

分类号: S562

密 级:

学 号: 20222006006

单位代码: 10759

# 石河子大学

## 硕士学位论文



### 细胞壁蛋白 PME/PMEI 参与棉花纤维发育的 功能分析

学 位 申 请 人	<u>何汝蜜</u>
指 导 教 师	<u>李鸿彬 教授</u> <u>靳翔 副教授</u>
申请学位门类级别	<u>理学硕士</u>
学 科、专 业 名 称	<u>生物学</u>
研 究 方 向	<u>植物学</u>
所 在 学 院	<u>生命科学学院</u>

中国·新疆·石河子

2026 年 5 月

分类号:

密级:

学号: 20222006006

单位代码: 10759

# 石河子大学

## 硕士学位论文



### 细胞壁蛋白 PME/PMEI 参与棉花纤维发育的 功能分析

学位申请人	何汝蜜
指导教师	李鸿彬 教授
	靳翔 副教授
申请学位门类级别	理学硕士
学科、专业名称	生物学
研究方向	植物学
所在学院	生命科学学院

中国·新疆·石河子

2026年5月

**Functional analysis of cell wall proteins PME/PMEI involved in cotton  
fiber development**

A Dissertation Submitted to

**Shihezi University**

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

**Master of Natural Science**

By

**Rumi He**

**(Botanical Research)**

Dissertation Supervisor: Prof. Hongbin Li

Assoc. Prof. Xiang Jin

May, 2026

# 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

本人所呈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：何进宝

时间：2026年5月19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：何进宝

时间：2026年5月19日

导师签名：李鸣

时间：2026年5月19日

## 摘要

**目的:** 棉花是世界上最重要的经济作物之一, 其棉纤维品质直接影响纺织工业的发展。成熟棉纤维的品质很大程度上受到纤维细胞壁蛋白质 (cell wall proteins, CWPs) 的调控, 但目前关于细胞壁蛋白调控棉纤维发育的研究仍较为有限。本研究旨在利用高通量蛋白质组学技术, 系统分析棉纤维发育过程中细胞壁蛋白质组的动态变化, 并在此基础上筛选调控纤维发育的候选 CWPs, 探究其在纤维发育中的生物学功能, 为进一步揭示细胞壁蛋白质调控棉纤维品质形成的分子机制奠定基础。

**方法:** 本研究首先优化棉纤维细胞壁蛋白质提取方法, 利用高通量蛋白质组学技术对陆地棉开花后 5~35 天 (days post anthesis, DPA) 的纤维中 CWPs 进行鉴定、时序分析、功能分类、差异表达及富集分析。随后, 对筛选出的关键细胞壁蛋白 PME/PMEI 家族开展系统进化分析、基因结构解析、选择压力分析和共线性分析, 探究 PME、PME-pro 和 PMEI 基因家族在植物界的进化规律及在棉花中的扩张分化机制。在此基础上, 结合细胞壁蛋白质组筛选结果, 聚焦候选基因 *GhPME-pro19* 和 *GhPMEI66*, 利用 qRT-PCR、亚细胞定位、病毒诱导的基因沉默 (VIGS) 及酵母双杂交等技术, 分析其表达模式、生物学功能及潜在互作蛋白。

### 结果:

1. 陆地棉纤维细胞壁蛋白组学分析揭示果胶修饰酶 PME-pro 可能对纤维发育具有重要调控作用: 为系统分析棉纤维发育过程中细胞壁蛋白的动态变化, 选取陆地棉 5、10、15、20、25、30、35 DPA 纤维材料进行细胞壁蛋白的分离和鉴定。不同提取方法的比较结果显示, 方法三提取的样品中未检测到 H<sup>+</sup>-ATPase (质膜标记)、Actin (细胞骨架标记) 及 BIP1/2 (内质网标记) 等非细胞壁蛋白污染, 表明该方法提取的 CWPs 纯度和特异性较高。采用该方法共鉴定到 1537 个细胞壁蛋白 (CWPs), 其蛋白组特征呈现从伸长期向次生壁加厚期转换的阶段性变化。其中, 作用于细胞壁碳水化合物化合物的蛋白质 (proteins acting on cell wall carbohydrates, PCs) 是数量最多的核心模块 (394 个), 氧化还原酶与蛋白酶的时序消长可能调控了纤维从伸长期向次生壁加厚期的发育转换。对 PCs 进行差异表达分析, 筛选出 13 个持续上调和 13 个持续下调的候选蛋白; 合并差异蛋白的富集分析得到 4 个同时含有 PME 和 PMEI 结构域的蛋白 (PME-pro), 将其筛选为调控棉纤维伸长的关键候选者。

