

巴西橡胶树 *HbWRKY* 基因家族 10 个成员在染色体上的定位

刘正林^{1,2}, 庄南生¹, 王 英¹, 高和琼¹, 代素珍¹

(¹海南大学热带农林学院, 海口 570228; ²中国热带农业科学院橡胶研究所, 海南儋州 571737)

摘要: *HbWRKY* 是橡胶树中的一类转录因子基因家族, 该家族基因编码的蛋白质参与橡胶树的产胶、衰老和抗逆胁迫等生理生化过程, 植物激素类物质刺激 (如乙烯利、茉莉酸、水杨酸等)、病原菌侵染和机械伤害均能诱导 *HbWRKYs* 基因的表达。目前, 该基因家族的大部分基因已被克隆和分析, 但这些基因在染色体上的具体位置尚未确定。本研究以巴西橡胶树热研 7-33-97 品系为材料, 利用荧光原位杂交技术 (FISH) 和原位 PCR 技术对 *HbWRKYs* 基因家族中 10 个成员 (*HbWRKY1*、*HbWRKY2*、*HbWRKY3*、*HbWRKY4*、*HbWRKY5*、*HbWRKY7*、*HbWRKY9*、*HbWRKY11*、*HbWRKY27* 和 *HbWRKY75*) 进行了物理定位分析。结果表明: *HbWRKY1*、*HbWRKY4* 和 *HbWRKY5* 基因同时定位在第 9 号染色体上, 其中 *HbWRKY1* 和 *HbWRKY4* 在第 9 号染色体短臂上, 其信号位点距离着丝粒的平均百分距分别为 57.38 和 4.57, *HbWRKY5* 在第 9 号染色体长臂上, 其信号位点距离着丝粒的平均百分距为 31.67; *HbWRKY2*、*HbWRKY3*、*HbWRKY7*、*HbWRKY9*、*HbWRKY11* 和 *HbWRKY75* 基因分别定位在第 8、3、4、10、2 和 7 号染色体的短臂上, 信号位点距离着丝粒的平均百分距分别为 6.00、12.30、4.40、45.21、5.74 和 26.11; *HbWRKY27* 基因定位在第 6 号染色体长臂上, 其信号位点距离着丝粒的平均百分距为 38.88。本研究还讨论了这些基因与其他已定位基因之间的位置关系。

关键词: 巴西橡胶树; *WRKY* 基因家族; 荧光原位杂交; 原位 PCR; 物理定位

Cytogenetic Localization of 10 *HbWRKY* Gene Family Members on the Chromosomes of *Hevea brasiliensis*

LIU Zheng-lin^{1,2}, ZHUANG Nan-sheng¹, WANG Ying¹, GAO He-qiong¹, DAI Su-zhen¹

(¹Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228;

²Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou Hainan 571737)

Abstract: *HbWRKY* is one of transcription factor gene families in *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg., and these family members are involved in the physiological and biochemical processes such as gum production, senescence and stress resistance of *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg.. Treatments by any of phytohormones (such as ethephon, jasmonic acid and salicylic acid, etc.), pathogen infestation or mechanical damage could result in the changes on transcriptional levels of *HbWRKYs*. At present, most members of this gene family have been cloned and analyzed, but the physical location of these genes on the chromosome has not yet been determined. In this work, by employment of FISH and *in situ* PCR techniques, we determined the physical positions of ten *HbWRKYs* (*HbWRKY1*, *HbWRKY2*, *HbWRKY3*, *HbWRKY4*, *HbWRKY5*, *HbWRKY7*, *HbWRKY9*, *HbWRKY11*, *HbWRKY27* and *HbWRKY75*) in genotype 'Reyan 7-33-97'. The results showed that *HbWRKY1* and *HbWRKY4* were on the short arm of chromosome 9 with PDCS (percent distance from centromere to the signal site) 57.38 and 4.57, respectively. The gene *HbWRKY5* was on the long arm of chromosome 9 with PDCS 31.67. The genes *HbWRKY2*, *HbWRKY3*, *HbWRKY7*, *HbWRKY9*, *HbWRKY11* and *HbWRKY75* were mapped on the short arms of chromosomes 8, 3,

收稿日期: 2018-05-10 修回日期: 2018-06-12 网络出版日期: 2018-08-14

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.s.20180810.1147.001.html>

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31360186); 国家天然橡胶产业技术体系 (CARS-33-GW)

第一作者研究方向为植物分子细胞遗传学。E-mail: 1623878580@qq.com

通信作者: 庄南生, 研究方向为植物分子细胞遗传学。E-mail: zhuangns@163.com

4,10,2 and 7, and their PDCS were 6.00, 12.30, 4.40, 45.21, 5.74 and 26.11, respectively. The gene *HbWRKY27* was located on the long arm of chromosome 6, and its PDCS was 38.88. The positional relationship between these genes and other mapped genes was further discussed.

Key words: *Hevea brasiliensis*; WRKY gene family; fluorescence *in situ* hybridization (FISH); *in situ* PCR; physical localization

WRKY 基因的得名是因其所编码的转录调控因子 *WRKY* 蛋白至少含有一段大约 60 个氨基酸的高度保守结构域,在该结构的 N-端,几乎所有成员都有 *WRKYGQK* 这样的 7 肽(W:色氨酸,R:精氨酸,K:赖氨酸,Y:酪氨酸,G:甘氨酸,Q:谷氨酰胺),所以简称为 *WRKY*^[1]。巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg., 也称橡胶树)原产于巴西亚马逊河流域,是我国重要的热带经济作物,其胶乳是天然橡胶的重要来源且具有很高的经济价值,目前已被广泛应用于工业领域、国防领域、医药卫生领域等,也在日常生活方面被应用。*HbWRKYs* 在巴西橡胶树抗逆和调控中发挥着极其重要的作用。据报道,*HbWRKY1* 基因具有启动子的活性,在乙烯信号途径对防卫蛋白的调节中起重要作用,参与天然橡胶合成中延长因子形成及胶乳代谢,能提高植株耐干旱能力^[2-7]。通过农杆菌介导的转化法分别将 *HbWRKY4* 和 *HbWRKY5* 基因导入拟南芥中发现:在乙烯诱导下,*HbWRKY4* 超表达时拟南芥植株的乙烯受体基因 *AtERS1* 和 *AtETR1* 基因的表达水平急剧增高,而 *HbWRKY5* 超表达抑制 *AtETR1* 和 *AtERS1* 基因的表达^[8]; *HbWRKY2*、*HbWRKY7* 和 *HbWRKY11* 参与植物中 SA(水杨酸)和 JA(茉莉酸)介导的抗病信号通路,在植物的抗病性方面起防御作用,*HbWRKY27* 也与橡胶树死皮病的发生有关^[9-11]。该家族大部分基因是与橡胶树叶片衰老和响应乙烯等激素刺激相关的转录因子,在橡胶树响应 PEG(聚乙二醇)、茉莉酸、ABA(脱落酸)、水杨酸、乙烯、 H_2O_2 、盐、干旱及低温胁迫中发挥调控作用^[12-18]。橡胶树基因组中已确定了 81 个 *WRKY* 基因(命名为 *HbWRKY1* 至 *HbWRKY81*)^[19],但各基因在染色体上的分布未见报道。

