

巴西橡胶树 *importin* 和 *exportin* 基因的克隆及其乙烯响应规律分析

冯伟强, 仝征, 靳翔, 王丹, 孙勇, 蒙雪茹, 王旭初*

(1. 海南大学农学院, 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海口 571101)

摘要: 为了解巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)中 *importin* 和 *exportin* 基因的功能, 采用 RACE 技术从巴西橡胶树中克隆了他们的 cDNA 全长, 分别命名为 *HbIMP* 和 *HbXPO*。结果表明, *HbIMP* 全长 4170 bp, 编码 1115 个氨基酸; *HbXPO* 全长 4108 bp, 编码 1081 个氨基酸。*HbIMP* 和 *HbXPO* 分别与 *importin5* 和 *exportin1A* 亚家族的同源性最高。*HbIMP* 包含 18 个外显子, 17 个内含子, 而 *HbXPO* 包含 30 个外显子, 29 个内含子, 且在上游调控序列中都存在乙烯响应元件 ERELEE4 和 LECPLEACS2。在无乙烯刺激情况下, *HbIMP* 和 *HbXPO* 在根、茎、叶、皮中有表达, 但在胶乳中几乎检测不到表达; 乙烯处理后 *HbIMP* 和 *HbXPO* 在胶乳中被明显诱导表达。因此, 推测 *HbIMP* 和 *HbXPO* 参与了乙烯诱导蛋白出入细胞核的转运。

关键词: 巴西橡胶树; 乙烯; 核质转运蛋白; 基因克隆

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.03.001

Molecular Cloning of *importin* and *exportin* in *Hevea brasiliensis* and Gene Expression Induced by Ethylene

FENG Wei-qiang, TONG Zheng, JIN Xiang, WANG Dan, SUN Yong, MENG Xue-ru, WANG Xu-chu*

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: The aim was to understand the functions of *importin* and *exportin* genes in *Hevea brasiliensis*. The full-length cDNAs of *importin* and *exportin* gene were cloned from *H. brasiliensis* by rapid amplification of cDNA ends (RACE) technique, named as *HbIMP* and *HbXPO*, respectively. The results showed that *HbIMP* was 4170 bp in length, encoding 1115 amino acids, and *HbXPO* for 4108 bp in length, encoding 1081 amino acids. Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis revealed that *HbIMP* belonged to *importin5* subfamily, while *HbXPO* to *exportin1A* subfamily. The sequences analysis showed that *HbIMP* contained 18 exons and 17 introns, while *HbXPO* had 30 exons and 29 introns, and both of them containing ethylene response elements ERELEE4 and LECPLEACS2 in upstream sequences. Real time PCR analysis indicated that both *HbIMP* and *HbXPO* had expression in root, stem, leaf and bark, but not in latex, but their expression in latex were obviously induced by ethylene stimulation. Therefore, it was suggested that *HbIMP* and *HbXPO* might be involved in the transporting of macromolecules induced by ethylene.

Key words: *Hevea brasiliensis*; Ethylene; Importin β family; Gene clone

收稿日期: 2015-08-18 接受日期: 2015-10-26

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31270712); 国家自然科学基金项目(31400523); 海南省重大科技专项(ZDZX2013023-1)资助

This work was supported by the National Natural Science General Project of China (Grant No. 31270712), the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31400523), and the Key Project of Science and Technology in Hainan Province (Grant No. ZDZX2013023-1).

作者简介: 冯伟强, 男, 硕士。E-mail: 18976051210@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: xchwanghainan@163.com

天然橡胶是关系国计民生以及国防安全的重要工业原料,全世界约有 2000 余种产胶植物,但 99% 的天然橡胶来自巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*)^[1-2]。由于生长条件所限只能通过提高单产来提升我国的天然橡胶产业。现已证实通过外施乙烯可促进橡胶树增产^[3-7],但目前还没有关于乙烯作用机制的研究报道。我们对乙烯处理前后的胶乳蛋白质进行了比较研究,在 143 个乙烯诱导的差异蛋白中,两类核质转运蛋白 importin 和 exportin 均在乙烯处理后表达量上调^[8],推测他们在乙烯调控胶乳合成过程中具有直接或间接的作用。在真核细胞中分子量超过 50 kDa 的生物大分子主要是通过核质转运蛋白(载体蛋白, Karyopherin)家族成员以主动运输的方式进行核质转运^[9-12],载体蛋白分为 importin α 、importin β 两型,简称 IMP α 和 IMP β 。根据底物分子(Cargo)^[13]的流向, β 载体蛋白又可分为核输入载体蛋白(importin)与核输出载体蛋白(exportin)^[14-15]以及可行使双向转运功能的载体蛋白,如 importin13^[16]。迄今为止,importin β 在人类细胞中发现超过 20 个成员,酵母细胞中大约 14 个,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中至少有 18 个^[17-22],成员分子量为 95~145 kDa,都具有保守的 N 端 Ran 结合结构域(IBM_N Domain)和多个(<20) HEAT Repeats 结构域(NCBI 数据库);功能比较保守,部分成员可以直接识别底物的核定位信号或出核信号并与底物结合行使其转运功能^[23-25]。还有一部分成员需要通过接头蛋白^[26]来行使功能。本研究克隆了巴西橡胶树中的 importin 和 exportin 基因,并进行系统进化分析,进而检测他们在不同组织及乙烯处理下的表达模式,为研究核质转运蛋白在乙烯促进橡胶树增产中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为 8 年生未开割的巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*),品系为热研 7-33-97,种植在中国热带农业科学院试验场。基因克隆采用 pMD18-T 质粒(Takara, Japan),*Escherichia coli* JM109 菌株由本实验室保存。

