

## 沙柳 *SpsNAC042* 基因克隆及逆境表达分析

杨海峰,薄高峰,于兴旺,李安玉,张鑫,郝璞,刘璐

(内蒙古农业大学 林学院,内蒙古 呼和浩特 010018)

**摘要:**采用同源克隆的方法获得沙柳 *SpsNAC042* 基因,通过生物信息学分析、组织特异性表达分析、逆境表达分析。结果表明,*SpsNAC042* 基因的开放阅读框序列长度为 900 bp,共编码 299 个氨基酸,测定为亲水性不稳定蛋白。组织特异性表达分析得出花中的基因相对表达量最高,幼叶、茎 9~15 节间、根、成熟叶的表达量依次降低,茎尖的表达量最低。*SpsNAC042* 基因在干旱处理下与对照组相比整体呈增长趋势,并在 8 h 处达到最高;在低温处理下,基因表达量迅速积累,在 2 h 处达到最高,然后维持在较低水平表达;在盐和高温处理下 *SpsNAC042* 基因缓慢积累,后期迅速增高,最终在 24 h 处达到最高。研究表明 *SpsNAC042* 基因参与逆境应答反应,为深入开展沙柳 NAC 基因对生物和非生物胁迫应答研究提供了参考价值。

**关键词:**沙柳;NAC;基因克隆;逆境表达

**中图分类号:**S718.46

**文献标志码:**A

**文章编号:**1001-7461(2021)05-0011-07

### Cloning of *SpsNAC042* and Its Expression Analysis under Stress in *Salix psammophila*

YANG Hai-feng, BO Gao-feng, YU Xing-wang, LI An-yu, ZHANG Xin, HAO Pu, LIU-Lu

(Forestry College, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, Inner Mongolia, China)

**Abstract:** In this study, *SpsNAC042* gene of *Salix psammophila* was obtained by homologous cloning method. The analyses of bioinformatics, tissue-specific expression, and stress expression indicated that the open reading frame (ORF) sequence of the gene was 900 bp, encoded with 299 amino acids. It was identified as an unstable protein with hydrophilic property. The tissue specific expression analysis showed that the relative expression of the gene in flowers was the highest, and decreased systematically in young leaf, the 9–15<sup>th</sup> internode in stem, root and mature leaf, the lowest expression was in the shoot apex. The expression increased under drought stress compared with the control group, and reached the highest level at 8 hours. Under low temperature treatment, the gene expression rapidly accumulated and reached the highest level in 2 hours after the treatment, and remained at a low level. *SpsNAC042* gene accumulated slowly under salt and high temperature treatments, and increased rapidly in the late stage, finally reached its maximum after 24 hours. The results showed that *SpsNAC042* gene was involved in stress response. This study provides a reference for further research on the biological and abiotic stress responses of *S. psammophila* NAC gene.

**Key words:** *Salix psammophila*; NAC; gene cloning; stress

NAC 家族转录因子是一类植物所特有的转录因子,其有多种生物功能且广泛分布于陆生植物中。

在 NAC 蛋白质 N 端的结构域是高度保守和特异的<sup>[1]</sup>。NAC 转录因子家族成员众多,主要涉及参与

收稿日期:2020-11-05 修回日期:2020-12-28

基金项目:国家自然科学基金(31660216);国家科技重大专项课题(2018ZX08020002-005-005);内蒙古自治区科技计划项目(2021GG0075,2019GG004)。

作者简介:杨海峰,博士,副教授。研究方向:林木基因组学及林木基因工程。E-mail: yang\_hf888@163.com

植物的生长发育调控、植物的逆境胁迫应答、调控植物的抗病性、植物次生生长期调控以及激素信号转导等过程。在植物不同发育时期和多种环境因素诱导下,激活特定目的蛋白,发挥着各种重要的生物学功能<sup>[2]</sup>。

NAC 家族转录因子被认为是至今发现的植物基因组中最大的转录因子家族之一<sup>[3]</sup>。E. Souer *et al*<sup>[4]</sup>在矮牵牛(*Petunia hybrida*)中克隆出了 NAC 转录因子基因 NAM(no apical meristem)。随后在矮牵牛和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中发现了 ATAF1/2 和 CUC2 这 2 个转录因子。并以其首字母命名为 NAC 结构域<sup>[5]</sup>。NAC 基因目前已在拟南芥、大豆(*Glycine max*)、玉米(*Zea mays*)、棉花(*Gossypium* spp.)、沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus*)、苹果(*Malus domestica*)、小黑杨(*Populus × xiaohei*)、怪柳(*Tamarix chinensis*)等多种植物中获得,但本植物中研究并不深入。其中以杨树为研究对象,对 NAC 家族进行了系统分析,共鉴定出 163 个 NAC 基因家族成员,进化分析显示这些基因被聚类成 18 个亚家族<sup>[6]</sup>。通过从小黑杨中克隆获得的 NAC7 基因并分析得出 NAC7 基因对高盐胁迫具有应答反应,基因主要在根中具有盐胁迫应答效应<sup>[7]</sup>。苏柳(*Salix × jiangsuensis* ‘J2345’)中也成功克隆 NAC 基因,并推测柳树 Sl-NAC1 基因在非生物胁迫下表达较为稳定,受 ABA 和 GA 胁迫诱导<sup>[8]</sup>。

