



陆地棉 MGDG 基因家族低磷胁迫下的表达分析

孟超敏,卿桂霞,耿翡翠,张富厚,李雪林

(河南科技大学农学院/河南省旱地作物种质资源利用工程研究中心,河南洛阳 471000)

摘要:单半乳糖甘油二酯(monogalactosyl diacylglycerol, MGDG)是植物光合膜的重要组成成分,在植物抵御不利环境过程中具有调控作用。研究利用生物信息学方法对陆地棉 MGDG 基因家族(*GhMGDs*)进行了全基因组鉴定,并验证其在低磷胁迫下的表达规律,为明确 MGDG 基因在陆地棉低磷胁迫中的作用奠定基础。结果表明:(1)该基因家族在陆地棉中有 17 个成员,氨基酸残基在 435~888 aa 之间,理论等电点在 6.00~9.67,均含有 6~8 个内含子。(2)系统进化分析表明,该基因家族可分为 A 型和 B 型 MGDG 合成酶,各亚族内各成员基因结构和保守基序的数量和分布基本一致。(3)17 个 MGDG 基因在 7 条染色体上呈现不均匀分布,二级结构均显示该家族主要由 α -螺旋和无规则卷曲所组成。(4)qRT-PCR 分析结果显示,MGDG 基因在陆地棉 4 个不同组织中表达量有差异,其中 *GhMGD2*、*GhMGD12* 和 *GhMGD16* 在根的表达量最高,*GhMGD7*、*GhMGD9* 和 *GhMGD10* 在叶的表达量较高。陆地棉 MGDG 家族 *GhMGD2*、*GhMGD7*、*GhMGD9*、*GhMGD10*、*GhMGD12* 和 *GhMGD16* 6 个候选基因均受低磷胁迫的诱导表达,*GhMGD2* 基因在低磷处理 72 h 表达量是适磷处理的 72 倍。

关键词:陆地棉;低磷胁迫;MGDG 蛋白;基因家族;表达分析

中图分类号:Q78;S33;S562 **文献标志码:**A

Expression Analysis of the MGDG Gene Family of *Gossypium hirsutum* L. under Low Phosphorus Stress

MENG Chaomin, QING Guixia, GENG Feifei, ZHANG Fuhou, LI Xuelin

(College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Henan Dryland Crop Germplasm Resources Utilization Engineering Research Centre, Luoyang, Hennan 471000, China)

Abstract: Monogalactosyl diacylglycerol (MGDG) is an important component of plant photosynthetic membranes and plays a regulatory role in the resistance of plants to adverse conditions. The genome of MGDG gene family (*GhMGDs*) of *Gossypium hirsutum* L. were analyzed and identified by bioinformatics method, and verified its expression rule under abiotic stress in this study. The results showed that: (1) There were 17 members of this gene family in the upland cotton genome, the amino acid residues ranged from 435 aa to 888 aa, the heoretical isoelectric point ranged from 6.00 to 9.67, and all genes contain 6—8 introns. (2) According to the phylogenetic tree, this gene family can be divided into type A and type B MGDG synthetase. The gene structure and conserved motifs of each member of each subfamily were very similar. (3) The 17 MGDG genes were unevenly distributed on 7 chromosomes. The secondary structures showed that the family was mainly composed of α -helix and random coil. (4) The results of qRT-PCR analysis showed that the expression analysis of MGDG gene family members were the difference in the expression levels of each MGDG gene in four different tissues of Upland cotton. *GhMGD2*, *GhMGD12* and

收稿日期:2023-03-06;修改稿收到日期:2023-05-13

基金项目:国家自然科学基金项目(31101184);棉花生物学国家重点实验室开放课题基金项目(CB2021A07)

作者简介:孟超敏(1977—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事经济作物遗传与育种研究。E-mail:chaominm@haust.edu.cn

GhMGD16 genes were highly expressed in upland cotton roots. *GhMGD7*, *GhMGD9* and *GhMGD10* genes were highly expressed in upland cotton leaves. Furthermore, we identified six candidate gene expression patterns induced by low phosphorus stress, including *GhMGD2*, *GhMGD7*, *GhMGD9*, *GhMGD10*, *GhMGD12* and *GhMGD16*. The expression of *GhMGD2* gene at 72 h under low phosphorus treatment was 72 times that of suitable phosphorus treatment.

Key words: *Gossypium hirsutum* L.; low phosphorus stress; MGDG protein; gene family; expression analysis

单半乳糖甘油二酯(monogalactosyl diacylglycerol, MGDG)和双半乳糖甘油二酯(digalactosyldiacylglycerol, DGDG)是高等植物光合膜中最主要的半乳糖脂,分别约占叶绿体脂质的 50% 和 20%,在叶绿体的类囊体膜中形成必不可少的基质,参与光合作用的光化学反应和电子传递反应^[1-2]。此外, MGDG 和 DGDG 在质体外膜上被发现,包括质膜、液泡膜、内质网和高尔基体,说明其在高等植物中不具有光合作用^[3-4]。单乳糖基二酰基甘油(monolactosyl diacylglycerol, MGDG)是造粉体膜的主要糖脂,约占总糖脂的 50%。MGDG 生物合成的最后一步发生在包膜内,其中 MGDG 合酶催化二酰基甘油脂(DAG)和 IUDP 一半乳糖(UDP-Gal)生成 MGDG 和 UDP^[5-6]。根据 MGDG 合成酶的酶学和生理特性, MGDG 合成酶可分为 A 型(MGD1)和 B 型(MGD2 和 MGD3)。A 型(MGD1)位于质体内膜,B 型(MGD2 和 MGD3)位于外膜。MGD1 在所有植物组织中均有表达,特别是在光合组织中。而 MGD2 和 MGD3 主要在非光合组织中表达^[7-8]。

