

文章编号: 1674 - 7054(2018) 03 - 0302 - 10

## 巴西橡胶树 *HbGSK1* 的基因克隆与表达分析

杨署光, 吴绍华, 陈月异, 李言, 张世鑫, 史敏晶, 田维敏

(中国热带农业科学院 橡胶研究所/农业部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室/  
省部共建国家重点实验室培育基地/海南省热带作物栽培生理学重点实验室, 海南 儋州 571737)

**摘要:** 采用 RACE 和 RT-PCR 技术, 从橡胶树 CATAS7-33-97 的胶乳 cDNA 中扩增到 1 条全长 cDNA, 共 1 506 bp, 包含 1 230 bp 开放阅读框, 编码 409 个氨基酸, 含有特征性的 STKc\_GSK3 和 S\_TKc 结构域, 命名为 *HbGSK1* (GenBank: JN835185.1), 其编码蛋白分子量为 46.35 kD, 理论等电点为 8.69。qPCR 分析结果表明: 机械伤害上调巴西橡胶树胶乳中 *HbGSK1* 的基因表达; 首次割胶胶乳中 *HbGSK1* 基因的表达水平下调, 而第 2 次割胶上调, 然后恢复到未处理的对照水平; 排胶对胶乳中 *HbGSK1* 基因表达的效应大于机械伤害的效应; 胶乳中 *HbGSK1* 基因的表达受生物钟调节。伤害和割胶过程中, 胶乳中 *HbGSK1* 基因转录水平的变化表明, *HbGSK1* 蛋白参与橡胶树的非生物胁迫响应。

**关键词:** 巴西橡胶树; *HbGSK1*; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: Q 786 文献标志码: A DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2018.03.006

GSK3(糖原合成酶激酶 3, Glycogen synthase kinase 3 /SHAGGY-like kinases) 最早从动物胰岛素途径中鉴定出来, 是 1 个丝氨酸/苏氨酸激酶, 磷酸化糖原合成酶, 糖原合成酶负责糖原合成的最后一步<sup>[1]</sup>。植物 GSK3s 是 1 个多基因家族。1993 年, Pay 等<sup>[2]</sup> 从紫花苜蓿中分离到第 1 个植物 GSK3 基因。目前, 已在拟南芥<sup>[3-5]</sup>、水稻<sup>[6]</sup>、小麦<sup>[7]</sup>、大豆<sup>[8]</sup> 和玉米<sup>[9]</sup> 等中克隆到 GSK3 基因, 拟南芥有 10 个<sup>[10-11]</sup>, 水稻有 9 个<sup>[11]</sup> GSK3s 基因成员。在油菜素内酯 (Brassinosteroid, BR) 信号途径中, 首次阐明了拟南芥 GSK3 激酶 BIN2 (Brassinosteroid-Insensitive2) 的功能<sup>[12-18]</sup>, BR 不仅在生长发育调控中有重要作用, 还可激发相关基因如 *HSP*, *RD29A* 和 *ERD10* 等的表达, 提高植物对高温、低温、干旱和高盐的抗性<sup>[19]</sup>, GSK3 激酶也涉及渗透胁迫、伤害应答和信号传导等多个功能<sup>[20-21]</sup>。因此, GSK3s 激酶家族在作物逆境胁迫响应中起重要作用, 这将为利用 GSK3 蛋白激酶的这些功能改良植物抗逆性或农艺性状提供了可能。

橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 原产于高温、高湿、静风的巴西亚马逊河流域, 是典型的热带雨林树种, 抗寒、抗风能力不强。中国植胶区位于北纬 18° ~ 24° 的热带北缘和南亚热带地区 (主要是海南、云南和广东), 寒潮、台风和干旱是最严重的自然灾害, 因此, 选育抗逆高产的橡胶树无性系是中国橡胶树育种的重要目标。在抗逆相关基因的研究基础上, 开发抗逆相关分子标记辅助育种, 将大幅提高抗逆性鉴定效率, 推进抗逆品种的选育进程。而且, 在天然橡胶生产中, 产量是通过切割橡胶树皮收集流出的胶乳而获得的, 在此过程中, 橡胶树要遭受机械伤害以及排胶引起的水分胁迫、营养胁迫、渗透胁迫等生物/非生物胁迫。笔者从橡胶树胶乳中克隆到 1 个 GSK3 基因 *HbGSK1*, 研究了机械伤害和割胶对胶乳中 *HbGSK1* 基因表达的影响, 旨在为进一步探讨橡胶树抗逆机理, 开发抗逆分子标记, 辅助橡胶树抗逆育种奠定基础。

收稿日期: 2017 - 12 - 09

修回日期: 2018 - 04 - 19

基金项目: 海南省自然科学基金 (20153136); 国家天然橡胶产业技术体系分子育种岗位专项 (CARS-34-GW1)

作者简介: 杨署光 (1982 -), 男, 助理研究员, 硕士, 研究方向: 橡胶树分子遗传学。E-mail: yangshuguang198241@163.com

通信作者: 田维敏 (1965 -), 男, 研究员, 研究方向: 橡胶树发育生物学。E-mail: wmtian@163.com

## 1 材料与方法

1.1 材料 实验材料为成龄巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) 无性系 CATAS 7-33-97 未开割树, 种植于中国热带农业科学院实验场, 选 64 株大小、长势基本一致的成龄树开展实验。DNase I 购自天根公司; RACE 试剂盒 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 购自 clontech 公司; 反转录试剂盒 Rever-tAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Ferments 公司; DNA 凝胶收试剂盒购自 OMEGA 公司; Pyrobest™ DNA Polymerase、实时荧光定量 PCR 试剂 SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 购自大连宝生物公司; pEASY-BluntSimple Cloning Kit 购自北京全式金公司; 其他生化试剂均为进口或国产分析纯试剂。引物合成和 DNA 测序由 Invitrogen 公司完成。

1.2 机械伤害和割胶处理 对照组(CK): 不做任何处理; 机械伤害处理组(Wounded): 开割线, 但不排胶; 割胶处理组(Tapped): 割胶。每组 18 株树。在上午 8:00 左右按照 S/2D(二分之一树围, 阳刀) 割胶制度对伤害组开割线、对割胶组进行割胶。分别在处理后 2 h, 1, 3, 5, 7 d 割胶, 并采集前 10 min 流出的胶乳样品, 每个时间点各处理(对照、伤害、割胶) 均取 3 株的混合样 9 mL(每株取 3 mL), 用于提取胶乳总 RNA。

1.3 S/2D d1(二分之一树围, 阳刀, 1 天 1 刀) 处理 选 5 株未开割树, 约在上午 8:00 h, 按照 S/2D d1 的割胶制度割胶, 连续割 6 刀, 以第 1 刀为对照。采集前 10 min 流出的胶乳样品, 每刀次均取 5 株的混合样 10 mL(每株取 2 mL), 用于提取胶乳总 RNA。

1.4 S/2D d3(二分之一树围, 阳刀 3 天 1 刀) 处理 选 5 株未开割树, 约在上午 8:00, 按照 S/2D d3 的割胶制度割胶, 连续割 5 刀, 然后停割 30 d 后割第 6 刀, 以第 1 刀为对照; 采集前 10 min 流出的胶乳样品, 每刀次均取 5 株的混合样 10 mL(每株取 2 mL), 用于提取胶乳总 RNA。

