

分类号: Q
学 号: 20202006037

密 级: 秘密 2 年后开放
单位代码: 10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



橡胶草顺式异戊烯基转移酶 (CPT) 基因功能 的研究

学 位 申 请 人	董高权
指 导 教 师	闫洁 教授
申请学位门类级别	理学硕士
学 科 、 专 业 名 称	生物学
研 究 方 向	生物化学与分子生物学
所 在 学 院	生命科学学院

中国·新疆·石河子
2023 年 9 月

分类号: Q
学 号: 20202006037

密 级: 秘密 2 年后开放
单位代码: 10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



橡胶草顺式异戊烯基转移酶 (CPT) 基因功能 的研究

学 位 申 请 人	董高权
指 导 教 师	闫洁 教授
申请学位门类级别	理学硕士
学 科 、 专 业 名 称	生物学
研 究 方 向	生物化学与分子生物学
所 在 学 院	生命科学学院

中国·新疆·石河子
2023 年 9 月

**The Function Study of *Cis*-prenyltransferase (*CPT*) Gene in
*Taraxacum kok-saghyz***

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Natural Science

By

Dong Gao-quan

(Biochemistry and Molecular Biology)

Dissertation Supervisor: Prof. Yan Jie

September, 2023

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：董高权

时间：2023 年 10 月 19 日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：董高权

时间：2023 年 10 月 19 日

导师签名：闫志

时间：2023 年 10 月 20 日

摘要

目的:

天然橡胶是国民经济发展和国防建设中至关重要的原料，也是一种关键的战略经济资源。天然橡胶生产的主要来源是巴西橡胶树，但巴西橡胶树自身局限性较多，橡胶产量的提升受到严重阻碍。橡胶草合成的天然橡胶与巴西橡胶树相似，且环境适应性强、生长周期短，现成为一种强有力的替代天然橡胶来源的产胶植物。橡胶草中的顺式异戊烯基转移酶（CPT）是催化天然橡胶长链合成的关键聚合酶，在橡胶的生物合成过程中扮演着不可或缺的角色。本研究通过对橡胶草 *TkCPT* 基因进行功能性分析，探究其在橡胶草产胶过程中的功能和作用机制，为橡胶草的选育和遗传改良提供重要的理论指导，推进橡胶草规模化种植产业的迅速发展。

方法:

本研究以国内橡胶草和短角蒲公英为材料，利用橡胶草全基因组筛选获得橡胶草 *TkCPT* 基因家族，结合生物信息学分析，鉴定 *TkCPT* 基因家族中的关键基因。采用基因克隆技术获取目的基因 *TkCPT1*、*TkCPT2*、*TkCPT3* 和 *TkCPT4*，并通过烟草叶片瞬时转化技术进行亚细胞定位分析；根据酵母双杂和双分子荧光互补实验，探究 *TkCPT1-4* 蛋白与 *TkCPTL1* 蛋白之间的互作关系；选取橡胶草和短角蒲公英不同生长时期的植物材料，进行时空定量表达、产胶性能和橡胶颗粒电镜观察。研究 *TkCPT* 对橡胶草产胶机制的影响，为提高天然橡胶的产量打下理论基础。

结果:

(1) 从橡胶草全基因组共获得 8 个 *TkCPT* 基因家族序列，都具有 *CPT* 基因家族特征；保守区分析发现橡胶草 *TkCPT1-4* 和其他产胶植物一样都具有 5 个高度保守区域，而 *TkCPT5-8* 却只有 2 个高度保守区域，除 *TkCPT8* 具有 UppS superfamily 保守结构域外，其余都具有 Cis_IPPS superfamily 保守结构域。分析系统进化树发现 *CPT* 家族共分三个亚族，*TkCPT5-8* 在 Group I 亚族，*TkCPT1-4* 在 Group III 亚族，且 *TkCPT1*、*TkCPT2* 和短角蒲公英的 3 个 *TbCPT* 亲缘关系最近。

