

基于表达谱分析陆地棉 *DUF642* 基因家族抗逆功能

解美霞, 杨君*, 王国宁, 李志坤, 张艳, 孟成生, 马峙英, 王省芬*

(教育部华北作物种质资源研究与利用重点实验室 / 河北省棉花产业协同创新中心 /

河北省作物种质资源重点实验室 / 河北农业大学农学院, 河北 保定 071001)

摘要:【目的】*DUF642* (Domain of unknown function 642 genes) 是 1 个未知功能基因家族, 在植物逆境胁迫响应中发挥重要作用。本研究旨在分析其在棉花抗逆反应中的功能。【方法】基于陆地棉基因组数据, 系统地鉴定 *DUF642* 基因家族。利用生物信息学方法分析基因结构、理化性质、亚细胞定位、亲缘关系、启动子顺式作用元件等。应用转录组数据和实时定量聚合酶链式反应技术分析该家族基因在不同组织和多种逆境(冷、热、干旱、盐和黄萎病菌)胁迫下的表达规律。【结果】陆地棉基因组中包含 23 个 *DUF642* 基因, 分布于 14 条染色体和 1 条 Scaffold; 编码的蛋白含有 1~2 个保守的 *DUF642* 结构域, 多定位在细胞膜。*DUF642* 家族基因可分成 4 个亚组, 在进化上相对保守。*DUF642* 基因具有较为广泛的组织表达类型, 其中根和叶中表达较高。通过启动子和胁迫表达分析, 推测 *GhDUF642-09* 参与棉花抗盐胁迫; *GhDUF642-08* 和 *GhDUF642-19* 参与棉花抗黄萎病; *GhDUF642-02*、*GhDUF642-14* 和 *GhDUF642-17* 参与棉花生长发育和抗逆胁迫。【结论】本研究结果为进一步研究 *DUF642* 基因家族功能和棉花抗逆分子机制提供了重要的理论依据。

关键词: 陆地棉; *DUF642* 基因家族; 生物信息学分析; 逆境胁迫抗性; 表达分析

Expression Profiles Reveal the Function of Upland Cotton *DUF642* Gene Family in Stress Tolerance

Xie Meixia, Yang Jun*, Wang Guoning, Li Zhikun, Zhang Yan, Meng Chengsheng, Ma Zhiying, Wang Xingfen*

(North China Key Laboratory for Crop Germplasm Resources Research and Utilization of Education Ministry/Co-Innovation Center for Cotton Industry of Hebei Province/Key Laboratory for Crop Germplasm Resources of Hebei/College of Agriculture, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071001, China)

Abstract: [Objective] *DUF642* (Domain of unknown function 642 genes), an unknown functional gene family, plays an important role in plant stress response. The aim of this study is to analyze its function in cotton stress response. [Method] The members of *DUF642* gene family in cotton were systematically identified base on the information from *Gossypium hirsutum* genome. The gene structure, physiochemical properties, subcellular localization, phylogenetic evolution and promoters of *DUF642* were analyzed by bioinformatics. The expression patterns of *DUF642* genes in different tissues and under various stresses, including cold, hot, drought, salt and *Verticillium dahliae* infection, were analyzed by transcriptome data and real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). [Result] The results showed that 23 *DUF642* genes in *G. hirsutum* distributed on 14 chromosomes and one scaffold. Most of *GhDUF642* proteins were predicated to be in the plasma membrane and contain 1–2 conserved *DUF642* domains. *GhDUF642* genes were divided into four subgroups and highly conservative in evolution. *GhDUF642* genes have a wide range of tissue expression types, most of which are highly expressed in roots and leaves. Combining promoter analysis and expression analysis, it was speculated that *GhDUF642-09* participated in cotton resistance to salt stress, *GhDUF642-08* and *GhDUF642-19* were involved into the interaction between cotton and *V. dahliae*, and *GhDUF642-02*, *GhDUF642-14* and *GhDUF642-17* were related to cotton growth and stress tolerance. [Conclusion] These results could provide reference for further study on the function of *DUF642* genes and the molecular mechanism for stress resistance in cotton.

Keywords: *Gossypium hirsutum*; *DUF642* gene family; bioinformatics analysis; stress tolerance; expression analysis

收稿日期: 2019-07-01 第一作者简介: 解美霞(1995–), 女, 硕士研究生, xiemeixia0720@163.com。

* 通信作者: 杨君, yang22181@163.com; 王省芬, cotton@hebau.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0100304); 河北省科技支撑计划(16226307D)

在蛋白家族数据库 Pfam 中有 3 700 多种未知功能域(Domains of unknown function, DUF)蛋白,占到所有已知结构域蛋白的 25%左右^[1]。基因组学与蛋白质组学的快速发展为系统研究 DUF 家族蛋白提供了重要的生物信息学数据,更为揭示这些未知结构域家族基因在调控植物生长发育以及响应逆境胁迫方面的研究奠定了基础^[2]。

DUF642 家族蛋白包含 1~2 个高度保守的 DUF642 结构域,是种子植物所特有的高度保守的细胞壁相关蛋白^[3]。在水稻(*Oryza sativa*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中分别有 12 个和 10 个 DUF642 家族成员^[4-6]。DUF642 在植物抵抗病原菌侵染和非生物逆境胁迫响应过程中发挥重要作用。拟南芥 DUF642 基因 At5g25460 和 At3g08030 可受细菌侵染和害虫取食诱导表达。在接种青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)后 At5g25460 下调表达^[7],而 At3g08030 在接种带化红球菌(*Rhodococcus fascians*)后上调表达^[8]。拟南芥 DUF642 家族蛋白 BIIDXI(BDX)参与调节不同组织中细胞壁果胶甲基酯化^[9]。Xie 等^[10]从中国葡萄(*Vitis quinquangularis*)丹凤 2 号中克隆到 VqDUF642,其过表达能够使植株果胶甲酯酶(Pectin methylesterases, PME)活性增强,从而提高对灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)的抗性,表明 VqDUF642 与浆果发育和抗病性有关。籽粒苋(*Amaranthus hypochondriacus*)AhDGR2 是 1 个编码 DUF642 蛋白的基因,在盐和干旱等胁迫诱导下发生显著表达变化^[11]。玉米 ZmDUF642 基因在干旱、盐和铝等胁迫诱导下也能发生显著表达变化^[12]。

目前,我国各大棉区都遭受不同程度的盐碱、干旱、冷害、病害、虫害的威胁^[13-20]。不断发掘和筛选具有抗逆功能的基因成为棉花研究领域的重要科学问题之一。陆地棉(*Gossypium hirsutum*)基因组测序工作取得明显进展^[21-22],使系统地鉴定和研究棉花基因家族成为可能。DUF642 基因已经显示出参与植物抗逆反应的潜在重要性,但目前尚未见其在棉花中的研究报道。本研究基于陆地棉全基因组数据,对 DUF642 基因家族进行了系统鉴定和生物信息学分析,特别是应用转录组数据和实时定量聚合酶链式反应(Re-

al-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)技术分析了 DUF642 家族基因在不同组织和多种逆境胁迫下的表达规律,为后续解析其功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 DUF642 基因鉴定与生物信息学分析

通过 TAIR(<https://www.arabidopsis.org>)网站下载拟南芥 DUF642 家族基因序列,在陆地棉 TM-1 基因组数据(NAU version 1.1)中进行 BLAST 分析,并利用 Pfam 数据库进一步鉴定。通过 ExPASy-ProtParam tool(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)在线软件分析 DUF642 蛋白的氨基酸残基数量、相对分子质量、理论等电点及不稳定性指数等^[23]。使用 CELLO V. 2.5(<http://cello.life.nctu.edu.tw/>)在线工具进行蛋白亚细胞定位预测^[24]。使用 SignalP 4.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测信号肽^[25]。

