

## 与棉纤维发育相关基因 *GhSAMS*、*GhNLP* 的克隆、鉴定与定位

张燕洁, 朱一超, 郭旺珍, 张天真

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095)

**摘要:** 【目的】克隆陆地棉纤维伸长发育相关的基因, 并做初步功能验证。【方法】以陆地棉李氏超短纤维突变体  $Li_1Li_1$  自交后代野生型  $Li_1Li_1$  和超短纤维突变体  $Li_1Li_1$  开花后 4 d 的胚珠纤维复合体为探针, 通过基因芯片筛选优质材料 7235 棉纤维伸长、次生壁加厚不同发育时期混合 cDNA 文库, 分离出两个在两种材料中差异表达的 cDNA 序列。【结果】测序结果表明, 两个 cDNA 均为完整的基因序列, 分别命名为 *GhSAMS* (GenBank 登录号: EF643509), *GhNLP* (GenBank 登录号: EF643508)。RT-PCR 分析表明: 开花后 4 d, *GhSAMS*、*GhNLP* 在陆地棉李氏野生型  $Li_1Li_1$  纤维中的表达量低于无纤维突变  $Li_1Li_1$ 。Southern 杂交结果表明两个基因在陆地棉基因组中都存在少数拷贝。利用本实验室陆地棉遗传标准系 TM-1 和海岛棉海 7124 培育的 140 个 BC<sub>1</sub> 作图群体, 将 *GhSAMS* 和 *GhNLP* 分别定位在染色体 14 (D2) 和 19 (D5) 上。【结论】克隆了两个棉纤维伸长发育相关基因 *GhSAMS* 和 *GhNLP*, 推测其高表达阻止纤维伸长生长, 为进一步分析功能和用于分子育种打下基础。

**关键词:** 陆地棉; 基因芯片; S-腺苷甲硫氨酸合成酶; 结瘤素

## Cloning, Characterization and Mapping of Two Genes *GhSAMS* and *GhNLP* Related with Fiber Development in *Gossypium hirsutum* L.

ZHANG Yan-jie, ZHU Yi-chao, GUO Wang-zhen, ZHANG Tian-zhen

(National Key Laboratory of Corp Genetics & Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

**Abstract:** 【Objective】The objective of this study was to clone new genes related with fiber development in upland cotton. 【Method】Genechips were performed with wild line  $li_1li_1$  and the *Ligon lintless* mutant line  $Li_1li_1$  segregated from the self-crossing progenies of the *Ligon lintless* mutant line  $Li_1$  to isolated genes preferentially expressed during elongating for providing the mechanism of cotton fiber rapid elongation. Two cDNA clones differently expressed were separated from cotton fiber library of elite quality material 7235 during fiber elongation and the second wall synthesis by genechips with probes of the 4 DPA ovule-fiber compound from the wild line  $li_1li_1$  and the *Ligon lintless* mutant line  $Li_1li_1$ . 【Result】RT-PCR analysis indicated that the expression quantity of two genes which named *GhSAMS* (GenBank accession: EF643509) and *GhNLP* (GenBank accession: EF643508) were less in the wild line  $li_1li_1$  than that in the *Ligon lintless* mutant line  $Li_1li_1$  at 4 DPA. The result of Southern blotting indicated that there are a few copies of both genes in the genome of upland cotton. The authors used the BC<sub>1</sub> mapping population derived from the hybridization between the upland cultivar TM-1 and the island cultivar Hai7124, further TM-1 as recurrent parent. *GhSAMS* and *GhNLP* were localized on the chromosome D2 and D5, respectively. 【Conclusion】Two genes related with fiber development in upland cotton were cloned and characterized with trancription level, genomic copies and genetic location. Future studies including analyses of these proteins function may shed light on the puzzles about the mechanism of cell elongation and excellent quality formation for cotton fibers.

**Key words:** *Gossypium hirsutum*; Genechips; S-adenosylmethionine synthetase; Nodulin

收稿日期: 2007-06-07; 接受日期: 2007-07-10

基金项目: 国家自然科学基金 (30471104; 30270806), 国家“973”项目 (2002CB111301), 教育部新世纪优秀人才项目 (NCET-04-0500), 教育部长江学者和创新团队发展计划项目 (IRT0432)

作者简介: 张燕洁 (1981-), 女, 江苏常州人, 硕士, 研究方向为植物基因组学。通讯作者张天真 (1962-), 男, 浙江东阳人, 教授, 研究方向为分子植物育种。Tel: 025-84395307; E-mail: cotton@njau.edu.cn

