

橡胶树 *HblMYB16* 基因的克隆、表达分析及功能验证

张峻烽^{1,2,3}, 郭冬^{2,3,4}, 李辉亮^{2,3,4}, 朱家红^{2,3,4}, 王颖^{2,3,4*}

1. 河北农业大学林学院, 河北保定 071000; 2. 热带作物生物育种全国重点实验室, 海南三亚 572024; 3. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101; 4. 中国热带农业科学院三亚研究院, 海南三亚 572024

摘要: 天然橡胶是重要的工业原料和战略物质, 具有良好的韧性、弹性和耐高温等优良特性, 是合成橡胶不可替代的。巴西橡胶树是目前天然橡胶最主要的商业来源。已有研究报道橡胶生物合成关键基因 *HbSRPP*、*HbHRT* 和 *HbFDP* 对提高橡胶产量起到关键作用, 同时 MYB 转录因子可能参与天然橡胶的生物合成与调控。本研究从橡胶树胶乳中克隆 1 个 MYB 类转录因子 *HblMYB16* 基因, 并对其进行生物信息学分析和表达分析。结果表明: *HblMYB16* 基因开放阅读框为 1116 bp, 编码 371 个氨基酸, 亲水性总平均值为 -0.498, 为亲水性蛋白, 含有 R2R3-MYB 结构域, 属于 MYB 类转录因子家族。*HblMYB16* 在胶乳中表达量最高, 且定位在细胞核中, 同时发现茉莉酸对 *HblMYB16*、*HbSRPP*、*HbHRT* 和 *HbFDP* 的表达有促进作用, 而乙烯只对 *HblMYB16* 和 *HbFDP* 表达有影响。酵母单杂交结果证明 *HblMYB16* 与橡胶生物合成关键基因 *HbSRPP*、*HbHRT* 和 *HbFDP* 互作, 这些研究为进一步探究 *HblMYB16* 参与调控天然橡胶生物合成的分子机制提供理论依据。

关键词: 橡胶树; MYB 转录因子; 天然橡胶; 生物合成; 关键基因

中图分类号: S794.1 文献标志码: A

Cloning, Expression Analysis and Functional Verification of the *HblMYB16* in *Hevea brasiliensis*

ZHANG Junfeng^{1,2,3}, GUO Dong^{2,3,4}, LI Huiliang^{2,3,4}, ZHU Jiahong^{2,3,4}, WANG Ying^{2,3,4*}

1. College of Forestry, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071000, China; 2. National Key Laboratory of Tropical Crop Breeding, Sanya, Hainan 572024, China; 3. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 4. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572024, China

Abstract: Natural rubber is an important industrial raw material and strategic resource. It has excellent properties such as comparable elasticity, flexibility and resistance to high temperature, which cannot be replaced by synthetic rubber. The rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is still the only commercial source of natural rubber. Previous studies have reported the key genes involved in rubber biosynthesis including *HbSRPP*, *HbHRT* and *HbFDP* play crucial roles in increasing rubber yield, while MYB, as a transcription factor, may participate in the synthesis of natural rubber. In the study, a MYB transcription factor *HblMYB16* gene was cloned from rubber tree, and bioinformatics and expression analysis were carried out successfully. The results showed that the open reading frame (ORF) of *HblMYB16* was 1116 bp, encoding 371 amino acids, and the total average hydrophilicity was -0.498, which was a hydrophilic protein containing the R2R3-MYB domain and belonging to the MYB transcription factor family. *HblMYB16* was highest expressed in latex and localized in the nucleus. It was found that jasmonic acid had a promoting effect on the expression of *HblMYB16*, *HbSRPP*, *HbHRT* and *HbFDP*, while ethylene only had an impact on the expression of *HblMYB16* and *HbFDP*. At the same time, the interactions between *HblMYB16* and the rubber biosynthesis key genes *HbSRPP*, *HbHRT* and *HbFDP*

收稿日期 2025-09-02; 接受日期 2025-11-04

基金项目 海南省自然科学基金项目 (No. 323RC539); 热带作物生物育种全国重点实验室科研项目 (No. NKLTCBZRJJ6); 国家自然科学基金面上项目 (No. 32572109)。

作者简介 张峻烽 (2001—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 植物次生代谢与调控。*通信作者 (Corresponding author): 王颖 (WANG Ying), E-mail: wangying@catasitbb.cn。

were verified by yeast one hybrid. The studies would lay a foundation for further revealing the molecular mechanism of *HblMYB16* participating in natural rubber biosynthesis.

Keywords: *Hevea brasiliensis*; MYB transcription factor; natural rubber; biosynthesis; key gene

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2026.02.001

天然橡胶是一种生物高分子材料, 顺式-1,4-聚异戊二烯是其主要成分, 它与石油、钢铁、煤炭都是国家战略性工业原料, 天然橡胶主要由橡胶树流出的乳汁(又称胶乳)提炼加工而成^[1]。天然橡胶独特的分子结构赋予它弹性好、耐腐蚀和抗拉伸等特点, 在航天航空、轨道交通、深海探测、国防装备等高端制造领域具有无法替代的战略地位^[2]。

天然橡胶是一种重要的次生代谢产物, 在橡胶树乳管细胞的橡胶粒子上合成, 以异戊烯基焦磷酸(IPP)为前体, 主要通过甲羟戊酸(MVA)途径, 再经过一些酶促反应, 由此生成橡胶分子^[3]。小橡胶粒子蛋白(small rubber particle protein, SRPP)是对于天然橡胶生物合成起到关键作用的因子, 由单基因编码^[4], SRPP 和橡胶转移酶(cis-prenyltransferase, CPT)是橡胶粒子膜的主要成分。HRT、SRPP、法尼基焦磷酸合成酶(farnesyl diphosphate synthase, FPS)在 MVA 途径中发挥重要作用。FPS 催化牻牛儿基焦磷酸(GPP)生成法尼基焦磷酸(farnesyl diphosphate, FDP), 然后 FDP 与 IPP 连续缩聚生成聚异戊二烯。HRT 会将异戊二烯二磷酸单元以顺式连接的形式不断聚合到橡胶分子链上, 对天然橡胶链的延伸起作用^[5-8]。橡胶延长因子(rubber elongation factor, REF)在天然橡胶生物合成和积累过程中发挥重要作用, 且和 SRPP、CPT 构成橡胶粒子膜。REF 在乳管中高表达, 与 CPT 共同协作完成顺式-聚异戊二烯的延长^[9-12]。研究还指出, 乳胶细胞的分化始于种子萌发阶段, 这表明 REF/SRPP 蛋白可能通过促进细胞早期发育, 在成熟植株中显著提升橡胶产量方面发挥关键作用^[13]。同时有研究认为, SRPP 独自完成长链橡胶分子的生物合成^[14-16]。对天然橡胶生物合成的早期研究主要集中在对合成途径中酶的特性分析、基因克隆、表达和功能分析^[17]。

