



陆地棉 *GhCSN6A* 基因克隆及低磷胁迫下的表达

卿桂霞^{1,2},耿翡翠^{1,2},梁颖颖^{1,2},周俊江^{1,2},张富厚^{1,2},孟超敏^{1,2*}

(1 河南科技大学 农学院,河南洛阳 471000;2 洛阳市作物遗传改良与种质创新重点实验室,河南洛阳 471000)

摘要:该研究基于陆地棉根部低磷胁迫基因表达谱芯片差异表达序列结果及基因组数据库,对表达差异序列ES816317进行克隆,利用生物信息学分析其核苷酸及蛋白序列,并通过qRT-PCR技术检测其组织表达模式和在低磷胁迫下的相对表达特征,为解析棉花*GhCSN6A*的生物学功能奠定基础,并为棉花磷高效基因工程育种提供基因资源。结果表明:(1)成功获得陆地棉*GhCSN6A*基因,该基因的开放阅读框全长为948 bp,编码315个氨基酸;*GhCSN6A*蛋白为COP9信号小体复合亚基6a,属于MOV34蛋白超家族,具有MPN_CSN6结构域,定位于细胞核。(2)序列比对和进化分析显示,陆地棉*GhCSN6A*与木槿*HsCSN6A*、拟南芥*AtCSN6A*的相似性分别为95.87%和84.54%。(3)qRT-PCR分析表明,*GhCSN6A*基因在陆地棉的根、茎、叶、花中均有表达,且在叶中表达水平最高,但叶与根中的表达无显著差异;*GhCSN6A*基因在低磷处理24 h时根中相对表达量最低,但低磷处理72 h时根中的相对表达量最高达到了适磷(对照)处理的2倍。研究推测,陆地棉*GhCSN6A*基因在棉花响应低磷胁迫过程中具有重要作用。

关键词:陆地棉;基因克隆;低磷胁迫;表达分析

中图分类号:Q785;Q786;Q789

文献标志码:A

Cloning of *GhCSN6A* Gene from *Gossypium hirsutum* L. and Its Expression under Low Phosphorus Stress

QING Guixia^{1,2}, GENG Feifei^{1,2}, LIANG Yingying^{1,2}, ZHOU Junjiang^{1,2},
ZHANG Fuhou^{1,2}, MENG Chaomin^{1,2*}

(1 College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471000, China; 2 Luoyang Key Laboratory of Crop Genetic Improvement and Germplasm Innovation, Luoyang, Henan 471000, China)

Abstract: In this study, the differentially expressed sequence ES816317 was cloned based on the differential expression sequence results of the low phosphorus stress gene expression profile chip in the roots of *Gossypium hirsutum* L. and the genome database. We used bioinformatics methods to analyze its nucleotide and protein. Its tissue expression pattern and relative expression under low phosphorus stress were detected by using qRT-PCR technology, so as to lay the foundation for analyzing the biological function of *GhCSN6A* in *G. hirsutum* and provide genetic resources for cotton phosphorus efficient genetic engineering breeding. The results showed that: (1) *GhCSN6A* gene of *G. hirsutum* L. was successfully cloned, and the full length of the open reading frame of the gene was 948 bp, encoding 315 amino acids. *GhCSN6A* protein, called COP9 signalosome complex subunit 6a, belonged to the MOV34 protein superfamily, had an MPN_CSN6 domain, and was localized in the nucleus. (2) Sequence alignment and evolution analysis

收稿日期:2022-07-26;修改稿收到日期:2022-12-15

基金项目:国家自然科学基金项目(31101184)

作者简介:卿桂霞(1997—),女,硕士研究生,主要从事作物分子育种研究。E-mail:3053271779@qq.com

*通信作者:孟超敏,副教授,硕士生导师,主要从事经济作物遗传育种研究。E-mail:chaominm@haust.edu.cn

showed that the similarity of *GhCSN6A* to *HsCSN6A* and *AtCSN6A* was 95.87% and 84.54%, respectively, so the gene was named *GhCSN6A*. (3) qRT-PCR analysis showed that *GhCSN6A* was expressed in all tested tissue including root, stem, leaf and flower, and the expression level was the highest in leaf, but there was no significant difference between leaf and root. The relative expression of *GhCSN6A* gene was the lowest in the root treated with low phosphorus for 24 h. However, the highest in the root treated with low phosphorus for 72 h, which was twice that of the suitable phosphorus (control) treatment. The study has speculated that *GhCSN6A* gene played an important role in the response to low phosphorus stress in *G. hirsutum*.

Key words: *Gossypium hirsutum* L.; gene cloning; low phosphorus stress; expression analysis

