

佟晓楠, 胡文娟, 杨 杰, 等. 枳 *PtrPP2C51* 基因克隆与非生物胁迫表达分析[J]. 江苏农业科学, 2024, 52(10): 49–54.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2024.10.006

枳 *PtrPP2C51* 基因克隆与非生物胁迫表达分析

佟晓楠, 胡文娟, 杨 杰, 陈 凯, 董小筠, 钟奕恬, 张晓媛, 李兴涛

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

摘要: 克隆枳 *PP2C* 基因家族的 *PtrPP2C51* 基因, 分析其在低温、高温和干旱等胁迫下的表达规律, 探究其在非生物胁迫中的功能。以 1 年生枳苗为试材, 从嫩叶克隆到 *PtrPP2C51* 基因 cDNA 序列, 采用生物信息学方法对其进行分析, 利用实时荧光定量 PCR 仪 (qRT-PCR) 检测枳苗在低温、高温和干旱 (15% PEG-6000) 处理下的 *PtrPP2C51* 基因表达模式。克隆获得 *PtrPP2C51* 基因编码区 CDS 序列长度为 879 bp, 编码 292 个氨基酸, 其蛋白分子量为 31.36 ku, 理论等电点 4.9, 脂肪系数 79.52, 不稳定系数 39.57, 亲水性平均值 -0.279。PtrPP2C51 蛋白的二级结构中 α -螺旋、 β -转角、延伸链和无规则卷曲占比分别为 40.07%、7.88%、18.15% 和 33.90%。PtrPP2C51 蛋白与克里曼丁橘的 PP2C 蛋白在同一小分支上, 亲缘关系最近。经低温 (0℃)、高温 (38℃) 和干旱 (15% PEG-6000) 3 种不同胁迫处理, *PtrPP2C51* 基因的相对表达量均表现持续上调趋势, 并且均在处理 12 h 时表达量达到最高值。*PtrPP2C51* 基因可能参与枳的抗逆胁迫调控机制。

关键词: 枳; *PP2C* 基因; 基因克隆; 非生物胁迫

中图分类号: S666.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2024)10-0049-06

柑橘 (*Citrus reticulata* Blanco) 是我国乃至全球多个国家的主要水果栽培作物之一, 是世界第一大水果, 但柑橘在生长发育过程中十分容易受到多种非生物胁迫的不利影响。柑橘砧木的选用是柑橘生产过程中的关键, 这不仅影响柑橘的质量和产量, 其抗逆性也会受到影响。目前, 在我国柑橘产业中枳是使用最为广泛的柑橘砧木^[1], 枳对气候具有较强的适应性, 抗逆性也较强, 这也为柑橘筛选抗性基因提供了良好的材料。

蛋白磷酸酶 2C (PP2C) 是磷蛋白金属磷酸酶的一个分支, 其活性受 Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 调控, 在大多数生物体中广泛存在^[2]。植物与动物相比, 含有数量更为丰富的 PP2C 蛋白^[3]。PP2C 家族蛋白具有一致特征, 即有 11 个特异的亚结构域。植物中 PP2C 兼具多种不同功能, 这是由于植物 PP2C 蛋白的 N 端具有多功能延伸区, 在 C 端还有保守的催化结构域。研究表明, 植物中的 PP2C 家族蛋白能够参与

多种激素信号的传导, 也能对植物体内的激素水平和代谢途径产生影响^[4], 从而在干旱、盐碱和低温等环境胁迫调控中发挥作用^[5-8]。迄今为止, 已经在拟南芥、二穗短柄草、马铃薯、水稻和大豆等多种植物中开展了 PP2C 的相关研究^[2,5-6,9-10]。Xue 等对拟南芥进行鉴定得到 80 个 *PP2C* 基因家族成员, 并将其分为 13 个亚族, 其中对 A、B、C 亚族的研究较多, 对其他亚族研究的相对较少^[9]。A 亚族的 ABI1 和 ABI2 等 PP2C 蛋白依靠结合脱落酸 (ABA) 受体蛋白进而负调控 ABA 表达^[11], Gosti 等的研究表明 ABI1 和 ABI2 均参与 ABA 信号的负调控机制^[12-13], B 亚族蛋白能够传导有丝分裂原激活蛋白激酶 (MAPK) 信号, C 亚族蛋白能够调控花发育^[14], 以此说明了 *PP2C* 可以依靠信号通路的差异影响转录因子的表达, 从而参与植物逆境响应和生长发育^[13,15]。*PP2C* 基因家族成员在非生物胁迫方面有重要的调控功能。低温胁迫下, 转 *ZmPP2C2* 基因的烟草植株的抗氧化酶活性和发芽率比对照显著升高, 电解质渗透率和丙二醛含量显著降低^[16]; 对葡萄 *PP2C* 家族基因表达谱分析表明, 低温胁迫下有 7 个葡萄 *PP2C* 基因表达显著上调^[17]; 张婷婷等对铁皮石斛全基因组鉴定得到了 67 个 *DcPP2C* 基因家族成员, 选取 10 个基因进行分析, 4℃ 低温处理后, 根系有 3 个基因表达量上调, 叶

