

曼地亚红豆杉 *NPR1* 基因家族鉴定及表达模式分析

杜雨晴¹, 袁菊红², 王旭³, 张恺恺¹, 陈段芬³, 邱德有¹, 杨艳芳^{1*}

1. 中国林业科学研究院林业研究所, 林木遗传育种国家重点实验室, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091

2. 江西财经大学艺术学院 风景园林与植物资源研究所, 江西 南昌 330032

3. 河北农业大学园艺学院, 河北 保定 071001

摘要: **目的** 通过鉴定曼地亚红豆杉 *Taxus × media* 中病程相关基因非表达子 1 (non-expressor of pathogenesis-related genes 1, *NPR1*) 家族基因, 分析并比较其蛋白结构以及基因表达等差异, 为利用 *NPR1* 基因提高红豆杉紫杉醇含量奠定理论基础。**方法** 利用本地化 blast 对曼地亚红豆杉 *NPR1* 基因进行鉴定, 通过 CD-search、MEGA X、DNAMAN 以及 MEME 在线网站等生物信息学技术进行保守结构域、进化树构建、多序列比对以及基序分析, 利用 blast 比对转录组数据, 预测所获得的 *NPR1* 基因在不同组织以及激素和低温处理后的表达模式。**结果** 在曼地亚红豆杉中共鉴定出 3 个 *NPR1* 家族基因, 命名为 *TmNPR1*~*TmNPR3*。研究发现, 3 个 *NPR1* 家族成员均含有 BTB_POZ 保守结构域, 并分成 2 个亚家族。*TmNPR1/2* 与 *AtNPR3/4* 聚在一起, *TmNPR3* 与 *AtNPR5/6* 亲缘关系较近。*TmNPR1/2* 与 *AtNPR3/4* 相似, 均含有 EAR 基序 (VDLNETP)。表达模式分析发现 3 个 *NPR1* 基因在不同组织中的表达有所差异, *TmNPR1/2* 在针叶组织中的表达水平最高, *TmNPR1* 响应低温胁迫, 且在茉莉酸甲酯和冠菌素激素处理曼地亚红豆杉细胞系中表达量最高。**结论** 曼地亚红豆杉 *NPR1* 家族的 3 个成员在序列和结构上存在保守性, 但也在红豆杉根和针叶的发育以及在低温等不同胁迫和茉莉酸甲酯信号途径中扮演了不同的角色, 推测具有不同的功能, 为揭示 *TmNPR1s* 基因功能和利用分子生物学技术提高红豆杉紫杉醇产量提供理论依据。

关键词: 红豆杉; 曼地亚红豆杉; *NPR1* 家族; 生物信息学; 紫杉醇; 表达分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)01-0240-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.01.024

Identification and expression pattern analysis of *NPR1* genes in *Taxus × media*

DU Yuqing¹, YUAN Juhong², WANG Xu³, ZHANG Kaikai¹, CHEN Duanfen³, QIU Deyou¹, YANG Yanfang¹

1. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, State Forestry Administration Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, Research Institute of Forestry Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China

2. Institute of Landscape Architecture and Plant Resources, College of Art, Jiangxi University of Finance and Economics, Nanchang 330032, China

3. College of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China

Abstract: Objective To provide a theoretical basis for increasing taxol content of Hongdoushan (*Taxus wallichiana* var. *chinensis*) by non-expressor of pathogenesis-related genes 1 (*NPR1*) gene through identifying the family gene of *NPR1* in *T. × media* and analyzing and comparing its differences in protein structure and gene expression. **Methods** Localized-blast was used to identify the *NPR1* gene. Bioinformatics techniques, such as CD-search, MEGA X, DNAMAN, and MEME online websites were used to construct the conservative domain, phylogenetic tree construction, multiple sequence alignment, and motif analysis. The transcriptome data were compared by blast to predict the expression patterns of the obtained *NPR1* gene in different tissues and after hormone and low-temperature treatments. **Results** A total of three *NPR1* genes were identified in *T. × media*, which were named *TmNPR1*-3. It was found that all the three *NPR1* family members contained BTB_POZ conservative domains and were divided into two subfamilies. Moreover, *TmNPR1/2* and *AtNPR3/4* were clustered together, and *TmNPR3* and *AtNPR5/6* were closely related. *TmNPR1/2* was similar to *AtNPR3/4* in which both of them contained an EAR motif (VDLNETP). The expression pattern analysis

收稿日期: 2023-06-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32371907)

作者简介: 杜雨晴 (1999—), 女, 硕士研究生, 主要从事林木次生代谢研究。E-mail: dyq991115@163.com

*通信作者: 杨艳芳, 研究员, 主要从事林木次生代谢工程与调控研究。Tel: (010)62889638 E-mail: echoyyf@caf.ac.cn

showed that the expression of the three *NPR1* genes was different in different tissues. It is worth noting that the expression level of *TmNPR1/2* was the highest in needles, and *TmNPR1* was the highest in methyl jasmonate (MeJA) and coronatine-treated *T. × media* cell lines in response to low temperature stress. **Conclusion** The three members of the *NPR1* family in *T. × media* were conserved in sequence and structure, and they may play different roles in the development of roots and needles as well as in hormonal signals and abiotic stresses, such as MeJA signaling pathways and low temperature, which was speculated to have different functions. This study provides a theoretical basis for revealing the function of *TmNPR1s* genes and improving the taxol content in *T. wallichiana* var. *chinensis* by molecular biology technology.

