

巴西橡胶树 ACA/ECA 基因家族鉴定及分析

杨晶晶^{1,2}, 方永军¹, 张鸿韬^{1,3}, 龙翔宇¹, 秦云霞¹, 阳江华¹, 肖小虎^{1*}

1. 农业农村部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室/中国热带农业学院橡胶研究所, 海南海口 571101; 2. 云南农业大学热带作物学院, 云南普洱 665099; 3. 海南大学热带作物学院, 海南海口 570228

摘要: Ca^{2+} 是植物细胞的第二信使, Ca^{2+} -ATPase (ACA/ECA) 作为 Ca^{2+} 运输的重要蛋白, 在保证细胞内钙离子的平衡和植物非生物胁迫方面发挥着至关重要的作用。为了研究巴西橡胶树中 Ca^{2+} -ATPase (ACA/ECA) 的生物学功能, 以模式植物拟南芥的 ACA/ECA 蛋白序列为探针, 从橡胶树基因组中鉴定得到 45 个 ACA/ECA 基因家族成员, 其中 ACA 成员 38 个, ECA 成员 7 个。利用 ExPasy、Plant-mPLoc 等工具对 45 个成员的理化性质、基因结构、染色体定位、系统进化和表达进行全面分析。理化性质分析表明: 各成员编码蛋白的氨基酸数目为 86~1142 个, 氨基酸分子量在 10 048.04~125 412.75 Da 之间, 蛋白产物多定位于细胞质膜, 有少量成员定位于内质网、叶绿体、液泡和细胞核。在进化方面, ACA/ECA 家族成员明显聚于 ACA 和 ECA 两个分枝, 2 个分支中橡胶树始终与木薯紧靠, 表明在系统进化过程中橡胶树与木薯存在较近的亲缘关系。染色体定位结果显示: ACA/ECA 家族的 45 个成员不均匀地分布在橡胶树的 14 条染色体和 1 个 contig 上, 其中 2 号和 9 号染色体上成员分布最多, 为 11 个。表达分析显示: 部分成员在不同组织中的表达存在显著差异, *HbACA31* 在叶片中表达丰度最高, *HbACA36* 在胶乳中表达丰度最高, 并且 *HbACA36* 经乙烯利刺激处理后在胶乳中的表达明显上调。另外, 本研究还分析了割胶对 ACA/ECA 家族成员基因表达的影响, 发现 *HbACA36* 在 PR107 和热研 8-79 两个橡胶树品种割胶过程中均处于较高的表达水平, 并且在高产品种热研 8-79 开割过程中明显上调表达, 推测 *HbACA36* 参与橡胶树产胶排胶调控, 并在其中起重要作用。本研究结果首次揭示了橡胶树 ACA/ECA 家族成员的理化性质和表达模式, 为进一步研究 ACA/ECA 基因在巴西橡胶树中的生物学功能, 特别是橡胶树产胶调控方面的功能奠定基础。

关键词: 巴西橡胶树; Ca^{2+} -ATPase (ACA/ECA); 基因家族; 生物学功能; 表达分析

中图分类号: S794.1 文献标识码: A

Identification and Analysis of ACA/ECA Gene Family in *Hevea brasiliensis*

YANG Jingjing^{1,2}, FANG Yongjun¹, ZHANG Hongtao^{1,3}, LONG Xiangyu¹, QIN Yunxia¹, YANG Jianghua¹, XIAO Xiaohu^{1*}

1. Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 2. College of Tropical Crops, Yunnan University, Pu'er, Yunnan 665099, China; 3. College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China

Abstract: Ca^{2+} is a second messenger in plant cells, and Ca^{2+} -ATPase (ACA/ECA), as an important protein in Ca^{2+} transport, plays a crucial role in ensuring the balance of intracellular calcium ions and abiotic stress in plants. To investigate the biological function of Ca^{2+} -ATPase (ACA/ECA) in *Hevea brasiliensis*, 45 ACA/ECA gene family members were identified from the rubber tree genome using the ACA/ECA protein sequence of the model plant *Arabidopsis* as a probe, including 38 ACA members and 7 ECA members. ExPasy and Plant-mPLoc were used to comprehensively analyze the physicochemical properties, gene structure, chromosomal localization, phylogeny, and expression patterns of

收稿日期 2022-10-21; 修回日期 2022-11-09

基金项目 海南省自然科学基金项目 (No. 320RC731); 中央级公益性科研院所基本科研业务费项目 (No. 1630022020023)。

作者简介 杨晶晶 (2001—), 女, 本科生, 研究方向: 植物分子生物学。*通信作者 (Corresponding author): 肖小虎 (XIAO Xiaohu), E-mail: xiaofeihu_011588@126.com。

the 45 members. Physicochemical properties analysis showed that the number of amino acids encoded by each member was 86–1142, the molecular weight of amino acids ranged from 10 048.04 to 125 412.75 Da, and the protein products were mostly localized on the cytoplasmic membrane, with a few members localized on the endoplasmic reticulum, chloroplast, vacuole, and nucleus. In evolutionary, members of the ACA/ECA family were clearly clustered into ACA and ECA two branches, and rubber tree members were always in close proximity to cassava in both branches, indicating that there was a close relative between rubber tree and cassava during phylogeny. Chromosomal localization revealed that the 45 members of the ACA/ECA family were unevenly distributed across 14 chromosomes and one contig in rubber tree, in which, chromosomes 2 and 9 had the largest member distribution of 11 members. Expression analysis showed that there were obvious differences in the expression of some members in different groups, *HbACA31* was expressed the most in leaves, *HbACA36* was expressed the most in latex, and the expression of *HbACA36* was obviously up-regulated in latex after treatment with ethanol. In addition, we also analyzed the influence of tapping on ACA/ECA gene expression, and found that *HbACA36* was at a high expression level during tapping of the two rubber tree varieties, PR107 and Reyan 8-79, and significantly up-regulated during tapping of high-yield variety Reyan 8-79, which speculated that *HbACA36* was involved in the regulation of rubber biosynthesis and played an important role. The results presented in this study reveal the physicochemical properties and expression patterns of ACA/CA family members for the first time in rubber tree, and would provide a foundation for further investigation of the biological functions of ACA/ECA genes in *H. brasiliensis*, especially in the regulation of the rubber production.

Keywords: *Hevea brasiliensis*; Ca^{2+} -ATPase (ACA/ECA); gene family; biological function; expression analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.11.013

钙离子 (Ca^{2+}) 作为植物细胞的第二信使几乎参与了植物生长发育的各个方面, 包括对生物和非生物胁迫的反应^[1]。植物细胞内 Ca^{2+} 信号的传递主要是通过改变细胞内外钙离子浓度实现的, 而 Ca^{2+} 浓度的变化则主要由膜上的跨膜转运蛋白进行控制^[2]。植物细胞的 Ca^{2+} 转运主要由钙离子通道、钙离子反向转运蛋白和钙离子泵^[3], Ca^{2+} -ATPase 属于 P-型 ATP 酶离子超家族的 P2 分支, 根据其蛋白质氨基酸序列和生化特征方面的差异分为 2 个亚家族 (P2A 和 P2B), 也分别称为内质网型 Ca^{2+} -ATPase (ER-type calcium ATPase, ECA, P2A) 和自抑制的质膜 (PM) 型 Ca^{2+} -ATPase (autoinhibited calcium ATPase, ACA, P2B)^[4]。在植物细胞中, 定位于质膜和内质网中的 P 型 Ca^{2+} -ATP 酶被认为在调节细胞质 Ca^{2+} 浓度方面起重要作用^[5], 同时 P 型 Ca^{2+} -ATP 酶在植物生长发育的各个方面都是不可或缺的, 包括花粉管生长、细胞程序性死亡、根部尖端生长, 以及生物和非生物胁迫应答 (如低温、高温、盐胁迫、干旱和渗透胁迫等)、共生等方面^[3]。目前已经在拟南芥^[6]、水稻^[7]、白菜^[8]、茄科植物^[9]、苜蓿^[10] 等植物中鉴定得到 ACA/ECA 基因家族多个成员, 并对其在植物中的功能进行了研究。研究表明, 在拟南芥中, *ACA8* 基因功能的缺失能显著提高拟南芥对零下低温的抗冻性^[11]; 在低钙环境下, *ECA1* 表达受到干扰的转基因株系耐受低 Ca^{2+}

