

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2020.04.005

杜仲 *EuREF1* 基因表达水平与橡胶积累的关系

冉昕¹, 赵德刚^{1,2*}

(1. 贵州大学农业生物工程研究院/生命科学学院/山地植物资源保护与种质创新教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025;

2. 贵州省农业科学院贵州特色植物资源保育工程研究中心, 贵州 贵阳 550006)

摘要: [目的] 为了探明 *EuREF1* 与胶分子量和含胶率的关系, 深入探究杜仲胶合成机制。[方法] 在杜仲新枝和叶片生长较快的4月中旬到6月中旬, 利用 RT-PCR 技术分析杜仲 *EuREF1* 基因在雌雄株叶片和茎皮中的表达水平, 以索氏提取法和 GPC/SEC 分别检测叶片和树皮中橡胶的含量和分子量。[结果] 在4月至6月期间, 雌雄株叶片、茎皮 *EuREF1* 表达水平分别与这些器官中胶含量及胶分子量呈显著或极显著正相关 ($R=0.898\ 2\sim 0.988\ 0$)。在雌株叶片、茎皮、果皮和雄株叶片、茎皮中, 分子量在 $1.0\times 10^6\sim 5.0\times 10^6\ \text{Da}$ 所占比例最多, 即长度在 $1.5\times 10^4\sim 7.4\times 10^4$ 个异戊二烯单体的橡胶最多。[结论] 结果推测 *EuREF1* 基因产物与杜仲胶积累程度有紧密的关系, 可能在橡胶链的延伸中发挥重要作用。

关键词: 杜仲; 橡胶; 橡胶延长因子; 基因

中图分类号: Q949.97

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2020)04-0035-07

杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliver) 是我国二级珍稀保护树种, 是单科单属单种的多年生落叶乔木, 分布于我国的热带至暖温带地区, 有 27 个省广泛种植^[1]。杜仲既是重要的药用植物, 也是优质的胶源植物, 在其叶片、果皮、树皮和根皮中均有白色杜仲胶丝^[2-3]。杜仲胶与天然橡胶 (产自巴西橡胶树) 均为聚异戊二烯, 二者互为同分异构体, 天然橡胶为顺式聚异戊二烯 (cis-polyisoprene), 杜仲胶为反式聚异戊二烯 (trans-polyisoprene)。与顺式橡胶相比, 反式杜仲胶的绝缘性更高, 热胀冷缩系数更低, 酸碱耐受性更强, 并具有形状记忆功能和独特的“橡胶-塑料”二重性^[4-6]。

橡胶基本单元为异戊烯基焦磷酸 (IPP)。在三叶橡胶中, 异戊烯基焦磷酸通过细胞中的甲瓦龙酸 (MVA) 途径产生, 在杜仲实生叶片含胶细胞中, IPP 通过 MVA 和甲基赤磷酸 (MEP) 2 种途径

产生^[7]。IPP 通过 2 种途径产出后, 在异戊烯基焦磷酸异构酶作用下部分转化为其同分异构体二甲基丙烯基焦磷酸 (DMAPP), 这 2 种物质通过一系列异戊烯基焦磷酸合酶, 包括牻牛儿基焦磷酸合酶 (GPPS)、法尼基焦磷酸合酶 (FPPS) 和牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合酶 (GGPPS) 合成相应的牻牛儿基焦磷酸、法尼基焦磷酸、牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸, 最后在橡胶延长因子 (Rubber Elongation Factor, REF)、小橡胶颗粒蛋白 (SRPP)、橡胶转移酶 (RT) 等作用下合成长链橡胶^[6]。杜仲中的反式聚异戊二烯分子, 由多个反式单元的二甲基烯丙基和末端脂肪族脂肪酸的酯基或二磷酸基排列组成^[8]。

在长链橡胶的生物合成过程中, 橡胶延长因子 (Rubber Elongation Factor, REF) 发挥重要功能并受到广泛关注。1989 年, Dennis 等从三叶橡胶树

收稿日期: 2020-02-01 修回日期: 2020-05-24

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (No.2013AA102605-05); 国家自然科学基金项目 (No.31870285); 国家转基因生物新品种培育重大专项 (No.2016ZX08010003-009); 贵州省高层次创新型人才培养项目 [黔科合人才 (2016)4003 号] 资助

* 通讯作者: 赵德刚, 博士, 教授, 博士生导师. 研究方向: 植物基因工程. 电话: 13885012693. E-mail: dgzhao@gzu.edu.cn

