

· 基础研究 ·

丹参NAC基因家族全基因组鉴定及表达研究[△]李海燕¹, 刘天壤¹, 陈佳惠¹, 王彪¹, 李宏博^{1,2*}

1. 沈阳农业大学 园艺学院, 辽宁 沈阳 110866;

2. 道地药材国家重点实验室, 北京 100700

[摘要] **目的:** 基于基因组数据鉴定丹参NAC家族转录因子(SmNACs)基因, 并对其进行生物信息学与表达模式分析, 为进一步深入阐明其基因功能提供依据。**方法:** 从丹参基因组数据库中鉴定出SmNACs基因, 运用生物信息学方法及在线工具分析其结构特征, 启动子顺式作用元件, 编码蛋白的理化性质、亚细胞定位等, 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)测定SmNACs基因在丹参受到茉莉酸甲酯(MeJA)胁迫时的表达模式。**结果:** 从丹参的基因组中共确定了84个SmNACs基因(SmNAC01~SmNAC84), 不均等分布于8条染色体上, 编码蛋白的氨基酸长度为120~794 aa, 等电点为4.27~10.28; 基因结构显示SmNACs基因基本都含有1~10个内含子; 上游启动子含有与激素、逆境胁迫应激相关的ABRE、MBS、ARE、LTR、CGTCA-motif、TGACG-motif等顺式作用元件; 构建丹参、南丹参与拟南芥的NAC家族成员的系统发育树, 将84个SmNACs基因分为23个亚族。转录组数据显示SmNACs基因在丹参不同组织中差异表达, 其中7个SmNACs基因在根中的表达水平较高; MeJA处理后, 17个SmNACs基因表达水平明显上调, 20个SmNACs基因表达水平明显下调。qRT-PCR表达分析发现, MeJA处理后, 12个SmNACs基因的表达模式随着激素处理时间的增加呈现上调或下调的趋势, SmNAC09、SmNAC15、SmNAC16受MeJA诱导后48 h表达水平显著上调, SmNAC20、SmNAC77、SmNAC78受MeJA诱导表达水平下调。**结论:** 研究结果为进一步解析SmNACs基因在丹参逆境响应及次生代谢产物生物合成中的调控机制提供了参考。

[关键词] 丹参; 基因组; NAC转录因子; 生物信息学; 茉莉酸甲酯; 表达分析

[中图分类号] R282.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2023)03-0499-14

doi: 10.13313/j.issn.1673-4890.20220313001

Genome-wide Identification and Expression Analysis of NAC Gene Family in *Salvia miltiorrhiza*LI Hai-yan¹, LIU Tian-rang¹, CHEN Jia-hui¹, WANG Biao¹, LI Hong-bo^{1,2*}

1. Horticultural College, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;

2. State Key Laboratory of Dao-di Herbs, Beijing 100700, China

[Abstract] **Objective:** To identify NAC transcription factors of *Salvia miltiorrhiza* (SmNACs) and analyze bioinformatics and expression patterns based on genomic data to provide a basis for further elucidating the gene functions. **Methods:** NAC family genes were identified based on the *S. miltiorrhiza* genome database, and the gene structure, promoter *cis*-elements, the physical and chemical properties of the encoded proteins, and subcellular localization were analyzed using bioinformatics tools. In addition, expression patterns of SmNACs in *S. miltiorrhiza* under methyl jasmonate (MeJA) stress were determined by the quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results:** Eighty-four NAC transcription factors (SmNAC01-SmNAC84) were identified from the genome of *S. miltiorrhiza* which were distributed unequally on the eight chromosomes, and the SmNACs consisted of 120-794 amino acids (aa) with the isoelectric point in the range of 4.27 to 10.28. The gene structures of those SmNACs showed that their introns varied from one to ten. The upstream promoters contained *cis*-acting elements such as ABRE, MBS, ARE, LTR, CGTCA-motif, and TGACG-motif related to hormones and stresses. Phylogenetic analysis divided the NAC gene family from *S. miltiorrhiza*, *S. bowleyana*, and *Arabidopsis thaliana* into 23 subgroups. Transcriptome data indicated that SmNACs were differentially expressed in different tissues of *S. miltiorrhiza*, among them, seven SmNACs were highly expressed in roots. Under MeJA treatment, 17 SmNACs were significantly up-regulated, and 20 SmNACs were significantly down-regulated. As revealed by qRT-PCR, 12 SmNACs were

[△] [基金项目] 中央本级重大增减支项目(2060302); 2018年全国中药资源普查项目(1102-01042918001)

* [通信作者] 李宏博, 副教授, 研究方向: 药用植物资源评价与利用; Tel: 024-88487143, E-mail: lhb@syau.edu.cn

differentially expressed after MeJA treatment, and specifically, *SmNAC09*, *SmNAC15*, and *SmNAC16* were significantly up-regulated 48 h after MeJA treatment, while *SmNAC20*, *SmNAC77*, and *SmNAC78* were significantly down-regulated.

Conclusion: This study is expected to provide a theoretical foundation for further analysis of the regulatory mechanism of *SmNACs* in the stress response and secondary metabolite biosynthesis of *S. miltiorrhiza*.

[Keywords] *Salvia miltiorrhiza* Bunge; genome; NAC transcription factors; bioinformatics; MeJA; expression patterns

NAC 是 NAM (no apical meristem)、ATAF (Arabidopsis transcription activation factor) 和 CUC (cup-shaped cotyledon) 的简称^[1-2]。NAC 转录因子家族是植物特有的基因家族之一, 具有独特的结构特征, 由 N 端蛋白结构域和 C 端转录激活域组成。N 端结构域相对保守, 由 A~E 5 个亚结构域组成, 包含 60 个氨基酸, 这些氨基酸能够折叠形成螺旋-转角-螺旋的结构模体, 与核定位及下游靶基因 DNA 序列的识别和结合密切相关, C 端结构域具有转录激活或转录抑制作用, 其序列多变的特性导致 NAC 蛋白功能多样化^[3-4]。

NAC 转录因子广泛参与调控植物的生长发育和逆境响应, 如顶端分生组织的形成、根的发育、次生壁的形成、细胞分裂、胚胎及花器官的发育、激素信号转导、叶片衰老、果实成熟等^[3,5-9]。在小麦根中过表达 1 个主要在根中表达的 NAC 转录因子 TaRNAC1 可以提高其根长、生物量和耐旱性^[6]。过量表达大豆 NAC 基因 *GmNAC109* 能够增加转基因拟南芥植株的侧根形成和非生物胁迫耐受性^[7]。拟南芥中有 117 个 NAC 转录因子, AtNAC103 定位于细胞核, 不仅参与细胞内质网应激和 DNA 损伤应答, 而且在种子发芽和幼苗生长阶段正调控拟南芥对脱落酸 (ABA) 的响应^[9-10]。内质网 (ER) 逆境应激条件下, NAC089 和 NAC062 表达水平均上调, 其中 NAC062 从细胞质膜转移到细胞核, 调控 ER 逆境应答基因的表达, 而 NAC089 从细胞质膜进入细胞核诱导程序化细胞死亡^[11-12]。ANAC087 和 ANAC046 可以控制拟南芥颖壳和侧根冠程序性细胞死亡^[13]。近年来, 越来越多 NAC 基因被鉴定, 并发现其在外源激素调节植物生长发育与逆境胁迫相关的一系列信号级联通路形成的交叉网络中具有重要作用^[14-15]。过表达拟南芥 NAC 基因, 可调控由 ABA 等胁迫诱导的基因表达, 如过表达的 *ANAC019*、*ANAC055* 和 *ANAC072* 基因可以通过激活下游基因的表达增强转基因植物的耐旱性^[16]。水稻中有 151 个 NAC 转录因子, 研究发现 *OsNAC6* 基因与拟南芥胁迫相关 NAC 基因 *ANAC019*、*ANAC055* 和 *ANAC072* 具有较高的

序列相似性, 茉莉酸甲酯 (MeJA)、ABA 等都可以诱导 *OsNAC6* 基因的表达, *OsNAC5*、*ONAC009*、*ONAC071* 是 *OsNAC6* 的同源物, 亦受 ABA 等非生物胁迫的诱导^[17]。NAC 转录因子还可以调节植物次生代谢产物的合成, 如 HbNAC1~HbNAC3 是巴西橡胶树一类多功能的转录因子, 乙烯利能够调控其在胶乳中的表达从而调控橡胶树产胶^[18]。

