

分类号: S2
学号: 20202306010

密级: 公开
单位代码: 10759

石河子大学

博士学位论文



GhBLH1 与 GhKNOX6 拮抗调控棉花纤维伸长发育的机制研究

学位申请人	贾婷婷
指导教师	林忠平 教授 李鸿彬 教授
申请学位类别	工学博士
专业名称	农业工程学
研究领域	农业生物环境与能源工程
所在学院	生命科学学院

中国·新疆·石河子

2024年5月

分类号: S2
学号: 20202306010

密级: 公开
单位代码: 10759

石河子大学

博士学位论文



GhBLH1 与 GhKNOX6 拮抗调控棉花纤维伸长发育的机制研究

学位申请人	贾婷婷
指导教师	林忠平 教授 李鸿彬 教授
申请学位类别	工学博士
专业名称	农业工程学
研究领域	农业生物环境与能源工程
所在学院	生命科学学院

中国·新疆·石河子

2024年5月

**Study on the antagonistically mechanism of GhBLH1 and
GhKNOX6 on cotton fiber elongation and development**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Doctor of Agriculture Engineering

By

Ting-ting Jia

(Agricultural Biological Environmental and Energy Engineering)

Dissertation Supervisor: Prof. Zhong-ping Lin

Prof. Hong-bin Li

Shihezi, Xinjiang, China

May, 2024

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：贾婷婷

时间：2024年5月15日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：贾婷婷

时间：2024年5月15日

导师签名：李圳

时间：2024年5月15日

摘要

目的：棉花纤维是天然纤维的来源之一，可用于纺织、医疗、工业等领域。随着社会的快速发展，人们对棉花纤维的需求日益增长。此外，市场对于棉花品质的要求越来越高，传统的棉花品种已无法满足市场需求。因此，利用现代育种技术以及遗传改良方法进行棉花新品种选育，可能会成为解决我国棉花供需矛盾的有效手段。本研究利用棉花遗传转化体系获得在纤维中高表达基因 *GhBLH1* 的过表达及基因沉默植株，并进行转录组分析，以探究 *GhBLH1* 调控的下游途径；进一步利用酵母双杂技术筛选出与 *GhBLH1* 互作的蛋白 *GhKNOX6*；最终利用分子生物学、棉花转基因和遗传学手段阐明 *GhBLH1* 和 *GhKNOX6* 在植物细胞伸长中的作用。本研究可为提高纤维产量和改善纤维品质提供重要的理论基础及新的基因资源。

方法：选择在棉花纤维中高表达基因 *GhBLH1*，利用棉花遗传转化技术获得 *GhBLH1* 过表达和沉默株系。利用 *GhBLH1* 转基因植株的转录组数据筛选 *GhBLH1* 下游调控途径及候选基因。通过酵母单杂试验（Y1H）、烟草荧光素酶（LUC）报告基因瞬时表达试验、凝胶阻滞电泳迁移试验（EMSA）和染色质免疫共沉淀 qPCR（ChIP-qPCR）验证 *GhBLH1* 与候选基因的互作关系。利用酵母双杂交技术筛选出 *GhBLH1* 的互作蛋白 *GhKNOX6*，并利用 Pull-down 试验和免疫共沉淀试验（Co-IP）试验进一步验证二者的结合。通过棉花杂交试验，进一步探究 *GhKNOX6* 与 *GhBLH1* 的遗传关系。

结果：（1）*GhBLH1* 正向调控棉花纤维伸长。对 *GhBLH1* 过表达和沉默株系遗传表型进行观察分析，结果表明与野生型植株相比，*GhBLH1*-OE 植株产生更长的纤维，而 *GhBLH1*-RNAi 植株产生更短的纤维。为了明确 *GhBLH1* 转基因棉花的遗传稳定性，对不同地区、不同世代棉花纤维长度进行统计分析，结果表明此性状可以稳定遗传。此外，*GhBLH1* 表达的改变并不影响棉铃的长宽比、种子重量和棉花植株的营养生长。这些结果表明，*GhBLH1* 正向调控棉花纤维伸长。

