

枳 *PP2C* 基因家族的鉴定及表达分析

杨 杰¹,陈 蓉¹,胡文娟¹,吴巧玲¹,佟晓楠^{1,2},李兴涛^{1,2*}

(¹赣南师范大学生命科学学院,江西赣州 341000; ²国家脐橙工程技术研究中心,江西赣州 341000)

摘要:【目的】鉴定枳(*Poncirus trifoliata*)*PP2C*基因家族,并分析其在不同组织的表达模式以及对低温、高温和干旱胁迫的响应。【方法】利用生物信息学方法在枳基因组中鉴定*PP2C*基因家族,分析其理化性质、染色体定位、系统进化、基因结构、保守基序、基因复制及启动子顺式作用元件等,并采用实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)方法检测*PtrPP2C*基因家族成员在不同非生物胁迫处理下的表达情况。【结果】枳中共鉴定出可聚类为10个亚族的53个*PP2C*基因,命名为*PtrPP2C1~PtrPP2C53*,其编码蛋白的氨基酸数介于235~1184 aa之间,分子质量为25.90~127.95 ku;这些基因分布于枳的10条染色体上,均具有保守的*PP2C*蛋白结构域。*PtrPP2Cs*启动子上存在大量的植物激素、胁迫响应以及生长发育相关的顺式作用元件。转录组数据分析结果显示,不同组织中*PtrPP2Cs*的相对表达量存在明显差异,总体上分为特异性表达和普遍性表达。qRT-PCR结果显示,在低温、高温和干旱胁迫处理条件下的12 h内,与对照相比分别有10、8和9个基因均持续上调表达;其中,*PtrPP2C29*较明显,其在(4±1) °C低温处理下的相对表达量是对照的56.8倍,在(38.0±0.5) °C高温处理下的相对表达量与对照相比显著上调,是对照的195.1倍,在干旱处理条件下的相对表达量是对照的5.1倍。【结论】从枳基因组中鉴定出53个*PP2C*基因家族成员,具有明显的组织表达特异性,并参与多种非生物胁迫应答。研究结果为进一步探究枳*PP2C*基因家族提供了参考。

关键词:枳;*PP2C* 基因家族;生物信息学;表达模式

中图分类号:S666

文献标志码:A

文章编号:1009-9980(2022)04-0532-16

Identification and expression analysis of *PP2C* gene family in *Poncirus trifoliata*

YANG Jie¹, CHEN Rong¹, HU Wenjuan¹, WU Qiaoling¹, TONG Xiaonan^{1,2}, LI Xingtao^{1,2*}

(¹College of Life Sciences, Gannan Normal University, Ganzhou 341000, Jiangxi, China; ²National Navel Orange Engineering Research Center, Ganzhou 341000, Jiangxi, China)

Abstract:【Objective】The plant hormone abscisic acid (ABA) plays critical roles in plant growth and developmental responses to various biological and abiotic stresses. Type 2C protein phosphatases (*PP2Cs*) are negative regulators at early step in the ABA-signaling pathway. *Citrus* is one of the most important fruit trees in tropical and subtropical areas. To date, the roles of the citrus *PP2C* gene family has not been systematically studied. We systematically identified the *PtrPP2C* gene family members, a sequence characteristic, expression patterns in different tissues of *Poncirus trifoliata* and their responses to abiotic stresses.【Methods】The genome sequences of citrus were retrieved from *P. trifoliata* genomic database. The gene sequences of *PtrPP2C* genes were obtained using NCBI-Conserved domain database (CDD), Pfam-Batch search (Pfam) and InterPro-Search sequence (InterPro). To investigate the characteristics of putative *PtrPP2C* proteins, ExPASy-ProtParam tool was used to predict the physical and chemical properties including the number of amino acids, theoretical isoelectric point and molecular weight. The distribution of *PtrPP2C* family members on chromosome was drawn by Map-MG2C. The phylogenetic analysis was performed by MEGA7.0 to construct neighbor-joining (NJ) phylogenetic

收稿日期:2021-09-29 接受日期:2021-12-22

基金项目:国家自然科学基金(32160731);江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ190758,GJJ180758)

作者简介:杨杰,男,在读硕士研究生,研究方向为果树逆境生理。Tel:18404906160,E-mail:yangjiersist@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel:15170779985,E-mail:lixingtao@gnnu.edu.cn

analysis with 1000 replicates. The genetic structure and conserved motifs of the *PtrPP2C* protein sequences were predicted by Gene Structure Display Server (GSDS) and the MultipleEm for Motif Elicitation (MEME), respectively. The genetic replication events of *PtrPP2C* genes were analyzed through TBtools software. The PlantCARE was used to predict *cis*-acting elements, which were visualized through Excel. The qRT-PCR was used to detect the expression patterns of *PtrPP2C* gene family members under drought, (4 ± 1) °C low temperature as well as (38.0 ± 0.5) °C high temperature. 【Results】A total of 53 *PtrPP2C* genes were identified in *P. trifoliata* genomic data, named as *PtrPP2C1*–*PtrPP2C53*. in the 53 candidate *PtrPP2C* genes. They were widely distributed on all the *P. trifoliata* chromosomes. The lengths of the putative *PtrPP2C* proteins ranged from 235 to 1184 amino acids, whereas their theoretical pI ranged from 4.82 to 9.47, their protein molecular weights from 25.90 to 127.95 ku, and their instability coefficient from 32.02 to 66.67. The subcellular localization prediction showed that the *PtrPP2C* proteins were localized at multiple cellular sites, including chloroplast, cytoplasm, nucleus, mitochondrion, peroxisome, extracellular and plasma membrane. A total of 133 genes from *Arabidopsis thaliana* and *P. trifoliata* were used to construct the phylogenetic tree, which were divided into 12 subfamilies (Subfamily A–L), of which the *PtrPP2C* proteins existed in the 10 subfamilies (except for Subfamily G and K). Consistently, most of the genes in the same subfamily possessed similar gene structure and conserved motifs distribution. The collinear analysis identified 10 pairs of fragment duplication events in the *PtrPP2C* family members, while no gene tandem phenomenon was found. The promoter sequence analysis revealed that the *PtrPP2C* promoters contained a large number of growth and development, plant hormone and stress-responsiveness related *cis*-acting elements. The gene expression profiles of *PtrPP2C* genes had obvious tissue-specific expression level. For example, *PtrPP2C9* was highly expressed in the stems, and *PtrPP2C9*, *PtrPP2C30* and *PtrPP2C34* were lowly expressed in the fruits; *PtrPP2C10* was highly expressed in the fruits and leaves, while lowly expressed in the flower buds, roots and stems; *PtrPP2C38* was highly expressed in the roots, while *PtrPP2C42*, *PtrPP2C43* and *PtrPP2C44* were lowly expressed, all of which suggested that different *PtrPP2C* genes might play different roles in growth and development of citrus. A total of 10 *PtrPP2C* genes (i.e., *PtrPP2C1*, *PtrPP2C3*, *PtrPP2C16*, *PtrPP2C17*, *PtrPP2C24*, *PtrPP2C27*, *PtrPP2C29*, *PtrPP2C33*, *PtrPP2C43* and *PtrPP2C51*) were chosen to analyze their relative expression levels under different abiotic stresses, including (4 ± 1) °C low temperature, (38.0 ± 0.5) °C high temperature and 15% PEG6000. All 10 *PtrPP2C* genes performed up-regulated under low temperature stress, while 8 out of 10 genes (i.e., *PtrPP2C3*, *PtrPP2C16*, *PtrPP2C24*, *PtrPP2C27*, *PtrPP2C29*, *PtrPP2C33*, *PtrPP2C43* and *PtrPP2C51*) were up-regulated under high temperature stress, and 9 out of 10 genes (i.e., *PtrPP2C1*, *PtrPP2C3*, *PtrPP2C16*, *PtrPP2C24*, *PtrPP2C29*, *PtrPP2C33*, *PtrPP2C43* and *PtrPP2C51*) were up-regulated under drought stress. Above all, 7 out of 10 genes (i.e., *PtrPP2C3*, *PtrPP2C16*, *PtrPP2C24*, *PtrPP2C29*, *PtrPP2C33*, *PtrPP2C43* and *PtrPP2C51*) were induced in low temperature and high temperature as well as drought stress. The expression levels of *PtrPP2C29* were induced under all the three stresses. These results indicated that the different *PtrPP2Cs* might played different roles in the process of low temperature stress and high temperature stress as well as drought stress in citrus development. In addition, there were different expression patterns of the same gene under the three stresses. The expression of the *PtrPP2C1* increased significantly under low temperature stress and drought stress, while decreased under high temperature stress, and the expression of the *PtrPP2C27* increased significantly under low temperature stress and high temperature stress, while decreased under drought stress, indicating that the *PtrPP2C* genes might participate in different regulatory pathways under the different stresses.

【Conclusion】A total of 53 *PtrPP2C* family members were identified in the whole *P. trifoliata* genome, and they might be correlated with citrus development. The expression of the *PtrPP2C* genes in the different tissues and their expression patterns in the response to the various abiotic stress implied that they might have complex roles in the resistances of citrus. This study provides insights into the *PtrPP2C* gene family's evolution, expression pattern and their response to multiple stresses.

Key words: *Poncirus trifoliata*; *PP2C* gene family; Bioinformatics; Expression pattern

蛋白磷酸酶2C(2C type protein phosphatases, PP2C)是依赖Mg²⁺或Mn²⁺的单体酶,属于丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶(serine/threonine protein phosphatases, STPs)家族中的小亚族,进化保守,广泛存在于古细菌、细菌、真菌、植物和动物中^[1]。相较于其他生物,植物中PP2C蛋白数量最为丰富^[2]。大部分植物PP2C蛋白的C端有保守的催化区域,而N端则是保守性不强、长度不一的延伸区域,这些延伸区域含有跨膜区域、激酶互作区域等与胞内信号相关的序列^[3]。

研究发现,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中共鉴定出80个PP2C基因家族成员,并将其划分为12个亚族(A~L)^[4]。其中,A亚族的PP2C蛋白(如ABI1、ABI2和AHG1)通过与脱落酸(abscisic acid,ABA)受体蛋白PYR/PYL/RCAR结合来负向调控ABA信号^[5];B亚族的PP2C蛋白被证明参与或介导了丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号传递^[6];C亚族的PP2C蛋白与花器发育相关^[7];而关于其他亚族的PP2C蛋白研究较少。*PP2C*基因家族成员在低温、高温以及干旱等非生物胁迫过程中也发挥重要的调控作用。利用转基因技术将玉米的ZmPP2C2基因转入烟草后,发现转基因植株较对照具有更高的发芽率和抗氧化酶活性以及更低的电解质渗透率和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量,这表明ZmPP2C2蛋白在烟草耐冷过程中起着积极的调节作用^[8];在葡萄中通过基因芯片表达谱分析发现,葡萄C亚族在响应低温胁迫过程中主要起正调控作用^[9];Zhang等^[10]对构树的研究中发现,在低温4℃处理下,被检测的18个*BpPP2Cs*基因家族成员中有4个成员上调表达,且有2个基因在低温处理6 h时磷酸化水平上升,初步证明了PP2C基因介导植株冷胁迫的过程;在对二穗短柄草的研究中发现,包括高温42℃和低温4℃在内的非生物胁迫下,几乎所有的*BdPP2Cs*基因都呈现上调表达的趋势^[11];过表达ZmPP2C-A10转基因拟南芥株

