

徐凯祥,焦 瑒,王帅帅,等. 陆地棉 *GhRTE* 基因家族的鉴定与耐盐性分析[J]. 江苏农业科学,2024,52(6):52–60.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2024.06.007

陆地棉 *GhRTE* 基因家族的鉴定与耐盐性分析

徐凯祥,焦 瑒,王帅帅,陈全家,郑 凯

(新疆农业大学农学院/棉花教育部工程研究中心,新疆乌鲁木齐 830052)

摘要: RTE (reversion – to – ethylene) 是一种植物乙烯响应的负调节因子,参与植物生长发育并在非生物胁迫的逆境中起着重要作用。通过对陆地棉 (*Gossypium hirsutum*) RTE 家族成员的鉴定及其在盐胁迫下的表达模式进行解析,为进一步探索棉花 RTE 家族成员的功能提供一定的研究指导。通过棉花全基因组数据,鉴定棉花 RTE 家族成员,以陆地棉为主要研究对象,结合海岛棉 (*Gossypium barbadense*)、亚洲棉 (*Gossypium arboreum*)、雷蒙德氏棉 (*Gossypium raimondii*) 等植物的 RTE 基因家族成员进行物种内的进化分析。同时,利用转录组学方法,研究陆地棉 RTE 家族基因的表达量及其对盐胁迫的应答规律。结果表明,棉花 RTE 蛋白家族共鉴定出 24 个 RTE 基因,其中来自陆地棉和海岛棉的各 8 个,有 4 个来自雷蒙德氏棉,4 个来自亚洲棉。系统发育树分析将 24 个 RTE 基因分成 3 个亚族, *GhRTE* 基因同一亚族成员间具有相似的基因结构和保守基序。 *GhRTE* 启动子区包含了许多与植物激素反应、生长发育和逆境应答密切相关的顺式调控因子。通过对转录组数据分析以及荧光定量分析,初步验证该家族 *GhRTE6* 基因可能在棉花生长发育以及盐胁迫响应中发挥作用,可为阐明 *GhRTE* 基因耐盐的分子机制提供理论依据。

关键词: 陆地棉; RTE 基因家族; 非生物胁迫; 表达特性分析; 耐盐性

中图分类号: S562.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2024)06–0052–09

乙烯是人类迄今发现的唯一一种植物气体激素,它在植物的生长发育过程中起着十分关键的作用。乙烯与受体结合后,可观察到对种子萌发、细胞分裂、细胞伸长和分化、根毛生长、幼苗、性别决定、果实成熟、果实衰老、果实脱落以及对盐、干旱、洪水、低温胁迫等方面的各种反应及影响^[1]。RTE 是植物乙烯反应的负调节因子,参与植物生长发育并在非生物胁迫的逆境中起着重要作用。RTE 基因在高等真核生物中广泛表达,而在低等真核生物和原核生物中不表达。前人通过遗传学分析及转基因技术,对拟南芥中 RTE 的功能进行了进一步研究,结果表明, RTE 基因的过表达导致了乙烯的抗性;然而,当乙烯受体 ETR (ethylene – response) 基因被敲除,该基因过表达后,植株就会丧失对乙烯的抗性,这表明乙烯受体与 RTE 之间存在着紧密的相互作用。通过构建 RTE 和受体功能缺失的多突

变体,发现 RTE 可能在乙烯信号通路中起负调控作用,并且 RTE 可能对 ETR 起正调控作用^[2]。然而在陆地棉中,关于棉花 RTE 基因家族成员相关的生物信息及功能特性鲜有报道。

棉花是一种重要的纤维作物,也是一种以商业规模将纤维转化为织物的经济作物^[3]。盐胁迫对植物生长发育的影响贯穿于植物个体发育的整个过程,但幼苗期被认为是最脆弱的时期之一^[4–5]。此外,虽然棉花被认为是中等耐盐的,临界值为 7.7 dS/m,但其生长在苗期受到严重影响,从而降低了产量^[6]。新疆是我国最大的棉产地,2022 年,新疆棉花产量 539.1 万 t,占全国总量的 90.2%,比 2021 年增加 26.2 万 t,增长 5.1%^[7],新疆棉花生产能够直接影响我国的棉花生产。据有关数据统计,新疆盐碱土地面积约占我国盐碱土地总面积的 22.01%,达到 2 181.4 万 hm²。在新疆地区 407 万 hm² 耕地中,受盐渍化影响的耕地达 122.88 万 hm²,极大程度影响了棉花的种植^[8–9]。提高棉花的耐盐性是改善土壤盐碱化的必要方法。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本研究所用陆地棉耐盐材料 CQJ–5 和敏盐材

收稿日期:2023–05–29

基金项目:新疆维吾尔自治区重大科技专项(编号:2022A03004–2)。

作者简介:徐凯祥(1995–),男,甘肃兰州人,硕士研究生,研究方向为棉花耐盐性。E–mail:965762115@qq.com。

通信作者:陈全家,博士,教授,博士生导师,从事棉花遗传育种研究, E–mail:chenqjia@126.com;郑 凯,博士,副教授,从事棉花种质资源优异基因挖掘和分子育种研究, E–mail:zhengkai555@126.com。

料新陆早 49 号(XLZ-49)均由新疆作物遗传改良与种质创新重点实验室提供^[10-11]。将形状饱满的棉种播种于装满蛭石与花土体积比 1:1 混合的营养钵中,每个营养钵放入 3~4 粒种子,于培养室中进行培养,温度为 25℃,光、暗周期为 12 h 光照、12 h 黑暗。待长到 3 叶 1 心期,选取真叶生长一致的幼苗,展开盐胁迫处理,将幼苗根系浸入 150 mmol/L NaCl 溶液中,分别于 0、3、6、12、24、48 h 后,取棉花幼苗的根、茎、叶部用于分析 *GhRTE6* 基因在盐胁迫条件下的表达水平。以上样品选取后迅速用液氮冷冻,贮藏于 -80℃ 冰箱备用^[12]。

1.2 棉花 *RTE* 家族基因鉴定与蛋白理化性质分析

本试验首先从 CottonGen 数据库(<https://www.cottongen.org/>)中获取棉花的全基因组和蛋白组学数据,并下载 GFF3 注释文件^[13]。以从 NCBI-CDD 数据库获取的 *RTE* 蛋白保守结构域(PF05608)为切入点,借助于隐马尔可夫模型,并基于 Hmmsrch 搜索结果,通过本地数据库 BLAST 比对,获取棉花全基因组 *RTE* 蛋白质的序列信息,并对其进行生物信息学分析,进而对已知的 *RTE* 蛋白质进行功能分析。通过 ExPASy 网站上的 ProtParam 在线工具,分析棉花 *RTE* 基因编码的蛋白质序列的分子量(MW)、等电点(pI)等物理化学性质,并通过 WoLF PSORT(<https://wolfpsort.hgc.jp/>)进行亚细胞定位^[14-15]。