（2）*GhBLH1* 通过促进亚麻酸生物合成正向调控棉纤维伸长。通过对 *GhBLH1* 转基因植株的 15 DPA 纤维进行转录组数据（RNA-seq）分析，发现不饱和脂肪酸生物合成途径（Biosynthesis of unsaturated fatty acids）和 α -亚麻酸代谢途径（alpha-Linolenic acid metabolism）被显著富集。不饱和脂肪酸谱检测表明，与野生型相比，*GhBLH1*-OE 转基因棉花中亚麻酸（C18:3）含量显著升高，而 *GhBLH1*-RNAi 转基因棉花中亚麻酸（C18:3）含量明显减少。*GhBLH1* 转基因株系中其他不饱和脂肪酸的含量与野生型相比无明显差异。这些结果表明 *GhBLH1* 促进亚麻酸生物合成正向调控纤维发育。

（3）*GhBLH1* 激活下游 *GhFAD7A-1* 的转录。通过 *GhBLH1* 转基因植株的转录组数据，成功鉴定到两个负责亚麻酸生物合成的脂肪酸去饱和酶 3 基因 *GhFAD7A-1* 和 *GhFAD3-1*。酵母单杂交试验（Y1H）表明 *GhBLH1* 可以直接结合 *GhFAD7A-1* 启动子，而不能结合 *GhFAD3-1* 启动子，表明 *GhFAD7A-1* 和 *GhFAD3-1* 分别是 *GhBLH1* 的直接和间接下游基因。烟草荧光素酶（LUC）报告基因瞬时表达试验、凝胶阻滞电泳迁移试验（EMSA）及染色质免疫沉淀 qPCR（ChIP-qPCR）进一步表明 *GhBLH1* 直接结合 *GhFAD7A-1* 启动子并促进其表达。根据 *GhBLH1* 的结构域特征以及 *GhFAD7A-1* 启动子中顺式作用元件 TGGA 分布，对 *GhBLH1* 结构域和 *GhFAD7A-1* 启动子进行分段

试验, 结果表明 GhBLH1 的 POX 结构域通过与 *GhFAD7A-1* 启动子区域的第四个 TGGA 顺式元件结合, 正向调节 *GhFAD7A-1* 基因的转录。

(4) GhFAD7A-1 正向调控棉花纤维伸长。对 *GhFAD7A-1* 过表达和敲除株系遗传表型进行观察分析, 结果表明与野生型植株相比, *GhFAD7A-1*-OE 株系产生的纤维更长, 而 *GhFAD7A-1*-Cas9 株系产生的纤维更短。不同地区与不同世代数的棉花纤维长度分析表明, 该性状可在棉花中稳定遗传。此外, *GhFAD7A-1* 表达的改变并不影响棉铃的长宽比、种子重量和棉花植株的营养生长。这些结果表明 GhFAD7A-1 对棉花纤维伸长发育起正向调节作用。

(5) GhBLH1 与 GhKNOX6 形成异源二聚体发挥功能。通过酵母双杂试验将 GhBLH1 与 GhKNOX 家族成员进行互作验证, 结果发现 GhBLH1 与 GhKNOX6 存在强烈的相互作用。蛋白结构域的分段试验表明 GhBLH1 的 POX 结构域和 GhKNOX6 的 K2 结构域是 GhBLH1 和 GhKNOX6 相互作用的必要结构域。

(6) GhKNOX6 负向调控棉花纤维伸长及种子重量。对 *GhKNOX6* 过表达和敲除植株遗传表型进行观察分析, 结果表明与野生型植株相比, *GhKNOX6*-OE 产生较短的纤维, *GhKNOX6*-Cas9 株系产生更长的纤维。此外, 与野生型相比, *GhKNOX6*-OE 株系的铃重减少、花明显变小以及纤维起始数量变少, *GhKNOX6*-Cas9 株系的铃重、花大小和纤维起始数量没有明显变化。不同地区与不同世代数的棉花纤维长度分析表明, 该性状可在棉花中稳定遗传。*GhKNOX6* 表达的改变不影响植株的营养生长。这些结果表明 GhKNOX6 在棉花纤维伸长及种子重量起负调控作用。

