

陆地棉离层基因 *GhBOP1* 的克隆及其功能的初步分析

常 璟^{1,2}, 晋 昕^{1,2}, 庞金环², 司怀军¹, 张 宁¹, 吴家和^{1,2}

(1. 甘肃农业大学 生命科学技术学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 中国科学院 微生物研究所 北京 100101)

摘要:为防止棉铃脱落提高结铃性,进而提高棉花产量,从陆地棉中分离出一个参与离层分化调控的相关基因 *GhBOP1*。通过生物信息学分析,表明 *GhBOP1* 蛋白序列含有保守性强的 BTB 和 ANK 结构域;进化树分析显示该蛋白氨基酸序列与许多植物的同源蛋白相似程度很高,说明该类蛋白进化较慢。利用 qRT-PCR 进行组织特异性表达分析的结果表明, *GhBOP1* 基因在根、茎、叶和花等组织器官中均有少量表达,但在离层中为优势表达,表达量为叶片表达水平的 20 倍。利用病毒诱导基因沉默(VIGS)技术干涉棉花 *GhBOP1* 基因的表达,同时进行低盐胁迫处理分析,对照植株叶片出现大量地脱落,而 *GhBOP1* 基因沉默植株叶片生长正常。总之 *GhBOP1* 基因在离层中优势表达,并对离层的形成可能具有调控功能。

关键词:棉花;离层;*GhBOP1* 基因;病毒诱导基因沉默

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2015)03-0014-06

doi:10.7668/hbxb.2015.03.003

Cloning of Abscission Zone Development Gene of *Gossypiumhirsutum* L. *GhBOP1* and Preliminary Analysis of Its Function

CHANG Jing^{1,2}, JIN Xin^{1,2}, PANG Jin-huan², SI Huai-jun¹, ZHANG Ning¹, WU Jia-he^{1,2}

(1. College of Life Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. Institute of Microbiology Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: In this study, a *GhBOP1* involved in abscission zone differentiation was examined in boll-shedding, and could be used as a new candidate gene for increasing cotton yield. Here, a cotton homolog of Arabidopsis *BOP* gene relating differentiation of abscission zone was isolated by PCR, which encoding protein contains BTB and ANK domains revealed by bioinformatics analysis. The phylogenetic tree analysis of *GhBOP1* as an entry showed that the protein sequences from various plants have high identity, exhibiting slow evolution in amino acid changes. The results of qRT-PCR analysis showed that *GhBOP1* gene predominantly expressed in abscission zone of petiole although it ubiquitously expressed in all organs, e. g. root, stem, leaf, and flower, etc. The expression level of *GhBOP1* gene in abscission zone was 20-fold higher than that in leaf. Virus-induced gene silencing (VIGS) technology was employed to repress *GhBOP1* gene expression in this study. Under salt stress, VIGS plants kept leaves normally growing, however, the control plants exhibited leaf shedding. In short, these results primarily suggest that *GhBOP1* gene is higher expression in abscission zone, and activated abscission zone formation. The molecular mechanism of this gene regulating differentiation and formation of abscission zone is deserved to further study.

Key words: Cotton; Abscission zone; *GhBOP1* gene; Virus inducing gene silence

棉花是一种世界性的重要的经济作物,其主要产品为棉纤维,同时其种子能够生产油和蛋白。棉花生产不仅保证纺织工业发展,又能提高人民生活

水平,同时伴随着中国社会的快速发展,对棉花的需求量逐年递增。

提高棉花产量是育种的主要目标,其中结铃性

收稿日期:2015-02-25

基金项目:国家自然科学基金项目(31471544);棉花生物学国家重点实验室开放课题基金项目(CB2014B02)

作者简介:常璟(1988-),男,甘肃兰州人,在读硕士,主要从事植物学研究。

通讯作者:吴家和(1968-),男,安徽合肥人,副研究员,博士,硕士生导师,主要从事分子生物学研究。

是产量育种的一个非常重要指标,然而蕾铃的脱落是一个普遍的现象。经过统计,棉花的整个生育期蕾铃的脱落率高达 60% ~ 70%,有的甚至达到了 80%,这严重影响了棉花的产量。传统的育种方法虽然在产量育种上已经做出了重要的贡献,但是当前棉花产量已经很难再有大幅度的提高,难以满足快速发展的工业需求,所以利用分子生物学和基因工程技术来提高棉花的产量成为未来棉花育种的主要方向。