## 0 引言

【研究意义】棉花是一种全球性的重要经济作物,也是最主要的纺织纤维作物。棉花纤维发育相关基因的克隆和功能分析,是通过分子手段进行棉纤维品质改良的第一步。获得与纤维品质相关的基因,意义重大。【前人研究进展】棉纤维是胚珠外层珠被上单个表皮细胞分化产生的,其发育受多种植物激素的诱导和控制。棉纤维发育一般经历 45~50 d,由 4 个连续而重叠的发育过程所组成:起始期、伸长期(初生壁形成)、次生壁形成期和成熟期<sup>[1]</sup>。一根棉纤维就代表一个细胞,一根棉纤维细胞从开花当天(0 DPA, day post anthesis)到 16 DPA 可由 10~15  $\mu\text{m}$  伸长到 2.5~3.0 cm,无细胞分裂且形成高纤维素含量,这使得棉花纤维成为研究植物细胞伸长和细胞壁合成的理想材料<sup>[2]</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>[2]</sup>。【本研究切入点】纤维突变体材料是进行纤维发育分子机理研究的优异材料。李氏超短纤维突变体(*Li<sub>1</sub>li<sub>1</sub>*)是显性单基因突变,表现为显性纯合体致死,显性杂合体表现为纤维短至 6 mm,并在叶、茎和花的生长上变形,其隐性纯合体纤维发育正常。【拟解决的关键问题】本研究选用陆地棉李氏超短纤维突变体 *Li<sub>1</sub>li<sub>1</sub>* 自交分离后代正常纤维野生型 *li<sub>1</sub>li<sub>1</sub>* 和李氏超短纤维突变体 *Li<sub>1</sub>li<sub>1</sub>* 为材料,利用基因芯片技术,旨在研究棉花纤维伸长发育阶段的差异表达情况,并从中分离棉花纤维发育相关基因,为棉纤维发育的分子生物学研究和棉纤维的品质改良打下基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 2005 年夏种植李氏超短纤维突变体 *Li<sub>1</sub>li<sub>1</sub>* 自交分离后代的正常纤维野生型 *li<sub>1</sub>li<sub>1</sub>* 和李氏超短纤维突变体 *Li<sub>1</sub>li<sub>1</sub>* 材料于南京农业大学网室。取两种材料 0、2、4、6 DPA 的胚珠纤维复合体和 8、10 DPA 的纤维;另取光照培养室中种子萌发后 10 d 的正常纤维野生型和突变体的根、下胚轴、子叶、花瓣、萼片、雄蕊等。

1.1.2 菌种 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  为笔者所在实验室保存。

1.1.3 基因来源 通过构建陆地棉优质材料 7235 开花后 5、8、11、14、17、20、23、25 d 等不同纤维发育时期的混合 cDNA 文库,从文库中随机挑取 10 000

个克隆,5'-端单边测序,通过非冗余性比较,获得 1 436 个 UniGenes。根据以李氏正常纤维野生型 *li<sub>1</sub>li<sub>1</sub>* 和超短纤维突变体 *Li<sub>1</sub>li<sub>1</sub>* 4 DPA 胚珠纤维复合体提取的 mRNA 为探针的基因芯片分析结果,选取其中两个 BLAST 结果可能与纤维发育相关的 cDNA 克隆 (*GhSAMS*, *GhNLP*) 进行分析。

1.1.4 试剂 试验所用各种限制性内切酶购自 NEB 公司,PCR 反应中所用 *Taq* 酶,RT-PCR 中 DNase I 为 TaKaRa 公司产品。M-MLV, RNase Inhibitor 为南京生兴生物技术有限公司产品。Southern 杂交采用 Roche 公司的 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I,硝酸纤维素膜也为 Roche 公司产品,探针纯化选用 QIAGEN 公司 QIAquick<sup>®</sup> Nucleotide Removal Kit。

### 1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 参照李继刚等<sup>[3]</sup>和武耀廷等<sup>[4]</sup>的热硼酸法,略做修改提取植物材料的总 RNA。以寡聚脱氧胸腺嘧啶为引物进行反转录得到单链 cDNA。根据二个基因 cDNA 序列设计 RT-PCR 引物。*GhSAMS*: 5'TCGGAGTCTGTGAACGAGGGA3'和 5'TCAGTGA GCGAGCACCAAGC3'。*GhNLP*: 5'TGAACAAAGC GAAGCCATAC3'和 5'CAGGCACTTAGGTCACGAA C3'内标 EF1 $\alpha$  的对应引物为 5'AGACCACCAAGTAC TACTGCAC3'和 5'CCACCAATCTTGTACACATC C3'。扩增体系 25  $\mu\text{l}$ ,包括:cDNA 1.0  $\mu\text{l}$ ,PrimerF(10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 1.0  $\mu\text{l}$ ,PrimerR(10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )1.0  $\mu\text{l}$ ,10 $\times$ PCR Buffer2.5  $\mu\text{l}$ ,MgCl<sub>2</sub>(25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 1.5  $\mu\text{l}$ ,dNTP(10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{l}$ ,*rTaq* 酶(5 U $\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) 0.1  $\mu\text{l}$ ,ddH<sub>2</sub>O 补足至 25  $\mu\text{l}$ 。扩增内标 EF1 $\alpha$  的程序为:94 $^{\circ}\text{C}$  3 min;94 $^{\circ}\text{C}$  45 s,55 $^{\circ}\text{C}$  45 s,72 $^{\circ}\text{C}$  1 min,28 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$  7 min。具体的 cDNA 量根据扩增结果而调整。扩增二个基因的程序同前,仅退火温度变化,分别是:*GhSAMS* 62 $^{\circ}\text{C}$ ; *GhNLP* 55 $^{\circ}\text{C}$ 。产物经 1%琼脂糖电泳鉴定。

1.2.2 提取棉花基因组 DNA 和 Southern blotting 李氏正常纤维野生型 *li<sub>1</sub>li<sub>1</sub>* 基因组 DNA 的分离与纯化参照 CTAB 法<sup>[5]</sup>。20  $\mu\text{g}$  DNA 经 *EcoR* I、*Hind*III、*Xba* I、*Bam*H I 完全酶切,体系如下:DNA 20  $\mu\text{g}$ ,内切酶(20 U $\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) 10  $\mu\text{l}$ ,10 $\times$ buffer 10  $\mu\text{l}$ ,ddH<sub>2</sub>O 补足至 100  $\mu\text{l}$ 。酶切结果经电泳检测后纯化。电泳分离,转移到尼龙膜上,80 $^{\circ}\text{C}$ 烘膜 2 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。用引物 T3: 5'ATTAACCCTCACTAAAG3' 和 T7: 5'TAATACGACTCACTATAGGG3',从菌液中扩增基因 *GhNLP* 的 cDNA 全长作为标记探针的模板,PCR 程序为 94 $^{\circ}\text{C}$