(0.2 mmol/L) 或高 Mn^{2+} (0.5 mmol/L) 胁迫的能力降低^[12]。水稻 ACA/ECA 家族由 15 个成员组成, 其中有 3 个属于内质网膜型钙离子泵, 12 个属于自抑制型钙离子泵, 盐、干旱和 ABA 胁迫可以显著激活 *OsACA6* 的表达, 但热胁迫激活作用相对较弱^[13]。ACA/ECA 家族在大白菜不同组织中表达模式不同, 5 个成员编码蛋白定位于细胞膜上, 其中 *Bra002762*、*Bra035649*、*Bra031701* 与低温和盐胁迫响应有关, 而 *Bra003276* 和 *Bra024117* 与自交不亲和性相关^[5], 大白菜缺少 *ECA* 基因会导致新叶生长缓慢, 叶片枯萎黄化^[14]。在茄科植物中, 低温和盐胁迫处理后, *SLyECA1* 基因表达丰度较高, 且处理前后表达趋势变化明显, 说明 *SLyACA1* 基因可能是提高植株抗性的关键基因^[9]。野生大豆 Ca^{2+} -ATPase 基因 *GsACA1* 在苜蓿中超量表达, 能够显著提高转基因苜蓿的耐盐碱性^[10]。以上研究表明, ACA/ECA 基因家族成员在多种植物中均发挥了重要作用。

巴西橡胶树是大戟科橡胶树属乔木, 其产生的胶乳是天然橡胶生成的主要原料。天然橡胶 (natural rubber) 是一种以聚异戊二烯为主要成分的天然高分子化合物, 与合成橡胶相比天然橡胶性能更加优良, 在很多方面具有不可替代性, 可用于生产飞机轮胎、手套等数万种橡胶制品, 在军事、医疗、运输等行业起着非常重要的作用^[15], 中国是目前为止世界上最大的天然橡胶消费国,

年消费量占全世界总消费量的 40%以上,但自给率不足为 15%^[16]。理论预测,以及生产上出现的高产橡胶树单株都显示出巴西橡胶树还具有巨大的产胶潜能^[17-18]。目前已知的 2500 余种产胶植物中橡胶树表现出优异的产胶能力,推测与橡胶树中高丰度表达的橡胶延伸因子/小橡胶粒子蛋白(REF/SRPP)基因家族发生扩增有关^[19]。已有研究表明,REF/SRPP 基因^[20]、HbNN2 基因^[21]、蔗糖转运蛋白 HbSUT3^[22]对橡胶树产胶具有重要作用。生产上,割胶和乙烯刺激都能显著提高胶乳产量,表明激素和伤害信号的传递与橡胶生物合成关系密切。钙离子是植物细胞内重要的信号传递因子,在植物应对生物和非生物胁迫方面具有重要功能,而目前关于钙离子泵 ACA/ECA 家族在橡胶树中的研究却未见报道。本研究以已发表植物 ACA/ECA 蛋白序列为探针从橡胶树转录组和基因组中鉴定出橡胶树 ACA/ECA 家族的全体成员,并从理化性质、系统进化和表达模式等方面进行了全面系统的分析。研究结果将为进一步研究 ACA/ECA 基因在橡胶树乳管钙离子信号的传递,以及橡胶树生长发育和逆境胁迫应答等方面的功能奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

供试材料均来自于海南省儋州市中国热带农业科学院试验基地。用于表达分析的不同组织材料(叶片、树皮、胶乳、种子、雄花、雌花等 6 种组织)均来自于正常开割 2 年的热研 7-33-97 橡胶树。由于生产上开割树多为嫁接苗,根部并非热研 7-33-97 品种,因而本研究选用热研 7-33-97 组培苗的根作为根材料。为了分析乙烯刺激对基因表达的影响,对正常开割 2 年的热研 7-33-97 橡胶树(未涂抹过乙烯利,割胶频率为 3 d 1 刀)进行乙烯利刺激试验,提前 0、3、12、24 h 将 1.5%的乙烯利涂抹在橡胶树剖面,然后在同一时间点采集胶乳样品。为了进一步研究割胶对 ACA/ECA 基因表达的影响,选取相邻 2 个林段,PR107 品系和热研 8-79 的未开割橡胶树,同时进行 3 d 1 刀割胶,分别在第 1、3、5、7、9 刀采集胶乳样品。利用试剂盒提取以上样品的 RNA,送往北京百迈克公司进行二代 illumina 转录组测序。

1.2 方法

1.2.1 橡胶树 ACA/ECA 家族成员鉴定及理化性质分析 根据文献[6]的方法,从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库中下载模式植物拟南芥的 ACA/ECA 蛋白序列,以拟南芥蛋白序列作为探针,通过本地服务器进行 blastp 比对(参数 e 值为 1e-4),得到候选橡胶树 ACA/ECA 家族成员。利用在线软件 CD-Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 对候选 ACA/ECA 家族成员所包含的结构域进行进一步鉴定分析,得到橡胶树 ACA/ECA 家族成员。利用在线软件 ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>)和 Plant-mPLoc(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>)对橡胶树 ACA/ECA 基因家族成员的氨基酸分子量、蛋白长度、理论等电点以及亚细胞定位进行分析。

1.2.2 构建系统进化树以及基因结构图 在 NCBI 网站通过 blastp 比对检索并下载水稻、杨树和木薯的 ACA/ECA 蛋白序列,使用多序列比对软件在线 mafft (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>)对拟南芥、水稻、杨树、橡胶树和木薯 5 种植物的蛋白序列进行比对,使用 MEGA 6.0^[23]软件采用邻接法构建系统进化树,参数 bootstrap 设置为 1000,利用在线软件 Figtree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)对进化树进行调整;利用基因组序列和基因组注释 GFF3 文件对橡胶树 ACA/ECA 基因家族进行基因结构分析,通过 GSDS (<http://gsds.gao-lab.org/>)^[24]在线软件结合系统进化树绘制出橡胶树 ACA/ECA 基因结构图。

1.2.3 橡胶树 ACA/ECA 家族成员染色体定位分析 利用 Tbtools^[25]软件,根据橡胶树 GFF3 文件相关信息绘制出橡胶树 ACA/ECA 基因家族的染色体定位图;利用 MCscanX 软件对橡胶树基因组进行共线性分析,绘制染色体之间的共线性连线^[26]。

1.2.4 橡胶树 ACA/ECA 家族成员表达模式分析 利用本实验室转录组数据,对 ACA/ECA 家族成员在不同组织中、乙烯利处理不同时间点以及割胶处理条件下的表达进行分析^[27]。将测序得到的转录组数据上传到本地服务器,利用 RSEM^[28]软件包进行表达分析得到每个基因的 FPKM 值,利用 Tbtools 软件中的 HeatMap 小程序绘制热图。

2 结果与分析

2.1 橡胶树 ACA/ECA 家族成员鉴定及理化性质分析

利用已发表模式植物拟南芥的 ACA/ECA 蛋白序列^[6], 通过 BLAST 比对筛选橡胶树 ACA/ECA 基因家族候选成员, 并利用在线软件 CD-Search 对候选成员的蛋白结构域进行进一步鉴定, 最终鉴定得到 45 个 ACA/ECA 基因家族成员, 其中包含 38

