

鉴定调控橡胶树胶乳特异表达 *HbCPT7* 的 MYB 和 MYC 转录因子

周苗苗^{1,2}, 罗小梅¹, 杨仪清¹, 刘开业^{1,2}, 张盛敏^{1,2}, 戚继艳^{1,2}, 唐朝荣^{1,2}, 曹杰^{1,2*}

1. 海南大学热带农林学院(农业农村学院、乡村振兴学院)/天然橡胶省部共建协同创新中心, 海南海口 570028; 2. 海南大学南繁学院(三亚南繁研究院), 海南三亚 572025

摘要: 天然橡胶是重要的工业原料, 广泛应用于生产生活中。在橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 的产胶细胞乳管中, 顺式异戊烯基转移酶 (*cis*-prenyltransferase, CPT) 是催化天然橡胶合成的关键组分。已报道的 *HbCPT7* 和 *HbCPT8* 在胶乳中特异表达, 并且在酵母和烟草中的 HbIMYB19 和 HbIMYB44 能够显著促进 *HbCPT8* 的表达。然而, 调控 *HbCPT7* 胶乳特异表达的转录因子尚不清楚。本研究发现 *HbCPT7* 的启动子区具有多个 MYB 和 MYC 转录因子结合的顺式作用元件, 通过生物信息学分析, 在橡胶树全基因组水平上鉴定到 226 个 HbMYBs 和 19 个 HbMYCs 转录因子, 其中 *HbMYB1*、*HbMYB2*、*HbMYC1*、*HbMYC2*、*HbMYC3*、*HbMYC4* 和 *HbMYC5* 在胶乳中高表达。本研究成功克隆了 *HbMYB1*、*HbMYB2*、*HbMYC1*、*HbMYC4* 和 *HbMYC5*, 并通过酵母单杂交实验证实 *HbMYC5* 能够结合 *HbCPT7* 起始密码子上游 1~1000 bp 和 1501~1971 bp 的启动子区域。本研究为解析 *HbCPT7* 调控天然橡胶合成的分子机制提供新的线索。

关键词: 橡胶树; *HbCPT7*; HbMYC; HbMYB

中图分类号: S794.1 文献标志码: A

Identification of MYB and MYC Transcription Factors Regulating the Latex-specific Expression of *HbCPT7* in *Hevea brasiliensis*

ZHOU Miaomiao^{1,2}, LUO Xiaomei¹, YANG Yiqing¹, LIU Kaiye^{1,2}, ZHANG Shengmin^{1,2}, QI Jiyan^{1,2}, TANG Chaorong^{1,2}, CAO Jie^{1,2*}

1. School of Tropical Agriculture and Forestry (Agriculture and Rural College, Rural Revitalization College), Hainan University / Natural Rubber Provincial and Ministerial Collaborative Innovation Center, Haikou, Hainan 570028, China; 2. School of Breeding and Multiplication (Sanya Institute of Breeding and Multiplication), Hainan University, Sanya, Hainan 572025, China

Abstract: Natural rubber is a key and widely used industrial raw material, which is mainly produced from *Hevea brasiliensis*. *Cis*-prenyltransferase (CPT) is an important component of natural rubber biosynthesis in laticiferous cells. It has been reported that *HbCPT7* and *HbCPT8* are specifically and highly expressed in latex, which is the cytoplasm of laticifers, and HbIMYB19 and HbIMYB44 can significantly promote the expression of *HbCPT8* in tobacco and yeast. However, the transcription factors that regulate the specific expression of *HbCPT7* in latex are still not clear. Here, we found there are several MYB- and MYC-binding sites located in promoter region of *HbCPT7*. We totally identified 226 HbMYBs and 19 HbMYCs in *Hevea* by using a genome-wide scanning approach. The transcriptome data showed that *HbMYB1*, *HbMYB2*, *HbMYC1*, *HbMYC2*, *HbMYC3*, *HbMYC4* and *HbMYC5* were highly expressed in latex. *HbMYB1*, *HbMYB2*, *HbMYC1*, *HbMYC4* and *HbMYC5* were successfully cloned from the latex of rubber trees. Through yeast one-hybrid assays, it was discovered that *HbMYC5* could bind to the promoter regions of 1–1000 bp and 1501–1971 bp upstream of the start codon of *HbCPT7*. The results would provide a new insight into the molecular mechanism of *HbCPT7* in regulating natural rubber biosynthesis.

收稿日期 2024-12-27; 接受日期 2025-02-24

基金项目 国家自然科学基金青年基金项目 (No. 32101543); 海南省自然科学基金高层次人才项目 (No. 321RC1024)。

作者简介 周苗苗 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 作物遗传育种。*通信作者 (Corresponding author): 曹杰 (CAO Jie), E-mail: caojie@hainanu.edu.cn。

Keywords: rubber tree; *HbCPT7*; HbMYC; HbMYB

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.06.002

天然橡胶(顺式-1,4-聚异戊二烯)是重要的工业原料,也是不可或缺的战略资源,主要来自巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*),因其具有优越的化学和物理特性,如良好的弹性、绝缘性、较强的抗撕裂、耐摩擦以及抗冲击等性能,广泛应用于国防军工、交通运输、机械制造以及医疗卫生等领域^[1-3]。目前市场上以天然橡胶为原料的产品多达4万余种^[4],特别在军用航空轮胎中,天然橡胶是不可替代的原材料。

天然橡胶的生物合成主要由4个阶段组成:合成异戊烯基焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP)及其同分异构体(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)、缩合IPP/DMAPP形成线性的类异戊二烯(geranyl diphosphate, GPP; farnesyl diphosphate, FPP; geranylgeranyl diphosphate, GGPP)、进一步缩合IPP/DMAPP和线性的类异戊二烯形成聚异戊二烯链、修饰聚异戊二烯链^[5]。IPP主要通过植物细胞质中的甲羟基戊酸途径(mevalonic acid, MVA)合成,异戊烯基焦磷酸异构酶(isopentenyl diphosphate isomerase, IPPI)催化IPP形成DMAPP,二者在香叶基二磷酸合酶(diphosphate synthase, GPS)、法尼基焦磷酸合酶(farnesyl diphosphate synthase, FPS)和香叶基香叶基焦磷酸合酶(geranylgeranyl pyrophosphate synthase, GGPS)的催化下产生天然橡胶的起始底物,即香叶基焦磷酸(GPP)、法尼基焦磷酸(FPP)和香叶基香叶基焦磷酸(GGPP)^[5]。橡胶粒子是天然橡胶合成和储存的场所,其表面的顺式异戊烯基转移酶(*cis*-prenyltransferase, CPT)具有橡胶转移酶的催化活性,能聚合IPP/DMAPP和GPP、FPP或GGPP形成天然橡胶的基本骨架,即顺式-1,4-聚异戊二烯^[6-8]。研究发现,*Hevea brasiliensis* *CPT7* (*HbCPT7*)和*CPT8* (*HbCPT8*)在胶乳中特异高表达^[9],*HbCPT7*受割胶诱导表达^[10],*HbCPT8*的表达水平与天然橡胶产量显著正相关^[11],说明*HbCPT7*和*HbCPT8*与天然橡胶的生物合成密切相关。

