

苦荞蛋白磷酸酶 2C 家族的鉴定及表达分析

刘耀东¹, 肖书雅¹, 王安虎², 刘 宇¹, 方 阳¹,
李小意¹, 刘志斌¹, 李旭峰¹, 王健美¹, 杨 毅¹

(1. 四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065;
2. 西昌学院, 西昌 615000)

摘 要: 为了研究苦荞蛋白磷酸酶 2C(*PP2C*) 家族的成员和分类, 及后续探究其在苦荞生长发育中的功能, 本文利用生物信息学方法对苦荞 *PP2C* 家族进行鉴定、分类, 并对其基因结构、保守基序、分子进化等进行分析. 结果表明, 苦荞 *PP2C* 家族有 81 个成员, 划分为 A-K 的 11 个亚族, 并且在同亚族中序列特征相似, 而不同亚族间序列特征有一定差异; 苦荞 *PP2C* 家族有 14 次基因重复事件. 此外, qRT-PCR 分析结果表明其 A 亚族基因在苦荞根、茎、叶、花、果中均有表达, 除 *FtPP2C44* 外的 8 个基因在苦荞花、果中表达量较高; 在苦荞幼苗中, 除 *FtPP2C08* 外的 8 个基因均受 ABA 诱导表达量上调. 上述结果揭示了苦荞 *PP2C* 家族的成员组成、序列特征、扩增和其 A 亚族基因的组织表达模式及受 ABA 诱导表达情况.

关键词: 苦荞; 蛋白磷酸酶 2C; 表达分析; 脱落酸

中图分类号: Q74 **文献标识码:** A **DOI:** 10.19907/j.0490-6756.2021.046002

Genome-wide identification and expression analysis of
protein phosphatase 2C family in Tartary buckwheat

LIU Yao-Dong¹, XIAO Shu-Ya¹, WANG An-Hu², LIU Yu¹, FANG Yang¹,
LI Xiao-Yi¹, LIU Zhi-Bin¹, LI Xu-Feng¹, WANG Jian-Mei¹, YANG Yi¹

(1. Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China;
2. Xichang College, Xichang 615000, China)

Abstract: In order to study the members and classification of protein phosphatase 2C (PP2C) family in Tartary buckwheat and to explore its function in the growth and development of Tartary buckwheat, this study used bioinformatics methods to identify and classify the *PP2C* genes of Tartary buckwheat (*FtPP2C*), and its genes structure, conservative motifs, and molecular evolution were analyzed. The results revealed that 81 *FtPP2C* genes divided into 11 subgroups (A-K), and the sequence characteristics in the same subgroups were similar, but there were certain differences in sequence characteristics among different subgroups. The results also revealed that *FtPP2C* genes had 14 gene duplication events. In addition, the expression patterns of *FtPP2C* clade A genes were analyzed by qRT-PCR, and the results revealed that all *FtPP2C* clade A genes were expressed in five organs (roots, stems, leaves, flow-

收稿日期: 2021-02-10
基金项目: 国家转基因重大专项(2016ZX08009003-002); 国家自然科学基金(31870240); 四川小麦育种攻关(2016nyz003); 四川小麦创新团队(2016SCYZ02)
作者简介: 刘耀东(1997-), 男, 四川南充人, 硕士研究生, 研究方向基因和遗传信息分析. E-mail: 1007383380@qq.com
通讯作者: 杨毅. E-mail: yangyi528@scu.edu.cn

ers, and fruits), among them, 8 genes except *FtPP2C44* were highly expressed in flowers and fruits; in seedlings, all 8 genes except *FtPP2C08* were up-regulated after ABA treatment. The above results revealed that the composition, sequence characteristics, and amplification of the *FtPP2C* genes. These results also revealed the tissue expression pattern and the expression induced by ABA of *FtPP2C* clade A genes.

Keywords: Tartary buckwheat; PP2C; Expression analysis; ABA

1 引言

蛋白磷酸酶 2C (protein phosphatases 2C, PP2C) 依赖于 Mg^{2+}/Mn^{2+} 离子, 是蛋白磷酸酶中极其重要的一支^[1]. 从原核生物到真核生物, PP2C 参与各种有意义的生命调控活动, 在植物中, PP2C 是蛋白磷酸酶最大的一个分支^[2]. 植物 PP2C 被认为是蛋白信号级联反应中的负调控因子, 也在激素信号转导过程中扮演重要角色^[3]. 此外, 植物 PP2C 还能调控植物的生长发育, 包括种子萌发和根系发育^[4-5]. 植物 PP2C 基因家族之前有很多研究, 例如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、水稻 (*Oryza sativa*) 和大豆 (*Glycine max*)^[6-8]. 但是苦荞 PP2C 基因家族的研究未见报道.

苦荞 (*Fagopyrum tataricum*) 是一种药食兼用的粮食, 与甜荞 (*Fagopyrum esculentum*) 相比, 它更富含维生素 B 和芦丁, 这些成分有助于降低高血压和缓解动脉硬化^[9], 并且苦荞对恶劣环境有很强的耐受力, 而 PP2C 的 A 亚族是 ABA 信号通路中的核心成员, 参与植物逆境胁迫应答^[10-12]. 苦荞的基因组测序已经完成, 加快了苦荞抗逆的机制研究. 本研究参考拟南芥 PP2C 基因家族信息, 通过生物信息学方法在苦荞中全基因组中鉴定出 81 个 PP2C 成员, 并分析了理化性质、基因结构、保守结构域、保守基序分布、染色体定位、进化情况等. 同时, 通过 qRT-PCR 对苦荞 PP2C 的 A 亚族基因组织特异性表达和 ABA 处理后受诱导情况进行了分析. 这些结果对苦荞 PP2C 基因家族的后续研究奠定了基础.

