

火龙果 *HuABAR* 的克隆、生物信息学分析及亚细胞定位

汤纬玮 王庆竹 李慧平 文晓鹏

贵州大学农业生物工程研究院/生命科学学院/
山地植物资源保护与保护种质创新教育部重点实验室, 贵阳 550025

摘要 在前期利用 SSH 筛选到抗旱相关基因 *HuABAR* 的 Unigene 序列的基础上,进行了 *HuABAR* 的全长 cDNA 克隆、生物信息学分析及亚细胞定位。结果表明:*HuABAR* 基因 cDNA 全长为 1 239 bp,5'-UTR 为 264 bp,3'-UTR 为 414 bp,完整开放阅读框(ORF)共 561 bp,编码 187 个氨基酸;生物信息学分析显示,*HuABAR* 基因编码蛋白具有典型的 SRPBCC 结构域,并与 PYR1/PYLs(pyrabactin resistance 1/PYR1 like)家族具有较高的相似性;*HuABAR* 在干旱、高温(42 °C)和低温(4 °C)等逆境胁迫下显著上调表达,并在干旱胁迫 5 d、高温 3 d 时表达量最高,低温处理 5 d 内,表达量持续上升;通过 PEG 介导法瞬时转化拟南芥原生质体进行亚细胞定位分析,发现该基因定位于细胞质,与已报道的其他 PYR1/PYLs 家族基因一致。因此,*HuABAR* 基因可能在火龙果干旱胁迫应答中发挥重要作用。

关键词 火龙果;非生物胁迫;脱落酸受体基因;生物信息学分析;亚细胞定位

中图分类号 S 667.903.2 文献标识码 A 文章编号 1000-2421(2018)05-0018-07

DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2018.05.003

干旱缺水是全世界面临的主要环境问题,会严重影响植物的生长发育。脱落酸(abscisic acid, ABA)作为一种植物生长抑制激素,能参与高等植物的休眠、落花落果、抗逆等生理过程,特别是在植物遭受逆境胁迫时,ABA 的含量会迅速增加,导致气孔关闭,减少水分蒸腾,减轻胁迫诱导的乙烯、活性氧对植物生长的伤害^[1],因此,常被称为逆境激素。研究表明,结合了 ABA 的受体蛋白(PYL)可与蛋白磷酸酶 PP2Cs 结合,会导致蛋白磷酸激酶自我磷酸化和蛋白磷酸化,并分别作用于下游转录因子及质膜离子通道,促使 ABA 信号应答相关基因的表达和气孔关闭^[2]。因此,脱落酸受体 ABAR PYL 家族在胁迫应答中发挥重要作用^[3]。火龙果(*Hylocereus undatus*)具有很强的抗旱性,在前期工作中,笔者所在课题组通过 SSH-cDNA 文库结合 cDNA-microarray 技术,初步筛选出抗旱相关基因 *HuABAR* 的 Unigene 序列^[4]。本研究拟在此基础上,进一步分析 *HuABAR* 基因应答干旱胁迫的表达特性,克隆其全长序列,并进行生物信息学分析及

亚细胞定位,旨在阐明该基因在火龙果抗旱机制上的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

采用火龙果品种‘紫红龙’组培苗^[5]为试验材料,为最大限度地保证试验材料的一致性,组培苗经 ISSR 分子标记进行遗传背景检测,确定无遗传差异且长势一致。取长势一致的组培苗,进行以下处理:(1)干旱胁迫处理。将试管苗移植于不含(对照,CK)和含有 20%聚乙二醇(PEG8000)的 1/2 MS 培养基中,分别于 3、5、10、15、和 20 d 收集幼苗(处理第 0 天不取材);(2)温度胁迫处理。将试管苗置于(4±1) °C(低温)、(42±1) °C(高温)和(25±1) °C(对照)人工气候室中培养,1、3 和 5 d 收集幼苗(处理当天不取材)。将收集的幼嫩茎段,于液氮迅速冷却后储存于-80 °C超低温冰箱中备用。亚细胞定位材料选用拟南芥 *Columbia* 野生型幼苗。

