

网络出版时间:2016-04-07 09:00

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2016.05.013

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20160407.0900.026.html

杜仲幼果和叶片 MVA 途径基因表达差异分析

王 淋^{1,2}, 乌云塔娜^{1,2}, 叶生晶³

(1 中国林业科学研究院 经济林研究开发中心, 河南 郑州 450003; 2 国家林业局杜仲工程技术研究中心, 河南 郑州 450003; 3 国家林业局 中南林业调查规划设计院, 湖南 长沙 410014)

[摘要] **【目的】**杜仲橡胶是一种多萜类物质,而甲羟戊酸(MVA)途径是合成萜类物质的重要途径之一。分析杜仲 MVA 途径相关基因表达的差异,预测杜仲橡胶合成的主要上游途径。**【方法】**在杜仲幼果和叶片转录组测序的基础上,根据基因功能注释和表达分析,确定 MVA 途径的系列基因,并对其进行表达差异分析。**【结果】**杜仲橡胶合成的 MVA 途径共涉及 23 条 Unigene,分别为 3 条 *EuACOT*、3 条 *EuHMGS*、8 条 *EuHMGR*、2 条 *EuMK*、1 条 *EuPMK* 和 6 条 *EuMDP* 基因。根据转录组 *RPKM*(Reads Per Kilo bases per Million reads)数据对基因表达差异进行分析,结果表明杜仲 MVA 途径中的 *EuACOT8*、*EuACOT10*、*EuHMGS4*、*EuHMGS5*、*EuHMGS6*、*EuHMGR18*、*EuMK3*、*EuMK4*、*EuMDP7*、*EuMDP8*、*EuMDP9*、*EuMDP10*、*EuMDP11* 基因在幼果和叶片中的表达量具有显著差异,其中仅 *EuMDP9* 在叶片中的表达量大于幼果,而其余基因在幼果的表达量大于叶片;*EuHMGR15* 和 *EuHMGR17* 只在幼果中特异表达。**【结论】**MVA 途径绝大部分基因在果实中大量表达,这与果实中杜仲橡胶含量远超过叶片的现象相吻合,推测杜仲果实 MVA 途径为杜仲橡胶合成的主要途径。

[关键词] 杜仲;幼果和叶片;甲羟酸途径;基因表达差异

[中图分类号] Q786

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2016)05-0097-08

Differential expression of MVA pathway genes in young fruits and leaves of *Eucommia ulmoides* Oliver

WANG Lin^{1,2}, WUYUN Ta-na^{1,2}, YE Sheng-jing³

(1 Non-timber Research and Development Center of CAF, Zhengzhou, Henan 450003, China;

2 The *Eucommia* Engineering Research Center of State Forestry Administration, Zhengzhou, Henan 450003, China;

3 Central South Forest Inventory and Planning Institute of State Forestry Administration, Changsha, Hunan 410014, China)

Abstract: **【Objective】***Eucommia ulmoides* Rubber (EuR) is one type of terpenoids, which can be synthesized by mevalonate (MVA) pathway. This study analyzed the differential expression of genes in MVA pathway in young fruits and leaves of *E. ulmoides* oliver and predicted main pathways of EuR synthesis. **【Method】**According to the high-throughput transcriptome sequencing (RAN-seq) data, functional annotation and expression analysis in *E. ulmoides* young fruits and leaves, unigenes of MVA pathway were determined, and their expressions were systematically analyzed. **【Result】**Twenty-three unigenes in MVA pathway were annotated including 3 acetyl-CoA C-acetyltransferase (*EuACTO*), 3 hydroxymethylglutaryl-CoA synthase (*EuHMGS*), 8 hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (*EuHMGR*), 2 mevalonate kinase (*EuMK*), 1 phosphomevalonate kinase (*EuPMK*), and 6 diphosphomevalonate decarboxylase (*EuMDP*). Reads Per Kilo bases per Million reads (*RPKM*) data analysis showed that the expressions of *EuACOT8*,

[收稿日期] 2014-09-29

[基金项目] 国家林业公益性行业科研专项(201004029)

[作者简介] 王 淋(1986—),女,辽宁鞍山人,博士,主要从事经济林育种研究。E-mail:174816279@qq.com

[通信作者] 乌云塔娜(1975—),女,内蒙古通辽人,教授,主要从事经济林育种栽培研究。E-mail:tanatanan@163.com

EuACOT10, *EuHMGS4*, *EuHMGS5*, *EuHMGS6*, *EuHMGR18*, *EuMK3*, *EuMK4*, *EuMDP7*, *EuMDP8*, *EuMDP9*, *EuMDP10*, and *EuMDP11* were significantly different in young fruits and leaves. Only the expression of *EuMDP9* in leaves was greater than in young fruits, while the expressions of other genes in young fruits were greater than in leaves. Furthermore, *EuHMGR15* and *EuHMGR17* were unique in young fruits. 【Conclusion】 Most of genes in MVA pathway were abundantly expressed in young fruits, which was consistent with the fact that rubbers form fruits were more than from leaves. Therefore, MVA pathway was considered the main synthetic pathway of EuR.

