钱娇,方佳琪,李迎迎,等.陆地棉YTH基因家族的鉴定与表达特征分析[J].山西农业大学学报(自然科学版),2024,44(3):1-13.
Qian J, Fang J Q, Li Y Y, et al.Identification and expression analysis of YTH gene family in cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J].Journal of Shanxi Agricultural University(Natural Science Edition), 2024,44(3):1-13.
doi: 10.13842/j.cnki.issn1671-8151.202312035

陆地棉YTH基因家族的鉴定与表达特征分析

钱娇,方佳琪,李迎迎,王丽*

(河南师范大学 生命科学学院,河南 新乡 453007)

摘　要:[目的]YT521-B同源(YTH)结构域蛋白可识别结合N^6-甲基腺苷(m^6A)调控mRNA的代谢过程,在植物生长发育与逆境响应中发挥重要作用。探究棉花YTH家族基因的组织表达模式、响应非生物胁迫和外源激素的表达特征,可为深入研究棉花YTH基因功能提供理论依据。[方法]采用生物信息学方法对陆地棉YTH基因家族进行全基因组分析,并利用转录组数据和实时荧光定量PCR(qPCR)分析*GhYTH*基因在逆境胁迫和外源激素处理下的表达特征。[结果]陆地棉中共鉴定获得26个GhYTH基因,在16条染色体上呈现不均一分布,其中22个YTH-DF和4个YTH-DC亚家族成员,GhYTHs具有相似的基序和结构。串联重复和片段复制是驱动陆地棉YTH基因家族扩张的主要方式;陆地棉与拟南芥YTH共线性基因间Ka/Ks<0.5,表明该基因家族在进化过程中受到了较强的纯化选择。转录组结果显示多数GhYTH具有组织表达特异性,*GhYTH2/16*在各组织中高表达;逆境胁迫可显著增加GhYTH的表达,尤其是*GhYTH9/12/14*,qPCR结果与转录组结果一致;外源赤霉素、脱落酸和茉莉酸甲酯处理时,*GhYTH10/12/14*的表达显著增加。[结论]本研究通过陆地棉全基因组分析,获得了5个重要的YTH候选基因*GhYTH2/9/10/12/14*,它们在棉花生长发育和逆境抵抗中可能发挥着重要的作用,为进一步解析YTH介导的m^6A修饰的作用提供了重要的理论依据。

关键词:陆地棉; YTH基因; 激素; 胁迫; 表达
中图分类号:S562　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1671-8151(2024)03-0001-13

遗传信息经转录从DNA传递给mRNA,之后经翻译由mRNA合成具有不同生物功能的蛋白质,该过程涉及多水平、多层次的调控,生物体因而能够在不同生长发育阶段和外界环境变化时启动特定基因的表达。RNA化学修饰是近年来倍受关注的一种新的转录后基因表达调控方式,目前已发现170余种化学修饰存在于mRNAs和非编码RNAs中[1-2]。N^6-甲基腺苷(m^6A)是广泛在于真核生物mRNA中的一种重要的转录后修饰,最早发现于1974年[3-4]。研究表明m^6A修饰调控mRNA几乎所有的代谢过程,包括稳定性、拼接、核输出和翻译效率,因而参与许多重要的生物学过程[5]。m^6A是一种动态的、可逆的修饰,由甲基转移酶复合体("writers")负责将m^6A添至RNA分子上[6-8],而去甲基化酶("erasers")复合体可将RNA分子上的m^6A可逆地清除[9]。m^6A的生物功能主要依赖不同的"reader"蛋白选择性识别m^6A来实现,这些"reader"包括YTH(YT521-B homology)结构域蛋白、IGF2BP和HNRNP家族[10-11],其中YTH结构域蛋白是最早发现且目前研究较清楚的m^6A"reader"。

动物体中YTH结构域蛋白研究较为清楚,人的YTH结构域蛋白家族有5个成员:YTHDF1-3和YTHDC1-2,均有高度保守的YTH结构域,但功能不完全相同[5]。植物中,YTH结构域蛋白是唯一报道的m^6A"reader",与动物相比,其家族成员较多[12-15]。模式植物拟南芥中共有13个YTH蛋白,其中YTH-DF成员有11个,命名为ECT

收稿日期:2023-12-15　　**修回日期**:2024-03-27
基金项目:国家自然科学基金项目(31601241);棉花生物育种与综合利用全国重点实验室开放课题基金(CB2023A07)
作者简介:钱娇(ORCID:0009-0006-0057-4372),硕士,研究方向:作物抗逆机理研究,E-mail:1838830803@qq.com
*通信作者:王丽(ORCID:0000-0001-9817-3302),副教授,博士,E-mail:wangli1015@htu.cn

(Evolutionarily Conserved C-Terminal Region)1-11,YTH-DC有2个成员(ECT12和AtCPSF30-L)[12]。拟南芥中ECT2、ECT3和ECT4均位于细胞质,以功能冗余的方式调控叶片发育和茎的生长[12,16-17];ECT1和ECT2通过与应激反应蛋白CIPK1互作,调控钙离子信号途径[18];AtCPSF30-L通过识别mRNA上的m^6A修饰调控mRNA的poly(A)位点选择,影响硝态氮信号相关基因的表达,调控植物氮吸收和同化[19]。水稻中发现12个YTH蛋白,其中YTH03、YTH05和YTH10协同调控水稻的株高[13]。番茄中鉴定了9个YTH蛋白,敲除*SlYTH2*增加了内源脱落酸(abscisic acid, ABA)含量,降低了赤霉素(gibberellin, GA)含量,植株呈现矮化、果实成熟延缓、种子败育率增加等表型[14];敲除*SlYTH1*抑制GA的合成,植株根长变短、营养生长受抑制、果实细长且扁平[20]。苹果中共有26个YTP蛋白,过表达*MhYTP1*的苹果植株在干旱条件下内源ABA水平升高,水分利用效率和净光合速率增加,耐旱性增强[15];*MhYTP2*过表达增加了m^6A修饰水平和翻译效率,促进MdMLO19和MdMLO19-X1 mRNA的降解,提高抗氧化相关基因的翻译效率,增强了白粉病抵抗能力[21]。由此,植物YTH结构域蛋白在植物多个生长发育过程、激素信号转导途径和多种胁迫响应中起着至关重要的作用,但大多数植物中YTH结构域蛋白家族成员尚未得以鉴定。

棉花(*Gossypium hirsutum* L.)是世界上重要的经济作物之一,其基因组较大,遗传背景复杂,与模式植物相比,棉花中m^6A修饰的功能研究相对滞后。Huang等[22]发现棉花m^6A甲基化酶基因*GhVIR*沉默植株叶片变小且形态异常,叶绿体和类囊体结构损坏,光合效率降低。Cui等[23]研究表明棉花去甲基化酶基因*GhALKBH10*沉默提高了植株的耐盐能力。Wang等[24]发现棉花幼苗根部m^6A修饰响应盐胁迫处理发生动态变化。陆地棉中YTH的功能尚不清楚,本研究对陆地棉YTH基因家族进行全基因组鉴定,并分析其理化性质、进化关系、保守基序、染色体分布、顺式作用元件等,探究YTH家族基因的组织表达模式、响应逆境胁迫和外源激素的表达特征,为后续深入研究棉花YTH基因的功能及揭示m^6A修饰在棉花生长发育和逆境响应中的功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料与处理

陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.)品种'中棉49'由中国农业科学院安阳棉花研究所提供。种子经10%次氯酸钠消毒处理后于28 ℃浸种12 h,将露白的种子种于盛有沙子的培养盒中,培养3 d后移至Hoagland营养液中于人工气候室中培养,温度为28 ℃/22 ℃,光周期为14 h光照/10 h黑暗,光照强度400 μmol·m^{-2}·s^{-1}。培养至三叶期时进行盐和干旱胁迫处理:在Hoagland营养液中分别添加250 mmol·L^{-1} NaCl和10% PEG-6000,对照组用正常Hoagland营养液培养。外源激素处理采用叶面喷施的方法,分别喷施100 μmol·L^{-1} GA_3、100 μmol·L^{-1} ABA和100 μmol·L^{-1}茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)。处理后0、3、6、12、24和48 h收集棉花幼苗叶片,用蒸馏水快速清洗并用滤纸擦干后,液氮冷冻保存于-80 ℃,用于RNA提取。每个处理组设置3个生物学重复。

1.2 陆地棉YTH基因家族成员鉴定

从棉花功能基因组数据库CottonFGD(https://cottonfgd.net/)中下载陆地棉的基因组数据(HAU)。在Pfam数据库(http://pfam.xfam.org)中获取YTH基因家族的隐马尔科夫模型(hidden Markov models, HMM)文件PF04146。使用HMMER3.0软件对陆地棉参考基因组的蛋白质序列进行初步筛选,过滤去除E-value小于0.05的序列。将筛选出的蛋白序列上传至SMART(http://smart.emblheidelberg.de/)和NCBI CD-Search数据库进行保守结构域的鉴定,最终筛选获得26个陆地棉YTH基因。利用在线网站ExPASy(https://web.expasy.org/compute_pi/)获得GhYTH蛋白的理论等电点和分子质量等信息。利用WoLF-PSORT(https://wolfpsort.hgc.jp/)预测GhYTH蛋白的亚细胞定位情况。

1.3 YTH基因家族蛋白保守结构域分析与系统发育分析

利用NCBI网站的CDD(The Conserved Domain Database)数据库,获取YTH蛋白结构域信息,并使用TBtools(https://github.com/CJ-Chen/TBtools)软件进行基因保守结构域示意图绘制。利用陆地棉YTH蛋白的氨基酸序列,将文件导入MEGA-X软件,先使用默认参数进行多序

列比对,再使用邻接法(neighbor joining, NJ)对YTH蛋白构建系统发育树,重复抽样检验参数Bootstrap值设置为1000,其他参数使用默认值。使用在线工具ChiPlot(https://www.chiplot.online)对进化树进行美化。

1.4　YTH基因家族染色体定位与共线性分析

提取陆地棉基因组gff注释文件中基因的位置信息,使用TBtools绘制染色体定位图。使用TBtools软件工具中的one step MCScanX进行陆地棉基因组自身比对,将得到的blast结果进行简化,利用注释文件简化并再次提取基因信息,得到共线性文件后用TBtools软件中的Advanced Circos进行绘图,并利用TBtools软件计算各个基因对的Ka/Ks的值。

1.5　YTH基因家族基因结构与蛋白保守基序分析

利用MEME在线网站(http://meme-suite.org/memei)分析GhYTH蛋白的保守基序,基序最大发现数设为10,利用TBtools中的"Visualize MEME/MAST Motif Pattern"工具对xml文件进行可视化分析。在TBtools"Gene Structure View"页面,上传陆地棉基因组注释文件与YTH家族的基因ID分析编码区/非编码区(CDS/UTR)。

1.6　YTH基因家族启动子区的顺式作用元件分析

从棉花功能基因组数据库CottonFGD(https:// cottonfgd.net)中下载陆地棉基因组Gff文件,然后使用TBtools Gff序列提取工具提取GhYTH基因起始密码子上游2000 bp的序列作为启动子区域。利用在线工具PlantCARE(http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html)对 *GhYTH* 基因启动子区的顺式作用元件进行预测分析,并用TBtools软件将预测的结果可视化。

1.7　基于转录组数据分析YTH基因家族成员的表达模式

从NCBI网站SAR数据库下载陆地棉不同组织(根、茎、叶、花托、花瓣、雄蕊、雌蕊、花萼)及非生物胁迫(低温、高温、盐、干旱)处理的转录组数据(登录号:PRJNA248163)。基于FPKM(fragments per kilobase of transcript per million mapped reads,每千个碱基的转录每百万映射读取的片段)对表达数据进行$\log_2$(FPKM+1)标准化处理,利用TBtools绘制基因表达热图。

1.8　qRT-PCR分析盐、干旱和外源激素处理时YTH基因家族成员的表达模式

采用Universal Plant RNA Kit试剂盒(金百特,北京)提取棉花叶片的总RNA,使用Reverse Transcriptase M-MLV(TaKaRa,大连)合成第一链cDNA。采用Primer Premier 5.0软件设计引物(表1),使用罗氏LightCycler®96荧光定量PCR仪,用2×SYBR Green qPCR Mix(艾德莱,北京)进行qRT-PCR。反应体系(25 μL):cDNA 2.0 μL,正向引物和反向引物各0.5 μL,SYBR Mix 12.5 μL,ddH_2O 9.5 μL。PCR反应程序:95 ℃ 2 min;95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,40个循环。试验设置3个生物学重复和3个技术重复。以 *GhUBQ7* 为内参基因,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$计算基因的相对表达量。

表1　qRT-PCR引物序列

Table 1　Real-time PCR Primer Sequences

引物名称 Primer name		引物序列(5′-3′) Primer sequence
YTH2	F	GGTCCAGGCGCAATAAAACC
	R	TCAAGCCATGGGATAGGGGA
YTH9	F	CACAAAAGTTCCCGAGCCTG
	R	AAGAGATGAACTGGGCACGG
YTH10	F	CGTGACTGCAAAAGTTCCCG
	R	CCGTCATGTCCCATAGCAGG
YTH12	F	TAACTGGCCTACGCTTGCTG
	R	TAGGTCCCCTGTTACGCTCA
YTH14	F	CCCCGTTGGACTCTTCTGTT
	R	GTGGACATCATCCTCGCTGT
GhUBQ7	F	AAGAAGAAGACCTACACCAAGCC
	R	GCCCACACTTACCGCAATA

1.9　数据处理

采用SPSS 17.0软件进行数据的统计分析,ANOVA法进行差异显著性分析($P<0.05$),Duncan's法进行多重比较。

2　结果与分析

2.1　陆地棉YTH基因家族的全基因组鉴定

利用拟南芥和水稻的YTH结构域蛋白序列通过BLASTP分析陆地棉的蛋白数据库,去除冗余序列和无完整读码框序列,共鉴定获得26个YTH基因,根据与拟南芥ECT基因的同源性命名为 *GhYTH1*～*GhYTH26*(表2)。GhYTH家族基因的CDS长度为1062～2097 bp,编码的蛋白含有

338(GhYTH6)～670(GhYTH16)个氨基酸,相对分子质量为38.35～73.96 kD。理论等电点为5.14～8.55,平均等电点为6.43。亚细胞定位预测结果显示,GhYTH21定位于细胞质,GhYTH1、GhYTH12和GhYTH26定位于叶绿体,其余22个GhYTH定位于细胞核。

