

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201808035

引文格式: 杨曙光, 赵悦, 陈月异, 等. 橡胶树茉莉酸信号途径相关基因表达与橡胶产量的相关性 [J]. 广西植物, 2019, 39(5): 641-649.

YANG SG, ZHAO Y, CHEN YY, et al. Correlation between expression level of genes related to jasmonate signalling and rubber yield [J]. *Guihaia*, 2019, 39(5): 641-649.

橡胶树茉莉酸信号途径相关基因 表达与橡胶产量的相关性

杨曙光¹, 赵悦², 陈月异¹, 李言¹, 张世鑫¹, 田维敏^{1*}

(1. 中国热带农业科学院橡胶研究所 农业农村部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室 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; 2. 中国农业大学 农学院, 北京 100193)

摘要: 割胶促进橡胶树合成天然橡胶与激活乳管细胞的茉莉酸信号途径密切相关, 但茉莉酸信号途径关键环节的基因表达水平与干胶产量的相关性尚不清楚。为了找到与产量相关的分子标记, 该研究采用 qPCR 技术, 分析了割胶条件下茉莉酸信号途径关键环节的 9 个相关基因在 5 个橡胶树魏克汉种质和 5 个 1981' IRRDB 种质乳管细胞中的表达。结果表明: 大多魏克汉种质的株次干胶产量显著高于 1981' IRRDB 种质。在 9 个基因中, 除了 *HbMYC4* 和 *HbMYC5*, 其余 7 个基因在大多橡胶树魏克汉种质中的表达量均显著高于 1981' IRRDB 种质, 尤其是 *HbMYC3* 基因表达差异性良好, 与干胶产量相关性高, 有望作为橡胶树产量育种的一个分子标记。这对育种周期长的橡胶树产量育种具有实际应用价值。

关键词: 巴西橡胶树, 割胶, 橡胶生物合成, 茉莉酸信号途径, *HbCO11*, *HbJAZs*, *HbMYCs*, 基因表达

中图分类号: Q943.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2019)05-0641-09

Correlation between expression level of genes related to jasmonate signalling and rubber yield

YANG Shuguang¹, ZHAO Yue², CHEN Yueyi¹, LI Yan¹, ZHANG Shixin¹, TIAN Weimin^{1*}

(1. *Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Key Laboratory of Rubber Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P. R. China/State Key Laboratory Incubation Base for Cultivation & Physiology of Tropical Crops, Danzhou 571737, Hainan, China*; 2. *College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 10093, China*)

Abstract: Tapping-enhanced rubber biosynthesis is closely related to the activation of jasmonate signaling in laticifer cells of rubber tree. The relationship between the expression level of the genes involved in jasmonate signaling and dry rubber yield remains not elucidated. In the present study, the expression of nine genes related to jasmonate signaling was analyzed by qPCR in the laticifer cells of five Wichham germplasms and 5 1981' IRRDB germplasms upon tapping with

收稿日期: 2018-11-22

基金项目: 国家青年科学基金(31800577); 国家天然橡胶产业技术体系分子育种岗位专项项目(CARS-34-GW1); 海南省自然科学基金(20153136); 中国热带农业科学院橡胶研究所基本科研业务费专项项目(1630022016003, 1630022017027) [Supported by the National Natural Science Foundation for Youth of China(31800577); Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-34-GW1); Provincial Natural Science Foundation of Hainan (20153136); Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund for Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences (1630022016003, 1630022017027)].

作者简介: 杨曙光(1982-), 男(苗族), 云南临沧凤庆人, 硕士, 助理研究员, 主要从事橡胶树分子遗传学研究, (E-mail) yangshuguang198241@163.com。

*通信作者: 田维敏, 博士, 教授/研究员, 博士研究生导师, 主要从事橡胶树发育生物学研究, (E-mail) wmtian@163.com。

S/2 d/3 tapping system. The rubber yield per tapping of most Wichham germplasms was significantly higher than that of 1981' IRRDB germplasms. Except for *HbMYC4* and *HbMYC5*, the expression level of the other seven genes in most of Wichham germplasms was significantly higher than that of 1981' IRRDB germplasms. It was noted that the expression of *HbMYC3* was highly different and closely related to the rubber yield, which may be used as a candidate marker for rubber yield-breeding of rubber tree.

Key words: *Hevea brasiliensis*, tapping, rubber biosynthesis, jasmonate signaling, *HbCOI1*, *HbJAZs*, *HbMYCs*, gene expression

茉莉酸是植物应对逆境胁迫的关键信号分子 (Qi et al., 2011), 其信号传导的三个核心环节是 COI1、JAZ 和 MYC (Chini et al., 2009)。在缺乏 JA-Ile (活性形式 JA) (Fonseca et al., 2009) 时, JAZ 蛋白与 MYC2 互作, 抑制 MYC2 对 JA 响应基因的转录激活。例如, 在拟南芥中, AtJAZ1 和 AtJAZ3 蛋白通过抑制 AtMYC2、AtMYC3 和 AtMYC4 转录因子, 影响硫代葡萄糖苷 (glucosinolate) 的合成 (Schweizer et al., 2013)。AtJAZ1 和 AtJAZ3 蛋白与 WD-Repeat/bHLH/MYB 复合体相互作用, 抑制花青素的合成 (Qi et al., 2011)。但是, 在 JA-Ile 存在的条件下, JAZ 与 COI1 结合, 进而通过 26S 蛋白酶体被降解, 使 MYC2 转录激活 JA 响应基因 (Donnell et al., 1996; Chini et al., 2007; Qi et al., 2011)。发生在橡胶树乳管细胞中的橡胶生物合成是一种典型的植物类异戊二烯代谢。最近研究表明, 割胶树的乳管细胞茉莉酸含量显著高于未开割树, 割胶促进天然橡胶生物合成与激活乳管细胞中的茉莉酸信号途径密切相关 (Deng et al., 2018)。但是, 茉莉酸信号途径关键环节的相关基因表达与橡胶产量的相关性尚不清楚。本研究通过分析茉莉酸信号途径关键环节相关基因的表达与橡胶产量的相关性, 旨在找到与产量相关的分子标记, 对于育种周期长的橡胶树产量育种具有重要的实际应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