2 材料和方法

2.1 材料

实验使用的苦荞种子为西荞 1 号, 由西昌学院王安虎老师提供. 所有的实验材料在四川大学生命科学学院阳台上的无菌土壤中进行培养, 培养土壤为蛭石和土壤的混合物 (1 : 3, v/v). 在相同生长条件下选择生长情况相同的样品进行处理. 将

收集到的植物样品用液氮处理后保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中用以进一步实验.

苦荞的基因组完整信息下载自 TBGP 数据库 (<http://www.mbkbase.org/Pinku1/>). 作为参考的拟南芥 PP2C 家族成员从已发表文献中获取, 蛋白质序列和 CDS 序列从 Ensembl Plants 数据库 (<http://plants.ensembl.org/index.html>) 下载.

2.2 方法

2.2.1 苦荞中 PP2C 家族成员的鉴定 通过参考拟南芥 PP2C 家族成员的蛋白质序列和苦荞其他基因家族的鉴定方法及参数选择^[7,13], 使用 BLAST 软件^[14] 搜索苦荞中 PP2C 家族的候选序列 ($\text{score} \geq 100$ and $e\text{-value} \leq 10^{-10}$), 并通过 HMMER^[15] 软件搜索 PP2C 结构域辅以搜索候选序列 ($e\text{-value} \leq 10^{-2}$). PP2C 结构域的隐马尔可夫模型文件 (HMM) 下载自 PFAM 数据库 (<http://pfam.xfam.org/>); PF00481. 候选序列通过搜索 PFAM 数据库验证是否含 PP2C 结构域以进一步筛选. 筛选后的序列中去掉基因的可变剪切, 最终确认了 81 个苦荞 PP2C 家族成员. 理论等电点 (pI) 和理论分子量 (MW) 等信息通过 ExPasy 网站 (https://web.expasy.org/compute_pi/) 上传蛋白质序列进行分析.

2.2.2 基于系统发育分析对苦荞 PP2C 家族进行分类 通过构建苦荞和拟南芥 PP2C 的系统发育树, 并参考拟南芥 PP2C 家族的分类, 根据它们在树上的相对位置, 将苦荞 PP2C 分为不同的亚族. 其中, 通过使用 MUSCLE 软件 (默认参数) 进行序列比对, 用 RAxML-NG 软件^[16] (`--all --msa input_file --model VT+I+G4+F --prefix at_ft --seed 678 --threads 4 --bs-tree autoMREs`) 构建极大似然 (ML) 系统发育树. 建树的模型通过 Modeltest-NG 软件分析, 选择 “VT+I+G4+F” 模型. 系统发育树的可视化通过 iTOL 网站 (<https://itol.embl.de/>) 完成.

2.2.3 苦荞 PP2C 家族的基因结构分析和序列特征分析 苦荞 PP2C 家族的基因结构分析通过

GSDS2.0 网站(<http://gsds.gao-lab.org/>)完成, 蛋白质保守基序分析通过使用 MEME 工具(<http://meme-suite.org/tools/meme>)完成, MEME 的参数调整为数目 20, 基序长度参数调整为 6 至 200.

2.2.4 苦荞 *PP2C* 家族的染色体定位和基因重复事件分析 苦荞 *PP2C* 家族的染色体定位基于苦荞基因组信息完成. 苦荞 *PP2C* 家族的基因重复事件分析使用 BLAST 软件进行序列比对, MC-ScanX 软件^[17]进行线性分析(默认参数), 得到苦荞 *PP2C* 家族的串联重复事件和区段重复事件.

2.2.5 实时荧光定量 PCR 为了分析苦荞 *PP2C* 的 9 个 A 亚族基因的组织特异性表达, 通过 qRT-PCR 对它们在苦荞根、茎、叶、花、果实五个器官中的表达进行分析, 并进行三组生物学重复. 为了分析苦荞 *PP2C* 的 A 亚族基因的受 ABA 诱导情况, 用 50 $\mu\text{mol/L}$ ABA 处理 7 日龄的苦荞幼苗后通过 qRT-PCR 进行分析, 其中, 处理时长分别为 0 h、0.5 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h, 用吸水纸干燥表面后使用 RNA 提取试剂盒(Tiagen)的方法从植物材料中提取总 RNA, 并通过使用 Prime Script RT

试剂盒(Takara)的方法合成 cDNA. 在 qRT-PCR 实验中, 引物通过 Primer3 程序(<http://frodo.wi.mit.edu/>)获取(表 1), 使用 *FtH3* 基因作为内部参考基因. 之后通过 2-($\Delta\Delta\text{Ct}$)方法分析获得的 mRNA 的表达情况.