个 ACA 和 7 个 ECA 亚家族成员, 分别命名为 *HbACA1*~*HbACA38* 和 *HbECA1*~*HbECA7*。橡胶树 ACA/ECA 基因编码的蛋白分子量在 10 048.04 Da (*HbACA26*)~125 412.75 Da (*HbACA36*) 之间, 理论等电点在 5.18 (*HbACA18*)~9.21 (*HbACA26*) 之间, 45 个成员中 30 个成员等电点均小于 7, 说明大多属于酸性蛋白。亚细胞定位结果显示, 橡胶树 ACA/ECA 基因家族成员大多定位于细胞膜(表 1)。

表 1 橡胶树 ACA/ECA 基因家族成员信息
Tab. 1 ACA/ECA gene family members of *H. brasiliensis*

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	染色体 Chromo- some	位置 Localization	基因大小 Gene length/bp	蛋白长度 Protein length/aa	氨基酸分子量 Molecular weight/Da	等电点 Isoelectric point	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>HbACA1</i>	EVM0016302.1	LG07	120 75 368~12 087 029	11 662	818	89 587.47	5.72	叶绿体、液泡
<i>HbACA2</i>	EVM0012621.1	LG03	48 737 744~48 743 632	5889	1032	113 138.54	8.78	叶绿体、内质网、液泡
<i>HbACA3</i>	EVM0000857.2	LG12	6 216 555~62 23 381	6827	1020	111 182.75	8.82	叶绿体、内质网、液泡
<i>HbACA4</i>	EVM0011980.1	LG06	78 963 020~78 970 776	7757	1015	112 073.73	6.92	叶绿体、内质网、液泡
<i>HbACA5</i>	EVM0039732.1	LG16	87 565 443~87 571 971	6529	1015	118 852.42	6.49	叶绿体、内质网、液泡
<i>HbACA6</i>	EVM0010645.1	LG16	87 574 251~87 591 324	17 074	943	108 545.60	6.43	叶绿体、内质网
<i>HbACA7</i>	EVM0003754.1	LG07	102 697 785~102 701 228	3444	1027	118 823.48	6.37	细胞膜
<i>HbACA8</i>	EVM0006762.1	LG02	3 117 085~3 120 040	2956	728	117 316.59	6.75	细胞膜
<i>HbACA9</i>	EVM0005296.1	LG02	3 265 205~3 267 018	1814	558	23 582.69	9.14	细胞膜
<i>HbACA10</i>	EVM0026077.1	LG02	3 125 359~3 127 310	1952	625	115 834.52	5.94	细胞膜
<i>HbACA11</i>	EVM0031132.1	LG02	3 233 955~3 236 682	2728	883	110 578.33	5.83	细胞膜
<i>HbACA12</i>	EVM0024428.1	LG02	3 243 686~3 246 736	3051	1016	111 393.79	8.36	细胞膜
<i>HbACA13</i>	EVM0015252.1	LG02	3 262 343~3 263 065	723	178	111 989.14	7.98	细胞膜
<i>HbACA14</i>	EVM0024534.1	LG09	66 096 509~66 100 083	3575	750	110 309.03	5.92	细胞膜
<i>HbACA15</i>	EVM0029641.1	LG09	66 317 572~66 321 445	3874	720	103 884.94	5.74	细胞膜
<i>HbACA16</i>	EVM0017927.1	LG08	4 391 059~4 394 100	3042	1013	121 009.41	5.34	细胞膜
<i>HbACA17</i>	EVM0032610.1	LG11	12 512 452~12 513 504	1053	209	113 546.69	8.23	细胞膜
<i>HbACA18</i>	EVM0030427.1	LG09	66 076 346~66 079 704	3359	733	116 818.40	5.18	细胞膜
<i>HbACA19</i>	EVM0003826.1	LG09	66 279 877~66 304 362	24 486	1142	80 664.67	7.21	细胞膜
<i>HbACA20</i>	EVM0027429.1	LG09	66 104 652~66 105 203	552	183	68 724.97	6.08	细胞膜
<i>HbACA21</i>	EVM0015004.1	LG09	66 325 873~66 326 422	550	137	97 047.61	8.07	叶绿体、细胞核
<i>HbACA22</i>	EVM0014853.1	LG09	66 353 279~66 353 827	549	182	112 055.29	8.31	细胞膜、细胞核
<i>HbACA23</i>	EVM0033987.1	LG09	66 354 136~66 354 761	626	151	20 006.51	5.45	细胞膜
<i>HbACA24</i>	EVM0021882.1	LG09	66 116 797~66 120 161	3365	465	61 593.16	6.18	细胞膜
<i>HbACA25</i>	EVM0003506.1	LG08	4 375 525~4 379 761	4237	1004	118 968.46	6.44	细胞膜
<i>HbACA26</i>	EVM0010956.1	LG05	96 367 224~96 370 397	3174	1057	10 048.04	9.21	细胞膜
<i>HbACA27</i>	EVM0037889.1	LG16	10 542 615~10 545 666	3052	1006	104 419.52	6.83	细胞膜
<i>HbACA28</i>	EVM0032692.1	LG16	10 696 931~10 700 001	3071	1011	116 861.51	8.48	细胞膜
<i>HbACA29</i>	EVM0016389.1	LG09	62 325 967~62 328 900	2934	977	117 740.50	5.24	细胞膜
<i>HbACA30</i>	EVM0028891.1	LG09	62 389 407~62 392 328	2922	973	107 702.42	5.35	细胞膜
<i>HbACA31</i>	EVM0000930.1	LG08	38 103 650~38 144 781	41 132	1082	107 266.05	5.40	细胞膜
<i>HbACA32</i>	EVM0008651.1	LG02	8 008 368~8 075 531	67 164	1058	80 305.37	8.37	细胞膜
<i>HbACA33</i>	EVM0021769.1	LG02	7 964 947~8 005 806	40 860	956	82 737.19	6.63	细胞膜

续表 1 橡胶树 ACA/ECA 基因家族成员信息
Tab. 1 ACA/ECA gene family members of *H. brasiliensis* (continued)

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	染色体 Chromosome	位置 Localization	基因大小 Gene length/bp	蛋白长度 Protein length/aa	氨基酸分子量 Molecular weight/Da	等电点 Isoelectric point	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>HbACA34</i>	EVM0034728.1	LG02	7 829 269~7 854 528	25 260	1082	20 379.37	8.93	细胞膜
<i>HbACA35</i>	EVM0001605.1	LG02	7 963 616~7 964 455	840	86	50 604.66	5.47	细胞核
<i>HbACA36</i>	EVM0027126.1	LG01	5 339 293~5 359 637	20 345	1070	125 412.75	6.14	细胞膜
<i>HbACA37</i>	EVM0017585.1	LG14	36 438 395~36 464 099	25 705	990	79 361.44	6.55	细胞膜
<i>HbACA38</i>	EVM0033009.1	LG14	36 607 045~36 633 937	26 893	1080	15 362.58	8.93	细胞膜
<i>HbECA1</i>	EVM0006681.1	LG12	6 495 924~6 517 245	21 322	1001	20 166.08	5.95	细胞膜
<i>HbECA2</i>	EVM0032367.1	LG10	74 562 648~74 567 522	4875	1050	16 172.53	8.73	内质网
<i>HbECA3</i>	EVM0035728.1	LG05	101 795 694~101 800 096	4403	1057	116 356.77	7.76	内质网
<i>HbECA4</i>	EVM0037175.1	LG03	3 585 354~3 589 740	4387	760	84 489.55	5.53	内质网
<i>HbECA5</i>	EVM0033174.1	LG02	19 860 280~19 864 338	4059	1070	111 941.08	5.94	内质网
<i>HbECA6</i>	EVM0001506.1	LG13	4 899 156~4 905 549	6394	1059	109 762.53	5.78	内质网
<i>HbECA7</i>	EVM0042041.1	Contig01284	39 845~46 637	6793	954	104 494.54	5.27	内质网

