

橡胶树 *HbMVD1* 基因启动子克隆及转录调控因子筛选

文连璇^{1,2}, 杨署光¹, 史敏晶¹, 邓小敏^{1,3}, 晁金泉^{1,3*}

1. 中国热带农业科学院橡胶研究所/热带作物生物育种全国重点实验室/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; 2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081; 3. 中国热带农业科学院三亚研究院, 海南三亚 572024

摘要: 转录调控是生命活动的重要调控方式之一。天然橡胶是一种重要的工业原材料, 主要来源于橡胶树。天然橡胶生物合成的转录调控是近年来橡胶树基础研究领域的热点之一。焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶 (MVD) 是天然橡胶生物合成途径的关键酶, 目前对其转录调控尚不清楚。本研究克隆了长度为 1500 bp 的橡胶树 *HbMVD1* 启动子, 序列分析显示其含有茉莉酸响应、乙烯响应、机械伤害响应、光响应、MYC 结合等顺式作用元件。自激活抑制梯度试验显示, AbA 浓度为 100 ng/mL 时, pAbAi-p*HbMVD1* 诱饵载体的转录自激活得到有效抑制。利用酵母单杂交技术从橡胶树胶乳酵母 cDNA 文库共筛选到 13 个与 *HbMVD1* 启动子结合的非冗余蛋白, 包括 1 个 WRKY 转录因子 (HbWRKY1)、1 个热激转录因子、1 个 G-box 结合因子。组织特异性分析显示这些蛋白的编码基因在不同组织间存在不同的表达模式。转录调控分析显示 HbWRKY1 在体内可以激活 *HbMVD1* 基因的表达。分子对接发现, HbWRKY1 与 *HbMVD1* 启动子的机械伤害响应元件结合, 并鉴定到 11 个潜在的氨基酸结合位点。本研究为进一步揭示橡胶树 *HbMVD1* 转录调控网络奠定基础。

关键词: 橡胶树; *HbMVD1* 启动子; 酵母单杂交; 转录因子; 转录调控

中图分类号: S794.1 文献标志码: A

Cloning of the *HbMVD1* Gene Promoter and Screening of Transcription Regulatory Factors in Rubber Tree

WEN Lianxuan^{1,2}, YANG Shuguang¹, SHI Minjing¹, DENG Xiaomin^{1,3}, CHAO Jinquan^{1,3*}

1. Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / National Key Laboratory for Tropical Crop Breeding / Key Laboratory of Biology & Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Haikou, Hainan 571101, China; 2. Graduate School, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100081, China; 3. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572024, China

Abstract: Transcriptional regulation is one of the pivotal mechanisms governing biological activities. Natural rubber (NR), a crucial industrial raw material, is predominantly derived from rubber trees. The transcriptional regulation of NR biosynthesis has emerged as a focal point in the fundamental research of rubber tree in recent years. Mevalonate diphosphate decarboxylase (MVD) is a key enzyme in the biosynthetic pathway of NR, yet its transcriptional regulation remains poorly understood. In this study, a 1500 bp promoter region of the *HbMVD1* gene from rubber tree was cloned. Sequence analysis revealed the presence of various *cis*-acting elements, including the responsive to jasmonic acid, ethylene, mechanical wounding, light, and MYC binding. A gradient assay for autoactivation suppression demonstrated that the transcriptional autoactivation of the pAbAi-p*HbMVD1* bait vector was effectively inhibited at an AbA concentration of 100 ng/mL. 13 non-redundant proteins from a rubber tree latex yeast cDNA library that interact with the *HbMVD1* promoter, including one WRKY transcription factor (HbWRKY1), one heat shock transcription factor, and one G-box binding factor were identified utilizing yeast one-hybrid screening. Tissue-specific expression analysis indicated that the genes encoding the proteins exhibited distinct expression patterns across different tissues. Transcriptional regulation

收稿日期 2025-02-17; 接受日期 2025-04-18

基金项目 海南省重点研发计划项目 (No. ZDYF2022XDNY252); 现代农业产业技术体系建设专项 (No. CARS-33-YZ1)。

作者简介 文连璇 (1999—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 橡胶树产量形成机制。*通信作者 (Corresponding author): 晁金泉 (CHAO Jinquan), E-mail: tianwang208@163.com。

analysis showed that HbWRKY1 activated the expression of *HbMVD1* *in vivo*. Molecular docking revealed that HbWRKY1 bound to the mechanical wounding element of the *HbMVD1* promoter, and 11 potential amino acid binding sites were identified. This study would lay the groundwork for further elucidating the transcriptional regulatory network of *HbMVD1* in rubber tree.

Keywords: rubber tree; *HbMVD1* promoter; yeast one-hybrid library; transcription factor; transcriptional regulation

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.08.001

转录调控是生命活动的重要调控方式之一,是指在转录过程中通过一系列复杂的机制对基因表达进行精细调控^[1]。转录因子是执行转录调控的重要成员。转录因子通过识别并结合到 DNA 上的顺式作用元件,激活或抑制相关基因的转录,进而调节生物体的生长发育、响应各种外界刺激以及自身生理反应等生物学过程^[2]。酵母单杂交技术(yeast one-hybrid method, Y1H)是将顺式作用元件序列和编码转录因子的序列分别构建到含报告基因及激活结构域的表达载体,共转化酵母观察是否启动下游报告基因的表达来确定转录因子是否和顺式作用元件结合^[3]。目前 Y1H 已是筛选鉴定与顺式作用元件结合转录因子的常用技术,被广泛应用于真核生物的转录调控研究。如余婧等^[4]利用 Y1H 从烟草酵母 cDNA 文库中筛选到与 *NtCBT* 基因启动子结合的转录因子 ANL2、ML1 及 NF-YA3; CAO 等^[5]利用 Y1H 从百合酵母 cDNA 文库中筛选到与 *LhMYBSPATTER* 基因启动子结合的转录因子 ERF4 和 MYB4,并利用荧光素酶实验系统证明 MYB4 对 *LhMYBSPATTER* 基因的表达起激活作用而 ERF4 对 *LhMYBSPATTER* 基因的表达起抑制作用。

