

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2011.00040

## 两个棉花 $\beta$ -葡聚糖酶新基因的结构与表达特征分析

董佳 蔡彩平 王立科 赵亮 张天真 郭旺珍\*

南京农业大学 / 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏南京 210095

**摘要:**  $\beta$ -葡聚糖酶是一类能降解  $\beta$ -葡聚糖的水解酶。本研究分别通过电子克隆和棉纤维发育 cDNA 文库筛选法克隆到 2 个棉花  $\beta$ -葡聚糖酶新基因, 内切-1,4- $\beta$ -葡聚糖酶基因(*GhEG*, GenBank 登录号为 HM462003)和 1,3- $\beta$ -葡聚糖酶基因(*GhGLU*, GenBank 登录号为 HM462004)。 *GhEG* 全长 ORF 为 1 581 bp, 编码 526 个氨基酸残基。 *GhGLU* 全长 ORF 为 1 410 bp, 编码 469 个氨基酸残基。基因组水平分析表明, *GhEG* 含 5 个内含子和 6 个外显子, 而 *GhGLU* 无内含子, 仅 1 个外显子。新克隆的 2 个基因在二倍体棉种非洲棉和雷蒙德氏棉中含 1 个拷贝, 而在四倍体陆地棉和海岛棉中存在 2 个拷贝。通过开发 SNP 标记分别将 *GhEG* 和 *GhGLU* 在四倍体中的 1 个拷贝定位在第 19 染色体和第 4 染色体上。Q-PCR 表达分析表明, *GhEG* 在根、茎、叶中表达水平很低, 而在纤维伸长期优势表达, 在 15 DPA 和 20 DPA 纤维中, 该基因在海岛棉海 7124 中的转录本显著高于陆地棉 TM-1。 *GhGLU* 在根、茎、叶及纤维发育不同时期均有表达, 属于组成性表达基因, 特别在根、纤维发育初始期和伸长期优势表达, 且表达水平在陆地棉 TM-1 和海岛棉海 7124 间也有显著差异。

**关键词:** 内切-1,4- $\beta$ -葡聚糖酶; 1,3- $\beta$ -葡聚糖酶; 结构; 表达

## Structure and Expression Analysis of Two Novel Genes Encoding $\beta$ -glucanase in Cotton

DONG Jia, CAI Cai-Ping, WANG Li-Ke, ZHAO Liang, ZHANG Tian-Zhen, and GUO Wang-Zhen\*

National Key Laboratory of Crop Genetics & Germplasm Enhancement / Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

**Abstract:** The  $\beta$ -glucanase is a type of enzyme degrading  $\beta$ -glucan. Cloning and expression analysis of genes encoding  $\beta$ -glucanase can provide information in both gene resources and breeding utilization for improvement of cotton fiber quality. The two novel genes encoding  $\beta$ -glucanase, designated as *GhEG* (GenBank accession No. HM462003) and *GhGLU* (GenBank accession No. HM462004), were obtained by silico cloning and cDNA library screening, respectively. *GhEG* contained an open reading frame of 1 581 bp that encoded a polypeptide of 526 amino acids, and *GhGLU* contained an open reading frame of 1 410 bp that encoded a polypeptide of 469 amino acids. The genome sequence indicated that *GhEG* has five introns and six exons, while *GhGLU* has no intron and only one exon. The two genes all had one copy in diploid cotton species *G. herbaceum* and *G. raimondii* and two copies in tetraploid cotton species *G. hirsutum* acc. TM-1 and *G. barbadense* cv. Hai 7124, respectively. One of *GhEG* or *GhGLU* homologs in tetraploid was located on chromosome 19 and chromosome 4 by developing SNP marker, respectively. Q-PCR expression analysis showed that *GhEG* was expressed specifically in fiber elongation and had obvious difference between TM-1 and Hai7124 at the fiber elongation period of 15 DPA and 20 DPA, almost no transcripts were detected in root, stem and leaf. *GhGLU* was expressed in all tissues, dominantly in root, at fiber initiation and fiber late elongation phase, with obvious difference between TM-1 and Hai7124.

**Keywords:** *GhEG*; *GhGLU*; Structure; Expression

$\beta$ -葡聚糖酶是一类能降解  $\beta$ -葡聚糖的水解酶类总称。包括内切和外切  $\beta$ -1,3 葡聚糖酶、 $\beta$ -(1,3-1,4)-葡聚糖酶、内切和外切  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶等。内切-

1,4- $\beta$ -葡聚糖酶(EGases), 俗称纤维素酶, 是一类普遍存在于原核生物和真核生物体内的水解酶, 它可以催化水解具有 1,4- $\beta$ -葡聚糖主链的多聚糖, 以随

本研究由国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2006AA10Z111), 转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX08009-003)和教育部 111 项目(B08025)资助。

\* 通讯作者(Corresponding author): 郭旺珍, E-mail: moelab@njau.edu.cn

Received(收稿日期): 2010-06-10; Accepted(接受日期): 2010-08-04.

机的作用方式将多聚糖降解成为糊精或寡聚糖<sup>[1-2]</sup>。一些 EGases 是在果实成熟或叶片脱落过程中特异表达, 而另一些 EGases 在正在伸展的细胞中高量表达, 这表明 EGases 对植物的生长发育可能具有广泛的作用<sup>[3-4]</sup>。已知的  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶均属于糖基水解酶第十七家族, 其成员具有共同的氨基酸序列结构<sup>[5]</sup>。 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶分为外切酶和内切酶, 目前主要研究的是内切酶。 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶在植物的细胞分裂、小孢子发生、花粉萌发、育性、韧皮部胼胝质去除、受精、种子萌芽及生长调控等过程中都具有作用<sup>[6]</sup>。

