

## 巴西橡胶树*HbMKK6*基因的克隆及表达分析

吴绍华<sup>1</sup>, 陈月昇<sup>1</sup>, 王建霄<sup>1,2</sup>, 田维敏<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>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; <sup>2</sup>海南大学农学院, 海口570228

**摘要:** 促分裂原活化蛋白激酶的激酶(MAPKKs/MKKs)在植物应对逆境胁迫中发挥重要作用。本研究采用RACE和RT-PCR方法, 从巴西橡胶树无性系‘热研7-33-97’的胶乳中克隆了一个MAPKK基因家族成员, 命名为*HbMKK6*。该基因的全长cDNA包含65 bp的5'非编码区, 316 bp的3'非编码区和1 065 bp的开放阅读框, 编码一个由354个氨基酸残基组成的蛋白质。该蛋白质分子量为39.91 kDa, 理论等电点为5.96, 含有保守的SMGQRDT (S/TxxxxxS/T)基序。实时荧光定量PCR结果表明, *HbMKK6*在橡胶树的根、皮、胶乳及叶片中均有表达, 其中在叶片中的表达量最高。*HbMKK6*基因在橡胶树抗寒无性系‘93-114’叶片中的表达丰度显著高于不抗寒无性系‘热垦501’, 而且在4 °C低温下显著上调。高丰度表达*HbMKK6*可能与增强橡胶树的抗寒性有关。

**关键词:** 巴西橡胶树; 促分裂原活化蛋白激酶的激酶; 抗寒; *HbMKK6*; 基因表达

## Cloning and Expression Analysis of a *HbMKK6* Gene in Rubber Tree (*Hevea brasiliensis*)

WU Shao-Hua<sup>1</sup>, CHEN Yue-Yi<sup>1</sup>, WANG Jian-Xiao<sup>1,2</sup>, TIAN Wei-Min<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture, State Key Laboratory Incubation Base for Cultivation & Physiology of Tropical Crops, Danzhou, Hainan 571737, China; <sup>2</sup>College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China

**Abstract:** Mitogen-activated protein kinase kinases (MAPKKs/MKKs) play an important role in tolerance of plants to abiotic and biotic stresses. In the present study, a full length cDNA sequence of *HbMKK6* was obtained from latex of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) clone ‘Reyan 7-33-97’ by rapid-amplification of cDNA ends (RACE) and RT-PCR. The *HbMKK6* contained 65 bp 5' untranslated region (UTR), 316 bp 3' UTR and a 1 065 bp open reading frame (ORF). The *HbMKK6* contained 354 amino acid residues with a predicted molecular mass of 39.91 kDa and theoretical isoelectric points (pI) of 5.96. It has the consensus sequence SMGQRDT (S/TxxxxxS/T). Real-time RT-PCR analysis showed that *HbMKK6* was expressed in root, bark, latex and especially in leaves. The transcripts of *HbMKK6* were more abundance in cold-resistant rubber tree clone ‘93-114’ than that in cold-sensitive rubber tree clone ‘Reken 501’. Moreover, the expression of *HbMKK6* in the leaves of rubber tree clone ‘93-114’ was significantly up-regulated while it remained hardly changed in the leaves of rubber tree clone ‘Reken 501’ under 4 °C treatment. The differential expression of *HbMKK6* between the two clones may be associated with their different tolerance to cold stress.

**Key words:** *Hevea brasiliensis*; mitogen-activated protein kinase kinase; cold-resistant; *HbMKK6*; gene expression

促分裂原活化蛋白激酶的激酶(mitogen-activated protein kinase kinases, MAPKKs/MKKs)是MAPK级联途径的组分之一, 在真核生物中普遍存在。MAPK级联途径由促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、MAPKK、促分裂原活化蛋白激酶的激酶之激酶(MAPK kinase kinase, MAPKKK)三个组分组成(MAPK Group 2002), 由MAPKKK-MAPKK-MAPK依次磷酸化传递信号

