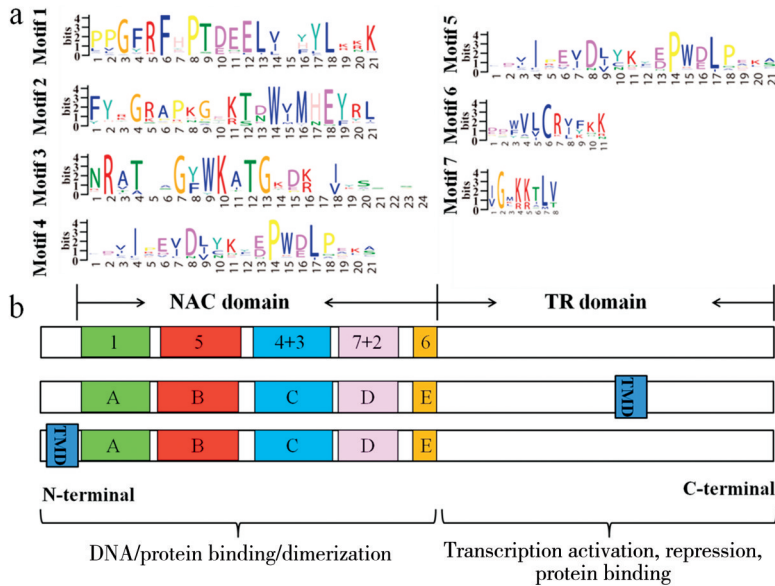


图 2 新疆野苹果 NAC 转录因子保守基序分析
 Fig. 2 Analysis of conservative motifs of MsNACs



a 代表新疆野苹果 NAC domain 的不同基序。b 代表新疆野苹果 NAC 转录因子的模式图。TMD. 跨膜结构域; b 上 . 无膜结合域的 NAC 转录因子; b 中 . 膜结合域位于 C 端的 NAC 转录因子; b 下 . 膜结合域位于 N 端的 NAC 转录因子。

a represents the different motifs of NAC transcription factor in *M. sieversii*. b represents model of NAC transcription factors in *M. sieversii*. TMD. Transmembrane domain; b above. NAC transcription factor without membrane-bound domain; b middle. NAC transcription factor with membrane-bound domain in C- terminus; b below. NAC transcription factor with membrane-bound domain in N- terminus.

图 3 新疆野苹果 NAC 转录因子保守基序及模式
 Fig. 3 Conservative motif and model of NAC transcription factor in *M. sieversii*

就各亚结构域的保守性而言,A、C、D亚结构域较为保守,而B亚结构域和E亚结构域保守性不高。进一步分析发现,165个新疆野苹果NAC转录因子中有113个NAC转录因子拥有完整的NAC结构域,其余52个NAC转录因子均存在1个或多个基序的缺失。

2.4 新疆野苹果NAC转录因子的膜结合域分析

膜结合NAC转录因子在植物逆境信号响应中发挥了关键的作用,是潜在的抗逆资源库。根据线上平台TMHMM及SMART预测结果,从165个新疆野苹果NAC蛋白中发现了18个具有膜结合域的NAC转录因子,且除MsNAC034外,其余17个膜结合NAC蛋白的膜结合域均位于C端(表4)。此外,这18个膜结合NAC转录因子分布在III(1个)、VII(1个)、VIII(6个)、IX(9个)、X(1个)等5个亚家族。另外MsNACs的膜结合域均由20个左右的氨基酸构成,其中由23个氨基酸组成的有14

个,而由20个和18个氨基酸组成的各有2个(表4)。核定位信号结果表明,大部分NAC转录因子具有核定位信号。亚细胞定位预测结果显示,18个膜结合NAC转录因子在细胞中具有不同的定位,其中细胞核、叶绿体、内质网及细胞质是其主要的预测定位点。

