

李宝昌,陈岳,张涵,等. 黄瓜 *CsNAC032* 基因的克隆及盐胁迫响应分析[J]. 江苏农业科学,2022,50(18):60-65.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.18.009

黄瓜 *CsNAC032* 基因的克隆及盐胁迫响应分析

李宝昌¹, 陈岳^{1,2}, 张涵¹, 张微微¹

(1. 上海农林职业技术学院, 上海 201699; 2. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240)

摘要: 黄瓜对盐胁迫非常敏感, 土壤中盐含量过高会严重影响其正常生长和发育, 从而影响黄瓜的品质和产量。为了筛选黄瓜耐盐相关基因, 采用同源克隆技术, 从黄瓜叶片的 cDNA 中克隆了 1 个 NAC 转录因子 *CsNAC032*。*CsNAC032* 基因 CDS 长 900 bp, 编码 299 个氨基酸, 相对分子质量为 34 271.63, 等电点为 5.67。亚细胞定位预测 *CsNAC032* 定位于细胞核。序列比对和进化分析表明, *CsNAC032* 有 NAC 家族蛋白典型的保守结构域, 在 N 端约 150 个氨基酸中包含 A、B、C、D、E 等 5 个保守的亚结构域, *CsNAC032* 与甜瓜的 *CmNAC-like* (NP_001284423.1) 的亲缘关系最近。通过 qRT-PCR 检测 *CsNAC032* 基因在黄瓜不同器官中的表达情况, 发现其在主要在根、茎、子叶、果刺等营养器官中表达, 暗示其可能主要参与营养器官的发育。在黄瓜幼苗受盐胁迫后 3 h, *CsNAC032* 表达水平升高, 并于处理后 12 h 表达水平达到最高, 说明 *CsNAC032* 可能在黄瓜抵御盐胁迫中发挥着一定功能。

关键词: 黄瓜; NAC 转录因子; 盐胁迫; qRT-PCR; 表达水平

中图分类号: S642.203 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2022)18-0060-05

转录因子在调节植物生长和逆境响应中发挥着至关重要的功能^[1]。其中 NAC 类家族蛋白是植物特有的转录因子之一, 其名字来源于矮牵牛的 NAM (no apical meristem)、拟南芥的 ATAF1/2 (*Arabidopsis* transcription activation factor) 和 CUC2 (cup-shaped cotyledon) 的首字母缩写而成^[2-3]。NAC 转录因子具有独特的结构特征, N 端含保守的蛋白结构域, 该结构域由 A、B、C、D、E 等 5 个亚结构域组成^[3-4]。NAC 转录因子在植物生长发育和胁迫响应中均发挥重要作用^[5]。例如拟南芥 *NAC032* 受到 H₂O₂、NaCl 和聚乙二醇的诱导表达, 并通过响应这些胁迫促进叶片的衰老^[6-7]。此外, 拟南芥的 *NAC019*、*NAC055* 和 *NAC072* 均受到盐、干

旱、脱落酸和茉莉酸的诱导表达^[8]。

黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 是葫芦科一年生草本植物, 是我国主要蔬菜作物之一。由于黄瓜根系脆弱、好气、分布浅, 因此对盐胁迫十分敏感。发生盐害时, 会对黄瓜的产量和品质造成严重影响^[9]。因此, 黄瓜耐盐是近年研究热点之一。刘东让等对黄瓜耐盐种质资源进行了筛选, 同时提出了当前黄瓜耐盐胁迫育种中存在的问题^[10-11]。Zhu 等在烟草中过表达黄瓜的 *CsSAMS1* 基因, 发现 *CsSAMS1* 可以影响烟草中多胺和乙烯的合成, 进而提高烟草耐盐性^[12]。Liu 等利用耐盐亲本 CG104 和对盐敏感的亲本 CG37 构建了重组自交系群体, 通过图位克隆获得了 1 个耐盐相关的主效 QTL, 并提出了 2 个候选基因^[13]。尽管 NAC 基因在植物中的耐盐研究报道了很多, 在黄瓜中却鲜有报道。本研究通过同源克隆获得了黄瓜 *CsNAC032* 基因, 并对其进行了生物信息学分析, 利用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 分析了该基因在不同器官中的表达, 在此基础上进行盐胁迫, 分析处理后该基因的表达, 为今后深入研究其功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 基因的克隆与鉴定