(Gustin等1998; Chang和Karin 2001)。植物中MAPK信号转导广泛参与多种生物与非生物胁迫, 如病害、低温、干旱、盐害和紫外线等引起的信

收稿 2014-11-10 修定 2015-03-23

资助 中国热带农业科学院橡胶研究所基本科研业务费专项资金(1630022014002)、国家自然科学基金项目(31300504)。

\* 通讯作者(E-mail: wmtian@163.com; Tel: 0898-23300309)。

号转导过程(Meng和Zhang 2013; Samajova等2013; Danquah等2014)。研究表明,拟南芥AtMEK1 (Matsuoka等2002)、AtMKK2 (Teige等2004),水稻*OsMEK1* (Wen等2002)、*OsMKK6* (Xie等2012),玉米*ZmMKK1* (Cai等2014)等MAPKK组分与低温胁迫相关。Matsuoka等(2002)研究发现,拟南芥AtMEK1的活性受到低温刺激后升高,并可能通过双重磷酸化TEY基序激活其下游的ATMPK4。而ATMPK4和ATMPK6的蛋白激酶活性能在冷胁迫2 min中后被激活,其中ATMPK4活性在60 min后达到最高;ATMPK6更快,10 min内活性达到最高(Ichimura等2000; Teige等2004; Smekalova等2014)。Teige等(2004)研究发现,拟南芥MKK2可能通过其上游的MEKK1被低温激活。更进一步的研究发现,拟南芥以MEKK1-MKK2-MPK4/MPK6途径在低温胁迫响应的过程中起作用(Teige等2004; Pitzschke等2009a)。水稻花药及幼苗中*OsMEK1*转录本的表达水平受12 °C低温诱导上调,幼苗*OsMEK1*对4 °C低温处理无响应。*OsMAP1*表现出与*OsMEK1*相同的表达模式,且酵母双杂交实验证实*OsMEK1*能与*OsMAP1*互作。因此,推断包含*OsMEK1*和*OsMAP1*组分在内的MAPK信号途径可能在较高的低温范围响应中起作用(Wen等2002)。Xie等(2012)将*OsMKK6*的活性形式*OsMKK6DD*转化水稻,提高了转化植株的抗低温能力。玉米*ZmMKK1*的低温响应表现出与*OsMEK1*相似的表达模式,即受12 °C低温诱导上调,对4 °C低温胁迫无响应,且在12 °C低温处理12 h后,*ZmMKK1*转录本大约是对照的17倍。而且*ZmMKK1*烟草转基因植株也表现出抗低温的能力(Cai等2014)。因此,植物在遭遇低温时,外界的低温信号通过MAPK级联途径向下传递,通过调控相关转录因子或靶基因的表达,使植物获得抵御低温的能力。

巴西橡胶树的原产地和传统植胶区均属于热带静风地区,没有寒潮和台风的影响(何康和黄宗道1987)。我国的植胶区分布于北纬18~24°的热带北缘地区(主要是海南、云南和广东),橡胶树经常面临寒潮的影响。选育抗寒高产无性系能从根本上减轻寒潮对橡胶树的危害。目前,抗寒种质的鉴定主要采用抗寒前哨梯度苗圃系比鉴定法,即在一般年份有寒流侵袭的地区或寒流通道上建立前哨梯度苗圃系比区。通过抗寒苗圃鉴定,选育

出一批抗辐射或抗平流低温能力强(或较强)的无性系(黄华孙2005)。但是,这种方法需要耗费大量的人力、物力。因此,橡胶树抗寒分子标记的研发就显得尤为重要。本研究从橡胶树中鉴定了一个MAPKK基因家族成员基因*HbMKK6*,并分析其在抗寒无性系‘93-114’与不抗寒无性系‘热垦501’低温胁迫下的基因表达模式,旨在为开发抗寒性分子标记辅助橡胶树育种奠定基础。

## 材料与方法

### 1 材料

实验材料为种植于中国热带农业科学院实验场增殖圃的橡胶树(*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) ‘热研7-33-97’萌条、种子萌发的橡胶树实生苗‘热研7-33-97’以及‘93-114’和‘热垦501’芽接苗。

RNAprep Pure多糖多酚植物总RNA提取试剂盒、DNase I、DNA凝胶回收试剂盒购自天根公司。cDNA末端快速扩增(rapid-amplification of cDNA ends, RACE)试剂盒SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit购自Clontech公司。反转录试剂盒RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit购自Ferments公司。PrimeSTAR Max 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-Blunt Simple 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。

### 2 材料处理

橡胶树‘热研7-33-97’萌条和实生苗用于分析基因表达的组织特异性,其中选取3株生长状态相近的实生苗根以及萌条第一伸长单位中间部位的茎皮、胶乳和顶蓬叶片,液氮冻存,用于RNA提取。选取处于稳定期‘93-114’和‘热垦501’一蓬叶芽接苗进行4 °C低温胁迫处理,在处理0、2、4、8、12、24、48 h后,取中间叶片经液氮速冻,用于RNA提取。每个处理时间点取3株混合。

### 3 总RNA提取与cDNA合成

橡胶树RNA的提取参照RNAprep Pure多糖多酚植物总RNA提取试剂盒的操作说明进行,用DNase I柱消化RNA样品中残留的微量DNA。cDNA第一链的合成参照Ferments公司试剂盒的说明书进行。

