

刘文豪,田 琴,余 渝,等. 陆地棉 CNGC 全基因组鉴定及表达分析[J]. 江苏农业科学,2021,49(24):49–56.  
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2021.24.008

# 陆地棉 CNGC 全基因组鉴定及表达分析

刘文豪,田 琴,余 渝,王旭文,马 麒,司爱君,孔宪辉

(新疆农垦科学院棉花研究所/农业农村部西北内陆区棉花生物学与遗传育种重点实验室,新疆石河子 832000)

**摘要:**环状核苷酸门控通道(CNGC)基因家族是非选择性阳离子通道基因家族之一,在与植物发育和环境胁迫有关的生理生化过程中起着至关重要的作用,但是目前尚无陆地棉 CNGC 基因家族的全基因组鉴定和分析。基于已知的拟南芥 CNGC 基因家族成员序列信息,以生物信息学方法分析陆地棉基因组中 CNGC 家族成员的理化性质、系统发育、染色体定位和差异表达情况。结果表明,共鉴定出 33 个 *GhCNGC* 基因,它们不均匀地分布在 A、D 染色体亚组上,其中 15 个基因分布在 A 染色体亚组上,18 个基因分布在 D 染色体亚组上。系统发育分析结果表明,*GhCNGC* 基因家族被分为 4 个主要组,由于在进化过程中不均等地扩增,IV 组又分为 IVa 和 IVb 组。同组陆地棉、拟南芥的 CNGC 基因显示出相似的保守基序和基因结构,尤其是同源性越近,相似度越高。*GhCNGC* 基因的表达谱以组织特异性模式表达,多数基因在根、叶中的表达量较高。研究结果使人们增加了对陆地棉和其他植物中 CNGC 基因家族的了解。

**关键词:**CNGC;基因家族;全基因组;陆地棉;染色体定位;差异表达

**中图分类号:**S562.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002–1302(2021)24–0049–07

植物中的  $\text{Ca}^{2+}$  通过钙离子传导通道进行信号转导是一种重要的信号转导机制。信号转导有助于植物生长发育、病原体防御及植物对激素、光和盐胁迫的反应<sup>[1]</sup>。环状核苷酸门控通道(CNGC)是可渗透  $\text{Ca}^{2+}$  的阳离子转运通道,调节植物生长并应对生物和非生物胁迫。CNGC 位于细胞质膜或核膜,由  $\text{Ca}^{2+}$ /钙调蛋白(CaM)和环状单磷酸核苷酸(cNMPs)等二级信使从细胞内部控制<sup>[2]</sup>。在植物中,CNGC 由 6 个跨膜(TM)域和介于第 5、第 6 个 TM 域之间的 1 个孔区域组成。环状核苷酸结合结构域(CNBD)是一个高度保守的区域,并有 1 个磷酸盐结合盒(PBC)和 1 个铰链区。CNGC 通过直接结合环状核苷酸而被激活,当钙调蛋白(CaM)结合到 CaM 结合域时会被抑制<sup>[3]</sup>。目前,生物信息学工具已在水稻<sup>[4]</sup>、玉米<sup>[5]</sup>、拟南芥<sup>[6]</sup>、甘蓝<sup>[7]</sup>、白菜<sup>[8]</sup>、番茄<sup>[9]</sup>中用于识别 CNGC 基因家族成员。

之前的研究发现,CNGC 是植物发育的关键组成部分。目前,大多数 CNGC 已通过遗传学方法得

到表征,并且它们已显示出与植物生理、分子功能有关的重要作用,例如信号通路、植物发育和对环境胁迫的响应中涉及的多个生理过程。拟南芥环状核苷酸门控通道 2(*AtCNGC2*)参与拟南芥表皮细胞中茉莉酸(JA)诱导的质外体  $\text{Ca}^{2+}$  流入<sup>[10]</sup>,*AtCNGC4* 可渗透  $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ ,并被环磷酸鸟苷(cGMP)、环磷酸腺苷(cAMP)激活<sup>[11]</sup>,*AtCNGC7*、*AtCNGC8* 基因对雄性生殖力的作用至关重要<sup>[12]</sup>,*AtCNGC16*、*AtCNGC18* 基因可参与花粉发育<sup>[13]</sup>,*AtCNGC6*、*AtCNGC19*、*AtCNGC20* 基因参与了非生物胁迫反应<sup>[14]</sup>。

近年来,人们对植物中的 CNGC 基因家族进行了研究,然而,关于陆地棉(*Gossypium hirsutum* Linn.)CNGC(*GhCNGC*)基因家族的系统鉴定、起源和功能的研究却很少。本研究利用陆地棉全基因组序列信息、拟南芥 CNGC 家族的研究信息及综合生物信息学分析技术对陆地棉中 CNGC 进行全基因组鉴定来完成每个 CNGC 基因家族成员的深入分析,包括对编码蛋白的生理、生化特性分析。此外,本研究还分析了 CNGC 家族成员的表达方式,以阐明其对生物、非生物胁迫响应的机制,并鉴定出可能对育种有用的新基因。

## 1 材料与方法

### 1.1 陆地棉 CNGC 基因家族成员的筛选鉴定

陆地棉 TM–1 的基因组数据来自南京农业大

收稿日期:2021–05–10

基金项目:新疆生产建设兵团科技攻关项目(编号:2016AC027);新疆生产建设兵团重点领域创新团队建设计划(编号:2017CB011)。

作者简介:刘文豪(1992—),男,安徽界首人,硕士,助理研究员,主要从事棉花分子育种研究。E-mail:why1wh2016@163.com。

通信作者:孔宪辉,硕士,研究员,主要从事棉花育种研究。E-mail:xjkh920@163.com。

学 Cotton Research Institute 网站 (<http://mascotton.njau.edu.cn/>), 试验时间为 2020 年 8 月, 试验地点为新疆维吾尔自治区石河子市新疆农垦科学院棉花研究所。以拟南芥 CNGC 基因家族成员的身份标志(ID)为探针在陆地棉 TM-1 基因组注释文件中查找陆地棉 CNGC 家族 ID, 用虚拟机 Bio-Linux 8.0 运行 HMM-Search 搜索结构域, 并提取目标基因序列。

