

桑树 *MaPP2C8* 基因克隆及其 干旱胁迫下的表达

黄仁维, 祁伟亮, 曾 睿, 任迎虹*

(成都师范学院 化学与生命科学学院, 特色园艺生物资源开发与利用四川省高校重点实验室, 成都 611130)

摘 要: 该研究基于桑树转录组测序结果及基因组数据库, 采用 PCR 技术, 克隆获得桑树 2C 型蛋白磷酸酶基因 *MaPP2C8* 的 cDNA 及其启动子序列, 运用生物信息学方法对序列进行分析, 并采用 qRT-PCR 方法检测 *MaPP2C8* 在干旱胁迫处理下的表达特性, 为进一步研究 *MaPP2C8* 基因在干旱胁迫响应中的功能奠定基础。结果显示: (1) *MaPP2C8* 基因 cDNA 全长为 1 309 bp, 开放阅读框(ORF)全长为 1 053 bp, 编码 350 个氨基酸。(2) *MaPP2C8* 蛋白与桑科其他植物亲缘关系较近, 归属于 PP2Cs 家族中的 A 亚族。(3) *MaPP2C8* 蛋白分布于细胞中的多个位置, 包括细胞质、细胞核及细胞膜等。(4) 克隆获得 *MaPP2C8* 基因编码起始位点上游长度为 1 612 bp 启动子序列, 该启动子含有 3 类激素相关的顺式作用元件, 且与 ABA 相关的元件多达 3 个。(5) *MaPP2C8* 基因受干旱胁迫诱导上调表达, 复水处理后, 其表达量显著下调。研究表明, *MaPP2C8* 基因在桑树响应干旱胁迫过程中可能起重要作用。

关键词: 桑树; *MaPP2C8*; 基因克隆; 启动子克隆; 干旱胁迫; 表达分析

中图分类号: Q785; Q786

文献标志码: A

Cloning of *MaPP2C8* Gene from Mulberry and Its Expression under Drought Stress

HUANG Renwei, QI Weiliang, ZENG Rui, REN Yinghong*

(College of Chemistry and Life Sciences, Sichuan Provincial Key Laboratory for Development and Utilization of Characteristic Horticultural Biological Resources, Chengdu Normal University, Chengdu 611130, China)

Abstract: In this study, based on the transcriptome results and genome database of mulberry, we cloned the cDNA and promoter sequence of *MaPP2C8* using PCR method. Bioinformatics methods were used to analyze the cDNA and promoter sequence of *MaPP2C8* and the expression pattern of *MaPP2C8* under drought treatment was determined by using qRT-PCR method. The results show that: (1) the full-length cDNA of *MaPP2C8* gene was 1 309 bp, which contained an opening reading frame of 1 053 bp and encoded a protein of 350 amino acids residues. (2) *MaPP2C8* protein was highly homologous with the species in Moraceae and belongs to the A branch in the PP2Cs family. (3) *MaPP2C8* protein may locate in multi-positions of the cell, such as the nucleus, cytoplasm, cytomembrane, etc. (4) A 1 612 bp promoter fragment upstream of translation initiation site was isolated from mulberry. *MaPP2C8* promoter contained three types of hormone-related *cis*-acting elements, and as many as 3 elements associated with ABA. (5)

收稿日期: 2021-02-20; 修改稿收到日期: 2021-05-07

基金项目: 四川省科技厅应用基础重点项目(2018JY0442); 成都师范学院校级创新团队项目(CSCXTD2020A04); 成都师范学院校级项目(CS20ZC04); 四川省教育厅教改项目(JG2018-888; JG2018-885)

作者简介: 黄仁维(1990—), 女, 博士, 主要从事桑树抗性分子育种研究。E-mail: swuhrw@126.com

* 通信作者: 任迎虹, 教授, 主要从事桑树资源遗传育种与植物生理学研究。E-mail: renyinghong@163.com

The expression of *MaPP2C8* gene was upregulated by drought treatment, and its expression level was significantly down-regulated after rewatering treatment. Our studies suggest that *MaPP2C8* gene may play an important role in response to drought stress in mulberry.

Key words: mulberry; *MaPP2C8*; gene cloning; promoter cloning; drought stress; expression analysis

桑树(*Morus alba* L.)属桑科(Moraceae)桑属(*Morus* Linn.)植物,由于其良好的适应性而广泛分布于世界各地,在中国已有 5000 多年的种植历史^[1]。桑树的果实桑葚味道鲜美,营养丰富,深受消费者的喜爱^[2]。桑叶作为家蚕(*Bombyx*)唯一的营养来源具有重要的生态学意义,对养蚕业具有极其重要的作用^[3]。桑树具有一定程度的耐旱性,适应性较强,被誉为生态经济两用型树种^[4]。但由于地理位置的不同,尤其在中国的北方地区,年降雨量少,严重的干旱极大地影响桑树的种植,且不同品种桑树的耐旱性差异大,同样严重制约了不同桑树品种的推广^[5-6]。植物抗性基因产生响应是植物应对外界各种胁迫的关键环节,因此克隆桑树抗性相关基因,解析其胁迫响应和抗性机制有利于桑树的抗性育种。