2.5 新疆野苹果NAC转录因子家族基因腐烂病胁迫下的表达特征分析

基于RNA-seq数据对腐烂病菌侵染后差异表达的NAC基因进行筛选和表达谱分析,发现有34个MsNACs差异表达,其中近60%差异MsNACs基因的表达模式为下调。根据MsNACs表达模式的聚类结果,可将34个MsNACs基因聚为3支,其中A支的6个基因最初受腐烂病诱导表达上调,随后又逐渐下调;B支的20个基因在0d时高表达,但在腐烂病侵染后表达下调;C支的8个基因受腐烂病菌诱导表达上调,在侵染后期高表达。这提示

表4 新疆野苹果膜结合NAC转录因子基因信息

Table 4 Information of membrane-bound NAC transcription factors in *M. sieversii*

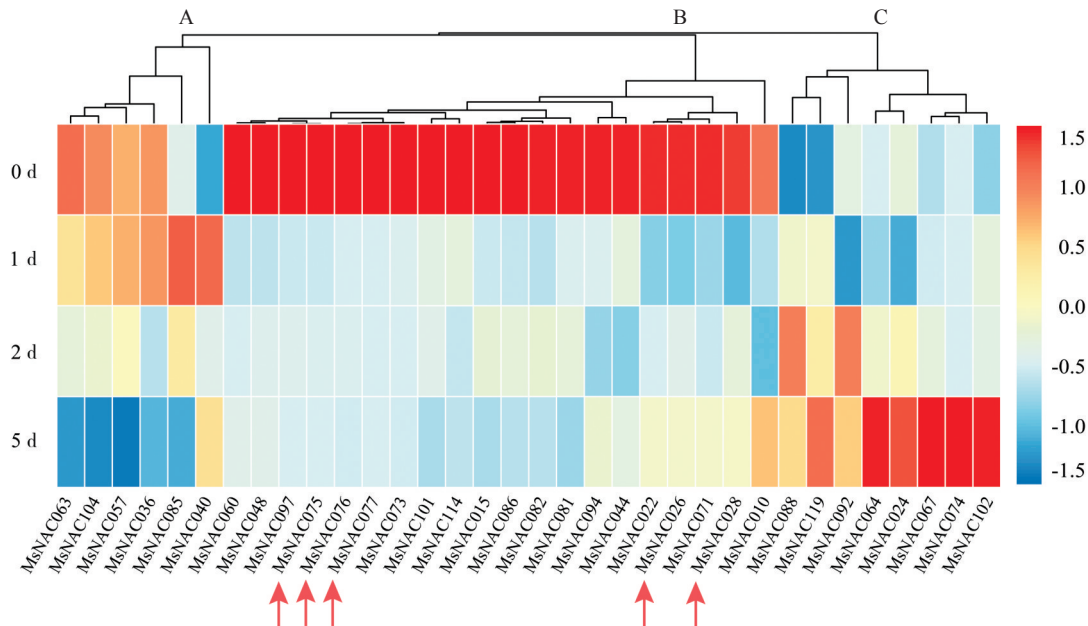
基因 Gene name	亚家族 Subfamily	膜结合域 Membrane-bound domain	亚细胞定位 Cellular location	差异基因 Differentially expressed genes	跨膜区 TM-helix/aa		核定位信号 NLS	
					起始 Start	终止 End	类型 Type	数目 Number
MsNAC003	IX	C-terminal	nucl: 5, chlo: 2	No	832	854	BN	1
MsNAC025	VIII	C-terminal	cyto: 3.5, cyto_nucl: 3	No	241	263	BN	1
MsNAC026	VIII	C-terminal	chlo: 4, nucl: 3	Yes	513	530	BN	1
MsNAC028	VIII	C-terminal	nucl: 3, vacu: 3	Yes	544	566	BN	2
MsNAC029	IX	C-terminal	nucl: 5, cyto: 5	No	517	539	N	0
MsNAC034	VII	N-terminal	chlo: 11	No	12	29	N	0
MsNAC037	IX	C-terminal	chlo: 5, nucl: 4	No	334	356	N	0
MsNAC046	IX	C-terminal	E.R.: 3.5, E.R._plas: 3	No	545	564	MN	1
MsNAC062	IX	C-terminal	nucl: 4, cyto: 3	No	823	845	N	0
MsNAC068	IX	C-terminal	cyto: 3, E.R.: 3	No	579	601	N	0
MsNAC075	VIII	C-terminal	chlo: 4, nucl: 2	Yes	476	498	N	0
MsNAC076	VIII	C-terminal	chlo: 7, plas: 3	Yes	481	503	BN	1
MsNAC077	VIII	C-terminal	chlo: 5, nucl: 3	Yes	503	522	BN	1
MsNAC079	IX	C-terminal	nucl: 4.5, cyto_nucl: 4	No	501	523	N	0
MsNAC095	IX	C-terminal	E.R.: 3.5, nucl: 3	No	548	570	MN&BN	2
MsNAC112	IX	C-terminal	nucl: 5, chlo: 4	No	366	388	BN	1
MsNAC118	III	C-terminal	cyto: 4, chlo: 3	No	168	190	BN	1
MsNAC165	X	C-terminal	nucl: 5, chlo: 4	No	584	606	BN	2