1.3 进化树、同源性分析

采用 MEGA-X 软件对陆地棉、海岛棉、亚洲棉、雷蒙德氏棉等棉花品种的 *RTE* 蛋白质序列进行多序列比对,并建立进化树^[16]。用名为 Evolview v3 的在线网站对其进行美化^[17]。根据棉花的基因组和染色体数据库 CottonFGD,利用 TBtools 软件显示出 *RTE* 蛋白家族成员在棉花染色体上的同源性^[18]。通过 CottonGen 数据库、BLAST 软件、TBtools 软件和 MCSanX 等工具,对在陆地棉内部 A、D 基因亚组之间以及四大棉种之间的 *RTE* 蛋白家族同源性,进行了比对和共线性分析,并通过 TBtools 进行可视化分析后用 Adobe Illustrator CS6 进行美化修饰^[19-22]。

1.4 染色体定位及基因结构分析

借助 TBtools 软件将 *GhRTE* 基因染色体的定位信息从已下载的 GFF3 注释文件中提取出来,之后进行可视化。利用 MEME 程序分析 *RTE* 家族成员的 Motif 基序(最大发现数设置为 15)^[23],并使用

TBtools 软件对其进行可视化分析。

1.5 顺式作用元件预测

利用 TBtools 软件,从已下载的基因组文件中提取陆地棉 *RTE* 基因起始密码子上游 2 000 bp 序列,将这些序列视为启动子区,并利用 PlantCARE 数据库(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对其进行分析,以此来预测 *GhRTE* 基因上游启动子区可能存在的顺式作用元件^[15,24]。

1.6 陆地棉 *RTE* 基因 RNA-seq 表达模式分析

从 NCBI SRA 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>)下载陆地棉各器官的转录组数据(根、茎、叶、雌蕊、雄蕊、花萼、花瓣和花托)和非生物胁迫处理的转录组数据(基因组测序计划编号为 PRJNA248163)。参考基因组文件 TM-1_genome_ZJU_v2.1,对原始数据进行转录组标准分析,获得表达数据^[25-26]。表达数据标准化为 $\lg(\text{TPM} + 1)$,通过 TBtools 软件绘制表达量图。本研究的基因结构图、顺式作用元素图和热图均由 TBtools 软件完成,然后用 Adobe Illustrator CS6 进行美化和调整。

1.7 RNA 提取及 qRT-PCR 分析

利用 CottonFGD 数据库下载陆地棉 *RTE* 基因编码序列(CDS)信息,利用 DNAMAN(Lynnon Corporation, Canada)软件实现对相关基因特异性荧光定量引物的设计。根据生产商提供的说明书,使用 RNAPrep Pure 多糖多酚的总 RNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]从幼苗中提取总 RNA,并使用 abm 反转录试剂盒进行合成,以获得第 1 条 cDNA。通常选择棉花 *Ubiquitin7(UBQ7)* 作为内参基因,利用罗氏 Light Cycler 荧光定量 PCR 仪,对在不同部位各个胁迫处理时期的 *RTE* 基因进行 qRT-PCR 扩增(3 次技术重复),相关基因相对表达量分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[27]。最后选择 GraphPad Prism version 9.0.0 for Windows 对数据进行可视化处理,完成后用 Adobe Illustrator CS6 进行美化调整。

2 结果与分析

2.1 棉花 *RTE* 基因的鉴定和分析

通过本地 BLAST 数据库和 NCBI-CDD 数据库对棉花 *RTE* 蛋白家族进行筛选验证,共鉴定出 24 个 *RTE* 基因,其中陆地棉和海岛棉均包含 8 个基因,雷蒙德氏棉 4 个、亚洲棉 4 个(表 1)。如表 1 所示,陆地棉 *RTE* 基因编码区长度范围为 684~762 bp,氨基酸长度范围在 227~253 aa 之间,基因编码的蛋白质

分子量范围为 25.84 ~ 28.62 ku,等电点(pI)介于 5.86 ~ 7.09 之间;海岛棉 *RTE* 基因编码区长度为 468 ~ 762 bp,氨基酸长度在 155 ~ 253 aa 之间,基因编码的蛋白质分子量范围为 17.92 ~ 28.64 ku,等电点介于 4.99 ~ 7.09 之间;雷蒙德氏棉 *RTE* 基因编码区长度为 588 ~ 762 bp,氨基酸长度在 195 ~ 253 aa 之间,基因编码的蛋白质分子量范围为 22.38 ~ 28.57 ku,等电点介于 4.94 ~ 7.09 之间;亚

洲棉 *RTE* 基因编码区长度为 684 ~ 762 bp,氨基酸长度在 227 ~ 253 aa 之间,基因编码的蛋白质分子量范围 25.83 ~ 28.54 ku,等电点介于 5.27 ~ 7.01 之间。预测亚细胞的定位结果显示,棉花中的 24 个 *RTE* 编码蛋白基本都位于细胞质或质膜中。*RTE* 基因家族成员的理化性质和亚细胞定位结果大致相同,这也预示该基因家族在棉花生长发育信号传递过程中扮演着重要角色。

