果 树 学 报 2021,38(12):2072-2081
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20210286

# 转录因子*FaNAC56*在草莓果实成熟中的功能分析

许 田,吴 敏,陈雪雪,黄芸,沈元月*

(北京农学院植物科学技术学院·农业应用新技术北京市重点实验室,北京 102206)

**摘 要:【目的】**研究NAC转录因子*FaNAC56*在草莓果实成熟中的作用。**【方法】**根据前期果实成熟过程中的蛋白组数据,以八倍体红颜草莓为试材,克隆*FaNAC56*基因及其启动子。在蛋白水平,利用MEGA构建FaNAC56系统进化树,并通过生物信息学预测其编码蛋白的二级结构,以及利用烟草进行亚细胞定位;在转录调控水平,利用预测网站分析*FaNAC56*启动子区顺式作用元件以及下游靶基因,并通过RT-qPCR分析*FaNAC56*的时空表达模式。最后,利用果实圆片温育方法分析*FaNAC56*基因受外源激素诱导情况。**【结果】***FaNAC56*基因全长1035 bp,编码344个氨基酸,具有NAC转录因子NAM保守结构域。系统发育分析表明FaNAC56与月季NAC56同源性最高。亚细胞定位显示FaNAC56定位于细胞核内。*FaNAC56*在果实中高度表达并随果实成熟表达量急剧增加。*FaNAC56*启动子区含有ABA、赤霉素、生长素、乙烯等激素和胁迫相关响应元件,其表达水平受这些激素诱导。靶基因分析发现FaNAC56可能响应多种激素、花色苷和蔗糖调控元件。**【结论】***FaNAC56*可能通过多种激素调控草莓果实的发育和成熟。

**关键词:**草莓;*FaNAC56*;表达分析;亚细胞定位;激素诱导

**中图分类号:**S668.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-9980(2021)12-2072-10

## Functional analysis of transcription factor *FaNAC56* in strawberry fruit ripening

XU Tian, WU Min, CHEN Xuexue, HUANG Yun, SHEN Yuanyue*

*(College of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture/Beijing Key Laboratory of New Technology in Agricultural Application, Beijing 102206, China)*

**Abstract:**【Objective】Strawberry is a very valuable horticultural crop, and its fruit ripening is regulated by a complex process. To find the important regulatory factor involved in strawberry fruit ripening, the proteome of *Fragaria* × *ananassa* 'Benihoppe' was analyzed around the onset of fruit ripening. The data have showed that a NAC transcription factor has high expression level during fruit ripening, which is named as FaNAC56. NAC is one of the largest families of plant-specific transcription factors, which play an important role in plant growth and development. In order to determine the function of *FaNAC56* in strawberry fruit ripening, we first cloned the *FaNAC56* gene and then investigated its tissue expression pattern and subcellular localization.【Methods】Firstly, we screened differentially expressed proteins around the onset of fruit ripening on the basis of our proteome, and found a NAC transcription factor that increased rapidly during strawberry ripening. According to phylogenetic analysis, this transcription factor was named as FaNAC56. The full-length ORF sequence of the *FaNAC56* gene was obtained by RT-PCR. After sequencing the amino acid sequence of the *FaNAC56* gene based on NCBI database, these genes with high homology were screened and downloaded. MEGA software was used to construct the phylogenetic tree. The molecular weight, isoelectric point, liposoluble index of encoding protein were analyzed by the Expasy website. The secondary structure of its protein, *cis*-acting elements in the promoter region and downstream target genes were predicted through bioinformatics. Secondly,

**收稿日期:**2021-07-01 **接受日期:**2021-10-03

**基金项目:**国家自然科学基金(32030100,32102362)

**作者简介:**许田,女,硕士,研究方向:果实发育与成熟调控。Tel:010-80794426,E-mail:Taryn1092@163.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel:010-80794426,E-mail:sfmn@tom.com

we used real-time PCR to detect the expression level of *FaNAC56* in strawberry including various organs and developmental fruits, including the root, stem, leaf, flower, seed, small green fruit, large green fruit, de-greening fruit, white fruit, initial red fruit, partial red fruit, and full red fruit. Meanwhile, the white fruit was made into cylinder-shaped cut with 8-mm diameter. We treated the fruits with the solution containing 100 μmol·$L^{-1}$ ABA, 500 μmol·$L^{-1}$ NAA, 50 mg·$L^{-1}$ GA, and 100 μmol·$L^{-1}$ ethylene, respectively and then used the RT-qPCR to analyze the expression level of *FaNAC56* gene after phytohormone treatment. Thirdly, the fusion protein of FaNAC56-GFP and the control GFP vector were transformed into tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaf cells by *Agrobacterium tumefaciens* mediated-infiltration. After 48 h infiltration, the subcellular localization of FaNAC56 was observed.【Results】The cloning and sequencing results showed that the *FaNAC56* gene contained 1035 bp of open reading frame that encoded 344 amino acids residues with a molecular mass of 38.3 kDa and had typical NAM domain belonging to the NAC transcription factor. Its GenBank accession number is XP_004291668.1. The results of physical and chemical properties of the FaNAC56 protein showed that the isoelectric point was 5.03 and average hydrophilicity was 0.904, indicating that it was a hydrophobic protein. The results of protein secondary structure prediction showed that the FaNAC56 protein mainly contained $\alpha$- helix, extended strand, $\beta$-corner and random coil with the proportion of 12.21%, 19.48%, 3.78% and 64.53%, respectively. The phylogenetic analysis revealed that it had the highest similarity with *Rose chinensis* NAC56 protein. The results of RT-qPCR showed that the *FaNAC56* gene had tissue expression specificity, with higher abundance expression in the fruits than in the roots, stems, leaves, flowers and seeds, suggesting that this gene was mainly expressed in the fruits. And the expression level of *FaNAC56* increased during fruit ripening and reached the peak at red fruit stage. The *cis*-acting elements of the *FaNAC56* promoter revealed that the promoter of *FaNAC56* contained multiple hormone responsive elements: ABA-responsive elements (ABRE), ethylene-responsive elements (ERE), auxin-responsive elements (AuxRR-core), Methyl jasmonate-responsive elements (CGTCA-motif, TGACG-motif) and gibberellin-responsive element (TCA-element). In addition, the promoter contained stress responsive motif, such as MBS site, a MYB binding site involved in drought-inducibility. These results indicated that *FaNAC56* was implicated in a wide range of plant processes. The expression level of *FaNAC56* was upregulated by ABA, GA, NAA or ethylene. These results showed that *FaNAC56* was indeed induced by a variety of hormones and the transcription factor may play an important regulatory role in fruit ripening. We used PlantPan website to predict the target genes of FaNAC56. The results showed that FaNAC56 had multiple potential target genes including auxin-induced protein 15A-like, ethylene-responsive transcription factor ERF071, UDP- glycosyltransferase 91C1- like, and serine/threonine- protein kinase Nek5. We used FaNAC56-GFP fusion protein for subcellular localization analysis and DAPI as nucleus marker in *Nicotiana tabacum* leaves. The result demonstrated that the FaNAC56-GFP fusion protein was accumulated in the nucleus.【Conclusion】In this study, *FaNAC56* was cloned and its function of regulating strawberry ripening was explored preliminarily. Its secondary structure and *cis*-acting elements were predicted. RT-qPCR was used to determine its expression pattern and response to ABA, GA, NAA, and ethylene treatments. *FaNAC56* was an organ-specific expressed gene. In addition, ABA, GA, NAA and ethylene induced *FaNAC56* expression. Prediction target gene analysis showed that many genes related to fruit ripening were the target of FaNAC56. These results revealed that *FaNAC56* may take part in the regulation of strawberry fruit development and ripening through a variety of hormones.