注:亚细胞定位:nucl代表细胞核、cyto代表细胞质、plas代表细胞质膜、chlo代表叶绿体、E.R.代表内质网、cyto_nucl代表细胞质-细胞核、E.R._plas代表内质网-细胞质膜;核定位信号(NLS):MN代表单分子核定位信号、BN代表双分子核定位信号。数字代表得分,得分越高亚细胞定位结果越可靠。

Note: Cellular location: nucl represent nucleus, cyto represent cytoplasm, plas represent plasma membrane, chlo represent chloroplast, E.R. represent endoplasmic reticulum, cyto_nucl represent cytoplasm- nucleus, E.R._plas represent endoplasmic reticulum-plasma membrane; NLS (Nuclear Localization Signal): MN represent monopartite nuclear localization signals; BN represent bipartite nuclear localization signals. The number represents the score, the higher the score, the more reliable the subcellular localization result.

NAC 基因在新疆野苹果响应腐烂病菌侵染过程中扮演了较为复杂的调控角色(图 4)。根据亚家族分类结果发现,III、IV、VI、VII、VIII、IX、X、XI及XII等 9 个亚族中均有差异表达的 *MsNACs*,且分别有 1、2、2、6、12、3、3、2、3 个基因。利用 qRT-PCR 对 *Ms-*

NAC024 等 12 个表达量变化大、可能参与抗病的 *MsNACs* 表达模式进行了验证,结果(图 5)显示,qRT-PCR 结果与 RNA-seq 数据基本一致,其中在腐烂病菌侵染后,*MsNAC073* 显著下调近 600%,*MsNAC102* 显著上调近 140 倍,由此推测 *MsNAC073*



MsNACs 不同时间点的 FPKM 值,经归一化后用于绘制表达热图;红色箭头所指为具有膜结合域的 *MsNACs*;A、B、C 代表三个不同分支的基因表达谱。

The heat map shows the expression patterns of *MsNAC* genes in different time points (0, 1, 2, 5 d) under *C. mali* infection. The normalized FPKM value was used to generate this heat map. Red arrow refers to *MsNACs* with membrane-bound domains. A, B and C represent three different expression profiles among *MsNACs*.