AOKI等^[12]分析了*HRT1* (*HbCPT8*)的启动子区,发现其启动子区含有MYB和bZIP转录因子的结合位点,推测该基因的表达水平可能受转录因子的调控。WANG等^[13]发现转录因子

HbIMYB19和HbIMYB44在橡胶树乳管中高丰度表达,并能够在酵母和烟草中激活*HbCPT8*的表达,认为HbIMYB19和HbIMYB44可能是调控*HbCPT8*乳管特异表达的重要因子。然而,调控*HbCPT7*乳管特异表达的转录因子尚未鉴定。

MYB是真核生物中一类高度保守的转录因子超家族,通过MYB保守结构域结合下游基因的启动子区来调控基因的表达水平^[14]。MYB保守结构域含有1~4个由52个氨基酸组成的重复序列(R),每一个R形成3个 α 螺旋,调控MYB转录因子与顺式作用元件的识别^[14]。根据R的数目,MYB转录因子可分为R2R3、1R、R1R2R3和4R四种类型^[14]。MYC亦是真核生物中一类高度保守的转录因子家族,其氮端和碳端分别含有1个HLH-MYC_N和bHLH(basic helix-loop-helix)保守结构域^[10]。本研究通过分析*HbCPT7*启动子序列的顺式作用元件,发现含有MYB和MYC转录因子的结合位点。为鉴定调控*HbCPT7*的MYB和MYC转录因子,利用生物信息学分析,从橡胶树基因组中分别鉴定到226个HbMYBs和19个HbMYCs转录因子,其中*HbMYB1*、*HbMYB2*、*HbMYC1*、*HbMYC2*、*HbMYC3*、*HbMYC4*和*HbMYC5*在胶乳中特异表达;成功克隆了*HbMYB1*、*HbMYB2*、*HbMYC1*、*HbMYC4*和*HbMYC5*,并采用酵母单杂交的方法证实HbMYC5能够结合*HbCPT7*起始密码子上游1~1000 bp和1501~1971 bp的启动子区域。本研究结果为解析*HbCPT7*调控天然橡胶生物合成的分子机制提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 *HbCPT7* 基因启动子克隆和顺式作用元件预测

采用CTAB法提取橡胶树叶片的DNA并以其为模板,参考热研7-33-97基因组中*CPT7*的序列设计特异性引物(表1),在PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase(R010Q)DNA聚合酶的作用下克隆*HbCPT7*的启动子序列。将克隆的目的基因片段送至海南楠山生物技术有限公司进行Sanger测序,测序正确的片段即为*HbCPT7*的启动子序列。利用PlantCARE(<https://bioinformatics.psb>.)

表 1 基因克隆和载体构建的引物
Tab. 1 Primers for gene cloning and vector construction

引物名称 Primer name	引物序列 (5'–3') Primer sequence (5'–3')	功能 Function
pHbCPT7-L3	GAGTATAAATAAAAGTGCAATGTTTCGT	<i>HbCPT7</i> 启动子区的克隆
pHbCPT7-R1	TTTCCTTAAACCCAAATCCC	
pHbCPT7-1-500-L	AATTCGAGCTCGGTACCCGGGAGAAATTAAGTCTATAC	
pHbCPT7-1-500-R	AGCACATGCCTCGAGGTCGACTTTCCTTAAACCCAAATCC	
pHbCPT7-501-1000-L	AATTCGAGCTCGGTACCCGGGTGTAATAATAAAAAAT	
pHbCPT7-501-1000-R	AGCACATGCCTCGAGGTCGACAATAAATATGATATAAATG	
pHbCPT7-1001-1500-L	AATTCGAGCTCGGTACCCGGGTGACATGGTATCACCGTTTC	
pHbCPT7-1001-1500-R	AGCACATGCCTCGAGGTCGACTGAAAGTGAAGTTATTT	
pHbCPT7-1501-1971-L	AATTCGAGCTCGGTACCCGGGGAGTATAATAAAGTGCAA	
pHbCPT7-1501-1971-R	AGCACATGCCTCGAGGTCGACGCATCTTATATGGAATGAC	<i>HbMYB1</i> 的克隆
B1-HbMYB1-F	ATGGCTGGCACGTGCACC	
B1-HbMYB1-R	TCAAGCAACACTGATGATGCCA	
B1-HbMYB2-F	ATGACTAGGCGGTGCTCGC	<i>HbMYB2</i> 的克隆
B1-HbMYB2-R	TTAAACTGCATGGATTGGACTACTG	
C1-HbMYC1-F	ATGCAGAAGATATCAATGGACGAG	<i>HbMYC1</i> 的克隆
C1-HbMYC1-R	TTAGTTCTGCATTCTTTGAAGAATGG	
C4-HbMYC4-F	ATGGAGGAGATAACGTCCCAATG	<i>HbMYC4</i> 的克隆
C4-HbMYC4-R	TTAGTTTTGCATTCTTTGAAGAATAGC	
C5-HbMYC5-F	ATGGAGGAGATAACGTCCCA	<i>HbMYC5</i> 的克隆
C5-HbMYC5-R	TCATAGGCTAGCAGCTAAGTTCTGC	
AD-HbMYB1-F	CATATGGCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGCTGGCACGTG	<i>HbMYB1</i> 的载体构建
AD-HbMYB1-L	CAGCTCGAGCTCGATGGATCCTCAAGCAACACTGATGATGC	
AD-HbMYB2-F	GCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGACTAGGCGGTGCTCGCA	<i>HbMYB2</i> 的载体构建
AD-HbMYB2-L	CAGCTCGAGCTCGATGGATCCTTAAACTGCATGGATTGGAC	
AD-HbMYC1-F	CATATGGCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGCAGAAGATATC	<i>HbMYC1</i> 的载体构建
AD-HbMYC1-L	GAGCTCGATGGATCCTTAGTTCTGCATTCTTTGAAGAATGG	
AD-HbMYC4-F	CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGAGGAGATAACGTCCCAA	<i>HbMYC4</i> 的载体构建
AD-HbMYC4-L	ATCTGCAGCTCGAGCTCGATGGATCCTTAGTTTTGCATTCT	
AD-HbMYC5-F	GCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGAGGAGATAACGTCCCC	<i>HbMYC5</i> 的载体构建
AD-HbMYC5-L	CAGCTCGAGCTCGATGGATCCTCATAGGCTAGCAGCTAAGT	

