

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.22281

付锦程, 高文举, 孙丰磊, 陈全家, 郑凯, 邓晓娟, 陈琴, 曲延英. 棉花 GDP-甘露糖焦磷酸化酶基因(*GMP*)家族的鉴定及分析[J]. 植物科学学报, 2023, 41(5): 636–646

Fu JC, Gao WJ, Sun FL, Chen QJ, Zheng K, Deng XJ, Chen Q, Qu YY. Identification and analysis of the GDP-mannose pyrophosphorylase gene (*GMP*) family in *Gossypium hirsutum* L.[J]. *Plant Science Journal*, 2023, 41(5): 636–646

棉花 GDP-甘露糖焦磷酸化酶基因 (*GMP*) 家族的鉴定及分析

付锦程, 高文举, 孙丰磊, 陈全家, 郑凯, 邓晓娟, 陈琴*, 曲延英*

(新疆农业大学农学院/棉花教育部工程研究中心, 乌鲁木齐 830052)

摘要: GDP-甘露糖焦磷酸化酶 (GDP-mannose pyrophosphorylase, *GMP*) 是植物多糖合成途径中的关键酶。本文对陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L.) *GMP* 基因家族成员进行了鉴定, 分析了其不同组织及非生物胁迫下的表达模式, 并与其他模式植物进行了物种间的进化分析。结果显示, 陆地棉和海岛棉 (*G. barbadense* L.) 均包含 38 个 *GMP* 家族成员, 雷蒙德氏棉 (*G. raimondii* Ulbrich) 包含 19 个成员, 亚洲棉 (*G. arboreum* L.) 包含 18 个成员。系统发育分析将不同植物的 141 个 *GMP* 分成了 6 个亚组, 同一亚族 *GhGMP* 成员具有相似的基因结构和保守基序, 且启动子区含有大量的激素应答、植物生长发育以及胁迫响应相关的顺式作用元件。转录组数据分析结果表明, *GhGMPs* 基因在叶片中的表达量最高, 非生物胁迫后, 部分基因的表达显著上调。

关键词: 棉花; *GMP* 基因家族; 非生物胁迫; 表达分析

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2023)05-0636-11

Identification and analysis of the GDP-mannose pyrophosphorylase gene (*GMP*) family in *Gossypium hirsutum* L.

Fu Jin-Cheng, Gao Wen-Ju, Sun Feng-Lei, Chen Quan-Jia,
Zheng Kai, Deng Xiao-Juan, Chen Qin*, Qu Yan-Ying*

(College of Agriculture, Xinjiang Agricultural University/Cotton Engineering Research Center of the Ministry of Education,
Urumqi 830052, China)

Abstract: GDP-mannose pyrophosphorylase (*GMP*) is a key enzyme in the plant polysaccharide synthesis pathway. In this paper, members of the *GMP* gene family in *Gossypium hirsutum* L. were identified, their expression patterns in different tissues and under different abiotic stresses were analyzed, and evolutionary analysis between species and *GMP* gene families of other model plants was carried out. Results showed that *G. hirsutum* L. and *G. barbadense* L. both contained 38 *GMP* family members, *G. raimondii* Ulbrich contained 19 members, and *G. arboreum* L. contained 18 members. Based on phylogenetic analysis, 141 *GMPs* from different plants were divided into six subgroups. *GhGMP* members of the same subfamily exhibited similar gene structures and conserved motifs, and the promoter region contained many *cis*-acting element related to hormone response, plant growth and development, and stress response. Transcriptomic analysis showed that the expression of *GhGMP* genes was highest in the leaves, and some genes were significantly up-regulated after abiotic stress.

Key words: *Gossypium hirsutum*; *GMP* gene family; Abiotic stress; Expression analysis

收稿日期: 2023-02-14, 修回日期: 2023-07-12。

基金项目: 新疆维吾尔自治区重大科技专项计划项目棉花生物育种创新工程项目 (2021A02001-4)。

This work was supported by a grant from Xinjiang Uygur Autonomous Region Major Science and Technology Special Plan Project Cotton Bio-Breeding Innovation Project (2021A02001-4).

作者简介: 付锦程 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向为棉花遗传育种 (E-mail: 573443172@qq.com)。

* 通讯作者 (Authors for correspondence. E-mail: cq0777@163.com; xjyyq5322@126.com)。

GDP-甘露糖焦磷酸化酶 (GMP) 是植物合成 GDP-甘露糖的关键酶, 可以催化鸟苷三磷酸和甘露糖-1-磷酸反应生成 GDP-甘露糖。作为多糖合成中的重要前体物质, GDP-甘露糖影响原核生物和真核生物的生长^[1], 有助于植物细胞壁中结构性碳水化合物化合物的合成, 是碳水化合物合成的关键基质, 并参与蛋白质的糖基化^[2]。GMP 也是植物抗坏血酸 (AsA) 生物合成途径的第一个关键酶, AsA 对于细胞的生长、分裂以及一些次生代谢物和激素的合成具有重要功能, 同时在应对非生物胁迫^[3]等方面也扮演着重要角色。

目前, 已在多种植物中展开了关于 GMP 基因的研究。在灵芝 (*Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst.) 中, 增加 GMP 的活性不仅可提高灵芝多糖的合成, 也可提高甘露糖磷酸变位酶 1 和变位酶 2 的表达量^[4]。在水稻 (*Oryza sativa* L.) 中, 该基因可调控植株 AsA 含量, 参与盐胁迫和干旱胁迫应答, 并影响植株的根系生长^[5]。在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 中, 过表达水稻 OsVTC1-1 基因能够恢复其 AsA 的合成^[6]。在芹菜 (*Apium graveolens* L.) 中, 非生物胁迫下的 AgGMP 基因表达量显著升高, 且转 AgGMP 基因拟南芥的 AsA 含量高于野生型植株, AgGMP 基因调节芹菜 AsA 积累, 并参与干旱胁迫响应^[7]。烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 转入西印度樱桃 (*Malpighia glabra* L.) MgGMP 基因后, 其 AsA 含量显著提高^[8]。尽管 GMP 基因参与多种植物的生长并能抵御植物非生物胁迫, 但关于棉花 (*Gossypium*) GMP 基因家族成员的生物信息及功能特性还鲜有报道。

