

巴西橡胶树 *HbNTL2* 基因的克隆和表达分析

康桂娟, 黎瑜[#], 曾日中^{*}

(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: 利用 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 技术, 对巴西橡胶树膜结合转录因子 *HbNTL2* 进行克隆和表达, 并通过酵母试验进行转录激活功能分析。结果表明, *HbNTL2* 基因的开放阅读框为 1 380 bp, 编码一个由 459 个氨基酸组成的蛋白, 该蛋白属于 NAC 转录因子家族中的 ANAC001 亚族; 在第 6~172 位氨基酸之间含有典型的 NAC 结构域, 第 433~453 位氨基酸具有跨膜结构域, 是膜结合 NAC 转录因子; *HbNTL2* 具有转录激活功能, 转录激活区在 C-末端; *HbNTL2* 在叶片的表达高于在橡胶树的其他部位, 受割胶、茉莉酸(JA)和乙烯(ET)处理以及低温胁迫诱导。综合分析结果表明, *HbNTL2* 可能参与调控巴西橡胶树的生长发育和胁迫应答过程。

关 键 词: 巴西橡胶树; 膜结合 NAC 转录因子; 基因克隆; 基因表达; 转录激活活性

中图分类号: S794.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2015)06-0602-08

Clone and expression analysis on gene *HbNTL2* from *Hevea brasiliensis* Muell. Arg.

Kang Guijuan, Li Yu[#], Zeng Rizhong^{*}

(Key Laboratory of Ministry of Agriculture for Rubber Biology and Genetic Resource Utilization/ Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences (CATAS), Danzhou, Hainan 571737, China)

Abstract: The whole open reading frame (ORF) sequence of a membrane-associated NAC transcription factor gene, *HbNTL2*, was cloned and analyzed by using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Real-time PCR, and yeast was adopted as a material in the transactivation assay. The results indicated that *HbNTL2* belonged to the ANAC001 subfamily with an ORF of 1 380 bp and encoded a protein with 459 amino acids. A conserved NAC domain (12–167) and a transmembrane motif (433–453) were respectively identified at the N-terminal and C-terminal from motif analysis, the result of which indicated that *HbNTL2* was a membrane-associated protein. Results from transactivation assay in yeast cells demonstrated that *HbNTL2* assumed the function for transcription activator, and its activation domain was located at the highly divergent C-terminus. The expression level of *HbNTL2* in leaves was higher than that in other parts of the rubber tree, and could be induced by tapping, jasmonic acid (JA), ethyphon (ET) and cold stress. The results suggested that *HbNTL2* might be play important roles in the regulation of growth, development and stress responses.

Keywords: *Hevea brasiliensis*; membrane-associated NAC transcription factor; gene cloning; expression analysis; transactivation activity

NAC 转录因子是植物特有的基因家族^[1]。在已经测序的大多数植物, 如拟南芥(*Arabidopsis*

收稿日期: 2015-04-15

修回日期: 2015-10-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201143); 海南省自然科学基金项目(313061); 中国热带农业科学院橡胶研究所基本科研业务费重点项目(1630022011024)

作者简介: 康桂娟(1983—), 女, 河南新乡人, 博士, 主要从事橡胶分子生物学研究, kangguijuan2010@126.com; # 贡献等同于第一作者, 黎瑜, 实验师, 主要从事分子生物学基础研究, 13976781768@163.com; *通信作者, 曾日中, 博士, 研究员, 主要从事橡胶树胶乳代谢和橡胶生物合成及其化学调控分子机制研究, hnzrz@aliyun.com

thaliana (L.) Heynh.)、水稻(*Oryza sativa* L.)^[2-3]、大豆(*Glycine max* (L.) Merr)^[4]、马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)^[5]、玉米(*Zea mays* (L.) Sp.)^[6]和中国白菜(*Brassica rapa* L.)^[7]中均有100多个NAC家族转录因子。大部分NAC蛋白的N-末端具有约160个氨基酸残基组成的保守NAC结构域(NAC domain)。根据序列保守性, NAC结构域还可以进一步分为5个亚结构域(A-E), C-末端是转录调控区(transcription regulatory region, TRR), 具有转录激活活性或转录抑制活性^[1-2]。部分NAC的C-末端还具有跨膜结构域(transmembrane motif, TM), 可以锚着在细胞质膜上, 是膜结合转录因子(membrane-associated transcription factors, MTFs), 又称为NTL(NAC with transmembrane motif 1-like)^[8-9]。这类NAC蛋白在不同物种中数量不等, 目前已发现拟南芥基因组有18个NAC蛋白是膜结合NAC^[3,9], 水稻有5个^[9], 大豆有11个^[4], 马铃薯有13个^[5], 玉米有7个^[6], 中国白菜有17个^[7], 木豆(*Cajanus cajan* (L.) Millsp.)有4个^[10], 甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)有6个^[11], 谷子(*Setaria italica* L.)有8个^[12]。膜结合转录因子(membrane-associated TFs, MTFs)是植物细胞中的一个快速反应体系^[8-9]。膜结合NAC转录因子蛋白参与调控植物的多种生长发育过程, 如细胞分裂^[13]、开花^[14]、发芽^[15]和叶片衰老^[16]。越来越多的研究还发现NTL蛋白在冷胁迫、盐胁迫和干旱胁迫反应和ABA信号转导中发挥着重要作用^[9,17-20]。Yang等^[21]发现NAC家族的膜结合转录因子NAC089(又称为NTL11)是拟南芥一个重要的细胞程序化死亡(programmed cell death, PCD)调节器。内质网应激(endoplasmic reticulum stress)促使NAC089基因表达上调, 并从内质网膜向细胞核转移, 通过调控PCD下游相关基因的表达控制其诱导的PCD过程。另一个拟南芥膜结合NAC转录因子NAC062(又称为ANAC062, NTL6)在非折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)中具有重要功能, 以一个去掉C-末端跨膜区的核定位短链形式从细胞质膜转移到细胞核上, 接力传递从质膜到细胞核的内质网应激信号, 并且调控UPR相关下游基因的表达^[22]。迄今只有关于拟南芥、水稻和血桃膜结合NAC TFs功能的报道^[9,14-23]。大戟科(Euphorbiaceae)植物巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis* Muell.Arg.)是天