2.2 系统进化树的构建及基因结构分析

为了比较拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, At)、木薯 (*Manihot esculenta*, Me)、杨树 (*Populus trichocarpa*, Pt)、水稻 (*Oryza sativa*, Os) 4 种植物和橡胶树 (*Hevea brasiliensis*, Hb) ACA/ECA 蛋白在进化上的相互关系, 利用 mafft 软件对 5 种植物蛋白序列进行多序列比对, 并用 MEGA 6.0 软件构建系统进化树, 然后用 Figtree 软件对进化树进行修饰。从进化树可以看出(图 1), ACA/ECA 基因家族成员分别聚于 ACA 和 ECA 两个不同分支, 橡胶树与木薯的 ACA/ECA 成员聚在一起, 这与系统进化上木薯与橡胶树的亲缘关系较近是一致的; 其中 *HbACA13*、*HbACA12*、*HbACA11*、*HbACA10*、*HbACA9*、*HbACA8* 和 *HbACA35* 聚集在同一个分支, 并且这 7 个成员均位于 LGO2 号染色体上, 推测这 7 个成员是通过串联复制进化而来。

利用基因组 GFF3 注释文件对橡胶树 ACA/ECA 基因家族成员进行基因结构分析, 并通过 GSDS 软件结合进化树绘制内含子-外显子结构图(图 2)。在橡胶树 45 个 ACA/ECA 基因家族成员中, 35 个成员含有内含子, 包括 26 个 ACA 和 7 个 ECA 成员, 橡胶树 ACA/ECA 家族成员内含子数量在 0~33 之间, 存在明显差异。同一分支上的成员在内含子数目和位置方面相对一致, 除 *HbACA12*、*HbACA24*、*HbACA20*、*HbACA22*、*ACA25*、*HbACA15* 和 *HbACA16* 等 12 个成员无内含子外, 其他成员均存在 1~33 个内含子; 部分

成员出现了较大数目的内含子, 如 *HbACA31*、*HbACA34*、*HbACA38* 和 *HbECA1* 的内含子数目在 30~33 之间。

2.3 橡胶树 ACA/ECA 基因家族成员染色体定位分析

从 45 个 ACA/ECA 基因家族染色体定位图可看出(图 3), 45 个成员分布在 14 条染色体上, LG02 和 LG09 号染色体上分布有最多的成员, 均为 11 个, LG16 染色体上有 4 个成员, LG08 染色体分布有 3 个成员, LG07、LG03、LG12、LG05、LG14 染色体上均有 2 个成员, LG06、LG01、LG10、LG13、LG11 染色体上分布最少, 均为 1 个成员, 另外, contig 上也有 1 个成员。进一步分析发现, LG02 和 LG09 号染色体上的成员大部分成簇分布, LG08、LG12、LG14 和 LG16 四条染色体上有成员成对分布, 这些成员可能是通过串联重复复制而来, 表明这些 ACA/ECA 家族成员蛋白序列具有较高的相似性, 可能具有类似的生物学功能。蓝色线连接表明成员之间具有共线性, 在进化过程中通过染色体加倍或大片段复制形成。

2.4 橡胶树 ACA/ECA 基因家族表达分析

利用本实验室转录组数据对 45 个橡胶树 ACA/ECA 基因家族成员在不同组织(胶乳、树皮、叶片、种子、根、雌花和雄花)、乙烯利和割胶处理下的胶乳的表达情况进行分析并绘制热图。从橡胶树 ACA/ECA 基因家族成员在不同组织中的表达可以看出(图 4), *HbACA1*、*HbACA3*、

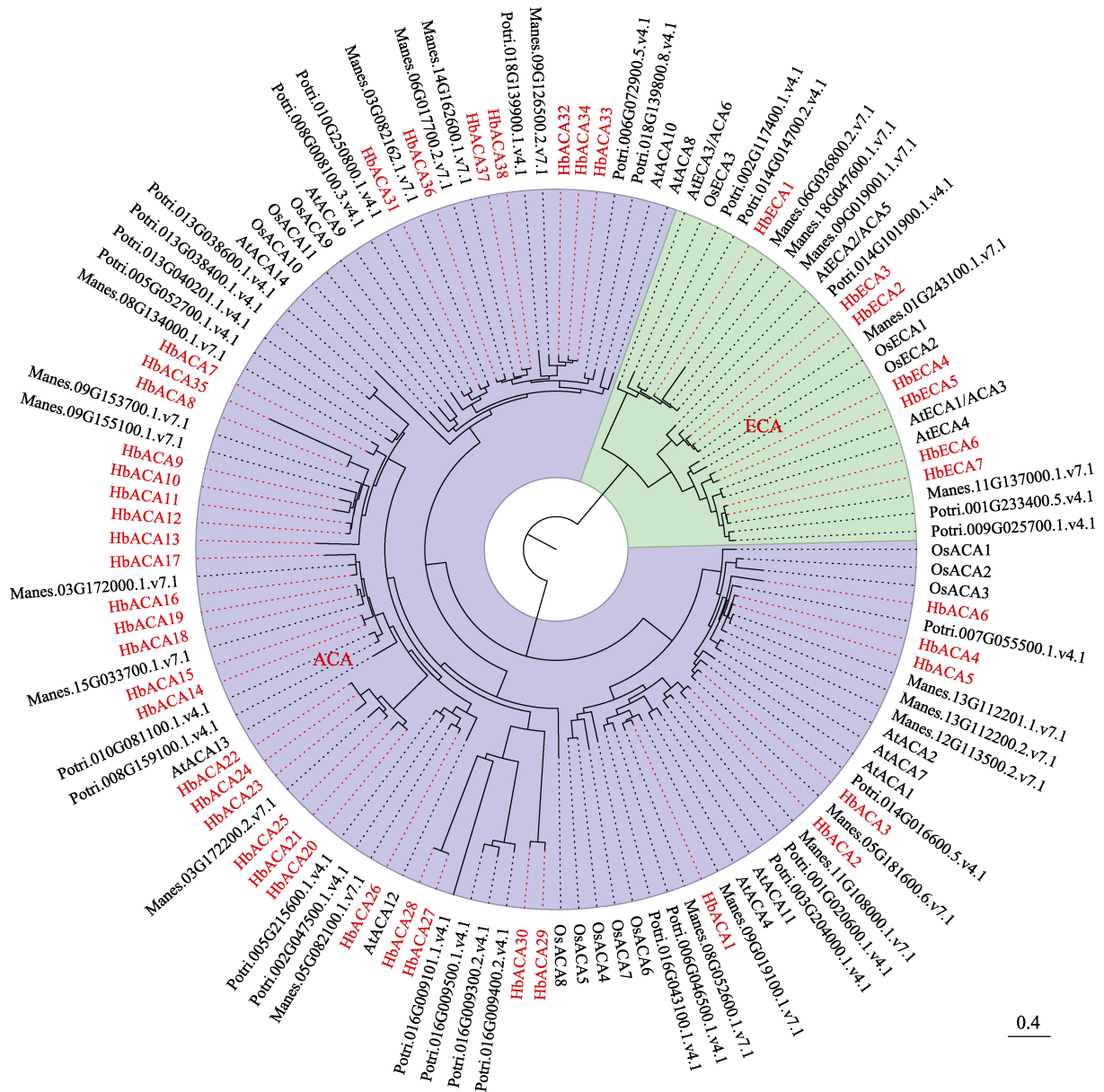
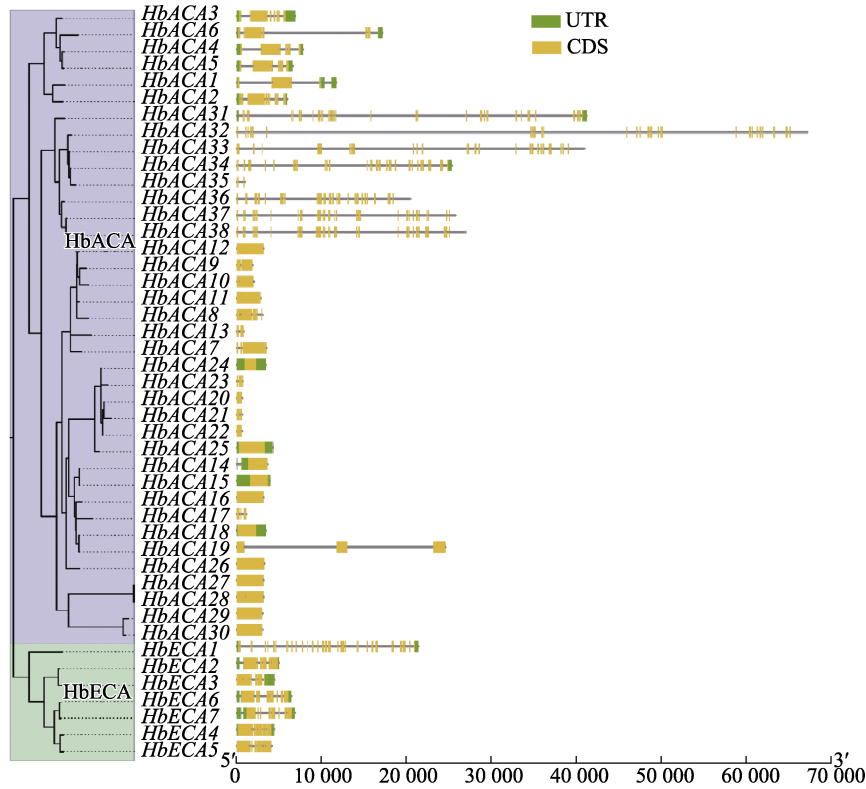


