

欧李 NAC 基因家族的鉴定及表达分析

张忠鑫, 郭夕雯, 汪泽文, 王鹏飞, 张建成, 杜俊杰, 穆霄鹏*

(山西农业大学园艺学院, 山西太谷 030801)

摘要:【目的】对 ChNAC 基因进行鉴定并分析其表达模式, 明晰 ChNAC 基因结构, 预测其潜在功能, 筛选抗逆相关基因, 为欧李抗逆性状形成的分子机制研究提供理论依据。【方法】在全基因组数据的基础上对 ChNAC 基因进行生物信息学分析, 并对不同非生物胁迫处理下 ChNAC 基因的转录组数据进行分析。【结果】欧李 NAC 基因家族有 76 个家族成员, 33 个 ChNAC 基因编码碱性氨基酸, 17 个 ChNAC 基因编码酸性氨基酸, 26 个 ChNAC 基因编码中性氨基酸。ChNAC 蛋白均为亲水性蛋白, 80% ChNAC 蛋白为不稳定蛋白, 79% ChNAC 蛋白定位于细胞核中。ChNAC 基因可分为 17 个亚族, 主要为 OsNAC7、ANAC001、ONAC003 等亚族。ChNAC 基因多存在于 Chr5 染色体上, 有 8 对 ChNAC 基因由染色体大片段复制而来, 其中 *ChNAC01*、*ChNAC20*、*ChNAC64* 这 3 条基因是互为共线性。启动子分析结果表明 ChNAC 基因可能参与欧李的生长发育、激素调控及胁迫响应等方面。【结论】ChNAC 基因的表达具有组织特异性。ChNAC 基因家族成员响应不同的胁迫处理, 尤其是 *ChNAC49* 基因在盐胁迫、干旱胁迫、低温胁迫和高温胁迫中均显著上调表达, 推测其可能在欧李抗逆过程中发挥核心作用。

关键词: 欧李; ChNAC 基因家族; 生物信息学分析; 表达模式

中图分类号: S662.3

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2023)02-0206-17

Identification and expression analysis of NAC gene family in *Cerasus humilis*

ZHANG Zhongxin, GUO Xiwen, WANG Zewen, WANG Pengfei, ZHANG Jiancheng, DU Junjie, MU Xiaopeng*

(College of Horticulture Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China)

Abstract: 【Objective】NAC (NAM, ATAF, CUC) gene, involved in a variety of metabolic activities in plants, plays an important role in stress response. With the innovation of technology, the potential functions of the NAC genes have been excavated continuously. However, there are few reports on the NAC gene in *Cerasus humilis*, which has strong adaptability to various stresses. Therefore, this experiment aims to identify the ChNAC gene and to clarify the structure and function of the gene by analyzing its expression pattern under different conditions. 【Methods】Based on the whole genome and transcriptome data of *C. humilis*, combined with a variety of online websites, this study will identify and sort out the NAC gene family of *C. humilis*. The evolutionary relationship, conserved motif, chromosome distribution, collinearity and promoter of the *C. humilis* NAC family genes were also analyzed. Taking Nongda No. 4 as a material, 200 mmol·L⁻¹ NaCl solution and 20% PEG6000 solution were used to simulate salt and drought stress, while 4 °C and 40 °C treatments were conducted to simulate low and high temperature stress, and 25 °C treatment was used as control. Five biological replicates were set for each treatment. After 48 hours, 3 leaves were collected from the middle of each plant, respectively. RNA samples were sent to the company for transcriptome sequencing. Based on the transcriptome sequencing results,

收稿日期: 2022-08-11 接受日期: 2022-09-29

基金项目: 山西省优秀博士来晋工作奖励资金科研项目 (SXYBKY2018041); 山西农业大学 2019 年科技创新博士科研启动基金项目 (2018YJ06); 中国博士后科学基金面上项目 (2017M621106)

作者简介: 张忠鑫, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 园艺植物种质创新与利用。Tel: 18219739467, E-mail: 2228370246@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 15110671026, E-mail: 15110671026@163.com

expression heat map of the ChNAC genes were drawn after data screening. 【Results】There are 76 members in the NAC gene family of *C. humilis*. Most of the ChNAC genes encode basic amino acids. Most of the ChNAC proteins are hydrophilic and unstable proteins. The ChNAC proteins are mostly located in the nucleus, and the rest are located in the cytoplasm, endoplasmic reticulum, and vesicles. The proportion of Alpha helix is 10.85%-45.05%; the proportion of extended strand is 9.69%-25.27%; the proportion of β turn is 0% -9.65%; and the proportion of random coil is 38.29%-70.60%. ChNAC gene can be divided into 17 subfamilies, mainly including OSNAC7, ANAC001, ONAC009 and other subfamilies. The number of CDS fragments of the ChNAC gene ranges from 1 to 8. Most ChNAC genes are composed of motif 2, motif 8, motif 4, motif 5, motif 3, motif 6, motif 1 and motif 7. ChNAC gene mostly exists in the Chr 5 chromosome, which has 19 family members. Eight pairs of ChNAC genes are copied from large fragments of chromosome, among which three genes, including *ChNAC01*, *ChNAC20* and *ChNAC64*, are collinear with each other. The results of promoter analysis showed that ChNAC gene may play roles in the growth and development, hormone regulation and stress response of *C. humilis*. In short, the functions of ChNAC gene are diverse and it has different biological roles. ChNAC gene also plays a great role in the growth and development of *C. humilis*. In order to study the expression pattern of ChNAC gene under stress environment, naturally grown Nongda No. 4 seedlings were used as the control, and the seedlings were treated with 200 mmol · L⁻¹ NaCl solution or 20% PEG6000 solution, at 4 °C or 40 °C to simulate salt stress, drought stress, low temperature stress and high temperature stress, respectively. The expression of *ChNAC49* gene significantly increased under the above stresses. Under salt stress, the expression of *ChNAC49* gene increased by 477 times compared with the control, while the expression of *ChNAC49* gene increased by 124 times under drought stress compared with the control. Interestingly, the expression of *ChNAC49* gene increased by 28 times under low temperature stress and its expression was up-regulated by 27.95 times under high temperature treatment. The expression of *ChNAC64* gene decreased most with salt stress group by 14.29%, and *ChNAC17* gene's expression decreased most with drought stress group by 15.96%. The expression of *ChNAC01* gene decreased most under high temperature stress, which was only 16.01% of that with control. The expression of *ChNAC11* gene decreased most under high temperature stress, which was only 26.14% of that with control. These genes may play important roles in the above four stress conditions respectively, and may help *C. humilis* plants to maintain the normal growth and development under stress environments. In particular, the expression of *ChNAC49* gene under salt, drought and low temperature stresses had the highest amplitude, and the expression of *ChNAC49* gene under high temperature stress was second, only next to that of *ChNAC08*. It is speculated that it may also play an important role in more stresses. 【Conclusion】This study identified and analyzed the physical and chemical properties and possible functions of 76 ChNAC genes, and identified the expression pattern of each ChNAC gene under different stress conditions, which lays a theoretical foundation for further study on ChNAC genes.

Key words: *Cerasus humilis*; ChNAC gene family; Bioinformatics analysis; Expression pattern

欧李(*Cerasus humilis*)属于蔷薇科樱桃属植物^[1],作为我国特有的矮生灌木果树资源,是实施“退耕还林”的重要树种之一。欧李树种适应性强,耐干旱、耐贫瘠、耐盐碱,对生长环境要求较低,具有短期内速生繁殖等优点^[2]。目前,欧李在我国中西部干旱和半干旱地区以及一些退化工矿用地推广应

用,不仅作用于改良土壤结构,还具有一定的经济效益^[3]。

植物在生长发育过程中会受到非生物性胁迫和生物性胁迫的危害。在长期进化过程中,为了更好的生存,植物产生了一系列生理生化机制来适应、抵御不良影响的影响^[4-5]。基因表达调控是一种重要的

防御机制^[6-7]。

NAC 基因家族是植物中最大的基因家族之一, 且是植物所特有的基因家族^[8]。NAC 转录因子的命名取自矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 的 *NAM* (no apical meristem) 基因、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的 *ATAF1/ATAF2* 基因、以及 *CUC2* (cup-shaped cotyledon) 基因的首字母^[9]。1996 年, Souer 等^[10]从矮牵牛中克隆出第一个 NAC 家族成员 *NAM*。NAC 基因家族参与植物的根、茎、叶、花等器官的生长发育、果实成熟、激素调控^[11-14]。同时, NAC 基因也参与植物激素调控, 如拟南芥 *ATAF1*、水稻 *OsNAP*, 水稻 *SNAC2*^[15-17] 被证明参与 ABA 信号转导途径; *ANAC072* 基因参与 MeJA 信号转导途径, 细胞分裂素、乙烯、赤霉素等的信号转导途径也有 NAC 基因的参与^[13, 18-19]。NAC 基因在植物抗干旱、冷害、高温、高盐等非生物胁迫中同样发挥着重要作用。Tran 等^[20]过表达 3 个 NAC 基因 (*ANAC019*、*ANAC055*、*ANAC072*), 使拟南芥的抗旱能力显著提高。Jeong 等^[21]发现干旱处理中 *OsNAC10* 基因在水稻根和穗中的表达量显著提高, 当该基因过表达时, 可促进根生长, 显著提高水稻产量。Lu 等^[22]将 NAC 家族中的 *ATAF1* 基因敲除后, 拟南芥 *ataf1-1* 和 *ataf1-2* 突变体在干旱响应试验中的恢复率相比于野生型, 提高了 6 倍左右。Hao 等^[23]发现大豆中的 *GmNAC11* 基因和 *GmNAC20* 基因响应冷害胁迫, 基因过表达植株对低温的耐受性显著提高, Hegedus 等^[24]在欧洲油菜中也证明 NAC 基因作用于冷害胁迫。Mao 等^[25]将小麦中的 *TaNAC2* 基因在拟南芥中过表达, 其与对照组相比抗低温能力显著提高。Dong 等^[26]发现玉米 NAC 家族中的 *NUTI* 基因调控水分转运, 从而影响玉米的高温表型, 而 *NUTI* 基因表达的时空特异性有利于农作物应对田间水分的不断变化, *NUTI* 基因可作为未来农作物抗高温胁迫的重要靶。梁晓庆^[27]对番茄进行高温胁迫, 结果表明抑制 *SINAC1* 基因表达的转基因植株相比于正常植株抗高温能力显著降低, 即证明 *SINAC1* 基因正向调控番茄对高温的抗性。Li 等^[28]在拟南芥和大豆毛状根中过表达 *GmNAC06* 基因, 植株均表现出较强的耐盐性, 表明 *GmNAC06* 基因在盐胁迫响应中发挥作用。Zheng 等^[29]研究发现, 过表达 *OsNAC45* 基因增强了转基因水稻的耐盐性。近年来, NAC 基因家族在病害、虫害等生物性胁迫方面的研究也取得重要成果^[30-36]。

基于已发表的欧李全基因组数据, 笔者在本研究中采用生物信息学分析方法, 对欧李 NAC 基因家族进行鉴定, 并对其家族成员的理化性质、基因结构、染色体定位、共线性、启动子进行分析。同时, 对不同胁迫处理下 ChNAC 基因成员的表达量进行分析, 旨在挖掘胁迫响应的关键 ChNAC 基因, 为欧李抗逆品种的选育奠定基础。

