

橡胶树胶乳 *HbHSP90.6* 基因克隆、表达与亚细胞定位分析

刘明洋, 杨 洪, 代龙军, 王立丰, 郭冰冰*

农业农村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/农业农村部儋州热带作物科学观测实验站/中国热带农业科学院橡胶研究所, 海南海口 571101

摘 要: HSP90 是维持细胞内稳态的关键成分, 其通过调节其底物的成熟、稳定性、活性和翻转来控制多个细胞过程。橡胶树 (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) 是生产天然橡胶的重要来源, 其拥有数千种工业用途, 具有较高的社会经济价值。利用 PCR 技术从橡胶树品种热研 73397 胶乳中克隆 1 个 HSP90 家族成员基因, 命名为 *HbHSP90.6* 基因 (GenBank 登录号: OP375588), 序列分析表明其编码区 (CDS) 为 2112 bp。理化性质分析表明其相对分子量为 80 774.85 Da, 等电点为 5.04, 不稳定系数为 38.98, 总平均亲水性为 -0.610, 推测 *HbHSP90.6* 蛋白是一个稳定的亲水蛋白。保守结构域分析和多序列比对结果显示, *HbHSP90.6* 含有 1 个 PTZ00272 的结构域和包含高度保守的 MEEVD 基序, 属于 HSP90 家族成员。进化分析结果显示, *HbHSP90.6* 与拟南芥 *AtHSP90.1* (NM_124642.4) 和水稻 *OsHsp90-1* (LOC_Os04g01740) 聚在一起, 同源性分别为 92.34% 和 86.44%。组织表达分析显示: *HbHSP90.6* 基因在胶乳中的基因表达量显著高于根、花、枝、茎、叶, *HbHSP90.6* 基因在胶乳中的表达量相对于花达到 283 倍, 推测 *HbHSP90.6* 基因可能参与乳管胞内运输和胶乳代谢调控; 胶乳中的伤害处理显著上调 *HbHSP90.6* 基因的表达, 是处理前的 19 倍, 推测 *HbHSP90.6* 基因参与机械伤害调控的橡胶树生理与代谢活动反应; *HbHSP90.6* 基因在植物激素乙烯利、茉莉酸处理和吲哚-3-乙酸处理的 6 h 时表达量均达到最高, 分别是处理前的 45 倍、17 倍和 6 倍; 在油菜素内酯处理后的 12 h 时, *HbHSP90.6* 基因表达量显著上调表达, 达到处理前的 50 倍, 推测 *HbHSP90.6* 基因参与植物激素介导的转录调控。通过构建 35S::*HbHSP90.6*::GFP 融合表达载体进行亚细胞定位, 结果显示 *HbHSP90.6* 基因定位在细胞质和细胞核中, 与亚细胞定位预测结果一致。该研究结果为阐明 *HbHSP90.6* 基因在植物激素信号调控的橡胶树逆境胁迫和胶乳代谢分子机制研究奠定坚实基础。

关键词: 橡胶树; *HbHSP90.6*; 油菜素内酯; 表达分析; 亚细胞定位

中图分类号: S794.1 文献标识码: A

Analysis of *HbHSP90.6* Gene Cloning, Expression and Subcellular Localization in Rubber Tree Latex

LIU Mingyang, YANG Hong, DAI Longjun, WANG Lifeng, GUO Bingbing*

Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / State Key Laboratory Incubation Base for Cultivation & Physiology of Tropical Crops / Danzhou Investigation & Experiment Station of Tropical Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: HSP90 is a key component in maintaining intracellular homeostasis, and it controls multiple cellular processes by regulating the maturation, stability, activity and turnover of its substrates. Rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) is an important source for the production of natural rubber, which has thousands of industrial uses and a high socioeconomic value. Using PCR technique, an HSP90 family member gene, named *HbHSP90.6* gene (GenBank accession number: OP375588), was cloned from rubber tree variety Reyan73397 latex, and the sequence analysis showed that its

收稿日期 2022-09-22; 修回日期 2022-11-02

基金项目 海南省自然科学基金青年基金项目 (No. 322QN408)。

作者简介 刘明洋 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 橡胶树生理与分子生物学。*通信作者 (Corresponding author): 郭冰冰 (GUO Bingbing), E-mail: guobingbing1989@126.com。

coding region (CDS) was 2112 bp. Physicochemical analysis showed that its relative molecular weight was 80 774.85 Da, isoelectric point was 5.04, instability coefficient was 38.98, and total average hydrophilicity was -0.610 , presumably HbHSP90.6 protein is a stable hydrophilic protein. The results of conserved structural domain analysis and multiple sequence alignment showed that HbHSP90.6 contained a structural domain of PTZ00272 and a highly conserved MEEVD motif, which is a member of the HSP90 family. Phylogenetic analysis showed that HbHSP90.6 clustered with *Arabidopsis* AtHSP90.1 (NM_124642.4) and rice OsHsp90-1 (LOC_Os04g01740) with 92.34% and 86.44% homology, respectively. Tissue expression analysis showed that the gene expression of *HbHSP90.6* gene in latex was significantly higher than that in root, flower, branch, stem and leaf, and the expression of *HbHSP90.6* gene in latex reached 283-fold relative to flowers, presumably the *HbHSP90.6* gene may be involved in intracellular transport of latex tubes and regulation of latex metabolism. Mechanical wounding treatment in latex significantly upregulated the expression of *HbHSP90.6* gene by 19 fold compared to the pretreatment pair, and it is hypothesized that *HbHSP90.6* gene is involved in mechanical wounding regulated physiological and metabolic activity responses in rubber trees. The expression of *HbHSP90.6* gene reached the highest level at 6 h of treatment with the phytohormones ethephon, jasmonic acid and 3-Indoleacetic acid, which were 45 fold, 17 fold and 6 fold higher than before treatment, respectively. The expression of *HbHSP90.6* gene was significantly upregulated at 12 h after brassinosteroids treatment, reaching 50 fold of the pretreatment expression, presumably the *HbHSP90.6* gene is involved in phytohormone mediated transcriptional regulation. Subcellular localization was performed by constructing a 35S::HbHSP90.6::GFP fusion expression vector, and the results showed that the *HbHSP90.6* gene was localized in the cytoplasm and nucleus, which was consistent with the predicted results of subcellular localization. The results of this study would provide a thorough basis for elucidating the molecular mechanisms of *HbHSP90.6* gene in plant hormone signaling-regulated stress and latex metabolism in rubber trees.

