DOI: 10. 11686/cyxb2025436
http://cyxb. magtech. com. cn
王艺华, 任慈, 张盼玉, 等. 柱花草*SgNAC1*基因的耐盐功能研究. 草业学报, 2026, 35(10): 144－155.
WANG Yi-hua, REN Ci, ZHANG Pan-yu, *et al*. A functional study of the role of *SgNAC1* in salt tolerance in *Stylosanthes*. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(10): 144－155.

柱花草*SgNAC1*基因的耐盐功能研究

王艺华[1], 任慈[1], 张盼玉[1], 刘翠玲[1], 何亮亮[1], 李洁仪[1], 刘超[1], 陈曙[1,2,3*]
(1. 华南农业大学林学与风景园林学院, 广东 广州 510642; 2. 广东省草业工程技术研究中心, 广东 广州 510642; 3. 华南农业大学中山创新中心, 广东 中山 528478)

摘要: 在热带和亚热带地区, 柱花草属是极具经济价值的豆科牧草, 被誉为“热带苜蓿”, 在饲草生产、水土保持、果园覆盖等领域发挥重要作用。随着全球盐碱地面积逐年扩大, 盐胁迫导致柱花草生长受阻、产量下降, 已成为限制其栽植推广的关键障碍, 亟需挖掘耐盐关键基因并解析其功能。NAC 转录因子是植物耐盐调控的核心家族, 而柱花草*SgNAC1*的耐盐特性尚未明确。本研究通过实时荧光定量 PCR 分析*SgNAC1*基因在细茎柱花草株系‘YN02’叶片及茎中的表达模式。结果表明, 盐胁迫(150 mmol·L^{-1} NaCl)处理后, 叶片中*SgNAC1*基因表达量在 2 h 时降至最低, 茎中表达量在 6 h 达到峰值; 脱落酸(ABA)处理后, 叶片和茎中*SgNAC1*基因表达量均在处理 1 h 达到最高, 在 ABA＋NaCl 复合处理后, 叶片中*SgNAC1*基因表达量在处理 0. 5 h 后达到峰值, 茎中表达量在 1 h 出现第一个峰值, 12 h 出现第二个峰值。上述结果表明, 茎中*SgNAC1*基因在 12 h 左右响应盐胁迫, 在 1 h 左右响应 ABA 和 ABA＋NaCl 胁迫; 盐胁迫下叶片中*SgNAC1*基因表达量在 2 h 显著下降, 推测可能受其他因素调控; ABA＋NaCl 复合处理下茎中*SgNAC1*基因的双表达峰, 可能是 NaCl 与 ABA 协同作用的结果。通过根癌农杆菌介导的叶盘法转化野生型烟草, 成功获得*SgNAC1*过表达的转基因烟草株系(*SgNAC1*-OE)。对野生型和*SgNAC1*-OE 烟草同时进行盐胁迫(300 mmol·L^{-1} NaCl)处理, 测定处理前后叶片的各项生理指标发现, *SgNAC1*过表达显著提升了脯氨酸水平, 增强了烟草耐盐能力。本研究明确了*SgNAC1*基因在柱花草不同组织中的表达特征, 并通过转基因烟草验证了其耐盐功能, 为柱花草耐盐机制解析及耐盐育种提供理论依据和基因资源。

关键词: 柱花草; *SgNAC1*基因; 转基因烟草; 基因表达; 耐盐性

A functional study of the role of *SgNAC1* in salt tolerance in *Stylosanthes*

WANG Yi-hua[1], REN Ci[1], ZHANG Pan-yu[1], LIU Cui-ling[1], HE Liang-liang[1], LI Jie-yi[1], LIU Chao[1], CHEN Shu[1,2,3*]
1. *College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou* 510642, *China*; 2. *Guangdong Engineering Research Center for Grassland Science, Guangzhou* 510642, *China*; 3. *South China Agricultural University, Zhongshan Innovation Center, Zhongshan* 528478, *China*

Abstract: *Stylosanthes* (stylo) is an economically important leguminous forage crop in tropical and subtropical regions. It plays critical roles in forage production, soil and water conservation, and orchard ground cover. Because its role is similar to that of alfalfa (*Medicago sativa*), stylo is often referred to as ‘tropical alfalfa’. With the continuing global expansion of saline-alkali land areas, salt stress reduces the growth and yield of stylo, and has

收稿日期: 2025-10-21; 改回日期: 2025-12-05
基金项目: 国家自然科学基金(31601990), 广东省基础与应用基础研究基金自然科学基金(2025A1515010836, 2023A1515140005)和广州市科技计划项目(2024E04J1233)资助。
作者简介: 王艺华(2001－), 女, 河南新乡人, 在读硕士。E-mail: wang_yihua2026@163. com
*通信作者 Corresponding author. E-mail: shuchen@scau. edu. cn

become a key constraint on its cultivation and promotion. Therefore, it is urgent to identify key genes related to salt tolerance and clarify their functions. The NAC family of transcription factors is known to regulate salt tolerance, but the specific role of *SgNAC1* in the salt tolerance of stylo remains unclear. In this study, we analyzed the transcript profiles of *SgNAC1* in leaves and stems of the *Stylosanthes guianensis* line 'YN02' using quantitative real-time PCR. The results show that under salt stress (150 mmol·L^{-1}NaCl), the transcript abundance of *SgNAC1* in leaves decreased to the lowest level at 2 hours after treatment (HAT), but peaked in stems at 6 HAT. After treatment with abscisic acid (ABA), the transcript abundance of *SgNAC1* in both leaves and stems peaked at 1 HAT. In the combined ABA+NaCl treatment, the transcript abundance of *SgNAC1* in leaves peaked at 0.5 HAT, whereas in stems, it exhibited two peaks at 1 HAT and 12 HAT. Thus, *SgNAC1* in stems responded to salt stress at approximately 12 HAT, and to both ABA and ABA+NaCl at approximately 1 HAT. Under salt stress, the transcript abundance of *SgNAC1* in leaves decreased significantly at 2 HAT, implying that it may be regulated by other factors. The dual expression peaks of *SgNAC1* in stems after treatment with ABA+NaCl may indicate a synergistic effect of NaCl and ABA. Transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) lines overexpressing *SgNAC1* (*SgNAC1*-OE) were obtained by transforming wild-type tobacco *via* the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated leaf disc method. When both wild-type and *SgNAC1*-OE tobacco plants were subjected to salt stress (300 mmol·L^{-1}NaCl), the *SgNAC1*-OE tobacco plants showed significantly increased proline levels and salt tolerance, compared with the wild-type plants. The results of this study reveal the transcript profiles of *SgNAC1* in different tissues of stylo, and the experiments with transgenic tobacco lines overexpressing *SgNAC1* confirm its ability to increase salt tolerance. Together, our results provide a theoretical basis for further research on salt tolerance mechanisms, and identify a genetic resource for breeding salt-tolerant stylo.