1.5 总 RNA 的提取与 cDNA 的合成 胶乳总 RNA 提取参照曾日中等的方法<sup>[22]</sup>。反转录试剂盒 Rever-tAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Ferments 公司, cDNA 第 1 链的合成根据 Ferments 公司试剂盒的操作步骤进行。

1.6 *HbGSK1* 的 RACE 和全长 cDNA 扩增 搜索本实验室的胶乳转录组数据库, 获得 1 个注释为 *GSK3* 的 Unigene, 采用 RACE 技术进行 3' 和 5' 端序列的扩增。RACE 扩增参照 clontech 公司的试剂盒 SMART-er™ RACE cDNA Amplification Kit 进行。将获得的 RACE 序列与已知的 *Unigene* 基因序列进行拼接, 在拼接出来的全长序列两端设计全长 cDNA 扩增印证引物(F-CTGTATTGAGGGAAGTTGAATTTGC, R-TTATGT-TAAGCCTCATTGCATATGCT), 利用 RT-PCR 技术进行基因全长 cDNA 扩增。cDNA 模板制备: 取 1 μg 胶乳总 RNA, 在 20 μL 反应体系中反转录合成 cDNA 第 1 链, 稀释 5 倍后作为全长 cDNA 扩增的模板。全长 cDNA 扩增体系为 50 μL, 其中, 10 × Pyrobest Buffer II 5 μL, dNTP Mixture(2.5 mmol · L<sup>-1</sup>) 4 μL, Pyrobest DNA Polymerase(5 U · μL<sup>-1</sup>) 0.25 μL, 上下游引物各 2.5 μL(引物浓度为 10 μmol · L<sup>-1</sup>), 反应体系中每条引物终浓度均为 0.5 μmol · L<sup>-1</sup>、cDNA 模板 1 μL、ddH<sub>2</sub>O 34.75 μL。扩增程序为: 95 °C 预变性 3 min, 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。1% 的琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 扩增产物, 凝胶回收纯化目的条带, 克隆到 pEASY-Blunt Simple Cloning Vector 载体上, 送 Invitrogen 公司进行测序。利用 BLAST 检索 GenBank 数据库进行同源性分析。

1.7 生物信息学分析 用 DNAMAN 软件对 *HbGSK1* 全长 cDNA 序列进行比对分析, 用 NCBI 网站 ORF Finder 软件预测开放阅读框(ORF), 并翻译成蛋白序列; 从 NCBI 数据库下载不同植物的 *GSK3* 蛋白序列, 首先用 ClustalW 进行序列多重比对, 再用 MEGA4.0 软件, 选择 neighbour-joining(NJ) 模型, 并进行 1 000 次 bootstrap 统计学检验, 构建包括 *HbGSK1* 蛋白序列在内的植物 *GSK3* 蛋白的系统进化树; 用 ProtParam 软件分析蛋白的分子量与等电点; 用 ProtScale 在线软件预测蛋白氨基酸序列的疏水性/亲水性; 用 SOPMA SECONDARY STRUCTURE PREDICTION METHOD 在线软件预测蛋白的 2 级结构; 用 TMHMM Server v. 2.0 在线软件预测跨膜结构; 用 TargetP1.1 Server 在线软件进行导肽的预测; 用 SignalP 4.1 Server 软件预测信号肽; 用 PSOR 在线软件预测蛋白的亚细胞定位; 用 Prosite 在线数据库分析蛋白的功能位点; 用 NetPhos2.0 Server

在线软件分析蛋白的磷酸化位点。

1.8 荧光定量 PCR 分析 根据获得的 *HbGSKI* cDNA 全长序列设计 qPCR 引物(F: GAGTAGTATTCCAG-GCTAAGTG ,R: TAGTTTGCAGCTCACGGTTCTT) ,以 Hb18S<sup>[23]</sup> ( F: GCTCGAAGACCATCAGATACC ,R: TTCAGCCTTGCACCATAC) 作为内参 ,分析 *HbGSKI* 的基因表达 ,*HbGSKI* 和 Hb18S 的 qPCR 产物分别为 99 bp 和 145 bp。取 1μg 胶乳总 RNA 反转录合成 cDNA 第 1 链 稀释 10 倍后作为荧光定量 PCR 分析的模板。qPCR 反应体系为 20 μL ,其中 2 × SYBR Premix 10 μL ,上下游引物各 0.4 μL(引物浓度为 10 μmol · L<sup>-1</sup> ,反应体系中每条引物终浓度均为 0.2 μmol · L<sup>-1</sup>) ,cDNA 模板 1μL ,ddH<sub>2</sub>O 8.2 μL。qPCR 反应在 Bio-Rad 公司的 CFX 实时荧光定量 PCR 仪中进行 ,实验操作按仪器使用说明书进行 ,qPCR 反应程序为: 95 °C 30 s 95 °C 10 s 60 °C 20 s 72 °C 20 s ,共 40 个循环 40 个循环后进行溶解曲线分析。利用 CFX-manager 3.0 软件自动进行基线和 C<sub>q</sub> 值分析。

1.9 数据处理 用 Excel 2003 作图 ,用 SPSS 软件的 R-E-G-WQ(Q) 检验进行多重比较分析: 标有不同大写字母者表示组间差异极显著 (alpha < 0.01) ,不同小写字母者表示组间差异显著 (alpha < 0.05) 相同小写字母者表示组间差异不显著 (alpha > 0.05) 。用 Excel TTEST(Array 1 ,Array 2 ,Tails 1 ,Type 1) 进行成对比较分析 “\* \* ”表示组间差异极显著 (P < 0.01) , “\* ”表示组间差异显著 (P < 0.05) 。根据  $Q = 2^{\Delta C_q} = 2^{\min C_q - \text{Sample } C_q}$  计算基因的表达值。