ugent.be/webtools/plantcare/html/) 在线软件预测其顺式作用元件。

1.2 橡胶树胶乳高表达 *HbMYB* 和 *HbMYC* 基因的鉴定和克隆

橡胶树 MYB 转录因子鉴定：分别以拟南芥 R2R3 型 MYB 转录因子 AtMYB3 (At1g22640)、3R 型 MYB 转录因子 AtMYB3R3 (At3g09370.3)、4R 型 MYB 转录因子 ATMYB4R1 (At3g18100) 以及 MYB-related 蛋白中 CCA1-like 亚类的 LATE ELONGATED HYPOCOTYL (At1g01060)、CPC-like 亚类的 AtMYB-like 2 (At1g71030.1)、I-box-binding-like 亚类的 AtRL6 (At1g75250) 和

R-R-type 亚类的 AtMYBL (At1g49010) 的氨基酸序列为 query 序列^[15]，利用 TBtools 软件，采用 BLASTp 的序列比对方法，从热研 7-33-97 的基因组数据库中检索同源序列 ($p\text{-value} < E^{-20}$)^[16]。橡胶树 MYC 转录因子鉴定：以拟南芥 MYC 转录因子 AtMYC2 (At1g32640.1) 的氨基酸序列为 query 序列，利用 TBtools 软件，采用 BLASTp 的序列比对方法，从热研 7-33-97 的基因组数据库中检索同源序列。At1g22640、At3g09370.3、At3g18100、At1g01060、At1g71030.1、At1g75250、At1g49010 和 At1g32640.1 的氨基酸序列下载自 Tair ([https:// www.arabidopsis.org/](https://www.arabidopsis.org/))。利用课题组

已发表的热研 7-33-97 的转录组数据^[9]和 TBtools 软件分析 *HbMYBs* 和 *HbMYCs* 的表达水平。利用 NCBI-Conserved domain database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/domains-Structures/>) 在线工具分析 *HbMYBs* 和 *HbMYCs* 的保守结构域。使用 TRIzol (ThermoFisher) 试剂提取橡胶树胶乳的 RNA, 取 1 μg 总 RNA, 在 Hiscript 1 st Strand cDNA Synthesis kit (+gDNA wiper) (R312) 试剂盒的作用下获得胶乳 cDNA, 并以其为模板, 设计特异性引物(表 1), 利用 PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase(R010Q) DNA 聚合酶扩增 *HbMYB1*、*HbMYB2*、*HbMYC1*、*HbMYC4* 和 *HbMYC5* 的编码序列(coding sequence, CDS)。

1.3 酵母诱饵菌株的自激活检测

利用限制性内切酶 *Sma* I 和 *Sal* I 线性化 pAbAi 载体, 利用同源重组引物(表 1)扩增 *HbCPT7* 启动子目标片段, 采用 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit (C115-02, Vazyme) 试剂盒构建 pAbAi-p*HbCPT7*-1-500、pAbAi-p*HbCPT7*-501-1000、pAbAi-p*HbCPT7*-1001-1500、pAbAi-p*HbCPT7*-1501-1971 载体。利用限制性内切酶 *Bbs* I 线性化 pAbAi (空载体)、p53-AbAi (阳性对照)、重组载体 pAbAi-p*HbCPT7*-1-500、pAbAi-p*HbCPT7*-501-1000、pAbAi-p*HbCPT7*-1001-1500 和 pAbAi-p*HbCPT7*-1501-1971 的质粒, 具体操作参照 TaKaRa Bio 公司的 Matchmaker[®] GoldYeast One-Hybrid Library Screening System User Manual 说明书手册, 随后转化 Y1H 酵母感受态细胞。取 100 μL 转化后的酵母菌液涂布于 SD/-Ura 平板上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 暗培养 3~5 d, 直至长出菌斑。取适量酵母菌斑, 加入配置好的酵母破壁酶 (25 μL 酵母破壁酶, 470 μL 山梨醇缓冲液, 5 μL 巯基还原剂), 30 $^{\circ}\text{C}$ 处理 1~2 h。以处理后的菌液为模板进行 PCR, 参考酵母基因组 DNA 提取试剂盒 (DP307) 说明书操作, 进而检测启动子片段是否整合至酵母基因组中。分别配制含有 0、100、200、300、400、500、700、800 ng/mL 金担子素 (aureobasidin A, AbA) 的 SD/-Ura 培养基。每个载体选取 1 个阳性克隆进行活化, 将活化后的菌液 ($\text{OD}_{600}=0.2$) 分别稀释 10、100、1000 倍。分别取 5 μL 稀释后的菌液滴至含有不同浓度 AbA 的 SD/-Ura 平板上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 暗培养 3~5 d, 观察长斑情况。

1.4 酵母单杂交实验

从橡胶树胶乳的 cDNA 中克隆 *HbMYB1*、*HbMYB2*、*HbMYC1*、*HbMYC4* 和 *HbMYC5* 目的基因片段, 使用带酶切位点的引物扩增插入的目的基因片段, 酶切载体(载体为 pGADT7, 使用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 进行双酶切)后, 利用 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit (C115-01) 同源重组酶连接插入片段和酶切后的载体, 产物转入 DH5 α 感受态细胞。一端使用载体引物, 另一端使用插入片段引物对产物进行 PCR 检测, 筛选阳性克隆送至海南楠山生物技术有限公司进行 Sanger 测序, 选取序列正确的阳性单克隆摇菌, 提取重组质粒 AD-*HbMYB1*、AD-*HbMYB2*、AD-*HbMYC1*、AD-*HbMYC4* 和 AD-*HbMYC5*, 同时, 提取载体 pGADT7 的质粒, 具体操作参照 TaKaRa Bio 公司的 Matchmaker[®] GoldYeast One-Hybrid Library Screening System User Manual 手册。将 pAbAi-p*HbCPT7*-1-500、pAbAi-p*HbCPT7*-501-1000、pAbAi-p*HbCPT7*-1501-1971 分别转化至酵母菌株中, 将转化后的酵母菌液点板至 SD/-Leu 和 SD/-Leu/AbA (500 ng/mL) 的平板上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 暗培养 3~5 d, 观察长斑情况。