#### 4 HbMKK6基因的RACE扩增和全长cDNA扩增

从巴西橡胶树转录组深度测序数据中得到一段注释为MKK的Unigene序列, 开放阅读框(open reading frame, ORF)分析显示该Unigene序列缺乏5'端序列。因此, 以转录组中获得MKK序列设计5' RACE引物(表1), 采用SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit进行5'端序列的克隆。将获得的5'端序列与Unigene序列进行拼接, 并设计全长cDNA扩增引物(表1), 进行PCR扩增验证。取1 μg胶乳RNA, 在20 μL反应体系中逆转录合成第一链cDNA。全长cDNA的扩增体系含PrimeSTAR Max Premix (2×) 25 μL、FL-CDNA-MKK6-F (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 2.5 μL、FL-CDNA-MKK6-R (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 2.5 μL、cDNA模板0.5 μL, 灭菌水补足到50 μL。扩增程序为: 95 °C预变性3 min; 94 °C变性30 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸2 min, 共30个循环; 72 °C延伸10 min。0.8%的琼脂糖凝胶电泳分离PCR扩增产物, 回收纯化目的条带, 克隆至pEASY-Blunt Simple Cloning Vector载体上测序。利用BLAST检索GenBank数据库, 进行同源性分析。

表1 本研究所用引物序列

Table1 Primer sequences used in this study

引物名称	序列
5RACE-MKK6-P	5'-AATGCAAATAATGTCCCAACCCATT-3'
5RACE-MKK6-NP	5'-TGATTCAAAAAGCAAATCTCCATCGT-3'
FL-CDNA-MKK6-F	5'-TGTTGCAGAGAAATTTAAACCCCT-3'
FL-CDNA-MKK6-R	5'-ACTTGAAAGACTAAACAAACCCAGA-3'
QPCR-MKK6-F	5'-TGGATCTTGCCCTCATATTCAAAGA-3'
QPCR-MKK6-R	5'-TGCCTACTTCCAAAACCAATGT-3'
QPCR-Actin-F	5'-GATTCCGTTGCCAGAAAGTC-3'
QPCR-Actin-R	5'-CACCCTCAGCACAAATGTTACC-3'

#### 5 生物信息学分析

采用NCBI网站ORF Finder软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)进行ORF预测, 同时翻译成蛋白序列。DNAMAN软件对HbMKK6蛋白的氨基酸序列进行比对分析。用NCBI网站Conserved Domain Database (CDD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析蛋白的保守结构域; ProtParam软件(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析该蛋白的分子量与等电点; TMHMM Server v. 2.0在线软件(<http://www.cbs.dtu>

<http://services.tmhmm/>)进行跨膜结构域分析; ProtScale在线软件(<http://web.expasy.org/protscale/>)预测该氨基酸序列的疏水性/亲水性; PSORT在线软件(<http://psort.hgc.jp/form.html>)对该蛋白进行亚细胞定位预测; SOPMA在线软件([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_sopma.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html))预测蛋白的二级结构。从NCBI数据库下载其他植物的MKK蛋白序列, 首先用Clustal W进行序列多重比对, 再利用MEGA 4.0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HbMKK6蛋白序列在内的植物MKK蛋白的系统进化树。

#### 6 实时荧光定量PCR分析

采用Bio-Rad公司的CFX实时荧光定量PCR系统, 实验操作按仪器使用说明书进行。取1 μg RNA, 逆转录合成第一链cDNA, 稀释10倍后作为实时定量PCR分析的模板。20 μL反应体系中, 包含1 μL模板、10 μL 2×SYBR Premix、10 μmol·L<sup>-1</sup> QPCR-MKK6-F和QPCR-MKK6-R引物(表1)各0.6 μL、灭菌水。PCR反应程序为: 95 °C预变性30 s; 95 °C变性10 s, 60 °C退火20 s, 72 °C延伸20 s, 共40个循环; 循环完后进行产物溶解曲线分析。利用CFX manager 3.0软件自动进行基线和C<sub>q</sub>值分析, 以HbActin作为内参基因(表1), 2<sup>-ΔΔC<sub>q</sub></sup>算法进行基因的相对定量表达分析。

采用t检验对‘93-114’和‘热垦501’同一处理的相对表达量进行统计分析, P<0.05时即达显著性, 用符号\*表示; P<0.01时即达极显著性, 用符号\*\*表示。