COP9 信号复合体 (constitutively photomorphogenic signalosome, CSN) 是一种进化上保守的多亚基蛋白复合体, 参与动植物的许多生理过程, 包括蛋白质降解、DNA 损伤反应和信号转导^[1]。主要在泛素蛋白酶体通路 (ubiquitin proteasome system, UPS) 中发挥着调节作用^[2], UPS 是蛋白质进行高效特异性降解的主要途径, 其过程为目标蛋白首先被泛素三酶级联反应, 然后对靶蛋白进行泛素化修饰, 最后由 26S 蛋白酶体催化将其降解^[3-4]。在高等真核生物中典型的 CSN 蛋白由 8 个不同亚基构成, 它们被命名为 CSN1-CSN8, 通常包含 2 个保守结构域, 分别是 MPN 和 PCI^[5]。其中 CSN5 和 CSN6 包含 MPN 结构域, 该结构域是由 3 条 α 螺旋和 9 条 β 线缠绕成 β 片层组成, 具有识别信号因子, 激活下游活动, 调控生物学等主要功能^[6-7]。COP9 信号复合体亚基已从多种生物中克隆并分析, 而且发现 CSN 在植物抵御逆境中具有重要作用。通过研究部分功能丧失突变体 VTC1-1 的 CSN5B 双突变拟南芥, 发现 CSN5B 通过 26S 蛋白酶体途径降解 GDP-甘露糖焦磷酸化酶 (VTC1), 使植物抵抗非生物胁迫的关键因子抗坏血酸 (AsA) 含量升高, 从而增强植物对环境胁迫的耐受性^[8]; 利用基因芯片技术筛选出缺铁条件下的基因, 并对水稻 CSN6 基因进行缺铁胁迫表达模式分析, 发现水稻 CSN6 基因能够应答缺铁胁迫^[9]。

棉花是中国当今最主要发展的经济作物之一, 其种植产业在整个世界上始终处于领先地位, 创造的经济效益在中国国民人均生产要素总值中具有重要意义^[10-11]。但是由于棉花吸收利用的磷素在土壤中主要以磷酸根的形式存在, 土壤中的磷酸根极其容易被金属阳离子和矿物质吸附固定或转化成有机磷而不能成为有效磷, 因此土壤有效磷的供应情况和棉花吸收磷素的能力是使棉花免遭受低磷胁迫危害, 降低低磷胁迫给棉花生长、纤维品质和产量造成影响的关键因素^[12-13]。在低磷环境下, 植物经过

长期的进化过程中会形成一系列的应答机制来调节其生理生化反应来应对低磷胁迫^[14-16], 从而减少缺磷对自身的伤害。因此, 可以通过克隆棉花应答低磷胁迫过程中的关键基因, 解析其胁迫响应及作用机制, 从而来提高棉花对磷的利用效率。

本研究在前期利用基因芯片技术筛选出适磷与低磷胁迫下的高差异表达序列 ES816317 和陆地棉基因组数据库的基础上, 以磷高效棉花品种陆地棉‘新陆早 19’ (*Gossypium hirsutum* ‘Xinluzao 19’) 为材料进行基因克隆, 并对该基因在不同组织及根系低磷胁迫下的相对表达水平进行分析, 为深入研究棉花 *GhCSN6A* 的生物学功能奠定基础, 以期为棉花磷高效基因工程育种提供基因资源。

1 材料和方法

1.1 试验材料及处理

选取自交留种中籽粒饱满的‘新陆早 19’种子用 70% 酒精杀菌 30 min, 冲洗干净后泡种 24 h 至棉花露白, 分别播种于沙土中和河南科技大学农学院试验田。沙土中的棉花在 28 ℃恒温培养箱培养至四叶期左右用以植株总 RNA 的提取。在试验田棉花花铃期取根、茎、叶、花等 4 个组织迅速放入液氮中备用。

将棉花种子播种于含干净湿润细沙的塑料盆内, 28 ℃恒温培养箱(光照 14 h、黑暗 10 h)培养至棉苗三叶期, 选择长势良好且一致的幼苗移至水培盆中, 用 1/2 Hoagland 营养液培养 1 周后分为 2 个处理水平, 即适磷处理 (SP, 1.0 mmol/L) 和低磷处理 (LP, 0.01 mmol/L), 磷源采用 KH₂PO₄, 为保证 K⁺ 的浓度一致, 以 1.0 mmol/L 为标准, 低磷营养液中以 KCl 补齐 K⁺, 其他营养成分含有 2 mmol/L Ca (NO₃)₂ · 4H₂O、2.5 mmol/L KNO₃、0.5 mmol/L NH₄NO₃、1.4 mmol/L MgSO₄ · 7H₂O、1 μ mol/L ZnSO₄ · 7H₂O、1 μ mol/L MnSO₄ · H₂O、0.1 μ mol/L CuSO₄ · 5H₂O、0.01 mmol/L H₃BO₃、

0.005 μmol/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O、0.1 mmol/L EDTA-FeNa^[17]。分别处理0、4、12、24和72 h后,选取3株生长一致的棉花植株,并混合取其根部组织,然后迅速置于液氮中,-80 °C保存备用。每日调节营养液pH,使其保持在6.5左右,每3 d更换1次营养液。

1.2 试验方法

1.2.1 低磷胁迫差异表达序列延伸 利用基因芯片技术筛选得到‘新陆早19’在低磷和适磷2种不同处理下差异表达序列ES816317,以ES816317为探针在NCBI网站的EST数据库中检索其相似序列,并利用DNASTAR的Seqman将所得到的相似序列(覆盖率>50%,相似度>85%)进行拼接得到其重叠群,后续以所得拼接序列为探针继续检索与拼接,直至没有新的相似序列出现,其所得才为结果序列,利用ORFfinder在线平台查找开放阅读框,并对目的基因进行克隆与分析。

1.2.2 陆地棉基因组DNA的提取 取液氮速冻‘新陆早19’完整植株,迅速将其研磨成粉末转移至离心管,然后利用CTAB法提取陆地棉‘新陆早19’的基因组DNA,并以1%的琼脂糖凝胶对其进行检测,最后-20 °C保存备用。