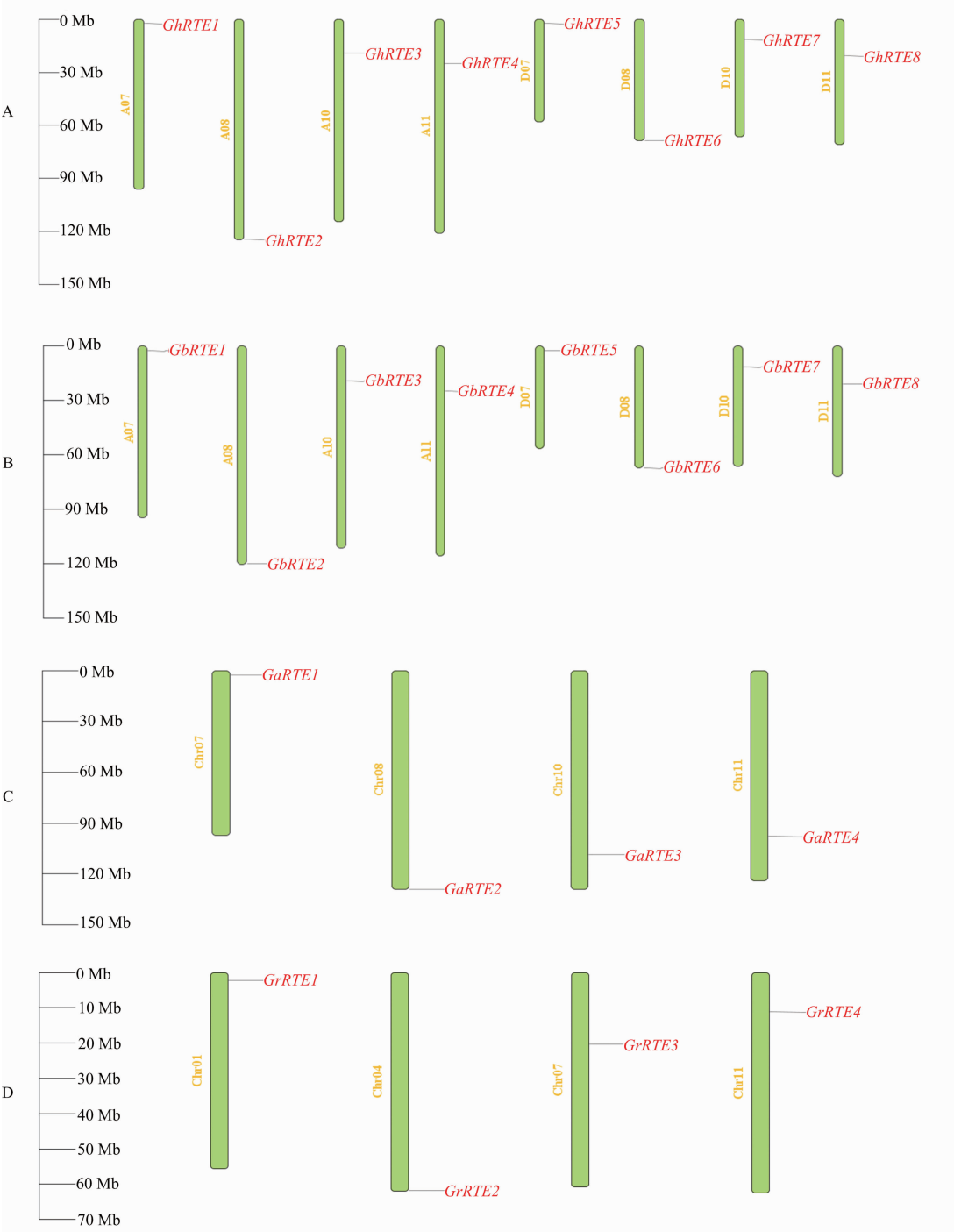
表 1 棉花 *RTE* 基因家族信息

基因编号	基因名称	染色体位置	CDS 长度 (bp)	氨基酸长度 (aa)	蛋白质分子量 (ku)	等电点	亚细胞定位
GH_A07G0233	<i>GhRTE1</i>	A07(+)2354927 ~ 2355773	726	241	27.31	7.09	细胞质
GH_A08G2821	<i>GhRTE2</i>	A08(+)124595947 ~ 124597061	762	253	28.59	6.77	质膜
GH_A10G0971	<i>GhRTE3</i>	A10(-)19055600 ~ 19057655	702	233	26.54	5.93	质膜
GH_A11G1878	<i>GhRTE4</i>	A11(+)24789395 ~ 24790599	684	227	25.88	5.86	细胞质
GH_D07G0240	<i>GhRTE5</i>	D07(+)2320069 ~ 2320915	726	241	27.37	6.83	细胞质
GH_D08G2814	<i>GhRTE6</i>	D08(+)68623588 ~ 68624709	762	253	28.62	6.82	质膜
GH_D10G0986	<i>GhRTE7</i>	D10(+)11504472 ~ 11506263	702	233	26.50	6.23	质膜
GH_D11G1911	<i>GhRTE8</i>	D11(+)20728007 ~ 20729211	684	227	25.84	6.29	细胞质
GB_A07G0224	<i>GbRTE1</i>	A07(+)2510547 ~ 2511393	726	241	27.31	7.09	细胞质
GB_A08G2933	<i>GbRTE2</i>	A08(+)120291842 ~ 120292956	762	253	28.64	6.83	质膜
GB_A10G1009	<i>GbRTE3</i>	A10(-)19260852 ~ 19262907	702	233	26.55	5.93	质膜
GB_A11G1889	<i>GbRTE4</i>	A11(+)24766435 ~ 24767639	684	227	25.88	5.86	细胞质
GB_D07G0231	<i>GbRTE5</i>	D07(+)2328863 ~ 2329709	726	241	27.47	7.09	质膜
GB_D08G2925	<i>GbRTE6</i>	D08(+)67234618 ~ 67235739	762	253	28.62	6.82	质膜
GB_D10G0974	<i>GbRTE7</i>	D10(+)11696863 ~ 11698655	702	233	26.50	6.23	质膜
GB_D11G1936	<i>GbRTE8</i>	D11(+)20851886 ~ 20854119	468	155	17.92	4.99	细胞质
Ga07G0241	<i>GaRTE1</i>	Chr07(+)2582687 ~ 2583533	726	241	27.28	7.09	细胞质
Ga08G2914	<i>GaRTE2</i>	Chr08(+)128889242 ~ 128890354	762	253	28.57	6.83	质膜
Ga10G2007	<i>GaRTE3</i>	Chr10(+)108589794 ~ 108591850	702	233	26.49	5.93	质膜
Ga11G2098	<i>GaRTE4</i>	Chr11(-)97805494 ~ 97806695	588	195	22.38	4.94	质膜
Gorai.001G022900	<i>GrRTE1</i>	Chr01(+)2163662 ~ 2166789	726	241	27.37	6.83	细胞质
Gorai.004G287200	<i>GrRTE2</i>	Chr04(+)61737022 ~ 61739142	762	253	28.54	7.01	质膜
Gorai.007G198700	<i>GrRTE3</i>	Chr07(+)20208559 ~ 20210386	684	227	25.83	6.07	细胞质
Gorai.011G100100	<i>GrRTE4</i>	Chr11(+)11150677 ~ 11152880	720	239	27.15	5.27	质膜