收稿日期: 2023-07-19

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 32160731); 江西省教育厅科技项目 (编号: GJJ2201233)。

作者简介: 佟晓楠 (1983—), 女, 辽宁辽阳人, 硕士, 讲师, 主要从事柑橘低温胁迫分子机制研究。E-mail: tongxn_gnnu@qq.com。

通信作者: 李兴涛, 博士, 副教授, 研究方向为果树逆境植物生理。E-mail: lixt_gnnu@qq.com。

片有 9 个基因表达量上调,对铁皮石斛 42 ℃ 高温处理后,在根系和叶片中,选取的 10 个基因均出现表达量上调^[18];Cao 等通过研究发现,对二穗短柄草进行 4 ℃ 低温和 42 ℃ 高温胁迫处理,全部 *BdPP2C* 基因均出现表达量上调^[2];对苗期的黄瓜进行干旱处理,根系、茎部和叶片的 *CsPP2C2* 都出现了上调^[19]。杨杰等在枳全基因组中鉴定得到 53 个 *PtrPP2C* 基因,分为 10 个亚族,利用 qRT-PCR 分析所有 *PtrPP2C* 基因在非生物胁迫下的表达模式,在低温、高温和干旱胁迫下,分别有 10、8、9 个基因表达量显著上调,其中较为明显的是 *PtrPP2C51*,研究还发现,其中的 A 和 F 2 个亚族在枳响应逆境胁迫中起突出作用^[20]。因此,*PP2C* 基因家族成员在非生物胁迫中起重要的调控功能。

目前,*PP2C* 基因已在拟南芥、小麦、苜蓿、玉米、白桦和茶树等多种植物中被克隆并进行了表达分析^[15-16,21-23],但涉及枳 F 亚族的 *PtrPP2C* 基因克隆及其非生物胁迫的表达研究尚未见报道。本研究以枳苗为试验材料,从嫩叶片中克隆 F 亚族的 *PtrPP2C51* 基因的 cDNA 全长序列,再进行生物信息学分析,使用 qRT-PCR 检测枳在低温、高温和干旱胁迫处理下 0、3、6、12 h 时间点 *PtrPP2C51* 基因的表达模式,为解析 *PtrPP2C51* 基因参与枳抗逆调控机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以 1 年生枳组培盆栽苗作为供试材料,培养基质为蛭石、珍珠岩和草炭以 1 : 1 : 3 的体积比混合,苗钵规格为 30 cm × 28 cm,在对其进行处理前保证

良好的生长状况。。

1.2 样品胁迫处理

挑选出生长良好的枳苗对其进行相应的处理,低温和高温胁迫处理为将枳苗放置于光照度 1 500 ~ 2 000 lx 和相对湿度 75% 的培养箱中,分别进行 0 ℃ 低温和 38 ℃ 高温处理;干旱胁迫处理为利用浓度为 15% 的 PEG-6000 溶液,将枳苗放置于装满 Hoagland 营养液的塑料容器 (36 cm × 33 cm × 26 cm) 中,并对其进行供氧,供氧使用的打氧机为 ACO-318 型 (广东海利集团有限公司)。每组处理均进行 3 次重复,并分别在 0、3、6、12 h 共 4 个时间点取枳苗嫩叶片,快速放置于 -80 ℃ 的超低温冰箱中保存以便取用。

1.3 总 RNA 提取及反转录合成 cDNA

利用 Trizol 法提取总 RNA,用超微量分光光度计 (上海元析仪器有限公司, B-500) 检测 RNA 浓度和纯度。以 cDNA 第一链合成试剂盒 (杭州新景生物试剂开发有限公司) 将合格的 RNA 模板反转录合成 cDNA。