## 2 结果与分析

2.1 *HbGSKI* 全长 cDNA 的克隆 通过 RACE 及测序方法从巴西橡胶树胶乳中扩增获得 *HbGSKI*( Gen-Bank: JN835185. 1) 全长 cDNA 序列 1 506 bp ,其中 ,包括 1 230 bp 的开放阅读框( ORF) 、64 bp 5'-UTR 和 212 bp 3'-UTR ,该基因编码 409 个氨基酸( 图 1) 。

```

1          attgaggggaagt tgeatttgcaeaaggaa tatacttgggttttttttccctttctcttagaaca
65  ATGGCTTCGTAAAGCGTTGTACCTACTTCTGGATTAAGATCCAAGTGGAAATACAGCT
1    M A S V S V V P T S G L K D P S G N T A
125 GGTGTTGATAGGTTACCTGATGAGATGAATGACATGAAAAATAGGGATGACAAGGAAATG
21    G V D R L P D E M N D M K I R D D K E M
185 GAAGCAACGGTTGTGTATGGTAACGGAACAGAGACGGCCACATAATTGTCACAACCATT
41    E A T V V D G N G T E T G H I I V T T I
245 GGTGGCAAAAATGGACAGCCAAAACAGACAATAAGCTATATGGCTGAGCGGGTTGTGGA
61    G G K N G Q P K Q T I S Y M A E R V V G
305 CATGGATCTTTTGGAGTAGTATTCAGGCTAAGTGCCTAGAGACTGGTGAAGTGTGTGCA
81    H G S F G V V F Q A K C L E T G E T V A
365 ATTA AAAAGGTTCTACAAAGATAAAAGGTACAAAGACCGTGAGCTGCAAACTATGCGTCTT
101   I K K V L Q D K R Y K N R E L Q T M R R L
425 CTGGACCAACCCCAATGTAGTGTCCCTTGAACACTGTTCCTCTCAACAACTGAAAAGAT
121   L D H P N V V S L K H C F F S T T E K D
485 GATCTTTATCTTAACCTGGTACTTGGATATGTCCTGAGACTGTCCACCGCTGATCAA
141   D L Y L N L V L E Y V P E T V H R V I K
545 CACTATAATAAGATGGCCAAAGGATGCCACTAATAACGTGAAACTTTATTTTACCG
161   H Y N K M G Q R M P L I Y V K L Y F Y Q
605 ATTTGCAGAGCTCTGCATACATTCACAACACTATTGGAGTGTGCCATAGGGACATAAAG
181   I C R A L A Y I H N T I G V C H R D I K
665 CCTCAAAAATTTGTTGGTTAACCCACACCCACCAGCTGAAATATGTGACTTTGGAGT
201   F Q N L L V N P H T H Q L K L C D F G S
725 GC AAAAGT TTTGGTGAAAGGGGAACCAACATATCTTATATATGTTCTAGGTATTATCGA
221   A K V L V K G E P N I S Y I C S R Y Y R
785 GCACCTGAAC TTATATTTGGTGC AACTGAGTACACCACAGCCATFGACATTTGGTGTGCT
241   A P E L I F G A T E Y T T A I D I W S A
845 GGTGTGTCTAGCTGAATTTGCTTTGGACAGCCTCTCTCTCTCTGGCGAGAGTGGAGTG
261   G C V L A E L L L G Q P L F P G E S G V
905 GACCAGCTTGTGAAATTAATAAGGTTTGGGTACC CCAACACGTGAAGAAATCAAAGTGC
281   D Q L V E I I K V L G T P T R E E I K C
965 ATGAATCCCACTACACTGAGTTCAAATTTCCGCAATCAAAGCTCACCCATGGCATAAG
301   M N P N Y T E F K F P Q I K A H P W H K
1025 ATATPCCATAAGCGTATGCCCCCTGAAGCTGTGGACCTGTCTCAAGACTATGCGAGTAC
1045 I F H K R M P P E A V D L V S R L L Q Y
1085 TCTCCAAAATCTTCGAAGCACAGCTGTGGAGCTTTGATCCATCCCTCTCTCAATGAGCTA
341   S P N L R S T A L K A L I H P F F N E L
1145 CGTGACCTTAGCACCCGCTTACCAAATGGACGCTTCTCCACCCTTTCAACTTTAAG
361   R D P S T R L L P N G R F L P P L F N F K
1205 CCTCATGAAC TGAAGGCTTGGCCAAATGAGATGTTGGTGAAGCTAATCCAGAGCATGCA
381   P H E L K G L P I E M L V K L I P E H A
1265 AGAAAGCAATGTGCTTCTCTTGGGTTTTGATgcaagtccggtgtagttagtgtctgctgct
401   R K Q C A F L G F *
1325 cgcagaaaaatgtgctgtataaaagtagctagtttccaaagtatcatattgaaagcagtggtt
1385 aattgtaggca tcccatgttccatatttcccttattattattttttgattctctacct
1445 cttttagagagcagataaaaaagaagtttctgcttattatgtttaagcctcatggcatatg
1505 ct

```

图 1 橡胶树 *HbGSKI* 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *HbGSKI*

2.2 HbGSK1 蛋白特性分析 ProtParam 分析表明, HbGSK1 含 409 个氨基酸, 相对分子量为 46.35 kD, 理论等电点为 8.69, 酸性氨基酸残基总数( Asp + Glu) 为 43 个, 碱性氨基酸残基总数( Arg + Lys) 49 个, 原子总数是 6 565 个, 分子式为  $C_{2093}H_{3304}N_{564}O_{584}S_{20}$ , 不稳定系数为 34.83, 是稳定蛋白, 脂肪族氨基酸指数为 91.71, 疏水系数为 -1.215, 是亲水蛋白。

ProtScale 在线软件预测 HbGSK1 氨基酸序列的疏水性/亲水性, 结果显示, 多肽链第 110 位的 Try 具有最低的分值( -3.567), 亲水性最强, 第 265 和 266 位的 Ala 和 Glu 具有最高的分值( 2.200), 疏水性最强; 但从整体来看, 亲水性氨基酸均匀分布在整条肽链中, 且存在 4 个明显的亲水区域( 11 ~ 42, 104 ~ 123, 292 ~ 329, 357 ~ 372), 因此, 该蛋白整条多肽链表现为亲水性。

在线软件 SOPMA 预测 HbGSK1 蛋白 2 级结构, 结果显示 HbGSK1 蛋白氨基酸序列的 2 级结构由 33.99% 的  $\alpha$ -螺旋, 20.54% 的延伸链, 11.74% 的  $\beta$ -转角和 33.74% 的无规则卷曲组成。  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲是其主要的结构元件, 而  $\beta$ -转角和延伸链则散布于整个蛋白中。

蛋白质亚细胞定位预测结果表明, HbGSK1 最有可能定位在细胞质中; 跨膜结构预测结果显示 HbGSK1 不具有跨膜结构域; 信号肽预测结果表明 HbGSK1 不具有信号肽, 说明它是 1 个非分泌型蛋白( non-secretory proteins); 导肽预测结果表明 HbGSK1 可能不存在导肽酶切位点, 不具有导肽, 预测可信度为 3 级。

Prosite 分析发现 HbGSK1 蛋白序列含有 5 类功能位点: 包括 4 个豆蔻酰化位点( N-myristoylation site), 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点( tyrosine kinase phosphorylation site), 3 个 N-糖基化位点( N-glycosylation site), 7 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点( casein kinase II phosphorylation site) 和 5 个蛋白激酶 C 磷酸化位点( Protein kinase C phosphorylation site)。

NetPhos 2.0 Server 磷酸化位点预测和分析结果显示, HbGSK1 蛋白共有 13 个磷酸化位点, 其中包括 5 个丝氨酸位点( Ser: 10, 135, 232, 278, 364, Score 分别为 0.845, 0.901, 0.861, 0.843, 0.819), 4 个苏氨酸位点( Thr: 43, 117, 137, 347, Score 分别为 0.799, 0.831, 0.949, 0.705), 4 个酪氨酸位点( Tyr: 110, 143, 233, 305, Score 分别为 0.520, 0.957, 0.710, 0.835)。

2.3 氨基酸序列比对及进化树构建 根据 cDNA 序列推导的 HbGSK1 氨基酸序列与其他植物同源蛋白的氨基酸序列构建系统进化树, 聚类结果显示, 橡胶树 HbGSK1( AFC33050) 与木薯 MANES\_01G232500( OAY61979.1) 和麻风树 SRPKa( XP\_012082965.1) 亲缘关系最近( 图 2)。