本研究以巴西橡胶树热研 7-33-97 品系(2n = 36)为试验材料制备染色体标本,采用荧光原位杂交技术和原位 PCR 技术对 *HbWRKY* 家族中的 10 个基因成员(*HbWRKY1*、*HbWRKY2*、*HbWRKY3*、*HbWRKY4*、*HbWRKY5*、*HbWRKY7*、*HbWRKY9*、*HbWRKY11*、*HbWRKY27* 和 *HbWRKY75*) 在细胞水平上

进行物理定位,由此揭示 *WRKY* 家族基因在染色体上的分布特点,这有助于深入了解该家族基因与其他功能基因之间在染色体上的位置关系,从而为橡胶树辅助育种和比较基因组学研究提供分子细胞遗传学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究的材料为橡胶树热研 7-33-97 品系的古铜期嫩叶。

1.2 染色体标本的制备

染色体标本的制备主要参照高和琼等^[20]和李懋学等^[21]的方法,用巴西橡胶树热研 7-33-97 品系古铜期有丝分裂旺盛的嫩叶的边缘进行染色体标本的制备,将制备好的染色体标本存放于 -20℃ 冰箱保存待用。

1.3 特异性引物的设计与筛选

依据 *HbWRKY* 基因家族 10 个基因的登录号在 NCBI 上找到基因的序列,利用 Primer Premier 5 设计引物。以橡胶树基因组的 DNA 为模板进行 PCR 扩增,反应程序为:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 1 min,50~60℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 3 min,27 个循环后 72℃ 后延伸 10 min。将 PCR 产物进行凝胶电泳检测,根据产物是否为单一条带、且条带回收测序后与基因序列比对是否吻合判断引物的特异性。筛选得到特异性引物如表 1。

1.4 原位 PCR

按照官锦燕^[22]的巴西橡胶树原位 PCR 方法步骤,稍加改进,操作如下。

(1)将染色体标本片置于 60℃ 干燥箱内烤片 1 h,依次在 0.01 mol/L HCl、0.5 × TBS 和灭菌水中各浸洗 10 min 后空气干燥;在 70℃ 的 70% 甲酰胺中处理 5 min,预冷的 0.1 × SSC、灭菌水中各处理 1 min,经 -20℃ 下 70%、95% 和 100% 酒精分别脱水 3 min 后在空气中干燥。其次将 50 μL PCR 反应液加在已贴有克隆框的标本目标区域上,滴加 20 μL 矿物油,密封。另设阴性对照,即在反应液中不加引物或 Taq DNA polymerase。

表 1 *HbWRKY* 基因家族 PCR 扩增的特异引物Table 1 The primers used for amplifying the *HbWRKY* genes

基因名称 Gene name	基因序列(登录号) Gene sequence(No.)	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	引物长度(bp) Primer length	扩增长度(bp) Amplified length
<i>HbWRKY1</i>	GU372969.1	GTCTTCTTGGGCTTCA	16	1009
		CTCGGTTTGTCTCGTAT	16	
<i>HbWRKY2</i>	JQ914656.1	ATCTTTGGTTGCTCGTT	17	1036
		TTGTGGGTAAGGTCTAATGT	20	
<i>HbWRKY3</i>	JQ914657.1	TATGGAAAGAAAATGCCAGGTC	22	333
		ATCCCATTTACAAAAGATAGAC	23	
<i>HbWRKY4</i>	JQ914658.1	GATGGGTCAGTTTGCTTT	18	991
		TCATTGGTTGCCGGCTTGT	18	
<i>HbWRKY5</i>	JQ914659.1	TCTGTATTTTCTCTTGC	18	1084
		AACTTGGTCTGCCGGCTTT	18	
<i>HbWRKY7</i>	JQ914651.1	AGACTCATCCACCAG	16	1165
		CACAGCCGAGCATTCC	16	
<i>HbWRKY9</i>	JQ914653.1	AATCTCAAACATCTCGCTAA	20	1284
		TTCTCTAAGCGTGGC	16	
<i>HbWRKY11</i>	JQ914655.1	TTCAGAAAGTGGGATG	16	1257
		CTGCCAAGCAACAAGTA	17	
<i>HbWRKY27</i>	KT906562.1	CCTCTGCCGCCAACACT	17	1266
		TCATCGTCGCCCTCAT	16	
<i>HbWRKY75</i>	KT906563.1	CCCCTTTCATCTTCTG	16	323
		ACTTGGCTCCTTGTTT	16	

(2) 配制原位 PCR 反应液(避光操作),反应液成分为:5 × Buffer 10 μmol/L, MgCl₂ (25 mmol/L) 9 μmol/L, dATP (10 mmol/L) 1 μmol/L, dGTP (10 mmol/L) 1 μmol/L, dCTP (10 mmol/L) 1 μmol/L, dTTP (3.6 mmol/L) 1 μmol/L, DIG-11-dUTP (50 μmol/L) 10 μmol/L, Taq DNA polymerase (5 U/μmol/L) 1 μmol/L, F-Primer (20 μmol/L) 5 μmol/L, R-Primer (20 μmol/L) 5 μmol/L, BSA (5mg/mmol/L) 5 μmol/L, ddH₂O 1 μmol/L。

(3) 在原位 PCR 仪中进行原位扩增,注意在玻片的四周加适量的 ddH₂O 防止干片。原位 PCR 扩增程序为:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 1 min,50 ~ 60 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 90 s,共 30 个循环;72 ℃延伸 7 min;4 ℃保存。

(4) 扩增完成后,加 50 μL Anti-DIG-Fluorescein 进行荧光信号显示,用 DAPI 对染色体染色后观察并拍照。

1.5 荧光原位杂交

双探针 FISH 时,由 PCR 扩增得到的 8 个基因

(除 *HbWRKY3* 和 *HbWRKY75* 基因外)扩增产物分别回收纯化后,将 *HbWRKY1*、*HbWRKY4*、*HbWRKY7* 和 *HbWRKY11* 序列用生物素切口平移试剂盒 (Biotin-Nick Translation Mix) 标记成探针,信号位点呈红色;将 *HbWRKY2*、*HbWRKY5*、*HbWRKY9*、*HbWRKY27* 用地高辛切口平移试剂盒 (DIG-Nick Translation Mix) 标记成探针,信号位点呈绿色。三探针 FISH 时,*HbWRKY1* 和 *HbWRKY4* 序列分别用生物素切口平移试剂盒和地高辛切口平移试剂盒标记成探针,而 *HbWRKY5* 则同时用生物素切口平移试剂盒和地高辛切口平移试剂混合标记为探针。混合标记的探针由红色和绿色荧光叠加呈现黄色。标记好的探针溶于 100% 去离子甲酰胺中避光保存备用。

