

# 巴西橡胶树*HbNAC1*基因的克隆和表达分析

邱琼<sup>1,2</sup>, 朱家红<sup>2</sup>, 张治礼<sup>2,3\*</sup>

(1. 海南大学农学院, 海口 571101; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海口 571101; 3. 海南省农业科学院, 海口 571000)

**摘要:** 根据 EST 序列信息, 利用 RACE 技术从巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)中克隆了 1 个 NAC 类转录因子基因 *HbNAC1*, 其 cDNA 全长为 1419 bp, 含有完整的开放阅读框, 编码 309 个氨基酸。推导的氨基酸序列含有 1 个 NAM 结构域, 具有典型的 NAC 类蛋白的结构特征, 与毛果杨(*Populus trichocarpa*)、蓖麻(*Ricinus communis*)、水稻(*Oryza sativa*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中的相应氨基酸序列的同源性分别达 79%、80%、57% 和 60%。聚类分析表明, *HbNAC1* 属于 NAC 家族 II 亚族。半定量 RT-PCR 分析表明, 该基因在胶乳中的表达较丰富, 经乙烯利刺激后其在胶乳中的表达量明显增加。

**关键词:** 巴西橡胶树; NAC 类转录因子; 乙烯利; 基因表达

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2012.05.007

## Cloning and Expression Analysis of *HbNAC1* in *Hevea brasiliensis*

QIU Qiong<sup>1,2</sup>, ZHU Jia-hong<sup>2</sup>, ZHANG Zhi-li<sup>2,3\*</sup>

(1. College of Agriculture, Hainan University, Haikou 57110, China; 2. Institute of Tropical Biotechnology and Bioscience, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China; 3. Hainan Academy of Agricultural Sciences, Haikou 571000, China)

**Abstract:** Based on EST sequences from an ethephon-induced latex SSH cDNA library of *Hevea brasiliensis*, a full-length cDNA, named as *HbNAC1*, was cloned from *H. brasiliensis* by RACE-PCR, encoding a NAC transcription factor. The full-length of *HbNAC1* cDNA was 1419 bp with an open reading frame (ORF) of 930 bp, and encoding 309 amino acids. The deduced *HbNAC1* with NAM domains had the typical characteristics of NAC family, and homologous to NACs in *Populus trichocarpa*, *Ricinus communis*, *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana* of 79%, 80%, 57% and 60%, respectively. Phylogenetic analysis showed that *HbNAC1* was classified into the II subfamily of NAC family. Semi-quantitative RT-PCR analysis indicated that the expression of *HbNAC1* was rich in latex, and significantly enhanced by ethephon stimulation.

**Key words:** *Hevea brasiliensis*; NAC transcription factor; Ethephon; Gene expression

NAC 类转录因子(NAM, ATAF and CUC transcription factor)是近十多年来发现的植物特有的转录调控因子, 目前已从矮牵牛(*Petunia hybrida*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、小麦(*Triticum aestivum*)、水稻(*Oryza sativa*)、大豆(*Glycine max*)等植物基因组中相继分离出来。NAC 类转录因子是一个大家族, 仅在拟南芥中就已报道了 110 个成员, 水稻中也有 140 个<sup>[1]</sup>。NAC 类转录因子

的 N 端高度保守, 含有 NAM 保守结构域, 是 DNA 结合和核定位信号部位; C 端为结构多变区, 也是转录激活区域<sup>[2-3]</sup>。NAC 结构保守域含有 5 个亚区域, 其中 A、C、D 在不同的物种中都是高度保守的, B、E 区则是多变的。由此推测, 亚区域 A、C、D 在 NAC 蛋白功能的发挥中起较重要的作用, 这已在矮牵牛中得到证实<sup>[4]</sup>。NAC 类转录因子在植物的生命活动中发挥重要的作用, 包括参与侧根的产生

收稿日期: 2011-11-21 接受日期: 2012-02-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31000313); 海南省自然科学基金项目(309052); 中央级公益性科研院所业务费专项(ITBB110201)资助

作者简介: 邱琼(1986~), 女, 在读硕士, 研究方向为植物分子学与植物生理学。E-mail: qiuyao198612@163.com

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zzl\_catas@hotmail.com

生和发育<sup>[5]</sup>、顶端分生组织的形成<sup>[6]</sup>、花器官分生组织的发育<sup>[7]</sup>及叶片衰老<sup>[8]</sup>等;在抵抗非生物和生物胁迫中, NAC 基因也发挥着重要的作用<sup>[9-12]</sup>。

巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)为大戟科(Euphorbiaceae)三叶橡胶属多年生乔木,原产于南美洲,生长在热带雨林中,一般定植7年后开始割胶,开采可达30年。乙烯利能够刺激橡胶树显著增产,但关于乙烯利在橡胶树增产过程中的信号转导、促进胶乳分泌的分子机制等目前仍不清楚<sup>[13]</sup>。为深入探讨乙烯利刺激橡胶树增产的分子机制,我们研究组采用SSH(Suppression Subtractive Hybridization)技术构建了乙烯利诱导表达的胶乳cDNA文库,通过斑点杂交和测序,获得了1个与NAC类转录因子家族基因同源性较高、乙烯利诱导高度表达的EST——HbEST 30。以此为基础,本研究对该基因的全长cDNA序列进行了克隆,并对其结构特征和表达特征进行了分析,为探讨该基因在胶乳再生过程中的作用研究提供科学基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和试剂

选取种植在中国热带农业科学院实验场的巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)无性系RRIM600(7年树龄未开割树),分别在乙烯利处理0、3、6、12和24 h后采集胶乳并迅速冷冻于液氮中, -80℃下保存。材料处理参考Hao等<sup>[14]</sup>的方法进行,胶乳总RNA的提取参照张治礼等<sup>[15]</sup>的方法,叶片、根、树皮和花总RNA的提取参照TranZol试剂盒说明书,叶片DNA提取参照傅荣昭等<sup>[16]</sup>的方法。TranZol、pEASY-T1 easy Vector试剂盒购自全式金公司;SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit购自CLONTECH公司;IPTG、X-Gal、dNTPs购于Promega公司;其它生化试剂和常规试剂均为超纯或分析纯。

### 1.2 HbNAC1基因的克隆

根据HbEST 30全长572 bp,设计5'RACE特异性引物GSP1: 5'-CGCCATGGAAATGACATGGTG-CAATAATA-3'和3'RACE特异性引物GSP2: 5'-AAGGGCAAGCTTCAGAGAAGA-3'。参照CLONTECH公司提供的SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit说明书扩增基因的5'和3'端片段,分别连接到PEASY-T1载体上进行测序。根据测

序结果和HbEST 30序列,推导出cDNA全长序列;根据推导出的序列,分别在5'端起始密码子的上游和3'端终止密码子的下游设计特异引物F1: 5'-GGCGGATCCATGACATGGTGCAATAATAAC-3'和F2: 5'-GCTGTCTGACTCTTCTCTGAAGCTTGC-CCTT-3',以胶乳cDNA为模板扩增目的片段,测序后与拼接推导结果进行比较。利用网上数据库进行BLAST分析,利用DNAMAN软件进行序列比对。

### 1.3 氨基酸序列分析和系统进化树构建

氨基酸序列分析、信号肽预测、蛋白特征分析分别采用<http://www.expasy.org>提供的相关软件,在<http://www.cbs.dtr.dk/services/signalP>和<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>上完成。不同物种NAC类转录因子基因编码的氨基酸序列比对分析、系统进化树分析采用DNAMAN软件完成。

### 1.4 HbNAC1基因的表达分析

施用乙烯利0、3、6、12和24 h后,分别采集胶乳并提取总RNA;分别提取叶片、根、树皮和花的总RNA。经反转录后,分别以橡胶树18S rRNA为参照基因进行半定量RT-PCR分析。用于半定量RT-PCR分析的基因特异引物为F1和F2;18S rRNA引物为P1: 5'-CAGTGGTCGTACAACACTGGTAT-3'和P2: 5'-ATCCTCCAATCCAGACACTGT-3'。反应程序为:94℃预变性3 min, 94℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 28个循环后再延伸7 min。反应结束后取5 μL反应液进行1%琼脂糖凝胶电泳检测。