棉花是重要的经济作物和战略物资, 为中国第二大农作物, 在国民经济中占有重要地位^[9]。中国棉花主要产区包括新疆、黄河流域、长江流域等。新疆作为我国最大的棉花生产基地, 2021 年种植面积和总产量的全国占比分别达 82.7% 和 89.5%^[10]。但近年来受极端气候和降水量变化的影响, 棉花的品质逐年下降^[11], 虽然采用科学滴灌方式可减轻棉花遭受干旱及盐胁迫的危害, 但还是不可避免地对其产量及纤维品质造成影响^[12]。对可能参与植物生长发育、非生物逆境胁迫响应的 GMP 基因家族进行生物信息学分析, 可为挖掘棉花中优异的抗胁迫基因提供基础, 并为育种提供

新的候选基因, 有助于今后采用分子技术手段提高棉花的抗逆境胁迫能力, 促进其产量及品质的提高。

1 材料及方法

1.1 植物材料

本研究选用新疆推广的陆地棉 (*G. hirsutum* L.) ‘石远 321’ (抗旱) 和 ‘奎 85-174’ (敏旱), 均由新疆农业大学作物遗传改良与种质创新重点实验室提供。采用盆栽土培的方式, 种植前称取盆栽整体重量。放置在光周期为 12 h 光照/12 h 黑暗、温度为 25 °C 的温室培养。棉花幼苗培养至三叶期时进行干旱胁迫。用整体称重法逐日测量土壤含水量, 在土壤含水量分别为 50%、40%、30%、20%、10% 时, 选取长势一致的 3 株棉苗, 对叶片进行取样, 放置液氮中冻存。

1.2 全基因组鉴定及理化性质分析

从 CottonFGD 数据库^[13]下载棉花基因序列。拟南芥和水稻的相关基因组和蛋白质组文件均从 Ensembl Plants 数据库^[14]中下载。借助 GMP 蛋白保守结构域的 HMM 隐马可夫模型 (PF00483), 在本地蛋白质组数据库中进行 Blast 比对, 得到具有 GMP 蛋白特有结构域的序列。将得到的推测为 GMP 蛋白的序列在 NCBI-CDD 数据库^[15]中进行 GMP 家族特异性结构域验证, 去除不包含 GMP 蛋白结构域的序列。最后, 利用 ExPASy^[16]网站中的 ProtParam 在线工具对 GhGMPs 蛋白序列的分子量 (MW)、等电点 (pI) 等理化性质进行分析, 利用 WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) 在线工具进行亚细胞定位预测。

1.3 进化树、同源性分析

利用 MEGA-X 软件^[17]中的 Clustal W 功能对棉花、拟南芥的 GMP 蛋白和水稻的 MPG 蛋白进行多序列比对。基于比对的果, 采用邻近法 (Neighbor-joining, NJ) 构建系统进化树, 重复次数为 1 000。利用在线网站 Evolview v3^[18]对其进行美化。根据棉花的基因组和染色体数据库 CottonFGD^[13], 利用 TBtools 软件^[19]展示 GMP 蛋白家族成员在棉花染色体上的同源性。通过 CottonGen 数据库^[20]、Blast^[21]、TBtools 软件^[19]和 MCScanX^[22]对 GMP 蛋白家族在陆地棉 AD 基因亚组之间以及陆地棉与水稻、拟南芥之间的同源

性进行比对和共线性分析,通过 TBtools 可视化后用 Adobe Illustrator CS6 软件进行美化调整。

1.4 陆地棉 *GMP* 基因结构分析及顺式作用元件预测

通过 MEME 程序^[23]对陆地棉 *GMP* 家族成员进行保守基序 (Motif) 分析。使用 CottonGen 网站^[16]下载基因组注释文件,利用 TBtools 软件^[19]进行数据可视化处理,并提取基因 CDS 区上游 2 000 bp 的序列,利用 Plant CARE 软件^[24]对启动子区的顺式作用元件进行预测。

1.5 陆地棉 *GMP* 基因转录组表达模式分析

从 NCBI SAR (Sequence read archive) 数据库下载陆地棉器官 (根、茎、叶、雌蕊、雄蕊、花萼、花瓣和花托) 和非生物胁迫处理后的转录组数据 (PRJNA248163)。参考基因组文件 TM-1_genome_ZJU_v2.1^[25],对原始数据进行转录组

标准分析,得到表达量数据,并对表达量数据进行 $\log_{10}(\text{TPM} + 1)$ 标准化。利用 TBtools 软件^[19]绘制表达量热图、基因结构图、顺式作用元件图,使用 Adobe Illustrator CS6 软件进行美化调整。

1.6 RNA 提取及 qRT-PCR 分析

利用 CottonFGD 数据库^[13]下载陆地棉 *GMP* 基因 CDS 序列信息,使用 DNAMAN 软件设计荧光定量 PCR 引物 (表 1)。利用 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (天根,北京)从幼苗中提取总 RNA,反转录合成第一链 cDNA。选择棉花 *Ubiquitin7* (*UBQ7*) 作为内参基因,利用罗氏 Light Cycler 荧光定量 PCR 仪进行 qRT-PCR 扩增 (3 次技术重复),采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[26]计算基因相对表达量。利用 GraphPad Prism v 9.0.0 对数据进行可视化处理,并用 Adobe Illustrator CS6 软件进行美化调整。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')	引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')
GhGMP08qt-F	GAGTTTGGGGAGTTGGTAGCAGATC	GhGMP27qt-F	GAGTTTGGGGAGTTGGTAGCAGATC
GhGMP08qt-R	ACCACAGTTGATTCGGTCACTTACG	GhGMP27qt-R	ACCACAGTTGATTCGGTCACTTACG
GhGMP11qt-F	TGATGGCTACTGGGAGGACATTGG	GhGMP30qt-F	TGCTTCTCTCAATCGTCACCTTTCC
GhGMP11qt-R	TCTGGCACTGGCTTCTTGGTAATTC	GhGMP30qt-R	GCCTCACCGCATCTGCTGTC
GhGMP15qt-F	GTGCCCTCGGACTTCGGTCTAATG	GhGMP34qt-F	CGTGCCCTCGGATTCGGTCTAATG
GhGMP15qt-R	TGCTTTCAATTCTGCTCCCTTGGG	GhGMP34qt-R	TGCTTTCAATTCTGCTCCCTTGGG
GhGMP16qt-F	GGCTCTCAAGGCTGTTGGTGTAAAG	GhGMP35qt-F	AATTGGTCCAGGCTGCGTTGTC
GhGMP16qt-R	CAGTGCCAAGCGGCTCAGTC	GhGMP35qt-R	GGTGGAATGCCATCCGATGATACTG
GhGMP17qt-F	GCTTGTCGTTCTCGGCGTCTG	GhGMP36qt-F	GCTTGTCGTTCTCGGCGTCTG
GhGMP17qt-R	ATTGAAGCAGTCCGTTCCGTTTCG	GhGMP36qt-R	ATTGAAGCAGTCCGTTCCGTTTCG
GhGMP25qt-F	CCTTCTCCCTCAATCGTCACTTAGC	GhUBQ7qt-F	GACCTACACCAAGCCCAAGAAG
GhGMP25qt-R	GCCTCACAGCATCAGCAGTTCC	GhUBQ7qt-R	TGAGCCCACACTTACCACAATAGT

