

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201510013

邓小敏, 吴绍华, 戴雪梅, 等. 巴西橡胶树胶乳和悬浮细胞中 MVA 和 MEP 代谢途径基因的表达分析[J]. 广西植物, 2016, 36(4):449-455
DENG XM, WU SH, DAI XM, et al. Expression analysis of MVA and MEP metabolic pathways genes in latex and suspension cells of *Hevea brasiliensis*[J].
Guihaia, 2016, 36(4):449-455

巴西橡胶树胶乳和悬浮细胞中 MVA 和 MEP 代谢途径基因的表达分析

邓小敏, 吴绍华, 戴雪梅, 田维敏*

(中国热带农业科学院橡胶研究所/农业部橡胶树生物学重点开放实验室/省部共建国家重点实验室培育基地—海南省热带作物栽培生理学重点实验室, 海南 儋州 571737)

摘要: MVA 和 MEP 代谢途径是植物类异戊二烯代谢途径的两条重要次生代谢途径。该研究利用荧光定量 PCR 技术, 分析了橡胶树胶乳和橡胶树花药愈伤组织来源的悬浮细胞中 MVA 代谢途径和 MEP 代谢途径中关键基因的表达水平, 同时分析了茉莉酸的结构类似物冠菌素 (coronatine, COR) 对悬浮细胞中 *HbAACT3*, *HbHMGR4*, *HbHMGR5*, *HbDXS2*, *HbDXR* 和 *HbSQS1* 基因表达的调节作用。结果表明: 在 MVA 代谢途径中, 基因 *HbAACT1*, *HbAACT2*, *HbHMGS1*, *HbHMGS2*, *HbHMGR1*, *HbHMGR3*, *HbMVK*, *HbPMK*, *HbMVD1*, *HbMVD2* 和 IPP 下游代谢基因 *HbIPPI1* 和 *HbFDPS1* 在胶乳中的表达量要相对高于其在悬浮细胞中的表达量, 然而橡胶树悬浮细胞中 MEP 代谢途径基因 *HbDXS1*, *HbDXS2*, *HbDXR*, *HbCMS1*, *HbCMS2*, *HbCMK*, *HbMCS1*, *HbMCS2*, *HbHDS*, *HbHDR* 和鲨烯合酶基因 *HbSQS1* 的表达水平要相对高于胶乳。而且 COR 能不同程度地上调 *HbHMGR5*, *HbHMGR4*, *HbSQS1*, *HbDXS2* 和 *HbDXR* 基因的表达水平。该研究结果为探索利用橡胶树悬浮细胞体系研究次生代谢合成调控以及生产活性次生代谢产物奠定了基础。

关键词: 巴西橡胶树, 甲羟戊酸, 脱氧木酮糖-5-磷酸, 冠菌素, 鲨烯合酶基因

中图分类号: Q945.4, Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2016)04-0449-07

Expression analysis of MVA and MEP metabolic pathways genes in latex and suspension cells of *Hevea brasiliensis*

DENG Xiao-Min, WU Shao-Hua, DAI Xue-Mei, TIAN Wei-Min*

(Key Laboratory for Rubber Biology, Ministry of Agriculture/State Key Laboratory Incubation Base for Cultivation and Physiology of Tropical Crops/Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China)

Abstract: The MVA and MEP metabolic pathways are two important plant isoprenoid metabolic pathways in plants. The expression of genes respectively in MVA and MEP secondary metabolic pathways were analyzed in the latex and suspension cells from anther-derived callus of *Hevea brasiliensis* by using qRT-PCR technology. In addition, expression changes of *HbAACT3*, *HbHMGR4*, *HbHMGR5*, *HbDXS2*, *HbDXR* and *HbSQS1* genes were further analyzed in the suspension cells under COR treatment. The results demonstrated that expressions of *HbAACT1*, *HbAACT2*, *HbHMGS1*, *HbHMGS2*, *Hb-*

收稿日期: 2015-10-13 修回日期: 2015-12-08

基金项目: 国家自然科学基金(31170642); 中国热带农业科学院橡胶研究所基本科研业务费(1630022015010)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(31170642); the Fundamental Research Fund for Rubber Research Institute, CATAS(NO.1630022015010)]。

作者简介: 邓小敏(1985-), 男, 湖北荆州监利人, 博士研究生, 助理研究员, 主要从事橡胶树分子生物学和次生代谢调控研究, (E-mail) dxm-bio822@163.com。

