

桂花 *OfNAC* 转录因子鉴定及在花开放阶段的表达分析

缪云锋^{1,2,3}, 周 丹^{1,2,3}, 董 彬^{1,2,3}, 赵宏波^{1,2,3}

(1. 浙江农林大学 浙江省园林植物种质创新与利用重点实验室, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江农林大学 南方园林植物种质创新与利用国家林业和草原局重点实验室, 浙江 杭州 311300; 3. 浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】研究 *OfNAC* 基因对桂花 *Osmanthus fragrans* 花开放的调控作用。【方法】从桂花品种‘堰虹桂’ *O. fragrans* ‘Yanhonggui’ 转录组数据中, 筛选获得相关 *OfNAC* 基因序列, 分析预测其理化性质和结构, 运用实时荧光定量 PCR 技术分析花开放过程的表达特性。【结果】筛选得到 22 条 *OfNAC* 序列。生物信息学分析发现: 22 条 *OfNAC* 转录因子均含有 NAM 结构域, 氨基酸序列含有 5 个保守的亚结构域 (A~E), 其保守性由强到弱依次为 C、A、D、B、E; 二级结构中不同结构的占比由大到小表现为无规则卷曲、 α -螺旋、延伸链、 β -折叠; 亚细胞定位及跨膜结构预测表明: *OfNAC17*、*OfNAC17-X2*、*OfNAC53*、*OfNAC91*、*OfNMT1-9* 是膜结合转录因子, 且大多数 *OfNAC* 定位在细胞核。在桂花花开放进程中, *OfNAC100-2*、*OfNAC43*、*OfNAC73* 相对表达量在铃梗期 (S_4) 到达顶峰, 在此之后相对表达降低; *OfNAC43* 在铃梗期 (S_4) 骤然升高, 并且在此时期相对表达最大; *OfNAC71*、*OfNAC29-1*、*OfNAC21/22* 从起始期 (S_1) 呈缓慢上升趋势, 在顶壳期 (S_3) 到达最高, 随后整体呈现下降趋势; *OfNAC29-2* 在圆珠期 (S_2) 相对表达量陡然上升, 在铃梗期 (S_4) 相对表达最低。【结论】推测 *OfNAC100-2*、*OfNAC43*、*OfNAC73*、*OfNAC71*、*OfNAC29-1*、*OfNAC21/22*、*OfNAC29-2* 等成员极有可能参与调控桂花的花开放。图 6 表 3 参 33

关键词: 植物学; 桂花; 花开放; NAC 转录因子; 表达分析

中图分类号: S718.3

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2021)03-0433-12

Identification and expression analysis of *OfNAC* transcription factors in *Osmanthus fragrans* during flower opening stage

MIAO Yunfeng^{1,2,3}, ZHOU Dan^{1,2,3}, DONG Bin^{1,2,3}, ZHAO Hongbo^{1,2,3}

(1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Germplasm Innovation and Utilization for Garden Plants, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration on Germplasm Innovation and Utilization for Southern Garden Plants, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 3. College of Landscape Architecture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] This study aims to investigate the regulation of *OfNAC* genes on flower opening of *Osmanthus fragrans*. [Method] From the transcriptome data of *O. fragrans* ‘Yanhonggui’, the related *OfNAC* genes were screened and analyzed to predict the physicochemical properties and structure. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to analyze the expression characteristics of the flower opening process. [Result] 22 *OfNAC* sequences were screened from transcriptome. Bioinformatics analysis showed that all of the 22 *OfNAC* transcription factors contained NAM domains, and the amino acid sequence contained 5 conserved subdomains (A~E). The sequence of conservatism ranging from strong to weak was C, A, D, B, and

收稿日期: 2020-07-21; 修回日期: 2020-12-30

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32072615)

作者简介: 缪云锋 (ORCID: 0000-0002-4517-4640), 从事观赏植物遗传育种研究。E-mail: 1150827869@qq.com。通信作者: 赵宏波 (ORCID: 0000-0003-4714-8240), 教授, 博士, 从事观赏植物遗传育种等研究。E-mail: zhaohb@zafu.edu.cn

E. The proportion of different structures in the secondary structure from large to small was random coils, α -helices, extended strands, and β -sheets. Subcellular localization and transmembrane structure prediction showed that *OfNAC17*, *OfNAC17-X2*, *OfNAC53*, *OfNAC91*, *OfNTM1-9* were membrane-bound transcription factors, and most *OfNACs* were located in the nucleus. During the *O. fragrans* flowering process, the relative expression levels of *OfNAC100-2*, *OfNAC43* and *OfNAC73* reached the peak at the boll stem stage (S_4), and then decreased. The relative expression of *OfNAC43* was the highest at the boll stem stage (S_4). The relative expression of *OfNAC71*, *OfNAC29-1*, and *OfNAC21/22* increased slowly from the initial stage (S_1), reached the highest at the apical shell stage, and then decreased as a whole. The relative expression of *OfNAC29-2* increased sharply at the bead stage (S_2) and reached the lowest at the boll stem stage (S_4). [Conclusion] It is speculated that *OfNAC100-2*, *OfNAC43*, *OfNAC73*, *OfNAC71*, *OfNAC29-1*, *OfNAC21/22*, *OfNAC29-2* may be involved in the regulation of *O. fragrans* flower opening. [Ch, 6 fig. 3 tab. 33 ref.]

Key words: botany; *Osmanthus fragrans*; flower opening; NAC transcription factor; expression analysis

NAC(NAM-ATAF1/2-CUC2)是植物中最大的转录因子家族之一,成员众多,功能多样^[1]。NAC转录因子参与植物多个生物学过程,如植物茎尖分生组织的形成^[2]、植物次生生长^[3]、组织愈合过程中的细胞增殖^[4]、生物和非生物胁迫响应^[5-6]、植物开花时间调节^[7-8]、叶片和花瓣衰老^[9]和果实成熟时颜色变化等^[10]。花瓣细胞的伸长和扩展也受到NAC转录因子的调控。花瓣的扩展是引起植物花开放的重要原因^[11-13],主要受花瓣细胞的膨压变化、细胞壁代谢变化等影响^[14]。研究发现:NAC转录因子*NAP*可能通过抑制拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 花瓣细胞扩张而影响花器官生长,且在花发育细胞分裂向细胞扩展过渡阶段发挥重要作用^[15]。*RhNAC3*可以作为上游调控因子结合具有调节渗透压功能的基因从而影响月季 *Rosa hybrida* 花瓣细胞扩张^[16]。桂花 *Osmanthus fragrans* 是中国传统的十大名花之一,花是其最重要的观赏器官。桂花花的开放受到温度、湿度等环境因子的影响,其具体的分子机制至今尚未阐明。本研究通过桂花NAC家族基因鉴定和筛选,预测它们的理化性质,运用荧光定量PCR分析花开放进程中的表达模式,筛选出参与桂花花开放调控的关键NAC转录因子成员,为明确其在花开放中的功能作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以桂花品种‘堰虹桂’*O. fragrans* ‘Yanhonggui’盆栽植株为材料,种植于浙江农林大学桂花资源圃。选取株龄相同、生长一致的健康植株,分别于起始期(S_1)以及花开放不同阶段:圆珠期(S_2)、顶壳期(S_3)、铃梗期(S_4)、初开期(S_5)、盛花期(S_6)进行取样^[17]。每个时期样品采集3份,取样时间均为10:00,液氮速冻后储藏于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 桂花*OfNAC*转录因子的鉴定及理化性质分析 本研究从已构建的桂花‘堰虹桂’转录组数据库^[18]中对NAC转录因子进一步进行NCBI-Blast(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)比对分析。通过PlantTFDB(<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/blast.php>)以及Pfam(<https://pfam.xfam.org/>)查询候选基因中的NAC的结构域,并通过NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>)进行保守功能域预测,利用TBtools工具进行桂花NAC保守结构域可视化分析,TBtools-ORF finder分析开放阅读框^[19],并通过NCBI-Blast获得开放阅读框完整的桂花*OfNAC*序列。运用ExPASy在线软件(<http://web.expasy.org/protparam/>)预测编码蛋白质分子量、理论电点、酸碱性等。