然橡胶的主要来源, 已经有关于其NAC转录因子的研究报道^[24-27]。已有关于巴西橡胶树膜结合NAC转录因子*HbNLT1*生物信息学分析和功能预测的报道^[28], 但是, NAC转录因子, 尤其是膜结合转录因子在巴西橡胶树中的功能还有待研究。笔者对巴西橡胶树膜结合NA转录因子*HbNLT2*进行克隆和转录激活功能分析, 同时利用实时荧光定量PCR技术(Real time-PCR)对该基因的组织表达特性和割胶、外源激素处理(茉莉酸jasmonic acid, JA, 乙烯ethephon, ET)、低温胁迫等对基因表达的影响进行分析, 旨在为进一步研究巴西橡胶树膜结合转录因子*HbNLT2*在生长发育和胁迫应答中的功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试巴西橡胶树均来自中国热带农业科学院试验农场。

1.2 方法

1.2.1 材料处理方法

1) 采集正常割胶的热研 7-33-97 橡胶树的叶片、雄花、雌花、树皮和胶乳, 用液氮冻存备用。

2) 割胶处理。选用已达标准而未开割的热研 7-33-97 橡胶树, 按照正常割胶制度(1/2 树围, 3天1刀)采集第1刀、第4刀和第7刀割胶胶乳, 用液氮冻存备用。

3) 外源激素 ET 和 JA 处理。具体处理方法参照康桂娟等^[26-27]的方法。

4) 低温胁迫试验。选取生长一致的低温敏感品系热垦 501 和抗寒品系 93-114 芽接苗, 于 25 °C 培养箱中正常培养(16 h 光照, 8 h 黑暗)2 d 后转移至 4 °C 培养箱低温处理。采集处理 2、4、6、8 h 的叶片, 用液氮碾磨后提取总 RNA。