植物对外界胁迫的响应受多种基因的调控。植物蛋白磷酸酶(protein phosphatases, PPs)在植物中参与多种信号传导途径,在可逆的磷酸化反应中用于抵消激酶的作用,其中,2C 型 PPs(PP2Cs)是植物 PPs 的主要类群^[7]。近年来研究发现,PP2Cs 参与多种与脱落酸(ABA)相关的信号传导通路,使得 PP2Cs 被认为处于植物逆境响应和发育主要信号通路的中心位置^[8]。截止目前,研究人员已在多个物种中鉴定出 PP2C 家族成员,对 PP2C 基因家族成员的分子、生化、遗传及功能研究均表明,PP2Cs 参与调控植物生理的多个方面^[9-11]。在对多种模式植物,如,拟南芥、玉米、水稻等的 PP2Cs 表达水平分析发现,PP2Cs 基因受 ABA 及多种非生物胁迫的诱导,如干旱胁迫、渗透性胁迫、盐胁迫及低温胁迫等^[11-13]。He 等^[14]发现,玉米多个 PP2C 基因家族成员的表达受多种胁迫及 ABA 的诱导,表明这些基因可能在玉米抵御胁迫过程中扮演着重要的角色。综上可知,PP2Cs 基因家族在植物响应外界胁迫中具有重要调控作用,克隆并解析桑树 *MaPP2C* 家族基因的功能对桑树抗性育种具有重要的作用。

目前针对 PP2Cs 家族基因的相关研究主要集中在一些模式植物上,对木本植物 PP2Cs 基因家族相关基因的研究还严重不足,有关桑树

MaPP2Cs 家族相关基因的研究还鲜有报道。本团队对前期的桑树转录组数据进行分析,发现 *MaPP2C8* 基因的表达受干旱胁迫强烈诱导。因此,本研究对桑树 *MaPP2C8* 基因及其启动子进行了克隆并分析,并对干旱胁迫处理下 *MaPP2C8* 基因的表达水平进行分析,为进一步研究 *MaPP2C8* 基因在干旱胁迫响应中的功能奠定基础,以期桑树抗旱基因工程和遗传改良提供基因资源。

1 材料和方法

1.1 供试材料及处理

供试材料为桑树品种‘德果 1 号’,由四川省德昌县桑树种质资源圃提供,该品种为德昌县桑树种植主推品种,其果实品质好,果叶兼用具有极高的经济价值。

干旱胁迫处理:将桑树种子播种于含营养土的 10 L 种植盆中,每盆种植 4 株,于 25 °C、相对湿度 20%~30% 温室自然光下培养。待桑苗长至株高约 45 cm 左右时,挑选长势一致的幼苗进行干旱处理。依据土壤含水量的差异共设置 4 个处理组,分别为:轻度干旱胁迫(相对含水量为 65%~75%)、中度干旱胁迫(相对含水量为 50%~65%)、重度干旱胁迫(相对含水量为 35%~40%)及重度干旱胁迫后复水组,每个处理组设置 3 个生物重复,每个重复 3 盆桑苗。具体操作为:将盆栽苗浇透水后进行自然干旱,每天傍晚取距盆表土 10~15 cm 处的土样,采用烘干称重法测定土壤含水量,土壤含水量达到胁迫处理要求后,于次日早晨 8 点取植株相同部位幼嫩叶片,用于干旱胁迫下的基因表达分析。复水组于重度干旱取材后立即给予充足水分,2 d 后取样用于后续试验。

试验所用的高保真 DNA 聚合酶 *TopTaq* DNA Polymerase、大肠杆菌感受态细胞购自北京全式金生物有限公司,琼脂糖凝胶回收试剂盒购自北京天根生物公司,反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (RR047A)、T 载体 pMD19-T 购自 TaKaRa 生物公司。RNA 提取试剂盒 RNAprep Pure Plant Kit(DP441)购自北京天根生物公司,引物合成和测序由生工生物工程(上海)

表 1 实验所用引物及用途
Table 1 Application of primers in the experiment

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	Tm/℃	用途 Use
<i>MaPP2C8</i> -F	AGCGAAGGAAGGGAGAAATC	57.7	基因克隆 Gene cloning
<i>MaPP2C8</i> -R	TGAGACCCCCAGATAGTTTACG	58.6	
p <i>MaPP2C8</i> -F	CACGGTGTAGTTGGAGACTTTGC	61.5	启动子克隆 Promoter cloning
p <i>MaPP2C8</i> -R	GGACTTCCGATTCTCTTGTTCC	59.5	
q <i>MaPP2C8</i> -F	TCGTCGGGTTCGGAATCGT	63.3	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
q <i>MaPP2C8</i> -R	TCTGTCGCCCTTGTCTGTTCT	62.3	
q <i>Maβactin</i> -F	TCCGATGCCCAGAAGTCCTC	62.1	
q <i>Maβactin</i> -R	TGATCTCCTTGCTCATCCTGTCT	60.4	

