

· 热带作物 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20230004



主持人: 徐 冉

## 橡胶树蛋白激酶基因 *SnRK2.7* 的克隆及表达

刘云飞<sup>1</sup>, 李 言<sup>2</sup>, 田维敏<sup>2</sup>

(1. 海南大学 热带作物学院, 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 橡胶研究所/农业农村部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室/海南省热带作物栽培生理学重点实验室, 海口 571101)

**摘要:** 为了探索蔗糖非发酵相关蛋白激酶 2 (Sucrose non-fermentating 1-related protein kinase 2, SnRK2) 在巴西橡胶树响应低温胁迫应答中的作用, 采用 RT-PCR 技术, 从橡胶树抗寒无性系 93-114 的叶片中克隆了 SnRK2 亚家族的一个成员, 命名为 *HbSnRK2.7*。该基因包含一个 1 095 bp 的开放阅读框, 编码 364 个氨基酸。*HbSnRK2.7* 的分子量为 41.39 kD, 等电点为 4.70, 具有保守丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域, 预测其能催化磷酸基从 ATP 转移到蛋白质底物上的丝氨酸/苏氨酸残基上, 也是磷酸化位点的集中区域, 还具有非生物胁迫所需的结构域和 ABA (脱落酸) 依赖的 *HbSnRK2.7* 激活所需结构域。q-PCR 结果显示, *HbSnRK2.7* 基因响应 ABA 诱导, 呈下调表达模式。在 ABA 处理 8 h 时, 表达量下调到最低点。在低温胁迫下, *HbSnRK2.7* 的表达量极显著降低。低温胁迫 4 h 和 8 h 时, *HbSnRK2.7* 持续下调表达, 低温胁迫 24 h 时, *HbSnRK2.7* 表达量下调到最低, 大约为非胁迫表达量的 1/2。而且, *HbSnRK2.7* 在不抗寒种质中的表达量显著高于抗寒种质。这些结果表明, *HbSnRK2.7* 可能作为负调控因子介导橡胶树依赖 ABA 的低温胁迫抗性形成。

**关键词:** 巴西橡胶树; 蔗糖非发酵相关蛋白激酶; 荧光定量 PCR; 低温胁迫抗性; 脱落酸信号途径

中图分类号: S794.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-7054(2024)01-0001-09

刘云飞, 李言, 田维敏. 橡胶树蛋白激酶基因 *SnRK2.7* 的克隆及表达 [J]. 热带生物学报, 2024, 15(1): 1-9. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20230004

脱落酸 (abscisic acid, ABA) 是一种经典植物激素, 在植物应对干旱、高盐和低温等非生物胁迫中起重要的调节作用。植物遭遇低温、干旱和高盐等逆境胁迫时, 内源 ABA 迅速积累, 应对环境胁迫的压力<sup>[1-2]</sup>。ABA 诱导细胞中分子伴侣、LEA 蛋白、防冻蛋白、糖、脯氨酸等保护剂的积累, 或激活解毒机制, 调节氧化还原平衡或改变离子转运来重建稳态, 从而增强植物非生物胁迫的耐受性<sup>[3]</sup>。此外, ABA 还调节植物种子成熟、种子休眠和萌发、营养发育、幼苗建立、根生长、开花、气孔运动和衰老等各方面的生长发育<sup>[4]</sup>。

人们对 ABA 信号传导途径已经有了较深入的了解。在高等植物逆境胁迫时, ABA 含量增加,

结合于受体 PYR/PYL/RCAR 蛋白内腔的配体结合位点, 诱导受体蛋白的构象变化, ABA 被封闭在受体蛋白内, 重塑了受体蛋白的表面, 为磷酸酶 PP2Cs 提供相互作用的结合位点, 形成 PYR/PYL/RCAR-ABA-PP2C 复合物, 从而阻断了底物进入 PP2Cs 的活性位点<sup>[5-7]</sup>。PP2Cs 是 ABA 信号通路的负调节因子, 可阻止 ABA 信号的传递, 降低了植物对环境胁迫的耐受性<sup>[8-9]</sup>。PP2Cs 与 ABA 受体的互作, 增强了 PYR/PYL/RCARs 与 ABA 的结合力, 其亲和力增加了大约 10 倍<sup>[10-11]</sup>, 从而减弱 PP2C 对下游蔗糖非发酵相关蛋白激酶 2 (Sucrose non-fermentating 1-related protein kinase 2, SnRK2) 的抑制作用<sup>[5-7]</sup>。一些没有与 ABA 结合的 PYR/

收稿日期: 2023-01-18

修回日期: 2023-03-03

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目 (2020b020217002); 海南省科技专项 (ZDKJ2021012); 国家天然橡胶产业技术体系项目 (CARS-33-YZ1)

第一作者: 刘云飞 (1997-), 男, 海南大学热带作物学院 2020 级硕士研究生。E-mail: liu281012@163.com

通信作者: 田维敏 (1965-), 男, 研究员。研究方向: 植物学。E-mail: wmtian@163.com

PYL/RCARs也可以自由与PP2Cs相互作用,但外源性ABA显著增强受体对PP2C活性的抑制作用<sup>[12]</sup>。在ABA信号转导途径中,SnRK2s是一个重要环节,能够磷酸化下游的转录因子和其他蛋白,从而调控植物的逆境反应。拟南芥有38个SnRKs,分为SnRK1、SnRK2和SnRK3三个亚家族<sup>[13]</sup>,其中,SnRK2家族有10个成员。SnRK2s通过磷酸化bZIP23,介导干旱胁迫反应<sup>[14]</sup>;通过磷酸化ABI5,介导ABA调控种子萌发<sup>[15]</sup>;通过磷酸化ICE1,介导ABA调控抗寒性的形成<sup>[16]</sup>。低温胁迫下,拟南芥内源ABA含量增加,SnRK2.6/OST1被激活,从而磷酸化下游ICE1,增强它的转录活性和稳定性,提高了植株的抗寒性<sup>[16]</sup>。又因为JA也调节ICE1的转录<sup>[17]</sup>,所以SnRK2.6/OST1在ABA和JA信号途径交互调控植物的ICE-CBF途径中起重要作用。

巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) (简称橡胶树)原产南美洲亚马逊河流域,是商业用天然橡胶的主要来源。我国的橡胶树种植区位于世界热带北缘,经常性遭遇的寒流是我国发展橡胶树种植业面临的一种主要的非生物逆境。所以选育“高产抗寒”品种一直是我国橡胶树育种的首要目标。通过60余年的杂交育种,选育出一批抗寒性强的橡胶树品种,为研究橡胶树低温胁迫抗性形成机制提供了优良材料。橡胶树无性系‘93-114’是我国自主选育的次世代抗寒品种,尤其是抗平流型寒害的能力强。笔者从橡胶树无性系‘93-114’的叶片中分离到一个SnRK2基因家族的一个成员—*HbSnRK2.7*。为了探索蛋白激酶基因*HbSnRK2.7*在巴西橡胶树应对低温胁迫反应中的作用,采用q-PCR技术,分析了该基因在外源ABA处理和低温胁迫下的表达模式,以及不同抗寒性种质间的表达差异,旨在为进一步鉴定*HbSnRK2.7*的功能提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 实验材料为处于一蓬叶稳定期的橡胶树抗寒种质‘桂研73-165’、‘GT1’、‘INA873’、‘湛试32-713’、‘93-114’和不抗寒种质‘PB235’、‘热垦514’、‘热垦515’、‘海垦1’、‘热垦501’的芽接苗,该材料于2020年芽接于中国热带农业科学院种

苗培育基地。多糖多酚植物总RNA提取试剂盒(离心柱型)和FastKing cDNA第一链合成试剂盒(去基因组)(天根生化科技有限公司);荧光定量所需酶(2×TB Green™ Premix Ex Taq™ II)(大连宝生物公司);其他生化试剂为进口或国产分析纯试剂;基因扩增和荧光定量引物(生工生物工程上海股份有限公司)。

**1.2 材料处理** 低温处理恒温培养箱(PGR15, COVVILN, 加拿大)条件设置为:光照强度为125  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,光照周期16 h/8 h,温度为28  $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度为80%。将生长一致且健康的30株芽接苗置于培养箱,恢复培养2 d,平均分为处理组和对照组,然后将处理组幼苗置于4  $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中,其他设置条件不变,分别在0、2、4、8、12、24 h时间点收集叶片,每个时间点选择15株幼苗,每株幼苗采集1片树叶,等量5片树叶制成1个混合样,每个时间点制成3个混合样,对照同样采集样品。用0.1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  ABA喷施整株幼苗,然后置于28  $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中继续培养,分别在0、2、4、8、12和24 h时间点收集叶片,每个时间点选择15株幼苗,每株幼苗采集1片树叶,等量5片树叶制成1个混合样,每个时间点制成3个混合样<sup>[18]</sup>。ABA处理和低温处理共用对照。采集的样品迅速置于液氮中,用于提取总RNA。分别采集一蓬叶稳定期的橡胶树种质‘桂研73-165’、‘GT1’、‘INA873’、‘湛试32-713’、‘93-114’、‘PB235’、‘热垦514’、‘热垦515’、‘海垦1’、‘热垦501’芽接苗的树皮,每个种质采集5株幼苗制成1个混合样品,3个生物学重复,迅速置于液氮中,用于提取总RNA。

**1.3 总RNA的提取与cDNA的合成** 按照多糖多酚植物总RNA提取试剂盒说明书提取样品的总RNA。按照cDNA合成试剂盒的说明书合成cDNA。然后置于-20  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

**1.4 基因*HbSnRK2.7*的克隆** 从转录组<sup>[19]</sup>中,筛选1个有差异表达的Unigene,注释为SnRK2家族成员,通过橡胶树基因组数据库<sup>[20]</sup>,获得该基因cDNA序列。借助NCBI比对分析,确定该基因为*HbSnRK2.7*,并获得完整的基因开放阅读框序列。依据*HbSnRK2.7*的开放阅读框序列,设计引物(表1),扩增基因开放阅读框全长。利用RT-PCR技术,从橡胶树‘93-114’叶片中扩增出基因

表 1 橡胶树基因 *HbSnRK2.7* 扩增引物和荧光定量引物

基因名称	引物用途	引物名称	引物序列
<i>HbSnRK2.7</i>	基因扩增	HbSnRK2.7-FL-F	ATGGATCGATCGACGATTACTG
		HbSnRK2.7-FL-R	TTATTGCAATGCATAAACTATCTC
<i>HbSnRK2.7</i>		HbSnRK2.7-Q-F	GAACTTCGGGGTTGCCAGAC
		HbSnRK2.7-Q-R	TGCCTGAGGGACCTGTGATT
<i>HbActin7a</i>	荧光定量	HbActin7a-Q-F	GGCACTTTGGTACTCAAGTC
		HbActin7a-Q-R	GAAGCATCCCAATCACTCTC
<i>HbRH8</i>		HbRH8-Q-F	TCACAGGGTTGGTAGATCAG
		HbRH8-Q-R	CCAAGCTCTTGCTCAATCC

