

引文格式: 廉瑞婷, 任宏, 翟文, 等. 大白菜 COBRA 基因家族鉴定及其低温胁迫表达分析[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2022, 37(6): 1031–1039. DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202203013](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202203013)

大白菜 COBRA 基因家族鉴定及其低温胁迫表达分析*

廉瑞婷¹, 任宏², 翟文², 陈连水², 汤晓辛^{1**}

(1. 贵州师范大学 生命科学学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 东华理工大学 化学生物与材料科学学院, 江西 南昌 330013)

摘要:【目的】鉴定大白菜 COBRA 基因家族成员, 分析基因在低温胁迫下的表达并预测基因功能。【方法】利用生物信息学方法对大白菜的 COBRA 基因家族进行鉴定, 并对基因结构、系统进化、启动子元件和表达模式进行分析。【结果】大白菜 COBRA 基因家族包含 23 个成员, 命名为 *BrCOBL1*~*BrCOBL23*, 分布于大白菜基因组的 8 条染色体上, 根据基因序列特点将其分为 2 个亚族。大白菜与同属于十字花科的拟南芥、甘蓝型油菜、甘蓝和芥菜基因组中共鉴定出 147 个 COBRA 基因, 系统进化树分析表明以上 COBRA 基因家族成员可聚为 8 个亚组。基因表达分析显示: 低温胁迫下, 大白菜 *BrCOBL1*、*BrCOBL2*、*BrCOBL15* 和 *BrCOBL16* 的表达量显著升高。【结论】COBRA 蛋白序列含有共同的保守基序, 且某些基序特异存在于不同的亚族, 表明这些基序可能与各亚族的功能分化有关。根据启动子分析结果推测 *BrCOBL* 基因可能参与大白菜的非生物胁迫响应及激素应答调控。

关键词: 大白菜; COBRA 基因家族; 基因表达分析; 低温胁迫

中图分类号: S634.101 文献标志码: A 文章编号: 1004-390X (2022) 06-1031-09

Identification and Expression Analysis under Low Temperature Stress of COBRA Gene Family in *Brassica rapa* L.

LIAN Ruiting¹, REN Hong², ZHAI Wen², CHEN Lianshui², TANG Xiaoxin¹

(1. School of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang 550025, China;

2. School of Chemistry, Biology and Materials Science, East China University of Technology, Nanchang 330013, China)

Abstract: [Purposes] To identify the members of COBRA gene family in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.), and the gene expression under low temperature will be analyzed to predict the gene function. [Methods] The COBRA gene family of *B. rapa* was identified by bioinformatics method, and the gene structure, phylogenetic evolution, promoter elements and expression pattern were analyzed. [Results] The COBRA gene family contained 23 members in *B. rapa*, named *BrCOBL1*~*BrCOBL23*, which were divided into two subfamilies according to the characteristics of gene sequence, and distributed on eight chromosomes. A total of 147 COBRA genes were identified

收稿日期: 2022-03-08 修回日期: 2022-08-20 网络首发日期: 2022-10-18

*基金项目: 国家自然科学基金项目(U1812401, 31560184, 31300317, 31760076)。

作者简介: 廉瑞婷(1995—), 女, 甘肃通渭人, 在读硕士研究生, 主要从事植物抗逆性研究。

E-mail: lianrt97@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 汤晓辛(1984—), 男, 贵州贵阳人, 博士, 教授, 主要从事植物育种研究。E-mail: txxfull@163.com

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20221017.1807.001.html>



from *B. rapa*, *Arabidopsis thaliana*, *B. napus*, *B. oleracea*, and *B. juncea*, which all belonged to Brassicaceae. Phylogenetic tree analysis showed that the members of COBRA gene family were divided into eight subgroups. The expression analysis of genes showed that: the expression levels of *BrCOBL1*, *BrCOBL2*, *BrCOBL15* and *BrCOBL16* were significantly increased under low temperature stress. [**Conclusion**] COBRA protein sequences contain common conserved motifs, and some motifs exist specifically in different subfamilies, indicating that these motifs may be related to the functional differentiation of each subfamily. According to the promoter analysis results, it is speculated that *BrCOBL* is involved in the regulation of abiotic stress response and hormone response in *B. rapa*.

Keywords: *Brassica rapa* L.; COBRA gene family; expression analysis; low temperature stress

大白菜 (*Brassica rapa* L.) 是十字花科 (Brassicaceae) 芸苔属 (*Brassica*) 蔬菜, 起源于中国^[1], 根据生长形态可分为结球型和非结球型^[2]。大白菜原分布于中国华北, 目前在中国各地广泛栽培, 耐寒, 喜好冷凉气候, 不适于栽植在排水不良的黏土地上; 其营养丰富, 菜叶可供炒食、生食、盐腌和酱渍, 外层脱落的菜叶可作饲料, 且具有一定的药用价值^[3]。大白菜是中国传统的重要蔬菜, 年种植面积约 180 万 hm^2 , 约占中国蔬菜种植面积的 15%^[4]。

大白菜 COBRA 基因编码糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白 (glycosylphosphatidylinositol-anchored protein), 在植物细胞壁纤维素的合成、细胞的定向伸长和纤维素的沉积过程中起重要作用^[5], 其结构特点是: (1) N-端信号肽将该蛋白质定位于内质网; (2) 碳水化合物结合区域 (CBM) 富含芳香族氨基酸残基; (3) 高度保守的半胱氨酸富集区 (CCVS); (4) 在 C-端具有 GPI 锚定位点和疏水尾巴。COBL 蛋白 (即 COBRA 蛋白) 被分泌到高尔基体囊泡中, 然后位于质膜上, 以调节纤维素的组装和结晶^[6]。根据 COBRA 蛋白序列相似性可将其分为 2 个亚组, 其中一个亚组的 N 端氨基酸序列较长, 比另一组约长 45%, 外显子数量较少^[7]。COBRA 基因最早发现于拟南芥根细胞异常膨大的突变体中^[8]。拟南芥中的 *AtCOBL4* 是次生细胞壁纤维素合成所必需, 其突变会使茎秆易折断^[9]; *AtCOBL9* 则会影响拟南芥根毛的生长和形态发育^[10]; COBL2 蛋白功能缺失会使拟南芥种子表皮黏液分泌细胞中的纤维素大幅减少^[11-12]。水稻 *Os-BCIL4* (COBRA-like 蛋白) 突变会导致叶片细胞壁纤维素含量降低、果胶含量增加^[13]; 玉米中 COBRA-like 蛋白 *bk2* 突变会使植株变得脆弱, 茎和叶中的纤维素含量显著降低, 木质素增加^[14]。