1.2 DUF642 基因染色体定位和基因结构分析

从 Cotton Functional Genomics Database (CottonFGD)(<https://cottonfgd.org/>)^[26]提取陆地棉 DUF642 基因家族的基本信息,包括基因序列、编码序列(Coding sequence, CDS)、染色体位置等。利用 TBtools 软件分析基因的染色体定位^[27]。通过 GSDS2.0(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)在线软件分析基因结构^[28]。

1.3 DUF642 基因家族系统进化分析

利用软件 MEGA7.0 对陆地棉与拟南芥 DUF642 基因编码的蛋白进行多序列比对,使用相邻连接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统进化树^[29]。

1.4 DUF642 基因上游顺式作用元件分析

截取陆地棉 DUF642 基因上游 1 500 bp DNA 序列,利用 PlantCARE 数据库(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)预测可能存在的顺式作用元件。

1.5 转录组表达谱分析

从 NCBI SRA(Sequence Read Archive)数据库下载陆地棉的 7 种器官(根、茎、叶、雌蕊、雄蕊、花萼和花瓣)和 4 种逆境胁迫(冷、热、干旱和盐)处理后的转录组数据(基因组测序计划编号

(Genome sequencing project accession): PRJNA 248163)。棉花材料处理和数据获取过程详见 Zhang 等^[21]的研究报道。以 FPKM(Fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped) >1 作为基因表达的筛选标准。通过对数据进行 $\log_2(1 + \text{FPKM})$ 标准化。以表达量倍数变化 (Fold change, FC) >1.5 或 <0.8 作为基因具有显著表达差异标准。使用 HemI (Heatmap Illustrator, version 1.0) 软件绘制基因表达热图^[30]。

1.6 棉苗培养、接菌与取样

供试棉花品种为抗病陆地棉农大 601 (ND601),由河北农业大学棉花品种创新与产业化团队提供。棉种先用无菌水浸泡 24 h,然后置于湿润毛巾上于室温催芽;大约 1 d 后,挑选长势一致(芽长 0.5 cm)的发芽种子播种到六棱钵中,于 16 h 光照/8 h 黑暗和 25 ℃ 条件下的生长室中进行培养。棉苗生长约 7 d 后用于接种黄萎病菌。参考 Yang 等^[31]的方法进行黄萎病菌孢子悬浮液的制备和棉苗接种处理。每棵棉苗接种悬浮液 30 mL (孢子含量 10^7 mL^{-1})。在接菌 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h 时,取棉花根部,用蒸馏水清洗干净,于液氮速冻后 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。每个时间点取 3 株棉苗,每次取 3 个生物学重复。以蒸馏水代替菌液处理的棉苗作为对照(CK)。

1.7 RT-qPCR 分析

按照 EASYspin Plant RNA kit 试剂盒操作说明提取棉花根组织总 RNA。经 1.5%(质量分数)的琼脂糖凝胶电泳和 Nano Drop 2000 分光光度计检测 RNA 样品的质量和浓度后,使用 ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(TOBOYO)反转录试剂盒合成 cDNA。采用 THUNDERBIRD[®] SYBR[®] qPCR Mix (TOBOYO) 定量试剂盒进行 RT-qPCR。反应于 7500 Real Time PCR System(Applied Biosystems)中进行,程序设置:95 ℃ 预变性 3 min;95 ℃ 变性 10 s, 58 ℃ 退火 20 s,72 ℃ 延伸 34 s,40 次循环。所用引物详见表 1,其中 *GhHis3* 作为内参^[32]。每个样品进行 3 次重复检测,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量^[33]。使用 GraphPad Prism[®] 7 软件对数据进行 Tukey 多重比较测试和绘图。

表 1 本研究所用引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	序列(5' - 3') Sequence(5' - 3')
<i>GhHis3</i> -F	TCAAGACTGATTTGCGTTTCCA
<i>GhHis3</i> -R	GCGCAAAGGTTGGTGTCTTC
<i>GhDUF642</i> -04-F	AGGAGGCTTTCAGTTAGGT
<i>GhDUF642</i> -04-R	CGGGAACAAACCAAGTCGT
<i>GhDUF642</i> -08-F	AACGGTTGCAACGGAGAAAT
<i>GhDUF642</i> -08-R	ACCACAAAGAGACCCGAAGT
<i>GhDUF642</i> -10-F	GGTCGAAACCACACCAAACA
<i>GhDUF642</i> -10-R	CTTTGGCCGTGAAGTTGACA
<i>GhDUF642</i> -16-F	TGGATGGGATTCGTATGCGT
<i>GhDUF642</i> -16-R	CCACAAGCAGCATCTTCCTC
<i>GhDUF642</i> -19-F	AACGGTTGCAACGGAGAAAT
<i>GhDUF642</i> -19-R	ACCACAAAGAGACCCGAAGT
<i>GhDUF642</i> -21-F	GGTCGAAACCACACCAAACA
<i>GhDUF642</i> -21-R	CTTTGGCCGTGAAGTTGACA

2 结果与分析

2.1 陆地棉 *DUF642* 基因家族鉴定

基于陆地棉基因组数据,通过 BLAST 共鉴定到 23 个 *DUF642* 基因。根据它们在染色体上的位置依次命名为 *GhDUF642*-01~*GhDUF642*-23(表 2)。其中 *GhDUF642*-18 基因序列不完整,故根据华中农业大学公布的陆地棉基因组信息(HAU version 1.1)对该基因序列进行了修正^[22]。陆地棉 *DUF642* 家族基因开放读码框(Open reading frame,ORF)长度为 612~1 245 bp,编码的蛋白含有 203~414 个氨基酸残基,相对分子质量介于 22.10~45.15 kDa,理论等电点在 4.37~9.41,不稳定指数为 27.85~41.13,结构相对稳定。除 *GhDUF642*-11 外,家族其他成员都含有信号肽。除 *GhDUF642*-23 含有 1 个 *DUF642* 结构域外,其他家族成员都含有 2 个结构域。蛋白亚细胞定位预测显示,*GhDUF642* 中有 8 个定位在细胞膜,6 个定位在胞外,5 个定位在叶绿体,2 个定位在细胞质,2 个定位在线粒体。