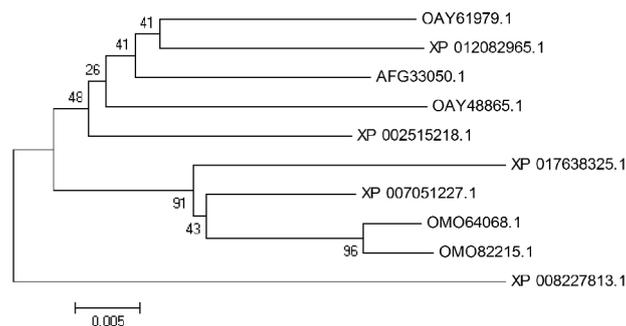


图 2 HbGSK1 与其他植物 GSK3s 蛋白的进化树分析

巴西橡胶树: AFC33050.1; 木薯: OAY61979.1, OAY48865.1; 麻风树: XP\_012082965.1; 蓖麻: XP\_002515218.1; 可可: XP\_007051227.1; 圆果种黄麻: OMO64068.1; 长果种黄麻: OMO82215.1; 木棉: XP\_017638325.1; 青梅: XP\_008227813.1

Fig. 2 Phylogenetic relationships between HbGSK1 and the GSK3s proteins of other plants

*Hevea brasiliensis*: AFC33050.1; *Manihot esculenta*: OAY61979.1, OAY48865.1; *Jatropha curcas*: XP\_012082965.1; *Ricinus communis*: XP\_002515218.1; *Theobroma cacao*: XP\_007051227.1; *Corchorus capsularis*: OMO64068.1; *Corchorus olitorius*: OMO82215.1; *Gossypium arboreum*: XP\_017638325.1; *Prunus mume*: XP\_008227813.1

将 HbGSK1 推导的氨基酸序列与其他植物的 GSK3 基因所编码的氨基酸序列进行比对, 结果显示 HbGSK1 蛋白序列与木薯 MANES\_01G232500( OAY61979.1)、麻风树 SRPKa( XP\_012082965.1)、蓖麻 SRPKa

(XP\_002515218.1)、木薯 MANES\_05G011400(OAY48865.1) 蛋白的序列相似性分别为 96.09%、96.09%、95.84% 和 95.60% (图 3), 均具有 STKc-GSK3 结构域。HbGSK1 蛋白与不同种类植物 GSK3 蛋白序列一致性较高, 说明该基因在植物进化过程中高度保守。InterProScan 蛋白保守结构域分析显示, HbGSK1 蛋白序列包含 STKc-GSK3 结构域(68~360)、STKc 结构域(73~357)、二聚体连接位点(83~311)、活性位点(79~276)、多肽底物结合位点(113~276)、ATP 结合位点(29~217)、生长素结合位点(245~313)、活性环(216~238)。

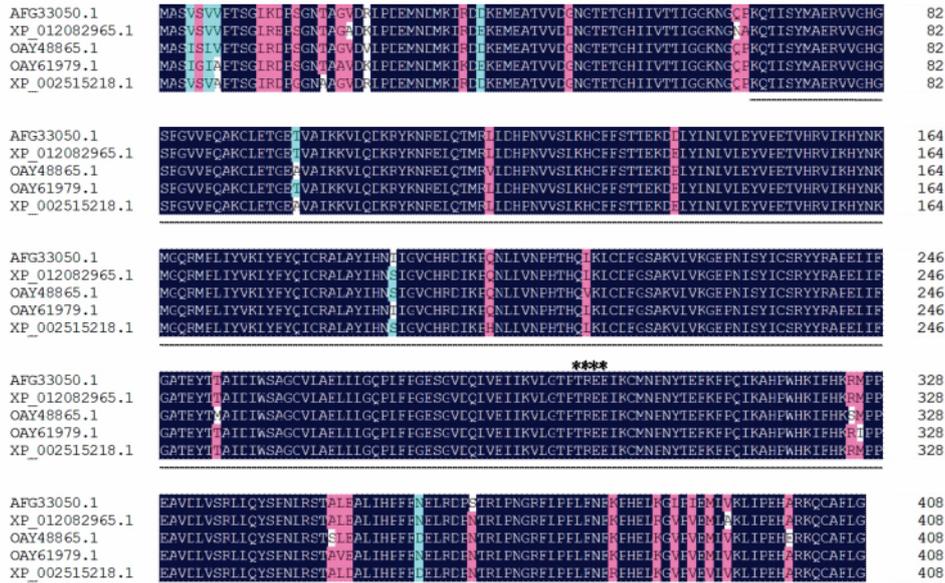


图 3 HbGSK1 推导的氨基酸序列与其他植物 GSK3s 蛋白序列比对

黑下划线表示 STKc-GSK3 结构域(68~360), \* 显示的是保守的 TREE 结构域(294~297)

Fig. 3 The deduced amino acid sequences of HbGSK1 compared with the GSK3s proteins of other plants.

The STKc-GSK3 domains are underlined (68-360); \* indicates the conserved TREE domains (294-297)

2.4 *HbGSK1* 基因表达与分析 以成龄未开割树为材料, 以 18S 基因为内参, RT-PCR 分析 *HbGSK1* 在巴西橡胶树胶乳中的基因表达情况。

2.4.1 机械伤害上调胶乳中 *HbGSK1* 基因的表达 以不作任何处理的成龄未开割树为对照, 研究机械伤害(开割线但不排胶)对 *HbGSK1* 基因表达的影响(图 4)。总体表达情况如图 4-A1, 结果表明, 随着处理时间的延长, *HbGSK1* 基因的表达先上升, 然后下降, 伤害后 3d 基因表达水平最高(图 4-A1, Wounded); 伤害 2 h, 1, 3, 5, 7 d 后, 机械伤害的基因表达水平分别是对照(2 h, 1, 3, 5, 7 d 对照的平均值)的 1.33, 1.43, 1.80, 0.75, 0.68 倍, 伤害后 3 d, 基因表达水平最高, 伤害 3 d 以内, 基因表达上调, 3 d 后基本恢复到对照水平(图 4-B1, Wounded)。这表明, 机械伤害上调胶乳中 *HbGSK1* 基因的表达。

2.4.2 首次割胶下调未开割树胶乳中 *HbGSK1* 基因的表达 以不作任何处理的成龄未开割树为对照, 研究割胶(伤害+排胶)对 *HbGSK1* 基因表达的影响(图 4)。总体表达情况如图 4-A1, 结果表明, 随着处理时间的延长, *HbGSK1* 基因的表达先上升, 然后下降, 割胶后 1, 3 d 基因表达水平最高(图 4-A1, Tapped), 割胶后 7 d 以内, 基因表达均显著低于对照水平(图 4-B1, Tapped), 割胶 2 h, 1, 3, 5, 7 d 后, 割胶的基因表达水平分别是对照(2 h, 1, 3, 5, 7 d 对照的平均值)的 0.19, 0.88, 0.70, 0.24, 0.32 倍。表明, 首次割胶下调未开割树胶乳中 *HbGSK1* 基因的表达。

2.4.3 首次排胶下调未开割树胶乳中 *HbGSK1* 基因的表达 以机械伤害处理的成龄未开割树为对照, 研究排胶(排胶=割胶/伤害)对 *HbGSK1* 基因表达的影响(图 4)。排胶 2 h, 1, 3, 5, 7 d 后, 排胶的基因表达水平分别是对照的 0.14, 0.62, 0.39, 0.33, 0.47 倍, 排胶后 1 d 基因表达水平最高, 排胶后 7 d 以内基因表达均显著低于对照水平(图 4-B1, Latex); 表明, 首次排胶下调未开割树胶乳中 *HbGSK1* 基因的表达。