图4 *MsNACs* 的表达热图

Fig. 4 Expression profiles of the *MsNACs*

和 *MsNAC102* 可能是潜在的关键抗病候选基因。

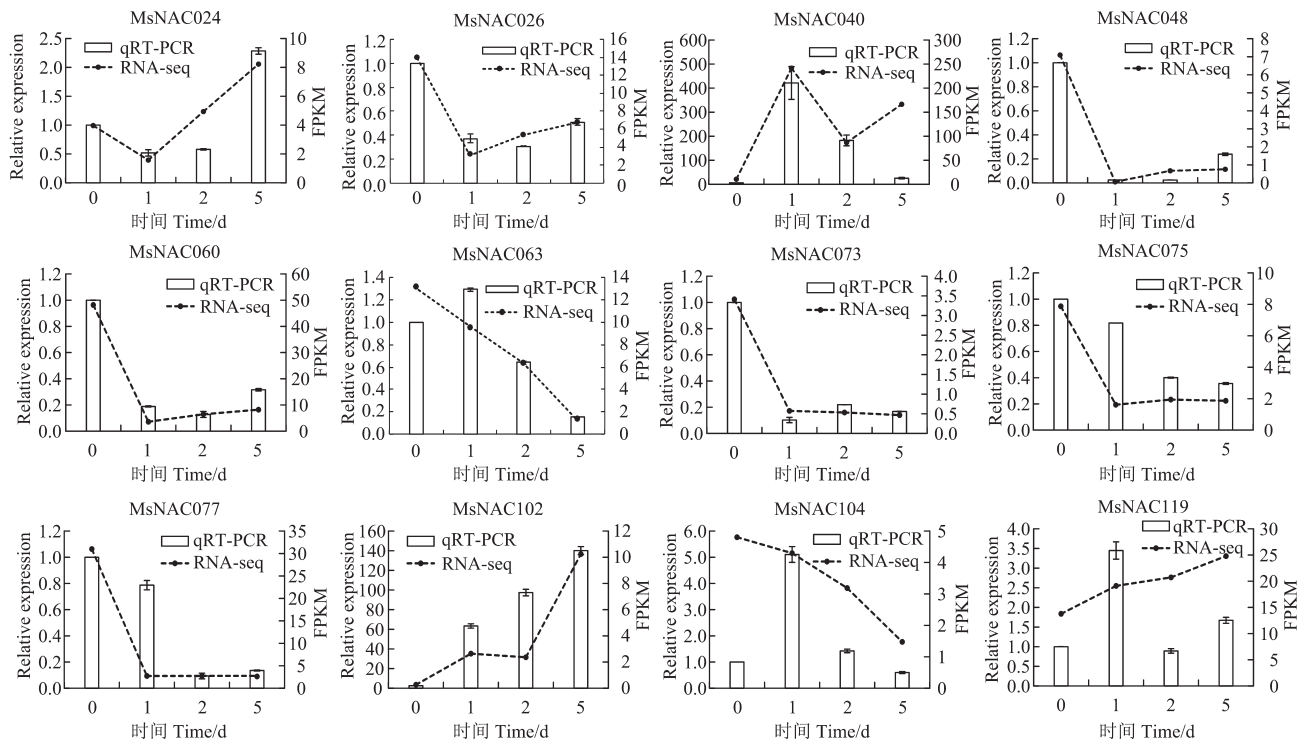
3 讨论

近年来利用基因组或转录组数据从苹果^[24]、梅^[12]等植物中筛选出大量的抗逆相关 NAC 基因资源,为 NAC 基因深入研究奠定了坚实的基础。新疆野苹果作为现代栽培苹果的祖先和天山野果林的主体群落,具有丰富的遗传多样性,是宝贵的抗病基因资源库,对我国乃至世界苹果选育和改良具有重要意义^[19]。

笔者利用 HMMsearch 从新疆野苹果转录组数据中检索到 165 个 *MsNACs* 序列。就家族成员的数目而言,*MsNAC* 转录因子显著多于生姜(*Zingiber officinale*, 72 个)、番茄(*Solanum lycopersicum*, 104 个)等物种^[25-26],但略少于苹果(180 个)和梨(185 个)等近缘蔷薇科植物^[13,24],这可能是种间差异

