广西植物 Guihaia Sept. 2025, 45(9): 1668-1678 http://www.guihaia-journal.com

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202408031

刘若琪, 郭思雨, 罗曼, 等, 2025. 沙蒿 *PP2C2* 基因的序列分析及其在干旱胁迫下的表达模式 [J]. 广西植物, 45(9): 1668-1678.

LIU RQ, GUO SY, LUO M, et al., 2025. Sequence analysis of *PP2C2* gene in *Artemisia desertorum* and its expression pattern under drought stress [J]. Guihaia, 45(9): 1668-1678.

沙蒿 *PP2C2* 基因的序列分析及其在干旱胁迫下的表达模式

刘若琪, 郭思雨, 罗 曼, 马玉花*

(青海大学 农牧学院, 西宁 810016)

摘 要: 2C 类蛋白磷酸酶(PP2C)在植株生长发育、细胞周期调节、信号传导及应对环境胁迫方面发挥着重要作用。该研究以干旱荒漠地区强耐旱和多功能植物沙蒿(*Artemisia desertorum*)为试验材料,通过对沙蒿 *PP2C2* 基因进行扩增,基于生物信息学分析沙蒿 *PP2C2* 基因序列,预测蛋白结构,分析沙蒿 *PP2C2* 基因在不同水分胁迫条件下的表达模式及其对沙蒿耐旱的调控作用。结果表明:(1)沙蒿 *PP2C2* 基因的开放阅读框(ORF)为 1 404 bp,编码 467 个氨基酸,与小蓬草(*Erigeron canadensis*)等植物 *PP2C* 基因同源性较高。(2)PP2C2 蛋白定位于细胞核中,无信号肽,为非分泌蛋白,其二级结构主要由无规则卷曲组成,具有较强的亲水性,无跨膜螺旋区,含多个修饰位点。(3)qRT-PCR 结果显示,*PP2C2* 基因表达随着干旱胁迫程度的加剧而变化,整体呈现上调表达的趋势,复水后表达量下调。该研究初步发现 *PP2C2* 基因在沙蒿耐旱机制方面发挥的重要作用,为深入解析沙蒿的耐旱机制及潜在的基因工程应用提供了理论参考。

关键词: 沙蒿, *PP2C2* 基因, 序列分析, 蛋白结构预测, 基因表达

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2025)09-1668-11

Sequence analysis of *PP2C2* gene in *Artemisia desertorum* and its expression pattern under drought stress

LIU Ruoqi, GUO Siyu, LUO Man, MA Yuhua*

(*College of Agriculture and Animal Husbandry*, *Qinghai University*, Xining 810016, China)

Abstract: Protein phosphatase 2C (PP2C) play important roles in growth and development, cell cycle regulation, signal transduction, and responses to environmental stress. This study focused on *Artemisia desertorum*, a highly drought-tolerant and multifunctional plant native to arid desert regions, to investigate the functional role of *PP2C2* gene in drought tolerance. Using *A. desertorum* as the experimental material, the *PP2C2* gene was amplified, its sequence was

收稿日期: 2024-12-24 **接受日期:** 2025-04-10

基金项目: 青海省科技厅基础研究计划项目(2023-ZJ-747); 青海省"昆仑英才·高端创新创业人才"计划项目(2022)。

第一作者: 刘若琪 (1999—),硕士研究生,主要从事林木资源开发利用研究,(E-mail)ruoqi@foxmail.com。

*通信作者: 马玉花,博士,教授,主要从事森林培育理论与技术、植物资源开发利用研究,(E-mail)qhxnmyh@163.com。

subjected to bioinformatic analysis, and its protein structure was predicted. Additionally, the expression patterns of *PP2C2* under various water stress conditions were analyzed, and the regulatory role of the *PP2C2* gene in drought stress responses was elucidated. The results were as follows: (1) The *PP2C2* gene in *A. desertorum* contained an open reading frame (ORF) of 1 404 bp, encoding a protein of 467 amino acids. Sequence alignment demonstrated that the gene shared high homology with *PP2C* genes from other plants, such as *Erigeron canadensis*. (2) Bioinformatic analysis revealed that the PP2C2 protein was localized in the nucleus, no signal peptide, and was classified as a non-secretory protein. Its secondary structure predominantly consisted of random coils, with strong hydrophilicity, no transmembrane helical region, and multiple potential modification sites. (3) Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis showed that the expression of the *PP2C2* gene was responsive to varying levels of drought stress. Under drought conditions, its expression exhibited an overall up-regulation trend, while rehydration led to a significant reduction in expression levels. This study preliminarily reveals that the *PP2C2* gene plays a significant role in the drought tolerance mechanism of *Artemisia desertorum*, offering a theoretical reference for further understanding of its drought resistance mechanism and potential application in genetic engineering.

Key words: *Artemisia desertorum*, *PP2C2* gene, sequence analysis, protein structure prediction, gene expression

沙蒿（*Artemisia desertorum*）为菊科（Asteraceae）蒿属（*Artemisia*）的一种多年生野生灌木，在中国大部分地区均有分布，其中以我国北方和西北地区较为常见，该植物主要生长在荒漠和半荒漠等干旱地区，根系发达，表现出良好的耐旱能力。沙蒿在荒漠地区可抵抗风蚀，强化固沙，是优良的固沙先锋植物，也是荒漠、半荒漠地带较重要的牧草之一。此外，沙蒿还是一种药用和经济植物（王方琳等，2021），其籽可用于榨油，具有极高的营养价值（李易珺等，2023），沙蒿胶被作为天然的食品添加剂（姜霞，2021），是沙漠地区待开发的重要野生植物资源（翟树琛等，2024）。

植物在应对低温、干旱和盐胁迫时，形成了多种应答机制，其中基因表达调控和蛋白质修饰是两个重要的途径。蛋白质磷酸化是一种由蛋白激酶（protein kinase，PK）介导的可逆性翻译后修饰过程，通过将腺苷三磷酸（adenosine triphosphate，ATP）的 γ-磷酸基转移到底物蛋白上，从而调节植物的多种生理反应。同时，蛋白磷酸酶（phosphorus protein phosphatase，PP）能使磷蛋白去磷酸化，通过去除磷酸基团调节酶活性和细胞信号传导，从而影响细胞增殖、分化和凋亡，维持细胞稳态，具有重要的生理功能和潜在的病理意义（Sobol et al.，2022）。真核蛋白磷酸酶根据其底物偏好、催化机制和抑制剂敏感性，分为四大类，即磷蛋白磷酸酶（phosphoprotein phosphatase，PPP）、金属依赖性蛋白磷酸酶（metal-dependent protein phosphatase，PPM）、蛋白酪氨酸磷酸酶（protein tyrosine phosphatase，PTP）和天冬氨酸蛋白磷酸酶（aspartate protein phosphatase，APP）（Moorhead et al.，2009）。植物 2C 型蛋白磷酸酶（protein phosphatases 2C，PP2Cs）是 PPM 家族的一大类，属于 Mg^{2+}/Mn^{2+} 依赖性的丝氨酸/苏氨酸磷酸酶（Fuchs et al.，2013）。在高等植物中，PP2C 家族包含超过 80 个成员，可划分为多个亚组（A-K）（Xue et al.，2008；Singh et al.，2010）。PP2C 被证明在植物生理学的多个方面起到调节作用，已有多项研究在不同的非生物胁迫条件下进行，旨在深入探讨其分子功能。例如，对枳中的 *PtrPP2C51* 基因（佟晓楠等，2024）、烟草中的 *PP2C2* 基因（Vranova et al.，2000），以及甘蔗中的 *SsPP2C38* 和 *SsPP2C81* 基因（张金旭等，2023）进行表达分析，均证实了 *PP2C* 基因的表达水平受逆境胁迫的诱导。进一步研究表明，不同物种的 *PP2C* 基因在各种非生物胁迫条件下展现出相似的表达模式，包括极端温度、干旱和盐胁迫（Cao et al.，2016；Li et al.，2018）。近年来，随着科学研究的不断深入，研究者发现，PP2C 蛋白家族是脱落酸信号途径中的重要负调控因子，参与 ABA 介导的植物抗逆信号传导，从而在植物应对非生物胁迫时发挥重要调节作用（Lozano-Juste et al.，2023），使植物能够在恶劣条件下维持正常的生长发育（Hamna et al.，2019），这一发现为培育抗逆性更强的植物新品种提供了有效的基因资源。例如：甜瓜 *Cmpp2c* 基因的启动子序列中包括 ABA 响应元件（韩子超等，2024）；*SlPP2C51-like* 基因在