较对照更易失水,使其对干旱更敏感^[11];在小麦中,TaPP2C-a10蛋白与TaDOG1L1、TaDOG1L4蛋白相互作用后会导致种子在萌发阶段耐旱性降低^[12]。还有研究发现,水稻PP2C基因家族成员*BIPP2C2a*基因在烟草中的异位表达使植株对烟草花叶病毒的抗病性增强,提示*OsBIPP2C2a*基因可能通过激活防御反应在抗病性中发挥重要作用^[13]。

柑橘是全球产量最大的水果,也是我国南方栽培面积最大、经济地位最重要的果树^[14]。然而,柑橘对栽培条件要求较高,易受低温、高温、干旱、盐害和病虫害等胁迫的影响,严重制约了柑橘产业的健康发展^[15]。因此,开展柑橘抗逆方面的研究工作尤为重要。枳作为柑橘种植中广泛应用的砧木,其抗性好,是挑选柑橘抗性基因的理想材料。笔者在本研究中基于枳基因组数据,利用生物信息学方法对*PtrPP2C*基因家族成员进行系统性分析,并对不同胁迫处理下的枳叶片相对表达量进行分析,以深入了解*PtrPP2C*基因家族,探究*PtrPP2C*基因家族成员响应多种胁迫的可能性,为抗性基因的挖掘和抗性机制的解析奠定基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料与处理

试验于2021年夏季在赣南师范大学国家脐橙工程技术研究中心果树逆境生理实验室进行。试验材料为1年生枳组培盆栽苗(规格30 cm×28 cm,基质为草炭、蛭石和珍珠岩按体积比3:1:1混合),在处理前进行常规管理,保证其生长良好。温度胁迫植株置于培养箱(光照度1500~2000 lx,相对湿度80%)分别进行(4±1)℃低温和(38.0±0.5)℃高温处理;干旱胁迫处理植株置于装满Hoagland营养液的塑料容器(36 cm×33 cm×26 cm)中,用ACO-318型打氧机(广东海利)供氧,干旱处理为15%PEG6000。每个处理均设置3次生物学重复,并分别在处理后0、3、6和12 h共4个时间点剪取枳苗嫩

叶片,经液氮速冻后置于-80 °C冰箱保存。

1.2 枳 $PP2C$ 基因家族的鉴定

从柑橘基因组数据库(<http://citrus.hzau.edu.cn/>)下载枳蛋白质序列文件,在Pfam(<http://pfam.xfam.org/>)下载 $PP2C$ 蛋白结构域(PF00481)的hmm文件,利用HMMER 3.0在E-value<1×10⁻⁶条件下进行枳 $PP2C$ 全基因组鉴定。进一步使用Pfam、CDD(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/term>)和InterPro(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>)进行蛋白结构域验证,剔除不含 $PP2C$ 结构域的蛋白序列,得到的枳 $PP2C$ 基因家族成员按照其在染色体上位置依次进行命名。在ExPASy ProtParam网站(<https://web.expasy.org/protparam/>)对 $PtrPP2C$ 蛋白序列的氨基酸数、等电点、分子质量、不稳定系数、亲水性及脂肪系数进行分析,亚细胞定位通过WoLF PSORT(<https://psort.hgc.jp/>)进行预测。

1.3 枳 $PP2C$ 基因家族成员染色体定位及系统进化分析

从柑橘基因组数据库下载枳基因组注释文件,使用TBtools从枳基因组注释文件中提取染色体长度信息和 $PP2C$ 基因在染色体上位置信息,利用Map MG2C在线工具(http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.0/)绘制 $PtrPP2Cs$ 在染色体上的位置。经查阅文献,得到80个拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) $PP2C$ 基因序列号,在拟南芥数据库(<https://www.arabidopsis.org/>)中下载其蛋白序列,同时参照前人命名方式对其进行命名^[16]。然后基于邻接法(neighbor-joining method, NJ),使用MEGA 7.0软件构建系统进化发育树,Bootstrap值重复1000次,其他参数为默认值。

1.4 枳 $PP2C$ 基因家族成员的基因结构与蛋白保守基序分析

根据 $PtrPP2Cs$ 的编码序列(coding sequence, CDS)及其基因组DNA序列,运用GSDS v2.0在线软件(<http://gsds.gao-lab.org/>)绘制基因结构分布图。 $PtrPP2C$ 蛋白的保守基序分析通过MEME在线网站(<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)完成,基序最大数量设置为14,保存结果数据,使用TBtools对其结果进行可视化。

1.5 枳 $PP2C$ 基因家族成员的共线性分析

使用Tbtools中的Advanced Circos分析 $PtrPP2Cs$ 在进化过程中可能发生的基因复制事件,并筛选基因复制对信息。然后使用TBtools中的Dual Syste-

ny Plot for McScanx分析枳与拟南芥、水稻中 $PP2C$ 基因的共线性,并筛选基因复制对信息。

1.6 枳 $PP2C$ 基因家族成员的二级结构和启动子顺式作用元件预测

利用SOPMA在线软件(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)对 $PtrPP2C$ 蛋白的二级结构进行预测分析。使用TB-tools提取 $PtrPP2Cs$ 起始密码子上游2000 bp的序列用于启动子分析,将序列提交至PlantCARE在线网站(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)进行启动子顺式作用元件预测,最后使用Excel统计分析数据并制图。

1.7 枳 $PP2C$ 基因家族成员的组织特异性分析

从NCBI Short Read Archive database(SRA)(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>)分别下载枳中根(检索号SRR5572297)、茎(检索号SRR1947307)、叶(检索号SRR7738121)、花芽(检索号SRR3924380)和果实(检索号SRR7743799)共5个组织的转录组数据,确定 $PtrPP2Cs$ 的FPKM(fragments per kilobase per million mapped fragments)值。使用TB-tools绘制热图,红色表示基因表达上调,绿色则表示下调。

1.8 枳 $PP2C$ 基因家族成员在不同非生物胁迫处理下的实时荧光定量PCR分析

使用植物总RNA提取试剂盒(SIMGEN,杭州)提取处理后的枳叶片总RNA,测定总RNA浓度并检测其质量后使用cDNA第一链合成试剂盒(SIMGEN,杭州)反转录合成第一链cDNA,-20 °C保存、备用。使用Beacon Designer 7.0软件设计实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)引物(表1),由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,使用LightCycler480型仪器(Roche, Basel, Switzerland)检测不同胁迫处理下 $PtrPP2Cs$ 相对表达量。反应体系为:2×SYBR Green PCR Mix(SIMGEN,杭州)5 μL,10 μmol·L⁻¹正反向引物各0.5 μL,cDNA和ddH₂O各2 μL。反应程序为:95 °C预变性2 min,95 °C变性20 s,60 °C退火20 s,72 °C延伸30 s,40个循环。内参基因为柑橘 $ACTB$ ^[17],每个反应设定3次技术重复。采用2^{-△△Ct}法^[18]计算 $PtrPP2Cs$ 的相对表达量,使用DPS 9.01软件分析基因表达间的差异显著性($p < 0.05$),利用SigmaPlot 14.0软件作图。

表1 枳 $PP2C$ 基因家族成员的qRT-PCR引物信息
Table 1 qRT-PCR primer information of *PtrPP2C* family members

基因名称 Gene name	目的片段长度 Amplicon length/bp	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	引物长度 Primer length/bp
<i>PtrPP2C1</i>	92	<i>PtrPP2C1-F</i>	CACCAAGCAAGTTCTCAAG	18
		<i>PtrPP2C1-R</i>	TTCATCATCTCATCCATCCT	20
<i>PtrPP2C3</i>	119	<i>PtrPP2C3-F</i>	GTTGCCATCACTCATACTA	19
		<i>PtrPP2C3-R</i>	CCTTAACACAAGCCTCTT	18
<i>PtrPP2C16</i>	94	<i>PtrPP2C16-F</i>	GTTCTCGTTGCCTGCTAT	18
		<i>PtrPP2C16-R</i>	GAATGCTGCGTCAATGTC	18
<i>PtrPP2C17</i>	135	<i>PtrPP2C17-F</i>	TTCTTGTTGGCTTCTG	18
		<i>PtrPP2C17-R</i>	CATAGTCCTCATCATTGTCTT	21
<i>PtrPP2C24</i>	109	<i>PtrPP2C24-F</i>	TTATTGTTCCGATTCCCTCAT	20
		<i>PtrPP2C24-R</i>	GCAGCCATATCAGAAGTTA	19
<i>PtrPP2C27</i>	207	<i>PtrPP2C27-F</i>	GAACCATCCATATGCACGAGA	21
		<i>PtrPP2C27-R</i>	CTTCTTAAGCTCGTCATAACCC	22
<i>PtrPP2C29</i>	226	<i>PtrPP2C29-F</i>	CTGTATTGGGTCCAATCACT	21
		<i>PtrPP2C29-R</i>	TGCTCAAACGGTCACTACCTG	21
<i>PtrPP2C33</i>	78	<i>PtrPP2C33-F</i>	TGGTGCTGCTGAAGAACT	18
		<i>PtrPP2C33-R</i>	AGGTCAACAATAACAAACAGAGATG	24
<i>PtrPP2C43</i>	89	<i>PtrPP2C43-F</i>	AATCTGTTCTGTTCCCTCA	20
		<i>PtrPP2C43-R</i>	TTCCCTTATCTGGCGAGTC	18
<i>PtrPP2C51</i>	108	<i>PtrPP2C51-F</i>	TACAGCCACACAGACTCGGAA	21
		<i>PtrPP2C51-R</i>	TGCAACAAGTAAGCGATCACC	21
<i>ACTB</i>	120	<i>ACTB-F</i>	CCAATTCTCTTGAACCTGTCCTT	25
		<i>ACTB-R</i>	TGACTGATGAGAACTGCCAGAAG	23

2 结果与分析

2.1 枳 $PP2C$ 基因家族的鉴定与分析

从枳基因组中共鉴定出53个*PtrPP2C*基因家族成员,根据其在染色体上的位置信息依次命名为*PtrPP2C1~PtrPP2C53*(表2)。*PtrPP2C*基因家族成员蛋白序列差异较大,氨基酸数目在235~1184 aa;等电点在4.82~9.47,其中*PtrPP2C10*、*PtrPP2C12*、*PtrPP2C17*、*PtrPP2C19*、*PtrPP2C23*、*PtrPP2C24*、*PtrPP2C28*、*PtrPP2C36*、*PtrPP2C37*、*PtrPP2C38*、*PtrPP2C41*、*PtrPP2C45*、*PtrPP2C47*和*PtrPP2C53*等电点大于7,为碱性蛋白,其余39个成员均为酸性蛋白;分子质量最大的为127.95 ku,最小的为25.90 ku,平均分子质量为76.93 ku;53个*PtrPP2C*蛋白中,稳定蛋白约占32.08%(17个),不稳定蛋白约占67.92%(36个),表明枳中 $PP2C$ 蛋白以不稳定蛋白为主;蛋白亲水性为-0.547~-0.022,均小于0,为亲水性蛋白;脂肪系数介于68.43~98.53之间,平均脂肪系数为83.48。亚细胞定位预测的结果显示,*PtrPP2C*蛋白分别被定位到了叶绿体(25个)、细胞