在拟南芥、玉米、水稻、番茄和大豆等植物中鉴定了 COBRA 基因家族成员的数量分别为 12、11、9、17 和 24 个^[15-19], 但大白菜 COBRA 基因家族的研究尚未有报道。纤维素含量与蔬菜产量、食用口感、营养品质和栽培方式等密切相关。研究表明: 温度对细胞壁合成物质和纤维素含量有一定的影响。35 $^{\circ}\text{C}$ 高温下, 非结球白菜叶片的纤维素含量增加, 而在 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温时降低^[20]; 15 $^{\circ}\text{C}$ 处理下, 烟草中的纤维素含量低于 25 $^{\circ}\text{C}$, 但木质素含量高于 25 $^{\circ}\text{C}$ ^[21]。本研究利用生物信息学方法对大白菜全基因组中的 COBRA 基因家族进行鉴定, 并对其基因序列结构、系统进化、启动子元件和低温胁迫下的表达模式进行分析, 以期深入研究 COBRA 家族各成员功能以及低温环境下 COBRA 基因对植物纤维素含量的调控提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 COBRA 基因家族鉴定

从十字花科植物数据库 (<http://brassicadb.cn/>) 获取大白菜 (*B. rapa*, AA)^[22]、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、甘蓝 (*B. oleracea*, CC)、芥菜 (*B. juncea*, AABB)、甘蓝型油菜 (*B. napus*, AA-CC) 的参考基因组及相关注释信息。查询大白菜的 COBRA 基因, 利用 HMMER 程序 (<http://hmmer.org/>) 和 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) 结果对 COBRA 蛋白保守结构域进行确认。使用 BlastP 在大白菜全基因组蛋白质数据中进行搜索, 筛选阈值 (*e*-value) 小于等于 10^{-5} , 获得大白菜和其他 4 种十字花科植物的 COBRA 基因家族成员。

1.2 COBRA 基因序列结构和系统进化分析

利用 ExPASy 在线分析蛋白质的氨基酸长

度、分子量和理论等电点; 在大白菜基因组注释信息中提取 COBRA 家族成员染色体位置信息。使用 MEME 程序 (Version 5.3.0, <http://meme-suite.org/tools/meme>) 分析大白菜 COBRA 蛋白质序列的保守基序, 迭代次数为 18 000, $n_{\text{motifs}} \leq 10$ 。使用 MEGA-X 软件的 ClustalW 工具对蛋白质序列进行比对排序 (默认参数); 采用邻接法 (neighbor-joining) 构建系统发生树, Bootstrap 校验值为 1 000 次。

1.3 COBRA 基因表达的分析

提取白菜 COBRA 家族基因上游 2 kb 序列作为启动子区域, 用 PlantCARE 软件预测大白菜 COBRA 家族基因的启动子顺式调控元件。

在常温 (25 ℃) 下将大白菜 (品种: KTRG-B49) 培养至四叶一心期, 然后分为以下 6 个处理组: (1) 4 ℃ (低温) 分别处理 1、4 和 6 h; (2) -2 ℃ 处理 2 h; (3) -4 ℃ 处理 1 h; (4) 低温处理后常温恢复 1 d。各处理组均以常温 (25 ℃) 为对照组。所有处理均取 3 个生物学重复, 共 7 组 21 个样

品。采用 Illumina HiSeq™ 2500 测序仪对各组处理的叶片进行转录组测序。计算每个样品每千个碱基的转录每百万映射读取的片段 (fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments, FPKM) 均值, 分析大白菜 COBRA 基因在不同条件下的表达量, 将其表达量通过 TB-tools 软件绘制热图。

1.4 荧光定量 qPCR 的基因表达分析

应用 Primer3 设计引物 (表 1), 内参基因为白菜 *BraActin*。使用 HiScript II QRT SuperMix for qPCR (诺维赞) 试剂盒对样品 RNA 进行反转录得到 cDNA, 用 ChamQ SYBR qPCR Master Mix (诺维赞) 试剂盒进行定量 PCR 试验。反应体系为 20 μL, 包括: cDNA 2 μL, 上、下游引物各 0.4 μL, SYBR 10 μL, 灭菌 ddH₂O 补至 20 μL。PCR 反应程序为: 95 ℃ 30 s, 95 ℃ 10 s, 60 ℃ 22 s, 40 个循环。基因的相对表达量以 2^{-ΔΔCt} 法计算, 用 Excel 软件整理数据并绘图。

表 1 qPCR 引物信息
Tab. 1 Primer sequence of qPCR

基因名称 gene name	引物序列 (5'→3') primer sequence		扩增序列长度/bp length of amplified sequence
<i>BrCOBL1</i>	F: GCTGGACTCCTGATGGCTAT	R: CGGGAGCAAATCTACAACCG	224
<i>BrCOBL2</i>	F: GATGCGCTTGATCCAGAAGG	R: GTTGTTGTGTCCGACCAT	191
<i>BrCOBL15</i>	F: GTCACCTCAGATGCAAGCGAG	R: GAGATCTCCATTTGCCGGG	228
<i>BrCOBL16</i>	F: CGTCCTAAACAACGGCAGAG	R: AACTGAGTACCCACGAGCTC	240
<i>BraActin</i>	F: ACAACGAGCTTCGTGTTGCA	R: TCTGCTGTGGTGGTGAAAGA	352

2 结果与分析

2.1 大白菜 COBRA 基因家族的鉴定及理化性质

大白菜基因组 COBRA 家族含有 23 个成员 (表 2), 命名为 *BrCOBL1*~*BrCOBL23*, 分布在大白菜基因组的 8 条染色体上 (图 1)。由表 2 可知: *BrCOBL* 蛋白质的分子量在 8.61~74.53 ku 之间, 大部分成员的相对分子量在 45~55 ku 之间; 氨基酸长度在 98~673 aa 之间, 有 73.91% 成员的氨基酸长度大于 400 aa; 等电点在 5.16~10.41 之间, 有 86.96% 成员的等电点大于 7。鉴定出的大多数 COBRA 基因具有 CCVS 基序、N 端信号肽和潜在的 ω 位点。