**Key words:** Strawberry; *FaNAC56*; Expression analysis; Subcellular localization; Hormone induction

果实成熟是指果实经过一系列复杂的生理生化变化而形成特有的色、香、味，并最终成为可食性状态的过程。果实成熟是果实品质形成的重要生物学基础[1-3]，因此，研究果实成熟调控的机制不仅能探索果实发育生物学的基础科学问题，而且能够有效调控果实的成熟和衰老，具有十分重要的现实意义。果实成熟的调控发生在转录、转录后、翻译和翻译后等系列过程中[4]。在转录水平上，许多转录因子通过调节下游靶基因的表达而控制果实的成熟过程，如NAC、AP2、MYC、WRKY、MADS、HSF以及Cys2/His2-type锌指蛋白等[5]。

NAC（NAM、ATAF1/2、CUC2）是最大的植物特有转录因子家族之一[6-7]。研究发现，NAC转录因子调控果实发育与成熟主要是通过乙烯途径实现的[8]。香蕉中的MaNAC1/2能够被乙烯调控表达，与乙烯信号的下游转录组分EIN3类似蛋白MaEIL5互作，激活乙烯信号转导从而促进果实成熟[8]。番茄中NOR（NAC）位于RIN（MADS-box）的上游，以乙烯依赖和不依赖的方式正调控*RIN*的表达及果实成熟[9]；而SlNAC4转录因子可以结合*NOR*和*RIN*的启动子从而影响乙烯的生成[10]。利用番茄转录因子NOR、RIN及乙烯受体NR的突变体分析发现，NOR可以直接调控乙烯响应基因并参与三羧酸循环中有机酸分解，最终影响乙烯合成和果实成熟[9]。Sl-NAC1/4/9通过调控不同的乙烯合成基因*LeACS2*、*LeACS4*和*LeACO1*的表达，正调控番茄果实成熟[11-12]。

另外，NAC调控果实成熟涉及了多种植物激素，例如NAC通过生长素调控果实成熟涉及了乙烯途径[13-14]；ABA可能作为乙烯信号系统的上游调节器来调控乙烯合成，从而促进果实成熟[15-18]；NAC还可以通过调控赤霉素/油菜素内酯的代谢和信号转导途径而影响果实成熟[19-20]。总之，NAC转录因子对果实发育及成熟过程起到重要的调控作用。由于NAC转录因子家族种类和功能的多样性，其差异调控果实成熟，特别是非呼吸跃变型果实，仍需要进一步研究。

草莓（*Fragaria*×*ananassa* Duch.）是蔷薇科草莓属多年生果树，具有较高的经济及营养价值，是栽培面积和产量仅次于葡萄的第二大浆果。因草莓栽培成花容易、生长周期短、连续坐果、已完成基因组测序以及具有成熟的稳定遗传转化体系等优点，已成为研究非呼吸跃变型果实成熟的模式材料[21]。笔者基于草莓果实的不同发育时期进行蛋白组分析，筛选出一个编码NAC保守结构域的蛋白FaNAC56，推测其是草莓果实成熟的关键调控因子。在此基础上，从八倍体栽培草莓红颜中克隆到了*FaNAC56*的CDS和启动子序列，并对其蛋白结构、组织表达、激素响应模式以及亚细胞定位进行了研究和预测，以期为进一步研究该基因的功能奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料与处理

材料于2019—2021年取自北京农学院东大地温室的八倍体红颜草莓品种，不同器官包括果实、根、茎、叶、花、种子。栽培条件为棚温16~28 ℃，相对湿度60%~80%，光照16 h，常规管理。根据之前研究[22]，取不同发育时期（小绿期，SG；大绿期，LG；褪绿期，DG；白果期，Wt；始红期，IR；片红期，PR；全红期，FR）果实，液氮速冻，−80℃保存。取长势一致的白果期果实，用刀片切成1 mm的圆片，将切好的圆片置于基础温育液（500 μmol·L$^{-1}$ EDTA，200 μL；500 μmol·L$^{-1}$ MES，10 mL；1 mol·L$^{-1}$新鲜VC，0.5 mL；1 mol·L$^{-1}$ $CaCl_2$，0.5 mL；1 mol·L$^{-1}$ $MgCl_2$，0.1 mL；1 mol·L$^{-1}$甘露醇，0.1 mL）中，30 min后随机取5 g圆片分别放置于含有100 μmol·L$^{-1}$ ABA, 500 μmol·L$^{-1}$ NAA, 50 mg·L$^{-1}$GA, 100 μmol·L$^{-1}$乙烯利中，于0 h，1 h，2 h，3 h，4 h分别取1 g处理的圆片，液氮速冻，−80 ℃保存。上述所有处理均设置3次生物学重复。

### 1.2 *FaNAC56*的克隆

采用植物RNA提取试剂盒（北京华越洋生物科技有限公司）提取样品总RNA，利用TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix（北京全式金生物技术有限公司）试剂盒反转录合成cDNA，放置−20 ℃保存备用。