MGDG 不仅是光合膜的重要组分,而且对逆境胁迫具有调节作用。当植物遭到逆境胁迫时,会通过 MGDG 含量和脂肪酸组成的变化来适应环境,而这些变化有助于维持和恢复膜的稳定性和完整性,从而增加植物的胁迫耐受性^[9]。在低磷胁迫下,膜中的磷脂含量降低,为了维持膜的完整性,会促进 MGDG 向 DGGD 的转化,增加膜中的 DGDG 来替代缺失的磷脂^[10]。低磷条件下,拟南芥中 *AtMGD1* 的表达量并未发生显著变化,而 *AtMGD2* 和 *AtMGD3* 的表达量显著上升,这表明低磷条件可以诱导激活 type B 型 MGD 的表达^[8]。当膜脂成分中的磷脂含量降低时,会引起叶绿体中 DGDG 合成量增加,并转移至线粒体膜^[11]、质膜^[12]和液泡膜^[13]。在低磷胁迫下,type B 型 MGD2-3 通过真核型途径合成了更多的 MGDG,而这些 MGDG 又被用于 DGGD 的合成,并运往非质体膜上,进一步改变植物体的膜脂组分,以此适应低磷环境^[14]。以上研究结果表明, MGDG 基因在低磷胁迫中起着重要的

作用。

棉花是全球重要的经济作物之一,而缺磷是作物生产力损失的主要原因之一。本研究基于前期棉花根部低磷胁迫基因表达谱分析结果,对候选陆地棉耐磷相关 *GhMGD* 基因家族进行生物信息分析,同时利用 qRT-PCR 技术对 *GhMGD* 基因在低磷胁迫下的表达模式进行分析,以解析 MGDG 家族基因在棉花中的进化及响应低磷胁迫应答的能力。

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,分别播种于室内培养箱沙土中和河南科技大学农学院试验田。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 °C 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⁺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 × 10⁻³ mmol/L Zn-SO₄ · 7H₂O、1 × 10⁻³ mmol/L MnSO₄ · H₂O、0.1 × 10⁻³ mmol/L CuSO₄ · 5H₂O、0.01 mmol/L H₃BO₃、0.05 × 10⁻⁴ mmol/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O、0.1 mmol/L EDTA-FeNa^[15]。分别处理 0, 4, 12, 24, 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 方法

1.2.1 陆地棉 MGDG 基因家族成员鉴定及序列分析

从棉花数据库(<http://www.cottongen.org>)

和生物学数据库 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 中检索提取出所有基因的 CDS 序列文件。使用 Pfam 数据库下载 MGDG 保守结构域的隐马尔可夫模型文件 (PF06925)。通过 HMM model 在基因组文件中搜寻候选基因家族成员蛋白序列。从 Swiss-Prot 数据资源库中分别下载拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、水稻 (*Oryza sativa*) MGDG 的基因家族成员, 双向 Blast 比对获取的陆地棉 MGDG 基因家族成员进一步确认, 查看基本特征。

将预测的蛋白序列在 Pfam 数据库、CD-Search、InterPro 数据库中进行 MGDG 蛋白保守结构域的检查。使用 ExPASy 对基因序列进行理化性质的分析, 等电点的确定对于纯化方面有较大的帮助。通过 CELLO v. 2.5 对蛋白进行亚细胞定位预测。利用 TBtools 从陆地棉的基因组注释文件中提取 MGDG 家族基因的基因结构进行可视化分析。

1.2.2 基因家族成员的进化分析 使用 MEGA5.0 对家族成员蛋白进行多序列比对后在 Jalview 进行可视化。用 MEGA5.0 筛选出最优的模型, 采用 ML(最大似然法)构建系统进化树。使用 MEME-Submission form 基于 Motif 分析成员序列保守特性。利用 NCBI 数据库中的 Batch CD-Search 基于 domain 分析成员结构域的保守性。

1.2.3 染色体定位 利用 TBtools 从陆地棉的基因组注释文件中提取 MGDG 家族基因的染色体位置信息并绘制染色体图谱。

1.2.4 蛋白质结构预测分析 在 SOPMA 网站预测该基因家族成员的蛋白质二级结构。

1.2.5 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。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 使用 Primer 5.0 软件, 根据基因的 CDS 序列设计特异引物, *GhActin* 作为内参基因(表 1), 由生工生物工程股份有限公司(上海)合成。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 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算目的

基因相对表达量, 利用 Origin 9.0 对数据进行统计分析并作图。

表 1 陆地棉 MGDG 基因家族实时荧光定量引物

Table 1 Real-time fluorescence quantitative primers of MGDG gene family in *Gossypium hirsutum* L.