2.2 大白菜 COBRA 基因家族的序列结构及保守基序

由图 2 可知: 大白菜 COBRA 基因家族可分

为 2 个亚家族 (Group1 和 Group2), Group1 有 13 个成员, 包括 *BrCOBL1*~*BrCOBL13*, Group2 家族有 10 个成员, 包括 *BrCOBL14*~*BrCOBL23*。对大白菜 23 个 COBRA 家族成员的蛋白质保守基序进行分析 (图 2a 和表 3) 可知: 除 *BrCOBL3*、*BrCOBL4* 和 *BrCOBL20* 外, 其他 20 个蛋白都具有 motif2; 除 *BrCOBL4*、*BrCOBL13* 和 *BrCOBL14* 外, 其他 20 个蛋白均含有 motif6, 说明 motif2 和 motif6 为 COBRA 家族的特征 motif。此外, 有 19 个蛋白含有 motif1, 有 19 个蛋白含有 motif3, 有 18 个蛋白含有 motif5、motif7 和 motif8, 说明这些 motif 在 COBRA 蛋白中也相当保守, 其中 motif5 含有 Cys-Cys-Val-Ser (CCVS) 结构域。Group1 中除 *BrCOBL4* 外, 其他均含有 motif2 和 motif3; Group2 中除 *BrCOBL14* 外, 其他均含有 motif1、motif5、motif6 和 motif9, 且 motif4 只存

表 2 大白菜 COBRA 基因家族成员的理化性质

Tab. 2 Physicochemical properties of COBRA gene family members of *Brassica rapa*

基因名称 gene name	基因编号 gene ID	染色体 chromosome	氨基酸长度/aa amino length	等电点 isoelectric point	分子量/ku molecular weight
<i>BrCOBL1</i>	BraA03g043890.3C	A03	458	8.55	51.10
<i>BrCOBL2</i>	BraA09g006780.3C	A09	459	8.63	51.26
<i>BrCOBL3</i>	BraA03g043920.3C	A03	207	10.41	23.06
<i>BrCOBL4</i>	BraA09g006790.3C	A09	98	9.85	10.30
<i>BrCOBL5</i>	BraA05g041100.3C	A05	456	8.98	50.42
<i>BrCOBL6</i>	BraA06g036270.3C	A06	437	8.80	48.94
<i>BrCOBL7</i>	BraA02g039040.3C	A02	440	9.15	49.39
<i>BrCOBL8</i>	BraA10g023880.3C	A10	407	9.98	45.84
<i>BrCOBL9</i>	BraA03g007000.3C	A03	430	9.26	47.88
<i>BrCOBL10</i>	BraA02g006110.3C	A02	424	9.07	47.20
<i>BrCOBL11</i>	BraA06g006660.3C	A06	517	7.88	58.18
<i>BrCOBL12</i>	BraA08g032400.3C	A08	434	7.59	48.77
<i>BrCOBL13</i>	BraA02g009590.3C	A02	210	7.30	24.14
<i>BrCOBL14</i>	BraA06g034870.3C	A06	73	6.80	8.61
<i>BrCOBL15</i>	BraA01g020750.3C	A01	660	6.89	72.30
<i>BrCOBL16</i>	BraA01g035640.3C	A01	668	7.90	72.74
<i>BrCOBL17</i>	BraA09g004470.3C	A09	663	5.16	73.10
<i>BrCOBL18</i>	BraA01g033000.3C	A01	673	9.01	74.62
<i>BrCOBL19</i>	BraA03g039440.3C	A03	669	9.22	74.34
<i>BrCOBL20</i>	BraA05g026640.3C	A05	374	8.39	41.44
<i>BrCOBL21</i>	BraA02g009400.3C	A02	182	7.24	20.05
<i>BrCOBL22</i>	BraA01g017810.3C	A01	668	9.51	74.12
<i>BrCOBL23</i>	BraA08g019530.3C	A08	670	9.26	74.53

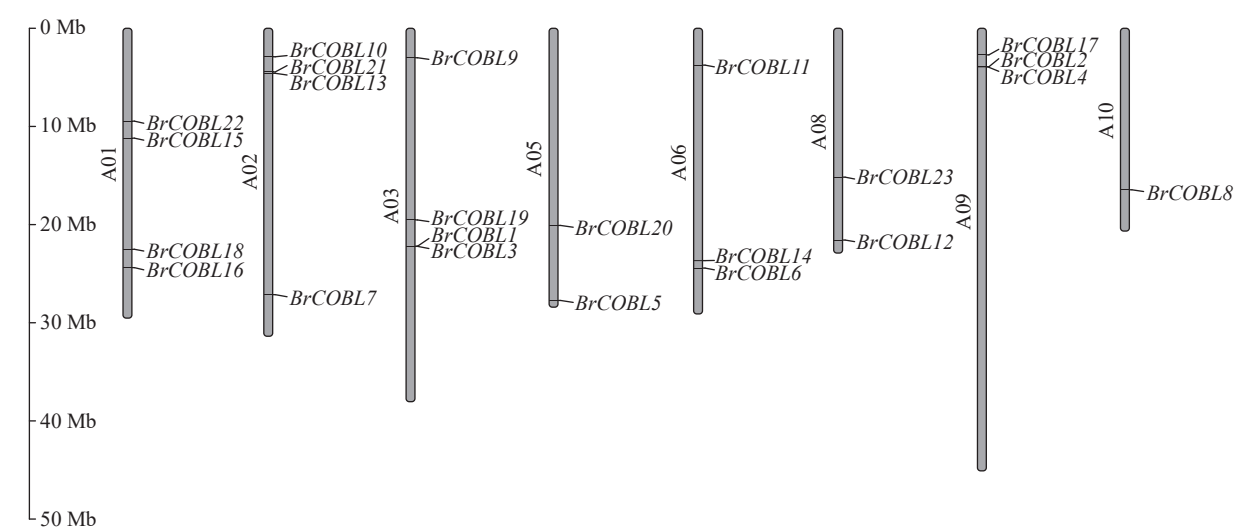


图 1 大白菜 COBRA 基因家族在染色体上的分布

Fig. 1 Distribution of COBRA gene family of *Brassica rapa* on chromosomes

在于 Group1，motif9 和 motif10 只存在于 Group2，表明这些 motif 可能与各亚族成员的功能分化有关。

对大白菜 COBRA 家族成员的基因结构分析 (图 2b) 可知：Group1 家族的外显子数量较多。COBRA 家族中有 10 个成员含有 5 个及 5 个以上

