

橡胶树中橡胶的生物合成与调控

邹智*, 杨礼富, 王真辉, 袁坤

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, 海南儋州 571737

Biosynthesis and Regulation of Natural Rubber in *Hevea*

ZOU Zhi*, YANG Li-Fu, WANG Zhen-Hui, YUAN Kun

Key Laboratory of Rubber Biology, Ministry of Agriculture/Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China

摘要: 介绍橡胶树橡胶生物合成的分子过程、参与合成的主要酶类和辅助因子, 以及割胶、生长调节物质(茉莉酸和乙烯等)和基因工程技术调控橡胶合成的研究进展。

关键词: 橡胶树; 橡胶; 生物合成; 调控

天然橡胶生物合成的研究始于20世纪50年代, 至今已取得巨大进展。橡胶主要通过依赖于甲羟戊酸的植物类异戊二烯次生代谢途径合成, 是一个酶促顺-1,4-异戊二烯聚合到长链聚异戊二烯链的过程。至今虽已基本了解了橡胶合成前中期生化反应的各个步骤和参与反应的酶类, 但对于顺-1,4-异戊二烯聚合成橡胶分子的详细过程还知之甚少(刘卫平等2002)。因此, 深入研究橡胶树中橡胶的生物合成途径及其调控机制是非常必要的。

1 橡胶树橡胶的生物合成

1.1 橡胶合成的类异戊二烯代谢途径 此途径中, 异戊二烯单体来源于异戊二烯焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP 或 IDP), IPP 来源于甲羟戊酸(mevalonic acid, MVA), MVA 来源于乙酰-CoA (acetyl CoA), 乙酰-CoA 最终来源于蔗糖。橡胶在胶乳细胞中的橡胶粒子表面合成, 其生物合成大致可以分为三个阶段: (1)乙酰-CoA 的形成; (2)乙酰-CoA 经 MVA 途径合成 IPP、二甲基丙烯基焦磷酸(dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP 或 DMADP)、牻牛儿基焦磷酸(geranyl pyrophosphate, GPP 或 GDP)、法尼基焦磷酸(farnesyl pyrophosphate, FPP 或 FDP)和牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP 或 GGDP); (3) IPP 聚合形成橡胶分子(图1)。

1.1.1 乙酰-CoA 的形成 橡胶生物合成的初始原料为蔗糖, 蔗糖通过糖酵解和三羧酸循环途径生成乙酰-CoA。

1.1.2 甲羟戊酸途径(mevalonate pathway) 该途径起始于乙酰-CoA 乙酰基转移酶(acetyl-coenzyme A

acetyltransferase, AACT)催化2分子乙酰-CoA 形成乙酰乙酰-CoA (acetoacetyl coenzyme A), 随后, 经3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶A合酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase, HMGs)、HMG-CoA 还原酶(HMG-CoA reductase, HMGR)、甲羟戊酸激酶(mevalonate kinase, MVK)、甲羟戊酸-5-磷酸激酶(phosphomevalonate kinase, PMVK)、甲羟戊酸-5-焦磷酸脱羧酶(mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase, MVD)、IPP 异构酶(IPP isomerase, IPI)作用依次形成 HMG-CoA、MVA、MVAP、MVAPP、IPP、DMAPP (刘卫平等2002; 张福城和陈守才2006; 于俊红等2007)。**1.1.3 橡胶分子的合成** 该过程大致分为橡胶分子合成的起始、橡胶分子链的延伸和橡胶分子合成的终止等三步。起始过程需要1分子反式构型的烯丙基焦磷酸(如 DMAPP、GPP、FPP 或 GGPP)作为引物(或起始物)(Tanaka 等1996)。胞质中, 在橡胶延长因子(rubber elongation factor, REF)的协助下, 反式-异戊烯基转移酶(*trans*-prenyltransferase, TPT)催化 DMAPP 与 IPP 分别合成 GPP、FPP 及 GGPP 等不同长度的烯丙基焦磷酸, 烯丙基焦磷酸的二磷酸基团很容易解离, 其解离产物作为亲电试剂作用于 IPP 的亚甲基, 重新产生1分子烯丙基焦磷酸末端基团, 从而启动橡胶分子的生物合成。

收稿 2009-09-18 修定 2009-10-23

资助 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项[XJSYWF ZX2009-12; YWFZX09-04(N)]和公益性行业科技专项(nyhyzx07-033-1)。

