

文章编号: 1674-7054(2018)01-0012-09

# 巴西橡胶树 *HbMYBs* 转录因子的克隆及表达分析

林贤桂, 翟金玲, 黄 惜

(海南省热带生物资源可持续利用重点实验室/海南大学 热带农林学院, 海口 570228)

**摘 要:** 通过同源序列比对, 笔者克隆了巴西橡胶树 5 个与抗逆相关的 *HbMYBs* 基因。根据其与拟南芥同源基因的相似性, 分别命名为 *HbMYB15*, *HbMYB21*, *HbMYB24*, *HbMYB35* 和 *HbMYB75*, 其阅读框长度分别为 651, 984, 999, 1 095, 933 bp。生物信息学分析结果表明, 这 5 个 *HbMYBs* 基因编码的蛋白序列都包含 MYB 家族结构域, 属于 R2R3 类 MYB 转录因子。酵母自激活实验结果显示这 5 个 *HbMYBs* 蛋白均具有转录活性, 具有转录因子特征。荧光定量 PCR 分析结果表明, 创伤、乙烯处理和茉莉酸处理对这 5 个 *HbMYBs* 基因中有不同程度的诱导作用, 这些基因有可能参与乙烯和茉莉酸信号相关的植物防御应答。

**关键词:** 巴西橡胶树; MYB 转录因子; 表达分析; 转录活性

中图分类号: S 794.1; Q 78 文献标志码: A DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2018.01.002

植物为了适应在不利环境(如创伤, 干旱和极端温度等)条件下生长、发育和生产, 已发展出复杂的应答机制, 包括用于转导应激信号的转录调控网络, 而这些复杂网络的实施取决于各种转录因子(TF)的参与, 如 MYB, NAC, AP2 / ERF, bZIP, bHLH 和 WRKY<sup>[1, 2]</sup>。作为植物转录因子家族中数量最多的一类转录因子, MYB 转录因子广泛地参与了植物生长发育、细胞形态建成、次生物质代谢、信号转导及环境应答等多种生命活动<sup>[3]</sup>, 以及生物胁迫。从玉米(*Zea mays*)中分离出来的第 1 个已知的 MYB 基因, 被命名为 COLORED1 (C1)——玉米粒糊粉中花色素苷合成所必需的<sup>[4]</sup>, 到如今水稻和拟南芥中 MYB 基因已经被鉴定和分析<sup>[5-6]</sup>。MYB 家族基因基于保守的 MYB 结构域重复序列被分为 4 个亚组, 即单个或部分 MYB 重复蛋白 MYB1R, 2 个重复蛋白 R2R3-MYB, 3 个重复蛋白 MYB3R 和 4 个 R1 / R2 型重复序列蛋白 4R-MYB<sup>[5]</sup>。有证据表明, 许多 R2R3-MYB 蛋白质能够响应非生物胁迫。在拟南芥中, 过表达 *AtMYB96* 基因可以通过融合 ABA 和生长素信号通路来增强植物干旱耐受性, 同时通过调节靶基因 *LTP3* 来提高冷冻和耐旱性<sup>[7-8]</sup>。同样, *AtMYB44* 和 *AtMYB60* 通过调节气孔运动参与植物对干旱胁迫的反应<sup>[9-10]</sup>。*AtMYB20* 过表达的拟南芥植物显示盐胁迫耐受性, 但对干燥敏感<sup>[11-12]</sup>。*AtMYB14* 和 *AtMYB15* 参与植物应答冷胁迫<sup>[13-14]</sup>。*AtMYB13* 基因<sup>[15]</sup> 受激素诱导后强烈表达, 能够提高转基因拟南芥对病原细菌的防卫反应, 而 *AtMYB30* 则参与调节水杨酸(SA)的合成从而调控细胞的死亡<sup>[16]</sup>。*AtMYB44* 基因通过 EIN2 调控拟南芥对桃蚜和菜蛾的抗性<sup>[17]</sup>。同样的, 在其他植物中对 MYB 基因进行研究也有相同发现, 如: 小麦 *TaMYBsdu1*<sup>[18]</sup> 转录因子是高盐和干旱胁迫下的调控子, *MdSIMYB1* 过表达能增强转基因小麦抗逆境能力。荔枝 *LcMYB5* 定位于细胞核, 能与花色素苷生物合成调控的 *LcbHLH1* 转录因子相互作用, 通过调控花色素苷生物合成结构基因启动子的活力调控花色素苷的生物合成<sup>[19]</sup>。棉花 *GbMYB5* 在应对干旱, ABA, GA 处理时都有所表达, 证明其在应答非生物胁迫时能起到重要作用<sup>[20]</sup>。

天然橡胶是重要的工业原料和国防战略物资, 主要来源巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)。随着对巴西

收稿日期: 2017-09-10

修回日期: 2017-11-05

基金项目: 国家自然科学基金(31370608, 31260170)