### 1.2 陆地棉 CNGC 基因家族的理化性质分析

通过 ExPASy-ProtParam 在线网站 (<https://web.expasy.org/protparam>) 对陆地棉 CNGC 蛋白家族氨基酸序列的分子式、总原子数、亲水性平均值、分子质量、蛋白不稳定系数等进行预测分析。通过 SOPMA 在线网站 (<https://npsa-prabi.ibcp.fr>) 分析陆地棉 CNGC 蛋白家族的二级结构。

### 1.3 陆地棉 CNGC 基因家族进化树的构建

将陆地棉、拟南芥的 CNGC 蛋白序列以 fasta 格式保存在 1 个文件中, 用默认参数运行 MEGA 7.0 软件的 ClustalW 命令, 进行序列对齐, 采用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 进行系统发育重建, 以自举法 (bootstrap method) 进行系统发育计算, 引导复制次数为 1 000 次, 输出格式为 Newick, 通过 Evolview 在线网站 (<https://www.evolgenius.info/evolview/>) 进行进化树的编辑。

### 1.4 陆地棉 CNGC 基因家族染色体的定位及结构分析

根据陆地棉基因组数据库中 CNGC 基因家族成员在染色体上的区域分布和染色体长度, 通过 Map Gene 2 Chrom 在线网站 ([http://mg2c.iask.in/mg2c\\_v2.1/](http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.1/)) 绘制染色体分布图。通过 MEME 在线网站 (<http://meme-suite.org/>) 进行 motif 分析, 搜索得到 motif 的总数为 10 个。用本地软件 TBtools 将 CNGC 基因家族进化树、MEME 分析图和基因结构图进行合并分析。

### 1.5 陆地棉 CNGC 基因家族的差异表达分析

从美国国家生物信息中心 (NCBI) 数据库中下载 TM-1 标准系陆地棉转录组数据包 PRJNA248163, 以 FPKM 值作为参数, 将 FPKM 值低于 8 的分为一组, 高于 8 的分为另一组。用 TB-tools 软件进行基因表达图谱的绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 陆地棉 CNGC 基因家族的鉴定分析

以已知的 20 个拟南芥 CNGC 基因家族成员的

蛋白序列作为参考序列, 在陆地棉标准系 TM-1 全基因组数据库中进行比对筛选, 最终获得 33 个环状核苷酸门控通道 (CNGC) 基因家族成员。由表 1 可以看出, 陆地棉环状核苷酸门控通道基因家族成员基因编码区 (CDS) 序列全长为 942 ~ 3 174 bp, 编码氨基酸 313 ~ 1 057 个, 脂肪指数为 77.03 ~ 102.46, 平均亲水性为 -0.673 ~ 0.097, 都属于亲水性蛋白; 氨基酸残基分子量为 36.54 ~ 121.04 ku, 理论等电点为 6.89 ~ 9.59。

### 2.2 陆地棉 CNGC 基因家族的二级结构预测及蛋白的稳定性分析

由表 2 可以看出, 陆地棉 CNGC 基因家族成员的二级结构均由  $\alpha$ -螺旋、延伸链、 $\beta$ -转角、无规卷曲 4 种结构组成, 并且  $\alpha$ -螺旋和无规卷曲是主要组成部分, 所占比例最大。延伸链、 $\beta$ -转角包含的氨基酸残基数少, 在二级结构中所占比例较小。根据蛋白不稳定指数统计结果发现, 该家族成员的蛋白不稳定指数为 39.11 ~ 57.22, 仅 GhCNGC29 为稳定蛋白 (稳定指数 < 40), 其余的 32 个家族成员均为不稳定蛋白。

### 2.3 拟南芥与陆地棉 CNGC 基因家族的系统发育分析

本研究从陆地棉标准系 TM-1 基因组数据库中筛选得到 33 个 *GhCNGC* 基因, 根据这些基因在染色体上的分布情况, 将这些基因命名为 *GhCNGC1* ~ *GhCNGC33*。依据拟南芥 *AtCNGC* 基因家族的系统发育关系, 将 *GhCNGC* 基因家族的 33 个成员与 *AtCNGC* 基因家族的 20 个成员的蛋白序列构建成系统进化树。由图 1 可以看出, *GhCNGC* 基因家族成员的聚类情况与拟南芥相似, 分为 4 个组群, 分别为 Group I、Group II、Group III、Group IV, 其中 Group IV 又分为 Group IV a 和 Group IV b。Group I 含有 13 个成员, 包括 7 个 *GhCNGC* (*GhCNGC1*、*GhCNGC2*、*GhCNGC3*、*GhCNGC4*、*GhCNGC19*、*GhCNGC20*、*GhCNGC21*) 和 6 个 *AtCNGC* (*AtCNGC1*、*AtCNGC3*、*AtCNGC10*、*AtCNGC11*、*AtCNGC12*、*AtCNGC13*); Group II 含有 6 个 *GhCNGC* (*GhCNGC13*、*GhCNGC14*、*GhCNGC15*、*GhCNGC16*、*GhCNGC17*、*GhCNGC18*) 和 5 个 *AtCNGC* (*AtCNGC5*、*AtCNGC6*、*AtCNGC7*、*AtCNGC8*、*AtCNGC9*); Group III 含有 10 个 *GhCNGC* (*GhCNGC22*、*GhCNGC23*、*GhCNGC24*、*GhCNGC25*、*GhCNGC26*、*GhCNGC27*、*GhCNGC28*、*GhCNGC29*、*GhCNGC30*、*GhCNGC31*) 和 5

