

# 橡胶树树皮 *HbbHLH* 基因三端序列的克隆及表达分析

陈霞, 吴华玲, 罗世巧, 曾日中, 白先权, 段翠芳<sup>\*</sup> (中国热带农业科学院橡胶研究所, 海南儋州 571737)

**摘要** [目的] 为今后深入了解茉莉酸诱导橡胶树乳管分化的分子机理奠定基础。[方法] 根据 bHLH 转录因子基因保守区设计引物, 以橡胶树树皮 RNA 反转录第一链 cDNA 为模板, 获得橡胶树树皮组织 *bHLH* 基因的 EST 序列, 以此序列设计巢式引物, 应用 3'RACE 技术对其三端序列进行克隆, 并利用半定量 RT-PCR 分析该基因在茉莉酸处理后 4 h、8 h、1 d、2 d、3 d 的表达情况。[结果] 克隆共得到 1 084 bp 的 *HbbHLH* 基因 3 端序列, 序列分析发现该基因属于 MYC 型 HLH 结构域。表达分析结果显示, 茉莉酸处理后, *bHLH* 基因在 8 h 内表达逐渐增强, 1 d、2 d 时表达稳定最高, 3 d 时表达水平开始减弱。[结论] 茉莉酸对 *HbbHLH* 基因的表达具有调控作用。

**关键词** 橡胶树; 茉莉酸; *HbbHLH* 基因; 克隆; 表达

**中图分类号** S794.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)26-11253-04

## Cloning and Expression Analysis of 3' End Region of *HbbHLH* Gene in Bark from *Hevea Brasiliensis*

CHEN Xia et al (Rubber Institute of Chinese Academy of Tropic Agriculture Sciences, Danzhou, Hainan 571737)

**Abstract** [Objective] The aim was to lay the foundation for further understanding the molecular mechanism of the jasmonate acid inducing laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis*. [Method] The EST sequence of *HbbHLH* gene in bark from *H. brasiliensis* was obtained from the first strand cDNA by reverse transcript mRNA from the bark of *H. brasiliensis* by using the primers designed according to the conservative region of bHLH transcription factor gene and the 3' end region of this gene was cloned by rapid amplification cDNA ends (RACE) technique using nested primers designed according to the obtained sequence. Further more, the expressions of the *HbbHLH* gene treated with jasmonate acid after 4 h, 8 h, 1 d, 2 d and 3 d were analyzed by semi-quantitative RT-PCR. [Result] A 1 084 bp cDNA fragment of the 3' end region from *HbbHLH* gene was obtained by clone and the sequence analysis showed that the gene belonged to the HLH domain from MYC type. The expression analysis result showed that after the treatment with jasmonic acid, the expression level of *HbbHLH* gene was increased gradually within 8 hours, and kept stable at a high level after treatment with 1 d and 2 d, but decreased at 3 d. [Conclusion] The jasmonic acid had the regulatory effect on the expression of *HbbHLH* gene.

**Key words** *Hevea brasiliensis*; Jasmonate acid; *HbbHLH* gene; Clone; Expression

巴西橡胶树的乳管是合成与贮存胶乳的地方<sup>[1]</sup>,也是决定橡胶产量的最重要的结构成分<sup>[2-3]</sup>,树干次生韧皮部中的乳管列数是影响橡胶产量的最主要的因素之一<sup>[4-6]</sup>。同时,乳管列的分布、乳管细胞的密度和乳管的大小也与橡胶胶乳的产量具有一定程度的相关性<sup>[2-3,7]</sup>。研究表明外施茉莉酸及较茉莉酸浓度更高的茉莉酸生物合成的前体亚麻酸能够诱导橡胶树的次生乳管分化<sup>[8-9]</sup>,外施其他激素,如细胞分裂素、生长素、脱落酸、乙烯和水杨酸等都不能诱导乳管分化<sup>[10]</sup>。机械损伤也可以诱导乳管分化,其作用可被外施茉莉酸增强,被外施茉莉酸生物合成的抑止剂阻断<sup>[11]</sup>,而且机械损伤和外源茉莉酸可提高橡胶树胶乳中脂氧合酶(内源茉莉酸合成的关键酶和限速酶)的活性<sup>[12]</sup>,表明机械伤害的作用是通过诱导橡胶树内源茉莉酸而发挥作用,与机械伤害可诱导植物体内源茉莉酸急剧增加的结论相一致<sup>[13-16]</sup>。曾日中等提出茉莉酸与机械伤害是通过对橡胶树内源茉莉酸的诱导作用而刺激橡胶树乳管分化的假说<sup>[12,17]</sup>。

bHLH<sup>[18]</sup>是在植物中广泛存在的一类重要转录因子,由约 60 个氨基酸残基组成,因 HLH 结构上游富含碱性氨基酸而得名,即 HLH Motif 及其上游富含碱性氨基酸基序,含有 2 个相连的基本亚区,其中碱性氨基酸基序与 DNA 结合有关,对基因的转录发挥调控作用<sup>[19]</sup>。bHLH 家族主要成员 *c-myc*、*mad1*、*max*、*mix* 和 *mtt* 在细胞增殖、分化和凋亡方面起着重要作用<sup>[20-21]</sup>。bHLH 转录因子在植物界已经被广泛克隆。在拟南芥、水稻和西红柿等植物中,发现了许多响应茉莉酸