棉纤维是胚珠外珠被单个表皮细胞分化发育而成, 是一种优良的天然纤维。其形成和发育可分为起始分化、纤维伸长或初生壁形成、次生壁合成及脱水成熟 4 个时期。这 4 个时期分隔明显但有部分重叠<sup>[7]</sup>。起始分化一般在开花前 3 d 到开花当天(-3~0 DPA), 纤维伸长在 1~25 DPA, 次生壁合成在 16~40 DPA, 脱水成熟在 40~50 DPA<sup>[8-9]</sup>。据估计, 棉花纤维发育过程中有上千特异基因表达, 但到目前为止, 仅有少数基因被分离鉴定<sup>[10]</sup>。已克隆到的  $\beta$ -葡聚糖酶基因在棉纤维中优势表达<sup>[11]</sup>, 也有一些在其他组织、器官中表达<sup>[12-13]</sup>。

本研究利用电子克隆和棉纤维发育 cDNA 文库筛选法分别获得 2 个与棉花纤维发育相关的  $\beta$ -葡聚糖酶新基因, 并对其基因组结构和表达特征进行了系统研究, 研究结果有望为棉纤维品质改良和提高棉花抗病性提供基因资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

2008—2009 年于南京农业大学网室种植陆地棉遗传标准系 TM-1 和海岛棉海 7124。在植株生长盛花期, 分别采集 2 个材料的 0 DPA 和 5 DPA 的胚珠纤维混合物, 10、15 和 20 DPA 的纤维, 于液氮中速冻, -70℃ 冰箱保存。根、茎和叶样品取自有五、六片真叶的棉花幼苗。

### 1.2 目的基因片段的获得

基于遗传标准系 TM-1 和海岛棉海 7124 基因芯片在纤维发育 15 DPA 的竞争杂交结果, 获得一个海 7124 优势表达 EST 序列(NCBI 登录号为 CM122B12)。以该 EST 序列为探针, 对陆地棉的 dbEST 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, 2009) 进行 tBlastn 比对。将获得的 EST 序列用 CAP3 拼接后形成 Contig, 然后以 Contig 为探针, 再次采用 Blastn 方式进行检索, 直至检出的 Contig 不能再延伸。对电子拼接获得的序列进行 ORF 预测、Blastp 和多重序列比较将其分类命名; 本研究克隆的另一个新基因是根据本实验室前人整理的棉花纤维发育 cDNA 文库中的测序结果, 选取 1 个可能与糖代谢相关的 cDNA 克隆进行研究, 测序并获得 1 条 ORF 完整的序列。根据目标序列生物信息学分析结果, 分别设计全长 ORF 引物和 Q-PCR 引物进行目标基因全长 ORF 验证和表达特征分析。表 1 示本研究中涉及的所有引物信息。所有引物合成和 DNA 序列测定由南京金斯瑞生

表 1 本研究所用引物  
Table 1 Primer pairs used in this study

基因名称 Gene name	引物编号 Primer No.	引物序列 Primer sequence (5'-3')	用途 Purpose
<i>GhEG</i>	Y3775F/R	TTTTACGACTGTCCGATGAGA TAGGGAAGCGTGGTATTGA	全长引物 Primer for full-length ORF amplification
	Y3561F	CATCTAACTCGGCATACTCAAGCAC	RT-PCR 引物 RT-PCR primer
	Y3562R	GCCACATTAGGATTCGGTTTCAG	
	Y3476F/R	CAACCGAATCCTAATGTGGC GCAGATGAGGTAGTGACCAAAC	定量引物 Q-PCR primer
	Y5612F	AATGAGCATACTTTTGTTCATAGTCGC	SNP 引物 SNP primer
	Y5613R	GAGTTAGATGTCTTAAACACCAGAGATGC	
<i>GhGLU</i>	Y5615F/R	AAAACAGCGTTCAAATCCTC TTCTCCACTTCAATGCCCT	全长引物 Primer for full-length ORF amplification
	Y2377F/R	TACTTTCATCCACCGCTGCT CGTTACCCGAATCTACTACACC	定量/RT-PCR 引物 Q-PCR and RT-PCR primer
	Y6099F	GAAAGCCGATGAGAAGAAGTTACAATCA	SNP 引物 SNP primer
	Y6100R	AATGCCCTGTTGAAACTCACAAC	

物科技有限公司完成。

### 1.3 序列的生物信息学分析

利用 NCBI 中 Blast 程序在蛋白数据库中进行相似性搜索, 获得测序片段的相关功能信息; 利用 DNASTAR (Ver. 5.01) 软件完成 ORF, 等电点和分子量预测; ClustalX (Ver. 1.81) 软件进行多重序列比对和进化树分析。

### 1.4 不同棉种基因组序列分析

利用扩增基因全长引物在陆地棉 TM-1、海岛棉海 7124、雷蒙德氏棉 (*G. raimondii*) 和阿非利加棉 (*G. herbaceum*) 基因组中分别扩增这 2 个基因。PCR 产物回收, 连接转化, 对每一基因分别从来自 TM-1 和海 7124 中的阳性克隆中随机挑选 10 个克隆, 从雷蒙德氏棉和阿非利加棉的阳性克隆中随机挑选 3 个克隆, 进行测序, 分别进行目标基因在不同棉种中的拷贝数和同源基因的确定<sup>[14]</sup>。进一步利用 MEGA 软件 (<http://www.megasoftware.net/>) 分析该基因在四倍体中亚基因组来源。

### 1.5 基因的染色体定位

分别根据 2 个基因在 TM-1 和海 7124 中基因序列差异, 开发 SNP 标记, 检测 TM-1 和海 7124 间分子差异及在其 140 个单株的 BC<sub>1</sub> 作图群体中的分离情况, 进一步利用 JoinMap 软件<sup>[15]</sup>将多态位点整合到 Guo 等<sup>[16]</sup>构建的海陆遗传图谱上, 完成基因的染色体定位。

### 1.6 总 RNA 和 DNA 的提取

采用改进的热硼酸法提取 10、15 和 20 DPA 的纤维组织<sup>[17]</sup>, 采用 CTAB-酚法<sup>[18]</sup>提取棉花 TM-1 0 DPA 和 5 DPA 的胚珠和纤维总 RNA 和棉花 5~6 片真叶时的根、茎和叶总 RNA; 采用 CTAB 法<sup>[19]</sup>从新鲜幼嫩的叶片提取 DNA。

