

蓖麻 *SnRK2* 基因家族的鉴定和特征分析

敖涛^{1,4}, 胡尊红^{2§}, 和珊^{3,4}, 胡学礼², 刘旭云^{2*}, 刘爱忠^{1*}

(1. 中国科学院西双版纳热带植物园热带植物资源开放实验室, 云南 勐腊, 666303;

2. 云南省农业科学院经济作物研究所, 云南 昆明, 650205;

3. 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明, 650201; 4. 中国科学院大学, 北京, 100049)

摘要: *SnRK2* 是一类植物特有的 Ser/Thr 类蛋白激酶。为研究其在蓖麻抗逆过程中的作用, 基于蓖麻的基因组序列信息, 利用生物信息学方法鉴定了 6 个蓖麻 *SnRK2* 蛋白激酶成员。分析发现这些蛋白具有亲水性属性, 基因结构分析表明, 植物 *SnRK2* 基因在进化过程中具有很高的保守性; 系统与进化分析发现植物 *SnRK2* 蛋白在单、双子叶植物中分化显著, 可能是独立演化的结果。高通量 RNA-seq 测序结果显示, 大部分 *SnRK2* 基因在检测的各个组织中均有表达, 且在不同组织间或种子发育的不同阶段没有明显的组织特异性; 外源 ABA 处理种子后, Group 2 的基因表达显著上调。进一步利用半定量 RT-PCR 技术检测外源 (100 μmol/L) ABA、(250 mmol/L) NaCl 和 (4℃) 冷胁迫处理的幼苗, 发现 Group 2 中的基因 29908. *m006067* 被这 3 种胁迫强烈激活, 基因 29772. *m000313* 对 ABA 和冷胁迫有较强的响应。

关键词: 蓖麻; *SnRK2*; 蛋白激酶; ABA; NaCl; 冷胁迫

中图分类号: S565.603

文献标识码: A

文章编号: 1007-9084(2015)02-0160-07

Identification and characterization of *SnRK2* gene family in castor bean (*Ricinus communis*)

AO Tao^{1,4}, HU Zun-hong^{2§}, HE Shan^{3,4}, HU Xue-li², LIU Xu-yun^{2*}, LIU Ai-zhong^{1*}

(1. Key Laboratory of Tropical Plant Resource and Sustainable Use,

Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla 666303, China;

2. Industrial Crop Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China;

3. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201 China;

4. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: *SnRK2* genes encoding Ser/Thr kinase exist exclusively in plants. To understand *SnRK2* function responding to abiotic stresses in castor bean, 6 *SnRK2* genes were identified and characterized based on complete genome data of castor bean. Results showed that *SnRK2*s were hydrophilic proteins and their gene sequences were highly conserved in plants. Phylogenetic analysis revealed that *SnRK2*s were significantly differentiated between monocotyledons and dicotyledons, implying their different evolution history. High-throughput RNA-seq data were used to define the expressional profiles of *SnRK2*s among tissues and different development stages of seeds. Results showed that most of *SnRK2*s expressed in all tested tissues and tissue specific expression was not detected. But expressions of Group 2 genes were significantly up-regulated by stress. Among them, *SnRK2* gene 29908. *m006067* responded specifically to exogenous ABA (100 μmol/L), NaCl (250 mmol/L) and cold (4℃) treatments in seedlings. And gene 29772. *m000313* responded specifically to ABA and cold.

Key words: Castor bean; *SnRK2*; Protein kinases; ABA; NaCl; Chilling stress

收稿日期: 2014-09-04

基金项目: 蓖麻产业技术研究与试验示范(201003057); 云南省农业科学院经济作物研究所青年基金; 国家自然科学基金(31401421)

作者简介: 敖涛(1989-), 男, 云南曲靖人, 硕士研究生, 主要从事植物分子遗传育种研究; § 胡尊红, 与第一作者具有同等贡献

* 通讯作者: 刘旭云(1964-), 女, 研究员, 硕士, 研究方向蓖麻、红花等特色油料作物新品种选育与推广, E-mail: liuxuyun280@163.com

刘爱忠(1969-), 男, 研究员, 博士, 研究方向植物分子遗传育种, E-mail: Liuiaizhong@mail.kib.ac.cn

在自然环境中,植物的生长经常受到盐害、干旱、高温、寒冷和渗透胁迫等不良环境的影响^[1]。植物为了感知和适应这些环境胁迫,形成了一系列复杂而精细的防御机制^[2]。植物通过特异的信号通路识别逆境胁迫,并将这种信号放大并传递到细胞核中,引起胁迫相关基因的表达。在这个过程中,蛋白激酶和磷酸酶发挥着极为重要的功能。目前,在植物中发现了很多蛋白激酶,如钙离子依赖的蛋白激酶和 SNF1 相关的蛋白激酶(SnRK)^[3],它们在调节蛋白的磷酸化和脱磷酸化、植物响应激素调节、病原体侵染和环境胁迫等方面起着关键作用^[1]。

