

巴西橡胶树*HbCPP1*基因的克隆与表达分析

潘冉冉^{1, #}, 位明明^{2, #}, 王亚杰¹, 胡欣欣¹, 李维国^{2, *}

¹海南大学热带农林学院, 海南海口570228

²中国热带农业科学院橡胶研究所, 海南儋州571737

摘要: *CPP*基因家族是广泛存在于动植物中, 成员数目较少的一类转录因子家族, 在植物生殖发育和细胞分裂过程中起着重要的调控作用。本研究以橡胶树优良品种‘热研7-33-97’为供试材料, 通过RT-PCR方法, 在橡胶树花器官中克隆到一个*CPP*基因, 命名为*HbCPP1* (登录号为MF360959)。序列分析表明, *HbCPP1*基因开放阅读框为1 755 bp, 编码584个氨基酸, 蛋白质分子量为63.676 kDa, 等电点(PI)为8.4。序列多重比对结果显示, *HbCPP1*蛋白具有*CPP*蛋白的特征基序, 含有2个保守的CXC结构域和1个比较保守R结构域。进化树分析表明, *HbCPP1*属于A亚族基因, 与其近缘物种木薯的*MeCPP*基因以及麻风树的*JcCPP7*基因同源性较高, 进化关系较近。氨基酸组分、理化性质以及蛋白结构预测分析显示, *HbCPP1*蛋白是一个不具有跨膜结构和信号肽的不稳定亲水蛋白, 可能定位于细胞核, 其二级结构主要由两个蛋白结合区域和多个无规则的卷曲螺旋组成, 其三级结构中CRC结构域构成了该蛋白的核心结构。利用QRT-PCR对*HbCPP1*基因在橡胶树不同组织中的表达量进行检测, 分析结果表明*HbCPP1*基因在橡胶树茎尖、花序以及雌花中特异性高表达。在干旱、盐、高温胁迫以及ABA处理下, *HbCPP1*基因的表达量呈显著下调表达; 而在低温处理下, *HbCPP1*基因的表达量则呈显著上调表达, 推测*HbCPP1*基因可能参与了橡胶树花器官发育以及对多种非生物学胁迫的响应过程。

关键词: 巴西橡胶树; *CPP*基因; 基因克隆; 表达分析; 胁迫处理

CPP (cysteine-rich polycomb-like protein) 基因家族是一类成员数目较少的转录因子家族, 该基因家族编码的蛋白序列通常包含一个或两个高度保守的富含半胱氨酸的CXC结构域, 以及一个像链子一样连接着两个CXC结构域的短序列R结构域。研究表明CXC结构域具有高度保守性, 从低等生物变形虫到高等动植物, 该基因家族的CXC结构域序列通常是高度保守的(Riechmann等2000), 这些高度保守的CXC结构域能够专一性地结合DNA, 从而调控目的基因的表达。*CPP*家族基因广泛存在于除酵母以外的动植物中(Andersen等2007)。动物中最先发现的*CPP*基因是人类和老鼠的*Tesmin*基因(Sugihara等1999; Sutou等2003), 该基因在睾丸和卵巢发育的特定时期特异性表达, 进一步研究证实该基因的表达与生殖细胞的减数分裂过程密切相关(Olesen等2004)。植物中最先被发现的*CPP*家族基因是拟南芥的*TSO1*基因, 该基因在拟南芥的花器官和花序分生组织中显著高表达, 其表达量在胚珠和小孢子发育时期达到最高峰。进一步研究证实拟南芥*tsol*突变体中*TSO1*蛋白结构的改变会影响细胞内染色体分离运动蛋白行使作用, 导致细胞定向扩张和相邻细胞的生长失去了控制, 使得拟南芥在发育过程中不进行细胞核

分裂和细胞质分裂(Hauser等1998, 2000; Song等2000)。此外, 除了调控生殖发育以外, *CPP*家族基因还具有其它调节功能。如在大豆中*CPP1*基因能与豆血红蛋白Gmlbc3结合, 调控共生根结节的发育(Cvitanich等2000)。

目前, *CPP*家族基因已经在拟南芥、水稻(Yang等2008)、小麦(孟超敏等2014)、大豆(Zhang等2015)和玉米(Song等2016)等多个物种中得以鉴定与功能分析, 这些研究结果丰富了对*CPP*基因家族种类、结构特征、以及功能的认识。然而, 橡胶树中*CPP*家族基因的研究及功能分析还未见报道。

本研究以橡胶树优良品种‘热研7-33-97’不同发育时期的花器官为供试材料, 从中分离和鉴定出一个*CPP*基因(命名为*HbCPP1*), 并对其基因结构、蛋白结构、序列同源性以及进化关系进行预测和比较分析; 同时, 我们还运用QRT-PCR技术对*HbCPP1*基因在橡胶树不同组织中的表达特异, 以及在不同胁迫与ABA处理下的表达特征进行了初步

收稿 2017-08-10 修定 2018-04-04

资助 海南省重要科技计划项目(ZDKJ2016020)和国家天然橡胶产业技术体系项目(CARS-34)。

并列第一作者。

* 通讯作者(rekeyuanlywmm@126.com)。

分析。研究结果对于进一步丰富木本植物中CPP基因家族的种类与功能研究奠定了良好基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料和处理

以正常生长的10年生橡胶树(*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)优良品种‘热研7-33-97’为供试材料,分别从5株不同的橡胶树中采集根、茎尖、叶、树皮、木质部、胶乳、雄花、雌花以及不同发育时期的花序后,立即投入液氮中冷冻,并转放至实验室-80°C冰箱保存。

胁迫处理与ABA处理使用一年生的‘热研7-33-97’组培苗,每个处理组设置5棵幼苗。干旱处理:用20%的PEG6000浇灌植株后,分别采集0、3、6、12、24、72、96和168 h的叶片。低温处理:将幼苗置入5°C持续光照条件(光照强度 $12\ 000\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)的培养箱中,分别采集处理0、3、6、12和24 h的叶片。盐胁迫处理:对幼苗喷施浓度为 $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NaCl,喷施清水处理的幼苗为对照,分别采集处理0、0.5、2、6、12、24和48 h植株与对照植株的叶片。高温处理:将幼苗放入40°C持续光照条件的培养箱中,分别采集处理0、3、6、12和24 h的叶片。ABA处理:对植株喷施浓度为 $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的ABA,使用过程中以无水乙醇溶解ABA后喷施处理植株,并以喷施等浓度乙醇处理的植株为对照,分别采集处理0、0.5、2、6、12、24和48 h植株与对照植株的叶片(Qin等2015)。以上所有材料取样后液氮速冻,保存至-80°C冰箱中供下一步分析使用。