参照官锦燕^[22]报道的方法进行荧光原位杂交检测。三探针杂交中,荧光的放大和检测步骤与双探针的相同。

1.6 图像检测与分析

经 DAPI 染色的染色体标本在暗处显色 0.5 h

后用荧光显微镜 BX51TR32FA1-A03 进行观察,用 Penguin/Proseries Camera systems 软件拍照。经 Photoshop 软件处理后,根据 Song 等^[23]报道的信号位点的百分距离的计算方法,结合高和琼等^[24]的核型分析确定信号位点在染色体上的具体位置。

扩增信号位点的百分距离 = [扩增信号位点到着丝粒的距离 (μm) / 扩增信号位点所在染色体臂的长度 (μm)] × 100

2 结果与分析

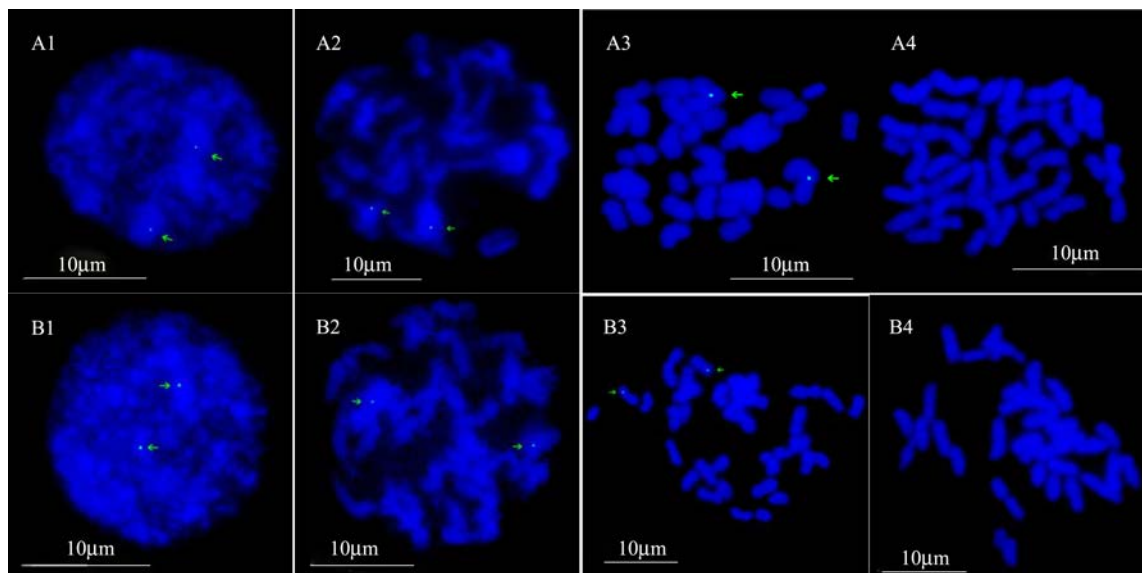
2.1 *HbWRKY3* 和 *HbWRKY75* 基因的原位 PCR 检测与物理定位分析

分别用 *HbWRKY3* 和 *HbWRKY75* 基因序列的特异引物对热研 7-33-97 品系 (2n = 36) 染色体标本进行原位 PCR 扩增和荧光检测 (图 1、图 2)。在热研 7-33-97 品系有丝分裂的间期、前期和中期细胞上都可以检测到 2 个信号。以不加引物作为阴性对照 (图 1A4、B4), 未出现信号。以高和琼等^[24]分析热研 7-33-97 品系核型得到的核型参数

为参考依据,对原位 PCR 成功的中期细胞染色体进行核型分析,得到核型图 (图 2) 及核型模式图 (详见 2.2 部分)。由此可知, *HbWRKY3* 和 *HbWRKY75* 基因分别位于第 3 号和第 7 号染色体的短臂上,信号位点到着丝粒的百分距离平均值分别为 12.30、26.11。

2.2 *HbWRKY1* 等 8 个基因的 FISH 检测与物理定位分析

对 *HbWRKY1*、*HbWRKY2*、*HbWRKY4*、*HbWRKY5*、*HbWRKY7*、*HbWRKY9*、*HbWRKY11*、*HbWRKY27* 这 8 个基因进行 FISH 检测 (图 3)。双探针或三探针 FISH 检测时,每个基因在有丝分裂各个时期都可以检测到 2 个信号位点。以不加探针作为阴性对照 (图 3A4、B4、C4、D4、E4), 未出现信号。以高和琼等^[24]分析热研 7-33-97 品系核型得到的核型参数为参考依据,对原位杂交成功的各个中期细胞染色体进行核型分析,得到 FISH 核型图 (图 4) 及核型模式图 (图 5)。



A1、A2、A3 分别表示 *HbWRKY3* 基因在间期、前期、中期的信号位置;A4 为阴性对照;

B1、B2、B3 分别表示 *HbWRKY75* 基因在间期、前期、中期的信号位置;B4 为阴性对照

A1, A2 and A3 indicate the signal positions of the *HbWRKY3* gene in the interphase, prophase and metaphase, respectively,

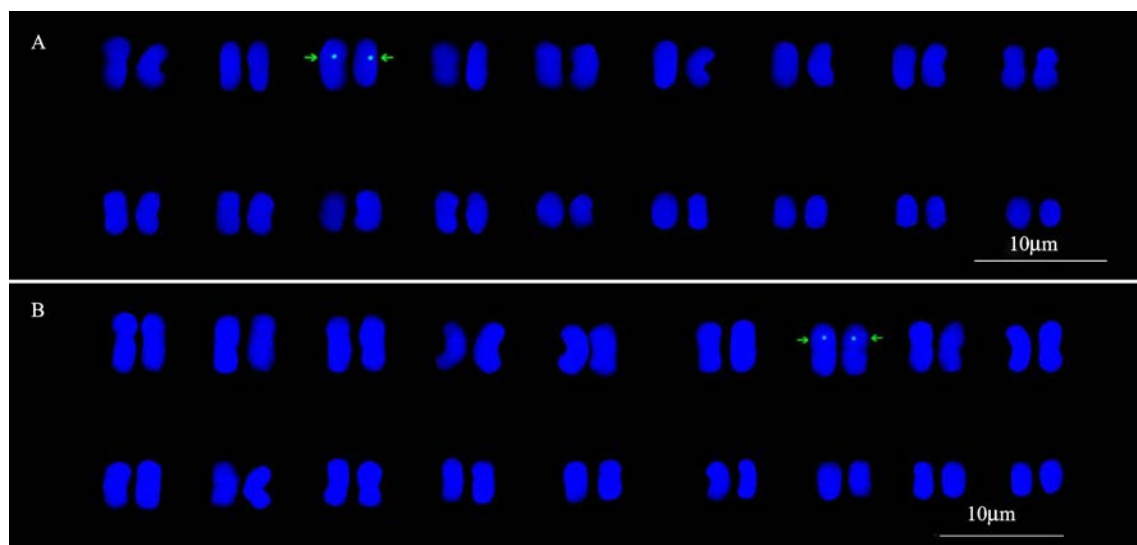
A4 indicates the negative control. B1, B2 and B3 indicate the signal positions of the *HbWRKY75* gene in the interphase,

prophase and metaphase, respectively, B4 indicates the negative control

图 1 *HbWRKY3* 和 *HbWRKY75* 在热研 7-33-97 品系有丝分裂不同时期

染色体上原位 PCR 结果 (绿色箭头所示信号位点)