所用材料为割龄 10 a 的巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 的 5 份魏克汉种质和 5 份 1981' IRRDB 种质。其中, 5 份魏克汉种质是经过人工选育的橡

胶树品种 PR107、RRIM600、热垦 628、热垦 525 和热垦 523; 5 份 1981' IRRDB 种质是未经人工选育的, 种质编号为 RO/CM/10 44/160、MT/IT/13 29/8、RO/C/8 24/104、RO/L/103 107、RO/CM/10 44/454。均种植于中国热带农业科学院实验场。DNase I 购自天根公司; 反转录试剂盒 RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Ferments 公司; qPCR 试剂 SYBR® Ppermix Ex Taq™ II (2×) (Tli RNaseH Plus) 购自大连宝生物公司 (TaKaRa Japan); 其他生化试剂均为进口或国产分析纯试剂。引物合成由 Invitrogen 公司完成。

1.2 方法

1.2.1 材料处理 每个种质选 3 株, 在生产中正常割胶 (S/2D d3; 二分之一树围, 阳刀, 每三天割一刀) 的第 10 刀, 收集前 10 min 流出的胶乳, 每个种质均取 3 株的等体积混合样, 用于提取胶乳总 RNA。

1.2.2 干胶产量测定方法 该研究中的干胶产量测定参照曾霞等 (2006) 的方法进行。

1.2.3 总 RNA 的提取与 cDNA 的合成 胶乳总 RNA 提取参照曾日中等 (2003) 的方法。cDNA 第一链的合成根据试剂盒的操作步骤进行: 取 1 μg 胶乳总 RNA 反转录合成 cDNA 第一链, 稀释 10 倍后作为 qPCR 分析的模板。

1.2.4 基因表达分析

1.2.4.1 qPCR 反应 qPCR 反应体系为 20 μL, 其中 SYBR® Ppermix Ex Taq™ II (2×) 10 μL、上游引物 0.4 μL、下游引物 0.4 μL (引物浓度为 10 μmol · L⁻¹, 每条引物终浓度均为 0.2 μmol · L⁻¹)、cDNA 模板 1 μL、ddH₂O 8.2 μL。qPCR 反应在 LightCycler® Capillaries (20 μl, Roche) 毛细管中完成, 在 Roche Diagnostics 公司的 LightCycler Real Time PCR 扩增仪中运行, 操作按仪器使用说明书

进行。qPCR 反应程序:95 ℃ 30 s、95 ℃ 5 s、60 ℃ 20 s、72 ℃ 20 s,共 40 个循环,40 个循环后进行溶解曲线分析(60~95 ℃,0.2 ℃·S⁻¹),运行结束后冷却至 40 ℃。每个样品做 2 次技术性重复,C_q 标准差控制在 0.2 以内。利用 LightCycler Software 4.05 软件采集 qPCR 反应的 C_q 值。

1.2.4.2 qPCR 引物筛选 根据 GenBank 登录的基

因的 cDNA 全长序列设计 qPCR 引物。以 10 倍梯度稀释的 cDNA 为模板制备标准曲线,获得目的基因 qPCR 引物的扩增效率,选择扩增效率在 85% 以上的引物对开展实验;通过溶解曲线峰的数目判断引物的特异性,选择具有单一的溶解曲线峰的引物对开展实验;获得的 qPCR 产物通过测序印证。本研究所用引物见表 1。

表 1 qPCR 引物及相关参数

Table 1 Primers for qPCR together with related parameters

基因登录号 GenBank accession number	基因 Gene	引物对 (5'-3') Primer pair (5'-3')	引物对效率 Efficiency of primer pair	qPCR 产物长度 Length of qPCR product (bp)
AY435212.1	<i>Hb18S</i>	GCTCGAAGACGATCAGATACC TTCAGCCTTGCGACCATAC	1.922±0.003 97	145
EU136026	<i>HbCO1</i>	GGGTTCCTTCAATGATATGCCAG TGGTCCTCTGTCTCAAGCAATG	1.925±0.007 30	170
GQ369508	<i>HbJAZ1</i>	TGGCTGGTCAATCTTTGCGAGTA AAAAGTTAGGTCTACGGTGCC	1.996±0.017 8	168
KP844627	<i>HbJAZ2</i>	AGTGGCTGCTTAATCTTCGCA ACCAAAAAGGAAACAGCAGGATT	1.914±0.004 63	176
KP844628	<i>HbJAZ3</i>	AACTTGCCCAAATGGAATCTC CATACGGGGATACCGAAGTCA	1.920±0.006 37	155
GU434304	<i>HbMYC1</i>	TCTTTAAATAACCCCAAGTCTCACTT TGTTCTTTTCTGTTTTTGGTTTAGC	2.002±0.003 63	141
HM061097	<i>HbMYC2</i>	TCATATCTCCCCTTCCCCCA CTGACAAAACGACATAAAGGAGGA	1.963±0.003 57	189
HM347338	<i>HbMYC3</i>	TCTCTCGCTTCCCTACCCTCT TCCTCCATGATATCTTTTTCTCG	1.873±0.013 6	140
HM347339	<i>HbMYC4</i>	CTGTCCCTTCTCCATTCTCAA CTTGACAAAACGACATAAAGGAGG	1.938±0.003 21	161
HM347340	<i>HbMYC5</i>	CTGCTTAAAACCTTTGCTCTGT GGGGGGCATAATCTCTTCCA	1.985±0.004 19	118

