 DOI：10.13430/j.cnki.jpgr.20250727001

西藏大花红景天 *RcNAC83* 基因克隆与功能分析

张力鹏[1]，武　美[2]，王宏鹏[2]，李天宇[2]，阴雅静[1]，卢嘉怡[1]

（[1]天津商业大学生物技术与食品科学学院/天津市食品生物技术重点实验室，天津 300134；[2]南开大学生命科学学院，天津 300071）

摘要：大花红景天是一种历史悠久的药用植物，广泛应用于传统中医与藏医。但是由于其生长环境极其特殊，采集和研究都十分困难，目前有关分子生物学的报道较少。本研究首次对西藏大花红景天 *RcNAC83* 基因进行了克隆，通过生物信息学和实时定量 PCR 技术初步了解其理化性质和表达模式，利用染色体步移技术获得启动子序列并预测顺式作用元件，构建酵母表达载体验证其转录激活活性，并异位表达于丹参中，分析盐胁迫下表型和生理指标的变化。结果表明，*RcNAC83* 基因编码区为 918 bp，包含 3 个外显子，可编码 248 个氨基酸，蛋白质具有明显的亲水性，不具有跨膜结构域，亚细胞定位于细胞核内，且含有多个可磷酸化位点。*RcNAC83* 基因的 N 端可分为 5 个亚结构域，其中 D domain 为 NARD 区，与同源基因具有相似的氨基酸序列和保守结构域。进化树分析发现，*RcNAC83* 与伽蓝属基因关系最近。*RcNAC83* 启动子序列长度为 888 bp，具有转录激活、光响应、厌氧诱导、植物激素茉莉酸甲酯以及 MYB、MYC 和 WRKY710S 基因识别的多个顺式作用元件。*RcNAC83* 在根、成熟茎、茎、叶、顶芽、花中均有表达并受到多种非生物胁迫和植物激素的诱导表达。该基因对酵母细胞无毒性和转录激活活性。在过表达丹参株系中，*RcNAC83* 基因不会影响丹参的生长代谢，但降低对盐胁迫的耐受性。本研究将进一步丰富植物 NAC 基因家族成员的生物学功能，同时为揭示大花红景天其高原适应性的分子机制提供一定的提供理论依据。

关键词：大花红景天；*RcNAC83*；盐胁迫；启动子

Cloning and Functional Analysis of *RcNAC83* from Xizang *Rhodiola crenulata*

ZHANG Lipeng[1], WU Mei[2], WANG Hongpeng[2], LI Tianyu[2], YIN Yajing[1], LU Jiayi[1]

([1] *School of Biotechnology and Food Science*, *Tianjin University of Commerce/Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology*, *Tianjin 300134*; [2] *College of Life Sciences*, *Nankai University*, *Tianjin 300071*)

Abstract: *Rhodiola crenulata* is a medicinal plant with a long history, widely used in traditional Chinese medicine and Xizang medicine. However, due to its extremely special growth environment, collection and research are very difficult, and there are currently few reports on molecular biology. This study firstly cloned the *RcNAC83* gene from the Xizang *Rhodiola crenulata*. Through bioinformatics and real-time quantitative PCR techniques, the physicochemical properties and expression patterns of this gene were preliminarily understood. Using chromosome walking technology, the promoter sequence was predicted to identify *cis*-acting elements. Yeast expression vectors were constructed to verify its transcriptional activation activity, and it was ectopically expressed in *Salvia miltiorrhiza* to analyze the changes in phenotypes and physiological indicators under salt stress. The results showed that the coding region of *RcNAC83* gene was 918 bp, containing 3 exons, and encoded 248 amino acids. The protein had obvious hydrophilicity and no transmembrane domain. It was subcellularly located in the nucleus and contained multiple phosphorylation sites. The N-terminal of the *RcNAC83* gene could be divided into 5 subdomains, among which D domain was the NARD region, which had a similar amino acid sequence and conserved domain to the homologous genes, and was closely related to the genus *Kalanchoe* genes. The *RcNAC83* promoter sequence was 888 bp and contained multiple *cis*-acting elements for transcriptional activation, light response, anaerobic induction, plant hormone MeJA, and recognition by MYB, MYC, and WRKY710S genes. *RcNAC83* was expressed in roots, mature stems, stems, leaves, apical buds and flowers, and was induced by various abiotic stresses and plant hormones. This gene had no toxicity to yeast cells and transcriptional activation activity. In overexpressing *Salvia miltiorrhiza*, the *RcNAC83* gene did not affect the growth and metabolism of *Salvia miltiorrhiza*, but reduced the tolerance to salt stress. This study will further enrich the biological functions of members of the plant NAC gene family, and provide a theoretical basis for revealing the molecular mechanism of highland adaptation in *Rhodiola crenulata*.

Key words: *Rhodiola crenulata*; *RcNAC83*; salt stress; promoter

收稿日期：2025-07-27　　**网络出版日期**：2025-11-18
URL：https: //doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20250727001
第一作者研究方向为植物分子细胞遗传学，E-mail: zhanglp@tjcu.edu.cn
基金项目：天津市自然科学基金（23JCQNJCOO780）
Foundation project: Natural Science Foundation of Tianjin (23JCQNJCOO78)

红景天为蔷薇目（Rosales）景天科（Crassulaceae）红景天属（*Rhodiola* L.）多年生草本或亚灌木植物，全世界共发现 96 种，我国占有大部分种质资源，约为 73 种；其中以西藏地区最多，为 32 种，2 个变种[1]。根据《中华人民共和国药典 2020 年版 一部》[2]规定，红景天属植物根部入药，具有益气活血、通脉平喘的功效，现代药理学研究证明红景天具有抗衰老、抗缺氧、抗疲劳、抗辐射、抗寒冷、预防高原反应等作用，因此也被称为高原人参[3]。其中大花红景天是红景天属植物中最为重要的药用种，为《中华人民共和国药典》指定的入药模式种，主要分布在青藏高原、云南、四川等地，以西藏地区的分布最广、贮备量最多，是历史悠久的传统藏药，同时也是藏族人民经济来源的重要组成部分[4]。近年来，随着药用和保健价值的开发，对大花红景天的需求也显著增加，据统计每年对红景天干燥根的需求量达 1000 t。然而由于至今仍无法实现人工产业化种植，只能依赖于剥夺野生资源，长此以往必然造成资源的严重枯竭[5]。更糟糕的是，青藏高原地质形成期较短，生态环境十分薄弱，倘若红景天资源遭到严重破坏，将难以恢复。因此，开展大花红景天对高原环境适应性机制的研究十分迫切，这是实现大花红景天人工驯化和栽培、物种的合理保护以及可持续利用的必由之路。然而大花红景天的生长环境恶劣，对其采集和研究工作尤为困难。当前国内外研究主要集中在红景天根部有效成分红景天苷、酪醇等化学物质的药理药效方面[6]，关于大花红景天如何应对高原恶劣环境的机制研究较少。

为了适应高原寒冷、低氧、强紫外线等不良的生长环境，大花红景天在长期的进化过程中形成了一系列复杂而有效的应对机制。如在形态学上，大花红景天为多年生草本，植株矮小、丛生、根系发达、多汁肉质叶、雌雄异株、根茎短而粗。在生理上，叶片光合作用途径中二氧化碳的固定方式为景天酸循环。此外，在遗传机制上，大花红景天也与其他物种一样，通过转录激活或转录抑制相关基因的表达发挥作用。现有的研究表明，转录因子在这一过程中扮演了重要的角色，通过与其他相关蛋白或自身之间的相互作用激活或抑制靶基因的表达[7]。近年来，NAC 转录因子因其可显著调控植物生物和非生物的胁迫而备受关注。NAC 转录因子是植物特有的、广泛分布的一类蛋白质，家族成员数量众多[8-9]。其命名来源于矮牵牛（*Petunia hybrida*）*NAM*（*No Apical Meristem*）和拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）*ATAF1*、*ATAF2* 以及 *CUC2*（*Cup-Shaped Cotyledon*）基因[10]。NAC 转录因子具有重要的生物学功能，一方面作为生长因子广泛地参与植物生长发育，如种子萌发、器官形成、侧根发育等生理过程[11-13]。另一方面，NAC 转录因子家族受到多种内源激素，如脱落酸、赤霉素、茉莉酸甲酯、乙烯等的调控，调节植物对干旱、盐、冷、创伤、病原菌等多种胁迫的响应，同时也参与次生代谢途径，影响相关活性成分的含量[14-18]。

为了深入开展大花红景天高原环境适应性机制的研究，本研究对 NAC 家族成员 *RcNAC83* 的编码区和启动子区进行了克隆，在基因结构、蛋白质理化性质、三级结构、跨膜结构域、磷酸化位点、亚细胞位置、系统进化树和启动子中顺式作用元件等特征进行了分析，利用实时荧光定量 PCR 检测 *RcNAC83* 在不同组织器官和非生物胁迫、植物激素下的表达模式，并构建表达载体转化酵母和药用模式植物丹参，对 *RcNAC83*

的转录活性进行检测，并对盐胁迫下的转基因株系和野生型的表型进行了比对。研究结果将进一步揭示其高原适应性机制，同时为育种栽培体系的建立提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大花红景天（*Rhodiola crenulata*）试验材料采集自西藏米拉山，转基因所用的野生型丹参（*Salvia miltiorrhiza*）由南开大学生命科学学院宋文芹教授惠赠。试验所用 T 载体、植物表达载体（pCAMBIA3301）、酵母表达载体（pGBKT7）以及大肠杆菌 DH5α、农杆菌菌株 EHA105、酵母菌株 Y2H 均购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司。

