

## 木薯 *MePP2C<sub>Ab</sub>* 基因克隆及表达分析

王舒婷<sup>1</sup>, 杨静琳<sup>1</sup>, 林 埏<sup>1</sup>, 李丽珍<sup>1</sup>, 刘博婷<sup>1</sup>, 吴春来<sup>2</sup>, 曾 坚<sup>1\*</sup>, 胡 伟<sup>2</sup>

1. 韶关学院广东省粤北食药资源利用与保护重点实验室/英东生物与农业学院, 广东韶关 512005; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101

**摘要:** 2C型蛋白磷酸酶 (protein phosphatase 2C, PP2C) 在 ABA 核心信号途径中发挥着重要作用。为了研究 *PP2C* 基因在木薯响应非生物胁迫过程中的功能, 本研究通过 RT-PCR 技术, 从木薯 Arg7 中克隆得到 *MePP2C<sub>Ab</sub>* 基因, 并对其进行了生物信息学分析、自激活活性分析、启动子活性分析及不同逆境和激素处理下的表达模式分析。结果表明: (1) *MePP2C<sub>Ab</sub>* 基因的长度为 1296 bp, 包含 431 个氨基酸残基, 蛋白相对分子量和理论等电点分别为 47.08 kDa 和 5.5, 具有 PP2C 家族的结构域特征。蛋白质序列比对结果显示, *MePP2C<sub>Ab</sub>* 与橡胶树和麻风树的 PP2C 序列最为相似, 一致性分别为 82.75% 和 74.01%, 在 C-端保守。上述结果证明 *MePP2C<sub>Ab</sub>* 基因属于 PP2C 家族。(2) *MePP2C<sub>Ab</sub>* 基因在木薯块根中的表达最高。(3) *MePP2C<sub>Ab</sub>* 具有一定的自激活活性, *MePP2C<sub>Ab</sub>* 基因的全长启动子的活性也较高。(4) *MePP2C<sub>Ab</sub>* 基因属于 ABA 核心通路, 启动子序列分析显示, 它包含 ABRE (abscisic acid responsiveness) 元件、MeJA 响应原件、干旱诱导元件 (drought-induced motif) 等元件。不同逆境和激素处理的结果也表明, *MePP2C<sub>Ab</sub>* 基因在冷处理和 SA 处理下受到抑制, 在 NaCl、mannitol、ABA 和 MeJA 处理的过程中受到诱导。另外酵母双杂交结果显示 *MePP2C<sub>Ab</sub>* 能够与 MePYL1 产生互作。根据上述结果推测, *MePP2C<sub>Ab</sub>* 基因可能对木薯的非生物胁迫有响应, 但其到底是正调控因子还是负调控因子尚不清楚。该结果为进一步研究解析 *MePP2C<sub>Ab</sub>* 基因在 ABA 信号通路中的作用及提高木薯在非生物胁迫中的适应能力提供参考。

**关键词:** 木薯; ABA; PP2C; 非生物胁迫

**中图分类号:** S533 **文献标识码:** A

## Cloning and Expression Analysis of *MePP2C<sub>Ab</sub>* Gene in Cassava

WANG Shuting<sup>1</sup>, YANG Jinglin<sup>1</sup>, LIN Man<sup>1</sup>, LI Lizhen<sup>1</sup>, LIU Boting<sup>1</sup>, WU Chunlai<sup>2</sup>, ZENG Jian<sup>1\*</sup>, HU Wei<sup>2</sup>

1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Utilization and Conservation of Food and Medicinal Resources in Northern Region / Henry Fok School of Biology and Agriculture, Shaoguan University, Shaoguan, Guangdong 512005, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Haikou, Hainan 571101, China

**Abstract:** Protein phosphatase 2C (PP2C) plays a key role in the ABA signaling pathway. In order to investigate the response process of the *PP2C* gene to abiotic stress in cassava, *MePP2C<sub>Ab</sub>* gene was cloned from Arg7 in cassava using the RT-PCR technique. Bioinformatic analysis, autoactivation activity analysis, promoter activity analysis, and expression pattern analysis of the *MePP2C<sub>Ab</sub>* gene under different stress and hormone treatments were conducted. The results showed that (1) the total length of the *MePP2C<sub>Ab</sub>* gene was 1296 bp, encoding 431 amino acid residues. The *MePP2C<sub>Ab</sub>* protein had a relative molecular weight of 47.08 kDa and a theoretical isoelectric point of 5.5. It exhibited structural domain characteristics of the PP2C family. Protein sequence analysis showed that *MePP2C<sub>Ab</sub>* was most similar to PP2C sequences of *Hevea rubber* and *Jatropha jatropha*, with consistencies of 82.75% and 74.01%, respectively, and a conserved C-terminal. These results indicated that *MePP2C<sub>Ab</sub>* belongs to the PP2C family. (2) The expression of the *MePP2C<sub>Ab</sub>* gene was found to be higher in cassava storage roots, stems, and leaves, with the highest expres-

**收稿日期** 2023-06-28; **修回日期** 2023-07-19

**基金项目** 广东省基础与应用基础研究基金项目 (No. 2023A1515010336); 广东省普通高校重点领域专项 (No. 2022ZDZX4047); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (No. 202310576009)。

