

曾坚,李丽珍,沈梓欣,等.木薯*MePP2CAa*基因克隆、表达及蛋白互作分析[J].华中农业大学学报,2024,43(1):141-148.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.01.016

木薯 *MePP2CAa* 基因克隆、表达及蛋白互作分析

曾坚¹,李丽珍¹,沈梓欣¹,林墁¹,刘博婷¹,
吴春来^{2,3},李冰⁴,胡伟³,曾力旺^{2,3}

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,韶关 512005;
2. 中国热带农业科学院科技信息研究所,海口 571101; 3. 中国热带农业科学院热带作物生物育种全国重点实验室/热带生物技术研究所,海口 571101; 4. 平江县第一中学,岳阳 414500

摘要 为探究2C型蛋白磷酸酶(protein phosphatase 2C, PP2C)在木薯响应非生物胁迫过程中的作用,利用木薯 Arg7 叶片 cDNA 扩增 *MePP2CAa* 基因,分析该基因序列、启动子活性、不同逆境和激素处理下的表达模式以及与 ABA 受体 PYLs 之间的互作关系。序列分析结果显示, *MePP2CAa* 基因全长 1 311 bp, 编码 436 个氨基酸, 具有 PP2C 家族的结构域特征, 与橡胶树和麻风树的 PP2C 序列同源性最高, 分别为 78.95% 和 74.09%, 在 C 端保守; qRT-PCR 分析结果显示, *MePP2CAa* 基因在木薯储藏根中的表达显著高于茎、叶中的表达量; 不同逆境和激素处理结果显示, 甘露醇、NaCl、ABA、MeJA、低温和 SA 处理可以显著诱导 *MePP2CAa* 基因的表达; *MePP2CAa* 基因启动子序列分析显示, 启动子包含 ABA 应答元件(abscisic acid responsive element, ABRE)、MeJA 响应元件、干旱诱导元件等; 酵母双杂交结果显示 *MePP2CAa* 能够与 MePYL1 互作。以上结果表明, *MePP2CAa* 基因可能响应木薯的非生物胁迫。

关键词 木薯; 脱落酸; 2C型蛋白磷酸酶; 非生物胁迫

中图分类号 S533 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)01-0141-08

脱落酸(abscisic acid, ABA)在植物的生长发育中扮演着重要角色,涉及种子发芽、幼苗发育、植物生长、开花、性别分化和果实成熟等多个过程^[1-3],同时也参与植物对干旱、高盐、寒冷和病原体侵染等非生物和生物胁迫反应^[4-5]。然而,ABA信号通路相对复杂,直到2009年,学者们才在拟南芥中阐明了ABA信号转导的核心通路,该通路包括ABA受体PYR/PYL/RCARs(ABA信号的正向调节)、蛋白磷酸酶A(PP2CAs)亚家族(ABA信号的负向调节)和蛋白激酶SnRK2s(ABA信号的正向调节)^[6]。

农业生产受干旱的影响,会导致作物生长受阻,作物产量显著降低^[7-8]。激素是植物对非生物胁迫做出响应的重要调节因子,其中ABA是对干旱胁迫做出反应的关键激素^[9]。研究表明,当植物面临干旱胁迫时,会增加ABA含量,同时也会改变许多基因

的表达,这种反应既有ABA依赖的反应,也有非ABA依赖的调节系统,而ABREs则是ABA依赖反应途径中的主要反应元件^[10-12]。PP2C A亚家族通常在ABA信号转导中发挥负调节作用^[6, 13],目前已经在水稻^[14-15]、玉米^[16]、二穗短柄草^[17]、棉花^[18]等物种中鉴定出PP2C A亚家族成员。研究表明,拟南芥中的 *abi1/abi2/hab1/ahg3/pp2ca* 基因突变体可以通过负调节ABA信号来影响植物的生长发育^[19-20]和应激反应^[21-22]。异源过表达 *ZmPP2C* 和 *ZmPP2C-A10* 基因可以负调节ABA信号传递,使转基因拟南芥对外源ABA处理不敏感,而对盐分和干旱胁迫的敏感性增加^[23-24];另外,过表达杨树 *PP2C* 基因也会负调节ABA信号转导,进而使转基因植株对干旱胁迫更加敏感^[25]。

木薯(*Manihot esculenta* Crantz)是热带和亚热带

收稿日期:2023-07-06

基金项目:广东省基础与应用基础研究基金项目(2023A1515010336; 2021A1515011236); 广东省普通高校重点领域专项(2022ZDZX4047); 韶关学院重点项目(SZ2022KJ05); 国家自然科学基金项目(31901537); 韶关学院博士科研启动项目(99000615); 国家级大学生创新创业训练计划项目(202310576009)