中分离出一种分子量为 14 KD 的胶粒蛋白 (HbREF), 制备了特异性免疫球蛋白 IgG 抗体, 或用丝氨酸蛋白酶 (serine protease trypsin) 处理该蛋白后, 在体外均很大程度抑制了橡胶的生物合成, 被称为橡胶延长因子^[9]。之后, Attanyaka 等获得了编码 HbREF 蛋白的 cDNA 序列, 编码的蛋白可以与橡胶粒子紧密结合, 是异戊烯基转移酶将异戊二烯单元添加到橡胶分子中不可缺少的成分^[10]。此后不久, Cornish 等发现, 橡胶延长因子在橡胶粒子的聚合中起到控制作用^[11]。目前的研究发现, 除根组织外, 三叶橡胶树的乳胶细胞、皮、叶中均检测到 HbREF mRNA 转录本, 但组织间表达水平不同, 通过对产胶量不同的无性系橡胶树 *HbREF* 的表达水平比较分析, 发现 *HbREF* 基因表达模式与乳胶产量呈正相关^[12]。本项目组通过转录数据库结合 RACE 技术扩增得到全长 1 075 bp 的序列, 分析比对后命名为 *EuREF1*^[13], Wuyun 等将该基因命名为 *EuSRPPI*^[14]。但 *EuREF* 对杜仲对橡胶积累及胶分子延长的关系和作用尚不明确, 本论文初步分析了 *EuREF1* 基因在不同器官组织中的表达水平与橡胶积累和橡胶分子量的关系, 试图探明 *EuREF1* 与胶分子量和含胶率的关系, 进一步深入探究杜仲胶合成机制。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料取自贵州大学农业生物工程研究院试验示范基地, 16 年生杜仲树。选择典型样株雌、雄株各 3 株, 从 2019 年 4 月 15 日开始, 每 15 d 取样 1 次, 至 6 月 15 日共 5 次。每株选择树冠中部外围当年生新梢同时期生长的叶片、茎皮和当年生果进行采摘, 用自封袋封上后放于液氮中保存防止 RNA 降解, 带回室内并保存于 -80°C , 用于 mRNA 提取和 RT-PCR 分析以及杜仲胶提取分析。

1.2 方法

1.2.1 杜仲胶提取与含量计算 参照 Spence 等的方法^[15], 将不同时期采摘叶片、茎皮和果皮分别用电子天平 (北京丹佛仪器有限公司) 称取 10 g 样品, 电热鼓风干燥箱 (上海一恒科学仪器有限公司) 中 120°C 30 min, 温度调至 80°C , 烘至恒质量, 称取烘干后的样品质量, 精确至小数点后 3 位, 将方法中溶剂苯替换为石油醚 (天津市致远

化学试剂有限公司, 沸程 $60\sim 90^{\circ}\text{C}$)。对杜仲胶进行提取获得精胶。橡胶含量 = 精胶 / 组织干质量 $\times 100\%$ 。

1.2.2 RT-PCR 分析 根据康为世纪公司的 Plant RNA Kit 试剂盒说明书, 提取杜仲叶、茎皮、雌果中的总 RNA, 并利用 Reverse Transcriptase M-MLV 试剂盒 (TAKARA) 反转录试剂盒反转录为 cDNA。设计的 *EuREF1* 基因 qPCR 引物为, F: 5'-CGCACATTGGTCGGAGAACTACAAC-3'; R: 5'-GCAAATAAGCAGCCGCCTCTAGTC-3', 以杜仲 *EuActin* 基因为内参基因^[16], 以 cDNA 为模板, 采用 RT-PCR 试剂盒 (Novoprotein) 对 *EuREF1* 基因进行实时定量 PCR 分析 (BIO-RAD)。反应体系 Primer F/R 各 0.2 μL , cDNA 1 μL , Premix Mix 5 μL , ddH₂O 3.6 μL , 共 10 μL , 做 3 次重复。

1.2.3 杜仲胶分子量检测 杜仲胶烘干后, 按照 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 用四氢呋喃 (Merck) 溶解, 置于 28°C 摇床 (Thermo) 溶解 3 h, 用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 的有机滤头过滤溶液; 装入安捷伦排阻色谱仪 (1260 Infinity II) 配套小棕瓶中进行检测; 流动相: 四氢呋喃; 样品注入量: 35 μL ($1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); 柱温箱: 40°C 。得到的图谱再用 GPC/SEC (gel permeation chromatography/Size-exclusion chromatography) 配套软件直接处理。