**作者简介** 王舒婷 (2002—), 女, 本科生, 研究方向: 植物基因功能。\*通信作者 (Corresponding author): 曾 坚 (ZENG Jian), E-mail: zengjian@sgu.edu.cn。

sion observed in storage roots. (3) *MePP2CAB* demonstrated self-activation activity, and its full-length promoter exhibited high activity. (4) The *MePP2CAB* gene belongs to the core ABA pathway, and promoter sequence analysis showed that it contained ABRE (abscisic acid responsiveness) elements, MeJA response elements, and a drought-induced motif. Under different stress and hormone treatments, low temperature and SA treatment significantly repressed the *MePP2CAB* gene, while mannitol, NaCl, ABA, and MeJA significantly induced its expression. In addition, the interaction between *MePP2CAB* and *MePYL1* was also observed. These results suggest that *MePP2CAB* may be responsive to abiotic stress in cassava, although its role as a positive or negative regulatory factor remains unclear. These results provide a clue for further investigation into the role of the *MePP2CAB* gene in the ABA signaling pathway and the improvement of cassava's adaptation to abiotic stress.

**Keywords:** cassava; ABA; PP2C; abiotic stress

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.12.004

脱落酸 (abscisic acid, ABA) 在植物的种子萌发、生长、开花和果实成熟等过程中发挥重要作用, 并且也参与植物对非生物和生物胁迫等逆境响应<sup>[1-5]</sup>。2009 年, 科学家们在拟南芥中阐明了 ABA 信号转导的核心通路, 包括 ABA 受体 PYR/PYL/RCARs、A 类蛋白磷酸酶 2Cs 以及蛋白激酶 SnRK2s<sup>[6]</sup>。

干旱是对农业生产产生重要影响的因素之一, 它会对作物的生长产生影响, 从轻微的产量下降到严重的作物绝收<sup>[7-8]</sup>。植物对非生物胁迫的响应主要通过激素实现, 其中 ABA 是应对干旱胁迫的重要激素<sup>[9]</sup>。当遭受干旱胁迫时, 植物体内的 ABA 含量增加, 而 ABA 的增加会影响许多基因的表达, 包括 ABA 依赖途径和非依赖途径, 其中 ABREs 是 ABA 依赖途径中的关键反应元件<sup>[10-12]</sup>。研究表明, ABA 信号传导途径中的 PP2C A 亚家族成员通常作为负调节因子<sup>[6, 13]</sup>, 该基因家族已在水稻、拟南芥、玉米、油菜和棉花等物种中被鉴定出来<sup>[14-18]</sup>。拟南芥的 PP2C A 亚家族基因突变体 *abi1/abi2/hab1/pp2ca* 会负调控 ABA 信号<sup>[19-22]</sup>。此外, 在拟南芥中过表达玉米 *ZmPP2C*、*ZmPP2c-A10* 基因和杨树 *PP2C* 基因也可负调控 ABA 信号, 从而降低转基因拟南芥对高盐和干旱胁迫的耐受性<sup>[23-25]</sup>。

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 是一种重要的粮食作物, 在热带和亚热带地区广泛种植, 被全球公认为第六大粮食作物, 为近 10 亿人提供碳水化合物<sup>[26-27]</sup>。木薯具备抗旱特性, 因此可作为研究抗旱机制的典型材料<sup>[28]</sup>。目前, 关于木薯中 PP2C 基因家族的研究还非常有限<sup>[29]</sup>。因此, 为了深入研究 PP2C 基因在木薯抗逆过程中的功能, 本研究克隆了 *MePP2CAB* 基因, 对其编码蛋白序列进行生物信息学分析。同时研究 *MePP2CAB* 基

因的启动子活性以及与 ABA 信号通路的上游成员 MePYLs 之间的相互作用。并分析 *MePP2CAB* 基因在不同逆境胁迫和激素处理下的表达模式, 为深入研究 *MePP2CAB* 基因的功能提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

木薯品种 Arg7 由中国热带农业科学院热带生物技术研究所提供。木薯 Arg7 通过茎秆插条进行繁殖, 取生长期为 60 d 且长势一致的 Arg7 幼苗, 分别进行不同处理。激素处理: 分别使用 100  $\mu\text{mol/L}$  ABA、100  $\mu\text{mol/L}$  SA、100  $\mu\text{mol/L}$  MeJA 进行喷施处理, 并在处理后的 0、2、6、12、24 h 时间点采集叶片样品; 逆境处理: 分别使用 300 mmol/L NaCl 和 200 mmol/L mannitol 进行浇灌处理, 并在处理后的 0、2、6 h 和 3、14 d 时间点采集叶片样品。4  $^{\circ}\text{C}$  处理后分别在 0、2、6、12、48 h 时间点取叶片样品。将取得的叶片样品迅速置入液氮中冷却, 并保存在  $-80^{\circ}\text{C}$  的冰箱中备用。

主要试剂: DNA 回收纯化试剂盒、质粒提取试剂盒、pMD18-T 载体、荧光定量 PCR 反应试剂、反转录试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司, 感受态细胞 (农杆菌 GV3101 和大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ) 购自诺唯赞生物科技有限公司, 2 $\times$ Taq Master Mix 酶、Nimble Clonig 克隆试剂盒和 T<sub>4</sub> 连接酶购买自海南壹田生物科技有限公司, 限制性核酸内切酶购买自 Thermo Fisher Scientific。pGBKT7 和 pGreenII 0800-LUC 表达载体保存在本课题组实验室。仪器设备: PCR 仪 (耶拿, 德国), EPS300 电泳仪 (Tanon, 上海), 4100 凝胶成像仪 (Tanon, 上海), MX3000 荧光定量 PCR 仪 (安捷伦, 美国), 超微量紫外分光光度计