Key words: *Taxus wallichiana* var. *chinensis* (Pilger) Florin; *Taxus × media* Rehder; *NPR1* family; bioinformatics; taxol; expression analysis

红豆杉 *Taxus wallichiana* var. *chinensis* (Pilger) Florin 又称为紫杉、赤柏松, 由于其能够提取天然抗癌药物紫杉醇而闻名于世。紫杉醇是高效的抗癌药物之一, 它对多种癌症, 如卵巢癌、乳腺癌、宫颈癌等的治疗有着明显的积极作用^[1], 同时也逐渐涉及到对胃癌、食道癌等癌症的治疗^[2-3]。紫杉醇虽然广受欢迎, 但是其在红豆杉中含量极低, 且红豆杉生长极为缓慢, 因此造成红豆杉野生资源遭受严重破坏。

水杨酸是植物抗病反应调控中的主要参与者, 同时也响应植物参与的其它非生物胁迫。病程相关基因非表达子 1 (non-expressor of pathogenesis-related genes 1, *NPR1*) 作为植物激素水杨酸信号通路调控的重要组成部分, 在水杨酸参与的植物系统获得抗性 (systemic acquired resistance, SAR) 反应中起着重要的传递作用^[4]。同时, 它也可以通过作用于某些转录因子来诱导抗性基因的表达, 从而激活植物的免疫系统, 提高植物的抗性^[5-6]。此外, 有研究也证实 *NPR1* 参与介导茉莉酸、乙烯、脱落酸等其他植物激素信号通路的交互作用^[7-8]。

目前, *NPR1* 作为水杨酸信号通路重要调控因子已得到广泛研究, 其作用机制已部分阐明。水杨酸通过改变细胞氧化还原势使得多聚体 *NPR1* 蛋白解聚为单聚体进入细胞核^[9-10], *NPR1* 在核内与其它转录因子互作, 激活或增强防御基因的表达, 从而启动多种防御反应^[6,11]。同时, *NPR1* 蛋白可以通过磷酸化、泛素化等修饰展现出不同的稳定性与功能^[12]。Liu 等^[13]在拟南芥的基因组中发现了 5 个 *NPR1* 的同源基因, 并且将它们分别命名为 *NPR2*、*NPR3*、*NPR4*、*NPR5* 和 *NPR6*, 之后 Fu 等^[14]发现 *AtNPR3/4* 能够直接结合水杨酸发挥负调控作用, 而 Ding 等^[15]则发现 *AtNPR1*、*AtNPR3/4* 都可以直接与水杨酸相互作用, 平行行使激活抗病基因的功能, 协同激活免疫反应。随着 *NPR1* 及其同源基因和

水杨酸相互调控机制逐步被揭示, *NPR1* 在调控水杨酸信号转导过程中的重要性逐渐被人们认识。

研究发现, 除了茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 以外, 水杨酸也会影响红豆杉中紫杉醇的生物合成, 从而影响紫杉醇的含量^[16]。然而, 相关分子机制研究较为少见。本研究通过对曼地亚红豆杉 *Taxus × media* Rehder 的 *NPR1* 基因家族进行生物信息学以及表达模式分析, 为进一步研究水杨酸调控红豆杉紫杉醇合成的分子机制提供理论依据, 并为后续利用细胞工程和基因工程提高紫杉醇终产量奠定理论基础。

1 材料

曼地亚红豆杉 3~5 年生小苗种植于中国林业科学研究院科研温室内, 并经中国林业科学研究院林业研究所杨艳芳研究员鉴定确认为曼地亚红豆杉 *Taxus × media* Rehder。曼地亚红豆杉愈伤组织保存于中国林业科学院研究院林木遗传育种国家重点实验室, 利用 B5 培养基进行培养, 28 d 继代 1 次, 培养条件为 25 °C, 暗培养。转录组测序在安诺优达基因科技 (北京) 有限公司进行。

2 方法

2.1 *TmNPR1* 家族成员鉴定及筛选

从 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) 数据库中获取拟南芥 *AtNPR1* (AT1G64280.1) 蛋白序列。将拟南芥 *AtNPR1* 序列作为 query, 与课题组前期测序获得的曼地亚红豆杉全长转录组数据进行 Tblastn 比对, *E* 值 $< 1 \times 10^{-10}$, 获得 *TmNPR1* 候选基因核苷酸序列。将所得到的核苷酸序列通过在线网站 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 来搜寻序列对应的完整开放阅读框 (open reading frame, ORF), 再通过 CD-HIT 软件对 *NPR1* 候选基因的 ORF 序列进行去冗余处理, 调整 cut-off 参数为 0.90, 最终获得 *TmNPR1s* 基因核苷酸序列。

2.2 TmNPR1 家族系统进化关系分析

利用 DNAMAN 将所获得的 TmNPR1s 氨基酸序列、拟南芥 NPR1 氨基酸序列与中国红豆杉 NPR1 氨基酸序列^[17]进行保守结构域的同源性比对。使用 MEGA X 软件采用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 对所获得的 TmNPR1s 蛋白序列和其他植物的 NPR1 蛋白序列 (下载自 Genbank 数据库与 TAIR 数据库) 进行进化树的构建, bootstrap 为 1 000 次重复, 其他参数为默认值。利用 iTOL (<https://itol.embl.de/>) 在线网站对进化树进行美化。

