

巴西橡胶树 HbPP2 基因家族鉴定与表达分析

杨 那^{1,2}, 林 远³, 胡 斌³, 郝园园³, 韩晓菲¹, 刘林娅^{2*}, 龙翔宇^{3*}

1. 大连大学生命健康学院, 辽宁大连 116622; 2. 六盘水师范学院生物科学与技术学院, 贵州六盘水 553004; 3. 中国热带农业科学院橡胶研究所/农业农村部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室, 海南海口 571101

摘 要: 橡胶树胶乳代谢过程受到多种机制调控, 其中泛素化修饰调控最为显著。韧皮部蛋白 PP2 属于 F-box 蛋白家族, 在胶乳中特异性高表达, 可能参与了胶乳再生调控。本研究对巴西橡胶树基因组中鉴定到的 17 个 F-box 成员 *HbPP2* 基因进行生物信息学和表达模式分析, 结果表明: 橡胶树 PP2 基因编码的蛋白大多数为不稳定亲水性蛋白, 分子量介于 9.402~61.206 kDa 之间; 系统进化分析表明巴西橡胶树中的 17 个 *HbPP2* 基因可以分为 3 个亚组 (I 亚组, II 亚组和 III 亚组), 其中 *HbPP2* 成员在 I 亚组中完全缺失; 顺式作用元件分析发现, PP2 基因启动子区域包含生长发育调控、激素响应和光响应等多种顺式作用元件; 亚细胞定位预测发现, PP2 蛋白主要定位在叶绿体或细胞质中; 表达分析显示, 橡胶树 *HbPP2* 家族中除部分成员具有组织表达特异性外, 多数成员在各个组织中均有表达, 在胶乳中, *HbPP2-B1*、*HbPP2-B1.1*、*HbPP2-B10.1*、*HbPP2-A13.2*、*HbPP2-B13* 和 *HbPP2-A15.1* 的表达丰度较高, 但割胶处理只显著上调 *HbPP2-A13.2* 和 *HbPP2-B13* 的表达。本研究初步揭示巴西橡胶树 *HbPP2* 家族成员的理化特征和表达特征, 为进一步研究该基因家族在橡胶树胶乳合成代谢中的功能奠定基础。

关键词: 巴西橡胶树; 基因表达分析; 韧皮部蛋白 2; PP2 基因家族; 胶乳生物合成

中图分类号: S794.1 文献标志码: A

Identification and Expression Analysis of HbPP2 Gene Family in *Hevea brasiliensis*

YANG Na^{1,2}, LIN Yuan³, HU Bin³, HAO Yuanyuan³, HAN Xiaofei¹, LIU Linya^{2*}, LONG Xiangyu^{3*}

1. School of Life and Health, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China; 2. School of Biological Science and Technology, Liupanshui Normal University, Liupanshui, Guizhou 553004, China; 3. Institute of Rubber Research, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: Rubber tree latex metabolic processes are regulated by a variety of mechanisms, among which ubiquitination modification is the most significant. The phloem protein PP2 belongs to the F-box protein family and is specifically highly expressed in latex, which may be involved in the regulation of latex regeneration. In this study, bioinformatics and expression pattern analysis were conducted on 17 F-box members of the *HbPP2* gene identified in the genome of *Hevea brasiliensis*. The results revealed that the majority of proteins encoded by the rubber tree PP2 genes were unstable hydrophilic proteins with molecular weights ranging from 9.402 to 61.206 kDa. Phylogenetic analysis showed that the 17 *HbPP2* genes in the *H. brasiliensis* could be divided into three subgroups (Subgroup I, Subgroup II, Subgroup III), in which *HbPP2* members were completely absent in subgroup I. Analysis of cis-acting elements revealed that the rubber tree PP2 gene family contained diverse functional elements involved in growth and development regulation, hormone response, and light response. Subcellular localization analysis indicated that PP2 proteins were primarily localized in chloroplasts or cytoplasm. Tissue expression analysis showed that, except for some members with tis-

收稿日期 2024-01-16; 接受日期 2024-03-08

基金项目 六盘水师范学院科研培育项目 (No. LPSSY2023KJZDPY07); 六盘水师范学院科研项目 (No. LPSSYLPY202226); 海南省自然科学基金创新团队项目 (No. 322CXTD526)。

作者简介 杨 那 (1997—), 女, 硕士, 研究方向: 橡胶树产胶分子生物学。*通信作者 (Corresponding author): 刘林娅 (LIU Linya), E-mail: liulinya913@126.com; 龙翔宇 (LONG Xiangyu), E-mail: yuxianglong006@163.com。

sue-specific expression, most members of the rubber tree HbPP2 family were expressed in various tissues. In latex, the expression levels of six genes, *HbPP2-B1*, *HbPP2-B1.1*, *HbPP2-B10.1*, *HbPP2-A13.2*, *HbPP2-B13* and *HbPP2-A15.1*, were relatively high, but tapping treatment significantly upregulated the expression of *HbPP2-A13.2* and *HbPP2-B13*. This study would provide preliminary insights into the physicochemical and expression characteristics of the *HbPP2* family members in the *H. brasiliensis*, laying a foundation for further research on the functions of this genes family in rubber trees latex synthesis and metabolism.

Keywords: *Hevea brasiliensis*; gene expression analysis; phloem protein 2; PP2 genes family; natural rubber biosynthesis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.04.001

F-box 蛋白是 SCF 类 E3 泛素连接酶的重要组成部分, 通过与其他蛋白结合形成复合物, 完成泛素化修饰的调控, 进而参与植物生长发育、激素信号转导、生物胁迫和非生物胁迫等生物过程^[1-4]。已有研究表明, 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) *F-box* 基因编码的生长素受体蛋白和茉莉酸受体蛋白能够和其他蛋白形成复合体从而调控植物的生长发育和逆境应答; 葡萄 (*Vitis vinifera* L.) *F-box* 基因 *BIG-24.1* 受到激素 SA、ABA、MeJA 和损伤胁迫的强烈诱导; 小麦 (*Triticum aestivum* L.) *F-box* 蛋白 TaFBA1 通过与胁迫相关蛋白的相互作用来调节其对于干旱和盐胁迫的耐受性。

韧皮部组织不仅在光合产物、大分子和小分子物质的长距离运输中起着重要的作用^[5-7], 也在植物应答各种外部刺激 (机械损伤、昆虫攻击和真菌感染等) 产生防御反应的过程中发挥核心作用^[8-14]。韧皮部蛋白 (phloem protein, PP) 是韧皮部中含量最为丰富的一种蛋白, 分为韧皮部蛋白 PP1 (phloem protein, PP1) 和韧皮部蛋白 PP2 (phloem protein, PP2)^[15-17]。PP2 主要存在于高等植物韧皮部中, 已有研究发现同物种之间的 PP2 蛋白大小差异明显, 主要是由保守结构域延伸的 N 端长度的可变性造成。如南瓜属植物 PP2 基因家族由 2~8 个基因构成^[18], 拟南芥中发现 30 个 PP2 基因, 编码蛋白长度 131~479 个氨基酸^[19], 苧麻 (*Boehmeria nivea* L. Gaudich) 中发现 15 个 PP2 基因, 编码蛋白长度为 177~441 个氨基酸^[20]。PP2 蛋白的功能较广泛, 不同植物中的 PP2 蛋白功能不尽相同。在南瓜 (*Cucurbita moschata*) 的韧皮部汁液中发现了 116 个 PP2 蛋白与泛素介导的蛋白水解相关, 因此研究者推测这些蛋白可能具有水解蛋白功能^[21]。在拟南芥中, *F-box* 蛋白韧皮部蛋白 AtPP2-B11 作为 SCF 型 E3 连接酶的底物受体, 负调控拟南芥对于干旱胁迫的应答^[22]。因此, 作为 *F-box* 家族成员韧皮部蛋白 PP2, 参