Key words: *Stylosanthes*; *SgNAC1* gene; transgenic tobacco; gene expression; salt tolerance

植物生长过程中常遭受干旱、低温、高温及高盐等非生物胁迫[1]。这些胁迫会破坏植物正常的代谢过程,具体表现为细胞萎缩、细胞膜损伤、相关酶功能受损、脂质和蛋白质变性及光合作用抑制等[2-3],阻碍植物的正常生长发育[4],从而导致全球范围内的生产损失。据统计,全球大约有7%的土地出现盐渍化[5],提高植物抗盐能力迫在眉睫。在长期进化中,植物已形成完整的盐胁迫调控网络,包括植物激素途径、脂质体信号途径、蔗糖非发酵-1-相关蛋白激酶2(sucrose non-fermenting-1-related protein kinase 2,SnRK2)、丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)、活性氧(reactive oxygen species,ROS)及气孔信号途径等[6]。转录因子通过与靶基因启动子顺式元件结合调控基因表达,是植物应对非生物胁迫的核心调控因子。NAC转录因子是植物特有的转录因子家族,在植物生长发育及非生物胁迫响应中发挥关键作用[7],包括种子萌发[8]、胚胎发育、顶端分生组织的形成[9]、纤维发育、叶片衰老[10]、细胞分裂、增强植物抗病性等,它们参与各种生理、生化过程和应激反应[11-15]。通过全基因组及转录组分析发现,NAC转录因子可通过调控下游基因表达增强植物抵抗非生物胁迫的能力[16-19]。通过在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)及其他植物中构建过表达转基因株系,证明*NAC*基因的过表达植株可以增强对一种甚至多种非生物胁迫的耐受性,包括干旱、高盐和低温[20-23],明确了*NAC*在非生物胁迫中的调节功能。因此,NAC类转录因子在植物非生物胁迫耐受机制中起重要作用,是植物抗性育种中具有重要价值的候选基因[24-27]。

目前提升植物耐盐性的手段主要包括耐盐品种筛选和转基因技术[28]。转基因技术中,抗逆相关基因可分为转录因子类和功能基因类。转录因子通过结合顺式作用元件,发挥转录调控作用,参与盐胁迫信号通路。研究发现,DREB、bZIP、MYB、NAC等转录因子与植物耐盐性密切相关[29]。例如,盐胁迫可诱导胡萝卜(*Daucus carota*)*DcDREB*基因的高表达[30];过表达构树(*Broussonetia papyrifera*)*BpDREB2*基因的拟南芥相对于野生型其抗盐能力更强[31];过表达玉米(*Zea mays*)*ZmbZIP33*[32]、大豆(*Glycine max*)*GsbZIP33*[33]、苋菜(*Amaranthus tricolor*)*AmMYB1*以及毛竹(*Phyllostachys edulis*)*PeMYB2*基因均可显著提升拟南芥耐盐能力[34];不同*NAC*家族成员在

盐胁迫抗性调控中发挥不同的作用，*SNAC1*过表达水稻基因显著提高了植物的耐盐能力[35]，而*SINAC4*过表达番茄(*Lycopersicon esculentum*)对盐的敏感性却显著升高了。研究发现，NAC转录因子可以帮助植物抵抗干旱、盐、寒冷等非生物胁迫[36]。在拟南芥和水稻中，ANAC096可以与脱落酸响应元件(abscisic acid response element，ABRE)结合，并且在干旱胁迫下提高植物的存活率[37]，AtNAC019、AtNAC055和AtNAC072可以与*ERD1*基因启动子区域的*NACRS*特异性结合以增强干旱耐受性[38-39]；干旱、高盐及脱落酸(abscisic acid，ABA)可以诱导水稻*OsNAC5*基因的表达，并且过表达*OsNAC5*基因的水稻与对照组相比有更高的抗性；AtNAC016通过转录调控ABA依赖信号途径中关键基因*AREB1*，从而提高植物的抗旱性[40]；在ABA信号途径中*ONAC022*基因起着非常重要的作用，过表达*ONAC022*基因的水稻对高盐和干旱的耐受能力更强[25]。除此之外，NAC转录因子还可以通过清除植物活性氧来提高植物的抗逆能力。转基因*SNAC3*的水稻通过调节植物体内活性氧水平来提高对高温及干旱的抗性[41]。油菜(*Brassica rapa*)*NAC56*和*NAC55*可以诱导清除ROS相关基因的表达，减少ROS积累，提高非生物胁迫的耐受性[42-43]。在大豆中，*GmNAC20*和*GmNAC11*参与各种非生物胁迫，转基因*GmNAC20*和*GmNAC11*相对于野生型更加抗冻和耐盐[44]。在花生(*Arachis hypogaea*)植株中过表达硬皮豆(*Macrotyloma uniflorum*)*MuNAC4*基因，发现在盐胁迫下，过表达植株相对于野生型细胞膜结构更加完整，抗氧化酶活性更高[45]。在非生物胁迫下，小麦(*Triticum aestivum*)的*TaNAC29*和*TaNAC67*基因表达上调，并且转基因拟南芥有更强的抗旱耐盐能力[46]。此外，来自鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)的NAC转录因子CarNAC4诱导参与胁迫耐盐相关基因的表达，包括*COR15A*、*DREB2A*、*RD29A*和*KIN1*，最终增强植物的抗旱耐盐能力[24]。*SNAC1*作为NAC的家族成员，其对干旱、盐、低温胁迫和ABA均有响应，常通过不同的途径作为调节因子介导对非生物胁迫的耐受性。*SNAC1*通过调节含有NAC识别序列(NAC recognition sequence，NACRS)的基因在其启动子区域内的表达中发挥作用。*SNAC1*在非生物胁迫期间分子和生理响应中的作用已被提出，关于*SNAC1*调控网络的研究也已取得显著进展，但仍存在若干未明通路，因此研究其功能具有重要的生物学意义[47]。

尽管已有多种植物的NAC转录因子功能被解析，*SNAC1*调控网络的研究也有所进展，但柱花草(*Stylosanthes guianensis*) NAC家族成员*SgNAC1*的耐盐功能尚未明确。前期本实验室对盐胁迫下的细茎柱花草株系'YN02'进行转录组测序，发现*SgNAC1*基因在盐胁迫处理后表达量显著上调，推测*SgNAC1*可能是柱花草耐盐调控的关键候选基因。因此，本研究以*SgNAC1*基因为对象，分析其盐胁迫下的表达模式，并通过转基因烟草(*Nicotiana tabacum*)验证其耐盐功能，为柱花草耐盐分子育种提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本试验于2017年9月至2019年6月在华南农业大学草类植物生物技术实验室完成。本研究采用细茎柱花草(*S. guianensis* var. *intermedia*)耐寒株系'粤农2号'('YN02')以及烟草品种'Wisconsin38'(W38)作为供试材料。生长基质使用泥炭土(捷菲产品国际集团，荷兰)和园艺蛭石(6～8 mm)，按2∶1比例混匀，在光周期为16 h光照/8 h黑暗，光照强度为100 μmol·m^{-2}·s^{-1}，相对湿度75%，平均温度为(25±2) ℃的培养条件下栽培生长。

1.2 核酸提取和反转录

采用三羟甲基氨基甲烷－盐酸盐－乙二胺四乙酸－氯化钾(Tris－HCl－EDTA－KCl，TPS)法提取柱花草以及转基因烟草的DNA；采用天根生化试剂(北京)有限公司的RNA prep Pure多糖多酚植物总RNA提取试剂盒，提取柱花草叶片和茎以及转基因烟草叶片的总RNA；使用全式金生物技术(北京)有限公司的反转录试剂盒合成cDNA第一链，操作均严格按照试剂盒说明书进行。

1.3 *SgNAC1*基因克隆及生物信息学分析

通过PCR从'YN02'叶片cDNA中克隆*SgNAC1*基因全长，采用表1中的*SgNAC1*引物对。从本实验室的结缕草(*Zoysia japonica*)基因组序列文件中提取*SgNAC1*基因序列及其上游2.0 kb区域序列，采用TBtools分析其基因结构，采用Plant CARE(http://bioinformatics. psb. ugent. be/webtools/plantcare/html/)对启动子中的顺式作用元件进行预测。