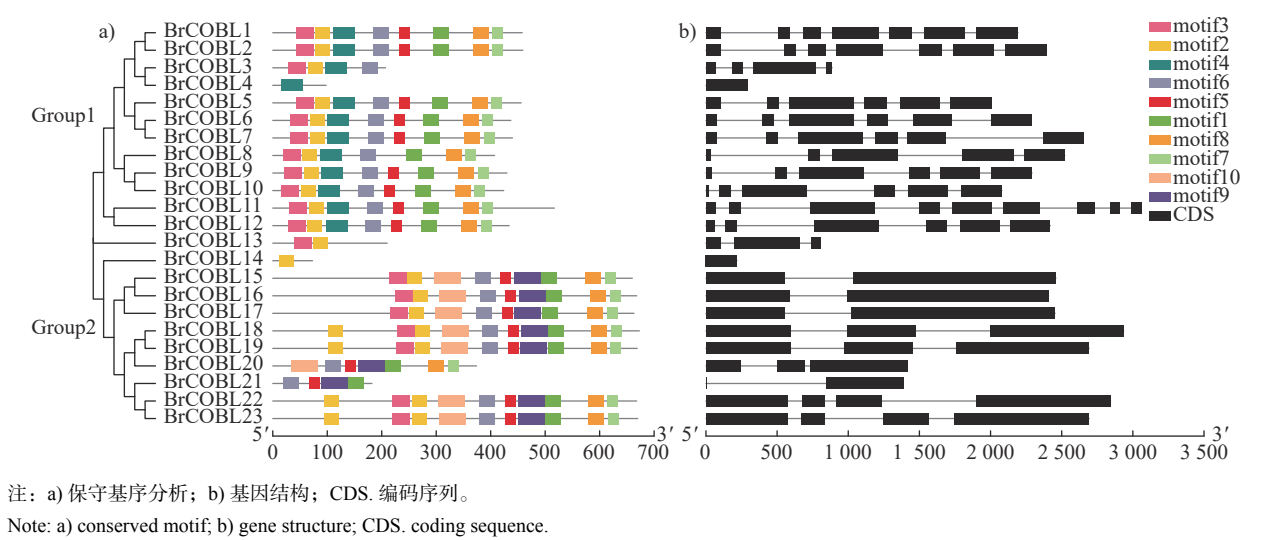


图 2 大白菜 COBRA 基因家族系统进化及基因结构
Fig. 2 Phylogenetic evolution and gene structure of COBRA gene family of *B. rapa*

表 3 大白菜 COBRA 基因家族的 motif 序列及长度
Tab. 3 Motif sequence and length of COBRA gene family of *B. rapa*

蛋白质 protein	序列 sequence	长度/bp length
motif1	HMCPISIHWHVKTBYKDYWRVKITITNWN	29
motif2	WTLGWEWAKKEVIWSMVGAQTTEQGDC	27
motif3	GBJTIKWDIMSWTPDGYVAQVTMENYQPYRHID	33
motif4	GNIPHCCKKTPTTVDLLPGTPYNQISNCKGGVLNSWAQD	41
motif5	CCVSFSAFYNDShIPCPTCAC	21
motif6	PGYTCGPPKRVDP TKFPDPDGRRK TQAAM	29
motif7	GWAFPRKVYFNGDECVLPPPD	21
motif8	GVKIFYNDPLREAGPPGNVQSEILFQKDLS	29
motif9	DIDTDTCNANAPLLLPPDALLVPFENRTLKAKAWAKRKHMPKPKLPCP	50
motif10	CQKKPAISDLPPERKDDKVLGKLPFCCKNGTJLPPLMDPSKRSIFQLQV	50

外显子, 它们都位于 Group1。Group2 家族中外显子数量较少, 其中 8 个成员含有 1~3 个外显子, 2 个成员含有 4 个外显子。结合系统进化分析可知: 进化关系较近的基因其结构也相似, 进一步表明系统进化树聚类的可靠性。

2.3 大白菜近缘物种的 COBRA 蛋白系统进化

由表 4 可知: 十字花科的 5 个物种共鉴定 COBRA 成员 147 个。根据氨基酸序列相似性构建的系统发生树(图 3)可将基因组成员分为 8 个不同的亚组(I~VIII)。I 亚组所含成员最多, 大白菜有 6 个成员在 I 亚组(*BrCOBL5*~*BrCOBL10*), 占总数的 18.75%, 这 6 个基因跟拟南芥的 3 个基因(*AT3G02210*、*AT3G29810* 和 *AT5G15630*) 位于同一亚组, 推测它们可能有类似的功能; *BrCOBL1* 和 *BrCOBL2* 位于第 II 亚组; *BrCOBL3* 和 *BrCOBL4*

位于第 III 亚组; *BrCOBL11* 和 *BrCOBL12* 位于第 V 亚组; *BrCOBL18*、*BrCOBL19* 和 *BrCOBL20* 位于第 VI 亚组; *BrCOBL15*、*BrCOBL16* 和 *BrCOBL17* 位于第 VII 亚组; *BrCOBL21*、*BrCOBL22* 和 *BrCOBL23* 位于第 VIII 亚组。

2.4 大白菜 COBRA 基因家族对低温胁迫的响应

由图 4 和图 5 可知: *BrCOBL1*、*BrCOBL2*、*BrCOBL5*、*BrCOBL10*、*BrCOBL15* 和 *BrCOBL16* 基因均在大白菜叶片中表达, 但另外 17 个基因在叶片中几乎不表达, 推测大白菜 COBRA 基因功能可能存在冗余。*BrCOBL15* 和 *BrCOBL16* 基因在常温下表达量较低, 在低温处理下表达量显著增高, 恢复常温后, 其表达量下降。*BrCOBL1* 和 *BrCOBL2* 基因在所有样品中都有表达, 尤其是在 4℃ 处理 6 h、-2℃ 处理 2 h 和 -4℃ 处理 1 h

