

陆地棉磷高效基因 *GhMGD3* 的克隆与表达分析

孟超敏^{1,2}, 耿菲菲^{1,2}, 卿桂霞^{1,2}, 周佳敏^{1,2}, 张富厚^{1,2}, 刘逢举³

(1. 河南科技大学 农学院, 河南 洛阳 471000; 2. 河南科技大学 洛阳市作物遗传改良与种质创新重点实验室, 河南 洛阳 471000; 3. 中国农业科学院 棉花研究所/棉花生物学国家重点实验室, 河南 安阳 455000)

摘要: 【目的】基于前期陆地棉 *Gossypium hirsutum* 根部低磷胁迫基因表达谱芯片差异表达序列数据分析, 挖掘相关基因, 并对其克隆与表达分析。【方法】克隆 *GhMGD3* 基因并进行基因组 DNA 与 cDNA 测序分析, 借助生物信息学方法分析 *GhMGD3* 的基因结构和进化关系; 采用半定量 RT-PCR 技术与实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 的方法检测该基因在根、茎、叶、花 4 个组织中的基因表达量的变化以及低磷胁迫下的表达模式。【结果】成功克隆了陆地棉 *GhMGD3* 基因。*GhMGD3* 基因的编码序列全长为 681 bp, 共编码 226 个氨基酸, 存在 3 个内含子, 分子量是 26 610.54 Da, 等电点为 8.74, 是稳定的亲水碱性蛋白。二级结构以 α -螺旋和无规则卷曲为主。该蛋白不存在信号肽、跨膜结构域、N-糖基化位点, 但含有多个磷酸化位点。亚细胞定位结果显示: 该基因编码的蛋白定位于叶绿体。*GhMGD3* 蛋白与木槿 *Hibiscus syriacus* 氨基酸序列相似性较高, 其亲缘关系最近。半定量 RT-PCR 和 RT-qPCR 试验结果均表示: *GhMGD3* 基因主要表达于根, 中量表达于茎, 微量表达于叶和花, 在低磷胁迫 72 h 时其相对表达量达到最高值。【结论】首次成功克隆到了陆地棉 *GhMGD3* 基因, 获得了 *GhMGD3* 基因的组织表达以及低磷胁迫下的表达模式, *GhMGD3* 基因在棉花磷高效利用信号调控中具有重要作用。图 7 表 1 参 27

关键词: 陆地棉; 低磷胁迫; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: S33; Q78

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2022)06-1203-09

Cloning and expression of phosphorus efficient gene *GhMGD3* in *Gossypium hirsutum*

MENG Chaomin^{1,2}, GENG Feifei^{1,2}, QING Guixia^{1,2}, ZHOU Jiamin^{1,2}, ZHANG Fuhou^{1,2}, LIU Fengju³

(1. College of Agricultural, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, Henan, China; 2. Luoyang Key Laboratory of Crop Genetic Improvement and Germplasm Innovation, Luoyang 471003, Henan, China; 3. Institute of Cotton Research of CAAS/State Key Laboratory of Cotton Biology, Anyang 455000, Henan, China)

Abstract: [Objective] Based on the genome-wide expression profile of cotton seedlings under low phosphorus stress in the early stage of our research group, related genes were excavated and their preliminary expression analysis was conducted. [Method] Genomic DNA and cDNA sequence of the gene were cloned and analyzed by bioinformatics method. Semi-quantitative RT-PCR and fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) were used to detect the changes of gene expression in root, stem, leaf and flower tissues. The expression patterns of *GhMGD3* under low phosphorus stress were analyzed by RT-qPCR technology. [Result] *GhMGD3* gene was cloned. The coding sequence of *GhMGD3* was 681 bp, encoding 226 amino acids and containing 3 introns. The molecular weight is 26 610.54 Da, isoelectric point is 8.74, it is a stable hydrophilic alkaline protein. The secondary structure is dominated by α -helix and random crimp. The protein does not have signal peptide, transmembrane domain and N-glycosylation site, but contains multiple acidification sites. Subcellular

收稿日期: 2022-01-25; 修回日期: 2022-07-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31101184)

作者简介: 孟超敏 (ORCID: 0000-0003-2783-3996), 副教授, 从事作物营养遗传育种研究。E-mail: chaominm@haust.edu.cn

localization showed that the gene encoded a protein in chloroplast. GhMGD3 protein and *Hibiscus syriacus* protein amino acid sequence similarity is high, the most recent genetic relationship. The results of semi-quantitative RT-PCR and RT-qPCR showed that *GhMGD3* gene was mainly expressed in root, medium expression in stem, and trace expression in leaf and flower, and its expression level reached the highest value at 72 h of low phosphorus stress. [Conclusion] The *GhMGD3* gene was preliminarily obtained. The expression patterns of *GhMGD3* in different tissues and under low phosphorus stress were analyzed. *GhMGD3* gene has an important function in regulation of the efficient utilization of phosphorus in cotton. [Ch, 7 fig. 1 tab. 27 ref.]

