

# 13 个苹果 NAC 转录因子基因的克隆与表达分析

李慧峰<sup>1</sup>, 董庆龙<sup>2</sup>, 赵强<sup>3</sup>, 冉昆<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 山东省果树研究所, 泰安 271000; <sup>2</sup> 中国农业科学院果树研究所, 辽宁兴城 125100; <sup>3</sup> 山东农业大学园艺科学与工程学院, 泰安 271018)

**摘要:** 利用同源比对和 RT-PCR 技术, 从紫弘富士苹果 (*Malus domestica* (Suckow) Borkh. 'Zihong Fuji') 中克隆了 13 个 NAC 转录因子基因: *MdNAC40~45*, *MdNAC47~53* (GenBank 登录号为 MG099877~MG099882, MG099884~MG099890)。序列分析表明, 其开放阅读框 (ORF, open reading frame) 分别为 1470 bp、1065 bp、912 bp、885 bp、948 bp、1041 bp、1182 bp、639 bp、705 bp、1830 bp、1980 bp、747 bp 和 1137 bp。进化分析表明, *MdNAC41* 属于 AtNAC3 组, *MdNAC40*、*MdNAC42~43* 和 *MdNAC45~53* 属于 NAM 组, *MdNAC44* 属于 VND 组。亚细胞定位预测结果显示, *MdNAC40~45*、*MdNAC47~50* 和 *MdNAC52~53* 可能定位于细胞核中; *MdNAC51* 可能定位在细胞质或细胞核中。Array 结果显示, 13 个 *MdNAC* 基因在 16 个被检测组织中均有不同程度的相对表达水平。RNA-seq 结果显示, *MdNAC43*、*MdNAC45*、*MdNAC47*、*MdNAC49* 和 *MdNAC51* 的表达明显受斑点落叶病菌 (AAAP, *Alternaria alternata* apple pathotype) 侵染的诱导。实时荧光定量 PCR 分析表明, 在 150 mmol/L NaCl 处理下, 嘎啦组培苗中 *MdNAC45*、*MdNAC47* 和 *MdNAC52* 的转录水平受到诱导, 而 *MdNAC40*、*MdNAC48* 和 *MdNAC51* 的转录水平下调; 在 300 mmol/L 甘露醇处理下, *MdNAC50* 转录水平受到诱导, *MdNAC41* 转录水平下调。这表明 *MdNAC* 基因多呈组成型表达, 并受斑点落叶病菌 (AAAP)、NaCl 和甘露醇诱导或下调, 可能参与调控苹果生长发育和逆境胁迫等过程。

**关键词:** 苹果; NAC 转录因子; 基因克隆; 序列分析; 表达分析

## Cloning, Sequence and Expression Analysis of Thirteen NAC Transcription Factors (*MdNACs*) in Apple

LI Hui-feng<sup>1</sup>, DONG Qing-long<sup>2</sup>, ZHAO Qiang<sup>3</sup>, RAN Kun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Shandong Institute of Pomology, Taian 271000; <sup>2</sup> Research Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences Liaoning Xingcheng 125100; <sup>3</sup> College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian 271018)

**Abstract:** NAC transcription factors are one of plant-specific transcription factors that participate in the regulation of plant growth and development as well as the responses to environmental stress. In relative to the in-depth study of NAC transcription factors in model plants *Arabidopsis* and rice, there are few related studies on NAC transcription factors in apple. In this study, to explore the role of NAC transcription factors in growth and development, as well as biotic and abiotic stress response of apple (*Malus domestica* (Suckow) Borkh.), full-length coding sequences of 13 *MdNAC* genes were isolated by search for sequence homolog and RT-PCR. The obtained cDNA sequences were used as queries in BLAST P searches against NCBI. The open reading frame (ORF) and amino acid sequence were analyzed by DNAMAN 6.0, and phylogenetic tree was constructed by MEGA 6 software. The conserved domains were predicted by Pfam 26.0 and Conserved Domains in NCBI. CELLO v.2.5, PSORT and SoftBerry ProtComp 9.0 were used for predicting subcellular location. As a result, thirteen *MdNAC* cDNAs from 'Zihong Fuji' were obtained (designated *MdNAC40-45*,

收稿日期: 2018-12-04 修回日期: 2019-01-09 网络出版日期: 2019-02-21

URL: <http://www.doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20181205001>

第一作者研究方向为苹果种质资源挖掘与利用, E-mail: fenglh79@163.com

通信作者: 冉昆, 研究方向为果树逆境生理与分子生物学, E-mail: rkr1001@126.com; 李慧峰为共同通信作者

基金项目: 国家自然科学基金 (31501742); 山东省农业良种工程 (2016LZGC034); 山东省农科院农业科技创新工程 (CXGC2016A03)

**Foundation project:** National Natural Science Foundation of China (31501742), Shandong Agricultural Good Cultivar Project (2016LZGC034), Agricultural Science and Technology Innovation Project of SAAS (CXGC2016A03)

*MdNAC47-53*, with GenBank accession No.MG099877-MG099882, MG099884-MG099890), with sizes of open reading frame (ORF) of 639-1830 bp. By phylogenetic analyses, *MdNAC41* was assigned to *AtNAC3* group, *MdNAC40*, *MdNAC42-43* and *MdNAC45-53* were NAM group, and *MdNAC44* was belonged to VND group. The subcellular localization prediction suggested that *MdNAC40-45*, *MdNAC47-50* and *MdNAC52-53* were in the nucleus, while *MdNAC51* was located in the cytoplasm or nucleus. The results from array analysis indicated that thirteen *MdNAC* genes were expressed in all examined tissues with various transcript abundance. RNA-seq data showed that the expression levels of *MdNAC43*, *MdNAC45*, *MdNAC47*, *MdNAC49* and *MdNAC51* were induced in response to AAP infection. qRT-PCR results showed that, under 150 mmol/L NaCl treatment, the transcription levels of *MdNAC45*, *MdNAC47* and *MdNAC52* were induced, whereas the transcription levels of *MdNAC40*, *MdNAC48* and *MdNAC51* were down-regulated in 'Gala' tissue culture seedlings under 300 mmol/L mannitol treatment, the transcription level of *MdNAC50* was induced, while the transcription level of *MdNAC41* was down-regulated. These results indicated that 13 *MdNAC* genes were expressed in all examined tissues, and these genes were inducible under AAP infection, NaCl or mannitol treatment with different degrees. Taken together, these results laid a theoretical foundation to further study the mechanism of NAC transcription factor in the regulation of apple growth, development and stress responses.