表 1　本研究所用引物

Table 1　Primers used in this study

引物名称 Name of the primer	正向引物序列 Forward primer sequence (5′→3′)	反向引物序列 Reverse primer sequence (5′→3′)
SgNAC1	TCTAGAATGGCAGCTGAACTTCAATTGC	GGATCCTCAGAACGGTTTCTGCAGGTTC
SgNAC1-qPCR	TTCCGATCATAGCCGAAATC	TGCCTTCCAGTACCCAGTTC
SgActin-qPCR	TCGATTGGATCTTGCAGGGC	TGGACAACGGAATCTCTCAGC

1.4　盐胁迫及 ABA 处理

选取 12 盆生长状况良好的‘YN02’，置于人工培养箱（光周期 16 h 光照/8 h 黑暗，光照强度 100 μmol·m^{-2}·s^{-1}，相对湿度 75%，温度 28 ℃）中培养 1 周后，将植物材料按 3 盆一组分为 4 组。其中，对照组每盆浇 100 mL 水并叶面喷施蒸馏水，NaCl 组每盆浇灌 100 mL 150 mmol·L^{-1} NaCl 并叶面喷施蒸馏水，ABA 组每盆浇 100 mL 水并叶面喷施 100 μmol·L^{-1} ABA，NaCl＋ABA 组每盆浇 150 mmol·L^{-1} NaCl 并叶面喷施 100 μmol·L^{-1} ABA。在处理 0、0.5、1.0、2.0、6.0、12.0 和 24.0 h 后，分别采集柱花草茎和叶片，将每个时间的每组样品等量混合之后，于－80 ℃冰箱保存备用。

1.5　实时定量 qPCR

从 NCBI 数据库获取 *SgNAC1* 基因及柱花草内参基因 *Actin* 的序列，使用 Primer 3 软件设计特异性引物（表 1），通过 NCBI Blast 工具验证引物特异性。qPCR 反应体系（20 μL）：SYBR Premix Ex Taq Ⅱ 10 μL，正反向引物（10 μmol·L^{-1}）各 0.8 μL，cDNA 模板 2 μL，ddH_2O 6.4 μL。反应程序：95 ℃预变性 30 s；95 ℃变性 5 s，58 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，40 个循环；熔解曲线分析（60～95 ℃）。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量[48]，每个样品设 3 次技术重复。

1.6　烟草遗传转化

1.6.1　菌液制备　配制含 50 mg·L^{-1} 大观霉素（spectinomycin，Spe）的 yeast extract beef（YEB）培养基（5 g·L^{-1} 牛肉浸膏、1 g·L^{-1} 酵母提取物、5 g·L^{-1} 蛋白胨、5 g·L^{-1} 蔗糖、0.4 g·L^{-1} $MgSO_4·7H_2O$），将携带 *SgNAC1* 过表达载体的农杆菌划线接种，28 ℃倒置培养 48 h；挑取单菌落接种至 5～6 mL 含 50 mg·L^{-1} Spe 的 YEB 液体培养基，28 ℃、200 r·min^{-1} 振荡培养 12 h；按 1∶50 体积比转接至 100 mL YEB 液体培养基（含 50 mg·L^{-1} Spe），同条件培养至 OD_{600} 为 0.4～0.8；5000 r·min^{-1} 离心 10 min 收集菌液，用含 100 mg·L^{-1} 乙酰丁香酮（acetosyringone，AS）的 Murashige&Skoog（MS）盐溶液重悬至 OD_{600} 为 0.4～0.8，备用。

1.6.2　外植体处理与转化　选取 4～5 周龄的野生型烟草叶片，剪去叶缘和主脉，切成 1 cm×1 cm 的叶盘（约 18 片·皿$^{-1}$）；将叶盘上表面朝下置于 MS1 固体培养基：MS＋2.0 mg·L^{-1} 6-苄氨基嘌呤（6-benzylaminopurine，6-BA）＋0.1 mg·L^{-1} 萘乙酸（1-naphthaleneacetic acid，NAA），25 ℃暗培养 2～3 d（至外植体膨大 2～3 倍）；将膨大的叶盘浸泡于上述农杆菌菌液中 15 min（每 5 min 振荡 1 次），用无菌滤纸吸干多余菌液；将叶盘上表面朝下置于铺有无菌滤纸的 MS1 培养基，28 ℃暗培养 3 d；用含 500 mg·L^{-1} 头孢霉素（cefotaxime sodium，cef）的去离子水冲洗叶盘 10 min，再用清水冲洗 4～5 次，吸干水分后转移至 MS3 选择培养基（MS＋2.0 mg·L^{-1} 6-BA＋0.1 mg·L^{-1} NAA＋5 mg·L^{-1} 草铵膦＋500 mg·L^{-1} cef），25 ℃、16 h 光照/8 h 黑暗培养 14 d；待叶盘边缘长出 1 cm 以上的抗性芽时，将芽切下转移至 MS 生根培养基（MS＋0.1 mg·L^{-1} NAA＋5 mg·L^{-1} 草铵膦），生根后移栽至泥炭土∶蛭石＝2∶1 的基质中，培养 15 d 后用于后续鉴定。

1.7　转基因烟草鉴定

1.7.1　草铵膦抗性鉴定　移栽 15 d 后，在转基因和野生型烟草叶片上标记相同大小的区域，涂抹 0.2% 重量/体积（weight/volume，W/V）草铵膦溶液，2 周后观察叶片表型：抗性叶片无明显变化，敏感叶片枯萎发黄。

1.7.2　PCR 分子鉴定　提取抗性烟草叶片总 RNA，反转录为 cDNA，以 cDNA 为模板，用 *SgNAC1*-qPCR 引物对（表 1）进行 PCR 扩增，以携带 *SgNAC1* 载体的农杆菌菌液为阳性对照，野生型烟草 cDNA 和 ddH_2O 为阴性对

照。PCR反应体系(25 μL):2×Taq Master Mix 12.5 μL,正反向引物(10 μmol·L^{-1})各1 μL,模板2 μL,ddH_2O 8.5 μL。反应程序:94 ℃预变性5 min;94 ℃变性30 s,58 ℃退火30 s,72 ℃延伸1 min,35个循环;72 ℃终延伸10 min。扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7.3 qRT-PCR分析 选取过表达株系*SgNAC1*-OE5和*SgNAC1*-OE8进行qRT-PCR分析,以cDNA为模板,利用特异性引物*SgNAC1*-qPCR(表1)进行实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测。

1.8 转基因烟草表型与盐胁迫响应分析

1.8.1 表型测定 为明确*SgNAC1*基因过表达对烟草形态特征的影响,选取生长状态一致的*SgNAC1*-过表达(over-expression,OE)与野生型(wild type,WT)植株,在相同培养条件下(光周期16 h光照/8 h黑暗,光照强度100 μmol·m^{-1}·s^{-1},温度28 ℃,相对湿度75%)进行表型观测,观测指标包括叶片形态(长宽比)和花色,每个指标设4次生物学重复,从植株顶部向下数第1至3片完全展开叶;用直尺分别测量叶片最大长度(叶尖至叶基的直线距离)和最大宽度(叶片最宽处的直线距离),计算长宽比(叶片长度/叶片宽度);花色观测于盛花期进行,拍照记录花瓣颜色差异。

1.8.2 盐胁迫表型与生理指标测定 选取3盆生长一致的*SgNAC1*-OE和WT烟草,每天每盆浇100 mL 300 mmol·L^{-1}NaCl溶液,连续处理6 d,分别在0、3、6 d观察并记录植株表型;在处理前和处理6 d后采集叶片,测定脯氨酸含量(磺基水杨酸法)[49]和丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量(硫代巴比妥酸法)[50]。

1.9 数据处理

运用Excel 2016进行数据统计,使用SPSS 26.0进行单因素方差分析(ANOVA),使用最小显著差数法(least significant difference,LSD)分析显著性差异。

