

# 棉花 *NHL* 基因家族鉴定及黄萎病菌胁迫下的表达分析

刘丽霞, 刘正文, 王国宁, 张 艳, 张松雨, 柯会锋, 李志坤, 吴金华, 杨 君,  
阎媛媛, 孙正文, 吴立强, 张桂寅, 马峙英, 王省芬

(教育部华北作物种质资源重点实验室/河北省作物种质资源重点实验室/河北农业大学, 保定 071001)

**摘要:** 已有研究证明拟南芥 *NHL* (*NDRI/HIN1-like*) 基因在抗病中发挥作用。本研究从海岛棉和陆地棉中分别鉴定出 100 个和 118 个 *NHL* 基因, 并对其进行了生物信息学分析。海岛棉和陆地棉 *NHL* 基因家族成员几乎遍布各条染色体, 并可分为 3 个亚组, 都含有 3 个与拟南芥保守基序相似的保守结构域。利用接菌后抗病陆地棉品种的转录组数据, 分析 *NHL* 基因家族各成员表达变化, 发现在黄萎病菌胁迫下, 有 57 个陆地棉 *NHL* 基因在根和茎中的表达都发生了明显的变化, 其表达模式可分为 3 种类型: 接菌前高, 接菌后表达下降; 接菌前较高, 接菌后表达先降后升; 接菌前低, 接菌后表达升高。第一类基因的表达在接菌后一直受到抑制, 推测其在棉花抗黄萎病反应中受到负调控; 后两类基因受黄萎病菌诱导表达升高, 推测其在棉花抗病中受到正调控。本研究结果为分析成员较多的 *NHL* 基因家族在棉花抗黄萎病中的作用提供了理论依据。

**关键词:** 海岛棉; 陆地棉; *NDRI/HIN1-like* 基因; 黄萎病; 抗病

## Genome-Wide Identification of *NHL* Gene Family and Expression Analysis in Cotton under *Verticillium dahliae* Stress

LIU Li-xia, LIU Zheng-wen, WANG Guo-ning, ZHANG Yan, ZHANG Song-yu, KE Hui-feng, LI Zhi-kun,  
WU Jin-hua, YANG Jun, YAN Yuan-yuan, SUN Zheng-wen, WU Li-qiang,  
ZHANG Gui-yin, MA Zhi-ying, WANG Xing-fen

(North China Key Laboratory for Crop Germplasm Resources of Education Ministry/  
Key Laboratory for Crop Germplasm Resources of Hebei/Hebei Agricultural University, Baoding 071001)

**Abstract:** Previous studies showed that *Arabidopsis NHL* (*NDRI/HIN1-like*) genes played roles in the disease resistance. By bioinformatics analysis, we identified 100 and 118 *NHL* genes from Sea Island cotton and upland cotton, respectively. The *NHL* family members from Sea Island cotton and upland cotton were found to be distributed almostly on all chromosomes. These genes can be divided into three subgroups, and all contained three conserved domains as observed with the conserved motifs of *Arabidopsis NHL* gene family. The expression patterns of *NHL* family members in upland cotton were analyzed on the basis of the previously published transcriptional data of the resistant upland cotton after inoculated with *V. dahliae*. Fifty-seven *NHL* genes represented obvious expression changes in the root and stem, with three types of and their expression patterns: (1) highly expressed before inoculation and then decreased after inoculation; (2) highly expressed before inoculation, but firstly decreased and then increased after inoculation; (3) lowly expressed before inoculation and then increased after inoculation. The genes (type-1) were negatively regulated in the cotton resistance to *Verticillium* wilt, while the genes (type-2 and type-3) were positively regulated. Thus, the accumulative results provided a theoretical basis for further analyzing the role of

收稿日期: 2018-05-22 修回日期: 2018-07-02 网络出版日期: 2018-09-12

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180910.1759.002.html>

基金项目: 国家自然科学基金(31171597); 河北省百名优秀创新人才支持计划(14226308D); 河北省青年拔尖人才

第一作者研究方向为遗传学。E-mail: llx2009hebau@163.com

通信作者: 王省芬, 研究方向为棉花遗传育种。E-mail: cotton@hebau.edu.cn

*NHL* gene family in cotton *Verticillium* wilt resistance.

**Key words:** *Gossypium barbadense* L.; *Gossypium hirsutum* L.; *NDRI/HIN1-like*; *Verticillium* wilt; disease-resistant

棉花一生中受到很多种病害的影响,其中黄萎病是影响棉花产量和品质最严重的土传维管束病害。在植物抵抗病原菌的过程中,抗性基因(R基因)起着重要作用<sup>[1]</sup>。目前,大量的R基因已经被鉴定出来,并且被有效用于作物抗病遗传改良<sup>[2]</sup>。近十年来,棉花中的一些抗黄萎病相关基因相继被鉴别出来,如 *GbVe*<sup>[3]</sup>、*GbVe1*<sup>[4]</sup>、*Gbvdr5*<sup>[5]</sup>、*GbRLK*<sup>[6]</sup>、*GhDHS1*<sup>[7]</sup>、*GhPAO*<sup>[8]</sup>、*Gbvdr3*<sup>[9]</sup>、*Gbvdr6*<sup>[10]</sup>等,这些基因在增强棉花黄萎病抗性中发挥着重要作用。

已有研究发现,由一些R基因产物诱导的拟南芥对细菌和真菌病原体的抵抗都需要 *NDRI* 基因(non-race-specific disease resistance gene)的参与<sup>[11]</sup>,*AtNDRI* 在拟南芥抵御病菌的过程中起到非常重要的作用<sup>[12]</sup>。在烟草中,*HIN1* 基因(harpin-induced gene)可以受过敏素蛋白(harpins)和病菌诱导,从而引发超敏反应<sup>[13]</sup>。*HIN1* 基因与 *NDRI* 基因存在序列上的相似性,*NDRI/HIN1-like* 基因家族是从拟南芥基因组数据库中发掘出来的与拟南芥 *NDRI* 基因和烟草 *HIN1* 基因序列同源的基因<sup>[14]</sup>,拟南芥中发现了45个 *NHL* 基因家族的成员,这些基因具有相似的内含子-外显子结构和序列特异的基序<sup>[15]</sup>。在 *NHL* 基因家族中发现了两个高度保守的基序 motif 2: NPNKRIGIYYD 和 motif 3: PFYQGH-KN, 以及一个低保守性的基序 motif 1: LILWLILR-PXKPKFXVQDATV<sup>[16]</sup>。

对拟南芥 *NHL* 基因家族的研究发现,*NHL2* 和 *NHL3* 在拟南芥抵御丁香假单胞杆菌反应中发挥作用<sup>[14]</sup>; *NHL25* 和 *NHL3* 受丁香假单胞杆菌和水杨酸(SA)诱导表达,预示了其在抗病中的作用<sup>[16-17]</sup>; *NHL10* 受花椰菜花叶病毒诱导表达,并且 *NHL10* 在植物衰老过程中起一定作用<sup>[15]</sup>; *NHL6* 的超表达可以影响 ABA 合成及其信号途径,进而调节非生物胁迫下的种子萌发<sup>[18-19]</sup>; *NHL17* 在 ABA 处理的种子中表达上调<sup>[18]</sup>。暗示着这些基因在拟南芥抗病及抗逆中起到重要的作用。

目前,海岛棉和陆地棉全基因组测序已经完成<sup>[20-21]</sup>,这为挖掘棉花中 *NHL* 基因家族提供了重要基因组资源。本研究是基于海岛棉和陆地棉全基因组测序数据库,鉴定 *NHL* 基因家族成员,之后对其基因结构、蛋白序列保守性、系统进化等进行分析,并且利用课题组获得的黄萎病菌胁迫后的陆地棉转

录组数据,分析 *NHL* 基因家族成员的表达规律,为明确 *NHL* 基因家族成员在抗病中的作用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 棉花 *NHL* 基因家族序列的搜索

从拟南芥信息网站 TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) 下载 *NHL* 基因家族序列,以查找到的拟南芥 *NHL* 家族44条种子序列<sup>[15]</sup>对海岛棉和陆地棉全基因组序列分别进行 BlastP,在阈值为  $1 \times e^{-4}$  的条件下筛选出相应序列,将筛选出的序列重新与拟南芥全基因组进行 BlastP,仅保留与拟南芥 *NHL* 家族同源的棉花序列,删除其他序列,从而得到海岛棉和陆地棉 *NHL* 基因家族成员。

### 1.2 棉花 *NHL* 基因家族的信息查找及染色体定位

从 Cotton Functional Genomics Database (Cotton-FGD) (<https://cottonfgd.org/>)<sup>[22]</sup> 提取海岛棉、陆地棉 *NHL* 基因家族中的各成员的基本信息,包括基因组序列、CDS 序列、编码的氨基酸序列、染色体位置等信息,之后使用 MapChart 软件绘制各基因染色体定位图。

### 1.3 基因结构、保守域、亚细胞定位及系统进化分析

基于各基因的全长序列和基因 CDS 序列,使用 Gene Structure Display Server (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 完成 *NHL* 基因家族的基因结构图绘制;使用 MEME 的 Motif Discovery (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 查找保守基序;EuLoc (<http://euloc.mbc.nctu.edu.tw/>) 在线对各基因的亚细胞定位进行预测分析<sup>[23]</sup>;利用 ClustalX 2.0 分析软件分别对海岛棉和陆地棉 *NHL* 基因序列进行比对,参数设为默认值,导出并保存比对获得的文件,之后使用 MEGA7 软件中的相邻连接法(Neighbor-joining)构建 *NHL* 基因家族的系统发育树,本研究中参数设为默认值。

### 1.4 黄萎病菌胁迫下棉花 *NHL* 基因家族表达分析

从课题组前期获得的抗病陆地棉品种农大棉 601 接菌后 0 h、2 h、6 h、12 h、24 h、48 h 的转录组数据,提取陆地棉 *NHL* 基因家族各成员的表达量,

对数据进行  $\log_2(1 + \text{RPKM})$  处理,然后利用 Hemi 软件(<http://hemi.biocuckoo.org/>)作图,分析 *NHL* 基因家族各成员在黄萎病菌胁迫下的表达。对于黄萎病菌胁迫下差异表达的 *NHL* 基因家族成员,使用 Z-score 方法对接菌后各时间点的表达量进行标准化,使用软件 STEM(Short Time-series Expression Miner)聚类分析其表达模式,再利用 Hemi 软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 棉花 *NHL* 基因家族成员的鉴定

基于获得的拟南芥 *NHL* 家族的 44 个成员的序列,从海岛棉、陆地棉基因组中分别提取出 100 个和 118 个基因。根据各基因在染色体上的位置依次命名 *GbNHL001* ~ *GbNHL100*、*GhNHL001* ~ *GhNHL118*。