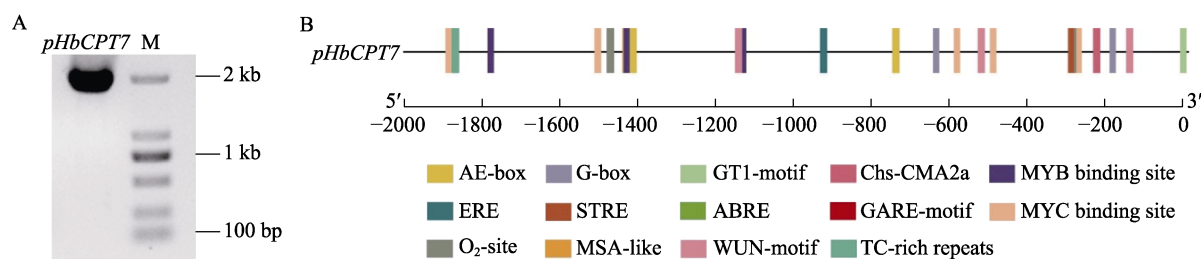
2 结果与分析

2.1 *HbCPT7* 启动子序列克隆和顺式作用元件分析

以橡胶树叶片 DNA 为模板, 扩增出 *HbCPT7* 基因起始密码子上游 1971 bp 的启动子区(图 1A)。使用 PlantCARE 软件预测该区域的顺式作用元件发现, 123 个核心顺式作用元件(TATA-box 和 CAAT-box)、6 个光响应元件(AE-box、chs-CMA2a、G-box、GT1-motif)、2 个蛋白质代谢调控元件(O2-site)、1 个细胞周期调节相关元件(MSA-like)、6 个激素响应相关元件(GARE-motif、STRE、ABRE、ERE)、4 个胁迫相关响应元件(TC-rich、WUN-motif)、12 个 MYB 结合位点和 5 个 MYC 结合位点(图 1B)。

2.2 橡胶树胶乳高表达 *HbMYBs* 基因的鉴定

从热研 7-33-97 的基因组数据库中检索到 258 条含有 MYB 保守结构域的序列, 去除重复的和氨基酸数目小于 100 的序列, 共得 228 个预测蛋白。通过保守结构域分析, 发现 226 个预测蛋白均具有 MYB 转录因子的保守结构域, 将上述蛋白命名为 *HbMYB1*~*HbMYB226*。



A: *HbCPT7* 启动子序列的克隆, M: DL2000 DNA marker; B: *HbCPT7* 启动子序列的顺式作用元件分析。
A: Cloning of *HbCPT7* promoter sequence, M: DL2000 DNA marker; B: *Cis*-elements analysis of *HbCPT7* promoter sequence.

图 1 *HbCPT7* 启动子序列的克隆和顺式作用元件分析

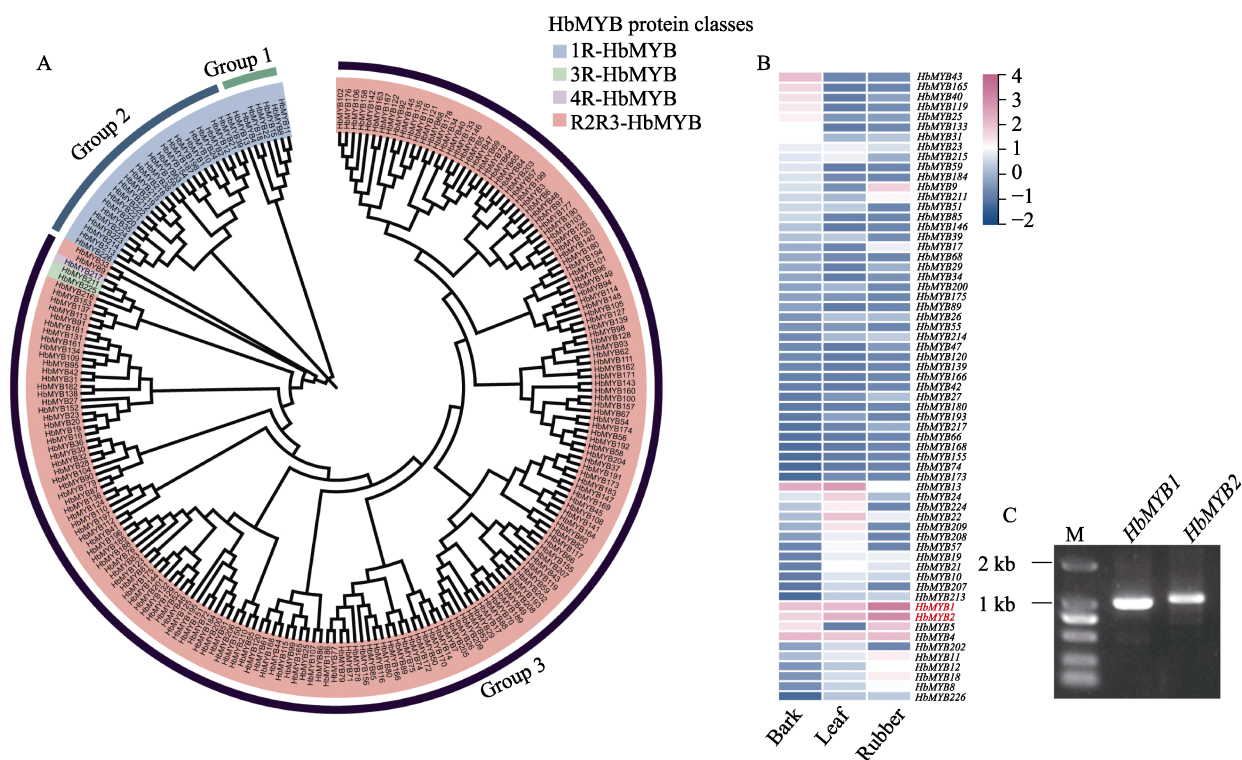
Fig. 1 Cloning and *cis*-acting element analysis of *HbCPT7* promoter sequence

对 226 个 *HbMYB* 蛋白进行进化分析,发现橡胶树 *MYB* 转录因子可分为 3 个亚家族,其中 Group 1 和 Group 2 中的 *MYB* 转录因子属于 1R 类型,除 *HbMYB211* 和 *HbMYB225* 为 R1R2R3 型 *MYB* 以及 *HbMYB217* 为 4R 型 *MYB* 外,其余 Group 3 的 *HbMYBs* 均是 R2R3 型的 *MYB* 转录因子(图 2A)。利用热研 7-33-97 树皮、叶片和胶乳的转录组数据^[9],分析 226 个 *HbMYB* 基因的表达水平,发现 163 个 *HbMYB* 基因在 3 个组织中的 FPKM 值均小于 5。分析其余基因的表达量,发现 *HbMYB1* (EVM0021518.1) 和 *HbMYB2*