与了植物生长发育以及抗性反应。

巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 属大戟科植物, 原产于亚马逊河流域^[23-24]。其产生的胶乳是天然橡胶的主要来源。天然橡胶作为四大工业基础原料之一, 在航空航天、医疗和军事等领域具有不可替代性。天然胶乳主要储存于韧皮部组织特化的乳管细胞中^[25]。本课题组在前期的研究中发现, 乳管中特异性表达基因与泛素化修饰途径相关基因均显著上调^[26], 同时橡胶树不同组织蛋白泛素化修饰组及割胶处理胶乳蛋白修饰组的数据显示, 乳管中泛素化修饰途径被显著富集 (数据未发表), 推测泛素化修饰是乳管中天然橡胶生物合成中重要的代谢调控方式, 但具体作用机制尚不清楚。通过橡胶树不同组织转录组数据分析发现, PP2 在胶乳中特异性高表达, 并受割胶强烈诱导, 推测 PP2 类基因可能通过泛素化修饰途径参与乳管中天然橡胶的生物合成调控。因此, 本研究以巴西橡胶树 (热研 7-33-97) 为试验材料, 在全基因组水平鉴定 PP2 基因家族成员, 对其成员的蛋白质理化性质、二级和三级结构、亚细胞定位、基因结构、顺式作用元件、系统进化和表达特征等方面进行分析, 研究结果将拓展对橡胶树 *F-box* 基因家族的功能认知, 为深入探究 HbPP2 基因家族在胶乳生物合成中的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究采用的实验材料种植于海南省儋州市中国热带农业科学院试验场的巴西橡胶树热研 7-33-97。选取其不同组织 (胶乳、叶片、种子、花、树皮和茎) 以及不同割次 [第 1 刀 (1)、第 2 刀 (2)、第 3 刀 (3)、第 5 刀 (5)、第 7 刀 (7) 和第 9 刀 (9)] 的胶乳抽提总 RNA, 并进行转录组测序。

1.2 方法

1.2.1 HbPP2 基因家族成员鉴定及其理化性质分析 从橡胶树基因组数据库(<http://hevea.catas.cn/home/index>) 中获取橡胶树基因组序列、蛋白质序列和注释信息文件, 利用 Pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org/>) 下载 PP2 结构域 (PF14299) 的隐马尔可夫模型 (HMM) 文件, 对橡胶树基因组数据库中含有 PP2 结构域的基因进行筛选, 选取 e 值小于 $1e^{-10}$ 的蛋白序列^[20]。从已有的转录组数据中根据结构域搜索 PP2 基因, 对比橡胶树数据库去除重复后通过 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库的 CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) 进行保守结构域分析, 去除不含 PP2 结构域的候选序列, 得到 HbPP2 基因家族成员。

1.2.2 HbPP2 基因家族亚细胞定位及二、三级结构预测 利用 ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线分析工具进行氨基酸数量、分子量大小、等电点、不稳定系数和亲水系数预测。通过 Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/#>) 在线分析工具对橡胶树 PP2 基因家族蛋白进行亚细胞定位。利用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_auto mat.pl? page=npsa_sopma.html) 在线分析工具分析蛋白质的二级结构。通过 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.Expasy.org/>) 在线分析工具对橡胶树 PP2 基因家族的蛋白质序列进行三级结构模型预测。

1.2.3 HbPP2 基因结构、启动子顺式作用元件分析 根据橡胶树基因组的注释信息, 利用 NCBI Batch CD-search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 在线分析工具搜索序列保守结构域, 利用 MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 在线分析工具预测 PP2 家族基因的保守 motif^[3]。截取 HbPP2 转录起始位点上游 2 kb 的序列作为启动子序列进行分析, 利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/web-tools/plantcare/html/>) 在线分析工具预测启动子序列的顺式作用元件^[27], 并通过 TBtools 软件对预测的结果进行可视化展示^[28]。

1.2.4 HbPP2 基因家族系统进化分析 通过 PlantTFdb (<http://planttfdb.gao-lab.org/index.php>) 数据库和 NCBI 数据库下载拟南芥、木薯 (*Manihot*

esculenta) 的 PP2 蛋白序列与 HbPP2 组成分析蛋白序列集, 通过 MEGA-X 软件采用邻接法 (neighbor-joiningmethod, NJ) 构建系统进化树^[29], 并使用 evolview (<https://www.evolgenius.info/evolview-v2/#mytrees/SHOWCASES/showcase%2001>) 在线分析工具进行结果优化。

1.2.5 HbPP2 基因差异表达分析 所有 RNA 样品均采用 Hiseq 平台进行转录组测序, 去除污染和低质量读长后进行基因组比对, 利用 RSEM 软件包对橡胶树不同组织、不同割次胶乳的 HbPP2 基因家族成员进行表达分析, 获得每个基因的 reads count、FPKM 及 TPM 值, 将 FPKM 值取以 2 为底的对数, 用 TBtools 软件绘制热图。

根据转录组数据挑选 6 个表达趋势显著的 HbPP2 家族成员基因, 利用 NCBI Primer 3.0 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) 在线网站设计特异性引物 (表 1)。用 TransZol Plant RNA 提取试剂盒 (ET121) 分别提取 5 个组织 (胶乳、花、茎、树皮和叶) 的总 RNA 和不同割胶处理 (第 1 刀、第 3 刀、第 5 刀、第 9 刀) 胶乳的总 RNA。取 1 μ g 总 RNA 用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒进行逆转录得到 cDNA。以 cDNA 为模板, YLS8 为内参基因, 用 2×Q3 SYBR qPCR Master Mix (Universal) (TOLOBIO, China) 进行 qPCR 实验, 反应体系和程序按照说明书进行, 结果按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。

表 1 RT-qPCR 引物
Tab. 1 Primers for RT-qPCR

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
HbPP2-A13.2-F	TGGACAATCCTGGGAAGTGG
HbPP2-A13.2-R	TGTGCTCATCTCACTGCCTA
HbPP2-B13-F	TGACAACAGCAGCTTATGG
HbPP2-B13-R	CAATCTCCAGCCACCCATC
HbPP2-B1.1-F	GCTGAAGGTTGTAAGCGAAGTT
HbPP2-B1.1-R	GTGGCGGAATAACCCGACTT
HbPP2-B10.1-F	GAACTGGTTGGAGGCGTGAA
HbPP2-B10.1-R	TTCCGTTTTCGGTCTCATCTCT
HbPP2A15.1-F	TGACGCCACCAGAGATTTGT
HbPP2A15.1-R	CCATCGTCAAAATGGAACGGGA
HbPP2A14.1-F	GTGGAGGTCCTTCTCCATCAA
HbPP2A14.1-R	CGTCTCCACACAAAATCGG

2 结果与分析

2.1 HbPP2 基因家族成员鉴定及理化性质分析

基于橡胶树数据库和转录组数据的比对筛选结果,共得到 17 个 PP2 蛋白编码基因。通过 CDD 数据库分析发现 PP2 含有保守结构域,命名如表 2 所示。进一步分析发现,HbPP2 蛋白之间差异较大,蛋白分子量介于 9.402~61.206 kDa 之间,等电点介于 5.14~9.64 之间,其中 10 个为酸性蛋