*HbSnRK2.7* 的开放阅读框全长。RT-PCR 扩增体系为 50  $\mu$ L, 高保真酶 25  $\mu$ L、引物 HbSnRK2.7-FL-F 和 HbSnRK2.7-FL-R 各 1  $\mu$ L、模板 1  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 添加至 50  $\mu$ L。扩增程序: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 10 s, 58  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。然后 1% 琼脂糖凝胶电泳, 胶回收, 连接转化, 挑阳性菌落, 送广州艾基生物技术公司进行测序验证。

1.5 *HbSnRK2.7* 生物信息学分析 通过 DNAMAN V9 软件对 *HbSnRK2.7* 进行多重序列比对、基因序列翻译、蛋白质分析等方面的分析。通过 ExPASy 软件对 *HbSnRK2.7* 蛋白的分子量和等电点进行分析。通过 MEGA5.10 软件对 *HbSnRK2.7* 的氨基酸序列进行进化树分析。通过 NetPhos 3.1 软件分析 *HbSnRK2.7* 的磷酸化位点。

1.6 q-PCR 分析 利用 CFX384 实时荧光定量 PCR 系统 (Bio-Rad, 加利福尼亚, 美国) 进行 q-PCR 实验。依据基因丰度, 将 cDNA 稀释 10 倍作为 q-PCR 模板。实验反应体系和方法参照文献 [18]。内参基因为 *HbActin7a* 和 *HbRH8*。基因 *HbSnRK2.7* 荧光定量引物和内参引物见表 1。*HbSnRK2.7* 相对表达量通过  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  法进行分析<sup>[21]</sup>。

1.7 数据处理 采用 *t*-test 方法对基因相对表达量进行差异显著性分析 ( $P < 0.05$  为显著性差异;  $P < 0.01$  为极显著差异)。

## 2 结果与分析

2.1 橡胶树 *HbSnRK2.7* 基因的克隆与生物信息学分析 在 *HbSnRK2.7* 阅读框的两端设计引物,

通过 RT-PCR 技术及核苷酸测序技术, 以橡胶树 ‘93-114’ 的 cDNA 为模板, 克隆了 *HbSnRK2.7* 基因的完整阅读框 (图 1)。*HbSnRK2.7* 包含 364 个氨基酸, 预测的分子量和等电点分别为 41.39 kD 和 4.70。*HbSnRK2.7* 与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L Heynh.) *AtSnRK2.2*、*AtSnRK2.3*、黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) *CsSnRK2.2*、葡萄 (*Vitis vinifera* L) *VvSnRK2.3* 的核苷酸序列的同源性分别为 73.39%、74.98%、80.87% 和 77.99%。*HbSnRK2.7* 氨基酸序列与黄瓜 *CsSnRK2.2*、葡萄 *VvSnRK2.3*、蓖麻 (*Ricinus communis* L) *RcSnRK2.2*、玉米 (*Zea mays* L) *ZmSnRK2.2* 的氨基酸序列同源性分别为 90.96%、84.07%、65.11% 和 67.58%。虽然氨基酸序列同源性有一定差异, 但是它们具有保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域 (结构域 I), 可催化磷酸基从 ATP 转移到蛋白质底物上的丝氨酸/苏氨酸残基上 (图 2)。另外, 它们都有结构域 II、结构域 III 和结构域 IV。结构域 II 是 *HbSnRK2.7* 响应非生物胁迫所需的结构域; 结构域 III 紧挨结构域 II, 位于蛋白的 C 端, 是 ABA 依赖的 *HbSnRK2.7* 激活所需结构域; 结构域 IV 位于结构域 I 内, *HbSnRK2.7* 蛋白的 N 端, 是与 ATP 结合的保守结构域 (图 2)。结构域的保守性表明它们可能具有相似的生物学功能。通过 NetPhos 3.1 软件分析 *HbSnRK2.7* 的磷酸化位点, 结果显示 *HbSnRK2.7* 含有 13 个丝氨酸、5 个苏氨酸和 4 个酪氨酸磷酸化位点, 大部分磷酸化位点集中在丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域 (图 2)。聚类结果显示, 橡胶树 *HbSnRK2.7* 与拟南芥 *AtSnRK2.2*、*AtSnRK2.3*、黄

```

1 ATGGATCGATCGACGATTACTGTGGGGCCTGCTATGGACATGCCGATCATGCACGATAGT
1 M D R S T I T V G P A M D M P I M H D S
61 GACCCGTACGATTTTGTCCGGGATATTGGGTCGGGAACTTCGGGGTTGCCAGACTGATG
21 D R Y D F V R D I G S G N F G V A R L M
121 AGAGATAAGGTCACCAAGGAGCTTGTGCTGTGAAGTATATCGAGAGAGGTGATAAGATT
41 R D K V T K E L V A V K Y I E R G D K I
181 GATGAAAATGTTCAAAGAGAAATTATTAATCACAGGTCCTCAGGCATCCCAACATTGTG
61 D E N V Q R E I I N H R S L R H P N I V
241 AGGTTTAAAGAGGTCATTTTAACTCCTACCCATCTGGCCATTGTGATGGAATATGCCTCT
81 R F K E V I L T P T H L A I V M E Y A S
301 GGGGAGAGCTTTTCGAGAAAATATGCAATGCTGCACGTTTCAGTGAGGATGAGGCTCGA
101 G G E L F E K I C N A A R F S E D E A R
361 TTCTTTTTTCAACAACATCATATCGGGGTTAGCTATTGCCATGCTATGCAAGTATGTCAC
121 F F F Q Q L I S G V S Y C H A M Q V C H
421 CGTGATTGAAGTTGGAGAACACTTTACTGGATGGAAGTGAGGCTCCTCGTTTGAAGATT
141 R D L K L E N T L L D G S E A P R L K I
481 TGATGTTTTGGTACTCCAAGTCTTCAAGTCTTCAAGTCTTCAAGTCTTCAAGTCTTCAAGT
161 C D F G Y S K S S V L H S Q P K S T V G
541 ACTCTGCATACATTGCGCCTGAGGTGTGTTGAGGCAAGAATACGATGGCAAGATTGCA
181 T P A Y I A P E V L L R Q E Y D G K I A
601 GATGTGTGGTCATGTGGGTAACCTTATATGTGATGCTGGTTGGAGCATATCCCTTTGAG
201 D V W S C G V T L Y V M L V G A Y P F E
661 GATCCTGATGAGCCAAAAGACTTCAGGAAGACAATACAGAGGATTCTTAATGTCAGTAT
221 D P D E P K D F R K T I Q R I L N V Q Y
721 TCCATCCAGACATTGTTTCAGATATCTCCCGAGTGTGAGATCTGATTTCTCGAATTTTC
241 S I P D I V Q I S P E C R D L I S R I F
781 GTTTTGATCCTGCAGCTAGGATTACCATTCCACAAATCAAGAACCATGAGTGGTTTCTG
261 V F D P A A R I T I P Q I K N H E W F L
841 AAGAATCTTCCAATGGACTTAATGGATGAAAATACAATGGGCAACCAGTTTGAAGAGCCT
281 K N L P M D L M D E N T M G N Q F E E P
901 GATCAACCCATGCAGAGTGTGATACCATAATGCAAAATAATTTCTGAGGCCACCATAACCG
301 D Q P M Q S V D T I M Q I I S E A T I P
961 GCAGCTGGGCCCATGGCCTTAATCGGTATATGGCAGACAACCTTGACATGGATGATGAT
321 A A G A H G L N R Y M A D N L D M D D
1 021 GACATGCTGGACITTTGATTCTGAACTCTGAGCTTGATGTGGATAGCAGTGGGAGATAGTT
341 D M L D F D S E S E L D V D S S G E I V
1 081 TATGCATTGCAATAA
361 Y A L Q *