Keywords: rubber tree; *HbHSP90.6*; brassinosteroids; expression analysis; subcellular localization

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.10.001

热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, HSP90) 是一类重要的分子伴侣, 其影响多种客户蛋白的构象来调节动物细胞的生长发育和先天免疫反应^[1]。此外, HSP90 还通过调节细胞蛋白质稳态参与植物在正常和胁迫条件下的生长发育^[2]。过表达 *GmHSP90* 降低拟南芥在热、渗透和盐胁迫诱导下的损伤^[3]。遗传分析表明, HSP90 是植物抗性 *R* 基因介导的免疫反应所必需的^[4]。植物缺失 HSP90 蛋白会降低拟南芥 RAR1 对 *R* 基因介导的免疫功能^[5]。同时, AtHSP90 也被报道在高温下调节植物的生长发育。在短暂的热休克处理中 *HSP90* 的 mRNA 水平增加, 使拟南芥花朵停止发育的趋势减弱, 表明 *HSP90* 在植物生殖过渡和花的发育过程中发挥重要的作用^[6]。HSP90 还通过抑制某些目标蛋白的突变来缓冲植物的表型变异。在拟南芥中抑制 *HSP90* 基因的表达后, 拟南芥的 *tir1-1* 突变体会导致拟南芥根部生长缺陷^[7]。此外, 格尔德霉素 (GDA) 作为 HSP90 的体内外抑制剂被广泛应用。外源施用格尔德霉素可导致多种发育表型, 如生长迟缓和叶片卷曲^[8-9]。为了使植物能够适应不断变化的环境, 植物激素及其相互间的信号传递在整合内外信号中起着关键作用^[10]。格尔德霉素抑制 HSP90 中 ATP 酶活性后

会引起 BES1 的过度磷酸化, 并破坏油菜素内酯 (BR) 响应基因的表达, 表明 HSP90 在 BR 信号通路中被证明是维持 BES1 去磷酸化状态所必需的^[11]。生长素和茉莉酸的激素受体成分也被确定为 HSP90 伴侣系统的客户, 这表明 HSP90 直接依赖于激素信号转导^[12]。*HSP90* 基因在模式植物中的功能已得到广泛研究, 而其在橡胶树中的功能鲜有报道。

大戟科橡胶树 (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) 是生产天然橡胶 (顺-1,4-聚异戊二烯, NR) 最可靠的来源, 天然橡胶的合成和储存在橡胶树乳管细胞^[13]。橡胶树的树皮每 2~3 d 切除 1 次, 切断乳汁管环以使乳胶流出, 每棵树从乳汁管中排出几十到几百毫升的胶乳, 用于可持续的橡胶生产^[14]。然而, 我国橡胶树植胶区位于热带北缘和南亚热带地区, 经常遭受台风、寒潮和干旱的影响^[15]。橡胶树无性系维管形成层乳汁管环的分化不仅受环境条件的影响, 还受基因控制。因此, 选育抗逆高产的橡胶树无性系是橡胶树育种的重要目标。为解析 *HSP90* 基因在橡胶树中的抗逆功能, 本研究分析乙烯、茉莉酸、生长素和油菜素内酯激素以及机械伤害处理对 *HbHSP90.6* 基因表达的影响, 并构建植物瞬时表达载体转化烟草分

析其亚细胞定位, 为深入揭示橡胶树胶乳 *HbHSP90.6* 基因在激素信号通路和胁迫反应机制中的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 本研究所用的橡胶树种植于中国热带农业科学院试验场三队的 10 a 树龄正常割胶巴西橡胶树无性系热研 73397。用于瞬时基因表达试验的本氏烟草种子来源于本实验室。

1.1.2 菌株与试剂 所用绿色荧光融合表达载体 pGREEN 由本实验室保存; Trans1-T1 Phage Resistant 化学感受态细胞购自 TRANS 生物公司; 农杆菌 GV3101 菌株购自唯地生物公司; 连接试剂盒 (零背景 pTOPO-Blun Simple 闪电克隆试剂盒) 购自金百特生物公司; 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒购自 TIANGEN 公司; 反转录试剂盒 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Thermo; 荧光定量试剂盒 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 和产物回收试剂盒 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit 均购自 Vazyme 公司; 质粒提试剂盒 E.Z.N.A Plasmid Mini Kit I 购自 OMEGA 公司。

1.2 方法

1.2.1 材料处理 选取橡胶树品种热研 73397 的根、花、枝、茎、叶和胶乳作为 *HbHSP90.6* 基因克隆和不同组织的表达量分析材料。不同的激素和胁迫按照以下方法: 配制 1.5% (V/V) 乙烯利 (ethephon, ETH)、200 $\mu\text{mol/L}$ 茉莉酸 (jasmonic acid, JA)、66 $\mu\text{mol/L}$ 吲哚-3-乙酸 (3-indoleacetic acid, IAA)、1 $\mu\text{mol/L}$ 油菜素内酯 (brassinosteroids, BR), 用毛刷均匀涂在橡胶树割线上下约 2 cm 割面上。橡胶树的伤害处理是在割线下方 3 cm 处, 沿割线每隔 5 cm 按下一个大头钉, 图钉一直保留到采样结束。以 0.05% (V/V) 乙醇溶液为对照, 处理和对照分别在 0、3、6、12、24 h 同步采集胶乳, 滴落的胶乳均用液氮速冻收集, 后保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。以上每种处理均设 3 次重复。

1.2.2 RNA 的提取和 cDNA 的合成 胶乳总 RNA 的提取参照刘明洋等^[16]的方法进行提取, RNA 反转录 cDNA 方法按照 Thermo 反转录试剂盒实验步骤进行, 反转获得的 cDNA 均稀释到 100~200 ng/ μL , 保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱后用于基因克