番茄的花、叶和未成熟果实中高度表达,参与脱落酸、生长素和赤霉素的响应,在低温、干旱和盐胁迫下发挥重要作用(王家兴,2023);在对辣椒(马玉虎等,2023)及玉米(王国瑞等,2020)等植物 *PP2C* 基因的研究中证实辣椒 11 个 *PP2C* 家族基因和玉米 *ZmPP2C* 参与了低温信号通路的调控。

尽管国内外研究已广泛关注大宗作物的 *PP2C* 基因在抗逆性中的作用,但对于沙蒿的 *PP2C* 基因如何介导其抗逆性尚未得到深入探究。鉴于沙蒿在荒漠生态系统中的关键地位及其对极端环境的适应能力,研究沙蒿 *PP2C2* 基因的抗逆机制能揭示旱生植物应对逆境的分子基础,为提高生态系统稳定性和开发抗逆性作物提供新的基因资源和理论支持,并且植物在面对干旱、寒冷、高盐等多种逆境时,需要通过复杂的基因调控网络和多条信号传导通路来应对这些不利条件带来的损伤(Zhou et al., 2024)。其中,干旱胁迫对植物表型产生显著影响,改变植物的生理状态,成为制约作物产量的主要环境因素之一(Vurukonda et al., 2016; Basu et al., 2016)。因此,本研究以青海柴达木盆地沙蒿为试验材料,采用扩增、序列分析和蛋白结构预测的方法,结合实时荧光定量 PCR 技术,分析 *PP2C2* 基因在干旱胁迫下的时空表达模式,旨在阐明沙蒿 *PP2C2* 基因的表达特征及其潜在的生物学功能,为沙蒿抗逆机制的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2022 年 10 月,在青海省柴达木盆地(36°01′23.4″ N、97°40′27.2″ E)地区采集沙蒿种子,并进行催芽育苗,选取长势一致的沙蒿苗为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 胁迫处理及样本采集 2023 年 3 月 12 日将沙蒿种子均匀播种在花盆中进行苗木培育,每盆约 40 粒,总计 50 盆,待所有种子萌发后,进行间苗处理,每盆保留 20 株生长良好、健壮的苗木继续培养,苗木培养方法参考张丹等(2021)的研究。

2023 年 6 月 25 日,选择长势良好、苗高约 20 cm 的沙蒿植株进行基因扩增和水分处理。选择长势一致、健壮的苗木进行胁迫处理。在停止浇水后,分别在水分处理开始当天(CK)、第 2 天(DS1)、第 4 天(DS2)、第 6 天(DS3)、第 8 天(DS4)和第 8 天复水 48 h(RW)后的清晨,采集根、茎、叶等样品。将采集好的沙蒿材料于液氮速冻,并带回实验室于-80 ℃保存,用于后续的基因表达模式分析。每组处理重复 3 次,每个重复用 20 株苗(刘瑞等,2024)。

1.2.2 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 称取 100~200 mg 液氮研磨的沙蒿样品(牛西强等,2021),按照 EASYspin Plus 植物快速提取试剂盒提取总 RNA,并通过微量核酸蛋白测定仪和 1%的琼脂糖凝胶电泳对提取的沙蒿总 RNA 质量进行检测,检测合格的总 RNA 用 PrimeScript® Ⅱ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 进行反转录。

1.2.3 *PP2C2* 基因的扩增及实时荧光定量 PCR 分析 使用引物 *PP2C2*-F(ATGGGATCGATAGATGAAA)和 *PP2C2*-R(TCAAGGCTTTGGT TTAAAC)进行 *PP2C2* 基因的扩增,采用 rTaq 酶对反转录得到的 cDNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系如下:上游引物和下游引物各 0.5 μL,cDNA 为 2.5 μL,Premix Taq 为 12.5 μL,RNase Free H_2O 为 9 μL,共计 25 μL。PCR 扩增程序如下:预变性 95 ℃ 30 s,变性 95 ℃ 50 s,退火 52 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 30 s,30 个循环,总延伸 72 ℃ 10 min。扩增产物经凝胶电泳检测,若显示出预期的单一条带,则视为检测合格,随后将样品送至生工生物工程(上海)有限公司进行测序分析。

荧光定量 PCR 样本来源于不同胁迫程度的沙蒿根、茎、叶。荧光定量 PCR 引物为 *PP2C2*-F(AACGACACCGTTCAGGTTCA)和 *PP2C2*-R(CTTCTGCTTGCTTTTCCTCCA)。选用在不同胁迫条件下稳定表达的白沙蒿 *Actin* 基因作为内参(*Actin*-F:CACGAGACCACATACAACTCCA,*Actin*-R:TTGAACCACCACTGAGAACGA)。qRT-PCR 在 Q2000 B 荧光定量 PCR 仪上进行,反应体系如下:上、下游引物各 0.8 μL,TB Green Premix Eraser 为 10 μL,cDNA 为 2 μL,RNase Free dH_2O 为 6.4 μL,共计 20 μL。每个样本设置 3 次生物学重复。

1.2.4 生物信息学及数据统计分析 利用 DNASTAR 软件分析序列特征,通过 MEME 软件(http://meme-suite.org)进行保守基序分析,使用 Expasy ProtParam(http://web.expasy.org/protparam)进行蛋白理化性质分析,采用 PredictProtein (https://predictprotein.org)进行亚细胞定位预测,借助 Kyet-