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 为唇形科鼠尾草属多年生的草本植物, 其干燥根及根茎入药, 味苦, 性微寒, 归心、肝经, 具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痛的功效^[19-20]。丹参具有多种药理活性, 临床应用广泛, 是治疗冠心病和脑血管疾病的重要药用植物之一^[21-28]。丹参酮类成分是评价丹参品质的重要指标之一, 其生物合成受到环境因子和遗传因素的双重影响。NAC 基因家族广泛参与调控植物发育进程与胁迫响应等, 因此, 推测 NAC 转录因子受非生物胁迫的诱导参与调控丹参次生代谢产物的生物合成, 以提升其对逆境环境的适应性。关于丹参 NAC 转录因子 (SmNACs) 家族的研究尚未见报道。本研究以 SmNACs 为切入点, 基于全基因组水平对其进行鉴定与生物信息学分析; 基于丹参转录组数据^[29], 分析 *SmNAC* 基因的空间表达特征及 MeJA 处理后 *SmNACs* 基因的表达模式; 采用荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 分析 *SmNACs* 基因对 MeJA 诱导的响应, 研究结果为进一步解析 *SmNACs* 基因调控丹参次生代谢产物生物合成及逆境响应的分子机制提供参考。

1 材料

1.1 样品

丹参材料来源于沈阳农业大学药用植物园培养的 1 年生植株, 经沈阳农业大学朴钟云教授鉴定为丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge。选择健壮无病、长势基本一致的幼苗, 植株株龄为 10 个月, 苗根长 12~15 cm, 定植于高 25 cm、内径 20 cm 的塑料盆中, 盆栽土采用草炭土。试验在沈阳农业大学药用植物园 (N42°1', E124°41') 进行。

1.2 试剂

MeJA (批号: M813623, 纯度: 95%, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 反转录试剂盒 PrimeScript TMRT reagent Kit with gDNA Eraser、2×SYBR Green qPCR Master Mix [天根生化科技(北京)有限公司]。

1.3 仪器

BSA6202SCW 型百分之一电子天平 [赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; KQ-500DE 型数控超声波清洗器 (江苏省昆山市超声仪器有限公司); MS 3 B 型涡旋混合仪 (IKA 公司); T100TM Thermal Cycler 型聚合酶链式反应 (PCR) 仪 (Bio-Rad 公司); Centrifuge 5804 R 型台式高速离心机 (艾本德公司); LightCycler 480 型 qRT-PCR 仪 (ABI 公司)。

2 方法

2.1 样品处理

将所选择的丹参苗均匀喷施 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MeJA, 以蒸馏水为对照组, 每组分别设置 3 个重复, 喷后立即套上保鲜袋, 分别于处理后 0、12、24、48、72 h 采样, 每次取材时对其他植株喷施相同量的 MeJA。

2.2 *SmNACs* 基因的鉴定与理化分析

从美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载拟南芥 NAC 蛋白序列作为检索序列, 采用 Blastp 检索丹参和南丹参 *S. Bowleyana* Dunn 全基因组数据库中的同源序列, 初步检索得到丹参和南丹参的 NAC 蛋白序列^[30-31]。运用 NCBI 在线工具 CD-search 验证目标蛋白序列保守结构域, 去除冗余和无效基因模型。再经 NCBI 中的 ORFfinder 和 Pfam (NAC 保守结构域序列号为 PF01849、PF02365) 验证, 最终得到 *SmNACs* 基因家族成员^[32]。使用 ExPASy 的 ProtParam 工具 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对 *SmNACs* 基因及其编码的蛋白进行理化性质分析^[33-34]。采用 SoftBerry ProtComp 9.0 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) 和 WoLF PSORT (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 进行蛋白亚细胞定位预测^[35]。

2.3 多序列比对及系统进化分析

利用 ClustalX 2.0.11 软件对 *SmNACs* 蛋白序列

同拟南芥和南丹参的 NAC 蛋白序列进行多重比对分析, 利用 Mega 7.0 软件采用邻接 (NJ) 法构建 *SmNACs* 和其他物种 NAC 的系统进化树, 参数设置为泊松校正 (poisson correction)、成对删除 (pairwise deletion) 和 Bootstrap 重复 1000 次^[36]。

2.4 *SmNACs* 基因结构与保守基序分析

基于基因结构显示系统 (GSDS, <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 分析 *SmNACs* 基因的外显子与内含子分布。利用 MEME 数据库 (<http://meme-suite.org/>) 分析 *SmNACs* 的保守 motif, motif 数量 < 20 个, 最大宽度值为 200, 最小宽度值为 6, 其余参数为默认设置。

2.5 *SmNACs* 基因染色体定位与共线性分析

利用 MapGene2 Chrom web v2 (http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.0/) 进行染色体定位。利用 MCS-X 软件分析 *SmNACs* 基因与其他物种 NAC 基因同源性。

2.6 反式作用元件分析

从丹参全基因组数据库中搜索 *SmNACs* 基因起始密码子 ATG 上游 2 kb DNA 序列。采用 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行启动子顺式作用元件分析, 明确转录起始位点上游的所包括的顺式作用元件的类型、来源、数目、位置及其功能。

2.7 *SmNACs* 基因的表达模式分析

从 NCBI 数据库下载丹参不同组织及 MeJA 处理后的转录组数据 (ID: PRJNA214019)^[30], 利用 Multiple Experiment Viewer 4.9.0 绘制基因表达量热图。

参照 EASYspin Plus plant RNA kit 试剂盒说明书提取不同处理丹参样品中的总 RNA, 用反转录试剂盒 PrimeScript TMRT reagent Kit with gDNA Eraser 合成 cDNA。采用 β -肌动蛋白 (β -actin) 作为 qRT-PCR 的内参基因, 测定 *SmNACs* 的相对表达量。内参基因的引物序列、扩增所用引物序列见表 1。PCR 反应体系为 10 μL : 超纯水 (ddH₂O) 2.6 μL , 上下游引物各 0.2 μL ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), cDNA 2 μL , 2×SYBR Green qPCR Master Mix 5 μL 。PCR 反应程序为 95 °C 预变性 30 s; 定量分析 (95 °C、5 s, 60 °C、30 s), 40 个循环; 融解曲线 (95 °C、5 s, 60 °C、60 s); 降温 50 °C、30 s。结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对数据进行分析。

表1 *SmNACs* 基因 qRT-PCR 引物序列

引物	序列 (5'→3')
GWHTAOSJ004279_SmNAC09-F	ACGATACCATGCCTGTCGAT
GWHTAOSJ004279_SmNAC09-R	AGTCGGGCTCAGTTGCTATT
GWHTAOSJ006897_SmNAC15-F	TCAAGAGCAGTCAACCCCTT
GWHTAOSJ006897_SmNAC15-R	ATGTAGTTTCTGCCGGGGAA
GWHTAOSJ007128_SmNAC16-F	TGCCACGGGTAAAGGGTATT
GWHTAOSJ007128_SmNAC16-R	ATGCATCCTGTGTCACTCCA
GWHTAOSJ007958_SmNAC20-F	AACTCCGGAAGTGCATTG
GWHTAOSJ007958_SmNAC20-R	CTGGGCTGTGTTGCTTTCTT
GWHTAOSJ008090_SmNAC21-F	TTGTGGGAGCAGAGACCAAT
GWHTAOSJ008090_SmNAC21-R	ACGGCAAACAACCAATCTC
GWHTAOSJ021626_SmNAC50-F	TGGGTCTATGCCGAGTGTT
GWHTAOSJ021626_SmNAC50-R	AAAATGGAGAAGCAGGGCAC
GWHTAOSJ022077_SmNAC51-F	TTTCTGCGGGATCTTGAGGA
GWHTAOSJ022077_SmNAC51-R	TTTCTTCCTCGTCGAGCTT
GWHTAOSJ023113_SmNAC53-F	GCAGCAACAAACCAGACAGA
GWHTAOSJ023113_SmNAC53-R	TGCCCTCATGCTCAAAGGTA
GWHTAOSJ026862_SmNAC68-F	TGGCAAGAATCAATGGCGAG
GWHTAOSJ026862_SmNAC68-R	CGCCTTCCAGAAACCGTTTT
GWHTAOSJ027336_SmNAC71-F	CATGAGATCCGGCGTTTCAA
GWHTAOSJ027336_SmNAC71-R	TGCATCCTCATCAACTTGCG
GWHTAOSJ028648_SmNAC77-F	AAATATCCCAACGGTTCGCG
GWHTAOSJ028648_SmNAC77-R	TTCCGGCGTAGAAAACGAGA
GWHTAOSJ028673_SmNAC78-F	TGGAAGCAACGACTCCAGAT
GWHTAOSJ028673_SmNAC78-R	TCCGAGTTTCAGCTAAGCCA

3 结果与分析

3.1 *SmNACs* 基因的鉴定及理化分析

经 CD 和 Pfam 在线分析后最终获得 84 个 NAC 蛋白序列, 均含有 NAM 保守结构域, 将所得到的 NAC 基因序列进行编号, 即 *SmNAC01*~*SmNAC84* (表2)。84 个 *SmNAC* 基因长度为 363~2385 bp, 编码的蛋白氨基酸长度差异亦较大, 为 120~794 aa, 平均为 317 aa; 相对分子质量为 14 010~89 740, 与氨基酸长度成正比; 等电点为 4.27~10.28, 其中 37 个为碱性蛋白质, 47 个为酸性蛋白质。亚细胞定位预测结果表明, 61 个 *SmNACs* 蛋白定位在细胞核, 表明其在细胞核发挥相关调控的功能; 12 个 *SmNACs* 蛋白定位在细胞质, 表明其在细胞质发挥调控的功能; 5 个 *SmNACs* 蛋白定位在叶绿体, 推测其可能参与叶绿体的基因表达调控; 此外, 还有 3 个成员定位于线粒体, 1 个定位于过氧化物体, 1 个定位于维管束, 可能参与其相关的基因表达调控。

