广西植物 Guihaia Sept. 2025, 45(9): 1679-1690 http://www.guihaia-journal.com

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202403021

周平, 王洪飞, 韦云凤, 等, 2025. 马缨杜鹃 *RdNAC*72 基因的克隆、亚细胞定位及表达分析 [J]. 广西植物, 45(9): 1679-1690.

ZHOU P, WANG HF, WEI YF, et al., 2025. Cloning, subcellular localization, and expression analysis of the *RdNAC*72 gene in *Rhododendron delavayi* [J]. Guihaia, 45(9): 1679-1690.

马缨杜鹃 *RdNAC72* 基因的克隆、亚细胞定位及表达分析

周 平[1], 王洪飞[2], 韦云凤[3], 胡晓玉[1], 周玉梅[2], 王孝敬[1*]

(1. 贵州大学 生命科学学院/农业生物工程研究院, 山地植物资源保护与种质创新教育部重点实验室, 贵阳 550025; 2. 贵州大学 林学院, 贵阳 550025; 3. 贵州大学 茶学院, 贵阳 550025)

摘 要: NAC 转录因子在植物生长发育和逆境胁迫中具有重要作用。然而,马缨杜鹃 *RdNAC*72 基因是否参与调控高温胁迫响应的分子机制尚未见报道。为研究 *RdNAC*72 基因与高温胁迫的相关性及其潜在的调控机制,该研究对马缨杜鹃 *RdNAC*72 基因 CDS 序列进行引物设计,通过 PCR 技术克隆 *RdNAC*72 基因全长编码序列,通过生物信息学方法对基因的结构、功能和蛋白理化性质等进行分析和预测,并利用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)对该基因在高温胁迫下的时空表达特征及在脱落酸(ABA)胁迫下的表达模式进行分析。结果表明:(1)该基因全长 1 005 bp,编码 334 个氨基酸,相对分子量为 37.415 kDa。亚细胞定位显示 RdNAC72 蛋白定位于细胞核。(2)多序列比对及系统发育分析表明,RdNAC72 与圆叶杜鹃的 RwNAC72 亲缘关系最近,顺式作用元件分析发现该基因启动子区具有参与激素、光响应、厌氧响应、低温和热应激响应元件。(3)高温胁迫可诱导 *RdNAC*72 表达且具有时空表达特异性。高温胁迫处理 3 d 时叶片中的 *RdNAC*72 相对表达量显著上调了 31.16 倍,但根和茎中该基因没有显著变化;高温胁迫处理 6 d 时,根、茎、叶中的 *RdNAC*72 相对表达量均显著上调。其中,叶中的最高,显著上调了 61.56 倍;其次是茎中,显著上调了 50.14 倍;根中则显著上调了 17.42 倍。此外,还发现 ABA 可诱导 *RdNAC*72 表达。(4)RT-qPCR 结果显示,*RdHSP*17.2 与 *RdNAC*72 基因有协同的表达模式,并且 *RdHSP*17.2 启动子区含有多个 NAC 识别基序 CATGTG 和核心结合序列 CACG,推测 *RdHSP*17.2 可能是 RdNAC72 转录因子的下游靶基因。该研究丰富了逆境胁迫下 NAC 转录因子的生物学功能,并为今后该植物的遗传育种提供了依据。

关键词: 马缨杜鹃, *RdNAC*72, 基因克隆, 亚细胞定位, 表达分析, 高温胁迫

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2025)09-1679-12

Cloning, subcellular localization, and expression analysis of the *RdNAC72* gene in *Rhododendron delavayi*

ZHOU Ping[1], WANG Hongfei[2], WEI Yunfeng[3], HU Xiaoyu[1], ZHOU Yumei[2], WANG Xiaojing[1*]

收稿日期: 2024-06-24 **接受日期:** 2024-07-24

基金项目: 国家自然科学基金(32260097); 贵州省科技计划项目(黔科合中引地 [2023]009)。

第一作者: 周平(1989—),硕士研究生,研究方向为生物化学与分子生物学,(E-mail)1569616716@qq.com。

*通信作者: 王孝敬,博士,副教授,从事植物基因的起源及进化功能生物信息分析、分子技术在园艺作物上的研究和应用等方面的研究,(E-mail)xjwang8@gzu.edu.cn。

(1. *Key Laboratory of Plant Resource Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region* (*Ministry of Education*), *College of Life Sciences/Institute of Agro-Bioengineering*, *Guizhou University*, Guiyang 550025, China; 2. *College of Forestry*, *Guizhou University*, Guiyang 550025, China; 3. *College of Tea*, *Guizhou University*, Guiyang 550025, China)

Abstract: NAC transcription factors play important roles in plant growth, development, and stress responses. However, the molecular mechanism of the *RdNAC*72 gene in *Rhododendron delavayi* involved in response to stress remains unclear. To investigate the the roles of the *RdNAC*72 gene in high temperature stress response and its potential regulation mechenism, we first designed primers for cloning the full length coding sequence of the *RdNAC*72 gene using PCR technology. Subsequently, the gene's structure, function, and physicochemical properties were analyzed and predicted using bioinformatics method. The spatial and temporal expression characteristics of the *RdNAC*72 gene under heat stress and expression pattern under ABA stress were analyzed using quantitative real-time PCR(RT-qPCR). The results were as follows: (1) The *RdNAC*72 gene had a full length of 1 005 bp, encoding 334 amino acids with a relative molecular weight of 37.415 kDa. Subcellular localization analysis showed that the RdNAC72 protein was located in the nucleus. (2) Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis indicated that the RdNAC72 was most closely related to the RwNAC72 in *R. williamsianum*. Additionally, *cis*-acting element analysis revealed that the gene contained elements associated with hormone response, light response, anaerobic response, low temperature response, and heat stress response. (3) High temperature stress could induce the expression of *RdNAC*72, exhibiting temporal and spatial expression specificity. After three days of high temperature stress treatment, the relative expression level of the *RdNAC*72 gene in leaves was significantly upregulated by 31.16-fold; while no significant change was observed in roots and stems. After six days of high temperature stress treatment, the relative expression levels of *RdNAC*72 roots, stems, and leaves were all significantly upregulated, with the highest observed in leaves (61.56-fold), followed by stems (50.14-fold), and roots (17.42-fold). Additionally, it was found that ABA could induce the expression of *RdNAC*72. (4) RT-qPCR analysis demonstrated a coordinated expression pattern between *RdHSP*17.2 and *RdNAC*72 with *RdHSP*17.2 containing multiple NAC recognition motifs (CATGTG) and core binding sequences (CACG) in its promoter region, indicating that *RdNAC*72 may be a downstream target gene of RdNAC72. Therefore, the RdNAC72, a transcription factor, localized in the nucleus, responds significantly to high temperature and ABA, potentially activating the *RdHSP*17.2 expression to confer heat resistance. This study enriches the biological functions of NAC transcription factors, and provides the reference for the future genetic and breeding of this plant.