表 2 陆地棉 *DUF642* 基因信息
Table 2 The information of *Gossypium hirsutum DUF642*

基因名称 Gene name	基因编号 Gene ID	开放阅读框 Open reading frame/bp	蛋白长度 Protein length/aa	相对分子质量 Relative molecular weight (M _r)/kDa	理论等电点 Theoretical isoelectric point (pI)	不稳定 指数 Instability index	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>GhDUF642-01</i>	Gh_A02G1063	1 110	369	40.19	9.24	30.73	PM,Ext
<i>GhDUF642-02</i>	Gh_A02G1106	1 110	369	39.90	6.84	39.29	Chl
<i>GhDUF642-03</i>	Gh_A05G1252	1 182	393	43.07	4.71	37.29	PM,Chl,Ext
<i>GhDUF642-04</i>	Gh_A06G1640	1 125	374	41.25	8.11	41.13	Cyt
<i>GhDUF642-05</i>	Gh_A07G0326	1 098	365	39.30	7.51	32.42	Chl,Ext
<i>GhDUF642-06</i>	Gh_A07G2099	1 200	399	42.84	4.37	33.43	Ext
<i>GhDUF642-07</i>	Gh_A07G2100	1 134	377	41.21	4.78	31.55	Ext,PM
<i>GhDUF642-08</i>	Gh_A08G1294	1 158	385	41.64	8.79	30.58	Ext
<i>GhDUF642-09</i>	Gh_A09G1148	1 188	395	43.39	8.78	34.85	PM
<i>GhDUF642-10</i>	Gh_A10G0376	1 188	395	43.29	4.95	32.37	Ext
<i>GhDUF642-11</i>	Gh_A10G0685	1 059	352	38.56	7.12	36.46	Mit
<i>GhDUF642-12</i>	Gh_A10G0686	1 125	374	41.02	8.12	34.64	Ext,Mit
<i>GhDUF642-13</i>	Gh_D03G0618	1 110	369	40.18	9.41	27.85	PM,Ext,Mit
<i>GhDUF642-14</i>	Gh_D03G1761	1 110	369	39.93	6.84	40.57	Ext,Chl
<i>GhDUF642-15</i>	Gh_D05G1414	1 182	393	42.96	4.57	35.16	Chl,Ext
<i>GhDUF642-16</i>	Gh_D06G2006	1 125	374	41.22	8.11	38.29	Cyt,Mit
<i>GhDUF642-17</i>	Gh_D07G0383	1 134	377	40.84	6.90	33.41	Chl
<i>GhDUF642-18</i>	Gh_D07G2313	1 191	396	42.79	4.73	33.85	PM,Ext
<i>GhDUF642-19</i>	Gh_D08G1586	1 245	414	45.15	9.06	31.29	PM
<i>GhDUF642-20</i>	Gh_D09G1152	1 176	391	42.93	8.79	33.73	PM
<i>GhDUF642-21</i>	Gh_D10G0384	1 188	395	43.18	4.84	33.00	Chl,PM
<i>GhDUF642-22</i>	Gh_D10G0700	1 125	374	40.99	8.12	35.81	Mit,Chl
<i>GhDUF642-23</i>	Gh_D10G0701	612	203	22.10	7.68	30.11	PM,Chl

注:PM,细胞膜;Ext,细胞外;Chl,叶绿体;Cyt,细胞质;Mit,线粒体。

Note: PM, plasma membrane; Ext, extracellular; Chl, chloroplast; Cyt, cytoplasm; Mit, mitochondrion.

23 个 *GhDUF642* 基因分布在陆地棉的 14 条染色体 (A02、A05、A06、A07、A08、A09、A10、D03、D05、D06、D07、D08、D09、D10) 和 1 条 scaffold (scaffold3920_D03) 上。*GhDUF642-06* 与 *GhDUF642-07*、*GhDUF642-11* 与 *GhDUF642-12*、*GhDUF642-22* 与 *GhDUF642-23* 分别串联分布在 A07、A10 和 D10 染色体(图 1)。

2.2 *GhDUF642* 基因结构分析

根据基因全长和 CDS 序列对 *GhDUF642* 进

行基因结构分析。如图 2 所示,*GhDUF642* 大多含有 2~4 个外显子。根据内含子和外显子的数量与位置,该家族基因可分为 3 组,即 I、II 和 III,分别包括 10 个、6 个和 7 个基因。同组内基因显示出相似的结构。