棉株从现蕾、开花到结铃过程中,蕾铃生理脱落的趋势是开花前脱落少,开花后逐渐增加,进入盛花期后达到高峰^[1]。棉花蕾铃脱落的原因是复杂的,国内外学者提出了一些假设和学说,如段海等^[2]论述在 1922 年 Mason 提出营养学说、Gowadi 等^[3]的激素平衡学说等,但迄今尚未完全弄清蕾铃脱落的原因。棉花蕾铃脱落时,在蕾柄或铃柄的基部形成一层离层,离层的形成是一系列复杂的生理变化的结果。在许多开花植物中,花、蕾、果和花器等均能够在花柄、蕾柄、果柄和花器基部产生离层^[4]。目前,在拟南芥中,有许多与器官离层相关的基因被克隆,并对这些基因调控器官的离层进行了初步研究。Cho 等^[5]首先研究表明,IDA、HAE、HSL2 和 MAPK 激酶调控拟南芥花器官的离层形成。接着一些研究报道,在拟南芥离层细胞中发现 3 个类受体细胞质激酶负调控 IDA/HAE 信号蛋白,从而影响离层的发育^[6-8];同时 Shi 等^[9]报道拟南芥中 KNOTTED-LIKE HOMEBOX 基因位于 IDA 调控信号途径的下游参与花器官离层的形成。总之上面所述的与离层形成相关的基因研究大都集中在器官离层发育的后期,即在离层细胞已经出现和最终分离时期。迄今,在器官离层发育前期,尤其在离层细胞开始分化时期的研究还很少见报道。

拟南芥的 BLADE-ON-PETIOLE (*BOP*) 基因属于 NPR1 (Non-expressor of PR1) 家族,它主要调控植物系统获得性抗性。研究表明 *BOP1* 和 *BOP2* 功能叠加可以促进拟南芥叶和花的形成^[10]。进一步的研究证明,拟南芥、烟草等植物的 BOPs 从各个方面决定器官的形成模式,有关这方面的研究有很多报道^[10-15]。除此,拟南芥的 *BOP1* 和 *BOP2* 基因对花器官离层发育有重要的作用^[10,16],烟草中 *BOP1* 蛋白对离层形成初期起着重要的作用。

本研究从陆地棉中分离了一个对离层的分化和形成相关的调控基因 *BOP*,命名为 *GhBOP1*。利用 qRT-PCR 分析表明,其表达量在各个器官中有所差异,但在离层中优势表达。通过病毒诱导的基因沉

默 (Virus-induced gene silencing, VIGS) 方法沉默棉花植株 *GhBOP1* 基因表达,在盐胁迫下发现其能够调控棉花叶片和蕾铃脱落。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验所用棉花材料为陆地棉品种中棉所 35。烟草脆裂病毒 (TRV) 干扰表达载体 pYL-156、辅助载体 pYL-192 均由清华大学刘玉乐教授惠赠。

T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶、*Taq* 聚合酶以及 dNTPs 购自 TaKaRa 公司,利福平及卡那霉素等抗生素购自 Sigma 公司。质粒提取试剂盒和 PCR 产物回收纯化试剂盒购自上海捷瑞工程有限公司,cDNA 逆转录试剂盒和大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 购自北京全式金公司,植物总 RNA 提取试剂盒购自上海生物工程有限公司。引物合成及测序均由北京三博远志生物技术有限公司完成。