隆和荧光定量分析。

1.2.3 荧光定量 PCR 分析 采用软件 primer premier 6.0 设计 *HbHSP90.6* 基因的 qRT-PCR 引物 (QF: GGTATCGGCATGACCAAGG, QR: TCCG CTACAAGGTAAGCAGAGT), 以反转录的 cDNA 为模板, *HbActin* 基因为内参 (F: GATGTGG ATATCAGGAAGGA, R: CATACTGCTTGGAGCA AGA), 采用 SYBR Green 法在 Bio-Rad 公司的 CFX 实时荧光定量 PCR 仪中进行扩增, 分析扩增完成后所获得的溶解曲线图和 C_q 值。基因相对表达结果在 Excel 2016 软件用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[17] 进行分析计算。使用 SPSS Statistics 25 (IBM) 进行单因素 ANOVA 检验分析差异显著性。采用 Origin 2018 (Origin Lab Corporation) 软件制图。

1.2.4 生物信息学分析 在 NCBI 蛋白数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) 下载拟南芥、水稻的氨基酸序列用于多序列比对和系统进化树分析; 用 NCBI Conserved Domains (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?>) 分析保守结构域; 用 ExPASy ProtParam (web.expasy.org/protparam/) 在线软件分析 *HbHSP90.6* 理化性质; 用 DeepLoc1.0 (www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc/) 在线软件进行亚细胞定位预测。

1.2.5 *HbHSP90.6* 基因克隆和植物瞬时表达载体构建 在橡胶树基因组中获得 *HbHSP90.6* 基因序列, 设计 *HbHSP90.6* 基因特异性引物 (F: GC GCTCTTTGCTTCG, R: CCCTGAAATCGGGTA)。以反转录得到的橡胶树热研 73397 胶乳 cDNA 为模板, 按照高保真酶试剂盒说明书进行扩增, PCR 扩增产物纯化后连接 pESI-Blunt vector 平末端载体转化 DH5 α 感受态细胞, 经 PCR 检测后挑取阳性克隆菌落送测序确认。结合 pGREEN 载体图谱及去除终止密码子后的 *HbHSP90.6* 的核酸序列, 通过 CD designV1.04 软件设计带有 *Hind* III 和 *Bam* H I 酶切位点插入片段的同源重组引物 (GF: gtcgacggtatcgataagcttATGGCGGATGTGAAGATG GC, GR: ttactcactagtgatccGTCTACTTCCTCC ATCTTGCTCTCC), 以 *HbHSP90.6* 质粒为模板进行 PCR 扩增, 同时对表达载体 pGREEN 进行双酶切。将扩增目的条带和载体酶切产物按 Vazyme 胶回收试剂盒说明书 (FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit) 进行回收纯化, 获得的胶回收产物通过同源重组体系连接后转化 DH5 α 感受态细胞, 在含有 Kana 抗性的 LB 平板上培养。测序验

证后提取质粒电击转化农杆菌 GV3101, 菌液和甘油 1 : 1 的比例混匀保存-80 °C 冰箱备用。

1.2.6 HbHSP90.6 基因亚细胞定位 将 PCR 检测为阳性的农杆菌单菌落加入 5 mL LB 液体培养基 (50 mg/L Rif+100 mg/L Kana) 28 °C 振荡培养至 OD₆₀₀=0.8 后收集菌体, 再吸取 100 μL 基因的菌液到含有 50 mL LB 培养基 (50 mg/L Rif+100 mg/L Kana) 的三角瓶中振荡过夜培养。在室温条件下 3200 g 离心 10 min, 弃上清收集菌体, 用重悬液 (1/2 MS, pH 5.7) 重悬菌体, 静置 2 min, 弃上清, 用侵染液 (10 mmol/L MES、10 mmol/L MgCl₂、150 μmol/L 乙酰丁香酮) 重悬菌体至 OD₆₀₀=0.6, 避光静置 2 h。选择长势一致的 5~6 周龄本氏烟草提前浇足水暗培养 1 d, 用 1 mL 无菌注射器吸取菌液从烟草叶片背面注射, 烟草注射后 24~48 h 内观察, 观察时撕取叶片表皮用 4,6-二脒基-2-苯

基吡啶 (DAPI) 进行染色, 用 0.9% 生理盐水洗涤后用盖玻片盖好, 用蔡司 LSM 880 激光共聚焦显微镜在波长为 488 nm 的激发光下观察绿色荧光信号, 拍照并保存实验结果。

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析

序列分析表明 HbHSP90.6 的编码区 (CDS) 为 2112 bp (GenBank 登录号: OP375588)。理化性质分析表明其分子量 (MW) 为 80 774.85 Da, 等电点 (pI) 为 5.04, 不稳定系数为 38.98, 总平均亲水性为-0.610, 推测该蛋白是一个稳定的亲水蛋白。保守结构域分析和多序列比对结果显示, HbHSP90.6 含有 PTZ00272 结构域, 且包含高度保守的 MEEVD 基序 (图 1)。DeepLoc1.0 预测分析显示, HbHSP90.6 蛋白 92.8% 定位在细胞质 (图 2)。