2.3 陆地棉与拟南芥 *DUF642* 家族的系统进化分析

利用陆地棉与拟南芥 *DUF642* 家族基因编码的氨基酸序列构建系统进化树,结果(图 3)显示,所

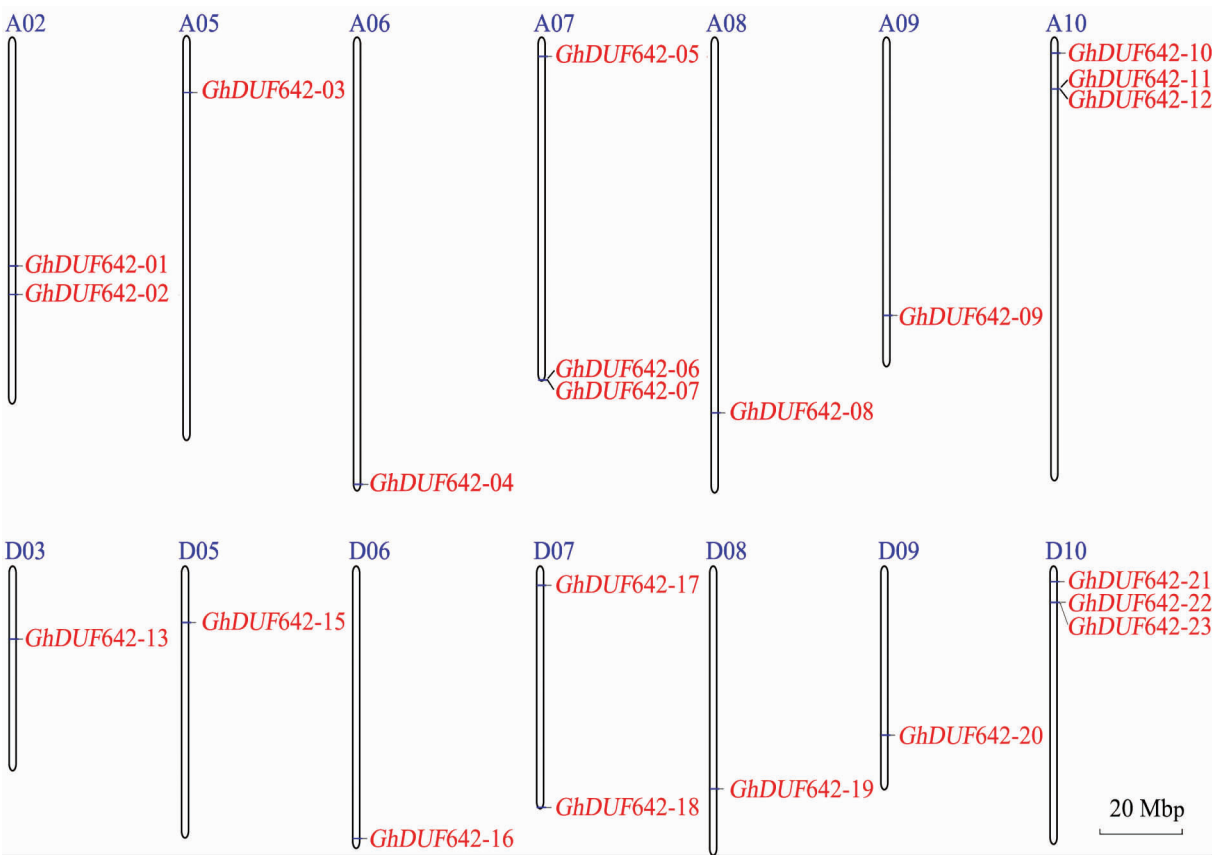


图 1 陆地棉 *DUF642* 基因的染色体定位

Fig.1 Chromosome location of *Gossypium hirsutum* *DUF642* genes

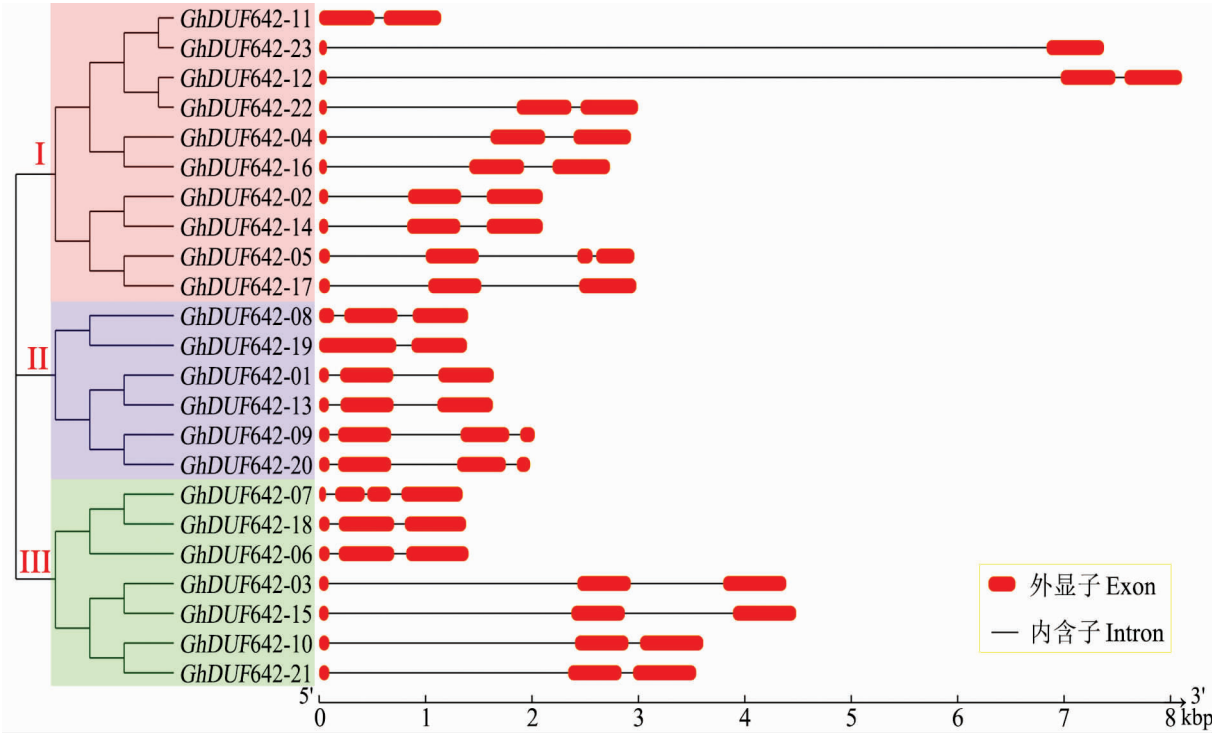


图 2 *GhDUF642* 基因结构

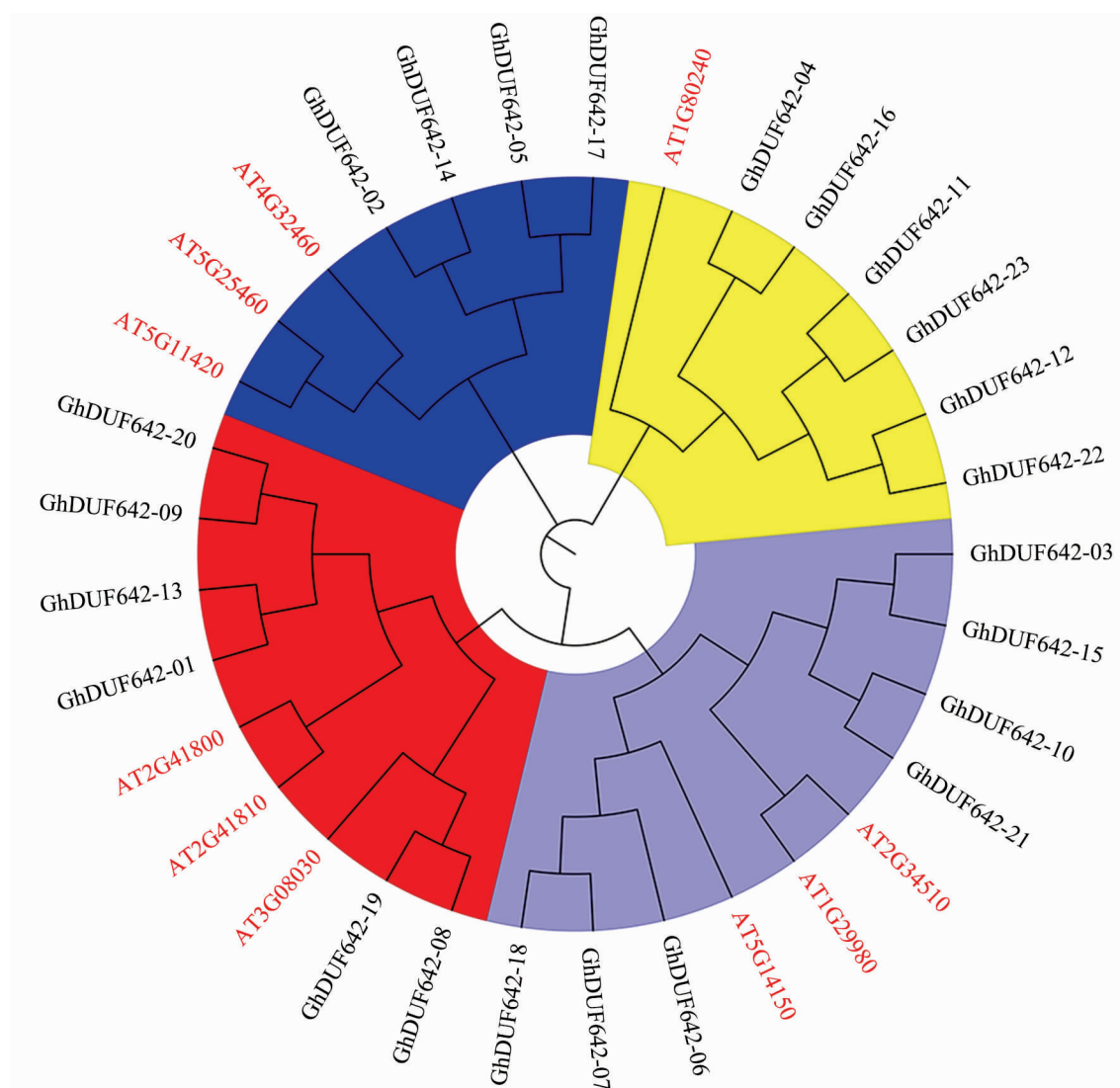
Fig.2 Gene structure of *GhDUF642*

有的 DUF642 蛋白可分为 4 个亚组。At2g41810 与 GhDUF642-01、GhDUF642-09、GhDUF642-13 和 GhDUF642-20 这 4 个蛋白位于同一分支。At3g08030 与 GhDUF642-08 和 GhDUF642-19 位于同一分支。At5g11420、At5g25460 和 At4g32460 与 GhDUF642-02、GhDUF642-05、GhDUF642-14 和 GhDUF642-17 这 4 个蛋白位于同一分支。每

个亚组并没有因为物种差异而单独分成 2 类,表明陆地棉与拟南芥 DUF642 家族成员有较近的亲缘关系,可能具有相似的生物学功能。

2.4 GhDUF642 基因启动子中顺式作用元件分析

如图 4 所示,陆地棉 DUF642 家族基因上游 1 500 bp 存在数量不等的响应植物激素和环境胁迫相关顺式作用元件。这些激素包括生长素(In-



每个亚组用不同颜色标注;拟南芥 DUF642 用红色字体突出显示。

Subgroups are marked with different colors; *Arabidopsis* DUF642 are highlighted in red.