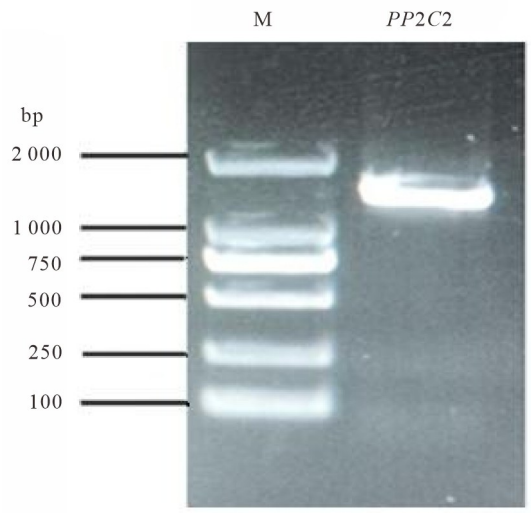
Doolittle（https://www.dnastar.com/manuals/protean3d/17.3/en/topic/hydropathy-kyte-doolittle）分析蛋白质的亲水性，使用 SignalP-6.0 软件（https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/）分析蛋白质信号肽，采用 TMHMM 软件（https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/）研究蛋白质跨膜螺旋区域，利用 I-TASSER 软件（http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu）预测蛋白二级结构，并使用 PredictProtein 对蛋白质的功能点位进行预测（刘瑞等，2024）。

qRT-PCR 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算，使用 Excel 2019 和 SPSS 27 进行数据统计与分析，所有试验数据均以 3 次重复的平均值±标准误差表示，使用邓肯多重范围检验各均值之间的显著性水平（$P<0.05$）。

2　结果与分析

2.1 沙蒿总 RNA 的提取及 *PP2C2* 基因 PCR 扩增结果

以沙蒿叶片提取的总 RNA 为起始材料，通过反转录合成 cDNA，以 *PP2C2*-F（ATGGGATCGATAGATGAAA）和 *PP2C2*-R（TCAAGGCTTTGGTTTAAAC）作为基因扩增引物进行 PCR 扩增。扩增产物在 1%琼脂糖凝胶上进行电泳分析，结果显示，*PP2C2* 基因在泳道中出现了预期的条带，其所在位置与预计的长度（1 404 bp）一致（图 1）。该片段对应 *PP2C* 基因的开放阅读框（open reading frame，ORF）区域，即该基因的编码区。



M 表示 DL2000 DNA Marker。
M indicates the DL2000 DNA Marker.

图 1　沙蒿 *PP2C2* 基因 PCR 产物电泳图
Fig. 1 Electrophoresis image of PCR product of *Artemisia desertorum PP2C2* gene

2.2 沙蒿 *PP2C2* 基因序列分析

对成功扩增的长度为 1 404 bp 的基因片段进行序列比对，确定该片段为沙蒿 *PP2C2* 基因（GenBank：PQ334621）。通过 DNASTAR 分析显示，*PP2C2* 基因长度为 1 404 bp，核苷酸组成包括 424 个 A、366 个 G、385 个 T 和 229 个 C。全基因序列中 A+T 的含量（57.62%）高于 G+C 的含量（42.38%）。通过 DNASTAR 软件将核苷酸序列翻译为氨基酸序列结果见图 2。*PP2C2* 基因编码了 1 条由 467 个氨基酸组成的序列，其蛋白质分子量为 50 786.08 Da，等电点为 5.236；该蛋白质中包含 62 个酸性氨基酸（K、R）和 46 个碱性氨基酸（D、E），分别占总氨基酸序列的 13.3%和 9.9%；亲水性氨基酸（A、I、L、F、W、V）有 105 个，疏水性氨基酸（N、C、Q、S、T、Y）有 173 个，分别占总氨基酸序列的 22.5%和 37.0%。

2.3 沙蒿 *PP2C2* 基因核苷酸同源性及保守基序分析

通过 NCBI 对比，发现沙蒿 PP2C2 蛋白与小蓬草（*Erigeron canadensis*）、刺苞菜蓟（*Cynara cardunculus*）、向日葵（*Helianthus annuus*）、莴苣（*Lactuca sativa*）、欧榛（*Corylus avellana*）、大花四照花（*Cornus florida*）、美国山核桃（*Carya illinoinensis*）、欧洲桤木（*Alnus glutinosa*）、胡桃（*Juglans regia*）、枣树（*Ziziphus jujuba*）、毛花猕猴桃（*Actinidia eriantha*）、蓖麻（*Ricinus communis*）等 12 个植物的 PP2C2 蛋白具有较高的同源性，其中与小蓬草的同源性最高（图 3）。

保守基序分析显示，PP2C2 蛋白有 15 个 motif，每个 motif 长度为 50 个保守氨基酸，包含 13 个位点，并且每个 motif 的 E 值均显著（图 4），其中小蓬草、朝鲜蓟、向日葵、生菜、欧榛、花楸和黑桤木等植物中的 motif 数一致。motif 的种类和位置能够反映不同基因之间的进化差异，每个物种都包含了 Motif 1－Motif 15，表明这些物种在 motif 种类上具有较高的保守性。此外，尽管所有 motif 排列顺序完全一致，但在某些物种中，motif 的位置有所变化，提示其可能在进化过程中出现差异。

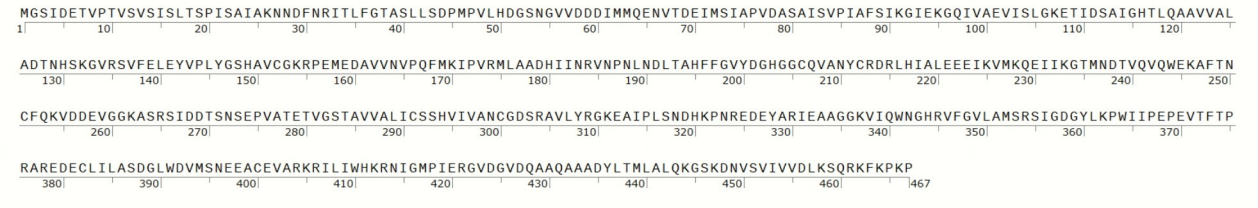


图 2 PP2C2 蛋白氨基酸序列

Fig. 2 Amino acid sequence of PP2C2 protein

一致性 Percent identity

差异性 Divergence

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
1		81.2	79.1	78.6	72.6	65.9	66.6	66.0	65.1	65.6	64.8	65.9	65.2	1
2	21.9		72.2	70.6	63.6	56.1	58.3	57.9	54.8	56.4	54.7	57.5	55.1	2
3	24.7	35.3		72.1	67.0	58.0	59.4	59.1	56.1	58.2	56.8	57.4	55.5	3
4	25.4	37.7	35.5		63.0	53.0	56.7	56.7	52.6	54.3	51.9	54.3	51.4	4
5	34.3	50.4	43.9	51.8		60.7	61.2	61.3	59.3	61.0	58.8	58.7	60.9	5
6	45.8	67.0	62.7	75.1	56.1		70.5	82.4	92.8	82.2	74.5	67.1	71.0	6
7	44.6	61.5	58.9	65.3	55.0	38.1		68.3	67.9	68.0	66.4	68.0	67.3	7
8	45.7	62.7	60.3	65.6	54.8	20.2	42.0		79.4	96.8	71.4	64.0	70.8	8
9	47.6	70.6	67.5	76.3	59.2	7.6	42.5	24.3		79.4	71.1	63.9	69.2	9
10	46.5	66.3	62.1	71.5	55.5	20.5	42.5	3.3	24.4		71.4	64.0	69.8	10
11	48.0	70.4	65.3	78.4	60.4	31.6	45.3	36.6	36.9	36.5		61.8	68.2	11
12	46.1	63.3	63.9	71.9	60.7	44.2	42.4	49.9	50.3	50.0	54.5		64.9	12
13	47.3	69.1	68.5	79.5	55.6	37.1	43.6	37.5	40.3	39.4	42.1	48.3		13
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	