*通讯作者: 田维敏, 博士, 教授, 主要从事橡胶树发育生物学研究, (E-mail) wmtian@163.com。

HMGR1, *HbHMGR3*, *HbMVK*, *HbPMK*, *HbMVD1*, *HbMVD2* in MVA metabolic pathway and *HbIPPI1* and *HbFDPS1* genes involved in IPP utilization were relatively higher in latex than that in suspension cells, while *HbDXS1*, *HbDXS2*, *HbDXR*, *HbCMS1*, *HbCMS2*, *HbCMK*, *HbMCS1*, *HbMCS2*, *HbHDS* and *HbHDR* in MEP metabolic pathway and *HbSQS1* were relatively higher in suspension cells than that in latex. Moreover, *HbHMGR5*, *HbHMGR4*, *HbSQS1*, *HbDXS2* and *HbDXR* genes were induced highly or to some degree in suspension cells by COR application. This study lays a foundation for further utilization of suspension cells to analyze secondary metabolism regulation as well as to produce bioactive compounds from anther-derived callus of *Hevea brasiliensis* in the future.

Key words: *Hevea brasiliensis*, mavalonic acid, methylerythritol phosphate, coronatine, squalene synthase

甲羟戊酸(mavalonic acid, MVA)途径和脱氧木酮糖-5-磷酸(DXP)或甲基赤藓醇-4-磷酸(methylerythritol phosphate, MEP)途径是植物细胞类异戊二烯代谢途径中合成异戊烯基焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP)的两条重要来源。其中, MVA 代谢途径位于细胞质中, 以乙酰辅酶 A 为代谢原料; 而 MEP 代谢途径则位于质体中, 以丙酮酸和甘油醛-3-磷酸为代谢原料(王凌健等, 2013; Chow et al, 2007, 2012)。异戊烯基焦磷酸是合成植物萜类次生代谢物的重要原料, 而且异戊烯基焦磷酸的合成和利用效率将直接影响到下游重要次生代谢产物的产率。

巴西橡胶树是工业原料天然橡胶的主要来源。乳管细胞细胞质——胶乳是合成天然橡胶(顺式异戊二烯链)的主要场所。天然橡胶生物合成是乳管细胞中典型的植物类异戊二烯代谢途径, 乳管细胞中也存在 MVA 和 MEP 代谢途径, 其中 MVA 代谢途径是胶乳中合成天然橡胶的主要途径 (Chow et al, 2007, 2012)。最近的研究发现胶乳中除了主要合成天然橡胶分子外, 同时还合成一些重要的萜类分子, 比如含量较高的角鲨烯(梅志刚等, 2011)(图 1), 并且胶乳中合成角鲨烯的关键基因 *HbSQS1* 已被鉴定(张志平等, 2014)。

橡胶树花药愈伤组织来源的悬浮细胞培养体系已经成功建立。目前主要用于原生质体融合和植株再生研究(戴学梅等, 2013), 其用于橡胶树次生代谢研究还未见报道。在同为天然橡胶合成(反式异戊二烯链)的杜仲树中, 已经有利用悬浮细胞生产绿原酸的初步研究(王亚琴等, 2008)。同时也有研究表明茉莉酸作为诱导子能诱导重要次生代谢物的合成(孙彬贤等, 2000; 王焕等, 2014)。因此, 本文重点研究橡胶树胶乳和悬浮细胞中 MVA 和 MEP 代谢途径重要基因的表达模式, 以及在悬浮细胞中茉莉酸类似物——COR 对关键酶编码基因的表达调控作用, 为今后利用胶乳和悬浮细胞研究次生代谢

调控, 同时为利用悬浮细胞生产生物活性物质奠定前期实验基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

橡胶树胶乳采集于中国热带农业科学院试验场的橡胶树无性系热研 8-79, 橡胶树无性系热研 8-79 花药愈伤组织来源的悬浮细胞由戴雪梅老师馈赠。本实验所用生化试剂冠菌素为 Sigma 分析纯, 所用试剂盒为天根植物总 RNA 提取试剂盒, Fermentas cDNA 反转录试剂盒, Takara SYBR Premix EX 荧光定量 PCR 试剂盒为, 引物为英骏公司合成。

1.2 方法

1.2.1 材料处理 将终浓度为 $1 \mu\text{m} \cdot \text{L}^{-1}$ 的茉莉酸生理活性类似物冠菌素 (coronatine, COR) 添加至橡胶树悬浮细胞培养液中分别处理 8 h, 1 d, 3 d, 5 d 和 7 d, 对照不添加 COR, 为正常的悬浮细胞培养液。每个时间点取样后置于 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 轻柔离心, 收集悬浮细胞放置液氮中速冻并保存于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。割胶后收集胶乳到预先添加提取液的无 RNase 污染的离心管中, 混匀置于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 RNA 提取与 cDNA 合成 胶乳样品和悬浮细胞样品的 RNA 提取利用天根植物总 RNA 提取试剂盒, 参照说明书上方法提取, 所提取的 RNA 经过琼脂糖凝胶电泳确定完整性和无 DNA 污染, 同时利用 Nano drop 核酸定量仪鉴定 RNA 的含量和纯度, 其中 OD260/OD280 为 1.8~2.0, 表明所提 RNA 纯度较高, 符合后续实验要求。cDNA 第一链合成利用 Fermentas cDNA 第一链反转录试剂盒参照使用说明书合成。