2.3 TmNPR1 家族蛋白理化性质分析

使用 ExPaSy-ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) 网站对所获得的 NPR1 蛋白序列的氨基酸数量 (number of amino acids)、相对分子质量 (molecular weight)、等电点 (pI)、不稳定系数 (instability index)、脂肪系数 (aliphatic index) 和总平均亲水性 (grand average of hydropathicity, GRAVY) 等理化性质进行分析。

2.4 TmNPR1 家族保守结构域与保守基序分析

利用 NCBI 网站上的在线工具 Batch CD-Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 对 TmNPR1s 基因的 ORFs 进行保守结构域预测分析, 随后将预测结果通过 DNAMAN 和 TBtoolsv1.108 软件进行可视化处理^[18]。利用 MEME 在线网站 (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 对 TmNPR1s 家族蛋白进行保守基序 (Motif) 分析^[19], 最大 motif 检索数为 10, 其余为默认参数, 将结果通过 TBtoolsv1.108 软件进行可视化处理^[17]。

2.5 TmNPR1s 基因表达模式分析

从 NCBI 网站 SRA 数据库中下载云南红豆杉不同组织 (根、茎、叶) 的转录组数据 (SRP127697)、

低温处理 (0℃ 处理 2~3 年生中国红豆杉幼苗 12 h) 后红豆杉的转录组数据 (SRP096539) 和 MeJA 处理 (红豆杉愈伤组织分别经过 MeJA 处理 0、0.5、3、24 h) 后的曼地亚红豆杉转录组数据 (SRP133888), 以及本课题组前期测得的冠菌素 (coronatine, COR) 处理 (在曼地亚红豆杉的 B5 培养基中加入 1 μmol/L COR, 分别于 0 h、4 h、12 h、48 h、4 d 和 14 d 时收集愈伤组织) 后的转录组数据^[20]。

利用所获得的 TmNPR1s 序列分别与以上转录组数据进行 Blastn 同源比对, 一致性最高同源序列的 FPKM 值即为不同处理下 TmNPR1s 的表达量, 并利用 GraphPad Prism 8 软件作图, 进行基因差异表达分析。

3 结果与分析

3.1 TmNPR1 家族成员鉴定及其编码蛋白理化性质分析

本研究从曼地亚红豆杉全长转录组中鉴定出 3 个 NPR1 基因, 通过 Batch CD-Search 在线工具预测分析发现 3 条 NPR1 的蛋白序列均含有 BTB_POZ 结构域与 AnK 保守域 (图 1), 是典型的 NPR1 家族蛋白。将鉴定到的 3 条基因序列分别命名为 TmNPR1~TmNPR3, 以便后续分析。

对获得的 3 个 TmNPR1 基因编码蛋白进行理化性质分析, 如表 1 所示, 发现 3 个 NPR1 蛋白分别含有 600、519 和 658 个氨基酸残基; 相对分子质量在 65 020~75 170; 3 个蛋白的等电点分别为 5.86、5.56 和 5.34, 全部小于 7, 说明该家族蛋白全部偏酸性; 不稳定系数为 42.43~51.79, 表明 3 个蛋白均不稳定; 脂肪系数 80.56~93.72, 都在 80 以上, 说明都为脂溶性蛋白; 总平均亲水性分别为-0.201、



图 1 TmNPR1s 蛋白保守结构域预测

Fig. 1 Prediction of conserved domains of TmNPR1s proteins

表 1 TmNPR1 家族成员理化性质分析

Table 1 Physicochemical property analysis of TmNPR1 family members

家族成员	氨基酸数量	相对分子质量	等电点	不稳定系数	脂肪系数	亲水性
TmNPR1	600	66.19	5.86	48.42	91.57	-0.201
TmNPR2	591	65.02	5.56	42.43	93.72	-0.235
TmNPR3	658	75.17	5.34	51.79	80.56	-0.498

-0.235 和 -0.498, 均为负值, 表明 3 个蛋白都为亲水蛋白。

3.2 TmNPR1 家族系统进化及多序列比对分析

本研究对包括 3 个 TmNPR1 蛋白在内的共 32 个 NPR1 蛋白进行系统进化树构建。结果如图 2 所

示, 这些 NPR1 家族蛋白共分为 3 个亚家族, 分别为 Clade I (AtNPR1/2 subfamily)、Clade II (AtNPR3/4 subfamily) 和 Clade III (AtNPR5/6 subfamily)。在 3 个 TmNPR1 蛋白中, TmNPR1、TmNPR2 聚在 Clade II 亚家族, TmNPR3 聚在 Clade III 亚家族。在拟南芥中, AtNPR5/6 被证明并没有参与免疫反应, 但能够调控叶片与花的发育^[21], TmNPR3 与 AtNPR5/6 聚类在一起, 说明 TmNPR3 可能对红豆杉植株生长形态起到调控作用。而 TmNPR1/2 则与 Clade II 类 AtNPR3/4 蛋白亲缘关系较近, 表明 TmNPR1/2 可能具有与 AtNPR3/4 蛋白相似的功能。