1 材料和方法

1.1 欧李 NAC 基因家族成员的鉴定及理化性质分析

欧李的全基因组数据来自 Wang 等^[37]的报道, 从 pfam (<http://pfam.xfam.org/>) 数据库中获得桃 NAC 基因的 Hmmer 文件, 对欧李全基因组数据进行本地 BLAST。并结合 NCBI 在线网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中桃、扁桃等相近物种的 NAC 序列对欧李的 NAC 基因进行补充、完善并剔除重复。利用 ExPASy 网站 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析欧李 NAC 基因的氨基酸数量、等电点、不稳定系数等理化性质。利用 PSORT 在线网站 (<https://psort.hgc.jp/form2.html>) 对亚细胞定位进行预测。利用 SOPMA 在线网站 (<https://prabi.ibcp.fr/html/site/web>) 对蛋白质二级结构进行分析^[38-39]。

1.2 欧李 NAC 基因家族分类

从 TAIR 在线网站中 (<https://www.arabidopsis.org/>) 下载拟南芥 NAC 基因家族的蛋白质序列与欧李 NAC 基因家族的蛋白序列进行比对。使用 MEGA7 软件, 将 Bootstrap 重复值设定为 1000, 其他参数均为默认值, 采用邻接法构建系统进化树^[38-39]。

1.3 欧李 NAC 基因家族基因结构分析

利用 MEME 在线网站 (<https://meme-suite.org/meme>) 对 NAC 蛋白的 motif 基序进行预测, 整合 NAC 蛋白的位置信息, 利用 Ttools 软件绘图并分析^[38-39]。

1.4 欧李 NAC 基因家族染色体定位和共线性分析

对欧李的 NAC 蛋白的位置信息和所处的染色体进行编号整理。利用 Ttools 软件绘制图表^[38-39]。

1.5 欧李 NAC 基因家族启动子分析

从欧李全基因组数据库中查找各 NAC 转录因子 ATG 密码子前 2000 bp 的序列, 利用 PlantCARE 在线网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webTtools/plantcare/html/>) 对其功能进行预测、整理。利

用Origin软件绘制功能分布柱状图^[38-39]。

1.6 欧李NAC基因组织特异性分析

采欧李品种农大4号成熟期果实、叶片、根状茎、种仁及一年生根送往Biomarker公司,提取各样品的总RNA,对RNA的质量进行检测,检测合格后构建cDNA文库,进行Illumina HiSeq平台高通量测序。获得不同组织基因的转录组文件后,利用注释信息对NAC基因进行筛选、整理。用Tbtool软件绘制基因表达热图^[38-39]。

1.7 欧李NAC基因家族在胁迫诱导下的表达模式分析

以山西农业大学欧李种质资源圃欧李品种农大4号嫩枝扦插苗做材料。待扦插苗长至株高25 cm、具有10枚叶片时,选择根系发育旺盛的材料移至霍格兰溶液中进行水培。将植株分别置于加入了200 mmol·L⁻¹ NaCl溶液或20% PEG6000溶液的霍格兰溶液中,25℃处理48 h作为盐处理及干旱处理,将植株置于加入等量清水的霍格兰溶液中,25℃处理48 h,作为对照。将植株置于霍格兰溶液培养,分别进行4℃处理48 h做低温处理或40℃处理48 h做高温处理,以25℃处理48 h,作为对照。每个处理设置5个生物学重复,48 h后分别在每株上采集植株中部3枚叶片,液氮处理后送往Biomarker公司,取各样品的总RNA,对RNA的质量进行检测,检测合格后构建cDNA文库,进行Illumina HiSeq平台高通量测序。获得不同组织基因的转录组文件后,利用注释信息对NAC基因进行筛选、整理。最后使用Tbtools软件绘制欧李NAC基因表达热图^[40-42]。

2 结果与分析

2.1 欧李NAC基因家族的理化性质分析

通过本地BLAST和NCBI网站与桃等相近物种进行比对,利用NCBI预测其结构域,共筛选得到76条NAC基因,根据欧李的拉丁文种名(*Cerasus humilis*),按照基因位置信息依次编号为*ChNAC01*-*ChNAC76*(表1)。

欧李NAC基因的理化性质和亚细胞定位结果表明,欧李NAC基因中氨基酸最少的为*ChNAC23*基因,仅有85个氨基酸,其相对分子质量为10 398.78 ku;最多的为*ChNAC65*基因,有854个氨基酸,其相对分子质量为95 216.85 ku。55个ChNAC基因的氨基酸数量集中在200~400个之

间。ChNAC蛋白的等电点值在4.28~9.63之间,其中碱性蛋白33个,酸性蛋白17个,中性蛋白26个。ChNAC蛋白多为不稳定蛋白,仅有15个NAC蛋白的不稳定指数小于40,为稳定蛋白。其余61个NAC蛋白的不稳定指数均大于40为不稳定蛋白。ChNAC蛋白的总平均疏水指数为-0.381~-1.023,均为亲水性蛋白。亚细胞定位结果显示:*ChNAC33*蛋白定位于内质网;*ChNAC55*蛋白定位于囊泡中;*ChNAC02*、*ChNAC09*、*ChNAC11*等15个蛋白定位于细胞质中;其余ChNAC蛋白均定位于细胞核中。亚细胞定位结果的多样性,表明ChNAC蛋白在细胞的不同部位,不同细胞器中行使不同的功能,为植物体的正常生命活动提供保障。

为进一步明确ChNAC蛋白的空间结构,利用在线网站(<https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/>)分别对76条ChNAC蛋白的二级结构进行了预测,分析了其 α -螺旋、延伸链、 β -转角及无规则卷曲所占的比例。其中, α -螺旋所占比例在10.85%~45.05%之间;延伸链所占比例在9.69%~25.27%之间; β -转角所占比例在0~9.65%之间;无规则卷曲所占比例在38.29%~70.60%之间(表2)。

2.2 欧李NAC基因系统进化分析

研究利用拟南芥的NAC基因序列做对照,参考Hisako等^[8]的研究结果将ChNAC基因分为17个亚族。不同的亚族在功能及进化关系上存在差异^[43]。ONAC01亚族中不含有ChNAC基因,说明ONAC001亚族中的拟南芥NAC基因与ChNAC基因无进化关系,其余亚族中均存在数量不等的ChNAC基因。ChNAC成员数量超过10个的有2个亚族。ANAC001亚族中的家族成员数量最多,有15个家族成员。ONAC003亚族中含有11个家族成员。研究表明,ANAC001亚族作用于植物的生长发育及胁迫应答过程^[44],ONAC003亚族参与调节开花时节^[45],推测欧李NAC基因多具备以上功能。其余亚族中的成员数量均小于10个;TIP亚族中有8个家族成员;NAC2亚族和OsNAC7亚族中均有7个家族成员;ONAC022亚族中有6个家族成员;NAP亚族中有5个家族成员;ANAC063亚族中有3个家族成员;ATAF亚族,NAM亚族,SENU5亚族,TERN亚族,ANAC011亚族及OsNAC8亚族中都有2个家族成员。AtNAC3亚族,NAC1亚族中仅具有1个家族成员(图1)。

表 1 ChNAC 蛋白的理化性质分析

Table 1 Physicochemical properties of ChNAC

基因编号 Gene name	氨基酸数 Number of amino acids	相对分子质量 Molecular mass/ku	等电点 Theoretical pI	不稳定指数 Instability index	平均疏水指数 RAVY	亚细胞定位 SORT prediction
ChNAC01	258	29 428.40	9.12	47.87	-0.694	细胞核 Nuclear
ChNAC02	229	26 326.76	5.06	38.00	-0.494	细胞质 Cytoplasmic
ChNAC03	302	34 291.52	5.83	42.04	-0.861	细胞核 Nuclear
ChNAC04	382	42 385.30	6.18	56.34	-0.649	细胞核 Nuclear
ChNAC05	265	30 261.12	9.14	56.34	-0.680	细胞核 Nuclear
ChNAC06	296	34 078.33	8.09	62.96	-0.892	细胞核 Nuclear
ChNAC07	206	23 530.06	5.05	50.91	-0.716	细胞核 Nuclear
ChNAC08	201	22 862.38	5.97	54.77	-0.878	细胞核 Nuclear
ChNAC09	389	43 622.59	5.76	46.46	-0.629	细胞质 Cytoplasmic
ChNAC10	390	43 735.75	5.76	46.37	-0.616	细胞核 Nuclear
ChNAC11	253	28 825.26	5.48	48.54	-0.725	细胞质 Cytoplasmic
ChNAC12	348	39 822.95	8.46	37.04	-0.676	细胞核 Nuclear
ChNAC13	290	33 389.76	6.33	46.43	-0.766	细胞核 Nuclear
ChNAC14	381	43 877.27	6.14	42.92	-0.781	细胞核 Nuclear
ChNAC15	363	41 510.05	4.92	42.78	-0.826	细胞核 Nuclear
ChNAC16	350	39 320.13	8.09	42.81	-0.632	细胞核 Nuclear
ChNAC17	370	41 940.84	6.96	37.11	-0.708	细胞核 Nuclear
ChNAC18	298	34 146.74	9.02	32.51	-0.703	细胞核 Nuclear
ChNAC19	318	35 906.43	8.47	51.91	-0.858	细胞核 Nuclear
ChNAC20	237	27 137.64	9.63	50.72	-0.811	细胞核 Nuclear
ChNAC21	387	42 572.33	5.16	40.51	-0.606	细胞核 Nuclear
ChNAC22	340	39 640.98	8.21	30.62	-0.632	细胞核 Nuclear
ChNAC23	92	10 398.78	5.12	58.82	-0.436	细胞质 Cytoplasmic
ChNAC24	558	62 298.82	5.32	40.43	-0.524	细胞质 Cytoplasmic
ChNAC25	558	62 284.78	5.22	39.84	-0.523	细胞质 Cytoplasmic
ChNAC26	222	24 308.61	4.38	58.19	-0.818	细胞核 Nuclear
ChNAC27	320	36 994.21	6.09	44.97	-0.831	细胞核 Nuclear
ChNAC28	302	34 291.52	5.83	42.04	-0.861	细胞核 Nuclear
ChNAC29	185	21 772.88	8.11	50.19	-0.742	细胞质 Cytoplasmic
ChNAC30	218	25 739.31	6.04	58.59	-0.767	细胞质 Cytoplasmic
ChNAC31	468	54 597.37	7.21	48.64	-0.849	细胞核 Nuclear
ChNAC32	457	53 432.13	7.19	48.23	-0.847	细胞质 Cytoplasmic
ChNAC33	469	54 660.51	7.21	47.87	-0.828	内质网 Endoplasmic reticulum
ChNAC34	379	43 945.31	4.67	61.67	-0.956	细胞核 Nuclear
ChNAC35	353	39 512.75	4.98	56.00	-0.905	细胞核 Nuclear
ChNAC36	467	52 819.74	4.75	52.65	-0.735	细胞核 Nuclear
ChNAC37	467	52 819.74	4.75	52.65	-0.735	细胞核 Nuclear
ChNAC38	396	43 757.22	4.86	58.87	-0.768	细胞核 Nuclear
ChNAC39	425	47 814.15	4.88	54.79	-0.698	细胞核 Nuclear
ChNAC40	590	66 030.16	4.52	28.75	-0.547	细胞质 Cytoplasmic
ChNAC41	632	68 907.61	5.63	31.75	-0.781	细胞核 Nuclear
ChNAC42	204	22 310.46	4.28	44.32	-0.815	细胞核 Nuclear
ChNAC43	497	55 356.46	4.73	52.02	-0.745	细胞核 Nuclear
ChNAC44	201	22 033.19	4.28	46.53	-0.836	细胞核 Nuclear
ChNAC45	425	47 814.15	4.88	54.79	-0.698	细胞核 Nuclear
ChNAC46	333	38 228.99	5.59	51.83	-0.959	细胞核 Nuclear
ChNAC47	414	47 418.05	5.61	43.55	-1.003	细胞核 Nuclear