3 结 果

3.1 苦荞 81 个 *PP2C* 家族成员的鉴定

用 BLAST 软件^[14]和 HMMER 软件^[15]筛选出 600 多个候选序列, 通过是否含 *PP2C* 结构域进一步筛选出 88 个序列, 在去除可变剪切的情况后, 确认了 81 个苦荞 *PP2C* 家族成员. 根据它们在染色体上的位置, 从上往下依次命名为 *FtPP2C01* 至 *FtPP2C81*, 相关结果提供下载(<https://github.com/felixlyd/ftpp2c>), 其中, 苦荞 *PP2C* 的 A 亚族序列特征信息如表 2 所示. 在苦荞 *PP2C* 家族中, 蛋白质序列长度从 125 (*FtPP2C06*)至 1 098(*FtPP2C15*), 平均长度为 400; 理论等电点(pI)分布在 4.34(*FtPP2C31*)至 9.6(*FtPP2C60*)之间; 理论分子量在 13 975.72 kD(*FtPP2C06*)至 123 818.42 kD(*FtPP2C15*)之间.

表 1 苦荞 *PP2C* 的 A 亚族基因表达分析的实时荧光定量引物

Tab. 1 The qRT-PCR primers for expression analysis of <i>FtPP2C</i> clade A genes		
基因 Gene	上游引物(5' - 3')Forward primer	下游引物(5' - 3')Reverse primer
FtPP2C08	GCGGGAGGCAAAGTTATACA	TTGTGCCACACATGAATCCT
FtPP2C17	GAAGCAGGGAAGATGAATGC	CCTCCACAGTGGTTTGAGGT
FtPP2C38	CTTCCACTTGCACCGAAAAT	GCGAAACTTGGATCTCTTGG
FtPP2C39	TGAAGCAGAGATCGGTGATG	GACGGTCAAGGGAACAGCTA
FtPP2C44	AATTGTGCCGTGTTTTGACA	AGCCCTTTCCCATTTGTTCCT
FtPP2C46	CGTTGTTCTGTGTTTCACCT	TTCATGCATCCTCTCAGCAC
FtPP2C50	GAGTGCGATAATGGCTGGAT	CTGCCACTGCATCTTCCATA
FtPP2C52	CTCGTAGGAGCGAGGATGAC	CTTGTGCAACCACAGCAGTT
FtPP2C57	TCCGATCATAAGCCGGATAG	ACAACGTCCCAGAGACCATC

表 2 苦荞 *PP2C* 家族的 A 亚族基因的序列特征信息

Tab. 2 The characteristics of <i>FtPP2C</i> clade A genes							
基因 Gene	基因登录号 Gene accession No.	染色体定位 Chr	分组 Group	氨基酸数 AA	分子量 MW/kD	等电点 pI	同源性最高基因(拟南芥) Homologous/At
FtPP2C08	FtPinG0006182000.01	Ft1	A	333	37 177.41	5.42	AT1G17550
FtPP2C17	FtPinG0006979700.01	Ft2	A	299	33 628.33	5.43	AT5G57050
FtPP2C38	FtPinG0007629100.01	Ft4	A	418	46 243.15	6.95	AT1G07430
FtPP2C39	FtPinG0004850700.01	Ft4	A	281	30 694.86	5.17	AT3G11410
FtPP2C44	FtPinG0003042800.01	Ft5	A	546	59 857.25	4.83	AT1G72770
FtPP2C46	FtPinG0009574600.01	Ft5	A	325	35 896.74	5.81	AT4G26080
FtPP2C50	FtPinG0006346100.01	Ft6	A	355	38 966.06	5.31	AT5G59220
FtPP2C52	FtPinG0007243300.01	Ft6	A	299	33 307.69	8.66	AT4G26080
FtPP2C57	FtPinG0002889200.01	Ft7	A	399	42 836.56	5.08	AT3G11410

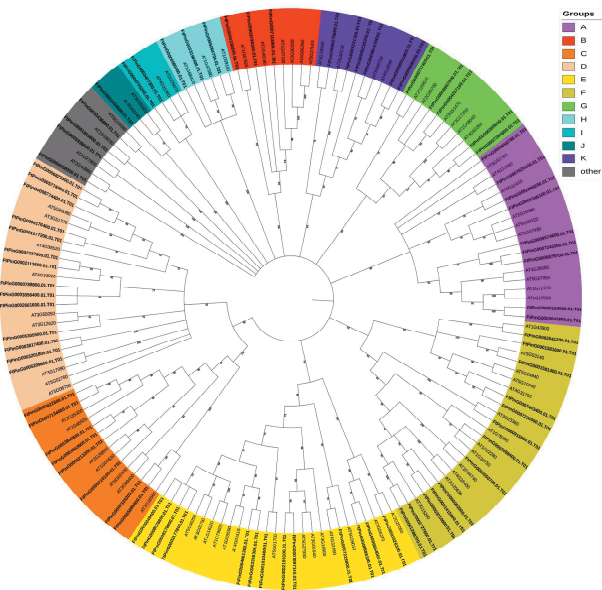


图 1 拟南芥和苦荞 PP2C 基因的系统发育树

Fig. 1 The phylogenetic tree of *AtPP2C* genes and *Ft*-*PP2C* genes

3.2 苦荞 PP2C 家族基因的分类

161 个 *PP2C* 基因的系统发育树通过 ML 方法构建(图 1),其中,苦荞 *PP2C* 基因数目为 81,拟南芥 *PP2C* 基因数目为 80. 根据拟南芥 *PP2C* 基因的分类^[6],将苦荞 *PP2C* 基因分为从 A 至 K 共 11 个亚族,标识“other”表示那些未分类的 *PP2C* 基因,其中,苦荞 *PP2C* 的 A 亚族有 9 个基因. Bootstrap 值用来标识分类的可靠性. C 亚族和 D 亚族的 bootstrap 值为 99%,被分类为 2 个亚族;F 亚族的两个子亚族 bootstrap 值为 92%,但这些基因被分类至 F 亚族. 这样的分类方法是依据拟南芥 *PP2C* 的分类推导出的. 在进化树中,最大的亚族是 E 亚族,有 13 个苦荞 *PP2C* 基因和 14 个拟南芥 *PP2C* 基因;最小的亚族是 J 亚族,只有 1 个苦荞 *PP2C* 基因和 2 个拟南芥 *PP2C* 基因. 此外,结果表明苦荞和拟南芥 *PP2C* 基因在各亚族的数目分布上趋近相同.