Fig. 1 *In situ* PCR with *HbWRKY3* and *HbWRKY75* at chromosomes on different phase of mitosis of 'Reyan-7-33-97' (Green arrows indicated the signal)



A: *HbWRKY3* 基因的 IS-PCR 中期细胞核型图; B: *HbWRKY75* 基因的 IS-PCR 中期细胞核型图

A: IS-PCR karyotype with *HbWRKY3* gene, B: IS-PCR karyotype with *HbWRKY75* gene

图 2 IS-PCR 核型图 (绿色箭头所示信号位点)

Fig. 2 IS-PCR karyotype (Green arrows indicate the signals)

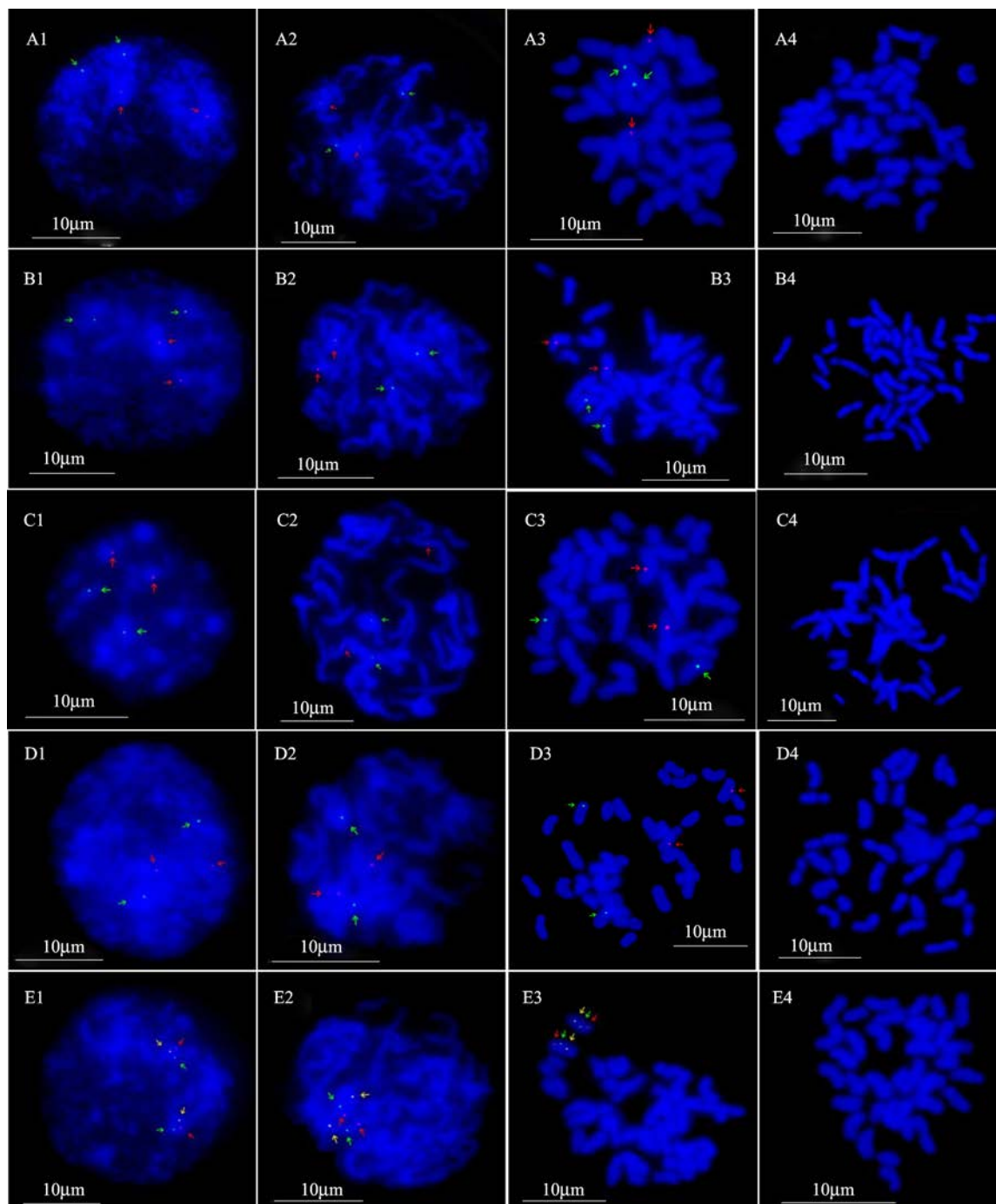
由生物素标记的 *HbWRKY1* 基因 (杂交信号为红色) 和地高辛标记的 *HbWRKY27* 基因 (杂交信号为绿色) 作为探针, 进行双探针荧光原位杂交检测和核型分析的结果表明: *HbWRKY1* 基因位于第 9 号染色体的短臂上, 信号位点到着丝粒的百分距离平均值为 57.38, 而 *HbWRKY27* 基因位于第 6 号染色体的长臂上, 信号位点到着丝粒的百分距离平均值为 38.88 (图 4A)。

由地高辛标记的 *HbWRKY2* 基因 (杂交信号为绿色) 和生物素标记的 *HbWRKY4* 基因 (杂交信号为红色) 作为探针, 进行双探针荧光原位杂交检测和核型分析的结果表明: *HbWRKY2* 基因位于第 8 号染色体的短臂上, 信号位点到着丝粒的百分距离平均值为 6.00, 而 *HbWRKY4* 基因位于第 9 号染色体的短臂上, 信号位点到着丝粒的百分距离平均值为 4.57 (图 4B)。

由地高辛标记的 *HbWRKY5* 基因 (杂交信号为绿色) 和生物素标记的 *HbWRKY11* 基因 (杂交信号为红色) 作为探针, 进行双探针荧光原位杂交检测和核型分析的结果表明: *HbWRKY5* 基因位于第 9 号染色体的长臂上, 信号位点到着丝粒的百分距离平均值为 31.67, 而 *HbWRKY11* 基因位于第 2 号染色体的短臂上, 信号位点到着丝粒的百分距离平均值为 5.74 (图 4C)。

由生物素标记的 *HbWRKY7* 基因 (杂交信号为红色) 和地高辛标记的 *HbWRKY9* 基因 (杂交信号为绿色) 作为探针, 进行双探针荧光原位杂交检测和核型分析的结果表明: *HbWRKY7* 基因位于第 4 号染色体的短臂上, 信号位点到着丝粒的百分距离平均值为 4.40, 而 *HbWRKY9* 基因位于第 10 号染色体的短臂上, 信号位点到着丝粒的百分距离平均值为 45.21 (图 4D)。