1.2 橡胶树CPPI基因的克隆

根据CPP家族基因的保守序列,在橡胶树基因组数据库与花器官发育相关转录组数据库中做同源序列搜索,通过CDS编码区预测和序列拼接得到橡胶树*HbCPPI*基因的cDNA序列。采用Primer Premier 3.0软件设计引物,用反转录得到的橡胶树花序cDNA为模板,对*HbCPPI*基因的编码区进行扩增,引物序列为F: 5' ATGGGACAAAGTGAGGCGACTT 3', R: 5' ATTTAGCTCTTGCTCTCTGGATT 3',引物合成由华大基因公司完成。PCR反应体系为20 μL ,包括10 μL 的Prime STAR Max Premix (2 \times) (购于TAKARA公司)、0.4 μL 上游引物、

0.4 μL 下游引物、1.0 μL cDNA模板以及8.2 μL 的ddH₂O至20 μL 。PCR反应程序为:94°C预变性5 min;94°C变性30 s,56°C退火30 s,72°C延伸90 s,扩增35个循环;72°C延伸10 min。采用OMEGA公司的胶回收试剂盒,对PCR扩增所得目的片段进行回收后,将目的片段与pMD19-T载体进行连接,再转入大肠杆菌DH5 α 进行转化获得重组子,最后挑取阳性克隆进行菌落PCR分析后,交华大基因公司进行测序。

1.3 橡胶树CPPI基因的生物信息学分析

利用NCBI数据库中的BLAST软件和ORF Finder软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)对橡胶树*HbCPPI*基因的编码区序列,以及氨基酸序列进行比对和预测分析。通过ExPASy ProtParam网站(<http://web.expasy.org/protparam/>)对*HbCPPI*基因编码蛋白的理化性质进行分析(Gasteiger等2003)。*HbCPPI*蛋白的亚细胞定位、信号肽、编码蛋白的跨膜区段以及功能结构域预测,则分别采用PSORT软件(<http://www.psort.org/>)、SignalP软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、TMPred软件(http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)以及SMART软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行分析。*HbCPPI*基因编码蛋白的二级结构与三级结构预测则分别采用PredictProtein软件(<https://www.predictprotein.org/home>)和SWISS-MODEL软件(<http://swissmodel.expasy.org/>)进行分析。利用DNAMAN 6.0软件对不同物种中CPP蛋白的氨基酸序列进行多重比对分析。利用MEGA 6.1软件(<http://www.megasoftware.net/>)对*HbCPPI*蛋白进行系统进化树分析(Tamura等2011)。

1.4 *HbCPPI*基因的表达分析

根据PCR扩增所得的*HbCPPI*基因序列,设计荧光定量特异引物F: 5' GGATGGGAGGACTCTGTCAA 3'; R: 5' CCCGGAAGACTGGTCAAGATA 3',对*HbCPPI*基因在不同组织、不同发育时期以及不同胁迫(干旱、高温、盐胁迫和低温胁迫)处理和ABA处理条件下的表达情况进行QRT-PCR分析。以橡胶树18S rRNA为内参基因(Tang等2010),其内参基因的荧光定量引物为18S-F: 5' GCTC-GAAGACGATCAGATACC 3'; 18S-R: 5' TTCAG-CCTTGCGACCATAC 3'。荧光定量分析具体操作

过程参考Takara公司的SYBR[®] Premix ExTaq[™]试剂盒的使用说明书进行。每个试验设置3次重复,使用SAS 9.1.3软件试验数据进行统计分析。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法对*HbCPP1*基因在不同组织中的相对表达量进行分析(Livak和Schmittgen 2001)。

2 实验结果

2.1 橡胶树*HbCPP1*基因的克隆和蛋白序列分析

以橡胶树花序cDNA为模板,使用特异性引物克隆到一个片段大小在1 800 bp左右的基因。对该基因片段进行测序分析,发现测序结果与转录组测序后的拼接序列一致,开放阅读框为1 755 bp,将该基因命名为*HbCPP1*,登录号为MF360959。

进一步分析表明*HbCPP1*基因编码584个氨基酸(图1),蛋白质分子量为63.676 kDa,等电点(pI)为8.4,带正电荷的氨基酸残基有69个,负电荷的残基有61个,分子式为 $C_{2703}H_{4367}N_{815}O_{878}S_{42}$,稳定系数为