和基因时空特异性表达所致。在野苹果基因组数据公布之前,利用转录组数据对 NAC 基因等重要基因资源进行挖掘,仍不失为一种高效且可靠的方式。

系统进化结果表明,新疆野苹果与拟南芥中的 NAC 转录因子可被分为 I~XII 等 12 个不同的亚家族,这与番茄(12 个亚族)、生姜(13 个亚族)、梅(14 个亚族)中的聚类结果相似,表明 NAC 转录因子家族不同亚组的分化时间较早,各物种间存在一定的保守性^[12,25-26]。但拟南芥与新疆野苹果的 NAC 蛋白在不同亚组中出现的比率并不相同,例如新疆野苹果的 VIII 亚组相较拟南芥存在显著的扩张,而 VIII 亚组中的 AT1G02250.1 (ANAC005)、AT4G01540.1 (ANAC068)及 AT4G01550.1 (ANAC069)被分别证实参与植物的木质部发育、细胞分裂调控及非生物胁迫响应等过程^[27-28],这提示新疆野苹果中生长发



柱状图为 qRT-PCR 得到的基因相对表达量,虚线为 RNA-Seq 基因表达丰度(FPKM value)。

Histogram represented the relative expression of *MsNACs* by qRT-PCR, dotted line chart represented the FPKM of *MsNACs* based on RNA-Seq.

图5 *MsNACs* 基因 qRT-PCR 表达模式分析

Fig. 5 Expression analysis of 12 selected *MsNACs* by qRT-PCR

育调控较拟南芥可能更为复杂。保守基序分析结果表明,新疆野苹果 NAC 结构域的 5 个亚结构域的保守性高低依次为 A > D > C > B > E,且不同的 *MsNACs* 的 NAC 结构域存在不同类型的亚结构域缺失,不同的缺失类型使不同的 NAC 转录因子可能具有不同的 DNA 结合域,使其拥有不同的下游靶基因。

膜结合转录因子(membrane-bound transcription factor)是一类日益引起关注的转录因子,目前已在拟南芥、番茄、玉米(*Zea mays*)和水稻(*Oryza sativa*)中分别发现了 18 个、13 个、7 个和 5 个膜结合 NAC 转录因子^[29-32]。基于 TMHMM 及 SMART 的预测结果,发现了 18 个含有膜结合域的 *MsNACs*,其中有 17 个 NAC 蛋白的膜结合域位于 C 端,这与番茄和玉米中的研究相似^[30-31]。此外 *MsNAC30* 与 *SINACMTF13* 相似,其膜结合域位于 N 端,较为少见,但不同位置的膜结合域对 NAC 转录因子生物学功能的影响还不清楚^[30]。近年来研究发现膜结合 NAC 转录因子在植物应对逆境胁迫时发挥了重要的调控作用,而腐烂病胁迫下有 5 个膜结合 *MsNACs* 差异表达且均为下调,这暗示它们可能

参与了新疆野苹果的抗病过程,但其具体功能和作用机制还需进一步探究^[31-33]。同时部分膜结合 NAC 转录因子定位在细胞核外,这提示它们在发挥转录调控功能之前,可能还需要经历跨膜转移的过程。

最后对 *MsNACs* 腐烂病侵染后的表达模式进行了分析,结果表明 165 个 *MsNACs* 中有 34 个差异表达,可能参与新疆野苹果抵御腐烂病菌的入侵的生物学过程。值得注意的是,大部分差异表达的 *MsNACs* 均属于 VIII 亚组和 IX 亚组,这表明以上两个亚组可能在新疆野苹果对生物胁迫响应的调控中扮演了关键的角色,值得深入研究。进一步根据已研究的拟南芥 NAC 蛋白对新疆野苹果 NAC 转录因子的注释结果,发现新疆野苹果中注释为 *NTL9* (AT4G35580)的 *MsNAC073* 在腐烂病胁迫下表达显著下调,而在拟南芥中 *NTL9* 恰好是 *PRI* 的负调控因子,其与 *CRWN1* 及 *SNI1* 形成复合体,在正常情况下抑制 *PRI* 的表达,但在病菌或 SA 诱导下,*CRWN1* 被降解,从而解除了对 *PRI* 的抑制,激发了免疫反应^[34]。因而 *MsNAC073* 表达下调显然有利于 *PRI* 等病程相关基因的表达,从而增强植物对腐烂病的抵抗能力。*MsNAC102* 在腐烂病菌侵染后持

