

巴西橡胶树*HbSUT3*和*HbSUT5* mRNA在嫩茎和中脉中的原位杂交分析

周斌辉^{1,2}, 秦云霞², 周率², 唐朝荣^{2*}

(1. 海南大学农学院, 海口 570288; 2. 中国热带农业科学院橡胶研究所, 海南 儋州 571737)

摘要: 为研究巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)中 *HbSUT3* 和 *HbSUT5* 基因的功能, 采用地高辛标记的 RNA 探针与橡胶树嫩茎和中脉两种组织切片分别进行 RNA 原位杂交, 对这 2 种 *SUT* 基因在组织中的表达区域与表达特点进行了分析。结果表明, 在橡胶树嫩茎中, 两个 *SUT* 基因主要在树皮的韧皮部和皮层细胞中表达; 在中脉中, 两个 *SUT* 基因在除木质部导管系统外的其它部位均有表达; *HbSUT3* 基因在嫩茎和中脉中的表达量相近, 而 *HbSUT5* 基因在嫩茎中的表达量远高于中脉。这些揭示 *HbSUT3* 和 *HbSUT5* 基因可能广泛参与韧皮部装载、蔗糖运输与库细胞供给等活动, 同时两个 *SUT* 基因也存在功能分化。

关键词: 巴西橡胶树; *HbSUT3*; *HbSUT5*; RNA 原位杂交; 表达模式

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2013.03.010

In situ Hybridization Analysis of *HbSUT3* and *HbSUT5* mRNAs in Young Stems and Midribs of *Hevea brasiliensis*

ZHOU Bin-hui^{1,2}, QIN Yun-xia², ZHOU Lü², TANG Chao-rong^{2*}

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China)

Abstract: In para rubber tree (*Hevea brasiliensis*), *HbSUT3* plays the role of key sucrose transporter (SUT) in sucrose loading into laticifers and rubber productivity, whereas *HbSUT5* is putatively involved in the regulation of sucrose loading into laticifers. To further investigate the functions of the two *SUT* genes, digoxigenin-labeled cRNA probes were prepared, and used by *in situ* hybridization to detect the distribution patterns of *HbSUT3* and *HbSUT5* mRNAs in tissues of rubber young stems and midribs. The results showed that the two *SUT* genes were mainly expressed in phloem and cortex of barks in young stems, whereas they were expressed in all tissues of midribs except for xylem. The expressions of *HbSUT3* were similar between young stems and midribs, while the expression of *HbSUT5* in young stems was much higher than that in midribs. It was suggested that *HbSUT3* and *HbSUT5* could involve in activities, such as phloem loading, sucrose transportation and supply to sink cells, and they also had functional differentiation.

Key words: *Hevea brasiliensis*; *HbSUT3*; *HbSUT5*; RNA *in situ* hybridization; Expression pattern

蔗糖作为大多数高等植物光合作用的主要产物, 为植物提供了能量来源和生物大分子合成的原

料^[1]。蔗糖自身溶解度高, 粘度低, 非还原性的理化性质使其能够经过韧皮部的长距离运输, 从源到

收稿日期: 2012-11-14

接受日期: 2013-02-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(30760114); 中国热带农业科学院橡胶研究所基本科研业务费项目(1630022011002); 国家天然橡胶产业技术体系育种项目(CRAS-34)资助

作者简介: 周斌辉(1986~), 男, 硕士研究生。E-mail: zhoubinhui@126.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mails: chaorongtang@126.com; crtang0527@hotmail.com

达库,为不同的组织所利用^[2]。蔗糖可以通过共质体途径和质外体途径两种方式进出韧皮部筛管分子。共质体途径主要是通过胞间连丝装卸,蔗糖无需经过跨膜过程。而质外体途径的运输中,蔗糖主要依赖于质膜上的蔗糖转运蛋白(SUT)的主动运输装卸,因此 SUT 在蔗糖转运过程中起着极为重要的作用^[3]。在巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)中,蔗糖是乳管系统进行新陈代谢、维持正常生理功能,尤其是合成天然橡胶的所需原料^[4],在乳管中经过一系列酶促反应后合成橡胶,因此蔗糖与橡胶树的产胶能力密切相关。但是,由于乳管与周围薄壁细胞之间缺乏胞间连丝介导的共质体运输途径,因此胶乳合成所需蔗糖必须依赖于 SUT 基因介导的跨膜转运。阳江华等^[5]从巴西橡胶树中克隆了 6 个 SUT 基因,分别命名为 *HbSUT1*、*HbSUT2A*、*HbSUT2B*、*HbSUT3*、*HbSUT4* 和 *HbSUT5*。国内外的相关基因表达与功能分析研究表明, *HbSUT3* (= *HbSUT1B*) 基因是橡胶树中决定乳管蔗糖供给的关键 SUT 基因^[6-7],而 *HbSUT5* 基因可能参与对乳管蔗糖供给能力的调控^[8-9]。