55.42,脂肪系数为64.85,平均亲水系数为-0.636,属于不稳定亲水蛋白。

利用PSORT软件对*HbCPP1*蛋白进行亚细胞定位预测分析,结果表明*HbCPP1*蛋白定位在细胞核、线粒体基质囊、叶绿体类囊体膜和质膜中几率分别为0.300、0.100、0.100和0.100,表明其主要定位在细胞核上,符合转录因子特征。利用SignalP和TMPred软件对*HbCPP1*蛋白进行跨膜结构预测,结果显示*HbCPP1*蛋白不存在信号肽和跨膜结构。利用SMART在线软件对*HbCPP1*蛋白结构域进行分析,结果显示*HbCPP1*蛋白序列的115~240区域存在2个高度保守的、富含半胱氨酸序列的CXC结构域(图2-A),该结构域主要起结合DNA的作用,也符合转录因子的特征。另外,我们在*HbCPP1*蛋白序列上还发现了一些与生长因子相关的结构域,如EGF、EGF-Lam、TNFR和IB等,以及结合DNA的结构域,如ZnF-GATA、RING和

```

1  ATGGGACAAAGTGGAGCGACTTCAGATTTTGGCCAAAAAATTGGCGCGGCGATTGGACTTTACGACGATTGTAGAGCATCAGCGAAT
1  M G Q S E A T S D F A P K K L A R Q L D F T T I C R A S A N
91  TTGGTTTTTCAGCGCGTCCGAGGCGCAACCAGCAAGGTTCACCGCGCACCCCTCTATGAAATTACAGTTACAAACGCCACCAAGCAGCAG
91  L V F T P S Q A Q P Q K V Q P H P L L N L Q L Q T P P K Q Q
31  TOGGCAATGCCTCAATTTTCATGTCCTGCCACAGCAGTGGCGGTGGTGGTGGGATTCCCTCATTCCGTGCAGAACTTCCGTTGCCAACA
61  S A M P Q F H V L P Q Q V P V V R R I P H S V P Q K L P L P T
271  TTGCCACCGGGCATGCAAGAGTCTCCTGGATCAGTTCCGAGAATGATGTAGAAGCAAAGATTGACTCCTAAGAAAATAAAGCACTGT
91  L P P G M Q E S P G S V P R N D V E A K D C T P K K I K H C
361  AATTCGAAAAATTCGCTATGCTTGAAGTTGTAATGTGAGTGCTTTGCTGCTGGATTGCATTCGAATGGTTCAGTTGCTTAAATTTGTCAT
121  N C K N S L C L K L Y C E C F A A G L H C N G C S C L N C H
451  AATAATGTGGAGAATGAGGCTGCTAGGCAAAAGGCTGTGGAGCTACCTTAGAGCCCAATCCAAATGCTTTAGACCTAAGATTGCTAGC
151  N N V E N E G A R Q K A V G A T L E R N P N A F R P K I A S
541  AGCCCGCAATCTCCGATACAGAGAGAATGCAAGGGAAGCTCAATGATAGGTAAGCACAATAAAGGATGCCACTGCAGAAATCAGGG
181  S P Q S P D T R E D A R E A Q M I G K H N K G C H C K K S G
631  TCCTCAAGAAATCTGTGAGTCTTCCAGCCCAATATTTTGTCTCTGACCAATTGTAAAGTGCATGGACTGCAAGAAATCTGAAGGAGT
211  C L K K Y C E C F Q A N I L C S D N C K C M D C K N S E G S
721  GAAGAAAGGAGTCTCTCTTTCATGGCAATCATAATAGCATAGGCTGCATTCACAAACAGAAAATGCAGACGTTACTGGAGCCATTGGGA
241  E E R K S L F H G N H N S I G C I Q Q T E N A D V T G A I G
811  TCATCTGGCTATGTACCCCTATAGCATCCAGAGAGGAAAAGCAAGGAAATCTTAGCCAGTGAATCAAGATCAATCTGCAAAATAC
271  S S G Y C T P I A S K K R K S K E I L G S V T K D Q S A K Y
901  CAACAGAAAGTCAATGTGAAAAATCTGCTGCTCTTCTTCTCCCTTATCCATCCCTGTTTCGCATTCTACTACTGCAACTGTATTGGGA
301  Q Q E S H V K N S A A S S S P L S I P V S H S T T A T V L G
991  GCTTCAAAATTCAGATACAAATCTCTTTGTGAGGCATCTCAAAACAGGATGTGAAGGAGATATGCTCACTCTGGTCATCTTTCA
331  A S K F R Y K S P L S G I L Q P Q D V K E I C S L L V I L S
1081  CAAGAACTCAAGGGAATCTGCAGGAAAATGGATAGGCAACCGGAGAGAAAACAATCATATTTTGAACCTACTTCTGCTTCATCC
361  Q E A Q R E L A G K M D R Q P E R E N N H Y F E P T S A S S
1171  GTACATGGGAGGAGATAGTGTAAATGGTCTGATATCCATAGAATTTGGCTGATGATTGCGTAAATGGGAAACAAAGCAGGAGAGAG
391  V H G R E D S V N G P D I H R T L A D D C V N G N K A G R E
1261  AGAAACAATGATTCAGAACTGGAGATGATCTGCAAAATGGAGGCGCAGCATCAACAGAAATGATTTGATGTGCCATGAACAAGAAATG
421  R N N D S R T G D D L A N G R P A S P E I D L M C H E Q E M
1351  GTATTTATGGAAGCTGGGCTAACCACTGGGATGGGAGGACTGTGTCAAAACAAAACCTCAGATATCATCTAATGGGCAATGATGCTCAGAG
451  V F M E A G L T T G M G G I L C Q N K T Q I S S N G H E C S E
1441  GTTTATGCTGAGCAAGAAAGCTCATCTTGACCAGGTTCGGGATTTTCTCAATAGGCTTGTCACTTGTGGGAGCATTAAGAAACCAATG
481  V Y A E Q E K L I L T R F R D F L N R L V T C G S I K E T M
1531  TACTCTCCATCAGCCAGAGTAACTAGGGGAACCAACAAAGAACCGGCAGATAGATTGATCATATGTGCTGAAAATGAAATAGGAATCC
511  Y S P S A K S N M G N Q Q E P A D R L I I C A E T E I G N H
1621  AAGAAGGCATACAGTAATGGCGATGCGAAATCTTCTATAGTTGCAACTTCTGCTTCTAATGGTGTCTGCTTATAATGTCAGCATTTCT
541  K K A Y S N G D A K S S I V A T S A S N G V L P I M S A F P
1711  GTGAAAAATAGTAATACAGAGATTAATCCAGAGCAGCAAGACTAA
571  V K N S N T E I N P E S K S *

```

图1 橡胶树*HbCPP1*基因的核苷酸与氨基酸序列

Fig.1 The nucleotide sequence and amino acid sequence of *HbCPP1* in rubber tree

下划线部分为保守结构域CRC; *为终止密码子。

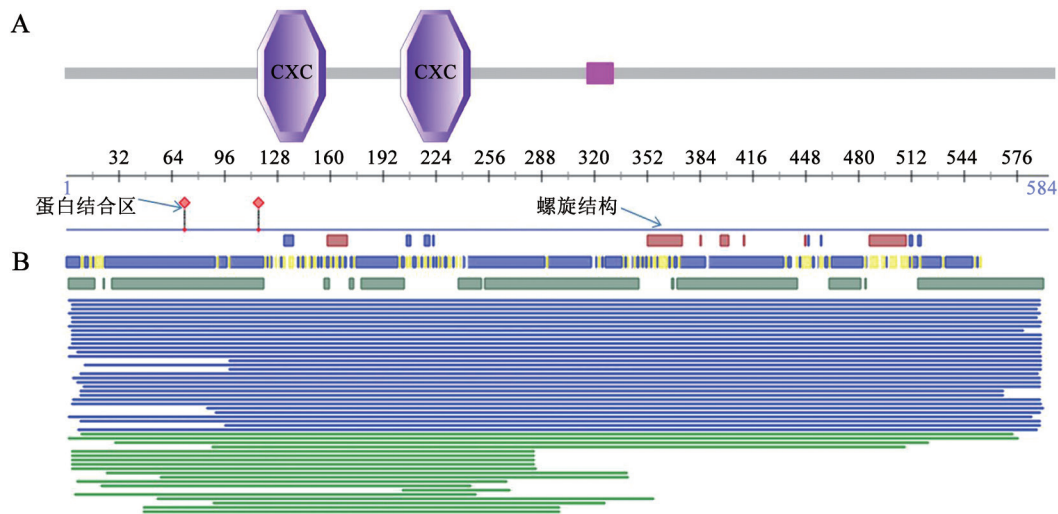


图2 HbCPP1蛋白的保守结构域和二级结构预测

Fig.2 The conserved domain and secondary structure of HbCPP1 protein

红色部分: 螺旋结构; 蓝色部分: 链; 黄色部分: 隐藏结构; 绿色部分: 无规律结构。

CDC37-M等。通过Predict Protein在线软件对HbCPP1蛋白的二级结构进行预测, 结果显示该蛋白含有2个蛋白结合区域和多个卷曲结构(图2-B)。

