

## • 药材与资源 •

掌叶大黄 *RpNAC1* 基因的克隆、亚细胞定位及表达分析

梁小燕, 李元敏, 李依民\*, 李 慧, 杜 鹃, 张明英, 高 静, 彭 亮, 张 岗\*

陕西中医药大学药学院 陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心, 陕西 西安 712046

**摘要:** 目的 克隆掌叶大黄 *Rheum palmatum* 转录因子基因 *RpNAC1*, 进行生物信息学、亚细胞定位及表达模式分析。方法 根据转录组中一个 NAC unigene, 利用 RT-PCR 克隆开放阅读框 (open reading frame, ORF)。通过生物信息软件预测基因编码蛋白的理化性质、结构域等分子特征。采用 DNASTar 6.0 和 MEGA 7.0 分别进行氨基酸序列比对和进化分析。构建绿色荧光蛋白 (GFP) 融合表达载体, 以农杆菌侵染烟草叶片的瞬时表达法分析亚细胞定位。运用 qRT-PCR 检测基因表达模式。结果 分离到 *RpNAC1* 基因, ORF (1269 bp), 编码一个由 422 个氨基酸组成的蛋白质, 相对分子质量 47 070, 等电点 5.80, 包含一个保守 NAC 结构域 (32~181), 与多种植物 NAC 蛋白一致性较高 (62.42%~88.7%), 聚在植物 NAC 分子进化树的 NAC2 分支, 与甜菜 NAC (XP\_010694507) 亲缘关系较近。*RpNAC1*-GFP 融合蛋白定位在烟草细胞核内。*RpNAC1* 基因在一年生植株根中表达量最高, 根茎中表达量最低, 相对表达量分别为叶中的 5.37、0.012 倍; 该基因响应 200  $\mu\text{mol/L}$  赤霉素 (gibberellin, GA3) 处理后在 24 h 内总体上调, 200  $\mu\text{mol/L}$  茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 处理 1 h 和 12 h 基因显著上调, 200  $\mu\text{mol/L}$  水杨酸 (salicylic acid, SA) 处理 12 h 显著诱导基因表达, 200  $\mu\text{mol/L}$  脱落酸 (abscisic acid, ABA) 处理抑制基因表达, 200  $\mu\text{mol/L}$  乙烯 (ethylene, ET) 处理未见明显变化。结论 获得掌叶大黄 *RpNAC1* 基因序列及表达特征, 为进一步研究其在萜醌类成分合成与积累中的转录调控作用提供支撑。

**关键词:** 掌叶大黄; NAC 转录因子; 基因克隆; 表达模式; 激素

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)23-7302-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.23.024

## Cloning, subcellular localization, and expression analysis of *RpNAC1* from *Rheum palmatum*

LIANG Xiao-yan, LI Yuan-min, LI Yi-min, LI Hui, DU Juan, ZHANG Ming-ying, GAO Jing, PENG Liang, ZHANG Gang

Shaanxi Qinling Chinese Herbal Medicine Application Development Engineering Technology Research Center, School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China

**Abstract: Objective** To clone a NAC transcription factor gene *RpNAC1* from Dahuang (*Rheum palmatum*) followed by bioinformatics, subcellular localization and expression pattern analysis. **Methods** According to a NAC transcription factor unigene in transcriptome, the open reading frame (ORF) was cloned by RT-PCR. The physical and chemical properties, protein structure, and other molecular characteristics of the deduced protein *RpNAC1* were predicted by bioinformatics tools. DNASTar 6.0 and MEGA7.0 were used for multiple sequence alignment and phylogenetic tree analyses, respectively. Green fluorescent protein (GFP) fused expression vector was constructed and subcellular localization of *RpNAC1* was observed by *Agrobacterium tumefaciens* transient expression method in tobacco. Quantitative PCR was employed for gene expression analyses. **Results** The ORF of *RpNAC1* was 1269 bp in size, encoding a 422-aa protein with a molecular weight of 47 070 and an isoelectric point of 5.80. The deduced *RpNAC1*, containing a conserved NAC domain (32—181). *RpNAC1* protein was highly consistent with other plant's NAC proteins (62.42%—88.7%), and was clustered in NAC2 subclass of plant NAC molecular phylogenetic tree, and was closely related to *Beta*

收稿日期: 2021-05-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82104334); 陕西中医药大学校级课题 (2020PG29); 陕西中医药大学新进博士科研启动经费 (104080001); 陕西中医药大学学科创新团队项目 (2019-QN01); 中央本级重大增减支项目 (2060302)