在 TAIR 网站下载拟南芥 *NAC032* (AT1G77450) 的蛋白序列, 将该序列比对到黄瓜

收稿日期: 2022-05-28

基金项目: 上海自然科学基金 (编号: 20ZR1439600); 上海市“科技创新行动计划”农业领域项目 (编号: 20392001300); 上海农林职业技术学院中青年领军人才项目 (编号: A2-0273-20-01-16); 上海农林职业技术学院校内课题 (编号: KY2-0000-20-01)。

作者简介: 李宝昌 (1970—), 男, 河北大名, 硕士, 副教授、高级工程师, 主要从事植物栽培、生理与育种研究, E-mail: 13321960916@qq.com; 共同第一作者: 陈岳 (1991—), 男, 山西大同, 博士, 主要从事植物栽培与育种研究, E-mail: yuechen321@aliyun.com。

通信作者: 张涵, 硕士, 讲师、工程师, 主要从事植物栽培、生理与育种研究, E-mail: 249848244@qq.com; 张微微, 博士, 教授, 主要从事植物栽培与育种研究, E-mail: zhangww@shafc.edu.cn。

9930 V2 版基因组 (http://cucurbitgenomics.org/ftp/genome/cucumber/Chinese_long/v2/), 获得 NAC032 在黄瓜中的同源基因 *Csa2M338830*, 将其命名为 *CsNAC032*。在 *CsNAC032* 编码区设计特异引物 *CsNAC032_F* (5' - ATGACCTTAGCTGGGCTCGTG - 3') 和 *CsNAC032_R* (5' - TTAAATCTGCCTCTGTAGATAAGAAAAC - 3')。以黄瓜叶片的 cDNA 为模板, *CsNAC032_F* 和 *CsNAC032_R* 为引物, 选用 TaKaRa 公司的 PrimeSTAR Max Premix 进行 PCR 扩增, 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳。将目标片段连接至 pClone007 Blunt Vector 克隆载体, 热激法转化 DH5 α 感受态细胞, 用通用引物进行菌落 PCR 筛选, 将阳

性克隆送往上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.2 *CsNAC032* 的生物信息学分析

利用 ExPasy 网站的“Compute pI/Mw tool”对 *CsNAC032* 的等电点与分子量进行预测。利用 ProtComp 9.0 网站对 *CsNAC032* 的亚细胞定位进行预测。利用 PlantCARE 网站的“Search for CARE”对 *CsNAC032* 的转录起始点上游 2 000 bp 的序列进行启动子元件预测。从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站中下载植物 NAC-like 序列 (表 1)。利用 DNAMAN 软件对 10 种植物的 *CsNAC032* 序列进行多序列比对, 并通过 MEGA X 软件构建 Neighbor Joining 系统进化树 (bootstrap 值为 1 000)。

表 1 不同植物的 NAC-like 蛋白信息

物种	简称	基因名/获取号
水稻 (<i>Oryza sativa</i>)	ONAC048	Os01t0884300 - 01
拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NAC032	AT1G77450
甜瓜 (<i>Cucumis melo</i>)	CmNAC-like	NP_001284423.1
冬瓜 (<i>Benincasa hispida</i>)	BhNAC-like	XP_038900561.1
印度南瓜 (<i>Cucurbita maxima</i>)	CmaNAC-like	XP_022970899.1
中国南瓜 (<i>Cucurbita moschata</i>)	CmoNAC-like	XP_022947787.1
西葫芦 (<i>Cucurbita pepo</i>)	CpNAC-like	XP_023533735.1
苦瓜 (<i>Momordica charantia</i>)	McNAC-like	XP_022157724.1
野生灰籽南瓜 (<i>Cucurbita argyrosperma</i>)	CaNAC-like	KAG7011087.1