2 min 预变性; 94°C 30 s, 55°C 1 min, 72°C 1.5 min, 30 个循环; 72°C 10 min。 *GhSAMS* 用 RT-PCR 引物, 对应 PT-PCR 程序扩增 *li<sub>1</sub>* 基因组 DNA, 胶回收 PCR 产物, 随机引物法标记两个探针, QIAGEN 公司 QIAquick® Nucleotide Removal Kit 纯化。37°C 预杂交 0.5~6 h, 加入探针, 37°C 杂交 17~20 h。按 Roche 公司的 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 洗膜。

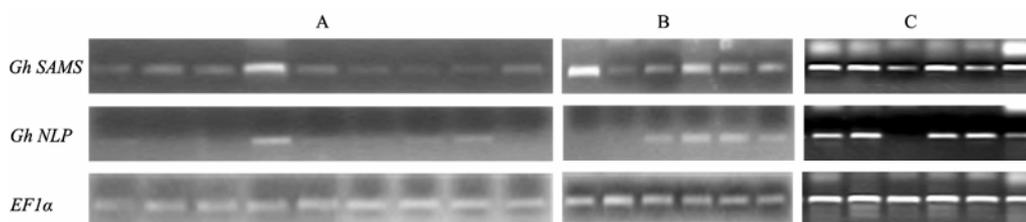
**1.2.3 定位** 笔者实验室利用陆地棉遗传标准系 TM-1 和海岛棉海 7124 为亲本, F<sub>1</sub> 与 TM-1 回交培育的 140 个 BC<sub>1</sub> 作图群体, 建立了相关遗传连锁图谱<sup>[6]</sup>。以 TM-1、海-7124、F<sub>1</sub> 群体的基因组 DNA 为模板, 将具有多态性位点的两个基因用 Mapmaker/EXP version 3.0b 软件整合到该图谱上, 用 MapDraw 绘制染色体连锁图。根据 cDNA 序列设计位于 ORF 两侧的引物, *GhSAMS* 基因对应引物为 5'CGTTCCTT TGAGGTTTTAG3' 和 5'AACATGGCAGTACATCC TTTC3'。 *GhNLP* 对应的的引物为 5'CTTCAGAGC AAGTAGTGA3' 和 5'GAGGGGTGGGTTACATAG 3'。PCR 扩增反应体系: DNA 模板 1 μl, 10×buffer 2 μl, MgCl<sub>2</sub> (25 μmol·L<sup>-1</sup>) 1.2 μl, dNTP (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 0.4 μl, Primer F (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 1 μl, Primer R (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 1 μl, rTaq 酶 (5 U·μl<sup>-1</sup>) 0.2 μl, ddH<sub>2</sub>O 补足至 20 μl。 *GhSAMS* 的 PCR 扩增程序: 95°C 3 min, 94°C 45 s, 54°C 30 s, 72°C 1.5 min, 30 个循环, 72°C 7 min。 *GhNLP* 的退火温度为 47°C。扩增产物用限制性内切酶酶切, 20 μl 酶切体系 (*Pst* I): PCR 产物 15 μl, 10×NEB buffer 2 μl, *Pst* I (20 U·μl<sup>-1</sup>) 0.2 μl, 100×BSA 0.2 μl, ddH<sub>2</sub>O 补足至 20 μl。酶切产物经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 *GhSAMS* 的序列分析与表达研究

**2.1.1 *GhSAMS* 的序列分析** 4 DPA 芯片分析结果显示, 编号为 G043H11A 的克隆表现为下调表达, 即该基因在野生型胚珠和纤维混合物中的表达量低于突变体中的表达量<sup>[7]</sup>。对其整个插入片段测序, 得到 1 547 bp 的全长 cDNA 序列。包含 1 182 bp 的 ORF, 编码 393 个氨基酸。通过 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 比对, 将其命名为 *GhSAMS* (*Gossypium hirsutum* S-adenosylmethionine synthetase)。该序列是棉属新发现的基因, GenBank 登录号为 EF643509。用 pI/Mw ([http://ca.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html)) 程序对 *GhSAMS* 进行了一级结构的预测, 其理论上的 pI = 5.65, Mw = 43.0 kD。根据 NetPhos2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>) 预测共有 16 个磷酸化位点。据 NetNGlyc1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>) 预测 *GhSAMS* 在 158 和 233 位有 N-端糖基化位点。用 NCBI CDS (<http://www.ncbi.nlm.nih.org/structure/cdd>) 预测 *GhSAMS* 包含下列保守区域: S-腺苷甲硫氨酸合成酶中心保守结构域; S-腺苷甲硫氨酸合成酶 C-末端保守结构域; S-腺苷甲硫氨酸合成酶 N-末端保守结构域; S-腺苷甲硫氨酸合成酶保守区域。前三个 S-腺苷甲硫氨酸合成酶保守结构域都包含相同的 α+β 折叠。

**2.1.2 *GhSAMS* 的 RT-PCR 分析** 对 *GhSAMS* 基因的表达进行分析, 结果如图 1 所示。RT-PCR 结果表明, *GhSAMS* 基因组成性表达, 但无论在正常纤维野生型 *li<sub>1</sub>li<sub>1</sub>* 还是超短纤维突变体 *Li<sub>1</sub>li<sub>1</sub>* 的胚珠纤维复合体中 0 DPA 的表达量均明显高于其后发育的各个时期。正常