表 4 系统发生树中的亚组
Tab. 4 Subgroups in phylogenetic tree

物种 species	基因数量 number of genes	亚组 subgroup							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
大白菜 <i>Brassica rapa</i>	23	6	2	2	2	2	3	3	3
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	11	3	1	1	1	0	1	3	1
甘蓝型油菜 <i>Brassica napus</i>	47	14	5	4	4	2	5	6	7
甘蓝 <i>Brassica oleracea</i>	25	7	3	2	2	1	2	3	5
芥菜 <i>Brassica juncea</i>	41	10	4	4	4	3	4	6	5

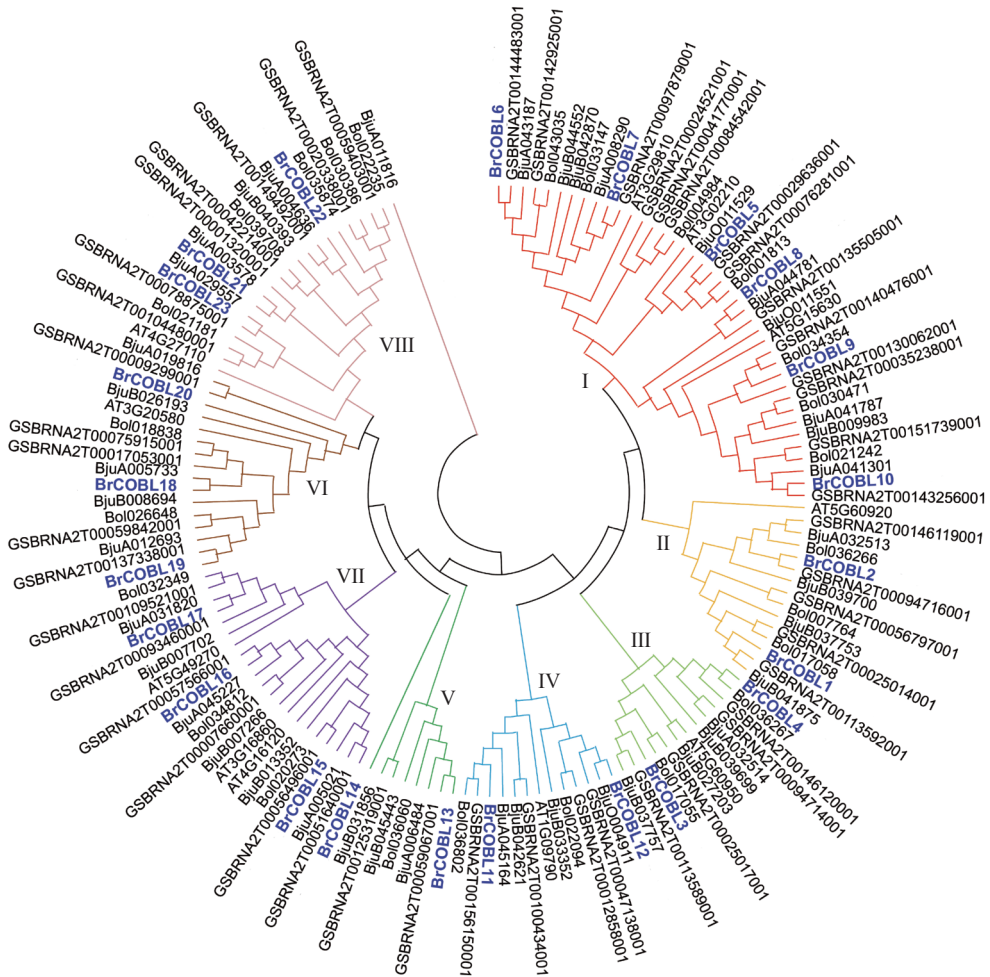


图 3 十字花科物种的 COBRA 家族系统发生树

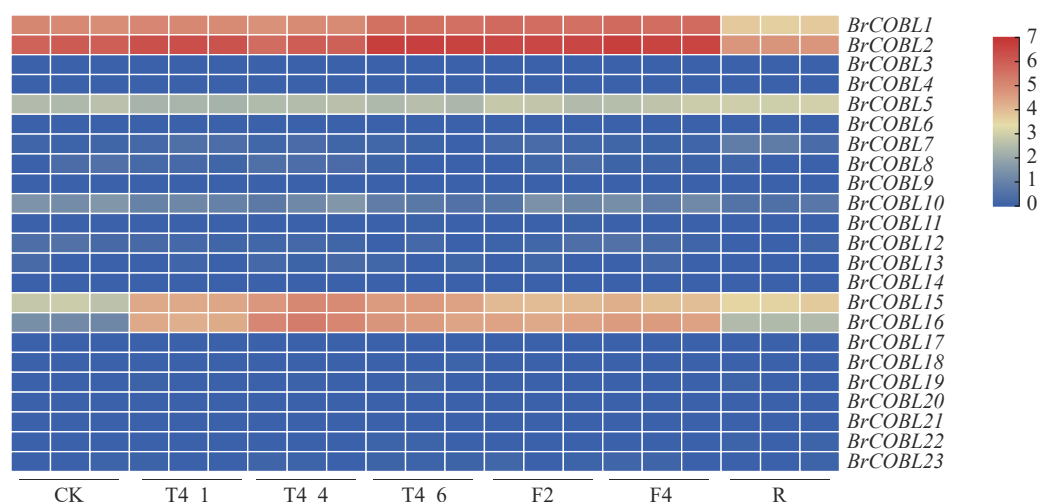
Fig. 3 COBRA family phylogenetic tree of Brassicaceae species

的样品中表达量较高，在-4℃处理1h的样品中 *BrCOBL1* 和 *BrCOBL2* 基因表达量分别是对照的4倍和3.5倍；样品在常温恢复1d后的表达量又显著降低，说明低温胁迫能增加 *BrCOBL1* 和 *BrCOBL2* 基因的表达量，且温度越低或在低温下处理时间越长其表达量增量越大。可见，*BrCOBL1*、*BrCOBL2*、*BrCOBL15* 和 *BrCOBL16* 基