表 3 苦荞 PP2C 的保守基序信息

Tab. 3 The conserved motifs information of FtPP2C proteins

保守基序编号 Motif	长度 Length	氨基酸序列信息 Amino acid conserved sequence
1	29	SGSTALVALIQGDDLYVANVGDSRAVLGR
2	29	LTPDDEFLILASDGLWDVLSNZEAVDIVR
3	53	NNPRGGIAKRLVKAALQEAAKKREMRYSDLKKIERGIRRHFHDDITV IVIFLD
4	15	TFFGVFDGHGGPDAA
5	65	TGEVVAEQLSTEHNVAIESVRQELKALHPDDSHIVVLKHNVWRVK GIIQVSRSIGDVYLKKPEFN
6	20	LAVSRAFGDKCLKQYVVSSP
7	29	VAVQLSVDHKPDRPDERERIERAGGRVFS
8	41	RQDGLLWYKDJGQHANGEFSMAVVQANNLLEDQSQVESGPL
9	41	NLKKFATEQGGMSDEVIRKAFQATEEGFLSLVKKQWPMNPQ
10	15	RGSKDBITVIVDLK
11	41	YLKNNLFENILKEPNFWSDEKAIRKAYLKTDEEILESED
12	41	SAPNRASAAKALVESAVRAWKLKYPTSKVDDCAVVCLFLDT
13	41	TSGRISVNGASQFASLFTQQGKKGTNQDAMIVWEDFGSRDD
14	23	PKFRYGVASVIGRRRSMEDAHAI
15	29	REPLYAKFRLPEPFKKPILSAEPSILVHE
16	34	KHISHGYNLVKGKAGHPMEDYLVAFKQIDDNEL
17	29	VDHEPSREKDDIESRGGFVSNI PGDVPRV
18	20	LEAWKEAFLKAFKKMDKELK
19	25	QNVQWAQKGAGEDRVHVVVSEENGW
20	15	KDPZAAAKKLVEEAL

3.3 苦荞 PP2C 家族的基因结构和保守基序分析

基因结构分析主要为外显子和内含子分布分析(图 2b). 结果表明苦荞 *PP2C* 家族基因中,内含子的数目最小为 0(*FtPP2C25*),最大为 19(*FtPP2C15*),但大多数分布在 3 至 5 之间,其中有 27

个苦荞 *PP2C* 基因内含子数目为 3,占比三分之一;外显子的数目分布为 1(*FtPP2C25*)至 20(*FtPP2C15*),但大多数分布在 4 至 6 之间,其中有 37 个苦荞 *PP2C* 基因外显子数目为 4,占比 45.7%. 此外,在不同亚族间,外显子和内含子的分布有一

定差异,但在同亚族中,苦荞 *PP2C* 基因之间的外显子和内含子分布接近.

在苦荞 *PP2C* 中找到了 20 个保守基序(motif)(图 2a,表 3). 除 FtPP2C78、*FtPP2C*07、FtPP2C60、FtPP2C12、FtPP2C24 外,其他苦荞 *PP2C* 均含 motif4. 除 D 亚族和 K 亚族外,其他亚族均含 motif6. 苦荞 *PP2C* 的 A 亚族的保守基序分布模式基本为 motif14、motif4、motif18、motif1、motif7、motif6、motif2、motif20、motif10 (除 FtPP2C39 和 FtPP2C52 不含 motif14 而 FtPP2C44 含额外的 motif17). 其他亚族中的保守基序分布

也极为接近,例如 G 亚族保守基序均为 motif14、motif4、motif1、motif7、motif6、motif2、motif20、motif10;D 亚族保守基序分布模式基本为 motif 8、motif 4、motif 9、motif 1、motif 5、motif 15、motif 2、motif 3 (FtPP2C45、FtPP2C48、FtPP2C41 不含 motif15; FtPP2C03 不含 motif8; FtPP2C54 不含 motif2 和 motif3).

基因结构分析结果和保守基序分析结果可验证苦荞 *PP2C* 家族分类的正确性,根据这些结果可以推测出苦荞 *PP2C* 不同亚族间的基因功能有一定差异.

