

巴西橡胶树 α -微管蛋白*HbTUA2*基因的克隆、表达及生物信息学分析

杨洪, 邓治, 刘辉, 代龙军, 李德军*

中国热带农业科学院橡胶研究所, 农业部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室, 海南儋州571737

摘要: 微管蛋白是微管的重要组成部分, 参与维持细胞骨架的稳定及延伸。本研究采用RT-PCR和RACE技术从巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)中克隆到一个 α -微管蛋白基因, 命名为*HbTUA2* (GenBank登录号: KX809698)。该基因cDNA全长1 940 bp, 其中开放阅读框1 353 bp, 编码含450个氨基酸残基的蛋白质序列。*HbTUA2*与其他植物TUA蛋白高度同源, 具有TUA蛋白家族保守的GTP结合位点和转录后调控片段。基因结构分析表明, *HbTUA2*具有4个外显子和3个内含子, 内含子外显子剪切符合“GT-AG”规则。荧光定量PCR分析表明, *HbTUA2*在巴西橡胶树叶片、雌花、雄花、茎尖、树皮及胶乳等组织中均有表达, 在雌花中表达量最高, 其次是茎尖和雄花, 在叶片、树皮和胶乳中表达量较低。此外, *HbTUA2*的表达还受高盐、干旱、低温、过氧化氢(H₂O₂)、乙烯利和茉莉酸甲酯(MeJA)调控, 表明*HbTUA2*可能参与巴西橡胶树乙烯和茉莉酸信号途径及逆境胁迫应答过程。

关键词: 橡胶树; α -微管蛋白; 逆境胁迫; 表达分析

微管是真核生物普遍存在且高度动态的细胞结构, 在细胞分裂、细胞运动、细胞间交流、细胞形态维持及细胞次生细胞壁形成、逆境应答等过程中起着至关重要的作用(Ledbetter和Porter 1963; 王琦等2005)。微管蛋白是所有组成微管的蛋白质总称, 也是构成细胞骨架的主要组分(Breviaro 2008)。目前已证实真核生物中至少存在7种微管蛋白即 α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η -微管蛋白(Oakley 2000; Dutcher 2001; McKean等2001)。微管主要由 α -微管蛋白(α -tubulin, TUA)和 β -微管蛋白(β -tubulin, TUB)通过头尾相接的方式装配而成, 其他种类的微管蛋白在微管形成中只起辅助作用(McKean等2001)。植物微管蛋白以基因家族的形式发挥作用, 比如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) TUA蛋白基因为6个(Kopczak等1992), TUB蛋白基因为9个(Snustad等1992); 玉米(*Zea mays*) TUA蛋白基因和TUB蛋白基因均为6个(Hussey等1990; Villemur等1992, 1994); 水稻(*Oryza sativa*)、大麦(*Hordeum vulgare*)和陆地棉(*Gossypium hirsutum*)均有5个TUA蛋白基因, 但TUB蛋白基因分别为8个、8个和19个(Whittaker和Triplett 1999; Jeon等2000; Yoshikawa等2003; He等2008; Rapacz等2012); 在杨树(*Populus tomentosa*)和小麦(*Triticum aestivum*)中TUA基因家族基因的数目大量增加, 分别达到9个和15个, 而TUB蛋白基因分别为20个和8个(Oakley等2007; Ridha Farajalla和Gulick 2007)。

在全世界2 500种以上的产胶植物中, 巴西橡胶树因产量高、品质好、持续生产周期长成为目

前唯一大面积商业化种植的产胶植物。割胶是目前获取其胶乳的唯一形式, 割胶后流失乳管细胞的再生和及时补充是关系胶乳产量和质量的重要因素。巴西橡胶树乳管细胞分化过程中在核膜附近能够观察到微管, 说明微管蛋白可能参与乳管细胞的分化。此外, 吴继林和郝秉中(1995)研究发现微管蛋白还可能参与橡胶树产排胶和死皮发生。目前, 对巴西橡胶树微管蛋白基因家族成员组成情况还不甚了解。唐朝荣等(2013)克隆了首个橡胶树TUA基因*HbTUA1*, 该基因表达受割胶和伤害诱导, 推测其可能参与胶乳再生和逆境应答等过程。进一步挖掘巴西橡胶树微管蛋白基因是深入了解微管蛋白在橡胶树中生物功能的基础。本研究从巴西橡胶树中获得一个TUA基因的cDNA全长序列, 对该基因进行生物信息学、基因结构、系统进化、组织表达特性分析, 以及不同胁迫条件和激素处理对该基因表达的影响, 研究结果为进一步揭示该基因在巴西橡胶树产排胶及逆境胁迫中的生物学功能奠定基础。

材料与方法

1 材料

本研究用的组织样品(叶片、树皮、胶乳、

收稿 2016-09-14 修定 2016-10-28

资助 国家自然科学基金(31570684、31270651和31200514)和中国热带农业科学院橡胶研究所基本科研业务费专项(1630022015003)。

* 通讯作者(E-mail: djli.rricatas@gmail.com)。

茎尖、花)、死皮及健康橡胶树树皮与胶乳样品及H₂O₂、乙烯利(ethephon, ET)及茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)处理胶乳样品均采自中国热带农业科学院实验农场五队巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)品系热研7-33-97。低温、干旱、高盐胁迫所用材料为移栽6个月长势基本一致的热研7-33-97组培苗。

2 方法

2.1 材料处理

选取离地1 m处树围大于50 cm未开割橡胶树(热研7-33-97)剖面进行H₂O₂、ET及MeJA处理,以不作任何处理的未开割树为对照。每时间点处理重复3次,每次重复采集5棵树,采集的胶乳立即用液氮冻存,用于RNA提取。参照Hao和Wu (2000)的方法,用浓度为1%的ET和0.3%的MeJA涂于割线及其上部约2 cm剖面,分别采集处理0、4、8、24、48和72 h后的胶乳。H₂O₂处理参照Tang等(2010)和Zhu等(2010)的方法,将浸有2% H₂O₂的棉花包裹在割线及其上部约2 cm剖面,采集0、6、24和48 h胶乳用于RNA提取。干旱、低温和NaCl胁迫处理选用橡胶树品系热研7-33-97组培苗,组培苗根部泥土洗净后放入清水中,在30°C、湿度80%、12 h光照(光照强度480 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$)和12 h黑暗静置培养2~3 d后进行逆境胁迫处理。低温(4°C)处理具体方法参照安泽伟等(2010)进行;干旱和NaCl胁迫处理参照刘辉等(2015)方法,分别采用30% PEG6000和1 mol·L⁻¹ NaCl分别模拟干旱和高盐胁迫条件,分别采集处理0、3、24和48 h后的叶片,立即用液氮冻存,用于RNA提取。