**Key words:** apple; NAC transcription factor; gene cloning; sequence analysis; expression analysis

NAC 转录因子是植物特异的一类转录因子, 不仅参与调控植物生长和发育, 而且在环境胁迫中起到重要的调控作用。其名称源于矮牵牛 (*Pharbitis nil* (L.) Choisy) 的 *NAM* 以及拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) *ATAF1/2* 和 *CUC2* 的首字母, 故称为 NAC 转录因子<sup>[1]</sup>。NAC 转录因子的 N 末端含有一段约 150 个氨基酸残基的 NAC 保守结构域, 又可细分为 A、B、C、D、E 5 个亚结构域, 其中不同植物的 A、C 和 D 亚结构域高度保守, 而 B 和 E 亚结构域则具有可变性; 其 C 端为转录调控区, 决定其具有转录激活或转录抑制活性<sup>[2-3]</sup>。

研究发现, NAC 转录因子参与植物的生长发育和形态建成, 包括侧根形成<sup>[4]</sup>、种子萌发<sup>[5]</sup>、分生组织和器官边界的形成<sup>[1,6]</sup>、次生壁增厚<sup>[7]</sup>、花器官发育<sup>[8]</sup>、植株衰老<sup>[9]</sup>以及果实成熟<sup>[10]</sup>等过程。此外, NAC 转录因子还广泛参与植物对逆境胁迫的应答, 包括干旱、高盐、逆温、水涝等非生物胁迫和病原菌侵染引起的生物胁迫。例如, 拟南芥 *ATAF1*、*ANAC019*、*ANAC055*<sup>[11-12]</sup>、*ANAC072*<sup>[13]</sup> 和水稻 *SNAC1*<sup>[14]</sup>、*OsNAC5*<sup>[15]</sup>、*SNAC2/OsNAC6*<sup>[16-17]</sup>、*OsNAC10*<sup>[18]</sup>、*ONAC022*<sup>[19]</sup> 等 NAC 转录因子不仅响应干旱和高盐等逆境胁迫, 并且相应的突变体或过表达植株的功能鉴定也证实上述基因在抗盐和干旱中具有重要的调控作用。水稻和拟南芥中多

个 NAC 转录因子正调控或负调控不同类型病原菌引起的抗病反应, 其中水稻 *OsNAC6* 正调控对稻瘟病的抗性<sup>[16]</sup>, 拟南芥 *ANAC019* 和 *ANAC055* 正调控对灰霉病的抗性<sup>[20]</sup>; 而水稻 *RIMI* 负调控对矮缩病的抗性<sup>[21]</sup>, 拟南芥 *ATAF1* 和 *ATAF2* 负调控对枯萎病的抗性<sup>[22]</sup>。此外, 过表达小麦 *TaNAC2*<sup>[23]</sup>、*TaNAC29*<sup>[24]</sup> 和 *TaNAC67*<sup>[25]</sup> 转基因拟南芥植株均能够增加对干旱和高盐的耐受性; 过表达 *AaNAC1* 的转基因青蒿和拟南芥植株能够增加抗旱能力和对灰霉病的抗性<sup>[26]</sup>; 过表达 *IbNAC1* 的转基因田薯植株能够增加抗机械损伤能力和斜纹夜蛾幼虫的容忍力<sup>[27]</sup>。过表达 *SINAC4* 和 *SIJUB1* 的转基因番茄均能增加抗旱能力<sup>[28-29]</sup>。

目前 NAC 转录因子的研究多集中在拟南芥、水稻、番茄等模式植物, 而在木本植物如苹果中的研究较少。最近研究表明, 苹果 NAC 转录因子 *MdNAC029* 能够促进王林愈伤花青苷积累和通过 CBF 途径负调控冷胁迫抗性; *MdNAC047* 和 *MdNAC143* 能够增加王林愈伤抗盐胁迫能力<sup>[30-33]</sup>; 在转基因苹果植株中, 过表达 *MdNAC1* 产生矮化表型<sup>[34]</sup>。前人研究结果已鉴定得到 180 个 *MdNAC* 基因<sup>[35]</sup>, 本研究通过序列比对去除 GenBank 数据库中存在的 23 个苹果 *NAC* 基因, 克隆得到 13 个 *MdNAC* 基因, 详细分析了 *MdNACs* 基因的进化聚类、亚细胞定位等信息, 并研究其在不

同组织器官以及不同非生物和生物胁迫条件下的表达模式,为进一步研究 NAC 转录因子在苹果生长发育和抗逆过程中的功能奠定相关理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

嘎啦组培苗 (*Malus domestica* (Suckow) Borkh. 'Gala') 用于逆境表达分析。嘎啦组培苗于继代培养基上 (MS 培养基 + 0.2 mg/L IAA + 0.8 mg/L 6-BA + 30 g/L 蔗糖 + 7 g/L 琼脂粉) 生长,每隔 30 d 继代一次,其生长条件为 14 h 光照 / 10 h 黑暗,温度控制在  $(24 \pm 2)$  °C。在继代培养基中分别加入 150 mmol/L NaCl 和 300 mmol/L 甘露醇。选取生长状态一致 (继代 20 d 左右) 的嘎啦组培苗分别接入上述培养基中进行处理,以正常继代培养基生长的嘎啦组培苗 (继代 20 d 左右) 作为对照<sup>[36]</sup>。

### 1.2 基因克隆与序列分析

采用改进 CTAB 法提取紫弘富士完全展开叶片的 RNA<sup>[37]</sup>,用反转录试剂盒 PrimeScript™1<sup>ST</sup> Strand cDNA Synthesis Kit 合成 cDNA。根据已鉴定的 MdNAC 基因序列,设计特异性引物 (表 1) 进行 PCR 扩增,PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 1 min 20 s, 56~60 °C 1 min 20 s, 72 °C 3 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。回收 PCR 产物并连接到 *pMD19-T* 载体上,构建重组质粒转化 *E.coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,筛选阳性克隆,送至北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

根据所得 cDNA 片段,利用 NCBI 的 BLAST P 程序进行序列比对分析 ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&BLAST\\_SPEC=&LINK\\_LOC=blasttab&LAST\\_PAGE=blastp](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastp)); DNAMAN 6.0.3.99 分析基因的 ORF 和氨基酸序列<sup>[38]</sup>; 利用 Pfam 31.0 (<http://pfam.xfam.org/>) 和 NCBI 中 Conserved Domains Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 程序预测蛋白保守域结构; MEGA 6.0 软件构建系统进化树<sup>[39]</sup>; 利用在线软件 CELLO v.2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>), PSORT Prediction (<http://psort.hgc.jp/form.ht>) 和 SoftBerry ProtComp 9.0 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) 进行亚细胞定位预测<sup>[36]</sup>。

### 1.3 苹果 MdNAC 的表达分析

苹果 MdNAC 组织表达数据来自 NCBI 的 GEO 数据库,数据登录号为 GSE42873 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE42873>), 包含 16 个不同苹果组织 (2 个重复) 的 array, array 使用探针为苹果基因组 V1.0 数据库 MDP 识别号。MdNACs 响应斑点落叶病菌 (AAAP, *Alternaria alternata* apple pathotype) 的 RNA-seq 数据参考 Zhu 等<sup>[40]</sup>的报道,具体方法为: 使用嫁接在 'Malus robusta Carr' 砧木上的盆栽 2 年生 'Starking Delicious' 苹果,在长势相同的一年生枝条上取第 4 或第 5 片幼叶接种 AAAP 病原菌。AAAP 病原菌在 PDA 培养基上培养 1 周,用打孔器 (5 mm) 取下菌斑,用无菌针头轻轻刺伤苹果幼叶下表皮,将菌斑正面定点接种到主叶脉两侧,每侧接种 3 个菌斑,以不含 AAAP 的 PDA 培养基作为对照。设置 1 组对照和 4 组处理,共 5 组。4 组处理以 36 h、18 h 和 6 h 时间间隔接种 AAAP 菌斑,将接种叶片置于培养箱中 14 h 光照 / 10 h 黑暗,25 °C 保湿培养。当第 1 组接种的叶片达到接种后 72 h (HPI, hour post inoculation) 时间点时,同时对其他 3 组进行取样。这 4 组代表 4 个感染阶段: 72 HPI、36 HPI、18 HPI 和 12 HPI。

依据 MdNAC 基因的 3' -UTR 或 5' -UTR 设计荧光定量引物 (表 1), 选取 *Md18 S* 为内参基因,采用三步法进行荧光定量 PCR。使用仪器为 BIO-RAD IQ5, 所有 PCR 反应均设 3 次重复。PCR 反应体系为: SYBR Green Master I 10  $\mu$ L, 上、下游引物 (5  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, 模板 1  $\mu$ L, 加去离子水至 20  $\mu$ L。PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 10 s, 58 °C 30 s, 72 °C 15 s, 40 个循环; 最后退火至 55 °C, 每隔 7 s 上升 0.5 °C 至 95 °C, 共 81 个循环。结果用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法对数据进行定量分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 苹果 MdNAC 基因克隆

