

芒果 *MiNAC7* 基因的表达模式及在开花和非生物逆境胁迫应答中的功能分析

黄 星, 徐欢欢, 黎开奖, 何新华*, 夏黎明, 陆婷婷, 梁容真, 罗 聪*

广西大学农学院/亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室/广西农业环境与农产品安全重点实验室, 广西南宁 530004

摘 要: NAC 转录因子是植物中一个大的基因家族, 在调控植物生长发育、信号传导、逆境胁迫响应等方面起重要作用。前期研究中, 从芒果成花基因酵母文库筛选中分离获得 1 个 NAC 基因, 命名为 *MiNAC7*, 本研究对该基因的生物信息学、表达模式和基因功能进行分析。生物信息学分析表明: *MiNAC7* 基因位于 10 号染色体上, 有 4 个内含子, 5 个外显子; *MiNAC7* 基因编码区长度为 1137 bp, 编码 379 个氨基酸, 理论等电点为 4.88, 蛋白质分子量为 93.41 kDa, 氨基酸序列中含有 1 个 NAM 保守结构域。系统进化树分析表明, 芒果 *MiNAC7* 与阿月浑子 *PvNAC26* 亲缘关系最接近, 同源性最高, 氨基酸序列相似性为 69.64%。启动子序列分析显示, *MiNAC7* 基因的启动子区域包含光响应元件、赤霉素响应元件以及生长素响应元件等。表达分析显示, *MiNAC7* 基因在童期组织的茎与芽中表达水平较高, 在叶中表达很低, 在成年期组织的茎中表达水平较高, 在花和叶中表达很低。同时发现 *MiNAC7* 基因在营养生长期的叶片中表达水平较高, 在成花转变期和花发育期的叶片中表达水平很低。超量表达的 *MiNAC7* 基因诱导转基因拟南芥出现晚花表型, 在超量表达 *MiNAC7* 基因的拟南芥中显著降低了促花基因 *AtFT* 和 *AtAPI* 的表达水平, 而 *AtFLC* 晚花基因的表达水平显著提高。逆境胁迫处理显示, 超量表达 *MiNAC7* 基因的拟南芥提高了对干旱和盐的抗性, 提高了对 GA₃ 的抗性, 但对 ABA 更敏感。本研究表明, 芒果 *MiNAC7* 基因不仅影响成花也参与对非生物胁迫的应答, 为深入研究 *MiNAC7* 基因参与调控芒果开花和逆境胁迫应答的基因调控网络奠定基础。

关键词: 芒果; *MiNAC7*; 生物信息学分析; 表达模式; 功能研究

中图分类号: S667.7 文献标识码: A

Expression and Function Analysis of a *MiNAC7* Gene in Response to Flowering and Abiotic Stress in Mango

HUANG Xing, XU Huanhuan, LI Kaijiang, HE Xinhua*, XIA Liming, LU Tingting, LIANG Rongzhen, LUO Cong*

College of Agriculture, Guangxi University / State Key Laboratory for Protection and Utilization of Subtropical Agricultural Biological Resources / Guangxi Key Laboratory for Agro-Environment and Agro-Product Safety, Nanning, Guangxi 530004, China

Abstract: NAC transcription factors are a large gene family in plants which play important roles in regulating plant growth and development, signal transduction, stress response, etc. In the previous study, the NAC gene, named *MiNAC7*, was isolated by the yeast two-hybrid system. In this study, the bioinformatics, expression patterns and gene functions of genes were studied. Bioinformatics analysis showed that the *MiNAC7* gene was located on chromosome 10, with 4 introns and 5 exons. The length of the coding region of the *MiNAC7* gene was 1137 bp, encoding 379 amino acids, the theoretical isoelectric point was 4.88, the molecular weight of the protein was 93.41 kDa, and the amino acid sequence

收稿日期 2022-09-30; 修回日期 2022-11-04

基金项目 国家现代农业产业技术体系岗位项目“广西芒果创新团队栽培与病虫害防治”(No. nycytxgxcxtd-2021-06-2); 科技先锋队“强农富农”“六个一”专项行动(No. 202204); 广西创新驱动发展专项(桂科 AA22068098-2)。

作者简介 黄 星(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 果树遗传育种与生物技术。*通信作者(Corresponding author): 何新华(HE Xinhua), E-mail: honest66222@163.com; 罗 聪(LUO Cong), E-mail: 22003luocong@163.com。

contained a conserved NAM domain. Phylogenetic tree analysis showed that mango *MiNAC7* and pistachio *PvNAC26* had the closest genetic relationship and the highest homology, and the amino acid sequence similarity was 69.64%. Promoter sequence analysis showed that the promoter region of the *MiNAC7* gene contained light response elements, gibberellin response elements and auxin response elements. Expression analysis showed that the expression level of the *MiNAC7* gene was high in the stems and buds of juvenile tissues, low in flowers, high in the stems of adult tissues, and low in flowers and leaves. At the same time, it was found that the *MiNAC7* gene maintained a high expression level in the leaves at the vegetative growth stage and a low expression level in the leaves at the flowering transformation stage and flower development stage. Overexpression of the *MiNAC7* gene led to a late-flowering phenotype in transgenic *Arabidopsis*. The overexpression of the *MiNAC7* gene in *Arabidopsis* significantly reduced the expression level of the floral-promoting genes *AtFT* and *AtAPI*, while the expression level of the late-flowering gene *AtFLC* was significantly increased. Stress treatment showed that *Arabidopsis* with excessive expression of the *MiNAC7* gene improved its resistance to drought and salt and improved its resistance to GA₃ but was more sensitive to ABA. This study shows that the mango *MiNAC7* gene not only affects flowering but also participates in the response to abiotic stress, which would lay a foundation for further research on the gene regulatory network of the *MiNAC7* gene involved in regulating mango flowering and stress response.