(Thermo, 美国), CT15RT 高速冷冻离心机 (TECHCOMP, 中国)。

## 1.2 方法

1.2.1 启动子的活性分析 采用农杆菌转化法将载体 pGreenII 0800-LUC-MePP2CAB 转化至 GV3101 感受态细胞, 获得阳性转化子后, 调整菌体的 OD<sub>600</sub> 至 1.0, 使用 1 mL 注射器, 将其注射至生长 2 个月左右的烟草嫩叶叶片下表皮, 注射后培养 3 d, 随后测定双荧光素酶含量, 进行 LUC/REN 计算 (6 个重复)。

1.2.2 生物信息学分析 通过 ExPASy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件分析基因编码蛋白的理化性质, 结构预测使用 SOPMA 软件和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 在线软件, 使用 BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 和 MEGA-5 软件进行搜索和同源序列比对, Neighbor-joining 法构建系统发育树 (Bootstrap 值设定为 1000)。

1.2.3 基因表达分析 根据 *MePP2CAB* 序列设计荧光定量引物 (表 1), 并选择木薯 *MeTUB* 基因作为内参基因, 使用 qRT-PCR 技术对不同处理下的 *MePP2CAB* 基因表达模式进行分析 (3 次生物学重复)。相对表达量的计算采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法<sup>[26]</sup>。

1.2.4 酵母双杂交 首先进行自激活分析, 使用 PEG 诱导方法, 将载体 pGBKT7-MePP2CAB 转化到酵母中, 取 200  $\mu$ L 涂板至一缺培养基 (SD/-Trp), 在 29  $^{\circ}$ C 培养 48~96 h, 从 SD/-Trp 培养基上挑取长势较好的单菌落, 使用 PCR 法验证阳性转化子, 用液体 SD/-Trp 培养基活化阳性转化子菌落, 用 ddH<sub>2</sub>O 稀释至合适浓度, 取 2  $\mu$ L 菌落水溶液分别点到 SD/-Trp、SD/-His 和 SD/-His/+x-a-gal 培养基上, 于 29  $^{\circ}$ C 培养, 观察生长状况。根据相关基因的上下游互作关系, 它们被分别构建到 pGADT7 和 pGBKT7 载体中, 并提取阳性重组克隆菌液的质粒。以 pGADT7-T 和 pGBKT7-53 作为阳性对照, pGADT7-T 和 pGBKT7-Lam 作为阴性对照, 将阳性对照质粒组合、阴性对照质粒组合以及构建的重组质粒组合两两转化到 AH109 酵母感受态中培养观察基因编码蛋白的互作情况。挑取二缺培养基 (LT/-Trp/-Leu) 上的长势较好的单菌落, 使用 PCR 法验证阳性转化子; 用液体 (LT/-Trp/-Leu) 培养基活化阳性转化子菌落, 挑取原始菌落, 然后按梯度稀释, 即 1 和 10<sup>-1</sup>; 吸取菌落水溶液 2  $\mu$ L, 分别点到二缺和四缺培养基 (LTAH/-Trp/-Leu/-Ade/-His) 上, 于 29  $^{\circ}$ C 培养, 观察生长状况。

表 1 本研究所用引物序列  
Tab. 1 Primers sequence used in the study

引物名称 Primer name	上游引物 (5'-3') Forward primer (5'-3')	下游引物 (5'-3') Reverse primer (5'-3')	用途 Usage
MePP2CAB	ATGGCTGGAATTTGTTGTGA	TGATGATGCCGGTTGATTCCTC	For cloning vector
MePP2CAB	CGACGGAGATGATAAGAAC	GGAGGAAAGAGGGATAGC	For qRT-PCR
MeTUB	TGCCATGTTCCTGGAAAGATG	CCCCTAGGTGGAATGTCACAGACAC	For qRT-PCR
BD MePP2CAB	GGAATTCATGGCTGGAATTTGTTGTGA	CGGGATCCTGATGATGCCGGTTGATTCCTC	For yeast two-hybrid assay
AD MePP2CAB	GGAATTCATGGCTGGAATTTGTTGTGA	CGGGATCCTGATGATGCCGGTTGATTCCTC	For yeast two-hybrid assay
BD MePYL1	GGAATTCATATGATGATAGAAAAGCTTGAGG	CGGGATCCGATGCAATTAATGGGCTCAGTC	For yeast two-hybrid assay
BD MePYL2	GGAATTCATGATTCTTGATCTTAACCTC	CGGGATCCAGATGATGATGATGATTG	For yeast two-hybrid assay
BD MePYL3	GGAATTCATGGAGAAGCCAGAGTCCTCA	CGGGATCCAATTACCTGCGATTTCCGTCAC	For yeast two-hybrid assay
BD MePYL4	GGAATTCATATGATGCCTTCTAATCCTCACAAG	CGGGATCCCGATGATGATGATTGTTTCTG	For yeast two-hybrid assay

## 2 结果与分析

### 2.1 *MePP2CAB* 基因克隆

在鉴定木薯的 PP2C A 亚基因家族时, 课题组发现其中 1 个基因序列 Manes.07G119400 显著受到 ABA 和 PEG 处理的诱导 (图 1)。基于该序列,