SnRK(sucrose non-fermenting 1-related protein kinases)属丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)类蛋白激酶,广泛存在于植物体中。SnRK 可分为 SnRK1、SnRK2 和 SnRK3 三个亚家族。其中,SnRK1 亚家族蛋白激酶与动物的 AMPK 蛋白和酵母的 SNF1 蛋白在结构和功能上高度同源,在调节能量状态、抵御病原体侵染、盐胁迫和低氧胁迫等方面起着重要作用^[4,5];而 SnRK2 和 SnRK3 两个亚家族是植物特有的,主要参与植物的生长发育和抗逆信号途径^[6],特别是 SnRK2 亚家族成员,在响应信号转导和非生物胁迫过程中扮演着重要角色^[4,7-9]。目前,研究者已经在全基因组范围内对玉米、水稻、拟南芥、高粱以及苹果等植物的 SnRK2 家族成员进行了分离鉴定,并对小麦、烟草、大豆、豌豆等植物中的部分 *SnRK2* 基因进行了鉴定和功能分析^[6,10]。第一个 *SnRK2* 基因是从小麦中鉴定到的,被命名为 *PKA-BA1*(或 *TaW55*),主要响应 ABA 信号途径和高渗透压胁迫^[11]。根据系统发生和 C 端蛋白结构组成,SnRK2 可以分为三个类群,即 Group 1~3^[6]。SnRK2 的 C 端主要包含两个结构域,其中结构域 I 存在于所有的 SnRK2 家族成员中,被认为与渗透胁迫应激有关,而结构域 II 特异出现在 Group 3 中,被认为是响应 ABA 激活的必要元件^[12-14]。在拟南芥中发现,所有的 SnRK2 蛋白激酶(除 *AtSnRK2.9* 外)均受高渗胁迫的诱导,同时具有结构域 II 的 Group 3 成员也受到 ABA 的强烈激活,而 Group 2 微弱响应 ABA 信号,Group 1 不受 ABA 诱导^[6,13,15]。在水稻中,10 个 *SnRK2* 家族成员均受高渗胁迫的诱导,其中 Group 1 和 Group 2 中的 3 个基因也受到 ABA 的诱导^[6,13]。除高渗胁迫和 ABA 信号之外,SnRK2 蛋白激酶也参与其它环境胁迫的响应,如玉米的 11 个 *SnRK2* 成员中有 2 个强烈响应 NaCl 处理,2 个响应低温处理,3 个基因受热击的抑制,大部分成员对盐胁迫也有微弱的响应^[16]。烟草中有 3

个 *SnRK2* 成员响应干旱、高盐和低温胁迫^[1]。小麦的 *TaSnRK2.3*、*TaSnRK2.4* 和 *TaSnRK2.7* 基因响应干旱、NaCl、低温以及冷胁迫^[17-19]。SnRK2 蛋白激酶还可以通过 ABA 信号途径参与气孔活动^[7,20,21]。

蓖麻为大戟科(Euphorbiaceae)蓖麻属(*Ricinus communis* L.)双子叶一年生或多年生草本植物,是世界十大油料作物之一^[22,23]。蓖麻油广泛应用于工业生产的各个领域^[24-26],亦是良好的生物柴油原料。此外,蓖麻具有很强的抵御环境胁迫的能力,具有耐瘠薄、耐干旱、耐盐碱、适应性强的特点,可以在贫瘠的边际土地上生长,不与粮争地,能有效解决我国现阶段耕地面积不足的问题^[22]。近年来,蓖麻产油和分子标记方面的研究取得了一定进展,但是在抵御环境胁迫方面研究较少,对 SnRK2 蛋白激酶家族的分析和研究还未见报道。本研究基于蓖麻的基因组信息,鉴定了 6 个蓖麻 *SnRK2* 基因,并对其系统发生、理化性质、基因结构、motif 和时空表达进行了分析。此外,还分析了蓖麻 *SnRK2* 基因在正常生长条件下和几种环境胁迫下的表达情况,期望对研究蓖麻 *SnRK2* 基因家族的生物学功能提供依据,为探索蓖麻抵御环境胁迫的机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 蓖麻 SnRK2 蛋白激酶的鉴定和分类

以已报道的双子叶模式植物拟南芥 SnRK2 蛋白序列^[6](<http://www.arabidopsis.org/>)为基序,在蓖麻基因组数据库(<http://castorbean.jcvi.org/index.php>)中进行 BLASTP 比对,设定阈值为 $p < e - 10$,序列一致度大于 60%。对于得到的候选蛋白,用 Pfam 数据库(<http://pfam.sanger.ac.uk/>)和 SMART 程序(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)检测是否具有典型的蛋白激酶结构域(protein kinase domain)。为了对蓖麻 SnRK2 蛋白激酶进行分类,分别下载拟南芥(10 个)、玉米(11 个)、水稻(10 个)和高粱(10 个)的 SnRK2 蛋白序列,并参考 Kobayashi 等的研究^[13],通过序列比对和系统进化树的构建,将蓖麻 SnRK2 蛋白激酶分成 3 类。