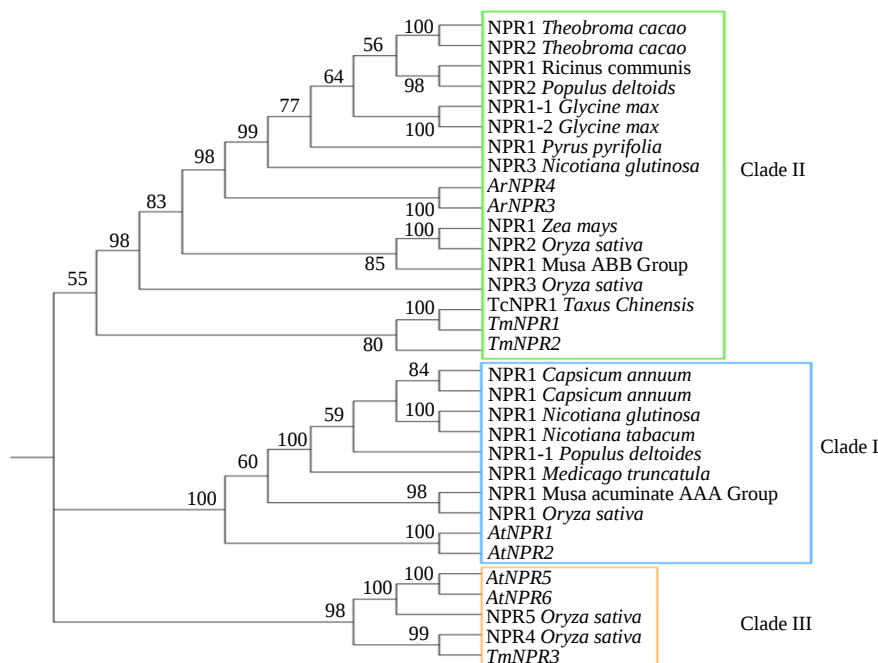


图 2 不同植物 NPR1 蛋白进化树分析

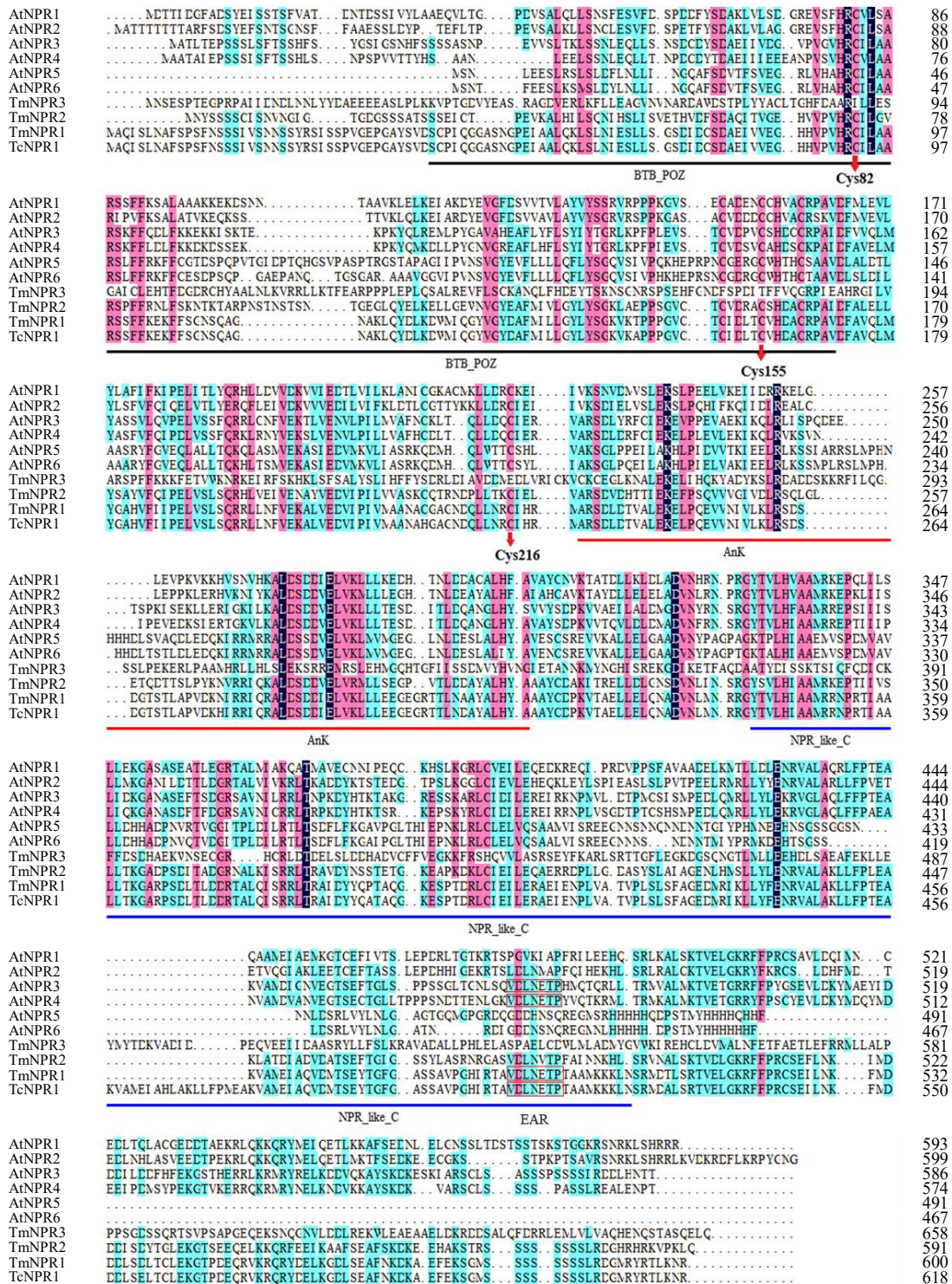
Fig. 2 Phylogenetic analysis of NPR1 proteins from different plant species