2.4.4 *HbGSKI* 基因的表达受生物钟调控 以不作任何处理的成龄未开割树为对照, 研究机械伤害( 开割线但不排胶) 和割胶( 伤害 + 排胶) 对 *HbGSKI* 基因表达的影响( 图 4)。结果表明, 在 14:00 点采样的处理( 6 h), 其基因表达情况与在 08:00 点采样的处理( 2 h, 1, 3, 5, 7 d) 不同( 图 4-A)。处理后 6 h 与前后相邻时间点相比, 机械伤害( 图 4-A, Wounded) 下调而割胶( 图 4-A, Tapped) 上调 *HbGSKI* 基因的表达; 与未处理的对照相比, 机械伤害低于( 图 4-B2, Wounded) 而割胶高于( 图 4-B2, Tapped) 对照的表达水平, 分别是对照的 0.53 倍和 1.63 倍; 与机械伤害相比, 排胶的基因表达水平高于机械伤害( 图 4-B2, Latex), 是伤害的 3.07 倍, 表明排胶是造成割胶的基因表达水平高于对照的原因; 而且, 不同日期相同时间点( 08:00) 采的对照, 绝大多数( CK-2h, CK-3d, CK-5d, CK-7d) 间 *HbGSKI* 基因的表达水平差异不显著( 图 4-A1, CK) ( $\alpha > 0.05$ ), 说明在环境条件基本一致的条件下, 对照的基因表达水平基本一致, 而在处理后 6 h 与前后的其他时间点( 2 h, 1, 3, 5, 7 d) 相比, 对照和机械伤害的表达水平显著降低(  $\alpha < 0.01$ ) 表明 *HbGSKI* 基因的表达受生物钟调控。

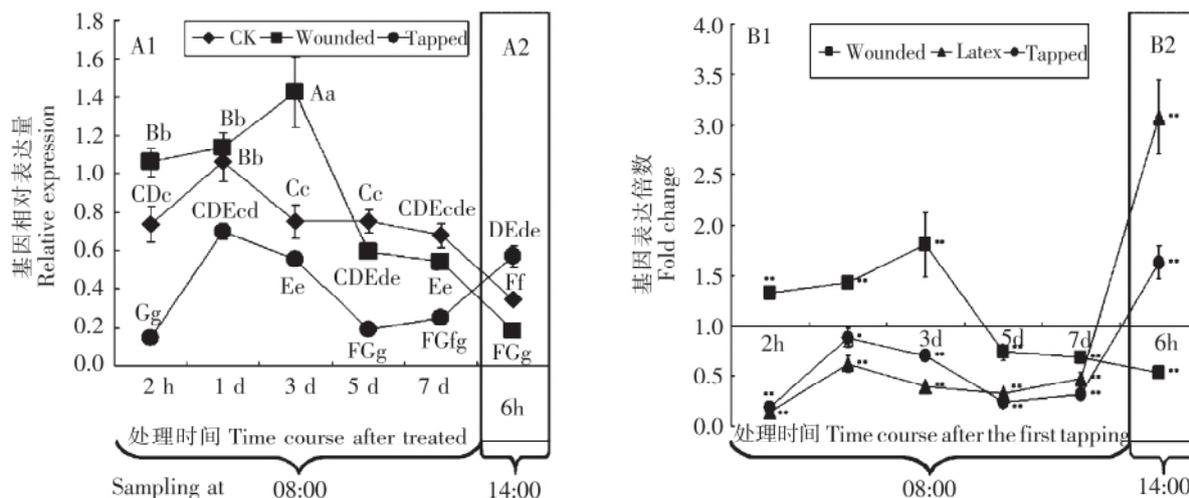


图 4 机械伤害( S/2D 开割线, 不排胶) 和割胶处理下胶乳中 *HbGSKI* 基因的表达分析

Fig. 4 Expression patterns of *HbGSKI* in latex at the indicated time after mechanically wounded ( Marking the S/2d cut lines without latex outflow ) and tapped under the S/2D tapping system

2.4.5 S/2D d1 割胶对 *HbGSKI* 基因表达的影响 上述的研究表明, 未开割树胶乳中 *HbGSKI* 基因在首次割胶后 1, 3 d 基因表达水平最高( 图 4-A1, Tapped), 排胶后 1 d 基因表达水平最高( 图 4-B1, Latex), 但都显著低于未处理的对照水平。

为进一步研究 *HbGSKI* 基因的表达水平是否能在某次割胶 1 d 后恢复到或超过未处理的对照水平, 选 5 株未开割树, 在每天上午 8:00 左右, 按照 S/2D d1 的割胶制度割胶, 连续割 6 刀( 1 st, 2 nd, 3 rd, 4 th, 5 th, 6 th), 采集前 10 min 流出的胶乳样品, 每次均取 5 株的混合样( 每株取 2 mL) 共 10 mL, 用于提取胶乳总 RNA, 反转录合成 cDNA 第 1 链, 以第 1 刀为未处理对照, qPCR 分析不同起始状态( 1st: 未开割树、2nd: 割过 1 刀、3rd: 割过 2 刀、4th: 割过 3 刀、5th: 割过 4 刀、6th: 割过 5 刀) 的橡胶树割胶后 1 d 的基因表达情况( 图 5-A)。结果表明, 从第 2 刀开始, 随着割胶刀次的增加( 2 nd, 3 rd, 4 th, 5 th, 6 th), *HbGSKI* 基因的表达先上升, 然后下降, 第 4 刀( 4 th) 的基因表达水平最高( 图 5-A); 2 nd, 3 rd, 4 th, 5 th, 6 th 的基因表达水平分别是对照的 0.52, 0.56, 0.67, 0.53, 0.49 倍, 第 4 刀的基因表达水平最高, 但各刀次的基因表达仍然显著低于对照水平( 图 5-B); 分别以上一刀次为对照, 分析相邻的下一刀次的基因表达情况, 结果表明, 随着割胶刀次的增加( 2 nd/1 st, 3 rd/2 nd, 4 th/3 rd, 5 th/4 th, 6 th/5 th), *HbGSKI* 基因的表达先上升, 然后下降, 2 nd/1 st 下调, 3 rd/2 nd 上调, 4 th/3 rd 上调, 5 th/4 th 下调, 6 th/5 th 下调, 第 2~6 刀次分别是第 1~5 刀次的 0.52, 1.07, 1.19, 0.79, 0.93 倍( 图 5-C)。表明, 不同割胶状态的橡胶树割胶后 1 d 胶乳中的 *HbGSKI* 基因的表达情况不同, 割胶并非总是下调胶乳中的 *HbGSKI* 基因的表达, 虽然未能恢复到未

开割树的水平,但未开割树按照 S/2D d1 的割胶制度割 2 刀次以后 *HbGSKI* 基因的表达开始上调。

2.4.6 S/2D d3 割胶对 *HbGSKI* 基因表达的影响 前面的研究表明,未开割树胶乳中 *HbGSKI* 基因在首次割胶后 1 d 3 d 基因表达水平最高(图 4-A1, Tapped),排胶后 1 d 基因表达水平最高(图 4-B1, Latex),但都显著低于未处理的对照水平;然而,割胶并非总是下调胶乳中的 *HbGSKI* 基因的表达,虽然未能恢复到未开割树的水平,但未开割树按照 S/2D d1 的割胶制度割 2 刀次以后, *HbGSKI* 基因的表达开始上调(图 5-C)。