1.2 SnRK2 蛋白家族的系统进化,基因结构和蛋白理化性质分析

为了详细地理解 SnRK2 蛋白家族的系统进化,利用 Clustal W 软件对蓖麻、小桐子(*Jatropha caracas* L.)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)、高粱(*Sorghum bicolor*)、江南卷柏(*Selaginella moellendorffii*)、小立碗藓(*Physcomitrella patens*)和衣藻(*Chlamydomonas rein-*

hardtii)中的 SnRK2 蛋白序列进行了比对,并以衣藻的 SnRK2 蛋白作为外类群,利用 MEGA5.0 软件中的邻接算法(Neighbor-Joining)构建了系统进化树,其中 Bootstrap 值设为 1 000 重复。利用 GSDS(Gene Structure Display Server, <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)在线程序分析了蓖麻 SnRK2 的基因结构,并用 MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/cgi-bin/meme.cgi>)在线分析软件对其蛋白序列进行了 motif 分析,参数设置为:最优宽度 6~200 个氨基酸残基,任意数量的重复次数,最多预测 25 个 motif。利用 ExPaSy 提供的在线 ProtParam 软件(<http://web.expasy.org/protparam/>)进行氨基酸数目、分子量、理论等电点、脂肪族氨基酸指数和蛋白质疏水性的分析。

1.3 蓖麻 SnRK2 基因的表达分析

蓖麻品种为淄博 306(由淄博农业科学研究院提供)。将刚长出两片真叶的蓖麻幼苗的根浸入到 250mmol/L 的 NaCl 或 100 μ mol/L 的 ABA 中,分别采取处理 3h 和 6h 后的叶片作表达分析。另外一部

分蓖麻幼苗在 4 $^{\circ}$ C 低温下培养 3h 和 6h,每个处理组至少 3 次重复。对照组在自然条件下生长,设置 2 个对照组:对照 1(3h 取样)和对照 2(6h 取样)。用 Transgene 公司的 TRIzol plant RNA 抽提试剂盒提取叶片总 RNA,利用 Nanodrop 测定 RNA 浓度和质量并用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。随后取 2 μ g 总 RNA 用 TaKaRa 公司的 PrimescriptTM III 1st strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒进行反转录,引物序列见表 1。用合成的 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增,程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 4min;94 $^{\circ}$ C 变性 30s,55 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 35s,25 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。

另外,利用已公布的蓖麻表达谱数据^[27],调查了 SnRK2 基因在不同组织包括叶、根、授粉后 20d 的种子(种子 1)、授粉后 35d 种子(种子 2)和授粉后 40d 的胚乳中的表达情况。同时调查离体培养的蓖麻种子^[28]和 ABA 处理的种子间的 SnRK2 基因的表达变化。

表 1 RT-PCR 引物序列
Table 1 Primers for RT-PCR

基因名称 Gene name	正向引物序列 Forward primer	反向引物序列 Reverse primer	扩增长度 PCR product/bp
28725. m000317	ATTGCGTTC AAGGAGGTGGT	CGGGTCCTCTTGATCTTCGA	438
29772. m000313	GCCTACATTGCACCAGAGG	CCCATCTGCAGGTTTCCTTG	453
29908. m006067	TGCAGATGTTTGCTCTGTGG	GGCACACGAAATCACCACCTT	450
29822. m003504	TTTGGAGTGGCAAGGCTAGT	GTGATAGACCTCAGGAGCA	475
29676. m001638	CCAGCTCCTCGGTTGAAGAT	GCTCTGCATGGGTTGATCAG	459
29780. m001320	GACAGTGACAGGTACGAGCT	GGTGCCATCCAACAATGTA	406
Actin	GAGCTTCGTGTGCTCCTGAG	TGGCCATCAGGAAGCTCATAG	461

表 2 蓖麻 SnRK2 蛋白的理化性质分析
Table 2 Physical and chemical properties of castor bean SnRK2 proteins

家族类群 Group	基因座位 Gene loci	编码氨基酸 Coded amino acids	不稳定系数 Instability index	分子量 MW/kD	等电点 pI	脂肪族氨基酸指数 Aliphatic index	蛋白质疏水性 Hydrophobicity
1	28725. m000317	357	48.6	40.872 4	5.76	78.66	-0.537
	29772. m000313	313	40.63	35.624	5.46	95.59	-0.232
2	29908. m006067	338	37.71	38.289 7	5.71	89.64	-0.292
	29822. m003504	336	42.95	38.056 4	5.74	88.21	-0.352
3	29676. m001638	362	37.5	41.058 8	4.8	85.88	-0.242
	29780. m001320	363	40.78	41.092 6	4.81	88.9	-0.337