天然橡胶是一种重要的工业原材料,主要来源于橡胶树。与人工合成橡胶相比,天然橡胶具有良好的绝缘性、耐磨性和抗拉性,被广泛运用于工农业生产、国防建设、交通运输、医药卫生等领域,在国计民生中发挥着不可替代的作用^[6-7]。天然橡胶本质是高分子聚异戊二烯链,分子量可达数百万道尔顿。自然界中存在 2 种主要的异戊二烯焦磷酸(isoprene pyrophosphate, IPP)合成途径:甲羟戊酸(mevalonic acid, MVA)途径和 2-C-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸(2-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP)途径,其中 MVA 途径与橡胶树中的天然橡胶生物合成密切相关。MVA 途径以乙酰辅酶 A 为底物,经过 6 步酶促反应最终形成 IPP。焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶(meva-lonate-5-pyrophosphate decarboxylase, MVD)催化 MVAPP

脱去 1 分子的 CO₂ 和 H₂O 形成 IPP,是 MVA 途径关键酶之一^[8-11]。1971 年 SKILLETER 等^[12]从橡胶树胶乳中成功纯化 MVD 蛋白,并对其酶学活性进行分析,发现其活性与胶乳代谢存在显著正相关。但有关 MVD 的转录调控研究尚无报道。本研究克隆了橡胶树 *HbMVD1* 的启动子,通过筛选胶乳酵母 cDNA 文库,得到 13 个与 *HbMVD1* 启动子结合的蛋白,包括 3 个转录因子。本研究为进一步揭示天然橡胶生物合成的转录调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

橡胶树无性系热研 8-79 定植于中国热带农业科学院儋州基地。橡胶树热研 8-79 胶乳酵母 cDNA 文库为本课题组保存。多糖多酚植物基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;平末端克隆试剂盒(pEASY®-Blunt Cloning Kit)购自北京全式金生物技术股份有限公司;胶回收试剂盒(FastPureGel DNA Extraction Mini Kit)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;同源重组试剂盒(ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;酵母菌株 Y1H Gold、农杆菌 GV3101、大肠杆菌 DH10B 感受态细胞购自上海唯地生物技术有限公司;其他常规试剂及生化试剂均为国产超纯和分析纯。

1.2 方法

1.2.1 橡胶树基因组 DNA 提取 取橡胶树热研 8-79 幼嫩叶片,液氮研磨后根据多糖多酚植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行基因组 DNA 提取,并通过 1%琼脂糖凝胶电泳进行完整度检测。

1.2.2 *HbMVD1* 启动子克隆及顺式作用元件预测 从橡胶树热研 8-79 基因组数据中获取 *HbMVD1* 基因的启动子序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计克隆 *HbMVD1* 启动子的上游引物(*proHbMVD1-F*: TGTAGCATTGATGCAGCTT)和下游引物(*proHbMVD1-R*: TACAGCAAGCAACACAC

CA)。以橡胶树热研 8-79 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应体系为: DNA 模板 1 μ L, 2 $\times$ PrimeSTAR mix 25 μ L, 10 μ mol/L 上、下游引物各 1 μ L, 超纯水 22 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离后, 切胶回收连接至 pEASY-Blunt 克隆载体并转化大肠杆菌 DH10B, 过夜培养后挑选阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证。将测序正确的 *HbMVD1* 启动子 (*proHbMVD1*) 序列提交至 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线网站进行顺式作用元件分析。

1.2.3 pAbAi-pHbMVD1 诱饵载体构建 以测序正确的 pEASY-*proHbMVD1* 质粒为模板, 用携带 pAbAi 载体同源臂的引物 *pHbMVD1*-F (AAGC TTGAATTCGAGCTGTAGCATTGATGCAGCTT) 和 *pHbMVD1*-R (ACAGATCCCCGGGTACCGAT ACAGCAAGCAACACAC) 进行 PCR 扩增并回收目的片段, 通过 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit 同源重组方法将片段构建至 pAbAi 载体获得 pAbAi-*pHbMVD1* 诱饵载体, 并以 *pHbMVD1*-F 端引物和 pAbAi 载体通用 R 端引物 (CCATCTCGAA AAAGGGTTTGCC) 对重组载体进行 PCR 验证。

1.2.4 最低 AbA 浓度测定 将 pAbAi-*pHbMVD1* 诱饵载体和 pAbAi-p53 阳性对照载体线性化, 分别转化酵母 Y1H Gold 感受态细胞并涂布于 SD/-Ura 固体培养基, 30 $^{\circ}$ C 恒温倒置培养 3 d。分别挑选阳性菌落, 经无菌水稀释后涂布到 SD/-Ura、SD/-Ura/AbAi (100 ng/mL)、SD/-Ura/AbAi (150 ng/mL)、SD/-Ura/AbAi (200 ng/mL) 的固体培养基上, 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 3 d, 观察平板上菌落的生长情况。

1.2.5 酵母单杂交 cDNA 文库筛选 从 SD/-Ura 平板上挑取含 pAbAi-*pHbMVD1* 诱饵载体的 Y1H Gold 单菌落, 接种于 5 mL SD/-Ura 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C、250 r/min 振荡培养 16~18 h 至饱和。取 1 mL 过夜培养物转接至 50 mL YPDA 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.5。室温下 1000 $\times$ g 离心 5 min 收集菌体, 用 25 mL 无菌水洗洗涤并重悬于 1 mL 1.1 $\times$ TE/LiAc 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA、100 mmol/L LiAc, pH 7.5)。取 50 μ L 含 pAbAi-*pHbMVD1* 诱饵载体的 Y1H Gold 感受态细胞, 依次加入: 2 μ g 胶乳酵母

cDNA 文库质粒 DNA、10 μ L 鲑精 DNA (10 mg/mL, 预先煮沸 5 min 后冰浴)、500 μ L PEG/LiAc 溶液 (40% PEG4000、100 mmol/L LiAc、10 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA, pH 7.5) 轻柔混匀后于 30 $^{\circ}$ C 水浴孵育 30 min。加入 20 μ L DMSO (终浓度为 7%), 42 $^{\circ}$ C 热激 15 min。室温下 1000 $\times$ g 离心 5 min, 弃上清, 菌体用 1 mL YPDA 重悬。30 $^{\circ}$ C、250 r/min 复苏培养 1 h。将复苏培养物 1000 $\times$ g 离心 5 min, 菌体用 100 μ L 无菌水重悬。取 10 μ L 涂布于 SD/-Ura-Leu/AbA (100 ng/mL) 筛选平板, 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 3~5 d。待阳性克隆菌斑直径达 1~2 mm 时, 挑取单菌落至新鲜 SD/-Ura-Leu/AbA 平板进行二次筛选。以含 pAbAi-p53 与 pGADT53m 的酵母菌株为阳性对照, 含 pAbAi-*pHbMVD1* 与 pGADT53m 的酵母菌株为阴性对照。pGADT53m 载体为课题组保存。