作者简介: 梁小燕, 女, 硕士研究生, 研究方向为药用植物生物技术与分子生物学。E-mail: 1446200532@qq.com

\*通信作者: 李依民, 女, 博士, 副教授, 研究方向为中药资源评价与利用。E-mail: 2051058@sntcm.edu.cn

张 岗, 男, 博士, 教授, 研究方向为中药资源评价与利用。E-mail: jay\_gumling2003@aliyun.com

*vulgaris* NAC (XP\_010694507). The RpNAC1-GFP fusion protein was located in the nucleus of tobacco mesophyll cells. The qRT-PCR analyses showed that the abundance of *RpNAC1* gene was the highest in roots and the lowest in rhizomes, and the relative expression levels were 5.37 and 0.012 times higher than those in leaves of *R. palmatum* seedlings at one-year stage. After 200  $\mu\text{mol/L}$  gibberellin (GA3) treatment, *RpNAC1* transcript was up-regulated within 24 h. Methyl jasmonate (MeJA, 200  $\mu\text{mol/L}$ ) treatment for 1 h and 12 h significantly up-regulated its expression level. Salicylic acid (SA, 200  $\mu\text{mol/L}$ ) treatment also significantly induced gene expression. Whereas, Abscisic acid (ABA, 200  $\mu\text{mol/L}$ ) treatment inhibited gene expression and 200  $\mu\text{mol/L}$  ethylene (ET) treatment did not show any effects. **Conclusion** The sequence and expression characteristics of *RpNAC1* gene were obtained, which will provide the reference for further study on the biological function of the gene in the biosynthesis and accumulation regulation of anthraquinones in *R. palmatum*.

**Key words:** *Rheum palmatum* L.; NAC transcription factor; gene cloning; expression pattern; hormone

中药资源的生产与其所处的生态环境有密切关系。药用植物在长期适应环境过程中,不断积累遗传变异特征,成为中药材品质形成的重要条件<sup>[1]</sup>。遗传与环境互作在调控药用植物次生代谢物合成与积累方面发挥重要作用<sup>[2]</sup>。随着现代生物技术的发展,通过转录水平对药用植物活性成分合成途径进行调控,能够定向且高效调节活性成分的生产。转录因子可调控细胞代谢途径基因表达,在植物生长发育、逆境适应和系统进化方面发挥重要作用<sup>[3]</sup>。NAC (NAM、ATAF、CUC)是植物中特有的一大类转录因子,在植物器官分化、衰老、次生代谢以及生物或非生物胁迫等方面中都有重要调控功能<sup>[4-5]</sup>。现已从模式植物和农作物等多种植物中鉴定到大量NAC基因,如拟南芥中有138个、水稻中有328个、小麦中有134个、烟草中有42个等<sup>[6]</sup>。药用植物NAC研究刚起步,仅有丹参*SmNAC1*<sup>[7]</sup>、穿心莲*ApNAC1*<sup>[8]</sup>、三七*PnNAC1*<sup>[9]</sup>等相关报道,在活性成分合成与积累及激素信号通路介导的逆境胁迫方面起关键调控作用。因此,药用植物NAC基因发掘及其功能解析研究亟待加强。

掌叶大黄*Rheum palmatum* L.是中药材大黄的基原之一,味苦,性寒,具有泻下攻积、清热泻火、凉血解毒、逐瘀通经之功效<sup>[10]</sup>,临床应用广泛。迄今为止,已从大黄中分离到蒽醌、蒽酮、二苯乙烯、类黄酮、酰基葡萄糖苷和吡喃酮等多种化学成分<sup>[11]</sup>。蒽醌类为大黄主要活性成分,具有抗肿瘤<sup>[12]</sup>、保肝<sup>[13]</sup>等药理活性。蒽醌类成分积累是决定大黄药材质量的关键因素。掌叶大黄主要分布在甘肃、青海等海拔地区,高光强、低温、强辐射等极端环境使其进化形成一套遗传调控适应机制。随着大黄蒽醌类成分生物合成途径的解析<sup>[14]</sup>,有助于下一步研究蒽醌类成分的积累和调控。课题组前期对一年生掌叶大黄根、根茎和叶片比较转录组测序(SRR10855670),并从中鉴定到一个NAC家族成员

基因 Cluster-7329.62847 (1794 bp),包含完整开放阅读框(open reading frame, ORF),与植物NAC家族成员序列相似性较高(>61%)。鉴于NAC在植物次生代谢调控中的重要作用,本研究进行*RpNAC1*基因克隆、生物信息学、亚细胞定位及组织和响应激素的表达模式,为下一步研究其在蒽醌类成分合成中的作用及应答植物激素的分子机制提供科学依据。