各泳道依次为 A: *li<sub>1</sub>li<sub>1</sub>* 的根、下胚轴、子叶、0、2、4、6、8、10 DPA 胚珠纤维复合体; B: *Li<sub>1</sub>li<sub>1</sub>* 的 0、2、4、6、8、10 DPA 胚珠纤维复合体; C: *Li<sub>1</sub>li<sub>1</sub>* 的根、下胚轴、子叶、花瓣、萼片、雄蕊; EF-1α 为内对照  
Each lane shows A: root, hypocotyl, cotyledon, ovule-fiber compound at 0, 2, 4, 6, 8, 10 DPA of *li<sub>1</sub>li<sub>1</sub>*; B: ovule-fiber compound of *Li<sub>1</sub>li<sub>1</sub>* at 0, 2, 4, 6, 8, 10 DPA; C: root, hypocotyls, cotyledon, petal, sepal, stamen of *Li<sub>1</sub>li<sub>1</sub>*; EF-1α is inner-check

图 1 *GhSAMS*、*GhNLP* 的 RT-PCR 分析

Fig. 1 The RT-PCR analysis of *GhSAMS* and *GhNLP*

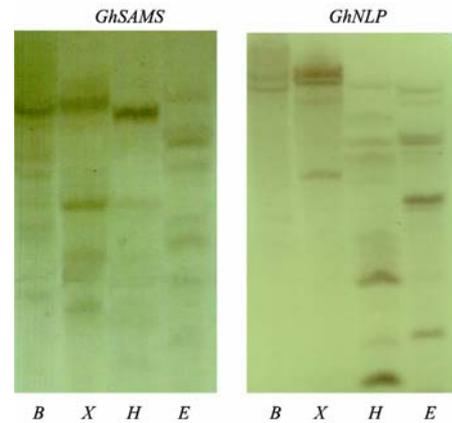
纤维野生型 *li<sub>1</sub>li<sub>1</sub> 4* DPA 的表达量 (图 1-A) 略低于超短纤维突变体 *Li<sub>1</sub>li<sub>1</sub> 4* DPA 的表达量 (图 1-B), 属下调表达, 与芯片结果符合。突变体的根、下胚轴、花瓣、萼片和雄蕊中的表达量高于子叶 (图 1-C)。

### 2.1.3 *GhSAMS* 的 Southern 杂交分析

*GhSAMS* 基因 cDNA 全长 1 547 bp, 在 183 bp 处有一个 *Bam*H I 酶切位点。Southern 杂交分析结果如图 2 所示。*Eco*R I、*Hind*III、*Xba* I 和 *Bam*H I 对应的泳道分别有 6、2、4、8 条带。*Hind*III 对应泳道有两条带。推测此基因在基因组中存在少数拷贝。*Eco*R I 和 *Xba* I 是切点较多的常用酶, 可能在基因内含子中分别含有两个和一个切点, 故对应的泳道有 6 和 4 条带。*Bam*H I 在 cDNA 序列中有一个酶切位点, 可能在基因内含子中有两个切点, 故两个拷贝经酶切后产生 8 条杂交带。另外泳道上还有一些弱带, 可能是探针与其它同源性较高的基因组序列杂交出现的非特异性条带。

### 2.1.4 *GhSAMS* 基因的染色体定位

用扩增 *GhSAMS* 基因 ORF 的特异性引物扩增本实验室的 BC<sub>1</sub> 作图群体中的亲本 TM-1、海 7124 和 F<sub>1</sub> 的基因组 DNA, TM-1 和 F<sub>1</sub> 的扩增产物无差异。用限制性内切酶 *Pst* I 酶切亲本 TM-1、海 7124 和 F<sub>1</sub> 的 PCR

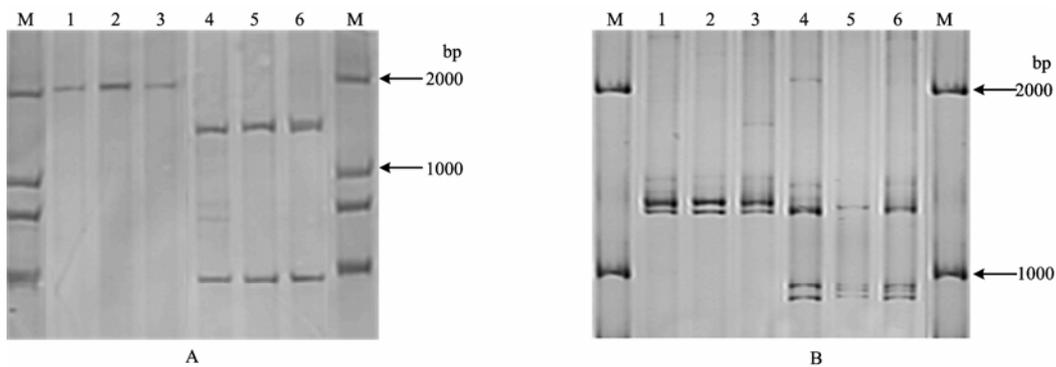


B、X、H、E 分别代表 *Bam*H I、*Xba*I、*Hind*III、*Eco*R I  
B, X, H, E are *Bam*H I, *Xba* I, *Hind*III, *Eco*R I, respectively

图 2 *GhSAMS* 和 *GhNLP* 的 Southern 杂交分析

Fig. 2 Southern blotting analysis of *GhSAMS* and *GhNLP*

产物, TM-1 和 F<sub>1</sub> 的酶切产物存在差异 (图 3-A)。用此引物扩增作图群体各单株目的 DNA 片段, PCR 产物酶切后进行聚丙烯酰胺电泳, 结果如图 4 所示。*GhSAMS* 基因位于染色体 14 (D2) 上, 结果如图 6 所示。