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

无机磷酸盐 (inorganic phosphates, Pi) 的消耗是影响全球植物生长的严重问题^[1]。所有生物体的生命都依赖于脂质双层细胞膜的存在, 该膜将细胞内部与环境分开, 单乳糖基和二乳糖基二酰基甘油 (分别为 MGDG 和 DGDG) 构成植物叶绿体中膜脂质的大部分^[2]。膜脂质重塑是植物用来在 Pi 耗尽条件下生存的防御机制^[3]。在 Pi 饥饿期间, 磷脂被降解为 Pi 提供其他必需的生物过程, 而质体中的半乳糖脂合成通过单半乳糖基二酰基甘油合酶 3(MGD3) 的转录激活上调^[4]。在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中, 已经鉴定出 3 种功能性 MGD 合成酶 (MGD1, MGD2 和 MGD3), 并根据其氨基酸身份将其分为 A 型 (MGD1) 和 B 型 (MGD2 和 MGD3) 酶^[5-6]。A 型和 B 型酶在特异性、亚细胞定位和基因表达谱方面存在一些差异, A 型酶定位于质体的内膜, 而 B 型酶定位于质体外膜。在这三者中, MGD1 是叶绿体中最丰富的亚型。MGD1 的表达在光合组织中广泛存在, 而 MGD2 和 MGD3 的表达在根等非光合组织中特异性检测到, 在绿色组织中很少检测到^[7]。2 种类型的 MGD 酶对于植物在低磷酸盐条件下的生存至关重要, 但尚未报道对 MGD 基因分歧的详细分析。这些基因对于植物适应磷素缺乏症可能是必不可少的。

棉花 *Gossypium* 是一种油籽和纤维作物, 在全球 70 多个国家种植, 在全球经济中发挥着重要作用^[8-10]。然而, 棉花的生长和生产力受到非生物和生物胁迫^[11]。磷是核酸的主要组成部分, 在植物生长发育和代谢过程中极为重要, 是细胞分裂和根系生长不可缺少的, 低磷胁迫不利于作物生长发育^[12-16]。因此, 研究低磷胁迫的分子适应机制和加强抗逆性对棉花生产至关重要。张学昕等^[17]通过田间试验对不同施磷处理下的棉花各时期取样进行养分和产量分析表明: 当其他条件一定时, 随着施磷量的递增, 棉株的单株铃数以及单铃质量也会随之增加, 从而实现增产的目标。王刚等^[18]研究发现: 棉株地上和地下两部分的干物质都随有效磷含量的增加而增加, 根冠比则随其增加而降低。通过有效磷含量影响糖类物质的合成转化以及棉株叶绿素含量, 进而作用于整个棉株的生长。刘耘华等^[19]研究表明: 施用有机肥能够增加土壤有效磷含量, 除了有机肥中有一部分磷素之外, 还可以促进有效磷的转化。磷素与有机肥混合施用对土壤磷库、棉花产量和磷素吸收量都会产生积极影响。

本研究以前期研究筛选出的磷高效棉花品种陆地棉 ‘新陆早 19’ *Gossypium hirsutum* ‘Xinluzao 19’ 为材料, 克隆了 *GhMGD3* 基因, 采用生物信息学工具分析其编码蛋白理化性质, 并对其进行表达特性分析, 旨在为深入解析棉花 *GhMGD3* 基因的生物学功能提供科学参考, 并为培育磷高效利用的棉花新品种提供基因资源。

1 材料与方法

1.1 材料

陆地棉 ‘新陆早 19’ 种植在河南科技大学农学院大田, 不施加磷肥。选取长势一致的植株, 采集根、茎、叶、花, 用于分析 *GhMGD3* 基因在植株 4 个组织中的表达状况。

将 ‘新陆早 19’ 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, 1.00 mmol·L⁻¹) 和低磷处理 (LP, 0.01 mmol·L⁻¹), 磷源采用 KH₂PO₄, 为保证 K⁺ 的浓度一致, 以 1.0 mmol·L⁻¹ 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⁻¹ Ca(NO₃)₂·4H₂O、2.5 mmol·L⁻¹ KNO₃、0.5 mmol·L⁻¹ NH₄NO₃、1.4 mmol·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O、

1.0×10⁻³ mmol·L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O、1.0×10⁻³ mmol·L⁻¹ MnSO₄·H₂O、0.1×10⁻³ mmol·L⁻¹ CuSO₄·5H₂O、0.01 mmol·L⁻¹ H₃BO₃、0.05×10⁻⁴ mmol·L⁻¹ (NH₄)₆MO₇O₂₄·4H₂O、0.1 mmol·L⁻¹ EDTA-FeNa^[20]。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 ℃ 保存备用。每日调节营养液 pH 6.5，3 d 更换 1 次营养液。

1.2 引物设计

根据前期陆地棉根部低磷胁迫基因表达谱芯片差异表达基因序列进行分析，在美国国家生物信息中心 (NCBI) 网站的 EST 数据库中检索差异表达基因序列，得到该基因的相似序列，将所得相似性序列 (覆盖率>50%，相似度>90%) 使用 DNASTAR 的 Seqman 进行拼接得到重叠群，将所得序列继续检索与拼接直至没有新的相似序列出现，所得即为结果序列 contig，利用 ORFfinder 在线平台查找开放阅读框，进行目标基因 *GhMGD3* 的克隆与分析。根据 ORFfinder 在线平台查找的开放阅读框，使用 Primer 5.0 设计引物，由生工生物工程有限公司合成，见表 1。

1.3 基因组 DNA 的克隆

1.3.1 基因组 DNA 的提取 取液氮速冻整株植株后在研钵中迅速研磨成粉末转移至离心管，利用十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法提取基因组 DNA，向其中添加 200 μL 的 TE 缓冲液溶解后置于-20 ℃ 保存备用。