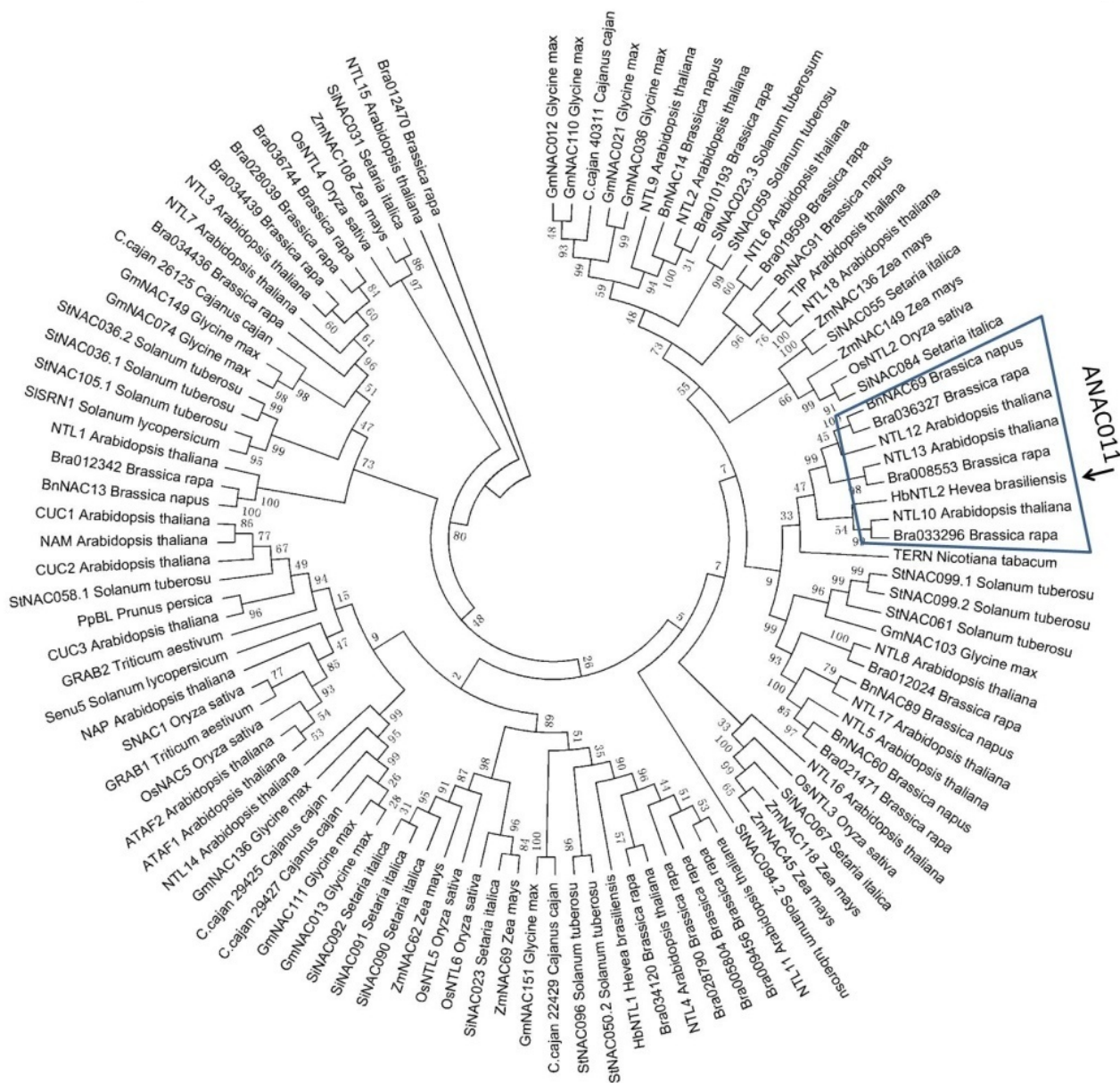
1.2 总 RNA 的提取与 *HbNLT2* 基因克隆

橡胶树不同组织样品总 RNA 的提取参照 An 等^[29]的方法。cDNA 的合成参照 Fermentas 公司的 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(K1622)反转录试剂盒说明书。依据本课题组转录组测序结果和基因组数据, 设计 1 对特异引物 *HbNLT2*-F 和 *HbNLT2*-R(表 1), 以橡胶树胶乳 cDNA 为模板对 *HbNLT2* 基因的 ORF 全长进行克隆。PCR 反应条件

利用 MEGA5.05 软件中 Neighbor-joininging 方法 (bootstrap 1000) 对 NCBI 数据库和植物转录因子数据库 PlantTFDB 搜索到的植物膜结合 NAC 转录因子进行系统进化树分析, NAC 转录因子的归类方法参照 Ooka^[2] 和 Kim^[9]。分析结果显示, *HbNTL2* 与拟南芥 *NTL10*, *NTL12*, *NTL13* 和油菜 *BnNAC69* 关系较近, 属于 ANAC001 亚族(图 2)。

利用 DNAMAN 软件对属于同一亚族的巴西橡

胶树 *HbNTL2*, 拟南芥 *NTL10*、*NTL12*、*NTL13*, 油菜 *BnNAC69*, 大白菜 *Bra033296*, *Bra008553* 和 *Bra036327* 蛋白序列进行多重比对的结果显示, 这些膜结合 NAC 转录因子蛋白的 NAC domain 比较保守, 可以进一步划分为 5 个(A~E)亚结构域, 而 C-端差异比较大(图 3)。



箭头所示为巴西橡胶树 *HbNTL2*。

图 2 *HbNTL2* 与其他植物 NAC MTFs 的系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of *HbNTL2* and membrane-associated NACs from other plant