沙柳(*Salix psammophila*)是中旱生落叶灌木,内蒙古西北地区主要防风固沙树种。具有根系发达、耐干旱、易成活、生长快等特点,适宜在沙区生长,有很好的固碳释氧和防风固沙作用<sup>[9]</sup>。目前已经从分枝角度<sup>[10]</sup>、生理胁迫<sup>[11]</sup>等多个方向展开研究。本研究由沙柳中克隆获得 *SpsNAC042* 基因,进行了生物信息学分析,对 *SpsNAC042* 基因开展了组织特异性表达及逆境下的表达分析。本研究为沙柳 NAC 基因家族的挖掘及逆境分子调控机制研究提供了基础,为相关调控机制研究提供重要理论依据,为进一步获得优异抗逆种质资源和种质创新奠定了理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料来自内蒙古达拉特旗国家沙柳无性系种质资源保存库,选取长势良好的 1 年生单一无性系沙柳枝条(无性系编号 11~30)扦插至内蒙古农业大学苗圃地。待成活后截取长势良好、长约 50 cm 的幼苗,放入植物培养箱中水培,待长出 10 cm

嫩枝后提取 RNA 用于基因克隆。

选取沙柳(无性系 11~30)生长良好的茎尖、茎、叶、花、幼叶,置于液氮中保存待用。将枝条水培至生根约 5 cm,取根置于液氮中保存待用。取沙柳嫩枝放置在 2 L 三角瓶中。以 20% 聚乙二醇(PEG)6000 干旱胁迫处理;250 mmol NaCl 盐胁迫处理;培养箱中进行 4℃ 水培冷处理;培养箱进行 40℃ 水培热处理;培养箱进行 24℃ 水培对照组。溶液保持在 1/2,光照 14 h 黑暗 10 h,并在 1、2、4、8、12 h 和 24 h 处理后收集叶片,3 个生物学重复,每个重复 3 株,置于液氮中保存待用。

### 1.2 试验方法

1.2.1 RNA 提取及 cDNA 反转录 使用天根 RNApure Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(DP441)提取总 RNA,以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。取 4 μg 总 RNA,以 Trans Script All in one First strand cDNA Synthesis Supermix for qPCR 试剂盒进行反转录合成 cDNA,用于克隆基因。

1.2.2 基因克隆 以全株的 cDNA 为模板,NAC1-F、NAC2-R 为引物,利用 A8 聚合酶(北京艾德莱 2×A8 Fast HiFi PCR MasterMix)进行 PCR 反应,反应条件为 95℃ 预变性 5 min;98℃ 10 s,60℃ 30 s,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 5 min,4℃ 保存。以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,切胶回收后连接克隆载体 pEASY-Blunt zero Cloning Vector(全式金,北京)。选取阳性克隆菌斑,送至北京 Thermo Fisher 公司进行测序。

1.2.3 *SpsNAC042* 基因生物信息学分析 通过 NCBI 的 ORF (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)在线软件分析 NAC 基因的开放阅读框;利用 Phytozome 11 数据库搜索同源核苷酸及氨基酸序列;ExPASy (<http://web.expasy.org/protscale/>)在线预测亲水性和疏水性;ExPASy-ProtParam tool (<http://web.expasy.org/prot-param/>)预测等电点、分子量;在线软件 NPS@ ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_gor4.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_gor4.html))预测二级结构。Singal P4.1 预测信号肽,<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>预测跨膜结构;T-COFFEE (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/index.html>)进行氨基酸多序列比对;MEME Suite (<http://meme-suite.org/>)进行氨基酸结构比对;利用软件 MEGA6 构建系统进化树<sup>[12]</sup>。

1.2.4 沙柳 *SpsNAC042* 基因 RT-qPCR 表达分析 利用 Primer3 根据克隆的 CDS 序列设计定量

引物 qN1-F (GCAACTGGACTAAGAACGAATC G), qN1-R (ACGACCCAGTACTGGCCCTT), 保证其特异性。利用实时定量 PCR (RT-qPCR) 的方法, 以 *UBQ* 为内参基因, 分析 *NAC042* 基因在沙柳不同组织中的表达量。用 Thermo RNA 试剂盒分别提取正常条件下生长沙柳的根、茎、叶、花、茎尖, 幼叶等组织的 RNA; 提取不同时间点经过干旱胁迫、盐胁迫、低温胁迫、高温胁迫成熟叶片的 RNA。将提取的 RNA 进行 cDNA 第一链合成。采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法分析 RT-qPCR 试验数据。

## 2 结果与分析

### 2.1 *SpsNAC042* 基因克隆

提取沙柳全株的总 RNA, 经琼脂糖凝胶电泳与紫外分光光度计分析, 提取的 RNA 质量较好, 可

用于 cDNA 转录。以 NAC1-F、NAC1-R 为引物, 进行 PCR 扩增, 扩增片段与目标条带 900 bp 一致 (图 1)。经 Thermo Fishe 公司测序, 确定克隆获得 900 bp 的目标基因 *CDS* 序列 (图 2)。