A: *GhSAMS* 酶切产物的差异; B: *GhNLP* 酶切产物的差异; M: DNA marker; 1~3: 未酶切 TM-1、海 7124、F<sub>1</sub> 的 PCR 产物; 4~6 为 TM-1、海 7124、F<sub>1</sub> 的 PCR 产物酶切产物  
A: The difference of enzyme digestion products of *GhSAMS*; B: The difference of enzyme digestion products of *GhNLP*; M: DNA markers; 1-3: PCR products of TM-1, hai7124 and F<sub>1</sub> without enzyme digestion; 4-6: PCR products of TM-1, hai7124 and F<sub>1</sub> with enzyme digestion

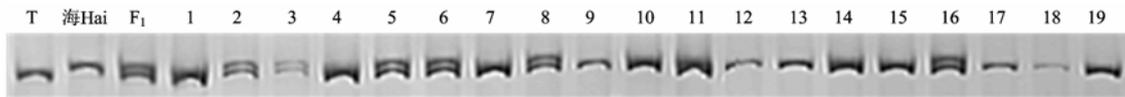
图 3 *GhSAMS*、*GhNLP* 酶切产物的差异

Fig. 3 The difference of enzyme digestion product of *GhSAMS* and *GhNLP*

## 2.2 *GhNLP* 的序列分析与表达研究

2.2.1 *GhNLP* 的序列分析 对 4 DPA 芯片分析结果中编号为 G026D08A 的克隆整个插入片段测序<sup>[7]</sup>, 得 1 418 bp 全长 cDNA 序列, 包含 1 158 bp 的 ORF, 编码 385 个氨基酸。通过 BLAST 比对, 将其命名为

*GhNLP* (*Gossypium hirsutum* nodulin-like protein)。该序列是棉属新发现的基因, GenBank 登录号为 EF643508。pI/Mw 程序对 *GhNLP* 预测, 理论上的 pI=9.26, Mw=41.8 kD。NetPhos2.0 预测 *GhNLP* 共有 10 个磷酸化位点。根据 NCBI CDS 预测, *GhNLP* 包



从右至左依次为 TM-1、海 7124 和 F<sub>1</sub>, 1~19 为部分群体  
From left to right the lanes show TM-1, hai7124 and F<sub>1</sub>, 1-19 are partial population

图 4 *GhSAMS* 在 BC<sub>1</sub> 群体中的分离

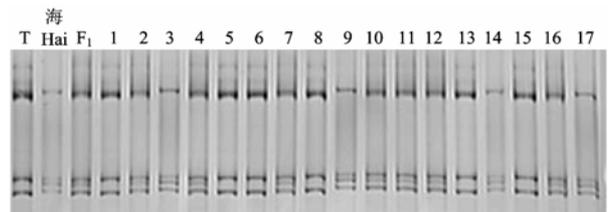
Fig. 4 The separation of *GhSAMS* in BC<sub>1</sub> population

含整合膜蛋白保守结构域和药物/代谢物转运器超家族的透性酶保守域。

**2.2.2 *GhNLP* 的 RT-PCR 分析** 对 *GhNLP* 基因的表达进行分析, 结果如图 1 所示。RT-PCR 结果表明, *GhNLP* 基因在野生型根、下胚轴、子叶中几乎不表达, 正常纤维野生型 *li<sub>1</sub>li<sub>1</sub>* 的胚珠纤维混合物中表达量在 0 DPA 明显高于其它时期, 从 2 DPA 往后呈现一个缓慢上升的趋势, 10 DPA 时下降很明显 (图 1-A); 超短纤维突变体 *Li<sub>1</sub>li<sub>1</sub>* 的胚珠纤维混合物中表达量随发育时期的推后上升趋势很明显, 但是到 10 DPA 时又略有下降。正常纤维野生型 *li<sub>1</sub>li<sub>1</sub>* 4 DPA 的表达量略低于超短纤维突变体 *Li<sub>1</sub>li<sub>1</sub>* 4 DPA 的表达量 (图 1-A、B)。突变体花器官中, 花瓣和萼片中表达量高于雄蕊 (图 1-C)。

**2.2.3 *GhNLP* 的 Southern 杂交分析** *GhNLP* 基因探针长 706 bp, 有一个 *Hind*III 酶切位点。Southern 杂交分析结果如图 3 所示。*Eco*RI, *Hind*III, *Xba*I, *Bam*HI 对应的泳道分别有 6、6、2、2 条带, 则推断基因组中存在少数拷贝。*Hind*III 在探针对应的片段上有一个切点, 可能在基因组 DNA 内含子中还有一个切点, 故有 6 个条带。*Eco*R I 是切点较多的常用酶, 可能基因组中两个拷贝的内含子中都存在两个切点, 故对应的泳道上有 6 条带。另外泳道上还有一些弱带, 可能是探针与其它同源性较高的基因组序列杂交出现的非特异性带。

**2.2.4 *GhNLP* 基因的染色体定位** 用 *GhNLP* 基因的 RT-PCR 引物扩增本实验室的 BC<sub>1</sub> 作图群体中的亲本 TM-1、海 7124 和 F<sub>1</sub> 的基因组 DNA, TM-1 和 F<sub>1</sub> 的扩增产物无差异。用限制性内切酶 *Pst* I 切 3 个 PCR 产物 TM-1 和 F<sub>1</sub> 的酶切产物有差异, 差异片段位于 1 000 bp 左右 (如图 3-B 所示)。用此引物扩增作图群体, PCR 酶切产物跑聚丙烯酰胺电泳, 结果如图 5 所示。定位结果如图 6 所示, *GhNLP* 基因位于染色体 19(D5) 上。