续上调表达,而它在拟南芥中的同源基因 *SMB* (AT1G79580)被证实参与根冠的发育,并能促进 *SND2* 等次生细胞壁合成相关基因的表达,这可能暗示着 *MsNAC102* 通过促进植物次生细胞壁的合成,增强植物对病原菌侵染的抵抗能力^[35-36]。

本研究从转录组水平首次较为全面地鉴定了 MsNACs 基因,并发现了 *MsNAC073*、*MsNAC102* 等潜在的抗病 NAC 基因资源,为进一步深入研究和利用 MsNACs 基因奠定了基础。

参考文献 References:

- [1] 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.
- [2] 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]. *The Plant Cell*, 1997, 9(6):841-857.
- [3] LIU Q, YAN S, HUANG W, YANG J, DONG J, ZHANG S, ZHAO J, YANG T, MAO X, ZHU X, LIU B. NAC transcription factor ONAC066 positively regulates disease resistance by suppressing the ABA signaling pathway in rice[J]. *Plant Molecular Biology*, 2018, 98(4/5):289-302.
- [4] PEROCHON A, KAHLA A, VRANIC M, JIA J, MALLA K B, CRAZE M, WALLINGTON E, DOOHAN F M. A wheat NAC interacts with an orphan protein and enhances resistance to *Fusarium* head blight disease[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(10):1892-1904.
- [5] HU H, DAI M, YAO J, XIAO B, LI X, ZHANG Q, XIONG L. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(35):12987-12992.
- [6] HONG Y, ZHANG H, HUANG L, LI D, SONG F. Overexpression of a stress-responsive NAC transcription factor gene *ONAC022* improves drought and salt tolerance in rice[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7:4.
- [7] ZHONG R, MCCARTHY R L, LEE C, YE Z H. Dissection of the transcriptional program regulating secondary wall biosynthesis during wood formation in poplar[J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(3):1452-1468.
- [8] ZHONG R, LEE C, YE Z H. Functional characterization of poplar wood-associated NAC domain transcription factors[J]. *Plant Physiology*, 2010, 152(2):1044-1055.
- [9] ZHONG R, DEMURA T, YE Z H. SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(11): 3158-3170.
- [10] MAO C, LU S, LV B, ZHANG B, SHEN J, HE J, LUO L, XI D, CHEN X, MING F. A rice NAC transcription factor promotes leaf senescence via ABA biosynthesis[J]. *Plant Physiology*, 2017, 174(3):1747-1763.
- [11] MOYANO E, MARTINEZ-RIVAS F J, BLANCO-PORTALES R, MOLINA-HIDALGO F J, RIC-VARAS P, MATAS-ARROYO A J, CABALLERO J L, MUNOZ-BLANCO J, RODRIGUEZ-FRANCO A. Genome-wide analysis of the NAC transcription factor family and their expression during the development and ripening of the *Fragaria × ananassa* fruits[J]. *PLoS One*, 2018, 13(5):e0196953.
- [12] ZHUO X, ZHENG T, ZHANG Z, ZHANG Y, JIANG L, AHMAD S, SUN L, WANG J, CHENG T, ZHANG Q. Genome-wide analysis of the NAC transcription factor gene family reveals differential expression patterns and cold-stress responses in the woody plant *Prunus mume*[J]. *Genes*, 2018, 9(10): 494-516.
- [13] AHMAD M, YAN X, LI J, YANG Q, JAMIL W, TENG Y, BAI S. Genome wide identification and predicted functional analyses of NAC transcription factors in Asian pears[J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1):214-229.
- [14] DUAN N, BAI Y, SUN H, WANG N, MA Y, LI M, WANG X, JIAO C, LEGALL N, MAO L, WAN S, WANG K, HE T, FENG S, ZHANG Z, MAO Z, SHEN X, CHEN X, JIANG Y, WU S, YIN C, GE S, YANG L, JIANG S, XU H, LIU J, WANG D, QU C, WANG Y, ZUO W, XIANG L, LIU C, ZHANG D, GAO Y, XU Y, XU K, CHAO T, FAZIO G, SHU H, ZHONG G Y, CHENG L, FEI Z, CHEN X. Genome re-sequencing reveals the history of apple and supports a two-stage model for fruit enlargement[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1):249.
- [15] 羊海军, 崔大方, 许正, 林培钧. 中国天山野果林种子植物组成及资源状况分析[J]. *植物资源与环境学报*, 2003, 12(2):39-45.
YANG Haijun, CUI Dafang, XU Zheng, LIN Peijun. Analysis on the components and resource situation of seed plants in the wild fruit forest in Tianshan[J]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2003, 12(2):39-45.
- [16] 傅立国. 中国植物红皮书[M]. 北京: 科学出版社, 1992.
FU Ligu. *Endanger plant of book in China* [M]. Beijing: Science Press, 1992.
- [17] 杨美玲. 新疆野苹果(*Malus sieversii*)生物学特性和居群遗传多样性研究[D]. 天津: 天津农学院, 2014.
YANG Meiling. *Biological characteristics and genetics diversity of populations of Malus sieversii*[D]. Tianjing: Tianjin Agricultural University, 2014.
- [18] 胡小平, 张吉光, 陈婧, 周书涛, 杨家荣, 康振生. 新疆野苹果和秦冠的抗黑星病特性[J]. *植物病理学报*, 2010, 40(6): 609-614.