1.2 目的基因克隆和序列验证

大花红景天叶片基因组总 DNA 提取在赵为等[19]建立的 CTAB 法上略有改进；叶片总 RNA 提取依照本实验室建立的 CTAB-异丙醇法[20]；cDNA 的合成依照逆转录酶说明书（TaKaRa Bio，Japan）进行。大花红景天 *RcNAC83* 基因扩增的 PCR 引物设计参考序列来自于本实验室的比较转录组 unigene 数据库（未发表），引物序列为 RcNAC83-cF：ATGGCTAATCAGGTTAACGTCG；RcNAC83-cR：CTAGGGTTTACTAACATTAAC。此序列在不同海拔的材料中表达丰度较高，呈现差异性，与本实验室 Nr 数据库（未发表）比对时，发现同 *NAC83* 基因相似性较高，因此确定为候选基因并命名为 *RcNAC83*。分别以 DNA 和 cDNA 为模版，反应体系为 100 ng DNA 或 10 ng cDNA，正反向引物各 0.8 μL，2×PrimerSTAR mix 12.5 μL（TaKaRa Bio，Japan），ddH_2O 补足 25 μL。PCR 程序为预变性 98℃ 2 min；变性 98℃ 10 s，复性 60℃ 5 s，延伸 72℃ 15 s，30 个循环。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测并回收，将目的基因与 T 载体连接并转入大肠杆菌 DH5α。利用 PCR 获得阳性克隆，并送于北京生工生物公司进行测序。将测序获得的 ABI 文件导入 Contigs 进行校准，经 ContigExpress 拼接，利用 DNAstar 软件中的 MegAlign 和 BioEdit 对拼接序列进行比对和调整以剔除低质量序列和引物区；利用 MegAlign 对 DNA 和 cDNA 扩增结果进行比对，绘制外显子和内含子的结构。

1.3 启动子序列获取

大花红景天 *RcNAC83* 基因启动子序列克隆依照 genome walking 试剂盒（TaKaRa Bio，Japan）说明书进行，根据已知 DNA 序列设计 3 条反向引物，引物之间间距 50~80 bp，以基因组总 DNA 为模版，进行巢式 PCR。引物序列为 SP1：AAGTCCCAAGGATCCGACTTGCA；SP2：CCTCGCCAAATAGTCAATGACGAGC；SP3：AGGAGGCAGTCTCATCACAACCCCA。将第 3 轮扩增产物经 PCR 产物回收试剂盒纯化，并与 T 载体连接，连接产物转化大肠杆菌，选择阳性菌株送于北京生工生物公司测序。利用 SP3 引物验证测序结果，并基于测序结果设计引物与 SP1 作为组合再次进行 PCR 扩增，产物测序完成启动子序列的验证。利用 New PLACE（https://www.dna.affrc.go.jp）分析启动子序列的特点和顺式作用元件。

1.4 生物信息学分析

RcNAC83 编码区序列经 SeqBuilder 翻译为氨基酸序列后，利用 blastP 在开放数据库 NCBI（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov）和 PlantTFDB（https://planttfdb.gao-lab.org）中获取同源基因，利用 DNAMAN 对氨基酸序列进行比对并获得序列相似性比值，利用 MEGA 5.0 对序列进行 clustal W 比对并基于比对结果构建 N-J 进化树，利用在线软件 TMHMM severv.2.0（http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/）分析序列的跨膜结构域，利用在线网站 MEME（http://meme-suite.org/tools/meme）对基因结构进行分析并以此为依据确定 N 端和 C 端的保守结构域范围。利用 SWISS-MODEL（https://swissmodel.expasy.org/interactive）预测其三级结构模型[21]，利用 netPhos3.0（https://services.healthtech.dtu.dk）预测磷酸化位点；利用 PSIPRED 工具预测蛋白质的二级结构。利用 Expasy-ProtParam（https://web.expasy.org/protparam/），预测其理化性质；利用 Signal P（https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/）预测信号肽的有无；利用 ProtComp（http://linux1.softberry.com/）预测亚细胞位置。

1.5 组织特异性与体外胁迫诱导

试验材料为组织培养获得的大花红景天无性繁殖苗。对根、成熟茎、茎、叶、顶芽和花 6 个组织进行取样，提取 RNA 用于组织特异性表达试验。体外胁迫参考 Zhang 等[22]的方法，分别选取干旱、低温、紫外线、盐、淹水（低氧）、植物激素脱落酸 ABA、茉莉酸甲酯 MeJA、重金属 $AgNO_3$ 以模拟大花红景天所处高原环境。具体处理为 20% PEG4000 处理 5 d 模拟干旱、UA 234 nm 处理 5 d 模拟紫外线、0 °C 处理 5 d 模拟低温、水淹 5 d 模拟低氧。此外，盐胁迫为 NaCl（100 mmol/L）处理 0、12、24、36、48 h。其余胁迫为植物激素 ABA（50 μmol/L）、茉莉酸甲酯 MeJA（50 μmol/L）分别处理 0、12、24、36、48 h；重金属 $AgNO_3$ 选择 0、50、100、200、300 μmol/L 共 5 个浓度梯度。分别选取 3 株生长一致的组培苗用以完成上述的各种处理条件，每种处理均包含 3 次生物学重复。以未经处理的组培苗为对照，提取盐胁迫后根系、叶片和其他处理后叶片的 RNA 用于表达分析。RNA 提取方法同 1.2。

1.6 酵母和植物双元表达载体构建

利用分别携带酶切位点（*Eco*R I/*Bam*H I 和 *Nco* I/*Bst*E II）的引物，使用高保真酶（TaKaRa Bio，Japan）扩增基因全长，与 T 载体连接、测序验证。引物序列分别为 RcNAC83-BDF：GAATTCATGGCTAATCAGGTTAACGTCG. RcNAC83-BDR：GGATCCCTAGGGTTTACTAACATTAAC；RcNAC83-3301F：CCATGGCTAATCAGGTTAACGTCG, RcNAC83-3301R：GGTCACCCTAGGGTTTACTAACATTAAC。提取 T 质粒、酵母表达载体 pGBKT7、植物双元表达载体 pCAMBIA3301，利用双酶切法构建载体，T4 DNA 连接酶连接，转化大肠杆菌。将测序检测正确的阳性质粒，经 PEG/LiTE 法转化酵母菌株 Y2H Gold，经冻融法转化农杆菌菌株 EHA105。利用缺陷型培养基 SD/-Trp 和 YEB 添加 100 mg/L 卡那霉素和 100 mg/L 利福平进行筛选培养，经组合引物（35S-F：AACAGAACTCGCCGTAAAG, RcNAC83-3301R：GGTCACCCTAGGG

TTTACTAACATTAAC）进行菌液 PCR 验证阳性菌株。

1.7 丹参转化

利用叶盘法转化野生型丹参，将含有阳性质粒的农杆菌 EHA105 活化，并用筛选培养基 YEB 扩大培养至 OD600 为 0.6~0.8。切取 0.5 cm^2 小块的、生长良好健硕的丹参无菌组培苗叶片，26℃下侵染 25 min，共培养 2 d。随后置于脱分化培养基（MS+1.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA+0.8 mg/L Basta+400 mg/L cef）中暗培养 7 d，光照培养 30 d 诱导愈伤组织，分化培养基（MS+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+0.8 mg/L Basta+400 mg/L cef）培养 30 d 促进芽的分化，诱导生根培养基为 MS+0.25 mg/L IBA+0.8 mg/L Basta+400 mg/L cef 培养 30 d 诱导生根。组织培养的光照强度为 2000 lx，选择完全无菌的丹参，提取叶片 RNA 进行半定量 PCR 用以筛选阳性转基因株系。提取转基因株系 L3 的老根、幼根、老茎、幼茎、老叶、幼叶、花部位的 RNA，用以分析基因的组织特性表达。RNA 提取方法同 1.2。半定量 PCR 体系为 cDNA 10 ng，正反向引物各 1 μL，2×Ftaq mix 12.5 μL，ddH_2O 补足体积至 25μL。扩增程序为预变性 95℃ 2 min；变性 95℃ 15s，复性 60℃ 15 s，延伸 72℃ 30 s，30 个循环。内参基因为 *SmActin*，引物序列 SmActin-F：GGTGCCCTGAGGTCCTGTT；SmActin-R：AGGAACCACCGATCCAGACA。

1.8 盐胁迫处理和胁迫生理指标的测定

选取生长一致的丹参转基因和野生型株系在光照培养室（光照培养条件为 3000 lx）中培养至 30 d，蒸馏水配置 250 mmol/L NaCl 浇灌材料，继续培养 15 d，并在第 5、7、9、11、13、15 天时拍照记录生长情况。在胁迫第 11 天时对叶绿素、叶黄素、胡萝卜素、超氧化物歧化酶、丙二醛和过氧化氢含量进行测定，每种实验均包含 3 次生物学重复。计算公式分别为：叶绿素 Ca（mg/L）=13.95×A665－6.88×A649；叶绿素 Cb（mg/L）=24.96×A649－7.32×A665；总叶绿素 C（a+b）（mg/L）=Ca＋Cb；叶黄素（mg/L）=(1000×A470－2.05×Ca－114.8×Cb)；丙二醛含量（μmol/g FW）=[6.45×（OD_{532}－OD_{600}）－0.56OD_{450}]/0.015W，其中 W 为样品鲜重；超氧化物歧化酶活性（U/g FW）=[（ACK－AE）×Vt]/（½ACK×W×VS），其中，ACK 为对照管的吸光值，AE 为样品管的吸光值，Vt 为酶液总体积，VS 为测定时酶液用量[23]。

1.9 酵母转化与自激活滴板验证

为了分析目的基因的自激活活性和细胞毒性，首先基于蛋白质三级结构和保守序列分析结果，将 *RcNAC83* 基因分为 N 端和 C 端序列，设计特定引物扩增相应区域，分别构建包含开放阅读框（747 bp）、N 端（441 bp）、C 端（306 bp）的重组酵母表达载体。以空载质粒 pGBKT7 为阴性对照、重组载体 pGBKT7-p53 为阳性对照，与包含 *RcNAC83* 完整蛋白质序列、*RcNAC83*-N 端和 *RcNAC83*-C 端序列的酵母同时扩大培养，利用紫外分光光度计测定菌液 OD_{600} 值，并均调整至 0.6，用无菌水分别稀释 10 倍、100 倍、1000 倍，移液器取 6 μL 分别滴于 SD/-Trp 和 SD/-Trp-His 固体培养基，30℃培养 3 d 后拍照。*RcNAC83* 基因 N 端扩增引物为 RcNAC83-NF：GAATTCATGGCTAATCAGGTTAACGTCG，RcNAC83-NR：GGATCCCTAGTCGAGA