为进一步研究 *HbGSKI* 基因的表达水平是否能在某次割胶 3 d 后恢复到或超过未处理的对照水平,选 5 株未开割树,在上午 8:00 左右,按照 S/2D d3 的割胶制度割胶,连续割 5 刀,然后停割 30 d 后割第 6 刀(1 st 2 nd 3 rd 4 th 5 th 6 th),采集前 10 min 流出的胶乳样品,每刀次均取 5 株的混合样(每株取 2 mL)共 10 mL,用于提取胶乳总 RNA,反转录合成 cDNA 第 1 链,以第 1 刀为未处理对照, qPCR 分析不同起始状态(1 st: 未开割树、2 nd: 割过 1 刀、3 rd: 割过 2 刀、4 th: 割过 3 刀、5 th: 割过 4 刀、6 th: 割过 5 刀并停割 30 d)的橡胶树割胶后 3 d 的基因表达情况(图 5-A)。结果表明,从第 2 刀开始,随着割胶刀次的增加(2 nd 3 rd 4 th 5 th 6 th), *HbGSKI* 基因的表达先上升,然后下降,第 3 刀(3 rd)的基因表达水平最高(图 5-A); 2 nd 3 rd 4 th 5 th 6 th 的基因表达水平分别是对照的 0.50 2.17 1.19 0.83 1.03 倍,第 3 刀的基因表达水平最高,并且第 3 刀和第 4 刀的基因表达显著高于对照水平(图 5-B); 分别以上一刀次为对照,分析相邻的下一刀次的基因表达情况,结果表明,随着割胶刀次的增加(2 nd/1 st 3 rd/2 nd 4 th/3 rd, 5 th/4 th 6 th/5 th) *HbGSKI* 基因的表达先上升,然后下降,2 nd/1 st 下调,3 rd/2 nd 上调,4 th/3 rd 下调、5 th/4 th 下调、6 th/5 th 上调,第 2~6 刀次分别是第 1~5 刀次的 0.50 4.34 0.55 0.70 1.26 倍(图 5-C)。表明不同割胶状态的橡胶树割胶后 3 d 胶乳中的 *HbGSKI* 基因的表达情况不同,割胶并非总是下调胶乳中的 *HbGSKI* 基因的表达,虽然首次割胶下调 *HbGSKI* 基因的表达,但未开割树按照 S/2D d3 的割胶制度割 2 刀次以后 *HbGSKI* 基因的表达上调,3 d 后超过未处理的对照水平。

综合分析表明:机械伤害上调胶乳中 *HbGSKI* 基因的表达, *HbGSKI* 基因对伤害的响应迅速,伤害后 2 h 基因表达就显著高于对照水平,3 d 达到最高,伤害的促进效应可持续 3 d 左右,然后恢复到对照水平(图 4-B1, Wounded)。首次割胶下调胶乳中 *HbGSKI* 基因的表达, *HbGSKI* 基因对割胶的响应迅速,割胶后 2 h 基因表达就显著低于对照水平,割胶的抑制效应持续时间更长,割胶后 7 d 基因表达水平仍显著低于对照水平(图 4-B1, Tapped),并且割胶的抑制效应主要是由排胶引起的(图 4-B1, Latex); S/2D d3 的实验结果表明,第 2 刀次割胶上调胶乳中 *HbGSKI* 基因的表达,第 2 刀次割胶 3 天后达到最高并超过未处理的对照水平(图 5-B), S/2D d1 的实验中,由于处理时间不够长,虽然始终未达到未处理的对照水平(图 5-A, B),但第 2~3 刀次割胶也上调胶乳中 *HbGSKI* 基因的表达(图 5-C); 割胶包括机械伤害和排胶,割胶和排胶的基因表达模式很相似(图 4-B, Tapped 和 Latex),说明排胶对胶乳中 *HbGSKI* 基因表达的影响大于机械伤害;在 8:00 采样的处理(2 h, 1 d, 3 d, 5 d, 7 d)机械伤害上调(图 4-A1, B1, Wounded)、割胶下调(图 4-A1, B1, Tapped) *HbGSKI* 基因的表达,而在 14:00 采样的处理(6 h)

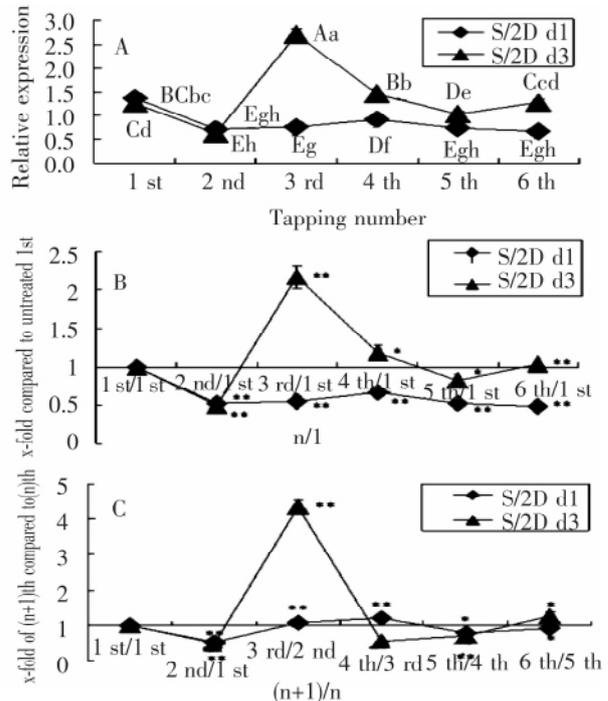


图 5 S/2D d1 和 S/2D d3 割胶处理下胶乳中 *HbGSKI* 基因的表达分析

Fig.5 Expression patterns of *HbGSKI* in latex under the S/2D d1 and S/2D d3 tapping system

(图 4-A1, B1, Wounded)、割胶下调(图 4-A1, B1, Tapped) *HbGSKI* 基因的表达,而在 14:00 采样的处理(6 h)

刚好相反 机械伤害下调(图 4-A2、B2 ,Wounded)、割胶上调(图 4-A2 ,B2 ,Tapped) *HbGSK1* 基因的表达,并且,14:00 采的空白对照的表达水平极显著低于在 8:00 采的对照(图 4-A ,CK) 表明 *HbGSK1* 基因的表达受生物钟的调节。