基因的基本信息如表 1 和表 2 所示,这些基因的大小介于 159 ~ 11664 bp 之间,编码的氨基酸为 52 ~ 999 个。对海岛棉和陆地棉 *NHL* 基因家族各成员进行亚细胞定位预测,大部分 *NHL* 基因都定位在膜上,包括细胞质膜、核质膜、叶绿体膜等,还有部分基因位于胞外、细胞核、细胞质、叶绿体、线粒体上。棉花 *NHL* 基因家族基因数目较多,它们在细胞的亚细胞定位的位置不同,反映出其行使的功能可能不同。除去位于不能组装到染色体上的大片段上的基因外,*NHL* 家族各成员分布在棉花基因组各染色体上(除海岛棉 D03 上没有 *NHL* 基因外),在棉花 A05、A06、A09、D05、D06 和 D09 染色体上分布较密集,数个基因串联地分布在染色体上(图 1 和图 2),可能是由于此基因家族的扩张导致了棉花中部分 *NHL* 基因的串联。

表 1 海岛棉 *NHL* 基因家族基因信息表

Table 1 Information of *NHL* gene family in *G. barbadense*

| 基因名称<br>Gene name | 基因 ID<br>Gene ID | 染色体定位<br>Chromosome location | 大小(bp)<br>Size | 编码蛋白(aa)<br>Protein | 亚细胞定位<br>Subcellular localization |
|-------------------|------------------|------------------------------|----------------|---------------------|-----------------------------------|
| <i>GbNHL001</i>   | GOBAR_AA30523    | A01:1954-3957                | 2004           | 196                 | 叶绿体胞质                             |
| <i>GbNHL002</i>   | GOBAR_AA37991    | A01:61105657-61107128        | 665            | 189                 | 胞外                                |
| <i>GbNHL003</i>   | GOBAR_AA06406    | A02:25067469-25068131        | 663            | 179                 | 线粒体膜                              |
| <i>GbNHL004</i>   | GOBAR_AA26585    | A03:5910608-5911390          | 783            | 260                 | 胞外                                |
| <i>GbNHL005</i>   | GOBAR_AA24454    | A03:89303464-89304588        | 1125           | 374                 | 核质膜                               |
| <i>GbNHL006</i>   | GOBAR_AA18185    | A03:97372935-97373657        | 723            | 215                 | 细胞质核                              |
| <i>GbNHL007</i>   | GOBAR_AA04218    | A03:103583062-103583811      | 750            | 249                 | 细胞质膜                              |
| <i>GbNHL008</i>   | GOBAR_AA25652    | A04:71013902-71014524        | 623            | 180                 | 细胞质核                              |
| <i>GbNHL009</i>   | GOBAR_AA22061    | A05:4220243-4222665          | 2423           | 371                 | 胞外                                |
| <i>GbNHL010</i>   | GOBAR_AA23202    | A05:8093709-8094341          | 633            | 210                 | 细胞质膜                              |
| <i>GbNHL011</i>   | GOBAR_AA20691    | A05:9794880-9796516          | 777            | 258                 | 胞外                                |
| <i>GbNHL012</i>   | GOBAR_AA33195    | A05:12906955-12907710        | 756            | 251                 | 线粒体                               |
| <i>GbNHL013</i>   | GOBAR_AA17939    | A05:29330521-29331087        | 567            | 188                 | 细胞质膜                              |
| <i>GbNHL014</i>   | GOBAR_AA17940    | A05:29331620-29332399        | 780            | 259                 | 细胞质膜                              |
| <i>GbNHL015</i>   | GOBAR_AA19137    | A05:97084887-97085856        | 970            | 285                 | 细胞质膜                              |
| <i>GbNHL016</i>   | GOBAR_AA13422    | A06:27836494-27837327        | 834            | 277                 | 细胞质膜                              |
| <i>GbNHL017</i>   | GOBAR_AA16859    | A06:62651638-62652571        | 934            | 229                 | 细胞质膜                              |
| <i>GbNHL018</i>   | GOBAR_AA38775    | A06:99771755-99773139        | 1385           | 421                 | 细胞质膜                              |
| <i>GbNHL019</i>   | GOBAR_AA33407    | A06:114053430-114054730      | 1301           | 308                 | 线粒体                               |
| <i>GbNHL020</i>   | GOBAR_AA06769    | A06:115083304-115085277      | 1974           | 372                 | 细胞质膜                              |
| <i>GbNHL021</i>   | GOBAR_AA06770    | A06:115089065-115089775      | 711            | 236                 | 细胞质膜                              |
| <i>GbNHL022</i>   | GOBAR_AA23623    | A07:2094036-2094578          | 543            | 146                 | 细胞核                               |
| <i>GbNHL023</i>   | GOBAR_AA16878    | A07:18866804-18870104        | 3301           | 493                 | 胞外                                |
| <i>GbNHL024</i>   | GOBAR_AA22112    | A07:20629066-20629698        | 633            | 210                 | 细胞质膜                              |
| <i>GbNHL025</i>   | GOBAR_AA35969    | A08:77322786-77324513        | 1728           | 186                 | 细胞质膜                              |
| <i>GbNHL026</i>   | GOBAR_AA26779    | A08:92260870-92261586        | 717            | 238                 | 叶绿体膜                              |
| <i>GbNHL027</i>   | GOBAR_AA34544    | A08:115704728-115705543      | 816            | 271                 | 细胞质膜                              |
| <i>GbNHL028</i>   | GOBAR_AA13837    | A09:49546463-49550598        | 4136           | 428                 | 细胞质膜                              |
| <i>GbNHL029</i>   | GOBAR_AA32959    | A09:55952966-55956322        | 3357           | 588                 | 胞外                                |
| <i>GbNHL030</i>   | GOBAR_AA30094    | A09:58950838-58951470        | 633            | 210                 | 细胞质膜                              |

表 1(续)

| 基因名称            | 基因 ID         | 染色体定位                   | 大小(bp) | 编码蛋白(aa) | 亚细胞定位                    |
|-----------------|---------------|-------------------------|--------|----------|--------------------------|
| Gene name       | Gene ID       | Chromosome location     | Size   | Protein  | Subcellular localization |
| <i>GbNHL031</i> | GOBAR_AA30093 | A09:58953834-58954763   | 718    | 199      | 叶绿体                      |
| <i>GbNHL032</i> | GOBAR_AA25736 | A09:62284327-62285087   | 761    | 215      | 细胞核                      |
| <i>GbNHL033</i> | GOBAR_AA08178 | A09:65185641-65186415   | 775    | 236      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL034</i> | GOBAR_AA08179 | A09:65222899-65223567   | 669    | 222      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL035</i> | GOBAR_AA25587 | A10:1453964-1455497     | 1534   | 261      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL036</i> | GOBAR_AA33539 | A10:7586861-7587649     | 789    | 262      | 线粒体                      |
| <i>GbNHL037</i> | GOBAR_AA15690 | A10:18228654-18229331   | 678    | 225      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL038</i> | GOBAR_AA26642 | A11:1401392-1402030     | 639    | 212      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL039</i> | GOBAR_AA26643 | A11:1404190-1404828     | 639    | 212      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL040</i> | GOBAR_AA35081 | A11:9247106-9247840     | 735    | 244      | 叶绿体                      |
| <i>GbNHL041</i> | GOBAR_AA40345 | A11:113658040-113659415 | 1376   | 175      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL042</i> | GOBAR_AA18496 | A12:74747618-74750296   | 2679   | 268      | 细胞质                      |
| <i>GbNHL043</i> | GOBAR_AA16808 | A12:76692079-76695428   | 3350   | 271      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL044</i> | GOBAR_AA20883 | A12:95945688-95951826   | 5921   | 782      | 细胞质核                     |
| <i>GbNHL045</i> | GOBAR_AA19583 | A12:96691380-96695101   | 3722   | 672      | 细胞质核                     |
| <i>GbNHL046</i> | GOBAR_AA31276 | A13:107556601-107560536 | 3936   | 459      | 胞外                       |
| <i>GbNHL047</i> | GOBAR_DD25600 | D01:126232-127982       | 1751   | 159      | 叶绿体                      |
| <i>GbNHL048</i> | GOBAR_DD20529 | D01:8970250-8970881     | 632    | 190      | 细胞核                      |
| <i>GbNHL049</i> | GOBAR_DD00467 | D01:57869999-57870628   | 630    | 209      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL050</i> | GOBAR_DD00468 | D01:57882807-57883436   | 630    | 209      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL051</i> | GOBAR_DD00469 | D01:57912887-57914056   | 1170   | 210      | 线粒体                      |
| <i>GbNHL052</i> | GOBAR_DD15837 | D02:9771289-9772011     | 723    | 240      | 胞外                       |
| <i>GbNHL053</i> | GOBAR_DD11771 | D02:28309925-28310587   | 663    | 179      | 线粒体                      |
| <i>GbNHL054</i> | GOBAR_DD01697 | D02:54371968-54373095   | 1128   | 375      | 核质膜                      |
| <i>GbNHL055</i> | GOBAR_DD05249 | D04:41415830-41416446   | 617    | 178      | 细胞质核                     |
| <i>GbNHL056</i> | GOBAR_DD25798 | D04:48292174-48294550   | 2377   | 367      | 核质膜                      |
| <i>GbNHL057</i> | GOBAR_DD29864 | D05:7429337-7429969     | 633    | 210      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL058</i> | GOBAR_DD35428 | D05:9162232-9163014     | 783    | 260      | 胞外                       |
| <i>GbNHL059</i> | GOBAR_DD38101 | D05:10670687-10673082   | 2396   | 415      | 细胞核                      |
| <i>GbNHL060</i> | GOBAR_DD20048 | D05:12646303-12647264   | 962    | 236      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL061</i> | GOBAR_DD16528 | D05:28405321-28406006   | 686    | 176      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL062</i> | GOBAR_DD10996 | D06:17410654-17411484   | 831    | 226      | 胞外                       |
| <i>GbNHL063</i> | GOBAR_DD16348 | D06:32324435-32325055   | 621    | 206      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL064</i> | GOBAR_DD03243 | D06:49380916-49381569   | 654    | 217      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL065</i> | GOBAR_DD14466 | D06:58209052-58209974   | 923    | 212      | 线粒体                      |
| <i>GbNHL066</i> | GOBAR_DD17608 | D06:59639214-59640424   | 1211   | 304      | 胞外                       |
| <i>GbNHL067</i> | GOBAR_DD17607 | D06:59643752-59644474   | 723    | 169      | 胞外                       |
| <i>GbNHL068</i> | GOBAR_DD26525 | D07:2506037-2506870     | 834    | 277      | 胞外                       |
| <i>GbNHL069</i> | GOBAR_DD17667 | D07:15832509-15835614   | 3106   | 461      | 胞外                       |
| <i>GbNHL070</i> | GOBAR_DD02526 | D07:17121397-17122029   | 633    | 210      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL071</i> | GOBAR_DD02527 | D07:17125226-17131526   | 6301   | 215      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL072</i> | GOBAR_DD19958 | D08:33982933-33983530   | 492    | 163      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL073</i> | GOBAR_DD04016 | D08:45054309-45057264   | 2833   | 411      | 高尔基体膜                    |
| <i>GbNHL074</i> | GOBAR_DD04022 | D08:45146142-45146858   | 717    | 238      | 叶绿体                      |
| <i>GbNHL075</i> | GOBAR_DD04098 | D09:29381052-29381627   | 576    | 191      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL076</i> | GOBAR_DD27216 | D09:31558760-31562066   | 3307   | 479      | 胞外                       |
| <i>GbNHL077</i> | GOBAR_DD29551 | D09:33506674-33507306   | 633    | 210      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL078</i> | GOBAR_DD29552 | D09:33509555-33510262   | 708    | 235      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL079</i> | GOBAR_DD15995 | D09:35973994-35974755   | 762    | 253      | 细胞核                      |
| <i>GbNHL080</i> | GOBAR_DD25177 | D09:38076828-38077706   | 879    | 292      | 胞质外膜                     |