表 1 陆地棉 GhCNGC 基因家族成员基本信息

基因名称	序列编号	CDS 序列 (bp)	氨基酸数量 (个)	脂肪指数	平均亲水性	分子量 (ku)	理论等电点
<i>GhCNGC1</i>	Gh_A05G3588	2 088	695	87.28	-0.175	80.37	9.30
<i>GhCNGC2</i>	Gh_D04G0016	2 190	729	87.87	-0.143	84.25	9.00
<i>GhCNGC3</i>	Gh_D07G1377	2 205	734	94.63	-0.094	84.57	9.29
<i>GhCNGC4</i>	Gh_D08G1044	2 262	753	88.43	-0.100	87.22	8.83
<i>GhCNGC5</i>	Gh_A05G3196	2 088	695	94.81	-0.008	76.67	9.33
<i>GhCNGC6</i>	Gh_A09G0110	1 575	524	102.46	0.097	60.48	9.35
<i>GhCNGC7</i>	Gh_A09G0111	2 301	766	93.29	0.022	87.43	9.57
<i>GhCNGC8</i>	Gh_D04G0409	1 896	631	92.36	-0.067	72.42	9.48
<i>GhCNGC9</i>	Gh_D09G0106	2 088	695	96.72	0.048	79.65	9.31
<i>GhCNGC10</i>	Gh_D09G0107	2 301	766	94.56	0.029	87.37	9.57
<i>GhCNGC11</i>	Gh_D01G0533	2 130	709	86.76	-0.197	81.65	9.02
<i>GhCNGC12</i>	Gh_A01G0520	2 130	709	86.47	-0.213	81.80	9.02
<i>GhCNGC13</i>	Gh_A13G1614	2 232	743	85.87	-0.187	84.80	9.02
<i>GhCNGC14</i>	Gh_D05G0547	2 217	738	89.09	-0.190	84.39	9.20
<i>GhCNGC15</i>	Gh_D13G1974	2 232	743	86.14	-0.191	84.77	8.97
<i>GhCNGC16</i>	Gh_A05G0448	942	313	77.03	-0.673	36.54	9.17
<i>GhCNGC17</i>	Gh_A05G1012	2 247	748	86.16	-0.265	85.93	8.95
<i>GhCNGC18</i>	Gh_D05G1129	2 241	746	86.92	-0.247	85.64	9.00
<i>GhCNGC19</i>	Gh_D12G1124	2 160	719	91.04	-0.145	82.39	9.51
<i>GhCNGC20</i>	Gh_A07G1267	1 800	599	100.60	0.015	68.78	9.23
<i>GhCNGC21</i>	Gh_A12G1004	2 127	708	91.50	-0.128	81.10	9.59
<i>GhCNGC22</i>	Gh_A13G1579	2 112	703	92.62	-0.156	80.99	8.95
<i>GhCNGC23</i>	Gh_D06G1113	2 658	885	80.33	-0.409	101.13	9.47
<i>GhCNGC24</i>	Gh_D13G1938	1 761	586	94.49	-0.042	67.78	9.12
<i>GhCNGC25</i>	Gh_A03G0266	2 112	703	94.75	-0.065	80.57	9.10
<i>GhCNGC26</i>	Gh_A05G0903	2 142	713	94.78	-0.055	81.44	9.21
<i>GhCNGC27</i>	Gh_D03G1301	2 166	721	96.57	-0.026	82.61	9.01
<i>GhCNGC28</i>	Gh_D05G0985	2 133	710	93.68	-0.062	81.33	9.18
<i>GhCNGC29</i>	Gh_D09G1606	3 174	1 057	93.60	0.063	121.04	9.06
<i>GhCNGC30</i>	Gh_D04G0507	2 223	740	95.68	-0.013	85.20	6.89
<i>GhCNGC31</i>	Gh_A05G3130	2 211	736	93.30	-0.093	84.75	8.37
<i>GhCNGC32</i>	Gh_A11G0014	2 361	786	89.26	-0.117	89.74	8.84
<i>GhCNGC33</i>	Gh_D11G0011	2 313	770	87.34	-0.170	88.33	9.20

个 *AtCNGC* (*AtCNGC14*、*AtCNGC15*、*AtCNGC16*、*AtCNGC17*、*AtCNGC18*)；Group IV a 含有 2 个 *GhCNGC* (*GhCNGC32*、*GhCNGC33*) 和 2 个 *AtCNGC* (*AtCNGC19*、*AtCNGC20*)；Group IV b 含有 8 个 *GhCNGC* (*GhCNGC5*、*GhCNGC6*、*GhCNGC7*、*GhCNGC8*、*GhCNGC9*、*GhCNGC10*、*GhCNGC11*、*GhCNGC12*) 和 2 个 *AtCNGC* (*AtCNGC2*、*AtCNGC4*)。

#### 2.4 陆地棉 CNGC 家族成员的染色体定位

根据陆地棉标准系 TM-1 的基因组数据库资源,通过网站 MapGene2Chrom 进行在线 GhCNGC 家

族成员的染色体定位分析<sup>[15]</sup>。将 GhCNGC 家族的 33 个成员定位在 19 条染色体上,并绘制该家族的基因图谱。结果(图 2)显示,分布在 D 基因组亚组的基因最多,有 18 个,而这 18 个基因主要分布在染色体的两端,分布在上端的基因比分布在下端的基因多,分布在中间部位的基因仅有 3 个。分布在 A 基因组亚组的基因相对较少,有 15 个,这 15 个基因依然主要分布在染色体的两端。分布在 D04、D05、D09 和 A05 染色体上的基因最多,分别为 3、3、3、6 个,而其他染色体上仅分布 1~2 个该家族基因成员。