Keywords: mango; *MiNAC7*; bioinformatics analysis; expression pattern; functional research

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.11.014

NAC (*NAM*、*ATAF1/2* 和 *CUC2*) 基因家族是最大的植物特有转录因子家族之一, 基因成员数量庞大^[1]。随着全基因组测序技术日趋完善, 目前已发现绝大部分物种均存在 100 个以上的 NAC 基因数量^[2]。NAC 基因在影响植物生长^[3]、调控植株成花^[4]、果实成熟^[5-6]、叶片衰老^[7]和应对非生物胁迫^[8-10]等生理过程中发挥了重要作用。

NAC 基因家族参与多种激素调控途径和非生物胁迫应答过程。NAC 基因参与调节 ABA 信号传导途径, 如: 拟南芥 *AtNAC016* 可以结合 ABA 依赖性胁迫信号通路中的关键转录因子脱落酸响应元件结合蛋白 1 基因 (*AREB1*) 的启动子, 通过抑制 *AREB1* 的转录来促进对干旱胁迫的反应^[11]; 过表达水稻 *ONAC022* 对外源 ABA 的敏感性增强, 与 ABA 有关的调控基因表达上调, 即水稻 *ONAC022* 通过调节 ABA 信号传导途径来提高抗旱和耐盐胁迫能力^[12]; 陆地棉 *GhirNAC2* 直接与 *GhNCED3a/3c* 的启动子结合, 通过调节 *GhNCED-3a/3c* 表达来调节 ABA 生物合成和气孔关闭, 增强了转基因植物的抗旱性^[13]。NAC 基因参与调节 GA 信号传导途径, 如甘蔗 *ScNAC23* 直接与 DELLA 蛋白 *ScGAI* 相互作用调节 GA 信号传导途径来促进甘蔗开花和叶片衰老^[14]。NAC 基因还参与调节生长素和细胞分裂素等途径, 如水稻 *OsNAC2* 基因可以直接结合 IAA 和细胞分裂素 (cytokinin, CK) 相关基因的启动子来调节根发育过程中的细胞分裂^[15]。另外, 甘蔗 *OsNAC14* 可以直接与 DNA 修复系统中同源重组的关键成分 *OsRAD51A1* 启动

子之间相互作用, 招募参与 DNA 损伤修复和防御反应的因子来提高耐旱性^[8]; 梭梭 *HaNAC1* 直接与 *AtNAC32* 蛋白相互作用来增强抗旱性^[16]。

芒果 (*Mangifera indica* L.) 是重要的热带水果, 适时开花有利于芒果生产^[17]。前期研究中, 课题组从芒果成花基因 *LEAFY* 的酵母文库筛选获得 1 个 *NAC7* 基因, 而 NAC 转录因子参与了植物的逆境胁迫应答^[18]。目前尚不清楚芒果 *MiNAC7* 基因是否参与了芒果的成花与逆境胁迫应答。因此, 本研究对 *MiNAC7* 的生物信息学、表达模式和基因功能进行分析, 明确 *MiNAC7* 基因在芒果开花和非生物胁迫中的功能。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用芒果品种为四季蜜芒 (*Mangifera indica* L. cv. SiJiMi), 该芒果品种生长于广西大学农学院标本园中。用于时间表达分析的样本主要为成年期的叶片, 采集时间为 2021 年 9 月至 2022 年 5 月, 每月 1 日下午 5 点采集 1 次。时间表达主要分为 5 个生长阶段, 即营养生长期、成花诱导期、花芽分化期、花序伸长和开花期、果实发育初期。用于组织表达分析的样本主要为童期的叶、茎、芽, 采集时间为 2022 年 2 月 15 日; 成年期的叶、茎、花以及幼胚和成熟胚, 采集时间为 2021 年 11 月 16 日。所有样品采集后立即用液氮冷冻并保存在 -80 °C 冰箱中。本研究使用的拟南芥为哥伦比亚型拟南芥。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 利用 TBtools 软件和 cDNA 以及 DNA 文件绘制 *MiNAC7* 的 DNA 序列结构图^[19]; 通过 NCBI/blastp 数据库对芒果 *MiNAC7* 编码的氨基酸序列进行同源查找并预测其保守结构域, 利用 DNAMAN 软件对不同物种的 NAC 蛋白进行氨基酸序列比对; 利用 MEGA 7.0 软件构建 NAC 蛋白的系统发育树^[20]; 利用 NewPlace 数据库对 *MiNAC7* 基因前 2000 bp 的启动子区进行分析并通过 TBtools 软件绘制顺式元件的分布。

1.2.2 *MiNAC7* 的表达分析 芒果样品 RNA 采用美基公司的难提植物总 RNA 小提试剂盒提取, 拟南芥样品 RNA 采用植物 RNA 小量提取试剂盒提取。利用 M-MLV 逆转录酶按照说明书将 RNA 逆转录为 cDNA, 用于后续实验。利用在线软件 Primer 3.0 Plus 设计特异引物 (*MiNAC7u*: 5'-CTGCAGACATAAACGGTGGGA-3', *MiNAC7d*: 5'-TGGGTTGACAAGATCCAACA-3'), 以芒果 *MiActin1* 为内参基因^[21] (*qMiACTu*: 5'-CCGAGACATGAAGGAGAAGC-3', *qMiACTd*: 5'-GTGGTCTCATGGATACCA-GCA-3')。采用 TaKaRa 公司的 SYBR Green 和 SYBR Premix Ex *Taq* II 试剂, 使用 Applied Biosystems 7500 实时定量 PCR 仪对 *MiNAC7* 基因的表达进行 RT-qPCR 检测, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法对荧光定量的结果进行分析^[22]。