信号的 bHLH 家族转录因子基因,如 *JAMYC2*、*JAMYC10* 和 *AtMYC2* 等<sup>[20]</sup>。茉莉酸可以诱导橡胶树皮中乳管的分化,为探索 bHLH 转录因子是否也可能参与了茉莉酸诱导橡胶树乳管分化的信号转导过程,笔者以先前在橡胶胶乳中得到的一个 *bHLH* 基因的 EST 为基础,根据其保守序列设计引物在橡胶树树皮中克隆 *bHLH* 基因,并分析其在茉莉酸处理不同时段下的橡胶树皮中的表达变化,为今后更深入地解析茉莉酸诱导橡胶树乳管分化的分子机理奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 橡胶树。**以中国热带农业科学院橡胶研究所 9 队实验基地巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)无性系热研 7-33-97 为材料,选取一年生具有 3~4 蓬叶且顶叶稳定无病虫害健康枝条为材料。材料处理:用 80% 酒精(0.1% DEPC·H<sub>2</sub>O 配制)溶解茉莉酸粉末,配制成 10 mg/ml 的茉莉酸母液,并剧烈摇动 10 min 混匀;以羊毛脂为载体,每 100 μl 茉莉酸母液称取 1 g 羊毛脂,用玻璃棒搅拌混匀;先用刀片轻轻刮去第一蓬叶下第一节间蜡质(勿刮伤,因为会产生伤害茉莉酸),用烘烤过的玻璃棒将茉莉酸涂液涂于第一节间,用黑色塑料袋包裹,并用编织带绑好以防止茉莉酸见光分解,分别取处理 4 h、8 h、1 d、2 d、3 d 的第一节间树皮,液氮研磨, -80 °C 保存备用。

**1.1.2 菌种。**JM109 由中国热带农科院橡胶研究所实验室保存, DH5α 购自 TAKARA 公司。

**1.1.3 其他。**克隆载体: pGEM-T easy Vector system (lot: #191022) 购自 promega 公司; 反转录试剂盒: Reverse Transcription system (lot: #228049) 购自 promega 公司; RECE 试剂盒: SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Cat. No. 634914) 试剂盒和 Advantage 2 × PCR Kit (Cat. No. 639206) 购自 clontech

**基金项目** 国家自然科学基金资助项目(30660147); 海南省自然科学基金项目(30507)。

**作者简介** 陈霞(1981-), 女, 四川简阳人, 硕士研究生, 研究方向: 分子生物学。\*通讯作者。

**收稿日期** 2008-06-20

公司;PCR 产物纯化试剂盒:离心柱型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(目录号:D9209)购自 QiaGen 公司,Gel Extraction kit (D2501-01)购自 OMEGA 公司;酶类:*EcoRI*、*HindIII*等酶内购自 TAKARA 公司,2 × PCR mix 购自天根公司;DNA marker: 购自 TAKARA 公司和天根公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 SDS 裂解法提取橡胶树皮总 RNA。**参照曾日中的方法,并有修改。

**1.2.2 cDNA 第一链的合成。**取约 1 μg RNA,70 °C 培育 10 min,依次加入 4 μl 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,2 μl 10 × 反转录 buffer,2 μl 10 mmol/L dNTP Mixture,0.5 μl 重组 RNA 酶抑制剂,0.6 μl AMV 反转录酶 1 μl Oligo(dT)引物,补灭菌超纯至 20 μl,42 °C 培育 60 min,95 °C 培育 5 min,冰浴 5 min,加灭菌超纯水稀释 5 倍,-20 °C 保存备用。

**1.2.3 *HbbHLH* 转录因子基因的 EST 克隆。**根据该实验室已获得但未发表橡胶胶乳 *HbbHLH* 转录因子基因的保守序列设计引物,引物序列如下:

bHLH-BU:5'-CAAAGGAGCCAAGCCACGAGTC-3'

bHLH-BD:5'-CTCTCTCTACGCCGCTCTC-3'

使用上海生工即用 PCR 扩增试剂盒进行,以树皮 cDNA 为模板,以 10 μmol/L 的 bHLH-BU/BD 为引物,在 50 μl 的反应体系中进行 PCR 扩增,体系由 25 μl PCR mix,1 μl bHLH-BU/BD,1 μl cDNA,22 μl ddH<sub>2</sub>O 组成,扩增程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,54 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,33 个循环;72 °C 延伸 10 min,1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,用 TianGen 公司的离心柱型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒对目的片段进行切胶纯化,用 promega 公司的 pGEM-T Easy Vector Systems 试剂盒进行连接,以该实验室保存的 JM109 为转化菌,挑选白色菌落,摇菌提质粒进行酶切检测,送有插入片段的阳性克隆到上海生工测序。