(7) GhKNOX6 负调控 GhBLH1 介导的脂肪酸对纤维的伸长。酵母单杂交 (Y1H) 试验、烟草荧光素酶 (LUC) 报告基因瞬时表达试验以及凝胶阻滞电泳迁移试验 (EMSA) 的结果表明 GhKNOX6 通过与 GhBLH1 相互作用形成异源二聚体, 从而干扰其对 *GhFAD7A-1* 的转录激活。杂交试验表明在 GhKNOX6 参与下, 抑制 GhBLH1 对 *GhFAD7A-1* 转录活性的调控, 进而影响亚麻酸含量的积累, 最终影响纤维发育。这些结果表明 GhKNOX6 负调控 GhBLH1 介导的脂肪酸对纤维的伸长。

结论: 在本研究中, 我们发现一个 BLH 家族成员 GhBLH1 通过直接结合 *GhFAD7A-1* 启动子区域的 TGGA 顺式元件诱导其表达, 促进亚麻酸的生物合成, 从而促进棉花纤维细胞的伸长。此外, GhKNOX6 与 GhBLH1 相互作用形成功能性异源二聚体, 干扰 GhBLH1 对 *GhFAD7A-1* 的转录激活, 从而负向调节棉纤维伸长。我们的研究结果揭示了 GhBLH1 与 GhKNOX6 拮抗调控棉花纤维伸长的分子机制, 加深了不饱和脂肪酸在棉纤维伸长中的理解, 为棉花遗传育种提供了新的基因资源。

关键词: 棉花纤维; GhBLH1; GhKNOX6; 亚麻酸生物合成; 纤维细胞伸长

Abstract

Object: Cotton fibers represent one of the sources of natural fibers, widely applied in fields such as textiles, medical, and industry. With the rapid development of society, people's ever-increasing demand for cotton fibers. In addition, the market's demand for cotton quality is escalating, and traditional cotton varieties can no longer meet these needs. Therefore, modern breeding techniques and genetic improvement methods to breed new cotton varieties may be an effective means to solve the contradiction between supply and demand of cotton. This study employed cotton genetic transformation system to obtain transgenic lines overexpressing and silencing the *GhBLH1* gene with high expression in cotton fiber. Transcriptome analysis of *GhBLH1* transgenic lines was used to explore downstream metabolic pathways regulated by *GhBLH1*. Additionally, yeast two-hybrid assay was utilized to screen for genes interacting with GhBLH1, such as GhKNOX6. Molecular techniques, cotton genetic transformation system, and genetic methods were applied to elucidate the roles of GhBLH1 and GhKNOX6 in plant cell elongation, providing a significant theoretical foundation and novel gene resources for increasing fiber yield and improving fiber quality.

Methods: *GhBLH1* gene with high expression in cotton fiber was selected and transgenic lines with overexpressed and silenced *GhBLH1* were obtained using genetic transformation techniques. Transcriptome analysis from *GhBLH1* transgenic plants were used to select downstream pathways regulated and candidate genes by GhBLH1. Validation of downstream target genes regulated by GhBLH1 was performed using yeast one-hybrid (Y1H) assay, tobacco transient expression with the luciferase (LUC) reporter gene assay, electrophoretic mobility shift assay (EMSA), and chromatin immunoprecipitation qPCR (ChIP-qPCR). The interaction between GhBLH1 and GhKNOX was confirmed through yeast two-hybrid assay and further validated by Pull-down and co-immunoprecipitation (Co-IP) assays. Genetic relationships between GhKNOX6 and GhBLH1 were further investigated through cotton hybridization experiments.

Results: (1) GhBLH1 positively regulates cotton fiber elongation. The genetic phenotypes of *GhBLH1* overexpressing and silencing lines were analyzed, and the results showed that the *GhBLH1*-OE lines produced longer fibers and the *GhBLH1*-RNAi lines produced shorter fibers compared with wild-type plants. To determine the genetic stability of *GhBLH1* transgenic cotton, the fiber length was observed and statistically analyzed across different regions and generations and the results showed that this trait could be inherited stably. Additionally, the *GhBLH1* transgenic plants did not affect the length/width ratio of cotton bolls, seed weight, or the vegetative growth of the cotton plants. These results indicate that GhBLH1 positively regulates cotton fiber elongation.