* 通讯作者(E-mail: zouzhi2008@126.com; Tel: 0898-23306692)。

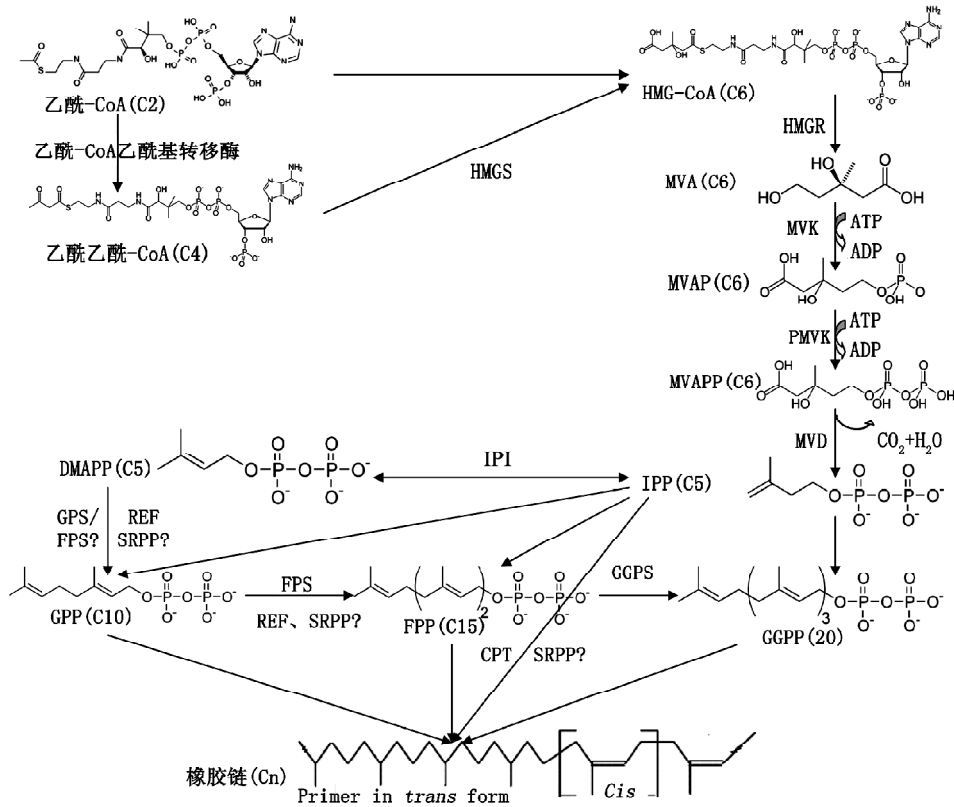


图1 橡胶树中橡胶的生物合成

HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A); HMGs: HMG-CoA synthase (HMG-CoA 合酶); HMGR: HMG-CoA reductase (HMG-CoA 还原酶); MVA: mevalonic acid (甲羟戊酸); MVK: mevalonate kinase (甲羟戊酸激酶); MVAP: mevalonate-5-phosphate (甲羟戊酸-5-磷酸); PMVK: phosphomevalonate kinase (甲羟戊酸-5-磷酸激酶); MVAPP: mevalonate-5-pyrophosphate (甲羟戊酸-5-焦磷酸); MVD: MVAP decarboxylase (甲羟戊酸-5-焦磷酸脱羧酶); IPP: isopentenyl pyrophosphate (异戊二烯焦磷酸); IPI: IPP isomerase (IPP 异构酶); DMAPP: dimethylallyl pyrophosphate (二甲基丙烯基焦磷酸); GPP: geranyl pyrophosphate (牻牛儿基焦磷酸); GPS: GPP synthase (GPP 合酶); FPS: farnesyl pyrophosphate (法尼基焦磷酸); FPS: FPP synthase (FPP 合酶); GGPP: geranylgeranyl pyrophosphate (牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸); GGPS: GGPP synthase (GGPP 合酶); REF: rubber elongation factor (橡胶延伸因子); SRPP: small rubber particle protein (橡胶小粒子蛋白); CPT: cis-prenyltransferase (顺式-异戊烯基转移酶)。? 表示还不确定。

橡胶链的延伸其实是一个 IPP 在橡胶转移酶 (rubber transferase, RuT) 的催化下不断掺入到聚异戊烯基焦磷酸长链上的过程。橡胶树中, 该反应由紧密结合在橡胶粒子上的顺式-异戊烯基转移酶 (cis-prenyltransferase, CPT) 执行 (Tanaka 等 1995), 随着越来越多的 IPP 掺入到橡胶链上, 形成不同大小的橡胶分子。延伸过程需要二价金属阳离子 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 的参与。

合成终止是聚异戊二烯链从橡胶合成复合体上解离下来的过程, 具体细节还不清楚。有人认为聚异戊二烯链的终止可能包含一个由焦磷酸酶催化的焦磷酸基团解离而形成羟基的过程; 也有人认为由于胶粒上 RuT 在合成橡胶分子达到一定程度时,

会产生几何空间上的阻碍而终止橡胶的合成 (Tangpakdee 等 1996), 也许这两种或其他情况同时存在。

1.2 参与橡胶合成的主要酶类及辅助因子

1.2.1 AACT (EC 2.3.1.9) 又称硫解酶 (acetyl coenzyme A thiolase), 它可催化 2 分子乙酰辅酶 A 形成乙酰乙酰-CoA。乙酰乙酰-CoA 是甲羟戊酸途径中 HMG-CoA 的前体。橡胶树中该酶由 *aact1*、*aact2* 和 *aact3* 等 3 个或以上的等位基因编码, 其中, *aact1* 主要在胶乳中高水平表达, 可能参与橡胶的合成; *aact2* 主要在成熟叶片和胶乳中表达, 且两者表达水平相当; *aact3* 主要在成熟叶片中表达 (Sando 等 2008a)。