图 3 陆地棉与拟南芥 DUF642 家族的系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of DUF642 from *Gossypium hirsutum* and *Arabidopsis thaliana*

dole-3-acetic acid, IAA)、脱落酸(Absciscic acid, ABA)、乙烯(Ethylene, ET)、水杨酸(Salicylic acid, SA)、赤霉素(Gibberellic acid, GA)和茉莉酸甲酯(Methyl jasmonate, MeJA)。环境胁迫相关的顺式

作用元件有 3 种,包括干旱响应元件(MBS)、防御和胁迫响应元件(Defense and stress)和低温响应元件(LTR)。其中 GhDUF642-08 和 GhDUF642-21 各含有 9 个顺式作用元件,是具有调控元

件最多的基因;*GhDUF642* 含有响应 ABA 的顺式作用元件数量最多,如 *GhDUF642-01*、*GhDUF642-04* 等 8 个基因各含有 3 个;除了 *GhDUF642-01*、*GhDUF642-11* 和 *GhDUF642-13* 外,其余 20 个 *DUF642* 基因中都具有 1 个响应 ET 的顺式作用元件。由此可见,每个 *GhDUF642* 启

动子含有不同数量和种类的顺式作用元件,表明它们可能通过不同的信号通路参与多种环境胁迫反应。

2.5 *GhDUF642* 基因的组织表达特异性分析

对 *GhDUF642* 基因在棉花根、茎、叶、雌蕊、雄蕊、花萼和花瓣 7 个组织中的表达模式分析结

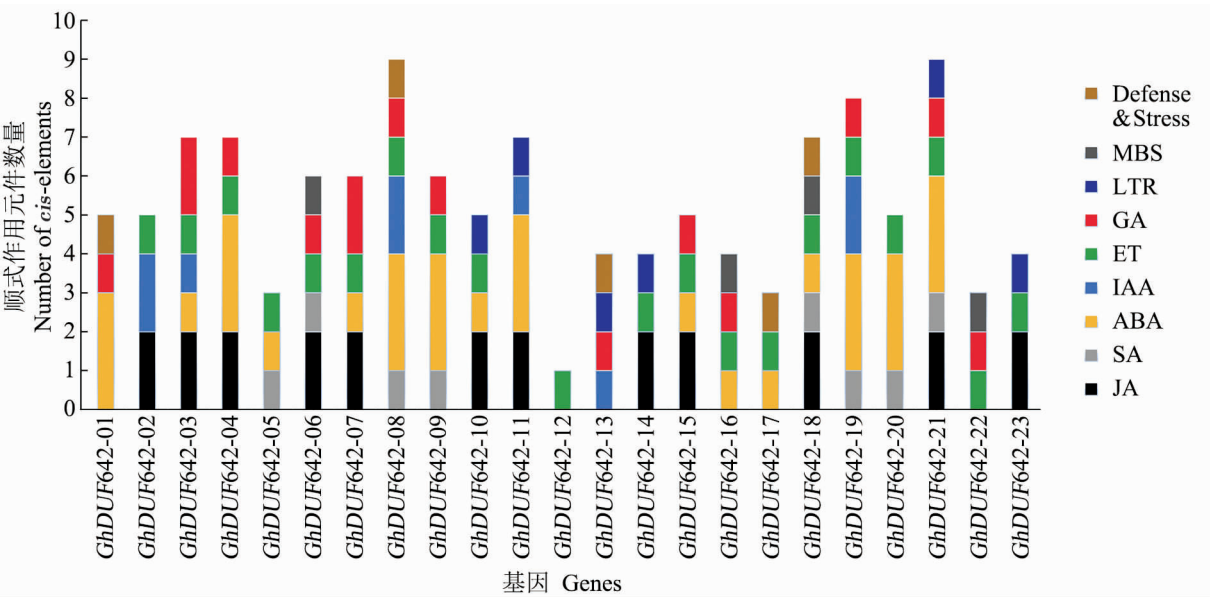


图 4 *GhDUF642* 顺式作用元件分析
Fig.4 *cis*-acting elements analysis of *GhDUF642* genes

果显示,23 个 *GhDUF642* 基因中有 14 个具有组织表达特异性(图 5)。可分为 5 种组织表达模式:模式 I 只包含 1 个基因 *GhDUF642-02*,其主要在副萼和根中表达;模式 II 包括 *GhDUF642-03*、*GhDUF642-09*、*GhDUF642-15*、*GhDUF642-20* 和 *GhDUF642-22*,它们在 7 种组织中都具有较低表达量;模式 III 包括 *GhDUF642-08*、*GhDUF642-10*、*GhDUF642-19* 和 *GhDUF642-21*,它们在根、茎、叶和雌蕊中具有较高表达量;模式 IV 包括 *GhDUF642-04*、*GhDUF642-14* 和 *GhDUF642-16*,它们除在茎和叶中低表达,在其余 5 种组织中都高表达;模式 V 只有 *GhDUF642-17*,其主要在副萼、花瓣和根中表达。

2.6 *GhDUF642* 基因响应逆境胁迫表达分析

对陆地棉 *DUF642* 家族基因在冷、热、干旱和盐 4 种逆境胁迫处理后的表达分析结果显示:冷胁迫处理后,14 个 *GhDUF642* 基因的表达发生了显著变化,其中 *GhDUF642-09* 在处理 1 h 时显著上调表达,随后转为显著下调表达;而 *Gh*