1.2 qPCR 分析

荧光定量 PCR 采用 Power SYBR Green Mas-

收稿日期:2018-05-07

基金项目:国家自然科学基金项目(31760566)

汤纬玮,硕士研究生。研究方向:细胞生物学。E-mail: t_w_w_@163.com

通信作者:文晓鹏,博士,教授。研究方向:植物生物技术与遗传育种。E-mail: xpwensc@hotmail.com

ter Mix 试剂盒(ABI 公司),按说明书进行操作,运用 Primer Premier 5.0 软件设计引物并进行评估,挑选符合评价标准的引物送上海生物工程有限公司(Sangon)合成。所用引物序列如表 1 所示,反应在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪上进行,反应程序为:

95 °C 变性 3 min 后,94 °C 20 s;60 °C 退火 25 s;72 °C 延伸 20 s 共 35 次循环,检测其荧光值,绘制熔解曲线,重复 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[6]得到各基因相对于内参基因的表达式量,利用 SPSS13.0 进行方差分析,Excel 作图。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers and their sequences used for PCR amplification

引用 Primer	Sequence(5'→3')	用途 Usage
5' adapter	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGCCCCCCCCCCCC	接头引物 As adapters
3' adapter	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	
Adapter outer	GCTGTCAACGATACGCTACGTAAC	
Adapter inner	GCTACGTAACGGCATGACAGTG	
3'-ABA-F1	GTCATTAAGGGCTGTTTGTGGATCTCTGTT	3' RACE
3'-ABA-F2	ATAGAGCTTGTTCGATTTCGGTAGTGT	
5'-ABA-R2	GTTTGACTGTCAGCTCAGCAGCTTACA	5'RACE 巢式引物 5'RACE nested primers
5'-ABA-R1	CCGAAAATCGTCCGATTGAATCA	
5'-ABA-RT2	AGATTTCCCTGAACTACACAT	
5'-ABA-RT1	GGAAGCCCTGACTTTACA	
CDS-F	CAGTGGTCTCACAAACATGATGAACGGAAACGGTAA	亚细胞定位 For subcellular localization
CDS-R	CAGTGGTCTCATACAAATCCTGTCAATTGGTTCTG	
M13-F	TGTAAAACGACGGCCAGT	通用引物 Universal primer
M13-R	CAGGAAACAGCTATGACC	
Actin-F	TCTGCTGAGCGAGAAAT	内参基因 Reference gene
Actin-R	AGCCACCACTAAGAACAAT	

1.3 总 RNA 提取及 cDNA 第一链合成

采用天根总 RNA 提取试剂盒(DP419, TIAN-GEN)提取总 RNA,提取步骤及方法见说明书。使用 KAI AO 超微量分光光度计 K5500 和琼脂糖凝胶电泳对提取的总 RNA 进行定量及纯度检测。基因克隆和 qRT-PCR 的 cDNA 分别参照 M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒(B532435)进行合成,储存于 -20 °C 备用。

1.4 火龙果 *HuABAR* 基因 cDNA 的克隆

以总 RNA 为模板,参照 TaKaRa 反转录试剂盒(型号:RR047A)说明书步骤合成 cDNA,利用前期筛选出的抗旱相关基因 *HuABAR* 的 Unigene 序列设计特异性引物(表 1),以样本 cDNA 为模板进行 PCR 扩增:94 °C 30 s;68 °C 30 s;72 °C 3 min,20 个循环。扩增 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收目的基因片段,连接到载体并转化至 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞中,挑取阳性克隆送至上海生工生物公司进行测序验证。经分析、拼接后获得 *HuABAR* 基因全长。