1.4 *PtrPP2C51* 基因的克隆

利用 Primer Premier 5.0 设计全长序列扩增引物 (表 1)。以枳苗嫩叶片 cDNA 为模板,克隆 *PtrPP2C51* 基因的 cDNA 全长序列。PCR 反应体系为 25 μL,反应体系含 2 × E-Taq PCR Master Mix 12.5 μL,上下游引物均为 1 μL,cDNA 模板 1 μL,ddH₂O 9.5 μL。扩增程序为 95 ℃ 预变性 3 min; 95 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,设置 35 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。PCR 经产物电泳检测后用 AxyPrep PCR 清洁试剂盒进行胶回收,送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

表 1 *PtrPP2C51* 引物序列及用途

基因	引物序列	用途
<i>PtrPP2C51</i>	F:5'-ATTGGAAGCTGAAGCGAAACC-3';R:5'-ACACATTAACGGCCGGG-3'	cDNA 全长序列扩增
<i>qPtrPP2C51</i>	F:5'-TACAGCCACACAGACTCGGAA-3';R:5'-TGCAAACAAGTAAGCGATCACC-3'	实时荧光定量 PCR

1.5 *PtrPP2C51* 基因的实时荧光定量 PCR 检测

根据扩增获得的 *PtrPP2C51* 基因序列,使用 Beacon Designer 7.0 软件设计 qRT-PCR 引物 *qPtrPP2C51*-F 和 *qPtrPP2C51*-R (表 1)。以枳苗嫩叶片 cDNA 为模板,使用 Light Cycler® 96 Real-Time PCR System 仪器进行 qRT-PCR 检测。反应体系 10 μL:2 × SYBR Green PCR Mix (杭州新景生物试剂开发有限公司) 5 μL,ddH₂O 和模板 cDNA 各

2 μL,15 μmol/L 正反向引物各 0.5 μL,每个样本 3 个重复。扩增程序为 94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 20 s,58 ℃ 退火 20 s,72 ℃ 延伸 30 s,35 个循环。以柑橘 *ACTB* 基因为内参基因^[24]。

1.6 生物信息学分析

使用 ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析 *PtrPP2C51* 蛋白理化性质;使用 WoLF PSORT (<https://psort.hgc.jp/>) 预测

PtrPP2C51 蛋白亚细胞定位;通过 ProtScale 分析 PtrPP2C51 蛋白的疏水性;利用 SOPMA 和 SWISS - MODEL 在线软件分别对 PtrPP2C51 蛋白二级、三级结构进行分析;通过 Jalview 对 *PtrPP2C51* 基因序列进行比对;从 NCBI 数据库下载与 PtrPP2C51 蛋白不同物种的同源氨基酸序列,使用 MEGA 7.0 中的邻接法(neighbor - joining method)生成系统发育进化树,Bootstrap 位置为 1 000,其他条件为默认。

1.7 统计分析

PtrPP2C51 基因的相对表达量计算利用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法^[25],基因表达量间的显著性分析使用 SPSS 21.0 软件,使用 Excel 2016 作图。

2 结果与分析

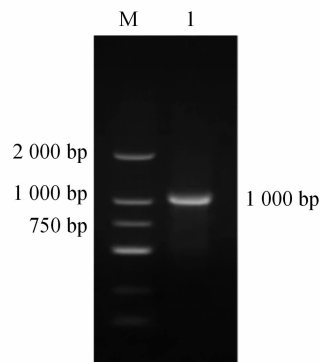
2.1 *PtrPP2C51* 基因的克隆

利用 *qPtrPP2C51* 基因上下游引物,以枳苗嫩叶片 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增得到的结果如图 1 所示,大小约 1 000 bp,与预期结果 1 006 bp 相符。测序结果表明,编码序列(CDS)全长为 879 bp,编码 292 个氨基酸,对其命名为 *PtrPP2C51*。

2.2 *PtrPP2C51* 基因的序列比对

将测序获得的 *PtrPP2C51* 基因序列在 NCBI 上进行 Blastx 比对,获得与之编码蛋白序列相同的一条克里曼丁橘蛋白序列(GenBank 登录号为 XP_

006450232.1,对应基因序列登录号为 XM_006450169.2),通过 Jaiview 软件比对其 CDS 序列,发现两序列共有 6 处不同,分别处于第 72、189、222、480、747、804 位,其中只有第 480 位为颠换,由鸟嘌呤置换成胸腺嘧啶,其余 5 处都是转换,分别为第 72 位由鸟嘌呤置换成腺嘌呤,第 222 位由腺嘌呤置换成鸟嘌呤,其余 3 个均是由胞嘧啶置换成胸腺嘧啶(图 2),由此可见,发生转换的频率比发生颠换的频率高。枳和克里曼丁橘蛋白序列完全相同(图 3),表明该序列在核酸水平发生的突变都是无义突变。枳是芸香科(Rutaceae)枳属(*Poncirus*),克里曼丁橘是芸香科柑橘属(*Citrus*),不同属的 2 个核酸序列虽然有差异,但是蛋白序列完全相同,说明在芸香科内,该基因在蛋白水平具有较为严格的保守性。