Key words: *Rhododendron delavayi*, *RdNAC*72, gene cloning, subcellular localization, expression analysis, high temperature stress

高温一直是植物生长的限制因素之一,随着高温、干旱等极端天气频繁出现,植物遭遇高温不利环境的概率逐渐增大。因此,适应高温已成为越来越多植物的选择。高温严重影响植物生长发育,甚至导致植物死亡,造成作物减产或绝收。高温胁迫会使植物形态发生变化、气孔关闭、光合作用下降、花朵败育,体内水分关系、细胞膜热稳定性、次生代谢、激素平衡,以及抗氧化系统等重要信号与代谢过程也会发生变化,严重干扰植物的正常生长发育和繁殖(Ul Hassan et al., 2022)。杜鹃花属 (*Rhododendron*)植物种类繁多,大小不一,形态各异,各种植物的花的大小、形状、颜色也不同,不仅有较高观赏价值,还具有很好的药用价值和食用价值。杜鹃花被认为是一种著名的园艺植物,很多杜鹃花在生态旅游中发挥作用,如照白杜鹃(*R. micranthum*)、兴安杜鹃(*R. dauricum*)、树形杜鹃(*R. arboreum*)等(Mao & Gogoi, 2012; Bhandari et al., 2019; Lu et al., 2021)。越来越多的杜鹃花被用于景观美化和城市绿化(Guo et al., 2022)。马缨杜鹃(*R. delavayi*),又名马缨花、密筒花、红山花、麻力光、苍山杜鹃,原产于中国,属于杜鹃花属常绿杜鹃亚属植物。该杜鹃生长海拔范围为 1 200~3 200 m,通常为常绿灌木至乔木,花色为鲜艳的国旗红,是杜鹃花中的佼佼者,在国际花卉市场上享有盛誉,被称为"花中之王"。马缨杜鹃不仅具有较高的观赏价值和药用价值,还具

有生态价值、食用价值和文化价值。但是，它对生态环境要求较严，温度是限制其向低海拔及高温地区引种的关键限制因素之一。

NAC 转录因子属于植物特有的转录因子之一，其家族成员众多。NAC 源于 3 个具有 NAC 结构域转录因子的首字母缩写，分别是 NAM（No Apical Meristem）、ATAF1/2（Activation Factor 1/2）和 CUC2（Cup-Shaped Cotyledon 2）（Jensen et al.，2008）。NAC 蛋白具有高度保守的 N 端结构域（NAM 结构域）和可变的 C 端转录激活结构域；其 N 端结构域进一步分为 A、B、C、D、E 共 5 个子结构域，涉及核定位、特异性识别和与下游靶基因 DNA 的结合（Ooka et al.，2003）。C 端是一个高度可变的转录调控区域，具有转录激活或抑制活性（Olsen et al.，2005）。NAC 转录因子不仅在植物生长、分化、开花等生长发育过程中发挥重要作用，在非生物胁迫响应中也具有重要角色（Shang et al.，2020）。研究发现，拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）（Guan et al.，2014）、水稻（*Oryza sativa*）（Wang et al.，2020）、棉花（*Gossypium hirsutum*）（Mehari et al.，2022）中的 NAC 转录因子参与调控植物应对高温、干旱及盐等胁迫的反应，并提高植物的抗逆性。此外，研究表明 *NAC*72 基因分别在月季（*Rosa chinensis*）盐胁迫及甘薯（*Ipomoea batatas*）抗旱中发挥调控作用（张欢等，2020；包颖，2022）。Zhao 等（2018）通过转录组分析发现，海南杜鹃（*Rhododendron hainanense*）中的 *NAC*72 基因被热诱导表达，说明该基因可能参与了海南杜鹃高温胁迫响应的调控。这暗示该基因在马缨杜鹃中也可能具有相同或相似的作用。目前，关于 NAC 转录因子响应高温胁迫的报道主要集中在拟南芥和水稻等模式植物上，而杜鹃中 *RdNAC*72 基因在调控高温胁迫中的功能和作用机制的研究较少。马缨杜鹃作为一种拥有巨大潜能的观赏乔木，对其进行高温胁迫研究有助于提升其观赏价值和经济价值。因此，研究马缨杜鹃高温胁迫响应的 NAC 转录因子可为其进一步的遗传育种提供一定的依据。

本研究基于前期对马缨杜鹃 *RdNAC*72 基因进行生物信息学分析，以两年生马缨杜鹃叶片为原材料，提取该物种基因组 DNA，并使用 PCR 克隆目的基因的全长编码区（coding sequence，CDS），再利用 RT-qPCR 实验对高温胁迫处理下马缨杜鹃根、茎、叶等组织中 *RdNAC*72 基因的表达模式进行分析，拟探讨如下问题：（1）通过马缨杜鹃 RdNAC72 蛋白的理化性质及其与其他物种 NAC 蛋白家族之间的亲缘进化关系，分析 *RdNAC*72 基因在高温胁迫响应中的潜在功能，并明确其在细胞中发挥作用的位置；（2）探究马缨杜鹃经高温或 ABA 等非生物胁迫处理后 *RdNAC*72 基因的时空表达特性；（3）分析马缨杜鹃 *RdNAC*72 基因在高温胁迫中可能具有的调控机制。本研究可为马缨杜鹃非生物胁迫的后续研究，如高温、干旱等提供参考，也为进一步研究该基因在高温胁迫中的生物学功能和潜在分子机制提供必要的依据。

1　材料与方法

1.1 材料

马缨杜鹃购自百里杜鹃风景名胜区万绿源种苗建设有限责任公司的两年生幼苗，正常生长在 23 ℃的温室中。高温胁迫处理的条件为白天高温 38 ℃ 12 h，光照强度 6 000 lx，夜间温度 30 ℃ 12 h，连续处理 6 d，分别于 0、3、6 d 时取根、茎、叶，并用液氮速冻 30 min 后置于−80 ℃冰箱备用。ABA 处理参考林先玉等（2023）的研究，具体为马缨杜鹃生长在条件为 23 ℃温室中，处理组用 100 mg·L^{-1}的 ABA 喷施叶片，每天 1 次，对照组用纯水进行同样的处理。在 6 d 取其叶片组织，快速浸入液氮中 30 min，之后放入超低温冰箱中保存。

1.2 *RdNAC*72 基因克隆

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 第一链合成　将高温胁迫处理的马缨杜鹃根、茎、叶等组织按北京华越洋生物科技有限公司的快速通用植物 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。测定浓度及凝胶电泳检验质量后，按南京诺维赞生物科技有限公司的 HiScriptIII RT SuperMix for qPCR 试剂盒反转录得到 cDNA。

1.2.2 *RdNAC*72 基因克隆和测序　以马缨杜鹃基因组中提取的 CDS 序列设计如下引物 *RdNAC*72-F/*RdNAC*72-R（表 1）。以马缨杜鹃叶片为材料提取总 RNA 并反转录后，使用翌圣生物科技（上海）股份有限公司的 2×HieffCanace® GoldPCRMasterMix 高保真酶预混液和 2×EasyTaq® PCRSuperMix（+dye）进行 PCR 实验。胶回收使用天根生化科技（北京）有限公司试剂盒，pCAMBIA1302 载体连接则用

表 1 *RdNAC*72 基因克隆及 PCR 引物

Table 1 Cloning of *RdNAC*72 gene and PCR primers

引物 Primer	引物序列（5′→3′） Primer sequence（5′→3′）	长度 Length（bp）
*RdNAC*72-F	CGGGGGACTCTTGACCATGGATGGGAGTACAGGAATCCGACC	43
*RdNAC*72-R	AAAGTTCTTCTCCTTTACTAGTCTGCCGAAACCCAAATCCTCC	43
*RdNAC*72-qF	AGAGTCGTTTCCCGAGATGAAC	22
*RdNAC*72-qR	CTCGACTCGCTGGTTCTTGA	20
*RdHSP*17.2-qF	GGAGGAGAAGAACGACAA	18
*RdHSP*17.2-qR	CCTCTTTAGGGACGGTAATA	20
18*sRNA*-qF	GGGGCATTCGTATTTCATAGTC	22
18*sRNA*-qR	CGGTATCTGATCGTCTTCGAG	21

Novoprotein 公司的 NovoRec® plusOnestepPCR-CloninGKit 试剂盒，之后将载体转化进入大肠杆菌（DH5α）。检测阳性后扩大培养，质粒小提试剂盒及酶切验证试剂盒来自天根生化科技（北京）有限公司，测序由陕西艾优稷生物科技有限公司完成。