作者简介: 林贤桂(1992-)女, 海南大学热带农林学院 2015 级生物化学与分子生物学硕士研究生. E-mail: 592602217@qq.com

通信作者: 黄惜(1969-)男, 海南大学热带农林学院研究员. 研究方向: 植物病理学. E-mail: xihuang@hainu.edu.cn

橡胶树研究的不断深入,其潜在的经济市场价值也在不断地被挖掘。近年来,橡胶基因组测序取得重大进展,为基因鉴定和成功分离奠定了基础<sup>[21]</sup>。虽然许多 MYB 基因已被鉴定在橡胶中,但迄今为止只有少数基因已被鉴定。*HbMYB44* 在干旱和高盐胁迫中被诱导表达<sup>[22]</sup>,*HbMYB52* 参与了植物次生壁形成调控<sup>[23]</sup>,另外 *HbSM1* 被鉴定表明可能通过不同的植物激素信号通路在植物发育中起多重作用,并且能够应答橡胶树死皮病<sup>[24]</sup>。笔者利用热研 7-33-97 的转录组测序数据库与 NCBI 比对分析,发掘了 5 个与植物抗逆可能相关的 *HbMYB* 转录因子。通过克隆了橡胶树 5 个 *HbMYB* 基因的全长序列,并进行了序列分析和蛋白质结构、功能预测;在不同胁迫处理下,分析了该基因的时空性表达,旨在为揭示 *HbMYB* 转录因子防卫应答机制提供新信息。

## 1 材料与方法

1.1 植物材料与胁迫处理 巴西橡胶树为种植在中国热带农业科学院试验场的 1 年生无性系热研 7-33-97。分别利用终浓度为 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  茉莉酸 (MeJA), 1.5% 乙烯 (ET) 对整株植物的叶片进行喷洒处理,分别采集处理后 1, 3 h 的叶片。利用镊子刮伤叶片,对叶片进行创伤处理,同样采集处理后 1, 3 h 的叶片,置于液氮中快速冷冻,置于  $-80^\circ\text{C}$  超低温冰箱保存,直至提取 RNA 材料。利用未处理的叶片为对照。

1.2 RNA 提取与 *HbMYBs* 基因的全长克隆 按照百泰克公司的 RNA 提取试剂盒内的提取步骤提取植物总 RNA,利用反转录试剂盒 (购自 Thermo 公司) 进行 cDNA 第 1 链的合成。利用实验室建立的橡胶树转录组测序网站 BHB ([www.h-brasiliensis.com](http://www.h-brasiliensis.com)) 寻找 MYB 基因,并且通过 NCBI 进行比对和电子拼接,获得 MYB 基因的全长 cDNA 序列。利用 Premier3 在线软件设计特异性克隆全长的引物,以巴西橡胶树叶片的 cDNA 为模板,利用高保真 DNA 聚合酶 PCR 扩增全长。目的片段经回收,连接到 pMD19-T Vector 载体上,再将载体转入感受态细胞中,均匀涂于添加有 Amp 的 LB 平板上,37  $^\circ\text{C}$  培养过夜,次日随机挑取单克隆菌落,并用 M13 载体引物进行菌落 PCR 验证,确认目的条带后送英骏公司进行测序。

1.3 序列分析 根据获得的全长序列经 NCBI 在线检索分别与其同源性较高的拟南芥的核酸和氨基酸序列,氨基酸序列比对采用 DNAMAN 软件,进化树构建用 MEGA5;利用在线软件 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对获得的蛋白序列理化特性进行分析;用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 在线软件对蛋白跨膜区域进行预测;用 TargetP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>), Wolf POSRT (<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 以及 MultiLoc / TargetLoc (<https://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc/>) 在线软件进行亚细胞定位预测;用 SWISS-MODEL 数据库 (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 预测蛋白三维结构。

### 1.4 *HbMYBs* 转录自激活

1.4.1 *HbMYBs* 酵母表达载体构建 根据获得的 *HbMYBs* 基因的 ORF 区,分析其自身酶切位点,同时结合酵母双杂交表达载体 pGBKT7 和 pGADT7 的多克隆位点,设计携带特定限制性酶切位点的 *HbMYBs* 引物 (表 1)。以巴西橡胶树叶片的 cDNA 为模板,扩增 *HbMYBs* 的 cDNA 全长。将扩增产物进行克隆、测序后与 pGBKT7 载体连接,构建 *HbMYBs* 的诱饵表达载体 pGBD-*HbMYBs*。利用 PEG/LiAC 介导的酵母转化方法,将诱饵表达载体 pGBD-*HbMYBs* 和空载体 BD 分别转入酵母 Y2HGold 感受态细胞中,涂布于 SD/-Trp 平板,30  $^\circ\text{C}$  培养长出单菌落后,选取直径大于 2 mm 的单菌落进行 PCR 鉴定。