### 实验结果

#### 1 HbMKK6基因全长cDNA的克隆及编码蛋白的结构特性

通过5' RACE、RT-PCR扩增及测序, 获得HbMKK6基因(GenBank登录号: KP262502)的全长cDNA序列1 446 bp, 其中5'非编码区65 bp, 3'非编码区316 bp, ORF预测显示该基因含有1 065 bp的编码框, 编码354个氨基酸(图1)。该基因编码的蛋白质分子量为39.91 kDa, 理论等电点为5.96, 不稳定系数为47.94, 属于不稳定类蛋白。通过NCBI的CDD分析发现, 该蛋白与其他植物MKK蛋白一样,

```

1          t t t a a
6  a c c c t a a a a a c t a c a a g a a c a g a g t t a a a t c t t t c a a a a a t t t g a a c a a a a a a g a a g a a a
66 ATGAAGAGCAAGAAGCCATTGCAGCAACTCAAGCTCTCCGTTCCGGCTCAAGAAATCCCC
1  M K S K K P L Q Q L K L S V P A Q E I P
126 ATTACCTCTTTCTTGACTGCAAGTGGTACATTTACGATGGAGATTTGCTTTTGAATCAG
21  I T S F L T A S G T F H D G D L L L N Q
186 AAAGGCCTGCGGCTTATCTCTGAAGAGAAGGAATCTCGTCCTCAGATAACAAGGAGCTT
41  K G L R L I S E E K E S R P S D N K E L
246 GATTTTGATTTCTCATTGGAAGACCTTGAGACAGTCAAAGTCATTGGAAAGGGGAGTGGA
61  D F D F S L E D L E T V K V I G K G S G
306 GGTGTAGTGCAACTGTTCGTCATAAATGGGTTGGGACATTATTTGCATTGAAGGTCATC
81  G V V Q L V R H K W V G T L F A L K V I
366 CAGATGAACATACAAGAGGATATTCGTAACAAATGTACAGGAGCTGAAAATAAACCAA
101 Q M N I Q E D I R K Q I V Q E L K I N Q
426 GCCTCCCAATGTTCTCACGTTGTTGTTGCCACCATTTCATTCTATCACAAATGGAGCTATT
121 A S Q C S H V V V C H H S F Y H N G A I
486 TCTCTGTACTAGAATACATGGATCGTGGATCTCTGGCAGATGTGATTAGACAAGTTAAA
141 S L V L E Y M D R G S L A D V I R Q V K
546 ACAATTCTGAACTTACCTGGCTGTTGTGTGCAAGCAGGTTTTACAGGGTCTCGTGTAT
161 T I L E P Y L A V V C K Q V L Q G L V Y
606 CTACACCATGAGCGACATGTCATACATAGGGACATTAACCATCCAATCTATTGGTAAAC
181 L H H E R H V I H R D I K P S N L L V N
666 CATAAAGGGAAGTGAAGATCACTGATTTTGGTGTGAGTGAATGCTAGCTAGTTCTGTAT
201 H K G E V K I T D F G V S A M L A S S M
726 GGTCAAAGGACACATTGTTGGAACCTACAATTACATGTCGCCAGAGCGAATTAGTGGG
221 G Q R D T F V G T Y N Y M S P E R I S G
786 AGCACCTATGACTACAGCAGTGAATTTGGAGTTTAGGGTTGGTAGTACTTGAGTGTGCT
241 S T Y D Y S S D I W S L G L V V L E C A
846 ATAGGGCGTTTTCTTATATGCAATCTGAAGATCAGCAAACTGGCCAAGCTTTTATGAG
261 I G R F P Y M Q S E D Q Q N W P S F Y E
906 CTCTTGGAGGCCATTGTGGAGAGCCACCTCCATCTGCTCCACCAGATCAATTCCTCCCC
281 L L E A I V E S P P P S A P P D Q F S P
966 GAGTTCTGTTCAATTTGTCTCATCTGTATACAGAAGAATCCTCGAGAAAGGGCATCATCT
301 E F C S F V S S C I Q K N P R E R A S S
1026 TTGGACCTTTGAAATCACCCATTATCAAAAAGTTGAAGACAAAGACATTGATCTTGGAA
321 L D L L N H P F I K K F E D K D I D L G
1086 ATTCTAGTTGGCAGCTTGGAACTCCTGTGAACTACCCTAGGTAGTTgtcttgatgt
341 I L V G S L E P P V N Y P R *
1146 ttatgttgaacctgagccagggtggcttgccttataatgctatatcgacttatctta
1206 gtataaagtgttcacatcaggctcttgctattaatctttatcaaacattacagaaattac
1266 catgtaactattgaagcaaatatttacttatatggatcttgccttcatttcaagagat
1326 aatatctaatttaggacagggttaccatgatcttgccttgatattgatctgggtttgtt
1386 tagtctttcaagttcaatgaacattgggttttgggaagtaggcataatttttgtacctttaa
1446 g

```

图1 *HbMKK6*的核苷酸序列和推导的氨基酸序列

Fig.1 The nucleotide and deduced amino acid sequences of *HbMKK6*

具有进化上保守的蛋白激酶催化结构域S<sub>TKc</sub>, 其中在结构域中包含一个保守的磷酸化基序SMGQ-RDT (S/TxxxxxS/T) (图2)。生物信息分析显示, *HbMKK6*蛋白可能定位于细胞质中, 无跨膜结构域, 属于亲水性蛋白, 其二级结构由33.05%  $\alpha$ -螺旋、21.19%延伸链、10.73%  $\beta$ -转角和35.03%无规则卷曲组成。