HbNTL2	MCAHLDTFLSDPLHEERFFSPKVGFRFETDEEIVGVYLLKFKINGKDS..LVNHIVGIDILQCEFF..WDIFDRCLISSNQWYFFSRFDYKYSNR..RANRTTRRGGWK	107
BnNAC69	MERNLVGYRSEETGEEVINYLKFKIDKFW..LVNEAINENICAHDF..KFLPALSKLBSKDLVWYFFTPREYHASEKKGTTRTTPSGGWK	90
Bra008553	MENNLYGYRSEETGEEVINYLKFKIDKSW..VVDHAISEVNICRYEF..WFLSLSKLBSKDLVWYFFSPKEY..TSAKKNVTRRTTTPSGGWK	89
Bra033296	MVEKPEFBRFHYDEELVGVYLLKFKILGNHS..VVDGVIRFIKIGSLDF..WDLRFQSKIKSRFPWYFFSLIEN...NRG.RQSRITTPSGGWK	85
Bra036327	MERNLVGYRSEETGEEVINYLKFKIDKFW..LVNEAINENICAHDF..KFLPALSKLBSKDLVWYFFTPREYHASEKKGTTRTTPSGGWK	90
NTL10	MEDQVGFGRFENDEELVGVYLLKFKIDKSW..VVDHAISEVNICRYEF..WFLSLSKLBSKDLVWYFFTPREYHASEKKGTTRTTPSGGWK	87
NTL12	MMKLICGYRSEETGEEVINYLKFKIDKSW..VVDHAISEVNICRYEF..WFLSLSKLBSKDLVWYFFTPREYHASEKKGTTRTTPSGGWK	90
NTL13	MVKDLVGYRSEETGEEVINYLKFKIDKSW..VVDHAISEVNICRYEF..WFLSLSKLBSKDLVWYFFTPREYHASEKKGTTRTTPSGGWK	89
A		
HbNTL2	VFGKIRHIAEETG....RGDIGNKRLVYFKKVSQSKPLRISWVHEHYQSTN..LLEHQM...EVVCKLKHKADEITDHS....LQDEGEFIQPMDEAVDNQVQTD	202
BnNAC69	ATGKDRIRKRRGH....GVVIGIKRKLIVYHGGKAANG..VGTFWWHEHYHIT...SLFLNQ...NVVHCQVMKKGADGDSLYG..NNSNALSHSMVSDLNTVREIN...TA	186
Bra008553	ATGVDRIKIRRRGN....GVVIGIKRKLIVYHGGKAVNG..VGTFWWHEHYHIT...SLFLNQ...NVVHCQVMKKGADGDSLYG..NNSNEPSSSMVSDNPFVKFIN...TS	185
Bra033296	ITGDFVNVNDRWGN..LTGFRGRIGKRVLTFSKAKSSSS..SVSEWVHBLHYTHIDLEHKKRTTYVVCORLEMKGDGVNLS....TPTFAPTMANASSAVDQSLQGN	187
Bra036327	ATGKDRIRKRRGH....GVVIGIKRKLIVYHGGKAANG..VGTFWWHEHYHIT...SLFLNQ...NVVHCQVMKKGADGDSLYG..NNSNALSHSMVSDLNTVREIN...TA	186
NTL10	ITGESVVEKQNGFCSEGFGRIGKRVLTFSKAKSSSS..SVSEWVHBLHYTHIDLEHKKRTTYVVCORLEMKGDGVNLS....TPTFAPTMANASSAVDQSLQGN	193
NTL12	ITGVDRIKIRRRGN....GVVIGIKRKLIVYHGGKSPHG..VGTFWWHEHYHIT...SLFLNQ...NVVHCQVMKKGADGDSLYG..NNSNEPSSSMVSDNPFVKFIN...TS	185
NTL13	ATGVDRIKIRRRGN....RGDIGNKRLVYFKKVSQSKPLRISWVHEHYQSTN..LLEHQM...EVVCKLKHKADEITDHS....LQDEGEFIQPMDEAVDNQVQTD	187
B		
HbNTL2	SEQVQSHICPTGMIFGRKISQIHSQRVS..DRHLPLTSCFNQPEGLDLDLS....SNDIEDPVKFAFADSLC..LDKYFTEKVDLVELIEYQSSPSESSQMKTSNL	304
BnNAC69	PQVEQPRQD..LYLSVDDLANPLNEQDDPS....LFNPDTLENIS.....YWEDEYINDLLGFNGG....NYDDVLRAPDITMQEDRNDHRRPKALTGI	270
Bra008553	PEVEQQRQE..DGMSMYDILIPNLQVDSFYDVFNPKNKSEFTNNY.....Y..PQTFYGEDYWNGLLDYNGG....NEFDVFRNCELTMRENQSNHRRPKPLTGI	278
Bra033296	SGHYNTLSYDS...GYQFNGNSDMQSQFGYSEYFNPTSEYGLANQSNWFSN..LQQQVFPYSAPYQDSS..DVWRQVVEEEDWFLDERTCMRVLDLHHRPKKPVGTI	291
Bra036327	PQVEQPRQD..LYLSVDDLANPLNEQDDPS....LFNPDTLENIS.....YWEDEYINDLLGFNGG....NYDDVLRAPDITMQEDRNDHRRPKALTGI	270
NTL10	SGSYNTYSEYDSANHGQQFNENSNIMQ..QQPLQGSFNFLEYDFANHGQWLSYIDLQQQVFPYLAPEYENESMIWKHVEENFEFLVDERTSMQQHYSDHRRPKKPVSV	302
NTL12	LQVEQPGKENLLGMSVDDITFPMNQDEPQGFHLPNDDEEIRG.....LRHVDRGTVEYLFANEENMDG..LSMNDLIPMIVQEDLSEWEGFNADTFF	279
NTL13	LEFEKPGQENFFGMSVDDITGPKNEQEDFSLDVLDPDMLESNNNPTVHPQAP..HLTPNDDEFLGLLAHVNRQVEYLFANEEDFISRTPLSMTENRNDHRRPKKALS	295
C		
HbNTL2	NDEAAR...SEYQHMRTFVSGRGSAAQDEPIFGVGGEPIFLFSSRESIDKFLDEWYCSYGRSMGLATCYS....PFAIKSSSTVSTVSNISCRYMSKEPAKPYWNL	405
BnNAC69	IVDCS..SDSDAESISATSYQETSSPDSFHSLSA...QFHTSGDEIPSLRKDSCDIDPHAE.....TSINRKRKAHLTRRTVPSKQEVNEGKSKAVN..ASVDRKK	366
Bra008553	SP...IMTEKKGWFIETEAICR..NHNAPYIYFMNMIIGLILLVAVIGN..IIWVIGLILLVAVIGNIIFWEASENEFADE	365
Bra033296	FVGDSS..DDTDTSTIGKGTWSSDVSFGSKDVPYHAPKDATEPSTVEPLYNDSDDTDTSTIGKGTWSSDVSFGSNVVPYHAPKDATEPSTVEPLYNDEPQEQPKQLML	400
Bra036327	IVDCS..SDSDAESISATSYQETSSPDSFHSLSA...QFHTSGDEIPSLRKDSCDIDPHAE.....TSINRKRKAHLTRRTVPSKQEVNEGKSKAVN..ASVDRKK	366
NTL10	LPDDSS..DTETGSMIFEDTSSSDVSFGSDEPGHTRIDIPSLNIEPLHN.....YKA.....QEQPKQ...	361
NTL12	SDNNN...NYNLNVHQLTPYGDGYLNAFSGYNEGNPDDELVLQGNRNDHMRFPVTG.....TIDYSSSDSGSAGSISTTVKQEP...RAYD...AFMNNE	369
NTL13	IVDYSSDSNDAESISATSYQETSSPDSFHSLSA...QFHTSGDEIPSLRKDSCDIDPHAE.....TSINRKRKAHLTRRTVPSKQEVNEGKSKAVN..ASVDRKK	393
D		
HbNTL2	RFTGSSFNDEWESS..CPDTTIPSNRSHLSVCIVNVLFGLAVFILVWEMLRH.....	459
BnNAC69	SSSSMVTEKKGWFIETEAICR..NHNAPYIYFMNMIIGLILLVAVIGN..IIWVIGLILLVAVIGNIIFWEASENEFADE	425
Bra008553	SP...IMTEKKGWFIETEAICR..NHNAPYIYFMNMIIGLILLVAVIGN..IIWVIGLILLVAVIGNIIFWEASENEFADE	425
Bra033296	QLQGGKQVINKQKSECEWKAEDSIXKAPSTYAVKQSWIVLEESIQKRSRWIYLN..IVGLLLFIIFIGWILLG....	475
Bra036327	SSSSMVTEKKGWFIETEAICR..NHNAPYIYFMNMIIGLILLVAVIGN..IIWVIGLILLVAVIGNIIFWEASENEFADE	425
NTL10	..QSKERVISSQKSECEWKAEDSIXKAPSTYAVKQSWIVLEENNAQ...WNYLKNMIIGVLLFISVIS..WILLVG....	429
NTL12	SS..LVTEKKGLFIVEADAMER..NRKPRFRIYLMKMIIGNIISVLLPVRKLIIPVKKL.....	423
NTL13	SS..MVTEKKGWFIETEAICR..NHNAPYIYFMNMIIGLILLVAVIGN..IIWVIGLILLVAVIGNIIFWEASENEFADE	457
E		