M—DL 2000 DNA marker; 1—*PtrPP2C51* 基因
图1 *PtrPP2C51* 基因 PCR 扩增电泳结果

<i>PtrPP2C51</i> /1~106	ATGGGGTATTTGAACTCGGTGTTGTTCATCTTCAAGCCAGGTTACGCCGATGATTCGCCGCTACGCCGCGAAGCCCTTAGTCAGAACGGAAGTTACAGTCACGGAT
XM_006450169.2/1~106	ATGGGGTATTTGAACTCGGTGTTGTTCATCTTCAAGCCAGGTTACGCCGATGATTCGCCGCTACGCCGCGAAGCCCTTAGTCAGAACGGAAGTTACAGTCACGGAT
<i>PtrPP2C51</i> /107~212	ATGCGAGTTCCTCGGCAAGAGGTCCTTATGGAAGATTTTATGAGACCAGAATTGATGGCGTGAAGGAGAGATAGTAGGCTCTCTTTGGAGTTTTTGATGGTCA
XM_006450169.2/107~212	ATGCGAGTTCCTCGGCAAGAGGTCCTTATGGAAGATTTTATGAGACCAGAATTGATGGCGTGAAGGAGAGATAGTAGGCTCTCTTTGGAGTTTTTGATGGTCA
<i>PtrPP2C51</i> /213~318	TGGGGGTGCGCGAGCTGCTGAGTATGTGAACACAACCTCTTCAGCAATCTGATCAGGCATCCAAAGTTTCATATCTGATACCAAAATCGGCAATAGCTGATGCATAC
XM_006450169.2/213~318	TGGGGGTGCGCGAGCTGCTGAGTATGTGAACACAACCTCTTCAGCAATCTGATCAGGCATCCAAAGTTTCATATCTGATACCAAAATCGGCAATAGCTGATGCATAC
<i>PtrPP2C51</i> /319~424	AGCCACACAGACTCGGAATTTCTGAAGTCAGAAAACAATCAAAACAGGGATGCTGGATCTACTGCTTCCACTGCCATCCTTGTTGGTGATCGCTTACTTGTTCGAA
XM_006450169.2/319~424	AGCCACACAGACTCGGAATTTCTGAAGTCAGAAAACAATCAAAACAGGGATGCTGGATCTACTGCTTCCACTGCCATCCTTGTTGGTGATCGCTTACTTGTTCGAA
<i>PtrPP2C51</i> /425~530	ATGTGGTGACTCCAGAGCTGTTATATGCAGGGGCGGTAAATGCTATTGCCGTATCTCGAGATCACAAACAGACAAACAGATGAGCGTCAACGGATTGAGGATGC
XM_006450169.2/425~530	ATGTGGTGACTCCAGAGCTGTTATATGCAGGGGCGGTAAATGCTATTGCCGTATCTCGAGATCACAAACAGACAAACAGATGAGCGTCAACGGATTGAGGATGC
<i>PtrPP2C51</i> /531~636	AGGAGGGTTTGTGATGTGGGCTGGAACTTGGAGAGTGGGAGGAGTTCTTGCCGTTTCTCGCGCATTTGGTGACAGACTCTGAAGCAGTATGTTGTTGCTGATCCG
XM_006450169.2/531~636	AGGAGGGTTTGTGATGTGGGCTGGAACTTGGAGAGTGGGAGGAGTTCTTGCCGTTTCTCGCGCATTTGGTGACAGACTCTGAAGCAGTATGTTGTTGCTGATCCG
<i>PtrPP2C51</i> /637~742	GAAATTCAGGAGGAAGTTATTGACAGCTCCCTTGAGTTTCTTATCCTTGCAAGTGATGGACTTTGGGATGTCGTCACAAATGAGGAAGCTGTTGCGATGATCAAA
XM_006450169.2/637~742	GAAATTCAGGAGGAAGTTATTGACAGCTCCCTTGAGTTTCTTATCCTTGCAAGTGATGGACTTTGGGATGTCGTCACAAATGAGGAAGCTGTTGCGATGATCAAA
<i>PtrPP2C51</i> /743~848	CAATTCAGGATCCAGAGGAGGCGAGCAAGAGGCTGATGCAGGAGGCATATCAGAGAGGCAGTGCAGACAACATCACTGTGTCGTTGTTTCGGTTCTTGCCCAATCA
XM_006450169.2/743~848	CAATTCAGGATCCAGAGGAGGCGAGCAAGAGGCTGATGCAGGAGGCATATCAGAGAGGCAGTGCAGACAACATCACTGTGTCGTTGTTTCGGTTCTTGCCCAATCA
<i>PtrPP2C51</i> /849~879	AGGTGGTTTCATCCTTTCCTGGCTCTGCATGA
XM_006450169.2/849~879	AGGTGGTTTCATCCTTTCCTGGCTCTGCATGA

