

油茶 NAC 基因鉴定及对干旱胁迫响应分析

曹瑞兰¹, 李知青¹, 欧阳雯婷², 胡冬南¹, 周增亮¹, 苏文娟¹, 陈霞¹, 刘娟^{1*}

(1.江西农业大学林学院江西省森林培育重点实验室,南昌 330045; 2.福建农林大学林学院, 福建 350028)

摘 要:【目的】NAC 是参与调控植物逆境胁迫反应的一类特异转录因子, 在植物应对干旱胁迫中具有重要的调控作用。油茶是南方丘陵山地重要的经济树种, 主产区夏季干旱严重影响了油茶生产。研究油茶应对干旱胁迫的响应机制具有重要意义。【方法】为明确油茶 NAC 基因家族成员并探究其应对干旱胁迫响应的表达特征, 本研究以油茶全长转录组为参考, 通过蛋白序列比对和保守功能域, 鉴定了 67 个 CoNAC 基因家族成员, 进一步明确了各基因的结构、理化性质、系统进化关系、亚细胞定位, 基于油茶干旱转录组数据, 明确各 CoNAC 在油茶不同干旱程度和复水下的表达水平, 并采用 qPCR 对 CoNAC 在不同油茶品种和不同干旱胁迫程度下的表达特征进行验证。【结果】根据系统发育关系, 67 个 CoNAC 可分为 17 个亚类, ANAC2 亚类最多, 有 13 个成员。亚细胞定位预测表明, 大部分 CoNAC 蛋白都定位在细胞核, 少数定位在细胞质、线粒体、叶绿体或细胞外。基于不同干旱程度和复水的干旱转录组数据, CoNAC 基因间的表达模式存在一定差异, 且发现在中度干旱、重度干旱胁迫时期, CoNAC28、CoNAC51、CoNAC52、CoNAC56、CoNAC60 和 CoNAC61 等基因随着干旱胁迫程度加强, 其表达量持续增加。在复水后, CoNAC28、CoNAC51、CoNAC52、CoNAC56、CoNAC60、和 CoNAC61 等基因均无表达或表达呈明显下降趋势。qPCR 验证结果显示, 长林 53 油茶品种中, 6 个 CoNAC 基因在干旱处理时表达量均呈显著上调趋势, 其表达量都表现出先上升后下降的趋势。长林 18 油茶中, CoNAC28、CoNAC56、CoNAC60 和 CoNAC61 基因在干旱胁迫下的表达量均呈显著上调趋势。【结论】CoNAC 基因表达受不同程度干旱胁迫的调控, 且其表达模式和表达水平在不同油茶品种间存在差异, 表明油茶不同品种的耐旱性不同。本研究为油茶 NAC 转录因子进一步功能分析奠定了理论基础, 为油茶耐旱性的遗传改良提供参考依据。

关键词:油茶; NAC 基因家族; 生物信息学分析; 干旱胁迫

Identification of NAC Gene in *Camellia oleifera* and Analysis of its response to drought stress

Abstract: [Objective] NAC is a kind of specific transcription factors which is involved in the regulation of plant stress response. It plays an important role in the regulation of plants in response to drought stress. *Camellia oleifera* is an important economic tree species in southern hills and mountains. the summer drought in the main producing areas has seriously affected the production of *C. oleifera*. It is of great significance to study the response mechanism of *C. oleifera* to drought stress. [Method] In order to explore the expression characteristics of NAC gene family members of *C. oleifera* to resistance drought stress, the full-length transcriptome of *C. oleifera* was used as a reference, through protein sequence alignment and conserved functional domain. 67 members of CoNAC gene family were identified, and the structure, physical and chemical properties, phylogenetic relationship and subcellular location of each gene were further identified. Based on the data of *Camellia oleifera* drought transcriptome, the expression levels of CoNAC in *C. oleifera* under different drought degrees and rewatering were determined. And qPCR was used to verify the expression characteristics of CoNAC in different *C. oleifera* varieties and different degrees of drought stress. [Result] According to the phylogenetic relationships, 67 NAC genes were divided into 17 subfamilies, of which ANAC2 subclass with 13 members is the most. The prediction

基金项目: 江西省林业科技创新专项(No. 创新专项[2019]23 号); 国家重点研发计划课题(No. 2018YFD1000603); 国家自然科学基金项目(No. 31760223)

Jiangxi Province Forestry Science and Technology Innovation Project (No. Innovation Special Project [2019] No. 23); National Key Research and Development Program Project (No. 2018YFD1000603); National Natural Science Foundation of China (No. 31760223)

作者简介:*刘娟为通信作者

of subcellular localization showed that most of the CoNAC proteins were located in the Nucleus and a few were located in the cytoplasm, mitochondria, chloroplasts or extracellular. Based on the drought transcriptome data of different drought degrees and rewatering, there were some differences in the expression patterns of most CoNAC genes. It was also found that during the period of moderate and severe drought stress, the genes CoNAC28, CoNAC51, CoNAC52, CoNAC56, CoNAC60 and CoNAC61 increased with the degree of drought stress, Its expression continued to increase. After rehydration, CoNAC28, CoNAC51, CoNAC52, CoNAC56, CoNAC60 and CoNAC61 genes were not expressed or decreased significantly. qPCR verification results show, In ‘Changlin 53’, the expression of six CoNAC genes was significantly up-regulated under drought treatment, and the expression increased at first and then decreased. In ‘Changlin 18’, the expressions of CoNAC28, CoNAC56, CoNAC60 and CoNAC61 genes were significantly up-regulated under drought stress. [Conclusion] the results show that the expression of CoNAC gene was regulated by different level of drought stress, and its expression pattern varied among different *C. oleifera* varieties, which indicated different *C. oleifera* varieties have different drought tolerance. This study laid a theoretical foundation for further functional analysis of NAC transcription factors in *C. oleifera* and provided a reference basis for genetic improvement of drought tolerance in *C. oleifera*.

Keywords: *Camellia oleifera*; NAC gene family; bioinformatics analysis; drought stress

油茶 (*Camellia oleifera* Abel.)，是我国特有的木本油料树种，与油橄榄、油棕和椰子并称为世界四大木本油料植物，综合利用价值极高^[1, 2]。油茶生长在山地或丘陵地带，适生性强，耐干旱贫瘠，且不与粮棉争耕地，近年来已成为我国南方山区重点发展的油料作物。发展油茶产业也成为保障国家粮油安全、提高食用油自给率的重要途径。截至 2019 年底，我国油茶种植面积约 6800 万亩，其中高产油茶林 1400 万亩，产油 62.7 万吨，全国油茶产业总产值达到 1160 亿元^[3]。

干旱是影响植物生长发育的主要逆境胁迫之一，也是全球作物栽培面临的最严重的环境压力之一^[4]。油茶是我国南方山地的乡土树种，一般认为其耐旱性较强，但是其主产区在 6–9 月常出现持续干旱，同时伴随着极端高温，这将严重影响油茶的集约化栽培和生产^[5]。干旱胁迫将降低油茶光合效率，影响花芽分化和油脂转化，导致大量落花落果，进而造成油茶林大面积减产^[6]。民间谚语“七月干果、八月干油”，说的就是夏季高温干旱对油茶产量和茶油品质的影响。大量研究发现，在长期进化过程中，油茶已形成一系列形态、生理机制来应对或适应干旱胁迫，例如，通过促进根系生长，提高根冠比^[7]；关闭部分叶片气孔，破坏光合色素，降低光合效率，减缓植株生长^[8]；减小花芽分化，降低油脂转化，抑制生殖生长等^[9]。在分子调控水平上，诱导或抑制一系列干旱胁迫相关的基因表达，这包括直接参与干旱胁迫相关基因，以及调节这些基因表达水平的转录因子。

NAC 转录因子家族是植物界数量最大、分布最广的转录因子家族之一，主要参与调控植物的生长发育和形态建成^[10–12]。Souer 和 Aida 等^[13, 14]先后从矮牵牛和拟南芥中发现了 *NAM*、*ATAF1/2* 和 *CUC2* 等三个 NAC 转录因子。序列比对分析结果发现，*NAM*、*ATAF1/2* 和 *CUC2* 所编码的蛋白质具有较高的同源性。即使它们有不同的生物学功能，但其 N 端结构相似，故以其首字母命名为 NAC^[15]。研究发现 NAC 家族 *NAM* 和 *CUC* 基因对顶端分生组织的形成和分化具有重要调控作用^[16]，启动子区富含逆境响应元件，如低温响应元件^[17]、干旱响应元件^[18]、损伤响应元件^[19]等，是植物应答生物或非生物胁迫的重要方式之一。研究表明，NAC 转录因子在植物应对干旱的过程中具有重要的调节作用。例如，Hu 等^[20]发现，NAC 转录因子能在气孔保卫细胞中被诱导表达，调控叶片气孔运动，进而提高植株抗旱性。Duan 等^[21]研究表明，苜蓿在受到干旱胁迫时，*MfNACsa* 去棕榈酰化易位至细胞核，通过调节相关基因表达维持植株体内谷胱甘肽库处于