2. PME、PME-pro 和 PMEI 的进化、扩张与功能分化: 为解析 PME、PME-pro 和 PMEI 三个基因家族的进化时序、扩张机制及功能分化特征, 本研究对从低等藻类到高等被子植物的代表性物种进行了系统进化、基因结构、保守基序、选择压力及共线性分析。结果显示, PME 起源于克里藻, PME-pro 出现于布氏轮藻, PMEI 至苔藓植物才形成, 与植物从水生到陆生演化一致。结构上, PME 较为保守, PME-pro 保留了较全面的保守基序, 而 PMEI 呈现内含子丢失、基序简化的趋势。三个家族整体受纯化选择, 但 PMEI 存在显著正选择信号, 提示其在棉花多倍化与驯化过程中可能发生了功能分化。在棉花中, 三个家族主要以串联重复方式扩张, 存在跨类型共线性与结构重排, 支持三者起源于共同祖先基因并发生功能分化的推测。细胞壁蛋白质组数据进一步证实, 三类蛋白在棉纤维不同发育阶段均有表达, 可能共同参与纤维细胞壁的动态调控。

3. *GhPME-pro19* 和 *GhPMEI66* 基因功能验证及 *GhPME-pro19* 候选互作蛋白筛选: 为明确 *GhPME-pro19* 和 *GhPMEI66* 在棉纤维发育中的功能, 构建 *pCLCrVA* 载体, 通过 VIGS 技术瞬时转化棉花, 分析 *GhPME-pro19-VIGS* 和 *GhPMEI66-VIGS* 植株的纤维表型变化。结果显示, *GhPME-pro19* 表达峰值与纤维快速伸长期吻合, 沉默该基因导致 15 DPA 棉铃变小, 纤维的可溶性果胶含量降低、果胶甲酯化程度及纤维素含量升高, 但总果胶含量无显著变化; 成熟纤维长度缩短、细胞壁增厚, 表明 *GhPME-pro19* 可能不参与果胶合成, 而是通过调控果胶修饰状态, 抑制纤维素沉积来促进纤维伸长。*GhPMEI66* 转录水平随发育逐渐降低但蛋白持续高表达, 沉默该基因后, 虽提高了可溶性果胶含量、降低了果胶甲酯化程度, 但未改变总果胶含量; 同时, 纤维素含量、成熟纤维长度及细

胞壁厚度均无变化。这表明 *GhPMEI66* 可能也不影响果胶合成，只是调控果胶的甲酯化状态；然而这种修饰改变既不足以改变纤维素沉积，也无法对纤维伸长和细胞壁增厚产生显著作用。酵母双杂交筛库获得 6 个可能与 GhPME-pro19 互作的蛋白：蛋白酶 GhRD19A/GhASPG1（可能参与前体激活）、BR 信号相关因子 GhEXL6、expansin-like 蛋白 GhEXLB1、GDSL 酯酶 GhGDSL18430 及 BURP 蛋白 GhRD22，提示 GhPME-pro19 可能通过上述候选互作蛋白参与细胞壁重塑与纤维发育调控。