1.3.2 基因克隆与测序 以基因组 DNA 为模板设计 PCR 扩增反应体系 (20 μL)，冰上操作：2×M5 蓝色染料高保真 *Taq* 酶 10.0 μL，上游引物 (10 μmol·L⁻¹) 0.5 μL，下游引物 (10 μmol·L⁻¹) 0.5 μL，模板 DNA 0.5 μL，无核酸酶 ddH₂O 8.5 μL。反应程序为：95 ℃

3 min；94 ℃ 25 s，53 ℃ 25 s，72 ℃ 40 s，32 个循环；72 ℃ 5 min；4 ℃ 低温保存。120 V，25 min，质量浓度为 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。将目的 DNA 片段进行胶回收纯化后连接 pTOPO-T 载体，具体体系为 (10 μL)：M5 HiPer pTOPO-TA Vector 1.0 μL，10×增强剂 1.0 μL，纯化后的 PCR 产物 3.9 μL，灭菌水 4.1 μL。取 5.0 μL 连接产物转化 50.0 μL 大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞，将菌液涂布在含氨苄青霉素的 LB 固体培养基上，37 ℃ 培养过夜。随机挑取单菌落，扩大培养 4 h。以所得菌液作模板进行菌液 PCR 反应，体系如下 (20 μL)：2×M5 蓝色染料高保真 *Taq* 酶 10.0 μL，通用引物 M13F 0.5 μL，通用引物 M13R 0.5 μL，模板 DNA 0.5 μL，无核酸酶 ddH₂O 8.5 μL。反应程序与以基因组 DNA 为模板 PCR 扩增反应体系相同。检测符合后送至生工生物工程有限公司测序。

1.4 cDNA 的克隆

1.4.1 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 取液氮速冻整株 ‘新陆早 19’ 植株后在研钵中迅速充分研磨成粉末，后续步骤依照 RNAPrep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA，150 V，15 min，质量浓度为 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。参考 HiScript® cDNA 一键合成试剂盒说明书完成 cDNA 一键的合成，-20 ℃ 保存备用。

1.4.2 基因克隆与测序 以 ‘新陆早 19’ 的 cDNA 为模板设计 PCR 扩增反应体系 (20 μL)，冰上操作：2×M5 蓝色染料高保真 *Taq* 酶 10.0 μL，上游引物 (10 μmol·L⁻¹) 0.5 μL，下游引物 (10 μmol·L⁻¹) 0.5 μL，cDNA 1.0 μL，无核酸酶 ddH₂O 8.0 μL。PCR 反应程序为：95 ℃ 3 min；94 ℃ 25 s，56 ℃ 25 s，72 ℃ 35 s，35 个循环；72 ℃ 5 min；4 ℃ 低温保存。120 V，25 min，质量浓度为 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。将目的 DNA 片段进行胶回收纯化后连接 pTOPO-T 载体，体系 (5 μL) 如下：M5 HiPer pTOPO-TA Vector 0.5 μL，10×增强剂 0.5 μL，纯化后的 PCR 产物 1.5 μL，灭菌水 2.5 μL。取 5 μL 连接产物转化 50 μL 大肠埃希菌 DH5α 感受态细胞，培养后随机挑取单菌落扩大培养后进行菌液 PCR 反应，电泳检测符合后送至生工生物工程有限公司进行测序。

1.5 生物信息学分析

使用在线平台及软件对基因进行生物信息学分析，预测分析基因的结构、性质等。

表 1 引物信息

Table 1 Primers used in the study	
引物名称	引物序列(5'→3')
上游引物	GGGTTCTTTGTCTTTCTTG
下游引物	ACCTGGATTGGGACTCTT
M13F	TGTAACACGACGCCAGT
M13R	CAGGAACAGCTATGACC
<i>GhACTIN</i> -F	ATCCTCCGCTTGACCTTG
<i>GhACTIN</i> -R	TGTCCGTCAGCAACTCAT
<i>GhMGD3</i> -F	CTTGTTTCTTTTCTTCTTGGTGGA
<i>GhMGD3</i> -R	TGATAATAATAGCCGTTGTTGTGA

1.6 半定量 RT-PCR

利用半定量 RT-PCR 技术, 分析 *GhMGD3* 基因在根、茎、叶、花中的表达状况。以各组织的 cDNA 为模板, *GhACTIN* 作内参基因, 所用引物见表 1。设计 PCR 扩增反应体系 (20 μ L), 冰上操作: 2 $\times$ M5 蓝色染料高保真 *Taq* 酶 10.0 μ L, *GhMGD3*-F (10 μ mol $\cdot$ L⁻¹) 0.5 μ L, *GhMGD3*-R (10 μ mol $\cdot$ L⁻¹) 0.5 μ L, cDNA 1.0 μ L, 无核酸酶 ddH₂O 8.0 μ L。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 25 s, 60 $^{\circ}$ C 25 s, 72 $^{\circ}$ C 10 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min; 4 $^{\circ}$ C 低温保存。120 V, 25 min, 质量浓度为 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7 实时荧光定量 PCR

采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术检测 *GhMGD3* 基因在不同组织中及低磷胁迫处理下的表达模式。以 *GhACTIN* 作为内参基因, 所用引物见表 1。采用 SYBR[®] Green Pro *Taq* HS 预混型 qPCR 试剂盒进行荧光定量, 使用的荧光定量 PCR 仪器型号是 CFX96, 数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法, 用 Origin 9.0 对数据进行统计分析并作图。