## 2 *HbMKK6*推导的氨基酸序列比对及进化树构建

采用DNAMAN软件对*HbMKK6*推导的氨基酸序列与其他植物MKK蛋白序列进行比对, 结果显示, *HbMKK6*蛋白序列与麻疯树(*Jatropha curcas*)假定蛋白JCGZ\_07355 (KDP33784.1)、陆地棉(*Gossypium hirsutum*) GhMKK6 (ADR31547.1)、白桦(*Betula platyphylla*) BpMKK6 (AHX99577.1)、葡萄(*Vitis vinifera*) VvMKK6 (XP\_002283491.1)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) AtMKK6 (NP\_200469.1)、

玉米(*Zea mays*) ZmMKK6 (ACG40591.1)、水稻(*Oryza sativa*) OsMKK6 (ABG45894.1)氨基酸序列相似性分别为96.33%、94.07%、92.94%、90.96%、87.08%、76.97%和76.97% (图2)。

选取NCBI数据库中7条与*HbMKK6*蛋白氨基酸较相似序列以及4条低温响应的MKK蛋白序列, 利用软件MEGA 4.0构建系统进化树。聚类结果显示, 橡胶树*HbMKK6*与麻疯树假定蛋白JCGZ\_07355聚为一类, 亲缘关系最近(图3)。

## 3 *HbMKK6*基因表达分析

采用荧光定量RT-PCR技术对*HbMKK6*基因的组织特异性和4 °C低温胁迫处理条件下的基因表达模式进行了分析。基因表达结果显示, *HbMKK6*在橡胶树的根、茎皮、胶乳及叶片中均有表达, 其中胶乳中的表达量最低, 叶片中的最高, 不同时期叶片中*HbMKK6*的表达量也不同(图4)。常温与

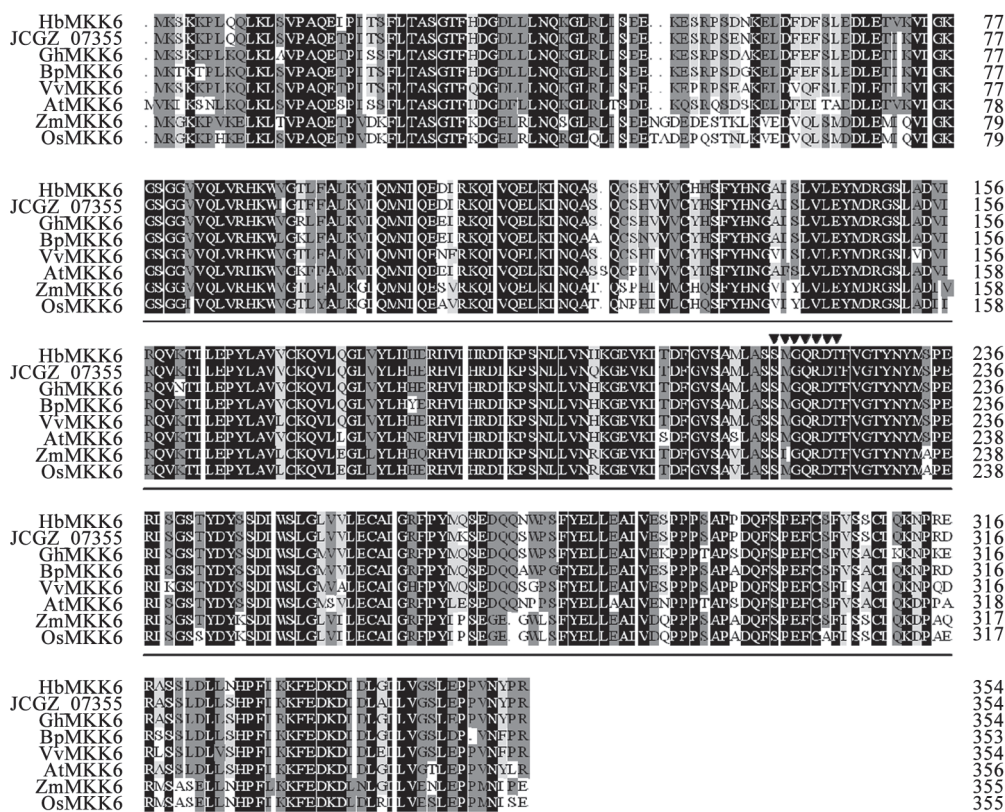


图2 *HbMCK6*推导的氨基酸序列与其他植物MKK蛋白序列比对  
Fig.2 Amino acid alignment of the *HbMCK6* with MKKs from other plant species  
黑下划线表示S\_TKc结构域; ▼显示的是SMGQRDT (S/TxxxxS/T)基序。