1.2.4.3 基因表达分析 根据“ $Q = 2^{\Delta C_q} = 2^{\min C_q - \text{Sample } C_q}$ ”计算基因的表达值(Q),以 *Hb18S* 作为内参基因,根据“ $E = Q_{\text{目的基因}} / Q_{\text{内参基因}}$ ”分析目的基因的相对表达值(E)。样本间相对基因表达倍数(Bénédicte et al.,2002;Silvia et al.,2012;Yuki et al.,2015)可直观的反映出彼此间表达差异的大小,根据“ $F = E_A \div E_B$ ”分析样本 A 对样本 B 的基因相对表达倍数(folds,F)。

1.3 数据处理

用 Excel 2003 作图,用 SPSS 软件的 Duncan 检验进行多重比较分析:标有不同大写字母表示组间差异极显著($P < 0.01$),标有不同小写字母表示

组间差异显著($P < 0.05$),而标有相同小写字母表示组间差异不显著($P > 0.05$)。用 Excel TTEST (Array 1,Array 2,Tails 1,Type 1)进行成对比较分析; $P < 0.01$ 表示组间差异极显著, $P < 0.05$ 表示组间差异显著。用 SPSS 软件分析基因表达和干胶产量的 Pearson 相关性, $P < 0.01$ 表示极显著相关, $P < 0.05$ 表示显著相关。

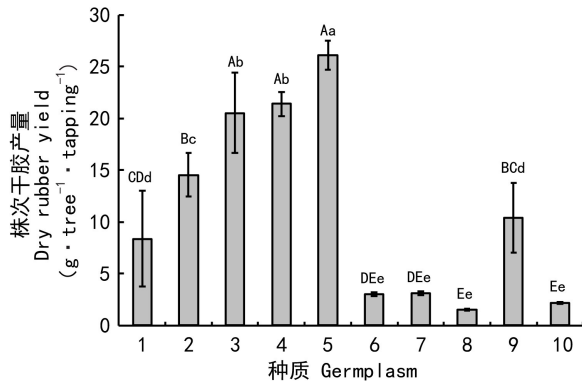
2 结果与分析

2.1 橡胶树种质间株次干胶产量比较

橡胶树不同种质间的株次干胶产量存在明显

差异(图1)。热垦523最高,RO/C/8 24/104最低。总体上,大多魏克汉种质的株次干胶产量显著高于1981' IRRDB种质;RO/L/103/107在1981' IRRDB种质中最高,但仅达到在魏克汉种质中最低的PR107的水平,且显著低于其他魏克汉种质;其余4份1981' IRRDB种质的株次干胶产量均极显著低于魏克汉种质,且四者差异不显著。

魏克汉种质与1981' IRRDB种质间株次干胶产量的倍数变化(表2)表明,魏克汉种质的株次干胶产量是1981' IRRDB种质的0.81~17.39倍,平均是6.81倍,不同种质间的表达倍数有明显差异,变异系数为63.66%。



注:横坐标,从左到右(1~10)依次代表魏克汉种质PR107、RRIM600、热垦628、热垦525、热垦523以及1981' IRRDB种质RO/CM/10 44/160、MT/IT/13 29/8、RO/C/8 24/104、RO/L/103/107、RO/CM/10 44/454;不同大写字母表示组间差异极显著($P<0.01$),不同小写字母表示组间差异显著($P<0.05$)。下同。

Note: X-axis, from the left to right (1-10), the samples are Wickham germplasm PR107, RRIM600, Re ken 628, Re ken 525, Re ken 523, and 1981' IRRDB germplasm RO/CM/10 44/160, MT/IT/13 29/8, RO/C/8 24/104, RO/L/103 107, RO/CM/10 44/454; Different capital letters indicate extremely significant differences ($P<0.01$), different small letters indicate significant differences ($P<0.05$). The same below.

图1 橡胶树种质间株次干胶产量的比较

Fig. 1 Comparison of dry rubber yield among rubber tree germplasm

2.2 基因表达分析

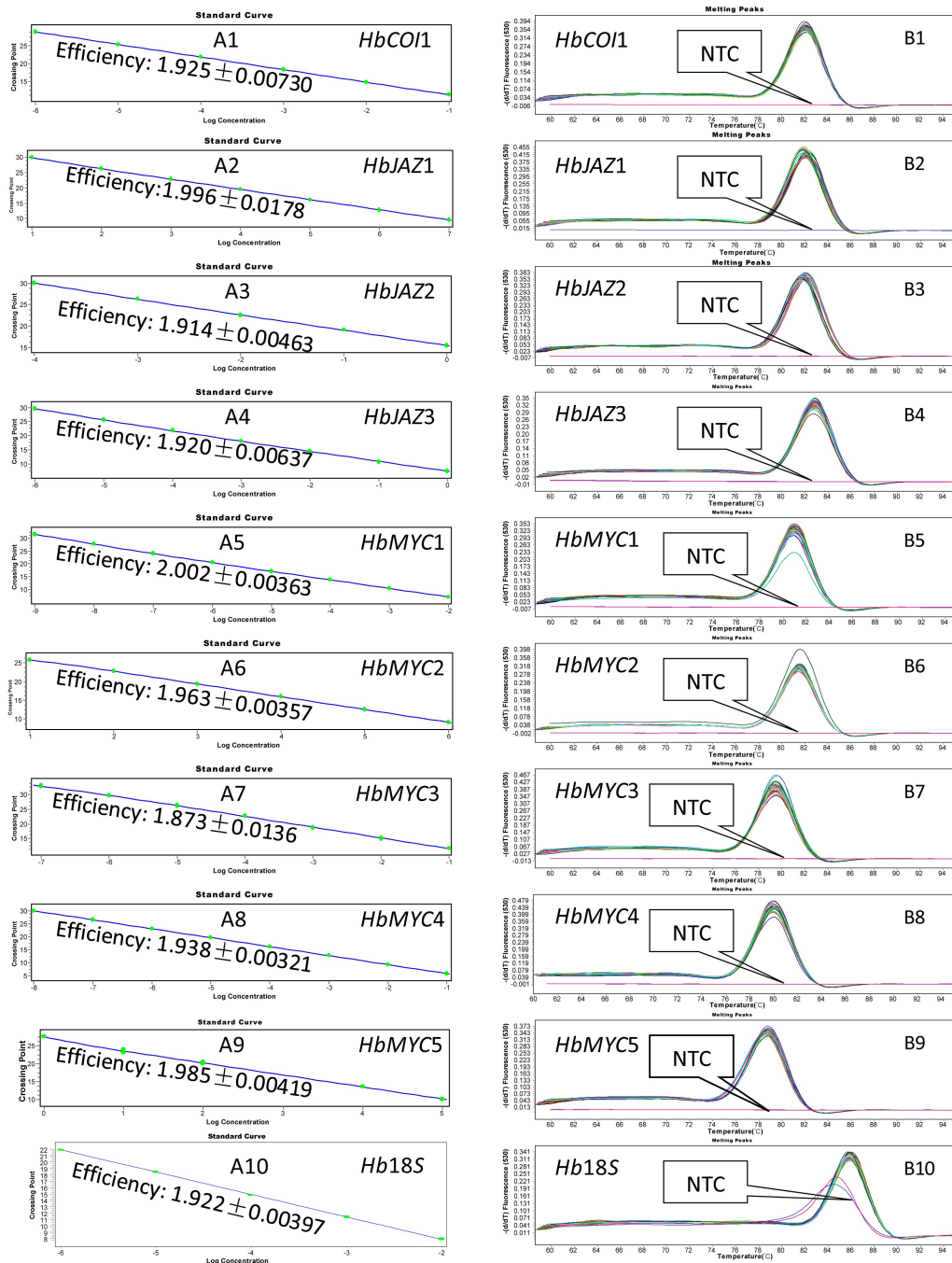
2.2.1 qPCR引物筛选 以10倍梯度稀释的cDNA为模板制备标准曲线,获得目的基因qPCR引物的扩增效率在87%~100%之间(图2:A);溶解曲线分析表明,各个基因的引物均获得单一的溶解曲线