图 1 橡胶树和其他 4 种植物的 ACA/ECA 蛋白系统进化树
 Fig. 1 ACA/ECA protein phylogenetic tree of *H. brasiliensis* and other four plants

HbACA36、*HbECA1*、*HbECA6* 和 *HbECA7* 功能较为保守，在各组织中均有表达；*HbACA2* 在胶乳中特异高表达，而在其他组织中低表达或不表达，表现出组织特异性。另外，除 *HbACA2* 外，*HbACA36*、*HbACA38* 和 *HbECA7* 四个成员在胶乳中的表达丰度也比较高，其中 *HbACA36* 在胶乳表达丰度最高；在叶片中，*HbECA6*、*HbECA7*、*HbACA1*、*HbACA31* 和 *HbACA36* 表达丰度相对较高，其中 *HbACA31* 表达丰度最高；在树皮中，*HbECA6*、*HbECA7*、*HbACA1*、*HbACA31*、*HbACA36*、*HbACA26* 和 *HbACA3* 表达丰度较高。*HbECA7* 在叶片、树皮和根等多种组织中都有相

对较高的表达，说明该成员可能在橡胶树钙离子运输方面具有重要功能。

乙烯利刺激是橡胶生产中常用的一种增产手段，为了进一步研究橡胶树 ACA/ECA 基因在乙烯利刺激后胶乳中的表达，本课题组在乙烯利处理后的 4 个不同时间点（0、3、12、24 h）对 ACA/ECA 基因家族成员在胶乳中的表达进行了分析（图 5）。经乙烯利处理后 *HbACA2*、*HbACA36*、*HbACA38*、*HbECA7* 四个成员表达呈上升趋势，其中 *HbACA36* 在乙烯利处理 24 h 后呈现高丰度表达，并且在处理前后相对于其他成员都处于较高表达水平，这和之前不同组织表达分析的结果



绿色代表 UTR 区，黄色代表外显子，外显子之间的连线代表内含子。
Green represents UTR region, yellow represents exons, and the lines between exons were introns.

图 2 橡胶树 ACA/ECA 家族基因结构图

Fig. 2 Gene structure of ACA/ECA family in *H. brasiliensis*

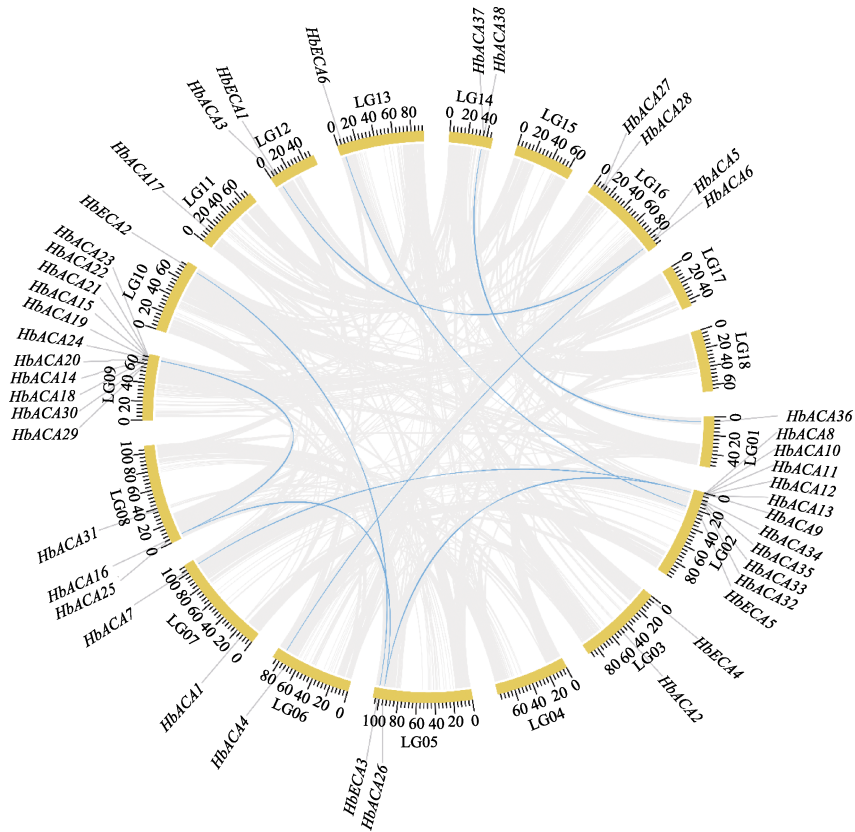


图 3 橡胶树 ACA/ECA 家族成员在染色体上的定位和共线性

Fig. 3 Localization and collinearity of ACA/ECA family members on chromosomes of *H. brasiliensis*