表2 陆地棉中YTH基因和蛋白信息

Table 2 Information of YTH genes and the predicated proteins in *G. hirsutum*

基因名称 Gene name	基因ID号 Gene ID	编码区/bp CDS	氨基酸数量 Amino acid number	分子质量/kD Molecular weight	等电点 Isoelectric point	亚细胞定位 Subcellular localization
GhYTH1	Ghir_A01G014840	2061	480	52.91	8.50	叶绿体
GhYTH2	Ghir_A08G001920	2001	666	73.40	6.09	细胞核
GhYTH3	Ghir_A01G003120	1965	609	67.13	8.39	细胞核
GhYTH4	Ghir_A02G005870	1887	628	69.52	6.00	细胞核
GhYTH5	Ghir_A05G011920	1938	647	70.97	5.14	细胞核
GhYTH6	Ghir_A08G018430	1062	338	38.35	5.56	细胞核
GhYTH7	Ghir_A08G022230	1677	568	63.04	6.40	细胞核
GhYTH8	Ghir_A11G028000	1818	605	66 50	6.15	细胞核
GhYTH9	Ghir_A11G028020	1866	621	67.86	5.80	细胞核
GhYTH10	Ghir_A13G011190	1824	607	66.32	6.08	细胞核
GhYTH11	Ghir_D01G003090	1965	654	72.24	7.22	细胞核
GhYTH12	Ghir_D01G016150	1878	503	55.21	8.47	叶绿体
GhYTH13	Ghir_D02G006200	1965	654	71.90	6.05	细胞核
GhYTH14	Ghir_D02G024710	1680	586	64.89	6.08	细胞核
GhYTH15	Ghir_D05G011680	1944	653	71.30	5.04	细胞核
GhYTH16	Ghir_D08G001990	2013	670	73.96	6.13	细胞核
GhYTH17	Ghir_D08G019330	1155	384	43.55	5.96	细胞核
GhYTH18	Ghir_D10G027590	1968	650	71.49	5.30	细胞核
GhYTH19	Ghir_D11G028180	1818	605	66.56	6.26	细胞核
GhYTH20	Ghir_D11G028200	1842	613	67.16	5.86	细胞核
GhYTH21	Ghir_D12G004550	2097	426	47.52	8.55	细胞质
GhYTH22	Ghir_D13G011820	1821	606	66.22	6.12	细胞核
GhYTH23	Ghir_A03G023300	1719	572	63.56	5.96	细胞核
GhYTH24	Ghir_D10G000140	1695	564	62.52	5.19	细胞核
GhYTH25	Ghir_D08G023010	1392	463	51.13	8.32	细胞核
GhYTH26	Ghir_A12G004610	1956	637	69.69	6.63	叶绿体

2.2 陆地棉YTH基因家族蛋白保守结构域与进化分析

陆地棉YTH基因家族蛋白成员均有保守的YTH结构域,且多数位于C-末端(图1A)。除YTH结构域外,GhYTH21的N-末端还有1个YTH1超家族结构域,GhYTH2与GhYTH16均有1个dnaA超家族结构域,GhYTH5与GhYTH15均有1个PHA03377超家族结构域。

将陆地棉26个YTH基因家族蛋白与模式植物拟南芥、水稻的ECT家族蛋白进行进化分析,YTH基因家族蛋白共有5个分支,而这些分支中均有陆地棉YTH成员(图1B)。拟南芥ECT蛋白中的AtCPSF30、AtECT12属于YTH-DC亚家族,陆地棉GhYTH21和GhYTH26与AtCPSF30亲缘关系较近,GhYTH6和GhYTH17则与AtECT12亲缘关系较近,表明这4个陆地棉YTH蛋白属于YTH-DC亚家族,其余22个陆地棉YTH蛋白属于YTH-DF亚家族。

2.3 陆地棉YTH基因家族成员染色体分布与共线性分析

基因染色体定位图显示,除A04、A06、A07、A09、A10和D03、D04、D06、D07、D09染色体,其余染色体上均有GhYTH基因(图2)。A亚基因组中分布有12个GhYTH基因,D亚基因组中分布

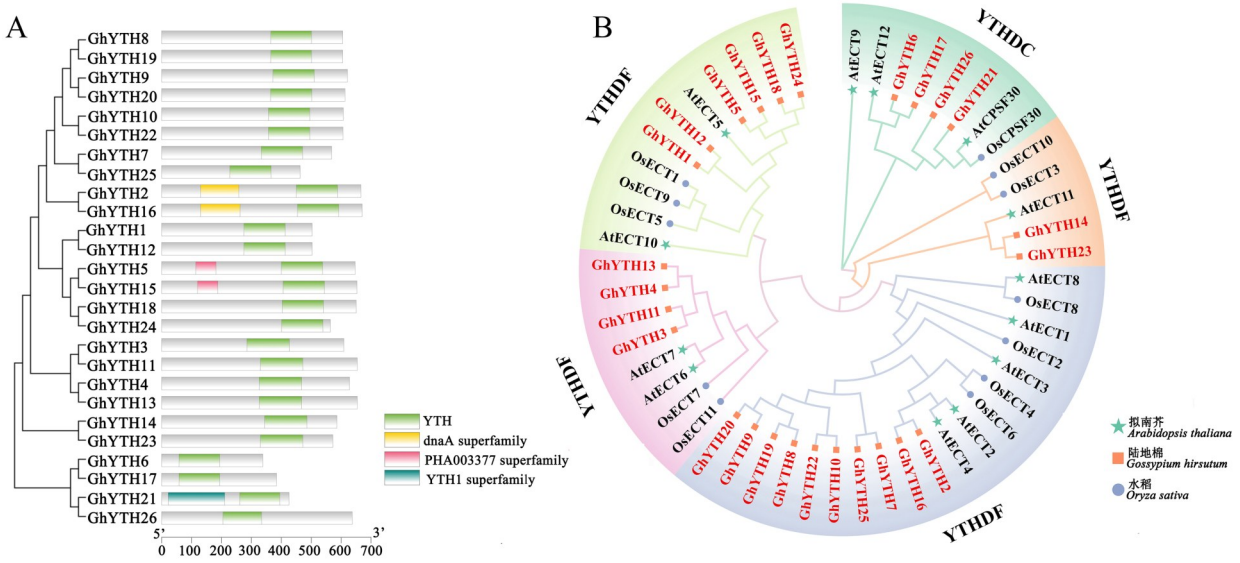


图 1　陆地棉 *YTH* 家族成员蛋白的保守结构域(A)和进化树(B)分析

Fig.1　Conserved domains (A) and phylogenetic tree (B) analysis of the YTH protein in *G. hirsutum*

有 13 个 GhYTH 基因,而 *GhYTH18* 染色体位置未知。A08 和 D08 染色体上分别有 3 个 GhYTH 基因,是 GhYTH 基因分布最多的染色体,A01、A11、D01、D02、D11 染色体上均分布 2 个 GhYTH 基因,其余的染色体上均只分布 1 个 GhYTH 基因。GhYTH 主要分布在染色体两端,在 A 和 D 亚基因组上呈现不完全均匀分布,并且在 A、D 亚基因组间无明显偏好性。