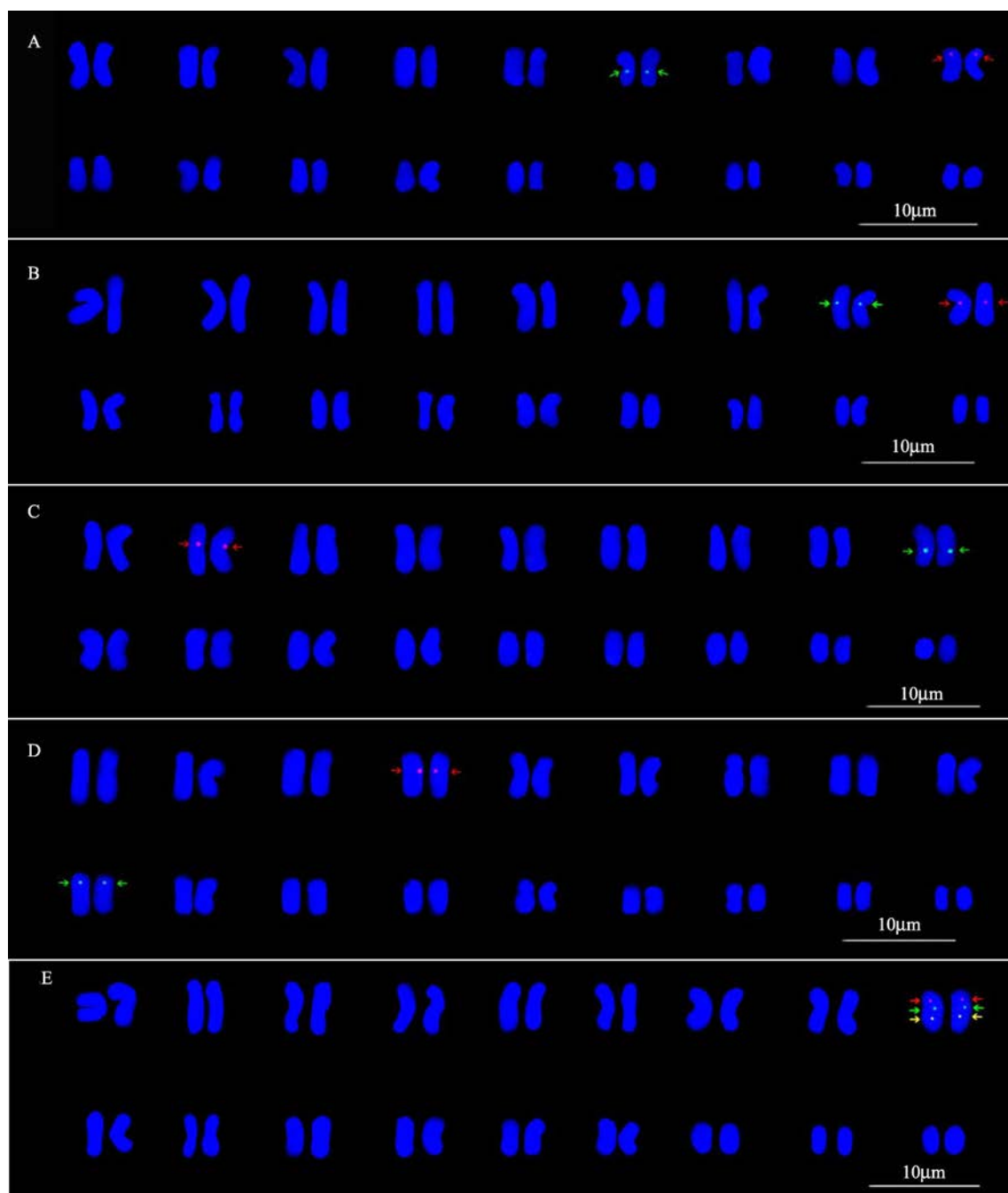
上述结果分析中, 对 *HbWRKY1*、*HbWRKY4* 和 *HbWRKY5* 基因分别进行的 FISH 检测和核型分析的结果可知, 这 3 个基因都位于热研 7-33-97 品系的第 9 号染色体上 (图 4A、B、C)。为了验证这 3 个基因的定位是否正确, 于是用三探针荧光原位杂交技术同时对这 3 个基因进行检测分析。其中 3 种探针的标记分别为: *HbWRKY1* 基因用生物素标记 (荧光检测为红色), *HbWRKY4* 基因用地高辛标记 (荧光检测为绿色), *HbWRKY5* 基因则用生物素与地高辛混合标记 (荧光检测为黄色)。通过三探针 FISH 检测和核型分析可知, 这 3 个基因均定位于第 9 号染色体上 (图 4E), 其中, *HbWRKY1* 和 *HbWRKY4* 基因位于短臂上, *HbWRKY5* 基因位于长臂上, 信号位点到着丝粒的百分距离平均值分别为 57.38、4.57 和 31.67。三探针荧光原位杂交检测和分析的结果与这 3 个基因分别单独 FISH 检测和分析的结果一致。



A1、A2、A3: *HbWRKY1* (红) 和 *HbWRKY27* (绿) 的 FISH 信号; B1、B2、B3: *HbWRKY2* (绿) 和 *HbWRKY4* (红) 的 FISH 信号;
 C1、C2、C3: *HbWRKY5* (绿) 和 *HbWRKY11* (红) 的 FISH 信号; D1、D2、D3: *HbWRKY7* (红) 和 *HbWRKY9* (绿) 的 FISH 信号;
 E1、E2、E3: *HbWRKY1* (红)、*HbWRKY4* (绿) 和 *HbWRKY5* (黄) 的 FISH 信号
 A1、B1、C1、D1 和 E1: 间期细胞; A2、B2、C2、D2 和 E2: 前期细胞; A3、B3、C3、D3 和 E3: 中期细胞; A4、B4、C4、D4、E4 均为阴性对照
 A1、A2、A3: FISH signals for *HbWRKY1* (Red) and *HbWRKY27* (Green), B1、B2、B3: FISH signals for *HbWRKY2* (Green) and *HbWRKY4* (Red),
 C1、C2、C3: FISH signals for *HbWRKY5* (Green) and *HbWRKY11* (Red), D1、D2、D3: FISH signals for *HbWRKY7* (Red) and *HbWRKY9* (Green),
 E1、E2、E3: FISH signals for *HbWRKY1* (Red)、*HbWRKY4* (Green) and *HbWRKY5* (Yellow)
 A1、B1、C1、D1 和 E1: interphase cells, A2、B2、C2、D2 和 E2: prophase cell,
 A3、B3、C3、D3 和 E3: metaphase cell, A4、B4、C4、D4、E4 all indicate negative controls