CGGTACTC；*RcNAC83* 基因 C 端扩增引物为 RcNAC83-CF：GGATCCAAATCTGCTGCAGACCATCAACC，RcNAC83-CR：GGATCCCTAGGGTTTACTAACATTAAC。

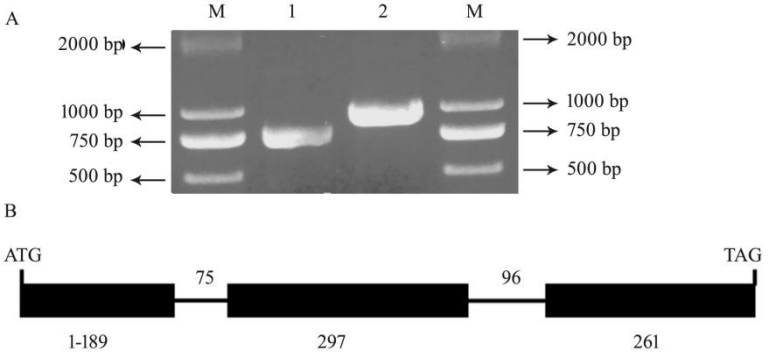
1.10 实时荧光定量 PCR

利用 Bio-RAD 公司的 iQ5 系统完成 qRT-PCR。反应体系为 20 μL，包含 10 ng cDNA、10 μL SYBRGreen I（TaKaRa Bio，Japan）、正反向引物[24]各 0.8 μL。组织特异性和非生物胁迫诱导表达均以 *RcGAPDH* 为内参基因，引物序列为 F：TACCCTTCATAGCACCCTCAGA，R：GAATGGCTTTCCGTGTCCC。*RcNAC83* 定量 PCR 引物所用序列为 F：TCGAGTGGCTGGGATGAAGAA，R：GCTAGGGCAGAGTCGAGACGG。每种样品包含 3 个生物学重复。

2 结果与分析

2.1 *RcNAC83* 基因编码区序列分离与验证

经过测序最终确定 *RcNAC83* 的编码区序列信息（图 1）。*RcNAC83* 基因编码区序列长度为 918 bp，包含 3 个外显子和 2 个内含子。外显子长度分别为 189 bp、297 bp、261 bp，内含子位于 190~264 bp 和 562~657 bp，长度分别为 75 bp 和 96 bp，均为典型的 TA-AG 内含子。开放阅读框为 747 bp，可翻译成 248 个氨基酸。



A：PCR 扩增电泳图，1：cDNA 为模版，2：DNA 为模版；B：DNA 结构图

A: The result of PCR amplification, M: 2000 bp marker, 1: cDNA as the template, 2: DNA as the template; B: DNA structure diagram

图 1 大花红景天 *RcNAC83* 基因扩增和 DNA 结构

Fig. 1 *RcNAC83* gene amplification and DNA structure of *Rhodiola crenulata*

2.2 *RcNAC83* 基因生物信息学预测分析

通过生物信息学软件分析预测，RcNAC83 蛋白质化学式为 $C_{1215}H_{1947}N_{357}O_{367}S_9$，分子量为 27.7 kDa，等电位点为 9.14，总原子数为 3895；负电荷的残基总数（天冬氨酸 Asp+谷氨酸 Glu）为 31，带正电荷的残基总数（精氨酸 Arg+赖氨酸 Lys）为 37，不稳定系数为 37.48，说明 RcNAC83 蛋白稳定；溶脂系数为 78.59，总平均亲水系数－0.481，说明该蛋白具有一定的亲水性。氨基酸的组成中，含量最高的是缬氨酸（Val），为 10.1%，其次为丙氨酸（Ala）和精氨酸（Arg），均占 8.5%。TMHMM 和 SingalP 预测 RcNAC83 蛋白不具有跨膜结构域和信号肽区域。ProtComp 亚细胞定位预测结果显示，RcNAC83 蛋白定位于细胞核。

SWISS-MODEL 预测的三级结构中包含明显区分的 N 端和 C 端（图 2A），二级结构共包含 2 个α-螺旋，8 个β-折叠，以及多个不规则卷曲。netPhos3.0 预测 RcNAC83 蛋白共包含 24 个磷酸化位点（图 2B），其中丝氨酸（Ser）16 个、苏氨酸（Thr）6 个、酪氨酸（Tyr）2 个，说明该蛋白可被磷酸化/去磷酸化调控。

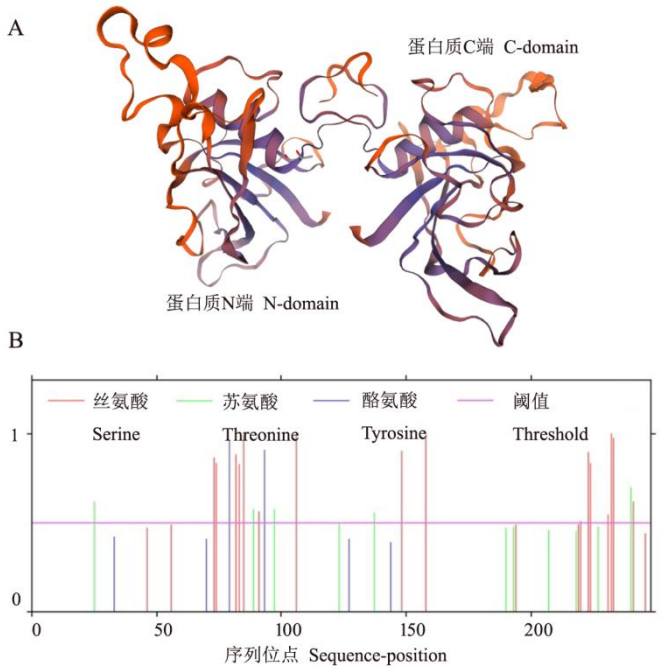


图 2 大花红景天 RcNAC83 蛋白质三级结构预测（A）与磷酸化位点分析（B）

Fig. 2 Prediction of the tertiary structure (A) and phosphorylation sites analysis (B) of the RcNAC83 protein from *Rhodiola crenulata*

2.3 *RcNAC83* 基因 N-J 进化树构建和保守序列分析

基于 RcNAC83 的氨基酸序列获取 11 个同源基因信息，分析序列间相似性，结果显示大花红景天 RcNAC83 与景天科伽蓝属白姬之舞（*Kalanchoe marnieriana*）Kalax.0609s0006.1 序列一致性最高，为 65.73%，随后依次为杨柳科银白杨（*Populus alba*，53.63%）XP_034906860.1、豆科大豆（*Glycine max*，52.55%）NP_001238078.1、桃金娘科短药蒲桃（*Syzygium oleosum*，52.9%）XP_030449261.1、鼠李科枣（*Ziziphus jujuba*，51.33%）XP_015881782.1、杨柳科紫红柳（*Salix purpurea*，51.14%）SapurV1A.0453s0210.1、凤仙花科喜马拉雅香豌豆（*Impatiens glandulifera*，50.19%）XP_047333405.1、菊科除虫菊（*Tanacetum cinerariifolium*，49.81%）GEX29981.1、桑科大麻（*Cannabis sativa*，49.08%）XP_030497096.1、菊科黄花蒿（*Artemisia annua*，49.07%）PWA81517.1、十字花科拟南芥（*Arabidopsis thaliana*，44.69%）AT5G13180.1。

氨基酸序列比对结果显示（图 3），RcNAC83 的 C 端序列保守性低，N 端序列保守性较高，可分为 5 个结构域（A~E），其中 B 和 E 与其他结构域相比保守性较低，D 结构域为典型的 NARD（KKTLVFYQGKPNKGERTDWIMHEYRL）可能具有转录抑制活性。N-J 系统进化树显示（图 4A），大花红景天 *RcNAC83* 与伽蓝属白姬之舞关系最近，明显聚为一支，其他同源基因聚为一类，且杨柳科的紫红柳

与银白杨、菊科的除虫菊与黄花蒿分别聚为一支。在线 MEME 分析软件获取上述基因的保守区域（模块数量设定为 5 个），结果进一步揭示 *RcNAC83* 与其他 NAC 基因具有相似的结构（图 4B、C）。

