

陆地棉低磷胁迫应答基因 *GhGDPD1* 的克隆与表达分析

孟超敏^{1,2}, 耿菲菲^{1,2}, 卿桂霞^{1,2}, 张富厚^{1,2}, 李雪林^{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‘新陆早 19’ *Gossypium hirsutum* ‘Xinluzao 19’ 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】克隆陆地棉‘新陆早 19’ *GhGDPD1* 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 *GhGDPD1* 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) 的方法检测该基因于根、茎、叶、花等 4 个组织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 *GhGDPD1* 基因, 开放阅读框序列长度为 1 149 bp, 共编码 382 个氨基酸, 属于 GDPD 家族, 其中存在一个保守结构域, 名为 GDPD_GDE5_like_1_plant。半定量 RT-PCR 和 RT-qPCR 试验结果均显示: *GhGDPD1* 基因主要表达于根, 中量表达于花和茎, 微量表达于叶。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, 胁迫 4 h 相对表达量达到最高值。【结论】首次成功克隆到陆地棉‘新陆早 19’ *GhGDPD1* 基因, 获得了 *GhGDPD1* 基因的组织表达以及低磷胁迫下的表达模式, 为深入解析棉花 *GhGDPD1* 基因的生物学功能以及培育棉花磷高效利用新种质提供科学参考。图 7 表 1 参 18

关键词: 陆地棉; 低磷胁迫; 基因克隆; 生物信息学分析; 表达分析

中图分类号: S330; Q781

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2023)04-0723-08

Cloning and expression analysis of low phosphorus stress response gene *GhGDPD1* in *Gossypium hirsutum*

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

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

Abstract: [Objective] Based on the analysis of differential expression sequence data of genome-wide expression profile of *Gossypium hirsutum* ‘Xinluzao 19’ seedlings under low phosphorus stress in our previous research, this study aims to explore the related genes, and to clone and analyze their expression, so as to provide a scientific reference for further research on the biological functions of *GhGDPD1* gene and the cultivation of new cotton germplasm with the efficient utilization of phosphorus. [Method] *GhGDPD1* gene was cloned from ‘Xinluzao 19’. Genomic DNA and cDNA sequence of the gene were performed, and the genetic structure and evolutionary relationship of *GhGDPD1* were 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, as well as the expression pattern under low phosphorus stress. [Result] The *GhGDPD1* gene was cloned, with an open reading frame sequence length of 1 149 bp, encoding

收稿日期: 2022-09-28; 修回日期: 2023-03-22

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

382 amino acids. This gene sequence belonged to the GDPD family, with a conservative structure domain named GDPD_GDE5_like_1_plant. Semi-quantitative RT-PCR and RT-qPCR showed that *GhGDPD1* gene was mainly expressed in roots, moderately expressed in flowers and stems, and slightly expressed in leaves. After being stimulated by low phosphorus stress, the gene would immediately respond to low phosphorus stress and its expression level reached the highest value after 4 hours of stress. [Conclusion] The *GhGDPD1* gene of ‘Xinluzao 19’ is successfully cloned for the first time. The tissue expression of *GhGDPD1* and its expression pattern under low phosphorus stress are obtained. [Ch, 7 fig. 1 tab. 18 ref.]

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

磷(P)是植物生长发育所必需的大量营养元素,对细胞组成、能量生成、新陈代谢和信号转导等关键细胞功能都具有重要作用^[1]。由于土壤中磷的质量分数及流动性非常低,无机磷成为全球作物生产力的常见限制因素^[2],缺磷是作物生产力损失的主要原因之一,因此,提高磷素利用效率对可持续粮食生产至关重要。为了提高磷的利用率,植物通过复杂的反应体系以改善从环境中获取磷素的途径,并在植物内循环中加以利用^[3]。单纯地增加磷的吸收只能使磷从环境中输出,因此提高磷从衰老器官向幼嫩器官和发育器官的再利用效率是提高作物磷素利用效率的一个重要发展方向^[4]。在许多植物中,磷脂降解是磷再活化的主要驱动因素^[5]。