2 结果与分析

2.1 杜仲不同组织的橡胶积累变化

2.1.1 杜仲叶片含胶量变化 在初春杜仲新芽长出以后, 于 4 月 15 日开始至 6 月 15 日, 每 15 d 采摘 1 次叶片测定含胶量。结果表明: 从 4 月 15 日至 6 月 15 日, 雌、雄株叶片中杜仲胶含量均不断增加; 在 4 月 15 日, 雌、雄株叶片含胶量分别为 0.51% 和 0.33%, 二者差异不显著; 5 月 2 日, 雌、雄株叶片含胶量分别为 0.84% 和 0.36%, 雌株叶片含胶量显著高于雄株叶片; 到 5 月 15 日, 雌、雄株叶片含胶量分别为 0.89% 和 0.76%, 二者差异不显著; 6 月 2 日, 雌、雄株叶片含胶量分别为 0.95% 和 1.36%, 雄株叶片含胶量显著高于雌株叶片; 6 月 15 日, 雄株叶片含胶量增加更明显, 达 1.83%, 雌株增长相对较少, 为 1.24%, 二者差异显著 (图 1)。

2.1.2 杜仲茎皮含胶量变化 初春新生嫩茎长出后, 于 4 月中旬开始, 至 6 月 15 日, 每隔 15 d 采摘 1 次, 将皮剥下测定含胶量。结果表明: 在 4 月 15 日至 6 月 15 日期间, 雌、雄株茎皮中杜仲

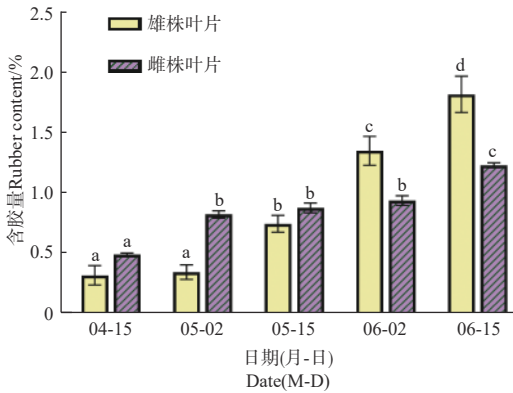


图1 雌雄株叶片含胶量积累变化

Fig. 1 Accumulation of rubber content in leaf of male and female

胶含量均不断增加; 4月15日, 雌、雄株茎皮含胶量分别为0.76%和0.74%, 二者差异不显著; 5月2日, 雌、雄株茎皮含胶量分别为0.98%和0.84%, 此时雌株茎皮含胶量显著高于雄株; 5月15日, 雌、雄株茎皮含胶量分别为1.03%和1.40%, 此时雄株显著高于雌株, 与叶片中含胶量相反; 至6月15日时, 雌、雄株含量分别为1.54%和2.01%, 二者差异显著(图2)。

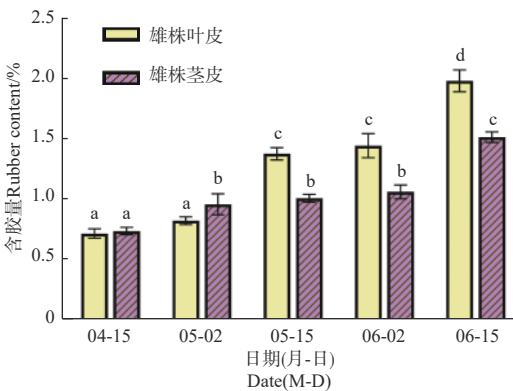


图2 雌雄株茎皮含胶量积累变化

Fig. 2 Accumulation of rubber content in stem of male and female

2.2 杜仲胶分子量变化

2.2.1 叶中杜仲胶分子量变化 雌株叶片中橡胶平均分子量呈上升趋势, 4月15日、5月2日、5月15日、6月2日、6月15日时平均分子量(Mw)分别为 3.59×10^6 、 6.69×10^6 、 7.83×10^6 、 8.14×10^6 、 9.05×10^6 Da。分子量分布随着叶片增长而变窄, 4月15日至6月15日分子量分布(数均分子量/重均分子量)依次为4.14、2.73、2.64、2.48、2.01。杜仲雄株叶片中橡胶平均分子量从4月15日至6月15日

