

李 *PsNAC* 基因家族鉴定及其在果实空腔褐变的表达模式分析¹

邓红红, 彭超[#], 梁茜, 张子扬, 刘俊伟, 李斌奇, 魏鸣康, 王雪颖, 李刘敏, 陈发兴*

(福建农林大学园艺学院, 福州 350002)

摘要:【目的】NAC 转录因子广泛参与植物生长发育和应对逆境胁迫过程, 被认为是植物次生壁生物合成转录调控的一级开关。鉴定李 *PsNAC* 转录因子家族, 探索其与皇冠李果实空腔褐变的关系。【方法】采用生物信息学方法, 分析李 *PsNAC* 家族成员、理化性质、系统发育和基因结构等, 并通过 qRT-PCR 技术, 分析 *PsNACs* 在皇冠李果实空腔褐变的表达模式。【结果】李 *PsNACs* 包含 115 个成员, 不均匀地分布在 8 条染色体上, 可分为 17 个亚族, 与植物次生胞壁合成相关的 *OsNAC003* 和 *OsNAC7* 亚族分别含 6 和 10 个 *PsNACs*。 *PsNACs* 启动子区域含有丰富的激素响应元件和 MYB 结合位点。10 个 *PsNACs* 在皇冠李的空腔褐变果实的表达量均高于非空腔褐变果实。【结论】为研究 *PsNAC* 家族成员与皇冠李果实空腔褐变的具体关联性奠定了重要基础。

关键词: 皇冠李; NAC 转录因子; 基因家族; 空腔褐变; 基因表达量

中图分类号: S662.3 文献标志码: A 文章编号: 1009-9980(2024)11-0001-08

Identification of plum *PsNAC* gene family and its expression patterns in fruit hollowiness and browning

DENG Honghong, PENG Chao[#], LIANG Xi, ZHANG Ziyang, LIU Junwei, LI Binqi, WEI Mingkang, WANG Xueying, LI Liumin, CHEN Faxing*

(College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China)

Abstract: 【Objective】 The NAC transcription factor family is one of the plant-specific transcription factor families and plays a pivotal role in plant growth and development and responses to biotic and abiotic stresses. ‘Huangguan’ plum is a newly developed high-quality plum variety bred by our team specifically suited for cultivation in Fujian Province, China. Its fruit has the advantages of excellent taste, pleasant flavor, and rich nutrient profile. However, in our previous long-term observations, Huangguan plum has been found to be prone to fruit hollowiness and browning (HB), characterized by rough and crystalline fruit pulp surfaces undergoing lignification and browning. We found that lignin biosynthesis and accumulation is one of the predominant biochemical responses to HB. The NAC transcription factor is recognized as

收稿日期: 2024-07-16 接受日期: 2024-09-21

基金项目: 福建省林业科技推广项目 (2023TG18); 福建农林大学青年教师赴海峡联合院访学研修专项计划 (KFXH23029); 永泰县“李梅基因库”建设暨‘皇冠李’新品种引种与示范推广项目 (KH240149A)

作者简介: 邓红红, 女, 讲师, 博士, 研究方向为果树种质资源开发与利用、果实品质形成与调控。E-mail: denghh@fafu.edu.cn. #为共同第一作者

*通信作者 Author for correspondence. E-mail: fxchen@fafu.edu.cn

the primary regulator in the transcriptional control of plant secondary wall synthesis. This study aims to characterize the *PsNAC* gene family members in plum and investigate their association with fruit HB in Huangguan plum. **【Methods】** The molecular weight, theoretical isoelectric point, and other physicochemical properties were predicted by the online tool ExpASy. The subcellular localization of *PsNACs* was predicted by the online software WoLF PSORT. The MEGA 11 software was used to construct a phylogenetic tree. The online tool Simple MEME Wrapper was used to analyze the motifs. The conserved motifs and gene structure maps were drawn by Tbttools. To analyze the *cis*-acting elements in the promoter region of *PsNACs*, the upstream 2000 bp promoter sequences were extracted from the genomic sequences and submitted to the Plant TBDB website for the identification of *cis*-elements in the promoter region. The analysis results were organized and displayed using Simple BioSequence Viewer. The expression analysis of ten *PsNACs* in Huangguan plum fruit with and without HB were analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). **【Results】** There are 115 *PsNAC* members identified in *Prunus salicina* Lindl., with protein sequences ranging from 182 to 861 amino acids, molecular weights from 20.98 to 95.97 kDa, theoretical isoelectric points from 4.43 to 9.55, and the instability index from 27.84 (*PsNAC60*) to 61.36 (*PsNAC087*). The grand average of hydropathy values of *PsNAC* gene family members were negative, indicating that these proteins are hydrophilic in nature. Transmembrane structure analysis revealed that 94% of *PsNAC* gene family members do not possess a transmembrane domain. The subcellular localization prediction results showed that 91 *PsNAC* gene family members were located in the cell nucleus, and the rest were distributed in structures such as the cytoplasm, Golgi apparatus, peroxisome, cytoskeleton, mitochondria, chloroplasts, plasma membrane, and vacuole. Chromosomal localization analysis revealed uneven distribution across the plum's eight chromosomes, with chromosomes 2 and 3 harboring the highest number counts (17.4%), followed by chromosome 5 (15.2%), and the fewest on chromosomes 6 and 7 (10 *PsNACs* each). Phylogenetic tree analysis between *Arabidopsis thaliana* and *P. salicina* Lindl. classified *PsNAC* genes into 17 subfamilies, with 6 and 10 members clustered in *OsNAC003*, and *OsNAC7*, respectively, which are associated with plant secondary wall biosynthesis. The number of coding sequence segments in *PsNACs* ranged from 1 to 8, with most containing 3 to 6 segments. Analysis of gene annotation files identified a total of 10 conserved motifs among *PsNACs*, with varying positions and frequencies. Motif 1, motif 2, motif 3, and motif 6 were found in the majority of *PsNACs*, typically located towards the N-terminus of the sequence. *PsNAC* members within the same subfamily exhibited similar motif distributions and gene structure characteristics including the CDS and UTR regions, suggesting potential functional similarity. Analysis of the 2000 bp upstream sequences from the transcription start site of *PsNACs* identified a total of 3069 *cis*-elements. The most significant core elements included phytohormone-responsive elements, MYB binding sites, low temperature responsiveness, drought-inducible elements, and light-responsive elements. Intraspecific synteny analysis revealed that the *PsNAC* gene family contained 13 pairs of duplicated genes within the plum genome. The

relative expression levels of *PsNAC26*, *PsNAC57*, *PsNAC77*, and *PsNAC95* were highest at the fruit expansion period and gradually decreased as fruit development progressed. Conversely, *PsNAC54* and *PsNAC74* exhibited their lowest expression levels at the fruit expansion period, which increased gradually with fruit development and ripening. The expression levels of *PsNAC26*, *PsNAC57*, *PsNAC77*, *PsNAC95*, *PsNAC54*, and *PsNAC74* were higher in Huangguan plum fruit showing hollowness and browning compared to those without. 【Conclusion】 This study represents the first comprehensive analysis of the *PsNAC* gene family in plum, identifying and characterizing 115 members of the *PsNAC* gene family. We explored their physical and chemical properties, gene structures, chromosome locations, phylogenetic relationships, and subcellular localization characteristics. Furthermore, using qRT-PCR technology, we investigated the gene expression patterns of *PsNAC* gene family members in Huangguan plum fruit exhibiting HB and non-HB across various developmental stages. The findings of this study will serve as a crucial foundation for further exploration into the biological functions of *PsNAC* gene family and the molecular mechanism by which *PsNAC* gene family members regulate fruit HB in Huangguan plum.

Key words: Huangguan plum; NAC transcription factor; Gene family; Fruit hollowness and browning; gene expression

转录因子是植物生长发育和外部（非）生物胁迫响应的主要调控因子^[1]。目前已知植物中存在转录因子有 58 种，其中，NAC 转录因子是超大转录因子家族之一，是植物特有的基因家族^[2]。NAC 这一命名是源自于矮牵牛（*Petunia hybrida*）的 NAM（no apical meristem）基因、拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）的 ATAF1/ATAF2（actiation factor 1/2）基因和 CUC2（cup-shaped cotyledon 2）基因的首字母^[3]。NAC 蛋白的 N 末端区域含有约 150 个高度保守氨基酸的 NAC 结构域，负责 DNA 结合和二聚体形成，可分为 A~E 5 个亚结构，其中 A、C 和 D 高度保守，B 和 F 较为多变。NAC 蛋白的 C 端由一些简单氨基酸重复序列构成高度可变的调控区域（transcription regulation region, TRR），具有蛋白结合活性，能够转录激活或者抑制^[4]。

植物基因组中 NAC 转录因子成员众多，目前已在多种植物鉴定出这一家族成员，包括模式植物拟南芥（*Arabidopsis thaliana*, 117 个）^[5]和毛果杨（*Populus trichocarpa*, 170 个）^[6]、作物水稻（*Oryza sativa*, 151）^[5]、玉米（*Zea mays* L., 148 个）^[7]和大豆（*Glycine max* L., 152 个）^[8]、蔬菜作物番茄（*Solanum lycopersicum*, 93 个）^[9]、辣椒（*Capsicum annuum* L., 104 个）^[10]、大白菜（*Brassica rapa* L. ssp. *Pekinensis*, 188 个）^[11]和果树作物苹果（*Malus domestica*, 180 个）^[12]、梨（*Pyrus bretschneideri* Rehd., 185）^[13]、火龙果（*Hylocereus undatus*, 64 个）^[14]、菠萝（*Ananas comosus*, 73 个）^[15]、欧李（*Cerasus humilis*, 76 个）^[16]。