2.2 总RNA提取及cDNA第一链合成

样品总RNA提取采用北京百泰克生物技术有限公司的通用植物总RNA提取试剂盒,提取方法参照说明书。利用DNase I (RNase free)去除RNA中少量的gDNA,采用分光光度法和琼脂糖电泳对总RNA进行定量和完整性检测。样品cDNA第一链合成按照PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒步骤操作。

2.3 全长cDNA克隆

在本实验室已建立的橡胶树筛管转录组数据库中,通过Blast比对确定一条HbTUA2基因片段。根据该片段设计RACE引物,利用RT-PCR和RACE

技术分别获得该基因的5'端序列。通过拼接最终获得包含该基因完整阅读框(ORF)的cDNA全长序列。

2.4 基因组序列克隆

根据获得的HbTUA2全长cDNA序列设计3对扩增产物首尾重叠的特异性引物,以橡胶树胶乳DNA为模板进行扩增。扩增产物纯化、回收后连接到pEASY-T1克隆载体(北京全式金生物公司),将该载体转化Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell,挑选阳性克隆测序。

2.5 生物信息学分析

利用NCBI的ORF finder预测开放阅读框;用在线程序Smart (<http://smart.emblheidelberg.de/>)对蛋白保守结构域进行分析;用Expasy网站的ProtParam程序(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析蛋白质理化性质;用NCBI中的BLAST和DNASTAR软件进行同源性分析;信号肽预测用SignalP 4.1 Server软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>),采用程序TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测跨膜结构域;通过在线工具Psort (<http://psort.hgc.jp/form.html>)进行目的序列的亚细胞定位分析;应用在线工具Profun (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/>)进行功能分类预测。用ClustalX和MEGA5.1进行多序列比对和N-J进化树的构建。

2.6 实时荧光定量PCR

根据HTUA2基因序列设计特异性荧光定量引物qtuaF和qtuaR,引物序列见表1。以不同样品反转录cDNA稀释5倍后为模板,反应体系为20 μL ,包括2 μL cDNA模板、1 μL 正向引物、1 μL 反向引物、10 μL SYBR Premix Ex Taq II (2 \times)和6 μL ddH₂O。按试剂盒推荐程序,以橡胶树18S rRNA基因为内参基因(引物序列见表1)。每个样品设置3个重复。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量。数据处理与作图采用Origin 9.0软件,相对表达量结果为3次重复的平均值 \pm SD。

实验结果

1 HbTUA2基因克隆及序列分析

在分析橡胶树筛管转录组测序数据时发现一条与杨树、拟南芥TUA基因高度相似的基因序

表1 本研究所用引物及其序列

Table 1 The sequence of all primers used in this study

引物名称	序列 (5'→3')	用途
HbtuaF	ATCTGGAACCTGAAGGCGTC	ORF扩增/基因组DNA片段1扩增
HbtuaR	GTGAAGATGGTGACGATGAAGA	ORF扩增/基因组DNA片段3扩增
gtuaR1	GGAAGATGCTGCCAACAACT	基因组DNA片段1扩增
gtuaF2	GAGGGGACGATGCCTTTTA	基因组DNA片段2扩增
gtuaR2	TCCCTTGACATTGAGCGACC	基因组DNA片段2扩增
gtuaF3	CCTGTTGGAGCGTTTGTCTGT	基因组DNA片段3扩增
qtuaF	CGACCCACCTACACCAATCTTA	Real-time PCR
qtuaR	GCTGTGCTTCTTGACAATGAGG	Real-time PCR
Hb18sF	GCTCGAAGACGATCAGATACC	Real-time PCR内参
Hb18sR	TTCAGCCTTGCGACCATAC	Real-time PCR内参
Tuagsp	GACATTGAGCGACCCACCTACCC	5' RACE第一轮扩增
TuaNgsp	TAAAAGCATCGTCCCTCCCG	5' RACE巢式引物

列。根据该序列设计特异性引物HbtuaF和HbtuaR (表1), 以橡胶树cDNA为模板进行PCR扩增。扩增产物切胶回收后连接到pMD18-T载体, 挑选阳性克隆测序。根据测序结果设计5' RACE引物Tuagsp和TuaNgsp (表1)扩增5'端序列。拼接后获得1 940 bp的包含完整ORF的cDNA序列, 经Blastx比对, 确定该基因为植物TUA家族成员并命名为*HbTUA2* (GenBank登录号: KX809698)。 *HbTUA2*最长开放阅读框1 353 bp, 编码450个氨基酸。

2 *HbTUA2*生物信息学分析

*HbTUA2*蛋白理论分子量约为49.57 kDa, 理论等电点为4.97。N端具有一个保守的转录后调控片段MRECI; 第142~148位含有微管蛋白标志信号片段GGGTGSG, 该结构域也是GTP核苷酸结合位点, 是 α 、 β 微管蛋白聚合的必要结构(图1); 第40位为赖氨酸K, K40的乙酰化是唯一一种发生在微管管腔面的修饰形式, 在微管组装过程中, 对维持微管的稳定性具有非常重要的作用(L'Hernault和Rosenbaum 1985; Ledizet和Piperno 1987; Nogales等1998)。

信号肽预测结果显示, *HbTUA2*蛋白不含信号肽。蛋白跨膜结构域分析表明*HbTUA2*不含跨膜结构。*HbTUA2*蛋白亚细胞定位预测结果表明该蛋白可能主要定位于细胞的细胞质、过氧化物酶体等亚细胞器位置。对*HbTUA2*微管蛋白的保守结构域预测表明, 该蛋白有2个高度保守的结构域, 即微管结构域和C端结构域, 属于微管蛋白/细菌FtsZ家族。

3 *HbTUA2*基因结构分析

为获得*HbTUA2*基因编码区基因结构, 根据获得的cDNA序列设计3对特异性引物(表1)。将扩增产物回收测序后, 共得到3段首尾重叠的基因片段。将这些片段拼接获得全长2 603 bp基因组序列, 经比对后确认为*HbTUA2*基因组序列。用NCBI上Splign内含子在线分析工具将*HbTUA2*全长cDNA序列与获得的基因组序列进行比对分析发现*HbTUA2*基因包含4个外显子和3个内含子(图2), 这与拟南芥、杨树等多数植物TUA Class I基因亚家族成员基因结构一致。4个外显子长度最小为235 bp, 最长为974 bp, 3个内含子大小分别为368、93和202 bp (表2)。三个内含子的A+T含量分别为67.66%、73.12%、70.79%, 而外显子中A+T含量分别为59.72%、48.09%、51.48%和56.22%, 内含子的A+T含量明显高于外显子。所有内含子-外显子边界均符合“AT-CG”剪切规则(表2)。按照内含子分型原则, 第1个内含子和第3个分别处于Gln31 (Q31)和Pro32 (P32)、Gln233 (Q233)和Val234 (V234)之间, 因此属于0型, 第2个内含子位于Ile110 (I110)第一个密码子后, 因此属于1型(表2)。