```

图 1 橡胶树 *HbSnRK2.7* 基因的阅读框及其推导的氨基酸序列

瓜 *CsSnRK2.2*、葡萄 *VvSnRK2.3* 等属于 *SnRK2* 亚家族的第三组(图 3)。

**2.2 外施 ABA 和低温胁迫对橡胶树 *HbSnRK2.7* 基因表达的影响** ABA 处理下, 抗寒橡胶树‘93-114’树皮中的 *HbSnRK2.7* 基因呈下调表达趋势。在 ABA 处理 2 h 时, *HbSnRK2.7* 的表达量稍微变动, 没有显著差异。处理 4 h 时, *HbSnRK2.7* 已极显著下调表达, 在处理 8 h 时, 表达量下调到最低点。在处理 12 h 和 24 h 时, *HbSnRK2.7* 表达量稍微上调且趋于稳定, 但是其表达量仍显著低于 ABA 处理 0 h 时的表达量。低温胁迫下, *HbSnRK2.7* 基因在橡胶树‘93-114’中的表达呈下调趋势。在低温胁迫 2 h 时, *HbSnRK2.7* 的表达量极显著降低。

低温胁迫 4 h 和 8 h 时, *HbSnRK2.7* 继续下调表达, 在低温胁迫 12 h 时, 表达量上调, 但极显著低于低温胁迫 0 h 的表达量。低温胁迫 24 h 时, *HbSnRK2.7* 表达量下调到最低, 是低温胁迫 0 h 的表达量的 1/2(图 4)。

**2.3 橡胶树 *HbSnRK2.7* 基因在抗寒种质和不抗寒种质中的表达分析** 橡胶树 *HbSnRK2.7* 在不抗寒种质‘热垦 515’中的本底表达最高, 在抗寒种质‘桂研 73-165’中的本底表达最低。在不抗寒种质‘PB235’、‘热垦 514’、‘热垦 515’、‘海垦 1’和‘热垦 501’中的整体表达量显著高于抗寒种质‘桂研 73-165’、‘GT1’、‘INA873’、‘湛试 32-713’和‘93-114’中的表达量(图 5)。