进一步利用SWISS-MODEL在线软件对HbCPP1蛋白的三维结构进行预测, 发现该蛋白与人类LIN54蛋白同源相似性达到55.38%, 其核心蛋白结构与LIN54 tesmin结构域(SMTL id为5fd3.2)高度相似, 接着利用LIN54 tesmin结构域建模, 我们获得了HbCPP1核心蛋白结构的三维模型(图3)。从三维模型可以看出HbCPP1蛋白的保守结构域CXC呈现出无规则卷曲, 能够与一段DNA片段紧密结合, 而且无规则卷曲的每个卷曲点都存在一个半胱氨酸残基, 每个CXC结构域都能结合3个 Zn^{2+} 离子。

2.2 HbCPP1蛋白序列的多重比对及进化分析

将HbCPP1蛋白序列与其它近缘物种的CPP蛋白序列进行多序列对比分析, 如木薯(*Manihot esculenta*)、麻疯树(*Jatropha curcas*)、蓖麻(*Ricinus communis*)、可可树(*Theobroma cacao*)以及甜橙(*Citrus sinensis*)。结果(图4)表明, HbCPP1蛋白序列与其它近缘物种的CPP蛋白序列都存在2个保守的CXC结构域和1个R结构域。除此之外, 它们还存在其它保守区域, 这可能是近缘物种CPP蛋白所特有的结构。

进一步选取拟南芥、水稻和玉米等已知的CPP家族基因构建系统进化树。进化树分析结果(图5)显示, CPP家族基因可以分为两类: A亚族和B亚

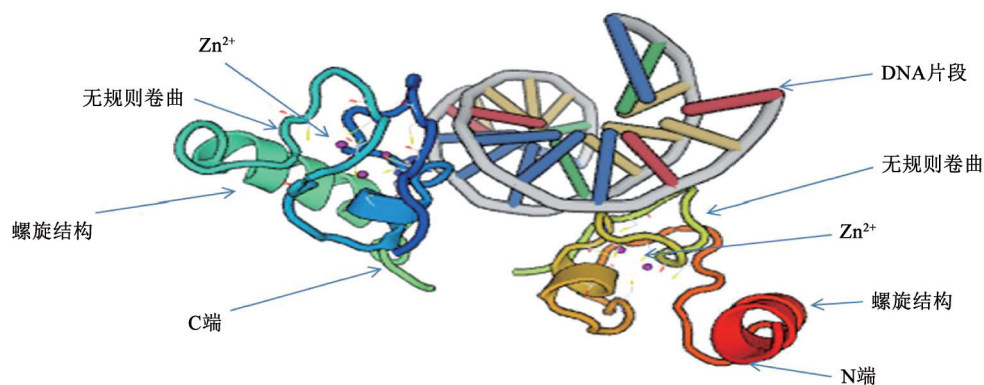


图3 三维模型中HbCPP1蛋白的核心结构

Fig.3 The core domain structure of HbCPP1 protein in three-dimensional model

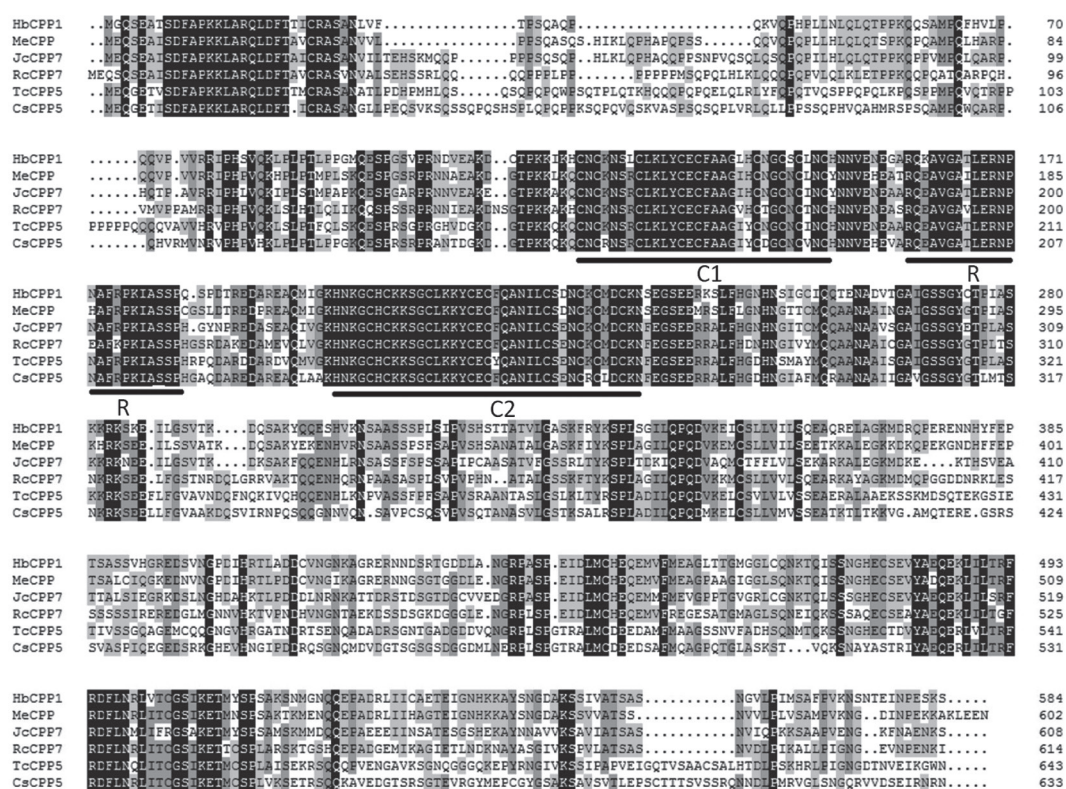


图4 橡胶树HbCPP1蛋白与其它植物氨基酸序列的多重比对

Fig.4 Multiple alignment of the amino acid sequences of HbCPP1 with the other species

MeCPP: 木薯(OAY26751.1); JcCPP7: 麻疯树(XP_012077422.1); RcCPP7: 蓖麻(XP_015573062.1); TcCPP5: 可可树(EOY29703.1); CsCPP5: 甜橙(XP_006476073.1).