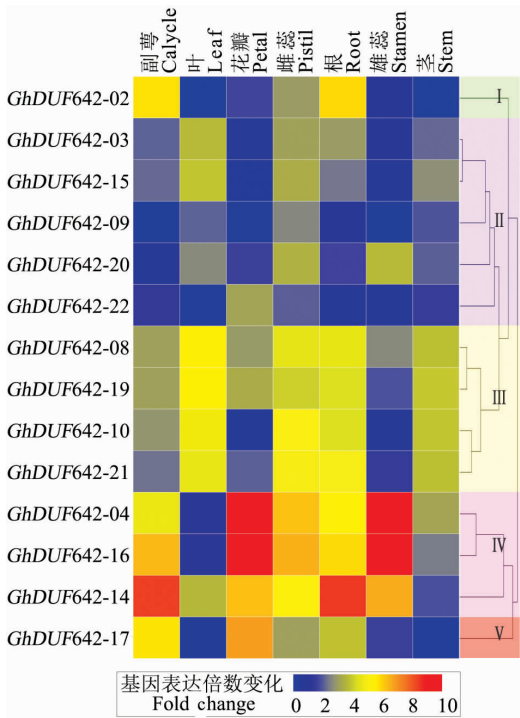
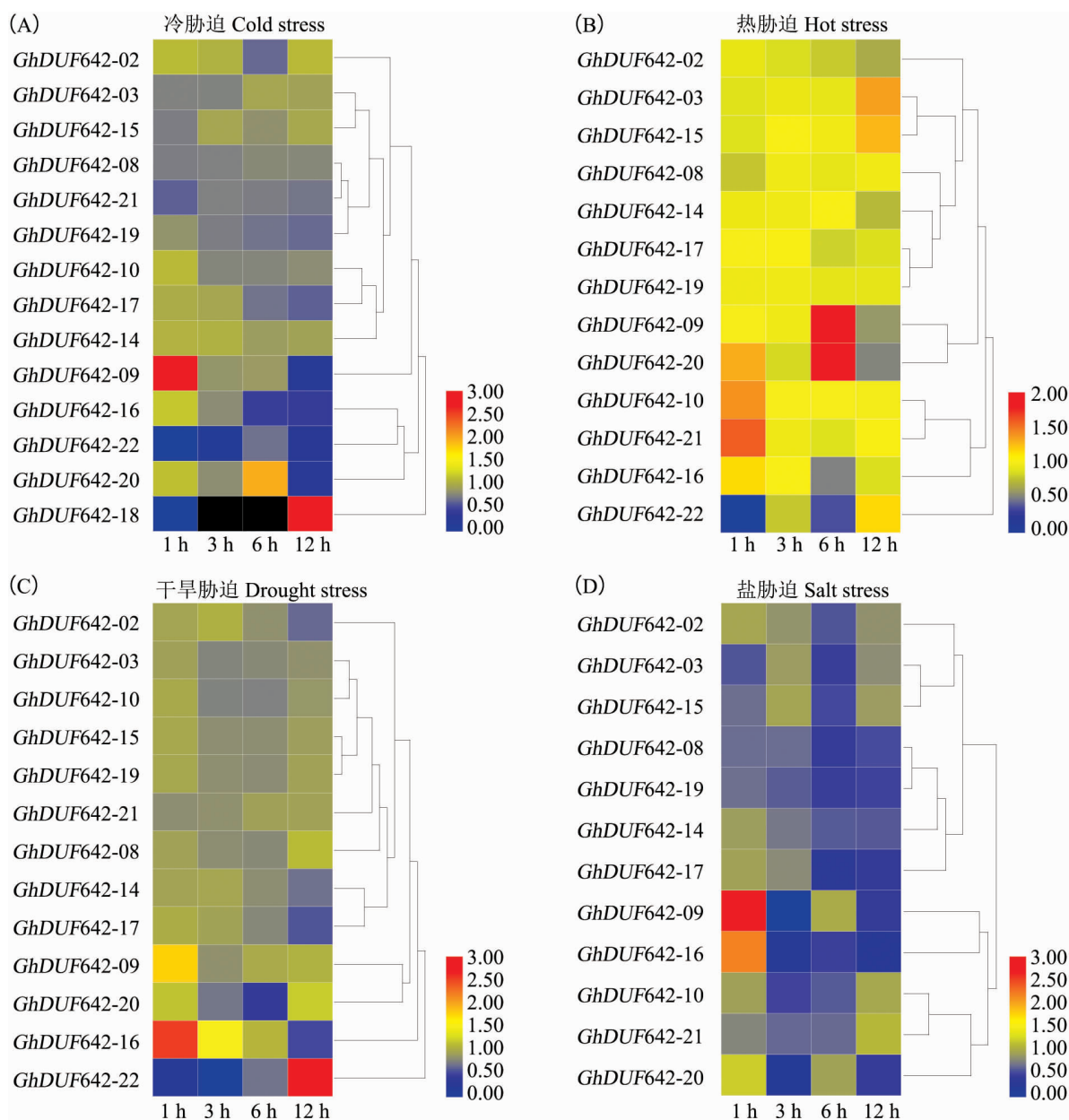


图 5 *GhDUF642* 基因的组织表达特异性
Fig.5 Tissue specificity expression of *GhDUF642* genes

DUF642-18 在处理 1 h 后显著下调表达,但在处理 12 h 时变为显著上调表达;*GhDUF642-20* 在处理 6 h 时显著上调表达;其余 11 个 *GhDUF642* 在冷胁迫处理后均表现为显著下调表达 (图 6A)。热胁迫处理后,13 个 *GhDUF642* 基因表达量发生显著变化,其中 *GhDUF642-21* 在处理 1 h 时显著上调表达;*GhDUF642-09* 和 *GhDUF642-20* 在处理 6 h 时显著上调表达,随后转为显著下调

表达;*GhDUF642-16* 和 *GhDUF642-22* 在处理 6 h 时显著下调表达;*GhDUF642-02* 和 *GhDUF642-14* 在处理 12 h 时显著下调表达 (图 6B)。通过聚乙二醇(Polyethylene glycol,PEG)模拟干旱胁迫效应,导致 13 个 *GhDUF642* 基因的表达发生显著变化,其中 *GhDUF642-09* 和 *GhDUF642-16* 在处理 1 h 时显著上调表达,但 *GhDUF642-16* 在处理 12 h 时又显著下调表达;*Gh-*



基因表达水平用不同的颜色显示。红色和蓝色分别代表高表达和低表达。

The levels of gene expression are showed in different colors. Red and blue represent high and low expression, respectively.

图6 陆地棉 *DUF642* 基因在冷(A)、热(B)、干旱(C)和盐(D)等4种逆境胁迫下的表达

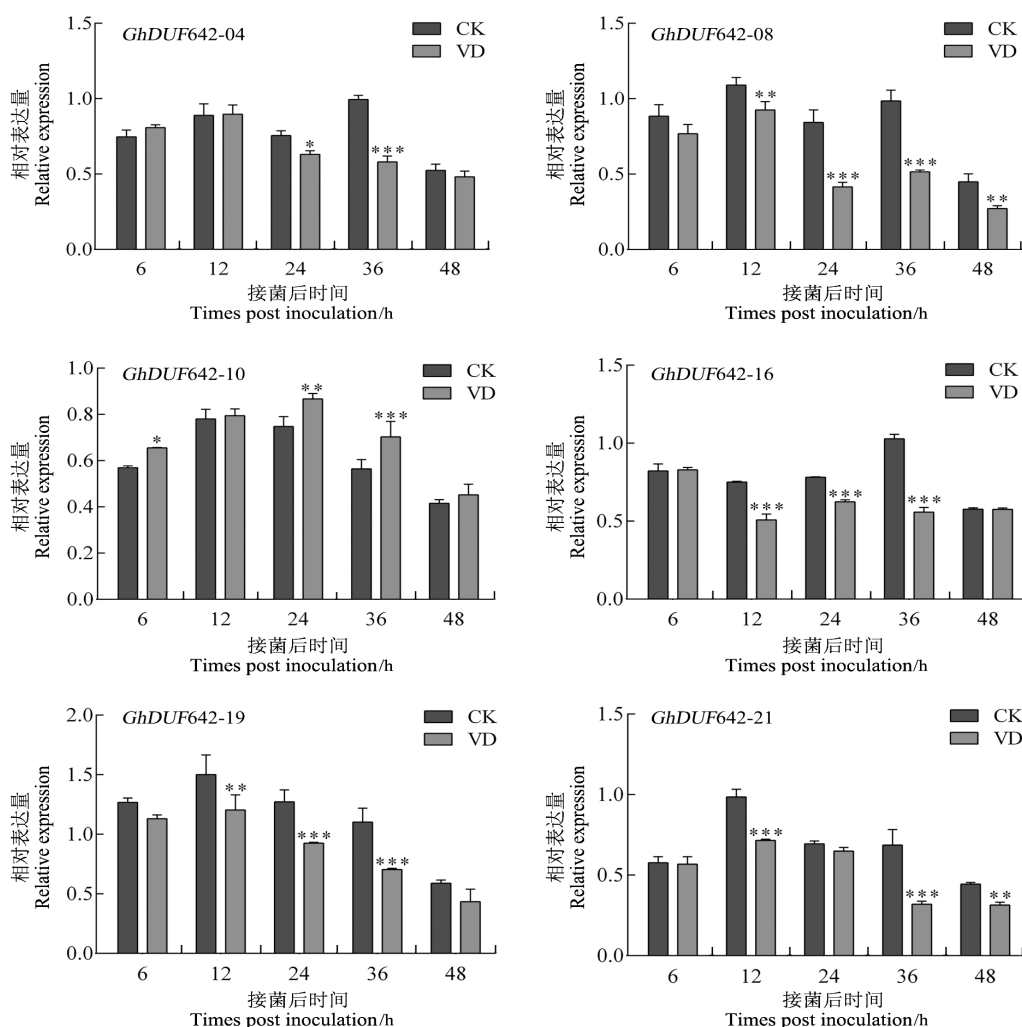
Fig.6 Expression profiling of *DUF642* genes from *Gossypium hirsutum* under four stresses, including cold (A), hot (B), drought (C) and salt (D)