股份有限公司完成,SsoFast™ EvaGreen Supermix 购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 基因克隆 桑树叶片总 RNA 的提取按照 RNAPrep Pure Plant Kit 说明书进行,cDNA 第一链合成按照 PrimeScript™ RT reagent Kit 说明书进行。根据桑树转录组数据库中的序列信息,设计引物(表 1),以桑树 cDNA 为模板,对 *MaPP2C8* 基因的 cDNA 序列进行扩增。PCR 反应体系为:cDNA 模板 2 μL,上、下游引物(10 μmol · L⁻¹)各 1 μL,10 × TopTaq 缓冲液 2.5 μL,dNTPs 1.5 μL,TopTaq 酶 0.2 μL,最后使用 ddH₂O 补足至终体积 25 μL。PCR 反应程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,57 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,26 个循环;72 °C 延伸 10 min。利用琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化 PCR 产物,将纯化后的产物连接至 PMD19-T 载体,转化大肠杆菌,经菌液 PCR 鉴定后送生工测序。

1.2.2 启动子克隆 桑树基因组 DNA 的提取采用改良 CTAB 法进行^[15]。以 NCBI 数据库中报道的桑树基因组序列中 *MaPP2C8* 启动子序列为参考序列设计引物(表 1),以‘德果 1 号’基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。扩增体系及程序采用 1.2 中所介绍的体系及程序,扩增程序依据引物的退火温度和扩增片段的长度略作改动。

1.2.3 生物信息学分析 利用 OFR Finder 在线分析工具分析 *MaPP2C8* cDNA 序列的开放阅读框,利用 BioEdit 7.2 分析 *MaPP2C8* CDS 序列所编码蛋白质的理化性质,采用 Mega7.0 构建 *MaPP2C8* 的系统进化树;使用 WoLF PSORT(<https://wolfpsort.hgc.jp/>)及 SoftBerry ProtComp9.0(<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>)对 *MaPPCC-8* 进行亚细胞定位预测^[16-17];

使用 SignalP 4.1(<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/webface2.fcgi?jobid=600E2532000021E01EC0E49B&wait=20>)对 *MaPP2C8* 蛋白的信号肽进行预测。采用在线分析软件 PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对 *MaPP2C8* 启动子顺势作用元件进行分析。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 分析 利用实时荧光定量 PCR 技术分析桑树 *MaPP2C8* 在干旱胁迫处理下的表达特性。以桑树 *MaPP2C8* cDNA 序列为基础,设计 1 对 *MaPP2C8* 定量 PCR 引物,以桑树 *Maβ-actin* 为内参基因(表 1)。qRT-PCR 反应在伯乐 BioRad CFX96Touch 实时荧光定量 PCR 仪上进行,所有 qRT-PCR 反应均设置 3 个生物学重复,每个生物学重复设置 3 个技术重复。qRT-PCR 反应总体系为 10 μL:SsoFast™ EvaGreen® Supermix 5 μL,上、下游引物(10 μmol · L⁻¹)各 0.5 μL,cDNA 0.5 μL,无 RNA 酶水 H₂O 3.5 μL。qRT-PCR 反应程序为:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 5 s,40 个循环。利用 Bio-Rad Manager™ Software (Version 1.1)软件对试验数据进行分析,用 2^{-ΔΔCT} 法计算 *MaPP2C8* 的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 *MaPP2C8* 基因的克隆及序列分析

从‘德果 1 号’cDNA 中克隆获得一段约 1 300 bp 的条带,对其进行回收、TA 克隆、PCR 鉴定及测序后发现,该条带全长为 1 309 bp。将该序列与转录组测序获得的 *MaPP2C8* 参考序列进行比对后发现,该序列为 *MaPP2C8* 的 cDNA 序列。其编码的氨基酸与核苷酸序列对应关系如图 1 所示。*MaPP2C8* CDS 序列中 A+T 含量为 44.25%,G+C 含量为 55.75%,共编码 350 个氨基酸,蛋白质相