下划线标示为 NAC domain 中的 5 个保守亚结构域(A-E)。

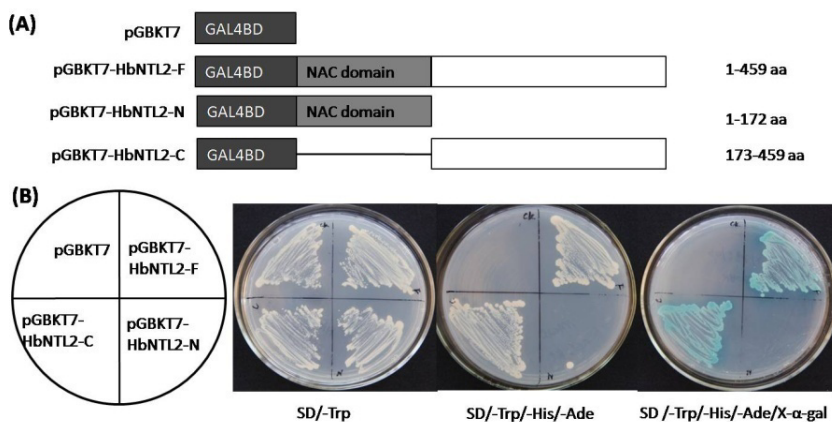
图3 HbNTL2与同一亚族膜结合NAC蛋白的多重序列比对结果

Fig.3 Multiple sequence alignment of the HbNTL2 with other membrane-associated NAC proteins belonged to the same subfamily

2.2 HbNTL2 在酵母中的转录激活功能分析

为了检测HbNTL2转录因子的转录激活功能和转录激活域的位置,将pGBKT7-HbNTL2-F(1-459 aa)、

pGBKT7-HbNTL2-N(1-172aa)、pGBKT7-HbNTL2-C(173-459 aa)融合表达蛋白以及pGBKT7空载对照分别接种到3种不同的缺陷型培养基上(图4)。



A 载体构建示意图; B HbNTL2 的转录激活功能分析。

图4 HbNTL2的转录激活试验结果

Fig.4 Transactivation assay for HbNTL2

培养结果(图4-B)显示,全部转化子在SD/-Trp培养基上均能正常生长,而只有pGBKT7-HbNLT2-F和pGBKT7-HbNLT2-C能在SD/-Ade/-His/-Trp培养基上正常生长,在X- α -gal存在时呈现蓝色。这说明HbNLT2NAC转录因子蛋白能够与pGBKT7载体中的GAL4-DB结合,激活下游报告基因转录,具有转录激活功能,转录激活域在C末端。

