

网络出版时间:2025-04-09

网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/61.1359.S.20250409.1012.002

# 大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族基因鉴定及盐胁迫下的表达分析

孙成群,张萌娜,洪益,张宇航,李璐飞,许如根,朱娟

(扬州大学农学院/江苏省作物基因组学和分子育种重点实验室/植物功能基因组学教育部重点实验室/

江苏省作物遗传生理重点实验室/江苏省粮食作物现代产业技术协同创新中心,江苏扬州 225009)

**摘要:**脱落酸(abscisic acid, ABA)在植物生长、发育、衰老及胁迫响应等方面均发挥重要作用,其核心信号转导通路由 PYL-PP2CA-SnRK2 组成。为探究大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 蛋白功能特征、表达模式及进化关系,本研究利用生物信息学方法对大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族成员进行了全基因组鉴定,并分析其成员的基因结构、染色体定位、蛋白理化性质、启动子区顺式作用元件、组织表达以及逆境胁迫下的转录组表达量等。结果在大麦中共鉴定到 10 个 *HvPYL*、13 个 *HvPP2CA* 及 9 个 *HvSnRK2* 基因。*HvPYLs* 和 *HvPP2CAs* 分布在 1H~5H 和 7H,*HvSnRK2s* 分布在 1H~5H;*HvPYLs* 和 *HvPP2CAs* 主要定位叶绿体,*HvSnRK2s* 主要定位在细胞质中。三个家族成员的 motif 均具有高度的保守性,氨基酸数均小于 500,启动子上含有大量响应激素元件。三个家族的基因在根、茎、花序和种子中表达量存在显著差异,*HvPYL2* 在根部表达量最高,*HvPYL9* 在种皮表达量最高;*HvPP2C-A1~10* 在花序表达量较高;*HvSnRK2.5*、*HvSnRK2.7*、*HvSnRK2.8* 在种皮表达量较高。对一对耐盐性差异显著的近等基因系在盐胁迫下 48 h 和 60 h 的转录组数据分析,结果显示,*HvPP2C-A2*、*HvPP2C-A4*、*HvPP2C-A6*、*HvPP2C-A9*、*HvPP2C-A10* 和 *HvSnRK2.4* 受盐胁迫诱导显著上调表达,而 *HvPYL6* 和 *HvPYL7* 显著下调表达。实时荧光定量 PCR 验证结果与转录组数据一致。综合来看,PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族基因在大麦响应盐胁迫过程中扮演着重要角色。

**关键词:** 大麦;PYL;PP2CA;SnRK2;生物信息学;盐胁迫

中图分类号:S512.3;S330

文献标识码:A

文章编号:1009-1041(2025)06-0735-14

## Identification of PYL, PP2CA and SnRK2 Family Genes in Barley (*Hordeum vulgare* L.) and Expression Analysis under Salt Stress

SUN Chengqun, ZHANG Mengna, HONG Yi, ZHANG Yuhang, LI Lufei, XU Rugen, ZHU Juan

(Agricultural College of Yangzhou University/Jiangsu Key Laboratory of Crop Genomics and Molecular Breeding/Key Laboratory of Plant Functional Genomics of the Ministry of Education/Jiangsu Key Laboratory of Crop Genetics and Physiology/Jiangsu Co-Innovation Center for Modern Production Technology of Grain Crops, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

**Abstract:** Abscisic acid (ABA) plays a crucial role in plant growth, development, senescence and stress response. The core signal transduction pathway is composed of PYL-PP2CA-SnRK2. In order to explore the protein functional characteristics, expression patterns and evolutionary relationships of PYL, PP2CA and SnRK2 in barley, the *HvPYL*, *HvPP2CA* and *HvSnRK2* was identified from whole genome by bioinformatics methods. Gene structure and chromosomal localization, protein physico-chemical properties, cis-acting elements in promoter region, expression analysis of different tissues and transcriptome expression patterns under salt stress were systematically analyzed. The results showed that 10 *HvPYL*, 13 *HvPP2CA* and 9 *HvSnRK2* genes were identified from the barley ge-

收稿日期:2024-04-06

修回日期:2024-05-26

基金项目:国家自然科学基金项目(32301871);国家重点研发计划项目(2022YFD2301302, 2022YFD2301300);国家大麦青稞产业技术体系专项(CARS-05);江苏高校优势学科建设工程项目;2022年农业重大技术协同推广计划项目(2022-ZYXT-04-2)

第一作者 E-mail:1606726064@qq.com(孙成群)

通讯作者 E-mail:007670@yzu.edu.cn(朱娟)

nome. *HvPYLs* and *HvPP2CAs* were distributed in 1H–5H and 7H chromosomes, and *HvSnRK2s* were distributed in 1H–5H chromosomes. *HvPYLs* and *HvPP2CAs* were mainly located in chloroplasts, and *HvSnRK2s* are mainly localized in the cytoplasm. The motifs of the three family genes were highly conserved. The number of amino acids were less than 500, and the promoters contained a large number of plant response hormone elements. Genes of the three families were differentially expressed in roots, stems, inflorescences and seeds. *HvPYL2* had the highest expression in root; *HvPYL9* had the highest expression in episperm; *HvPP2C-A1–10* had the highest expression in inflorescence. *HvSnRK2.5*, *HvSnRK2.7*, and *HvSnRK2.8* had the highest expression in episperm. Transcriptome data analysis of a pair of near-isogenic lines with significant differences in salt tolerance at 48 h and 60 h under salt stress showed that *HvPP2C-A2*, *HvPP2C-A4*, *HvPP2C-A6*, *HvPP2C-A9*, *HvPP2C-A10*, and *HvSnRK2.4* were significantly up-regulated by salt stress, while *HvPYL6* and *HvPYL7* were significantly down-regulated. The results of qPCR were consistent with the transcriptome data. The results showed that the PYL, PP2CA, and SnRK2 family played an important role in the response of barley to salt stress.

**Keywords:** Barley; PYL; PP2CA; SnRK2; Bioinformatics; Expression pattern

脱落酸(abscisic acid, ABA)是植物天然生长调节剂之一,对植物的生长发育及逆境抵御具有重要调节作用。ABA 信号转导模型由 ABA 受体 PYR/PYL/RCARs (pyrabactin resistance/pyr1-like/regulatory components of ABA receptor)、蛋白磷酸酶 A 亚族 PP2CA (protein phosphatase 2CA)、蔗糖非发酵-1-相关蛋白激酶 2 SnRK2 (sucrose non-fermenting-1-related protein kinase 2) 和下游的靶基因组成<sup>[1]</sup>。正常条件下,植物体内 ABA 含量较低,其受体 PYR/PYL/RCARs 不能与 PP2CA 结合,游离的 PP2CA 与 SnRK2 结合使其处于非活化状态,不能磷酸化下游的转录因子,使响应基因不能表达<sup>[2-3]</sup>。当植物受到干旱、低温等非生物胁迫后,植物体内 ABA 含量迅速增加,ABA 与受体 PYR/PYL/RCARs 结合,促使其构象发生改变,与 PP2CA 互作形成 PYR/PYL/RCARs-PP2CA 异质二聚体,抑制了 PP2CA 与 SnRK2 结合,激活 SnRK2<sup>[4]</sup>,开启 ABA 信号。

PYL 家族蛋白具有特殊的结合疏水性配基的空腔,与 START 超家族和 Bet V-fold 超家族同源<sup>[5]</sup>。在拟南芥中鉴定出 14 个 PYL 蛋白,根据序列的相似性分为 3 个亚类<sup>[1]</sup>;水稻中鉴定出 13 个 PYL 成员,参考拟南芥 PYL 分类方法,也分成 3 个亚类<sup>[6]</sup>,这些亚类在结构和功能上跨物种保守。PP2C 是一种单体丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶<sup>[7]</sup>。拟南芥中鉴定到 76 个 PP2C 成员,分为 10 个类群(A~J),其中 PP2CA 包括 9 个成

员<sup>[8]</sup>。水稻中鉴定到 90 个 PP2C,其中 10 个与拟南芥中 A 亚族功能相似,是 ABA 信号转导途径的负调控因子<sup>[9]</sup>。SnRKs 是酵母 SNF1 同源的蛋白激酶,分为 3 个亚家族:SnRK1、SnRK2 和 SnRK3。拟南芥和水稻中均鉴定到 10 个 SnRK2 成员,分为 3 个亚类:Ⅰ类不被 ABA 激活,Ⅱ类微弱响应 ABA,Ⅲ类被 ABA 强激活<sup>[10]</sup>。

在植物响应盐胁迫过程中,PYL-PP2CA-SnRK2 通过 ABA 信号转导途径发挥重要作用。Ren 等<sup>[11]</sup>分析了冷胁迫后葡萄 PYL 基因表达量,发现在拟南芥中过表达 *VaPYL4* 增强了植株耐盐性。水稻中 ABI1 是 PP2CA 亚组的成员,被证实与 *SnRK2.4* 相互作用;盐胁迫下 ABI1 通过抑制 *SnRK2.4* 活性促进水稻根系生长,且参与了 ABA 依赖型和非 ABA 依赖型信号通路的转导<sup>[12]</sup>。*OsPP2C09* 是 ABA 信号核心负调控成分,也是泛素化和蛋白质降解靶点;上游 *OsRF1* 通过靶向降解 *OsPP2C09*,增强 ABA 信号转导途径,导致水稻耐盐性增强<sup>[13]</sup>。小麦中 *TaSnRK2.9* 的过表达增强了植株的耐盐性,ABA 可以上调 *TaSnRK2.9* 的表达;过表达株系的 SOD、CAT、POD 活性和 GSH 含量显著高于对照, $H_2O_2$  含量较低,表明 *TaSnRK2.9* 可以提高酶活性和抗氧化剂含量,从而消除更多的 ROS, *TaSnRK2.9* 通过 ROS 解毒或参与 ABA 信号通路赋予植株盐胁迫耐受性<sup>[14]</sup>。

大麦 (*Hordeum vulgare* L.) 隶属禾本科大麦属,是人类栽培史上最古老的作物之一,也是全

球广泛种植的第四大禾谷类作物,具有食用、饲用、酿造等多种用途<sup>[15]</sup>。大麦的耐盐性显著强于水稻、小麦等其他禾谷类作物,是盐碱地利用的先锋作物,亦是麦类遗传研究的模式植物,挖掘其耐盐相关基因对大麦耐盐性遗传改良十分重要。目前,对大麦中以 PYL、PP2CA、SnRK2 为核心的 ABA 信号通路研究较少。本研究拟利用生物信息学分析大麦 PYL、PP2CA、SnRK2 家族基因的编码序列特征,在全基因组水平分析其组织特异性及盐胁迫中的表达模式,以期为深入解析大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族成员的生物学功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族成员鉴定

