

巴西橡胶树 *HbPSKR2* 基因克隆及互作蛋白鉴定

杜晓愚^{1,2}, 赵一杰³, 张世鑫², 田维敏², 晁金泉^{2*}

1. 浙江农林大学现代农学院, 浙江杭州 311300; 2. 中国热带农业科学院橡胶研究所/热带作物生物育种全国重点实验室/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, 海南海口 571101; 3. 海南大学热带作物学院, 海南海口 570228

摘要: 磺胺素是一种高等植物特有的小肽类激素, 广泛参与植物的生长发育、分裂分化、生物或非生物胁迫等生物学过程。磺胺素受体蛋白 (phytosulfokine receptor, PSKR) 是磺胺素的直接受体, 对于磺胺素信号传导至关重要。本研究采用 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 技术克隆了橡胶树的 *HbPSKR2* 基因, 并对其进行了生物信息学、基因表达模式、互作蛋白筛选及鉴定分析。结果显示 *HbPSKR2* 基因的开放阅读框全长 3159 bp, 编码 1052 个氨基酸, 理论分子量为 114.84 kDa, 理论等电点为 6.34。结构域分析显示 *HbPSKR2* 属于典型的跨膜蛋白, 前 640 个氨基酸是由亮氨酸重复组成的天线结构, 第 692~714 个氨基酸是跨膜结构域, 第 765~1052 个氨基酸是膜内激酶结构域。对 *HbPSKR2* 膜内激酶结构域以及拟南芥和水稻的 PSKR 同源序列进行多重比对, 结果显示均存在 ATP binding site、CaM binding site、Activation segment、GC Centre 等保守性位点。表达模式分析显示, *HbPSKR2* 基因在橡胶树形成层区高丰度表达, 其表达量在冠菌素处理前期显著上升。通过酵母双杂交技术筛选到 12 个与 *HbPSKR2* 互作的候选蛋白, 并对其中的 2 个蛋白激酶 (HbPBL8 和 HbPIX13) 与 *HbPSKR2* 的互作关系进行荧光素酶互补成像验证。结果显示, 在烟草中共转化 *HbPSKR2*-nLUC/HbPBL8-cLUC 和 *HbPSKR2*-nLUC/HbPIX13-cLUC 可以观察到强烈的荧光信号, 进一步证明了 *HbPSKR2* 在体内可与 HbPBL8 激酶和 HbPIX13 激酶互作。橡胶树 *HbPSKR2* 基因克隆及互作蛋白鉴定将为深入揭示橡胶树乳管分化分子机制提供新的思路。

关键词: 巴西橡胶树; *HbPSKR2*; 酵母双杂交; 荧光素酶互补成像; 互作蛋白

中图分类号: S794.1 文献标志码: A

Cloning and Interacted Protein Identification of *HbPSKR2* Gene from Rubber Tree

DU Xiaoyu^{1,2}, ZHAO Yijie³, ZHANG Shixin², TIAN Weimin², CHAO Jinquan^{2*}

1. College of Advance Agricultural Sciences, Zhejiang A&F University, Hangzhou, Zhejiang 311300, China; 2. Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / National Key Laboratory for Tropical Crop Breeding / Key Laboratory of Rubber Biology, Ministry of Agriculture & Rural Affairs / State Key Laboratory Incubation Base for Cultivation & Physiology of Tropical Crops, Haikou, Hainan 571101, China; 3. College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China

Abstract: Phytosulfokine (PSK) is a small peptide hormone unique to higher plants, widely involved in biological processes such as plant growth and development, division and differentiation, biotic and abiotic stress. PSK receptor (PSKR) is a direct receptor for PSK and is crucial for PSK signal transduction. In the present study, *HbPSKR2* was cloned from rubber tree by RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction), and its bioinformatics, gene expression pattern, interacted proteins screening and identification were also analyzed. Results showed that the open reading frame of

收稿日期 2023-06-27; 修回日期 2023-09-04

基金项目 热带作物生物育种全国重点实验室科研项目 (No. NKLTCB202309); 现代农业产业技术体系建设专项资金 (No. CARS-33-YZ1); 海南省自然科学基金高层次人才项目 (No. 322RC781)。

作者简介 杜晓愚(1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 农艺与种业。*通信作者 (Corresponding author): 晁金泉 (CHAO Jinquan), E-mail: tianwang208@163.com。

reading frame of *HbPSKR2* had a total length of 3159 bp and encoded 1052 amino acids with molecular weight 114.84 kDa and theoretical isoelectric point 6.34. Domain analysis showed that *HbPSKR2* was a typical trans-membrane protein. The first 640 amino acids were the antenna structures composed of leucine rich repeat (LRR), the 692 to 714 amino acids were transmembrane domains, and the 765 to 1052 amino acids were kinase domains. Multiple comparisons were conducted on the membrane kinase domain of *HbPSKR2* and the membrane kinase domain of PSKR homologous proteins in *Arabidopsis* and rice. The results showed the existence of conserved sites such as ATP binding site, CaM binding site, Activation segment, GC Centre. Expression pattern analysis showed that *HbPSKR2* was highly expressed in the cambium region of rubber tree. The expression level of *HbPSKR2* was significantly increased at the early stage of coronatine (COR) treatment. Twelve candidate proteins interacted with *HbPSKR2* were screened by yeast two hybrid technology, and the interaction between two protein kinases (*HbPBL8* and *HbPIX13*) and *HbPSKR2* was further verified by luciferase complementary imaging. The strong fluorescence signal was observed by co-transformation *HbPSKR2*-nLUC/*HbPBL8*-cLUC and *HbPSKR2*-nLUC/*HbPIX13*-cLUC into tobacco, suggesting the interaction between *HbPSKR2*-*HbPBL8* and *HbPSKR2*-*HbPIX13* *in vivo*. The cloning of *HbPSKR2* and identification of *HbPSKR2* interacted protein would provide new insights into the molecular mechanism of laticifer differentiation in rubber tree.