**结论：**本研究共鉴定出 1537 个棉纤维细胞壁蛋白，并解析了它们的时序动态，在此基础上筛选出 PME-pro，将其作为调控纤维伸长的关键候选因子。进化分析表明，PME、PME-pro 及 PMEI 三个家族的起源与植物登陆过程一致，其中 PMEI 在多倍化与驯化过程中可能发生了功能分化。功能验证表明，*GhPME-pro19* 可能通过参与果胶修饰、细胞壁松弛及纤维素沉积的调控促进纤维伸长，而 *GhPMEI66* 虽能影响果胶甲酯化状态，但对纤维伸长无显著影响。本研究为进一步解析细胞壁蛋白质调控棉纤维品质形成的分子机制奠定了基础，也为棉花纤维品质改良提供了候选基因资源。

**关键词：**棉纤维；细胞壁蛋白质组；果胶甲酯酶；果胶甲酯酶抑制蛋白；纤维发育

## Abstract

**Object:** Cotton is one of the most important economic crops in the world, and its fiber quality directly affects the development of the textile industry. The quality of mature cotton fibers is largely regulated by fiber cell wall proteins (CWPs); however, research on the role of cell wall proteins in regulating cotton fiber development remains relatively limited. This study aims to systematically analyze the dynamic changes of the cell wall proteome during cotton fiber development using high-throughput proteomics technology. Based on these analyses, we intend to screen candidate CWPs that regulate fiber development and explore their biological functions, thereby laying a foundation for further elucidating the molecular mechanisms by which cell wall proteins regulate the formation of cotton fiber quality.

**Methods:** In this study, we first optimized the extraction method for cotton fiber cell wall proteins, and then employed high-throughput proteomics technology to perform identification, temporal analysis, functional classification, differential expression analysis, and enrichment analysis of CWPs in fibers of *Gossypium hirsutum* from 5 to 35 days post anthesis (DPA). Subsequently, we conducted phylogenetic analysis, gene structure characterization, selection pressure analysis, and synteny analysis on the selected key cell wall protein families PME/PMEI, to investigate the evolutionary patterns of the PME, PME-pro, and PMEI gene families across the plant kingdom and the mechanisms underlying their expansion and divergence in cotton. On this basis, combined with the cell wall proteomics screening results, we focused on two candidate genes, *GhPME-pro19* and *GhPMEI66*, and analyzed their expression patterns, biological functions, and potential interacting proteins using qRT-PCR, subcellular localization, virus induced gene silencing (VIGS), and yeast two-hybrid assays.

### **Results:**

1. Proteomic analysis of the cell wall of *G. hirsutum* fibers reveals that pectin-modifying enzymes PME-pro may play important regulatory roles in fiber development: To systematically analyze the dynamic changes of cell wall proteins during cotton fiber development, fiber materials from *G. hirsutum* at 5, 10, 15, 20, 25, 30, and 35 DPA were collected for cell wall protein isolation and identification. Comparison of different extraction methods showed that no contamination from non-cell wall proteins, such as H<sup>+</sup>-ATPase (plasma membrane marker), Actin (cytoskeleton marker), and BIP1/2 (endoplasmic reticulum marker), was detected in the samples extracted by Method 3, indicating that the CWPs extracted by this method have high purity and specificity. Using this method, a total of 1537 CWPs were identified, and their proteomic characteristics exhibited a phased transition from the elongation stage to the secondary cell wall thickening stage. Among them, proteins acting on cell wall carbohydrates (PCs) constituted the most abundant core module (394 proteins). The temporal increase and decrease of oxidoreductases and proteases may regulate the developmental transition of fibers from the elongation stage to the secondary wall thickening stage. Differential expression analysis of PCs identified 13 continuously upregulated and 13 continuously downregulated candidate proteins. Enrichment analysis of the combined differentially expressed proteins yielded four proteins containing both PME and PMEI domains (PME-pro), which were screened as key candidates regulating cotton fiber elongation.