1.2 试验方法

1.2.1 *GhBOP1* 基因的克隆 根据李晶等^[17]报道的 CTAB 法分离陆地棉总 RNA。取棉花根、茎和叶片为材料,利用植物 RNA 提取试剂盒(上海生物工程有限公司)提取棉花总 RNA。取 2 μ g 总 RNA,50 pmol 的 Anchored Oligo (dT)₁₈ 用于第一链 cDNA 的合成,具体方法参照逆转录试剂盒说明(北京全式金公司)。根据 *GhBOP1* 基因的电子克隆序列设计特异引物 *BOP1* F:5'-CGCGGATCCATGAGTAGCC TTGAC-3'; *BOP1* R:5'-ACGCGTTCGACCTAGAAGTC ATCAGACTG-3',PCR 扩增获得 *GhBOP1* 基因,扩增产物回收、连接然后进行克隆测序。

1.2.2 qRT-PCR 分析 以棉花 *actin* 基因作为内参对照(引物: AF2: 5'-TTTGGCATCATACCTTT-3' 和 AR2: 5'-CACTGGCATATAGGGA-3'),进行了 qRT-PCR 分析。设计的特异引物(*qBOP1* R:5'-CCAGTA TGGTGGAGAAGGCT-3'; *qBOP1* F:5'-GCAGATGTTT GGCGAGAA-3'),以上面获得 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,以棉花 *actin* 基因为内标基因,获得结果采用 2^{- $\Delta\Delta C_q$} 方法计算基因的相对表达量^[18]。试验重复 3 次。

1.2.3 病毒诱导 *GhBOP1* 基因沉默 棉花的盐胁迫分析用上面获得 *GhBOP1* 基因为模板,利用引物设计软件 Oligo 7.0 设计的引物(*vBOP1* F:5'-GGA ATTCTGTAGAGGGTCGGTTAGTTC-3'; *vBOP1* R:5'-GGGGTACCGGCAGCAAGAGTGTCAAG-3';下划线部分为保护碱基及酶切位点)进行 PCR 扩增,扩增出的 *GhBOP1* 片段大小为 341 bp,片段通过 *EcoR* I 和

Kpn I 酶切、产物回收、4 ℃ 过夜连接和阳性克隆筛选等,将片段插入到载体 pYL-156^[19],然后经过酶切和测序验证最终获得病毒重组载体 pYL-156-*BOP1*。

将重组质粒 pYL-156-*BOP1* 利用电击法导入农杆菌 GV3101 中。农杆菌工程菌株的制备和 VIGS 方法参照 Pang 等^[20]报道。简单地说,就是将分别含有 pYL-156-*BOP1*、pYL-156、pYL-192 和正对照 pTRV-CLAI1(植物基因组学国家重点前期构建^[20])农杆菌 GV3101 进行划线培养,挑单克隆在含有 Kan、Rif、乙酰丁香酮和 MES(Sigma 公司)的液体 LB 培养基中培养过夜,取菌液 10 mL,4 000 r/min 离心 10 min 弃上清,加入 5 mL 重悬液(重悬液成分 MgCl₂ 10 mmol/L, MES 10 mmol/L, AS 200 μmol/L)重悬菌体,并调整 OD₆₀₀ 到 1.5 左右,再分别将含 pYL-156-*BOP1*、pYL-156 或正对照菌液与 pYL-192 菌液 1:1 混合,室温下静置 3 h 待用。

棉花种植于光照培养室,温度 25 ℃,光照周期 16 h。发芽 7 d 后,用注射器针头在子叶背面轻划一下,用去掉针头的 1 mL 注射器将菌液从背面注入棉花子叶,尽量使菌液浸染整个子叶。注射后的棉花植株避光处理 12 h 后,再次置于光照下培养。相同试验重复 3 次。

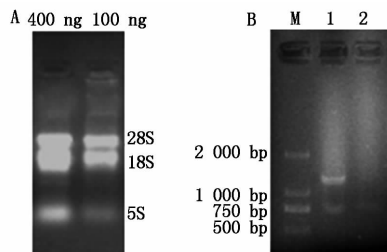
将 VIGS 处理后 15 d 的棉花植株每 3 d 浇灌 200 mmol/L 的 NaCl 溶液 100 mL 进行盐胁迫试验,然后进行观察叶片等脱落情况。