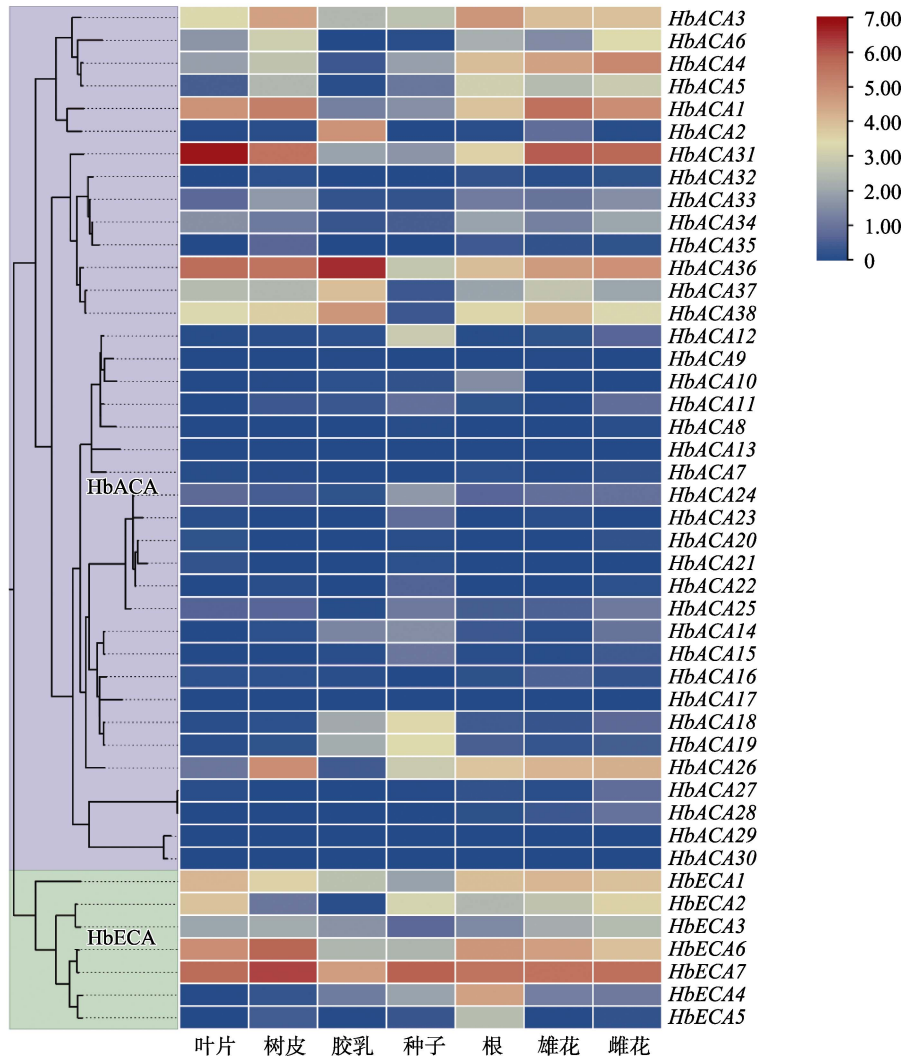


图 4 橡胶树 ACA/ECA 基因家族成员在 7 种组织中的表达分析

Fig. 4 Expression analysis of ACA/ECA family members in seven tissues of *H. brasiliensis*

一致。*HbACA3* 在乙烯利处理后上调表达，*HbECA5* 在胶乳中低表达或不表达但经乙烯利刺激 24 h 后上调表达。结合染色体定位图来看，*HbACA36* 和 *HbACA38* 有较高同源性，但在表达上却存在差异，*HbACA36* 表达丰度更高，并且乙烯利刺激后表达变化也更明显，推测 *HbACA36* 在乳管钙离子运输方面起主要作用。研究表明，部分成员乙烯利刺激后在胶乳中的表达呈明显的上升趋势，推测这些成员可能在乳管胶乳再生方面发挥重要作用。

在橡胶生产中发现，割胶能够促进橡胶树产胶。为了进一步分析割胶对橡胶树 ACA/ECA 基因家族成员表达的影响，选用 2 种不同产量水平的未开割橡胶树品种进行割胶试验，包括相对低产的 PR107 和高产品种热研 8-79；同时对 2 个品

种的已开割橡胶树进行割胶试验，通过转录组测序对基因的表达进行分析。由图 6 可以看出，在割胶过程中 ACA/ECA 基因家族成员在 PR107 和热研 8-79 中的表达趋势整体一致，如 *HbECA6*、*HbECA7*、*HbACA1*、*HbACA2*、*HbACA3*、*HbACA36*、*HbACA37* 和 *HbACA38* 在 2 个品种的割胶过程中均有表达。其中 *HbACA36* 在 PR107 和热研 8-79 割胶过程中均处于较高的表达水平，这与前面不同组织以及乙烯利处理的试验结果一致。但是 *HbACA36* 在热研 8-79 割胶过程的表达表现出明显的上升趋势（第 1、3、5、7、9 刀的 FPKM 值分别为 206.19、221.96、281.45、353.36、355.59），而 *HbACA36* 在 PR107 中的表达则表现出先下降后上升再下降的表达趋势（第 1、3、5、7、9 刀的 FPKM 值分别为 212.89、160.28、209.92、205.15、

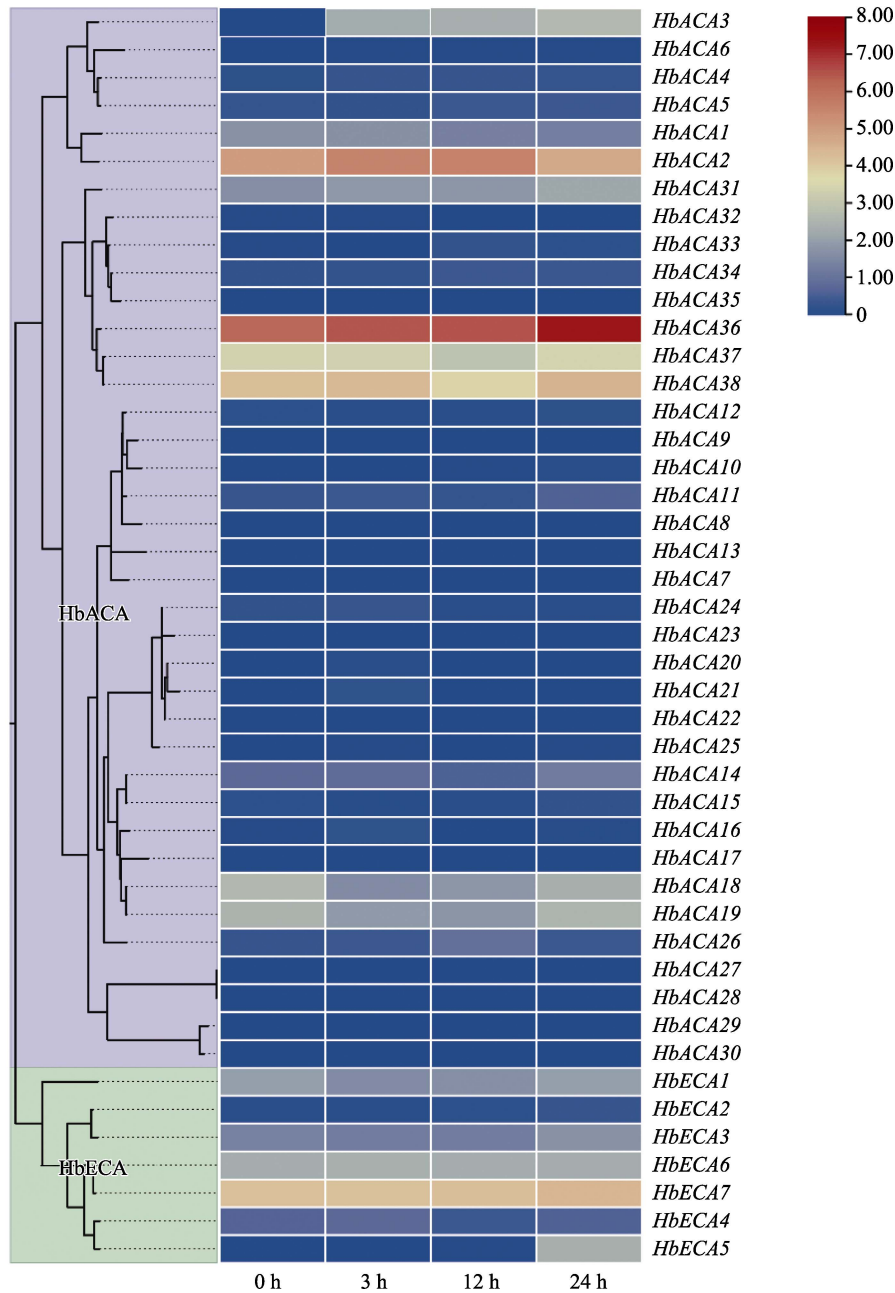


图 5 橡胶树 ACA/ECA 基因家族成员在乙烯处理后胶乳中的表达分析

Fig. 5 Expression analysis of ACA/ECA genes in rubber latex after ethylene treatment

159.48), *HbACA36* 在热研 8-79 中的整体表达水平高于 PR107, 这可能与热研 8-79 的高产具有一定的相关性。此外, *HbACA18* 和 *HbACA19* 经割胶处理后仅在热研 8-79 中表达, 再次说明橡胶树 ACA/ECA 基因家族成员在 2 个品种中的表达存在一定差异。