1.5 *HuABAR* 的亚细胞定位

以火龙果 cDNA 第一链为模板设计引物 CDS-F

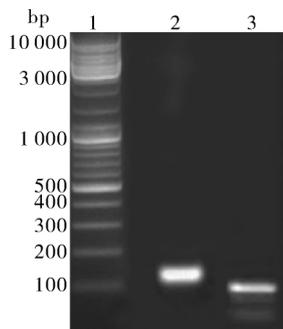
和 CDS-R(表 1);将扩增的目的片段进行胶回收,检测无误后将去掉终止密码的 *HuABAR* 连接到表达载体 pBWA(V)HS-gfp 上,取 5~10 μ L 转化大肠杆菌感受态 DH5 α 过夜培养后进行菌落 PCR 验证并送样测序,连接得到 pBWA(V)HS-*HuABAR*-gfp,取拟南芥苗若干,加入 5~10 mL 酶解液,28 °C 缓慢震荡(100 r/min)酶解 5~6 h 后筛网过滤后重悬,取 10 μ L 纯化质粒加入 200 μ L 拟南芥原生质体中并加入等体积 PEG 轻柔混匀,室温静置 30 min,暗培养后激光共聚焦显微镜观察。

2 结果与分析

2.1 *HuABAR* 全长 cDNA 克隆及生物信息学分析

根据前期所获得的 *HuABAR* 基因的 Unigene 序列,分别设计特异性引物(表 1)进行 cDNA 的全长序列扩增,最终片段经纯化连接、测序比对,确定所获得的片段为 *HuABAR* 基因的 3'端序列和 5'端序列(图 1)。将 3'/5'-RACE 所得到的基因片段序列与中间片段进行拼接,得到全长 1 239 bp 的 *HuABAR* 基因 cDNA 序列,通过在线 ORF 预测软件分析该基因的全长序列,其 5'-UTR 大小为 264 bp,3'-UTR 大小为 414 bp,有一段长 561 bp 的

ORF(图 2),共编码一个含有 187 个氨基酸残基的蛋白,364 位碱基到第 780 位碱基为该基因的 SRP-BCC 结构域。



泳道 1~3 分别代表 BBI B600032 marker, *HuABAR* 基因 3'-RACE 和 *HuABAR* 基因 5'-RACE。Lanes 1-3 sequentially represented BBI B600032 marker, 3'-RACE and 5'-RACE PCR product of *HuABAR*。

图 1 *HuABAR* 基因 RACE 电泳结果
Fig.1 Electropherogram of *HuABAR*
RACE PCR amplification

使用 NCBI 中的 CDD(Conserved Domain Database)数据库,对 *HuABAR* 全长序列可能存在的蛋白结构、功能进行预测。结果表明,*HuABAR* 编码的蛋白在 122~260 aa 有一个属于 SRPBCC 超家族的保守结构域,与 PYL 蛋白类似,故命名 *HuABAR*。通过 ProtParam 工具对 *HuABAR* 蛋白进行分析表明,该蛋白分子质量为 21.73 ku,理论等电点 pI 为 5.52。通过氨基酸组成分析,发现以缬氨酸(10.9%)、谷氨酸(9.9%)的含量最高。蛋白不稳定系数值 33.78,脂肪系数 89.69,预测其属于不稳定蛋白,带负电荷残基(Asp+Glu)总数为 30,带正电荷残基(Arg+Lys)总数为 23。

利用 ProtScale 程序在线分析 *HuABAR* 疏水性,结果显示,*HuABAR* 总平均亲水性(GRAVY)为 -0.445;通过在线软件 TargetP 预测,发现 *HuABAR* 蛋白 cTP 得分、mTP 得分以及 SP 得分均小于 1;SignalP 4.1 结果显示无信号肽存在;采用在线分析软件 TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)对 *HuABAR* 的跨膜区进行分析发现,*HuABAR* 蛋白不存在跨膜区,推测其在细胞膜上没有功能;通过在线分析软件 NetPhos 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)预测,发现 *HuABAR* 蛋白含有磷酸化位点,共有 49 个苏氨酸(Thr)可成为潜在蛋白激酶磷

酸化位点(图 3D)。

利用 GOR4 在线分析 *HuABAR* 蛋白的二级结构,结果显示共 39 个氨基酸残基参与了 α -螺旋,所占比率为 20.31%;105 个氨基酸残基参与了无规则卷曲的形成,占 54.69%;48 个氨基酸残基参与延伸链的形成,占 25.00%,可见,大多数氨基酸残基形成了无规则卷曲。使用 PHYRE(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/>)系统的分析显示,*HuABAR* 蛋白的三维结构模型与模板 c5ujvA_的相似度高达 90.0%,都具有与脱落酸复合的 fepyr1 晶体结构,属于 SRPBCC 超家族蛋白,进一步印证了上述序列分析中对该蛋白存在与脱落酸结合结构域的推测。