Key words: *Eucommia ulmoides* Olives; young fruits and leaves; MVA pathway; differential expression of gene

杜仲(*Eucommia ulmoides* Olives)是中国特有的名贵滋补药材,具有补肝肾、益筋骨、安胎等多种功效^[1];除此之外,杜仲叶片、果实、树皮、根中均含有大量的天然胶状物质——杜仲橡胶(*Eucommia ulmoides* Rubber, EUR)。杜仲橡胶是温带地区重要的胶源,杜仲树在温带地区适生面积较广。杜仲橡胶与天然三叶橡胶的化学成分相同,但化学结构不同,天然橡胶为顺式聚异戊二烯,而杜仲橡胶为反式聚异戊二烯,这种独特的橡塑二重性质决定了杜仲橡胶具有重要的经济价值^[2-3]。杜仲果实和叶片中橡胶含量有明显差异,一般而言,果实含胶率为10%~12%,叶片含胶率仅为1%~3%^[4]。因此,进行不同组织的基因表达与橡胶含量的相关性研究,比较分析橡胶合成相关基因的表达差异,阐明基因表达差异与橡胶含量的动态变化关系,可以揭示杜仲橡胶合成的基因调控机制。

杜仲橡胶属于多萜类化合物,Chaykin 等^[5]和 Lynen 等^[6]首次提出了萜类物质合成的甲羟戊酸(Mevalonate, MVA)途径,且该途径主要位于细胞质中,又被称为细胞质途径。Takeshi 等^[7]利用同位素标定法标记萜类物质合成 MVA 途径代谢的中间产物发现,在杜仲的含胶细胞中存在 MVA 代谢途径,提出杜仲橡胶生物合成与 MVA 代谢途径有关及杜仲橡胶是反式聚异戊二烯的观点。到目前为止,杜仲中已分离鉴定的萜类物质有 16 种以上, MVA 途径主要包括 6 步化学反应:① 3 分子的乙酰 CoA 在乙酰乙酰 CoA 硫解酶(Acetyl-CoA acetyl transferase, ACOT)的催化作用下生成乙酰乙酰辅酶 A;② 乙酰乙酰辅酶 A 在 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 合成酶(3-Hydroxyl-3-methylglutaryl-CoA synthase, HMGS)的催化作用下生成 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA;③ 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 经 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶(3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, HMGR)催化生成

甲羟戊酸;④甲羟戊酸在 MVA 甲羟戊酸激酶(Mevalonate kinase, MK)的磷酸化作用下形成 5-磷酸-甲羟戊酸;⑤ 5-磷酸-甲羟戊酸随后在甲羟戊酸磷酸激酶(5-phosphate-mevalonate kinase, PMK)的作用下生成甲羟戊酸焦磷酸;⑥甲羟戊酸焦磷酸在甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶(Mevalonate-5-diphosphate decarboxylase, MDC)的作用下脱羧生成异戊烯基焦磷酸 IPP(Isopentenyl-PP)^[8-11]。

近年来,转录组研究在 RNA 水平上可获得高通量基因表达水平的相关信息,而且是解析基因表达差异、新基因发掘、基因结构功能研究的有效方法之一^[12-13]。基于 Illumina/Solexa 高通量测序平台的转录组测序技术具有高度自动化、读取片段多、适合进行各种大小片段的测序、能够在单核苷酸水平检测对任意物种的整体转录情况等多种功能^[14-15]。本研究根据李铁柱等^[16-17]已构建的杜仲果实和叶片转录组数据库,将杜仲幼果和叶片转录组中的 Uni-gene 根据 GO 功能分析得出萜类化合物生物合成的代谢通路,对其幼果和叶片萜类合成 MVA 途径基因的表达差异进行了分析,阐明基因表达差异与橡胶含量的动态变化关系,以为杜仲萜类化合物尤其是杜仲橡胶的生物合成途径及其分子调控机理研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

选取中国林业科学研究院经济林研究开发中心(国家林业局泡桐研究开发中心)国审良种‘华仲 6 号’杜仲的幼果(授粉后 50 d,杜仲橡胶合成第 1 个高峰期)和叶片(展叶后 55 d,橡胶含量较高)为试验材料,液氮速冻后, -80 ℃ 保存备用。

1.2 杜仲样品 RNA 的提取

分别取杜仲幼果和叶片约 100 mg,采用 Omega 公司的 Plant RNA Kit 试剂盒提取杜仲幼果和叶片

的总 RNA,提取完毕测定总 RNA 品质,如果 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.2,表明提取的 RNA 符合要求。将杜仲幼果和叶片的 RNA(约 2 μ g)送至深圳华大基因公司进行转录组测序及基因功能注释。