(2) 克隆 *TkCPT1-4* 分别获得 927bp、906bp、828bp 和 840bp 的大小序列，亚细胞定位结果显示 *TkCPT1-4* 蛋白均定位在内质网上；qPCR 结果表明：*TkCPT1-4* 基因均在根和叶中表达，且 *TkCPT1*、*TkCPT2* 和 *TkCPT4* 表达量相近；*TkCPT3* 表达量较低，且与 *TkCPT1* 在根中的表达量相比具有极显著性差异。此外，只有 *TkCPT1* 在花萼和花中有低表达量，其余三个基因均不在花萼和花中表达。

(3) 酵母双杂实验结果显示，*TkCPT1-4* 都能与 *TkCPTL1* 互作；双分子荧光互补转化实验进一

步验证 TkCPT1-4 通过与 TkCPTL1 产生互作，并形成顺式异戊烯基转移酶复合物的形式参与天然橡胶的生物合成。

(4) 在橡胶草和短角蒲公英不同生长时期中，不同部位的 *TkCPT1-4* 表达量均高于同时期的 *TbCPT1-4*，且橡胶草的天然橡胶含量也高于短角蒲公英，胶乳离心后分成三个特征相：橡胶相、界面相和颗粒相。橡胶草的橡胶颗粒数量远大于短角蒲公英。在橡胶草中，小型橡胶颗粒（直径 200 nm 左右）占据数量优势，中型的橡胶颗粒（400 nm 左右）随植物生长逐渐增多。在短角蒲公英中，中型的橡胶颗粒占据数量优势，其次是大型橡胶颗粒（直径 800 nm 左右）。

结论：

(1) 从橡胶草基因组中共鉴定得到 8 个橡胶草 *TkCPT* 家族基因，通过生物信息学分析推测 TkCPT1、TkCPT2、TkCPT3 和 TkCPT4 是天然橡胶生物合成中的关键酶。

(2) 从橡胶草 cDNA 中克隆得到 *TkCPT1*、*TkCPT2*、*TkCPT3* 和 *TkCPT4* 基因，均属于内质网定位蛋白，*TkCPT1-4* 基本只在橡胶草根部和叶片中表达，但 *TkCPT3* 在橡胶草内表达量较低。

(3) TkCPT1、TkCPT2、TkCPT3 和 TkCPT4 都可与 TkCPTL1 结合形成顺式异戊烯基转移酶复合物，从而使 TkCPT 锚定在橡胶颗粒上，催化 IPP 缩合到聚异戊烯链上形成长链橡胶。

(4) 在橡胶草和短角蒲公英中，CPT 影响着植物体内天然橡胶的生物合成，*CPT* 基因的表达量与橡胶含量、橡胶颗粒数量的关系为正相关。

关键词：橡胶草；顺式异戊烯基转移酶；时空定量；蛋白互作；天然橡胶合成

Abstract

Objective:

Natural rubber is a crucial raw material in national economic development and national defense construction, as well as a key strategic economic resource. The primary source of natural rubber production is *Hevea brasiliensis*; however, this particular source is plagued by numerous limitations that have significantly impeded the growth of rubber production. The natural rubber synthesized from *Taraxacum kok-saghyz* exhibits similarities to that of *Hevea brasiliensis*, displaying robust environmental adaptability and a short growth cycle. It has become a powerful alternative to natural rubber as a rubber producing plant. The *cis*-prenyltransferase (CPT) in *Taraxacum kok-saghyz* is a key polymerase that catalyzes the long chain synthesis of natural rubber and plays an indispensable role in the biosynthesis process of rubber. The present study aims to analyze the functionality of the *TkCPT* gene in *Taraxacum kok-saghyz* in order to investigate its functions and mechanisms in the rubber production process. This research provides valuable theoretical guidance for the breeding and genetic enhancement of *Taraxacum kok-saghyz*, and facilitates the rapid advancement of the large-scale cultivation industry of *Taraxacum kok-saghyz*.