1.3 生物信息学分析

从杜鹃 TEGR 数据库（http://www.tegr.com.cn）获取马缨杜鹃基因组数据及相应的注释文件，利用 TBtools 软件提取马缨杜鹃 *RdNAC*72 基因 CDS 序列及上游启动子序列。利用线上软件 Pfam（http://pfam.xfam.org）对 *RdNAC*72 基因的编码蛋白进行保守结构域分析。利用 Expasy ProtParam（http://web.expasy.org/protparam/）与 ScanProsite（http://web.expasy.org/protparam/）软件对 RdNAC72 蛋白质的理化性质进行预测与分析。利用 TMHMM（http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/）和 WoLFPSORT（https://www.genscript.com/wolf-psort.html）软件进一步预测 *RdNAC*72 基因编码蛋白的跨膜结构域和亚细胞定位。此外，用 SOPMA 和 SWISS-MODEL（https://swissmodel.expasy.org/interactive）在线软件预测蛋白质的二级结构和三级结构，并用 SnapGene 软件进行酶切位点分析。*RdNAC*72 基因及其同源基因的氨基酸进行多序列比对在 Multalin 软件（http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html）中完成。*RdNAC*72 基因上游启动子顺式作用元件分析采用在线软件 PlantCARE（http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/）完成。使用 MEGA11 软件中 Neighbor-joining 法构建系统进化树。利用在线工具 MEME（https://meme-suite.org/meme/tools/meme）进行 Motifs 分析，利用 primer 5.0 进行引物设计。通过对该基因的初步了解，推测该基因可能具有的功能及其在细胞中起作用的位置等。

1.4 亚细胞定位

利用 1.2 步骤中构建的 pCAMBIA1302 载体，转化到 GV3101 农杆菌，将检测成功的农杆菌菌液过夜扩摇，稀释菌液浓度至 OD_{600} 为 0.4 备用。为使烟草气孔打开，需在侵染前将其置于日光灯下 1~1.5 h，标记需要转染的区域后，注射器将稀释后的菌液注射到健康生长的烟草叶片背面，转染后的烟草放置在恒温器中，将叶片适当喷水，并覆盖上保鲜膜，暗培养一夜后，继续培养 2~3 d，切取侵染区域，撕表皮制片，用激光共聚焦显微镜（FV10-ASW，Olympus）观察 GFP 在烟草细胞中的分布情况。

1.5 *RdNAC*72 基因表达分析

马缨杜鹃高温胁迫处理后提取 RNA 并反转 cDNA 备用。分别设计 *RdNAC*72 和 *RdHSP*17.2 基因引物 *RdNAC*72-qF/*RdNAC*72-qR 和 *RdHSP*17.2-qF/*RdHSP*17.2-qR（表 1），用于 RT-qPCR 反应。相关基因相对表达变化情况采用德国 Analytik Jena 分析仪器股份公司荧光定量 PCR 仪检测。反应试剂 2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 购自南京诺维赞生物科技有限公司。RT-qPCR 反应体系：ddH_2O 3 μL、SYBR qPCR Master Mix5 μL、引物各 0.5 μL（10 μmol · L^{-1}）、cDNA1 μL。扩增程序设置如下：95 ℃预变性 30 s；95 ℃变性 10 s，60 ℃ 30 s，35 个循环。实验样品采用 3 个生物学

重复，内参基因为马缨杜鹃 18*sRNA*，相对表达量分析使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$。

1.6 数据统计分析

使用 SPSS 对相对表达数据进行差异显著性分析，使用 GraphPad 软件绘制图片，最后利用 Photoshop 处理图片。

2　结果与分析

2.1 马缨杜鹃 *RdNAC*72 基因 CDS 序列克隆及基因位置和结构分析

杜鹃 RPGD 数据库（http://bioinfor.kib.ac.cn/RPGD/index.html）搜索发现，*RdNAC*72 基因位于马缨杜鹃基因组第 6 号染色体上，由 3 个外显子组成，基因长度为 1 005 bp（图 1：A），根据该目的基因引物进行 PCR 扩增后测序，发现克隆基因与基因组 CDS 序列仅在第 597 处有 1 个碱基差异，即 G 被 A 取代，该基因编码 334 个氨基酸。琼脂糖凝胶电泳结果与马缨杜鹃基因组中的数据相符。因此，扩增出来 PCR 产物将用于后续亚细胞定位分析，条带大小如图 1：B 所示。

2.2 马缨杜鹃 *RdNAC*72 基因的生物信息学分析

2.2.1 马缨杜鹃 *RdNAC*72 基因编码蛋白理化性质分析　利用 Pfam 数据库对马缨杜鹃 *RdNAC*72 基因的编码蛋白进行保守结构域分析，发现其 N 端含有 1 个高度保守结构域 NAM，属于 NAC 转录因子家族（图 2：A）。利用 Expasy ProtParam 与 ScanProsite 网站对 RdNAC72 蛋白的理化性质分析，结果显示该蛋白分子量为 37.415 kDa，编码 334 个氨基酸，理论等电点为 9.22，分子式为 $C_{1666}H_{2555}N_{467}O_{502}S_8$。脂溶系数为 64.49，不稳定指数为 38.88，属于稳定蛋白。亲水性指数为 -0.643，表明其为亲水性蛋白。使用 TMHMM 程序预测上述基因的蛋白质跨膜结构域和亚细胞定位，结果表明，RdNAC72 没有跨膜结构域，也没有信号肽。亚细胞定位预测表明 RdNAC72 可能定位于细胞核。采用 SOPMA 和 SWISS-MODEL 在线软件对蛋白质的二级结构和三级结构预测发现，该基因编码蛋白的主要二级结构为无规则卷曲（random coil）和 α-螺旋（α-helix）。其中，无规则卷曲最多，为 82.34%；α-螺旋最少，为 7.19%。三级结构预测 RdNAC72 蛋白是由单体相互作用形成的同源二聚体（图 2：B、C）。

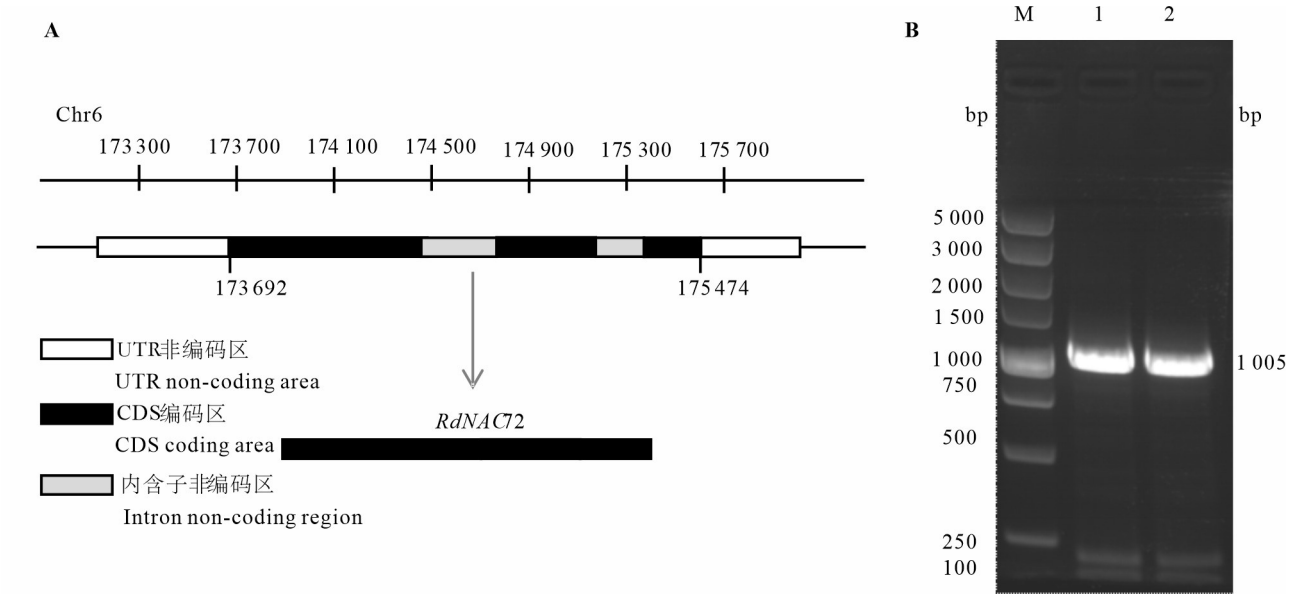
2.2.2 马缨杜鹃 *RdNAC*72 基因启动子顺式作用元件分析　使用 PlantCARE 在线软件对 *RdNAC*72 基因的启动子进行顺式作用元件分析发现，*RdNAC*72 基因上游启动子的顺式作用元件包括脱落酸反应元件（ABRE）、厌氧感应顺式作用元件（ARE）、光响应元件（G-box）、低温胁迫响应元件（LTR）、热应激核心元件（STRE）和水杨酸反应元件（TCA-element）等（图 3）。由此推测，马缨杜鹃 *RdNAC*72 基因在高温胁迫响应、光响应、低温胁迫响应等反应中起调控作用。这表明 *RdNAC*72 基因可能参与了调控植物多种非生物胁迫响应。