**1.2.4 RACE 技术获得 *HbbHLH* 基因三端。**根据测序获得 EST 序列及试剂盒要求设计引物 3'RACE 引物,序列如下:

3bGSP:5'-CATCTGACTCCGCGCTTCTGATTCTG-3'

3bNGSP1:5'-GCCTATAAACCATGTTGAAGCGGAGAG-3'

用 clontech 公司的 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒和 Advantage2 PCR Kit 进行,具体操作按试剂盒说明书进行。扩增产物用 OMEGA 公司的 Gel Extraction kit 试剂盒进行回收,用 TAKARA 公司的 pMD18-T vector 试剂盒进行连接,以 TAKARA 公司 DH5α 为转化菌,挑选白色菌落,提质粒进行酶切鉴定,送有插入片段的单克隆到上海生工测序。

**1.2.5 RT-PCR 表达分析。**以测序得到是三端序列设计引物,序列如下:

3bHLHU:5'-GCCAAGAATTGCCTATAAACC-3'

3bHLHD:5'-AATGGCACTTCTCACAACTT-3'

ActinU:5'-CAGTGGTCTGACAACTGCTAT-3'

ActinD:5'-ATCCTCAAATCCAGACACTGT-3'

以 *Actin* 基因为内参,以 10 μmol/L 的 ActinU/ActinD 为引物,在 10 μl 的反应体系中 PCR 扩增橡胶树皮对照和处理的 RNA 反转录 cDNA,扩增程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C

变性 1 min,50 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 45 s,分别采用 22、24、26、28、30 和 32 个循环;72 °C 延伸 7 min,1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,得到与预期长度相符的约 600 bp 的目的片段。再采用 26 个循环,扩增 *actin* 基因,调整各模板 cDNA 加入量,直至扩增出来的条带在琼脂糖凝胶上看起来亮度一致为止。目的基因 *HbbHLH* 的扩增以 10 μmol/L 3bHLHU/3bHLHD 为引物,10 μl 的反应体系,扩增程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,50 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 45 s,分别采用 30 个循环,72 °C 延伸 7 min。

## 2 结果与分析

**2.1 橡胶树皮 RNA 质量鉴定** 提取的胶乳总 RNA 经 1% 的甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测均呈现两条相对集中的亮带,28S 和 18S RNA 的带型完整,边缘清晰,说明 RNA 样品的完整性好(图 1)。用紫外分光光度测定样品在 260 nm 和 280 nm 波长的 OD 值。两者的比值,即 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 都在 1.8 ~ 2.1,说明 RNA 样品纯度较高,可以用于后期的实验。