## 2 结果和分析

### 2.1 基因的克隆和特征分析

利用设计的5'RACE引物(GSP1)和3'RACE引物(GSP2)对基因5'端和3'端进行扩增,分别获得了500 bp和300 bp左右的两个片段。经回收、克隆和测序,这两个片段分别为542 bp和305 bp。利用DNAMAN软件对这2个cDNA与HbEST 30序列进行拼接,获得了1个含有完整阅读框架的cDNA序列。利用设计的特异引物F1/F2,以胶乳cDNA和叶片DNA为模板进行扩增,分别获得两个大小基本一致的特异片段,测序表明这两个片段均为1419 bp,核苷酸序列与拼接结果一致。这表明,我们获得了目标基因的全长cDNA和DNA序



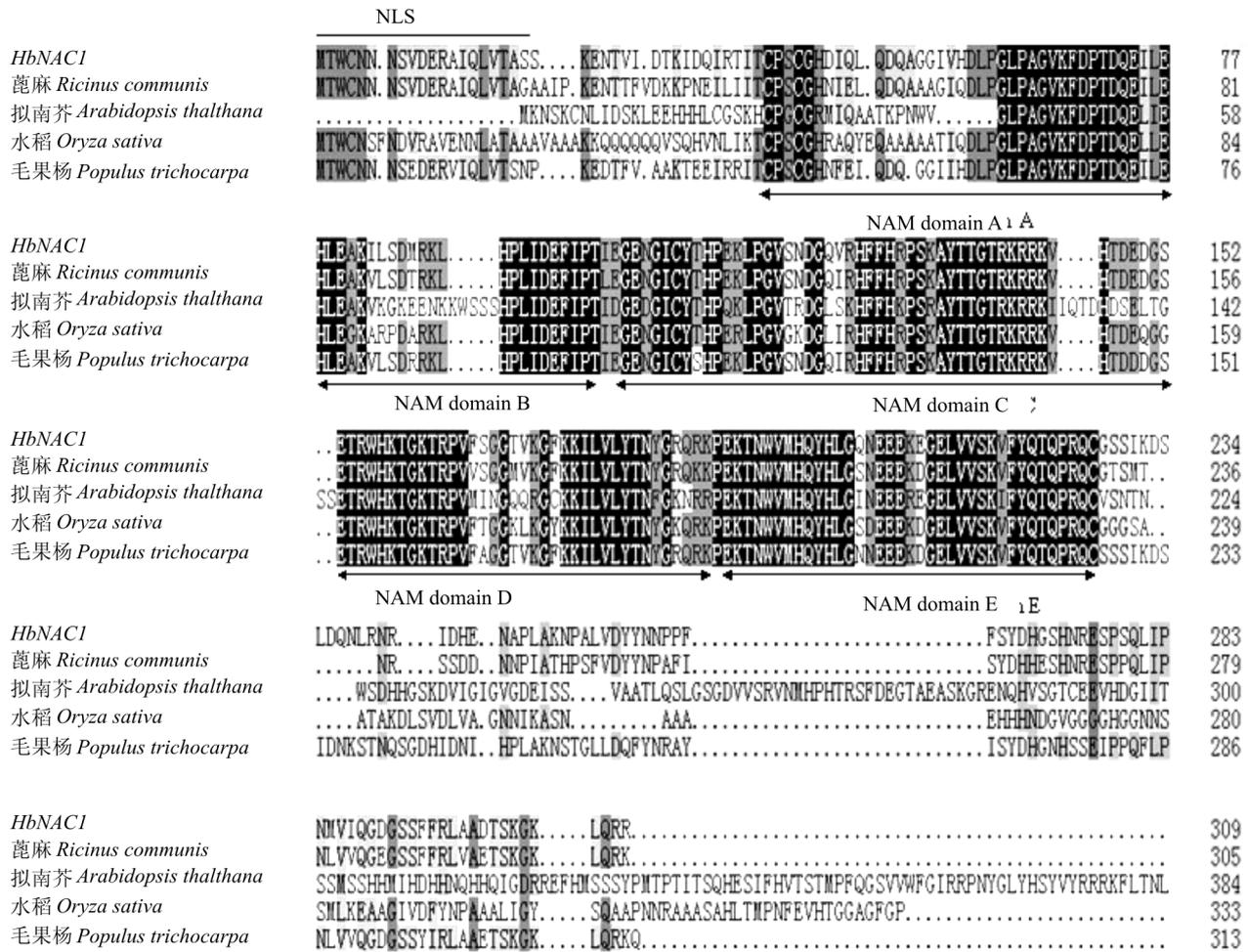


图2 *HbNAC1* 与其它4种植物 NAC 类转录因子的序列比对。NLS: 核定位信号序列; NAM: NAC 保守结构域。

Fig. 2 Sequence alignment of *HbNAC1* and NAC transcription factor in other four plants. NLS: Nuclear localization signal sequences; NAM: NAC conserved domain.