从右至左依次为 TM-1、海 7124 和 F<sub>1</sub>, 1~17 为部分群体  
From left to right the lanes show TM-1, Hai7124 and F<sub>1</sub>, 1-17 are partial population

图 5 *GhNLP* 在 BC<sub>1</sub> 群体中的分离

Fig. 5 The separation of *GhNLP* in BC<sub>1</sub> population

### 3 讨论

#### 3.1 S-腺苷甲硫氨酸合成酶在生物体及棉纤维发育中的可能功能分析

S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM) 参与了细胞中 3 个最主要的生化代谢途径: 转甲基作用、转巯基化作用和多胺合成 (氨基丁酰基团前体)。S-腺苷甲硫氨酸合成酶 (EC 2. 5. 1. 6, S-adenosylmethionine synthetase, SAMS) 是一种利用甲硫氨酸和 ATP 合成 SAM 的酶。SAMS 基因的表达水平对 SAM 含量的影响具有非常重要的作用<sup>[8]</sup>。

棉纤维的起始发育即纤维原始细胞的分化是指胚珠表皮细胞分化形成纤维原始细胞的过程, 是在棉花开花前 0~3 d 完成的。纤维原始细胞在开花前 3 d 到开花前 2 d 由于受 IAA 和 GA<sub>3</sub> 的刺激反应而获得了细胞延伸的生理能力。但开花前 24 h, 纤维原始细胞的细胞核、细胞质和液泡才出现较明显的变化<sup>[9]</sup>。开花前 24 h 及开花当天发生了一系列植物生理反应, 大量物质合成。如前所述, SAM 在正常的磷脂、DNA、RNA 和蛋白质甲基化反应和基因表达中提供甲基基团<sup>[8,10]</sup>。无论是作为基团供体还是作为酶诱导剂, SAM 都参与了一系列关键的生化反应; 而作为一个辅助因