(2) GhBLH1 promote linolenic acid synthesis to positively regulate fiber development. Transcriptome sequencing (RNA-seq) analysis of 15 DPA fibers from *GhBLH1* transgenic plants revealed significant enrichment in the biosynthesis of unsaturated fatty acids and alpha-linolenic acid metabolism. Analysis of the unsaturated fatty acid profile showed a significant increase in linolenic acid (C18:3) content in

GhBLH1-OE transgenic cotton, while *GhBLH1*-RNAi transgenic cotton had a notable reduction in linolenic acid (C18:3) content compared to wild type. The contents of other unsaturated fatty acids in *GhBLH1* transgenic plants were not significantly different compared to wild type. These results suggest that GhBLH1 promote linolenic acid synthesis to positively regulate fiber development.

(3) GhBLH1 positively regulates the transcription of the *GhFAD7A-1*. Through transcriptome data from *GhBLH1* transgenic plants, two fatty acid desaturase 3 genes, *GhFAD7A-1* and *GhFAD3-1*, responsible for the biosynthesis of linolenic acid, were successfully identified. Yeast one-hybrid (Y1H) assay revealed that GhBLH1 could directly bind to the promoter of *GhFAD7A-1* but not to the promoter of *GhFAD3-1*, indicating that *GhFAD7A-1* and *GhFAD3-1* are direct and indirect downstream genes of GhBLH1, respectively. Further functional validation that GhBLH1 directly binds to the *GhFAD7A-1* promoter and promotes its expression were provided by tobacco transient expression with the luciferase (LUC) reporter gene assay, electrophoretic mobility shift assay (EMSA), and chromatin immunoprecipitation quantitative PCR (ChIP-qPCR). Based on the structural domain characteristics of GhBLH1 and the distribution of the TGGG cis-elements in the *GhFAD7A-1* promoter, segmental analysis of GhBLH1 domain and the *GhFAD7A-1* promoter revealed that the POX domain of GhBLH1 positively regulates the transcription of the *GhFAD7A-1* by binding to the fourth TGGG cis-element in the promoter region of *GhFAD7A-1*.

(4) *GhFAD7A-1* positively regulates cotton fiber elongation. The genetic phenotypes of *GhFAD7A-1* overexpressing and silencing lines were analyzed, and the results showed that the *GhFAD7A-1*-OE lines produced longer fibers, and the *GhFAD7A-1*-Cas9 lines produced shorter fibers compared to wild-type plants. Observations and statistical analyses of cotton fiber length across different regions and generations showed that the trait was stably inherited in *GhFAD7A-1* transgenic cotton. Additionally, *GhFAD7A-1* transgenic material did not affect the length/width ratio of cotton bolls, seed weight, or vegetative growth of cotton plants. These results indicate that *GhFAD7A-1* positively regulates cotton fiber elongation.

(5) GhBLH1 and GhKNOX6 form a heterodimer to function. The interaction between GhBLH1 and GhKNOX family members was verified by yeast two-hybrid assay, and it was found that GhBLH1 and GhKNOX6 had strong interaction. Domain dissection experiments indicated that the POX domain of GhBLH1 and the K2 domain of GhKNOX6 are essential for the interaction between GhBLH1 and GhKNOX6 by protein domain segmentation assay.

(6) GhKNOX6 negatively regulates cotton fiber elongation and seed weight. *GhKNOX6* overexpression and knockout lines were analyzed, and the results showed that *GhKNOX6*-OE plants produced shorter fibers, while *GhKNOX6*-cas9 plants produced longer fibers compared to wild-type plant. In addition, compared with the wild type, the boll weight, flower size and fiber initiation number of *GhKNOX6*-OE lines decreased, while the *GhKNOX6*-Cas9 lines did not change significantly. The analysis of cotton fiber length in different regions and generations showed that this trait could be inherited stably in cotton. The

change of GhKNOX6 expression did not affect the vegetative growth of the plants. These results suggest that GhKNOX6 negatively regulates cotton fiber elongation and seed weight.