1.2.6 阳性克隆测序 将阳性菌落接种于 SD/-Ura-Leu/AbAi 的液体培养基, 30 $^{\circ}$ C 摇床震荡培养。以 pGADT7 载体测序引物 (F: TAATACGAC TCACTATAGGCG; R: TAAGAGTCACTTTAAAA TTTGTAT) 进行菌液 PCR, 取 5 μ L 的 PCR 产物进行电泳分析, 挑选条带清晰的 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.7 表达谱数据提取 从国家基因组数据中心下载橡胶树形成层、树皮内层、初生胶乳、次生胶乳、雌花、雄花、叶片等 7 个组织的转录组数据, 数据序列号为 PRJCA004986。利用 Tophat 程序, 将所下载数据与橡胶树热研 8-79 基因组序列进行比对, 根据 Cufflink 程序完成基因的相对表达 (FPKM) 值计算。提取目的基因对应的 FPKM 值, 经 log₂ 转换后通过 Genesis 软件进行表达热图绘制。

1.2.8 转录调控分析 以特异引物 0800-F (GG GCGAATTGGGTACCTGTAGCATTGATGCAGCT T) 和 0800-R (AGGAATTCGATATCAAGCTTTAC AGCAAGCAACACACCA) 扩增 pEASY-*proHbMVD1* 质粒, 以特异引物 2300-F (GACAGGGTACCCGGGGATCCATGACTTCCAAAGTTCTC) 和 2300-R (ACCATGGTACTAGTGTCTGACTTAGCT TTGGACAGGCTCTGC) 扩增含 *HbWRKY1* 基因的阳性酵母菌。参照 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit 同源重组试剂盒操作说明书, 将扩增片段分别连入 pGreen II 0800-LUC 载体和 pCAM-BIA2300 载体, 获得 pGreen II 0800-*proHbMVD1*:

LUC 和 pCAMBIA2300-HbWRKY1 重组载体。将测序正确的 pGreen II 0800-*proHbMVD1*-LUC 和 pCAMBIA2300-HbWRKY1 重组载体，以及 pCAMBIA2300 空载体分别转化农杆菌 GV3101 感受态，挑选单菌落于 YEP 液体培养基中过夜培养（30℃，220 r/min）。离心收集菌体并用 YEP 液体培养基重悬，按试验组（pGreen II 0800-*proHbMVD1*-LUC：pCAMBIA2300-HbWRKY1=1：1）和对照组（pGreen II 0800-*proHbMVD1*-LUC：pCAMBIA2300=1：1）进行菌液混合并调整至 OD₆₀₀=0.6，通过注射法注射烟草叶片。注射后的烟草暗培养 48 h 后喷施 D-荧光素钾盐溶液，置于 Princeton 公司的活体植物发光成像系统（型号：LumaZonepylon 2048B）中观察。

1.2.9 互作位点分析 通过 HelixFold3 (<https://paddlehelix.baidu.com/?redirect=console>)在线软件

分析 HbWRKY1 与不同顺式作用元件之间的相互作用，并进一步利用 PyMOL3.1 软件（Schrödinger，美国）展示互作的氨基酸位点。

2 结果与分析

2.1 *HbMVD1* 启动子克隆及顺式作用元件分析

提取橡胶树热研 8-79 基因组 DNA 作为模板，以 *HbMVD1* 启动子引物进行扩增并测序分析，成功获得长度为 1500 bp 的 *HbMVD1* 启动子序列（图 1A）。将序列提交至 PlantCARE 在线网站进行顺式作用元件分析，结果显示，*HbMVD1* 启动子除了常见的 TATA-box 和 CAAT-box 等核心元件外，还含有茉莉酸响应元件（CGTCA-motif）、乙烯响应元件（ERE）、器械伤害响应元件（WUN-motif）、MYC 结合元件（MYC）、光响应元件（Box 4）等（图 1B）。

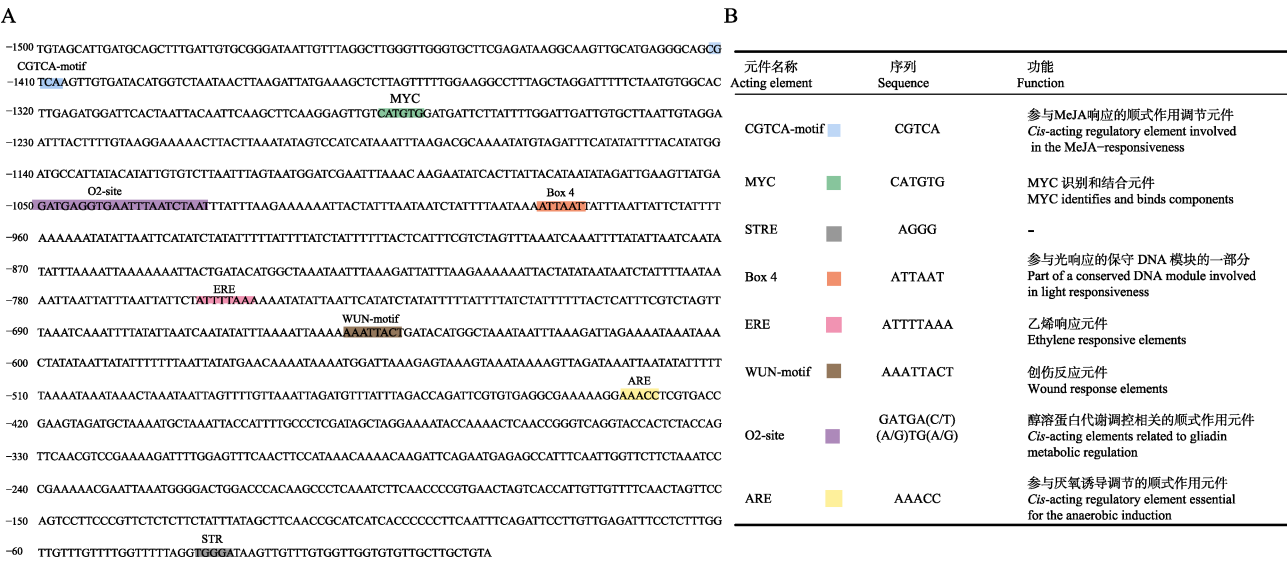


图 1 *HbMVD1* 基因启动子序列 (A) 及顺式作用元件预测 (B)