1.3 转录组测序及 Unigene 功能注释方法

深圳华大基因公司采用 Illumina 技术进行测序,首先是将细胞中的所有转录产物反转录为 cDNA 文库,然后将 cDNA 文库中的 DNA 随机剪切为小片段(或将 RNA 片段化后再反转录),这样可产生了成千上万的短 cDNA reads,然后再进行 Illumina 测序。获得序列数据后,对测序序列进行拼接组装,首先使用短 reads 组装软件 SOAP denovo 做转录组从头组装,然后利用 paired-end reads 对 Scaffold 做补洞处理,最后将 Unigene 序列与蛋白数据库 nr、Swiss-Prot、KEGG 和 COG 做 blastx 比对(期望值<0.000 01),取比对结果最好的蛋白确定 Unigene 的序列方向。Unigene 的表达量计算使用 RPKM 法(Reads Per kb per Million reads),其计算公式如下:

$$RPKM=\frac{10^6C}{NL/10^3}。$$

式中:设 RPKM 为 Unigene A 的表达量,则 C 为唯一比对到 Unigene A 的 reads 数,N 为唯一比对到所有 Unigene 的总 reads 数,L 为 Unigene A 的碱基数^[18]。

2 结果与分析

2.1 杜仲萜类物质合成 MVA 途径的代谢位点

将杜仲幼果和叶片 Unigene 输入到 KEGG 数据库,结果发现 MVA 合成途径共有 6 个基因 23 条 Unigene 被注释,如图 1 所示,其中代谢位点 2.3.1.9 为乙酰乙酰 CoA 硫解酶 (Acetyl-CoA acetyl transferase,ACOT),共被注释 3 条 Unigene,记为 *EuACOT*8-10;代谢位点 2.3.3.10 为 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 合成酶 (3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase, HMGS),被注释 3 条 Unigene,记为 *EuHMGS*4-6;代谢位点 1.1.1.34 为 3-

羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶 (3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, HMGR),被注释 8 条 Unigene,记为 *EuHMGR*12-19;代谢位点 2.7.1.36 为甲羟戊酸激酶 (Mevalonate kinase, MK),被注释 2 条 Unigene,记为 *EuMK*3-4;代谢位点 2.7.4.2 为甲羟戊酸磷酸激酶 (5-phosphate-mevalonate kinase, PMK),被注释 1 条 Unigene,记为 *EuPMK*3;代谢位点 4.1.1.33 为甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶 (Mevalonate-5-diphosphate decarboxylase, MDP),被注释 6 条 Unigene,记为 *EuMDP*6-11。

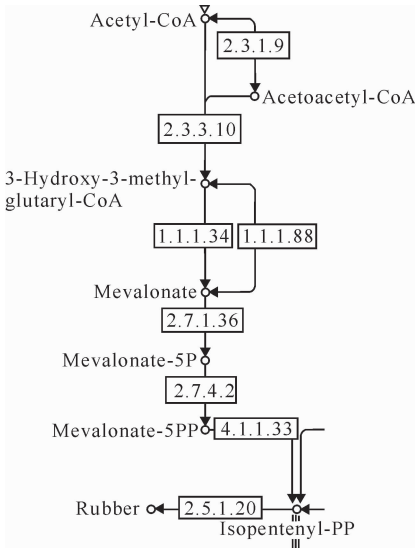


图 1 杜仲 MVA 途径代谢位点
Fig.1 Metabolic loci in MVA pathway of *Eucommia ulmoides*

2.2 杜仲乙酰乙酰 CoA 硫解酶基因 (*EuACOT*) 的确定及表达差异

2.2.1 *EuACOT* 的确定 从杜仲幼果和叶片的转录组数据中发现,杜仲幼果和叶片 *ACOT* 基因均有 3 条 Unigene 被注释,与油茶 (*Camellia oleifera*, ADD10719.1) 和烟草 (*Nicotianatabacum*, AAU95619.1) 的 *ACOT* 基因相似性达到 82%~91%(表 1),因此命名为 *EuACOT* 基因,继杜仲成熟果实 *EuACOT*1-7 基因家族^[19],命名为 *EuACOT*8-10。

表 1 杜仲幼果和叶片 *EuACOT* 基因的相关信息

Table 1 Information of *EuACOT* in *Eucommia ulmoides* compared with other species

Unigene 命名 Unigene name	Unigene 编号 Unigene ID	长度/bp Length	参考序列 ID Reference sequence ID	物种 Species	期望值 E-value	相似度/% Similarity
<i>EuACOT</i> 8	14429	1 643	ADD10719.1	油茶 <i>Camellia oleifera</i>	0	91
<i>EuACOT</i> 9	4889	1 398	AAU95619.1	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	0	82
<i>EuACOT</i> 10	550	1 464	ADD10719.1	油茶 <i>Camellia oleifera</i>	0	91

2.2.2 *EuACOT* 在杜仲幼果和叶片中的表达量差异 乙酰乙酰 CoA 硫解酶是萜类物质合成 MVA

途径的起始酶,对众多蛋白的乙酰化具有修饰作用^[20-21]。由图 2 可见,*EuACOT* 在杜仲幼果和叶片中均有表达,且在幼果中的表达量均大于叶片;其中 *EuACOT8* 和 *EuACOT10* 在幼果中的表达量显著高于叶片。无论在杜仲幼果还是叶片中,*EuACOT* 的表达量大小顺序均为 *EuACOT8*>*EuACOT10*>*EuACOT9*。

2.3 杜仲 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 合成酶基因 (*EuHMGS*) 的确定及表达差异