1.2.3 荧光定量 PCR 本实验涉及到的 MVA 和 MEP 代谢途径基因和橡胶树鲨烯合酶基因 *HbSQS1* 的引物序列(表 1)主要来源于 5 篇已报道的文献 (Chow et al, 2007, 2012; 张志平等, 2014; Sando et al,

表 1 该研究使用的引物信息
Table 1 Primers used in present study

路径名 Pathway name	基因名 Gene name	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
MVA 代谢途径 MVA metabolic pathway	<i>HbAACT1</i>	<i>HbAACT1</i> -qFW	GCATTGGCTATACCTAAAACGATTG
		<i>HbAACT1</i> -qRV	GCGAAGGCTTCATTTATTTTCATAGT
	<i>HbAACT2</i>	<i>HbAACT2</i> -qFW	GCTCCGACCAAGTTTCAAAGAG
		<i>HbAACT2</i> -qRV	ATTACAGCAGCAGCACCATCAC
	<i>HbAACT3</i>	<i>HbAACT3</i> -qFW	GCATCTGCCCTTGTTCCTTGAG
		<i>HbAACT3</i> -qRV	GCTGATGTTAGAGTGACCAATTTGA
	<i>HbHMGS1</i>	<i>HbHMGS1</i> -qFW	CGGGTGACACTGTTCTCTTATGG
		<i>HbHMGS1</i> -qRV	GGGATGTTGGCCTTCATGTAGT
	<i>HbHMGS2</i>	<i>HbHMGS2</i> -qFW	CTTGCGCCTGGAACATACTA
		<i>HbHMGS2</i> -qRV	TGTATCGCCAACAGCCTTCTG
	<i>HbHMGR1</i>	<i>HbHMGR1</i> -qFW	GTCTTGTGAAGGATGCCATGAC
		<i>HbHMGR1</i> -qRV	TCAACTCCGGCCTCTAGTC
	<i>HbHMGR3</i>	<i>HbHMGR3</i> -qFW	AGTGTCCATGCCTTCCATTGA
		<i>HbHMGR3</i> -qRV	CAGACAAGCTGATTGAGATGCAA
	<i>HbHMGR4</i>	<i>HbHMGR4</i> -qFW	TGGAGCCACAAGTGTCTCTGTT
		<i>HbHMGR4</i> -qRV	TTGCTGTCCAAACCTAACGA
	<i>HbHMGR5</i>	<i>HbHMGR5</i> -qFW	CCCTGGCTGGAGCTCTAGGT
		<i>HbHMGR5</i> -qRV	TCTTGGCCTGTGCGTATGTAGAT
	<i>HbMVK</i>	<i>HbMVK</i> -qFW	GTCTGTAATCTGACTCGCATCAA
		<i>HbMVK</i> -qRV	GTTCTCCCAACTCTTGTGTAGTG
	<i>HbPMK</i>	<i>HbPMK</i> -qFW	GAAATGCCATGCTTCAGATCAG
		<i>HbPMK</i> -qRV	TGATTCAGGCTCTATCGGAACA
	<i>HbMVD1</i>	<i>HbMVD1</i> -qFW	CACACTTAACCTGTGCTGATAGTAATC
		<i>HbMVD1</i> -qRV	TGAGGTGTTCTACAGAACGATTC
<i>HbMVD2</i>	<i>HbMVD2</i> -qFW	GTAATAGGCAGGCTGCTGCCCG	
	<i>HbMVD2</i> -qRV	CTGGACCTCGACCTGGTCTTTGTG	
MEP 代谢途径 MEP metabolic pathway	<i>HbDXS1</i>	<i>HbDXS1</i> -qFW	CAGAAGCAGAAAGTGGACAAGGAT
		<i>HbDXS1</i> -qRV	AACGGCGAAGGAAGAGATTTAAG
	<i>HbDXS2</i>	<i>HbDXS2</i> -qFW	TGTTTTGTTGTTGTCAGATG
		<i>HbDXS2</i> -qRV	CTACCATGTTGGGCAAGCAA
	<i>HbDXR</i>	<i>HbDXR</i> -qFW	ACCCTTCTATGGATCTTGCCTATG
		<i>HbDXR</i> -qRV	GCAGCACTAAGCACTCCAGTCA
	<i>HbCMS1</i>	<i>HbCMS1</i> -qFW	CAGCTGCCAAAAGAGAAGAGTGTT
		<i>HbCMS1</i> -qRV	GCTTGCACCCATTCTTTTTCG
	<i>HbCMS2</i>	<i>HbCMS2</i> -qFW	CCAAAAGAACGGGAGGAAGAGA
		<i>HbCMS2</i> -qRV	AGGTTTATGCCAAGAAGATGATG
	<i>HbCMK</i>	<i>HbCMK</i> -qFW	GGCAAGACCGCCACTGAA
		<i>HbCMK</i> -qRV	CAGGGCTTGGTGGTGGA
	<i>HbMCS1</i>	<i>HbMCS1</i> -qFW	AACTTGGATGCCACCTTGATTC
		<i>HbMCS1</i> -qRV	AGCTGACACAAATTGTCCCTGAT
	<i>HbMCS2</i>	<i>HbMCS2</i> -qFW	GGATGCCACCTTAATTCTTCAAAG
		<i>HbMCS2</i> -qRV	CCAAGCAGCTGACACAAATTGT