研究表明，NAC 转录因子广泛参与植物多种生命代谢活动，包括在植物调控生长发育、响应逆境胁迫^[17-20]、花器官形成^[21]、器官边界和植物形态建成^[22-23]、次生细胞壁形成与增厚

[24-25]、芽和根尖分生组织形成^[1,26]、侧根发育^[20-27]、纤维发育^[24]、植株衰老调节^[28]、果实生长发育^[29]、果实风味形成^[30-31]、果实成熟^[1,32]等方面发挥着重要作用。

皇冠李 (*Prunus salicina* Lindl. var. *cordata* ‘Huangguan’) 是笔者团队选育的一种适宜福建地区栽培和发展的优质柰李新品种。该品种于 2018 年 12 月通过福建省林木良种审定, 编号为闽 S-SV-PS-2018。皇冠李的果实呈鲜亮的黄色, 口味鲜甜, 风味浓郁, 成熟期在 5 月底至 6 月初, 是早熟柰李的优新品种。然而, 皇冠李是属于典型的柰李类, 存在的突出问题是果实内部的核顶端常与果肉分离, 形成蛀孔状 (似虫蛀而非虫蛀) 的空腔 (hollowness, or cavity)。笔者课题组前期的长期观察发现, 这种现象使得空腔周围的果肉表面变得粗糙呈结晶状, 同时出现木质化 (lignification) 褐变 (化) (browning), 降低了果实内在品质与商品价值。这种空腔褐变特征, 可能会让消费者误认为是烂果, 从而对产业造成严重的经济损失。

果肉组织的木质化过程是木质素积累的结果, 受到木质素生物合成和转录调控的相关基因调控^[33-34]。木质素生物合成是一个复杂的过程, 其中转录因子如 NAC、MYB、WRKY 和 bHLH 等在调控木质素生物合成中发挥着关键作用。在这些转录因子中, NAC 和 MYB 被认为是木质素生物合成调控网络的关键上游转录因子, 担任主调节开关角色^[37]。NAC 转录因子特别被视为植物次生壁生物合成转录调控的一级开关^[35-37]。

本研究利用生物信息学手段, 鉴定李 *PsNAC* 基因家族成员, 并系统分析 *PsNAC* 家族基因的理化性质、基因结构、染色体定位、系统进化、亚细胞定位等特征, 采用 qRT-PCR 技术分析 *PsNAC* 家族基因在皇冠李不同发育时期的空腔褐变果和非空腔果的基因表达模式。研究结果将为进一步研究 *PsNAC* 家族基因的生物学功能、寻找可能参与木质素合成调控柰李果实空腔褐变的 *PsNAC* 候选基因提供重要参考, 并有望为未来制定柰李果实空腔褐变防控技术方案、品种改良和种质创新提供重要依据。

1 材料和方法

1.1 基因家族成员鉴定、染色体定位和理化性质分析

从 Pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org/>) 下载 NAC.hmm (PF01849) 和 NAM.hmm (PF02365) 隐马尔可夫模型, 利用 TBtools 软件的 Simple HMM search 功能鉴定李 NAC 家族蛋白序列 (E-value 设定为 $1e-5$)。利用 NCBI 在线 CD-search 工具, 检测候选蛋白序列的保守结构域, 剔除冗余和无效基因模型, 最终获得 *PsNAC* 基因家族成员及其序列信息。

基于三月李 (*P. salicina* Lindl.) 基因组注释的 GFF 文件, 采用 TBtools 对 *PsNAC* 基因家族成员进行染色体定位分析, 并根据它们在染色体的位置顺序进行了重命名。

利用 ExPASy 网站 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析 *PsNAC* 家族成员的理化性质, 包括等电点、分子量、不稳定系数、氨基酸数目等。使用 SignalIP4.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalIP-4.1/>) 预测这些 *PsNAC* 家族成员是否存在信号肽。采用 TMHMM 2.0 (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>) 预测 *PsNAC* 家族成员的

跨膜结构、WoLF PSORT 网站 (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 预测 *PsNAC* 家族成员的亚细胞定位。

1.2 基因家族成员多序列比对与系统进化树的构建

从 PlantTFDB (<http://plantfdb.gao-lab.org/>) 获取拟南芥 NAC 基因 (125 个) 的蛋白序列, 采用 MEGA 11 软件的 ClustalW 进行李和拟南芥 NAC 蛋白序列比对, 去除差异较大的氨基酸序列。采用 Neighbor-Joining 方法构建系统进化树 (Bootstrap 设置为 1000 次)。采用 iTOL 网站 (<https://itol.embl.de/tree/>) 美化系统进化树。最后参考已知的拟南芥 NAC 基因家族分类信息, 对构建好的系统发育树进行亚族分类。

1.3 基因家族成员保守基序和基因结构分析

根据亚族分类结果, 利用 TBtools 的 Simple MEME Wrapper 功能对 *PsNAC* 家族的保守基序进行分析, 最大 motif 数设置为 20, 其他参数为默认值。根据生成的 XML 文件和家族成员 ID, 使用 TBtools 将 *PsNAC* 亚族成员的保守基序进行可视化绘制。根据三月李基因注释文件, 使用 TBtools 将 *PsNAC* 亚族成员的编码区和非编码区的基因结构进行可视化绘制。

1.4 基因家族成员的启动子顺式作用元件预测

根据三月李基因组文件和基因结构注释信息文件, 使用 TBtools 筛选 *PsNAC* 家族成员基因转录起始位点上游 2000 bp 的序列, 并将这些序列上传到 Plant TFDB 网站, 进行启动子区域顺式作用元件的预测与分析。最后, 通过 TBtools 的 Simple BioSequence Viewer 功能, 将筛选出的启动子顺式作用元件数据进行可视化展示。

1.5 基因家族成员共线性分析

从拟南芥基因组数据库 (<http://www.arabidopsis.org/>) 下载拟南芥基因组和基因注释文件, 从三月李基因组 (<https://www.rosaceae.org/Analysis/9450778>) 下载全基因组文件和注释文件, 利用 MCScanX 软件对这 2 个物种进行共线性比较。

1.6 *PsNAC* 基因家族成员的表达模式分析

以皇冠李不同发育时期, 包括膨大期、转色期、成熟期和后熟期的果实作为试验材料, 采自福建省宁德市古田县昞谷村李园 (E 118°49'4", N 26°39'3", 海拔 280 m)。选取树龄为 5 年, 株行距 3.5 m×4.0 m, 生长一致、长势良好, 水肥管理水平一致的植株为采样树。采样时, 选择树体东、南、西、北四个方向高度一致、外围花束状果枝上果形均匀一致的果实, 每 3 株树的样本被视为 1 个生物学重复, 用冰盒放置带回实验室。用手术刀将果实切开, 判断是否为空腔褐变果实。

采用 qRT-PCR 技术分析 *PsNAC* 家族基因的相对表达量。采用 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (DP441, 天根生化科技北京有限公司, 北京) 提取 RNA, M5 Super plus qPCR RT kit with gDNA remover 试剂盒 (北京聚合美生物科技有限公司, 北京) 合成 cDNA 第一链。使用 Primer Premier 5 设计实时荧光定量引物, 选用 *Actin* 位内参基因, 引物

由擎科伟业生物技术有限公司进行合成。qRT-PCR 反应使用 LightCycler 480 SYBR Green I Master 试剂盒 (Roche), 通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因的相对表达量。

表 1 李 *PsNAC* 基因家族表达分析的实时荧光定量引物

Table 1 Real-time fluorescence quantitative primers for expression analysis of plum *PsNAC* gene family

基因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>PsNAC95</i>	AGAAGCCCCAGGAAAGTTGA	TAGAAATCAGGCCACGACGT
<i>PsNAC77</i>	CATCAACAACAGAGCTCGCA	ACATTGAGACGCACGACCT
<i>PsNAC74</i>	AGATGAAGAGCTGGTGGACT	ATCCCATGGCTCGAACTTGA
<i>PsNAC57</i>	AAATGCTGCTCGATCGTCTG	GCCCCGCCATTCTGATAAAA
<i>PsNAC54</i>	AGCGAAGGAAGGTTCAACT	ACCCTTAAGTGTCCACCAA
<i>PsNAC22</i>	TTCACCACCTCATCACCAGA	GTATTTTCTTGCCGGCGTCT
<i>PsNAC23</i>	GACGTGTGATTGTGCGCT	ATTCATAATCTGCGGCCCA
<i>PsNAC26</i>	GCCCCAATCTCCCAACTTTT	GCTGTGTCTGTTGTGCTTTG
<i>PsNAC107</i>	GGGGCATATGTTGAAGCGTT	AGTTGCTCGTCTCCCATAA
<i>PsNAC51</i>	TCATCCTTCGTATCGGCTAA	TCACCACCGTTGATCAAGGA
<i>PsActin</i>	CTGGACCTTGCTGGTCTGT	ATTTCCCGCTCAGCAGTG