2.3.1 *EuHMGS* 的确定 从杜仲幼果和叶片的转录组数据中发现,杜仲幼果和叶片 *HMGS* 基因有 3 条 Unigene 被注释,与烟草属观赏烟(*N. langsdorffii*×*N. sanderae*, ABV02025. 1)、喜树(*Camptotheca acuminata*, ACD87446. 1)的 *HMGS* 基因相似性达到 61%~89%(表 2),因此命名为杜仲的*Eu-*

HMGS 基因,继杜仲成熟果实 *EuHMGS1*—3 基因家族^[19],记为 *EuHMGS4*—6。

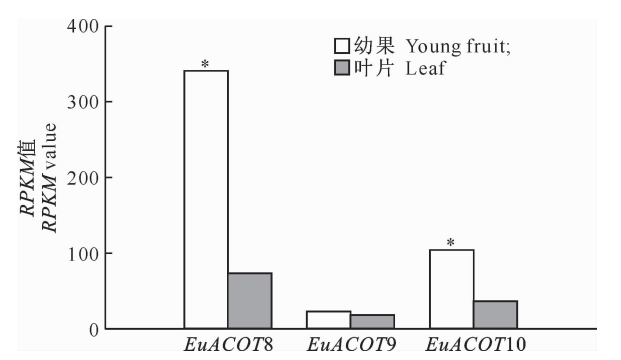


图 2 *EuACOT* 基因在杜仲幼果和叶片中的差异表达
*. 差异显著。下同

Fig. 2 Differential expression levels of *EuACOT* in young fruits and leaves of *Eucommia ulmoides*
* shows significance. The same below

表 2 杜仲幼果和叶片 *EuHMGS* 基因的相关信息

Table 2 Information of *EuHMGS* in *Eucommia ulmoides* compared with other species

Unigene 命名 Unigene name	Unigene 编号 Unigene ID	长度/bp Length	参考序列 ID 号 Reference sequence ID	物种 Species	期望值 E-value	相似度/% Similarity
<i>EuHMGS4</i>	10312	1 525	ABV02025. 1	观赏烟 <i>Nicotiana langsdorffii</i> × <i>Nicotiana sanderae</i>	0	89
<i>EuHMGS5</i>	136	1 924	ACD87446. 1	喜树 <i>Camptotheca acuminata</i>	0	87
<i>EuHMGS6</i>	40010	558	ABV02025. 1	观赏烟 <i>Nicotiana langsdorffii</i> × <i>Nicotiana sanderae</i>	7e—62	61

2.3.2 *EuHMGS* 基因在杜仲幼果和叶片中的表达量差异 从图 3 可以看出,*EuHMGS* 家族的成员在杜仲幼果和叶片中均有表达,且在幼果中的表达量显著高于叶片。无论在幼果还是叶片中,其表达量大小顺序均为 *EuHMGS5*>*EuHMGS4*>*EuHMGS6*。

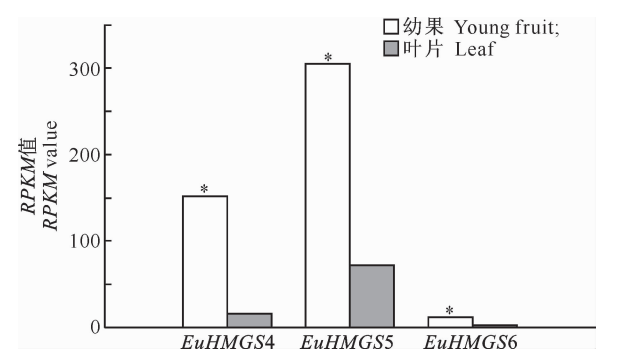


图 3 *EuHMGS* 在杜仲幼果和叶片中的差异表达

Fig. 3 Differential expression levels of *EuHMGS* in young fruits and leaves of *Eucommia ulmoides*

2.4 杜仲 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶基因 (*EuHMGR*) 的确定及表达差异

2.4.1 *EuHMGR* 的确定 从杜仲幼果和叶片的转录组数据中发现,杜仲幼果和叶片 *HMGR* 基因

均有 8 条 Unigene 被注释,与杜仲(*E. ulmoides*, AAV54051. 1)、黄龙胆(*Gentiana lutea*, BAE92730. 1)、烟草(*N. tabacum*, AAB87727. 1)、胡黄连(*Picrorhiza kurrooa*, ABC74565. 1)、丹参(*Salvia miltiorrhiza*, ACD37361. 1)、黄龙胆(*Gentiana lutea*, BAE92730. 1)、喜树(*C. acuminata*, P48021. 1)的 *HMGR* 基因相似性达到 53%~99%(表 3),命名为 *EuHMGR* 基因,继杜仲成熟果实 *EuHMGR1*—11 家族基因^[19],命名为 *EuHMGR12*—19。

2.4.2 *EuHMGR* 基因在幼果和叶片中的表达量差异 从图 4 可以看出,家族成员 *EuHMGR15* 和 *EuHMGR17* 在幼果中特异表达,而其他 *EuHMGR* 家族成员在幼果和叶片中均有表达;*EuHMGR14* 和 *EuHMGR19* 在叶片中的表达量大于幼果,而其他 *EuHMGR* 家族成员的表达量均是幼果大于叶片,其中 *EuHMGR18* 在幼果中的表达量显著高于叶片。