2 结果与分析

2.1 蓖麻 SnRK2 候选蛋白的鉴定

通过 BLASTP 比对获得了 22 个候选蛋白,但通过 Pfam 和 SMART 蛋白结构域分析和系统进化树分析,获得了 6 个蓖麻 SnRK2 同源蛋白(表 2)。

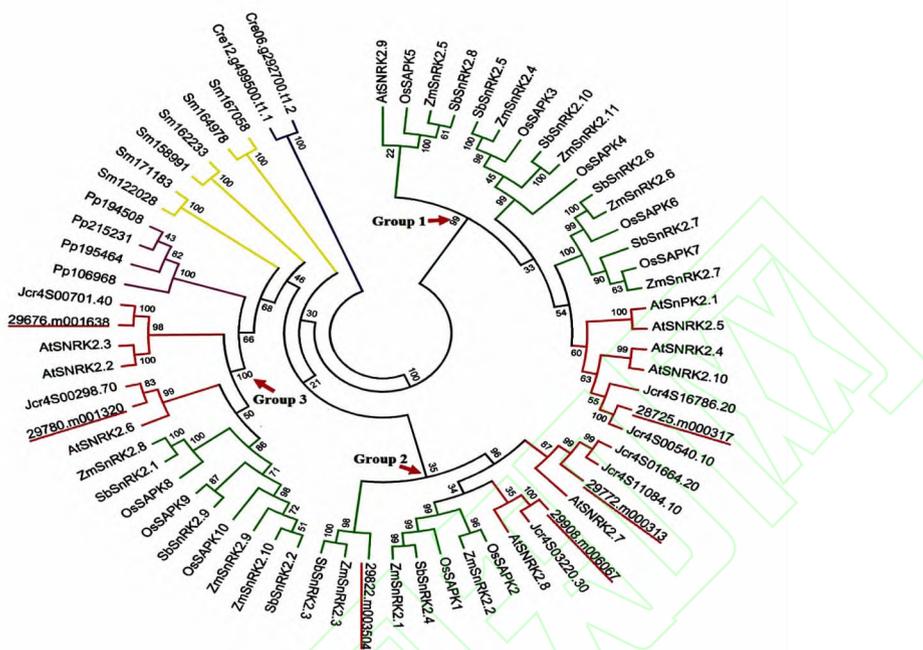
2.2 蓖麻 SnRK2 蛋白的系统进化分析

图 1 表明,SnRK2 蛋白具有明显的拓扑结构,且在被子植物中被分成 3 个类群:Group 1、Group 2 和 Group 3,而苔藓植物(如小立碗藓)和蕨类植物(如

江南卷柏)的 SnRK2 蛋白仅存在于 Group 3 中。衣藻的 SnRK2 蛋白单独聚在一支,明显区别于陆生植物,且与 Group 3 有较近的进化关系。这些结果显示出植物中的 SnRK2 蛋白起源非常早,是一类古老保守的基因,Group 3 成员可能是最早分化出现的。另外,除 AtSnRK2.9 和 29822. m003504 之外,发现 SnRK2 蛋白在单子叶植物和双子叶植物间具有明显的分化(图 1),预示着 SnRK2 蛋白在单子叶植物和双子叶植物中是独立进化的。根据系统进化树,蓖麻 Group 1 中包含 1 个 SnRK2 蛋白(28725. m000317),

Group 2 中包含 3 个成员 (29772. m000313、29908. m006067和 29822. m003504), Group 3 中包含 2 个成员 (29676. m001638 和 29780. m001320), 且

蓖麻的 *SnRK2* 蛋白和同科的小桐子在进化树上进化关系很近。



注:不同颜色的分支代表不同的植物类群,蓝色代表藻类,黄色代表蕨类,紫色代表苔藓类,红色代表双子叶植物,绿色代表单子叶植物。红色下划线标示蓖麻的 *SnRK2* 蛋白
 Note: Branches in different color represent different plant groups (blue; alga; yellow; Pteridophyta; purple; moss; red; dicotyledon; green; monocotyledon). Red underlined; castor *SnRK2* proteins

图 1 蓖麻 (*Rc*)、小桐子 (*Jcr*)、拟南芥 (*At*)、玉米 (*Zm*)、水稻 (*Os*)、高粱 (*Sb*)、小立碗藓 (*Pp*)、江南卷柏 (*Sm*) 和莱茵衣藻 (*Cre*) 的 *SnRK2* 蛋白激酶系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic analysis of *SnRK2* from castor bean (*Rc*), *Jatropha curcas* (*Jcr*), *Arabidopsis thaliana* (*At*), maize (*Zm*), rice (*Os*), sorghum (*Sb*), *Physcomitrella patens* (*Pp*), *Selaginella moellendorffii* (*Sm*) and *Chlamydomonas reinhardtii* (*Cre*)