2 结果与分析

2.1 *PsNAC* 基因家族成员的鉴定及理化性质特征

通过三月李 NAC 转录因子特异隐马可夫模型文件的构建及对三月李蛋白数据库的二次搜索, 共提取到 117 个 *PsNAC* 转录因子家族成员。经过 NCBI CD-search 功能验证蛋白序列的保守结构域, 剔除冗余和无效基因模型, 最终获得了 115 个 *PsNAC* 转录因子基因。根据其在染色体位置的排列顺序, 依次编号为 *PsNAC01*~*PsNAC115*。

对 *PsNAC* 家族基因蛋白序列进行基本理化性质分析, 如表 2 所示, *PsNACs* 编码蛋白质的氨基酸序列长度范围是 182 (*PsNAC98*) 至 861 (*PsNAC95*) 个, 平均氨基酸数量 366 个。蛋白理论等电点值 (pI) 分布在 4.43 至 9.55 之间, 其中 86 个为酸性蛋白, 29 个为碱性蛋白。相对分子质量在 20 980.52 (*PsNAC98*) 至 95 967.63 (*PsNAC95*) 之间。不稳定指数范围从 27.64 (*PsNAC60*) 至 61.36 (*PsNAC093*), 其中, 108 个 *PsNAC* 家族成员不稳定指数大于 35, 7 个 *PsNAC* 家族成员不稳定指数则小于 35。*PsNAC* 家族成员的 GRAVY 值均为负数, 说明这些 *PsNAC* 家族成员蛋白均为亲水性蛋白。

跨膜结构分析显示, 94%的 *PsNAC* 家族成员没有跨膜结构域, 而 *PsNAC14*、*PsNAC80*、*PsNAC85*、*PsNAC95*、*PsNAC105* 和 *PsNAC107* 则各含有 1 个跨膜结构域, 仅 *PsNAC112* 具有 3 个跨膜结构。亚细胞定位的预测结果显示, 91 个 *PsNAC* 家族成员位于细胞核, 其余分布于细胞质、高尔基体、过氧化物酶体、细胞骨架、线粒体、叶绿体、质膜和液泡等结构。

表 2 *PsNAC* 转录因子家族理化特征分析Table 2 Physicochemical properties of *PsNAC* transcription factor family

基因编号 Gene ID	基因名称 Gene Name	氨基酸数量 Number of amino acids	相对分子质量 Molecular mass/ku	等电点 Theoretic al pI	不稳定指数 Instability index	亲水指数 Hydrophobicity score (GRAVY)	亚细胞定位 Subcellar localization
PsSY0028742	<i>PsNAC1</i>	321	37 017.25	6.09	42.10	-0.824	过氧化物酶体 Peroxisome
PsSY0026484	<i>PsNAC2</i>	330	37 567.05	5.13	34.35	-0.646	叶绿体 Chloroplast
PsSY0007631	<i>PsNAC3</i>	372	43 076.79	4.65	47.59	-0.787	细胞核 Nucleus
PsSY0017418	<i>PsNAC4</i>	252	29 578.21	6.70	46.91	-0.840	细胞核 Nucleus
PsSY0022568	<i>PsNAC5</i>	237	27 449.07	9.44	37.24	-0.765	线粒体 Mitochondria
PsSY0014229	<i>PsNAC6</i>	348	39 717.71	8.18	37.25	-0.672	细胞核 Nucleus
PsSY0021220	<i>PsNAC7</i>	445	50 530.61	4.43	40.83	-0.780	细胞核 Nucleus
PsSY0023045	<i>PsNAC8</i>	457	52 034.23	4.49	42.99	-0.833	细胞核 Nucleus
PsSY0024302	<i>PsNAC9</i>	298	34 315.34	5.16	39.51	-0.766	叶绿体 Chloroplast
PsSY0025630	<i>PsNAC10</i>	357	41 217.73	4.73	46.78	-0.845	细胞核 Nucleus
PsSY0008631	<i>PsNAC11</i>	284	32 817.57	5.14	37.45	-0.812	细胞核 Nucleus
PsSY0017528	<i>PsNAC12</i>	373	43 174.54	4.6	40.61	-0.886	细胞核 Nucleus
PsSY0022852	<i>PsNAC13</i>	255	29 162.70	5.67	49.28	-0.749	细胞核 Nucleus
PsSY0010290	<i>PsNAC14</i>	389	43 572.52	5.84	45.11	-0.630	液泡 Vacuole
PsSY0004695	<i>PsNAC15</i>	355	40 346.24	7.95	41.33	-0.745	细胞核 Nucleus
PsSY0006766	<i>PsNAC16</i>	461	52 127.43	6.47	49.76	-0.818	细胞核 Nucleus
PsSY0017158	<i>PsNAC17</i>	425	47 098.06	4.57	41.88	-0.622	细胞核 Nucleus
PsSY0011487	<i>PsNAC18</i>	207	23 690.33	5.15	49.39	-0.698	细胞核 Nucleus
PsSY0013949	<i>PsNAC19</i>	295	33 898.11	8.09	61.09	-0.861	细胞核 Nucleus
PsSY0013465	<i>PsNAC20</i>	345	38 258.01	8.95	32.66	-0.711	细胞骨架

								Cytoskeleton
PsSY0012107	<i>PsNAC21</i>	280	31 554.47	8.06	51.20	-0.514		细胞核
								Nucleus
PsSY0013234	<i>PsNAC22</i>	383	42 472.49	6.47	55.10	-0.644		细胞核
								Nucleus
PsSY0025091	<i>PsNAC23</i>	442	50 215.67	4.87	44.72	-0.931		细胞质
								Cytoplasm
PsSY0006726	<i>PsNAC24</i>	264	30 280.41	5.31	46.24	-0.381		细胞质
								Cytoplasm
PsSY0014952	<i>PsNAC25</i>	225	25 749.80	4.68	44.23	-0.600		细胞骨架
								Cytoskeleton
PsSY0024912	<i>PsNAC26</i>	288	33 177.55	7.01	37.02	-0.692		细胞核
								Nucleus
PsSY0020064	<i>PsNAC27</i>	485	53 902.07	7.93	47.31	-0.655		细胞质
								Cytoplasm
PsSY0026548	<i>PsNAC28</i>	256	29 159.05	9.12	46.89	-0.707		细胞核
								Nucleus
PsSY0017862	<i>PsNAC29</i>	258	29 352.30	9.12	47.87	-0.695		细胞核
								Nucleus
PsSY0018284	<i>PsNAC30</i>	353	40 095.44	4.64	42.89	-0.754		细胞核
								Nucleus
PsSY0027731	<i>PsNAC31</i>	352	40 146.64	4.78	44.21	-0.774		细胞核
								Nucleus
PsSY0005034	<i>PsNAC32</i>	353	40 172.71	4.70	44.59	-0.746		细胞核
								Nucleus
PsSY0000769	<i>PsNAC33</i>	307	34 785.63	4.84	43.81	-0.783		叶绿体
								Chloroplast
PsSY0003225	<i>PsNAC34</i>	321	36 628.23	6.01	40.03	-0.998		细胞核
								Nucleus
PsSY0026419	<i>PsNAC35</i>	367	42 570.98	4.74	45.91	-0.956		细胞核
								Nucleus
PsSY0022165	<i>PsNAC36</i>	478	53 627.83	4.87	50.74	-0.746		细胞核
								Nucleus
PsSY0024469	<i>PsNAC37</i>	292	33 651.07	6.19	45.55	-0.749		细胞核
								Nucleus
PsSY0006447	<i>PsNAC38</i>	381	42 431.65	4.70	47.57	-0.714		细胞核
								Nucleus
PsSY0015074	<i>PsNAC39</i>	360	40 047.17	4.89	48.29	-0.674		细胞核
								Nucleus
PsSY0001009	<i>PsNAC40</i>	363	41 232.57	4.72	40.82	-0.817		细胞核
								Nucleus
PsSY0017649	<i>PsNAC41</i>	374	41 847.26	4.62	46.26	-0.610		细胞核
								Nucleus
PsSY0001124	<i>PsNAC42</i>	362	40 318.29	8.34	43.63	-0.746		细胞核