1. 沙蒿; **2**. 小蓬草; **3**. 刺苞菜蓟; **4**. 向日葵; **5**. 莴苣; **6**. 欧榛; **7**. 大花四照花; **8**. 美国山核桃; **9**. 欧洲桤木; **10**. 胡桃; **11**. 枣树; **12**. 毛花猕猴桃; **13**. 蓖麻。

1. *Artemisia desertorum*; **2**. *Erigeron canadensis*; **3**. *Cynara cardunculus*; **4**. *Helianthus annuus*; **5**. *Lactuca sativa*; **6**. *Corylus avellana*; **7**. *Cornus florida*; **8**. *Carya illinoinensis*; **9**. *Alnus glutinosa*; **10**. *Juglans regia*; **11**. *Ziziphus jujuba*; **12**. *Actinidia eriantha*; **13**. *Ricinus communis*.

图 3 *PP2C2* 基因核苷酸同源性分析

Fig. 3 Nucleotide homology analysis of *PP2C2* gene

2.4 PP2C2 蛋白结构预测

2.4.1 PP2C2 蛋白的理化性质分析 对 PP2C2 编码的氨基酸序列进行理化性质分析，结果显示，PP2C2 蛋白质分子式为 $C_{2224}H_{3565}N_{619}O_{688}S_{22}$，理论等电点(pI)为 5.26。在该蛋白中丙氨酸(alanine)和精氨酸(arginine)含量较高，所占比例分别为 9.0%和 4.5%。脂肪系数为 94.12，蛋白质的不稳定系数为 37.10，小于 40。Guruprasad 等(1990)的方法表明，该蛋白是稳定的。PredictProtein 预测显示，沙蒿 PP2C2 蛋白定位于细胞核中(图 5:a)，说明该蛋白可能在细胞核中发挥作用。

采用 Kyet-Doolittle 方法对 PP2C2 蛋白亲水性进行预测，结果表明，PP2C2 蛋白具有较强的亲水性且存在多个连续的亲水区域，主要分布在 24~33 位、62~77 位、92~97 位、127~135 位、148~160 位、183~193 位、200~279 位、300~335 位、355~382 位、392~404 位、408~431 位、445~450 位和 457~468 位(图 5:b)。

2.4.2 信号肽及跨膜结构预测 对沙蒿 PP2C2 蛋白的信号肽分析表明其是一种无信号肽的非分泌蛋白(图 6:a)。使用 TMHMM 技术预测跨膜区域，结果显示 PP2C2 不含跨膜螺旋，属于非跨膜蛋白(图 6:b)。

2.4.3 PP2C2 蛋白结构预测 PP2C2 蛋白的二级结构主要包括 α-螺旋(35.55%)、β-折叠 (19.06%)和

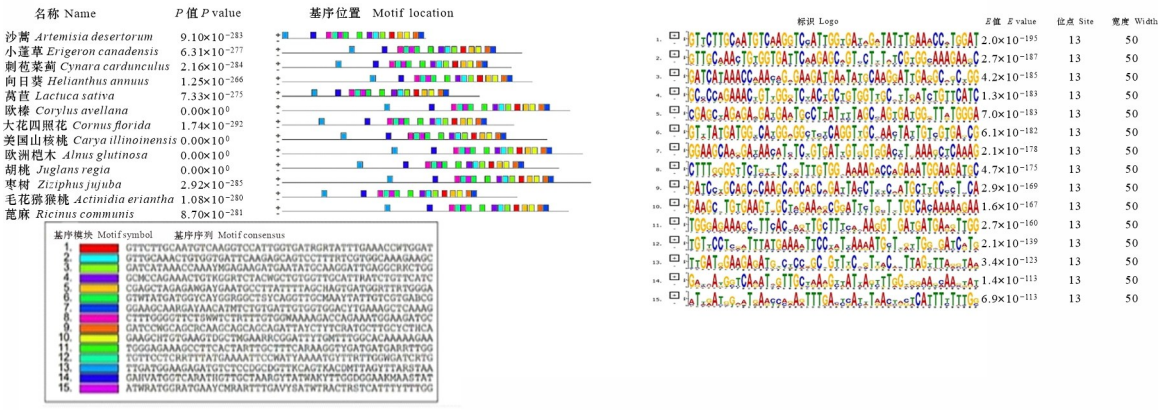
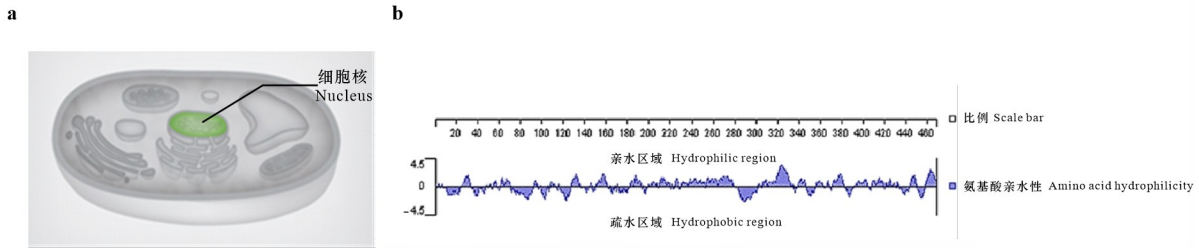


图 4　*PP2C2* 基因的保守基序

Fig. 4　Conserved motif of *PP2C2* gene



a. PP2C2 蛋白亚细胞定位；**b**. PP2C2 蛋白亲水性分析。

a. Subcellular localization of PP2C2 protein; **b**. Hydrophilicity analysis of PP2C2 protein.