同样呈现上升趋势, 平均分子量(Mw)依次为 7.38×10^6 、 9.94×10^6 、 11.24×10^6 、 12.06×10^6 、 14.78×10^6 Da。雄株叶片中胶平均分子量均大于雌株。雄叶分子量分布同样随着叶片增长而变窄, 4月15日至6月15日依次为5.30、4.06、3.31、3.3、2.65。说明雌、雄株叶片中胶分子量分布均随着叶片增大越来越集中。雌雄株叶片中橡胶不同分子量大小所占比例随叶片增长而发生变化, 在4月15日至6月15日之间, 雌雄株叶片中分子量在 1.0×10^6 Da以下所占比例分别从27.86%、17.08%降至1.10%、0.00%; 分子量在 1.3×10^7 Da以上所占比例分别从3.60%、17.10%上升至20.20%、33.54%; 此期间, 雌、雄株叶片, 分子量在 $1.0 \times 10^6 \sim 5.0 \times 10^6$ Da间所占比例最多(表1)。

2.2.2 茎皮中杜仲胶分子量变化 雌株茎皮中橡胶分子量从4月15日至6月15日呈上升趋势, 平均分子量(Mw)分别为 2.51×10^6 、 3.68×10^6 、 4.18×10^6 、 4.53×10^6 、 4.71×10^6 Da。分子量分布从4月15日至6月5日在1.95至2.73之间, 说明雌株茎皮中橡胶分子量分布不随茎皮增长而变化。雄株茎皮中橡胶分子质量从4月15日至6月15日同样呈现上升趋势, 平均分子量(Mw)分别为 0.84×10^6 、 2.15×10^6 、 4.74×10^6 、 5.07×10^6 、 5.45×10^6 Da。雄株茎皮中橡胶分子量分布从4月15日至6月5日在3.00至3.50之间, 说明雄株茎皮中橡胶分子量分布同样不随茎皮增长而变化。此期间, 雌株橡胶分子量分布整体小于雄株茎皮。雌、雄株茎皮中橡胶不同分子量大小所占比例随茎皮增长而变化, 在4月15日至6月15日之间, 雌、雄株茎皮中分子量在 1.0×10^6 Da以下所占比例分别从44.61%、75.15%降至2.18%、15.74%; 分子量在 1.3×10^7 Da以上所占比例分别从1.97%、0.93%上升至4.62%、12.76%; 此期间, 除4月15日时雄株茎皮中分子量小于 1.0×10^6 Da所占比例最多, 其余均为分子量在 $1.0 \times 10^6 \sim 5.0 \times 10^6$ Da间所占比例最多(表1)。

2.2.3 果皮中杜仲胶分子量变化 果皮中橡胶分子量大小从4月15日至6月15日呈现上升趋势, 平均分子量(Mw)分别为 2.53×10^6 、 4.11×10^6 、 5.65×10^6 、 6.88×10^6 、 7.72×10^6 Da。果皮中分子量分布随果增长而变窄, 依次为4.88、4.49、2.61、2.33、2.25, 说明随着果增长, 果皮中胶分子量分布越来越集中。果皮中橡胶不同分子量大小所占比例随果增长同样发生变化, 在4月15日至6月15日之间,

表1 雌雄株叶片和茎皮橡胶分子量分布比例

Table 1 Molecular weight distribution of rubber in leaf and stem of male and female

%

分子量 Molecular weight/ ($\times 10^4$)Da	叶 Leaves					茎皮 Stem					
	日期(月-日) Date(M-D)					日期(月-日) Date(M-D)					
	04-15	05-02	05-15	06-02	06-15	04-15	05-02	05-15	06-02	06-15	
雌株 Female	≤ 100	27.86	7.77	6.73	7.47	1.10	44.61	36.54	23.89	17.99	2.18
	100~500	52.74	49.28	42.68	41.44	37.83	45.04	47.51	51.81	52.86	58.87
	500~900	11.85	21.02	22.09	21.98	27.02	6.44	9.94	14.86	18.17	24.29
	900~1 300	3.95	9.81	11.11	11.39	13.86	1.95	3.63	5.88	7.05	10.04
	≥ 1300	3.60	12.13	17.38	17.72	20.20	1.97	2.38	3.56	3.92	4.62
雄株 Male	≤ 100	17.08	13.31	4.79	3.50	0.00	75.15	43.26	17.42	18.82	15.74
	100~500	36.15	32.98	34.72	34.31	30.20	22.06	45.43	53.03	49.07	48.15
	500~900	19.64	20.35	21.25	20.85	21.85	1.36	6.98	14.63	16.24	16.33
	900~1 300	10.04	11.47	12.17	12.45	14.41	0.49	2.13	6.39	6.41	7.02
	≥ 1300	17.10	21.89	27.07	28.89	33.54	0.93	2.21	8.54	9.46	12.76