3.2 *SmNACs* 蛋白进化树分析

为明确 *SmNACs* 基因家族成员间的亲缘关系及其与生物学功能的关系, 利用 MEGA 7.0 软件, 采用 NJ 法构建丹参、南丹参和拟南芥的 NAC 基因家

表2 *SmNACs* 基因及其编码蛋白的理化特征

基因	ID	开放阅读框/bp	蛋白氨基酸长度/aa	蛋白相对分子质量	蛋白等电点	蛋白亚细胞定位
<i>SmNAC01</i>	GWHTAOSJ002438	585	194	22 410	10.10	细胞核
<i>SmNAC02</i>	GWHTAOSJ002534	549	182	20 880	5.07	细胞质
<i>SmNAC03</i>	GWHTAOSJ002796	564	187	21 630	7.37	细胞核
<i>SmNAC04</i>	GWHTAOSJ002812	1065	354	39 700	6.50	细胞核
<i>SmNAC05</i>	GWHTAOSJ003047	906	301	34 850	5.69	细胞核
<i>SmNAC06</i>	GWHTAOSJ003701	588	195	23 100	8.14	细胞质
<i>SmNAC07</i>	GWHTAOSJ004106	741	246	27 120	4.90	叶绿体
<i>SmNAC08</i>	GWHTAOSJ004278	1734	577	64 290	4.52	细胞核
<i>SmNAC09</i>	GWHTAOSJ004279	1689	562	63 640	4.61	细胞核
<i>SmNAC10</i>	GWHTAOSJ004317	1029	342	38 410	6.81	细胞质
<i>SmNAC11</i>	GWHTAOSJ004691	846	281	32 380	6.86	叶绿体
<i>SmNAC12</i>	GWHTAOSJ006026	492	163	19 240	6.96	叶绿体
<i>SmNAC13</i>	GWHTAOSJ006403	1203	400	44 820	4.98	细胞核
<i>SmNAC14</i>	GWHTAOSJ006404	1656	551	61 670	4.58	叶绿体
<i>SmNAC15</i>	GWHTAOSJ006897	975	324	35 860	8.89	线粒体
<i>SmNAC16</i>	GWHTAOSJ007128	1161	386	43 290	4.97	叶绿体
<i>SmNAC17</i>	GWHTAOSJ007129	1683	560	62 370	4.33	细胞核
<i>SmNAC18</i>	GWHTAOSJ007607	993	330	37 560	6.92	细胞核
<i>SmNAC19</i>	GWHTAOSJ007711	828	275	31 650	6.57	细胞质
<i>SmNAC20</i>	GWHTAOSJ007958	1827	608	68 030	4.58	细胞核

续表 2

基因	ID	开放阅读框/bp	蛋白氨基酸长度/aa	蛋白相对分子质量	蛋白等电点	蛋白亚细胞定位
<i>SmNAC21</i>	GWHTAOSJ008090	630	209	24 030	10.11	细胞核
<i>SmNAC22</i>	GWHTAOSJ010438	861	286	32 570	7.79	细胞核
<i>SmNAC23</i>	GWHTAOSJ013176	801	266	30 330	7.60	细胞核
<i>SmNAC24</i>	GWHTAOSJ013205	363	120	14 010	7.29	细胞核
<i>SmNAC25</i>	GWHTAOSJ013935	1335	444	50 580	4.77	细胞质
<i>SmNAC26</i>	GWHTAOSJ013945	921	306	35 490	4.98	细胞质
<i>SmNAC27</i>	GWHTAOSJ014327	1017	338	37 410	8.58	细胞核
<i>SmNAC28</i>	GWHTAOSJ014330	960	319	35 620	8.58	细胞核
<i>SmNAC29</i>	GWHTAOSJ014405	966	321	36 030	8.11	细胞核
<i>SmNAC30</i>	GWHTAOSJ014775	858	285	32 060	8.81	细胞核
<i>SmNAC31</i>	GWHTAOSJ015088	873	290	32 850	6.96	细胞核
<i>SmNAC32</i>	GWHTAOSJ015257	933	310	35 760	6.23	细胞核
<i>SmNAC33</i>	GWHTAOSJ015421	996	331	37 970	7.26	细胞核
<i>SmNAC34</i>	GWHTAOSJ016527	852	283	32 330	6.23	细胞核
<i>SmNAC35</i>	GWHTAOSJ016660	1131	376	42 430	5.30	细胞核
<i>SmNAC36</i>	GWHTAOSJ018070	1026	341	38 590	6.50	细胞核
<i>SmNAC37</i>	GWHTAOSJ018119	1665	554	61 490	5.95	细胞核
<i>SmNAC38</i>	GWHTAOSJ018419	495	164	19 240	8.46	细胞质
<i>SmNAC39</i>	GWHTAOSJ018506	984	327	37 070	7.21	细胞核
<i>SmNAC40</i>	GWHTAOSJ018513	864	287	33 050	9.04	细胞核
<i>SmNAC41</i>	GWHTAOSJ018544	990	329	37 200	7.46	细胞核
<i>SmNAC42</i>	GWHTAOSJ018787	993	330	38 570	6.50	细胞核
<i>SmNAC43</i>	GWHTAOSJ019144	627	208	23 620	9.92	细胞质
<i>SmNAC44</i>	GWHTAOSJ021112	843	280	31 540	9.45	细胞核
<i>SmNAC45</i>	GWHTAOSJ021119	726	241	26 450	4.78	细胞质
<i>SmNAC46</i>	GWHTAOSJ021193	858	285	32 020	7.23	细胞核
<i>SmNAC47</i>	GWHTAOSJ021535	816	271	31 370	7.61	过氧化物酶体
<i>SmNAC48</i>	GWHTAOSJ021545	879	292	32 980	5.05	细胞核
<i>SmNAC49</i>	GWHTAOSJ021603	807	268	30 930	8.73	细胞核
<i>SmNAC50</i>	GWHTAOSJ021626	870	289	32 470	7.17	细胞核
<i>SmNAC51</i>	GWHTAOSJ022077	999	332	37 470	4.42	细胞核
<i>SmNAC52</i>	GWHTAOSJ022887	978	325	36 230	8.82	细胞核
<i>SmNAC53</i>	GWHTAOSJ023113	1311	436	49 340	4.69	细胞核
<i>SmNAC54</i>	GWHTAOSJ023623	810	269	31 120	8.56	细胞核
<i>SmNAC55</i>	GWHTAOSJ023639	1011	336	38 020	6.89	细胞核
<i>SmNAC56</i>	GWHTAOSJ024238	942	313	35 550	6.89	细胞核
<i>SmNAC57</i>	GWHTAOSJ024671	1092	363	40 680	8.01	细胞核
<i>SmNAC58</i>	GWHTAOSJ024792	579	192	22 100	5.28	细胞核
<i>SmNAC59</i>	GWHTAOSJ025029	798	265	30 620	4.90	细胞核
<i>SmNAC60</i>	GWHTAOSJ025862	1608	535	60 680	6.12	细胞核
<i>SmNAC61</i>	GWHTAOSJ026129	663	220	24 570	9.72	细胞核
<i>SmNAC62</i>	GWHTAOSJ026302	981	326	36 860	8.23	细胞核
<i>SmNAC63</i>	GWHTAOSJ026341	1041	346	38 620	4.32	细胞核
<i>SmNAC64</i>	GWHTAOSJ026433	642	213	25 280	5.76	线粒体
<i>SmNAC65</i>	GWHTAOSJ026436	438	145	16 710	7.31	叶绿体
<i>SmNAC66</i>	GWHTAOSJ026438	726	241	28 100	6.30	线粒体
<i>SmNAC67</i>	GWHTAOSJ026832	1191	396	44 080	6.64	细胞核
<i>SmNAC68</i>	GWHTAOSJ026862	714	237	27 100	7.03	细胞核