质(12个)、细胞核(9个)、线粒体(3个)、过氧化物酶体(2个)、细胞外基质(1个)和质膜(1个)中。

2.2 枳 $PP2C$ 基因家族成员的染色体定位及系统进化分析

53个*PtrPP2C*基因家族成员被不均等地定位到10条染色体上(图1)。Chr 1和Chr 9上含有数量最多的*PtrPP2Cs*(9个),其次是含6个*PtrPP2Cs*的Chr 6,Chr 5和Chr 7上均含有5个*PtrPP2Cs*,Chr 3、Chr 4、Chr 8和Chr Un上均含有4个*PtrPP2Cs*,含*PtrPP2Cs*数量最少的染色体为Chr 2,仅含有3个*PtrPP2Cs*。总的来看,染色体的长度与其含有的*PtrPP2Cs*数量无正相关联系。此外,同一条染色体上的基因在进化树中大多不属于同一亚族,推测同一条染色体上的不同基因可能行使不同的功能。

为了明确枳中 $PP2C$ 基因家族成员的进化关系,将拟南芥和枳中 $PP2C$ 基因的蛋白序列合并构建系统发育树。结果显示,供试 $PP2C$ 基因共分为12个亚族(A~L),而枳 $PP2C$ 基因被分到10个亚族中。其中A亚族的*PtrPP2Cs*数量最多,达到12个,其数量显著高于其他亚族,推测A亚族可能为枳中

表2 枳*PP2C*基因家族成员信息
Table 2 The information of *PtrPP2C* family members

基因名称 Gene name	登录号 Gene ID	氨基酸数目 Amino acid number/aa	等电点 pI	分子质量 Molecular weight/ku	不稳定系数 Instability index	亲水性 GRAVY	脂肪系数 Aliphatic index	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>PtrPP2C1</i>	Pt1g000910.2	362	5.14	39.78	40.42	-0.449	70.36	Nucl
<i>PtrPP2C2</i>	Pt1g001260.1	292	4.90	31.36	39.57	-0.279	79.52	Cyto
<i>PtrPP2C3</i>	Pt1g004280.1	329	6.15	36.01	35.08	-0.169	92.67	Chlo
<i>PtrPP2C4</i>	Pt1g007580.2	1082	5.33	119.90	41.22	-0.217	88.91	Chlo
<i>PtrPP2C5</i>	Pt1g007890.1	394	4.86	43.23	59.54	-0.231	85.30	Chlo
<i>PtrPP2C6</i>	Pt1g009990.1	334	6.33	36.86	47.93	-0.383	86.74	Cyto
<i>PtrPP2C7</i>	Pt1g011360.1	235	4.82	25.90	43.72	-0.195	91.28	Cyto
<i>PtrPP2C8</i>	Pt1g016350.1	818	5.57	90.83	42.35	-0.272	89.32	Cyto
<i>PtrPP2C9</i>	Pt1g023450.1	550	4.89	59.68	46.43	-0.128	90.00	Chlo
<i>PtrPP2C10</i>	Pt2g011050.1	283	8.28	31.20	33.90	-0.294	88.87	Cyto
<i>PtrPP2C11</i>	Pt2g011520.1	470	5.31	51.88	44.63	-0.495	68.43	Chlo
<i>PtrPP2C12</i>	Pt2g020070.1	428	8.43	46.35	35.49	-0.239	85.00	Chlo
<i>PtrPP2C13</i>	Pt3g016390.1	389	5.52	42.67	40.06	-0.027	98.53	Chlo
<i>PtrPP2C14</i>	Pt3g022860.1	679	6.49	74.75	35.95	-0.211	87.04	Cyto
<i>PtrPP2C15</i>	Pt3g024080.1	663	6.35	73.03	34.07	-0.187	88.85	Cyto
<i>PtrPP2C16</i>	Pt3g031650.2	1103	6.03	124.68	40.78	-0.368	79.54	Chlo
<i>PtrPP2C17</i>	Pt4g006290.1	430	7.10	47.10	47.09	-0.399	76.44	Nucl
<i>PtrPP2C18</i>	Pt4g016480.1	654	6.44	73.72	44.45	-0.371	83.94	Pero
<i>PtrPP2C19</i>	Pt4g021610.1	370	7.08	39.93	37.04	-0.296	78.27	Chlo
<i>PtrPP2C20</i>	Pt4g022540.1	412	6.23	45.13	56.75	-0.396	79.95	Nucl
<i>PtrPP2C21</i>	Pt5g004220.1	429	5.17	46.75	41.14	-0.355	80.49	Chlo
<i>PtrPP2C22</i>	Pt5g007310.1	316	5.20	34.24	34.01	-0.279	80.00	Chlo
<i>PtrPP2C23</i>	Pt5g009690.1	282	7.74	30.75	41.02	-0.358	81.24	Chlo
<i>PtrPP2C24</i>	Pt5g013020.1	427	7.51	45.83	32.10	-0.130	88.13	Chlo
<i>PtrPP2C25</i>	Pt5g013120.1	368	6.60	40.67	39.59	-0.237	77.12	Cyto
<i>PtrPP2C26</i>	Pt6g005610.1	659	6.02	73.33	41.74	-0.197	91.78	Chlo
<i>PtrPP2C27</i>	Pt6g009610.1	390	6.90	44.06	51.08	-0.204	91.21	Mito
<i>PtrPP2C28</i>	Pt6g012140.1	434	7.92	48.23	41.88	-0.466	75.74	Cyto
<i>PtrPP2C29</i>	Pt6g015590.1	679	5.66	75.37	37.42	-0.547	74.82	Nucl
<i>PtrPP2C30</i>	Pt6g016590.1	386	6.19	43.61	38.11	-0.366	82.82	Chlo
<i>PtrPP2C31</i>	Pt6g018470.1	491	5.66	53.99	43.60	-0.446	75.48	Chlo
<i>PtrPP2C32</i>	Pt7g005700.1	377	5.08	41.26	32.95	-0.417	74.80	Nucl
<i>PtrPP2C33</i>	Pt7g010990.1	479	5.59	52.93	44.02	-0.403	77.41	Nucl
<i>PtrPP2C34</i>	Pt7g012930.1	544	5.01	58.75	42.74	-0.136	94.08	Chlo
<i>PtrPP2C35</i>	Pt7g016560.1	380	6.77	42.40	42.11	-0.165	95.95	Cyto
<i>PtrPP2C36</i>	Pt7g021110.1	474	9.02	52.68	48.13	-0.288	86.75	Chlo
<i>PtrPP2C37</i>	Pt8g001190.1	397	8.17	44.18	48.28	-0.298	88.09	Chlo
<i>PtrPP2C38</i>	Pt8g003220.1	382	8.83	42.59	49.52	-0.266	91.10	Mito
<i>PtrPP2C39</i>	Pt8g010880.1	429	5.51	46.95	41.91	-0.428	73.85	Cyto
<i>PtrPP2C40</i>	Pt8g012080.1	399	5.88	43.10	65.01	-0.268	80.90	Chlo
<i>PtrPP2C41</i>	Pt9g001110.1	463	9.28	51.99	41.21	-0.359	85.27	Pero
<i>PtrPP2C42</i>	Pt9g002760.1	478	4.92	52.25	37.71	-0.232	86.09	Nucl
<i>PtrPP2C43</i>	Pt9g003660.1	419	4.90	45.92	32.02	-0.369	75.30	Nucl
<i>PtrPP2C44</i>	Pt9g004660.1	584	6.09	64.16	44.78	-0.171	91.51	Chlo
<i>PtrPP2C45</i>	Pt9g008100.1	274	9.47	30.67	40.17	-0.420	80.80	Chlo
<i>PtrPP2C46</i>	Pt9g018140.1	438	5.39	48.01	66.67	-0.464	73.97	Nucl
<i>PtrPP2C47</i>	Pt9g018150.1	402	8.95	43.75	55.82	-0.310	84.45	Mito
<i>PtrPP2C48</i>	Pt9g018480.1	352	5.15	39.15	38.60	-0.397	78.64	Chlo
<i>PtrPP2C49</i>	Pt9g020950.1	370	6.27	40.13	42.84	-0.022	93.35	Chlo
<i>PtrPP2C50</i>	PtUn012080.1	296	5.99	32.33	41.94	-0.061	95.91	Chlo
<i>PtrPP2C51</i>	PtUn026560.1	292	4.90	31.36	39.57	-0.279	79.52	Cyto
<i>PtrPP2C52</i>	PtUn034640.1	1184	6.32	127.95	47.31	-0.256	78.85	Extr
<i>PtrPP2C53</i>	PtUn034650.1	441	8.67	48.92	52.99	-0.119	88.68	Plas

注: Nucl. 细胞核; Cyto. 细胞质; Chlo. 叶绿体; Pero. 过氧化物酶体; Mito. 线粒体; Extr. 细胞外基质; Plas. 质膜。

Note: Nucl. Nucleus; Cyto. Cytoplasm; Chlo. Chloroplast; Pero. Peroxisome; Mito. Mitochondrion; Extr. Extracellular; Plas. Plasma membrane.