SMARTerTM RACE cDNA 扩增试剂盒购自 Clontech 公司。RNA 提取试剂盒购自百泰克公司,质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒购自 AXYGEN

公司。逆转录试剂盒、实时荧光定量染料 Maxima SYBR Green/ROX Qpcr Master Mix 购自 Thermo 公司。*Taq* DNA Polymerase 购自康为世纪公司。内切酶、连接酶购于 TaKaRa 公司。其他生化试剂和常规试剂均为国产或进口分析纯试剂。

1.2 材料处理

从同一株系 90 株巴西橡胶树上采集根、茎、叶、树皮和胶乳,其中 45 株进行乙烯处理,45 株作为对照,对未开割的橡胶树开割线,收集胶乳(0 d),开割 1 d 后在割线处涂乙烯利(3% ET, V/V)或水(对照),然后分别收集处理 2 d(以 D3 和 E3 表示)和 4 d(以 D5 和 E5 表示)的胶乳保存备用。胶乳的采集按照 Wang 等^[27]的方法进行,液氮速冻,于 -80℃ 保存备用。

1.3 总 RNA 的提取及 cDNA 第一条链的合成

巴西橡胶树根、茎、叶和树皮组织的 RNA 按照百泰克植物 RNA 提取试剂盒(#RP3301)说明书提取;胶乳 RNA 的提取使用 High SDS extraction buffer (100 mmol L⁻¹ Tris-HCl, 300 mmol L⁻¹ LiCl, 10 mmol L⁻¹ EDTA-Na₂, 10% SDS)进行提取。cDNA 第一条链的合成按照 Thermo 公司的反转录试剂盒(#K1622)说明书操作。

1.4 基因全长的克隆

根据已报道的植物 importin 和 exportin 基因保守序列分别设计简并引物,通过 PCR 扩增获得 importin 和 exportin 序列片段,再根据两片段序列设计特异的 3' RACE 和 5' RACE 引物(表 1)。cDNA 的合成和 RACE 扩增按照 SMARTerTM RACE cDNA 扩增试剂盒(#PT4096)使用说明书进行,扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离,回收纯化目的条带,连接到 pMD18-T 载体上并转化至 JM109,挑取单菌落 PCR 鉴定后,各选 3 个阳性单克隆送立菲生物技术公司测序。

1.5 生物信息学分析

使用 NCBI 网站的 ORF Finder 在线工具对全长 cDNA 序列进行开放阅读框的预测和氨基酸的翻译,用 Expasy 数据库中的 protparam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)对编码蛋白的理化性质进行分析。NCBI 结合 smart (<http://smart.embl-heidel->

表1 引物序列

Table 1 Sequence of primers

	引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
简并引物 Degenerate prime	HbIMP-F	CTCCTYACCCGHGACGATGC
	HbIMP-R	CAAACCCBCAATCTTCRCATC
	HbXPO-F	GCTTTKACYGAGCHTTTA
	HbXPO-R	AGCHAACTCTTCATACCG
cDNA 末端 cDNA ends	HbIMP-3'	TGGCTTGATTCAGCACGAG
	HbIMP-5'	CAACTGCCATCCCAACCA
	HbXPO-3'	GTAAACCAGGAGTAGCAGCCATT
	HbXPO-5'	TGATGAATAAGGGTCAAGTAGGAT
荧光定量 qPCR	HbIMP-F	CTTCCAAAAATACTATGATGCGGTG
	HbIMP-R	CAACTGCCATCCCAACCAGACTA
	HbXPO-F	CTGTAACCAGTTCTATCGCACGTAC
	HbXPO-R	CAAAGCACCACTTCAACCAGAC
	Actin-F	CCCCATGCTATCCTTCG
	Actin-R	AGGCAGCTCATAGTTCTTCTC

berg.de/)进行保守结构域预测。利用在线预测工具 psort (<http://psort.hgc.jp/cgi-bin/runpsort.pl>)对基因的亚细胞定位进行预测,应用 DNAMAN 软件进行多重序列比对分析,MEGA 6.0 构建进化树分析与其他植物蛋白的同源性。将序列在 NCBI 中与巴西橡胶树的基因组进行比对,拼接。利用 Softberry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>)网站的植物启动子预测软件 TSSP 分析所克隆到的序列核心启动子区;通过搜索植物顺式作用元件数据库 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) 和 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对启动子序列中可能存在的顺式作用元件进行分析。

1.6 实时荧光定量 PCR 分析

使用 STARTAGENE 公司的 MX3005p 荧光定量 PCR 系统分析 *importin* 和 *exportin* 在不同组织和乙烯处理的表达模式。以 *Actin* 作为内参基因,按照 Thermo 公司的 Maxima SYBR Green/ROX Qpcr Master Mix 试剂盒(#K0221)说明书操作。PCR 引物见表 1。每个样品设 3 个重复。PCR 反应程序为: 95℃ 预变性 10 min; 然后 95℃ 20 s; 56℃ 20 s; 72℃ 25 s, 共 40 个循环。利用 MXPRO 软件进行自动分析并计算基因的相对表达量。