### 1.7 实时荧光定量 RT-PCR 反应

实时荧光定量 PCR 在 iCycler iQ5 荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad, USA) 上进行, 棉花内参基因 EF1 $\alpha$  作为平行反应被扩增。Bio-Rad 公司的 SYBR Green I (SGI) 是一种与双链 DNA 特异结合的荧光染料, 能显示 PCR 反应中扩增的 DNA。反应组分加在专用的定量 PCR 管中, 反应体系含 10 $\times$ PCR buffer 2.0  $\mu$ L、25 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 1.2  $\mu$ L、10 mmol L<sup>-1</sup> dNTP Mix 0.4  $\mu$ L、10  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> 正向引物和反向引物各 1  $\mu$ L、cDNA 第一链模板 1  $\mu$ L 和 rTaq 酶 (5 U  $\mu$ L<sup>-1</sup>, TaKaRa) 0.1  $\mu$ L, 加无菌超纯水至 20  $\mu$ L; 扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 55~60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸

30 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 以熔解曲线结束。计算公式<sup>[20]</sup>如下, 目的基因相对表达量 =  $2^{-\Delta Ct}$ ;  $\Delta Ct = Ct$  目的基因 - CtEF1 $\alpha$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 GhEG 和 GhGLU 全长 cDNA 获得及其序列分析

按 1.2 方法, 获得一个新的 cDNA 全长基因。该全长序列与已报道的蓖麻 (*Ricinus communis*) 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的内切-1,4- $\beta$ -葡聚糖酶 (EG) 分别有 85% 和 82% 的同源性, 因此将该基因命名为 GhEG, GenBank 登录号为 HM462003。另 1 个可能与糖代谢相关的 cDNA 克隆其全长序列与已报道的枣 (*Ziziphus jujuba*) 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因 (GLU) 都有 63% 的同源性, 因此将该基因命名为 GhGLU, GenBank 登录号为 HM462004。

用 EditSeq 软件分别对 GhEG 和 GhGLU cDNA 序列进行分析, 结果显示 GhEG 和 GhGLU 的 ORF 分别为 1 581 bp/1 410 bp, 分别编码 526 个和 469 个氨基酸残基。用 ExPASy pI/Mw 程序对这 2 个基因氨基酸序列进行一级结构的预测发现, GhEG 和 GhGLU 理论上的等电点分别为 6.38 和 5.31, 分子量分别为 56.94 和 50.30 kD。进一步对其蛋白质结构预测分析发现, GhEG 和 GhGLU 均编码的是一个蛋白前体, 它们在被合成之后将通过分泌途径运输到其作用部位或被分泌到细胞外。

### 2.2 GhEG 和 GhGLU 系统进化分析

为进一步明确棉花 GhEG 和 GhGLU 与已报道的棉花和其他植物中亲缘关系相近的基因间进化关系, 从 NCBI 网站中搜索了陆地棉 (*Gossypium hirsutum*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、水稻 (*Oryza sativa*)、蓖麻 (*Ricinus communis*)、大豆 (*Glycine max*)、枣 (*Ziziphus jujube*)、烟草 (*Nicotiana tabacum*) 等植物中同源性高的基因, 同时也加入从海岛棉 (*Gossypium barbadense*) 中克隆的 GbGLU<sup>[13]</sup>, 与本实验新克隆的内切-1,4- $\beta$ -葡聚糖酶基因和 1,3- $\beta$ -葡聚糖酶基因分别进行氨基酸的多重序列比较和进化树分析。结果表明, 来源于上述植物中的内切-1,4- $\beta$ -葡聚糖酶和 1,3- $\beta$ -葡聚糖酶基因都含有与棉花 GhEG 和 GhGLU 相同的保守结构域, 新克隆的棉花 GhEG 和 GhGLU 均与蓖麻的同源基因亲缘关系最近, 而与棉花中已报道的几个内切-1,4- $\beta$ -葡聚糖酶基因