表 2 GhCNGC 基因家族蛋白二级结构及稳定性预测

基因名称	蛋白不稳定指数	各二级结构的氨基酸数量(个)			
		α-螺旋	延伸链	β-转角	无规卷曲
GhCNGC1	54.06 N	372(53.53%)	84(12.09%)	21(3.02%)	218(31.37%)
GhCNGC2	54.19 N	391(53.64%)	85(11.66%)	19(2.61%)	234(32.10%)
GhCNGC3	45.38 N	399(54.36%)	84(11.44%)	20(2.72%)	231(31.47%)
GhCNGC4	52.36 N	415(55.11%)	90(11.95%)	18(2.39%)	230(30.54%)
GhCNGC5	54.85 N	366(52.66%)	69(9.93%)	22(3.17%)	238(34.24%)
GhCNGC6	50.26 N	297(56.68%)	59(11.26%)	16(3.05%)	152(29.01%)
GhCNGC7	51.01 N	359(46.87%)	88(11.49%)	24(3.13%)	295(38.51%)
GhCNGC8	52.58 N	330(52.30%)	75(11.89%)	26(4.12%)	200(31.70%)
GhCNGC9	53.33 N	358(51.51%)	76(10.94%)	26(3.74%)	235(33.81%)
GhCNGC10	53.11 N	358(46.74%)	97(12.66%)	28(3.66%)	283(36.95%)
GhCNGC11	54.17 N	377(53.17%)	70(9.87%)	30(4.23%)	232(32.72%)
GhCNGC12	52.48 N	378(53.31%)	69(9.73%)	30(4.23%)	232(32.72%)
GhCNGC13	48.26 N	379(51.01%)	97(13.06%)	21(2.83%)	246(33.11%)
GhCNGC14	47.96 N	380(51.49%)	101(13.69%)	28(3.79%)	229(31.03%)
GhCNGC15	47.66 N	373(50.20%)	93(12.52%)	25(3.36%)	252(33.92%)
GhCNGC16	57.22 N	205(65.50%)	20(6.39%)	10(3.19%)	78(24.92%)
GhCNGC17	45.79 N	395(52.81%)	92(12.30%)	19(2.54%)	242(32.35%)
GhCNGC18	45.52 N	401(53.75%)	95(12.73%)	22(2.95%)	228(30.56%)
GhCNGC19	44.82 N	390(54.24%)	81(11.27%)	19(2.64%)	229(31.85%)
GhCNGC20	41.70 N	341(56.93%)	77(12.85%)	17(2.84%)	164(27.38%)
GhCNGC21	46.15 N	396(55.93%)	76(10.73%)	18(2.54%)	218(30.79%)
GhCNGC22	47.80 N	361(51.35%)	84(11.95%)	22(3.13%)	236(33.57%)
GhCNGC23	55.28 N	380(42.94%)	117(13.22%)	43(4.86%)	345(38.98%)
GhCNGC24	47.16 N	348(59.39%)	76(12.97%)	17(2.90%)	145(24.74%)
GhCNGC25	50.48 N	369(52.49%)	87(12.38%)	21(2.99%)	226(32.15%)
GhCNGC26	49.16 N	380(53.30%)	85(11.92%)	21(2.95%)	227(31.84%)
GhCNGC27	50.80 N	375(52.01%)	101(14.01%)	22(3.05%)	223(30.93%)
GhCNGC28	49.75 N	387(54.51%)	91(12.82%)	21(2.96%)	211(29.72%)
GhCNGC29	39.11 Y	530(50.14%)	174(16.46%)	40(3.78%)	313(29.61%)
GhCNGC30	43.27 N	387(52.30%)	91(12.30%)	21(2.84%)	241(32.57%)
GhCNGC31	42.78 N	384(52.17%)	86(11.68%)	28(3.80%)	238(32.34%)
GhCNGC32	48.49 N	361(45.93%)	85(10.81%)	23(2.93%)	317(40.33%)
GhCNGC33	46.77 N	367(47.66%)	82(10.65%)	19(2.47%)	302(39.22%)

注:N 表示不稳定,Y 表示稳定;括号内的数据为 GhCNGC 基因家族成员不同二级结构所占的比例。

2.5 陆地棉 CNGC 的系统进化和基因结构分析

通过 MEME 在线网站<sup>[16]</sup>及 TB-tools 软件<sup>[17]</sup>分析 GhCNGC 家族成员的保守基序、内含子和外显子的数量及分布。由图 3 可以看出,同一亚家族成员分布在同一进化分支上,与图 1 中的进化分析结果相同。分析 motif 的数量及位置发现,同一组成员的 motif 数量基本相同,且分布的位置较接近,在不同组之间存在差异。该家族 33 个成员中的 24 个成员均含有 10 个 motif,8 个成员的 motif 数量为 9 个,

1 个成员的 motif 数量为 5 个。而 motif 数量为 9 个的成员大多分布在Ⅳ组,可能由于Ⅳ组与其他 3 组的亲缘关系较远。有趣的是,Ⅱ组中的 GhCNGC16 仅有 5 个 motif 基序。从在内含子与外显子的分布情况看出,多数同一组成员的内含子及外显子数量较为接近,I 组 7 个成员外显子数为 6~8 个;Ⅱ组 6 个成员的外显子数量为 3~7 个,除 GhCNGC 之外,均为 7 个外显子;Ⅲ组的外显子数量为 5~11 个;Ⅳ组的外显子数量为 7~13 个,但是Ⅳa 的 2 个成员