## 1 材料

1年生掌叶大黄系课题组于2019年10月采自甘肃省陇南市宕昌县阿坞乡麻界村(东经104°10'4.98",北纬34°16'50.9",海拔2377 m),经陕西中医药大学胡本祥教授鉴定为掌叶大黄*R. palmatum* L.。取大黄根、根茎、叶3个部位样品,液氮速冻后置-80 °C超低温冰箱保存备用。本氏烟*Nicotiana benthamiana* Domin由本实验室保存。

## 2 方法

### 2.1 样品的处理

参考黑小斌等<sup>[15]</sup>建立的方法培养大黄无菌实生苗。选取生命旺盛、长势均匀的1月龄幼苗,分别喷施200  $\mu\text{mol/L}$ 的赤霉素(gibberellin, GA3)、乙烯(ethylene, ET)、茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)、水杨酸(salicylic acid, SA)、脱落酸(abscisic acid, ABA)激素作为处理组,以不含激素的溶剂模拟喷施作为模拟处理对照组(Mock),材料以0 h为空白对照,所有样品重复3次,分别于处理后1、3、6、12、24 h取处理和Mock组叶片样品,液氮速冻后置-80 °C冰箱保存备用。

### 2.2 总RNA提取及cDNA合成

使用植物RNA提取试剂盒RN38(艾德莱,北京)提取掌叶大黄各样品的总RNA,用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,用K5800自动检测微量分光光度计(凯奥,中国)检测RNA浓度和纯度;使用PrimeScript™ RT Master Mix反转录试剂

盒(TaKaRa公司,中国)合成cDNA第一链,-20℃保存备用。所有操作均按试剂盒说明书进行。

### 2.3 基因克隆

以掌叶大黄转录组 NAC 基因 Cluster-7329.62847 ORF 为模板,设计 RT-PCR 引物, RpNAC1-ORF-F: 5'-ATGGGGTTT GAGCCACCG-3', RpNAC1-ORF-R: 5'-CTACGCTTCTCGCCGTTGAG-3'。以 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板,用 *Ex Taq*<sup>®</sup> DNA Polymerase (TaKaRa 公司,中国)进行扩增。PCR 体系为 25 μL: *Ex Taq* 0.125 μL、10×*Ex Taq* Buffer 2.5 μL、dNTPs 2 μL、Forward Primer 1 μL、Reverse Primer 1 μL、cDNA 2 μL、ddH<sub>2</sub>O 16.375 μL。PCR 扩增条件: 预变性 95℃、2 min, 变性 95℃、30 s、60℃ 30 s、72℃ 1 min, 34 个循环, 72℃ 5 min, 4℃ 保温。将 PCR 特异性片段经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后,用 DNA 胶回收试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司,中国)回收,连入 pUC19 载体(TaKaRa 公司,中国)后转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,随机选取 3 个带有目的产物的阳性克隆质粒,送由杨凌天润奥科生物科技有限公司完成测序。

### 2.4 RpNAC1 生物信息学分析

用 NCBI 在线比对分析 RpNAC1 序列相似性分析;利用 ExPASy (<https://www.expasy.org/>) 进行 RpNAC1 蛋白质相对分子质量、理论等电点和亲、疏水性的在线分析;分别用 SignalP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) 和 TMHMM 软件进行蛋白信号肽与跨膜区分析;ProtScale 软件分析蛋白亲水性;用 SOPMA 预测蛋白二级结构。Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 和 WolfPSORT (<https://wolffpsort.hgc.jp/>) 进行亚细胞定位分析;借助 DNASTar 6.0 进行多序列比对,运用 MEGA 7.0 采用相邻连接法(neighbour-joining, NJ) 构建多种植物 NAC 蛋白的系统进化树。

### 2.5 RpNAC1 蛋白亚细胞定位分析

为研究 RpNAC1 蛋白在植物细胞中的定位情况,在 ORF 扩增引物两端分别加入 Nco I 和 Spe I 酶切位点: RpNAC1<sub>orf</sub>-GFP-F: 5'-CTATCCA TGGGGTTT GAGCCACCG-3' 和 RpNAC1<sub>orf</sub>-GFP-R: 5'-CTCCTCCGCTTCTCGCCGTG-3', 克隆连接至 pCAMBIA1302 (华越洋) 构建重组载体, CaCl<sub>2</sub> 法转入农杆菌感受态细胞 EHA105 (上海唯地), 倒置培养 2 d, 挑取阳性克隆接种到含有抗生素的 5

mL LB 培养基中, 28℃, 200 r/min 培养至菌液浑浊, 用 5 mL 农杆菌缓冲液洗涤 3 次, 稀释至菌体浓度(A<sub>600</sub>值)为 200 时, 避光静置 2 h。选择长有 8 叶左右的本氏烟的第 2~4 叶, 快速撕取内表皮, 平铺于 MS 固体培养基, 25℃ 下暗培养 36 h。农杆菌注射法将质粒 pCAMBIA1302-GFP、pCAMBIA1302-RpNAC1-GFP 转化到内表皮, 25℃ 共培养 36 h 后, 用 10 μg/mL DAPI 染色 20 min, 再用 pH 7.2 的磷酸缓冲液清洗 3 次, 制片, 用 Olympus FV3000 激光共聚焦显微镜(Olympus 公司, 日本)观察。