2.2.3 马缨杜鹃 RdNAC72 多重序列比对和同源性分析　将 RdNAC72 氨基酸序列与圆叶杜鹃（*Rhododendron williamsianum*）、杜鹃（*R. simsii*）、欧洲越橘（*Vaccinium padifolium*）、山梨猕猴桃（*Actinidia rufa*）、茶树（*Camellia sinensis*）、蓝果树（*Nyssa sinensis*）、甜橙（*Citrus sinensis*）、川桑（*Morus notabilis*）、胡桃（*Juglans regia*）、月季（*Rosa chinensis*）、苹果（*Malus pumila*）、白梨（*Pyrus bretschneideri*）、湖北海棠（*Malus hupehensis*）、梅（*Prunus mume*）、欧洲甜樱桃（*P. avium*）、桃（*P. persica*）、拟南芥等 17 种常见植物 NAC 转录因子进行同源性分析。分析结果发现，RdNAC72 蛋白与圆叶杜鹃 RwNAC72 的同源性最高，达 97.9%；与桃树 PpNAC056 同源性最低，为 48.4%（图 4）。使用 MEGA11.0 进行系统发育分析显示，RdNAC72 蛋白与圆叶杜鹃 RwNAC72 和杜鹃 RsNAC72 亲缘关系最近，而与桃树 PpNAC056 亲缘关系最远，这与氨基酸同源多序列比对结果一致（图 5）。

2.2.4 RdNAC72 同源氨基酸保守基序分析　通过 MEME 软件鉴定来自 15 个物种的 20 条 NAC72 的同源蛋白保守基序（motif）15 个。结果显示，RdNAC72 与模式植物拟南芥中的同源蛋白 AtNAC72 和 AtNAC19 差别较大，与桃树中的 PpNAC056 差别最大（图 6）。此外，RdNAC72 蛋白与其他同源蛋白有 5 个相同的保守基序（Motif 1、Motif 2、Motif 3、Motif 4 和 Motif 11），并且位置和分布相同或相似。由此可知，NAC 家族基因在非生物胁迫中发挥着相同或相似的功能。

2.3 马缨杜鹃 *RdNAC*72 基因的亚细胞定位

利用 pCambia1302-GFP-*RdNAC*72 载体，转染农杆菌后，将其注入烟草原生质体中，瞬时表达研

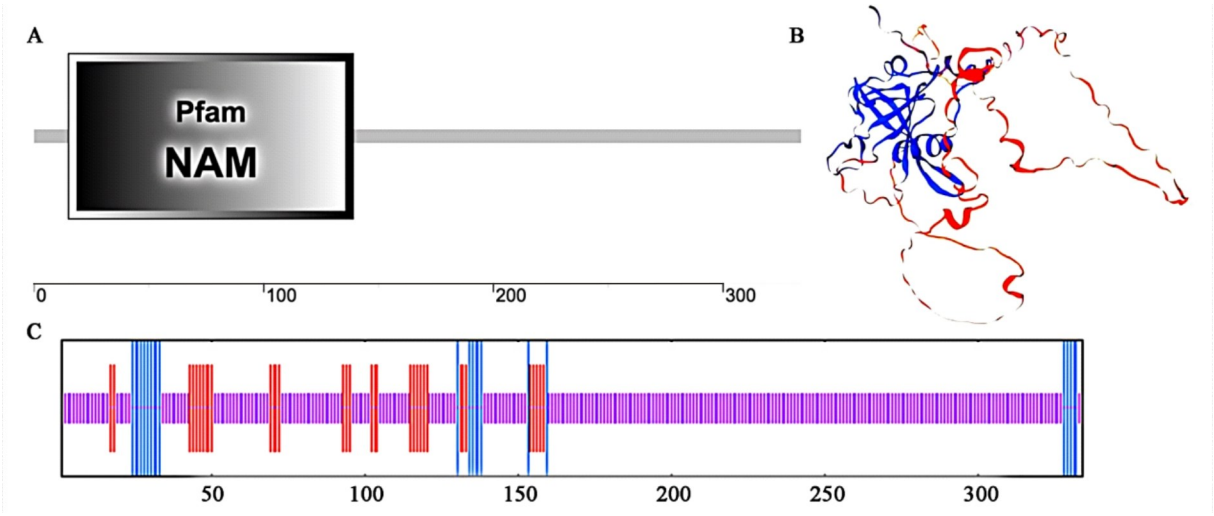


A. *RdNAC72* 基因结构及在染色体上的位置；**B**. *RdNAC72* 凝胶电泳检测图；**M**. DL5000 标记；**1**、**2**. *RdNAC72* 基因产物。

A. Structure and position of *RdNAC72* gene on chromosomes; **B**. *RdNAC72* gel electrophoresis detection diagram; **M**. DL5000 marker; **1**, **2**. *RdNAC72* gene product.

图 1 *RdNAC72* 基因位置、结构及其扩增产物

Fig. 1 Location, structure, and amplification products of *RdNAC72* gene

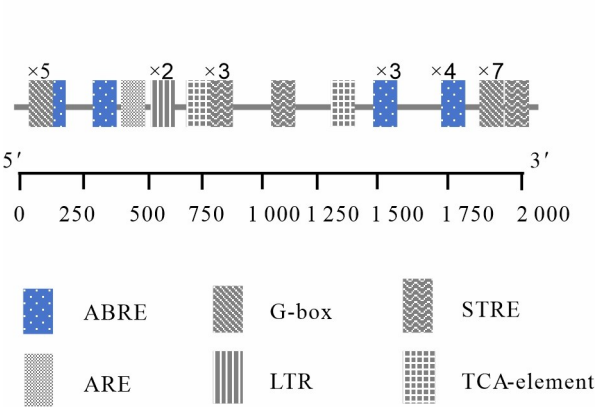


A. 保守结构域预测；**B**. RdNAC72 蛋白三级结构预测；**C**. 二级结构组成。紫色表示无规则卷曲；浅蓝色表示 α-螺旋；浅红色表示延伸链。

A. Conservative structural domain prediction; **B**. Prediction of the tertiary structure of RdNAC72 protein; **C**. Secondary structural composition. Purple indicates random coil; light blue indicates α-helix; light red indicates extended strand.

图 2 RdNAC72 蛋白结构预测

Fig. 2 Prediction of RdNAC72 protein structure



ABRE. 脱落酸反应顺式作用元件；**ARE**. 厌氧感应顺式作用元件；**G-box**. 光响应元件；**LTR**. 低温胁迫响应元件；**STRE**. 热应激相关核心元件；**TCA-element**. 水杨酸反应顺式作用元件。

ABRE. Abscisic acid reaction *cis*-acting element; **ARE**. Anaerobic induction *cis*-acting element; **G-box**. Photoresponsive element; **LTR**. Low temperature stress response element; **STRE**. Core elements related to heat stress; **TCA-element**. Salicylic acid reaction *cis*-acting element.