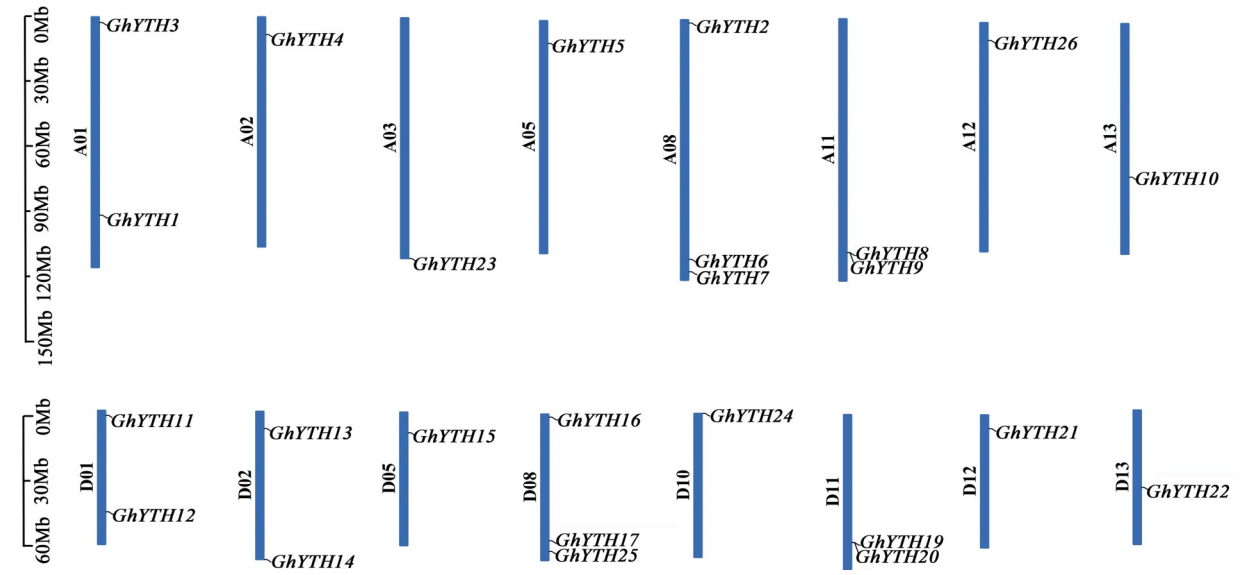
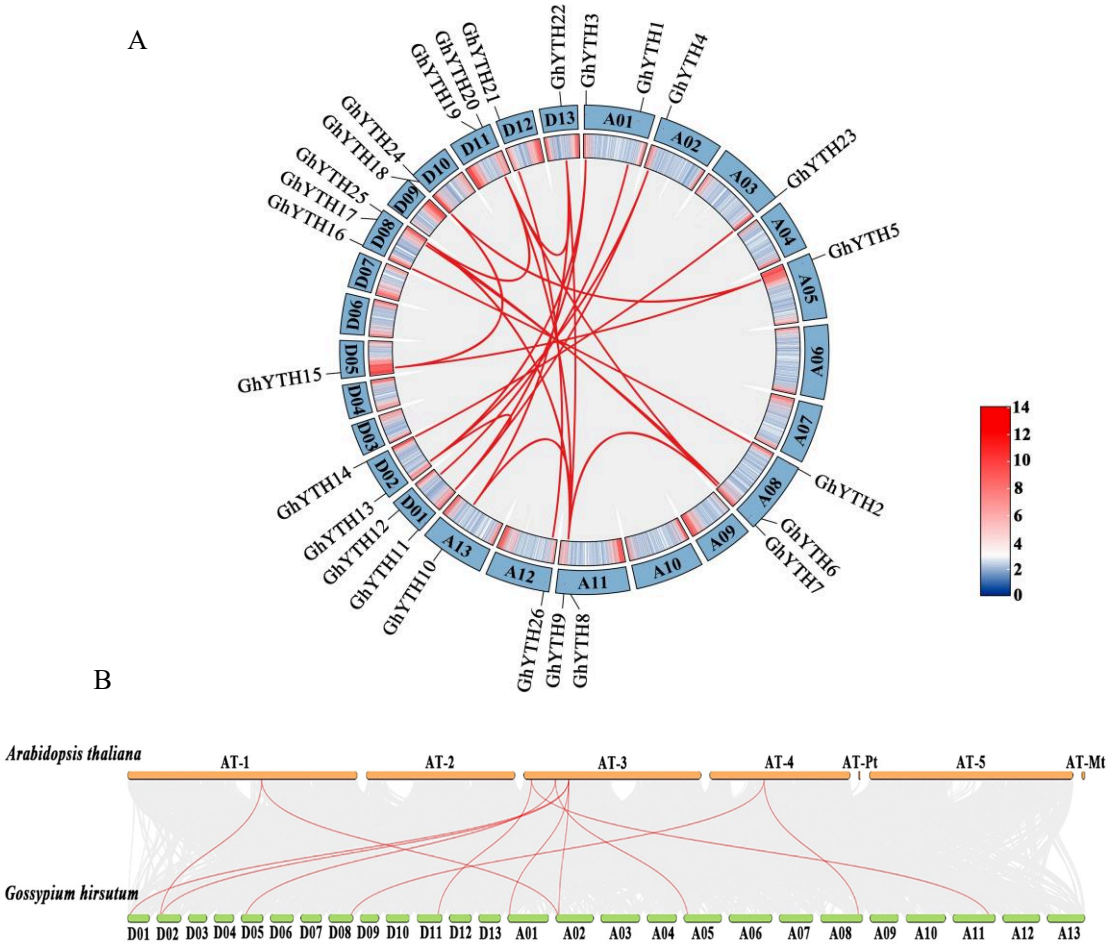


图 2　陆地棉 YTH 基因家族的染色体定位

Fig.2　Chromosomal localization of YTH gene family in *G. hirsutum*

基因复制对于新基因和新功能的产生十分重要,片段复制和串联重复是基因家族扩大的重要驱动力[25]。为进一步探索陆地棉 YTH 基因家族的进化过程,对该家族不同成员间的共线性关系进行了分析,共发现 22 对 GhYTH 基因存在共线性关系(图 3A),A 亚组和 D 亚组之间有 8 对同源基因呈绝对共线性,此外,A 亚组和 D 亚组内分别有 3 对 GhYTH 基因也存在共线性关系,有 2 对串联重复基因(*GhYTH8/9*、*GhYTH19/20*),同时 GhYTH 基因家族存在单个基因对应多个基因的

情况,表明GhYTH基因家族的进化涉及染色体片段复制事件。为了解GhYTH基因家族的进化关系,将陆地棉与拟南芥进行了共线性关系比较,发现陆地棉中10个YTH基因与拟南芥的5个YTH基因存在共线性关系(图3B),进一步对陆地棉与拟南芥的共线性基因对的Ka/Ks进行计算,发现Ka/Ks值在0.157 5~0.269 6之间,平均值0.207 7,表明陆地棉YTH基因家族在进化过程中可能受到了较强的纯化压力。



A:陆地棉YTH基因的共线性分析,蓝色方框代表染色体;B:陆地棉与拟南芥YTH基因的共线性分析,绿色和橙色粗线代表染色体。红色的线条代表共线的基因对

A: Collinearity analysis of YTH genes in *G. hirsutum*, blue boxes represent chromosomes; B: Collinearity analysis of YTH genes in *Arabidopsis* and *G. hirsutum*, The green and orange thick lines represent chromosomes. The red lines represent collinear gene pairs

图3 陆地棉YTH家族基因的共线性分析

Fig.3 Collinearity analysis of YTH gene family in *G. hirsutum*

2.4 陆地棉YTH蛋白保守基序和基因结构分析

陆地棉YTH蛋白序列中共发现10个保守的motif,所有的陆地棉YTH蛋白序列中均有motif 2与motif 3(图4),表明这2个基序是陆地棉YTH基因家族进化的主要组成部分。9个YTH蛋白GhYTH2、GhYTH7~10、GhYTH16、GhYTH19、GhYTH20、GhYTH22含有全部的motif,而GhYTH6、GhYTH17、GhYTH21、GhYTH26仅有2个motif,其余13个YTH蛋白均有6~7个motif。

基因的外显子-内含子分布模式与其特异的生物学功能有关,陆地棉26个YTH基因均含有内含子,外显子数目有6~10个,内含子的数目有5~9个,各基因内含子和外显子数目差别不大(图4)。*GhYTH14*中的外显子(10个)和内含子(9个)数目