2 结果与分析

2.1 *SgNAC1*启动子顺式作用元件及基因结构分析

利用PlantCARE及TBtools对*SgNAC1*进行启动子区域顺式作用元件预测及基因结构分析。结果表明,*SgNAC1*基因由3个外显子组成,其中1号外显子包含了5个保守的NAC亚结构域A、B、C、D和E;*SgNAC1*启动子区域含有大量的胁迫及ABA响应类的顺式作用元件,其中包括3个STRE、4个ARE、1个DRE core、4个ERE、9个ABRE(图1)。*SgNAC1*基因序列已上传至NCBI Genbank数据库,登录号为KY440433[51]。

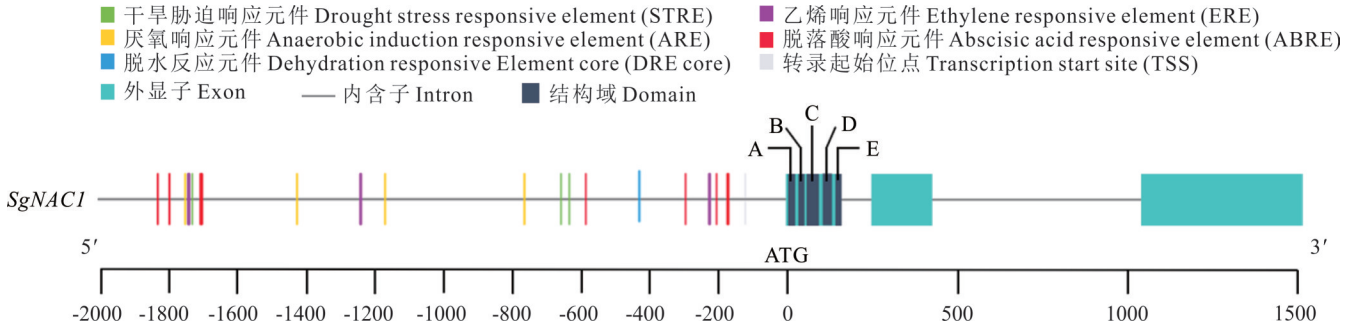


图1 *SgNAC1*基因启动子顺式作用元件及其基因结构分析

Fig. 1 Analysis of cis-acting elements in the promoter of *SgNAC1* gene and its gene structure

A~E分别代表5个保守亚结构域。A-E represent the 5 conserved subdomains.

2.2 不同胁迫处理下柱花草*SgNAC1*基因的表达模式

为了测定柱花草*SgNAC1*基因对盐胁迫和ABA的响应模式,对柱花草分别进行了NaCl、ABA以及NaCl和ABA的复合处理,采用qRT-PCR技术分析*SgNAC1*在柱花草叶片与茎中的表达动态。结果表明,NaCl胁迫处理下,*SgNAC1*表达量在叶片中处理0.5和1.0 h无显著变化($P>0.05$),1 h后呈先降后升的趋势(图2A),2 h时降至最低值(相对表达量为初始时的0.4倍,$P<0.01$);而其表达量在茎中先呈缓慢上升的趋势(图2D),在0.5~

2.0 h无显著差异($P>0.05$),6 h达到峰值(为0 h的3.35倍,$P<0.01$),后又缓慢回落。ABA处理下,叶片与茎中*SgNAC1*表达量均呈“快速升降”动态变化(图2B和2E),均在1 h达到峰值,但叶和茎对ABA的响应程度存在差异,叶片中*SgNAC1*表达量变化更加剧烈(1 h表达量为初始的3.95倍而茎为1.48倍)。在NaCl+ABA复合处理下,*SgNAC1*表达量在叶中呈现“急速上升,缓慢回落”的模式(图2C),0.5 h时就达到峰值(为0 h的5.45倍,$P<0.01$),1 h后逐渐回落;而其表达量在茎中呈“双峰”模式(图2F),首先在1 h达到第一峰值(为0 h的8.34倍,$P<0.01$),2 h回落至2.46倍($P>0.05$),6 h后又逐步回升,12 h达到第二峰值(为0 h的11.27倍,$P<0.01$),24 h又迅速下降,该“双峰”特征未在单一胁迫处理中出现,推测为NaCl与ABA协同调控的结果。

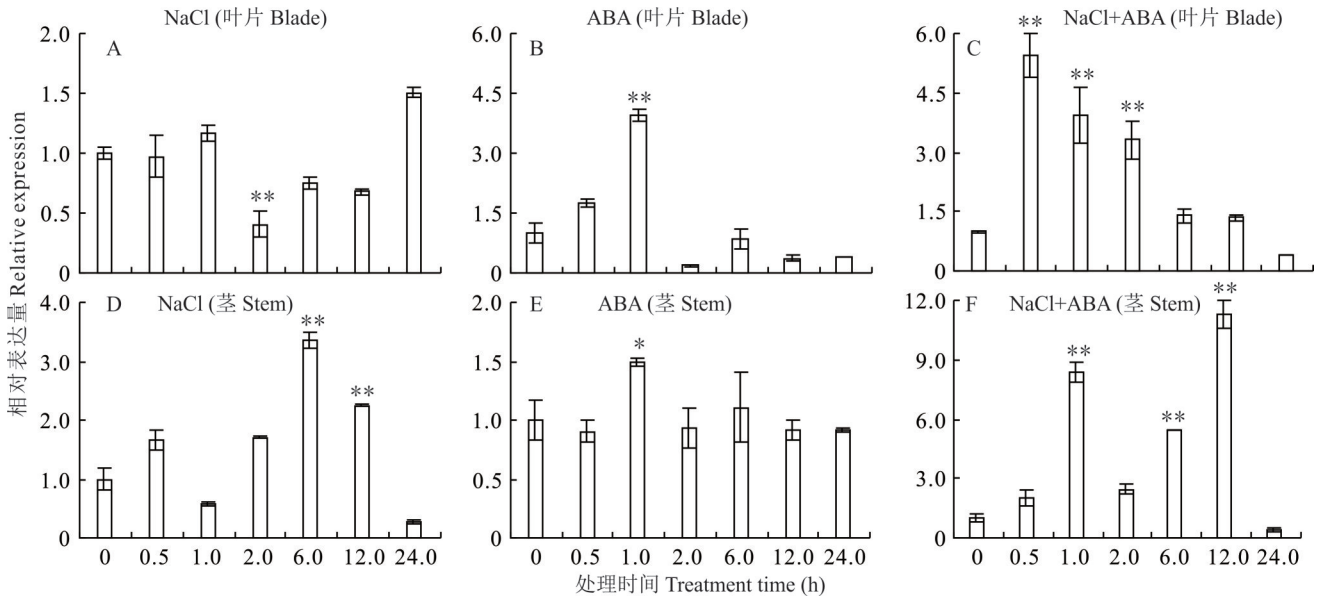


图2　不同处理下柱花草‘YN02’叶片及茎中*SgNAC1*基因的相对表达量变化

Fig. 2　Changes in the relative expression levels of the *SgNAC1* gene in leaves and stems of *Stylosanthes* ‘YN02’ under different treatments

NaCl:盐胁迫 Salt stress;ABA:脱落酸 Abscisic acid. A:盐胁迫下叶片中*SgNAC1*表达量的变化;B:ABA处理下叶片中*SgNAC1*表达量的变化;C:ABA和NaCl处理下叶片中*SgNAC1*表达量的变化;D:盐胁迫下茎中*SgNAC1*表达量的变化;E:ABA处理下茎中*SgNAC1*表达量的变化;F:ABA和NaCl处理下茎中*SgNAC1*表达量的变化;* 和 **分别表示在$P<0.05$和$P<0.01$水平存在显著差异。A: Changes in *SgNAC1* expression levels in leaves under salt stress; B: Changes in *SgNAC1* expression levels in leaves treated with ABA; C: Changes in *SgNAC1* expression levels in leaves treated with NaCl and ABA; D: Changes in *SgNAC1* expression levels in stems under salt stress; E: Changes in *SgNAC1* expression levels in stems treated with ABA; F: Changes in *SgNAC1* expression levels in stems treated with NaCl and ABA. * and ** indicate significant differences at $P<0.05$ and $P<0.01$ levels, respectively.