表 1(续)

| 基因名称            | 基因 ID         | 染色体定位                              | 大小(bp) | 编码蛋白(aa) | 亚细胞定位                    |
|-----------------|---------------|------------------------------------|--------|----------|--------------------------|
| Gene name       | Gene ID       | Chromosome location                | Size   | Protein  | Subcellular localization |
| <i>GbNHL081</i> | GOBAR_DD33835 | D10;1369078-1370305                | 1228   | 269      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL082</i> | GOBAR_DD05903 | D11;1167529-1168167                | 639    | 212      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL083</i> | GOBAR_DD27919 | D11;9037887-9038621                | 735    | 244      | 细胞核                      |
| <i>GbNHL084</i> | GOBAR_DD10224 | D11;9696670-9697284                | 615    | 204      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL085</i> | GOBAR_DD26046 | D11;64335681-64336313              | 633    | 210      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL086</i> | GOBAR_DD20466 | D12;35385137-35385874              | 738    | 245      | 叶绿体                      |
| <i>GbNHL087</i> | GOBAR_DD27009 | D12;37785088-37787283              | 2196   | 242      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL088</i> | GOBAR_DD33450 | D12;50345931-50352161              | 6231   | 673      | 细胞质核                     |
| <i>GbNHL089</i> | GOBAR_DD21504 | D12;51216677-51221759              | 5083   | 707      | 细胞质核                     |
| <i>GbNHL090</i> | GOBAR_DD29420 | D13;58535661-58540606              | 4946   | 467      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL091</i> | GOBAR_AA20739 | scaffold_0122. UKA;93145-93927     | 783    | 260      | 胞外                       |
| <i>GbNHL092</i> | GOBAR_AA25469 | scaffold_0179. UKA;134592 - 135206 | 615    | 204      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL093</i> | GOBAR_AA30113 | scaffold_0280. UKA;7254-10188      | 2812   | 400      | 核质膜                      |
| <i>GbNHL094</i> | GOBAR_AA32010 | scaffold_0343. UKA;5602-10339      | 4738   | 655      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL095</i> | GOBAR_AA38867 | scaffold_0663. UKA;22179-24188     | 2010   | 245      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL096</i> | GOBAR_DD36544 | scaffold_1045. UKD;27161-27913     | 753    | 250      | 核质膜                      |
| <i>GbNHL097</i> | GOBAR_AA21676 | scaffold_1105. A01;89-718          | 630    | 209      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL098</i> | GOBAR_AA21678 | scaffold_1105. A01;27698-28225     | 528    | 175      | 细胞质膜                     |
| <i>GbNHL099</i> | GOBAR_DD10818 | scaffold_1785. D05;280682-281437   | 756    | 251      | 线粒体                      |
| <i>GbNHL100</i> | GOBAR_DD30720 | scaffold_1935. D10;71611-72400     | 733    | 258      | 线粒体                      |

表 2 陆地棉 *NHL* 基因家族基因信息表Table 2 Information of *NHL* gene family in *G. hirsutum*

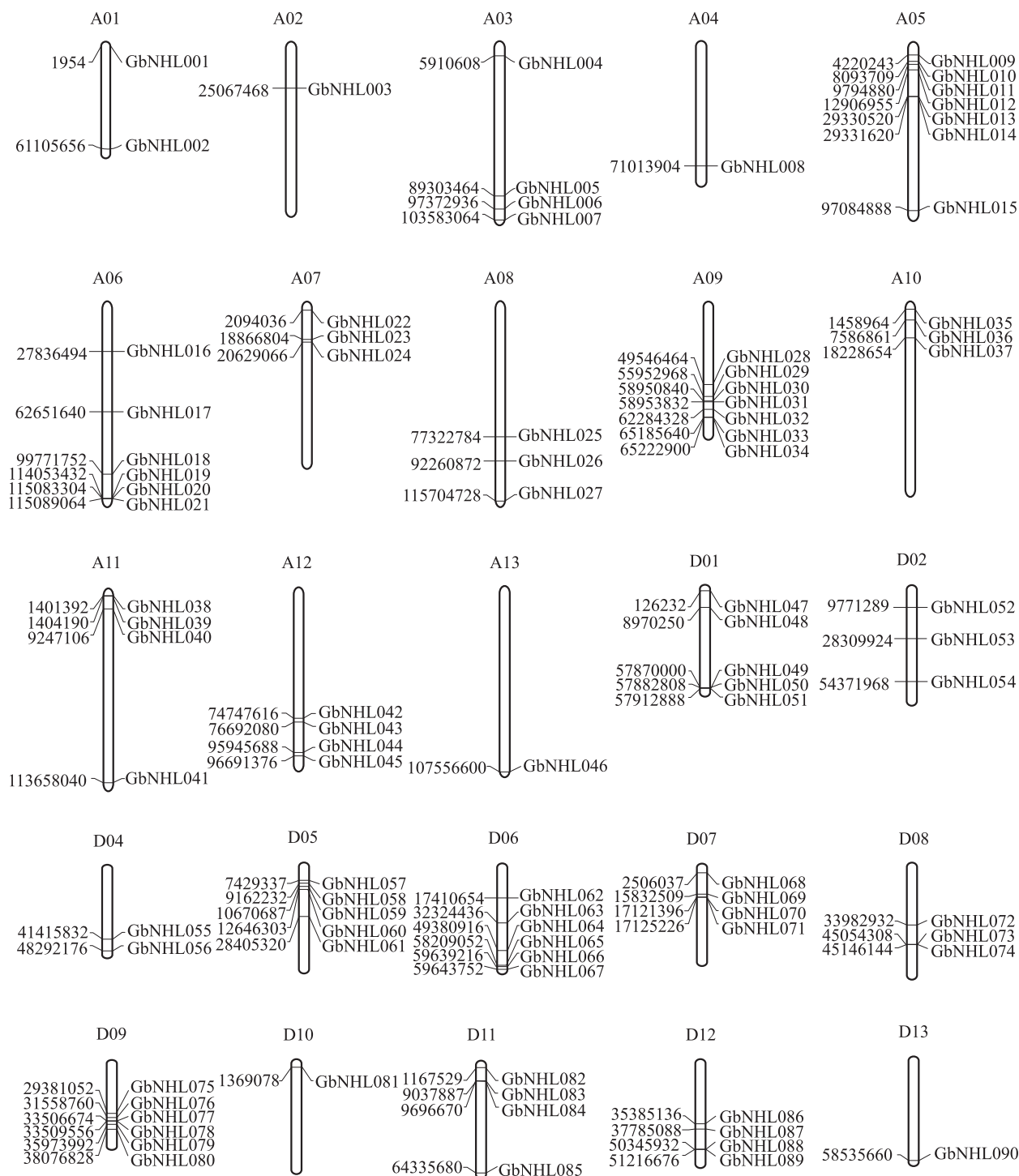
| 基因名称            | 基因 ID       | 染色体定位                   | 大小(bp) | 蛋白(aa)  | 亚细胞定位                    |
|-----------------|-------------|-------------------------|--------|---------|--------------------------|
| Gene name       | Gene ID     | Chromosome location     | Size   | Protein | Subcellular localization |
| <i>GhNHL001</i> | Gh_A01G0008 | A01;65114-67112         | 1999   | 245     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL002</i> | Gh_A01G1723 | A01;96185187-96185816   | 630    | 209     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL003</i> | Gh_A01G1725 | A01;96211113-96211742   | 630    | 209     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL004</i> | Gh_A01G1726 | A01;96222404-96223084   | 681    | 226     | 胞外                       |
| <i>GhNHL005</i> | Gh_A02G0918 | A02;35041425-35042087   | 663    | 220     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL006</i> | Gh_A03G1156 | A03;83198845-83199969   | 1125   | 374     | 核质膜                      |
| <i>GhNHL007</i> | Gh_A03G1865 | A03;99663938-99666895   | 2958   | 262     | 核质膜                      |
| <i>GhNHL008</i> | Gh_A04G0033 | A04;353070-353882       | 813    | 270     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL009</i> | Gh_A04G0480 | A04;23598585-23599214   | 630    | 209     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL010</i> | Gh_A04G1185 | A04;62051824-62053309   | 1330   | 338     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL011</i> | Gh_A05G0326 | A05;3579431-3580255     | 825    | 274     | 胞外                       |
| <i>GhNHL012</i> | Gh_A05G0645 | A05;6815956-6816545     | 590    | 193     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL013</i> | Gh_A05G0870 | A05;8653559-8654341     | 783    | 260     | 胞外                       |
| <i>GhNHL014</i> | Gh_A05G1122 | A05;11360656-11361411   | 756    | 251     | 线粒体                      |
| <i>GhNHL015</i> | Gh_A05G1174 | A05;11828374-11829322   | 949    | 232     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL016</i> | Gh_A05G2344 | A05;28659193-28659972   | 780    | 259     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL017</i> | Gh_A05G3390 | A05;88537591-88538340   | 750    | 249     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL018</i> | Gh_A06G0785 | A06;27964384-27965217   | 834    | 277     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL019</i> | Gh_A06G1030 | A06;55095957-55096577   | 621    | 206     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL020</i> | Gh_A06G1266 | A06;91864172-91864825   | 654    | 185     | 胞外                       |
| <i>GhNHL021</i> | Gh_A06G1677 | A06;101866814-101867578 | 765    | 254     | 线粒体                      |
| <i>GhNHL022</i> | Gh_A06G1781 | A06;102783118-102783828 | 711    | 236     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL023</i> | Gh_A06G1782 | A06;102787668-102788255 | 588    | 195     | 胞外                       |
| <i>GhNHL024</i> | Gh_A07G0964 | A07;18147311-18150606   | 3296   | 493     | 胞外                       |