曾坚, E-mail: zengjian@sgu.edu.cn

通信作者:曾力旺, E-mail: zengliwang@163.com

地区一种重要的粮食作物,是全球第六大粮食作物,为7亿人提供碳水化合物^[26-27]。木薯具有典型的抗旱特性,可以作为作物抗旱机制研究的理想材料^[28]。目前关于木薯中 *PP2C* 基因家族的研究相对有限^[29],该基因在非生物胁迫下的功能和调控机制仍不清楚。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 *MePP2CAa* 基因,并对其编码蛋白序列进行生物信息学分析,分析 *MePP2CAa* 基因的自激活和启动子活性,不同逆境胁迫和激素处理下的表达模式,以及与 ABA 受体 PYLs 之间的互作关系,旨在为深入研究 *MePP2CAa* 基因的功能提供有价值的参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料和处理

试验品种为木薯 Arg7,由中国热带农业科学院热带生物技术研究所提供。采集大田种植环境下木薯叶片(90 d)、茎(90 d)和储藏根(R1 90 d、R2 150 d、R3 210 d、R4 270 d)材料;选取扦插后 60 d 长势一致的木薯 Arg7 幼苗进行不同激素和胁迫处理试验,① 100 $\mu\text{mol/L}$ MeJA、100 $\mu\text{mol/L}$ SA、100 $\mu\text{mol/L}$ ABA 处理后分别在 0、2、6、12、24 h 采集叶片;② 300 mmol/L NaCl 和 200 mmol/L 甘露醇处理后分别在 0 h、2 h、6 h、3 d 和 14 d 采集叶片;③ 4 $^{\circ}\text{C}$ 处理后分别在 0、

2、6、12、48 h 采集叶片。采样后迅速放入液氮速冻,于 -80°C 超低温冰箱中保存,用于 RNA 提取和实时荧光定量分析。

1.2 基因克隆与生物信息学分析

根据 Phytozome 数据库中的木薯序列(Manes.02 G128000),设计引物 *MePP2CAa*-F/*MePP2CAa*-R (表 1),以叶片 cDNA 为模板进行扩增。利用 ExPASy ProtParam (<http://web.expasy.org/prot-param/>)对 *MePP2CAa* 基因编码蛋白的理化性质进行分析,运用 SOPMA 和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)进行结构预测,利用 BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行同源序列的搜索,利用 MEGA-X 中的 MUSCLE 方法进行序列比对,采用 Neighbor-joining 法构建系统发育树。

1.3 启动子克隆和序列分析

从 Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>)中获取木薯 *MePP2CAa* 基因上游 1 500 bp 启动子序列,设计 *MePP2CAaP*-F/*MePP2CAaP*-R 引物扩增启动子区域(表 1),利用 PlantCARE (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对 *MePP2CAa* 基因启动子进行顺式作用元件分析。

表 1 引物序列

Table 1 Primers used in this experiment

基因名称 Gene name	引物序列(5'—3') Primers sequences	用途 Usage
<i>MePP2CAa</i>	F:ATGGCGATGGCTGGGATATGTTGCGAA; R:CGTGCCTTTCCTAAGATCCAC	基因克隆 Gene cloning
<i>qMePP2CAa</i>	F:ACCGTCCAGATGAGTTGAAG; R:CCGTCCGTTCCGTTATCG	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
<i>TUB</i>	F:TGCCATGTTCCGTGGAAAGATG; R:CCCCTAGGTGGAATGTCACAGACAC	启动子克隆 Promoter cloning
<i>MePP2CAaP</i>	F:GTCTCACATAAGCCTATAAGCA; R:TAAAAAAGAAAATACACTCCTTATTAAGTC	
BD <i>MePP2CAa</i>	F:GGAATTCATGGCTGGGATATGTTGCGAA; R:CGGGATCCCGTGCCTTTCCTAAGATCCAC	
AD <i>MePP2CAa</i>	F:GGAATTCATGGCTGGGATATGTTGCGAA; R:CGGGATCCCGTGCCTTTCCTAAGATCCAC	
BD <i>MePYL1</i>	F:GGAATTCATATGATGATAGAAAAGCTTGAGG; R:CGGGATCCGATGCAATTAATGGGCTCAGTC	酵母双杂交 Yeast two-hybrid assay
BD <i>MePYL2</i>	F:GGAATTCATGATTCTTGATCTTAACCTC; R:CGGGATCCAGATGATGATGATGATGATTG	
BD <i>MePYL3</i>	F:GGAATTCATGGAGAAGCCAGAGTCTCA; R:CGGGATCCAATTACCTGCGATTTCCGTCAC	
BD <i>MePYL4</i>	F:GGAATTCATATGATGCCTTCTAATCCTCACAAG; R:CGGGATCCCGATGATGATGATTGTTTCTG	