甘油磷酸二酯磷酸二酯酶(GDPD)将甘油磷酸二酯水解为甘油-3-磷酸和相应的醇,是甘油磷酸二酯代谢途径中的重要成员。这类基因被认为在磷酸盐稳态中发挥重要作用^[6]。在原核生物和真核生物中都存在GDPD,它在各种生理过程中都发挥着重要作用^[7],因此该蛋白具有生化和生物功能多样性。在哺乳动物中,GDPD与G蛋白信号转导、磷酸肌醇代谢、渗透保护、运动神经元分化、细胞骨架组织、成骨细胞分化和成肌分化有关^[8]。第1个GDPD编码基因在大肠埃希菌 *Escherichia coli* 中被鉴定,它积极参与甘油和甘油-3-磷酸的摄取和代谢,因此在碳水化合物代谢和磷脂生物合成中发挥重要作用^[9]。有关植物中GDPD的内容相对较少^[10]。GDPD首先在磷饥饿胡萝卜 *Daucus carota* var. *sativa*、美国梧桐 *Platanus occidentalis* 和拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 细胞悬浮培养物的液泡和细胞壁中被发现^[10-11]。细胞膜以磷脂的形式占细胞有机磷的三分之一,因此,在缺磷条件下从膜磷脂中再活化磷可以成为提高磷利用效率的重要策略^[12]。

中国的棉花 *Gossypium* 栽种始于宋元时期,通过引进新的品种打开了一种区域化、大面积的棉花种植模式^[13],此后不断引入种质资源、培育棉花品种,逐步改善了棉花的纤维品质,提高了中国棉花的生产率及效益。1978—2019年中国棉花种植面积逐年减少,中国农业部要求致力提高单产、品质,增加效益^[14]。因此必须不断优化棉花品种,提升棉花品质,而缺磷是作物生产力损失的主要原因之一。本研究以陆地棉‘新陆早19’ *Gossypium hirsutum* ‘Xinluzao 19’为试验材料,克隆了 *GhGDPD1* 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 *GhGDPD1* 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

采用前期研究筛选出的磷高效陆地棉品种‘新陆早19’为试验材料,在河南科技大学农学院(34°59'N, 112°42'E)进行大田种植,选取长势一致的‘新陆早19’植株采集根、茎、叶、花组织,用于分析 *GhGDPD1* 基因在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14h、黑暗10h)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),磷源为磷酸二氢钾(KH₂PO₄)。为保证K⁺的浓度一致,以1.0 mmol·L⁻¹为标准,低磷营养液中以氯化钾(KCl)补齐K⁺,其

他营养成分含有 $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KNO}_3$ 、 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $1.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_3\text{BO}_3$ 、 $0.5 \times 10^{-5} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} (\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{EDTA-FeNa}^{[15]}$ 。分别处理 0、4、12、24、72 h 后，选取 3 株生长一致的‘新陆早 19’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，使 pH 保持在 6.5 左右，每 3 d 更换 1 次营养液。

1.2 方法

1.2.1 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，在美国国家生物技术信息中心 (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 (conting)，将所得序列继续检索与拼接直至没有新的相似序列出现，所得即为结果序列重叠群，利用 ORFfinder 在线平台查找开放阅读框，进行目标基因 *GhGDPD1* 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 软件设计引物，由生工生物工程有限公司合成 (表 1)。

表 1 试验所用引物信息

Table 1 Primers used in the study

引物	引物序列(5'→3')	引物	引物序列(5'→3')
Sense primer	ATTTTTCCTCTCTTACTCTATCCC	<i>GhActin</i> -F	ATCCTCCGTCTTGACCTTG
Anti-sense primer	GTAGGGACAAGTTAGTGGTGTATCA	<i>GhActin</i> -R	TGTCGGTCAGGCAACTCAT
通用引物M13F	TGTA AACGACGCGCCAGT	<i>GhGDPD1</i> -F	TTCTCTGTCTCTCTACTCGTCTCGT
通用引物M13R	CAGGAAACAGCTATGACC	<i>GhGDPD1</i> -R	TCTATGCCCTATTACCAAAAACCTC

1.2.2 基因组 DNA 克隆与测序 取液氮速冻整株‘新陆早 19’植株在研钵中迅速研磨成粉末转移至离心管，利用 CTAB 法提取‘新陆早 19’的基因组 DNA，向其中添加 200 μL 的 TE 缓冲液溶解后置于 -20°C 下保存备用。