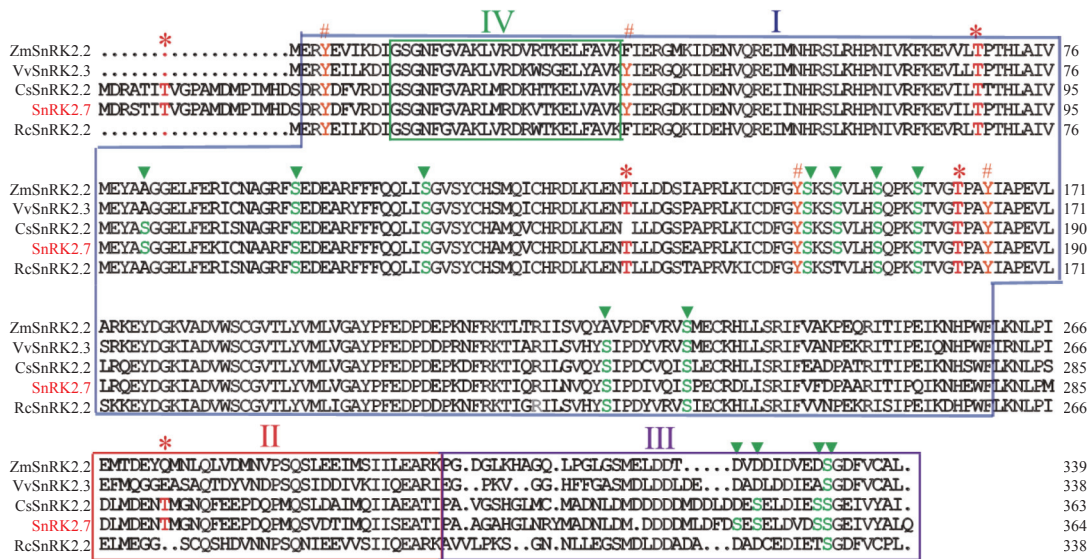


图 2 橡胶树 HbSnRK2.7 蛋白与其他植物的 SnRK2 蛋白结构及其磷酸化位点

I: 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶催化结构域, II: 参与非生物胁迫所需结构域, III: ABA 依赖的 SnRK2 激活所需结构域, IV: ATP 结合结构域, 星号表示苏氨酸磷酸化位点, 三角号表示丝氨酸磷酸化位点, 井字号表示酪氨酸磷酸化位点。

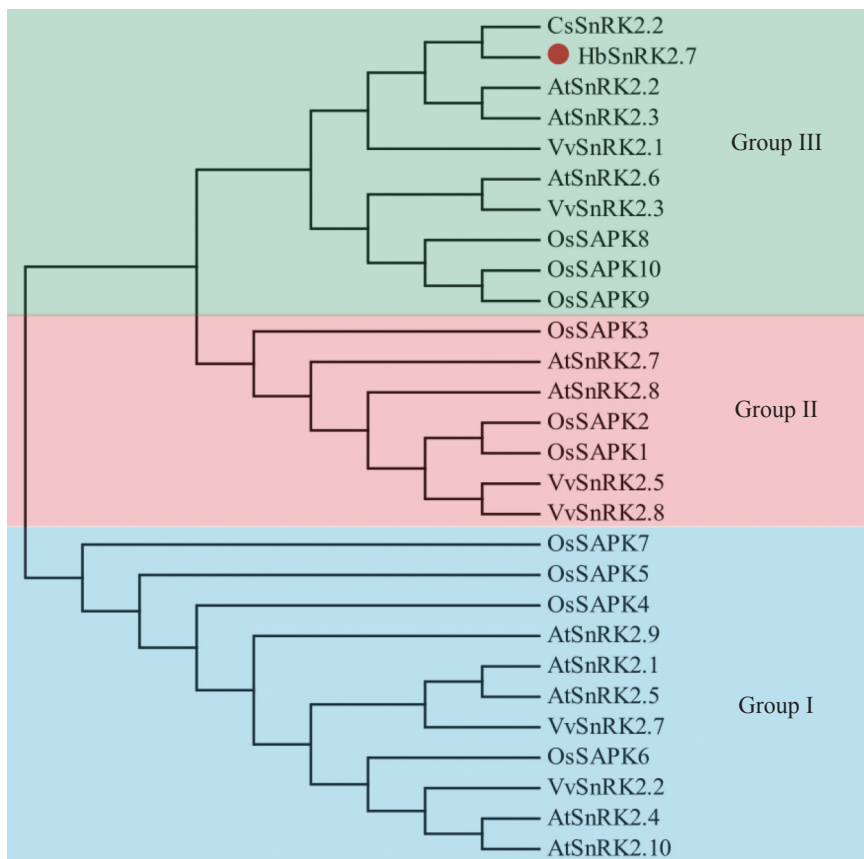


图 3 橡胶树 HbSnRK2.7 蛋白与其他植物的 SnRK2 蛋白的系统进化树分析

橡胶树 HbSnRK2.7(AT058465)、黄瓜 CsSnRK2.2(XP\_004148038)、拟南芥 AtSnRK2.1(NP\_196476)、AtSnRK2.2 (NP\_001190047)、AtSnRK2.3(NP\_001318893)、AtSnRK2.4(NP\_001031021)、AtSnRK2.5(NP\_201170)、AtSnRK2.6 (NP\_567945)、AtSnRK2.7(NP\_195711)、AtSnRK2.8(NP\_001077839)、AtSnRK2.9(NP\_179885)、AtSnRK2.10(NP\_176290)、水稻 OsSAPK10(NP\_001389116)、OsSAPK9(NP\_001391667)、OsSAPK8(NP\_001389202)、OsSAPK3(XP\_052134301)、OsSAPK2A(NP\_001390090)、OsSAPK1(NP\_001389097)、OsSAPK6(NP\_001388802)、OsSAPK5(NP\_001389390)、OsSAPK4 (NP\_001383791)、OsSAPK7(BAH93169)、葡萄 VvSnRK2.3(XP\_002284959)、VvSnRK2.2(XP\_002269221)、VvSnRK2.5 (XP\_003634478)、VvSnRK2.7(XP\_002267922)、VvSnRK2.8(XP\_002262731)。