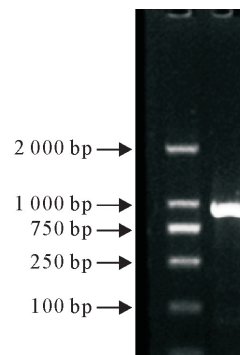


图1 目标基因电泳检测

Fig. 1 Target gene electrophoresis

```

1 ATGAGCAACATAAGTTTGTGGAGGCAAAATGCCACCGGTTGAGGTTCCATCCAGAGATGAAGAGCTTGTGTGTGACTACTTGATGAAGAAGGTTTCTGCTGTGACTCCCTTCTT
1 M S N I S F V E A K L P P G F R F H P R D E E L V C D Y L M K K V S C C D S L L
121 ATGATAGAAGTTGACCTCAACAGGTGTGAGCCGTGGGATATTCCTGATACGGCATGCGTGGAGGCAAGGAATGGTACTTTTATAGCCAAAGAGATCGTAAATACGCAACTGGACTAAGA
41 M I E V D L N R C E P W D I P D T A C V G G K E W Y F Y S Q R D R K Y A T G L R
241 ACGAATCGAGCAACAGCATCTGGATATTGGAAGGCCACAGGGAAGGAGACATATCCTACGTGAGGGAACCCCTTGTGGCATGAGAAGACCTTGGTGTCTACCAAGGTAGGGCACCT
81 T N R A T A S G Y W K A T G K D R H I L R E G T L V G M R K T L V F Y Q G R A P
361 AAAGGGAAAAAATGATTGGGTGATGATGAGTTTCGGCTTGAAGGGCCAGTACGGTCCGCCAATTTTTTTCAGAGAAGGAAGACTGGGTTTATGTGAGTGTCTATAAAAAAC
121 K G K K T D W V M H E F R L E G P V L G R P N F F S E K E D W V L C R V F Y K N
481 ACTAGAGAAGTTATGGCCAAACCTAGCATAAGAGCTGCTATGATGACACTGGCTCTTTCATCTTTGGCTGCGTTAATGGATTCAATATACACTTTTGACCAAACTCAACCCCAATTAGAT
161 T R E V M A K P S I R S C Y D D T G S S S L P A L M D S Y I T F D O T Q P N L D
601 GAGCAGGAGCAAGTGCCTGCTTCTCCATTTTCTCTCAAAATCCAAACCAACCAAGTTTCCCATACATCACTCAAATGGAAGTGCCAAATTTACCTATAAGAGTACAGAGCCCAATTGCT
201 E H E Q V P C F S I F S Q I Q P N Q S F P Y I T Q M E V P N L P I K S T S P F A
721 CAAGTACTATAAATATCACCACACCTCTAGACTCTTTTCTTGTGATACAAAGGTCTAAAGCTGTTTGAATCGCATTACCATGATGGAACCAAGGGTCACCAAGCTTAGGAGAA
241 Q V P I N I T T P L D S F S C D T K V L K A V L N R I T M M E N K G S P S L G E
841 GGTAGTTCAGAAAGCTATTATCTGATGTGGGCATGCCCACTTATGGAATAATTATTGA
281 G S S E S Y L S D V G M P N L W N N Y *

```

图2 *SpsNAC042* 基因 CDS 及蛋白序列

Fig. 2 *SpsNAC042* gene CDS and protein sequence

### 2.2 目标序列的生物信息学分析

2.2.1 蛋白理化特性分析 扩增得到完整的 CDS 序列, 长 900 bp, 编码 299 个氨基酸。利用 ExPASy-ProtPaRamtool 软件在线分析 *SpsNAC042* 氨基酸序列的理化性质。测定蛋白亲水性, *SpsNAC042* 理论等电点 (PI) 为 6.45, 分子量为 34 190.99 ku, *SpsNAC042* 基因蛋白质分子式为  $C_{1521}H_{2344}N_{406}O_{452}S_{20}$ , 蛋白质的半衰期为 30 h, 不稳定指数 51.39, 为不稳定蛋白。

2.2.2 *SpsNAC042* 蛋白亲水性和跨膜区分析 利用 ExPASy-ProtPaRamtool 分析得到 *SpsNAC042* 蛋白在第 42 个氨基酸处, 疏水性最强, 最大值 1.578, 在第 200 个氨基酸处, 亲水性最强, 最小值 -2.444, 总平均疏水指数 (GRAVY) -0.460, 蛋白质亲水区域多于疏水区域, 是亲水性蛋白 (图 3)。带负电荷的残基总数 (Asp + Glu): 36, 带正电荷的残基总数 (Arg + Lys): 35。利用 Pfam 在线软件分

析, *SpsNAC042* 只有 1 个蛋白结构域 NAM, 氨基酸序列 12~134 为 NAM 结构域。

2.2.3 *SpsNAC042* 蛋白质结构预测 蛋白质结构显示, *SpsNAC042* 主要包含结构形式为  $\alpha$  螺旋 ( $\alpha$ -*pha helix*) 占 9.70%, 延伸链 (*extended strand*) 占 24.41%, 无规则卷曲 (*random coil*) 占 65.89%。3 种结构所占比例差异比较大, 以无规则卷曲为主,  $\alpha$  螺旋最小 (图 4)。 *SpsNAC042* 基因的 N 端和 C 端以延伸链和无规则卷曲为主。三级结构中全局模型质量评估 (GMQE) 为 0.36, 覆盖率 48.72% (图 5)。通过 SWISS-MODEL 对 *SpsNAC042* 蛋白质的三级结构预测, 得到的三级结构 (图 5)。

2.2.4 *SpsNAC042* 蛋白同源序列分析及同源结构域分析 将克隆获得的 *SpsNAC042* 序列与欧洲红皮柳 *SapurV1A.0284s0040.1*、毛果杨 *Potri.007G065400.1*、苹果 *MDP0000298182*、桃子 *Prupe.4G143600.1*、拟南芥 *AT1G56010.2*、水稻 *LOC\_*



*Os06g46270.1*、玉米 *GRMZM2G063522\_T01* 所编码的氨基酸序列进行多序列比对分析(图 6)。*SpsNAC005* 与其他的氨基酸序列都具有 1 个典型的保守结构域 NAM,且均有 A、B、C、D、E 共 5 个氨

基酸同源序列区域。同时 N 端序列相对保守,而 C 端是高度多变的转录激活功能域,符合 NAC 基因家族的典型特征。上述结构表明克隆所获得的基因属于 NAC 基因家族成员。