Keywords: *Hevea brasiliensis*; *HbPSKR2*; yeast two-hybrid; luciferase complementary imaging; interaction protein

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.04.001

磺胺素 (phytosulfokine, PSK) 是一种高等植物特有的小肽类激素, 广泛参与植物的生长发育、分裂分化、逆境胁迫等生物学过程^[1-3]。磺胺素基因编码的前体多肽长度约为 80~110 个氨基酸, 通过翻译后剪切形成 5 个氨基酸的小肽 (Tyr-Ile-Tyr-Thr-Gln), 而后在酪氨酸硫化转移酶的作用下对其第 1 位和第 3 位的酪氨酸 (tyrosine, Tyr) 发生特异的磺基化修饰, 最终形成有活性形式的磺胺素^[4-5]。与其他植物激素一样, 磺胺素信号传导也依赖于细胞膜定位的受体蛋白。磺胺素受体 (phytosulfokine receptor, PSKR) 是一种典型的跨膜蛋白, 其膜外的亮氨酸重复元件 (leucine rich repeat, LRR) 主要用于感知磺胺素信号, 而膜内的激酶结构域主要用于下游信号的传导^[6-7]。PSKR 在植物中一般有 2 个成员, 目前对其功能的研究还比较少。ZHANG 等^[8]发现番茄的 SPSKR1 和 SPSKR2 均可与 PSK 结合, 并且证明 PSKR1 通过促进钙调素与生长素合成蛋白 YUC 的互作进而激活番茄对疫霉病的响应。HOLZWART 等^[9]报道拟南芥的 PSKR1 可以和 RLP44 蛋白互作, 在调控形成层向木质部分化过程中起关键作用。

天然橡胶是一种重要的工业原料, 在医疗卫生、交通运输、航空航天等领域具有广泛应用^[10-11]。巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) 原产南美洲亚马逊雨林地区, 是当前世界天然橡胶的主要来源^[12]。位于橡胶树树皮内层的次生乳管是天然橡胶合成和贮存的主要场所。橡胶树胶乳本质上是乳管细胞的细胞质部分, 含 30%~50% 的天

然橡胶^[13]。生产上人们通过割胶的方式收集从被切断乳管中流出的胶乳用于天然橡胶加工, 因此橡胶树的次生乳管是决定天然橡胶产量的结构基础。前人研究表明, 橡胶树次生乳管由形成层分化而来, 茉莉酸信号途径在该过程中起关键作用^[14-15]。最近课题组研究发现磺胺素参与了茉莉酸诱导次生乳管分化^[16]。本研究克隆了橡胶树磺胺素受体 *HbPSKR2*, 并对其互作蛋白进行筛选和鉴定, 为深入揭示橡胶树乳管分化分子机制提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

橡胶树形成层区 cDNA、橡胶树形成层区酵母双杂交文库、酵母双杂交诱饵载体 pGBKT7、pCAMBIA1300-nLUC、pCAMBIA1300-cLUC 均由本实验室保存; 本生烟播种于中国热带农业科学院橡胶研究所植物培养室, 培养至 4~7 叶期备用; 农杆菌菌株 GV3101、酵母菌株 Y187、酵母菌株 AH109、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞均购自上海唯地生物技术有限公司; 橡胶树全基因组序列从 NCBI 下载 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/LVXX000000000.1>); 组织特异性及割胶前后胶乳的转录组原始数据从国家基因组数据中心下载 (<https://ngdc.cncb.ac.cn>), GSA 编号为 CRA004268; 冠菌素 (COR) 处理形成层的转录组原始数据从 NCBI 下载 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>), 数据编号分别为 SRR3423347~SRR3423350。

1.2 方法

1.2.1 *HbPSKR2* 基因的克隆 以拟南芥 *AtPSKR2* 蛋白序列对橡胶树基因组进行 BLASTn 搜索, 得到含橡胶树完整 *HbPSKR2* 序列的 scaffold0093_1558507。根据序列信息设计扩增 *HbPSKR2* 完整开放阅读框的特异性引物 *HbPSKR2*-F 和 *HbPSKR2*-R (表 1), 以橡胶树形成层区 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增体系为: 2×PCR buffer 10 μL, 正、反向引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, cDNA 模板 1 μL,

ddH₂O 7 μL; 扩增程序为: 98 °C 预变性 5 min; 98 °C 变性 20 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 3 min, 共设置 33 个循环; 最终 72 °C 延伸 10 min。扩增产物用普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (天根生化科技有限公司) 进行回收纯化, 通过 pEASY-Blunt Cloning Kit (全式金生物科技有限公司) 连接载体并转化大肠杆菌 DH5α。过夜培养后挑选阳性克隆送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
HbPSKR2-F	ATGGATGTCCAAGATTGTGGGCAATTGTTT
HbPSKR2-R	TTACAACAGGATCACGATTTCGATGTTGTC
pGBDKT7-HbPSKR2-F	CATGGAGGCCGAATTCATGGATGTCCAAGATTTGTGGG
pGBDKT7-HbPSKR2-R	GCAGGTCGACGGATCCTTACAACAGGATCACGATTTCGA
HbPSKR2-nLUC-F	GGACGAGCTCGGTACCATGGATGTCCAAGATTTGTGGGCAA
HbPSKR2-nLUC-R	GCGTACGAGATCTGGTCGACTTACAACAGGATCACGATTTCGATG
HbPBL8-cLUC-F	GTCCCGGGGCGGTACCATGGGCAACTGCGGCACTAGAGAGG
HbPBL8-cLUC-R	CGAAAGCTCTGCAGGTCGACTCATCTAACCTACAAGCTGCAGGA
HbPIX13-cLUC-F	GTCCCGGGGCGGTACCATGGGCAATTGCTTTGGATCTCCCT
HbPIX13-cLUC-R	CGAAAGCTCTGCAGGTCGACCTAGTTGTACATGTGAGTCGCCAC

1.2.2 *HbPSKR2* 的生物信息学分析 利用在线工具 Compute pI/Mw (http://web.expasy.org/compute_pi/) 分析 *HbPSKR2* 的分子量和等电点; 利用在线结构域分析工具 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析 *HbPSKR2* 的结构域; 利用 DNAMAN 软件分析 *HbPSKR2* 与其他植物同源蛋白间的序列比对; 利用在线工具 iTQL (<https://itol.embl.de/>) 绘制 *HbPSKR2* 与其他植物同源蛋白间的系统发育树; 利用依托单位服务器, 采用 Tophat 软件将所下载的转录组原始数据比对到橡胶树基因组上, 根据 Cufflink 软件计算基因的 FPKM 值。

1.2.3 *HbPSKR2* 的自激活检测 以测序正确的 pEASY-*HbPSKR2* 质粒为模板, 用特异性引物 pGBDKT7-*HbPSKR2*-F 和 pGBDKT7-*HbPSKR2*-R 扩增目的片段, 采用 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit (南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 同源重组方法构建 pGBDKT7-*HbPSKR2* 的 Bait 载体。将测序正确的质粒转化至酵母 Y187 菌株, 涂布于 SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His/-