- HU Xiaoping, ZHANG Jiguang, CHEN Jing, ZHOU Shutao, YANG Jiarong, KANG Zhensheng. Resistance characteristics of Xinjiang wild apple and Qinguan cultivars to apple scab[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2010, 40(6):609-614.
- [19] ANA-ROSA B, JOHN N, ERIK B, AHMED A, ELENA L, LUIS G C, SAMIR D, MICHAEL W. Transcriptomic response of resistant (PI613981-*Malus sieversii*) and susceptible ('Royal Gala') genotypes of apple to blue mold (*Penicillium expansum*) infection[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1981.
- [20] HARSHMAN J M, EVANS K M, ALLEN H, POTTS R, FLAMENCO J, ALDWINCKLE H S, WISNIEWSKI M E, NORELLI J L. Fire blight resistance in wild accessions of *Malus sieversii*[J]. *Plant Disease*, 2017, 101(10):1738-1745.
- [21] 刘爱华,张新平,温俊宝,岳朝阳,阿里木,焦淑萍,张静文,克热曼.天山野苹果林苹果小吉丁与苹果腐烂病复合危害研究[J]. *新疆农业科学*, 2014, 51(12):2240-2244.
- LIU Aihua, ZHANG Xinping, WEN Junbao, YUE Chaoyang, A Limu, JIAO Shuping, ZHANG Jingwen, KE Reman. Preliminary research on the composite damage of *Agrilus mali* Matsuura and *Valsa mali* Miyabe et Yama[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2014, 51(12):2240-2244.
- [22] 刘晓洁,李小双,张燕,梁玉青,周平,赵津艺,张道远.划布轮法鉴定新疆野苹果树腐烂病抗性方法的建立[J]. *西北农业学报*, 2019, 28(4):674-679.
- LIU Xiaojie, LI Xiaoshuang, ZHANG Yan, LIANG Yuqing, ZHOU Ping, ZHAO Jinyi, ZHANG Daoyuan. The pattern wheel inoculation method used to identify resistance of Xinjiang wild apple trees (*Malus sieversii*) to *Valsa* canker[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2019, 28(4):674-679.
- [23] LIU X J, LI X S, BOZOROV A T, MA R, MA J B, ZHANG Y H, YANG H L, LI L, ZHANG D Y. Characterization and pathogenicity of six *Cytospora* strains causing stem canker of wild apple in the Tianshan Forest, China [J]. *Forest Pathology*, 2020, 9: e12587.
- [24] SU H, ZHANG S, YUAN X, CHEN C, WANG X F, HAO Y J. Genome-wide analysis and identification of stress-responsive genes of the NAM-ATAF1, 2-CUC2 transcription factor family in apple[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 71 (Complete): 11-21.
- [25] 廖钦洪,邹勇,李洪雷,姜玉松.基于RNA-seq数据的生姜NAC转录因子家族鉴定及分析[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(3):493-501.
- LIAO Qinrong, ZOU Yong, LI Honglei, JIANG Yusong. Identification and analysis of NAC family in ginger (*Zingiber officinale*) based on RNA-seq data[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2018, 43(3):493-501.
- [26] 陈秀玲,王傲雪,张珍珠,李景富.番茄NAC转录因子家族的鉴定及生物信息学分析[J]. *植物生理学报*, 2014, 50(4):461-470.