PsSY0018753	<i>PsNAC64</i>	242	27 611.42	8.75	48.58	-0.558	细胞骨架 Cytoskeleton
PsSY0005654	<i>PsNAC65</i>	322	35 696.89	5.05	51.35	-0.634	细胞核 Nucleus
PsSY0006576	<i>PsNAC66</i>	449	50 804.13	4.66	55.90	-0.776	细胞核 Nucleus
PsSY0007670	<i>PsNAC67</i>	505	56 058.04	4.91	60.18	-0.754	细胞核 Nucleus
PsSY0022170	<i>PsNAC68</i>	456	51 255.43	4.44	55.28	-0.717	细胞核 Nucleus
PsSY0025975	<i>PsNAC69</i>	467	52 846.77	4.70	57.29	-0.754	细胞核 Nucleus
PsSY0020086	<i>PsNAC70</i>	453	51 139.41	5.47	55.29	-0.777	细胞核 Nucleus
PsSY0023204	<i>PsNAC71</i>	451	52 028.34	4.80	55.23	-0.896	细胞核 Nucleus
PsSY0024339	<i>PsNAC72</i>	380	44 037.27	4.70	58.91	-0.941	细胞核 Nucleus
PsSY0027895	<i>PsNAC73</i>	504	58 318.07	6.08	50.45	-0.827	叶绿体 Chloroplast
PsSY0012520	<i>PsNAC74</i>	191	22 513.61	7.81	38.80	-0.583	细胞骨架 Cytoskeleton
PsSY0022316	<i>PsNAC75</i>	448	52 203.43	6.91	43.60	-0.852	高尔基体 Golgi apparatus
PsSY0026601	<i>PsNAC76</i>	437	49 531.24	5.82	40.10	-0.720	细胞核 Nucleus
PsSY0012725	<i>PsNAC77</i>	213	25 252.89	6.55	56.24	-0.730	细胞骨架 Cytoskeleton
PsSY0004600	<i>PsNAC78</i>	185	22 033.89	5.35	58.82	-0.875	细胞骨架 Cytoskeleton
PsSY0003387	<i>PsNAC79</i>	184	22 018.89	8.41	44.04	-0.895	细胞核 Nucleus
PsSY0028882	<i>PsNAC80</i>	539	60 419.46	5.03	41.11	-0.545	叶绿体 Chloroplast
PsSY0021976	<i>PsNAC81</i>	284	32 847.21	5.64	42.51	-0.674	叶绿体 Chloroplast
PsSY0021124	<i>PsNAC82</i>	290	33 751.64	7.72	46.84	-0.668	细胞核 Nucleus
PsSY0024583	<i>PsNAC83</i>	284	32 704.57	5.67	53.47	-0.811	细胞核 Nucleus
PsSY0000423	<i>PsNAC84</i>	271	30 898.07	8.66	39.66	-0.555	细胞核 Nucleus
PsSY0016599	<i>PsNAC85</i>	577	65 388.75	4.90	48.17	-0.594	细胞核

P _s SY0001641	<i>P_sNAC107</i>	590	66 114.13	4.53	28.26	-0.573	叶绿体 Chloroplast
P _s SY0027282	<i>P_sNAC108</i>	632	68 967.68	5.71	32.72	-0.789	细胞核 Nucleus
P _s SY0009363	<i>P_sNAC109</i>	425	47 698.99	4.92	53.79	-0.716	细胞核 Nucleus
P _s SY0021588	<i>P_sNAC110</i>	316	36 132.78	5.92	47.47	-0.933	细胞核 Nucleus
P _s SY0018873	<i>P_sNAC111</i>	423	48 680.55	6.01	40.90	-1.009	细胞核 Nucleus
P _s SY0006710	<i>P_sNAC112</i>	376	43 058.75	6.75	42.69	-0.087	质膜 Plasma membrane
P _s SY0006233	<i>P_sNAC113</i>	285	32 107.54	6.51	59.94	-0.856	细胞核 Nucleus
P _s SY0026633	<i>P_sNAC114</i>	335	38 645.14	5.00	57.01	-0.782	细胞核 Nucleus
P _s SY0012482	<i>P_sNAC115</i>	486	54 722.66	6.63	53.27	-0.979	细胞核 Nucleus

2.2 *P_sNAC* 基因染色体定位

染色体定位结果（图 1）显示，115 个 *P_sNAC* 基因不均匀地定位到 8 对染色体，其中，第 2 号和 3 号染色体上分布的 *P_sNAC* 家族成员最多（占 17.4%），其次是第 5 号染色体（占 15.7%），第 6 号和 7 号染色体上分布的基因数量最少，仅含有 10 个 *P_sNACs*。

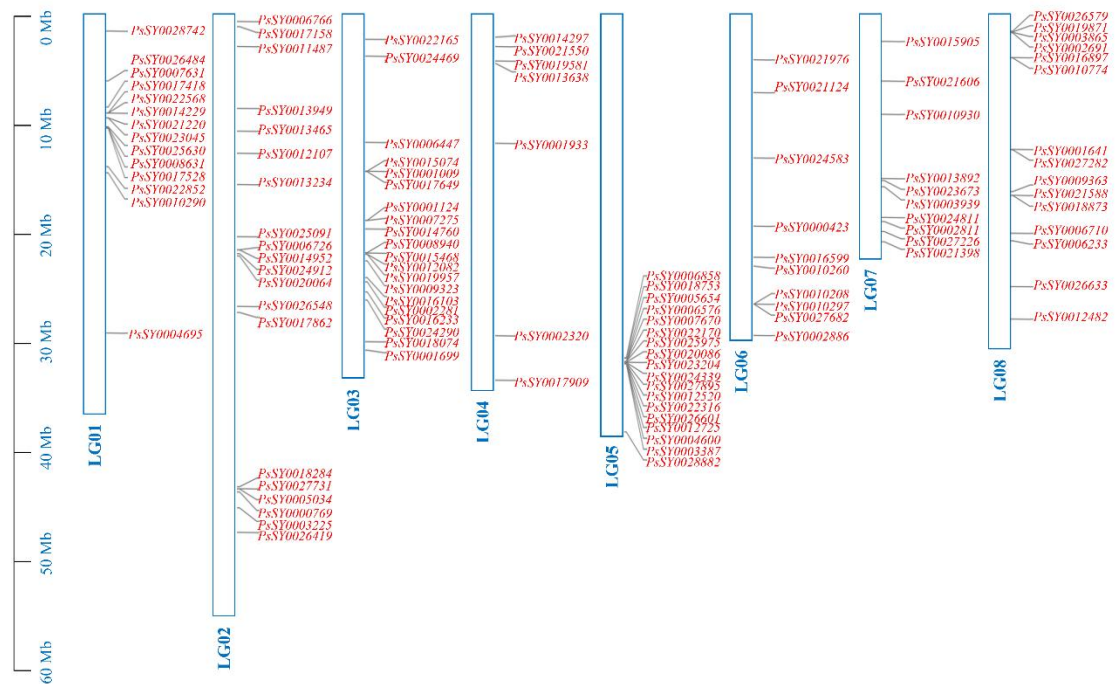
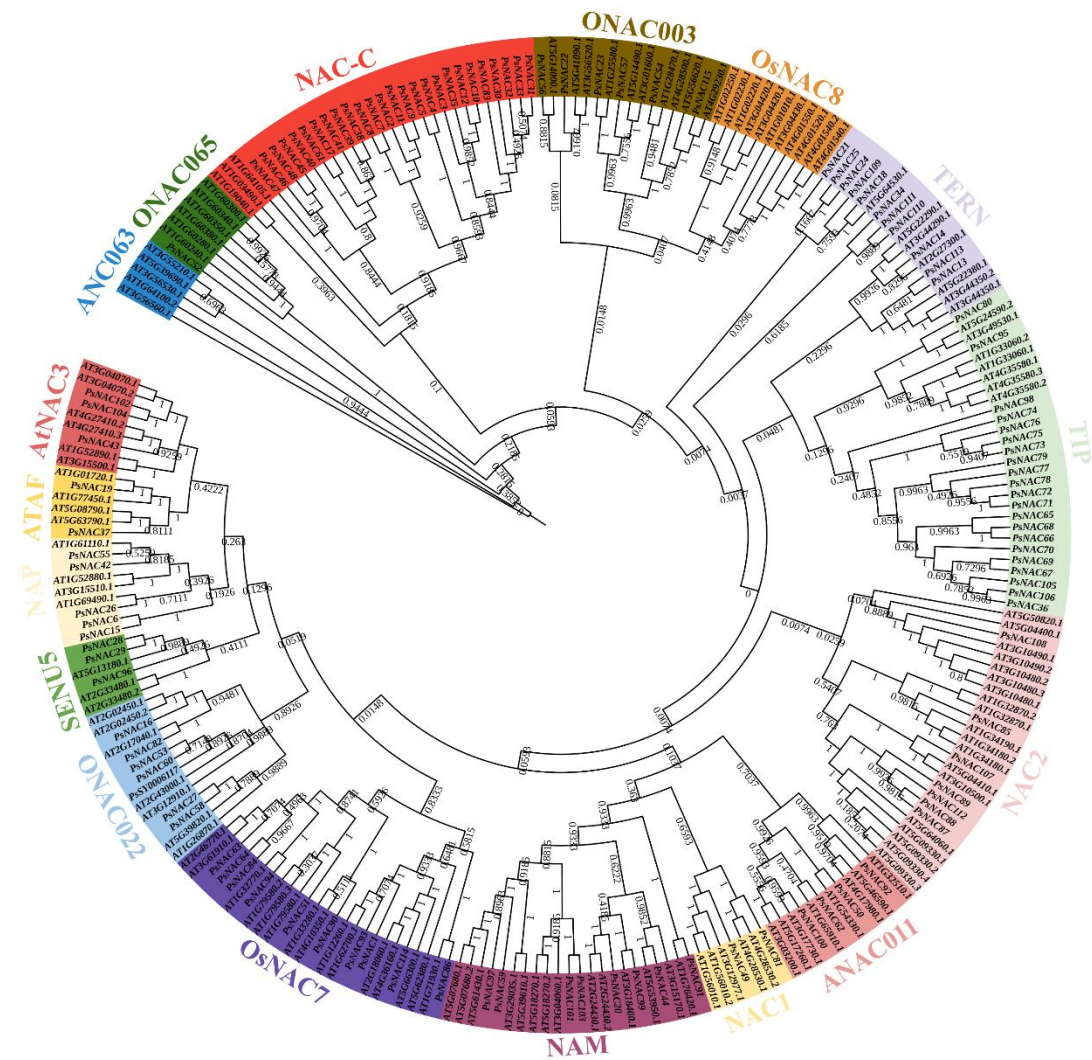


图 1 李 *P_sNAC* 家族成员在染色体的位置分布

Fig. 1 The location distribution of *PsNAC* gene family members on the chromosomes of *Prunus salicina* Lindl.