和 1,3-β-葡聚糖酶基因亲缘关系均较远。图 1~图 2 和图 3~图 4 分别表示不同来源内切-1,4-β-葡聚糖酶

和 1,3-β-葡聚糖酶基因编码氨基酸多重序列比较和进化树分析结果。

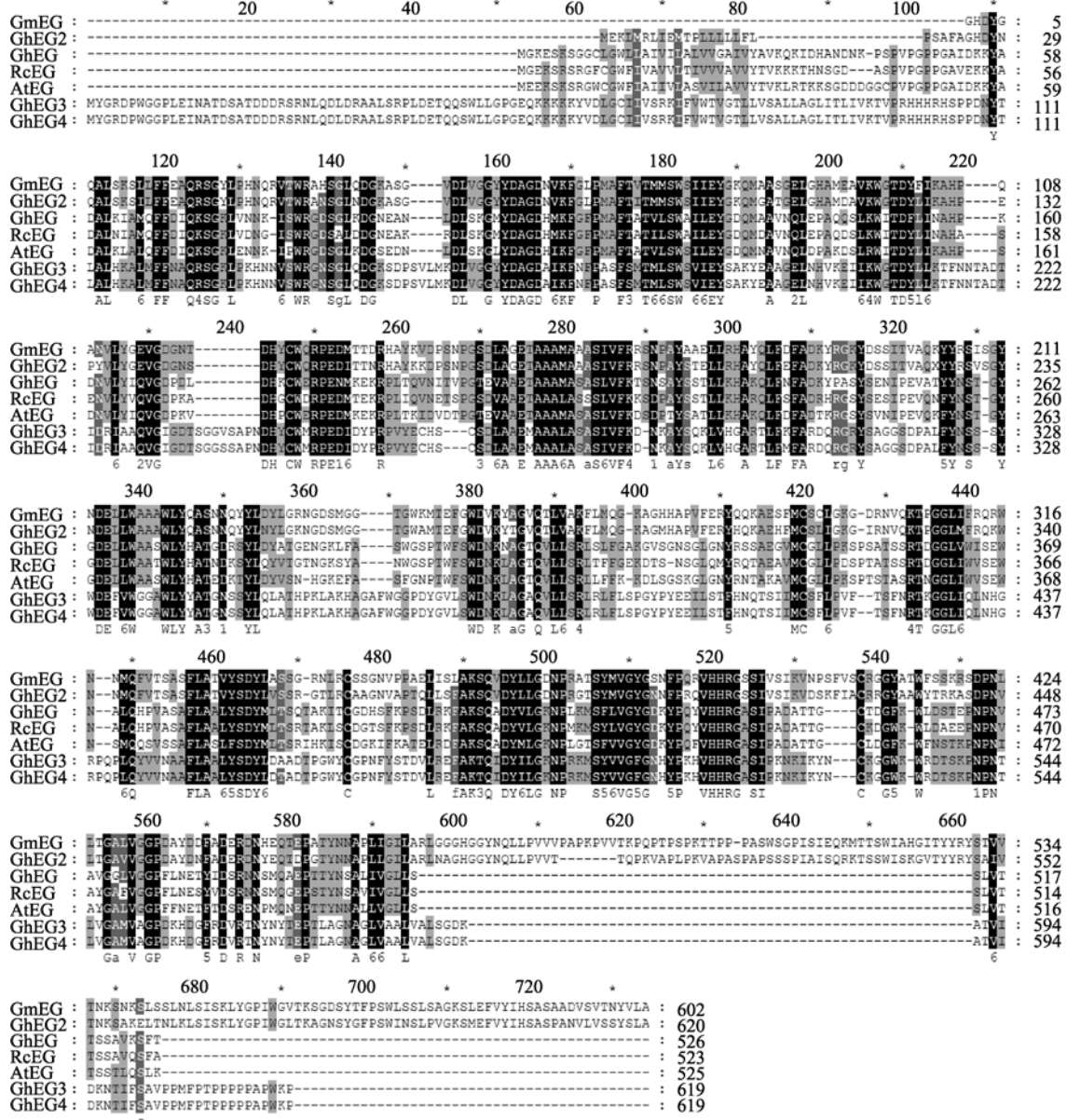


图 1 棉花 *GhEG* 与来源于其他植物的外切 β-1,4-葡聚糖酶的序列比对

Fig. 1 Multiple alignment of *GhEG* with glucanases from other plants

### 2.3 *GhEG* 和 *GhGLU* 在不同棉种基因组序列分析

*GhEG* 和 *GhGLU* 的基因组全长分别为 3 170 bp/1 820 bp, *GhEG* 有 5 个内含子, 6 个外显子; 而 *GhGLU* 属于单外显子。它们在二倍体棉种中仅出现一种序列类型, 而在四倍体棉种中出现 2 种序列类型。结合序列聚类分析结果, 推测它们在二倍体棉种中均为一个拷贝, 而在四倍体棉种中有 2 个拷贝, 且在四倍体棉种中均呈亚基因组独立进化模式(图

5)。多外显子的 *GhEG* 在不同棉种中其剪切位点均完全一致。

### 2.4 *GhEG* 和 *GhGLU* 基因的染色体定位

分别根据 *GhEG* 和 *GhGLU* 基因组序列在 TM-1 和海 7124 棉种间的 SNP 位点差异, 开发仅在海 7124 中有扩增产物的 SNAP 引物。进一步用差异引物检测其在 BC<sub>1</sub> 作图群体的多态性, 获得其多态分离信息。利用 JoinMap 3.0 作图软件与本实验室的骨架标记整合, 将 *GhEG* 和 *GhGLU* 在四倍体棉种中的

一个拷贝分别定位在第 19 染色体和第 4 染色体上(图 6)。由于序列的一致性,不能在 TM-1 和海 7124 棉种间开发出 *GhEG* 和 *GhGLU* 另一个拷贝多态的分子标记,无法完成其染色体定位,但根据四倍体棉种部分同源染色体特性和其在不同棉种基因组序列分析结果,推测它们的另一个拷贝应该分别在相应的部分同源群第 5 染色体和第 22 染色体上。

### 2.5 *GhEG* 和 *GhGLU* 的 Q-PCR 分析

分别以陆地棉遗传标准系 TM-1 和海岛棉海 7124 的幼根、茎、叶、0 和 5 DPA 胚珠纤维混合物、10、15、20 DPA 纤维的总 RNA 作为模板,以持家基因 *EF1a* 为内参,进行不同发育期相对表达水平比较。结果表明(图 7),*GhEG* 转录本在海 7124 的 15 DPA 纤维发育期的表达量显著高于陆地棉 TM-1,与基因芯片检测结果完全吻合。*GhEG* 在根、茎、叶中表达很低,而在纤维伸长期优势表达,特别在 15 DPA 和 20 DPA 纤维中,该基因在海岛棉海 7124

中的转录本显著高于陆地棉 TM-1。*GhEG* 在纤维伸长期的表达特点表明其与纤维伸长发育密切相关。

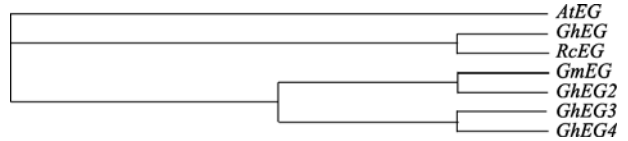


图 2 棉花 *GhEG* 与来源于其他植物的葡聚糖酶的聚类分析  
Fig. 2 Phylogenetic analysis of *GhEG* with glucanases from other plants

*GhEG*: 陆地棉(登录号: HM462003); *AtEG*: 拟南芥(登录号: AAM63477.1); *GhEG2*: 陆地棉(登录号: AAN04496.2); *RcEG*: 蓖麻(登录号: XP\_002510516.1); *GmEG*: 大豆(登录号: ABC94542.1); *GhEG3*: 陆地棉(登录号: AAS87601); *GhEG4*: 陆地棉(登录号: AAP83128)

*GhEG*: *Gossypium hirsutum* (GenBank accession No. HM462003); *AtEG*: *Arabidopsis thaliana* (GenBank accession No. AAM63477.1); *GhEG2*: *Gossypium hirsutum* (GenBank accession No. AAN04496.2); *RcEG*: *Ricinus communis* (GenBank accession No. XP\_002510516.1); *GmEG*: *Glycine max* (GenBank accession No. ABC94542.1); *GhEG3*: *Gossypium hirsutum* (GenBank accession No. AAS87601); *GhEG4*: *Gossypium hirsutum* (GenBank accession No. AAP83128).