设计引物并成功扩增出 1 个 1296 bp 的片段 (图 2)。测序结果显示, 该序列编码的氨基酸残基数量为 431, 命名为 *MePP2CAB* 基因。*MePP2CAB* 蛋白的分子式为 C<sub>2004</sub>H<sub>3254</sub>N<sub>596</sub>O<sub>657</sub>S<sub>27</sub>, 相对分子量为 47.08 kDa, 理论等电点为 5.5, 不稳定系数

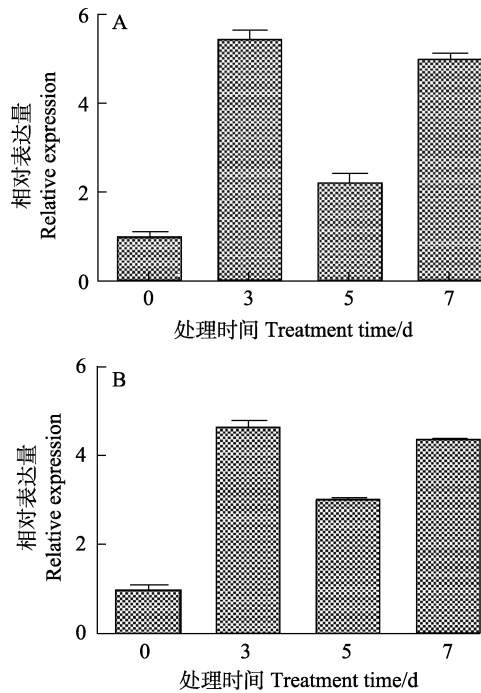
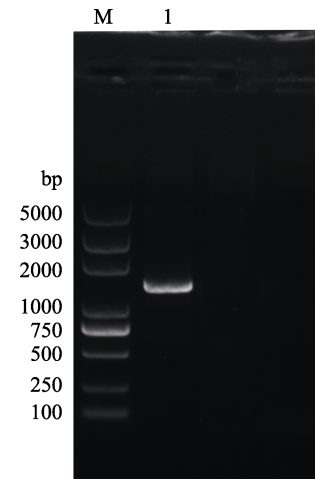


图 1 *MePP2CAb* 基因在 ABA (A) 和 PEG (B) 处理下的表达分析

Fig. 1 Expression level of *MePP2CAb* under ABA (A) and PEG (B) treatment

(46.66) 显示它为不稳定蛋白。根据木薯基因组

序列, *MePP2CAb* 基因包含 4 个外显子和 3 个内含子。二级结构预测显示, *MePP2CAb* 蛋白的无规则卷曲占比 42.92%,  $\alpha$ -螺旋占比 37.12%, 延伸链占比 13.23%,  $\beta$ -转角占比 6.73%。保守结构域预测显示, *MePP2CAb* 蛋白含有 PP2C 家族结构域(图 3)。以上预测结果表明 *MePP2CAb* 基因属于 PP2C 基因家族的成员。



M: DL5000 DNA marker.

图 2 *MePP2CAb* 基因扩增结果

Fig. 2 PCR amplification result of *MePP2CAb* gene

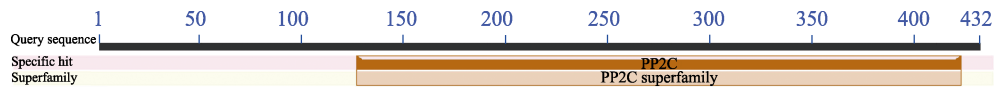


图 3 *MePP2CAb* 结构域分析

Fig. 3 Analysis of conserved domain of *MePP2CAb*

## 2.2 *MePP2CAb* 蛋白的序列比对和系统发育分析

通过在 NCBI 数据库中使用 blastp 方法, 本研究获得了与 *MePP2CAb* 蛋白序列相似性较高 (>65%) 的其他 PP2C 基因的蛋白序列。蛋白序列比对结果显示, 与 *MePP2CAb* 的一致性最高的是橡胶树中的 PP2C 基因 (XP\_021656015.1), 达到 82.75%, 其次是麻疯树 (XP\_012088646.1), 一致性为 74.01%。*MePP2CAb* 蛋白序列与其他 PP2C 基因蛋白序列具有较高的保守性, 尤其是在 C 端 (图 4)。进化分析结果进一步证实, *MePP2CAb* 与 HbPP2C24 处于同一分支 (图 5), 木薯和橡胶树均属于大戟科植物, 进一步证明 PP2C 蛋白氨基酸序列具有高度保守性。

## 2.3 *MePP2CAb* 基因的表达分析

为了分析 *MePP2CAb* 基因在木薯不同组织中的表达水平, 本研究对木薯的根、茎、叶等 3 种

组织中 *MePP2CAb* 基因的表达模式进行分析。如图 6 所示, *MePP2CAb* 基因在叶和茎中的表达量相似, 而在根中的表达量最高。

其次, 对 *MePP2CAb* 基因在不同胁迫和激素处理下的表达情况进行分析。在 NaCl 处理下, *MePP2CAb* 基因的表达量先增加, 在 6 h 达到最高水平后逐渐降低 (图 7A); 在 mannitol 处理下, *MePP2CAb* 基因的表达量在 2 h 时达到最高水平 (图 7B); 而在冷处理下, *MePP2CAb* 基因的表达量受到抑制 (图 7C)。在 MeJA 处理下, *MePP2CAb* 基因的表达量随着处理时间的增加先增加, 在 6 h 达到最高水平后逐渐降低 (图 7D); 在 ABA 处理下, *MePP2CAb* 基因的表达量在 24 h 达到最高水平 (图 7E); 然而, 在 SA 处理下, *MePP2CAb* 基因的表达量在所有处理时间点均被抑制 (图 7F)。以上结果表明, *MePP2CAb* 基因在冷处理和 SA 处理下受到抑制, 在 NaCl、