1.4.2 诱饵表达载体 pGBD-*HbMYBs* 的自激活检测和毒性测定 将含有 pGBD-*HbMYBs* 和正负对照 Y2HGold (BD-53 + AD-T, BD-lam + AD-T) 的酵母稀释不同浓度,点在 SD-Trp, SD-Trp/X, SD-Trp/X/A, SD-Trp/-Ade/-His 平板上,30  $^\circ\text{C}$  培养 3~5 d,观察其在选择培养基上的生长情况,确定表达载体是否有自激活活性。将含有 pGBD-*HbMYBs* 和正负对照 Y2HGold (BD-53 + AD-T, BD-lam + AD-T) 的酵母菌分别接种于 50 mL SD/-Trp 液体培养基中,30  $^\circ\text{C}$  250  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  振荡培养 24 h。检测其菌液的  $OD_{600}$ ,根据  $OD_{600}$  值判定载体对酵母菌株的细胞毒性。

1.5 荧光实时定量 PCR 以乙烯,茉莉酸和创伤处理橡胶苗得到的样品为模板,分别使用 RH8 和 eIF2 作为乙烯处理和茉莉酸处理以及创伤处理的标准对照。所有使用的引物列于表 1 中。使用荧光染料

SYBR Green(Trans) 进行实时 RT-PCR,并用 7500 Real-Time PCR 系统(Applied Biosystems Industries) 进行分析。靶基因的表达水平绘制为 RQ ( $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ )。qRT-PCR 条件设定如下:95 °C 10min 变性 然后 94 °C 8 s ,58 °C 15 s ,72 °C 30 s 50 个循环扩增。每个处理进行 3 次独立的生物复制。

表 1 克隆 MYB 基因所用引物序列

Tab.1 List of primers for amplification of MYB gene family

引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence
pGBD-HbMYB15-F	<u>CCGGAATTC</u> ATGTTGAGGGTTCCTTGT
pGBD-HbMYB15-R	ACGCGT <u>CGACCT</u> ACTGCCCTAAATTT
pGBD-HbMYB35-F	<u>GGAATTC</u> ATGGGGAGGCCTCCTTGCT
pGBD-HbMYB35-R	ACGCGT <u>CGACTT</u> AGTAATCAAAAAGAA
pGBD-HbMYB75-F	<u>GGAATTC</u> ATGAGGAACCCATCTTCT
pGBD-HbMYB75-R	ACGCGT <u>CGACCT</u> AATTTAAAGCAACAT
pGBD-HbMYB21-F	<u>CCGGAATTC</u> ATGACAGTGGTGGCTAT
pGBD-HbMYB21-R	ACGCGT <u>CGACCT</u> AAATTGCCATAAAT
pGBD-HbMYB24-F	<u>GGAATTC</u> CATATGATGATGGATGTTAAA
pGBD-HbMYB24-R	<u>CGGGATCCT</u> CACATGTTGAACCAGATAT
HbMYB15-RT-F	CTGGCACACACACATAAAAGAAG
HbMYB15-RT-R	AATTCAGGTTGCTGTGATGA
HbMYB35-RT-F	CCATGACATTTTGAACCACAT
HbMYB35-RT-R	TGTTGGCAGGTATAGGATTGTG
HbMYB75-RT-F	GCACCTTCAGTTCAAAGTTC AAG
HbMYB75-RT-R	AAGCAACATCTTCGTCACCTAA
HbMYB21-RT-F	GGAGCATGGATGAATTTATGGC
HbMYB21-RT-R	GACAGACATGGAATTAACAGTTGC
HbMYB24-RT-F	ATGGATGCCGAGATTAATGGAG
HbMYB24-RT-R	ATGGTGCTGTTGATTAGGTGAT

注:下划线表示酶切位点以及保护碱基

Note: The underlined indicates the cleavage site and base pairs from end

## 2 结果与分析

2.1 5 个 HbMYBs 基因全长扩增 通过橡胶树全基因组测序分析,得到 5 个 *HbMYBs* 转录因子,分别命名为: *HbMYB15*, *HbMYB21*, *HbMYB24*, *HbMYB35*, *HbMYB75*。根据所得序列设计引物(表 1)。通过 PCR 扩增(图 1),得到 5 个 *HbMYB* 的全长序列。测序分析显示: *HbMYB15* cDNA 序列全长 651 bp, *HbMYB21* cDNA 序列全长 984 bp, *HbMYB24* cDNA 序列全长 999 bp, *HbMYB35* cDNA 序列全长 1 095 bp, *HbMYB75* cDNA 序列全长 933 bp 结果与预测一致。