1.2.2 桂花*OfNAC*转录因子结构和亚细胞定位预测分析 用DNAMAN对已筛选的桂花*OfNAC*转录因子氨基酸序列进行比对,分析其保守亚结构域;在线分析软件MEME 5.1.0分析NAC的保守基序(<http://meme-suite.org/tools/meme>),对桂花*OfNAC*蛋白质二级结构以及跨膜结构分别采用在线软件SOPMA(<https://npsapraibicp.fr/cgi-bin/npsa-sopma.html>)和TMHMM Server V.2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/>)

TMHMM/) 进行分析。用在线分析软件 Wolp sort Genscript(<https://www.genscript.com/wolf-psort.html?src=leftbar>) 进行亚细胞定位预测。

1.2.3 桂花 *OfNAC* 转录因子系统进化树构建 从 PlantTFDB(<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/blast.php>) 中获取拟南芥、水稻 *Oryza sativa* 的 NAC 序列，使用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树，采用邻近法 (neighbor-joining)，1 000 次 Bootstrap 抽样。

1.2.4 桂花 *OfNAC* 转录因子表达分析 RNA 提取采用 UltraClean Polysaccharide and Phenol Plant RNA Purification Kit 试剂盒 (诺禾致源公司，中国天津)，方法参照说明书。使用核酸分析仪 (IMPLEN 公司，德国) 对 RNA 的纯度与浓度进行检测，并用质量分数 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。依据说明书使用 PrimeScript™RT Master Mix Perfect Real Time(TaKaRa，中国大连) 试剂盒对桂花不同花开放时期的 cDNA 进行合成。利用 Primer Premier 5.0 对 22 个 *OfNAC* 基因进行定量特异性引物设计，桂花 *OfACT* 作为内参基因^[20]，引物序列如表 1 所示。荧光定量反应体系如下：SYBR Premix Ex *Taq* 10 μL，cDNA 2 μL，上游引物和下游引物 (10 μmol·L⁻¹) 各 8 μL，双蒸水 (ddH₂O) 补足至 20 μL，每个样品设置 3 次生物学重复。反应程序为：95 ℃ 预变性 30 s，95 ℃ 变性 5 s，60 ℃ 复性 30 s，共 40 个循环；然后以 95 ℃ 持续 5 s，60 ℃ 持续 1 min，95 ℃ 持续 15 s 作为溶解曲线分析程序。循环阈值由 Light Cycler 480 软件自动计算。最后根据 2^{-ΔΔC_t} 法计算目的基因的相对表达量。

表 1 桂花 *OfNAC* 转录因子 RT-PCR 特异性引物

Table 1 Specific primers for RT-PCR of *OfNAC* in *O. fragrans*

基因名称	用于荧光定量的引物序列(5'→3')	基因名称	用于荧光定量的引物序列(5'→3')
<i>OfNAC100-1</i>	F: TGAACAAGATTGAGCCTTGGG R: CCTTCCTGTGGCTTTCCAG	<i>OfNAC104</i>	F: TGCATTTTACATTGGTGAAGATGTC R: GCTCGTACACTTGACACACCA
<i>OfNAC53</i>	F: AGATTGTGGGGATGAAGAAAA R: CAACTCCATATCAGTAAGCCG	<i>OfNAC92</i>	F: TCCTAGTCGGAATGAAGAAAACCTC R: ATGGCTTTCTAATCTGTATTCTGTGC
<i>OfNTM1-9</i>	F: GGTGTCTCTAATGCCCCACTTC R: CTGGTTCCGTAGCACGATACT	<i>OfNAC72-1</i>	F: GGAAAAGCCCCCAAAGGAAC R: CCCAATCATCCAACCTTGAGC
<i>OfNAC73</i>	F: AGGCAAGGATGGCCAAATTC R: TTGTGCCATCTTGTTTCTCC	<i>OfNAC72-2</i>	F: ACGTAGGAAAAGCACCAAAAGG R: AGCATCCAACCTTGCGCTTC
<i>OfNAC43</i>	F: AGGCTACTGGTCGTGATAAAG R: GGGGTCATGAGTGTCGTCC	<i>OfNAC29-1</i>	F: TTACAAGGGAAGGCCTCCAAAG R: TTGAGCCATTTTGCGTGTTAGG
<i>OfNAC91</i>	F: TCTACAAAGGTCGTGCTCCG R: CCCTGACCAGGATAAGTGCC	<i>OfNAC29-2</i>	F: CCCAAAGGGCGTCAAAACTG R: GCACACAATCATCCAACCTCA
<i>OfNAC50-X2</i>	F: TGGCAAAGGGTATTGGAAAGC R: TCGCCCACTATGGAAAACAAG	<i>OfNAC71</i>	F: CTATCGTGGAAGAGCACCACT R: TCCCTGAAATCTTGGGGTGTC
<i>OfNAC50</i>	F: AAGCAACTGGAAAGGATCGC R: AATTCTGCATCGCAAAGCCTG	<i>OfNAC2</i>	F: TTGGGAATAAAGAAGGCTCTGGTG R: ACACAACACCCAATCATCAAGCCTC
<i>OfNAC21/22</i>	F: GAAGGGAAGCCTGGTTGGAAT R: CCCAATCCTCCTTGACAGATG	<i>OfNAC100-2</i>	F: TCAGAGGAAAAATCCTCGTCGG R: TTTGGGAGGTTGTGGATCGAG
<i>OfNAC56</i>	F: TCTATGGTGGAAAGCCTCCT R: CATCAAGCCTTAAAGAGCCC	<i>OfNAC32</i>	F: AAGCCTTGGTTTCTATGCCG R: AAGCTGTTGTTCTTGTTTCGA
<i>OfNAC17-X2</i>	F: TCCTGTTGGGGTGAAGAAGA R: ATAGTCATCCTGTGCATCCTGC	<i>OfACT</i>	F: CCCAAGGCAAACAGAGAAAAAAT R: ACCCCATCACCAGAATCAAGAA
<i>OfNAC17</i>	F: TGGTCTTCCATAAAGGTGCTGC R: TTGTACAGAGCATAGCAATCCCGTG		