表1(续) Table 1 (Continued)

基因编号 Gene name	氨基酸数 Number of amino acids	相对分子质量 Molecular mass/ku	等电点 Theoretical pI	不稳定指数 Instability index	平均疏水指数 RAVY	亚细胞定位 SORT prediction
ChNAC48	346	38 942.65	5.06	42.94	-0.560	细胞核 Nuclear
ChNAC49	285	32 143.59	6.32	61.33	-0.843	细胞核 Nuclear
ChNAC50	335	38 522.04	4.95	56.94	-0.760	细胞核 Nuclear
ChNAC51	347	38 715.14	7.74	43.48	-0.937	细胞核 Nuclear
ChNAC52	284	32 769.05	5.64	41.74	-0.675	细胞核 Nuclear
ChNAC53	271	30 798.01	8.76	35.76	-0.530	细胞质 Cytoplasmic
ChNAC54	306	35 509.64	6.17	55.98	-0.806	细胞核 Nuclear
ChNAC55	577	65 360.69	4.90	46.12	-0.599	囊泡 Vesicles of secretory system
ChNAC56	432	48 123.89	4.58	36.43	-0.381	细胞质 Cytoplasmic
ChNAC57	351	39 435.07	5.01	31.38	-0.588	细胞核 Nuclear
ChNAC58	351	39 161.92	5.39	40.59	-0.541	细胞核 Nuclear
ChNAC59	378	42 935.64	7.01	38.48	-0.952	细胞核 Nuclear
ChNAC60	166	17 968.3	5.79	52.16	-0.666	细胞核 Nuclear
ChNAC61	306	34 936.34	8.00	51.13	-0.829	细胞核 Nuclear
ChNAC62	352	39 567.18	6.61	46.52	-0.701	细胞核 Nuclear
ChNAC63	182	20 939.42	6.44	49.07	-0.695	细胞质 Cytoplasmic
ChNAC64	262	29 584.17	7.96	53.75	-0.597	细胞核 Nuclear
ChNAC65	854	95 216.85	4.93	48.15	-0.824	细胞核 Nuclear
ChNAC66	362	42 308.98	6.31	60.16	-0.953	细胞核 Nuclear
ChNAC67	344	39 123.11	5.21	40.85	-0.822	细胞核 Nuclear
ChNAC68	437	49 328.48	6.35	35.52	-0.636	细胞核 Nuclear
ChNAC69	483	53 683.97	6.98	46.65	-0.611	细胞质 Cytoplasmic
ChNAC70	294	33 023.53	6.08	32.62	-0.825	细胞核 Nuclear
ChNAC71	321	36 523.06	6.01	41.05	-1.023	细胞核 Nuclear
ChNAC72	454	51 744.89	6.41	49.40	-0.892	细胞核 Nuclear
ChNAC73	363	40 353.33	7.78	46.51	-0.729	细胞质 Cytoplasmic
ChNAC74	295	33 935.43	7.04	41.89	-0.677	细胞核 Nuclear
ChNAC75	373	41 068.51	8.45	38.98	-0.764	细胞核 Nuclear
ChNAC76	383	42 910.39	8.23	41.37	-0.596	细胞核 Nuclear

2.3 欧李NAC基因结构及保守基序分析

ChNAC基因CDS片段数量在1~8个之间,多数CDS片段数量为3~6个,ChNAC15、ChNAC23基因均为一整段的CDS序列,其中没有内含子插入。ChNAC65基因由8个CDS片段组成,CDS片段数量最多(图2)。

使用MEME在线网站将Motif值设置为20,对欧李的NAC基因进行显示分析。结果表明,ChNAC基因的Motif数量并不完全一致。Motif1、Motif2、Motif7出现的次数最多,且Motif2总出现在序列的最前端,有35个ChNAC基因均由Motif2、Motif8、Motif4、Motif5、Motif3、Motif6、Motif1、Motif7组成,有11个ChNAC基因是在上述Motif后端插入了其他一个或几个Motif组成,有10个ChNAC基因是在上述基础上少了一个或几个Motif组成,

ChNAC08基因和ChNAC23基因都仅含有2个Motif, Motif13只在ChNAC26基因中出现了1次,ChNAC43基因中的Motif11、Motif18连续出现了2次(图2)。

2.4 欧李NAC基因家族染色体分布及种内共线性分析

利用ChNAC基因的注释信息和Tbtools绘图软件,可以清楚直观地了解ChNAC基因在欧李8条染色体上的分布情况。如图3所示,ChNAC基因在染色体上的分布是不均匀的。第五条染色体上(Chr5)ChNAC基因的数量最多,有19个家族成员,且多集中于染色体的前端。其次是第一条染色体(Chr1)上,有12个ChNAC家族成员且分布较均匀。第三条染色体(Chr3)和第七条染色体(Chr7)上家族成员的数量是一致的,都有9个家族成员。

表 2 ChNAC 蛋白的二级结构

Table 2 Secondary structure of ChNAC protein

基因编号 Gene name	比例 Ratio/%				基因编号 Gene name	比例 Ratio/%			
	α -螺旋 α -helix	延伸链 Extended strand	β -转角 β -turn	无规则卷曲 Random coil		α -螺旋 α -helix	延伸链 Extended strand	β -转角 β -turn	无规则卷曲 Random coil
ChNAC01	10.85	18.99	5.81	64.34	ChNAC39	21.41	14.59	3.53	60.47
ChNAC02	18.34	23.14	4.80	53.71	ChNAC40	22.37	15.42	4.75	57.46
ChNAC03	11.59	17.88	2.98	67.55	ChNAC41	27.85	18.83	9.65	43.67
ChNAC04	18.06	14.40	3.40	64.14	ChNAC42	43.14	11.27	5.88	39.71
ChNAC05	16.98	17.74	3.02	62.26	ChNAC43	29.58	11.87	3.42	55.13
ChNAC06	16.55	13.51	2.03	67.91	ChNAC44	36.82	12.44	6.97	43.78
ChNAC07	20.39	14.56	3.88	61.17	ChNAC45	21.41	14.59	3.53	60.47
ChNAC08	23.38	10.95	3.48	62.19	ChNAC46	18.32	14.41	4.50	62.76
ChNAC09	22.88	13.62	4.63	58.87	ChNAC47	17.15	17.15	4.11	61.59
ChNAC10	23.59	15.13	5.13	56.15	ChNAC48	21.10	11.85	4.05	63.01
ChNAC11	15.02	16.60	3.16	65.22	ChNAC49	20.70	11.93	3.16	64.21
ChNAC12	23.28	15.80	4.02	56.90	ChNAC50	25.07	16.72	5.07	53.13
ChNAC13	24.83	10.34	3.79	61.03	ChNAC51	20.75	14.99	6.34	57.93
ChNAC14	22.57	15.75	4.46	57.22	ChNAC52	14.79	16.90	4.93	63.38
ChNAC15	21.76	17.63	6.89	53.72	ChNAC53	16.61	17.34	5.17	60.89
ChNAC16	16.57	16.00	4.86	62.57	ChNAC54	17.65	15.03	3.27	64.05
ChNAC17	25.68	12.97	4.59	56.76	ChNAC55	28.60	10.92	3.12	57.37
ChNAC18	18.79	12.08	3.02	66.11	ChNAC56	21.06	11.34	3.94	63.66
ChNAC19	15.72	23.90	6.60	53.77	ChNAC57	24.22	9.69	3.99	62.11
ChNAC20	19.83	17.30	4.22	58.65	ChNAC58	20.51	14.25	3.99	61.25
ChNAC21	18.35	15.25	4.39	62.02	ChNAC59	17.20	13.76	4.76	64.29
ChNAC22	17.94	17.06	2.65	62.35	ChNAC60	44.58	10.84	2.41	42.17
ChNAC23	26.09	20.65	0.00	53.26	ChNAC61	16.80	13.93	4.10	65.16
ChNAC24	17.56	11.65	2.51	68.28	ChNAC62	22.73	10.80	3.12	63.35
ChNAC25	23.30	13.62	3.94	59.14	ChNAC63	18.68	25.27	8.24	47.80
ChNAC26	45.05	11.71	4.95	38.29	ChNAC64	20.61	20.61	4.20	54.58
ChNAC27	19.38	13.12	2.81	64.69	ChNAC65	24.94	12.18	1.99	60.89
ChNAC28	12.58	17.88	3.64	65.89	ChNAC66	24.31	14.09	3.87	57.73
ChNAC29	19.46	17.30	5.41	57.84	ChNAC67	14.53	11.92	3.20	70.35
ChNAC30	23.39	21.10	4.59	50.92	ChNAC68	27.23	13.50	4.81	54.46
ChNAC31	23.93	17.09	3.21	55.77	ChNAC69	16.98	9.73	2.69	70.60
ChNAC32	24.07	18.16	3.72	54.05	ChNAC70	13.95	19.73	7.82	58.50
ChNAC33	27.08	18.34	3.84	50.75	ChNAC71	18.69	19.00	7.17	55.14
ChNAC34	18.21	16.09	3.17	62.53	ChNAC72	24.45	10.57	4.63	60.35
ChNAC35	27.20	12.46	3.68	56.66	ChNAC73	13.50	14.60	2.75	69.15
ChNAC36	24.63	11.56	4.07	59.74	ChNAC74	15.93	15.93	2.03	66.10
ChNAC37	24.63	11.56	4.07	59.74	ChNAC75	19.03	13.94	3.49	63.54
ChNAC38	24.49	12.88	3.54	59.09	ChNAC76	20.37	14.62	4.18	60.84

第四条染色体(Chr4)上家族成员数量最少,仅有4个家族成员。

为了进一步明确ChNAC基因在染色体上的分布情况,对ChNAC基因的种内共线性进行了注释和分析,结果表明(图4),ChNAC基因家族中存在8对共线性基因: *ChNAC12- ChNAC08*、*ChNAC11-*

ChNAC49、*ChNAC73- ChNAC75*、*ChNAC20- ChNAC01*、*ChNAC20- ChNAC64*、*ChNAC01- ChNAC64*、*ChNAC25- ChNAC65*、*ChNAC27- ChNAC66*,其中 *ChNAC01*、*ChNAC20*、*ChNAC64* 这3条基因是互为共线性,推测以上8对基因可能是由染色体大片段复制而成的。