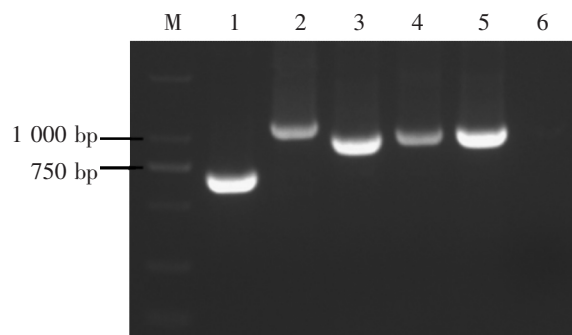


图 1 *HbMYBs* 基因全长编码区 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of full-length CDS of *HbMYBs* cDNA  
M:DL2000;1-5:*HbMYB15*, *HbMYB35*, *HbMYB75*, *HbMYB21*, *HbMYB24*; 6:H<sub>2</sub>O CK

2.2 巴西橡胶树 5 个 *HbMYBs* 蛋白结构及理化特性分析 巴西橡胶树 5 个 *HbMYBs* 转录因子的相对分子质量和等电点,以及疏水性分析结果显示 *HbMYB15*, *HbMYB21*, *HbMYB24*, *HbMYB35*, *HbMYB75D* 的相对分子质量分别为:24 655. 87, 36 792. 20, 37 646. 63, 40 630. 98, 34 799;等电点分别为:9.44, 6.45, 6.73, 7.16, 8.53;总平均疏水指数(GRAVY)分别为: -0.779, -0.622, -0.736, -0.779, -0.719。利用 WoLF PSORT, TargetP 1.1 Server 以及 MultiLoc / TargetLoc 等在线软件对 5 个巴西橡胶树 MYB 转录因子进行核定位信号预测,发现不同的软件预测结果并不一致, WoLF PSORT, TargetP 1.1 Server 预测结果显示 *HbMYB75*, *HbMYB21* 定位在叶绿体中,其余定位在细胞核中,而 MultiLoc / TargetLoc 预测结果显示全部定位在细胞核中。利用 TMHMM 在线预测分析跨膜结构域,结果显示 5 个 *HbMYB* 转录因子都无跨膜结构域。利用 SWISS - MODEL 数据库预测 5 个 MYB 蛋白的三维结构,见图 2 所示。结果表明, *HbMYB15*, *HbMYB21* 的三维建模模板编号为 3zqc. 1. A (MYB3 蛋白),与模板有较高相似度的分别是在 14 ~ 122 位和 35 ~ 141 位氨基酸,相似度分别为 38.89%, 37.74%。这与在 NCBI Conserved domains 中预测的保守蛋白结构域范围一致。 *HbMYB24* 的三维建模模板编号为 1h8a. 1. c (MYB 转录因子),与模板有较高相似度的是在 31 ~ 134 位氨基酸,相似度为 45.19%。这与在 NCBI Conserved domains 中预测的保守蛋白结构域范围一致。 *HbMYB35* 的三维建模模板编号为 1h88. 1. c (MYB 转录因子),与模板有较高相似度的是在 13 ~ 138 位氨基酸,相似度为 28.35%。这与在 NCBI Conserved domains 中预测的保守蛋白结构域范围一致。 *HbMYB75* 的三维建模模板编号为 3osf. 1. A (MYB21 蛋白),与模板有较高相似度的是在 27 ~ 131 位氨基酸,相似度为 34.21%。这与在 NCBI Conserved domains 中预测的保守蛋白结构域范围一致。