1.2.2 HMGS (EC 2.3.3.10) 它可将1分子乙酰-CoA和1分子乙酰乙酰-CoA缩合形成HMG-CoA。研究表明, 橡胶树中, HMGR活性水平与胶乳中干胶含量呈正相关(Suwanmanee等2002, 2004; Sirinupong等2005)。该酶由一个多基因家族编码, 在已克隆的2个成员(即 *hmgs1* 和 *hmgs2*)中, *hmgs1* 在乳管细胞中的转录水平比叶片中高(Suwanmanee等2002); *hmgs2* 在幼叶和韧皮部的转录水平最高, 乳管细胞和叶柄中次之, 成熟叶片中最低(Sirinupong等2005; Sando等2008a)。

1.2.3 HMGR (EC 1.1.1.34) 它催化HMG-CoA形成MVA, MVA是IPP的前体。在橡胶树中, HMGR是一种黄色体膜结合蛋白, 由 *hmgr1*、*hmgr2*、*hmgr3* (早期称为 *hmg1*、*hmg2*、*hmg3*)、*hmgr4*、*hmgr5* 和 *hmgr6* 等多个基因组成的基因家族编码(Chye等1992; 黄俊生和孔德睿1996; Sando等2008a)。其中, *hmgr1* 编码575个氨基酸, 分子量为61 702 Da, 在乳管中的表达高于叶片, 受乙烯诱导, 可能与橡胶生物合成有关; *hmgr2* 只报道了部分序列, 无组织特异性; *hmgr3* 编码586个氨基酸, 分子量为62 978 Da, 其cDNA序列与 *hmgr1* 的相似性为86%, 氨基酸相似性为95%, 在叶片和胶乳中组成型表达, 启动子像大多数持家基因一样, 缺少TATA盒, 可能与其他类异戊二烯的生物合成有关(Chye等1992); *hmgr4* 的cDNA序列与 *hmgr1* 和 *hmgr3* 的相似性分别为73%和71%, 主要在成熟叶片中高水平表达; *hmgr5* 的cDNA序列与 *hmgr1* 和 *hmgr3* 的相似性都为71%, 主要在木质部中高水平表达(Sando等2008a); *hmgr6* 与其他等位基因的核酸序列相差很大, 其编码蛋白的分子量为42 kDa(黄俊生和孔德睿1996)。同源性分析表明, 不同物种中, HMGR N-端保守性较低, 其中, 植物与动物和微生物差异甚大; 而靠近C-端部分高度保守, 估计与该酶的活性中心有关。

1.2.4 MVK (EC 2.7.1.36) 它催化MVA形成MVAP, 反应需要消耗1分子ATP。MVK是一种激酶, 对pH和温度都不太敏感, Mn^{2+} 存在时活性最高, 其酶活性受硫醇类物质抑制。橡胶树中, 该酶可能由单基因编码, 在胶乳中高水平表达(Sando等2008a)。

1.2.5 PMVK (EC 2.7.4.2) 它催化MVAP形成MVAPP, 消耗1分子ATP。此酶对酸和高温不稳定, 需要硫醇类物质维持其活性。橡胶树中, 该酶

可能由单基因编码(Sando等2008a)。

1.2.6 MVD (EC 4.1.1.33) 它催化MVAPP脱去1分子的 CO_2 和1分子 H_2O 从而形成IPP, IPP是橡胶合成的前体。与PMVK相比, MVD对酸和热的稳定性较好, 但该酶易受其产物IPP和ADP反馈抑制(Cornish 1993)。橡胶树中, 该酶可能由单基因编码(Sando等2008a)。

1.2.7 IPI (EC 5.3.3.2) 又名异戊二烯二磷酸异构酶(isopentenyl-diphosphate delta-isomerase, IDI1), 离心后分布于C-乳清中, 它催化IPP转化成DMAPP, 其最大酶活性需要DTT和二价金属离子(Mg^{2+} 或 Mn^{2+})存在(Koyama等1996)。橡胶树中, 该酶可能由2个等位基因编码, 体外实验表明它对橡胶的合成是必需的(Oh等2000)。它易受碘乙酰胺(iodoacetamide)、对氯汞苯甲酸(*p*-chloromercuribenzoate)和N-乙基马来酰亚胺(*N*-ethylmaleimide)等巯基抑制剂抑制(Koyama等1996)。

1.2.8 RuT 在含顺式橡胶的植物体内, 存在2种异戊烯基转移酶——CPT和TPT, CPT与膜结合, TPT则是可溶性的, RuT是这多种酶的总称, 通常所称的橡胶转移酶主要是指CPT。

TPT (EC 2.5.1.1) 它也是多个酶的一种合称, 包括GPP合酶(GPP synthase, GPS或GPPS或GDPS)、FPP合酶(FPP synthase, FPS或FPPS或FDPS, EC 2.5.1.1/2.5.1.10)和牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合酶(GGPP synthase, GGPS或GGPPS或GGDPS)等。该类酶属于可溶性胞质蛋白, 橡胶树中, 胶乳离心后分布于C-乳清中(Asawatreratanakul等2003)。TPT是植物类异戊二烯代谢途径中的分支点, 可催化DMAPP与IPP分别合成GPP、FPP及GGPP等不同长度的烯丙基焦磷酸, 从而促使IPP掺入到聚异戊二烯链中。