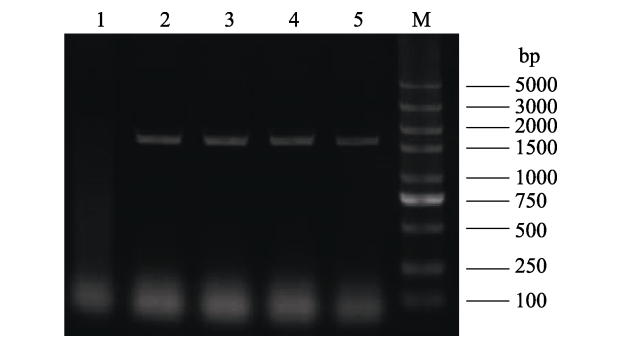
Fig. 1 Promoter sequence of *HbMVD1* gene (A) and *cis*-acting element prediction (B)

2.2 pAbAi-pHbMVD1 诱饵载体构建

通过同源重组方式将 *HbMVD1* 构建至 pAbAi 得到 pAbAi-*pHbMVD1* 诱饵载体，利用 *HbMVD1* 启动子 F 端引物和 pAbAi 载体通用 R 端引物进行 PCR 扩增验证，结果显示可以扩增出 1685 bp 目的片段（1500 bp+185 bp），而以空载体为模板未扩增出目的条带（图 2）。

2.3 AbA 最小抑制浓度确定

取转化 pAbAi-*pHbMVD1* 诱饵载体的 YIH Gold 酵母菌株涂布于不同浓度 AbA 的 SD/-Ura 固体培养基上，以含 p53-AbAi 载体的 YIH Gold



M: DL5000 DNA marker; 1: 空载体; 2~5: 阳性载体。
M: DL5000 DNA marker; 1: Empty vector; 2~5: Positive vector.

图 2 阳性重组酵母菌株鉴定

Fig. 2 Identification of positive recombinant yeast strains

酵母菌株为阳性对照。结果显示，p53-AbAi 阳性对照菌株在 AbA 浓度为 200 ng/mL 时生长被抑制，而 pAbAi-*pHbMVD1* 测试菌株在 AbA 浓度为 100 ng/mL 时生长就被抑制（图 3），因此 AbA 最小浓度为 100 ng/mL。

2.4 酵母单杂交文库筛选

将胶乳 cDNA 文库转化至含有 pAbAi-*pHbMVD1* 的酵母感受态细胞，涂布于多个 SD/-Ura-Leu 筛选平板进行文库筛选（图 4A），并将候选阳性克隆进一步转移至新的 SD/-Ura-Leu 筛选平板培养，最终得到 34 个阳性克隆，编号 P1~P34（图 4B）。

2.5 克隆测序结果分析

将获得的 34 个阳性克隆经菌落 PCR 扩增测序，与 NCBI 数据库 BLAST 比对后共得到 13 个可能与 *HbMVD1* 启动子结合的蛋白，包括注释为磷脂酶（Hb15g055630）、细胞分裂周期因子

（Hb07g037490）、生长素抑制蛋白（Hb04g-047470）、小分子热休克蛋白（Hb04g052040）、蛋白酶抑制剂蛋白（Hb06g002380）、钙调素结合蛋白（Hb07g028960）、磷脂酸磷酸酶（Hb07g032180）、铁硫簇组装酶（Hb07g037260）、F-box 蛋白（Hb12g001190）、橡胶延伸因子（Hb12g002580）等 10 个蛋白。此外，还筛选到 3 个潜在转录因子，分别是 Hb18g010770（WRKY 转录因子）、Hb13g050000（G-box 结合因子）、Hb16g003060（热应激转录因子）（表 1）。

2.6 组织特异性表达分析

利用课题组保存的 7 个橡胶树组织转录组数据，分析 13 个蛋白编码基因的组织特异性（图 5）。结果显示，*Hb15g055630* 和 *Hb07g037260* 在 7 个组织中均高丰度表达，*Hb06g002380* 在 7 个组织中的表达丰度很低甚至不表达，*Hb07g037490* 和 *Hb12g001190* 在胶乳中的表达量远高于其他组