MYB 转录因子在高等植物转录因子中数目最多, 具有保守的 MYB 结构, R2R3-MYB 转录因子成员对于植物的不同生物学过程具有调节作用, 如调节次生代谢、细胞发育以及对胁迫的响应^[18]。在调控次生代谢方面, 拟南芥 MYB4、

MYB7 以及 MYB32 与 MBW 复合物中的 TT8 产生相互作用, 抑制 MBW 结合并减弱其转录活性, 同时, MYB4 还可以通过抑制编码 ADT(aroenate dehydratase)的基因来减少类黄酮的积累^[19]; *MYB112* 在盐胁迫或者高光胁迫下上调表达, 加速花青素的积累^[20]; *PtoMYB92*、*EgMYB1* 和 *EgMYB2* 调控植物中木质素的生物合成^[21-22]。在调控细胞发育方面, MYB59 可以延长细胞有丝分裂中期来抑制拟南芥根部生长^[23]; 在胁迫响应方面, 过表达 *TaMYB344* 的烟草植株抗旱、抗热和抗盐胁迫能力增强^[24]; 转录因子是调节次生代谢产物的生物合成途径的重要基因^[25], 一些调控橡胶生物合成途径的转录因子也被相继鉴定^[26-35], 但对橡胶生物合成的调控机制仍缺乏深入了解。

为了研究橡胶树 MYB 转录因子在天然橡胶生物合成中的作用, 本研究克隆了 *HblMYB16* 基因, 并对其进行生物信息学分析、橡胶树不同组织的特异性表达分析、激素处理表达分析、亚细胞定位及其与橡胶生物合成关键基因在酵母中的相互作用, 旨在为进一步揭示 *HblMYB16* 参与调控天然橡胶生物合成的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为巴西橡胶树幼树, 品种为热研 7-33-97 植株, 种植在中国热带农业科学院国家橡胶树种质资源圃。

大肠杆菌(*E. coli*)DH5 α 和 GV3101(pSoup-p19)菌株分别购自天根生物科技有限公司(北京)和上海唯地生物技术有限公司, 酵母单杂交载体 pHIS2.1 和 PGADT7、亚细胞定位载体 pCambia1302 由实验室保存, DNA Marker、pMD19T 载体、高保真酶 PrimeSTAR 和 T₄ DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司(大连), 质粒提取试剂盒、RNA 抽提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒来自 FOREGENE 公司(成都), DNA 产物纯化试剂盒来自 OMEGA (BIO-TEK), 逆转录试剂盒与荧光定量试剂来自 NOVA 公司(苏州)。引物合成和测序由擎科生物技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 基因CDS区克隆 在NCBI中搜索*HblMYB16*的基因序列,使用IDT网站设计基因特异性扩增引物(*MYB16-F*: 5'-ATGGAAATCGATTGAA-GGA-3', *MYB16-R*: 5'-TTAAAGATGCCCCATT-TGCG-3')。以橡胶树胶乳cDNA为模板扩增目的序列,PCR扩增体系:模板1.5 μL、上下游引物2 μL、2×PrimeSTAR HS (Premix) 15 μL、无菌水9.5 μL。设定PCR程序:95℃预变性8 min;95℃变性25 s,59℃退火45 s,72℃延伸60 s,重复32个循环;72℃延伸8 min。PCR产物经纯化后连接到pMD19T载体中,pMD19T-*HblMYB16*经PCR通用引物M13扩增鉴定阳性克隆,将大小正确的阳性克隆抽提质粒后测序。

1.2.2 生物信息学分析 将*HblMYB16*基因序列用NOVA PRO在线网站翻译成氨基酸序列,利用TBtools软件分析*HblMYB16*蛋白质分子质量、等电点、稳定性和平均亲水系数;采用SMART和MEME在线软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测并分析蛋白保守结构域;将*HblMYB16*蛋白序列通过NCBI进行多序列比对,下载同源性高的相似蛋白序列,利用DNAMAN进行多序列比对,再将序列比对结果可视化。

1.2.3 橡胶树不同组织的采集及茉莉酸(MeJA)和乙烯(ET)处理 橡胶树根、树皮、叶片和花等组织同时采样后立即用液氮研磨或保存在-80℃。胶乳用液氮速冻后收集到离心管,保存于液氮中,用于RNA提取。

分别用0.07% MeJA、0.5% ET处理橡胶树幼树,处理时长为1、3、6、9、24、48 h,然后采集胶乳置于液氮中冻存,用于RNA提取。

1.2.4 胶乳总RNA提取和cDNA合成 采用FOREGENE公司(成都)的植物总RNA提取试剂盒(多糖多酚含量高的样本)提取RNA。然后,采用NOVA公司(苏州)的去基因组与逆转录一管化三代预混液试剂盒将提取的RNA逆转录成cDNA。

1.2.5 qRT-PCR和数据分析 采用NOVA公司(苏州)的*Taq SYBR*[®] Green qPCR Premix(Universal)试剂盒,使用BIO-RADCFX96 Real-time PCR系统(Bio-Rad, USA),进行qRT-PCR分析。*HblMYB16-F*: 5'-GCACCTCATGGATCTCAAGC-3', *HblMYB16-R*: 5'-GGTTGCGACACCCATTAACT-3'; *HbSRPP-F*: 5'-TTTGCCTTTGTTGCCCACTGAG-3', *HbSRPP-R*: 5'-TGCACCAACAAT-