1.2.3 拟南芥的转化 将 *MiNAC7* 的完整 cDNA 序列 (CDS) 插入到 pBI121 载体中, 将阳性重组质粒 pBI121-*MiNAC7* 按照说明书的方法导入农杆菌 EHA105 中, 随后用花序侵染法对野生型拟南芥进行转化^[23]。收获侵染后的种子, 将其播种于含有 50 mg/L 卡纳的 1/2MS 培养基中进行阳性苗筛选, 利用余海霞等^[24]改良的 CTAB 法提取阳性拟南芥的 DNA, 用 *MiNAC7* 的特异引物对阳性转基因拟南芥进行 PCR 检测与验证。对序列检测正确的阳性拟南芥进行培育繁殖, 直至获得纯合株系。

1.2.4 转基因拟南芥的表型分析 将拟南芥置于长日照 (16 h 光照/8 h 黑暗) 和 21 °C 的条件下培养, 以野生型拟南芥 (WT) 和转空载拟南芥 (pBI121) 为对照, 观察转基因拟南芥的表型, 统计植株第一朵花开的时间。以 T₃ 代纯合转基因拟南芥的 cDNA 为模板, 拟南芥基因 *AtACTIN2* 为内参基因 (*AtActin2u*: 5'-TCAGATGCCAG-AAGTCTTGTCC-3', *AtActin2d*: 5'-CCGTACAGATCCTTCCTGATATCC-3'), 通过半定量法^[25]

检测芒果 *MiNAC7* 基因在转基因拟南芥中的表达水平。通过 qRT-PCR 法检测开花相关基因在转基因拟南芥中的表达水平 (*AtFTu*: 5'-CTTGGCAG-GCAAACAGTGTATGCAC-3', *AtFTd*: 5'-GCCA-CTCTCCCTCTGACAATTGTAGA-3'; *AtAP1u*: 5'-CACCAAATCCAGCATCCTTAC-3', *AtAP1d*: 5'-GTTTCGAGATCATTCCTCCTCA-3'; *AtFLCu*: 5'-ACTTGTGGATAGCAAGCTTGTGG-3', *AtFLCd*: 5'-CATGAGTTCGGTCTTCTTGGCTC-3')。

1.2.5 转基因拟南芥的非生物逆境胁迫处理 将 T₄ 代转基因拟南芥幼苗置于长日照培养箱经过 3 d 培养后转入逆境培养基中, 竖直放置并继续培养 5 d 后, 拍照并记录野生型和转基因拟南芥的根长表型和鲜重。逆境胁迫处理所用的试剂及浓度设计如下: 盐胁迫使用浓度为 0、100、125 mmol/L 氯化钠 (NaCl); 干旱胁迫使用的甘露醇 (mannitol) 浓度为 0、300、400 mmol/L; ABA 浓度为 0、5 μmol/L, GA₃ 浓度为 0、5、10 μmol/L。