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')
<i>GhMGD2-F</i>	ATTACAGAGAAGGTATGGCAGAGAG
<i>GhMGD2-R</i>	GTTCCATCCTCATCCTCGTATTCAT
<i>GhMGD7-F</i>	TGCTTCGCTCAGTTGGG
<i>GhMGD7-R</i>	AAACACCGCCACCGTCAT
<i>GhMGD9-F</i>	GCGTTTCTTCGAGCGTCAG
<i>GhMGD9-R</i>	CCACCATCTCTCACTCCATTGTTAT
<i>GhMGD10-F</i>	TTGCTTCTATTGGGTTGG
<i>GhMGD10-R</i>	CACCA GTATCACTCATCAAATCAG
<i>GhMGD12-F</i>	TGGCAGAGTGTACGGG
<i>GhMGD12-R</i>	CGATGACCACGCCAGTA
<i>GhMGD16-F</i>	CCTATCTCCTCATTCTGCCACTTA
<i>GhMGD16-R</i>	CATAGTGGTAAAAATCGTTAGAA
<i>GhActin-F</i>	ATCCTCCGTCTTGACCTTG
<i>GhActin-R</i>	TGTCCGTCAGGCAACTCAT

2 结果与分析

2.1 陆地棉 MGDG 基因家族鉴定及其序列特征分析

通过 hmmsearch 搜索和数据验证, 在陆地棉基因组中共鉴定出 17 个 MGDG 基因家族成员 *Gh-MGD1*~*Gh-MGD17*(表 2), 17 个 MGDG 基因家族成员编码的氨基酸数量在 435~888 之间, 其中 *Gh-MGD15* 所编码的蛋白序列最短, *Gh-MGD16* 所编码的蛋白序列最长。等电点分布在 6.00~9.67 之间, 仅有 *GhMGD12* 与 *GhMGD15* 的等电点小于 7, 其中绝大多数均为碱性蛋白。相对分子质量介于 48 612.78~99 187.20 Da 之间, 变化相对较大。亚细胞定位预测结果表明, 陆地棉基因编码蛋白位于线粒体、细胞质、叶绿体和细胞膜等细胞结构。*MGDG* 基因序列基因结构分析结果如图 1, 各家族成员均含有多个内含子与外显子。该基因家族的各家族成员的外显子数目分布在 7~9 之间, 内含子的数目分布在 6~8 之间, 其中仅 *GhMGD9* 含有 7 个外显子, 其次有 *GhMGD14* 和 *GhMGD16* 含有 9 个外显子, 其余的 14 个 MGDG 成员均含有 8 个外显子。

表 2 陆地棉 MGDG 基因家族信息

Table 2 Information of MGDG gene family in *G. hirsutum* L.

基因名称 Gene name	基因登录号 Accession number	氨基酸数量 Amino acid number	等电点 Theoretical pI	分子量 Molecular weight/Da	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>GhMGD1</i>	XM_016897799.2	493	9.64	54 448.68	线粒体 Mitochondrial
<i>GhMGD2</i>	XM_041093039.1	469	7.61	53 005.08	细胞质 Cytoplasmic
<i>GhMGD3</i>	XM_016827728.2	537	9.35	58 895.40	线粒体 Mitochondrial
<i>GhMGD4</i>	XM_016897800.2	466	9.36	50 866.01	叶绿体 Chloroplast
<i>GhMGD5</i>	XM_016897801.2	460	9.31	50 234.22	叶绿体 Chloroplast
<i>GhMGD6</i>	XM_041112761.1	469	7.61	52 975.06	细胞质 Cytoplasmic
<i>GhMGD7</i>	XM_016827729.2	531	9.31	58 263.61	线粒体 Mitochondrial
<i>GhMGD8</i>	XM_041117257.1	533	9.16	58 566.65	叶绿体 Chloroplast
<i>GhMGD9</i>	XM_041117256.1	560	9.15	61 844.52	线粒体 Mitochondrial
<i>GhMGD10</i>	XM_016889113.2	532	9.16	58 583.68	线粒体 Mitochondrial
<i>GhMGD11</i>	XM_016897798.2	499	9.67	55 080.47	线粒体 Mitochondrial
<i>GhMGD12</i>	XM_041108665.1	470	6.00	52 257.86	细胞质 Cytoplasmic
<i>GhMGD13</i>	XM_016897797.2	531	9.31	58 250.56	线粒体 Mitochondrial
<i>GhMGD14</i>	XM_041115144.1	882	9.52	98 555.41	质膜 Plasma membrane
<i>GhMGD15</i>	XM_041085685.1	435	6.77	48 612.78	细胞质 Cytoplasmic
<i>GhMGD16</i>	XM_041115143.1	888	9.53	99 187.20	质膜 Plasma membrane
<i>GhMGD17</i>	XM_016897795.2	537	9.35	58 882.35	线粒体 Mitochondrial

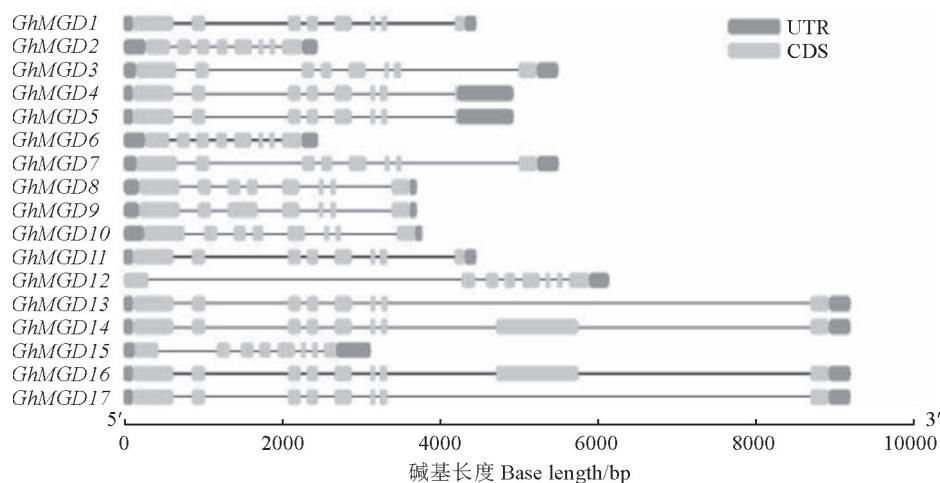


图 1 陆地棉 MGDG 基因家族结构分析

Fig. 1 Structure analysis of MGDG gene family in *G. hirsutum* L.