Ade 固体培养基上, 30 °C 倒置培养 3 d 观察菌落生长情况。

1.2.4 *HbPSKR2* 的酵母双杂交文库筛选 将 pGBDKT7-*HbPSKR2* 和橡胶树形成层酵母 cDNA 文库分别转化至 Y187 和 AH109 酵母感受态细胞中, 分别涂布于 SD/-Trp 和 SD/-Leu 筛选平板, 30 °C 恒温培养 3~4 d。用涂布棒刮取上述 Prey 菌株和 Bait 菌株, 分别接种于相应筛选培养基中, 30 °C 振荡培养至 OD₆₀₀=0.8。离心收集菌体, 用 YPDA 液体培养基重悬菌体并调整至细胞密度大于 1×10⁸ mL⁻¹。将二者等体积混匀, 接种于 YPDA 液体培养基中扩大培养。在相差显微镜下观察酵母菌液产生合子后收集菌体, 涂布 SD/-Leu/-Trp 筛选平板置于 30 °C 倒置培养。挑取候选阳性菌落分别点板 SD/-Leu/-Trp 二缺和 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 四缺筛选平板, 30 °C 倒置观察菌落生长情况。挑选四缺平板阳性菌落送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。

1.2.5 荧光素酶互补验证 用特异性引物 *HbPSKR2*-nLUC-F 和 *HbPSKR2*-nLUC-R 扩增测序正确

的 pEASY-HbPSKR2 质粒并连接 pCAMBIA1300-nLUC 载体;用特异性引物 HbPBL8-cLUC-F/HbPBL8-cLUC-R 和 HbPIX13-cLUC-F/HbPIX13-cLUC-R 分别扩增测序正确的阳性酵母菌株并连接 pCAMBIA1300-cLUC 载体。将连接好的载体转化大肠杆菌 DH5 α 过夜培养并送样测序,将测序正确的 pCAMBIA1300-HbPSKR2-nLUC、pCAMBIA1300-HbPBL8-cLUC、pCAMBIA1300-HbPIX13-cLUC 质粒分别转化农杆菌 GV 3101 感受态,并于 YEB 液体培养基中 28℃ 过夜培养。离心收集菌体,用培养液调整 OD₆₀₀=1.0,通过注射法注射烟草叶片。注射后的烟草暗培养 24 h 后在相同注射部位注射荧光素酶底物 D-荧光素钾盐溶液,置于活体成像系统中观察。

2 结果与分析

2.1 HbPSKR2 基因克隆及其编码蛋白分析

以 HbPSKR2 开放阅读框引物对橡胶树形成层区 cDNA 扩增,获得一条与预期大小一致的条带。测序结果显示,扩增产物长度为 3159 bp,编码 1052 个氨基酸(图 1A)。HbPSKR2 的理论分子量为 114.84 kDa,理论等电点为 6.34。蛋白结构域分析显示 HbPSKR2 是个典型的跨膜蛋白,其中前 640 个氨基酸是由 22 个 LRR 结构域组成的膜外天线,第 692 个氨基酸至第 714 个氨基酸是跨膜结构域,第 765 个氨基酸至第 1052 个氨基酸是介导膜内信号途径的激酶结构域(图 1B)。

2.2 HbPSKR2 系统进化及多序列比对分析

选取拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, At2g02220, At5g53890)、樱桃(*Prunus persica*, XP_007227028.1)、榴莲(*Durio zibethinus*, XP_022776608.1)、蓖麻(*Ricinus communis*, XP_002518809.2, EEF34126.1)、柚子(*Citrus clementina*, XP_024035321.1, XP_006451809.1)、树棉(*Gossypium arboreum*, XP_017632150.1)、油菜(*Brassica napus*, XP_013707217.1, XP_022546871.2)、毛果杨(*Populus trichocarpa*, XP_002312507.3, XP_002317487.3) 8 种双子叶植物和水稻(*Oryza sativa*, LOC_Os02g41890.1, LOC_Os04g57630.1)、玉米(*Zea mays*, AQK72791.1, NP_001340572.1)、高粱(*Sorghum bicolor*, XP_002454207.1, XP_021318925.1)、小麦(*Triticum aestivum*, XP_044413269.1, XP_044335016.1) 4 种单子叶植物的 PSKR 序列,与 HbPSKR2 共同构建系统发育树。结果显示所有

PSKR 成员可以划分为 4 个类群: Group I 类群由双子叶植物 PSKR1 构成; Group II 类群由双子叶植物 PSKR2 构成; Group III 类群由单子叶植物 PSKR1 构成; Group IV 类群由单子叶植物 PSKR2 构成(图 2A)。其中 HbPSKR2 属于 Group II 类群,且与来自蓖麻的 RcPSKR2 亲缘关系最接近。

作为跨膜受体蛋白,PSKR 的膜内激酶结构域是介导信号传导的关键部分。采用 DNAMAN 软件对 HbPSKR2 的膜内激酶结构域以及拟南芥和水稻的 PSKR 同源蛋白的膜内激酶结构域进行多重比对,结果显示均存在 ATP binding site、CaM binding site、Activation segment、GC Centre 等保守性位点(图 2B)。

2.3 HbPSKR2 基因表达模式分析

组织特异性分析显示, HbPSKR2 在橡胶树各个组织中均有表达,其中在形成层、雌花、雄花中表达丰度较高,而在胶乳、叶片、树皮中表达丰度较低(图 3A)。冠菌素(coronatine, COR)是一种茉莉酸类似物,可以有效诱导橡胶树形成层分化次生乳管。HbPSKR2 的表达量在冠菌素处理前期(COR-A)较对照(CK-A)有显著上升,而在处理后期(COR-B)与对照(CK-B)相比则差异不显著(图 3B)。割胶是收获天然橡胶的唯一方式。与未开割树相比, HbPSKR2 在开割树胶乳中的表达量极显著上升(图 3C)。

2.4 HbPSKR2 诱饵载体自激活检测及互作蛋白筛选

采用重组法构建 pGBKT7-HbPSKR2 诱饵载体。自激活实验结果显示,含 pGBKT7-53 阳性对照载体的酵母菌在 SD-TL 二缺培养基和 SD-TLHA 四缺培养基上均可以生长,并且加入 x-gal 后菌落变蓝。而含 pGBKT7-Lam 阴性对照载体的酵母菌以及含 pGBKT7-HbPSKR2 载体的酵母菌只能在 SD-TL 二缺培养基上生长(图 4A),表明 HbPSKR2 无细胞毒性及自激活活性,可以用于酵母文库筛选。