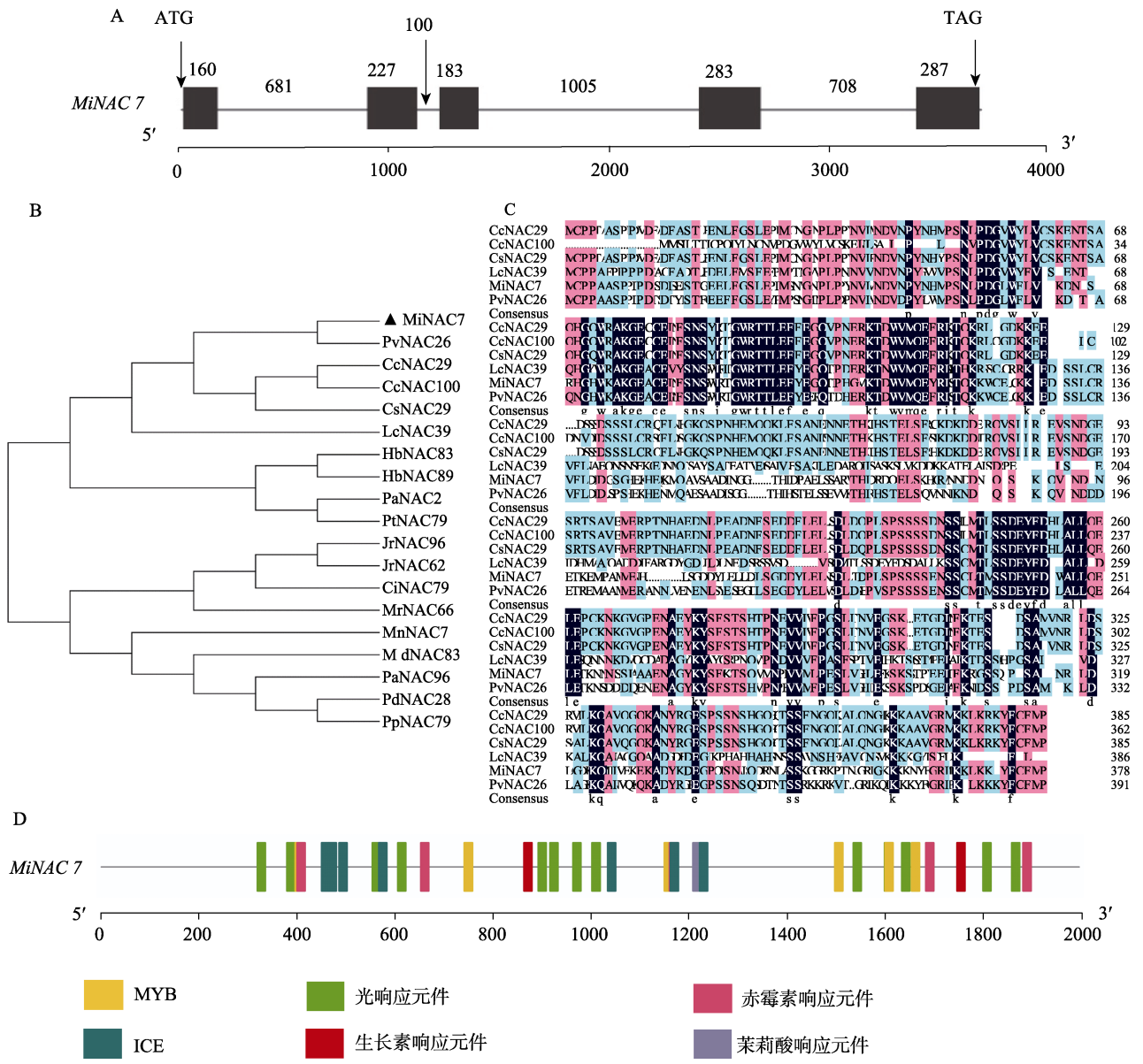
1.3 数据处理

本研究所有数据 (如表达分析、表型分析和非生物胁迫逆境分析数据等) 均使用 Excel 软件进行统计处理, 采用 IBM SPSS 25.0 软件进行单因素方差分析和 Duncan 多重范围检验, 利用 GraphPad Prism 9 绘制条形图, $P < 0.05$ 表示差异显著, 有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 *MiNAC7* 生物信息学分析

MiNAC7 基因 DNA 全长为 3631 bp, 编码区长度为 1137 bp, 编码 379 个氨基酸, 等电点为 4.88, 蛋白质分子量为 93.41 kDa。 *MiNAC7* 有 4 个内含子, 5 个外显子 (图 1A)。利用 MEGA 7.0 软件构建了 NAC 蛋白的系统进化树 (图 1B), 芒果 *MiNAC7* 与阿月浑子 *PvNAC26* 最接近, 同源性最高, 氨基酸相似性为 69.64%, 且 *MiNAC7* 与 *PvNAC26*、*CcNAC29*、*CcNAC100*、*CsNAC29*、*LcNAC39* 同源性较高。故对这 6 个物种的 NAC 氨基酸序列进行比对, 其保守结构域如图 1C 所示, 6 种蛋白的 N 端表现出高度的相似性, 氨基酸序列中含有 1 个 NAM 保守结构域, 是 NAC 基因家族的典型结构域, C 端表示出明显的差异。对 *MiNAC7* 基因的起始密码子前 2000 bp 的启动子区域进行顺式元件分析 (图 1D), *MiNAC7* 基因启动子主要包含 6 种不同类型的顺式调控元件, 即



A: *MiNAC7* 的 DNA 序列结构，方块表示外显子，横线表示内含子；B: *MiNAC7* 的系统进化树；
 C: *MiNAC7* 的氨基酸序列比对；D: *MiNAC7* 的启动子顺式作用元件可视化图。

A: Gene structure analysis of *MiNAC7*, squares represent exons and horizontal lines represent introns; B: Phylogenetic analysis of *MiNAC7*;
 C: Sequences analysis of *MiNAC7*; D: Cis-elements within *MiNAC7* gene promoters analysis of *MiNAC7*.

图 1 *MiNAC7* 基因生物信息学分析

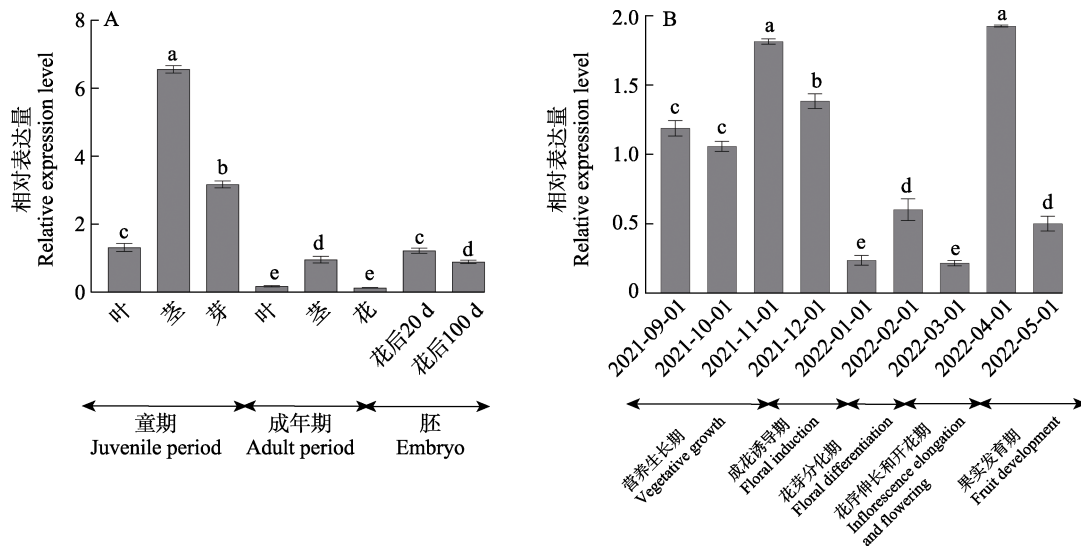
Fig. 1 Bioinformatics analysis of *MiNAC7* gene

光响应元件 (light response element)、ICE 转录因子结合位点、MYB 转录因子结合位点、赤霉素响应元件 (gibberellin response)、茉莉酸响应元件 (jasmonic acid response element) 以及生长素响应元件 (auxin response element) 等。

2.2 *MiNAC7* 基因的表达模式分析

为探究 *MiNAC7* 基因在四季蜜芒不同组织的表达特性，采集童期和成年期的不同组织进行表达模式分析。如图 2A 所示，*MiNAC7* 基因在各个组织中均表达，但表达存在差异，*MiNAC7* 在

童期组织的茎中表达最高，其次是在芽中，在叶中表达很低，在成年期的茎中表达水平较高，在花和叶中表达很低；表明 *MiNAC7* 基因在茎中优势表达。为了探究 *MiNAC7* 基因在四季蜜芒中不同生长发育时期的表达特性，利用 qRT-PCR 对不同时期的表达模式进行分析。如图 2B 所示，*MiNAC7* 基因在不同时期的叶片中均存在不同程度的表达，其中在营养生长期的叶片中维持较高的表达水平，在成花转变期和花发育期的叶片中表达水平很低，说明 *MiNAC7* 基因与植物生长发



A: *MiNAC7* 基因在不同组织中的表达; B: *MiNAC7* 基因在不同时期的表达。不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

A: Relative expression of *MiNAC7* in different tissues; B: Relative expression of *MiNAC7* at different stages.