Methods:

This study used domestic *Taraxacum kok-saghyz* and short horned dandelion as research materials, and conducted a comprehensive genome screening of rubber grass to identify the *TkCPT* gene family. Combined with the utilization of bioinformatics analysis, the identification of key genes within the *TkCPT* gene family was achieved. Utilizing gene cloning technology, the target genes *TkCPT1*, *TkCPT2*, *TkCPT3*, and *TkCPT4* were obtained. Subsequently, subcellular localization analysis was conducted using tobacco leaf instantaneous transformation technology. Furthermore, the interaction relationship between *TkCPT1-4* protein and *TkCPTL1* protein was explored through yeast dual hybrid and bimolecular fluorescence complementary experiments. Additionally, plant materials from various growth stages were selected to examine spatiotemporal quantitative expression, rubber production performance, and electron microscopy observation of rubber particles. Studying the effect of *TkCPT* on the rubber production mechanism of *Taraxacum kok-saghyz* will lay a theoretical foundation for improving the yield of natural rubber.

Results:

(1) A total of 8 TkCPT gene family sequences were obtained from the entire genome of *Taraxacum kok-saghyz*, all of which exhibit characteristics of the CPT gene family. Analysis of the conservative zones revealed that *Taraxacum kok-saghyz* TkCPT1-4, similar to other rubber-producing plants, possess 5 highly conserved zones, whereas TkCPT5-8 only possess 2 highly conserved zones. With the exception of TkCPT8, which contains UppS superfamily conserved structural domains, all other sequences contain the Cis_IPPS superfamily conservative structural domain. Upon examination of the phylogenetic tree, it was determined that the CPT family can be classified into three distinct subfamilies. Specifically, the TkCPT5-8 enzymes belong to the Group I subfamily, while the TkCPT1-4 enzymes are categorized under the Group III subfamily. Additionally, TkCPT1, TkCPT2, and the three TbCPT of the *Taraxacum brevicorniculatum* have the closest genetic relationships.

(2) Cloning of *TkCPT1-4* resulted in obtaining size sequences of 927bp, 906bp, 828bp, and 840bp, respectively. Subcellular localization results showed that the TkCPT1-4 protein was located in the endoplasmic reticulum; The qPCR results showed that the *TkCPT1-4* gene was expressed in both roots and leaves, and the expression levels of *TkCPT1*, *TkCPT2*, and *TkCPT4* were similar; The expression level of *TkCPT3* is relatively low, and there is a highly significant difference compared to the expression level of *TkCPT1* in the root. Furthermore, it is noteworthy that only *TkCPT1* exhibits low levels of expression in scape and flowers, whereas the remaining three genes do not demonstrate any expression in these tissues.

(3) The results of the yeast double hybrid experiment demonstrated that TkCPT1-4 exhibits interaction with TkCPTL1. This interaction was further confirmed through the bimolecular fluorescence complementary transformation experiment, which provided evidence that TkCPT1-4 plays a role in the regulation of natural rubber biosynthesis by forming a cis-prenyltransferase complex with TkCPTL1.

(4) During various growth stages of *Taraxacum kok-saghyz* and *Taraxacum brevicorniculatum*, it was observed that the expression level of *TkCPT1-4* in different parts was consistently higher than that of *TbCPT1-4* at the corresponding period. Additionally, the natural rubber content in *Taraxacum kok-saghyz* was found to be significantly higher compared to *Taraxacum brevicorniculatum*. The latex was observed to undergo phase separation into three distinct phases, namely the rubber phase, interface phase, and particle phase, through the process of centrifugation. The quantity of rubber particles present in *Taraxacum kok-saghyz* is significantly higher compared to *Taraxacum brevicorniculatum*. In the context of *Taraxacum kok-saghyz*, the predominant particles in terms of quantity are small rubber particles, measuring approximately

200 nm in diameter. However, as the plant grows, there is a gradual increase in the presence of medium-sized rubber particles, which have a diameter of around 400 nm. In *Taraxacum brevicorniculatum*, the abundance of rubber particles is primarily attributed to medium-sized particles, with large rubber particles (approximately 800 nm in diameter) following suit.