续表 2

基因	ID	开放阅读框/bp	蛋白氨基酸长度/aa	蛋白相对分子质量	蛋白等电点	蛋白亚细胞定位
<i>SmNAC69</i>	GWHTAOSJ027051	819	272	31 350	6.69	细胞核
<i>SmNAC70</i>	GWHTAOSJ027335	576	191	21 940	9.80	细胞质
<i>SmNAC71</i>	GWHTAOSJ027336	582	193	22 150	6.64	细胞核
<i>SmNAC72</i>	GWHTAOSJ027527	924	307	34 730	6.44	细胞质
<i>SmNAC73</i>	GWHTAOSJ027815	1377	458	51 150	6.86	细胞核
<i>SmNAC74</i>	GWHTAOSJ027980	894	297	33 720	7.08	细胞核
<i>SmNAC75</i>	GWHTAOSJ028306	828	275	31 160	7.38	细胞核
<i>SmNAC76</i>	GWHTAOSJ028611	843	280	32 590	5.89	细胞核
<i>SmNAC77</i>	GWHTAOSJ028648	879	292	33 670	7.09	细胞核
<i>SmNAC78</i>	GWHTAOSJ028673	2385	794	89 740	6.78	维管束
<i>SmNAC79</i>	GWHTAOSJ028705	750	249	28 870	9.41	细胞核
<i>SmNAC80</i>	GWHTAOSJ028805	894	297	33 760	8.31	细胞核
<i>SmNAC81</i>	GWHTAOSJ028841	1002	333	37 630	5.99	细胞核
<i>SmNAC82</i>	GWHTAOSJ029142	555	184	21 310	4.27	细胞质
<i>SmNAC83</i>	GWHTAOSJ029179	1719	572	63 720	4.63	细胞核
<i>SmNAC84</i>	GWHTAOSJ001580	585	194	22 310	10.28	细胞核

族成员的系统发育进化树，见图 1。*SmNACs* 蛋白家族共分为 23 个亚族（A~W）。其中，W 亚族的所有成员均来自拟南芥，没有 *SmNACs* 和 *SbNACs* 家族成员，为拟南芥特有 *NAC* 蛋白分支，其他 22 个亚类中均有 *SmNACs* 家族成员分布。其中，E 亚族中 *SmNACs* 成员分布最多，有 9 个 *SmNACs* 成员，其次是亚家族 J、S，分别有 7、6 个，亚族 A、F、G 和 M 均有 5 个 *SmNACs* 成员，亚家族 C、K、L 和 N 均有 4 个 *SmNACs* 成员，亚家族 B、D、H、I 和 P 是 3 个 *SmNACs* 成员，亚家族 O、R、T 和 U 是 2 个 *SmNACs* 成员，亚家族 V 仅有 1 个 *SmNACs* 成员。另外，亚族 A、T 和 U 中仅有 *SmNACs* 和 *SbNACs* 家族成员，推测 *SmNACs* 在进化过程中可能出现了功能特异蛋白。系统进化上与拟南芥直系同源基因比较相近的 *NAC* 基因，在其结构与功能上可能比较相似，可以作为推测丹参中 *NAC* 基因功能的参考依据。

3.3 *SmNACs* 基因结构与保守基序分析

为了进一步分析 *SmNACs* 基因家族成员的结构和潜在功能，利用 GSDS、MEME 分析 *SmNACs* 基因的外显子与内含子的分布、保守 motifs，结果见图 2，*SmNACs* 基因单独建树与拟南芥、南丹参共同构建的物种间系统进化树的结果基本一致（图 1），由此可见通过构建系统进化树分析基因家族的基因功能是可靠的。对 *SmNACs* 基因家族成员的结构分析发

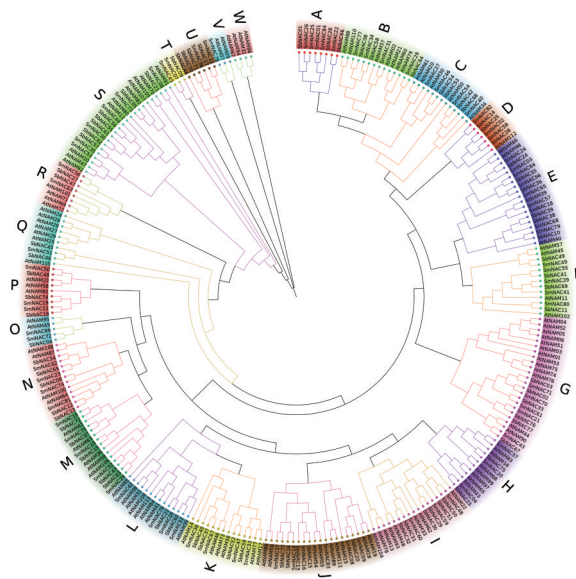
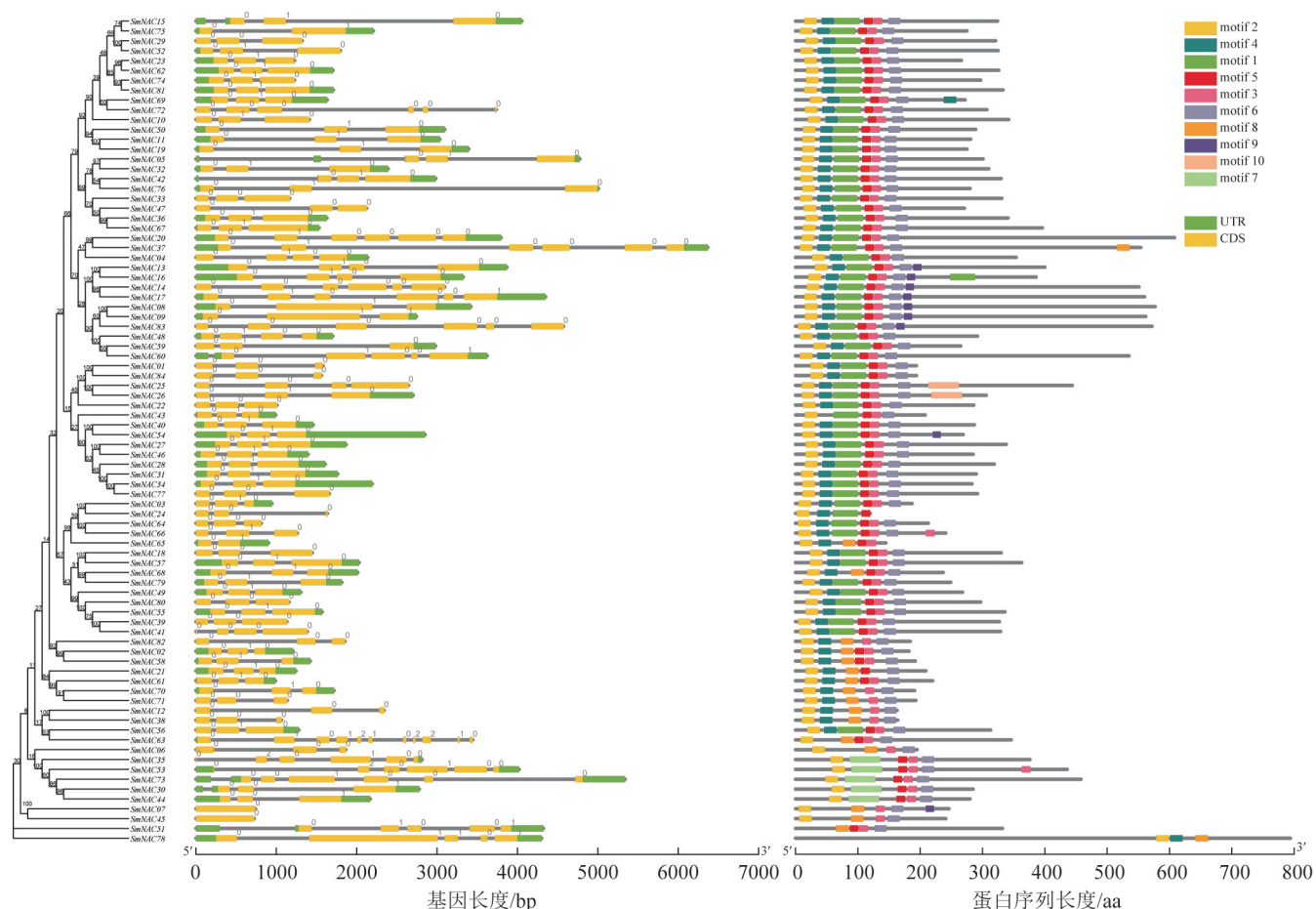


图 1 丹参 *NAC* 蛋白系统进化树

现，其内含子和外显子数量存在高度的差异性，基本都含有内含子 1~10 个，多数 *SmNACs* 基因含有 2 个内含子，同一亚族的 *SmNACs* 转录因子的基因结构相对保守。

SmNACs 基因家族的蛋白序列中，motif 2、motif 4、motif 1、motif 5、motif 3、motif 6 均出现在大多数亚族中，出现频率最高，其与 NAM 结构域相关，分别对应 *SmNACs* 转录因子 N 端 5 个保守的亚结构 A~E。同一亚族中的 *SmNACs* 家族成员具有

图2 *SmNACs*基因结构与其编码蛋白的motif分析

相对一致的保守基序分布, *SmNAC51*、*SmNAC78* 分别单独形成1个分支, 分别含有4、3个motif; *SmNAC35*、*SmNAC53*、*SmNAC73*、*SmNAC30*、*SmNAC44*形成1个分支, motif 4(子域B)和motif 1(子域C)被motif 7取代, 此外, J亚族成员中含有独有的motif 9, 推测这些亚组中的*NAC*基因可能具有其他重要的生物学功能。