1.2.3 总RNA提取及cDNA合成 按照天根RNAprep Pure多糖多酚植物总RNA提取试剂盒说明书提取棉株总RNA,然后利用超微量分光光度计测定RNA浓度,并用1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。若RNA的质量符合要求,则根据HiScript® II 1st Strand cDNA Synthesis Kit cDNA第一链合成试剂盒说明书将所提取的总RNA反转录合成

cDNA第一链,用于后续实验。

1.2.4 基因克隆与测序 根据拼接所得到的*Gh-CSN6A*基因序列信息,利用软件Primer 5.0设计其ORF上、下游引物(表1),并分别以陆地棉‘新陆早19’的DNA及cDNA为扩增模板,进行目的基因的扩增,再以1%琼脂糖凝胶电泳进行PCR扩增检测。将目的条带的PCR产物与TOPO-T载体进行连接,转化、菌液PCR检测,然后目标条带的菌液送至上海生工生物有限公司测序,并保留一些菌液。

1.2.5 生物信息学分析 采用NCBI数据库中的blastn和blastp分析*GhCSN6A*基因的核苷酸序列及编码氨基酸序列的同源性,并使用DNAMAN对*GhCSN6A*与同源蛋白序列多重比对,使用在线工具ProtParam预测*GhCSN6A*蛋白的各种理化性质^[18];利用SOPMA对其二级结构进行预测。利用SWISS-MODEL和CD-Search分别对*GhCSN6A*蛋白进行三维结构同源建模和功能结构域的分析。使用SingalP 3.0和TMHMM 2.0分别预测其信号肽和跨膜螺旋结构域;其磷化位点和亚细胞定位分别由NetPhos3.1 Server和Plant-mPLoc进行预测。利用MEGA 5.0的邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育进化树。

1.2.6 *GhCSN6A*表达的qRT-PCR 基于*Gh-CSN6A*基因全长序列及保守域的分析,使用Primer5.0设计荧光定量PCR引物(表1),*GhActin*作为内参基因。反应体系按照SYBR® Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit试剂盒说明配制,使用荧光定量PCR仪型号为CFX96,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 算法计算目的基因相对表达量,利用Origin 9.0对数据进行统

表1 实验所用引物

Table 1 Application of primers in the experiment

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'→3')	用途 Use
<i>GhCSN6A</i> -1F	CAAAAGCATCGAGTAGGG	基因克隆 Gene cloning
<i>GhCSN6A</i> -1R	TGGGCAACATGATCCACAGA	
<i>GhCSN6A</i> -2F	TCTGTGGATCATGTTGCC	
<i>GhCSN6A</i> -2R	ATCACCAATTCTCCCCAAC	
<i>GhCSN6A</i> -F	GGAAGGAAAATCAAGCAAA	
<i>GhCSN6A</i> -R	TTTGCAGGCAAGGTAAGG	
<i>M13</i> -F	TGTAAACAGCAGGCCAGT	
<i>M13</i> -R	CAGGAAACAGCTATGACC	
<i>GhActin</i> -F	ATCCTCCGTCTGACCTTG	qRT-PCR
<i>GhActin</i> -R	TGTCCGTCAAGCAACTCAT	
<i>qGhCSN6A</i> -F	GACTGGAATTACATTGTCGTTT	
<i>qGhCSN6A</i> -R	ACCTCCGCTGCTCCAAT	

计分析并作图。

2 结果与分析

2.1 低磷胁迫差异表达序列延伸

通过 BLAST 检索陆地棉 EST 数据库, 获得 ES816317 相似的陆地棉 ESTs, 采用电子延伸的方法进行最大程度的序列延伸。然后利用 NCBI 上的 ORF finder 进行查找, 发现拼接得到的序列全长为 1 814 bp, 开放阅读框为 88~1 035 共 948 bp, 编码 315 个氨基酸。通过 blastn 及 blastp 检索全长序列, 将该基因命名为 GhCSN6A。

2.2 基因克隆与序列分析

以‘新陆早 19’的基因组 DNA 为模板, GhCSN6A-1F 和 GhCSN6A-1R 及 GhCSN6A-2F 和 GhCSN6A-2R 两对引物进行 PCR 扩增, 得到的扩增产物如图 1 的第 1、2 条带, 分别约为 1 650 bp 和 1 780 bp, 以‘新陆早 19’总 RNA 反转得到的 cDNA 为模板, GhCSN6A-F 和 GhCSN6A-R 为引物进行扩增, 得到的产物如图 1 的第 3 条带, 约 1 190 bp。利用在线工具 GSDS 对分别以 DNA 和 cDNA 为模板扩增得到的已拼接的序列进行分析, 可发现该基因含有 9 个外显子和 8 个内含子(图 2)。

2.3 GhCSN6A 蛋白理化性质及结构分析

陆地棉 GhCSN6A 蛋白分子式为 $C_{1582}H_{2491}N_{435}O_{471}S_{11}$, 相对分子量为 35.49 kD, 含 32 个酸性氨基酸(Asp+Glu)、30 个碱性氨基酸(Arg+Lys), 理论等电点为 6.70, 疏水性总平均值