### 2.6 RpNAC1 基因表达分析

利用实时荧光定量 PCR 分析 RpNAC1 在 1 年生掌叶大黄不同组织部位和一月龄幼苗叶片经激素处理下的表达特征。利用 NCBI BLAST 分析和 PrimerPremier 5.0 软件设计 qRT-PCR 引物: RpNAC1-qPCR-F: 5'-GATTCCC GTTGTGATGAT-TCTG-3' 和 RpNAC1-qPCR-R: 5'-CTCGTATCTTAGCCTCTTGT TTTGG-3', 扩增产物长度 207 bp。以 β-actin 为内参基因, β-actin-F: AGGGTCCA-ATGCTTTATC, β-actin-R: CAGTCTTCTCCACCA-CAA。使用 TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa 公司, 中国) 进行 qPCR。20 μL 反应体系: 2×TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (Tli RNaseH Plus) 10 μL, Forward/Reverse Primer 各 0.8 μL, cDNA 模板 2 μL, 50×ROX Reference Dye 0.4 μL, ddH<sub>2</sub>O 6 μL。反应程序: 预变性 95℃、30 s, 变性 95℃、5 s, 退火 60℃、30 s, 延伸 60℃、34 s, 40 个循环, 融解曲线 95℃、15 s, 60℃、1 min, 95℃、15 s。同时绘制融解曲线, 包括不加模板的对照在内, 所有 qRT-PCR 反应技术重复和实验重复各 3 次, 利用 StepOnePlus<sup>®</sup> Real-Time (Applied Biosystems 公司, 美国) 进行 qRT-PCR 检测, 以 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算相对表达量。

## 3 结果与分析

### 3.1 RpNAC1 基因克隆

以掌叶大黄无菌苗的 cDNA 为模板, 利用 RpNAC1-ORF-F/R 进行 RT-PCR。扩增产物通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 获得清晰明亮的单条带(图 1)。目标条带经克隆测序获得 1269 bp 的序列, 与原 Cluster-7329.62847 ORF 一致, 序列分析结果表明其编码 NAC 蛋白, 故命名为 RpNAC1 (GenBank 登录号 MW269549)。

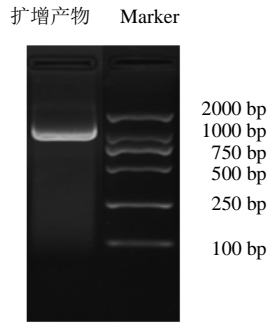


图1 RpNAC1 RT-PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR amplicon of RpNAC1

3.2 RpNAC1 理化性质、结构域

ProtParam 预测 RpNAC1 基因编码的蛋白质的分子式为 C<sub>2082</sub>H<sub>3266</sub>N<sub>568</sub>O<sub>644</sub>S<sub>16</sub>，相对分子质量为 47 071.21，理论等电点为 5.80，RpNAC1 蛋白带正电残基 (Asp+Glu) 为 51，带负电残基 (Arg+Lys) 为 57。该蛋白的不稳定系数为 53.79，脂肪系数为 72.37，亲水性系数为-0.581。SOPMA 分析表明，RpNAC1 蛋白二级结构主要由 α 螺旋 (alpha helix, 29.15%)、随机卷曲 (random coil, 56.87%)、延伸链 (extended strand, 8.53%) 和少量的 β 转角 (beta turn, 5.45%) 组成。

InterProScan 与 PROSITE 分析结果一致，显示 RpNAC1 蛋白有一个保守蛋白结构域：32~181 (NAC)，PROSITE SCAN 分析表明该蛋白中包含

5 个 N-糖基化位点 (102~105、236~239、275~278、300~303、322~325)、1 个 cAMP-和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点 (414~417)、7 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (110~112、141~143、259~261、306~308、384~386、391~393、417~419)、8 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (41~44、65~68、118~121、160~163、226~229、277~280、331~334、401~404)、1 个酪氨酸激酶磷酸化位点 (84~91)、4 个 N-豆蔻酰化位点 (103~108、132~137、222~227、318~323)、1 个酰胺化位点 (146~149)。