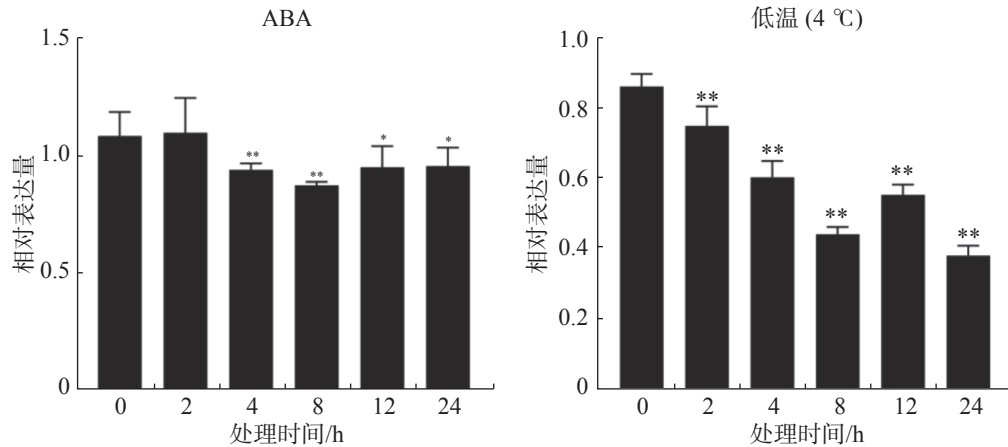


图4 ABA和低温胁迫对橡胶树 *HbSnRK2.7* 基因表达的影响

\*: 显著差异 ( $P < 0.05$ ); \*\*: 极显著差异 ( $P < 0.01$ ), 下图同。

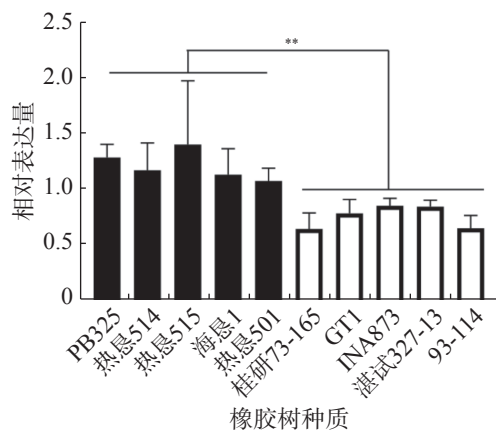


图5 橡胶树 *HbSnRK2.7* 在不同抗寒种质中的表达

### 3 讨论

本研究利用 RT-PCR 技术从橡胶树‘93-114’中分离鉴定了丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 *HbSnRK2.7* 基因, 橡胶树 *HbSnRK2.7* 基因与草本植物拟南芥 *AtSnRK2.2*、*AtSnRK2.3*、黄瓜 *CsSnRK2.2*、木本植物葡萄 *VvSnRK2.3* 的同源性较高, 核苷酸序列的一致性在 73% 以上, 氨基酸序列的一致性在 65% 以上。它们具有共同的保守丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶催化结构域<sup>[22-24]</sup>, 同源性比较高, 该结构域是 SnRK2 蛋白磷酸化功能的核心催化中心, 其中包含 ATP 结合结构域, 可催化磷酸基从 ATP 转移到蛋白质底物上的丝氨酸/苏氨酸残基上, 使底物磷酸化<sup>[25]</sup>。SnRK2s 参与了植物对非生物胁迫和脱落酸(ABA)依赖的植物发育的响应。SnRK2 亚家族分为 3 个组: 组 I 中的蛋白激酶是不被 ABA 激活的; 组 II 中的蛋白激酶不被 ABA 激活或

被 ABA 微弱激活, 取决于植物种类; 组 III 中的蛋白激酶强烈响应 ABA 诱导<sup>[22]</sup>。*HbSnRK2.7* 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族的 SnRK2 亚家族的组 III 成员, 具有 ABA 激活所需结构域, 推测 *HbSnRK2.7* 能够响应 ABA 的刺激反应。另外, *HbSnRK2.7* 还具有响应非生物胁迫所需的结构域, 推测 *HbSnRK2.7* 能够响应非生物胁迫反应。磷酸化位点主要集中在 *HbSnRK2.7* 的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶催化结构域, 磷酸化/去磷酸化调控了 *HbSnRK2.7* 对底物的磷酸化活性。

植物在遭受干旱、低温、高盐等环境胁迫时, 其内源激素 ABA 迅速合成和积累, 在植物应对环境胁迫中起着重要作用<sup>[1-2]</sup>。SnRK2s 蛋白激酶是 ABA 信号途径的关键环节, 介导依赖 ABA 的非生物胁迫反应<sup>[26-27]</sup>。拟南芥 *AtSnRK2.2*、*AtSnRK2.3* 响应 ABA 刺激反应, 呈下调表达趋势<sup>[28-30]</sup>。*HbSnRK2.7* 与黄瓜 *CsSnRK2.2* 核苷酸序列的同源性为 80.87%, *CsSnRK2.2* 响应 ABA 诱导下调表达<sup>[23]</sup>。*HbSnRK2.7* 与葡萄 *VvSnRK2.1* 核苷酸序列的同源性为 75.08%, *VvSnRK2.1* 同样响应 ABA 诱导下调表达<sup>[31]</sup>。*HbSnRK2.7* 与拟南芥 *AtSnRK2.2*、*AtSnRK2.3*、黄瓜 *CsSnRK2.2*、葡萄 *VvSnRK2.1* 的表达模式一致, 受 ABA 诱导下调表达。推测 *HbSnRK2.7* 可能在 ABA 信号转导途径中起着负调控的作用。然而与 *HbSnRK2.7* 同属于亚家族 III 的水稻 *SAPK8*、*SAPK9* 和 *SAPK10* 受 ABA 诱导上调表达<sup>[32]</sup>, 暗示即使同一亚家族的成员, 在不同的物种对于 ABA 刺激的响应也存在差异。