2 结果与分析

2.1 棉花 *GMP* 基因家族的全基因组鉴定及理化性质分析

通过本地 Blast 数据库和 NCBI-CDD 数据库^[15]对棉花 *GMP* 蛋白家族进行筛选,共鉴定出 113 个 *GMPs* 基因,其中陆地棉和海岛棉 (*G. barbadense* L.) 均包含 38 个,雷蒙德氏棉 (*G. raimondii* Ulbrich) 和亚洲棉 (*G. arboreum* L.) 分别有 19 和 18 个 (附表 1¹⁾)。分析结果表明,陆地

棉 *GMP* 基因编码区长度为 225 ~ 2 181 bp,编码氨基酸在 74 ~ 726 aa,编码蛋白分子量为 8.14 ~ 81.54 kD,等电点介于 4.65 ~ 9.15;海岛棉 *GMP* 基因编码区长度为 183 ~ 2 181 bp,编码氨基酸长度在 60 ~ 726 aa,编码蛋白质分子量为 6.57 ~ 81.51 kD,等电点在 4.65 ~ 9.4;雷蒙德氏棉 *GMP* 基因编码区在 1 002 ~ 2 178 bp,编码氨基酸 333 ~ 725 aa,编码蛋白分子量为 36.54 ~ 81.44 kD,等电点介于 4.68 ~ 9.13;亚洲棉 *GMP* 基因编码区长度为 1 080 ~ 2 181 bp,编码氨基酸

1)如需查阅附件内容请登录《植物科学学报》网站(<http://www.plantscience.cn>)查看本期文章。

长度在 359~726 aa, 编码蛋白分子量为 39.24~81.53 kD, 等电点在 4.64~9.11。亚细胞定位结果显示, 棉花 GMP 蛋白大多数位于叶绿体、细胞质或细胞核中, 少数成员存在于不止一个细胞器内。GMP 家族成员的理化性质和亚细胞定位存在较大差异, 预示着该基因家族在棉花生长发育过程中可能扮演着不同的角色。

2.2 棉花 GMP 基因染色体定位与命名

将棉花 GMP 基因进行染色体定位, 结果如附图 1¹⁾所示, 陆地棉、海岛棉、雷蒙德氏棉、亚洲棉的 GMP 基因在染色体上呈不均匀分布。陆地棉和海岛棉的 A02、A12、D03、D12 染色体均无 GMP 基因分布, A03、A04、A06、A08、A10、A11、D01、D02、D05、D06、D08、D10 和 D11 染色体各有 1 个基因, 其他染色体 GMP 基因分布数目 2~5 个不等, 陆地棉和海岛棉的 A01 与 A05 染色体上的基因分布数量存在差异。雷蒙德氏棉中 08 染色体无基因分布, Chr02、Chr05、Chr07、Chr09、Chr10 和 Chr11 染色体各有 1 个, *GrGMP19* 分布于 14 号染色体大片段, 其他染色体上基因分布数目在 2~4 个。亚洲棉 Chr01、Chr02、Chr12 染色体无基因分布, Chr03、Chr05、Chr06、Chr08、Chr10、Chr11 各 1 个, 其他染色体上 2~4 个不等, *GaGMP17* 和 *GaGMP18* 基因分布在 14 号染色体大片段上。陆地棉 GMP 基因不均匀地分布于 22 条染色体上, 其中 A 亚组和 D 亚组均有 19 个, 海岛棉同上。但在各自的 AD 亚组染色体中也存在差异, 如 A04 染色体中有 1 个 GMP 基因, 而 D04 染色体中有 3 个; 陆地棉 A05 染色体有 3 个基因, 海岛棉 A05 染色体有 2 个, 而各自的 D05 染色体只有 1 个 GMP 基因。雷蒙德氏棉 19 个 GMPs 基因不均匀地分布于 11 条染色体上, 1 个分布于 14 号染色体大片段上。亚洲棉 18 个 GMPs 基因有 16 个分布于 11 条染色体上, 2 个分布于染色体大片段上。根据基因在不同棉种染色体上的位置, 陆地棉命名为 *GhGMP01*~*GhGMP38*, 海岛棉命名为 *GbGMP01*~*GbGMP38*, 雷蒙德氏棉命名为 *GrGMP01*~*GrGMP19*, 亚洲棉命名为 *GaGMP01*~*GaGMP18*。

2.3 棉花 GMP 基因家族系统进化分析

为了解 GMP 基因家族的进化关系, 对棉花、

拟南芥以及水稻中的 GMPs 基因编码蛋白进行聚类分析, 构建系统进化树。结果如图 1 所示, 141 个 GMPs 可分为 6 个亚组, 即 Group 1~Group 6。Group 4 成员最少, 为 6 个, 其中陆地棉和海岛棉均有 2 个, 雷蒙德氏棉和亚洲棉各 1 个。Group 1 和 Group 3 成员均为 17 个, Group 1 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, 拟南芥有 1 个, 而水稻有 4 个。Group 3 中陆地棉有 5 个, 海岛棉有 4 个, 雷蒙德氏棉、亚洲棉、拟南芥及水稻均有 2 个。Group 5 成员有 23 个, 其中陆地棉和海岛棉均有 5 个, 雷蒙德氏棉有 4 个, 亚洲棉、拟南芥及水稻均有 3 个。Group 2 成员共 31 个, 其中陆地棉有 9 个, 海岛棉有 8 个, 雷蒙德氏棉和亚洲棉各 4 个, 拟南芥和水稻各有 3 个。Group 6 成员最多, 为 47 个, 其中陆地棉 13 个, 海岛棉 15 个, 雷蒙德氏棉、亚洲棉及拟南芥分别为 6 个, 水稻有 1 个。陆地棉和海岛棉在染色体相同位置上的 GMPs 基因均紧密聚集在同一个亚组中, 且每个亚组中陆地棉和海岛棉的基因数量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(图 2)。