2.3 *HbNLT2* 基因的表达分析

利用 Real-time PCR 技术分析巴西橡胶树 *HbNLT2* 基因在不同组织和处理中的表达特性,结果显示,该基因没有组织表达特异性,在橡胶树雄花、雌花、叶片、胶乳和树皮中均有表达,在叶片中的表达量最高,在雄花中的表达量次之,在胶乳中的表达量较低,在叶片中的表达量约为胶乳中表达量的40倍(图5)。割胶处理对 *HbNLT2* 基因的表达也有影响,在未开割巴西橡胶树树胶乳中, *HbNLT2* 基因的表达随着割胶刀次的增加呈上升趋势(图6)。外源激素ET或JA处理对 *HbNLT2* 基因表达影响的分析结果显示,随着时间的增加,表达量逐步升高,在处理72 h后检测的表达量最高(图7)。低温胁迫对巴西橡胶树抗寒品系93-114和敏感品系热垦501胶乳中 *HbNLT2* 基因的表达均有影响,4℃低温处理后 *HbNLT2* 基因的表达量均有所上升(图8)。

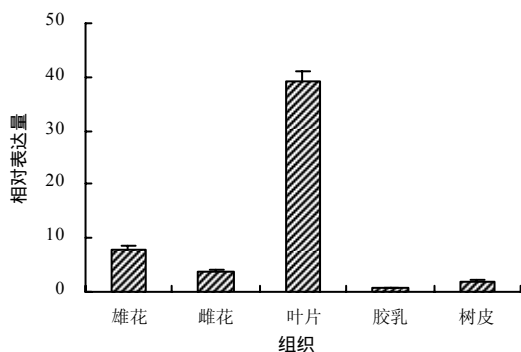


图5 巴西橡胶树不同组织中 *HbNLT2* 的相对表达量

Fig.5 Expression level of *HbNLT2* in different tissues of *Hevea brasiliensis*

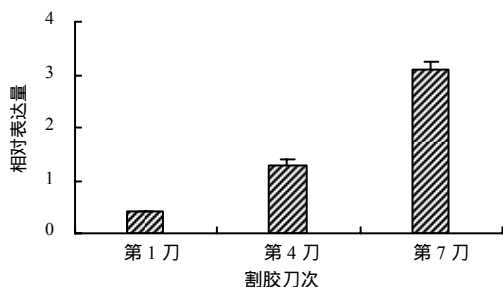


图6 不同割胶刀次胶乳中 *HbNLT2* 的相对表达量

Fig.6 Expression level of *HbNLT2* in latex at different tapping time

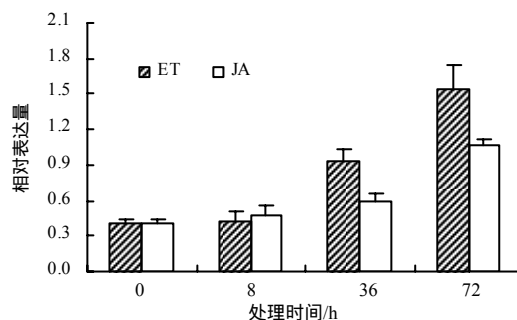


图7 乙烯(ET)和茉莉酸(JA)不同处理时间 *HbNLT2* 的相对表达量

Fig.7 Expression level of *HbNLT2* at different durations by ethephon (ET) and jasmonic acid (JA)

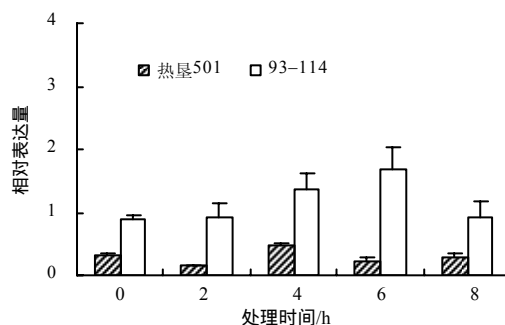


图8 低温胁迫不同处理时间 *HbNLT2* 的相对表达量

Fig.8 Expression level of *HbNLT2* at different durations of low temperature stress

3 结论与讨论

NAC TFs是植物特有的一类转录因子,在保守的N-末端具有由A、B、C、D、E这5个亚结构域组成的NAC domain,而不保守的C-末端是转录激活调控区(TRR)^[1-2]。NTL是NAC转录因子家族中比较特殊的一类,除了具有上述NAC转录因子的共同特征外,在C-末端还具有一个跨膜结构域(TM),是膜结合转录因子(MTF)^[8-9]。本研究中克隆的 *HbNLT2* 基因,不但具有NAC domain 和转录激活活性等NAC转录因子的基本特征,还在C-末端具有跨膜结构域,与已报道的膜结合NAC转录因子结构特点相符,是巴西橡胶树膜结合NAC转录因子家族的成员。

NAC TFs不仅参与调控植物的生长发育,而且参与包括干旱、盐、低温和病原菌等多种生物、非生物胁迫的应答过程^[3,13-22]。Kim等^[9,14]的研究发现,拟南芥和水稻膜结合转录因子在不同的植物组织中表达,具有多种功能,在接受到外界信号后快速作出反应,调控下游基因的表达。在拟南芥基因组中发现至少有13个NAC家族转录因子MTFs,其中NTM1(NAC with Transmembrane Motif 1)与叶片

的形态变化有关,还参与调控细胞分化过程^[13]。本研究中对*HbNLT2*的组织表达特性分析结果表明,该基因在巴西橡胶树叶片、花、树皮和胶乳等多个组织中均有表达,推测其可能参与调控橡胶树的生长发育过程。