1.4 启动子活性分析

将 pGreen II 0800-LUC-*MePP2CAaP* 载体转入

农杆菌 GV3101 感受态细胞,挑选阳性转化子,将菌体用注射烟草的重悬液调整至 OD₆₀₀ 为 1.0, 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒

温培养箱中暗培养3 h后,将其注射至生长56 d左右的烟草嫩叶下表皮,培养3 d后进行双荧光素酶含量的测定,计算LUC/REN值,每个样品6次生物学重复。

1.5 基因表达分析

根据 *MePP2CAa* 序列设计实时荧光定量PCR引物 *qMePP2CAa-F* 和 *qMePP2CAa-R*(表1),分析 *MePP2CAa* 基因在不同激素和胁迫处理中的表达情况,*MeTUB* 为内参基因,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[26] 计算基因的相对表达量。

1.6 转录激活和互作分析

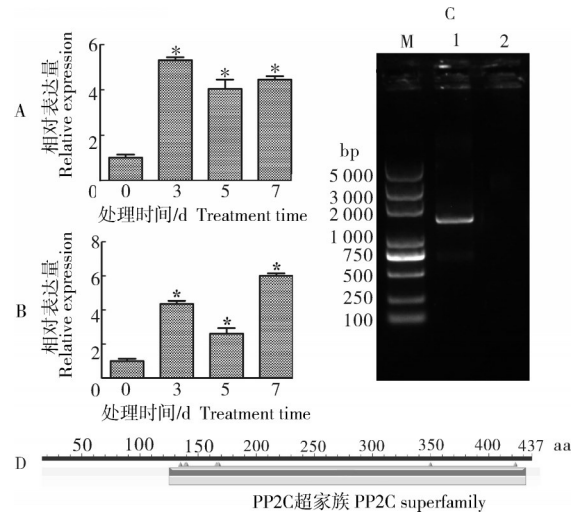
将载体 pGBKT7-*MePP2CAa* 转化到酵母中,取200 μ L 涂板至一缺培养基(SD/-Trp),29 $^{\circ}$ C培养48~96 h,挑取长势较好的单菌落验证阳性转化子,用液体SD/-Trp培养基活化阳性转化子菌落,用ddH₂O稀释至合适浓度,取2 μ L菌落水溶液分别点于SD/-Trp、SD/-His和SD/-His/X- α -gal培养基,29 $^{\circ}$ C培养观察菌落生长状况。

构建 *MePYLs* 和 *MePP2CAa* 基因的酵母表达载体。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(引物见表1)两两转化到 AH109 酵母感受态中培养观察蛋白的互作情况。挑取 SD/-Trp/-Leu 培养基上的长势较好的单菌落验证阳性转化子,挑取原始菌落进行10倍稀释,吸取稀释后菌落水溶液2 μ L,点于SD/-Trp/-Leu和SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His培养基,29 $^{\circ}$ C培养观察菌落生长状况。

2 结果与分析

2.1 *MePP2CAa* 基因克隆

前期试验结果表明,木薯 PP2C 基因(Manes.02G128000)可以受到ABA和PEG的诱导表达(图1A、B)。根据 Manes.02G128000 序列设计引物进行基因扩增,得到长度1311 bp的片段(图1C),经测序分析发现,该片段编码436个氨基酸,保守结构域预测显示该蛋白含有PP2C家族结构域(图1D),因此命名为 *MePP2CAa* 基因。*MePP2CAa* 蛋白的分子式为 C₂₀₃₀H₃₂₉₈N₆₀₂O₆₄₇S₃₁,理化性质分析结果显示,*MePP2CAa* 蛋白的分子质量为47.48 ku,理论等电点为6.08,不稳定系数为54.24,属不稳定蛋白。序列分析发现 *MePP2CAa* 基因序列包含4个外显子和3个内含子。



A: ABA处理下 *MePP2CAa* 基因的表达分析 Expression level of *MePP2CAa* under ABA treatment; B: PEG处理下 *MePP2CAa* 基因的表达分析 Expression level of *MePP2CAa* under PEG treatment; C: *MePP2CAa* 基因扩增 *MePP2CAa* gene amplification. M: DNA marker; 1: 目标基因 Target gene; 2: 阴性对照 Negative control; D: *MePP2CAa* 蛋白结构域分析 Conserved domain analysis of *MePP2CAa*; *表示0.05水平上差异显著, * indicates significant difference at 0.05 level.