- CHEN Xiuling, WANG Aoxue, ZHANG Zhenzhu, LI Jingfu. Genome-wide identification and bioinformatic analysis of NAC gene family in tomato[J]. *Plant Physiology Journal*, 2014, 50(4): 461-470.
- [27] ZHAO J, LIU J S, MENG F N, ZHANG Z Z, LONG H, LIN W H, LUO X M, WANG Z Y, ZHU S W. ANAC005 is a membrane-associated transcription factor and regulates vascular development in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2016, 58(5):442-451.
- [28] KIM Y S, KIM S G, PARK J E, PARK H Y, LIM M H, CHUA N H, PARK C M. A membrane-bound NAC transcription factor regulates cell division in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2006, 18(11):3132-3144.
- [29] KIM S G, LEE S, SEO P J, KIM S K, KIM J K, PARK C M. Genome-scale screening and molecular characterization of membrane-bound transcription factors in *Arabidopsis* and rice[J]. *Genomics*, 2010, 95(1):56-65.
- [30] BHATTACHARJEE P, DAS R, MANDAL A, KUNDU P. Functional characterization of tomato membrane-bound NAC transcription factors[J]. *Plant Molecular Biology*, 2017, 93(4/5):511-532.
- [31] WANG D, YU Y, LIU Z, LI S, WANG Z, XIANG F. Membrane-bound NAC transcription factors in maize and their contribution to the oxidative stress response[J]. *Plant Science*, 2016, 250:30-39.
- [32] HE L, SHI X, WANG Y, GUO Y, YANG K, WANG Y. *Arabidopsis* ANAC069 binds to C[A/G]CG[T/G] sequences to negatively regulate salt and osmotic stress tolerance[J]. *Plant Molecular Biology*, 2017, 93(4/5):369-387.
- [33] CHI Y H, MELENCION S M B, ALINAPON C V, KIM M J, LEE E S, PAENG S K, PARK J H, NAWKAR G M, JUNG Y J, CHAE H B, KANG C H, LEE S Y. The membrane-tethered NAC transcription factor, AtNTL7, contributes to ER-stress resistance in *Arabidopsis*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 488(4):641-647.
- [34] GUO T, MAO X, ZHANG H, ZHANG Y, FU M, SUN Z, KUAI P, LOU Y, FANG Y. Lamin-like proteins negatively regulate plant immunity through NAC WITH TRANSMEMBRANE MOTIF1-LIKE9 and NONEXPRESSOR OF PR GENES1 in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(10): 1334-1348.
- [35] BENNETT T, VAN DEN TOORN A, SANCHEZ-PEREZ G F, CAMPILHO A, WILLEMSSEN V, SNEL B, SCHERES B. SOMBRERO, BEARSKIN1, and BEARSKIN2 regulate root cap maturation in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2010, 22(3):640-654.
- [36] HUSSEY S G, MIZRACHI E, SPOKEVICIUS A V, BOSSINGER G, BERGER D K, MYBURG A A. SND2, a NAC transcription factor gene, regulates genes involved in secondary cell wall development in *Arabidopsis* fibres and increases fibre cell area in *Eucalyptus*[J]. *BMC Plant Biology*, 2011, 11: 173-190.