(7) GhKNOX6 negatively regulates the GhBLH1-mediated promotion of fiber elongation by fatty acids. Yeast one-hybrid (Y1H) assay, tobacco transient expression with the luciferase (LUC) reporter gene assay, and electrophoretic mobility shift assay (EMSA) indicated that GhKNOX6 interacts with GhBLH1 to form a heterodimeric complex, thereby interfering with the transcriptional activation of *GhFAD7A-1*. Further cotton hybridization experiments between *GhKNOX6* transgenic lines and *GhBLH1* transgenic lines showed that in the presence of GhKNOX6 protein, the regulatory effect of GhBLH1 on the transcriptional activity of *GhFAD7A-1* was inhibited, which in turn affects the accumulation of linolenic acid content and ultimately influences fiber development. These results indicate that GhKNOX6 negatively regulates the GhBLH1-mediated promotion of fiber elongation by fatty acids.

Conclusions: In this study, we identified a BLH member, GhBLH1, that regulated *GhFAD7A-1* transcription through direct binding to the TGGGA cis-element in its promoter region to promote linolenic acid accumulation and to promote fiber cell elongation in cotton. In addition, GhKNOX6 interacts with GhBLH1 to form a functional heterodimer that interferes with the transcriptional activation of *GhFAD7A-1* to negatively regulate cotton fiber cell elongation. Our results reveal that GhBLH1 and GhKNOX6 antagonistically modulate fiber development, broaden the understanding of the role of unsaturated fatty acids in cotton fiber elongation, and provide new gene resources for crop genetic breeding.

Key words: Cotton fiber; GhBLH1; GhKNOX6; Linolenic acid biosynthesis; Fiber cell elongation

目录

摘要	I
Abstract	III
缩写词表	X
第 1 章 文献综述	1
1.1 棉花概述	1
1.2 转录因子调控植物生长发育	2
1.3 TALE 超家族转录因子研究进展	4
1.3.1 BLH 转录因子	5
1.3.2 KNOX 转录因子	7
1.4 不饱和脂肪酸代谢及其调控	10
1.4.1 不饱和脂肪酸的功能	10
1.4.2 不饱和脂肪酸的代谢途径及其调控	10
1.4.3 脂肪酸调控棉花发育的研究进展	11
1.5 研究目的与意义	11
第 2 章 GhBLH1 通过促进亚麻酸生物合成正向调控棉纤维伸长	13
2.1 材料与方法	13
2.1.1 植物材料	13
2.1.2 植物转化	13
2.1.3 植物 DNA 的提取	14
2.1.4 棉花纤维 RNA 提取及检测	15
2.1.5 cDNA 合成	15
2.1.6 实时定量 PCR (qRT-PCR)	16
2.1.7 纤维长度测量	16
2.1.8 RNA-Seq 分析	17
2.1.9 不饱和脂肪酸含量测定	17
2.2 结果与分析	17
2.2.1 <i>GhBLH1</i> 转基因棉花鉴定与分析	17
2.2.2 GhBLH1 转基因棉花表型分析	19
2.2.3 <i>GhBLH1</i> 转基因棉花转录组数据分析	23
2.2.4 转录组数据差异基因 KEGG 富集分析	24
2.2.5 长链不饱和脂肪酸在纤维中含量分析	26
2.2.6 长链不饱和脂肪酸代谢途径差异基因表达分析	28

2.3 讨论	31
2.3.1 GhBLH1 促进棉花纤维发育	31
2.3.2 GhBLH1 参与亚麻酸 (C18:3) 的合成调控	31
第 3 章 GhBLH1 靶向调控 <i>GhFAD7A-1</i> 转录促进棉纤维伸长	32
3.1 材料与方法	32
3.1.1 植物材料	32
3.1.2 植物转化	32
3.1.3 棉花纤维 RNA 提取及检测	32
3.1.4 cDNA 合成	32
3.1.5 实时定量 PCR (qRT-PCR)	32
3.1.6 纤维长度测量	32
3.1.7 酵母单杂试验	33
3.1.8 烟草瞬时表达和双荧光素酶(dual-LUC)测定	36
3.1.9 原核表达试验 (His 标签)	38
3.1.10 凝胶阻滞电泳迁移试验 (EMSA)	43
3.1.11 染色质免疫共沉淀试验	45
3.2 结果与分析	48
3.2.1 <i>GhFAD7A-1</i> 是 GhBLH1 的直接靶基因	48
3.2.2 GhBLH1 的 POX 结构域直接结合 <i>GhFAD7A-1</i> 启动子	49
3.2.3 GhBLH1 直接结合 <i>GhFAD7A-1</i> 启动子的 P2 段	50
3.2.4 GhBLH1 的 POX 结构域直接结合 <i>GhFAD7A-1</i> 启动子的 P2 段 TGGA 顺式元件	52
3.2.5 <i>GhFAD7A-1</i> 转基因棉花鉴定与分析	54
3.2.6 <i>GhFAD7A-1</i> 转基因棉花表型分析	55
3.3 讨论	59
第 4 章 GhKNOX6 通过抑制 <i>GhFAD7A-1</i> 的转录活性负调控纤维伸长	61
4.1 材料与方法	61
4.1.1 植物材料	61
4.1.2 植物转化	61
4.1.3 棉花纤维 RNA 提取及检测	61
4.1.4 cDNA 合成	61
4.1.5 实时定量 PCR (qRT-PCR)	61
4.1.6 纤维长度测量	61
4.1.7 酵母双杂试验	62
4.1.8 系统发育进化分析	64