2.3　*SgNAC1*过表达转基因烟草的鉴定

首先,对移栽15 d的转基因烟草(*SgNAC1*-OE)及野生型(WT,W38株系)进行0.2%(W/V)草铵膦抗性筛选。结果显示(图3A):WT烟草涂抹区域在处理7 d后出现枯萎发黄,14 d后坏死面积在90%以上;而*SgNAC1*-OE株系(1~18号单株)中除17号株系外,涂抹区域均无明显萎蔫,叶片保持翠绿,初步表明目的基因已整合至烟草基因组并实现除草剂抗性基因*Bar*的功能表达。

为了进一步验证*SgNAC1*基因是否在转基因株系中表达,提取烟草叶片总RNA,反转录为cDNA后,以*SgNAC1*特异性引物进行PCR鉴定。结果显示(图3B):除12和17号株系外,其他转基因株系均扩增出162 bp的特异性条带(与预期产物长度一致),而WT烟草及空白对照(ddH_2O)无扩增条带,证实*SgNAC1*基因已整合至烟草基因组并成功表达。选取过表达株系*SgNAC1*-OE5和*SgNAC1*-OE8进行qRT-PCR分析,结果表明这两个株系中*SgNAC1*基因的表达量显著高于野生型($P<0.001$),证明*SgNAC1*基因在这两个株系中过表达(图3C),因此被选取用于后续试验。

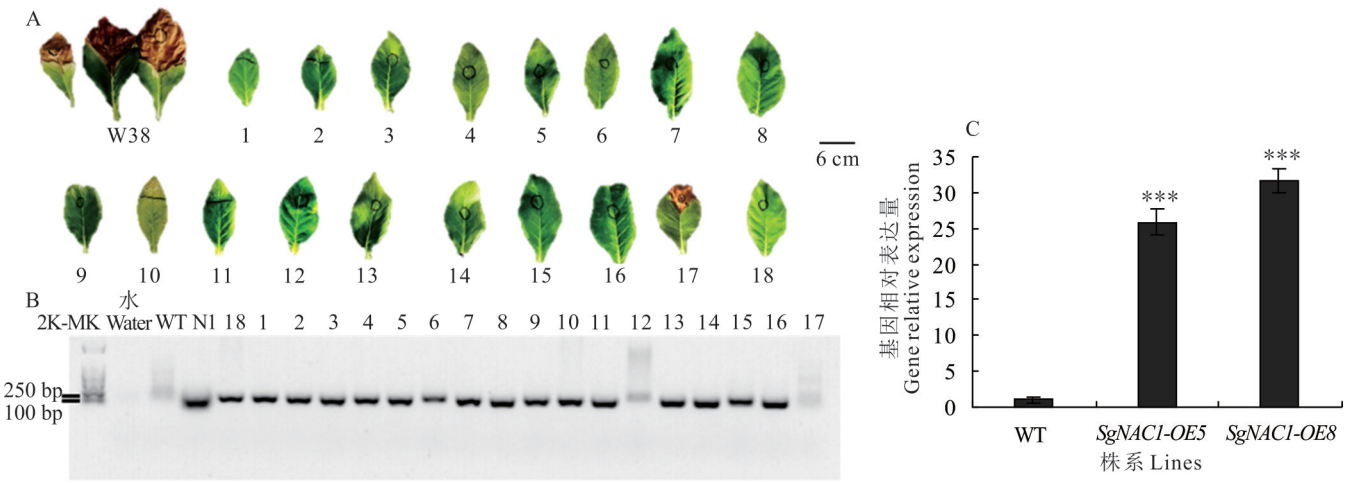


图3 *SgNAC1*-OE转基因烟草的Basta抗性鉴定及*SgNAC1*基因的PCR鉴定和qRT-PCR分析

Fig. 3 Identification of Basta resistance in *SgNAC1*-OE transgenic tobacco, PCR identification and qRT-PCR analysis of the *SgNAC1* gene

A:转基因植株的草铵膦抗性鉴定,W38为野生型烟草株系。1～18均为转基因*SgNAC1*-OE同一株系的不同单株,黑色标记为草铵膦涂抹处;B:野生型及转基因烟草中*SgNAC1*基因的PCR鉴定。C:野生型及转基因烟草中*SgNAC1*基因的qRT-PCR分析。2K-MK为DNA marker DL 2000,N1为农杆菌菌液阳性对照,WT为野生型烟草W38,1～18均为转基因株系;***表示在$P<0.001$水平存在显著差异。A: Basta resistance identification of transgenic plants, with W38 as the wild type *N. tabacum*. 1－18 are different individual plants from the same transgenic *SgNAC1*-OE strain, with black marks indicating Basta application sites; B: PCR identification of the *SgNAC1* gene in wild-type and transgenic tobacco. C: qRT-PCR analysis of the *SgNAC1* gene in wild-type and transgenic tobaccos. 2K-MK is the DNA marker DL 2000, N1 is the *Agrobacterium* culture positive control, WT is the wild type *N. tabacum* W38, and 1－18 are transgenic lines. *** indicates significant differences at the $P<0.001$ levels.

2.4 转基因烟草的表型差异

选取生长一致的*SgNAC1*-OE与WT烟草,在统一培养条件下测定表型指标。结果表明,*SgNAC1*-OE各叶位长宽比均显著高于WT($P<0.05$),第1、2、3片叶的长宽比较WT分别增加了26.2%、23.4%、26.8%(图4),即*SgNAC1*过表达导致烟草叶片变得更加狭长;此外,本研究还发现,*SgNAC1*-OE盛花期花瓣颜色较WT明显变浅(图4)。

2.5 盐处理后烟草的表型变化

挑选生长状态一致的株系*SgNAC1*-OE5和*SgNAC1*-OE8与WT烟草进行NaCl胁迫处理,观测并比较不同时间点的生长状态。结果表明,在处理前(0 day after treatment,0 DAT)三者生长状态一致,无明显差异;处理3 d

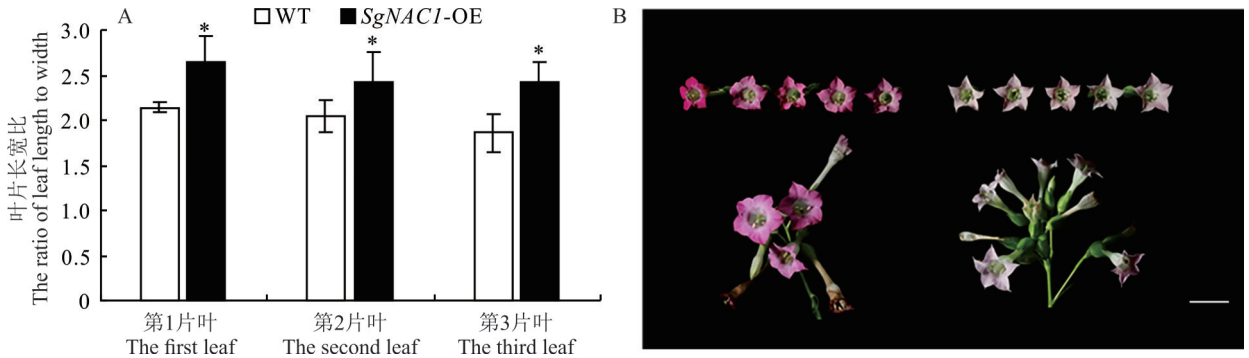


图4 转基因与野生型烟草叶片长宽比与花色差异

Fig. 4 Differences in the length-to-width ratio and flower color between genetically modified and wild *N. tabacum* leaves

*表示与WT相比有显著差异($P<0.05$),*SgNAC1*-OE为转基因烟草,WT为野生型烟草W38。下同。标尺=10 cm。* indicates a significant difference compared to WT ($P<0.05$). *SgNAC1*-OE refers to transgenic *N. tabacum*, and WT refers to wild-type tobacco W38. The same below. Bar=10 cm.