RNA 原位杂交技术具有安全、稳定、实验周期短的特点,在动植物基因的组织、细胞表达分析中应用广泛,是基因功能解析的重要技术之一。该技术是利用非放射性的生物素(BIO)和地高辛(DIG)或放射性的同位素(³²P)标记单链反义 RNA 探针,与组织或细胞中特定基因的 mRNA 发生杂交,通过反义探针定位的分布检测特定基因的表达区域^[10]。本文利用 RNA 原位杂交技术分析 *HbSUT3* 和 *HbSUT5* 基因的 mRNA 在橡胶树嫩茎和主中脉两种组织中的表达区域及表达特点,为进一步研究这些基因的功能提供科学参考。

1 材料和方法

1.1 材料

巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)品系为‘热研 7-33-97’,定植于中国热带农业科学院橡胶研究所的苗圃,于 2011 年 4 月采集巴西橡胶树新生的嫩茎和叶片两种幼嫩组织。pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司, *Taq* DNA 聚合酶和 DNA Marker 购自 TIANGEN 公司,大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH-5 α 菌株和橡胶树胶乳 cDNA 为本实验室保存。DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)购自罗氏公司,其

他试剂购自 Sigma 公司。引物合成和 DNA 测序均由上海 Invitrogen 贸易有限公司负责完成。

1.2 材料处理

样品采集 用剪刀剪取巴西橡胶树新鲜的嫩茎和叶片,用新刀片将嫩茎横切成 1 cm 左右的小段;用刀片沿着叶片中脉两边 5 mm 处纵切,将长条状的中脉切成 1 cm 左右的小段,用纸擦净样品流出的胶乳。

切片制备 以预冷的 4% 多聚甲醛固定材料, 4℃ 过夜(12 ~ 16 h)。利用常规方法对材料进行脱水、透明、浸蜡及包埋处理^[11-14]。切片用 DEPC-H₂O 在 45℃ 下展片、贴片,于 42℃ 烘烤过夜^[15-16]。

标记探针的制备 采用 DNAMAN 软件分析 *HbSUT3* 和 *HbSUT5* 基因的 cDNA 全长序列,选择同源性低的序列作为模板设计引物,用于探针片段的扩增。*HbSUT3* 和 *HbSUT5* 基因探针扩增所用的引物对分别为 *in situ* P3-F (5'-CAAATCCGAC-CCAACTATGTACAAAACACCTCT-3') 和 *in situ* P3-R (5'-TCTAAGCTTGCTTGAAGCGGGTGGT-GGAGGA-3'), *in situ* P5-F (5'-ACGGGTGGAA-ACCAAAGTGAGT-3') 和 *in situ* P5-R (5'-GGTGGT-CTAGCCCTGGCTCGGT-3')。以橡胶树胶乳 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,将扩增产物纯化回收后克隆到 pGEM-T Easy 载体上,送公司测序验证后提取重组质粒 pGEM-SUT3 和 pGEM-SUT5。

分别以构建的 pGEM-SUT3 和 pGEM-SUT5 重组质粒为模板,用载体特异性引物 RV-M (5'-GAGCGGATAACAATTTACACAGG-3') 和 M13-47 (5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3') 进行 PCR 扩增,获得包含 SP6 和 T7 RNA 聚合酶识别启动子的探针模板片段。扩增产物用酚氯仿抽提、异丙醇和醋酸钠冰浴沉淀回收^[17],取 1 μ L 回收产物进行凝胶电泳来检测模板浓度。

RNA 探针制备 参照 Roche 公司地高辛标记试剂盒的说明书,具体操作步骤如下:以地高辛标记的 NTP 为原料,分别用 T7 RNA 聚合酶及 SP6 RNA 聚合酶转录出两条互补的双向探针,其中与 mRNA 互补的为反义探针。标记体系为:2 μ L 10 $\times$ NTP;2 μ L 10 $\times$ 转录 Buffer;1 μ L RNA 酶抑制剂 (20 U);2 μ L RNA 聚合酶(SP6 或 T7);2 μ L DNA 探针模板片段,补水至 20 μ L 后混匀。37℃ 温育 2 ~ 3 h 后加 2 μ L DNase I 于 37℃ 水浴 30 min 消化模板