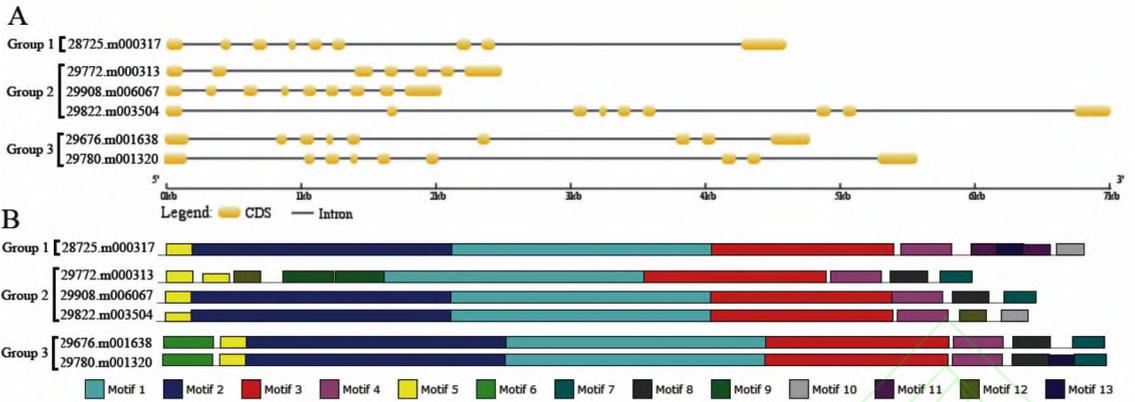
2.3 蓖麻 *SnRK2* 家族的基因结构和蛋白理化性质

用软件预测了蓖麻 6 个 *SnRK2* 基因的内含子和外显子组成(图 2A)。除了 29772. m000313 基因(包含 7 个外显子)之外,其余 5 个成员都含有 9 个外显子,且外显子长度很保守,这与先前的报道一致^[16]。motif 分析结果显示(图 2B)蓖麻 *SnRK2* 蛋白共包含 13 个保守的 motif。其中的 1、3、4 和 5 分布于所有的 *SnRK2* 蛋白中。motif 1、3 和 5 分布在蛋白激酶结构域,4 位于 C 端的结构域 I 中。另外,在各 Group 中存在着特异的 motif,如 motif 6 特异地存在于 Group 3 中,而 motif 11 特异地存在于 Group 1 中。大部分 Group 2 和 Group 3 蛋白的 C 末端(除 29822. m003504 之外)都含有 motif 7 和 motif 8,可能与 ABA 信号响应有关^[6,13,15]。这些结果表明,在进化过程中 *SnRK2* 家族的基因结构和功能域是高度保守的,说明该家族基因在植物生长发育过程中起重要作用。但是,在不同的 Group 间存在特异的 motif,这可能是 *SnRK2* 蛋白家族产生功能分化的部分原因。

蓖麻 *SnRK2* 蛋白理化性质的分析显示(表 2),蓖麻 *SnRK2* 蛋白包含 313 到 363 个氨基酸残基,与已报道物种如小立碗藓、江南卷柏、玉米、水稻、拟南芥和高粱中 *SnRK2* 蛋白的氨基酸数目相似(表 3)。蓖麻 *SnRK2* 蛋白的理论等电点均呈现酸性。对蛋白亲/疏水性进行预测,发现 6 个蛋白的 GRAVY 值都为负值,说明蓖麻的 *SnRK2* 蛋白都是亲水蛋白,只是亲水程度有所差异。除了蓖麻 29908. m006067 和 29676. m001638 蛋白属于稳定蛋白,其余 4 个均为不稳定蛋白。

2.4 蓖麻 *SnRK2* 基因的表达分析

首先利用已报道的蓖麻基因表达谱数据调查了 *SnRK2* 基因在不同组织中的表达情况。结果发现,除了 2 个基因(29772. m000313 和 29822. m003504)在种子 2 阶段未检测到表达以外,其余 *SnRK2* 基因在根、叶、种子 1、种子 2 和胚乳中均有表达,且没有表现出明显的组织偏爱性(图 3C)。利用 RNA-seq 测序数据^[28] 分析了外源 ABA 对蓖麻离体种子中 *SnRK2* 基因表达的影响(图 3A)发现,Group 1 中



注:A:蓖麻 *SnRK2* 基因的内含子、外显子结构分析。框代表外显子,线条代表内含子。B:蓖麻 *SnRK2* 蛋白的保守 motif 组成分析
 Note:A:Exon/intron structures of castor bean *SnRK2* genes. Exons and introns are represented by boxes and lines respectively.
 B:Distribution of conserved motifs within amino acid sequences of each *SnRK2* protein