还原状态, 保证植株在干旱胁迫下正常生长发育。拟南芥中转录因子 *ANAC096* 与 *ABRE* 结合蛋白共同激活植株体内 ABA 诱导基因, 促使植株体内 ABA 合成, 保证在干旱时植株体内渗透压平衡, 增加抗旱性^[22]。

本研究从课题组油茶三代全长转录组数据分离得到 *CoNAC* 转录因子家族成员, 明确各个基因的系统发育进化关系、理化性质、Motif 预测、亚细胞定位等, 并基于油茶干旱转录组数据, 分析 *CoNAC* 在不同干旱胁迫程度和复水下的表达水平, 最后采用 q-PCR 验证 *CoNAC* 家族成员在不同油茶品种和不同干旱胁迫强度下的表达特征, 进而探讨油茶响应干旱胁迫的分子调控机理, 为水分高效利用油茶基因型的筛选提供了理论基础和科学依据, 具有重要的现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料

取生长较一致的一年生油茶苗为试验材料, 供试品种为长林 18 和长林 53, 2019 年 7-9 月在江西农业大学科技园大棚内进行盆栽试验, 每 3 株一盆, 每盆装相等的质量的河沙为基质, 测定土壤田间持水量和含水量。试验设置充分供水 (对照)、自然干旱 (8 天)、复水 (自然干旱 8 天后) 3 个处理。采用称重控水法于每天下午 5 点称重测定土壤含水量, 并将同一处理补水至相同含水量值。实验对照组的土壤含水量维持在田间持水量的 85%~90%; 处理组土壤经自然干旱, 第 8 天时土壤含水量下降至田间持水量的 35%, 处理第 9 天复水至对照水平。分别在处理前、处理第 8 天、复水后第 5 天采样, 采样时间为每天上午 8 点到 9 点。采集油茶苗幼叶, 立即放入液氮中冷冻, 然后置于 -80℃ 冰箱冷藏, 直至 RNA 提取。

1.2 方法

1.2.1 油茶 NAC 基因家族成员的筛选及基本信息分析

下载拟南芥 NAC 蛋白序列 (<https://www.arabidopsis.org/>) 和茶树 NAC 蛋白序列^[23], 使用本地 blast-2.9.0+ 程序中 tblastn 对课题组已有的油茶三代测序转录组数据进行检索, 参数设置为 -evalue 1e-5, -max_target_seqs 100, -outfmt 6。随后, 将初始搜索中鉴定出的所有油茶 NAC 基因序列上传至 NCBI 数据库中的 CDD (<http://www.ncbi.nih.gov/structure/cdd/wrpsb.cgo>) 进行在线验证, 确定存在 NAC 结构域, 去除冗余和无效基因模型。将 CDD 验证的所有候选基因上传到 ORFfinder (<http://www.ncbi.nih.gov/orffinder/>), 获得 CDS 序列和氨基酸序列。最后将这些氨基酸序列再次使用 CDD 和 Pfam 验证, 得到油茶 NAC 基因家族候选基因。ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>) 在线分析分子量 (MW)、理论等电点 (pI) 等基因的一级结构, 利用 CELLO v.2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) 进行亚细胞定位预测。

1.2.2 多序列比对及系统进化树构建

利用 ClustalX2.1 软件将本研究鉴定出的油茶 *CoNAC* 蛋白序列同拟南芥 (*A. thaliana*) 和茶树 (*C. sinensis*) 的 NAC 蛋白序列进行多重比对分析, 然后运用 MEGA10.0 软件打开, 在氨基酸序列中使用邻近法 (Neighbor-Joining method) 构建系统进化树, 参数设置为泊松矫正 (Poisson correction)、成对删除 (pairwise deletion) 和 1000 次重复的 Bootstrap 值。使用在线程序 iTOL (<https://itol.embl.de/>) 对进化树进行美化。根据序列比对结果和进化树, 通过引进已知亚家族分类的拟南芥 NAC 蛋白和茶树 NAC 蛋白的 NAC 区域, 分类方法综合 Ooka^[24] 文献, 对油茶 NAC 基因进行亚家族的分类。

1.2.3 基因家族保守结构域分析

利用保守元件分析工具 MEME5.0.5 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 在线对油茶 NAC 家族蛋白进行保守序列分析, 设定参数 motif 的最大数目为 20, motif 长度设置为 6~60 个氨基酸, 其他则为默认值。使用

TBtools软件绘图。

1.2.4 基因表达谱分析

根据已发表的油茶干旱转录组数据，使用 Galaxy 生信在线分析平台的 Salmon quant 工具进行转录组reads的mapping，将不同处理的所有可用读取数据分别映射到对应的转录组数据库，计算油茶 NAC 基因的 TPM 值，最后使用 TBtools 绘制表达图谱。

1.2.5 候选基因的表达模式分析

提取油茶长林18和长林53幼叶在不同试验处理下的RNA，使用iScript™ cDNA Synthesis Kit进行cDNA的合成，于 -20℃保存，用于差异表达分析。挑选 CoNAC28、CoNAC51、CoNAC52、CoNAC56、CoNAC60和 CoNAC61 基因进行 q-PCR 验证，引物序列如表1所示，内参基因为EF1a1。将所有样品都放在冰盒，按照所需的反应体系进行实验，每个样品设置3个重复。设置好荧光定量仪程序，待反应结束后，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行计算实时荧光定量反应中候选基因的相对表达量。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物
Table 1 Primers for quantitative real-time PCR

基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	目的产物 Product
CoNAC28	F:TCAAGAGTGGCCAGGCTTAC R:TGTATCTTCCGACGCTTCCG	270
CoNAC51	F:TCAAAGCCCTCCCCTGTTTC R:GATCCACAGGCCAGTTGAA	298
CoNAC52	F:CTGTGCTAGAGCCATCGGAG R:TCTTGGGGCTTCTTGTCGTC	576
CoNAC56	F:GAGCGCCCAAAAACCCATTT R:CACTGCCGAAACCCAAACAG	501
CoNAC60	F:GGTTTGGCCTTGTATGGGGA R:GCTAGCCTGTACTCGTGCAT	236
CoNAC61	F:TTTTACGCCGAAAAGCACC R:ATTGACGTGGCCTCGTATCC	251
EF1a1	F:CAAAGAAGGGTGCCAAGTGA R:ACCAAACAACCGACCTACGA	128

2 结果与分析

2.1 油茶 NAC 家族的筛选与基本信息分析

本研究在已成功构建的 RNA-seq 本地 blast 文库的基础上进行 NAC 基因相似序列检索与搜索，经 CCD 和 Pfam 在线数据库进一步筛选分析后最终确定了 67 个含有 NAC 保守结构域的序列。根据转录组数据库中的 unigenes 编号大小对 67 个 NAC 基因进行编号，即 CoNAC1~CoNAC67 (表 2)。油茶 NAC 蛋白质理化性质分析显示，67 个 CoNAC 基因大小为 423 (CoNAC48)~1911 (CoNAC7) bp，编码的氨基酸长度在 140 (CoNAC48)~636 (CoNAC7)之间，这些油茶 NAC 蛋白的氨基酸长度变化差异较大；相对分子质量介于 15.65 (CoNAC48)~388.73 (CoNAC13) ku，与氨基酸含量成正比；等电点分布在 4.54 (CoNAC11)~9.65 (CoNAC65) 之间，其中 26 个为碱性蛋白质 (pI>7)，41 个为酸性蛋白质 (pI<7)；有 18 个 CoNAC 的不稳定指数均小于 40，是稳定蛋白，约占 NAC 基因家族的 26.87%。CoNAC 成员的总平均亲水系数

(GRAVY 值) 都小于 0, 因此推断这些油茶 NAC 家族蛋白表现均为亲水蛋白, 并且多数稳定。亚细胞定位预测表明, 除了 *CoNAC24* 定位在叶绿体和细胞核其余的油茶 *CoNAC* 蛋白都定位在细胞核。