DNA 片段。加 2 μL 0.5 mol L^{-1} EDTA (pH 8.0) 终止反应, 取探针和 RNA Marker (试剂盒中自带) 各 1 μL 进行 1.5% TBE 凝胶电泳检测浓度。

1.3 RNA 原位杂交

预杂交 将干燥的石蜡切片在二甲苯中脱蜡 2 次, 每次 30 min, 在二甲苯: 乙醇(1:1)、100%、95%、70%、30% 乙醇、DEPC- H_2O 中复水, 每级 2 min。0.2 mol L^{-1} HCl 中处理 20 min 后在 $2 \times \text{SSC}$ 中 70 $^\circ\text{C}$ 孵育 15 ~ 20 min, 用蛋白酶 K (终浓度为 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) 于 37 $^\circ\text{C}$ 消化 30 min, 4% 多聚甲醛再固定 10 min。依次在 100 mL 的 $3 \times \text{PBS}$ 、100 mL 的 $1 \times \text{PBS}$ 、500 mL 的 0.1 mol L^{-1} 三乙醇胺(pH 8.1) 中室温孵育 5 min, 在三乙醇胺中加入 1.24 mL 乙酸酐, 混匀后再孵育 5 min。重复 1 次后室温用 500 mL $2 \times \text{SSC}$ 清洗载玻片 2 min。再经 30%、50%、70%、95%、100% 乙醇梯度脱水, 每次 2 min, 室温晾干。每张图片滴加 100 μL 预杂交缓冲液(不加探针), 45 $^\circ\text{C}$ 避光温育 2 h^[18]。

杂交 去除杂交缓冲液, 每张图片取 5 μL 探针用甲酰胺稀释至 30 μL , 70 $^\circ\text{C}$ 变性 10 min 后立即冰浴。加入 30 μL $2 \times$ 杂交缓冲液后将混合液滴加在载玻片上, 轻轻地盖上杂交片。置于湿盒内于 60 $^\circ\text{C}$ 杂交过夜(12 ~ 16 h)^[19]。

杂交后处理和封阻反应 杂交后的载玻片于 $2 \times \text{SSC}$ 中清洗去除杂交片。置于含有 50% 甲酰胺的 $2 \times \text{SSC}$ 中漂洗(50 $^\circ\text{C}$, 20 min, 2 次) $\rightarrow 2 \times$ 马来酸缓冲液室温清洗 15 min $\rightarrow 0.5 \times$ 马来酸清洗缓冲液 65 $^\circ\text{C}$ 清洗 1 h $\rightarrow 1\%$ 封闭液室温封闭 1 h $\rightarrow$ 把载玻片放在 0.1% 封闭液中室温清洗 5 min。用 0.1% 封闭液按 1:500 稀释 Anti-Digoxigenin-AP, 每张载玻片滴加 60 μL 抗体混合液, 轻轻盖上杂交片。置于湿盒中室温孵育 2 h 或 4 $^\circ\text{C}$ 12 h(过夜)^[20-21]。

显色反应 用 0.1% 封闭液室温清洗 15 min 去除杂交片。换新的 0.1% 封闭液室温清洗 1 h, 重复 3 次。加显色缓冲液(Tris-HCl 100 mmol L^{-1} ; NaCl 150 mmol L^{-1} ; MgCl_2 50 mmol L^{-1} ; 10% PVA; pH 9.5) 室温预处理 15 min。在 1 mL 显色缓冲液中加 40 μL NBT/BCIP 混合液, 混匀后每张图片滴加 60 μL 显色液, 置于湿盒中室温避光孵育 3 h 或更久直到显色完成。然后用 0.5 mol L^{-1} EDTA 终止显色反应, 再用 ddH_2O 清洗去除杂交片^[22-23]。

封片及观察 将切片置于灭菌的双蒸水中

清洗干净后用 50% 甘油封片。在 Leica 光学显微镜下进行观察和拍照, 组织切片内的蓝紫色沉淀为阳性反应。

2 结果和分析

2.1 DNA 探针模板的扩增

以巴西橡胶树胶乳 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增得到 *HbSUT3* 和 *HbSUT5* 两个 *SUT* 基因的 DNA 探针片段(图 1: A,B)。将该探针片段克隆到 pGEM-T Easy 载体上, 转化大肠杆菌感受态细胞 DH-5 α , 通过测序确定携带正确插入片段的阳性克隆, 并提取重组质粒 pGEM-SUT3 和 pGEM-SUT5。以这两个质粒为模板, 分别用载体引物 RV-M 和 M13-47 进行扩增, 得到两端分别含有 T7 和 SP6 启动子序列的探针模板 *HbSUT3*-T 和 *HbSUT5*-T, 取 1 μL 回收产物进行凝胶电泳检测(图 1: C), 电泳图中有两条单一条带, 表明回收产物具有较高的纯度, 符合原位杂交探针制备的要求。