*SnRK2s* 是 ABA 信号途径的重要环节, 参与植物低温胁迫反应<sup>[33]</sup>。拟南芥 *AtSnRK2.6* 受低温胁迫上调表达, 激活的 *AtSnRK2.6* 磷酸化 ICEs, 干扰了 E3 连接酶 HOS1 与 ICEs 的互作, 从而抑制了 ICEs 经 26S 蛋白酶体的降解, 增强其稳定性和转录活性, 提高植物的抗寒性<sup>[16]</sup>。橡胶树 *HbSnRK2.6A/B/C* 受 ABA 和低温诱导上调表达, 且通过调控抗寒关键因子 *HbICE2* 的转录活性, 参与 ABA 调控橡胶树响应低温胁迫<sup>[34]</sup>。本研究克隆的橡胶树 *HbSnRK2.7* 对 ABA 处理和低温胁迫的响应与 *HbSnRK2.6s* 相反, 该基因既在 ABA 处理下显著下调表达, 又受低温胁迫显著下调表达, 而且在不抗寒种质中的表达量显著高于抗寒种质, 表明橡胶树 *HbSnRK2.7* 可能作为负调控因子, 介导 ABA 依赖的橡胶树低温胁迫抗性的形成。与 *HbSnRK2.7* 同源性比较高的玉米 *ZmSnRK2.2*<sup>[35]</sup>、葡萄 *VvSnRK2.1*、*VvSnRK2.3*<sup>[36]</sup> 在低温胁迫下呈下调表达模式。鹅掌楸 (*Liriodendron chinense*) *SnRK2* 家族 2 个成员 (*Lchi00543* 和 *Lchi01348*) 受 ABA 和低温诱导同样下调表达<sup>[37]</sup>。*HbSnRK2.7* 类似的基因都是对应物种 *SnRK2* 家族的极少数成员, 与其他受 ABA 和低温正向调控的多数成员不同<sup>[38]</sup>。因此, 这些基因可能作为负调控因子在植物响应低温胁迫中起着特殊的作用。

## 参考文献:

- [1] YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57: 781 – 803.
- [2] QIN F, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Achievements and challenges in understanding plant abiotic stress responses and tolerance[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2011, 52(9): 1569 – 1582.
- [3] KLINE K G, BARRETT-WILT G A, SUSSMAN M R. *In planta* changes in protein phosphorylation induced by the plant hormone abscisic acid[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(36): 15986 – 15991.
- [4] FINKELSTEIN R. Abscisic Acid synthesis and response [J]. *The Arabidopsis Book*, 2013, 11: e0166.
- [5] MELCHER K, NG L M, ZHOU X E, et al. A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors[J]. *Nature*, 2009, 462(7273): 602 – 608.
- [6] MIYAZONO K I, MIYAKAWA T, SAWANO Y, et al. Structural basis of abscisic acid signalling[J]. *Nature*, 2009, 462(7273): 609 – 614.
- [7] YIN P, FAN H, HAO Q, et al. Structural insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2009, 16(12): 1230 – 1236.
- [8] HAIDER M S, ZHANG C, KURJOGI M M, et al. Insights into grapevine defense response against drought as revealed by biochemical, physiological and RNA-Seq analysis[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 13134.
- [9] SHAZADEE H, KHAN N, WANG J, et al. Identification and expression profiling of protein phosphatases (PP2C) gene family in *Gossypium hirsutum* L[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(6): 1395.
- [10] MA Y, SZOSTKIEWICZ I, KORTE A, et al. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors[J]. *Science*, 2009, 324(5930): 1064 – 1068.
- [11] SANTIAGO J, DUPEUX F, ROUND A, et al. The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid[J]. *Nature*, 2009, 462(7273): 665 – 668.
- [12] HAO Q, YIN P, LI W, et al. The molecular basis of ABA-independent inhibition of PP2Cs by a subclass of PYL proteins[J]. *Molecular Cell*, 2011, 42(5): 662 – 672.
- [13] HRABAK E M, CHAN C W M, GRIBSKOV M, et al. The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases[J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(2): 666 – 680.
- [14] ZONG W, TANG N, YANG J, et al. Feedback regulation of ABA signaling and biosynthesis by a bZIP transcription factor targets drought-resistance-related genes[J]. *Plant Physiology*, 2016, 171(4): 2810 – 2825.
- [15] WANG Z, REN Z, CHENG C, et al. Counteraction of ABA-mediated inhibition of seed germination and seedling establishment by ABA signaling terminator in *Arabidopsis*[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(9): 1284 – 1297.
- [16] DING Y, LI H, ZHANG X, et al. OST1 kinase modulates freezing tolerance by enhancing ICE1 stability in *Arabidopsis*[J]. *Developmental Cell*, 2015, 32(3): 278 – 289.
- [17] HU Y, JIANG L, WANG F, et al. Jasmonate regulates the inducer of *cbf* expression-C-repeat binding factor/dre binding factor1 cascade and freezing tolerance in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2013, 25(8): 2907 – 2924.
- [18] 李言, 余文才, 陈月昇, 等. 巴西橡胶树过氧化氢酶基因 *HbCAT2* 的克隆及表达分析[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(21): 6993 – 7002.
- [19] DENG X, WANG J, LI Y, et al. Comparative transcriptome analysis reveals phytohormone signalings, heat shock module and ROS scavenger mediate the cold-tolerance of rubber tree[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 4931.