4 *HbTUA2*在不同组织及死皮橡胶树中的表达分析

实时定量PCR结果表明, *HbTUA2*在本研究检测的6个橡胶树组织(叶片、雌花、雄花、树皮、胶乳、茎尖)中均有表达, 但其表达量存在差异。*HbTUA2*主要在雌花、茎尖和雄花中高表达, 叶片、树皮和胶乳中表达量较低(图3); 其中雌花中的表达量约是胶乳的173倍, 茎尖表达量是胶乳的


```

1   TGGAGTACAGTAGCCAATAATAATTTGATCGGTTATTTAACCATGGTTAACTAACCAAT
61  GGATTGTGCCATCCTGTACCCACCATTACCCCATATTTCTCCCTGTATATAATCCAGAA
121 ACGCGAGATCAGAACATCTCACATCTGGAAGCTGAAGGCGTCTTCATAAACGCCGCTCTT
181 AGCATTAGCTTCGATCAATCTCTGTTTTTCGATTATTTCTTTAACGTTTTTCTTGAATT
241 CTCTTTGTTATTTTGAATCAGACAAGATGAGAGAGTGCATCTCGATTACATTTGGTCAG
1   M R E C I S I H I G Q
301 GCCGGTATTCAGGTCGAAATGCTTGCTGGAACTTTACTGCCTCGAGCATGGCATTACAG
12  A G I Q V G N A C W E L Y C L E H G I Q
361 CCTGATGGCAAGATGCCGAGTATAAGACTGTCGGGGAGGGGACGATGCTTTAACACT
32  P D G K M P S D K T V G G G D D A F N T
421 TTTTTCAGTAACTGGTGCAGGAAGCACGTTCTCGCGCTGTCTTTGTAGATCTTGAG
52  F F S E T G A G K H V P R A V F V D L E
481 CCAACTGTCATTGATGAAGTTAGGACCGAACTTACCGCCAGCTCTTACCCTGAGCAG
72  P T V I D E V R T G T Y R Q L F H P E Q
541 CTCATCAGTGGCAAGGAAGATGTCGCAACAACCTTGCCTGGCCATTATACCATTGGC
92  L I S G K E D A A N N F A R G H Y T I G
601 AAGGAAATTTGATCTCTGCTTGGACCGCATCAGAAAGCTTGCTGACAACGCACTGGC
112 K E I V D L C L D R I R K L A D N C T G
661 CTCCAGGATTCTTGTGTTAATGCTGTTGGTGGTACCAGATCTGGTCTTGGATCT
132 L Q G F L V F N A V G G G T G S G L G S
721 CTCCTGTTGGAGCGTTTGTCTGTTGATTATGAAAAGAAATCCAAGTTGGGTTTCACTGTC
152 L L L E R L S V D Y G K K S K L G F T V
781 TACCCCTCTCCCAAGTCTCCACATCTGTTGTTGAGCCCTACAACAGTGTCTTCAACT
172 Y P S P Q V S T S V V E P Y N S V L S T
841 CACTCCCTCTGGAAACACTGATGTTGCTGTGCTTCTGACAATGAGGCCATCTATGAT
192 H S L L E H T D V A V L L D N E A I Y D
901 ATCTGTAGGCGTTCCCTTGACATTGAGCGACCCACCTACACCAATCTTAACAGGCTTGTC
212 I C R R S L D I E R P T Y T N L N R L V
961 TCTCAGGTGATTTCTCCTTGACTGCTTCTGAGGTTGATGGTGCCTGAACGTGGAT
232 S Q V I S S L T A S L R F D G A L N V D
1021 GTGACTGAATCCAGACCAACTTGGTCCCATACCAAGAATCCACTTCATGCTTTCCTCC
252 V T E F Q T N L V P Y P R I H F M L S S
1081 TATGCACCAGTTATCTCTGCTGAGAAAGCTTACCATGAGCAACTTCTGTTGCTGAAATC
272 Y A P V I S A E K A Y H E Q L S V A E I
1141 ACCAACAGTCTTTGAGCCCTTCTATGATGGCAAGTGTGATCCTCGTCATGGCAAA
292 T N S A F E P S S M M A K C D P R H G K
1201 TACATGGCCTGCTGCTGATGTACCGTGGTGTGTTGTCGCAAGGATGTAATGCTGCA
312 Y M A C C L M Y R G D V V P K D V N A A
1261 GTTGCCACTATCAAAACCAAGCGTACCATTGAGTTGTTGACTGGTGCCTGCAACTGGATTC
332 V A T I K T K R T I Q F V D W C P T G F
1321 AAGTGGGTATCAACTACCAGCCACCCACTGTTGTTCTGGTGGTGACCTTGCCTGCAAGTG
352 K C G I N Y Q P P T V V P G G D L A K V
1381 CAGAGAGCTGTGCTGATGATCTCCAACCTCAACAGTGTGCTGAGGTTCTCAAGAATT
372 Q R A V C M I S N S T S V A E V F S R I
1441 GACCACAAGTTGACCTAATGATGCAAGCGTCTTTTGTGACTGATGTTGGGCGAG
392 D H K F D L M Y A K R A F V H W Y V G E
1501 GGCATGGAGGAAGTGAGTTTTCTGAGGCTCGTGGATCTTGCTGCCCTGAGAAGGAT
412 G M E E G E F S E A R E D L A A L E K D
1561 TATGAAGAGTTGGTGTGAATCGGCTGAGGTTGAAGATGGTACGATGAAGAGATTAA
432 Y E E V G A E S A E G E D G D D E E Y *
1621 TTAAGTCTGCTGCTATTTGAATCAGTGTATTTCGGTTTGTGTTGTTGTTGTTTAT
1681 TGCGAATATATGCAATCATTGAAGCTATCTTGCTCAAGGATGCTTAAATAGATATATT
1741 CTGTGTTGAATGGTACTATTATTTAGTAATGTTTACAATTATTTTAGGGATTCATTT
1801 CTTACTTAGCTTTCTTAAATGTGCCATTTACTGTTTATCGCTAGCGCTGTGGAGTGCAA
1861 GTGACAAAATTGGATTCTGCCTCCAGTTTCTATGGACGCTGAAATACTTAGAATTGCAA
1921 GTGACAAAATTGGATTCTTG

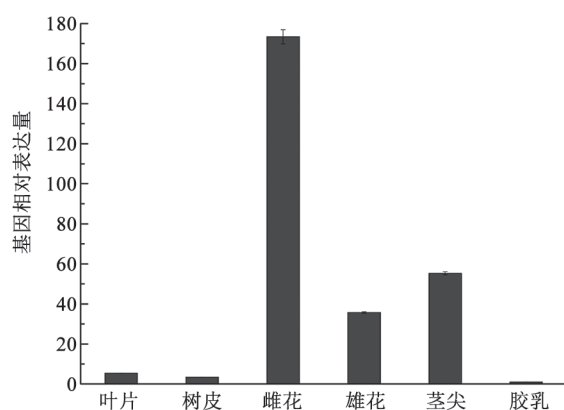
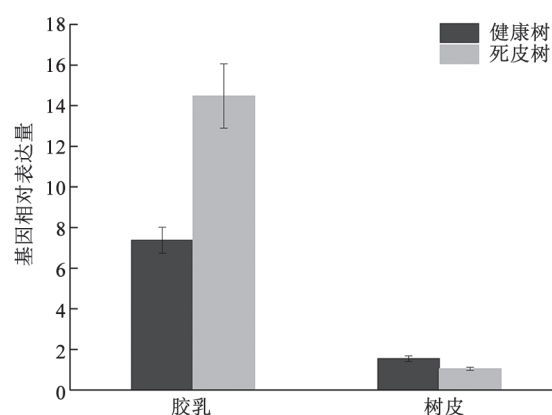
```