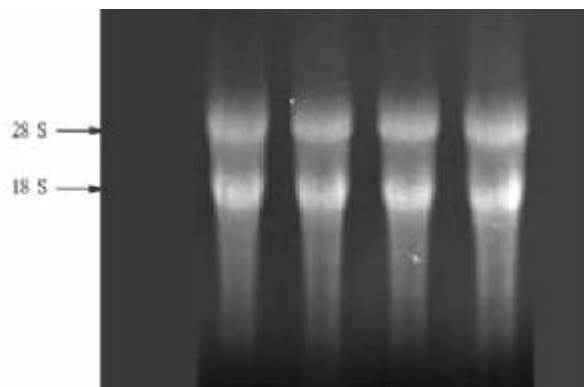


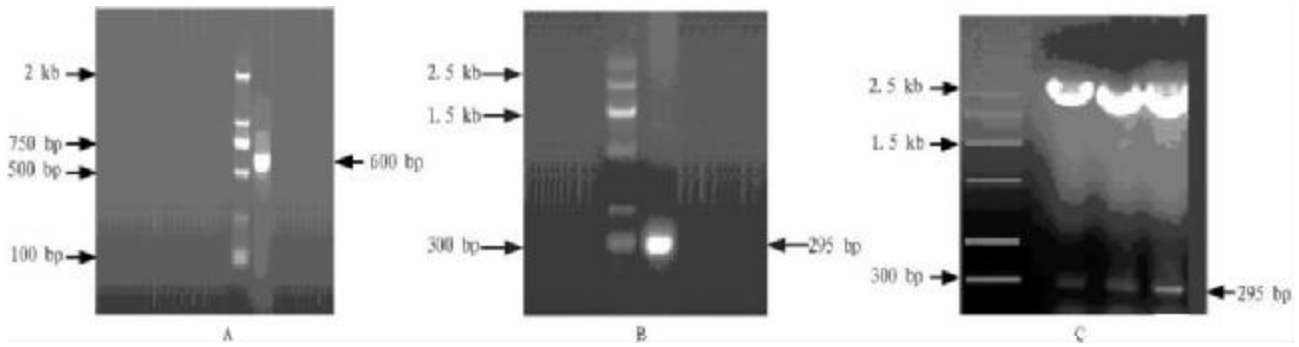
图 1 橡胶树皮总 RNA 甲醛变性凝胶电泳图

Fig. 1 Formaldehyde-denatured agarose electrophoresis of total RNA from bark

**2.2 *HbbHLH* 基因 EST 的克隆及序列分析** 树皮 RNA 经反转录得一链 cDNA,以扩增  $\beta$ -*actin* 保守基因进行 cDNA 质量检测,扩增结果在约 600 bp 处得到一条特异亮带(图 2A),表明所得到的 cDNA 是完整的,质量良好,可用于后续实验;以树皮 cDNA 为模板,以胶乳 bHLH 家族基因保守区设计两对特异引物,PCR 扩增得到约 300 bp 的清晰亮带(图 2B),用 TianGen 胶回收试剂盒进行回收,回收产物连接到 pGEM-T Vector,转化 JM109,获得重组质粒,该质粒酶切(图 2C)检测确定其正确性后,将其穿刺管送上海生工测序。

经测序,EST 扩增产物的大小为 295 bp(图 2)。在 NCBI 上进行 blastx 同源比较,结果表明,所得到的 EST 的蛋白氨基酸序列具有 bHLH 同源功能结构域(图 3),属于 bHLH 类家族基因,且与甘蓝、水稻等作物的 bHLH 转录因子相似性分别为 75% 和 65%。

**2.3 采用 3'RACE 技术克隆橡胶树 *HbbHLH* 基因 3'端及序列分析** 根据已得到的橡胶树皮 *bHLH* 基因 EST 序列,设计 3'RACE 引物 3bGSP 和 3bNGSP,采用 clontech SMART RACE cDNA Amplification Kit 得到 cDNA 模板并进行 *actin* 扩增检测表明 cDNA 完整可靠(图 4A),再使用 Advantage2 PCR Kit 试剂盒进行橡胶树皮 *HbbHLH* 基因 3'端的快速扩



注:A. actin 扩增;B. EST 扩增;C. 酶切检测重组质粒。

Note: A. Actin amplification; B. EST amplification; C. Recombinant plasmid by enzyme digestion.

图 2 EST 克隆

Fig.2 EST cloning

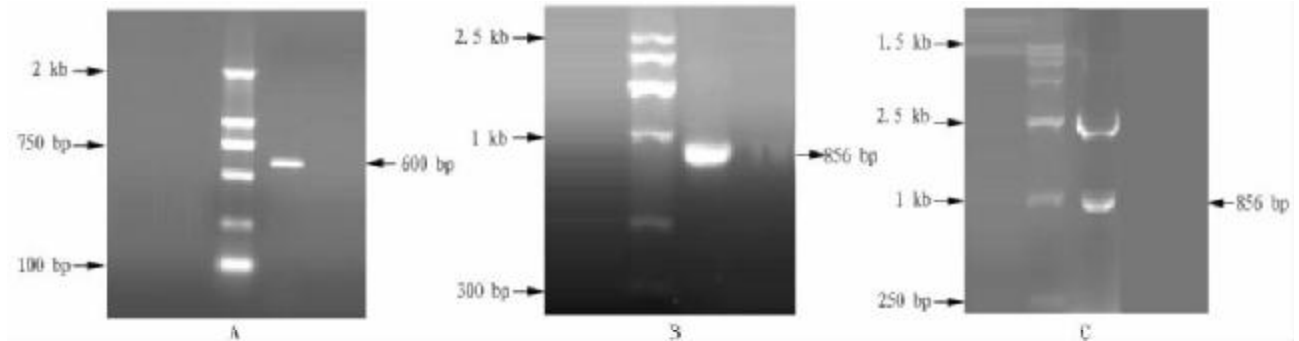
```

5'-CAAAGGAGCCAAAGCCACGATCTCAAACACAGATTCTAAATACTTCTCTGTGATATGG
CACGTTCAGCTCTCTAAAAGGAGACCTTTAAGCAGAAAGGAAATGAAAGCAGCAAAAATA
AGAAAGATGCGACTGGGAAAGCCGCTCATCATCTACTCCGGGCTTGTGATTTGATGCGA
ATTTTACTGCTGGAAATACCGATCGGTTCAAGAAAAGAGGAAAGCAACTAAACGCGCAA
GAATTGCTATAAACCATGTTGAAAGCGGAGAGGCGCGGTAGAGAGAC-3'

```

图 3 EST 测序结果(方框内为引物序列)

Fig.3 EST sequencing result (primers in boxes)



注:A. actin 扩增;B. EST 扩增;C. 酶切检测重组质粒。

Note: A. Actin amplification; B. EST amplification; C. Recombinant plasmid by enzyme digestion.