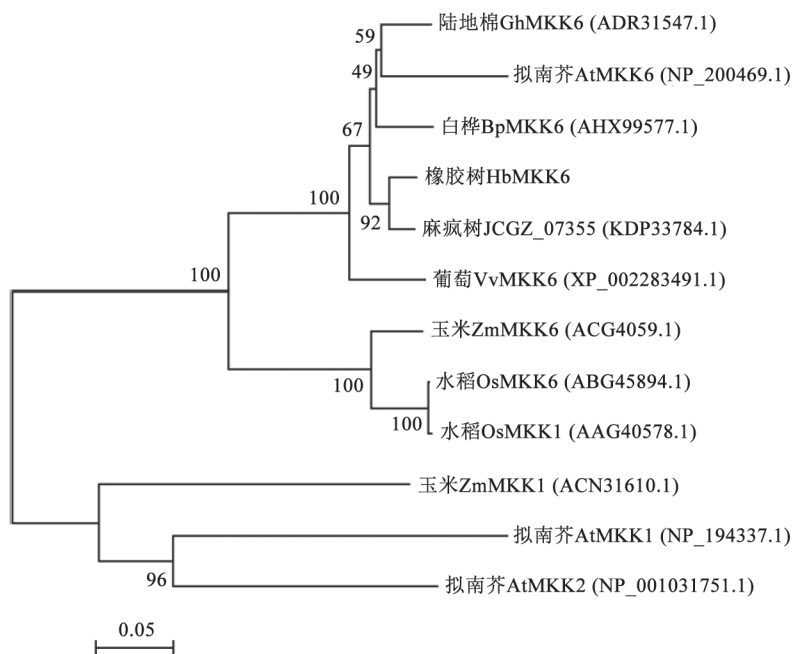


图3 *HbMCK6*与其他同源蛋白的进化分析  
Fig.3 Phylogenetic analysis of *HbMCK6* and other homologs

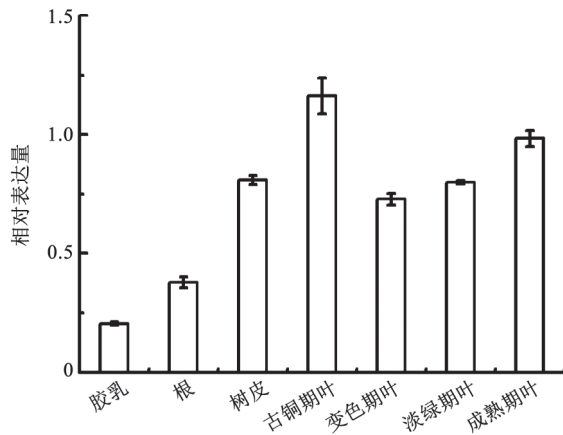


图4 *HbMKK6*基因在橡胶树不同组织中的表达特性  
Fig.4 Expression of *HbMKK6* in different tissues of *H. brasiliensis*

4 °C低温处理条件下, *HbMKK6*在橡胶树抗寒无性系‘93-114’叶片中表达丰度均显著高于不抗寒无性系‘热垦501’, 其中4 °C低温处理4 h后, ‘93-114’中*HbMKK6*基因表达量更是达到了‘热垦501’表达量的近10倍(图5)。而且, 4 °C低温处理后, ‘93-114’叶片中*HbMKK6*基因的表达量受低温诱导大幅上调, 与常温相比, ‘93-114’无性系叶片中*HbMKK6*基因

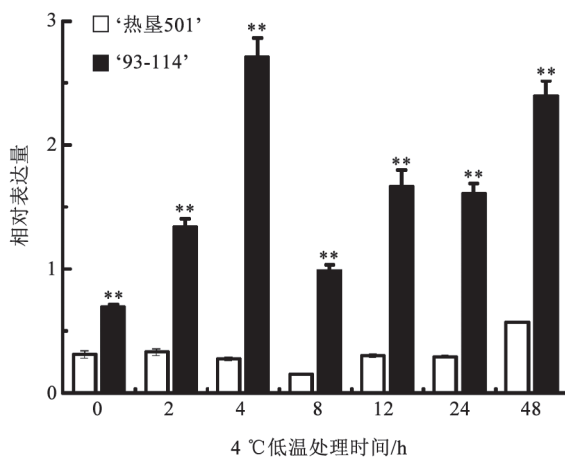


图5 低温(4 °C)胁迫下*HbMKK6*基因在橡胶树抗寒无性系‘93-114’和不抗寒无性系‘热垦501’中的差异表达  
Fig.5 Differential expression of *HbMKK6* in the leaves of cold-resistant rubber tree clone ‘93-114’ and cold-sensitive rubber tree clone ‘Reken 501’ in response to low-temperature (4 °C)

采用*t*检验对同一处理‘93-114’和‘热垦501’的表达量进行统计分析, \*表示达显著性( $P < 0.05$ ), \*\*表示达极显著性( $P < 0.01$ )。