GPS催化1分子DMAPP与1分子IPP缩合形成GPP。NCBI中公布了2个橡胶树GPS的cDNA序列(AB294709和AB294710), *GPS1*编码330个氨基酸, *GPS2*编码328个氨基酸, 两者的氨基酸序列相似性为91.8%, 至今它们的表达模式和表达水平还不清楚。

FPS主要催化1分子GPP与1分子的IPP缩合形成FPP, 但它也可能替代GPS的功能(Cornish 1993), 橡胶树中, 该酶可能由2个等位基因编码(*FPS1*和*FPS2*), 其编码蛋白只有5个氨基酸的差

异。Adiwilaga 和 Kush (1996)从橡胶树胶乳的 cDNA 文库中筛选到的 *FPS1* 编码 341 个氨基酸, 分子量为 47 kDa, 与拟南芥、酵母、鼠中 FPS 氨基酸序列的相似性分别为 80%、59%、51%。Northern 杂交表明 *FPS1* 在乳管细胞和表皮细胞中都有表达, 且明显高于花, 割胶可促进该基因表达, 但乙烯对其无明显作用。*FPS2* 的表达模式还不清楚。

GGPS 催化 1 分子 FPP 与 1 分子 IPP 缩合形成 GGPP。Takaya 等(2003)从巴西橡胶树的叶片和胶乳 cDNA 文库中克隆到 *GGPS* 基因, 分别命名为 *HGGPPS1* 和 *HGGPPS2*。2 条序列在 5' 端非编码区和 3' 端非编码区存在一些差异, 但编码蛋白都含有反式 - 异戊烯链延长酶特有的保守区, 且其氨基酸序列与拟南芥、辣椒、长春花的 GGPS 相似性较高, 而与人类、果蝇的 GGPS 相似性较低。转录分析表明, *GGPS* 基因在橡胶树花和叶片中的表达水平比在叶柄和胶乳中高。

CPT (EC 2.5.1.10) 又叫顺式 - 异戊二烯二磷酸合酶 (*cis*-prenyl diphosphate synthase), 它是一种与橡胶粒子紧密结合的膜蛋白, 催化形成长链橡胶, 决定橡胶分子的大小(Cornish 1993)。橡胶树中, 该酶可能由 10 个以上的等位基因编码, 目前还不能确定哪个或哪些真正参与橡胶的合成。Asawatreratanakul 等(2003)从橡胶树胶乳中分离到的 2 个 cDNA (*HRT1* 和 *HRT2*)核苷酸相似性为 92%, 氨基酸相似性为 87%, 且与滕黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、大肠杆菌、酵母、拟南芥等的氨基酸相似性都大于 30%, 具有顺式 - 异戊烯基延长酶特有的 5 个高度保守结构域, 主要在胶乳中表达。Ko 等(2003)以 HbCPT (AY12446)序列为探针, 从胶乳 cDNA 文库中获得 4 个 CPT 的 cDNA 序列, 分别命名为 *HbCPT1*、*HbCPT2*、*HbCPT3* 和 *HbCPT4*。酶活性分析表明, *HbCPT3* 和 *HbCPT4* 都具有将 [¹⁴C]-IPP 掺入到橡胶链中的能力。罗明武等(2009)克隆到的 *CPT* 编码 290 个氨基酸, 分子量约为 32.9 kDa, 等电点为 7.2, Northern 杂交表明该基因在胶乳中高度表达, 在叶中不表达, 不受乙烯诱导。

1.2.9 REF 它是一种与橡胶粒子紧密结合的膜蛋白, 分子量为 14.6 kDa, 占橡胶粒子膜蛋白的 10%~60%, 占胶乳总蛋白的 6%~10% (Han 等 2000)。

REF 小于 100 nm, 它对于 FPS 合成橡胶起始物, 乃至橡胶链的延长是必需的(Goyvaerts 等 1991)。Goyvaerts 等(1991)从橡胶叶片的 cDNA 文库中分离到 *REF* 编码区长 417 bp, 编码蛋白缺少 Cys、Met、His 和 Trp 四种氨基酸; 定量分析表明, REF 与橡胶粒子的分子比为 1:1。邓晓东等(2002)采用基因组步移法分离到 *REF* 260 bp 的启动子区域序列, 其中含典型的 TATA 盒和 CAAT 盒, 体外实验表明该启动子可受乙烯利和 ABA 诱导。Priya 等(2007)从一高产橡胶树品种 RR1105 中分离到 *REF* 的基因组序列, 该序列全长 1 367 bp, 被 2 个内含子分割成 3 个外显子, 编码 138 个氨基酸, 与已知 cDNA 的相似性达 100%; RNA 杂交表明, 与低产品种相比, 高产品种中 REF 的转录水平明显要高。李先昆(2009)用酵母双杂交系统从胶乳中筛选到的与 REF 作用的 3 个阳性克隆, 其中 2 个与 REF 高度同源(HbREF, AB074308 和 AY430052), 同属 REF 家族; 另一个为翻译调控肿瘤蛋白(translationally controlled tumor protein, TCTP, AF091455)。