果皮中分子量在 1.0×10^6 Da 以下所占比例从 38.86% 降至 5.65%，分子量在 1.3×10^7 Da 以上所占比例从 4.76% 上升至 22.99%，分子量在 $1.0 \times 10^6 \sim 5.0 \times 10^6$ Da 间所占比例最多 (表 2)。

表2 果皮橡胶分子量分布比例

Table 2 Molecular weight distribution of rubber in fruit

%

分子量 Molecular weight/ ($\times 10^4$)Da	日期(月-日) Date(M-D)				
	04-15	05-02	05-15	06-02	06-15
≤ 100	38.86	17.69	13.84	5.58	5.65
100~500	46.86	57.44	52.87	50.40	43.68
500~900	8.33	14.99	17.91	21.67	22.16
900~1 300	1.19	2.57	3.59	4.55	5.53
≥ 1300	4.76	7.30	11.79	17.80	22.99

2.3 杜仲 *EuREF1* 基因表达特征与含胶量的关系

2.3.1 叶片中 *EuREF1* 基因表达特征与含胶量的关系 提取雌、雄株叶片 mRNA 反转录成 cDNA 后，以杜仲 *Actin* 为内参基因，对 4 月 15 日至 6 月 15 日的杜仲雌雄株叶 *EuREF1* 基因相对表达量进行分析，结果表明：随着叶片增长，雌雄株叶片的 *EuREF1* 基因表达量不断增加；6 月 2 日时，雄株叶中 *EuREF1* 表达量是 4 月 15 日的 6 倍；到 6 月 15 日时，雌株叶片中 *EuREF1* 表达量继续升高，而雄株叶片表达量与 6 月 2 日相比差异不显著 (图 3)。对雌、雄株叶片中含胶量与 *EuREF1* 表达量进行相关分析表明：雌株叶中的 *EuREF1* 基因

表达量与其胶含量呈极显著正相关 ($P < 0.01$)， R 值为 0.969 3；杜仲雄株叶中的 *EuREF1* 基因表达量与其胶含量呈显著正相关 ($P < 0.05$)， R 值为 0.910 5 (表 3)。

2.3.2 茎皮中 *EuREF1* 基因表达特征与含胶量的关系 以当年发生的杜仲嫩枝分离树皮组织的 mRNA 反转录成 cDNA，以 *Actin* 作为内参基因，对 4 月 15 日至 6 月 16 日雌雄株茎皮中的 *EuREF1* 基因表达量进行分析，结果表明：雌雄株的茎皮组织中，*EuREF1* 基因表达量均呈上升趋势。雌株茎皮 6 月 15 日 *EuREF1* 相对表达量是 4 月 15 日的 2.2 倍；雄株茎皮 6 月 15 日 *EuREF1* 相对表达量是 4 月 15 日的 1.7 倍 (图 4)。对雌、雄株茎皮中含胶量与 *EuREF1* 表达量进行相关分析表明：杜仲雌株茎皮中 *EuREF1* 基因表达量与其胶含量呈显著正相关 ($P < 0.05$)， R 值为 0.952 2；雄株茎皮中 *EuREF1* 基因表达量与其胶含量呈极显著正相关 ($P < 0.01$)， R 值为 0.988 0 (表 1)。

2.4 杜仲 *EuREF1* 基因表达特征与分子量的关系

2.4.1 叶片中 *EuREF1* 基因表达特征与分子量的关系 雌、雄株叶片中分子量与 *EuREF1* 基因表达量在 4 月 15 至 6 月 15 日期间均呈上升趋势，通过对二者相关性分析表明：雌、雄株叶片中平均分子量与 *EuREF1* 基因表达量均呈显著正相关 ($P < 0.05$)， R 值分别为 0.942 8、0.898 2。