2 结果和分析

2.1 *importin* 和 *exportin* 蛋白的表达分析

对本实验室所做的乙烯处理条件下胶乳蛋白

的 iTRAQ 数据^[8]进行分析(图 1),结果表明乙烯处理 2 d 和 4 d 的 *importin* 含量均比水处理对照的高,处理 4 d 的比处理 2 d 有所下调;同样,乙烯处理 2 d 和 4 d 的 *exportin* 含量均比水处理的高,处理 4 d 比处理 2 d 略有上调。

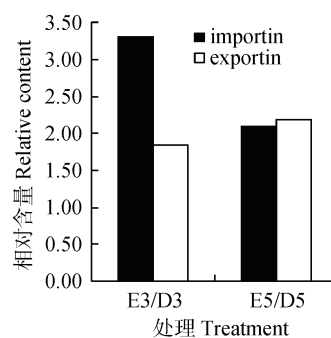


图1 乙烯处理下胶乳中 *importin* 和 *exportin* 的相对含量。E3: 乙烯处理 2 d; D3: 水处理 2 d; E5: 乙烯处理 4 d; D5: 水处理 4 d。图 5 同。

Fig. 1 Relative content of *importin* and *exportin* in rubber latex treated by ethylene. E3: Ethylene treatment for 2 days; D3: Water treatment for 2 days; E5: Ethylene treatment for 4 days; D5: Water treatment for 4 days. The same is Figure 5.

2.2 *HbIMP* 和 *HbXPO* 基因的克隆与生物信息学分析

根据已有的植物 *importin* 和 *exportin* 亚家族基因保守序列设计简并引物(表 1),以巴西橡胶树 cDNA 为模板通过同源扩增分别获得了 1 条 378 bp 的 *importin* 序列和 1 条 531 bp 的 *exportin* 序列,再采用 RACE 技术分别获得包含完整阅读框的 cDNA 全长序列。*importin* 基因的全长为 4170 bp,命名为

HbImportin (HbIMP), 含有 3348 bp 的开放式阅读框架, 5'端有 398 bp 的非编码区; 3'端有 424 bp 的非编码区, ProtParam tool 软件预测 *HbIMP* 基因编码 1 个由 1115 个氨基酸组成的蛋白。*exportin* 基因的全长为 4108 bp, 命名为 *HbExportin (HbXPO)*, 含有 3246 bp 的开放式阅读框架, 5'端有 313 bp 的非编码区, 3'端有 549 bp 的非编码区, 编码 1 个由 1081 个氨基酸组成的蛋白。

HbIMP 蛋白分子量约为 123.62 kD, 富含亮氨酸(Leu, 12.6%)和丙氨酸(Ala, 10%), 而组氨酸(His, 1.7%)和色氨酸(Trp, 0.9%)含量较低, 理论等电点 *pI* 为 4.74, 不稳定系数为 49.09, 说明属于不稳定蛋白。保守结构域分析表明, *HbIMP* 蛋白存在 importin β 家族的保守结构域: IBN-N (smart00913)、HEAT (pfam13513)和 ARM (cd00020)结构(图 2: A)。亚细胞定位预测 *HbIMP* 蛋白主要分布在细胞质(52.2%)和细胞核(39.1%)上。*HbXPO* 蛋白分子量约为 124.45 kD, 富含亮氨酸(Leu, 12.9%)和谷氨酸(Glu, 7.7%), 而半胱氨酸(Cys, 1.3%)和色氨酸(Trp, 1.2%)含量较低; 理论等电点 *pI* 为 5.45, 不稳定系数为 46.03, 说明属于不稳定蛋白。保守结构域分析表明, *HbXPO* 蛋白存在 exportin 亚家族的保守结构域: IBN-N、XPO1 (pfam08389)和 CRM1-C (pfam08767) (图 2: B)。亚细胞定位预测其主要分布在细胞质(65.2%)和细胞核中(26.1%)。

2.3 *HbIMP* 和 *HbXPO* 氨基酸序列比对及进化树的构建

使用 DNAMAN 软件进行多重序列比对(图 2), 结果表明 *HbIMP* 与麻疯树(*Jatropha curcas*, gi802563793)和拟南芥 importin5 (gi297812163)的同源性分别为 96.05%和 84.86%。*HbXPO* 与麻疯树 (gi802777573)和拟南芥 exportin1A (gi75266112)的同源性分别为 95.65%和 87.88%。

为进一步比较巴西橡胶树 *HbIMP* 和 *HbXPO* 与其他植物 importin β 基因在进化上的关系, 选取蓖麻(*Ricinus communis*)、麻疯树、拟南芥、可可(*Theobroma cacao*)、水稻(*Oryza sativa*)、大豆(*Glycine soja*)和棉花(*Gossypium arboreum*)共 7 种植物的 19 条 importin 序列和 14 条 exportin 序列, 利用 MEGA6.0 软件的 Neighbor-Joining 方法进行 1000 次 Bootstrap 统计学检测并构建进化树(图 3)。结果表明, *HbIMP* 与 importin β 家族中的 importin5 亚家