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 2 *MiNAC7* 基因的表达模式分析

Fig. 2 Expression analysis of *MiNAC7* gene in mango

育有关。

2.3 *MiNAC7* 转基因拟南芥对开花的影响

将构建好的载体采用花序侵染法转化野生型拟南芥植株后,筛选阳性株系并繁育至 T_3 代纯合植株。通过半定量 PCR 技术检测 *MiNAC7* 在转基因拟南芥中的表达情况,结果如图 3A1 所示, *MiNAC7* 在这 3 个转基因株系(OE-2、OE-3、OE-6)中均可以正常表达,而在野生型(WT)和转 pBI121 空载拟南芥中不表达。以野生型拟南芥(WT)和转空载 pBI121 拟南芥为对照,观察 *MiNAC7* 转基因拟南芥的开花时间。结果如图 3A 所示, *MiNAC7* 转基因拟南芥显著延迟开花,开花时间比对照植株晚约 4 d (图 3B)。转基因拟南芥开花内源基因表达水平检测显示, *MiNAC7* 转基因拟南芥中促花基因 *AtFT* 和 *AtAPI* 的表达水平被显著下调,而抑制成花基因 *AtFLC* 的表达水平被显著上调(图 3C)。

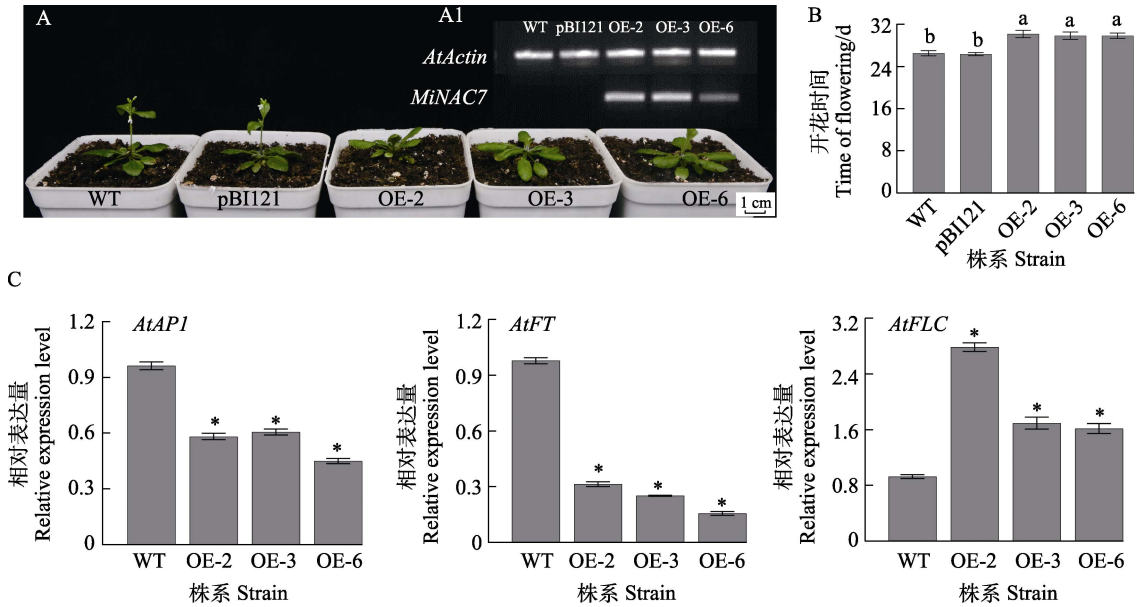
2.4 *MiNAC7* 转基因拟南芥对逆境胁迫应答的影响

为了解 *MiNAC7* 在非生物逆境胁迫中的功能,对野生型拟南芥和 3 个超量表达株系进行盐胁迫处理(0、100、125 mmol/L NaCl)、干旱胁迫处理(0、300、400 mmol/L 甘露醇)和激素处理(0、5 μ mol/L ABA, 0、5、10 μ mol/L GA_3),结果见图 4。在对照组中,野生型与 *MiNAC7* 转基因拟南芥在根长和鲜重上差异不显著,实验组

的野生型与 *MiNAC7* 转基因拟南芥在根长和鲜重上差异显著。盐胁迫处理使拟南芥根长生长受到抑制,但 *MiNAC7* 转基因拟南芥的根长受到的抑制显著小于野生型拟南芥。干旱胁迫抑制了拟南芥根长生长,鲜重重量降低,但 *MiNAC7* 转基因拟南芥的根长受到的抑制比野生型拟南芥轻,鲜重比野生型拟南芥重。 GA_3 激素处理使拟南芥根长和鲜重均受到不同程度的影响,5 μ mol/L GA_3 激素处理促进了 *MiNAC7* 转基因拟南芥的根长生长,鲜重升高,但对野生型拟南芥的根长生长无显著差异;10 μ mol/L GA_3 激素处理与 5 μ mol/L GA_3 激素处理相比,野生型拟南芥和 *MiNAC7* 转基因拟南芥的根长生长均被抑制。在 5 μ mol/L ABA 激素处理下拟南芥表型差异明显,植株弱小, *MiNAC7* 转基因拟南芥的根长比野生型拟南芥的短。综上所述,过表达 *MiNAC7* 基因增强了转基因拟南芥对 ABA 的敏感性、抗 GA_3 以及抗旱和耐盐碱能力。

3 讨论

NAC 基因家族广泛存在于大量物种中,在植物激素信号传导,成花发育、果实成熟、叶片衰老等植物生长发育过程以及高盐、干旱、低温或高温等非生物胁迫中起重要作用^[26]。通过酵母双杂交文库筛选,挖掘获得了 1 个 NAC 类转录因子,命名为 *MiNAC7*, NCBI 同源性比较分析显示,