2.2 陆地棉 MGDG 基因家族系统进化分析

由图 2 可知, 陆地棉 MGDG 基因家族的 17 个成员被划分为两大分支。

其中 *GhMGD2*、*GhMGD6*、*GhMGD12*、*GhMGD15* 4 个陆地棉 MGDG 蛋白成员与拟南芥 *AtMGD2*、*AtMGD3*、*AtMGD4*、*AtMGD5*、*AtMGD6* 同属于 B 型 MGDG 合成酶。

另一个分支中 *GhMGD8*、*GhMGD9*、*GhMGD10*、*GhMGD3*、*GhMGD7*、*GhMGD1*、*GhMGD4*、*GhMGD5*、*GhMGD11*、*GhMGD13*、*GhMGD14*、*GhMGD16*、*GhMGD17* 和拟南芥 *AtMGD1*、*AtMGD7*、*AtMGD8* 亲缘关系较近, 属于 A 型 MGDG 合成酶。

对陆地棉 MGDG 基因家族成员进行蛋白的保守基序分析和蛋白保守结构域的分析可知(图 3),

大部分家族成员都具有相似的 motif。

在陆地棉 MGDG 基因家族中一共鉴定出了 10 个 motif(motif 代表一段特定的氨基酸序列,即表示氨基酸位置),各亚族之间的 motif 的数量和分布基本一致。

蛋白保守结构域的分析表明 17 个家族成员均包含 MGDG 保守结构域,除 GhMGD14 和 Gh-MGD16 含有 2 个其他类型的保守结构域之外的 15 个成员都仅含有一个 MGDG 保守结构域。

2.3 陆地棉 MGDG 基因家族染色体定位

对陆地棉 MGDG 基因家族成员进行染色体定位(图 4),陆地棉 MGDG 基因家族 17 个成员分布于 A05、A06、A07、A13、D05、D06、D07、D13 共 7 条染色体上,其中 A 亚组共有 12 个 GhMGD 基因,D 亚组共有 5 个基因。

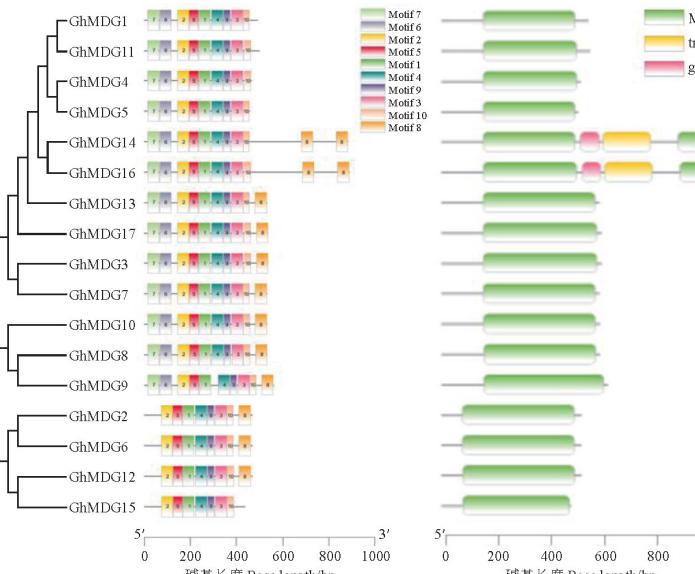


图 3 陆地棉 MGDG 基因家族的保守基序和保守结构域的分析

Fig. 3 Conserved motif and domain analysis of MGDG gene family in *G. hirsutum* L.

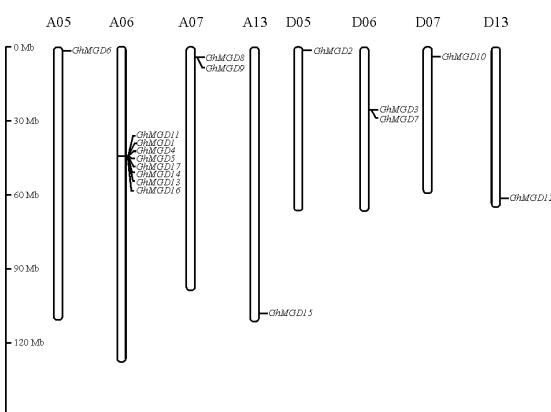
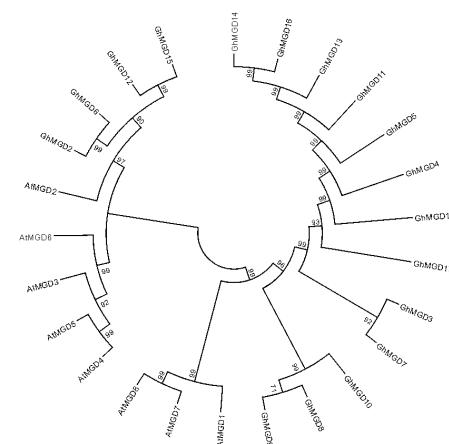


图 4 陆地棉 MGDG 基因家族的染色体定位

Fig. 4 Chromosomal localization of MGDG gene family in *G. hirsutum* L.