续表 1

路径名 Pathway name	基因名 Gene name	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')
IPP 下游代谢基因和内参基因 IPP downstream metabolic genes and internal control genes	<i>HbHDS</i>	<i>HbHDS</i> -qFW	GCTGACAAAGCCATTACCCAAT
		<i>HbHDS</i> -qRV	CGTGACCTTCTGGCAAAAGC
	<i>HbHDR</i>	<i>HbHDR</i> -qFW	TTCCTACCAGAAGGTCCCATTAC
		<i>HbHDR</i> -qRV	ATATCCAACCACTAATTGCAGCTC
	<i>HbIPPI1</i>	<i>HbIPPI1</i> -qFW	ACCTTGCTTTAGACTAGTTGTGGAC
		<i>HbIPPI1</i> -qFV	AACTCGTTTACAACCTGACATTACCA
	<i>HbIPPI2</i>	<i>HbIPPI2</i> -qFW	ACACGTTGAAAAGGGGACACTC
		<i>HbIPPI2</i> -qFV	CCAGACTAAGAATACTGAATGCCG
	<i>HbFDPS1</i>	<i>HbFDPS1</i> -qFW	TAACCTCTATTGAAGCTCATCCTAG
		<i>HbFDPS1</i> -qFV	TTCAGCGTCATCCAGCTCTTTG
	<i>HbSQS1</i>	<i>HbSQS1</i> -qFW	GATTTGGCACCAGATGTCCT
		<i>HbSQS1</i> -qRV	GCCAAAACATGCCTGACTTA
	<i>Hb18S</i>	<i>Hb18S</i> -qFW	CCATAAACGATGCCGACCAG
		<i>Hb18S</i> -qRV	CAGCCTTGCCGACCATACTC
<i>HbACTIN</i>	<i>HbACTIN</i> -qFW	GATTCCGTTGCCCAGAAGTC	
	<i>HbACTIN</i> -qFV	CACCACTCAGCACAATGTTACC	

2008a,b), 另外 *HbMVD1* 和 *HbMVD2* 基因序列来源于 NCBI 数据库, 序列号分别为 JN036537 和 JN036539, 其特异性已经过序列比对, 琼脂糖电泳和测序分析, 均为正确可用。其中, 内参基因的选择参照伯乐 CFX 系列荧光定量 PCR 仪中的分析软件说明, 选取两个内参基因 (*Hb18S* 和 *HbActin* 基因) 用于分析其他待研究基因的相对表达量。

荧光定量 PCR 反应的反应体系为 10 μL : 水 3 μL , 2 \times Takara SYBR Premix EX Taq 5 μL , 正反向引物 (10 $\mu\text{M} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 0.5 μL , cDNA 模板 1 μL 。荧光定量 PCR 反应在伯乐 CFX 系列荧光定量 PCR 仪上运行, PCR 反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 40 个循环; 实验设 3 个重复。利用仪器自带分析软件分析基因的表达水平 ($\Delta\Delta\text{CT}$ 法), 其中以悬浮细胞为对照样品检测所研究的目标基因与内参基因的相对表达量作为目标基因的表达水平。