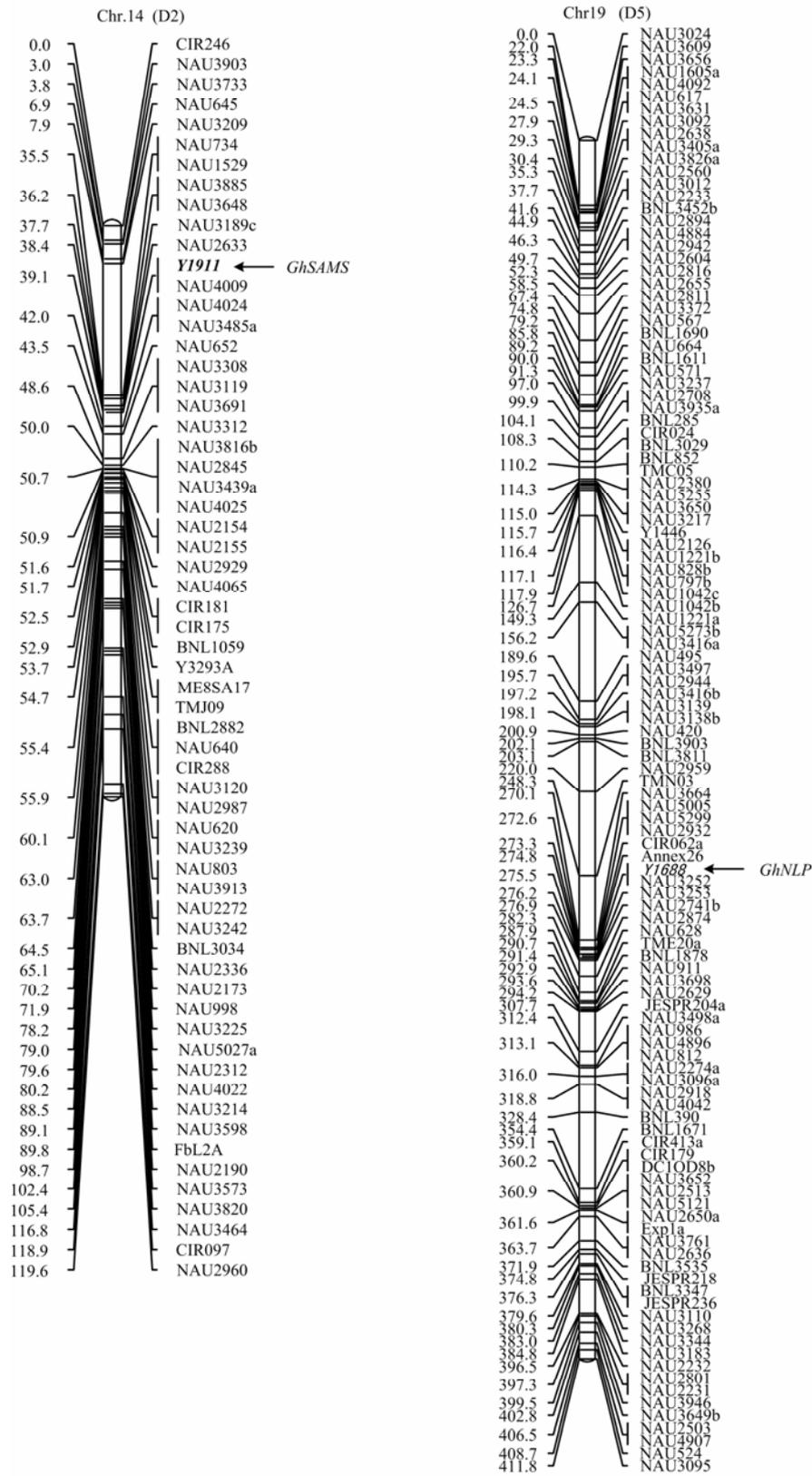


图 6 *GhSAMS* 和 *GhNLP* 基因的染色体精细定位

Fig. 6 The cotton genetic linkage map of *GhSAMS* and *GhNLP*

子, SAM 在一系列的反应中的作用仅次于 ATP<sup>[11]</sup>。所以, 推测当一系列物质大量合成的时候, SAM 的需求量大量增加; 而编码 SAMS 的 *SAMS* 基因的表达水平对 SAM 量的影响具有非常重要的作用, 故也是随之增长的。RT 结果显示 *GhSAMS* 无论在在正常纤维野生型 *Li<sub>1</sub>li<sub>1</sub>* 还是超短纤维突变体 *li<sub>1</sub>li<sub>1</sub>* 的胚珠和纤维中 0 DPA 的表达量均明显高于纤维伸长阶段的其它时期, 这也与上述推断符合。

在其他植物的研究中发现, 当在自然生境中遇到恶劣的环境长期胁迫, 使其产生的活性氧超出活性氧清除系统的能力所及时, 就会产生氧化损伤<sup>[12-14]</sup>。谷胱苷肽 (glutathione, GSH) 作为细胞内主要的抗氧化物质, 在活性氧脱毒过程中起重要作用。SAM 在细胞中是 GSH 合成的前体, 它通过转巯基化作用合成 GSH。

另外, 多胺 (PAS) 广泛存在于原核生物及真核生物中, 也参与植物的胁迫反应, 在生物体内起重要的作用<sup>[15]</sup>。其中的腐胺 (PUT) 作为一种有机阳离子, 实际上起着调节细胞 pH 作用; 腐胺还调节活性氧代谢的平衡, 在稳定膜结构, 使植物免受胁迫伤害中起一定的作用<sup>[15]</sup>。从多胺的生物合成以及多胺的抗逆作用出发, 也值得进一步探讨 SAM 及其调控在逆境中的作用。

在棉花中关于 SAMS 参与抗逆生理的研究还比较少, 通过基因或其它分子水平调控和研究细胞逆境中 SAM 的水平变化, 对于探讨各种逆境生理、老化等研究和提高抗逆性亦具有重要价值。

### 3.2 结瘤素在生物体中的可能功能分析

根瘤菌的结瘤基因负责根瘤菌信号分子——结瘤因子的合成和运输, 宿主植物中特异性诱导表达的结瘤素基因, 负责根瘤器官的发生和功能。在共生关系的建立过程中, 根形成固氮的根瘤归因于植物宿主和内寄生细菌调节机制的整合。这些根瘤是植物和微生物之间特殊而协调的相互作用发展而成的结果, 包括细菌和植物编码基因之间高度并行的诱导。在根瘤发育过程中诱导或者提高表达的植物基因产物称为结瘤素<sup>[16]</sup>。

根瘤中的生理环境明显不同于其它植物组织, 就进化出一些新功能来方便共生固氮。在分子水平上, 这些适应性的变化表明在表达许多植物基因时它们与根瘤发育和/或根瘤功能后期阶段相关联, 这些基因归类为后期结瘤素基因<sup>[17]</sup>。这成员包括: 编码酶或者酶亚基的基因; 参与碳或者氮固定的基因; 蔗糖合成酶;

与围绕细菌的膜的生物发生和功能相关联的蛋白; 携氧豆血红蛋白; 推断的植物转录因子以及许多未知功能的蛋白<sup>[18-23]</sup>。

结瘤素涉及结瘤时宿主的一类基因, 故也可能在非豆科植物中表达。本研究证实这些基因在棉属中有表达。对模式生物拟南芥, 水稻和苜蓿, 用更为灵敏的探测方法及基因工程手段, 揭示了许多认为是根瘤特异的基因也在宿主其它非共生组织中表达, 其同源物在非豆类植物中也能发现<sup>[24]</sup>。这说明共生特异基因广泛存在于高等植物中。

RT 结果显示, 随着纤维发育时间的推移, *GhNLP* 基因的表达逐渐上升, 显示出一定的纤维发育相关性。因为很多结瘤素基因广泛存在与植物中, 并非完全是共生特异的, 有些还与细胞壁发育相关, 比如蔗糖合成酶和一些富含脯氨酸的蛋白。所以对 *GhNLP* 基因进一步研究, 有望发现其在棉花中具体代谢功能。

## 4 结论

本研究以竞争性杂交芯片为基础, 克隆 2 个棉纤维伸长发育相关基因 (*GhSAMS*、*GhNLP*)。两者表现超短纤维突变体优势表达, 在陆地棉基因组中存在少数拷贝, 并分别定位与染色体 14 (D2) 和 19 (D5) 上。初步鉴定表明, 这 2 个基因和棉纤维发育相关, 为进一步阐明其功能和用于分子育种打下基础。