At. 拟南芥; Gh. 陆地棉。

图 2 陆地棉 MGDG 基因家族的系统进化树

At. *Arabidopsis thaliana*; Gh. *Gossypium hirsutum*.

Fig. 2 Phylogenetic analysis of MGDG gene family in *G. hirsutum* L.



染色体 A05、A13、D05、D07 和 D13 分别含有 GhMGD6、GhMGD15、GhMGD2、GhMGD10、Gh-MGD12,而 GhMGD8 和 GhMGD9 主要分布于 A07 染色体上,GhMGD3 和 GhMGD7 主要分布于 D06 染色体上,A06 染色体上共有 8 个成员,这 8 个成员表现为簇分布,较为集中。

2.4 陆地棉 MGDG 基因家族蛋白质结构预测

陆地棉 MGDG 基因家族成员的蛋白质二级结构呈现出基本相似的结果(表 3),MGDG 基因家族 17 个家族成员全部都表现出 α -螺旋和无规则卷曲所占比例最大,其次是延伸链, β -转角所占比例最少。

每个亚族的表现也更为相似,如GhMGD2、Gh-MGD6、GhMGD12、GhMGD15同属一个亚族,均表现出 α -螺旋所占比例大于无规则卷曲。

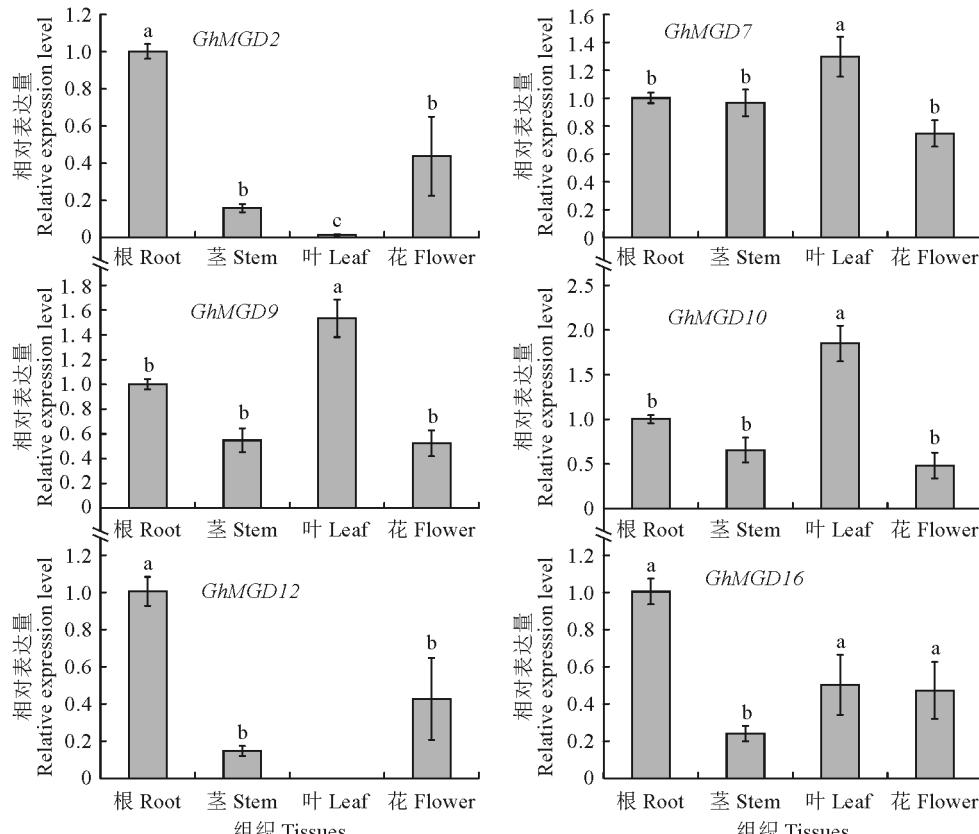
2.5 陆地棉 MGDG 基因家族表达特性分析

以棉花的GhActin为内参基因,利用qRT-PCR技术检测陆地棉MGDG基因家族中6个代表性的基因在根、茎、叶和花等4个组织中的表达情况。6个MGDG基因家族成员在不同组织中均有表达,但相对表达量各不相同(图5)。

其中GhMGD9和GhMGD10在叶片中的表达量最高,其次是根。

GhMGD2和GhMGD12在根中的表达量最高,而在叶中几乎不表达。GhMGD7基因在根中的表达量略低于叶,在花中表达量最低。和GhMGD16在根和叶中的表达量最高,在茎和花中的表达量最低。

对陆地棉幼苗进行低磷胁迫,以处理不同时间的陆地棉根部组织为材料进行qRT-PCR分析MGDG基因表达情况。



不同字母表示组织间的差异显著($P<0.05$)。

图5 陆地棉MGDG基因在不同组织的相对表达分析

Different letters indicate significant difference between tissues at 0.05 level.