表 2 油茶 NAC 蛋白基本信息

Table 2 Basic information of *C. oleifera* NAC proteins

基因 Gene	编码序 列 CDS(bp)	开放阅读 框 ORF(aa)	分子量 MW(kD)	等 电点 pI	不稳定系数 Instability index	脂肪系数 Aliphatic index	平均亲水系 数 GRAVY	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>CoNA</i> <i>C1</i>	1098	365	41.35289	5.7 7	47.09	78.25	-0.511	Nucleus
<i>CoNA</i> <i>C2</i>	1656	551	61.6185	4.7 1	36.46	65.70	-0.538	Nucleus
<i>CoNA</i> <i>C3</i>	1683	560	62.69583	4.7 2	37.71	67.25	-0.527	Nucleus
<i>CoNA</i> <i>C4</i>	1677	558	62.34645	4.7 7	36.75	66.61	-0.522	Nucleus
<i>CoNA</i> <i>C5</i>	1341	446	52.70569	4.7 5	28.36	68.39	-0.574	Nucleus
<i>CoNA</i> <i>C6</i>	1404	467	51.228	9.0 6	35.47	73.32	-0.676	Nucleus
<i>CoNA</i> <i>C7</i>	1911	636	71.69433	4.8 0	41.26	69.26	-0.659	Nucleus
<i>CoNA</i> <i>C8</i>	1749	582	64.61382	4.9 9	40.54	69.73	-0.593	Nucleus
<i>CoNA</i> <i>C9</i>	1404	467	51.22702	9.1 2	35.97	73.32	-0.676	Nucleus
<i>CoNA</i> <i>C10</i>	1890	629	70.6232	4.8 5	42.92	68.49	-0.61	Nucleus
<i>CoNA</i> <i>C11</i>	1437	478	52.84271	4.5 4	34.93	69.96	-0.448	Nucleus
<i>CoNA</i> <i>C12</i>	1899	632	70.96056	4.8 5	41.77	68.47	-0.616	Nucleus
<i>CoNA</i> <i>C13</i>	1023	340	388.7333	6.0 9	51.45	49.24	-0.777	Nucleus
<i>CoNA</i> <i>C14</i>	1092	363	41.15577	5.2 0	47.04	52.01	-0.696	Nucleus
<i>CoNA</i> <i>C15</i>	1683	560	62.54586	4.7 7	36.02	68.61	-0.464	Nucleus
<i>CoNA</i> <i>C16</i>	1623	540	60.64119	5.8 5	39.40	78.31	-0.466	Nucleus
<i>CoNA</i> <i>C17</i>	1281	426	48.20273	4.8 7	47.27	71.34	-0.734	Nucleus
<i>CoNA</i> <i>C18</i>	1203	400	44.92557	6.7 2	44.63	60.00	-0.603	Nucleus
<i>CoNA</i> <i>C19</i>	1194	397	44.76814	5.3 8	48.46	70.00	-0.658	Nucleus
<i>CoNA</i> <i>C20</i>	1125	374	42.26791	7.7 1	61.82	57.86	-0.849	Nucleus
<i>CoNA</i> <i>C21</i>	1224	407	45.80752	5.5 4	46.64	70.25	-0.689	Nucleus
<i>CoNA</i> <i>C22</i>	972	323	35.43611	6.5 9	52.05	77.86	-0.21	Nucleus
<i>CoNA</i> <i>C23</i>	819	272	30.47321	7.9 4	42.46	57.28	-0.887	Nucleus
<i>CoNA</i> <i>C24</i>	975	324	35.68541	6.3 8	53.27	80.59	-0.185	Nucleus Chloroplast,
<i>CoNA</i> <i>C25</i>	1275	424	47.93137	4.8 7	47.99	69.60	-0.753	Nucleus
<i>CoNA</i> <i>C26</i>	960	319	35.13274	6.3 3	51.87	77.90	-0.219	Nucleus
<i>CoNA</i> <i>C27</i>	1164	387	43.91964	6.6 8	59.29	72.53	-0.646	Nucleus

CoNA				8.2				
C28	837	278	31.43458	0	42.26	65.43	-0.758	Nucleus
CoNA				6.0				
C29	594	197	21.99678	7	41.80	74.77	-0.44	Nucleus
CoNA				6.1				
C30	1098	365	40.59863	2	44.48	65.78	-0.698	Nucleus
CoNA				4.6				
C31	945	314	35.09683	7	37.66	56.53	-0.787	Nucleus
CoNA				8.8				
C32	876	291	32.98727	5	48.84	63.92	-0.828	Nucleus
CoNA				6.1				
C33	903	300	34.42317	9	53.74	58.60	-0.686	Nucleus
CoNA				8.1				
C34	1092	363	40.99698	2	39.45	70.94	-0.655	Nucleus
CoNA				8.9				
C35	696	231	26.24167	8	46.69	63.20	-0.626	Nucleus
CoNA				8.6				
C36	1212	403	46.16577	7	54.54	78.34	-0.52	Nucleus
CoNA				6.6				
C37	882	293	33.41904	7	54.15	63.96	-0.619	Nucleus
CoNA				6.1				
C38	987	328	38.0036	2	43.40	79.94	-0.448	Nucleus
CoNA				9.0				
C39	786	261	30.0191	8	45.03	63.03	-0.513	Nucleus
CoNA				8.0				
C40	702	233	26.69318	4	48.73	64.81	-0.63	Nucleus
CoNA				8.8				
C41	888	295	33.26033	7	38.25	63.80	-0.824	Nucleus
CoNA				4.6				
C42	1230	409	45.82879	9	40.77	65.55	-0.679	Nucleus
CoNA				5.6				
C43	498	165	18.45746	8	62.61	60.85	-0.731	Nucleus
CoNA				6.4				
C44	660	219	25.00201	5	33.34	60.85	-0.797	Nucleus
CoNA				5.2				
C45	996	331	38.73294	4	48.01	57.43	-0.985	Nucleus
CoNA				7.0				
C46	741	246	27.83922	3	55.55	55.89	-0.742	Nucleus
CoNA				9.4				
C47	561	186	21.28826	1	37.39	63.44	-0.656	Nucleus
CoNA				5.0				
C48	423	140	15.65498	0	54.38	42.64	-0.885	Nucleus
CoNA				9.5				
C49	705	234	26.56851	2	43.88	60.73	-0.617	Nucleus
CoNA				7.7				
C50	1167	388	43.92922	2	57.29	63.12	-0.672	Nucleus
CoNA			39.50864	6.3				
C51	1041	346	5	8	43.46	60.87	-0.674	Nucleus
CoNA				6.3				
C52	1002	333	38.26488	3	39.68	57.12	-0.870	Nucleus
CoNA				8.7				
C53	1212	403	46.23782	1	57.12	78.34	-0.519	Nucleus
CoNA				8.7				
C54	723	240	27.36882	7	53.74	60.50	-0.693	Nucleus
CoNA				9.2				
C55	639	212	24.60106	0	26.72	52.45	-0.83	Nucleus
CoNA				8.7				
C56	993	330	37.14167	5	35.89	61.73	-0.638	Nucleus
CoNA				7.1				
C57	843	280	32.25665	3	45.89	64.75	-0.677	Nucleus
CoNA				7.9				
C58	912	303	34.45441	7	43.67	61.39	-0.503	Nucleus
CoNA				7.0				
C59	876	291	33.48401	6	45.18	69.04	-0.638	Nucleus
CoNA				9.5				
C60	537	178	20.70373	3	43.59	64.21	-0.847	Nucleus

<i>CoNA</i>				6.4				
<i>C61</i>	846	281	32.11737	0	51.09	58.40	-0.725	Nucleus
<i>CoNA</i>				4.8				
<i>C62</i>	1281	426	48.18471	7	48.77	71.10	-0.736	Nucleus
<i>CoNA</i>				5.1				
<i>C63</i>	1275	424	47.73311	0	46.33	68.16	-0.799	Nucleus
<i>CoNA</i>				5.5				
<i>C64</i>	990	329	37443.72	8	47.92	50.27	-0.722	Nucleus
<i>CoNA</i>				9.6				
<i>C65</i>	453	150	17.30967	5	36.26	61.81	-0.783	Nucleus
<i>CoNA</i>				4.8				
<i>C66</i>	1908	635	71.33404	6	41.74	67.53	-0.613	Nucleus
<i>CoNA</i>				8.5				
<i>C67</i>	702	233	26.6312	2	48.65	66.48	-0.615	Nucleus