以‘新陆早 19’的基因组 DNA 为模板设计如下 PCR 扩增反应体系 (20.0 μL)。冰上操作：2 $\times$ M5 HiPer plus *Taq* HiFi PCR mix (with blue dye) 10.0 μL ，Sense primer ($10.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 μL ，Anti-sense primer ($10.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 μL ，Template DNA 0.5 μL ，Nuclease-free ddH₂O 8.5 μL 。反应程序为：95 $^\circ\text{C}$ 3 min；94 $^\circ\text{C}$ 25 s，55 $^\circ\text{C}$ 25 s，72 $^\circ\text{C}$ 50 s，35 个循环；72 $^\circ\text{C}$ 5 min； -4°C 低温保存。120 V，25 min，质量分数为 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 (5.0 μL)：M5 HiPer pTOPO-TA Vector 0.5 μL ，10 $\times$ Enhancer 0.5 μL ，纯化后的 PCR 产物 1.8 μL ，灭菌水 2.2 μL 。取 5.0 μL 连接产物转化 50.0 μL 大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 α 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 $^\circ\text{C}$ 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 (20.0 μL)：2 $\times$ M5 HiPer plus *Taq* HiFi PCR mix (with blue dye) 10.0 μL ，通用引物 M13F 0.5 μL ，通用引物 M13R 0.5 μL ，Template DNA 0.5 μL ，Nuclease-free ddH₂O 8.5 μL 。反应程序为：95 $^\circ\text{C}$ 3 min；94 $^\circ\text{C}$ 25 s，55 $^\circ\text{C}$ 25 s，72 $^\circ\text{C}$ 50 s，35 个循环；72 $^\circ\text{C}$ 5 min； -4°C 低温保存。检测符合后送至生工生物工程有限公司测序。

1.2.3 总 RNA 的提取及 cDNA 克隆与测序 取液氮速冻整株‘新陆早 19’植株在研钵中迅速充分研磨成粉末，后续步骤依照所用试剂盒说明书进行，150 V，15 min，质量分数为 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。参考试剂盒说明书完成 cDNA 的合成， -20°C 保存备用。

以‘新陆早 19’的 cDNA 为模板设计如下 PCR 扩增反应体系 (20.0 μL)。冰上操作：2 $\times$ M5 HiPer plus *Taq* HiFi PCR mix (with blue dye) 10.0 μL ，Sense primer ($10.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 μL ，Anti-sense primer ($10.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 μL ，cDNA 1.0 μL ，Nuclease-free ddH₂O 8.0 μL 。PCR 反应程序为：95 $^\circ\text{C}$ 3 min；94 $^\circ\text{C}$ 25 s，56 $^\circ\text{C}$ 25 s，72 $^\circ\text{C}$ 45 s，35 个循环；72 $^\circ\text{C}$ 5 min； -4°C 低温保存。120 V，25 min，质量分数为 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, 体系如下 (5.0 μL): M5 HiPer pTOPO-TA Vector 0.5 μL , 10 $\times$ Enhancer 0.5 μL , 纯化后的 PCR 产物 1.5 μL , 灭菌水 2.5 μL 。加入 50.0 μL 大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞转化, 挑菌进行菌液 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。

1.2.4 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。

1.2.5 半定量 RT-PCR 利用半定量 RT-PCR 技术, 分析 *GhGDPD1* 基因在根、茎、叶、花 4 个组织中的表达状况。以‘新陆早 19’各组织的 cDNA 为模板, *GhActin* 作内参基因, 所用引物见表 1。设计如下 PCR 扩增反应体系 (20.0 μL)。冰上操作: 2 $\times$ M5 HiPer plus *Taq* HiFi PCR mix (with blue dye) 10.0 μL , Sense primer (10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.5 μL , Anti-sense primer (10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.5 μL , cDNA 1.0 μL , Nuclease-free ddH $_2\text{O}$ 8.0 μL 。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 25 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 25 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; -4 $^{\circ}\text{C}$ 低温保存。120 V, 25 min, 质量分数为 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.6 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 采用 RT-qPCR 技术检测 *GhGDPD1* 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 $^{\circledR}$ 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。

2 结果与分析

2.1 低磷胁迫差异表达序列延伸

以实验室前期低磷胁迫差异表达序列为探针, 检索发现并下载了 10 条相似序列, 利用 DNASTAR 将所得序列全部拼接得到新的重叠群, 对新得到的序列再次进行检索, 在第 1 次检索序列的基础上又增加了 1 条新的序列, 将 11 条基因序列全部拼接, 得到了 1 个新的重叠群, 序列长度为 1 462 bp。