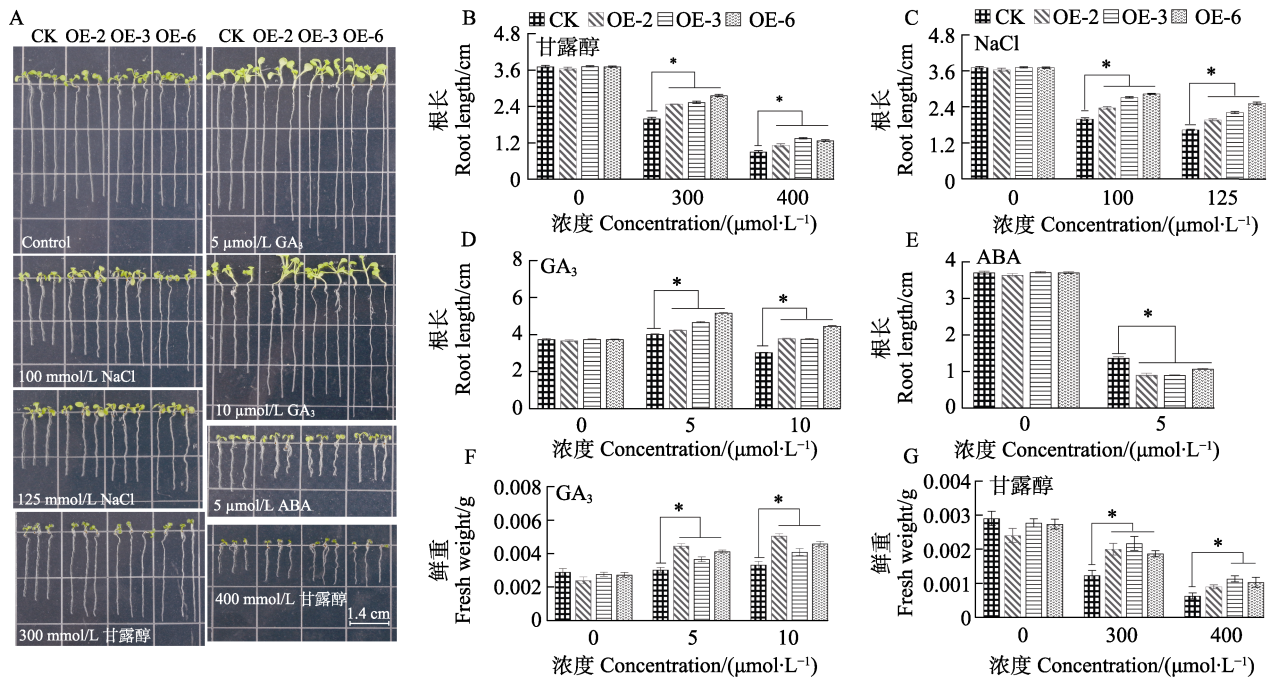


A: 过表达 *MiNAC7* 转基因拟南芥推迟开花图, A1: *MiNAC7* 基因在野生型拟南芥、转 pBI121 空载拟南芥和 3 个超量表达 *MiNAC7* 拟南芥株系中的半定量表达水平; B: 过表达 *MiNAC7* 转基因拟南芥表型开花时间分析, 不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$); C: *MiNAC7* 转基因拟南芥中 3 个开花相关基因的表达模式, *表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

A: Overexpression of *MiNAC7* in *Arabidopsis* delays flowering, A1: Semi-quantitative expression analysis of *MiNAC7* in wide type, pBI121-expressing and *MiNAC7* overexpression transgenic lines; B: Phenotypic data of overexpressed *MiNAC7* gene in *Arabidopsis*, Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$); C: Expression analysis of the transgenic *Arabidopsis* with flowering time-related genes, * indicates significant difference among treatments ($P < 0.05$).

图 3 超量表达 *MiNAC7* 拟南芥推迟开花的表型分析

Fig. 3 Overexpression of *MiNAC7* in *Arabidopsis* delays flowering



A: 不同逆境胁迫下过表达 *MiNAC7* 转基因拟南芥生长情况; B~E: 不同逆境胁迫下过表达 *MiNAC7* 转基因拟南芥根长数据图; F~G: 不同逆境胁迫下过表达 *MiNAC7* 转基因拟南芥鲜重数据图; *表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

A: Growth of *Arabidopsis* seedlings on MS plates with different stress; B~E: Root length data of overexpressed *MiNAC7* transgenic *Arabidopsis* under different stress; F~G: Weight data of overexpressed *MiNAC7* transgenic *Arabidopsis* under different stress; * indicates significant difference among treatments ($P < 0.05$).

图 4 超量表达 *MiNAC7* 拟南芥植株对逆境胁迫的抗性分析

Fig. 4 Phenotypic analysis of roots of wild-type and *MiNAC7*-overexpressing *Arabidopsis* under abiotic stress

MiNAC7 与多个被命名为不同名字的 *NAC* 基因具有同源性, 其中与阿方索芒果 *MiNAC7* 的核苷酸和氨基酸同源性分别为 98.16% 和 96.04%。进化树分析显示芒果 *MiNAC7* 与阿月浑子 *PvNAC26* 最接近, 同源性最高, 氨基酸相似性为 69.64%。启动子顺式元件分析表明, 芒果 *MiNAC7* 基因可能受到光照、激素以及逆境胁迫的调控。