参考前期蛋白组测序结果，结合NCBI数据库二倍体森林草莓同源基因（XP_004291668.1），利用SnapGene设计正反特异引物*FaNAC56*-F和*FaNAC56*-R，采用金普莱公司Pfu高保真DNA聚合酶（2×HI-FI PCR Mix）扩增目的基因。反应体系50 μL，包括2×HI-FI PCR Mix 25 μL，正反引物各2 μL，去离子水20 μL，DNA模板1 μL。扩增反应条件：95 ℃预变性5 min，95 ℃变性25 s，60 ℃退火25 s，

72 ℃延伸15 s，35个循环，72 ℃终延伸10 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测后切胶回收目的条带，然后连接至pEASY-Blunt Cloning Vector（北京全式金生物技术有限公司）并转化大肠杆菌DH5α（北京擎科新业生物技术有限公司），阳性克隆送北京睿博兴科生物技术有限公司进行测序。

### 1.3　*FaNAC56*启动子的克隆

采用CTAB法提取红颜草莓幼叶DNA，−20 ℃保存备用。参考GDR（Genome Database for Rosaceae）上登录的森林草莓和栽培草莓的基因组序列，利用SnapGene软件设计两条特异性引物*FaNAC56*Pro-F和*FaNAC56*Pro-R（表1），采用金普莱公司Pfu高保真DNA聚合酶（2×HI-FI PCR Mix）扩增目的基因。反应体系50 μL，包括2×HI-FI PCR Mix 25 μL，正反引物各2 μL，去离子水20 μL，DNA模板1 μL。扩增反应条件：95 ℃预变性5 min，95 ℃变性25 s，58 ℃退火25 s，72 ℃延伸15 s，35个循环，72 ℃终延伸10 min。回收PCR产物并进行测序。

**表1　本研究中所用引物**

**Table 1　The specific primers of this study**

| 引物名称<br>Primers name | 引物序列（5’—3’）<br>Primer sequence（5’—3’） |
|---|---|
| *FaNAC56*-F | ATGGAGAGCACCGACTCGTC |
| *FaNAC56*-R | CTAAGAATACCAATTCCCCGGAAGTTGA |
| *FaNAC56*Pro-F | GTGTCTAGCGTCTACACTATACCT |
| *FaNAC56*Pro-R | CTGATGAGGTTTTTGAAGCCAAG |
| RT-qPCR-*FaNAC56*-F | GATGATTGGGTGCTTTGTCG |
| RT-qPCR-*FaNAC56*-R | AAGCAGAATGGCAATAGAACC |
| RT-qPCR-*FaActin*-F | TGCATATATCAAGCAACTTTACACTGA |
| RT-qPCR-*FaActin*-R | ATAGCTGAGATGGATCTTCCTGT |
| *FaNAC56*-GFP-F | ttcataaccaatctcgatacaccaaatcgactctagaATGGAGAGCACCGACTCGTC |
| *FaNAC56*-GFP-R | tgctcaccatggtaccggatccaCTAGTAGAATACCAATTCCCCGGAAGTTGA |

### 1.4　*FaNAC56*的生物信息学分析

利用ORFfinder（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/）、Conserved domains（https://www. ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi）、TMHMM（http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/）、ProtParam（http://web.expasy.org/protparam/）、Expasy（http://www.expasy.org）等生物学在线网站对FaNAC56进行蛋白质分子质量、等电点、疏水性和保守结构域的预测，根据得到的FaNAC56氨基酸序列，利用MEGA软件进行氨基酸序列的同源性比对并构建系统进化树。并利用PlantCARE网站（http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/）分析*FaNAC56*启动子的序列特征。利用PlantPan（http://plantpan.itps.ncku.edu.tw/）网站对FaNAC56的靶基因进行预测。

### 1.5　*FaNAC56*荧光定量分析

提取圆片温育各样品RNA并进行反转录（方法同1.2），cDNA模板−20 ℃保存备用。根据克隆得到的*FaNAC56*的cDNA序列，利用Primer 5软件在保守区设计荧光定量引物RT-qPCR-*FaNAC56*-F和RT-qPCR-*FaNAC56*-R（表1），以草莓的*Actin*为内参基因[23-25]，采用Bio-Rad CFX96荧光定量PCR仪，检测草莓不同器官和不同处理的*FaNAC56*转录水平。荧光定量PCR采用10 μL体系，其中包括SYBR Green荧光染料5 μL，上、下游引物各0.25 μL，cDNA 2 μL，去离子水补足至10 μL。扩增程序为95 ℃预变性30 s；95 ℃变性5 s，55 ℃退火30 s，72 ℃延伸30 s，40个循环。以不加cDNA模板的体系为阴性对照，4孔重复，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法[26]计算相对表达量。采用单因素方差分析数据（$p < 0.05$；$p < 0.01$）。

### 1.6　*FaNAC56*亚细胞定位

利用SnapGene软件设计两条特异性引物*FaNAC56*-GFP-F和*FaNAC56*-GFP-R，以获得的阳性克隆载体为模板，采用高保真酶扩增目标片段，电泳检测后切胶回收。采用限制性内切酶*Xba* Ⅰ和*Spe* Ⅰ对亚细胞定位载体进行双酶切，切胶回收目标片段。采用ClonExpress Ⅱ One Step Cloning Kit（南京诺唯赞生物科技有限公司）同源重组上述回收片段，阳性克隆鉴定测序后提取质粒，−20 ℃保存备用。对照质粒和得到的阳性重组质粒采用冻融法分别转

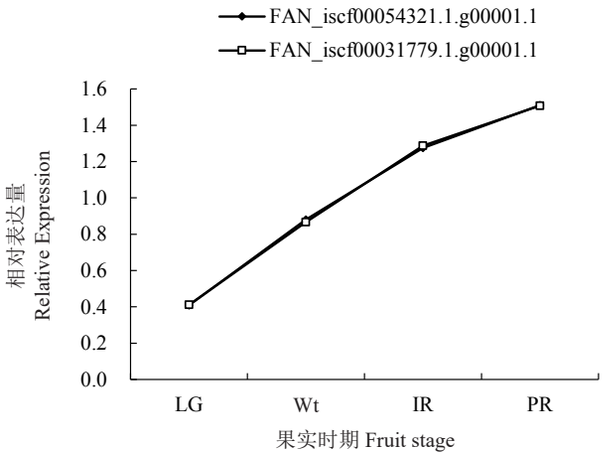
化入农杆菌GV3101，侵染本氏烟草叶片，3 d后在激光共聚焦显微镜（德国卡尔蔡司公司）下观察并拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 *FaNAC56*基因的克隆和同源分析