2.2 油茶 NAC 蛋白保守结构域分析

保守结构域是蛋白质中能够折叠成特定三维结构的一段相对区域，其结构亚单位称为基序 (motif)，组成这些基序的氨基酸区段行使特异的功能，并蕴含各自的遗传进化信息^[26]。通过 GeneDoc 软件对油茶 NAC 转录因子进行序列比对 (图 1)，发现油茶 NAC 转录因子的蛋白质的 N 端存高度保守的 NAC 结构域 (约 150~160 个氨基酸)，这与拟南芥也相吻合^[24, 27]。此外，油茶 NAC 家族成员中除了少数基因具有不完整的 NAC 结构域外，大多数基因具有 5 个保守的亚结构域 (A~E)，说明 CoNAC 基因在进化过程中具有高度保守性。

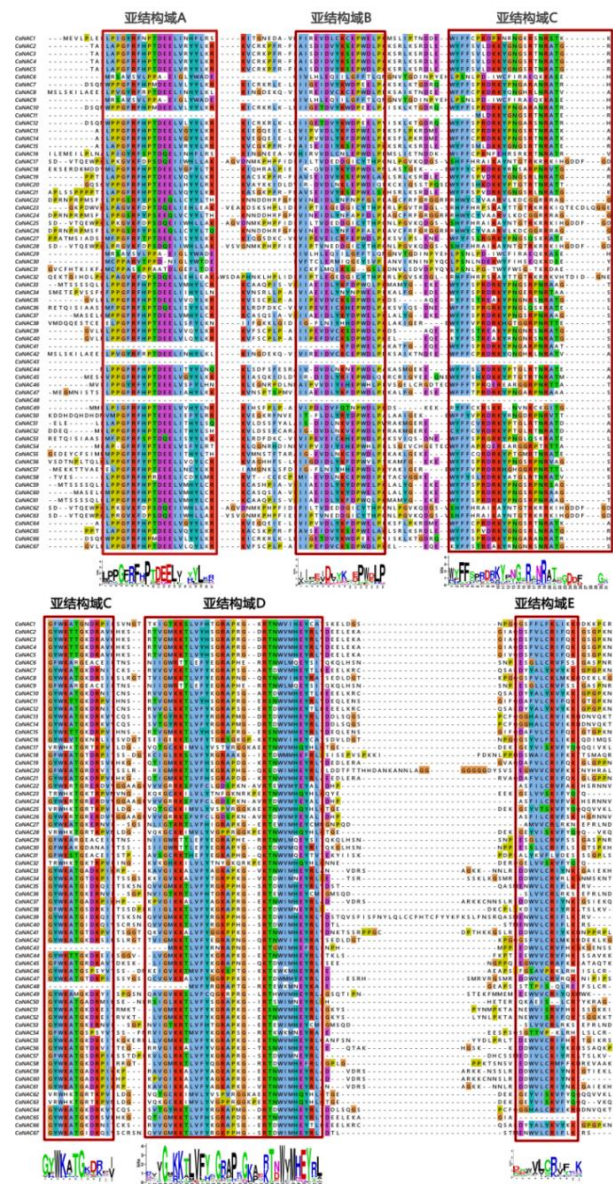


图1 油茶 *NAC* 蛋白序列比对
Fig. 1 Sequence alignment of *C. oleifera* *NAC* proteins

注：红色线框圈出的位置代表不同的亚结构域 A~E，线框下方的 Logo 代表对应亚结构域的保守序列。

Note: the positions circled in the red wireframe represent different substructural domains of A~E, and the Logo below the wireframe represents the conservative sequence of the corresponding subdomains.

2.3 油茶 *NAC* 蛋白 motif 分析

CoNAC 基因家族中选用了 20 个 Motif 对油茶的 *NAC* 蛋白分析显示 (图 2)，油茶 *NAC* 家族单独建树与拟南芥、茶树和油茶共同构建的物种间系统进化树总体趋势相吻合 (图 3)，表明通过建树预测基因功能稳定可靠。按照 motif 在 CoNAC 基因家族中出现次数进行排序，其中 motif 5 出现 65 次，motif 6 出现 62 次，motif 1 出现 58 次，motif 2 和 motif 4 出现 56 次，motif 7 和 motif 10 出现 12 次，motif 12 和 motif 13 出现 7 次，motif 8 和 motif 9 出现 6 次，motif 11、motif 14、motif 19 和 motif 20 出现 5 次，motif 15、motif 16、motif 17 和 motif 18 出现 4 次，motif 在 CoNAC 基因家族中出现频率越高说明其越重要。通过分析 motif 与蛋白结构域，发现 motif 5、6、1、2、3 和 4 分别对应 CoNAC 转录因子 N 端 5 个保守

的亚结构 A~E。

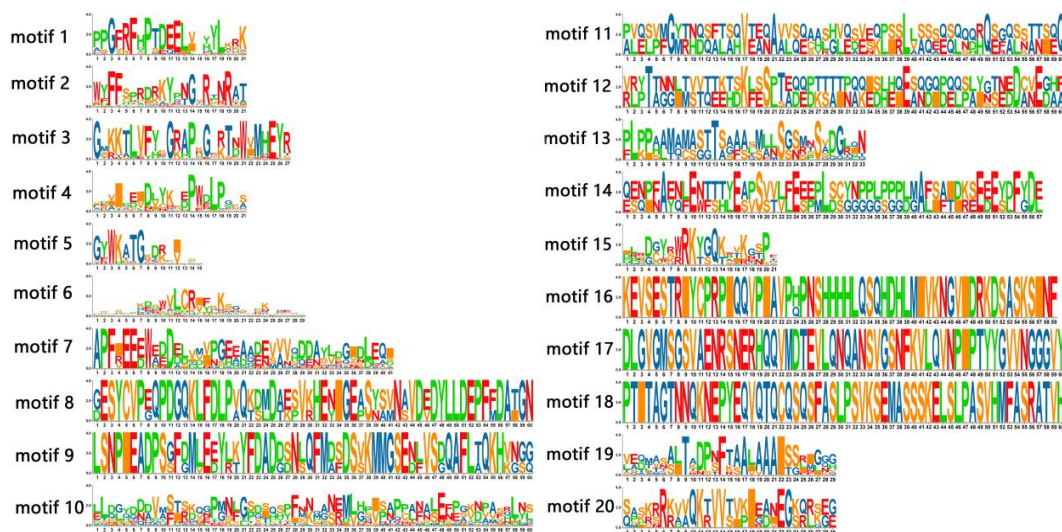


图 2 油茶中 NAC 蛋白保守基序
Fig. 2 Sequence logos of CoNAC domains in *C. oleifera*

注: Motif 1~20 代表不同的保守氨基酸序列, 每个 motif 中不同位置处出现的氨基酸种类越少, 说明该位置处保守性越高。

Note: Motif1~20 represents different conservative amino acid sequences, and the fewer amino acids that appear at different positions in each motif, the more conserved it is.