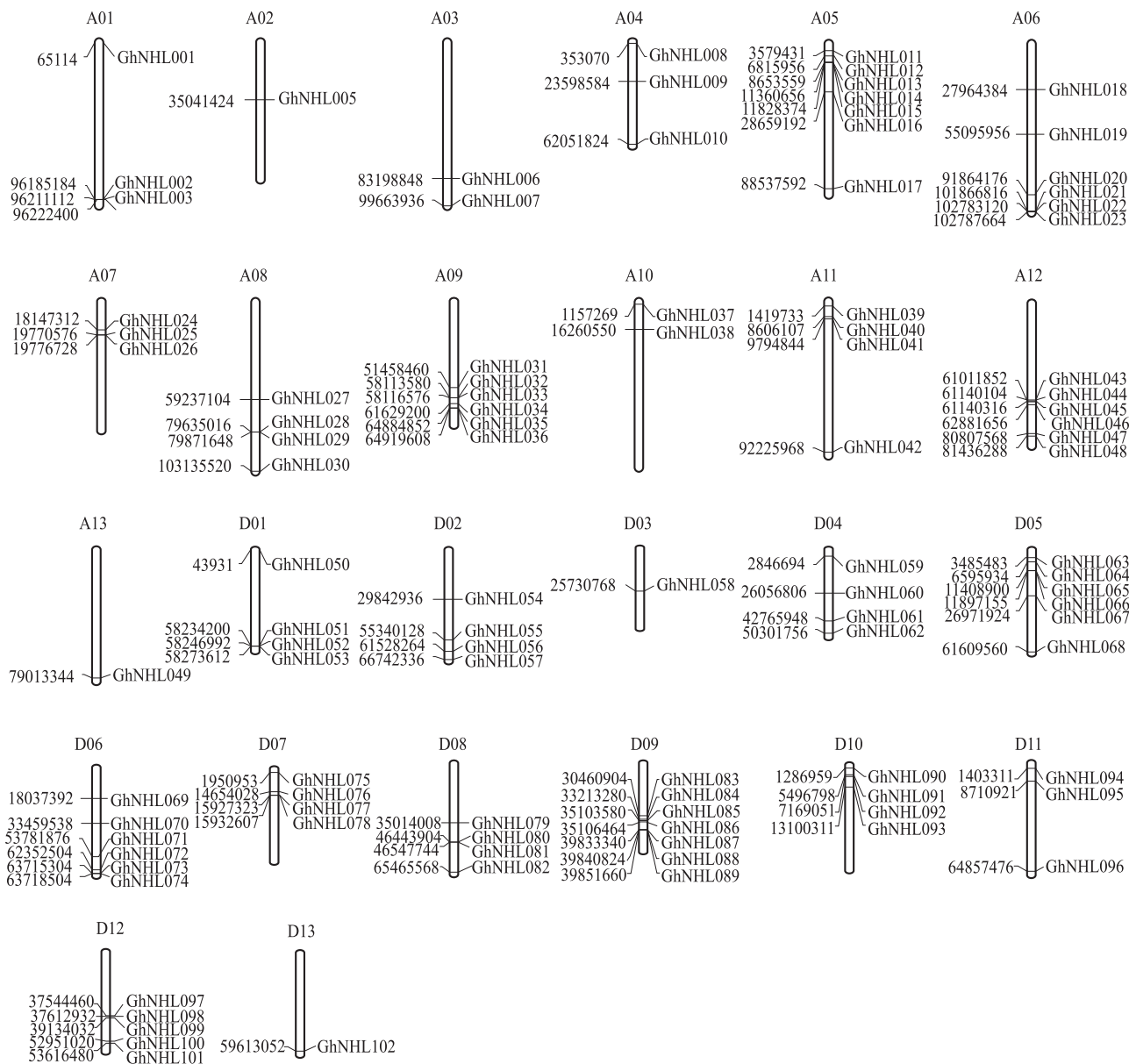
表 2(续)

| 基因名称            | 基因 ID       | 染色体定位                   | 大小(bp) | 蛋白(aa)  | 亚细胞定位                    |
|-----------------|-------------|-------------------------|--------|---------|--------------------------|
| Gene name       | Gene ID     | Chromosome location     | Size   | Protein | Subcellular localization |
| <i>GhNHL025</i> | Gh_A07G1025 | A07:19770577-19771209   | 633    | 210     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL026</i> | Gh_A07G1026 | A07:19776727-19777434   | 708    | 235     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL027</i> | Gh_A08G0928 | A08:59237102-59237737   | 636    | 211     | 细胞外质膜                    |
| <i>GhNHL028</i> | Gh_A08G1121 | A08:79635014-79635730   | 717    | 238     | 叶绿体质膜                    |
| <i>GhNHL029</i> | Gh_A08G1126 | A08:79871650-79874500   | 2851   | 429     | 核质膜                      |
| <i>GhNHL030</i> | Gh_A08G2218 | A08:103135519-103136334 | 816    | 271     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL031</i> | Gh_A09G0668 | A09:51458460-51459035   | 576    | 191     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL032</i> | Gh_A09G0929 | A09:58113580-58114212   | 633    | 210     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL033</i> | Gh_A09G0930 | A09:58116575-58117282   | 708    | 166     | 叶绿体                      |
| <i>GhNHL034</i> | Gh_A09G1084 | A09:61629199-61629960   | 762    | 253     | 细胞核                      |
| <i>GhNHL035</i> | Gh_A09G1271 | A09:64884851-64885726   | 876    | 242     | 胞外                       |
| <i>GhNHL036</i> | Gh_A09G1272 | A09:64919606-64920274   | 669    | 222     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL037</i> | Gh_A10G0137 | A10:1157269-1158066     | 798    | 265     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL038</i> | Gh_A10G0795 | A10:16260550-16261227   | 678    | 225     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL039</i> | Gh_A11G0143 | A11:1419733-1420371     | 639    | 212     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL040</i> | Gh_A11G0852 | A11:8606107-8606841     | 735    | 244     | 叶绿体细胞核                   |
| <i>GhNHL041</i> | Gh_A11G0921 | A11:9794844-9795458     | 615    | 204     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL042</i> | Gh_A11G2846 | A11:92225964-92228446   | 2483   | 112     | 细胞外质膜                    |
| <i>GhNHL043</i> | Gh_A12G0987 | A12:61011851-61018685   | 6835   | 386     | 细胞质                      |
| <i>GhNHL044</i> | Gh_A12G0992 | A12:61140102-61140260   | 159    | 52      | 胞外                       |
| <i>GhNHL045</i> | Gh_A12G0993 | A12:61140316-61141475   | 1160   | 204     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL046</i> | Gh_A12G1056 | A12:62881655-62882323   | 669    | 222     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL047</i> | Gh_A12G1824 | A12:80807565-80812077   | 4374   | 458     | 胞外                       |
| <i>GhNHL048</i> | Gh_A12G1885 | A12:81436292-81440195   | 3904   | 652     | 细胞质核                     |
| <i>GhNHL049</i> | Gh_A13G1943 | A13:79013347-79016749   | 3403   | 506     | 胞外                       |
| <i>GhNHL050</i> | Gh_D01G0007 | D01:43931-45938         | 2008   | 245     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL051</i> | Gh_D01G1973 | D01:58234199-58234828   | 630    | 209     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL052</i> | Gh_D01G1974 | D01:58246992-58247621   | 630    | 209     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL053</i> | Gh_D01G1975 | D01:58273612-58274292   | 681    | 226     | 胞外                       |
| <i>GhNHL054</i> | Gh_D02G1083 | D02:29842935-29843597   | 663    | 220     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL055</i> | Gh_D02G1592 | D02:55340130-55341257   | 1128   | 375     | 核质膜                      |
| <i>GhNHL056</i> | Gh_D02G1847 | D02:61528264-61528986   | 723    | 240     | 胞外                       |
| <i>GhNHL057</i> | Gh_D02G2304 | D02:66742337-66745413   | 3077   | 262     | 细胞外质膜                    |
| <i>GhNHL058</i> | Gh_D03G0739 | D03:25730769-25731761   | 993    | 220     | 细胞质                      |
| <i>GhNHL059</i> | Gh_D04G0194 | D04:2846694-2847446     | 753    | 250     | 核质膜                      |
| <i>GhNHL060</i> | Gh_D04G0913 | D04:26056806-26057435   | 630    | 209     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL061</i> | Gh_D04G1312 | D04:42765947-42766557   | 611    | 176     | 细胞质核                     |
| <i>GhNHL062</i> | Gh_D04G1797 | D04:50301756-50302784   | 1029   | 342     | 细胞核                      |
| <i>GhNHL063</i> | Gh_D05G0431 | D05:3485483-3486307     | 825    | 274     | 叶绿体                      |
| <i>GhNHL064</i> | Gh_D05G0791 | D05:6595934-6596566     | 633    | 210     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL065</i> | Gh_D05G1292 | D05:11408900-11409655   | 756    | 251     | 线粒体                      |
| <i>GhNHL066</i> | Gh_D05G1350 | D05:11897155-11898116   | 962    | 236     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL067</i> | Gh_D05G2611 | D05:26971923-26972699   | 777    | 258     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL068</i> | Gh_D05G3701 | D05:61609562-61610374   | 813    | 270     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL069</i> | Gh_D06G0908 | D06:18037392-18038225   | 834    | 277     | 叶绿体                      |
| <i>GhNHL070</i> | Gh_D06G1245 | D06:33459538-33460415   | 878    | 240     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL071</i> | Gh_D06G1597 | D06:53781877-53782530   | 654    | 185     | 胞外                       |