图 5　PP2C2 蛋白理化性质分析

Fig. 5　Physicochemical properties analysis of PP2C2 protein

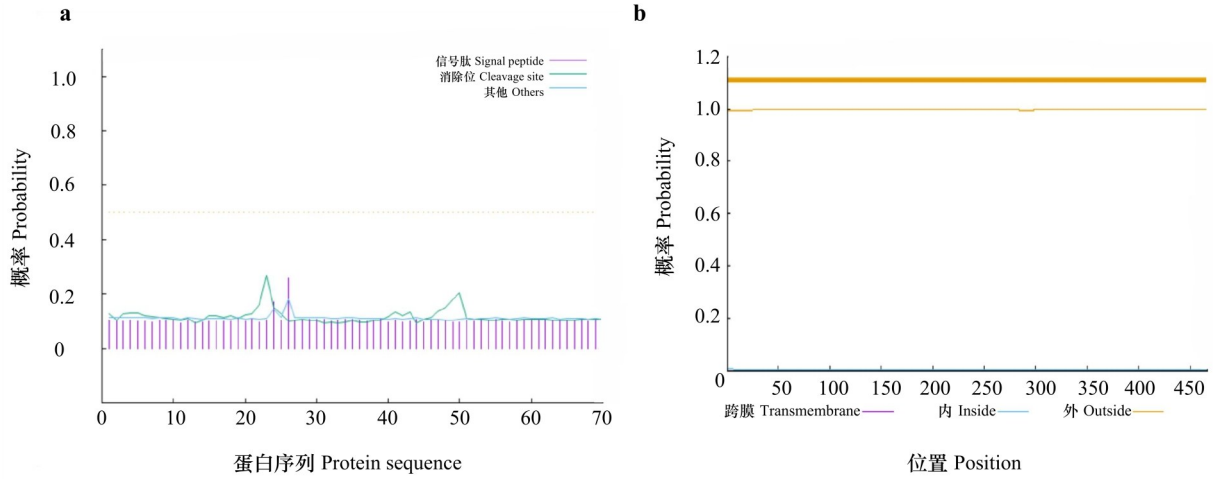
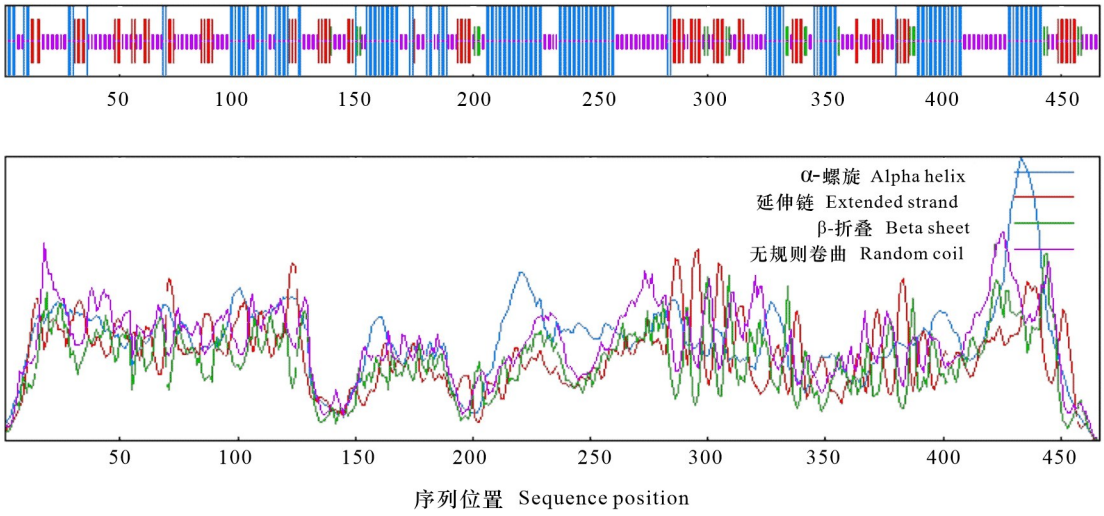


图 6　PP2C2 蛋白的信号肽(a)和跨膜结构域(b)分析

Fig. 6　Analysis of signal peptide (**a**) and transmembrane domain (**b**) of PP2C2 protein

无规则卷曲(40.69%),其中 α-螺旋和无规则卷曲是其二级结构的主要组成部分(图 7)。

通过 NetPhos3.1 预测 PP2C2 蛋白的磷酸化位点,当阈值为 0.5 时,预测共有 30 个磷酸化位点,包括 21 个丝氨酸(serine)、6 个苏氨酸(threonine)和 3 个酪氨酸(tyrosine)位点(图 8)。这些磷酸化位点包括蛋白激酶 A、蛋白激酶 C 和细胞分裂周期蛋白 2 等。



不同颜色代表不同的二级结构类型。

Different colors represent different types of secondary structures.

图 7 PP2C2 二级结构预测

Fig. 7 Prediction of PP2C2 secondary structure

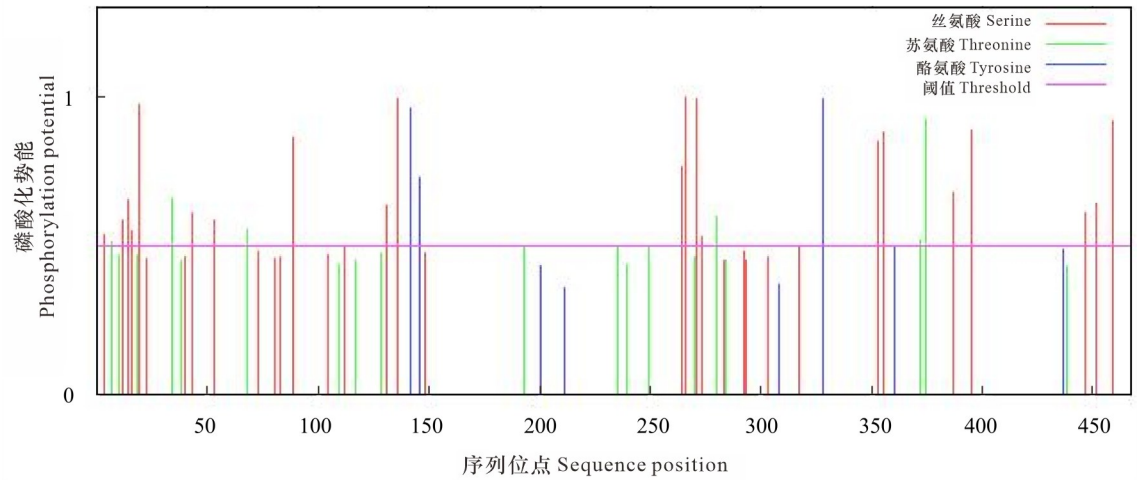


图 8 PP2C2 磷酸化位点预测

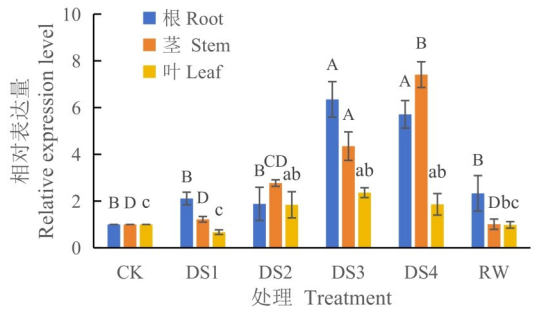
Fig. 8 PP2C2 phosphorylation site prediction

2.5 *PP2C* 基因的表达模式分析

在不同干旱胁迫条件下,沙蒿苗的形态变化显著。在停止浇水当天,土壤水分处于正常状态,水势为-0.2 MPa,叶片没有明显变化;第 2 天,叶片开始出现卷曲,土壤水势下降至-0.4 MPa;第 4 天,叶片明显卷曲、萎蔫,颜色变暗或变黄,土壤水