图1 *HbTUA2* cDNA序列及推导的氨基酸序列

Fig.1 *HbTUA2* cDNA sequence and its deduced amino acid sequence
起始密码子和终止密码子加粗, 灰色阴影分别表示MRECI 保守区和GTP 核苷酸结合位点(GGGTGSG)。

图2 *HbTUA2*基因结构模式图Fig.2 Genomic organization of *HbTUA2*表2 *HbTUA2*内含子/外显子长度、剪切位点及内含子类型Table 2 Intron/exon lengths, splice junctions and intron types of *HbTUA2*

外显子	外显子长度/bp	剪切位点		内含子长度/bp	内含子类型
		3'端	5'端		
1	~360	—	CAGgtaatc	368	—
2	235	ctctcagCCT	CCAgtaagtata	93	0
3	371	tttcagTTG	CAGgtaagtatt	202	1
4	974	ctatccagGTG	—	—	0

图3 *HbTUA2*在巴西橡胶树不同组织的表达
Fig.3 Expression of *HbTUA2* in different tissues of *H. brasiliensis*图4 *HbTUA2*在健康和死皮橡胶树胶乳及树皮中的表达差异
Fig.4 Differential expression analysis of *HbTUA2* in latex and barks of the healthy and TPD trees

55倍, 雄花中的表达量是胶乳的36倍(图3)。*HbTUA2*基因在死皮(tapping panel dryness, TPD)和健康树胶乳和树皮中表达结果表明, *HbTUA2*在死皮橡胶树胶乳中表达量约是健康树胶乳中表达量的2倍, 而在树皮中*HbTUA2*基因的表达量基本一致(图4)。

5 *HbTUA2*在橡胶树响应非生物胁迫中的表达分析

利用荧光定量PCR分析了干旱、低温、NaCl处理和过氧化氢(H_2O_2)处理对*HbTUA2*表达的影响。干旱胁迫下, *HbTUA2*表达呈现上调-下调-上调波浪式变化。处理后3 h, *HbTUA2*表达较处理前升高; 而到24和48 h较处理前表达水平显著下降

(图5-A)。低温胁迫3 h, 叶片中*HbTUA2*表达水平显著下降, 而处理后24 h该基因又恢复到处理前水平, 处理后48 h该基因表达水平上调且达到最高(图5-B)。*HbTUA2*的表达还受高盐胁迫调控, NaCl胁迫3 h, *HbTUA2*表达水平与处理前基本一致, 随后该基因表达下降, 至24 h达到最低表达水平, 48 h略有上升但仍显著低于处理前(图5-C)。此外, *HbTUA2*表达受 H_2O_2 诱导, 处理6、24和48 h显著高于处理前, 表达量分别为处理前的2.9倍、2.4倍和2.9倍(图5-D)。