GGCAATTGGCC-3'; *HbHRT-F*: 5'-TTGGTCTTCGACACGTGGTGTG-3', *HbHRT-R*: 5'-CCGGCTTAATTAAGTGTCCGAG-3'; *HbFDP-F*: 5'-CCTCTATTGAAGCTCATCCTAGC-3', *HbFDP-R*: 5'-CTGCATTATTCAGCGTCATCCAG-3'。采用*Actin*为内参基因, *Actin-F*: 5'-CAGTGGTCGTACAACCTGGTAT-3', *Actin-R*: 5'-ATCCTCC-AATCCAGACACTGT-3'。qRT-PCR的反应体系20 μL: 1 μL模板,正反向引物(10 μmol/L¹)各1 μL, 10 μL *Taq SYBR*[®] Green qPCR Premix, 无菌水7 μL。按照以下程序反应:95℃预变性30 s;95℃变性10 s;58℃退火10 s;72℃延伸30 s;40个循环。每个样品进行3次生物学重复和3次技术重复试验,结果采用2^{-ΔΔC_T}法分析基因的相对表达量,使用SPSS软件分析样本间的差异显著性。

1.2.6 亚细胞定位载体构建 用带有*Nco* I和*Spe* I酶切位点的引物扩增*HblMYB16*,并构建到PMD19T载体上,测序无误后将质粒进行双酶切,同时对含有GFP标签的空载体pCambia1302进行双酶切,将上述2种酶切产物用T₄连接酶16℃连接过夜,转化到大肠杆菌DH5α,挑选单菌落进行质粒提取后,将测序验证的重组表达载体命名为pCambia1302-*HblMYB16*。

1.2.7 亚细胞定位分析 取GV3101(pSoup-p19)农杆菌感受态,将构建亚细胞定位载体的质粒pCambia1302-*HblMYB16*按说明书步骤转化后,吸取50 μL涂布在含利福平和卡那霉素的LB培养基上,29℃培养3 d。

挑取单克隆进行菌液PCR鉴定,将条带大小符合的单菌落扩大培养到5 mL离心管,28℃震荡过夜,第2天按照1:25的比例扩大到新的LB液体培养基中,直到OD₆₀₀为0.6~0.8,6500 r/min离心8 min,收集菌体。沉淀用25 mL MES-MgCl₂缓冲液(pH 5.7, 10 mmol/L)重悬,加入乙酰丁香酮(acetosyringone, AS)至终浓度为150 μmol/L,室温静置2 h。取新鲜的白洋葱,取中部切成1 cm×1 cm,浸入到菌液中,置于真空干燥器内(-0.08 kPa)抽滤60 min,用灭菌的镊子夹出后平铺到湿润的滤纸上,28℃暗培养3 d。

取洋葱内表皮置于载玻片,滴加150 μL DAPI染液(10 mg/mL)覆盖样本,避光染色2 min。使用激光共聚焦显微镜观察DAPI(激发波长358 nm,发射波长461 nm)与mCherry(激发波

长 587 nm, 发射波长 610 nm) 双通道荧光信号, 验证目标蛋白亚细胞定位。

1.2.8 酵母单杂载体的构建 用含有酶切位点 *Nde* I 和 *Eco*R I 引物扩增 *HblMYB16* 的 CDS 序列, 连接 PMD19T 载体, 测序正确的阳性克隆质粒进行双酶切, 同时对 PGADT7 空载体进行双酶切, 后续实验方法同 1.2.6, 将测序验证的重组表达载体命名为 pGADT7-*HblMYB16*。*HbSRPP* 和 *HbFDP* 启动子用含有 *Mlu* I 和 *Spe* I 的引物, *HbHRT* 用 *Eco*R I 和 *Sac* I 的引物扩增连接 PMD19T 后酶切再连接 pHis2.1 载体, 分别命名为 pHis-*HbSRPP*、pHis-*HbFDP*、pHis-*HbHRT*。

1.2.9 酵母单杂交验证 *HblMYB16* 与 *HbSRPP*、*HbHRT*、*HbFDP* 的互作关系 将试验分为 3 组: 阳性对照 (p53His2.1 和 pGAD-53 共同转化), 阴性对照 (pHis2.1 和 pGAD-53 共同转化, pHis-*HbSRPP*、pHis-*HbFDP*、pHis-*HbHRT* 分别与 pGADT7 两两组合共同转化, pGADT7-*HblMYB16* 和 pHis2.1 共同转化) 和试验组 (pHis-*HbSRPP*、pHis-*HbFDP*、pHis-*HbHRT* 分别与 pGADT7-*HblMYB16*) 两两组合共同转化)。将表达载体质粒共同转化至 Y187 酵母菌株中, 按酵母转化试剂盒说明书操作后, 吸取 30 μ L 菌液涂布在加入 3-AT 的缺色氨酸、组氨酸、亮氨酸的 SD 固体培养基上 (SD/-Trp-His-Leu), 29 $^{\circ}$ C 倒置培养 5~7 d, 观察并拍照记录。

在以上 3 组培养基平板中挑选长势良好的单菌落用缺少色氨酸和亮氨酸 SD 培养基液体培养基 (SD/-Trp-Leu) 培养至 OD₆₀₀ 为 0.4, 然后稀释成不同倍数, 吸取 7 μ L 点接于 SD/-Trp-Leu 固体培养基和含有相应 3-AT 的缺色氨酸、组氨酸、亮氨酸的 SD 固体培养基上 (SD/-Trp-His-Leu), 29 $^{\circ}$ C 倒置培养 5~7 d, 观察并拍照记录。

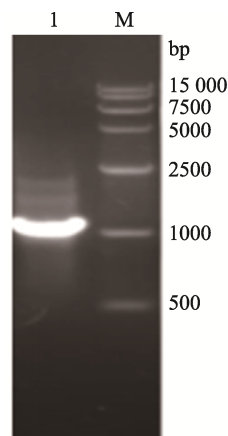
2 结果与分析

2.1 *HblMYB16* 基因的克隆

以橡胶树胶乳的 cDNA 为模板, 以特异性引物 *MYB16-F* 和 *MYB16-R* 扩增到 1116 bp 的条带 (图 1), 连接到 PMD19T 上, 在 DH5 α 转化后, 经菌液 PCR 验证, 提取质粒后且测序与 NCBI 中 ORF 序列完全一致。

2.2 *HblMYB16* 蛋白的生物信息学分析

先用 NOVOPro 在线工具将氨基酸翻译成蛋



1: *HblMYB16*; M: DL15000 DNA marker.