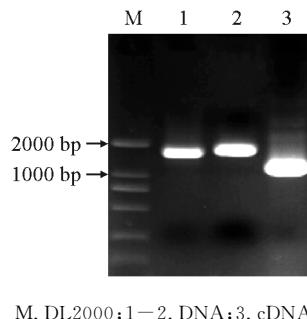


图 1 GhCSN6A 的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of GhCSN6A

为 -0.217, 不稳定系数为 46.49, 属于亲水性不稳定蛋白。蛋白质二级结构预测表明, 其二级结构由 α -螺旋(alpha helix, 44.13%)、无规则卷曲(random coil, 38.10%)、延伸链(extended strand, 15.87%)和 β -折叠(Beta turn, 1.90%)组成。GhCSN6A 蛋白三维结构同源建模显示, 该蛋白包含 COP9 信号体复合亚基 6, 即 COP9 信号体的晶体结构。利用 CD-Search 对 GhCSN6A 蛋白功能结构域进行分析, 发现 GhCSN6A 蛋白属于 MPN 或 MOV34 超家族, 具有 MPN_CSN6 结构域, 是 COP9 信号体的 8 个亚基之一, 与三级结构得到的结果一致。TM-HMM 2.0 预测结果显示, GhCSN6A 蛋白无跨膜螺旋结构和信号肽。SignalP 3.0 信号肽预测结果与 TMHMM 预测结果相同, 即该蛋白无信号肽。NetPhos 3.1 Server 预测结果显示, GhCSN6A 蛋白含有 36 个能被磷酸化的位点(超过阈值线), 其中包括 Ser 位点 20 个、Thr 位点 11 个和 Tyr 位点 5 个, 主要被 unsp、PKC 和 cdc2 等蛋白激酶磷酸化。GhCSN6A 蛋白亚细胞定位预测, 该蛋白定位于细胞核。

2.4 GhCSN6A 蛋白的同源比对及系统进化树分析

以 GhCSN6A 蛋白与拟南芥的 10 个 AtCSN 蛋白构建系统发育进化树, 结果(图 3)显示, GhCSN6A 蛋白与拟南芥 CSN6 家族聚为一类, 其中, 与 AtCSN6A 蛋白相似性最高。从 NCBI 数据库下载 CSN6A 的同源蛋白氨基酸序列, 并利用 DNAMAN 对陆地棉与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、烟草(*Nicotiana attenuata*)、木槿(*Hibiscus syriacus*)的 CSN6A 蛋白序列进行多重序列比对, 结果(图 4)显示, 蛋白序列的一致性达到 90.93%, 由此可知 MPN_CSN6 结构域有一定的保守性。用 NCBI 数据库中 BLASTp 对 GhCSN6A 基因进行同源比对, 结果显示该基因与木槿 CSN6A 基因的相似性最高, 达 95.87%, 与哥伦比亚锦葵(*Herrania umbellata*) CSN6A 基因和榴莲(*Durio zibethinus*) CSN6A 基因的相似性均达 93%。利用 MEGA5 对 GhCSN6A 和其他植物的 CSN6A 蛋白进行构建系



图 2 GhCSN6A 基因结构分析

Fig. 2 Analysis of GhCSN6A gene structure

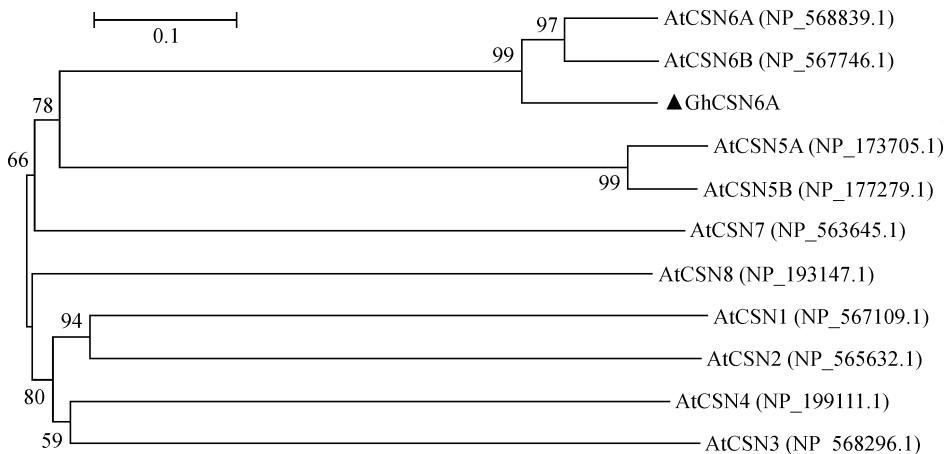


图 3 基于 GhCSN6A 与拟南芥 AtCSN 蛋白氨基酸序列构建的系统发育进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed based on amino acid sequences of GhCSN6A and *Arabidopsis thaliana* AtCSN protein

AtCSN6A (NP_568839)	M A P S S S G L T F K L E P L V I	N I S D H Y T R V K T C L N P P A S I	C A S G H C S N N G E A N F C C Q N P R V Y C C V I	G V C R G R T V E I	F N S F E L L Y C P S I	C T L L R S F L E K K Q E L Y	100	
NaCSN6A (XP_019251864)	M A S S S S G L T F K L E P L V I	N I S D H Y T R V S C S	I S A A A S	E G A D S S P P P T R V L C C V I	G V C R G R T V E I	F N S F E L L Y C P S I	E S L L R P F L E K K Q E L Y	93
HsCSN6A (XP_039028627)	M A S S S S G L T F K L E P L V I	N I S D H Y T R V S C N P . H P L T S T . . .	V N G V E N Q Q P A P .	R V Y C C V I	G V C R G R T V E I	F N S F E L L Y C P S I	E S L L R S F L E K K Q E L Y	95
GhCSN6A	M A S S S S G L T F K L E P L V I	N I S D H Y T R V S C N P . P P L T S T S A T V N G V E N Q Q P A P .	R V Y C C V I	G V C R G R T V E I	F N S F E L L Y C P S I	E S L L R P F L K K Q E L Y	98	