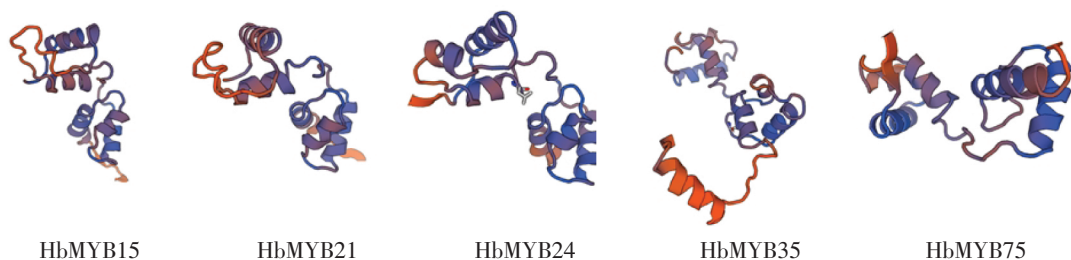


图 2 巴西橡胶树 *HbMYBs* 蛋白三维结构预测  
Fig.2 Predicted 3D structure of *HbMYBs* proteins

2.3 巴西橡胶树 5 个 *HbMYB* 氨基酸序列分析 通过 DNAMAN 软件对 5 个 *HbMYBs* 转录因子氨基酸序列进行同源性分析。如图 3 所示, *AtMYB52*, *AtMYB54* 是典型的 R2R3 型结构的 MYB 转录因子,通过同源性分析发现 5 个 *HbMYBs* 转录因子与 *AtMYB52*, *AtMYB54* 的保守结构域存在高度同源,属于典型的 R2R3 型 MYB 转录因子,与 NCBI Blast 保守结构域分析结果一致。为了进一步研究橡胶树 MYB 蛋白的进化关系,利用 MEGA 5.1 软件构建了 MYB 转录因子的系统进化树(图 4),结果表明, *HbMYB15* 与 *AtMYB15* 最接近, *HbMYB21* 与 *AtMYB62* 最接近, *HbMYB24* 与 *AtMYB108* 最接近, *HbMYB35* 与 *AtMYB35* 最接近, *HbMYB75* 与 *AtMYB5* 最接近。有研究结果表明, *AtMYB5*<sup>[25-27]</sup>, *AtMYB35*<sup>[28-30]</sup>, *AtMYB62*<sup>[31]</sup>, *AtMYB112*<sup>[32]</sup> 和 *AtMYB15*<sup>[13, 33-34]</sup> 都与植物抗逆有一定的关系,这说明 *HbMYB15*, *HbMYB21*, *HbMYB24*, *HbMYB35*, *HbMYB75* 也都可能参与植物胁迫应答。

2.4 巴西橡胶树 5 个 *HbMYB* 酵母转录自激活分析 将转化后的 Y2HGold (BD-*HbMYB15*, BD-*HbMYB35*, BD-*HbMYB75*, BD-*HbMYB21*, BD-*HbMYB24*) 菌株,均匀涂布于 SD/-Trp 平板培养,观察菌落生长情况,发现与 Y2HGold (BD), Y2HGold (BD-53), Y2HGold (BD- $\lambda$ am) 相比, Y2HGold (BD-*HbMYB15*, BD-*HbMYB35*, BD-*HbMYB75*, BD-*HbMYB21*, BD-*HbMYB24*) 的生长状况没有太大变化,3 d 后可以形成直径约 2 mm 的菌落。将 Y2HGold (BD-*HbMYB15*, BD-*HbMYB35*, BD-*HbMYB75*, BD-*HbMYB21*, BD-*HbMYB24*) 菌落于 SD-Trp 液体中培养 24 h 后,测定  $OD_{600}$  值,  $OD_{600}$  值均大于 0.8,表明转入酵母的表达载体对酵母 Y2HGold 没有细胞毒性。将获得的酵母表达菌株 Y2HGold (BD-*HbMYB15*, BD-*HbMYB35*, BD-*HbMYB75*, BD-*HbMYB21*, BD-*HbMYB24*) 和正负对照 Y2HGold (BD-53 + AD-T, BD- $\lambda$ am + AD-T) 稀释不同浓度,点板培养,结果显示, *HbMYB35*, *HbMYB75*, *HbMYB21*, *HbMYB24* 蛋白均有转录激活活性,其中 *HbMYB15* 在 SD-Trp/-Ade/-His 上有微弱生长,在 SD-Trp/X 上生长且变蓝,所以认为 *HbMYB15* 具有转录激活活性(图 5)。