图 4 3'RACE 克隆

Fig.4 3'RACE cloning

序列(图 5),其中 3'非编码区为 308 bp。

在 NCBI 上对所克隆到 1 084 bp 的 *HbbHLH* 基因 3 端序列进行 blastx 同源比较,结果如表 1 所示,所得到序列具有 bHLH 同源功能结构域,属于 bHLH 家族基因的 MYC 亚类,与拟南芥、甘蓝、长春花、马铃薯、玉米和水稻等 MYC 蛋白同源性分别为 46%、44%、44%、43%、41% 和 38%。

在 DNAMAN 中将所得碱基序列翻译为氨基酸序列(图 6),用 pfam 工具对该氨基酸序列进行分析表明,该克隆片段存在 Helix-Loop-Helix DNA binding domain(图 6 黑色背景加粗部分),定位于细胞核内,具有调节转录活性的功能。进一步进行 prosite 分析表明,该基因属于 MYC 型 HLH 结构域。

**2.4 半定量 PCR 分析** 采用半定量 PCR 方法,以 *actin* 基因为内参,以未经茉莉酸处理为对照,对茉莉酸处理 4 h、8 h、1 d、2 d、3 d 后该基因的表达进行分析。结果表明:茉莉酸处理后,*HbbHLH* 基因表达在 8 h 内逐渐增加,8 h、1 d、2 d 表达稳定最强,3 d 后表达量下降(图 7),这表明茉莉酸对该基因的表达具有调控作用。

增,第一轮 PCR 得到约 1 000 bp 条带,第二轮 PCR 得到约 900 bp 的亮带(图 4B),用 OMEGA 的 Gel Extraction kit 进行回收,连接到 TAKARA 公司的 pMD 18-Tvector,转化 DH5 $\alpha$ ,对重组子进行双酶切(图 4C),切下约 900 bp 片段,送有插入片段的穿刺管至英俊生物技术有限公司测序。

测序结果表明 3'RACE 扩增产物的大小为 856 bp,将 EST 与 3 端序列拼接后,得到 *HbbHLH* 基因 3 端 1 084 bp 的

```

CAAAGGAGCCAAAGCCACGATCTCAAACACAGATTCTAAATACTTGTCTCTTBTATTTGGCAGDTT
TTGNGTCTCTCAAAGGAGACCTTTAAGCAGAAAGGAAATGAAAGCAGCAAAAATAAGAAAGATOC
GACTGCGCAAGCCCGGTCATCTGAGTCCCGGCTTGTGATTTGATGCGAATTTTACTGCTGGA
AATACCGATCGGTTCAAGAAAGAGGAGAAAGCAACTAAAGCCGCAAGAAATTCCTATAAAACCA
TCTTGAAGCCGAGAGCCAGCGGTAGAGAGAGGCTGCAATCATGATTCATGCACTCCGATCTGCACT
TCTAATGTCGCAAGATGCAAAAGCATCTCTACTAGCAGATGCGAGTTACTTACATCAAGGAGATC
AAGCCACTGTTGATGAAATGCAAGTCCAAACTAGAAAGCTATGCAAGAAATCCAAAGATCAAAAC
GTACTGATATCAAAAGCACTGATTCATGATGATCATATGAGGCTCTTCTCAAGTTACAAAGCCA
AGGGAATGAAATGGATGCAATTTGAGATGCAAGCTAAGAACTAATGATGATGATTCCTCCAGAGAT
TAATTAACCGCTCCAGGTTAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
ATGTCAGCATTAAAGAGATGCGTCTTCAAGATGTTGCTGATGAGGTTCTGATGAGGACTCAGATG
AAGAAGTTGTGAGAAAGTGCATTTCTCAAGAAAGTCAAGAACTAAATTAAGGTCCTTCTGATCTCAT
ATTAGCAACATAAAATGTTGTCAGGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
TCTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
CATGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
AAAAAATAAAATCTCTCCCTTCAACACTCTCT

```

注:加粗 TAA 为终止密码子,方框内为 3'RACE 引物部分。

Note: Overstriking TAA is the termination codon, and those in panes are 3'RACE primers.

图 5 EST 与 3'RACE 序列拼接结果

Fig.5 The assembly sequence of EST and 3'RACE

表 1 HbbHLH 同源性分析  
Table 1 The homology analysis of HbbHLH

物种	拉丁名	Gi 号	相似性	definition	E-value
Species	Latin name	Gi No.	Similarity		
拟南芥	<i>Arabidopsis thaliana</i>	15223256	46%	ATMYC2 (JASMONATE INSENSITIVE 1)	2e-34
甘蓝	<i>Brassica oleracea</i>	151383081	44%	MYC	4e-33
长春花	<i>Catharanthus roseus</i>	33339705	44%	MYC2	1e-32
马铃薯	<i>Solanum tuberosum</i>	45421752	43%	MYC transcription factor	4e-32
水稻	<i>Oryza sativa</i>	12643064	42%	putative MYC TF	1e-30
玉米	<i>Zea mays</i>	4321762	41%	TF MYC7E	2e-30
葡萄	<i>Vitis vinifera</i>	149347186	37%	Myc2 bHLH protein	9e-22
小麦	<i>Triticum aestivum</i>	1702428	38%	bHLH TF	5e-20

```

KLPSEHQIQPNTCLLDIGTTRASQKELFTQEQMEDDKKKKIDATQGGSSDSARSDDGNFTAG
NTRDFRGRGRKQLNGIILPDPNHVVAIRRRERDLNERFYALRSKAVPNVHEMDKARILLADAVTVI
NKLKATVDELQSKLEAVSEKSKSTHVTDNQDDEMDHMRSSSYKAKQWMLDVTIVGHEAMDF
LSPDVNYPARLMDVLRVNEFKVHHSMSKSKKCVLQD VYVYRVPDOLTDDEVVRSAILQRUKQ*
    
```