1.3 黄瓜 *CsNAC032* 的表达分析

2021 年 9 月在上海农林职业技术学院五库实训基地种植黄瓜自交系 9930。当黄瓜幼苗生长到 5 张真叶时, 取根、茎、叶、子叶; 当黄瓜生长到 20 节位时, 取雄蕊, 雌蕊, 花瓣, 果刺, 果皮, 卷须。当黄瓜处于 5 张真叶时, 将 100 mmol/L 的 NaCl 添加到营养液中, 并在处理后的 1、3、6、12、24 h 分别取叶片, 每次取样 3 个重复。样本采取后立即置于液氮中, 放于 -80 °C 冰箱中备用。

通过全能型植物 RNA 提取试剂盒 (DNase I) 分别提取各个器官的总 RNA, 然后利用反转录试剂盒 HiFiScript cDNA Synthesis Kit 将 RNA 反转录成 cDNA。根据 *CsNAC032* 基因编码区序列, 设计特异性引物 RT - *CsNAC032F* (5' - TTCAGATTTACCCCTACTGATGAG - 3') 和 RT - *CsNAC032R* (5' - GAGATCAATCTCCTTGATGATGG - 3'), 用 HiFiScript cDNA Synthesis Kit 试剂进行 qRT - PCR 试验, 检测 *CsNAC032* 在黄瓜不同器官以及盐处理后的表达情况。黄瓜 *Actin* (*Csa6G484600*) 基因为对照。定量 PCR 相关试剂均购买于江苏康为世纪生物科技股

份有限公司。使用 CFX96 Touch™ Real - Time PCR System 进行反应, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法进行基因的相对表达量分析^[14]。

2 结果与分析

2.1 RNA 提取与基因克隆

通过 Blast 比对, 获得拟南芥 *NAC032* 基因在黄瓜中的同源基因 *Csa2G338830*, 将其命名为 *CsNAC032*。利用黄瓜叶片 cDNA 对 *CsNAC032* 进行扩增, 电泳检测后发现在 1 000 bp 位置有单一条带 (图 1)。将该片段回收后连接克隆载体进行转化, 测序结果显示 *CsNAC032* 基因 CDS 长 900 bp, 编码 299 个氨基酸, 其相对分子质量是 34 271.63, 等电点是 5.67。亚细胞定位预测 *CsNAC032* 定位于细胞核, 符合其转录因子的特性。

2.2 *CsNAC032* 的进化分析

利用 DNAMAN 软件对黄瓜的 *CsNAC032* 和其他植物的 9 条 NAC-like 蛋白序列进行相似性比对 (图 2)。结果表明, 黄瓜 *CsNAC032* 与甜瓜的 CmNAC-like 和冬瓜的 BhNAC-like 同源性最高,

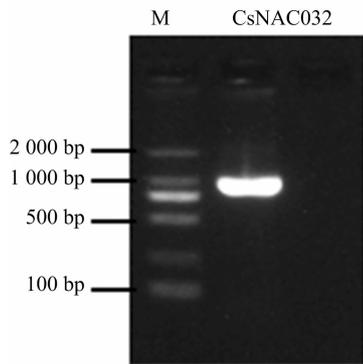


图1 CsNAC032 基因 cDNA 的 PCR 扩增

分别是 97.00% 和 95.00%，与印度南瓜、中国南瓜、西葫芦、苦瓜、野生灰籽南瓜、拟南芥、水稻的 NAC-like 蛋白同源性依次降低，分别为 86.09%、85.76%、85.43%、82.24%、73.79%、56.92%、52.44%。此外，这些序列均拥有 NAC 家族蛋白典型的保守结构域，在 N 端约 150 个氨基酸中共包含 A、B、C、D、E 等 5 个保守的亚结构域。