植物 NAC 转录因子的 ONAC003 类具有最高的相似性,其中亚结构 E 高度保守,这也符合 ONAC003 类亚组的特征,因此我们认为 *HbNAC1* 蛋白在进化关系上属于 NAC 家族转录因子 II 型亚族中的 ONAC003 亚组(图 3)。

### 2.3 *HbNAC1* 的表达分析

分别提取巴西橡胶树胶乳、叶、树皮、根以及花的总 RNA,经反转录后进行半定量 RT-PCR 分析。结果表明, *HbNAC1* 在所有检测的胶乳和组织器官中均有表达,但在根和树皮中的表达量相对较低,胶乳中的表达量最高(图 4)。

分别提取乙烯利处理 0、3、6、12、24 h 后的胶乳总 RNA,反转录后分别进行半定量 RT-PCR 分析。结果表明,乙烯利处理 12 h 后 *HbNAC1* 表达量急剧上升,处理 24 h 后仍维持较高的表达水平(图 5)。

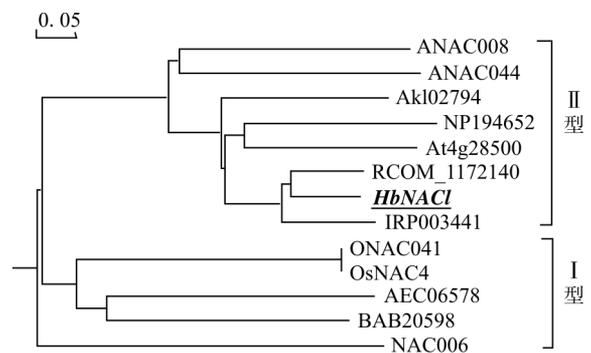


图3 *HbNAC1* 与不同植物的 NAC 转录因子的进化分析。ANAC008、At4g28500、ANAC044、BAB20598、NAC006、AEC06578、NP194652: *Arabidopsis thaliana*; RCOM\_1172140: *Ricinus communis*; IPR003441: *Populus trichocarpa*; AK102794、ONAC041、OsNAC4: *Oryza sativa*。

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *HbNAC1* and NAC transcription factors in other species. ANAC008, At4g28500, ANAC044, NAC006, AEC06578, NP194652: *Arabidopsis thaliana*; RCOM\_1172140: *Ricinus communis*; IPR003441: *Populus trichocarpa*; AK102794, ONAC041, OsNAC4: *Oryza sativa*.

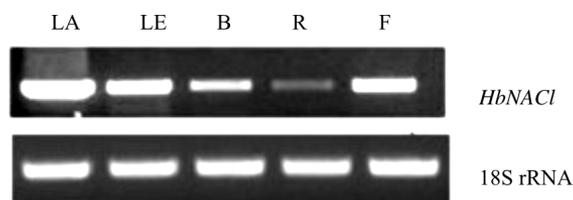


图4 *HbNAC1* 在橡胶树中表达。LA: 胶乳;LE: 叶;B: 树皮;R: 根;F: 花。

Fig. 4 Expression of *HbNAC1* in *Hevea brasiliensis*. LA: Latex; LE: Leaf; B: Bark; R: Root; F: Flower.