图 6 推导的 HbbHLH 蛋白氨基酸序列

Fig. 6 Amino acid sequence of deduced HbbHLH protein

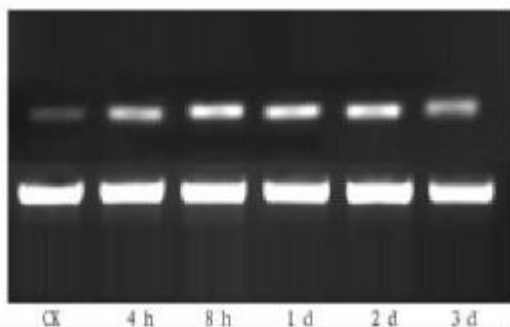


图 7 茉莉酸处理后橡胶树树皮中 HbbHLH 的差异表达

Fig. 7 Differential expression of HbbHLH in bark after treated with JA

3 结论与讨论

bHLH 转录因子在植物界中已被广泛关注和研究,但目前对于橡胶树 bHLH 转录因子基因的克隆、表达及功能研究还没有系统的报道,该研究属首次在橡胶树中克隆 bHLH 转录因子基因并在橡胶树树皮中进行茉莉酸处理不同时段后的表达分析。笔者在橡胶树皮组织中获得了一个 bHLH 转录因子基因的 3 端序列,该基因属于 bHLH 转录因子的 MYC 亚类,表达分析表明该基因在橡胶树皮组织中的表达受茉莉酸调节。

茉莉酸能够诱导橡胶树乳管的分化,是调控乳管分化的关键因子。但是,橡胶树是如何感应茉莉酸信号以及茉莉酸是如何传递并启动哪些基因的表达而引起乳管分化目前还不清楚。MYC (Myelocytomatosis) 转录因子是 bHLH 转录因子中重要的一大类,大量 MYC 型 bHLH 转录因子主要在分生组织中表达,参与植物细胞分化和发育过程<sup>[24]</sup>。另外,在拟南芥、水稻和西红柿等植物中,发现了许多响应茉莉酸信号的 MYC 转录因子基因,如 *JAMYC2*、*JAMYC10* 和 *AtMYC2* 等,茉莉酸可诱导这些基因的表达<sup>[25]</sup>。参考上述 MYC 型 bHLH 转录因子在其他植物中的作用,并结合该研究的结果,笔者推测 MYC 型 bHLH 转录因子很可能在茉莉酸诱导橡胶树乳管分化的过程中起着重要的调控作用,这将为解析茉莉酸诱导橡胶树乳管分化的分子机理奠定理论基础。