使用 SignalP 4.1 和 TMHMM 在线分析一致表明该蛋白无信号肽或跨膜域，同时 Plant-mPLoc 和 WolfPSORT 一致预测 RpNAC1 定位在细胞核。

3.3 蛋白多序列比对和系统进化

借助 DNASTar 6.0 中的 MegAlign 对目的蛋白和其他 NAC 家族植物蛋白进行多序列比对。图 2 分析结果显示，RpNAC1 ORF 编码的蛋白质序列与刚毛怪柳 *Tamarix hispida* L. (AGV29495)、藜麦 *Chenopodium quinoa* Willd. (XP\_021761189)、菠菜 *Spinacia oleracea* L. (XP\_021864947)、甜菜 *Beta vulgaris* subsp. *Vulgaris* (XP\_010694507)、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* L. (NP\_566376)、拟南芥 (NP\_196061)、大豆 *Glycine max* L. (XP\_003546832) 等 NAC 蛋白的相似性较高，分别为 87.88%、74.29%、73.30%、73.03%、68.42%、66.84%、62.42%。

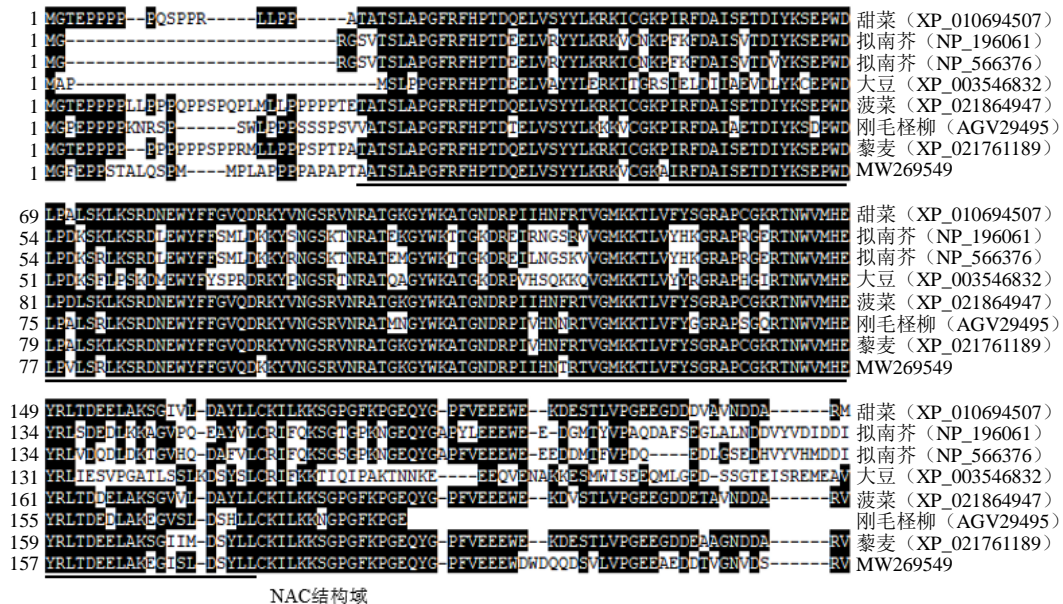


图2 RpNAC1 蛋白与其他植物 NAC 蛋白的多序列比对

Fig. 2 Multiple sequence alignment of RpNAC1 and NAC proteins from other plants

从 NCBI 下载拟南芥、水稻、丹参、大豆和甜菜等植物 NAC 蛋白家族成员,采用 MEGA7.0 软件 N-J 法对 19 个 NACs 及 RpNAC1 蛋白构建系统进化树(图 3)。从图中可以看出, RpNAC1 聚在植物 NAC 家族的 NAC2 亚类,与刚毛怪柳 NAC (AGV29495)和甜菜 NAC (XP\_010694507)蛋白亲缘关系最近。

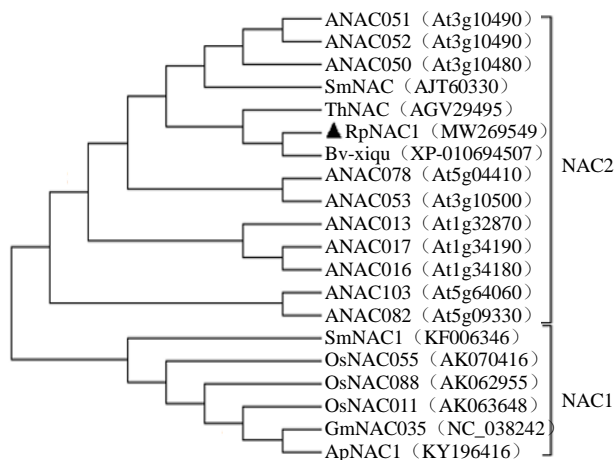


图 3 RpNAC1 与其他植物 NAC 蛋白的进化树分析  
Fig. 3 Phylogenetic tree of RpNAC1 with NAC proteins from other plants