2.2 *GhGDPD1* 基因的克隆

根据得到的克隆重叠群, 横跨 *GhGDPD1* 基因的编码序列 (coding sequence, CDS) 区设计特异性引物, 以‘新陆早 19’植株的 DNA 和 cDNA 为模板, 克隆得到 *GhGDPD1* 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。获得的 DNA 序列大于 2 000 bp (图 1, 泳道 2), 与重叠群序列的一致性较高, 均大于 89%。获得 cDNA 序列 1 200 bp (图 1, 泳道 1), 与重叠群序列比对一致性为 99%。开放阅读框为长度为 1 149 bp, 共编码 382 个氨基酸。该编码区具有 GDPD_GDE5_like_1_plant 结构域, 因此 *GhGDPD1* 基因是 GDPD 家族成员。

2.3 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'非编码序列, 共有 5 个内含子, 6 个外显子 (图 2)。

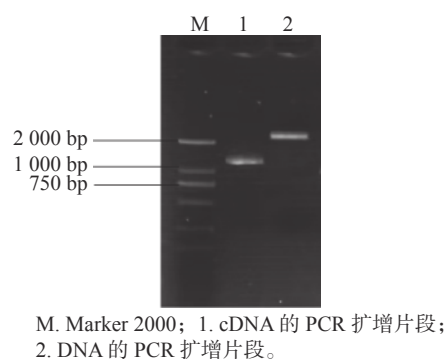


图 1 *GhGDPD1* 基因编码序列的克隆

Figure 1 Cloning of *GhGDPD1* CDS

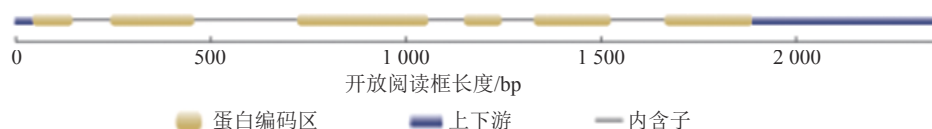


图 2 *GhGDPD1* 基因结构分析

Figure 2 *GhGDPD1* gene structure analysis

2.4 生物信息学分析

2.4.1 *GhGDPD1* 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:该基因共编码了 382 个氨基酸,所编码蛋白的分子式为 $C_{1930}H_{3030}N_{506}O_{580}S_{12}$,脂肪族氨基酸指数为 94.84,分子量为 42 987.05 Da,等电点为 5.17,属于酸性蛋白。其中亮氨酸的相对含量占比最大,为 10.2%,共 39 个。在该蛋白中带正电荷的氨基酸有 38 个,带负电荷的有 54 个。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-0.179,不稳定系数为 41.79,是亲水性不稳定蛋白。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 0,异亮氨酸疏水性最强,亲水指数为 4.500 0。

2.4.2 *GhGDPD1* 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 α -螺旋占 40.84%,包含 156 个氨基酸,其次是无规则卷曲占比为 38.22%,包含 146 个氨基酸。此外,此蛋白还含有延伸链(extended strand)和 β -转角(beta turn),其中延伸链占比较多,为 15.18%,有 58 个氨基酸, β -转角仅有 22 个氨基酸,占比为 5.76%,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,各结构在各个区间分布较为均匀。由于无规则卷曲占比较多,预测其结构比较复杂。

运用 TMHMM-2.0 分析发现:该基因所编码蛋白不含有跨膜结构域,属于非跨膜蛋白,382 个氨基酸均位于细胞膜表面,并未形成跨膜螺旋区。通过 SignalP-5.0 进行信号肽分析,可知:*GhGDPD1* 基因编码蛋白有信号肽的概率是 0.000 3,其他的可能性则高达 0.999 7。382 个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 Plant-mPLOC 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,预测定位在细胞膜(Cell membrane)。预测结果与跨膜结构预测分析结果相同,均为该蛋白位于膜外,推测该基因可能直接在细胞膜发挥作用。

2.4.3 *GhGDPD1* 基因编码蛋白的三级结构预测及功能位点预测 通过 SWISS-MODEL Interactive Workspace 进行同源建模,预测蛋白三级结构(图 3)。评价同源建模(QMEAN)结果为 0.57,全球性模型质量估测(GMQE)值为 0.44,预测其含有甘油磷酸二酯磷酸二酯酶,与腾冲嗜热菌 *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4 的甘油磷酸二酯磷酸二酯酶的晶体结构类似。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:*GhGDPD1* 基因编码蛋白能够预测到蛋白质的相互作用网络,因此预测 *GhGDPD1* 基因可能是通过多个蛋白互作进行调控。