表 2(续)

| 基因名称            | 基因 ID           | 染色体定位                            | 大小(bp) | 蛋白(aa)  | 亚细胞定位                    |
|-----------------|-----------------|----------------------------------|--------|---------|--------------------------|
| Gene name       | Gene ID         | Chromosome location              | Size   | Protein | Subcellular localization |
| <i>GhNHL072</i> | Gh_D06G2051     | D06:62352503-62353267            | 765    | 254     | 线粒体                      |
| <i>GhNHL073</i> | Gh_D06G2198     | D06:63715304-63715897            | 594    | 197     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL074</i> | Gh_D06G2199     | D06:63718502-63719218            | 717    | 238     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL075</i> | Gh_D07G0183     | D07:1950953-1951786              | 834    | 277     | 胞外                       |
| <i>GhNHL076</i> | Gh_D07G1044     | D07:14654028-14665691            | 11664  | 999     | 胞外                       |
| <i>GhNHL077</i> | Gh_D07G1101     | D07:15927323-15927955            | 633    | 210     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL078</i> | Gh_D07G1102     | D07:15932607-15933314            | 708    | 235     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL079</i> | Gh_D08G1132     | D08:35014007-35014642            | 636    | 211     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL080</i> | Gh_D08G1404     | D08:46443902-46444618            | 717    | 238     | 叶绿体                      |
| <i>GhNHL081</i> | Gh_D08G1410     | D08:46547742-46550613            | 2872   | 424     | 核质膜                      |
| <i>GhNHL082</i> | Gh_D08G2584     | D08:65465567-65466369            | 803    | 239     | 叶绿体                      |
| <i>GhNHL083</i> | Gh_D09G0673     | D09:30460904-30461479            | 576    | 191     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL084</i> | Gh_D09G0841     | D09:33213280-33216525            | 3246   | 497     | 胞外                       |
| <i>GhNHL085</i> | Gh_D09G0958     | D09:35103581-35104213            | 633    | 210     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL086</i> | Gh_D09G0959     | D09:35106462-35107391            | 930    | 280     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL087</i> | Gh_D09G1273     | D09:39833341-39834207            | 867    | 288     | 细胞外质膜                    |
| <i>GhNHL088</i> | Gh_D09G1274     | D09:39840825-39841454            | 630    | 209     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL089</i> | Gh_D09G1275     | D09:39851661-39852329            | 669    | 222     | 细胞外质膜                    |
| <i>GhNHL090</i> | Gh_D10G0158     | D10:1286959-1287756              | 798    | 265     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL091</i> | Gh_D10G0554     | D10:5496798-5497586              | 789    | 262     | 线粒体                      |
| <i>GhNHL092</i> | Gh_D10G0658     | D10:7169051-7171443              | 2393   | 256     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL093</i> | Gh_D10G0967     | D10:13100311-13100988            | 678    | 225     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL094</i> | Gh_D11G0157     | D11:1403311-1403949              | 639    | 212     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL095</i> | Gh_D11G0994     | D11:8710921-8711655              | 735    | 244     | 叶绿体                      |
| <i>GhNHL096</i> | Gh_D11G3201     | D11:64857476-64858108            | 633    | 210     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL097</i> | Gh_D12G1107     | D12:37544460-37551260            | 6801   | 399     | 细胞质                      |
| <i>GhNHL098</i> | Gh_D12G1112     | D12:37612931-37613668            | 738    | 245     | 叶绿体                      |
| <i>GhNHL099</i> | Gh_D12G1180     | D12:39134030-39134725            | 696    | 231     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL100</i> | Gh_D12G1996     | D12:52951020-52956781            | 5762   | 657     | 细胞质核                     |
| <i>GhNHL101</i> | Gh_D12G2064     | D12:53616482-53620329            | 3716   | 676     | 细胞质核                     |
| <i>GhNHL102</i> | Gh_D13G2338     | D13:59613053-59617063            | 4011   | 492     | 胞外                       |
| <i>GhNHL103</i> | Gh_Sca012069G01 | scaffold12069:1013-1810          | 798    | 265     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL104</i> | Gh_Sca132506G01 | scaffold132506:63-308            | 246    | 81      | 胞外                       |
| <i>GhNHL105</i> | Gh_Sca140707G01 | scaffold140707:16-312            | 297    | 99      | 细胞核                      |
| <i>GhNHL106</i> | Gh_Sca146636G01 | scaffold146636:6-320             | 315    | 105     | 胞外                       |
| <i>GhNHL107</i> | Gh_Sca017508G01 | scaffold17508:237-515            | 279    | 93      | 胞外                       |
| <i>GhNHL108</i> | Gh_A07G2310     | scaffold1917_A07:70188-71021     | 834    | 277     | 胞外                       |
| <i>GhNHL109</i> | Gh_A09G2481     | scaffold2316_A09:59008-62567     | 3560   | 497     | 胞外                       |
| <i>GhNHL110</i> | Gh_A10G2253     | scaffold2456_A10:9526-10314      | 789    | 262     | 线粒体                      |
| <i>GhNHL111</i> | Gh_A11G3305     | scaffold3052_A11:29864-30496     | 633    | 210     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL112</i> | Gh_A12G2559     | scaffold3185_A12:1609811-1611370 | 1560   | 519     | 内质网质膜                    |
| <i>GhNHL113</i> | Gh_Sca033106G01 | scaffold33106:88-1090            | 1003   | 110     | 细胞质核                     |
| <i>GhNHL114</i> | Gh_D03G1808     | scaffold3933_D03:8669-9451       | 783    | 260     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL115</i> | Gh_D05G3882     | scaffold4074_D05:154817-155599   | 783    | 260     | 胞外                       |
| <i>GhNHL116</i> | Gh_D11G3524     | scaffold4566_D11:27648-28262     | 615    | 204     | 细胞质膜                     |
| <i>GhNHL117</i> | Gh_A03G2061     | scaffold514_A03:51425-52207      | 783    | 260     | 胞外                       |
| <i>GhNHL118</i> | Gh_Sca078795G01 | scaffold78795:244-510            | 267    | 89      | 细胞质                      |

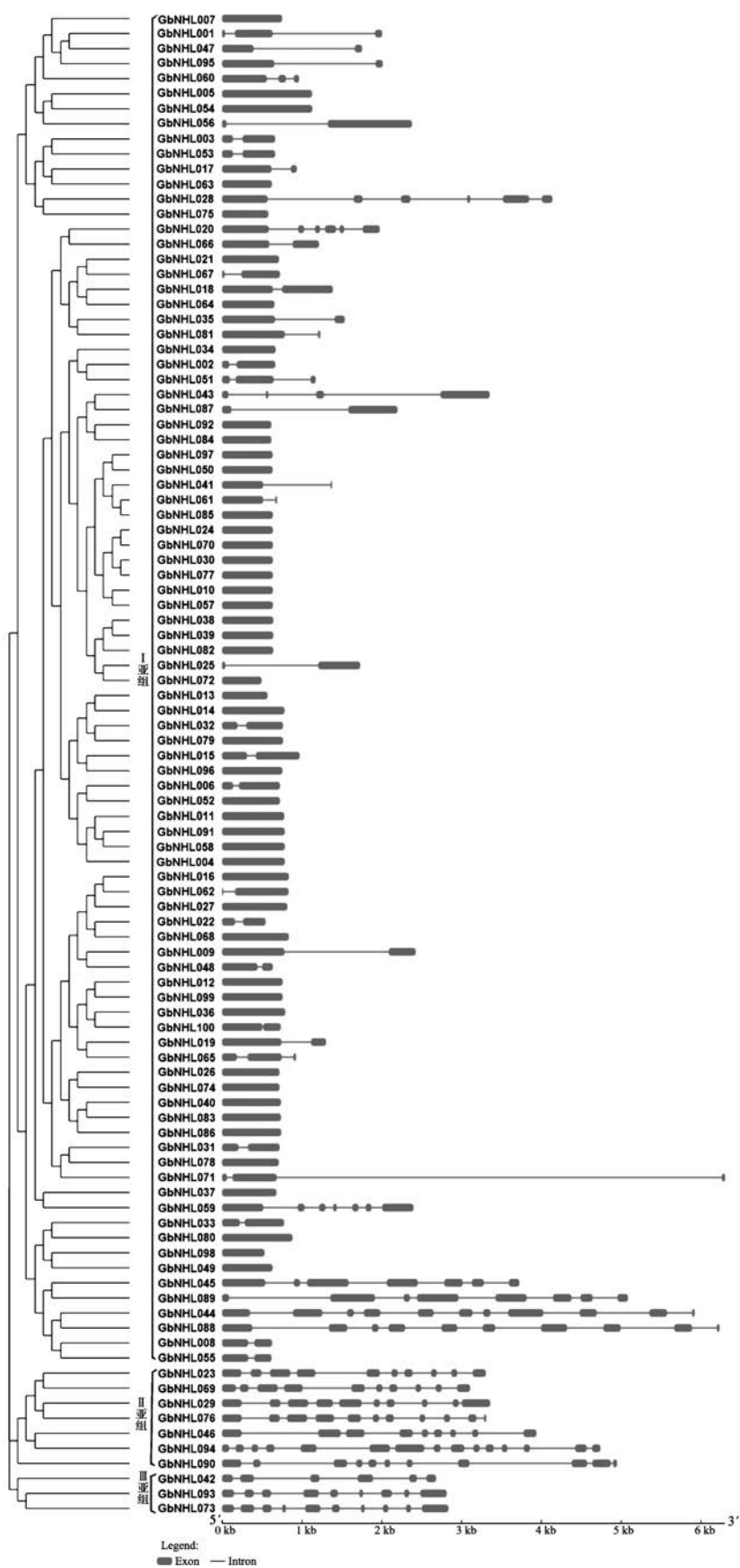
图 1 海岛棉 *NHL* 基因家族各基因染色体定位图Fig. 1 Chromosome location of *NHL* gene family in *G. barbadense*