2.4 陆地棉 GMP 基因同源性分析

以拟南芥、水稻作为参考物种, 分析陆地棉 GMP 家族基因的进化关系。由图 2 可知, 陆地棉与拟南芥有 22 对直系同源基因, 与水稻有 18 对直系同源基因。由此推断, 陆地棉与拟南芥和水稻中的 GMP 基因可能由共同祖先基因组的进化产生, GMP 基因家族进化演变可能不受被子植物分化传递至单子叶和双子叶植物过程的影响。

2.5 陆地棉 GMP 蛋白保守基序及基因结构分析

陆地棉中 38 个 GMPs 蛋白的序列保守程度较高, 7 个保守基序(Motif1~Motif7)中, 包含 Motif2(92.1%)、Motif4(94.7%)、Motif5(97.3%)和 Motif6(89.5%)的基因最多。第 1 组 12 个陆地棉成员中有 11 个均只含有 Motif2、Motif4、Motif5、Motif6, 而 *GhGMP20* 缺少 Motif6。第 2 组 9 个陆地棉成员中有 8 个均包含 Motif1~Motif7, 而 *GhGMP05* 只含有 Motif4、Motif5。第 3 组 17 个成员中有 10 个均包含 Motif1~Motif7, *GhGMP01* 缺少 Motif6, 其余 4 个成员均包含 Mo-

1) 如需查阅附件内容请登录《植物科学学报》网站(<http://www.plantscience.cn>)查看本期文章。

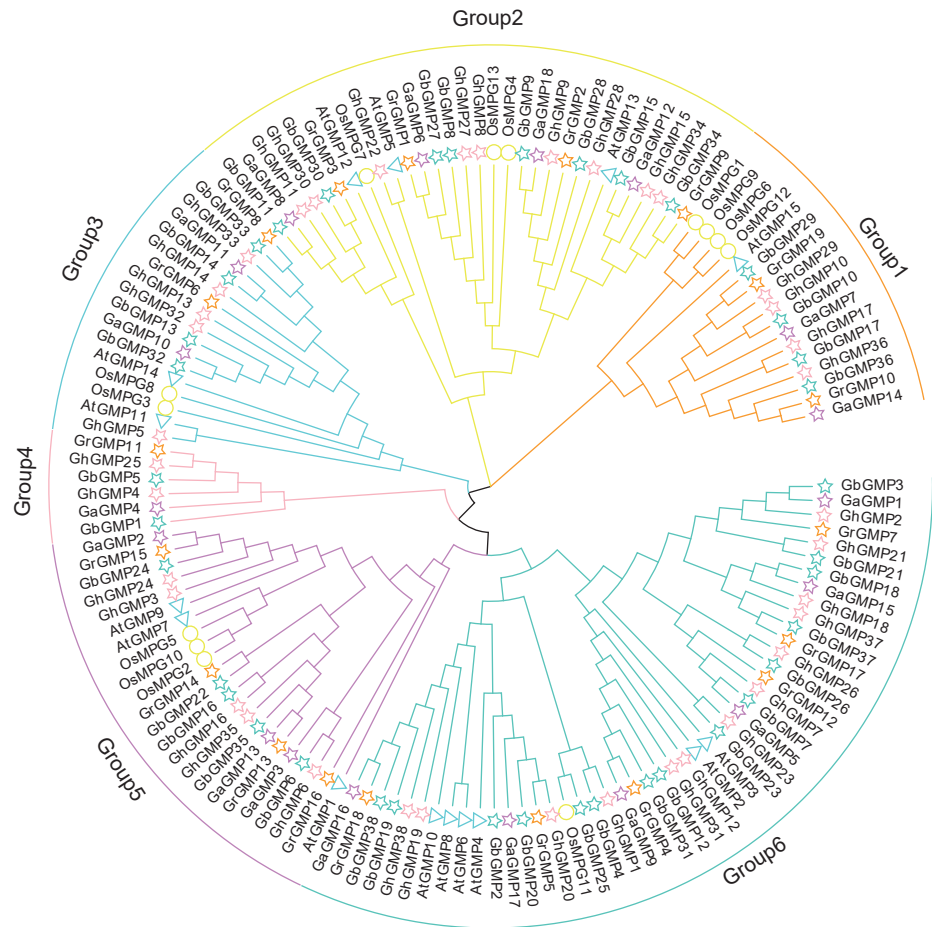


图 1 基于拟南芥、水稻和 4 个棉种的 GMP 家族系统进化树
Fig. 1 Phylogenetic tree of GMP families based on *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, and four *Gossypium* species

tif2、Motif4、Motif5、Motif6，而 *GhGMP22* 基因只含有 Motif6，*GhGMP23* 基因只含有 Motif5（图 3：A）。

基因结构分析结果表明（图 3：B），GMPs 含有 2~15 个外显子，*GhGMP23* 和 *GhGMP05* 数目最少，分别为 2 和 3 个，大多数基因具有 14 个外显子。同组成员中个别基因的保守基序数量差异较大，且长度相似的基因其外显子的数量和长度也不相同。

2.6 陆地棉 GMP 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，发现 38 个 GMPs 基因启动子主要包含与激素相关的顺式元件，如赤霉素响应元件（GARE-motif、TATC-box、P-box）、水杨酸响应元件（TCA-element、SARE）、脱落酸响应元件（ABRE）、茉莉酸甲酯响应元件（TGACG-motif、CGTCA-motif）、生

长素响应元件（TGA-element、AuxRR-core）等；以及与胁迫相关的顺式元件，如防御和应激响应元件（TC-rich repeats）、低温反应响应元件（LTR）和干旱胁迫响应元件（MBS），此外还有类黄酮生物合成基因的调控元件（MBSI）。各 GMP 基因所含顺式作用元件在 2~8 个不等，脱落酸、茉莉酸甲酯相关的顺式作用元件数目最多。其中，*GhGMP13*、*GhGMP17*、*GhGMP29*、*GhGMP32*、*GhGMP36*、*GhGMP37* 等 6 个基因所含脱落酸、茉莉酸甲酯顺式作用元件数量最多（附图 2¹⁾）。这说明陆地棉 GMP 基因家族可能在植物生长发育及抵御非生物逆境胁迫中发挥作用。