图 3 8 个 *HbWRKYs* 基因有丝分裂不同时期染色体上 FISH 结果

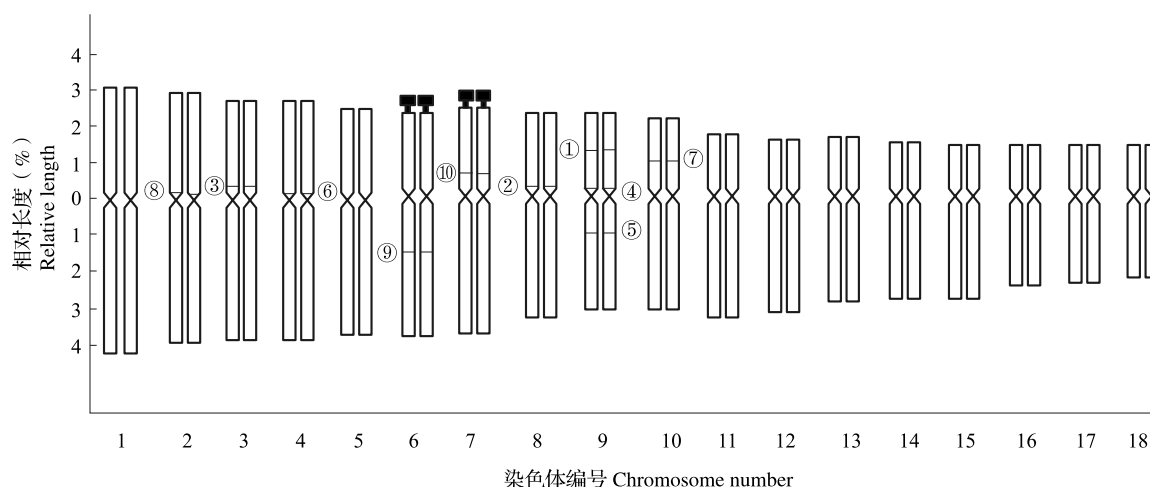
Fig. 3 The physical positions of eight *HbWRKYs* genes at different stages of mitosis using FISH



A: *HbWRKY1* (红) 和 *HbWRKY27* (绿); B: *HbWRKY2* (绿) 和 *HbWRKY4* (红);
 C: *HbWRKY5* (绿) 和 *HbWRKY11* (红); D: *HbWRKY7* (红) 和 *HbWRKY9* (绿); E: *HbWRKY1* (红)、*HbWRKY4* (绿) 和 *HbWRKY5* (黄)
 A: karyotype by FISH with *HbWRKY1* (Red) and *HbWRKY27* (Green), B: karyotype by FISH with *HbWRKY2* (Green) and *HbWRKY4* (Red),
 C: karyotype by FISH with *HbWRKY5* (Green) and *HbWRKY11* (Red), D: karyotype by FISH with *HbWRKY7* (Red) and *HbWRKY9* (Green),
 E: karyotype by FISH with *HbWRKY1* (Red), *HbWRKY4* (Green) and *HbWRKY5* (Yellow) cell karyotype

图4 8个 *HbWRKYs* 基因的 FISH 核型图

Fig. 4 Karyotypes of eight *HbWRKYs* genes using FISH



①: *HbWRKY1*; ②: *HbWRKY2*; ③: *HbWRKY3*; ④: *HbWRKY4*; ⑤: *HbWRKY5*;
⑥: *HbWRKY7*; ⑦: *HbWRKY9*; ⑧: *HbWRKY11*; ⑨: *HbWRKY27*; ⑩: *HbWRKY75*

图 5 10 个 *HbWRKYs* 基因在热研 7-33-97 上位置的核型模式图

Fig. 5 Idiogram showing the location of ten *HbWRKY* genes on genotype 'Reyan 7-33-97'

3 讨论

3.1 不同功能基因在橡胶树中的连锁关系

本研究的结果表明,已定位的 *HbWRKY* 基因家族的 10 个基因成员间,*HbWRKY1*、*HbWRKY4* 和 *HbWRKY5* 位于相同的染色体上,这在遗传上可能具有连锁遗传的关系,可能互为连锁基因;而其他基因均位于不同的染色体上,遗传上可能互为独立基因的关系(图 5)。结合前人已报道的橡胶树其他功能基因定位的结果,可以得知 *HbWRKY1*、*HbWRKY4* 和 *HbWRKY5* 还与 *HbCPT*^[25] 同时位于第 9 号染色体上;*HbWRKY2* 与 *SRPP*^[26]、*HEV1.1*^[27] 同时位于第 8 号染色体上;*HbWRKY3* 与 *HbSUT2A*^[28]、*REF*^[26]、*HbRZF2*^[28]、*HMGRI*^[25]、*HbNIN3* 和 *HbMYC2*^[29] 同时位于第 3 号染色体上;*HbWRKY7* 与 *GGPS*^[30]、*HbJAZ1* 和 *HbCOII*^[29] 同时位于第 4 号染色体上;*HbWRKY9* 与 *V-PPase* 和 *HCPT-3*^[25] 同时位于第 10 号染色体上;*HbWRKY11* 与 *HbNIN2*^[29] 同时位于第 2 号染色体上;*HbWRKY27* 与 *RT*^[26]、*HEV2.1*^[27]、*HbRT1*^[25]、*HbRZF* 和 *HbSUT3*^[28] 同时位于第 6 号染色体上;*HbWRKY75* 与 *HEV1.2*^[27]、*HbPT3*^[25]、*HbRZF4* 和 *HbSUT4*^[28] 同时位于第 7 号染色体上。这些位于同一条染色体上的基因可能互为连锁基因。因此,研究功能基因间的染色体位置关系,有助于进一步了解这些基因间可能的遗传关系,从而为橡胶树分子辅助育种提供科学依据。

3.2 三探针荧光原位杂交物理定位分析

荧光原位杂交 (FISH, fluorescence *in situ* hybridization) 技术是一种非放射性分子细胞遗传学技术,它是在 20 世纪 80 年代末已有的放射性原位杂交技术的基础上发展起来的^[31-32],用荧光标记已知序列的核酸为探针,根据碱基互补配对的原则,与染色体标本的靶序列进行特异性结合,将带有标记的 DNA 序列定位到染色体上^[33]。该技术经过不断的改进和完善,逐步形成了灵敏度高、检测时间短、多样化、动态等特点,目前已广泛应用于功能基因的物理定位、减数分裂时期染色体行为研究、染色体的识别、物理图谱的构建、探讨物种的起源、外源染色质的检测及远缘杂种的鉴定等研究^[34]。近年来,国内外专家利用 FISH 结合高分辨率显微镜分析了 RNA 的亚细胞定位、精确检测染色体异常来源以及利用 FISH 进行染色体核型分析揭示 2 种小麦不同的基因组在分类学上的表达等^[35-41]。

本研究应用三探针 FISH 原位杂交分析,根据杂交信号显示的位置,可再次确定 *HbWRKY1*、*HbWRKY4* 和 *HbWRKY5* 的位置以验证双探针 FISH 的结果,结果显示这 3 个基因的位置与之前的定位结果完全一致。一般说来,单探针 FISH 相较于双探针 FISH、三探针 FISH,检测率较高。但由于橡胶树染色体属于小型染色体,染色体形态相对不易识别,核型分析时容易造成误差,因此,当多个基因进行定位时,用不同细胞分别进行单探针检测和核型分析的结果,可能比不上用同一细胞同时进行三探针检

测和核型分析的结果准确。本研究通过提高染色体制片的质量,缩短酶解橡胶树叶片时间,优化洗片技术,调整原位杂交和探针制备的条件,从而加快了试验进程,节约了试验成本,减少了标本组织需求量,又使结果更准确可靠和具有说服力。三探针 FISH 在染色体结构异常的临床诊断和研究中也具有广泛的应用范围和重要的应用价值^[42]。