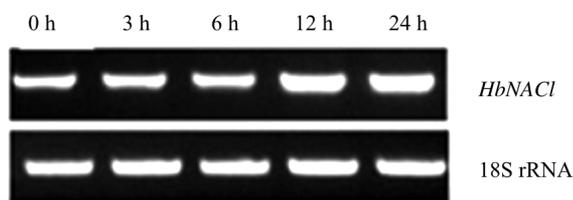


图5 乙烯利刺激对胶乳中 *HbNAC1* 表达的影响

Fig. 5 Effects of ethephon on expression of *HbNAC1* in latex

### 3 讨论

NAC 家族中某些基因的表达与乙烯信号传导有关。He 等<sup>[18]</sup>证实拟南芥中 *AtNAC2* 基因处于乙烯信号传导的下游,盐胁迫后 *AtNAC2* 基因被诱导表达,但在超量表达乙烯受体基因 *NTHK1* 的拟南芥中却受到抑制,并不受 ABA 中间体的影响。Oh 等<sup>[19]</sup>也证实,辣椒(*Capsicum frutescens*) *CaNAC1* 的表达受乙烯的诱导。本研究结果表明,乙烯利处理 12 h 后,巴西橡胶树胶乳中 *HbNAC1* 表达量明显增加,说明 *HbNAC1* 的表达也受到乙烯利的诱导。NAC 转录因子在植物响应外界环境的多种抗逆信号途径中发挥重要的作用。对于 *HbNAC1* 是否参与乙烯利刺激橡胶树增产过程中的乙烯信号传导和抗逆反应还需进一步的研究。

大量的 NAC 类转录因子参与了拟南芥的次生生长过程,如 VND 家族(Vascular-related NAC Domain)<sup>[20]</sup>、NST 家族(NAC Secondary Wall Thickening Promoting Factor)及 XND1/ANAC104 (Xylem NAC Domain)<sup>[21]</sup> 等。Zhong<sup>[22]</sup>和 Mitsuda 等<sup>[23]</sup>的研究表明,拟南芥 NAC 家族中的 SND1 (Secondary wall-associated NAC Domain protein)在调控拟南芥纤维次生壁生成中发挥关键性的作用,NST1/NST3 是拟南芥木质部次生壁合成的关键调制因子。比对结果表明, *HbNAC1* 与拟南芥中

SND1 的氨基酸序列有着很高的同源性, *HbNAC1* 是否参与了橡胶树乳管次生壁的形成也还需进一步地研究。

Teruyuki 等<sup>[24]</sup>报道拟南芥 NAC 类转录因子 *ANAC078* 基因编码的蛋白在正常情况下处于与膜结合的休眠状态,受到强光、高温刺激后释放,可以上调类黄酮合成相关基因的表达;超量表达 *ANAC078*,一些类黄酮合成相关的基因被上调表达。已有研究表明,许多转录因子参与了类黄酮和花青素等次生代谢产物的合成,其中包括 MYB、MYC、bHLH、WRKY 和 NAC 等转录因子。胶乳是橡胶树的重要次生代谢产物, NAC 类转录因子 *HbNAC1* 与胶乳的生物合成关系还需进一步地研究。

NAC 转录因子有许多重要的生物学功能,近几年虽已取得较大的进展<sup>[5-12,25]</sup>,但由于 NAC 类转录因子的多样性和复杂性,目前对大多数 NAC 类转录因子的功能并不清楚,许多研究还主要停留在基因克隆、序列分析、结构鉴定和表达分析等层面。关于 *HbNAC1*,我们已经获得了过量表达的转基因烟草(*Nicotiana tabacum*)株系,相关的表型观察与分析、对代谢方面的影响等检测工作还在进行之中。

### 参考文献

- [1] Zhang H J, Wu J F, Hu S, et al. Isolation and expression analysis of *BcNAC2*: A NAC transcription factor gene in turnip [J]. Acta Hort Sin, 2011, 38(6): 1089–1096.  
张海娟, 吴剑锋, 胡帅, 等. 芜菁 NAC 转录因子 *BcNAC2* 基因的分选及其表达 [J]. 园艺学报, 2011, 38(6): 1089–1096.
- [2] Olsen A N, Ernst H A, Lo Leggio L, et al. NAC transcription factors: Structurally distinct, functionally diverse [J]. Trends Plant Sci, 2005, 10(2): 79–87.
- [3] Peng H, Yu X W, Cheng H Y, et al. A survey of functional studies of the plant-specific NAC transcription factor family [J]. Chin Bull Bot, 2010, 45(2): 236–248.  
彭辉, 于兴旺, 成慧颖, 等. 植物 NAC 转录因子家族研究概况 [J]. 植物学报, 2010, 45(2): 236–248.
- [4] Liu Z J, Shao F X, Tang G Y. The research progress of structure, function and regulation of plant NAC transcription factors [J]. Acta Bot Boreal-Occid Sin, 2007, 27(9): 1915–1920.  
柳展基, 邵凤霞, 唐桂英. 植物 NAC 转录因子的结构功能及其表达调控研究进展 [J]. 西北植物学报, 2007, 27(9): 1915–1920.
- [5] Xie Q, Frugis G, Colgan D, et al. *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root