图1 *MePP2CAa* 基因的克隆及不同处理条件下的表达分析
Fig.1 Cloning and expression analysis of *MePP2CAa* in different treatments

2.2 *MePP2CAa* 氨基酸序列同源性比对和系统发育分析

利用NCBI数据库序列查找与 *MePP2CAa* 蛋白序列相似性较高(>65%)的蛋白序列,序列比对结果显示, *MePP2CAa* 蛋白序列与橡胶树 PP2C(XP_021649290.1)和麻风树 PP2C(KDP42204.1)一致性最高,分别为78.95%和74.09%(图2),表明不同物种间PP2C蛋白序列具有较高的保守性。系统进化树分析显示,大戟科植物木薯 *MePP2CAa* 和橡胶树 HbPP2C24 亲缘关系较近,位于同一分支(图3)。

2.3 *MePP2CAa* 基因启动子的活性分析

通过PCR获得 *MePP2CAa* 基因1500 bp的启动子序列,利用PlantCARE数据库对 *MePP2CAa* 基因的启动子序列进行分析,结果如图4所示,该基因的启动子除了包含基本的核心启动子元件,还包括2个ABRE顺式调控元件、2个MeJA响应元件及1个干旱诱导元件。为了验证克隆得到的 *MePP2CAa* 基因启动子是否具有活性,进行了瞬时转化烟草叶片的实验。结果显示,克隆得到的 *MePP2CAa* 基因启动子具有较高的活性,能够有效启动下游结构基因的表达。

橡胶树 XP_021642594.1[<i>Hevea brasiliensis</i>]	MAITGGCVVSDSASMPCE.GSPRAA.....RRRRRETRRFVFTGVFSSPTAE.....SNRRRIEVHT... 61
木薯 MePP2CAa[<i>Manihot esculenta</i>]	MAGHCGEVSVDGSASTQSE.GSSRA.....RRRRRETRRFVFTGVFSSPTAE.....SNRRRIEVHT... 61
麻疯树 KDP42204.1[<i>Jatropha curcas</i>]	MAGHCGEVSVDGSASTQSE.GSSRA.....RRRRRETRRFVFTGVFSSPTAE.....SNRRRIEVHT... 62
蓖麻 XP_015575533.3[<i>Ricinus communis</i>]	MADTGGCVVSDSASAKFCGSSRAA.....RRRRRETRRFVFTGVFSSPTAE.....SNRRRIEVHT... 80
楝树 KAJ4725720.1[<i>Melia azedarach</i>]	MADTGGCVVSDSASAKFCGSSRAA.....RRRRRETRRFVFTGVFSSPTAE.....SNRRRIEVHT... 31
银白杨 XP_034926636.1[<i>Populus alba</i>]	MADTGGCVVSDSASAKFCGSSRAA.....RRRRRETRRFVFTGVFSSPTAE.....SNRRRIEVHT... 67
可可树 EOY33930.1[<i>Theobroma cacao</i>]	MADTGGCVVSDSASAKFCGSSRAA.....RRRRRETRRFVFTGVFSSPTAE.....SNRRRIEVHT... 59
榴莲 XP_022752708.1[<i>Durio zibethinus</i>]	MADTGGCVVSDSASAKFCGSSRAA.....RRRRRETRRFVFTGVFSSPTAE.....SNRRRIEVHT... 58
拟南芥 VYS53880.1[<i>Arabidopsis thaliana</i>]	MADTGGCVVSDSASAKFCGSSRAA.....RRRRRETRRFVFTGVFSSPTAE.....SNRRRIEVHT... 52
水稻 NP_001393272.1[<i>Oryza sativa</i>]	MAITGGCVVSDSASAKFCGSSRAA.....RRRRRETRRFVFTGVFSSPTAE.....SNRRRIEVHT... 74

黑色线段表示PP2C结构域,由307个氨基酸组成。The black line represents the PP2C domain, which consists of 307 amino acids.

图2 MePP2CAa 蛋白序列的同源性比对

Fig.2 Homologous alignment of MePP2CAa sequences

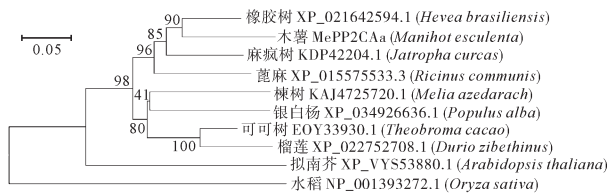
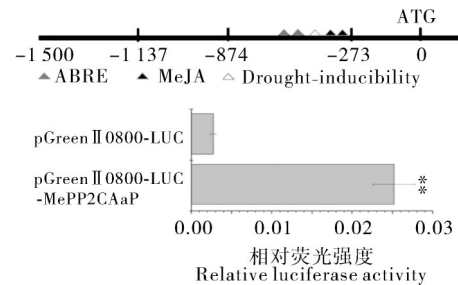


图3 基于MePP2CAa氨基酸序列相似性构建的系统发育树
Fig.3 Phylogenetic tree based on MePP2CAa amino acid sequence similarity