1.2.10 SRPP (small rubber particle protein, 橡胶小粒子蛋白) 它是橡胶小粒子中含量最为丰富的膜蛋白之一(即胶乳过敏原 Hev b3), 分子量为 22 kDa。Oh 等(1999)从胶乳中分离到 SRPP 的 cDNA 全长, 其编码的氨基酸序列与 REF 相似性高达 72%; 另外, SRPP 也跟菜豆胁迫相关蛋白(*phaseolus vulgaris* stress-related protein, PvSRP)高度相似, PvSRP 在植物防御中起作用, 虽然 PvSRP 可受重金属、伤害及病毒侵染等诱导, 但乙烯和伤害均不能改变 SRPP 的转录水平, 此外, SRPP 的等电点(pI=4.8)也不同于 PvSRP (pI=9.47), 这说明 SRPP 的表达模式和功能可能与 PvSRP 不同。Southern 和 Northern 杂交显示 SRPP 由单基因编码, SRPP 与 REF 位于基因组的同一基因座, 在胶乳中高水平表达。离体实验表明, 在无其他橡胶粒子蛋白存在时, SRPP 也能合成长链橡胶分子, 因此认为它可能在橡胶生物合成中起橡胶聚合的作用, 或类似于延长因子的功能。

2 橡胶树橡胶生物合成的调控

2.1 影响橡胶合成的关键酶和限速酶及其调控 橡胶的生物合成是一个非常复杂的过程。研究表明, 橡胶树乳管细胞中 HMGR、FPS 和 RuT 等酶所催化的反应, 是橡胶合成的关键步骤和限速步骤。

2.1.1 HMGR及其调控 HMGR催化的反应是不可逆的。与橡胶树胶乳中的其他酶类相比, HMGR活性非常低, 而MVA的利用速度比HMG-CoA快许多, 随着中间产物碳链的延长, 其利用速度逐渐加快, 呈DMAPP(C5)<GPP(C10)<FPP(C15)=GGPP(C20); 有报道表明橡胶树胶乳中HMGR活性与橡胶产量密切相关; 银胶菊中, 橡胶粒子迅速形成时, HMGR活性也迅速提高, 这表明HMGR参与调控橡胶的合成, 并且很可能是橡胶合成的限速酶之一。由于编码HMGR的家族成员*hmgr1*主要在乳管中表达, 且受乙烯和茉莉酸(jasmonic acid, JA)诱导, 可能与橡胶生物合成有关, 而*hmgr3*在叶片和胶乳中组成型表达, 可能与其他类异戊二烯的合成有关, 因此, HMGR不同等位基因的表达可能对MVA途径中“碳流”的去向起调控作用, 外源JA刺激可能通过诱导*hmgr1*表达从而促使“碳流”朝着有利于橡胶生物合成的方向进行。为了证实这种猜测, Arokiaraj (1995)用基因枪法将*hmgr1*导入橡胶树花药愈伤组织后, 转化的愈伤组织和胚状体中的HMGR活性提高580%, 遗憾的是他们未能获得转化植株。

2.1.2 FPS及其调控 由于橡胶分子合成的起始是一个十分缓慢的过程, 因而起始过程也就成为橡胶生物合成的限速步骤之一。橡胶分子合成的起始需要有反式构型的烯丙基焦磷酸的参与, 虽然DMAPP、GPP、FPP和GGPP都可作为起始物, 且聚异戊烯基转移酶对起始物的长度选择性不大, 不同起始物都以一个恒定的速度启动橡胶的合成(Tanaka等1996), 但橡胶合成的速度随着起始物碳链长度的增加而加快, FPP与GGPP相近(刘卫平等2002), 因此, FPP和GGPP就可能是橡胶合成的主要起始物。同位素示踪技术和核磁共振技术结果表明, FPP对合成启动起决定性作用, 是橡胶分子合成最主要的起始物(刘卫平等2002), 因而FPP也就成为橡胶生物合成最大的限制因子之一。橡胶树中, FPP由FPS催化合成(Light和Dennis 1989)。因此, 采用基因工程技术促使FPS基因过量表达, 有望提高橡胶的产量和质量。

2.1.3 CPT及其调控 CPT催化IPP掺入到聚异戊烯链上, 直接决定橡胶分子的大小。迄今虽已从橡胶树中克隆到CPT基因(Asawatreratanakul等2003; Ko等2003), 但它们的生理生化性质还不完全清楚;

以前认为橡胶分子的延伸由CPT和SRPP决定, 但Western分析表明, CPT和SRPP都不是橡胶聚合的核心蛋白(Singh等2003)。因此, 进一步鉴定与CPT互作的蛋白将有助于更好的了解和调控橡胶的生物合成。