3.4 *SmNACs*基因的染色体定位与共线性分析

对从丹参基因组中获得的*SmNACs*基因进行染色体定位分析, 结果见图3, 大部分基因分布在8条染色体的上下臂, 每条染色体上的*SmNACs*基因数量为3~15个, 基因在Sm2、Sm3、Sm5染色体上分布的较少, 集中在Sm1、Sm4、Sm6、Sm7、Sm8染色体的较多, 这可能与染色体结构和大小的差异有关。

丹参同拟南芥、南丹参的基因组共线性分析(图4)表明, 丹参中14个*NAC*家族成员同拟南芥*NAC*具有共线性, 丹参Sm4号染色体上的基因大多

对应拟南芥1号染色体上; 丹参中61个*NAC*家族成员同南丹参*NAC*具有共线性。

3.5 *SmNACs*基因顺式作用元件分析

真核生物基因的启动子由核心启动子和上游启动子2部分组成, 是调节基因转录的重要DNA序列。对*SmNACs*启动子进行顺式作用元件预测(图5), 发现一些*SmNACs*基因家族成员除含有大量CAAT-box、TATA-box基本元件外, 还含有G-box、GT1-motif、AE-box、ATCT-motif、TCT-motif、MRE等光响应元件, CGTCA-motif、TGACG-motif、TGA-element、ABRE等激素响应元件, WUN-motif、MBS、ARE、LTR等胁迫响应元件, 这表明这些*SmNACs*基因在损伤、干旱、厌氧、低温、盐胁迫应答中具有重要作用。此外, 还有GCN4_motif、CAT-box、RY-element、MSA-like、HD-Zip1等调控胚乳发育等调控元件, 以及O2-site、MBSI等调控代谢的响应元件。84个*SmNACs*基因中, 其中72个含有MeJA响应元件, *SmNAC13*、*SmNAC14*、

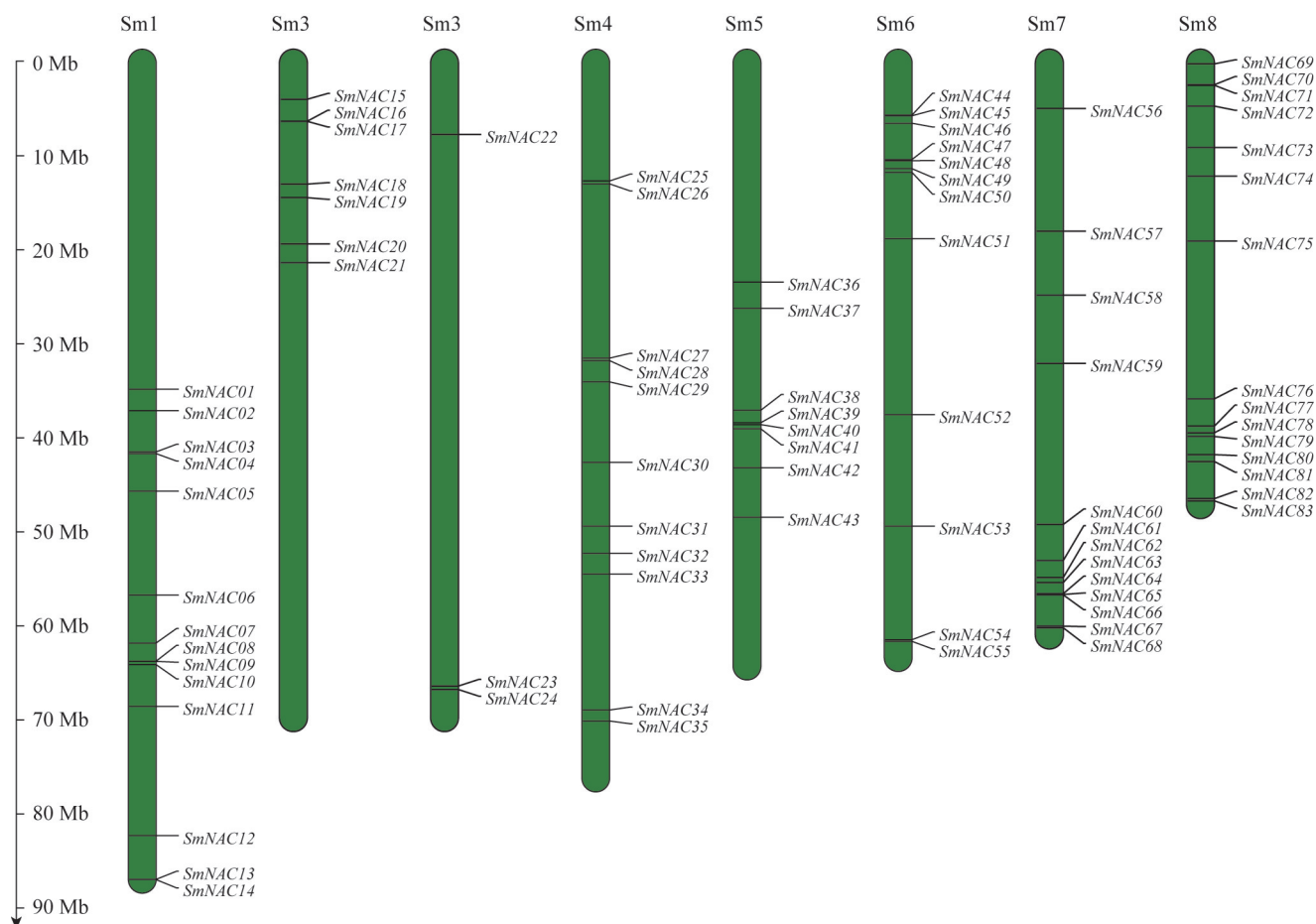


图3 丹参NAC基因的染色体定位

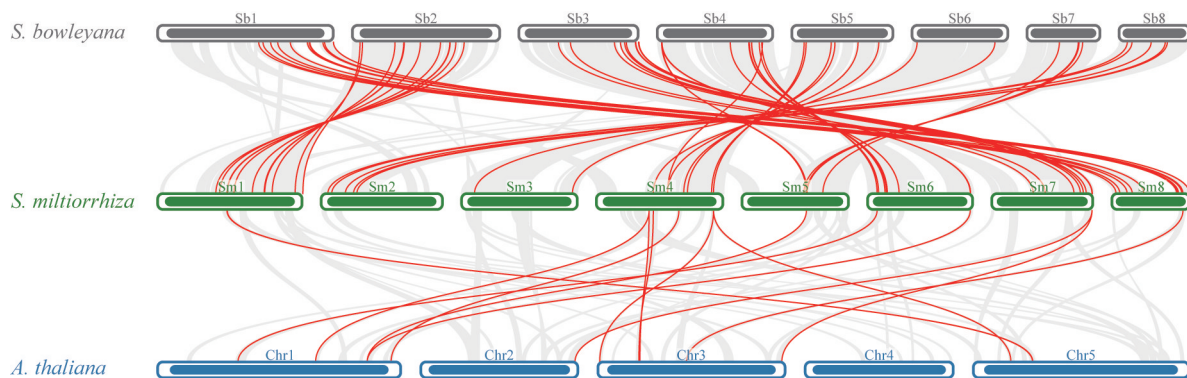


图4 丹参NAC基因的共线性分析

SmNAC15、*SmNAC16*、*SmNAC17*、*SmNAC24*、*SmNAC27*、*SmNAC31*、*SmNAC65*、*SmNAC67*、*SmNAC77* 含有较多的MeJA响应, 均有5个以上, 推测这些基因可能会受MeJA诱导。

3.6 丹参不同组织及MeJA处理后 *SmNACs* 基因的表达分析

以NCBI下载的丹参不同组织及MeJA处理后的

转录组数据为基础, 分析84个 *SmNACs* 基因在不同组织中的表达模式, 以及MeJA处理后的表达特性(图6)。结果表明, 84个 *SmNACs* 在丹参不同组织中的表达水平差异很大, 其中 *SmNAC20*、*SmNAC31*、*SmNAC79*、*SmNAC21*、*SmNAC43* 5个基因在茎中表达量相对较高, FPKM (fragments per kilobases per million-reads) 值>1, 其余均小于1; 84个 *SmNACs* 基因在叶片中表达量较低, FPKM值均小于1; 34个