致谢: 本研究由高等学校创新引智计划 (B08025) 资助

## References

- [1] Basra A S, Malik C P. Development of the cotton fiber. *International Review of Cytology*, 1984, 89: 65-113.
- [2] Kim H J, Triplett B A. Cotton fiber growth in planta and *in vitro*. models for plant cell elongation and cell wall biogenesis. *Plant Physiology*, 2001, 127: 1361-1366.
- [3] 李继刚, 郭三堆. 棉花高质量 RNA 的提取及 MADS-box 基因保守区段的克隆. *棉花学报*, 2004, 16 (1): 3-7.  
Li J G, Guo S D. Extraction of total RNA and cloning of conservation fragment of MADS-box gene by RT-PCR in upland cotton. *Cotton Science*, 2004, 16 (1): 3-7. (in Chinese)
- [4] 武耀廷, 刘进元. 一种高效提取棉花不同组织总 RNA 的热硼酸改良法. *棉花学报*, 2004, 16(2): 67-71.  
Wu Y T, Liu J Y. A modified hot borate method for efficient isolation of total RNA from different cotton tissues. *Cotton Science*, 2004, 16 (2): 67-71. (in Chinese)

- [5] Parterson A H, Brubaker C L, Wendel J F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP and PCR analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1993, 11: 122-127.
- [6] Han Z G, Guo W Z, Song X L, Zhang T Z. Genetic mapping of EST-derived microsatellites from the diploid *Gossypium arboreum* in allotetraploid cotton. *Molecular Genetics Genomics*, 2004, 272: 308-327.
- [7] 朱一超, 张天真, 贺亚军, 郭旺珍. 棉花纤维伸长发育期的基因表达分析. *作物学报*, 2006, 11: 1656-1662.  
Zhu Y C, Zhang T Z, He Y J, Guo W Z. Gene expression analysis during the fiber elongation period in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Acta Agronomica Sinica*, 2006, 11: 1656-1662. (in Chinese)
- [8] Mato J M, Alvarez L, Ortiz P, Pajares M A. S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacology & Therapeutics*, 1997, 73(3): 265-280.
- [9] 杜雄明, 潘家驹, 汪若海. 棉纤维细胞分化和发育. *棉花学报*, 2000, 12 (4): 212-217.  
Du X M, Pan J J, Wang R H. Differentiation and development of fiber cells on the ovules in cotton. *Cotton Science*, 2000, 12(4): 212-217. (in Chinese)
- [10] Duthie S J, Narayanan S, Brand G M, Grant G. DNA stability and genomic methylation status in colonocytes isolated from methyl-donor-deficient rats. *European Journal of Nutrition*, 2000, 39: 106-111.
- [11] 吴 颖, 梁月荣. S-腺苷甲硫氨酸在茶树生理代谢中的研究现状. *茶叶*, 2005, 31(2): 85-87.  
Wu Y, Liang Y R. Research progress in effect of S-adenosylmethionine on physiological metabolism in tea plant. *Journal of Tea*, 2005, 31(2): 85-87. (in Chinese)
- [12] 骆颖颖, 梁月荣. 茶树抗寒性的间接鉴定. *茶叶科学技术*, 1998, (3): 1-7.  
Luo Y Y, Liang Y R. Indirect detection of cold resistance in tea plant. *Science and technology of Tea*, 1998, 3: 1-7. (in Chinese)
- [13] 钱利生. 保护酶系统与茶树的逆境胁迫和衰老. *茶叶*, 1993, 19(4): 26-29.  
Qian L S. Protection enzyme system for adversity and caducity resistance in tea plant. *Journal of Tea*, 1993, 19(4): 26-29. (in Chinese)
- [14] 屠幼英, 杨秀芳, 杨贤强. 茶树逆境生理与超氧化物歧化酶(SOD)的相关性. *茶叶*, 1996, 22(2): 40-43.  
Tu Y Y, Yang X F, Yang X Q. The relativity of adversity resistance and SOD in tea plant. *Journal of Tea*, 1996, 22(2): 40-43. (in Chinese)
- [15] 沈惠娟, 谢寅峰. 多胺(PAS)与植物的几种胁迫反应. *南京林业大学学报*, 1997, 21(4): 26-30.  
Shen H J, Xie Y F. Polyamine and plant stress. *Journal of Nanjing Forestry University*, 1997, 21(4): 26-30. (in Chinese)
- [16] Van Kammen A. Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1984, 2: 43-45.
- [17] Szczyglowski K, Kapranov P, Hamburger D, de Bruijn F J. The Lotus japonicus *LjNOD70* nodulin gene encodes a protein with similarities to transporters. *Plant Molecular Biology*, 1998, 37: 651-661.
- [18] Szczyglowski K, Hamburger D, Kapranov P, De Bruijn F J. Construction of a *Lotus japonicus* late nodulin EST library and identification of novel nodule specific genes. *Plant Physiology*, 1997, 144: 1335-1346.
- [19] Delauney A J, Verma D P S. Cloned nodulin genes for symbiotic nitrogen fixation. *Current Opinion in Plant Biology*, 1988, 6: 279-285.
- [20] Gamas P, Niebel F de C, Lescure N, Cullimore J. Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1996, 9: 233-242.
- [21] Heard J, Caspi M, Dunn K. Evolutionary diversity of symbiotically induced nodule MADS box genes: characterization of *nmhC5*, a member of a novel subfamily. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1997, 5: 665-676.
- [22] Heard J, Dunn K. Symbiotic induction of a MADS box gene during development of alfalfa root nodules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1995, 92: 5273-5277.
- [23] Kapranov P, de Bruijn F J, Szczyglowski K. A novel, highly expressed late nodulin gene *LjNOD16* from *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 1997, 113: 1081-1090.
- [24] Gualtieri G, Bisseling T. The evolution of nodulation. *Plant Molecular Biology*, 2000, 42: 181-194.

(责任编辑 于 竞)