为了分析黄瓜的 CsNAC032 在进化中的位置，利用多序列比对的 10 条蛋白序列构建了系统进化树，结果(图 3)显示，10 条蛋白序列分为 2 组，水稻

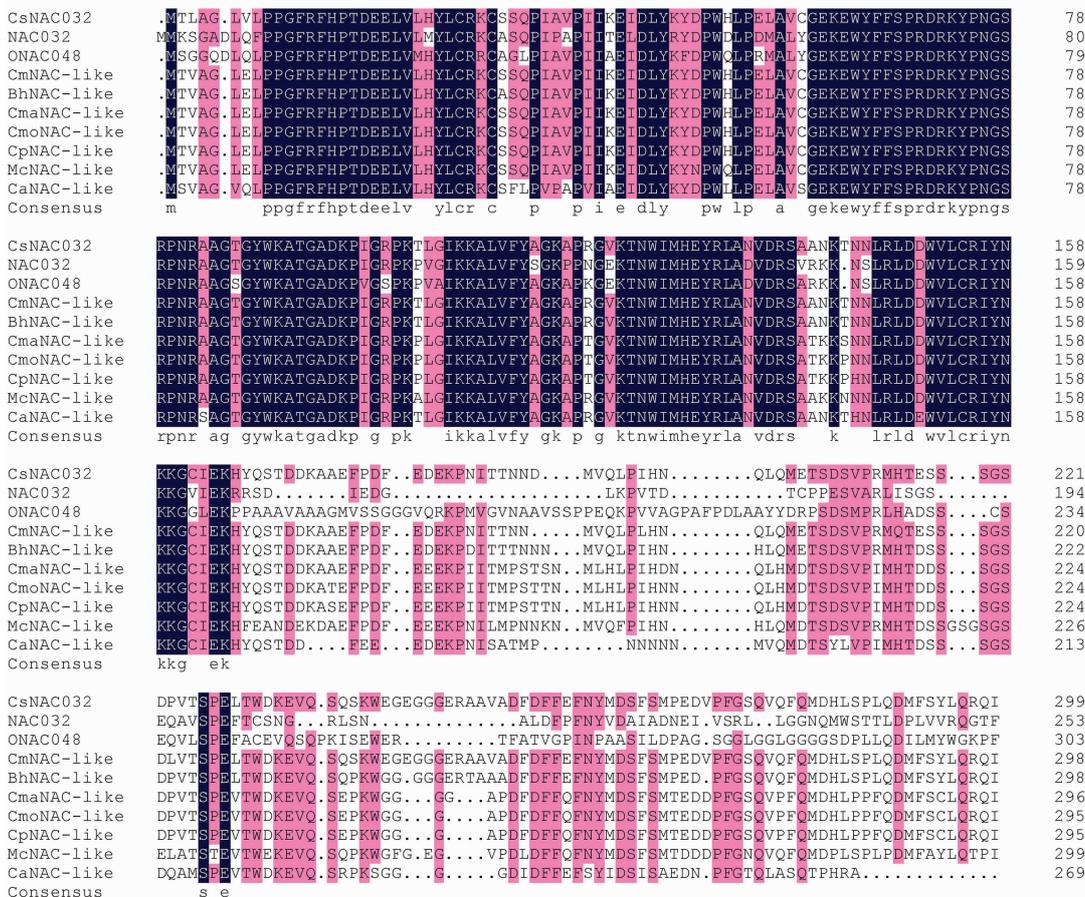


图2 CsNAC032 蛋白与其他植物的 NAC-like 蛋白序列的多序列比对

的 ONAC048 和拟南芥的 NAC032 聚为一组，葫芦科植物的 NAC-like 蛋白序列聚为另一组。其中，黄瓜 CsNAC032 与甜瓜的 CmNAC-like 和冬瓜的 BhNAC-like 蛋白又聚为同一亚组，说明它们的亲缘关系较近，与多序列比对的结果一致。

2.3 启动子元件分析

利用 Plantcare 对 CsNAC032 起始密码子上游 2 000 bp 的启动子区域进行分析(表 2)，结果表明，在 CsNAC032 转录起始点上游除了含有真核生物启动