白,7 个为碱性蛋白(表 2)。根据蛋白亲疏水性指标,大部分 *HbPP2* 基因编码的蛋白亲水性平均系数在-0.608~-0.178 之间,属于亲水性蛋白,HbPP2-B11 的亲水性平均系数为正值,属于疏水性蛋白。HbPP2 蛋白的不稳定系数介于 31.82~55.04 之间,其中 HbPP2-B1、HbPP2-A12、HbPP2-A13.2 和 HbPP2-B11 的不稳定系数小于 40,属于稳定蛋白,其余 13 个均为不稳定蛋白。

表 2 HbPP2 基因家族蛋白理化性质
Tab. 2 Physicochemical properties of proteins in HbPP2 gene family

蛋白 Protien	基因 ID Gene ID	氨基酸个数 Number of amino acids	分子质量 Molecular weight/kDa	等电点 pI	不稳定系数 Instability index	亲水系数 GRAVY
HbPP2-B1	scaffold0016_1581782	198	22.829	5.48	36.08	-0.608
HbPP2-A15	scaffold0020_30195	296	33.407	6.25	49.35	-0.313
HbPP2-A12	scaffold0082_457438	172	19.697	7.62	31.82	-0.178
HbPP2-A14	scaffold0148_1285467	285	32.384	6.65	50.70	-0.284
HbPP2-B13	scaffold0178_461591	140	15.530	9.64	48.08	-0.500
HbPP2-B15	scaffold0340_117358	538	61.206	7.03	47.91	-0.456
HbPP2-B15.1	scaffold0340_123434	231	26.018	5.37	46.87	-0.324
HbPP2-A13	scaffold0425_531538	290	32.903	6.20	46.35	-0.373
HbPP2-A13.1	scaffold0425_534088	290	32.958	6.36	47.87	-0.386
HbPP2-B10	scaffold0429_412565	170	19.614	7.83	47.37	-0.245
HbPP2-B10.1	scaffold0594_96082	201	23.027	5.54	40.93	-0.297
HbPP2-A15.1	scaffold0753_521075	294	33.394	5.94	55.04	-0.370
HbPP2-A13.2	scaffold0782_510591	290	32.886	6.38	35.09	-0.273
HbPP2-A12.1	scaffold0976_68746	295	33.524	9.06	41.26	-0.265
HbPP2-A14.1	scaffold0997_310741	285	32.328	7.99	51.38	-0.248
HbPP2-B11	scaffold1141_68043	83	9.402	8.74	35.23	0.206
HbPP2-B1.1	scaffold1150_191714	335	37.344	5.14	42.82	-0.444

2.2 HbPP2 蛋白亚细胞定位及二、三级结构预测

对 HbPP2 基因家族编码蛋白进行亚细胞定位预测,结果显示有 5 个家族成员定位于叶绿体,6 个成员定位于细胞核,3 个成员定位于胞质,2 个成员定位于细胞膜和叶绿体,1 个成员定位于叶绿体和胞质(表 3)。对 HbPP2 蛋白进行二级结构预测发现,有 82%蛋白成员的二级结构主要由无规则卷曲和延伸链组成,18%成员的二级结构由无规则卷曲和 α -螺旋组成(表 3),与 17 个家族成员的三级结构预测结果基本一致(图 1)。

2.3 HbPP2 基因结构分析

对橡胶树 17 个 PP2 基因进行多重序列比对并进行系统进化分析。结果显示 17 个基因被划分为 2 类。为进一步研究 *HbPP2* 基因结构特征,利

用 MEME 软件对 HbPP2 家族成员进行保守基序分析。结果显示,在 I 亚组中,除了 *HbPP2-A12* 缺失 motif3 和 motif5,其余 7 个成员都包含了 motif1~motif6;在 II 亚组中,分别含有 2~10 个 motif,多数都含有 motif7、motif10、motif8 和 motif9;*HbPP2-B13* 和 *HbPP2-B11* 相对其他成员缺失 motif7、motif8 和 motif9,且与 I 亚组成员极少有相同 motif(图 2A)。为了更加直观地呈现 HbPP2 蛋白的保守结构域及其分布,通过 NCBI 蛋白保守结构域数据库分析所有 HbPP2 家族成员氨基酸序列,结果显示 HbPP2 家族成员均含有 PP2 结构域(图 2B)。F-box 结构域位于 HbPP2-A15、HbPP2-A15.1、HbPP2A14、HbPP2A13.2、HbPP2A13、HbPP2A13.1、HbPP2-A13.1、HbPP2-A12.1 和 HbPP2-B10.1 靠近

表 3 HbPP2 蛋白亚细胞定位及二级结构预测
Tab. 3 Subcellular localization and secondary structure prediction of HbPP2 proteins

蛋白 Protien	亚细胞定位 Subcellular localization	α -螺旋 Alpha helix/%	β -转角 Beta turn/%	延伸链 Extended strand/%	无规则卷曲 Random coil/%
HbPP2-B1	Chloroplast, Cytoplasm	12.63	5.05	27.78	54.55
HbPP2-A15	Cell membrane, Chloroplast	25.34	7.09	27.03	40.54
HbPP2-A12	Cell membrane, Chloroplast	16.28	9.88	38.37	35.47
HbPP2-A14	Chloroplast	26.67	7.02	24.21	42.11
HbPP2-B13	Chloroplast	10.71	7.14	22.86	59.29
HbPP2-B15	Nucleus	28.44	4.65	23.42	43.49
HbPP2-B15.1	Nucleus	27.27	4.33	21.65	46.75
HbPP2-A13	Chloroplast	22.76	5.17	28.28	43.79
HbPP2-A13.1	Chloroplast	23.45	5.86	26.21	44.48
HbPP2-B10	Chloroplast	14.71	4.71	29.41	51.18
HbPP2-B10.1	Cytoplasmic	9.95	8.46	35.32	46.27
HbPP2-A15.1	Nuclear	25.17	6.80	25.85	42.18
HbPP2-A13.2	Nuclear	22.07	6.21	26.55	45.17
HbPP2-A12.1	Cytoplasmic	24.75	4.75	25.08	45.42
HbPP2-A14.1	Nuclear	22.81	6.32	28.77	42.11
HbPP2-B11	Cytoplasmic	16.87	7.23	42.17	33.73
HbPP2-B1.1	Nuclear	22.39	5.67	23.88	48.06