6 茉莉酸甲酯和乙烯处理下*HbTUA2*的表达分析

如图6所示, 胶乳中*HbTUA2*的表达受MeJA和

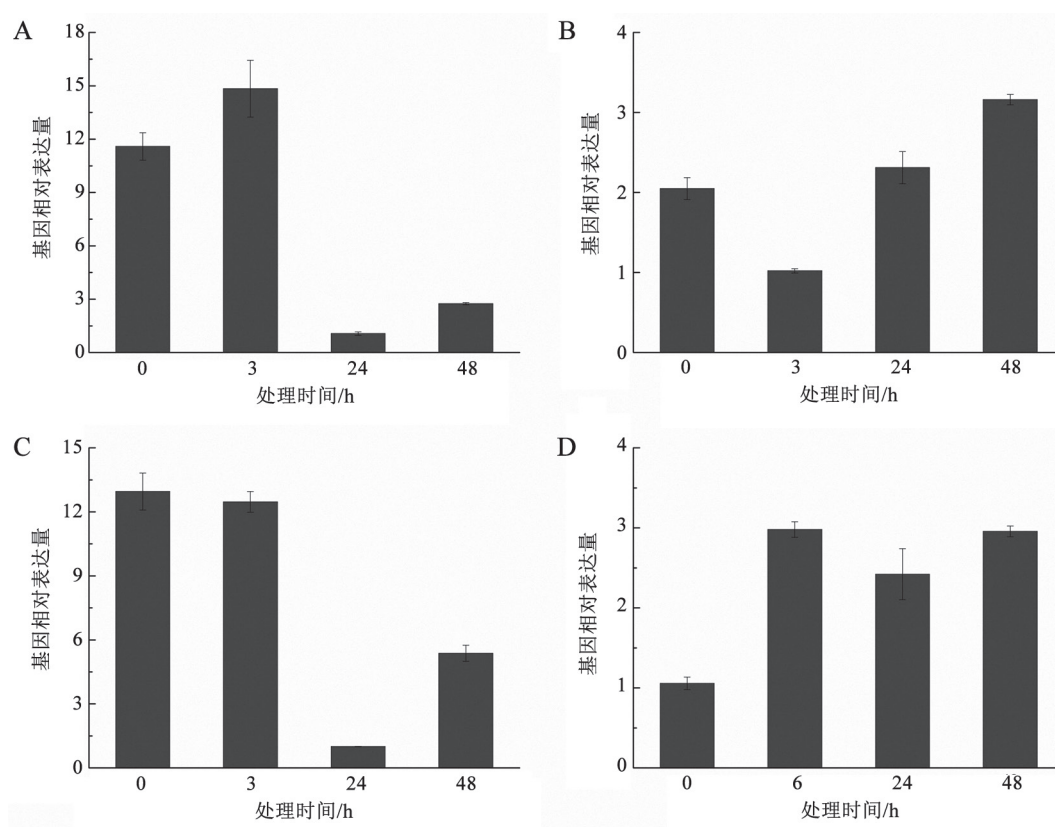


图5 不同胁迫条件下*HbTUA2*表达模式

Fig.5 Expression patterns of *HbTUA2* under different abiotic stress

A: 30% PEG6000模拟干旱处理; B: 低温(4°C)胁迫; C: 1 mol·L⁻¹ NaCl模拟高盐胁迫; D: 2% H₂O₂胁迫处理。

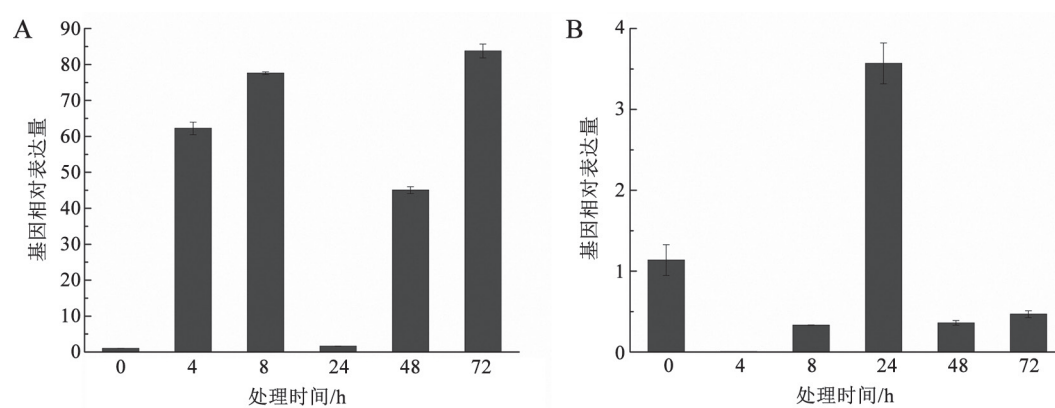


图6 茉莉酸甲酯和乙烯利刺激下*HbTUA2*在巴西橡胶树中的表达

Fig.6 Expression patterns of *HbTUA2* under MeJA and ET

A: 0.3% MeJA处理; B: 1% ET处理。

ET调控。MeJA处理4、8 h, 胶乳中*HbTUA2*表达显著持续上调, 分别为处理前的62倍和77倍, 但到24 h该基因表达恢复到处理前水平, 随后该基因的表达又持续升高, 处理72 h达到最高水平约为处理

前的84倍(图6-A)。乙烯利处理前8 h, *HbTUA2*表达显著下调, 随后快速升高, 24 h时达到表达高峰(为处理前3.6倍左右), 此后该基因表达下调且显著低于处理前水平(图6-B)。

7 HbTUA2氨基酸相似性及系统进化分析

由于TUAs氨基酸在N端相似性极高,我们对巴西橡胶树(HbTUA2)、木薯(*Manihot esculenta*)、麻风树(*Jatropha curcas*)、蓖麻(*Ricinus communis*)、陆地棉(*Gossypium hirsutum*)、野草莓(*Fragaria vesca*)、白梨(*Pyrus x bretschneideri*)、黄杉(*Pseudotsuga menziesii*)、毛白杨(*Populus trichocarpa*)、可可(*Theobroma cacao*)、钻天柳(*Salix arbutifolia*)、酿

酒葡萄(*Vitis vinifera*)、垂枝桦(*Betula pendula*)、枣树(*Ziziphus jujuba*)、青杆(*Picea wilsonii*)、巨桉(*Eucalyptus grandis*)、拟南芥(*A. thaliana*) TUA氨基酸C末端进行比对(图7)。比对结果显示大多数TUA氨基酸C末端均以酪氨酸Y结尾,该酪氨酸可在酶的催化作用下经历“去酪氨酸化/酪氨酸化”的循环来维持微管蛋白的稳定和其他驱动蛋白的结构。

HbTUA2	H K F D L M Y A K R A F V H W Y V G E G M E E G E F S E A R E D L A A L E K D Y E E V G A E S A E G E D G - D D E E Y -
MeTUA	H K F D L M Y A K R A F V H W Y V G E G M E E G E F S E A R E D L A A L E K D Y E E V G A E S A E G D D G - E D E E Y -
AtTUA1	H K F D L M Y S K R A F V H W Y V G E G M E E G E F S E A R E D L A A L E K D Y E E V G G E G A E D D D E - E G D E Y -
AtTUA2/4	H K F D L M Y A K R A F V H W Y V G E G M E E G E F S E A R E D L A A L E K D Y E E V G A E G G D D E D D - E G E E Y -
AtTUA3/5	H K F D L M Y A K R A F V H W Y V G E G M E E G E F S E A R E D L A A L E K D Y E E V G A E G G D D E - E D E G E D Y -
JcTUA2	H K F D L M Y A K R A F V H W Y V G E G M E E G E F S E A R E D L A A L E K D Y E E V G A E S A E G E E - G D D D E Y -
SaTUA3	H K F D L M Y S K R A F V H W Y V G E G M E E G E F S E A R E D L A A L E K D Y E E V G A E S A E G D D E - D G E E Y M
PtTUA3	H K F D L M Y S K R A F V H W Y V G E G M E E G E F S E A R E D L A A L E K D Y E E V G A E S A E G D D E - D G D E Y M
RcTUA	H K F D L M Y A K R A F V H W Y V G E G M E E G E F S E A R E D L A A L E K D Y E E V G A E S A E G E D G D E G D E Y -
VvTUA	H K F D L M Y A K R A F V H W Y V G E G M E E G E F S E A R E D L A A L E K D Y E E V G A E S A E G E D G D E G D E Y -
EgTUA	H K F D L M Y A K R A F V H W Y V G E G M E E G E F S E A R E D L A A L E K D Y E E V G A E S A E G E D G D E G D E Y -
PwTUA	H K F D L M Y A K R A F V H W Y V G E G M E E G E F S E A R E D L A A L E K D Y E E V G A E S A E G E G D E G G E Y -
PmTUA1	H K F D L M Y A K R A F V H W Y V G E G M E E G E F S E A R E D L A A L E K D Y E E V G A E S A E G E G D E G D E Y -
GhTUA4	H K F D L M Y A K R A F V H W Y V G E G M E E G E F S E A R E D L A A L E K D Y E E V G A E S G E G D E G D E E E Y - -
TcTUA2	H K F D L M Y A K R A F V H W Y V G E G M E E G E F S E A R E D L A A L E K D Y E E V G A E S G E G D E G D E G E E Y -
FvTUA	H K F D L M Y A K R A F V H W Y V G E G M E E G E F S E A R E D L A A L E K D Y E E V G A E S A E G D D D - E G E E Y -
ZjTUA	H K F D L M Y A K R A F V H W Y V G E G M E E G E F S E A R E D L A A L E K D Y E E V G A E S A E G E D D - E G E E Y -
BpTUA	H K F D L M Y A K R A F V H W Y V G E G M E E G E F S E A R E D L A A L E K D Y E E V G A E S A E G E D D - E G D E Y -