族距离较近, 与同科植物麻疯树的 importin5 最近, 与其它亚家族成员距离的较远。*HbXPO* 与 importin β 家族中的 exportin1A 距离较近, 与麻疯树的 exportin1A 距离最近, 与其它亚家族的成员距离较远。

2.4 *HbIMP* 和 *HbXPO* 基因的结构分析

利用 *HbIMP* 和 *HbXPO* 的 mRNA 序列在 NCBI 中巴西橡胶树的基因组数据库进行 BLAST 分析, 分别获得了 5 条和 3 条与 mRNA 序列部分区域高度一致的基因组序列。将这些序列进行拼接, 得到 1 条长度为 13801 bp 的 *HbIMP* 序列和 1 条长度为 17001 bp 的 *HbXPO* 序列。将 mRNA 序列和基因组序列进行比较, 显示 *HbIMP* 基因序列含有 18 个外显子和 17 个内含子; *HbXPO* 含有 30 个外显子和 29 个内含子(图 4: A)。在线软件 TSSP 预测表明, *HbIMP* 基因的 5'上游序列存在 1 个可能的转录起始位点, 在起始密码子上游 242 bp 处标记为 0, 对应的 TATA 框在 -29 bp, 增强子 CAAT-BOX 在 -75 bp; *HbXPO* 基因的转录起始位点在起始密码子上游 150 bp 处, 对应的 TATA 框在 -35 bp, 增强子 CAAT-BOX 在 -74 bp 处, 都符合高等植物启动子的基本结构特征。利用在线软件 PlantCARE 和 PLACE 对 *HbIMP* 和 *HbXPO* 启动子序列中可能的顺式作用元件进行分析, 结果表明有两类乙烯响应元件(ERELEE4, L-ECPLEACS2)存在于两个基因核心转录区上游 500 bp 内(图 4: B), 说明两个基因可能响应乙烯的调控。此外, 在他们的上游区域还包含一些逆境胁迫响应元件(CCAATBOX1、CURECORECR、DOFCOREZM、MYBCORE、MYC-CONSENSUSAT 和 W-BOX)、光顺式反应元件(GATA-BOX、GT1CONSENSUS 和 I-BOX)、组织特异表达元件(NTBBF1ARROLB、OSE2ROOTNODULE 和 ROOTMOTIFTAPO-X1), 以及细胞分裂素响应元件(ARR1AT)(表 2)。

2.5 *HbIMP* 和 *HbXPO* 基因的表达分析

利用实时荧光定量 PCR 技术分析 *HbIMP* 和 *HbXPO* 基因在巴西橡胶树根、茎、叶、树皮和胶乳 5 种组织中的表达特性。结果表明, 未经乙烯处理, *HbIMP* 在叶片和树皮中的表达明显, 茎中次之, 根和胶乳中非常弱(图 5: A), 这说明 *HbIMP* 主要在绿色组织中表达, 可能与基因上游的光响应元件的调控相关(表 2)。*HbXPO* 在根、茎、叶、皮中都有表达, 但胶乳中的非常低(图 5: A)。经乙烯处理 2 d