4.1.9 蛋白结构域分析	64
4.1.10 原核表达试验 (GST 标签)	64
4.1.11 Pull-down 试验	66
4.1.12 免疫共沉淀试验 (Co-IP)	67
4.2 结果与分析	69
4.2.1 棉花中 KNAT 家族进化分析	69
4.2.2 GhBLH1 蛋白与 GhKNOX6 蛋白相互作用	72
4.2.3 GhKNOX6 蛋白结构域分析	74
4.2.4 GhBLH1 蛋白的 POX 结构域结合 GhKNOX6 蛋白 K2 结构域发挥功能	76
4.2.5 GhKNOX6 转基因棉花鉴定与分析	77
4.2.6 GhKNOX6 转基因棉花表型分析	78
4.2.7 GhKNOX6 抑制 <i>GhFAD7A-1</i> 的转录活性	85
4.3 讨论	86
4.3.1 GhKNOX6 调控棉花纤维伸长	86
4.3.2 GhBLH1 与 GhKNOX6 结合调控下游基因表达	87
第 5 章 GhKNOX6 抑制 GhBLH1 介导的纤维细胞伸长	88
5.1 材料与方法	88
5.1.1 植物材料	88
5.1.2 植物转化	88
5.1.3 棉花纤维 RNA 提取及检测	88
5.1.4 cDNA 合成	88
5.1.5 实时定量 PCR (qRT-PCR)	88
5.1.6 纤维长度测量	88
5.1.7 酵母单杂试验	88
5.1.8 烟草瞬时表达和双荧光素酶(dual-LUC)测定	89
5.1.9 凝胶阻滞电泳迁移试验 (EMSA)	89
5.1.10 棉花杂交试验	89
5.2 结果与分析	89
5.2.1 GhKNOX6 结合 GhBLH1 抑制 <i>GhFAD7A-1</i> 的转录活性	89
5.2.2 GhKNOX6 抑制 GhBLH1 介导的纤维细胞伸长	91
5.3 讨论	98
5.3.1 BLHs 与 KNOX 蛋白相互作用调控植物发育	98
5.3.2 脂肪酸参与植物细胞的伸长	98
第 6 章 结论与展望	100

6.1 全文结论	100
6.2 创新点	102
6.3 展望	102
参考文献	103
附录	117
致谢	121
作者简介	123

缩写词表

英文缩写	英文全称	中文名称
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
CTAB	Cetyltrimethylammonium Bromide	十六烷基三甲基溴化铵
min	minute	分钟
s	second	秒
h	hour	小时
DPA	days post anthesis	开花后天数
FDR	false discovery rate	错误发现率
DEG	differential expression Gene	差异表达基因
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
Kan	Kanamycin	卡那霉素
Rif	Rifampicin	利福平
Gent	Gentamicin	庆大霉素
OD	Optical Density	光密度
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
RNase	Ribonucleic acid enzyme	核糖核酸酶
rpm	Rotation per minute	每分钟转速
RT-PCR	Reverse transcriptative PCR	反转录 PCR
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoly- β -D- galactoside	5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷
EDTA	Ethylene Diaminetetracetic Acid	乙二胺四乙酸
IPTG	isopropylthio- β -D-galactoside	异丙基硫代- β -D-半乳糖苷