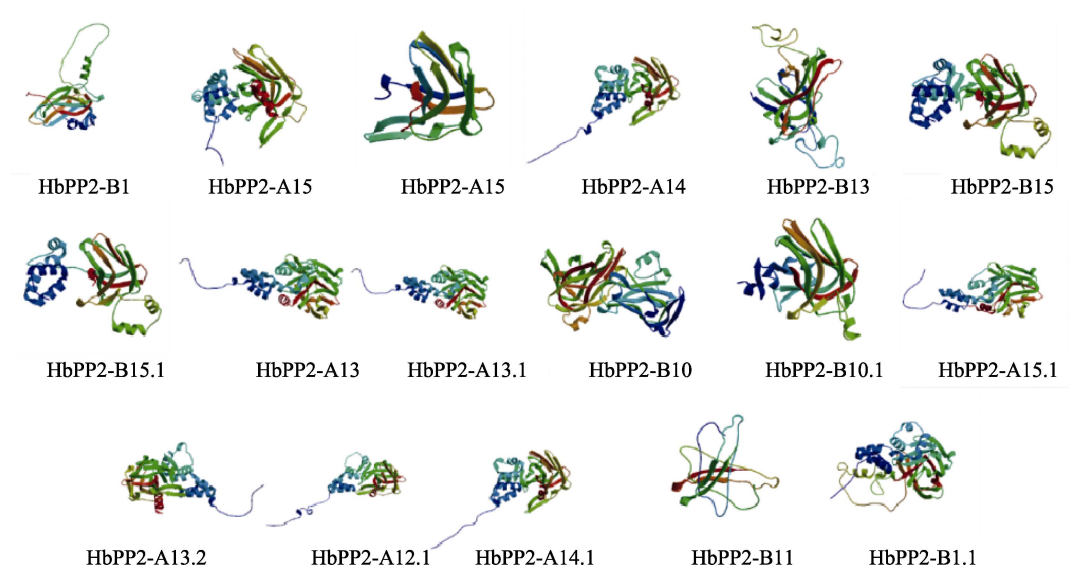
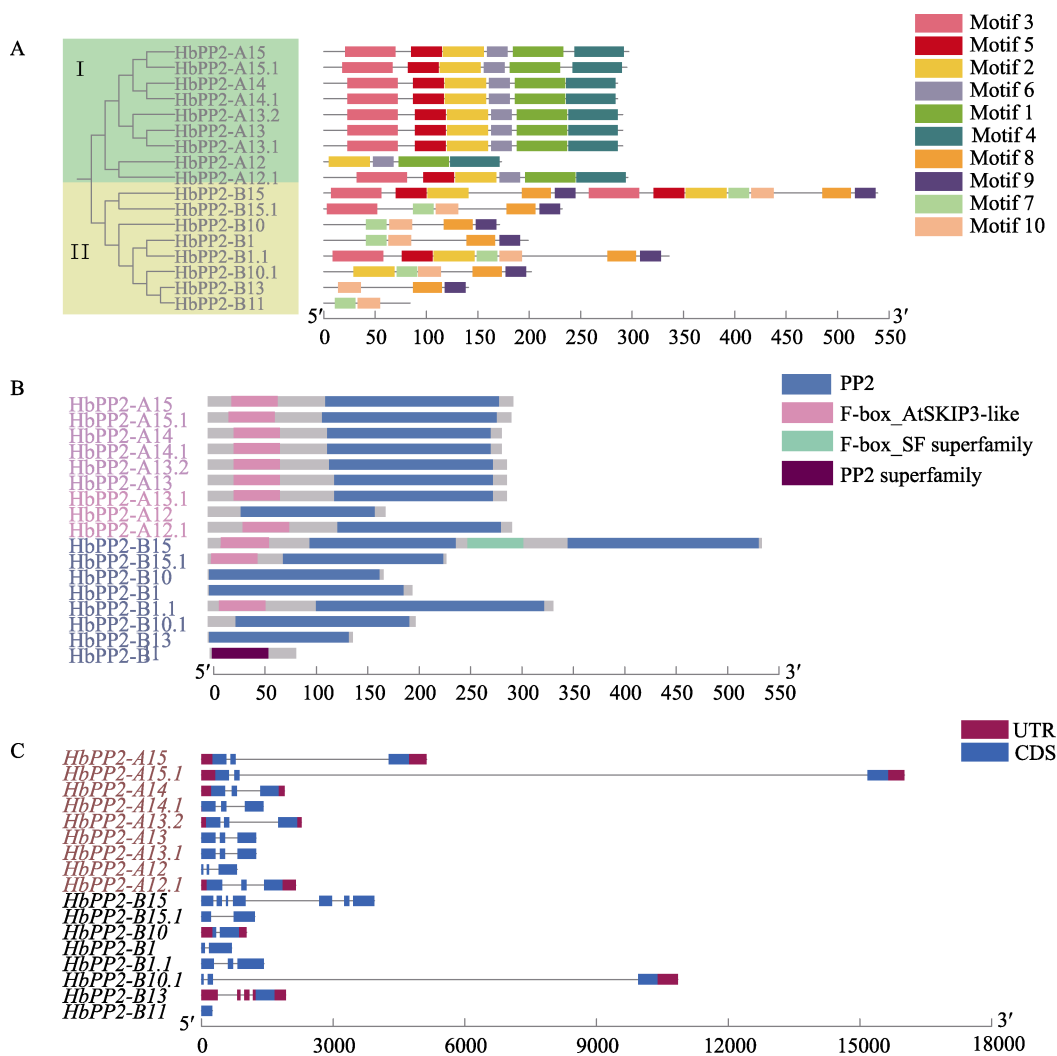


图 1 HbPP2 蛋白三级结构模型
Fig. 1 Tertiary structure model of HbPP2 proteins

N 端的位置（图 2B）。通过橡胶树基因组注释文件和 HbPP2 氨基酸序列对 17 个家族成员进行基因结构（外显子和内含子）分析，结果表明，所有成员含有外显子数目在 1~7 个不等，不同基因序列长短存在差异，内含子和外显子的位置也存在差异。其中，*HbPP2.A15.1* 基因序列最长，包含 3 个外显子；*HbPP2-B15* 基因包含最多的外显子数，且基因两端均不含 UTR 区（图 2C）。

2.4 HbPP2 基因启动子顺式作用元件分析
为进一步探究 HbPP2 基因家族的功能，分别截取 17 个 *HbPP2* 基因转录起始位点上游 2000 bp 序列作为启动子区，利用 PlantCARE 在线工具对启动子区进行顺式作用元件预测，共鉴定到 21 种启动子顺式作用元件（图 3）。这些作用元件包含 198 个光响应元件、52 个甲基茉莉酸响应元件、26 个脱落酸响应元件、22 个厌氧诱导元件、16



A: 系统进化树和 HbPP2 蛋白基序分布; B: HbPP2 蛋白结构域位置; C: *HbPP2* 基因结构。
A: Phylogenetic tree and HbPP2 proteins motif distribution; B: HbPP2 proteins domain location; C: *HbPP2* gene structure.

图 2 HbPP2 蛋白序列结构特征

Fig. 2 Sequence structure analysis of HbPP2 proteins

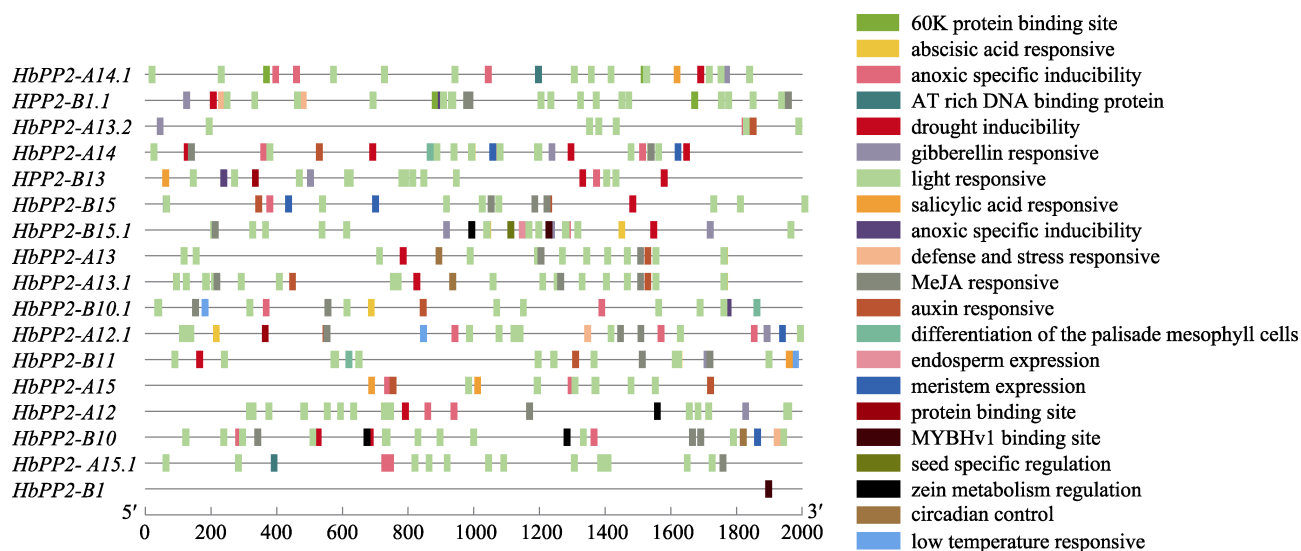


图 3 *HbPP2* 基因启动子区顺式作用元件示意图

Fig. 3 Cis-regulatory elements in promoter region of *HbPP2*s

个干旱诱导元件、13 个生长素响应元件、12 个赤霉素应答元件、6 个分生组织表达元件、5 个水杨酸响应元件和 4 个防御和胁迫应答元件。*HbPP2-B1* 基因中只存在 1 个 MYBhv1 binding site 非生物胁迫响应元件。此外, 部分家族成员还包含少数几个调控元件, 如玉米素代谢调控元件、分生组织表达调控元件和昼夜节律调控元件等。