根据 Zhang 等<sup>[16]</sup>的研究成果,获取拟南芥和水稻 PYL、PP2CA 和 SnRK2 基因号,并从 Ensembl Plants 数据库 (<http://plants.ensembl.org/index.html>) 获取其保守氨基酸序列,在 Phytozome 数据库 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) 通过 BLAST 同源对比,获得大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 基因的候选序列;将候选序列上传 InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>)、SMART (<http://smart.embl>) 和 NCBI 的 CDD<sup>[17]</sup>,分析同源基因的保守结构域,剔除不含对应蛋白功能域的序列,获得大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族成员基因。

### 1.2 大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族成员蛋白理化特性分析

将大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族成员的蛋白序列上传 ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>),获得蛋白理化特性,包括氨基酸数、等电点和饱和指数等信息<sup>[18]</sup>;将蛋白序列上传至 WOLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>),获得各基因亚细胞定位结果,取出现频率最高的作为预测结果<sup>[19]</sup>。

### 1.3 大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族成员染色体定位

在 Ensembl Plants 数据库 (<http://plants.ensembl.org/index.html>) 下载大麦全基因组注释文件,获取大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族成员在大麦 7 条染色体上位置信息,利用 TBtools 的 Gene visualize from GFF3 功能将各个基因在染色体上分布可视化。

### 1.4 大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族成员基因结构与保守基序分析

利用 TBtools 的 Visualize Gene Structure (Basic) 功能,获得大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族成员基因结构;将相应的蛋白序列上传至 TBtools 的 Simple MEME Wrapper,设置 6 个 motif 搜索数目,Min Motif Width=6,Max Motif Width=50,Max E-value=10,得到对应 MEME 文件,利用 Visualize MEME/MAST Motif Pattern 功能,将保守基序可视化<sup>[20]</sup>。

### 1.5 大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族成员进化分析

在 MEGA11 软件中输入拟南芥、水稻、小麦和大麦的 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族成员蛋白序列,选用 ClustalW 对其进行多重对比,采用邻接法 (NJ) 构建进化树,校验值 Bootstrap 设置 1 000 重复<sup>[21]</sup>,其他参数为默认值,用 iTOL 进行美化。

### 1.6 大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族成员基因顺式作用元件分析

利用 TBtools 调取大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 基因上游 2 000 bp 作为启动子区域,将结果上传 PlantCARE (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>),对返回结果进行整理<sup>[20,22]</sup>,用 TBtools Basic Biosequence View 功能可视化。

### 1.7 大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族成员基因与近源物种共线性分析

使用 TBtools 中 Advance Circos 功能,对大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族成员共线性进行分析。利用 MCScan X 对比大麦与水稻基因组,设置 E-value 小于  $1e^{-3}$ ,分析两个物种中上述 3 个家族成员基因的共线性并可视化。

### 1.8 大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族成员的表达模式分析

在 IPK (<https://apex.ipk-gatersleben.de/apex/>) 获得大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 基因在不同组织的表达量,包括根、叶、籽粒和花序,并对 FPKM 值 (fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments) 进行  $\log_2$  归一化处理,用 TBtools 绘制热图。

### 1.9 盐胁迫下大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族成员转录组检测及实时荧光定量 PCR 验证

用耐盐性不同的大麦近等基因系 N53 (盐敏感) 和 T66 (耐盐) 为供试材料<sup>[23]</sup>,在温室播种生长两周后,用  $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 和水 (对照

CK)处理,设置 3 个生物学重复,在处理 48 h 和 60 h 取根组织,液氮迅速冷冻后送百迈客公司进行转录组测定。在返回的转录组数据中筛选差异表达基因,筛选的标准为  $|\log_2 \text{Fold Change}| \geq 1$  且  $P < 0.05$ 。设计 4 个比较组合:N53 处理 48 h 的 CK (N53-CK-48 h)与盐胁迫 (N53-S-48 h)、T66 处理 48 h 的 CK (T66-CK-48 h)与盐胁迫 (T66-S-48 h)、N53 处理 60 h 的 CK (N53-CK-60 h)与盐胁迫 (N53-S-60 h)、T66 处理 60 h 的 CK (T66-CK-60 h)与盐胁迫 (T66-S-60 h),筛选上调和下调的差异基因。用 Ttools 将数据可视化,

红色表示 up,蓝色表示 down,白色表示 normal。

用诺唯赞公司试剂盒按照说明提取大麦幼叶的总 RNA,并合成 cDNA。用 Primers 5.0 设计引物(表 1),以  $\alpha\text{-Tublin}$  和  $GAPDH$  为内参,用实时荧光定量 PCR 扩增大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族成员盐胁迫后基因表达量,引物由上海生工合成。PCR 反应体系 10  $\mu\text{L}$ : SYBR<sup>®</sup>Select Master Mix 5  $\mu\text{L}$ ,前后引物各 1  $\mu\text{L}$ ,模板 1.5  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 1.5  $\mu\text{L}$ 。反应程序:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s,60  $^{\circ}\text{C}$  退火和延伸,循环数 40;60  $^{\circ}\text{C}$  采集信号。用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算基因表达量。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物  
Table 1 Primers in barley used for qPCR

基因名称 Gene name	上游引物 Forward primer sequence (5'-3')	下游引物 Reverse primer sequence (5'-3')
$\alpha\text{-Tublin}$	AGTGTCTGTCCACCCACTC	AGCATGAAGTGGATCCTTGG
$GAPDH$	GTGAGGCTGGTGCTGATTACG	TGGTGCAGCTAGCATTGAGAC
$HvPYL1$	CGCTCGTCAAGCACATCAAGGC	CGGCTGACGAACGGCTTGATC
$HvPYL2$	CACCGCTCTCCAACCTACCG	CACGATGGTGTGACGAAGG
$HvPYL3$	TCGAGATCCTGGACGACGAG	TCACGGACCGGTAGTTGCGG
$HvPYL4$	CCTGGGAAGACACCGTTGTG	GTGACGGAGGATACGGAGCG
$HvPYL5$	CCGAGTTCACGGACCAGCCTTC	CGGCGAGTTTCTGGAGGTTGAG
$HvPYL6$	TGGTGGTTCGAGTCTTATGTG	CGATGGTGTCCACGAACATG
$HvPYL7$	TCAAGAACTACCTCTCTGTAC	GGTGTTCATCGATCGTGTAC
$HvPYL8$	TATCCCCAGCCTCAGCATTG	TCAGGAACGACATAGGATTC
$HvPYL9$	CACCTCGTTCATCGCCAAGCAC	AAAAGGCTTGAAAACCTGCGGC
$HvPYL10$	ACCGCCACATCCTCAGCTTCAG	GGTGAACATCCTGGTGTCTCTCC
$HvPP2C-A1$	CAATGGAATGGACACCGAG	CATCTTTTGCCCGAGGAAC
$HvPP2C-A2$	GGGGTCCATCCACCTCCAG	CTTGTCCTCCTCCTCCACCG
$HvPP2C-A3$	GCCACTCTCTCTGGACCATAAG	TACGGTTTTCAGGTATCTGTCCC
$HvPP2C-A4$	GCAAGGTCATCTTCATCAACGG	CGGTTATGCTGATTTCTGGCTC
$HvPP2C-A5$	GGTAGCAGATTACTGTGCGG	CAAACGCTTTCTCCACTGC
$HvPP2C-A6$	ATGAGCAGCGAGACGAGCAAG	GGGCCACGGTCATCAACTTC
$HvPP2C-A7$	GATTGTTTCCAGAAGGTAGACG	AAGAGCAGACAATCGCAACCAC
$HvPP2C-A8$	GTGCCAGGAGCTGATGCATGAG	CCTCTCCATCACCTCTTTCCAC
$HvPP2C-A9$	TACGGCGTGACGTCGGTGTG	CGAAGACCCCGAAGAAGTGG
$HvPP2C-A10$	GAGGGGCAGAGAGAGGTGGTG	TGGTTCTTTGGCCGAGATCGA
$HvPP2C-A11$	AAAATGCCTGGAAAACAAGAGC	AGATTTGTTAGGCGGATAGCGG
$HvPP2C-A12$	GGACGATGACGGGAAGATGATG	ATCGAAGACGGCGAAGAAGTGC
$HvPP2C-A13$	TAGGAAAATGCCTGGAAGACAAG	AAGATTTGTTAGGCGGATAGCGG
$HvSnRK2.1$	TACGAGGCGTTGAAGGAGTTGG	CTTGACGGCGACGAGCTCTTTG
$HvSnRK2.2$	CGCCACCGCTTCTTGCTCCAG	GCCGAAGTTGCCCGACCCTATG
$HvSnRK2.3$	GCTGATGCGTAACAAGGAGACC	TGATCTCCCTCGCCACATTCTC
$HvSnRK2.4$	TCGCTGATGTTTGGTCTTGTTGG	ACTGTACGCTGAGTATCCTTGC
$HvSnRK2.5$	ACTCAAAGTCGTGGTGTCTTCAC	AGCATCACGTAGAGCGTACCC
$HvSnRK2.6$	GACATCGGGTCGGGCAACT	GGTGGTTGATGATCTCCCTG
$HvSnRK2.7$	TCATCCTCACGCCACGCAC	CTCGTCTCGTGAACCTGCC
$HvSnRK2.8$	AGAACACTCTGCTGGATGGAAG	AGAACTCAGGGCAATGTATG
$HvSnRK2.9$	CGGCTATTCTAAGTCTTCAGTTC	ACAGGACCATAACATCAGCAATC

## 2 结果与分析

### 2.1 大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族成员分布及理化特性分析

通过 BLASTP 比对分析和保守结构域预测,在大麦基因组中共鉴定出 10 个 *HvPYL*、13 个 *HvPP2CA* 和 9 个 *HvSnRK2*。根据其在染色体上位置依次命名为 *HvPYL1*~*HvPYL10*、*HvPP2C-A1*~*HvPP2C-A13* 和 *HvSnRK2.1*~*HvSnRK2.9*