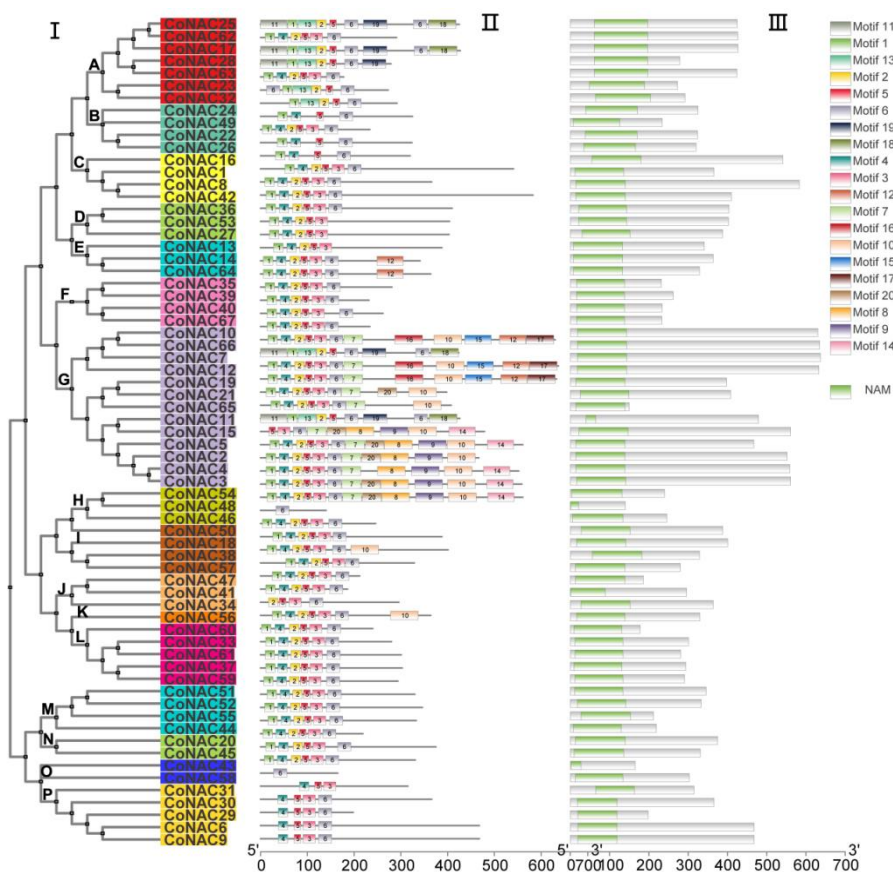


图 3 NAC 基因家族成员保守基序分析

Fig. 3 Distribution of conserved motifs in the NAC gene family members

注：I 表示油茶 NAC 基因家族的系统进化树分析，采用 MEGA10.0 软件的邻位相连接法（NJ）构建系统进化树，A-P 不同颜色表示不同亚家族分类；II 表示油茶 NAC 基因家族 motif 分析，不同颜色的模块表示不同的 motif；III 表示油茶 NAC 基因家族保守结构域分析图。

Note: I represents the phylogenetic tree analysis of the NAC gene family of *C. oleifera*, and the phylogenetic tree is constructed by the adjacent linkage method (NJ) of the MEGA10.0 software, and the different colors represent the classification of different subfamilies; II represents the motif analysis of the NAC gene family of *C. oleifera*, and the modules of different colors represent different motif; III represents the conservative domain analysis map of the NAC gene family of *C. oleifera*.

2.4 NAC 基因家族的多序列比对和系统进化树构建

为充分明确油茶 NAC 基因家族各基因间亲缘关系与生物学功能的关系，对鉴定得到的油茶、茶树和拟南芥的 NAC 基因家族成员进行进化关系分析，根据 OOKA 等^[24]的分类方法，对 CoNAC 家族进行了分类，结果显示(图4)：进化树共分为17个亚组，其中 ANAC2 最多有13个成员，ONAC003 次之有 8 个 CoNAC 成员，ATAF 和 ANAC63 含有5个 CoNAC 成员，NAM、Unclassified、TIP 和 SENU5含有4个 CoNAC 成员，NAP、TERN、ONAC22、ANAC011 和 OSNAC8 含有3个 CoNAC 成员，OSNAC7、NAC1含有2个CoNAC 成员，ATNAC3 和 ONAC022 亚组最少，含有1个 CoNAC 成员，只有 ANAC001 亚组中不包含 CoNAC 基因。在进化关系上比较相近的一类 NAC 基因在结构与功能上均比较相似，可以作为推测油茶中 NAC 基因功能的参考依据。

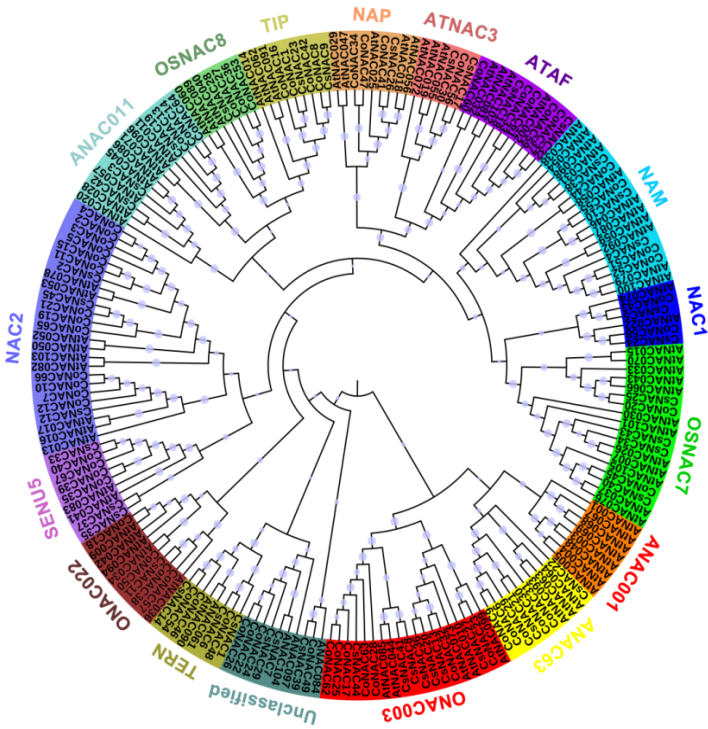


图 4 油茶、茶树和拟南芥 NAC 的邻接法进化树

Fig. 4 Neighbor-joining phylogenetic tree of NAC in *C. oleifera*, *C. sinensis* and *A. thaliana*

2.5 油茶 NAC 基因家族表达分析

基于油茶不同干旱胁迫处理下转录组数据，使用 TBtools 分析软件进行 Row-Scale 均一化处理(图 5)，发现在中度干旱、重度干旱和复水后，大部分 CoNAC 基因间的表达模式存在一定差异。其中，CoNAC 1、CoNAC8、CoNAC9、CoNAC27、CoNAC34、CoNAC43、CoNAC45、CoNAC47 和 CoNAC58 等基因在干旱胁迫下，下调表达；CoNAC15、CoNAC16、CoNAC18、CoNAC28、CoNAC49、CoNAC51、

CoNAC52、*CoNAC55*、*CoNAC56*、*CoNAC57*、*CoNAC60*、*CoNAC61*、*CoNAC65* 和 *CoNAC67* 等基因上调表达, 其中 *CoNAC56* 在中度干旱胁迫下的表达量比对照增加 7 倍, *CoNAC60* 基因的表达量增加 4 倍, *CoNAC61* 增加 12 倍, 达到最高峰。随着干旱胁迫程度加强, *CoNAC15*、*CoNAC16*、*CoNAC18*、*CoNAC28*、*CoNAC51*、*CoNAC60*、*CoNAC61* 等基因表达量也持续增加。在复水后, *CoNAC18*、*CoNAC28*、*CoNAC49*、*CoNAC51*、*CoNAC52*、*CoNAC56*、*CoNAC57*、*CoNAC59*、*CoNAC60*、*CoNAC61* 和 *CoNAC65* 等基因表达呈明显下降趋势, 而 *CoNAC12*、*CoNAC14*、*CoNAC23*、*CoNAC30*、*CoNAC36*、*CoNAC41*、*CoNAC50*、*CoNAC53*、*CoNAC54*、*CoNAC62*、*CoNAC63* 和 *CoNAC64* 等基因表现为上调表达, 表达量增加。分析油茶干旱转录组数据发现, *CoNAC* 基因家族中有大部分 *CoNAC* 会响应干旱胁迫。为了验证 RNA-seq 数据, 本研究挑选了 *CoNAC28*、*CoNAC51*、*CoNAC52*、*CoNAC56*、*CoNAC60* 和 *CoNAC61* 基因进行 q-PCR 验证。