因与大白菜响应低温胁迫和低温下调白菜纤维素合成有密切关系。

2.5 大白菜 COBRA 启动子区域顺式元件预测

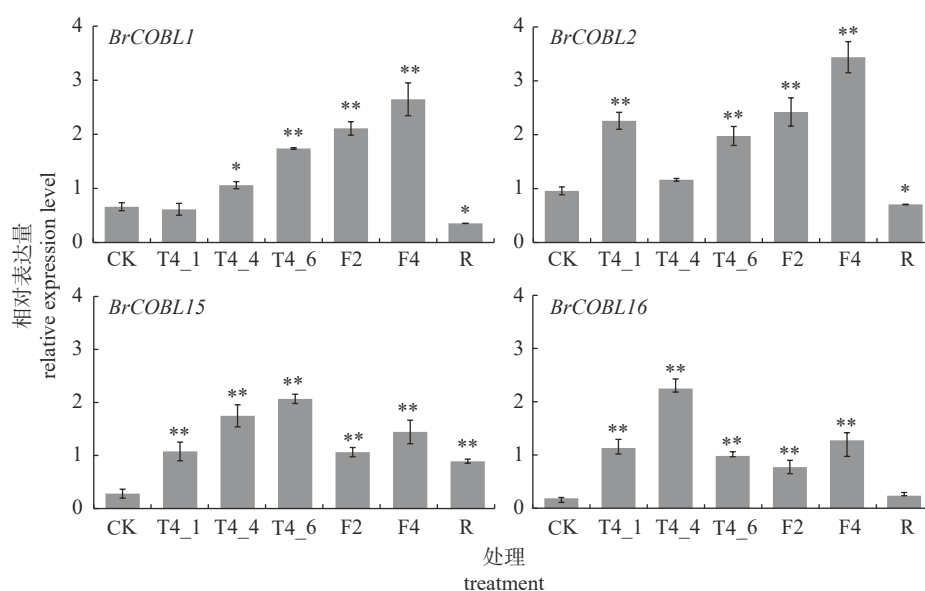
由图6可知：在15种启动子元件中，每个COBRA成员启动子区域都含有共同的1个或多个TATA-box和CAAT-box元件；分别有73.9%、73.9%和56.5%的COBRA启动子含有ARE、G-



注: CK. 对照; T4. 4 °C 处理 1/4/6 h; F2. -2 °C 处理 2 h; F4. -4 °C 处理 1 h; R. 低温处理后常温恢复 1 d; 同组 3 列表示 3 个生物学重复; 下同。
Note: CK. control; T4. treated 1/4/6 h under 4 °C; F2. treated 2 h under -2 °C; F4. treated 1 h under -4 °C; R. normal temperature was restored for one day after low temperature treatment; the same group of three columns represent the three biological replicates; the same as below.

图 4 应用转录组测序分析 *COBRA* 在低温胁迫下的表达量

Fig. 4 Expression level of *COBRA* analyzed by RNA-seq at low temperature stress



注: “*”和“**”分别表示与 CK 相比在 0.05 和 0.01 水平上差异显著。

Note: “*” and “**” indicate the significant difference at 0.05 and 0.01 level, respectively, which comparing with CK.

图 5 *BrCOBL1*、*BrCOBL2*、*BrCOBL15* 和 *BrCOBL16* 在低温胁迫下的 qPCR 表达

Fig. 5 qPCR expression of *BrCOBL1*, *BrCOBL2*, *BrCOBL15* and *BrCOBL16* at low temperature stress

box 和 ABRE 元件, 这些与植物抗氧化反应、光应答反应以及脱落酸和茉莉酸调控相关。*BrCOBL2* 基因启动子区域的 ABRE 元件最多 (7 个), 而赤霉素调控元件 TATC-box 在 *BrCOBL1* 中特异存在, 这可能与 *BrCOBL1* 和 *BrCOBL2* 的特异性表达有关。以上结果说明 *COBRA* 基因参与大白菜的非生物胁迫响应及激素应答调控。

3 讨论

COBRA 基因家族是植物特有的基因家族, 其主要功能是参与植物细胞的扩增, 且与籽粒产量和纤维素的生物合成密切相关^[23-25]。本研究基于生物信息学方法在大白菜中共鉴定到 23 个 *COBRA* 基因家族成员, 从其蛋白序列整体分析结果可知: *COBRA* 基因分为 2 个亚族, 同一亚

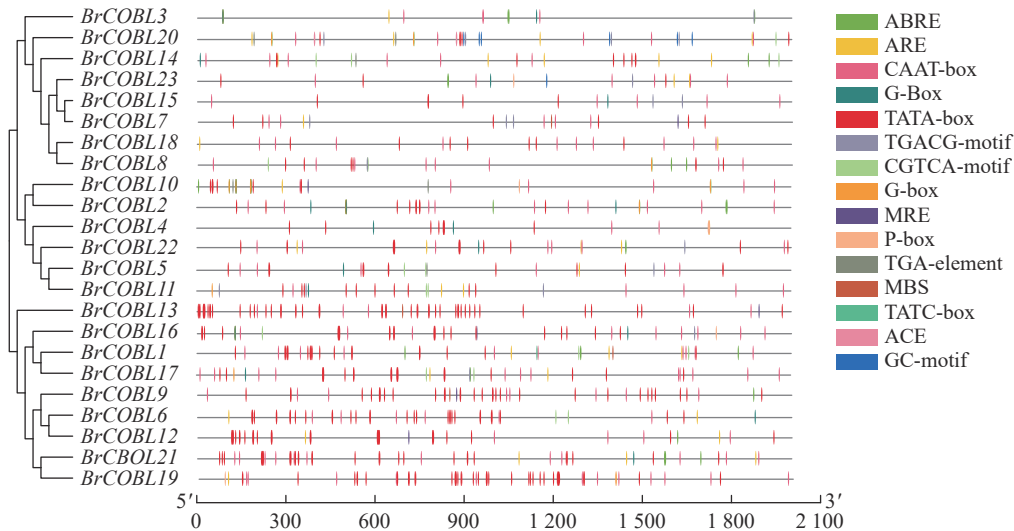


图 6 大白菜 COBRA 基因家族启动子顺式调控元件

Fig. 6 Cis-elements in COBRA gene family promoters

族的基因具有相似的基因结构,不同亚族之间蛋白长度差异明显。在基因结构上, Group1 家族 COBRA 基因的外显子数量多于 Group2 家族,该结果与对拟南芥^[8]、水稻^[24]、棉花^[26]、冬枣^[27]、高粱^[28]和大豆^[22]的研究结果基本一致。大白菜 COBRA 蛋白结构较保守,有 82% 以上的成员含有 motif2、motif6、motif1 和 motif3,且 2 个亚族成员也有各自特有的基序,不同亚族的保守基序不同暗示着基因功能的多样性。