2. Evolution, Expansion, and Functional Differentiation of PME, PME-pro, and PMEI: To elucidate the evolutionary chronology, expansion mechanisms, and functional divergence of the three gene families PME, PME-pro, and PMEI, this study performed phylogenetic analysis, gene structure characterization, conserved motif identification, selection pressure estimation, and synteny analysis on representative species ranging from low-order algae to higher angiosperms. The results showed that PME originated in *Klebsormidium nitens*, PME-pro emerged in *Chara braunii*, and PMEI appeared only in bryophytes, consistent with the

evolutionary transition of plants from aquatic to terrestrial habitats. Structurally, PME is relatively conserved, PME-pro retains a relatively comprehensive set of conserved motifs, whereas PMEI exhibits a trend of intron loss and motif simplification. All three families are predominantly under purifying selection; however, PMEI shows significant signals of positive selection, suggesting that functional divergence may have occurred during polyploidization and domestication of cotton. In cotton, the three families have expanded mainly via tandem duplications, with cross-type synteny and structural rearrangements, supporting the hypothesis that they originated from a common ancestral gene and subsequently underwent functional divergence. Cell wall proteome data further confirmed that all three types of proteins are expressed at different developmental stages of cotton fibers, and they may collectively participate in the dynamic regulation of the fiber cell wall.

3. Functional validation of *GhPME-pro19* and *GhPMEI66* and screening of candidate interacting proteins for GhPME-pro19: To clarify the functions of *GhPME-pro19* and *GhPMEI66* in cotton fiber development, the *pCLCrVA* vector was constructed and used to transiently transform cotton via VIGS, and the fiber phenotypic changes of *GhPME-pro19-VIGS* and *GhPMEI66-VIGS* plants were analyzed. The results showed that the expression peak of *GhPME-pro19* coincided with the rapid fiber elongation stage. Silencing this gene led to smaller bolls at 15 DPA, decreased soluble pectin content, increased pectin methylesterification degree and cellulose content in fibers, with no significant change in total pectin content. Mature fibers were shorter with thicker cell walls, indicating that *GhPME-pro19* may not participate in pectin synthesis but rather promotes fiber elongation by modulating pectin modification status and inhibiting cellulose deposition. For *GhPMEI66*, its transcript level gradually decreased during development, whereas the protein remained highly expressed. Silencing this gene resulted in increased soluble pectin content and decreased pectin methylesterification degree, but total pectin content remained unchanged. Meanwhile, no alterations were observed in cellulose content, mature fiber length, or cell wall thickness. This suggests that *GhPMEI66* has little influence on pectin synthesis. It mainly regulates the degree of pectin methylesterification. Such modification cannot change cellulose deposition, and also has no obvious effect on fiber elongation and cell wall thickening. Yeast two-hybrid screening identified six proteins potentially interacting with GhPME-pro19: the proteases GhRD19A/GhASPG1 (possibly involved in precursor activation), the BR signaling-related factor GhEXL6, the expansin-like protein GhEXLB1, the GDSL esterase GhGDSL18430, and the BURP protein GhRD22. These findings suggest that GhPME-pro19 may participate in cell wall remodeling and fiber development regulation through these candidate interacting proteins.

**Conclusion:** In this study, a total of 1537 cotton fiber cell wall proteins were identified and their temporal dynamics were characterized, based on which PME-pro was screened out as a key candidate factor regulating fiber elongation. Evolutionary analysis showed that the origins of the three families PME, PME-pro, and PMEI are consistent with the plant terrestrialization process, with PMEI potentially undergoing functional divergence during polyploidization and domestication. Functional validation demonstrated that *GhPME-pro19* may promote fiber elongation by participating in the regulation of pectin modification, cell wall loosening, and cellulose deposition, whereas *GhPMEI66*, although capable of affecting pectin methylesterification status, had no significant effect on fiber elongation. This study lays a foundation for further dissecting the molecular mechanisms by which cell wall proteins regulate the formation of cotton fiber quality, and also provides candidate gene resources for the genetic improvement of cotton fiber quality.

**Key words:** Cotton fiber; cell wall proteome; pectin methylesterase; pectin methylesterase inhibitor protein; fiber development.