族。HbCPP1蛋白属于A亚族的*CPP*基因, 与同属大戟科的木薯*CPP*基因进化关系最近。

2.3 *HbCPP1*在不同组织中的表达分析

为了探究*HbCPP1*在橡胶树各个组织和器官中表达情况, 我们利用荧光定量PCR技术对橡胶树根、茎、叶等10个组织器官中*HbCPP1*的表达特征进行分析。结果表明, *HbCPP1*基因在橡胶树10个组织中均有表达, 但在不同组织中的表达量差异很大(图6)。 *HbCPP1*基因在根、茎、树皮、胶乳、果实和雄花中表达量较低, 而在茎尖、叶片、花序和雌花中显著高表达, 其中雌花中表达量最高, 推测*HbCPP1*基因可能在橡胶树花芽分化和雌蕊发育过程中起重要调控作用。

此外, 我们还分析了*HbCPP1*基因在橡胶树花蕾期(花序长度约为3 cm)、伸展期(花序长度约为6 cm)、盛花期(花序长度约为9 cm)以及开花末期(花序长度约为12 cm)花序中的表达情况。结果(图7)显示, 随着花序的增长, *HbCPP1*基因在该组织中

的表达量逐渐增加, 在盛花期(9 cm花序) *HbCPP1*的表达量达到最高。

2.4 非生物胁迫对橡胶树叶片*HbCPP1*基因相对表达量的影响

为了探究*HbCPP1*基因是否受非生物胁迫的诱导表达, 我们对*HbCPP1*基因进行了检测。总的来看, 干旱、盐以及高温胁迫下*HbCPP1*基因在橡胶树叶片中的表达受到抑制, 低温胁迫促进了*HbCPP1*基因在橡胶树叶片中的表达(图8)。干旱处理3 h后, *HbCPP1*基因在橡胶树叶片中的表达量虽稍微上升, 但其表达量差异不明显, 之后该基因的表达量都低于胁迫前的表达水平, 尤其在胁迫72 h时*HbCPP1*的基因表达量达到最低, 仅为胁迫前的0.2倍。低温胁迫能促进*HbCPP1*基因在橡胶树叶片中的表达。在低温胁迫12和24 h, *HbCPP1*基因在橡胶树叶片中的表达量明显升高, 尤其在低温胁迫12 h, 该基因的表达量迅速升高, 达到胁迫前表达量的4.63倍; 低温胁迫3和6 h的*HbCPP1*基因的表达量虽

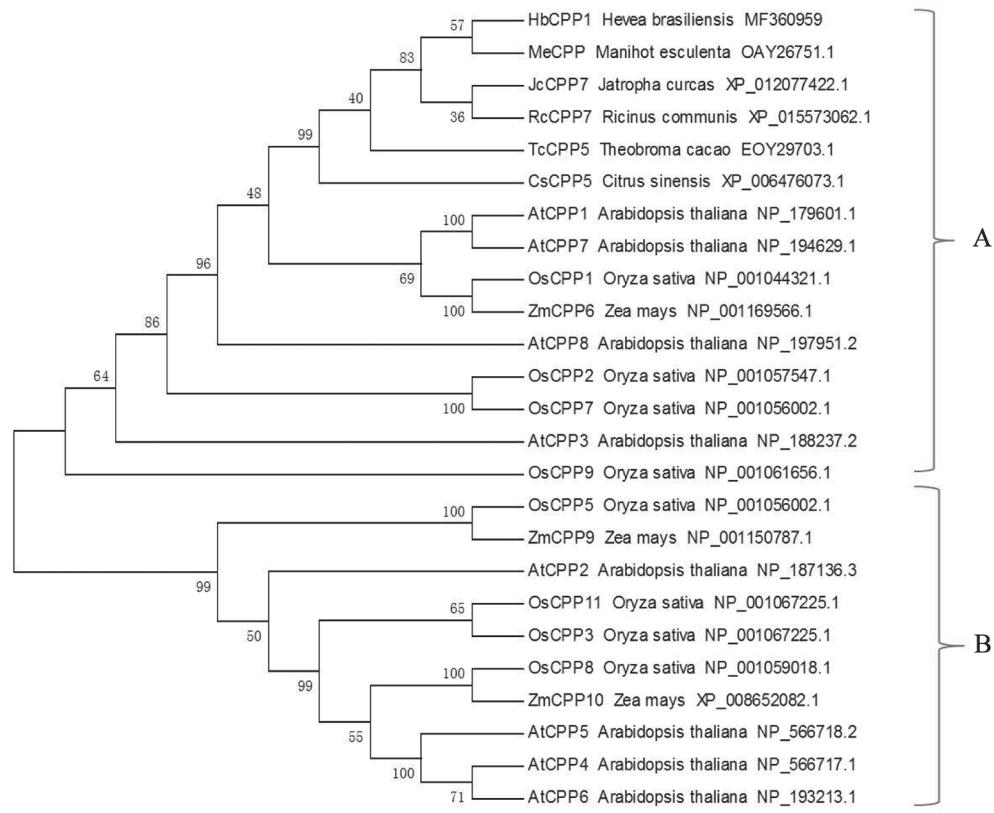


图5 橡胶树HbCPP1蛋白与其它植物CPP蛋白的系统进化树分析

Fig.5 Phylogenetic tree analysis of rubber tree HbCPP1 protein and other CPP proteins