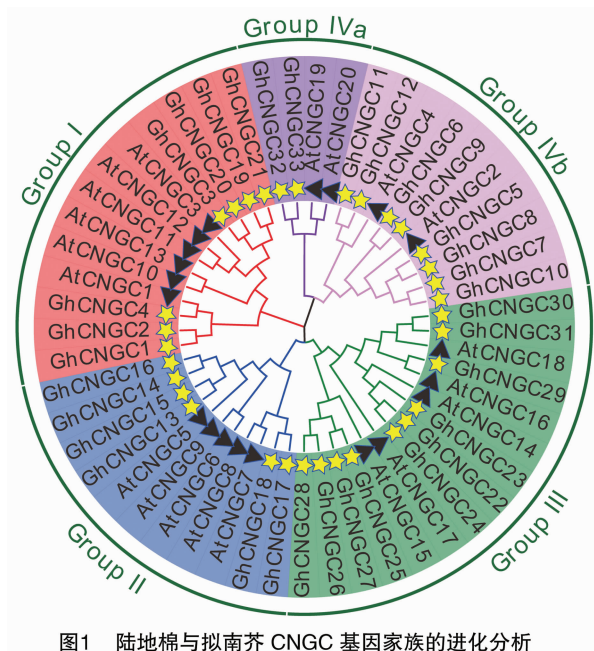


图1 陆地棉与拟南芥 CNGC 基因家族的进化分析

的外显子数量分别为 12、13 个, IV b 的成员中, 5 个外显子数量为 7 个, 3 个外显子数量为 8 个。而且同一组成员的外显子、内含子分布情况类似, 差异显著性小, 表明了进化的保守性。不同组之间的差异较为显著, 尤其是 IV 组的成员之间及其与其他组相比较差异较大。

## 2.6 陆地棉 CNGC 家族成员表达分析

从 NCBI 网站下载陆地棉 TM - 1 的 PRJNA248163 数据资源, 分析 GhCNGC 家族基因的表达模式, 选取根、茎、叶、雄蕊、雌蕊、花托、花萼和花瓣等 8 个组织进行预测。图 4 - a 中 16 个基因的表达量较低, 图 4 - b 中 17 个基因的表达量较高。不同 GhCNGC 家族基因在不同组织中的表达量存在差异, GhCNGC10 在茎、花托中的表达量高, GhCNGC11 在根、叶、花托中的表达量高, GhCNGC17 在茎中的表达量高, GhCNGC26 在雄蕊中的表达量

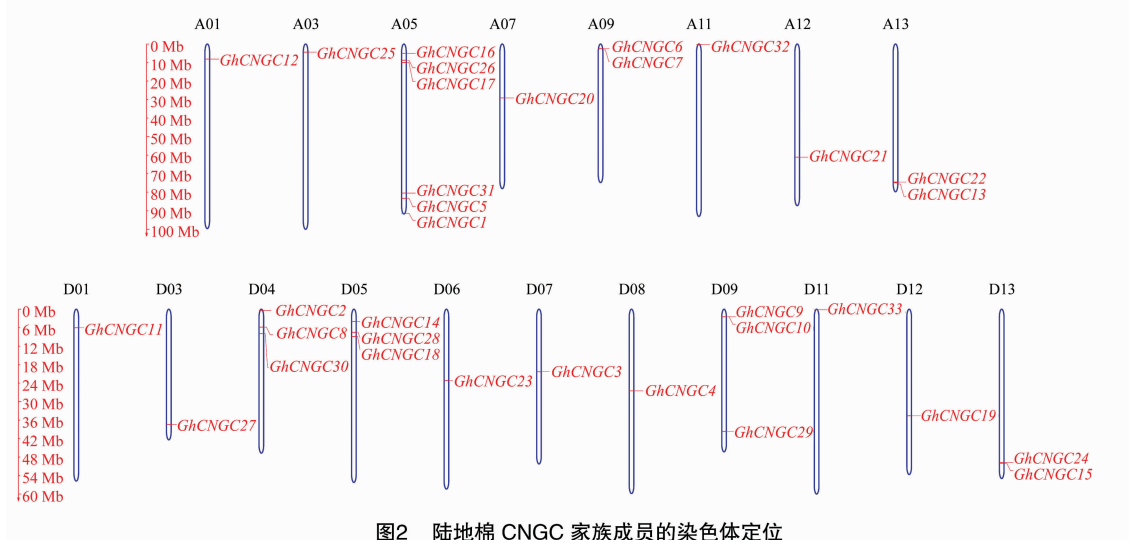


图2 陆地棉 CNGC 家族成员的染色体定位

高, GhCNGC29 在花萼中的表达量高, GhCNGC27 在雌蕊中的表达量高。GhCNGC2、GhCNGC11、GhCNGC15、GhCNGC17、GhCNGC26 和 GhCNGC30 在根中的表达量相对较高。由此可见, GhCNGC10、GhCNGC11、GhCNGC27、GhCNGC29 可能参与陆地棉的生殖过程, GhCNGC17、GhCNGC2、GhCNGC15 可能参与到陆地棉的营养生长过程, 而 GhCNGC10、GhCNGC11、GhCNGC17、GhCNGC29 等基因在多个组织中的表达量均较高, 可能这些基因具有一因多效的特点。

## 3 讨论

环核苷酸门控通道是配体门控、钙离子渗透的

二价阳离子选择性通道, 在非生物胁迫信号传导相关的信号传导过程中具有重要的生物学功能。本研究基于电生理和异源表达分析, 用正向遗传方法明确了拟南芥中的 AtCNGC2、AtCNGC4、AtCNGC11 和 AtCNGC12 参与了植物免疫过程<sup>[18]</sup>。据报道, 其生物学作用在防御反应、发育和离子体内平衡方面具有重要作用。目前, 枣树<sup>[19]</sup>、水稻<sup>[20]</sup>、梨<sup>[2]</sup>、烟草<sup>[21]</sup>、小麦<sup>[22]</sup>等植物的 CNGC 蛋白均有相应研究。虽然 CNGC 在植物生存及对环境的胁迫响应中起着关键作用, 但人们对陆地棉中 CNGC 家族所扮演的角色和功能知之甚少。陆地棉是全球重要的经济作物, 本研究在陆地棉 TM - 1 全基因组数据库中筛选鉴定获得 33 个 GhCNGC 蛋白。通过分析确