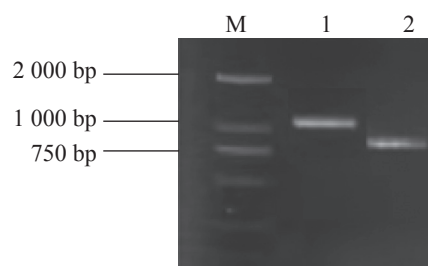
2 结果与分析

2.1 低磷胁迫差异表达序列延伸

利用前期低磷胁迫差异表达序列为探针, 共检索发现并下载了 8 条相似序列, 利用 DNASTAR 将所得序列全部进行拼接, 得到了一个新的 contig 重叠群, 序列长度为 1 276 bp。

2.2 *GhMGD3* 基因的克隆

根据 *GhMGD3* 基因的编码序列 (coding sequence, CDS) 设计特异性引物, 以植株的 DNA 和 cDNA 为模板, 克隆得到 *GhMGD3* 基因的 CDS (图 1), 其条带符合目的条带大小。通过无缝克隆连接到 pTOPO-T 载体上, 挑选阳性克隆测序。获得 DNA 序列 1 040 bp 左右 (泳道 1) 与 contig 序列的一致性较高, 为 93.14%。获得 cDNA 序列 780 bp 左右 (泳道 2) 与 contig 序列比对一致性为 99.43%。开放阅读框为长度为 681 bp, 共编码 226 个氨基酸。该基因 *GhMGD3* 是 MGD 家族成员。



M. marker 2000; 1. DNA 的 PCR 扩增片段; 2. cDNA 的 PCR 扩增片段

图 1 *GhMGD3* 基因编码序列的克隆

Figure 1 Cloning of *GhMGD3* CDS

2.3 *GhMGD3* 基因结构分析

将 DNA 测序结果序列与 cDNA 测序结果的最大开放阅读框序列导入 Gene Structure Display Server 2.0 对该基因组序列与编码序列进行分析, 表明该基因编码序列包含 5' 与 3' 端非编码序列, 含有 3 个内含子, 4 个外显子 (图 2)。

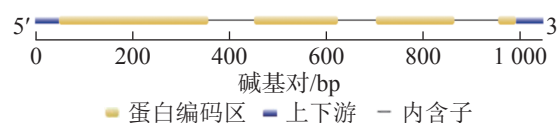


图 2 *GhMGD3* 基因结构分析

Figure 2 *GhMGD3* gene structure analysis

2.4 生物信息学分析

2.4.1 *GhMGD3* 基因编码蛋白的理化参数及疏水性 将基因编码蛋白导入 ExPASy-ProtParam tool 在线软件, 分析可知 *GhMGD3* 共编码了 226 个氨基酸, 编码蛋白的分子式是 C₁₂₀₁H₁₈₃₂N₃₂₈O₃₃₃S₁₃, 脂肪族氨基酸指数是 76.28, 分子量是 26 610.54 Da, 等电点为 8.74, 属于碱性蛋白。其中缬氨酸的质量分数占比最大, 为 8.4%, 共 19 个。在该蛋白中带正电荷的氨基酸有 30 个, 另外有 26 个带负电荷。氨基酸组分会直接影响蛋白的亲疏水性, 总亲水性平均系数为 -0.471, 不稳定系数是 37.83, 是亲水性稳定蛋白。ProtScale analysis 在线软件显示此蛋白中精氨酸亲水性最强, 亲水指数为 -4.500, 异亮氨酸疏水性最强, 亲水指数为 +4.500。

2.4.2 *GhMGD3* 基因编码蛋白的二级结构预测及亚细胞定位 在 NPS@:SOPMA secondary structure prediction 网站预测该蛋白二级结构, 其中占比最大的无规则卷曲占 39.38%, 包含 89 个氨基酸, 其次是 α -螺旋, 占比为 34.96%, 包含 79 个氨基酸; 此外此蛋白还含有延伸链 (extended strand) 和 β -转角 (beta

turn), 其中延伸链占比相比较多, 占比 21.24%, 有 48 个氨基酸, β -转角仅有 10 个氨基酸, 占比 4.42%, 是最少的。表明此蛋白的二级结构由 α -螺旋和无规则卷曲占据主体地位所组成。由于无规则卷曲占比比较多, 预测其结构比较复杂。运用 TMHMM-2.0 分析该基因所编码蛋白不含有跨膜结构域, 属于非跨膜蛋白, 226 个氨基酸并未形成跨膜螺旋区。通过 SignalP-5.0 进行信号肽分析可知: 此基因编码蛋白有信号肽的概率是 0.001 6, 其他的可能性则高达 0.998 4。226 位氨基酸中并未出现典型的信号肽趋势, 即该蛋白不存在信号肽。在线网站内输入基因编码序列进行基因编码蛋白的亚细胞定位预测, 预测定位在叶绿体, 该蛋白可能在叶绿体发挥作用。

2.4.3 *GhMGD3* 基因编码蛋白的三级结构及功能位点预测 通过 SWISS-MODEL Interactive Workspace 进行同源建模, 预测蛋白三级结构。如图 3 所示: QMEAN 值为 0.60, GMQE 值为 0.12, 预测其结构与单半乳糖基二酰基甘油合酶相似, 与拟南芥半乳糖脂合酶 MGD1 的结构类似。蛋白的三级结构与二级结构分析结果一致, 均以 α 螺旋和无规则卷曲为主体。