基于本实验室草莓果实4个时期（LG：大绿期；Wt：白果期；IR：始红期；PR：片红期）中的蛋白组数据（NCBI SAR No. SRP135832），利用Maxquant（v1.5.2.8）分析得到了蛋白的相对表达量，发现了一个随草莓果实成熟表达量逐渐增加的NAC家族转录因子（图1），通过序列分析将其命名为*FaNAC56*。

以红颜草莓果实的cDNA为模板，采用特异性引物（表1）进行PCR扩增，得到了约1000 bp的特异条带（图2）。测序得*FaNAC56*开放阅读框ORF（Open Reading Frame）长度为1035 bp，编码一个344个氨基酸的蛋白。预测其蛋白分子质量为38.3 kDa。Expasy在线分析理论等电点为5.03，亲水性平均值为0.904，为疏水性蛋白。蛋白保守结构域分析表明FaNAC56在N端含有一个NAM结构域（图2），证明其属于NAC转录因子家族。




FAN_iscf00054321.1.g00001.1 和 FAN_iscf00031779.1.g00001.1 表示 NAC56 通过不同剪切方式产生的不同转录本编码产物。LG. 大绿期；Wt. 白果期；IR. 始红期；PR. 片红期。

FAN_iscf00054321.1.g00001.1 and FAN_iscf00031779.1.g00001.1 represented the products encoded by different transcripts of NAC56 produced by alternative splicing. LG. Large green; Wt. White fruit; IR. Initial red; PR. Partial red.

**图1 草莓果实成熟过程中FaNAC56蛋白的相对表达量**

**Fig. 1 The protein relative expression level of FaNAC56 during strawberry fruit ripening**

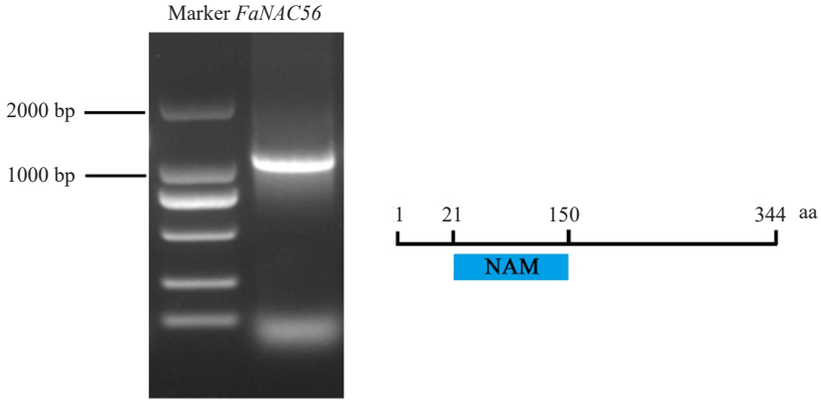



**图2 *FaNAC56*基因的扩增及编码蛋白的保守结构域分析**

**Fig. 2 PCR amplification of *FaNAC56* and protein conserved domain analysis of FaNAC56**

通过MEGA邻接法（Neighbor-Joining method）对草莓*FaNAC56*及森林草莓、月季、苹果、湖北海棠、番木瓜、榴莲、白梨、河岸葡萄和大豆等植物中的同源基因进行聚类分析，并构建系统进化树。结果表明，红颜草莓NAC56与月季NAC56聚为一类，两者相似率为90.75%（图3），为今后*FaNAC56*进行功能研究提供参考。

### 2.2 FaNAC56蛋白的结构预测

为进一步分析FaNAC56蛋白的结构，利用在线数据库对其二级结构进行了预测。结果显示FaNAC56蛋白包含12.21%的$\alpha$-螺旋，19.48%的延伸链、3.78%的$\beta$-翻转和64.53%的无规卷曲，其中无规卷曲所占比例最高，推测其主要是为了连接其他二级结构。

### 2.3 *FaNAC56*的相对表达量

利用RT-qPCR检测了草莓不同器官和草莓果实不同阶段*FaNAC56*的相对表达量（图4）。以草莓*Actin*基因为内参基因，检测*FaNAC56*在草莓不同器官中的表达量以及随果实成熟过程中的表达水