图 1 *HblMYB16* PCR 克隆

Fig. 1 PCR clone of *HblMYB16*

白, 然后用 TB Tools 分析 *HblMYB16* 蛋白性质, 分析显示: *HblMYB16* 的分子式为 C₁₇₁₃H₂₇₂₂N₅₁₄O₅₅₄S₁₅, 等电点为 5.33, 相对分子量为 39.86 kDa, 不稳定系数为 38.91, 是不稳定蛋白。利用 ProtScale 工具分析 *HblMYB16* 蛋白质的亲水性或疏水性, 结果显示, 亲水性总平均值为 -0.498, 是亲水性蛋白 (图 2)。

通过 Inter Pro 工具 (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 和 DNAMAN 软件对 *HblMYB16* 的保守结构域进行分析, 研究结果显示, *HblMYB16* 的 R 结构域内存在 3 个色氨酸残基, 这些残基彼此间隔 19 个氨基酸; 另一个保守的 R 结构域则包含 2 个色氨酸残基, 二者相距 18 个氨基酸。剩下的色氨酸残基会被苯丙氨酸残基取代, 对比其他生物中 MYB 蛋白序列, 具有一致的 R2 和 R3 保守结构域, 由此证实 *HblMYB16* 转录因子属于 R2R3-MYB 亚家族 (图 3)。

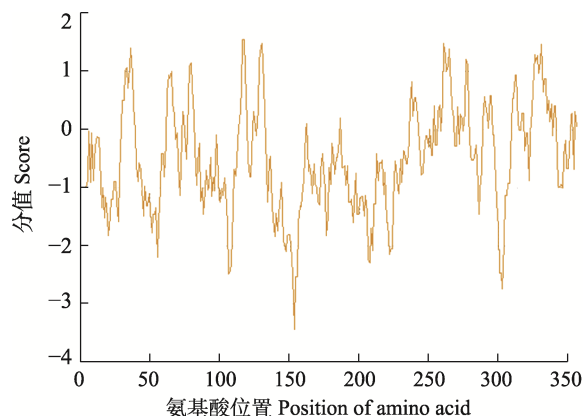
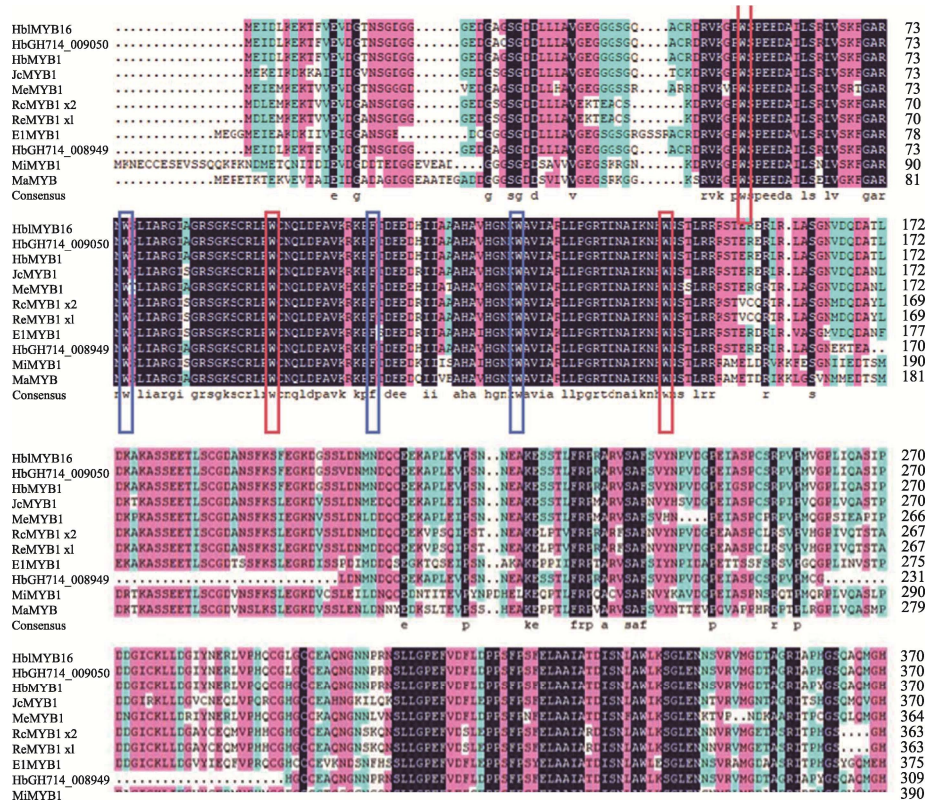


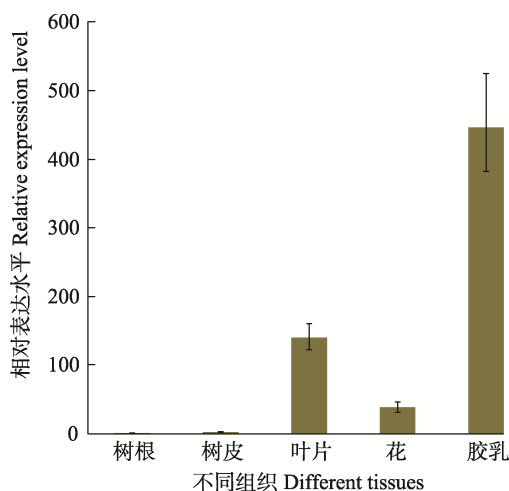
图 2 *HblMYB16* 亲水/疏水性分析图

Fig. 2 Hydrophilic/hydrophobic analysis of *HblMYB16*

图 3 *HbIMYB16* 氨基酸序列与不同物种的比对Fig. 3 Homologous alignment of *HbIMYB16* amino acid sequences with other species