在系统发生树中,遗传距离相近或同亚组的基因可能执行类似的功能。大白菜 COBRA 家族成员在低温胁迫下表达的 2 个基因 (*BrCOBL15* 和 *BrCOBL16*) 均在第 VII 亚组上,在这个亚组的还有 *AtCOBL9* (*AT5G49270*),它会影响拟南芥根毛的生长和形态发育^[10]。*BrCOBL5*~*BrCOBL10* 的 6 个成员在 Group1 家族,与拟南芥的 *AtCOBL4* (*AT5G15630*) 均位于 I 亚组, *AtCOBL4* 为拟南芥次生细胞壁纤维素合成所必需,其突变会使茎秆易折断^[23]。

‘cob-5’ (*AT5G60950*) 功能缺失会严重影响植株的生长发育,同时会积累大量应激化合物(如花青素和胍胍体等),还会导致参与花青素合成的基因上调、参与细胞生长的基因下调并大量诱导防御胁迫相关的基因,如植物茉莉酸信号通路^[29]。大白菜的 *BrCOBL3* 和 *BrCOBL4* 与拟南芥 *AtCOBL5* 都在第 III 亚组,推测它们可能有类似的基因功能。

纤维素是细胞壁的重要成分,低温会影响植

物细胞壁各物质的含量或改变细胞壁的机械结构。研究表明:4℃低温下,非结球白菜的纤维素含量降低了 22.16%^[20];15℃处理下,烟草的纤维素含量降低而木质素含量升高^[21];低温下棉花纤维的长度会显著缩短^[30]。同属于第 II 亚组的 *BrCOBL1* 和 *BrCOBL2* 在常温下少量表达,同属于第 VII 亚组 *BrCOBL15* 和 *BrCOBL16* 在常温下几乎不表达,这 4 个 COBRA 基因在低温时的表达量显著升高,推测与纤维素合成、细胞壁形成以及细胞的定向生长密切相关。

4 结论

低温环境下,大白菜 *BrCOBL1*、*BrCOBL2*、*BrCOBL15* 和 *BrCOBL16* 在其叶片显著表达,根据启动子分析结果推测 *BrCOBL* 基因可能参与大白菜的非生物胁迫响应及激素应答调控。COBRA 蛋白序列含有共同的保守基序,且某些基序特异存在于不同的亚组,表明这些基序可能与各亚组的功能分化有关。

[参考文献]

- [1] 张凤兰,于拴仓,余阳俊,等.“十三五”我国大白菜遗传育种研究进展[J].中国蔬菜,2021(1):22.
- [2] CHENG F, SUN R F, HOU X L, et al. Subgenome parallel selection is associated with morphotype diversification and convergent crop domestication in *Brassica rapa* and *Brassica oleracea*[J]. Nature Genetics, 2016, 48(10): 1218. DOI: 10.1038/ng.3634.
- [3] 张凤兰.中国大白菜产业发展现状及品种需求分析[J].中国果菜,2009(5):9. DOI: 10.3969/j.issn.1008-1038.