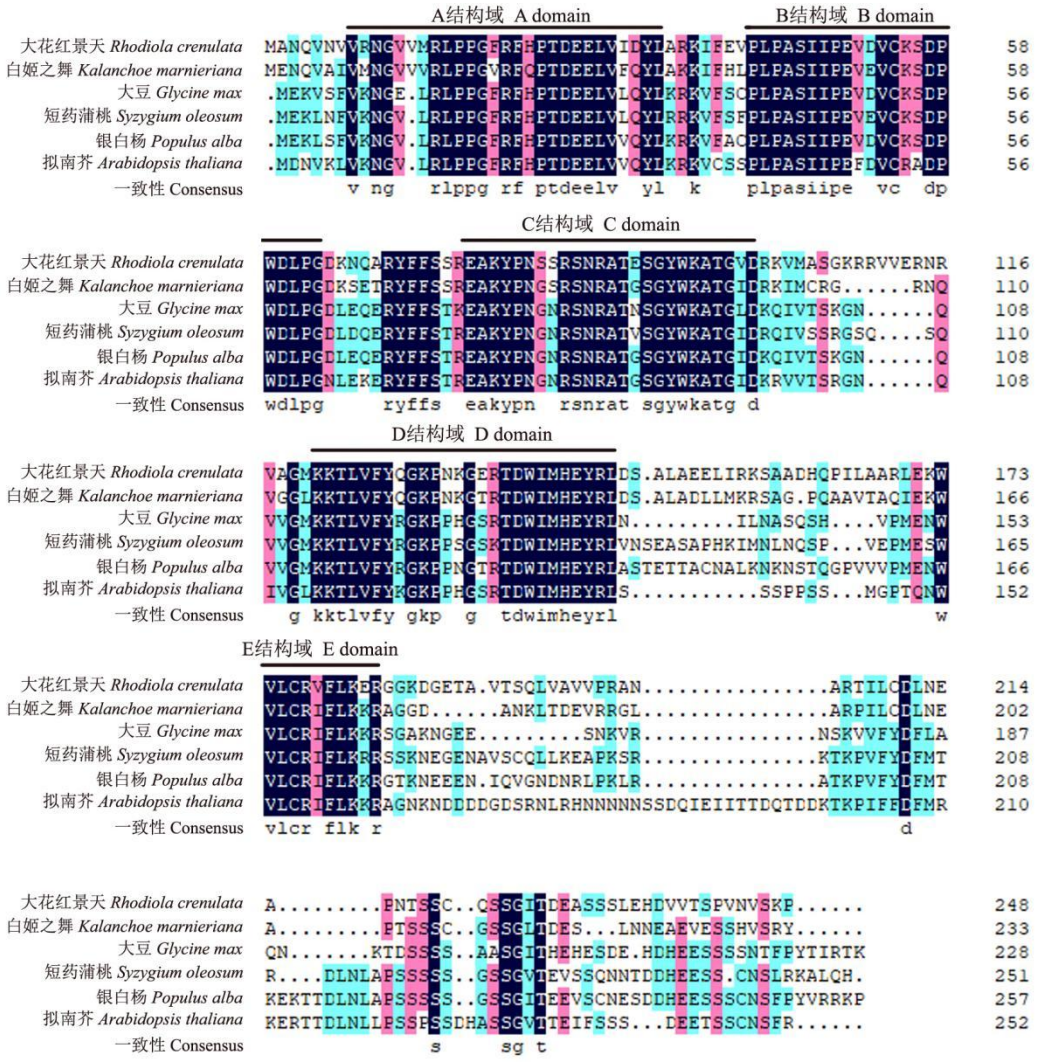
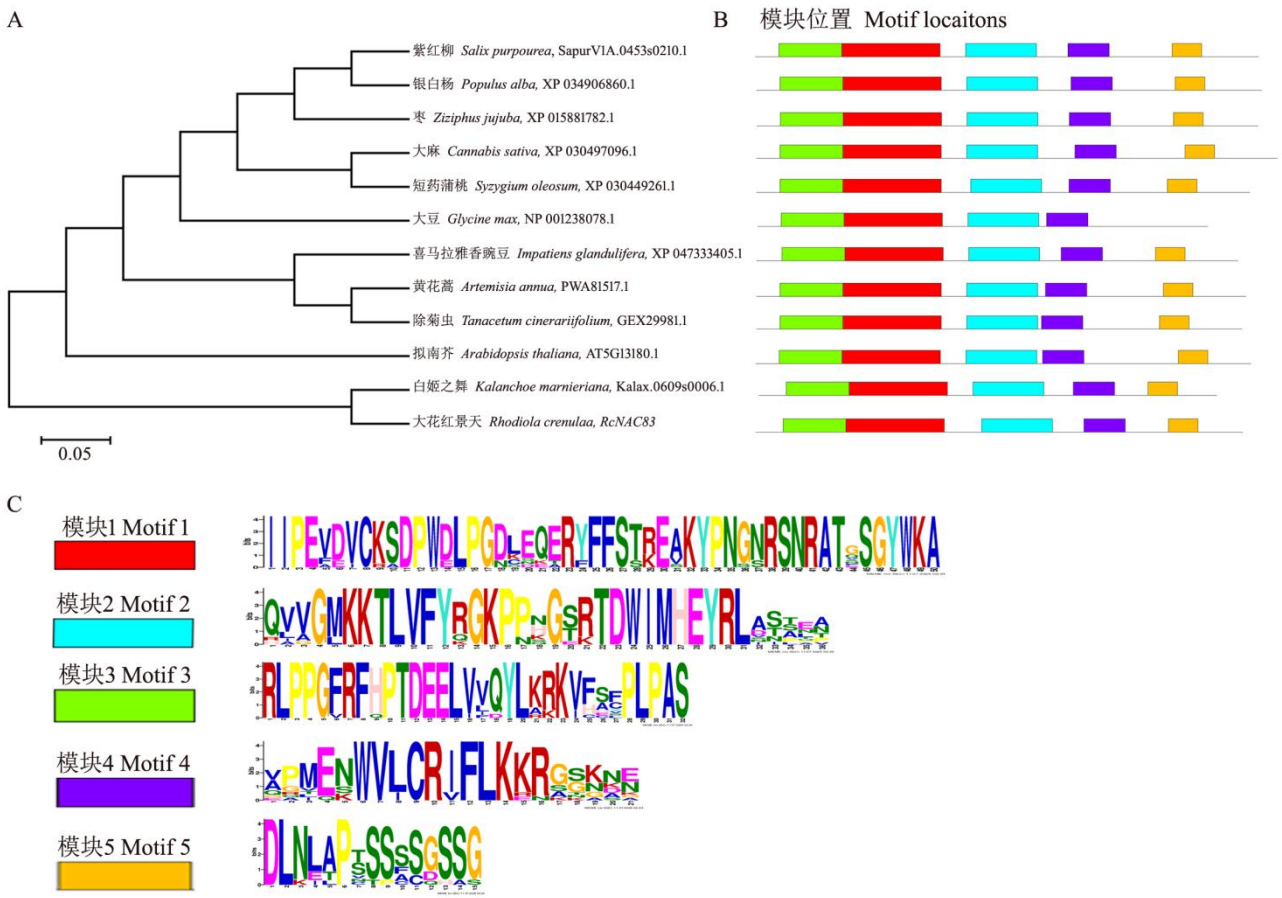


图 3 大花红景天 RcNAC83 蛋白质与代表性物种的氨基酸序列比对

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of *Rhodiola crenulata* RcNAC83 protein with representative species



A：N-J 进化树；B：保守结构域；C：保守结构域氨基酸序列顺序

A: N-J evolutionary tree; B: Conserved domain; C: Amino acid sequence

图 4 大花红景天 *RcNAC83* 基因 N-J 进化树构建与保守结构域分析

Fig. 4 Construction of the N-J evolutionary tree and analysis of conserved domains of *Rhodiola crenulata RcNAC83* gene

2.4 *RcNAC83* 基因启动子序列分析

RcNAC83 基因启动子序列长度为 888 bp，含有 69 个顺式作用元件，其中转录激活相关的 TATA-box 与 CAAT-box 元件最为丰富，分别为 25 和 17 个。在生物和非生物胁迫分类中，*RcNAC83* 基因启动子包含厌氧诱导相关响应元件 ARE（AAACCA）、光响应元件 ATCT-motif（AATCTAATCC）、转录因子 MYB（CAACCA）与 MYC（CATTTG）响应元件等。在植物激素响应分类中，茉莉酸甲酯 MeJA 应答元件较多，包括 2 个 CGTCA-motif、2 个 TGACG-motif（图 5）。

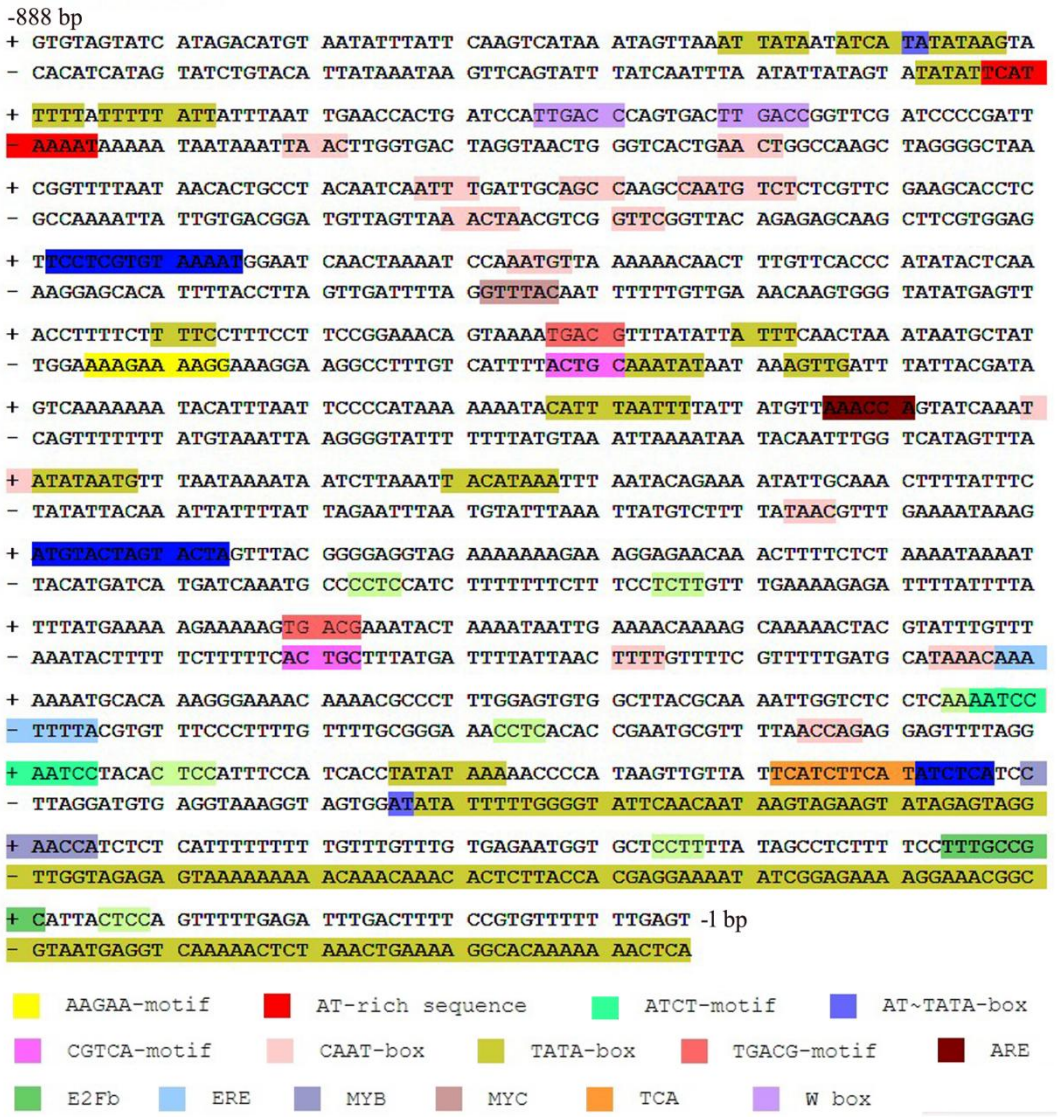
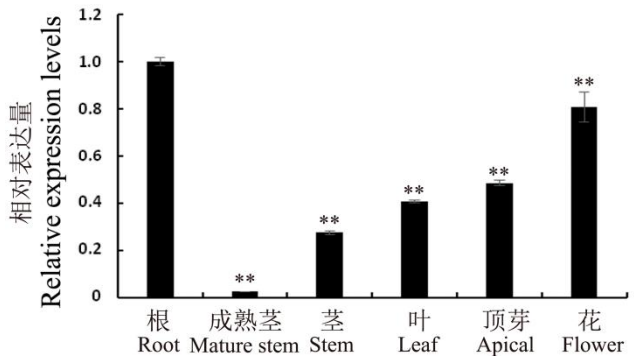