# 目录

摘要.....	I
<b>Abstract</b> .....	III
目录.....	V
中英文缩写对照表.....	VIII
第 1 章 绪论.....	1
1.1 棉花纤维细胞伸长发育的过程.....	1
1.2 植物细胞壁的结构和生长.....	2
1.3 植物细胞壁蛋白质组学.....	4
1.3.1 植物细胞壁蛋白质组学研究进展.....	4
1.3.2 植物细胞壁蛋白质的主要功能分类.....	7
1.4 植物细胞壁蛋白提取技术研究进展.....	12
1.5 蛋白组测序方法介绍.....	12
1.6 VIGS 技术原理及在棉花中的应用.....	14
1.7 本研究的目的及意义.....	14
第 2 章 棉纤维发育的细胞壁蛋白质组学分析.....	15
2.1 引言.....	15
2.2 方法.....	16
2.2.1 实验材料.....	16
2.2.2 主要试剂和仪器.....	16
2.2.3 棉纤维细胞壁蛋白质提取方法比较.....	16
2.2.4 不同时期棉纤维总蛋白质提取.....	19
2.2.5 Bradford 法测蛋白质浓度.....	19
2.2.6 SDS-PAGE.....	20
2.2.7 Western Blot 验证.....	20
2.2.8 蛋白酶解.....	21
2.2.9 毛细管高效液相色谱.....	22
2.2.10 质谱鉴定.....	22
2.2.11 搜库数据库和软件、数据处理软件.....	23
2.2.12 不同发育时期棉纤维细胞壁蛋白质组学分析处理.....	23

2.3 结果.....	24
2.3.1 三种不同方法提取的 CWP 的 Western Blot 纯度验证.....	24
2.3.2 蛋白浓度测定结果.....	25
2.3.3 不同时期的棉纤维总蛋白和细胞壁蛋白的 SDS-PAGE 电泳检测及 Western Blot 纯度验证.....	26
2.3.4 基于 DIA 技术的棉纤维细胞壁蛋白质组学数据质量分析.....	28
2.3.5 5~35 DPA 棉纤维细胞壁蛋白 (CWP) 的鉴定与生物信息学分析.....	29
2.3.6 所有发育时期的棉纤维 CWP 的功能类别整体分布.....	31
2.3.7 纤维不同发育时期细胞壁蛋白功能类别的动态变化.....	38
2.3.8 作用于细胞壁碳水化合物的蛋白质家族分析.....	38
2.3.9 差异蛋白的鉴定及富集分析.....	41
2.4 讨论.....	43
2.5 本章小结.....	44
第 3 章 细胞壁蛋白 PME、PME-pro 和 PME1 基因家族联合分析.....	46
3.1 引言.....	46
3.2 方法.....	47
3.2.1 植物 PME、PME-pro 和 PME1 基因成员的鉴定.....	47
3.2.2 PME 和 PME1 结构域序列的提取.....	48
3.2.3 进化树分析.....	48
3.2.4 染色体定位.....	48
3.2.5 共线性及 Ka/Ks 分析.....	48
3.2.6 保守基序、保守结构域和基因结构分析.....	49
3.2.7 互作网络分析.....	49
3.3 结果.....	49
3.3.1 植物 PME、PME-pro 和 PME1 基因家族的进化分析.....	49
3.3.2 棉花 PME、PME-pro 和 PME1 基因家族的联合分析.....	55
3.4 讨论.....	68
3.5 本章小结.....	70
第 4 章 陆地棉 <i>GhPME-pro19</i> 和 <i>GhPME166</i> 基因的功能验证.....	71
4.1 引言.....	71
4.2 方法.....	72
4.2.1 实验材料.....	72
4.2.2 主要试剂及仪器.....	72
4.2.3 荧光定量.....	72

4.2.4 亚细胞定位.....	74
4.2.5 VIGS 载体构建及转化.....	76
4.2.6 目的基因沉默后棉纤维细胞壁组分测定.....	77
4.2.7 沉默植株成熟纤维细胞壁横切面透射电镜.....	77
4.2.8 酵母双杂筛库及互作鉴定.....	77
4.3 结果.....	79
4.3.1 <i>GhPME-pro19</i> 和 <i>GhPMEI66</i> 在不同发育时期棉纤维中的表达模式.....	79
4.3.2 亚细胞定位.....	80
4.3.3 基因沉默后陆地棉表型观察及沉默效率验证.....	81
4.3.4 <i>GhPME-pro19</i> 和 <i>GhPMEI66</i> 基因沉默对棉纤维发育及细胞壁组分的影响.....	82
4.3.5 <i>GhPME-pro19</i> 互作蛋白的筛选与验证.....	85
4.4 讨论.....	89
4.5 本章小结.....	92
第 5 章 全文结论与展望.....	93
5.1 全文结论.....	93
5.2 本研究特色与创新.....	94
5.3 展望.....	94
参考文献.....	96
附录.....	113
附录一 主要培养基配制.....	113
附录二 主要溶液配制.....	113
致谢.....	115
作者简介.....	116