2.2 *HuABAR* 聚类分析及系统演化

将 *HuABAR* 蛋白经 DNAMAN(4.0)软件进行序列比对,结果显示 *HuABAR* 与许多植物 PYL 编码氨基酸序列的同源性高,为 78%(百脉根, *Lotus japonicus*)~85%(香石竹, *Dianthus caryophyllus*)。 *HuABAR* 编码蛋白属于 PYL/PML/RCAP 家族,再将其 ORF 氨基酸序列进行 BLAST,发现不同植物中该基因的 ORF 区相似度极高,为 81%(绿豆, *Vigna radiata*)~89%(芝麻, *Sesamum indicum*),说明在进化上该编码区较保守。

根据 ORF 氨基酸比对结果,利用 MEGA 6.0 软件,采用邻接法(neighbor joining)构建系统发育树,设定 Boot-strap 值为 1 000(图 3),发现 *HuABAR* 与芝麻 PYL 氨基酸序列的同源性最高,与香石竹、甜菜(*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*)、昆诺阿藜(*Chenopodium quinoa*)和菠菜(*Spinacia oleracea*)等植物 PYL 的氨基酸序列同源性相对较近。

2.3 *HuABAR* 应答逆境胁迫的表达分析

以筛选出的 *HuABAR* Unigene 序列设计特异性引物,对 *HuABAR* 在 3 种非生物胁迫下的表达情况进行 qPCR 分析。结果表明 *HuABAR* 在干旱胁迫 5 d 时相对表达量显著增高,比对照增加 5 倍以上(图 4A);在高温胁迫下,*HuABAR* 的上调十分显著,在 3 d 时相对表达量最高,比对照增加 10 倍以上(图 4B);而在低温处理中,*HuABAR* 呈逐步上调的表达模式,在 5 d 时相对表达量比对照增强表达 7 倍以上(图 4B)。因此,*HuABAR* 基因在干旱、高温及低温胁迫下,其表达水平均得到增强。

```

1 AUGAUGAACGGAAACGGUAAUACGGCGAUCGUAGAAGAGUACAUAAAGGAGAUACCACACG 60
  M M N G N G N T A I V E E Y I R R Y H T
  * * T E T V I R R S * K S T * G D T T R
  D E R K R * Y G D R R R V H K E I P H A

61 CAUGAGCCUGGGGAGAAUCAUUGUAGUCAAUUCUCAUCAAGCAUUAUAAAGGCCUCUGUU 120
  H E P G E N Q C S S I L I K H I K A P V
  M S L G R I N V V Q F S S S I L R L L F
  * A W G E S M * F N S H Q A Y * G S C S

121 CAUCGUGUUUGGUCUUUAGUGAGGAGAUUCGAUCAACCGCAGAAAUACAAGCCCUUCGUC 180
  H R V W S L V R R F D Q P Q K Y K P F V