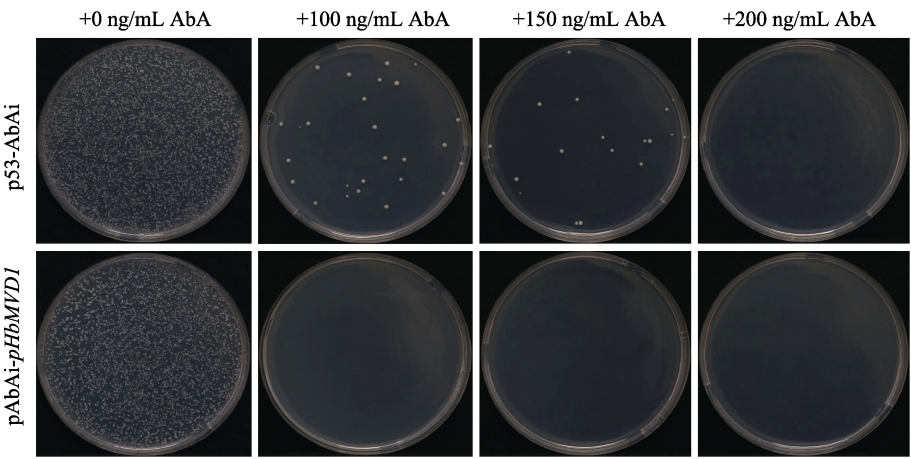


图 3 AbA 抑制浓度测定
Fig. 3 Screening of AbA inhibitory concentration

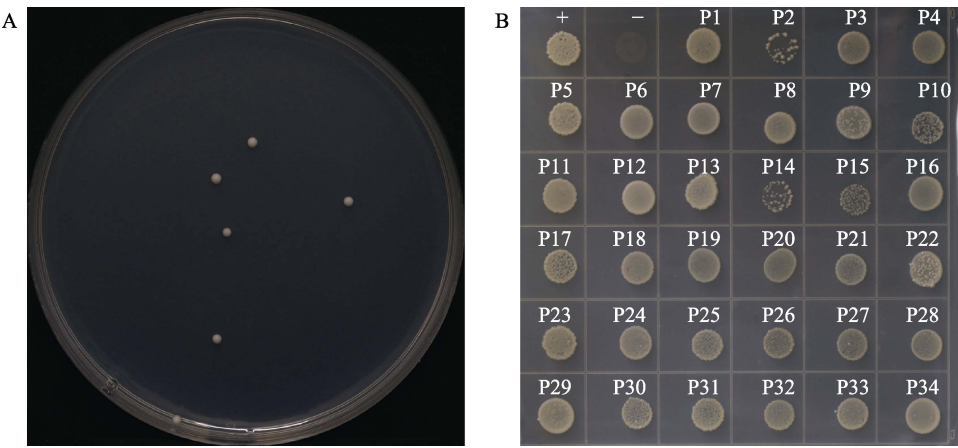


图 4 *HbMVD1* 启动子结合蛋白初筛（A）及验证（B）
Fig. 4 Candidate interactive protein screening (A) and verification (B) for *HbMVD1* promoter

表 1 不同蛋白的编码基因
Tab. 1 Genes encoding different proteins

克隆编号 Clone No.	蛋白名称 Protein name	蛋白注释 Protein annotation	NCBI 登录号 NCBI accession number
P1, P16, P33, P34	Hb18g010770	WRKY 转录因子 WRKY transcription factor	AEE81757.1
P2, P3, P30	Hb15g055630	磷脂酶 Phospholipase	XM_021826119.2
P4, P14, P20, P21	Hb13g050000	G-box 结合因子 G-box binding factor	XM_021805425.2
P5	Hb07g037490	细胞分裂周期因子 Cell division cyclin	XM_021824597.2
P6, P25	Hb04g047470	生长素抑制蛋白 Auxin inhibitory protein	XM_021781239.2
P7, P22, P31	Hb04g052040	小分子热休克蛋白 Small molecule heat shock proteins	XM_058139817.1
P8	Hb06g002380	蛋白酶抑制剂蛋白 Protease inhibitor proteins	EU295479.1
P9	Hb07g028960	钙调素结合蛋白 Protease inhibitor proteins	XM_058133125.1
P10, P19, P28	Hb07g032180	磷脂酸磷酸酶 Phosphatidate phosphatase	XM_021833350.2
P11	Hb07g037260	铁硫簇组装酶 Iron-sulfur cluster assembly enzymes	XM_021814182.2
P12, P29	Hb12g001190	F-box 蛋白 F-box protein	XM_058144621.1
P13, P17, P27, P32	Hb12g002580	橡胶延伸因子 Rubber elongation factor	NM_001405322.1
P15, P18, P23, P24, P26	Hb16g003060	热激转录因子 Heat stress transcription factor	XM_021789152.2

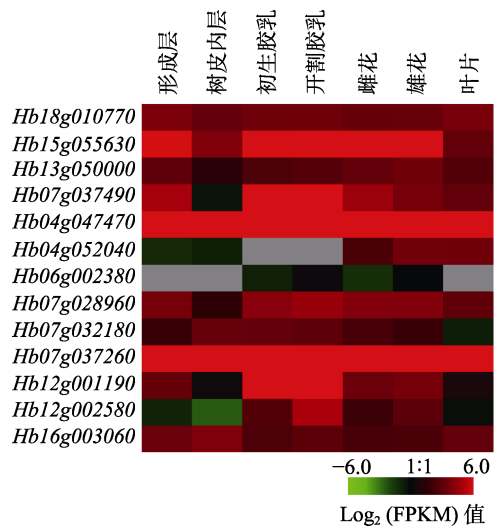


图 5 13 个蛋白编码基因的组织特异性表达分析
Fig. 5 Tissue-specific expression analysis of 13 protein-coding genes

织。此外, *Hb13g050000*、*Hb07g028960*、*Hb12g002580*、*Hb16g003060* 在开割胶乳中的表达量高于初生胶乳。

2.7 HbWRKY1 对 *HbMVD1* 启动子转录调控分析及互作位点鉴定

Blast 比对分析显示, Hb18g010770 序列与前人报道的橡胶树 HbWRKY1 完全一致。为鉴定 HbWRKY1 对 *HbMVD1* 启动子的转录调控, 将携带 *proHbMVD1*-0800 重组载体 (含荧光素酶报告基因) 和 pCambia2300-HbWRKY1 重组载体的农杆菌注射烟草叶片。活体成像分析显示, 与空载组相比, HbWRKY1 组荧光信号显著增强 (图