将获得的基因编码序列提交到 STRING 11.0 在线网站预测该基因可能的互作网络, 分析结果显示: 此基因编码蛋白能够预测到蛋白的相互作用网络, 因此预测该基因可能是通过多个蛋白互作进行调控。

糖基化对蛋白稳定及功用均会产生极其重要的影响。将获得的基因编码序列提交到 NetNGlyc 1.0 在线软件可知: 该蛋白不存在 N-糖基化位点。磷酸化位点与蛋白的功能、结构都有很大的关系, 通过 NetPhos 3.1 在线网站分析: 此蛋白中占比最大的是丝氨酸和苏氨酸磷酸化位点, 而酪氨酸占比较少。它除了可以调控蛋白的活性以外, 在细胞的信号转导中也占据了重要的位置。

2.4.4 *GhMGD3* 蛋白氨基酸序列同源性比对及系统进化树 使用 NCBI 的保守结构域数据库 (CDD-search) 查找此氨基酸序列的保守结构域, 结果显示: 该基因所编码蛋白匹配所属的超家族是 PLN02605, 是一类包含多个结构域的模式。经与其他物种 MGD 家族同源蛋白进行多序列比对 (图 4), 该基因存在 1 个 MGD 家族特有的保守结构域 (图 4 红框所示), 说明该基因属于陆地棉 MGD 家族成

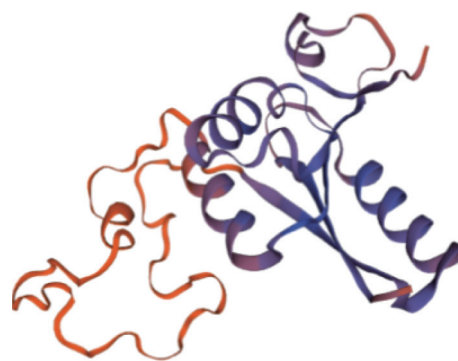


图 3 *GhMGD3* 蛋白的三级结构预测分析结果

Figure 3 Predicted three-dimension structure of *GhMGD3* protein

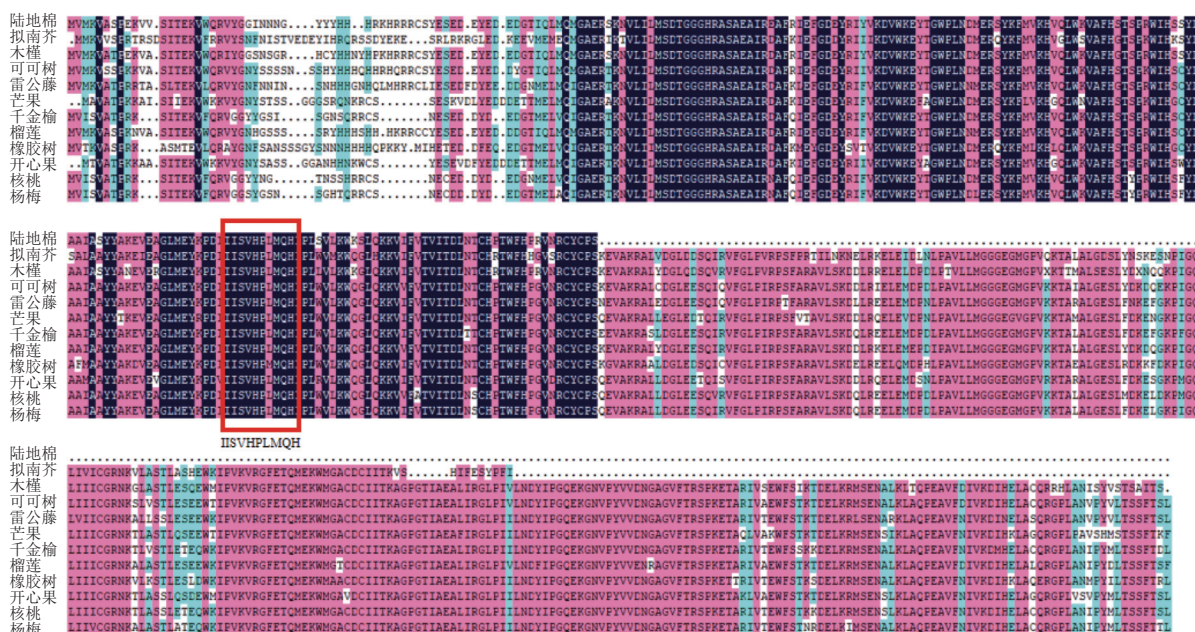


图 4 *GhMGD3* 与其他物种 MGD 家族同源蛋白的多序列比对分析结果

Figure 4 Multi-alignment of *GhMGD3* amino acid sequence with other MGD family in different plants

员。在 NCBI 数据库利用 BLASTp 检索氨基酸序列的同源序列, 下载了 11 条不同物种的蛋白序列: 雷公藤 *Tripterygium wilfordii*、拟南芥、可可树 *Theobroma cacao*、芒果 *Mangifera indica*、千金榆 *Carpinus fangiana*、木槿 *Hibiscus syriacus*、榴莲 *Durio zibethinues*、核桃 *Juglans regia*、橡胶树 *Hevea brasiliensis*、开心果 *Pistacia vera*、杨梅 *Morella rubra*。通过软件 MEGA5 构建系统进化树 (图 5), 棉花蛋白序列与木槿亲缘关系最近, 其次是榴莲、可可树, 与其余物种的亲缘关系较远。