DUF642-22 在处理 1 h 后先显著下调表达,而在处理 12 h 时变为显著上调表达;*GhDUF642-10* 和 *GhDUF642-20* 在处理 3 h 和 6 h 时分别发生显著下调表达;*GhDUF642-02*、*GhDUF642-14* 和 *GhDUF642-17* 在处理 12 h 时显著下调表达(图 6C)。盐胁迫处理后,12 个 *GhDUF642* 基因的表达量发生了显著变化,其中 *GhDUF642-09* 和 *GhDUF642-16* 在处理 1 h 时显著上调表达,随后转为显著下调表达;其余 10 个基因在盐胁迫处理后部分时间点表现为显著下调表达(图 6D)。这些 *GhDUF642* 对于不同胁迫处理表现出不同的表达变化,表明它们可能在棉花应对不同的逆境

胁迫时发挥不同的重要作用。

2.7 黄萎病菌胁迫处理后 *GhDUF642* 基因的表达分析

根据本研究团队已获得的大丽轮枝菌胁迫处理后的棉花根组织转录组数据(尚未发表),选择其中 6 个具有潜在表达差异的 *GhDUF642* 基因进行 RT-qPCR 分析。结果显示,在一段时期内,*GhDUF642-04*、*GhDUF642-08*、*GhDUF642-16*、*GhDUF642-19* 和 *GhDUF642-21* 这 5 个基因受黄萎病菌诱导后显著下调表达,而 *GhDUF642-10* 显著上调表达(图 7),表明这些基因参与棉花响应黄萎病菌侵染过程。



数据显示为 3 次生物学重复的平均值 \pm 标准误。星号标示为 Tukey 多重比较的显著性 (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$)。CK: 对照, 蒸馏水处理; VD: 大丽轮枝菌处理。

Data represent the means \pm SE from three biological replicates. Asterisks indicate statistically significant differences according to Tukey's multiple comparisons test (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$). CK: Control, treated with distilled water; VD: Treated with *Verticillium dahliae*.

图 7 黄萎病菌胁迫下陆地棉 *DUF642* 基因表达分析

Fig.7 The expression analysis of *GhDUF642* genes from upland cotton induced with *Verticillium dahliae*

3 讨论与结论

近年来,棉花基因组测序工作的不断完成与更新,为从全基因组水平研究基因功能奠定了基础。目前,关于棉花 *DUF642* 基因家族的研究还未见报道。本研究首次在陆地棉基因组中鉴定到 23 个 *GhDUF642* 基因(表 1),多于拟南芥(10 个)和水稻(12 个)中已鉴定的 *DUF642* 基因数量^[4-6],这可能是由于棉花基因组加倍的结果。*GhDUF642-06* 与 *GhDUF642-07*、*GhDUF642-11* 与 *GhDUF642-12* 以及 *GhDUF642-22* 与 *GhDUF642-23* 分别串联于 A07、A10 和 D10 染色体(图 1),可能是由于基因串联复制导致该基因家族的扩张。基因结构分析显示 *GhDUF642* 家族基因可分为 3 组,各组基因具有相似的基因结构,且内含子长度、外显子数目几乎一致,但各组之间内含子序列长度不同(图 2)。另外,通过氨基酸序列进行的聚类分析显示,拟南芥与棉花的 *DUF642* 基因发生了聚集效应(图 3)。*GhDUF642-01*、*GhDUF642-09*、*GhDUF642-13*、*GhDUF642-20* 与 *At2g41810* 位于同一进化分支,而 *At2g41810* 与拟南芥耐盐相关^[34],因此推测这 4 个 *GhDUF642* 基因可能参与棉花盐胁迫响应。转录水平上的变化进一步表明了 *GhDUF642-09* 参与棉花抗盐胁迫(图 6D)。*GhDUF642-08*、*GhDUF642-19* 与 *At3g08030* 位于同一进化分支。目前,*At3g08030* 被证明参与种子发育过程^[35],尚未见其参与抗逆功能的报道。本研究发现 *GhDUF642-08* 和 *GhDUF642-19* 序列上游都有响应 SA、ABA、IAA、ET 和 GA 的调控元件(图 4),并且它们在根中高表达(图 5),受黄萎病菌诱导后显著下调表达(图 7),表明这 2 个基因可能参与棉花抗黄萎病菌感染过程,但具体的抗病信号通路还有待进一步确认。*At4g32460* 和 *At5g11420* 编码的 *DUF642* 蛋白在拟南芥发育过程中可能是 PME 活性的阳性调控因子。在种子萌发过程中过表达这 2 个基因,转基因株系的 PME 活性显著增强,种子萌发性能改善^[36]。*At5g25460* 对根与叶的伸展和生长具有重要的作用^[4]。*GhDUF642-02*、*GhDUF642-05*、*GhDUF642-14*、*GhDUF642-17* 与 *At4g32460*、*At5g11420* 和 *At5g25460* 位于同一进化分支(图 3),推测这 4 个 *GhDUF642* 基因可能参与调节棉

花生长发育过程。目前,关于植物 *DUF642* 基因家族功能的研究还很有限。本研究通过生物信息学鉴定了陆地棉 *DUF642* 基因家族,在转录水平上初步探讨了它们可能具有的生长发育和抗逆功能,为进一步研究该家族基因奠定了重要的基础。

参考文献:

- [1] Mudgal R, Sandhya S, Chandra N, et al. De-DUFing the DUFs: Deciphering distant evolutionary relationships of domains of unknown function using sensitive homology detection methods[J]. *Biology Direct*, 2015, 10(1): 38-60. <https://doi.org/10.1186/s13062-015-0069-2>
- [2] 罗成科, 田蕾. 水稻 *DUF966* 基因家族的生物信息学分析[J]. *分子植物育种*, 2017, 15(12): 4791-4796. <https://doi.org/10.13271/j.mpb.015.004791>
- [3] Luo Chengke, Tian Lei. Bioinformatics analysis of the *DUF966* gene family in rice[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(12): 4791-4796.
- [4] Vázquez-Loboa A, Roujol D, Zuñiga-Sánchez E, et al. The highly conserved spermatophyte cell wall *DUF642* protein family: Phylogeny and first evidence of interaction with cell wall polysaccharides *in vitro*[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2012, 63 (2): 510-520. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.02.001>
- [5] Bayer E M, Bottrill A R, Walshaw J, et al. *Arabidopsis* cell wall proteome defined using multidimensional protein identification technology[J]. *Proteomics*, 2006, 6: 301-311. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500046>
- [6] Jamet E, Canut H, Boudart G, et al. Cell wall proteins: A new insight through proteomics[J]. *Trends in Plant Science*, 2006, 11: 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.11.006>
- [7] Chen X Y, Kim S T, Cho W K, et al. Proteomics of weakly bound cell wall proteins in rice calli[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2009, 166(7): 675-685. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.09.010>
- [8] Hu J, Barlet X, Deslandes L, et al. Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* during wilt disease caused by the soil-borne phytopathogenic bacterium, *Ralstonia solanacearum*[J]. *PLoS One*, 2008, 3: e2589. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002589>
- [9] Depuydt S, Trenkamp S, Fernie A R, et al. An integrated genomics approach to define niche establishment by *Rhodococcus fascians*[J]. *Plant Physiology*, 2009, 149: 1366-1386. <https://doi.org/10.1104/pp.108.131805>
- [10] Salazar-Irribia A, Cruz-Valderrama J E, Jiménez-Durán K, et al. BIIDXI, a *DUF642* cell wall protein, is involved in hypocotyl