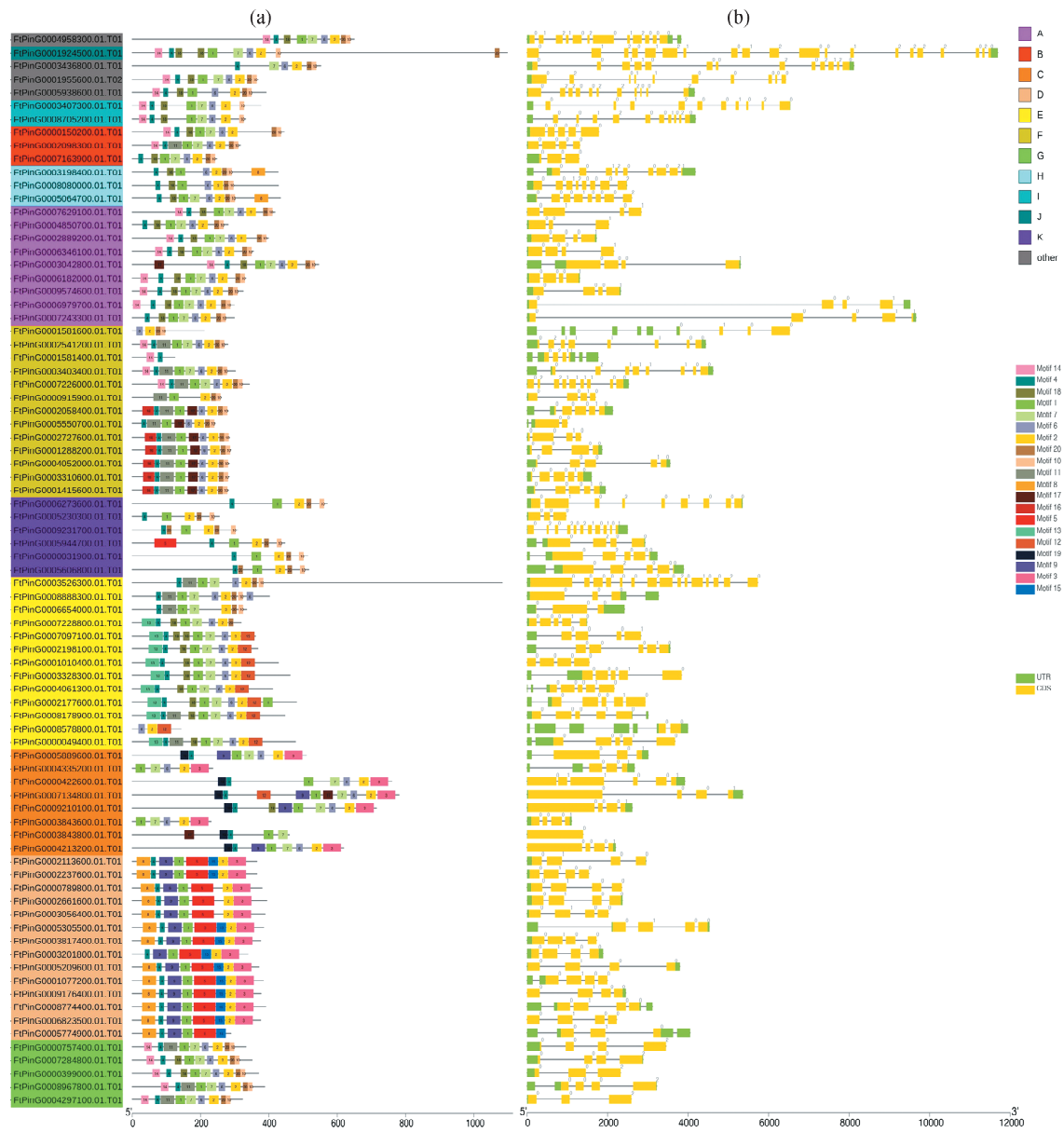


图 2 81 个苦荞 *PP2C* 基因的保守基序分布和基因结构分析
(a) 苦荞 *PP2C* 的保守基序, (b) 苦荞 *PP2C* 基因的基因结构.

Fig. 2 The conserved protein motifs and gene structures of the 81 *FtPP2C* genes
(a)The conserved motifs of the *FtPP2C* proteins, (b)the gene structures of the *FtPP2C* genes.

3.4 苦荞 PP2C 家族的染色体定位和基因重复事件分析

基于苦荞基因组信息对苦荞 PP2C 基因进行染色体定位,结果表明苦荞 PP2C 基因在苦荞的 8 个染色体上均有分布,并且分布情况相对均匀(图 3a). 苦荞 PP2C 基因在染色体上的分布数量分别

为:15(*Ft1*)、10(*Ft2*)、9(*Ft3*)、9(*Ft4*)、4(*Ft5*)、8(*Ft6*)、10(*Ft7*)、16(*Ft8*). 基因重复事件分析结果表明苦荞 PP2C 家族没有串联重复事件,但是有 14 次分布在苦荞不同染色体上的区段重复事件(图 3b). 这表明区段重复事件是苦荞 PP2C 基因数量增多的重要途径.