第1章 文献综述

1.1 棉花概述

棉花 (*Gossypium spp.*) 是一种常异花授粉作物, 属于锦葵科棉属, 是世界上最重要的天然纤维作物之一, 还是食品工业的主要油料来源。其中陆地棉具有较高的产量和良好的环境适应性, 是目前世界范围内主要栽培棉花。棉花的种植区域主要集中在中国新疆, 中亚和南非等地区 (张经博, 2021)。棉花主要包括两种异源四倍体棉花陆地棉 (*Gossypium hirsutum*, AD_1) 和海岛棉 (*Gossypium barbadense*, AD_2), 及两种二倍体棉花亚洲棉 (*Gossypium arboreum*, A_1) 和雷蒙德氏棉 (*Gossypium raimondii*, D_5)。近几年研究发现, 四倍体棉花 A 亚基因组的实际供体既不是 A_1 也不是 A_2 , 而是可能已灭绝的共同祖先 A_0 (Huang et al., 2020)。 A_0 基因组在大约 70 万年前分化形成现存的 A_1 和 A_2 基因组 (图 1-1) (Huang et al., 2020)。现今二倍体和四倍体棉花基因组测序的完成, 为转录组测序分析基因功能提供更有利的条件。

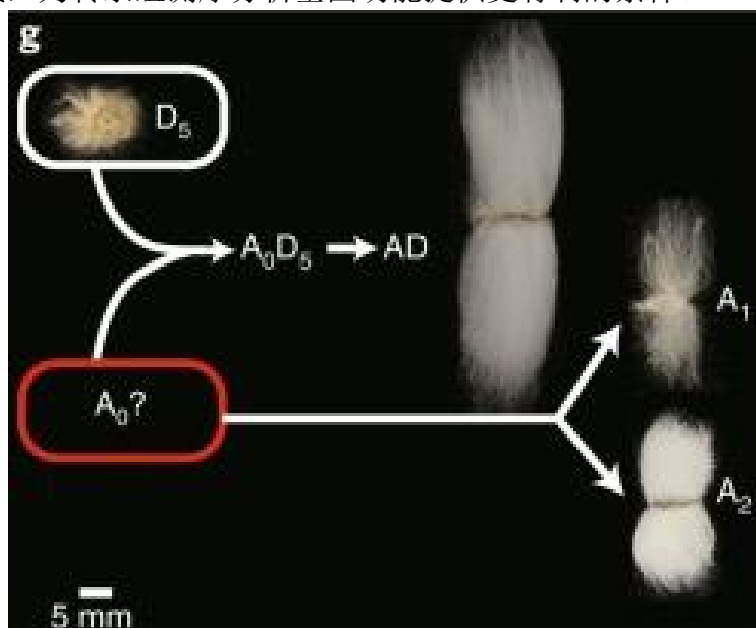


图 1-1 异源四倍体棉花的形成模型 (Huang et al., 2020)

Figure 1-1 Formation model of allotetraploid cotton

棉纤维常被用作研究单细胞伸长和细胞壁生物发生的模型系统 (Haigler et al., 2012)。棉纤维是源自胚珠表皮细胞的单细胞毛状体, 其生长可分为五个重叠的阶段: 细胞起始、细胞伸长、过渡壁增厚、细胞壁增厚和成熟 (图 1-2) (Kim and Triplett, 2001; Haigler et al., 2012)。其中, 细胞伸长是纤维发育的关键时期, 直接决定纤维的