以紫弘富士叶片总 RNA 的反转录产物为模板进行 PCR 扩增,测序结果显示,共克隆得到 13 个 MdNAC 基因。基因命名、ORF、蛋白大小、分子量、等电点、染色体定位和 GenBank 登录号详见表 2。对 13 个 MdNAC 蛋白氨基酸序列进行同源性比对,结果显示均含有 NAC 结构域, NAC 结构域又可进一步分为 A、B、C、D、E 5 个亚结构域 (图 1)。

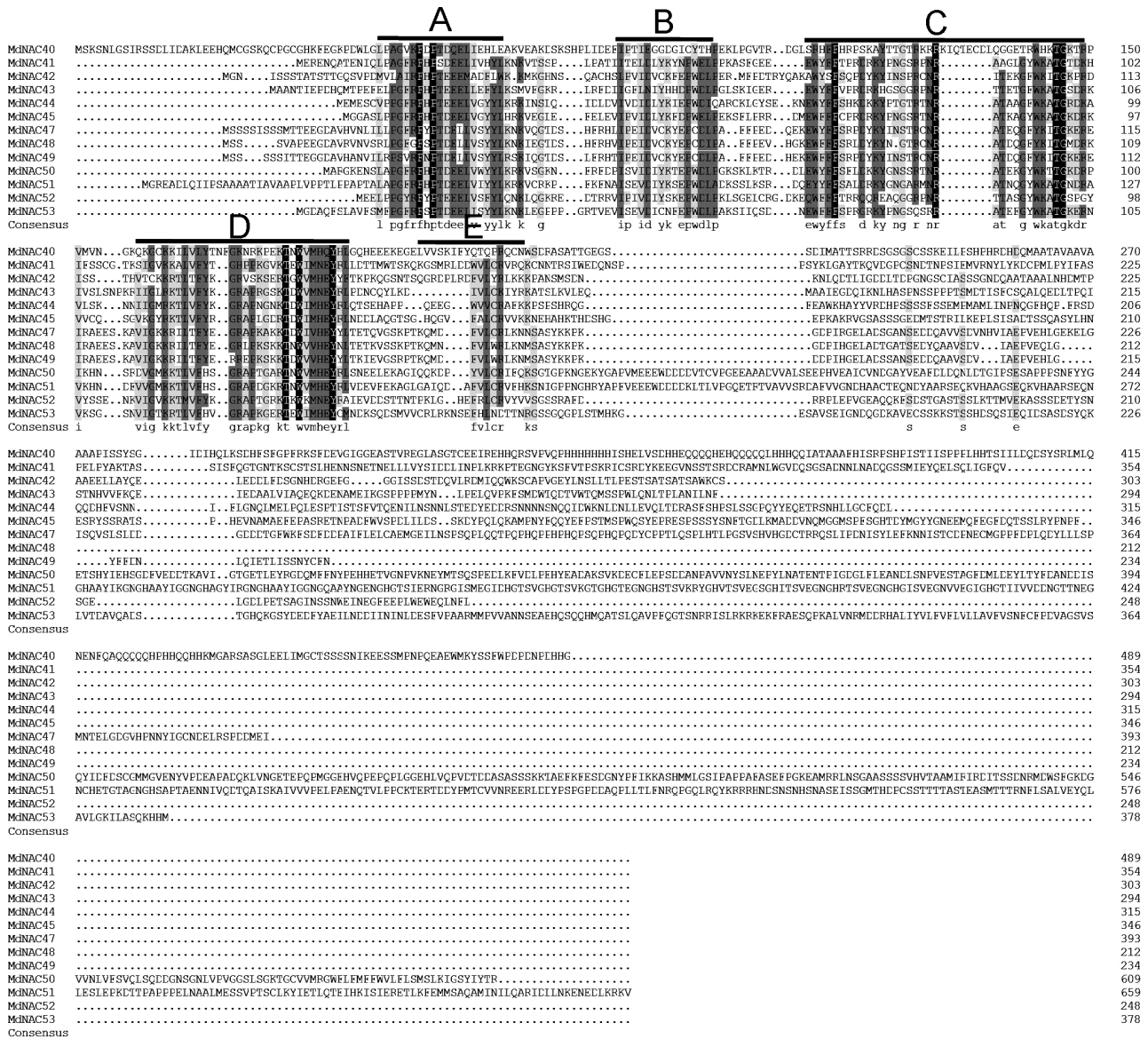
表 1 引物用途及序列

Table 1 The primers and sequences used in this study

用途 Use	引物名称 Primer name	上游引物序列 (5' -3') Forward primer sequence (5' -3')	下游引物序列 (5' -3') Reverse primer sequence (5' -3')	
ORF 扩增 Complete ORF amplification	MdNAC40	ATGAGTAAGAGTAATTTGGGGTCC	CTACCCATGATGATCTGGGTTGTC	
	MdNAC41	ATGGAGAGGGAAAACCAAGCCACC	TCACACCTGAAAGCCAATTAATTG	
	MdNAC42	ATGGGAAACATCAGCAGCAGCACC	TCAGGAGCATTTCGAAGCTGAGGT	
	MdNAC43	ATGGCAGCCAACACTATAGAACCT	TTAGAAGTTGAGAATGTTCCGCAA	
	MdNAC44	ATGGAGATGGAATCTTGTGTCCA	TCACAAGTCTTGGGAAGCATCCAAG	
	MdNAC45	ATGGGAGGAGCATCACTGCCACCA	TCAGAAGGGGTTTGATATCTCAG	
	MdNAC47	ATGAGCAGTAGCAGCATCAGCAGC	TTAAATCTCCATATCATCTGGAGA	
	MdNAC48	ATGAGCAGCAGCGTCGCACCTGAA	TTATCCCAGCTGTCCACTGGCTC	
	MdNAC49	ATGAGCAGCAGCAGCAGCATCACA	TTAATTAAGCAATAGTTACTAGA	
	MdNAC50	ATGGCTCGCGGCAAAGAGAATTCA	TCACCTGGTATAGATATAGCTCCC	
	MdNAC51	ATGGGTGCGGAAGCTGACCTTCAG	TCAGACCTTCCTCTTCAAATCCTC	
	MdNAC52	ATGGAGGAGCTACCACCAGGTTAT	TTAGAGGAAATTTAGTTGTTCCCA	
	MdNAC53	ATGGGTGACGCTCAGTTTCTCTA	TTACATGTGATGTTTTGACTTGC	
	荧光定量 PCR Fluorescent quantitative PCR	MdNAC40	GAGTAAGAGTAATTTGGGGTCCA	CGGCTTTCCTTCGAACTTGT
		MdNAC41	ACTGTGAGCGATGAACTTG	CGCACTTCTCATCACTGCTT
MdNAC42		TCCGAAATGATCAAGCAGC	GAATCAGATGAGATGCCGCC	
MdNAC43		TCCTCCTCCTCCCATGTACA	AGAAGTTGAGAATGTTCCGCA	
MdNAC44		CTATGAGGACGACAGGAGCA	GTCCCGACGATAAACTTGGGA	
MdNAC45		CGCATGTCACCATTCTCTG	AGCGACAAAATGATCTTTCGGT	
MdNAC47		GCGGCAATCTTTAATTCCAGAT	ATGCACACCATCTCCAGTT	
MdNAC48		ACCCACCAAGCAGATGAACT	GCTCTGCAATCACGTCACTT	
MdNAC49		CTGGCGCTGAAGAACATG	TGCTTACTGGCTCTGCAAT	
MdNAC50		AGACGGGATGTGTGGTGATG	GAAGTCACTACAAGATCCTGA	
MdNAC51		TCAACATCTTCAAGCCCGA	GGGCCGATAACTCATAACAACG	
MdNAC52		CAAATTCAGGAGACTTGGTGA	GTGGGCTGCTTCTTAGAGGA	
MdNAC53		TGCAGAGTCACGCAAAAAG	CCAGCAACGTCAGGAAAACA	