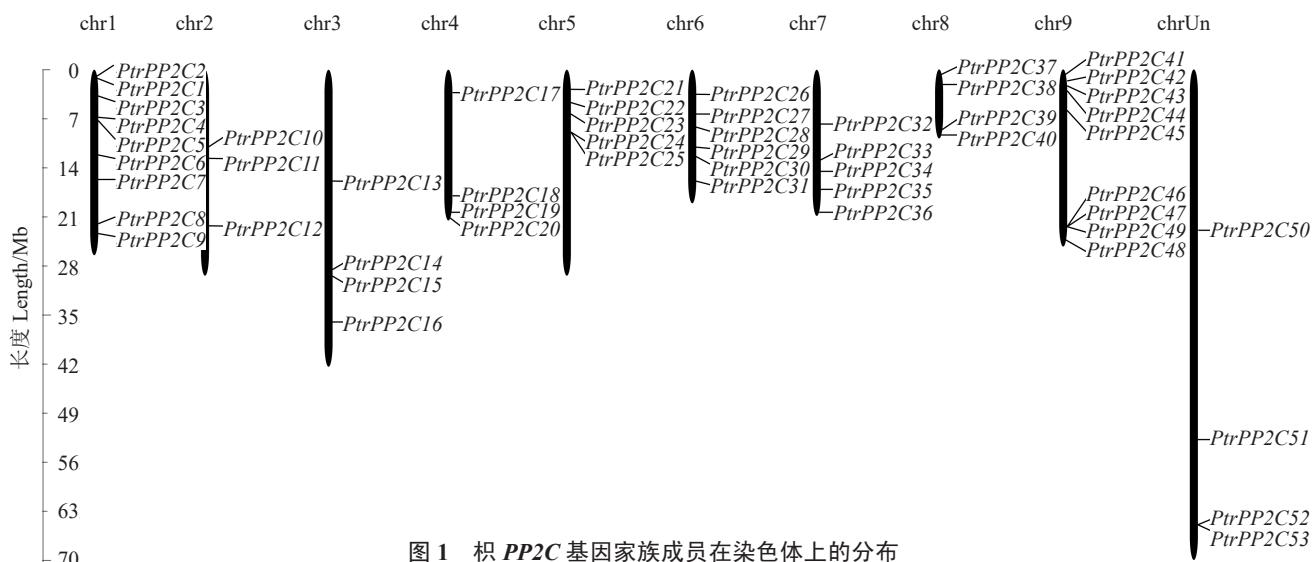


图 1 析 *PP2C* 基因家族成员在染色体上的分布

Fig. 1 Chromosome distribution of *PtrPP2C* family members



分支上数值表示大于 75% 的自展支持率。

The number of the branches indicate the bootstrap confidence values over 75%.

图 2 枳与拟南芥 *PP2C* 基因家族成员系统发育进化树

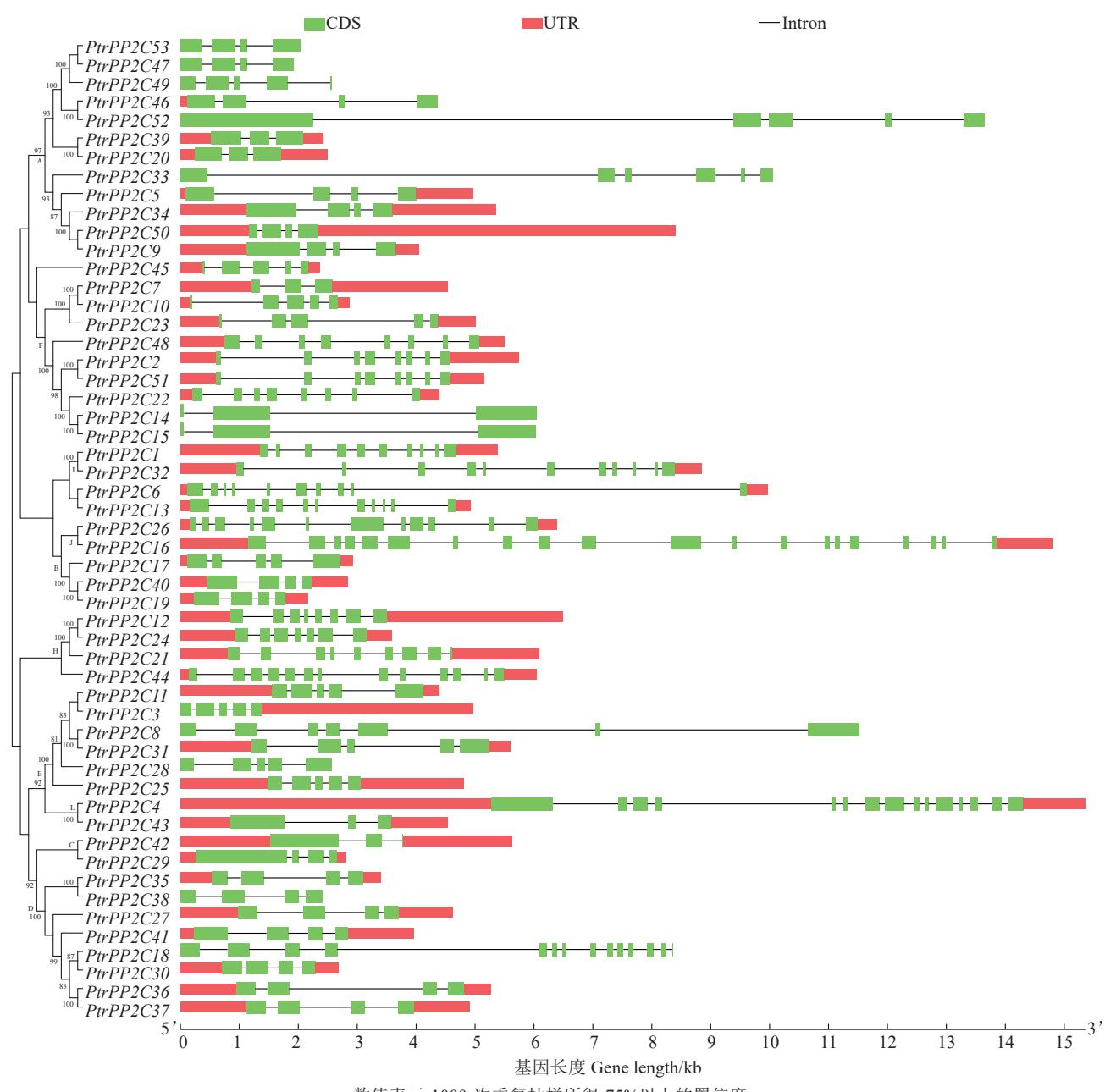
Fig. 2 Phylogenetic trees of *PP2C* family members between *Poncirus trifoliata* (Ptr) and *Arabidopsis thaliana* (At)

最重要的亚族;而J亚族的 $PtrPP2Cs$ 数量最少,仅有1个;G和K亚族中则没有 $PtrPP2Cs$ 。此外还有5个 $PtrPP2Cs$ ($PtrPP2C6$ 、 $PtrPP2C13$ 、 $PtrPP2C26$ 、 $PtrPP2C44$ 和 $PtrPP2C45$)未分入任何一个亚族中,单独形成分支,其进化关系有待进一步分析。

2.3 枳 $PP2C$ 基因家族成员的基因结构分析

为了解 $PtrPP2Cs$ 的基因结构,对其基因序列的内含子和外显子组成进行分析(图3)。结果显示,所有 $PtrPP2Cs$ 中的内含子与外显子均交叉镶嵌在

一条完整的基因序列上。 $PtrPP2Cs$ 的内含子数量2~19个不等,约81.13%(43个)的 $PtrPP2Cs$ 含有2~7个内含子。其中, $PtrPP2C16$ 的内含子数量最多,达到19个;其次是 $PtrPP2C4$,内含子有14个; $PtrPP2C7$ 、 $PtrPP2C14$ 、 $PtrPP2C15$ 、 $PtrPP2C20$ 、 $PtrPP2C39$ 、 $PtrPP2C42$ 和 $PtrPP2C43$ 内含子数量最少,均为2个;包含3个内含子的基因达到17个,这可能与 $PtrPP2Cs$ 基因结构相对保守有关。系统发育树中同属一个亚族的 $PtrPP2Cs$ 通常含有相似的



The number represent the percentage of 1000 bootstrap replications, only above 75% was showed.

图3 枳 $PP2C$ 基因家族成员的基因结构

Fig. 3 Gene structure of $PtrPP2C$ family members

内含子-外显子结构,如在D亚族中约87.5%(7个)的*PtrPP2Cs*含有4个内含子。

2.4 枳*PP2C*蛋白的保守基序分析

为进一步探究*PtrPP2C*蛋白的序列特征,对*PtrPP2C*蛋白保守基序组成进行分析,得到14个保守Motif(图4)。结果显示,不同*PtrPP2C*蛋白的Motif数量相差较大,为5~11个。其中,*PtrPP2C44*和*PtrPP2C45*均含5个Motif,为所有蛋白中所含Motif数量最少的;其余大部分(19个)*PtrPP2C*蛋白都含有9个Motif,推测其可能与基因的进化有关。

Motif 2和Motif 3在所有*PtrPP2C*蛋白中均存在,Motif 1、Motif 4、Motif 5、Motif 6、Motif 7、Motif 11和Motif 12在大部分*PtrPP2C*蛋白中都存在,Motif 8、Motif 9和Motif 13存在于D亚族中,Motif 10存在于F和L亚族中,Motif 14则仅存在于A亚族中。该现象可能是不同亚族行使不同的功能所致。此外,*PtrPP2C19*的Motif数量相比同一亚族的其他基因有缺失,这可能是基因串联重复过程中碱基丢失导致的;94.34%(50个)的*PtrPP2C*蛋白C端是Motif 6,且该氨基酸序列高度保守。