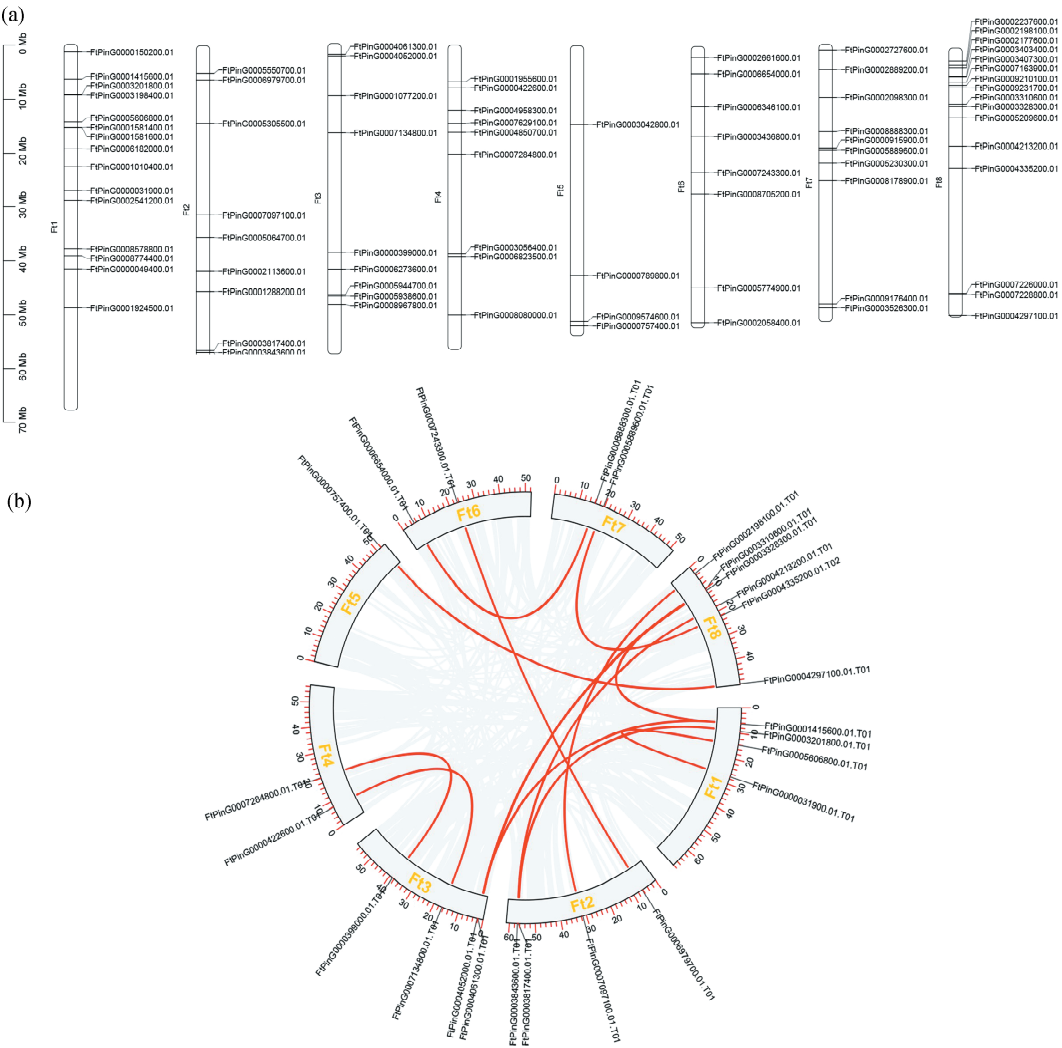


图 3 苦荞 PP2C 基因的染色体分布及线性分析
(a)苦荞 PP2C 基因的染色体分布, (b)苦荞 PP2C 基因在苦荞全基因组上的线性分析.
Fig. 3 The position distribution and synteny analysis of *FtPP2C* genes on the chromosomes
(a)The position distribution of *FtPP2C* genes, (b)the synteny analysis of the *FtPP2C* genes based on the genomic sequences of Tartary buckwheat.

3.5 苦荞 PP2C 的 A 亚族基因的组织特异性表达分析

通过 qRT-PCR 分析了苦荞 PP2C 的 A 亚族基因在苦荞根、茎、叶、花、果实五个器官中的表达模式,结果表明它们在所有器官中均有表达. 其中,除 *FtPP2C44* 外,8 个基因在苦荞生殖器官尤其是果实中,表达量比较高(图 4a),例如 *FtPP2C08* 主要在花和果实中表达,*FtPP2C38* 在果实中的表达量是在叶中的 1 715 倍. 此外, *Ft*-

PP2C39 在根中表达量比较高,其他基因在根中表达量较低. 据此推测苦荞 PP2C 家族的 A 亚族基因主要在苦荞生殖器官中表达并发挥一定作用,这与之前拟南芥[6]、水稻[7]、大豆[8]中的研究一致.

3.6 苦荞 PP2C 的 A 亚族基因受 ABA 诱导的表达情况

通过 qRT-PCR 分析了苦荞 PP2C 的 A 亚族基因在 ABA 处理下的表达情况,其中,处理条件分别为 0 h、0.5 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h(图 4b).

结果表明除 *FtPP2C08* 外, 8 个基因均受 ABA 诱导表达量显著上调。其中, 在 ABA 诱导下 4 h 时, 8 个基因受 ABA 诱导表达量最高; *FtPP2C39* 在所有处理条件下表达量都较高。从而推测, 苦荞