2.2 RNA 探针的制备

按照 DIG RNA Labeling Kit 说明书配制探针转录体系, 于 37 $^\circ\text{C}$ 反应 3 h 后加 2 μL DNase I 消化 DNA 探针片段 30 min, 再加入 2 μL 0.5 mol L^{-1} EDTA (pH 8.0) 终止反应。用甲酰胺稀释 5 倍后取探针 2.5 μL 与 RNA Marker 1 μL 用 1.5% TBE 凝胶电泳检测(图 1: D), 其中 RNA Marker 浓度为 100 ng μL^{-1} , 根据亮度对比推测目的探针浓度约为 40 ng μL^{-1} 。从图 1: D 可见, RNA 探针的电泳条带清晰, 无弥散现象, 表明制备的探针没有被降解, 可以进行后续实验。

2.3 *HbSUT3* 和 *HbSUT5* 在嫩茎和中脉中的表达

用反义 RNA 探针与橡胶树两种组织切片进行杂交, 结果表明原位杂交质量较好, 细胞轮廓清楚, 有明显的阳性信号——紫红色或蓝紫色沉淀物, 而且在组织中的不同部位的细胞中信号存在明显差异; 而正义 RNA 探针与切片杂交后组织细胞中没有出现明显的紫红色或蓝紫色沉淀物, 只有一些较弱的背景信号。进一步分析表明, 在嫩茎中两个 *SUT* 基因的转录产物主要分布于树皮中, 特别是树皮的韧皮部和皮层细胞, 而其他部位包括木质部中都没有明显的阳性信号(图 2: A,C); 在中脉中, 两个

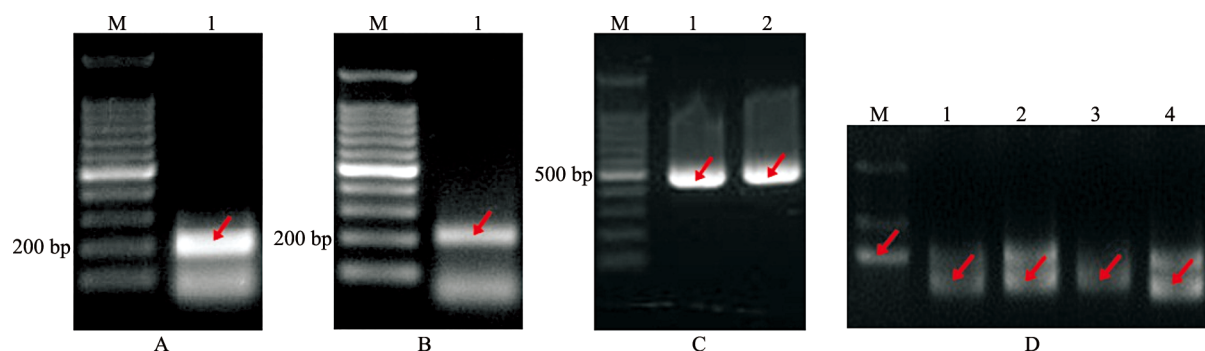


图1 原位杂交探针的制备。A. *HbSUT3* 基因探针模板的扩增; B. *HbSUT5* 基因探针模板的扩增; C. 带 T7 和 SP6 启动子序列的 *HbSUT3* 和 *HbSUT5* 探针模板的扩增。1. *HbSUT3*; 2. *HbSUT5*; A ~ C: M = 100 bp DNA Ladder; D. RNA 探针检测。1. *HbSUT3* 的正义 RNA 探针; 2. *HbSUT3* 反义 RNA 探针; 3. *HbSUT5* 的正义 RNA 探针; 4. *HbSUT5* 的反义 RNA 探针; M 为 RNA 分子量标准, 箭头示目标扩增条带。

Fig. 1 Preparation of probes for *in situ* hybridization. A. Amplification of *HbSUT3* probe template; B. Amplification of *HbSUT5* probe template; C. Amplification of *HbSUT3* (1) and *HbSUT5* (2) probe templates with T7 and SP6 promoter sequence; D. Detection of RNA probes. 1, 2. Sense and antisense probes of *HbSUT3*, respectively; 3, 4. Sense and antisense probes of *HbSUT5*, respectively. M show 100 bp DNA ladder in A – C, and RNA standard in D. The arrowheads in A – C indicate target bands.