均最多。陆地棉YTH基因家族成员中外显子/内含子分布类型较相似。

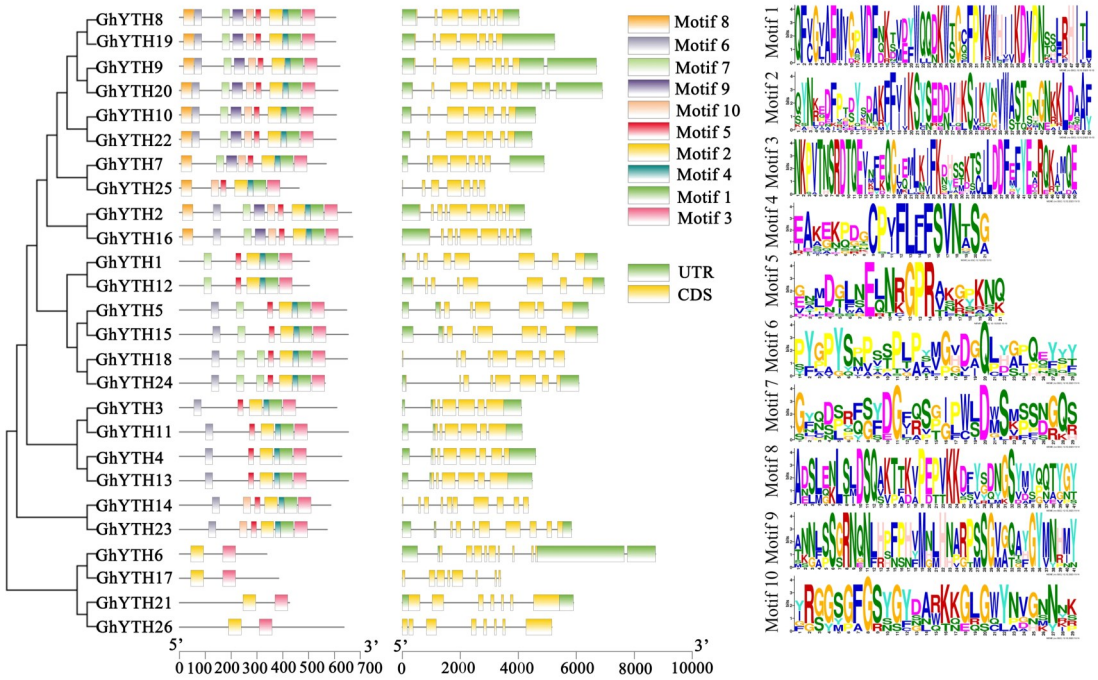


图4　陆地棉YTH基因家族的保守蛋白基序和基因结构分析

Fig.4　Conserved motifs and gene structure of YTH gene family in *G. hirsutum*

2.5　陆地棉YTH基因家族顺式作用元件分析

基因启动子区的顺式作用元件分析有助于了解家族基因的不同功能。通过对陆地棉 *YTH* 基因转录起始位点上游2000 bp的基因组序列进行启动子分析,发现其具有多种顺式作用元件(图5),根据调控功能将其分为3类:第1类是与生长发育相关的元件,包括昼夜节律调控元件、种子特异性调控元件、与分生组织表达相关的调控元件、胚乳表达调控元件、类黄酮生物合成基因调控元件等;第2类是激素响应元件,包括脱落酸响应元件、赤霉素应答元件、生长素调控元件、水杨酸响应元件和茉莉酸应答元件等;第3类是生物/非生物胁迫响应元件,包括防御和应激反应元件、低温反应元件、响应干旱的MYB结合位点元件、创伤反应元件等。上述应答元件的富集表明YTH基因可能在棉花的生长发育、激素响应和非生物胁迫响应中发挥重要功能。

2.6　陆地棉YTH基因家族成员组织表达模式分析

通过分析陆地棉8个不同组织的转录组测序数据,发现GhYTH的表达呈现一定的组织特异性(图6)。*GhYTH2/16* 在不同组织中的表达水平均较高,花瓣中表达最高,其次是茎;*GhYTH6/17/21/26* 在各组织中的表达均较低。与其它组织相比,*GhYTH14/23* 在地上部营养器官茎和叶片中表达水平较高,*GhYTH8/19* 在茎和花瓣中表达水平相对较高,*GhYTH7/25* 在雌蕊和茎中表达水平较高,*GhYTH1/12* 主要在雄蕊中表达。这些结果表明不同的 *GhYTH* 基因在棉花生长发育的不同阶段和不同组织中发挥不同的功能。

2.7　陆地棉YTH基因家族成员响应非生物胁迫和外源激素的表达特征

陆地棉YTH基因响应低温、高温、干旱和盐胁迫的转录组数据显示,低温处理时,*GhYTH2/9/12/16/20* 的表达上调,且处理12 h时上调最明显;随着高温处理时间的增加,*GhYTH1/9/12/14/22/23* 表达上调幅度增加,其中 *GhYTH12* 上调最明显;干旱和盐胁迫处理时,*GhYTH1/2/10/12/14/22/23* 的表达均明显上调,其中 *GhYTH12* 上调最明显(图7A)。这些结果表明YTH家族基因在不同的非生物胁迫中发挥不同的功能。

基于以上转录组分析结果,采用qPCR对逆境反应较敏感的 *GhYTH2/9/10/12/14* 基因在干旱和盐胁迫条件下的表达进行了验证,发现 *GhYTH2/9/12/14* 在PEG和盐处理时表达均显