进一步对 3 个 TmNPR1 蛋白 (TmNPR1-3) 序列以及 6 个拟南芥 NPR1 蛋白序列 (AtNPR1-6)、1 个中国红豆杉 NPR1 蛋白^[17] (TcNPR1) 进行多序列对比分析, 结果如图 3 所示, 所有序列均包含 BTB_POZ 结构域和锚蛋白重复结构域 AnK, 这 2 个结构域在红豆杉和拟南芥中较为保守, 但 TmNPR3 的 BTB_POZ 结构域和 AnK 保守域位置与其他序列相比有较大差异 (图 1); 除 AtNPR5/6 和 TmNPR3 外, 其余 NPR1 蛋白序列均包含 NPR_like_C 区域。此外, 在寡聚物-单体相互转变过程中发挥重要作用的 3 个半胱氨酸残基 (Cys82、Cys155 和 Cys216) 在除 TmNPR3 外的 9 个 NPR1 蛋白中完全保守。同时,

TmNPR1、TcNPR1 和 AtNPR3/4 还具有 EAR 基序 (VDLNETP), 该基序在转录抑制方面发挥着重要的作用。

3.3 TmNPR1 家族蛋白保守基序分析

利用 MEME 在线网站对 3 个 TmNPR1 蛋白以及拟南芥、中国红豆杉的 NPR1 蛋白进行保守基序分析, 结果如图 4 所示。所有 NPR1 蛋白均含有 motif1、3、5, 但 TmNPR3 只含有这 3 种 motif, 而且 motif1、3 在 TmNPR3 蛋白上的位置也与其他 NPR1 蛋白存在较大差异。此外, 除 AtNPR5、6 与 TmNPR3 外, 剩余 7 个 NPR1 蛋白均含有 motif1~10, AtNPR5、6 缺少 motif6、7、9、10。同时, 从图 4 中还发现 TmNPR1 与 TcNPR1、AtNPR1



图中黑色下划线代表 BTB_POZ 保守结构域；红色下划线代表锚蛋白重复结构域 AnK；蓝色下划线代表 NPR_Like_C 结构域；红色箭头分别指出的是 NPR1 氨基酸序列 Cys82、Cys155 和 Cys216 位点；红色方框为 EAR 基序。

the black underline in the figure represents the BTB_POZ conservative domains; the red underline represents the ankyrin repeat domain AnK; the blue underline represents the NPR_Like_C domain; the red arrows point out the Cys82, Cys155 and Cys216 sites of the NPR1 amino acid sequence, respectively; the red box represents the EAR motif.

图 3 曼地亚红豆杉及拟南芥 NPR1 蛋白多序列比对

Fig. 3 Multiple sequence alignment of NPR1 proteins of *Taxus × media* and *Arabidopsis thaliana*

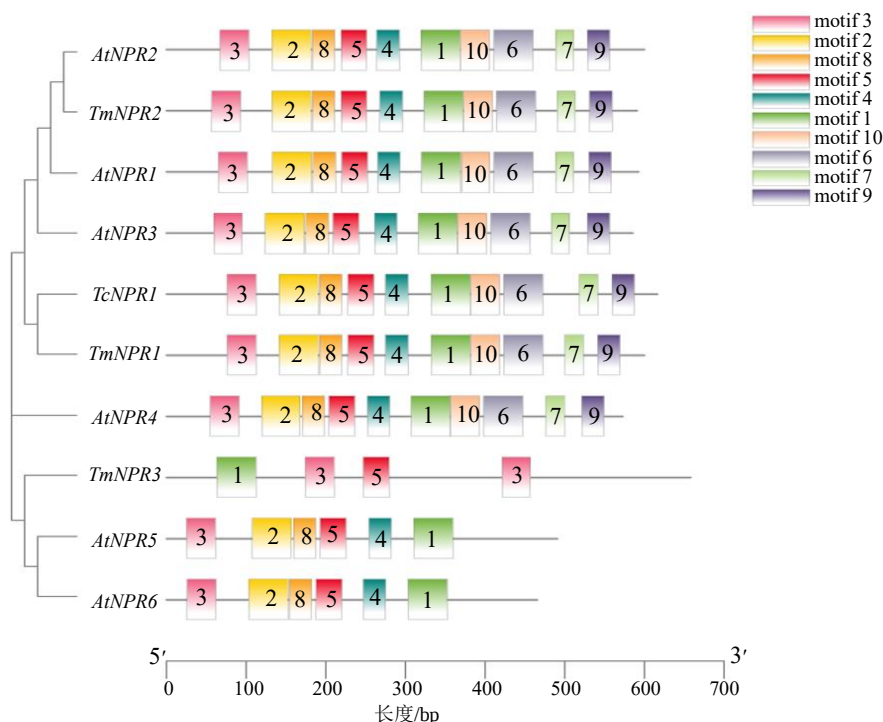


图 4 红豆杉及拟南芥 NPR1 蛋白保守基序分析

Fig. 4 Conservative motif analysis of NPR1 proteins of *T. wallichiana* var. *chinensis* and *A. thaliana*