  I V F G L * * G D S I N R R N T S P S S
  S C L V F S E E I R S T A E I Q A L R Q

181 AGCAGAUGUGUAGUUCAGGGAAAUCUUGAGAUCGGAAGUGUAAGAGAAGUUGAUGUAAAAG 240
  S R C V V Q G N L E I G S V R E V D V K
  A D V * F R E I L R S E V * E K L M * S
  Q M C S S G K S * D R K C K R S * C K V

241 UCAGGGCUCCAGCUACUACCAGCACGGAGAGGUUGGAGCUUCUUGAUGACAAUGAGCAU 300
  S G L P A T T S T E R L E L L D D N E H
  Q G F Q L L P A R R G W S F L M T M S M
  R A S S Y Y Q H G E V G A S * * Q * A C

301 GUCCUAGUAUCAGGAUAGUUGGUGGAGAUCAUAGGCUCAAGAACUACUCUUCUGUUGUG 360
  V L S I R I V G G D H R L K N Y S S V V
  S L V S G * L V E I I G S R T T L L L C
  P * Y Q D S W W R S * A Q E L L F C C V

361 UCCCUCAUCCGGAGAUCAUUGAUGGGAGGCCCGGACAAUGGUGAUCGAGUCCUUGUG 420
  S L H P E I I D G R P G T M V I E S F V
  P S I R R S L M G G P G Q W * S S P L W
  P P S G D H * W E A R D N G D R V L C G

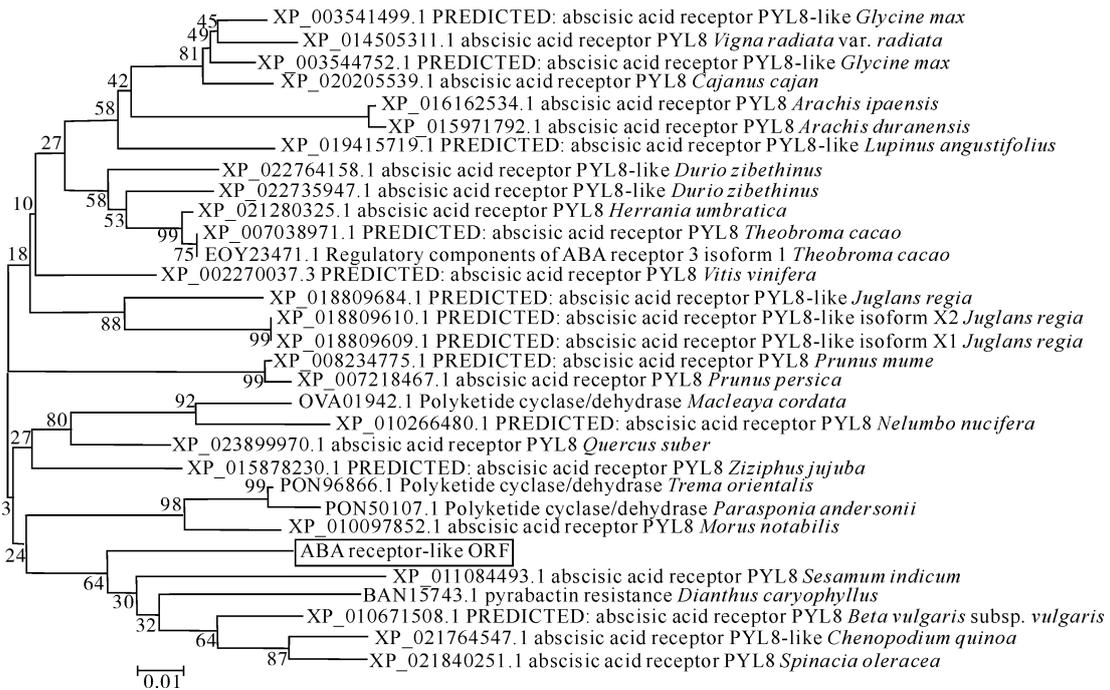
421 GUUGAUGUACCUGAGGGCAACACCAAGGACGAAACCUUUACUUUGGGAAGCGCUGAUC 480
  V D V P E G N T K D E T C Y F V E A L I
  L M Y L R A T P R T K P V T L W K R * S
  * C T * G Q H Q G R N L L L C G S A D Q

481 AAGUGCAAUCUCAAAGUCACUUGCUGAUGUCAGAGCGGCAGGCUGUACAGGACAGAACA 540
  K C N L K S L A D V S E R Q A V Q D R T
  S A I S S H L L M S Q S G R L Y R T E Q
  V Q S Q V T C * C L R A A G C T G Q N R

541 GAACCAAUUGACAGGAUUUGA 561
  E P I D R I *
  N Q L T G F
  T N * Q D L