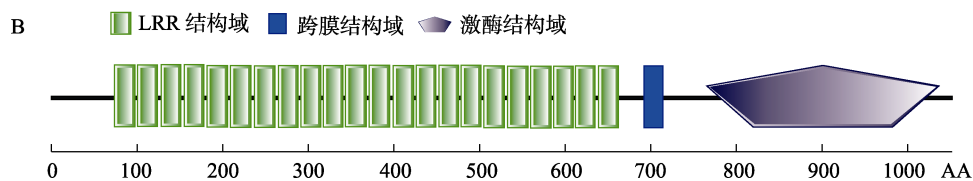
将含橡胶树形成层区酵母 cDNA 文库质粒的酵母 AH109 菌株和含 pBGKT7-HbPSKR2 的酵母 Y187 菌株共培养,镜检发现合子后收集菌体涂布至 SD-TL 二缺平板进行培养,挑选阳性菌落接种于 SD-TLHA 四缺平板进行进一步筛选。最终得到 12 个阳性克隆(图 4B)。对阳性克隆插入片段进行测序,测序结果在橡胶树数据库进行 BLASTx 同源比对,鉴定到 2 个核糖体相关成员、2 个泛

A

```

atgatggtcttgacattgttacaatgactttctcctcaaatgggtattcttctgttcttcttctgttcatcttgggtctcctcaaacctca
M M V L D I V T M T F L K W V F F A C F L C S S L G L K T S
tccagtcctgtgatccaagtgtattttggcactgagagaattttccggaacctcacaatgggtccattgttacagcatgggtccaac
S Q S C D P S D Y L A L R E F S G N L T N G S I V T A W S N
gaggtcaattgctgccaatgggatgggtgtgtttcggaataatggcaatgggttcgactggtaatagggttaattgaagcttaattctgcct
E A N C C Q W D G V V C G N N G N G S T G N R V I K L I L P
aggaaggggtctcaagggataatcgcgaatctttgggcggtttggataaactgaaatcgcttgatctctcttgcaatcatcttcaaggt
R K G L K G I I S Q S L G R L D K L K S L D L S C N H L Q G
ggattgcctatggagtttctcaagcttgagcagctggaggtgtgtgtgatttgagccataacatgttgcaggacgggtttctgggtgctt
G L P M E F S S L K Q L E V V D L S H N M L S G R V S G V L
tctgggtttgtgtctatgacgtcagtcagtaattttctagcgaatctgttccaaagaggattgtttgaactgggggatttccaaatcttctt
S G L L S M Q S L N I S S N L F K E D L F E L G G F P N L L
gtattcaatgtgagcaacaattctatttctggcgaatcctccccacatttgcagctcctctagtgggattcggtttcttgattgttca
V F N V S N N S F T T G R I P P H I C S S S G I R F L D L S
atgaaccatctgttggcaatcttgaaggcttggataatgcagcacatctctccagcaatgcatttggattccaatttcacatttcaggc
M N H L V G N L E G L D N C S T S L Q Q L H L D S N S L S G
tctcttcggattcttcttactcactgtcagctcagtcagcaatttcaatttccaaacaaacttactggtccaggttaagcaagaattg
S L P D S L Y S L S A L Q Q F S I S N N N L S G Q L S K E L
agtaagctttctagcctcagaaccttgggttatttatggaacccggttttcaggctatattccaaacgtgttggtaaccttaccagcta
S K L S S L R T L V I Y G N R F S G Y I P N V F G N L T Q L
gaacaaattgttgacattcaaatatgttttccggccatttacttcaacactggcattatgcacagagctctgcacttgacctgaga
Q L V A H S N M F S G P L P S T L A L C T E L C I L D L R
aataattctctaaactgggtccaatcgatcttaatttctcaggaatgcctgcttggactcttgatcttggcagtaattcatttgggttggc
N N S L T G P I D L N F T G M P S L G T L D L A S N H L F G
ccccctcaaaattccctgtctgattgccaacaaactgaaagtgttggctggttaagaatgagtttaactggccatattccccatagtttt
P L P N S L S D C Q K L K V L S L A K N E L T G H I P N S F
gcaaaactcactcattctgttctcactttatcaacaaatagttttttgacctatctggagcattatctgcactgcagcagtgcaaaa
A K L T S I L V L T L S N N S F F D L S G A L S Q Q C K
aatctctctactcttattctcacaagaatttcatgttggtagaagaattccagaaatgtgagtggaatttgagaatttaattggttttagcc
N L S S T L I L T K N F I G E E I P R N V S G F E N L M V L A
ctgggaattgtgctcctcaaggccaaattccagcttgggttgaagttcaggaagttacaagttctggatttgatggaatcaattg
L G N C A L K G Q I P A W L L S C R K L Q V L D L S W N Q L
gatggcagcactcctccttgattgtgttgaggaatttatttttggacttctcaataactctctcactgggaagatccagaa
D G S I P P W I G L M E N L F T Y L D F S N N S L T G K I P E
agtttgacagctgaagagcctcatttccctgcattgcagtatatccaaatgtttctgctggtgttccgctgtatgttaagagaaatcgg
S L T E L K S L I S L H C S I S N V S A G V P L Y V K R N R
agtgttagcgggttctgtgtacaaacaaactacaagtttccccctcgcctacttttgagtaacaatagaataaaatggggcaattttgcct
S A S G L L Y N Q P T S F P P S L L L S N N R I N G A I L P
gaaattggagcgttgaacagctccatgtcttagattgagcagaatagtagtaactgggaaccatacctagctccatcagaaatggag
E I G R L Q L H V L D L S R N S I T G T I P S I S E M E
aacttggaaacttttagatttgtcactaaatgatctgtatgggtcaattcccccatcatttgagaaaatcacattcttaccagtttagt
N L E E T L D L S S N D L Y G S I P P S S F E K L T F L S K F S
gtggctaataatcacttgaaggcgaatccagctggagggcagtttctcagcttccaaagttcgagcttgaaggcgaacccaggacta
V A N N H L K G Q I P A G G Q F S S F P S S S F E G N P G L
tgtggaggagtagtttctccttgaatgtcattaccaatattgtgaagccttggtattccatctggttcaaacggttagatttggttagagga
C G G V V S P C N V V T N M L K P G I P S G S N G R F G R G
aacattggaaatactctgggataaacaatcactgtgggagtggggcttgcactgatccttgcgattgttttgcttaagatgtcaaagagg
N I G N I L G I T I T V G V G L A L I L A I V L L K M S K R
gatgtgggagatccaattgaggttttgatgaggaatcagctggccacacagatttatctgaaggccttgggtcttccaaagtgggtgctt
D V G D P I E D L D E E I S W P H R L S E G L G S S K L V L
tttcagaattcagattgtgaagatcttacagttgcagacttgttgaagcttcaaaataattttaaccaagcaaatatcattgggtgtggt
F Q N S D K D L T V A D L L K S T N N F N Q A N I I G C G
ggatttggcctggtttacaaggccaaccttccaatgggtaccaaaagcagcaatcaagaggctttccggggactgtggtcagatggaacgt
G F G L V Y K A N L P N G T K A A I K R L S G D C G Q M E R
gaatttcgagctgaagtggaagcactttcaagggtcacaacacagaatctgtttctcctcaaggttattggcgtcatggtaatgacaga
E F R A E V E A L S R A Q H K N L V S L Q G Y C R H G N D R
ttattgattttatcatactggagaatggaagtttgatttattggctacatgagtggttggatggagcttctttaaattgggagtggt
L L I Y S Y M E N G S L D Y W L H E C V D G A S F L K W D V
agactcaagatagcgcaagggtgcagcatctgggttagcttatctgcacaaagtttgtgagccacatagtttcatcgggatgtgaaatct
R L K I A Q G A A S G L A Y L H K V C E P H I V H R D V K S
agcaacatacttttagatgaataattgaagctcatttggcagattttggcctctcaaggctacttctgcctcatgactcatgtttaca
S N I L L D E K F E A H L A D F G L S R L L R P Y D T H V T
acggatttgggtggcacttttaggtctatattcctcctgaatatagtcagacattgcagcaacctgcagggttgatgtttacagtttgggt
T D L V G T L G Y I P P E Y S Q T L T A T C R G D V Y S F G
gttgttcttcttgagctcgttactcgtagaaggcctgtggaagtttgcaaggaaaaactgcagggtatctagtctcttgggtgtttcag
V V L L E L V T R R P V E V C K G K N C R G D L V S W V F Q
atgaagctcgaataaaggaggcagatgttggactcatcaatttgggacaaagatctcgagaagcagctgtttgaaatgcttgaaatt
M K S E K R E A D V V D S S I W D K D L E K Q L F E M L E I
gcctgtagatgcttagaccaagatcctaggcggagacccctcattgatgaggtgtttcatggcttgatggtattggaattcagagttct
A C R C L D Q D P R R R P L I D E V V S W L D G I G I Q S S
caacactga
Q H *