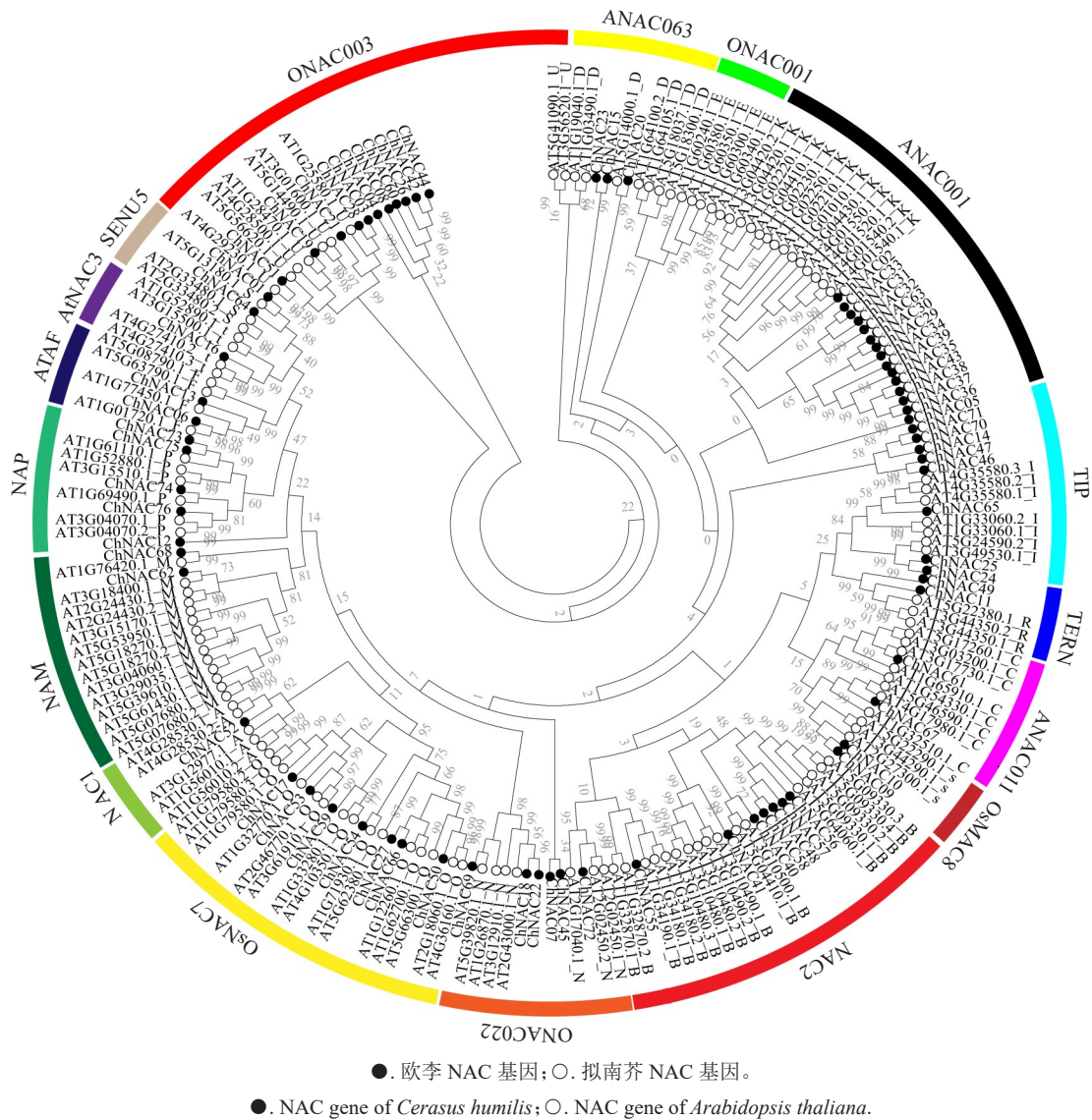


图 1 ChNAC 基因系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of ChNAC gene

2.5 欧李NAC基因启动子分析

为便于预测ChNAC基因可能所具有的潜在功能,对ChNAC基因起始密码子前2000 bp的序列进行分析,并利用绘图软件进行整理并绘图。结果如图5所示。ChNAC基因顺式作用元件中除了CAAT、TATA等保证基因家族进行正常转录活动所需的组成型转录元件外,还含有植物激素类响应元件:TGA-element(生长素响应元件)、TCA-element(水杨酸响应元件)、P-box(赤霉素响应元件)、ABRE(脱落酸响应元件)、TGACG-motif(茉莉酸甲酯响应元件);植物生长发育响应元件:MSA-like(细胞周期响应元件)、circadian(昼夜节律控制响应元件)、RY-element(种子特异性响应元件)、O2-site(玉米醇溶蛋白代谢元件)、CAT-box(分生组织的表达

元件)、GCN4-motif(胚乳发育元件)、HD-Zip 1(参与栅栏叶肉细胞分化的元素元件);结合位点MBS(MYB结合位点元件)、HD-Zip 3(蛋白质结合位点元件)、Box 4(光响应元件)、LTR(低温胁迫响应元件)、ARE(厌氧诱导响应元件)、TC-rich repeats(参与防御和应激反应响应元件)等。其中,占比较大的是组成型转录元件、植物激素类响应元件和光响应元件。

2.6 欧李NAC基因组织特异性分析

欧李农大4号不同组织中,ChNAC基因的表达量存在差异(图6)。ChNAC01、ChNAC07、ChNAC08等16个基因在果实中的表达量最高,且ChNAC07基因仅在果实中表达;ChNAC50、ChNAC53、ChNAC63等15个基因在叶片中的表达量最高,且