PP2C 的 A 亚族基因在 ABA 处理后表达量上调具有一定生物学意义, 而 *FtPP2C39* 发挥的作用可能较为重要。

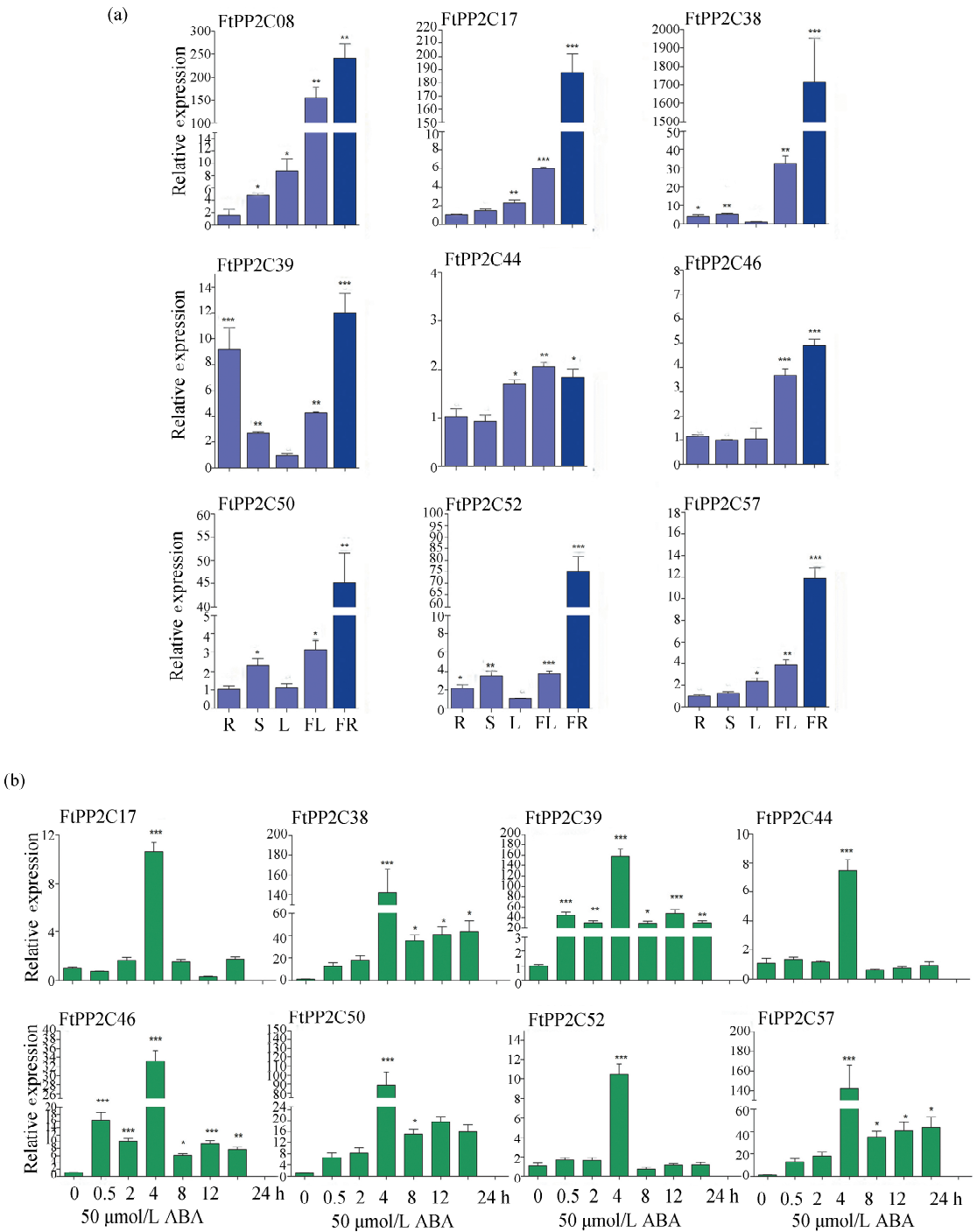


图 4 苦荞 *PP2C* 的 A 亚族基因的表达分析

星号表示显著差异(*t* 检验, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)。 (a)苦荞 *PP2C* 的 A 亚族基因的组织特异性表达分析, (b)苦荞 *PP2C* 的 A 亚族基因在 ABA 胁迫下的表达模式。

Fig. 4 The gene expression analysis of *FtPP2C* clade A genes

Asterisks indicate significant differences (Student's *t* test, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$). (a) The tissue-specific expression analysis of *FtPP2C* clade A genes, (b)the expression patterns of *FtPP2C* clade A genes at ABA stress.

4 讨 论

过去的研究表明 *PP2C* 基因家族在植物中具有关键作用,但是目前有关苦荞 *PP2C* 基因家族的研究很少。本文从苦荞全基因组中鉴定出 81 个 *PP2C* 家族成员,与拟南芥 80 个 *PP2C* 家族成员在数量上非常接近^[7]。对苦荞和拟南芥 *PP2C* 进行系统发育分析,将苦荞 *PP2C* 分类为从 A-K 的 11 个亚族,其中苦荞 *PP2C* 的 A 亚族有 9 个成员。结果还表明除 *AT4G11040* 外,拟南芥 *PP2C* 其他分类结果与以前的研究一致。这可能是因为构建系统发育树的方法不同,以前的研究^[7]使用了邻接法(NJ)而此处使用了极大似然法(ML)。此外,与拟南芥 *PP2C* 家族相比,苦荞 *PP2C* 家族中 C、D、K 亚族的成员更多,而 A、B、E、G、J 亚族的成员更少。基因重复事件分析结果表明苦荞 *PP2C* 家族有 14 次区段重复事件,而拟南芥中则是 13 次,数值非常接近。基因重复事件与基因家族的扩增有关,从而推测这可能是两者 *PP2C* 数量上十分接近的原因。出现这种情况的原因可能是植物 *PP2C* 的基因功能在进化过程中相对保守^[18]。