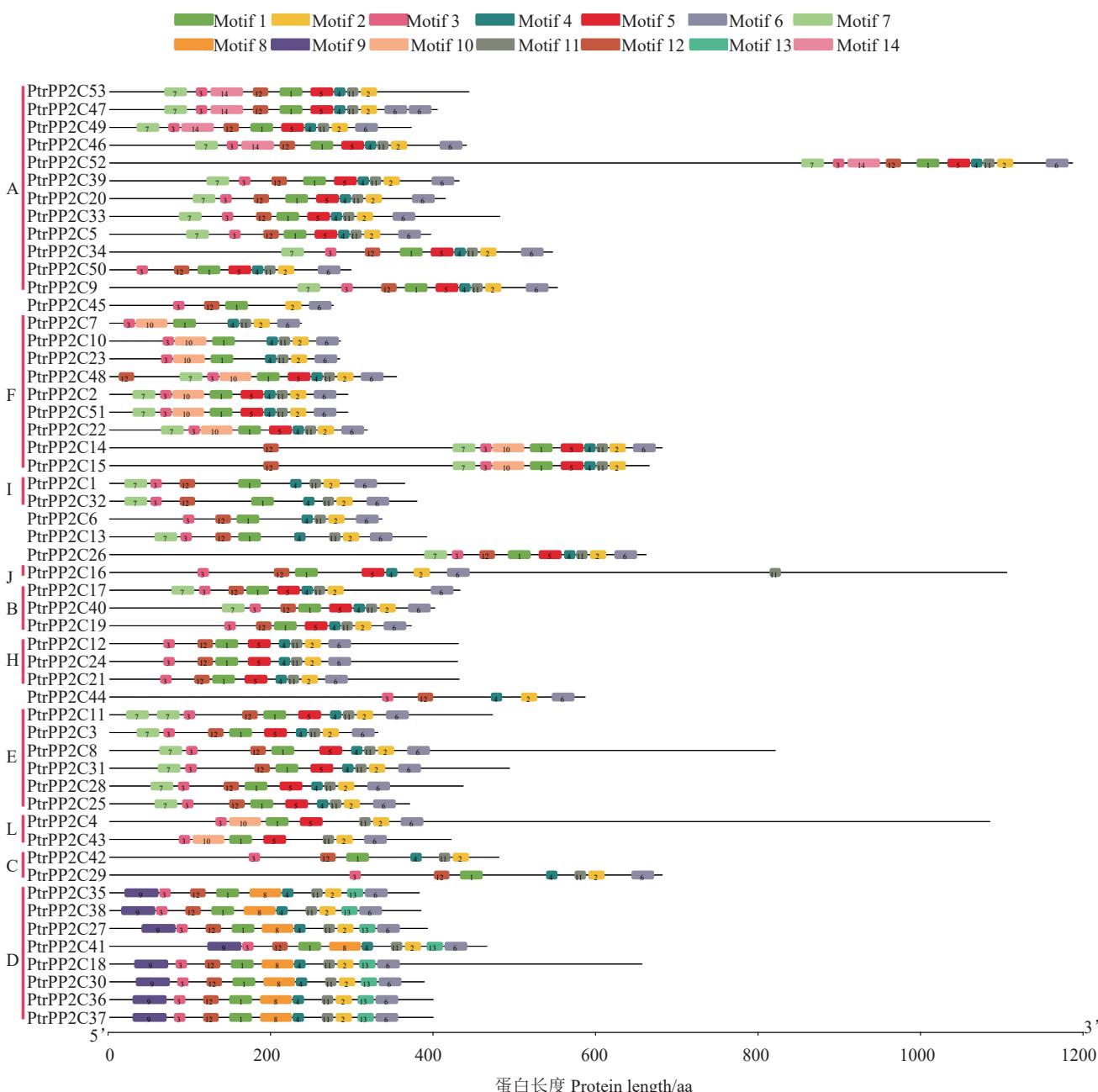


图4 枳*PP2C*基因家族成员保守基序分布

Fig. 4 Distribution of conserved motifs within *PtrPP2C* family members

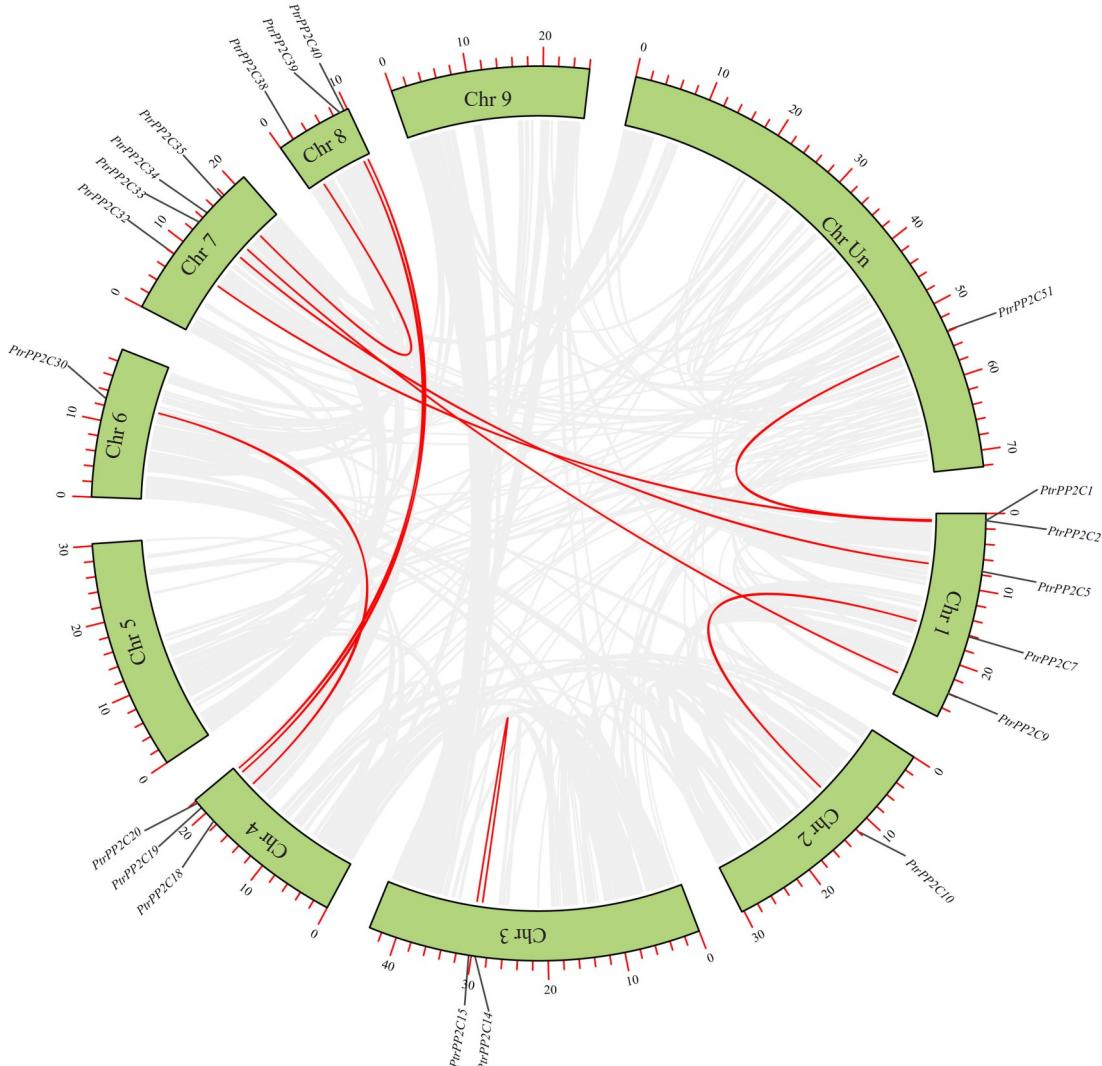
2.5 枳PP2C基因家族成员的共线性分析

为进一步探索枳PP2C基因家族成员的进化,对枳基因组进行共线性分析(图5)。结果显示,53个 $PtrPP2Cs$ 中共鉴定出了10对片段复制基因,分别为 $PtrPP2C1/PtrPP2C32$ 、 $PtrPP2C2/PtrPP2C51$ 、 $PtrPP2C5/PtrPP2C33$ 、 $PtrPP2C7/PtrPP2C10$ 、 $PtrPP2C9/PtrPP2C34$ 、 $PtrPP2C14/PtrPP2C15$ 、 $PtrPP2C18/PtrPP2C30$ 、 $PtrPP2C19/PtrPP2C40$ 、 $PtrPP2C20/PtrPP2C39$ 和 $PtrPP2C35/PtrPP2C38$ 。10条染色体中仅Chr 5和Chr 9这两条染色体上无 $PtrPP2C$ 片段复制基因;Chr 1上含有最多的片段复制基因,达5个;其次是Chr 7,片段复制基因数量为4个。

为进一步阐明PP2C基因在不同物种间的进化关系,对枳、拟南芥和水稻进行共线分析(图6)。结果显示,枳与拟南芥、水稻2种物种间均表现出共线性关系,并分别具有43和27个有共线性关系的 $PtrPP2Cs$,其中仅11个 $PtrPP2Cs$ ($PtrPP2C3$ 、 $PtrPP2C4$ 、 $PtrPP2C19$ 、 $PtrPP2C23$ 、 $PtrPP2C28$ 、 $PtrPP2C29$ 、 $PtrPP2C36$ 、 $PtrPP2C38$ 、 $PtrPP2C39$ 、 $PtrPP2C40$ 和 $PtrPP2C43$)在拟南芥和水稻中同时具有同源关系。

2.6 枳PP2C基因家族成员的二级结构

$PtrPP2C$ 蛋白的二级结构预测结果(表3)显示,53个 $PtrPP2C$ 蛋白的二级结构均存在 α -螺旋(α -helix)、



Chr 1~Chr Un 代表枳 10 条染色体;0~70 代表染色体长度,单位为 Mb;红色线连接的基因存在共线关系。下同。

Chr 1-Chr Un represent ten *Poncirus trifoliata* chromosomes; 0-70 represent chromosome length, the unit is Mb; The genes connected by red lines have a collinear relationship. The same as below.

图 5 枳 PP2C 基因家族成员共线性分析

Fig. 5 Collinear distribution of *PtrPP2C* family members

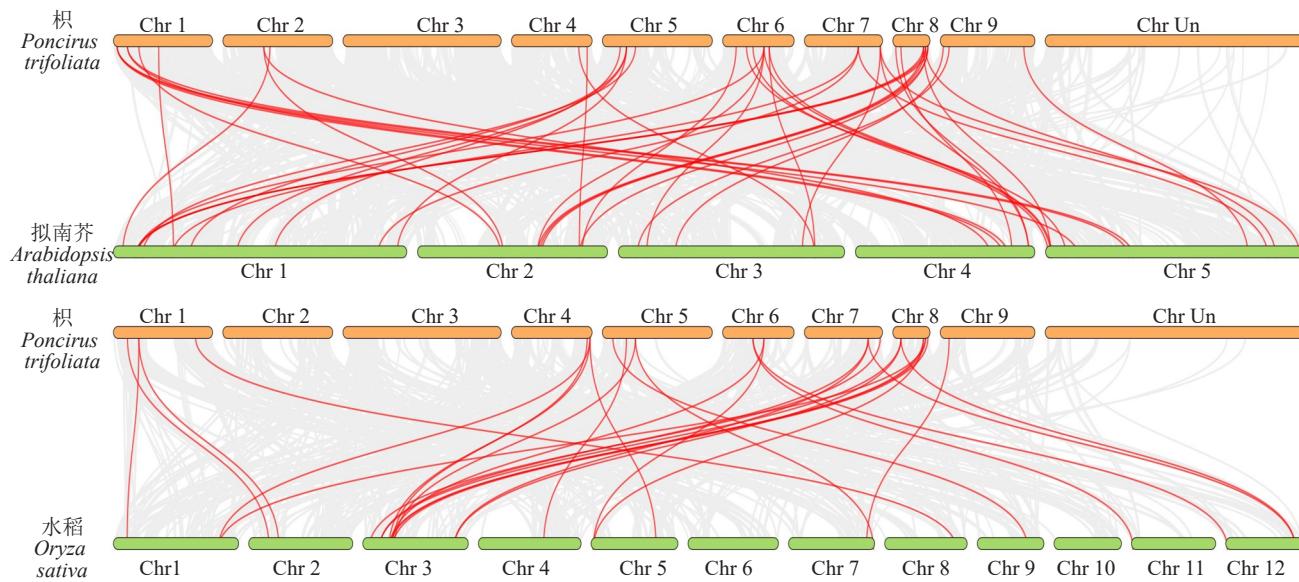


图 6 枳、拟南芥和水稻 PP2C 基因家族成员的同源性分析

Fig. 6 Synteny analysis of PP2C family members between *Poncirus trifoliata*, *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*