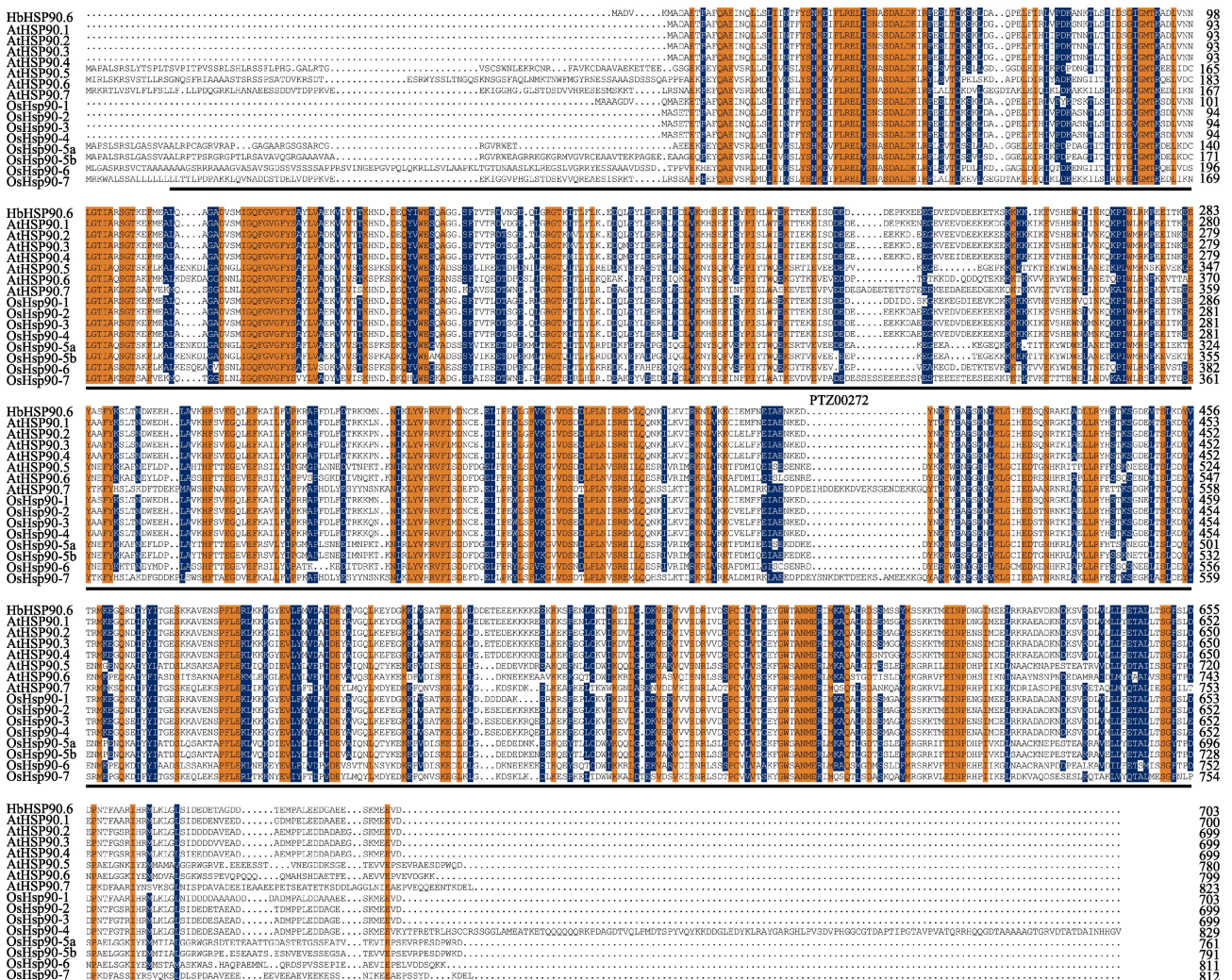


图 1 HbHSP90.6 与拟南芥和水稻 HSP90 蛋白的多序列比对

Fig. 1 Multiple sequence alignment of HbHSP90.6 with Arabidopsis and rice HSP90 proteins

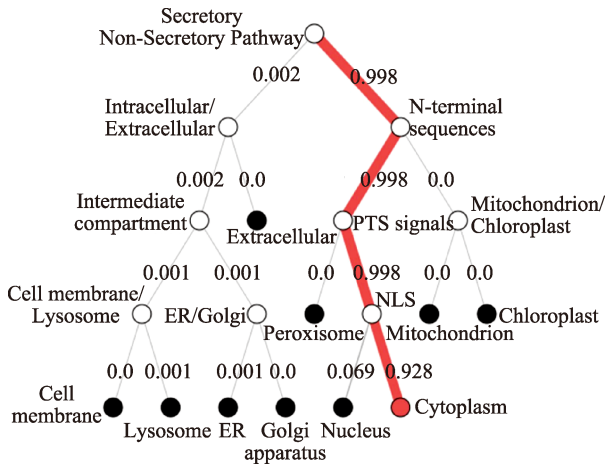


图 2 *HbHSP90.6* 亚细胞定位预测

Fig. 2 Prediction of *HbHSP90.6* subcellular localization

2.2 进化分析

为揭示 *HbHSP90.6* 的进化特征，将其已报道的拟南芥和水稻的 HSP90 蛋白构建进化树（图 3）。结果表明，HSP90 蛋白被聚为 5 支，其中 *HbHSP90.6* 与拟南芥 *AtHSP90.1* (NM_124642.4) 和水稻 *OsHsp90-1* (LOC_Os04g01740) 聚在一起，同源性分别为 92.34% 和 86.44%。

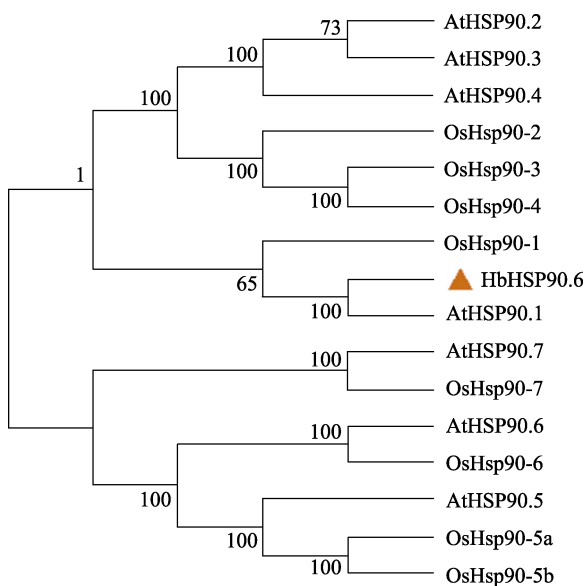


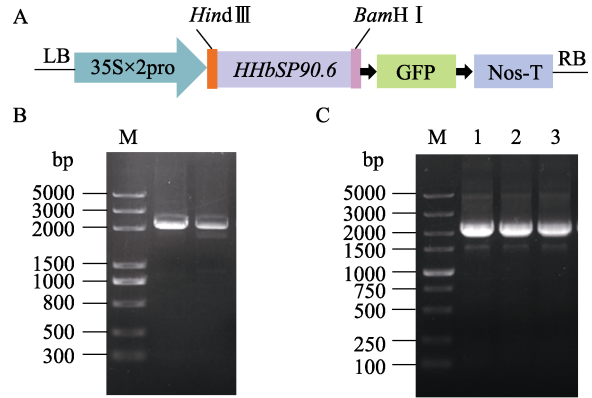
图 3 *HbHSP90.6* 与拟南芥和水稻 HSP90 蛋白的进化分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *HbHSP90.6* and HSP90 proteins in *Arabidopsis* and rice