子固有的 TATA 区和 CAAT 区外，启动子区域还包含 1 个防御胁迫响应元件(defense and stress responsive)、1 个赤霉素响应元件(gibberellin responsive)、2 个水杨酸响应元件(salicylic acid responsive)、4 个茉莉酸甲酯响应元件(meja responsive)、7 个脱落酸响应元件(abscisic acid responsive)和 10 个光周期响应元件(light responsive)。

2.4 CsNAC032 基因在不同器官中的表达模式

利用 qRT-PCR 检测 CsNAC032 基因在黄瓜不

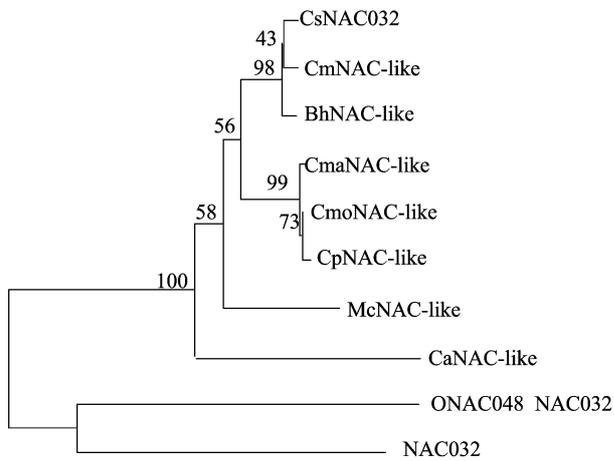


图3 *CsNAC032* 蛋白与其他植物的 NAC-like 蛋白的系统进化分析

同器官中的表达情况,结果(图4)显示,*CsNAC032*在黄瓜子叶中相对表达水平最高,其次是根、果刺、茎、果皮、卷须中,在叶片、雄蕊、花瓣和雄蕊中表达水平较低。

2.5 *CsNAC032* 基因在盐胁迫处理下的表达模式

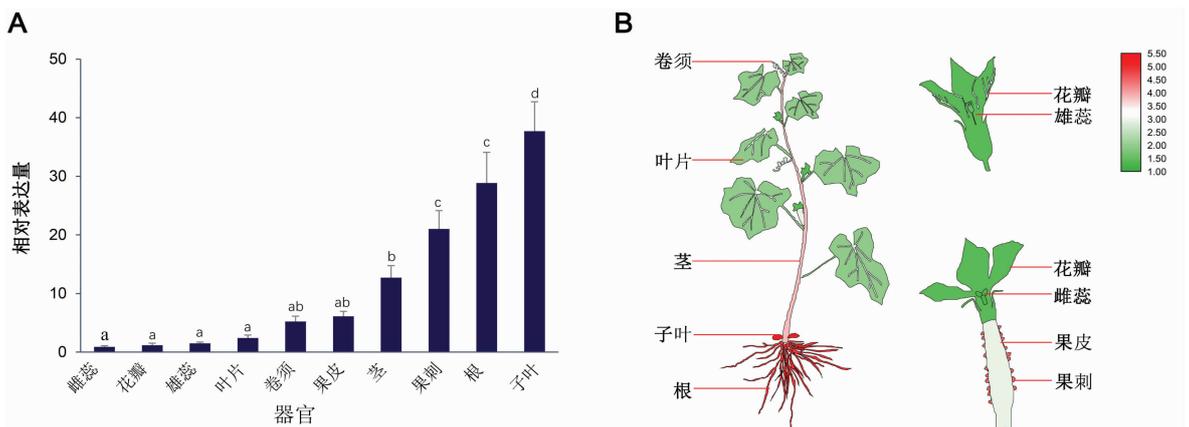
用 100 mmol/L 的 NaCl 处理黄瓜幼苗,分别于处理后 1、3、6、12、24 h 通过 qRT-PCR 检测 *CsNAC032* 基因的表达水平,结果(图5)显示:*CsNAC032* 在盐胁迫的 3 h 后,表达水平升高,并于处理后 12 h 表达水平达到最高,达到初始水平的 10 倍左右,说明 *CsNAC032* 可以响应盐胁迫的诱导。