2.5 杜仲甲羟戊酸激酶基因 (*EuMK*) 的确定及表达差异

2.5.1 *EuMK* 的确定 从杜仲幼果和叶片的转录组数据中发现,杜仲幼果和叶片 *MK* 基因均有 2 条 Unigene 被注释,与橡胶树(*Hevea brasiliensis*, AAL18925. 1)的 *MK* 基因相似性达到 77%~85%

(表 4),命名为 *EuMK* 基因,继成熟果实 *EuMK*1— 2 基因家族^[19],命名为 *EuMK*3—4。

表 3 杜仲幼果和叶片 *EuHMGR* 基因的相关信息

Unigene 命名 Unigene name	Unigene 编号 Unigene ID	长度/bp Length	参考序列 ID Reference sequence ID	物种 Species	期望值 E-value	相似度/% Similarity
<i>EuHMGR</i> 12	2258	2 410	AAV54051.1	杜仲 <i>Eucommia ulmoides</i>	0	99
<i>EuHMGR</i> 13	23567	420	BAE92730.1	黄龙胆 <i>Gentiana lutea</i>	8e—60	86
<i>EuHMGR</i> 14	30410	219	AAB87727.1	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	3e—11	56
<i>EuHMGR</i> 15	31427	229	ABC74565.1	胡黄连 <i>Picrorhiza kurrooa</i>	9e—17	53
<i>EuHMGR</i> 16	32651	241	ACD37361.1	丹参 <i>Salvia miltiorrhiza</i>	0	58
<i>EuHMGR</i> 17	37874	351	BAE92731.1	黄龙胆 <i>Gentiana lutea</i>	4e—64	88
<i>EuHMGR</i> 18	5849	2 353	AAB87727.1	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	0	79
<i>EuHMGR</i> 19	697	2 185	P48021.1	喜树 <i>Camptotheca acuminata</i>	0	79



图 4 *EuHMGR* 基因在杜仲幼果和叶片中的差异表达

Fig. 4 Differential expression levels of *EuHMGR* in young fruits and leaves of *Eucommia ulmoides*

表 4 杜仲幼果和叶片 *EuMK* 基因的相关信息

Unigene 命名 Unigene name	Unigene 编号 Unigene ID	长度/bp Length	参考序列 ID Reference sequence ID	物种 Species	期望值 E-value	相似度/% Similarity
<i>EuMK</i> 3	18927	1 094	AAL18925.1	橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i>	1e—172	77
<i>EuMK</i> 4	2112	480	AAL18925.1	橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i>	6e—33	85

2.5.2 *EuMK* 在杜仲幼果和叶片中的表达量差异

从图 5 可以看出,*EuMK* 家族成员在杜仲幼果和叶片中均有表达,且在幼果中的表达量显著高于叶片,无论是果实还是叶片中,表达量大小均为 *EuMK*3>*EuMK*4。

2.6 杜仲甲羟戊酸磷酸激酶基因(*EuPMK*)的确定及表达差异

2.6.1 *EuPMK* 的确定 从杜仲幼果和叶片的转录组数据中发现,杜仲幼果和叶片 *PMK* 基因均有 1 条 Unigene 被注释,与茶(*Camellia sinensis*, AFC34137.1)的 *PMK* 基因相似性达到 90%(表 5),故命名为 *EuPMK* 基因,继杜仲成熟果实 *Eu-*

*PMK*1—2 基因家族^[19],命名为 *EuPMK*3。

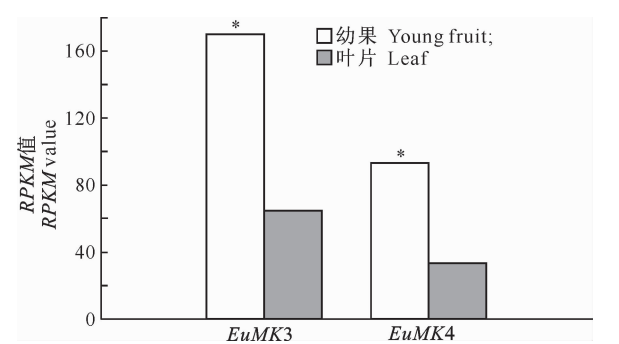


图 5 *EuMK* 基因在杜仲幼果和叶片中的差异表达

Fig. 5 Differential expression levels of *EuMK* in young fruits and leaves of *Eucommia ulmoides*

表 5 杜仲幼果和叶片 *EuPMK* 基因的相关信息

Table 5 Information of *EuPMK* in *Eucommia ulmoides* oliver compared with other species

Unigene 命名 Unigene name	Unigene 编号 Unigene ID	长度/bp Length	参考序列 ID Reference sequence ID	物种 Species	期望值 E-value	相似度/% Similarity
<i>EuPMK3</i>	10321	1 817	AFC34137.1	茶 <i>Camellia sinensis</i>	0	90

2.6.2 *EuPMK* 基因在幼果和叶片中的表达量差异 从图 6 可以看出,*EuPMK3* 基因在杜仲幼果和叶片中均有表达,且在幼果中的表达量大于叶片。

2.7 杜仲甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶基因 (*EuMDP*) 的确定及表达差异