### 3.4 RpNAC1 蛋白的亚细胞定位

用激光共聚焦显微镜观察本氏烟叶片表皮细胞。图 4 结果显示, RpNAC1-GFP 融合蛋白在烟草细胞核中显荧光,说明 RpNAC1 定位在细胞核。

### 3.5 RpNAC1 基因组织特异性表达分析

分别提取一年生掌叶大黄根、根茎、叶总 RNA,利用 qRT-PCR 检测不同组织部位中的基因表达(图 5)。

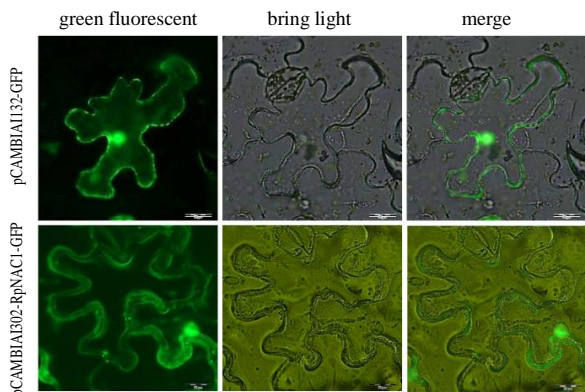


图 4 RpNAC1 蛋白在烟草叶肉中的亚细胞定位  
Fig. 4 Subcellular localization of RpNAC1 in tobacco mesophyll cells

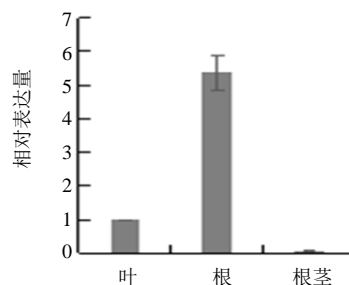


图 5 RpNAC1 在不同组织器官中的表达模式  
Fig. 5 Expression pattern of RpNAC1 in different organs of *R. palmatum*

图 5 可以看出, RpNAC1 基因转录本在一年生植株根中表达丰度最高,相对表达量为叶中的 5.37 倍,茎中表达量最低,为叶中的 0.012 倍。

### 3.6 RpNAC1 基因的诱导表达分析

qRT-PCR 分析显示,1 月龄幼苗 Mock 组 1 h 叶片中 RpNAC1 迅速下调至空白对照的 0.40 倍,其他时间点变化不显著;ABA 显著抑制 RpNAC1 表达,24 h 恢复至 0 h 表达量水平;ET 处理基因表达未见明显变化;RpNAC1 响应 GA3 处理后在 24 h 内总体上调,且在诱导处理 24 h 时表达量达到最高,为空白对照的 3.09 倍;RpNAC1 响应 MeJA 处理在 1、12 h 呈双峰式诱导,分别为空白对照的 7.52、4.94 倍;SA 处理 12 h 时 RpNAC1 基因表达量达到最高,为 CK 的 5.06 倍,见图 6。

## 4 讨论

NAC 是植物中已报道的一大类重要转录因子,其家族成员数量庞大,在拟南芥和水稻等模式植物中研究较多<sup>[16]</sup>,药用植物中也有零星报道,参与植物生长发育、次生代谢和逆境适应等生物学过程。本研究以前测序获得的转录组数据为基础,克隆获得 RpNAC1 ORF,与多种植物 NACs 基因一致性较高,编码蛋白包含一个 NAC 结构域,符合 NAC 蛋白结构特征<sup>[17]</sup>。Plant-mPLOC 预测与亚细胞定位结果表明, RpNAC1 蛋白是核定位蛋白,作为转录因子行使其调控功能。分子进化上 RpNAC1 属于植物 NAC 分子进化树的 NAC2 亚类,该亚类相关基因与植物抗逆性密切相关<sup>[16]</sup>,推测 RpNAC1 可能具有类似功能。

NAC 基因在不同植物、不同组织中或不同发育阶段的表达模式通常存在差异<sup>[9]</sup>。拟南芥 NAC1 在根、茎、叶中表达水平变化大,根中表达量最高,在茎和叶中表达量相对较低<sup>[18]</sup>。Li 等<sup>[19]</sup>在藜麦中鉴定了 90 个 NACs,11 个表现出明显的组织特异性表