2 结果与分析

2.1 *GhBOP1* 基因的克隆

由图 1 可以看出,通过 CTAB 法分离的陆地棉叶根茎总 RNA 在电泳条件下看不到有基因组 DNA 的污染,28S 核糖体 RNA 与 18S 核糖体 RNA 的带型比较整齐,无拖尾的现象(图 1-A)。为了进一步确定此 RNA 的质量,对其进行分光光度法测定,结果显示 OD_{260/280} > 2,表明 RNA 的纯度较高,蛋白质的污染少。

在 NCBI 数据库中,利用棉花 EST 数据,通过电子克隆获得 *GhBOP1* 基因的 cDNA 全长。以 cDNA 第一链为模板,用合成的引物进行 PCR 反应,经电泳检测,扩增出大约 1.5 kb 大小的条带(图 1-B)。对此片段回收克隆后进行序列测定。将测定的序列和数据库进行比较,和大多生物的 *BOP* 基因同源性很高,所以把该基因定名为 *GhBOP1*,其开放阅读框长度为 1 489 bp,推导的氨基酸序列为 484 个氨基酸残基,具体氨基酸序列见图 2-A。



A. 棉花总 RNA 的电泳图; B. *GhBOP1* 基因的 PCR 扩增; M. DL2000 DNA 分子量标准; 1. 棉花 cDNA; 2. ddH₂O。

A. Detection of cotton total RNA; B. Isolation of *GhBOP1* gene by PCR amplification; M. DL2000 DNA molecular Marker; 1. Cotton cDNA; 2. ddH₂O.

图 1 棉花总 RNA 的提取和 *GhBOP1* 基因的分离

Fig. 1 Extraction of cotton total RNA and isolation of *GhBOP1* gene

2.2 棉花 *GhBOP1* 同源性和进化分析

GhBOP1 蛋白序列通过结构域分析表明,含有 BTB 和 ANK 这 2 个结构域(图 2-B),BTB 结构域家族比较大,包括 BOP 和 NPR 这 2 类蛋白。应用拟南芥的 NPR1 和烟草的 BOP3 进行序列比对,这个家族蛋白是比较保守的,蛋白同源性在 95% 以上,在氨基酸序列上也发现了保守的 BTB 和 4 个 ANK 的结构域(图 2-B)。

将 *GhBOP1* 氨基酸序列与 GenBank 中已经登陆的同源蛋白质库进行比对后,获取其同源性高的其他植物氨基酸序列。所有同源性氨基酸序列的 E-值都在 0.01 以下,因此,选取同物种序列中 score 值最高的一条,共选 11 条,利用 NCBI 上自带软件,采用邻连法(NJ 法)绘制进化树,如图 3。序列比较表明,*GhBOP1* 在进化过程中具有保守性较高,进化速度缓慢的特点。