拟南芥和水稻NLT基因可以被多种生物和非生物胁迫诱导表达,参与调控植物多种胁迫的应答过程^[9],例如,拟南芥膜结合NAC转录因子NLT6基因受低温、干旱、高盐和脱落酸(abscisic acid, ABA)诱导表达,冷胁迫还诱导NLT6活化,随之进入细胞核后调控一系列抗病相关(pathogenesis-related, PR)基因,如PR1、PR2和PR5的表达使转基因植株表现出明显抗病性^[20]。花青苷是一种重要的植物次生代谢产物,血桃(blood-fleshed peach)膜结合NAC转录因子基因*BL*参与调控植物花青苷的合成过程,在果实发育后期与其他NAC基因形成异质二聚体,激活MYB基因的转录,进而促进花青苷代谢相关基因的表达,最终导致果肉大量积累花青苷呈血色^[23]。胶乳是橡胶树的次生代谢产物,割胶是获得胶乳的主要方式,具有机械伤害和促进排胶双重作用,诱导*HbNLT2*基因的表达,推测该基因可能参与调控伤害应激反应和橡胶生物合成过程。ET是一种植物激素,广泛参与植物的生长发育和生物与非生物的胁迫过程。Shan等^[33-34]发现香蕉NAC的表达受ET和低温胁迫诱导,并且通过ET信号通路和ICE1-CBF冷反应信号通路调控香蕉的成熟过程和耐冷性。目前使用的橡胶树增产刺激剂的主要成分也是ET。JA已被证实能够促进橡胶树次生乳管分化和橡胶生物合成。*HbNLT2*基因表达受到外源ET和JA处理均诱导,推测其可能参与了植物激素的信号转导过程。

巴西橡胶树是原产于热带的多年生乔木,对低温十分敏感,在气温低于10℃时往往受到不同程度的寒害^[35]。中国主要植胶区位于热带北缘18国附近,是非传统植胶区,经常受到低温寒潮的影响,导致产量下降,严重时危及橡胶树生存,因此,低温寒害已成为中国天然橡胶发展的主要限制因子^[35-38]。本研究中发现低温胁迫可以诱导耐寒品系93-114和敏感品系热垦501中*HbNLT2*基因的表达,推测*HbNLT2*与巴西橡胶树低温胁迫的应答过程相关。本研究克隆了一个巴西橡胶树ANAC001亚家族

的膜结合NAC转录因子,依据其转录激活域和表达特性分析结果,可推测其参与了巴西橡胶树的生长发育和次生代谢、胁迫应答和激素转信号转导过程,转化模式植物的功能验证还有待研究。

参考文献:

- [1] Olsen A N, Ernst H A, Leggio L L, et al. NAC transcription factors: Structurally distinct, functionally diverse[J]. Trends Plant Sci, 2005, 10(2): 79-87.
- [2] Ooka H, Satoh K, Doi K, et al. Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*[J]. DNA Res, 2003, 10(6): 239-247.
- [3] Puranik S, Sahu P P, Srivastava P S, et al. NAC proteins: Regulation and role in stress tolerance[J]. Trends Plant Sci, 2012, 17(6): 369-381.
- [4] Le DT, Nishiyama R, Watanabe Y, et al. Genome-wide survey and expression analysis of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress[J]. DNA Res, 2011, 18(4): 263-276.
- [5] Singh A K, Sharma V, Pal A K, et al. Genome-wide organization and expression profiling of the NAC transcription factor family in potato (*Solanum tuberosum* L.)[J]. DNA Res, 2013, 20(4): 403-423.
- [6] Shiriga K, Sharma R, Kumar K, et al. Genome-wide identification and expression of drought-responsive members of the NAC family in maize[J]. Meta Gene, 2014, 2: 407-417.
- [7] Liu T K, Song X M, Duan W K, et al. Genome-wide analysis and expression patterns of NAC transcription factor family under different developmental stages and abiotic stresses in chinese cabbage[J]. Plant Mol Biol Rep, 2014, 32(5): 1041-1056.
- [8] Seo P J, Kim S G, Park C M. Membrane-bound transcription factors in plants[J]. Trends Plant Sci, 2008, 13(10): 550-556.
- [9] Kim S G, Lee S M, Seo P J, et al. Genome-scale screening and molecular characterization of membrane-bound transcription factors in *Arabidopsis* and rice[J]. Genomics, 2010, 95(1): 56-65.
- [10] Satheesh V, Jagannadham P T, Chidambaramanathan P, et al. NAC transcription factor genes: Genome-wide identification, phylogenetic, motif and cis-regulatory element analysis in pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.)[J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(12): 7763-7773.
- [11] Wang B Y, Guo X H, Wang C, et al. Identification and characterization of plant-specific NAC gene family in canola (*Brassica napus* L.) reveal novel members involved in cell death[J]. Plant Mol Biol, 2015, 87(4/5): 1-17.
- [12] Puranik S, Sahu P P, Mandal S N, et al. Comprehensive genome-wide survey, genomic constitution and