Fig. 5 The relative expression of MGDG gene in tissues in *G. hirsutum* L.

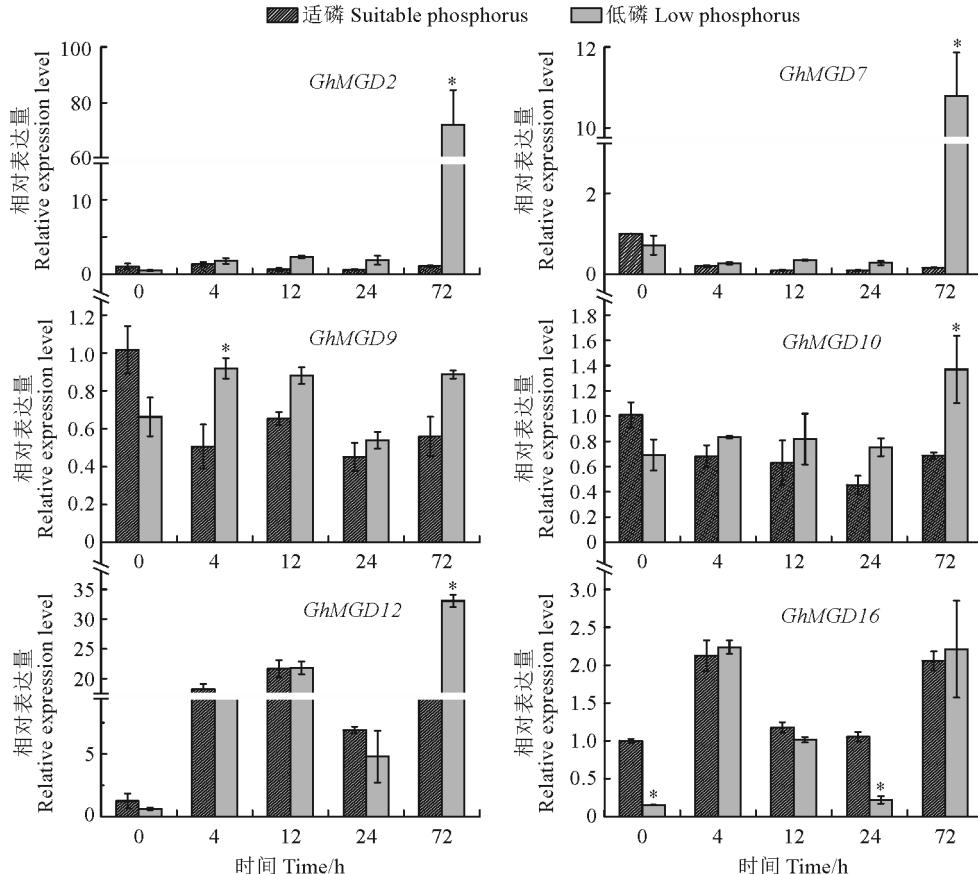
表3 陆地棉 MGDG 家族蛋白质二级结构预测结果

Table 3 Secondary prediction results of MGDG family proteins in *G. hirsutum* L. (%)

基因名称 Gene name	α -螺旋 Alpha helix	无规则卷曲 Random coil	延伸链 Extended strand	β 转角 Beta turn
GhMGD1	33.54	41.26	19.51	5.69
GhMGD2	40.60	37.18	16.88	5.34
GhMGD3	38.43	40.86	15.86	4.85
GhMGD4	32.69	35.91	21.08	10.32
GhMGD5	33.12	41.18	19.39	6.32
GhMGD6	41.45	36.97	16.88	4.70
GhMGD7	35.28	40.00	17.74	6.98
GhMGD8	38.16	40.04	16.35	5.45
GhMGD9	38.28	39.00	17.35	5.37
GhMGD10	36.16	40.68	18.08	5.08
GhMGD11	33.94	35.14	21.49	9.44
GhMGD12	40.09	39.02	16.84	4.05
GhMGD13	34.15	41.13	18.49	6.23
GhMGD14	28.83	38.71	22.81	9.65
GhMGD15	39.86	36.87	18.20	5.07
GhMGD16	32.02	35.06	22.55	10.37
GhMGD17	35.45	42.35	17.35	4.85

如图 6 所示, *GhMGD2* 和 *GhMGD7* 基因在受到低磷胁迫的刺激下, 能够持续性响应低磷胁迫, *GhMGD2* 基因在低磷胁迫 4~72 h 其表达量均比适磷条件下高, 且在 72 h 表达量约是对照组的 72 倍; *GhMGD7* 基因在低磷胁迫 4~72 h 其表达量均比适磷条件下高, 且在 72 h 表达量约是对照组的 67.2 倍。*GhMGD9* 基因在低磷处理 4~24 h 时其趋势为逐渐下降, 但表达量均比正常情况下高, 在 72 h 时其表达量又上升, 仅比 4 h 时表达量略低; *GhMGD10* 基因在低磷处理 4~24 h 时其趋势为逐渐下降, 但表达量均比正常情况下高, 在 72 h 时其表达量又上升, 达到最高表达量。从 *GhMGD9* 和 *GhMGD10* 基因的表达趋势看, 该基因在受到低磷