A: CPP家族基因A亚族; B: CPP家族基因B亚族。

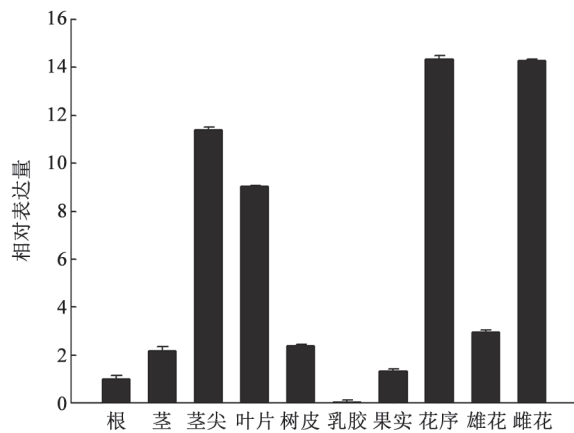


图6 *HbCPP1*基因在橡胶树不同组织中的表达分析

Fig.6 Expression analysis of *HbCPP1* in different tissue of rubber tree

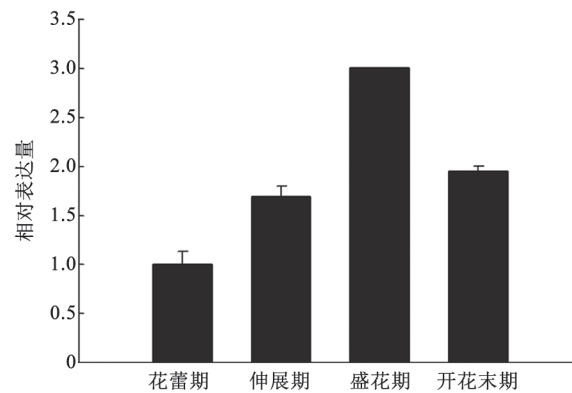
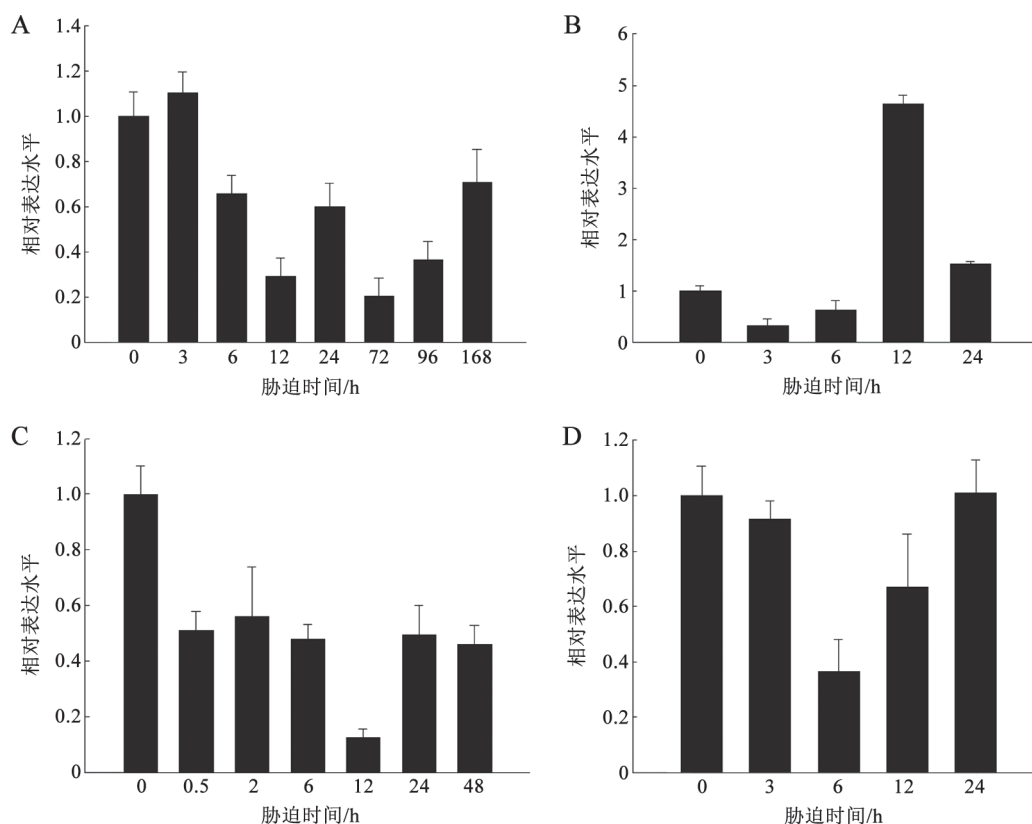


图7 *HbCPP1*基因在橡胶树不同发育时期花序中的表达分析

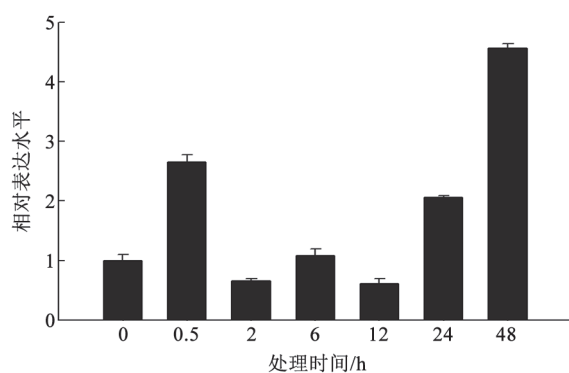
Fig.7 Expression analysis of *HbCPP1* of rubber tree in different periods of inflorescence development

有稍微下降, 但与胁迫前差异不明显。盐胁迫下, *HbCPP1*基因在橡胶树叶片的表达量都显著低于胁迫前的表达水平, 且在胁迫12 h时达到最低, 仅为胁迫前的0.12倍。在高温胁迫下, *HbCPP1*基因在

橡胶树叶片中的表达量呈先降低, 后上升的表达趋势。在高温胁迫6 h时, 该基因的表达量达到最低, 为胁迫前的0.36倍。随后, *HbCPP1*基因的表达量又上升, 胁迫24 h的表达量与对照无明显差异。

图8 非生物学胁迫下*HbCPP1*基因在橡胶树叶片中的表达分析Fig.8 Expression analysis of *HbCPP1* in leaves of rubber tree under abiotic stresses

A: 干旱胁迫; B: 低温胁迫; C: 盐胁迫; D: 高温胁迫。

图9 ABA处理下*HbCPP1*基因在橡胶树叶片中的表达Fig.9 Expression of *HbCPP1* in leaves of rubber tree under ABA treatment

2.5 ABA对橡胶树叶片*HbCPP1*基因相对表达量的影响

ABA作为植物应答非生物胁迫的重要信号分子,在植物生长发育过程中起着重要的调节作用。为了探究*HbCPP1*基因的表达是否受ABA诱导,我

们利用QRT-PCR技术检测了外源喷施ABA处理条件下*HbCPP1*基因在橡胶树叶片中的表达模式。结果(图9)显示,在外源喷洒ABA条件下,*HbCPP1*基因在橡胶树叶片中的表达量总体呈波动性增加趋势,且*HbCPP1*基因对ABA处理迅速响应,ABA处理0.5 h时,*HbCPP1*基因的表达量迅速升高,达到处理前表达量的2.65倍。之后该基因的表达量又降至与处理前的表达水平相当或偏下,但在24 h后又开始迅速升高,在48 h时达到最高峰,为处理前表达水平的4.56倍。