SUT 基因表达的部位比较广泛,除木质部导管系统外的其它部位均有表达(图 2: I,K)。此外, *HbSUT3* 基因在嫩茎中的杂交信号较强(图 2: E),在中脉中的信号相对较弱且阴性对照背景较深(图 2: M,N);而 *HbSUT5* 基因在嫩茎和中脉中的表达量相差不大,嫩茎(图 2: G)中的杂交信号比中脉(图 2: O)中的略强,同时中脉的阴性对照(图 2: P)的背景比较深。

3 讨论

研究基因的表达模式是探索基因功能的一个重要环节, RT-PCR 技术可以在分子水平检测特定基因在不同组织和不同时期的表达情况,但是若要确定基因在显微或亚显微水平上的时空表达模式, RNA 原位杂交技术是一种非常重要和有效的手段。该技术经常被用于检测动物或植物某种组织中特定基因 mRNA 的分布状况^[24]。黄德宝^[8]利用半定量 RT-PCR 分析了 6 个 *SUT* 基因的组织表达特性,认为 *HbSUT3* 和 *HbSUT5* 是巴西橡胶树树皮中表达丰度较高的两个 *SUT* 基因,而本文采用 RNA 原位杂交技术进一步研究了它们在橡胶树嫩茎和中脉两种组织中的表达区域及表达量。结果表明(图 2),在嫩茎中两个 *SUT* 基因主要在韧皮部和皮层细胞中表达,而在中脉中两个 *SUT* 基因的表达部位比较广泛,除木质部导管系统外均有表达;同时,在嫩茎组织中 *HbSUT3* 基因的表达量比 *HbSUT5* 基因高。此外,就同一种 *SUT* 基因在不同组织中表达的比较来看, *HbSUT5* 基因在嫩茎中的表达量高

于中脉,主要在嫩茎中表达;而 *HbSUT3* 基因在嫩茎中的表达量比中脉略高。这些结果,不仅与已有研究^[8]结果相符,同时进一步明确了两个 *SUT* 基因在组织中的表达区域。*HbSUT3* 和 *HbSUT5* 在巴西橡胶树嫩茎和中脉组织的多个部位细胞中均有表达信号,反映它们的生理功能可能具有多样性,可能广泛参与巴西橡胶树中蔗糖的韧皮部装载、运输与库细胞(例如乳管细胞)供给等多种活动,这在其它植物 *SUT* 基因的研究中亦有类似报道^[4]。最近, Dusotoit-Coucaud 等^[6]报道 *SUT1* 类基因(*HbSUT1* 和 *HbSUT3*)主要在巴西橡胶树树皮的软皮中表达,而在木质部无表达信号,这也与本文研究结果相似。

在正常割胶的巴西橡胶树中, Tang 等^[7]与 Dusotoit-Coucaud 等^[25]均证明 *HbSUT3* 基因是决定采胶部位——茎干树皮中乳管细胞蔗糖供给的关键 *SUT* 基因。本研究结果表明(图 2),在橡胶树嫩茎的韧皮部中 *HbSUT3* 基因的表达信号比 *HbSUT5* 强,且嫩茎中的初生乳管细胞正是分布在韧皮部中^[26],推测它们共同参与嫩茎中初生乳管细胞的发育与产胶调控,同时进一步证明 *HbSUT3* 基因是乳管细胞蔗糖供给的关键基因。

割胶明显影响采胶部位树皮的解剖结构,特别是影响乳管的分化和发育,从而显著促进产胶与排胶^[27],进一步利用 RNA 原位杂交技术分析正常割胶树采胶部位树皮中这两个 *SUT* 基因的表达区域与表达特点,有助于深入研究相应 *SUT* 基因在胶乳再生调控中的功能,以及对橡胶树生产调控的应答特点,这还有待于进一步的研究。