峰,表明获得特异性的扩增产物,无模板对照(NTC)无扩增产物表明反应体系无污染(图2:B)。

2.2.2 橡胶树种质间茉莉酸信号途径关键环节基因的表达分析 qPCR分析表明,*HbCOI1*(图3:A)和*HbMYC2*(3:F)仅在1个(20%)1981' IRRDB种质中达到魏克汉种质的表达水平;*HbJAZ2*(图3:C)和*HbJAZ3*(图3:D)仅在1(20%)个魏克汉种质中低至1981' IRRDB种质的表达水平;*HbJAZ1*(图3:B)有2个(40%)魏克汉种质低至1981' IRRDB种质的表达水平;*HbMYC4*(图3:H)和*HbMYC5*(图3:I)在魏克汉种质和1981' IRRDB种质中表达水平相当的占80%;值得注意的是,*HbMYC1*(图3:E)和*HbMYC3*(图3:G)在所有魏克汉种质中的表达量均显著高于1981' IRRDB种质。统计分析表明,*HbMYC1*和*HbMYC3*在魏克汉种质组的表达量极显著高于1981' IRRDB种质组,*HbCOI1*、*HbJAZ1*、*HbJAZ2*、*HbJAZ3*和*HbMYC2*的表达量显著高于1981' IRRDB种质组,但*HbMYC4*和*HbMYC5*在两组间的表达差异不显著(图3:J)。

魏克汉种质分别对1981' IRRDB种质的基因表达倍数的结果表明(表2),优势表达基因是*HbJAZ2*、*HbJAZ3*、*HbMYC1*和*HbMYC3*,表达倍数分别为5.30、8.96、5.09和27.79倍。但是,同一基因在不同种质间的表达倍数有明显差异,变异系数分别为47.66%(*HbCOI1*)、63.01%(*HbJAZ1*)、72.60%(*HbJAZ2*)、76.41%(*HbJAZ3*)、32.83%(*HbMYC1*)、48.45%(*HbMYC2*)、45.77%(*HbMYC3*)、81.17%(*HbMYC4*)、58.16%(*HbMYC5*)。值得注意的是,除了Re ken 628对RO/L/103 107的表达倍数为8.74倍(0.04%),*HbMYC3*在5个魏克汉种质对1981' IRRDB种质的表达倍数均在10倍以上(96%)。

统计分析表明,*HbCOI1*、*HbJAZ1*、*HbJAZ2*、*HbJAZ3*、*HbMYC1*、*HbMYC2*和*HbMYC3*这7个基因在魏克汉种质中的表达平均值均显著高于1981' IRRDB种质,其中80%达到极显著水平(图4)。Pearson相关性分析(表3)表明,*HbCOI1*、*HbJAZ1*、*HbJAZ3*、*HbMYC1*、*HbMYC2*和*HbMYC3*基因表达与干胶产量的相关性均达到0.05的显著水平;其中,*HbCOI1*、*HbJAZ1*、*HbMYC2*、*HbMYC3*达到0.01的显著水平,值得注意的是*HbMYC2*基因表达与干