2 结果分析

2.1 桂花 *OfNAC* 转录因子鉴定及理化性质分析

通过对桂花‘堰虹桂’转录组数据分析，并结合 NCBI-Blast 筛选，对其中 22 个桂花 *OfNAC* 基因进

行分析。结果显示：它们均含有 NAC 家族蛋白特有的 NAM 保守功能域 (图 1)。通过 ExPASy 对 22 条桂花 *OfNAC* 转录因子进行理化性质分析 (表 2)，结果表明：22 条桂花 *OfNAC* 基因的氨基酸 (OfNAC104~OfNAC91) 长度为 186~609 个；蛋白质 (OfNAC104~OfNAC17) 相对分子量为 21 498.77~68 408.12；等电点为 4.59~9.33，其中 OfNAC100-1、OfNAC73、OfNAC56、OfNAC72-1、OfNAC72-2、OfNAC29-1、OfNAC29-2、OfNAC32 等 8 个蛋白质等电点大于 7，偏碱性，其余 14 个 OfNAC 等电点小于 7，偏酸性。OfNAC 的不稳定系数为 29.27~52.83，OfNAC53、OfNAC73、OfNAC56、OfNAC92、OfNAC29-2 等 5 个蛋白质不稳定系数低于 40，为稳定蛋白质，其余 17 个不稳定系数均高于 40，为不稳定蛋白质。脂溶性指数为 53.37(OfNAC71)~77.70 (OfNAC17-X2)，总平均疏水值为 -0.816~-0.530，蛋白质的平均疏水指数均小于 0，表明 OfNAC 均为亲水性蛋白质 (表 2)。

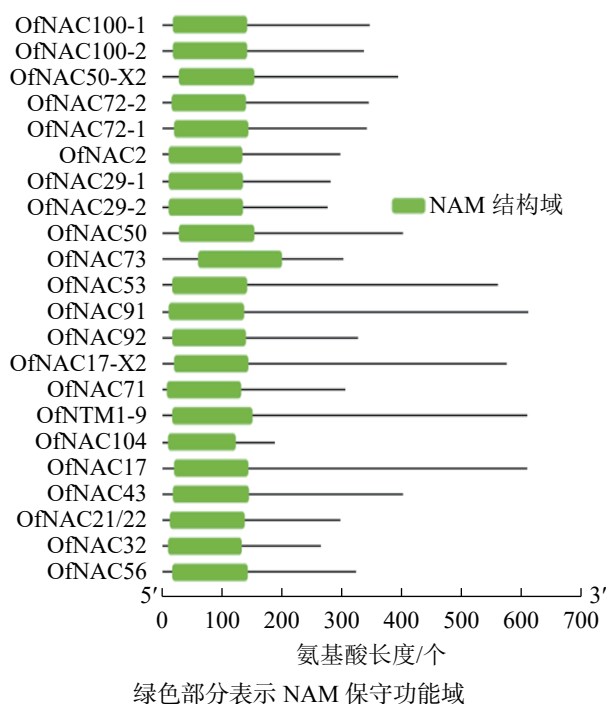


图 1 桂花 NAC 的 NAM 保守功能域分析

Figure 1 NAM conserved functional domain about NAC

表 2 桂花 OfNAC 蛋白质理化性质及二级结构分析

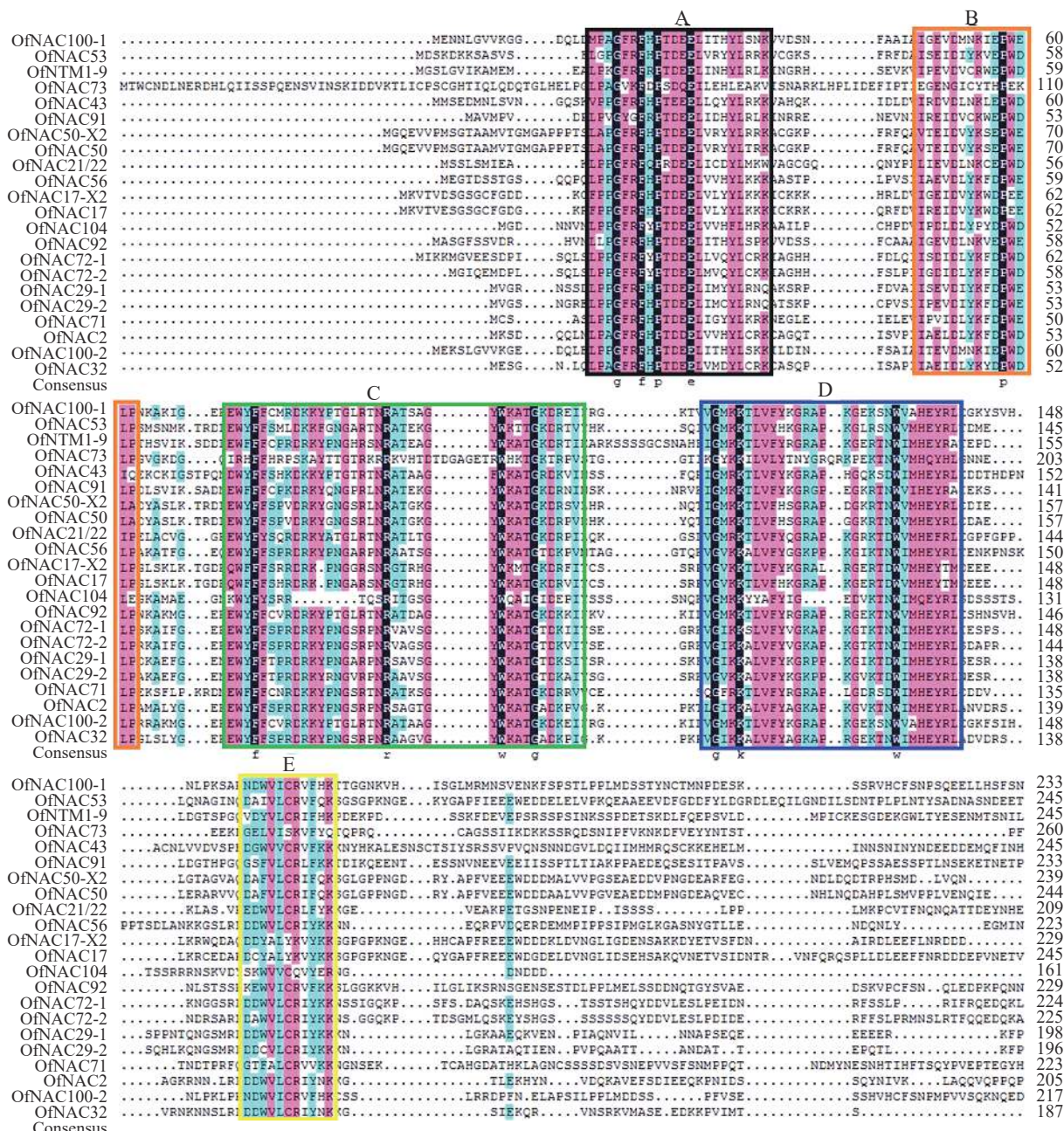
Table 2 Physicochemical properties and secondary structure analysis of *OfNAC* of *O. fragrans*