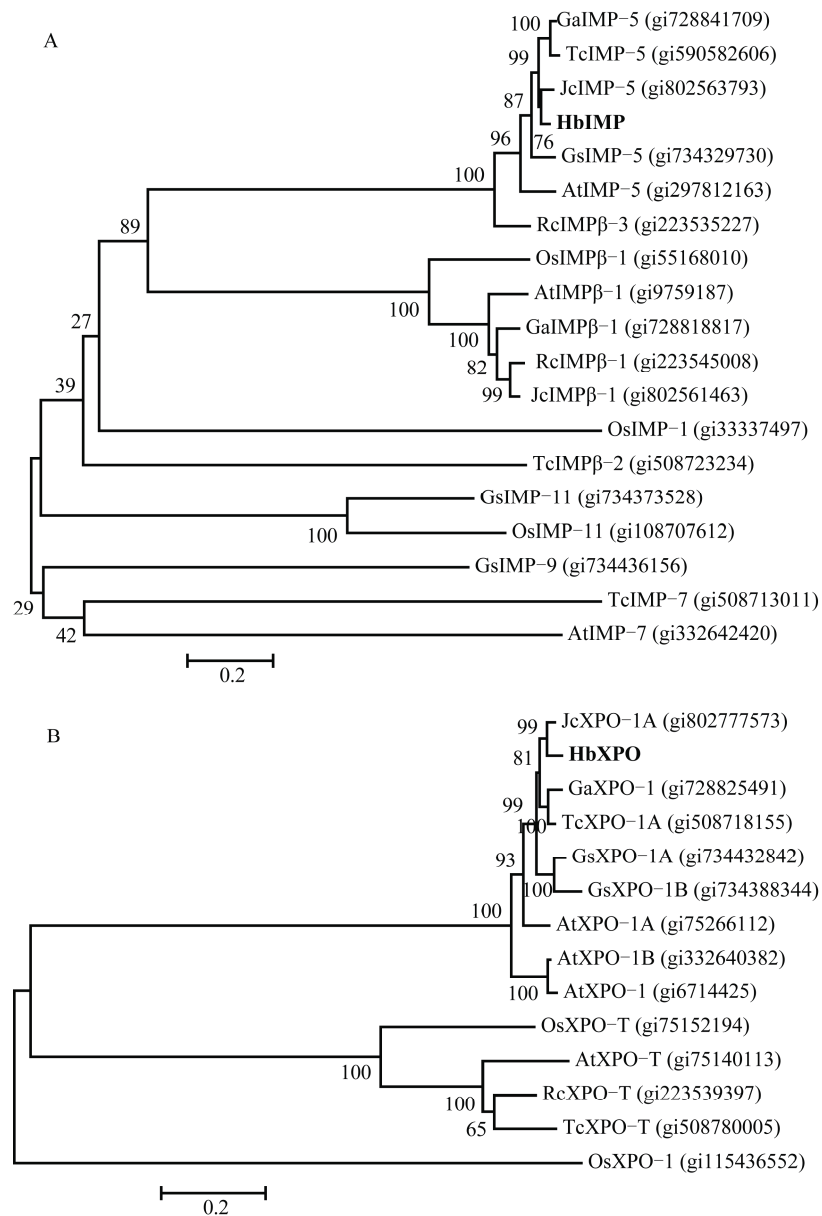


图 3 HbIMP (A) 和 HbXPO (B) 系统进化树。At: 拟南芥; Jc: 麻疯树; Rc: 蓖麻; Tc: 可可; Ga: 棉花; Os: 水稻; Gs: 大豆。

Fig. 3 Phylogenetic tree of the deduced amino acid sequence of HbIMP (A) and HbXPO (B). At: *Arabidopsis thaliana*; Jc: *Jatropha curcas*; Rc: *Ricinus communis*; Tc: *Theobroma cacao*; Ga: *Gossypium arboreum*; Os: *Oryza sativa*; Gs: *Glycine soja*.

后 *HbIMP* 和 *HbXPO* 基因(图 5: B)的表达量比水处理 2 d 的显著升高, 处理 4 d 的虽有所回落但仍比水处理 4 d 的高, 说明乙烯促进了 *HbIMP* 和 *HbXPO* 在胶乳中的表达。

3 讨论和结论

生物细胞内各个生命过程的有序进行及准确调节依赖于生物大分子在细胞核和细胞质之间进

行有选择、有控制的转运。一旦核质转运失调, 会使转运底物不能正常执行功能, 导致个体发育的异常与疾病的发生。例如水稻 *importin β* 的突变可阻碍杂合子花粉管的伸长^[28]; 拟南芥 *importin β* 家族中 *KPNB1* 可以不通过脱落酸(ABA)途径调控干旱胁迫^[29]; 拟南芥中的 *SAD2* (*importin7* 或 *8*) 突变体在种子萌发和生长期表现为 ABA 敏感型^[30]; 拟南芥中的 *importin* 家族中 *MOS14* 突变体会阻遏 SR 蛋白的核定位以及抗病基因 *SNCI* 和 *PRS4* mRNA 的

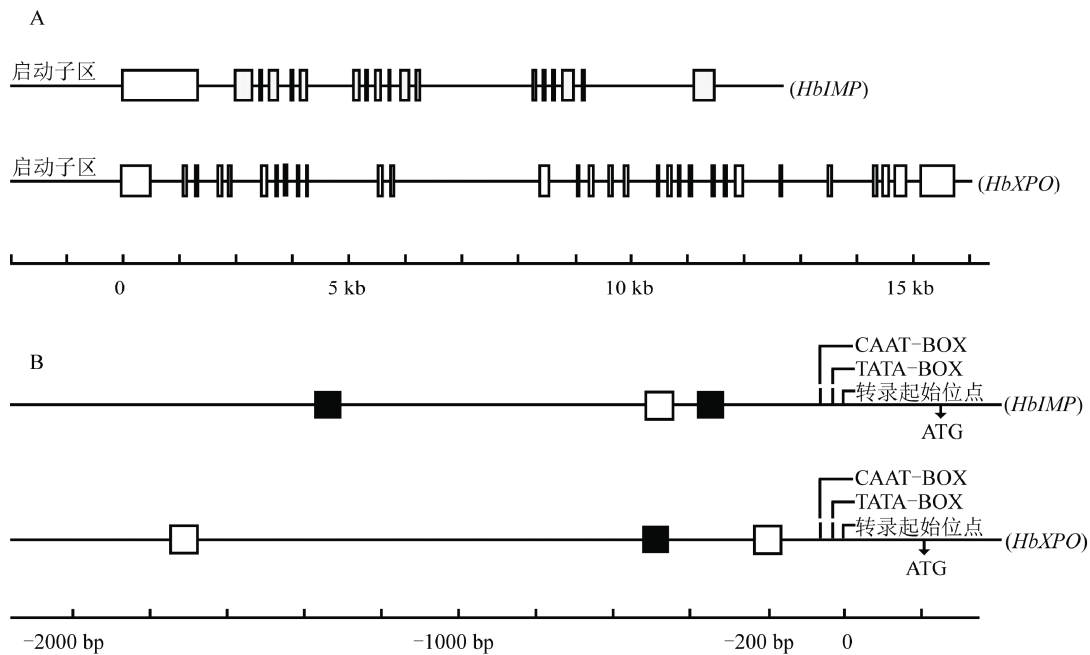


图 4 *HbIMP* 和 *HbXPO* 基因结构(A)及顺式元件(B)示意图。A 中方框为外显子, 直线为内含子; B 中■和□为乙烯响应元件 ERELEE4 和 LECPLEACS2。
 Fig. 4 Sketch map of genetic structure and *cis*-acting regulatory elements of *HbIMP* and *HbXPO*. The boxes and straight lines in Fig. A represent exons and introns, respectively; while ■ and □ in Fig. B represent ethylene-induced elements ERELEE4 and LECPLEACS2, respectively.