图 3　*RdNAC72* 基因启动子顺式作用元件分析

Fig. 3　*Cis*-acting element analysis of *RdNAC72* gene promoter

究表明，35S-GFP 的信号在整个细胞中被检测到，35S-RdNAC72-GFP 融合蛋白信号在细胞核中被检测到，其在细胞核中与核定位标记共表达，说明 RdNAC72 蛋白定位于细胞核中（图 7）。

2.4 马缨杜鹃 *RdNAC72* 基因表达特性分析

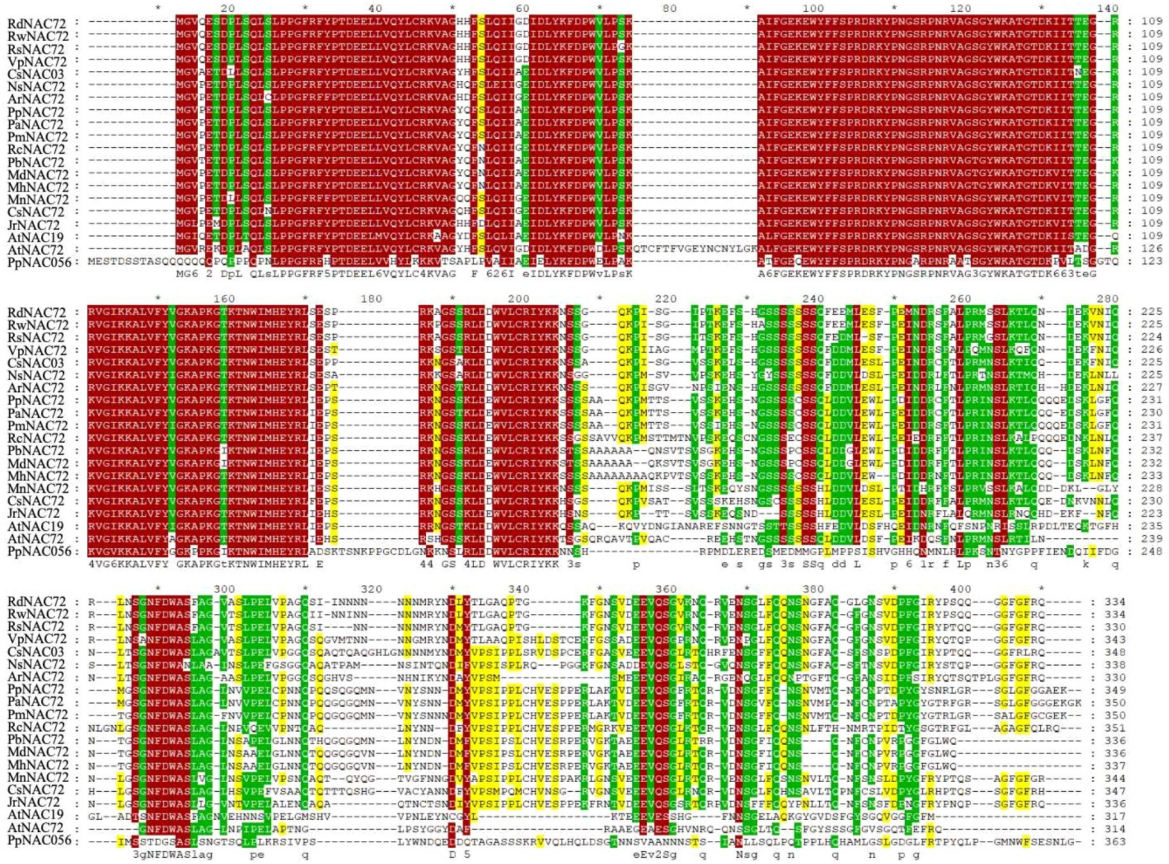
为进一步分析马缨杜鹃 *RdNAC72* 基因时空的表达特性，对两年生马缨杜鹃进行了高温胁迫处理，以 0 d 为对照组，分别收集高温胁迫处理 0、3、6 d 的根、茎、叶等组织进行 RT-qPCR 试验，结果显示，高温胁迫处理 3 d 时叶片中的 *RdNAC72* 相对表达量显著上调了 31.16 倍，但茎和根中该基因没有显著变化，这可能是因为高温首先影响植物叶片的发育（图 8：A-C）。高温胁迫处理 6 d 时，根、茎、叶中的 *RdNAC72* 相对表达量均显著上调。其中，叶中的最高，显著上调了 61.56 倍；其次是茎中，显著上调了 50.14 倍；根中则显著上调了 17.42 倍（图 8：A-C）。这说明 *RdNAC72* 基因能被高温显著诱导表达，其可能参与了马缨杜鹃高温胁迫响应调控。此外，由于此前文献报道，*NAC72* 基因参与了 ABA 依赖的途径，进而调控植物非生物胁迫反应，并且 *NAC72* 基因可被 ABA 诱导表达（Aida et al.，1997），因此本研究用 100 mg · L^{-1} 的 ABA 胁迫处理马缨杜鹃幼苗，结果显示，ABA 胁迫处理 6 d 后，与对照相比，*RdNAC72* 相对表达量被显著上调了 4.36 倍（图 8：D），与此前文献报道一致。Tang 等（2008）研究发现，高温能显著增加水稻中 ABA 含量，推测高温胁迫也能增加马缨杜鹃 ABA 含量，进而诱导 *RdNAC72* 表达增强，而 *RdNAC72* 作为转录因子继续调控下游基因的表达，以响应高温胁迫。

2.5 *RdNAC72* 基因响应高温胁迫的作用机制分析

Aida 等（1997）报道拟南芥 *NAC* 家族基因可被 ABA 诱导表达，本研究证明 *RdNAC72* 基因也可被 ABA 诱导表达（图 8：D）。此外，Meng 等（2022）研究表明 NAC 转录因子可直接作用于热激蛋白（HSP）基因启动子，增强热激蛋白表达，从而调控植物高温胁迫反应。在分析了大量热激蛋白基因启动子后，本研究发现 *RdHSP*17.2（gene id Rhdel01G0311000）启动子区含有多个 NAC 识别基序 CATGTG 和核心结合序列 CACG。RT-qPCR 结果也显示高温胁迫处理后 *RdHSP*17.2 相对表达量显著上调，具有与 *RdNAC72* 基因相协同的表达模式（图 8：E），这表明 *RdHSP*17.2 可能为 RdNAC72 的下游靶基因。因此，推测 *RdNAC72* 基因响应高温胁迫的作用机制为高温胁迫后 ABA 合成增加，诱导了 *RdNAC72* 基因表达，该基因进一步激活 *RdHSP*17.2 等下游基因表达和翻译，从而调控马缨杜鹃高温胁迫反应（图 9）。

3　讨论与结论

非生物胁迫会影响马缨杜鹃发芽、生长、开花等生命进程，其中高温是限制马缨杜鹃生长的关键限制因子。研究发现，ERF、bHLH、MYB、WRKY 和 MYB 等多种转录因子参与了杜鹃抵御高温胁迫的调控（Zhao et al.，2018；Xu et al.，2022）。NAC 作为转录激活因子也参与了植物各阶段生长发育和非生物胁迫反应（Tran et al.，2004）。本研究通过生物信息学分析和亚细胞定位说明 *RdNAC72* 基因作为转录因子可能参与马缨杜鹃的多种非生物胁迫反应。目前，有研究发现 *NAC72* 在提高棉花和辣椒（*Capsicum annuum*）的耐旱性中发挥重要作用（Borras et al.，2021；Mehari et al.，



PpNAC72. 桃树(XP_007211475.1)；**PaNAC72**. 欧洲甜樱桃(XP_021809122.1)；**PmNAC72**. 梅(XP_008226676.1)；**PbNAC72**. 白梨(XP_009378492.1)；**MdNAC72**. 苹果(ADL36797.1)；**MhNAC72**. 湖北海棠(AGS08773.1)；**RsNAC72**. 杜鹃(KAF7141918)；**MnNAC72**. 川桑(XP_010089503.1)；**RwNAC72**. 圆叶杜鹃(KAE9458132.1)；**CsNAC72**. 甜橙(XP_006464708.1)；**VpNAC72**. 欧洲越橘(AYC35383.1)；**RdNAC72**. 马缨杜鹃(Rhdel06G0290200.1)；**CsNAC03**. 茶树(XP_028078560.1)；**RcNAC72**. 月季(AKC88481.1)；**JrNAC72**. 胡桃(XP_018851445.1)；**ArNAC72**. 山梨猕猴桃(GFS39141.1)；**NsNAC72**. 蓝果树(KAA8523858.1)；**AtNAC72**. 拟南芥(NP_001078452.1)；**AtNAC19**. 拟南芥(NP_175697.1)；**PpNAC056**. 桃(XP_020418173.1)。深棕色表示序列同一性≥90%；深绿色表示 70%≤序列同一性<90%；明黄色表示 50%≤序列同一性<70%。