图2 *PtrPP2C51* 基因与克里曼丁橘的核苷酸序列比对分析

2.3 *PtrPP2C51* 蛋白的理化性质分析

利用 ExPASy ProtParam 对 *PtrPP2C51* 蛋白的理

化性质进行分析,结果显示,*PtrPP2C51* 蛋白的分子式为 $C_{1366}H_{2133}N_{391}O_{444}S_7$,由 292 个氨基酸残基组

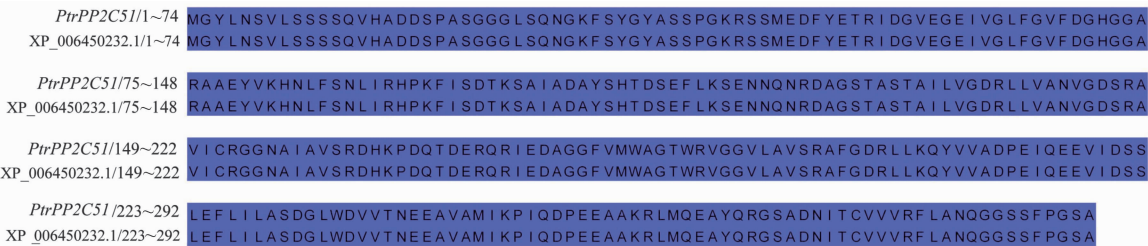


图3 PtrPP2C51 蛋白与克里曼丁橘的蛋白氨基酸序列比对分析

成,包含 20 种氨基酸,其中丝氨酸(Ser)、丙氨酸(Ala)和甘氨酸(Gly)含量较高,且丝氨酸含量最高,占 10.6%,丙氨酸和甘氨酸含量相同,均占 10.3%;PtrPP2C51 蛋白分子量为 31.36 ku,理论等电点为 4.9,不稳定系数为 39.57,表明其为稳定蛋白;脂肪系数为 79.52,为强脂溶性蛋白。亚细胞定位预测该蛋白可能位于细胞质。

PtrPP2C51 蛋白的疏水性通过 ProtScale 进行分析,结果(图 4)显示,分值最高出现于第 276 位的缬氨酸,为 2.333,疏水性最强,分值最低出现于第 119 位的天冬酰胺,为 -3.356,疏水性最弱。其整体疏水性小于 0,亲水性平均值(GRAVY)为 -0.279,由此判断 PtrPP2C51 蛋白为亲水性蛋白。

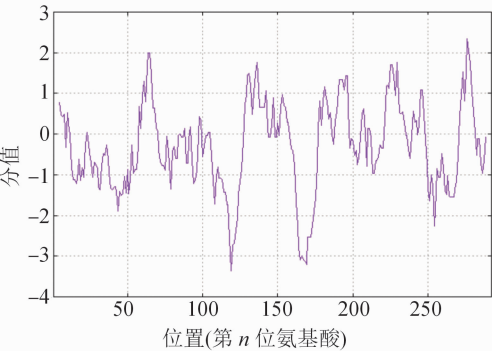


图4 PtrPP2C51蛋白的疏水性分析结果

2.4 PtrPP2C51 蛋白的二级、三级结构分析

对 PtrPP2C51 蛋白进行二级结构分析使用的是 SOPMA 软件,结果(图 5)显示,PtrPP2C51 蛋白含有 4 种二级结构类型,分别为 α -螺旋、 β -转角、延伸链和无规则卷曲,其中 α -螺旋由 117 个氨基酸残基构成,占氨基酸序列的 40.07%,是占比最多的一个类型;延伸链由 53 个氨基酸残基构成,占氨基酸序列的 18.15%; β -转角由 23 个氨基酸残基构成,占氨基酸序列的 7.88%,且占比最少;无规则卷曲由 99 个氨基酸残基构成,占氨基酸序列的 33.90%。利用 SWISS-MODEL 对 PtrPP2C51 蛋白的三级结构进行分析,结果(图 6)与二级结构的分