2.7.1 *EuMDP* 的确定 从杜仲幼果和叶片的转录组数据中发现,杜仲幼果和叶片 *MDP* 基因有 6 条 Unigene 被注释,与橡胶树(*Hevea brasiliensis*, AAL18927.1, BAF98285.1)、烟草属观赏烟(*N. langsdorffii* × *N. sanderae*, ABV02028.1)、人参(*Panax ginsen*, ADI80345.1)的 *MDP* 基因相似性达到 82%~89%(表6),命名为*EuMDP*基因,继成熟

果实 *EuMDP1*—5 基因家族^[19],记为 *EuMDP6*—11。

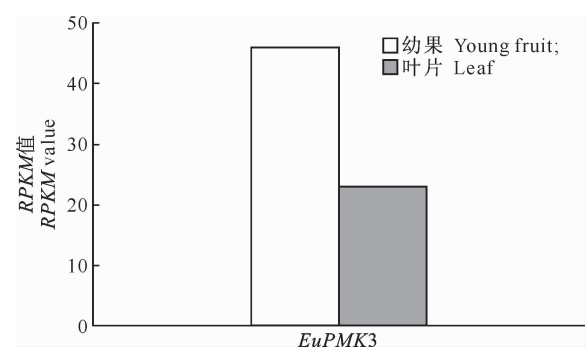


图 6 *EuPMK* 在杜仲幼果和叶片中的差异表达
Fig. 6 Differential expression levels of *EuPMK* in young fruits and leaves of *Eucommia ulmoides*

表 6 杜仲幼果和叶片 *EuMDP* 基因的相关信息

Table 6 Information of *EuMDP* in *Eucommia ulmoides* compared with other species

Unigene 命名 Unigene name	Unigene 编号 Unigene ID	长度/bp Length	参考序列 ID 号 Reference sequence ID	物种 species	期望值 E-value	相似度/% Similarity
<i>EuMDP6</i>	2961	485	AAL18927.1	橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i>	5e-17	82
<i>EuMDP7</i>	41324	240	ABV02028.1	观赏烟 <i>Nicotiana langsdorffii</i> × <i>Nicotiana sanderae</i>	2e-36	89
<i>EuMDP8</i>	45009	224	ABV02028.1	观赏烟 <i>Nicotiana langsdorffii</i> × <i>Nicotiana sanderae</i>	2e-40	88
<i>EuMDP9</i>	46901	275	ADI80345.1	人参 <i>Panax ginsen</i>	1e-26	89
<i>EuMDP10</i>	47529	306	ADI80345.1	人参 <i>Panax ginsen</i>	1e-26	89
<i>EuMDP11</i>	6878	952	BAF98285.1	橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i>	9e-160	84

2.7.2 *EuMDP* 在杜仲幼果和叶片中的表达量差异 从图 7 可以看出,*EuMDP* 家族成员在幼果和叶片中均有表达,其中 *EuMDP6* 和 *EuMDP9* 在叶片中的表达量大于幼果,其余成员表达量均是幼果

大于叶片;除了 *EuMDP6* 在幼果与叶片中的表达量无显著差异外,杜仲 *EuMDP* 家族其他成员在幼果与叶片中的表达量均存在显著差异。

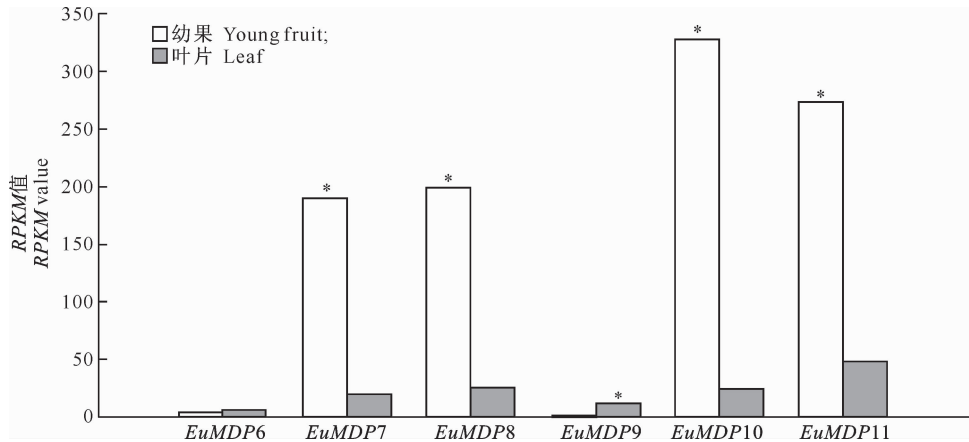


图 7 *EuMDP* 在杜仲幼果和叶片中的差异表达

Fig. 7 Differential expression levels of *EuMDP* in young fruits and leaves of *Eucommia ulmoides*