(表 2)。*HvPYL* 蛋白的氨基酸数在 116~224 之间,*HvPP2CA* 的氨基酸数在 324~477 之间,*HvSnRK2* 的氨基酸数在 341~366 之间。大部分蛋白等电点小于 7,属于酸性蛋白。*HvPYL4*、*HvPP2C-A7*、*HvSnRK2.1*、*HvSnRK2.2*、*HvSnRK2.4*、*HvSnRK2.5*、*HvSnRK2.7*、*HvSnRK2.8* 的不稳定指数小于 40,属于稳定蛋白。所有蛋白的脂溶指数均小于 100,说明 PYL、PP2CA、SnRK2 家族成员均为疏水性脂溶蛋白。亚细胞定位结果显

表 2 大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 基因家族成员及理化特性

Table 1 Physicochemical properties of PYL, PP2CA, and SnRK2 gene family members in barley

基因名称 Gene name	基因号 Gene ID	氨基酸数 Amino acid number	分子量 Molecular weight/kD	等电点 Isoelectric point	不稳定指数 Instability index	脂溶指数 Aliphatic index	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>HvPYL1</i>	HORVU.MOREX.r3.1HG0032540.1	205	22 211.07	6.05	50.68	87.85	Cyto
<i>HvPYL2</i>	HORVU.MOREX.r3.1HG0071710.1	201	21 265.93	8.72	42.26	82.99	Chlo
<i>HvPYL3</i>	HORVU.MOREX.r3.2HG0108630.1	222	23 198.02	7.14	46.42	78.65	Chlo
<i>HvPYL4</i>	HORVU.MOREX.r3.3HG0247520.1	116	12 586.20	5.21	39.42	90.69	Chlo
<i>HvPYL5</i>	HORVU.MOREX.r3.3HG0248870.1	199	21 711.29	5.23	45.48	79.75	Chlo
<i>HvPYL6</i>	HORVU.MOREX.r3.3HG0304260.1	206	22 008.04	9.19	41.59	90.39	Chlo
<i>HvPYL7</i>	HORVU.MOREX.r3.4HG0383820.1	224	23 385.49	6.38	42.21	88.75	Cyto
<i>HvPYL8</i>	HORVU.MOREX.r3.5HG0534410.1	149	15 616.49	6.27	45.89	79.80	Chlo
<i>HvPYL9</i>	HORVU.MOREX.r3.7HG0708570.1	197	22 367.59	5.92	40.85	92.39	Cyto
<i>HvPYL10</i>	HORVU.MOREX.r3.7HG0717820.1	196	21 261.88	6.31	40.17	79.03	Cyto
<i>HvPP2C-A1</i>	HORVU.MOREX.r3.1HG0080890.1	384	41 109.49	5.43	44.09	87.14	Chlo
<i>HvPP2C-A2</i>	HORVU.MOREX.r3.1HG0090670.1	395	41 587.63	6.32	56.43	83.27	Nucl
<i>HvPP2C-A3</i>	HORVU.MOREX.r3.1HG0094890.1	406	42 946.44	5.21	46.53	86.63	Chlo
<i>HvPP2C-A4</i>	HORVU.MOREX.r3.2HG0095500.1	426	44 550.31	5.68	62.85	84.18	Nucl
<i>HvPP2C-A5</i>	HORVU.MOREX.r3.3HG0267730.1	477	49 686.3	4.94	41.84	87.51	Vacu
<i>HvPP2C-A6</i>	HORVU.MOREX.r3.3HG0276740.1	398	42 207.4	6.37	52.68	80.68	Chlo
<i>HvPP2C-A7</i>	HORVU.MOREX.r3.3HG0284740.1	383	40 588.17	5.59	38.69	85.12	Cyto
<i>HvPP2C-A8</i>	HORVU.MOREX.r3.3HG0302180.1	393	41 866.12	5.78	56.40	71.83	Cyto
<i>HvPP2C-A9</i>	HORVU.MOREX.r3.4HG0389000.1	400	43 066.01	5.86	72.80	69.53	Nucl
<i>HvPP2C-A10</i>	HORVU.MOREX.r3.5HG0473680.1	349	37 075.93	6.42	58.85	77.25	Pero
<i>HvPP2C-A11</i>	HORVU.MOREX.r3.7HG0640890.1	324	34 082.92	8.26	44.78	84.10	Chlo
<i>HvPP2C-A12</i>	HORVU.MOREX.r3.7HG0640920.1	372	38 861.60	4.85	56.64	79.06	Chlo
<i>HvPP2C-A13</i>	HORVU.MOREX.r3.7HG0640930.1	338	35 828.81	7.59	44.83	81.48	Chlo
<i>HvSnRK2.1</i>	HORVU.MOREX.r3.1HG0057490.1	341	38 534.95	5.85	37.87	84.40	Cyto
<i>HvSnRK2.2</i>	HORVU.MOREX.r3.2HG0123910.1	341	38 594.20	5.45	36.28	89.41	Cyto
<i>HvSnRK2.3</i>	HORVU.MOREX.r3.2HG0168730.1	357	40 897.52	5.54	43.27	77.31	Cyto
<i>HvSnRK2.4</i>	HORVU.MOREX.r3.2HG0201420.1	342	38 824.37	5.75	32.30	87.72	Cyto
<i>HvSnRK2.5</i>	HORVU.MOREX.r3.2HG0216470.1	393	44 200.89	6.04	37.68	72.70	Cyto
<i>HvSnRK2.6</i>	HORVU.MOREX.r3.3HG0299220.1	362	41 938.57	5.96	50.62	75.36	Cysk
<i>HvSnRK2.7</i>	HORVU.MOREX.r3.4HG0342860.1	361	40 647.17	4.80	36.19	88.59	Cysk
<i>HvSnRK2.8</i>	HORVU.MOREX.r3.5HG0438740.1	357	40 151.00	4.94	28.19	89.83	Cysk
<i>HvSnRK2.9</i>	HORVU.MOREX.r3.5HG0512820.1	366	41 530.34	4.86	47.81	86.83	Cysk

Cyto: 细胞质; Chlo: 叶绿体; Nucl: 细胞核; Vacu: 液泡; Pero: 过氧化物酶体; Cysk: 细胞骨架。

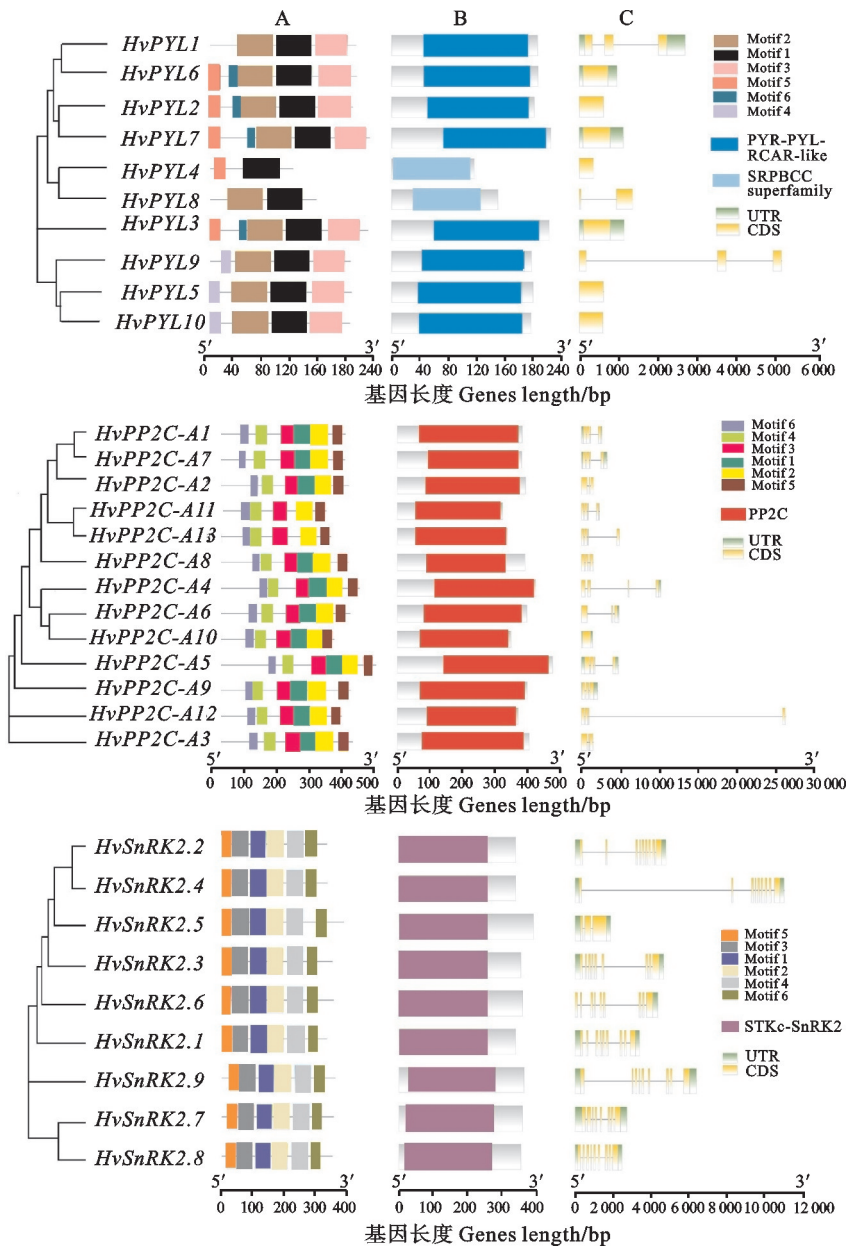
Cyto: Cytoplasm; Chlo: Chloroplast; Nucl: nucleus; Vacu: Vacuole; Pero: Peroxisome; Cysk: Cytoskeleton.

示,6 个 *HvPYL* 定位在叶绿体,4 个定位在细胞质;6 个 *HvPP2CA* 定位在叶绿体,3 个在细胞核,2 个在细胞质,1 个在液泡,1 个在过氧化物酶体;*HvSnRK2* 则 5 个定位在细胞质,4 个定位在细胞骨架。

### 2.2 大麦 *PYL*、*PP2CA* 和 *SnRK2* 家族基因结构分析

利用最新公布的大麦基因组信息,使用 TBtools 软件绘制大麦 *PYL*、*PP2CA* 和 *SnRK2* 家族成员的结构组成图(图 1)。*HvPYL* 家族中,仅 *HvPYL1*、*HvPYL8* 和 *HvPYL9* 有内含子(图 C

直线部分),*HvPP2CA* 和 *HvSnRK2* 基因均包含多个内含子,其中 *HvSnRK2* 的内含子数量较多。3 个家族成员的 motif 都具有高度的保守性,其中 *HvPP2CA* 和 *HvSnRK2* 各成员的 motif 数量和排列顺序相同。*HvPYL* 成员间 motif 数量存在明显差异,*HvPYL4* 没有 motif2 和 motif3,*HvPYL8* 含有 motif2 但缺失 motif3,所有成员都含有 motif1。3 个家族所有成员中,仅 *HvPYL4* 和 *HvPYL8* 不具有 *PYL*-*PYL*-*RCAR*\_like 保守结构域。



A: 基因 motif 分布; B: 基因结构域; C: 基因结构。

A: Motif distribution of genes; B: Genes domain; C: Gene structure.