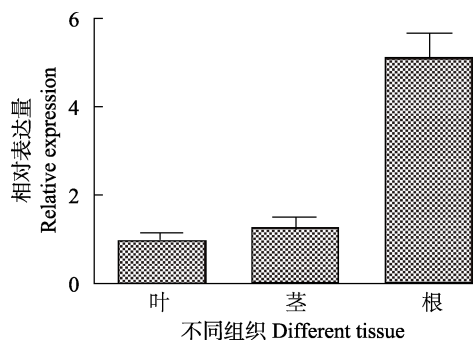


图 6 *MePP2C<sub>ab</sub>* 在不同组织中的表达量

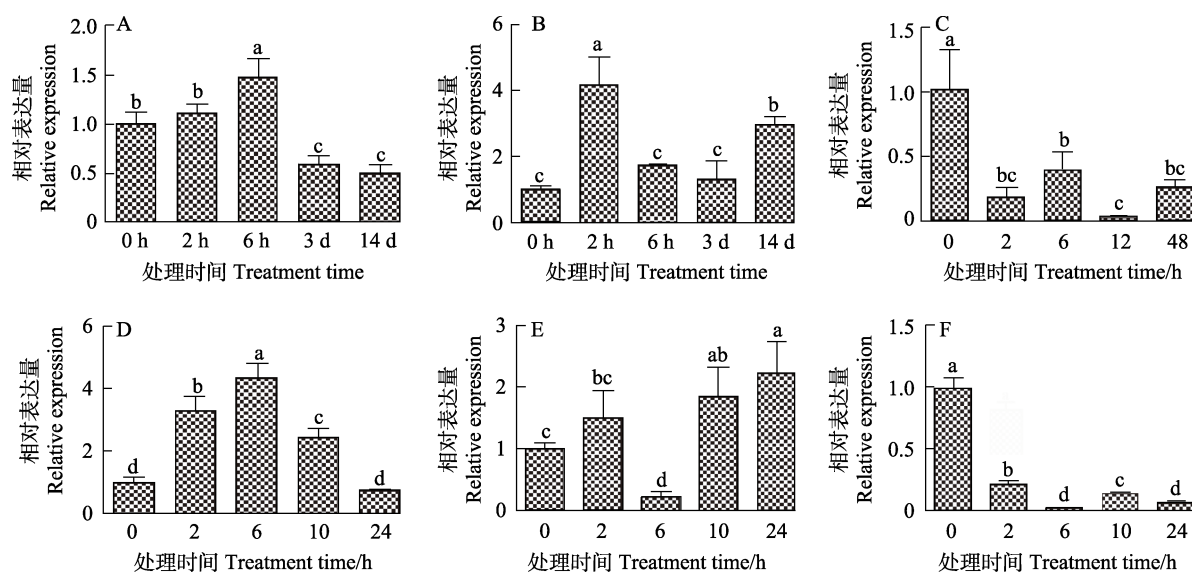
Fig. 6 *MePP2C<sub>ab</sub>* expression in different tissues

中,并使用双荧光素酶测定试剂盒测定 *MePP2C<sub>ab</sub>*

基因启动子活性。结果显示, *MePP2C<sub>ab</sub>* 基因的全长启动子具有较高的活性(图 8B)。

## 2.5 酵母双杂交互作初步验证 *MePP2C<sub>ab</sub>* 基因参与 ABA 信号通路

为了验证 *MePP2C<sub>ab</sub>* 是否具有自激活能力,本研究将其构建到 pGBKT7 载体上,并进行验证。结果如图 8C 所示, pGBKT7-*MePP2C<sub>ab</sub>* 在一缺培养基 (SD/-Trp 和 SD/-His) 上正常生长,并在 SD/-His/x-a-gal 培养基上呈现出蓝色。结果表明, *MePP2C<sub>ab</sub>* 具有一定的自激活活性。因此,后续的酵母双杂实验需将其构建至 pGADT7 载体。



A: NaCl 处理; B: Mannitol 处理; C: 冷处理; D: MeJA 处理; E: ABA 处理; F: SA 处理。

不同小写字母表示处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

A: NaCl treatment; B: Mannitol treatment; C: Cold treatment; D: MeJA treatment; E: ABA treatment; F: SA treatment.

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ( $P < 0.05$ ).