2.2 割胶对橡胶生物合成的调控 由于胶乳中含有大量的防卫相关蛋白, 因此, 一般认为, 胶乳在橡胶树机械损伤和病原伤害等逆境反应中起作用。成龄橡胶树会对割胶做出应答, 刚开割的树胶乳非常少, 持续割胶可促使胶乳产量呈曲线上升, 并最终达到稳定(Sakdapipanich等1999)。未开割的橡胶树中, 胶乳细胞维持相对稳定状态, 主要是“看家基因”表达, 割胶及胶乳的流失会导致乳管细胞的基因表达模式发生改变。割胶开始后, 与胶乳再生和凝固相关的基因过量表达, 同时伴随着蛋白合成效率的提高, 胶乳的代谢活性增加。而随着代谢的增强, 活性氧和自由基含量增加, 这又进一步诱导过氧化物酶和超氧化物歧化酶等编码基因的过量表达, 而胶乳中过氧化物酶的水平与割胶后橡胶的产量成正相关。割胶还可促进FPS和REF等基因的表达(Adiwilaga和Kush 1996), 而FPS和REF在橡胶分子的起始中起作用。鉴于损伤可提高番茄体内HMGR转录水平, 因此, 橡胶树中割胶是否有类似的效应尚待研究。另外, 胶乳中存在橡胶合成抑制剂, 此抑制剂具酯酰水解酶活性(Yusof等1998), 割胶和排胶可降低其浓度, 从而有利于胶乳的合成。

2.3 茉莉酸类物质对橡胶生物合成的调控 JA是近20年来研究较多的一类植物生长调节物质, 它是十八碳脂肪酸的衍生物, 其前体是亚麻酸。其他在化学结构和功能上与JA相似的化合物, 统称为茉莉酸类物质(jasmonates)。在JA的生物合成过程中, 有3种关键酶: 脂氧合酶(lipoxygenase, LOX; EC 1.13.11.12)、丙二烯氧化物合酶(allene oxide synthase, AOS; EC 4.2.1.9)和丙二烯氧化物环化酶(allene oxide cyclase, AOC; EC 5.3.99.6)。

JA具有广泛的生理效应, 除参与调控植物生长和发育外, 它还介导植物对机械损伤、虫害和病害等逆境的反应。在这一过程中, JA既可作为信号分子, 也可作为激发子。外施JA和亚麻酸等前体物质可诱导橡胶树次生乳管的分化。与JA相比, 亚麻酸需要更高的浓度, 且亚麻酸会造成次生韧皮部细胞层数的减少(Hao和Wu 2000)。由于机械损

伤和外源JA均可诱导橡胶树AOS基因的表达、提高胶乳中脂氧合酶的活性和橡胶树内源JA的水平,且机械损伤对乳管分化的诱导可为外施JA所增强,而被JA合成抑制剂阻断(Wu等2002;曾日中等2001),因此认为机械损伤可能通过促进橡胶树内源JA的合成进而调控乳管细胞的分化。机械损伤和外施JA对乳管分化的效应是局部的,伴随着受伤和JA施用部位的树皮和形成层区内JA含量在短时间内快速增加,此部位的树皮诱导次生乳管的形成(Tian等2003),一旦分化出乳管,乳管细胞中就迅速形成大量的橡胶粒子。外施茉莉酸甲酯可以提高胶乳的干胶含量,表明茉莉酸类物质能够促进已有乳管中橡胶的合成。JA还可促进参与编码与橡胶合成关键酶的基因如*PMVK*、*hmgr1*等基因的表达(曾日中等2003)。

2.4 乙烯利对橡胶生物合成的调控 乙烯利释放的乙烯是橡胶生产上广泛应用的生长调节物质,但至今没有证据表明乙烯可促进橡胶合成中的关键基因如*HMGR*、*FPS*等的表达。因此认为乙烯可能是通过其他途径起相关的生物学效应。研究表明,外源乙烯可促进橡胶树韧皮部和木质部中淀粉的水解,加速糖酵解,增加乙酰-CoA、ATP、多聚核糖体和rRNA浓度;加速水分和养分的吸收,改变细胞质和膜部分钙调蛋白的分布,增加细胞膜的通透性,导致胶乳流速加快,增强排胶功能;增加Mn-SOD、几丁质酶、谷氨酰胺合酶、橡胶蛋白(Hevein)、伸展蛋白等酶或蛋白编码基因的转录水平。其中,几丁质酶可竞争性地与凝乳相关蛋白的受体位点结合,延缓胶乳的凝乳,延长排胶时间;过氧化物酶水平的增加与及时清除由于代谢加强所产生的活性氧有关(段翠芳等2004; Dusotoit-Coucaud等2009)。

3 结束语

天然橡胶的生物合成是一个很复杂的过程。至今还不完全清楚橡胶在橡胶树中确切的生物学功能。虽然胶乳可起防卫作用,但橡胶分子本身并无这种功能,并且橡胶分子在植物中似乎属于代谢终产物,迄今还未发现可降解此类分子的酶类,那么,橡胶树为什么要花费如此多的原料和能量合成这类物质?面对胶乳和木材两个库,橡胶树又是如何分配各种养分和光合产物的?物质分配的分支点又在哪里?为什么高频割胶和过度的乙烯刺激会造成死

皮?这都是橡胶树生产中需要解决的难题。

就橡胶的合成途径而言,一般认为橡胶树是通过典型的MVA途径合成IPP。然而,在其他物种中,IPP的合成也存在不依赖MVA的植物类异戊二烯代谢途径,这种非甲羟戊酸途径又称为2C-甲基-4-磷酸-D-赤藓糖醇(2C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP或DXP)途径,存在于质体中。此途径以糖代谢的中间产物丙酮酸和3-磷酸-甘油醛为前体,经焦磷酸硫胺素依赖的DXS(DXP synthase)缩合形成DXP;DXP在DXP还原异构酶(DXP reductoisomerase, DXR)等酶的催化下,通过分子内重排和还原反应转变成MEP和IPP。有研究表明,橡胶树中也存在此类途径,但同位素示踪显示其并不参与橡胶的生物合成(Sando等2008b),其中的机制还值得探讨。