图 5 大花红景天 *RcNAC83* 基因启动子序列作用元件预测

Fig. 5 Prediction of *cis*-acting elements in the promoter sequence of *Rhodiola crenulata RcNAC83* gene

2.5 *RcNAC83* 基因组织特异性表达模式分析

利用实时荧光定量 PCR 检测 *RcNAC83* 基因在根、成熟茎、茎、叶、顶芽和花中的相对表达水平，结果显示（图 6），以 *RcNAC83* 在根中的表达量为参考，发现其在待测组织内均有表达，但存在极显著差异。主要在根（1.000）和花（0.809）两种非绿色器官中表达；在成熟茎最低，为 0.027；在能够进行光合作用的叶（0.408）和顶芽（0.486）中表达量相似。说明 *RcNAC83* 参与大花红景天多个生长发育代谢过程，但可能与水、盐等物质的吸收或生殖生长关系更为密切。



以根中相对表达量定义为 1；**：在 *P*<0.01 水平差异极显著；下同

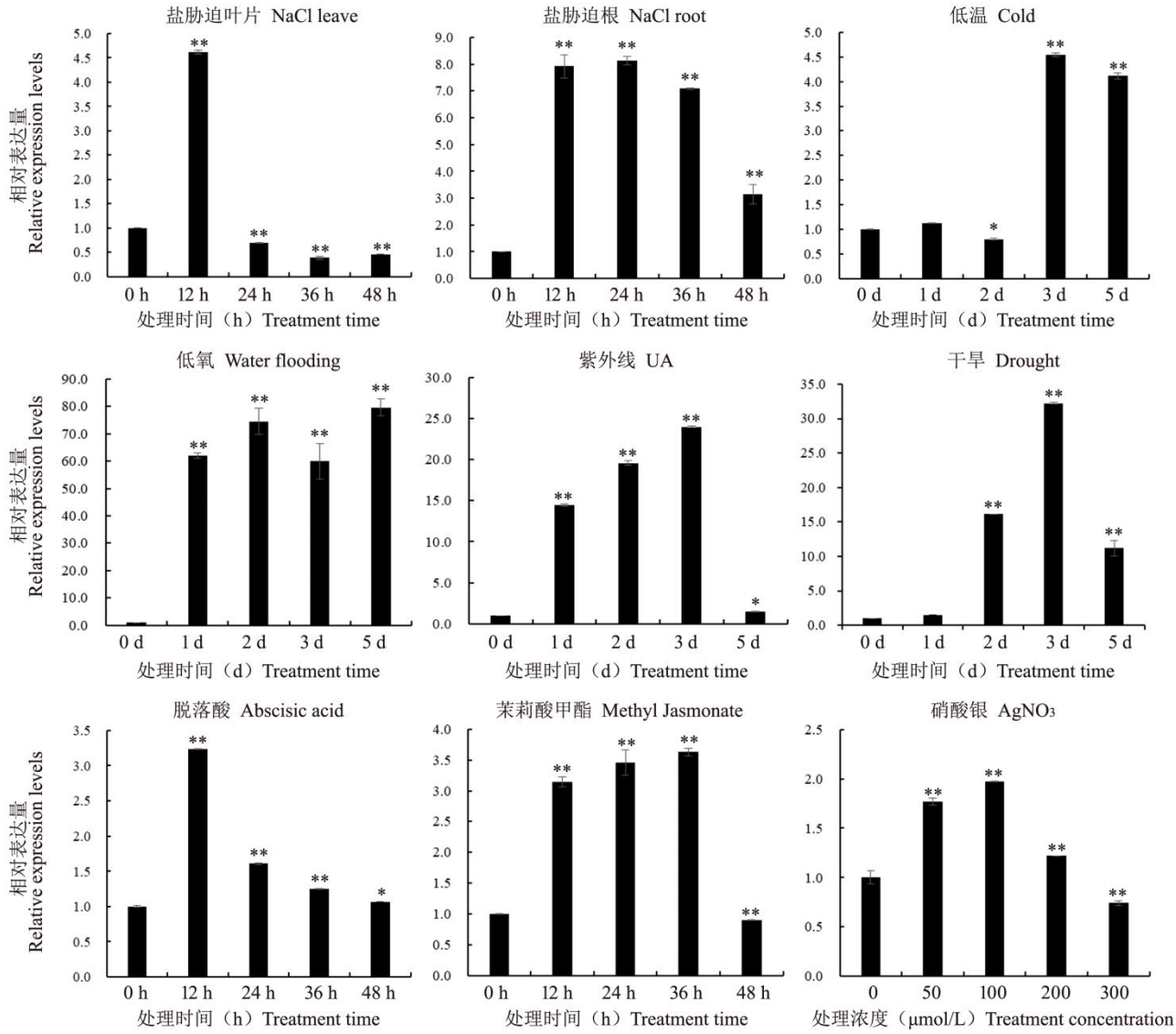
The relative expression level in the root is defined as 1**: Extremely significant difference at *P*<0.01 level; The same as below

图 6 大花红景天 *RcNAC83* 组织特异性表达模式

Fig. 6 The tissue-specific expression pattern of *Rhodiola crenulata RcNAC83*

2.6 *RcNAC83* 基因对非生物胁迫诱导响应模式分析

由于 *RcNAC83* 基因启动子包含多个与非生物胁迫响应基因识别相关的顺式作用元件，对 *RcNAC83* 基因在不同胁迫条件下的表达水平进行检测。如图 7 所示，盐胁迫下 *RcNAC83* 基因在根和叶中的表达变化趋势一致，即随胁迫时间的延长呈现出先增长后降低的趋势，但在根中差异更为显著且在短时间内维持了较高的水平，这可能与其组织特异性表达模式有关。其他非生物胁迫如低温、低氧、紫外线、干旱均可显著或极显著诱导 *RcNAC83* 基因转录，但表达谱稍有不同，如低温、紫外线和干旱胁迫 3 d 时表达量均最高，但低温处理的初期阶段并未显著提高表达，而低氧条件下 *RcNAC83* 基因表达保持了稳定的高表达。植物激素与非生物胁迫响应具有直接的调控关系，*RcNAC83* 基因也可受到脱落酸诱导表达，并在胁迫初期（12 h）达到顶峰。茉莉酸甲酯对于 *RcNAC83* 基因的影响可能与其启动子的识别元件有关，随着胁迫时间的延长，表现出先上升后下降的趋势。重金属银离子也参与调控 *RcNAC83* 基因的转录，表现为低浓度时诱导、高浓度时抑制。



以 0 h/0 d/0 μmol/L 中相对表达量定义为 1；*：在 $P<0.05$ 水平差异显著

The relative expression level in 0 h/0 d/0 μmol/L was defined as 1.; *: significant difference at P<0.05 level

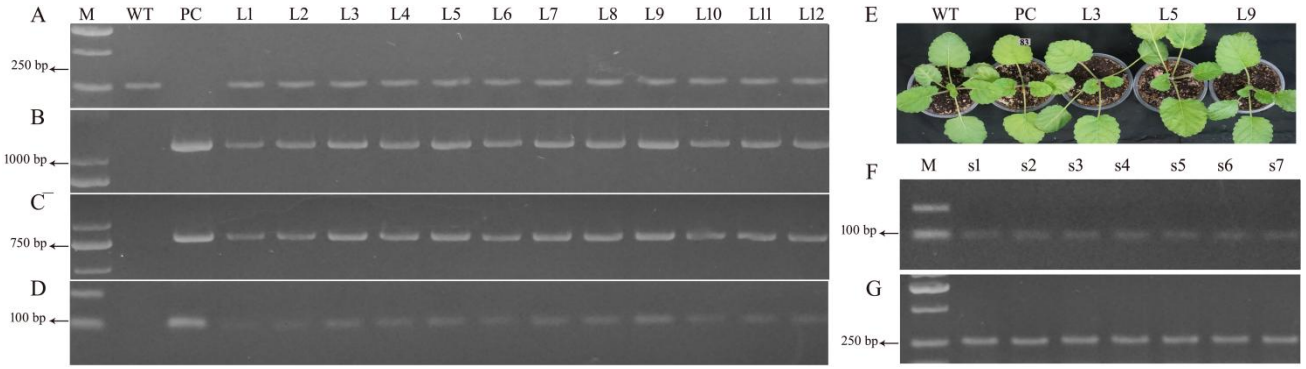
图 7 大花红景天 *RcNAC83* 体外胁迫诱导表达模式

Fig. 7 The expression pattern of *Rhodiola crenulata RcNAC83* under in vitro stress conditions