2.4 MePP2CAa 基因的表达分析

木薯储藏根、茎、叶3种组织中MePP2CAa基因的表达模式分析结果显示(图5),MePP2CAa基因在储藏根中的表达明显高于叶和茎。MePP2CAa基因在储藏根中的表达随着发育时间的增加而上升,在R2(150 d)阶段达到最高水平,随后呈下降趋势。为

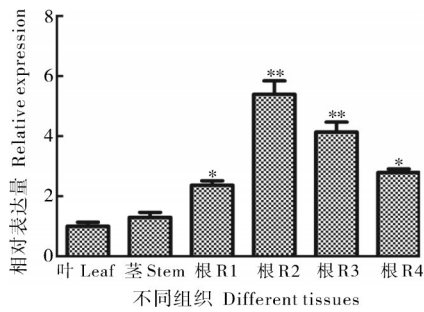


**表示在0.01水平上差异显著。 ** indicates significant difference at 0.01 level.

图4 MePP2CAa的启动子活性分析

Fig.4 The promoter activity analysis of MePP2CAa

了探究MePP2CAa基因的表达是否受胁迫诱导,检测了不同胁迫和激素处理条件下叶片中MePP2CAa基因的表达水平,结果显示,NaCl处理和甘露醇处理条件下,MePP2CAa基因的表达量随着处理时间的

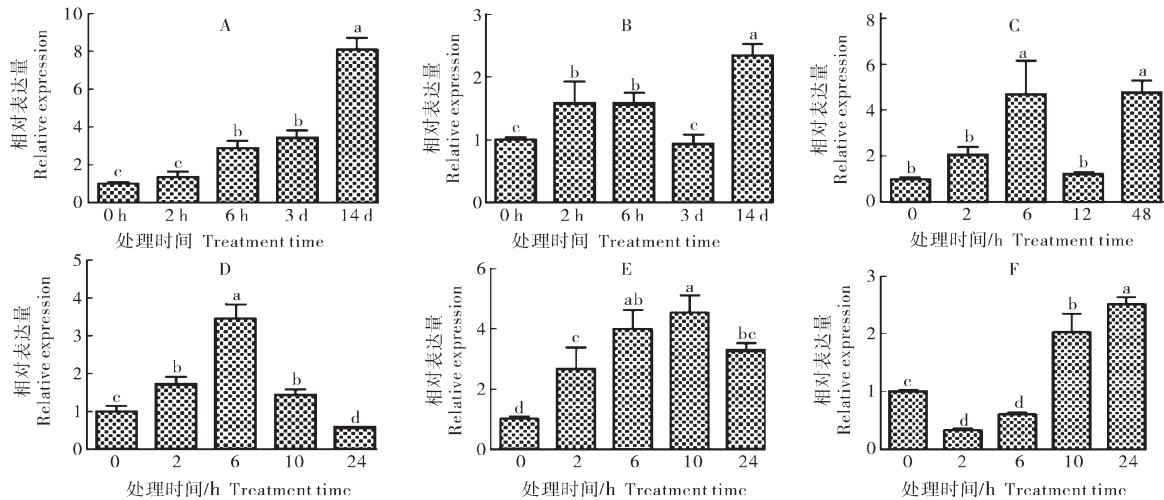


R1-R4 储藏根发育 90、150、210、270 d。*和**分别表示在 0.05 和 0.01 水平上差异显著。R1-R4 represent storage roots developed for 90 d, 150 d, 210 d and 270 d, respectively. * and ** indicate significant difference at 0.05 and 0.01, respectively.

图5 *MePP2CAa* 在不同组织中的表达量

Fig.5 *MePP2CAa* expression in different tissues

延长而增加,在 14 d 时达到最高(图 6A、B);冷处理下,*MePP2CAa* 基因的表达量在 48 h 达到最高(图



A:NaCl处理 NaCl treatment;B:甘露醇处理 Mannitol treatment;C:冷处理 Cold treatment;D:MeJA处理 MeJA treatment;E:ABA处理 ABA treatment;F:SA处理 SA treatment. 不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著 Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level.

图6 *MePP2CAa* 基因在不同胁迫和激素处理条件下的表达

Fig.6 *MePP2CAa* expression under different stress and hormone treatments

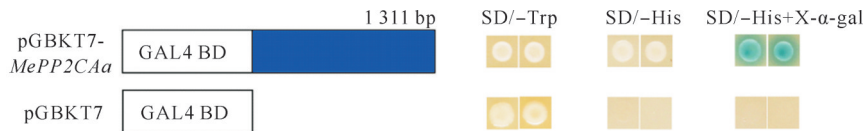


图7 *MePP2CAa* 自激活检测

Fig.7 Analyses of *MePP2CAa* self-activation in yeast

前人研究发现,ABA 信号转导途径中 PP2CA 亚家族成员可以与 PYLs 家族成员互作。为证明 *MePP2CAa* 参与了 ABA 信号通路的调控,本研究构建了 *MePYL1-MePYL4* 基因酵母表达载体,分析了 *MePP2CAa* 与 *MePYL1-MePYL4* 的互作关系,结果如图 8 所示,所有组合在 SD/-Trp/-Leu 培养基上都表现出正常的生长。在 SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His