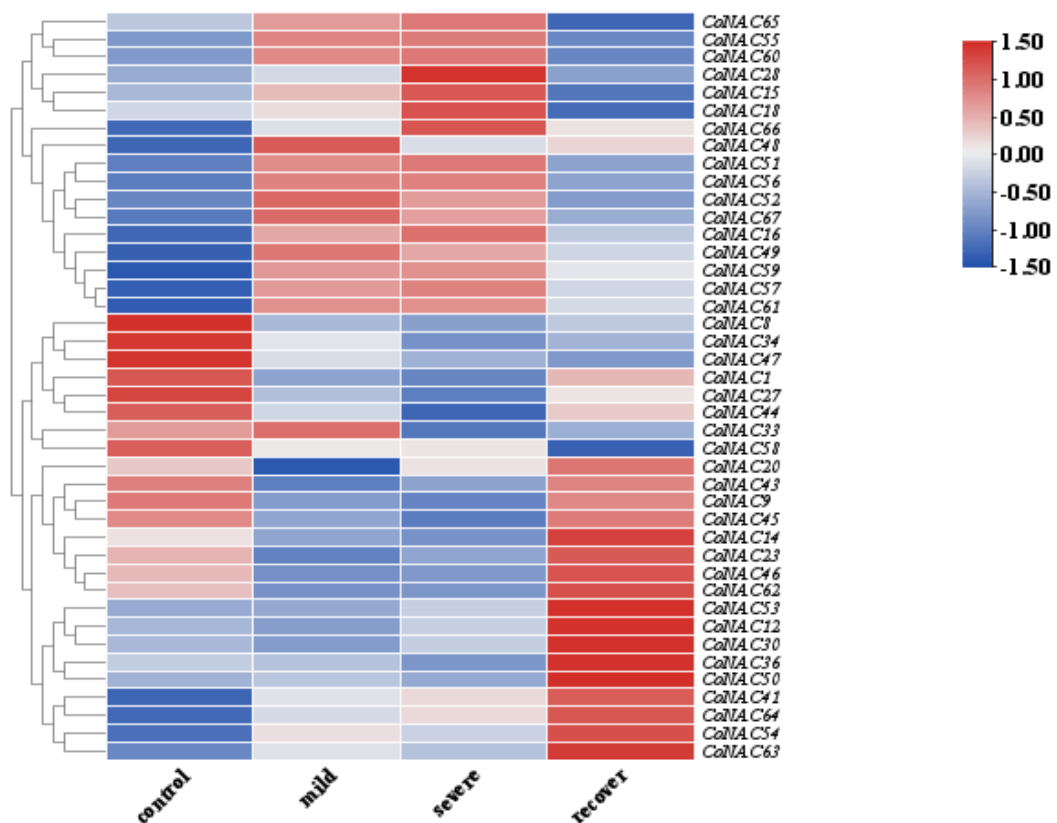


图 5 *CoNAC* 基因在不同干旱胁迫下的表达特征

Fig. 5 Expression profiles of *CoNAC* genes under different concentration of drought

注: 不同干旱胁迫下所有 *CoNAC* 基因的表达热图。表达量的值经过均一化后呈现在热图, 红色代表高表达, 蓝色代表低表达。

Note: heat map of expression of all *CoNAC* genes under different drought stress. After homogenization, the value of expression appears in the heat map, with red representing high expression and blue representing low expression.

2.6 候选基因在干旱胁迫下的表达模式分析

为了研究 *CoNAC* 基因在油茶不同干旱时期的表达情况, 本研究挑选在干旱胁迫表达谱中表达量较高的 6 个 *CoNAC* 基因, 利用 q-PCR 检测它们在适宜水分、干旱、复水试验下, 两个油茶品种 (长林 18、长林 53) 叶片中表达量。结果显示, 这些 *CoNAC* 基因在不同干旱胁迫下不同品种间存在表达量差异。其中, 在长林 53 中, *CoNAC28*、*CoNAC51*、*CoNAC52*、*CoNAC56*、*CoNAC60* 和 *CoNAC61* 基因在干旱处理时表达量均呈显著上调趋势, 其表达量都表现出先上升后下降的趋势, 这与表达谱 (图 5) 结果

基本相同。长林 18 中,除 *CoNAC51* 和 *CoNAC52* 外, *CoNAC28*、*CoNAC51*、*CoNAC52*、*CoNAC56*、*CoNAC60* 和 *CoNAC61* 基因在干旱处理时的表达量均呈显著上调趋势。此外,发现 *CoNAC28*、*CoNAC51*、*CoNAC52*、*CoNAC56*、*CoNAC60* 和 *CoNAC61* 等基因在长林 18 和长林 53 中的表达量也不相同,在适宜水分条件下,除 *CoNAC60* 和 *CoNAC61* 外,其他基因均在长林 53 中表达较高一些。长林 18 在干旱时期, *CoNAC28*、*CoNAC56* 和 *CoNAC60* 基因表达较高,长林 53 在干旱时期, *CoNAC51*、*CoNAC52* 和 *CoNAC61* 基因表达较高,推测其表达差异性可能与油茶长林 53 和长林 18 品种间差异相关。

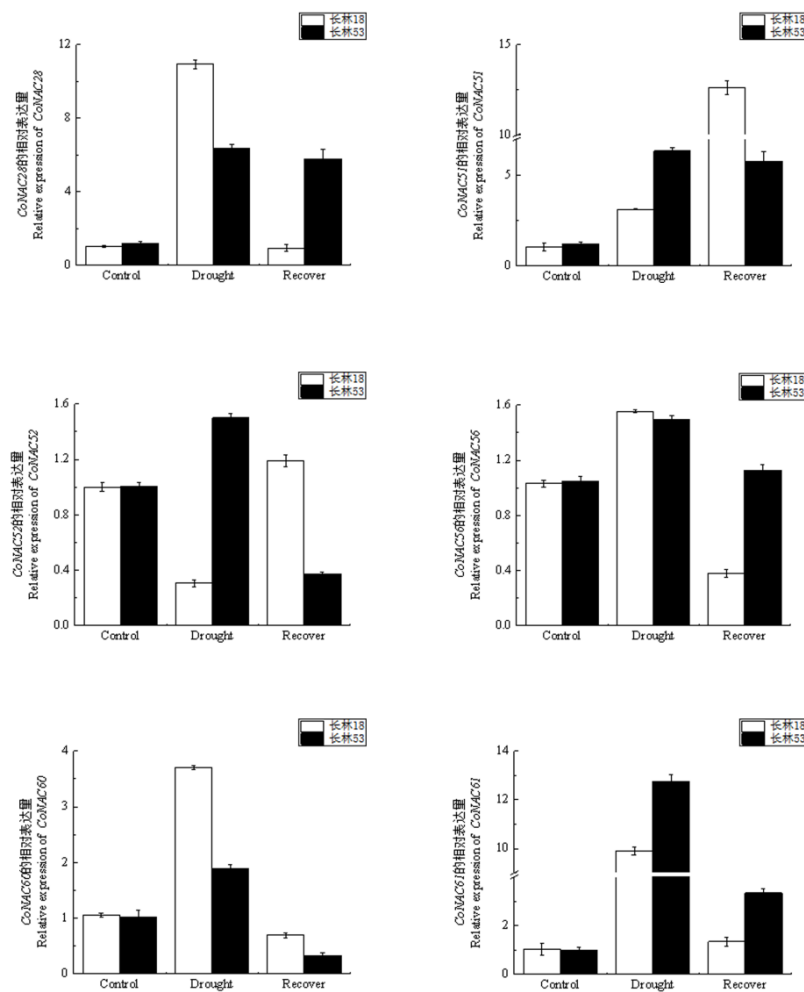


图 6 6 个 *CoNAC* 基因表达特征
Fig. 6 Expression patterns of 6 *CoNAC* genes

3 讨论

油茶是我国南方山地或丘陵地区主要的经济树种之一。虽然油茶属于中等耐旱植物,但是干旱胁迫仍是其生长发育过程中常遇到的逆境胁迫,夏季持续干旱会对油茶生长产生严重影响,造成油茶林大面积减产^[5]。NAC 家族的 NAM 和 CUC 基因具有高度保守的结构域,能调控顶端分生组织的形成和分化,且启动子区富含逆境响应元件,在植物应答干旱胁迫中具有重要作用^[29,30]。本研究从油茶全长转录组数据中鉴定出 67 个 NAC 转录因子。油茶为六倍体树种,其 NAC 基因数目明显低于拟南芥(117)^[31]、水稻(151)^[32]、大豆 (152)^[33]、茶树 (45) ^[23]等二倍体物种。这可能是在三代转录组测序过程中由于受到

基因文库构建或测序仪数据读取不确定性的影响,导致相对基因组测序来说存在基因数目不全等问题。因此油茶 *NAC* 家族成员的完整性需要依赖全基因组测序数据来进一步确定和完善。