2.7 丹参过表达 *RcNAC83* 基因株系筛选和盐胁迫表型

利用农杆菌介导的方法转化野生型丹参在 0.8 mg/L 的 Basta 初步筛选后，获得正常生长的 T_0 代组培苗，选取生长一致的叶片为材料，提取 RNA 并逆转录为 cDNA，以此为模板进行分子鉴定。阴性对照为野生型丹参，阳性对照为 *RcNAC83* 基因重组质粒，半定量 PCR 扩增结果可实现对转基因株系的确定和筛选。图 8 显示，内参基因 *SmActin* 在野生型和候选转基因株系中均能扩增出大小、亮度一致的目的条带，说明 cDNA 质量均一、PCR 扩增结果可靠（图 8A）。随后将载体 35S 启动子上游与 *RcNAC83* 下游引物组合，可扩增出 1261 bp 的条带，*RcNAC83* 全长引物可以扩增出 747 bp 的条带，说明获得的材料均为阳性株系（图 8B、C）。以 *RcNAC83* 定量引物扩增上述材料，发现 12 个样品中电泳条带的亮度不同，其中 L3、L5、L9 亮度

较高，表明 *RcNAC83* 的表达量较高（图 8D）。通过观察外观特点，发现野生型、重组质粒和 *RcNAC83* 转基因株系在生长期无明显差异（图 8E），说明 *RcNAC83* 过量表达不会影响丹参正常的生长发育过程。分别对过表达丹参转基因株系 L3 不同组织（老根、幼根、老茎、幼茎、老叶、幼叶、花）的 *RcNAC83* 表达量进行分析，结果显示 *RcNAC83* 在不同组织中均有大量表达，且不存在差异性，这可能与 35S 组成型启动子有关（图 8F、G）。



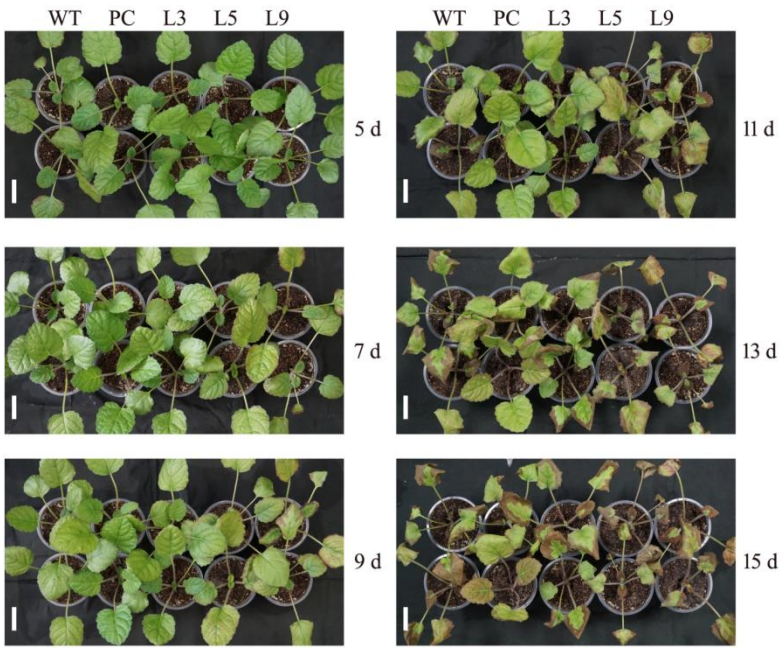
WT：野生型；PC：*RcNAC83* 基因重组质粒；L1~L12：转基因株系；下同；A：*SmActin* 引物在丹参不同株系中扩增结果；B：组合引物在丹参不同株系中扩增结果；C：*RcNAC83* 全长引物在丹参不同株系中扩增结果；D：*RcNAC83* 定量引物在丹参不同株系中扩增结果；E：正常生长条件下不同株系丹参表型；F：*RcNAC83* 定量引物在转基因株系 L3 的不同器官表达量（s1~s7 分别为老根、幼根、老茎、幼茎、老叶、幼叶、花）；G：*SmActin* 内参基因在转基因株系 L3 的不同器官表达量

M: Marker; WT: Wild type; PC: *RcNAC83* recombinant plasmid; L1-L12: Transgenic varieties; The same as below; A: The amplification results of the *SmActin* qRT-PCR primers in different varieties of *Salvia miltiorrhiza*; B: The amplification results of the combination primers in different varieties of *Salvia miltiorrhiza*; C:The amplification results of the *RcNAC83* primers in different varieties of *Salvia miltiorrhiza*; D: The amplification results of *RcNAC83* quantitative primers in different varieties of *Salvia miltiorrhiza*; E: Phenotypes of different strains of *Salvia miltiorrhiza* under normal growth conditions; F: The expression of *RcNAC83* quantitative primers in different organs of transgenic line L3 (s1-s7 represent old roots, young roots, old stems, young stems, old leaves, young leaves, and flowers, respectively); G: *SmActin* expression levels in different organs of the transgenic line L3

图 8 *RcNAC83* 过表达转基因丹参鉴定

Fig. 8 Identification of *RcNAC83* overexpression transgenic *Salvia miltiorrhiza*

为了进一步分析 *RcNAC83* 基因与非生物胁迫应答的关系，选择处于同样生长状态的丹参幼苗进行盐胁迫。结果显示，在胁迫早期（0~5 d）转基因株系和对照均表现一致的生长状态，未见胁迫表型。但第 7 天时，L9 株系的叶片首先可见黄化和坏死，L3 和 L5 情况尚可。第 11 天时，L5 株系也出现了生长阻滞和坏死的现象，而野生型与空载株系的表型明显较轻。随着胁迫时间的增长，持续的高盐环境会破坏所有丹参的生长，最终引发植株的死亡（图 9）。



标尺为 3 cm

Scale bar=3 cm

图 9 不同丹参株系在盐胁迫下的表型

Fig. 9 Phenotypes of different strains of *Salvia miltiorrhiza* under salt stress

2.8 盐胁迫前后生理指标变化分析

为了进一步研究盐胁迫对丹参生长的影响，在胁迫第 11 天取野生型、空载株系和转基因型株系的叶片进行相关生理指标测定（图 10）。盐胁迫前超氧化物歧化酶活性、过氧化氢、丙二醛和部分光合色素（叶绿素 a、总叶绿素）含量在不同转基因株系及野生型、空载质粒对照间无明显差异，但胁迫后转基因株系的过氧化氢和丙二醛含量均极显著增高，超氧化物歧化酶活性降低了 50%左右，光合色素如叶绿素 a、总叶绿素、叶黄素的含量均极显著减少。说明 *RcNAC83* 基因过表达不利于植物在胁迫后清除过氧化氢，多余的活性氧分子损害了正常的细胞结构或生长代谢过程，如破坏了生物膜系统，导致丙二醛含量的提高以及光合色素的流失和降解。

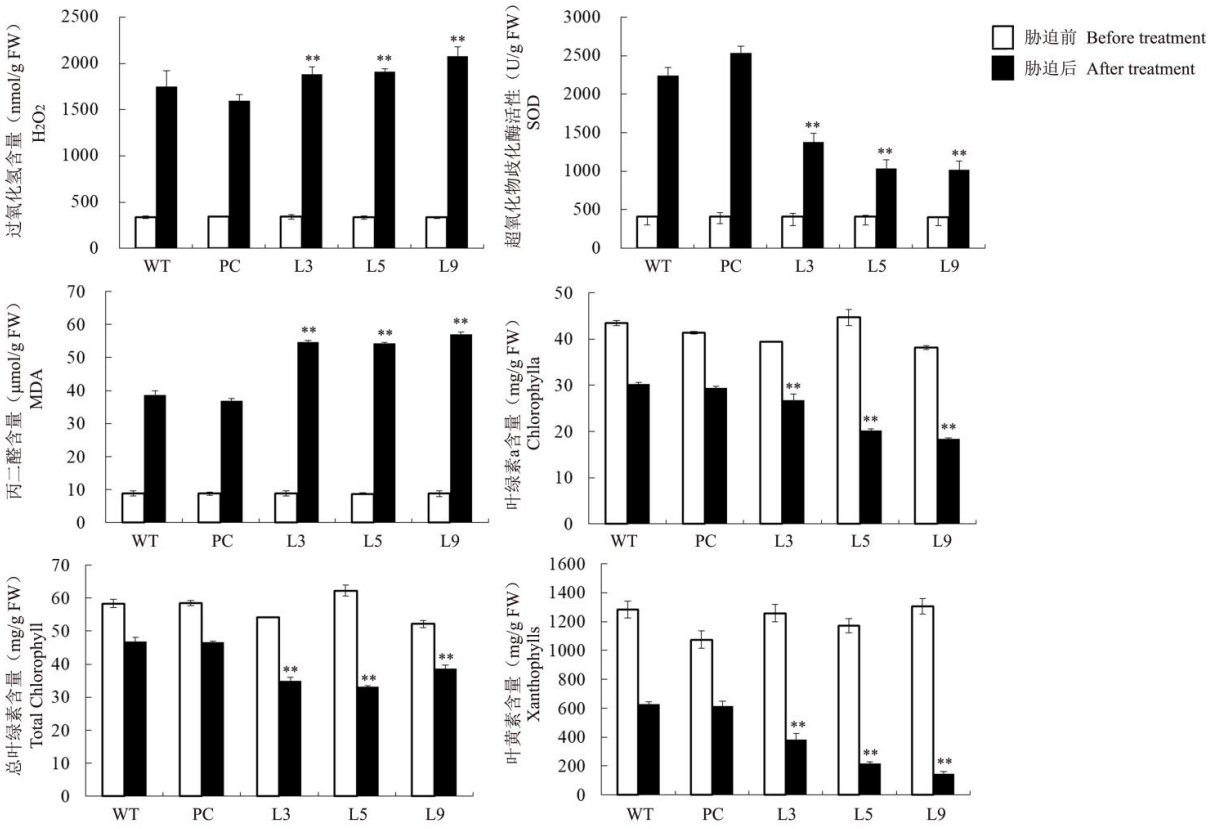


图 10 盐胁迫下不同株系丹参生理指标测定

Fig. 10 Measurement of physiological indicators for different *Salvia miltiorrhiza* lines under salt stress