```

图1 *HbPSKR2* 序列信息 (A) 及蛋白结构域分析 (B)Fig. 1 *HbPSKR2* sequence information (A) and protein domain analysis (B)

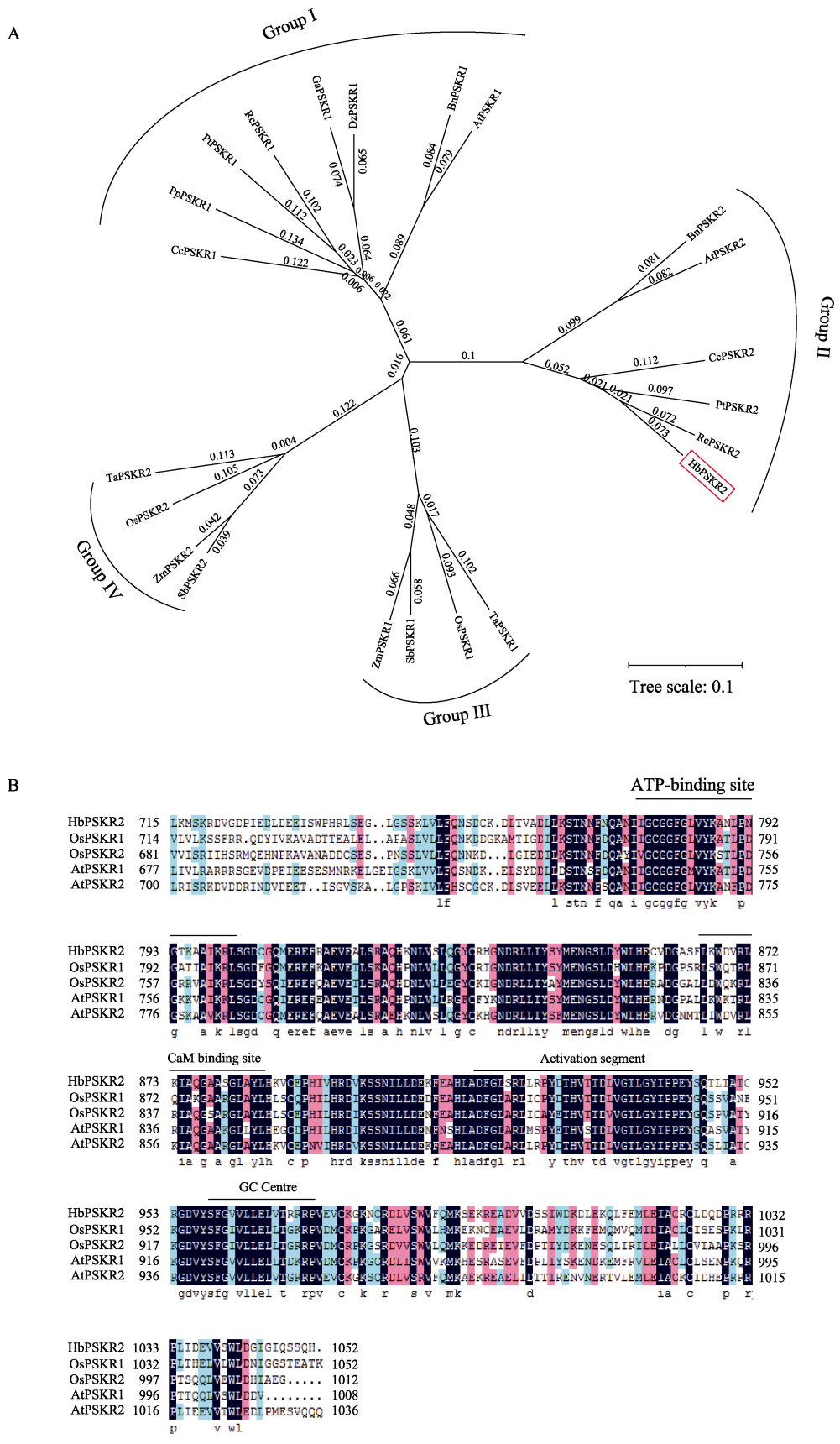
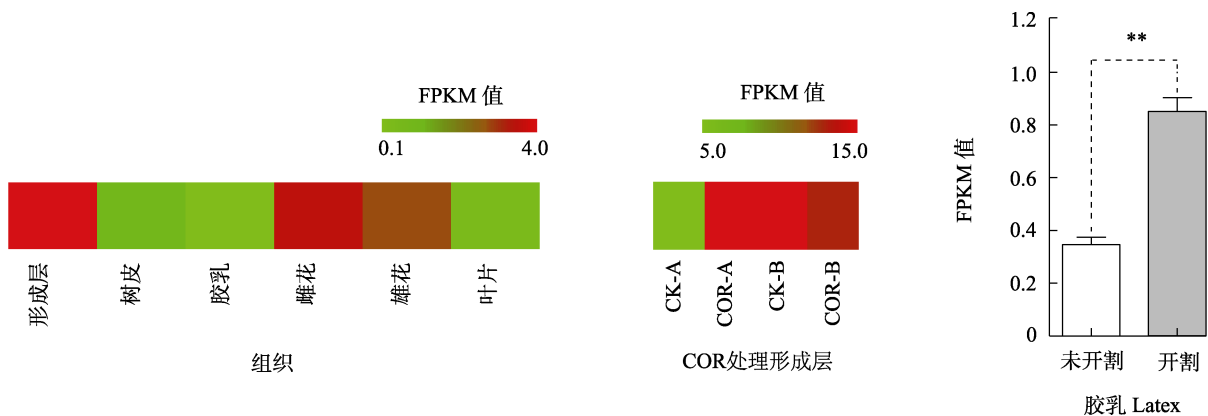