3 讨论

Ca^{2+} -ATPase (ACA/ECA) 在植物逆境胁迫应答和生长发育等方面起重要作用^[28], 目前, 在拟

南芥^[6]、大白菜^[8]、茄科植物^[9]等多种植物中鉴定得到 ACA/ECA 家族成员, 并对部分家族成员的功能进行了系统分析, 而关于 ACA/ECA 基因在橡胶树中的功能的研究还未见报道。天然橡胶是重要的战略物质, 在工业和国防等方面发挥着重要作用, 橡胶树作为生产天然橡胶的唯一来源, 其种植和生产一直备受关注^[29], 随着经济的发展, 天然橡胶的消耗也不断增长, 出现供不应求^[30], 因而提高橡胶产量显得尤为重要, 钙离子信号在乙烯刺激和割胶过程中的传递对增加胶乳产量促

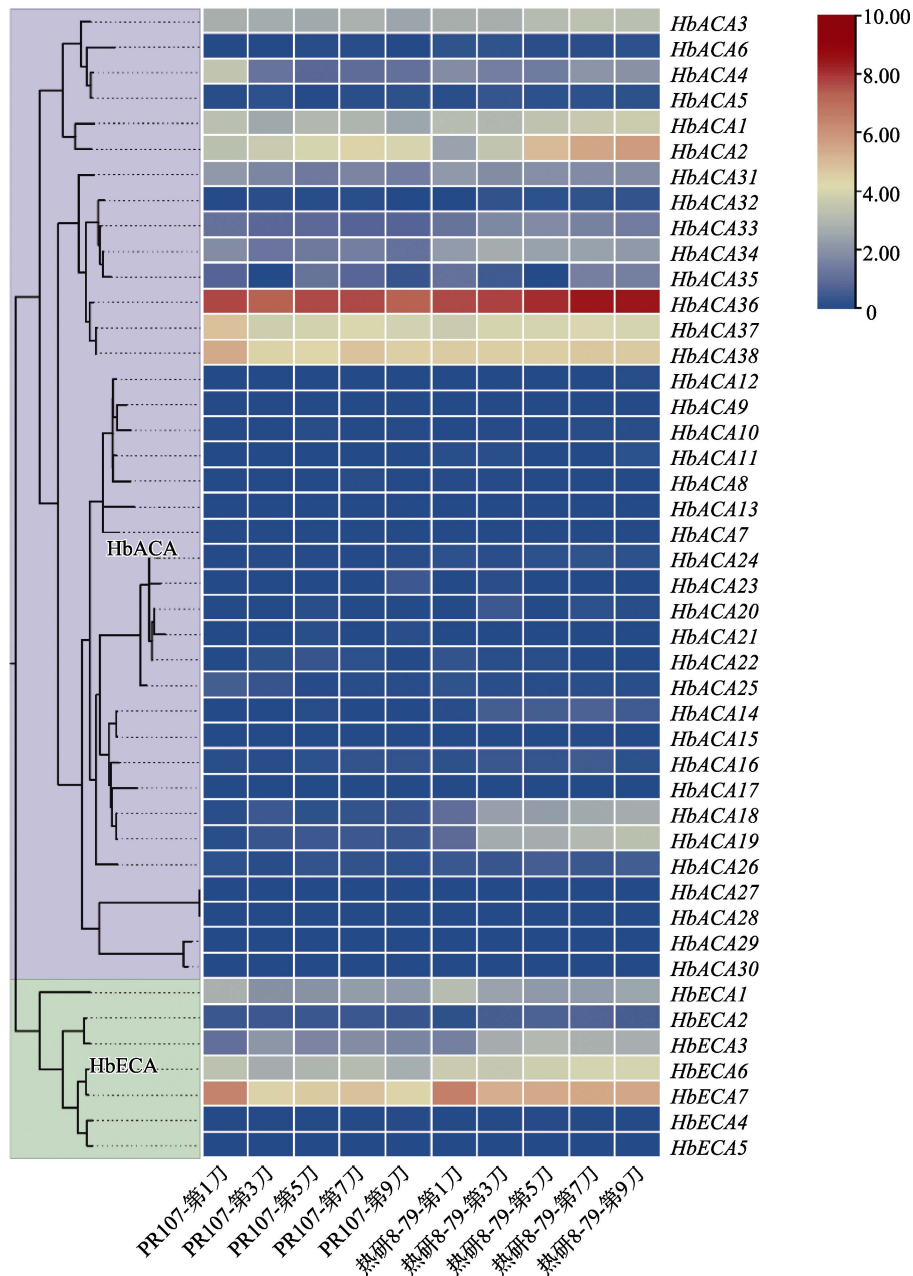


图 6 橡胶树 ACA/ECA 家族成员在 PR107 和热研 8-79 两种品系不同割胶刀数表达分析
 Fig. 6 Expression analysis of *H. brasiliensis* ACA/ECA family members under different tapping number in PR107 and Reyan 8-79 strains

使乳管胶乳再生至关重要，因此探明 ACA/ECA 基因家族在橡胶树中的功能有重要研究意义。本研究鉴定得到橡胶树中 45 个 ACA/ECA 基因家族成员，包括 38 个 ACA 成员，7 个 ECA 成员，其中 ACA 成员明显多于 ECA 成员，这与其他植物的研究结果一致。从系统进化树来看有 2 个明显分支，在 2 个分支中橡胶树与木薯 ACA/ECA 聚在一起，这与橡胶树和木薯在系统进化上有较近的亲缘关系是一致的。从染色体定位图看，有成员成对或者成簇存在，其中 2 号和 9 号染色体上

的部分成员聚在一起，结合进化树可以看出，相对于杨树和木薯等其他植物，橡胶树 ACA/ECA 成员在部分分支上出现了扩张，并且扩张主要由串联复制产生的。在表达方面，部分 ACA/ECA 成员在不同组织中的表达表现出组织特异性，如：*HbACA2* 在胶乳中表达丰度较高，*HbACA12* 在种子中表达丰度较高，而在其他组织中表达丰度很低或不表达；在胶乳中，*HbACA2*、*HbACA36*、*HbACA38* 和 *HbECA7* 四个成员表达丰度相对较高，其中 *HbACA36* 在胶乳中表达丰度最高，并且

明显高于其他 3 个成员,推测 *HbACA36* 在乳管钙离子转运方面具有重要作用。乙烯利刺激和割胶是橡胶树生产中最主要的 2 种增产手段,乙烯利处理后, *HbACA36* 在胶乳中表达呈现明显的上升趋势,在高产品种热研 8-79 割胶过程中 *HbACA36* 的表达也表现出明显的上升趋势,表明 *HbACA36* 在橡胶树乳管中可能具有重要功能并且和橡胶树的产量具有一定的相关性。综上表明, *HbACA36* 在橡胶树乳管的信号传递方面起重要作用,进而影响橡胶树乳管中的橡胶生物合成。本研究相关结果为进一步研究 *ACA/ECA* 基因的生物学功能,及其在乙烯利刺激橡胶树增产过程中的重要作用奠定了基础。