- [20] TANG C, YANG M, FANG Y, et al. The rubber tree genome reveals new insights into rubber production and species adaptation[J]. *Nature Plants*, 2016, 2(6): 16073.
- [21] LI Y, QUAN C, YANG S, et al. Functional identification of ICE transcription factors in rubber tree[J]. *Forests*, 2022, 13(1): 52.
- [22] KULIK A, WAWER I, KRZYWIŃSKA E, et al. SnRK2 protein kinases-key regulators of plant response to abiotic stresses[J]. *Omic*, 2011, 15(12): 859 – 872.
- [23] WAN Z, LUO S, ZHANG Z, et al. Identification and expression profile analysis of the *SnRK2* gene family in cucumber[J]. *PeerJ*, 2022, 10: e13994.
- [24] BONEH U, BITON I, SCHWARTZ A, et al. Characterization of the ABA signal transduction pathway in *Vitis vinifera*[J]. *Plant Science*, 2012, 187: 89 – 96.
- [25] LIN Z, LI Y, WANG Y, et al. Initiation and amplification of SnRK2 activation in abscisic acid signaling[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 2456.
- [26] BELDA-PALAZÓN B, ADAMO M, VALERIO C, et al. A dual function of SnRK2 kinases in the regulation of SnRK1 and plant growth[J]. *Nature Plants*, 2020, 6(11): 1345 – 1353.
- [27] WAADT R, SELLER C A, HSU P K, et al. Plant hormone regulation of abiotic stress responses[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2022, 23(10): 680 – 694.
- [28] BOUDSOCQ M, BARBIER-BRYGOO H, LAURIÈRE C. Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(40): 41758 – 41766.
- [29] FUJII H, VERSLUES P E, ZHU J K. Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2007, 19(2): 485 – 494.
- [30] KOBAYASHI Y, MURATA M, MINAMI H, et al. Abscisic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors[J]. *The Plant Journal*, 2005, 44(6): 939 – 949.
- [31] 陈娜娜. 葡萄 *SnRK2* 基因家族的全基因组鉴定、表达分析及 *VvSnRK2.2* 基因的功能验证 [D]. 南京: 南京农业大学, 2013.
- [32] KOBAYASHI Y, YAMAMOTO S, MINAMI H, et al. Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase 2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid[J]. *Plant Cell*, 2004, 16(5): 1163 – 1177.
- [33] CHEN X, DING Y, YANG Y, et al. Protein kinases in plant responses to drought, salt, and cold stress[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(1): 53 – 78.
- [34] WANG X, LIU W C, ZENG X W, et al. HbSnRK2.6 functions in ABA-regulated cold stress response by promoting HbICE2 transcriptional activity in *Hevea brasiliensis*. *Int J Mol Sci.*, 2021, 22(23): 12707.
- [35] HUAI J, WANG M, HE J, et al. Cloning and characterization of the *SnRK2* gene family from *Zea mays*[J]. *Plant Cell Reports*, 2008, 27(12): 1861 – 1868.
- [36] 马宗桓, 毛娟, 李文芳, 等. 葡萄 *SnRK2* 家族基因的鉴定与表达分析[J]. *园艺学报*, 2016, 43(10): 1891 – 1902.
- [37] HUSSAIN Q, ZHENG M, CHANG W, et al. Genome-wide identification and expression analysis of SnRK2 gene family in dormant vegetative buds of *Liriodendron chinense* in response to abscisic acid, chilling, and photoperiod. *Genes*, 2022, 13(8): 1305.
- [38] MASZKOWSKA J, SZYMAŃSKA K P, KASZTELAN A, et al. The multifaceted regulation of SnRK2 kinases[J]. *Cells*, 2021, 10(9): 2180.



## Cloning and expression analysis of sucrose non-fermenting 1-related protein kinase 2.7 (*SnRK2.7*) gene in *Hevea brasiliensis*

LIU Yunfei<sup>1</sup>, LI Yan<sup>2</sup>, TIAN Weimin<sup>2</sup>

(1. College of Tropical Crops, Hainan university, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture/State Key Laboratory Incubation Base for Cultivation & Physiology of Tropical Crops, Rubber Research Institute, CATAS, Haikou, Hainan 571101, China)

**Abstract:** To explore the role of sucrose non-fermentation associated protein kinase 2 (SnRK2) in the response of *Hevea brasiliensis* to low temperature stress, a member of the SnRK2 subfamily, named *HbSnRK2.7*, was cloned from the leaves of the cold-resistant clone Reyan '93-114' of *Hevea brasiliensis* by using RT-PCR. The gene cloned contains an open reading frame of 1 095 bp that encodes a protein of 364 amino acids. *HbSnRK2.7* has a conserved serine/threonine protein kinase domain with a molecular weight of 41.39 kD and an isoelectric point of 4.70. It is predicted that it can catalyze the transfer of phosphate groups from ATP to the serine/threonine residues on the protein substrate, which is also the concentrated region of phosphorylation sites. It also has domains needed for abiotic stress and ABA-dependent domains for *HbSnRK2.7* activation. Quantitative PCR (qPCR) results showed that *HbSnRK2.7* gene was down-regulated in response to ABA induction. When treated with ABA for 8 h, the expression was down-regulated to the lowest point. Under low temperature stress, the expression of *HbSnRK2.7* decreased significantly. The expression of *HbSnRK2.7* was down-regulated continuously under low temperature stress for 4 h and 8 h, and the expression of *HbSnRK2.7* was down-regulated to the lowest level at 24 h under low temperature stress, which was about 1/2 of non-stress expression. Moreover, the expression of *HbSnRK2.7* was significantly higher in the cold-susceptible clones than in the cold-resistant clones. These results suggest that *HbSnRK2.7* may act as a negative regulatory factor to mediate the formation of low temperature stress resistance of *Hevea brasiliensis* dependent on ABA.

**Keywords:** *Hevea brasiliensis* Muell. Arg; SnRK2; q-PCR; cold resistance; ABA signaling pathway

(责任编辑: 潘学峰)