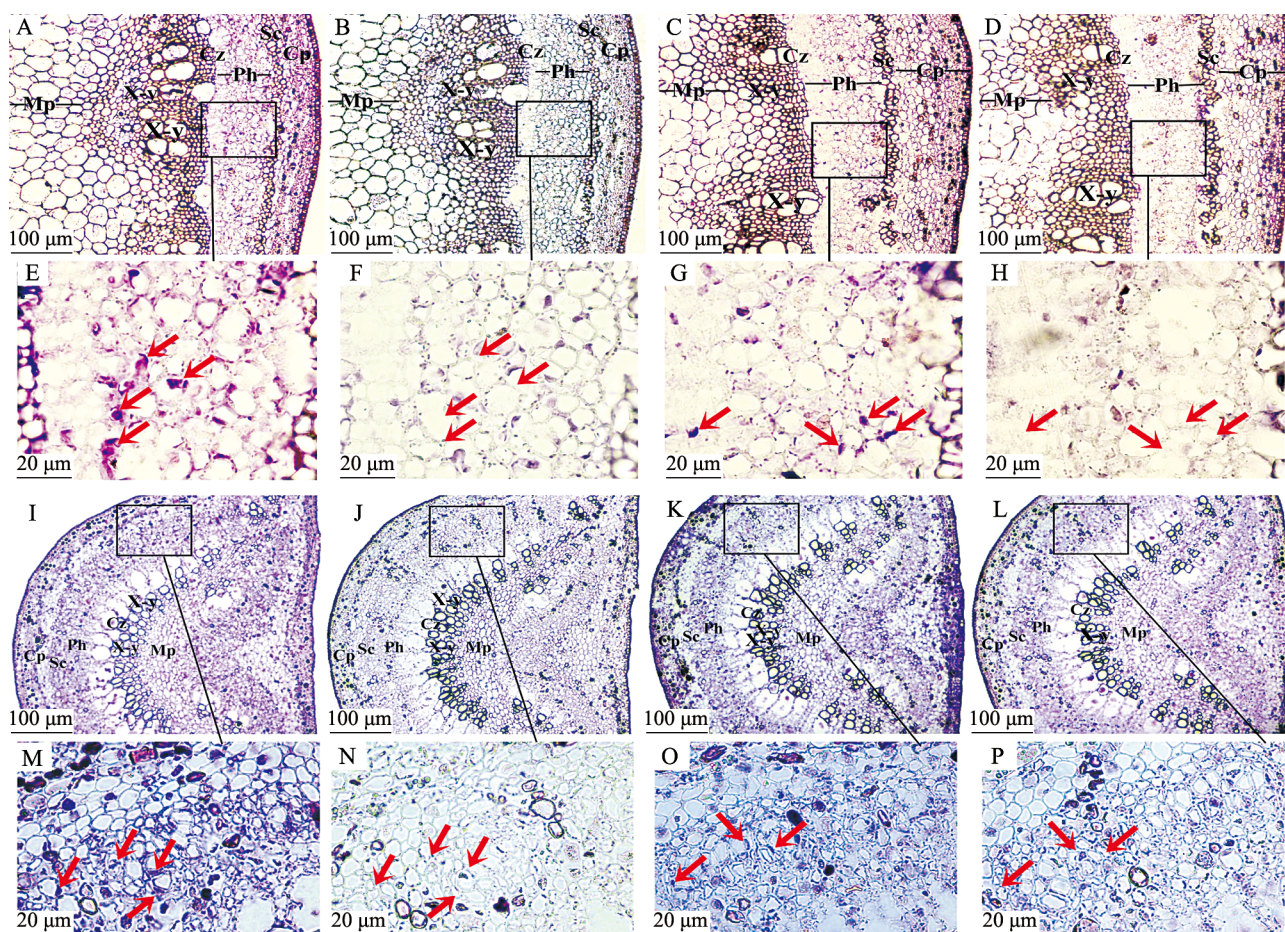


图2 *HbSUT3* 和 *HbSUT5* 基因转录产物在橡胶树嫩茎和中脉中的原位杂交。嫩茎(A, B, C, D, E, F, G, H)和中脉(I, J, K, L, M, N, O, P)的横切片分别用反义探针(*HbSUT3* 基因, A, E, I, M; *HbSUT5* 基因, C, G, K, O)和正义探针(*HbSUT3* 基因, B, F, J, N; *HbSUT5* 基因, D, H, L, P)杂交。E, F, G, H, M, N, O, P 分别是 A, B, C, D, I, J, K, L 中黑色方框部分的放大。E, G, M, O 中箭头所指是反义探针杂交呈现的部分阳性信号位置, 呈现蓝紫色沉淀; F, H, N, P 中箭头所指是与阳性信号相同部位的正义探针杂交结果。Cp. 皮层; Cz. 形成层; Mp. 髓状组织; Ph. 韧皮部; Sc. 厚壁组织; X-y. 木质部。探针浓度为 $3 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ 。