2.4.2 茎皮中 *EuREF1* 基因表达特征与分子量的关系 雌、雄株茎皮中分子量与 *EuREF1* 基因表达量

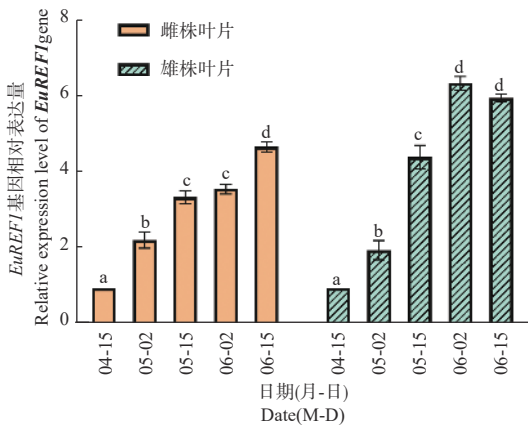


图3 叶片 *EuREF1* 基因相对表达水平

Fig. 3 Relative expression level of *EuREF1* gene in leaf

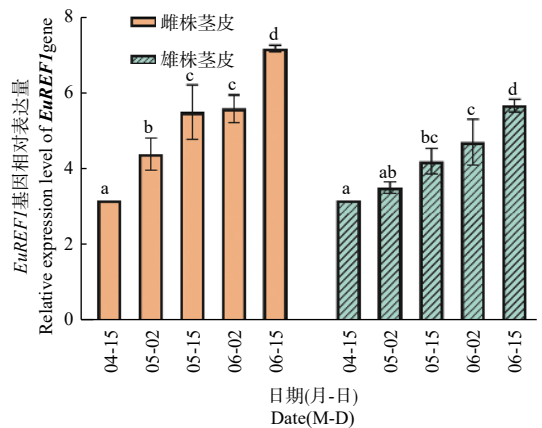


图4 杜仲茎皮 *EuREF1* 基因相对表达水平

Fig. 4 Relative expression level of *EuREF1* gene in stem

表3 *EuREF1* 表达量与含胶量相关性分析

Table 3 Correlation analysis of *EuREF1* expression and rubber content

项目 Item	<i>EuREF1</i> 表达量 <i>EuREF1</i> expression			
	雌株叶片 Female leaves	雄株叶片 Male leaves	雌株茎皮 Female stem	雄株茎皮 Male stem
雌株叶片 Female leaves	0.969 3**			
含胶量 Rubber content		0.910 5*		
雌株茎皮 Female stem			0.952 2*	
雄株茎皮 Male stem				0.988 0**

注:**表示在 $P=0.01$ 水平显著,*表示在 $P=0.05$ 水平显著。下同。

Notes:**Represent signigicant at 0.01 level.*Represent signigicant at 0.05 level.The same below.

表4 *EuREF1* 表达量与橡胶分子量相关性分析

Table 4 Correlation analysis between *EuREF1* expression level and molecular weight of rubber

项目 Item	<i>EuREF1</i> 表达量 <i>EuREF1</i> expression			
	雌株叶片 Female leaves	雄株叶片 Male leaves	雌株茎皮 Female stem	雄株茎皮 Male stem
雌株叶片 Female leaves	0.942 8*			
分子量 Molecular weight		0.898 2*		
雌株茎皮 female stem			0.937 4*	
雄株茎皮 Male stem				0.905 1*

在4月15至6月15期间均呈上升趋势,通过对二者相关性分析表明:雌、雄株茎皮中橡胶平均分子量与 *EuREF1* 基因表达量均呈显著正相关 ($P < 0.05$), R 值分别为 0.937 4、0.905 1 (表4)。

3 讨论

3.1 杜仲橡胶积累规律

杜仲所产的反式橡胶具有独特的“橡胶-塑料”二重性^[4]。杜仲的茎皮、叶片以及果皮中均含有杜仲胶,但随着季节的不同,不同器官含胶量也不同。雌、雄株叶片或茎皮中含胶量均随着器官生长而增加;在杜仲生长初期,叶片和茎皮中橡胶积累较缓慢,到5-6月时,橡胶积累量快速增加,与莫俊等^[17]结果一致。研究发现,含有杜仲橡胶的胶颗粒粒随器官成熟而增大^[18-19],含胶细胞内的细胞核与细胞器随着器官的发育而解体,并被橡胶颗粒

充满^[20]。推测5月后环境条件适宜杜仲生长发育,加速胶颗粒中橡胶合成相关基因转录和翻译,使得橡胶积累量增加。研究发现,雌、雄株茎皮中的含胶量均大于叶片,与杜红岩结果一致^[21]。杜仲叶中小胶颗粒、中等胶颗粒、大胶颗粒所占比例较平均,而皮中小胶颗粒所占比例为98.38%^[19],推测雌、雄株不同器官中含胶量虽都有增加,但增加量和总含量有差异可能与器官中所含胶颗粒大小有关。