2.2 棉花 *RTE* 基因染色体定位与命名

将棉花 *RTE* 基因进行染色体结构定位分析,结果如图 1 所示,4 个棉花品种 *RTE* 基因在染色体上呈不均匀分布。陆地棉和海岛棉的 A01、A02、A03、A04、A05、A06、A09、A12、A13、D01、D02、D03、D04、D05、D06、D09、D12、D13 染色体均无 *RTE* 基因分布,A07、A08、A10、A11、D07、D08、D10 和 D11 染色体各有 1 个基因分布。亚洲棉中 Chr07、Chr08、Chr10 和 Chr11 染色体各有 1 个基因分布,其他染色

体上均无 *RTE* 基因。雷蒙德氏棉中 Chr01、Chr04、Chr07 和 Chr11 染色体各有 1 个基因,其他染色体上均无 *RTE* 基因。陆地棉所含的 *RTE* 基因分布于 8 条不同的染色体上,其中 A 亚组染色体上有 4 个,D 亚组染色体上有 4 个,海岛棉与之相同。雷蒙德氏棉 4 个 *RTE* 基因分布于 4 条不同的染色体上,亚洲棉与之相同。说明该基因家族在进化过程中比较稳定。之后根据基因在染色体上的排列位置,将它们命名为 *GhRTE1* ~ *GhRTE8*、*GbRTE1* ~ *GbRTE8*、



A—陆地棉；B—海岛棉；C—亚洲棉；D—雷蒙德氏棉
图1 RTE 基因家族成员在棉花染色体上的位置

GaRTE1 ~ *GaRTE4*、*GrRTE1* ~ *GrRTE4*。

2.3 棉花 RTE 基因家族系统进化分析

采用邻接法对棉花 RTE 基因进行聚类,并建立系统发育树。从图 2 可以看出,24 个 RTE 基因可以被划分为 3 个亚族,分别用 Group1、Group2 和 Group3 表示。Group1 成员最多有 12 个,其中陆地棉和海岛棉均有 4 个,雷蒙德氏棉和亚洲棉均有 2

个。其次,Group2 和 Group3 成员个数相同,均为 6 个,Group2 中陆地棉和海岛棉成员均有 2 个,雷蒙德氏棉和亚洲棉成员均有 1 个。Group3 中陆地棉和海岛棉成员均有 2 个,雷蒙德氏棉和亚洲棉均有 1 个。结合图 1 可以发现,陆地棉和海岛棉在染色体相同位置上的 RTE 基因都紧密地聚集在了同一个亚族中,另外,每一个亚族中,与雷蒙德氏棉、亚

洲棉相比,陆地棉、海岛棉所含的基因数量均是它们的 2 倍,这与棉属的演化规律相吻合。

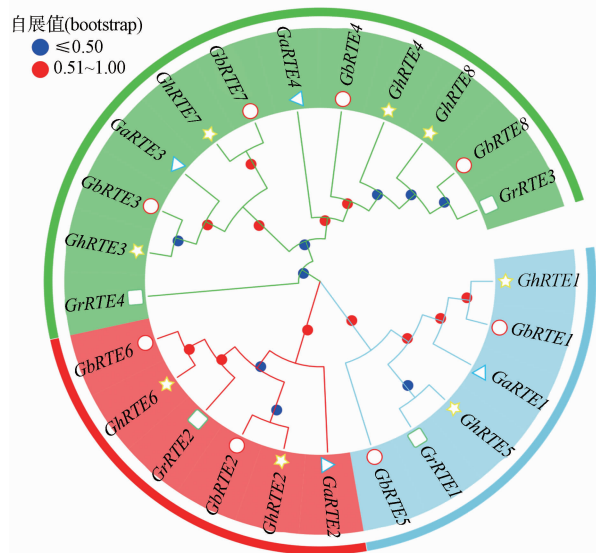


图2 基于4个棉种的 *RTE* 基因家族系统进化树

2.4 陆地棉 *RTE* 基因同源性分析

同源是指在演化过程中具有相同祖先血统的支系间的演化关系。在不同的物种中,源自于同一个祖先的基因被叫作直系同源基因,而在相同的物种中,因为基因复制而分离出来的同源基因就是旁系同源基因^[28]。为了解棉花 *RTE* 基因家族的同源进化关系,对陆地棉、海岛棉、亚洲棉以及雷蒙德氏棉进行分析,同时也可以了解到 8 个 *GhRTE* 在二倍

体棉和四倍体棉中的进化联系。陆地棉各染色体之间有 4 对直系同源基因,A 亚组和 D 亚组出现了加倍复制,并且不同亚组之间有更紧密的进化关系(图 3)。陆地棉与亚洲棉之间有 12 对直系同源基因,与雷蒙德氏棉之间有 12 对直系同源基因,与海岛棉之间有 8 对直系同源基因(图 4),说明彼此之间具有极密切的进化关系,且这些基因在不同棉花中可能具有相同的功能。