3 讨论

本研究利用拟南芥的 *NAC032* 基因,通过同源

表2 *CsNAC032* 启动子区的顺式作用元件分布及功能

功能	元件名称	序列	位置 (bp)
防御胁迫响应元件	TC - rich repeats	ATTCTCTAAC	94
赤霉素响应元件	P - box	CCTTTTG	295
水杨酸响应元件	TCA - element	CCATCTTTTT	180,238
茉莉酸甲酯响应元件	CGTCA - motif	CGTCA	775,889,1585,1662
脱落酸响应元件	ABRE	ACGTG	873,1223,1428,1430,1431,1812,1813
光周期响应元件	Box 4	ATTAAT	862,1737
	G - Box	CACGTG	872,1223,1430,1812
	GATA - motif	GATAGGA	1540
	MRE	AACCTAA	114
	TCT - motif	TCTTAC	1405
	GT1 - motif	GGTTAA	1001



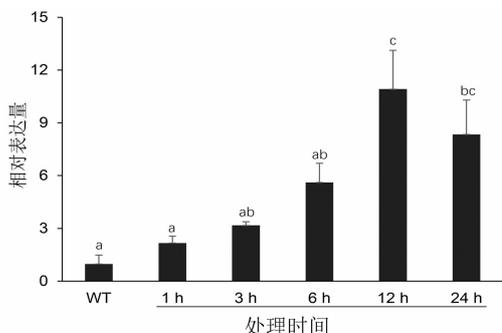
A—*CsNAC032* 的表达情况,图柱上不同小写字母表示相对表达量在不同器官间达到显著水平($P<0.05$);

B—*CsNAC032* 基因表达情况的热图,绿色表示相对表达量低,红色表示相对表达量高

图4 黄瓜 *CsNAC032* 在不同器官中的表达模式分析

克隆获得了其在黄瓜中的同源基因 *CsNAC032*。*CsNAC032* 编码区为 900 bp,编码 299 个氨基酸,N 端含有 NAC 家族蛋白典型的结构域,包含 A、B、C、D、E 5 个亚结构域。亚细胞定位预测 *CsNAC032* 主

要在细胞核中发挥功能,进化树分析表明该蛋白与甜瓜的 CmNAC-like (NP_001284423.1) 亲缘关系最近。qRT-PCR 检测 *CsNAC032* 基因在黄瓜不同器官中的表达情况,发现其在主要在根、茎、子叶、



图柱上不同小写字母表示不同处理时间之间的相对表达水平差异显著($P < 0.05$)

图5 黄瓜 *CsNAC032* 在盐胁迫下的表达模式分析

果刺等营养器官中表达,在雄蕊、雌蕊等生殖器官中相对表达水平较低,说明 *CsNAC032* 可能还参与了黄瓜营养器官的发育。

NAC 是植物中广泛存在的一类转录因子,大量的 NAC 转录因子受生物和非生物胁迫诱导表达。在 *CsNAC032* 启动子上发现了多个响应激素信号通路和逆境胁迫的元件,如防御胁迫响应元件、赤霉素响应元件、水杨酸响应元件、茉莉酸甲酯响应元件、脱落酸响应元件和光周期响应元件,这些元件在黄瓜 NAC 家族基因启动子中相对保守,这与辣椒和玉米 NAC 基因的启动子元件分析结果类似^[14-16]。NAC 基因可能通过这些元件受相应的信号诱导表达。

番茄的 NAC 转录因子 *SIJUB1* 受到 H_2O_2 、NaCl、聚乙二醇(PEG)的诱导表达,*SIJUB1* 基因 TRV 干扰掉后,番茄的抗干旱能力显著下降^[17]。水稻的 NAC 家族膜结合转录因子 *OsNTL3* 在 NaCl 和 42 °C 的高温处理后,表达量上调。利用 CRISPR - Cas9 技术编辑 *OsNTL3* 后,突变体对高温胁迫敏感,耐热能力减弱^[18]。在小麦中敲除 *TaNAC071 - A* 会减弱植株的耐旱性,而该基因过表达后可以提高水分利用效率和增加胁迫响应基因的表达来显著增强小麦耐旱性^[19]。水稻的 *ONAC066*、番茄的 *StNAC053*、葡萄的 *VvNAC17* 均受到 NaCl、ABA、干旱以及高温的诱导,进而调控下游基因以增强植物的抗逆能力^[20-22]。黄瓜 *CsNAC032* 受盐胁迫后,在叶片的表达水平显著上调,说明 *CsNAC032* 可能在黄瓜抵御盐胁迫中发挥着一定功能。