Conclusion:

(1) A total of eight *TkCPT* family genes were identified from the genome of *Taraxacum kok-saghyz*. Bioinformatics analysis indicates that *TkCPT1*, *TkCPT2*, *TkCPT3*, and *TkCPT4* play crucial roles as key enzymes in the biosynthesis of natural rubber.

(2) The genes *TkCPT1*, *TkCPT2*, *TkCPT3* and *TkCPT4* were cloned from the cDNA of *Taraxacum kok-saghyz*. These genes are classified as endoplasmic reticulum localization proteins. *TkCPT1-4* exhibits predominant expression in the root and leaf tissues, whereas *TkCPT3* demonstrates relatively low expression levels in *Taraxacum kok-saghyz*.

(3) *TkCPT1*, *TkCPT2*, *TkCPT3*, and *TkCPT4* have the ability to interact with *TkCPTL1*, resulting in the formation of a *cis*-prenyltransferase complex. This complex plays a crucial role in anchoring *TkCPT* onto rubber particles and facilitating the condensation of IPP onto the polyisopentene chain to form long chain rubber.

(4) In *Taraxacum kok-saghyz* and *Taraxacum brevicorniculatum*, *CPT* affects the biosynthesis of natural rubber in plants. The expression level of the *CPT* gene is positively correlated with the rubber content and the quantity of rubber particles.

Key words: *Taraxacum kok-saghyz*; *cis*-prenyltransferase; Space-time quantification; Protein interaction; Natural rubber synthesis

目录

摘 要	I
ABSTRACT	III
中英文符号缩略词表	IX
引 言	1
第一章 文献综述	3
1.1 橡胶草	3
1.1.1 天然橡胶的概况	3
1.1.2 橡胶草	4
1.1.3 天然橡胶的生物合成	5
1.2 异戊烯基转移酶	10
1.2.1 类异戊二烯	10
1.2.2 异戊烯基转移酶	10
1.2.3 顺式异戊烯基转移酶	12
1.2.4 异戊烯基转移酶复合物	13
1.3 研究目的与意义	14
第二章 橡胶草 <i>CPT</i> 基因家族生物信息学分析	15
2.1 数据库和软件	15
2.1.1 实验数据库	15
2.1.2 数据处理软件	15
2.2 研究方法	15
2.2.1 橡胶草 <i>CPT</i> 基因家族生物信息学分析	15
2.2.2 橡胶草 <i>CPT</i> 基因家族保守区和系统进化树分析	15
2.2.3 橡胶草 <i>CPT</i> 基因家族保守基序和结构域分析	15
2.3 结果分析	16
2.3.1 橡胶草 <i>CPT</i> 基因家族生物信息学分析	16
2.3.2 橡胶草 <i>CPT</i> 基因家族保守区和系统进化树分析	16
2.3.3 橡胶草 <i>CPT</i> 基因家族保守基序和结构域分析	18
2.4 讨论	19
第三章 橡胶草 <i>TKCPT1-4</i> 基因克隆及表达分析	21
3.1 材料	21
3.1.1 植物材料与培养条件	21

3.1.2 仪器与试剂	21
3.2 实验方法	21
3.2.1 橡胶草根部总 RNA 提取	21
3.2.2 橡胶草根部总 RNA 反转录	22
3.2.3 <i>TkCPT1-4</i> 基因克隆	22
3.2.4 <i>TkCPT1-4</i> 亚细胞定位载体构建及转化农杆菌	23
3.2.5 <i>TkCPT1-4</i> 亚细胞定位分析	25
3.2.6 <i>TkCPT1-4</i> 不同组织表达分析	25
3.3 结果分析	26
3.3.1 <i>TkCPT1-4</i> 基因克隆	26
3.3.2 <i>TkCPT1-4</i> 亚细胞定位分析	26
3.3.3 <i>TkCPT1-4</i> 不同组织表达分析	28
3.4 讨论	29
第四章 橡胶草 <i>TKCPT1-4</i> 参与天然橡胶生物合成的作用研究	31
4.1 材料	31
4.1.1 植物材料与培养条件	31
4.1.2 实验仪器与试剂	31
4.2 实验方法	32
4.2.1 <i>TkCPTL1</i> 基因克隆	32
4.2.2 酵母双杂载体构建	32
4.2.3 酵母双杂转化实验	33
4.2.4 双分子荧光互补载体构建	35
4.2.5 双分子荧光互补转化实验	35
4.3 结果分析	36
4.3.1 <i>TkCPTL1</i> 基因克隆	36
4.3.2 酵母双杂转化实验	36
4.3.3 双分子荧光互补转化实验	39
4.4 讨论	41
第五章 橡胶草和短角蒲公英产胶性能的差异分析	42
5.1 材料	42
5.1.1 植物材料与培养条件	42
5.1.2 实验仪器与试剂	42
5.2 实验方法	42
5.2.1 <i>TkCPT1-4</i> 基因时空表达分析	42