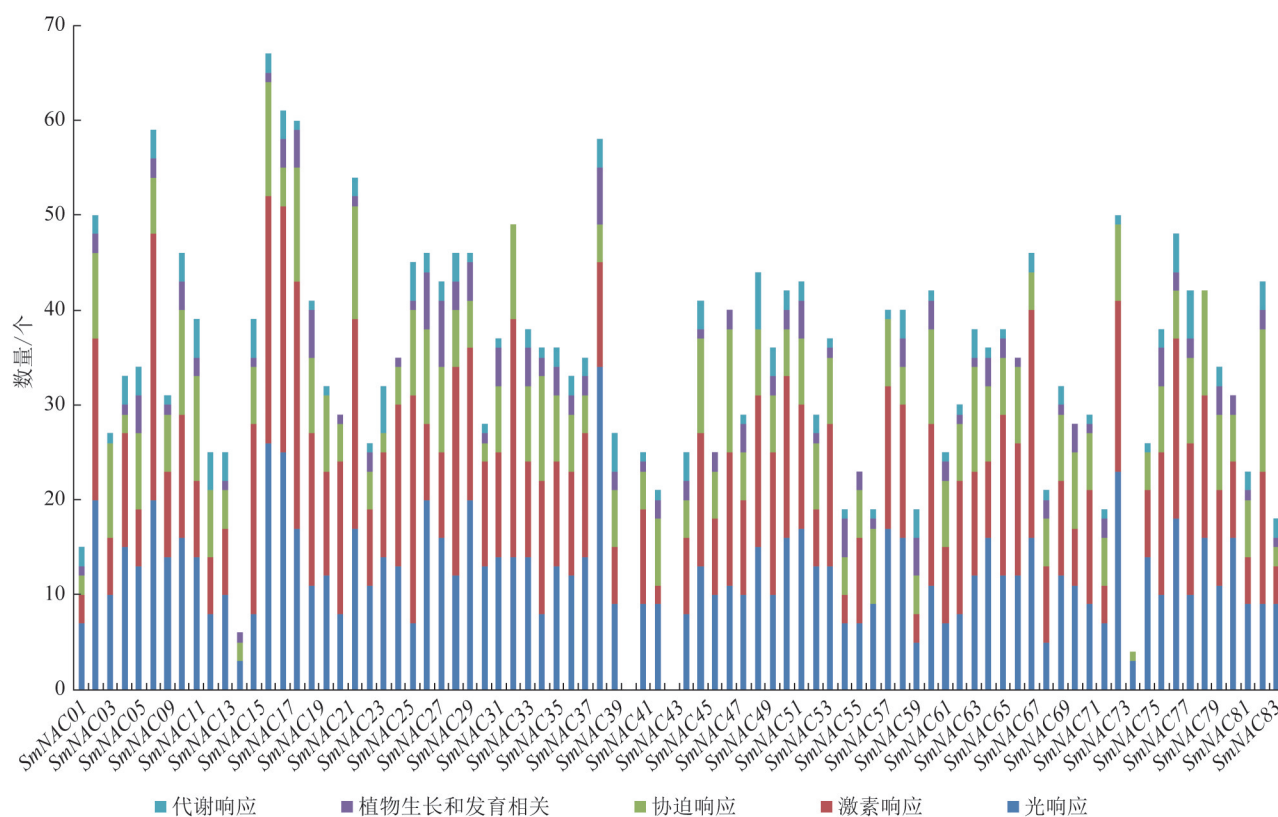


图5 丹参NAC基因启动子顺式作用元件及其数量分布

SmNACs 基因在根中的表达水平较高，其中 *SmNAC28*、*SmNAC20*、*SmNAC31*、*SmNAC54*、*SmNAC43*、*SmNAC21*、*SmNAC16* 7个基因的FPKM值>10，以上结果表明 *SmNACs* 可能主要在根中发挥功能，可能是 *SmNACs* 基因功能分化所导致的。

MeJA处理后，*SmNACs* 基因对MeJA的响应并不完全一致，其中47个 *SmNACs* 基因的表达水平较低，处理前后FPKM值均小于1，没有明显变化；17个 *SmNACs* 基因在MeJA处理后表达明显上调，其中 *SmNAC31*、*SmNAC43*、*SmNAC77*、*SmNAC81*、*SmNAC16*、*SmNAC02*、*SmNAC14*、*SmNAC54* 8个基因的表达水平较高，处理后的FPKM值均高于10；此外，20个 *SmNACs* 基因在MeJA处理后表达明显下调。

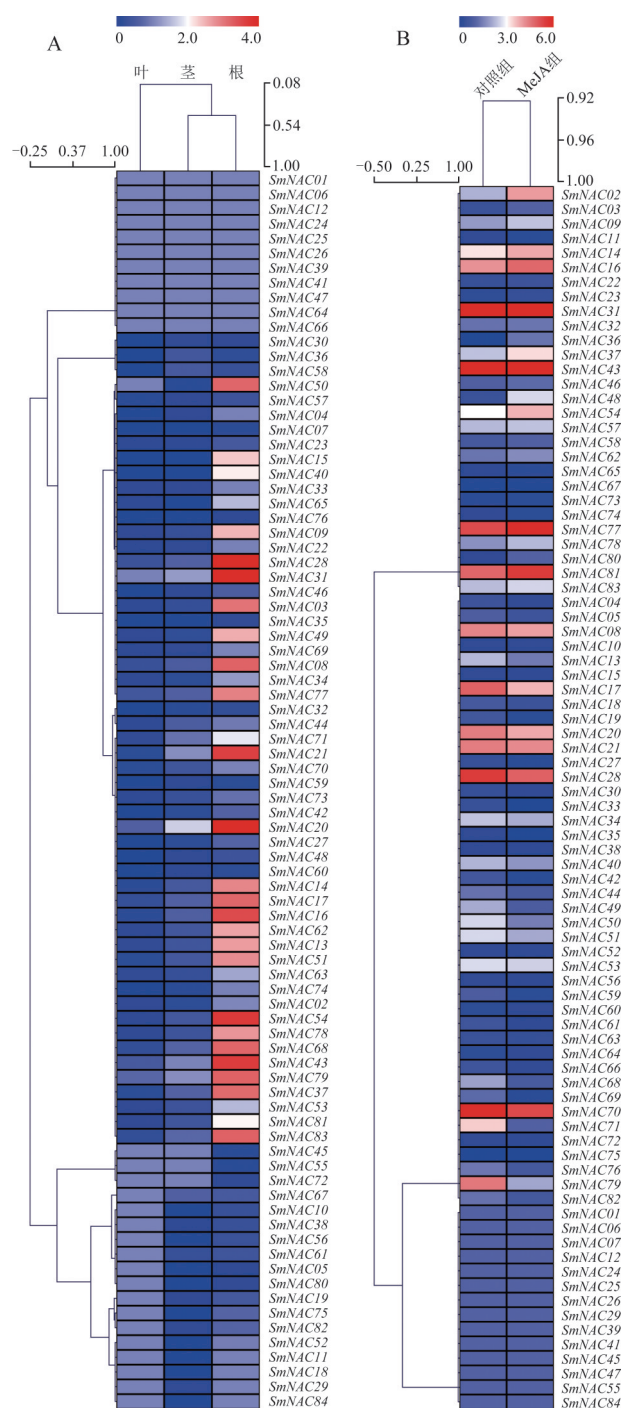
3.7 MeJA诱导 *SmNACs* 基因表达的qRT-PCR分析

选取12个 *SmNACs* 基因，包括与拟南芥逆境胁迫相关NAC蛋白同源性较高的，以及聚在不同分支的 *SmNACs* 基因，分析其在MeJA处理后的表达量的变化（图7），结果发现12个 *SmNACs* 基因均受MeJA诱导表达。其中，*SmNAC09*、*SmNAC15*、*SmNAC16* 受MeJA诱导后48 h显著上调表达，

SmNAC21、*SmNAC50*、*SmNAC51*、*SmNAC68* 受MeJA诱导后72 h呈现较弱的上调表达，*SmNAC53*、*SmNAC71* 受MeJA诱导后分别在12、24 h上调表达而后下降，*SmNAC20*、*SmNAC77*、*SmNAC78* 受MeJA诱导下调表达。与NCBI下载的丹参MeJA处理后的转录组数据相比，其中5个 *SmNACs* 基因，包括 *SmNAC15*、*SmNAC68*、*SmNAC71*、*SmNAC77*、*SmNAC78* 的表达模式与qRT-PCR不同，其他 *SmNACs* 基因的表达模式基本一致。由此可见，不同丹参 *SmNACs* 基因受MeJA诱导表达模式存在一定差异。

4 结论与讨论

NAC转录因子是植物中最大的特异性转录因子家族之一，广泛参与调控植物的生长发育进程，如植物根的生长^[7,37]、果实的成熟^[8]等。目前，NAC基因的鉴定和分类等研究已经在许多植物中进行，但关于丹参的NAC基因家族的研究还很少，NAC基因家族成员有待进一步挖掘并进行功能鉴定。基于 *S. miltiorrhiza* 基因组序列^[30]，本研究共确定了84个 *SmNACs* 基因家族成员，与南丹参（77个）中NAC