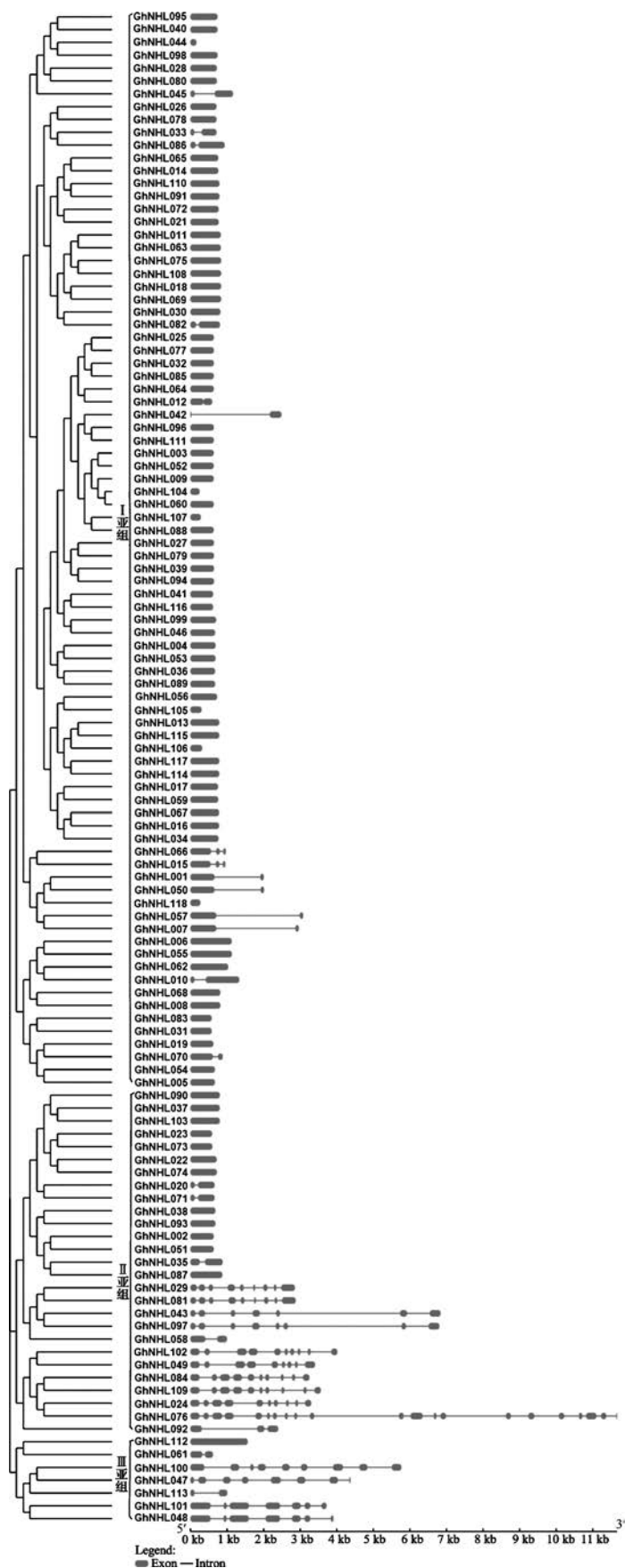
图2 陆地棉 *NHL* 基因家族各基因染色体定位图Fig. 2 Chromosome location of *NHL* gene family in *G. hirsutum*

## 2.2 棉花 *NHL* 基因家族结构分析

对海岛棉 *NHL* 基因家族的 100 个成员、陆地棉的 118 个成员的基因结构进行分析后发现,该基因家族的外显子个数多在 1~2 之间,但是部分基因成员的外显子数目较多,最多的可达 21 个外显子,结构较为复杂。结合基因结构及系统进化树分析可以将 *NHL* 基因家族分为 I、II、III 3 个亚组(图 3、图 4)。海岛棉 *NHL* 家族 I、II、III 亚组分别包含 90 个、7 个、3 个基因,陆地棉 *NHL* 家族 I、II、III 亚组分别包含 84 个、27 个、7 个基因。海岛棉 *NHL* 家族 I 亚组的成员最多,并且基因的外显

子个数大多数为 1 个(48 个基因)或 2 个(30 个基因),II 亚组和 III 亚组成员较少且基因结构较为复杂,外显子数在 6~15 个之间。陆地棉 *NHL* 家族 I 亚组的成员也是最多的,并且基因的外显子个数大多数为 1 个(70 个基因),其余的为 2~3 个,II 亚组基因外显子数在 1~21 个之间,III 亚组外显子数在 1~9 个之间。这些结果表明,基因结构与亚组分类存在一定的联系,无论是海岛棉还是陆地棉,I 亚组以含有 1 个或 2 个外显子的基因居多,而 II 亚组和 III 亚组中基因结构多数比较复杂,含有较多的外显子。

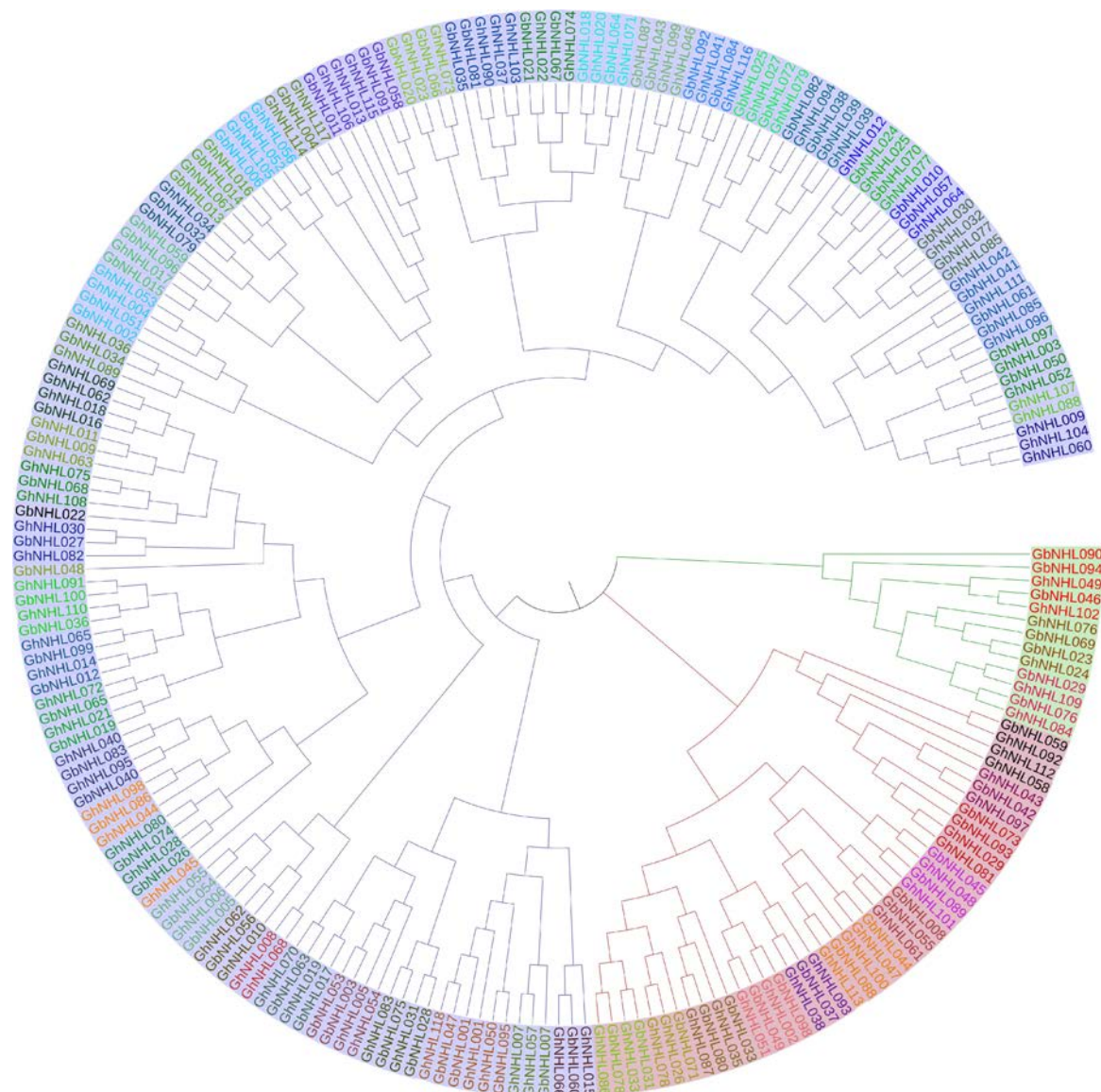
图3 海岛棉 *NHL* 基因家族进化树和基因结构Fig. 3 Phylogenetic tree and gene structure of *NHL* gene family in *G. barbadense*

图4 陆地棉 *NHL* 基因家族进化树和基因结构Fig. 4 Phylogenetic tree and gene structure of *NHL* gene family in *G. hirsutum*

### 2.3 棉花 *NHL* 基因家族同源基因分析及保守域分析

在分子进化研究中,一般来说,如果两个基因序列之间的相似性达到 80%,就可以把这两个基因称为同源基因。对棉花中 *NHL* 基因家族各成员进行

序列比对后发现,绝大部分具有同源性的基因序列一致性在 90% 以上。同源性较高的基因在进化上关系也较近,这些序列高度相似的同源基因很可能发挥着相似的功能(图 5)。



邻近的相同颜色表示的是海岛棉和陆地棉中的同源基因

黑色表示该基因没有同源基因

The adjacent and same color indicates the homologous genes between *G. barbadense* and *G. hirsutum*

The black indicate that the genes has no homologous genes

图 5 海岛棉和陆地棉 *NHL* 基因家族进化树及同源基因分析

Fig. 5 Phylogenetic tree and homologous genes of *NHL* gene family in *G. barbadense* and *G. hirsutum*

通过分析海岛棉和陆地棉 *NHL* 基因家族的氨基酸序列发现,海岛棉和陆地棉 *NHL* 家族各含有 3 个保守基序(表 3),而且海岛棉 *NHL* 家族的 3 个保守基序 TVTARNPNKKIGIYYDKLSVSA、IAVLILWLILRPHKPRFSLQSVTIYAFNL、LPPFYQGHKNTTLK 与陆

地棉的 3 个保守基序 PSLSANFQVTVTARNPNK-KIGIYYDKLV、IAVLJIWLILRPHKPRFTLQSVTIYAFNL、SLPPFYQGHKNTTVLKPVLKG 具有相似的组成。此外,棉花中的这些保守基序与拟南芥中的 3 个保守基序 motif 1: LILWLILRPXKPKFXVQDATV、motif 2:

NPNKRIGIYYD 和 motif 3: PFYQGHKN<sup>[16]</sup> 之间存在相似的保守区域, 这表明 *NHL* 基因家族在进化上相

对保守, 预示着棉花中 *NHL* 基因很可能发挥着与拟南芥中 *NHL* 基因相似的功能。

表 3 海岛棉和陆地棉 *NHL* 基因家族保守基序

Table 3 Conservative motifs of *NHL* gene family in *G. barbadense* and *G. hirsutum*

| <i>GbNHL</i> 基因家族保守基序<br>Conservative motif of <i>GbNHL</i> gene family | <i>GhNHL</i> 基因家族保守基序<br>Conservative motif of <i>GhNHL</i> gene family |
|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| <b>IAVLILWLILRPHKPRFSLQSVTIYAFNL</b>                                    | <b>IAVLJIWLILRPHKPRFTLQSVTIYAFNL</b>                                    |
| <b>TVTARNPNKKIGIYYDKLSVSA</b>                                           | <b>PSLLSANFQVTVTARNPNKKIGIYYDKLV</b>                                    |
| <b>LPPFYQGHKNTTLLK</b>                                                  | <b>SLPPFYQGHKNTTVLKPVLKG</b>                                            |

加粗字体表示海岛棉和陆地棉 *NHL* 基因家族相似的保守基序

Blod fonts indicate the similar conservative motifs between *GbNHL* gene family and *GhNHL* gene family