PpNAC72. *Prunus persica*(XP_007211475.1)；**PaNAC72**. *P. avium*(XP_021809122.1)；**PmNAC72**. *P. mume*(XP_008226676.1)；**PbNAC72**. *Pyrus bretschneideri*(XP_009378492.1)；**MdNAC72**. *Malus pumila*(ADL36797.1)；**MhNAC72**. *M. hupehensis*(AGS08773.1)；**RsNAC72**. *Rhododendron simsii*(KAF7141918)；**MnNAC72**. *Morus notabilis*(XP_010089503.1)；**RwNAC72**. *Rhododendron williamsianum*(KAE9458132.1)；**CsNAC72**. *Citrus sinensis*(XP_006464708.1)；**VpNAC72**. *Vaccinium padifolium*(AYC35383.1)；**RdNAC72**. *Rhododendron delavayi*(Rhdel06G0290200.1)；**CsNAC03**. *Camellia sinensis*(XP_028078560.1)；**RcNAC72**. *Rosa chinensis*(AKC88481.1)；**JrNAC72**. *Juglans regia*(XP_018851445.1)；**ArNAC72**. *Actinidia rufa*(GFS39141.1)；**NsNAC72**. *Nyssa sinensis*(KAA8523858.1)；**AtNAC72**. *Arabidopsis thaliana*(NP_001078452.1)；**AtNAC19**. *A. thaliana*(NP_175697.1)；**PpNAC056**. *P. persica*(XP_020418173.1). Dark brown indicates sequence identity ≥ 90%; dark green indicates 70% ≤ sequence identity < 90%; bright yellow indicates 50% ≤ sequence identity<70%.

图 4 RdNAC72 蛋白同源多序列比对分析

Fig. 4 Analysis of homologous multiple sequence alignment of RdNAC72 protein

2022)。但是,*RdNAC*72 基因在马缨杜鹃中参与逆境胁迫功能和机制的研究尚未见报道。Zhao 等(2018)研究揭示 *NAC*72 基因可能在海南杜鹃高温胁迫响应中发挥作用,与本研究在马缨杜鹃中的实验结果与分析一致,说明该基因也可能在马缨杜鹃的高温胁迫中具有相同功能。*RdNAC*72 基因含有 3 个外显子、2 个内含子,与拟南芥、水稻等同源基因一致且都含有相同的 N 端保守结构域

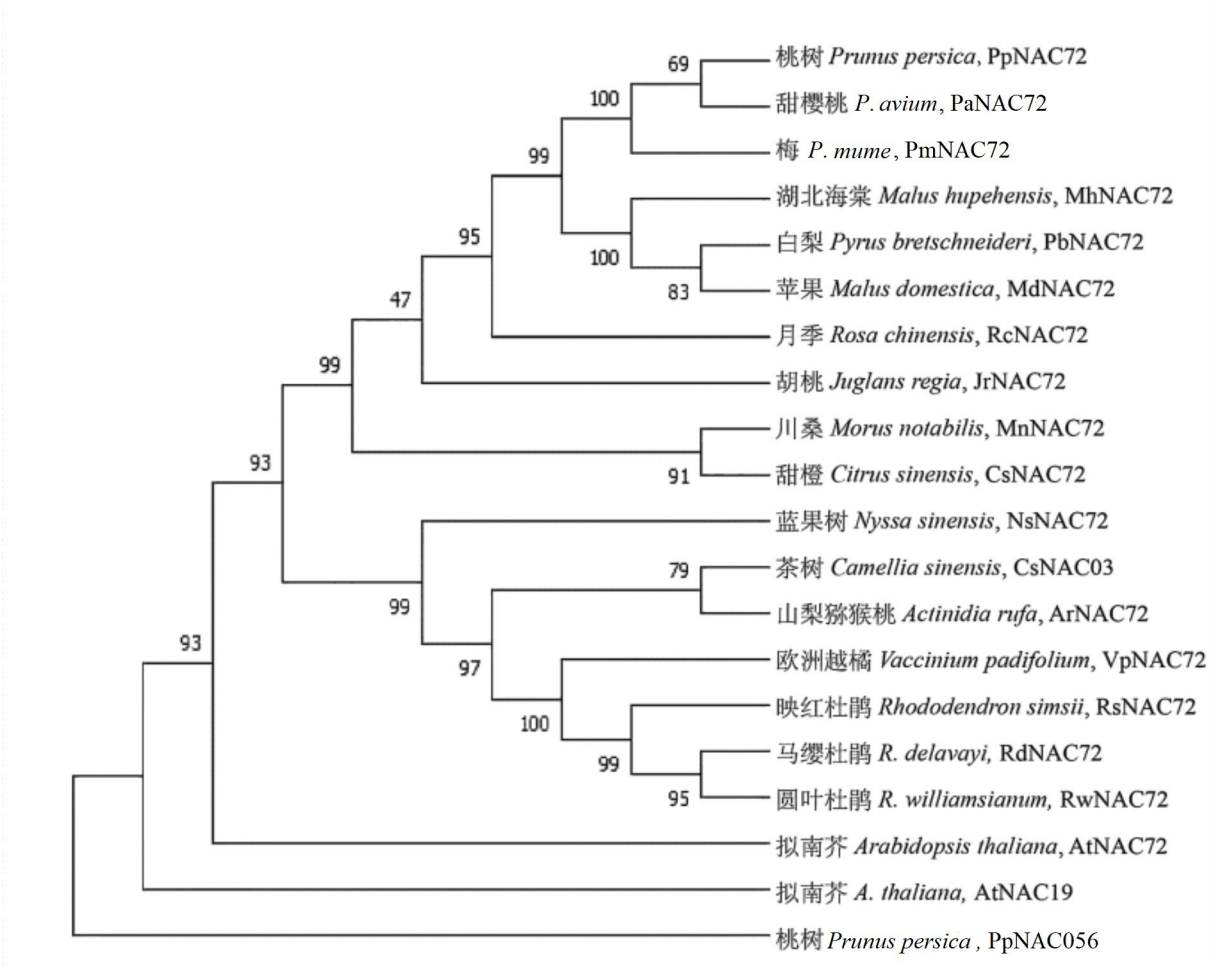


图 5　马缨杜鹃 RdNAC72 与其他物种 NAC 同源蛋白的系统发育树

Fig. 5　Phylogenetic tree of RdNAC72 and NAC homologous proteins in *Rhododendron delavayi* and other species