Fig. 2 *In situ* hybridization (ISH) of *HbSUT3* and *HbSUT5* transcripts in young rubber stem and midrib. Transversal sections (young stem: A, B, C, D, E, F, G, H; midrib: I, J, K, L, M, N, O, P) were hybridized with antisense (*HbSUT3*, A, E, I, M; *HbSUT5*, C, G, K, O) or sense (*HbSUT3*, B, F, J, N; *HbSUT5*, D, H, L, P) probes. Transcripts of *HbSUT3* and *HbSUT5* are presented blue-purple precipitate. The images of E, F, G, H, M, N, O and P magnified rectangle regions in images of A, B, C, D, I, J, K, and L, respectively. Sense probe control was used to indicate unspecific background signaling. Cp. Cortical parenchyma; Cz. Cambium zone; Mp. Medullary parenchyma; Ph. Phloem; Sc. Sclerenchyma; X-y. Xylem vessel. The red arrowheads indicate the positive (E, G, M, O) and negative (F, H, N, P) signal of ISH. The probe concentration was $3 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

致谢 感谢中国科学院遗传与发育生物学研究所周奕华研究员在实验过程中给予的技术指导。

参考文献

- [1] Smeekens S. Sugar-induced signal transduction in plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2000, 51: 49–81.
- [2] Bai X M, Zhang L J, Wu X D, et al. Sucrose transporters in plants [J]. *Plant Physiol Commun*, 2006, 42(6): 1195–1202.
白雪梅, 张立军, 吴晓丹, 等. 植物蔗糖转运蛋白 [J]. *植物生理学通讯*, 2006, 42(6): 1195–1202.
- [3] Williams L E, Lemoine R, Sauer N. Sugar transporters in higher plants: A diversity of roles and complex regulation [J]. *Trends Plant Sci*, 2000, 5(7): 283–290.
- [4] Qi J Y, Yang J H, Tang C R. Sucrose transporter genes and their functions in plants [J]. *Chin Bull Bot*, 2007, 24(4): 532–543.
戚继艳, 阳江华, 唐朝荣. 植物蔗糖转运蛋白的基因与功能 [J]. *植物学通报*, 2007, 24(4): 532–543.
- [5] Yang J H, Huang D B, Liu S J, et al. Molecular cloning and sequence analysis of six sucrose transporter genes from *Hevea brasiliensis* (para rubber tree) [J]. *Chin J Trop Crops*, 2007, 28(4): 32–38.
阳江华, 黄德宝, 刘术金, 等. 巴西橡胶树6个蔗糖转运蛋白基因的克隆与序列分析 [J]. *热带作物学报*, 2007, 28(4): 32–38.