1 ATGGAGAGCTTGAATCGGAAGGATATCGACTGTCGTTTGGAGGATTTCTGTACGAACAAGAGAATGAGAGGCATCAGCGAGATCAACTCG
1 M E S L N R K D I D C R L E D F C T N K R M R G I S E I N S
91 TCGGGTTCGGAATCGTCAACCGGAGGATGATTGGAAATCTGATGGGGAGTTAGAGAAGAACGACAAGGGCGACAGAGGAAGGAGCTTG
1 S G S E S S N R R M I G K S D G E L E K N D K G D R G R S L
31 S G S E S S N R R M I G K S D G E L E K N D K G D R G R S L
181 ATCAAGTGCATTGTTTCGGCTGGATCTCGGTGATCGGGCGGCAGAGAACGATGGAGGACGCGGTGGCGGTGGCGGAGCTCGATTATAC
61 I K C D S F G W I S V I G R Q R T M E D A V A V A E L D S Y
271 CGGTTCCTCGCGTGTACGACGGCCACGAGGGTTCGGGAGTGGCGAATGCGTGCCGCGATCGGCTCCACCAGCTGCTGGAGGAGGAGGTG
91 R F F A V Y D G H G G S G V A N A C R D R L H Q L L E E E V
361 GAGGTAAGGCTAACGATCGGGCGGCGCGCGGCAGTGGAGTGGGAGAAGGTGATGAGGGAGTGCTTTTCGGAAGATGGACGAGGAGATC
121 E G R A N G S G G G A A V E W E K V M R E C F R K M D E E I
451 GTTGGTGTGCGAGGCTCGATGATCAGGTTGAGGACGCGACGCGGAGGCGCGCGTGGTTCGAGAGGTGGCGTTGAATACGGTGGGATCT
151 V G G R G L D D Q V E D G D G G G G R G R E V A L N T V G S
541 ACGGCGCTGGTCTCATTGTTGGGAAGCGGTGGTGGTGGCCAATTGTGGTGATTCTAGGCGGTGCTGTGCCGCGACGGTGGTACT
181 T A L V L I V G K A V V V V A N C G D S R A C D G G T
631 GTGCCTTATCACGTGCTTACAAGCTGACCGACCTGACGAAAGGAGAGAGTCGAGGCGCGGAGGAGGAATCATAAATGGAACGGA
211 V P L S R A Y K P D R P D E R E R V E A A G G G I I N W N G
721 TGCCGCGTCTTGGCGTCTTCTACTTCAAGATCAATAGGAGATCATTATTTGAAGCCATATGTGATCTCCGAACCTGAAGTACCGTT
241 C R V L G V L S T S R S I G D H Y L K P Y V I S E P E V T V
811 TGGAAACGTTTCGACTCGGATCAGTTCCTTATAATAGCAAGCGACGACTATGGGATGTAGTGTCAAATGAGTTTGCTGCGAGATTGTA
271 W K R F D S D Q F L I I A S D G L W D V V S N E F A C E I V
901 GGAAGGTGTTTATGATGGGCAATCAGGAGAAGGTTTCCGAAGGGTTGGGTGGAATACTGCCGAGAGGACGCGGCTTGTGCGCCGAA
301 G R C F D G Q I R R R F S E G L G G N T A G E A A A L L A E
991 CTGGAATGGCTCGGGGAAGCAAACAATATCAGTGTGTAGTTGTGGATCTAAAGAAGTAG
331 L A M A R G S K D N I S V V V V D L K K *

图 1 *MaPP2C8* 核苷酸序列及其氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and amino acid sequences of *MaPP2C8*

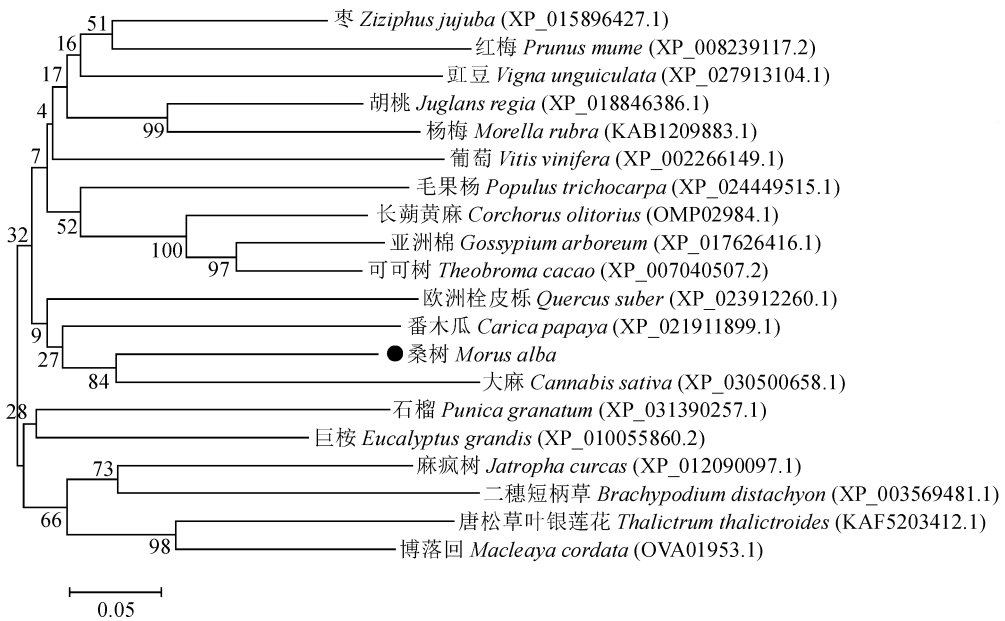


图 2 *MaPP2C8* 与其他植物 PP2C 家族成员的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis between *MaPP2C8* and PP2C family members of other plants