N-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,可知该蛋白存在 3 个潜在的 N-糖基化位点(分别位于 7~10、21~24、116~119 氨基酸区段)。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 在线网站分析可知:此蛋白中占比最大的是丝氨酸和苏氨酸磷酸化位点。*GhGDPD* 蛋白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 基因氨基酸序列同源性比对及进化树分析 使用 NCBI 的保守结构域数据库(CDD-search)查找 *GhGDPD1* 氨基酸序列的保守结构域。分析结果显示:*GhGDPD1* 基因所编码蛋白含有 1 个特异匹配,为 GDPD_GDE5_like_1_plant,匹配所属的超家族是 PI-PLCc_GDPD_SF 基因家族。*GhGDPD1* 基因与其他物种的 GDPD1 氨基酸序列进行多重比对分析,同源性较高,物种间 GDPD 蛋白氨基酸长度基本一致,同源性达 84.12%(图 4)。

在 NCBI 数据库利用 BLASTp 检索氨基酸序列的同源序列,下载了榴莲 *Durio zibethinues*、木槿 *Hibiscus syriacus*、可可树 *Theobroma cacao*、哥伦比亚锦葵 *Herrania umbratica*、长蒴黄麻 *Corchorus olitorius*、麻疯树 *Jatropha curcas*、芒果 *Mangifera indica*、胡杨 *Populus euphratica*、开心果 *Pistacia vera*、白梨 *Pyrus bretschneideri*、金钱橘 *Citrus clementina* 等 11 条不同物种的蛋白序列。通过软件 MEGA 5 构建系统进化树(图 5),‘新陆早 19’蛋白序列与木槿的亲缘关系最近,其次与可可树、哥伦比亚锦葵、