势下降至-0.7 MPa；第 6 天，叶片严重萎蔫，部分叶片枯黄并出现干枯斑点，水势进一步下降至-1.1 MPa；第 8 天，大多数叶片严重萎蔫和枯黄，部分叶片脱落，水势下降至最低值-1.4 MPa；复水 48 h 后，大多数叶片恢复绿色和正常形态，但部分受损严重的叶片未完全恢复，水势回升至-0.3 MPa。这表明干旱处理对沙蒿苗的生长发育有明显的负面影响。

随着干旱胁迫的加剧，沙蒿根、茎、叶中 *PP2C2* 基因的表达情况如图 9 所示。根中 *PP2C2* 基因的表达呈升-降-升-降的趋势；茎中表达量则持续增加；叶中表达量呈现先降后升再降的变化。根和叶中的 *PP2C2* 基因表达量在第 6 天（DS3）达到峰值，而茎中则在第 8 天（DS4）达到最大表达量。复水 48 h 后，3 个部位的基因表达量较 DS4 有所下降，茎和叶的表达接近对照水平，而根的表达未完全恢复到对照水平。



CK、DS1、DS2、DS3、DS4 分别代表干旱处理 0、2、4、6、8 d，RW 代表复水。不同大写字母表示不同干旱胁迫下差异极显著（$P<0.01$），不同小写字母表示不同干旱胁迫下差异显著（$P<0.05$）。

CK, DS1, DS2, DS3, and DS4 represent drought treatments of 0, 2, 4, 6, 8 d, respectively, while RW represents rewatering. Different uppercase letters indicate extremely significant differences under different drought stresses ($P<0.01$), and different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

图 9　干旱胁迫下 *PP2C2* 基因表达模式

Fig. 9　Expression pattern of *PP2C2* gene under drought stress

3　讨论与结论

PP2C 在植物生长和发育（Jianmei et al., 2016）、细胞周期调节、信号传导和非生物胁迫中起着重要作用（胡秋涛等, 2020）。近年来，该基因已在多种植物中被鉴定，本研究对旱生植物沙蒿的 *PP2C2* 基因进行了扩增，并对其序列等进行了深入的比较分析。通过同源性分析发现，沙蒿 *PP2C2* 基因与小蓬草的同源性最高，表明两者亲缘关系最近，推测其蛋白质结构和功能也可能更加相似。这种相似性可能源于两者在进化过程中共享了相似的生态环境，并面临类似的环境压力，尤其是在应对干旱胁迫时，保留了更多相似的基因序列（冶晓芳，2009）。有研究表明，沙蒿 PP2C2 蛋白与苹果（许璇等，2022）及藜麦（杨冬冬，2024）中多数 PP2C 相似，都定位在细胞核内，属于没有信号肽及跨膜结构的亲水性蛋白，这表明其主要通过与细胞核内的其他蛋白或 DNA 相互作用来执行其功能。其亲水性特征可能有助于其在核内保持稳定且高效的功能执行。此外，细胞核定位还表明 PP2C2 蛋白可能参与转录调控或信号转导的调节过程（王雨璇等，2023），这对于植物在逆境条件下的生存和适应至关重要。这些保守的结构特性和功能优势可能是 PP2C 蛋白在不同植物种中得以保留的原因，它们为植物提供了适应多种逆境环境的能力。沙蒿 PP2C2 蛋白的结构分析显示，其二级结构以无规则卷曲为主，这种结构特征通常与灵活多变的功能区域相关（王新永等，2023）。无规则卷曲区域往往包含酶活性位点及其他蛋白质特异性功能位点，并在蛋白功能的执行中起到关键作用。这种灵活的结构可能赋予 PP2C2 蛋白更强的适应能力，使其能够在不同环境条件下与多种分子伙伴相互作用。对磷酸化位点的预测结果显示，沙蒿 PP2C2 蛋白有多个丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸等磷酸结合位点，表明该蛋白可能通过磷酸化调节植物的生长发育、抗逆境生存、种子储藏及信号转导途径等。此外，PP2C2 蛋白还含有蛋白激酶 A、蛋白激酶 C 和细胞分裂周期蛋白 2 等磷酸化位点，提示其可能在细胞分裂周期和酶活性调控方面发挥重要作用。这些激酶位点可能通过与信号转导途径相关的其他蛋白相互作用，调控细胞周期进程和响应外部环境刺激的能力。这种多功能性使得 PP2C2 蛋白成为植物应对环境变化的一个重要调节子，说明通过其灵活的结构和复杂的磷酸化调控，PP2C 蛋白帮助沙蒿在多变和极端的环境中取得生存优势（王家兴，2023）。

PP2C2 基因可能在促进植物适应环境变化、调节资源分配及优化生长条件方面发挥了不可或

缺的作用。本研究对沙蒿 *PP2C2* 基因在干旱胁迫下的表达进行了分析,结果表明该基因在干旱胁迫下的表达呈整体上调趋势。这一现象可能与 *PP2C2* 基因在植物应对干旱胁迫过程中发挥的关键保护和调控作用有关。干旱胁迫会导致植物体内水分不足和渗透压变化,从而激活一系列信号转导途径和应激响应机制。*PP2C2* 基因的上调表达可能通过调节脱落酸(ABA)相关信号通路,增强细胞对渗透压变化的适应能力,进而提高植物在缺水条件下的生存能力。此外,*PP2C2* 基因的上调表达还可能通过增强信号转导效率、调节细胞内渗透压以及稳定细胞膜结构等途径,帮助植物维持细胞的正常功能和结构稳定性。这些作用共同提高了植物的耐旱能力。因此,*PP2C2* 基因的表达上调不仅是植物对干旱胁迫的直接响应,而且还反映出其在复杂信号网络中的中心调控角色的重要性(Sidonskaya et al., 2016;Shubchynskyy et al., 2017)。

通过对沙蒿根、茎、叶中 *PP2C2* 基因表达的分析,发现在复水 48 h 后,该基因在 3 个部位的表达量相比胁迫第 8 天(DS4)均呈下降趋势。其中,茎和叶的表达量接近对照水平,而根中的表达量未能恢复到对照水平。这可能是因为茎和叶作为光合作用和蒸腾作用的主要部位,对水分变化高度敏感。复水后,茎和叶可能具备更加敏锐的信号传导和调控机制,能够迅速感知和响应水分变化,从而及时调整基因表达。同时,沙蒿根和叶中的 *PP2C2* 基因表达量在干旱胁迫下并非持续上调且最高表达量出现时间存在差异。这可能与不同组织的生理功能不同及沙蒿 *PP2C2* 基因在各组织中受到复杂的反馈调控机制影响有关,某些调控因子在特定时间点上调或下调该基因的表达,以适应不断变化的环境条件。此外,沙蒿在干旱胁迫下需要迅速响应环境变化,不同组织适当降低 *PP2C2* 基因对信号途径的抑制作用,可以使其更有效地传递和转导干旱信号,启动适应性机制和抗旱反应,因此 *PP2C2* 基因的表达也会有所差异(Cutler et al., 2010)。然而,其他植物如葡萄、玉米及巴西橡胶树部分 *PP2C* 基因,在干旱胁迫下可能发挥负调控作用(Xiang et al., 2017;张冬,2017;何红红等,2018)。由此可见,*PP2C* 基因在植物中参与了较为复杂的信号转导体系,并且由于多种同工酶的协同作用,不同基因型可能具有不同作用机制,*PP2C* 基因表达量的下调可能会通过复杂的信号网络调控植物的整体应激反应,帮助植物更好地适应干旱胁迫,并在有限水分资源下生存和生长(何亮等,2008)。