图 1 大麦 *PYL*、*PP2CA* 和 *SnRK2* 家族基因保守基序和结构

Fig. 1 Conservative motifs and gene structure of *PYL*, *PP2CA* and *SnRK2* family genes in barley

### 2.3 大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族成员的系统进化树分析

分别对不同来源的 PYL(大麦 10 个、拟南芥 14 个、小麦 38 个和水稻 13 个)、PP2CA(大麦 13 个、拟南芥 9 个、小麦 36 个、水稻 10 个和 SnRK2 序列(大麦 9 个、拟南芥 10 个、小麦 31 个、水稻 10)构建系统进化树(图 2)。结果表明,大麦 PYL 家族可分为 3 个 Group, Group 1 包括 *HvPYL1* 和 *HvPYL9*; Group 2 包括 *HvPYL2*、*HvPYL3*、*HvPYL6* 和 *HvPYL7*; Group 3 包括 *HvPYL4*、*HvPYL5*、*HvPYL8* 和 *HvPYL10*(图 2A)。进化树(图 2B)将大麦 PP2CA 分成 4 类: *HvPP2C-A4*、*HvPP2C-A11*、*HvPP2C-A12*、*HvPP2C-A13* 为 I 类; *HvPP2C-A8*、*HvPP2C-A9*、*HvPP2C-A10* 为 II 类; *HvPP2C-A2* 和 *HvPP2C-A6* 为 III 类; *HvPP2C-A1*、*HvPP2C-A3*、*HvPP2C-A5* 和 *HvPP2C-A7* 为 IV 类。SnRK2 家族分为 3 个亚族(图 2C), 即 Group I ~ III; Group I 包括 *HvSnRK2.3*、*HvSnRK2.5*、*HvSnRK2.6*; Group II 包括 *HvSnRK2.1*、*HvSnRK2.2*、*HvSnRK2.4*;

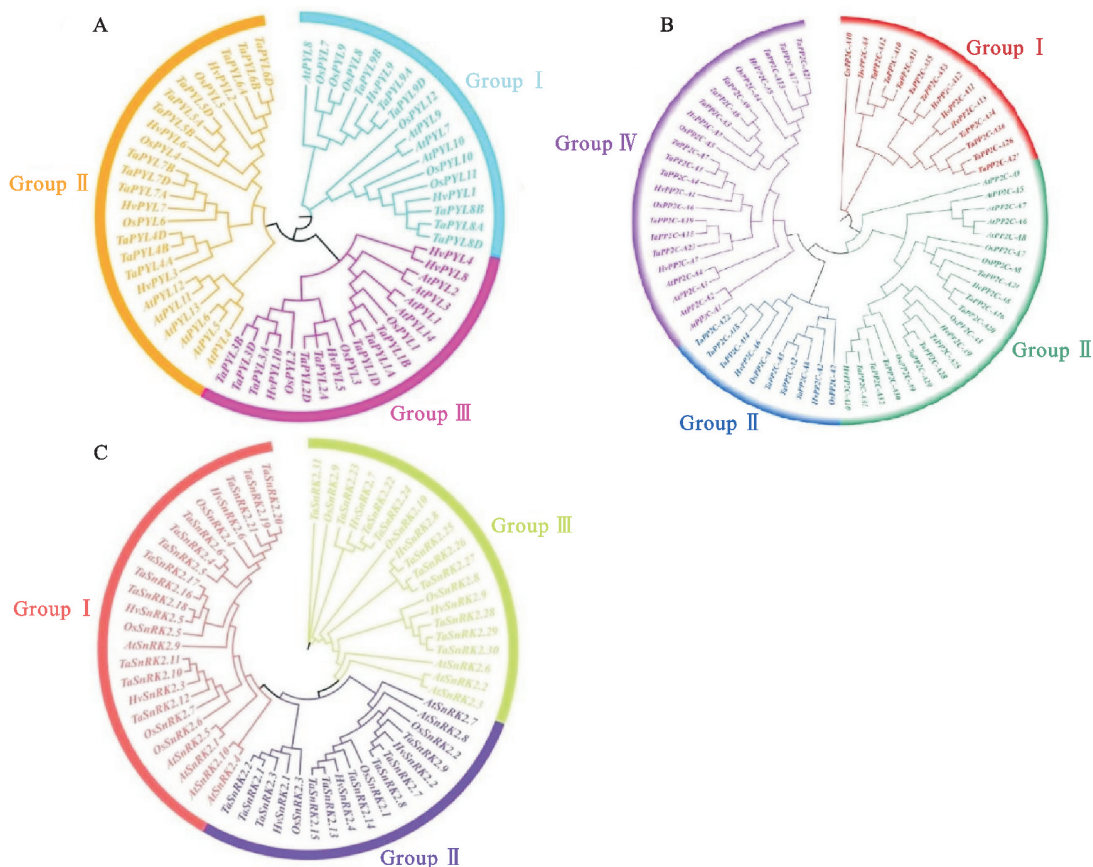
Group III 包括 *HvSnRK2.7*、*HvSnRK2.8*、*HvSnRK2.9*。所有家族中,大麦与小麦进化关系最近,其次是水稻,与拟南芥关系较远。

### 2.4 大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族成员的染色体定位

在大麦 7 条染色体中,10 个 *HvPYL* 基因和 13 个 *HvPP2CA* 基因定位在 1~5 和 7 号染色体上,9 个 *HvSnRK2* 基因定位在 1~5 号染色体上(图 3)。从单条染色体来看,3 号染色体分布 3 个 *HvPYL* 基因和 4 个 *HvPP2CA* 基因,2 号染色体上分布了 4 个 *HvSnRK2* 基因。*HvPP2C-A11*、*HvPP2C-A12*、*HvPP2C-A13* 串联在 7 号染色体上,表明 PP2CA 家族在进化过程中可能出现了基因的自我复制,导致基因数量增加。

### 2.5 大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族成员启动子区顺式作用元件预测

为了预测 *HvPYL*、*HvPP2CA*、*HvSnRK2* 家族成员的功能,分析大麦 PYL、PP2CA、SnRK2 家族各基因转录起始位点上游 2 000 bp 序列顺式作用元件。结果(图 4)显示,大麦 PYL、PP2CA、



At: 拟南芥; Os: 水稻; Ta: 小麦; Hv: 大麦。

At: *Arabidopsis thaliana*; Os: *Oryza sativa* L.; Ta: *Triticum aestivum* L.; Hv: *Hordeum vulgare* L.

图 2 拟南芥、水稻、小麦和大麦 PYL(A)、PP2CA(B)、SnRK2(C) 家族基因进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of PYL(A), PP2CA(B), and SnRK2(C) family genes in *Arabidopsis*, rice, wheat and barley

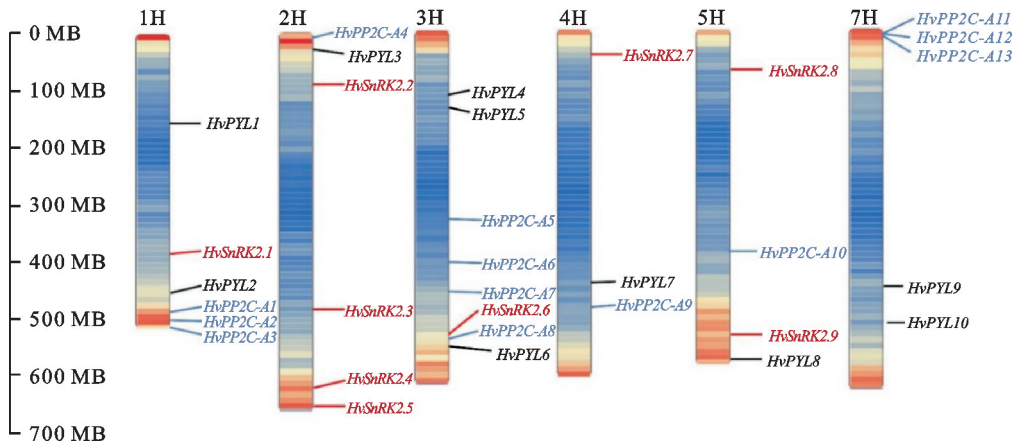
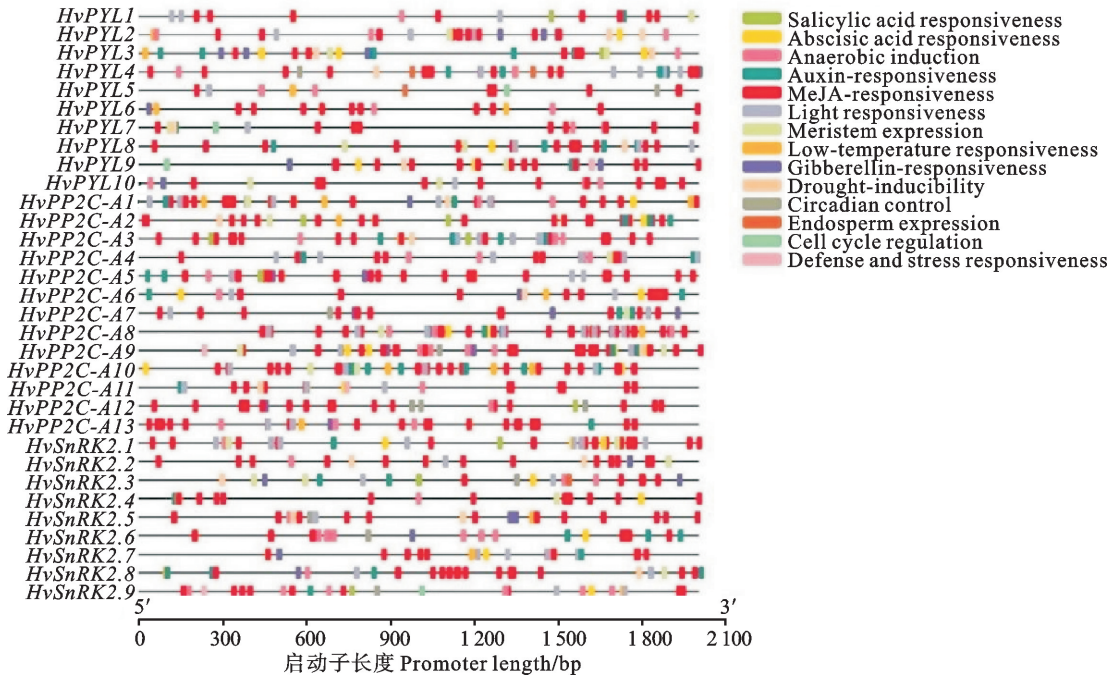