参考文献

- [1] DICKENSON P B. Electron microscopical studies of the latex vessel system of *Hevea brasiliensis* [J]. J RIMM, 1969, 2(4): 543 - 559.
- [2] HO CY, NARAYANAN R, CHEN K T. Clonal nursery studies in Hevea. I: Nursery yield and associated structural characteristics and their variations [J]. J RIMM, 1973, 23(4): 305 - 316.
- [3] NARAYANAN R, GOMEZ J B, CHEN K T. Some structural factors affecting the productivity of *Hevea brasiliensis*. II: Correlation studies between structural factors and yield [J]. J RIMM, 1973, 23(4): 285 - 297.
- [4] BOBILIOFF W. Anatomy and physiology of *Hevea brasiliensis* [M]. Zurich Art stitut Ovell Fussl, 1923: 93 - 95.
- [5] GOMEZ J B, NARAYANAN R, CHEN K T. Some structural factors affecting the productivity of *Hevea brasiliensis*. I. Quantitive determination of laticious tissues [J]. J RIMM, 1972, 23: 193.
- [6] GOMEZ J B. Anatomy of Hevea and its influence on latex production [M]. Monograph No. 4, Malaysian RRDB, Rubber Research Institute Malaysia. Kuala Lumpur, 1982.
- [7] NARAYANAN R, HO C Y, CHEN K T. Clonal nursery studies in *Hevea*. III: Correlation between yield structural characters, latex constituents and plugging index [J]. J RIMM, 1974, 24: 1.
- [8] HAO BING ZHONG, WU JI LIN. Laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis*: Induced by exogenous jasmonic acid and linolenic acid [J]. Annals of Botany, 2000, 85(1): 37 - 43.
- [9] FARMER E E, JOHNSON R R, RYAN C A. Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid [J]. Plant Physiol, 1992, 98: 995 - 1002.
- [10] 刘惠芳, 吴继林, 郝秉中. 茉莉酸和其他激素对巴西橡胶树乳管分化的协同作用 [J]. 热带作物学报, 2001, 22(3): 6 - 16.
- [11] JI LIN-WU, BING ZHONG-HAO, HAI YAN-TAN. Wound-induced laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis* shoots mediated by jasmonic acid [J]. Journal of Rubber Research, 2002, 5(1): 53 - 63.
- [12] 曾日中, 白先权, 黎瑜, 等. 外源茉莉酸诱导巴西橡胶树乳管分化的酶学研究 [J]. 热带作物学报, 2001, 22(3): 17 - 23.
- [13] JÖRG ZIEGLER, MARKKU KEINÄNEN, IAN T BALDWIN. Herbivore-induced allene oxide synthase transcripts and jasmonic acid in *Nicotiana attenuata* [J]. Phytochemistry, 2001, 58: 729 - 738.
- [14] JOSÉ LEÓN, ENRIQUE ROJO, JOSÉ J, et al. Wound signaling in plants [J]. Journal of Experimental Botany, 2001, 52: 1 - 9.
- [15] JOHN G, TURNER, CHRISTINE ELLIS, et al. The Jasmonate Signal Pathway [M]. The Plant Cell, Supplement, 2002: 153 - 164.
- [16] KASEM ASAWATRERATANAKUL, YUAN -WEI ZHANG, DHIRAYOS WITITSUWANNAKUL, et al. Molecular cloning, expression and characterization of cDNA encoding cis -prenyltransferases from *Hevea brasiliensis* [J]. European Journal of Biochemistry, 2003, 270(23): 4671 - 4680.
- [17] 段翠芳, 曾日中, 黎瑜. 激素对巴西橡胶树橡胶生物合成的调控 [J]. 热带农业科学, 2004, 24(5): 67 - 68.
- [18] BUCK M J, ATCHLEY W R. Phylogenetic Analysis of Plant Basic Helix-Loop-Helix Proteins [J]. J Mol Evol, 2003, 56: 742 - 750.
- [19] FISCHER A, LEIMEISTER C, WINKLER, C, et al. Hey bHLH factors in cardiovascular development [J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2002, 67(6): 63 - 70.
- [20] HORIKAWA I, CABLE P L, MAZUR S J, et al. Downstream E-box mediated regulation of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene transcription: evidence for an endogenous mechanism of transcriptional repression [J]. Mol Biol Cell, 2002, 13(8): 2585 - 2597.
- [21] ELLENBERER T, FASS D, AMAUD M, et al. Crystal structure of transcription factor E47, recognition by a basic region helix-loop-helix dimer [J]. Genes Dev, 1994, 8: 970 - 980.

在序列比对的基础上,采用 MEGA3.1 软件的 NJ(Neighbor-Joining)法构建系统进化树,以确定 *MaCBL1* 在系统进化中的地位。结果如图 4 所示,*MaCBL1* 与其他植物如杨树、甘蓝、沙冬青、棉花和水稻的 CBL 基因的氨基酸序列亲缘关系较近,并在同一个进化枝上。

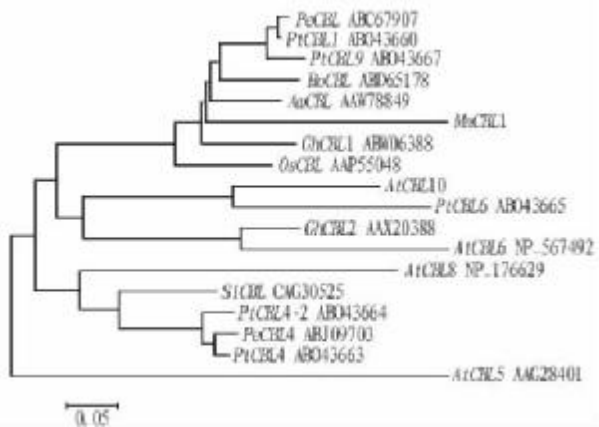


图 4 *MaCBL1* 推导的氨基酸序列与其他植物钙调信使蛋白氨基酸序列的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of the deduced amino acid sequence of *MaCBL1* and the amino acid sequence of calcium regulating messengers in other plants