### 3 讨论

植物 GSK3s 蛋白激酶与非生物胁迫密切相关。盐胁迫<sup>[24]</sup>和渗透胁迫<sup>[6]</sup>上调拟南芥 *AtSK13*、*AtSK31*、*AtSK42* 的基因表达,过表达 *AtSK22* 基因增强植株的抗盐性<sup>[25]</sup>,过表达 *AtSK31* 的植株对冻害过敏<sup>[26]</sup>;盐胁迫上调小麦 *TaGSK1* 的基因表达<sup>[7]</sup>,低温、NaCl 和干旱诱导冬小麦 *TaSK5* 的基因表达<sup>[27]</sup>;盐胁迫上调而干旱下调水稻 *OsGSK1* 的基因表达,*OsGSK1* 基因的 1 个 T-DNA 插入突变体表现出很强的耐盐性和耐旱性<sup>[6]</sup>;盐胁迫<sup>[28,29]</sup>和渗透胁迫<sup>[28]</sup>上调甘蔗 *SuSK* 的基因表达;高渗条件下苜蓿 MsK4 激酶活性迅速升高<sup>[30]</sup>;NaCl、ABA、PEG、低温和机械损伤上调小桐子 *JcGSK* 基因的表达<sup>[31]</sup>;渗透胁迫上调大叶落地生根 *KdSK* 基因的表达<sup>[32]</sup>;寒冷、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 SDS 胁迫上调禾谷镰刀菌 *FGK3* 基因的表达<sup>[33]</sup>。酵母 GSK3s 基因,特别是 *MCK1*,参与高温、寒冷、盐胁迫、渗透胁迫、营养胁迫、氧化胁迫和金属离子胁迫等环境胁迫<sup>[34-36]</sup>;哺乳动物 GSK3 $\beta$  互补 1 个酵母 GSK3 四重突变体的温度敏感型<sup>[37]</sup>;拟南芥 *AtSK22* 互补酵母 *mck1* 突变体的盐敏感型<sup>[38]</sup>;小麦 *TaSK5* 互补酵母  $\Delta$ *mck1* 突变体的冷敏感型和盐敏感型<sup>[27]</sup>;山梨醇和聚乙二醇上调转基因拟南芥和水稻中苔藓 *PpSK2*、*PpSK4* 基因的表达<sup>[39]</sup>;过表达苜蓿 MsK4 提高拟南芥的耐盐性<sup>[30]</sup>;表明 GSK3s 蛋白在胁迫响应中的保守功能。机械伤害、割胶和排胶调节 *HbGSK1* 的基因表达,表明 *HbGSK1* 可能参与橡胶树胁迫响应过程;此外, *HbGSK1* 基因的转录调节主要表现在割胶初期,因此,推测割胶后期主要表现在 *HbGSK1* 的激酶活性调节层面。

拟南芥 *AtSK31* 在黑暗处理植株中唯一上调表达<sup>[24]</sup>,*AtSK21* 是光敏色素互作因子 PIF3 的激酶,在暗形态建成过程中引起 PIF3 的蛋白酶体降解<sup>[40]</sup>,*AtSK21* 的显性突变体 *bin2-1* 植株的光形态发生异常<sup>[15]</sup>,表明植物 GSK3s 基因的表达受光照或昼夜周期的调节。*HbGSK1* 基因的表达也受生物钟的调节。考虑到采样时间以及处理到采样过程中的环境条件如光照强度、温度、湿度等差异较大,推测 *HbGSK1* 基因的表达受这些环境因子的调节,从而表现出生物钟效应,具体的调节机制有待深入研究。

### 参考文献:

- [1] Cohen P, Yellowlees D, Aitken A, et al. Separation and characterisation of glycogen synthase kinase 3, glycogen synthase kinase 4 and glycogen synthase kinase 5 from rabbit skeletal muscle [J]. *Euro. J. Biochem.*, 1982, 124(1): 21-35.
- [2] Pay A, Jonak C, Bogre L, et al. The MsK family of alfalfa protein kinase genes encodes homologues of shaggy/glycogen synthase kinase-3 and shows differential expression patterns in plant organs and development [J]. *Plant Journal*, 1993, 3(6): 847-856.
- [3] Bianchi M W, Guivarc'h D, Thomas M, et al. Arabidopsis homologs of the shaggy and GSK-3 protein kinases, molecular cloning and functional expression in *Escherichia coli* [J]. *Molecular General Genetics*, 1994, 242(3): 337-345.
- [4] Dornelas M C, Lejeune B, Dron M, et al. The Arabidopsis SHAGGY-related protein kinase (ASK) gene family: structure organization and evolution [J]. *Gene*, 1998, 212(2): 249-257.
- [5] Dornelas M C, Wittich P, Von Recklinghausen I, et al. Characterization of three novel members of the Arabidopsis SHAGGY related protein kinase (ASK) multigene family [J]. *Plant Molecular Biology*, 1999, 39(1): 137-147.
- [6] Koh S, Lee S C, Kim M K, et al. T-DNA tagged knockout mutation of rice *OsGSK1*, an orthologue of Arabidopsis BIN2, with enhanced tolerance to various abiotic stresses [J]. *Plant Mol Biol.*, 2007, 65(4): 453-466.
- [7] Chen G, Ma M, Huang Z, et al. Isolation and characterization of *TaGSK1* involved in wheat salt tolerance [J]. *Plant Sci.*, 2003, 165: 1369-1375.
- [8] 徐涛. 小麦耐盐突变体 *TaGSK1* 基因的分离和鉴定 [D]. 石家庄: 河北师范大学, 2003.
- [9] 邹华文, 吴忠义, 张海秀, 等. 玉米非生物胁迫响应基因 *ZmASK1* 的克隆表达分析 [J]. *作物学报*, 2008, 34(2): 184-191.
- [10] De la Fuente van Bentem S, Anrather D, Dohnal I, et al. Site-specific phosphorylation profiling of Arabidopsis proteins by mass spectrometry and peptide chip analysis [J]. *Proteome Res.*, 2008, 7(6): 2458-2470.