后(3 DAT),WT与*SgNAC1*-OE5下部老叶均出现轻微萎蔫,*SgNAC1*-OE8无明显变化,三者叶尖卷曲程度无明显差异;处理6 d后(6 DAT),WT烟草萎蔫程度明显加重,除顶部3片新生叶外,下部老叶均严重萎蔫,而*SgNAC1*-OE5烟草仅下部2~3片老叶出现轻微萎蔫,其余叶片保持正常生长状态,*SgNAC1*-OE8下部叶片颜色变浅,轻微萎蔫,可以看出*SgNAC1*-OE5和*SgNAC1*-OE8盐胁迫伤害症状都明显低于WT(图5),表明*SgNAC1*过表达可以提高烟草的耐盐性。



图5　盐胁迫下烟草的表型变化

Fig. 5　Phenotypic changes in tobacco under salt stress

2.6　盐处理后烟草的生理指标变化

NaCl溶液处理6 d后测定野生型和转基因烟草的脯氨酸和丙二醛含量。结果表明,处理前,野生型与转基因株系间无显著性对比;处理后,野生型株系脯氨酸含量仅提高了0.66倍,而过表达株系*SgNAC1*-OE5和*SgNAC1*-OE8则分别提高了5.5和6.2倍,达到极显著水平(图6A);野生型株系的丙二醛含量提高了0.41倍,与处理前相比具有显著差异,而过表达株系的丙二醛含量在处理前后不存在显著差异(图6B),可见过表达株系相对WT来说具有更强的耐盐性。

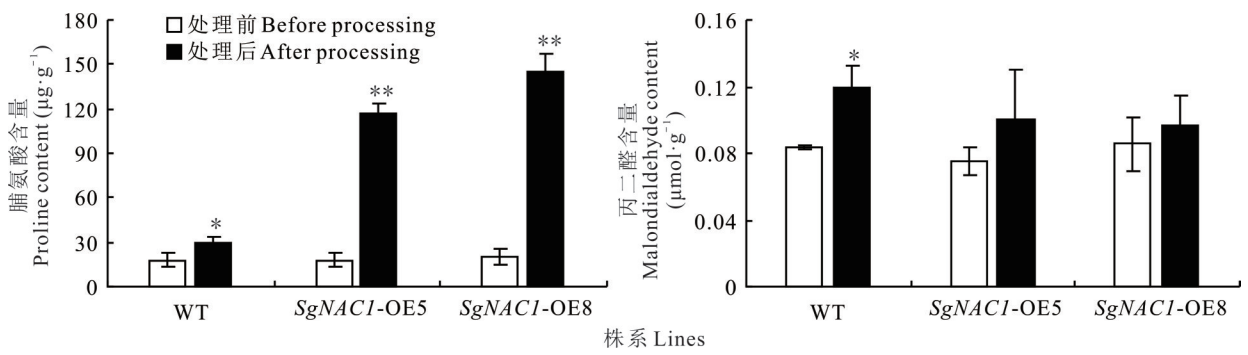


图6　盐胁迫下野生型与过表达*SgNAC1*烟草生理指标变化

Fig. 6　Changes in physiological indicators of wild-type and S*gNAC1*-overexpressing tobacco under salt stress

*表示与处理前相比有显著差异($P<0.05$),**表示与处理前相比有极显著差异($P<0.01$)。* indicates a significant difference compared to before processing ($P<0.05$). ** indicates an extremely significant difference compared to before treatment ($P<0.01$).

3 讨论

盐胁迫是限制全球农牧业生产力的主要非生物胁迫之一,对柱花草这类重要热带豆科牧草的引种和推广构成了严重威胁。NAC转录因子家族作为植物特有的调控因子,在逆境胁迫应答中扮演着核心角色,但其在柱花草属植物中的功能仍有待阐明。本研究首次对柱花草*SgNAC1*基因的表达模式及其在盐胁迫下的生物学功能进行了系统研究,为揭示热带牧草的耐盐分子机制提供了新的视角和证据。

本研究发现,*SgNAC1*基因在柱花草的茎和叶中对盐胁迫和ABA表现出明显的组织特异性响应模式。在盐胁迫下,叶片中的*SgNAC1*表达量在2 h内迅速下调,随后逐渐回升。这种"先抑制后恢复"的模式可能是一种快速应激反应,即植物在遭受胁迫初期暂时抑制部分基因的表达以重新分配能量,应对突发的渗透胁迫和离子毒害,随后再激活适应性调控网络。与叶片不同,茎中的*SgNAC1*表达量则持续上升,并在6 h达到峰值,这表明*SgNAC1*在茎中可能主要参与更为持久的胁迫适应过程,例如调节长距离信号转导或离子运输与平衡。ABA是植物响应非生物胁迫的关键信号分子,众多研究表明NAC转录因子参与了ABA介导的信号通路。本研究中,外源ABA能够快速诱导茎和叶中*SgNAC1*的表达,表明*SgNAC1*的表达调控可能依赖于ABA信号通路。尤为值得关注的是,在NaCl与ABA复合处理下,茎中的*SgNAC1*表达呈现出独特的"双峰"模式,分别在1和12 h出现表达高峰。这一现象在单一处理中并未出现,有力地证明了盐胁迫与ABA信号通路之间存在复杂的互作关系,而*SgNAC1*可能是这两条通路的一个重要交汇点。本研究推测,第一个表达峰(1 h)可能是对ABA信号的快速响应,而第二个表达峰(12 h)则可能是盐胁迫引发的内源ABA积累与其他信号分子协同调控的结果,这种精细的调控模式有助于植物在不同胁迫阶段启动差异化的防御和适应机制。

为验证*SgNAC1*的生物学功能,本研究通过农杆菌介导法获得了异源过表达*SgNAC1*的转基因烟草。在300 mmol·L^{-1} NaCl胁迫处理下,与野生型相比,过表达*SgNAC1*的烟草表现出更强的耐盐性,其萎蔫程度明显减轻。生理指标的测定进一步证实了这一点,*SgNAC1*-OE植株在盐胁迫后积累了更高水平的脯氨酸,其增量约为野生型的5倍。脯氨酸作为一种重要的渗透调节物质,其大量积累有助于维持细胞渗透势、保护生物大分子结构和清除活性氧。上述结果共同证明,*SgNAC1*基因作为一个正向调控因子,通过增强植物的渗透调节能力和维持细胞膜的稳定性,从而提高植物的耐盐能力。这与在水稻、大豆、鹰嘴豆等多种作物中发现的NAC转录因子的抗逆功能相一致[52−53]。