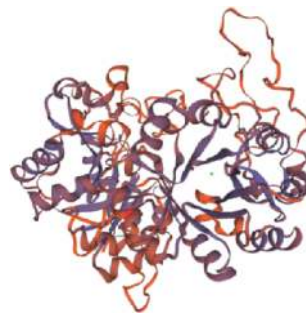


图 3 *GhGDPD1* 蛋白的三级结构预测分析结果

Figure 3 Predicted three-dimension structure of *GhGDPD1* protein

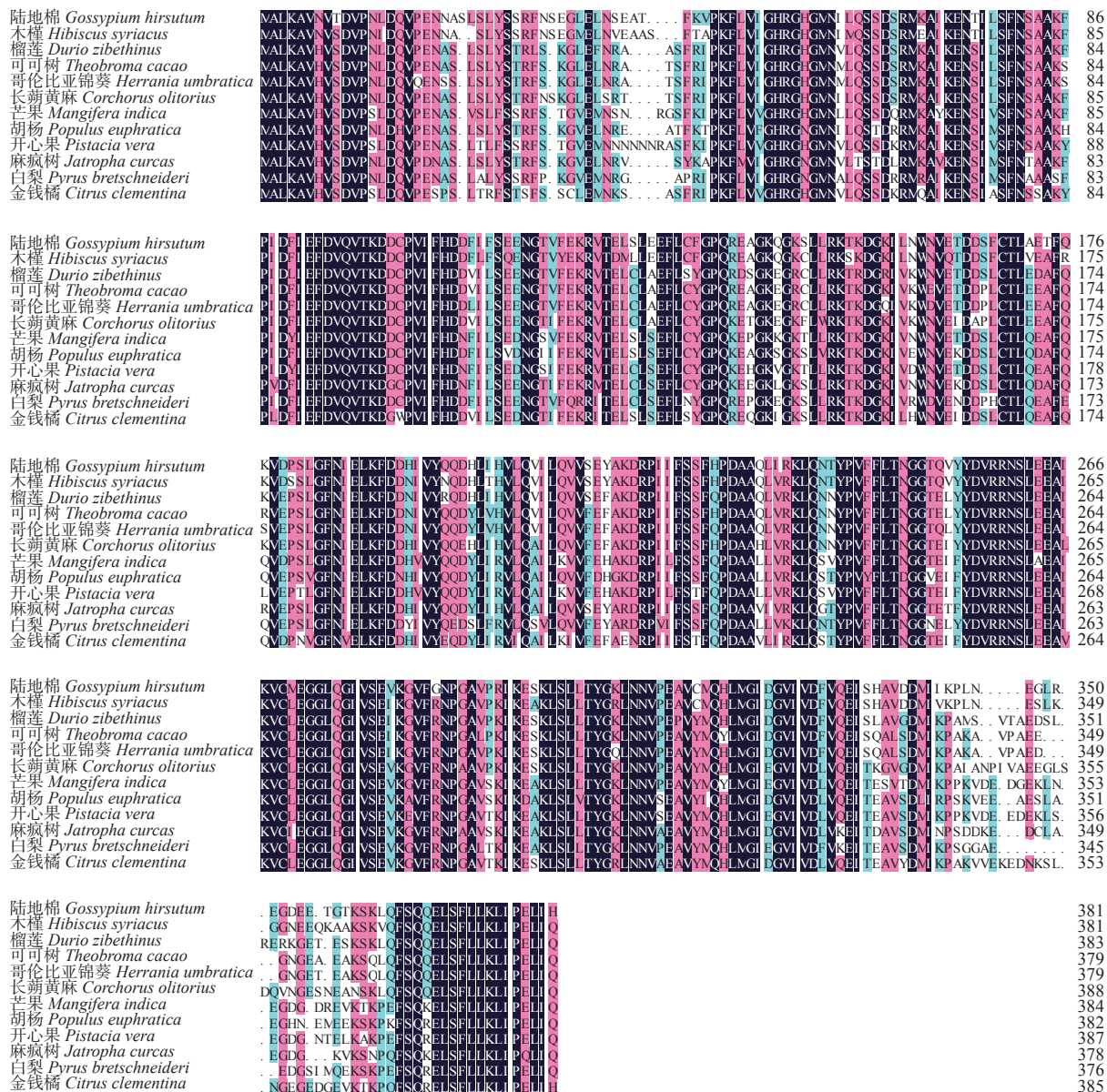


图4 GhGDPD1与其他物种GDPD家族同源蛋白的多序列比对分析结果

Figure 4 Multi-alignment of GhGDPD1 amino acid sequence with other GDPD family in different plants

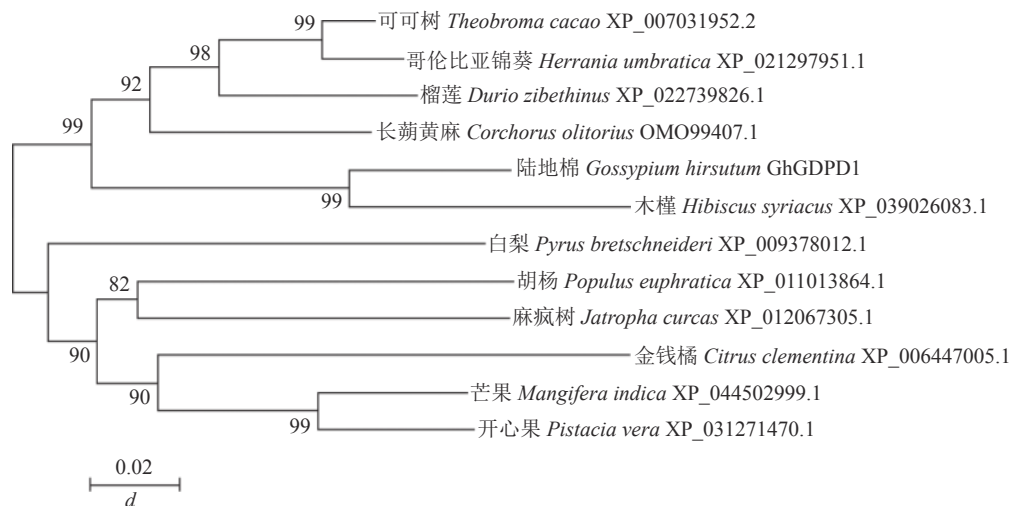


图5 GhGDPD1蛋白系统进化树分析

Figure 5 GhGDPD1 phylogenetic tree analysis

榴莲、长蒴黄麻的亲缘关系较近，与其余 6 种物种的亲缘关系较远，不在一个大支上。

2.5 半定量 RT-PCR 分析

以棉花的 *GhActin* 为内参基因，通过半定量 RT-PCR 技术对 *GhGDPD1* 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：*GhGDPD1* 高表达于根，微量表达于叶，中量表达于茎和花。利用 RT-qPCR 检测 *GhGDPD1* 基因在‘新陆早 19’植株的根、茎、叶、花 4 个组织中的表达结果 (图 7A)，

结果与半定量 RT-PCR 分析一致。由图 7B 可以看出：在低磷处理 4~24 h 时相对表达量逐渐下降，但相对表达量均比适磷情况下高，在 72 h 时其相对表达量又上升，仅略低于 4 h 时的相对表达量。其中，4、12、72 h 时低磷处理比适磷处理显著表达 ($P < 0.05$)，说明 *GhGDPD1* 基因在受到低磷胁迫刺激后，会立即对低磷胁迫做出应答，且具有持续性。