AtCSN6A (NP_568839)	K K V F P D F Y I L G V Y S T G S L A E F E S M H I	H R A L A N I I	N E S P V V L L N P A I	N I T P Q K D L V T I	Y E S E L F V I	E G I P Q L I F	A F T S Y T I E T V E A E R I	S V I F V A E L K P S D	200
NaCSN6A (XP_019251864)	K K V F P D F Y I L G V Y S T G S L A E Q E S M H I	H R A L A N I I	N E S P V V L L N P A I	N I R A C K D L V T I	Y E S E L F V I	E G I P Q L I F	F V C A T V T I E I V E A E R I	S V I F V A E L K P S D	193
HsCSN6A (XP_039028627)	K K V F P D F Y I L G V Y S T G S L A E Q E S M H I	H R A L A N I I	N E S P V V L L N P A I	N I T P Q K D L V T I	Y E S E L F V I	E G I P Q L I F	V R S S Y T I E T V E A E R I	S V I F V A E L K P S D	195
GhCSN6A	K K V F P D F Y I L G V Y S T G S L A E Q E S M H I	H R A L A N I I	N E S P V V L L N P A I	N I T P Q K D L V T I	Y E S E L F V I	E G I P Q L I F	V R S S Y T I E T V E A E R I	S V I F V A E L K P S D	198

AtCSN6A (NP_568839)	G G S A A T C L A A F L T G I	E S A I K M L N S R I R V L Y C N L A A N C K G E K S	C D N S V L R C V S S L L R R L P A I	E N E S B R F	O D F L A E Y N I K L I I	T Y L A N I	T N C S S I N N E N V L K F	300
NaCSN6A (XP_019251864)	G G S A A T C L A A F L T G I	E S A I K M L N S R I R V L Y C N L A A N C K G E K S	C D N S V L R C V S S L L R R L P T I	E S E R F	O D F L A E Y N I K L I I	N S Y L A N I	T N C S S I N N E N V L K F	293
HsCSN6A (XP_039028627)	G G S A A T C L A A F L T G I	E S A I K M L N S R I R V L Y C N L A A N C K G E K S	C D N S V L R C V S S L L R R L P A I	E S E B K F	O D F L A E Y N I K L I I	T Y L A N I	T N C S S I N N E N V L K F	295
GhCSN6A	G G S A A T C L A A F L T G I	E S A I K M L N S R I R V L Y C N L A A N C K G E K S	C D N S V L R C V S S L L R R L P T I	E S E B K F	O D F L A E Y N I K L I I	T Y L A N I	T N C S S I N N E N V L K F	298

AtCSN6A (NP_568839)	N T A Y D R N T R R G G R T A F							316
NaCSN6A (XP_019251864)	N T A Y D R E S R R G G R T A F							309
HsCSN6A (XP_039028627)	N T A Y D R E S R R G G R T A F							311
GhCSN6A	N T A Y D R E S R R G G R T A F							314

AtCSN6A. 拟南芥; NaCSN6A. 烟草; HsCSN6A. 木槿; GhCSN6A. 陆地棉

图 4 GhCSN6A 蛋白与同源蛋白氨基酸序列的多重比对结果

AtCSN6A. *Arabidopsis thaliana*; NaCSN6A. *Nicotiana attenuata*; HsCSN6A. *Hibiscus syriacus*; GhCSN6A. *Gossypium hirsutum* L.

Fig. 4 Multiple alignment results of amino acid sequences between GhCSN6A protein and homologous proteins

统发育进化树, 结果(图 5)表明, 不同物种的 GhCSN6A 蛋白分为 2 大分支, 其中陆地棉 GhCSN6A 与在同一分支上的澳洲棉 CSN6A、木槿 CSN6A、榴莲 CSN6A 和哥伦比亚锦葵 CSN6A 亲缘关系较近。

2.5 GhCSN6A 基因在不同组织及根部低磷胁迫处理的表达模式分析

以棉花的 *GhActin* 为内参基因, 利用 qRT-PCR 技术检测 GhCSN6A 基因在根、茎、叶和花等 4 个组织中的表达情况, 结果(图 6)显示, GhCSN6A 基因在根、茎、叶和花中均有表达, 在叶中的表达量最高, 显著高于花与茎中的表达量, 其次是在根中的表

达量较高, 与茎中的表达量无显著差异, 在花中的表达量最低($P < 0.05$)。对陆地棉整株植物进行低磷胁迫, 以不同处理时间的陆地棉根部组织为材料进行 qRT-PCR, 分析 GhCSN6A 基因响应低磷胁迫的情况。结果(图 7)表明, 低磷处理 0、4、12 和 24 h 该基因的表达量比同期适磷处理的表达量低, 低磷处理 72 h 时其表达量比适磷处理 72 h 的表达量高, 是适磷处理的 2 倍。GhCSN6A 基因在低磷胁迫 0~72 h 的总体变化趋势为: 相对表达量在 0~4 h 内上调, 在 4~24 h 从一个较高的水平(4 h)降落到一个最低水平(24 h), 然后在 72 h 时又上升到最高水平。