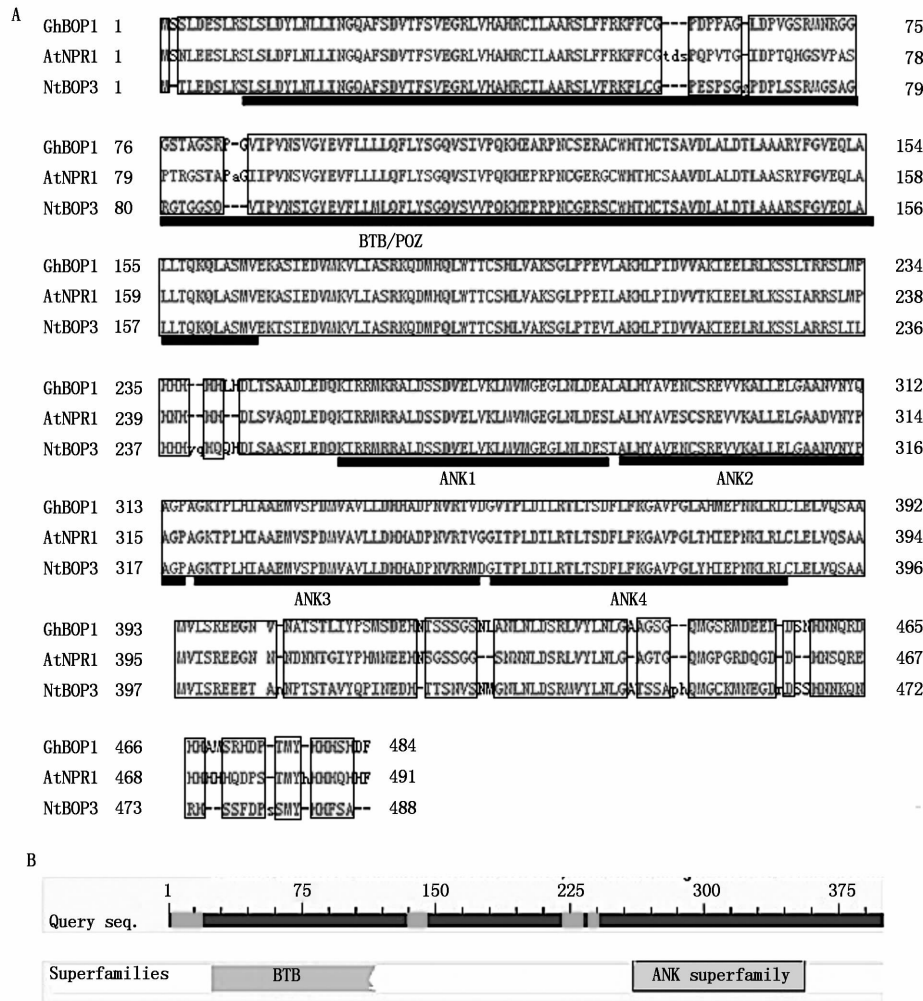
2.3 *GhBOP1* 基因的组织表达分析

利用定量 qRT-PCR 技术分析棉花 *GhBOP1* 基因在叶、根、茎、子叶、花、开花后 3, 9 d 纤维以及叶柄离层组织中的表达情况。*GhUBI* 基因作为内标来定量各组织器官的表达情况。结果表明,*GhBOP1* 基因在陆地棉的根、茎、叶等器官组织均有表达,但在离层为优势表达,表达量为叶片表达量的 20 倍(图 4)。

2.4 病毒诱导基因沉默技术分析 *GhBOP1* 的功能

利用植物基因组学国家重点实验室建立了烟草脆裂病毒(TRV)为载体的棉花功能基因沉默体系,该体系很好地验证了基因缺失后所表现的表型和功能^[20]。当病毒接种后 15 d,病毒沉默的标记基因 *GhCLA1* 植株呈现白色漂白叶片,对照没有变化(图 5-A, B)。采摘植株顶端叶片进行基因沉默效果分析,结果表明, *GhBOP1* 基因的表达被抑制(图 5-C)。这时,对沉默 *GhBOP1* 基因植株进行盐胁迫试

验。以 200 mmol/L NaCl 来浇灌植株,处理 5 d 后,因植株叶片没有脱落(图 5-C)。发现对照植株表现为全部落叶;而沉默 *GhBOP1* 基



A. 序列同源性分析; 方框内表示相同, 方框外表示不同; B. 蛋白结构域。
A. Amino acid sequences alignment of GhBOP1 and two homologs; The letter in the box represent same amino acid, the letters out of box represent different; B. Predication of GhBOP1 domains.

图 2 GhBOP1 序列同源性分析和功能结构域

Fig.2 Analysis of sequence identity of GhBOP1 and two homologs and predication of GhBOP1 domain

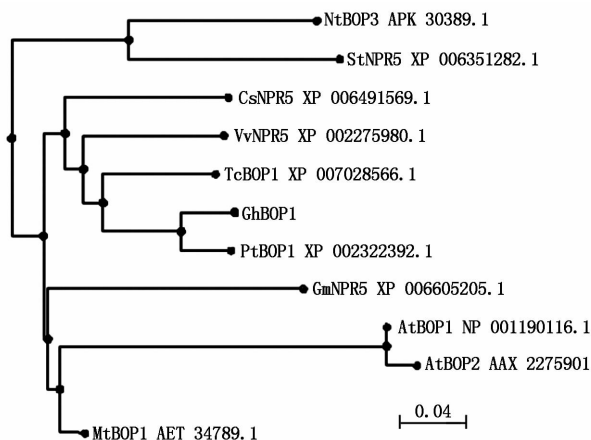


图3 GhBOPI 蛋白的系统进行树分析
Fig.3 The relatedness of GhBOPI and homologs shown by an unrooted phylogenetic tree