2.3 *PsNAC* 多序列比对与系统发育树

利用拟南芥 NAC 基因序列作为对照, 可将 *PsNACs* 分为 17 个亚族, 不同亚族在功能和进化关系上存在差异。OsNAC8 和 ANC063 亚族不含 *PsNAC* 家族成员, 其余亚族均含有数量不等的 *PsNAC* 家族成员。NAC-C 和 TIP 亚族的 *PsNAC* 家族成员数量超过 20 个, 其中 NAC-C 亚族包含 *PsNAC* 家族成员数量最多, 为 26 个。OsNAC003 亚族含 6 个 *PsNAC* 家族成员, 分别是 *PsNAC22*、*PsNAC23*、*PsNAC54*、*PsNAC56*、*PsNAC57* 和 *PsNAC115*; OsNAC7 亚族含 10 个 *PsNAC* 家族成员, 分别是 *PsNAC1*、*PsNAC51*、*PsNAC63*、*PsNAC64*、*PsNAC84*、*PsNAC86*、*PsNAC90*、*PsNAC93*、*PsNAC94* 和 *PsNAC114* (图 2)。



Ps. 李; At. 拟南芥。

Ps for *Prunus salicina* Lindl. and At for *Arabidopsis thaliana*.

图2 李 *PsNAC* 和拟南芥 *AtNAC* 基因家族系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of NAC gene family in *Prunus salicina* Lindl. and *Arabidopsis thaliana*

2.4 *PsNAC* 家族成员保守基序和基因结构

PsNAC 基因的 CDS 片段数量在 1~8 个不等，多数 *PsNAC* 基因具有 3~6 个 CDS 片段。基于基因注释文件的分析，共识别出 10 个保守 motifs，它们的分布位置和数量在 *PsNAC* 基因并不完全一致。其中，motif 1、motif 2、motif 3 和 motif 6 出现的次数最多，且通常是依次分布在 N 端。同一个亚族的 *PsNAC* 成员具有相似的 motif 分布和基因结构（包括 CDS 和 UTR 区域），这说明每个亚族的 *PsNAC* 成员可能具有类似的功能。*PsNAC33* 和 *PsNAC95* 所具有的 motif 数量最少，仅有 3 个（图 3）。

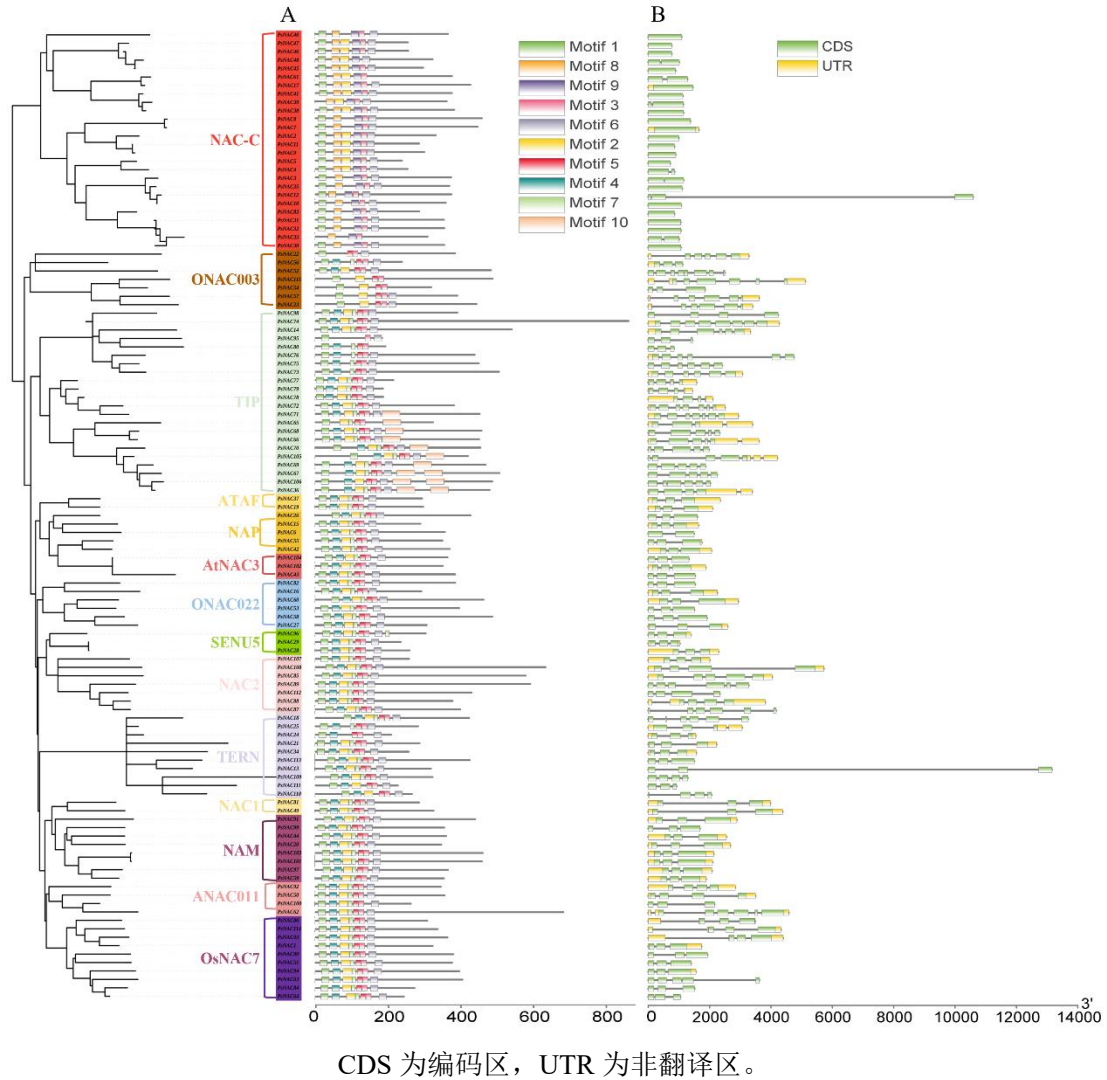


图3 *PsNAC* 家族基因的保守基序 (A) 和基因结构 (B) 示意图

Fig. 3 Schematic diagram of conserved motif elements (A) and gene structure characteristics

(B) of *PsNACs*

2.5 *PsNAC* 家族成员启动子顺式作用元件

为便于预测 *PsNAC* 基因所具有的潜在功能，对 *PsNAC* 基因起始密码子 ATG 上游 2000 bp 的序列进行分析，共预测到 3069 个功能不同的顺式作用元件（图 4）。其中，最主要的响应元件是植物激素响应元件，包括茉莉酸甲酯响应元件（MeJA-responsive element, 320 个）、脱落酸响应元件（Abscisic acid-responsive element, 296 个）、赤霉素响应元件（Gibberellin-responsive element, 127 个）和生长素响应元件（Auxin-responsive element, 78 个）。此外，在非生物胁迫中，*PsNAC* 家族还含有 87、64 和 49 个响应元件，分别参与干旱诱导反应的 MYB 结合位点（MYB binding site involved in drought-inducibility）、参与低温（Cis-acting element involved in low-temperature responsiveness）和光（MYB binding site involved in light responsiveness）响应。