表 3 枳 PP2C 基因家族成员的二级结构组成

Table 3 Secondary structure of *PtrPP2C* family members

%

蛋白 Protein	α -螺旋 α -helix	延伸链 Extended strand	β -折叠 β -turn	无规则卷曲 Random coil	蛋白 Protein	α -螺旋 α -helix	延伸链 Extended strand	β -折叠 β -turn	无规则卷曲 Random coil
PtrPP2C1	38.12	15.75	6.63	39.50	PtrPP2C28	29.49	19.12	6.22	45.16
PtrPP2C2	40.07	18.15	7.88	33.90	PtrPP2C29	30.04	11.19	4.57	54.20
PtrPP2C3	28.27	22.80	7.60	41.34	PtrPP2C30	39.12	16.58	9.07	35.23
PtrPP2C4	36.88	17.65	5.64	39.83	PtrPP2C31	24.85	16.90	5.70	52.55
PtrPP2C5	34.01	17.51	7.61	40.86	PtrPP2C32	41.38	15.65	6.37	36.60
PtrPP2C6	36.83	16.17	7.49	39.52	PtrPP2C33	35.07	21.50	6.26	37.16
PtrPP2C7	43.83	21.70	10.21	24.26	PtrPP2C34	29.23	17.83	4.23	48.71
PtrPP2C8	36.92	17.48	7.58	38.02	PtrPP2C35	34.47	21.58	8.16	35.79
PtrPP2C9	28.36	19.82	4.00	47.82	PtrPP2C36	32.49	17.13	7.05	43.32
PtrPP2C10	38.52	21.91	8.13	31.45	PtrPP2C37	31.99	17.38	6.55	44.08
PtrPP2C11	27.23	18.72	5.74	48.30	PtrPP2C38	35.60	18.32	7.33	38.74
PtrPP2C12	32.01	20.33	5.84	41.82	PtrPP2C39	33.33	16.78	5.59	44.29
PtrPP2C13	39.07	17.48	5.91	37.53	PtrPP2C40	33.33	19.80	8.02	38.85
PtrPP2C14	35.35	20.32	7.95	36.38	PtrPP2C41	31.75	17.93	6.70	43.63
PtrPP2C15	34.39	21.87	9.95	33.79	PtrPP2C42	38.49	14.44	5.02	42.05
PtrPP2C16	35.63	16.77	4.90	42.70	PtrPP2C43	23.87	21.96	6.21	47.97
PtrPP2C17	29.53	16.74	7.21	46.51	PtrPP2C44	28.60	18.84	4.97	47.60
PtrPP2C18	38.23	15.90	5.35	40.52	PtrPP2C45	41.24	20.80	6.57	31.39
PtrPP2C19	33.51	16.76	9.19	40.54	PtrPP2C46	33.79	12.33	6.16	47.72
PtrPP2C20	37.14	15.29	5.34	42.23	PtrPP2C47	33.83	14.18	5.22	46.77
PtrPP2C21	31.70	19.11	5.83	43.36	PtrPP2C48	40.06	21.31	9.94	28.69
PtrPP2C22	34.18	21.20	8.23	36.39	PtrPP2C49	40.81	14.05	6.49	38.65
PtrPP2C23	35.82	25.53	9.93	28.72	PtrPP2C50	37.50	17.91	6.42	38.18
PtrPP2C24	32.55	19.20	6.32	41.92	PtrPP2C51	40.07	18.15	7.88	33.90
PtrPP2C25	35.05	22.01	6.79	36.14	PtrPP2C52	26.86	21.71	7.01	44.43
PtrPP2C26	42.03	15.48	7.74	34.75	PtrPP2C53	41.72	12.70	4.99	40.59
PtrPP2C27	38.72	17.44	6.92	36.92					

β -转角(β -turn)和无规则卷曲(random coil)现象。其中,无规则卷曲所占比例为24.26%~54.20%,是 $PtrPP2C$ 蛋白结构的重要组成部分; α -螺旋和 β -转角所占比例较少,分别为23.87%~43.83%和4.00%~10.21%。

2.7 枳 $PP2C$ 基因家族成员的启动子顺式作用元件分析

通过对 $PtrPP2Cs$ 启动子顺式作用元件进行预测和分析(图7),发现其中含有大量的光响应元件、

激素响应元件及与逆境胁迫相关的响应元件。分别有81.13%(43个)、73.58%(39个)、60.38%(32个)、50.94%(27个)和37.74%(20个)的 $PtrPP2Cs$ 启动子中含有脱落酸、茉莉酸甲酯、赤霉素、水杨酸和生长素响应元件;分别有81.13%(43个)、52.72%(29个)、41.51%(22个)和35.85%(19个)的 $PtrPP2Cs$ 启动子中含有参与厌氧胁迫、干旱胁迫、防御与胁迫以及低温胁迫的响应元件。另外,少部分 $PtrPP2Cs$ 启

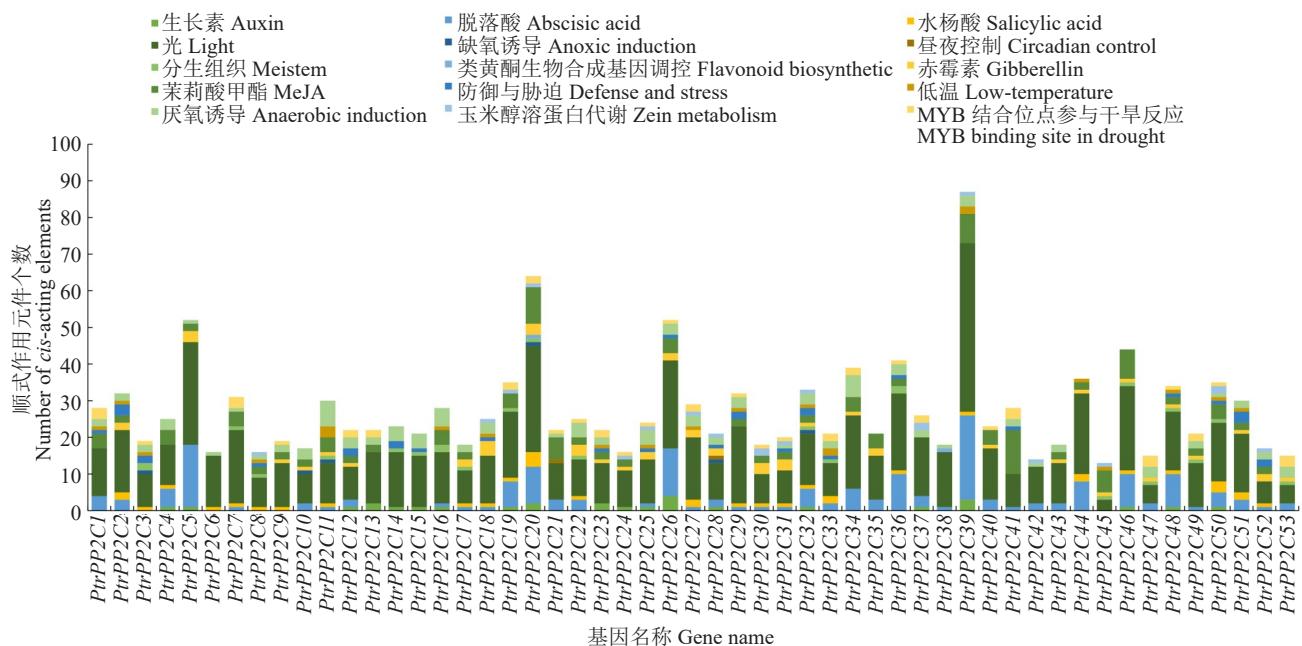


图7 枳 $PP2C$ 基因家族成员启动子顺式作用元件种类和数量

Fig. 7 Types and numbers of cis-acting elements in promoters of *PtrPP2C* family members

动子中还含有缺氧诱导、昼夜控制、分生组织表达、类黄酮生物合成和玉米醇溶蛋白代谢相关的组织生长发育以及特异性响应元件。这些结果表明, $PtrPP2Cs$ 在响应光调控、激素诱导和逆境胁迫的过程中可能发挥重要的调控作用。

2.8 枳 $PP2C$ 基因家族成员的组织特异性表达

为了明确 $PtrPP2Cs$ 在枳不同组织(根、茎、叶、花芽和果实)中的表达水平,基于转录组数据库FP-KM值绘制 $PtrPP2Cs$ 相对表达量热图(图8)。结果显示, $PtrPP2Cs$ 在枳不同组织中均有不同程度的表达。其中, $PtrPP2Cs$ 在花芽中特异表达的基因最多,达到25个,相对表达量最高的为 $PtrPP2C39$,属于A亚族;在根中特异表达的基因有24个,相对表达量最高的为 $PtrPP2C38$,属于D亚族;在果实中特异表达的基因有17个,相对表达量最高的为 $PtrPP2C10$,属于F亚族;在叶中特异表达的基因有

15个,相对表达量最高的也为 $PtrPP2C10$;在茎中特异表达的基因数量最少,仅有13个,相对表达量最高的为 $PtrPP2C48$,属于F亚族。该结果暗示 $PtrPP2Cs$ 在枳生长发育过程中可能发挥不同的调控作用。

2.9 枳 $PP2C$ 基因家族成员在不同非生物胁迫处理下的表达模式分析

结合 $PtrPP2Cs$ 的系统进化分析结果与启动子顺式作用元件预测结果,从10个亚族中各挑选1个成员共计10个基因,利用qRT-PCR检测干旱、低温和高温胁迫处理下的 $PtrPP2Cs$ 相对表达量是否存在显著差异(图9)。在低温胁迫条件下,10个 $PtrPP2Cs$ 的相对表达量呈现持续上调的趋势,均在低温处理12 h达到峰值,上调1.7~56.8倍。在高温胁迫条件下,10个 $PtrPP2Cs$ 表达呈现2种不同的表达模式,分别为持续上调($PtrPP2C3$ 、 $PtrPP2C16$ 、