图 2 HbPSKR2 与其他植物 PSKR1s 的系统发育树构建 (A) 及激酶结构域的多重比对分析 (B)

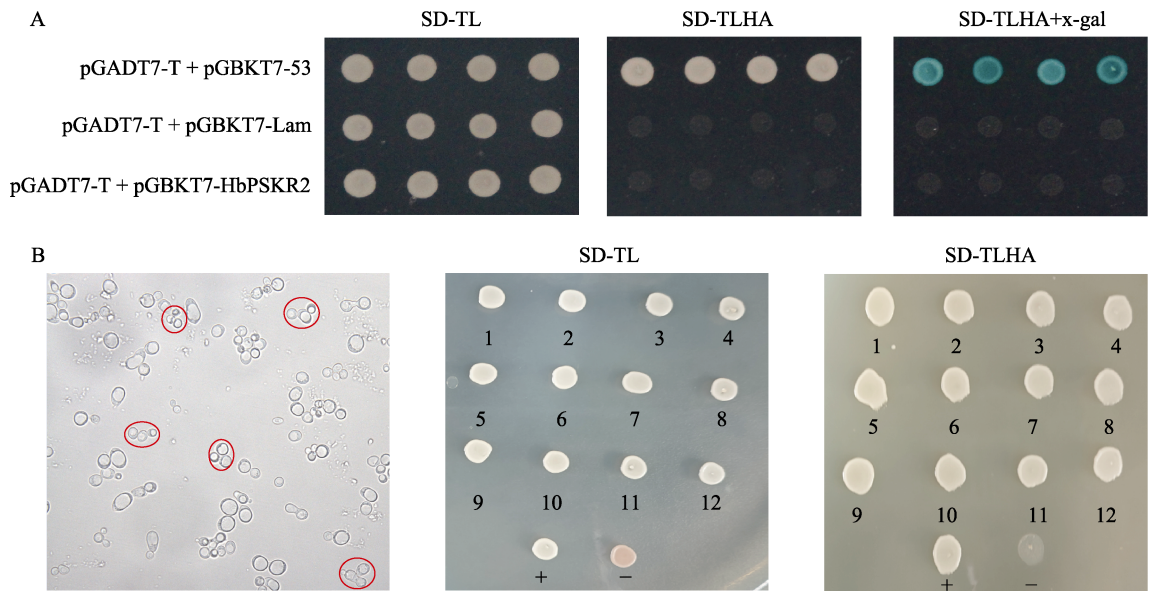
Fig. 2 Construction of phylogenetic trees (A) and multiple alignment analysis of kinase domains (B) between *HbPSKR2* and other plant PSKR1s



**表示处理间差异极显著 ($P<0.001$)。
** indicate extremely significant difference among treatments ($P<0.001$).

图 3 *HbPSKR2* 基因的表达模式分析

Fig. 3 Expression pattern analysis of *HbPSKR2* gene



红色圆圈表明杂交后的酵母合子细胞。

The red circle indicates the yeast zygotic cells after hybridization.

图 4 *HbPSKR2* 的自激活检测 (A) 及互作蛋白鉴定 (B)

Fig. 4 Auto-activation detection (A) and interacting protein identification (B) of *HbPSKR2*

素化相关成员、2 个生长发育相关成员、2 个蛋白激酶、1 个 RNA 聚合酶、1 个几丁质酶以及 2 个功能未知蛋白 (表 2)。

2.5 *HbPSKR2* 与蛋白激酶 *HbPBL8* 和 *HbPIX13* 的互作验证

蛋白激酶在信号传导中起重要作用。在 *HbPSKR2* 互作蛋白中鉴定到 2 个蛋白激酶 *HbPBL8* 和 *HbPIX13*, 推测其可能介导橡胶树 PSK 的信号传导。分别构建 *HbPSKR2*-nLUC 载体、*HbPBL8*-cLUC 以及 *HbPIX13*-cLUC 载体, 采用 LCI 技术在烟草叶片中验证 *HbPSKR2* 与 *HbPBL8* 和 *HbPIX13*

的互作关系。结果显示共转 *HbPSKR2*-nLUC/*HbPBL8*-cLUC 和 *HbPSKR2*-nLUC/*HbPIX13*-cLUC 可以检测到强烈的荧光信号 (图 5A), 进一步证明 *HbPSKR2* 在体内可以与 *HbPBL8* 激酶和 *HbPIX13* 激酶互作。

2.6 *HbPBL8* 和 *HbPIX13* 响应 COR 处理的表达模式分析

通过分析 COR 处理的橡胶树形成层区转录组数据, *HbPBL8* 表达量在 COR 处理前期和后期均较对照显著上调, 而 *HbPIX13* 表达量则在 COR 处理前后均无差异 (图 5B)。