2.3 *HbIMYB16* 在橡胶树不同组织中的表达

将橡胶树的根、树皮、叶片、花和胶乳中提取总 RNA 逆转录成 cDNA 作为荧光定量 PCR 试验所需的模板。利用 qRT-PCR 检测 *HbIMYB16* 在橡胶树根、树皮、叶片、花和胶乳等组织的表达情况。从图 4 可知, *HbIMYB16* 在胶乳中的表达水平最高, 叶片次之, 花最低, 树根和树皮中不表达。

图 4 橡胶树不同组织中 *HbIMYB16* 的表达情况Fig. 4 Expression of *HbIMYB16* in different tissues of rubber tree

2.4 激素处理对 *HbIMYB16*、*HbSRPP*、*HbHRT* 和 *HbFDP* 表达的影响

为探究外源激素 MeJA、ET 对 *HbIMYB16*、*HbSRPP*、*HbHRT* 和 *HbFDP* 的影响, 本研究用 MeJA、ET 分别对橡胶树幼树进行处理, 采集激素处理后的胶乳提取总 RNA 合成 cDNA, 利用实时荧光定量 PCR 技术, 检测了外源激素对 *HbIMYB16* 表达的影响。发现 *HbIMYB16* 的表达量均受 MeJA 和 ET 的影响, 其中 *HbIMYB16* 在 MeJA 和 ET 处理 9 h 时均达到最高表达量, 同时研究了 *HbSRPP*、*HbHRT* 和 *HbFDP* 在 MeJA 和 ET 处理下的表达, *HbSRPP* 和 *HbHRT* 在 MeJA 处理 9 h 时表达量最高, ET 处理无明显变化, *HbFDP* 在 JA 和 ET 处理 9 h 时表达量均达到最高 (图 5)。

2.5 亚细胞定位分析

将构建的 pCambia1302-*HbIMYB16* 载体质粒转化 GV3101 农杆菌, 随后侵染洋葱, 结果显示: 试验组荧光定位在细胞核上, 而对照组空载的荧光分布在细胞核和细胞质中, 证明 *HbIMYB16* 蛋白定位在细胞核内 (图 6)。

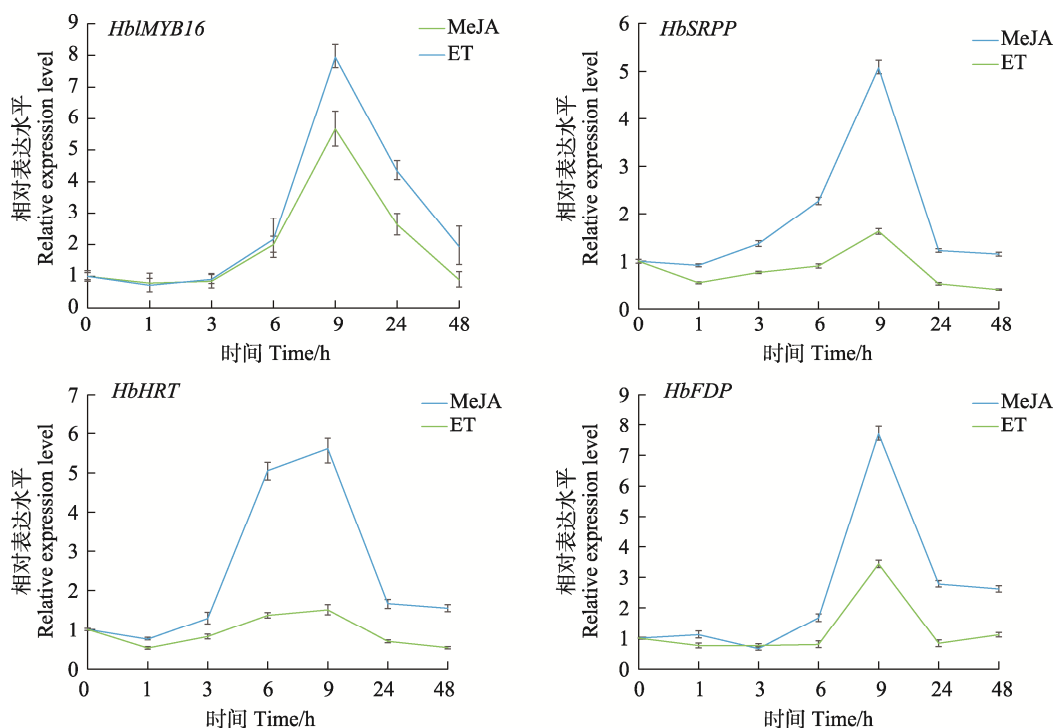


图 5 *HblMYB16*、*HbSRPP*、*HbHRT* 和 *HbFDP* 在 JA 和 ET 处理下表达量变化

Fig. 5 Expression of *HblMYB16*, *HbSRPP*, *HbHRT* and *HbFDP* under JA and ET treatments

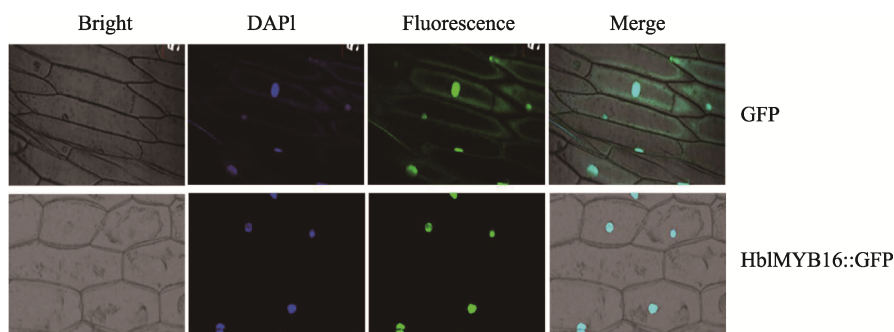


图 6 *HblMYB16* 亚细胞定位

Fig. 6 Subcellular localization of *HblMYB16*

2.6 酵母单杂交验证分析

如图 7 所示, 酵母单杂交验证阴性对照不能正常生长, 试验组和阳性对照均能正常生长, 结果表明 *HblMYB16* 与 *HbSRPP*、*HbFDP* 和 *HbHRT* 启动子互作。