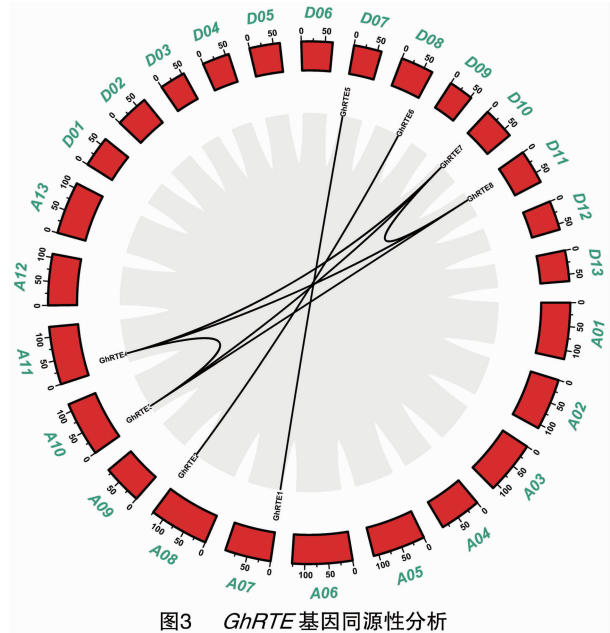


图3 *GhRTE* 基因同源性分析

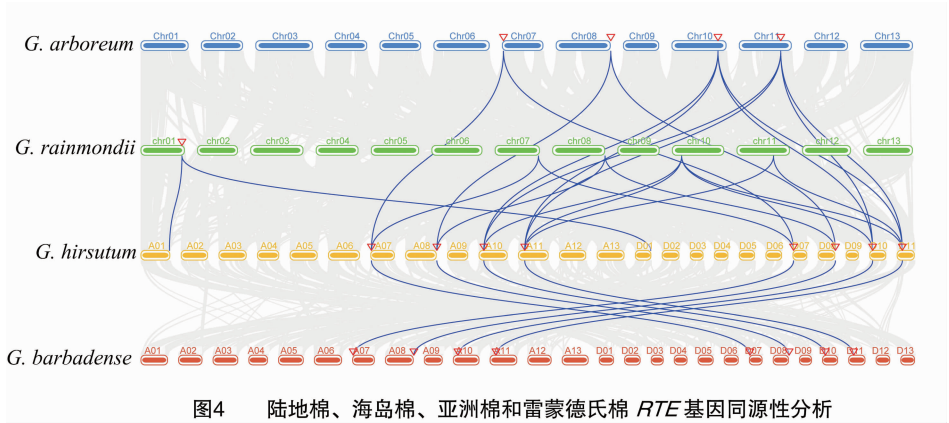


图4 陆地棉、海岛棉、亚洲棉和雷蒙德氏棉 *RTE* 基因同源性分析

2.5 陆地棉 *RTE* 蛋白保守基序及对应的基因结构分析

本研究分析了陆地棉中 8 个 *RTE* 蛋白的序列特征,发现其结构域保守程度较高,将从 *RTE* 蛋白序列中找到的 12 个保守基序依次命名为 Motif1 ~ Motif12,8 个 *GhRTE* 蛋白均含有 Motif1 ~ Motif7 和 Motif9(图 5 - A)。Motif11 基序只存在于 *GhRTE*1

与 *GhRTE*5 中。Motif10 基序只存在于 *GhRTE*2 与 *GhRTE*6 中。Motif12 基序只存在于 *GhRTE*3 与 *GhRTE*7 中。而 *GhRTE*1、*GhRTE*5、*GhRTE*2 和 *GhRTE*6 中均含有 Motif8 基序。*GhRTE* 家族 8 个基因均有 2 个外显子(图 5 - B)。从基因长度方面来看,具有不同长度的基因,其编码序列是相似的。这表明,在进化的过程中,*RTE*基因的内含子长度

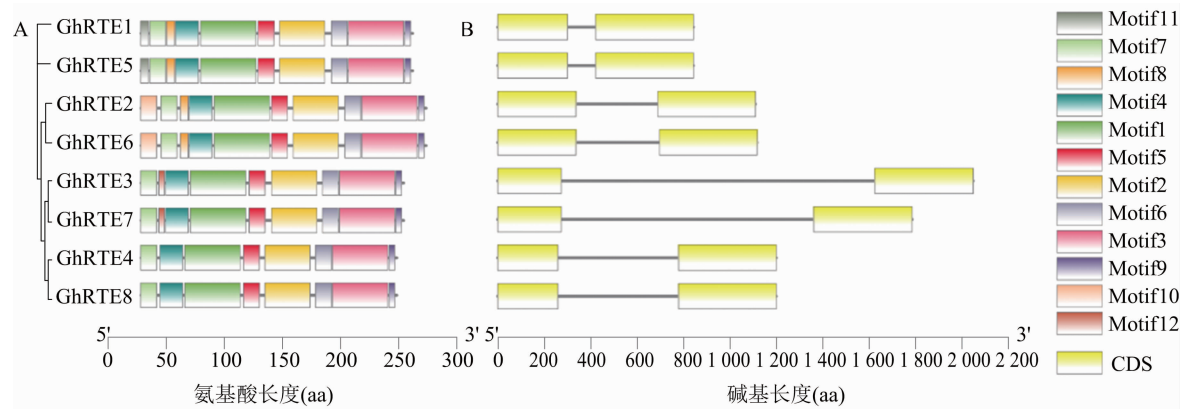


图5 陆地棉 RTE 蛋白保守基序 (A) 及基因结构 (B) 特征分析

发生了较大的改变,这就有可能导致不同的功能。

2.6 陆地棉 *RTE* 基因家族的启动子分析

对陆地棉启动子的顺式元件进行分析,可为研究基因的组织特异性或应激性表达模式提供思路和帮助。由图 6 可知,在 8 个陆地棉 *RTE* 基因中鉴定到的顺式作用元件中,有 41 个与激素有关,例如水杨酸响应元件 (TCA - element, SARE)、脱落酸响应元件 (ABRE)、赤霉素响应元件 (GARE - motif, TATC - box, P - box)、生长素响应元件 (TGA - element, AuxRR - core)、茉莉酸甲酯 (MeJA) 响应元件 (TGACG - motif, CGTCA - motif) 等^[29]。此外,还发现了 20 个逆境应答元件,如低温反应响应元件

(LTR)、防御和应激响应元件 (TC - rich repeats)、干旱胁迫响应元件 (MBS),以及 1 个类黄酮合成响应元件 (MBSI)。8 个 *GhRTE* 基因含有 4 ~ 10 个不同的顺式作用元件,其中以脱落酸和茉莉酸酯相关的顺式作用元件的含量最高。据研究,脱落酸与植株抗逆性显著相关,茉莉酸甲酯与植物生长发育以及抗逆性相关。其中 *GhRTE1*、*GhRTE4* 和 *GhRTE5* 基因所含脱落酸、茉莉酸甲酯顺式元件数量为 3 个, *GhRTE6* 和 *GhRTE8* 基因所含脱落酸、茉莉酸甲酯顺式元件数量为 4 个。说明陆地棉 *RTE* 基因家族可能在植物生长发育以及在非生物胁迫逆境中发挥着较强作用。