不同物种 *NAC* 家族基因表现出不同的表达模式。蜡梅 *CpNAC68* 在成熟叶和花上特异表达^[27], 小麦 *TiNAC2A* 在叶和根中特异表达^[28]。黄瓜 *NAC* 基因家族中有 11 个基因的优势表达部位是茎^[29], 菊花菜 *NAC* 基因家族中有 3 个成员在茎的生长发育过程中起重要的调控作用^[30]。在本研究中, 芒果 *MiNAC7* 基因在童期组织中的表达水平相对于成年期更高, 在童期茎的表达量最高, 与北沙柳 *SpsNAC005* 的研究结果相似^[31]。芒果时空组织分析结果显示, *MiNAC7* 基因在营养生长期表达量较高, 但在成花转变和花发育期表达水平较低, 说明 *MiNAC7* 与芒果成花有关。

在植物开花时间的调控中不同的 *NAC* 基因具有不同的功能。甘蔗 *ScNAC23* 的过表达促使转基因拟南芥提前开花^[14], 黄麻 *CcNAC1* 可以让植物的花期提前^[32], *OsNAC7* 亚家族 *CHR00069684* 基因使转基因烟草提前开花^[30]。本研究中, *MiNAC7* 过表达的转基因拟南芥延迟开花, 并下调开花促进基因 *AtFT* 和 *AtAPI* 的表达, 上调成花抑制基因 *AtFLC* 的表达, 说明 *MiNAC7* 通过调控成花相关基因的表达进而影响转基因植株成花。芒果 *MiNAC1* 基因不影响转基因拟南芥的开花时间^[33], 说明不同类型的 *NAC* 基因在调控植物成花过程中的功能存在差异。

植物 *NAC* 转录因子在多种非生物胁迫应答中起重要作用, 在 NaCl、甘露醇或 ABA 胁迫条件下, 刚毛怪柳 *ThNAC13* 转基因植物的根长和鲜重与野生型植物相比均显著增加^[34]。在 ABA 胁迫条件下, 南荻 *MINAC10*^[35]、欧李 *ChNAC1*^[36] 转基因植物都增加了对 ABA 的敏感性。在本研究中, 100、125 mmol/L 浓度的盐胁迫处理和 300、400 mmol/L 的干旱胁迫的转基因拟南芥根长均比野生型拟南芥根长较长, 鲜重比野生型拟南芥重。5、10 $\mu\text{mol/L}$ GA_3 激素处理促进了 *MiNAC7* 转基因拟南芥的根长生长, 在 5 $\mu\text{mol/L}$ ABA 激素处理下转基因拟南芥根长较短, 说明 *MiNAC7* 也参与了植物的逆境胁迫应答过程。这与芒果 *MiNAC1* 基因