3 讨论

MYB 转录因子是植物中成员数量最多的基因家族之一, 其 N 端包含高度保守的 MYB 结构域^[36]。R2R3-MYB 转录因子主要存在于植物中, 它含有 R2 和 R3 结构域。据报道, *R2R3-MYB* 基因是由 *R1R2R3-MYB* 基因中 R1 的重复丢失或 *R1-MYB* 基因中 R1 的重复进化而来^[37-38]。R2R3-

MYB 转录因子通过特异性结合靶基因启动子的关键序列来激活或抑制转录^[36]。R2R3-MYB 基因家族广泛参与调控各种生物过程, 包括植物生长发育、激素信号转导、初级和次级代谢等^[39-40]。例如, 在玉米中, 黄酮类化合物的生物合成受 3 个编码 R2R3-MYB 结构域的基因 (P、C1、PI) 直接或间接控制^[41-42]。猕猴桃中的 *MYB7* 基因能够调节类胡萝卜素和叶绿素的生物合成^[43]。观赏烟草的 *MYB305* 基因含有 1 个保守的 R2R3-MYB DNA 结合域, 敲除该基因的表达会导致花蜜素和黄酮类化合物生物合成相关基因的表达减少^[44]。

橡胶树乳管细胞是特异化合成和储存天然橡胶的场所, 它上下贯通分布于橡胶树树皮的韧皮

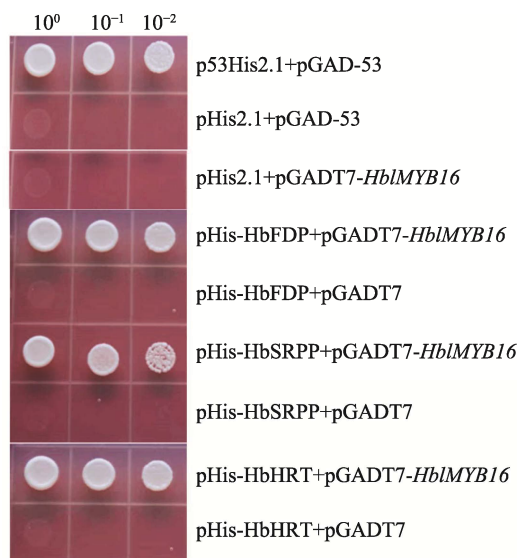


图7 *HbIMYB16* 与橡胶生物合成基因启动子的交互
Fig. 7 Interaction between *HbIMYB16* and the promoters of rubber synthesis genes

部。乳管的数量是决定天然橡胶产量的关键因素^[45], 天然橡胶生物合成相关基因在乳管细胞中高丰度表达^[46]。有证据显示乙烯对橡胶生物合成的某些方面可能有重要影响。乙烯被广泛应用于橡胶树刺激采胶, 大幅度提高了天然橡胶产量。杨子平^[47]证实乙烯通过诱导转录因子的表达来影响天然橡胶生物合成关联酶基因的表达。此外发现茉莉酸甲酯能诱导橡胶树幼树乳管分化, 且茉莉酸可能是橡胶生物合成的关键调节因子^[48-51], 这一发现将为发展新的激素调节提供可能。

彭世清等^[52]从巴西橡胶树中分离出 *HbMyb1* 基因。刘彤^[53]从橡胶树中分离出 2 个与木质素合成相关的基因 *HbMYB20* 和 *HbMYB52*。WANG 等^[31]证明 *HbIMYB19*, *HbIMYB44* 能够促进 *HbSRPP*、*HbFDP* 和 *HbHRT* 启动子的表达, 参与天然橡胶的生物合成途径。本研究通过对 *HbIMYB16* 的结构域分析发现, 与其他生物中 MYB 具有一致的 R2 和 R3 保守结构域, 说明 *HbIMYB16* 转录因子属于 R2R3-MYB 亚家族。通过对 *HbIMYB16* 基因在橡胶树不同组织特异性表达分析发现, *HbIMYB16* 在胶乳中的表达量最高。通过激素处理表明, 茉莉酸对 *HbIMYB16*、*HbSRPP*、*HbHRT* 和 *HbFDP* 的表达有促进作用, 而乙烯只对 *HbIMYB16* 和 *HbFDP* 表达有影响。暗示 *HbIMYB16* 可能与橡胶生物合成存在密切关系。亚细胞定位荧光观察结果显示 *HbIMYB16* 定位于细胞核中, 符合转录因子的特征。酵母单杂交验证 *HbIMYB16* 能促进

HbSRPP、*HbFDP* 和 *HbHRT* 启动子的表达, 证明它们之间存在着相互作用, 推测 *HbIMYB16* 可能参与调控天然橡胶生物合成。但具体调节机制还有待进一步研究。本研究为阐明天然橡胶生物合成的分子调控机制奠定基础, 可为将来通过生物技术调节橡胶生物合成提供理论依据。