2.5 HbPP2 基因家族进化分析

通过 NCBI 数据库和 PlantTFdb 数据库分别搜索模式植物拟南芥 (30 个) 和木薯 (19 个) PP2

氨基酸序列, 与橡胶树 17 个 PP2 氨基酸序列进行比对并构建系统进化树。如图 4 所示, PP2 家族可以分为 3 个亚组, 其中拟南芥 PP2 的 AtPP2-A 成员分布于 I 和 II 亚组中, AtPP2-B 成员仅分布在 III 亚组, 而橡胶树 HbPP2 家族成员仅分布在 II 亚组和 III 亚组中, 分别与拟南芥的 AtPP2-A 和 AtPP2-B 聚集在一起。另外 HbPP2 大多数成员均与木薯聚集在 II 亚组和 III 亚组中的同一分支, 表明其亲缘关系与木薯更为接近, 这与物种进化上橡胶树与木薯亲缘关系最近相一致^[30]。

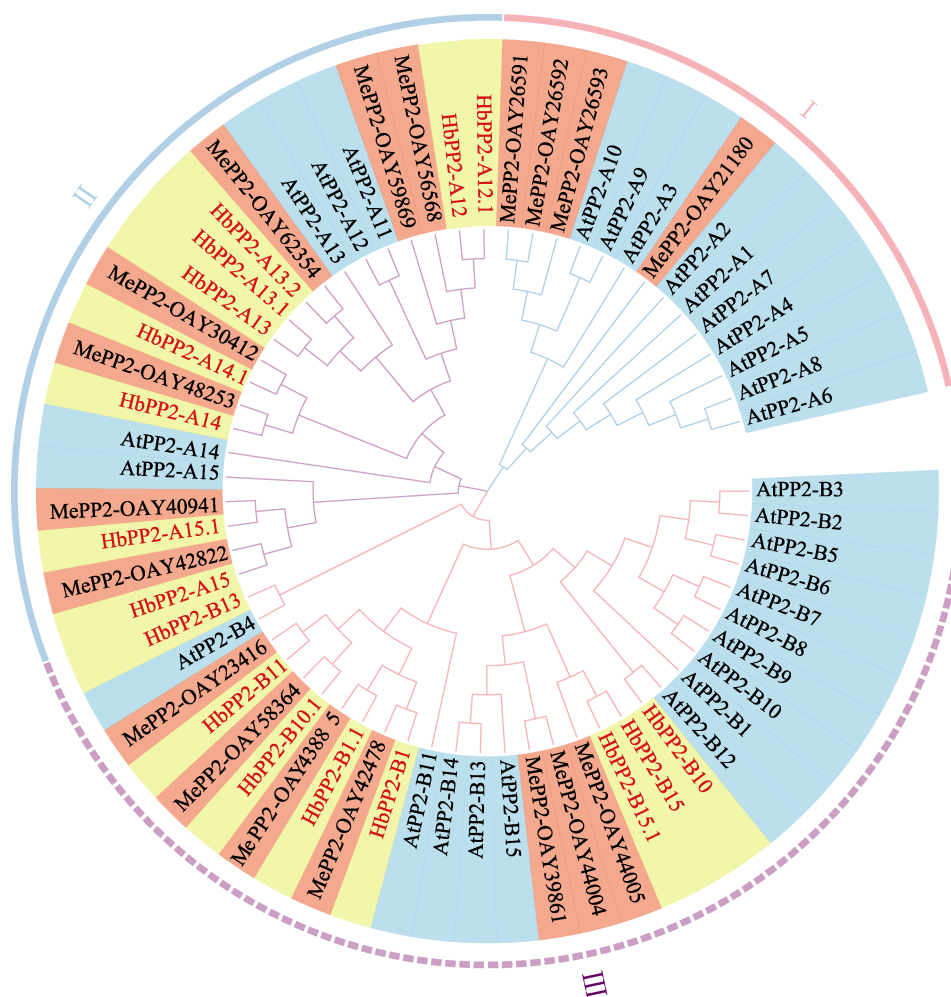


图 4 橡胶树、拟南芥及木薯 PP2 蛋白家族系统进化分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of PP2 in *H. brasiliensis*, *Arabidopsis thaliana* and *Manihot esculenta*

2.6 HbPP2 基因家族成员表达分析

对橡胶树不同组织 (花、茎、胶乳、树皮、叶片和种子) 和不同割胶刀次 (1、2、3、5、7、9) 胶乳中的 *HbPP2* 基因表达水平进行分析 (图 5)。结果表明该基因家族成员具有显著的组织表达特异性。*HbPP2-B15.1*、*HbPP2-B15*、*HbPP2-B10*

和 *HbPP2-A12.1* 在叶片中表达量较高, 在胶乳中不表达或者低表达, 且不受割胶处理诱导。*HbPP2-A14.1*、*HbPP2-A14*、*HbPP2-A15* 和 *HbPP2-B11* 基因在茎中的表达量较高, 但随着割胶刀次的增加, 变化并不明显。在花组织中没有明显高表达的 *HbPP2* 基因。*HbPP2-A13*、

HbPP2-A13.1 和 *HbPP2-A12* 在树皮中呈现高表达趋势,但在割胶实验中的变化趋势恰好相反。在种子中表达量较高的基因 *HbPP2-B1.1*、*HbPP2-B1*、*HbPP2-B10.1* 和 *HbPP2-A13.2*,在胶乳中同样也表现出高表达的趋势,但随着连续的

割胶处理,只有 *HbPP2-B1.1* 和 *HbPP2-A13.2* 的表达水平在不断升高,*HbPP2-B1* 和 *HbPP2-B10.1* 基本上保持着相似的表达趋势。另外 *HbPP2-B13* 和 *HbPP2-A15.1* 也在胶乳中特异表达,且 *HbPP2-B13* 的表达受割胶诱导。