2.3 基因克隆和植物瞬时表达载体构建

以橡胶树热研 73397 胶乳 cDNA 为模板进行 *HbHSP90.6* 基因全长克隆，获得单一条带，长度为 2196 bp（图 4B），经测序验证成功克隆 *HbHSP90.6* 基因。结合 pGREEN 表达载体图谱（图

4A），以 *HbHSP90.6* 质粒为模板 PCR 扩增得到的产物与双酶切后的表达载体 pGREEN 进行连接，经菌落 PCR 验证和测序，结果表明成功构建 35S::*HbHSP90.6*::GFP 融合表达载体（图 4C）。



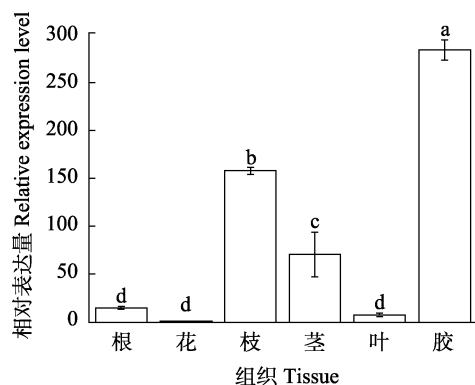
A: pGREEN 表达载体构建图谱; B: *HbHSP90.6* 基因克隆; C: 35S::*HbHSP90.6*::GFP 连接产物转化 DH5 α 单克隆菌落 PCR; M: DL5000 DNA marker.
A: pGREEN expression vector construction mapping; B: *HbHSP90.6* gene clone; C: PCR of transformed DH5 α monoclonal colonies with 35S::*HbHSP90.6*::GFP ligation product, M: DL5000 DNA marker.

图 4 *HbHSP90.6* 过表达载体构建

Fig. 4 Construction of *HbHSP90.6* overexpression vector

2.4 *HbHSP90.6* 基因表达分析

2.4.1 *HbHSP90.6* 基因的组织表达分析 采用实时荧光定量 PCR 对 *HbHSP90.6* 基因在橡胶树的根、花、枝、茎、叶和胶乳中进行基因表达分析。结果表明（图 5），*HbHSP90.6* 在橡胶树的不同组织中均有表达，但表达量差异显著，*HbHSP90.6* 在胶乳中的基因表达量显著高于根、花、枝、茎、叶，*HbHSP90.6* 基因在胶乳中的表达量相对于花达到 283 倍，推测 *HbHSP90.6* 基因主要在胶乳中起作用。



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

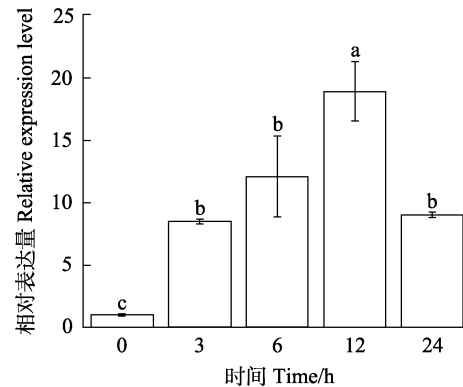
Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 5 *HbHSP90.6* 基因在橡胶树不同组织中的表达分析
Fig. 5 Expression analysis of *HbHSP90.6* gene in different tissues of rubber trees

2.4.2 机械伤害处理对 *HbHSP90.6* 基因表达的影响 机械伤害会引起橡胶树胶乳细胞内氧化应激, 严重时会导致胶乳停止流动。通过 qRT-PCR 分析机械伤害对 *HbHSP90.6* 基因在胶乳中表达的影响, 结果表明, 伤害处理明显上调了 *HbHSP90.6* 基因的表达, 在 12 h 上调最显著, 是处理前的 19 倍左右 (图 6)。

2.4.3 激素处理对 *HbHSP90.6* 基因表达的影响 植物激素在橡胶树胶乳代谢调控中发挥重要作用^[18]。利用 qRT-PCR 分析 *HbHSP90.6* 基因在 ETH、JA、IAA 和 BR 处理下的表达模式 (图 7)。结果表明, *HbHSP90.6* 基因的表达显著受乙烯利和茉莉酸调控, 在 6 h 时表达量达到最高, 分别是处理前的 45 倍和 17 倍。吲哚-3-乙酸处理后, *HbHSP90.6* 基因的表达也显著上调。油菜素内酯处理后, *HbHSP90.6* 基因表达量在处理 12 h 时显著上调表