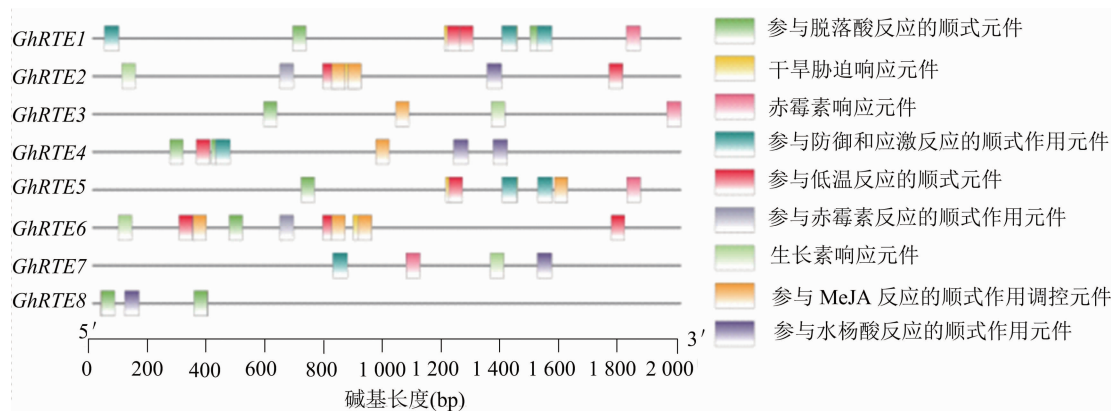


图6 陆地棉中 *RTE* 基因启动子顺式元件分析

2.7 陆地棉 *RTE* 基因家族的表达分析

为了明确 *RTE* 家族基因在陆地棉中的组织表达特异性,以及它们对盐胁迫的响应规律,利用转录组数据,借助 TBtools 软件对 8 个 *GhRTE* 基因在棉花根、茎、叶、花瓣、花托、花萼等组织进行了特异性表达分析。在正常的生长环境下,这些基因在陆地棉的不同部位表现出了不同的表达模式: *GhRTE1*、*GhRTE2*、*GhRTE4*、*GhRTE5*、*GhRTE6* 和

GhRTE8 基因在不同组织中的表达有很大的差异,并且它们的表达量比较高,而其他基因的表达量则比较低,甚至不表达,暗示这些基因可能在陆地棉的生长发育中起重要作用(图 7 - A)。同时分析在不同时期盐胁迫下的陆地棉 *RTE* 家族基因表达情况,发现 *GhRTE2*、*GhRTE5* 和 *GhRTE6* 在盐胁迫下的各个时间阶段中表现出高表达趋势(图 7 - B),且在花托和花萼这类营养器官中的表达量高于其他

组织。由此可推测出 *GhRTE2*、*GhRTE5* 和 *GhRTE6* 可能在棉花的生长发育阶段以及在非生物胁迫响应中发挥重要作用。

2.8 qRT-PCR 分析

通过启动子区相关顺式作用元件(图 6)以及转录组表达(图 7)分析结果,选取盐胁迫下表达变化明显且抗逆性相关顺式作用元件交集最多的 *GhRTE* 基因,最终挑选 *GhRTE6* 基因进行进一步研究。分别对耐盐棉花材料 CQJ-5 以及敏盐材料新

陆早 49 号进行 72 h 盐胁迫处理(图 8)。根据 *GhRTE6* 基因序列设计引物(表 2)并利用 qRT-PCR 分析发现,耐盐材料 CQJ-5 经盐胁迫处理 12 h 后,*GhRTE6* 基因在茎部的表达量较高,而在叶片和根部的表达量则相对较低;敏盐材料新陆早 49 在胁迫后 24 h 时,在茎中表达水平较高,而在根和叶中表达水平相对较低(图 9)。从总体观察发现,*GhRTE6* 基因在耐盐材料中的表达量高于敏盐材料。

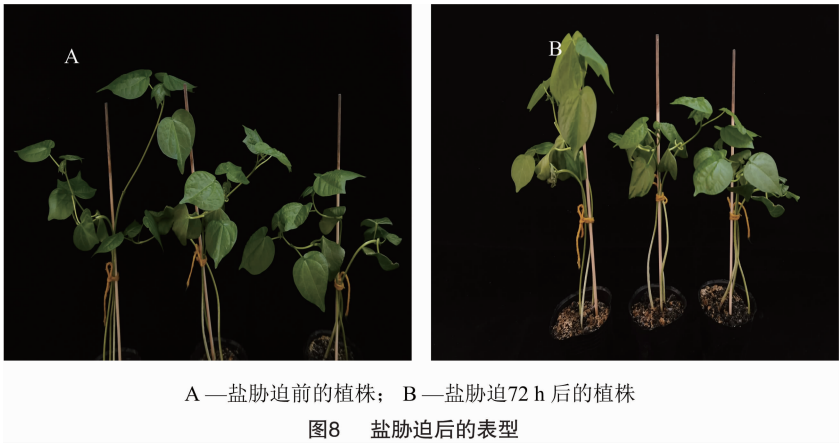
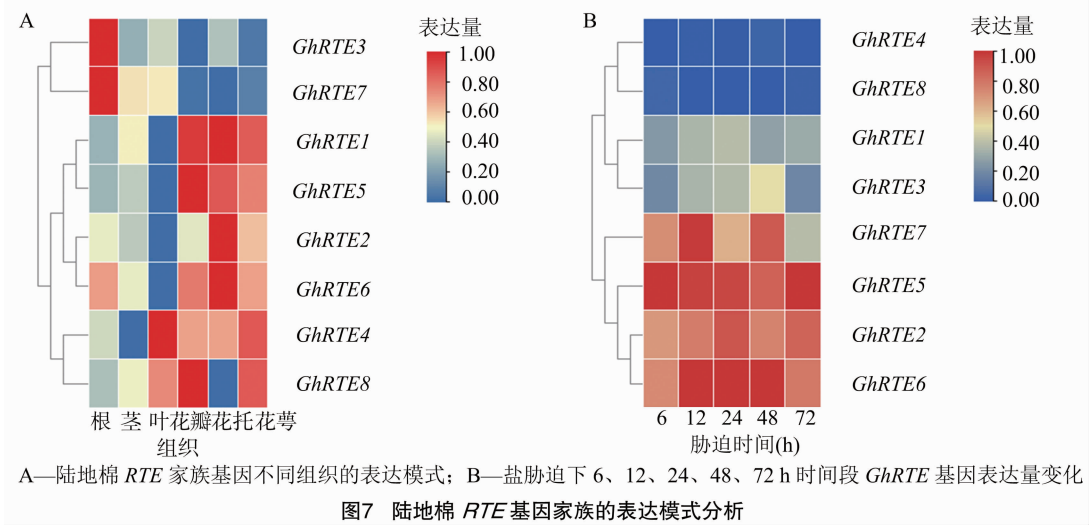