3.3 原位 PCR 物理定位分析

原位 PCR 技术是 Haase 等^[43]于 1990 年建立的一种将 PCR 技术和原位杂交技术相结合起来的原位 DNA 多聚酶链式反应技术 (IS-PCR, *in situ* PCR),简称原位 PCR。它是指在细胞或者组织标本制片上对特异 DNA 序列进行扩增,再结合 FISH 或者免疫反应等方法检测及定位细胞内特异核酸序列的一种分子分析技术^[44]。总体上可以分为 3 种,即直接原位 PCR、间接原位 PCR 和原位反转录 PCR^[45]。原位 PCR 技术在动物、医学等研究领域得到了广泛的应用,但在植物研究领域中的应用甚少,目前主要用于植物染色体、细胞、组织水平上的基因检测和定位^[46-47]。

除 FISH 技术外,本研究还应用直接法原位 PCR 技术对 *HbWRKY3* 和 *HbWRKY75* 进行物理定位。原位 PCR 对于靶序列为短小片段的基因定位具有很大优势。本研究是以前人已完善稳定的原位 PCR 试验体系和技术为基础展开的,所得的原位 PCR 结果较好,信号杂点少、假阳性少、背景干净而且信号检出率高。在试验过程中发现前期和中期细胞上的信号检出率远远高于中期细胞上的检出率,其原因可能是由于不同时期染色体密度、折叠程度不同而导致的;有时在有些中期细胞中仅能检测到一个信号位点,这可能是中期染色体高度聚缩,靶序列暴露不完全,最终导致了扩增的失败。多次重复试验注意到,熟练精准的原位 PCR 操作技术、完善稳定的原位 PCR 反应体系和干净优质的染色体标本是原位扩增成功与否的重要保障,而引物与模板的错配是产生假阳性的主要原因,所以特异引物的设计尤为重要。

3.4 本研究在橡胶树基因组组装中的辅助作用

随着全基因组测序工作的不断推进,中国热带农业科学院橡胶研究所于 2016 年 5 月完成了巴西橡胶树热研 7-33-97 品系的测序工作并发布了其基因组草图^[48]。但目前只是将 *congtin* (重叠群) 拼接为大片段的 scaffold,而众多 scaffold 尚未锚定在具体哪条染色体上,故染色体归类并不清楚。本研

究将 *HbWRKY* 家族的 10 个成员 *HbWRKY1*、*HbWRKY2*、*HbWRKY3*、*HbWRKY4*、*HbWRKY5*、*HbWRKY7*、*HbWRKY9*、*HbWRKY11*、*HbWRKY27* 和 *HbWRKY75* 基因的序列在 NCBI 中与巴西橡胶树热研 7-33-97 品系的全基因组序列进行比对,这 10 个成员分别位于全基因组中的 scaffold0839 (ID: LVXX01000839.1)、scaffold0101 (ID: LVXX01000101.1)、scaffold0148 (ID: LVXX01000148.1)、scaffold0280 (ID: LVXX01000280.1)、scaffold7279 (ID: LVXX01007016.1)、scaffold0050 (ID: LVXX01000050.1)、scaffold0217 (ID: LVXX01000217.1)、scaffold0208 (ID: LVXX01000208.1)、scaffold0800 (ID: LVXX01000800.1) 和 scaffold1767 (ID: LVXX01001676.1) 片段上。根据本研究对 *HbWRKY* 基因家族 10 个成员定位的结果,可以初步判定: scaffold0839、scaffold0280 位于第 9 号染色体短臂上, scaffold7279 位于第 9 号染色体长臂上; scaffold0101、scaffold0148、scaffold0050、scaffold0217、scaffold0208、scaffold1767 分别位于第 8、3、4、10、2、7 号染色体的短臂上位; scaffold0800 位于第 6 号染色体长臂上。因此,本研究结果可为橡胶树基因组 scaffold 序列的染色体归属提供分子细胞遗传学依据。

参考文献

- [1] 文锋,吴小祝,廖亮,刘新圣,李鹏. WRKY 转录因子在植物抗逆生理中的研究进展. 广西植物, 2017, 37(1): 69-79, 68
- [2] 张全琪,倪燕妹,朱家红,黄志. 巴西橡胶树 *HbWRKY1* 基因的克隆及转化烟草的初步研究. 热带亚热带植物学报, 2012, 20(4): 356-364
- [3] 唐潇,李辉亮,郭冬,彭世清. 巴西橡胶树 *HbWRKY1* 基因 5' 调控序列的克隆及功能初步鉴定. 热带作物学报, 2013, 34(4): 630-635
- [4] Wang Y, Guo D, Li H L, Peng S Q. Characterization of *HbWRKY1*, a WRKY transcription factor from *Hevea brasiliensis* that negatively regulates *HbSRPP*. Plant physiology and biochemistry, 2013, 71: 283-289
- [5] Zhang Q Q, Zhu J H, Ni Y M, Cai Y B, Zhang Z L. Expression profiling of *HbWRKY1*, an ethephon-induced WRKY gene in latex from *Hevea brasiliensis* in responding to wounding and drought. Trees, 2012, 26(2): 587-595
- [6] 陈月昇,杨署光,杨武,田维敏. 巴西橡胶树乳管细胞 *HbWRKY1* 基因克隆及表达分析. 热带作物学报, 2011, 32(6): 987-992
- [7] 王颖. 调控橡胶树 *HbSRPP* 的转录因子 *HbWRKY1* 的分离与功能分析. 海口: 海南大学, 2012
- [8] 谢黎黎. 橡胶树抗逆相关 WRKY 转录因子的克隆与功能鉴定. 海口: 海南大学, 2013
- [9] 翟琪麟. 橡胶树 *HbWRKY7* 和 *HbWRKY11* 的克隆及功能研究. 海口: 海南大学, 2013
- [10] Zhai Q L, An Z W, Li Y C, Zhao J W, Xie L L, Li W G, Huang H S. Construction and application of a co-expression vector for double genes in plants. Journal of Agricultural Biotechnology, 2013, 21(5): 612-620
- [11] 闫栋,陈晓丽,孙丽娜,曾日中,杨礼富. 橡胶树胶乳 WRKY 家族转录因子 *HbWRKY27* 基因的克隆与表达分析. 热带作物学