在橡胶合成的代谢途径中,虽然目前对IPP合成的MVA途径的研究比较透彻,但关于橡胶分子合成的起始、延伸和终止,特别是延伸和终止过程还不明了。一般认为,橡胶分子链的延伸是由紧密结合在橡胶粒子上的CPT催化(Tanaka等1995)。虽然也有一些所谓的CPT基因已得到克隆(Asawatreratanakul等2003;Ko等2003),但对它们的理化性质和生物学功能还不甚了解,因而采用转基因技术对此类基因进行功能鉴定以及深入研究与其互作的蛋白将有助于更好地了解 and 调控橡胶的生物合成。就橡胶合成的终止过程而言,是否可采用电镜体外监控橡胶合成的整个过程和深入研究橡胶粒子的空间结构以获得更多的信息,还有待研究。此外,目前对橡胶合成途径中相关酶类和辅助因子的认识主要来自其他物种或一些间接的证据,最为直接的方法是进行转基因研究。然而,至今橡胶树的遗传转化体系还不成熟,又加上与橡胶合成相关基因的功能鉴定需要的周期很长,所以对橡胶树橡胶合成的分子机制的阐释还任重道远。

参考文献

- 邓晓东, 费小雯, 黄俊生, 郑学勤(2002). 橡胶树延伸因子cDNA及其5'端启动子区域序列的分离与分析. 作物学报, 28(4): 528~532
- 段翠芳, 曾日中, 黎瑜(2004). 激素对巴西橡胶树橡胶生物合成的调控. 热带农业科学, 24(5): 61~68
- 黄俊生, 孔德馨(1996). 橡胶树HMG-CoA还原酶基因结构序列分析. 热带作物学报, 17(2): 5~10
- 李先昆(2009). 利用酵母双杂交系统从巴西橡胶树胶乳cDNA文