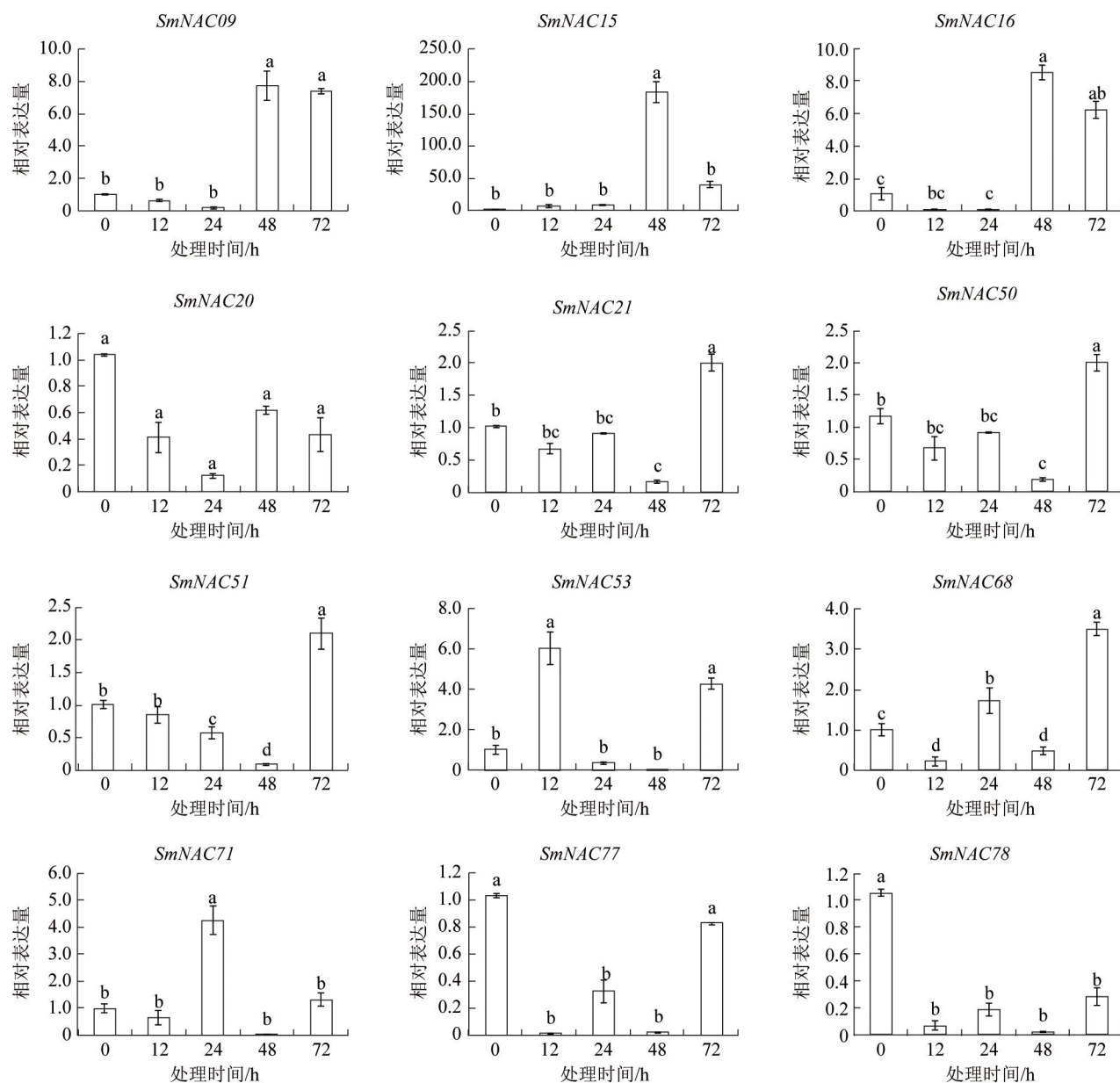
注：A. 丹参不同组织；B. MeJA 处理。

图6 丹参SmNACs基因的表达模式分析

基因的数目基本一致，但比拟南芥的NAC基因数目少，其大小的差异可能是由于每个物种在进化和分化过程中全基因组多倍体化事件的发生。理化分析表明SmNACs基因氨基酸长度、相对分子质量和等电点差异较大，但基因结构较为保守，其中56个SmNACs基因具有2个内含子，其他SmNACs基因有内含子1~10个，类似的结果亦在*Coffea canephora*^[38]、

烟草^[39]等植物中发现。保守基序对于蛋白质行使生物学功能非常重要，SmNACs基因家族的蛋白序列中，motif 2、4、1、3、5、6出现频率最高，对应SmNACs转录因子N端5个保守的亚结构A~E。在亚组S中，motif 4（子域B）和motif 1（子域C）被motif 7取代，说明这个亚组中的NAC基因可能具有不同的生物学功能，这一现象与*Coffea canephora*^[38]的结果相似。SmNACs蛋白具有较高的基序保守性，同一亚族的SmNACs蛋白基序组成基本相似，但也有少数聚在一支的SmNACs蛋白基序构成并不相同，推测其可能与SmNACs家族成员的功能分化有关。本研究采用NJ法构建了丹参、南丹参和拟南芥的NAC基因家族成员的系统发育进化树，将丹参NAC基因家族分为了23个亚族，丹参NAC家族单独建树与拟南芥、南丹参共同构建的物种间系统进化树的结果基本一致。蛋白序列的相似性往往决定其功能的相似性，研究发现拟南芥NAC转录因子ANAC092/AtNAC2可以正向调节叶片衰老并响应非生物胁迫，影响主根发育，ANAC054、ANAC098和ANAC031在分生组织形成和器官边界的建立中起重要作用^[40-41]。同源进化分析发现，SmNAC81与AtNAM100（ANAC092）的同源关系较近，SmNAC29、SmNAC52与AtNAM100（ANAC092）、AtNAM106（ANAC098），SmNAC10与AtNAM36（ANAC031）的同源关系较近，推测这些丹参转录因子可能与其同源蛋白具有相似的生物学功能。拟南芥VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6（VND6）和VND7是木质部导管分化的关键调控因子^[42]，系统进化分析发现SmNAC52与VND6（AtNAM109）、SmNAC32与VND7（AtNAM35）的同源关系较近，暗示其可能在调控丹参根木质部导管分化中起重要作用。

NAC广泛参与植物的生长发育，基因表达是其发挥生物学功能的前提。SmNACs基因呈现不同的组织表达特征，84个SmNACs在丹参不同组织中的表达水平差异很大，在叶片中表达量均较低，茎中也仅有5个SmNACs基因表达量的FPKM值>1，部分SmNACs基因在根中的表达水平较高，表明这些SmNACs可能在不同组织的转录调节中起协助作用，可能是SmNACs基因功能分化所导致的。部分基因在丹参根中高水平表达，暗示这些SmNACs可能在丹参根发育中发挥重要作用。



注：不同小写字母表示 $P < 0.05$ 。

图7 MeJA诱导*SmNACs*基因的表达分析 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

NAC转录因子在应对植物非生物胁迫和生物胁迫反应中起着重要的调节作用，其可以调控植物激素信号形成交叉通路进而参与调控植物的生长发育和响应逆境胁迫，NAC转录因子是茉莉酸信号的调控因子，也可以参与生长素、细胞分裂素、乙烯和赤霉素等的信号转导途径，有研究发现ANAC072/RD26可能同时介导ABA和MeJA的信号转导途径^[43-44]，VaNAC26通过在拟南芥中调节茉莉酸的合成增强其抗旱性^[14]，GhATAF1可被MeJA和SA高度诱导，表明GhATAF1参与应对非生物胁迫的反应^[15]，

植物逆境应答是一复杂的调控网络，逆境胁迫能促进植物次生代谢产物的积累，在丹参中，MeJA可以诱导丹参酮和酚酸合成酶基因的表达，促进丹参酮和酚酸的生物合成^[45-46]。MeJA处理后，*SmNACs*基因对MeJA的响应并不完全一致，其中20个*SmNACs*基因在MeJA处理后表达明显下调；17个*SmNACs*基因在MeJA处理后表达明显上调，其中*SmNAC31*、*SmNAC43*、*SmNAC77*、*SmNAC81*、*SmNAC16*、*SmNAC02*、*SmNAC14*、*SmNAC54* 8个基因的表达水平较高，而*SmNACs*基因均含有2个以上

的MeJA响应元件,说明这些*SmNACs*基因参与丹参响应MeJA的逆境胁迫应答。本研究选取与拟南芥逆境胁迫相关NAC蛋白同源性较高的,以及聚在不同分支的*SmNACs*基因,进行qRT-PCR分析,发现12个*SmNACs*基因均受MeJA诱导表达,不同丹参*SmNACs*基因受MeJA诱导表达模式存在一定差异,其中*SmNAC09*、*SmNAC15*、*SmNAC16*受MeJA诱导后48 h显著上调表达,推测这些*SmNACs*基因受MeJA的诱导参与调控丹参次生代谢成分的生物合成。在丹参根中高水平表达的,参与MeJA胁迫响应的*SmNACs*,这些基因能否增强丹参的抗逆性、是否能诱导丹参酮和酚酸生物合成途径关键酶基因的表达、其作用机制是什么还有待进一步研究。研究结果为进一步解析*SmNACs*基因调控丹参酮等次生代谢产物的合成机制,增强丹参的抗逆性及其提升品质的分子育种提供了参考。