图 3 大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族基因染色体定位  
 Fig. 3 Chromosome localization of PYL, PP2CA and SnRK2 family genes in barley



Salicylic acid responsiveness: 水杨酸响应; Abscisic acid responsiveness: 脱落酸响应; Anaerobic induction: 厌氧诱导; Auxin-responsiveness: 生长素响应; MeJA-responsiveness: 茉莉酸甲酯响应; Light responsiveness: 光响应; Meristem expression: 分生组织表达; Low-temperature responsiveness: 低温响应; Gibberellin-responsiveness: 赤霉素响应; Drought-inducibility: 干旱诱导; Circadian control: 生理调控; Endosperm expression: 胚乳表达; Cell cycle regulation: 细胞周期调控; Defense and stress responsiveness: 防御和应激反应。

图 4 大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族基因启动子区顺式作用元件分析

Fig. 4 Analysis of cis-elements in the promoter regions of PYL, PP2CA and SnRK2 family genes in barley

SnRK2 家族成员启动子区有大量的顺式作用元件, 共计 14 种。这些顺式作用元件可分为 3 大类: 植物生长发育元件 (519 个)、激素响应元件 (503 个) 和非生物胁迫响应元件 (44 个)。植物生长发育元件中, 光响应元件数量最多 (473 个), 广泛分布在每个基因启动子区域。激素响应元件种类丰富, 主要包括脱落酸响应元件、茉莉酸甲酯响应元件、水杨酸响应元件、赤霉素响应元件和生长

素响应元件, 其中脱落酸响应元件 (208 个) 最丰富, 除 *HvPP2C-A12* 外, 其他基因启动子区域至少含有一个脱落酸响应元件, 表明 3 个家族基因广泛参与 ABA 信号转导途径; 非生物胁迫元件主要包括低温和干旱响应元件, 其中 *HvPYL2*、*HvPYL3*、*HvPP2C-A1*、*HvPP2C-A2*、*HvPP2C-A6*、*HvSnRK2.5* 和 *HvSnRK2.8* 同时含有这两种元件。这些结果表明, 3 个家族基因对大麦生长

发育、响应胁迫有重要作用。

### 2.6 大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族基因共线性分析

对 *HvPYL*、*HvPP2CA* 和 *HvSnRK2* 的基因进行共线性分析,结果(图 5)显示,*HvPYL* 和 *HvSnRK2* 均有 2 对共线性基因,分别为 *HvPYL2* 与 *HvPYL6*、*HvPYL3* 与 *HvPYL7*、*HvSnRK2. 7* 与 *HvSnRK2. 8*; *HvPP2CA* 家族成员有 4 对共线性基因,分别是 *HvPP2C-A1* 与 *HvPP2C-A6*、*HvPP2C-A2* 与 *HvPP2C-A6*、*HvPP2C-A5* 与 *HvPP2C-A7*、*HvPP2C-A8* 与 *HvPP2C-A9*,均存在基因复制。

构建大麦与水稻的基因共线性图谱,发现二者间的 *HvPYL*、*HvPP2CA* 和 *HvSnRK2* 分别有 11 对、14 对和 12 对共线性基因(图 6)。*HvPYL* 家族中,*HvPYL1*、*HvPYL2*、*HvPYL3*、*HvPYL6*、*HvPYL7* 可在水稻中找到共线基因; *HvPP2CA* 家族中, *HvPP2C-A1*、*HvPP2C-A2*、*HvPP2C-A4*、*HvPP2C-A5*、*HvPP2C-A6*、*HvPP2C-A7*、*HvPP2C-A8*、*HvPP2C-A9* 可在水稻中找到共线性基因; *HvSnRK2* 家族中, *HvSnRK2. 1*、*HvSnRK2. 2*、*HvSnRK2. 3*、*HvSnRK2. 6*、*HvSnRK2. 7* 可在水稻中找到共线基因。

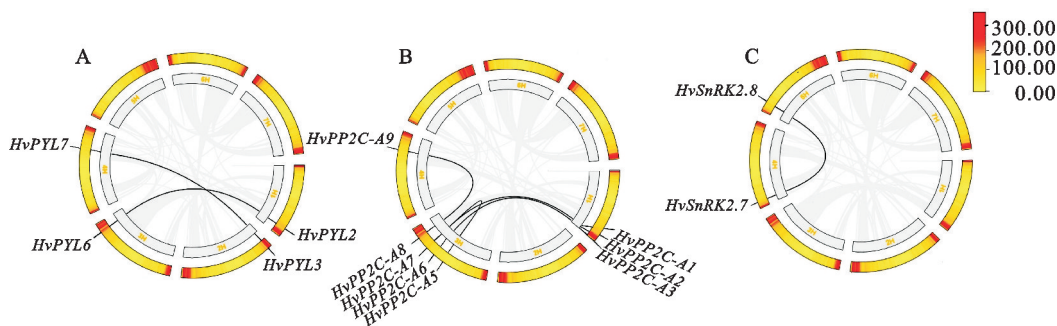


图 5 大麦 PYL(A)、PP2CA(B)、SnRK2(C)家族间基因的共线性分析

Fig. 5 Circos analysis of fragment repeat genes of PYL(A), PP2CA(B) and SnRK2(C) family genes in barley

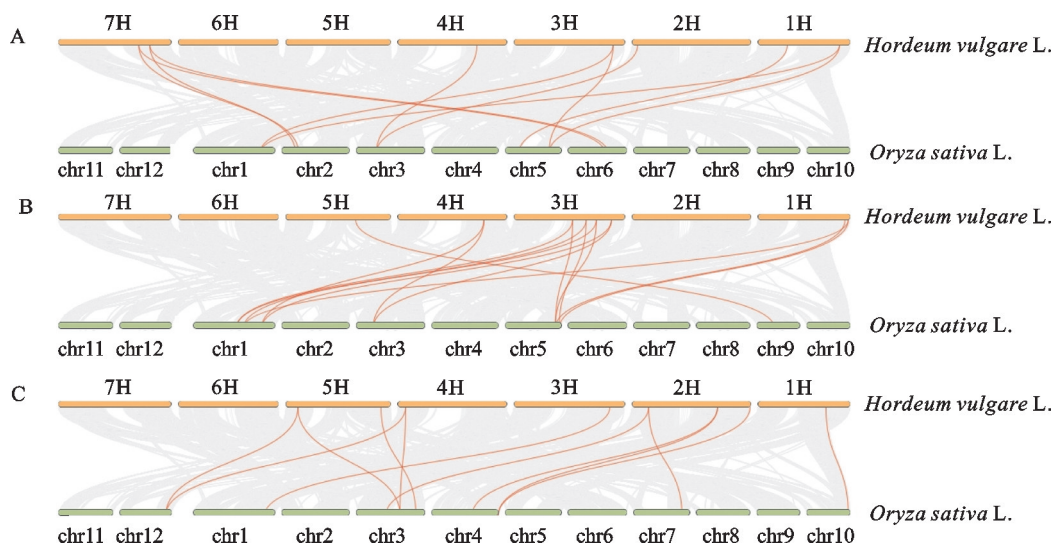


图 6 大麦和水稻 PYL(A)、PP2CA(B)、SnRK2(C)家族基因的共线性

Fig. 6 Synteny analysis of PYL (A), PP2CA (B) and SnRK2 (C) genes between barley and rice

### 2.7 大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族基因在不同组织中的表达

收集 3 个家族成员在 14 个组织的表达量信息,并制作热图(图 7)。根据 32 个基因在不同组织的表达水平,将其分为四类,第一类以 *HvPP2C-A6*、*HvPYL6* 为代表,在籽粒中表达量较高;第二类以 *HvPP2C-A9*、*HvSnRK2. 1* 为代

表,主要在花序中表达;第三类主要在根部表达,其中 *HvPYL6* 和 *HvPYL2* 表达水平较高;第四类以 *HvSnRK2. 4*、*HvPYL4* 为代表,在叶片的表达量较高。不同家族间基因表达量比较发现, *HvPYL2*、*HvPYL5*、*HvPYL6*、*HvPYL7* 在根部表达量较高; *HvPP2C-A1*、*HvPP2C-A5*、*HvPP2C-A8*、*HvPP2C-A9*、*HvPP2C-A10* 在花序表达量较

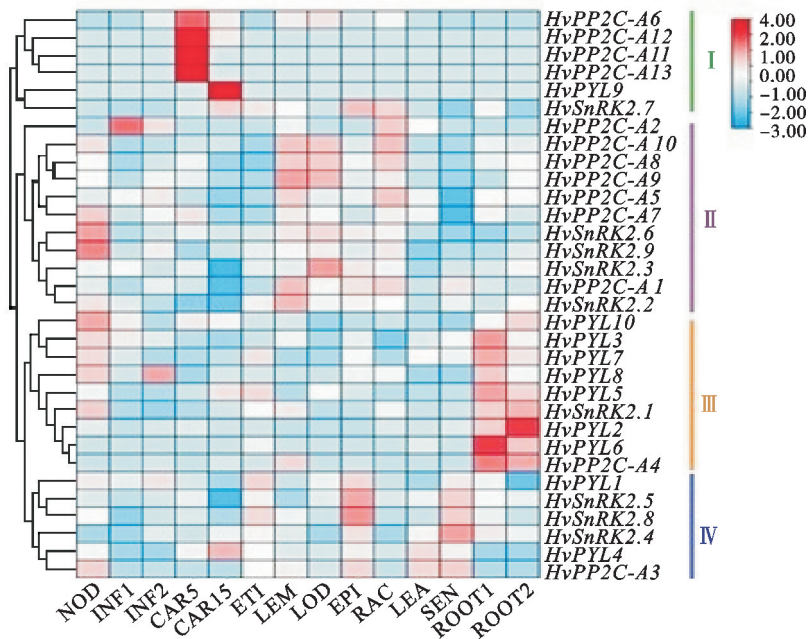
高; *HvSnRK2.4*, *HvSnRK2.5*, *HvSnRK2.8* 在种皮表达量较高。同一家族的基因在不同组织中表达量差异明显, 如 *HvPYL9* 只在籽粒中表达, *HvPYL10* 在分蘖和根部表达; *HvSnRK2.4* 在叶片表达量最高, 而 *HvSnRK2.1* 在根部表达量最高。可见大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族基因与大麦的生长发育调控密切相关, 在各生长阶段发挥不同的功能。