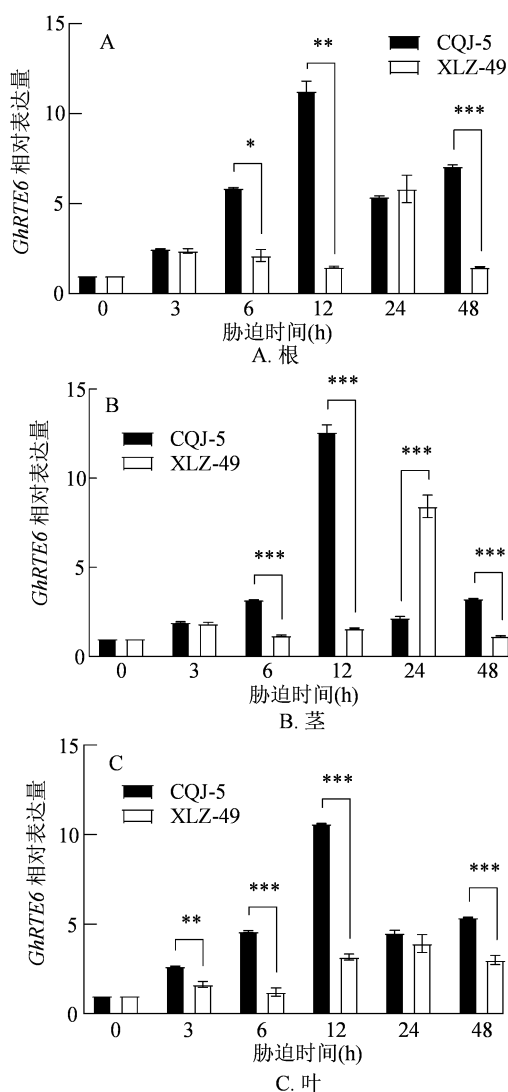
表 2 引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')
qt <i>GhRTE6</i> - F	TGCAAGCCAGGTTACCAACA
qt <i>GhRTE6</i> - R	CCAATCCATCGATCCGTCGT

3 讨论与结论

RTE 基因在多种植物中的功能分析已见报道,但关于 *RTE* 基因家族分析研究却极少,在棉花中从未有过基因家族鉴定及功能分析。本研究鉴定出陆

地棉 8 个、海岛棉 8 个、雷蒙德氏棉 4 个和亚洲棉 4 个,共 24 个棉花 *RTE* 家族成员,进行进化关系解析将其分为 3 个亚族,每个亚族中的陆地棉和海岛棉在染色体相同位置上的 *RTE* 基因都紧密地聚集在了一起,而且每个亚组中陆地棉和海岛棉的基因数量都是雷蒙德氏棉和亚洲棉的 2 倍左右,符合棉花物种的进化关系。本研究中棉花 *RTE* 基因家族成员编码的蛋白通过亚细胞定位预测多数位于质膜上,少数位于细胞质中,这与前人的研究结果^[2]较为一致。



*, **, *** 表示同一部位同一时间 *GhRTE6* 基因在不同材料间的表达量在 0.05、0.01、0.001 水平上差异显著

图9 盐胁迫下不同材料中 *GhRTE6* 的表达分析

前人的研究表明, RTE 家族包括 2 个类群: RTE1 组和 RTH (RTE1 - homolog) 组^[23,30-32]。RTE1 可以正调控乙烯受体 ETR1, 并通过 ETR1 的 N 端跨膜域对乙烯信号进行调控, 番茄中的 *GR* (green - ripe) 和 *GRL1* (green - ripe like 1) 是拟南芥中的 *AtRTE1* 的同源基因, 对 *RTE1/GR/GRL1* 基因进行过表达, 可以提高乙烯受体活性, 进而降低植株对乙烯的敏感性^[31-33]。拟南芥中的 *AtRTE1* 也可以结合生长素调节基因 (*ARGOS*) 参与调控器官大小, 它的保守的 TPT 区使其对乙烯的敏感性下降^[33-34], *ARGOS* 基因的过表达能够提高拟南芥和玉米的耐旱性。本研究通过顺式作用元件预测得出陆地棉 *RTE* 基因家族启动子区包含多个生长发育激素以及逆境响应调控元件, 其中 *GhRTE1*、

GhRTE4、*GhRTE5*、*GhRTE6* 和 *GhRTE8* 基因所含脱落酸、茉莉酸甲酯顺式元件数量最多, 且 *GhRTE1*、*GhRTE4* 和 *GhRTE5* 基因含有抵御胁迫相关的顺式作用元件, 说明 *RTE* 基因家族可能也参与了棉花的生长发育并调控其他酶类合成以应对逆境胁迫。

对 RTE 家族中不同组织及逆境条件下不同基因表达量分析发现, *GhRTE1*、*GhRTE2*、*GhRTE4*、*GhRTE5*、*GhRTE6* 和 *GhRTE8* 基因的表达量明显高于其他基因, 表明它们在棉花生长发育中起着重要的作用。同时分析在不同时期盐胁迫下的陆地棉 *RTE* 家族基因表达情况, 结果表明, *GhRTE2*、*GhRTE5* 和 *GhRTE6* 在不同的盐分胁迫时期表现出了较高的表达趋势, 在 12 ~ 48 h 之间表达量较高, 其余基因受非生物胁迫后表达量低甚至不表达。*GhRTE6* 基因在棉花受到盐胁迫处理下, 随着胁迫时间的延长, 在不同的陆地棉材料中做出了显著性应答。在耐盐材料中, *GhRTE6* 基因在胁迫 12 h 后表达量较高, 而在敏盐材料中 *GhRTE6* 在胁迫 24 h 后表达量较高, 且都在茎中高表达, 这说明 *GhRTE6* 在敏盐材料中对于盐胁迫的响应比耐盐材料中慢, 证明 *GhRTE6* 对盐胁迫具有一定的调控作用。由此可推测出 *GhRTE6* 可作为棉花响应非生物胁迫的关键基因进一步研究其功能特性。

本研究从陆地棉、海岛棉、雷蒙德氏棉以及亚洲棉等 4 个棉花品种中, 发现了 24 个 *RTE* 基因家族成员, 并在进化树上将它们划分为 3 个亚族, 依据同源性关系可推断出陆地棉与海岛棉、亚洲棉以及雷蒙德氏棉之间的进化关系, 发现同族成员中个别基因保守基序不同且相似长度基因其外显子的数量和长度也有所不同, 故其功能可能存在一定的差异。通过顺式作用元件分析发现, 陆地棉 *RTE* 基因启动子区含有多个生长发育激素和逆境响应元件, 说明其可能在植物生长发育及抵御非生物胁迫逆境中发挥着较大作用。本研究通过转录组表达模式分析发现, 陆地棉 *RTE* 基因在不同组织和非生物胁迫下的表达量存在差异, 并且 qRT - PCR 结果证明 *GhRTE6* 对盐胁迫具有一定的调控作用。本研究结果可为今后探索棉花 *RTE* 基因的功能及分子机制提供参考。