(EVM0023669.1) 在胶乳中高表达(图 2B)。从橡胶树胶乳的 cDNA 中成功克隆了 *HbMYB1* 和 *HbMYB2* 的编码序列,长度分别为 995、1058 bp,与基因组注释的编码序列一致(图 2C)。

2.3 橡胶树胶乳高表达 *HbMYCs* 基因的鉴定

从热研 7-33-97 的基因组数据库中检索到 19 条编码 *MYC* 蛋白的序列,通过保守结构域分析,发现上述序列均含有 bHLH-MYC_N 和 bHLH 两个保守结构域,将其分别命名为 *HbMYC1*-*HbMYC19*(图 3A)。对 *HbMYCs* 的氨基酸序列进行进化分析,发现 *HbMYC* 转录因子家族可分

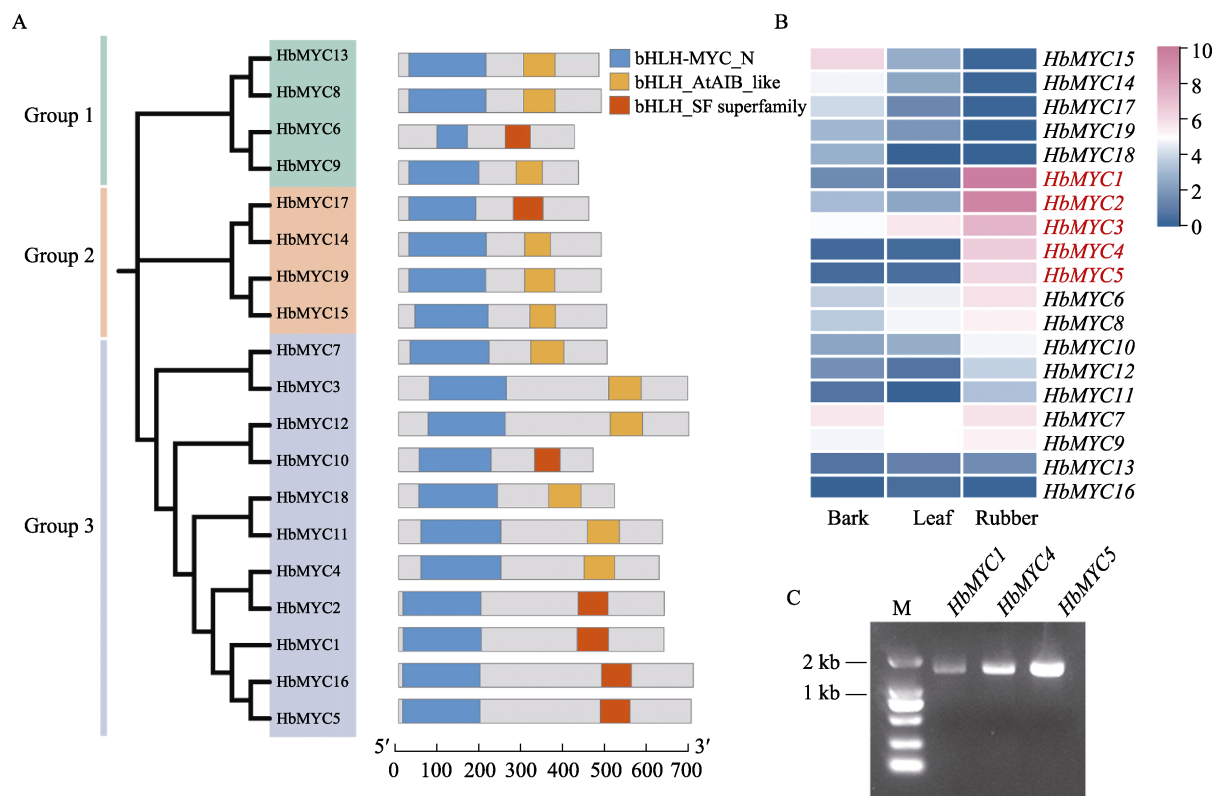


A: *HbMYBs* 的进化树分析; B: *HbMYBs* 的表达模式分析; C: *HbMYB1* 和 *HbMYB2* 基因克隆, M: DL2000 DNA marker。

A: Phylogenetic analysis of *HbMYBs*; B: Expression pattern analysis of *HbMYBs*; C: Cloning of *HbMYB1* and *HbMYB2*, M: DL2000 DNA marker.

图 2 胶乳高表达 *HbMYBs* 基因的鉴定和克隆

Fig. 2 Identification and cloning of *HbMYBs* gene with high expression in latex



A: *HbMYCs* 的进化树和 motif 分析; B: *HbMYCs* 的表达模式分析; C: *HbMYC1*、*HbMYC4* 和 *HbMYC5* 的克隆, M: DL2000 DNA marker。

A: Phylogenetic and motif analysis of *HbMYCs*; B: Expression pattern analysis of *HbMYCs*; C: Cloning of *HbMYC1*, *HbMYC4* and *HbMYC5*, M: DL2000 DNA marker.