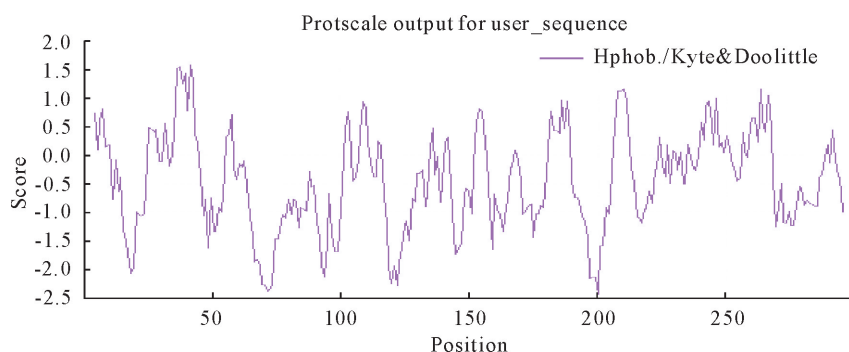


图 3 蛋白亲疏水性分析

Fig. 3 Distributing curve of hydropathy of the protein

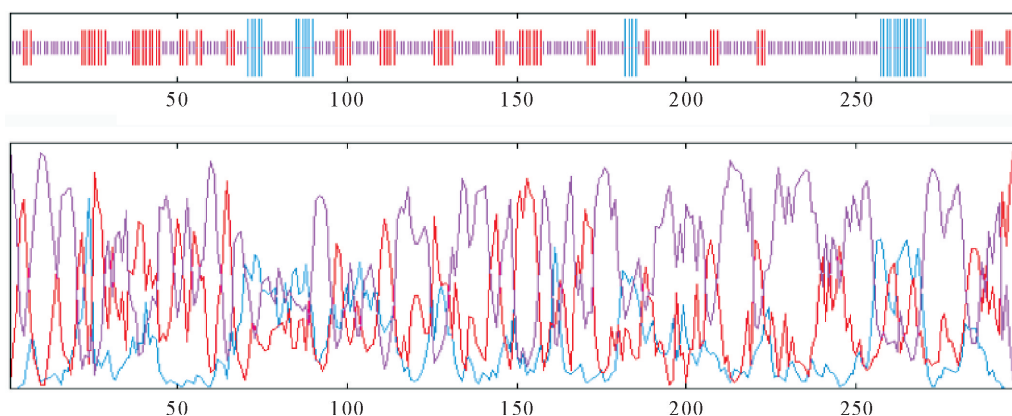


图 4 *SpsNAC042* 蛋白二级结构预测

Fig. 4 Prediction of secondary structure of *SpsNAC042* protein

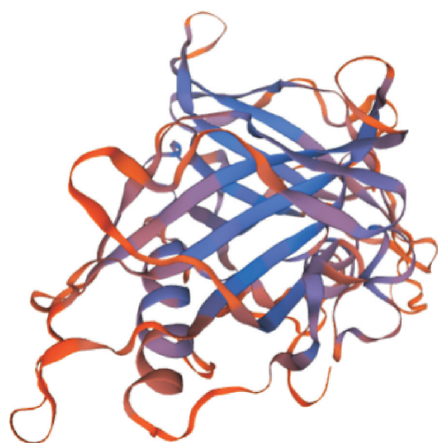


图 5 *SpsNAC042* 蛋白的三级结构预测

Fig. 5 Putative of *SpsNAC042* protein tertiary structure

利用 MEME Suite 在线软件,对 *SpsNAC042* 和同源基因进行同源结构域对比(图 6),结构域参数设定为 12。结果表明 *SpsNAC042* 和对比植物均有保守结构 NAM,均具有 A、B、C、D、E 共 5 个保守亚结构域,符合 NAC 基因家族的特征。其中柳科与杨树科亲缘关系相近,所分析的结构域完全一致。

这组对比基因的同源结构相似度很高,推测 *SpsNAC042* 在进化过程中,结构较稳定。

**2.2.5 *SpsNAC042* 系统发育树构建** 将本研究克隆所得的 *SpsNAC042* 基因编码的氨基酸序列与拟南芥、欧洲红皮柳、毛果杨、717 杨、苹果、桃子、拟南芥、水稻、玉米同源基因,利用 NJ 算法进行进化树分析(图 7)。结果表明,沙柳 *NAC042* 与欧洲红皮柳、毛果杨及毛白杨科属亲缘关系相近的为同一进化分支,木本植物与草本植物在不同进化分支,预测 NAC 基因有可能在木本植物和草本植物中存在分化,与上述同源序列和同源结构域分析结果一致。

**2.2.6 沙柳 *SpsNAC042* 基因的组织特异性定量分析** 以沙柳 7 个不同组织部位为模板,通过中 RT-qPCR 检测分析各组织部位的相对表达量(图 8)。以 *UBQ* 基因为参照,其中花中的基因相对表达量最高,幼叶、茎 9~15 节间根、叶的表达量依次降低,茎尖的表达量最低。

**2.2.7 沙柳 *SpsNAC042* 基因在逆境处理下定量表达分析** 将沙柳在干旱胁迫、盐胁迫、低温胁迫、



高温胁迫进行处理,利用 RT-qPCR 分析 *SpsNAC042* 基因的相对表达量。结果表明,在干旱处理下 *SpsNAC042* 基因与对照组相比整体呈增长趋势,并在 8 h 处达到最高;在低温处理下,基因

表达量迅速积累,在 2 h 处达到最高,然后维持在较低水平表达;(图 9A、9C)。在盐和高温处理下 *SpsNAC042* 基因缓慢积累,后期迅速增高,最终在 24 小时处达到最高(图 9B、9D)。