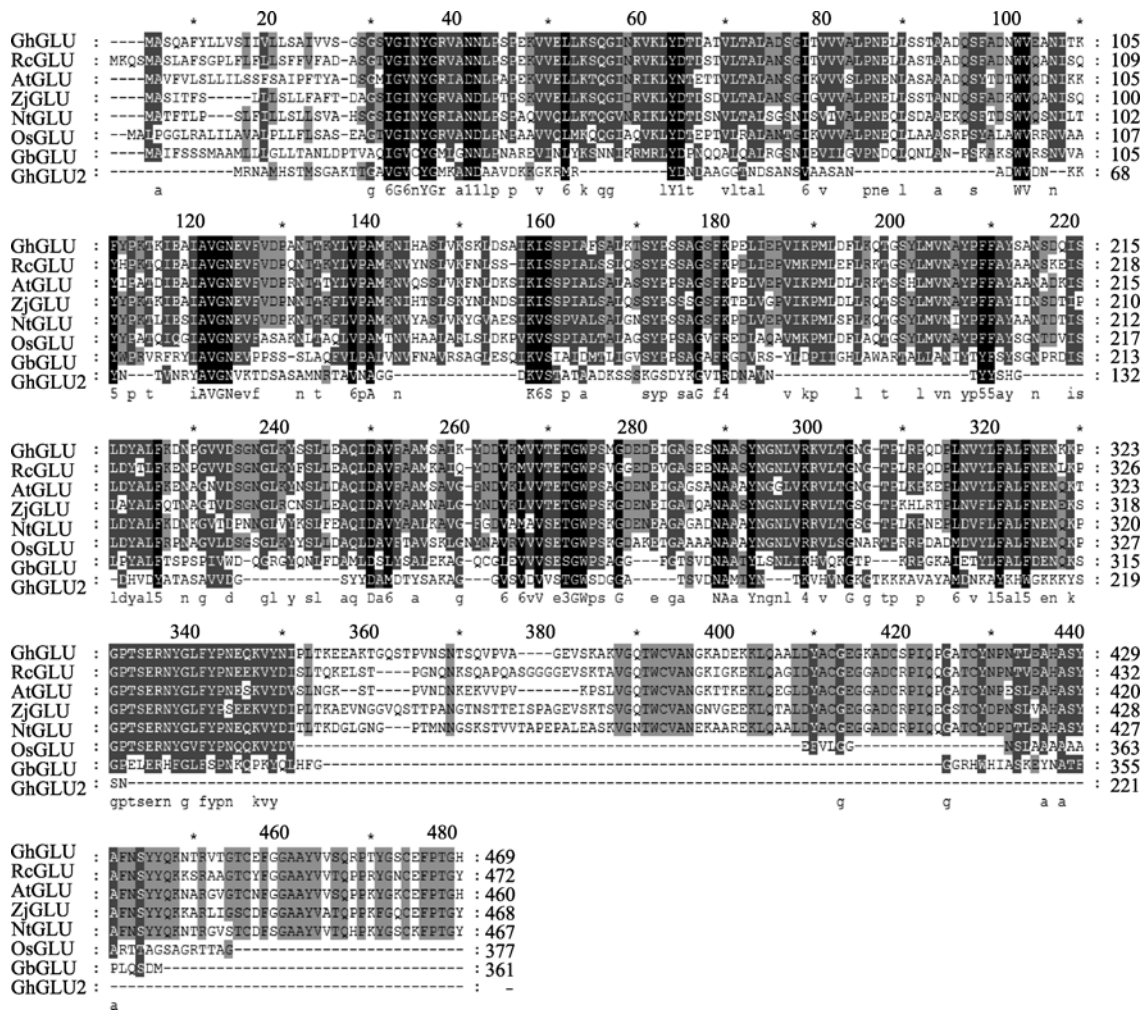


图 3 棉花 *GhGLU* 与来源于其他植物的  $\beta$ -葡聚糖酶的序列比对  
Fig. 3 Multiple alignment of *GhGLU* with glucanases from other plants

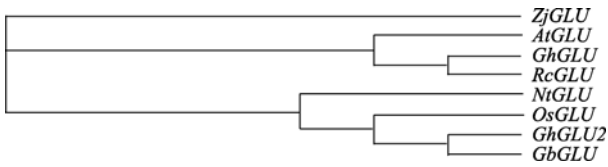


图 4 棉花 *GhGLU* 与来源于其他植物的 β-葡聚糖酶的聚类分析  
Fig. 4 Phylogenetic analysis of *GhGLU* with glucanases from other plants

*GhGLU*: 陆地棉(登录号: HM462004); *ZjGLU*: 枣(登录号: AAZ40342.1); *AiGLU*: 拟南芥(登录号: AAM66024.1); *RcGLU*: 蓖麻(登录号: XP-002529472.1); *NiGLU*: 烟草(登录号: BAB17320.1); *OsGLU*: 水稻(登录号: AAD10386.1); *GhGLU2*: 陆地棉(登录号: CAA92278); *GbGLU*: 海岛棉<sup>[13]</sup>。  
*GhGLU*: *Gossypium hirsutum* (GenBank accession No. HM462004); *ZjGLU*: *Ziziphus jujube* (GenBank accession No. AAZ40342.1); *AiGLU*: *Arabidopsis thaliana* (GenBank accession No. AAM66024.1); *RcGLU*: *Ricinus communis* (GenBank accession No. XP-002529472.1); *NiGLU*: *Nicotiana tabacum* (GenBank accession No. BAB17320.1); *OsGLU*: *Oryza sativa* (GenBank accession No. AAD10386.1); *GhGLU2*: *Gossypium hirsutum* (GenBank accession No. CAA92278); *GbGLU*: *Gossypium barbadense*<sup>[13]</sup>.