5.2.2 橡胶草天然橡胶含量测定	42
5.2.3 橡胶草胶乳中橡胶颗粒分析	43
5.2.4 <i>TbCPT1-4</i> 基因时空表达分析	43
5.2.5 短角蒲公英天然橡胶含量测定	43
5.2.6 短角蒲公英胶乳中橡胶颗粒分析	43
5.3 结果分析	44
5.3.1 <i>TkCPT1-4</i> 基因时空表达分析	44
5.3.2 橡胶草天然橡胶含量测定	45
5.3.3 橡胶草胶乳中橡胶颗粒分析	45
5.3.4 <i>TbCPT1-4</i> 时空表达分析	46
5.3.5 短角蒲公英天然橡胶含量测定	47
5.3.6 短角蒲公英胶乳中橡胶颗粒分析	47
5.4 讨论	49
第六章 结论与展望	51
6.1 结论	51
6.2 展望	51
参考文献	52
致 谢	60
作者简介	61

中英文符号缩略词表

英文缩写 Abbreviation	英文名 English Name	中文名 Chinese Name
CPT	<i>cis</i> -prenyltransferase	顺式异戊烯基转移酶
IPP	Isopentenyl pyrophosphate	异戊烯基焦磷酸
MVA	Mevalonate	甲羟戊酸
MEP	2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphate	2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸
Amp	Ampicilline	氨苄青霉素
Kan	Kanamycin	卡那霉素
Rif	Rifampicin	利福平
cDNA	Complementary DNA	互补 DNA
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
RNase	Ribonuclease	核糖核酸酶
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
qPCR	Quantitative real time polymerase chain reaction	实时定量聚合酶链式反应
bp	Base pair	碱基对

引 言

天然橡胶的主要成分是聚异戊二烯，它是由多个异戊二烯单体通过共价键连接而成的高分子链。天然橡胶具有良好的弹性、耐磨、耐腐蚀等性能，因此广泛应用于各个领域，如轮胎制造、工业制品、医疗用品等（汪恽翔，2008）。天然橡胶主要来自于巴西橡胶树（*Hevea brasiliensis*）的胶乳。巴西橡胶树是一种生长在热带地区的乔木，其树皮被切割后会流出白色的胶乳，胶乳中含有橡胶颗粒。马来西亚、印度尼西亚和泰国等东南亚地区是巴西橡胶树主要生长地，这些地区的气候和土壤条件使得橡胶树生长繁茂，成为全球天然橡胶的主要产地。但巴西橡胶树面临非常严重的问题（李国尧等，2014；叶露等，2014），如滥砍滥伐、疾病和害虫侵袭、不可持续的种植管理、市场竞争和价格波动以及生态环境破坏，这些问题使得巴西橡胶树面临着严重的生存和可持续发展的挑战（Rahimi, 2013; Tang et al., 2016; 曾霞等，2014）。而我国天然橡胶产业也面临这些问题，如生产成本上升、疾病和害虫侵袭、种植结构调整困难、技术水平不高、市场竞争压力以及环境问题等。这些问题使得中国天然橡胶产业面临着生产成本高涨、市场竞争加剧、技术创新不足等挑战，需要采取措施来提升产业的可持续发展能力（祁栋灵等，2013；李国尧等，2014；刘少等，2015）。根据国际橡胶研究组织（IRSG，<http://www.rubberstudy.org/welcome>）公布的数据，从2015年到2019年，全球天然橡胶消费量的年增长率从0.1%上升到8.9%，需要注意的是，2020年受到COVID-19疫情影响，全球经济放缓，导致天然橡胶的消费量略有下降。然而，由于全球对天然橡胶的需求稳定且持续增长，预计未来几年的天然橡胶消费量将继续增加。尽管世界上有2500多种橡胶生产植物，但全球天然橡胶需求还是仅由巴西橡胶树满足（Cherian et al., 2019; Hirata et al., 2014）。到目前为止，巴西橡胶树几乎是天然橡胶的唯一来源；但由于种植面积有限、疾病严重和工作要求繁重，橡胶产量的进一步增加受到了严重阻碍（Lin et al., 2018）。这促使人们致力寻找能替代巴西橡胶树的产胶植物。