3 讨论

*CPP*基因家族是动植物中广泛存在的一类成员数目较少的转录因子家族,它们在生物体的生殖发育中起重要调控作用。*CPP*基因家族含有保守的CRC结构域,用于与DNA结合,调控目的基因的表达(Hauser等2000)。除了保守的CRC结构域外,其它区域不同物种中具有较大差异。目前,根

据模糊聚类分析方法,可将生物体内的*CPP*基因家族可以分为A类与B类,A类*CPP*基因家族的CRC结构域通常位于蛋白的C末端,而B类*CPP*基因家族的CRC结构域通常位于蛋白的N末端(Liu等2012)。本研究中我们鉴定到的*HbCPP1*基因不仅与拟南芥*AtCPP1*、水稻*OsCPP1*等基因同属A类*CPP*基因,而且与近缘物种麻风树、蓖麻、可可以及木薯的*CPP*基因也具有很高的同源相似性(Kent等2003; Zhang 2003; Conant等2007),推测*HbCPP1*在橡胶树中的作用机制可能与其它同类型基因在近缘物种中的作用机制相似。进一步对*HbCPP1*基因进行生物信息学分析,结果表明*HbCPP1*基因符合转录因子的特征,如蛋白理化性质预测显示该蛋白等电点为碱性,可以通过电荷之间作用来增强与DNA的结合作用;利用PSORT软件对*HbCPP1*蛋白进行亚细胞定位分析,结果表明该蛋白定位到细胞核;二级结构预测该蛋白存在与DNA结合的CRC结构域;三级结构预测该蛋白核心区域与人类LIN54蛋白的部分空间结构相似,都存在结合DNA的螺旋结构和不规则卷曲结构。

为了探究*HbCPP1*基因的组织表达特异性,我们对*HbCPP1*基因在橡胶树不同组织中的表达模式进行了分析,结果显示*HbCPP1*基因主要在橡胶树的茎尖、叶片、花序以及雌花中高调表达。橡胶树中*HbCPP1*基因的表达模式与拟南芥中*CPP*基因家族的表达模式相同(王凯2010),这些研究结果都表明*CPP*基因主要在生长发育比较旺盛的组织中高调表达,尤其是在植物花器官发育中表达丰度最高。进一步功能分析证明,*CPP*基因家族在植物的生殖发育中起着至关重要的作用。如拟南芥*CPP*基因家族中*TSO1*基因在花器官中表达量很高,该基因的突变会导致拟南芥丧失对定向细胞扩展和邻近细胞生长调控的控制,使得拟南芥不进行核分裂和胞质分裂(Hauser等2000)。大豆*CPP*基因家族中*GmCPP3*、*GmCPP12*和*GmC-PP20*基因不仅在花器官组织中高效表达,参与了大豆的生殖发育过程,而且在根瘤中高丰度表达,还参与了根瘤的细胞分裂过程(Zhang等2015)。本研究发现*HbCPP1*基因不仅在橡胶树花器官中高丰度表达,而且随着橡胶树花序的生长,*HbCPP1*基因的表达量也相应增加,表明*HbCPP1*基因可能参与了

调控橡胶树花序与花器官发育过程。

此外,*HbCPP1*基因的表达模式亦受到不同非生物胁迫的诱导。本研究发现*HbCPP1*基因在干旱、盐胁迫以及高温胁迫下,其表达模式呈现明显的负调控;相反,*HbCPP1*基因在低温胁迫下则呈现出明显的正调控,推测*HbCPP1*基因可能通过降低或调高自身的表达量来参与橡胶树的干旱、盐胁迫、高温以及低温胁迫响应过程。同样,玉米*CPP*基因家族成员*ZmCPP2*、*ZmCPP3*和*ZmCPP11*基因在干旱、盐胁迫以及低温胁迫下也表现出类似的表达模式(Song等2016)。此外,大豆*GmCPP01*基因对于干旱胁迫的响应模式亦与*HbCPP1*基因对于干旱的响应模式相似(Zhang等2015),这些结果暗示在植物逆境胁迫过程中不同物种的*CPP*基因家族成员可能具有某种程度的功能相似性。同时,考虑到ABA作为植物逆境胁迫过程中的重要信号交汇点,在植物逆境胁迫的信号转导过程中起重要调控作用。本研究结果显示在外源喷施ABA处理0.5 h,*HbCPP1*基因的表达量亦显著上调,表明其能对ABA的诱导迅速做出响应,随后其表达量虽有部分降低,但处理24和48 h又呈显著上调表达趋势,推测*HbCPP1*基因可能在橡胶树中的ABA信号转导中存在某种反馈调节机制。如前人研究证实玉米*CPP*基因家族成员*ZmTSO1*基因参与了ABA信号调控,在外源ABA处理以及脱水胁迫条件下,*ZmTSO1*基因的表达量显著上升;相反,在过表达*ZmTSO1*基因的拟南芥植株中,内源ABA的含量却明显低于野生型(闵浩巍等2011),表明玉米*ZmTSO1*基因在ABA信号转导中可能通过某种反馈作用机制来抑制内源ABA的合成。橡胶树中*HbCPP1*基因能够对ABA信号迅速做出响应,暗示其可能也存在某种类似的ABA信号转导反馈调控机制。

总之,本研究首次在橡胶树中克隆到一个*HbCPP1*基因,对其进行生物信息学分析和功能预测,并对其进行了组织特异性表达分析,以及不同非生物胁迫下的表达模式分析,为进一步深入探究*HbCPP1*基因在橡胶树生长发育过程中的功能,以及多种非生物胁迫条件下的应答机制奠定了良好基础。同时,本研究也为木本植物中*CPP*基因家族的种类鉴定和功能研究提供了有利的参考信息。

参考文献(References)