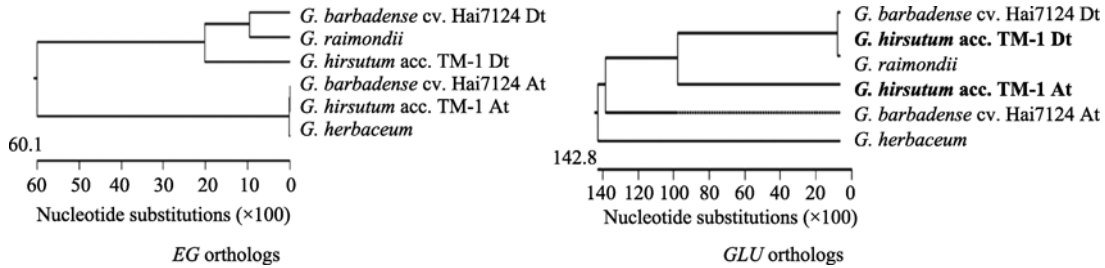


图 5 *EG* 和 *GLU* 基因在非洲棉、雷蒙德氏棉、TM-1 和海 7124 中聚类分析  
Fig. 5 Phylogenetic tree for *EG* and *GLU* orthologs in *G. herbaceum*, *G. raimondii*, *G. hirsutum*, and *G. barbadense*

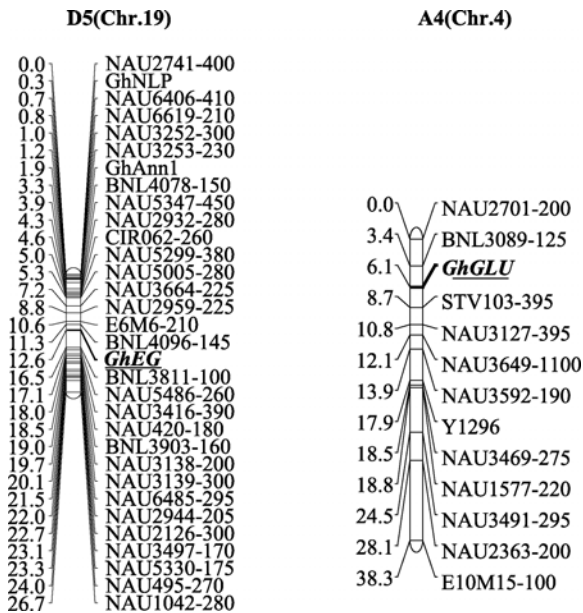


图 6 *GhEG* 和 *GhGLU* 基因的定位结果  
Fig. 6 Mapping of *GhEG* and *GhGLU* in tetraploid cotton

*GhGLU* 在根、茎、叶及纤维发育不同时期均有表达, 属于组成性表达基因。相对于茎和叶, 在根里表达量最高, 且在海 7124 的根中表达量显著高于在 TM-1 根中。该基因主要在纤维起始期和伸长后期优势表达, 且表达水平在陆地棉 TM-1 和海岛棉海 7124 间也有显著差异。陆地棉 TM-1 中在纤维发育 0 DPA 和 20 DPA 优势表达, 而海岛棉海 7124 中在 15 DPA 表达量最高(图 7)。

### 3 讨论

#### 3.1 内切 β-1,4-葡聚糖酶基因在棉纤维发育中的可能功能

植物在自然条件下生长、开花、果实成熟、器官脱落等过程均可诱导内切 β-1,4-葡聚糖酶基因表达, 表明该基因在植物生长的不同发育阶段均起作用。因此研究植物内切 β-1,4-葡聚糖酶基因的克隆、

表达调控模式、编码蛋白的结构及底物对于全面了解内切 β-1,4-葡聚糖酶基因表达特征及与植物的生理效应关系具有重要指导意义。

到目前为止, 棉花中已克隆了多个 β-1,4-葡聚糖酶基因(GenBank 登录号分别为 BAA21111、AANO4496、AAS87601、AAP83128 等), 这些基因编码的产物均属于纤维素酶类, 参与了棉花纤维的伸长。本文新克隆的编码 526 个氨基酸的 *GhEG* 基因与来源于棉花和其他植物中的 β-1,4-葡聚糖酶基因高度同源, 均含有糖基水解酶第 9 家族的完整保守结构域。该基因在纤维伸长期优势表达, 且在海 7124 15 DPA 和 20 DPA 中表达量显著高于 TM-1。Brummell 等<sup>[21]</sup>报道根据植物 *EG* 保守序列设计简并引物从番茄 cDNA 文库中分离出 1 个 *Cel3* 基因, 推测 *Cel3* 可能与植物纤维素合成有关; Shani 等<sup>[22]</sup>通过简并 PCR 引物从拟南芥中分离出的一个 *EG* 基因 *cell*, 证明 *cell* 基因的表达和植物细胞的伸长发育相关。陆地棉和海岛棉是两大四倍体栽培棉种, 与陆地棉 TM-1 相比, 海