然而在产胶植物里面，只有少数几种植物能够产生高分子质量的天然橡胶，如巴西橡胶树、橡胶草（*Taraxacum kok-saghyz*）、灰白银胶菊（*Parthenium argentatum*）、杜仲树（*Eucommia ulmoides*）、短角蒲公英（*Taraxacum brevicorniculatum*）等（Bhavitha et al., 2021; Cherian et al., 2019）。杜仲树胶乳含量少且提取成本高，灰白银胶菊会排挤本地植物生长，短角蒲公英胶乳含量少，而橡胶草因其具有较高的胶乳含量和较低的生产成本引起科研人员的广泛关注（杨超等，2021）。这些特点使得橡胶草成为一种具有很大潜力的橡胶替代品，可以更有效地满足橡胶需求。相较于传统的巴西橡胶树，种植橡胶草更加容易，并且其生长周期较短，使得橡胶的生产更加高效（Lin et al., 2018）。

此外，橡胶草的组培再生和遗传转化相对简单，这为基因层面的编辑提供了更多的可能性和机会。这些研究结果为橡胶草的进一步开发和利用提供了有力支持，为橡胶产业的可持续发展带来了新的希望。

天然橡胶是由异戊二烯单位——异戊烯基焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP)，在生物体内经过相应的酶催化而形成的长链顺式-聚异戊二烯(Amerik et al., 2018)。甲羟戊酸(Mevalonate, MVA)途径和 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸(2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP)途径是生物体内已知的两种合成 IPP 的途径。天然橡胶长链，即由超过 5000 个 IPP 单元的高分子量顺式-聚异戊二烯链(>106 kDa)组成。链伸长反应发生在橡胶颗粒上，橡胶颗粒位于乳管细胞的细胞液——胶乳中。这些橡胶颗粒由单层磷脂膜组成(Cornish, 1999; Cornish, 2001a)。橡胶颗粒中含量最丰富的蛋白质是小橡胶颗粒蛋白(Small rubber particle protein, SRPP)。短角蒲公英的 SRPP 亚型与橡胶颗粒的稳定性相关，由于它们与组成不饱和脂肪酸的磷脂之间具有亲和力，它们可以结合到颗粒膜上。SRPP 作为结构蛋白，在天然橡胶合成中起着至关重要的作用(Hillebrand et al., 2012; Laibach et al., 2018)。研究人员通过从短角蒲公英中分离出具有酶活性的橡胶颗粒，并掺入带有标记的 IPP，确认了这些颗粒中存在顺式异戊烯基转移酶(*cis*-prenyltransferases, CPT)活性(Post et al., 2012)。从短角蒲公英中鉴定出三种高度保守的 CPT, 命名为 TbCPT1、TbCPT2 和 TbCPT3, 发现它们主要在乳管中表达，与橡胶颗粒有关，而且这三种酶都能在酵母中产生顺式-聚异戊二烯长链(Schmidt et al., 2010a; Schmidt et al., 2010b)。使用 RNA 干扰(RNAi)技术来抑制短角蒲公英中的 *TbCPT1-3* 基因，研究人员证明了这些基因在植物中的关键作用。这种干扰抑制了高分子量天然橡胶的合成和规则橡胶颗粒的形成，同时导致胶乳中三萜含量的增加(Tetsuo et al., 1993; Akashi et al., 1994)以及根部主要贮藏碳水化合物菊糖的含量的增加(Wim et al., 2000; Schütz et al., 2010)。因此，CPT 是天然橡胶生物合成中的关键酶，研究其在天然橡胶合成中发挥的功能，对阐释清楚天然橡胶生物合成的作用机制和培育高产橡胶品种具有重要的意义。