- development [J]. *Genes Dev*, 2000, 14(23): 3024–3036.
- [6] Aida M, Ishida T, Fukaki H, et al. Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: An analysis of the cup-shaped cotyledon mutant [J]. *Plant Cell*, 1997, 9(6): 841–857.
- [7] Souer E, van Houwelingen A, Kloos D, et al. The no apical meristem gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries [J]. *Cell*, 1996, 85(2): 159–170.
- [8] Guo Y F, Gan S S. AtNAP: A NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence [J]. *Plant J*, 2006, 46(4): 601–612.
- [9] Hu H H, Dai M Q, Yao J L, et al. Overexpressing a *NAM*, *ATAF*, and *CUC* (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(35): 12987–12992.
- [10] Lu P L, Chen N Z, An R, et al. A novel drought-inducible gene, *ATAF1*, encodes a NAC family protein that negatively regulates the expression of stress-responsive genes in *Arabidopsis* [J]. *Plant Mol Biol*, 2007, 63(2): 289–305.
- [11] Hegedus D, Yu M, Baldwin D, et al. Molecular characterization of *Brassica napus* NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 53(3): 383–397.
- [12] Delessert C, Kazan K, Wilsom L M, et al. The transcription factor *ATAF2* represses the expression of pathogenesis-related genes in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2005, 43(5): 745–757.
- [13] Zhu J H, Zhang Q Q, Zhang Z L. Ethephon stimulation on latex production and its molecular biological basis in *Hevea brasiliensis* [J]. *Plant Physiol Commun*, 2010, 46(1): 87–93.  
朱家红, 张全琪, 张治礼. 乙烯利刺激橡胶树增产及其分子生物学基础 [J]. *植物生理学通讯*, 2010, 46(1): 87–93.
- [14] Hao B Z, Wu J L. Laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis*: Induction by exogenous jasmonic acid and linolenic acid [J]. *Ann Bot*, 2000, 85(1): 37–43.
- [15] Zhang Z L, Yang Y, Liu K C, et al. A rapid and efficient protocol for total RNA isolation from latex of *Hevea brasiliensis* [J]. *Chin Bull Bot*, 2007, 24(4): 516–520.  
张治礼, 杨云, 刘宽灿, 等. 一种快速、高效的橡胶树胶乳总RNA提取方法 [J]. *植物学通报*, 2007, 24(4): 516–520.
- [16] Fu R Z, Sun Y R, Jia S R. Technical Manual of Plant Genetic Transformation [M]. Beijing: China Science and Technology Press, 1994: 134–143.  
傅荣昭, 孙勇如, 贾世荣. 植物遗传转化技术手册 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994: 134–143.
- [17] 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.
- [18] He X J, Mu R L, Cao W H, et al. *AtNAC2*, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development [J]. *Plant J*, 2005, 44(6): 903–916.
- [19] Oh S K, Lee S, Yu S H, et al. Expression of a novel NAC domain-containing transcription factor (*CaNAC1*) is preferentially associated with incompatible interactions between Chili pepper and pathogens [J]. *Planta*, 2005, 222(5): 876–887.
- [20] Kubo M, Udagawa M, Nishikubo N, et al. Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation [J]. *Genes Dev*, 2005, 19(16): 1855–1860.
- [21] Zhao C S, Avci U, Grant E H, et al. XND1, a member of the NAC domain family in *Arabidopsis thaliana*, negatively regulates lignocellulose synthesis and programmed cell death in xylem [J]. *Plant J*, 2008, 53(3): 425–436.
- [22] Zhong R Q, Demura T, Ye Z H. SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(11): 3158–3170.
- [23] Mitsuda N, Iwase A, Yamamoto H, et al. NAC transcription factors, *NST1* and *NST3*, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(1): 270–280.
- [24] Morishita T, Kojima Y, Maruta T, et al. *Arabidopsis* NAC transcription factor, ANAC078, regulates flavonoid biosynthesis under high-light [J]. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(12): 2210–2222.
- [25] Xie Q, Guo H S, Dallman G, et al. SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals [J]. *Nature*, 2002, 419(6903): 167–170.