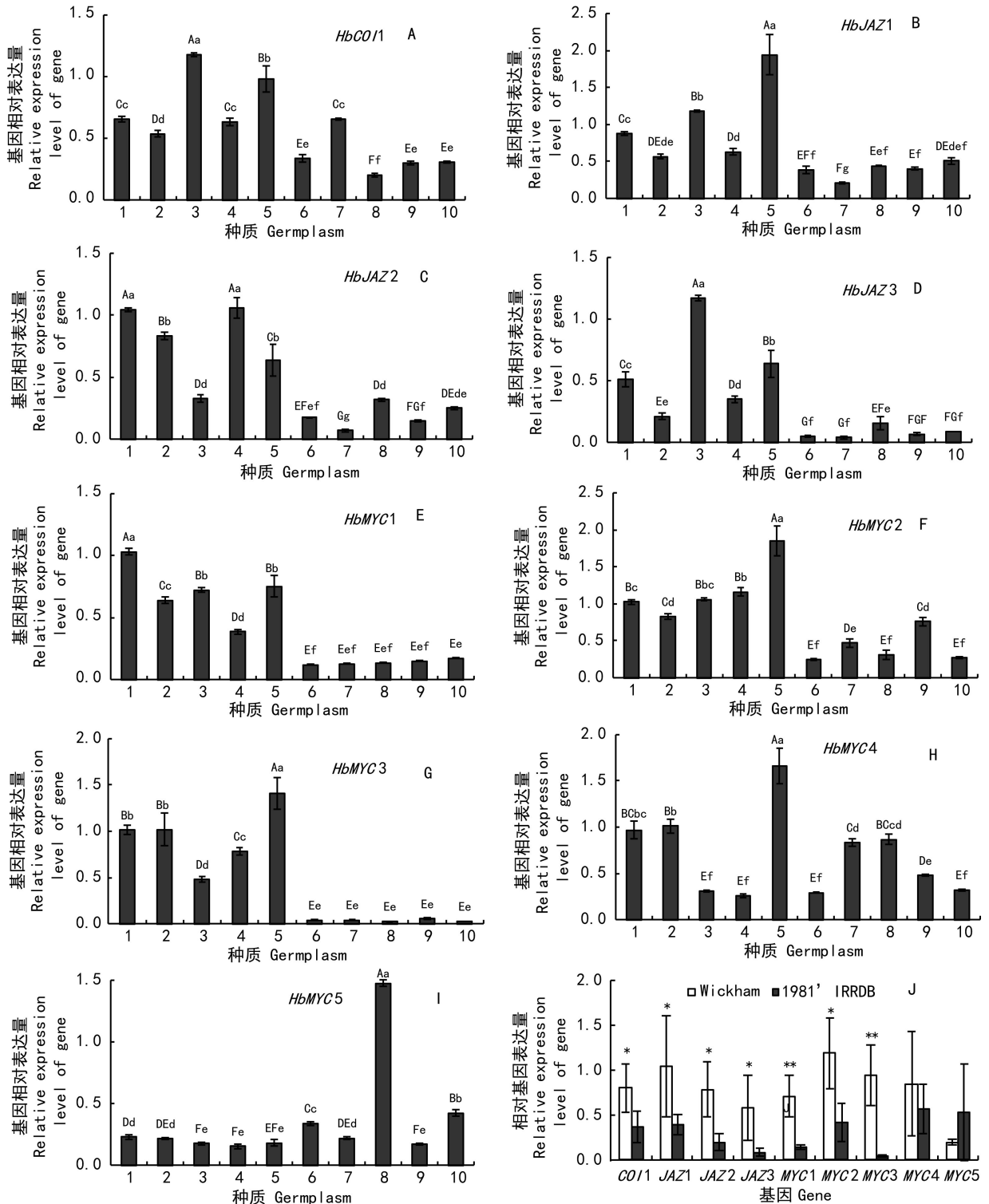
注：A. qPCR 引物扩增效率。通过标准曲线计算出 qPCR 的扩增效率为 87%~100%；纵坐标. Cp 值；横坐标. 模板浓度的对数。
 B. qPCR 引物扩增曲线特异性。通过溶解曲线分析 qPCR 扩增的特异性，均获得单一的溶解曲线峰；无模板对照 (NTC) 无扩增，说明反应体系无污染，结果准确；在 18S 的扩增中，虽然 NTC 有很少的一点扩增 ($C_p = 31.1 \pm 2.2$)，但 C_p 值远远小于样品的 C_p 值 (9.5 ± 0.3)，因此对定量无影响；纵坐标. 荧光 (530 nm) 强度；横坐标. 温度 (65~95 °C)。

Note: A. Efficiency of qPCR amplification. Efficiency of each primer pair was assessed by amplification curve analysis. Optimized primer pairs and reaction conditions amplified with a high level of efficiency (87%~100%). Y-axis. Crossing point (C_p); X-axis. log concentration of cDNA template. B. Specificity of qPCR amplification (45 cycles). Optimized primer pairs and reaction conditions produced an amplicon with a single dissociation curve. NTC (no-template control) has no amplification indicates the accuracies of qPCR. For the amplification of 18S, NTC have such a smaller C_p value (31.1 ± 2.2) than the sample's (9.5 ± 0.3) without influence to accuracies.

Y-axis. $-(d/dT)$ Fluorescence (530 nm); X-axis. Temperature (65~95 °C).

图 2 qPCR 引物的效率和特异性分析

Fig. 2 Efficiency and specificity analysis of each qPCR primers



注: J. 每个基因的相对表达量为 5 个魏克汉种质或 5 个 1981' IRRDB 种质中的平均数±标准差。

** 表示组间差异极显著 ($P<0.01$); * 表示组间差异显著 ($P<0.05$)。

Note: J. Relative expression of each gene is $\bar{x}\pm s$ of 5 Wickham germplasm or 5 1981' IRRDB germplasm in each gene.