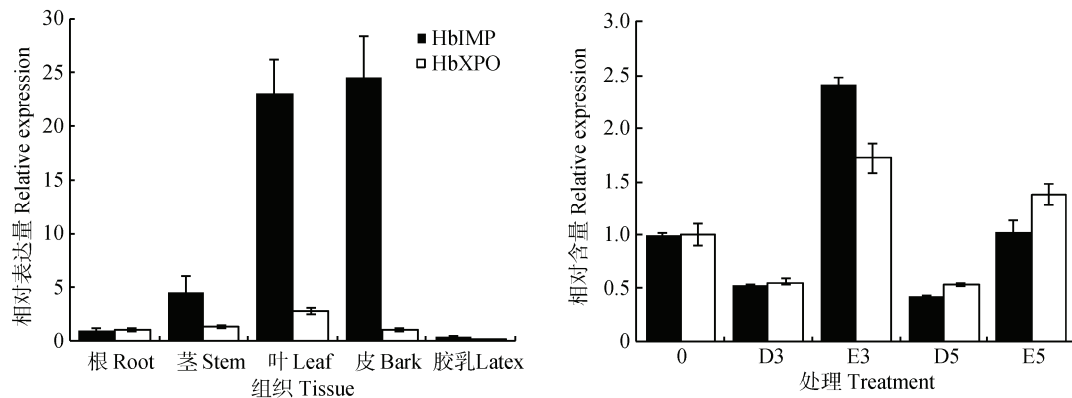


图 5 *HbIMP* 和 *HbXPO* 的组织表达(A)及乙烯处理下的表达 (B)
 Fig. 5 Expression of *HbIMP* and *HbXPO* in different tissues (A) and under ethylene treatment (B)

剪切异常^[31]; 拟南芥中的 *exportin1* (*XPO1*)可调控干旱和氧化胁迫^[32]。本研究首次在巴西橡胶树中对 *importin*β 家族的两个成员进行了克隆, 根据 *HbIMP* 和 *HbXPO* 与其家族序列的比对及构建进化树, 表明该类蛋白家族在进化上十分保守, 在同源性上可将 *HbIMP* 归为 *importin5* 亚家族; *HbXPO* 归为 *exportin1A*^[20]亚家族。两个基因启动子序列中的主要顺式元件种类相同(图 4), 数量上存在差别, 值得注意的是 *HbIMP* 和 *HbXPO* 都存

在两类乙烯响应元件 ERELEE4 和 LECPLEACS2, 且处在转录起始位点上游较近的区域, 说明 *HbIMP* 和 *HbXPO* 的表达可能受到乙烯的诱导。根据两个基因的组织表达谱(图 5), 未经乙烯处理 *HbIMP* 在叶片和树皮中表达明显, 茎中较低, 非绿色组织的根和胶乳中非常低, 说明该基因主要在绿色组织中表达, 可能与基因的上游光响应元件调控相关; *HbXPO* 在根、茎、叶、皮中都有表达, 但胶乳中的表达很低, 推测 *HbIMP* 和 *HbXPO*

表 2 *HbIMP* 和 *HbXPO* 基因上游区域的顺式作用元件Table 2 *Cis*-acting regulatory elements in the upstream sequence of *HbIMP* and *HbXPO*