- expression profiling of the NAC transcription factor family in Foxtail millet (*Setaria italica* L.)[J]. Plos One, 2013, 8(5): e64594.
- [13] Kim Y S, Kim S G, Park J E, et al. A membrane-bound NAC transcription factor regulates cell division in Arabidopsis[J]. Plant Cell, 2006, 18(11): 3132–3144.
- [14] Kim S G, Kim S Y, Park C M. A membrane-associated NAC transcription factor regulates salt-responsive flowering via FLOWERING LOCUS T in Arabidopsis[J]. Planta, 2007, 226: 647–654.
- [15] Kim S G, Lee A K, Yoon H K, et al. A membrane bound NAC transcription factor NTL8 regulates gibberellic acid mediated salt signaling in Arabidopsis seed germination[J]. Plant J, 2008, 55: 77–78.
- [16] Lee S, Seo P J, Lee H J, et al. A NAC transcription factor NTL4 promotes reactive oxygen species production during drought-induced leaf senescence in Arabidopsis[J]. Plant J, 2012, 70(5): 831–844.
- [17] Li P, Wind J J, Shi X, et al. Fructose sensitivity is suppressed in Arabidopsis by the transcription factor ANAC089 lacking the membrane-bound domain[J]. P Natl Acad Sci USA, 2011, 108(8): 3436–3441.
- [18] Li P, Zhou H, Shi X L, et al. The ABI4-induced Arabidopsis ANAC060 transcription factor attenuates ABA signaling and renders seedlings sugar insensitive when present in the nucleus[J]. PLOS Genet, 2014, 10(3): e1004213.
- [19] Nuruzzaman M, Shari A M, Kikuchi S. Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants[J]. Front Microbiol, 2013, 4: 248.
- [20] Seo P J, Park C M. A membrane-bound NAC transcription factor as an integrator of biotic and abiotic stress signals[J]. Plant Signal Behav, 2010, 5(5): 481–483.
- [21] Yang Z T, Lu S J, Wang M J, et al. A plasma membrane-tethered transcription factor, NAC062/ANAC062/NTL6, mediates the unfolded protein response in Arabidopsis[J]. Plant J, 2014, 79(6): 1033–1043.
- [22] Yang Z T, Wang M J, Sun L, et al. The membrane-associated transcription factor NAC089 controls ER–Stress-Induced programmed cell death in plants[J]. PLoS Genetics, 2014, 10(3): e1004243.
- [23] Zhou H, Kui L W, Wang H L, et al. Molecular genetics of blood-fleshed peach reveals activation of anthocyanin biosynthesis by NAC transcription factors[J]. Plant J, 2015, 82(1): 105–121.
- [24] 邱琼, 朱家红, 张治礼. 巴西橡胶树 *HbNAC1* 基因的克隆和表达分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2012, 20(5): 469–474.
- [25] 康桂娟, 曾日中, 聂智毅, 等. 巴西橡胶树 NAC 转录因子 *HbNAC1* 基因的克隆及生物信息学分析[J]. 中国农学通报, 2012, 28(34): 1–11.
- [26] 康桂娟, 黎瑜, 曾日中. 巴西橡胶树 *HbNAC24* 基因克隆和表达分析[J]. 西北植物学报, 2014, 34(12): 2374–2381.
- [27] 康桂娟, 黎瑜, 曾日中. 巴西橡胶树 *HbNAC33* 基因的克隆和表达分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(4): 1–8.
- [28] 康桂娟, 曾日中, 聂智毅, 等. 巴西橡胶树膜结合 NAC 转录因子 *HbNTL1* 的克隆及生物信息学分析[J]. 中国农学通报, 2012, 28(31): 7–14.
- [29] An, Z W, Wang Q T, Hu Y S, et al. Co-extraction of high-quality RNA and DNA from rubber tree (*Hevea brasiliensis*)[J]. Afr J Biotechnol, 2012, 39(11): 9308–9314.
- [30] Jin J P, Zhang H, Kong L, et al. PlantTFDB 3.0: A portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors[J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(1): 1182–1187.
- [31] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Mol Biol Evol, 2011, 28: 2731–2739.
- [32] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method[J]. Methods, 2001, 25: 402–408.
- [33] Shan W, Kuang J F, Chen L, et al. Molecular characterization of banana NAC transcription factors and their interactions with ethylene signalling component EIL during fruit ripening[J]. J Exp Bot, 2012, 63(14): 5171–5187.
- [34] Shan W, Kuang J F, Lu W J, et al. A banana fruit NAC transcription factor MaNAC1 is a direct target of MaICE1 and involved in cold stress through interacting with MaCBF1[J]. Plant Cell Environ, 2014, 37(9): 2116–2127.
- [35] 刘世红, 田耀华. 橡胶树抗寒性研究现状与展望[J]. 广东农业科学, 2009, 11(3): 26–28.
- [36] 程汉, 安泽伟, 蔡海滨, 等. 转移巴西橡胶树 *HbCBF1* 基因提高烟草抗寒能力的研究[J]. 热带作物学报, 2010, 31(9): 1433–1438.
- [37] 王立丰, 吴绍华, 田维敏. 巴西橡胶树抗寒机制研究进展[J]. 热带作物学报, 2012, 33(7): 1320–1325.
- [38] 王祥军, 李维国, 高新生, 等. 巴西橡胶树响应低温逆境的生理特征及其调控机制[J]. 植物生理学报, 2012, 48(4): 318–324.

责任编辑: 王赛群
英文编辑: 王 库