2 结果与分析

2.1 MVA 代谢途径基因的表达分析

MVA 代谢途径就是将初始原料蔗糖转化为异戊烯基焦磷酸 IPP 的代谢途径, 利用橡胶树在该代谢通路中已发表的基因表达检测引物和新登录的基

因序列设计的引物, 在胶乳和悬浮细胞中检测这些基因的表达模式, 结果发现 MVA 代谢途径基因 *HbAACT1*, *HbAACT2*, *HbHMGR1*, *HbHMGR3*, *HbHMGS1*, *HbHMGS2*, *HbMVK*, *HbPMK*, *HbMVD1* 和 *HbMVD2* 在胶乳中的表达量高于其在悬浮细胞中的表达量 (图 2)。这表明至少与悬浮细胞相比, 橡胶树乳管细胞的胶乳中 MVA 途径基因的表达占优势, 表明在胶乳中相比 MEP 代谢途径, MVA 代谢途径是主要的 IPP 代谢途径。而且 IPP 下游代谢基因 *HbIPPI1* 和 *HbFDPS1* 在胶乳中的表达量也高于悬浮细胞, 这些结果表明胶乳中对蔗糖的转化利用效率可能要高于悬浮细胞。另外部分 MVA 代谢途径基因如 *HbAACT3*, *HbHMGR4*, *HbHMGR5* 和 *HbIPPI2* 在悬浮细胞中的表达量却相对高于其在胶乳中的表达量, 说明 MVA 代谢途径部分基因的同源基因在悬浮细胞中可能也发挥着重要的作用 (图 2)。

2.2 MEP 代谢途径基因的表达分析

定位于质体或叶绿体中的脱氧木酮糖-5-磷酸 (DXP) 或甲基赤藓醇-4-磷酸 (methylerythritol phosphate, MEP) 途径是将初始原料丙酮酸和甘油醛-3-磷酸转化为异戊烯基焦磷酸 IPP。同样地, 利用橡胶树该代谢通路中已发表的基因表达检测引物和新登录的基因序列设计的引物, 在胶乳和悬浮细胞中检测这些基因的表达模式, 结果发现 MEP 代谢途径