```

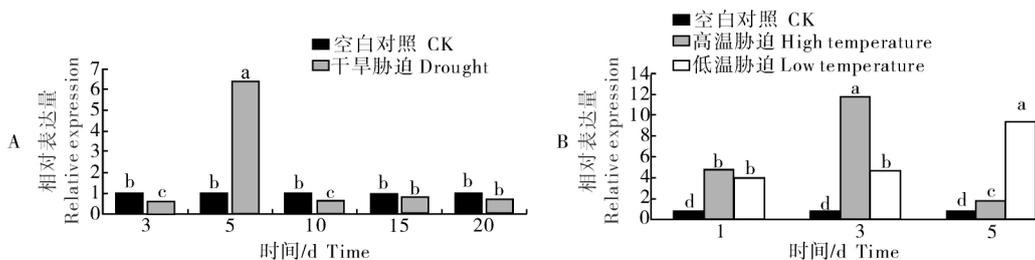
图 2 *HuABAR* 基因的 ORF 序列Fig.2 The ORF sequence of *HuABAR*



方框标记的为 HuABAR 蛋白。HuABAR amino acids were marked in frame.

图 3 HuABAR 与其他物种 PYL 氨基酸序列系统进化树分析

Fig.3 Phylogenetic tree based on the ORF amino acid sequences of HuABAR and PYL from other plant species



A 和 B 分别为干旱胁迫和温度胁迫；图中相同处理中不同字母代表 0.05 水平差异显著。A and B represented for drought and temperature stresses, respectively. The different letters within same treatments represented significant differences at 0.05 levels.

图 4 火龙果非生物胁迫下 HuABAR 的表达水平

Fig.4 The HuABAR expression levels of abiotic stress in the pitaya

2.4 HuABAR 的亚细胞定位结果

利用亚细胞定位在线预测软件 Psort (<https://www.genscript.com/psort.html>) 预测到 HuABAR 蛋白定位于细胞质中的概率为 43.5%，于细胞核中概率为 26.1%，于线粒体上概率为 21.7%。为了进一步验证定位情况，用去除终止密码子的 HuA-BAR 构建由 35S 启动子驱动的 pBWA (V) HS-HuABAR-gfp 融合蛋白表达载体，并将融合蛋白表达载体和空载通过 PEG 介导法转入拟南芥原生质体中。激光共聚焦显微镜下观察融合蛋白的位置大多定位于细胞质，极少量见于细胞核(图 5)。

3 讨论

ABA 作为一种重要的植物激素，参与了高等植物的侧根发生、叶片脱落、气孔关闭等多个重要生长过程^[2]。且当植物遭受各种非生物和生物胁迫时，ABA 含量也会迅速增加，导致气孔关闭减少水分蒸腾，并激活编码可溶性渗透保护物质的相关基因，以降低逆境胁迫对植物的伤害^[7-8]。本研究中，通过 qPCR 分析表明，HuABAR 在火龙果干旱、高温与低温胁迫下均有显著上调表达，意味着该基因可能参与了逆境胁迫调控；前人在拟南芥中鉴定出介导

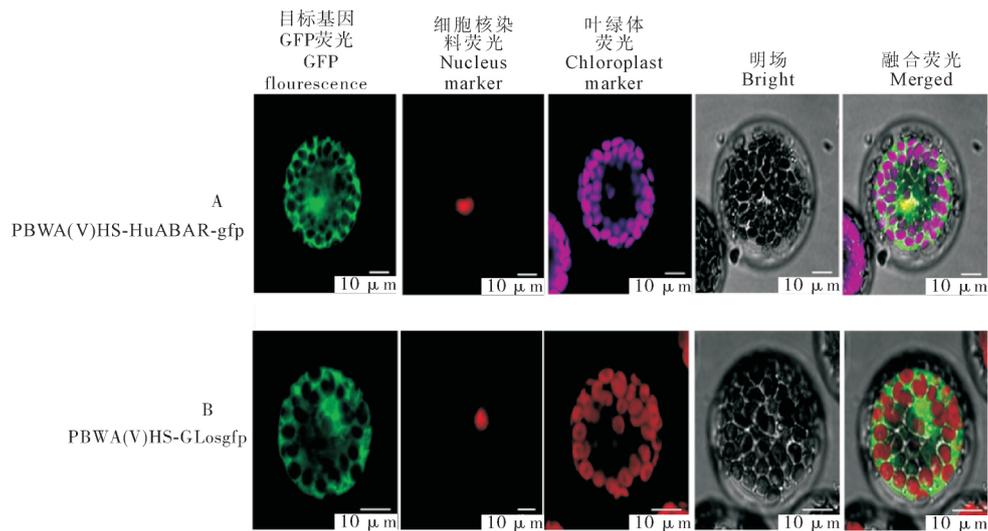


图 5 *HuABAR* 基因在拟南芥原生质体中的亚细胞定位

Fig.5 Subcellular localization of *HuABAR* protein in protoplasts of *Arabidopsis* protoplast