表达在4 °C低温处理2 h后开始上调, 表达量是对照的1.9倍; 在4 h达到最高, 表达量是对照的3.9倍; 8 h后基因表达开始下调, 但整个低温处理过程中, ‘93-114’中*HbMKK6*基因的表达丰度维持在一个较高的水平。而‘热垦501’叶片中*HbMKK6*基因表达除在4 °C低温处理48 h有所上调外, 其他时间点的表达量基本维持不变(图5)。结合2个无性系在生产上的表现, 即‘93-114’比‘热垦501’更具有抗寒性, 推测高丰度表达*HbMKK6*可能与增强橡胶树的抗寒性有关。

## 讨 论

选育抗寒高产橡胶树品种是我国橡胶产业可持续发展的迫切需求。目前, 橡胶树抗寒性种质的鉴定主要采用传统的抗寒前哨梯度苗圃系比鉴定法, 而橡胶树抗寒性的分子机理研究还处于起步阶段, 主要集中在抗寒基因的筛选。已有的研究发现*HbCBF1* (程汉等2005)、*HbCBF2* (蔡海滨等2008)、*HbMT2a* (李言等2011)、*HbSoloit* (杜磊等2013)、*HbHsp70* (Zhang等2009)基因表达受低温胁迫诱导。另外, 安泽伟等(2010)采用cDNA-AFLP技术从11个橡胶树抗寒无性系和12个不抗寒无性系中鉴定了12条表现一致的差异片段, 其中TDF7-8、TDF5-15、TDF16-10片段分别与植物抗逆相关的ABC转运蛋白、3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸合成酶(DAHPS)、WRKY基因有较高相似性。Silva等(2014)从橡胶树低温诱导的文库中鉴定ATP合酶CF0 C亚基(CF0)、NAD(P)H醌氧化还原酶H亚基(NADH)、光系统II 10 kDa多肽(PsbR)及吡啶-3-乙酸诱导蛋白ARG2-1和ARG2-2的表达受低温诱导。MAPKK作为MAPK级联组分的成员之一, 在植物的生长发育和抗逆响应中发挥着极为重要的作用(Colcombet和Hirt 2008; Fiil等2009; Pitzschke等2009b; Rodriguez等2010; Sinha等2011)。而有关MAPKK基因介导的橡胶树抗寒分子机理的研究还未见报道。本研究从橡胶树中鉴定了一个MAPKK基因家族成员*HbMKK6*, 并采用抗寒无性系‘93-114’与不抗寒无性系‘热垦501’作为材料, 分析*HbMKK6*在低温胁迫下基因表达模式。基因表达结果显示, 抗寒‘93-114’无性系叶片中*HbMKK6*基因的表达受4 °C低温诱导表达大幅上调, 4 h的表达量达到最高, 此后维持在一个较高的水平, 这与水稻*Os-*

*MEK1*和玉米*ZmMKK1*低温响应的基因表达模式是不同的, *OsMEK1*和*ZmMKK1*受12℃低温诱导上调, 对4℃低温胁迫无响应(Wen等2002; Cai等2014)。另外, *HbMKK6*基因在橡胶树抗寒无性系‘93-114’叶片中的表达丰度显著高于不抗寒无性系‘热垦501’, 而且抗寒无性系‘93-114’叶片中*HbMKK6*基因表达受4℃低温显著上调, 与*BnMKK4*和*BnMKK2*在‘陇油6号’和‘天油2号’油菜中的诱导模式相似(张腾国等2012a, b)。即‘陇油6号’中*BnMKK4*基因受低温胁迫诱导的持续时间更长或*BnMKK2*基因在‘陇油6号’油菜中受低温胁迫诱导的程度更强, 这种低温胁迫响应与‘陇油6号’油菜比‘天油2号’更具有抗寒性的品种特性是相一致(张腾国等2012a, b)。因此, 橡胶树*HbMKK6*可能与其他植物的MKK基因具有相似的功能, 在橡胶树低温响应中发挥作用。在后续的研究中, 将进一步扩大橡胶树抗寒无性系与不抗寒无性系的群体, 着重分析*HbMKK6*低温响应的基因表达差异模式是否也存在于其他抗寒与不抗寒种质中, 以进一步评估*HbMKK6*是否可作为评价橡胶树抗寒性的一种潜在标记。