根据油茶、拟南芥和茶树 *NAC* 家族共建的系统发育树,油茶 67 个 *NAC* 基因家族的蛋白序列可分为 17 个亚族,除 *AtNAC001* 亚组中不包含油茶 *CoNAC* 基因,其它每个亚族都同时含有拟南芥和茶树的 *NAC* 基因。其中 *ANAC2* 和 *ONAC003* 亚组成员较多,暗示 *ANAC2* 和 *ONAC003* 亚组对油茶具有更加重要的作用。一般而言,位于同一系统发育进化枝小组上的蛋白,若序列的相似性较高,则它们可能具有极为类似的蛋白功能^[34]。因此,可以利用 *NAC* 蛋白间的进化保守性,来探讨和预测油茶 *NAC* 蛋白的抗旱能力。已有研究表明, *ATAF*, *AtNAC3*, *ONAC003*, *NAM* 亚组在非生物胁迫中具有重要作用^[35, 23]。拟南芥水胁迫处理抑制 *ATAF1* 的表达,脱水和 *ABA* 处理可以诱导拟南芥 *ATAF* 亚组的一些干旱相关基因表达,从而影响拟南芥抵抗干旱胁迫^[12, 36]。在本研究中,系统发育结果分析显示,油茶 *CoNAC60* 和 *CoNAC61* 分布于 *ATAF* 亚类,与拟南芥 *AtNAC102*、*AtNAC81*、*AtNAC32*、*AtNAC2* 聚为一类,并且该基因在干旱胁迫后表达量上调,表明其可能与 *ATAF* 亚类基因具有相似的功能。拟南芥 *AtNAC3* 亚类若干 *AtNAC19*、55、72 基因受水分影响诱导表达,且过表达该基因可提高植株抗旱性^[37]。Fujita 等^[38] 对拟南芥进行脱水处理,分离出一个编码 *NAC* 蛋白 *AtNAC3* 亚组的 *AtNAC072* 基因,在干旱、高盐胁迫诱导下高表达。*CoNAC56* 分布于 *AtNAC3* 亚组,与拟南芥 *AtNAC072*、*AtNAC019* 和 *AtNAC055* 有较近的同源关系。水稻 *ONAC003* 的表达受干旱诱导,其过表达株系在高温、干旱抗性增强,表明 *ONAC003* 调控水稻非生物胁迫过程^[39]。油茶 *CoNAC28* 基因归于 *ONAC003* 亚组,在干旱胁迫下的表达模式相似,具有相似的亲缘关系,表明它们在干旱胁迫下具有相似的功能。陈琼琼等^[40] 采用实时定量 *qRT-PCR* 表达分析显示,10 个 *NAM* 基因在不同组织中均特异表达,大部分 *NAM* 基因在盐和干旱胁迫下表达上调。*CoNAC51* 和 *CoNAC52* 分布于 *NAM* 亚组,它们可能具有极为类似的蛋白功能在干旱胁迫时都表现为上调。在干旱胁迫下,油茶中的大部分 *ATAF*, *AtNAC3*, *ONAC003*, *NAM* 亚组成员上调表达,暗示这些 *NAC* 蛋白极有可能在油茶抗干旱胁迫中发挥重要作用。

此外,基于 *RNA-Seq* 和 *q-PCR* 分析,本研究验证了 6 个 *CoNAC* 基因在油茶干旱胁迫时的表达差异,同时也发现这些基因表达的品种特异性,即不同油茶品种对干旱胁迫的响应机制不同。通过上调或下调一些 *NAC* 基因来适应干旱环境,使得油茶具有独特地应对干旱的响应策略。冯士令^[41] 对长林 59 号等 9 个油茶品种的抗旱性进行综合评价分析,发现长林 53 号的耐旱能力要高于长林 18 号。本研究在油茶长林 53 和长林 18 中 *NAC* 转录因子的表达量也存在明显的差异,例如,油茶长林 53 的 6 个 *CoNAC* 基因在干旱处理时表达量均呈显著上调趋势;长林 18 中 *CoNAC28*、*CoNAC56*、*CoNAC60* 和 *CoNAC61* 基因在干旱处理时呈显著上调趋势,这与干旱胁迫表达谱的结果基本一致。值得注意的是,6 个 *CoNAC* 基因在长林 18 和长林 53 中的不同水分胁迫条件下表达量也不尽相同,在适宜水分条件下,除 *CoNAC60* 和 *CoNAC61* 外,其他基因均在长林 53 中表达较略高一些。且长林 53 在干旱时期, *CoNAC51*、*CoNAC52*、*CoNAC56* 和 *CoNAC61* 基因表达较高,推测其表达差异性可能与油茶长林 53 和长林 18 品种间的耐旱性差异相关。

4 结论

本研究的结果丰富了油茶 *NAC* 家族转录因子的基本信息,对其蛋白理化特征、保守基序和基因结构等进行了分析。多数 *CoNAC* 基因保守结构域位于蛋白 N 端,与其他植物中 *NAC* 的结构特征相符。*CoNAC* 基因启动子区具有多种胁迫响应元件,系统进化树将 67 个 *CoNAC* 划分为 17 个亚类,同一

亚组在基因结构方面具有相似性且同一或不同亚类 *CoNAC* 基因在干旱胁迫处理后呈现差异表达。基于公共数据库中油茶干旱 RNA-Seq 数据, 筛选油茶干旱胁迫相关的 42 个 *NAC* 基因的 TPM 值显示不同 *NAC* 基因在干旱胁迫下具有不同的表达程度。q-PCR 结果显示, 6 个油茶 *NAC* 基因在干旱胁迫下呈现不同的表达水平, 同时本研究也发现这些基因表达的品种特异性, 即不同油茶品种对干旱胁迫的响应机制不同。本研究为更好的探讨油茶耐旱胁迫响应机制提供一定的参考, 同时也能为油茶进一步抗旱品种选育和改良提供良好的基因资源。

参考文献:

- 杜洋文, 邓先珍, 周伟国, 等. 油茶长林品种引进及综合评价[J]. 林业科技开发. 2014, 28(03): 96-100.
- Du YW, Deng XZ, Zhou WG, et al. Introduction and comprehensive evaluation of *Camellia oleifera* 'Changlin' cultivars[J]. Journal of Forestry Engineering. 2014, 28(03): 96-100.
- 王金凤, 谭新建, 吴喜昌, 等. 我国油茶产业发展现状与对策建议[J]. 世界林业研究. 2020, 33(06): 80-85.
- Wang JF, Tan XJ, Wu XC, et al. Development Status and Suggestions of *Camellia* Industry in China[J]. World Forestry Research. 2020, 33(06): 80-85.
- 黄俊毅. 全国油茶种植面积达 6800 万亩油茶产业总产值达 1160 亿元[J]. 中国食品. 2020, No.807(23): 160-160.
- Huang JY. The country's oil-tea camellia planting area reaches 68 million mu and the total output value of the *Camellia oleifera* industry reaches 116 billion yuan[J]. China Food. 2020, No.807(23): 160-160.
- 刘洋, 王娟, 白婷玉, 等. 4 种园林植物幼苗对干旱胁迫的生长和生理响应[J]. 干旱区资源与环境. 2021, 35(04): 173-179.
- Liu Y, Wang J, Bai Ty, et al. Growth and physiological responses of seedlings of four garden plants to drought stress[J]. Journal of Arid Land Resources and Environment. 2021, 35(04): 173-179.
- 叶宝鉴, 苏春连, 曾钦滕, 等. 油茶干旱胁迫研究进展[J]. 福建农业学报. 2020, 35(03): 351-358.
- Ye BJ, Su CL, Zeng QM, et al. Research progress of drought stress to *Camellia oleifera*[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences. 2020, 35(03): 351-358.
- 曹林青, 钟秋平, 罗帅, 等. 干旱胁迫下油茶叶片结构特征的变化[J]. 林业科学. 2018, 31(03): 136-143.
- Cao LQ, Zhong QP, Luo S, et al. Variation in leaf structure of *Camellia oleifera* under drought stress [J]. Forest Research. 2018, 31(03): 136-143.
- 陈铭. 土壤水分对油茶根际微生物多样性的影响[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2020.
- Chen M. Effect of soil moisture on microbial diversity in the rhizosphere of *C.oleifera*[D]. Changsha: Central south university of forestry and technology, 2020.
- 董斌, 蓝来娇, 黄永芳, 等. 干旱胁迫对油茶叶片叶绿素含量和叶绿素荧光参数的影响[J]. 经济林研究. 2020, 38(03): 16-25.
- Dong B, Lan LJ, Huang YF, et al. Effects of drought stress on photosynthetic pigments and chlorophyll fluorescence characteristics in leaves of *Camellia oleifera*[J]. Nonwood Forest Research. 2020, 38(03): 16-25.
- 丁少净. 干旱胁迫对油茶生长发育的影响[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2016.
- Ding SJ. Effects of drought stress on growth and development of *Camellia Oleifera*[D]. Beijing: Chinese academy of forestry, 2016.
- He Q, Liu Y, Zhang M, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the *NAC* transcription factor family in Pineapple[J]. Tropical Plant Biology. 2019, 12(4): 255-267.
- Shen SY, Zhang QR, Shi Y, et al. Genome-wide analysis of the *NAC* domain transcription factor gene family in *Theobroma cacao*.[J]. Genes. 2019, 11(1): 35.
- 李桂玲, 李思云, 刘卫群. 转录因子 *NAC* 及其在植物生长发育中的作用[J]. 分子植物育种. 2019, 17(03): 811-826.
- Li GL, Li SY, Liu WQ. Transcription factor *NAC* and its role in plant growth and development[J]. Molecular Plant Breeding | Mol Plant Breed. 2019, 17(03): 811-826.
- Souer E, van Houwelingen A, Kloos D, et al. 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.
- Aida, M. Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant[J]. Plant Cell. 1997,

9(6): 841-857.