2.7 陆地棉 GMP 基因家族的表达分析

对 38 个 *GhGMPs* 基因的组织特异性表达进行分析，结果显示，正常生长条件下，不同基因

1)如需查阅附件内容请登录《植物科学学报》网站(<http://www.plantscience.cn>)查看本期文章。

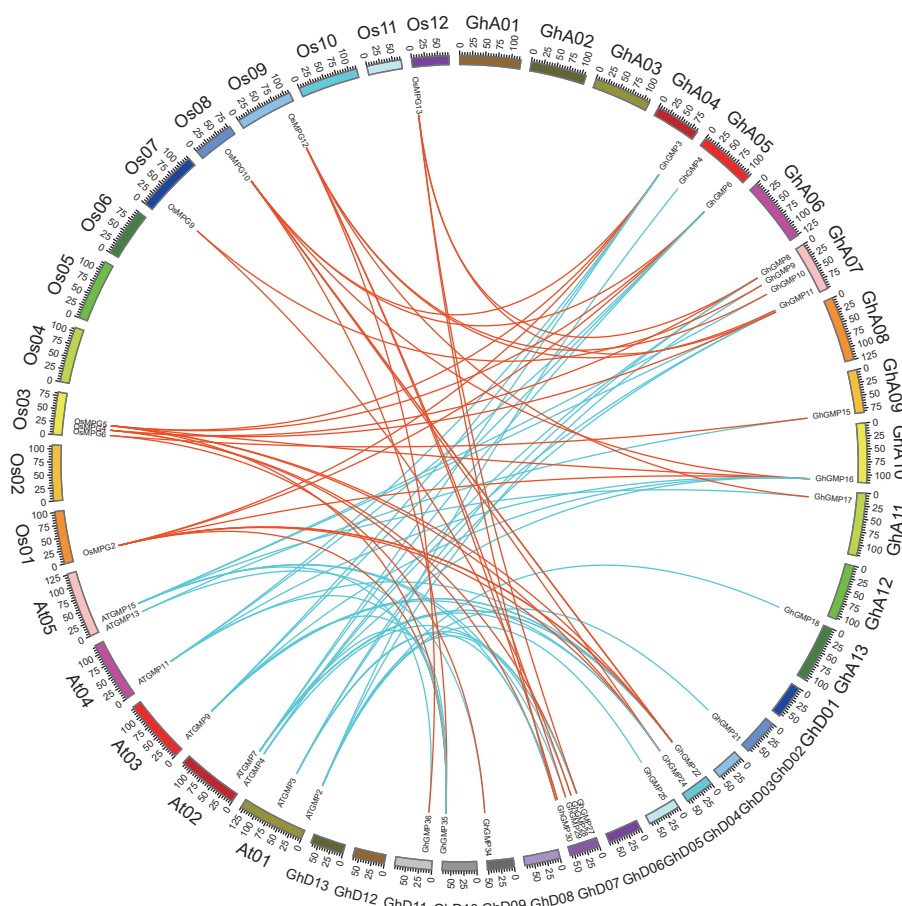


图 2 陆地棉、拟南芥、水稻 GMP 基因同源性分析图

Fig. 2 Homology-based analysis of GMP genes in *Gossypium hirsutum*, *Arabidopsis thaliana*, and *Oryza sativa*

在不同组织呈现不同的表达模式。*GhGMP02*、*GhGMP08*、*GhGMP16*、*GhGMP17*、*GhGMP21*、*GhGMP27*、*GhGMP35* 和 *GhGMP36* 在不同组织中差异较大, 且表达量较高, 其中 *GhGMP02*、*GhGMP17*、*GhGMP21* 和 *GhGMP36* 在根、茎、叶、花托中均有表达, 且在叶中表达量最高, 其余基因则低表达, 甚至不表达 (附图 3¹⁾)。

不同非生物胁迫下的 GMP 家族基因表达情况分析结果表明, *GhGMP08*、*GhGMP16*、*GhGMP25*、*GhGMP27*、*GhGMP35* 和 *GhGMP36* 的表达在干旱、冷、热胁迫不同时间后多呈升高趋势, 冷胁迫后基因的表达趋势相反, 但基因表达量较高。*GhGMP11*、*GhGMP15*、*GhGMP17*、*GhGMP30* 和 *GhGMP34* 在不同非生物胁迫下持续高表达, 且在花托和花萼等器官中的表达量高于其他组织。*GhGMP02*、*GhGMP21* 呈先上升后下

降的趋势, 在干旱和热胁迫 3 h、盐胁迫 6 h 后的表达量最高, 且在叶片中的表达量最高。其余基因在非生物胁迫后表达量较低甚至不表达 (图 4)。

2.8 qRT-PCR 分析

为了验证 RNA-seq 分析的准确性, 选取干旱胁迫下表达变化明显且含干旱相关顺式作用元件最多的 11 个 *GhGMPs* 基因, 对其在相同叶片部位的表达水平进行 qRT-PCR 分析。结果显示, 干旱胁迫处理下, 11 个 *GhGMPs* 基因随着土壤含水量的递减, 在干旱敏感材料‘奎 85-174’叶片中的表达水平呈下降-上升-下降的变化趋势。在耐旱材料‘石远 321’叶片中呈现先上升后下降的变化趋势。*GhGMP08*、*GhGMP25*、*GhGMP27* 基因呈上升-下降-上升-下降的变化趋势, 并在土壤含水量为 40% 和 20% 时显著高表达。相较于土壤含水量为 50% (对照) 时, ‘奎 85-174’中各基因在

1) 如需查阅附件内容请登录《植物科学学报》网站(<http://www.plantscience.cn>)查看本期文章。



图 3 陆地棉中 GMP 家族成员结构域分析
Fig. 3 Domain analysis of GMP family members in *Gossypium hirsutum*

40% 时的表达均显著降低，而‘石远 321’与之相反。总体上，GMP 基因在耐旱材料中的表达量高于干旱敏感材料（图 5）。

3 讨论

GMP 基因的功能在多种植物中已有报道，但 GMP 基因家族相关研究却较少，在棉花中还未见报道。番茄（*Solanum lycopersicum* L.）^[27]中发现了 4 个 GMP 基因家族成员，拟南芥和水稻中各有 15 和 13 个成员，而本研究从陆地棉、海岛棉、雷蒙德氏棉和亚洲棉中分别鉴定到 38、38、19 和

18 个 GMP 家族成员，共 113 个。各物种 GMP 家族成员数量差异较大，说明棉花同其他物种相比有较为明显的扩增。水稻^[6]、芹菜^[8]、白芥（*Bletila striata* (Thunb. ex Murray) Rchb. F）^[28]等植物的 GMP 蛋白位于细胞质或线粒体中，本研究发现棉花 GMP 家族成员多位于叶绿体、细胞质或细胞核中，少数位于多个细胞器中，与前人的研究结果较为一致。拟南芥为双子叶植物，水稻为单子叶植物，本研究分析了水稻、拟南芥、棉花 GMP 家族成员的进化关系，并将其分为 6 个亚组。每个亚组中陆地棉和海岛棉在染色体相同位置的