6C)。MeJA 和 ABA 处理下,*MePP2CAa* 基因的表达量随着处理时间的延长呈现先增加后降低的趋势,分别在 6 h 和 10 h 达到最高(图 6D、E);而在 SA 处理下,*MePP2CAa* 基因的表达量随着处理时间的延长先降低后增加,在 24 h 达到最高(图 6F)。以上结果表明 *MePP2CAa* 基因可受到不同逆境和激素处理的诱导表达。

2.5 *MePP2CAa* 与 PYLs 基因的互作验证

MePP2CAa 基因自激活检测结果如图 7 所示, pGBKT7-*MePP2CAa* 能够在 SD/-Trp 和 SD/-His 培养基上生长,并且在 SD/-His/X-α-gal 培养基上呈现出蓝色,表明 *MePP2CAa* 具有一定的自激活活性。因此,构建 pGADT7-*MePP2CAa* 载体用于酵母双杂交试验。

培养基上, pGADT7-*MePP2CAa*+pGBKT7-*MePYL1* 和 pGADT7-T+pGBKT7-53 阳性对照有菌落形成;而 pGADT7-*MePP2CAa*+pGBKT7-*MePYL2/MePYL3/MePYL4* 组合及 pGADT7-T+pGBKT7-Lam 阴性对照则没有菌落产生,表明 *MePP2CAa* 与 *MePYL1* 存在相互作用。

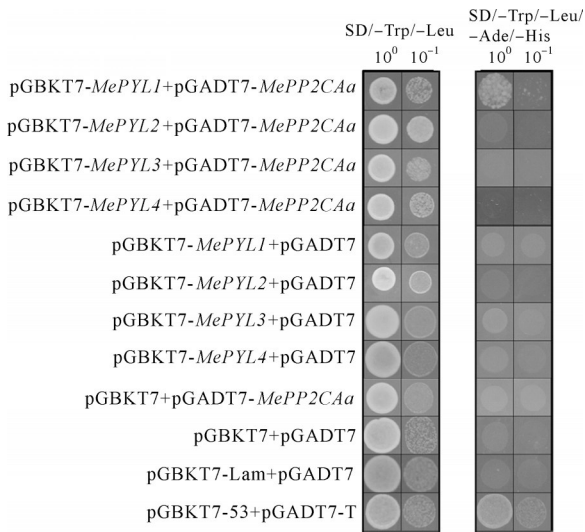


图8 酵母双杂交筛选互作蛋白

Fig.8 Yeast two-hybrid assays between the candidate proteins

3 讨论

ABA在植物中发挥着重要的作用,帮助植物适应不同的环境变化和应对胁迫。Umezawa等^[6]在拟南芥中鉴定了ABA受体及其核心信号转导通路(ABA受体PYR/PYL/RCARs、蛋白磷酸酶PP2CAs和蛋白激酶SnRK2s)。在没有ABA存在的情况下,PP2CAs会抑制SnRK2s对下游靶蛋白的磷酸化,而一旦ABA出现,PYL和PP2CAs会相互结合,SnRK2s被释放,磷酸化其他靶标蛋白,并进一步激活ABA信号转导通路^[6]。PP2CAs在ABA信号转导通路中扮演着关键的角色,深入研究其功能显得尤为重要。本研究成功克隆了1个PP2CA亚家族成员*MePP2CAa*。通过表达分析发现,*MePP2CAa*基因在木薯Agr7的不同组织中呈现差异表达。在储藏根、茎和叶中均表现出较高的表达水平,尤其是在储藏根中的表达水平最为显著。这一结果表明*MePP2CAa*基因可能在木薯储藏根的生长和发育中发挥着重要的功能。相关研究发现,PP2C基因在其他作物的不同组织中也存在不同的表达模式,比如小麦*TaPP2C-a10*基因在叶片和种子的不同发育阶段均有表达,但在种子开花后20d的表达水平最高^[30]。同样,二穗短柄草*BdPP2CA6*基因在根、茎、叶和芽中也有表达,但以茎中的表达水平最高^[31]。这些结果表明PP2C基因的表达水平与植物不同组织的生长和发育过程之间存在密切关系。