在干旱胁迫的初期和发展过程中,*PP2C2* 的上调可形成反馈回路,调控沙蒿逐步适应并增强耐旱性。为了进一步验证本试验结果,后续实验可通过构建沙蒿 *PP2C2* 基因的过表达载体进行遗传转化,获得过表达或 RNA 干扰植株,并在干旱胁迫条件下观察它们的生长表现、存活率及抗旱生理生化指标,并与野生型进行对比;此外,还可以通过干旱胁迫环境下的转录组分析,揭示该基因在胁迫反应中的具体功能。

综上所述,本研究对沙蒿 *PP2C2* 基因进行了深入分析,发现其 ORF 为 1 404 bp,编码 467 个氨基酸。定位研究表明,PP2C2 蛋白位于细胞核中,无信号肽,属于非分泌蛋白,其二级结构以无规则卷曲为主,具有亲水性且无跨膜螺旋区域,并含有多个修饰位点。qRT-PCR 分析显示,*PP2C2* 基因在干旱胁迫下表达量显著上调,复水后表达量则下降。本研究不仅丰富了植物抗旱基因的研究内容,而且还为提高植物耐旱性提供了新的基因资源和理论依据,对未来植物抗旱育种工作具有重要参考价值。

参考文献:

BASU S, RAMEGOWDA V, KUMAR A, et al., 2016. Plant adaptation to drought stress [J]. F1000Research, 5: 1554.

CAO JM, JIANG M, LI P, et al., 2016. 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, 17: 175.

CUTLER SR, RODRIGUEZ PL, FINKELSTEIN RR, et al., 2010. Abscisic acid: Emergence of a core signaling network [J]. Annual Review of Plant Biology, 61(1): 651-679.

FUCHS S, GRILL E, MESKIENE I, et al., 2013. Type 2C protein phosphatases in plants [J]. The FEBS Journal, 280(2): 681-693.

GURUPRASAD K, REDDY BVB, PANDIT MW, 1990. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting *in vivo* stability of a protein from its primary sequence [J]. Protein Engineering, 4(2): 155-161.

HAMNA S, NADEEM K, WANG JJ, et al., 2019.

Identification and expression profiling of protein phosphatases (*PP2C*) gene family in *Gossypium hirsutum* L. [J]. International Journal of Molecular Sciences, 20(6): 1395.

HAN ZC, ZHANG YY, LIU CG, et al., 2024. Identification and bioinformatics analysis of PP2C gene family in melon [J]. Molecular Plant Breeding, 22(13): 4222-4232. [韩子超, 张月洋, 刘成功, 等, 2024. 甜瓜 PP2C 基因家族的鉴定和生物信息学分析 [J]. 分子植物育种, 22(13): 4222-4232.]

HE HH, LU ZH, MA ZH, et al., 2018. Genome-wide identification and expression analysis of the PP2C gene family in *Vitis vinifera* [J]. Acta Horticulturae Sinica, 45(7): 1237 - 1250. [何红红, 路志浩, 马宗桓, 等, 2018. 葡萄 PP2C 家族基因的鉴定与表达分析 [J]. 园艺学报, 45(7): 1237-1250.]

HE L, LI FH, SHA LN, et al., 2008. Activity of serine/threonine protein phosphatase type-2C (PP2C) and its relationships to drought tolerance in maize [J]. Acta Agronomica Sinica, 34(5): 899-903. [何亮, 李富华, 沙莉娜, 等, 2008. 玉米 2C 型丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶(PP2C)活性与耐旱性的关系 [J]. 作物学报, 34(5): 899-903.]

HU QT, HOU D, ZHAO ZY, et al., 2020. Identification and expression analysis of PP2C gene family in *Phyllostachys edulis* [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 28(10): 1776-1787. [胡秋涛, 侯丹, 赵钟毓, 等, 2020. 毛竹 PP2C 基因家族鉴定与表达分析 [J]. 农业生物技术学报, 28(10): 1776-1787.]

JIANG X, GUO CF, PENG T, et al., 2021. Preparation and characterization of alum-free vermicelli with *Artemisia absinthium* seed gums [J]. Agricultural Science-Technology and Information (20): 64-66. [姜霞, 郭成芳, 彭涛, 等, 2021. 沙蒿籽胶无矾粉条的制备及特性研究 [J]. 农业科技与信息 (20): 64-66.

LI JB, JIA HX, ZHANG J, et al., 2018. Genome-wide characterization of *protein phosphatase* 2C genes in *Populus euphratica* and their expression profiling under multiple abiotic stresses [J]. Tree Genetics & Genomes, 14(6): 80.

LI YJ, GUO SJ, YANG ZH, 2023. Effect of salt and drought stresses on seed germination and seedling physiological characteristics of *Artemisia desertorum* [J]. Grassland and Turf, 43(5): 113 - 119. [李易珺, 郭树江, 杨自辉, 2023. 盐、干旱胁迫对沙蒿种子萌发与幼苗生理特性的影响 [J]. 草原与草坪, 43(5): 113-119.]

LIU R, ZHAO L, YE GS, et al., 2024. Correlation of *HrANR* genes and flavonoid accumulation with drought resistance in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis*) [J]. Guihaia, 44(2): 235-244. [刘瑞, 赵浪, 冶贵生, 等, 2024. 中国沙棘 *HrANR* 基因及黄酮类累积与抗旱的关系 [J]. 广西植物, 44(2): 235-244.]

LOZANO-JUSTE J, INFANTES L, GARCIA-MAQUILON I, et al., 2023. Structure-guided engineering of a receptor-agonist pair for inducible activation of the ABA adaptive response to drought [J]. Science Advances, 9(10): 9948.

MA YH, WEI M, DUAN PP, et al., 2023. Identification and expression analysis of *PP2C* family genes in pepper in response to low temperature stress [J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 41(6): 39-53. [马玉虎, 魏敏, 段盼盼, 等, 2023. 辣椒 *PP2C* 家族基因鉴定与响应低温胁迫的表达分析 [J]. 干旱地区农业研究, 41(6): 39-53.]

MOORHEAD GB, DE WV, TEMPLETON G, et al., 2009. Evolution of protein phosphatases in plants and animals [J]. Biochemical Journal, 417(2): 401-409.

NIU XQ, LUO XY, HU NB, et al., 2021. Comparison of two isolation methods of total RNA from tissues of *Capsicum annuum* and qRT-PCR verification [J]. Journal of Anhui Science and Technology University, 35(6): 42-47. [牛西强, 罗潇云, 胡能兵, 等, 2021. 辣椒组织总 RNA 两种提取方法比较及 qRT-PCR 验证 [J]. 安徽科技学院学报, 35(6): 42-47.]

SHUBCHYNSKYY V, BONIECKA J, SCHWEIGHOFER A, et al., 2017. Protein phosphatase AP2C1 negatively regulates basal resistance and defense responses to *Pseudomonas syringae* [J]. Journal of Experimental Botany, 68(5): 1169-1183.