与 *TmNPR2* 具有极高的相似性，除去 motif3、7、9 在位置上有所偏移，其余 motif 类型、数量以及位置几乎没有差别，*TmNPR2* 与 *TmNPR1*、*TcNPR1* 相比，也只是 motif 位置有所不同，可见，在不同物种中 NPR1 蛋白具有较高的保守性，但也存在 motif 类型、数量以及位置等差异。

3.4 *TmNPR1s* 基因不同组织表达模式分析

为进一步探讨 3 个 *TmNPR1* 基因的表达特性，本研究同时利用转录组数据对红豆杉 3 个组织(根、茎、叶)中 *TmNPR1*~*TmNPR3* 的表达模式进行分析。结果发现 3 个基因具有组织表达特异性(图 5)。在根中，*TmNPR1* 的表达量最高；在茎中，*TmNPR1* 表达量略高于其他 2 个基因，但是明显低于该基因在根和叶中表达量；在针叶中，*TmNPR1* 和 *TmNPR2* 表达量最高且两者非常相近，*TmNPR3* 在针叶中表达量虽不及前 2 个基因，但是比其在根和茎中的表达量相对较高。

3.5 *TmNPR1s* 基因在低温胁迫表达分析

本研究对低温处理下红豆杉植株中 *TmNPR1*-3 的表达水平也进行了检测。结果如图 6 所示，3 个基因在正常温度下表达水平较为接近，但是在低温诱导(LT)后，*TmNPR1* 基因的表达与对照(NT)相比显著提升，而 *TmNPR2* 和 *TmNPR3* 基因在低温

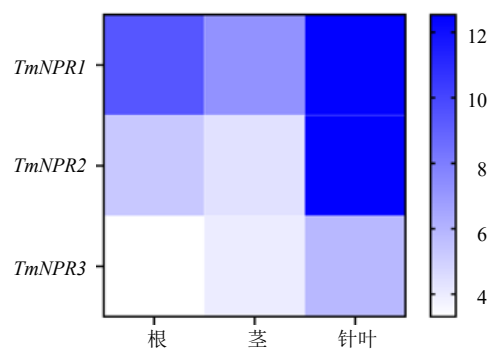


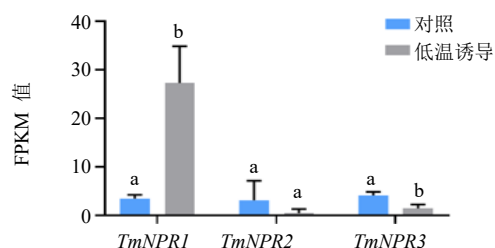
图 5 *TmNPR1s* 基因在曼地亚红豆杉不同组织的表达模式

Fig. 5 Expression pattern of *TmNPR1s* genes in different tissues of *Taxus × media*

处理后的表达发生了降低，且远低于 *TmNPR1* 的表达水平。

3.6 *TmNPR1s* 基因在 COR 和 MeJA 处理下表达分析

如图 7 所示，经过 COR 处理后，*TmNPR1* 表达量明显高于 *TmNPR2* 和 *TmNPR3*，并且呈现随着处理时间的增加而升高进而再降低的趋势，在处理 4 h 时达到最大值，在处理 4 d 时表达量达到最低值，处理 14 d 时表达量基本同对照持平。*TmNPR2* 和 *TmNPR3* 2 个基因在 COR 处理后表达量变化幅度较小，这表



不同字母之间表示处理间存在显著性差异 ($P < 0.05$), 下同。
different letter indicates significant between different treatments ($P < 0.05$), same as below Figs.

图 6 *TmNPR1s* 基因冷胁迫下的表达模式

Fig. 6 Expression pattern of *TmNPR1s* genes under cold stress

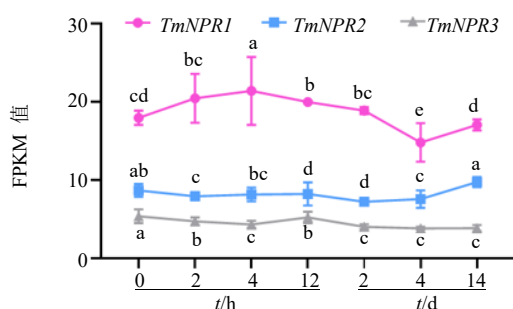


图 7 *TmNPR1s* 基因在 COR 处理下的表达模式

Fig. 7 Expression pattern of *TmNPR1s* genes under COR processing

明 *TmNPR1* 对 COR 的处理响应更为积极。

本研究还对 MeJA 处理下曼地亚红豆杉细胞系中 *TmNPR1s* 基因的表达水平进行了分析。结果如图 8 所示, 整体来看与 COR 处理下结果相似, 三者中, *TmNPR1* 基因表达水平最高, *TmNPR2* 和 *TmNPR3* 表达量较低, 且 2 个基因在处理后的各个时间点表达量并没有显著变化。与 COR 处理不同的是, 在 MeJA 处理后, *TmNPR1* 基因在处理 0~24 h