图 3 胶乳高表达 *HbMYCs* 基因的鉴定和克隆

Fig. 3 Identification and cloning of *HbMYCs* gene with high expression in latex

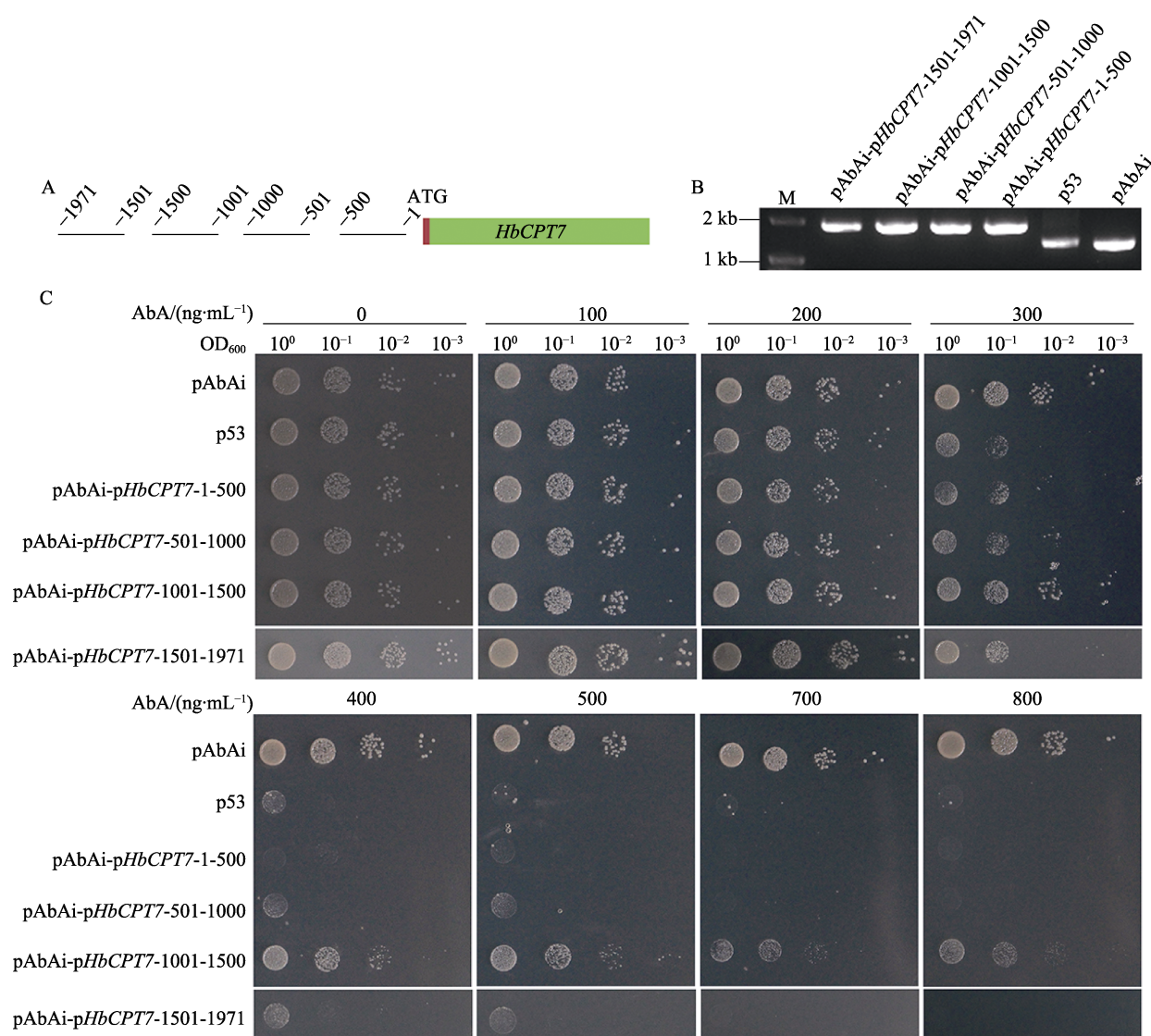
为 3 个亚家族。利用热研 7-33-97 树皮、叶片和胶乳的转录组数据^[9]分析 *HbMYCs* 基因的表达模式,结果发现,*HbMYC1* (EVM0032728.1)、*HbMYC2* (EVM0015982.1)、*HbMYC3* (EVM0021390.1)、*HbMYC4* (EVM0029927.1) 及 *HbMYC5* (EVM0033326.1) 在胶乳中特异性高表达(图 3B)。随后,从橡胶树胶乳中成功克隆得到 *HbMYC1*、*HbMYC4* 和 *HbMYC5* 的编码序列,长度分别为 1280、1314、1469 bp,均与基因组注释的编码序列长度一致(图 3C)。

2.4 检测诱饵菌株的自激活活性

为了鉴定调控 *HbCPT7* 胶乳特异表达的 *HbMYBs* 和 *HbMYCs* 转录因子,将克隆得到的 *HbCPT7* 的启动子序列分为 4 部分,即 *pHbCPT7*-1-500、*pHbCPT7*-501-1000、*pHbCPT7*-1001-1500 和 *pHbCPT7*-1501-1971(图 4A),分别构建至 *pAbAi* 载体,获得诱饵载体 *pAbAi-pHbCPT7*-1-500、*pAbAi-pHbCPT7*-501-1000、*pAbAi-pHbCPT7*-1001-1500、*pAbAi-pHbCPT7*-1501-1971。使用限

制性内切酶 *Bbs* I 线性化诱饵载体、阳性对照(*p53*-*AbAi*)以及空载体(*pAbAi*)并转化 *Y1H* 酵母感受态细胞。取 SD/-Ura 平板上的菌斑加入配置好的酵母破壁酶,30℃处理 1~2 h,以处理后的菌液为模板进行 PCR,提取转化后的酵母菌液,利用酵母基因组 DNA 提取试剂盒检测启动子片段是否整合至酵母基因组上,结果如图 4B 所示,目的片段均整合至诱饵菌株的基因组上。

将诱饵菌液($OD_{600}=0.2$)分别稀释 10、100、1000 倍,涂布至含有 0、100、200、300、400、500、700 和 800 ng/mL *AbA* 的 SD/-Ura 的培养基上,检测诱饵菌株的自激活活性。30℃暗培养 3 d 后发现,*pAbAi-pHbCPT7*-1-500、*pAbAi-pHbCPT7*-501-1000 和 *pAbAi-pHbCPT7*-1501-1971 在含有 400 ng/mL *AbA* 的 SD/-Ura 培养基上不生长,说明 400 ng/mL 的 *AbA* 能够抑制 *pAbAi-pHbCPT7*-1-500、*pAbAi-pHbCPT7*-501-1000 和 *pAbAi-pHbCPT7*-1501-1971 的自激活活性(图 4C),*pAbAi-pHbCPT7*-1001-1500 在 *AbA* 浓度为 100、



A: *HbCPT7* 启动子序列的分段; B: 诱饵菌株的 PCR 检测, M: DL2000 DNA marker; C: 检测诱饵菌株的自激活活性。
A: Segmentation of *HbCPT7* promoter sequence; B: PCR detection of the bait vectors, M: DL2000 DNA marker; C: The self-activation activity of the decoy strains was detected.