对分子质量为 37.96 kD,等电点为 5.099。其氨基酸残基中共含有 48 个带正电氨基酸,57 个带负电氨基酸,116 个疏水氨基酸,69 个极性氨基酸。采用 SignalP 4.1 Server 对 *MaPP2C8* 蛋白信号肽进行预测后发现,该蛋白无信号肽序列,为非分泌蛋白。

2.2 *MaPP2C8* 进化树分析

采用 Mega7.0 构建桑树 *MaPP2C8* 及 NCBI 中

已报道的 19 个 PP2C 蛋白的系统进化树(图 2),结果表明,桑树 *MaPP2C8* 与大麻、番木瓜的亲缘关系较近,其中与同属于桑科的大麻亲缘关系最近,这进一步明确了 *MaPP2C8* 属于桑树 PP2C 基因家族成员。

2.3 *MaPP2C8* 在 PP2Cs 基因家族中分支分析

在 NCBI 中进一步查询拟南芥中已报道的拟南芥 AtPP2Cs 家族成员,采用 Mega7.0 对 *MaPP2C8* 在

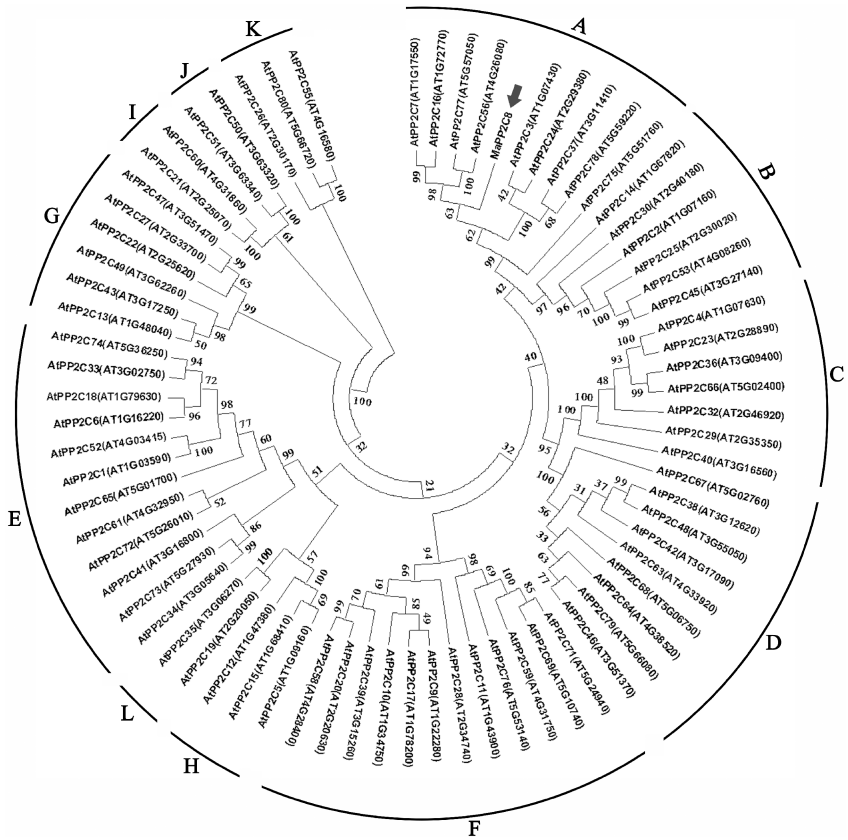


图 3 MaPP2C8 蛋白与拟南芥 (At)PP2C 蛋白的进化树分析
Fig. 3 Phylogenetic tree of MaPP2C8 with PP2C proteins from *Arabidopsis* (At)

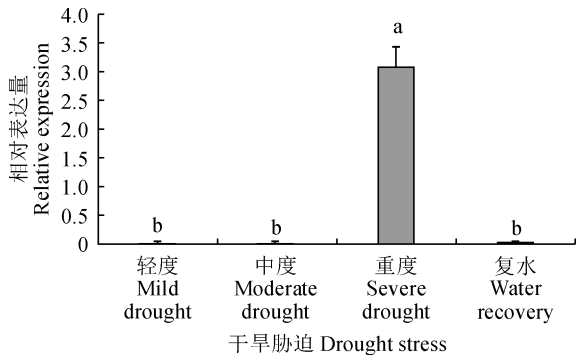
PP2Cs 基因家族中的归属分支进行分析,结果显示, MaPP2C8 与其他拟南芥 PP2C 蛋白分为 12 个亚族(A-L), MaPP2C8 与 A 亚族成员聚为一类(图 3),这进一步为将来研究 *MaPP2C8* 基因的功能提供了参考。

2.4 MaPP2C8 亚细胞定位预测

采用 SoftBerry ProtComp9. 0 (Plant) 对 MaPP2C8 蛋白的亚细胞定位预测后发现, MaPP2C8 蛋白可能存在于细胞中的多个位置,如细胞质、细胞核、细胞膜,表明 MaPP2C8 在细胞中的作用范围广泛,对各种胁迫的响应速度快。采用 WoLFPSORT 进一步对 MaPP2C8 蛋白的亚细胞定位进行分析后发现, MaPP2C8 同样定位于细胞中的多个位置。结合相关文献^[18-19],推测 MaPP2C8 可能分布于细胞中的多个位置,如细胞质、细胞核及细胞膜等。