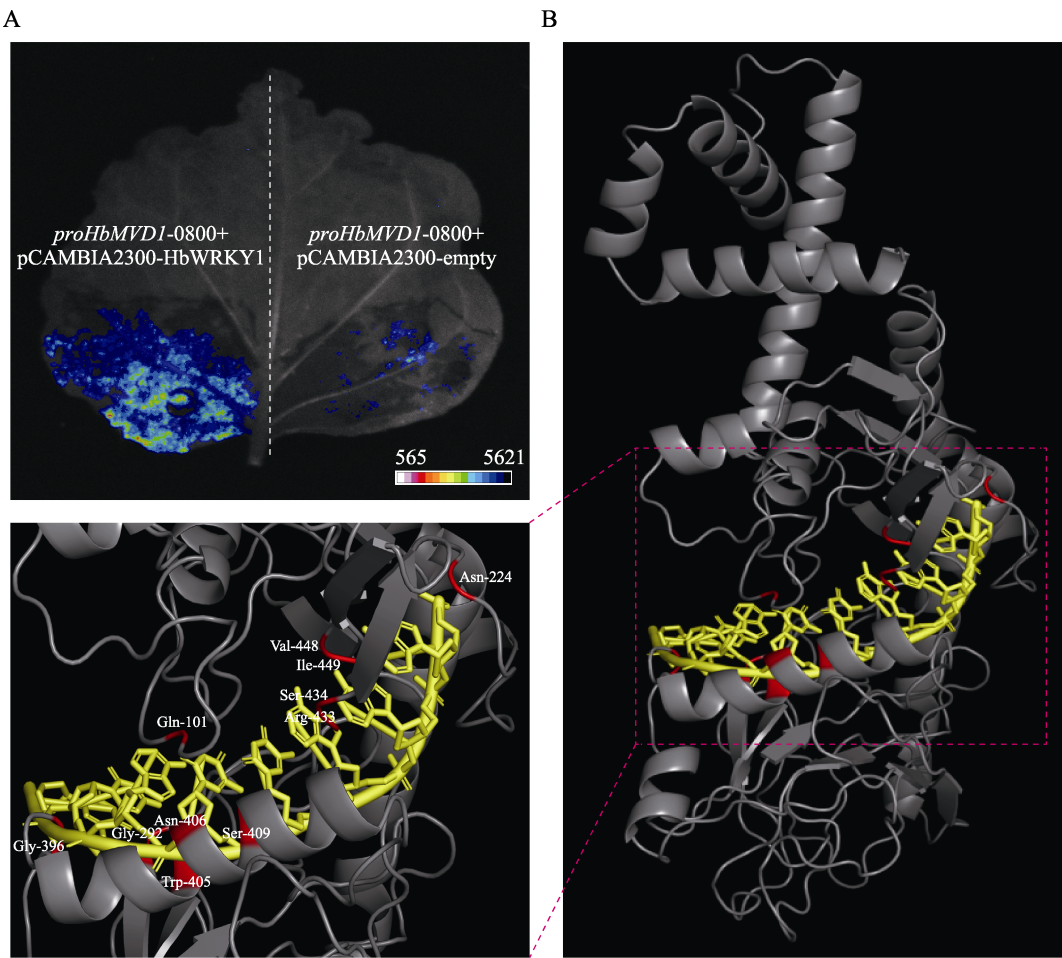
6A), 表明 HbWRKY1 可以在体内激活 *HbMVD1* 启动子的表达。

为进一步解析 HbWRKY1 与 *HbMVD1* 启动子的结合位点, 本研究利用 HelixFold3 分析 *HbMVD1* 启动子上不同顺式作用元件与 HbWRKY1 间的互作关系, 发现仅 WUN-motif 与 HbWRKY1 存在相互作用, 且在 2 埃距离范围内鉴定到 11 个与 WUN-motif 互作的氨基酸: Gln-101、Asn-224、Gly-292、Gly-396、Trp-405、Asn-406、Ser-409、Arg-433、Ser-434、Val-448 和 Ile-449 (图 6B)。

3 讨论

天然橡胶的生物合成大致可分为 MVA 途径的 IPP 合成 (pre-IPP) 和橡胶链的聚合延伸 (post-IPP) 2 个阶段^[13]。近年来天然橡胶生物合成的转录调控是橡胶树基础研究领域的热点之一, 先后有多个转录因子生物学功能得到揭示, 如 HbMYC2 结合并激活 *HbSRPP* 和 *HbFPS* 基因的启动子、HbCZF1 结合并激活 *HbHMGR* 基因的启动子、HbMADS4 结合并抑制 *HbSRPP* 基因的启动子等^[14-16]。MVD 是橡胶生物合成途径关键酶之一, 目前对其转录调控尚无报道。本研究克隆了橡胶树 *HbMVD1* 启动子序列, 并通过酵母单杂交文库筛选获得了 3 个与其结合的转录因子成员。

编码 G-box 结合因子的 Hb13g050000 属于 bZIP 转录因子家族。bZIP 是植物最大的转录因子家族之一, 其特征是 bZIP 结构域高度保守^[17]。前人研究显示, bZIP 转录因子可以与 ABRE、



A: HbWRKY1 调控 *HbMVD1* 启动子的荧光素酶活体成像; B: HbWRKY1 与 WUN-motif 的互作分析, 图中灰色表示 HbWRKY1 的三维结构, 黄色表示 AAATTACT 核心序列, 红色表示与核心序列互作的 HbWRKY1 氨基酸。
A: *In vivo* luciferase imaging of the regulation of the *HbMVD1* promoter by HbWRKY1; B: Interaction analysis between HbWRKY1 and the WUN-motif. Gray represents the three-dimensional structure of HbWRKY1, yellow represents the core sequence of AAATTACT, and red represents the amino acids of HbWRKY1 that interact with the core sequence.

图 6 HbWRKY1 对 *HbMVD1* 启动子的转录活性分析

Fig. 6 Analysis of transcriptional activity of *HbMVD1* promoter by HbWRKY1

H-box、G-box、GLM、ACE 等顺式作用元件相结合, 广泛参与植物的生长发育及逆境胁迫等生物学过程^[18]。有研究表明 bZIP 也参与植物次生代谢物的合成调控, 刺五加的 3 个 bZIP 转录因子可以与刺五加皂苷合成关键基因 (*EsFPS*, *EsSS*, *EsSE*) 启动子结合并激活其表达^[19]; 拟南芥的 bZIP 转录因子 HY5 可以结合萜类合成关键基因 *AtTPS03* 的启动子并激活其表达^[20]。作为高分子萜类化合物, 天然橡胶的合成途径属于典型的次生代谢。G-box 结合因子的鉴定为深入研究 *HbMVD1* 的转录调控机制奠定基础。

热激转录因子 (heat shock transcription factor, HSF) 是植物中研究最广泛的转录因子家族之一, 其结构可以分为 DNA 结合结构域、寡聚化结构域、核定位信号、核输出信号和 C 端转录激活结

构域等 5 个部分, 其中 DNA 结合结构域通过与启动子上的顺式作用元件结合, 广泛调控植物对多种非生物胁迫尤其是低温/高温胁迫的响应^[21]。在橡胶树中, 李言等^[22]分析了 30 个 HbHSF 家族成员在低温胁迫下抗寒品种和不抗寒品种中的表达模式, 发现有 5 个成员在抗寒品种中的表达量显著高于不抗寒品种。有研究表明 HSF 也参与植物次生代谢物的合成调控。KUMAR 等^[23]将 *HvHSEA2e* 基因在大麦中过表达, 发现转基因株系的黄酮和萜类代谢主要基因的表达量显著上调; ZHANG 等^[24]发现茶树的 CsHSFA1b 和 CsHSFA2 可以通过激活茉莉酸途径抑制因子 CsJAZ6 的表达进而减少儿茶素的积累。本研究鉴定到 1 个 HSF 成员与 *HbMVD1* 启动子结合, 为进一步解析 HSF 对天然橡胶的调控机制提供新的