本研究利用拟南芥的 *NAC032* 基因,通过同源克隆获得了其在黄瓜中的同源基因 *CsNAC032*。通过生物信息学方法对其序列以及表达进行了分析,推测 *CsNAC032* 可能响应盐胁迫。本研究为进一步

研究其功能奠定了初步基础,但其胁迫响应机理有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Gollack D, Lüking I, Yang O. Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network [J]. *Plant Cell Reports*, 2011, 30(8): 1383 - 1391.
- [2] Souer E, van Houwelingen A V, Kloos D, et al. The 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.
- [3] Ooka H, Satoh K, Doi K, et al. Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana* [J]. *DNA Research*, 2003, 10(6): 239 - 247.
- [4] Olsen A N, Ernst H A, Leggio L L, et al. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse [J]. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(2): 79 - 87.
- [5] Shao H B, Wang H Y, Tang X L. NAC transcription factors in plant multiple abiotic stress responses: progress and prospects [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 902.
- [6] Mahmood K, El - Kereamy A, Kim S H, et al. ANAC032 positively regulates age - dependent and stress - induced senescence in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2016, 57(10): 2029 - 2046.
- [7] Mahmood K, Xu Z H, El - Kereamy A, et al. The *Arabidopsis* transcription factor *ANAC032* represses anthocyanin biosynthesis in response to high sucrose and oxidative and abiotic stresses [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1548.
- [8] Jensen M K, Skriver K. NAC transcription factor gene regulatory and protein - protein interaction networks in plant stress responses and senescence [J]. *IUBMB Life*, 2014, 66(3): 156 - 166.
- [9] 赖伟, 何鹏, 徐明远, 等. 黄瓜耐盐性与耐盐相关基因的研究进展 [J]. *中国蔬菜*, 2020(6): 16 - 22.
- [10] 刘东让, 董邵云, 苗晗, 等. 黄瓜耐盐胁迫遗传育种研究进展 [J]. *中国蔬菜*, 2021(7): 14 - 23.
- [11] 曹齐卫, 杜连达, 杨宗辉, 等. 黄瓜耐盐种质资源的筛选与评价 [J]. *核农学报*, 2022, 36(5): 865 - 875.
- [12] Zhu H Y, He M W, Jahan M S, et al. CsCDPK6, a CsSAMS1 - interacting protein, affects polyamine/ethylene biosynthesis in cucumber and enhances salt tolerance by overexpression in tobacco [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(20): 11133.
- [13] Liu X W, Wang T, Bartholomew E, et al. Comprehensive analysis of NAC transcription factors and their expression during fruit spine development in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. *Horticulture Research*, 2018, 5: 31.
- [14] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real - time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402 - 408.

胡庆峰,杜灿灿,曾生元,等. 1种水稻叶片后期功能型因子的初步定位[J]. 江苏农业科学,2022,50(18):65-68.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.18.010

1种水稻叶片后期功能型因子的初步定位

胡庆峰,杜灿灿,曾生元,李 闯,景德道,林添资,钱华飞,余 波,周义文,孙立婷,杨 军,龚红兵
(江苏丘陵地区镇江农业科学研究所,江苏句容 212400)