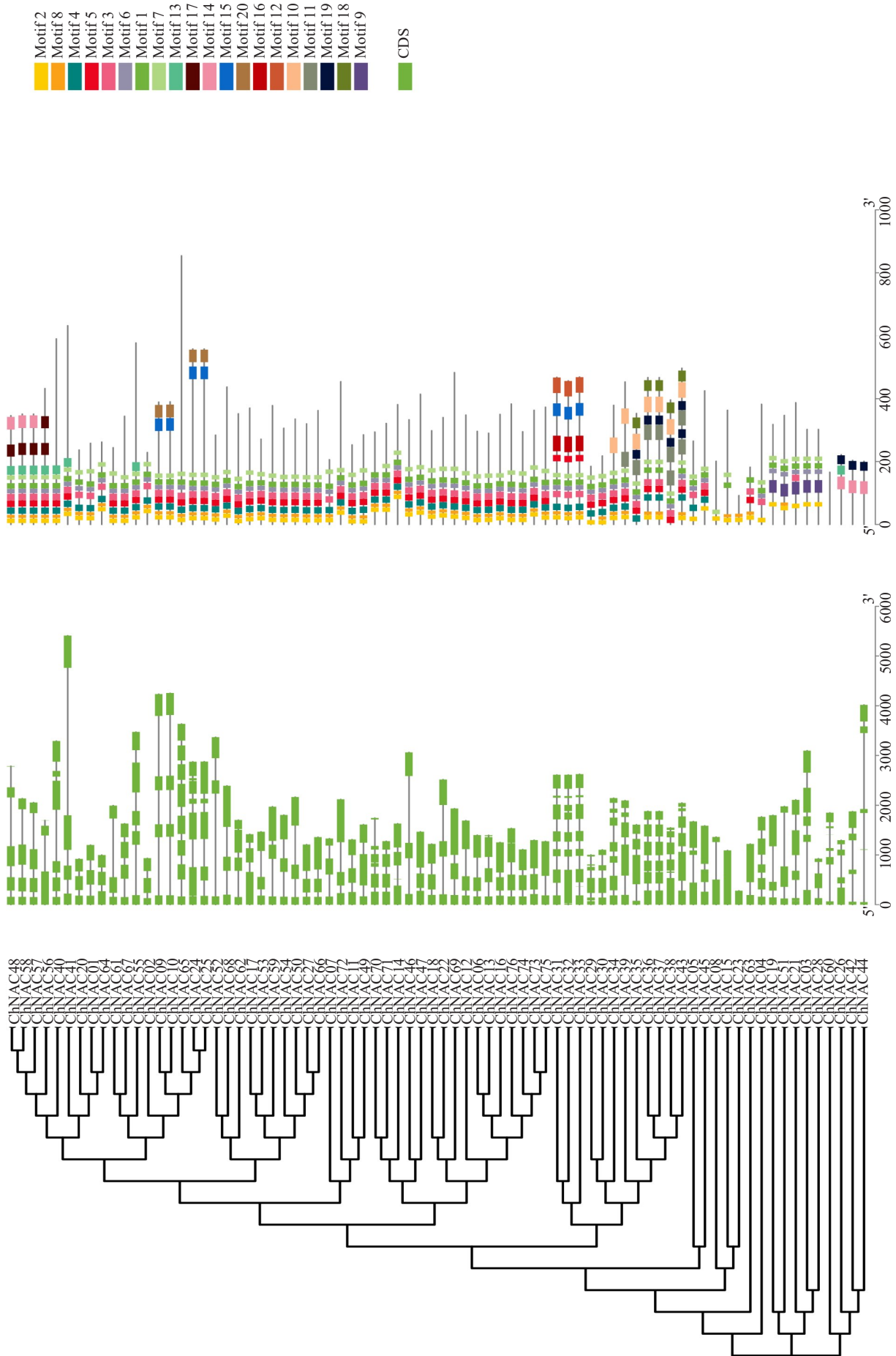


图 2 ChNAC 基因结构和保守基序

Fig. 2 Structure and conserved motif of ChNAC gene

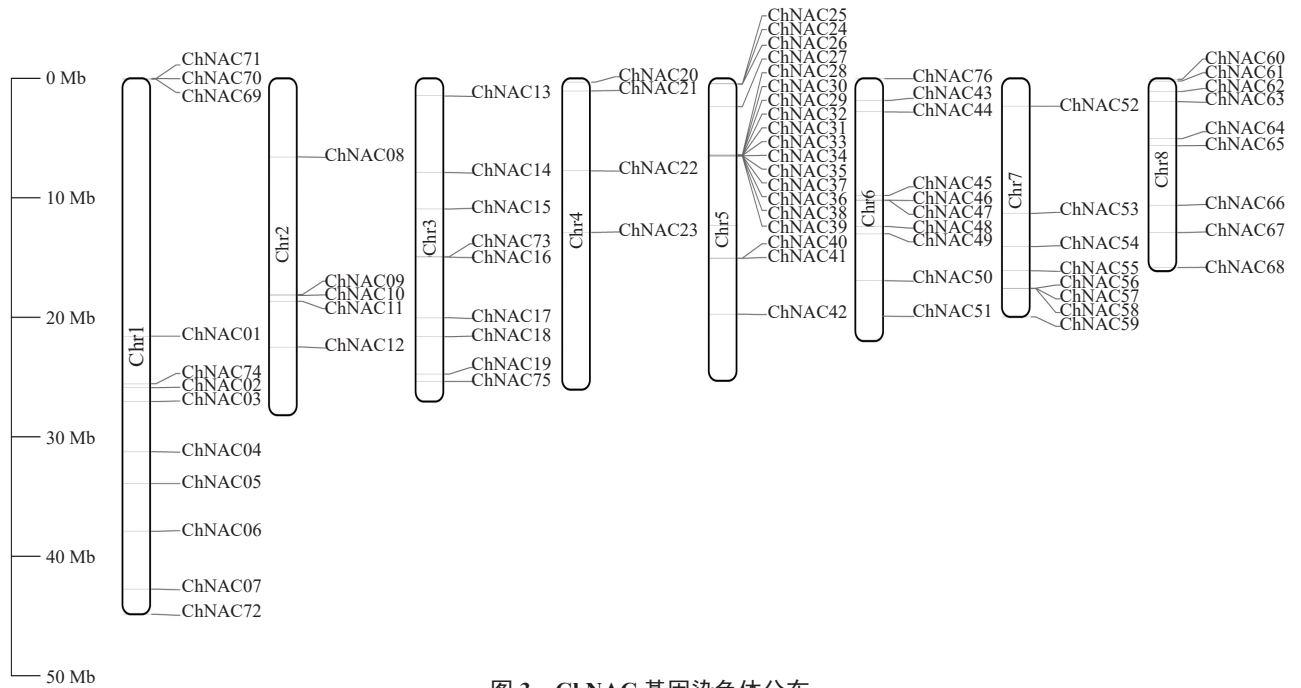


图3 ChNAC 基因染色体分布

Fig. 3 Chromosomal distribution of ChNAC gene

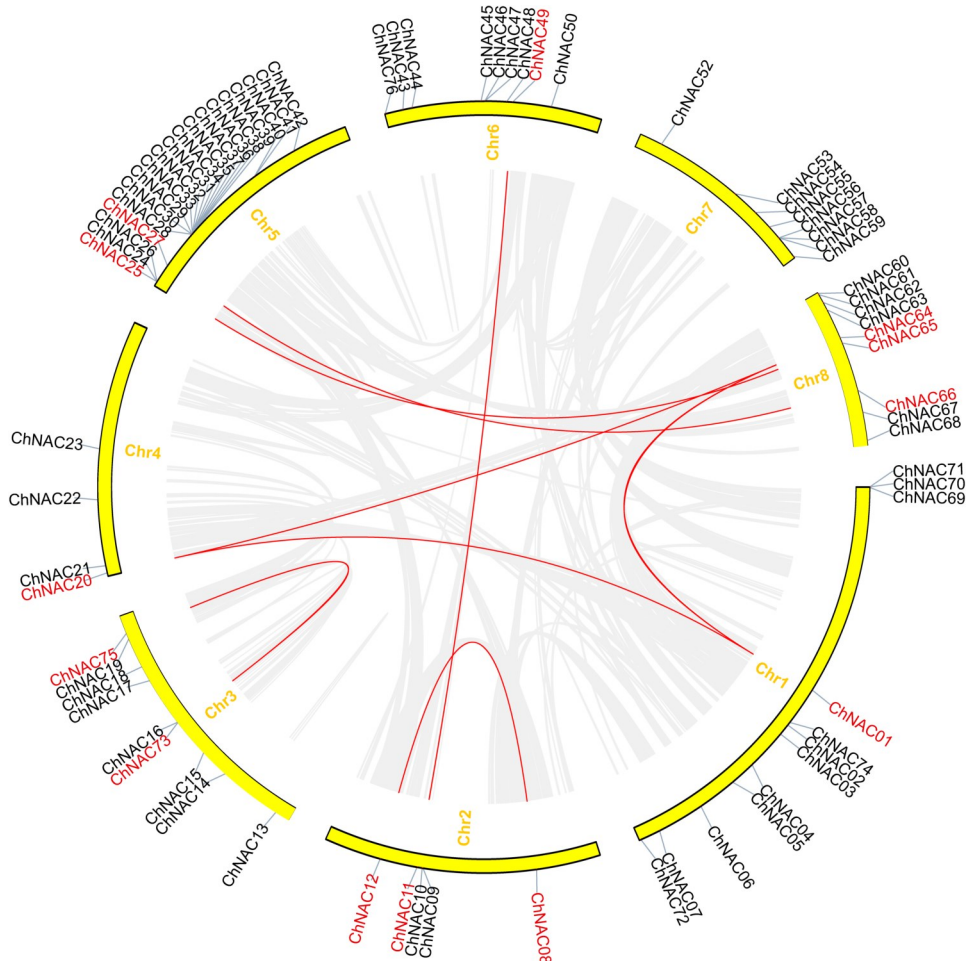


图4 ChNAC 基因共线性

Fig. 4 ChNAC gene collinearity

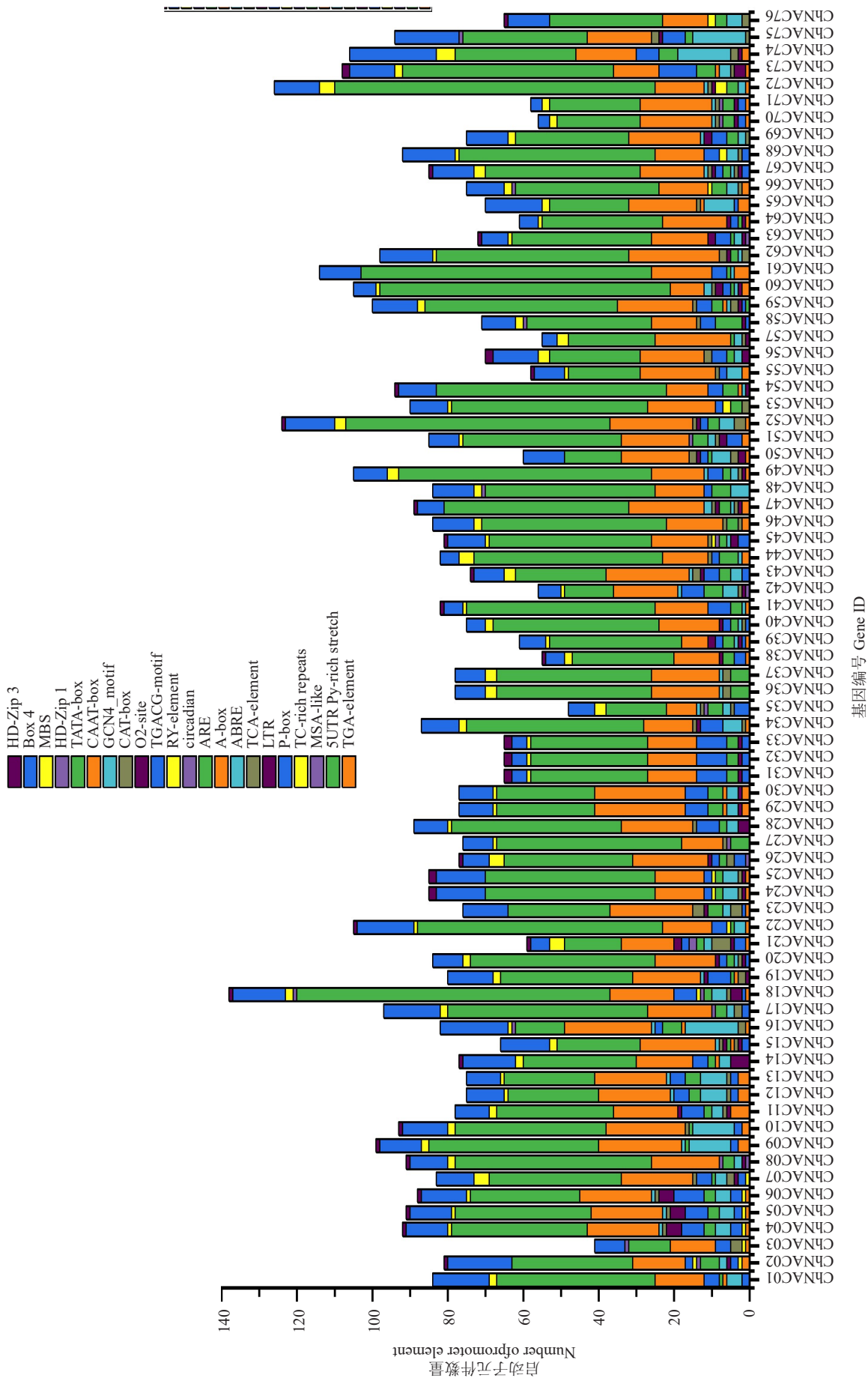


图 5 ChNAC 基因启动子分析
Fig. 5 Promoter analysis of ChNAC gene

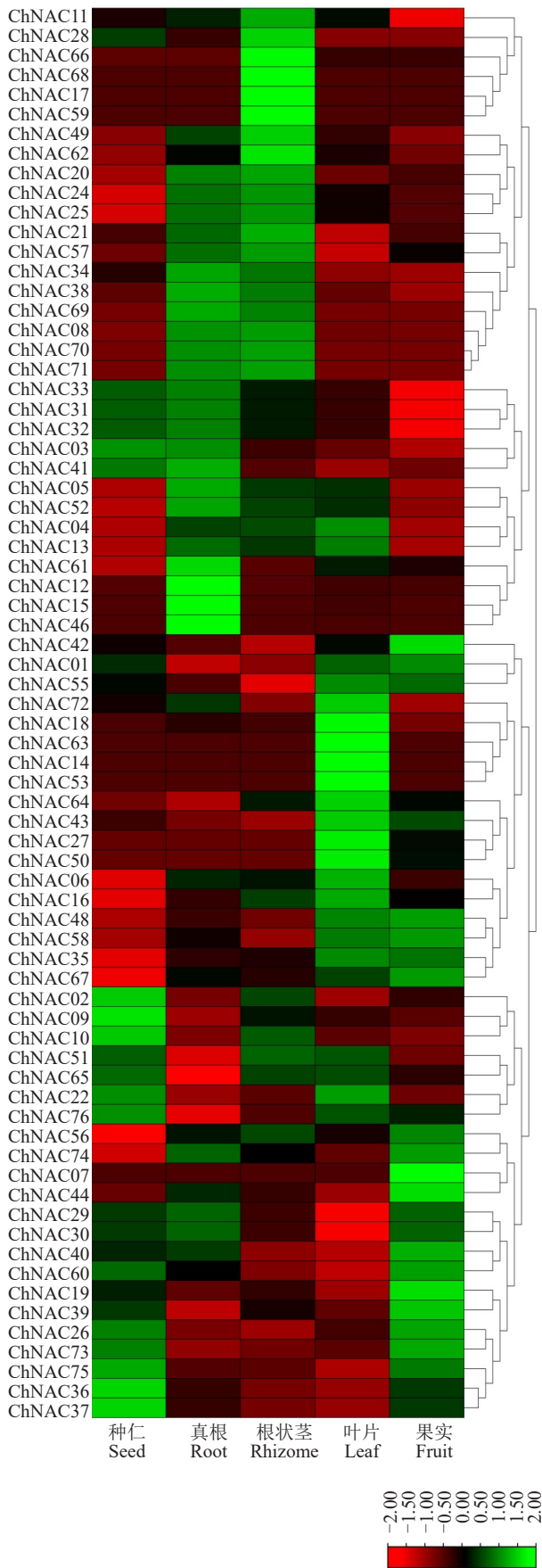


图6 不同组织中 ChNAC 基因表达图谱

Fig. 6 Expression map of ChNAC gene in different tissues

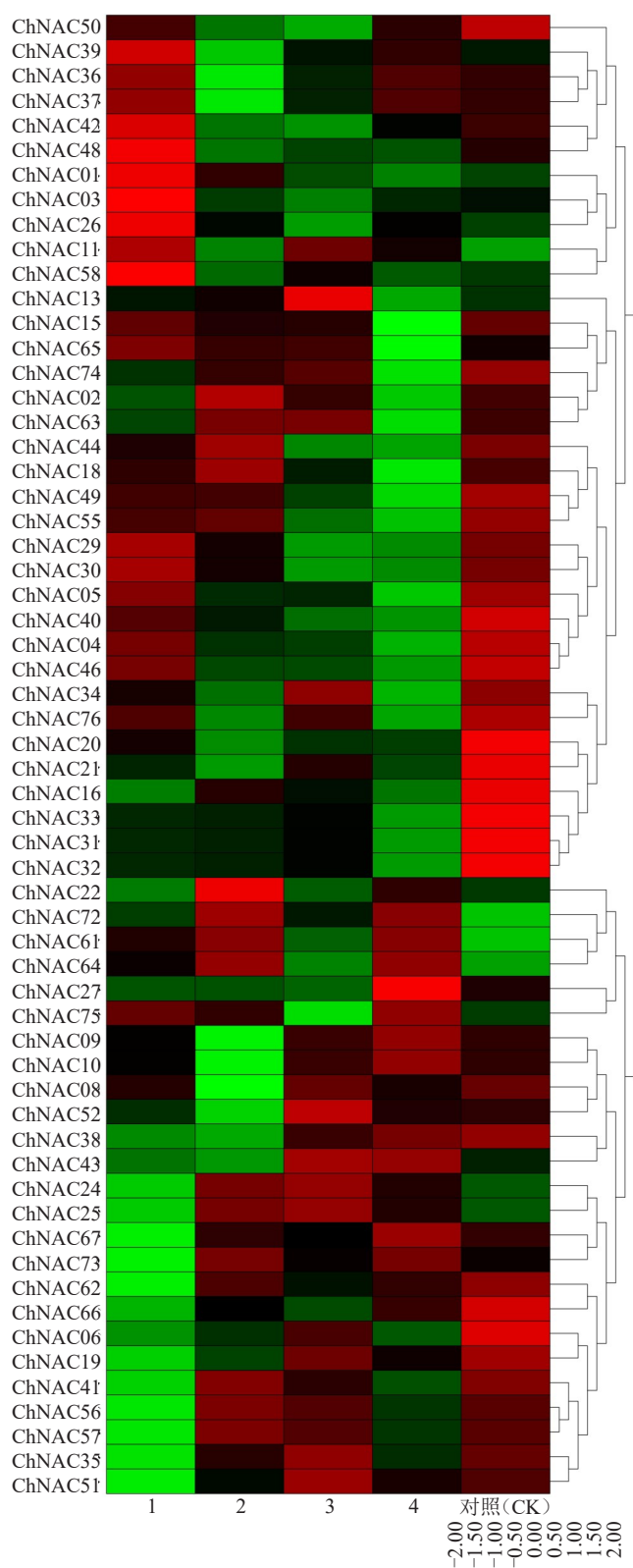
ChNAC13、*ChNAC53*、*ChNAC63* 基因仅在叶片中表达；*ChNAC17*、*ChNAC66*、*ChNAC62* 等 15 个基因在根状茎中表达量最高，且 *ChNAC17*、*ChNAC59*、*ChNAC68* 基因仅在根状茎中表达；*ChNAC15*、*ChNAC46* 等 16 个基因在真根中的表达量最高；*ChNAC36*、*ChNAC37* 等 10 个基因在种仁中的表达量最高。*ChNAC23*、*ChNAC45*、*ChNAC47*、*ChNAC54* 这 4 个基因在上述组织中均不表达，推测其可能在花或其他器官中表达。ChNAC 基因表达量在不同组织中存在差异，表明不同的 ChNAC 基因调控不同组织的生长发育，即 ChNAC 基因的功能存在多样性，具有不同的生物学作用，ChNAC 基因在欧李的生长发育中发挥着巨大作用。

2.7 欧李 NAC 基因在非生物胁迫诱导下的表达模式分析

对 60 个 ChNAC 基因在胁迫中的表达量进行分析，结果表明（图 7）：在盐胁迫中，*ChNAC15*、*ChNAC65*、*ChNAC74* 等 40 个基因的表达量上调，*ChNAC24*、*ChNAC26*、*ChNAC27* 等 14 个基因的表达量下降，*ChNAC36*、*ChNAC37*、*ChNAC39* 等 6 个基因的表达量处理前后均差距不大；在模拟干旱胁迫中 *ChNAC01*、*ChNAC03*、*ChNAC18* 等 38 个基因的表达量上调，*ChNAC24*、*ChNAC11*、*ChNAC13* 等 13 个基因的表达量下降，*ChNAC09*、*ChNAC10*、*ChNAC34* 等 9 个基因的表达量处理前后差距不大；在高温胁迫中，*ChNAC08*、*ChNAC09*、*ChNAC10* 等 38 个基因的表达量上调，*ChNAC01*、*ChNAC13*、*ChNAC25* 等 19 个基因的表达量下降。*ChNAC41*、*ChNAC62*、*ChNAC63* 这 3 个基因的表达量处理前后差距不大；在低温胁迫中，*ChNAC24*、*ChNAC25*、*ChNAC35* 等 40 个基因的表达量上调，*ChNAC01*、*ChNAC03*、*ChNAC13* 等 18 个基因的表达量下调，*ChNAC15*、*ChNAC63* 这 2 个基因的表达量在处理前后差距不大。综上，大多数 NAC 基因在胁迫条件下，通过正向调控来激活抗逆机制的运转，进而维持植物正常的生长发育。

在胁迫处理下，一些基因的表达模式基本相似，如：*ChNAC24* 基因和 *ChNAC25* 基因在低温胁迫下均为上调表达；在盐胁迫、模拟干旱及高温胁迫下均下调表达。*ChNAC31* 基因、*ChNAC32* 基因和 *ChNAC33* 基因在上述 4 种胁迫下表达量均上调。

ChNAC49 基因在上述胁迫下表达量均显著升高。在盐胁迫下，*ChNAC49* 基因表达量与对照组相比上调了 477 倍；在模拟干旱胁迫下，*ChNAC49* 基因表



1. 低温处理(4 ℃); 2. 高温处理(40 ℃); 3. 模拟干旱处理(PEG6000); 4. 盐处理(NaCl).

1. Low temperature treatment (4 ℃); 2. High temperature treatment (40 ℃); 3. Simulated drought treatment (PEG6000); 4. Salt treatment (NaCl).

图7 不同胁迫处理中 ChNAC 基因表达图谱