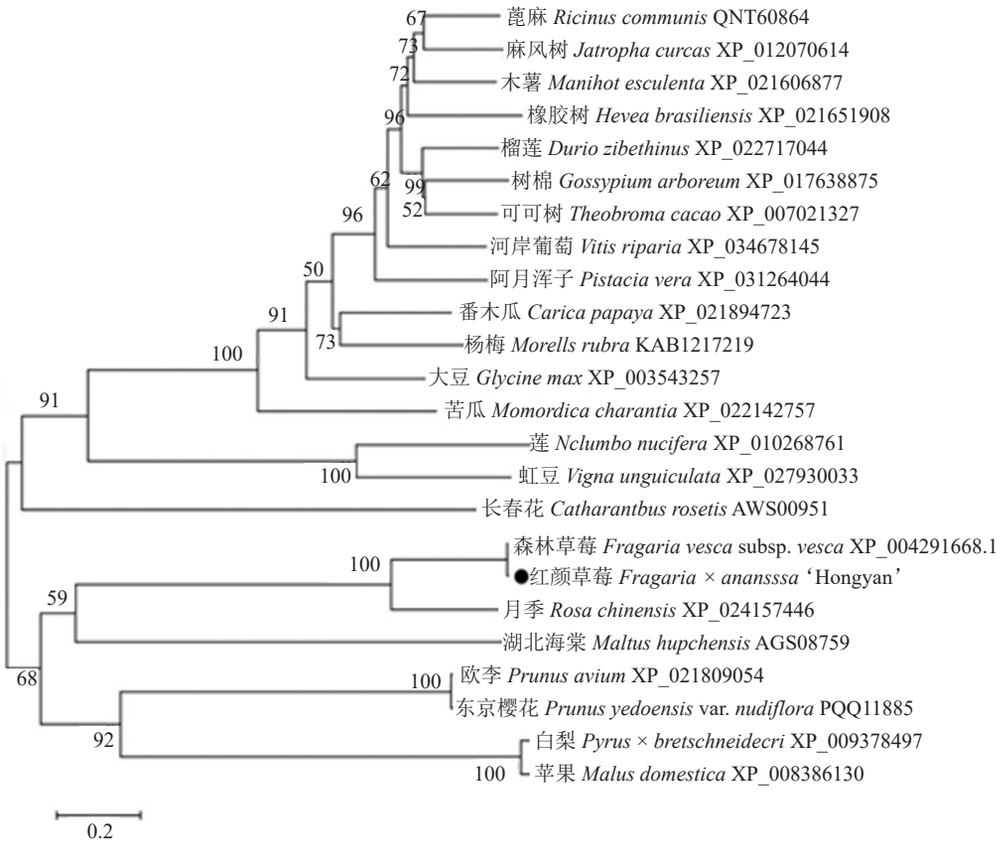


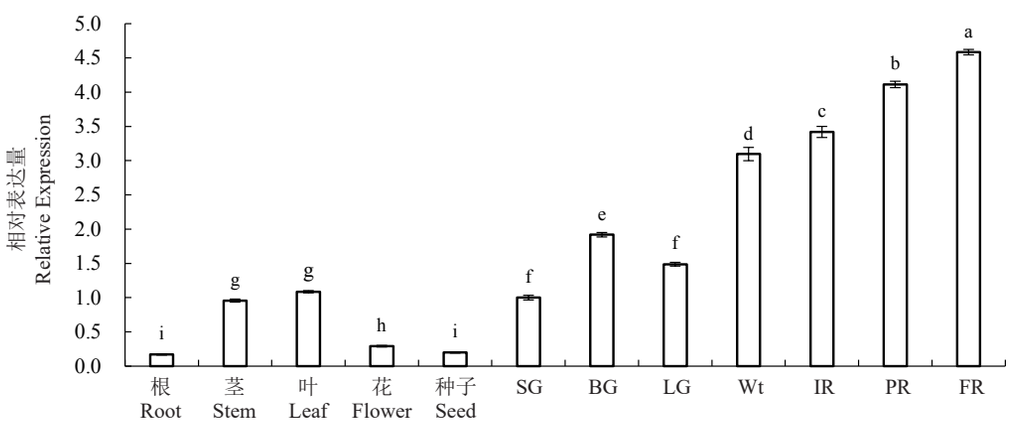

**图 3　FaNAC56 的系统进化分析**

**Fig. 3　The phylogenetic tree of FaNAC56 protein**

平，结果显示*FaNAC56*在果实中的表达量高于根、茎、叶、花和种子，且随着果实成熟*FaNAC56*的表达量增加，全红果实中转录水平最高（图4）。

## 2.4　*FaNAC56*启动子顺式作用元件分析及植物激素处理

为了进一步分析*FaNAC56*的功能，以红颜草莓基因组DNA为模板，扩增了*FaNAC56*起始密码子至上游1500~2000 bp序列（图5）。最终测序得到了1660 bp的序列，经NCBI序列比对后确认为*FaNAC56*启动子序列。使用PlantCARE对*FaNAC56*




SG. 小绿期；LG. 大绿期；DG. 褪绿期；Wt. 白果期；IR. 始红期；PR. 片红期；FR. 全红期。

SG. Small green period; LG. large green period; DG. de-green period; Wt. White fruit period; IR. Initial red period; PR. Partial red period; FR. Full red period.

**图 4　*FaNAC56*在草莓中的相对表达量**

**Fig. 4　Relative expression level patterns of *FaNAC56* in strawberry**

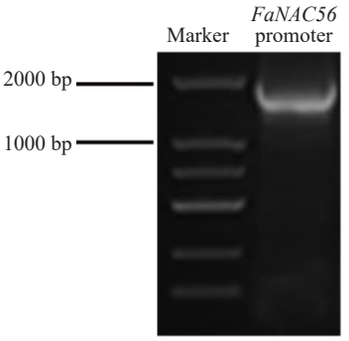



**图5 *FaNAC56*启动子克隆**

**Fig. 5 Cloning of *FaNAC56* promoter**

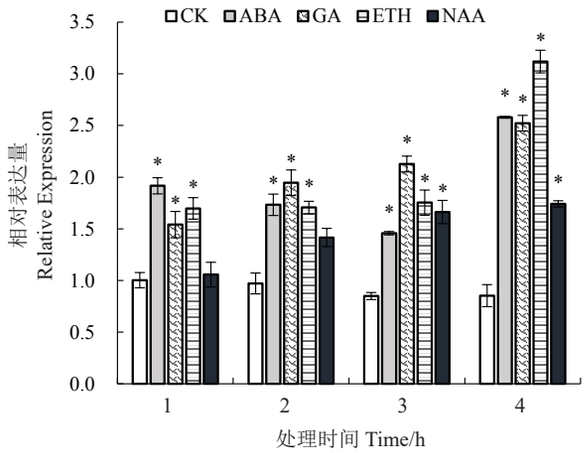
启动子的顺式作用元件进行分析(表2)。分析表明,*FaNAC56*的启动子包含多种激素响应元件:ABA响应元件(ABRE)、乙烯响应元件(ERE)、生长素响应元件(AuxRR-core)、茉莉酸甲酯响应元件(CGTCA-motif、TGACG-motif)和赤霉素响应元件(TCA-element)。此外,还存在MYB结合的干旱响应元件MBS等胁迫响应元件。这些分析表明,*FaNAC56*参与了广泛的植物生长发育及胁迫响应过程。

**表2 *FaNAC56*启动子序列重要顺式作用元件**

**Table 2 Cis-acting regulatory elements in the promoter of *FaNAC56***

| 顺式作用元件名称 *Cis*-acting element name | 序列 Sequence | 位点功能 Function of site |
|---|---|---|
| ABRE | CACGTG, ACGTG | ABA响应 The abscisic acid responsiveness |
| ARE | AAACCA | 厌氧响应 The anaerobic induction |
| ACE | GACACGTATG | 光响应 Light responsiveness |
| ATCT-motif | AATCTAATCC | 光响应 Light responsiveness |
| AuxRR-core | GGTCCAT | 生长素响应 Auxin responsiveness |
| Box4 | ATTAAT | 光响应 Light responsiveness |
| CGTCA-motif | CGTCA | 茉莉酸甲酯响应 MeJA-responsiveness |
| ERE | ATTTCAAA | 乙烯响应 Ethylene-responsive elements |
| G-box | CACGTG | 光响应 Light responsiveness |
| GATA-box | GATAGGG | 光响应 Light responsiveness |
| GT1-motif | GGTTAA | 光响应 Light responsiveness |
| TCA-element | TCAGAAGAGG, CCATCTTTTT | 水杨酸响应 Salicylic acid responsiveness |
| MBS | CAACTG | MYB结合位点,参与干旱响应 MYB binding site involved in drought-inducibility |
| TGACG-motif | TGACG | 茉莉酸甲酯响应 MeJA-responsiveness |

为了验证上述激素对*FaNAC56*是否具有诱导作用,用ABA、GA、NAA和乙烯(ETH)对草莓进行同一时间不同激素的果实圆片温育处理,采用RT-qPCR检测*FaNAC56*的表达水平。经过ABA、GA、NAA、乙烯处理后,分析*FaNAC56*相对表达量,结果表明,*FaNAC56*对不同种激素处理均有响应(图6),表明*FaNAC56*受这些激素诱导。




*表示同一时间不同激素处理与CK之间差异显著($p < 0.05$)。

* indicates significant difference between different hormone treatments and CK at the same time ($p < 0.05$).