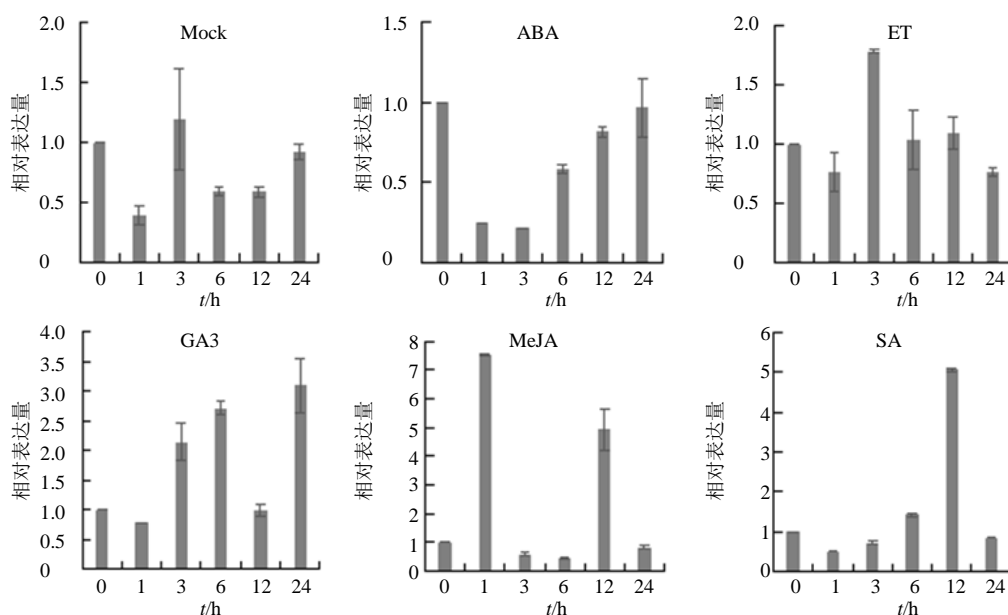


图6 *RpNAC1* 基因在不同激素处理下的表达模式

Fig. 6 Expression patterns of *RpNAC1* under different hormone treatments

达模式, *CqNAC38* 基因主要在茎中表达, 而 *CqNAC45*、*CqNAC36*、*CqNAC21* 和 *CqNAC66* 基因在叶片中表达水平较高, *CqNAC85*、*CqNAC16*、*CqNAC23*、*CqNAC42*、*CqNAC62* 和 *CqNAC32* 基因在根中具有较高的表达水平。本研究组织表达分析结果表明 *RpNAC1* 基因在一年生掌叶大黄根中表达水平最高, 暗示其可能在根中发挥重要的转录调控功能。转录因子通常能响应外源激素处理从而通过激素信号转导参与植物次生代谢与胁迫反应等生物学过程。研究表明 NAC 基因启动子区常含有多个响应激素和逆境胁迫的元件, 如 *OsNAC19* 基因启动子区有 ABA、MeJA、SA、逆境胁迫顺式作用元件<sup>[20]</sup>。外源 SA、ET 和 MeJA 处理可提高 *CaNAC1* 基因的转录水平<sup>[21]</sup>。ANAC019 通过正调控 ABA 信号转导参与调节拟南芥种子萌发和幼苗发育<sup>[22]</sup>。本研究结果显示, *RpNAC1* 对 5 种外源激素处理的响应有差异。ABA 处理显著抑制 *RpNAC1* 基因表达, 说明 ABA 为负调控信号, 和陆地棉 *GhNAC15* 的表达模式相似<sup>[23]</sup>。ET 处理未显著引起基因表达水平变化, 说明 *RpNAC1* 可能不受乙烯信号调控。*RpNAC1* 基因响应 GA3 处理后在 24 h 内总体上调, 说明该基因参与赤霉素信号转导途径。SA 是一种天然植物激素信号分子, 在调节植物对生物和非生物胁迫的反应中发挥重要作用<sup>[24]</sup>。*RpNAC1* 基因受 SA 处理后在 12 h 显著上调, 与 *CaNAC1* 受 SA 诱导响应方式一致<sup>[25]</sup>。MeJA 外源处理在诱导药用植