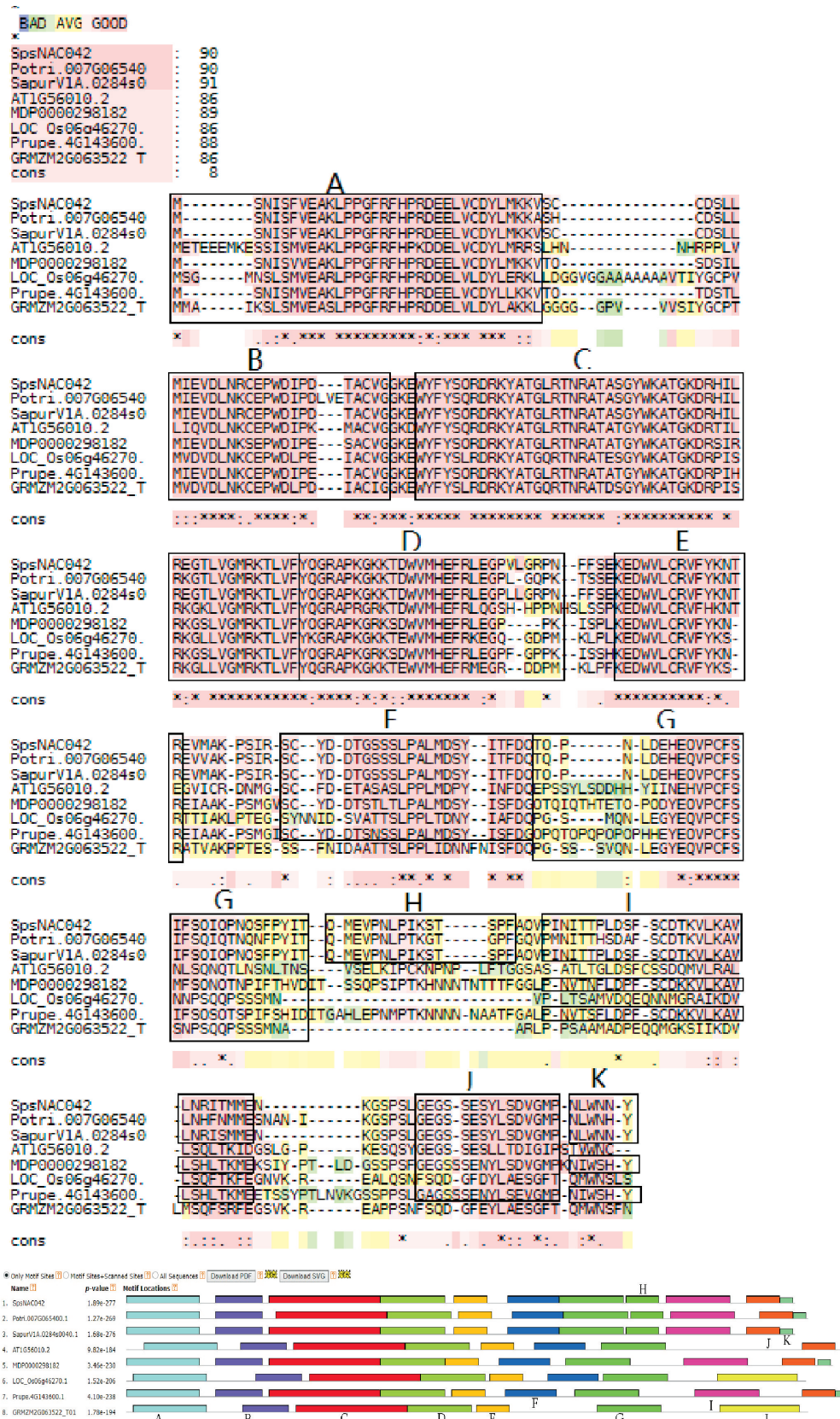
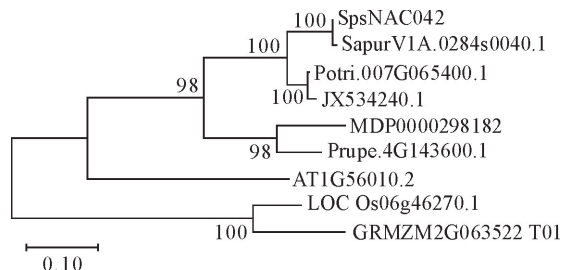


图 6 *SpsNAC042* 基因家族氨基酸序列多重比对和同源结构域对比

Fig. 6 Multiple alignment of amino acid sequences and comparison of homologous domains of *SpsNAC042* gene family



注: SapurV1A.0284s0040.1 欧洲红皮柳、Potri.007G065400.1 毛果杨、JX534240.1 717 杨、MDP0000298182 苹果、Prupe.4G143600.1 桃子、AT1G56010.2 拟南芥、LOC\_Os06g46270.1 水稻、GRMZM2G063522\_T01 玉米