** indicate extremely significant differences ($P<0.01$); * indicate significant differences ($P<0.05$).

图 3 橡胶树种质胶乳中茉莉酸信号途径相关基因的表达分析

Fig. 3 Expression analysis of genes related to jasmonate signaling in latex from rubber tree germplasm

表 2 魏克汉种质与 1981' IRRDB 种质间橡胶产量和基因表达量的倍数变化

Table 2 Fold changes on rubber yield and gene expression level between Wickham germplasms and 1981' IRRDB germplasms

种质比较对 Comparative germplasm pairs	橡胶产 量倍数 Rubber yield folds	基因表达倍数 Gene expression folds								
		<i>COI1</i>	<i>JAZ1</i>	<i>JAZ2</i>	<i>JAZ3</i>	<i>MYC1</i>	<i>MYC2</i>	<i>MYC3</i>	<i>MYC4</i>	<i>MYC5</i>
1 vs. 6	2.79	1.94	2.28	5.92	10.27	8.61	4.20	26.36	3.32	0.68
1 vs. 7	2.70	1.00	4.14	14.93	12.88	8.14	2.18	24.36	1.16	1.04
1 vs. 8	5.59	3.22	1.98	3.29	3.27	7.59	3.31	40.05	1.12	0.16
1 vs. 9	0.81	2.18	2.17	7.15	7.60	6.80	1.35	18.45	2.01	1.34
1 vs. 10	3.81	2.13	1.73	4.18	5.87	6.00	3.81	40.30	3.02	0.54
2 vs. 6	4.84	1.59	1.48	4.71	4.26	5.34	3.37	26.54	3.46	0.63
2 vs. 7	4.68	0.82	2.69	11.88	5.34	5.05	1.75	24.52	1.22	0.98
2 vs. 8	9.67	2.64	1.28	2.62	1.36	4.71	2.66	40.32	1.17	0.15
2 vs. 9	1.39	1.78	1.41	5.69	3.15	4.21	1.08	18.58	2.10	1.26
2 vs. 10	6.59	1.74	1.12	3.33	2.43	3.72	3.06	40.58	3.15	0.51
3 vs. 6	6.83	3.50	3.07	1.85	23.40	6.02	4.34	12.48	1.06	0.52
3 vs. 7	6.61	1.80	5.57	4.67	29.35	5.70	2.25	11.53	0.37	0.80
3 vs. 8	13.67	5.80	2.67	1.03	7.46	5.31	3.43	18.96	0.36	0.12
3 vs. 9	1.97	3.93	2.92	2.24	17.32	4.76	1.39	8.74	0.64	1.03
3 vs. 10	9.32	3.84	2.32	1.31	13.36	4.20	3.94	19.08	0.96	0.41
4 vs. 6	7.12	1.88	1.64	5.99	6.99	3.22	4.76	20.40	0.89	0.45
4 vs. 7	6.89	0.96	2.98	15.12	8.77	3.04	2.47	18.85	0.31	0.69
4 vs. 8	14.24	3.11	1.43	3.33	2.23	2.84	3.75	31.00	0.30	0.10
4 vs. 9	2.05	2.11	1.56	7.25	5.18	2.54	1.52	14.28	0.54	0.89
4 vs. 10	9.71	2.06	1.24	4.24	3.99	2.24	4.32	31.19	0.81	0.36
5 vs. 6	8.69	2.90	5.04	3.61	12.76	6.28	7.57	36.68	5.69	0.53
5 vs. 7	8.41	1.49	9.15	9.11	16.00	5.94	3.93	33.89	1.99	0.82
5 vs. 8	17.39	4.82	4.38	2.01	4.07	5.54	5.98	55.73	1.92	0.12
5 vs. 9	2.51	3.26	4.79	4.36	9.45	4.96	2.43	25.68	3.44	1.06
5 vs. 10	11.85	3.19	3.82	2.55	7.29	4.38	6.87	56.09	5.18	0.43
Wickham groups vs. 1981' IRRDB groups	6.81± 4.33	2.55± 1.21	2.91± 1.84	5.30± 3.84	8.96± 6.85	5.09± 1.67	3.43± 1.66	27.79± 12.72	1.85± 1.50	0.62± 0.36

注: 因为是比率计算, 所以表中不显示标准差 (s)。

Note: Due to the ratio calculation, the standard deviations (s) are not represented in this table.

胶产量的相关性最高。

3 讨论与结论

割胶促进橡胶树合成天然橡胶, 2 次割胶之间的橡胶再生涉及到橡胶合成酶基因的诱导表达调控 (Deng et al., 2018; 赵悦, 2011)。割胶促进天然橡胶生物合成与激活乳管细胞中的茉莉酸信号途径密切相关 (Deng et al., 2018)。茉莉酸信号传导的核心环节是 *COI1*、*JAZ* 和 *MYC* (Chini et al., 2009); *HbMYC1* 和 *HbMYC3* 的基因表达水平与橡胶树种质的干胶产量正相关 (卢世香, 2010; 何鑫, 2013)。因此, 可通过研究橡胶树“*HbCOI1*-*HbJAZs*-*HbMYCs*”在不同干胶产量种质中的表达差

异来筛选产量相关的分子标记。

变异幅度大于 2 倍的基因为差异表达基因 (Bénédicte et al., 2002), 高产组种质胶乳中 *HbCOI1*、*HbJAZ1*、*HbJAZ2*、*HbJAZ3*、*HbMYC1*、*HbMYC2* 和 *HbMYC3* 基因的表达水平是低产组种质的 2 倍以上, 表明这 7 个基因的表达水平与干胶产量正相关。其中 *HbMYC3* 基因的表达差异最大, 与橡胶树种质的干胶产量相关性最高, 有望作为橡胶树产量育种的一个的分子标记。下一步将扩大研究群体来印证该推测。

5 个 *HbMYC* 家族成员中, *HbMYC1*、*HbMYC2*、*HbMYC3* 在胶乳中特异表达, 而 *HbMYC4* 和 *HbMYC5* 主要在花中表达 (赵悦, 2011)。*HbMYC4* 和 *HbMYC5* 的基因表达水平与橡胶树种质的干胶