序列名称	氨基酸长度/个	相对分子量	等电点	碱性氨基酸	酸性氨基酸	不稳定系数	脂溶性指数	总平均疏水值	亚细胞定位	
									位置	预测值/%
OfNAC100-1	345	38 986.11	8.69	40	36	40.06	61.01	-0.574	细胞核	61.54
OfNAC53	558	62 807.47	4.60	51	88	38.87	69.37	-0.564	内质网	42.42
OfNTM1-9	606	68 053.70	5.63	71	86	51.49	62.43	-0.725	细胞核	76.92
OfNAC73	300	33 768.95	8.79	39	34	38.21	69.47	-0.754	细胞核	76.92
OfNAC43	399	45 513.66	5.77	43	55	46.31	63.26	-0.752	细胞核	69.23
OfNAC91	609	67 741.52	4.98	63	86	52.83	71.07	-0.593	细胞核	76.92
OfNAC50-X2	389	43 765.29	5.29	46	58	47.83	69.43	-0.629	叶绿体	58.33
OfNAC50	399	44 952.52	5.35	46	61	50.45	67.69	-0.652	叶绿体	46.15
OfNAC21/22	296	33 613.15	6.54	33	34	51.26	66.52	-0.570	细胞核	71.43
OfNAC56	322	35 946.51	8.62	37	34	39.48	64.81	-0.725	细胞核	92.30
OfNAC17-X2	573	64 828.71	4.87	63	91	40.60	77.70	-0.530	细胞核	53.85
OfNAC17	606	68 408.12	4.85	60	97	46.79	74.62	-0.571	细胞核	30.77
OfNAC104	186	21 498.77	4.59	19	31	46.96	68.60	-0.695	细胞核	84.61
OfNAC92	325	36 813.71	6.47	40	42	29.27	71.35	-0.579	细胞核	38.46
OfNAC72-1	339	38 289.93	8.64	40	37	40.14	64.96	-0.671	细胞核	84.61
OfNAC72-2	342	38 848.46	8.64	42	39	40.04	61.64	-0.762	细胞核	100
OfNAC29-1	280	32 538.56	7.71	36	35	42.96	61.96	-0.816	细胞核	52.50
OfNAC29-2	275	31 330.36	9.33	35	26	33.81	61.35	-0.741	细胞核	100
OfNAC71	303	34 864.61	5.42	33	43	51.89	53.37	-0.795	细胞核	85.71
OfNAC2	296	34 249.55	6.09	35	38	50.01	66.22	-0.735	细胞核	69.23
OfNAC100-2	334	37 778.80	6.51	38	40	43.10	67.96	-0.540	细胞核	85.71
OfNAC32	263	30 253.45	8.45	38	35	43.91	69.32	-0.635	细胞核	61.54

说明：不稳定系数大于40为不稳定序列，小于40为稳定序列

2.2 桂花 *OfNAC* 转录因子结构及亚细胞定位分析

使用 DNAMAN 软件对桂花 *OfNAC* 转录因子的氨基酸序列进行比对, 结果显示 (图 2): 22 个 *OfNAC* 的氨基酸序列均具有保守的亚结构域 (A~E)。对这 5 个亚结构域进行分析发现: A 区较为保守的氨基酸是甘氨酸 (G)、苯丙氨酸 (F)、脯氨酸 (P)、谷氨酸 (E); B 区较为保守的氨基酸是脯氨酸 (P); C 区较为保守的氨基酸是苯丙氨酸 (F)、精氨酸 (R)、色氨酸 (W)、甘氨酸 (G); D 区较为保守的氨基酸是甘氨酸 (G)、赖氨酸 (K)、色氨酸 (W); E 区没有完全稳定的氨基酸。各保守亚域的保守性由强到弱依次为 C、A、D、B、E。对所有 *OfNAC* 的氨基酸序列进行保守基序分析发现 (图 3): 大多数 *OfNAC* 均含有较保守的元件, 除 *OfNAC73* 只有 2 个保守元件 (元件 1、元件 2) 外, 其余 *OfNAC* 均含有 4 个保守元件 (元件 1、元件 3、元件 4、元件 5)。另外, 22 条 *OfNAC* 转录因子中元件 7、元件 9 和元件 10 出现在一些 *OfNAC* 蛋白质的 C 端, 且对应的序列亲缘关系较近。桂花 *OfNAC* 蛋白质二级结构分析表明: *OfNAC*



黑色区域表示序列一致, 红色区域保守性稍弱, 蓝色区域保守性较差。字母 A、B、C、D、E 下面的方框部分为 *OfNAC* 转录因子 N 端保守区 5 个保守亚结构域

图 2 *OfNAC* 转录因子氨基酸序列比对

Figure 2 Sequence alignment of *OfNAC* transcription factor

蛋白质的二级结构包括 α -螺旋、 β -折叠、延伸链和无规则卷曲 4 种结构，且不同结构占比从大到小依次表现为无规则卷曲、 α -螺旋、延伸链、 β -折叠 (表 3)。OfNAC32 的无规则卷曲占比最高，为 67.30%。此外，OfNAC73、OfNAC92、OfNAC29-2 结构中 α -螺旋占比均小于延伸链。跨膜结构预测分析表明 (图 4)：OfNAC17、OfNAC17-X2、OfNAC53、OfNAC91、OfNTM1-9 均在 C 端有 1 个跨膜结构。亚细胞定