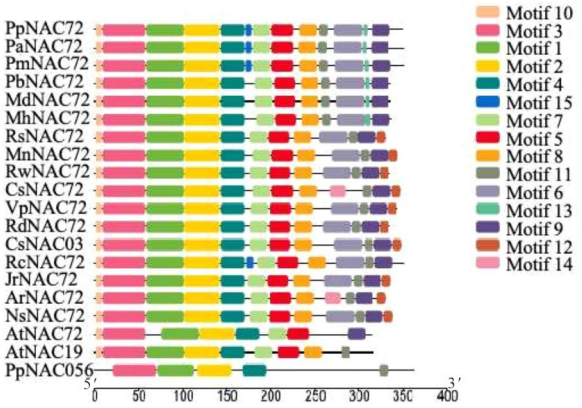
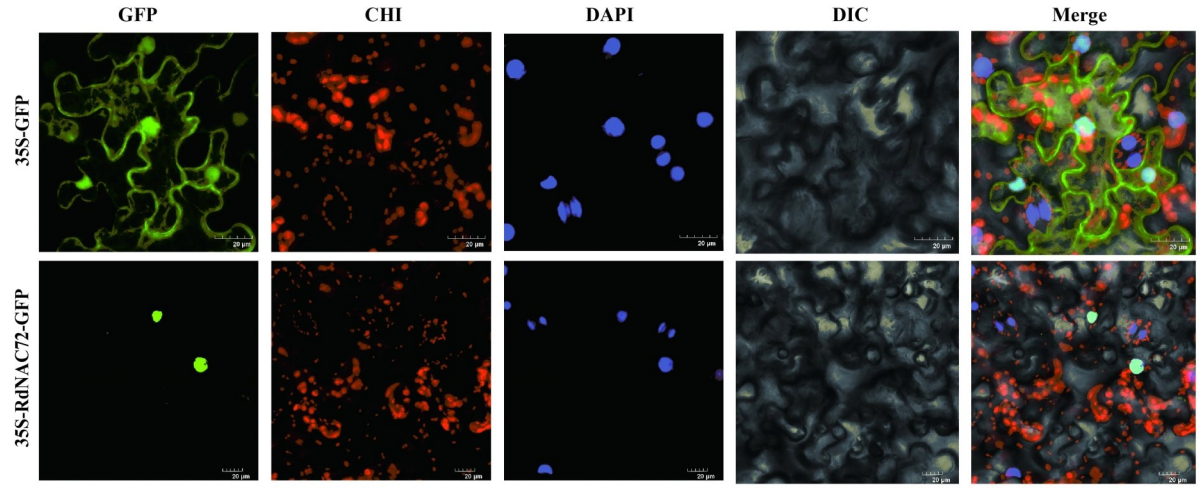


图 6　马缨杜鹃 RdNAC72 蛋白保守基序分析

Fig. 6　Conserved motif analysis of RdNAC72 protein in *Rhododendron delavayi*

NAM，保守基序分析该基因与桃树中的 *PpNAC*56 基因及拟南芥中的 *AtNAC*19 等同源基因含有多个相同的保守基序，而这两个基因已经被证明参与植物高温胁迫响应，这进一步表明 *RdNAC*72 基因可能在马缨杜鹃热胁迫中发挥调控作用。多序列比对及系统发育分析表明，RdNAC72 与圆叶杜鹃的 RwNAC72 亲缘关系最近，其次是 RsNAC72，说明它们有相同的功能，该结果将为其他杜鹃属植物在逆境胁迫中的研究提供参考。此外，本研究发现 *RdNAC*72 基因不仅能被高温诱导显著表达，还可以被 ABA 显著诱导，这与之前相关同源基因的报道一致（Aida et al., 1997）。RT-qPCR 的结果显示，*RdNAC*72 基因在不同组织中的表达具有差异性，高温胁迫后叶中的 *RdNAC*72 表达最高，说明叶对高温最为敏感，其次是茎和根。这表明该基

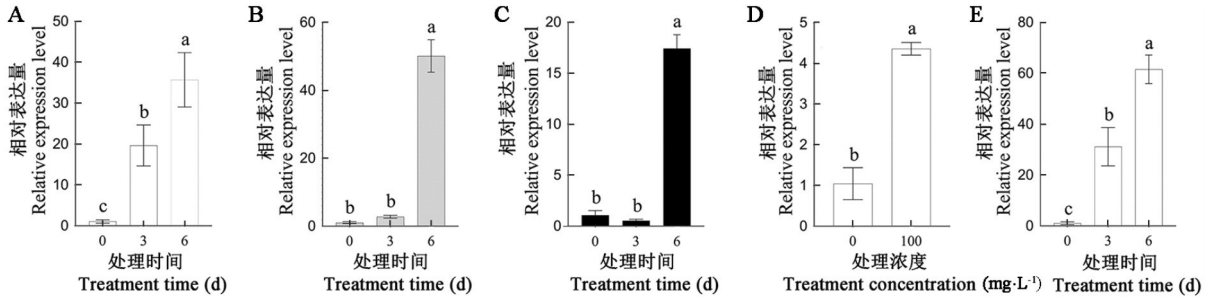


GFP 代表绿色荧光场,CHI 代表叶绿体自发荧光场,DAPI 代表 DAPI 场(细胞核染色),DIC 代表明场,Merge 代表叠加场。GFP 场:488 nm; DAPI 场:358 nm; CHI 场:488 nm。标尺=20 μm。

GFP represents green fluorescence field, CHI represents chloroplast spontaneous fluorescence field, DAPI represents DAPI field (nuclear staining), DIC represents bright field, and Merge represents superposition field. GFP field: 488 nm; DAPI field: 358 nm; CHI field: 488 nm. Bars=20 μm.

图 7 RdNAC72 亚细胞定位

Fig. 7 Subcellular localization of RdNAC72



A. 高温胁迫处理后 *RdNAC72* 基因在叶片组织中的表达分析; **B**. 高温胁迫处理后 *RdNAC72* 基因在茎组织中的表达分析; **C**. 高温胁迫处理后 *RdNAC72* 基因在根组织中的表达分析; **D**. 100 mg·L^{-1} ABA 诱导 *RdNAC72* 基因的表达分析; **E**. 高温胁迫处理后 *RdHSP17.2* 基因的表达分析。高温胁迫的温度为 38 ℃。不同字母表示显著性差异($P<0.05$)。

A. Expression analysis of *RdNAC72* gene in leaf tissue after high temperature stress treatment; **B**. Expression analysis of *RdNAC72* gene in stem tissue after high temperature stress treatment; **C**. Expression analysis of *RdNAC72* gene in root tissue after high temperature stress treatment; **D**. Expression analysis of *RdNAC72* gene induced by 100 mg·L^{-1} ABA; **E**. Expression analysis of *RdHSP17.2* gene after high temperature stress treatment. The temperature of high temperature stress is 38 ℃. Different letters indicate significant differences ($P<0.05$).

图 8 不同胁迫处理后 *RdNAC72* 基因的相对表达量变化

Fig. 8 Relative expression level changes of *RdNAC72* gene under different stress treatments

因发挥逆境胁迫作用的组织主要是叶片。

关于 NAC 转录因子在植物高温胁迫中发挥作用的分子机制,前人的研究主要集中在拟南芥、水稻等植物中。例如,通过系统敲除水稻基因 *OsNAC6*,得到了干旱和热敏感的敲除系,实验证明该基因参与了水稻高温胁迫调控(Wang et al., 2020)。AtNAC19 与热应激转录因子 *HSFA1b*、*HSFA6b*、*HSEA7a* 和 *HSFCl* 的启动子区域结合,过表达 *AtNAC19* 增强了转基因拟南芥的热耐受性(Guan et al., 2014)。桃树转录因子 PpNAC56 可

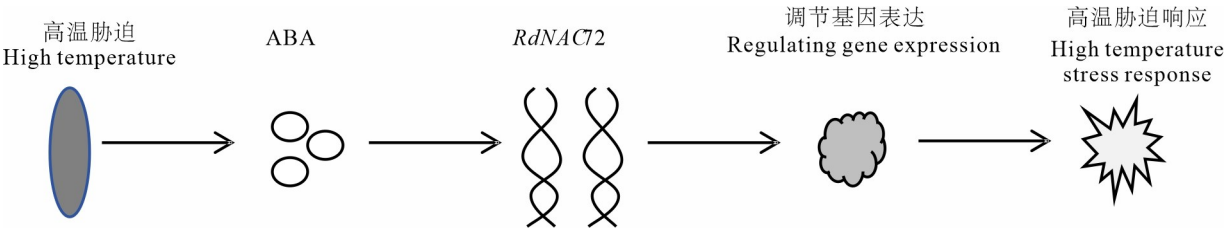


图 9　*RdNAC*72 基因调控马缨杜鹃响应高温胁迫机制模式图

Fig. 9　Model diagram of the mechanism of *RdNAC*72 gene regulation in response to high temperature stress in *Rhododendron delavayi*