图 7 *MePP2C<sub>ab</sub>* 基因在不同处理下的表达分析

Fig. 7 *MePP2C<sub>ab</sub>* expression under different treatments

在 ABA 信号转导途径中, PYLs 位于 PP2C A 亚家族的上游, 为了证明 *MePP2C<sub>ab</sub>* 参与 ABA 信号通路, 本研究克隆了 *MePYL1~MePYL4* 基因, 并将其连接至 pGBKT7 载体上。通过验证 PYLs 与 PP2C A 之间的相互作用关系, 结果如图 8D 所示, 所有组合在二缺培养基上都能正常生长; 在四缺培养基上, *MePP2C<sub>ab</sub>*+*MePYL1* 和 pGADT7-T+pGBKT7-53 阳性对照有菌落形成; 而 *MePP2C<sub>ab</sub>*+*MePYL2* / *MePYL3* / *MePYL4* 组合及 pGADT7-T+pGBKT7-Lam 阴性对照则没有菌落形成。初步推测 *MePP2C<sub>ab</sub>* 与 ABA 信号通路上游成分 *MePYL1* 存在相互作用关系。

## 3 讨论

UMEZAWA 等<sup>[6]</sup>在拟南芥中首次确认了 ABA 受体及其核心信号转导通路, 包括 PYR/PYL/RCARs (ABA 受体)、A 类 PP2Cs (蛋白磷酸酶) 和 SnRK2s (蛋白激酶)。ABA 作为植物响应非生物胁迫的关键激素, 使得研究 A 类 PP2Cs 基因的功能显得十分重要。

### 3.1 *MePP2C<sub>ab</sub>* 基因的结构与亲缘关系

本研究成功克隆了 PP2C A 亚家族成员 *MePP2C<sub>ab</sub>* 基因, 其位于木薯 7 号染色体上, 并包含 4 个外显子。通过与多个物种中 PP2C 的氨基酸序列比对分析, 发现 *MePP2C<sub>ab</sub>* 基因在 C 端

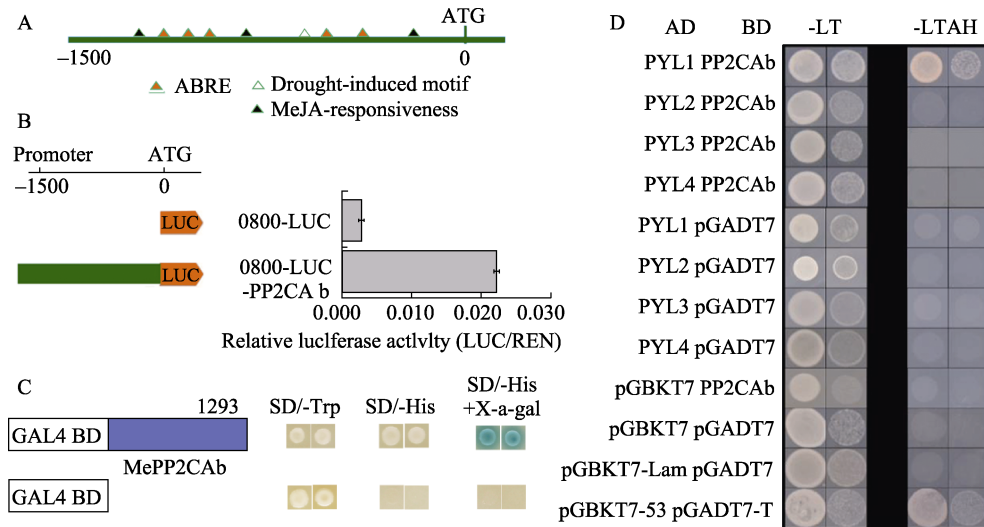


图 8 *MePP2CAB* 基因的启动子活性分析及其酵母双杂交筛选上游互作蛋白  
Fig. 8 Analysis of *MePP2CAB* gene promoter activity and yeast two-hybrid screening for upstream interacting proteins

具有保守性<sup>[9]</sup>。此外, *MePP2CAB* 与 *HbPP2C* 和 *JcPP2C* 在亲缘关系上较为接近, 进一步证明 *MePP2CAB* 属于 PP2C 家族基因。

### 3.2 *MePP2CAB* 基因在木薯不同组织中的表达模式

木薯作为热区的重要粮食和经济作物, 具有耐贫瘠和抗旱的特性。ABA 在植物应对非生物逆境的过程中扮演着重要角色, 而 PP2C 则是 ABA 信号转导通路的核心组成成分<sup>[6]</sup>。*MePP2CAB* 基因在 *Agr7* 的根、茎和叶中的表达水平都较高, 其中根中的表达水平最高, 这表明 *MePP2CAB* 基因可能参与根的生长发育。有研究显示, *TaPP2C-a10* 和 *AanPP2C1* 基因分别在小麦和青蒿的不同组织中均有表达<sup>[30-31]</sup>。

### 3.3 A 类 PP2C 基因的功能研究

已有研究表明, 在拟南芥中的 A 类 PP2C 基因通常扮演负调控 ABA 信号的角色, 其中一些基因参与氧化胁迫的响应, 而 *AHG3* 参与抗冷胁迫<sup>[32-34]</sup>。玉米中的 *ZmPP2CA* 负调控干旱, 而 *ZmPP2C2* 则可增强植物的抗寒能力<sup>[23-24]</sup>。此外, 水稻中的 A 类 PP2C 基因也能响应多种非生物逆境<sup>[15]</sup>。本研究结果显示, *MePP2CAB* 基因可被 mannitol、NaCl、ABA 和 MeJA 诱导, 但受 SA 和低温抑制。在拟南芥中, A 类 PP2C 家族基因通常被视为 ABA 信号途径的负调控因子, 但过表达 *FsPP2C2* 和