3 讨论与结论

本研究结果表明,萜类物质合成 MVA 途径共涉及 23 条 Unigene,其中包括 3 条 *ACOT* (*EuACOT8*—10)、3 条 *HMGS* (*EuHMGS4*—6)、8 条 *HMGR* (*EuHMGR12*—19)、2 条 *MK* (*EuMK3*—4)、1 条 *PMK* (*EuPMK3*)、6 条 *MDP* (*EuMDP6*—11)。利用 RPKM 法对杜仲幼果和叶片转录组基因表达水平进行计算分析,可以消除基因长度和测序量差异对基因表达丰度的影响^[16-17,22],从而可直接准确地反应基因的表达水平,为分析基因表达情况提供了方便有效的方法。根据杜仲幼果和叶片转录组 RPKM 数据分析,杜仲 MVA 途径中的 *EuACOT8*、*EuACOT10*、*EuHMGS4*、*EuHMGS5*、*EuHMGS6*、*EuHMGR18*、*EuMK3*、*EuMK4*、*EuMDP7*、*EuMDP8*、*EuMDP9*、*EuMDP10*、*EuMDP11* 基因在杜仲幼果和叶片中的表达量具有显著差异,*EuHMGR15* 和 *EuHMGR17* 在幼果中特异表达。另外,幼果和叶片中表达量具有显著差异的基因中,仅 *EuMDP9* 在叶片中的表达量大于幼果,其余基因在杜仲幼果中的表达量大于叶片。综上所述,杜仲果实和叶片中均存在萜类合成的 MVA 代谢途径,且基因表达量在果实和叶片中具有明显差异,果实的基因表达量显著高于叶片,这与果实中杜仲橡胶含量远超过叶片相一致,推测杜仲橡胶合成的上游途径主要以 MVA 途径为主。

萜类是一大类植物次生代谢产物,结构复杂、种类繁多^[23]。MVA 途径相关酶基因主要参与萜类物质的合成,且对光合作用、呼吸作用、生长发育的调节,细胞内信号传导以及细胞膜结构和功能等重要生物学进程有影响,对细胞代谢的诸多方面以及细胞膜的结构和功能发挥着重要作用。Wititsuwannakul 等^[24]证明巴西橡胶 *HMGR* 基因的表达量与其橡胶含量相关;Chappell^[25]等将仓鼠的 *HMGR* 基因转入烟草中,结果提高了总的 *HMGR* 酶活性,同时甾醇的含量也有一定增加;Ren Chen 等^[26]将 *EuIPI* 基因转入杜仲,从而提高了转基因杜仲中反式聚异戊二烯的含量,推测 *EuIPI* 的表达调控可提高杜仲产胶量。因此,综上所述,将 MVA 途径相关基因表达量提高或抑制其表达应该会对 IPP 的表达调控产生影响,亦或是 MVA 途径相关基因结合 *IPP* 基因一起调控下游杜仲胶合成关键基因的表达可以影响反式聚异戊二烯的含量,即合成杜仲胶的含量。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京:化学工业出版社,2005:114-115.
Pharmacopoeia Commission of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [M]. Beijing:Chemical Industry Press,2005:114-115. (in Chinese)
- [2] 杜红岩. 我国的杜仲胶资源及其开发潜力与产业发展思路 [J]. 经济林研究,2010,28(3):1-6.
Du H Y. Discussion on industry development and exploration potential of gutta-percha resource in China [J]. Nonwood Forest Research,2010,28(3):1-6. (in Chinese)
- [3] 薛 萍. 杜仲研究现状与发展前景 [J]. 经济林研究,1995,13(3):56-58.
Xue P. Research status and development prospects of *Eucommia ulmoides* Oliv [J]. Nonwood Forest Research,1995,13(3):56-58. (in Chinese)
- [4] 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]. 中南林业科技大学学报(自然科学版),2006,26(4):1-4.
Du H Y, Du L Y, Fu J M, et al. The difference and its pertinence analysis of the gutta-percha content in organs of *Eucommia ulmoides* Oliv [J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology (Nat Sci Ed), 2006, 26(4): 1-4. (in Chinese)
- [5] Chaykin S, Law J, Phillips A H, et al. Phosphorylated intermediates in the synthesis of squalene [J]. PNAS, 1958, 44(10): 998-1004.
- [6] Lynen F, Efferer H, Henning U, et al. Farnesyl-pyrophosphatund 3-Methyl- Δ^3 -butenyl-1-pyrophosphat, die biologischen vorstufendes squalens zur biosyntheseder terpene, III [J]. Angewandte Chemie, 1958, 70(24): 738-742.
- [7] Takeshi B, Michiko M, Koichirou G, et al. Contribution of mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to polyisoprenoid biosynthesis in the rubber-producing plant *Eucommia ulmoides* Oliver [J]. Z Naturforsch C, 2010, 65: 363-372.
- [8] 兰文智,余龙江,蔡永军,等. 类异戊二烯非甲羟戊酸代谢途径的分子生物学研究进展 [J]. 西北植物学报,2001,21(5):1039-1047.
Lan W Z, Yu L J, Cai Y J, et al. Advance on molecular biology of isoprenoids non-mevalonate pathway [J]. Acta Botanica Borreali-Occiden Sinica, 2001, 21(5): 1039-1047. (in Chinese)
- [9] 韩军丽,李振秋,刘本叶. 植物萜类代谢工程 [J]. 生物工程学报,2007,23(4):561-569.
Han J L, Li Z Q, Liu B Y. Metabolic engineering of terpenoids plants [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2007, 23(4): 561-569. (in Chinese)
- [10] Mann V, Harker M, Pecker I, et al. Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco lowers [J]. Nat Biotechnol, 2000, 18: 888-892.
- [11] Lichtenthaler H K. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1999, 50: 47-65.