表 2 苹果 *MdNAC* 基因信息Table 2 The *MdNAC* genes in apple

基因名称 Gene name	V1.0 数据库 ID ID in the V1.0 database	GDDH 数据库 ID ID in the GDDH database	GenBank 登录号 GenBank accession number	染色体定位 Chromosome location in the GDDH database	开放 阅读框 ORF	氨基酸 Amino acid	分子量 MW	等电点 pI
<i>MdNAC40</i>	MDP0000618650	MD02 G1068700	MG099877	Chr02: 5573852-5579173	1470	489	54.952	6.936
<i>MdNAC41</i>	MDP0000802924	MD04 G1100400	MG099878	Chr04: 18583832-18585692	1065	354	40.198	7.575
<i>MdNAC42</i>	MDP0000835180	MD07 G1163100	MG099879	Chr07: 23818801-23822751	912	303	33.839	6.447
<i>MdNAC43</i>	MDP0000868556	MD10 G1133400	MG099880	Chr10: 21527167-21528831	885	294	33.833	6.702
<i>MdNAC44</i>	MDP0000849944	MD05 G1042100	MG099881	Chr05: 7064603-7067981	948	315	36.59	6.27
<i>MdNAC45</i>	MDP0000119446	MD06 G1031700	MG099882	Chr06: 3830614-3833754	1041	346	39.563	6.278
<i>MdNAC47</i>	MDP0000882983	MD01 G1092200	MG099884	Chr01: 20690900-20692017	1182	393	44.461	4.756
<i>MdNAC48</i>	MDP0000138340	MD01 G1093500	MG099885	Chr01: 20844530-20846106	639	212	24.129	8.204
<i>MdNAC49</i>	MDP0000200646	MD01 G1093700	MG099886	Chr01: 20852376-20853844	705	234	27.109	5.904
<i>MdNAC50</i>	MDP0000180605	MD07 G1073200	MG099887	Chr07: 6967226-6972169	1830	609	67.994	4.548
<i>MdNAC51</i>	MDP0000437676	MD02 G1243900	MG099888	Chr02: 29381808-29387922	1980	659	71.6	6.253
<i>MdNAC52</i>	MDP0000205938	MD11 G1167900	MG099889	Chr11: 17878685-17880107	747	248	28.38	6.184
<i>MdNAC53</i>	MDP0000133636	MD03 G1150800	MG099890	Chr03: 16932074-16936457	1137	378	42.359	6.724



A、B、C、D 和 E 亚结构域的位置标示在序列的顶部  
 The locations of A, B, C, D and E subdomains are indicated on the top of the sequences  
 图 1 苹果 MdNAC 氨基酸序列同源性比对  
**Fig.1 Homology alignment of the deduced amino acid sequence of MdNACs**

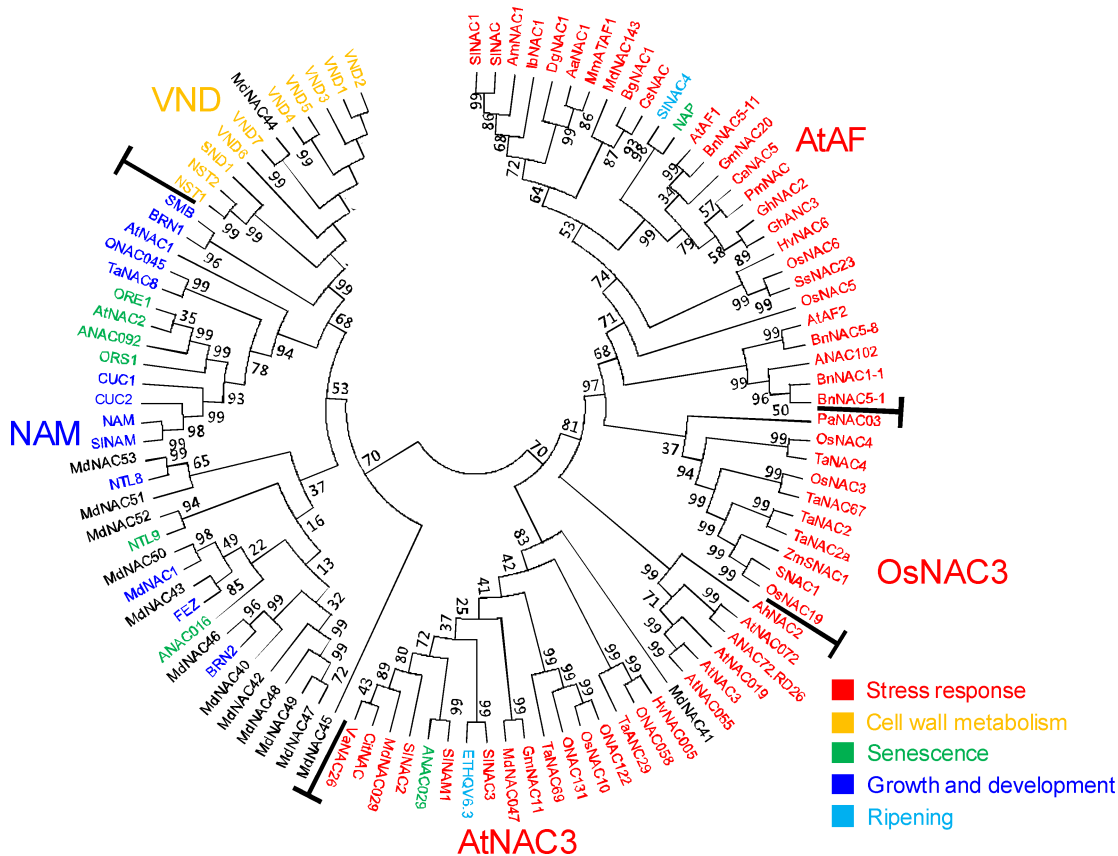
**2.2 MdNAC 进化分析**

利用 MEGA 6.0 软件对苹果 NAC 蛋白和其他植物的 NAC 蛋白进行进化分析。结果显示: 101 个 NAC 蛋白被分为 5 组: ATAF、OsNAC3、AtNAC3、NAM 和 VND。其中, ATAF、OsNAC3 和 AtNAC3 组成员多参与胁迫响应, NAM 组成员多参与生长发育和衰老, VND 组成员多参与细胞壁代谢<sup>[41-42]</sup>。MdNAC41 属于 AtNAC3 组, MdNAC40、MdNAC42-43 和 MdNAC45-53 属于 NAM 组, MdNAC44 属于 VND 组(图 2)。

**2.3 MdNAC 亚细胞定位预测**

通过在线预测软件 SoftBerry ProtComp 9.0 对

MdNAC 蛋白进行亚细胞定位预测。结果显示, MdNAC40~45、MdNAC47~50 和 MdNAC52~53 定位在细胞核的相应预测数值均为最高(共 10 分, 数值越高表示可信度越大); MdNAC51 定位在细胞核和细胞质的预测数值相对较高(表 3)。进一步利用在线预测软件 CELLO 和 PORST 对 MdNAC 蛋白进行亚细胞定位, 预测结果显示 MdNAC 定位部位与上述结果一致。由此判断, MdNAC40~45、MdNAC47~50 和 MdNAC52~53 可能定位于细胞核中, MdNAC51 可能定位在细胞质或细胞核中。