保守基序分析结果表明苦荞 *PP2C* 家族在保守基序分布上有一定差异,但它们均含保守的 *PP2C* 结构域。而且在相同亚族中,蛋白质保守基序的组成相近。特定的保守基序分布可以代表特定的功能,例如拟南芥中 *PP2C* 的 A 亚族成员参与调控 ABA 应答过程^[7],而它们的保守基序组成类似。苦荞 *PP2C* 的 A 亚族也具有相似的保守基序组成,与拟南芥 *PP2C* 的 A 亚族亲缘性较高,从而推测苦荞 *PP2C* 的 A 亚族也参与调控 ABA 应答过程。而 qRT-PCR 分析结果表明苦荞 *PP2C* 的 A 亚族基因在 ABA 处理后除 *FtPP2C08* 外均受诱导表达显著上调,上调的原因可能是因为 ABF 结合 *PP2C* 启动子调控其表达^[19]。因此推测苦荞 *PP2C* 的 A 亚族基因在苦荞 ABA 应答过程中发挥一定作用。

qRT-PCR 分析结果还表明苦荞 *PP2C* 的 9 个 A 亚族基因在根、茎、叶、花、果中均有一定表达,其中, *FtPP2C08*、*FtPP2C17*、*FtPP2C38* 在花和果实中的表达量较高;*FtPP2C39* 在根中表达量很高。此外, *FtPP2C39* 与拟南芥 *AT4G11040* (又名 *DOG18*) 基因同源性较高,而拟南芥种子休眠和萌发受到 *DOG18* 的调控^[20],据此推测 *FtPP2C39* 在苦荞种子休眠和萌发过程中发挥一定作用。

综上所述,本文通过生物信息学方法对苦荞 *PP2C* 家族进行分析,并通过 qRT-PCR 对苦荞 *PP2C* 的 A 亚族基因进行了组织特异性表达和 ABA 处理后受诱导情况分析,这些结果为进一步挖掘和研究苦荞 *PP2C* 家族的基因功能奠定了基础,有利于进一步对苦荞抗逆的机制研究。

参考文献:

- [1] Luan S. Protein phosphatases and signaling cascades in higher plants [J]. Trends Plant Sci, 1998, 3: 271.
- [2] 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]. Crit Rev Biotechnol, 2016, 36: 1023.
- [3] Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, et al. Regulators of *PP2C* phosphatase activity function as abscisic acid sensors [J]. Science, 2009, 324: 1064.
- [4] Kim W, Lee Y, Park J, et al. HONSU, a protein phosphatase 2C, regulates seed dormancy by inhibiting ABA signaling in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell Physiol, 2013, 54: 555.
- [5] Song S K, Hofhuis H, Lee M M, et al. Key divisions in the early *Arabidopsis* embryo require POL and PLL1 phosphatases to establish the root stem cell organizer and vascular axis [J]. Dev Cell, 2008, 15: 98.
- [6] Schweighofer A, Hirt H, Meskiene I. Plant *PP2C* phosphatases: emerging functions in stress signaling [J]. Trends Plant Sci, 2004, 9: 236.
- [7] Xue T, Wang D, Zhang S, et al. Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and *Arabidopsis* [J]. BMC Genom, 2008, 9: 550.
- [8] Fan K, Chen Y, Mao Z, et al. Pervasive duplication, biased molecular evolution and comprehensive functional analysis of the *PP2C* family in *Glycine max* [J]. BMC Genom, 2020, 21: 1.
- [9] Wang Y, Campbell C G. Tartary buckwheat breeding (*Fagopyrum tataricum* L. Gaertn.) through hybridization with its Rice-Tartary type [J]. Euphytica, 2007, 156: 399.
- [10] Zhang L, Li X, Ma B, et al. The tartary buckwheat genome provides insights into rutin biosynthesis and abiotic stress tolerance [J]. Mol Plant, 2017, 10: 1224.
- [11] Dittrich M, Mueller H M, Bauer H, et al. The role of *Arabidopsis* ABA receptors from the PYR/

PYL/RCAR family in stomatal acclimation and closure signal integration [J]. Nat Plants, 2019, 5: 1002.

[12] 李褚喆, 王博雅, 李颖, 等. 拟南芥 E3 泛素连接酶 AtARRE 与 ABI5 相互作用分析 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2019, 56: 181.

[13] Liu M, Ma Z, Sun W, *et al.* Genome-wide analysis of the NAC transcription factor family in Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) [J]. BMC Genom, 2019, 20: 1.

[14] Altschul S F, Gish W, Miller W, *et al.* Basic local alignment search tool [J]. J Mol Biol, 1990, 215: 403.

[15] Potter S C, Luciani A, Eddy S R, *et al.* HMMER web server: 2018 update [J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46: W200.

[16] Kozlov A M, Darriba D, Flouri T, *et al.* RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference [J]. Bioinformatics, 2019, 35: 4453.

[17] Wang Y, Tang H, Debarry J D, *et al.* MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity [J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40: e49.

[18] Fuchs S, Grill E, Meskiene I, *et al.* Type 2C protein phosphatases in plants [J]. FEBS J, 2013, 280: 681.

[19] Wang X, Guo C, Peng J, *et al.* ABRE-BINDING FACTORS play a role in the feedback regulation of ABA signaling by mediating rapid ABA induction of ABA co-receptor genes [J]. New Phytol, 2019, 221: 341.

[20] Xiang Y, Song B, Née G, *et al.* Sequence polymorphisms at the REDUCED DORMANCY5 pseudophosphatase underlie natural variation in Arabidopsis dormancy [J]. Plant Physiol, 2016, 171: 2659.

引用本文格式:

中 文: 刘耀东, 肖书雅, 王安虎, 等. 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: 046002.

英 文: Liu Y D, Xiao S Y, Wang A H, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of protein phosphatase 2C family in Tartary buckwheat [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 2021, 58: 046002.