- [11] Yoo M J , Albert VA , Soltis PS , et al. Phylogenetic diversification of glycogen synthase kinase 3/SHAGGY-like kinase genes in plants [J]. *BMC Plant Biol.* ,2006( 6) : 3.
- [12] Kim T W and Wang Z Y. Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors [J]. *Annu. Rev. Plant Biol.* ,2010 ,61: 681 – 704.
- [13] Clouse S D. Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development [J]. *Plant Cell* ,2011 ,23( 4) : 1219 – 1230.
- [14] Yang C J , Zhang C , Lu Y N , et al. The mechanisms of brassinosteroids' action: from signal transduction to plant development [J]. *Mol Plant* ,2011 ,4( 4) : 588 – 600.
- [15] Li J , Nam K H , Vafeados D , et al. BIN2 , a new brassinosteroid-insensitive locus in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol* ,2001 , 127( 1) : 14 – 22.
- [16] Li J and Nam K H. Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase [J]. *Science* ,2002 , 295 ( 5558) : 1299 – 1301.
- [17] Pérez-Pérez J M , Ponce M R , Micol J L. The UCU1 *Arabidopsis* gene encodes a SHAGGY/GSK3-like kinase required for cell expansion along the proximodistal axis [J]. *Dev Biol.* ,2002 ,242( 2) : 161 – 173.
- [18] Choe S , Schmitz R J , Fujioka S , et al. *Arabidopsis* brassinosteroid-insensitive dwarf12 mutants are semidominant and defective in a glycogen synthase kinase 3 beta-like kinase [J]. *Plant Physiol* ,2002 ,130( 3) : 1506 – 1515.
- [19] Diviu K , Rahman T , Krishna P. Brassinosteroid-mediated stress tolerance in *Arabidopsis* shows interactions with abscisic acid ethylene and salicylic acid pathways [J]. *BMC Plant Biol.* ,2010( 10) : 51.
- [20] Kim L , Kimmel A R. GSK3 , a master switch regulating cell-fate specification , and tumorigenesis [J]. *Current Opinion Genetics Development* ,2008 , 10( 5) : 508 – 514.
- [21] Youn J H , Kim T W. Functional insights of plant GSK3-like kinases: multi-taskers in diverse cellular signal transduction pathways [J]. *Molecular Plant* ,2015 ,8( 4) : 552 – 65.
- [22] 曾日中 , 段翠芳 , 黎瑜 , 等. 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 [J]. *热带作物学报* ,2003 , 24( 3) : 1 – 6.
- [23] Tian Wei-min , Zhang Hua , Yang Shu-guang , et al. Molecular and biochemical characterization of a cyanogenic  $\beta$ -glucosidase in the inner bark tissues of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) [J]. *Journal of Plant Physiology* ,2013 ,170( 8) : 723 – 730.
- [24] Charrier B , Champion A , Henry Y , et al. Expression profiling of the whole *Arabidopsis* shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction [J]. *Plant Physiol* ,2002 ,130( 2) : 577 – 590.
- [25] Piao H L , Lim J H , Kim S J , et al. Constitutive over-expression of *AtGSK1* induces NaCl stress responses in the absence of NaCl stress and results in enhanced NaCl tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant J.* ,2001 ,27( 4) : 305 – 314.
- [26] Li H , Ye K , Shi Y , et al. BZR1 Positively regulates freezing tolerance via CdbF-dependent and CBF-independent pathways in *Arabidopsis* [J]. *Mol Plant* ,2017 ,10( 4) : 545 – 559.
- [27] Christov N K , Christova P K , Kato H , et al. TaSK5 , an abiotic stress-inducible GSK3/shaggy-like kinase from wheat , confers salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol Biochem* ,2014 ,84: 251 – 260.
- [28] Patade V Y , Rai A N , Suprasanna P. Expression analysis of sugarcane shaggy-like kinase ( SuSK) gene identified through cDNA subtractive hybridization in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) [J]. *Protoplasma* ,2011 ,248( 3) : 613 – 621.
- [29] Poonsawat W , Theerawitaya C , Suwan T , et al. Regulation of some salt defense-related genes in relation to physiological and biochemical changes in three sugarcane genotypes subjected to salt stress [J]. *Protoplasma* ,2015 ,252( 1) : 231 – 43.
- [30] Kempa S , Rozhon W , Samaj J , et al. A plastid-localized glycogen synthase kinase 3 modulates stress tolerance and carbohydrate metabolism [J]. *Plant J.* ,2007 ,49( 6) : 1076 – 1090.
- [31] 黄尧瑶 , 文锦芬 , 邓明华 , 等. 小桐子糖原合成激酶基因 JcGSK 的克隆与表达分析 [J]. *西北植物学报* ,2017 ,37( 2) : 217 – 224.
- [32] 黄慧青 , 张利娟 , 杜小姣 , 等. 大叶落地生根类糖原合成激酶 *KdSK* 基因的克隆与表达分析 [J]. *广西植物* ,2017 ,37 ( 8) : 1025 – 1034.
- [33] Qin J , Wang G , Jiang C , et al. Fgk3 glycogen synthase kinase is important for development , pathogenesis , and stress responses in *Fusarium graminearum* [J]. *Scientific Reports* ,2015( 5) : 8504.
- [34] Xiao Y , Mitchell A P. Shared roles of yeast glycogen synthase kinase 3 family members in nitrogen-responsive phosphorylation

- of meiotic regulator Ume6p [J]. *Mol. Cell Biol.* 2000 ,20( 15) : 5447 – 5453.
- [35] Kassir Y ,Rubin-Bejerano I ,Mandel-Gutfreund Y. The *Saccharomyces cerevisiae* GSK-3 beta homologs [J]. *Curr. Drug Targets* ,2006 ,7( 11) : 1455 – 1465.
- [36] Pereira J ,Pimentel C ,Amaral C , et al. Yap4 PKA-and GSK3-dependent phosphorylation affects its stability but not its nuclear localization [J]. *Yeast* ,2009 ,26( 12) : 641 – 653.
- [37] Andoh T ,Hirata Y ,Kikuchi A. Yeast glycogen synthase kinase 3 is involved in protein degradation in cooperation with Bull1 ,Bul2 , and Rsp5 [J]. *Mol. Cell Biol.* ,2000 ,20( 18) : 6712 – 6720.
- [38] Piao H L ,Pih K T ,Lim J H , et al. An *Arabidopsis* *GSK3/shaggy*-like gene that complements yeast salt stress-sensitive mutants is induced by NaCl and abscisic acid [J]. *Plant Physiol* ,1999 ,119( 4) : 1527 – 1534.
- [39] Richard O ,Paquet N ,Haudecoeur E , et al. Organization and expression of the GSK3/shaggy kinase gene family in the moss *Physcomitrella patens* suggest early gene multiplication in land plants and an ancestral response to osmotic stress [J]. *J. Mol. Evol.* ,2005 ,61( 1) : 99 – 113.
- [40] Ling J J ,Li J ,Zhu D , et al. Noncanonical role of *Arabidopsis* COP1/SPA complex in repressing BIN2-mediated PIF3 phosphorylation and degradation in darkness [J]. *PNAS* ,2017 ,114( 13) : 3539 – 3544.

## Molecular Cloning and Expressional Analysis of *HbGSK1* from Rubber Tree ( *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. )

YANG Shuguang , WU Shaohua , CHEN Yueyi , LI Yan , SHI Minjing , TIAN Weimin

Rubber Research Institute , Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences , Ministry of Agriculture Key Laboratory of Rubber Biology/State Key Laboratory Incubation Base for Cultivation & Physiology of Tropical Crops , Danzhou , Hainan 571737 , China

**Abstract:** Recent studies have revealed that plant GSK3 proteins are actively implicated in hormonal signalling networks during development as well as in biotic and abiotic stress responses. The GSK in rubber tree function in stress tolerance is unknown. Rubber trees of clone CATAS7-33-97 were treated with mechanical wounding ( without latex flow) , tapping ( with latex flow) with the untreated as the control , and then tapped after 2hr , 6 hr and 1d , 3d , 5d , 7d of treatment to extract the total RNA from the latex sampled , and the full length cDNA of *HbGSK1* ( GenBank: JN835185.1) was amplified from the cDNA library in the latex. It was 1 506 base pairs ( bp) in length , containing a 1 230 bp open reading frame ( ORF) , encoding 409 amino acid residues with a predicted molecular mass of 46.35 ku and a pI of 8.69. Real-time PCR analysis showed that the expression of *HbGSK1* was upregulated by mechanical wounding ( without latex flow) . However , the expression of *HbGSK1* was down-regulated by first tapping , upregulated by second tapping , and then recovered to the level of that of the untreated control. The tapping had higher influence on *HbGSK1* expression than the mechanical wounding. Furthermore , the expression patterns of *HbGSK1* in the latex was regulated by biological clock. The change of *HbGSK1* transcript levels in the latex indicated that the *HbGSK1* protein was involved in abiotic stress responses of rubber tree.

**Keywords:** *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. ; *HbGSK1*; gene cloning; expression analysis

( 责任编辑: 潘学锋)