图 7 *SpsNAC042* 基因家族系统进化树

Fig. 7 The neighbor-joining tree of *SpsNAC042* gene family

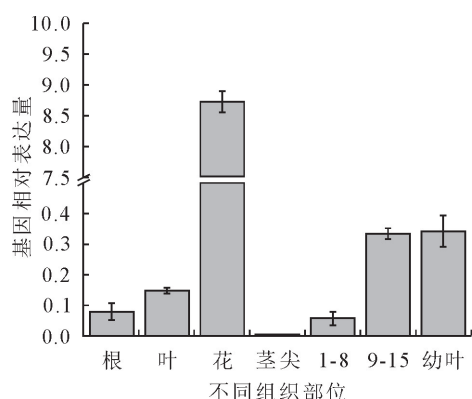


图 8 RT-qPCR 分析 *SpsNAC042* 基因的组织特异性表达

Fig. 8 Tissue specific expression analysis of *SpsNAC042* with RT-qPCR

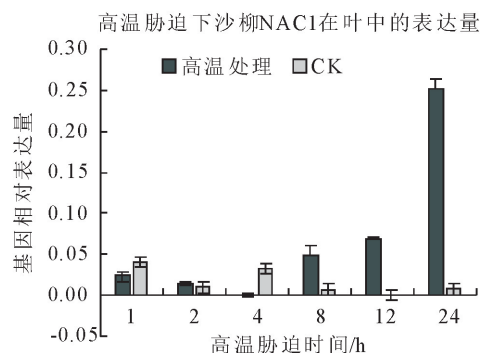
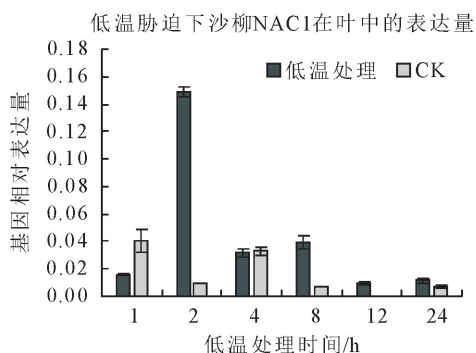
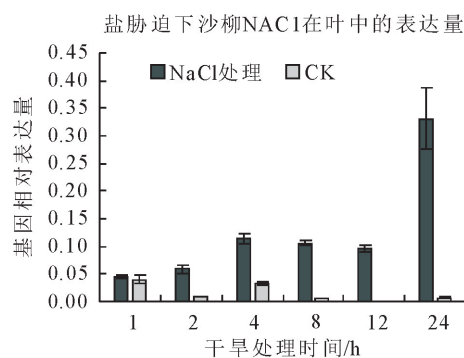
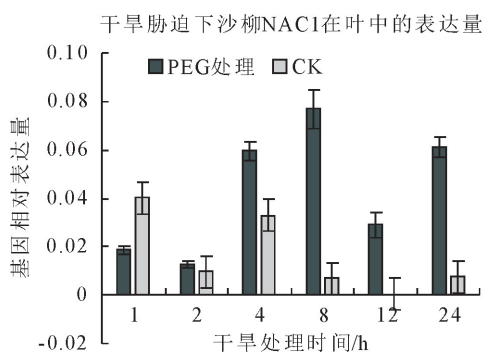


图 9 RT-qPCR 分析 *SpsNAC042* 基因在不同逆境下的特异性表达

Fig. 9 Specific expression of *SpsNAC042* gene under different stresses of RT-qPCR analysis

### 3 结论与讨论

多序列及结构域比对分析表明, *SpsNAC042* 蛋白含有 1 个高度保守的典型 NAM 结构域。系统发育树构建表明 *SpsNAC042* 基因与欧洲红皮柳和毛果杨同源基因的同源性较高。*SpsNAC042* 基因在盐胁迫和高温胁迫下应答较为明显。在低温和干旱胁迫下有应答。该基因归属于 SNAC (Stress-responsive NAC) 大类。

本研究以木本植物沙柳为材料, 选取 *SpsNAC042* 转录因子基因进行抗逆功能分析。M. Nuruzzaman *et al* [13] 研究表明, 20%~25% 的 NAC 基因都至少与一种胁迫相关 [13]。而干旱、高盐、低温、高温是影响植物生长发育的主要逆境因子 [14]。故本研究应用荧光定量 PCR 法分析了 *SpsNAC042* 基因在干旱、高盐、冷和高温胁迫下的表达模式, 发现 NAC 基因与多种非生物胁迫响应相关。在有关香蕉 (*Musa nana*) 的研究中表明, *MusaNAC042* 在提高转基因香蕉植株的耐盐性和耐旱性方面的作用明显, *MusaNAC042* 的表达与盐胁迫和干旱胁迫呈正相关 [15]。在小黑杨的研究中表明 NAC7 转录因子基因对盐胁迫具有应答反应 [7]。上述研究与本研究结果相似, 在本研究中干旱、低温、高温、盐胁迫均能诱导 *SpsNAC042* 基因的表达, 但在应答快慢上有不同程度的差异。该结

果表明沙柳 *NAC042* 基因对胁迫有所应答,很有可能参与沙柳的抗逆调控。

根据同源序列分析,本研究由沙柳中克隆获得 *SpsNAC042* 基因,进化树分析表明与草本植物拟南芥 *NAC1*(AT1G56010)基因为同源基因<sup>[16]</sup>。在拟南芥中研究发现 *NAC1* 转录因子可能参与外植体特异性伤口信号传导途径。在器官形成、再生、侧根、不定根形成中发挥不同的作用<sup>[16]</sup>。有学者研究表明,与拟南芥 *NAC1* 为同源基因的葡萄 *VvNAC1* 基因在非生物胁迫下有积极作用,*VvNAC1* 基因在发育中的花表达增强<sup>[17]</sup>。在本研究基因组织特异性表达与之相吻合。此外,研究人员还进行了一系列的生物胁迫试验,并表示 *VvNAC1* 基因可能会触发不同信号防御途径的调节<sup>[17]</sup>。因为 *NAC* 基因结构域的 C 端是高度多变的转录激活功能域,可能导致不同调控功能。后续研究会补充该试验内容。