本研究基于橡胶草全基因组筛选鉴定出 8 个橡胶草 *TkCPT* 家族基因，通过 qPCR 分析基因表达量、透射电子显微镜观察橡胶颗粒、酵母双杂和荧光双分子验证蛋白互作等方法研究 *TkCPT1*、*TkCPT2*、*TkCPT3* 和 *TkCPT4* 基因在橡胶合成中所发挥的作用，为培育优质高产的橡胶草种质资源提供理论依据。

第一章 文献综述

1.1 橡胶草

1.1.1 天然橡胶的概况

天然橡胶，也称为乳胶或聚异戊二烯，是从植物中提取的极具价值的资源之一，用途广泛。它被人类使用了几个世纪，其起源可以追溯到古代中美洲文明。天然橡胶的独特性能使其成为许多应用的理想材料（Zhang et al., 2018; Sethulekshmi et al., 2022）。首先，它具有很高的弹性，可以在受力后恢复原状，适用于需要弹性和拉伸能力的产品，如汽车轮胎、橡胶管和弹簧等。此外，天然橡胶还具有良好的抗拉强度和抗撕裂性，非常适合用于需要耐久性和抗磨损能力的应用，例如工业密封件和橡胶输送带。其次，天然橡胶在低温下仍能保持灵活性，这使其在寒冷气候条件下仍能发挥作用。特别是在汽车行业，天然橡胶作为密封圈和防滑材料广泛应用于寒冷地区的车辆，确保了安全性和可靠性。天然橡胶在生活中几乎无处不在。在医疗行业，天然橡胶用于制造手套、胶带和其他医疗器械，确保无菌和安全。在建筑业中，它用于制造防水材料和隔音垫等。在纺织业中，天然橡胶用于制造弹性纤维和伸展性布料。此外，天然橡胶还被广泛用于各种消费品，如橡皮筋、橡皮擦和胶水等。在国防科技领域，天然橡胶的重要性更加突出。它被广泛用于制造火箭、人造卫星、坦克和飞机等高科技装备（汪恽翔，2008）。在这些关键应用中，天然橡胶承担着抗震、防护和密封等关键作用，确保了装备的可靠性和安全性。因此，天然橡胶在世界经济，尤其是国防科技的发展中具有重要的意义。

巴西橡胶树是天然橡胶的主要来源，主要生长在亚热带和热带地区，如东南亚地区的马来西亚、印度尼西亚和泰国等，那里的气候有利于橡胶生产。中国也有种植橡胶树的地区，如云南、海南、广东、广西和福建等省份。但巴西橡胶树也面临非常严重的问题（李国尧等，2014；叶露等，2014；Hirata et al., 2014）：（1）疾病和害虫侵袭：巴西橡胶树容易受到各种疾病和害虫的侵袭，如橡胶树白背飞虱和橡胶树锈病等，这些病虫害对橡胶树造成严重的损害，影响橡胶产量和质量；（2）气候变化：全球气候变暖会导致降雨模式的改变和干旱的增加，这对橡胶树的生长和橡胶产量都有负面影响，气候变化还可能导致橡胶树的疾病和虫害增加，对橡胶树的健康和生存造成威胁；（3）面临滥砍滥伐：为了满足市场对橡胶不断增长的需求，胶农过度割胶，导致橡胶树资源的过度消耗和丧失。这些问题使得巴西橡胶树面临着严重的生存和可持续发展的挑战。

我国橡胶产业正处在这种危机当中，主要问题包括（祁栋灵等，2013；金华斌等，