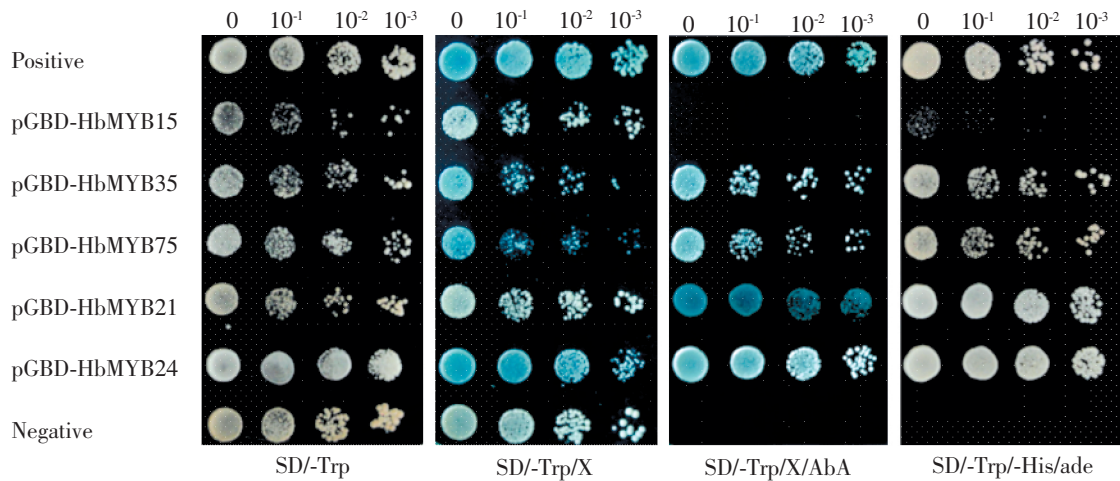


图 5 巴西橡胶树 5 个 *HbMYBs* 蛋白酵母转录自激活检测

Fig.5 Autoactivity of five *HbMYBs* in yeast

2.5 巴西橡胶树 5 个 *HbMYB* 应对不同胁迫时的表达分析 以 RH8 作为乙烯处理的内参基因,以 eIF2 作为创伤处理和茉莉酸处理的内参基因 通过实时定量 PCR 对橡胶树不同胁迫处理及不同处理时间的表达进行分析,能够在一定程度上反映 *HbMYB* 基因在不同处理中表达差异和在应答胁迫过程中的作用。结果(图 6) 显示 经乙烯处理与未处理相比, *HbMYB15*, *HbMYB35*, *HbMYB21*, *HbMYB24* 的表达量均有下降,而 *HbMYB75* 在 3 h 时的表达量有明显的上升;经茉莉酸处理与未处理相比, *HbMYB15*, *HbMYB21* 和 *HbMYB35* 的表达量明显降低,而 *HbMYB75* 的表达量则是先升后降。经创伤处理与未处理相比,可以看到 *HbMYB75*, *HbMYB21* 和 *HbMYB24* 的表达量都表现为先升后降,其中 *HbMYB21* 的表达量的变化最明显。

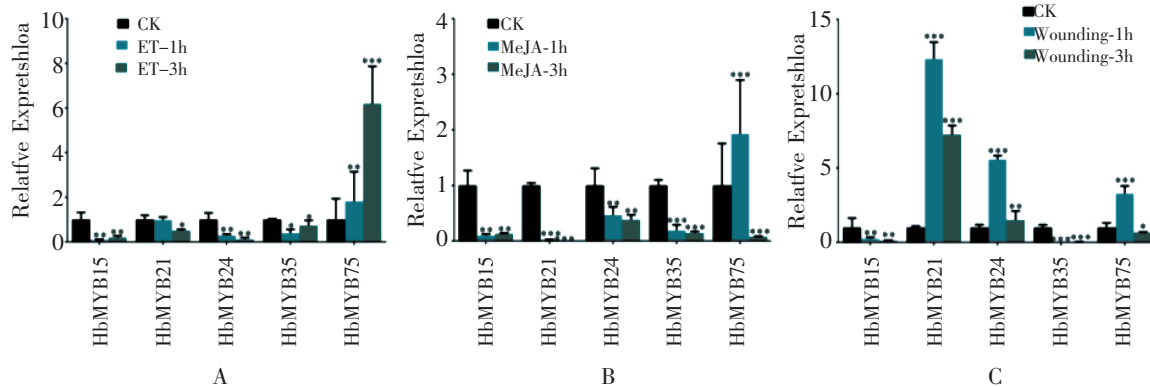


图 6 不同胁迫时 *HbMYBs* 的表达模式

A: 乙烯处理(ET); B: 茉莉酸处理(MeJA); C: 创伤处理(Wounding)

Fig.6. Expression profile of *HbMYBs* under different stresses

A: Ethylene; B: Methyl jasmonate; C: Wounding

### 3 讨论

MYB 转录因子作为转录因子家族中重要的成员,通过与真核基因启动子区域中顺式作用元件特异性结合,激活或抑制转录,从而达到调节植物生长发育<sup>[35]</sup>。如:水稻 *OsmB3R-2* 基因在拟南芥中过表达后转基因植株对冻害、干旱和高盐的耐受性显著提高<sup>[36]</sup>;棉花 *GbMYB5* 在应对干旱, ABA, GA 处理时都有所表达,证明其在应答非生物胁迫时能起到重要作用<sup>[20]</sup>。柑橘的 *MYB15* 基因均能被 ABA、干旱、低温和高盐胁迫诱导表达,表明柑橘 *MYB15* 转录因子在柑橘响应非生物胁迫过程中起到一定的作用<sup>[34]</sup>。

笔者利用本实验室构建的热研 7-33-97 转录组数据库与 NCBI 进行比对,从中筛选与植物抗逆相

关的 MYB 基因 随机抽取 5 个 HbMYB 基因 通过对其进行蛋白质理化分析以及序列分析,了解该转录因子的基本功能 并进行了推测。利用 MEGA. 5 软件构建系统进化树(图 4),发现其与拟南芥中的 *AtMYB5*, *AtMYB15*, *AtMYB35*, *AtMYB112* 和 *AtMYB62* 转录因子同源性最高 这些 *AtMYB* 转录因子在前人的研究<sup>[13, 25-27, 29, 31, 33, 37]</sup>中 经证实是与植物抗逆或者植物生长发育有重要联系的 MYB 基因 从而可推测这 5 个 *HbMYB*s 转录因子在橡胶树中的作用应该与抗逆或发育相关。通过亚细胞定位在线软件对其进行分析 不同的软件得到的结果并不相同 故进一步进行了自激活检测。检测实验发现 得到的 5 个 *HbMYB* 基因皆具有转录自激活活性 属于转录因子。为了进一步验证这 5 个巴西橡胶树 *HbMYB* 转录因子在植物抗逆过程中的作用 笔者利用荧光实时定量 PCR 实验检测其在不同胁迫处理时的表达量变化。发现 HbMYB75 在茉莉酸 乙烯以及创伤处理中 表达量都有明显升高 其中乙烯和茉莉酸处理最明显 这表明 HbMYB75 在应答非生物胁迫时被诱导表达。HbMYB21 和 HbMYB24 在创伤反应中表现明显 表达量迅速增加近 5 倍 随着时间推移慢慢减少 但是与对照组相比还是有明显的累积 这表明这 2 个转录因子在植物创伤应答中起重要作用。HbMYB15 和 HbMYB15 在 3 种处理后 表达量都明显降低 这表明这 2 个基因可能与 3 种处理的负调控相关 受处理影响 抑制表达。利用软件 *plantCARE* 预测 这 2 个基因可能与冷胁迫相关。通过以上实验 笔者证明了得到的 5 个 *HbMYB* 基因受非生物胁迫诱导或抑制 与乙烯 茉莉酸和创伤应答具有一定关系 为进一步研究 MYB 转录因子在植物抗逆应答中的反应机理提供了重要的理论依据。