### 参考文献

- 安泽伟, 陈根辉, 程汉, 赵彦宏, 谢黎黎, 黄华孙(2010). 橡胶树冷应答转录组cDNA-AFLP分析. 林业科学, 46 (3): 62-67
- 蔡海滨, 胡彦师, 黄华孙, 程汉(2008). 巴西橡胶树*CBF2*基因的克隆和表达分析. 热带农业科技, 31 (3): 1-5, 12
- 程汉, 安泽伟, 黄华孙(2005). 巴西橡胶树*CBF1*基因的克隆和序列分析. 热带作物学报, 26 (3): 50-55
- 杜磊, 张德春, 邓治, 刘向红, 李德军(2013). 巴西橡胶树一个AP2/EREBP转录因子的克隆及表达分析. 植物生理学报, 49 (11): 1238-1244
- 何康, 黄宗道(1987). 热带北缘橡胶树栽培. 广州: 广东科技出版社, 110-112
- 黄华孙(2005). 中国橡胶树育种五十年. 北京: 中国农业出版社, 82-86
- 李言, 杨曙光, 陈月异, 田维敏(2011). 渗透胁迫与植物激素等对巴西橡胶树*HbMT2a*基因表达的影响. 热带作物学报, 32 (5): 828-832
- 张腾国, 王宁, 王娟, 王圆圆, 张艳, 孙万仓, 常燕, 夏惠娟(2012a). 油菜*BnMKK4*全长基因的克隆及表达分析. 植物生理学报, 48 (5): 491-498
- 张腾国, 王圆圆, 王娟, 王宁, 张艳, 孙万仓, 陈琼琼, 夏惠娟(2012b). 油菜*BnMKK2*基因的克隆及表达分析. 植物研究, 32 (5): 578-583
- Cai GH, Wang G, Wang L, Pan J, Liu Y, Li D (2014). *ZmMKK1*, a novel group A mitogen-activated protein kinase kinase gene in maize, conferred chilling stress tolerance and was involved in pathogen defense in transgenic tobacco. Plant Sci, 214: 57-73
- Chang L, Karin M (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature, 410 (6824): 37-40
- Colcombet J, Hirt H (2008). *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. Biochem J, 413 (2): 217-226
- Danquah A, de Zelicourt A, Colcombet J, Hirt H (2014). The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. Biotechnol Adv, 32 (1): 40-52
- Fiil BK, Petersen K, Petersen M, Mundy J (2009). Gene regulation by MAP kinase cascades. Curr Opin Plant Biol, 12 (5): 615-621
- Gustin MC, Albertyn J, Alexander M, Davenport K (1998). MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol Rev, 62 (4): 1264-1300
- Ichimura K, Mizoguchi T, Yoshida R, Yuasa T, Shinozaki KT (2000). Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. Plant J, 24 (5): 655-665
- MAGP Group (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. Trends Plant Sci, 7 (7): 301-308
- Matsuoka D, Nanmori T, Sato K, Fukami Y, Kikkawa U, Yasuda T (2002). Activation of AtMEK1, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase, *in vitro* and *in vivo*: analysis of active mutants expressed in *E. coli* and generation of the active form in stress response in seedlings. Plant J, 29 (5): 637-647
- Meng X, Zhang S (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. Annu Rev Phytopathol, 51: 245-266
- Pitzschke A, Djamei A, Bitton F, Hirt H (2009a). A major role of the MEK1-MKK1/2-MPK4 pathway in ROS signalling. Mol Plant, 2 (1): 120-137
- Pitzschke A, Schikora A, Hirt H (2009b). MAPK cascade signalling networks in plant defence. Curr Opin Plant Biol, 12 (4): 421-426
- Rodriguez MC, Petersen M, Mundy J (2010). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. Annu Rev Plant Biol, 61: 621-649
- Samajova O, Plihal O, Al-Yousif M, Hirt H, Samaj J (2013). Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases. Biotechnol Adv, 31 (1): 118-128
- Silva CC, Mantello CC, Campos T, Souza LM, Goncalves PS, Souza AP (2014). Leaf-, panel- and latex-expressed sequenced tags from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) under cold-stressed and suboptimal growing conditions: the development of gene-targeted functional markers for stress response. Mol Breed, 34 (3): 1035-1053
- Sinha AK, Jaggi M, Raghuram B, Tuteja N (2011). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. Plant Signal Behav, 6 (2): 196-203
- Smekalova V, Doskocilova A, Komis G, Samaj J (2014). Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. Biotechnol Adv, 32 (1): 2-11
- Teige M, Scheikl E, Eulgem T, Doczi R, Ichimura K, Shinozaki K, Dangl JL, Hirt H (2004). The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. Mol Cell, 15 (1): 141-152
- Wen JQ, Oono K, Imai R (2002). Two novel mitogen-activated protein signaling components, OsMEK1 and OsMAP1, are involved in a moderate low-temperature signaling pathway in rice. Plant Physiol, 129 (4): 1880-1891
- Xie GS, Kato H, Imai R (2012). Biochemical identification of the Os-MKK6-OsMPK3 signalling pathway for chilling stress tolerance in rice. Biochem J, 443 (1): 95-102
- Zhang ZL, Zhu JH, Zhang QQ, Cai YB (2009). Molecular characterization of an ethephon-induced Hsp70 involved in high and low-temperature responses in *Hevea brasiliensis*. Plant Physiol Biochem, 47 (10): 954-959