2.5 MaPP2C8 启动子克隆及序列分析

依据 NCBI 中报道的桑树基因组序列为参考序列设计 *MaPP2C8* 启动子克隆引物,以‘德果 1 号’基因组 DNA 为模板,克隆获得 *MaPP2C8* 起始密码子上游一段大小为 1 612 bp 的序列,采用 Plant-



不同小写字母表示 0.05 水平上存在差异显著
图 4 *MaPP2C8* 在干旱胁迫处理下的表达分析
Different lowercase letters mean significant differences at 0.05 level
Fig. 4 The expression analysis of *MaPP2C8* gene under drought stress

CARE 在线软件对 *MaPP2C8* 启动子序列中的顺式作用元件进行预测发现, *MaPP2C8* 启动子序列中含有激素响应元件、光响应元件及防御与胁迫响应元件(表 2)。激素响应元件包括脱落酸响应元件 ABRE、茉莉酸响应元件 (CGTCA-motif 和 TGA-CG-motif) 及水杨酸响应元件 (TCA-element); 光响应元件包括 Box 4、G-Box、Gap-box、MRE、Sp1、

表 2 *MaPP2C8* 启动子顺式作用元件

Table 2 *Cis*-elements in the promoter of *MaPP2C8*

元件 Motif	序列 Sequence	功能 Function
ABRE	ACGTG/GACACGTGGC/CACGTG	脱落酸响应的顺式调控元件 <i>cis</i> -acting element involved in the abscisic acid responsiveness
ABRE3a	TACGTG	
ABRE4	CACGTA	
AT~TATA-box	TATATA	
Box 4	ATTAAT	光应答中保守 DNA 模块的部分序列 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
CAAT-box	CAAT/CCAAT	启动子和增强子区域普通顺式作用元件 Common <i>cis</i> -acting element in promoter and enhancer regions
CCAAT-box	CAACGG	MYBHv1 结合位点 MYBHv1 binding site
CGTCA-motif	CGTCA	茉莉酸响应的顺式调控元件 <i>cis</i> -acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
ERE	ATTTTAAA	
G-box	CACGTG/CACGTT	光应答元件 <i>cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness
Gap-box	CAAATGAA(A/G)A	光应答元件的部分序列 Part of a light responsive element
JERE	AGACCGCC	
MRE	AACCTAA	参与光应答的 MYB 结合位点 MYB binding site involved in light responsiveness
MYB	CAACAG	
MYB 识别位点 MYB recognition site	CCGTTG	
MYC	CATTTG	
Myb 结合位点 Myb-binding site	CAACAG	
Myc 结合位点 Myc-binding site	TCTCTTA	
STRE	AGGGG	
Sp1	GGGCGG	光应答元件 Light responsive element
TATA-box	TATA/TATAA/TATAAATA	启动子核心元件 Core promoter element around -30 of transcription start
TC-rich repeats	GTTTTCTTAC/ATTCTCTAAC	参与防御与胁迫应答的顺式调控元件 <i>cis</i> -acting element involved in defense and stress responsiveness
TCA-element	CCATCTTTTT	水杨酸响应的顺式调控元件 <i>cis</i> -acting element involved in salicylic acid responsiveness
TCCC-motif	TCTCCCT	光应答元件的部分序列 Part of a light responsive element
TGACG-motif	TGACG	茉莉酸响应的顺式调控元件 <i>cis</i> -acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
WRE3	CCACCT	
as-1	TGACG	

TCCC-motif;防御与胁迫响应元件包括 TC-rich repeats。以上结果表明 *MaPP2C8* 基因的表达可能受到这些因素诱导。

2.6 *MaPP2C8* 对干旱胁迫的响应

采用 qRT-PCR 技术检测桑树 *MaPP2C8* 在干旱胁迫下的表达特性。结果(图 4)显示,*MaPP2C8*

基因的表达受干旱胁迫强诱导,重度干旱时,*MaPP2C8* 表达量达到最高水平。在重度干旱胁迫后,给予复水处理,并对 *MaPP2C8* 的表达水平进行分析,结果显示,*MaPP2C8* 的表达量显著下降。以上结果表明,*MaPP2C8* 可能参与了桑树对干旱胁迫的响应。