Fig. 7 Expression map of ChNAC gene under different stress

达量与对照组相比上调了124倍;在低温胁迫下, *ChNAC49*基因与对照组相比表达量上调了28倍。 *ChNAC08*基因在高温胁迫下的表达量上调值最大,与对照组相比上调了70.6倍。 *ChNAC49*基因在高温胁迫下表达量的上调值仅次于 *ChNAC08*基因,与对照组相比其上调了27.95倍。 *ChNAC64*基因在盐胁迫下的表达量下降幅度最多,仅为对照组的14.29%; *ChNAC17*基因在模拟干旱胁迫下表达量的下降幅度最多,仅为对照组的15.96%; *ChNAC01*基因的表达量在高温胁迫下的下降幅度最多,表达量仅为对照组的16.01%; *ChNAC11*基因的表达量在高温胁迫下的下降幅度最多,表达量仅为对照组的26.14%。说明这几个基因在上述4种胁迫下发挥着更重要的作用,是保证胁迫环境中植株正常生长发育的关键,对其表达量进行胁迫诱导处理,可能会获得所需的抗性植株。

3 讨 论

通过生物信息学分析首次从欧李基因组中筛选出76个NAC基因家族成员。ChNAC基因家族成员数量低于水稻(151)^[8]、核桃(121)^[41]、甘蔗(85)^[46]、龙眼(114)^[47]、西瓜(104)^[48]等,高于黑麦草(72)^[49]等,综合来看,ChNAC家族成员数量相比于其他物种较少,可能是基因组中没有大规模的片段复制且相对保守造成的^[50]。

Ooka等^[8]首次根据NAC基因的结构与功能将水稻和拟南芥的NAC基因家族分为17个亚族,大多数学者多用此方法作为NAC基因家族的分类标准。笔者在本研究中以拟南芥NAC基因作为参照将ChNAC基因家族分为17个亚族,各亚族所包含的ChNAC家族成员数量不同,其功能也可能存在差异。Clercq等^[51]证明拟南芥NAC2亚族基因参与植物氧化的应激反应。Fujiwara等^[45]认为ONAC003亚族基因参与开花调节。依据系统进化树的同源关系,可以推测ChNAC对应亚族中的基因可能具有相似功能。NAM亚族及NAC1亚族中的拟南芥基因,被证明与拟南芥的形态发生有关^[52],由此推测 *ChNAC52*基因、*ChNAC62*基因、*ChNAC68*基因中的一种或者几种,可能作用于欧李的形态发生过程中。ATAF、AtNAC3亚族参与拟南芥的应激反应^[53],与其同源性高的ChNAC基因,可能在欧李的抗旱、抗盐碱方面发挥着重要的作用。

启动子是RNA聚合酶识别、结合和开始转录的一段DNA序列,它含有RNA聚合酶特异性结合和转录起始所需的保守序列,多数位于结构基因转录起始点的上游,关系到基因的时空表达,是基因的开关,影响基因的表达程度。对启动子元件进行分析,可以推测其潜在功能^[54-58]。*ChNAC68*、*ChNAC72*、*ChNAC76*等基因存在种子特异性作用元件,推测其可能在欧李种子胚乳的发育中具有重要作用;*ChNAC03*、*ChNAC05*等基因存在胚乳表达元件,提示这些基因可能作用于种子表达或者种子萌发时期;*ChNAC04*、*ChNAC05*、*ChNAC06*等基因含有分生组织表达的相关作用元件,其可能作用于植物分生组织的形成;*ChNAC03*、*ChNAC72*等基因的作用元件表明其可能诱导参与栅栏叶肉细胞分化的元素形成;O₂-site是一种代谢网络调控有关的作用元件,*ChNAC03*、*ChNAC04*、*ChNAC05*等基因存在这种启动子元件说明这些基因可能参与玉米醇溶蛋白代谢途径;*ChNAC*基因的启动子中含有许多响应激素调控的作用元件(TGA-element响应生长素调控,P-box响应赤霉素调控,TCA-element响应水杨酸调控,ABRE响应脱落酸调控,TGACG-motif响应茉莉酸甲酯调控)防御基因和应激反应作用元件提示基因在应对胁迫方面有重大作用,如*ChNAC03*、*ChNAC04*、*ChNAC05*等基因。启动子分析结果表明*ChNAC*基因家族作用于欧李的生长、发育、组织分化、抗逆等多个方面,这与其他物种中NAC基因家族的研究结果相一致^[59-61]。

当植物感受到外界刺激时,通过信号传导途径传递给胁迫应答因子,从而激活植物的抗逆反应,减少植物受到的损伤,NAC基因在这个过程中扮演着重要角色。盐胁迫被认为是一种渗透胁迫^[62],有学者认为,NAC基因在盐胁迫时作用于植物ABA、乙烯、GA等代谢途径,促进这些激素的合成,从而提高植物的抗盐性^[63-64];也有学者认为,盐胁迫时可通过Na⁺、K⁺离子的改变,或可溶性糖、游离脯氨酸等低分子渗透调节物的增加来维持体内的渗透压,进而抵御盐胁迫,维持植物正常生长发育^[65-66]。后续可对盐胁迫下欧李NAC转基因植株中上述物质的含量进行测定,进而来验证这一猜想。温度胁迫时,NAC基因主要通过调节温度应激基因启动子的表达及合成,进而来激发植物的抗逆机制的运作^[67-68]。干旱胁迫时,一类NAC转录因子与MYC-like元件