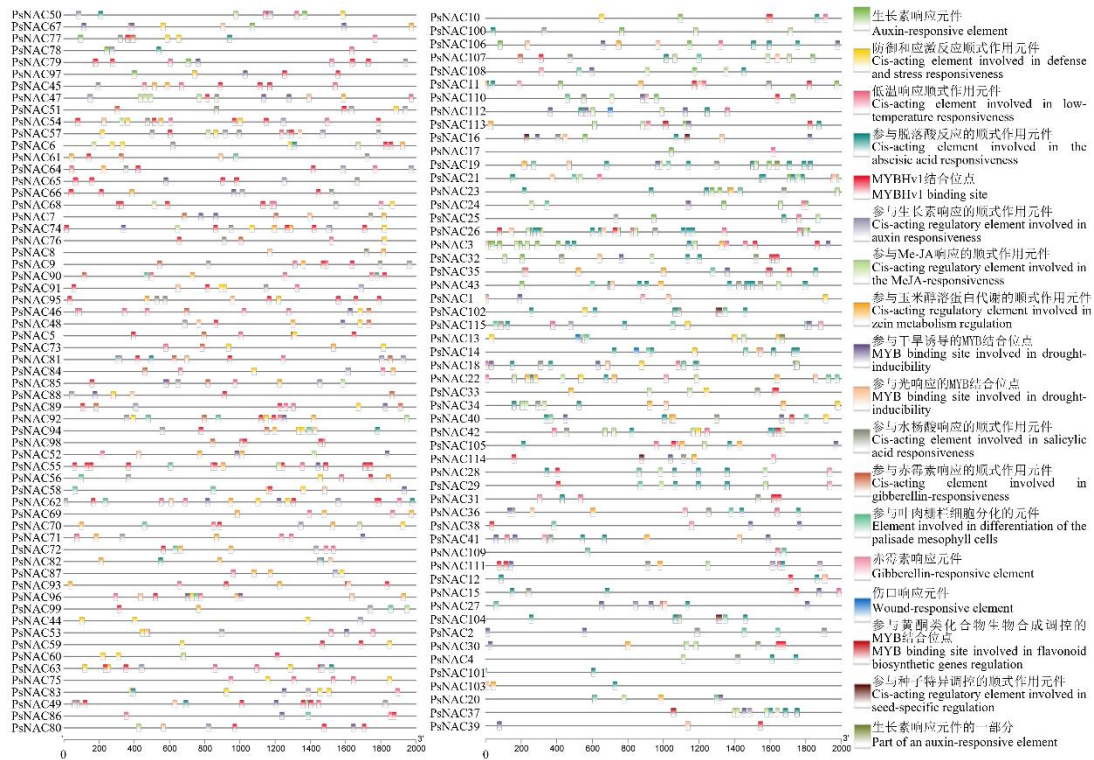


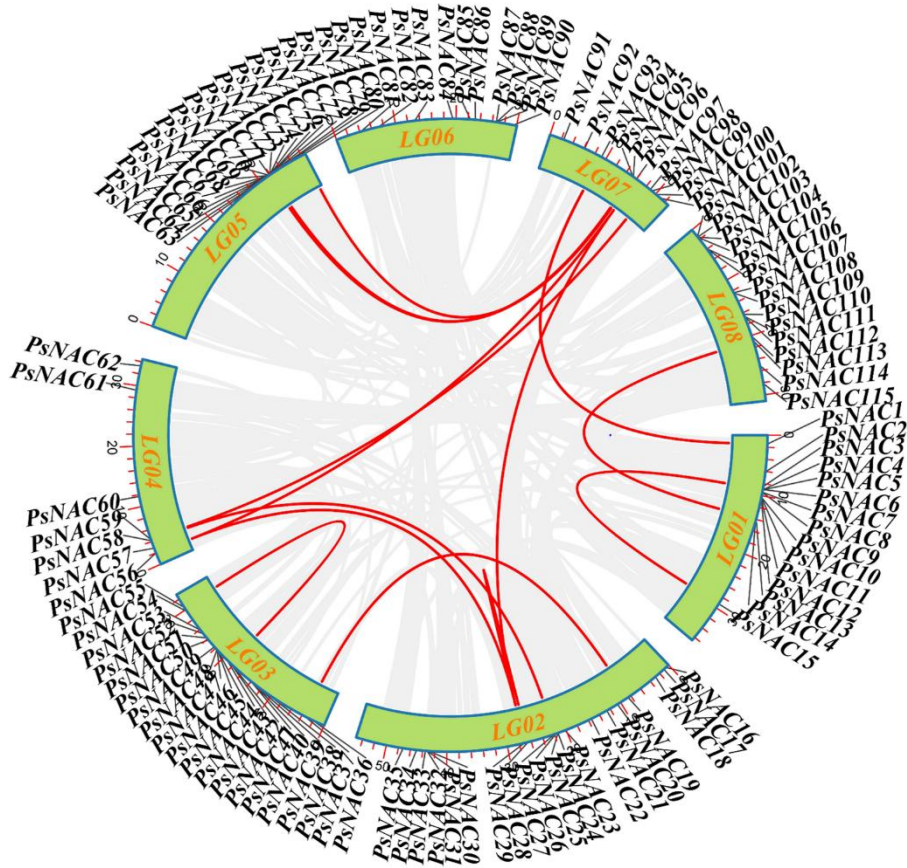
图 4 *PsNAC* 基因启动子区域的顺式作用元件

Fig. 4 *cis*-Acting elements in promoter region of *PsNAC* genes

2.6 *PsNAC* 基因家族种内共线性

为了鉴定 *PsNAC* 基因家族内是否存在基因复制现象，通过 MCScanX 共线性分析，总共鉴定出 16 对片段重复基因复制事件（图 5，红线相连的是基因复制事件的基因对），片段重复是 *PsNAC* 基因家族进化重要事件。其中，*PsNAC37* 与 *PsNAC19*、*PsNAC29* 与 *PsNAC56*、*PsNAC28* 与 *PsNAC96*、*PsNAC26* 与 *PsNAC58*、*PsNAC96* 与 *PsNAC56*、*PsNAC80* 与 *PsNAC94*、

PsNAC93 与 *PsNAC1*、*PsNAC94* 与 *PsNAC71* 发生的是两两基因片段复制，*PsNAC97*、*PsNAC59* 与 *PsNAC58*、*PsNAC79*、*PsNAC94* 与 *PsNAC95*、*PsNAC29*、*PsNAC28* 与 *PsNAC96* 发生的是 3 个基因之间的基因片段复制。*PsNAC13*、*PsNAC14*、*PsNAC113* 与 *PsNAC114* 发生的是 4 个基因之间的基因片段复制。根据片段重复的基因结构分析和系统发育树构建，推测这些片段重复基因的功能可能存在相似性。



图中灰线表示李基因组的所有共线性片段，红线表示片段重复的 *PsNAC* 基因对。

The gray background line represents the collinear fragments in the whole genome of *Prunus salicina* Lindl. and the highlighted red line represents the *PsNAC* gene pairs with segmental duplication.

图 5 *PsNAC* 基因的共线性分析

Fig. 5 The collinearity analysis of *PsNAC* genes

2.7 *PsNAC* 基因家族在皇冠李果实空腔褐变的表达模式分析

植物次生壁加厚过程包含纤维素、半纤维和木质素的合成，同时结合 *PsNAC* 基因家族成员的顺式作用元件预测结果，对 10 个 *PsNAC* 基因家族成员的基因表达量进行了分析（图 6）。其中，*PsNAC57*、*PsNAC54* 和 *PsNAC51* 既是 *OsNAC7* 和 *OsNAC003* 的亚族成员，又同时具有生长素和赤霉素响应元件，在激素参与木质素生物合成的转录调控网络具有重要作用。

PsNAC26、*PsNAC57*、*PsNAC77* 和 *PsNAC95* 在果实膨大期的基因相对表达量最高，随果实发育逐渐降低，在空腔褐变果的表达量高于非空腔褐变果。*PsNAC54* 和 *PsNAC74* 在果实膨大期的表达量最低，随果实发育逐渐上升，在空腔褐变果的表达量高于非空腔褐变果。*PsNAC22* 和 *PsNAC23* 在果实膨大期基因相对表达量最高，随果实发育呈现先下降后上升的趋势。*PsNAC51* 基因相对表达量随果实发育呈现先下降后上升的波动变化，后熟期的相对表达量最低，而 *PsNAC107* 在各时期的相对表达量基本保持不变。

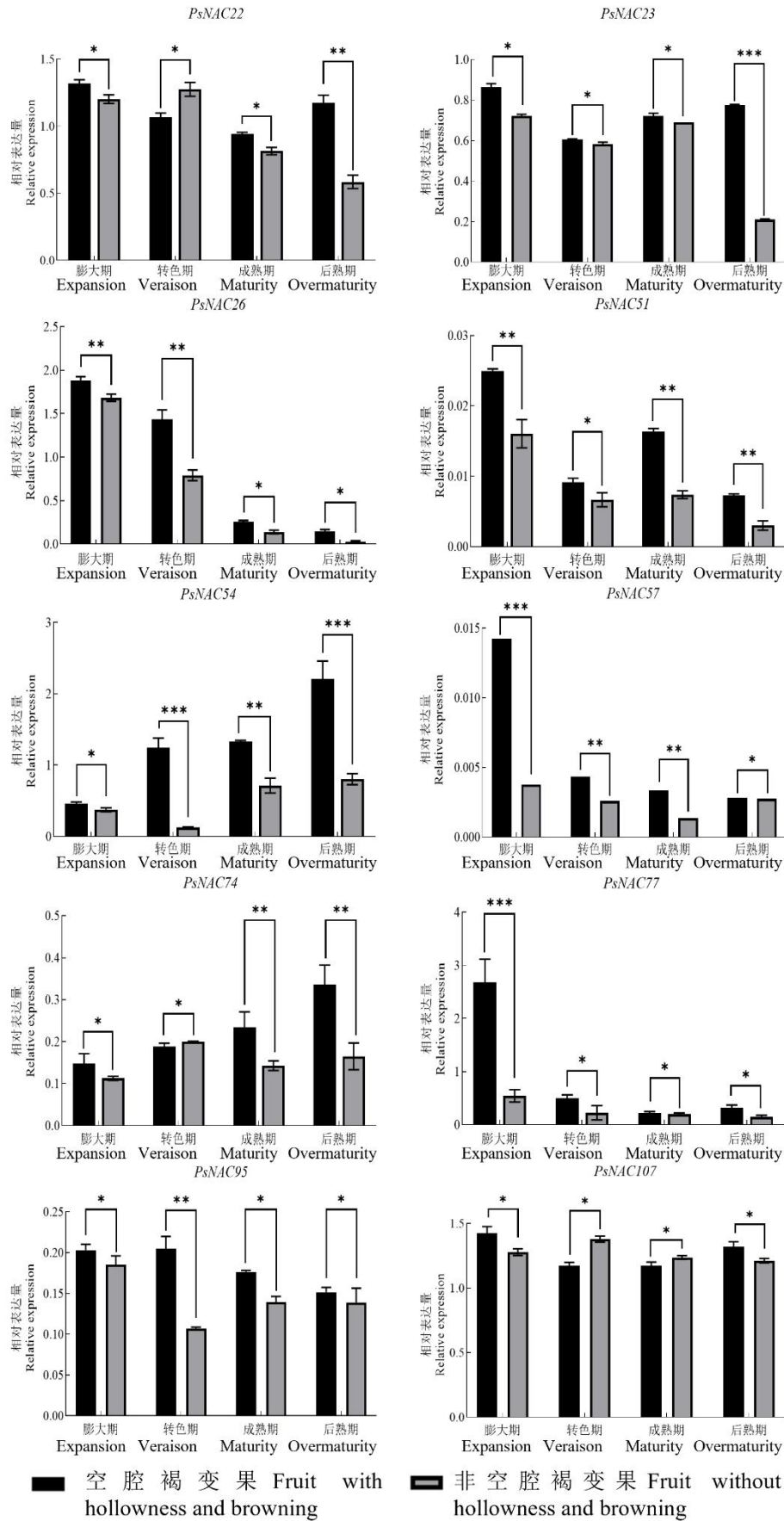


图6 *PsNAC* 基因在皇冠李空腔褐变和非空腔褐变果的不同发育时期的表达水平

Fig. 6 Expression analysis of *PsNAC* genes in Huangguan plum fruit with and without hollowness and browning during different development stages