### 3 结论与讨论

(1) CBL 为钙离子结合蛋白在植物钙信号传递转导过程中具有重要的调控作用<sup>[2]</sup>。拟南芥的 CBL1 突变体植株明显削弱了植株对干旱和盐胁迫的反应,影响冷胁迫基因的表达,相反 CBL1 过表达的植株表现抗逆能力明显增强,蒸腾作用减弱,胁迫反应相关基因的表达增加<sup>[11]</sup>。在多种胁迫刺激作用下,拟南芥的 CBL 基因家族表达增加,表明 CBL 参与植物对各种胁迫信号反应的调控<sup>[12]</sup>。对拟南芥 CBL *AtCBL2* 的结晶学研究表明,*AtCBL2* 的高级结构形成带有 EF 手型结合基序的严谨  $\alpha$ -螺旋结构,与神经元的折叠拓扑结构的 CBL 结构相似,但是构象不同,钙离子的结合结构域相同<sup>[13]</sup>。这表明生物体的 CBL 也具有一定的结构保守性。

(2) 经多重序列比对分析发现,*MaCBL1* 推导的氨基酸序列与毛果杨、沙冬青、胡杨、水稻、棉花、拟南芥、甘蓝和西红柿的 CBL 基因同源性较高。遗传进化分析表明,*MaCBL1* 与其他植物如杨树、甘蓝、沙冬青、棉花和水稻的 CBL 基因的氨基酸序列亲缘关系较近,并在同一个进化枝上。

(3) 这些结果表明,*MaCBL1* 编码的氨基酸序列与其他生物的 CBL 的氨基酸序列的同源性比较高,可能也具有其他植物 CBL 的功能。在香蕉的生长、发育及果实的成熟过程中可能起着重要的调控作用。*MaCBL1* 基因的克隆、序列的生物信息学分析,这些初步的研究结果为进一步研究香蕉 CBL 对香蕉生长发育、果实的成熟调控及对各种逆境反应的调控奠定了基础。

### 参考文献

- [1] GU Z, MA B, JIANG Y, et al. Expression analysis of the calcineurin B-like gene family in rice (*Oryza sativa* L.) under environmental stresses [J]. Gene, 2008, 415(1/2): 1-12.
- [2] CHEONG Y H, PANDEY G K, GRANT J J, et al. Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2007, 52(2): 223-239.
- [3] KIM B G, WAADT R, CHEONG Y H, et al. The calcium sensor CBL10 mediates salt tolerance by regulating ion homeostasis in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2007, 52(3): 473-484.
- [4] CARRIERE C, MORNON J P, VENIEN-BRYAN C, et al. Calcineurin B-like domains in the large regulatory alpha/beta subunits of phosphorylase kinase [J]. Proteins, 2008, 71(4): 1597-1606.
- [5] AKABOSHI M, HASHIMOTO H, ISHIDA H, et al. The crystal structure of plant-specific calcium-binding protein AtCBL2 in complex with the regulatory domain of AtCIPK14 [J]. J Mol Biol, 2008, 377(1): 246-257.
- [6] WANG M, GU D, LIU T, et al. Overexpression of a putative maize calcineurin B-like protein in *Arabidopsis* confers salt tolerance [J]. Plant Mol Biol, 2007, 65(6): 733-746.
- [7] LEE S C, LAN W Z, KIM B G, et al. A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(40): 15959-15964.
- [8] XU J, LI H D, CHEN L Q, et al. A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates  $K^+$  transporter AKT1 in *Arabidopsis* [J]. Cell, 2006, 125(7): 1347-1360.
- [9] KIM B G, WAADT R, CHEONG Y H, et al. The calcium sensor CBL10 mediates salt tolerance by regulating ion homeostasis in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2007, 52(3): 473-484.
- [10] MAHAJAN S, SOPORY S K, TUTEIA N. Cloning and characterization of CBL-CIPK signalling components from a legume (*Pisum sativum*) [J]. FEBS J, 2006, 273(5): 907-925.
- [11] ALBRECHT V, WEINL S, BLAZEVIC D, et al. The calcium sensor CBL1 integrates plant responses to abiotic stresses [J]. Plant J, 2003, 36(4): 457-470.
- [12] CHEONG Y H, KIM K N, PANDEY G K, et al. CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2003, 15(8): 1833-1845.
- [13] NAGAEM, NOZAWA A, KOIZUMI N, et al. The crystal structure of the novel calcium-binding protein AtCBL2 from *Arabidopsis thaliana* [J]. J Biol Chem, 2003, 278(43): 42240-42246.
- [14] 徐碧玉, 苏伟, 张建斌, 等. 香蕉果实 SMART cDNA 文库的构建及利用 PCR 方法筛选香蕉 Actin2 基因 [J]. 热带亚热带植物学报, 2005, 13(5): 375-380.

(上接第 11256 页)

- [22] FERRE D, AMARE A E, ORENDERGAST G C, et al. Recognition by Max of its cognate DNS through a dimeric b/HLH/Z domain [J]. Nature, 1993, 363: 38-45.
- [23] KOSUGI S, OHASHI Y. DNA binding and dimerization specificity and po-

tential targets for the TCP protein family [J]. Plant J, 2002, 30(3): 337-348.

- [24] MARTA B, OMAR R R, ASHRAF A, et al. Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signalling both in tomato and *Arabidopsis* [J]. Gege & Development, 2004, 18: 1577-1591.