以与 PpMIEL1 相互作用并激活 *PpHSP*17.4 和 *PpSnRK2D* 的表达，从而增强植物耐热性（*Meng et al.*，2022）。Wu 等（2023）报道了百合花基因 *LlNAC*014 通过感知高温和转移到细胞核来激活 DREB2-HSFA3 模块，从而提高耐热性。本研究通过生物信息学及实验验证说明 *RdNAC*72 也可能在马缨杜鹃耐热性调控中发挥积极作用。此外，Meng 等（2022）研究发现 NAC 家族基因可直接激活热激蛋白的表达以应对高温胁迫，本研究发现热激蛋白基因 *RdHSP*17.2 启动子区含有多个 NAC 转录因子的核心结合基序 CACG 和识别基序 CATGTG 且该基因与 *RdNAC*72 基因表达模式一致，说明 RdNAC72 可能和 *RdHSP*17.2 启动子区结合并激活其表达，从而增强马缨杜鹃耐热性，但这需要进一步实验证明。此前文献报道 NAC72 可以靶向 *PUB*19，*ATHB*13 和 *BAM*1（Zhao et al.，2018），而 *BAM*1 可以通过降解淀粉，为脯氨酸合成提供碳骨架，从而促进脯氨酸合成，进而降低植物中的 ROS，最终增强植物抗热性（Zanella et al.，2016）。高温会使植物产生大量 ROS，RdNAC72 也可能会通过作用下游靶基因 *BAM*1，从而降低 ROS，提高马缨杜鹃耐热性。此前的研究表明，NAC 转录因子可以激活下游热激蛋白和热激转录因子，从而提高植物耐热性。因此，推测 RdNAC72 也可能通过激活下游热激蛋白基因的表达，从而调控马缨杜鹃耐热性。

目前，仍然没有 NAC 转录因子通过何种方式参与杜鹃抗逆境胁迫的报道，但是可以推测杜鹃中的 NAC 转录因子能激活其下游靶基因，从而在杜鹃的抗逆胁迫中发挥调控作用。本研究结果表明，高温及 ABA 胁迫能显著诱导 *RdNAC*72 基因表达，进而可能激活下游热激蛋白基因 *HSP*17.2 或 *BAM*1，最终增强马缨杜鹃耐热性。但是，这一调控通路是否成立，需要更进一步的研究。

参考文献：

AIDA M, ISHIDA T, FUKAKI H, et al., 1997. Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: An analysis of the cup-shaped cotyledon mutant [J]. Plant Cell, 9(6): 841-857.

BAO Y, 2022. Gene cloning and expression analysis of *Rcnac*72 in *Rosa chinensis* [J]. Journal Tangshan Normal University, 44(3): 44-49. [包颖, 2022. 月季 *RcNAC*72 基因的克隆及表达分析 [J]. 唐山师范学院学报, 44(3): 44-49.]

BHANDARI MS, MEENA RK, SHANKHWAR R, et al., 2019. Prediction mapping through maxent modeling paves the way for the conservation of *Rhododendron arboreum* in Uttarakhand Himalayas [J]. Journal of the Indian Society of Remote Sensing, 48(3): 411-422.

BORRAS D, BARCHI L, SCHULZ K, et al., 2021. Transcriptome based identification and functional characterization of NAC transcription factors responsive to drought stress in *Capsicum annuum* L. [J]. Frontiers in Genetics, 12: 743902.

GUAN QM, YUE XL, ZENG HT, et al., 2014. The protein phosphatase RCF2 and its interacting partner *NAC*019 are critical for heat stress-responsive gene regulation and thermotolerance in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 26(1): 438-453.

GUO ZH, LIU XQ, SU JL, et al., 2022. Species diversity of *Rhododendron* shrub communities and utilization of *Rhododendron* resources in urban green spaces of Nanjing [J]. Journal of Tropical Ecology, 63(4): 506-521.

JENSEN MK, HAGEDORN PH, DE TORRES ZABALA M, et al., 2008. Transcriptional regulation by an NAC (NAM-ATAF1, 2-CUC2) transcription factor attenuates ABA signalling for efficient basal defence towards *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in *Arabidopsis* [J]. The Plant Journal,

56(6): 867-880.

LIN XY, BAI S, LI MY, et al., 2023. Effects of exogenous abscisic acid on photosynthetic and fluorescence indexes of *Camellia reticulata* under drought stress [J/OL]. Molecular Plant Breeding: 1-12 [2024-02-06]. https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20230524.1453.018.[林先玉, 柏松, 李美玉, 等, 2023. 外源脱落酸对干旱胁迫下云南山茶光合与荧光指标的影响 [J/OL]. 分子植物育种: 1-12 [2024-02-06]. https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20230524.1453.018.]

LU YP, LIU HC, CHEN W, et al., 2021. Conservation planning of the genus *Rhododendron* in Northeast China based on current and future suitable habitat distributions [J]. Biodiversity and Conservation, 30(3): 673-697.

MAO AA, GOGOI R, 2012. *Rhododendrons* of Manipur and Nagaland, India [J]. New Biotechnology, 3(1): 1-10.

MEHARI TG, HOU YQ, XU YC, et al., 2022. Overexpression of cotton *GhNAC*072 gene enhances drought and salt stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. BMC Genomics, 23: 648.

MENG XG, WANG N, HE HJ, et al., 2022. *Prunus persica* transcription factor PpNAC56 enhances heat resistance in transgenic tomatoes [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 182: 194-201.

OLSEN AN, ERNST HA, LEGGIO LL, et al., 2005. NAC transcription factors: Structurally distinct, functionally diverse [J]. Trends in Plant Science, 10(2): 79-87.

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

SHANG XG, YU YJ, ZHU LJ, et al., 2020. A cotton NAC transcription factor GhNAC2 plays positive roles in drought tolerance via regulating ABA biosynthesis [J]. Plant Science, 296: 110498.

TANG RS, ZHENG JC, JIN ZQ, et al., 2008. Possible correlation between high temperature-induced floret sterility and endogenous levels of IAA, GAs and ABA in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Growth Regulation, 54: 37-43.

TRAN LS, NAKASHIMA K, SAKUMA Y, et al., 2004. 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 promoter [J]. Plant Cell, 16(9): 2481-2498.

UL HASSAN M, RASOOL T, IQBAL C. et al., 2022. Linking plants functioning to adaptive responses under heat stress conditions: a mechanistic review [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 41(97): 2596-2613.

WANG B, ZHONG ZH, WANG X, et al., 2020. Knockout of the OsNAC006 transcription factor causes drought and heat sensitivity in rice [J]. International Journal of Molecular Sciences, 21(7): 2288.

WU Z, LI T, XIANG J, et al., 2023. A lily membrane-associated NAC transcription factor LlNAC014 is involved in thermotolerance via activation of the DREB2-HSFA3 module [J]. Journal of Experimental Botany, 74(3): 945-963.

XU SD, GENG XM, MAO LF, et al., 2022. Transcriptome analysis and identification of the genes associated with the heat stress response in four *Rhododendron* species [J]. Scientific Horticulture, 303: 111176.

ZANELLA M, BORGHI GL, PIRONE C, et al., 2016. β-amylase 1 (BAM1) degrades transitory starch to sustain proline biosynthesis during drought stress [J]. Journal of Experimental Botany, 67(6): 1819-1826.

ZHANG H, YANG NK, SHANG LL, et al., 2020. Cloning and functional analysis of a drought tolerance-related gene *IbNAC*72 in sweet potato [J]. Acta Agronomica Sinica, 46(11): 1649-1658. [张欢, 杨乃科, 商丽丽, 等, 2020. 甘薯抗旱相关基因 *IbNAC*72 的克隆与功能分析 [J]. 作物学报, 46(11): 1649-1658.]

ZHAO Y, YU WG, HU XY, et al., 2018. Physiological and transcriptomic analysis revealed the involvement of crucial factors in heat stress response of *Rhododendron hainanense* [J]. Gene, 660: 109-119.

(责任编辑 李 莉 王登惠)