#### 参考文献:

- [1] Qin F, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Achievements and challenges in understanding plant abiotic stress responses and tolerance [J]. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52(9): 1569 - 1582.
- [2] Chen L, Song Y, Li S, et al. The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1819(2): 120 - 128.
- [3] Jin H, Martin C. Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family [J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 41(5): 577 - 585.
- [4] Paz-Ares J, Ghosal D, Wienand U, et al. The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators [J]. *Embo J.*, 1987, 6(12): 3553 - 3558.
- [5] Dubos C, Stracke R, Grotewold E, et al. MYB transcription factors in Arabidopsis [J]. *Trends Plant Sci*, 2010, 15(10): 573 - 581.
- [6] Katiyar A, Smita S, Lenka S K, et al. Genome-wide classification and expression analysis of MYB transcription factor families in rice and Arabidopsis [J]. *BMC Genomics*, 2012(13): 544.
- [7] Seo P J, Xiang F, Qiao M, et al. The MYB96 transcription factor mediates abscisic acid signaling during drought stress response in Arabidopsis [J]. *Plant Physiol*, 2009, 151(1): 275 - 289.
- [8] Guo L, Yang H B, Zhang X Y, et al. Lipid transfer protein 3 as a target of MYB96 mediates freezing and drought stress in Arabidopsis [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(6): 1755 - 1767.
- [9] Cominelli E, Galbiati M, Vavasseur A, et al. A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance [J]. *Curr Biol*, 2005, 15(13): 1196 - 1200.
- [10] Jung C, Seo J S, Han S W, et al. Overexpression of *AtMYB44* enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic Arabidopsis [J]. *Plant Physiol*, 2008, 146(2): 623 - 635.
- [11] Cui M H, Yoo K S, Hyoung S, et al. An Arabidopsis R2R3-MYB transcription factor, *AtMYB20*, negatively regulates type 2C serine/threonine protein phosphatases to enhance salt tolerance [J]. *Febs Lett*, 2013, 587(12): 1773 - 1778.
- [12] Gao S, Zhang Y L, Yang L, et al. *AtMYB20* is negatively involved in plant adaptive response to drought stress [J]. *Plant and Soil*, 2014, 376(1/2): 433 - 443.
- [13] Agarwal M, Hao Y, Kapoor A, et al. A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(49): 37636 - 37645.