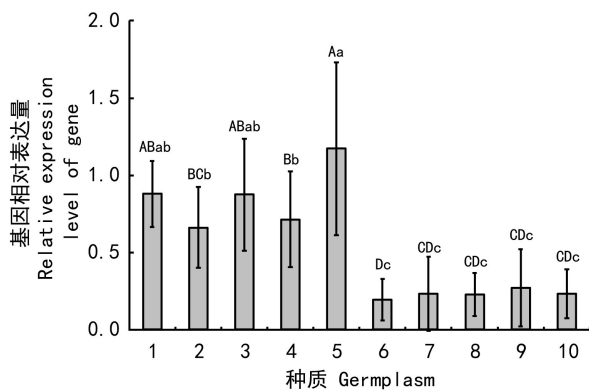
表 3 基因表达与干胶产量的相关性分析

Table 3 Correlation analysis between gene expression and dry rubber yield

项目 Item	基因 Gene									
	<i>COI1</i>	<i>JAZ1</i>	<i>JAZ2</i>	<i>JAZ3</i>	<i>MYC1</i>	<i>MYC2</i>	<i>MYC3</i>	<i>MYC4</i>	<i>MYC5</i>	
产量 Yield										
Pearson 相关性 Pearson correlation	0.754	0.0774	0.525	0.695	0.601	0.921	0.770	0.290	-0.505	
单尾检验显著性 1-tailed significance	0.006 **	0.004 **	0.060	0.013 *	0.033 *	0.000 **	0.005 **	0.208	0.068	
双尾检验显著性 2-tailed significance	0.012 *	0.009 **	0.120	0.026 *	0.066	0.000 **	0.009 **	0.416	0.136	
样本数 Sample number	10	10	10	10	10	10	10	10	10	

注: ** 表示极显著相关 ($P < 0.01$), * 表示显著相关 ($P < 0.05$)。

Note: ** indicate extremely significant correlation ($P < 0.01$), * indicate significant correlation ($P < 0.05$).



注: 7 个基因为每个种质中的 *HbCOI1*, *HbJAZ1*, *HbJAZ2*, *HbJAZ3*, *HbMYC1*, *HbMYC2*, *HbMYC3*。

基因表达值为平均数±标准差。

Note: Seven genes include *HbCOI1*, *HbJAZ1*, *HbJAZ2*, *HbJAZ3*, *HbMYC1*, *HbMYC2*, *HbMYC3* in each germplasm. Data are $\bar{x} \pm s$.

图 4 橡胶树种质胶乳中 7 个茉莉酸信号途径相关基因表达的平均值

Fig. 4 Average expression levels of seven genes related to jasmonate signaling in latex from rubber tree germplasms

产量不相关,推测参与橡胶合成调控的 *HbMYCs* 成员主要是 *HbMYC1*、*HbMYC2* 和 *HbMYC3*。个别的, RO/C/8 24/104 中 *HbMYC5* 的基因表达水平均极显著高于其他种质,是其他种质的 4.34~9.67 倍,平均是 6.96 倍,变异系数仅为 29.15%;*HbMYC5* 在橡胶树中的功能尚不完全清楚,RO/C/8 24/104 有望成为研究 *HbMYC5* 功能的优良材料。

“*HbCOI1*-*HbJAZs*-*HbMYCs*”彼此间以及家族成员间的相互作用(赵悦,2011;刘伟,2011;何鑫,2013;

包杰,2014;肖华,2015;王靖等,2016;姚笛,2016)表明他们在调控橡胶生物合成过程中具有协同作用。尽管个别基因在个别低产种质中已达到高产种质的表达水平,但高产种质中与干胶产量相关的 7 个基因的整体平均表达水平均显著并且 80%极显著高于低产种质,进一步证实了他们之间的协同作用。

韧皮部中次生乳管的分化能力(卢世香,2010; Chen et al., 2016)、两次割胶之间橡胶的再生能力(Deng et al., 2018)和排胶能力(王冬冬等,2016;蔡甫格,2011;李言等,2015)是影响橡胶产量的 3 个主要因素。该研究在橡胶再生能力调控层面获得了一些有价值的结果。非刺激割胶条件下 PR107 的排胶时间短以及乙烯利刺激能显著延长其排胶时间(王冬冬等,2016;蔡甫格,2011)和增加排胶量(李言等,2015),说明其具有一定的乳管分化能力,并且排胶能力可能是限制 PR107 橡胶产量的主要原因之一;PR107 中与干胶产量相关的 7 个基因均具有较高的表达水平说明其橡胶再生能力强,而其干胶产量(非刺激)相对偏低进一步证实该推测。RO/L/103/107 的干胶产量在低产种质中最高,已达到 PR107 的水平;而与干胶产量相关的 7 个基因中有 6 个的表达水平均比较低,仅 *HbMYC2* 的表达水平与 PR107 相当;推测其橡胶再生能力弱,但具有一定的乳管分化能力和/或排胶能力,同时也说明单个基因对橡胶产量的贡献不大,也证实了这些基因在调控橡胶再生中的协同(增效)作用。深入研

究这 3 个因素对不同橡胶树种质干胶产量的贡献率, 是一个有意义的课题。

参考文献:

- BAO J, 2014. Studies on the transcriptional regulation of key enzymes of natural rubber biosynthesis by MYC and Myb transcription factors [D]. Haikou: Hainan University: 1-70. [包杰, 2014. MYC 和 Myb 转录因子对橡胶生物合成关键酶转录调节的研究 [D]. 海口: 海南大学: 1-70.]
- BÉNÉDICTE C, ANTHONY C, YVES H, et al., 2002. Expression profiling of the whole *Arabidopsis* shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction [J]. *Plant Physiol*, 130(2): 577-590.
- CAI FG, 2011. Hev b 7 protein in C-serum involves in the prolongation of duration of latex flow stimulated by ethrel in rubber tree [D]. Haikou: Hainan University: 1-59. [蔡甫格, 2011. 乙烯促进橡胶树排胶与 C-血清 Hev b 7 的关系 [D]. 海口: 海南大学: 1-59.]
- CHEN YY, GAO XS, ZHANG XF, et al., 2016. Relationship between the number of tapping-induced secondary laticifer lines and rubber yield among *Hevea* germplasm [J]. *Front Agric Sci Eng*, 3(4): 363-367.
- CHINI A, BOTER M, SOLANO R, 2009. Plant oxylipins: COI1/JAZs/MYC2 as the core jasmonic acid-signalling module [J]. *Febs J*, 276(17): 4682-4692.
- CHINI A, FONSECA S, FERNÁ NDEZ G, et al., 2007. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling [J]. *Nature*, 448(7154): 666-671.
- DENG XM, GUO D, YANG SG, et al., 2018. Jasmonate signalling in regulation of rubber biosynthesis in laticifer cells of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) [J]. *J Exp Bot*, 69(15): 3559-3571.
- DONNELL PJ, CALVERT C, ATZORN R, et al., 1996. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants [J]. *Science*, 274(5294): 1914-7.
- FONSECA S, CHINI A, HAMBERG M, et al., 2009. (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate [J]. *Nat Chem Biol*, 5(5): 344-50.
- HE X, 2013. Research on the expression of several members of JAZ and MYC genes family correlated with natural rubber yield in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. [D]. Haikou: Hainan University: 1-77. [何鑫, 2013. 巴西橡胶树 JAZ 和 MYC 家族几个成员基因表达和产量相关性的研究 [D]. 海口: 海南大学: 1-77.]
- LI Y, SHI MJ, CHEN YY, et al., 2015. Effect of a novel latex flow regulator on increasing rubber yield of rubber tree clone Reyan8-79 [J]. *Chin J Trop Crop*, 36(10): 1785-1790. [李言, 史敏晶, 陈月异, 等, 2015. 新型排胶调节剂对橡胶树无性系热研 8-79 的增产效应 [J]. *热带作物学报*, 36(10): 1785-1790.]
- LIU W, 2011. Screen the proteins interacting with HbJAZ of *Hevea brasiliensis* [D]. Haikou: Hainan University: 1-55. [刘伟, 2011. 橡胶树 HbJAZ1 基因的互作蛋白筛选研究 [D]. 海口: 海南大学: 1-55.]
- LU SX, 2010. Structural and HblMYC1 gene correlated with natural rubber yield in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. [D]. Haikou: Hainan University: 1-49. [卢世香, 2010. 树皮结构和 HblMYC1 基因与橡胶树产量相关性研究 [D]. 海口: 海南大学: 1-49.]
- QI T, SONG S, REN Q, et al., 2011. The jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-Repeat/bHLH/MYB complexes to regulate jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 23(5): 1795-1814.
- SCHWEIZER F, FERNÁ NDEZ-CALVO P, ZANDER M, et al., 2013. *Arabidopsis* basic helix-loop-helix transcription factors MYC2, MYC3, and MYC4 regulate glucosinolate biosynthesis, insect performance, and feeding behavior [J]. *Plant Cell*, 25(8): 3117-3132.
- SILVIA DS, HANSJÖRG S, JULIA K, et al., 2012. Stress-induced GSK3 regulates the redox stress response by phosphorylating glucose-6-Phosphate dehydrogenase in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 24: 3380-3392.
- WANG DD, SHI MJ, YANG SG, et al., 2016. Effect of ethrel on the gene expression and content of laticifer plugging-related protein in *Hevea brasiliensis* [J]. *Chin J Trop Crop*, 37(6): 1122-1127. [王冬冬, 史敏晶, 杨署光, 等, 2016. 乙烯利对橡胶树乳管伤口堵塞相关蛋白基因表达和含量的影响 [J]. *热带作物学报*, 37(6): 1122-1127.]
- WANG J, DENG XM, TIAN WM, 2016. Screening and *in vitro* functional analysis of the HblMYC3 interacted proteins in laticifer cell of *Hevea brasiliensis* [J]. *Chin J Trop Crop*, 37(7): 1312-1317. [王靖, 邓小敏, 田维敏, 2016. 巴西橡胶树乳管细胞 HblMYC3 互作蛋白筛选与功能分析 [J]. *热带作物学报*, 37(7): 1312-1317.]
- XIAO H, 2015. Validation and characterization of HbJAZ1 interacted proteins of *Hevea brasiliensis* [D]. Haikou: Hainan University: 1-70. [肖华, 2015. 巴西橡胶树 HbJAZ1 互作蛋白的验证及功能鉴定 [D]. 海口: 海南大学: 1-70.]
- YAO D, 2016. Cloning and interactions of HbJAZs of *Hevea brasiliensis* [D]. Haikou: Hainan University: 1-55. [姚笛, 2016. 巴西橡胶树 HbJAZs 基因的克隆与互作蛋白鉴定 [D]. 海口: 海南大学: 1-55.]
- YUKI K, TAKASHI F, MUNETAKA S, et al., 2015. A novel system for xylem cell differentiation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Mol Plant*, 8: 612-621.
- ZENG RZ, DUAN CF, LI Y, et al., 2003. Construction of cDNA library and analyses of cDNA sequences in latex from JA-stimulated rubber trees [J]. *Chin J Trop Crop*, 24(3): 1-6. [曾日中, 段翠芳, 黎瑜, 等, 2003. 茉莉酸刺激的橡胶树胶乳 cDNA 消减文库的构建及其序列分析 [J]. *热带作物学报*, 24(3): 1-6.]
- ZENG X, HU YS, HUANG HS, et al., 2006. The evaluation report of 1981' IRRDB rubber tree germplasm—1987-field-planted germplasm [J]. *Chin J Trop Crop*, 27(2): 34-38. [曾霞, 胡彦师, 黄华孙, 等, 2006. 橡胶树 1981' IRRDB 种质主要性状鉴定评价——1987 年定植种质鉴定评价研究报告 [J]. *热带作物学报*, 27(2): 34-38.]
- ZHAO Y, 2011. Involvement of jasmonate signaling pathway in regulating rubber biosynthesis in laticifer cells of *Hevea brasiliensis* [D]. Haikou: Hainan University: 1-159. [赵悦, 2011. 巴西橡胶树乳管细胞茉莉酸信号途径对橡胶生物合成调节的研究 [D]. 海口: 海南大学: 1-159.]