植物中的A类PP2C基因通常对各种逆境胁迫表现出响应。拟南芥的研究发现,A类PP2C基因在

对ABA信号的负调控方面表现出相似的功能,参与拟南芥的氧化胁迫反应^[32-33]和抗冷胁迫的响应^[34]。对于重要作物水稻和玉米,A类PP2C基因在应对如高盐、干旱和低温等非生物逆境也呈现出不同程度的响应^[14, 23-24]。本研究的结果显示,*MePP2CAa*基因可以被低温、甘露醇、NaCl、ABA、MeJA和SA诱导,这与笔者所在课题组前期RNA-seq试验结果^[35]相符。然而,与此相反,*FsPP2C2*基因的超表达在增强植物对逆境胁迫的抵抗力的同时,也提高了对ABA信号的敏感性^[36];*AtPP2CG1*基因的超表达也被证明能够提高植株对高盐胁迫的抵抗力和对ABA信号的敏感性^[37]。本研究中,酵母双杂交实验明确了*MePP2CAa*和*MePYL1*蛋白存在相互作用,这进一步证实了*MePP2CAa*属于PP2CA亚家族,并可能参与ABA信号转导。根据以上结果推测,*MePP2CAa*基因可能通过ABA信号通路来响应非生物胁迫,但*MePP2CAa*在ABA信号转导中发挥正调控还是负调控作用尚不明确。这些结果可为进一步解析*MePP2CAa*基因在ABA信号通路中的功能提供参考。

参考文献 References

- [1] FENG C Z, CHEN Y, WANG C, et al. *Arabidopsis* RAV1 transcription factor, phosphorylated by SnRK2 kinases, regulates the expression of ABI3, ABI4, and ABI5 during seed germination and early seedling development [J]. *The plant journal*, 2014, 80(4): 654-668.
- [2] TIJERO V, TERIBIA N, MUÑOZ P, et al. Implication of abscisic acid on ripening and quality in sweet cherries: differential effects during pre- and post-harvest [J/OL]. *Frontiers in plant science*, 2016, 7: 602 [2023-07-06]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00602>.
- [3] WASILEWSKA A, VLAD F, SIRICHANDRA C, et al. 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, et al. 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, et al. 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, SEMERÁDOVÁ D, et al. Effect of drought on yield variability of key crops in Czech Republic [J]. *Agricultural and forest meteorology*, 2009, 149(3/

- 4):431-442.
- [8] DIETZ K J, ZÖRB C, GEILFUS C M. Drought and crop yield [J]. *Plant biology*, 2021, 23(6):881-893.
- [9] DASZKOWSKA-GOLEC A, SZAREJKO I. The molecular basis of ABA-mediated plant response to drought, in abiotic stress [M/OL]//VAHDATI K, LESLIE C. Abiotic stress - plant responses and applications in agriculture. Rijeka: IntechOpen, 2013: 103-134 [2023-07-06]. <https://doi.org/10.5772/53128>.
- [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, et al. Monitoring the expression pattern of around 7,000 *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, et al. Genome-wide characterization and expression profiling of HD-Zip genes in ABA-mediated processes in *Fragaria vesca* [J/OL]. *Plants*, 2022, 11(23):3367 [2023-07-06]. <https://doi:10.3390/plants11233367>.
- [13] SHAZADEE H, KHAN N, WANG L, et al. GhHAI2, GhAHG3, and GhABI2 negatively regulate osmotic stress tolerance via ABA-dependent pathway in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J/OL]. *Frontiers in plant science*, 2022, 13:905181 [2023-07-06]. <https://doi:10.3389/fpls.2022.905181>.
- [14] 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/OL]. *BMC genomics*, 2010, 11:435 [2023-07-06]. <https://doi:10.1186/1471-2164-11-435>.
- [15] XUE T, WANG D, ZHANG S, et al. Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and *Arabidopsis* [J/OL]. *BMC genomics*, 2008, 9:550 [2023-07-06]. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-550>
- [16] WEI K, PAN S. Maize protein phosphatase gene family: identification and molecular characterization [J/OL]. *BMC genomics*, 2014, 15(1):773 [2023-07-06]. <https://doi:10.1186/1471-2164-15-773>.
- [17] CAO J, 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/OL]. *BMC genomics*, 2016, 17:175 [2023-07-06]. <https://doi:10.1186/s12864-016-2526-4>.
- [18] SHAZADEE H, KHAN N. Identification and expression profiling of protein phosphatases (*PP2C*) gene family in *Gossypium hirsutum* L. [J/OL]. *International journal of mechanical sciences*, 2019, 20(6):1395 [2023-07-06]. <https://doi:10.3390/ijms20061395>.
- [19] ALLEN G J, KUCHITSU K, CHU S P, et al. *Arabidopsis abi1-1* and *abi2-1* phosphatase mutations reduce abscisic acid-induced cytoplasmic calcium rises in guard cells [J]. *The plant cell*, 1999, 11(9):1785-1798.
- [20] 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):1897-1910.
- [21] 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.
- [22] RUBIO S, RODRIGUES A, SAEZ A, et al. 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 X, HU X L, SONG J A, et al. 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 L, SUN X P, GAO S, et al. 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, 等. 木薯 MePYL8 基因克隆及表达分析 [J]. *分子植物育种*, 2018, 16(14):4498-4504. YAN Y, TIE W W, DING Z H, et al. Cloning and expression analysis of MePYL8 gene in cassava [J]. *Molecular plant breeding*, 2018, 16(14):4498-4504 (in Chinese with English abstract).
- [27] HU W, JI C M, SHI H T, et al. Allele-defined genome reveals biallelic differentiation during cassava evolution [J]. *Molecular plant*, 2021, 14(6):851-854.
- [28] HU W, JI C M, LIANG Z, et al. Resequencing of 388 cassava accessions identifies valuable loci and selection for variation in heterozygosity [J/OL]. *Genome biology*, 2021, 22(1):316 [2023-07-06]. <https://doi:10.1186/s13059-021-02524-7>.
- [29] ZHAO H, WU C L, YAN Y, et al. Genomic analysis of the core components of ABA signaling reveals their possible role in abiotic stress response in cassava [J/OL]. *Environmental and experimental botany*, 2019, 167:103855 [2023-07-06]. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103855>.
- [30] 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.
- [31] ZHANG F, WEI Q, SHI J, et al. *Brachypodium distachyon* BdPP2CA6 interacts with BdPYLs and BdSnRK2 and positively regulates salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J/OL]. *Frontiers in plant science*, 2017, 8:264 [2023-07-06]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00264>.
- [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,