### 2.8 盐胁迫下大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族基因的转录组测序与表达量分析

对 3 个家族基因的转录组数据进行分析, 结果(图 8)发现, N53-ck-48 h 与 N53-s-48 h 比较, 共有 13 个差异表达基因, 其中 *HvPYL10*, *HvPP2C-A1*, *HvPP2C-A2*, *HvPP2C-A4*, *HvPP2C-A6*, *HvPP2C-A7*, *HvPP2C-A8*, *HvPP2C-A9*, *HvPP2C-A10* 和 *HvSnRK2.4* 上调表达, *HvPYL5*, *HvPYL6* 和 *HvPYL7* 下调表达。T66-ck-48 h 与 T66-s-48 h 比较, 共 9 个差异表达基因, 其中 *HvPYL10*, *HvPP2C-A4*,

*HvPP2C-A6*, *HvPP2C-A9*, *HvPP2C-A10*, *HvSnRK2.4* 上调表达, *HvPYL5*, *HvPYL6* 和 *HvPYL7* 下调表达。N53-ck-60 h 与 N53-s-60 h 比较, 共 11 个差异表达基因, 其中 *HvPYL1*, *HvPYL4*, *HvPP2C-A1*, *HvPP2C-A2*, *HvPP2C-A4*, *HvPP2C-A6*, *HvPP2C-A7*, *HvPP2C-A8*, *HvPP2C-A9*, *HvPP2C-A10* 和 *HvSnRK2.4* 上调表达, *HvPYL5*, *HvPYL6* 和 *HvPYL7* 下调表达。T66-ck-60 h 与 T66-s-60 h 比较, 有 13 个差异表达基因, 其中 *HvPP2C-A1*, *HvPP2C-A4*, *HvPP2C-A5*, *HvPP2C-A6*, *HvPP2C-A7*, *HvPP2C-A8*, *HvPP2C-A9*, *HvPP2C-A10*, *HvSnRK2.4* 上调表达, *HvPYL2*, *HvPYL5*, *HvPYL6* 和 *HvPYL7* 下调表达。

与对照相比, 盐处理后 *HvPP2C-A6*, *HvPP2C-A9*, *HvPP2C-A10*, *HvSnRK2.4* 在近等基因系中均显著上调表达, 而 *HvPYL5*, *HvPYL6* 和 *HvPYL7* 均显著下调表达。与对照相比, *HvPP2C-A1*, *HvPP2C-A2*, *HvPP2C-A7* 和 *HvPP2C-A8* 仅在盐处



NOD: 发育的分蘖, 第三节间(花后 42 d); INF1: 幼嫩发育的花序(花序 5 mm 时期, 播种后 30 d); INF2: 幼嫩发育的花序(花序 1~1.5 cm 时期, 播种后 50 d); CAR5: 发育中的籽粒(花后 5 d); CAR15: 发育中籽粒(花后 15 d); ETI: 暗处理黄化苗(花后 10 d); LEM: 花序和外稃(花后 42 d); LOD: 花序和浆片(花后 42 d); EPI: 表皮(花后 28 d); RAC: 花序和花序轴(花后 35 d); LEA: 幼苗芽(10 cm 时期, 播种后 17 d); SEN: 衰老叶片(花后 56 d); ROOT1: 幼苗根(10 cm 时期, 播种后 17 d); ROOT2: 根(花后 28 d)。

NOD: Developing tillers, 3rd internode[42 days after anthesis(DAA)]; INF1: Young developing inflorescences(5 mm, 30 days after planting); INF2: Developing inflorescences(1-1.5 cm, 50 days after planting); CAR5: Developing grain(5 DAA); CAR15: Developing grain(15 DAA); ETI: Etiolated seedling, dark cond. (10 DAA); LEM: Inflorescences, lemma(42 DAA); LOD: Inflorescences, lodicule(42 DAA); EPI: Epidermal strips(28 DAA); RAC: Inflorescences, rachis(35 DAA); LEA: Shoots from seedlings(10 cm shoot stage, 17 days after planting); SEN: Senescing leaves(56 DAA); ROOT1: Roots from seedlings(10 cm shoot stage, 17 days after planting); ROOT2: Roots(28 DAA)。

图 7 大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族基因在不同组织下的表达分析

Fig. 7 Expression analysis of PYL, PP2CA and SnRK2 family genes in different tissues of barley

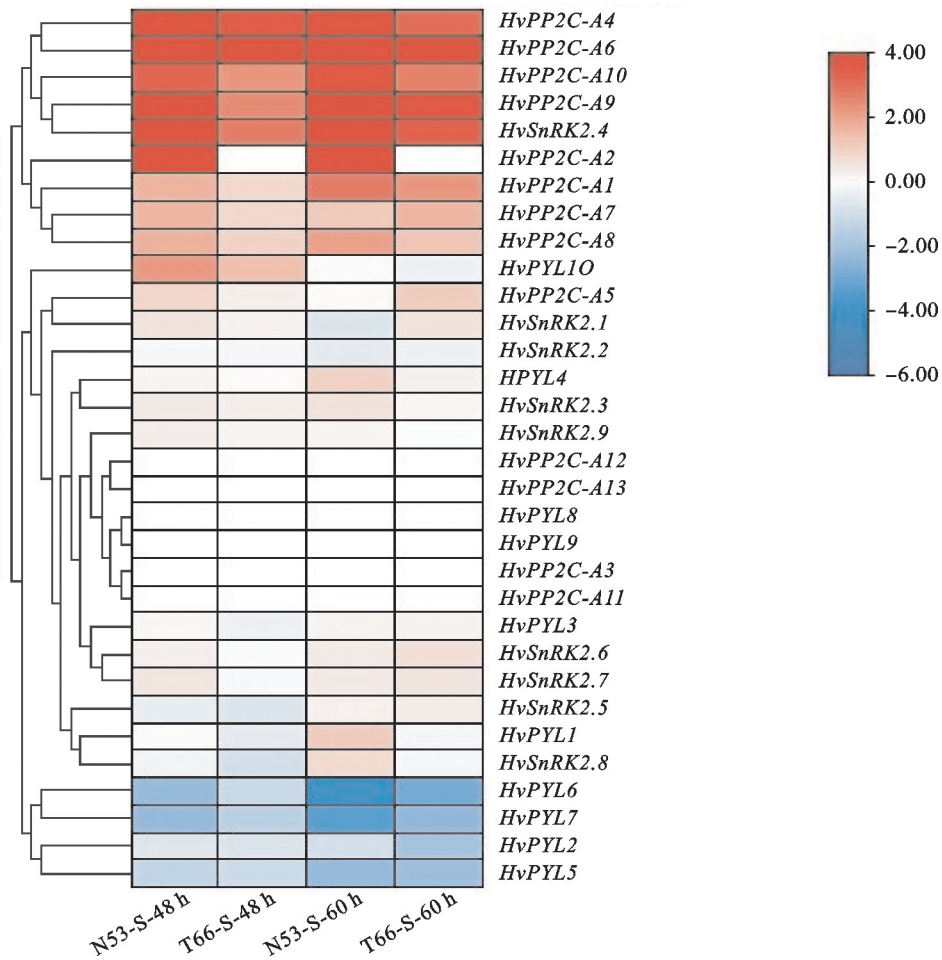


图 8 大麦 *PYL*、*PP2CA* 和 *SnRK2* 基因盐胁迫后转录组数据分析

Fig. 8 Transcriptome data analysis *PYL*, *PP2CA* and *SnRK2* genes in barley under salt stress

理 48 h 后的盐敏感系 N53 中上调表达。而 *HvPYL1*、*HvPYL4* 和 *HvPP2C-A2* 在盐处理 60 h 后的盐敏感系 N53 中特异上调表达, *HvPP2C-A5* 和 *HvPYL2* 在盐处理 60 h 后的耐盐系 T66 中特异上调和下调表达。