ABA 信号转导的关键元件,包括蛋白激酶、磷酸酶、蛋白酶、转录因子、RNA 加工因子、染色质重组蛋白等^[9]。Park 等^[10]在拟南芥上更证实了 PYR1/PYLs (pyrabactin resistance 1/PYR1 like) 属于细胞质 ABA 受体蛋白。通过 NCBI 进行比对发现,本研究克隆的 *HuABAR* 核酸序列与 ABA 受体核酸序列相似度很高;通过 DNAMAN 软件对 *HuABAR* 编码氨基酸进行序列比对分析发现,其与许多植物 PYL 的氨基酸序列同源性较高;*HuABAR* 与芝麻 PYL 基因的 ORF 氨基酸序列的同源性最高^[11],在保守结构域上序列变化不大,因此,推测 *HuABAR* 在进化和功能上可能与芝麻的 PYL 相似;*HuABAR* 与大豆 (*Glycine max*, 登录号: XP_003544752.1)、绿豆 (*Vigna radiata*, 登录号: XP_014505311.1) 等 PYL 的氨基酸序列同源性虽然比芝麻低,但相似度也高达 81%,表明在 PYL 家族进化上相对保守,在功能结构域上具有较高的同源性。而在葡萄 (*Vitis vinifera* L.)^[12] 及水稻 (*Oryza sativa*)^[13] 中对 PYL 的研究证实,它们都具有应答干旱胁迫等非生物胁迫的作用,因此,推测火龙果 *HuABAR* 基因与这些植物的 PYL 基因的功能相类似。

同时,*HuABAR* 第 364~780 位碱基编码的氨基酸属于 SRPBCC 超家族,具有与 ABA 复合的 fepyr1 晶体结构,并可以在与 ABA 结合后参与 2C 型蛋白磷酸酶 (PP2C, 如 ABI1 和 ABI2) 的相互作用,并抑制它们的活性,这与 Yuan 等^[3] 的研究具相似:结合了 ABA 的受体蛋白 (PYL) 可与 PP2Cs 结合,会导致 PP2Cs 自我磷酸化和蛋白磷酸化,并分

别作用于下游转录因子及质膜离子通道,促使 ABA 信号应答相关基因的表达和气孔的关闭。亚细胞定位结果显示,*HuABAR* 蛋白定位于细胞质上,属于细胞质/细胞核脱落酸受体,这与近期相关研究结果类似^[9,14-16],与亲水性分析结果一致,与 ABA 受体 PYL 家族一般在细胞质内行使 ABA 受体调控机制的生物学功能相吻合。因此,推测火龙果 *HuABAR* 在植株应答非生物逆境胁迫中发挥了重要作用,但具体的作用机制和功能尚需进一步验证,这也是下一步要进行的工作。亚细胞定位的结果可为进一步探究其与 ABA 作用的方式、筛选其互作蛋白及研究其逆境胁迫下的功能奠定基础。

参 考 文 献

- [1] FINKELSTEIN R R, LYNCHT J. The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor[J]. *Plant cell*, 2000, 12(4): 599-609.
- [2] HAO Q, YIN P, YAN C, et al. Functional mechanism of the abscisic acid agonist pyrabactin[J]. *Journal of biological chemistry*, 2010, 285(37): 28946-28952.
- [3] YUAN X, YIN P, HAO Q, et al. Single amino acid alteration between valine and isoleucine determines the distinct pyrabactin selectivity by PYL1 and PYL2[J]. *Journal of biological chemistry*, 2010, 285(37): 28953-28958.
- [4] 范富华, 施文娟, 阮仁超, 等. 贵州地方稻种资源的 ISSR 遗传多样性评价[J]. *种子*, 2010, 29(8): 11-14.
- [5] 刘鹏飞, 乔光, 文晓鹏. 火龙果组培苗 DNA 甲基化变化及应答赤霉素效应[J]. *华中农业大学学报*, 2016, 35(5): 18-26.
- [6] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene ex-