图 4 诱饵菌株自激活活性的检测

Fig. 4 Self-activation analysis of bait strains

200、300、400、500、700、800 ng/L 的培养基上均能生长,说明上述不同浓度梯度的 AbA 均不能抑制 pAbAi-pHbCPT7-1001-1500 的自激活活性。

2.5 诱饵菌株与 prey 载体的互作验证

利用同源重组技术将 *HbMYB1*、*HbMYB2*、*HbMYC1*、*HbMYC4* 和 *HbMYC5* 构建至载体 pGADT7 上获得 prey 载体,即 AD-HbMYB1、AD-HbMYB2、AD-HbMYC1、AD-HbMYC4 和 AD-HbMYC5。采用酵母单杂交的方法检测诱饵菌株 pAbAi-pHbCPT7-1-500、pAbAi-pHbCPT7-501-1000 和 pAbAi-pHbCPT7-1501-1971 是否与 prey 载体互作。如图 5 所示,AD-HbMYC5 与

pAbAi-pHbCPT7-1-500、pAbAi-pHbCPT7-501-1000、pAbAi-pHbCPT7-1501-1971 的组合均能在含有 500 ng/mL AbA 的 SD/-Ura 平板上长出菌斑,说明 HbMYC5 能够结合 *HbCPT7* 起始密码子上游的 1~1000 bp 和 1501~1971 bp 的启动子区域。

3 讨论

本研究从热研 7-33-97 中鉴定到 226 个 HbMYBs 和 19 个 HbMYCs 转录因子,利用热研 7-33-97 树皮、叶片和胶乳的转录组数据分析上述基因的表达模式,发现 *HbMYB1*、*HbMYB2*、*HbMYC1*、*HbMYC2*、*HbMYC3*、*HbMYC4* 及

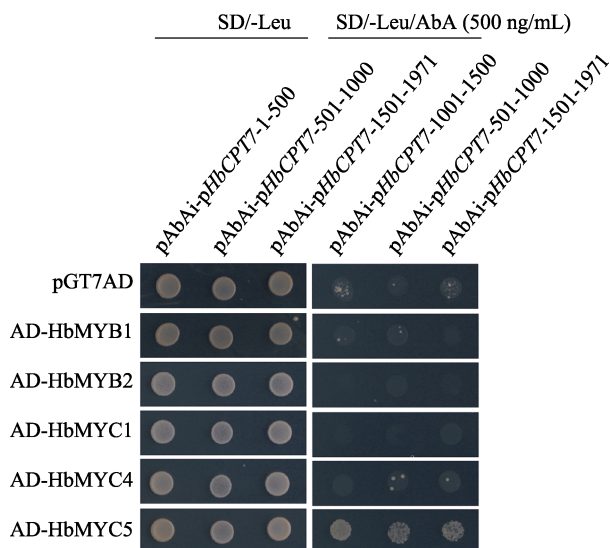


图 5 诱饵菌株与 prey 载体的酵母单杂交检测

Fig. 5 Detection of yeast single hybridization between bait strain and prey vector

HbMYC5 在胶乳中高丰度表达。与已发表的结果相比, *HbMYB1*、*HbMYB2* 与 *HbMYC1*、*HbMYC4* 分别是橡胶树中新鉴定的 MYB 和 MYC 类转录因子。此外, *HbMYC2* (*HblMYC2*)、*HbMYC3* (*HblMYC6*) 和 *HbMYC5* (*HblMYC3*) 的表达模式与 ZHANG 等^[10]报道的结果一致。

天然橡胶存在于橡胶树韧皮部的乳管细胞中, 通过割开树皮 (割胶) 来收集胶乳。已有研究报道, 开割树中的茉莉酸含量显著高于未开割树的, 说明割胶促进内源茉莉酸含量的积累。DENG 等^[17]发现 *HbCPT7* 在开割树中的表达水平显著高于未开割树, 并且 *HbCPT7* 在茉莉酸处理后显著上调表达, 表明 *HbCPT7* 响应茉莉酸信号, 也说明 *HbCPT7* 在胶乳中特异高表达可能是由于茉莉酸的诱导。MYC 转录因子可以与 E3 泛素连接酶 CORONATINE INSENSITIVE1 (COI1)、茉莉酸 ZIM 结构域抑制因子 Jasmonate-ZIM (JAZ) 形成 COI1/JAZ/MYC 复合体, 参与茉莉酸信号途径。当植物体内的茉莉酸积累时, 茉莉酸活性物质 (JA-Ile) 结合 JAZ-COI1 复合体使 JAZ 被泛素化和解离, 进而被 26S 蛋白酶体降解, 最终释放出 MYC, 随后 MYC 在转录水平调控响应茉莉酸信号的基因, 因此 MYC 是调节茉莉酸信号的重要蛋白^[16]。ZHANG 等^[10]用茉莉酸替代物 (冠菌素, Coronatine) 处理橡胶树 0.5~4 h^[18-20], 显著提高了形成层中 *HblMYC3* (*HbMYC5*) 的表达水平, 说明 *HblMYC3* (*HbMYC5*) 能够响应茉莉酸

信号^[10]。本研究发现 *HbMYC5* 在酵母中能够与 *HbCPT7* 的启动子序列结合, 进而推测橡胶树割胶后, 内源茉莉酸可能通过诱导 *HbMYC5* 的表达调控胶乳中 *HbCPT7* 的表达水平。此外, *HbMYC2*^[18]和 *HbMYC2b*^[21]分别显著促进 *HbFPS* 和小橡胶粒子基因 (*Hevea brasiliensis small rubber particle protein*, *HbSRPP*) 的表达, 其中 *HbSRPP* 是胶乳中丰度最高的蛋白, 在抑制胶乳凝固及维持橡胶粒子的稳定性等方面发挥重要作用, 进一步说明 MYC 是调控橡胶树产胶相关基因表达的重要转录因子。

AOKI 等^[12]分析了橡胶树乳管特异表达基因 *HbREF1*、*HbSRPP1* 和 *HRT1* (*HbCPT8*) 的启动子区, 发现启动子区含有 MYB 和 bZIP 转录因子的结合位点, 推测上述基因的表达水平可能受 MYB 转录因子的调控。*HbWRKY1*、*HbWRKY3*、*HbWRKY14*、*HbWRKY55*、*HblMYB19*、*HblMYB44*、*HbMYC2b* 以及 *HbMADS4* 等转录因子均能与 *HbSRPP1* 的启动子序列结合, 促进或抑制 *HbSRPP1* 的表达, 表明上述转录因子协同调控 *HbSRPP* 在胶乳中高丰度表达^[8]。本研究利用酵母单杂交的方法, 未发现 *HbMYB1*、*HbMYB2* 与 *HbCPT7* 启动子直接结合, 表明在天然橡胶的合成过程中 *HbMYB1* 和 *HbMYB2* 可能不参与调控 *HbCPT7* 的表达。综上所述, 本研究克隆分析了 *HbCPT7* 的启动子序列, 鉴定了在橡胶树胶乳中高丰度表达的 MYB 和 MYC 类转录因子, 并发现 *HbMYC5* 能与 *HbCPT7* 的启动子序列结合, 研究结果为解析 *HbCPT7* 调控天然橡胶合成的分子机理提供新的思路。