颜色表明蛋白功能,其中,红色:胁迫响应;橘黄:细胞壁代谢;绿色:衰老;蓝色:植物生长和发育;浅蓝:果实成熟

Colors indicate protein function, red: stress response, orange: cell wall metabolism, green: senescence,

blue: plant growth and development, light blue: fruit ripening

图2 苹果和其他已知功能植物 NAC 蛋白的进化分析

Fig.2 Phylogenetic relationships from NAC proteins of apple and known function of other plant species

表3 MdNAC 亚细胞定位预测

Table 3 Outcome of *in silico* predicted subcellular localization of MdNACs

定位 Location	细胞核 Nuclear	质膜 Plasma membrane	胞外 Extracellular	细胞质 Cytoplasmic	线粒体 Mitochondrial	细胞质内层 Endoplasm retic	过氧化 物酶体 Peroxisomal	高尔 基体 Golgi	叶绿体 Chloroplast	液泡 Vacuolar
MdNAC40	9.16	0.09	0.02	0.32	0.31	0	0.11	0	0	0
MdNAC41	9.94	0	0	0	0	0	0	0	0.06	0
MdNAC42	4.58	0.9	1.3	0.78	1.8	0	0.15	0.05	0.4	0
MdNAC43	9.75	0	0	0	0	0	0	0	0.24	0.01
MdNAC44	9.98	0	0	0	0	0	0	0	0.02	0
MdNAC45	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MdNAC47	6.61	0.39	0.13	0.4	0.34	0.08	0.11	0	1.94	0
MdNAC48	9.99	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MdNAC49	9.98	0	0	0	0	0	0	0	0.02	0
MdNAC50	9.71	0	0.01	0.07	0	0.17	0	0.01	0	0.02
MdNAC51	3.17	1.73	0	3.85	0	0.14	0.46	0.1	0.48	0.07
MdNAC52	9.84	0	0	0	0	0	0	0	0.15	0.01
MdNAC53	8.72	0.19	0.22	0	0.68	0	0	0	0.19	0

## 2.4 MdNAC 基因的表达分析

利用 NCBI GEO 数据库下载苹果 16 个不同组织的 Array (GSE42873), 检测 *MdNAC* 在不同组织中的表达水平 (图 3)。结果显示, 13 个 *MdNAC* 基

因在 16 个被检测组织中均有不同程度的表达水平。其中, *MdNAC48~51* 在被检测的多个组织中有较高的表达水平, 其他 *MdNAC* 基因在少数组织中有相对较高的表达水平 (图 3)。

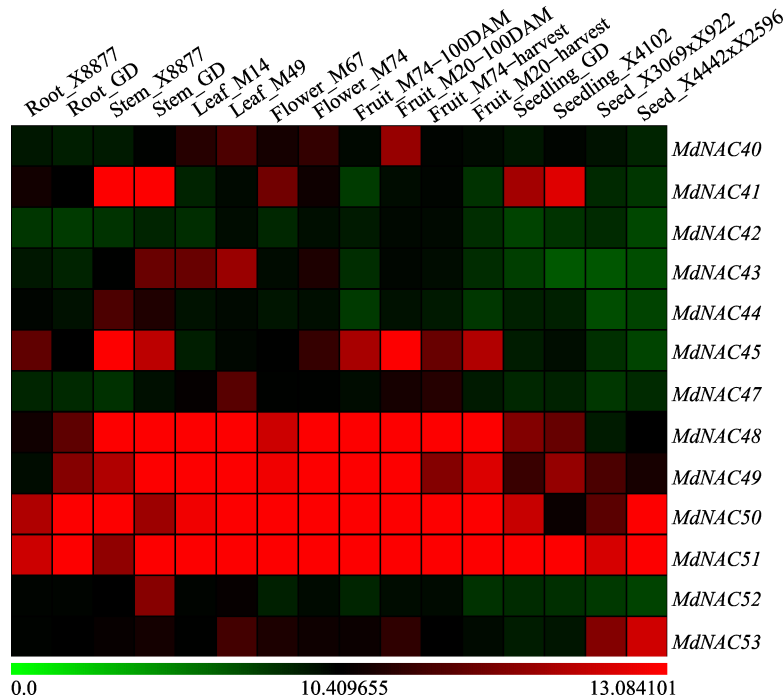


图 3 *MdNAC* 基因多个组织表达热图

Fig.3 Heatmap of *MdNAC* expression in various tissues

进一步检测了 *MdNAC* 基因在斑点落叶病菌 (AAAP) 侵染下的相对表达水平。结果显示, 与对照相比, 在 AAAP 侵染后, *MdNAC43*、*MdNAC45*、*MdNAC47*、*MdNAC49* 和 *MdNAC51* 的相对表达水平明显升高。其中, 在侵染 18 h 后, *MdNAC45* 的相对表达水平升高了 7.23 倍; 在侵染 36 h 后, *MdNAC49* 的相对表达水平升高了 5.43 倍; 而其他 *MdNAC* 基因与对照相比相对表达水平变化不明显 (图 4)。

利用 qRT-PCR 分析 NaCl 和甘露醇处理下嘎啦组培苗中 *MdNAC* 的表达情况。结果显示, 在 150 mmol/L NaCl 处理条件下, *MdNAC45*、*MdNAC47* 和 *MdNAC52* 的相对表达水平与对照相比明显升高, 其中 *MdNAC52* 相对表达水平最高, 在 48 h 达到对照的 31 倍 (图 5A、B); 而 *MdNAC40*、*MdNAC48* 和 *MdNAC51* 的相对表达水平与对照相比下降, 其中 *MdNAC40* 的相对表达水平下调幅度最大, 在 48 h 仅为对照的 0.12 倍 (图 5A、B); *MdNAC41* 的相对表达水平与对照相比则是先下降后又恢复到对照水平 (图 5A、B)。在 300 mmol/L 甘露醇处理

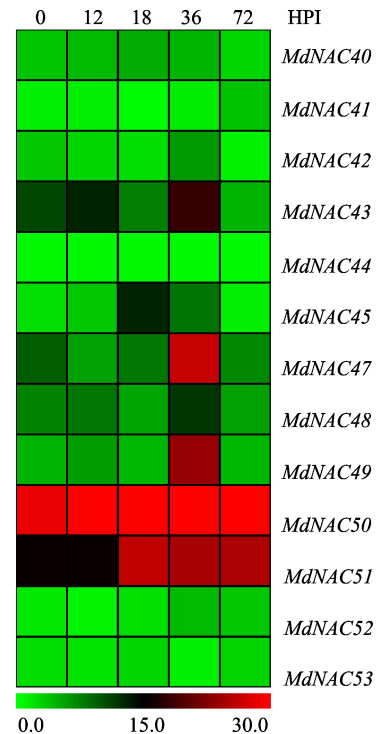


图 4 *MdNAC* 基因在斑点落叶病菌侵染下的表达热图

Fig.4 Heatmap of *MdNACs* expression in response to *Alternaria alternata* apple pathotype infection