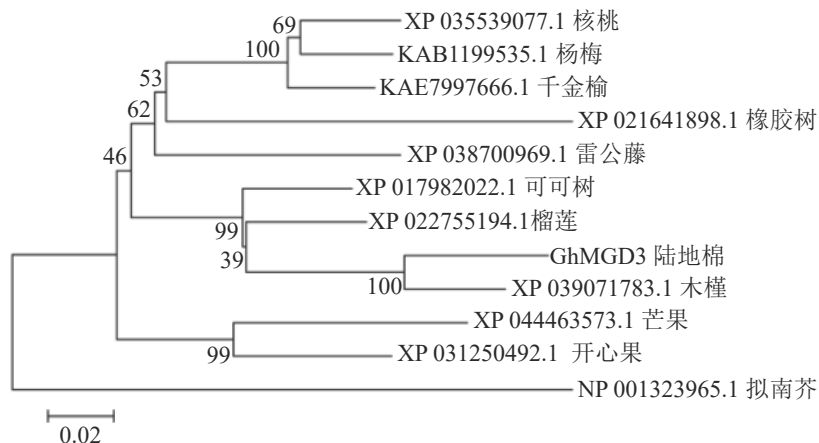


图 5 *GhMGD3* 基因系统进化树分析

Figure 5 *GhMGD3* Phylogenetic tree analysis

2.5 半定量 RT-PCR 分析与低磷胁迫处理下的基因相对表达量分析

以棉花的 *GhACTIN* 为内参基因, 通过半定量 RT-PCR 技术对 *GhMGD3* 基因在‘新陆早 19’的 4 个组织中的表达情况进行分析。从图 6 可知: 该基因高表达于根, 微量表达于叶和花, 中量表达于茎。利用 qPCR 检测 *GhMGD3* 基因在陆地棉‘新陆早 19’植株的根、茎、叶、花等 4 个组织中的表达结果 (图 7A) 同半定量 RT-PCR 一致。由图 7B 可以看出: 在低磷胁迫下 4~24 h, 表达量逐渐下调, 但是与适磷处理相比, 其表达量都相对较高, 且在低磷处理 72 h 时表达量达到最高, 其中 12 和 72 h 时低磷处理比适磷处理显著表达 ($P < 0.05$), 说明该基因在受到低磷胁迫的刺激后, 能够对低磷胁迫作出应答反应。

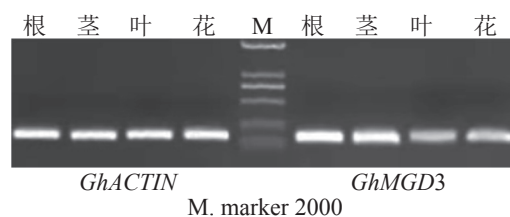
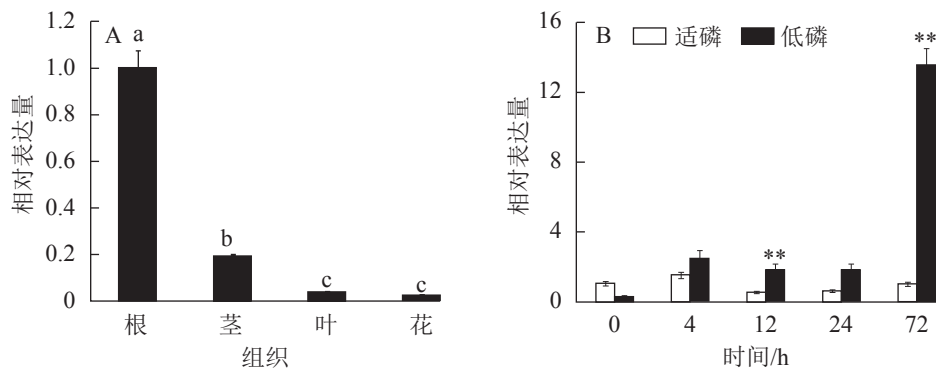


图 6 半定量 RT-PCR 分析 *GhMGD3* 在棉花不同组织中的表达

Figure 6 Expression of *GhMGD3* in different tissues of cotton by semi-quantitative RT-PCR



A 图不同字母表示不同组织差异显著 ($P < 0.05$); B 图**表示与适磷处理相比差异显著 ($P < 0.05$)

图 7 *GhMGD3* 基因在不同组织 (A) 及低磷胁迫处理下 (B) 的表达模式

Figure 7 Expression analysis of *GhMGD3* in different tissues (A) and low phosphorus stress (B)

3 讨论与结论

大部分脂质由非磷且不带电荷的半乳糖甘油酯类单半乳糖基二酰基甘油 (MGDG) 和二半乳糖基二酰

基甘油 (DGDG) 组成, 它们占总脂质的 80%。单半乳糖基二酰基甘油是质体的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。因此, MGDG 的合成对植物至关重要。大部分 MGDG 是由位于质体膜上的 MGDG 合酶合成的^[21]。尽管植物组织中磷含量之间的平衡可能对植物生长很重要, 但细节仍然未知。