元件 Element	数量 Number		位置 Site		核心序列 Core sequence
	IMP	XPO	IMP	XPO	
ARR1AT	9	6	470(+)/590(+)/730(+)/758(+)/1106(+)/ 1256(+)/1689(+)/1884(+)/1929(+)	574(+)/685(+)/858(+)/946(+)/1080(+)/1450(+)	NGATT
CAAT-BOX	10	11	52(+)/172(+)/200(+)/338(+)/693(+)/ 960(+)/1034(+)/1303(+)/1696(+)/2082(+)	141(+)/401(+)/644(+)/790(+)/821(+)/1052(+)/ 1361(+)/1547(+)/1870(+)/1910(+)/2126(+)	CAAT
CCAATBOX1	1	1	692(+)	789(+)	CCAAT
CURECORECR	2	2	100(+)/1159(+)	43(+)/2296(+)	GTAC
DOFCOREZM	13	9	16(+)/38(+)/59(+)/116(+)/391(+)/420(+)/ 903(+)/1429(+)/1513(+)/1558(+)/1582(+)/ 2115(+)/2326(+)	40(+)/626(+)/705(+)/1163(+)/1448(+)/1556(+)/ 1710(+)/1893(+)/2092(+)	AAAG
ERELEE4	2	1	833(+)/1800(+)	1714(+)	AWTTCAAA
GATA-BOX	10	8	242(+)/257(+)/747(+)/889(+)/1063(+)/ 1243(+)/1464(+)/1522(+)/1820(+)/1969(+)	241(+)/279(+)/373(+)/451(+)/616(+)/808(+)/ 868(+)/1426(+)	GATA
GT1CONSENSUS	7	7	56(+)/119(+)/242(+)/304(+)/889(+)/ 1529(+)/1969(+)	241(+)/279(+)/451(+)/616(+)/767(+)/808(+)/ 1325(+)	GRWAAW
IBOXCORE	4	5	242(+)/889(+)/1522(+)/1969(+)	241(+)/279(+)/451(+)/616(+)/808(+)	GATAA
LECPLEACS2	2	2	1656(+)/1810(+)	456(+)/2009(+)	TAAAAATAT
MYBCORE	3	2	514(+)/754(+)/1416(+)	1075(+)/1455(+)	CNGTTR
MYCONSENSUSAT	4	5	489(+)/1910(+)/1946(+)/2058(+)	694(+)/762(+)/854(+)/953(+)/1718(+)	CANNTG
NTBBF1ARROLB	3	1	1429(+)/1519(+)/1582(+)	1670(+)	ACTTTA
OSE2ROOTNODULE	4	5	45(+)/2204(+)/2195(+)/2277(+)	655(+)/1448(+)/1934(+)/2282(+)/2299(+)	CTCTT
ROOTMOTIFTAPOX1	7	6	83(+)/144(+)/278(+)/543(+)/748(+)/ 1318(+)/1821(+)	286(+)/605(+)/869(+)/1054(+)/1460(+)/ 1659(+)	ATATT
TATA-BOX	11	10	33(+)/87(+)/197(+)/371(+)/494(+)/575(+)/ 586(+)/930(+)/1233(+)/1454(+)/2128(+)	20(+)/185(+)/369(+)/397(+)/408(+)/776(+)/ 961(+)/1237(+)/1310(+)	TATA
W-BOX	1	1	430(+)	1609(+)	TGAC

在胶乳中可能属于诱导表达型，且 *HbIMP* 和 *HbXPO* 的乙烯诱导表达趋势较一致，两基因在乙烯处理后的表达量比对照的显著升高。*HbIMP* 基因表达与其蛋白表达结果一致，而 *HbXPO* 蛋白在乙烯处理 4 d 比处理 2 d 的还略有上调，可能是因为蛋白的表达较基因的表达具有滞后性。核酸和蛋白水平的检测都说明了乙烯可促进 *HbIMP* 和 *HbXPO* 在胶乳中的表达。*HbIMP* 和 *HbXPO* 在胶乳中的表达受乙烯诱导，可能参与了乙烯诱导表达的其它蛋白的出、入核转运。这些为进一步研究核质转运蛋白在乙烯促进橡胶树增产中的作用提供了一定的基础。

参考文献

- [1] HE K, HUANG Z D. Cultivation of Rubber Tree in North Tropic [M]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 1987: 1–3.
何康, 黄宗道. 热带北缘巴西橡胶树栽培 [M]. 广州: 广东科技出版社, 1987: 1–3.
- [2] ALLEN P W, JONES K P. A historical perspective of the rubber industry [M]// ROBERTS A D. Natural rubber science and technology. Oxford: Oxford University Press, 1988: 22–27.
- [3] DUSOTOIT-COUCAUD A, KONGSAWADWORAKUL P, MAUROU-SSET L, et al. Ethylene stimulation of latex yield depends on the expression of a sucrose transporter (*HbSUT7B*) in rubber tree (*Hevea brasiliensis*) [J]. Tree Physiol, 2010, 30(12): 1586–1598. doi: 10.1093/treephys/tpq088.
- [4] DOUNGMUSIK A, SDOODEE S. Enhancing the latex productivity of *Hevea brasiliensis* clone RRIM 600 using ethylene stimulation [J]. J Agri Sci Techn, 2012, 8(6): 2033–2042.
- [5] PIYATRAKUL P, YANG M, PUTRANTO R A, et al. Sequence and expression analyses of ethylene response factors highly expressed in latex cells from *Hevea brasiliensis* [J]. PLoS ONE, 2014, 9(6): e99367. doi: 10.1371/journal.pone.0099367.
- [6] CHERDCHIM B, SUDCHADA R. Ethylene stimulation of rubber wood (*Hevea brasiliensis*) increases the water permeability of lumber [J]. J Agri Sci Techn, 2014, 4(2): 129–134.
- [7] PUTRANTO R A, DUAN C F, KUSWANHADI, et al. Ethylene response factors are controlled by multiple harvesting stresses in *Hevea brasiliensis* [J]. PLoS ONE 2015, 10(4): e0123618. doi: 10.1371/journal.pone.0123618.
- [8] WANG X C, WANG D, SUN Y, et al. Comprehensive proteomics