荣欢, 任师杰, 汪梓坪, 等. 植物 NAC 转录因子的结构及功能研究进展[J]. 江苏农业科学. 2020, 48(18): 44-53.

Rong H, Ren SJ, Wang ZP, et al. Progress in structure and function of transcription factor of plant NAC [J]. Jiangsu agricultural sciences. 2020, 48(18): 44-53.

张丹, 马玉花. NAC 转录因子在植物响应非生物胁迫中的作用[J]. 生物技术通报. 2019, 35(12): 144-151.

Zhang D, Ma YH. The role of NAC transcription factors in plant response to abiotic stress[J]. Biotechnology Bulletin. 2019, 35(12): 144-151.

雍玉冰. 低温胁迫应答转录因子在百合逆境响应中的功能及调控机制研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2020.

Yong YB. Function and transcriptional regulatory mechanism of cold stress responsive transcription factors in Lily stress response[D]. Beijing: Beijing forestry university, 2020.

王萍. 拟南芥 ANAC055 在干旱胁迫响应中的作用及其机理[D]. 南昌: 南昌大学, 2020.

Wang P. The role and its mechanism of ANAC055 for drought stress response in *Arabidopsis thaliana*[D]. Nanchang: Nanchang university, 2020.

刘薇, 张彦威, 王玉斌, 等. 大豆涝渍响应 NAC 基因的鉴定及 GmNAC038 的克隆和激素应答分析[J]. 大豆科学. 2021, 40(02): 159-167.

Liu W, Zhang YW, Wang YB, et al. Identification of waterlogging responsive NAC genes in soybean and cloning and hormone responsive analysis of GmNAC038[J]. Soybean Science. 2021, 40(02): 159-167.

Hu HH, Dai MQ, Yao JL, et al. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2006, 103(35): 12987-12992.

Duan M, Zhang R, Zhu F, et al. A lipid-anchored NAC transcription factor is translocated into the nucleus and activates glyoxalase i expression during drought stress[J]. Plant Cell. 2017, 29(7): 1748.

Zheng YX, Soo YK, Do YH, et al. The Arabidopsis NAC transcription factor ANAC096 cooperates with bZIP-Type transcription factors in dehydration and osmotic stress responses[J]. The Plant Cell. 2013, 25(11): 4708-4724.

Wang YX, Liu ZW, Wu ZJ, et al. Transcriptome-wide identification and expression analysis of the NAC gene family in tea plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. [J]. PLoS ONE. 2016, 11(11): e166727.

Hisako O, Kouji S, Koji D, et al. Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*[J]. DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes. 2003, 10(6): 239-247.

Chen SP, Lin IW, Chen X, et al. Sweet potato NAC transcription factor, IbNAC1, upregulates sporamin gene expression by binding the SWRE motif against mechanical wounding and herbivore attack[J]. Plant Journal. 2016, 86(3): 234-248.

蒋瑶, 陈其兵. 植物 CBF1 转录因子的生物信息学分析[J]. 林业科学. 2010, 46(06): 43-50.

Jiang Y, Chen QB. Bioinformatic analysis of CBF1 transcription factors from the plants[J]. Scientia Silvae Sinicae. 2010, 46(06): 43-50.

黄文娟, 许鑫, 陈靳松, 等. 川白芷 NAC 家族的生物信息及表达模式分析[J]. 中国中药杂志.: 1-17[2021-03-18]. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcm.20201225.101>.

Huang WJ, Xu X, Chen JS, et al. Bioinformatics analysis and expression pattern of NAC transcription factor family of *Angelica dahurica* var. *formosana* from Sichuan province[J]. China Journal of Chinese Materia Medica: 1-17[2021-03-18]. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcm.20201225.101>.

Chen C, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant. 2020, 13(8): 1194-1202.

Liu Q, Sun CY, Han JZ, et al. Identification, characterization and functional differentiation of the NAC gene family and its roles in response to cold stress in ginseng, *Panax ginseng* C.A. Meyer.[J]. PLoS ONE. 2020, 15(6): e234423.

王涛涛, 杨勇, 魏唯, 等. 互花米草 NAC 转录因子家族的鉴定与表达分析[J]. 遗传. 2020, 42(02): 194-211.

Wang TT, Yang Y, Wei W, et al. Identification and expression analyses of the NAC transcription factor family in *Spartina alterniflora*[J]. Hereditas. 2020, 42(02): 194-211.

Ling S, Ping LL, Zhen WY, et al. NAC103, a NAC family transcription factor, regulates ABA response during seed germination and seedling growth in *Arabidopsis*[J]. Planta. 2020, 252(6): 1-11.

赵才美, 黄兴奇, 殷富有, 等. 水稻 NAC 转录因子家族的研究进展[J]. 植物科学学报. 2020, 38(02): 278-287.

Zhao CM, Huang XQ, Yin FY, et al. Research progress on NAC transcription factor family in *Oryza sativa* L.[J]. Plant Science Journal. 2020, 38(02): 278-287.

So H, Lee J. NAC transcription factors from soybean (*Glycine max* L.) differentially regulated by abiotic stress[J]. Hyun-Ah So; Jai-Heon Lee. 2019, 62(2): 147-160.

- 阮城城, 胡福初, 王祥和, 等. 基于转录组的荔枝 GRF 基因家族的鉴定及表达分析[J/OL]. 分子植物育种: 1-2[2021-03-18].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210112.1317.010.html>.
- Ruan CC, Hu FC, Wang XH, et al. Identification and Analysis of GRF Transcription Factor Family Based on Transcriptome Data in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.)[J/OL]. Molecular Plant Breeding. 1-2[2021-03-18].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210112.1317.010.html>.
- Shen S, Zhang Q, Shi Y, et al. Genome-wide analysis of the NAC domain transcription factor gene family in *Theobroma cacao*[J]. Genes. 2020, 11(1): 35.
- Lu P, Chen N, An R, et al. A novel drought-inducible gene, ATAF1, encodes a NAC family protein that negatively regulates the expression of stress-responsive genes in *Arabidopsis*[J]. Plant Molecular Biology. 2007, 63(2):289-305.
- Shao HB, Wang HY, Tang XL., et al. NAC transcription factors in plant multiple abiotic stress responses: progress and prospects[J]. Frontiers in Plant Science. 2015, 6: 902.
- Fujita M, Fujita Y, Maruyama K, et al. A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway.[J]. Plant Journal. 2010, 39(6): 863-876.
- 黄娟, 荣玉萍, 孟子焱, 等. 苦荞转录因子 FtNAC15 基因的克隆及表达分析[J]. 江西农业大学学报. 2019, 41(06): 1183-1191.
- Huang J, Rong YP, Meng ZY, et al. Cloning and expression of FtNAC15 transcription factor in *Fagopyrum tataricum*[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis. 2019, 41(06): 1183-1191.
- 陈琼琼, Shalmani Abdullah, 陈云波, 等. 水稻 NAM 基因家族的全基因组鉴定及表达分析[J]. 西北植物学报. 2020, 40(06): 907-917.
- Chen QQ, Shalmani A, Chen YB, et al. Genome-wide identification and expression analysis of NAM gene family in rice[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica. 2020, 40(06): 907-917.
- 冯士令. 9 个油茶品种幼苗的抗旱性比较研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2014.
- Feng SL. Comparison of drought resistance of nine *Camellia oleifera* clones in seeding stage[D]. Yaan: Sichuan agricultural university, 2014.