3 讨论

桑树虽具有强的适应性,但在中国干旱给桑树产业所带来的损失仅次于病虫害^[20]。干旱胁迫下,对不同抗性桑树品种的生理生化特性研究发现,抗性高的品种,其 SOD、POD、CAT 等酶的活性显著高于低抗性品种,而造成这一现象的根本原因是基因调控层面^[21]。植物 PP2Cs 基因家族含有多个成员,参与植物生长发育过程的多个环节,如根系发育、叶片衰老、气孔发育、种子萌发、花粉萌发等,且在植物应答生物与非生物胁迫中发挥着重要作用^[22]。Shazadee 等^[23]采用 qRT-PCR 技术对棉花 30 个 GhPP2Cs 基因进行分析后发现,这些基因在棉花响应高温、低温、干旱、盐等胁迫时起到重要的作用。在模式植物拟南芥中,已鉴定出 80 个 PP2Cs 成员,研究人员依据 PP2Cs 蛋白结构的不同,将其分为 12 个亚群(A-L)^[11, 24]。Yu 等^[25]对小麦 A 亚族基因 PP2C-a10 进行研究,发现拟南芥中异源表达小麦 PP2C-a10 显著提高了转基因拟南芥种子的萌发率,降低了转基因拟南芥对干旱胁迫的抗性。He 等^[14]对玉米 A 亚族基因 ZmPP2C-A2 和 ZmPP2C-A6 在多种非生物胁迫下的表达模式进行分析,并在拟南芥中对其功能进行研究,结果显示,ZmPP2C-A2 和 ZmPP2C-A6 在干旱、盐、ABA 等胁迫条件下表达量显著增加,过表达 ZmPP2C-A2 和 ZmPP2C-A6 基因降低了拟南芥对干旱的抗性。以上均表明,PP2Cs 基因家族成员在植物胁迫响应中具有重要调控作用。为此,本研究克隆了桑树 MaPP2Cs 家族成员 MaPP2C8 基因,以期对桑树的抗性育种提供基因资源。在对桑

树 MaPP2C8 的分支归属进行分析发现, MaPP2C8 归属于 PP2Cs 基因家族中的 A 亚族。此外,在对干旱胁迫下 MaPP2C8 基因的表达模式进行分析发现, MaPP2C8 受干旱胁迫的强诱导,并且有趣的是,复水处理后 MaPP2C8 的表达量又显著降低,这些结果暗示着桑树 MaPP2C8 基因可能和其他 A 亚族基因一样参与了对干旱胁迫的响应。然而,这种响应机制还有待通过过表达 MaPP2C8 基因等实验来进一步研究。

植物激素 ABA 在提高植物对干旱等非生物胁迫的耐受水平方面发挥重要作用^[26]。研究表明,多数 PP2Cs 基因在植物 ABA 信号通路中起重要调节作用, ABA 与其受体(PYR、PYL、RCAR 等)结合,抑制 PP2Cs 活性,使得 SnRK2 得到释放,释放的 SnRK2 激活 ABF、AREB 及 ABI5 等转录因子,从而调节 ABA 响应基因的表达水平,调节植物生长,响应外界胁迫^[8, 27-28]。启动子在基因表达调控过程中起重要的作用^[29]。为探讨 MaPP2C8 基因表达与 ABA 之间的调控关系,本研究对 MaPP2C8 基因的启动子进行了克隆,对启动子序列进行预测发现, MaPP2C8 启动子中含有 3 个与 ABA 相关的元件 ABRE,这暗示 MaPP2C8 的表达可能受 ABA 的诱导,因此,推测 ABA 可能通过诱导 MaPP2C8 的表达水平,进而对下游基因的表达进行调节,然而有关 MaPP2C8 的作用机制有待进一步研究。

综上所述,本研究克隆获得了桑树 MaPP2C8 基因及其启动子序列,并对其进行生物信息学分析和干旱胁迫应答分析,本研究结果为进一步研究 MaPP2C8 基因的功能及利用 MaPP2C8 基因进行桑树抗旱育种奠定了基础。

参考文献:

[1] GUO S, BAI L, HO C T, *et al.* Characteristic components, biological activities and future prospective of *Fructus Mori*: a review[J]. *Current Pharmacology Reports*, 2018, **4**(3): 210-219.

[2] 杨 新, 卢红梅, 杨双全, 等. 桑葚及桑葚果酒的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2019, **45**(4): 257-262.

YANG X, LU H M, YANG S Q, *et al.* Research progress on mulberry and mulberry wine[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, **45**(4): 257-262.

[3] 李帅军, 张敏娟, 孟彩婷, 等. 桑树 MaGPX 家族基因的克隆及表达分析[J]. *西北植物学报*, 2019, **39**(6): 991-1 000.

LI S J, ZHANG M J, MENG C T, *et al.* Gene cloning and

expression analysis of the MaGPX family in *Morus alba* L[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2019, **39**(6): 991-1 000.

[4] 蓝必忠, 滕伟国, 宾荣佩, 等. 5 个桑树品种在石漠化地区不同种植模式试验[J]. *广西蚕业*, 2020, **57**(1): 1-7.

[5] 李昭良. 不同桑树品种茎叶解剖结构的耐旱性特征研究[D]. 陕西咸阳: 西北农林科技大学, 2014.

[6] 刘雪琴, 丁天龙, 魏从进, 等. 13 份桑树杂交组合 F₁ 代的耐盐性和耐旱性鉴定[J]. *蚕业科学*, 2014, **40**(5): 764-773.