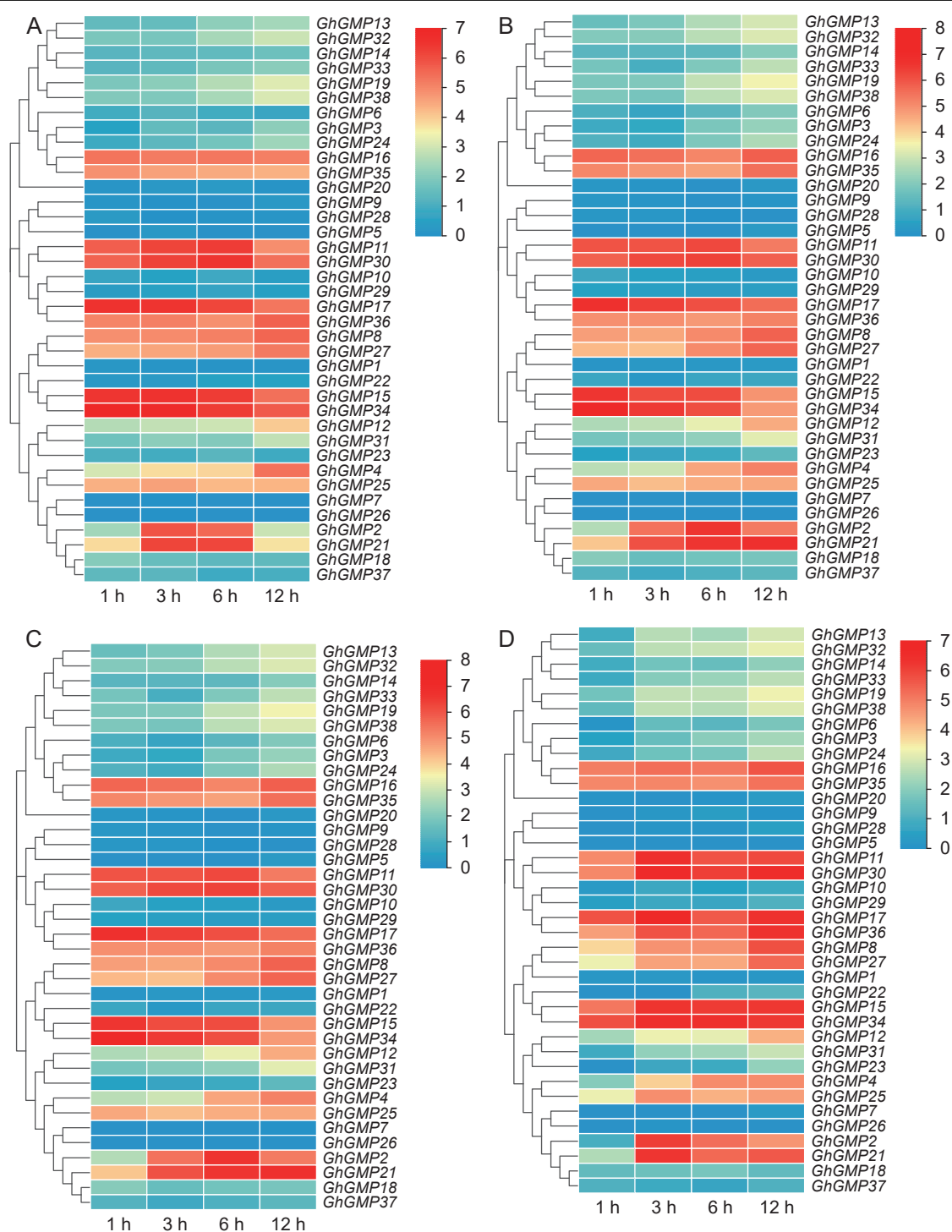


图 4 陆地棉 GMP 基因家族的表达模式分析

Fig. 4 Expression patterns of GMP family genes in *Gossypium hirsutum*

A: 干旱胁迫; B: 盐胁迫; C: 冷胁迫; D: 热胁迫。

A: Drought stress; B: Salt stress; C: Cold stress; D: Heat stress.

GMPs 基因都紧密地聚集在一起, 且每个亚组中陆地棉和海岛棉的基因数量基本上是雷蒙德式棉和亚洲棉的 2 倍左右, 符合棉花物种的进化关系。对陆地棉 GMP 家族成员进行结构域分析, 可将其

分为 3 组, 同一组中大部分成员具有相似的保守结构基序。第 1 组的 *GhGMP20* 仅缺少 Motif6, 第 2 组中 *GhGMP05* 则只含有 Motif4、Motif5, 第 3 组的 *GhGMP22* 只含有 Motif6, 而 *GhGMP23* 只