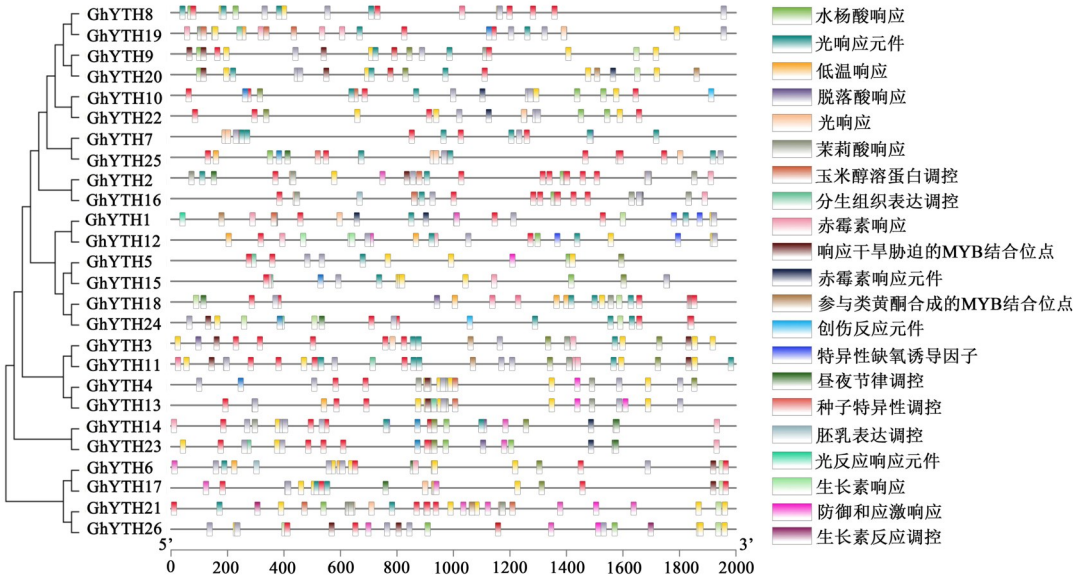


图5 陆地棉YTH基因启动子顺式作用元件

Fig.5 Cis-acting elements of YTH genes promoter in *G. hirsutum*

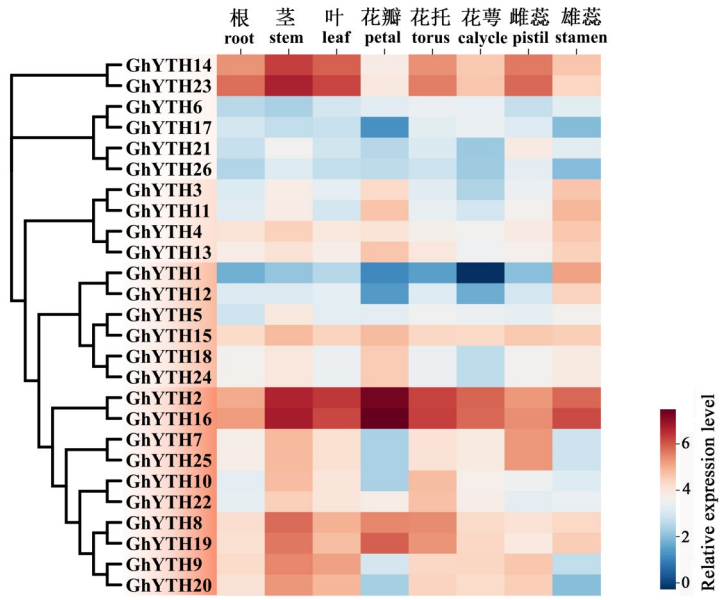
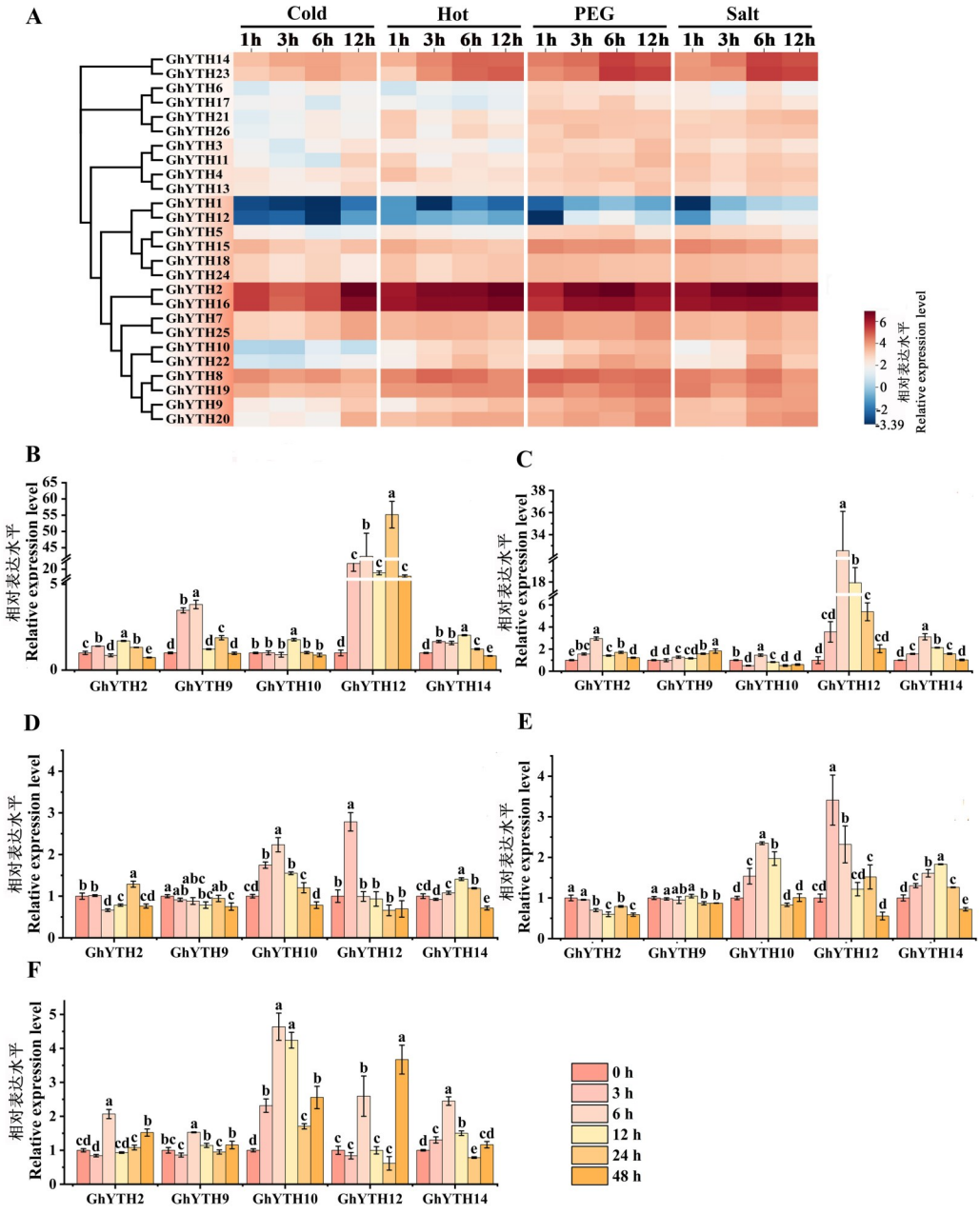


图6 陆地棉YTH基因在不同组织中的表达分析

Fig.6 Expression analysis of YTH genes in different tissues of *G. hirsutum*

著增加,尤以*GhYTH12*的表达增加最显著,在盐处理6 h和PEG处理24 h时增至峰值,分别为0 h的33倍和55倍;*GhYTH10*仅在盐处理3 h和PEG处理12 h时表达水平增加,该结果与转录组数据一致(图7B~7C)。此外,所检测的5个*GhYTH*基因对外源GA_3、ABA和MeJA处理也较敏感(图7D-7F),其中,*GhYTH10*对3种外源激素最敏感,表达水平均显著增加且在处理6 h时达到峰值;*GhYTH12*在GA_3和ABA处理时表达水平先增加后降低,处理3 h时增加最明显,MeJA处理时仅6 h和24 h显著高于对照;3种激素处理时*GhYTH14*的表达均先增加后降低,分别在ABA和GA_3处理12 h、MeJA处理6 h增至峰值。这些结果进一步表明陆地棉YTH基因家族的不同成员在激素信号转导途径和胁迫响应方面发挥不同的作用。



A. 基于转录组分析GhYTH基因在低温、高温、PEG和盐胁迫处理时的表达特征。B～F. qPCR分析GhYTH基因在10% PEG(B)、250 mmol·L^{-1} NaCl(C)、100 μmol·L^{-1} GA_3(D)、100 μmol·L^{-1} ABA(E)和100 μmol·L^{-1} MeJA(F)处理时的相对表达量。内参基因:*GhUBQ7*;n=3;不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

A. The expression pattern of GhYTH genes in response to cold, hot, PEG and salt stresses based on transcriptome data from *Gossypium hirsutum*. B～F. The relative expression levels of GhYTH genes under 10% PEG (B), 250 mmol·L^{-1}NaCl (C), 100 μmol·L^{-1}GA_3(D), 100 μmol·L^{-1} ABA (E) and 100 μmol·L^{-1} MeJA (F) treatments by qPCR, respectively. Reference gene: *GhUBQ7*; n=3; Different lowercase letters mean significant difference between different treatment times ($P<0.05$)

图7　陆地棉YTH基因响应非生物胁迫和外源激素的表达模式

Fig.7　Expression analysis of YTH genes in *G. hirsutum* in response to hormones and stresses

3　讨论

YTH结构域蛋白是最早被发现的一类m^{6}A“reader”蛋白,广泛存在于真核生物中且高度保守,有YTH-DF和YTH-DC 2个亚家族,通过识别结合m^{6}A调控mRNA的多个代谢过程,对生命活动产生重要的影响[26]。目前YTH基因家族成

员仅在少数植物中被鉴定,且以YTH-DF成员居多,YTH-DC亚家族成员相对较少,如拟南芥有13个YTH成员,YTH-DC成员2个[12];水稻中YTH成员12个,YTH-DC成员1个[13];番茄中9个YTH成员,5个YTH-DC成员[27];小麦中39个YTH成员,3个YTH-DC成员[28]。本研究从陆地棉中共鉴定获得26个YTH基因家族成员,YTH-DC亚家族成员有4个,其中GhYTH21与拟南芥AtCPSF30、水稻OsCPSF30高度同源,它们除具有YTH保守结构域外,均有YTH1超家族结构域,该结构域可结合RNA并参与RNA前体的拼接[12]。亚细胞定位预测GhYTH21主要在细胞质中表达,与报道的AtCPSF30亚细胞定位一致[29],表明GhYTH21与AtCPSF30可能具有相似的功能。此外,GhYTH6、GhYTH17与拟南芥另一个YTH-DC成员AtECT12高度同源。