- [6] Dusotoit-Coucaud A, Brunel N, Kongsawadworakul P, et al. Sucrose importation into laticifers of *Hevea brasiliensis*, in relation to ethylene stimulation of latex production [J]. *Ann Bot*, 2009, 104(4): 635–647.
- [7] Tang C R, Huang D B, Yang J H, et al. The sucrose transporter *HbSUT3* plays an active role in sucrose loading to laticifer and rubber productivity in exploited trees of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree) [J]. *Plant Cell Environ*, 2010, 33(10): 1708–1720.
- [8] Huang D B. Molecular cloning and expression analysis of sucrose transporter genes from *Hevea brasiliensis* (para rubber tree) [D]. Hainan: Hainan University, 2009: 1–6.
黄德宝. 巴西橡胶树蔗糖转运蛋白基因的克隆和表达分析 [D]. 海南: 海南大学, 2009: 1–6.
- [9] Li H P. Expression analysis of sucrose transporter genes *HbSUT5* from *Hevea brasiliensis* (para rubber tree) [D]. Hainan: Hainan University, 2010: 1–6.
李和平. 巴西橡胶树蔗糖转运蛋白基因 *HbSUT5* 的表达特性研究 [D]. 海南: 海南大学, 2010: 1–6.
- [10] Lin D H, Ye W D, Tang Q H. The application of *in situ* hybridization technique with RNA probes [J]. *Lett Biotechnol*, 2007, 18(4): 650–652.
林大河, 叶文铎, 唐清煌. RNA原位杂交技术的一些应用技巧 [J]. *生物技术通讯*, 2007, 18(4): 650–652.
- [11] Hou C C, Xu S. Analysis on the key influence factors of paraffin section's quality [J]. *Chin Agri Sci Bull*, 2009, 25(23): 94–98.
侯春春, 徐水. 浅析影响石蜡切片质量的关键因素 [J]. *中国农学通报*, 2009, 25(23): 94–98.
- [12] Yang J P. Improvement of traditional paraffin section preparation methods [J]. *J Biol*, 2006, 23(1): 45–46.
杨捷频. 常规石蜡切片方法的改良 [J]. *生物学杂志*, 2006, 23(1): 45–46.
- [13] Lu J, Wang L. Solve the problems in paraffin section production [J]. *Preclini Med Edu*, 2001, 3(3): 263.
路健, 王伶. 石蜡切片制作中的问题与解决 [J]. *基础医学教育*, 2001, 3(3): 263.
- [14] Ruan J B, He H B, Tian S X. The discussion of fast paraffin section [J]. *J Pract Med*, 1994, 10(6): 589.
阮建波, 何洪标, 田宋先. 快速石蜡切片的探讨 [J]. *实用医学杂志*, 1994, 10(6): 589.
- [15] Zhang Y Y. The problems and improvement measures in paraffin section production [J]. *Chin Sci Techn Infor*, 2007(6): 91–92.
张玉英. 制作石蜡切片易出现的问题及改进措施 [J]. *中国科技信息*, 2007(6): 91–92.
- [16] Xu Y Y, Chong K, Xu Z H, et al. The practical technique of *in situ* hybridization with RNA probe [J]. *Chin Bull Bot*, 2002, 10(2): 234–238.
徐云远, 种康, 许智宏, 等. RNA原位杂交实用技术 [J]. *植物学通报*, 2002, 19(2): 234–238.
- [17] Luo L T, Wang J, Yao Q, et al. An effective method: Extracting short fragment products of PCR [J]. *Biotechnology*, 2006, 16(3): 47–48.
罗立廷, 王珏, 姚琴, 等. 一种有效回收短片段PCR产物的方法 [J]. *生物技术*, 2006, 16(3): 47–48.
- [18] Luo J M, Liu Z Q, Liu J S, et al. Distribution pattern of *GPRC6A* mRNA in mouse tissue by *in situ* hybridization [J]. *J C South Univ (Med Sci)*, 2010, 35(1): 1–10.
- [19] Tanimoto E Y, Rost T L. Non-radioactive *in situ* RNA hybridization using digoxigenin and its application for co-localization studies using radioactive probes [M]// Bryant J A. *Methods in Plant Biochemistry*, Volume 10: Molecular Biology. London: Academic Press, 1993: 141–158.
- [20] Li M Y, Zhang L, Bao H J, et al. ISH detection of androgen receptor mRNA in spleen cells of *Pelodiscus sinensis* [J]. *J Fish Sci Chin*, 2008, 15(2): 337–341.
李梅英, 张莉, 包慧君, 等. 中华鳖脾脏雄激素受体mRNA的原位杂交检测 [J]. *中国水产科学*, 2008, 15(2): 337–341.
- [21] Sun H B, Ding X Y, Song Q B. RNA *in situ* hybridization using digoxigenin labeled probes [J]. *Chin J Cell Biol*, 1993, 15(1): 42–44.
孙慧斌, 丁小燕, 宋秋宝. 以地戈辛标记反义RNA为探针的组织原位杂交 [J]. *细胞生物学杂志*, 1993, 15(1): 42–44.
- [22] Block M D, Debrouwer D. RNA-RNA *in situ* hybridization using digoxigenin-labeled probes: The use of high-molecular-weight polyvinyl alcohol in the alkaline phosphatase indoxyl-nitroblue tetrazolium reaction [J]. *Anal Biochem*, 1993, 215(1): 86–89.
- [23] Zhang J L. Establishing of *in situ* hybridization method for the expression of dentin phosphoprotein mRNA [J]. *J Clin Stomatol*, 2007, 23(10): 598–600.
张敬雷. 牙本质磷蛋白mRNA原位杂交方法的建立 [J]. *临床口腔医学杂志*, 2007, 23(10): 598–600.
- [24] Liu H M, Liang W H, Bi J J. *In situ* hybridization analysis of two rice *OsRhoGDI*s genes in young panicle [J]. *J Henan Agri Sci*, 2009(12): 22–25.
刘洪梅, 梁卫红, 毕佳佳. 2种水稻 *OsRhoGDI*s 基因在幼穗组织中的原位杂交分析 [J]. *河南农业科学*, 2009(12): 22–25.
- [25] Dusotoit-Coucaud A, Kongsawadworakul P, Maurousset L, et al. Ethylene stimulation of latex yield depends on the expression of a sucrose transporter (*HbSUT1B*) in rubber tree (*Hevea brasiliensis*) [J]. *Tree Physiol*, 2010, 30(12): 1586–1598.
- [26] Hao B Z, Wu J L. Laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis*: Induction by exogenous jasmonic acid and linolenic acid [J]. *Ann Bot*, 2000, 85(1): 37–43.
- [27] d'Auzac J, Jacob J L, Prévôt J C, et al. The regulation of *cis*-polyisoprene production (natural rubber) from *Hevea brasiliensis* [C]// Pandalai S G. *Recent Research Developments in Plant Physiology*, Vol. 1. Trivandrum: Research Singpost, 1997: 273–332.