结合,在胁迫应答中起作用^[20],另一类NAC基因^[69]主要在气孔的保卫组织中表达,当植物感受到外界刺激时,会促进气孔关闭,从而使植株的抗旱性提高。Wang等^[70]在拟南芥中对*ChNAC06*基因过表达,发现其在干旱胁迫下表达量升高,根系中ABA敏感性升高,抗干旱能力显著提高。笔者在干旱胁迫下所获得的结果与之相一致。尤其是*ChNAC49*基因,在盐胁迫、干旱胁迫、低温胁迫下的表达量上调幅度均最大,在高温胁迫下的表达量上调幅度仅次于*ChNAC08*基因。推测其可能在更多的胁迫下同样发挥着重要的作用,对欧李的抗性研究可能是一种“关键基因”。且该基因在叶片、根状茎、根中均表达。可对该基因进行基因过表达处理,获得转基因植物,以期挖掘出*ChNAC*基因家族更多的潜在功能,为欧李抗性植株的培育做贡献,也可根据不同品种*ChNAC*基因家族的表达量,初步筛选出具有特殊抗性的欧李品种。

4 结 论

笔者在本研究中首次鉴定并分析了76个欧李NAC基因家族成员,明确了胁迫条件下各*ChNAC*基因的表达模式,发现*ChNAC49*基因在各胁迫处理下表达量的变化幅度显著高于其他基因,后期可对*ChNAC49*基因进行克隆,培育出抗性更强的欧李转基因株系,为*ChNAC*基因家族的功能验证奠定了理论基础。

参考文献 References:

- [1] 俞德浚. 中国果树分类学[M]. 北京:农业出版社,1979.
YU Dejun. Chinese fruit tree taxonomy[M]. Beijing: Agricultural Press, 1979.
- [2] 张东为,贾天会,舒乔生. 水保优良树种欧李的研究进展及今后研究方向[J]. 中国水土保持,2012(1):45-47.
ZHANG Dongwei, JIA Tianhui, SHU Qiaosheng. Research progress and future research direction of *Cerasus humilis*[J]. Soil and Water Conservation in China, 2012(1):45-47.
- [3] 吴亚芳,李晓艳,郭金丽,李连国,李东方,张薇,邵郅胜. 欧李适应非生物胁迫的研究进展及应用前景[J]. 特产研究,2022, 44(1):104-110.
WU Yafang, LI Xiaoyan, GUO Jinli, LI Lianguo, LI Dongfang, ZHANG Wei, SHAO Zhisheng. Research progress and application prospect of *Cerasus humilis* adaptation to abiotic stress[J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research, 2022, 44(1):104-110.
- [4] SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SEKI M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold

- stress responses[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2003, 6(5):410-417.
- [5] SINGH K B, FOLEY R C, OÑATE-SÁNCHEZ L. Transcription factors in plant defense and stress responses[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5(5):430-436.
- [6] HUANG G T, MA S L, BAI L P, ZHANG L, MA H, JIA P, LIU J, ZHONG M, GUO Z F. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(2):969-987.
- [7] CHEN W J, ZHU T. Networks of transcription factors with roles in environmental stress response[J]. *Trends in Plant Science*, 2004, 9(12):591-596.
- [8] OOKA H, SATOH K, DOI K, NAGATA T, OTOMO Y, MURAKAMI K, MATSUBARA K, OASTO N, KAWAI J, CARNINCI P, HAYASHIZAKI Y, SUZUKI K, KOJIMA K, TAKAHARA Y, YAMAMOTO K, KIKUCHI S. Comprehensive analysis of NAC Family Genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*[J]. *Dna Research*, 2003, 10(6):239-247.
- [9] AIDA M, ISHIDA T, FUKAKI H, FUJISAWA H, TASAKA M. Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: An analysis of the cupshaped cotyledon mutant[J]. *The Plant Cell*, 1997, 9(6):841-857.
- [10] 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.
- [11] 柳展基, 邵凤霞, 唐桂英. 植物 NAC 转录因子的结构功能及其表达调控研究进展[J]. *西北植物学报*, 2007, 27(9): 1915-1920.
- LIU Zhanji, SHAO Fengxia, TANG Guiying. The research progress of structure, function and regulation of plant NAC transcription factors[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2007, 27(9):1915-1920.
- [12] XIE Q, FRUGIS G, COLGAN D, CHUA N H. *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development[J]. *Genes & Development*, 2000, 14(23):3024-3036.
- [13] MAO C J, HE J M, LIU L N, DENG Q M, YAO X F, LIU C M, QIAO Y L, LI P, MING F. OsNAC2 integrates auxin and cytokinin pathways to modulate rice root development[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(2):429-442.
- [14] GUO Y F, GAN S S. At NAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence[J]. *The Plant Journal*, 2006, 46(4):601-612.
- [15] JENSEN M K, LINDEMOSE S, DE MASI F, REIMER J J, NIELSEN M, PERERA V, WORKMAN C T, TURCK F, GRANT M R, MUNDY J, PETERSEN M, SKRIVER K. ATAF1 transcription factor directly regulates abscisic acid biosynthetic gene *NCED3* in *Arabidopsis thaliana*[J]. *FEBS Open Bio*, 2013, 3:321-327.
- [16] CHEN X, WANG Y F, LÜ B, LI J, LUO L Q, LU S C, ZHANG X, MA H, MING F. The NAC family transcription factor OsNAP confers abiotic stress response through the ABA pathway[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2014, 55(3):604-619.
- [17] HU H H, YOU J, FANG Y J, ZHU X Y, QI Z Y, XIONG L Z. Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice[J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 67(1):169-181.
- [18] CHEN X, LU S C, WANG Y F, ZHANG X, LÜ B, LUO L Q, XI D D, SHEN J B, MA H, MING F. OsNAC2 encoding a NAC transcription factor that affects plant height through mediating the gibberellic acid pathway in rice[J]. *The Plant Journal*, 2015, 82(2):302-314.
- [19] HE X J, MU R L, CAO W H, ZHANG Z G, ZHANG J S, CHEN S Y. At NAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development[J]. *The Plant Journal*, 2005, 44(6):903-916.
- [20] TRAN L P, NAKASHIMA K, SAKUMA Y, SINPSON S D, FUJITA Y, MARUYAMA K, FUJITA M, SEKI M, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI- SHINOZAKI K. Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress inducible NAC transcription factors that bind to a drought responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress I promoter[J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(9):2481-2498.
- [21] JEONG J S, KIM Y S, BAEK K H, JUNG H, HA S H, CHOI Y D, KIM M, REUZEAU C, KIM J K. Root-specific expression of OsNAC10 improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions[J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(1): 185-197.
- [22] LU P L, CHEN N Z, AN R, SU Z, QI B S, REN F, CHEN J, WANG X C. A novel drought-inducible gene, ATAF1, encodes a NAC family protein that negatively regulates the expression of stress-responsive genes in *Arabidopsis*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 63(2):289-305.
- [23] HAO Y J, WEI W, SONG Q X, CHEN H W, ZHANG Y Q, WANG F, ZOU H F, GANG L, TIAN A G, ZHANG W K, MA B, ZHANG J S, CHEN S Y. Soybean NAC transcription factors promote abiotic stress tolerance and lateral root formation in transgenic plants[J]. *The Plant Journal*, 2011, 68(2):302-313.
- [24] HEGEDUS D, YU M, BALDWIN D, GRUBER M, SHARPE A, PARKIN I, WHITWILL S, LYDIATE D. Molecular characterization of *Brassica napus* NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress[J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, 53(3):383-397.
- [25] MAO X G, ZHANG H Y, QIAN X Y, LI A, ZHAO G Y, JING R L. *TaNAC2*, a NAC-type wheat transcription factor conferring enhanced multiple abiotic stress tolerances in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(8):2933-2946.
- [26] DONG Z B, XU Z N, XU L, XU L, GALLI M, GALLAVOTTI A, DOONER H K, CHUCK G. *Necrotic upper tips1* mimics heat and drought stress and encodes a protoxylem-specific transcription factor in maize[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2020, 117(34):20908-20919.
- [27] 梁晓庆. 高温胁迫下番茄 *SINAC1* 基因的功能分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2015.
- LIANG Xiaoqing. Functional analysis of the tomato *SINAC1* gene under heat stress[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2015.