陆地棉中26个YTH基因在大多数染色体上有分布,且主要位于染色体的两端,该特征与此前水稻、小麦和草莓中的报道一致[13,28,30]。YTH基因在陆地棉A和D亚基因组上呈现不完全均匀分布,如A02仅有1个YTH基因,D02有2个YTH基因,A03和D10上分别有1个YTH基因,但D03和A10上无YTH基因,而小麦39个YTH基因在A、B和D亚基因组的染色体上呈现完全均匀分布[28],表明YTH家族基因在染色体定位方面具有一定的物种特征。串联重复和片段重复在植物基因扩张和功能分化中发挥重要的作用[25]。研究发现串联重复和片段重复事件是拟南芥YTH基因进化的主要驱动力,而水稻YTH基因家族的基因复制主要由片段重复事件主导[29]。本研究发现陆地棉YTH基因家族中存在串联重复和片段重复事件,表明这两种复制方式在陆地棉YTH基因家族进化中发挥了重要作用。

随着少数植物YTH基因家族成员的鉴定及功能分析,发现YTH蛋白参与调控植物多个生长发育过程[29,31-32]。Scutenaire等[31]发现拟南芥*ECT2*在整个生长发育过程高水平表达,调控毛状体的形成。ECT2/ECT3/ECT4在拟南芥器官发生过程中控制着细胞的增殖,*ect2/3/4*突变降低了叶片和维管束原基中细胞分裂速率,延缓了叶、根和茎的生长及花的形成[32]。水稻中与拟南芥ECT2和ECT4高度同源的OsYTH03(*LOC_Os03g06240*)、OsYTH05(*LOC_Os03g53670*)和OsYTH10(*LOC_Os07g07490*)同样在各组织中高度表达,同时敲除这3个蛋白的编码基因显著降低植株的高度[13]。本研究对陆地棉、拟南芥和水稻的YTH基因家族成员构建了进化树,发现陆地棉GhYTH2与拟南芥ECT2、ECT4及水稻的OsECT4(OsYTH05,*LOC_Os03g53670*)和OsECT6(OsYTH03,*LOC_Os03g06240*)同源性均较高,且组织表达模式显示*GhYTH2*在棉花的不同组织中表达水平均较高,表明*GhYTH2*在棉花生长发育尤其在营养生长阶段可能有重要的调控作用。

植物激素在植物生长发育和抵抗逆境方面发挥着非常重要的作用。近期研究发现YTH蛋白可通过与植物激素的互作调控器官发育,如水稻*yth03/05/10*三突变体的矮化表型与油菜素内酯合成受阻有关[13];敲除番茄*SlYTH2*增加了内源ABA含量,降低了内源GA_3含量,植株表现为矮化、果实成熟期延迟和种子败育率增加[14]。本研究在*YTH*基因家族成员的启动子区域发现许多激素响应元件,包括ABA、GA、NAA、SA和MeJA等应答元件,用qPCR分析陆地棉*YTH*基因家族成员对外源激素的响应情况,发现5个YTH基因对GA_3、ABA和MeJA均有响应,但*GhYTH10/12/14*更为敏感,且以上调为主,而这3个基因的启动子区域存在多个GA、ABA和MeJA反应元件。GA是一种重要的植物生长促进激素,可通过其信号途径调控下游基因表达影响植物多个生长发育过程,如节间伸长、种子萌发等[33];ABA作为一类重要的植物激素和信号分子,除调控植物的生长发育,还参与植物对干旱、盐胁迫、温度等多种胁迫应对[34];MeJA参与植物的多种生理生化过程,在植物应对生物和非生物胁迫方面均发挥着重要的作用[35]。陆地棉YTH基因家族成员对这3种激素的响应表明它们不仅调控棉花的生长发育,也通过激素介导的信号途径参与棉花对逆境胁迫的适应。

陆地棉转录组数据显示YTH基因家族成员*GhYTH2/9/10/12/14/22/23*在低温、高温、PEG和盐胁迫处理时表达水平均变化明显,qPCR验证了其中5个YTH基因对PEG和盐胁迫的响应,*GhYTH12*在PEG和盐胁迫处理时表达上调最明显,而*GhYTH9*和*GhYTH14*在PEG处理时、

GhYTH2 和 *GhYTH14* 在盐胁迫处理时表达均显著上调,相应地在这些对逆境胁迫较敏感的 *GhYTH* 基因启动子区域检测到了低温反应元件、干旱诱导的MYB结合位点、厌氧胁迫元件、防御和胁迫响应元件等,表明这些YTH基因家族成员可能在棉花应对干旱和盐胁迫时起重要作用。Guo等[15, 21]发现过表达 *MhYTP1* 可显著提高苹果的耐旱能力,过表达 *MhYTP2* 可提高苹果对白粉病的抵抗力。YTH蛋白对生命体活动的影响基于对mRNA代谢调控,动物中的研究表明亚细胞定位不同的YTH蛋白调控mRNA不同的代谢过程,细胞核中主要参与mRNA加工、输出和表观调控,而细胞质中主要控制翻译和mRNA稳定性[36]。植物中YTH功能研究非常有限,而YTH功能与亚细胞定位之间的关系还有待研究。本研究中 *GhYTH10* 和 *GhYTH14* 亚细胞定位预测为细胞核,而 *GhYTH12* 定位在叶绿体,其如何参与棉花生长发育和逆境响应的调控仍需进一步开展功能研究。

4　结论

综上所述,本研究从陆地棉中鉴定获得26个YTH基因家族成员,它们均有YTH保守结构域,其中YTH-DF亚家族成员22个,YTH-DC亚家族成员4个,A亚基因组和D亚基因组上分别有12个和13个YTH基因。陆地棉YTH基因家族成员的启动子区域存在许多激素和胁迫响应元件,表达模式显示大多数YTH基因具有组织表达特异性,YTH基因对外源激素和胁迫处理较为敏感,其中 *GhYTH10/12/14* 最为敏感,表明它们在棉花生长发育和应对逆境胁迫中可能发挥重要的作用。该研究结果可为揭示m^6A修饰及其阅读蛋白YTH在棉花生长发育和胁迫应对中的功能奠定良好的基础,为棉花的生长发育和逆境研究提供了重要的候选基因。

参　考　文　献

[1]Zhao B S, Roundtree I A, He C. Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2017, 18: 31-42.

[2]Shen L S, Liang Z, Wong C E, et al. Messenger RNA modifications in plants[J]. Trends in Plant Science, 2019, 24(4): 328-341.

[3]Desrosiers R, Friderici K, Rottman F. Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1974, 71(10): 3971-3975.

[4]Perry R P, Kelley D E. Existence of methylated messenger RNA in mouse L cells[J]. Cell, 1974, 1(1): 37-42.

[5]Wang X, Zhao B S, Roundtree I A, et al. N^6-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency [J]. Cell, 2015, 161(6): 1388-1399.

[6]Zhong S L, Li H Y, Bodi Z, et al. MTA is an *Arabidopsis* messenger RNA adenosine methylase and interacts with a homolog of a sex-specific splicing factor[J]. The Plant Cell, 2008, 20(5): 1278-1288.

[7]Bodi Z, Zhong S L, Mehra S, et al. Adenosine methylation in *Arabidopsis* mRNA is associated with the 3′ end and reduced levels cause developmental defects [J]. Frontiers in Plant Science, 2012, 3: 48.

[8]Růžička K, Zhang M, Campilho A, et al. Identification of factors required for m^6A mRNA methylation in *Arabidopsis* reveals a role for the conserved E3 ubiquitin ligase HAKAI[J]. The New Phytologist, 2017, 215(1): 157-172.

[9]Zheng G Q, Dahl J A, Niu Y M, et al. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility[J]. Molecular Cell, 2013, 49(1): 18-29.

[10]Huang H L, Weng H Y, Sun W J, et al. Recognition of RNA N6-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation[J]. Nature Cell Biology, 2018, 20(3): 285-295.