物活性成分积累和防御反应方面起关键作用<sup>[8-9]</sup>, *RpNAC1* 基因响应 MeJA 处理呈双峰式诱导, 说明 MeJA 正调控 *RpNAC1* 基因的特殊性和复杂性。*RpNAC1* 响应不同激素的差异表达特征, 对于后续研究其在大黄蒽醌类成分生物合成中的作用以及应答植物激素的分子机制具有重要意义。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 郭兰萍, 周良云, 康传志, 等. 药用植物适应环境胁迫的策略及道地药材“拟境栽培” [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(9): 1969-1974.
- [2] 商彤, 胡会娟, 孟磊, 等. 遗传和环境对唐古特大黄功效成分含量的影响研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(11): 2246-2253.
- [3] 马建辉, 仝豆豆, 张文利, 等. 乌拉尔图小麦 NAC 转录因子的筛选与分析 [J]. 遗传, 2016, 38(3): 243-253.
- [4] Shen S Y, Zhang Q R, Shi Y, et al. Genome-wide analysis of the NAC domain transcription factor gene family in *Theobroma cacao* [J]. *Genes (Basel)*, 2019, 11(1): E35.
- [5] Ling L, Song L L, Wang Y J, et al. Genome-wide analysis and expression patterns of the NAC transcription factor family in *Medicago truncatula* [J]. *Physiol Mol Biol Plants*, 2017, 23(2): 343-356.
- [6] 李桂玲, 李思云, 刘卫群. 转录因子 NAC 及其在植物生长发育中的作用 [J]. 分子植物育种, 2019, 17(3): 811-826.
- [7] Yin X J, Fan H, Chen Y, et al. Integrative omic and transgenic analyses reveal the positive effect of

- ultraviolet-B irradiation on salvianolic acid biosynthesis through upregulation of SmNAC1 [J]. *Plant J*, 2020, 104(3): 781-799.
- [8] 王健, 齐梦蝶, 郭娟, 等. 穿心莲转录因子 ApNAC1 的克隆、亚细胞定位及原核表达 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(5): 890-895.
- [9] 王国东, 李金晶, 白智伟, 等. 三七 NAC 转录因子基因 PnNAC1 的克隆及表达特性分析 [J]. *华北农学报*, 2017, 32(4): 91-97.
- [10] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 23.
- [11] Zheng Q X, Wu H F, Guo J, *et al.* Review of rhubarbs: Chemistry and pharmacology [J]. *Chin Herb Med*, 2013, 5(1): 9-32.
- [12] Yi J, Yang J, He R, *et al.* Emodin enhances arsenic trioxide-induced apoptosis via generation of reactive oxygen species and inhibition of survival signaling [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(1): 108-116.
- [13] Yang F, Xu Y, Xiong A Z, *et al.* Evaluation of the protective effect of *Rhei Radix* et *Rhizoma* against  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate induced liver injury based on metabolic profile of bile acids [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 144(3): 599-604.
- [14] 李欢, 张娜, 李依民, 等. 利用转录组测序挖掘掌叶大黄蒽醌类生物合成相关基因 [J]. *药学报*, 2018, 53(11): 1908-1917.
- [15] 黑小斌, 李依民, 李欢, 等. 掌叶大黄种子特性研究及无菌培养体系的构建 [J]. *中草药*, 2019, 50(18): 4430-4437.
- [16] 徐晓阳, 李国龙, 孙亚卿, 等. 甜菜 NAC 转录因子鉴定及其在水分胁迫下的表达分析 [J]. *植物生理学报*, 2019, 55(4): 444-456.
- [17] 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.
- [18] Xie Q, Frugis G, Colgan D, *et al.* *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development [J]. *Genes Dev*, 2000, 14(23): 3024-3036.
- [19] Li F, Guo X H, Liu J X, *et al.* Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of the NAC transcription factor in *Chenopodium quinoa* [J]. *Genes*, 2019, 10(7): 500.
- [20] Huang D, Wang S, Zhang B, *et al.* A gibberellin-mediated DELLA-NAC signaling cascade regulates cellulose synthesis in rice [J]. *Plant Cell*, 2015, 27(6): 1681-1696.
- [21] Oh S K, Lee S, Yu S H, *et al.* Expression of a novel NAC domain-containing transcription factor (CaNAC1) is preferentially associated with incompatible interactions between chili pepper and pathogens [J]. *Planta*, 2005, 222(5): 876-887.
- [22] Jensen M K, Kjaersgaard T, Nielsen M M, *et al.* The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: Structure-function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling [J]. *Biochem J*, 2010, 426(2): 183-196.
- [23] Shah S T, Pang C, Fan S, *et al.* Isolation and expression profiling of GhNAC transcription factor genes in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) during leaf senescence and in response to stresses [J]. *Gene*, 2013, 531(2): 220-234.
- [24] Taşgin E, Atici O, Nalbantoğlu B, *et al.* Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves [J]. *Phytochemistry*, 2006, 67(7): 710-715.
- [25] Tran L S, 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.

[责任编辑 时圣明]