表 2 HbPSKR2 互作蛋白信息
Tab. 2 Information of HbPSKR2 interacted proteins

克隆编号 Clone No.	NCBI 序列号 NCBI accession	基因注释 Gene annotation
1	XM_021826051.1	<i>Hevea brasiliensis</i> flowering time control protein FPA
2	XM_021826436.1	<i>Hevea brasiliensis</i> 60S ribosomal protein L15-1-like
3	XM_021812705.1	<i>Hevea brasiliensis</i> uncharacterized
4	XM_021795228.1	<i>Hevea brasiliensis</i> uncharacterized
5	XM_021810009.1	<i>Hevea brasiliensis</i> polyubiquitin-like
6	XM_021836988.1	<i>Hevea brasiliensis</i> E3 ubiquitin-protein ligase CIP8
7	XM_021828633.1	<i>Hevea brasiliensis</i> probable serine/threonine-protein kinase PBL8 AT5G01020
8	XM_021784810.1	<i>Hevea brasiliensis</i> protein LIGHT-DEPENDENT SHORT HYPOCOTYLS 4-like
9	XM_021819060.1	<i>Hevea brasiliensis</i> probable serine/threonine-protein kinase PIX13 AT2G12390
10	XM_021820903.1	<i>Hevea brasiliensis</i> cellulose synthase A catalytic subunit 7
11	XM_021789815.1	<i>Hevea brasiliensis</i> DNA-directed RNA polymerases II, IV and V subunit 11
12	XM_021807104.1	<i>Hevea brasiliensis</i> 60S ribosomal protein L37-3

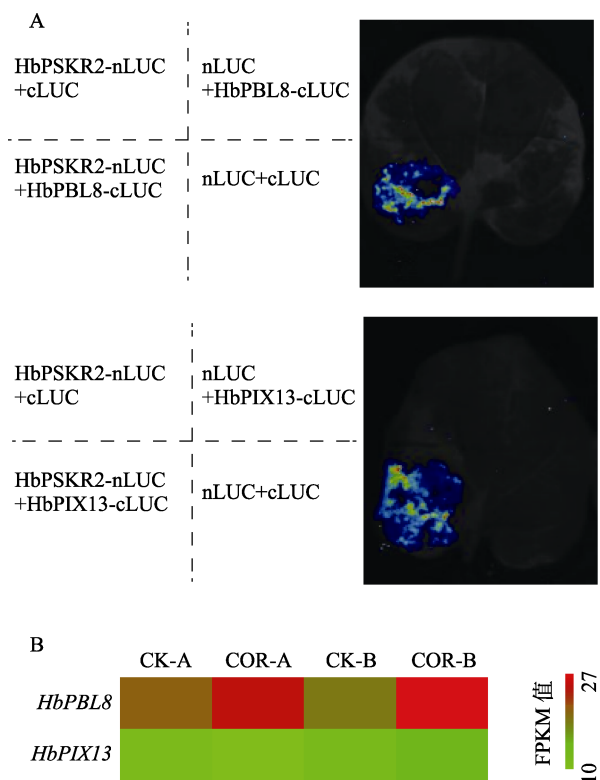


图 5 2 个激酶与 HbPSKR2 间的 LCI 验证 (A) 及响应 COR 处理的表达模式分析 (B)
Fig. 5 LCI validation between two kinases and HbPSKR2 (A) and expression pattern analysis of two kinases upon COR treatment (B)

3 讨论

PSKR 是 PSK 的直接受体, 在 PSK 信号传导中起重要作用^[6-7]。本研究克隆了橡胶树的 HbPSKR2 基因。序列分析显示, HbPSKR2 是一

个跨膜蛋白, 含有 PSKR 蛋白典型的膜外 LRR 结构域和膜内激酶结构域。组织特异性分析显示 HbPSKR2 在橡胶树形成层区域相对表达丰度最高, 并且在 COR 处理早期被显著诱导。课题组前期研究发现茉莉酸信号在诱导形成层分化次生乳管过程中起重要作用^[14-15], 近期已有研究证明 PSK 参与了茉莉酸诱导乳管分化过程^[16]。鉴于 HbPSKR2 在形成层区域高丰度表达, 且可被茉莉酸类似物诱导, 因此推测该基因可能参与了橡胶树的乳管分化。

酵母双杂交文库筛选是鉴定互作蛋白的常用方法^[17]。本研究构建了 HbPSKR2 诱饵表达载体, 对橡胶树形成层区域酵母双杂交文库进行筛选, 共得到 12 个候选蛋白, 测序分析显示这些成员涉及初生代谢、生长发育、信号传导等多个生物学途径。蛋白质是生命活动的主要承担者, 其生物合成和降解过程直接关系到生命活动的进行^[18]。核糖体是真核生物中与蛋白质合成密切相关的细胞器, 由不同大小的亚基组成^[19]。泛素化是真核生物普遍存在的翻译后修饰方式, 通过将靶标蛋白标记泛素标签进而启动蛋白质的降解^[20-21]。本研究从 HbPSKR2 互作蛋白中发现 2 个核糖体相关成员和 2 个泛素化相关成员, 表明 PSK 信号途径可能直接参与橡胶树蛋白质合成和降解过程。

蛋白激酶是一种催化蛋白质发生磷酸化修饰的酶^[22]。生物体内的蛋白磷酸化是调控蛋白活力和功能的重要机制之一, 在细胞信号传导过程中起重要作用^[23-25]。作为一种受体蛋白, 已有报道

PSKR 可以和多种激酶互作, 参与不同的生物学过程。如 WANG 等^[26]报道拟南芥中 PSK 与 PSKR 互作后可以改变结合位点附近的构象, 促使 PSKR 与体细胞胚胎发育受体激酶 (somatic embryogenesis receptor kinase, SERK) 发生互作; HOLZWART 等^[9]报道拟南芥的受体蛋白 RLP44 可以介导油菜素内酯关键成员 BRI1-ASSOCIATED KINASE 1 (BAK1) 与 PSKR1 互作, 以复合体的形式介导形成层分化木质部。本研究中通过荧光素酶实验证明 2 个蛋白激酶 HbPIX13 和 HbPBL8 与 HbPSKR2 之间存在强烈互作, 基因表达模式分析显示 *HbPBL8* 可被 COR 显著诱导, 推测 HbPSKR2-HbPBL8 信号通路可能在橡胶树乳管分化过程中起一定作用。揭示 HbPBL8 的靶标蛋白将是下一步的工作重点。