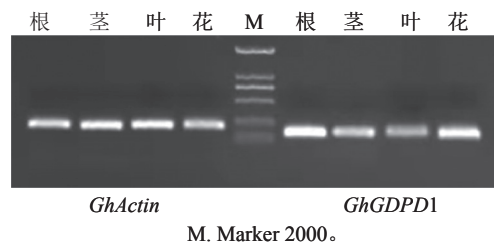
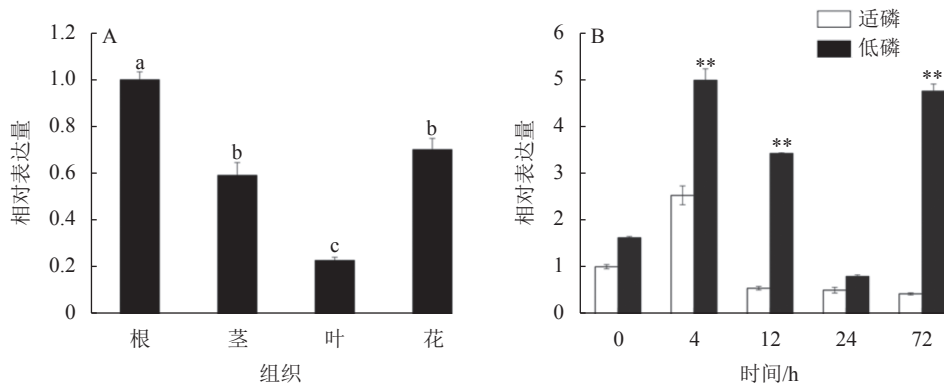


图 6 半定量 RT-PCR 分析 *GhGDPD1* 在棉花不同组织中的表达

Figure 6 Expression of *GhGDPD1* in different tissues of cotton by semi-quantitative RT-PCR results



不同小写字母表示组织间的差异显著 ($P < 0.05$); **表示与适磷相比存在显著差异 ($P < 0.05$)。

图 7 *GhGDPD1* 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 *GhGDPD1* in different tissues (A) and low phosphorus stress (B)

3 讨论与结论

磷是植物最重要的必需营养素之一，因为它是核酸、核苷酸和磷脂等关键大分子的组成部分，并且以磷酸盐或磷酸酯的形式参与新陈代谢和蛋白质调节。但磷的特性也导致植物对磷肥的低效利用。施加的磷肥只有 15%~25% 被植物吸收，其余的则渗入环境，造成土壤退化和水体富营养化等有害后果^[16]。GDPD 已被鉴定为拟南芥中的多基因家族^[17]。所有已鉴定的拟南芥 GDPD 被分为 2 组：具有 1 个 GDPD 结构域的 A 型 GDPD 和具有 2 个推定的 GDPD 结构域的 B 型 GDPD。其中 B 型 GDPD 具有植物特异性，磷酸二酯酶活性相对较低。据报道，GDPD 基因能水解甘油磷酸二酯，并在磷饥饿时显著诱导，表明它们在低磷胁迫中存在潜在作用^[18]。