参考文献

- [1] 覃怀德, 张安洋, 聂智毅, 康桂娟, 位明明, 曾日中, 罗微, 湛瑞芳. 海南热研 73397 等 5 个橡胶树品种全年割胶周期生胶质量变化[J]. 热带作物学报, 2024, 45(6): 1226-1234. QIN H D, ZHANG A Y, NIE Z Y, KANG G J, WEI M M, ZENG R Z, LUO W, ZHAN R F. Annual variations of the rubber qualities of five rubber tree clones including Reyan 73397 planted in Hainan, China[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2024, 45(6): 1226-1234. (in Chinese)
- [2] 张立群, 张继川, 廖双泉. 天然橡胶及生物基弹性体[M]. 北京: 化学工业出版社, 2014. ZHANG L Q, ZHANG J C, LIAO S Q. Natural rubber and bio-based elastomers[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2014. (in Chinese)
- [3] 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.
- [4] 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(12): 1231-1238. ZOU Z, YANG L F, WANG Z H, YUAN K. Biosynthesis and regulation of natural rubber in *Hevea*[J]. Plant Physiology Journal, 2009(12): 1231-1238. (in Chinese)
- [5] 刘卫平, 王敏杰, 韩玉珍, 赵德刚. 天然橡胶的生物合成机制[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(4): 382-388. LIU W P, WANG M J, HAN Y Z, ZHAO D G. Biosynthetic mechanism of natural rubber[J]. Plant Physiology Journal, 2002, 38(4): 382-388. (in Chinese)
- [6] ASAWATRERATANAKUL K, ZHANG Y W, WITITSUWANNAKUL D, WITITSUWANNAKUL R, TAKAHASHI S, RATTANAPITTAYAPORN A, KOYAMA T. Molecular cloning, expression and characterization of cDNA encoding cis - prenyltransferases from *Hevea brasiliensis*: a key factor participating in natural rubber biosynthesis[J]. European Journal of Biochemistry, 2003, 270(23): 4671-4680.
- [7] CORNISH K, BACKHAUS R A. Rubber transferase activity in rubber particles of guayule[J]. Phytochemistry, 1990, 29(12): 3809-3813.
- [8] CORNISH K, SILER D J. Characterization of cis-phenyl transferase activity localised in a bouyant fraction of rubber

- particles from *Ficus elastica* latex[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 1996, 34: 377-384.
- [9] DENNIS M S, LIGHT D R. Rubber elongation factor from *Hevea brasiliensis*: identification, characterization, and role in rubber biosynthesis[J]. Journal of Biological Chemistry, 1989, 264(31): 18608-18617.
- [10] GOYVAERTS E, DENNIS M, LIGHT D, CHUA N H. Cloning and sequencing of the cDNA encoding the rubber elongation factor of *Hevea brasiliensis*[J]. Plant Physiology, 1991, 97(1): 317-321.
- [11] CORNISH K, WOOD D F, WINDLE J J. Rubber particles from four different species, examined by transmission electron microscopy and electron-paramagnetic-resonance spin labeling, are found to consist of a homogeneous rubber core enclosed by a contiguous, monolayer biomembrane[J]. Planta, 1999, 210(1): 85-96.
- [12] OH S K, KANG H, SHIN D H, YANG J, CHOW K S, YEANG H Y, WAGNER B, BREITENEDER H, HAN K H. Isolation, characterization, and functional analysis of a novel cDNA clone encoding a small rubber particle protein from *Hevea brasiliensis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(24): 17132-17138.
- [13] JOHNSON A R, MOGHE G D, FRANK M H. Growing a glue factory: open questions in laticifer development[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2021, 64: 102096.
- [14] 刘祥. 杠柳顺式-1,4-聚异戊二烯生物合成关键基因 *PsIPPI* 和 *PsCPT* 的克隆及功能分析[D]. 银川: 宁夏大学, 2017.
- LIU X. Molecular cloning and functional analysis of key genes *PsIPPI* and *PsCPT* associated with *cis*-1,4-polyisoprene biosynthesis in *Periploca sepium*[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2017. (in Chinese)
- [15] YAMASHITA S, YAMAGUCHI H, WAKI T, AOKI Y, MIZUNO M, YANBE F, ISHII T, FUNAKI A, TOZAWA Y, MIYAGI-INOUE Y, FUSHIHARA K, NAKAYAMA T, TAKAHASHI S. Identification and reconstitution of the rubber biosynthetic machinery on rubber particles from *Hevea brasiliensis*[J]. eLife, 2016, 5: e19022.
- [16] BROWN D, FEENEY M, AHMADI M, LONOCE C, SAJARI R, COLA A D, FRIGERIO L. Subcellular localization and interactions among rubber particle proteins from *Hevea brasiliensis*[J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68(18): 5045-5055.
- [17] BANGRAK P, CHOTIGEAT W. Molecular cloning and biochemical characterization of a novel cystatin from *Hevea* rubber latex[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2011, 49(3): 244-250.
- [18] 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(1): 107-124.
- [19] WANG X C, WU J, GUAN M L, ZHAO C H, GENG P, ZHAO Q. *Arabidopsis* MYB4 plays dual roles in flavonoid biosynthesis[J]. The Plant Journal, 2020, 101(3): 637-652.
- [20] LOTKOWSKA M E, TOHGE T, FERNIE A R, XUE G P, BALAZADEH S, MUELLER-ROEBER B. The *Arabidopsis* transcription factor MYB112 promotes anthocyanin formation during salinity and under high light stress[J]. Plant Physiology, 2015, 169(3): 1862-1880.
- [21] LI C, WANG X, RAN L, TIAN Q, FAN D, LUO K. PtoMYB92 is a transcriptional activator of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in *Populus tomentosa*[J]. Plant and Cell Physiology, 2015, 56(12): 2436-2446.
- [22] MCCARTHY R L, ZHONG R, FOWLER S, LYSKOWSKI D, PIYASENA H, CARLETON K, SPICER C, ZHENG H Y. The poplar MYB transcription factors, PtrMYB3 and PtrMYB20, are involved in the regulation of secondary wall biosynthesis[J]. Plant and Cell Physiology, 2010, 51(6): 1084-1090.
- [23] MU R L, CAO Y R, LIU Y F, LEI G, ZOU H F, LIAO Y, WANG H W, ZHANG W K, MA B, DU J Z, YUAN M, ZHANG J S, CHEN S Y. An R2R3-type transcription factor gene *AtMYB59* regulates root growth and cell cycle progression in *Arabidopsis*[J]. Cell Research, 2009, 19(11): 1291-1304.
- [24] WEI Q H, CHEN R, WEI X, LIU Y H, ZHAO S J, YIN X P, XIE T. Genome-wide identification of R2R3-MYB family in wheat and functional characteristics of the abiotic stress responsive gene *TaMYB344*[J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 792.
- [25] DE GEYTER N, GHOLAMI A, GOORMACHTIG S, GOOSSENS A. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism[J]. Trends in Plant Science, 2012, 17(6): 349-359.
- [26] 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.
- [27] 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.