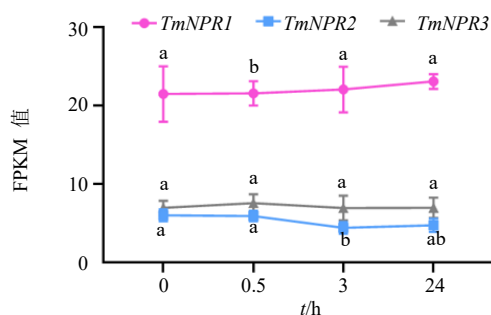


图 8 *TmNPR1s* 基因在 MeJA 处理下的表达模式

Fig. 8 Expression pattern of *TmNPR1s* genes under MeJA processing

呈现逐渐升高趋势, 并在 24 h 表达量最高。

4 讨论

水杨酸是植物抗病反应中激活植物防御保护机制的信号分子^[22], 而 NPR1 是水杨酸信号通路的重要调控因子, 在植物中常常以家族形式存在, 该基因家族在植物的抗病以及逆境胁迫响应等方面起着重要作用。本研究从曼地亚红豆杉全长转录组中筛选出 3 个与拟南芥 *AtNPR1* 同源性较高的 *NPR1* 基因, 并发现其有 2 个进化分枝, *TmNPR1/2* 与 *AtNPR3/4* 聚为一类, *TmNPR3* 与 *AtNPR5/6* 为一类, 该实验结果和鳄梨 *Persea americana* 的研究结果类似^[23], 可以看出该家族基因在植物的进化种具有高度保守性。

拟南芥中 NPR1 家族成员, 结构十分相似, 但是功能却相差甚远。尽管 *AtNPR1* 和 *AtNPR3/AtNPR4* 都是水杨酸受体, 但是它们在水杨酸诱导的防御基因表达的转录调控中起相反的作用。SA 通过抑制 *AtNPR4* 的转录抑制活性和促进 *AtNPR1* 的转录激活活性, 从而激活关键免疫调节因子的表达^[15]。本研究通过结构域分析, 发现 3 个 *TmNPR1* 蛋白的 N 端均含有 BTB_POZ 结构域和 AnK 保守域, 但是 *TmNPR3* 的 C 端缺少 NPR1_Like_C 结构域。Motif 分析结果也看出 *TmNPR3* 与 *TmNPR1* 和 *TmNPR2* 结构上存在显著差异。此外, motif 分析结果显示, *TmNPR1* 和 *TmNPR2* 与拟南芥的 *AtNPR1-3* 不论从 motif 数目还是位置上都是一致, 但进化树分析结果显示 *TmNPR1/2* 与 *AtNPR3* 聚在一起。Ding 等^[15]发现 *AtNPR3* 和 *AtNPR4* 蛋白含有 EAR 基序 (VDLNETP), 该基序在转录抑制方面发挥着重要的作用。多序列比对结果可以看出, *TmNPR1/2* 也具有 EAR 基序。由此推测 *TmNPR1/2* 更有可能与 *AtNPR3* 的功能相似。上述结果也表明 *TmNPR1* 家族既存在较高的保守性, 同时, 不同成员之间也很可能存在功能特异性。

NPR1 家族成员还参与器官发育进程, 研究发现拟南芥中的 *AtNPR5* 和 *AtNPR6* 基因, 具有调控叶片及花器官生长发育的功能^[21, 24]。在本研究组织表达量分析中, *TmNPR1* 家族基因成员 *TmNPR1/2* 在针叶和/或根中高表达, *TmNPR3* 在针叶中相对表达量较高。该结果与棉花、小麦 *NPR1* 基因表达结果相似, 具有典型的组织表达特异性^[25-26]。此外, 进化树分析结果显示 *TmNPR3* 与 *AtNPR5/6* 聚在一

起, 因此, *TmNPR3* 极可能在曼地亚红豆杉中调控针叶的形成, 同时 *TmNPR1/2* 也可能参与了根和针叶器官的发育。

NPR1 家族除了具有抗病以及影响器官发育的功能, 还被证实与植物非生物胁迫相关。如在低温胁迫下, *AtNPR1* 与热休克转录因子 1 (recombinant heat shock transcription factor 1, HSF1) 相互作用, 提高拟南芥的抗寒性^[27]。在高粱中, *SbNPR1* 基因在 PEG6000 和 NaCl 处理 0.5 h 时表达达到高峰^[28], 可见其可能也与干旱和高盐胁迫有关。因此, 本研究利用转录组数据对曼地亚红豆杉 *NPR1* 基因家族的表达模式进行分析, 冷胁迫、COR 以及 MeJA 处理的结果均显示 *TmNPR1* 表达量最高, *TmNPR2* 在 COR 处理 14 d 表达量较高。可见, 三者中, *TmNPR1* 响应激素信号以及低温诱导, 而 *TmNPR3* 极有可能不参与低温胁迫。此外, 本研究中来自曼地亚红豆杉的 *TmNPR1* 与前人报道的中国红豆杉的 *TcNPR1* 序列一致性达到 88%, 进化树分析也聚类在一起, 推测两者为不同种红豆杉中的直系同源基因。研究发现 *TcNPR1* 强烈响应干旱和高盐逆境胁迫^[17], 本研究中 *TmNPR1* 也能响应低温胁迫, 这表明红豆杉 *TmNPR1* 基因能响应多种非生物胁迫。