*AtPP2CG1* 基因可增强植株对逆境胁迫的耐受能力和对 ABA 信号的敏感性<sup>[35-36]</sup>。上述研究揭示了 A 类 PP2C 基因在不同植物和不同逆境条件下的功能差异。通常情况下, ABA 主要在植物体内的根部和受胁迫的叶片中合成。然而, 在本研究中, 研究人员仅选择了叶片样品来检测 *MePP2CAB* 基因的表达量, 而忽略了其在根部高表达的情况, 这种方法可能会限制对 *MePP2CAB* 基因在不同处理条件下表达模式的全面理解。为了更好地解释研究结果, 后续研究将对根部中 *MePP2CAB* 基因在不同处理条件下的表达模式进行分析。通过进行全面表达模式分析, 可以更全面地了解 *MePP2CAB* 基因在逆境处理中的响应, 有助于揭示 *MePP2CAB* 基因在植物逆境响应中的具体作用, 并提供更准确解释相关现象的线索。酵母双杂交实验观察到 *MePP2CAB* 与 *MePYL1* 蛋白存在互作, 进一步证明 *MePP2CAB* 属于 PP2C A 亚家族并参与 ABA 信号转导, 推测 *MePP2CAB* 基因可能通过 ABA 信号通路响应非生物胁迫, 但其具体是正调控因子还是负调控因子尚不明确。该研究结果为进一步研究 *MePP2CAB* 基因在 ABA 信号通路中的作用及提高木薯在非生物胁迫中的适应能力提供参考。

致谢 感谢李丹丹女士在论文撰写过程中的校对工作。

## 参考文献

- [1] FENG C Z, CHEN Y, WANG C, KONG Y H, WU W H, CHEN Y F. *Arabidopsis* RAV1 transcription factor, phosphorylated by SnRK2 kinases, regulates the expression of ABI3, ABI4, and ABI5 during seed germination and early seedling development[J]. *Plant Journal*, 2014, 80(4): 654-668.
- [2] TIJERO V, TERIBIA N, MU OZ P, MUNN-BOSCH S. Implication of abscisic acid on ripening and quality in sweet cherries: differential effects during Pre- and Post-harvest[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 602.
- [3] WASILEWSKA A, VLAD F, SIRICHANDRA C, REDKO Y, JAMMES F, VALON C, FREI DIT FREY, NLEUNG J. An update on abscisic acid signaling in plants and more[J]. *Molecular Plant*, 2008, 1(2): 198-217.
- [4] BEN-ARI G. The ABA signal transduction mechanism in commercial crops: learning from *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell Reports*, 2012, 31(8): 1357-1369.
- [5] CHEN K, LI G J, BRESSAN R A, SONG C P, ZHU J K, ZHAO Y. Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2020, 62(1): 25-54.
- [6] UMEZAWA T, NAKASHIMA K, MIYAKAWA T, KUROMORI T, TANOKURA M, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2010, 51(11): 1821-1839.
- [7] HLAVINKA P, TRNKA M, SEMER DOV D, DUBROVSK M, ŽALUD Z, MOŽN M. Effect of drought on yield variability of key crops in Czech Republic[J]. *Agricultural and Forest Meteorology*, 2009, 149(3): 431-442.
- [8] DIETZ K J, Z RB C, GEILFUS C M. Drought and crop yield[J]. *Plant Biology*, 2021, 23(6): 881-893.
- [9] AGATA DASZKOWSKA-GOLEC A, SZAREJKO I. The molecular basis of ABA-Mediated plant response to drought, in abiotic stress[M]. Rijeka: IntechOpen, 2013: 103-134.
- [10] ASSMANN S M. OPEN STOMATA1 opens the door to ABA signaling in *Arabidopsis* guard cells[J]. *Trends in Plant Science*, 2003, 8(4): 151-153.
- [11] SEKI M, ISHIDA J, NARUSAKA M, FUJITA M, NANJO T, UMEZAWA T, KAMIYA A, NAKAJIMA M, ENJU A, SAKURAI T, SATOU M, AKIYAMA K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, CARNINCI P, KAWAI J, HAYASHIZAKI Y, SHINOZAKI K. Monitoring the expression pattern of around 7000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray[J]. *Functional and Integrative Genomics*, 2002, 2(6): 282-291.
- [12] WANG Y, FAN J, WU X, GUAN L, LI C, GU T, LI Y, DING J. Genome-wide characterization and expression profiling of HD-Zip genes in ABA-mediated processes in *Fragaria vesca*[J]. *Plants (Basel)*, 2022, 11(23): 3367
- [13] SHAZADEE H, KHAN N, WANG L, WANG X. *GhHAI2*, *GhAHG3*, and *GhABI2* negatively regulate osmotic stress tolerance via ABA-dependent pathway in cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 905181.
- [14] CAO J, JIANG M, LI P, CHU Z. 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: 175.
- [15] SINGH A, GIRI J, KAPOOR S, TYAGI A, KPANDEY G K. Protein phosphatase complement in rice: genome-wide identification and transcriptional analysis under abiotic stress conditions and reproductive development[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 435.
- [16] WEI K, PAN S. Maize protein phosphatase gene family: identification and molecular characterization[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 773.
- [17] XUE T, WANG D, ZHANG S, 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.
- [18] SHAZADEE H, KHAN N. Identification and expression profiling of protein phosphatases (PP2C) gene family in *Gossypium hirsutum* L.[J]. *International Journal of Mechanical Sciences*, 2019, 20(6): 1395.
- [19] ALLEN G J, KUCHITSU K, CHU S P, MURATA Y, SCHROEDER J I. *Arabidopsis* abi1-1 and abi2-1 phosphatase mutations reduce abscisic acid-induced cytoplasmic calcium rises in guard cells[J]. *Plant Cell*, 1999, 11(9): 1785-1798.
- [20] GOSTI F, BEAUDOIN N, SERIZET C, WEBB A A, VARTANIAN N, GIRAUDAT J. ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling[J]. *Plant Cell*, 1999, 11(10): 1897-1910.
- [21] MERLOT S, GOSTI F, GUERRIER D, VAVASSEUR A, GIRAUDAT J. The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway[J]. *Plant Journal*, 2001, 25(3): 295-303.
- [22] RUBIO S, RODRIGUES A, SAEZ A, DIZON M B, GALLE A, KIM T H, SANTIAGO J, FLEXAS J, SCHROEDER J I, RODRIGUEZ P L. Triple loss of function of protein phosphatases type 2C leads to partial constitutive response to endogenous abscisic acid[J]. *Plant Physiology*, 2009, 150(3): 1345-1355.