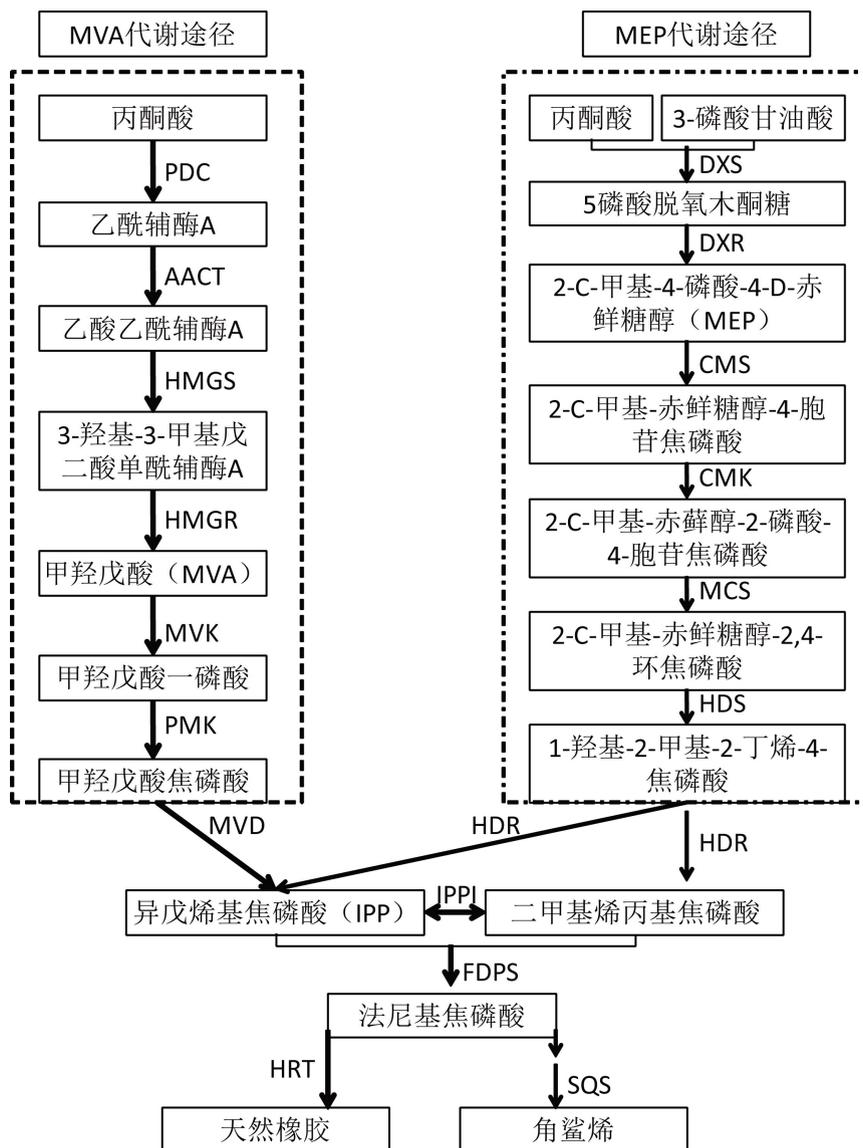


图 1 橡胶树胶乳中 MVA 和 MEP 代谢途径 引自 Sando et al, 2008a, b, 略有改动。

Fig. 1 MVA and MEP metabolic pathways in latex of *Hevea brasiliensis*

This map was draw based on Sando et al, 2008a, b, with some modification.

基因 *HbDXS1*, *HbDXS2*, *HbDXR*, *HbCMS1*, *HbCMS2*, *HbCMK*, *HbMCS1*, *HbMCS2*, *HbHDR* 和 *HbHDS* 在悬浮细胞中的表达量均高于其在胶乳中的表达量(图 3)。这说明悬浮细胞在离体培养条件下 MEP 代谢途径基因的表达相比 MVA 代谢途径基因更占优势, 悬浮细胞可能更倾向于利用 MEP 途径生产其所需的 IPP 原料。同时对 IPP 下游代谢基因鲨烯合酶基因 *HbSQS1* 的表达检测发现其在悬浮细胞中的表达量也高于其在胶乳中的表达量(图 3), 这些结果说明胶乳系统中由于将 IPP 主要用于合成天然橡胶, 一些其他的萜类化合物合成酶基因如鲨烯合酶

基因的表达可能会受到一定程度的抑制。然而悬浮细胞因为不能合成橡胶, 其 IPP 代谢流将转向其他代谢分支, 鲨烯合酶基因 *HbSQS1* 的表达量可能由此升高, 以上结果表明悬浮细胞中的两条 IPP 代谢途径与胶乳系统相比进行了调整, 使得 MEP 代谢途径可能成为优势代谢途径, 并且同时也加强了合成下游次生代谢物比如角鲨烯的鲨烯合酶基因的表达。

2.3 COR 对橡胶树悬浮细胞中 MEP 代谢途径关键基因和 MVA 代谢途径中优势表达基因的影响

茉莉酸及其结构类似物被证明通过上调植物次

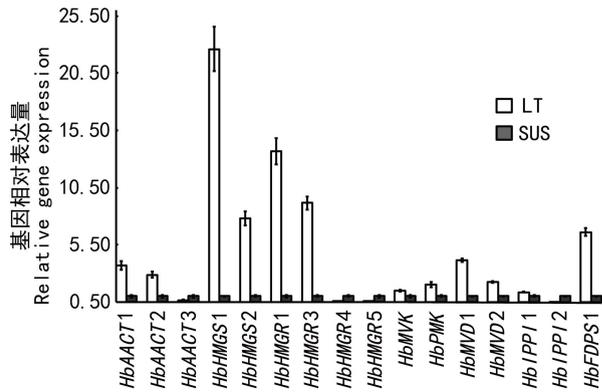


图2 橡胶树胶乳和悬浮细胞中MVA代谢途径基因的表达分析 LT代表胶乳;SUS代表橡胶树花药愈伤组织来源的悬浮细胞。下同。

Fig. 2 Expression analysis of genes involved in MVA metabolic pathway in latex and suspension cells of *Hevea brasiliensis* LT represents latex, SUS represents suspension cells of *Hevea brasiliensis*. The same below.

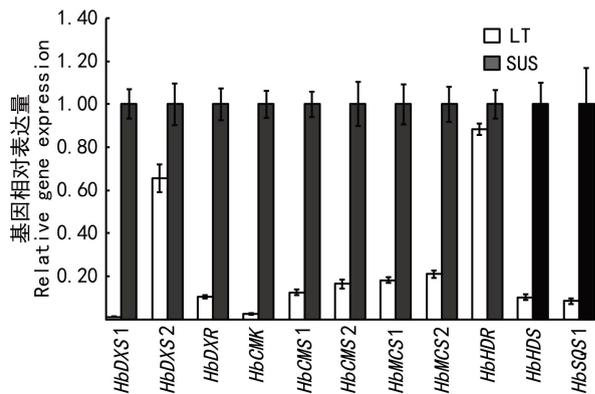


图3 橡胶树胶乳和悬浮细胞中MEP代谢途径基因的表达分析

Fig. 3 Expression analysis of genes involved in MEP pathway in latex and suspension cells of *Hevea brasiliensis*