摘要:通过以遗传背景相近的2个籼型恢复系 C090-1、C090-2 为中间材料构建1个遗传 F₂ 群体,并以其为制种父本进行组配,从经典遗传学角度和分子生物学角度对1个水稻叶片后期功能型因子进行初步定位,对其效应进行分析。结果表明,叶片后期功能因子位于1号染色体上,且与水稻落粒性基因 *qSH1* 紧密连锁,具有延缓水稻叶片衰老的效应;叶片 SPAD 值测定结果表明,不同环境下后期功能型水稻(C090-1) SPAD 值都大于非后期功能型水稻(C090-2),且随着生育进程其 SPAD 值降低幅度小于非后期功能型;组配结果显示,以 C090-1 为父本制种的杂交稻具有更高的产量。

关键词:水稻;后期功能型;落粒性;SPAD 值

中图分类号: 511.2⁺10.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2022)18-0065-04

叶片作为叶的主要组成部片,是植物生长发育过程中最重要的光合产物合成器官。水稻稻穗中 60%~70% 碳源由功能叶光合作用合成转运而来,叶片光合功能期的长短会显著影响水稻最终的产量与品质。研究表明,叶片早衰 1 d,水稻光合功能期缩减 1 d,其产量会降低 1%,同时会造成用于籽粒灌浆的营养物质减少,形成青粒、瘪粒,甚至可能

引起籽粒发育障碍,从而导致水稻品质变劣^[1-3]。早期以水稻高产作为主要目标而选育大面积推广种植的杂交水稻普遍存在穗大粒多的特点,叶片生育后期的功能性已成为水稻产量和品质提高的重要因素^[4-5]。

水稻落粒性是指水稻谷粒成熟后自然从枝梗上掉落的性状,目前,已报道被克隆的水稻落粒性基因有 *qSH1* (QTL for seed-shattering 1)、*Sh4* (shattering-4)、*SHAT1* (shattering APETALA2 transcription factor 1) 等。*qSH1* 是第 1 个被克隆的水稻落粒性基因,位于第 1 号染色体^[6]。*qSH1* 的表达在开放阅读框 12 kb 处 5'端调控区的 1 个 SNP 变异(G/T)阻碍了 ABI3 (abscisic acid insensitive3) 型

收稿日期:2022-03-27

基金项目:江苏省重点研发项目(编号:BE2021360)。

作者简介:胡庆峰(1991—),男,江苏南京人,硕士,研究实习员,从事水稻新品种选育研究。E-mail:446899328@qq.com。

通信作者:龚红兵,硕士,研究员,从事水稻新品种选育及推广应用研究。E-mail:hongbingong973@sina.com。

[15] Wang G R, Yuan Z, Zhang P Y, et al. Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in maize under drought stress and rewatering[J]. *Physiol Mol Biol Plants*, 2020, 26(4): 705-717.

[16] Diao W P, Snyder J C, Wang S B, et al. Genome-wide analyses of the NAC transcription factor gene family in pepper (*Capsicum annuum* L.): chromosome location, phylogeny, structure, expression patterns, cis-elements in the promoter, and interaction network[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(4): 1028.

[17] Thirumalaikumar V P, Devkar V, Mehterov N, et al. NAC transcription factor JUNGBRUNNEN1 enhances drought tolerance in tomato[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(2): 354-366.

[18] Liu X H, Lyu Y S, Yang W P, et al. A membrane-associated NAC transcription factor OsNTL3 is involved in thermotolerance in rice[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(5): 1317-1329.

[19] Mao H D, Li S M, Chen B, et al. Variation in cis-regulation of a NAC transcription factor contributes to drought tolerance in wheat[J]. *Molecular Plant*, 2022, 15(2): 276-292.

[20] Wang Q, Guo C, Li Z Y, et al. Potato NAC transcription factor StNAC053 enhances salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(5): 2568.

[21] Ju Y L, Yue X F, Min Z, et al. *VvNAC17*, a novel stress-responsive grapevine (*Vitis vinifera* L.) NAC transcription factor, increases sensitivity to abscisic acid and enhances salinity, freezing, and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 146: 98-111.

[22] Yuan X, Wang H, Cai J T, et al. Rice NAC transcription factor ONAC066 functions as a positive regulator of drought and oxidative stress response[J]. *BMC Plant Biol*, 2019, 19(1): 278.