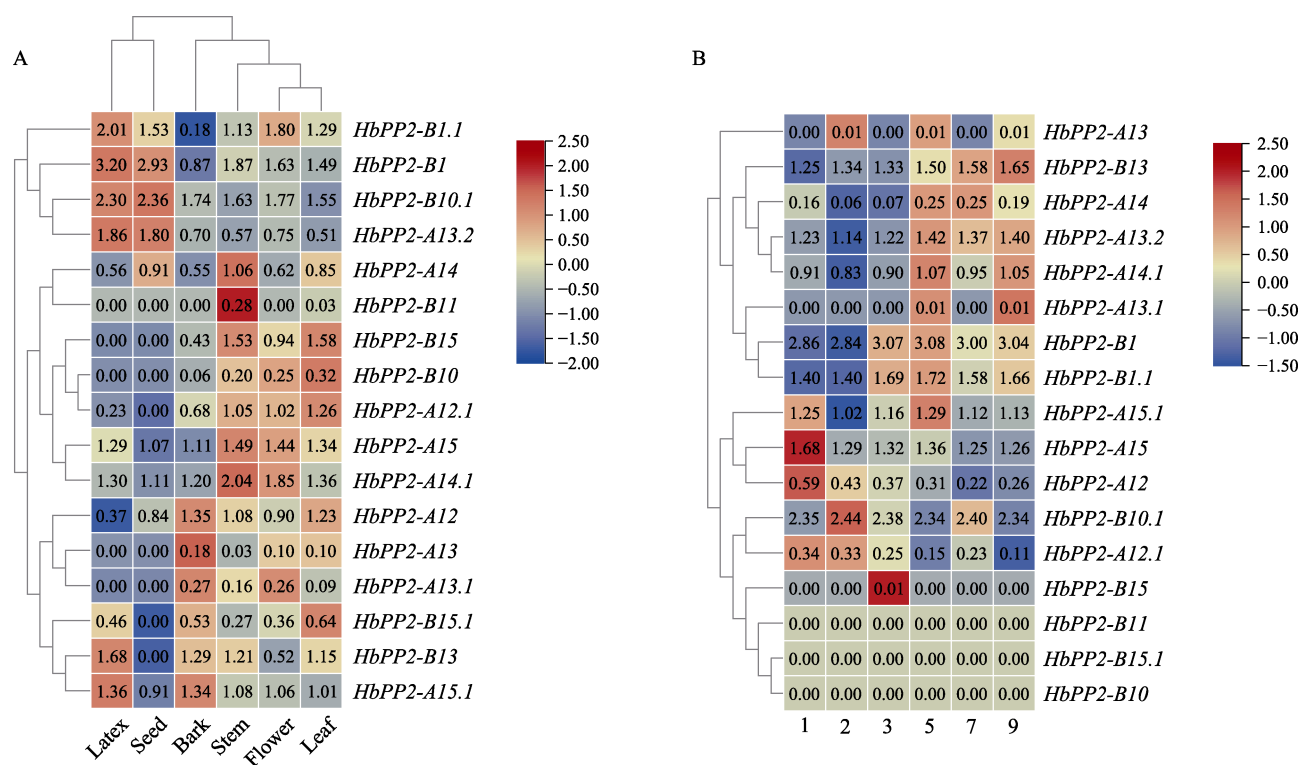


图 5 *HbPP2* 基因在不同组织 (A) 和不同割胶刀次 (B) 中的表达分析

Fig. 5 Expression analysis of *HbPP2*s in different tissues (A) and different tapping number (B) of rubber tree

鉴于转录组分析结果中 *HbPP2* 在橡胶树不同组织割胶处理中均有显著的表达差异,本研究选择了 6 个表达趋势较为显著的 *HbPP2* 家族成员基因设计引物,以橡胶树不同组织(胶乳、叶片、树皮、花和茎)与不同割次(1、3、5、9)处理的胶乳 RNA 为模板进行反转录,以反转录的 cDNA 为模板进行 RT-qPCR 分析,验证转录组数据。结果如图 6、7 所示, *HbPP2-A13.2*、*HbPP2-B13*、*HbPP2-B1.1* 和 *HbPP2-B10.1* 和 *HbPP2-A14.1* 在不同组织中的表达趋势与转录组数据高度一致,虽然 *HbPP2-A15.1* 在不同组织中的表达趋势与转录组数据不完全一致,但整体的表达趋势一致。*HbPP2-A13.2*、*HbPP2-B13* 和 *HbPP2-B1.1* 在不同割胶处理下均有 1 个上调表达的趋势, *HbPP2-B10.1*、*HbPP2-A15.1* 和 *HbPP2-A14.1* 的表达趋势与转录组数据不完全一致,但在不同割胶处理下依旧无显著变化。综上

所述,RT-qPCR 实验结果验证了转录组数据的准确性。

3 讨论

近年来,随着橡胶树基因组的测定,橡胶树基因家族的研究也得到了迅速发展,然而对橡胶树 PP2 基因家族的研究尚未见报道。早期的研究表明,葫芦属中 PP2 是一个小家族,包含 2~8 个基因^[18],而 WANG 等^[31]认为 PP2 蛋白是由较多基因家族成员编码。本研究中,在拟南芥数据库中共搜索到 30 个 PP2 基因,木薯中搜索到 19 个 PP2 基因,橡胶树基因组共鉴定到 17 个 PP2 基因,相比较拟南芥而言,数量差异较大,这表明不同物种之间 PP2 数量差异明显,可能预示 PP2 基因随着物种演化发生独立进化。基于拟南芥 PP2 结构聚类分析显示该家族分为 3 个亚组,橡胶树 PP2 成员只分布在 2 个亚组中,在橡胶树

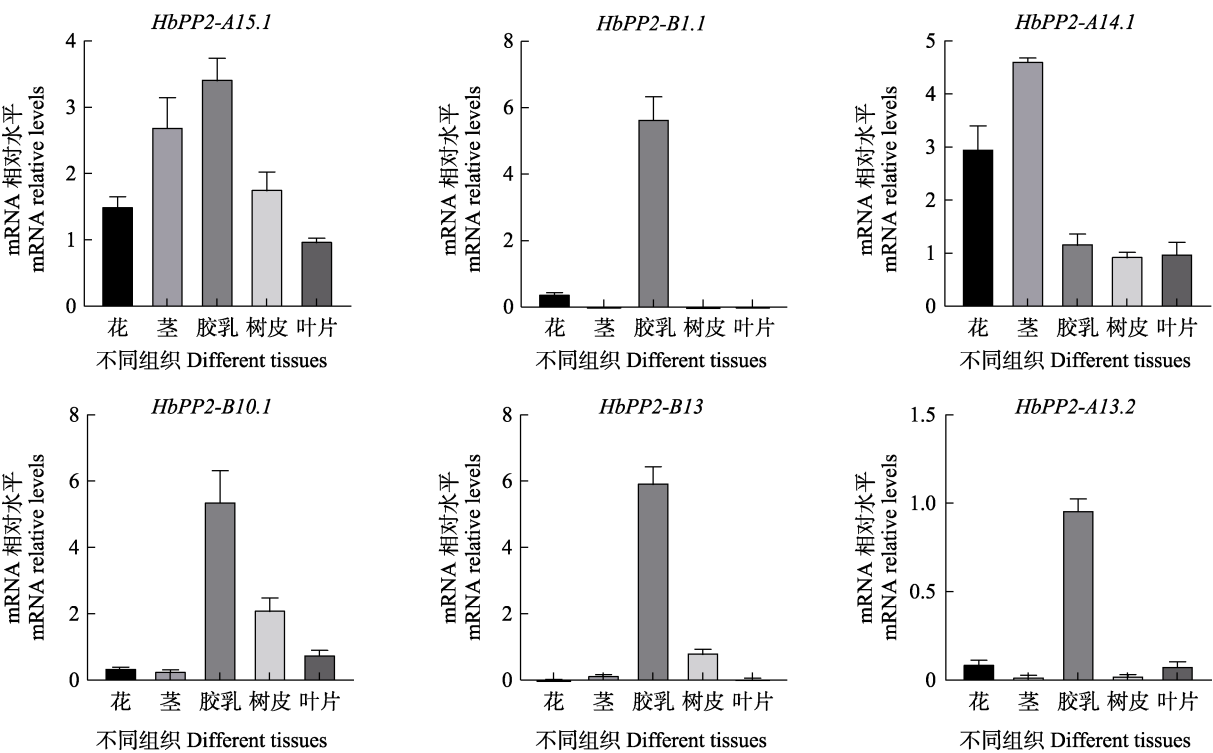


图 6 橡胶树不同组织中 *HbPP2* 基因表达模式

Fig. 6 Expression patterns of *HbPP2* genes in different tissues of *H. brasiliensis*