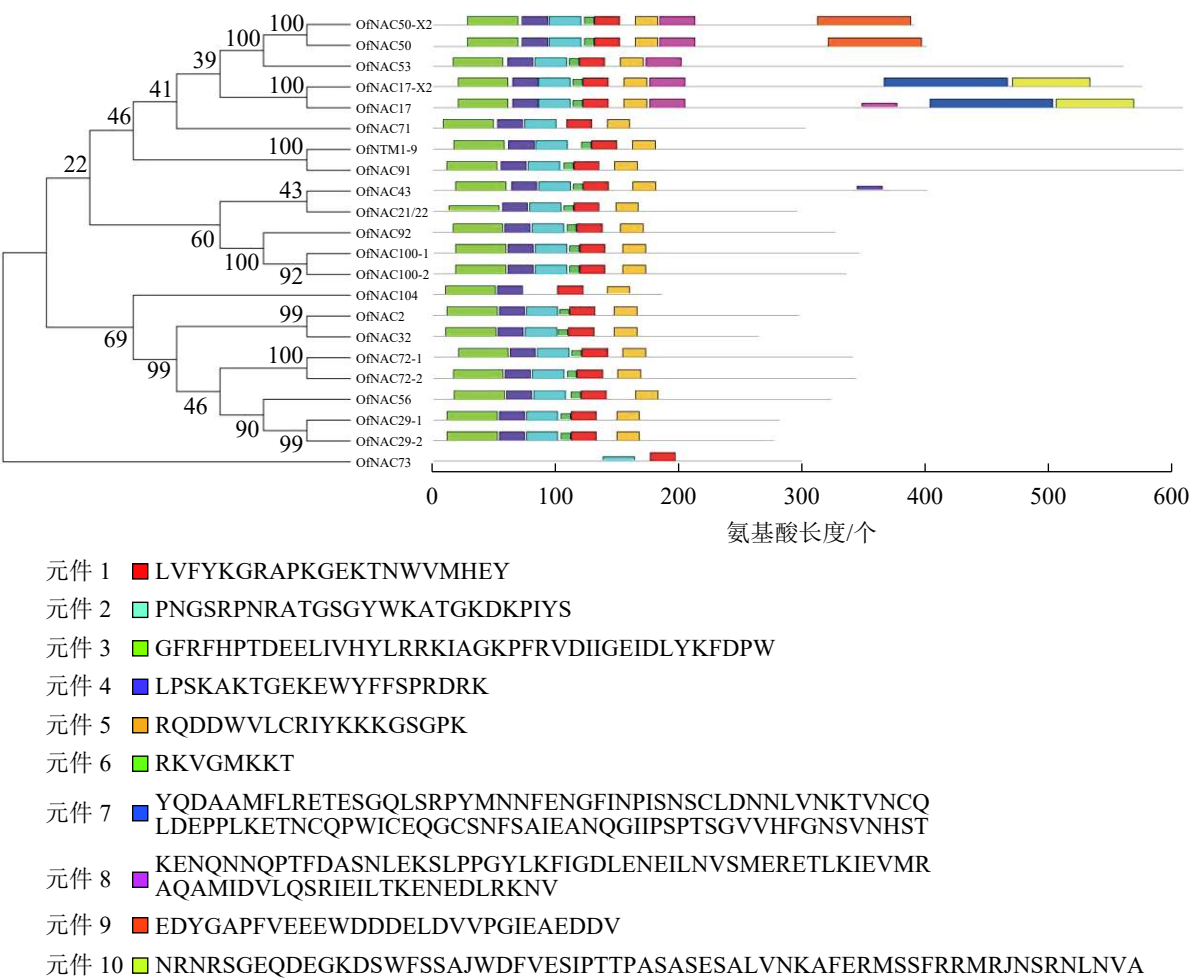


图 3 桂花 OfNAC 转录因子进化分析及保守基序分析

Figure 3 Evolution analysis of 22 OfNAC transcription factors and analysis of conserved motif

表 3 桂花 OfNAC 蛋白质理化性质及二级结构分析

Table 3 Secondary structure analysis of OfNAC of *O. fragrans*

序列名称	二级结构占比				序列名称	二级结构占比			
	α -螺旋/%	β -螺旋/%	延伸/%	无规则卷曲/%		α -螺旋/%	β -螺旋/%	延伸/%	无规则卷曲/%
OfNAC100-1	15.07	3.19	14.78	66.96	OfNAC17	24.59	2.81	12.71	59.90
OfNAC53	21.33	3.76	14.52	60.39	OfNAC104	18.82	3.76	15.59	61.83
OfNTM1-9	23.27	3.14	9.74	63.86	OfNAC92	14.15	3.69	15.69	66.46
OfNAC73	13.00	3.67	20.00	63.33	OfNAC72-1	17.99	3.54	16.22	62.24
OfNAC43	21.55	4.26	14.29	59.90	OfNAC72-2	16.96	3.51	16.08	63.45
OfNAC91	20.36	2.63	10.51	66.50	OfNAC29-1	3.21	3.57	17.86	55.36
OfNAC50-X2	31.11	5.91	12.34	50.64	OfNAC29-2	15.64	4.36	16.73	63.27
OfNAC50	27.82	5.01	10.53	56.64	OfNAC71	16.17	4.95	14.52	64.36
OfNAC21/22	17.23	3.04	15.20	64.53	OfNAC2	21.62	4.05	11.82	62.50
OfNAC56	16.15	3.11	15.84	64.91	OfNAC100-2	16.47	3.59	14.07	65.87
OfNAC17-X2	25.83	2.97	12.91	58.29	OfNAC32	17.11	2.66	12.93	67.30

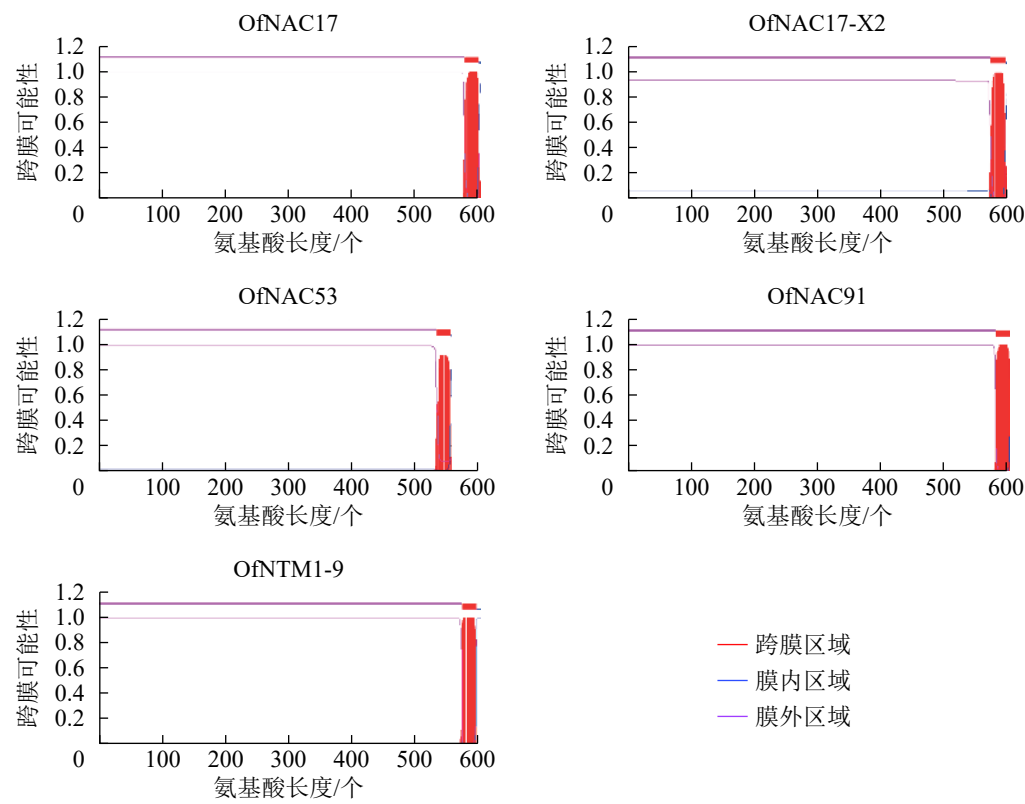


图 4 桂花 *OfNAC* 蛋白质跨膜结构预测

Figure 4 Transmembrane structure prediction related to *OfNAC* protein

位预测分析表明：*OfNAC53* 定位于内质网，*OfNAC50-X2* 和 *OfNAC50* 定位于叶绿体，其余 *OfNAC* 蛋白质均定位在细胞核中。

2.3 桂花 *OfNAC* 转录因子系统进化树

为了进一步研究 *OfNAC* 的进化关系，对桂花、拟南芥和水稻的 *NAC* 蛋白构建系统进化树。结果表明：22 个桂花 *OfNAC* 与拟南芥和水稻的 *NAC* 蛋白质共划分为 11 个亚族 (图 5)，除 a、b、c、e、h 亚族外，其他亚族均有 *OfNAC* 分布。其中 i 亚族桂花 *NAC* 蛋白质较多，有 8 个 *OfNAC* 蛋白质。