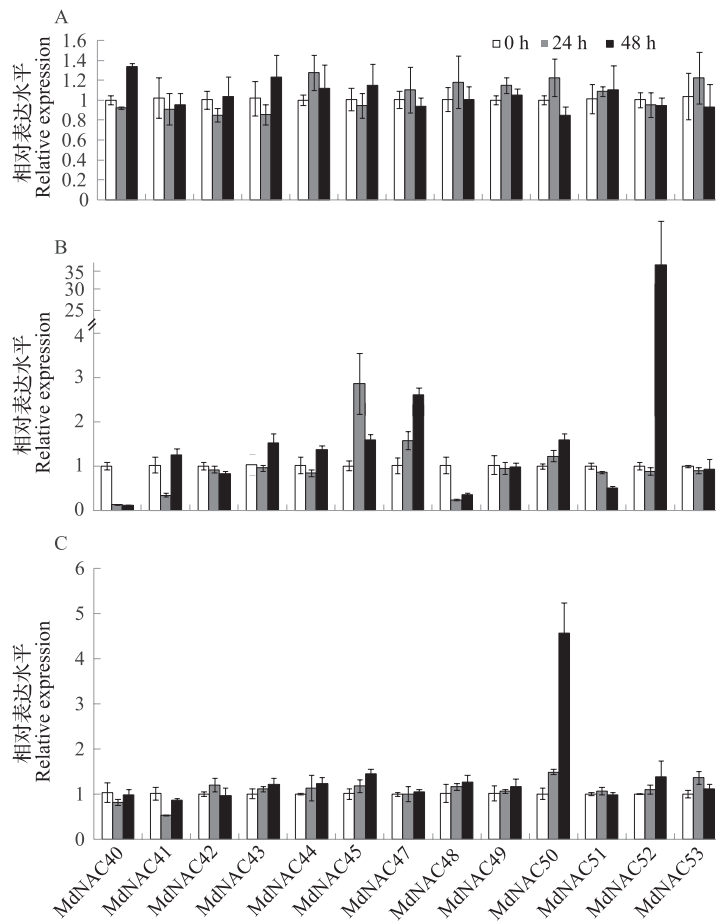


图5 *MdNAC* 基因在正常生长 (A)、NaCl (B) 和甘露醇 (C) 处理下的表达分析

Fig.5 Expression analysis of *MdNAC* genes under normal growth (A), NaCl (B) and mannitol (C) treatments

条件下, *MdNAC50* 的相对表达水平与对照相比明显上调, 在 48 h 时为对照的 4.5 倍 (图 5A、C); *MdNAC41* 的相对表达水平与对照相比先下降后又恢复到对照水平 (图 5A、C), 而其他 *MdNAC* 基因的相对表达水平没有明显变化 (图 5A、C)。

### 3 讨论

基于植物 NAC 结构域的高度保守和苹果基因组的公布<sup>[43-45]</sup>, Shu 等<sup>[35]</sup> 利用苹果 v1.0 基因组数据库对 NAC 转录因子家族进行了全基因组鉴定, 筛选出 180 个 *MdNAC* 基因。然而, 相比拟南芥等模式植物, 苹果 NAC 转录因子的研究不够深入。本研究克隆了 13 个 *MdNAC* 基因, 检测了其组织器官表达特征以及对非生物胁迫和生物胁迫的应答模式。蛋白序列比对结果表明, *MdNAC* 转录因子 N-末端的 NAC 结构域高度保守, 而 C-末端的转录调节结构域高度变异, 暗示这些 *MdNAC* 转录因子在调控苹果生长发育以及响应生物和非生物胁迫中

发挥着多重作用。

由于 NAC 转录因子是植物最大的转录因子家族之一, 成员众多, 这决定了其亚家族分类较为复杂。采用不同物种的 NAC 蛋白以及不同软件和算法进行聚类分析, NAC 转录因子进化聚类的结果往往存在明显差异<sup>[41, 46-47]</sup>。对 105 个拟南芥和 75 个水稻 NAC 转录因子进行聚类分析, 根据 NAC 结构域的序列特征可分成 2 组: I 组和 II 组。I 组可进一步分为 14 个亚组, II 组可分为 4 个亚组<sup>[41]</sup>。Rushton 等<sup>[46]</sup> 对拟南芥、水稻、烟草、白杨、茄科植物的 450 个 NAC 蛋白进行聚类分析, 将 NAC 蛋白分成 7 个亚家族, 其中 6 个亚家族为各科植物所共有, 而另一个亚家族为茄科植物所特有。Lv 等<sup>[47]</sup> 和 Hu 等<sup>[48]</sup> 分别将杨树和西瓜基因组鉴定得到的 NAC 蛋白与拟南芥和水稻的 NAC 蛋白进行聚类分析, 可以将 NAC 蛋白分为 18 组。此外, 研究发现聚在同一亚组的 NAC 转录因子的功能具有相似性<sup>[49]</sup>。例如, 对水稻 NAC 基因家族进行聚类分析,



发现已报道的与胁迫响应相关的 NAC 转录因子属于 III 类, 而与生长发育相关的 NAC 属于 I-2、I-3 和 I-4 亚类<sup>[49]</sup>。本研究将已报道的与植物生长发育以及胁迫应答相关的 NAC 转录因子与克隆得到的 13 个 MdNAC 蛋白进行进化分析, 结果发现, ATAF、AtNAC3 和 OsNAC3 三组 NAC 成员多参与逆境胁迫应答<sup>[17-19, 50]</sup>, 苹果 MdNAC41 属于 AtNAC3 组, 暗示其可能参与逆境胁迫应答。然而, 在 NaCl 和甘露醇处理条件下, 其转录水平均先降低后上升, 但变化不明显; 而对斑点落叶病菌 (AAAP) 侵染无响应 (图 4 和图 5), 这暗示苹果作为多年生落叶果树其 MdNAC41 可能并不是生物胁迫和非生物胁迫应答的核心调控因子, 其功能还需进一步试验验证。

NAC 转录因子可以通过参与多种激素代谢途径调控植物生长发育, 是植物发育过程的关键调节因子<sup>[4-8]</sup>。进化分析和基因的功能验证结果表明, NAM 和 VND 两组 NAC 成员多参与植物生长和发育<sup>[7, 9-10]</sup>。本研究克隆了多个 NAM 组和 VND 组的 MdNAC 成员, 尽管这两组 NAC 成员多参与植物的生长发育和形态建成, 但通过生物和非生物胁迫处理发现后, 多个 NAM 组的 MdNAC 成员的转录水平呈现多种表达特征, 例如, *MdNAC45* 和 *MdNAC47* 的转录水平受斑点落叶病菌 (AAAP) 和 NaCl 诱导, 甘露醇处理下变化不明显; *MdNAC51* 的转录水平受斑点落叶病菌 (AAAP) 诱导, NaCl 处理下转录水平下调, 对甘露醇处理无响应。不同成员表达模式的多样性意味着其生物学功能的多样性, 这些结果暗示, 苹果 NAM 组成员除了参与生长发育和形态建成等过程外, 部分成员还参与调控逆境胁迫应答等过程。

研究表明, NAC 转录因子是植物免疫系统基础防御和系统获得性抗性方面的核心组成部分, NAC 和其他转录因子之间存在的调节途径可能是植物应对病原体感染的重要机制<sup>[40]</sup>。苹果斑点落叶病是目前苹果主产区的主要病害之一。本研究所鉴定的 NAC 转录因子在 AAAP 侵染下存在明显的差异表达, 如 *MdNAC43*、*MdNAC45*、*MdNAC47*、*MdNAC49* 和 *MdNAC51* 的相对表达水平明显升高, 说明其在苹果对真菌病害的抗性中可能起调控作用。下一步将研究确定 NAC 下游 (如直接或间接调控的基因) 或上游 (如信号分子) 的遗传组分, 以提供它们参与不同信号转导通路的更多证据, 为阐明植物在生长发育和逆境胁迫下的调控机制提供新的线索和切入点。