达, 是处理前的 50 倍。整体而言, 4 种植物激素对 *HbHSP90.6* 基因表达都呈现显著上调表达趋势。

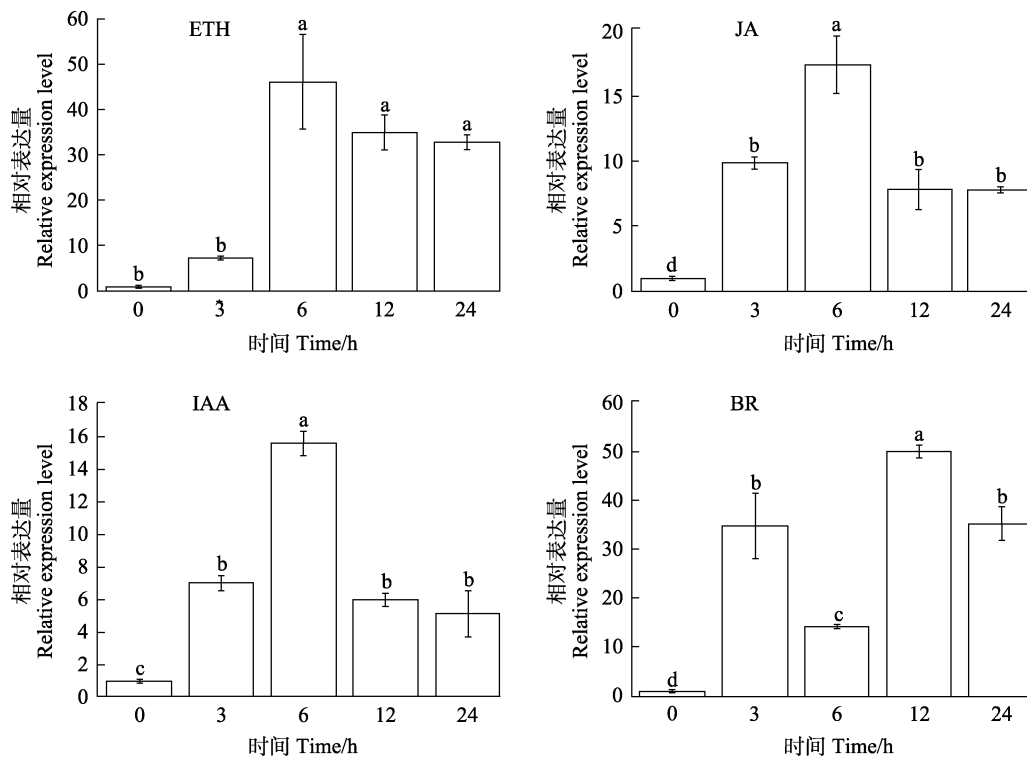


不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 6 机械伤害处理对 *HbHSP90.6* 的表达调控分析

Fig. 6 Analysis of regulation of *HbHSP90.6* expression by mechanical wounding treatment



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

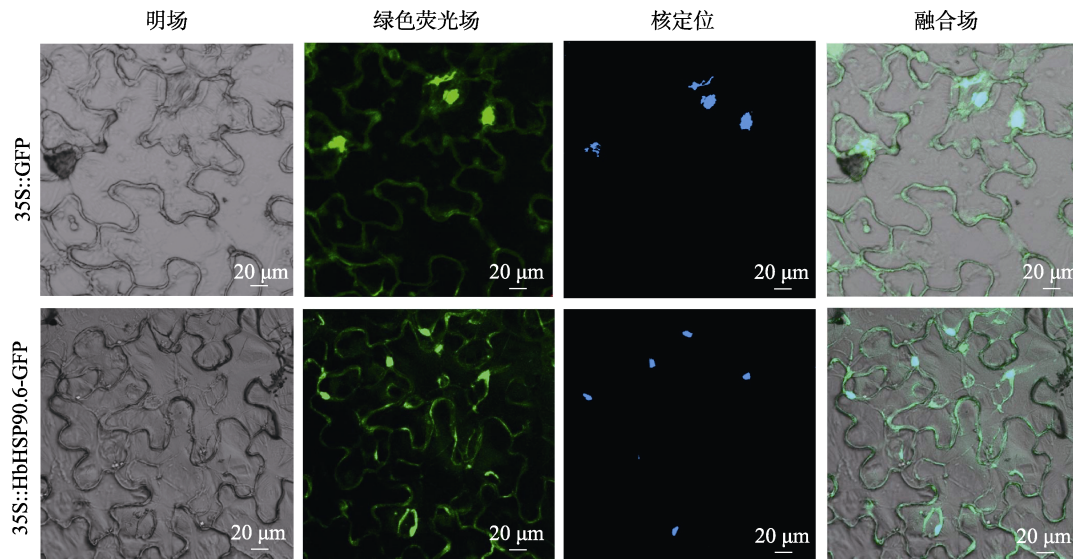
图 7 激素处理下 *HbHSP90.6* 的表达规律

Fig. 7 Expression pattern of *HbHSP90.6* under different hormone treatment

2.5 亚细胞定位

将构建成功的 35S::*HbHSP90.6*::GFP 融合表达载体侵染本氏烟草, 在强启动子的驱动下 *HbHSP90.6* 与 GFP 融合在本氏烟草中瞬时表达。在激光共聚焦显微镜下观察烟草表皮细胞的绿色

荧光信号以及通过 DAPI 染色观察细胞核的位置。结果显示, 488 nm 的激发光下可观察到绿色荧光信号在 *HbHSP90.6* 的细胞质和细胞核上均有分布, 对照组 GFP 激发出的荧光信号在烟草细胞表皮中普遍存在 (图 8)。

图 8 *HbHSP90.6* 亚细胞定位Fig. 8 Subcellular localization of *HbHSP90.6*

3 讨论

巴西橡胶树是主要的天然橡胶生产植物，橡胶树的健康生长是获取胶乳的不断来源。然而，橡胶树生长环境错综复杂，面临着各种环境胁迫的威胁，影响着橡胶树的生理代谢过程，进而影响胶乳的产量。HSP90 是一种进化高度保守的多效性分子伴侣，对真核生物在生理和应激条件下的生存至关重要^[19]。HSP90 异构体在细胞总蛋白中占 1%~2%，在不同类型的应激下，这一比例可增加至 4%~6%^[20-21]。在植物中，HSP90 直接或间接地参与了从植物生长发育到非生物和生物胁迫反应以及激素信号传递^[22-24]。本研究从橡胶树胶乳中克隆 *HbHSP90.6* 基因，该基因含有 PTZ00272 的结构域和包含高度保守的 MEEVD 基序，属于 HSP90 家族^[25]。进化树分析表明 *HbHSP90.6* 基因的氨基酸序列与已报道的拟南芥 *AtHSP90.1* (NM_124642.4) 和水稻 *OsHsp90-1* (LOC_Os04g01740) 具有较高的同源性，推测同源性较高的基因可能执行相似的生物学功能。组织表达分析显示 *HbHSP90.6* 基因主要在胶乳中表达，推测 *HbHSP90.6* 基因可能参与乳管胞内运输和胶乳代谢调控。