思路。

WRKY 是植物特有的一类转录因子家族,其特征是含有 1~2 个高度保守的 WRKYGQK 基序以及 1 个锌指基序^[25]。通过与启动子序列上的顺式作用元件结合,WRKY 转录因子广泛参与植物的生长发育以及响应生物/非生物胁迫的生物学过程^[26]。前人从橡胶树基因组中鉴定到 81 个 HbWRKY 成员,其中 HbWRKY27 结合并激活 *HbFPS* 基因的启动子, HbWRKY1 结合并抑制 *HbSRPP* 基因的启动子^[27-29]。本研究通过酵母单杂筛选库发现 HbWRKY1 也可以结合 *HbMVD1* 启动子,进一步的活体成像试验证明 HbWRKY1 可以激活 *HbMVD1* 启动子的表达。基于 MVD 是 pre-IPP 阶段关键酶而 SRPP 是 post-IPP 阶段的关键酶,推测 HbWRKY1 在天然橡胶生物合成的不同阶段起不同的调控作用,这可能是一种精细的调控模式,进而控制天然橡胶的生物合成。

转录因子通过与启动子区域的靶向顺式作用元件结合进而调控功能基因的表达。本研究对 *HbMVD1* 启动子序列分析鉴定到多个顺式作用元件,如 CGTCA-motif、ERE、WUN-motif、MYC、ARE 等。分子对接发现仅 WUN-motif 与 HbWRKY1 存在互作,且在 2 埃范围内鉴定到 11 个潜在的互作氨基酸。WUN-motif 是一种与伤害反应相关的作用元件,通过响应机械伤害来激活目标基因的表达^[30]。在生产中,割胶是收获橡胶树天然橡胶的唯一方式。割胶不仅可以提高天然橡胶合成效率,还可以激活橡胶合成相关基因如 *HbMVD1* 等的表达^[16]。考虑到割胶也是一种严重的机械伤害,推测割胶后 HbWRKY1 可能通过与 *HbMVD1* 启动子上的 WUN-motif 顺式作用元件结合进而促进天然橡胶的生物合成。

参考文献

- [1] 付芸,何铭,徐建飞,张姣姣,卞春松,胡军,李广存,金黎平. 光周期调控马铃薯块茎初始形成关键时期的转录组分析[J]. 河北农业大学学报, 2024, 47(4): 45-56.
FU Y, HE M, XU J F, ZHANG J J, BIAN C S, HU J, LI G C, JIN L P. Transcriptome analysis of tuber initiation of *Solanum tuberosum* regulated by photoperiod[J]. Journal of Hebei Agricultural University, 2024, 47(4): 45-56. (in Chinese)
- [2] FRANCOIS M, DONOVAN P, FONTAINE F. Modulating transcription factor activity: interfering with protein-protein interaction networks[J]. Seminars in Cell and Developmental Biology, 2020, 99: 12-19.
- [3] LUO Y, HUANG X X, SONG X F, WEN B B, XIE N C, WANG K B, HUANG J A, LIU Z H. Identification of a WRKY transcriptional activator from *Camellia sinensis* that regulates methylated EGCG biosynthesis[J]. Horticulture Research, 2022, 9: uhac024.
- [4] 余婧,杨慧,余世洲,赵会纳,郑庆霞,王兵,雷波. 烟草 *NtCBT* 基因启动子酵母单杂诱饵载体构建及互作蛋白筛选[J]. 生物技术通报, 2022, 38(10): 73-79.
YU J, YANG H, YU S Z, ZHAO H N, ZHENG Q X, WANG B, LEI B. Construction of yeast one-hybrid bait vector of tobacco *NtCBT* gene promoter and screening of interacted proteins[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(10): 73-79. (in Chinese)
- [5] CAO Y W, BI M M, YANG P P, SONG M M, HE G R, WANG J, YANG Y, XU L F, MING J. Construction of yeast one-hybrid library and screening of transcription factors regulating LhMYBSPLATTER expression in *Asiatic hybrid lilies* (*Lilium* spp.)[J]. BMC Plant Biology, 2021, 21(1): 563-563.
- [6] 晁金泉,杨署光,田维敏. 后基因组时代橡胶树分子生物学[J]. 分子植物育种, 2020, 18(22): 7404-7412.
CHAO J Q, YANG S G, TIAN W M. Molecular biology of *Hevea brasiliensis* in the post genomic era[J]. Molecular Plant Breeding, 2020, 18(22): 7404-7412. (in Chinese)
- [7] 杨超,李海英,马春泉. 植物中天然橡胶合成及研究进展[J]. 黑龙江大学工程学报, 2021, 12(2): 84-89.
YANG C, LI H Y, MA C Q. Synthesis and research progress of natural rubber in divergent plant species[J]. Journal of Engineering of Heilongjiang University, 2021, 12(2): 84-89. (in Chinese)
- [8] 张长波,孙红霞,巩中军,祝增荣. 植物萜类化合物的天然合成途径及其相关合酶[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(4): 779-786.
ZHANG C B, SUN H X, GONG Z J, ZHU Z R. Plant terpenoid natural metabolism pathways and their syntheses[J]. Plant Physiology Communications, 2007, 43(4): 779-786. (in Chinese)
- [9] 邹智,杨礼富,王真辉,袁坤. 橡胶树中橡胶的生物合成与调控[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(12): 1231-1238.
ZOU Z, YANG L F, WANG Z H, YUAN K. Biosynthesis and regulation of natural rubber in *Hevea*[J]. Plant Physiology Communications, 2009, 45(12): 1231-1238. (in Chinese)
- [10] 王鹏杰,陈丹,曹红利,陈静,陈笛,叶乃兴. 茶树甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶基因 *CsMVD* 的克隆与表达分析[J]. 西北植物学报, 2017, 37(12): 2342-2349.