- [23] LIU L, HU X, SONG J, ZONG X, LI D, LI D. Over-expression of a *Zea mays* L. protein phosphatase 2C gene (*ZmPP2C*) in *Arabidopsis thaliana* decreases tolerance to salt and drought[J]. Journal of Plant Physiology, 2009, 166(5): 531-542.
- [24] XIANG Y, SUN X, GAO S, QIN F, DAI M. 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.
- [25] ARSHAD M, MATTSSON J. A putative poplar PP2C-encoding gene negatively regulates drought and abscisic acid responses in transgenic *Arabidopsis thaliana*[J]. Trees, 2014, 28(2): 531-543.
- [26] 颜彦, 铁韦韦, 丁泽红, 吴春来, 胡伟. 木薯 *MePYL8* 基因克隆及表达分析[J]. 分子植物育种, 2018, 16(14): 36-42.
- YAN Y, TIE W W, DING Z H, WU C L, HU W. Cloning and expression analysis of *MePYL8* gene in cassava[J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(14): 36-42. (in Chinese)
- [27] HU W, JI C, SHI H, LIANG Z, LI K. Allele-defined genome reveals biallelic differentiation during cassava evolution[J]. Molecular Plant, 2021, 14(6): 8651-8854.
- [28] HU W, JI C, LIANG Z, YE J, OU W, DING Z, ZHOU G, TIE W, YAN Y, YANG J, MA L, YANG X, WEI Y, JIN Z, XIE J, PENG M, WANG W, GUO A, XU B, GUO J, CHEN S, WANG M, ZHOU Y, LI X, LI R, XIAO X, WAN Z, AN F, ZHANG J, LENG Q, LI Y, SHI H, MING R, LI K. Resequencing of 388 cassava accessions identifies valuable loci and selection for variation in heterozygosity[J]. Genome Biology, 2021, 22(1): 316.
- [29] ZHAO H, WU C, YAN Y, TIE W, DING Z, LIU G, YAN W, LI Y, WANG W, PENG M, GUO J, GUO A, HU W. Genomic analysis of the core components of ABA signaling reveals their possible role in abiotic stress response in cassava[J]. Environmental and Experimental Botany, 2019, 167: 103855.
- [30] YU X, HAN J, LI L, ZHANG Q, YANG G, HE G. Wheat PP2C-a10 regulates seed germination and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. Plant Cell Reports, 2020, 39(5): 635-651.
- [31] ZHANG F, WEI Q, SHI J, JIN X, HE Y, ZHANG Y, LUO Q, WANG Y, CHANG J, YANG G, HE G. *Brachypodium distachyon* BdPP2CA6 interacts with BdPYLs and BdSnRK2 and positively regulates salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. Front Plant Science, 2017, 8: 264.
- [32] MEYER K, LEUBE M P, GRILL E. A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*[J]. Science, 1994, 264(5164): 1452-1455.
- [33] SAEZ A, APOSTOLOVA N, GONZALEZ-GUZMAN M, GONZALEZ-GARCIA M P, NICOLAS C, LORENZO O, RODRIGUEZ P L. Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling[J]. Plant Journal, 2004, 37(3): 354-369.
- [34] NISHIMURA N, YOSHIDA T, KITAHATA N, ASAMI T, SHINOZAKI K, HIRAYAMA T. ABA-hypersensitive germination1 encodes a protein phosphatase 2C, an essential component of abscisic acid signaling in *Arabidopsis* seed[J]. Plant Journal, 2007, 50(6): 935-949.
- [35] REYES D, RODRIGUEZ D, GONZALEZ-GARCIA M P, LORENZO O, NICOLAS G, GARCIA-MARTINEZ J L, NICOLAS C. Overexpression of a protein phosphatase 2C from beech seeds in *Arabidopsis* shows phenotypes related to abscisic acid responses and gibberellin biosynthesis[J]. Plant Physiology, 2006, 141(4): 1414-1424.
- [36] LIU X, ZHU Y, ZHAI H, CAI H, JI W, LUO X, LI J, BAI X. AtPP2CG1, a protein phosphatase 2C, positively regulates salt tolerance of *Arabidopsis* in abscisic acid-dependent manner[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 422(4): 710-715.