- [28] LI M, CHEN R, JIANG Q Y, SUN X J, ZHANG H, HU Z. Gm-NAC06, a NAC domain transcription factor enhances salt stress tolerance in soybean[J]. *Plant Molecular Biology*, 2021, 105(3): 333-345.
- [29] ZHENG X N, CHEN B, LU G J, HAN B. Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 379(4): 985-989.
- [30] COLLINGE M, BOLLER T. Differential induction of two potato genes, *Stprx2* and *StNAC* in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding[J]. *Plant Molecular Biology*, 2001, 46(5): 521-529.
- [31] JENSEN M K, RUNG J H, GREGERSEN P L, GJETTING T, FUGLSANG A T, HANSEN M, JOEHNK N, LYNGKJAER M F, COLLINGE D B. The *HvNAC6* transcription factor: a positive regulator of penetration resistance in barley and *Arabidopsis* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 65(1): 137-150.
- [32] DELESSERT C, KAZAN K, WILSON I W, STRAETEN D V D, MANNERS J, DENNIS E S, DOLFERUS R. The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2005, 43(5): 745-757.
- [33] BU Q Y, JIANG H L, LI C B, ZHAI Q Z, ZHANG J, WU X Y, SUN J Q, XIE Q, LI C Y. Role of the *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factors ANAC019 and ANAC055 in regulating jasmonic acid-signaled defense responses[J]. *Cell Research*, 2008, 18(7): 756-767.
- [34] LIN R M, ZHAO W S, MENG X B, WANG M, PENG Y L. Rice gene *OsNAC19* encodes a novel NAC-domain transcription factor and responds to infection by *Magnaporthe grisea*[J]. *Plant Science*, 2007, 172(1): 120-130.
- [35] REN T, QU F, MORRIS T J. *HRT* gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus[J]. *The Plant Cell*, 2000, 12(10): 1917-1925.
- [36] SELTH L A, DOGRA S C, RASHEED M S, HEALY H, RANDLES J W, REZAIAN M A. A NAC domain protein interacts with *Tomato leaf curl virus* replication accessory protein and enhances viral replication[J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(1): 311-325.
- [37] WANG P F, YI S K, MU X P, ZHANG J C, DU J J. Chromosome-level genome assembly of *Cerasus humilis* using PacBio and Hi-C technologies[J]. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 956.
- [38] 张晓旭, 郭彩珍, 穆霄鹏, 郭夕雯, 王鹏飞, 汪泽文, 曹琴, 杜俊杰. 欧李 AP2 基因家族的鉴定与表达分析[J]. *分子植物育种*, 2022, 20(7): 2162-2169.
- ZHANG Xiaoxu, GUO Caizhen, MU Xiaopeng, GUO Xiwen, WANG Pengfei, WANG Zewen, CAO Qin, DU Junjie. Identification and expression analysis of AP2 gene family in Chinese dwarf cherry [*Cerasus humilis* (Bge.) Sok] [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2022, 20(7): 2162-2169.
- [39] 汪泽文, 杨依维, 王鹏飞, 张建成, 穆霄鹏, 付鸿博, 杜俊杰. 欧李 DREB 基因家族的鉴定与分析[J]. *植物生理学报*, 2020, 56(3): 413-422.
- WANG Zewen, YANG Yiwei, WANG Pengfei, ZHANG Jiancheng, MU Xiaopeng, FU Hongbo, DU Junjie. Identification and analysis of *DREB* gene family in *Cerasus humilis*[J]. *Plant Physiology Journal*, 2020, 56(3): 413-422.
- [40] 钱祺锋, 谷书杰, 赵雪婷, 饶席兵, 曾丹, 沈庆庆, 张蓉琼, 陈疏影, 何丽莲, 李富生. 基于转录组的蔗茅 CML 基因家族鉴定及冷胁迫表达分析[J]. *农业生物技术学报*, 2022, 30(5): 885-895.
- QIAN Zhenfeng, GU Shujie, ZHAO Xueting, RAO Xibing, ZENG Dan, SHEN Qingqing, ZHANG Rongqiong, CHEN Shuying, HE Liliang, LI Fusheng. Identification and cold stress expression analysis of CML gene family in *Eriarthus fulvus* based on transcriptome[J]. *Chinese journal of agricultural biotechnology*, 2022, 30(5): 885-895.
- [41] 亢超, 郭彩华, 张雪蒙, 刘金明, 袁星, 全绍文, 牛建新. 核桃 NAC 基因家族的全基因组鉴定与分析[J]. *果树学报*, 2021, 38(9): 1444-1458.
- KANG Chao, GUO Caihua, ZHANG Xueming, LIU Jinming, YUAN Xing, QUAN Shaowen, NIU Jianxin. Genome-wide identification and analysis of *NAC* gene family in walnut (*Juglans regia* L.) [J]. *Journal of Fruit Science*, 2021, 38(9): 1444-1458.
- [42] 郭禄芹, 赵世豪, 朱华玉, 胡建斌, 孙守如, 马长生, 杨路明. 167 份西瓜种质材料的遗传多样性分析[J]. *中国瓜菜*, 2018, 31(1): 5-11.
- GUO Luqin, ZHAO Shihao, ZHU Huayu, HU Jianbin, SUN Shouru, MA Changsheng, YANG Luming. The genetic diversity analysis of 167 watermelon germplasms[J]. *China Cucurbits and Vegetables*, 2018, 31(1): 5-11.
- [43] ZHU T T, NEVO E, SUN D F, PENG J H. Phylogenetic analyses unravel the evolutionary history of NAC proteins in plant[J]. *Evolution*, 2012, 66(6): 1833-1848.
- [44] 康桂娟, 黎瑜, 曾日中. 巴西橡胶树 *HbNTL2* 基因的克隆和表达分析[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2015, 41(6): 602-609.
- KANG Guijuan, LI Yu, ZENG Rizhong. Clone and expression analysis on gene *HbNTL2* from *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. [J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2015, 41(6): 602-609.
- [45] FUJIWARA S, MITSUDA N. ANAC075, a putative regulator of VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7, is a repressor of flowering[J]. *Plant Biotechnology*, 2016, 33(4): 255-265.
- [46] RAMASWAMY M, NARAYANAN J, MANICKAVACHAGAM G, ATHIAPPAN S, ARUN M, GOMATHI R, RAM B. Genome wide analysis of NAC gene family 'sequences' in sugarcane and its comparative phylogenetic relationship with rice, sorghum, maize and *Arabidopsis* for prediction of stress associated NAC genes[J]. *Agri Gene*, 2017, 3: 1-11.
- [47] MUNIR N, CHEN Y K, CHEN X H, NAWAZ M A, IFTIKHAR J, RIZWAN H M, SHEN X, LIN Y L, XU X H, LAI Z X. Genome-wide identification and comprehensive analyses of NAC transcription factor gene family and expression patterns during somatic embryogenesis in *Dimocarpus longan* Lour. [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 157: 169-184.
- [48] LÜ X L, LAN S R, GUY K M, YANG J H, ZHANG M F, HU Z Y. Global expressions landscape of NAC transcription factor family

- and their responses to abiotic stresses in *Citrullus lanatus*[J]. Scientific Reports, 2016, 6:30574.
- [49] NIE G, YANG X Y, YANG Z F, ZHONG M Y, ZHU Y Q, ZHOU J, APPIAH C, LIAO Z C, FENG G Y, ZHANG X Q. Genome-wide investigation of the NAC transcript factor family in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and expression analysis under various abiotic stressor[J]. Genomics, 2020, 112(6):4224-4231.
- [50] SONG J, GAO Z H, HUO X M, SUN H L, XU Y S, SHI T, NI Z J. Genome-wide identification of the auxin response factor (ARF) gene family and expression analysis of its role associated with pistil development in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.)[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2015, 37(8): 145.
- [51] CLERCQ I D, VERNEIRSSEN V, AKEN O V, VANDEPOELE K, MURCHA M W, LAW S R, INZE A, NG S, IVANOVA A, ROMBAUT D, COTTE B V D, JASPERS P, PEER Y V D, KANGASJARVI J, WHELAN J, BREUSEGEM F V. The membrane-bound NAC transcription factor ANAC013 functions in mitochondrial retrograde regulation of the oxidative stress response in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2013, 25(9): 3472-3490.
- [52] AIDA M, ISHIDA T, FUAFUKI 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.
- [53] COLLINGE M, BOLLER T. Differential induction of two potato genes, Stprx2 and StNAC, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding[J]. 2001, 46(5):521-529.
- [54] 苏炳茜, 张舒婷, 刘蒲东, 李晓斐, 戚峰, 林玉玲, 赖钟雄. 龙眼 TMK 基因家族成员的全基因组鉴定及表达分析[J]. 果树学报, 2021, 38(10):1668-1680.
- SU Bingxi, ZHANG Shuting, LIU Pudong, LI Xiaofei, QI Feng, LIN Yuling, LAI Zhongxiong. Genome-wide identification and expression analysis of TMK gene family in *Dimocarpus longan* Lour.[J]. Journal of Fruit Science, 2021, 38(10): 1668-1680.
- [55] 杨杰, 陈蓉, 胡文娟, 吴巧玲, 佟晓楠, 李兴涛. 枳 PP2C 基因家族的鉴定及表达分析[J]. 果树学报, 2022, 39(4):532-547.
- YANG Jie, CHEN Rong, HU Wenjuan, WU Qiaoling, TONG Xiaonan, LI Xingtao. Identification and expression analysis of PP2C gene family in *Poncirus trifoliata*[J]. Journal of Fruit Science, 2022, 39(4):532-547.
- [56] 谭彬, 魏鹏程, 栗焕楠, 连晓东, 陈谭星, 郑先波, 程钧, 王伟, 王小贝, 冯建灿. 桃 PEBP 基因家族全基因组鉴定及桃 TFL1 基因功能分析[J]. 果树学报, 2020, 37(10):1443-1454.
- TAN Bin, WEI Pengcheng, LI Huannan, LIAN Xiaodong, CHEN Tanxing, ZHENG Xianbo, CHENG Jun, WANG Wei, WANG Xiaobai, FENG Jiancan. Genome-wide identification of PEBP gene family and functional analysis of TFL1 gene in peach (*Prunus persica*) [J]. Journal of Fruit Science, 2020, 37(10):1443-1454.
- [57] 周婉莹, 曲东, 张晓娟, 张文慧, 刘艳飞, 张羽. 中华猕猴桃 fasciclin 基因家族生物信息学分析及克隆[J]. 果树学报, 2020, 37(8):1144-1155.
- ZHOU Wanying, QU Dong, ZHANG Xiaojuan, ZHANG Wenhui, LIU Yanfei, ZHANG Yu. Bioinformatics analysis and cloning of fasciclin gene family in kiwifruit[J]. Journal of Fruit Science, 2020, 37(8):1144-1155.
- [58] 陈迪飞, 魏秀清, 许玲, 许家辉, 曾黎辉. 莲雾 PG 基因家族全基因组鉴定及表达分析[J]. 果树学报, 2022, 39(4):548-563.
- CHEN Difei, WEI Xiuqing, XU Ling, XU Jiahui, ZENG Lihui. Genome-wide identification and expression analysis of PG gene family in wax apple [*Syzygium samarangense* (Bl.) Merr. et Perry][J]. Journal of Fruit Science, 2022, 39(4): 548-563.
- [59] LIU J, CHEN T Y, YUAN Y, ZHOU J H, ZHAO Y Y, HUANG L Q. Bioinformatics and expression analysis of NAC transcription factor genes in *Scutellaria baicalensis*[J]. World Journal of Traditional Chinese Medicine, 2018, 4(2):37-42.
- [60] LING L, SONG L L, WANG Y J, GUO C H. Genome-wide analysis and expression patterns of the NAC transcription factor family in *Medicago truncatula*[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants: An International Journal of Functional Plant Biology, 2017, 23(2):343-356.
- [61] SAIDI M N, MERGBY D, BRINI F. Identification and expression analysis of the NAC transcription factor family in durum wheat (*Triticum turgidum* L. ssp. durum)[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2017, 112:117-128.
- [62] ZHU J K. Abiotic stress signaling and responses in plants[J]. Cell, 2016, 167(2):313-324.
- [63] YANG R, DENG C, QUYANG B, YE Z. Molecular analysis of two salt-responsive NAC-family genes and their expression analysis in tomato[J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(2):857-863.
- [64] LIU Q L, XU K D, ZHAO L J, PAN Y Z, JIANG B B, ZHANG H Q, LIU G L. Overexpression of a novel chrysanthemum NAC transcription factor gene enhances salt tolerance in tobacco[J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(10):2073-2082.
- [65] 张丹, 马玉花. NAC 转录因子在植物响应非生物胁迫中的作用[J]. 生物技术通报, 2019, 35(12):144-151.
- ZHANG Dan, MA Yuhua. The role of NAC transcription factors in plant response to abiotic stress[J]. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(12):144-151.
- [66] SONG S Y, CHEN Y, CHEN J, DAI X Y, ZHANG W H. Physiological mechanisms underlying OsNAC5-dependent tolerance of rice plants to abiotic stress[J]. Planta, 2011, 234(2):331-345.
- [67] KNIGHT M R, KNIGHT H. Low-temperature perception leading to gene expression and cold tolerance in higher plants[J]. New Phytologist, 2012, 195(4):737-751.
- [68] GUAN Q M, YUE X L, ZENG H T, ZHU J H. The protein phosphatase RCF2 and its interacting partner NAC019 are critical for heat stress - responsive gene regulation and thermotolerance in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2014, 26(1):438-453.
- [69] HU H H, DAI M Q, YAO J L, XIAO B Z, LI X H, ZHANG Q F, XIONG L Z. 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, 2006, 103(35):12987-12992.
- [70] WANG F, WANG J W, SUN L J, SONG X S. The molecular cloning and functional characterization of *ChNAC1*, a NAC transcription factor in *Cerasus humilis*[J]. Plant Growth Regulation, 2019, 89(3):331-343.