#### 参考文献

- [1] 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. *Plant Cell*, 1997, 9 (6): 841-857
- [2] 孙利军, 李大勇, 张慧娟, 宋凤鸣. NAC 转录因子在植物抗病和抗非生物胁迫反应中的作用. *遗传*, 2012, 34 (8): 993-1002
- [3] Sun L J, Li D Y, Zhang H J, Song F M. Functions of NAC transcription factors in biotic and abiotic stress responses in plants. *Hereditas (Beijing)*, 2012, 34 (8): 993-1002
- [4] Puranik S, Sahu P P, Srivastava P S, Prasad M. NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 2012, 17 (6): 369-381
- [5] 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. *Plant Journal*, 2005, 44 (6): 903-916
- [6] Kim S G, Lee A K, Yoon H K, Park C M. A membrane-bound NAC transcription factor NTL8 regulates gibberellic acid-mediated salt signaling in *Arabidopsis* seed germination. *Plant Journal*, 2008, 55 (1): 77-88
- [7] Mao C, Ding W, Wu Y, Yu J, He X, Shou H, Wu P. Overexpression of a NAC-domain protein promotes shoot branching in rice. *New Phytologist*, 2007, 176 (2): 288-298
- [8] Mitsuda N, Iwase A, Yamamoto H, Yoshida M, Seki M, Shinozaki K, Ohme-Takagi M. NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2007, 19 (1): 270-280
- [9] Yoo S Y, Kim Y, Kim S Y, Lee J S, Ahn J H. Control of flowering time and cold response by a NAC-domain protein in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 2007, 2 (7): e642
- [10] Sperotto R A, Ricachenevsky F K, Duarte G L, Boff T, Lopes K L, Sperb E R, Grusak M A, Fett J P. Identification of up-regulated genes in flag leaves during rice grain filling and characterization of OsNAC5, a new ABA-dependent transcription factor. *Planta*, 2009, 230 (5): 985-1002
- [11] Rios P, Argyris J, Vegas J, Leida C, Kenigswald M, Tzuri G, Troade C, Bendahmane A, Katzir N, Picó B, Monforte A J, Garcia-Mas J. *JETHQV6.3* is involved in melon climacteric fruit ripening and is encoded by a NAC domain transcription factor. *Plant Journal*, 2017, 91 (4): 671-683
- [12] 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*. *Plant Molecular Biology*, 2007, 63 (2): 289-305
- [13] Wu Y, Deng Z, Lai J, Zhang Y, Yang C, Yin B, Zhao Q, Zhang L, Li Y, Yang C, Xie Q. Dual function of *Arabidopsis* ATAF1 in abiotic and biotic stress responses. *Cell Research*, 2009, 19 (11): 1279-1290
- [14] Tran L S, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson 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 1 promoter. *Plant Cell*, 2004, 16 (9): 2481-2498

- [ 14 ] Hu H, Dai M, Yao J, Xiao B, Li X, Zhang Q, Xiong L. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC ( NAC ) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103 ( 35 ): 12987-12992
- [ 15 ] Takasaki H, Maruyama K, Kidokoro S, Ito Y, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Nakashima K. The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. *Molecular Genetics and Genomics*, 2010, 284 ( 3 ): 173-183
- [ 16 ] Nakashima K, Tran L S P, van Nguyen D, Fujita M, Maruyama K, Todaka D, Ito Y, Hayashi N, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *Plant Journal*, 2007, 51 ( 4 ): 617-630
- [ 17 ] Hu H, You J, Fang Y, Zhu X, Qi Z, Xiong L. Characterization of transcription factor gene *SNAC2* conferring cold and salt tolerance in rice. *Plant Molecular Biology*, 2008, 67 ( 1-2 ): 169-181
- [ 18 ] Jeong J S, Kim Y S, Baek K H, Jung H, Ha S H, Do Choi Y, Kim M, Reuzeau C, Kim J K. Root-specific expression of *OsNAC10* improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions. *Plant Physiology*, 2010, 153 ( 1 ): 185-197
- [ 19 ] Hong Y, Zhang H, Huang L, Li D, Song F. Overexpression of a stress-responsive NAC transcription factor gene *ONAC022* improves drought and salt tolerance in rice. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 4
- [ 20 ] Bu Q Y, Jiang H L, Li C B, Zhai Q, Zhang J, Wu X, Sun J, Xie Q, Li C. Role of the *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factors ANAC019 and ANAC055 in regulating jasmonic acid-signaled defense responses. *Cell Research*, 2008, 18 ( 7 ): 756-767
- [ 21 ] Yoshii M, Yamazaki M, Rakwal R, Kishi-Kaboshi M, Miyao A, Hirochika H. The NAC transcription factor RIM1 of rice is a new regulator of jasmonate signaling. *Plant Journal*, 2010, 61 ( 5 ): 804-815
- [ 22 ] Delessert C, Kazan K, Wilson I W, Van Der Straeten D, Manners J, Dennis E S, Dolferus R. The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 2005, 43 ( 5 ): 745-757
- [ 23 ] 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*. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63 ( 8 ): 2933-2946
- [ 24 ] Huang Q, Yan W, Li B, Chang J, Chen M, Li K, Yang G, He G. TaNAC29, a NAC transcription factor from wheat, enhances salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 2015, 15: 268
- [ 25 ] Mao X, Chen S, Li A, Zhai C, Jing R. Novel NAC transcription factor TaNAC67 confers enhanced multi-abiotic stress tolerances in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 2014, 9 ( 1 ): e84359
- [ 26 ] Lv Z, Wang S, Zhang F, Chen L, Hao X, Pan Q, Fu X, Li L, Sun X, Tang K. Overexpression of a novel NAC domain-containing transcription factor (*AaNAC1*) enhances the content of artemisinin and increases tolerance to drought and *Botrytis cinerea* in *Artemisia annua*. *Plant Cell Physiology*, 2016, 57 ( 9 ): 1961-1971
- [ 27 ] Chen S P, Lin I W, Chen X, Huang Y H, Chang S C, Lo H S, Lu H H, Yeh K W. Sweet potato NAC transcription factor, IbNAC1, up-regulates sporamin gene expression by binding the SWRE motif against mechanical wounding and herbivore attack. *Plant Journal*, 2016, 86 ( 3 ): 234-248
- [ 28 ] Zhu M, Chen G, Zhang J, Zhang Y, Xie Q, Zhao Z, Pan Y, Hu Z. The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor *SINAC4* regulates salt and drought tolerance and stress-related genes in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Cell Reports*, 2014, 33 ( 11 ): 1851-1863
- [ 29 ] Thirumalaikumar V P, Devkar V, Mehterov N, Ali S, Ozgur R, Turkan I, Mueller-Roeber B, Balazadeh S. NAC transcription factor JUNGBRUNNEN1 enhances drought tolerance in tomato. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16 ( 2 ): 354-366
- [ 30 ] 张全艳, 于建强, 王佳慧, 胡大刚, 郝玉金. 苹果 *MdNAC143* 的克隆及其在苹果愈伤组织的抗盐功能鉴定. *园艺学报*, 2017, 44 ( 11 ): 2163-2170  
Zhang Q Y, Yu J Q, Wang J H, Hu D G, Hao Y J. Molecular cloning and functional characterization of *MdNAC143* reveals its involvement in salt tolerance in apple callus. *Acta Horticulturae Sinica*, 2017, 44 ( 11 ): 2163-2170
- [ 31 ] 安建平, 宋来庆, 赵玲玲, 由春香, 王小非, 郝玉金. 苹果愈伤组织超表达 *MdNAC029* 促进花青苷积累. *园艺学报*, 2018, 45 ( 5 ): 845-854  
An J P, Song L Q, Zhao L L, You C X, Wang X F, Hao Y J. Overexpression of *MdNAC029* promotes anthocyanin accumulation in apple calli. *Acta Horticulturae Sinica*, 2018, 45 ( 5 ): 845-854
- [ 32 ] An J P, Li R, Qu F J, You C X, Wang X F, Hao Y J. An apple NAC transcription factor negatively regulates cold tolerance via CBF-dependent pathway. *Journal of Plant Physiology*, 2017, 221: 74-80
- [ 33 ] An J P, Yao J F, Xu R R, You C X, Wang X F, Hao Y J. An apple NAC transcription factor enhances salt stress tolerance by modulating the ethylene response. *Physiologia Plantarum*, 2018, 164 ( 3 ): 279-289
- [ 34 ] Jia D, Gong X, Li M, Li C, Sun T, Ma F. Overexpression of a novel apple NAC transcription factor gene, *MdNAC1*, confers the dwarf phenotype in transgenic apple (*Malus domestica*). *Genes*, 2018, 9 ( 5 ): E229
- [ 35 ] Shu H, Zhang S, Yuan X, Chen C, Wang X F, Hao Y J. Genome-wide analysis and identification of stress-responsive genes of the NAM-ATAF1, 2-CUC2 transcription factor family in apple. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 71: 11-21
- [ 36 ] 李慧峰, 冉昆, 程来亮, 王海波, 何平, 常源升, 李林光. 苹果磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶基因 (*PEPCKs*) 的克隆与表达分析. *中国农业科学*, 2016, 49 ( 7 ): 1417-1428  
Li H F, Ran K, Cheng L L, Wang H B, He P, Chang Y S, Li L G. Cloning, sequence and expression analysis of phosphoenolpyruvate carboxykinase (*PEPCK*) genes in apple. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49 ( 7 ): 1417-1428
- [ 37 ] Ran K, Yang H Q, Sun X L, Su Q, Shen W, Zhang W W, Jiang Q Q, Jie Y L. A rapid and simple protocol for isolation of functional RNA from different tissues of multiple fruit trees.