2.4 桂花 *OfNAC* 转录因子在不同花开放时期的表达分析

为了研究 *OfNAC* 在桂花花开放进程中的表达模式，对其进行荧光定量表达分析 (图 6)。*OfNAC100-2*、*OfNAC43*、*OfNAC73* 相对表达量在铃梗期 (S_4) 出现表达高峰，在此之后相对表达量大幅度降低，其中 *OfNAC43* 只在铃梗期 (S_4) 相对表达量最高，其余时期相对表达量很低；*OfNAC56* 从铃梗期开始呈现上升趋势，并在盛花期 (S_6) 到达顶峰；*OfNAC71*、*OfNAC29-1*、*OfNAC21/22* 从起始期 (S_1) 缓慢上升，在顶壳期 (S_3) 到达最高，随后急剧下降；*OfNAC29-2* 在圆珠期 (S_2) 相对表达量达到最大，之后在铃梗期 (S_4) 相对表达达到最低。*OfNAC* 在花开放不同阶段的表达情况说明：*OfNAC100-2*、*OfNAC43*、*OfNAC73*、*OfNAC71*、*OfNAC29-1*、*OfNAC21/22*、*OfNAC29-2* 可能参与花开放的调控，其中又以 *OfNAC43* 和 *OfNAC29-2* 关联最为紧密。

OfNAC50-X2、*OfNAC50*、*OfNAC17-X2* 整体呈现上升趋势，并在初开期 (S_5) 达到最高；*OfNAC100-1*、*OfNAC92*、*OfNAC72-1*、*OfNAC91*、*OfNTM1-9*、*OfNAC53* 在起始期 (S_1) 表达量较高，整体呈下降趋势；*OfNAC104*、*OfNAC32*、*OfNAC2*、*OfNAC17*、*OfNAC72-2* 均呈现先下调后上升的表达趋势，到盛花期 (S_6) 相对表达量较高。这说明，这些基因成员可能不参与桂花花开放的调控。

3 讨论

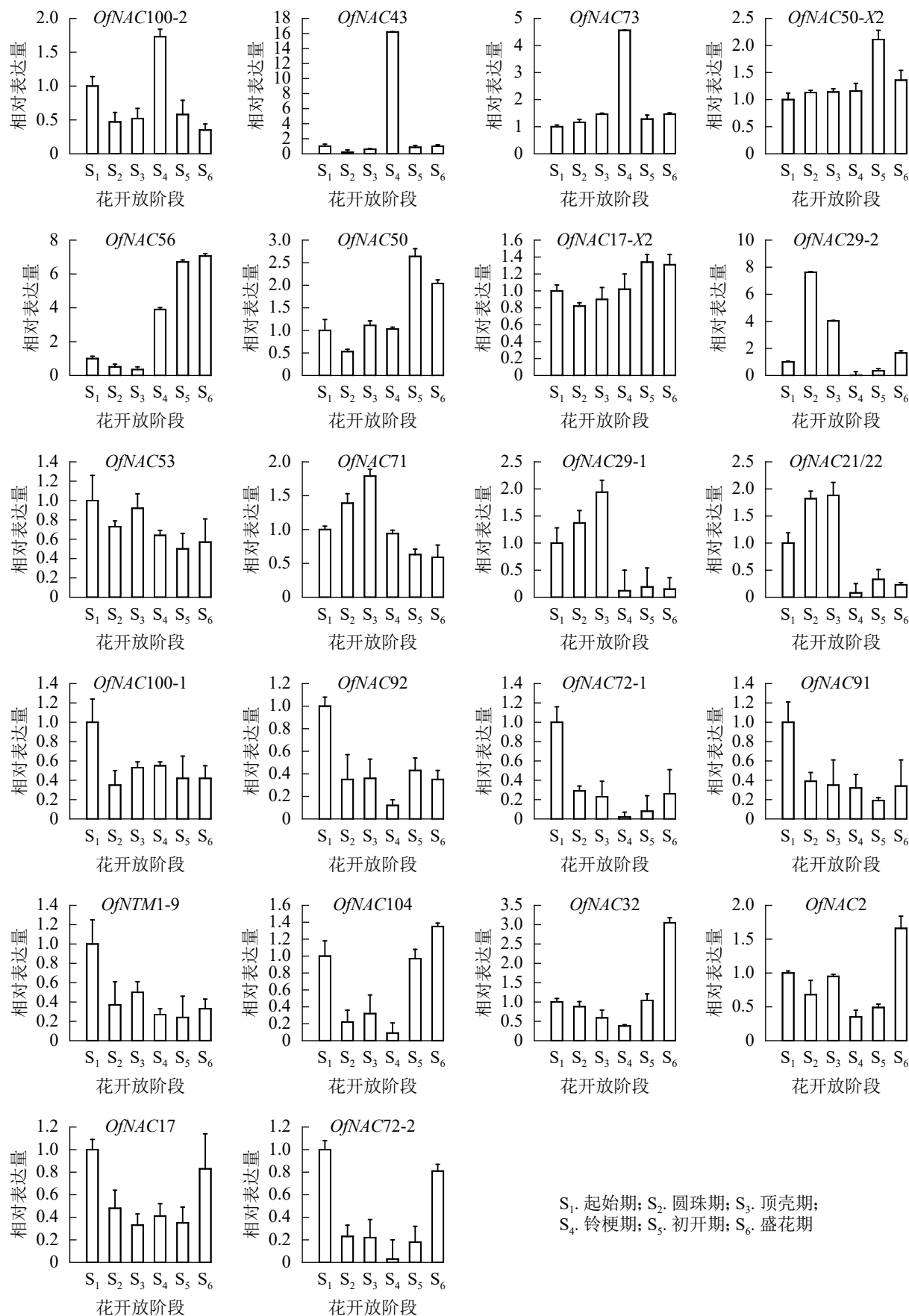
NAC 转录因子最初在矮牵牛 *Petunia hybrida* 中发现^[21]。在模式植物拟南芥、水稻以及园艺作物中的研究较多。在拟南芥、水稻、黄瓜 *Cucumis sativus*、紫花苜蓿 *Medicago sativa* 中分别有 151、117、91、

图5 桂花 *OfNAC* 与拟南芥、水稻的系统进化树Figure 5 Phylogenetic tree of *OfNAC*, *A. thaliana* and *O. sativa*

113 个 NAC 基因被鉴定^[22-24]。目前关于桂花 *OfNAC* 转录因子的报道较少。通过桂花 *OfNAC* 转录因子的鉴定与分析, 可为进一步了解桂花 *OfNAC* 的生物学功能及其在花开放过程中的作用奠定基础。