**图6 同一时间ABA、GA、NAA、乙烯处理草莓果实后*FaNAC56*的表达水平**

**Fig. 6 Expression levels of FaNAC56 in strawberry fruits treated with ABA, GA, NAA and ethylene at the same time**

100 μmol·L$^{-1}$ ABA处理草莓果实不同时间,1~3 h,*FaNAC56*的相对表达量逐渐降低,但始终高于相应的对照组,在4 h时,*FaNAC56*的表达量达到最高;50 mg·L$^{-1}$ GA处理该基因4 h,*FaNAC56*相对表达量始终高于对照组且相对表达量逐渐升高,在4 h达到最高;100 μmol·L$^{-1}$乙烯处理4 h时,1~3 h,*FaNAC56*相对表达量几乎无变化,但始终高于对照组,在4 h时其相对表达量达到最高;500 μmol·L$^{-1}$ NAA处理该基因4 h,其相对表达量虽均高于对照组,但是其相对表达量变化不明显,在4 h时最高。

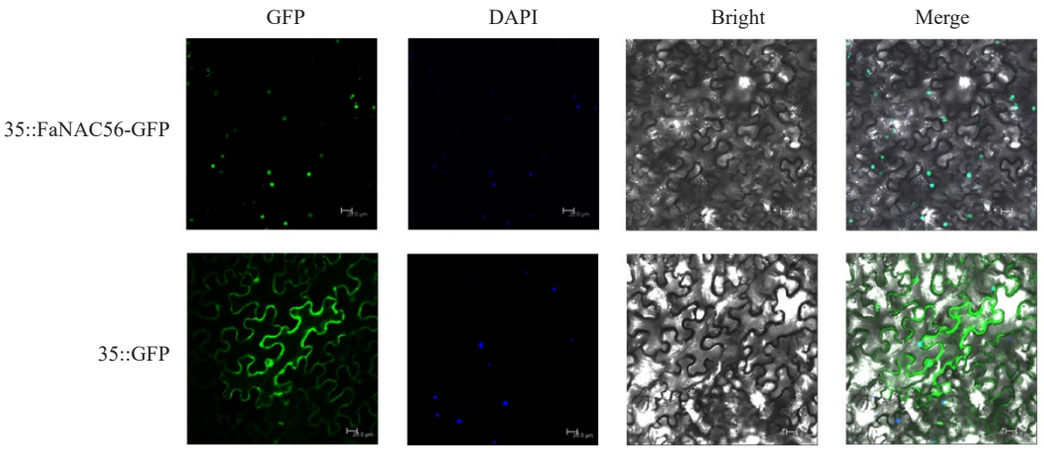
4种激素中,处理1 h时,ABA对*FaNAC56*的诱导表达最明显;处理2 h时,*FaNAC56*相对表达量对GA响应最显著;处理3 h时,仍为GA诱导其表达最明显;处理4 h时,乙烯对*FaNAC56*的诱导最显著。

总之,在100 μmol·L$^{-1}$乙烯处理4 h时,*Fa-*

*NAC56* 的相对表达量与对照组相比上调最高，约为对照组的 3.2 倍。

### 2.5　FaNAC56 的亚细胞定位

为了进一步研究 FaNAC56 在草莓中的蛋白功能，利用 FaNAC56-GFP 融合蛋白进行亚细胞定位分析，以 DAPI 作为核定位标记（图 7）。结果表明，FaNAC56-GFP 融合蛋白在细胞核内表达。




以 GFP::pCAMBIA1300-ProSuper (35::GFP)为对照；DAPI 为核定位标记物。

The GFP::pCAMBIA1300-ProSuper (35::GFP) was used as control. DAPI as the nucleus marker.

**图 7　FaNAC56-GFP 融合蛋白在烟草叶片中的亚细胞定位**

**Fig. 7　Subcellular location of FaNAC56-GFP fusion protein in *Nicotiana tabacum* leaves**

### 2.6　预测 FaNAC56 的靶基因

FaNAC56 转录因子可能在果实成熟过程中发挥重要的调控作用。为了进一步了解 FaNAC56 参与的生物学过程，利用 PlantPan（http://plantpan.itps.ncku.edu.tw/）网站对 FaNAC56 的靶基因进行了预测。结果表明，FaNAC56 具有多个潜在的靶基因，其中涉及了果实成熟相关的基因（表 3）。推测 FaNAC56 可能涉及了多种激素调控。

**表 3　FaNAC56 靶基因预测**

**Table 3　The predictive genes of FaNAC56**

| 基因名称<br>Gene name | 序列号<br>Genebank accession |
|---|---|
| 生长素诱导蛋白 15A-like<br>Auxin-induced protein 15A-like | XM_004290325.2 |
| 乙烯响应转录因子 ERF071<br>Ethylene-responsive transcription factor ERF071 | XM_004290768.2 |
| UDP-糖基转移酶 91C1-like<br>UDP-glycosyltransferase 91C1-like | XM_004287535.2 |
| 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶<br>Serine/threonine-protein kinase Nek5 | XM_011461107.1 |

## 3　讨　论

已有大量研究表明，NAC 转录因子参与果实发育及成熟过程：如调控番茄中乙烯生物合成的关键基因 *NOR* 就属于 NAC 家族，其突变体 *nor* 的果实呈现不能成熟的表型[27]；随后发现的 SlNAC1、SlNAC4 和 SlNAC9 也同样作用于乙烯合成相关基因来调控番茄果实成熟[16,28-29]；在非跃变型果实草莓中，miRNA164 成员可以通过 NAC 转录因子调控采后草莓的衰老[30]；近期的研究相继在桃、柿和枇杷果实中证明了 NAC 在果实成熟中的作用[31-33]；LcNAC13 能够与 LcR1MYB1 相互作用来调节荔枝果实成熟过程中花青素的生物合成[34]；在木瓜果实成熟过程中，CpNAC1 能够激活 CpPDS2/4 的表达从而促进类胡萝卜素的生物合成[35]；CrNAC036 与 CrMYB68 相互作用并负调节 CrNCED5 以抑制柑橘果实成熟过程中的 ABA 生物合成[36]。这些结果表明 NAC 转录因子在果实成熟过程中起重要作用。