参考文献

- [1] MATSUBAYASHI Y, SAKAGAMI Y. Peptide hormones in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2006, 57(1): 649-674.
- [2] KAUFMANN C, SAUTER M. Sulfated plant peptide hormones[J]. Journal of Experimental Botany, 2019, 70(16): 4267-4277.
- [3] SAUTER M. Phytosulfokine peptide signalling[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(17): 5161-5169.
- [4] MATSUBAYASHI Y, SAKAGAMI Y. Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L.[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996, 93(15): 7623-7627.
- [5] YANG H, MATSUBAYASHI Y, NAKAMURA K, SAKAGAMI Y. *Oryza sativa* PSK gene encodes a precursor of phytosulfokine- α , a sulfated peptide growth factor found in plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999, 96(23): 13560-13565.
- [6] MATSUBAYASHI Y, OGAWA M, MORITA A, SAKAGAMI Y. An IRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone, phytosulfokine[J]. Science, 2002, 296(5572): 1470-1472.
- [7] HARTMANN J, FISCHER C, DIETRICH P, SAUTER M. Kinase activity and calmodulin binding are essential for growth signaling by the phytosulfokine receptor PSKR1[J]. The Plant Journal, 2014, 78(2): 192-202.
- [8] ZHANG H, HU Z J, LEI C, ZHENG C F, WANG J, SHAO S J, LI X, XIA X J, CAI X Z, ZHOU J, ZHOU Y H, YU J Q, FOYER C H, SHI K. A plant phytosulfokine peptide initiates auxin-dependent immunity through cytosolic Ca^{2+} signaling in tomato[J]. The Plant Cell, 2018, 30(3): 652-667.
- [9] HOLZWART E, HUERTA A I, GLÖCKNER N, GARNELO G B, WANKE F, AUGUSTIN S, ASKANI J C, SCHÜR-HOLZ A, HARTER K, WOLF S. BRI1 controls vascular cell fate in the *Arabidopsis* root through RLP44 and phyto-sulfokine signaling[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018, 115(46): 11838-11843.
- [10] 郭冰冰, 代龙军, 杨洪, 赵溪竹, 王立丰. 橡胶树排胶机理与调控研究进展[J]. 热带作物学报, 2022, 43(4): 754-768.
- [10] GUO B B, DAI L J, YANG H, ZHAO X Z, WANG L F. Research progress on mechanism and regulation of latex flow in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg.[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(4): 754-768. (in Chinese)
- [11] TANG C R, YANG M, FANG Y J, LUO Y F, GAO S H, XIAO X H, AN Z W, ZHOU B H, ZHANG B, TAN X Y, YEANG H Y, QIN Y X, YANG J H, LIN Q, MEI H L, MONTORO P, LONG X U, QI J Y, HUA Y W, HE Z L, SUN M, LI W J, ZENG X, CHENG H, LIU Y, YANG J, TIAN W M, ZHUANG N S, ZENG R Z, LI D J, HE P, LI Z, ZOU Z, LI S L, LI C J, WANG J X, WEI D, LAI C Q, LUO W, YU J, HU S N, HUANG H S. The rubber tree genome reveals new insights into rubber production and species adaptation[J]. Nature Plants, 2016, 2(6): 1-10.
- [12] 张晓飞, 黄肖, 李维国. 4个引进橡胶树胶木兼优品种比较试验[J]. 热带作物学报, 2023, 44(3): 526-534.
- [12] ZHANG X F, HUANG X, LI W G. Comparison experiment of four introduced timber / latex clones in *Hevea brasiliensis*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2023, 44(3): 526-534. (in Chinese)
- [13] LOH S C, OTHMAN A S, VEERA SINGHAM G. Identification and characterization of jasmonic acid-and linolenic acid-mediated transcriptional regulation of secondary laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis*[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 1-16.
- [14] ZHAI J L, HAO H, XIAO H, CAO Y X, LIN X G, HUANG X. Identification of JAZ-interacting MYC transcription factors involved in latex drainage in *Hevea brasiliensis*[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 1-13.
- [15] CHAO J Q, ZHAO Y, JIN J, WU S H, DENG X M, CHEN Y Y, TIAN W M. Genome-wide identification and characterization of the JAZ gene family in rubber tree (*Hevea brasiliensis*)[J]. Frontiers in Genetics, 2019, 10: 372.
- [16] CHAO J Q, WU S H, SHI M J, XU X, GAO Q, DU H L, GAO B, GUO D, YANG S G, ZHANG S S, LI Y, FAN X L, HAI C Y, KOU L Q, ZHANG J, WANG Z W, LI Y, XUE W B, XU J, DENG X M, HUANG X, GAO X S, ZHANG X F, HU Y S, ZENG X, LI W G, ZHANG L S, PENG S Q,

- WU J L, HAO B Z, WANG X C, YU H, LI J Y, LIANG C Z, TIAN W M. Genomic insight into domestication of rubber tree[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 4651.
- [17] PAIANO A, MARGIOTTA A, DE LUCA M, BUCCI C. Yeast two-hybrid assay to identify interacting proteins[J]. *Current Protocols in Protein Science*, 2019, 95(1): e70.
- [18] HENCHION M, HAYES M, MULLEN A M, FENELON M, TIWARI B. Future protein supply and demand: strategies and factors influencing a sustainable equilibrium[J]. *Foods*, 2017, 6(7): 53.
- [19] BASSLER J, HURT E. Eukaryotic ribosome assembly[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2019, 88(1): 281-306.
- [20] ROBERTS J Z, CRAWFORD N, LONGLEY D B. The role of ubiquitination in apoptosis and necroptosis[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2022, 29(2): 272-284.
- [21] FOOT N, HENSHALL T, KUMAR S. Ubiquitination and the regulation of membrane proteins[J]. *Physiological Reviews*, 2017, 97(1): 253-281.
- [22] ENDICOTT J A, NOBLE M E M, JOHNSON L N. The structural basis for control of eukaryotic protein kinases[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2012, 81(1): 587-613.
- [23] RACIOPPI L, MEANS A R. Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase kinase 2: roles in signaling and pathophysiology[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(38): 31658-31665.
- [24] CORCORAN A, COTTER T G. Redox regulation of protein kinases[J]. *The FEBS Journal*, 2013, 280(9): 1944-1965.
- [25] ZHANG M M, ZHANG S Q. Mitogen-activated protein kinase cascades in plant signaling[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 64(2): 301-341.
- [26] WANG J Z, LI H J, HAN Z F, ZHANG H Q, WANG T, LIN G Z, CHANG J B, YANG W C, CHAI J J. Allosteric receptor activation by the plant peptide hormone phytosulfokine[J]. *Nature*, 2015, 525(7568): 265-268.