本研究通过转录组测序鉴定出 22 条开放阅读框完整的 *OfNAC* 转录因子, 对它们进行跨膜结构预测发现: *OfNAC17*、*OfNAC17-X2*、*OfNAC53*、*OfNAC91*、*OfNTM1-9* 这 5 个转录因子均在 C 端有 1 个跨膜结构, 推测它们可能是 NAC 膜结合转录因子。大多数 *OfNAC* 蛋白质预测定位在细胞核中的可能性较高, 因此推测, *OfNAC* 转录因子可能大多依旧在细胞核内发挥功能。目前, 已经在模式植物中发现 NAC 膜结合转录因子, 如拟南芥和水稻 NAC 基因组中已发现分别有 18 和 6 个膜结合 NAC 转录因子^[25-26], 其中拟南芥膜结合转录因子 *NTM1* 调节细胞分裂素信号传导而参与细胞分裂; *NTL8* 调节拟南芥开花时间, 过表达转基因植株出现晚花现象; *ANAC089* 被确定为另一个膜结合转录因子, 也有调控拟南芥开花时间的功能^[27-28]。由此推测, 桂花 *OfNAC17*、*OfNAC17-X2*、*OfNAC53*、*OfNAC91*、*OfNTM1-9* 可能也具有调控开花时间的功能。

桂花 22 个 *OfNAC* 与拟南芥和水稻 NAC 蛋白质共同划分为 11 个亚族。根据亲缘关系推测相关 *OfNAC* 基因的功能, 如 *OfNAC100-1*、*OfNAC100-2* 与拟南芥 *At5G6140.1*、*At5G7680.1*、*At5G39610.1*、*At3G29035.1* 亲缘性较高, 其中 *At5G39610.1*(*ANAC92/ATNAC2*) 存在于部分或完全开放的花的花器官

图 6 22 个 *OfNAC* 基因在不同花开放时期的表达结果Figure 6 Expression results of 22 *OfNAC* genes in different flower opening periods

中,且参与叶和花的衰老过程^[29]。在月季中,*RhNAC100*是At5G39610.1(*ANAC92/ATNAC2*)的同源基因,乙烯通过微调*microRNA164-RhNAC100*模块来调节细胞的扩张从而影响月季花瓣的扩展^[30],*OjNAC100-1*和*OjNAC100-2*与拟南芥At5G39610.1亲缘关系较近,所以推测*OjNAC100-1*与*OjNAC100-2*可能有调节花瓣扩展的相关功能。*OjNTM1-9*与At1G33060.1同源性较高,且At1G33060.1是膜结合转录因子,在拟南芥各个器官均有表达,影响叶片衰老^[25],推测*OjNTM1-9*可能作为NAC膜结合转录因子参与细胞衰老。

花开放的主要原因是花瓣细胞的扩展^[11-13],对*OjNAC*基因在桂花花开放时期的荧光定量表达分析表明:*OjNAC*在桂花花开放过程中发挥重要作用,且不同的*OjNAC*在此过程中表达模式有差异。*OjNAC71*、*OjNAC29-1*、*OjNAC21/22*在顶壳期相对表达达到最大。罗云等^[31]发现:*OjEXPA2*和*OjEXLA1*在桂花花开放的顶壳期相对表达急剧增加并到达顶峰,推测此时期的低丰度表达是后续花开放的基础。*OjNAC71*、*OjNAC29-1*、*OjNAC21/22*与*OjEXPA2*和*OjEXLA1*表达模式相似,推测它们参与花开放进程。*OjEXPA4*在花芽萌发期至圆珠期表达量较低,而顶壳期开始急剧上升,铃梗期表达量达到最大。罗云等^[31]推测:*OjEXPA4*是参与花瓣扩展的关键基因,*OjNAC100-2*、*OjNAC43*、*OjNAC73*相对表达量也在铃梗期出现峰值,推测它们亦作为关键基因参与桂花花瓣扩展。对月季的研究发现:*RhNAC2*和*RhEXPA4*参与月季花瓣细胞扩展,且*RhEXPA4*的表达可能受到*RhNAC2*的调控^[32],拟南芥中*NAC25*和*NAC1L*被确定是*EXPA2(EXPANSIN2)*的上游调控因子^[33]。以此推测,NAC转录因子可能与EXP的启动子结合,是EXP的上游调控因子,则*OjNAC29-2*在圆珠期相对表达最大,可能是作为*OjEXPA2*和*OjEXLA1*调控因子调节*OjEXP*影响花瓣细胞扩张从而为后续花瓣展开奠定基础,所以*OjNAC100-2*、*OjNAC43*、*OjNAC73*、*OjNAC71*、*OjNAC29-1*、*OjNAC21/22*、*OjNAC29-2*可能是参与桂花花开放的关键基因。由于*OjNAC43*、*OjNAC29-2*相对表达差异明显,推测它们与花开放关系更为紧密,但这些关键基因在桂花开花中的具体作用还需要进一步研究。

4 结论

本研究从桂花品种‘堰虹桂’转录组数据中筛选得到22条*OjNAC*序列,生物信息学分析结果表明:22条*OjNAC*转录因子氨基酸序列含有5个保守的亚结构域(A~E),其保守性由强到弱依次为C、A、D、B、E;亚细胞定位及跨膜结构预测表明:*OjNAC17*、*OjNAC17-X2*、*OjNAC53*、*OjNAC91*、*OjNTM1-9*是膜结合转录因子,且大多数*OjNAC*定位在细胞核。实时荧光定量PCR分析表明:在桂花花开放进程中,22个*OjNAC*基因表达模式不同,其中*OjNAC100-2*、*OjNAC43*、*OjNAC73*相对表达量在铃梗期(S₄)达到顶峰,在此之后相对表达降低。*OjNAC43*在铃梗期骤然升高,并且在此时期相对表达最大;*OjNAC71*、*OjNAC29-1*、*OjNAC21/22*从起始期呈缓慢上升趋势,在顶壳期到达最高,随后整体呈现下降趋势;*OjNAC29-2*在圆珠期相对表达量陡然上升,在铃梗期相对表达最低,推测*OjNAC100-2*、*OjNAC43*、*OjNAC73*、*OjNAC71*、*OjNAC29-1*、*OjNAC21/22*、*OjNAC29-2*等成员极有可能参与调控桂花的花开放。

5 参考文献

- [1] OLSEN A N, ERNST H A, LEGGIO L L, et al. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse [J]. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(2): 79–87.
- [2] HIBARA K, TAKADA S, TASAKA M. *CUC1* gene activates the expression of *SAM*-related genes to induce adventitious shoot formation [J]. *Plant J*, 2004, 36(5): 687–696.
- [3] ZHANG Qian, LUO Fang, ZHONG Yu, et al. Modulation of NAC transcription factor *NST1* activity by XYLEM NAC DOMAIN1 regulates secondary cell wall formation in *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2019, 71(4): 1449–1458.
- [4] PITAKSARINGKARN W, MATSUOKA K, ASAHINA M, et al. *XTH20* and *XTH19* regulated by *ANAC071* under auxin flow are involved in cell proliferation in incised *Arabidopsis* inflorescence stems [J]. *Plant J*, 2014, 80(4): 604–614.
- [5] KANEDA T, TAGA Y, TAKAI R, et al. The transcription factor *OsNAC4* is a key positive regulator of plant hypersensitive cell death [J]. *EMBO J*, 2009, 28(7): 926–936.