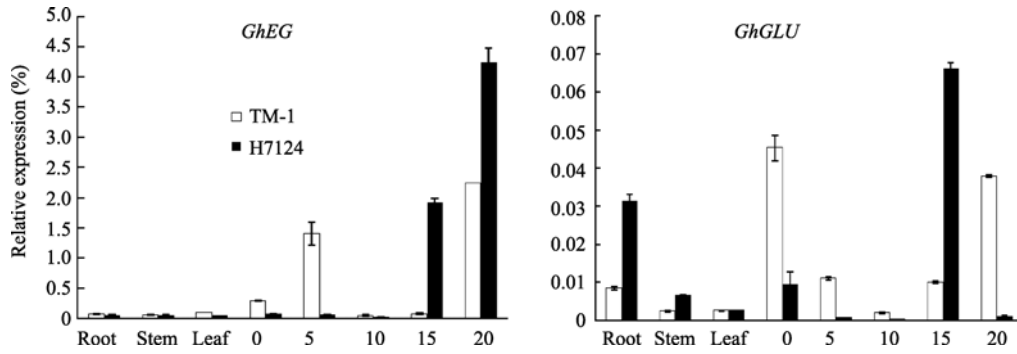


图 7 *GhEG* 和 *GhGLU* 基因在 TM-1 和海 7124 中的表达分析  
Fig. 7 *GhEG* and *GhGLU* expression pattern in TM-1 and Hai7124

0、5、10、15 和 20 分别代表 0 DPA 和 5 DPA 胚珠纤维混合物、10、15 和 20 DPA 纤维组织。  
0, 5, 10, 15, 20 indicates 0 DPA and 5 DPA mixture of ovule and fibers, 10, 15, and 20 DPA fiber tissues, respectively.

岛棉海 7124 具有更长、更细、更强的纤维, *GhEG* 在棉纤维中特异表达, 且纤维伸长后期在海 7124 中表达量显著高于 TM-1。因此, 推测该基因表达与纤维的伸长发育有关, 在纤维伸长后期的高表达可进一步有效延长纤维伸长时期。目前, 已报道通过转基因的手段可调控植物内切  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶基因表达, 进而影响植物生理功能<sup>[23-24]</sup>。对于在纤维发育期专化表达的 *GhEG* 基因, 笔者将进一步利用转基因技术阐明其在纤维品质形成中的作用机理。

### 3.2 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因在植物体内的可能功能

$\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因在植物中是一个大的基因家族。许多研究表明, 它参与植物的多种正常生理过程, 包括细胞分裂、小孢子发生、花粉萌发、受精、种子萌芽及植物生长调控等过程<sup>[25-27]</sup>。本文克隆的 cDNA 全长 2 088 个核苷酸, 共编码 469 个氨基酸残基, 与棉花及其他植物中的  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因高度同源, 均含有糖基水解酶第 17 家族的完整保守结构域。它在纤维起始和伸长早期(0~5 DPA), 纤维发育初生-次生壁转换期(15~20 DPA)均优势表达, 且在海 7124 和 TM-1 中表达水平有显著差异。暗示该基因与纤维发育密切相关。前人也对该家族中纤维专化表达的一个  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因在不同棉种中的表达特征进行了系统研究, 利用该基因的部分 cDNA 序列(*GhGluc1* 登录号为 D88416)设计 RT-PCR 引物进行不同纤维发育时期表达分析, 发现该基因在短纤维品种中的表达量很高, 而在中长纤维品种中的表达量却较低<sup>[28]</sup>, 同时也发现 *GhGluc1* 的高表达促进胼胝质的降解, 进而打开胞间连丝, 导致纤维细胞膨压减少, 纤维伸长动力不足。本文克隆的 *GhGLU* 基因是否在纤维发育中与 *GhGluc1* 有相似功能, 尚需进一步研究。

$\beta$ -1,3-葡聚糖酶是重要的水解酶。在正常情况下, 它的表达水平很低, 但当其遭受病原物、昆虫取食等生物因子以及乙烯、细胞分裂素、紫外线、机械损伤、金属离子等非生物因子诱导后, 迅速积累, 表达活性显著增强。McFadden 等<sup>[29]</sup>对登录号为 CAA92278 的棉花  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因的研究发现, 该基因参与了棉花对黄萎病的防卫反应。Jongedijk 等<sup>[30]</sup>将烟草的  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因转化番茄时发现, 番茄发病率降低 36%~58%。众所周知, 海 7124 具有强的抗黄萎病特点。在本研究中, *GhGLU* 在海 7124 根中的表达量比 TM-1 显著高, 暗示该基因与棉花黄萎病抗性可能有直接的关系, 可能是棉花抗黄萎病育种的良好抗源基因。

## 4 结论

从陆地棉中克隆出 2 个基因, 分别编码内切-1,4- $\beta$ -葡聚糖酶(*GhEG*)和 1,3- $\beta$ -葡聚糖酶(*GhGLU*)。 *GhEG* 含 5 个内含子和 6 个外显子, 而 *GhGLU* 无内含子, 仅 1 个外显子。新克隆的 2 个基因在二倍体棉种非洲棉和雷蒙德氏棉中含 1 个拷贝, 而在四倍体陆地棉和海岛棉中存在 2 个拷贝。分别将 2 个基因在四倍体棉种中的一个拷贝定位在第 19 染色体上和第 4 染色体上。*GhEG* 是纤维发育特异表达基因, 在纤维伸长期优势表达, 在海岛棉海 7124 中的转录本显著高于陆地棉 TM-1。 *GhGLU* 是组成性表达基因, 在根, 纤维初始期和伸长后期优势表达, 且表达水平在陆地棉 TM-1 和海岛棉 H7124 间存在显著差异。

## References

- [1] Won G Y, Fincher G B, Maclachlan G A. Cellulases can enhance beta-glucansynthesis. *Science*, 1977, 195: 679-681