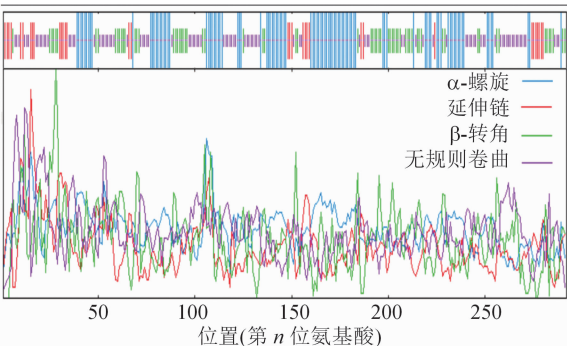


图5 PtrPP2C51 蛋白的二级结构分析结果

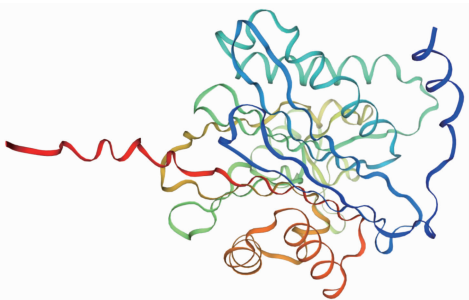


图6 PtrPP2C51 蛋白的三级结构分析结果

析结果相符。

2.5 系统发育进化树分析

利用 NCBI 数据库进行搜索,从中下载了甜橙(*Citrus sinensis*)、月季花(*Rosa chinensis*)、桃(*Prunus persica*)、麻风树(*Jatropha curcas*)、苹果(*Malus pumila*)、石榴(*Punica granatum*)、胡杨(*Populus euphratica*)、大麻(*Cannabis sativa*)、胡桃(*Juglans regia*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、雷公藤(*Tripterygium wilfordii*)、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)、茶(*Camellia sinensis*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)等不同植物物种的 PP2C 蛋白氨基酸序列,与 PtrPP2C51 蛋白共同构建系统发育进化树。结果(图 7)表明,PtrPP2C51 蛋白与克里曼丁橘的 PP2C 蛋白在同一小分支上,同源性最高,亲缘关系最近,与葡萄的亲缘关系也比较近;而与拟南芥的同源性最差,亲缘关系最远。

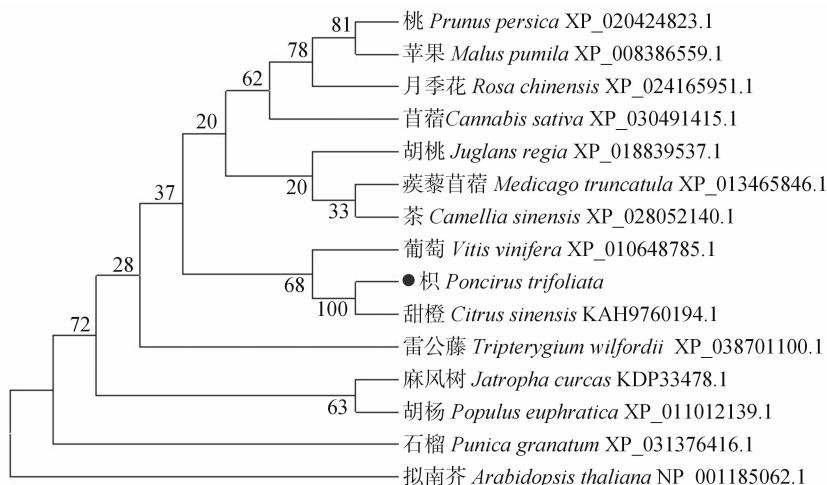
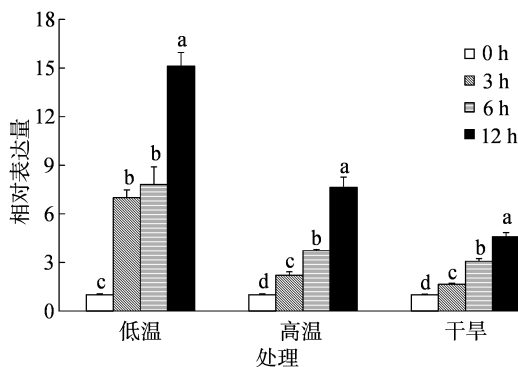