- [14] Chen Y, Chen Z, Kang J, et al. AtMYB14 Regulates Cold Tolerance in Arabidopsis [J]. *Plant Mol Biol Report*, 2013 (31): 87–97.
- [15] 徐珏. 转录因子 AtMYB13 抑制拟南芥防卫反应的研究 [D]. 南京:南京农业大学, 2009.
- [16] Raffaele S, Rivas S, Roby D. An essential role for salicylic acid in AtMYB30-mediated control of the hypersensitive cell death program in Arabidopsis [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(14): 3498–3504.
- [17] Waites R, Selvadurai H R, Oliver I R, et al. The PHANTASTICA gene encodes a MYB transcription factor involved in growth and dorsoventrality of lateral organs in *Antirrhinum* [J]. *Cell*, 1998, 93(5): 779–789.
- [18] Rahaie M, Xue G P, Naghavi M R, et al. A MYB gene from wheat (*Triticum aestivum* L.) is up-regulated during salt and drought stresses and differentially regulated between salt-tolerant and sensitive genotypes [J]. *Plant Cell Rep*, 2010, 29(8): 835–844.
- [19] 赖彪. 荔枝果皮花色素苷生物合成关键调控因子的筛选及其功能验证 [D]. 广州:华南农业大学, 2016.
- [20] 胡雪虹, 陈天子, 杨郁文 等. 棉花 MYB 转录因子基因 GbMYB5 的克隆及表达分析 [J]. *江苏农业学报*, 2012(1): 12–17.
- [21] Xia Z, Xu H, Zhai J, et al. RNA-Seq analysis and de novo transcriptome assembly of *Hevea brasiliensis* [J]. *Plant Mol Biol*, 2011, 77(3): 299–308.
- [22] 王立丰, 陆燕茜, 王纪坤 等. 植物 MYB44 转录因子的功能及其在橡胶树抗逆研究中的应用前景 [J]. *热带农业科学*, 2017(5): 30–36.
- [23] 仇键, 刘彤, 王帆, 等. 巴西橡胶树 *HbMYB52* 基因的克隆及其在拟南芥中的表达 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2016 (6): 671–679.
- [24] Chen S, Peng S, Huang G, et al. Association of decreased expression of a Myb transcription factor with the TPD (tapping panel dryness) syndrome in *Hevea brasiliensis* [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 51(1): 51–58.
- [25] Kirik V, Lee M M, Wester K, et al. Functional diversification of MYB23 and GL1 genes in trichome morphogenesis and initiation [J]. *Development*, 2005, 132(7): 1477–1485.
- [26] Gonzalez A, Mendenhall J, Huo Y, et al. TTG1 complex MYBs, MYB5 and TT2, control outer seed coat differentiation [J]. *Dev Biol*. 2009, 325(2): 412–421.
- [27] Li S F, Milliken O N, Pham H, et al. The Arabidopsis MYB5 transcription factor regulates mucilage synthesis, seed coat development, and trichome morphogenesis [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(1): 72–89.
- [28] Zhang Z B, Zhu J., Gao J F, et al. Transcription factor AtMYB103 is required for anther development by regulating tapetum development, callose dissolution and exine formation in Arabidopsis [J]. *Plant J*, 2007, 52(3): 528–538.
- [29] Allen R S, Li J, Stahle M I, et al. Genetic analysis reveals functional redundancy and the major target genes of the Arabidopsis miR159 family [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(41): 16371–16376.
- [30] 吴宪. 拟南芥干旱诱导型启动子的克隆及功能分析 [D]. 长春:吉林大学, 2013.
- [31] Devaiah B N, Madhuvanthi R, Karthikeyan A S, et al. Phosphate starvation responses and gibberellic acid biosynthesis are regulated by the MYB62 transcription factor in Arabidopsis [J]. *Mol Plant*, 2009, 2(1): 43–58.
- [32] Lotkowska M E, Tohge T, Fernie A R, et al. The Arabidopsis transcription factor MYB112 promotes anthocyanin formation during salinity and under high light stress [J]. *Plant Physiol*, 2015, 169(3): 1862–1880.
- [33] Reyes J L, Chua N H. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination [J]. *Plant J*, 2007, 49(4): 592–606.
- [34] 郭文芳, 刘德春, 杨莉 等. 柑橘 MYB15 基因的克隆与表达分析 [J]. *植物科学学报*, 2015(6): 808–818.
- [35] 刘蕾, 杜海, 唐晓凤 等. MYB 转录因子在植物抗逆胁迫中的作用及其分子机理 [J]. *遗传*, 2008(10): 1265–1271.
- [36] Schmidt R, Schippers J H, Mieulet D, et al. MULTIPASS, a rice R2R3-type MYB transcription factor, regulates adaptive growth by integrating multiple hormonal pathways [J]. *Plant J.*, 2013, 76(2): 258–273.
- [37] Mengiste T, Chen X, Salmeron J, et al. The BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1 gene encodes an R2R3MYB transcription factor protein that is required for biotic and abiotic stress responses in Arabidopsis [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(11): 2551–2565.



## Cloning and Expression Profiling of Transcription Factors *HbMYBs* of *Hevea brasiliensis*

LIN Xiangui , ZHAI Jinling , HUANG Xi

(Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources , Institute of Tropical Agriculture and Forestry , Hainan University , Haikou 570228 , China)

**Abstract:** *Hevea brasiliensis* is the main source of natural rubber. *MYB* gene family plays an important role in plant growth , development and responses under environmental stresses. Through homologous sequence alignment , five *HbMYBs* related genes were cloned in *H. brasiliensis* and termed as *HbMYB15* , *HbMYB21* , *HbMYB24* , *HbMYB35* and *HbMYB75* according to the similarity with the homologous gene in *Arabidopsis*. The ORF ( open reading frame) lengths of these five *HbMYBs* are 651 bp , 984 bp , 999 bp , 1 095 bp and 933 bp , respectively. Bioinformatics analysis showed that all the *HbMYBs* protein contain MYB conserved domains and belong to R2R3 type MYB transcription factor. Yeast self-activation experiments showed that the five *HbMYBs* proteins had transcriptional activity , indicating that the five *HbMYBs* genes are potential transcription factors. The results of quantitative RT-PCR showed that the five *HbMYBs* genes were regulated by treatment of wounding , ethylene and jasmonic acid , indicating that these genes may be involved in the plant defense response related to ethylene and jasmonic acid signaling pathway.

**Keywords:** *Hevea brasiliensis*; MYB transcription factor; expression analysis; transcription activity

(责任编辑:叶 静)