- 报,2016,37(3):517-524
- [12] 谢黎黎,安泽伟,李雅超,翟琪麟,程汉,方家林,黄华孙. 橡胶树 *HbWRKY3* 的克隆及其响应逆境胁迫的表达分析. 热带作物学报,2013,34(8):1463-1472
- [13] Xie L L, An Z W, Li Y C, Zhai Q L, Chen H, Fang J L, Huang H S. Cloning and expression analysis of *HbWRKY3* in *Hevea brasiliensis* under abiotic stress. Chinese Journal of Tropical Crops, 2013,34(8):1463-1472
- [14] 陈晓丽,闫栋,孙丽娜,曾日中,杨礼富. 橡胶树 *WRKY* 家族转录因子 *HbWRKY75* 基因的克隆及表达分析. 植物生理学报,2016,52(3):250-258
- [15] Chen X L, Yan D, Sun L N, Zeng R Z, Yang L F. Cloning and expression analysis of *HbWRKY75* gene in leaf from *Hevea brasiliensis*. Plant Physiology Journal, 2016,52(3):250-258
- [16] 王磊,高晓清,朱冬华,周永力,黎志康. 植物 *WRKY* 转录因子家族基因抗病相关功能的研究进展. 植物遗传资源学报,2011,12(1):80-85
- [17] Zhao W S, Zhai Q L, An Z W, Fang J L, Huang H S. Cloning and characteristics of *HbWRKY9* transcription factor in the rubber tree. Genomics and Applied Biology, 2015,34(3):599-606
- [18] Liu J, Que Y, Guo J, Xu L, Wu J, Chen R. Molecular cloning and expression analysis of a *WRKY* transcription factor in sugarcane. African Journal of Biotechnology, 2012,11(24):6434-6444
- [19] Li H L, Guo D, Yang Z P, Tang X, Peng S Q. Genome-wide identification and characterization of *WRKY* gene family in *Hevea brasiliensis*. Genomics, 2014,104(1):14-23
- [20] 高和琼,王英,金鸽,邱海燕,庄南生. 橡胶树叶片染色体制片方法的优化. 热带作物学报,2009,30(5):565-569
- [21] 李懋学,张敦方. 植物染色体研究技术. 哈尔滨:东北林业大学出版社,1991:30
- [22] 官锦燕. 巴西橡胶树 *SUT* 和 *RZF* 基因家族物理定位的研究. 海口:海南大学,2014
- [23] Song Y C, Gustafson J P. The physical location of fourteen RFLP markers in rice (*Oryza sativa* L.). Theoretical and Applied Genetics, 1995,90(1):113-119
- [24] 高和琼,庄南生,王英,邱海燕. 橡胶树两个品种的核型分析. 武汉植物学研究,2009,27(5):537-540
- [25] 张新新. 巴西橡胶树 4 个胶乳生物合成相关基因的物理定位研究. 海口:海南大学,2013
- [26] 邱海燕. 巴西橡胶树 *REF*、*RT* 和 *SRPP* 基因物理定位的研究. 海口:海南大学,2010
- [27] 彭宝丰,王英,高和琼,庄南生. 橡胶素基因家族 4 个成员在橡胶树染色体上的定位. 热带生物学报,2016,7(3):318-324
- [28] 官锦燕,王英,高和琼,庄南生. 巴西橡胶树 4 个环锌指蛋白基因(*HbRZF*)的物理定位. 基因组学与应用生物学,2014,33(3):610-616
- [29] 高佳佳. 巴西橡胶树几个与橡胶合成相关基因的物理定位研究. 海口:海南大学,2014
- [30] 张新新,王英,高和琼,曾冬冬,庄南生. 巴西橡胶树 *GGPS* 和 *V-PPase* 基因的染色体定位分析. 热带作物学报,2013,34(7):1270-1273
- [31] 余尚扬. 荧光原位杂交技术的研究进展和应用. 中国现代药物应用,2011,5(14):129-131
- [32] 何世斌,柴连琴,谭珺隽,沈尧,周萍,马云峰,李立家. 荧光原位杂交技术的研究进展. 植物科学学报,2014,32(2):199-204
- [33] 李牧尧. 荧光原位杂交(FISH)技术. 国外医学:遗传学分册,1994,17(1):8-13
- [34] 林秀琴,毛钧,陆鑫,刘新龙,马丽,蔡青. 荧光原位杂交技术(FISH)及其在植物分子细胞遗传学中的应用与展望. 甘蔗糖业,2012(1):51-57
- [35] Zirkel A, Papantonis A. Detecting circular RNAs by RNA fluorescence in situ hybridization. Methods in Molecular Biology, 2018,1724:69-75
- [36] 韦小妮,康涵,王文丹,吕康模. 荧光原位杂交技术在检测染色体异常来源成分中的应用价值. 中国优生与遗传杂志,2018,26(2):33-35
- [37] Zhao L B, Ning S Z, Yi Y J, Zhang L Q, Yuan Z W, Wang J R, Zheng Y L, Hao M, Liu D C. Fluorescence in situ hybridization karyotyping reveals the presence of two distinct genomes in the taxon *Aegilops tauschii*. BMC Genomics, 2018,19(1):3
- [38] 杨学明,裔传灯. 植物染色体原位杂交技术及其在稻属研究中的应用. 植物遗传资源学报,2004,5(4):401-405
- [39] 吴琼,宋国立,刘三宏,王春英,刘方,黎绍惠,张香娣,王玉红,王坤波. 黄褐棉 45S rDNA 的 FISH 定位及核型分析. 植物遗传资源学报,2008,9(4):439-442,569
- [40] 窦全文,雷云霆,王海庆. 苜蓿种质间染色体多态性的荧光原位杂交检测. 植物遗传资源学报,2012,13(5):782-788
- [41] 杨学明,姚金保,马鸿翔,陈佩度. 普通小麦-簇毛麦 6V 代换系 45S rDNA 和 5S rDNA 位点的 FISH 分析. 植物遗传资源学报,2011,12(3):464-467,472
- [42] 何妹婧,曾艳红,宋新明,师蕊婷,陈争. 运用三色 FISH 技术确定自然流产夫妇染色体微小区域倒位. 中山大学学报:医学科学版,2014,35(1):111-115
- [43] Haase A T, Retzel E F, Staskus K A. Amplification and detection of lentiviral DNA inside cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990,87(13):4971-4975
- [44] 罗帅,杨洪一. 原位 PCR 原理及应用. 黑龙江农业科学,2017(6):108-111
- [45] 李分龙,陈庆富. 原位 PCR 技术在植物学中的应用. 贵州师范大学学报:自然科学版,2010,28(2):111-114
- [46] Li F L, Zeller F J, Huang K F, Shi T X, Chen Q F. Improvement of fluorescent chromosome in situ PCR and its application in the phylogeny of the genus *Fagopyrum* Mill. using nuclear genes of chloroplast origin (cpDNA). Plant Systematics and Evolution, 2013,299(9):1679-1691
- [47] Kim I S, Kang J S, Choi A N, Kim Y S. The prevalence of Epstein-Barr virus in uterine cervical cancer: Detection by PCR and in situ PCR methods. Korean Journal of Obstetrics and Gynecology, 2000,43(2):184-191
- [48] Tang C, Yang M, Fang Y, Luo Y, Gao S, Xiao X, An Z, Zhou B, Zhang B, Tan X, Yeang H Y, Yang J, Lin Q, Mei H, Montoro P, Long X, Qi J, Hua Y, He Z, Sun M, Li W, Zeng X, Cheng H, Liu Y, Yang J, Tian W, Zhuang N, Zeng R, Li D, He P, Li Z, Zou Z, Li S, Li C, Wang J, Wei D, Lai C Q, Luo W, Yu J, Hu S, Huang H. The rubber tree genome reveals new insights into rubber production and species adaptation. Nature plants, 2016, 2(6):16073