生代谢物合成关键酶基因的表达,进而诱导次生代谢物的合成(王焕等,2014;魏洁书等,2014)。本研究分析茉莉酸的活性结构类似物COR对橡胶树悬浮细胞中MEP代谢途径关键基因*HbDXS1*,*HbDXS2*和*HbDXR*,MVA代谢途径中上调表达的基因*HbAACT3*,*HbHMGR4*和*HbHMGR5*,以及角鲨烯合成途径重要基因*HbSQS1*表达的影响。结果发现,1 $\mu\text{m} \cdot \text{L}^{-1}$ COR对*HbHMGR5*基因表达的诱导最强,其次是*HbHMGR4*基因,而对*HbSQS1*,*HbDXS2*和*HbDXR*基因的诱导作用相对较弱。*HbAACT3*基因的表达呈现“振荡表达模式”,其诱导作用也较弱

(图4)。这表明COR对橡胶树悬浮细胞MEP代谢通路关键基因具有一定程度的诱导作用,而且COR对悬浮细胞中MEP和MVA代谢通路内部分基因都能诱导表达,不局限于特定诱导或调控其中一种代谢通路。通过对这两条代谢通路基因的诱导,特别是诱导鲨烯合酶基因*HbSQS1*的表达,COR很有可能有助于提高橡胶树悬浮细胞中角鲨烯或其他次生代谢物质的合成。

3 讨论

橡胶树乳管是橡胶树树皮中的一种特化组织,具有抵御外界刺激的作用,因此是一种重要的保护组织。胶乳是乳管中的细胞质组分,其中主要合成天然橡胶分子(何康和黄宗道,1987)。胶乳中虽然存在MEP代谢途径基因表达,但是MVA代谢途径仍然是胶乳中合成天然橡胶分子的主要途径(Chow et al,2007,2012)。橡胶树花药愈伤组织来源的悬浮细胞体系实验系统已经成功建立,但尚不清楚MVA代谢途径在橡胶树悬浮细胞中是否也是主要异戊二烯代谢途径。本研究对MVA和MEP代谢途径基因在胶乳系统和悬浮细胞系统中的表达水平进行比较,发现了新的现象:与胶乳系统不同,体外离体培养的橡胶树悬浮细胞中MEP代谢途径基因的表达量比MVA代谢途径基因的表达量高,说明不是所有的组织都主要采用MVA代谢途径来生产IPP原料分子,悬浮细胞作为离体组织细胞有它自身的内在特征,利用这一体系进行实验需要先了解这个体系的本身特征,而不能照搬已有的认识。因此,本研究有助于对橡胶树悬浮细胞和胶乳中差异代谢途径特征的认识,对其他植物悬浮细胞体系的研究和利用也具有一定的借鉴意义。

悬浮细胞已经被用来研究和生产重要次生代谢产物(孙彬贤等,2000;王亚琴等,2008)。为提高所需次生代谢物质的含量需要添加各种诱导物,其中茉莉酸及其类似物是广泛使用的诱导剂,能够促进次生代谢物合成基因的表达,并提高其含量。如茉莉酸能促进南方红豆杉(*Taxus chinensis* var. *meirei*)悬浮细胞中抗癌物质紫杉醇的积累(孙彬贤等,2000)。本研究分析了茉莉酸活性结构类似物——COR对在橡胶树悬浮细胞中优势表达和一些关键酶编码基因的转录调节作用,结果发现COR能同时诱导MEP和MVA代谢途径的基因,表明这种诱导