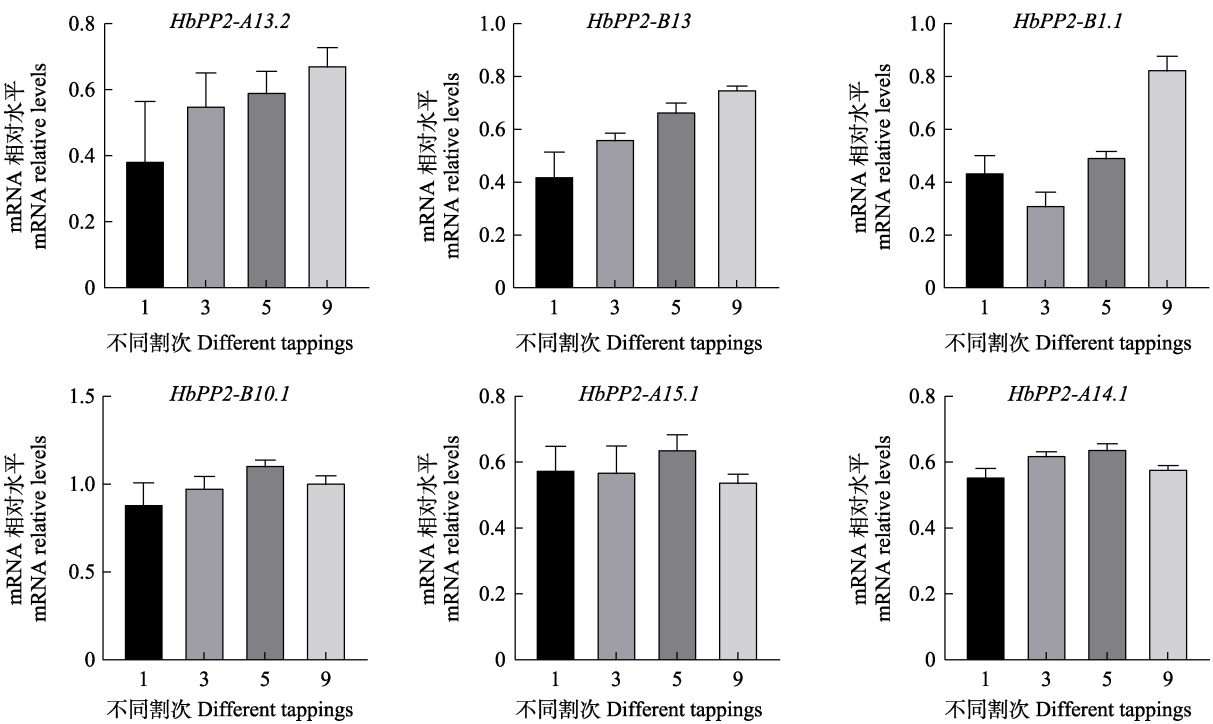


图 7 橡胶树割胶处理 *HbPP2* 基因表达分析

Fig. 7 Expression analysis of *HbPP2* genes in treatment of tapping

中缺失拟南芥 *AtPP2-A1~AtPP2-A10* 10 个同源基因，且木薯的 *PP2* 基因在 I 亚组中仅有 4 个，进一步预示大戟科植物在进化过程中该亚组中的基因发生了变化。另外，根据已有的研究结果以及

橡胶树 *HbPP2* 在 I 亚组的缺失现象^[20, 32-33]，推测橡胶树中响应生物/非生物胁迫的功能在亚组之间出现了分化。

本研究对橡胶树基因组鉴定到的 17 个

HbPP2 基因进行生物信息学分析,发现橡胶树 PP2 家族成员编码的蛋白中无规则卷曲和延伸链占比较大,而无规则卷曲一般与酶活性和特异性功能的形成有关^[34],这表明 *HbPP2* 基因可能进化出不一样的功能。拟南芥 *AtPP2 II* 亚群蛋白通过 F-box 结构域与其他蛋白结合从而参与调控许多重要的生物学过程^[19, 35]。在橡胶树中,11 个 *HbPP2* 蛋白中含有 F-box 结构域,其中 *HbPP2-A13.2* 在胶乳中特异性表达并受割胶诱导,表明含有 F-box 结构域的 *HbPP2-A13.2* 蛋白在割胶过程中发挥作用。*HbPP2-B13* 虽然不包含 F-box 结构域,但在割胶过程中随着割胶刀次的增加其表达逐渐增强。同样 *HbPP2-B10.1* 和 *HbPP2-B1* 在胶乳中特异性表达,在割胶过程中保持一个较高的表达水平,这些蛋白是否具有类似 F-box 泛素连接酶的作用通过介导其他蛋白的稳定性或发挥凝集素作用来应答割胶刺激而参与橡胶树胶乳合成还需进一步探究。顺式作用元件及表达模式分析结果表明,在胶乳中特异表达的 *HbPP2-A13.2* 和 *HbPP2-B13* 蛋白含有多个激素诱导元件和抗性应答元件并在割胶过程中表达水平逐渐增强,推测 *HbPP2-A13.2* 和 *HbPP2-B13* 蛋白可能与激素受体蛋白或响应胁迫相关蛋白形成复合蛋白继而参与植物激素传导和应答生物/非生物胁迫。*HbPP2-B10.1* 在种子中也表现出较高表达丰度,可能在合成并储存营养物质上同样发挥作用^[35-36]。*HbPP2-B10*、*HbPP2-B15* 和 *HbPP2-B15.1* 在发育组织叶片和茎中表现出较高表达水平并含有大量光响应元件和分生组织表达调控元件,且不受割胶刺激的影响,推测这 3 个基因可能在植物生长、维持形态和光合作用物质输送方面发挥重要作用。*HbPP2-A12*、*HbPP2-A13* 和 *HbPP2-A13.1* 在树皮中表现较高表达水平,但不受割胶诱导,说明这 3 个基因可能只参与了树皮的生长发育过程。*HbPP2-A15.1* 不仅在胶乳中也在树皮中表现出较高的表达水平,在割胶过程中也出现 1 个上调的趋势,说明该基因在割胶伤害过程中会启动应答机制。综上,不同 *HbPP2* 基因家族在不同组织中的表达水平出现明显的差异,表明橡胶树 *HbPP2* 基因家族在组织表达特异性及功能特异性上具有分化差异。

本研究首次从巴西橡胶树中鉴定出 *HbPP2* 基因,并从基因家族成员鉴定、基因结构、顺式作用元件和表达模式等方面对 *HbPP2* 家族成员进行

全面分析,对不同组织和不同割胶刀次胶乳中 *HbPP2* 家族成员表达模式进行分析,从中筛选出胶乳特异表达的 *HbPP2* 基因。本研究为进一步探索 PP2 基因家族在橡胶树胶乳合成代谢调控中的功能提供了理论基础。