- Andersen SU, Algreen-Petersen RG, Hoedl M, et al (2007). The conserved cysteine-rich domain of a tesmin/TSO1-like protein binds zinc *in vitro* and TSO1 is required for both male and female fertility in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 58: 3657–3670
- Conant GC, Wagner GP, Stadler PF (2007). Modeling amino acid substitution patterns in orthologous and paralogous genes. *Mol Phylogenet Evol*, 42: 298–307
- Cvitanich C, Pallisgaard N, Nielsen KA, et al (2000). CPP1, a DNA-binding protein involved in the expression of a soybean leghemoglobin *c3* gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 8163–8168
- Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, et al (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*, 31: 3784–3788
- Hauser BA, He JQ, Park SO, et al (2000). TSO1 is a novel protein that modulates cytokinesis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Development*, 127: 2219–2226
- Hauser BA, Villanueva JM, Gasser CS (1998). *Arabidopsis TSO1* regulates directional processes in cells during floral organogenesis. *Genetics*, 150: 411–423
- Kent WJ, Baertsch R, Hinrichs A, et al (2003). Evolution's cauldron: duplication, deletion, and rearrangement in the mouse and human genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 11484–11489
- Liu Q, Xue Q (2007). Molecular phylogeny, evolution, and functional divergence of the LSD1-like gene family: inference from the rice genome. *J Mol Evol*, 64 (1): 354–363
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods*, 25: 402–408
- Lu T, Dou Y, Zhang C (2013). Fuzzy clustering of CPP family in plants with evolution and interaction analyses. *BMC Bioinformatics*, 14 (Suppl 13): S10
- Meng CM, Ji JH, Li XL, et al (2014). Electronic clone and bioinformatics analysis of CPP transcription factor genes from wheat. *Biotechnology*, 24 (4): 39–42 (in Chinese with English abstract) [孟超敏, 姬俊华, 李雪林等(2014). 小麦CPP转录因子基因的电子克隆及生物信息学分析. *生物技术*, 24 (4): 39–42]
- Min HW (2011). Maize *ZmTSO1-like* gene involved in signal regulation of plant abscisic acid. National Congress of Plant Biology, 2011. Guangxi Nanning, 1 (in Chinese) [闵浩巍(2011). 玉米*ZmTSO1-like*基因参与植物脱落酸的信号调控. 全国植物生物学研讨会, 2011. 广西南宁, 1]
- Olesen C, Møller M, Byskov AG(2004). Tesmin transcription is regulated differently during male and female meiosis. *Mol Reprod Dev*, 67 (1): 116–126
- Qin B, Zheng F, Zhang Y (2015). Molecular cloning and characterization of a *Mlo* gene in rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *J Plant Physiol*, 175: 78–85
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, et al (2000). *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290: 2105–2110
- Song JY, Leung T, Ehler LK, et al (2000). Regulation of meristem organization and cell division by *TSO1*, an *Arabidopsis* gene with cysteine-rich repeats. *Development*, 127: 2207–2217
- Song XY, Zhang YY, Wu FC, et al (2016). Genome-wide analysis of the maize (*Zea mays* L.) *CPP-like* gene family and expression profiling under abiotic stress. *Genet Mol Res*, 15 (3): gmr.15038023
- Sugihara T, Wadhwa R, Kaul SC, et al (1999). A novel testis-specific metallothionein-like protein, *tesmin*, is an early marker of male germ cell differentiation. *Genomics*, 57:130–136
- Sutou S, Miwa K, Matsuura T, et al (2003). Native tesmin is a 60-kilodalton protein that undergoes dynamic changes in its localization during spermatogenesis in mice. *Biol Reprod*, 68 (5): 1861–1869
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 28: 2731–2739
- Tang C, Huang D, Yang J, et al (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
- Wang K (2010). Bioinformatic analysis of the cpp transcription factors family in *Arabidopsis* and rice. *Biotechnol Bull*, (02): 76–84 (in Chinese with English abstract) [王凯(2010). 拟南芥和水稻CPP转录因子家族的生物信息学分析. *生物技术通报*, (02): 76–84]
- Yang Z, Gu S, Wang X, et al (2008). Molecular evolution of the CPP-like gene family in plants: insights from comparative genomics of *Arabidopsis* and rice. *J Mol Evol*, 67: 266–277
- Zhang J (2003). Evolution by gene duplication: an update. *Trends Ecol Evol*, 18: 292–298
- Zhang L, Zhao HK, Wang YM, et al (2015). Genome-wide identification and expression analysis of the *CPP-like* gene family in soybean. *Genet Mol Res*, 14: 1260–1268

Cloning and expression analysis of *HbCCP1* in rubber tree (*Hevea brasiliensis*)

PAN Ran-Ran^{1,#}, WEI Ming-Ming^{2,#}, WANG Ya-Jie¹, HU Xin-Xin¹, LI Wei-Guo^{2,*}

¹Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570288, China

²Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agriculture Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China

Abstract: The *CPP* gene family is a family of transcription factors widely found in plants and animals, and plays an important role in the regulation of plant reproductive development and cell division. In this study, a *CPP* gene was cloned from the floral organs of by RT-PCR method using a cDNA template from rubber tree (*Hevea brasiliensis*) cultivar 'Reyan7-33-97'. This gene was named as *HbCCP1* (accession number MF360959). Sequence analysis showed that the open reading frame of *HbCCP1* gene was 1 755 bp length, which encoding 584 amino acids, the molecular weight of protein was 63.676 kDa, and the isoelectric point (pI) was 8.4. Multiple alignments showed that *HbCCP1* protein contained two conserved CXC domains and a relatively conserved R domain, which are the characterized motifs of CPP protein. Analysis of phylogenetic tree showed that *HbCCP1* belonged to the A subfamily gene, and has higher similarity with the *MeCPP* gene in cassava and the *JcCPP7* gene in *Jatropha*, and the phylogenetic relationship was close. The amino acid composition, physical and chemical properties, and structure prediction analysis showed that the *HbCCP1* protein was an unstable hydrophilic protein with no trans-membrane and signal peptide, and which may be localized in the nucleus. The secondary structure of *HbCCP1* proteins was mainly composed of two protein binding regions and a number of irregular coiled coils. In the 3D model structure, the CRC domain constituted the core structure of *HbCCP1* proteins protein. The expression of *HbCCP1* gene in different tissues of rubber tree was detected by QRT-PCR. The results showed that *HbCCP1* gene expressed specifically in the stem tip, inflorescence and female flower. Under drought, salt, high temperature stress, and ABA treatment, the expression level of *HbCCP1* gene was significantly down-regulated; while in low temperature treatment, the expression level of *HbCCP1* gene was significantly up-regulated. It was speculated that *HbCCP1* gene may be involved in the development of floral organs and responses to many abiotic stresses in *H. brasiliensis*.

Key words: *Hevea brasiliensis*; *CPP* gene; gene cloning; expression analysis; stress treatment

Received 2017-08-10 Accepted 2018-04-04

This work was supported by the Important Science And Technology Project Of Hainan Province (ZDKJ2016020) and the Earmarked Fund for Modern Agro-Industry Technology Research System (CARS-34).

#Co-first author.

*Corresponding author (rekeyuanlywmm@126.com).