图7 HbTUA2与其他植物 α -微管蛋白C端氨基酸序列的比对

Fig.7 Alignment of HbTUA2 protein sequences and other TUAs

Hb: 巴西橡胶树; Me: 木薯; At: 拟南芥; Jc: 麻风树; Sa: 钻天柳; Pt: 毛白杨; Rc: 蓖麻; Vv: 酿酒葡萄; Eg: 巨桉; Pw: 青杆; Pm: 黄杉; Gh: 陆地棉; Tc: 可可; Fv: 野草莓; Zj: 枣树; Bp: 垂枝桦。

为了探讨HbTUA2与其他植物TUA基因的亲缘进化关系,利用ClustalX 1.8和MEGA5.1软件采用N-J (neighbor-joining)法对巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)、玉米(*Zea mays*)、水稻(*Oryza sativa*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、钻天柳(*Salix arbutifolia*)和毛白杨(*Populus tomentosa*)的TUA氨基酸序列进行系统进化分析。结果显示植物TUAs分为Class I和Class II两大类。HbTUA2与SaTUA7、PtTUA7等TUA聚于Class I亚家族(图8)。

讨 论

在植物中,微管不仅是细胞壁的组成成分,纤维素也是沿着微管的生成方向合成(Paredez等2006)。植物微管蛋白是以基因家族的形式发挥作用,不同家族成员具有不同的生物功能。拟南芥 α -微管蛋白基因家族是由6个基因编码的4个不同蛋白组成,分别为AtTUA1~6 (Snustad等1992)。AtTUA1主要表达在雄蕊和成熟花粉中(Carpenter等1992); AtTUA2和AtTUA4编码同一蛋白,主要在细胞壁和

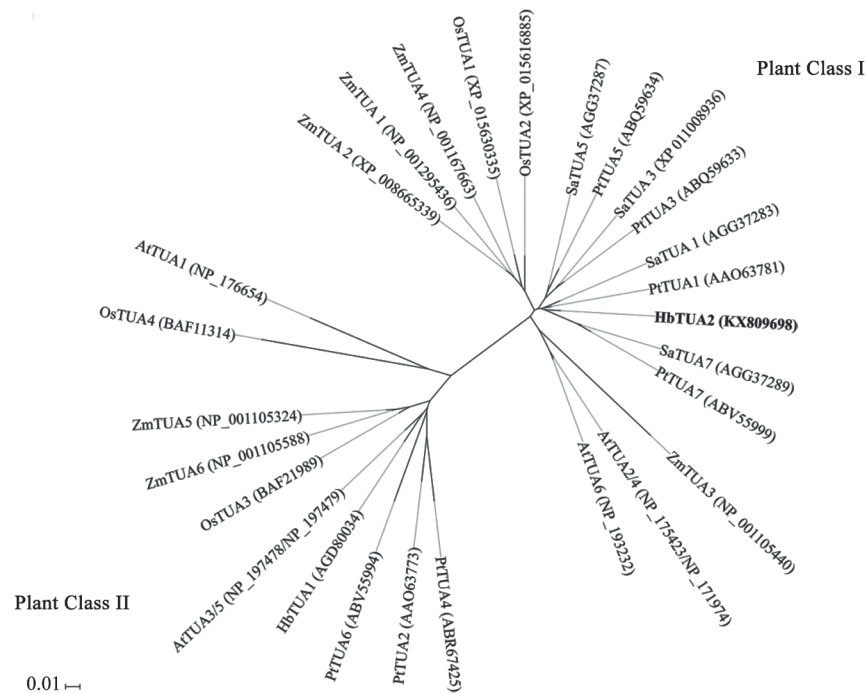


图8 HbTUA2与其他植物 TUA微管蛋白系统进化树分析

Fig.8 Phylogenetic tree analyse of HbTUA2 and other plant TUA proteins

Hb: 巴西橡胶树; Zm: 玉米; Os: 水稻; At: 拟南芥; Sa: 钻天柳; Pt: 毛白杨。

膜上表达,参与拟南芥的生长发育以及对逆境胁迫应答过程中;*AtTUA3*与*AtTUA5*编码同一蛋白,参与植物向重性响应;*AtTUA6*编码的是组成型蛋白,在其各器官和组织中普遍表达(Snustad等1992)。在巴西橡胶树中,唐朝荣等(2013)报道了首个 α -微管蛋白基因*HbTUA1*,该基因表达受割胶和伤害诱导,推测可能参与胶乳再生和逆境应答等过程。本研究克隆了一个巴西橡胶树TUA基因*HbTUA2*,该基因的核酸序列及其编码的氨基酸序列与木薯(*Manihot esculenta*)、麻风树(*Jatropha curcas*)、蓖麻(*Ricinus communis*) TUA基因具有很高的相似性,其编码的蛋白N端含有植物TUA基因保守GTP结合位点GG-GTGSG和一个保守转录后调控片段MRECI。进化分析均表明,HbTUA2与PtTUA7、SaTUA7等同属于Class I亚家族。

组织表达谱表明*HbTUA2*在橡胶树叶片、树皮、胶乳、茎尖、花等组织中均有表达,且在活跃分生组织(如茎尖、花)中表达量明显上调;同时,该基因在死皮橡胶树胶乳中表达明显升高,这表明*HbTUA2*基因可能参与巴西橡胶树发育调控和死皮发生。茉莉酸和乙烯是调控巴西橡胶树产排

胶的重要因子。茉莉酸作为调节乳管分化和发育的重要信号,可以诱导橡胶树乳管分化和调节橡胶生物合成(Hao和Wu 2000; 段翠芳等2004; 李德军等2015; 袁红梅等2015)。本研究发现,茉莉酸甲酯刺激后*HbTUA2*表达量急剧升高,表明*HbTUA2*可能参与巴西橡胶树调控产排胶过程。乙烯利是天然橡胶生产上广泛使用的化学刺激剂,能显著延长排胶时间(Pakianathan 1977; 王聪等2016)。橡胶树排胶过程会在乳管伤口形成一个蛋白质网,这个蛋白质网在乳管伤口堵塞中起关键性作用(Hao等2004)。吴继林和郝秉中(1995)研究发现橡胶树乳管细胞的细胞骨架可能参与该蛋白质网的形成。 β -1,3-葡聚糖酶、几丁质酶以及橡胶素是蛋白质网的主要组成成分,并且对橡胶粒子凝集起着重要的作用(Gidrol等1994; Wang等2013)。王冬冬等(2016)研究发现乙烯利刺激后胶乳中蛋白质网组成蛋白表达均显著下调。本研究也发现橡胶树*HbTUA2*基因的表达受乙烯利的影响,表明*HbTUA2*可能参与巴西橡胶树产排胶过程乳管堵塞。此外,本研究还表明*HbTUA2*表达受非生物逆境干旱、低温、NaCl处理和过氧化氢调控,说明*Hb*-