胶乳开采是获得天然橡胶的唯一途径，采胶的方式割胶对橡胶树是一种不可避免的机械伤害，机械伤害影响橡胶树的乳管细胞的生长发育进而影响胶乳的再生能力^[26]。本研究结果显示 *HbHSP90.6* 基因响应机械伤害处理，推测 *HbHSP90.6* 基因参与机械伤害调控的橡胶树生理

与代谢活动反应。植物激素在植物的生长发育过程中协调其他因子参与胁迫修复发挥重要作用。乙烯利和茉莉酸参与植物对病原菌攻击的防御反应，并且其是系统性损伤反应的主要因素^[27-28]。本研究结果显示，*HbHSP90.6* 基因在 ETH 和 JA 处理下呈现先上升后下调的趋势，与 *HSP90* 在拟南芥中调控激素信号通路研究结果一致^[29]。推测 *HbHSP90.6* 基因可能受 ETH 和 JA 信号通路调控参与植物抗病反应过程。有研究已表明 ETH 和 JA 的刺激会引起胶乳细胞的生理和代谢发生显著变化。应用乙烯利到橡胶树的树干树皮上可以显著提高橡胶树胶乳产量，而茉莉酸则是诱导橡胶树乳管细胞分化和橡胶生物合成的关键信号分子^[30]。因此，推测 *HbHSP90.6* 基因在橡胶树产胶过程中发挥重要作用。生长素在植物生命周期的几乎所有方面都发挥重要作用，尤其是在植物组织和器官中呈极性分布，在植物发育过程中具有类似的形态发生活性^[31]。本研究结果显示吲哚-3-乙酸处理后显著诱导 *HbHSP90.6* 基因上调表达，表明 *HbHSP90.6* 基因参与生长素诱导的信号通路。油菜素内酯是一种甾体植物激素，调节植物的各种发育过程以及生物和非生物胁迫反应^[32]。本研究结果显示 *HbHSP90.6* 基因在 BR 处理下呈现上调表达的趋势，这与前人在拟南芥中研究 *HSP90* 基因在 BR 信号传导中的作用结果一致^[33]。推测 *HbHSP90.6* 基因参与 BR 信号通路介导的基因转录调控。BR 信号是通过 HSP90 活性介导的，并且 HSP90/BES1 复合体在形成的亚细胞位点主动

调节 BR 信号,结果显示活性 BR 信号降低了细胞核中的 BES1/HSP90 复合物,而在细胞质中 BES1/HSP90 复合物明显^[34]。为了确定 *HbHSP90.6* 基因编码蛋白的亚细胞室,通过构建植物瞬时表达载体转化烟草,激光共聚焦观察结果显示绿色荧光信号在 *HbHSP90.6* 的细胞质和细胞核上均有分布,与亚细胞定位预测结果一致。

综上所述,本研究完成了橡胶树胶乳 *HbHSP90.6* 基因的克隆、生物信息学分析、表达模式分析及亚细胞定位。此结果为深入研究橡胶树 *HbHSP90.6* 基因在激素信号介导转录调控通路中的功能奠定坚实基础。

参考文献

- [1] CHEN Z, SASAKI T, TAN X, CARRETERO J, SHIMAMURA T, LI D, XU C, WANG Y, ADELMANT G O, CAPELLETTI M, LEE H J, RODIG S J, BORGMAN C, PARK S I, KIM H R, PADERA R, MARTO J A, GRAY N S, KUNG A L, SHAPIRO G I, JANNE P A, WONG K K. Inhibition of ALK, PI3K/MEK, and HSP90 in murine lung adenocarcinoma induced by EML4-ALK fusion oncogene[J]. *Cancer Research*, 2010, 70(23): 9827-9836.
- [2] WANG R, ZHANG Y, KIEFFER M, YU H, KEPINSKI S, ESTELLE M. HSP90 regulates temperature-dependent seedling growth in *Arabidopsis* by stabilizing the auxin co-receptor F-box protein TIR1[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 10269.
- [3] XU J, XUE C, XUE D, ZHAO J, GAI J, GUO N, XING H. Overexpression of GmHsp90s, a heat shock protein 90 (Hsp90) gene family cloning from soybean, decrease damage of abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69810.
- [4] HUBERT D A, Y. H, MCNULTY B C, TORNERO P, DANGL J L. Specific *Arabidopsis* HSP90.2 alleles recapitulate RAR1 cochaperone function in plant NB-LRR disease resistance protein regulation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106: 9556-9563.
- [5] MUSKETT P R, KAHN K, AUSTIN M J, MOISAN L J, SADANANDOM A, SHIRASU K, JONES J D G, PARKER J E. *Arabidopsis RAR1* exerts rate-limiting control of *R* gene-mediated defenses against multiple pathogens[J]. *The Plant Cell*, 2002, 14(5): 979-992.
- [6] MARGARITPOULOU T, KRYOVRYSANAKI N, MEGKOULA P, PRASSINOS C, SAMAKOVLIS D, MILIONI D, HATZOPOULOS P. HSP90 canonical content organizes a molecular scaffold mechanism to progress flow-ering[J]. *The Plant Journal*, 2016, 87(2): 174-187.
- [7] WATANABE E, MANO S, HARA-NISHIMURA I, NISHIMURA M, YAMADA K. HSP90 stabilizes auxin receptor TIR1 and ensures plasticity of auxin responses[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2017, 12(5): e1311439.
- [8] SANGSTER T A, SALATHIA N, LEE H N, WATANABE E, SCHELLENBERG K, MORNEAU K, WANG H, UNDURRAGA S, QUEITSCH C, LINDQUIST S. HSP90-buffered genetic variation is common in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(8): 2969-2974.
- [9] QUEITSCH C, SANGSTER T A, LINDQUIST S. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation[J]. *Nature*, 2002, 417(6889): 618-624.
- [10] LI N, HAN X, FENG D, YUAN D, HUANG L J. Signaling crosstalk between salicylic acid and ethylene/jasmonate in plant defense: do we understand what they are whispering?[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(3): 671.
- [11] SHIGETA T, ZAIZEN Y, SUGIMOTO Y, NAKAMURA Y, MATSUO T, OKAMOTO S. Heat shock protein 90 acts in brassinosteroid signaling through interaction with BES1/BZR1 transcription factor[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2015, 178: 69-73.
- [12] DI DONATO M, GEISLER M. HSP90 and co-chaperones: a multitaskers' view on plant hormone biology[J]. *FEBS Letters*, 2019, 593(13): 1415-1430.
- [13] UDAYABHANU J, HUANG T, XIN S, CHENG J, HUA Y, HUANG H. Optimization of the transformation protocol for increased efficiency of genetic transformation in *Hevea brasiliensis*[J]. *Plants*, 2022, 11(8): 1067.
- [14] XIAO X, MO C, SUI J, LIN X, LONG X, QIN Y, FANG Y, TANG C. The calcium sensor calcineurin B-Like Proteins-calcineurin B-Like interacting protein kinases is involved in leaf development and stress responses related to latex flow in *Hevea brasiliensis*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 743506.
- [15] WANG L F. Physiological and molecular responses to drought stress in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, 83: 243-249.
- [16] 刘明洋, 肖化兴, 王立丰, 梁晓宇, 张宇, 王萌. 橡胶树热激蛋白 *HbHSP9.8-1* 基因的克隆与功能分析[J]. *植物研究*, 2021, 42(5): 811-820.