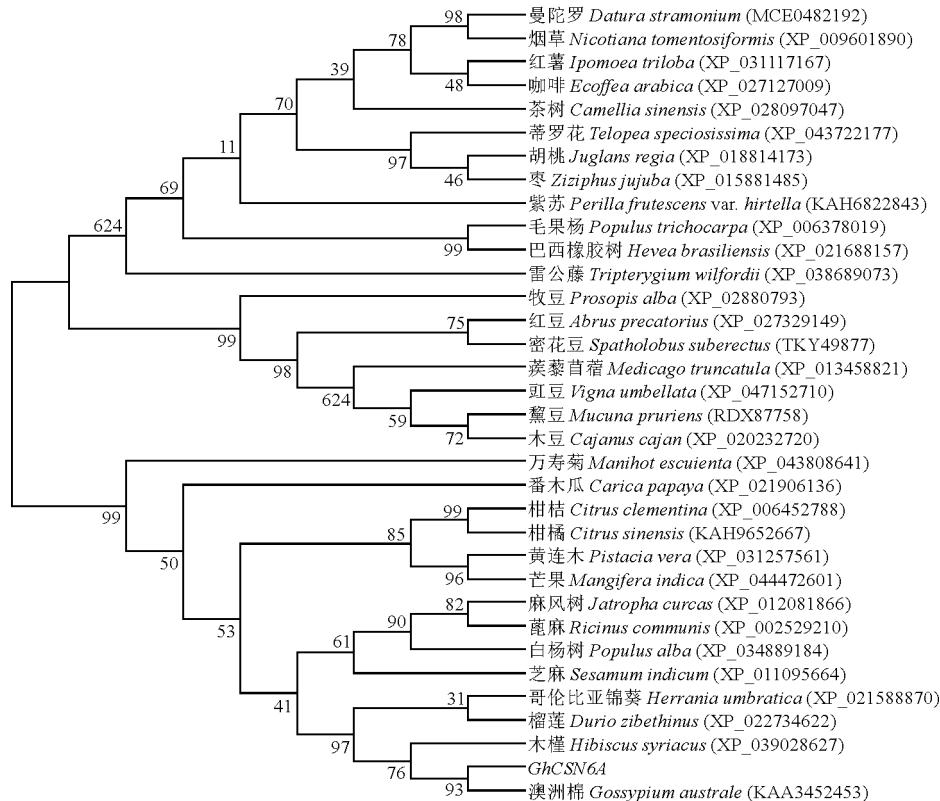
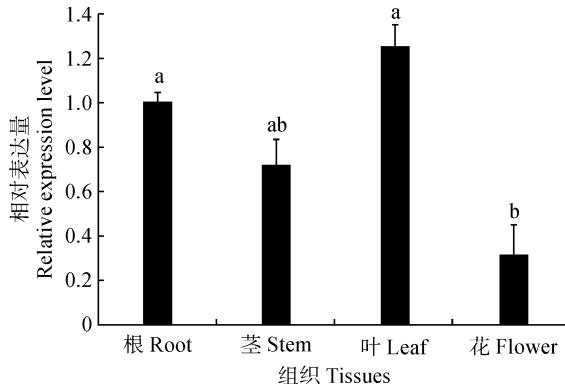


图 5 基于 GhCSN6A 与其他植物的 CSN6A 蛋白氨基酸序列构建的系统发育进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree constructed based on amino acid sequences of GhCSN6A and CSN6A proteins in other plants

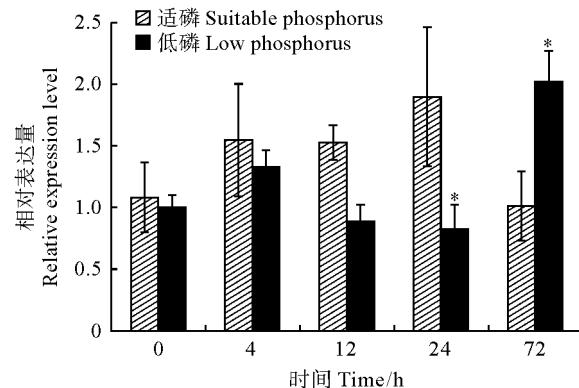


不同字母表示在 0.05 水平差异显著 ($P < 0.05$)

图 6 GhCSN6A 基因在不同组织的相对表达分析

Different letters indicate significant differences
at 0.05 level ($P < 0.05$)

Fig. 6 The relative expression of GhCSN6A gene in different tissues



* 表示同期适磷与低磷处理间存在显著差异 ($P < 0.05$)

图 7 GhCSN6A 基因在根部低磷胁迫
不同时间的表达模式

* indicates significant difference between suitable and low phosphorus treatment at 0.05 level.

Fig. 7 The relative expression analysis of GhCSN6A gene with low phosphorus treatment at different time points in roots

3 讨 论

COP9 复合信号体在进化过程中是一种高度保守的蛋白复合物^[19]。其中拟南芥 COP9 信号体的亚基 6 由一个家族的 2 个基因 CSN6A 和 CSN6B 编码, 其蛋白具有 87% 的氨基酸相似, 并在 N 端区

域包含 MPR1p 和 PAD1p N 端(MPN)结构域。CSN6 蛋白与 CSN5 具有相似性, 均属于 Mov34 蛋白超家族^[20-22]。本研究克隆的 GhCSN6A 基因编码的蛋白含有 MPN 结构域, 属于 Mov34 蛋白超家族, 与

拟南芥、烟草、木槿的 CSN6A 蛋白序列相似性达 90.93%,说明其在进化过程中具有一定的保守性。Gusmaroli 等^[23]发现,在拟南芥中,MPN 结构域控制着 CSN 复合体的组装、复合体的稳定性及活性,并且还调控着一种泛素连接酶的稳定性。陆地棉 GhCSN6A 和拟南芥 AtCSN6A 蛋白具有相似的结构域,可能具有相似的功能。