另外，NACs 转录因子可通过参与不同激素途径从而调控生物学过程。比如在水稻种子萌发和幼苗形态建成过程中，OsNAC2 一方面直接激活 *OsACO* 和 *OsACO3* 的表达，增强乙烯合成，延迟幼苗建立；另一方面 OsNAC2 结合 *OsNCED3*，*OsZEP1* 及 *OsABA8ox1*，通过 ABA 信号途径延迟种子萌发和胚芽鞘生长。另外，OsNAC2 也可以结合 *OsKO2* 启动子，通过赤霉素信号途径促进幼苗生长[37]。本研究中的 FaNAC56 的靶基因预测结果表明其可能调控多种信号途径的基因表达，暗示 FaNAC56 可能通过不同激素信号途径参与调控草莓果实成熟。

本研究前期围绕红颜草莓果实的不同发育时期

进行蛋白组分析，发现了一个编码NAC保守结构域的蛋白FaNAC56，其蛋白水平的表达量随着果实成熟过程急剧上升。RT-qPCR结果显示，其转录水平同样随着果实成熟过程急剧上升，暗示其在果实成熟中具有重要作用。本研究通过蛋白质保守结构域分析发现，FaNAC56具有一个与植物发育相关的NAM超家族结构域。系统发育分析表明FaNAC56与月季的NAC56亲缘关系最近。RT-qPCR分析表明*FaNAC56*在果实中的表达水平高于根、茎、叶、花和种子，并且在全红时期的果实中表达量达到峰值。*FaNAC56*的启动子含有ABA响应元件、乙烯响应元件、生长素响应元件（AuxRR-core）、赤霉素响应元件（TCA-element），经外源ABA、GA、NAA和乙烯处理后*FaNAC56*的表达被显著诱导，暗示其可能参与果实成熟过程中各激素间的交互作用。亚细胞定位分析显示FaNAC56-GFP在细胞核中积累。FaNAC56的靶基因预测结果表明其可能调控多种靶基因的表达，如生长素诱导蛋白、乙烯响应转录因子、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶等。以上结果表明FaNAC56可能作为一个核心转录因子，通过ABA、赤霉素、生长素和乙烯等多激素途径共同调节草莓果实的成熟过程。

## 4 结 论

研究克隆了*FaNAC56*基因及启动子，预测了其编码蛋白的二级结构、启动子区顺式作用元件以及下游靶基因，证明了FaNAC56在细胞核中定位且其表达受ABA、GA、NAA和乙烯诱导。FaNAC56可能通过多种激素途径调控草莓果实的成熟。

### 参考文献 References:


[1] PRASANNA V，PRABHA T N，THARANATHAN R N. Fruit ripening phenomena--an overview[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition，2007，47(1)：1-19.

[2] FORLANI S，MASIERO S，MIZZOTTI C. Fruit ripening：the role of hormones，cell wall modifications，and their relationship with pathogens[J]. Journal of Experimental Botany，2019，70(11)：2993-3006.

[3] JAAKOLA L. New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits[J]. Trends Plant Science，2013，18(9)：477-483.

[4] GIOVANNONI J. Molecular biology of fruit maturation and ripening[J]. Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology，2001，52(1)：725-749.

[5] YAMASAKI K，KIGAWA T，INOUE M，WATANABE S，TATENO M，SEKI M，SHINOZAKI K，YOKOYAMA S. Structures and evolutionary origins of plant-specific transcription factor DNA-binding domains[J]. Plant Physiology Biochemistry，2008，46(3)：394-401.

[6] GONG W，SHEN Y P，MA L G，PAN Y，DU Y L，WANG D H，YANG J Y，HU L D，LIU X F，DONG C X，MA L，CHEN Y H，YANG X Y，GAO Y，ZHU D，TAN X，MU J Y，ZHANG D B，LIU Y L，DINESH-KUMAR S P，LI Y，WANG X P，GU H Y，QU L J，BAI S N，LU Y T，LI J Y，ZHAO J D，ZUO J，HUANG H，DENG X W，ZHU Y X. Genome-wide ORFeome cloning and analysis of *Arabidopsis* transcription factor genes[J]. Plant Physiology，2004，135(2)：773-782.

[7] XIONG Y，LIU T，TIAN C，SUN S，LI J，CHEN M. Transcription factors in rice：a genome-wide comparative analysis between monocots and eudicots[J]. Plant Molecular Biology，2005，59(1)：191-203.

[8] SHAN W，KUANG J F，CHEN L，XIE H，PENG H H，XIAO Y Y，LI X P，CHEN W X，HE Q G，CHEN J Y，LU W J. Molecular characterization of banana NAC transcription factors and their interactions with ethylene signalling component EIL during fruit ripening[J]. Journal of Experimental Botany，2012，63(14)：5171-5187.

[9] OSORIO S，ALBA R，DAMASCENO C M，LOPEZ-CASADO G，LOHSE M，ZANOR M I，TOHGE T，USADEL B，ROSE J K，FEI Z，GIOVANNONI J J，FERNIE A R. Systems biology of tomato fruit development：combined transcript，protein，and metabolite analysis of tomato transcription factor (nor，rin) and ethylene receptor (Nr) mutants reveals novel regulatory interactions[J]. Plant Physiology，2011，157(1)：405-425.

[10] ZHU M，CHEN G，ZHOU S，TU Y，WANG Y，DONG T，HU Z. A new tomato NAC (NAM/ATAF1/2/CUC2) transcription factor，SlNAC4，functions as a positive regulator of fruit ripening and carotenoid accumulation[J]. Plant and Cell Physiology，2014，55(1)：119-135.

[11] KOU X，LIU C，HAN L，WANG S，XUE Z. NAC transcription factors play an important role in ethylene biosynthesis，reception and signaling of tomato fruit ripening[J]. Molecular Genetics and Genomics，2016，291(3)：1205-1217.

[12] MENG C，YANG D，MA X，ZHAO W，LIANG X，MA N，MENG Q. Suppression of tomato SlNAC1 transcription factor delays fruit ripening[J]. Journal of Plant Physiology，2016，193：88-96.

[13] STEPANOVA A N，ROBERTSON-HOYT J，YUN J，BENAVENTE L M，XIE D Y，DOLEZAL K，SCHLERETH A，JÜRGENS G，ALONSO J M. TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development[J]. Cell，2008，133(1)：177-191.