## 2.4 黄萎病菌胁迫下陆地棉 *NHL* 基因表达分析

根据课题组前期获得的黄萎病菌胁迫下抗病陆地棉品种农大 601 的根、茎组织的转录组数据, 本研究分析了 *NHL* 基因在接菌前后的表达量变化, 以推测这些基因在棉花黄萎病抗性中的作用。结果表明, 在 118 个陆地棉 *NHL* 基因中, 57 个基因的表达量在接菌后都发生了明显的变化, 意味着这些基因参与了棉花抗黄萎病反应过程, 其余 61 个基因在接菌前后的棉花根和茎中一直维持较低的表达水平 (图 6), 推测它们在棉花抵抗黄萎病菌过程中可能作用很小。

57 个差异表达基因在棉花根、茎组织中的表达模式可以分为 3 种类型 (图 7a、7b): 第 I 类表现为接菌前表达较高, 接菌后表达下降, 其中根中表达的基因有 18 个, 茎中有 8 个; 第 II 类表现为接菌前较高, 接菌后表达先降后升, 这类基因在根中表达的有 19 个, 茎中有 27 个; 第 III 类表现为接菌前表达低, 而接菌后表达升高, 其中根中表达的有 20 个, 茎中有 22 个。从表达规律可以看出, 第 I 类基因在棉花抵抗黄萎病菌过程中被抑制, 它们在抗病过程中受到负调控, 第 II 类和第 III 类都被黄萎病菌诱导, 意味着这些基因参与了抗病反应过程。

## 3 讨论

本研究从海岛棉和陆地棉全基因组序列中分别鉴别出 100 个和 118 个 *NHL* 基因家族成员。生物信息学分析发现, 海岛棉和陆地棉 *NHL* 基因家族含有的保守基序, 其与拟南芥 *NHL* 基因家族的保守基序含有相似的结构。相比于拟南芥中发现的 45 个 *NHL* 基因, 棉花中 *NHL* 基因家族成员要更多, 拟南芥是二倍体植物, 而海岛棉和陆地棉是四倍体, 棉花中 *NHL* 基因的增多可能是基因组的扩增导致的。由基因位置分析发现, 棉花 *NHL* 基因几乎遍布在所

有染色体上, 是一个大家族, 具有结构多样性, 该基因家族的外显子个数多在 1~2 个之间, 但是部分基因成员的外显子数目较多, 最多的可达 21 个外显子, 结构更为复杂, 这可能是由于在长期的进化过程中基因发生变异和进化造成的, 预示着 *NHL* 基因家族成员功能的多样性。

拟南芥中 *NHL* 基因是根据其与烟草 *HIN1* 基因和拟南芥 *NDR1* 基因序列上的相似性发掘出来的<sup>[14]</sup>。已有研究证明, *HIN1* 在烟草中可诱导抗病<sup>[24]</sup>; 大豆中的 *Hin1* 基因与大豆对疫霉根腐病抗性相关<sup>[25]</sup>; 拟南芥 *AtHin1* 在植物细胞衰老和防卫过程中发挥一定的作用<sup>[26]</sup>; *NDR1* 在多种植物对细菌和真菌病原体的抗病反应中都发挥重要作用<sup>[11-12, 27]</sup>; 拟南芥中的 *NHL3*、*NHL25* 和 *NHL10* 都与抗病存在一些关系<sup>[14-16]</sup>。由此我们推测棉花 *NHL* 基因在抗病中可能也发挥作用。本研究通过转录组数据发现, 在黄萎病菌胁迫下, 陆地棉中有 57 个 *NHL* 基因的表达量发生了明显的变化。基因的表达模式与其发挥的功能之间具有紧密的联系<sup>[28]</sup>。在系统进化上与 *NtHIN1*、*AtNHL2*、*AtNHL3*、*AtNHL10* 关系较近的 *GhNHL004*、*GhNHL036*、*GhNHL053*、*GhNHL089*, 与 *AtNHL25* 关系较近的 *GhNHL016*、*GhNHL034*、*GhNHL067* 都可受黄萎病菌诱导表达升高, 表明这些基因以及与其表达模式相同的 *NHL* 基因在棉花抵抗黄萎病菌的过程中起着重要作用。而在黄萎病菌胁迫下, 表达量明显下降且一直受到抑制的基因, 其是否负向介导棉花抗病尚需进一步研究。

目前, 关于 *NHL* 基因的抗病机理了解还较少, 已有研究表明, 拟南芥中超表达 *NHL2* 可导致 SA 信号途径中标志基因 *PR-1* 表达量升高<sup>[14]</sup>。*AtNHL1* 和 *AtNHL8* 在转基因大豆中可诱导茉莉酸和乙烯途径标志基因表达, 从而提高对大豆胞囊线虫病的抗性<sup>[29]</sup>。茄属中的 *NHL* 基因 *StPOTHR1* 与 MAP 激酶

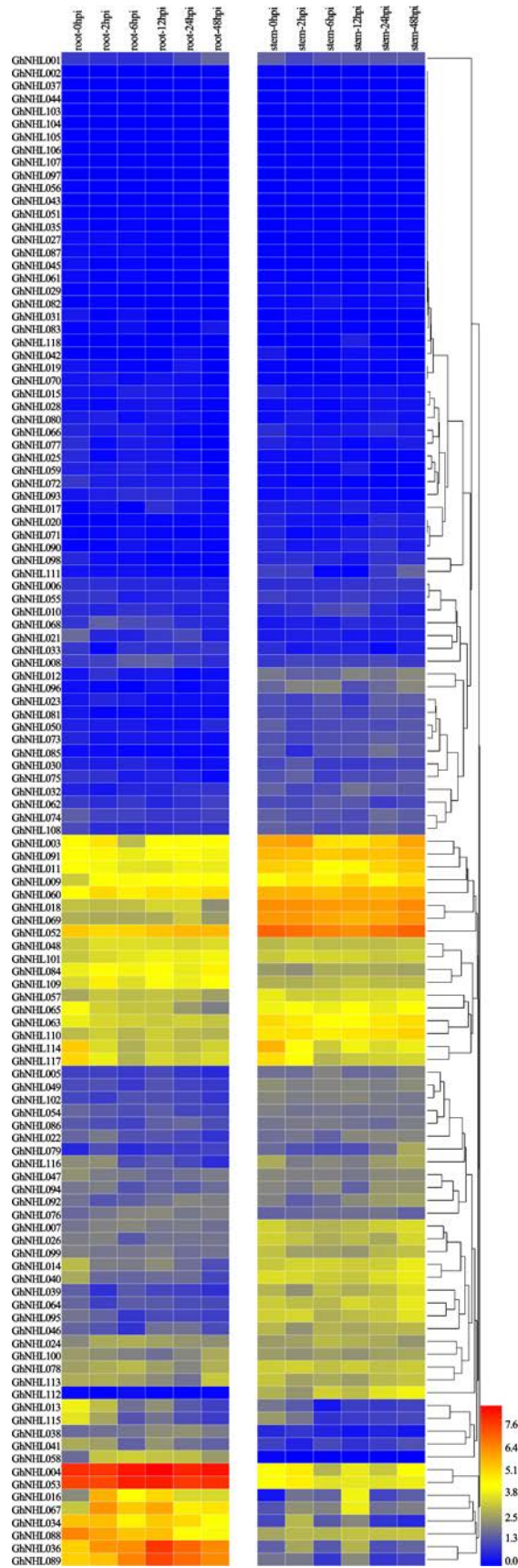
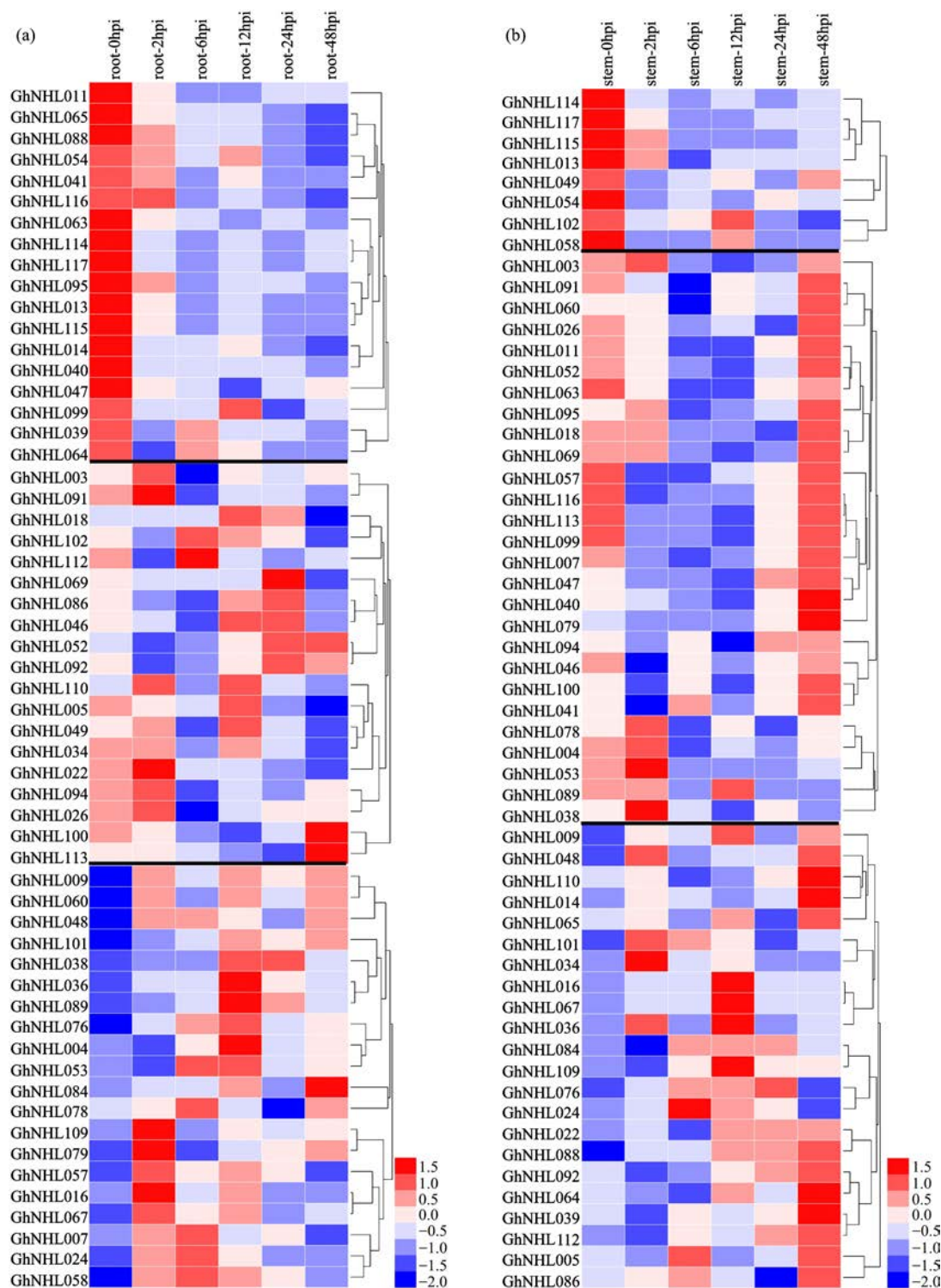