- 库中筛选与 REF 相互作用蛋白的基因研究[硕士学位论文]. 海口: 海南大学
- 刘卫平, 王敏杰, 韩玉珍, 赵德刚(2002). 天然橡胶的生物合成机制. 植物生理学通讯, 38 (4): 382~388
- 罗明武, 邓柳红, 易小平, 曾会才, 肖苏生(2009). 巴西橡胶树顺式异戊烯基转移酶基因 cDNA 克隆及其序列特征分析. 热带亚热带植物学报, 17 (3): 223~228
- 于俊红, 黄绵佳, 田维敏(2007). 巴西橡胶树橡胶生物合成调控的研究进展. 安徽农学通报, 13 (12): 38~40
- 张福城, 陈守才(2006). 巴西橡胶树天然橡胶生物合成中关键酶及相关基因研究进展. 热带农业科学, 26 (1): 42~46, 74
- 曾日中, 白先权, 黎瑜, 谭海燕, 郝秉中, 吴继林(2001). 外源茉莉酸诱导巴西橡胶树乳管分化的酶学研究(I). 热带作物学报, 22 (3): 17~23
- 曾日中, 段翠芳, 黎瑜, 郝秉中(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. 热带作物学报, 24 (3): 1~6
- Adiwilaga K, Kush A (1996). Cloning and characterization of cDNA encoding farnesyl diphosphate synthase from rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Mol Biol*, 30 (5): 935~946
- Arokiaraj P (1995). Towards molecular genetic improvement of rubber yield in transgenic *Hevea brasiliensis* Muell Arg. PhD Thesis. England: University of London, 102~126
- Asawatreratanakul K, Zhang YW, Wititsuwannakul D, Wititsuwannakul R, Takahashi S, Rattanapittayaporn A, Koyama T (2003). Molecular cloning, expression and characterization of cDNA encoding *cis*-prenyltransferases from *Hevea brasiliensis*. A key factor participating in natural rubber biosynthesis. *Eur J Biochem*, 270 (23): 4671~4680
- Chye ML, Tan CT, Chua NH (1992). Three genes encode 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in *Hevea brasiliensis*: *hmg1* and *hmg3* are differentially expressed. *Plant Mol Biol*, 19: 473~484
- Cornish K (1993). The separate roles of plant *cis* and *trans* prenyl transferases in *cis*-1,4-polyisoprene biosynthesis. *Eur J Biochem*, 218 (1): 267~271
- Dusotoit-Coucaud A, Brunel N, Kongsawadworakul P, Viboonjun U, Lacoite A, Julien JL, Chrestin H, Sakr S (2009). Sucrose importation into laticifers of *Hevea brasiliensis*, in relation to ethylene stimulation of latex production. *Ann Bot*, 104 (4): 635~647
- Goyvaerts E, Dennis MS, Light DR, Chua NH (1991). Cloning and sequencing of the cDNA encoding the rubber elongation factor of *Hevea brasiliensis*. *Plant Physiol*, 97: 317~321
- Han K H, Shin D H, Yang J, Kim I J, Oh S K, Chow K S (2000). Genes expressed in the latex of *Hevea brasiliensis*. *Tree Physiol*, 20 (8): 503~510
- Hao B Z, Wu J L (2000). Laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis*: induction by exogenous jasmonic acid and lipoic acid. *Ann Bot*, 85: 37~47
- Ko J H, Chow K S, Han K H (2003). Transcriptome analysis reveals novel features of the molecular events occurring in the laticifers of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Plant Mol Biol*, 53 (4): 479~492
- Koyama T, Wititsuwannakul D, Asawatreratanakul K, Wititsuwannakul R, Ohya N (1996). Isopentenyl diphosphate isomerase in rubber latex. *Phytochemistry*, 43 (4): 769~772
- Light DR, Dennis MS (1989). Purification of a prenyltransferase that elongates *cis*-polyisoprene rubber from the latex of *Hevea brasiliensis*. *J Biol Chem*, 264 (31): 18589~18597
- Oh SK, Kang H, Shin DH, Yang J (1999). Isolation, characterization, and functional analysis of a novel cDNA clone encoding a small rubber particle protein from *Hevea brasiliensis*. *J Biol Chem*, 274 (24): 17132~17138
- Oh SK, Kang H, Shin DH, Yang J (2000). Molecular cloning and characterization of a functional cDNA clone encoding isopentenyl diphosphate isomerase from *Hevea brasiliensis*. *J Plant Physiol*, 157: 549~557
- Priya P, Venkatachalam P, Thulaseedharan A (2007). Differential expression pattern of rubber elongation factor (REF) mRNA transcripts from high and low yielding clones of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Plant Cell Rep*, 26 (10): 1833~1838
- Sakdapipanich J, Tanaka Y, Jacob JL, D'Auzac J (1999). Characterization of *Hevea brasiliensis* rubber from virgin trees: a possible role of *cis*-polyisoprene in unexploited tree. *Rubb Chem Technol*, 72: 299~307
- Sando T, Takaoka C, Mukai Y, Yamashita A, Hattori M (2008a). Cloning and characterization of mevalonate pathway genes in natural rubber producing plant, *Hevea brasiliensis*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 72 (8): 2049~2060
- Sando T, Takeno S, Watanabe N, Okumoto H (2008b). Cloning and characterization of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway genes of a natural-rubber producing plant, *Hevea brasiliensis*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 72 (11): 2903~2917
- Singh AP, Wi SG, Chung GC, Kim YS (2003). The micromorphology and protein characterization of rubber particles in *Ficus carica*, *Ficus benghalensis* and *Hevea brasiliensis*. *J Exp Bot*, 54 (384): 985~992
- Sirinupong N, Suwanmanee P, Doolittle RF, Suvachittanont W (2005). Molecular cloning of a new cDNA and expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene from *Hevea brasiliensis*. *Planta*, 221: 502~512
- Suwanmanee P, Suvachittanont W, Fincher GB (2002). Molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase from *Hevea brasiliensis* (HBK) Mull Arg. *Sci Asia*, 28: 29~36
- Suwanmanee P, Sirinupong N, Suvachittanont W (2004). Regulation of the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene in *Hevea brasiliensis* (B.H.K.) Mull. Arg. *Plant Sci*, 166: 531~537
- Tangpakdee J, Tanaka Y, Wititsuwannakul R, Chareonthiphakorn N (1996). Possible mechanisms controlling molecular weight of rubbers in *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry*, 42 (2): 353~355
- Takaya A, Zhang YW, Asawatreratanakul K, Wititsuwannakul D, Wititsuwannakul R (2003). Cloning, expression and characterization of a functional cDNA clone encoding geranylgeranyl

- diphosphate synthase of *Hevea brasiliensis*. *Biochim Biophys Acta*, 1625 (2): 214~220
- Tanaka K, Aik Hwee E, Ohya N, Nishiyama N, Tangpakdee J, Kawahara S, Wititsuwannakuk R (1996). Initiation of rubber biosynthesis in *Hevea brasiliensis*: characterization of initiating species by structural analysis. *Phytochemistry*, 41 (6): 1501~1055
- Tanaka K, Kawahara S, Aik-Hwee E, Shiba K, Ohya N (1995). Initiation of biosynthesis in *cis*-polyisoprene. *Phytochemistry*, 39 (4): 779~784
- Tian WM, Shi MJ, Yu FY, Wu J L, Hao BZ, Cui KM (2003). Localized effects of mechanical wounding an exogenous jasmonic acid on the induction of secondary laticifer differentiation in relation to the distribution of jasmonic acid in *Hevea brasiliensis*. *Acta Bot Sin*, 45 (11): 1366~1372
- Wu JL, Hao BZ, Tan HY (2002). Wound-induced differentiation in *Hevea brasiliensis* shoots mediated by jasmonic acid. *J Rubb Res*, 5: 53~63
- Yusof F, Ward MA, Walker JM (1998). Purification and characterization of an inhibitor of rubber biosynthesis from C-serum of *Hevea brasiliensis* latex. *J Rubb Res*, 1 (2): 95~110