图7 基于PtrPP2C51 同源蛋白氨基酸序列构建的系统发育进化树

2.6 *PtrPP2C51* 基因在非生物胁迫下的表达模式分析

对枳苗分别进行 0 ℃ 低温、38 ℃ 高温以及干旱 (15% PEG-6000) 处理,再使用 qRT-PCR 检测枳在 3 种不同处理方式下 *PtrPP2C51* 基因的表达模式,结果(图 8)显示,经低温、高温以及干旱处理后的 0~12 h 内,*PtrPP2C51* 基因均出现了表达量持续升高的情况($P < 0.05$),其中在低温处理后 12 h 表达量上调尤为显著,并且 3 种不同处理下的 *PtrPP2C51* 基因表达量均在处理后 12 h 达到最高值。



不同小写字母表示相同处理不同胁迫时间存在显著差异($P < 0.05$)

图8 *PtrPP2C51* 基因在 3 种不同非生物胁迫处理下的相对表达量

3 讨论与结论

PP2C 是植物体内十分重要的一类蛋白磷酸酶,能够调控植物的逆境信号传导,主要依靠催化底物蛋白的去磷酸化和磷酸化反应进行。柑橘生长发育过程会受到生物和非生物胁迫,以至于品质变差、产量下降,而枳是柑橘生产中常用的砧木,探究 *PP2C* 基因家族成员在枳逆境中发挥的功能及作用

从而提高柑橘生产的质量就很有必要。目前,已经从枳中鉴定出了可分为 10 个亚族(A、B、C、D、E、F、H、I、J、L)的 53 个 *PtrPP2C* 基因家族成员,并将其命名为 *PtrPP2C1* ~ *PtrPP2C53*^[20]。本研究从枳中克隆得到的 *PtrPP2C51* 基因归类于 F 亚族,*PtrPP2C51* 基因 CDS 长度为 879 bp,蛋白质编码长度为 292 个氨基酸,蛋白分子量为 31.36 ku。系统进化结果表明,*PtrPP2C51* 蛋白与克里曼丁橘和葡萄的亲缘关系较近,与拟南芥 NP_001185062.1 的亲缘关系最远,相似性为 43.25%,说明 PP2C 在进化中相对保守。

本研究对枳苗分别进行低温、高温以及干旱 (15% PEG-6000) 胁迫处理,结果表明 *PtrPP2C51* 基因表达量会随着处理时间逐步升高。Dong 等的研究表明,*PP2C* 基因能够参与低温胁迫的调控是通过 MAPK 或 ABA 信号通路^[15],在谷子的 *PP2C* 基因受到低温胁迫后,除了 *SiPP2CA2*,其他的基因表达量都呈现上升趋势^[26],本研究中的 *PtrPP2C51* 基因低温胁迫下表现与之一致。张金旭等分析干旱处理的甘蔗转录组,发现有 37 个 *SsPP2Cs* 基因表达受到干旱强烈诱导(FPKM > 2),相对表达量分析结果表明,*SsPP2C38* 和 *SsPP2C81* 2 个基因的表达量随着干旱处理时间逐步升高,处理 12 h 达到最高值^[27]。对葡萄赤霞珠进行干旱(PEG)处理,发现大部分基因表达量下降,但也有 5 个 *PP2C* 基因的表达量在干旱处理 6 h 后均表现出逐步上升的趋势^[17],表明只有部分 *PP2C* 基因响应干旱胁迫,在本研究中 *PtrPP2C51* 基因对干旱胁迫也存在响应。同样,经高温处理后,*PtrPP2C51* 基因也表现出表达量上升的情况,但上升趋势不如低温和干旱处理。

综上所述,*PtrPP2C51* 基因能积极响应多种非生物胁迫,可能参与调控低温、高温和干旱胁迫。

以上分析及结果对今后深入研究枳的抗逆胁迫机制,为提高枳抗逆境胁迫能力提供参考,同时也为柑橘筛选良好的抗性基因提供了材料。

参考文献:

- [1] 朱世平,王福生,陈 娇,等. 柑橘不同类型砧木的种子和苗期性状[J]. 中国农业科学,2020,53(3):585–599.
- [2] Cao J M, Jiang M, Li P, et al. 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.
- [3] Singh A, Pandey A, Srivastava A K, et al. 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.
- [4] Nishimura N, Okamoto M, Narusaka M, et al. *ABA hypersensitive germination2 – 1* causes the activation of both abscisic acid and salicylic acid responses in *Arabidopsis* [J]. Plant and Cell Physiology,2009,50(12):2112–2122.
- [5] Wang Y F, Liao Y Q, Wang Y P, et al. Genome – wide identification and expression analysis of *StPP2C* gene family in response to multiple stresses in potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. Journal of Integrative Agriculture,2020,19(6):1609–1624.
- [6] Chen C, Yu Y, Ding X D, et al. Genome – wide analysis and expression profiling of PP2C clade D under saline and alkali stresses in wild soybean and *Arabidopsis* [J]. Protoplasma,2018,255(2):643–654.
- [7] Bhaskara G B, Nguyen T T, Verslues P E. Unique drought resistance functions of the highly ABA – induced clade A protein phosphatase 2Cs [J]. Plant Physiology,2012,160(1):379–395.
- [8] Akimoto – Tomiyama C, Tanabe S, Kajiwar H, et al. Loss of chloroplast – localized protein phosphatase 2Cs in *Arabidopsis thaliana* leads to enhancement of plant immunity and resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* infection [J]. Molecular Plant Pathology,2018,19(5):1184–1195.
- [9] Xue T T, Wang D, Zhang S Z, et al. Genome – wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and *Arabidopsis* [J]. BMC Genomics,2008,9:550.
- [10] 曾 坚,谢雅倩,陈丽萍,等. 木薯 2C 型蛋白磷酸酶基因 *MePP2C55* 的克隆及表达分析 [J]. 江苏农业科学,2022,50(8):73–78.
- [11] Singh A, Jha S K, Bagri J, et al. ABA inducible rice protein phosphatase 2C confers ABA insensitivity and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. PLoS One,2015,10(4):e0125168.
- [12] Gosti F, Beaudoin N, Serizet C, et al. ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling [J]. The Plant Cell,1999,11(10):1897–1909.
- [13] Merlot S, Gosti F, Guerrier D, et al. The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway [J]. The Plant Journal,2001,25(3):295–303.
- [14] 张继红,陶能国. 植物 PP2C 蛋白磷酸酶 ABA 信号转导及逆境胁迫调控机制研究进展 [J]. 广西植物,2015,35(6):935–941.
- [15] Dong W, Liu X J, Lü J, et al. The expression of alfalfa *MsPP2CA1* gene confers ABA sensitivity and abiotic stress tolerance on *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiology and Biochemistry,2019,143:176–182.
- [15] Hu X L, Liu L X, Xiao B L, et al. Enhanced tolerance to low temperature in tobacco by overexpression of a new maize protein phosphatase 2C, *ZmPP2C2* [J]. Journal of Plant Physiology,2010,167(15):1307–1315.
- [17] 何红红,路志浩,马宗桓,等. 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.
- [18] 张婷婷,李雨欣,张德遥,等. 铁皮石斛蛋白磷酸酶 *PP2C* 家族基因鉴定及其表达分析 [J]. 园艺学报,2021,48(12):2458–2470.
- [19] Wang Y P, Wu Y, Duan C R, et al. The expression profiling of the *CsPYL*, *CsPP2C* and *CsSnRK2* gene families during fruit development and drought stress in cucumber [J]. Journal of Plant Physiology,2012,169(18):1874–1882.
- [20] 杨 杰,陈 蓉,胡文娟,等. 枳 *PP2C* 基因家族的鉴定及表达分析 [J]. 果树学报,2022,39(4):532–547.
- [21] Hu W, Yan Y, Hou X W, et al. *TaPP2C1*, a group F2 protein phosphatase 2C gene, confers resistance to salt stress in transgenic tobacco [J]. PLoS One,2014,10(6):e0129589.
- [22] Sugimoto H, Kondo S, Tanaka T, et al. Overexpression of a novel *Arabidopsis* PP2C isoform, *AtPP2CF1*, enhances plant biomass production by increasing inflorescence stem growth [J]. Journal of Experimental Botany,2014,65(18):5385–5400.
- [23] Xing B Y, Gu C R, Zhang T X, et al. Functional study of *BpPP2C1* revealed its role in salt stress in *Betula platyphylla* [J]. Frontiers in Plant Science,2021,11:617635.
- [24] 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,2010:41–56.
- [25] 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.
- [26] 闵东红,薛飞洋,马亚男,等. 谷子 *PP2C* 基因家族的特性 [J]. 作物学报,2013,39(12):2135–2144.
- [27] 张金旭,周少丽,姜 烁,等. 甘蔗割手密 *PP2C* 基因家族的全基因组鉴定与表达分析 [J]. 植物生理学报,2023,59(6):1101–1116.