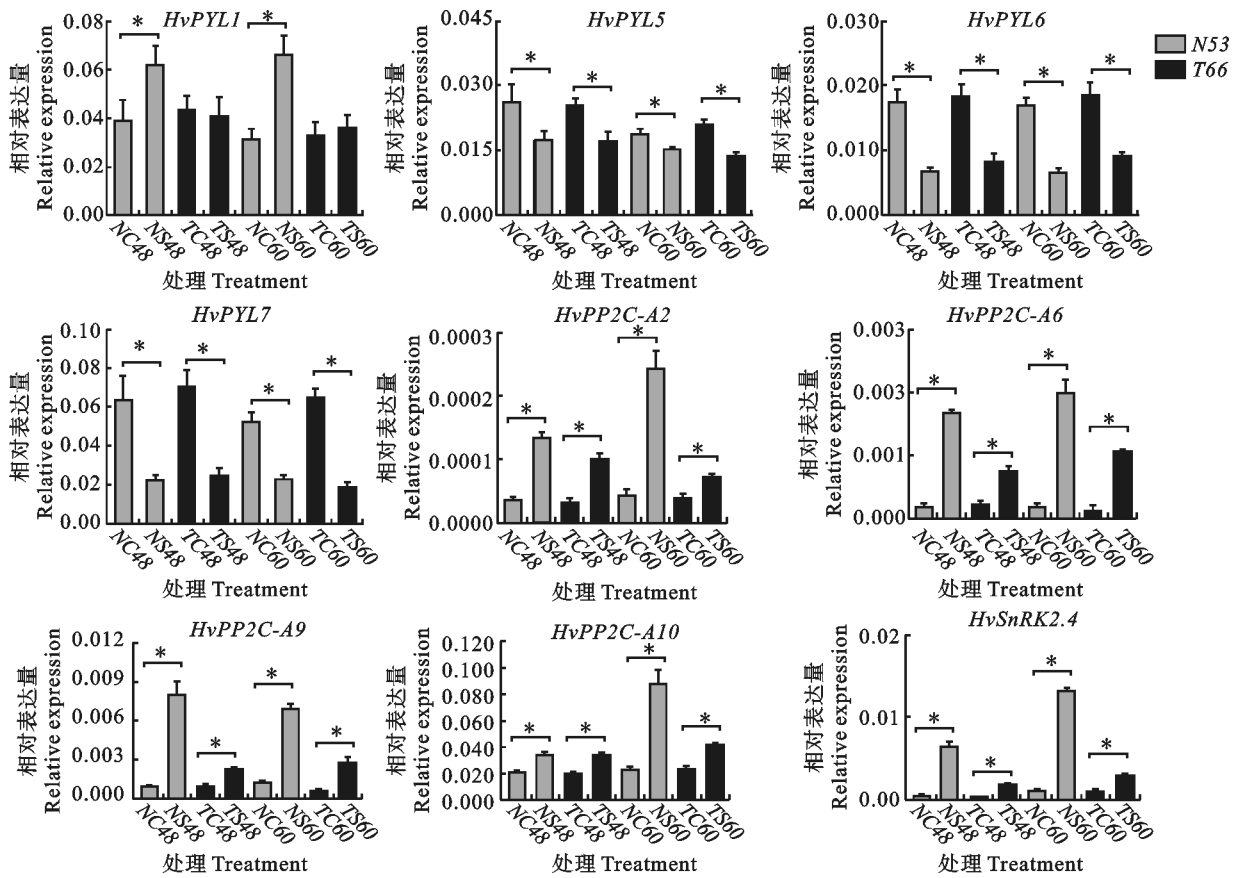
*HvPYLs* 基因中, *HvPYL7* 下调水平最高, 在盐敏感系 N53 中下调 3.3 倍, 在耐盐系 T66 下调 2.4 倍。 *HvPP2CAs* 基因中 *HvPP2C-A6* 和 *HvPP2C-A9* 受盐胁迫强烈诱导表达, 且在近等基因系中差异显著, 在 N53 中分别上调 8.8 倍和 5.5 倍, 在 T66 中分别上调 4 倍和 3 倍。 *HvSnRK2.4* 是 *HvSnRK2s* 基因中受盐胁迫影响最大的基因, 在 N53 和 T66 中分别上调 6.9 倍和 3.3 倍。 *HvPYL1*、*HvPP2C-A2*、*HvPP2C-A6*、*HvPP2C-A9*、*HvSnRK2.4* 在 N53 中的表达水平极显著高于耐盐系 T66。这些基因可能对大麦应对盐胁迫具有重要作用。为验证转录组测序的数据, 选取部分差异基因进行 qPCR 分析, 并计算相对表达量, 结果表明, qPCR 的结

果与转录组数据一致, 证实了转录组数据的可靠性(图 9)。

### 3 讨论

#### 3.1 基因的结构和进化分析

本研究在大麦中鉴定到 10 个 *PYL*、13 个 *PP2CA* 和 9 个 *SnRK2* 基因, 与拟南芥 (*PYL*、*PP2CA*、*SnRK2* 基因分别为 14、9、10 个) 和水稻 (*PYL*、*PP2CA*、*SnRK2* 基因分别为 13、10、10 个) 相比, 3 个物种间 *PYL*、*PP2CA* 和 *SnRK2* 家族成员数量差异不大。鉴定 *PYL* 家族基因时, 发现 *HvPYL4* 和 *HvPYL8* 保守结构域与其他 *PYL* 基因不同, *PYR-PYL-RCAR\_like* 结构域是 *PYL* 家族的经典特征, 而 *HvPYL4* 和 *HvPYL8* 却不包含该结构域。在单子叶模式作物水稻的 *PYL* 成员中, *OsPYL7* 也不含 *PYR-PYL-RCAR\_like* 结构域, 但 Bhatnagar 等<sup>[25]</sup>证实了 *OsPYL7* 是 ABA 受体, 高度依赖 ABA, 有较低的 ABA 转运活性。



NC48:水处理 48 h 的 N53;NS48:盐处理 48 h 的 N53;TC48:水处理 48 h 的 T66;TS48:盐处理 48 h 的 T66;NC60:水处理 60 h 的 N53;NS60:盐处理 60 h 的 N53;TC60:水处理 60 h 的 T66;TS60:盐处理 60 h 的 T66。\* : 在 N53 和 T66 中,水与盐处理间存在显著差异( $P < 0.05$ )。

NC48: N53 under water treatment for 48 h; NS48: N53 under salt treatment for 48 h; TC48: T66 under water treatment for 48 h; TS48: T66 under salt treatment for 48 h; NC60: N53 under water treatment for 60 h; NS60: N53 under salt treatment for 60 h; TC60: T66 under water treatment for 60 h; TS60: T66 under salt treatment for 60 h. \* : Significant differences between water and salt treatment in N53 and T66( $P < 0.05$ ).

图 9 差异表达基因在盐胁迫后 qPCR 分析

Fig. 9 qPCR analysis of differentially expressed genes after salt stress

*HvPYL4*、*HvPYL8* 与 *OsPYL7* 同源性较高,因此将 *HvPYL4* 和 *HvPYL8* 也归于 *HvPYL* 家族成员。进行大麦物种内共线性分析时发现,*HvSnRK2.6* 与本研究新发现的基因 *HORVU.MOREX.r3.1HG0075630* 存在共线性,而并未与其他鉴定的 *HvSnRK2* 基因存在共线性。通过 SMART 网站对 *HORVU.MOREX.r3.1HG0075630* 的序列进行分析,发现其与 9 个 *HvSnRK2* 基因均含有 S<sub>2</sub>TKc domain 和 Low complexity region,但 *HORVU.MOREX.r3.1HG0075630* 的 Low complexity region 位于蛋白质的 N 端,而 9 个 *HvSnRK2* 基因的 Low complexity region 则位于蛋白质的 C 端。NCBI 的 Batch CD-Search 分析结果显示, *HORVU.MOREX.r3.1HG0075630* 的蛋白结构域属于 PKc<sub>2</sub> like superfamily,与本研究鉴定的 9 个 *HvSnRK2* 基因结构域(STKc<sub>2</sub>SnRK2)不同。因此未将 *HORVU.MOREX.r3.1HG0075630* 纳入 *HvSnRK2* 基因家族。植物进化的过程中常常伴

随基因复制,基因复制为基因家族扩张和物种产生新功能提供了潜力<sup>[26]</sup>。大麦 PP2CA 家族成员数量略多于其他两个物种,因其在 7 号染色体前端(*HvPP2C-A11*、*HvPP2C-A12* 和 *HvPP2C-A13*)发生了基因的自我复制(图 3),这些基因位置相近、序列高度相似、进化关系很近,是典型的串联重复基因。这些串联重复基因在顺式作用元件、蛋白理化性质、组织表达特异性等方面高度相似但略有不同,暗示这些基因在进化中发生了亚功能化,共同行使祖先基因功能<sup>[27]</sup>。Kulik 等<sup>[28]</sup>根据系谱发生分析,将水稻的 SnRK2 家族分为 3 个亚族<sup>[29]</sup>:不被 ABA 激活(*OsSnRK2.8* 和 *OsSnRK2.9*);较弱响应 ABA(*OsSnRK2.1*、*OsSnRK2.2* 和 *OsSnRK2.3*)和强烈响应 ABA(*OsSnRK2.4*、*OsSnRK2.5*、*OsSnRK2.6* 和 *OsSnRK2.7*)。结合图 2C 结果,我们推测 Group III 为不被 ABA 激活类(*HvSnRK2.7*、*HvSnRK2.8* 和 *HvSnRK2.9*);Group II 为较弱响应 ABA 类(*HvSnRK2.1*、*HvSnRK2.2* 和

*HvSnRK2. 4*), Group I 为强烈响应 ABA 类 (*HvSnRK2. 3*, *HvSnRK2. 5* 和 *HvSnRK2. 6*)。

3 个家族成员启动子区域顺式作用元件种类丰富,包含了大麦生长发育与抗逆相关多种元件。3 个家族基因虽然是 ABA 通路的核心,但除了 ABA 响应元件外,还发现了大量的其他激素元件,如生长素、赤霉素等。脱落酸与赤霉素对植物的生长发育具有拮抗作用,而脱落酸与生长素具有协同作用,多种激素间的相互作用对植物调节各种生理过程、响应环境变化具有重要作用<sup>[30]</sup>。推测 3 个家族基因也可能参与了其它激素调节途径,调控大麦的生长和抗非生物胁迫。

### 3.2 盐胁迫下表达分析

盐胁迫条件下,*HvPYL* 家族中 *HvPYL5*, *HvPYL6* 和 *HvPYL7* 在一对近等基因系中表达量显著下调, *HvPYL7* 下调水平最高,该基因在水稻中的同源基因为 *RCAR4*。Kumar 等<sup>[31]</sup>发现, *RCAR4* 稳态是 ABA 生物合成的关键调节因子,非胁迫下过表达或 RNAi 沉默 *RCAR4* 均导致 ABA 在幼苗中积累增加;过表达 *RCAR4* 增强了应激反应基因表达及营养生长和生殖生长阶段的耐旱性;相比过表达系,野生型在对照和干旱条件下的气孔关闭率更低。 *HvPYL7* 可能与 *RCAR4* 具有相似的功能。 *HvPYL1* 在盐敏感系 N53 中特异性表达,表达量显著高于对照。水稻中 *RCAR5* 是 *HvPYL1* 的同源基因,该基因已证实可以增强水稻耐盐性,是提高水稻非生物胁迫耐受性良好的候选基因<sup>[32]</sup>,推测 *HvPYL1* 具有较大利用潜力。

*HvPP2CA* 是 3 个家族中响应盐胁迫基因数量最多的家族。盐处理后, *HvPP2C-A6* 和 *HvPP2C-A2* 在盐敏感系 N53 中的表达量均显著高于耐盐系 T66。 *HvPP2C-A6* 与 *HvPP2C-A2* 具有共线性,推测两者共同行使祖先基因的功能,对大麦响应盐胁迫具有重要作用。盐处理后, *HvPP2C-A10* 在 N53 中显著上调表达,其水稻中的同源基因为 *OsPPI08*,过表达 *OsPPI08* 的拟南芥植株在种子萌发、根系生长和整体幼苗生长过程中对 ABA 高度不敏感,对高盐胁迫具有耐受性<sup>[33]</sup>。推测 *HvPP2C-A10* 可能在大麦耐盐性调控中发挥重要功能。