*TUA2*可能参与巴西橡胶树非生物逆境应答。

微管在生命活动过程中发挥着重要作用,参与细胞活动的多个过程。本研究表明*HbTUA2*可能参与发育调控、死皮发生、产排胶及非生物应答等多个橡胶树关键生命过程。微管的功能并不是单纯地由微管自身来完成的,它的结构、组装、动力和功能的发挥都受到微管结合蛋白和微管翻译后修饰的调控(Hamada 2007; Janke和Bulinski 2011)。尽管不同生物微管蛋白氨基酸序列高度保守,但其C端序列多变,而C端是微管蛋白翻译后修饰的作用位点,这就使得微管蛋白能够通过不同翻译后修饰调控不同生命过程。不同的微管翻译后修饰又能调节不同的微管结合蛋白的功能,不同的微管结合蛋白又能招募不同的蛋白到微管上发挥作用,从而赋予微管多种多样的生物学功能。

参考文献

- An ZW, Chen YG, Cheng H, Zhao YH, Xie LL, Huang HS (2010). cDNA-AFLP analysis on transcriptomics of *Hevea brasiliensis* induced by cold stress. *Sci Silvae Sin*, 46 (3): 62–67 (in Chinese) [安泽伟, 陈根辉, 程汉, 赵彦宏, 谢黎黎, 黄华孙(2010). 橡胶树冷应答转录组cDNA-AFLP分析. *林业科学*, 46 (3): 62–67]
- Breviario D (2008). Plant tubulin genes: Regulatory and evolutionary aspects. *Plant Cell Monogr*, (11): 207–232
- Carpenter JL, Ploense SE, Snustad DP, Silflow CD (1992). Preferential expression of an α -tubulin gene of *Arabidopsis* in pollen. *Plant Cell*, 4 (5): 557–571
- Duan CF, Zeng RZ, Li Y (2004). Regulation of plant hormones on biosynthesis of natural rubber in *Hevea brasiliensis*. *Chin J Trop Agric*, 24 (5): 61–68 (in Chinese with English abstract) [段翠芳, 曾日中, 黎瑜(2004). 激素对巴西橡胶树橡胶生物合成的调控. *热带农业科学*, 24 (5): 61–68]
- Dutcher SK (2001). The tubulin fraternity: alpha to eta. *Curr Opin Cell Biol*, 13 (1): 49–54
- Gidrol X, Chrestin H, Tan HL, Kush A (1994). Hevein, a lectin-like protein from *Hevea brasiliensis* (rubber tree) is involved in the coagulation of latex. *J Biol Chem*, 269 (12): 9278–9283
- Hamada T (2007). Microtubule-associated proteins in higher plants. *J Plant Res*, 120 (1): 79–98
- Hao BZ, Wu JL (2000). Laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis*: Induction by exogenous jasmonic acid and linolenic acid. *Anna Bot*, 85 (1): 37–43
- Hao BZ, Wu JL, Meng CX, Gao ZQ, Tan HY (2004). Laticifer wound plugging in *Hevea brasiliensis*: The role of a protein-network with rubber particle aggregations in stopping latex flow and protecting wounded laticifers. *J Rubb Res*, 7 (4): 281–299
- He XC, Qin YM, Xu Y, Hu CY, Zhu YX (2008). Molecular cloning, expression profiling, and yeast complementation of 19 β -tubulin cDNAs from developing cotton ovules. *J Exp Bot*, 59 (10): 2687–2695
- Hussey PJ, Haas N, Hunsperger J, Larkin J, Snustad DP, Silflow CD (1990). The β -tubulin gene family in *Zea mays*: two differentially expressed beta-tubulin genes. *Plant Mol Biol*, 15 (6): 957–972
- Janke C, Bulinski JC (2011). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12 (12): 773–786
- Jeon JS, Lee S, Jung KH, Jun SH, Kim C, An G (2000). Tissue-preferential expression of a rice α -tubulin gene, *OsTubA1*, mediated by the first intron. *Plant Physiol*, 123 (3): 1005–1014
- Kopczak SD, Haas NA, Hussey PJ, Silflow CD, Snustad DP (1992). The small genome of *Arabidopsis* contains at least six expressed α -tubulin genes. *Plant Cell*, 4 (5): 539–547
- Ledbetter MC, Porter KR (1963). A microtubule in plant cell fine structure. *J Cell Biol*, 19 (1): 239–250
- Ledizet M, Piperno G (1987). Identification of an acetylation site of *Chlamydomonas* α -tubulin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84 (16): 5720–5724
- L'Hernault SW, Rosenbaum JL (1985). *Chlamydomonas* α -tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the ϵ -amino group of lysine. *Biochemistry*, 24 (2): 473–478
- Li DJ, Guo HN, Deng Z, Liu H, Chen JS, Jiang D, Xia LQ, Xia ZH (2015). Cloning, bioinformatics and expression analysis of *sHSP23.8* gene in *Hevea brasiliensis*. *Plant Physiol J*, 51 (11): 1955–1962 (in Chinese with English abstract) [李德军, 郭会娜, 邓治, 刘辉, 陈江淑, 姜达, 夏立琼, 夏志辉(2015). 巴西橡胶树 *sHSP23.8*基因的克隆、生物信息学及表达分析. *植物生理学报*, 51 (11): 1955–1962]
- Liu H, Deng Z, Chen JS, Li DJ (2015). Cloning and expression analysis of calmodulin-like protein gene *HbCML27* from *Hevea brasiliensis*. *Mol Plant Breed*, 13 (12): 2721–2727 (in Chinese with English abstract) [刘辉, 邓治, 陈江淑, 李德军(2015). 巴西橡胶树类钙调素蛋白基因*HbCML27*克隆与表达分析. *分子植物育种*, 13 (12): 2721–2727]
- McKean PG, Vaughan S, Gull K (2001). The extended tubulin superfamily. *J Cell Sci*, 114 (15): 2723–2733
- Nogales E, Wolf SG, Downing KH (1998). Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*, 391 (6663): 199–203
- Oakley BR (2000). An abundance of tubulins. *Trends Cell Biol*, 10 (12): 537–542
- Oakley RV, Wang YS, Ramakrishna W, Harding SA, Tsai CJ (2007). Differential expansion and expression of α - and β -tubulin gene families in *Populus*. *Plant Physiol*, 145 (3): 961–973
- Pakianathan SW (1977). Some factors affecting yield response to stimulation with 2-chloroethylphosphonic acid. *J Rubb Res Inst Malaysia*, 251 (1): 50–60
- Paredes AR, Somerville CR, Ehrhardt DW (2006). Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science*, 312 (5779): 1491–1495
- Rapacz M, Stepień A, Skorupa K (2012). Internal standards for quantitative RT-PCR studies of gene expression under drought treatment in barley (*Hordeum vulgare* L.): the effects of developmental stage and leaf age. *Acta Physiol Plant*, 34 (5): 1723–1733
- Ridha Farajalla M, Gulick PJ (2007). The α -tubulin gene family in