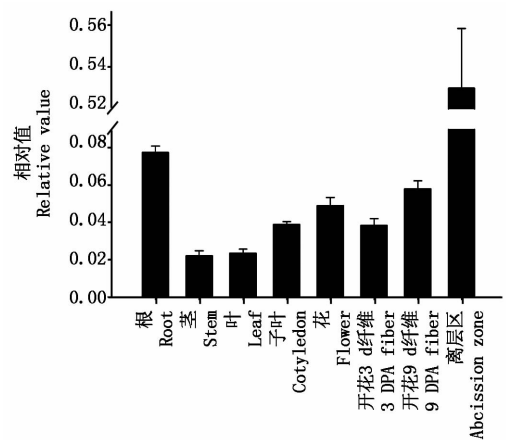


图4 *GhBOPI* 基因在棉花不同器官中的表达
Fig.4 Expression profile of *GhBOPI* gene
in various cotton organs

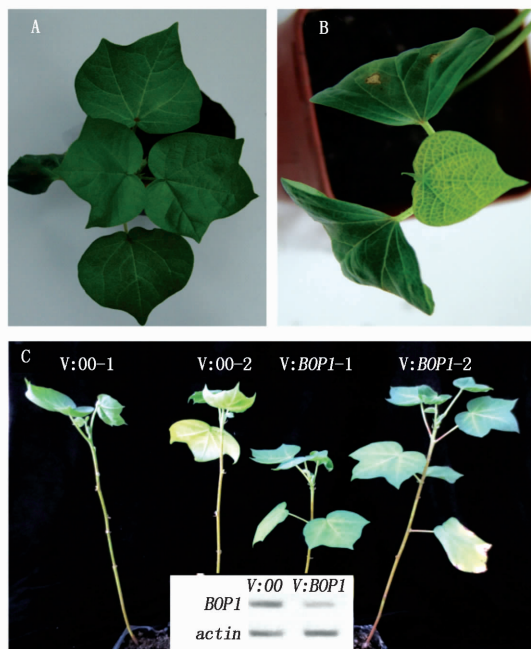


图 5 *GhBOP1* 基因表达沉默植株对盐胁迫响应
Fig5 Response of *GhBOP1*-silenced plant under salt stress

3 讨论

BOP 蛋白在植物中有多种作用,包括模式植物拟南芥中叶片和花器官形成^[10],拟南芥叶形分化^[11],器官分化和极性的决定^[12-13]等;在烟草中 BOP2 调节花冠离层的分化^[14],最近也报道 BOP 蛋白也控制着抗性和发育^[15]。从以上的报道中表明,BOP 蛋白主要是在新生区和离层区起着特异分化的功能,同时也涉及植物的抗病性。

棉花中 *BOP* 基因可能有多个同源基因,其会在植株不同的部位表达量不同,发挥不同功能。因此,这类蛋白作用也存在多样性,控制多个器官的分化发育和形态建成,并且参与多个调控网络。正如别的植物中 BOP 蛋白也存在其他功能,拟南芥中 BOP1 和 BOP2 功能叠加可以促进叶和花的形成^[10]。*GhBOP1* 基因在铃柄离层组织中的表达为优势表达,其表达量远远大于其他组织器官中的表达。因此,其功能可能参与离层的形成和分化。控制离层区细胞的特异性分化与在烟草中 BOP2^[14]可能存在着相似的功能和分子机制。

本研究中分离的棉花 *BOP1* 基因编码的蛋白可

能通过决定离层的分化进而参与整个叶片的脱落过程。本研究通过 VIGS 技术诱导基因沉默,成功干扰了 *GhBOP1* 基因的表达,可能使叶柄着生处的离层区细胞分化不能有效地进行,造成了叶片在盐等逆境下不能正常脱落。这些结果表明,*GhBOP1* 蛋白对棉花的离层形成有重要的调控功能。