3 讨论

NAC 转录因子家族是植物中最大的转录因子家族之一，在调节植物的生长发育、抵御病原菌、响应非生物胁迫（如干旱、高盐和低温等）以及调控果实品质等方面发挥着重要作用。尽管对 NAC 基因家族的鉴定和功能分类在多种植物中已有广泛的研究，但 NAC 转录因子在李的系统性研究方面尚不充分。木质素与果实品质和风味密切相关，其过度积累可能导致园艺植物的果实口感变差、果肉变硬、风味变淡、颜色变褐加深等，致使感官特性裂变、商品价值降低^[38-39]。笔者课题组前期观察发现，皇冠李果实空腔褐变这一产业问题与木质素密切相关。作为木质素生物合成途径的上游调控因子^[35-37]，NAC 转录因子在木质素生物合成的转录调控方面发挥关键作用。因此，对 *PsNAC* 转录因子进行全面生物信息学鉴定和分析，有望为未来制定防控柰李果实空腔褐变的技术方案、品种改良和种质创新提供重要参考。

笔者在本研究中鉴定到 115 个 *PsNAC* 转录因子成员，该数量高于番茄（93 个）^[9]、辣椒（104 个）^[10]、火龙果（64 个）^[14]、菠萝（73 个）^[15]和欧李（76 个）^[16]，但低于拟南芥（117 个）^[5]、毛果杨（170 个）^[6]、水稻（151 个）^[5]、玉米（148 个）^[7]、大豆（152 个）^[8]、大白菜（188 个）^[11]、苹果（180 个）^[12]和梨（185 个）^[13]。与其他物种相比，李 *PsNAC* 基因家族成员数量存在一定的差异，显示出明显的物种间的差异性。

笔者在本研究中的蛋白理化性质分析结果显示，李 *PsNAC* 基因家族成员在氨基酸序列长度、相对分子质量、等电点、CDS 长度等存在明显差异，表明了 *PsNAC* 基因家族成员在结构和功能上的多样性。尽管 *PsNAC* 蛋白质呈现亲水性特征，但其稳定性存在较大变异，反映了它们在不同生物学环境中的适应性和功能多样性。亚细胞定位预测结果显示，*PsNAC* 家族成员主要定位于细胞核，也有少数位于细胞质、叶绿体、线粒体等，说明李 *PsNAC* 转录因子可能在不同细胞部位发挥着多样性的功能，从而为植物体的正常生命活动提供保障。

利用拟南芥 NAC 基因序列作为对照，将 *PsNACs* 基因分为 17 亚族。其中，6 个 *PsNAC* 基因聚集在 *OsNAC003* 亚族，10 个 *PsNACs* 聚集在 *OsNAC7* 亚族。前人研究表明，*OsNAC003* 和 *OsNAC7* 亚族的大部分参基因参与植物的次生细胞壁合成^[40]。因此，推测聚类在这 2 个亚族的 *PsNACs* 可能具有相似的功能。*OsNAC7* 亚族在 NAC 家族中被广泛研究，包括 *SND1*、*NST1*、*URP7*、*BRN1/2*、*VND1-7* 基因，其主要功能集中在调控茎、根和花药次生壁的形成，在木质素调控植物生长发育和逆境胁迫中起重要作用^[41-42]。

启动子顺式作用元件的预测可以为进一步研究基因的转录调控机制和潜在功能提供理论依据^[43]。本研究中启动子顺式作用元件分析结果表明，*PsNACs* 含大量与激素相关元件的成员，推测这些成员在激素调控木质素生物合成的转录调控网络发挥重要作用。研究表明，NAC 转录因子在植物次生壁合成的转录调控网络起关键作用，是该复杂调控网络的主要开

关。枇杷 *EjNAC1* 通过反式激活木质素合成相关基因 *EjPAL1* 和 *Ej4CL1* 的启动子,使其表达上调,从而导致果实木质素积累,呈现出明显的木质化特征^[33]。Ge 等^[34]发现, *EjNAC3* 蛋白能直接结合并激活木质素合成结构基因 *EjCAD-like* 的启动子,参与调控枇杷果实木质化过程。三红蜜柚 *CgNAC043* 能激活下游转录因子 *CgMYB46* 和木质素合成基因 *CgC3H* 和 *CgCCoAOMT1* 的启动子,共同参与蜜柚汁胞木质素合成的转录调控^[44]。冬枣 MYB 激活子 (LOC107425254) 和抑制子 (LOC107415078) 通过调节 *F5H* 和 *CCR* 参与木质素生物合成,而 NAC 转录因子 (LOC107435239) 则促进 *F5H* 的表达,从而正向调控木质素的积累^[45]。石榴 NAC 类蛋白 *PgSND1-like* 能结合木质素合成酶基因启动子特异元件,提高 *PAL*、*4CL*、*F4H*、*CCR* 和 *CAD* 表达,从而调控石榴籽粒的硬度^[46]。

笔者在本研究中结合 *PsNAC* 基因家族成员顺式作用元件预测,共鉴定到 10 个 *PsNAC* 基因家族成员,其中 *PsNAC57*、*PsNAC54* 和 *PsNAC51* 既是 *OsNAC7* 和 *OsNAC003* 的亚族成员,又同时具有生长素和赤霉素响应元件。因此,这 3 个基因在激素参与木质素生物合成的转录调控网络至关重要。*PsNAC26*、*PsNAC57*、*PsNAC77* 和 *PsNAC95* 在果实膨大期表达量最高,随果实发育逐渐降低,在空腔褐变果的表达量高于非空腔褐变果,推测这些家族成员可能负向调控木质素生物合成。*PsNAC54* 和 *PsNAC74* 在果实膨大期的表达量最低,随果实发育逐渐上升,在空腔褐变果的表达量高于非空腔褐变果,*PsNAC54* 和 *PsNAC74* 可能正向调控木质素生物合成。本研究为后续研究皇冠李空腔褐变的分子机制提供了重要靶标。

4 结 论

首次鉴定并分析了 115 个李 *PsNAC* 基因家族成员,分析了 *PsNAC* 家族基因的理化性质、基因结构、染色体定位、系统进化、亚细胞定位等特征,采用 qRT-PCR 技术分析 *PsNAC* 家族基因在皇冠李不同发育时期的空腔褐变果和非空腔果的基因表达模式。研究结果将为进一步研究 *PsNAC* 家族基因的生物学功能、*PsNAC* 家族成员与皇冠李果实空腔褐变的具体关联性奠定了重要基础。

参考文献 References:

- [1] LIU G S, LI H L, GRIERSON D, FU D Q. NAC transcription factor family regulation of fruit ripening and quality: A review[J]. Cells, 2022, 11(3): 525.
- [2] SINGH S, KOYAMA H, BHATI K K, ALOK A. The biotechnological importance of the plant-specific NAC transcription factor family in crop improvement[J]. Journal of Plant Research, 2021, 134(3): 475-495.
- [3] 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.
- [4] PURANIK S, SAHU P P, SRIVASTAVA P S, PRASAD M. NAC proteins: Regulation and role in stress tolerance[J]. Trends in Plant Science, 2012, 17(6): 369-381.
- [5] NURUZZAMAN M, MANIMEKALAI R, SHARONI A M, SATOH K, KONDOH H, OOKA H, KIKUCHI S. Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice[J]. Gene, 2010, 465(1/2): 30-44.
- [6] MENG L, CHEN S Y, LI D W, HUANG M R, ZHU S. Genome-wide characterization and evolutionary