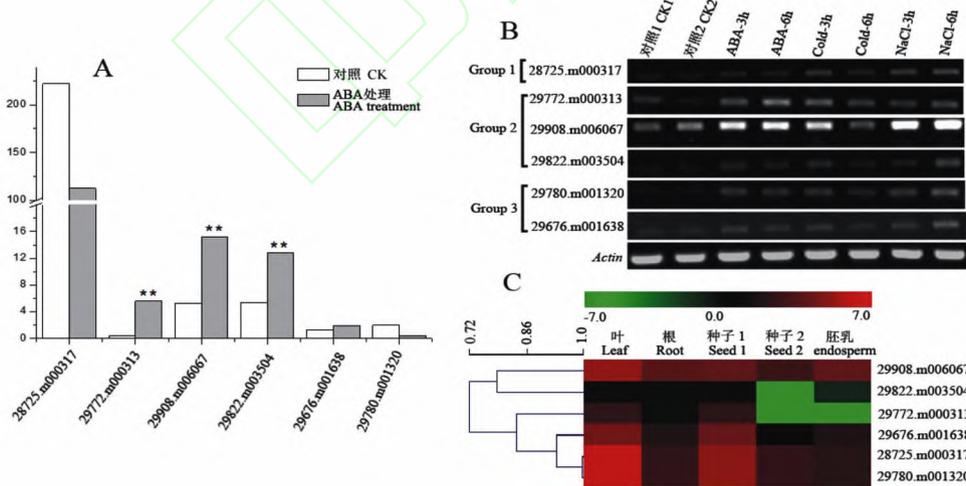
图2 蓖麻 *SnRK2* 基因家族的基因结构及 motif 分析

Fig. 2 Structural features and distribution of conserved motifs within *SnRK2* family in castor bean

表3 八种植物的 *SnRK2* 家族蛋白

Table 3 Summary of *SnRK2* in 8 plant species

物种 Species	类群 1 Group 1	类群 2 Group 2	类群 3 Group 3	总数 Total	氨基酸数目 Number of amino acids	分类 Classification
小立碗藓 <i>P. Patens</i> ^[29]	0	0	4	4	340 ~ 349	苔藓 Moss
江南卷柏 <i>S. moellendorffi</i> ^[29]	0	0	6	6	334 ~ 360	蕨类 Pteridophyta
蓖麻 Castor	1	3	2	6	313 ~ 363	双子叶 Dicotyledon
小桐子 <i>Jatropha</i>	2	3	2	7	326 ~ 362	双子叶 Dicotyledon
拟南芥 <i>Arabidopsis</i> ^[15]	5	2	3	10	339 ~ 369	双子叶 Dicotyledon
玉米 Maize ^[16]	5	3	3	11	263 ~ 393	单子叶 Monocotyledon
水稻 Rice ^[13]	5	2	3	10	295 ~ 371	单子叶 Monocotyledon
高粱 Sorghum ^[30]	5	2	3	10	333 ~ 379	单子叶 Monocotyledon



注: A 为 RNA 高通量测序检测蓖麻离体培养种子^[28]中 *SnRK2* 基因在 10 μ mol/LABA 处理下的表达情况。双星号代表差异极显著 ($P < 0.01$)。

B 为半定量 RT-PCR 检测蓖麻幼苗叶片中 *SnRK2* 基因在 100 μ mol/L ABA、冷(4 $^{\circ}$ C)和 250mmol/L NaCl 处理下的表达情况; CK1 和 CK2 分别代表 3h 和 6h 的对照叶片。C 为蓖麻 *SnRK2* 基因在叶、根、授粉后 20d 的种子(种子 1)、授粉后 35d 种子(种子 2)和授粉后 40d 的胚乳中的表达谱热图。将 DGE 测序的数据用 log₂ 标准化后作图,有颜色的标尺代表的是 log₂ 标准化后的表达数据
 Note:A:Expression of *SnRK2* genes in castor bean seeds^[28] cultured under 10 μ mol/L ABA treatment *in vitro* through high-throughput RNA sequencing. Double asterisks denoted a highly significant difference from the wild type ($P < 0.01$). B:RT-PCR analysis of *SnRK2* genes expression level in castor seedling leaf under ABA (100 μ mol/L), NaCl (250mmol/L) and cold (4 $^{\circ}$ C) treatments after 3h and 6h; CK1 and CK2 indicated 3h and 6h control. C: Heatmap represented the expression profiles of castor bean *SnRK2* genes in leaf, root, seed 1 (20d after pollination), seed 2 (35d after pollination) and endosperm (40d after pollination). The generated heatmap was based on DGE expression data (log₂ normalized). Color scale (representing log₂ signal values) was on the top of heatmap

图3 蓖麻 *SnRK2* 基因的表达分析

Fig. 3 Expression analysis of castor bean *SnRK2* genes

28725. *m000317* 基因在 10 μmol/L ABA 处理后表达下调; 在 Group 3 中, 外源 ABA 的处理导致了基因 29676. *m001638* 的上调, 而基因 29780. *m001320* 却表现出下调趋势; Group 2 的 3 个基因在外源 ABA 处理后都表现出显著上调的趋势, 暗示着在蓖麻种子中主要是 Group 2 家族成员响应外源 ABA 信号。