- [2] Hayashi T, Wong Y S, Maclachlan G. Pea Xyloglucan and cellulose: II. hydrolysis by pea endo-1,4- $\beta$ -glucanases. *Plant Physiol*, 1984, 75: 605–610
- [3] Lashbroo K C C, Bennet T A B. Two divergent endo-beta-1,4-glucanase genes exhibit overlapping expression in ripening fruit and abscising flowers. *Plant Cell*, 1994, 6: 1485–1493
- [4] Catalac C, Rose J K C, Bennett A B. Auxin regulation and spatial localization of an endo-1,4-beta-D-glucanase and a xyloglucan endo-transglycosylase in expanding tomato hypocotyls. *Plant J*, 1997, 12: 417–426
- [5] Chang M M, Culley D E, Hadwiger L A. Nucleotidesequence of a pea (*Pisum sativum* L.)  $\beta$ -1,3-glucanase gene. *Plant Physiol*, 1993, 101: 1121–1122
- [6] Abeles F B, Bosshart R P, Forrence L E. Preparation and purification of glucanase and chitinase from bean leaves. *Plant Physiol*, 1971, 47: 129–134
- [7] Basra A S, Malik C P. Development of cotton fiber. *Int Rev Cytol*, 1984, 89: 65–113
- [8] Turley R B, Ferguson D L. Changes of ovule proteins during early fiber developing in a normal and a fiberless line of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *J Plant Physiol*, 1996, 149: 695–702
- [9] Orford S J, Timmis J N. Abundant mRNAs specific to the developing cotton fiber. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 909–918
- [10] Kim H J, Triplett B A. Cotton fiber growth in planta and in vitro models for plant cell elongation and cell wall biogenesis. *Plant Physiol*, 2001, 127: 1361–1366
- [11] Shimizu Y, Aotsuka S, Hasegawa O, Kawada T, Sakuno T, Sakai F, Hayashi T. Changes in levels of mRNAs for cell wall-related enzymes in growing cotton fiber cells. *Plant Cell Physiol*, 1997, 38: 375–378
- [12] McFadden H G, Chapple R, Feyter D E, Dennis E. Expression of pathogenesis-related genes in cotton stem in response to infection by *Verticillium dahliae*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2001, 58: 119–131
- [13] Gao Y-L(高玉龙), Guo W-Z(郭旺珍), Wang L(王磊), Zhang T-Z(张天真). Cloning and characterization of one  $\beta$ -1,3-glucanase gene cDNA in cotton (*Gossypium barbadense* L.). *Acta Agron Sin* (作物学报), 2007, 33(8): 1310–1315 (in Chinese with English abstract)
- [14] Cronn R C, Small R L, Haselkorn T, Wendel J F. Rapid diversification of the cotton genus (*Gossypium: Malvaceae*) revealed by analysis of sixteen nuclear and chloroplast gene. *Am J Bot*, 2002, 89: 707–725
- [15] Van Ooijen J W, Voorrips R E. JoinMapR Version 3.0: Software for the Calculation of Genetic Linkage Maps. 2001, CPRO-DLO, Wageningen
- [16] Guo W Z, Cai C P, Wang C B, Han Z G, Song X L, Wang K, Niu X W, Wang C, Lu K Y, Shi B, Zhang T Z. A microsatellite-based, gene-rich linkage map in tetraploid cotton reveals genome structure, function and evolution in *Gossypium*. *Genetics*, 2007, 176: 527–541
- [17] Wu Y-T(武耀廷), Liu J-Y(刘进元). A modified hot borate method for efficient isolation of total RNA from different cotton tissues. *Cotton Sci* (棉花学报), 2004, 16(2): 67–71 (in Chinese with English abstract)
- [18] Jiang J-X(蒋建雄), Zhang T-Z(张天真). Tissues with CTAB-acidic phenolic method. *Cotton Sci* (棉花学报), 2003, 15(3): 166–167 (in Chinese with English abstract)
- [19] Paterson A H, Brubaker C L, Jonathan F. Rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis. *Plant Mol Biol Rep*, 1993, 11: 122–127
- [20] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the  $2(-\Delta\Delta C(T))$  method. *Methods*, 2001, 25: 402–408
- [21] Brummell D A, Catala C. A membrane-anchored E-type endo-1,4-beta-glucanase is localized on Golgi and plasma membranes of higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 4794–4799
- [22] Shani Z, Dekel M. Cloning and characterization of elongation specific endo-1,4-beta-glucanase (cell1) from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 1997, 34: 837–842
- [23] Palomer X, Llop T I, Vendrell M. Antisense down-regulation of strawberry endo- $\beta$ -(1,4)-glucanase genes does not prevent fruit softening during ripening. *Plant Sci*, 2006, 5: 640–646
- [24] Harpster M H, Dawson D M, Nevins D J, Dunsmuir P, Brummell D A. Constitutive over-expression of a ripening-related pepper endo-1,4- $\beta$ -glucanase in transgenic tomato fruit does not increase xyloglucan depolymerization or fruit softening. *Plant Mol Biol*, 2002, 50: 35–369
- [25] Morohashi Y, Matsushima H. Development of  $\beta$ -1,3-glucanase activity in germinated tomato seeds. *J Exp Bot*, 2000, 51: 1381–1387
- [26] Buchner P, Rochat C, Wuillème S. Characterization of a tissue-specific and developmentally regulated-1,3-glucanase gene in pea (*Pisum sativum*). *Plant Mol Biol*, 2002, 49: 171–186
- [27] Akiyama T, Pillai M A, Sentoku N. Cloning, characterization and expression of *OsGLN2*, a rice endo-1,3- $\beta$ -glucanase gene regulated developmentally in flowers and hormonally in germinating seeds. *Planta*, 2004, 220: 129–139
- [28] Ruan Y L, Xu S M, White R, Furbank R T. Genotypic and developmental evidence for the role of plasmodesmatal regulation in cotton fiber elongation mediated by callose turnover. *Plant Physiol*, 2004, 136: 4104–4113
- [29] McFadden H G, Chapple R, Feyter D E. Expression of pathogenesis-related genes in cotton stem in response to infection by *Verticillium dahliae*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2001, 58: 119–131
- [30] Jongedijk E, Tigelaar H. Synergistic activity of chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. *Euphytica*, 1995, 85: 173–180