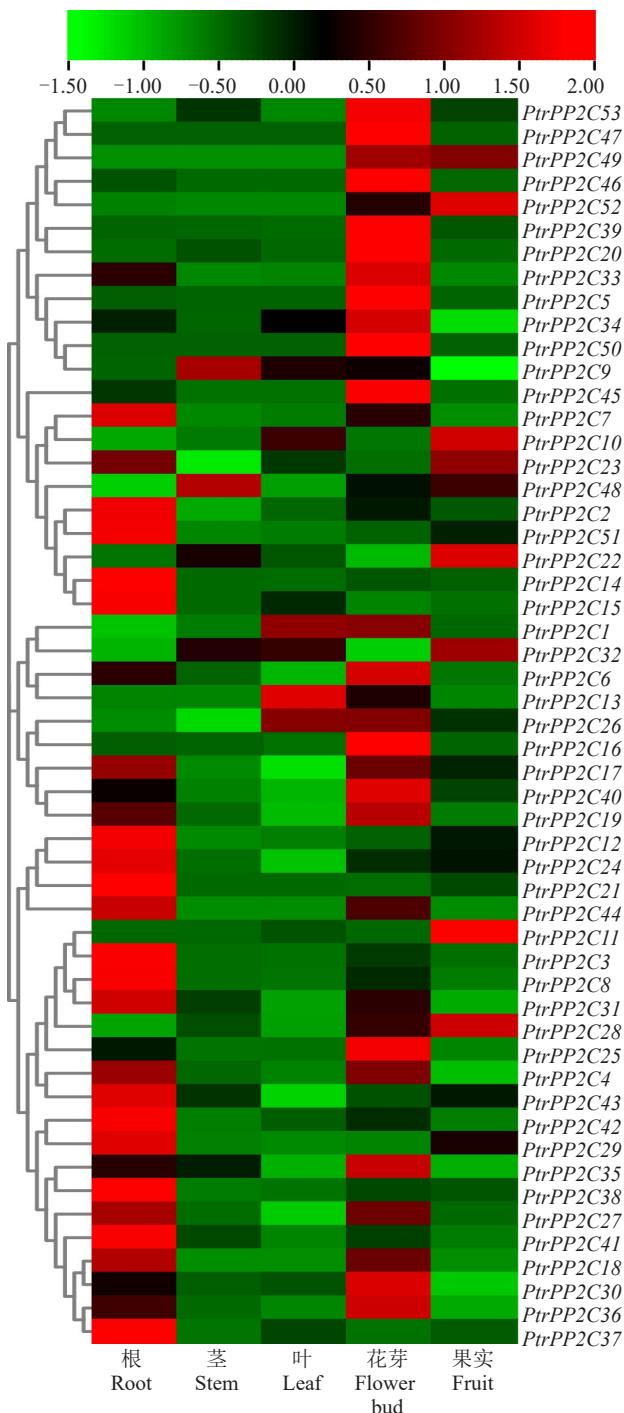
图 8 枳 *PP2C* 基因家族成员在不同组织的表达

Fig. 8 Different tissue expression analysis of *PtrPP2C* family members

PtrPP2C24、*PtrPP2C27*、*PtrPP2C29*、*PtrPP2C33*、*PtrPP2C43* 和 *PtrPP2C51*) 和持续下调 (*PtrPP2C1* 和 *PtrPP2C17*)；其中，*PtrPP2C27*、*PtrPP2C29* 和 *PtrPP2C33* 显著上调，分别上调了 21.6、195.1 和 21.7 倍，而 *PtrPP2C1* 和 *PtrPP2C17* 的相对表达量分别仅为对照的 37.7% 和 21.9%。在干旱胁迫条件下，10

个 *PtrPP2Cs* 同样表现出 2 种不同的表达模式，除 *PtrPP2C27* 持续下调以外，其余 9 个基因相对表达量均呈持续上调趋势，在整个胁迫过程中 *PtrPP2C1*、*PtrPP2C3*、*PtrPP2C16*、*PtrPP2C17*、*PtrPP2C24*、*PtrPP2C29*、*PtrPP2C33*、*PtrPP2C43* 和 *PtrPP2C51* 在干旱处理 12 h 相对表达量达到最高，上调 2.6~5.8 倍。

3 讨 论

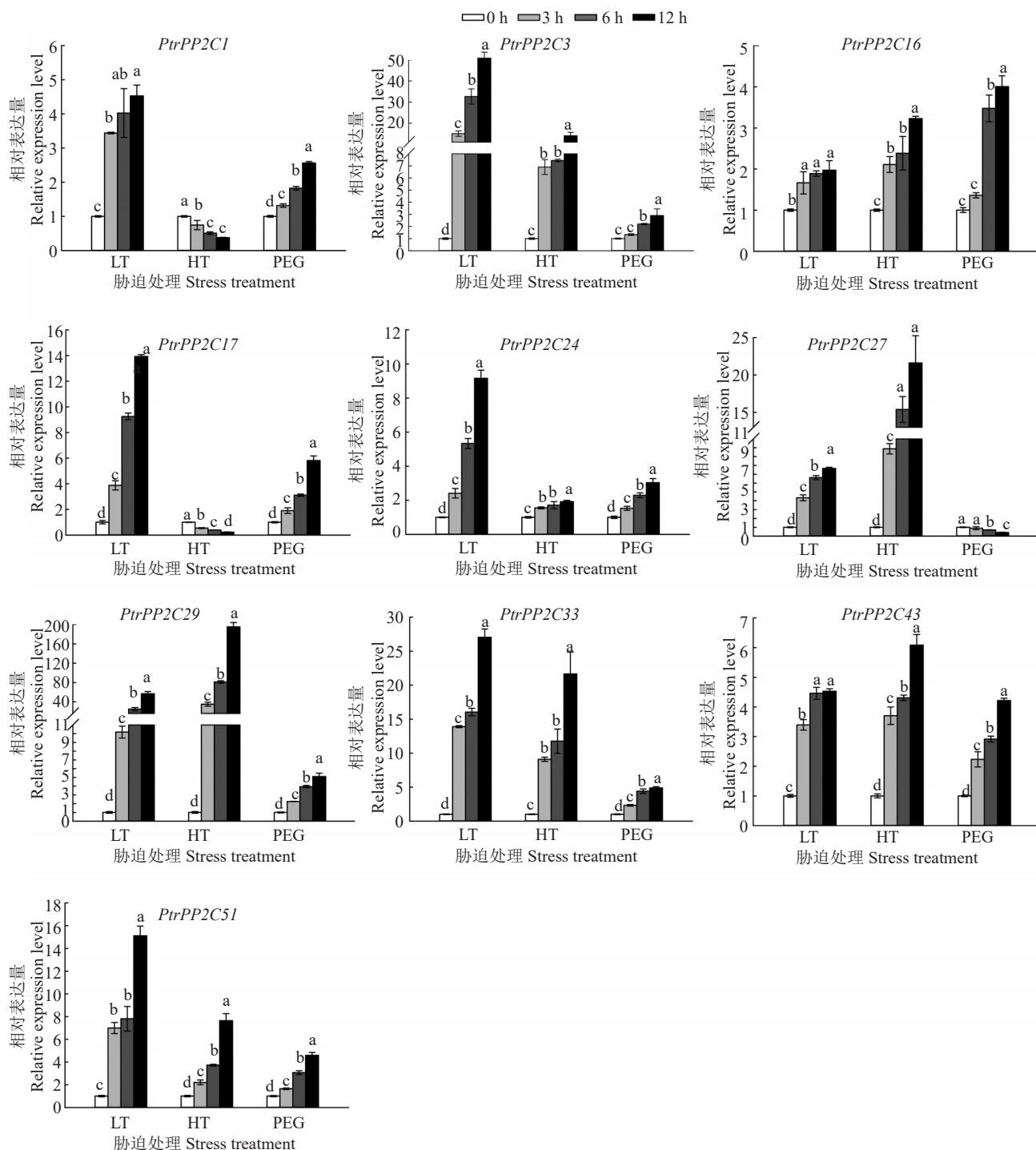
3.1 枳 *PP2C* 基因家族成员的鉴定与结构分析

PP2C 基因家族作为植物最大的蛋白磷酸酶家族，通过催化已磷酸化的蛋白质分子发生去磷酸化反应而调节植物代谢活动^[19]。在不同植物中，*PP2C* 基因家族的基因数量差异较大，如拟南芥有 80 个，水稻有 90 个，玉米则有 104 个^[20]。本研究从枳基因组中共鉴定获得 53 个 *PtrPP2Cs*。*PtrPP2C* 蛋白的氨基酸数、等电点及相对分子质量都存在较大差异，这可能与其功能多样性有关。在基因结构上，*PtrPP2Cs* 的内含子数量在 2~19 个之间，外显子数量在 3~20 个之间，与谷子 *PP2C* 基因家族相似^[7]。此外，*PtrPP2C* 家族中存在 10 对片段复制基因，其中 6 对存在于 *PtrPP2Cs* 的 A 和 F 亚族成员之间，推测枳为适应外界环境变化在进化过程中发生 *PP2C* 基因家族尤其是 A 和 F 亚族成员的复制事件，暗示这 2 个亚族成员在枳响应逆境胁迫过程中可能发挥重要作用。

系统进化分析显示，*PtrPP2Cs* 可以分为 10 个亚族 (A、B、C、D、E、F、H、I、J 和 L)。与拟南芥相比，*PtrPP2Cs* 没有分布在全部 12 个亚族中，G 和 K 亚族中均没有 *PtrPP2Cs*，这与葡萄中的研究结果相似^[9]。研究表明，同一亚族的基因在基因结构和基序组成上具有较高的相似性^[21]。本研究发现属于同一亚族的大部分 *PtrPP2Cs* 也具有相似的基因结构和基序组成，暗示属于同一亚族的 *PtrPP2Cs* 可能具有相似的功能。然而，个别 *PtrPP2Cs* 的基因结构和同一亚族的其余 *PtrPP2Cs* 相比存在差异，如 *PtrPP2C8* 的外显子数量相比同一亚族的其他基因有所增加，推测其可能是同一亚族不同基因在进化过程中出现了内含子的增加。

3.2 枳 *PP2C* 基因家族成员在不同组织及非生物胁迫下的表达

同一物种不同 *PP2C* 基因之间以及不同物种



不同小写字母表示在 $p < 0.05$ 水平上显著差异; LT. $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ 低温处理; HT. $(38.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 高温处理; PEG. 15% PEG6000 溶液处理, 模拟干旱环境。

Different small letters indicate significant differences at the 0.05 level; LT. Low temperature; HT. High temperature; PEG. Water culture with 15% PEG solution, simulated arid environment.

图 9 枳 PP2C 基因家族成员在不同非生物胁迫处理下的相对表达量

Fig. 9 Relative expression of *PtrPP2C* family members under different stress treatments

PP2C 基因之间在不同组织器官的表达存在差异。如在苹果中, *MdPP2C-Like* 在根中表达水平较高, 而在果实中低表达^[22]; 草莓中, *FvPP2C1* 在花药和花瓣中的相对表达量显著高于其在叶片、心皮和表皮中

的相对表达量, *FvPP2C10* 在花药、花瓣和心皮中的相对表达量较高^[23]; 苦荞中, *FtPP2C08* 在花和果实中的相对表达量较高, *FtPP2C38* 在果实中的相对表达量是其在叶中相对表达量的 1715 倍, 而

FtPP2C39 在根中高表达^[24]。本研究结果也表明, *PtrPP2Cs* 的表达具有明显的组织表达特异性, 如 *PtrPP2C10* 在果实和叶中高表达, 而在花芽、根和茎中的相对表达量较低; *PtrPP2C38* 在根中的相对表达量显著高于其在花芽、果实、叶和茎中的相对表达量; *PtrPP2C32* 在果实、叶和茎中的相对表达量较高, 而在花芽和根中低表达。

植物对于寒冷、高温与干旱等非生物胁迫的响应机制已被广泛研究^[25]。有研究表明, *PP2C* 基因主要通过 ABA 通路和 MAPK 通路参与低温胁迫响应^[26], 在拟南芥^[27]和构树^[10]中均有部分 *PP2C* 基因在受到低温胁迫后出现上调表达的趋势, 这与本研究在枳中的结果一致, 说明 *PtrPP2Cs* 也可能通过调节 MAPK 通路等形式参与枳抵抗低温胁迫的响应。已知 *PP2C* 基因的表达对干旱胁迫也存在明显的调控作用^[28]。本研究结果表明, 10 个 *PtrPP2Cs* 中有 9 个基因表达上调, 说明多数 *PtrPP2Cs* 在干旱胁迫过程中可能具有重要的调控作用。此外, 笔者分析 *PtrPP2Cs* 在高温处理条件下的表达水平发现, 不同的基因出现不同的表达模式, 在陆地棉中也出现过类似的结果^[29]。综上结果表明, *PtrPP2Cs* 在低温、高温和干旱胁迫中发挥重要作用, 但尚需大量的研究工作才能揭示其在枳生长与逆境胁迫抵抗中具体的功能机制。