此外,本研究还观察到*SgNAC1*的过表达导致转基因烟草出现了叶片长宽比增大和花色变浅的表型变化。这表明*SgNAC1*除了在胁迫响应中发挥作用外,可能还参与调控植物的生长发育与次生代谢过程,具有潜在的基因多效性。已有研究表明部分NAC转录因子参与调控植物表型,例如过表达大豆*GmNAC085*会导致拟南芥花序变短,莲座叶变小[53−54]。花色的改变则通常与花青素的生物合成途径有关,研究表明拟南芥*ANAC032*可阻碍植物体内花青素的合成,最终使得转基因植物花色变浅[55]。*SgNAC1*对烟草叶型和花色的影响机制有待进一步的深入研究。

综上所述,本研究不仅阐明了*SgNAC1*在盐胁迫和ABA响应中的表达规律,还通过转基因功能验证了其在提高植物耐盐性中的重要作用。然而,本研究在异源系统(烟草)中进行功能验证,其在柱花草中的具体调控网络仍需进一步解析。未来的研究可集中于利用基因编辑或同源转化技术,深入探究*SgNAC1*在柱花草中的功能,并通过酵母单杂交、ChIP-seq等技术筛选其上下游互作因子与靶基因,从而更全面地揭示*SgNAC1*介导的耐盐分子网络,为柱花草乃至其他豆科牧草的耐盐分子育种提供更坚实的理论基础。

4 结论

本研究成功克隆并鉴定了柱花草*SgNAC1*基因,并证实其在植物盐胁迫应答中发挥关键的正向调控功能。研究表明:

1)*SgNAC1*基因的表达受NaCl和ABA的显著诱导,并在柱花草的茎和叶中表现出组织差异性表达模式。特别是在NaCl与ABA复合胁迫下,该基因在茎中呈现独特的"双峰"表达特征,揭示其可能为盐胁迫与ABA信

号转导网络中的一个关键整合节点。

2)在烟草中异源过表达*SgNAC1*基因,可通过提高脯氨酸含量,显著增强转基因植株的耐盐能力。本研究结果首次解析了*SgNAC1*基因在柱花草耐盐性中的作用,不仅为深入理解豆科牧草的耐盐分子机制提供了新的见解,更明确了*SgNAC1*可作为一个重要的候选基因,为未来柱花草的耐盐遗传改良和分子育种提供了宝贵的基因资源与理论依据。

参考文献 References:

[1] Wang W D. Transcriptome analysis of *Camellia sinensis* under heat and drought stress and functional characterization of *Histone H1* gene. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016.
王伟东. 高温和干旱胁迫下茶树转录组分析及*Histone H1*基因的功能鉴定. 南京: 南京农业大学, 2016.

[2] Tak H, Negi S, Ganapathi T R. Banana NAC transcription factor *MusaNAC042* is positively associated with drought and salinity tolerance. Protoplasma, 2016, 254(2): 803-816.

[3] Thirumalaikumar V P, Devkar V, Mehterov N, *et al*. NAC transcription factor JUNGBRUNNEN1 enhances drought tolerance in tomato. Plant Biotechnology Journal, 2017, 16(2): 354-366.

[4] Boyer J S. Plant productivity and environment. Science, 1982, 218(4571): 443-448.

[5] Zhang X K, Lu G Y, Long W H, *et al*. Recent progress in drought and salt tolerance studies in *Brassica* crops. Breeding Science, 2014, 64(1): 60-73.

[6] Li T, Sun J K, Liu J T. Role of different transcription factor families in the regulatory networks of drought and salinity tolerance in plants. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2015, 27(2): 217-227.
李田, 孙景宽, 刘京涛. 植物转录因子家族在耐盐抗旱调控网络中的作用. 生命科学, 2015, 27(2): 217-227.

[7] Yao W J. Functinal analysis of poplar transcription factor *ERF76* gene on salt-stress tolerance. Harbin: Northeast Forestry University, 2016.
姚文静. 杨树转录因子*ERF76*基因耐盐功能研究. 哈尔滨: 东北林业大学, 2016.

[8] Ooka H, Satoh K, Doi K, *et al*. Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. DNA Research, 2003, 10(6): 239-247.

[9] Kim S G, Kim S Y, Park C M. A membrane-associated NAC transcription factor regulates salt-responsive flowering via *FLOWERING LOCUS T* in *Arabidopsis*. Planta, 2007, 226(3): 647-654.

[10] Jae-Heung K, Seung Hwan Y, Park A H, *et al*. ANAC012, a member of the plant-specific NAC transcription factor family, negatively regulates xylary fiber development in *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal for Cell & Molecular Biology, 2010, 50(6): 1035-1048.

[11] Christianson J A, Dennis E S, Llewellyn D J, *et al*. ATAF NAC transcription factors: regulators of plant stress signaling. Plant Signaling & Behavior, 2010, 5(4): 428-432.

[12] Zhong R, Lee C, Ye Z H. Global analysis of direct targets of secondary wall NAC master switches in *Arabidopsis*. Molecular Plant, 2010, 3(6): 1087-1103.

[13] Trine K, Jensen M K, Christiansen M W, *et al*. Senescence-associated barley NAC (NAM, ATAF1,2, CUC) transcription factor interacts with radical-induced cell death 1 through a disordered regulatory domain. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(41): 35418-35429.

[14] So-Dam Y, Pil Joon S, Hye-Kyung Y, *et al*. The *Arabidopsis* NAC transcription factor VNI2 integrates abscisic acid signals into leaf senescence via the *COR/RD* genes. Plant Signaling & Behavior, 2011, 23(6): 2155-2168.

[15] Nakashima K, Takasaki H, Mizoi J, *et al*. NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 2012, 1819(2): 97-103.

[16] Jiang Y, Deyholos M K. Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed *Arabidopsis* roots reveals novel classes of responsive genes. BMC Plant Biology, 2006, 6(1): 25.

[17] Fang Y J, You J, Xie K B, *et al*. Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice. Molecular Genetics & Genomics, 2008, 280(6): 547-563.

[18] Le D T, Nishiyama R, Watanabe Y, *et al*. Genome-wide survey and expression analysis of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress. DNA Research, 2011, 18(4): 263-276.

[19] Huang H, Wang Y, Wang S L, *et al*. Transcriptome-wide survey and expression analysis of stress-responsive *NAC* genes in

Chrysanthemum lavandulifolium. Plant Science, 2012, 193/194(3): 18－27.

[20] Nogueira F T S, Schlögl P S, Camargo S R, *et al*. SsNAC23, a member of the NAC domain protein family, is associated with cold, herbivory and water stress in sugarcane. Plant Science, 2005, 169(1): 93－106.

[21] Li X L, Yang X, Hu Y X, *et al*. A novel NAC transcription factor from *Suaeda liaotungensis* K. enhanced transgenic *Arabidopsis* drought, salt, and cold stress tolerance. Plant Cell Reports, 2014, 33(5): 767－778.

[22] Shan W, Kuang J F, Lu W J, *et al*. Banana fruit NAC transcription factor MaNAC1 is a direct target of *MaICE1* and involved in cold stress through interacting with MaCBF1. Plant Cell & Environment, 2014, 37(9): 2116－2127.

[23] Shao H B, Wang H Y, Tang X L. NAC transcription factors in plant multiple abiotic stress responses: progress and prospects. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 902.

[24] Yu X W, Liu Y M, Wang S, *et al*. CarNAC4, a NAC-type chickpea transcription factor conferring enhanced drought and salt stress tolerances in *Arabidopsis*. Plant Cell Reports, 2015, 35(3): 1－15.

[25] Hong Y B, Zhang H J, Huang L, *et al*. Overexpression of a stress-responsive NAC transcription factor gene *ONAC022* improves drought and salt tolerance in rice. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 4.