- growth via auxin efflux[J]. Journal of Plant Physiology, 2018, 231: 105-109. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.09.006>
- [10] Xie X Q, Wang Y J. VqDUF642, a gene isolated from the Chinese grape *Vitis quinquangularis*, is involved in berry development and pathogen resistance[J]. Planta, 2016, 224(5): 1075-1094. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2569-4>
- [11] Palmeros-Suarez P A, Massange-Sanchez J A, Sanchez-Segura L, et al. AhDGR2, an amaranth abiotic stress-induced DUF642 protein gene, modifies cell wall structure and composition and causes salt and ABA hyper-sensibility in transgenic *Arabidopsis* [J]. Planta, 2017, 245(3): 623-640. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2635-y>
- [12] 刘天宇, 杨永娟, 赵卓, 等. 玉米 *DUF642* 基因家族的鉴定和分析[J]. 分子植物育种, 2018, 16(21): 6888-6898. <https://doi.org/10.13271/j.mpb.016.006888>
- Liu Tianyu, Yang Yongjuan, Zhao Zhuo, et al. Identification and analysis of the *DUF642* gene family in maize[J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(21): 6888-6898.
- [13] 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. <https://doi.org/10.3864/j.issn.0578-1752.2018.01.003>
- Lu Xiuru, Jia Xiaoyue, Niu Jiahui. The present situation and prospects of cotton industry development in China[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2018, 51(1): 26-36.
- [14] 何晞. 棉花多逆境响应基因的挖掘和功能验证[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
- He Xi. Isolation and characterization of genes in cotton responsive to multiple stresses[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016.
- [15] 赵云雷, 王宁, 葛晓阳, 等. 棉花抗逆遗传改良技术与应用[J]. 棉花学报, 2017, 29(S1): 11-19. <https://doi.org/10.11963/1002-7807.zyllfg.20170825>
- Zhao Yunlei, Wang Ning, Ge Xiaoyang, et al. Research and application of genetic improvement for cotton stress resistance[J]. Cotton Science, 2017, 29(S1): 11-19.
- [16] 李少昆, 肖璐, 黄文华, 等. 不同时期干旱胁迫对棉花生长和产量的影响: 棉花生长发育及生理特性的变化[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 1999, 3(4): 259-264. <https://doi.org/10.13880/j.cnki.65-1174/n.1999.04.001>
- Li Shaokun, Xiao Lu, Huang Wenhua, et al. Effects of drought stress on cotton growth and yield in different periods: Changes in growth and physiological characteristics of cotton[J]. Journal of Shihezi University (Natural Science), 1999, 3(4): 259-264.
- [17] 王桂峰, 魏学文, 贾爱琴. 5 个棉花品种的耐盐鉴定与筛选试验[J]. 山东农业科学, 2013, 45(10): 51-55. <https://doi.org/10.14083/j.issn.1001-4942.2013.10.027>
- Wang Guifeng, Wei Xuwen, Jia Aiqin. Identification and screening test on salt tolerance of five cotton varieties[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2013, 45(10): 51-55.
- [18] 郭新正. 新疆北疆棉花苗期冻伤对产量的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2005, 23(3): 600-601. <https://doi.org/10.3321/j.issn:1000-7601.2005.03.022>
- Guo Xinzheng. Effects of freezing injury on cotton yield at seedling stage in northern Xinjiang[J]. Agricultural Research in Arid Areas, 2005, 23(3): 600-601.
- [19] Singh R P, Vara Prasad P V, Sunita K, et al. Influence of high temperature and breeding for heat tolerance in cotton[J]. Advances in Agronomy, 2007, 93: 317-318. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(06\)93006-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(06)93006-5)
- [20] 林玲, 张昕, 邓晟. 棉花黄萎病研究进展[J]. 棉花学报, 2014, 26(3): 260-267. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1002-7807.2014.03.010>
- Lin Ling, Zhang Xin, Deng Sheng. Research advances in cotton Verticillium wilt[J]. Cotton Science, 2014, 26(3): 260-267.
- [21] Zhang T Z, Hu Y, Jiang W K, et al. Sequencing of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. acc. TM-1) provides a resource for fiber improvement[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(5): 531-537. <https://doi.org/10.1038/nbt.3207>
- [22] Wang M J, Tu L L, Yuan D J, et al. Reference genome sequences of two cultivated allotetraploid cottons, *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*[J]. Nature Genetics, 2019, 51(2): 224-229. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0282-x>
- [23] Wang W, Zhang X P, Deng F N, et al. Genome-wide characterization and expression analyses of superoxide dismutase (SOD) genes in *Gossypium hirsutum*[J]. BMC Genomics, 2017, 18: 376. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3768-5>
- [24] Yu C S, Chen Y C, Lu C H, et al. Prediction of protein subcellular localization[J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2006, 64(3): 643-651. <https://doi.org/10.1002/prot.21018>
- [25] Petersen T N, Brunak S, Von Heijne G, et al. SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions[J]. Nature Methods, 2011, 8(10): 785-786. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1701>
- [26] Zhu T, Liang C Z, Meng Z G, et al. CottonFGD: An integrated functional genomics database for cotton[J]. BMC Plant Biology, 2017, 17(1): 101-109. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1039-x>
- [27] Chen C J, Xia R, Chen H, et al. TBtools, a toolkit for biologists integrating various HTS-data handling tools with a user-friendly interface[J]. BioRxiv, 2018. <https://doi.org/10.1101/289660>
- [28] Hu B, Jin J P, Guo A Y, et al. GSDS 2.0: An upgraded gene feature visualization server[J]. Bioinformatics, 2015, 31(8): 1296-1297. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu817>
- [29] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular

- lar Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- [30] Deng W K, Wang Y B, Liu Z X, et al. Heml: A toolkit for illustrating heatmaps[J]. PLoS ONE, 2014, 9(11): e111988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111988>
- [31] Yang J, Ma Q, Zhang Y, et al. Molecular cloning and functional analysis of *GbRVd*, a gene in *Gossypium barbadense* that plays an important role in conferring resistance to Verticillium wilt [J]. Gene, 2016, 575(2): 687-694. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.09.046>
- [32] Zhu Y Q, Xu K X, Luo B, et al. An ATP-binding cassette transporter *GhWBC1* from elongating cotton fibers [J]. Plant Physiology, 2003, 133: 580-588. <https://doi.org/10.1104/pp.103.027052>
- [33] Rao X Y, Huang X L, Zhou Z C, et al. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis[J]. Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics, 2003, 3(3): 71-85. [https://doi.org/10.1016/S0920-5489\(99\)92176-1](https://doi.org/10.1016/S0920-5489(99)92176-1)
- [34] Kreps J A, Wu Y J, Chang H S, et al. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress [J]. Plant Physiology, 2002, 130: 2129-2141. <https://doi.org/10.1104/pp.008532>
- [35] Garza-Caligaris L E, Avendano-Vazquez A O, Alvarado-Lopez S, et al. At3g08030 transcript: A molecular marker of seed ageing[J]. Annals of Botany, 2012, 110: 1253-1260. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs200>
- [36] Zúñiga-Sánchez E, Soriano D, Martínez-Barajas E, et al. *BI-1DXI*, the At4g32460 *DUF642* gene, is involved in pectin methyl esterase regulation during *Arabidopsis thaliana* seed germination and plant development[J]. BMC Plant Biology, 2014, 14: 338. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0338-8> ●