胁迫的刺激后, 立即会对低磷胁迫做出应答, 且具有持续性。*GhMGD12* 基因在低磷胁迫 0~4 h 的表达量均比适磷条件下低, 在 12 h 虽比适磷条件下略高, 但在 24 h 时表达量下调, 低于适磷条件下的表达量, 然而, 在低磷胁迫 72 h 时表达量达到最高值, 是适磷条件下表达量的 1.9 倍, 说明该基因低磷胁迫下虽不稳定表达, 但对低磷刺激有应答反应。*GhMGD16* 基因在低磷处理 4 h 时达到最大值, 在 4~24 h 这个时间段该基因呈现表达量逐渐下调的趋势, 且低磷胁迫下的表达量在 12, 24 h 时都比适磷条件下低, 但在 72 h 该基因表达上调, 且在低磷胁迫下的表达量高于适磷处理的表达量, 说明该基因能够响应低磷胁迫。



* 表示与对照相比存在显著差异($P<0.05$)。

图 6 陆地棉 MGDG 基因在根部低磷胁迫不同时间的表达模式

* are significant difference in different tissues and low phosphorus stress at 0.05 level.

Fig. 6 The relative expression analysis of MGDG gene in roots of *G. hirsutum* L. different time points with low phosphorus treatment

3 讨 论

磷素是核酸的重要组成成分之一, 在植物体内的新陈代谢中起着关键性的作用, 低磷胁迫不利于

作物生长发育^[16]。大部分脂质由 MGDG 和 DGDG 组成, 它们占总脂质的 80%。单半乳糖基二酰基甘油是生物活动以及光合活性所需的主要和必需的植物脂质, 这需要富含半乳糖脂的环境。MGDG 也是

二半乳糖基二酰基甘油(DGDG)的关键前体,它在磷酸盐胁迫下转移到质体膜外。大部分 MGDG 是由位于质体膜上的 MGDG 合酶合成的^[17]。因此, MGDG 的合成对植物至关重要。而在植物体内合成的磷脂的含量会受到磷素利用率的影响发生改变,在低磷胁迫下,磷脂含量会产生明显地下降,进而影响细胞膜的稳定性^[18]。

虽然 MGDG 是高等植物中最多的糖脂,但因为细胞中 MGD 的含量却非常低,因此想要分离并得到 MGD 的序列是较为困难的。目前对棉花中 MGDG 基因在全基因组水平的鉴定和分析仍未见报道。棉花属于异源多倍体,基因组庞大而复杂,高质量版本的基因组成为提升基因家族分析准确性的必要条件。本研究利用最新的棉花基因组数据库,通过生物信息学的方法在陆地棉中鉴定了 17 个具有 MGDG 结构域的 GhMGD 基因。与拟南芥^[8]和水稻^[19]等植物相比,陆地棉 MGDG 基因数目明显较多,推测陆地棉单半乳糖甘油二酯家族成员分化可能早于拟南芥、水稻的物种分化。MGDG 家族分成了两种不同的 MGD 类型:Type A MGD 家族(AtMGD1)和 type B MGD 家族(AtMGD2 和 At-MGD3)^[8]。由图 2 系统进化树分析可知陆地棉 MGDG 基因家族的 17 个成员同样被划分为两大亚族,但每个亚族中的单半乳糖甘油二酯蛋白数量多于拟南芥,由此推测陆地棉中单半乳糖甘油二酯蛋白家族基因可能发生了物种特异性扩增^[20]。

蛋白质处于特定的亚细胞位置上才能有效发挥其功能,因此了解亚细胞定位对研究蛋白质功能具有一定的帮助,本研究亚细胞定位分布位置较多,包括线粒体、细胞质、叶绿体和细胞膜等细胞结构,这可能与基因功能分化的多样性有关。通过保守基序和功能结构域分析发现,陆地棉 GhMGD 基因结构相似且都包含 MGDG 保守结构域,亚族中的 motif

的数量和分布几乎相同,亚族间有一定差异,这可能和功能的发挥有至关重要的联系。染色体定位发现 17 个基因中,12 个基因分布于 A 基因组,5 个基因分布于 D 基因组,其中有 8 个基因成簇分布于 A 基因组的一条染色体上,基因数量的不同以及成簇的分布可能与植物在进化过程中发生的基因复制、基因组重排、基因丢失等有关系,对此有待进一步研究^[21]。

用实时荧光定量 PCR 技术分析陆地棉 MGDG 基因组织表达特异性和低磷胁迫下的抗性,各个 MGDG 基因在陆地棉根、茎、叶和花 4 个不同组织中表达量的差异,表明 MGDG 基因家族在棉花中可能功能分化有所不同。分析的 6 个 GhMGD 基因在根部具有不同程度的表达,其中 GhMGD2、GhMGD12 和 GhMGD16 在根部的表达量均最高。根部低磷胁迫相对表达量分析表明,这 6 个 Gh-MGD 基因均能响应低磷胁迫,其中 GhMGD2 基因在低磷胁迫 72 h 表达量约是适磷处理的 72 倍。在低磷环境胁迫下,植物会在分子机制、生理生化和形态结构等多环节的调整来增加自身的适应性,而根系作为植物吸收矿质元素的主要器官对植物适应磷饥饿具有重要作用^[22-23]。GhMGD 基因会持续性地对低磷胁迫作出应答,表明其在棉花磷素信号调控中起到一定的作用。