在逆境胁迫方面的研究结果相似^[33]。

综上所述, 芒果 *MiNAC7* 基因不仅参与调控植株开花, 同时响应非生物逆境胁迫应答。

参考文献

- [1] OLSEN A N, ERNST H A, LEGGIO L L, SKRIVER K. *NAC* transcription factors: structurally distinct, functionally diverse[J]. Trends in Plant Science, 2005, 10(2): 79-87.
- [2] NURUZZAMAN M, MANIMEKALAI R, SHARONI A M, SATOH K, KONDOH H, OOKA H, KIKUCHI S. Genome-wide analysis of *NAC* transcription factor family in rice[J]. Gene, 2010, 465: 30-44.
- [3] GRANT E H, FUJINO T, BEERS E P, BRUNNER A M. Characterization of *NAC* domain transcription factors implicated in control of vascular cell differentiation in *Arabidopsis* and *Populus*[J]. Planta, 2010, 232(2): 337-352.
- [4] PIMENTA M R, SILVA P A, MENDES G C, ALVES J R, CAETANO H D N, MACHADO J P B, BRUSTOLINI O J B, CARPINETTI P A, MELO B P, SILVA J C F, ROSADO G L, FERREIRA M F S, DAL-BIANCO M, PICOLI E A D T, ARAGAO F J L, RAMOS H J O, FONTES E P B. The stress-induced soybean *NAC* transcription factor *GmNAC81* plays a positive role in developmentally programmed leaf senescence[J]. Plant & Cell Physiology, 2016, 57(5): 1098-1114.
- [5] CARRASCO-ORELLANA C, STAPPUNG Y, MENDEZ-YAÑEZ A, ALLAN A C, ESPLEY R V, PLUNKETT B J, MOYA-LEON M A, HERRERA R. Characterization of a ripening-related transcription factor *FcNAC1* from *Fragaria chiloensis* fruit[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 10524-10535.
- [6] KOU X H, ZHAO Y N, WU C, JIANG B L, ZHANG Z, RATHBUN J R, HE Y L, XUE Z H. *SNAC4* and *SNAC9* transcription factors show contrasting effects on tomato carotenoids biosynthesis and softening[J]. Postharvest Biology and Technology, 2018, 144: 9-19.
- [7] CAO S X, ZHANG Z B, WANG C H, LI X X, GUO C, YANG L Y, GUO Y F. Identification of a novel melon transcription factor *CmNAC60* as a potential regulator of leaf senescence[J]. Genes, 2019, 10(8): 584-600.
- [8] SHIM J S, OH N, CHUNG P J, KIM Y S, CHOI Y D, KIM J K. Overexpression of *OsNAC14* improves drought tolerance in rice[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 310-323.
- [9] 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[J]. Journal of Plant Physiology, 2018, 221: 74-80.
- [10] 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[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22: 11897-11958.
- [11] 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[J]. *The Plant Cell*, 2015, 27(6): 1771-1787.
- [12] HONG Y B, ZHANG H J, HUANG L, LI D Y, SONG F M. Overexpression of a stress-responsive NAC transcription factor gene *ONAC022* improves drought and salt tolerance in Rice[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 4-22.
- [13] SHANG X G, YU Y J, ZHU L J, LIU H Q, CHAI Q C, GUO W Z. A cotton NAC transcription factor *GhirNAC2* plays positive roles in drought tolerance via regulating ABA biosynthesis[J]. *Plant Science*, 2020, 296: 110498-110510.
- [14] FANG J L, CHAI Z, YAO W, CHEN B S, ZHANG M Q. Interactions between *ScNAC23* and *ScGAI* regulate GA-mediated flowering and senescence in sugarcane[J]. *Plant Science*, 2020, 304: 110806-110817.
- [15] MAO C J, HE J M, LIU L N, DENG Q M, YAO X F, LIU C M, QIAO Y L, LI P, MING F. *OsNAC2* integrates auxin and cytokinin pathways to modulate rice root development[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(2): 429-442.
- [16] GONG L, ZHANG H W, LIU X, GAN X Y, NIE F J, YANG W J, ZHANG L, CHEN Y C, SONG Y X, ZHANG H X. Ectopic expression of *HaNAC1*, an ATAF transcription factor from *Haloxylon ammodendron*, improves growth and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 151: 535-544.
- [17] LUO C, YU H X, FAN Y, ZHANG X J, HE X H. Research advance on the flowering mechanism of mango[J]. *Acta Horticulturae*, 2019, 1244: 17-22.
- [18] 赵才美, 黄兴奇, 殷富有, 李定琴, 陈越, 陈玲, 程在全. 水稻 NAC 转录因子家族的研究进展[J]. *植物科学学报*, 2020, 38(2): 278-287.
- ZHAO C M, HUANG X Q, YIN F Y, LI D Q, CHEN Y, CHEN L, CHENG Z Q. Research progress on NAC transcription factor family in *Oryza sativa* L.[J]. *Plant Science Journal*, 2020, 38(2): 278-287. (in Chinese)
- [19] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, THOMAS H R, FRANK M H, HE Y, XIA R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13: 1194-1202.
- [20] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33: 1870-1874.
- [21] GUO Y H, LUO C, LIU Y, LIANG R Z, YU H X, LU X X, MO X, CHEN S Q, HE X H. Isolation and functional analysis of two *CONSTANS-like 1* genes from mango[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2022, 172: 125-135.
- [22] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [23] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Journal*, 1998, 16: 735-743.
- [24] 余海霞, 罗聪, 徐趁, 何新华. 一种简单高效提取高质量转基因拟南芥和烟草 DNA 的方法[J]. *分子植物育种*, 2016, 14(6): 1436-1440.
- YU H X, LUO C, XU C, HE X H. A simple and efficient method for high quality DNA extraction from transgenic *Arabidopsis* and tobacco[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2016, 14(6): 1436-1440. (in Chinese)
- [25] WANG Y H, HE X H, YU H X, MO X, LUO C. The overexpression of four *MiTFL1* genes from mango delays the flowering time in transgenic *Arabidopsis*[J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21: 407-422.
- [26] 陈倩, 游双梅, 邢乐华, 徐凡, 罗明, 郭启高. 果树 NAC 转录因子的研究进展[J]. *分子植物育种*, 2021, 19(19): 6396-6405.
- CHEN Q, YOU S M, XING L H, XU F, LUO M, GUO Q G. Research progress of NAC transcription factors in fruit trees[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19(19): 6396-6405. (in Chinese)
- [27] LIN J, LIU D F, WANG X, AHMED S, LI M Y, KOVINICH N, SUI S Z. Transgene *CpNAC68* from wintersweet (*Chimonanthus praecox*) improves *Arabidopsis* survival of multiple abiotic stresses[J]. *Plants*, 2021, 10: 1403-1418.
- [28] MERGBY D, HANIN M, SAIDI M N. The durum wheat NAC transcription factor *TtNAC2A* enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2021, 186: 104439-104448.
- [29] LIU X W, WANG T, BARTHOLOMEW E, BLACK K, DONG M M, ZHANG Y Q, YANG S, CAI Y L, XUE S D, WENG Y Q, REN H Z. Comprehensive analysis of NAC transcription factors and their expression during fruit spine development in cucumber (*Cucumis sativus* L.)[J]. *Horticulture Research*, 2018, 5: 31-44.
- [30] WANG H, LI T, LI W, WANG W, ZHAO H E. Identification and analysis of *Chrysanthemum nankingense* NAC transcription factors and an expression analysis of *OsNAC7* subfamily members[J]. *PeerJ*, 2021, 9: 11505-11533.
- [31] YANG H F, FAN L J, YU X W, ZHANG X Q, HAO P, WEI

- D S, ZHANG G S. Analysis of the NAC gene family in salix and the identification of *SpsNAC005* gene contributing to salt and drought tolerance[J]. *Forests*, 2022, 13: 971-996.
- [32] ZHANG G Y, HUANG S Q, ZHANG C, LI D F, WU Y B, DENG J L, SHAN S L, QI J M. Overexpression of *CcNAC1* gene promotes early flowering and enhances drought tolerance of jute (*Corchorus capsularis* L.)[J]. *Protoplasma*, 2020, 258: 337-345.
- [33] 杨小州, 周少丽, 何新华, 刘源, 余海霞, 陆婷婷, 王卓, 罗聪. 芒果 *MiNAC1* 基因的功能研究[J]. *热带作物学报*, 2022, 43(8): 1527-1534.
- YANG X Z, ZHOU S L, HE X H, LIU Y, YU H X, LU T T, WANG Z, LUO C. Functional analysis of a *MiNAC1* gene in mango[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2022, 43(8): 1527-1534. (in Chinese)
- [34] WANG L Q, LI Z, LU M Z, WANG Y C. *ThNAC13*, a NAC transcription factor from *Tamarix hispida*, confers salt and osmotic stress tolerance to *Transgenic tamarix* and *Arabidopsis*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 635-647.
- [35] HE K, ZHAO X, CHI X Y, WANG Y P, JIA C L, ZHANG H P, ZHOU G K, HU R B. A novel miscanthus NAC transcription factor *MINAC10* enhances drought and salinity tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2019, 233: 84-93.
- [36] WANG F, WANG J W, SUN L J, SONG X S. The molecular cloning and functional characterization of *ChNAC1*, a NAC transcription factor in *Cerasus humilis*[J]. *Plant Growth Regulation*, 2019, 89(3): 331-343.