参考文献:

- [1] 李 建, 黄琳丽. 乙烯在植物抗性反应中的作用[J]. 生物化工, 2020, 6(6): 140 - 142.
- [2] 周 欣, 张 杰, 文 光. RTE1: 拟南芥乙烯受体 ETR1 的调节子 [C]//2006 年中国植物逆境生理生态与分子生物学学术研讨会

- 论文摘要汇编. 上海: 中国植物生理学会, 2006.
- [3] Lacape J M, Nguyen T B, Courtois B, et al. QTL analysis of cotton fiber quality using multiple *Gossypium hirsutum* × *Gossypium barbadense* backcross generations[J]. Crop Science, 2005, 45 (1): 123 – 140.
 - [4] Chartzoulakis K, Klapaki G. Response of two greenhouse pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages[J]. Scientia Horticulturae, 2000, 86 (3): 247 – 260.
 - [5] 张超, 马晓丽, 卢晓峰, 等. 盐胁迫下土施甲拌磷对棉苗叶片生理和根系形态的影响[J]. 江苏农业科学, 2022, 50 (22): 81 – 86.
 - [6] Sexton P D, Gerard C J. Emergence force of cotton seedlings as influenced by salinity[J]. Agronomy Journal, 1982, 74 (4): 699 – 702.
 - [7] 熊丽. 2022 年全国棉花产量增长 4.3% [N]. 经济日报, 2022 – 12 – 27 (4).
 - [8] 石婧, 黄超, 刘娟, 等. 脱硫石膏不同施用量对新疆盐碱土壤改良效果及作物产量的影响[J]. 环境工程学报, 2018, 12 (6): 1800 – 1807.
 - [9] 王俊铎, 黎玉华, 龚照龙, 等. 棉花耐盐性研究进展[J]. 棉花科学, 2021, 43 (5): 3 – 10.
 - [10] 范蓉, 郭亚萍, 赵柯柯, 等. 旱、盐胁迫下棉花 3 个转录因子基因的表达与生理指标相关性分析[J]. 生物学杂志, 2021, 38 (4): 86 – 91.
 - [11] 郑巨云, 曾辉, 王俊铎, 等. 陆地棉品种资源萌发期耐盐性的隶属函数法评价[J]. 新疆农业科学, 2018, 55 (9): 1579 – 1592.
 - [12] 王亦学, 董艳辉, 张欢欢, 等. 陆地棉胁迫相关蛋白基因 *GhSAP8* 的克隆及其耐盐性分析[J]. 农业生物技术学报, 2020, 28 (7): 1230 – 1239.
 - [13] 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 – 113.
 - [14] Wilkins M R, Gasteiger E, Bairoch A, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server[J]. Methods in Molecular Biology, 1999, 112: 531 – 552.
 - [15] 陈琴, 李多露, 赵杰银, 等. 陆地棉 UDPGP 基因家族的鉴定及抗旱性分析[J]. 棉花学报, 2022, 34 (1): 12 – 22.
 - [16] Kumar S, Stecher G, Li M, et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular Biology and Evolution, 2018, 35 (6): 1547 – 1549.
 - [17] Subramanian B, Gao S H, Lercher M J, et al. Evolview v3: a webserver for visualization, annotation, and management of phylogenetic trees[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47 (W1): W270 – W275.
 - [18] 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.
 - [19] Yu J, Jung S, Cheng C H, et al. CottonGen: a genomics, genetics and breeding database for cotton research[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42 (D1): D1229 – D1236.
 - [20] O'Driscoll A, Belogrudov V, Carroll J, et al. HBLAST: parallelised sequence similarity; a Hadoop MapReducable basic local alignment search tool[J]. Journal of Biomedical Informatics, 2015, 54: 58 – 64.
 - [21] Wang Y P, Tang H B, Debarry J D, et al. MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40 (7): e49.
 - [22] 陈琴, 李多露, 高文举, 等. 陆地棉 APX 基因家族鉴定及抗旱性分析[J]. 农业生物技术学报, 2021, 29 (10): 1894 – 1903.
 - [23] Bailey T L, Boden M, Buske F A, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37: W202 – W208.
 - [24] Lescot M, Déhais P, Thijs G, et al. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30 (1): 325 – 327.
 - [25] 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.
 - [26] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. Methods, 2001, 25 (4): 402 – 408.
 - [27] 张岚, 程琦, 梁士辰, 等. 棉花 *UGPase* 基因鉴定与生物信息学分析[J]. 棉花学报, 2021, 33 (4): 337 – 346.
 - [28] Tan Y Y, Liu J X, Huang F, et al. PhGRL2 protein, interacting with PhACO1, is involved in flower senescence in the petunia[J]. Molecular Plant, 2014, 7 (8): 1384 – 1387.
 - [29] 张朵朵, 林丽梅, 国红玉, 等. 人参与三七鲨烯环氧酶家族的适应性进化[J]. 华北理工大学学报(自然科学版), 2022, 44 (1): 98 – 106.
 - [30] Dong C H, Jang M, Scharein B, et al. Molecular association of the *Arabidopsis* ETR1 ethylene receptor and a regulator of ethylene signaling, RTE1[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285 (52): 40706 – 40713.
 - [31] Barry C S, Giovannoni J J. Ripening in the tomato Green-ripe mutant is inhibited by ectopic expression of a protein that disrupts ethylene signaling[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103 (20): 7923 – 7928.
 - [32] Dong C H, Rivarola M, Resnick J S, et al. Subcellular co-localization of *Arabidopsis* RTE1 and ETR1 supports a regulatory role for RTE1 in ETR1 ethylene signaling[J]. The Plant Journal, 2008, 53 (2): 275 – 286.
 - [33] Shi J R, Drummond B J, Wang H Y, et al. Maize and *Arabidopsis* ARGOS proteins interact with ethylene receptor signaling complex, supporting a regulatory role for ARGOS in ethylene signal transduction[J]. Plant Physiology, 2016, 171 (4): 2783 – 2797.
 - [34] Shi J R, Habben J E, Archibald R L, et al. Overexpression of ARGOS genes modifies plant sensitivity to ethylene, leading to improved drought tolerance in both *Arabidopsis* and maize[J]. Plant Physiology, 2015, 169 (1): 266 – 282.