参考文献

- [1] WILLIAMS J S, DER J P, DEPAMPHILIS C W, KAO T. Transcriptome analysis reveals the same 17 S-locus *F-box* genes in two haplotypes of the self-incompatibility locus of *Petunia inflata*[J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(7): 2873-2888.
- [2] LI Q, WANG W, WANG W, ZHANG G, LIU Y, WANG Y, WANG W. Wheat F-box protein gene *TaFBA1* is involved in plant tolerance to heat stress[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 521.
- [3] BAILEY T L, BODEN M, BUSKE F A, FRITH M, GRANT C E, CLEMENTI L, REN J Y, LI W W, NOBLE W S. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37: W202-W208.
- [4] SIJACIC P, WANG X, SKIRPAN A L, WANG Y, DOWD P E, MCCUBBIN A G, HUANG S, KAO T. Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility[J]. *Nature*, 2004, 429(6989): 302-305.
- [5] LEE J R, BOLTZ K A, LEE S Y. Molecular chaperone function of *Arabidopsis thaliana* phloem protein 2-A1, encodes a protein similar to phloem lectin[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, 443(1): 18-21.
- [6] TURGEON R, WOLF S. Phloem transport: cellular pathways and molecular trafficking[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2009, 60: 207-221.
- [7] DU C X, SI Y Y, PANG N N, LI Y P, GUO Y T, LIU C, FAN H F. Prokaryotic expression, purification, physicochemical properties and antifungal activity analysis of phloem protein PP2-A1 from cucumber[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 194: 395-401.
- [8] VAN BEL A J, GAUPELS F. Pathogen-induced resistance and alarm signals in the phloem[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2004, 5(5): 495-504.
- [9] KEHR J. Phloem sap proteins: their identities and potential roles in the interaction between plants and phloem-feeding insects[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(4): 767-774.
- [10] TJALLINGII W F. Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(4): 739-745.
- [11] WILL T, VAN BEL A J. Physical and chemical interactions between aphids and plants[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(4): 729-737.
- [12] LANNOO N, VAN DAMME E J. Nucleocytoplasmic plant lectins[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General*

- Subjects, 2010, 1800(2): 190-201.
- [13] WEI F, CHEN P, JIAN H, GUO X, LV X, LIAN B, SUN M, AN L, DANG X, YANG M. A systematic analysis of the phloem protein 2 (PP2) proteins in *Gossypium hirsutum* reveals that GhPP2-33 regulates salt tolerance[J]. BMC Genomics, 2023, 24(1): 467.
 - [14] READ S M, NORTHCOTE D H. Chemical and immunological similarities between the phloem proteins of three genera of the Cucurbitaceae[J]. Planta, 1983, 158: 119-127.
 - [15] GOLECKI B, SCHULZ A, CARSTENS-BEHRENS U, KOLLMANN R. Evidence for graft transmission of structural phloem proteins or their precursors in heterografts of Cucurbitaceae[J]. Planta, 1998, 206: 630-640.
 - [16] NARAHARI A, SWAMY M J. Rapid affinity-purification and physicochemical characterization of pumpkin (*Cucurbita maxima*) phloem exudate lectin[J]. Bioscience Reports, 2010, 30(5): 341-349.
 - [17] KNOBLAUCH M, PETERS W S. Münch, morphology, microfluidics-our structural problem with the phloem[J]. Plant Cell and Environment, 2010, 33(9): 1439-1452.
 - [18] BOSTWICK D E, SKAGGS M I, THOMPSON G A. Organization and characterization of *Cucurbita* phloem lectin genes[J]. Plant Molecular Biology, 1994, 26: 887-897.
 - [19] DINANT S, CLARK A M, ZHU Y, VILAINE F, PALAUQUI J, KUSIAK C, THOMPSON G A. Diversity of the superfamily of phloem lectins (phloem protein 2) in angiosperms[J]. Plant Physiology, 2003, 131(1): 114-128.
 - [20] GUO P G, ZHENG Y C, PENG D X, LIU L J, DAI L J, CHEN C, WANG B. Identification and expression characterization of the phloem protein 2 (PP2) genes in ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaudich)[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 10734.
 - [21] LIN M K, LEE Y J, LOUGH T J, PHINNEY B S, LUCAS W J. Analysis of the pumpkin phloem proteome provides insights into angiosperm sieve tube function[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2009, 8(2): 343-356.
 - [22] LI Y, JIA F, YU Y, LUO L, HUANG J, YANG G, WU C, ZHENG C. The SCF E3 ligase AtPP2-B11 plays a negative role in response to drought stress in *Arabidopsis*[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2014, 32: 943-956.
 - [23] 金华斌, 田维敏, 史敏晶. 我国天然橡胶产业发展概况及现状分析[J]. 热带农业科学, 2017, 37(5): 98-104.
JIN H B, TIAN W M, SHI M J. Current situation and industrial development of natural rubber in China[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2017, 37(5): 98-104. (in Chinese)
 - [24] PUSKAS J E, GAUTRIAUD E, DEFFIEUX A, KENNEDY J P. Natural rubber biosynthesis: a living carbocationic polymerization[J]. Progress in Polymer Science, 2006, 31(6): 533-548.
 - [25] DORNELAS M C, RODRIGUEZ A P M. The rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) homologue of the LEAFY/FLORICAULA gene is preferentially expressed in both male and female floral meristems[J]. Journal of Experimental Botany, 2005, 56(417): 1965-1974.
 - [26] LONG X, FANG Y, QIN Y, YANG J, XIAO X. Latex-specific transcriptome analysis reveals mechanisms for latex metabolism and natural rubber biosynthesis in laticifers of *Hevea brasiliensis*[J]. Industrial Crops and Products, 2021(171): 113835.
 - [27] LESCOT M, DÉHAIS P, THUIS G, MARCHAL K, MOREAU Y, VAN DE PEER Y, ROUZÉ P, ROMBAUTS S. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(1): 325-327.
 - [28] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, THOMAS H R, FRANK M H, HE Y H, XIA R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194-1202.
 - [29] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers[J]. Bioinformatics, 1994, 10(2): 189-191.
 - [30] LIU J. The chromosome-based rubber tree genome provides new insights into spurge genome evolution and rubber biosynthesis[J]. Molecular Plant, 2020, 13(2): 15.
 - [31] WANG M B, BOULTER D, GATEHOUSE J A. Characterization and sequencing of cDNA clone encoding the phloem protein PP2 of *Cucurbita pepo*[J]. Plant Molecular Biology, 1994, 24: 159-170.
 - [32] SI Y Y, FAN H F, LU H J, LI Y P, GUO Y T, LIU C, CHAI L A, DU C X. *Cucumis sativus* PHLOEM PROTEIN 2-A1 like gene positively regulates salt stress tolerance in cucumber seedlings[J]. Plant Molecular Biology, 2023, 111(6): 493-504.
 - [33] WOJSZKO K, RÓŻAŃSKA E, SOBCZAK M, KUCZERSKI K, KRĘPSKI T, WIŚNIEWSKA A. The role of AtPP2-A3 and AtPP2-A8 genes encoding Nictaba-related lectin domains in the defense response of *Arabidopsis thaliana* to *Heterodera schachtii*[J]. Planta, 2023, 258: 40.
 - [34] PALLAS V, GÓMEZ G. Phloem RNA-binding proteins as potential components of the long-distance RNA transport system[J]. Frontiers in Plant Science, 2013, 4: 130.
 - [35] RIECHMANN J L, HEARD J, MARTIN G, REUBER L, JIANG C Z, KEDDIE J, ADAM L, PINEDA O, RATCLIFFE O J, SAMAHA R R. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes[J]. Science, 2000, 290(5499): 2105-2110.
 - [36] BURDO B, GRAY J, GOETTING MINESKY M P, WITTLER B, HUNT M, LI T, VELLIQUETTE D, THOMAS J, GENTZEL I, BRITO M D S. The Maize TFome: development of a transcription factor open reading frame collection for functional genomics[J]. The Plant Journal, 2014, 80(2): 356-366.