参考文献

- [1] RAHMATI ISHKA M, BROWN E, ROSENBERG A, ROMANOWSKY S, DAVIS J, CHOI W, HARPER F. *Arabidopsis* Ca²⁺-ATPases 1, 2, and 7 in the endoplasmic reticulum contribute to growth and pollen fitness[J]. *Plant Physiology*, 2021, 185(4): 1966-1985.
- [2] SPALDING E P, HARPER J F. The ins and outs of cellular Ca²⁺ transport[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2011, 14(6): 715-720.
- [3] XU S, WANG J, FU X, ZHANG S, CHEN G, LI S, SHANGGUAN T, ZHENG Y, XU F, CHEN Z. Evolutionary and regulatory pattern analysis of soybean Ca²⁺ ATPases for abiotic stress tolerance[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022: 1648.
- [4] BAXTER I, TCHIEU J, SUSSMAN M R, BOUTRY M, PALMGREN M, GRIBSKOV M. Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice[J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(2): 618-628.
- [5] WIMMERS L E, EWING N N, BENNETT A B. Higher plant Ca²⁺-ATPase: primary structure and regulation of mRNA abundance by salt[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89(19): 9205-9209.
- [6] HILLEARY R, PAEZ-VALENCIA J, VENS C, TOYOTA M, PALMGREN M, GLIROY S. Tonoplast-localized Ca²⁺ pumps regulate Ca²⁺ signals during pattern-triggered immunity in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2020, 117(31): 18849-18857.
- [7] 马永佳. 外源 Ca²⁺对酸雨胁迫下水稻根系质膜组分、Ca²⁺分布和转运的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
MA Y J. Effects of exogenous Ca²⁺ on plasma membrane components, Ca²⁺ distribution and transport of rice roots under acid rain stress[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021. (in Chinese)
- [8] 王洁, 吴晓宇, 杨柳, 段巧红, 黄家保. 大白菜 ACA 基因家族的全基因组鉴定与表达分析[J]. *中国农业科学*, 2001, 54(22): 4851-4868.
WANG J, WU X Y, YANG L, DUAN Q H, HUANG J B. Whole genome identification and expression analysis of Chinese cabbage ACA gene family[J]. *Chinese Agricultural Sciences*, 2021, 54(22): 4851-4868. (in Chinese)
- [9] 刘宇欣, 束艺, 张念, 陈秀玲, 王傲雪. 茄科植物 Ca²⁺-ATPase 基因家族鉴定及分析[J]. *分子植物育种*, 2021, 19(13): 4268-4277.
LIU Y X, SHU Y, ZHANG N, CHEN X L, WANG A X. Identification and analysis of Ca²⁺-ATPase gene family in Solanaceae[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19(13): 4268-4277. (in Chinese)
- [10] 张美萍, 杨珺凯, 孙明哲, 贾博为, 孙晓丽. 基于家族分析的苜蓿逆境应答 Ca²⁺-ATPase 家族基因筛选与鉴定[J]. *植物生理学报*, 2017, 53(2): 198-208.
ZHANG M P, YANG J K, SUN M Z, JIA B W, SUN X L. Screening and identification of stress response Ca²⁺ ATPase family genes in alfalfa based on family analysis[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2017, 5 (2): 198-208. (in Chinese)
- [11] 张洁, 李唯奇. 拟南芥 Ca²⁺-ATPase ACA8 基因响应低温胁迫分子机制研究[C]//中国植物学会. 生态文明建设中的植物学: 现在与未来——中国植物学会第十五届会员代表大会暨八十周年学术年会论文集——第 3 分会场: 植物分子生物学与基因组学, 2013: 70-71.
ZHANG J, LI W Q. Molecular mechanism of response of *Arabidopsis* Ca²⁺-ATPase *aca8* gene to low temperature stress[C]//Botanical Society of China. Botany in the construction of ecological civilization: present and future—Proceedings of the 15th member congress and the 80th Annual Academic Conference of the Chinese Botanical Society—session 3: Plant Molecular Biology and genomics, 2013: 70-71. (in Chinese)
- [12] 朱炜. 利用 RNAi 技术研究拟南芥 Ca²⁺泵基因 *ECA1* 和 *ACA2* 的功能[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2008.
ZHU W. Using RNAi technology to study the function of Ca²⁺ pump genes *ECA1* and *ACA2* in *Arabidopsis*[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2008. (in Chinese)
- [13] HUDA K M, BANU M S, GARG B, TULA S, TUTEJA R, TUTEJA N. OsACA6, a P-type IIB Ca²⁺ ATPase promotes salinity and drought stress tolerance in tobacco by ROS scavenging and enhancing the expression of stress-responsive genes[J]. *The Plant Journal*, 2013, 76(6): 997-1015.
- [14] 程涣, 苏同兵, 于拴仓, 张凤兰, 余阳俊, 张德双, 赵岫云, 汪维红, 卢桂香, 龚义勤, 柳李旺. 大白菜钙运输基

- 因 *ECA* 和钙响应基因 *CAS* 在缺钙胁迫下的表达分析[J]. 植物生理学报, 2015, 51(4): 566-572.
- CHENG H, SU T B, YU S C, ZHANG F L, YU Y J, ZHANG D S, ZHAO X Y, WANG W H, LU G X, GONG Y Q, LIU L W. Expression analysis of calcium transport gene *ECA* and calcium response gene *CAS* in Chinese cabbage under calcium deficiency stress[J]. Acta Phytologica Sinica, 2015, 51(4): 566-572. (in Chinese)
- [15] CHERIAN S, RYU S B, CORNISH K. Natural rubber biosynthesis in plants, the rubber transferase complex, and metabolic engineering progress and prospects[J]. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17(11): 2041-2061.
- [16] 莫业勇. 天然橡胶供需形势和风险分析[J]. 中国热带农业, 2019(2): 4-6, 10.
- MO Y Y. Natural rubber supply and demand situation and risk analysis[J]. China Tropical Agriculture, 2019(2): 4-6, 10. (in Chinese)
- [17] PAARDEKOOPEER E. Exploitation of the rubber tree[M]// Webster C, Baukwill W. Rubber. New York: Longman Scientific and Technical, 1989.
- [18] TANG C R, XIAO X H, LI H, FANG Y J, YANG J H, QI J Y, LI H B. Comparative analysis of latex transcriptome reveals putative molecular mechanisms underlying super productivity of *Hevea brasiliensis*[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e75307.
- [19] 唐朝荣. 橡胶树产胶生物学研究进展[J]. 热带作物学报, 2020, 41(10): 1958-1967.
- TANG C R. Research progress of rubber production biology of *Hevea brasiliensis*[J]. Journal of Tropical Crops, 2020, 41(10): 1958-1967. (in Chinese)
- [20] TANG C, YANG M, FANG Y, LUO Y, GAO S, XIAO X. The rubber tree genome reveals new insights into rubber production and species adaptation[J]. Nature Plants, 2016, 2(6): 1-10.
- [21] LIU S, LAN J, ZHOU B, QIN Y, ZHOU Y, XIAO X, YANG J, GUO J, QI J, HUANG Y, TANG C. HbNIN2, a cytosolic alkaline/neutral-invertase, is responsible for sucrose catabolism in rubber-producing laticifers of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree)[J]. New Phytologist, 2015, 206(2): 709-725.
- [22] TANG C, HUANG D, YANG J, LIU S, SAKR S, LI H, ZHOU Y. 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)[J]. Plant, Cell & Environment, 2010, 33(10): 1708-1720.
- [23] KOICHIRO T, GLEN S, DANIEL P, ALAN F, SUDHIR K. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology & Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [24] GUO A Y, ZHU Q H, CHEN X, LUO J C. GSDB: a gene structure display server[J]. Hereditas, 2007, 29(8): 1023-1026.
- [25] CHEN C, CHEN H, ZHANG Y, THOMAS H, FRANK M, HE Y, XIA R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [26] WANG Y, TANG H, DEBARRY J D, TAN X, LI J, WANG X, LEE T H, JIN H, MARLER B, GUO H, KISSINGER J C, PATERSON A H. MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(7): e49.
- [27] LI B, DEWEY C N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12(1): 1-16.
- [28] POTTOSIN I, OLIVAS-AGUIRRE M, DOBROVINSKAYA O, ZEPEDA-JAZO L, SHABALA S. Modulation of ion transport across plant membranes by polyamines: understanding specific modes of action under stress[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 11: 2187.
- [29] MIGNON E, WERBROUCK S. Somatic embryogenesis as key technology for shaping the rubber tree of the future[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 1804.
- [30] VAN BEILEN J B, POIRIER Y. Establishment of new crops for the production of natural rubber[J]. Trends in Biotechnology, 2007, 25(11): 522-529.