[26] Peng H, Yu X W, Cheng H Y, *et al*. Erratum to: cloning and characterization of a novel NAC family gene *CarNAC1* from chickpea (*Cicer arietinum*.). Molecular Biotechnology, 2016, 58(3): 220－221.

[27] Qu Y T, Duan M, Zhang Z Q, *et al*. Overexpression of the *Medicago falcata* NAC transcription factor MfNAC3 enhances cold tolerance in *Medicago truncatula*. Environmental & Experimental Botany, 2016, 129(9): 67－76.

[28] Tang X B, Zhao H W, Lin Z P. Progress of genetic engineering of drought stress in plants. Journal of Capital Normal University (Natural Sciences Edition), 2002(3): 47－51.
唐先兵, 赵恢武, 林忠平. 植物耐旱基因工程研究进展. 首都师范大学学报(自然科学版), 2002(3): 47－51.

[29] Riechmann J L, Ratcliffe O J. A genomic perspective on plant transcription factors. Current Opinion in Plant Biology, 2000, 3(5): 423－434.

[30] Que F, Huang Y, Wang F, *et al*. Cloning and expression analysis of a transcription factor gene *DcDofD1* related to abiotic stress reaction in carrot. Journal of Plant Genetic Resources, 2015, 16(5): 1073－1079.
却枫, 黄莹, 王枫, 等. 胡萝卜中*DcDofD1*转录因子的克隆及其对非生物逆境胁迫的响应分析. 植物遗传资源学报, 2015, 16(5): 1073－1079.

[31] Sun J W, Peng X J, Fan W H, *et al*. Functional analysis of *BpDREB2* gene involved in salt and drought response from a woody plant *Broussonetia papyrifera*. Gene, 2014, 535(2): 140－149.

[32] Wang C, Yang Y G, Lv W T, *et al*. Cloning, expression, and functional analysis of an A subfamily bZIP transcription factor gene *ZmbZIP81* in maize. Acta Agronomica Sinica, 2014, 40(9): 1549－1556.
王策, 杨艳歌, 吕维涛, 等. 玉米A亚族bZIP转录因子基因*ZmbZIP81*的克隆、表达与功能分析. 作物学报, 2014, 40(9): 1549－1556.

[33] Cai H, Zhu Y M, Bai X, *et al*. Isolation and tolerance analysis of *GsbZIP33* gene linked to response on stress in *Glycine soja*. Molecular Plant Breeding, 2011, 9(4): 397－401.
才华, 朱延明, 柏锡, 等. 野生大豆*GsbZIP33*基因的分离及胁迫耐性分析. 分子植物育种, 2011, 9(4): 397－401.

[34] Xiao D C, Zhang Z J, Xu Y W, *et al*. Cloning and functional analysis of *Phyllostachys edulis* MYB transcription factor *PeMYB2*. Hereditas, 2013, 35(10): 1217－1225.
肖冬长, 张智俊, 徐英武, 等. 毛竹MYB转录因子*PeMYB2*的克隆与功能分析. 遗传, 2013, 35(10): 1217－1225.

[35] Hu H H, Dai M Q, Yao J L, *et al*. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103(35): 12987－12992.

[36] Xie L N, Chen M, Min D H, *et al*. The NAC-like transcription factor Si NAC110 in foxtail millet (*Setaria italica*) confers tolerance to drought and high salt stress through an ABA independent signaling pathway. Journal of Integrative Agriculture, 2017, 16(3): 559－571.

[37] Xu Z Y, Kim S Y, Hyeon D Y, *et al*. The *Arabidopsis* NAC transcription factor ANAC096 cooperates with bZIP-type transcription factors in dehydration and osmotic stress responses. Plant Cell, 2013, 25(11): 4708－4724.

[38] Lam-Son Phan T, Kazuo N, Yoh S, *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. Plant Cell, 2004, 16(9): 2481－2498.

[39] Richard H, Claire H, Penfold C A, *et al*. A local regulatory network around three NAC transcription factors in stress responses

and senescence in *Arabidopsis* leaves. Plant Journal for Cell & Molecular Biology, 2013, 75(1): 26－39.

[40] Sakuraba Y, Kim Y S, Han S H, *et al*. The *Arabidopsis* transcription factor NAC016 promotes drought stress responses by repressing AREB1 transcription through a trifurcate feed-forward regulatory loop involving NAP. Plant Cell, 2015, 27(6): 1771－1787.

[41] Fang Y J, Liao K F, Du H, *et al*. A stress-responsive NAC transcription factor SNAC3 confers heat and drought tolerance through modulation of reactive oxygen species in rice. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(21): 6803－6817.

[42] Niu F F, Wang C, Yan J L, *et al*. Functional characterization of NAC55 transcription factor from oilseed rape (*Brassica napus*) as a novel transcriptional activator modulating reactive oxygen species accumulation and cell death. Plant Molecular Biology, 2016, 92(1/2): 89－104.

[43] Chen Q Q, Niu F F, Yan J L, *et al*. Oilseed rape NAC56 transcription factor modulates reactive oxygen species accumulation and hypersensitive response-like cell death. Physiologia Plantarum, 2017, 160(2): 209－221.

[44] Hao Y J, Wei W, Song Q X, *et al*. Soybean NAC transcription factors promote abiotic stress tolerance and lateral root formation in transgenic plants. The Plant Journal, 2011, 68(2): 302－313.

[45] Merum P, Rao G L, Sudhakarbabu O, *et al*. Overexpression of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* Lam. Verdc.) NAC transcriptional factor (MuNAC4) in groundnut confers enhanced drought tolerance. Molecular Biotechnology, 2014, 56(8): 758－769.

[46] Mao X G, Chen S S, Li A, *et al*. Novel NAC transcription factor TaNAC67 confers enhanced multi-abiotic stress tolerances in *Arabidopsis*. PLoS One, 2014, 9(1): e84359.

[47] Kurowska M, Daszkowska-Golec A. Molecular mechanisms of *SNAC1* (stress-responsive NAC1) in conferring the abiotic stress tolerance. Plant Science, 2023, 337: 111894.

[48] Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 2001, 25(4): 402－408.

[49] Yuan S Z, Li S Y, Qiao C. Effect of low temperature stress on content of free proline in spirulina. Modern Agricultural Science and Technology, 2010(18): 35－37.
袁淑珍, 栗淑媛, 乔辰. 低温胁迫对螺旋藻细胞内游离脯氨酸含量的影响. 现代农业科技, 2010(18): 35－37.

[50] Li Z F, Wu X D. Experimental design scheme for the effect of drought stress on content of malondialdehyde of indoor ornamental plants. Tianjin Agricultural Sciences, 2016, 22(9): 49－51.
李子芳, 吴锡冬. 植物丙二醛含量测定试验设计方案. 天津农业科学, 2016, 22(9): 49－51.

[51] Zhan P L, Ke S W, Zhang P Y, *et al*. Overexpression of two cold-responsive ATAF-like NAC transcription factors from fine-stem stylo (*Stylosanthes guianensis* var. *intermedia*) enhances cold tolerance in tobacco plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2018, 135(3): 545－558.

[52] Wang L L, Hu Z L, Zhu M K, *et al*. The abiotic stress-responsive NAC transcription factor SlNAC11 is involved in drought and salt response in tomato (*Solanum lycopersicum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2017, 129(1): 161－174.

[53] Fuertes-Aguilar J, Matilla A J. Transcriptional control of seed life: New insights into the role of the NAC family. Molecular Sciences, 2024, 25(10): 5369.

[54] Huang W J, Lv H Y, Wang Y. Functional characterization of a novel R2R3-MYB transcription factor modulating the flavonoid biosynthetic pathway from *Epimedium sagittatum*. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1274.

[55] 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. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 1548.