2.9 *RcNAC83* 基因自激活检测与细胞毒性分析

利用酵母杂交自激活检测法能够预测 *RcNAC83* 基因在大花红景天体内是否行使转录因子的转录功能。如图 11 所示，pGBKT7-*RcNAC83* 含基因完整开放阅读框的阳性菌株能够在 SD/-Trp 培养基上正常生长，在 SD/-Trp-His 培养基上无法生长，因此 *RcNAC83* 基因无转录激活活性和无细胞毒性。截断的 N 端或 C 端在 SD/-Trp-His 培养基上也无法生长，同样证实其无转录激活活性。考虑到 *RcNAC83* 基因的 N 端第 4 亚结构域为典型的 NARD 区，说明该基因在体内可能主要起转录抑制功能，但具体调控形式仍需进一步研究。

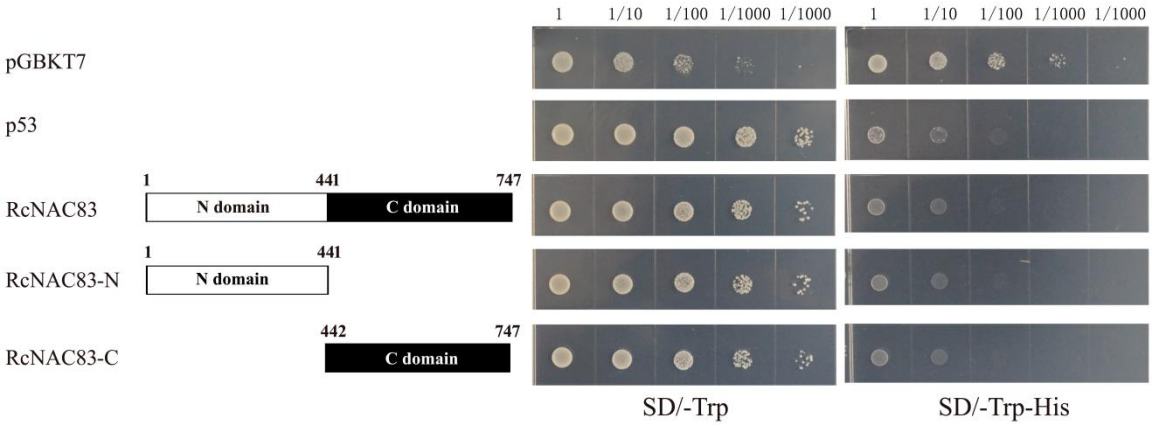


图 11 大花红景天 *RcNAC83* 基因细胞毒性和转录激活功能分析

Fig. 11 Analysis of cytotoxicity and transcriptional activation function of *Rhodiola crenulata RcNAC83*

3 讨论

转录因子作为一类具有特殊结构的蛋白质分子，其功能主要体现在与启动子顺式作用元件结合，精准的调控下游目标基因表达。NAC 作为植物特有的转录因子，常以保守的 N 端结构域和高度可变的 C 端转录激活域为特征，在调控植物的营养生长如种子的萌发[25]、衰老[26]等，生殖生长如开花[27]等，次生代谢产物的合成与积累以及生物/非生物胁迫应答响应过程中扮演重要的角色[28]。NAC 转录因子是植物体最大的基因家族之一，随着测序和转基因技术的推广，已有许多物种的 *NAC* 基因被报道，如拟南芥、水稻、大豆、烟草等[29]，但在药用植物中的研究依然较少，目前已公布的有丹参（84 个）[29]，板蓝根（96 个）[29]，黄芩（56 个）[29]。大花红景天作为典型的高原物种之一，研究仍比较薄弱。本研究克隆了 *RcNAC83* 基因的编码序列，分析了其表达模式和对盐胁迫下转 *RcNAC83* 基因丹参生长的影响，并利用染色体步移技术获取了启动子序列，试验结果进一步丰富了对植物 NAC 转录因子的认识，并有助于了解高原植物对特殊生境的适应性机制。

NAC 基因可作为正调控因子提高植物对干旱、盐、冷、创伤、病原菌等多种胁迫耐受性[30-33]，又可作为负调控因子降低相关基因的表达或活性成分的积累，如 *ATAF1* 和 *ATAF2* 基因可受到病原菌诱导表达，在拟南芥的抗病防御机制中起负调控作用，表现为过表达株系的抗病性减弱、抗病相关基因的表达量下调、敲除株系的抗性增强[34]；挪威云杉 *PaNAC03* 抑制 *CHS*、*F3'H*、*PaLAR3* 三个关键基因的表达，负调控类黄酮合成并引发胚胎发育异常[35]；过表达丹参 *NAC2* 能够下调转基因株系中关键基因 *CYP76AH1* 的表达量，从而降低丹参酮 I 和丹参酮 IIA 的含量[36]。本研究发现 *RcNAC83* 基因虽能受到 NaCl 的诱导，但对丹参盐胁迫的耐受性也起到负调控的作用，表现为转基因株系的生长更容易受到抑制，促进丙二醛、过氧化氢等含量的积累。推测原因可能是 *RcNAC83* 基因能够抑制下游盐胁迫应答途径中相关基因的表达，这与其 N 端的转录抑制结构域存在一定关系，如其基因全长在酵母中无转录激活功能。此外，*RcNAC83* 基因主要在根中表达，可能在大花红景天吸收土壤中的无机盐具有十分重要的作用，但持续高浓度的盐环境下，对于植物的生长产生了不可逆的破坏，从而使得高表达的 *RcNAC83* 基因不利于丹参的耐盐性。

NAC 转录因子调控植物生长发育和各种胁迫应答过程的机制复杂多样，一方面 NAC 对于下游基因的调控主要是通过控制表达，如丹参 NAC1 被紫外线 UV-B 诱导后，直接与 *PAL3* 和 *TAT3* 启动子的 CATGTG 和 CATGTC 基序结合，促进丹参酮 A 的生物合成[37]；MdNAC52 识别 *MdMYB9* 和 *MdMYB11* 的启动子，调节苹果花青素的积累[38]。另一方面 *NAC* 基因的表达可受到信号分子的调控，如干旱、盐、低温和植物激素（脱落酸、茉莉酸甲酯、乙烯）等[18, 39]。来自内在或外在的刺激会改变 *NAC* 基因的转录水平，表现出时间-空间特异性，精准的调控植物的生长[40]。这与 *NAC* 基因启动子序列有直接的联系，通过对 *RcNAC83* 启动子序列分析发现，ARE、ATCT-motif、CGTCA-motif、TGACG-motif 等元件可受到低氧、光和茉莉酸甲酯的诱导，在随后的表达谱中也进一步验证其可受到低温和激素强烈的诱导，说明 *RcNAC83* 可以直接参与信

号分子的响应。此外，在启动子区也发现了其他转录因子 MYC、MYB、WRKY 的识别调控元件，说明 *RcNAC83* 基因参与的调控网络十分复杂，存在分级调节。大花红景天在进化的过程中，逐渐形成对高原特殊环境的适应性，此机制涉及多个方面多条途径，其中 *RcNAC83* 基因的功能也许是不可或缺的。

参考文献

[1] Zhang J Q, Meng S Y, Wen J, Rao G Y, Chen S. DNA barcoding of *Rhodiola* (Crassulaceae): A case study on a group of recently diversified medicinal plants from the Qinghai-Tibetan Plateau. PLoS ONE, 2015, 10(3): e0119921

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2020 年版: 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020

Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People′s Republic of China 2020 edition: Volume 1. Beijing: China Medical Science Press, 2020

[3] Kosanovic D, Tian X, Pak O, Lai Y J, Hsieh Y L, Seimetz M, Weissmann N, Schermuly R T, Dahal B K. *Rhodiola*: An ordinary plant or a promising future therapy for pulmonary hypertension? A brief review. Pulmonary Circulation, 2013, 3(3): 499-506

[4] Dechaine E G, Forester B R, Schaefer H, Davis C C. Deep genetic divergence between disjunct refugia in the Arctic-alpine King′s Crown, *Rhodiola integrifolia* (Crassulaceae). PLoS ONE, 2013, 8(11): e79451

[5] Fu Y Y, Li L W, Hao S J, Guan R, Fan G Y, Shi C C, Wan H B, Chen W B, Zhang H, Liu G C, Wang J H, Ma L L, You J L, Ni X M, Yue Z, Xu X, Sun X, Liu X, Lee S M. Draft genome sequence of the Tibetan medicinal herb *Rhodiola crenulata*. Developmental Biology, 2017, 6(6): gix033

[6] Grech-Baran M, Sykłowska-Baranek K, Pietrosiuk A. Biotechnological approaches to enhance salidroside, rosin and its derivatives production in selected *Rhodiola* spp. in vitro cultures. Phytochem Reviews, 2015, 14(4): 657-674