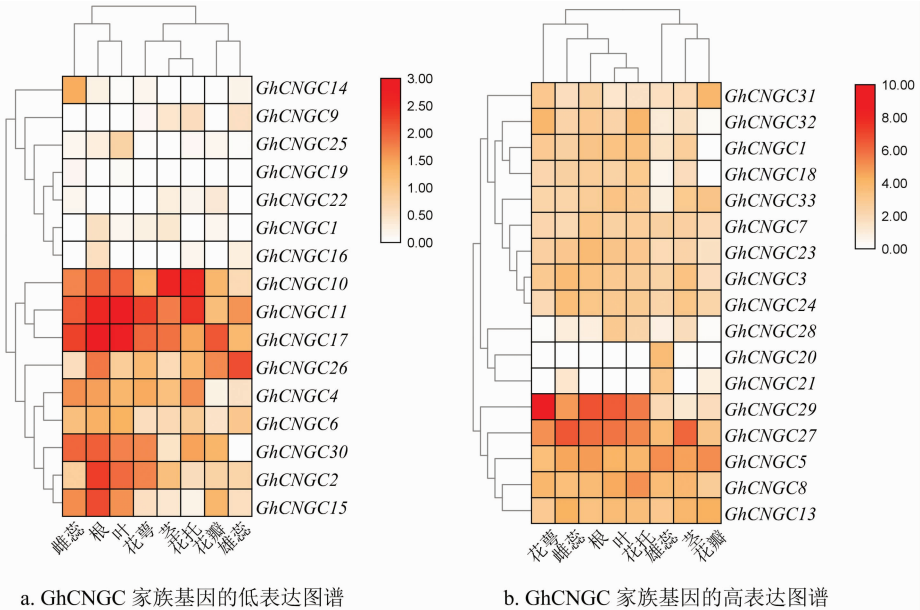
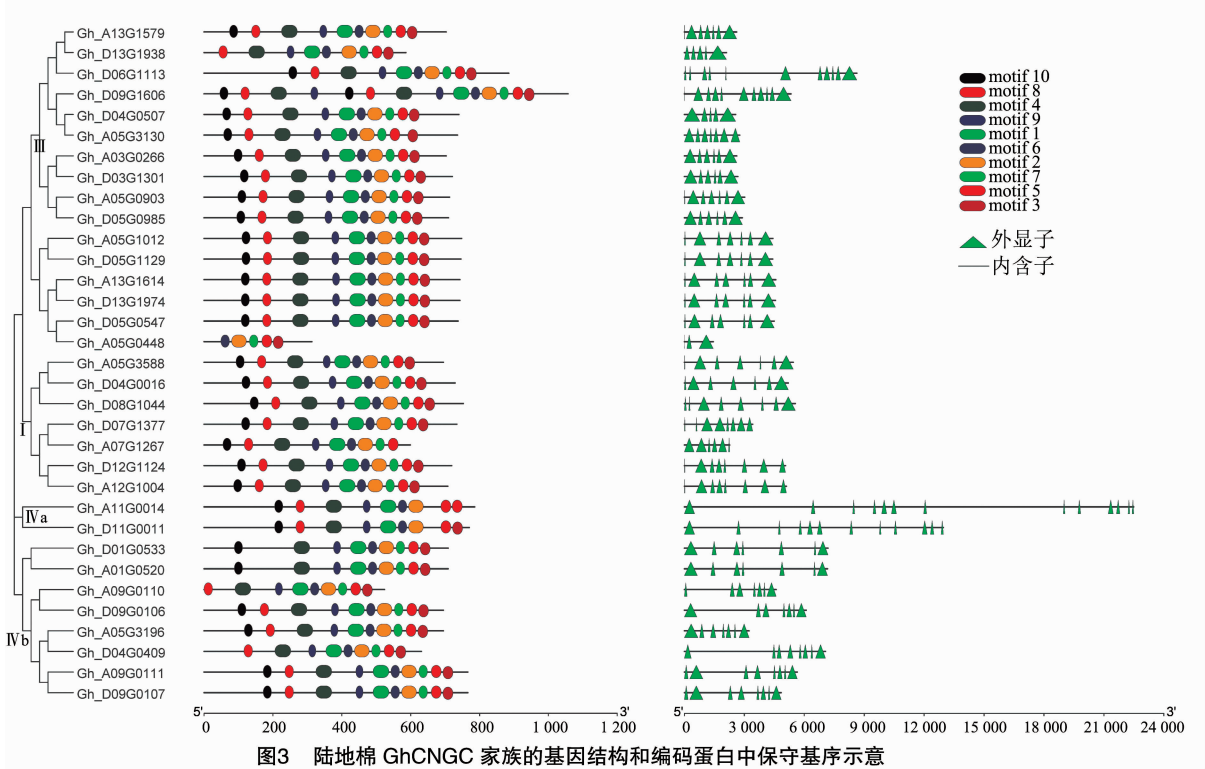


图4 陆地棉 CNGC 家族基因的表达分析

定 33 个 GhCNGC 蛋白的生理生化特征,陆地棉环状核苷酸门控通道基因家族成员 CDS 序列全长为 942 ~ 3 174 bp, 编码的氨基酸数量为 313 ~ 1 057 个。脂肪指数为 77.03 ~ 102.46, 平均亲水性为 -0.673 ~ 0.097, 都属于亲水性蛋白。理论等电点为 6.89 ~ 9.59, 且等电点、蛋白质电荷对于溶解度, 亚细胞定位和相互作用非常重要, 这取决于直系同源物之间的插入和缺失及有机体的生态<sup>[24]</sup>。根据蛋