- [28] LI H L, WEI L R, GUO D, WANG Y, ZHU J H, CHEN X T, PENG S Q. HbMADS4, a MADSbox transcription factor from *Hevea brasiliensis*, negatively regulates HbSRPP[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1709.
- [29] LI H L, QU L, GUO D, WANG Y, ZHU J H, PENG S Q. Histone deacetylase interacts with a WRKY transcription factor to regulate the expression of the small rubber particle protein gene from *Hevea brasiliensis*[J]. *Industrial Crops and Products*, 2020, 145: 111989.
- [30] 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 Products*, 2019, 133: 90-97.
- [31] 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]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1974.
- [32] WANG Y, ZHAN D F, LI H L, GUO D, ZHU J H, PENG S Q. Identification and characterization of the MADS-box genes highly expressed in the laticifer cells of *Hevea brasiliensis*[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 12673.
- [33] 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.
- [34] GUO D, YANG Z P, LI H L, WANG Y, ZHU J H, PENG S Q. The 14-3-3 protein HbGF14a interacts with a RING zinc finger protein to regulate expression of the rubber transferase gene in *Hevea brasiliensis*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(8): 1903-1912.
- [35] 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.
- [36] ZHU N, DUAN B L, ZHENG H L, MU R R, ZHAO Y Y, KE L P, SUN Y Q. An R2R3 MYB gene *GhMYB3* functions in drought stress by negatively regulating stomata movement and ROS accumulation[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2023, 197: 107648.
- [37] JIANG C, GU J, CHOPRA S, GU X, PETERSON T. Ordered origin of the typical two-and three-repeat Myb genes[J]. *Gene*, 2004, 326: 13-22.
- [38] ROSINSKI J A, ATCHLEY W R. Molecular evolution of the MYB family of transcription factors: evidence for polyphyletic origin[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1998, 46(1): 74-83.
- [39] MARTIN C, PAZ-ARES J. MYB transcription factors in plants[J]. *Trends in Genetics*, 1997, 13(2): 67-73.
- [40] JIN H, MARTIN C. Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family[J]. *Plant Molecular Biology*, 1999, 41(5): 577-585.
- [41] CONE K C, COCCIOLOONE S M, BURR F A, BURR B. Maize anthocyanin regulatory gene P1 is a duplicate of C1 that functions in the plant[J]. *The Plant Cell*, 1993, 5(12): 1795-1805.
- [42] DU H, FENG B R, YANG S S, HUANG Y B, TANG Y X. The R2R3-MYB transcription factor gene family in maize[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e37463.
- [43] AMPOMAH-DWAMENA C, THRIMAWITHANA A H, DEJNOPRAT S, LEWIS D, ESLEY R V, ALLAN A C. A kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) R2R3-MYB transcription factor modulates chlorophyll and carotenoid accumulation[J]. *New Phytologist*, 2019, 221(1): 309-325.
- [44] LIU G, REN G, GUIRGIS A, THORNBURG R W. The MYB305 transcription factor regulates expression of nectarin genes in the ornamental tobacco floral nectary[J]. *The Plant Cell*, 2009, 21(9): 2672-2687.
- [45] 史敏晶, 张世鑫, 晁金泉, 李言, 邓小敏, 胡彦师, 田维敏. 橡胶树 1981TRRDB 野生种质预割诱导次生乳管分化的比较分析[J]. *热带作物学报*, 2022, 43(2): 303-310.
- SHI M J, ZHANG S X, CHAO J Q, LI Y, DENG X M, HU Y S, TIAN W M. Comparison of secondary laticifer differentiation of mature tree induced by pre-tapping in 1981TRRDB wild germplasm of rubber tree[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2022, 43(2): 303-310. (in Chinese)
- [46] ZHANG M, YANG Z, GUO D, LI H L, ZHU J H, PENG S Q, WANG Y. 14-3-3 proteins participate in regulation of natural rubber biosynthesis in *Hevea brasiliensis*[J]. *Forests*, 2023, 14(5): 911.
- [47] 杨子平. 14-3-3 蛋白调控天然橡胶生物合成的分子机制研究[D]. 海口: 海南大学, 2016.
- YANG Z P. 14-3-3 protein regulation of the molecular mechanism of natural rubber biosynthesis[D]. Haikou: Hainan University, 2016. (in Chinese)
- [48] HAO B Z, WU J L. Laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis*: induced by exogenous jasmonic acid and linolenic acid[J]. *Annals of Botany*, 2000, 85(1): 37-43.
- [49] DUAN C F, RIO M, LECLERCQ J, BONNOT F, OLIVER G, MONTORO P. Gene expression pattern in response to wounding, methyl jasmonate and ethylene in the bark of *Hevea brasiliensis*[J]. *Tree Physiology*, 2010, 30: 1349-1359.
- [50] TIAN W W, HUANG W F, ZHAO Y. Cloning and charac-

- terization of *HbJAZ1* from the laticifer cells in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)[J]. *Trees*, 2010, 24: 771-779.
- [51] HONG H, XIAO H, YUAN H, ZHAI J, HUANG H. Cloning and characterisation of JAZ gene family in *Hevea brasiliensis*[J]. *Plant Biology*, 2015, 17(3): 618-624.
- [52] 彭世清, 傅湘辉, 吴坤鑫, 陈守才. 巴西橡胶树死皮病相关基因 *HbMyb1* 的结构分析及表达[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2003(2): 147-152.
- PENG S Q, FU X H, WU K X, CHEN S C. Structural analysis and expression of the *HbMyb1* gene related to bark disease in Brazilian rubber trees[J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2003(2): 147-152. (in Chinese)
- [53] 刘彤. 橡胶树木质素合成相关 *MYB* 基因的功能鉴定[D]. 海口: 海南大学, 2015.
- LIU T. Functional identification of lignin biosyntheses related *MYB* genes from *H. brasiliensis*[D]. Haikou: Hainan University, 2015. (in Chinese)