综上所述,本研究从陆地棉基因组数据库中共获得 17 个 GhMGD 基因,首先进行生物学分析,然后利用实时荧光定量技术进行分析,陆地棉 MGDG 家族 GhMGD2、GhMGD7、GhMGD9、GhMGD10、GhMGD12 和 GhMGD16 基因对低磷胁迫均有不同程度的响应。本试验为进一步研究陆地棉 MGDG 基因家族在低磷胁迫下的功能鉴定提供了一定理论依据。

参考文献:

- [1] DÖRMANN P, BENNING C. Galactolipids rule in seed plants [J]. *Trends in Plant Science*, 2002, 7(3): 112-118.
- [2] KALISCH B, DÖRMANN P, HÖLZL G. DGDG and glycolipids in plants and algae [M]//Subcellular biochemistry. Cham: Springer International Publishing, 2016: 51-83.
- [3] HÄRTEL H, DÖRMANN P, BENNING C. DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(19): 10 649-10 654.
- [4] WANG S W, UDDIN M I, TANAKA K, et al. Maintenance of chloroplast structure and function by overexpression of the rice MONOGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL SYNTHASE gene leads to enhanced salt tolerance in tobacco [J]. *Plant Physiology*, 2014, 165(3): 1 144-1 155.
- [5] MARÉCHAL E, AWAI K, BLOCK M A, et al. The multi-gene family of monogalactosyl diacylglycerol synthases [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2000, 28(6): 732-738.

- [6] SHIMOJIMA M, OHTA H. Critical regulation of galactolipid synthesis controls membrane differentiation and remodeling in distinct plant organs and following environmental changes[J]. *Progress in Lipid Research*, 2011, **50**(3): 258-266.
- [7] KOBAYASHI K, KONDO M, FUKUDA H, et al. Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, **104**(43): 17 216-17 221.
- [8] AWAI K, MARÉCHAL E, BLOCK M A, et al. Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16 : 3 and 18 : 3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, **98**(19): 10 960-10 965.
- [9] OHLROGGE J, BROWSE J. Lipid biosynthesis[J]. *The Plant Cell*, 1995, **7**(7): 957-970.
- [10] HARWOOD J L. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1996, **1301**(1/2): 7-56.
- [11] JOUHET J, MARÉCHAL E, BALDAN B, et al. Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria[J]. *Journal of Cell Biology*, 2004, **167**(5): 863-874.
- [12] ANDERSSON M X, STRIDH M H, LARSSON K E, et al. Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol[J]. *FEBS Letters*, 2003, **537**(1/2/3): 128-132.
- [13] ANDERSSON MATS X, LARSSON KARIN E, HENRIK T, et al. Phosphate-limited oat. The plasma membrane and the tonoplast as major targets for phospholipid-to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, **280**(30): 27 578-27 586.
- [14] KOBAYASHI K, AWAI K, NAKAMURA M, et al. Type-B monogalactosyldiacylglycerol synthases are involved in phosphate starvation-induced lipid remodeling, and are crucial for low-phosphate adaptation[J]. *The Plant Journal*, 2009, **57**(2): 322-331.
- [15] 卿桂霞,耿翡翠,梁颖颖,等.陆地棉 GhCSN6A 基因克隆及低磷胁迫下的表达[J].西北植物学报,2023,43(1):29-36.
- QING G X, GENG F F, LIANG Y Y, et al. Cloning of *Gh-CSN6A* gene from *Gossypium hirsutum* L. and its expression under low phosphorus stress[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2023, **43**(1): 29-36.
- [16] 文亦蒂,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-Occidentalia Sinica*, 2019, **39**(2): 226-233.
- [17] TRIPATHI S, SRIVASTAVA Y, SANGWAN R S, et al. In silico mining and functional analysis of AP2/ERF gene in *Withania somnifera* [J]. *Scientific Reports*, 2020, **10**: 4 877.
- [18] 王海英,许亦农.缺磷胁迫下烟草叶片磷脂酰甘油(PG)含量降低的分子机理[J].植物生理与分子生物学报,2006,32(6):643-648.
- WANG H Y, XU Y N. Molecular mechanism of the decrease in phosphatidylglycerol content in tobacco leaves under phosphate deficiency stress[J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2006, **32**(6): 643-648.
- [19] 张梅娟.水稻 MGD 同源基因的克隆及功能研究[D].陕西杨凌:西北农林科技大学,2017.
- [20] 刘伟.2个二倍体棉种CDPK和FAD基因家族的全基因组鉴定与基因结构功能分析[D].杭州:浙江大学,2015.
- [21] 刘潮,韩利红,宋培兵,等.桑树 WRKY 转录因子的全基因组鉴定及生物信息学分析[J].南方农业学报,2017,48(9):1 691-1 699.
- LIU C, HAN L H, SONG P B, et al. Genome-wide identification and bioinformatics analysis for mulberry WRKY transcription factors[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2017, **48**(9): 1 691-1 699.
- [22] 许仙菊,张永春.植物耐低磷胁迫的根系适应性机制研究进展[J].江苏农业学报,2018,34(6):1 425-1 429.
- XU X J, ZHANG Y C. Research progress on the root adaptation mechanism of plants under low phosphorus stress[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2018, **34**(6): 1 425-1 429.
- [23] 丁广大,陈水森,石磊,等.植物耐低磷胁迫的遗传调控机理研究进展[J].植物营养与肥料学报,2013,19(3):733-744.
- DING G D, CHEN S S, SHI L, et al. Advances in genetic regulation mechanism of plant tolerance to phosphorus deficiency[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2013, **19**(3): 733-744.

(编辑:韦青侠)