- analysis of laticifer latex reveals new insights into ethylene stimulation of natural rubber production [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 13778. doi: 10.1038/srep13778.
- [9] KOLODKIN A N, BRUGGEMAN F J, PLANT N, et al. Design principles of nuclear receptor signaling: How complex networking improves signal transduction [J]. *Mol Syst Biol*, 2010, 6(1): 446–460. doi: 10.1038/msb.2010.102.
- [10] NEUMANN N, LUNDIN D, POOLE A M. Comparative genomic evidence for a complete nuclear pore complex in the last eukaryotic common ancestor [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(10): e13241. doi: 10.1371/journal.pone.0013241.
- [11] ROTH D M, MOSELEY G W, POUTON C W, et al. Mechanism of microtubule-facilitated “fast track” nuclear import [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(16): 14335–14351. doi: 10.1074/jbc.M110.210302.
- [12] PANTÉ N, KANN M. Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of ~39 nm [J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(2): 425–434. doi: 10.1091/mbc.01-06-0308.
- [13] CINGOLANI G, PETOSA C, WEIS K, et al. Structure of importin- β bound to the IBB domain of importin- α [J]. *Nature*, 1999, 399(6733): 221–229. doi: 10.1038/20367.
- [14] LIU J, COAKER G. Nuclear trafficking during plant innate immunity [J]. *Mol Plant*, 2008, 1(3): 411–422. doi: 10.1093/mp/ssn010.
- [15] MOSAMMAPARAST N, PEMBERTON L F. Karyopherins: From nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators [J]. *Trends Cell Biol*, 2004, 14(10): 547–556. doi: 10.1016/j.tcb.2004.09.004.
- [16] MINGOT J M, KOSTKA S, KRAFT R, et al. Importin 13: A novel mediator of nuclear import and export [J]. *EMBO J*, 2001, 20(14): 3685–3694. doi: 10.1093/emboj/20.14.3685.
- [17] MEHDI A M, SEHGAL M S B, KOBE B, et al. A probabilistic model of nuclear import of proteins [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(9): 1239–1246. doi: 10.1093/bioinformatics/btr121.
- [18] ZHANG Y L, LI X. A putative nucleoporin 96 is required for both basal defense and constitutive resistance responses mediated by *suppressor of npr1-1, constitutive 1* [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(4): 1306–1316. doi: 10.1105/tpc.104.029926.
- [19] LU Q, TANG X R, TIAN G, et al. *Arabidopsis* homolog of the yeast TREX-2 mRNA export complex: Components and anchoring nucleoporin [J]. *Plant J*, 2010, 61(2): 259–270. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.04048.x.
- [20] WU S J, WANG L C, YE H C H, et al. Isolation and characterization of the *Arabidopsis heat-intolerant 2 (hit2)* mutant reveal the essential role of the nuclear export receptor EXPORTIN1A (XPO1A) in plant heat tolerance [J]. *New Phytol*, 2010, 186(4): 833–842. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03225.x.
- [21] TAMURA K, FUKAO Y, IWAMOTO M, et al. Identification and characterization of nuclear pore complex components in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(12): 4084–4097. doi: 10.1105/tpc.110.079947.
- [22] KIMURA M, IMAMOTO N. Biological significance of the importin- β family-dependent nucleocytoplasmic transport pathways [J]. *Traffic*, 2014, 15(7): 727–748. doi: 10.1111/tra.12174.
- [23] CHOOK Y M, BLOBEL G. Structure of the nuclear transport complex karyopherin- β 2-Ran-GppNHp [J]. *Nature*, 1999, 399(6733): 230–237. doi: 10.1038/20375.
- [24] WEIS K. Regulating access to the genome: Nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle [J]. *Cell*, 2003, 112(4): 441–451. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00082-5.
- [25] PEMBERTON L F, PASCHAL B M. Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export [J]. *Traffic*, 2005, 6(3): 187–198. doi: 10.1111/j.1600-0854.2005.00270.x.
- [26] BAYLISS R, LITTLEWOOD T, STEWART M. Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin- β in nuclear trafficking [J]. *Cell*, 2000, 102(1): 99–108. doi: 10.1016/S0092-8674(00)00014-3.
- [27] ZHUANG Y T, TONG Z, WANG L M, et al. A simple method of RNA extraction from fresh rubber latex of *Hevea brasiliensis* [J]. *Chin J Trop Crops*, 2013, 34(10): 1907–1913. doi: 10.3969/j.issn.1000-2561.2013.10.010.
庄盈婷, 全征, 王力敏, 等. 橡胶树胶乳 RNA 简易提取和保存方法的比较探索 [J]. *热带作物学报*, 2013, 34(10): 1907–1913. doi: 10.3969/j.issn.1000-2561.2013.10.010.
- [28] HAN M J, JUNG K H, YI G, et al. Rice *importin β 1* gene affects pollen tube elongation [J]. *Mol Cell*, 2011, 31(6): 523–530. doi: 10.1007/s10059-011-2321-7.
- [29] LUO Y J, WANG Z J, JI H T, et al. An *Arabidopsis* homolog of importin β 1 is required for ABA response and drought tolerance [J]. *Plant J*, 2013, 75(3): 377–389. doi: 10.1111/tpj.12207.
- [30] VERSLUES P E, GUO Y, DONG C H, et al. Mutation of SAD2, an importin β -domain protein in *Arabidopsis*, alters abscisic acid sensitivity [J]. *Plant J*, 2006, 47(5): 776–787. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02833.x.
- [31] XU S H, ZHANG Z B, JING B B, et al. Transportin-SR is required for proper splicing of resistance genes and plant immunity [J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(6): e1002159. doi: 10.1371/journal.pgen.1002159.
- [32] BLANVILLAIN R, BOAVIDA L C, McCORMICK S, et al. *Exportin₁* genes are essential for development and function of the gametophytes in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Genetics*, 2008, 180(3): 1493–1500. doi: 10.1534/genetics.108.094896.