此外, 利用半定量 RT-PCR 调查了蓖麻幼苗叶片中 *SnRK2* 家族基因在胁迫下的表达(图 3B), 结果发现, 该家族基因对 ABA、NaCl 和冷胁迫均有响应。Group 2 中的基因 29908. *m006067* 被这 3 种胁迫强烈激活, 基因 29772. *m000313* 对 ABA 和冷胁迫有较强的响应。而 Group 3 和 Group 1 的基因对 3 种胁迫都只具有微弱的响应, 暗示在蓖麻中 Group 2 的蛋白成员在抵御环境胁迫中发挥重要作用。

3 结论与讨论

SnRK2 基因家族作为一类植物特有的 Ser/Thr 类蛋白激酶, 在植物多种信号传导和抗逆过程中发挥重要作用^[31]。本研究从蓖麻全基因组中鉴定了 6 个 *SnRK2* 基因。与拟南芥(10 个)、玉米(11 个)、水稻(10 个)以及高粱(10 个)相比, 蓖麻的 *SnRK2* 基因数目明显偏少。系统进化分析发现 *SnRK2* 蛋白激酶是一类非常古老和保守的蛋白, 且在陆生植物, 尤其是被子植物中发生了明显分化。另外发现, Group 3 可能是最早起源的 *SnRK2* 蛋白, 因为 Group 3 中的成员与苔藓类植物和蕨类植物有较近的进化距离, 可以明显看出 *SnRK2* 蛋白从水生藻类到陆生苔藓、蕨类到被子植物的进化趋势, 这与已知的报道一致^[6]。在被子植物中, *SnRK2* 蛋白的数量发生了明显的增加, 形成了 3 个类群, 且单双子叶之间是独立进化的。这可能与被子植物的多倍化和基因的复制有关^[16]。

大量研究表明, *SnRK2* 蛋白激酶在植物正常生长发育, 响应 ABA 信号、干旱、高盐、低温和 NaCl 等非生物胁迫中起重要作用^[1, 6, 13, 15-18]。本研究发现蓖麻 *SnRK2* 基因在各个组织中都有所表达, 与前人研究结果一致^[10], 说明 *SnRK2* 蛋白激酶在植物各个组织的正常发育与生长方面也是必要的。外源 ABA 处理蓖麻种子和幼苗叶片得到非常类似的结果, 即 Group 2 蛋白成员的强烈诱导表达, 强烈暗示着 Group 2 蛋白成员参与了响应外源 ABA 信号传导过程。这与拟南芥中的报道不同, 在拟南芥中 Group 2 只是微弱响应 ABA 信号, 而 Group 3 受到 ABA 的强烈激活^[6, 15]。而在玉米中, *SnRK2* 家族的两个类群中, 都有基因被 ABA 处理激活^[16]。在水

稻中, 受 ABA 诱导的三个基因来源于 Group 1 和 Group 2^[13]。因此, 可以看出在不同物种中响应 ABA 的类群是不同的, 因物种而异。此外, 蓖麻的所有 *SnRK2* 基因都对 NaCl 和冷胁迫具有一定程度的响应, 其中, Group 2 类群中的 29908. *m006067* 基因被 NaCl 和冷胁迫强烈激活, 29772. *m000313* 基因对冷胁迫也有较强的响应, 暗示着它们在逆境胁迫中发挥着重要功能。而 Group 3 和 Group 1 的基因对 ABA、NaCl 和冷胁迫都只具有微弱的响应。通过对蓖麻 *SnRK2* 蛋白 motif 的进一步分析发现, 各个类群间存在一些特异的 motif, 这可能是导致不同类群在响应胁迫过程中表现出差异的潜在原因, 需要进一步的研究。

蓖麻在贫瘠的边际土地上生长, 种植蓖麻符合我国现阶段发展生物质能源的战略需求^[22]。本研究鉴定了对蓖麻抗逆境胁迫紧密相关的 *SnRK2* 家族, 详细分析了系统发生、功能以及在逆境胁迫中的表达, 为进一步探索蓖麻 *SnRK2* 基因家族的生物学功能提供了数据, 为了解蓖麻抵御胁迫的分子机制以及蓖麻分子育种提供了重要的理论基础。

参考文献:

- [1] Zhang H, Jia H, Liu G, et al. Cloning and characterization of *SnRK2* subfamily II genes from *Nicotiana tabacum* [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(9): 5 701 - 5 709.
- [2] Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu J K. Molecular genetic perspectives on cross - talk and specificity in abiotic stress signalling in plants [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(395): 225 - 236.
- [3] Hrabak E M, Chan C W M, Gribskov M, et al. The Arabidopsis CDPK - SnRK superfamily of protein kinases [J]. *Plant Physiol*, 2003, 132: 666 - 680.
- [4] Halford N J, Hey S J. Snf1 - related protein kinase (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants [J]. *Biochem J*, 2009, 419: 247 - 259.
- [5] Polge C, Thomas M. SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? [J]. *Trends in Plant Science*, 2006, 12(1): 1 360 - 1 385.
- [6] Kulik A, Wawer L, Krzywińska E, et al. SnRK2 protein kinases - key regulators of plant response to abiotic stresses [J]. *OMICS*, 2011, 15(12): 859 - 872.
- [7] Li J, Wang X Q, Watson M B, et al. Regulation of abscisic acid - induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase [J]. *Science*, 2000, 287: 300 - 303.
- [8] Yoshida R, Hobo T, Ichimura K, et al. ABA - activated

- SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43 (12): 1 473 – 1 483.
- [9] Umezawa T, Yoshida R, Maruyama K, et al. SRK2C, a SNF1 – related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress – responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(49): 17 306 – 17 311.
- [10] 陈娜娜, 刘金义, 蔡 斌, 等. 苹果 *SnRK2* 基因家族的鉴定和生物信息学分析 [J]. *中国农学通报*, 2013, 29 (13): 120 – 127.
- [11] Anderberg R J, Walker – Simmons M K. Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid – inducible transcript with homology to protein kinases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 10 183 – 10 187.
- [12] Belin C, de Franco P O, Bourbousse C, et al. Identification of features regulating OST1 kinase activity and OST1 function in guard cells [J]. *Plant Physiology*, 2006, 141: 1 316 – 1 327.
- [13] Kobayashi Y, Yamamoto S, Minami H, et al. Differential activation of the rice sucrose Nonfermenting1 – related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid [J]. *The Plant Cell*, 2004, 16: 1 163 – 1 177.
- [14] Yoshida R, Umezawa T, Mizoguchi T, et al. The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in *Arabidopsis* [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281 (8): 5 310 – 5 318.
- [15] Boudsocq M, Brygoo H B, 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): 41 758 – 41 766.
- [16] Huai J, Wang M, He J, et al. Cloning and characterization of the *SnRK2* gene family from *Zea mays* [J]. *Plant Cell Rep*, 2008, 27: 1 861 – 1 868.
- [17] Tian S, Mao X, Zhang H, et al. Cloning and characterization of *TaSnRK2.3*, a novel *SnRK2* gene in common wheat [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64 (7): 2 063 – 2 080.
- [18] Mao X, Zhang H, Tian S, et al. *TaSnRK2.4*, an SNF1 – type serine/threonine protein kinase of wheat (*Triticum aestivum* L.), confers enhanced multistress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(3): 683 – 696.
- [19] Zhang H Y, Mao X G, Jing R L, et al. Characterization of a common wheat (*Triticum aestivum* L.) *TaSnRK2.7* gene involved in abiotic stress responses [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(3): 975 – 988.
- [20] Mustilli A C, Merlot S, Vavasseur A, et al. *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production [J]. *The Plant Cell*, 2002, 14: 3 089 – 3 099.
- [21] Li J, Assmann S M. An abscisic acid – activated and calcium – independent protein kinase from guard cells of fava bean [J]. *The Plant Cell*, 1996, 8: 2 359 – 2 368.
- [22] 高彩婷, 宝力高, 刘 涛. 蓖麻研究概况 [J]. *内蒙古民族大学学报: 自然科学版*, 2010, 25(2): 178 – 181.
- [23] 严兴初, 王力军. 蓖麻作为能源开发的现状与前景 [J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(34): 11 165 – 11 167.
- [24] 朱保葛. 蓖麻生物工程研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(10): 98 – 102.
- [25] 黄文霞, 何觉民, 陆建农. 国内外蓖麻杂种优势利用和蓖麻加工研究现状 [J]. *作物研究*, 2006(5): 541 – 544.
- [26] 吕凤霞, 刘恩魁, 刘永平. 蓖麻的开发利用前途广阔 [J]. *河北农业科技*, 1994, 4(2): 12.
- [27] Xu W, Li F, Ling L Z, et al. Genome – wide survey and expression profiles of the AP2/ERF family in castor bean (*Ricinus communis* L.) [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 785.
- [28] Chandrasekaran U, Xu W, Liu A Z. Transcriptome profiling identifies ABA mediated regulatory changes towards storage filling in developing seeds of castor bean (*Ricinus communis* L.) [J]. *Cell & Bioscience*, 2014, 4: 33.
- [29] Umezawa T, Nakashima K, Miyakawa T, et al. Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport [J]. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51(11): 1 821 – 1 839.
- [30] Li L B, Zhang Y R, Liu K C, et al. Identification and bioinformatics analysis of *SnRK2* and *CIPK* family genes in sorghum [J]. *Agricultural Sciences in China*, 2010, 9 (1): 19 – 30.
- [31] Boudsocq M, Droillard M J, Brygoo H B, et al. Different phosphorylation mechanisms are involved in the activation of sucrose non – fermenting 1 related protein kinases 2 by osmotic stresses and abscisic acid [J]. *Plant Mol Biol*, 2007, 63: 491 – 503.