3.2 杜仲胶分子量变化规律

杜仲胶是三倍半萜烯醇的一个高分子量同系物,主要由反式聚异戊二烯单体构成,对杜仲雌、雄株不同时期叶片、茎皮与果皮中橡胶分子量进行测定,在4月15至6月15期间,不同器官分子量均随时间的延长呈上升趋势,但增加量有差异。Bamba等^[22]在杜仲不同组织中检测到低分子量聚异戊二烯的分布有组织特异性,认为不同组织间聚异戊二烯伸长的调节机制可能不同。对于雌雄株不

同器官中不同时期各分子量大小所占比例而言,随着器官生长发育,小分子量橡胶占比逐步降低,而大分子量橡胶占比逐步增加,说明各器官组织中橡胶分子量随着器官生长而增大。雌、雄株叶片、茎皮和果皮中,分子量在 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ KD 间所占比例几乎为最多,异戊二烯分子量为 68.12 KD,说明长度在 1.5 万至 7.4 万个异戊二烯单体的橡胶最多。

3.3 *EuREF1* 基因表达特征与分子量及胶含量的关系

对杜仲雌、雄株叶片和茎皮中 *EuREF1* 表达量与分子量大小和含胶量进行比较, *EuREF1* 在雌、雄株不同时期的叶片和茎皮中均有表达,且表达量均呈上升趋势,与分子量大小变化规律和含胶量增长规律呈正相关关系,叶片和茎皮中高分子量橡胶占比也逐步增加。

4 结 论

通过对不同时期杜仲雌、雄株各器官 *EuREF1* 基因表达量与含胶量、分子量比较分析,得出以下结论: *EuREF1* 表达量与含胶量增长规律呈正相关关系,推测 *EuREF1* 基因产物与杜仲胶积累有密切关系; *EuREF1* 表达量和分子量大小变化规律呈正相关关系,推测 *EuREF1* 基因与橡胶链的延伸有关系,但仍需要直接证据。

参 考 文 献:

- [1] Wang L, Du H, Wuyun T. Genome-wide identification of microRNAs and their targets in the leaves and fruits of *Eucommia ulmoides* using high-throughput sequencing[J]. *Frontiers in plant science*, 2016, 7: 1632.
- [2] Weiss F E. The caoutchouc-containing cells of *Eucommia ulmoides* Oliver[C]. *Linnean Society*, 1892, 3(8):243-256
- [3] Wang L, Jing T, Li T, *et al.* Identification and expression analysis of the *Eucommia ulmoides* farnesyl diphosphate synthase gene family to reveal the key gene involved in rubber biosynthesis[J]. *Acta physiologiae plantarum*, 2018, 40(1): 11.
- [4] 严瑞芳, 胡汉杰. 杜仲胶的研究与开发[J]. *中国科学基金*, 1994, 8(1): 55-59.
- [5] Bamba T, Fukusaki E, Nakazawa Y, *et al.* In-situ chemical analyses of trans-polyisoprene by histochemical staining and Fourier transform infrared microspectroscopy in a rubber-producing plant, *Eucommia ulmoides* Oliver[J]. *Planta*, 2002, 215(6): 934-939.
- [6] Chen R, Harada Y, Bamba T, *et al.* Overexpression of an isopentenyl diphosphate isomerase gene to enhance trans-polyisoprene production in *Eucommia ulmoides* Oliver[J]. *BMC biotechnology*, 2012, 12(1): 78.
- [7] Bamba T, Murayoshi M, Gyoksen K, *et al.* Contribution of mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to polyisoprenoid biosynthesis in the rubber-producing plant *Eucommia ulmoides* Oliver[J]. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2010, 65(5-6): 363-372.
- [8] Tangpakdee J, Tanaka Y, Shiba K, *et al.* Structure and biosynthesis of trans-polyisoprene from *Eucommia ulmoides*[J]. *Phytochemistry*, 1997, 45(1): 75-80.
- [9] Dennis, Mark S, D. R. Light. Rubber elongation factor from *Hevea brasiliensis*. Identification, characterization, and role in rubber biosynthesis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(31): 18608-18617.
- [10] Attanyaka D, Kekwick R G O, Franklin F C H. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the rubber elongation factor gene from *Hevea brasiliensis*[J]. *Plant molecular biology*, 1991, 16(6): 1079-1081.
- [11] Cornish, Katrina. The separate roles of plant cis and trans prenyl transferases in cis - 1,4 - polyisoprene biosynthesis[J]. *The FEBS Journal*, 1993, 218(1): 267-271.
- [12] Priya P, Venkatachalam P, Thulaseedharan A. Differential expression pattern of rubber elongation factor (REF) mRNA transcripts from high and low yielding clones of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)[J]. *Plant cell reports*, 2007, 26(10): 1833-1838.
- [13] 王 宇, 董 旋, 赵德刚. 杜仲胶合成相关基因*EuREF1*的克隆及分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34(5): 1-7.
- [14] Wuyun T, Wang L, Liu H, *et al.* The hardy rubber tree genome provides insights into the evolution of polyisoprene biosynthesis[J]. *Molecular plant*, 2018, 11(3): 429-442.
- [15] Spence D, Caldwell M L. Determination of rubber in rubber-bearing plants[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 1933, 5(6): 371-375.
- [16] Chen R, Gyokusen M, Nakazawa Y, *et al.* Selection of housekeeping genes for transgene expression analysis in *Eucommia ulmoides* Oliver using real-time RT-PCR[J]. *Journal of Botany*, 2010: 1-7.
- [17] 莫 俊, 赵德刚. 杜仲胶累积与异戊二烯代谢途径相关基因表达关系研究[J]. *山地农业生物学报*, 2014(3): 28-32.
- [18] Nakazawa Y, Takeda T, Suzuki N, *et al.* Histochemical study of trans-polyisoprene accumulation by spectral confocal laser scanning microscopy and a specific dye showing fluorescence solvatochromism in the rubber-producing plant, *Eucommia ulmoides* Oliver[J]. *Planta*, 2013, 238(3): 549-560.
- [19] 杨正伟, 秦利军, 赵德刚. 杜仲胶颗粒提取纯化及胶颗粒显微观察研究[J]. *林业科学研究*, 2019, 32(6): 115-121.
- [20] 田兰馨, 卢 敏, 胡正海. 杜仲含胶细胞发生和发育的研究[J]. *植物学报*, 1990, 32(1): 1-6
- [21] 杜红岩, 杜兰英, 傅建敏, 等. 杜仲不同器官含胶率的差异及其相关性分析[J]. *中南林学院学报*, 2006, 26(4): 1-4.
- [22] Bamba T, Fukusaki E, Kajivama S, *et al.* The occurrence of geometric polyprenol isomers in the rubber-producing plant, *Eucommia ulmoides* Oliver[J]. *Lipids*, 2001, 36(7): 727-732.

The Relationship Between Rubber Molecular Weight and Expression of *EuREF1* Genes in *Eucommia ulmoides* Olive

RAN Xin¹, ZHAO De-gang^{1,2}

(1. Institute of Agro-Bioengineering and College of Life Sciences, The Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. Institute of Guizhou Distinctive Plant Resources Conservation, Guizhou Academy of Agricultural Science, Guiyang 550025, Guizhou, China)

Abstract: [Objective] To study the relationship between *EuREF1* and molecular weight and rubber content, and to understand the synthesis mechanism of gutta-percha. [Method] In mid-April to mid-June when the new stems and leaves of *Eucommia ulmoides* grew rapidly, RT-PCR technique was used to analyze the expression level of *EuREF1* gene in male and female leaves and stems, and Soxhlet extraction and GPC/SEC were used respectively to detect the rubber content and molecular weight of rubber in leaves and stems. [Result] From April to June, the expression levels of *EuREF1* in female leaves, stems and male leaves, stems were significantly or extreme-significantly positively correlated with the rubber content and molecular weight in these plant organs ($R=0.898\ 2-0.988\ 0$). Among the leaves, stems, fruit of female and leaves, stems of male, the proportion of molecular weight of 1.0×10^6 Da to 5.0×10^6 Da was the highest, and the rubber with length of 1.5×10^4 to 7.4×10^4 isoprene residues was the most. [Conclusion] The results suggest that the product of *EuREF1* gene is closely related to the accumulation of gutta-percha and may also plays an important role in the elongation of rubber chain.

Keywords: *Eucommia ulmoides* Oliv; gutta-percha; rubber elongation factor; genes

(责任编辑: 张 研)