参考文献

- [1] 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.
- [2] AIDA M, ISHIDA T, TASAKA M. Shoot apical meristem and *Cotyledon* formation during *Arabidopsis* embryogenesis: Interaction among the cup-shaped *Cotyledon* and shoot meristemless genes [J]. *Development*, 1999, 126(8):1563-1570.
- [3] OOKA H, SATOH K, DOI K, et al. Comprehensive analysis of *NAC* family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana* [J]. *DNA Res*, 2003, 10(6):239-247.
- [4] DUVAL M, HSIEH T F, KIM S Y, et al. Molecular characterization of AtNAM: A member of the *Arabidopsis* *NAC* domain superfamily [J]. *Plant Mol Biol*, 2002, 50(2):237-248.
- [5] WANG F T, LIN R M, FENG J, et al. TaNAC1 acts as a negative regulator of stripe rust resistance in wheat, enhances susceptibility to *Pseudomonas syringae*, and promotes lateral root development in transgenic *Arabidopsis thaliana*[J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6:108.
- [6] CHEN D D, CHAI S C, MCINTYRE C L, et al. Overexpression of a predominantly root-expressed *NAC* transcription factor in wheat roots enhances root length, biomass and drought tolerance[J]. *Plant Cell Rep*, 2018, 37(2):225-237.
- [7] YANG X F, KIM M Y, HA J, et al. Overexpression of the soybean *NAC* gene *GmNAC109* increases lateral root formation and abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants[J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10:1036.
- [8] JIA D, JIANG Z, FU H, et al. Genome-wide identification and comprehensive analysis of *NAC* family genes involved in fruit development in kiwifruit (*Actinidia*) [J]. *BMC Plant Biol*, 2021, 21(1):44.
- [9] SUN L, LIU L P, WANG Y Z, et al. NAC103, a *NAC* family transcription factor, regulates ABA response during seed germination and seedling growth in *Arabidopsis* [J]. *Planta*, 2020, 252(6):95.
- [10] RYU T H, GO Y S, CHOI S H, et al. SOG1-dependent NAC103 modulates the DNA damage response as a transcriptional regulator in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2019, 98(1):83-96.
- [11] YANG Z T, LU S J, WANG M J, et al. A plasma membrane-tethered transcription factor, NAC062/ANAC062/NTL6, mediates the unfolded protein response in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2014, 79(6):1033-1043.
- [12] YANG Z T, WANG M J, SUN L, et al. The membrane-associated transcription factor *NAC089* controls ER-stress-induced programmed cell death in plants [J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(3):e1004243.
- [13] HUYSMANS M, BUONO R A, SKORZINSKI N, et al. NAC transcription factors ANAC087 and ANAC046 control distinct aspects of programmed cell death in the *Arabidopsis* *Columella* and lateral root cap [J]. *Plant Cell*, 2018, 30(9):2197-2213.
- [14] FANG L C, SU L Y, SUN X M, et al. Expression of *Vitis amurensis* NAC26 in *Arabidopsis* enhances drought tolerance by modulating jasmonic acid synthesis [J]. *J Exp Bot*, 2016, 67(9):2829-2845.
- [15] HE X, ZHU L F, XU L, et al. GhATAF1, a *NAC* transcription factor, confers abiotic and biotic stress responses by regulating phytohormonal signaling networks [J]. *Plant Cell Rep*, 2016, 35(10):2167-2179.
- [16] TRAN L S P, NAKASHIMA K, SAKUMA Y, et al. Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible *NAC* transcription factors that bind to a drought-responsive *cis*-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter [J]. *Plant Cell*, 2004, 16(9):2481-2498.
- [17] TAKASAKI H, MARUYAMA K, KIDOKORO S, et al. The abiotic stress-responsive *NAC*-type transcription

- factor *OsNAC5* regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice[J]. *Mol Genet Genomics*, 2010, 284(3):173-183.
- [18] 邱琼. 三个巴西橡胶树NAC类转录因子基因的克隆和表达分析[D]. 海口:海南大学,2012.
- [19] 佚名. 神农本草经:卷四[M]. 顾观光,辑. 北京:学苑出版社,2002:79.
- [20] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:77.
- [21] 李翔,吴磊宏,范晓辉,等. 复方丹参方主要活性成分网络药理学研究[J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(21): 2911-2915.
- [22] 单晓晓,洪帮振,刘洁,等. 丹参化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(21):5496-5511.
- [23] LIN H C, CHANG W L. Phytochemical and pharmacological study on *Salvia miltiorrhiza* (I)-isolation of new tanshinones [J]. *Chin Pharmacol J*, 1991, 43(1):11.
- [24] CHANG J Y, CHANG C Y, KUO C C, et al. Salvinal, a novel microtubule inhibitor isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen), with antimitotic activity in multidrug-sensitive and-resistant human tumor cells[J]. *Mol Pharmacol*, 2004, 65(1):77-84.
- [25] WANG X H, MORRIS-NATSCHKE S L, LEE K H. New developments in the chemistry and biology of the bioactive constituents of Tanshen [J]. *Med Res Rev*, 2007, 27(1):133-148.
- [26] JI W, GONG B Q. Hypolipidemic activity and mechanism of purified herbal extract of *Salvia miltiorrhiza* in hyperlipidemic rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 119(2):291-298.
- [27] ZHANG J, AN S J, FU J Q, et al. Mixed aqueous extract of *Salvia miltiorrhiza* reduces blood pressure through inhibition of vascular remodelling and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(1/2):347-360.
- [28] SONG Q T, ZHANG Y Y, HAN X, et al. Potential mechanisms underlying the protective effects of salvianic acid A against atherosclerosis *in vivo* and *vitro* [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109:945-956.
- [29] LUO H M, ZHU Y J, SONG J Y, et al. Transcriptional data mining of *Salvia miltiorrhiza* in response to methyl jasmonate to examine the mechanism of bioactive compound biosynthesis and regulation[J]. *Physiol Plant*, 2014, 152(2):241-255.
- [30] XU H, SONG J, LUO H, et al. Analysis of the genome sequence of the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Mol Plant*, 2016, 9(6):949-952.
- [31] ZHENG X H, CHEN D, CHEN B H, et al. Insights into salvianolic acid B biosynthesis from chromosome-scale assembly of the *Salvia bowleyana* genome [J]. *J Integr Plant Biol*, 2021, 63(7):1309-1323.
- [32] EL-GEHALI S, MISTRY J, BATEMAN A, et al. The Pfam protein families database in 2019 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1):D427-D432.
- [33] ARTIMO P, JONNALAGEDDA M, ARNOLD K, et al. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(web server issue):W597-W603.
- [34] BLOM N, GAMMELTOFT S, BRUNAK S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites [J]. *J Mol Biol*, 1999, 294(5): 1351-1362.
- [35] CHOU K C, SHEN H B. A new method for predicting the subcellular localization of eukaryotic proteins with both single and multiple sites: Euk-mPLoc 2. 0 [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(4):e9931.
- [36] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10):2731-2739.
- [37] GUO H S, XIE Q, FEI J F, et al. MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for *Arabidopsis* lateral root development [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(5):1376-1386.
- [38] DONG X S, JIANG Y, YANG Y N, et al. Identification and expression analysis of the *NAC* gene family in *Coffea canephora* [J]. *Agronomy*, 2019, 9(11):670.
- [39] LI W, LI X X, CHAO J T, et al. NAC family transcription factors in tobacco and their potential role in regulating leaf senescence [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 1900.
- [40] XI D D, CHEN X, WANG Y X, et al. *Arabidopsis* ANAC092 regulates auxin-mediated root development by binding to the ARF₈ and PIN₄ promoters [J]. *J Integr Plant Biol*, 2019, 61(9):1015-1031.
- [41] SPINELLI S V, MARTIN A P, VIOLA I L, et al. A mechanistic link between STM and CUC1 during *Arabidopsis* development [J]. *Plant Physiol*, 2011, 156(4):1894-1904.
- [42] YAMAGUCHI M, GOUÉ N, IGARASHI H, et al. Vascular-related nac-domain6 and vascular-related NAC-domain7 effectively induce transdifferentiation into

- xylem vessel elements under control of an induction system[J]. Plant Physiol, 2010, 153(3):906-914.
- [43] 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 J, 2004, 39(6):863-876.
- [44] XIE Q, GUO H S, DALLMAN G, et al. SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals [J]. Nature, 2002, 419(6903): 167-170.
- [45] GAO W, HILLWIG M L, HUANG L Q, et al. A functional genomics approach to tanshinone biosynthesis provides stereochemical insights[J]. Org Lett, 2009, 11: 5170-5173.
- [46] XIAO Y, GAO S H, DI P, et al. Methyl jasmonate dramatically enhances the accumulation of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures [J]. Physiol Plant, 2009, 137(1):1-9.

(收稿日期: 2022-03-13 编辑: 田苗)