- Acta Horticulturae, 2016, 1110: 163-170
- [ 38 ] 曹珂, 薛灵姿, 王蛟, 方伟超, 朱更瑞, 陈昌文, 王新卫, 王力荣. 桃 GRF 基因家族的序列及其组织特异性表达分析. 植物遗传资源学报, 2018, 19(3): 578-586  
Cao K, Xue L Z, Wang J, Fang W C, Zhu G R, Chen C W, Wang X W, Wang L R. The sequence character of GRF gene and its tissue-specific expression pattern in peach (*Prunus persica*). Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19(3): 578-586
- [ 39 ] 袁华招, 于红梅, 夏瑾, 庞夫花, 陈晓东, 赵密珍. 森林草莓 MYB 家族鉴定及生物信息学分析. 植物遗传资源学报, 2019, 20(3): 695-708  
Yuan H Z, Yu H M, Xia J, Pang F H, Chen X D, Zhao M Z. Genome-wide identification and bioinformatics analysis of MYB gene families in *Fragaria vesca* L. Journal of Plant Genetic Resources, 2019, 20(3): 695-708
- [ 40 ] Zhu L, Ni W, Liu S, Cai B, Xing H, Wang S. Transcriptomics analysis of apple leaves in response to *Alternaria alternata* apple pathotype infection. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 22
- [ 41 ] Ooka H, Satoh K, Doi K, Nagata T, Otomo Y, Murakami K, Matsubara K, Osato 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*. DNA Research, 2003, 10(6): 239-247
- [ 42 ] Zhu M K, Hu Z L, Zhou S, Wang L L, Dong T T, Pan Y, Chen G P. Molecular characterization of six tissue-specific or stress-inducible genes of NAC transcription factor family in tomato (*Solanum lycopersicum*). Journal of Plant Growth Regulation, 2014, 33(4): 730-744
- [ 43 ] Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar S K, Troggio M, Pruss D, Salvi S, Pindo M, Baldi P, Castelletti S, Cavaiuolo M, Coppola G, Costa F, Cova V, Dal Ri A, Goremykin V, Komjanc M, Longhi S, Magnago P, Malacarne G, Malnoy M, Micheletti D, Moretto M, Perazzolli M, Si-Ammour A, Vezzulli S, Zini E, Eldredge G, Fitzgerald L M, Gutin N, Lanchbury J, Macalma T, Mitchell J T, Reid J, Wardell B, Kodira C, Chen Z, Desany B, Niaz F, Palmer M, Koepke T, Jiwon D, Schaeffer S, Krishnan V, Wu C, Chu V T, King S T, Vick J, Tao Q, Mraz A, Stormo A, Stormo K, Bogden R, Ederle D, Stella A, Vecchiotti A, Kater M M, Masiero S, Lasserre P, Lespinasse Y, Allan A C, Bus V, Chagné D, Crowhurst R N, Gleave A P, Lavezzo E, Fawcett J A, Proost S, Rouzé P, Sterck L, Toppo S, Lazzari B, Hellens R P, Durel C E, Gutin A, Bumgarner R E, Gardiner S E, Skolnick M, Egholm M, Van de Peer Y, Salamini F, Viola R. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). Nature Genetics, 2010, 42(10): 833-839
- [ 44 ] Li X, Ling K, Zhang J, Xie Y, Wang L, Yan Y, Wang N, Xu J, Li C, Wang W, van Nocker S, Dong Y, Ma F, Guan Q. Improved hybrid *de novo* genome assembly of domesticated apple (*Malus × domestica*). GigaScience, 2016, 5: 35
- [ 45 ] Daccord N, Celton J M, Linsmith G, Becker C, Choisne N, Schijlen E, van de Geest H, Bianco L, Micheletti D, Velasco R, Di Pierro E A, Gouzy J, Rees D J G, Guérif P, Muranty H, Durel C E, Laurens F, Lespinasse Y, Gaillard S, Aubourg S, Quesneville H, Weigel D, van de Weg E, Troggio M, Bucher E. High-quality *de novo* assembly of the apple genome and methylome dynamics of early fruit development. Nature Genetics, 2017, 49(7): 1099-1106
- [ 46 ] Rushton P J, Bokowiec M T, Han S C, Zhang H, Brannock J F, Chen X, Laudeman T W, Timko M P. Tobacco transcription factors: novel insights into transcriptional regulation in the *Solanaceae*. Plant Physiology, 2008, 147(1): 280-295
- [ 47 ] Lv X, Lan S, Guy K M, Yang J, Zhang M, Hu Z. Global expressions landscape of NAC transcription factor family and their responses to abiotic stresses in *Citrullus lanatus*. Scientific Reports, 2016, 6: 30574
- [ 48 ] Hu R, Qi G, Kong Y, Kong D, Gao Q, Zhou G. Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in *Populus trichocarpa*. BMC Plant Biology, 2010, 10: 145
- [ 49 ] Fang Y J, You J, Xie K, Xie W, Xiong L. Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice. Molecular Genetics and Genomics, 2008, 280(6): 547-563
- [ 50 ] 申玉华, 徐振军, 杨晓坡, 相吉山, 文静, 黄文婕. 紫花苜蓿 NAC 转录因子 *MsNAC1* 基因的克隆、生物信息学分析及非生物逆境胁迫下的表达分析. 植物遗传资源学报, 2014, 15(6): 1312-1319  
Shen Y H, Xu Z J, Yang X P, Xiang J S, Wen J, Huang W J. Cloning and bioinformatics analysis of a novel NAC transcription factor *MsNAC1* from *Medicago sativa* L. and detection of its expression under abiotic stresses. Journal of Plant Genetic Resources, 2014, 15(6): 1312-1319