- pression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [7] MAUCH-MANI B, MAUCH F. The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions[J]. *Current opinion in plant biology*, 2005, 8(4): 409-414.
- [8] 李世鹏, 刘富洋, 张丛, 等. 6 个玉米 ERF 基因的克隆、序列及表达分析[J]. *华中农业大学学报*, 2016, 35(5): 1-8.
- [9] CHINNUSAMY V, OHTA M, KANRARS, et al. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Genes and development*, 2003, 17: 1043-1054.
- [10] PARK S Y, FUNG P, NISHIMURA N, et al. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins[J]. *Science*, 2009, 324: 1068-1071.
- [11] WEI W, QI X, WANG L, et al. Characterization of the sesame (*Sesamum indicum*, L.) global transcriptome using illumina paired-end sequencing and development of EST-SSR markers [J]. *BMC genomics*, 2011, 12 (1): 451. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-451>.
- [12] 马宗桓, 陈佰鸿, 李文芳, 等. 葡萄 PYL 基因家族的鉴定与表达分析[J]. *果树学报*, 2018, 35(3): 265-274.
- [13] 田晓杰. 水稻 ABA 受体 *OsPYLs* 基因家族的鉴定和功能研究 [D]. 哈尔滨: 中国科学院大学(中国科学院东北地理与农业生态研究所), 2017.
- [14] 易文凯, 王佳, 杨辉, 等. 植物 ABA 受体及其介导的信号转导通路[J]. *植物学报*, 2012, 47(5): 515-524.
- [15] MENG C M, ZHANG T Z, GUO W Z, et al. Molecular cloning and characterization of a novel *Gossypium hirsutum* L. PYL gene in response to ABA and drought stresses[J]. *Plant molecular biology reporter*, 2009, 27: 381-387.
- [16] LIAO L, VIMOLMANGKANG S, WEI G, et al. Molecular characterization of genes encoding leucoanthocyanidin reductase involved in proanthocyanidin biosynthesis in apple[J]. *Frontiers in plant science*, 2015, 6: 243. doi: 10.3389/fpls.2015.00243.

Molecular cloning, bioinformatics analyses and subcellular localization of *HuABAR* gene in pitaya (*Hylocereus undatus*)

TANG Weiwei WANG Qingzhu LI Huiping WEN Xiaopeng

Institute of Agriobioengineering/Key Laboratory of Germplasm Innovation on Protection and Conservation of Mountain Plant Resources, Ministry of Education/College of Life Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract Based on the previous drought-associated-gene-enriched SSH-cDNA library and cDNA-microarray, we preliminarily screened an *HuABAR* Unigene presumably involving in the tolerance of abiotic stresses including drought, cold and high temperature. Full-length cDNA sequence of this gene was cloned. Bioinformatic analyses and subcellular localization was carried out. The results showed that *HuABAR* gene was significantly up-regulated in response to abiotic stresses including in drought, high temperature and low temperature. The highest expression level was observed at the 5th day or the third day after drought stress or high temperature stress. The expression was increasingly un-regulated as exposure to low temperature within five days. *HuABAR* gene contained 1 239 bp in full cDNA length, and consisted of 264 bp 5'-UTR, 414 bp 3'-UTR, and 561 bp open reading frame (ORF) encoding 187 amino acids. This gene might encode a typical SRPBCC domain, and was highly similar to the PYR1/PYLs (pyrabactin resistance 1/PYR1 like) family. The target gene was ligated with green fluorescent protein (GFP) by constructing plant transient expression vector pBWA (V) HS-*HuABAR*-gfp, and the PEG-mediated method was used to transiently transform into *Arabidopsis* protoplasts. It was found that target gene was located in the cytoplasm, which satisfied the expectations. It is indicated that *HuABAR* in pitaya may be involved tolerance of multiple abiotic stresses.

Keywords *Hylocereus undatus*; abiotic stress; *HuABAR*; bioinformatics analyses; subcellular localization

(责任编辑: 张志钰)