参考文献

- [1] METCALFE C R. Distribution of latex in the plant kingdom[J]. Economic Botany, 1967, 21: 115-127.
- [2] CORNISH K. Biochemistry of natural rubber, a vital raw material, emphasizing biosynthetic rate, molecular weight and compartmentalization, in evolutionarily divergent plant species[J]. Natural Product Reports, 2001, 18(2): 182-189.
- [3] CORNISH K. Similarities and differences in rubber biochemistry among plant species[J]. Phytochemistry, 2001, 57(7): 1123-1134.
- [4] LIU J P, XIA Z Q, TIAN X Y, LI Y J. Transcriptome sequencing and analysis of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell.) to discover putative genes associated with tapping

- panel dryness (TPD)[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 398.
- [5] TAN Y C, CAO J, TANG C R, LIU K Y. Advances in genome sequencing and natural rubber biosynthesis in rubber-producing plants[J]. Current Issues in Molecular Biology, 2023, 45(12): 9342-9353.
- [6] ENG A H, KAWAHARA S, TANAKA Y. Trans-isoprene units in natural rubber[J]. Rubber Chemistry and Technology, 1994, 67(1): 159-168.
- [7] TANAKA Y, KAWAHARA S, AIK-HWEE E, SHIBA K, OHYA N. Initiation of biosynthesis in *cis*-polyisoprenes[J]. Phytochemistry, 1995, 39(4): 779-784.
- [8] TAKAHASHI S J, KOYAMA T. Structure and function of *cis*-prenyl chain elongating enzymes[J]. The Chemical Record, 2006, 6(4): 194-205.
- [9] TANG C R, YANG M, FANG Y J, LUO Y F, GAO S H, XIAO X H, AN Z W, ZHOU B H, ZHANG B, TAN X Y, YEANG H Y H, QIN Y X, YANG J H, LIN Q, MEI H L, MONTORO P, LONG X Y, QI J Y, HUA Y W, HE Z L, SUN M, LI W G, ZENG X, CHENG H, LIU Y, YANG J, TIAN W M, ZHUANG N S, ZENG R Z, LI D G, HE P, LI Z, ZOU Z, LI S L, LI C G, WANG J X, WEI D, LAI C Q, LUO W, YU J, HU S N, HUANG H S. The rubber tree genome reveals new insights into rubber production and species adaptation[J]. Nature Plants, 2016, 2(6): 1-10.
- [10] ZHANG S X, WU S H, CHAO J Q, YANG S G, BAO J, TIAN W M. Genome-wide identification and expression analysis of MYC transcription factor family genes in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)[J]. Forests, 2022, 13(4): 531.
- [11] 杨曙光, 陈月昇, 李言, 张世鑫, 张晓飞, 曾霞, 晁金泉, 田维敏. 天然橡胶生物合成相关基因表达与橡胶产量的相关性[J]. 热带作物学报, 2019, 40(3): 475-482.
- YANG S G, CHEN Y Y, LI Y, ZHANG S X, ZHANG X F, ZENG X, CHAO J Q, TIAN W M. Correlation between the expression level of natural rubber biosynthesis genes and rubber yield[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2019, 40(3): 475-482. (in Chinese)
- [12] AOKI Y, TAKAHASHI S, TAKAYAMA D, OGATA Y, SAKURAI N, SUZUKI H, ASAWATRERATANAKUL K, WITITSUWANNAKUL D, WITITSUWANNAKUL R, SHIBATA D, KOYAMA T, NAKAYAMA T. Identification of laticifer-specific genes and their promoter regions from a natural rubber producing plant *Hevea brasiliensis*[J]. Plant Science, 2014, 225: 1-8.
- [13] WANG Y, ZHAN D F, LI H L, GUO D, ZHU J H, PENG S Q. Transcriptome-wide identification and characterization of MYB transcription factor genes in the laticifer cells of *Hevea brasiliensis*[J]. Front Plant Science, 2017, 8: 1974.
- [14] DUBOS C, STRACKE R, GROTEWOLD E, WEISSHAAR B, MARTIN C, LEPINIEC L. MYB transcription factors in *Arabidopsis*[J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(10): 573-581.
- [15] CHEN Y H, YANG X Y, HE K, LIU M H, LI J G, GAO Z F, LIN Z Q, ZHANG Y F, WANG X X, QIU X M, SHEN Y P, ZHANG L, DENG X H, LUO J C, DENG X W, CHEN Z L, GU H Y, QU L J. The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family[J]. Plant Molecular Biology, 2006, 60: 107-124.
- [16] ZHANG S X, WU S H, CHEN Y Y, TIAN W M. Analysis of differentially expressed genes associated with coronatine-induced laticifer differentiation in the rubber tree by subtractive hybridization suppression[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0132070.
- [17] DENG X M, GUO D, YANG S G, SHI M J, CHAO J Q, LI H L, PENG S Q, TIAN W M. Jasmonate signalling in the regulation of rubber biosynthesis in laticifer cells of rubber tree, *Hevea brasiliensis*[J]. Journal of Experimental Botany, 2018, 69(15): 3559-3571.
- [18] CHINI A, FONSECA S, FERNÁNDEZ G, ADIE B, CHICO J M, LORENZO O, GARCÍA-CASADO G, LÓPEZ-VIDRIERO I, LOZANO F M, PONCE MR, MICOL J L, SOLANO R. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling[J]. Nature, 2007, 448(7154): 666-671.
- [19] WU S H, ZHANG S X, CHAO J Q, DENG X M, CHEN Y Y, SHI M J, TIAN W M. Transcriptome analysis of the signalling networks in coronatine-induced secondary laticifer differentiation from vascular cambium in rubber trees[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 36384.
- [20] TIAN W M, YANG S G, SHI M J, ZHANG S X, WU J L. Mechanical wounding-induced laticifer differentiation in rubber tree: an indicative role of dehydration, hydrogen peroxide, and jasmonates[J]. Journal of Plant Physiology, 2015, 182: 95-103.
- [21] GUO D, LI H L, WANG Y, ZHU J H, PENG S Q. A myelocytomatosis transcription factor from *Hevea brasiliensis* positively regulates the expression of the small rubber particle protein gene[J]. Industrial Crops and Production, 2019, 133: 90-97.