[14] BUSATTO N，TADIELLO A，TRAINOTTI L，COSTA F. Climacteric ripening of apple fruit is regulated by transcriptional circuits stimulated by cross-talks between ethylene and auxin[J].

Plant Signaling Behavior，2017，12(1)：e1268312.

[15] ZHANG M，YUAN B，LENG P. The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit[J]. Journal of Experimental Botany，2009，60(6)：1579-1588.

[16] MA N N，FENG H L，MENG X，LI D，YANG D Y，WU C G，MENG Q W . Overexpression of tomato SlNAC1 transcription factor alters fruit pigmentation and softening[J]. BMC Plant Biology，2014，14(1)：351-360.

[17] KOU X，WANG S，WU M，GUO R，XUE Z，MENG N，TAO X M，CHEN M M，ZHANG Y F. Molecular characterization and expression analysis of NAC family transcription factors in tomato[J]. Plant Molecular Biology Reporter，2014，32(2)：501-516.

[18] KOU X，WATKINS C B，GAN S S. Arabidopsis AtNAP regulates fruit senescence[J]. Journal of Experimental Botany，2012，63(17)：6139-6147.

[19] ARNAUD N，GIRIN T，SOREFAN K，FUENTES S，WOOD T A，LAWRENSON T，OSTERGAARD L. Gibberellins control fruit patterning in *Arabidopsis thaliana*[J]. Gene and Development，2010，24(19)：2127-2132.

[20] SHAHNEJAT-BUSHEHRI S，ALLU A D，MEHTEROV N，THIRUMALAIKUMAR V P，ALSEEKH S，FERNIE A R，MUELLER- ROEBER B，BALAZADEH S. *Arabidopsis* NAC transcription factor JUNGBRUNNEN1 exerts conserved control over gibberellin and brassinosteroid metabolism and signaling genes in tomato[J]. Frontiers in Plant Science，2017，8：214.

[21] COVEY S N，AL-KAFF N S. Plant DNA virus and gene silencing[J]. Plant Molecular Biology，2000，43(2)：307-322.

[22] JIA H F，CHAI Y M，LI C L，LU D，LUO J J，QIN L，SHEN Y Y. Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening[J]. Plant Physiology，2011，157(1)：188-199.

[23] DELPORTE M，LEGRAND G，HILBERT J L，GAGNEUL D. Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis of gene expression in *Cichorium intybus*[J]. Frontiers in Plant Science，2015，6：651.

[24] ZHU X，LI X，CHEN W，CHEN J，LU W，CHEN L，FU D. Evaluation of new reference genes in papaya for accurate transcript normalization under diferent experimental conditions[J]. PLoS One，2012，7(8)：e44405.

[25] JAIN M，NIJHAWAN A，TYAGI A K，KHURANA J P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications，2006，345(2)：646-651.

[26] LIVAK K J，SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method[J]. Methods，2001，25(4)：402-408.

[27] MARTEL C，VREBALOV J，TAFELMEYER P，GIOVANNONI J J. The tomato MADS-box transcription factor RIPENING INHIBITOR interacts with promoters involved in numerous ripening processes in a COLORLESS NONRIPENING-dependent manner[J]. Plant Physiology，2011，157(3)：1568-1579.

[28] ZHU M K，CHEN G P，ZHOU S，TU Y，WANG Y，DONG T T，HU Z L. A new tomato NAC (NAM/ATAF1/2/CUC2) transcription factor，SlNAC4，functions as a positive regulator of fruit ripening and carotenoid accumulation[J]. Plant and Cell Physiology，2014，55(1)：119-135.

[29] KOU X，LIU C，HAN L，WANG S，XUE Z. NAC transcription factors play an important role in ethylene biosynthesis，reception and signaling of tomato fruit ripening[J]. Molecular Genetics Genomics，2016，291(3)：1205-1217.

[30] XU X，YIN L，YING Q，SONG H，XUE D，LAI T，SHEN B，WANG H，XU M，SHI X. High-throughput sequencing and degradome analysis identify miRNAs and their targets involved in fruit senescence of *Fragaria ananassa*[J]. PLoS One，2013，8(8)：e70959.

[31] PIRONA R，EDUARDO I，PACHECO I，LINGE C D S，MICULAN M，VERDE I，TARTARINI S，DONDINI L，PEA G，BASSI D，ROSSINI L. Fine mapping and identification of a candidate gene for a major locus controlling maturity date in peach[J]. BMC Plant Biology，2013，13(1)：166.

[32] MIN T，WANG M M，WANG H，LIU X，FANG F，GRIERSON D，YIN X R，CHEN K S. Isolation and expression of NAC genes during persimmon fruit postharvest astringency removal[J]. International Journal Molecular Sciences，2015，16(1)：1894-1906.

[33] XU Q，WANG W Q，ZENG J K，ZHANG J，GRIERSON D，LI X，YIN X R，CHEN K S. A NAC transcription factor，EjNAC1，affects lignification of loquat fruit by regulating lignin[J]. Postharvest Biology and Technology，2015，102：25-31.

[34] JIANG G，LI Z，SONG Y，ZHU H，LIN S，HUANG R，JIANG Y，DUAN X. LcNAC13 physically interacts with LcR1MYB1 to coregulate anthocyanin biosynthesis-related genes during litchi fruit ripening[J]. Biomolecules，2019，9(4)：135.

[35] FU C C，HAN Y C，FAN Z Q，CHEN J Y，CHEN W X，LU W J，KUANG J F. The Papaya transcription factor CpNAC1 modulates carotenoid biosynthesis through activating phytoene desaturase genes CpPDS2/4 during fruit ripening[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2016，64(27)：5454-5463.

[36] ZHU F，LUO T，LIU C，WANG Y，ZHENG L，XIAO X，ZHANG M，YANG H，YANG W，XU R，ZENG Y，YE J，XU J，XU J，LARKIN R M，WANG P，WEN W，DENG X，FERNIE AR，CHENG Y. A NAC transcription factor and its interaction protein hinder abscisic acid biosynthesis by synergistically repressing NCED5 in *Citrus reticulate*[J]. Journal of Experimental Botany，2020，71(12)：3613-3625.

[37] YU J T，MAO C J，ZHONG Q，YAO X F，LI P，LIU C M，MING F. OsNAC2 is involved in multiple hormonal pathways to mediate germination of rice seeds and establishment of seedling[J]. Frontiers in Plant Science，2021，12，699303.