COP9 信号复合体亚基已从多种生物中被克隆分析,其功能也被陆续发现,主要参与植物激素信号传导、逆境胁迫应答、次生代谢活动等^[24]。黄瓜绿斑驳花叶病毒 CGMMV 侵染黄瓜苗后,CsCSN5b 基因表达量逐渐上升,说明该基因参与了病毒胁迫的应答机制响应 CGMMV 感染胁迫^[25];CSN6 参与水稻缺铁的早期反应,在缺铁的早期,由于 CSN6 和 CSN 活性的下调,IDEF1 在水稻中积累。IDEF1 蛋白的积累有助于通过增加水稻中铁吸收/利用相关基因的表达水平来克服缺铁胁迫^[26]。本研究发现该基因在‘新陆早 19’叶中的表达量最高,根、茎次之,在花中表达量最低。王彦平等^[27]发现低磷胁迫下棉花的生长素在根、茎、叶的含量变化明显,尤其是叶中的含量变化最大。Stuttmann 和 Schwechheimer 等^[28-29]发现 CSN 与 SCF^{TRI} 互作参与植物生长素信号途径。本研究低磷胁迫处理下的表达模式结果表明,在 4~24 h 这个时间段里,该基因的表达量从一个较高的水平(4 h)到一个最低水平(24 h),然后又上升到最高水平(72 h),其趋势符合植物响应低磷胁迫反应的典型过程^[9]。因为

COP9 复合体是作为一个整体的形式发挥作用的,通过与泛素系统相互作用来调控一系列的生物学功能。也就是说,生物体内的许多功能与泛素及 COP9 复合体有关。所以可以推测:在低磷胁迫的早期,生物体的功能会呈现出一种紊乱的状态,导致很多功能被抑制,所以与这些功能相关的分子,如泛素、COP9 复合体,也会受到相应的影响,因此表达量会明显下降;但是当植物开始启动低磷胁迫响应时,相应的基因就会得到表达,从而要启动特殊的转录与调控机制,其中就包括 COP9 复合体在内的一些具有重要调控功能的基因就会加强表达,这个加强表达的时间就可能在 72 h 左右。因此,根据低磷胁迫表达模式的结果可推测:在 72 h 以后,COP9 复合体的表达量明显大于 4~24 h,说明植物在 72 h 左右的时候已经进入一种响应低磷胁迫且相对稳定的状态。在这个状态之中,有很多基因需要受到特异性的转录或表达调控,从而应答低磷胁迫。

依据该基因的组织表达分析及根部低磷处理不同时间的表达模式分析结果,推测陆地棉 GhCSN6A 基因在调控低磷胁迫方面具有重要作用。但是 GhCSN6A 基因作为 COP9 信号复合体亚基之一,其具体的生物学功能及在植物应答低磷胁迫的调控机制仍需深入研究。后续将通过酵母杂交、VIGS 和转基因等功能验证手段分析 GhCSN6A 基因如何在低磷胁迫中发挥作用,并观察植株在低磷胁迫下的表现,从而揭示 GhCSN6A 基因在植物应答低磷胁迫的调控机制。

参考文献:

- [1] 祖未希,靳 飞,印莉萍. 植物 COP9 信号复合体的结构特征和功能[J]. 植物生理学通讯,2007,43(5): 961-968.
- ZU W X, JIN F, YIN L P. The structural characteristics and functions of COP9 signalosome in plant[J]. *Plant Physiology Communications*, 2007,43(5): 961-968.
- [2] 杨 晓,王明爽,李红叶. 真菌中 COP9 信号复合体的研究进展[J]. 生物学杂志,2018,35(3): 67-71.
- YANG X, WANG M S, LI H Y. Research advances in the COP9 signalosome in fungi[J]. *Journal of Biology*, 2018,35(3): 67-71.
- [3] 古智文,史伟峰. 去泛素化酶在病毒感染过程中的调控作用研究进展[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2015, 35(6): 477-480.
- GU Z W, SHI W F. Research progress on the regulation of ubiquitination enzyme in the process of virus infection[J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2015,35(6): 477-480.
- [4] ZHANG Y, DAI C L. Pathophysiological significance of ubiquitin-proteasome system in myocardial infarction[J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2010, 26(6): 1 234-1 236.
- [5] SCHWECHHEIMER C, ISONO E. The COP9 signalosome and its role in plant development[J]. *European Journal of Cell Biology*, 2010,89(2-3): 157-162.
- [6] ZHANG S N, PEI D S, ZHENG J N. The COP9 signalosome subunit 6 (CSN₆): A potential oncogene[J]. *Cell Division*, 2013,8(1): 14.
- [7] ZHANG H, GAO Z Q, WANG W J, et al. The crystal structure of the MPN domain from the COP9 signalosome subunit CSN₆[J]. *FEBS Letters*, 2012,586(8): 1 147-1 153.
- [8] WANG J, YU Y W, ZHANG Z J, et al. *Arabidopsis* CSN5B interacts with VTC1 and modulates ascorbic acid synthesis[J]. *The Plant Cell*, 2013,25(2): 625-636.
- [9] 靳 飞. 缺铁水稻根 cDNA 芯片分析及 CSN6 基因的克隆