本研究以陆地棉‘新陆早 19’植株的 cDNA 为模板克隆到 1 个 *GDPD1* 基因。该基因序列开放阅读框的长度为 1 149 bp，共编码 382 个氨基酸；该基因的结构比较复杂，有 5 个内含子，1 个 GDPD_GDE5_like_1_plant 结构域，命名为 *GhGDPD1*。生物信息学分析结果显示：*GhGDPD1* 蛋白相对分子质量是 42 987.05 Da，理论等电点为 5.17，是酸性蛋白，具备不稳定性与亲水性。*GhGDPD1* 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：*GhGDPD1* 基因三级结构预测其含有甘油磷酸二酯磷酸二酯酶。*GhGDPD1* 基因编码蛋白不存在信号肽和跨膜结构域。*GhGDPD1* 蛋白存在 3 个潜在的 N-糖基化位点和多个酸化位点。亚细胞定位结果显示：*GhGDPD1* 基因编码蛋白在细胞膜中，预测其能够通过蛋白质的相互作用参与调控。RT-qPCR 与半定量 RT-PCR 结果表明：*GhGDPD1* 基因在‘新陆早 19’根中的表达量最大，在叶片中表达量最小，中量表达于花和茎。在受到低磷胁迫的刺激后，*GhGDPD1* 基因会立即对低磷胁迫做出应答。*GhGDPD1* 基因可能在根系发挥作用，在‘新陆早 19’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] DISSANAYAKA D M S B, PLAXTON W C, LAMBERS H, *et al.* Molecular mechanisms underpinning phosphorus-use efficiency in rice [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2018, **41**(7): 1483 – 1496.
- [2] HINSINGER P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review [J]. *Plant and Soil*, 2001, **237**(2): 173 – 195.
- [3] KYLA S, WILLIAM P. Molecular mechanisms of phosphorus metabolism and transport during leaf senescence [J]. *Plants*, 2015, **4**(4): 773 – 798.
- [4] VENEKLAAS E J, LAMBERS H, BRAGG J, *et al.* Opportunities for improving phosphorus-use efficiency in crop plants [J]. *New Phytologist*, 2012, **195**(2): 306 – 320.
- [5] PLAXTON W, TRAN H T. Metabolic adaptations of phosphate-starved plants [J]. *Plant Physiology*, 2011, **156**(3): 1006 – 1015.
- [6] MEHRA P, GIRI J. Rice and chickpea *GDPDs* are preferentially influenced by low phosphate and *CaGDPD1* encodes an active glycerophosphodiester phosphodiesterase enzyme [J]. *Plant Cell Reports*, 2016, **35**(8): 1699 – 1717.
- [7] ZHENG Bin, CHEN Dan, FARQUHAR M G. MIR16, a putative membrane glycerophosphodiester phosphodiesterase, interacts with RGS16 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, **97**(8): 3999 – 4004.
- [8] CORDA D, MOSCA M G, OHSHIMA N, *et al.* The emerging physiological roles of the glycerophosphodiesterase family [J]. *The FEBS Journal*, 2014, **281**(4): 998 – 1016.
- [9] LEMIEUX M J, HUANG Yafei, WANG Daneng. Glycerol-3-phosphate transporter of *Escherichia coli*: structure, function and regulation [J]. *Research in Microbiology*, 2004, **155**(8): 623 – 629.
- [10] 王欣. 拟南芥 *AtGDPD5* 基因在低磷环境下功能的研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2011.
WANG Xin. *Studies on the Function of Arabidopsis AtGDPD5 Gene in Low Phosphorus Environment* [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2011.
- [11] van der REST B, BOISSON A M, GOUT E, *et al.* Glycerophosphocholine metabolism in higher plant cells. evidence of a new glyceryl-phosphodiester phosphodiesterase [J]. *Plant Physiology*, 2002, **130**(1): 244 – 255.
- [12] MEHRA P, PANDEY B K, VERMA L, *et al.* A novel glycerophosphodiester phosphodiesterase improves phosphate deficiency tolerance in rice [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2019, **42**(4): 1167 – 1179.
- [13] 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 for cotton production protection reserve in Shandong Province under national cotton production pattern [J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2020, **52**(5): 130 – 135.
- [14] 王桂峰, 徐勤青, 王安琪. 近二十年全国及山东植棉变化与山东省棉花生产保护区支撑体系构建思考 [J]. *棉花科学*, 2020, **42**(1): 3 – 13.
WANG Guifeng, XU Qinqing, WANG Anqi. Changes of cotton planting in China and Shandong Province in recent 20 years and the construction of supporting system of cotton production protection area in Shandong Province [J]. *Cotton Sciences*, 2020, **42**(1): 3 – 13.
- [15] 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 Maimaitiaili, *et al.* Response of root morphology and phosphatase activity of cotton to phosphorus supply [J]. *Cotton Science*, 2017, **29**(3): 283 – 291.
- [16] PAZ-ARES J, PUGA M I, ROJAS-TRIANA M, *et al.* Plant adaptation to low phosphorus availability: core signaling, crosstalks, and applied implications [J]. *Molecular Plant*, 2022, **15**(1): 104 – 124.
- [17] CHENG Yuxiang, ZHOU Wenbin, SHEERY N I E, *et al.* Characterization of the *Arabidopsis* glycerophosphodiester phosphodiesterase (GDPD) family reveals a role of the plastid-localized *AtGDPD1* in maintaining cellular phosphate homeostasis under phosphate starvation [J]. *The Plant Journal*, 2011, **66**(5): 781 – 795.
- [18] CHENG Lingyun, BUCCIARELLI B, LIU Junqi, *et al.* White lupin cluster root acclimation to phosphorus deficiency and root hair development involve unique glycerophosphodiester phosphodiesterases [J]. *Plant Physiology*, 2011, **156**(3): 1131 – 1148.