- 2009.05.005.
- [4] 杨雅婷,崔志超,高庆生,等.我国大白菜机械化生产现状及发展建议[J].中国蔬菜,2020(11):9.
 - [5] SCHINDELMAN G, MORIKAMI A, JUNG J, et al. COBRA encodes a putative GPI-anchored protein, which is polarly localized and necessary for oriented cell expansion in Arabidopsis[J]. Genes & Development, 2001, 15(9): 1115. DOI: [10.1101/gad.879101](https://doi.org/10.1101/gad.879101).
 - [6] LIU L F, SHANGGUAN K K, ZHANG B C, et al. Brittle Culm1a COBRA-like protein functions in cellulose assembly through binding cellulose microfibrils[J]. PLoS Genetics, 2013, 9(8): e1003704. DOI: [10.1371/journal.pgen.1003704](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003704).
 - [7] ROUDIER F, SCHINDELMAN G, DESALLE R, et al. The COBRA family of putative GPI-anchored proteins in Arabidopsis. A new fellowship in expansion[J]. Plant Physiology, 2002, 130(2): 538. DOI: [10.1104/pp.007468](https://doi.org/10.1104/pp.007468).
 - [8] BORNER G H H, LILLEY K S, STEVENS T J, et al. Identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in Arabidopsis. A proteomic and genomic analysis[J]. Plant Physiology, 2003, 132: 568. DOI: [10.1104/pp.103.021170](https://doi.org/10.1104/pp.103.021170).
 - [9] BAILEY T L, BODEN M, BUSKE F A, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 37: W202. DOI: [10.1093/nar/gkp335](https://doi.org/10.1093/nar/gkp335).
 - [10] JONES M A, RAYMOND M J, SMIRNOFF N. Analysis of the root-hair morphogenesis transcriptome reveals the molecular identity of six genes with roles in root-hair development in Arabidopsis[J]. The Plant Journal, 2006, 45: 83. DOI: [10.1111/j.1365-3113x.2005.02609.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3113x.2005.02609.x).
 - [11] BEN-TOV D, ABRAHAM Y, STAV S, et al. COBRA-LIKE2, a member of the glycosylphosphatidylinositol-anchored COBRA-like family, plays a role in cellulose deposition in Arabidopsis seed coat mucilage secretory cells[J]. Plant Physiology, 2015, 167(3): 711. DOI: [10.1104/pp.114.240671](https://doi.org/10.1104/pp.114.240671).
 - [12] BEN-TOV D, IDAN-MOLAKANDOV A, HUGGER A, et al. The role of COBRA-LIKE 2 function, as part of the complex network of interacting pathways regulating Arabidopsis seed mucilage polysaccharide matrix organization[J]. The Plant Journal, 2018, 94(3): 497. DOI: [10.1111/tbj.13871](https://doi.org/10.1111/tbj.13871).
 - [13] DAI X X, YOU C J, CHEN G X, et al. OsBC1L4 encodes a COBRA-like protein that affects cellulose synthesis in rice[J]. Plant Molecular Biology, 2011, 75(4/5): 333. DOI: [10.1007/s11103-011-9730-z](https://doi.org/10.1007/s11103-011-9730-z).
 - [14] SINDHU A, LANGEWISCH T, OLEK AMULTANI D S, et al. Maize Brittle stalk2 encodes a COBRA-like protein expressed in early organ development but required for tissue flexibility at maturity[J]. Plant Physiology, 2007, 145(4): 1444. DOI: [10.1104/pp.107.102582](https://doi.org/10.1104/pp.107.102582).
 - [15] CHING A, DHUGGA K S, APPENZELLER L, et al. Brittle stalk 2 encodes a putative glycosylphosphatidylinositol-anchored protein that affects mechanical strength of maize tissues by altering the composition and structure of secondary cell walls[J]. Planta, 2006, 224(5): 1174. DOI: [10.1007/s00425-006-0299-8](https://doi.org/10.1007/s00425-006-0299-8).
 - [16] BRADY S M, SONG S, DHUGGA K S, et al. Combining expression and comparative evolutionary analysis, the COBRA gene family[J]. Plant Physiology, 2007, 143(1): 172. DOI: [10.1104/pp.106.087262](https://doi.org/10.1104/pp.106.087262).
 - [17] DAI X X, YOU C J, WANG L, et al. Molecular characterization, expression pattern, and function analysis of the OsBC1L family in rice[J]. Plant Molecular Biology, 2009, 71(4/5): 469. DOI: [10.1007/s11103-009-9537-3](https://doi.org/10.1007/s11103-009-9537-3).
 - [18] CAO Y, TANG X F, GIOVANNONI J, et al. Functional characterization of a tomato COBRA-like gene functioning in fruit development and ripening[J]. BMC Plant Biology, 2012, 12: 211. DOI: [10.1186/1471-2229-12-211](https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-211).
 - [19] SANGI S, ARAÚJO P M, COELHO F S, et al. Genome-wide analysis of the COBRA-like gene family supports gene expansion through whole-genome duplication in soybean (*Glycine max*)[J]. Plants, 2021, 10(1): 167. DOI: [10.3390/plants10010167](https://doi.org/10.3390/plants10010167).
 - [20] 朱红芳,李晓峰,朱玉英.温度对紫色不结球白菜外观和营养品质的影响[J].西北植物学报,2019,39(2):268. DOI: [10.7606/j.issn.1000-4025.2019.02.0268](https://doi.org/10.7606/j.issn.1000-4025.2019.02.0268).
 - [21] 张玉琴,周蕾,王永,等.温度对烟草叶片细胞壁物质含量及组成变化的影响[J].江苏农业学报,2022,38(1):39. DOI: [10.3969/j.issn.1000-4440.2022.01.005](https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-4440.2022.01.005).
 - [22] ZHANG L, CAI X, WU J, et al. Improved Brassica rapa reference genome by single-molecule sequencing and chromosome conformation capture technologies[J]. Horticulture Research, 2018, 5(1): 50. DOI: [10.1038/s41438-018-0071-9](https://doi.org/10.1038/s41438-018-0071-9).
 - [23] ROUDIER F, FERNANDEZ A G, FUJITA M, et al. COBRA, an Arabidopsis extracellular glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein, specifically controls highly anisotropic expansion through its involvement in cellulose microfibril orientation[J]. The Plant Cell, 2005, 17(6): 1749. DOI: [10.1105/tpc.105.03173](https://doi.org/10.1105/tpc.105.03173).
 - [24] LI Y H, QIAN Q, ZHOU Y H, et al. BRITTLE CULM1, which encodes a COBRA-like protein, affects the mechanical properties of rice plants[J]. The Plant Cell, 2003, 15(9): 2020. DOI: [10.1105/tpc.011775](https://doi.org/10.1105/tpc.011775).
 - [25] PERSSON S, CAFFALL K H, FRESHOUR G, et al. The Arabidopsis irregular xylem8 mutant is deficient in glucuronoxylan and homogalacturonan, which are essential for secondary cell wall integrity[J]. The Plant Cell, 2007, 19(1): 237. DOI: [10.1105/tpc.106.047720](https://doi.org/10.1105/tpc.106.047720).
 - [26] NIU E L, SHANG X G, CHENG C Z, et al. Comprehensive analysis of the COBRA-like (COBL) gene family in Gossypium identifies two COBLs potentially associated with fiber quality[J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0145725. DOI: [10.1371/journal.pone.0145725](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145725).
 - [27] 盛松柏,田菊,庞晓明.冬枣 COBRA 基因家族全基因组鉴定及表达分析[J].分子植物育种,2018,16(1):61. DOI: [10.13271/j.mpb.016.000061](https://doi.org/10.13271/j.mpb.016.000061).
 - [28] 元志成,柯余生,吴富进,等.高粱COBRA基因家族全基因组的鉴定和表达分析[J].河南农业科学,2020,49(10):33. DOI: [10.15933/j.cnki.1004-3268.2020.10.005](https://doi.org/10.15933/j.cnki.1004-3268.2020.10.005).
 - [29] KO J H, KIM J H, JAYANTY S S, et al. Loss of function of COBAR, a determinant of oriented cell expansion, invokes cellular defence responses in Arabidopsis thaliana[J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(12): 2923. DOI: [10.1093/jxb/erl052](https://doi.org/10.1093/jxb/erl052).
 - [30] 郑密.低温、遮荫、干旱和氮素对棉 (*Gossypium hirsutum* L.) 纤维伸长期蛋白质组的影响及其与纤维长度形成的关系[D].南京:南京农业大学,2011.

责任编辑:何馨成