- et al. 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]. *The plant journal*, 2004, 37(3):354-369.
- [34] NISHIMURA N, YOSHIDA T, KITAHATA N, et al. ABA-hypersensitive germination1 encodes a protein phosphatase 2C, an essential component of abscisic acid signaling in *Arabidopsis* seed[J]. *The plant journal*, 2007, 50(6):935-949.
- [35] WU C L, DING Z H, CHEN M J, et al. Identification and functional prediction of lncRNAs in response to PEG and ABA treatment in cassava[J/OL]. *Environmental and experimental botany*, 2019, 166: 103809 [2023-07-06]. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103809>.
- [36] REYES D, RODRÍGUEZ D, GONZÁLEZ-GARCÍA M P, et al. 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.
- [37] LIU X, ZHU Y M, ZHAI H, et al. 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.

Cloning, expression, and protein interaction analysis of cassava *MePP2CAa* gene

ZENG Jian¹, LI Lizhen¹, SHEN Zixin¹, LIN Man¹, LIU Boting¹,
WU Chunlai^{2,3}, LI Bing⁴, HU Wei³, ZENG Liwang^{2,3}

1. *Guangdong Provincial Key Laboratory of Utilization and Conservation of Food and Medicinal Resources in Northern Region/Henry Fok College of Biology and Agriculture, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China;*

2. *Institute of Scientific and Technical Information, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Haikou 571101, China;*

3. *National Key Laboratory for Tropical Crop Breeding/Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Haikou 571101, China;*

4. *The First Middle School of Pingjiang Country, Yueyang 414500, China*

Abstract The cDNA from cassava Arg7 leaves was used to amplify *MePP2CAa* gene with RT-PCR to study the role of the protein phosphatase 2C (PP2C) gene in the response of cassava to abiotic stress. The sequence, self-activation activity, and the activity of promoter of the *MePP2CAa* gene were analyzed bioinformatically. The expression patterns of *MePP2CAa* gene under different stress and hormone treatments, and its interaction with ABA receptor PYLs were studied. The results showed that the total length of *MePP2CAa* gene was 1 311 bp, encoding 436 amino acids with the structural domain characteristics of the PP2C family. The protein sequence of *MePP2CAa* had the highest homology with that of PP2C in *Hevea rubber* and *Jatropha curcas*, with 78.95% and 74.09%, respectively, and conserved at the C-terminus. The results of real time fluorescence quantitative PCR showed that the expression level of *MePP2CAa* gene in cassava storage roots was significantly higher than that in stems and leaves. Mannitol, NaCl, ABA, MeJA, low temperature and SA treatment significantly induced the expression of *MePP2CAa* gene. The results of analyzing the *cis*-acting elements of promoters showed that the promoter of *MePP2CAa* gene included ABRE responsive element, MeJA responsive element, and drought induced element, etc. The results of yeast two hybridization showed that *MePP2CAa* interacted with MePYL1. It is indicated that the *MePP2CAa* gene may respond to the abiotic stress in cassava.

Keywords cassava; abscisic acid; protein phosphatase 2C; abiotic stress

(责任编辑:葛晓霞)