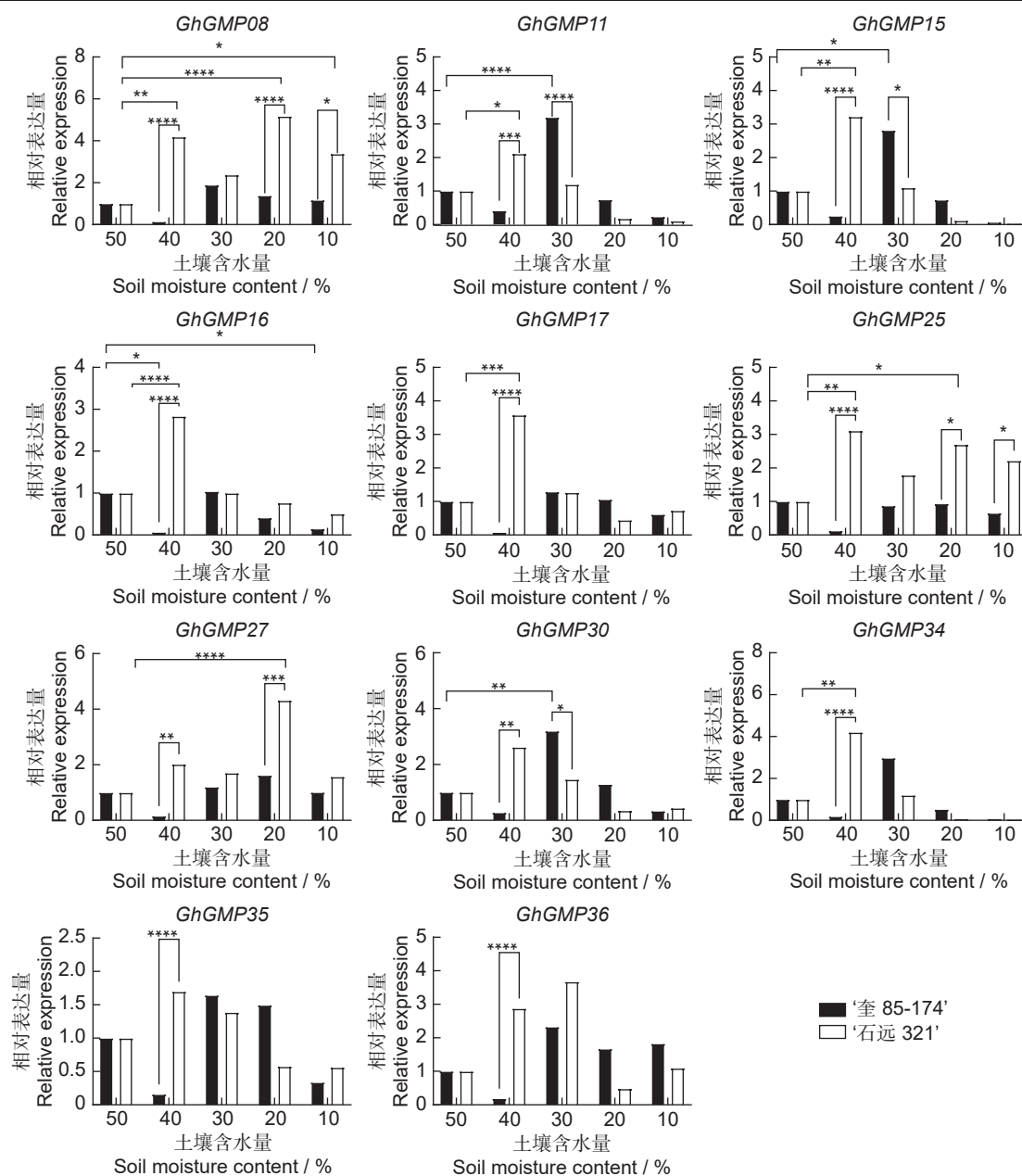


图 5 干旱胁迫 qRT-PCR 分析

Fig. 5 qRT-PCR analysis of drought stress

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

含有 Motif5。这说明该基因家族在棉花生长发育过程中可能发挥不同的功能。

研究表明, 缺乏 GDP-甘露糖焦磷酸化酶的拟南芥突变体其细胞壁生物合成存在严重缺陷, 胚胎会停止发育^[29]。在番茄^[30]、马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.)^[31] 中增加 GMP 酶活性均可提高植物 AsA 含量, 且番茄叶片中的 AsA 含量上升较多, 此外, 马铃薯叶片的色素含量及净光合速率显著增加, 延缓了植株衰老。本研究发现陆地棉 GMP

基因启动子区含有生长发育及激素相关、逆境响应调控相关等顺式作用元件, 其中 GhGMP13、GhGMP17、GhGMP29、GhGMP32、GhGMP36 和 GhGMP37 等 6 个基因所含脱落酸、茉莉酸甲酯相关顺式元件数量最多。这表明 GMP 基因家族可能参与棉花的生长发育调控, 以及逆境胁迫响应。

茶 (*Camellia sinensis* O. Ktze)^[32]、番茄^[33]、苹果 (*Malus domestica* L.)^[34] 的 GMP 基因在不

同组织中表达量具有差异, 叶片中高于其他组织。水稻 GMP 同源蛋白在 AsA 合成中的不同作用可能与其转录水平和酶活性的差异有关^[35]。这与本研究结果较为一致, GMP 家族不同基因在陆地棉不同组织和不同非生物胁迫下的表达模式不同。qRT-PCR 分析结果表明, 11 个陆地棉 GhGMPs 基因的表达随着土壤含水量的递减发生了明显变化, 说明 GhGMP 蛋白家族可能与转录因子或者激酶互作, 对于干旱胁迫具有一定的响应或调控作用。我们推测 GhGMP08、GhGMP11、GhGMP15、GhGMP16、GhGMP17、GhGMP25、GhGMP27、GhGMP30、GhGMP34、GhGMP35 和 GhGMP36 可能是棉花响应非生物胁迫的关键基因, 可进一步研究其功能特性。

参考文献:

- [1] 刘项. GDP-甘露糖焦磷酸化酶(GMPP)的原核表达与性质的表征[D]. 济南: 山东大学, 2008: 14-25.
- [2] Zakrzewska A, Palamarczyk G, Krotkiewski H, Zdebska E, Saloheimo M, et al. Overexpression of the gene encoding GTP: mannose-1-phosphate guanylttransferase, *mpg1*, increases cellular GDP-mannose levels and protein mannosylation in *Trichoderma reesei*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69 (8): 4383-4389.
- [3] 俞乐, 刘拥海, 袁伟超, 周丽萍, 彭长连. 植物抗坏血酸积累及其分子机制的研究进展[J]. *植物学报*, 2016, 51(3): 396-410.
Yu L, Liu YH, Yuan WC, Zhou LP, Peng CL. Recent advances in the study of accumulation of ascorbic acid and its molecular mechanism in plants[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2016, 51 (3): 396-410.
- [4] Zhao LN, Cao YB, Luo Q, Xu YL, Li N, et al. Overexpression of phosphomannomutase increases the production and bioactivities of Ganoderma exopolysaccharides[J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 294: 119828.
- [5] 王亚云. GDP-甘露糖焦磷酸化酶基因OsVTC1-1和OsVTC1-3在水稻抗坏血酸合成与胁迫应答中的功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016: 26-37.
- [6] Kumar R, Mustafiz A, Sahoo KK, Sharma V, Samanta S, et al. Functional screening of cDNA library from a salt tolerant rice genotype Pokkali identifies mannose-1-phosphate guanyl transferase gene (*OsMPG1*) as a key member of salinity stress response[J]. *Plant Mol Biol*, 2012, 79 (6): 555-568.
- [7] Liu YH, Wang H, Liu JX, Shu S, Tan GF, et al. AgGMP encoding GDP-D-mannose pyrophosphorylase from celery enhanced the accumulation of ascorbic acid and resistance to drought stress in *Arabidopsis*[J]. *PeerJ*, 2022, 10: e12976.
- [8] Badejo AA, Tanaka N, Esaka M. Analysis of GDP-D-mannose pyrophosphorylase gene promoter from acerola (*Malpighia glabra*) and increase in ascorbate content of transgenic tobacco expressing the acerola gene[J]. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49 (1): 126-132.
- [9] 张钊, 田迎春. 棉花精量播种高产技术要点[J]. *现代农村科技*, 2019(9): 15-16.
- [10] 国家统计局. 国家统计局关于2021年棉花产量的公告[EB/OL]. (2021-12-14)[2022-09-05]. https://www.gov.cn/xinwen/2021-12/14/content_5660705.htm.
- [11] 黄静, 张运, 汪明秀, 王芳, 汤志, 何好. 近17年新疆干旱时空分布特征及影响因素[J]. *生态学报*, 2020, 40(3): 1077-1088.
Huang J, Zhang Y, Wang MX, Wang F, Tang Z, He H. Spatial and temporal distribution characteristics of drought and its relationship with meteorological factors in Xinjiang in last 17 years[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2020, 40 (3): 1077-1088.
- [12] 蔡焕杰, 邵光成, 张振华. 荒漠气候区膜下滴灌棉花需水量和灌溉制度的试验研究[J]. *水利学报*, 2002(11): 119-123.
Cai HJ, Shao GC, Zhang ZH. Water demand and irrigation scheduling of drip irrigation for cotton under plastic mulch[J]. *Journal of Hydraulic Engineering*, 2002 (11): 119-123.
- [13] Zhu T, Liang CZ, Meng ZG, Sun GQ, Meng Z, et al. Cotton-FGD: an integrated functional genomics database for cotton[J]. *BMC Plant Biol*, 2017, 17 (1): 101.
- [14] Howe KL, Contreras-Moreira B, de Silva N, Maslen G, Akanni W, et al. Ensembl Genomes 2020-enabling non-vertebrate genomic research[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48 (D1): D689-D695.
- [15] Lu SN, Wang JY, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer RC, et al. CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48 (D1): D265-D268.
- [16] Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server[M]//Link AJ, ed. 2-D Proteome Analysis Protocols. Totowa: Humana, 1999, 112: 531-552.
- [17] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Mol Biol Evolut*, 2018, 35 (6): 1547-1549.
- [18] Subramanian B, Gao SH, Lercher MJ, Hu SN, Chen WH. Evolview v3: a webserver for visualization, annotation, and management of phylogenetic trees[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47 (W1): W270-W275.
- [19] Chen CJ, Chen H, Zhang Y, Thomas HR, Frank MH, et al.

- TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Mol Plant*, 2020, 13 (8): 1194–1202.
- [20] Yu J, Jung S, Cheng CH, Ficklin SP, Lee T, *et al.* Cotton-Gen: a genomics, genetics and breeding database for cotton research[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42 (D1): D1229–D1236.
- [21] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool[J]. *J Mol Biol*, 1990, 215 (3): 403–410.
- [22] Wang Y, Tang H, Debarry JD, Tan X, Li J, *et al.* MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40 (7): e49.
- [23] Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, *et al.* MEME SUITE: tools for motif discovery and searching[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37 (S2): W202–W208.
- [24] Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, *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 Res*, 2002, 30 (1): 325–327.
- [25] Zhang TZ, Hu Y, Jiang WK, Fang L, Guan XY, *et al.* Sequencing of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. acc. TM-1) provides a resource for fiber improvement[J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33 (5): 531–537.
- [26] Livak KJ, Schmittgen TD. 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] Zhang CJ, Ouyang B, Yang CX, Zhang XH, Liu H, *et al.* Reducing AsA leads to leaf lesion and defence response in knock-down of the AsA biosynthetic enzyme GDP-D-mannose pyrophosphorylase gene in tomato plant[J]. *PLoS One*, 2013, 8 (4): e61987.
- [28] 许娟, 石云平, 韦绍龙, 苏祖祥, 林茜, 等. 白及GMP基因cDNA全长克隆及生物信息学分析[J]. 西南农业学报, 2018, 31(6): 1104–1110.
- Xu J, Shi YP, Wei SL, Su ZX, Lin Q, *et al.* Cloning and bioinformatics analysis of GMP gene in *Bletilla striata*[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 31 (6): 1104–1110.
- [29] Lukowitz W, Nickle TC, Meinke DW, Last RL, Conklin PL, Somerville CR. *Arabidopsis* *cyt1* mutants are deficient in a mannose-1-phosphate guanylyltransferase and point to a requirement of N-linked glycosylation for cellulose biosynthesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (5): 2262–2267.
- [30] Cronje C, George GM, Fernie AR, Bekker J, Kossmann J, Bauer R. Manipulation of L-ascorbic acid biosynthesis pathways in *Solanum lycopersicum*: elevated GDP-mannose pyrophosphorylase activity enhances L-ascorbate levels in red fruit[J]. *Planta*, 2012, 235 (3): 553–564.
- [31] 林玲玲. GDP-D-甘露糖焦磷酸化酶基因(GMPase)在马铃薯中的功能分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2009: 29–42.
- [32] 肖瑶, 周天山, 李佼, 张佳欣, 余有本. 茶树GDP-D-甘露糖焦磷酸化酶基因cDNA全长的克隆与表达分析[J]. 茶叶科学, 2015, 35(1): 55–63.
- Xiao Y, Zhou TS, Li J, Zhang JX, Yu YB. Cloning and expression analysis of GDP-D-mannose pyrophosphorylase cDNA in *Camellia sinensis*[J]. *Journal of Tea Science*, 2015, 35 (1): 55–63.
- [33] 王华森. 番茄叶片GDP-甘露糖焦磷酸化酶基因(GMPase)的cDNA克隆及功能分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2007: 61–62.
- [34] 夏惠, 张敏, 马锋旺. 苹果GMP、GME和GGP基因的克隆与表达分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2014, 42(3): 191–196.
- Xia H, Zhang M, Ma FW. Cloning and expression analysis of GMP, GME and GGP genes in apple[J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2014, 42 (3): 191–196.
- [35] Qin H, Deng ZA, Zhang CY, Wang YY, Wang J, *et al.* Rice GDP-mannose pyrophosphorylase OsVTC1-1 and OsVTC1-3 play different roles in ascorbic acid synthesis[J]. *Plant Mol Biol*, 2016, 90 (3): 317–327.

(责任编辑: 李惠英)