LIU M Y, XIAO H X, WANG L F, LIANG X Y, ZHANG Y, WANG M. Cloning and functional analysis of heat shock protein *HbHSP90.8-1* from *Hevea brasiliensis* Müll. Arg.[J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2021, 42(5): 811-820. (in

- Chinese)
- [17] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [18] DUAN C, RIO M, LECLERCQ J, BONNOT F, OLIVER G, MONTORO P. Gene expression pattern in response to wounding, methyl jasmonate and ethylene in the bark of *Hevea brasiliensis*[J]. *Tree Physiology*, 2010, 30(10): 1349-1359.
- [19] SAMAKOVLI D, TICHA T, VAVRDOVA T, OVECKA M, LUPTOVCIK I, ZAPLETALOVA V, KUCHAROVA A, KRENEK P, KRASYLENKO Y, MARGARITPOULOU T, ROKA L, MILIONI D, KOMIS G, HATZOPOULOS P, SAMAJ J. YODA-HSP90 module regulates phosphorylation-dependent inactivation of SPEECHLESS to control stomatal development under acute heat stress in *Arabidopsis*[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(4): 612-633.
- [20] KRISHNA P, GLOOR G. The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Cell Stress & Chaperones*, 2001, 6(3): 238-246.
- [21] TAIPALE M, JAROSZ D F, LINDQUIST S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010, 11(7): 515-528.
- [22] YAMADA K, NISHIMURA M. Cytosolic heat shock protein 90 regulates heat shock transcription factor in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2008, 3(9): 660-662.
- [23] HEIN I, BARCISZEWSKA-PACAK M, HRUBIKOVA K, WILLIAMSON S, DINESEN M, SOENDERBY I E, SUNDAR S, JARMOLOWSKI A, SHIRASU K, LACOMME C. Virus-induced gene silencing-based functional characterization of genes associated with powdery mildew resistance in barley[J]. *Plant Physiology*, 2005, 138 (4): 2155-2164.
- [24] LU R, DONG Y, LI J D. Necdin regulates BMAL1 stability and circadian clock through SGT1-HSP90 chaperone machinery[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(14): 7944-7957.
- [25] LI J, SOROKA J, BUCHNER J. The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823(3): 624-635.
- [26] 唐朝荣, 秦云霞, 黄亚成, 方永军. 橡胶树胶乳 4 个 *HbRab* 基因的克隆和表达分析[J]. *植物生理学报*, 2013, 49(11): 1189-1196.
- TANG C R, QIN Y X, HUANG Y C, FANG Y J. Molecular cloning and expression analysis of four *HbRab* genes from the latex of *Hevea brasiliensis* (Para rubber tree)[J]. *Plant Physiology Journal*, 2013, 49(11): 1189-1196. (in Chinese)
- [27] WASTERNAK C, HAUSE B. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. an update to the 2007 review in *Annals of Botany*[J]. *Annals of Botany*, 2013, 111(6): 1021-1058.
- [28] PENNINGCKX I A M A, THOMMA B P H J, BUCHALA A, MÉTRAUX J-P, BROEKAERT W F. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 1998, 10(12): 2103-2113.
- [29] ZHANG X C, MILLET Y A, CHENG Z, BUSH J, AUSUBEL F M. Jasmonate signalling in *Arabidopsis* involves SGT1b-HSP70-HSP90 chaperone complexes[J]. *Nature Plants*, 2015, 1: 15049.
- [30] HAO B, WU J. Laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis*: induction by exogenous jasmonic acid and linolenic acid[J]. *Annals of Botany*, 2000, 85(1): 37-43.
- [31] DUBROVSKY J.G, SAUER M, NAPSUCIALY- MENDIVIL S, IVANCHENKO MG, FRIML J, SHISHKOVA S, CELENZA J, BENKOVA E. Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105 (25): 8790-8794.
- [32] WANG W, BAI M Y, WANG Z Y. The brassinosteroid signaling network-a paradigm of signal integration[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2014, 21: 147-153.
- [33] SAMAKOVLI D, MARGARITPOULOU T, PRASSINOS C, MILIONI D, HATZOPOULOS P. Brassinosteroid nuclear signaling recruits HSP90 activity[J]. *New Phytologist*, 2014, 203(3): 743-757.
- [34] SAMAKOVLI D, ROKA L, PLITSI P K, KAL TSA I, DARAS G, MILIONI D, HATZOPOULOS P. Active BR signalling adjusts the subcellular localisation of BES1/HSP90 complex formation[J]. *Plant Biology*, 2020, 22(1): 129-133.