LIU X Q, DING T L, WEI C J, *et al.* An evaluation on salt and drought tolerance of F₁ generations from 13 mulberry hybrid combinations[J]. *Science of Sericulture*, 2014, **40**(5): 764-773.

- [7] UHRIG R G, LABANDERA A M, MOORHEAD G B. *Ara-bidopsis* PPP family of serine/threonine protein phosphatases: many targets but few engines[J]. *Trends in Plant Science*, 2013, **18**(9): 505-513.
- [8] 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): 1 023-1 035.
- [9] 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.
- [10] KIM S, PARK M, YEOM S I, *et al.* Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species[J]. *Nature Genetics*, 2014, **46**(3): 270-278.
- [11] SINGH A, GIRI J, KAPOOR S, *et al.* Protein phosphatase complement in rice: genome-wide identification and transcriptional analysis under abiotic stress conditions and reproductive development[J]. *BMC Genomics*, 2010, **11**: 435.
- [12] SUN D M, WANG H P, WU M H, *et al.* Crystal structures of the *Arabidopsis thaliana* abscisic acid receptor PYL10 and its complex with abscisic acid[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, **418**(1): 122-127.
- [13] WEI K F, PAN S. Maize protein phosphatase gene family: Identification and molecular characterization[J]. *BMC Genomics*, 2014, **15**: 773.
- [14] HE Z H, WU J F, SUN X P, *et al.* The maize clade A PP2C phosphatases play critical roles in multiple abiotic stress responses[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, **20**(14): 3 573.
- [15] 梁景霞, 祁建民, 吴为人, 等. 烟草 DNA 的提取与 SRAP 反应体系的建立[J]. 中国烟草学报, 2005, **11**(4): 33-38.
- LIANG J X, QI J M, WU W R, *et al.* DNA extraction and the establishment of SRAP reaction system in tobacco[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2005, **11**(4): 33-38.
- [16] 刘 超, 王玲利, 吴 頔, 等. 枇杷叶片发育基因 *EjGRF5* 与启动子克隆及其在不同倍性枇杷中的表达[J]. 中国农业科学, 2018, **51**(8): 1 598-1 606.
- LIU C, WANG L L, WU D, *et al.* Molecular cloning of leaf developmental gene *EjGRF5*, its promoter and expression analysis in different ploidy loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.] [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, **51**(8): 1 598-1 606.
- [17] PARENICOVA L, DE FOLTER S, KIEFFER M, *et al.* Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world[J]. *The Plant Cell*, 2003, **15**(7): 1 538-1 551.
- [18] UMEZAWA T, SUGIYAMA N, MIZOGUCHI M, *et al.* Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis* [J]. *PNAS*, 2009, **106**(41): 17 588-17 593.
- [19] FUJII H, CHINNUSAMY V, RODRIGUES A, *et al.* *In vitro* reconstitution of an abscisic acid signalling pathway[J]. *Nature*, 2009, **462**(7 273): 660-664.
- [20] 陈善福, 舒庆尧. 植物耐干旱胁迫的生物学机理及其基因工程研究进展[J]. 植物学通报, 1999, **16**(5): 555-560.
- CHEN S F, SHU Q Y. Biological mechanism of and genetic engineering for drought stress tolerance in plants[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 1999, **16**(5): 555-560.
- [21] 冀宪领, 盖英萍, 牟志美, 等. 干旱胁迫对桑树生理生化特性的影响[J]. 蚕业科学, 2004, **30**(2): 117-122.
- JI X L, GAI Y P, MU Z M, *et al.* Effect of water stress on physiological and biochemical character of mulberry[J]. *Acta Sericologica Sinica*, 2004, **30**(2): 117-122.
- [22] FAN K, YUAN S N, CHEN J, *et al.* Molecular evolution and lineage-specific expansion of the PP2C family in *Zea mays*[J]. *Planta*, 2019, **250**(5): 1 521-1 538.
- [23] SHAZADEE H, KHAN N, WANG J J, *et al.* Identification and expression profiling of protein phosphatases (PP2C) gene family in *Gossypium hirsutum* L [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, **20**(6): 1 395.
- [24] 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.
- [25] YU X F, HAN J P, LI L, *et al.* Wheat PP2C-a10 regulates seed germination and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell Reports*, 2020, **39**(5): 635-651.
- [26] FUJII H, ZHU J K. *Arabidopsis* mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress [J]. *PNAS*, 2009, **106**(20): 8 380-8 385.
- [27] 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**(5 930): 1 068-1 071.
- [28] MA Y, SZOSTKIEWICZ I, KORTE A, *et al.* Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors [J]. *Science*, 2009, **324**(5 930): 1 064-1 068.
- [29] 聂丽娜, 夏兰琴, 徐兆师, 等. 植物基因启动子的克隆及其功能研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2008, **9**(3): 385-391.
- NIE L N, XIA L Q, XU Z S, *et al.* Progress on cloning and functional study of plant gene promoters [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2008, **9**(3): 385-391.

(编辑:宋亚珍)