图 6 黄萎病菌胁迫下,陆地棉抗病品种农大棉 601 中 *NHL* 基因表达分析

Fig. 6 The expression analysis of *NHL* genes in resistant cultivar ND 601 under *V. dahliae* stress



a: 根中差异表达的基因; b: 茎中差异表达的基因

a: The differentially expressed *GhNHL* genes in the root; b: The differentially expressed *GhNHL* genes in the stem图 7 黄萎病菌胁迫下差异表达的陆地棉 *NHL* 基因表达模式分析Fig. 7 The patterns of *GhNHL* genes with differential expression under *V. dahliae* stress

信号级联的组份 NbMKK5L 互作, 参与马铃薯免疫反应<sup>[30]</sup>。由此推断 *NHL* 基因很可能参与各种信号反应, 从而在植物抗病抗逆反应中发挥作用。棉花 *NHL* 基因家族成员众多, 相似的保守基序保证了其

在功能上的联系, 而各基因结构与序列的差异又使其功能产生了分化。目前对 *NHL* 基因在棉花抗病的研究很少, 本研究中对棉花 *NHL* 基因家族的分析为将来更深入地研究其功能奠定了理论基础。

## 参考文献

- [1] Belkhadir Y, Subramaniam R, Dangel J L. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7(4): 391-399
- [2] Gururani M A, Venkatesh J, Upadhyaya C P, Nookaraju A, Pandey S K, Park S W. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2012, 78: 51-65
- [3] Zhang Y, Wang X F, Yang S, Chi J N, Zhang G Y, Ma Z Y. Cloning and characterization of a *Verticillium* wilt resistance gene from *Gossypium barbadense* and functional analysis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 2011, 30(11): 2085-2096
- [4] Zhang B L, Yang Y W, Chen T Z, Yu W G, Liu T L, Li H J, Fan X H, Ren Y Z, Shen D Y, Liu L, Dou D L, Chang Y H. Island cotton *Gbvel* gene encoding a receptor-like protein confers resistance to both defoliating and non-defoliating isolates of *Verticillium dahliae*. *PLoS ONE*, 2012, 7(12): e51091
- [5] Yang Y W, Ling X T, Chen T Z, Cai L W, Liu T L, Wang J Y, Fan X H, Ren Y Z, Yuan H B, Zhu W, Zhang B L, Ma D P. A cotton *GbvdR5* gene encoding a leucine-rich-repeat receptor-like protein confers resistance to *Verticillium dahliae* in transgenic *Arabidopsis* and upland cotton. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2014, 33(4): 987-1001
- [6] Jun Z, Zhang Z Y, Gao Y L, Zhou L, Fang L, Chen X D, Ning Z Y, Chen T Z, Guo W Z, Zhang T Z. Overexpression of *GbRLK*, a putative receptor-like kinase gene, improved cotton tolerance to *Verticillium* wilt. *Scientific Reports*, 2015, 5: 15048
- [7] Yang J, Ji L L, Wang X F, Zhang Y, Wu L Z, Yang Y N, Ma Z Y. Overexpression of 3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase gene from *Gossypium hirsutum* enhances *Arabidopsis* resistance to *Verticillium* wilt. *Plant Cell Reports*, 2015, 34(8): 1429-1441
- [8] Mo H J, Wang X F, Zhang Y, Zhang G Y, Zhang J F, Ma Z Y. Cotton polyamine oxidase is required for spermine and camalexin signalling in the defence response to *Verticillium dahliae*. *The Plant Journal*, 2015, 83(6): 962-975
- [9] Chen T Z, Kan J L, Yang Y W, Ling X T, Chang Y H, Zhang B L. A *Ve* homologous gene from *Gossypium barbadense*, *GbvdR3*, enhances the defense response against *Verticillium dahliae*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 98: 101-111
- [10] Yang Y W, Chen T Z, Ling X T, Ma Z Q. *GbvdR6*, a gene encoding a receptor-like protein of cotton (*Gossypium barbadense*), confers resistance to *Verticillium* Wilt in *Arabidopsis* and upland cotton. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 2272
- [11] Century K S, Shapiro A D, Repetti P P, Dahlbeck D, Holub E, Staskiewicz B J. *NDRI*, a pathogen-induced component required for *Arabidopsis* disease resistance. *Science*, 1997, 278(5345): 1963-1965
- [12] Century K S, Holub E B, Staskiewicz B J. *NDRI*, a locus of *Arabidopsis thaliana* that is required for disease resistance to both a bacterial and a fungal pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(14): 6597-6601
- [13] Gopalan S, Wei W, He S Y. *hrp* gene-dependent induction of *hin1*: A plant gene activated rapidly by both harpins and the *avrPto* gene-mediated signal. *The Plant Journal*, 1996, 10(4): 591-600
- [14] Dörmann P, Gopalan S, He S Y, Benning C. A gene family in *Arabidopsis thaliana* with sequence similarity to *NDRI* and *HINI*. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2000, 38(10): 789-796
- [15] Zheng M S, Takahashi H, Miyazaki A, Hamamoto H, Shah J, Yamaguchi I, Kusano T. Up-regulation of *Arabidopsis thaliana NHL10* in the hypersensitive response to *Cucumber mosaic virus* infection and in senescing leaves is controlled by signalling pathways that differ in salicylate involvement. *Planta*, 2004, 218(5): 740-750
- [16] Varet A, Parker J, Tornero P, Nass N, Nürnberger T, Dangel J L, Scheel D, Lee J. *NHL25* and *NHL3*, two *NDRI/HINI*-like genes in *Arabidopsis thaliana* with potential role(s) in plant defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2002, 15(6): 608-616
- [17] Varet A, Hause B, Hause G, Scheel D, Lee J. The *Arabidopsis NHL3* gene encodes a plasma membrane protein and its overexpression correlates with increased resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Plant Physiology*, 2003, 132(4): 2023-2033
- [18] Bao Y, Song W M, Zhang H X. Role of *Arabidopsis NHL* family in ABA and stress response. *Plant Signaling & Behavior*, 2016, 11(5): e1180493
- [19] Bao Y, Song W M, Pan J, Jiang C M, Srivastava R, Li B, Zhu L Y, Su H Y, Gao X S, Liu H, Yu X, Yang L, Cheng X H, Zhang H X. Overexpression of the *NDRI/HINI*-Like gene *NHL6* modifies seed germination in response to abscisic acid and abiotic stresses in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 2016, 11(2): e0148572
- [20] Zhang T Z, Hu Y, Jiang W K, Fang L, Guan X Y, Chen J D, Zhang J B, Saski C A, Scheffler B E, Stelly D M, Hulse-Kemp A M, Wan Q, Liu B L, Liu C X, Wang S, Pan M Q, Wang Y K, Wang D W, Ye W X, Chang L J, Zhang W P, Song Q X, Kirkbride R C, Chen X Y, Dennis E, Llewellyn D J, Peterson D G, Thaxton P, Jones D C, Wang Q, Xu X Y, Zhang H, Wu H T, Zhou L, Mei G F, Chen S Q, Tian Y, Xiang D, Li X H, Ding J, Zuo Q Y, Tao L N, Liu Y C, Li J, Lin Y, Hui Y Y, Cao Z S, Cai C P, Zhu X F, Jiang Z, Zhou B L, Guo W Z, Li R Q, Chen Z J. Sequencing of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. acc. TM-1) provides a resource for fiber improvement. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(5): 531-537
- [21] Liu X, Zhao B, Zheng H J, Hu Y, Lu G, Yang C Q, Chen J D, Chen J J, Chen D Y, Zhang L, Zhou Y, Wang L J, Guo W Z, Bai Y L, Ruan J X, Shangguang X X, Mao Y B, Shan C M, Jiang J P, Zhu Y Q, Jin L, Kang H, Chen S T, He X L, Wang R, Wang Y Z, Chen J, Wang L J, Yu S T, Wang B Y, Wei J, Song S C, Lu X Y, Gao Z C, Gu W Y, Deng X, Ma D, Wang S, Liang W H, Fang L, Cai C P, Zhu X F, Zhou B L, Chen Z J, Xu S H, Zhang Y G, Wang S Y, Zhang T Z, Zhao G P, Chen X Y. *Gossypium barbadense* genome sequence provides insight into the evolution of extra-long staple fiber and specialized metabolites. *Scientific Reports*, 2015, 5: 14139-14152
- [22] Zhu T, Liang C Z, Meng Z G, Sun G Q, Meng Z H, Guo S D, Zhang R. CottonFGD: an integrated functional genomics database for cotton. *BMC Plant Biology*, 2017, 17(1): 101-109
- [23] Chang T H, Wu L C, Lee T Y, Chen S P, Huang H D, Horng J T. EuLoc: a web-server for accurately predict protein subcellular localization in eukaryotes by incorporating various features of sequence segments into the general form of Chou's PseAAC. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 2013, 27(1): 91-103
- [24] Lee J, Klessig D F, Nürnberger T. A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene *HINI* independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. *The Plant Cell*, 2001, 13(5): 1079-1093
- [25] 华彩锋. 大豆疫霉根腐病抗性相关基因 *Hin1* 的克隆及功能的初步研究. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014
- [26] Pontier D, Gan S S, Amasino R M, Roby D, Lam E. Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns of expression. *Plant Molecular Biology*, 1999, 39(6): 1243-1255
- [27] Gao X Q, Wheeler T, Li Z H, Kenerley C M, He P, Shan L B. Silencing *GhNDRI* and *GhMKK2* compromises cotton resistance to *Verticillium* wilt. *The Plant Journal*, 2011, 66(2): 293-305
- [28] 安亚茹, 杨君, 刘正文, 张桂寅, 马峙英, 王省芬. 陆地棉 *XTH* 基因家族全基因组鉴定及在纤维发育过程的表达分析. *植物遗传资源学报*, 2017, 18(6): 1179-1192
- [29] Maldonado A, Youssef R, McDonald M, Brewer E, Beard H, Matthews B. Overexpression of four *Arabidopsis thaliana NHL* genes in soybean (*Glycine max*) roots and their effect on resistance to the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2014, 86: 1-10
- [30] Chen Q S, Tian Z D, Jiang R, Zheng X A, Xie C H, Liu J. *StPOT-HRI*, a *NDRI/HINI*-like gene in *Solanum tuberosum*, enhances resistance against *Phytophthora infestans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 496(4): 1155-1161