本研究从曼地亚红豆杉转录组中鉴定出 3 个 *NPR1* 基因成员, 发现 *TmNPR1* 家族基因编码的 3 个蛋白在 N 端均具有典型的 BTB_POZ 结构域和 AnK 保守域, *TmNPR1* 家族很有可能与其他植物的 *NPR1* 蛋白功能相似。蛋白功能结构域分析结果预示着 *TmNPR1* 家族成员之间可能存在功能的特异性。表达模式分析显示, 3 个 *TmNPR1* 基因在红豆杉不同组织中和不同处理下的表达量各不相同, *TmNPR1* 基因可能在红豆杉体内响应多种非生物胁迫, *TmNPR3* 基因则极可能参与红豆杉针叶的形成。该研究为进一步探索红豆杉 *NPR1* 基因功能提供理论支撑, 并为后续深入挖掘水杨酸调控红豆杉紫杉醇合成的分子机制提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 冯巧惠, 李琼, 贺延苓, 等. 紫杉醇对卵巢癌、乳腺癌、宫颈癌的抗癌功效及生物分子机制研究进展 [J]. 药物生物技术, 2020, 27(3): 278-280.
- [2] 陈成. 紫杉醇联合顺铂用于 58 例晚期食道癌化疗治疗的临床效果分析 [J]. 智慧健康, 2018, 4(27): 58-59.
- [3] 许晓东, 徐志英, 谢君. 紫杉醇脂质体治疗进展期胃癌

的疗效及安全性研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(5): 107-110.

- [4] Johnson C, Boden E, Arias J. Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(8): 1846-1858.
- [5] Sun Y L, Detchemendy T W, Pajerowska-Mukhtar K M, et al. NPR1 in JazzSet with pathogen effectors [J]. *Trends Plant Sci*, 2018, 23(6): 469-472.
- [6] Zhou J M, Trifa Y, Silva H, et al. NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the *PR-1* gene required for induction by salicylic acid [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2000, 13(2): 191-202.
- [7] 任陪娣, 谢碧玉, 陈翠, 等. 香蕉 NPR1 基因家族的鉴定及在枯萎病菌胁迫下表达分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2019, 20(6): 1621-1629.
- [8] 王攀, 蔡兆明, 廖静静, 等. 大白菜 NPR 家族基因鉴定及表达模式分析 [J]. 分子植物育种, 2021, 19(3): 746-758.
- [9] Mou Z L, Fan W H, Dong X N. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes [J]. *Cell*, 2003, 113(7): 935-944.
- [10] Tada Y, Spoel S H, Pajerowska-Mukhtar K, et al. Plant immunity requires conformational changes[corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins [J]. *Science*, 2008, 321(5891): 952-956.
- [11] Després C, DeLong C, Glaze S, et al. The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors [J]. *Plant Cell*, 2000, 12(2): 279-290.
- [12] Withers J, Dong X N. Posttranslational modifications of NPR1: A single protein playing multiple roles in plant immunity and physiology [J]. *PLoS Pathog*, 2016, 12(8): e1005707.
- [13] Liu G S, Holub E B, Alonso J M, et al. An *Arabidopsis* NPR1-like gene, NPR4, is required for disease resistance [J]. *Plant J*, 2005, 41(2): 304-318.
- [14] Fu Z Q, Yan S P, Saleh A, et al. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants [J]. *Nature*, 2012, 486(7402): 228-232.
- [15] Ding Y L, Sun T J, Ao K, et al. Opposite roles of salicylic acid receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in transcriptional regulation of plant immunity [J]. *Cell*, 2018, 173(6): 1454-1467.
- [16] Sarmadi M, Karimi N, Palazón J, et al. The effects of salicylic acid and glucose on biochemical traits and taxane production in a *Taxus baccata* callus culture [J].

- Plant Physiol Biochem*, 2018, 132: 271-280.
- [17] 谢莎, 许想平, 张蒙, 等. 中国红豆杉 *TcNPR1* 基因的克隆与功能研究 [J]. 植物科学学报, 2014, 32(4): 383-393.
- [18] Chen C J, Chen H, Zhang Y, *et al.* TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Mol Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [19] Bailey T L, Boden M, Buske F A, *et al.* MEME SUITE: Tools for motif discovery and searching [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(Web Server issue): W202-W208.
- [20] Yang Y F, Zhang K K, Yang L Y, *et al.* Identification and characterization of MYC transcription factors in *Taxus* sp [J]. *Gene*, 2018, 675: 1-8.
- [21] Hepworth S R, Zhang Y L, McKim S, *et al.* BLADE-ON-PETIOLE-dependent signaling controls leaf and floral patterning in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(5): 1434-1448.
- [22] 孟雪娇, 邸昆, 丁国华. 水杨酸在植物体内的生理作用研究进展 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(15): 207-214.
- [23] Backer R, Mahomed W, Reeksting B J, *et al.* Phylogenetic and expression analysis of the NPR1-like gene family from *Persea americana* (Mill.) [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 300.
- [24] Ha C M, Jun J H, Nam H G, *et al.* BLADE-ON-PETIOLE1 encodes a BTB/POZ domain protein required for leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(10): 1361-1370.
- [25] 张颖. 植物 NPR1 及 NPR1-like 基因的克隆与功能分析 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2008.
- [26] Liu X, Liu Z G, Niu X H, *et al.* Genome-wide identification and analysis of the *NPR1*-like gene family in bread wheat and its relatives [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(23): 5974.
- [27] Olate E, Jiménez-Gómez J M, Holuigue L, *et al.* NPR1 mediates a novel regulatory pathway in cold acclimation by interacting with HSFA1 factors [J]. *Nat Plants*, 2018, 4(10): 811-823.
- [28] 杜巧丽, 方远鹏, 蒋君梅, 等. 高粱病程相关基因非表达子 1(NPR1)基因家族鉴定及胁迫应答分析 [J]. 核农学报, 2021, 35(5): 1074-1083.

[责任编辑 时圣明]