- wheat (*Triticum aestivum* L.) and differential gene expression during cold acclimation. *Genome*, 50 (5): 502–510
- Snustad DP, Haas NA, Kopczak SD, Silflow CD (1992). The small genome of *Arabidopsis* contains at least nine expressed β -tubulin genes. *Plant Cell*, 4 (5): 549–556
- Tang CR, Qi JY, Fang YJ, Long XY (2013). Cloning and expression analysis of *HbTUA1*, an α -tubulin gene from *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Chin J Trop Crops*, 34 (11): 2158–2163 (in Chinese with English abstract) [唐朝荣, 戚继艳, 方永军, 龙翔宇(2013). 橡胶树 α -微管蛋白基因HbTUA1的克隆及表达分析. 热带作物学报, 34 (11): 2158–2163]
- Tang CR, Huang DB, Yang JH, Liu SJ, Sakr S, Li HP, Zhou YH, Qin YX (2010). The sucrose transporter *HbSUT3* plays an active role in sucrose loading to laticifer and rubber productivity in exploited trees of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Plant Cell Environ*, 33 (10): 1708–1720
- Villemur R, Joyce CM, Haas NA, Goddard RH, Kopczak SD, Hussey PJ, Snustad DP, Silflow CD (1992). α -tubulin gene family of maize (*Zea mays* L.). Evidence for two ancient α -tubulin genes in plants. *J Mol Biol*, 227 (1): 81–96
- Villemur R, Haas NA, Joyce CM, Snustad DP, Silflow CD (1994). Characterization of four new β -tubulin genes and their expression during male flower development in maize (*Zea mays* L.). *Plant Mol Biol*, 24 (2): 295–315
- Wang C, Xiao XZ, Wei F, Qiu J, Wu M, Gao HH, Yang WF, Luo SQ (2016). Cloning and expression analysis of copper transporter genes in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.). *Plant Physiol J*, 52 (9): 1389–1396 (in Chinese with English abstract) [王聪, 校现周, 魏芳, 仇键, 吴明, 高宏华, 杨文凤, 罗世巧(2016). 橡胶树铜转运蛋白HbCOPT基因克隆与表达分析. 植物生理学报, 52 (9): 1389–1396]
- Wang DD, Shi MJ, Yang SG, Tian WM (2016). Effect of ethrel on the gene expression and content of laticifer plugging-related protein in *Hevea brasiliensis*. *Chin J Trop Crops*, 37 (6): 1122–1127 (in Chinese with English abstract) [王冬冬, 史敏晶, 杨曙光, 田维敏(2016). 乙烯利对橡胶树乳管伤口堵塞相关蛋白基因表达和含量的影响. 热带作物学报, 37 (6): 1122–1127]
- Wang Q, Yang K, Li YH (2005). Microtubule organizing centers and related proteins in higher plants. *Plant Physiol J*, 41 (3): 400–404 (in Chinese) [王琦, 杨坤, 李艳红(2005). 高等植物微管组织中心及其相关蛋白. 植物生理学报, 41 (3): 400–404]
- Wang XC, Shi MJ, Wang D, Chen YY, Cai FG, Zhang SX, Wang LM, Tong Z, Tian WM (2013). Comparative proteomics of primary and secondary laticifers reveals that chitinase and glucanase play a crucial combined role in rubber particle aggregation in *Hevea brasiliensis*. *J Proteome Res*, 12 (11): 5146–5159
- Whittaker DJ, Triplett BA (1999). Gene-specific changes in α -tubulin transcript accumulation in developing cotton fibers. *Plant Physiol*, 121 (1): 181–188
- Wu JL, Hao BZ (1995). Advances research of latex regeneration and latex flow of *Hevea brasiliensis*. *Trop Crops Sci Technol*, (6): 11–15 (in Chinese) [吴继林, 郝秉中(1995). 橡胶树排胶研究进展. 热带作物科技, (6): 11–15]
- Yoshikawa M, Yang GX, Kawaguchi K, Komatsu S (2003). Expression analyses of β -tubulin isotype genes in rice. *Plant Cell Physiol*, 44 (11): 1202–1207
- Yuan HM, Hong H, Huang X (2015). The research advance of biosynthesis and drainage of latex in *Hevea brasiliensis*. *Mol Plant Breed*, 13 (5): 1151–1156 (in Chinese with English abstract) [袁红梅, 洪灏, 黄惜(2015). 巴西橡胶树产排胶机理的研究进展. 分子植物育种, 13 (5): 1151–1156]
- Zhu JH, Zhang QQ, Wu R, Zhang ZL (2010). *HbMT2*, an ethephon-induced metallothionein gene from *Hevea brasiliensis* responds to H_2O_2 stress. *Plant Physiol Biochem*, 48 (8): 710–715

Cloning, expression and bioinformatics analysis of *HbTUA2* gene in *Hevea brasiliensis* (rubber tree)

YANG Hong, DENG Zhi, LIU Hui, DAI Long-Jun, LI De-Jun*

Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture, Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China

Abstract: As the major proteins assemble into microtubules, tubulins are involved in maintaining the stability and elongation of the cytoskeleton. Here we report an α -tubulin gene (*TUA*), *HbTUA2*, from *Hevea brasiliensis* by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid-amplification of cDNA ends (RACE). The *HbTUA2* cDNA sequence is 1 940 bp in length, and contains an open reading frame (ORF) of 1 353 bp encoding a polypeptide of 450 residues. *HbTUA2* owned the typical conserved GTP binding site and a post transcriptional active domain of *TUA* and showed high homology with *TUA* proteins from other plants. Genomic organization analysis showed that *HbTUA2* contained four exons and three introns, and all intron/exon boundaries were in accordance with the GT/AG rule. Real-time PCR results showed that *HbTUA2* was expressed in leaf, flower, stem tip, bark and latex of *Hevea brasiliensis*, with the highest expression in female flower and the lowest expression in latex. Moreover, the expression of *HbTUA2* was regulated by NaCl, drought, low temperature, hydrogen peroxide (H_2O_2), ethephon (ET) and methyl jasmonate (MeJA) treatments. All these results suggested that *HbTUA2* might play important roles in stresses responses as well as ET and JA signals in *Hevea brasiliensis*.

Key words: *Hevea brasiliensis*; α -tubulin; stresses responses; expression analysis

Received 2016-09-14 Accepted 2016-10-28

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 31570684, 31270651 and 31200514) and the Fundamental Research Funds for Rubber Research Institute, CATAS (Grant No. 1630022015003).

*Corresponding author (E-mail: djli.rricatas@gmail.com).