[7] Xu B J, Chen B, Qi X L, Liu S L, Zhao Y B, Tang C, Meng X L. Genome-wide identification and expression analysis of *RcMYB* genes in *Rhodiola crenulata*. Frontiers in Genetics, 2022, 13: 831611

[8] Yang Q, Li B, Rizwan H M, Sun K, Zeng J, Shi M, Guo T X, Chen F X. Genome-wide identification and comprehensive analyses of NAC transcription factor gene family and expression analysis under *Fusarium kyushuense* and drought stress conditions in *Passiflora edulis*. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 972734

[9] Fu C, Liu M Y. Genome-wide identification and molecular evolution of *NAC* gene family in *Dendrobium nobile*. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1232804

[10] Souer E, Van H 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. Cell, 1996, 85(2): 159-170

[11] Pereira-Santana A, Alcaraz L D, Castano E, Sanchez-Calderon L, Sanchez-Teyer F, Rodriguez-Zapata L. Comparative genomics of NAC transcriptional factors in Angiosperms: Implications for the adaptation and diversification of flowering plants. PLoS ONE, 2015,10 (11): e0141866

[12] Bhatti M F. Comprehensive analyses of NAC transcription factor family in almond (*Prunus dulcis*) and their differential gene expression during fruit development. Plants(Basel), 2022, 10(10): 2200

[13] Wang W Q, Wang J, Wu Y Y, Li D W, Allan A C, Yin X R. Genome-wide analysis of coding and non-coding RNA reveals a conserved miR164-NAC regulatory pathway for fruit ripening. New Phytologist, 2020, 225(4): 1618-1634

[14] Liu W J, Mei Z X, Yu L, Gu T T, Li Z Q, Zou Q, Zhang S H, Fang H C, Wang Y C, Zhang Z Y, Chen X S, Wang N. The ABA-induced NAC transcription factor *MdNAC1* interacts with a bZIP-type transcription factor to promote anthocyanin synthesis in red-fleshed apples. Horticulture Research, 2023, 10(5):

uhad049

[15] Qin Y X, Zhang B, Wang Y N, Su R P. Characterization of *SEC14* family in wheat and the function of *TaSEC14-7B* in salt stress tolerance. Plant Physiology and Biochemistry, 2023, 202: 107926

[16] Zhang X M, Yu H J, Sun C, Deng J, Zhang X, Liu P, Li Y Y, Li Q, Jiang W J. Genome-wide characterization and expression profiling of the NAC genes under abiotic stresses in *Cucumis sativus*. Plant Physiology and Biochemistry, 2017, 113: 98-109

[17] Chen Y H, Huang Q H, Hua X, Zhang Q, Pan W J, Liu G Y, Yu C M, Zhong F, Lian B L, Zhang J. A homolog of AtCBFs, SmDREB A1-4, positively regulates salt stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Salix matsudana*. Plant Physiology and Biochemistry, 2023, 202: 107963

[18] Xi Y, Ling Q Q, Zhou Y, Liu X, Qian Y X. *ZmNAC074*, a maize stress-responsive NAC transcription factor, confers heat stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 986628

[19] 赵为, 邓科君, 杨足君, 周建平, 任正隆. 景天科植物基因组 DNA 的高效提取方法. 安徽农业科学, 2006, 34(22): 5804-5805

Zhao W, Deng K J, Yang Z J, Zhou J P, Ren Z L. An effective method of DNA extraction from crassulaceae plant. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2006, 34(22): 5804-5805

[20] 张力鹏, 张银兴, 宋文芹, 陈成彬. 红景天属植物叶片 RNA 高效提取的方法. 南开大学学报: 自然科学版, 2017, 50(6): 48-53

Zhang L P, Zhang Y X, Song W Q, Chen C B. A highly efficient method of RNA extraction from *Rhodiola* plant. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis, 2017, 50(6): 48-53

[21] 王宏鹏, 成璐路, 滕彦娇, 陈成彬, 张力鹏. 西藏大花红景天 *RcUDPGTs* 基因克隆与表达分析. 药学学报, 2021, 56(7): 2015-2024

Wang H P, Cheng L L, Teng Y J, Chen C B, Zhang L P. Cloning and expression analysis of *RcUDPGTs* genes in Tibetan *Rhodiola crenulata*. Acta Pharmaceutica Sinica, 2021, 56(7): 2015-2024

[22] Zhang L P, Wu M, Yu D S, Teng Y J, Wei T, Chen C C, Song W Q. Identification of glutathione peroxidase (GPX) gene family in *Rhodiola crenulata* and gene expression analysis under stress conditions. International Journal of Molecular sciences, 2018, 19(11): 3329

[23] Zhang L P, Wu M, Teng Y J, Jia S H, Yu D S, Wei T, Chen C C, Song W Q. Overexpression of the glutathione peroxidase 5 (*RcGPX5*) gene from *Rhodiola crenulata* increases drought tolerance in *Salvia miltiorrhiza*. Frontiers in Plant Science, 2019, 9: 1950

[24] 滕彦娇, 王宏鹏, 王菁, 宋文芹, 陈成彬, 张力鹏. 大花红景天内参基因筛选与 POD 基因表达分析. 中药材, 2021, 44(6): 1343-1349

Teng Y J, Wang H P, Wang J, Song W Q, Chen C B, Zhang L P. Study on the screen of reference genes in *Rhodiola crenulata* and the analysis of POD gene expression. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2021, 44(6): 1343-1349

[25] Sun H, Hu M L, Li J Y, Chen L, Li M, Zhang S Q, Zhang X L, Yang X Y. Comprehensive analysis of NAC transcription factors uncovers their roles during fiber development and stress response in cotton. BMC Plant Biology, 2018, 18(1): 150

[26] Guo Y F, Gan S S. AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. The Plant Journal, 2006, 46(4): 601-612

[27] Xu B, Sathitsuksanoh N, Tang Y, Udvardi M K, Zhang J Y, Shen Z, Balota M, Harich K, Zhang Y H, Zhao B. Overexpression of *AtLOV1* in switchgrass alters plant architecture, lignin content, and flowering time. PLoS ONE, 2012, 7(12): e47399

[28] 陆海芹, 李娜, 蒋凯旋, 王幼平, 蒋金金. NAC 转录因子调控植物生长发育和胁迫应答的研究进展. 植物生理学报, 2024, 60(2): 271-283

Lu H Q, Li N, Jiang K X, Wang Y P, Jiang J J. Research advances on NAC transcription factors regulating plant development and stress responses. Plant Physiology Journal, 2024, 60(2): 271-283

[29] 徐世强, 李静宇, 孙铭阳, 顾艳, 王继华. 穿心莲 NAC 基因家族的鉴定与表达分析. 中国农学通报, 2024, 40(36): 117-125

Xu S Q, Li J Y, Sun M Y, Gu Y, Wang J H. Identification and expression analysis of NAC gene family in *Andrographis paniculate*. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 40(36): 117-125

[30] Sakuraba Y, Kim Y S, Han S H, Lee B D, Paek N C. The Arabidopsis transcription factor NAC016 promotes drought stress responses by repressing *AREB1* transcription through a trifurcate feed-forward regulatory loop involving NAP. Plant Cell, 2015, 27(6): 1771-1787

[31] Li M, Wu Z Y, Gu H,Cheng D W, Guo X Z, Li L, Shi C Y, Xu G Y, Gu S C,Abid M, Zhong Y P, Qi X J, Chen J Y. *AvNAC030*, a NAC domain transcription factor, enhances salt stress tolerance in Kiwifruit. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(21): 11897

[32] 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. Plants (Basel), 2023, 12(6): 1393

[33] 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. Plant Molecular Biology, 2010, 72(4-5): 567-568

[34] Wang X E, Basnayake B M V S, Zhang H J, Li G J, Li W, Virk N, Mengiste T, Song F M.The *Arabidopsis* ATAF1, a NAC transcription factor, is a negative regulator of defense responses against necrotrophic fungal and bacterial pathogens. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2009, 22(10): 1227-1238

[35] Dalman K, Wind J J, Nemesio-Gorriz M, Hammerbacher A, Lunden K, Ezcurra I, Elfstrand M. Overexpression of *PaNAC03*, a stress induced NAC gene family transcription factor in Norway spruce leads to reduced flavonol biosynthesis and aberrant embryo development. BMC Plant Biology, 2017, 17(1): 6

[36] Zhang H H, Xu J F, Chen H M, Jin W B, Liang Z S. Characterization of NAC family genes in *Salvia miltiorrhiza* and NAC2 potentially involved in the biosynthesis of tanshinones. Phytochemistry, 2021, 191: 112932

[37] Yin X J, Fan H, Chen Y, Li L Z, Song W, Fan Y M, Zhou W, Ma G X, Alolga R N, Li W Q, Zhang B L, Li P, Tran L S P, Lu X, Qi L W. Integrative omic and transgenic analyses reveal the positive effect of ultraviolet irradiation on salvianolic acid biosynthesis through up-regulation of *SmNAC1*. The Plant Journal, 2020, 104(3): 781-799

[38] Sun Q G, Jiang S H, Zhang T L, Xu H F, Fang H C, Zhang J Su M Y, Wang Y C, Zhang Z Y, Wang N, Chen X S. Apple NAC transcription factor *MdNAC52* regulates biosynthesis of anthocyanin and proanthocyanidin through *MdMYB9* and *MdMYB11*. Plant Science, 2019, 289: 110286

[39] Kim Y S, Kim S G, Park J E, Park H Y, Lim M H, Chua N H, Park C M. A membrane-bound NAC transcription factor regulates cell division in *Arabidopsis*. The Plant Cell, 2006, 18(11): 3132-3144

[40] Lee D K, Chung P J, Jeong J S, Jang G, Bang S W, Jung H, Kim Y S, Ha S H, Choi Y D, Kim J K. The rice *OsNAC6* transcription factor orchestrates multiple molecular mechanisms involving root structural adaptions and nicotianamine biosynthesis for drought tolerance. Plant Biotechnology Journal, 2017, 15(6): 754-764