- expansion of poplar NAC transcription factors and their tissue-specific expression profiles under drought[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 24(1): 253.
- [7] PENG X J, ZHAO Y, LI X M, WU M, CHAI W B, SHENG L, WANG Y, DONG Q, JIANG H Y, CHENG B J. Genomewide identification, classification and analysis of *NAC* type gene family in maize[J]. Journal of Genetics, 2015, 94(3): 377-390.
- [8] LE D T, NISHIYAMA R, WATANABE Y, MOCHIDA K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K, TRAN L S P. Genome-wide survey and expression analysis of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress[J]. DNA Research, 2011, 18(4): 263-276.
- [9] JIN J F, WANG Z Q, HE Q Y, WANG J Y, LI P F, XU J M, ZHENG S J, FAN W, YANG J L. Genome-wide identification and expression analysis of the NAC transcription factor family in tomato (*Solanum lycopersicum*) during aluminum stress[J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 288.
- [10] DIAO W P, SNYDER J C, WANG S B, LIU J B, PAN B G, GUO G J, GE W, DAWOOD M H S A. Genome-wide analyses of the *NAC* transcription factor gene family in pepper (*Capsicum annuum* L.): Chromosome location, phylogeny, structure, expression patterns, *Cis*-elements in the promoter, and interaction network[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(4): 1028.
- [11] MA J, WANG F, LI M Y, JIANG Q, TAN G F, XIONG A S. Genome wide analysis of the NAC transcription factor family in Chinese cabbage to elucidate responses to temperature stress[J]. Scientia Horticulturae, 2014, 165: 82-90.
- [12] SU H Y, ZHANG S Z, YUAN X W, CHEN C T, 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: 11-21.
- [13] AHMAD M, YAN X H, LI J Z, YANG Q S, JAMIL W, TENG Y W, BAI S L. Genome wide identification and predicted functional analyses of NAC transcription factors in Asian pears[J]. BMC Plant Biology, 2018, 18(1): 214.
- [14] HU X L, XIE F F, LIANG W W, LIANG Y H, ZHANG Z K, ZHAO J T, HU G B, QIN Y H. *HuNAC20* and *HuNAC25*, two novel NAC genes from pitaya, confer cold tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(4): 2189.
- [15] HE Q, LIU Y H, ZHANG M, BAI M Y, PRIYADARSHANI S V G N, CHAI M N, CHEN F Q, HUANG Y M, LIU L P, CAI H Y, QIN Y. Genome-wide identification and expression analysis of the NAC transcription factor family in pineapple[J]. Tropical Plant Biology, 2019, 12(4): 255-267.
- [16] 张忠鑫, 郭夕雯, 汪泽文, 王鹏飞, 张建成, 杜俊杰, 穆霄鹏. 欧李 NAC 基因家族的鉴定及表达分析 [J]. 果树学报, 2023, 40(2): 206-222.
- ZHANG Zhongxin, GUO Xiwen, WANG Zewen, WANG Pengfei, ZHANG Jiancheng, DU Junjie, MU Xiaopeng. Identification and expression analysis of NAC gene family in *Cerasus humilis*[J]. Journal of Fruit Science, 2023, 40(2): 206-222.
- [17] NURUZZAMAN M, SHARONI A M, KIKUCHI S. Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants[J]. Frontiers in Microbiology, 2013, 4: 248.
- [18] HOU X M, ZHANG H F, LIU S Y, WANG X K, ZHANG Y M, MENG Y C, LUO D, CHEN R G. The NAC transcription factor CaNAC064 is a regulator of cold stress tolerance in peppers[J]. Plant Science, 2020, 291: 110346.
- [19] XU Y, LI P F, MA F N, HUANG D M, XING W T, WU B, SUN P G, XU B Q, SONG S. Characterization

- of the NAC transcription factor in passion fruit (*Passiflora edulis*) and functional identification of *PeNAC-19* in cold stress[J]. *Plants*, 2023, 12(6): 1393.
- [20] HE X J, MU R L, CAO W H, ZHANG Z G, ZHANG J S, CHEN S Y. AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development[J]. *Plant Journal*, 2005, 44(6): 903-916.
- [21] SABLONSKI R W, MEYEROWITZ E M. A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes *APETALA3*/*PISTILLATA*[J]. *Cell*, 1998, 92(1): 93-103.
- [22] BERGER Y, HARPAZ-SAAD S, BRAND A, MELNIK H, SIRDING N, ALVAREZ J P, ZINDER M, SAMACH A, ESHED Y, ORI N. The NAC-domain transcription factor GOBLET specifies leaflet boundaries in compound tomato leaves[J]. *Development*, 2009, 136(5): 823-832.
- [23] KATO H, MOTOMURA T, KOMEDA Y, SAITO T, KATO A. Overexpression of the NAC transcription factor family gene *ANAC036* results in a dwarf phenotype in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167(7): 571-577.
- [24] KO J H, YANG S H, PARK A H, LEROUXEL O, HAN K H. ANAC012, a member of the plant-specific NAC transcription factor family, negatively regulates xylary fiber development in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Journal*, 2007, 50(6): 1035-1048.
- [25] NAKANO Y, YAMAGUCHI M, ENDO H, REJAB N A, OHTANI M. NAC-MYB-based transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in land plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 288.
- [26] 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.
- [27] XIE Q, FRUGIS G, COLGAN D, CHUAN H. *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development[J]. *Genes & Development*, 2000, 14(23): 3024-3036.
- [28] PODZIMSKA-SROKA D, O'SHEA C, GREGERSEN P L, SKRIVER K. NAC transcription factors in senescence: from molecular structure to function in crops[J]. *Plants*, 2015, 4(3): 412-448.
- [29] FORLANI S, MIZZOTTI C, MASIERO S. The NAC side of the fruit: Tuning of fruit development and maturation[J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 238.
- [30] CAO X M, WEI C Y, DUAN W Y, GAO Y, KUANG J F, LIU M C, CHEN K S, KLEE H, ZHANG B. Transcriptional and epigenetic analysis reveals that NAC transcription factors regulate fruit flavor ester biosynthesis[J]. *Plant Journal*, 2021, 106(3): 785-800.
- [31] FU B L, WANG W Q, LI X, QI T H, SHEN Q F, LI K F, LIU X F, LI S J, ALLAN A C, YIN X R. A dramatic decline in fruit citrate induced by mutagenesis of a NAC transcription factor, AcNAC1[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(8): 1695-1706.
- [32] 卓茂根, 王惠聪. NAC 转录因子在果实成熟中的调控作用[J]. *果树学报*, 2023, 40(7): 1455-1470.
- ZHUO Maogen, WANG Huicong. The roles of NAC transcription factors in regulating fruit ripening[J]. *Journal of Fruit Science*, 2023, 40(7): 1455-1470.
- [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] GE H, ZHANG J, ZHANG Y J, LI X, YIN X R, GRIERSON D, CHEN K S. EjNAC3 transcriptionally regulates chilling-induced lignification of loquat fruit *via* physical interaction with an atypical CAD-like

- gene[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(18): 5129-5136.
- [35] 郭光艳, 柏峰, 刘伟, 秘彩莉. 转录因子对木质素生物合成调控的研究进展[J]. *中国农业科学*, 2015, 48(7): 1277-1287.
- GUO Guangyan, BAI Feng, LIU Wei, BI Caili. Advances in research of the regulation of transcription factors of lignin biosynthesis[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(7): 1277-1287.
- [36] 张雨, 赵明洁, 张蔚. 植物次生细胞壁生物合成的转录调控网络[J]. *植物学报*, 2020, 55(3): 351-368.
- ZHANG Yu, ZHAO Mingjie, ZHANG Wei. Transcriptional regulatory network of secondary cell wall biosynthesis in plants[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2020, 55(3): 351-368.
- [37] 陈倩, 游双梅, 邢乐华, 徐凡, 罗明, 郭启高. 果树 NAC 转录因子的研究进展[J]. *分子植物育种*, 2021, 19(19): 6396-6405.
- CHEN Qian, YOU Shuangmei, XING Lehua, XU Fan, LUO Ming, GUO Qigao. Research progress of NAC transcription factors in fruit trees[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19(19): 6396-6405.
- [38] 薛维文, 周显芳, 张昭其, 方方. 果蔬采后木质素积累及其调控对品质的影响研究进展[J]. *园艺学报*, 2022, 49(9): 2023-2036.
- XUE Weiwen, ZHOU Xianfang, ZHANG Zhaoqi, FANG Fang. Advances in lignin accumulation and its regulation on the quality of postharvest fruit and vegetables[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2022, 49(9): 2023-2036.
- [39] SHI Y N, LI B J, SU G Q, ZHANG M X, GRIERSON D, CHEN K S. Transcriptional regulation of fleshy fruit texture[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 64(9): 1649-1672.
- [40] 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.
- [41] MITSUDA N, SEKI M, SHINOZAKI K, OHME-TAKAGI M. The NAC transcription factors NST1 and NST2 of *Arabidopsis* regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence[J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(11): 2993-3006.
- [42] ZHONG R Q, 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.
- [43] HERNANDEZ-GARCIA C M, FINER J J. Identification and validation of promoters and *Cis*-acting regulatory elements[J]. *Plant Science*, 2014, 217: 109-119.
- [44] LI X T, WANG N Y, SHE W Q, GUO Z X, PAN H L, YU Y, YE J W, PAN D M, PAN T F. Identification and functional analysis of the *CgNAC043* gene involved in lignin synthesis from *Citrusgrandis* San Hong[J]. *Plants*, 2022, 11(3): 403.
- [45] ZHANG Q, WANG L H, WANG Z T, ZHANG R T, LIU P, LIU M J, LIU Z G, ZHAO Z H, WANG L L, CHEN X, XU H F. The regulation of cell wall lignification and lignin biosynthesis during pigmentation of winter jujube[J]. *Horticulture Research*, 2021, 8(1): 238.
- [46] XIA X C, LI H X, CAO D, LUO X, YANG X W, CHEN L N, LIU B B, WANG Q, JING D, CAO S Y. Characterization of a NAC transcription factor involved in the regulation of pomegranate seed hardness (*Punica granatum* L.)[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 139: 379-388.