根据基于拟南芥、水稻、石松和苔藓中大部分 *NAC* 基因的系统进化树分析研究,将功能相近的 *NAC* 基因各自归类,其中胁迫响应的 *NAC* 基因都归属于 *SNAC* (*Sress-responsive NAC*) 大类<sup>[18]</sup>。*NAC* 转录因子中很多成员对非生物胁迫都具有应答反应,如柑橘在低温、干旱、高盐和 ABA 胁迫条件下 *NAC83* 基因呈现出差异性的表达<sup>[19]</sup>。*MdNAC1* 转基因苹果植株在干旱胁迫条件下,抗旱性明显增强<sup>[20]</sup>。玉米 *ZmNAC62* 转基因株系参与调控干旱,低温胁迫<sup>[21]</sup>。*AgNAC1* 对高温,低温,干旱和盐胁迫均有响应<sup>[22]</sup>。根据上述研究及本研究中 *SpsNAC042* 基因在逆境下的相应,分析预测 *SpsNAC042* 基因应该在沙柳遭遇生物或非生物胁迫时响应表达,为正调节因子,隶属 *SNAC* 大类。

#### 参考文献:

- [1] 柳展基,邵凤霞,唐桂英. 植物 *NAC* 转录因子的结构功能及其表达调控研究进展[J]. 西北植物学报, 2007, 27(9): 1915-1920.  
LIU Z J, SHAO F X, TANG G Y. Advances in structure, function and expression regulation of *NAC* transcription factors in plants[J], 2007, 27(9): 1915-1920. (in Chinese)
- [2] 王春雨,张茜. 植物 *NAC* 转录因子功能研究进展[J]. 生物技术通报, 2018, 34(11): 8-14.  
WANG C Y, ZHANG X. Research progress of plant *NAC* transcription factor function [J]. Biotechnology bulletin, 2018, 34 (11): 8-14. (in Chinese)
- [3] 王萍,于月华,白玉翠,等. 大豆 *GmNAC23* 基因的克隆及特征分析[J]. 华北农学报, 2019, 34(1): 46-53.
- [4] SOUER E, VAN 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.
- [5] AI DA M, ISHIDA T, FUKAKI H, *et al.* Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant[J]. Plant Cell, 1997, 9(6): 841-857.
- [6] 祁广. 杨树 *NAC* 基因家族分析及 *PdCSLD5* 和 *PdCSLD6* 基因功能研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2012.
- [7] 张雪梅,姚文静,赵凯,等. 杨树 *NAC7* 转录因子基因应答盐胁迫表达[J]. 东北林业大学学报, 2017, 45(8): 6-9, 13.  
ZHANG X M, YAO W J, ZHAO K, *et al.* Expression of *NAC7* transcription factor gene in poplar responding to salt stress [J]. Journal of Northeast Forestry University, 2017, 45 (8): 6-9, 13. (in Chinese)
- [8] 田雪瑶,周洁,王保松,等. 柳树 *NAC* 基因的克隆与表达模式分析[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2020, 44(1): 119-124.  
TIAN X Y, ZHOU J, WANG B S, *et al.* Cloning and expression pattern analysis of *NAC* gene in willow [J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Science Edition, 2020, 44 (1): 119-124. (in Chinese)
- [9] 刘文军,吕广林,邬满平,等. 库布其沙漠沙柳造林技术要点[J]. 内蒙古林业, 2020(9): 35-36.
- [10] 张磊,叶志玮,赵晨曦,等. 沙柳 *SpsLAZY1a* 和 *SpsLAZY1b* 基因克隆及生物信息学分析[J]. 西北林学院学报, 2017, 32(1): 98-105.  
ZHANG L, YE Z W, ZHAO C X, *et al.* Cloning and bioinformatics analysis of *SpsLAZY1a* and *SpsLAZY1b* genes in *Salix psammophila* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2017, 32(1): 98-105. (in Chinese)
- [11] 田胃,左小容,梁宗锁. 黄土高原 3 种优势种对干旱胁迫的生理响应及其抗旱性评价[J]. 西北林学院学报, 2011, 26(6): 18-23.  
TIAN Z, ZUO X R, LIANG Z S. Physiological response and drought resistance evaluation of three dominant species in Loess Plateau [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2011, 26(6): 18-23. (in Chinese)
- [12] 张磊. 沙柳 *SpsLAZY1a*、*b* 基因克隆及功能初步分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
- [13] NURUZZAMAN M, MANIMEKALAI R, SHARONI A M, *et al.* Genome-wide analysis of *NAC* transcription factor family in rice. [J]. Gene, 2010, 465(1/2): 30-44.
- [14] 孙利军,李大勇,张慧娟,等. *NAC* 转录因子在植物抗病和非生物胁迫反应中的作用[J]. 遗传, 2012, 34(8): 993-1002.  
SUN L J, LI D Y, ZHANG H J, *et al.* The role of *NAC* transcription factors in plant resistance to disease and abiotic stress [J]. Genetics, 2012, 34(8): 993-1002. (in Chinese)
- [15] TA K H, NEGI S, GANAPATHI T R. Banana *NAC* transcription factor *MusaNAC042* is positively associated with drought and salinity tolerance [J]. Protoplasma, 2016, 254(2): 1-14.
- [16] CHEN X, CHENG J, CHEN L, *et al.* Auxin-Independent *NAC* pathway acts in response to explant-specific wounding and promotes root tip emergence during de novo root organogenesis in arabidopsis. [J]. Plant Physiology, 2016: 2136.