白不稳定指数统计结果可知, 该家族成员的蛋白不稳定指数为 39.11 ~ 57.22, 仅 GhCNGC29 为稳定蛋白(稳定指数 < 40), 其余 32 个家族成员均为不稳定蛋白。陆地棉是四倍体, 具有 A、D 2 个亚基因组, 染色体定位分析发现, 这 33 个 GhCNGC 蛋白有 15 个存在于 A 亚基因组上, 18 个存在于 D 亚基因组上。由系统发育分析结果可知, GhCNGC 家族成员分为 I、II、III、IV 等 4 个组, 第 IV 组又分为 IV a、



IV b 2 个亚组,与拟南芥 CNGC 家族分类相似<sup>[25]</sup>。这些数据表明,基因在进化过程中发生了分离。不同分组中包含的家族成员数量不同,可能由于在基因家族进化过程中,基因复制、基因丢失扮演着重要角色,从而创造新的基因和不同的功能<sup>[26]</sup>,以优化植物的适应性。分析基因差异表达图谱发现,*GhCNGC10*、*GhCNGC11*、*GhCNGC27*、*GhCNGC29* 在花托、花萼、雌蕊中表现出差异表达,表明它们可能参与到陆地棉的生殖过程中。而 *GhCNGC10*、*GhCNGC11*、*GhCNGC17*、*GhCNGC29* 等基因在多个组织中均有较高表达量,可能由于这些基因参与了多个代谢通路。

本研究以生物信息学和比较基因组学方法,分析了关于结构域、外显子-内含子结构以及系统进化树和表达分析的全面信息。已知植物 CNGC 对多种非生物刺激起着关键作用,包括冷胁迫、盐胁迫、激素应答、发育和光信号传导等<sup>[27]</sup>,这些信息可以用于分析蛋白质相互作用网络,可为改善陆地棉的抗逆性、分子育种、纤维品质等提供重要参考。

#### 4 结论

综上所述,本研究通过生物信息学手段从陆地棉基因组中全面鉴定出 33 个 CNGC 基因,分别位于 A、D 亚基因组中的 CNGC 家族中,分别有 15、18 个成员。本研究还分析了系统发育、保守基序和外显子等,以转录组数据为基础分析了该家族成员在不同组织中的差异性表达。总体来看,对陆地棉基因组中 GhCNGC 基因家族的分析对植物 CNGC 功能研究提供了综合概述,并为进一步阐明 GhCNGC 基因家族基因间相互作用的机制提供了前景。

#### 参考文献:

- [1] DeFalco T A, Marshall C B, Munro K, et al. Multiple calmodulin-binding sites positively and negatively regulate *Arabidopsis* CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED CHANNEL12 [J]. *Plant Cell*, 2016, 28 (7): 1738-1751.
- [2] Chen J Q, Yin H, Gu J P, et al. Genomic characterization, phylogenetic comparison and differential expression of the cyclic nucleotide-gated channels gene family in pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) [J]. *Genomics*, 2015, 105 (1): 39-52.
- [3] Zelman A K, Dawe A, Berkowitz G A. Identification of cyclic nucleotide gated channels using regular expressions [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2013, 1016: 207-224.
- [4] Nawaz Z, Kakar K U, Saand M A, et al. Cyclic nucleotide-gated ion channel gene family in rice, identification, characterization and experimental analysis of expression response to plant hormones, biotic and abiotic stresses [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15 (1): 853.
- [5] Hao L D, Qiao X L. Genome-wide identification and analysis of the CNGC gene family in maize [J]. *Peer J*, 2018, 6: e5816.
- [6] Moon J Y, Belloeil C, Ianna M L, et al. *Arabidopsis* CNGC family members contribute to heavy metal ion uptake in plants [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20 (2): 413.
- [7] Kakar K U, Nawaz Z, Kakar K, et al. Comprehensive genomic analysis of the CNGC gene family in *Brassica oleracea*; novel insights into synteny, structures, and transcript profiles [J]. *BMC Genomics*, 2017, 18 (1): 869.
- [8] Li Q Q, Yang S Q, Ren J, et al. Genome-wide identification and functional analysis of the cyclic nucleotide-gated channel gene family in Chinese cabbage [J]. *3 Biotech*, 2019, 9 (3): 114.
- [9] Saand M A, Xu Y P, Munyampundu J P, et al. Phylogeny and evolution of plant cyclic nucleotide-gated ion channel (CNGC) gene family and functional analyses of tomato CNGCs [J]. *DNA Research*, 2015, 22 (6): 471-483.
- [10] Lu M, Zhang Y Y, Tang S K, et al. AtCNGC2 is involved in jasmonic acid-induced calcium mobilization [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67 (3): 809-819.
- [11] Ali R, Ma W, Lemtiri-Chlieh F, et al. Death don't have no mercy and neither does calcium: *Arabidopsis* CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL2 and innate immunity [J]. *Plant Cell*, 2007, 19 (3): 1081-1095.
- [12] Tunc-Ozdemir M, Rato C, Brown E, et al. Cyclic nucleotide gated channels 7 and 8 are essential for male reproductive fertility [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (2): e52777.
- [13] Tunc-Ozdemir M, Tang C, Ishka M R, et al. A cyclic nucleotide-gated channel (CNGC16) in pollen is critical for stress tolerance in pollen reproductive development [J]. *Plant Physiology*, 2013, 161 (2): 1010-1020.
- [14] Gao F, Han X W, Wu J H, et al. A heat-activated calcium-permeable channel - *Arabidopsis* cyclic nucleotide-gated ion channel 6 - is involved in heat shock responses [J]. *Plant Journal*, 2012, 70 (6): 1056-1069.
- [15] 晁江涛, 孔英珍, 王倩, 等. MapGene2Chrom 基于 Perl 和 SVG 语言绘制基因物理图谱 [J]. *遗传*, 2015, 35 (1): 91-97.
- [16] Bailey T L, Boden M, Buske F A, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching [J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37: 202-208.
- [17] Chen C J, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools: an integrative Toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Molecular Plant*, 2020, 13 (8): 1194-1202.
- [18] Moeder W, Urquhart W, Ung H, et al. The role of cyclic nucleotide-gated ion channels in plant immunity [J]. *Molecular Plant*, 2011, 4 (3): 442-452.
- [19] Wang L X, Li M, Liu Z G, et al. Genome-wide identification of CNGC genes in Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) and *ZjCNGC2* mediated signalling cascades in response to cold stress [J]. *BMC Genomics*, 2020, 21 (1): 191.