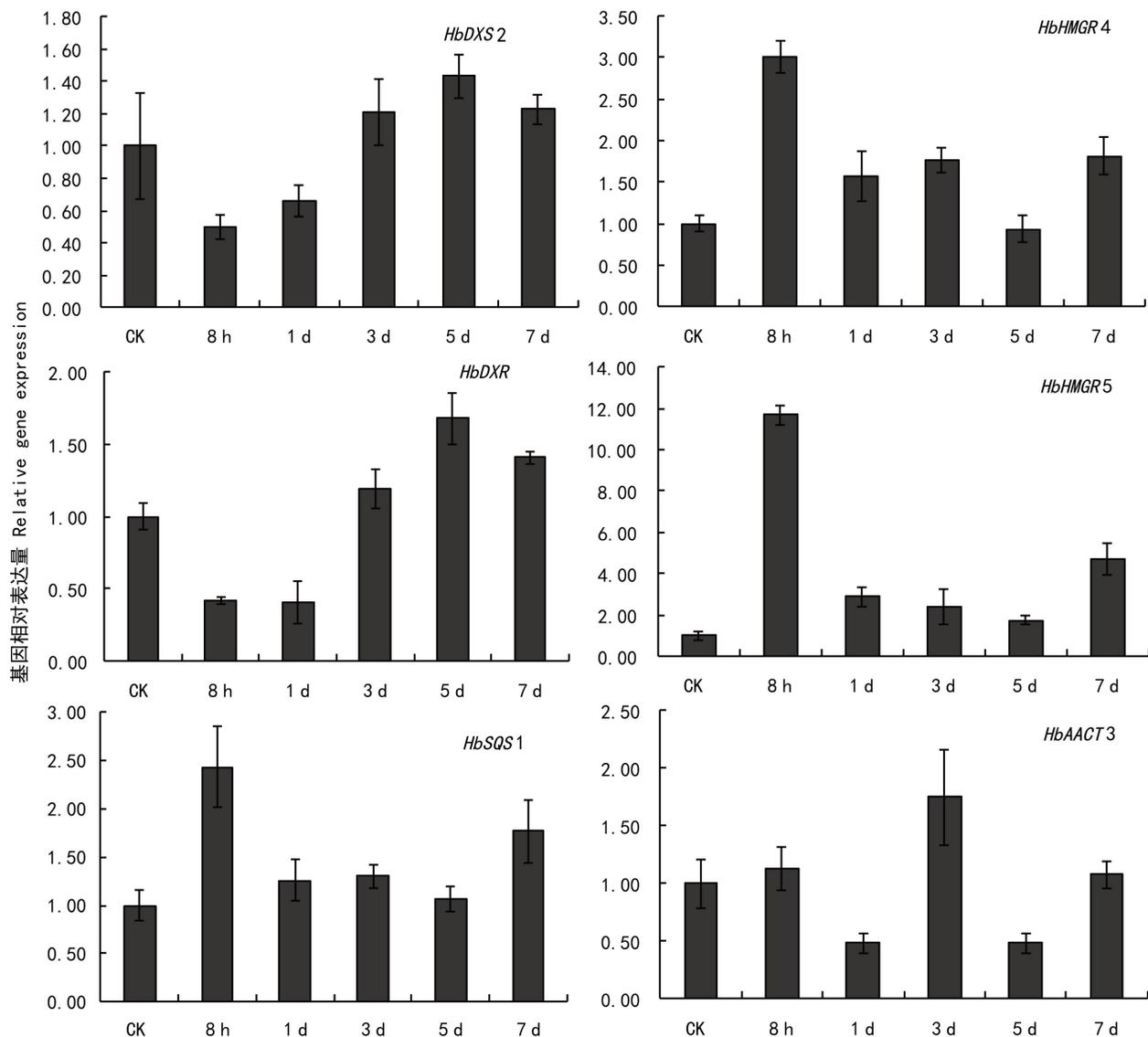


图 4 COR 对 MEP 代谢途径关键基因和其它在悬浮细胞中富集表达基因的调节
Fig. 4 Regulatory effects of COR on expression of key genes involved in MEP metabolic pathway or enriched expressed genes in suspension cells

效应不仅仅局限于某一个基因或某一类代谢途径, 这样可能更有利于增强植物的次生代谢。因此相比某一特定次生代谢产物的积累, 茉莉酸及其结构类似物可能更多的是一种通用的促进剂或诱导剂。

角鲨烯虽然在胶乳中的含量已被测定, 但是胶乳中提取利用该物质目前还有一定的难度。而橡胶树悬浮细胞也检测到鲨烯合酶基因 *HbSQS1* 的表达, 同时也受 COR 诱导, 这些实验结果将为利用悬浮细胞体系生产角鲨烯等活性次生代谢物质奠定重要的前期研究基础。

参考文献:

- CHOW KS, MAT-ISA MN, BAHARI A, et al, 2012. Metabolic routes affecting rubber biosynthesis in *Hevea brasiliensis* latex [J]. *J Exp Bot*, 63(5): 1 863-1 871.
- CHOW KS, WAN KL, ISA MN, et al, 2007. Insights into rubber biosynthesis from transcriptome analysis of *Hevea brasiliensis* latex [J]. *J Exp Bot*, 58(10): 2 429-2 440.
- DAI XM, LI Z, HUA YW, et al, 2013. Plant regeneration from protoplast culture of Reyan 8-79 (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) [J]. *J Southern Agric*, 44(12): 2 040-2 045. [戴雪梅, 李哲, 华玉伟, 等, 2013. 橡胶树热研 879 原生质体培养再生植株 [J]. *南方农业学报*, 44(12): 2 040-2 045.]

(下转第 396 页 Continue on page 396)