最终长度和质量。因此，探索纤维伸长的调控机制，对促进纺织工业的发展十分有益。

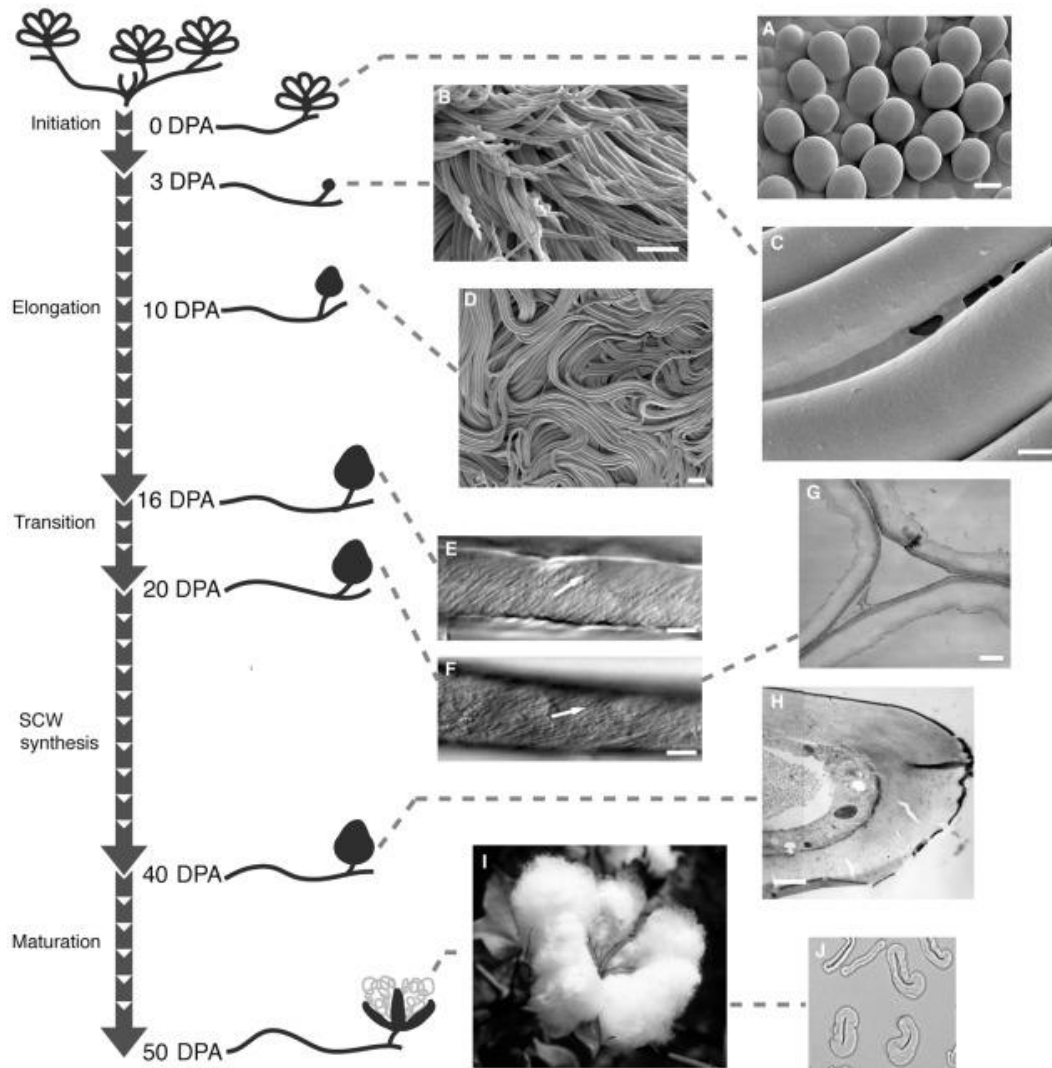


图 1-2 棉花纤维发育进程 (Haigler et al., 2012)

Figure 1-2 Cotton fiber development process

1.2 转录因子调控植物生长发育

植物细胞伸长是一个复杂的调控过程，受多种转录因子、酶和激素相关代谢途径的调控。转录因子在植物体内广泛存在，其通过与下游启动子区域顺式作用元件结合或者与其他调控蛋白相互作用发挥功能，从而实现对植物生长发育的调节 (Latchman, 1998)。

转录调控是植物体内重要的调控过程，参与植物各组织的生长发育以及对逆境的适应。NAC 转录因子 JUNGBRUNNEN1 可以提高番茄抗旱性 (Thirumalaikumar et al., 2018)。过表达 *ANAC019*、*ANAC055* 或 *ANAC072/RD26* 的转基因拟南芥表现出胁迫响应基因的表达增强，对于干旱和盐胁迫的耐受性提高 (Tran et al., 2004)。NAC016 抑制