- WANG P J, CHEN D, CAO H L, CHEN J, CHEN D, YE N X. Cloning and expression of mevalonate diphosphate decarboxylase gene *CsMVD* in tea plant (*Camellia sinensis*)[J]. Northwest Chinese Journal of Botany, 2017, 37(12): 2342-2349. (in Chinese)
- [11] 尚怡彤, 闫欢欢, 王丽红, 田学琴, 薛萍红, 罗涛, 胡志宏. 米曲霉磷酸甲羟戊酸激酶功能研究[J]. 生物技术通报, 2023, 39(12): 311-319.
- SHANG Y T, YAN H H, WANG L H, TIAN X Q, XUE P H, LUO T, HU Z H. Study on the function of phosphomevalonate kinase in *Aspergillus oryzae*[J]. Biotechnology Bulletin, 2023, 39(12): 311-319. (in Chinese)
- [12] SKILLETER D N, KEKWICK R G. The enzymes forming isopentenyl pyrophosphate from 5-phosphomevalonate (mevalonate 5-phosphate) in the latex of *Hevea brasiliensis*[J]. Biochemical Journal, 1971, 124(2): 407-417.
- [13] 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.
- [14] GUO D, YI H Y, LI H L, LIU C, YANG Z P, PENG S Q. Molecular characterization of HbCZF1, a *Hevea brasiliensis* CCCH-type zinc finger protein that regulates hmg1[J]. Plant Cell Reports, 2015, 34(9): 1569-1578.
- [15] LI H L, WEI L R, GUO D, WANG Y, ZHU J H, CHEN X T, PENG S Q. HbMADS4, a MADS-box transcription factor from *Hevea brasiliensis*, negatively regulates HbSRPP[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 1709.
- [16] 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.
- [17] DRÖGE-LASER W, SNOEK B L, SNEL B, WEISTE C. The *Arabidopsis* bZIP transcription factor family—an update[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2018, 45: 36-49.
- [18] 孙晓丽, 李勇, 才华, 柏锡, 纪巍, 季佐军, 朱延明. 拟南芥 bZIP1 转录因子通过与 ABRE 元件结合调节 ABA 信号传导[J]. 作物学报, 2011, 37(4): 612-619.
- SUN X L, LI Y, CAI H, BAI X, JI W, JI Z J, ZHU Y M. *Arabidopsis* bZIP1 transcription factor binding to the ABRE cis-element regulates abscisic acid signal transduction[J]. Acta Agronomica Sinica, 2011, 37(4): 612-619. (in Chinese)
- [19] JING D, XUE L Z, XIN S, SHUO W, XUE Y Z, BAO X L, YUE H L, ZHAO B X. Identification of *Eleutherococcus senticosus* NAC transcription factors and their mechanisms in mediating DNA methylation of EsFPS, EsSS, and EsSE promoters to regulate saponin synthesis[J]. BMC Genomics, 2024, 25(1): 536-536.
- [20] MICHAEL R, RANJAN A, KUMAR S R, PATHAK K P, TRIVEDI K P. Light-regulated expression of terpene synthase gene, AtTPS03, is controlled by the bZIP transcription factor, HY5, in *Arabidopsis thaliana*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2020, 529(2): 437-443.
- [21] 彭国颖, 卢山, 杨坤, 万玮, 黄长干. 紫鸭跖草热激转录因子基因家族鉴定及在 Cu^{2+} 胁迫下表达模式分析[J]. 生物工程学报, 2022, 38(1): 238-251.
- PENG G Y, LU S, YANG K, WAN W, HUANG C G. Identification of heat stress transcription factors gene family in *Setcreasea purpurea* and analysis of its expression pattern under Cu^{2+} stress[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(1): 238-251. (in Chinese)
- [22] 李言, 余文才, 陆庆志, 杨署光, 田维敏. 非生物胁迫对橡胶树热激转录因子家族成员表达的影响[J]. 热带作物学报, 2021, 42(8): 2119-2125.
- LI Y, YU W C, LU Q Z, YANG S G, TIAN W M. Effects of abiotic stresses on the expression of heat shock transcription factor (HSF) family members in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(8): 2119-2125. (in Chinese)
- [23] KUMAR S M, CHANDERKANT C, SUCHI B, KUMAR A P, PARUL S, MEENAKSHI K, SNEHI G, ANNU K, DEBABRATA S, HUGO G, HARSH C. Heat-stress-responsive *HvHSFA2e* gene regulates the heat and drought tolerance in barley through modulation of phytohormone and secondary metabolic pathways[J]. Plant Cell Reports, 2024, 43(7): 172-172.
- [24] ZHANG X Y, LI L Y, HE Y Q, LANG Z L, ZHAO Y, TAO H, LI Q S, HONG G J. The CsHSFA-CsJAZ6 module-mediated high temperature regulates flavonoid metabolism in *Camellia sinensis*[J]. Plant Cell Environment, 2023, 46(8): 2401-2418.
- [25] XIONG W D, XU X Q, ZHANG L, WU P Z, CHEN Y P, LI M R, JIANG H W, WU G J. Genome-wide analysis of the WRKY gene family in physic nut (*Jatropha curcas* L.)[J]. Gene, 2013, 524(2): 124-132.
- [26] 王艺璇, 孟庆伟, 马娜娜. 番茄低温响应 WRKY 转录因子的鉴定和分析[J]. 植物生理学报, 2021, 57(6): 1349-1362.
- WANG Y X, MENG Q W, MA N N. Characterization and analysis of some chilling-response WRKY transcription factors in tomato[J]. Chinese Journal of Plant Physiology, 2021, 57(6): 1349-1362. (in Chinese)
- [27] WANG Y, GUO D, LI H L, PENG S Q. Characterization of

- HbWRKY1, a WRKY transcription factor from *Hevea brasiliensis* that negatively regulates HbSRPP[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 71: 283-289.
- [28] LI H L, GUO D, YANG Z P, TANG X, PENG S Q. Genome-wide identification and characterization of WRKY gene family in *Hevea brasiliensis*[J]. *Genomics*, 2014, 104(1): 14-23.
- [29] QU L, LI H L, GUO D, WANG Y, ZHU J H, YIN L Y, PENG S Q. HbWRKY27, a group IIe WRKY transcription factor, positively regulates HbFPS1 expression in *Hevea brasiliensis*[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 20639-20639.
- [30] HAYASHI T, KOBAYASHI D, KARIU T, TAHARA M, HADA K, KOUZUMA Y, KIMURA M. Genomic cloning of ribonucleases in *Nicotiana glutinosa* leaves, as induced in response to wounding or to TMV-infection, and characterization of their promoters[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2003, 67(12): 2574-2583.