拟南芥 *mgd3* 和 *mgd2mgd3* 突变体在磷胁迫下植物会出现严重的生长迟缓和 DGDG 含量降低, 清楚地表明 MGD3 介导的 MGDG 合成在磷稀缺时对生存具有重要作用^[22]。史中惠等^[23]将 *OsMGD* 基因转入烟草 *Nicotiana tabacum* 植株得到了超表达 *OsMGD* 基因烟草植株, 通过低磷胁迫下各生理生化指标变化情况的分析表明: 该基因可以提高磷脂与半乳糖脂的含量, 进一步增强植株耐低磷的特性。MGDG 仅存在于质体中, 但 DGDG 可以存在于非质体膜中, 在特定条件下, 例如磷胁迫下, 它可以替代磷脂^[24]。半乳糖脂被认为在种子萌发过程中原层体向类囊体膜的光依赖性转化以及响应光变化的高度堆叠的颗粒膜和光合机制的动态组织中发挥重要作用^[25]。MGDG 和 DGDG 还可以稳定叶绿体中的光系统蛋白复合物^[26-27]。在磷胁迫的条件下, 植物激活体内相关的机制, 以应对细胞对环境条件变化的需求。

本研究所得基因序列与拟南芥中的 MGD 家族中的单半乳糖基二酰基甘油合酶同源性较高, 从陆地棉 ‘新陆早 19’ 中克隆得到了 1 个 MGD3 类似基因, 并将其命名为 *GhMGD3*, 该基因属于 MGD 超家族成员。该基因存在 3 个内含子, *GhMGD3* 蛋白相对分子质量为 26 610.54 Da, 等电点为 8.74, 是碱性蛋白, 具备稳定性与亲水性。此蛋白的二级结构由 α -螺旋和无规则卷曲占据主体地位所组成, 通过同源建模可知该基因三级结构预测其结构与拟南芥半乳糖脂合酶 MGD1 结构相似。该基因编码蛋白不存在信号肽和跨膜结构域。该蛋白不存在潜在的 N-糖基化位点, 但含有多个酸化位点。亚细胞定位结果显示该基因编码蛋白在叶绿体中, 预测其能够通过蛋白质的相互作用参与调控。基因表达分析结果表明: 该基因在棉花根中的表达量是最大的, 中量表达于茎, 微量表达于叶和花, 在低磷胁迫 72 h 时其相对表达量达到最高值。*GhMGD3* 基因可能在根系发挥作用, 在棉花的磷高效利用信号调控过程中具有重要的作用。

4 参考文献

- [1] LYNCH J P. Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: tools for future crops [J]. *Plant Physiol*, 2011, **156**(3): 1041 – 1049.
- [2] 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]. *Plant J Cell Mol Biol*, 2010, **57**(2): 322 – 331.
- [3] SHIMOJIMA M, MADOKA Y, FUJIWARA R, *et al.* An engineered lipid remodeling system using a galactolipid synthase promoter during phosphate starvation enhances oil accumulation in plants [J/OL]. *Front Plant Sci*, 2015, **6**: 664 [2022-01-15]. doi: 10.3389/fpls.2015.00664.
- [4] KOBAYASHI K, AWAI K, TAKAMIYA K, *et al.* *Arabidopsis* type B monogalactosyldiacylglycerol synthase genes are expressed during pollen tube growth and induced by phosphate starvation [J]. *Plant Physiol*, 2004, **134**(2): 640 – 648.
- [5] 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]. *Proc Nat Acad Sci*, 2001, **98**(19): 10960 – 10965.
- [6] YUZAWA Y, NISHIHARA H, HARAGUCHI T, *et al.* Phylogeny of galactolipid synthase homologs together with their enzymatic analyses revealed a possible origin and divergence time for photosynthetic membrane biogenesis [J]. *DNA Res*, 2012, **19**(1): 91 – 102.
- [7] KOBAYASHI K, NAKAMURA Y, OHTA H. Type A and type B monogalactosyldiacylglycerol synthases are spatially and functionally separated in the plastids of higher plants [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2009, **47**(6): 518 – 525.
- [8] 王桂峰, 张杰, 王安琪. 全国棉花生产格局时景下山东省棉花生产保护区支撑体系构建 [J]. *山东农业科学*, 2020, **52**(5): 130 – 135.

WANG Guifeng, ZHANG Jie, WANG Anqi. Construction of support system of cotton production reserve in Shandong