- [12] 祁云霞,刘永斌,荣威恒. 转录组研究新技术:RNA-Seq 及其应用 [J]. 遗传,2011,33(11):1191-1202.
Qi Y X,Liu Y B,Rong W H. RNA-Seq and its applications;a new technology for transcriptomics [J]. Hereditas,2011,33(11):1191-1202. (in Chinese)
- [13] 井赵斌,魏琳,俞靓,等. 转录组测序及其在牧草基因资源发掘中的应用前景 [J]. 草业科学,2011,28(7):1364-1369.
Jing Z B,Wei L,Yu L,et al. Transcription sequencing and its application prospective on discovering the gene resources of forages [J]. Praticultural Science,2011,28(7):1364-1369. (in Chinese)
- [14] Wang X W,Luan J B,Li J M,et al. De novo characterization of a whitefly transcriptome and analysis of its gene expression during development [J]. BMC Genomics,2010,24(11):400. doi:10.1186/1471-2164-11-400.
- [15] 侯志伟,王赞,高宏,等. dRNA-seq 原理及其在原核生物转录组学研究中的应用 [J]. 遗传,2013,35(8):983-991.
Hou Z W,Wang Y,Gao H,et al. The principle of dRNA-seq and its applications in prokaryotic transcriptome analyses [J]. Hereditas,2013,35(8):983-991. (in Chinese)
- [16] 李铁柱,杜红岩,刘慧敏,等. 杜仲果实和叶片转录组数据组装及基因功能注释 [J]. 中南林业科技大学学报(自然科学版),2012,32(11):22-30.
Li T Z,Du H Y,Liu H M,et al. Transcriptome data assembly and gene function annotation of *Eucommia mature* fruits and leaves [J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology (Nat Sci Ed),2012,32(11):22-30. (in Chinese)
- [17] 李铁柱,杜红岩,刘慧敏,等. 杜仲幼果和成熟果实转录组数据组装及基因功能注释 [J]. 中南林业科技大学学报(自然科学版),2012,32(10):9-17.
Li T Z,Du H Y,Liu H M,et al. Transcriptome data assembly and gene function annotation of *Eucommia mature* fruits and young fruits [J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology (Nat Sci Ed),2012,32(10):9-17. (in Chinese)
- [18] Mortazavi A,Williams B A,Mccue Kenneth,et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq [J]. Nat Methods,2008,5(7):621-628.
- [19] 王淋,乌云塔娜,叶生晶. 杜仲成熟果实和幼果 MVA 途径基因表达差异分析 [J]. 经济林研究,2013,31(4):45-51.
Wang L,Wuyun T N,Ye S J. Analysis on gene differential expression in ripe and young fruits of *Eucommia ulmoides* by MVA pathway [J]. Nonwood Forest Research,2013,31(4):45-51. (in Chinese)
- [20] 张琳,谭晓凤,胡娇,等. 油茶乙酰 CoA 酰基转移酶基因 cDNA 克隆及序列特征分析 [J]. 中南林业科技大学学报(自然科学版),2011,31(8):108-112.
Zhang L,Tan X F,Hu J,et al. Cloning and sequence characterization of cDNA encoding acetyl-CoA:acetyl transferase in *Camellia oleifera* [J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology (Nat Sci Ed),2011,31(8):108-112. (in Chinese)
- [21] 王计平,史华凭,李润植. 植物种子油合成的调控与遗传修饰 [J]. 植物遗传资源学报,2007,7(4):488-493.
Wang J P,Shi H P,Li R Z. Regulation and genetic modification of seed oil synthesis in plants [J]. Journal of Plant Genetic Resources,2007,7(4):488-493. (in Chinese)
- [22] Mortazavi A,Williams B A,Mccue K,et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq [J]. Nat Methods,2008,5(7):621-628.
- [23] 郑清平,余龙江,刘智,等. 红豆杉细胞非甲羟戊酸途径关键酶基因 *dxr* 的克隆与分析 [J]. 生物工程学报,2004,7(20):548-553.
Zheng Q P,Yu L J,Liu Z,et al. Cloning and analysis of cDNA encoding key enzyme gene (*dxr*) of the non-MVA pathway in *Taxus chinensis* cells [J]. Chinese Journal of Biotechnology,2004,7(20):548-553. (in Chinese)
- [24] Wititsuwannakul R,Wititsuwannakul D,Suwanmanee P. Purification and characterization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from latex of Hevea [J]. Phytochem,1990,29:1401-1403.
- [25] Chappell J,Wolf F,Proulx J,et al. Is the reaction catalyzed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase a rate-limiting step for isoprenoid biosynthesis in plant [J]. Plant Physiol,1995,109:1337-1343.
- [26] Ren Chen,Yoko Harada,Takeshi Bamba,et al. Overexpression of an isopentenyl diphosphate isomerase gene to enhance trans-polyisoprene production in *Eucommia ulmoides* Oliver [J]. BMC Biotechnology,2012,12:78.