参考文献:

- [1] 倪金柱. 棉花栽培生理[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986.
- [2] 段海,徐立华,陈德华. 氮肥运筹及化控对棉花源库质量影响的研究[J]. 江苏农业研究,1999,20(4):11-15.
- [3] Gowadi A G, Avery G S. Leaf abscission and the so called "abscission layer" [J]. American Journal of Botany, 1950, 37:172-180.
- [4] Van Doorn W G, Stead A D. Abscission of flowers and floral parts [J]. Journal of Experimental Botany, 1997, 48: 821-83.
- [5] Cho S K, Larue C T, Chevalier D, et al. Regulation of floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana* [J]. Proceeding of the National Academy of Sciences USA, 2008, 105: 15629-15634.
- [6] Leslie M E, Lewis M W, Youn J Y, et al. The EVERSLED receptor-like kinase modulates floral organ shedding in *Arabidopsis* [J]. Development, 2010, 137(3):467-476.
- [7] Lewis M W, Leslie M E, Fulcher E H, et al. The SERK1 receptor-like kinase regulates organ separation in *Arabidopsis* flowers [J]. The Plant Journal, 2010, 62(5):817-828.
- [8] Niederhuth C E, Cho S K, Seitz K, et al. Letting go is never easy: abscission and receptor-like protein kinases [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2013, 55(12):1251-1263.
- [9] Shi C L, Stenvik G E, Vie A K, et al. *Arabidopsis* class I KNOTTED-like homeobox proteins act downstream in the IDA-HAE/HSL2 floral abscission signaling pathway [J]. The Plant Cell, 2011, 23(7):2553-2567.
- [10] Hepworth S R, Zhang Y, Mckim S, et al. BLADE-ON-PETIOLE-dependent signaling controls leaf and floral patterning in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2005, 17(5):1434-1448.
- [11] Ha C M, Jun J H, Fletcher J C. Control of *Arabidopsis* leaf morphogenesis through regulation of the YABBY and KNOX families of transcription factors [J]. Genetics, 2010, 186(1):197-206.
- [12] Jun J H, Ha C M, Fletcher J C. BLADE-ON-PETIOLE1 coordinates organ determinacy and axial polarity in *Arabidopsis* by directly activating ASYMMETRIC LEAVES2

- [J]. The Plant Cell, 2010, 22(1): 62–76.
- [13] Xu M, Hu T, Mckim S M, *et al.* Arabidopsis BLADE-ON-PETIOLE1 and 2 promote floral meristem fate and determinacy in a previously undefined pathway targeting AP-ETALA1 and AGAMOUS-LIKE24 [J]. The Plant Journal, 2010, 63(6): 974–989.
- [14] Wu X M, Yu Y, Han L B, *et al.* The tobacco BLADE-ON-PETIOLE2 gene mediates differentiation of the corolla abscission zone by controlling longitudinal cell expansion [J]. Plant Physiology, 2012, 159(2): 835–850.
- [15] Khan M, Xu H, Hepworth S R. BLADE-ON-PETIOLE genes: setting boundaries in development and defense [Z]. 2014; 157–171.
- [16] Mckim S M, Stenvik G E, Butenko M A, *et al.* The BLADE-ON-PETIOLE genes are essential for abscission zone formation in Arabidopsis [J]. Development, 2008, 135(8): 1537–1546.
- [17] 李 晶, 王亦学, 郑德刚, 等. 一种简单高效提取棉花不同组织总 RNA 的方法 [J]. 山西农业科学, 2009, 37(5): 17–19.
- [18] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method [J]. Nature Protocols, 2008, 3(6): 1101–1108.
- [19] Liu Y, Schiff M, Marathe R, *et al.* Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco Mosaic virus [J]. The Plant Journal, 2002, 30(4): 415–429.
- [20] Pang J, Zhu Y, Li Q, *et al.* Development of agrobacterium-mediated virus-induced gene silencing and performance evaluation of four marker genes in gossypium barbadense [J]. PLoS One, 2013, 8(9): e73211.

网址: <http://www.hbnxb.net/>