SIDONSKYA E, SCHWEIGHOFER A, SHUBCHYNSKYY V, et al., 2016. Plant resistance against the parasitic nematode *Heterodera schachtii* is mediated by MPK3 and MPK6 kinases, which are controlled by the MAPK phosphatase AP2C1 in Arabidopsis [J]. Journal of Experimental Botany, 67(1): 107-118.

SINGH A, GIRI J, KAPOOR S, et al., 2010. Protein phosphatase complement in rice: Genome-wide identification and transcriptional analysis under abiotic stress conditions and reproductive development [J]. BMC Genomics, 11: 435.

SOBOL G, CHAKRABORTY J, MARTIN GB, et al., 2022. The emerging role of PP2C phosphatases in tomato immunity [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 35(9): 737-747.

TONG XN, HU WJ, YANG J, et al., 2024. Cloning and abiotic stress expression analysis of *PtrPP2C*51 gene in *Hovenia dulcis* [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 52(10): 49-54. [佟晓楠, 胡文娟, 杨杰, 等, 2024. 枳 *PtrPP2C*51 基因克隆与非生物胁迫表达分析 [J]. 江苏农业科学, 52(10): 49-54.]

VRANOVA E, LANGEBARTELS C, VAN MONTAGU M, et al., 2000. Oxidative stress, heat shock and drought differentially affect expression of a tobacco protein phosphatase 2C [J]. Journal of Experimental Botany, 51(351): 1763-1764.

VURUKONDA SSKP, VARDHARAJULA S, SHRIVASTAVA M, et al., 2016. Enhancement of drought stress tolerance in

crops by plant growth promoting rhizobacteria [J]. Microbiological Research, 184: 13-24.

WANG FL, WEI QS, CHAI CW, et al., 2021. Allelopathic effects of *Artemisia desertorum* extracts on its own seed germination and seedling growth [J]. Journal of Desert Research, 41(6): 21-28. [王方琳, 尉秋实, 柴成武, 等, 2021. 沙蒿(*Artemisia desertorum*)浸提液对自身种子萌发与幼苗生长的化感作用[J]. 中国沙漠, 41(6): 21-28.]

WANG GR, YUAN Z, ZHANG PY, et al., 2020. Expression and protein interactions analysis of *ZmPP2C3* gene in maize (*Zea mays*) [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 28(3): 389-398. [王国瑞, 袁珍, 张鹏钰, 等, 2020. 玉米 *ZmPP2C3* 基因的表达及互作蛋白分析[J]. 农业生物技术学报, 28(3): 389-398.]

WANG JX, 2023. Identification of tomato *PP2C* gene family and stress resistance analysis of *SlPP2C51-like* gene [D]. Yantai: Ludong University: 1-54. [王家兴, 2023. 番茄 *PP2C* 基因家族鉴定及 *SlPP2C51-like* 基因的抗逆性分析[D]. 烟台: 鲁东大学: 1-54.]

WANG XY, LIN Z, WANG PC, 2023. Recent advances in phytohormone abscisic acid receptor-coupled pathway [J]. Plant Physiology Journal, 59(4): 741-758. [王新永, 蔺祯, 王鹏程, 2023. 植物激素脱落酸受体偶联途径研究进展[J]. 植物生理学报, 59(4): 741-758.]

WANG YX, XU C, LI GX, et al., 2023. Research progress of protein phosphatases type 2C family in response to various stresses in plants [J]. Plant Physiology Journal, 59(8): 1463-1473. [王雨璇, 徐晨, 李桂新, 等, 2023. PP2C 蛋白磷酸酶家族参与植物多种胁迫应答的研究进展[J]. 植物生理学报, 59(8): 1463-1473.]

XIANG YL, SUN XP, GAO S, et al., 2017. Deletion of an endoplasmic reticulum stress response element in a *ZmPP2C-A* gene facilitates drought tolerance of maize seedlings [J]. Molecular Plant, 10: 456-469.

XU X, HE YX, YAO YC, et al., 2022. Cloning and bioinformatics analysis of group A-PP2C genes in *Malus* '*hupehensis* Rehd.' [J]. Journal of Beijing University of Agriculture, 37(2): 33-38. [许璇, 何钰贤, 姚允聪, 等, 2022. 苹果属 PP2C A 亚家族基因的克隆及生信分析[J]. 北京农学院学报, 37(2): 33-38.]

XUE TT, WANG D, ZHANG SZ, et al., 2008. Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and Arabidopsis [J]. BMC Genomics, 9: 550.

YANG DD, 2024. Identification and functional analysis of PYL-PP2C-SnRK2s gene family in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) [D]. Yantai: Yantai University: 1-145. [杨冬冬, 2024. 藜麦 PYL-PP2C-SnRK2s 基因家族的鉴定及功能分析[D]. 烟台: 烟台大学: 1-145.]

YE XF, 2009. Isolation and function analysis of plant stress tolerance-related genes [D]. Beijing: Capital Normal University: 1-111. [冶晓芳, 2009. 植物抗逆相关基因的分离及功能分析[D]. 北京: 首都师范大学: 1-111.]

ZHAI SC, WANG TJ, LI XH, et al., 2024. Environmental regulation of water use efficiency in *Artemisia ordosica* in Mu Us Sandy Land: From leaf to ecosystem [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 35(4): 997-1006. [翟树琛, 王天娇, 李鑫豪, 等, 2024. 毛乌素沙地黑沙蒿水分利用效率环境调控: 从叶片到生态系统[J]. 应用生态学报, 35(4): 997-1006.]

ZHANG D, LI XN, XIAO HZ, et al., 2017. Bioinformatics and drought tolerance of *PP2C* gene family members in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. [J]. Bulletin of Botanical Research, 37(5): 730-737. [张冬, 李晓娜, 肖厚贞, 等, 2017. 巴西橡胶树 6 个 *PP2C* 家族基因成员分子信息学与抗旱功能分析[J]. 植物研究, 37(5): 730-737.]

ZHANG D, MA HR, ZHANG XZ, et al., 2021. Changes in proline content and expression patterns of key regulatory genes in sea buckthorn *Hippophae rhamnoides* L. under drought stress [J]. Molecular Plant Breeding, 19(22): 7596-7603. [张丹, 马红荣, 张秀芝, 等, 2021. 干旱胁迫下中国沙棘脯氨酸含量变化及其关键调控基因的表达模式[J]. 分子植物育种, 19(22): 7596-7603.]

ZHANG JX, ZHOU SL, JIANG S, et al., 2023. Genome-wide identification and expression analysis of *PP2C* gene family in *Saccharum spontaneum* [J]. Plant Physiology Journal, 59(6): 1101-1116. [张金旭, 周少丽, 姜烁, 等, 2023. 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, 59(6): 1101-1116.]

ZHOU Z, WANG YQ, ZHENG XN, et al., 2024. Optimizing ABA-based chemically induced proximity for enhanced intracellular transcriptional activation and modification response to ABA [J]. Science China Life Sciences, 67: 2650-2663.

(责任编辑 邓斯丽)