袁 谦,张 锋,张中州,等. 国审小麦品种漯麦 18 重要功能基因的 KASP 标记检测[J]. 江苏农业科学,2021,49(24):56-59.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.24.009

# 国审小麦品种漯麦 18 重要功能基因的 KASP 标记检测

袁 谦,张 锋,张中州,甄士聪,望俊森,赵永涛,鲁进恒,范志业

(漯河市农业科学院,河南漯河 462300)

**摘要:**为了深入了解漯麦 18 重要性状的分子机制,采用竞争性等位基因特异性 PCR(KASP)标记检测的方法对其重要功能基因进行检测,并分析了漯麦 18 含有的重要功能基因。结果表明,漯麦 18 含有 1 个矮秆基因型 *Rht-D1b*、2 个光周期不敏感早开花等位基因型 *Ppd-A1a* 和 *Ppd-B1a*,具有较广的适应性;漯麦 18 籽粒较大,商品性好,品质优良,聚合了 10 个高粒质量微效基因,同时高分子量麦谷蛋白亚基基因 *Glu-A1* 和 *Glu-D1* 等位基因型为 1 和 5+10,含有 1 个籽粒硬度基因 *Pinb-D1b*;漯麦 18 抗逆性强,聚合了抗穗发芽主效基因 *Vp-B1*、*PHS\_646* 和微效基因 *TaSdr-B1*,同时抗旱能力突出,具有 *1-feh-w3*、*CWI-4A* 和 *CWI-5D* 等 3 个微效基因。以上信息为深入认识漯麦 18 的特征性状的分子机制提供了理论支持,对品种的进一步应用和未来小麦遗传改良具有较强的实用价值。

**关键词:**漯麦 18;适应性;粒质量;抗逆性;品质;KASP 标记检测

**中图分类号:** S512.103 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)24-0056-04

漯麦 18 是漯河市农业科学院为了拓宽小麦遗传基础,聚合多生态区小麦优良性状选育而成的小麦新品种<sup>[1]</sup>。采用阶梯杂交的方法聚合法国抗源材料 Fr81-3 的抗性,绵阳 84-27 的早熟性、大穗大粒等特点和宝丰 7228 的冠层结构优良、灌浆速度快等特点创制了小麦新种质 4336<sup>[2-3]</sup>。漯麦 18 以 4336 为母本、周麦 16 为父本进一步拓宽广适性遗传基础,将共同优点进一步巩固和提高,具有根系

活力强、冬季抗寒性好、耐后期高温干旱、灌浆速度快、高产稳产等特点<sup>[4]</sup>。

竞争性等位基因特异性 PCR(kompetitive allele specific PCR,简称 KASP)标记检测,即竞争性等位基因特异性 PCR 技术,是一种单核苷酸多态性(SNP)检测方法,具有高通量、低成本、准确性高等优点<sup>[5]</sup>,目前已经逐渐被应用于小麦功能基因检测、解析品种特性以及分子标记辅助育种工作。杨子博等采用 KASP 标记检测技术对江苏淮北地区近年来育成品种的硬度基因型进行了检测分析,明确了该地区小麦品种籽粒性状的基因型,为品种的品质改良提供了参考<sup>[6]</sup>;权有娟等采用 KASP 标记检

收稿日期:2021-04-04

基金项目:河南省现代农业产业技术体系专项(编号:z2010-01-06)。

作者简介:袁 谦(1987—),男,河南开封人,硕士,助理研究员,主要从事小麦育种研究。E-mail:524341502@qq.com。

通信作者:赵永涛,硕士,副研究员,主要从事小麦育种研究。

E-mail:zhaoyt81@163.com。

[20] Cui Y M, Lu S, Li Z, et al. CYCLIC NUCLEOTIDE - GATED ION CHANNELS 14 and 16 promote tolerance to heat and chilling in rice [J]. Plant Physiology, 2020, 183(4): 1794-1808.

[21] Nawaz Z, Kakar K U, Ullah R, et al. Genome - wide identification, evolution and expression analysis of cyclic nucleotide - gated channels in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) [J]. Genomics, 2019, 111(2): 142-158.

[22] Guo J, Islam M A, Lin H C, et al. Genome - wide identification of cyclic nucleotide - gated ion channel gene family in wheat and functional analyses of *TaCNGC14* and *TaCNGC16* [J]. Front Plant Sci, 2018, 9: 18.

[23] 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.

[24] Khaldi N, Shields D C. Shift in the isoelectric - point of milk proteins as a consequence of adaptive divergence between the milks of mammalian species [J]. Biol Direct, 2011, 6: 40.

[25] Mäser P, Thomine S, Schroeder J I, et al. Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2001, 126(4): 1646-1667.

[26] Chauve C, Doyon J P, El - Mabrouk N. Gene family evolution by duplication, speciation, and loss [J]. Journal of Computational Biology, 2008, 15(8): 1043-1062.

[27] Fu Y P, Duan X Y, Tang C L, et al. TaADF7, an actin - depolymerizing factor, contributes to wheat resistance against *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* [J]. Plant J, 2014, 78(1): 16-30.