*HvSnRK2* 家族中 *HvSnRK2. 4* 受盐胁迫强烈诱导表达,且在盐敏感系 N53 中表达水平显著高于耐盐系 T66,该基因可能对盐胁迫有重要的调控作用,其水稻中同源基因 *OsSAPK1* 被报道是水稻耐盐胁迫的正调控因子,在幼苗生长阶段, *OsSAPK1* 和 *OsSAPK2* 发挥协同作用,增强水稻耐盐性<sup>[34]</sup>。

植物的耐盐性是非常复杂的数量性状,控制耐盐性状的基因大多遗传基础复杂,且易受环境影响,很难精准的进行克隆。Zhang 等<sup>[35]</sup>通过 meta 分析将耐盐相关的 meta-QTL (MQTL) 预测到大麦物理图谱上。其中 *HvPP2C-A5* 和 *HvPP2C-A6* 在 *MQTL3H. 2* 区间中; *HvSnRK2. 6* 在 *MQTL3H. 4* 区间中; *HvPYL6* 在 *MQTL3H. 4* 区间中; *HvPP2C-A9* 和 *HvSnRK2. 7* 在 *MQTL4H. 2* 区间中。结合 qPCR 分析, *HvPYL6*, *HvPP2C-A6* 和 *HvPP2C-A9* 有可能是候选基因。

本研究对大麦 PYL-PP2CA-SnRK2 家族基因进行了系统解析,不仅阐明了其基本特征和分类归属,还挖掘出潜在的关键耐盐基因,如 *HvPYL6*, *HvPP2C-A6*, *HvPP2C-A9*, *HvSnRK2. 4*, 为大麦 PYL、PP2CA 和 SnRK2 家族在大麦耐盐性调控中功能及机理研究奠定了基础,但还需通过基因编辑等途径,进一步验证主要家族成员的功能,揭示其在大麦中响应盐胁迫的分子机制。

### 参考文献:

- [1] 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(5930): 1068.
- [2] 刘维仲, 李林艳, 胡勇. ABA 信号通路的起源与进化 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2016, 32(8): 857.  
LIU W Z, LI L Y, HU Y. The origin and evolution of ABA signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 32(8): 857.
- [3] 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): 936.  
ZHANG J H, TAO N G. Research progress of plant PP2C-type protein phosphatase in ABA signal transduction and adversity stress regulation mechanism [J]. *Guangxi Plant*, 2015, 35(6): 936.
- [4] NAKASHIMA K, FUJITA Y, KANAMORI N, et al. Three *Arabidopsis* SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2. 2, SRK2E/SnRK2. 6/OST1 and SRK2I/SnRK2. 3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2009, 50(7): 1345.
- [5] 黄思源, 呼天明, 杨培志. 藜苜蓿 PYL 基因家族的全基因组鉴定、表达和功能分析 [J]. *草业科学* 2019, 36(2): 12.  
HUANG S Y, HU T M, YANG P Z. Genome-wide identification, expression and functional analysis of PYL gene family in *Medicago truncatula* [J]. *Pratacultural Science* 2019, 36(2): 12.
- [6] YADAV S K, SANTOSH KUMAR V V, VERMA R K, et al. Genome-wide identification and characterization of ABA receptor PYL gene family in rice [J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 676.
- [7] 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): 2139.  
MIN D H, XUE F Y, MA Y N, et al. Characteristics of PP2C gene family in foxtail millet (*Setaria italica*) [J]. *The Crop Journal*, 2013, 39(12): 2139.

- [8]王帅磊,李子琪,陈辉龙,等.谷子PYR/PYL/RCAR基因家族进化及表达分析[J].分子植物育种,2020,18(17):5549.  
WANG S L,LI Z Q,CHEN H L,*et al.* Evolution and expression analysis of the PYR/PYL/RCAR gene family in *Setaria italica* [J]. *Molecular Plant Breeding*,2020,18(17):5549.
- [9]MIAO J,LI X,LI X,*et al.* OsPP2C09, a negative regulatory factor in abscisic acid signalling, plays an essential role in balancing plant growth and drought tolerance in rice [J]. *New Phytol.* 2020 227(5):1418.
- [10]苗丽丽,刘秀林,张宏纪,等.植物多功能调控因子 SnRK2 研究进展[J].麦类作物学报,2019,39(7):790.  
MIAO L L,LIU X L,ZHANG H J,*et al.* Research progress of the plant multi-functional regulator SnRK2 [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2019,39(7):790.
- [11]REN C,KUANG Y,LIN Y,*et al.* Overexpression of grape ABA receptor gene *VaPYL4* enhances tolerance to multiple abiotic stresses in *Arabidopsis* [J]. *BMC Plant Biology*, 2022,22(1):271.
- [12]KRZYWIŃSKA E,BUCHOLC M,KULIK A,*et al.* Phosphatase ABI1 and okadaic acid-sensitive phosphoprotein phosphatases inhibit salt stress-activated SnRK2.4 kinase [J]. *BMC Plant Biology*,2016,16(1):136.
- [13]KIM S,PARK S I,KWON H,*et al.* The rice abscisic acid-responsive RING finger E3 ligase OsRF1 targets OsPP2C09 for degradation and confers drought and salinity tolerance in rice [J]. *Frontiers in Plant Science*,2022,12:797940.
- [14]FENG J,WANG L,WU Y,*et al.* *TaSnRK2.9*, a sucrose non-fermenting 1-related protein kinase gene, positively regulates plant response to drought and salt stress in transgenic tobacco [J]. *Frontiers in Plant Science*,2019,9:2003.
- [15]白道宽,郭宝健,洪益,等.一个大麦黄化突变体的突变机理及其遗传机制研究[J].中国农业科技导报,2023,25(5):35.  
BAI D K,GUO B J,HONG Y,*et al.* Study on the mutation mechanism and genetic mechanism of a barley yellowing mutant [J]. *Chinese Journal of Agricultural Science and Technology*,2023,25(5):35.
- [16]ZHANG Z,ALI S,ZHANG T,*et al.* Identification, evolutionary and expression analysis of PYL-PP2C-SnRK2s gene families in soybean [J]. *Plants*,2020,9(10):1356.
- [17]LU S,WANG J,CHITSAZ F,*et al.* CDD/SPARCLE: The conserved domain database in 2020 [J]. *Nucleic Acids Research*,2020,48(D1):D265.
- [18]DUVAUD S,GABELLA C,LISACEK F,*et al.* Expasy, the Swiss bioinformatics resource portal, as designed by its users [J]. *Nucleic Acids Research*,2021,49(W1):W218.
- [19]XIONG E,ZHENG C,WU X,*et al.* Protein subcellular location: The gap between prediction and experimentation [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*,2016,34(1):55.
- [20]CHEN C,WU Y,LI J,*et al.* TBtools-II: A “one for all, all for one” bioinformatics platform for biological big-data mining [J]. *Molecular Plant*,2023,16(11):1733.
- [21]TAMURA K,STECHE G,KUMAR S.MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11 [J]. *Molecular Biology and Evolution*,2021,38(7):3022.
- [22]LESCOT M.PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences [J]. *Nucleic Acids Research*,2002,30(1):325.
- [23]WANG J,YANG J,ZHANG Q,*et al.* Mapping a major QTL for malt extract of barley from a cross between TX9425 × *Naso Nijo* [J]. *Theoretical and Applied Genetics*,2015,128(5):948.
- [24]ZHU J,FAN Y,SHABALA S,*et al.* Understanding mechanisms of salinity tolerance in barley by proteomic and biochemical analysis of near-isogenic lines [J]. *International Journal of Molecular Sciences*,2020,21(4):1516.
- [25]BHATNAGAR N,KIM R,HAN S,*et al.* Expression of OsPYL/RCAR7, an ABA Receptor having low signaling activity, improves drought tolerance without growth defects in rice. [J]. *International. Journal. Molecular. Sciences*,2020,21(11):4163.
- [26]刘莉,董静.大麦耐非生物胁迫相关分子标记研究进展[J].科技通报,2007,23(3):364.  
LIU L,DONG J. Research advance of molecular markers for abiotic stress tolerance in barley [J]. *Bulletin of Science and Technology*,2007,23(3):364.
- [27]CUI Y X,XU Z C,CHEN X L,*et al.* Genome-wide identification of abscisic acid (ABA) receptor pyrabactin resistance 1-like protein (PYL) family members and expression analysis of PYL genes in response to different concentrations of ABA stress in *Glycyrrhiza uralensis* [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*,2020,18(8):610.
- [28]KNLIK A,WAWER I,KRZYWIŃSKA E,*et al.* SnRK2 protein kinases-key regulators of plant response to abiotic stresses [J]. *Omics-A Journal of Integrative Biology*. 2011,15(12):860.
- [29]庞彩红,李双云,夏阳,等.植物非ABA依赖型SnRK2研究进展[J].植物生理学报,2018,54(01):19.  
PANG C H,LI S Y,XIA Y,*et al.* Advances in ABA-independent SnRK2 in plants [J]. *Plant Physiology Journal*, 2018,54(01):19.
- [30]SINGH A,ROYCHOUDHURY A. Abscisic acid in plants under abiotic stress: crosstalk with major phytohormones. [J]. *Plant Cell Rep.* 2023,42(6):964
- [31]KIM H,LEE K,HWANG H,*et al.* Overexpression of PYL5 in rice enhances drought tolerance, inhibits growth, and modulates gene expression [J]. *Journal of Experimental Botany*,2014,65(2):453.
- [32]SANTOSH K V V,YADAV S K,VERMA R K,*et al.* The abscisic acid receptor OsPYL6 confers drought tolerance to *indica* rice through dehydration avoidance and tolerance mechanisms [J]. *Journal of Experimental Botany*,2021,72(4):1414.
- [33]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.
- [34]LOU D,WANG H,YU D. The sucrose non-fermenting-1-related protein kinases SAPK1 and SAPK2 function collaboratively as positive regulators of salt stress tolerance in rice [J]. *BMC Plant Biology*,2018,18(1):203.
- [35]ZHANG X,SHABALA S,KOUTOULIS A,*et al.* Meta-analysis of major QTL for abiotic stress tolerance in barley and implications for barley breeding [J]. *Planta*,2017,245(2):293.