- [6] JEONG J S, KIM Y S, BAEK K H, *et al.* Root-specific expression of *OsNAC10* improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions [J]. *Plant Physiol*, 2010, **153**(1): 185 – 197.
- [7] CHEN Xu, LU Songchong, WANG Yaofeng, *et al.* *OsNAC2* encoding a NAC transcription factor that affects plant height through mediating the gibberellic acid pathway in rice [J]. *Plant J*, 2015, **82**(2): 302 – 314.
- [8] LIU Yuanlong, KE Lili, WU Guizhi, *et al.* *miR3954* is a trigger of *phasiRNAs* that affects flowering time in citrus [J]. *Plant J*, 2017, **92**(2): 263 – 275.
- [9] TRUPKINSA, ASTIGUETA F, BAIGORRIA A H, *et al.* Identification and expression analysis of NAC transcription factors potentially involved in leaf and petal senescence in *Petunia hybrid*[J]. *Plant Science*, 2019, **287**: 110195. doi: 10.1016/j.plantsci.2019.110195.
- [10] JIANG Guoxiang, LI Zhiwei, SONG Yunbo, *et al.* *LcNAC13* physically interacts with *LcR1MYB1* to coregulate anthocyanin biosynthesis-related genes during litchi fruit ripening[J]. *Biomolecules*, 2019, **9**(4): 135. doi: 10.3390/biom9040135.
- [11] van DOORN W G, van MEETEREN U. Flower opening and closure: a review [J]. *J Exp Bot*, 2003, **54**(389): 1801 – 1812.
- [12] van DOORN W G, KAMDEE C. Flower opening and closure: an update [J]. *J Exp Bot*, 2014, **65**(20): 5749 – 5757.
- [13] IRISH V F. The *Arabidopsis* petal: a model for plant organogenesis [J]. *Trends Plant Sci*, 2008, **13**(8): 430 – 436.
- [14] ZONIA L, MUNNIK T. Life under pressure: hydrostatic pressure in cell growth and function [J]. *Trends Plant Sci*, 2007, **12**(3): 90 – 97.
- [15] SABLowski R, MEYEROWITZ E M. A homolog of *NO APICAL MERISTEM* is an immediate target of the floral homeotic genes *APETALA3/PISTILLATA* [J]. *Cell*, 1998, **92**(1): 93 – 103.
- [16] JIANG Xinqiang, ZHANG Changqing, LÜ Peitao, *et al.* *RhNAC3*, a stress-associated NAC transcription factor, has a role in dehydration tolerance through regulating osmotic stress-related genes in rose petals [J]. *Plant Biotechnol J*, 2014, **12**(1): 38 – 48.
- [17] 王英, 张超, 付建新, 等. 桂花花芽分化和花开放研究进展[J]. *浙江农林大学学报*, 2016, **33**(2): 340 – 347.
WANG Ying, ZHANG Chao, FU Jianxin, *et al.* Progress on flower bud differentiation and flower opening in *Osmanthus fragrans* [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2016, **33**(2): 340 – 347.
- [18] ZHANG Chao, WANG Yiguang, FU Jianxin, *et al.* Transcriptomic analysis and carotenogenic gene expression related to petal coloration in *Osmanthus fragrans* ‘Yanhong Gui’ [J]. *Trees-Struct Funct*, 2016, **30**(4): 1207 – 1223.
- [19] CHEN Chengjie, CHEN Hao, ZHANG Yi, *et al.* TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Mol Plant*, 2020, **13**(8): 1194 – 1202.
- [20] 付建新, 张超, 王艺光, 等. 桂花组织基因表达中荧光定量 PCR 内参基因的筛选[J]. *浙江农林大学学报*, 2016, **33**(5): 727 – 733.
FU Jianxin, ZHANG Chao, WANG Yiguang, *et al.* Reference gene selection for quantitative real-time polymerase chain reaction(qRT-PCR) normalization in the gene expression of sweet osmanthus tissues [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2016, **33**(5): 727 – 733.
- [21] 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*, 1997, **85**(2): 159 – 170.
- [22] NURUZZAMAN M, MANIMEKALAI R, AKHTER S, *et al.* Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice [J]. *Gene*, 2010, **465**(1/2): 30 – 44.
- [23] LIU Xingwang, WANG Ting, BARTHOLOMEW E, *et al.* Comprehensive analysis of NAC transcription factors and their expression during fruit spine development in cucumber (*Cucumis sativus* L.)[J]. *Hortic Res*, 2018, **5**(1): 31. doi: 10.1038/s41438-018-0036-z.
- [24] MIN Xueyang, JIN Xiaoyu, ZHANG Zhengshe, *et al.* Genome-wide identification of NAC transcription factor family and functional analysis of the abiotic stress-responsive genes in *Medicago sativa* L. [J]. *J Plant Growth Regul*, 2020, **39**(1): 324 – 337.
- [25] KIM S M, KIM S G, KIM Y S, *et al.* Exploring membrane-associated NAC transcription factors in *Arabidopsis*: implications for membrane biology in genome regulation [J]. *Nucl Acids Res*, 2007, **35**(1): 203 – 213.

- [26] FANG Yujie, YOU Jun, XIE Kabin, *et al.* Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice [J]. *Mol Genet Genomics*, 2008, **280**(6): 547 – 563.
- [27] KIM S G, LEE A K, YOON H K, *et al.* A membrane-bound NAC transcription factor *NTL8* regulates gibberellic acid-mediated salt signaling in *Arabidopsis* seed germination [J]. *Plant J*, 2008, **55**(1): 77 – 88.
- [28] 李建琴, 张娟, 王学臣, 等. 膜系留转录因子 *ANAC089* 在拟南芥开花诱导过程中起负调控作用[J]. *中国科学: 生命科学*, 2010, **40**(5): 408 – 417.
- LI Jianqin, ZHANG Juan, WANG Xuechen, *et al.* A membrane-tethered transcription factor *ANAC089* negatively regulates floral initiation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Sci Sin Vitae*, 2010, **40**(5): 408 – 417.
- [29] BALAZADEH S, SIDDIQUI H, ALLU A D, *et al.* A gene regulatory network controlled by the NAC transcription factor *ANAC092/AtNAC2/ORE1* during salt-promoted senescence [J]. *Plant J*, 2010, **62**(2): 250 – 264.
- [30] PEI Haixia, MA Nan, TIAN Ji, *et al.* An NAC transcription factor controls ethylene-regulated cell expansion in flower petals [J]. *Plant Physiol*, 2013, **163**(2): 775 – 791.
- [31] 罗云, 张超, 付建新, 等. 桂花扩展蛋白基因家族的鉴定和表达分析[J]. *农业生物技术学报*, 2017, **25**(8): 1289 – 1299.
- LUO Yun, ZHANG Chao, FU Jianxin, *et al.* Identification and expression analysis of expansin gene family in *Osmanthus fragrans* [J]. *J Agric Biotechnol*, 2017, **25**(8): 1289 – 1299.
- [32] DAI Fanwei, ZHANG Changqing, JIANG Xinqiang, *et al.* *RhNAC2* and *RhEXPA4* are involved in the regulation of dehydration tolerance during the expansion of rose petals [J]. *Plant Physiol*, 2012, **160**(4): 2064 – 2082.
- [33] SÁNCHEZ-MONTESINO R, BOUZA-MORCILLO L, MARQUEZ J, *et al.* A regulatory module controlling GA-mediated endosperm cell expansion is critical for seed germination in *Arabidopsis* [J]. *Mol Plant*, 2019, **12**(1): 71 – 85.