4 结 论

从枳基因组中鉴定出 53 个 *PtrPP2Cs*, 分析了其理化性质、进化关系、保守基序和表达谱等, 并从中挑选 10 个基因, 通过 qRT-PCR 检测了其在干旱、低温和高温胁迫处理下的表达水平, 为系统研究 *PtrPP2C* 基因家族的功能奠定了基础。

参考文献 References:

- [1] CAO J M, JIANG M, LI P, CHU Z Q. Genome-wide identification and evolutionary analyses of the *PP2C* gene family with their expression profiling in response to multiple stresses in *Brachypodium distachyon*[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 175-191.
- [2] SINGH A, PANDEY A, SRIVASTAVA A K, TRAN L S P, PANDEY G K. Plant protein phosphatases 2C: From genomic diversity to functional multiplicity and importance in stress management[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2016, 36(6): 1023-1035.
- [3] 胡秋涛, 侯丹, 赵钟毓, 魏涵天, 林新春. 毛竹 *PP2C* 基因家族鉴定与表达分析[J]. *农业生物技术学报*, 2020, 28(10): 1776-1787.
- [4] HU Qiutao, HOU Dan, ZHAO Zhongyu, WEI Hantian, LIN Xinchun. Identification and expression analysis of *PP2C* gene family in *Phyllostachys edulis*[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2020, 28(10): 1776-1787.
- [5] FUCHS S, GRILL E, MESKIENE I, SCHWEIGHOFER A. Type 2C protein phosphatases in plants[J]. *FEBS Journal*, 2013, 280(2): 681-693.
- [6] SINGH A, JHA S K, BAGRI J, PANDEY G K. ABA inducible rice protein phosphatase 2C confers ABA insensitivity and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): 1-24.
- [7] 张冬, 李晓娜, 肖厚贞, 陆燕茜, 张宇, 王萌. 巴西橡胶树 6 个 *PP2C* 家族基因成员分子信息学与抗旱功能分析[J]. *植物研究*, 2017, 37(5): 730-737.
ZHANG Dong, LI Xiaona, XIAO Houzhen, LU Yanxi, ZHANG Yu, WANG Meng. Bioinformatics and drought tolerance of *PP2C* gene family members in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg.[J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2017, 37(5): 730-737.
- [8] 闵东红, 薛飞洋, 马亚男, 陈明, 徐兆师, 李连城, 刁现民, 贾冠清, 马有志. 谷子 *PP2C* 基因家族的特性[J]. *作物学报*, 2013, 39(12): 2135-2144.
MIN Donghong, XUE Feiyang, MA Yanan, CHEN Ming, XU Zhaoshi, LI Liancheng, DIAO Xianmin, JIA Guanqing, MA Youzhi. Characteristics of *PP2C* gene family in foxtail millet (*Setaria italica*) [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2013, 39(12): 2135-2144.
- [9] HU X L, LIU L X, XIAO B L, LI D P, XING X, KONG X P, LI D Q. Enhanced tolerance to low temperature in tobacco by over-expression of a new maize protein phosphatase 2C, *ZmPP2C2*[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167(15): 1307-1315.
- [10] 何红红, 路志浩, 马宗桓, 梁国平, 马丽娟, 万鹏, 毛娟. 葡萄 *PP2C* 家族基因的鉴定与表达分析[J]. *园艺学报*, 2018, 45(7): 1237-1250.
HE Honghong, LU Zhihao, MA Zonghuan, LIANG Guoping, MA Lijuan, WAN Peng, MAO Juan. Genome-wide identification and expression analysis of the *PP2C* gene family in *Vitis vinifera*[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2018, 45(7): 1237-1250.
- [11] ZHANG B H, CHEN N Z, PENG X J, SHEN S H. Identification of the *PP2C* gene family in paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*) and its roles in the regulation mechanism of the response to cold stress[J]. *Biotechnology Letters*, 2021, 43(5): 1089-1102.
- [12] XIANG Y L, SUN X P, GAO S, QIN F, DAI M Q. Deletion of an endoplasmic reticulum stress response element in a *ZmPP2C-A* gene facilitates drought tolerance of maize seedlings[J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(3): 456-469.
- [13] 陈耘蕊, 毛志君, 李兆伟, 范凯. 植物蛋白磷酸酶 2C 结构和功能的研究现状与进展[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2021, 47(1): 11-20.
CHEN Yunrui, MAO Zhijun, LI Zhaowei, FAN Kai. Research status and progress in structure and function of protein phosphatase 2C.

- tase 2C in plants[J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences), 2021, 47(1): 11-20.
- [13] HU X B, ZHANG H J, LI G J, YANG Y X, ZHENG Z, SONG F M. Ectopic expression of a rice protein phosphatase 2C gene *Os-BIPP2C2* in tobacco improves disease resistance[J]. Plant Cell Reports, 2009, 28(6): 985-995.
- [14] 郭文武, 叶俊丽, 邓秀新. 新中国果树科学研究 70 年: 柑橘[J]. 果树学报, 2019, 36(10): 1264-1272.
- GUO Wenwu, YE Junli, DENG Xiuxin. Fruit scientific research in New China in the past 70 years: Citrus[J]. Journal of Fruit Science, 2019, 36(10): 1264-1272.
- [15] 张庆华. 枳两个基因 *PtrABF* 和 *PtrCDPK* 转化枳的抗逆功能及其作用机制解析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
- ZHANG Qinghua. Functional characterization of stress-response and elucidation of mechanism underlying the enhanced stress tolerance of *PtrABF* and *PtrCDPK* in *Poncirus trifoliata*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015.
- [16] XUE T T, WANG D, ZHANG S Z, EHLTING J, NI F, JAKAB S, ZHENG C C, ZHONG Y. Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and *Arabidopsis*[J]. BMC Genomics, 2008, 9(1): 550-570.
- [17] 严佳文. 柑橘内参基因筛选及转 *pthA* 基因甜橙的表达分析[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2010.
- YAN Jiawen. Selection of reference genes in citrus and expression of *pthA* gene in transgenic sweet orange[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2010.
- [18] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [19] KHAN N, KE H, HU C M, NASERI E, HAIDER M S, AYAZ A, AMJAD K W, WANG J J, HOU X L. Genome-wide identification, evolution, and transcriptional profiling of $PP2C$ gene family in *Brassica rapa*[J]. BioMed Research International, 2019 (2019): 2965035.
- [20] YANG Q, LIU K, NIU X C, WANG Q, WAN Y Q, YANG F Y, LI G J, WANG Y F, WANG R G. Genome-wide identification of $PP2C$ genes and their expression profiling in response to drought and cold stresses in *Medicago truncatula*[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 12841.
- [21] 阮城城, 胡福初, 罗志文, 王祥和, 郭利军, 李玉静, 范鸿雁, 韩冰, 陈哲, 张治礼. 菠萝 *TCP* 基因家族的鉴定及成花诱导阶段的表达谱分析[J]. 果树学报, 2020, 37(11): 1623-1635.
- RUAN Chengcheng, HU Fuchu, LUO Zhiwen, WANG Xianghe, GUO Lijun, LI Yujing, FAN Hongyan, HAN Bing, CHEN Zhe, ZHANG Zhili. Genome-wide identification of pineapple *TCP* gene family and analysis of expression profile in flower induction stage[J]. Journal of Fruit Science, 2020, 37(11): 1623-1635.
- [22] 张春玲, 周李杰, 王桂来, 李媛媛, 王小非, 郝玉金. 苹果蛋白磷酸酶基因 *MdPP2C-Like* 的克隆及其对 ABA 的响应分析[J]. 园艺学报, 2018, 45(7): 1225-1236.
- ZHANG Chunling, ZHOU Lijie, WANG Guijuan, LI Yuanyuan, WANG Xiaofei, HAO Yujin. Molecular cloning of protein phosphatase gene *MdPP2C-Like* in apple and the response analysis of ABA[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2018, 45(7): 1225-1236.
- [23] HAIDER M S, KHAN N, PERVAIZ T, LIU Z J, NASIM M, JOGAIH S, MUSHTAQ N, JIU S T, FANG J G. Genome-wide identification, evolution, and molecular characterization of the $PP2C$ gene family in woodland strawberry[J]. Gene, 2019, 702: 27-35.
- [24] 刘耀东, 肖书雅, 王安虎, 刘宇, 方阳, 李小意, 刘志斌, 李旭峰, 王健美, 杨毅. 苦荞蛋白磷酸酶 2C 家族的鉴定及表达分析[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2021, 58(4): 163-171.
- LIU Yaodong, XIAO Shuya, WANG Anhu, LIU Yu, FANG Yang, LI Xiaoyi, LIU Zhibin, LI Xufeng, WANG Jianmei, YANG Yi. Genome-wide identification and expression analysis of protein phosphatase 2C family in *Tartary buckwheat*[J]. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 2021, 58 (4): 163-171.
- [25] 种康, 王台, 钱前, 王小菁, 左建儒, 顾红雅, 姜里文, 陈之端, 白永飞, 杨淑华, 孔宏智, 陈凡, 萧浪涛. 2014 年中国植物科学若干领域重要研究进展[J]. 植物学报, 2015, 50(4): 412-459.
- CHONG Kang, WANG Tai, QIAN Qian, WANG Xiaojing, ZUO Jianru, GU Hongya, JIANG Liwen, CHEN Zhiduan, BAI Yongfei, YANG Shuhua, KONG Hongzhi, CHEN Fan, XIAO Langtao. Research advances on plant science in China in 2014[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2015, 50(4): 412-459.
- [26] 杜驰, 张富春. 植物蛋白磷酸酶 2C 在非生物胁迫信号通路中的调控作用[J]. 生物技术通报, 2014(8): 16-22.
- DU Chi, ZHANG Fuchun. Protein phosphatases II C in plants are involved in abiotic stress tolerance of several signaling pathways[J]. Biotechnology Bulletin, 2014(8): 16-22.
- [27] SCHWEIGHOFER A, HIRT H, MESKIENE I. Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling[J]. Trends in Plant Science, 2004, 9(5): 236-243.
- [28] BHASKARA G B, WEN T N, NGUYEN T T, VERSLUES P E. Protein phosphatase 2Cs and *Microtubule-Associated Stress Protein 1* control microtubule stability, plant growth, and drought response[J]. The Plant Cell, 2017, 29(1): 169-191.
- [29] SHAZADEE H, KHAN N, WANG J J, WANG C C, ZENG J G, HUANG Z Y, WANG X Y. Identification and expression profiling of protein phosphatases ($PP2C$) gene family in *Gossypium hirsutum* L.[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20: 1395-1411.