[11]Xu W J, Rahman R, Rosbash M. Mechanistic implications of enhanced editing by a HyperTRIBE RNA-binding protein[J]. RNA, 2018, 24(2): 173-182.

[12]Arribas-Hernández L, Bressendorff S, Hansen M H, et al. An m^6A-YTH module controls developmental timing and morphogenesis in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2018, 30(5): 952-967.

[13]Cai L, Cui S, Jin T, et al. The N^6-methyladenosine binding proteins YTH03/05/10 coordinately regulate rice plant height [J]. Plant Science, 2023, 329: 111546.

[14]Ao Q J, Qiu T S, Liao F, et al. Knockout of SlYTH2, encoding a YTH domain-containing protein, caused plant dwarfing, delayed fruit internal ripening, and increased seed abortion rate in tomato[J]. Plant Science, 2023, 335: 111807.

[15]Guo T L, Wang N, Xue Y C, et al. Overexpression of the RNA binding protein MhYTP1 in transgenic apple enhances drought tolerance and WUE by improving ABA level under drought condition[J]. Plant Science, 2019, 280: 397-407.

[16]Wei L H, Song P Z, Wang Y, et al. The m^6A reader ECT2 controls trichome morphology by affecting mRNA stability in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2018, 30(5): 968-985.

[17]Arribas-Hernández L, Brodersen P. Occurrence and functions of m^6A and other covalent modifications in plant mRNA[J]. Plant Physiology, 2020, 182(1): 79-96.

[18]Ok S H, Jeong H J, Bae J M, et al. Novel CIPK1-associated proteins in *Arabidopsis* contain an evolutionarily conserved C-terminal region that mediates nuclear localization[J]. Plant Physiology, 2005, 139(1): 138-150.

[19]Hou Y F, Sun J, Wu B X, et al. CPSF30-L-mediated recognition of mRNA m^{6}A modification controls alternative polyadenylation of nitrate signaling-related gene transcripts in *Arabidopsis*[J]. Molecular Plant, 2021, 14(4): 688-699.

[20]Yin S Q, Ao Q J, Qiu T S, et al. Tomato SlYTH1 encoding a putative RNA m^{6}A reader affects plant growth and fruit shape [J]. Plant Science, 2022, 323: 111417.

[21]Guo T L, Liu C H, Meng F X, et al. The m^{6}A reader MhYTP2 regulates MdMLO19 mRNA stability and antioxidant genes translation efficiency conferring powdery mildew resistance in apple[J]. Plant Biotechnology Journal, 2022, 20(3): 511-525.

[22]Huang X Y, Abuduwaili N, Wang X T, et al. Cotton (*Gossypium hirsutum*) VIRMA as an N6-methyladenosine RNA methylation regulator participates in controlling chloroplast-dependent and independent leaf development[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(17): 9887.

[23]Cui C J, Ma Z F, Wan H, et al. GhALKBH10 negatively regulates salt tolerance in cotton[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2022, 192: 87-100.

[24]Wang W, Li W X, Cheng Z M, et al. Transcriptome-wide N6-methyladenosine profiling of cotton root provides insights for salt stress tolerance[J]. Environmental and Experimental Botany, 2022, 194: 104729.

[25]Cannon S B, Mitra A, Baumgarten A, et al. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*[J]. BMC Plant Biology, 2004, 1: 4-10.

[26]Roundtree I A, He C. RNA epigenetics--chemical messages for posttranscriptional gene regulation[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2016, 30: 46-51.

[27]Yin S Q, Ao Q J, Tan C Y, et al. Genome-wide identification and characterization of YTH domain-containing genes, encoding the m^{6}A readers, and their expression in tomato[J]. Plant Cell Reports, 2021, 40(7): 1229-1245.

[28]Sun J, Bie X M, Wang N, et al. Genome-wide identification and expression analysis of YTH domain-containing RNA-binding protein family in common wheat[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 351.

[29]Li D Y, Zhang H J, Hong Y B, et al. Genome-wide identification, biochemical characterization, and expression analyses of the YTH domain-containing RNA-binding protein family in *Arabidopsis* and rice[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2014, 32(6): 1169-1186.

[30]Xu P B, Li X Y, Fan J M, et al. Comprehensive identification and expression analysis of the YTH family of RNA-binding proteins in strawberry[J]. Plants (Basel), 2023, 12(7): 1449.

[31]Scutenaire J, Deragon J M, Jean V, et al. The YTH domain protein ECT2 is an m^{6}A reader required for normal trichome branching in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2018, 30(5): 986-1005.

[32]Arribas-Hernández L, Simonini S, Hansen M H, et al. Recurrent requirement for the m^{6}A-ECT2/ECT3/ECT4 axis in the control of cell proliferation during plant organogenesis [J]. Development, 2020, 147(14): dev189134.

[33]Gao S P, Chu C C. Gibberellin metabolism and signaling: targets for improving agronomic performance of crops[J]. Plant and Cell Physiology, 2020, 61(11): 1902-1911.

[34]Gomez-Cadenas A, Vives V, Zandalinas S I, et al. Abscisic acid: a versatile phytohormone in plant signaling and beyond [J]. Current Protein & Peptide Science, 2015, 16(5): 413-434.

[35]Santino A, Taurino M, De Domenico S, et al. Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a)biotic stresses[J]. Plant Cell Reports, 2013, 32(7): 1085-1098.

[36]Patil D P, Pickering B F, Jaffrey S R. Reading m^{6}A in the transcriptome: m^{6}A-binding proteins [J]. Trends in Cell Biology, 2018, 28(2): 113-127.

Identification and expression analysis of YTH gene family in cotton (*Gossypium hirsutum* L.)

Qian Jiao, Fang Jiaqi, Li Yingying, Wang Li*

(*College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China*)

Abstract: [Objective] The YT521-B homology (YTH) family proteins can recognize and bind *N*^{6}-methyladenosine (m^{6}A), regulating the mRNA metabolism process, playing an important role in plant growth, development, and stress response. Exploring the tissue expression patterns and response of the cotton YTH gene family, as well as their response to exogenous hormones and abiotic stresses treatments, can provide a theoretical basis for a deeper understanding of the function of cotton GhYTHs genes. [Methods]In this study, the genome-wide identification of YTH genes in *Gossypium hirsutum* was performed and the basic characteristics were analyzed using bioinformatics methods. The expression patterns of GhYTH genes under abiotic stress and exogenous hormone treatment were analyzed using online RNA-Seq data and/or quantitative real-time PCR. [Results]The results showed that a total of 26 GhYTH genes were identified from *G. hirsutum*,

unevenly distributed on 16 chromosomes, including 22 members of the YTH-DF subfamily and four members of the YTH-DC subfamily. GhYTHs exhibited similar motifs and gene structures. Tandem duplication and fragment duplication were the main driving forces for expansion of YTH gene family in *G. hirsutum*. The Ka/ Ks ratio of the collinear genes between *G. hirsutum* and Arabidopsis were less than 0.5, indicating strong purifying selection during the evolution process of this gene family. Transcriptome results showed most GhYTHs showed tissue-specific expression patterns, with *GhYTH2/16* showing high expression in various tissues. Abiotic stress significantly increased the expression of GhYTHs, especially *GhYTH9/12/14*, which was consistent with the qPCR results. Additionally, exogenous treatments with gibberellin, abscisic acid and methyl jasmonate led to a significant increase in the expression of *GhYTH10/12/14*. [Conclusion] Through whole-genome analysis of *G. hirsutum*, five important candidate genes, including *GhYTH2/9/10/12/14*, were identified. They may play important roles in cotton growth, development, and stress resistance, providing important theoretical basis for further research on the role of YTH-mediated m^6A modification in cotton.

Keywords: *Gossypium hirsutum*, YTH gene, Hormone, Stress, Expression

(编辑:吕俊俐)