- [D]. 北京: 首都师范大学, 2006.
- [10] 翟雪玲, 张杰. 中国棉花产业供给侧结构性改革现状与展望[J]. 农业展望, 2018, 14(8): 53-58.
ZHAI X L, ZHANG J. Status quo and outlook of supply-side structural reform of China's cotton industry[J]. *Agricultural Outlook*, 2018, 14(8): 53-58.
- [11] 唐淑荣, 杨伟华, 熊宗伟, 等. 近十几年来我国棉花生产领域纤维品质状况分析[J]. 中国纤检, 2013, (S1): 40-44.
TANG S R, YANG W H, XIONG Z W, et al. Analysis on the cotton fiber quality of the production field over the past decade[J]. *China Fiber Inspection*, 2013, (S1): 40-44.
- [12] 杨瑞娟, 白建荣, 闫蕾, 等. 玉米低磷胁迫诱导型强启动子 P_{1502} -ZmPHR1的克隆与表达分析[J]. 作物学报, 2018, 44(7): 1 000-1 009.
YANG R J, BAI J R, YAN L, et al. Cloning and expression analysis of strong inducible promoter P_{1502} -ZmPHR1 responding to low phosphorus stress in maize[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2018, 44(7): 1 000-1 009.
- [13] 文亦芾, 单贵莲, 姜飞, 等. 柱花草WRKY转录因子在低磷胁迫下的克隆与分析[J]. 西北植物学报, 2019, 39(2): 226-233.
WEN Y F, SHAN G L, JIANG F, et al. Cloning and analysis of WRKY transcription factors of *Stylosanthes guianensis* under low phosphorus stress[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalis Sinica*, 2019, 39(2): 226-233.
- [14] 刘建中, 李振声, 李继云. 利用植物自身潜力提高土壤中磷的生物有效性[J]. 生态农业研究, 1994, 2(1): 16-23.
LIU J Z, LI Z S, LI J Y. Utilization of plant potentialities to enhance the bio-efficiency of phosphorus in soil[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 1994, 2(1): 16-23.
- [15] YUN S, KAEPPLER S. Induction of maize acid phosphatase activities under phosphorus starvation[J]. *Plant and Soil*, 2001, 237: 109-115.
- [16] QIU H B, MEI X P, LIU C X, et al. Fine mapping of quantitative trait loci for acid phosphatase activity in maize leaf under low phosphorus stress[J]. *Molecular Breeding*, 2013, 32(3): 629-639.
- [17] 张敏, 盛建东, 白灯莎·买买提艾力, 等. 不同磷效率棉花根系形态和磷酸酶活性对供磷强度的响应[J]. 棉花学报, 2017, 29(3): 283-291.
ZHANG M, SHENG J D, BAIDENGSHA MAIMAITIAI-LI, et al. Response of root morphology and phosphatase activity of cotton to phosphorus supply[J]. *Cotton Science*, 2017, 29(3): 283-291.
- [18] 陆鲸冰, 杨润梅, 张飞扬, 等. 茶树CsMAPKK3基因克隆及表达分析[J]. 南方农业学报, 2021, 52(3): 651-659.
LU J B, YANG R M, ZHANG F Y, et al. Cloning and expression analysis of CsMAPKK₃ gene in tea plant[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2021, 52(3): 651-659.
- [19] CHAMOVITZ D A, WEI N, OSTERLUND M T, et al. The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch[J]. *Cell*, 1996, 86(1): 115-121.
- [20] 薛玉文. Akt对CSN6的上调作用及Akt-CSN6轴对NSCLC恶性生长的影响[D]. 济南: 山东大学, 2012.
- [21] WEI N, SERINO G, DENG X W. The COP9 signalosome: More than a protease[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2008, 33(12): 592-600.
- [22] 郑艳静. CSN复合体亚基CsnE对无花果拟盘多毛孢生长发育及次级代谢的影响[D]. 浙江温州: 温州大学, 2017.
- [23] GUSMAROLI G, FIGUEROA P, SERINO G, et al. Role of the MPN subunits in COP9 signalosome assembly and activity, and their regulatory interaction with *Arabidopsis* Cullin3-based E3 ligases[J]. *The Plant Cell*, 2007, 19(2): 564-581.
- [24] SINGH A K, CHAMOVITZ D A. Role of Cop9 signalosome subunits in the environmental and hormonal balance of plant [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(6): 224.
- [25] 缪倩, 任春梅, 季英华, 等. 黄瓜COP9信号复合体亚基CsCSN5b的亚细胞定位和表达分析[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(4): 1 084-1 088.
MIAO Q, REN C M, JI Y H, et al. Subcellular location and expression analysis of subunit CsCSN5b from COP9 signaling complex in *Cucumis sativus* L. [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2021, 37(4): 1 084-1 088.
- [26] TAN S, LIU F, PAN X X, et al. CSN6, a subunit of the COP9 signalosome, is involved in early response to iron deficiency in *Oryza sativa* [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 25 485.
- [27] 王彦平, 蒋平安, 陈波浪, 等. 磷胁迫下不同品种棉花内源激素的动态变化[J]. 新疆农业科学, 2008, 45(3): 522-525.
WANG Y P, JIANG P A, CHEN B L, et al. Dynamic changes of endogenous hormones in different varieties of cotton under phosphorus stress [J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2008, 45(3): 522-525.
- [28] STUTTMANN J, LECHNER E, GUEROIS R, et al. COP9 signalosome- and 26S proteasome-dependent regulation of SCF^{TIR1} accumulation in *Arabidopsis* [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(12): 7 920-7 930.
- [29] SCHWECHHEIMER C, SERINO G, CALLIS J, et al. Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCF^{TIR1} in mediating auxin response[J]. *Science*, 2001, 292(5 520): 1 379-1 382.

(编辑:宋亚珍)