- mixed forest in Xiaolong Mountains, Gansu Province of north-western China[J]. Beijing Forestry University Journal, 2019, 41(4): 21-31. (in Chinese)
- [17] 惠刚盈, 胡艳波, 赵中华. 结构化森林经营研究进展[J]. 林业科学研究, 2018, 31(1): 85-93.  
HUI G Y, HU Y B, ZHAO Z H. Research progress of structure-based forest management[J]. Forest Research, 2018, 31(1): 85-93. (in Chinese)
- [18] 惠刚盈. 角尺度——一个描述林木个体分布格局的结构参数[J]. 林业科学, 1999, 35(1): 3-5.
- [19] 惠刚盈, 胡艳波. 混交林树种空间隔离程度表达方式的研究[J]. 林业科学研究, 2001, 14(1): 23-27.
- [20] 惠刚盈, von Gadow K, Albert M. 一个新的林分空间结构参数——大小比数[J]. 林业科学研究, 1999, 13(1): 3-5.
- [21] 胡艳波, 惠刚盈. 基于相邻木关系的林木密集程度表达方式研究[J]. 北京林业大学学报, 2015, 37(9): 1-8.  
HU Y B, HUI G Y. How to describe the crowding degree of trees based on the relationship of neighboring trees[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2015, 37(9): 1-8. (in Chinese)
- [22] 徐美玲, 农明川, 欧光龙. 思茅松天然林林分空间结构分析[J]. 西南林业大学学报: 自然科学, 2020, 40(3): 122-130.  
XU M L, NONG M C, OU G L. Spatial structure analysis of *Pinus kesiya* var. *langbianensis* natural forest[J]. Journal of Southwest Forestry University: Natural Science, 2020, 40(3): 122-130. (in Chinese)
- [23] 韩金, 王新杰, 段皓赞. 金沟岭云冷杉针阔混交林林分结构研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2019, 39(1): 58-63.  
HAN J, WANG X J, DUAN H Y. Study on forest structure of coniferous and broad-leaved mixed forest in Jingouling forest farm of Wangqing County of Jilin Province[J]. Journal of Central South University of Forestry and Technology, 2019, 39(1): 58-63. (in Chinese)
- [24] 刘燕, 李春旭, 王子纯, 等. 大兴安岭两种主要天然次生林林分空间结构特征[J]. 东北林业大学学报, 2020, 48(6): 128-134.  
LIU Y, LI C X, WANG Z C, et al. Stand spatial structure characteristics of two main natural secondary forests in Daxing'an Mountains[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2020, 48(6): 128-134. (in Chinese)
- [25] 张岗岗, 王得祥, 柴宗政, 等. 小陇山2种典型天然林空间结构参数分布特征[J]. 林业科学研究, 2015, 28(4): 531-537.  
ZHANG G G, WANG D X, CHAI Z Z, et al. Distribution characteristics of two typical natural forest spatial structure parameters in Xiaolongshan[J]. Forest Research, 2015, 28(4): 531-537. (in Chinese)
- [26] 陈亚南. 落叶松云冷杉林空间结构多样性及择伐模型的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2016.
- [27] 万盼, 刘文帧, 刘瑞红, 等. 结构化经营对栎松混交林林分结构及稳定性的影响[J]. 林业科学, 2020, 56(4): 35-45.  
WAN P, LIU W Z, LIU R H, et al. Effects of structure-based forest management on stand space structure and its stability of mixed oak-pine forest[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2020, 56(4): 35-45. (in Chinese)
- [28] 胡中洋, 刘锐之, 刘萍. 不同尺度天山云杉活立木空间结构分析[J]. 西北林学院学报, 2020, 35(2): 153-159.  
HU Z Y, LIU R Z, LIU P. Spatial structure on *Picea schrenkiana* var. *tianschanica* standing tree at different scales[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2020, 35(2): 153-159. (in Chinese)

(上接第17页)

- [17] LE HÉNANFF GALLE, CAMILLE P, BARBARA C, et al. Grapevine NAC1 transcription factor as a convergent node in developmental processes, abiotic stresses, and necrotrophic/biotrophic pathogen tolerance. [J]. Journal of Experimental Botany, 2013(16): 4877-4893.
- [18] 黄娟, 邓娇, 朱丽伟, 等. 植物种子发育相关 NAC 家族转录因子研究进展[J]. 种子, 2017, 36(11): 54-58.  
HUANG J, DENG J, ZHU L W, et al. Research progress of NAC family transcription factors related to plant seed development [J]. Seeds, 2017, 36(11): 54-58. (in Chinese)
- [19] 郭文芳, 刘德春, 杨莉, 等. 柑橘抗逆基因 NAC83 的克隆与表达[J]. 园艺学报, 2015, 42(3): 445-454.  
GUO W F, LIU D C, YANG L, et al. Cloning and expression of stress resistance gene NAC83 in *Citrus*[J]. Acta Horticulture Sinica, 2015, 42(3): 445-454. (in Chinese)
- [20] 贾东峰. 苹果 NAC 转录因子调控干旱胁迫响应和矮化性状的研究[D]. 杨陵: 西北农林科技大学, 2019.
- [21] 吴庚锦, 程殿君, 贺琳, 等. 玉米 *ZmNAC62* 调控低温渗透胁迫的反应[C]//中国作物学会. 2019 年中国作物学会学术年会论文摘要集, 2019. 1.
- [22] 段奥其, 冯凯, 刘洁霞, 等. 芹菜 NAC 转录因子基因 *AgNAC1* 的克隆及其对非生物胁迫的响应[J]. 园艺学报, 2018, 45(6): 1125-1135.  
DUAN A Q, FENG K, LIU J X, et al. Cloning of the NAC transcription factor gene *AgNAC1* from celery and its response to abiotic stress[J]. Acta Horticulture Sinica, 2018, 45(6): 1125-1135. (in Chinese)