- Province under the background of national cotton production pattern [J]. *Shandong Agric Sci*, 2020, **52**(5): 130 – 135.
- [9] 卢秀茹, 贾肖月, 牛佳慧. 中国棉花产业发展现状及展望[J]. *中国农业科学*, 2018, **51**(1): 26 – 36.
LU Xiuru, JIA Xiaoyue, NIU Jiahui. Development status and prospect of China's cotton industry [J]. *China Agric Sci*, 2018, **51**(1): 26 – 36.
- [10] 毛玮, 曹跃芬. 棉纤维发育的遗传特性及相关基因的研究进展[J]. *浙江农林大学学报*, 2018, **35**(6): 1155 – 1165.
MAO Wei, CAO Yuefen. Genetic characteristics and research advances of genes related to cotton fiber developments [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2018, **35**(6): 1155 – 1165.
- [11] JIN Longguo, LIU Jinyuan. Molecular cloning, expression profile and promoter analysis of a novel ethylene responsive transcription factor gene *GhERF4* from cotton (*Gossypium hirsutum*) [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2008, **46**(1): 46 – 53.
- [12] 蒋柏藩. 石灰性土壤无机有效性的研究[J]. *土壤*, 1992, **24**(2): 61 – 64.
JIANG Baifan. Study on inorganic availability of calcareous soil [J]. *Soils*, 1992, **24**(2): 61 – 64.
- [13] 马星竹, 周宝库, 郝小雨, 等. 小麦—大豆—玉米轮作体系长期不同施肥黑土磷素平衡及有效性[J]. *植物营养与肥料学报*, 2018, **24**(6): 1672 – 1678.
MA Xingzhu, ZHOU Baoku, HAO Xiaoyu, *et al.* Phosphorus balance and availability of black soil under long-term different fertilization in wheat soybean maize rotation system [J]. *J Plant Nutr Fert*, 2018, **24**(6): 1672 – 1678.
- [14] 付明鑫, 向敏超, 孟凤轩, 等. 阿克苏棉区不同氮磷钾配比对棉花产量的影响[J]. *西北农业学报*, 2000, **9**(2): 117 – 120.
FU Mingxin, XIANG Minchao, MENG Fengxuan, *et al.* Effects of nitrogen, phosphorus and potassium ratios on cotton yield in aksu cotton region [J]. *Acta Agric Boreali-Occident Sin*, 2000, **9**(2): 117 – 120.
- [15] 周建菲, 史文辉, 潘凯婷, 等. 低磷胁迫对毛竹幼苗生长和养分生理的影响[J]. *浙江农林大学学报*, 2022, **39**(5): 1010 – 1017.
ZHOU Jianfei, SHI Wenhui, PAN Kaiting, *et al.* Effect of low phosphorus stress on growth and nutrient physiology of *Phyllostachys edulis* seedlings [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2022, **39**(5): 1010 – 1017.
- [16] 陈可可, 黄莉娟, 王普昶, 等. 2种雀稗属牧草对低磷胁迫的生长、生理应激响应[J]. *核农学报*, 2021, **35**(8): 1908 – 1915.
CHEN Keke, HUANG Lijuan, WANG Puchang, *et al.* Growth and physiological responses of two species of *Paspalum forage* to low phosphorus stress [J]. *J Nucl Agric Sci*, 2021, **35**(8): 1908 – 1915.
- [17] 张学昕, 刘淑英, 王平. 施磷量对棉花磷素吸收利用和产量的影响[J]. *农业科技与信息*, 2019(10): 36 – 41.
ZHANG Xuexin, LIU Shuying, WANG Ping. Effects of phosphorus application rate on phosphorus uptake, utilization and yield of cotton [J]. *Agric Sci Technol Inf*, 2019(10): 36 – 41.
- [18] 王刚, 郑苍松, 李鹏程, 等. 土壤有效磷含量对棉花幼苗干物质积累和碳氮代谢的影响[J]. *棉花学报*, 2016, **28**(6): 609 – 618.
WANG Gang, ZHENG Cangsong, LI Pengcheng, *et al.* Effects of soil available phosphorus content on dry matter accumulation and carbon and nitrogen metabolism of cotton seedlings [J]. *Cotton J*, 2016, **28**(6): 609 – 618.
- [19] 刘耘华, 卢响军, 陈波浪, 等. 施用有机肥对棉田土壤磷素有效性及棉花产量的影响[J]. *新疆农业科学*, 2013, **50**(4): 667 – 673.
LIU Genhua, LU Xiangjun, CHEN Bolang, *et al.* Effects of organic fertilizer application on soil phosphorus availability and cotton yield in cotton field [J]. *Xinjiang Agric Sci*, 2013, **50**(4): 667 – 673.
- [20] 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 Min, SHENG Jiandong, Baidengsha Maimaitierli, *et al.* Responses of root morphology and phosphatase activity to phosphorus supply in cotton with different phosphorus efficiencies [J]. *Cotton Sci*, 2017, **29**(3): 283 – 291.
- [21] TRIPATHI S, SRIVASTAVA Y, SANGWAN R S, *et al.* In silico mining and functional analysis of *AP2/ERF* gene in *Withania somnifera* [J]. *Sci Rep*, 2020, **10**(1): 1 – 12.
- [22] MURAKAWA M, SHIMOJIMA M, SHIMOMURA Y, *et al.* Monogalactosyldiacylglycerol synthesis in the outer envelope membrane of chloroplasts is required for enhanced growth under sucrose supplementation[J/OL]. *Front Plant Sci*, 2014, **5**: 280[2022-01-20]. doi: 10.3389/fpls.2014.00280.
- [23] 史中惠, 王仕稳, 殷俐娜, 等. 超表达水稻 *MGD* 基因 (*OsMGD*) 烟草植株的耐低磷胁迫能力[J]. *西北农林科技大学学*

- 报 (自然科学版), 2013, **41**(10): 97 – 104.
- SHI Zhonghui, WANG Shiwen, YIN Li'na, *et al.* Overexpression of rice *MGD* gene (*OsMGD*) in tobacco plants tolerant to low phosphorus stress [J]. *J Northwest A&F Univ Nat Sci Ed*, 2013, **41**(10): 97 – 104.
- [24] ANDERSSON M X, LARSSON K E, TJELLSTRM H, *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]. *J Biol Chem*, 2005, **280**(30): 27578 – 27586.
- [25] FUJII S, KOBAYASHI K, NAGATA N, *et al.* Monogalactosyldiacylglycerol facilitates synthesis of photoactive protochlorophyllide in etioplasts [J]. *Plant Physiol*, 2017, **174**(4): 2183 – 2198.
- [26] KOBAYASHI, KOICHI. Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development [J]. *J Plant Res*, 2016, **129**(4): 565 – 580.
- [27] MIZUSAWA N, WADA H. The role of lipids in photosystem II [J]. *Biochim Biophysic Acta Bioenerg*, 2012, **1817**(1): 194 – 208.