## 中英文缩写对照表

英文缩写	英文全称	中文名称
CW	cell wall	细胞壁
PCW	primary cell wall	初生壁
SCW	secondary cell wall	次生壁
DPA	day post anthesis	开花后天数
CWPs	cell wall proteins	细胞壁蛋白
PCs	Proteins acting on cell wall carbohydrates	作用于细胞壁碳水化合物的蛋白质
ORs	Oxido-reductases	氧化还原酶
Ps	Proteases	蛋白酶
PLMs	Proteins related to lipid metabolism	与脂质代谢相关的蛋白质
PSs	Proteins involved in signaling	参与信号传导的蛋白质
PIDs	Proteins with interaction domains, with proteins or polysaccharides	具有相互作用结构域的蛋白质包括与其他蛋白质相互作用的蛋白质
SPs	Structural proteins	结构蛋白
MPs	Miscellaneous proteins	杂类蛋白
PUFs	Proteins of unknown function	未知功能的蛋白质
EXPA	expansins	扩展蛋白
HG	Homogalacturonan	同聚半乳糖醛酸
PME	pectin methylesterase	果胶甲酯酶
PMEI	Pectin methylesterase Inhibitors	果胶甲酯酶抑制剂
GHs	glycosyl hydrolases	糖苷水解酶
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	hydrogen peroxide	过氧化氢
CEs	carbohydrate esterases	碳水化合物酯酶
AGPs	arabinogalactan proteins	阿拉伯半乳聚糖蛋白
EXTs	extensins	伸展蛋白
MeOH	methanol	甲醇
EG	endoglucanases	内切葡聚糖酶
PGIP	Polygalacturonase inhibiting proteins	多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白
ORs	Oxido-reductases	氧化还原酶
LACs	laccases	漆酶
RK	receptor kinases	受体激酶
CaCl <sub>2</sub>	calcium chloride	氯化钙
LiCl	lithium chloride	氯化锂
DDA	data-dependent acquisition	数据依赖性采集模式
DIA	Data independent acquisition	数据非依赖性采集
DM	Degree of methyl esterification	甲酯化程度
CLCrV	Cotton Leaf Crumple Virus	棉花叶皱缩病毒
VIGS	Virus-induced gene silencing	病毒诱导的基因沉默
NaAc	Sodium acetate	醋酸钠
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

## 第1章 绪论

### 1.1 棉花纤维细胞伸长发育的过程

棉花 (*Gossypium* spp.) 属于锦葵科棉属植物, 既是世界上最重要的经济作物之一, 又是世界六大油料作物。同时, 棉花也是研究植物多倍化、细胞伸长和细胞壁生物合成的模式植物 (Huang et al., 2021)。棉属由 45 个二倍体种 ( $2n=2\times 26$ , A, B, C, D, E, F, G, K 基因组型) 和 7 个四倍体种 ( $2n=4\times 52$ , AD1~AD7) 组成, 包括野生小多年生植物、灌木和一年生栽培植物 (Wen et al., 2023)。大约 1~200 万年前, 二倍体 A 和 D 基因组在越洋扩散重组、自然杂交和加倍后重聚, 形成了 7 个已知的异源四倍体 AD 基因组型棉花品种。随后, 自然选择和人类驯化形成了陆地棉 (*Gossypium hirsutum*) 和海岛棉 (*Gossypium barbadense*) 两种主要栽培棉种 (Wendel and Grover, 2015), 除此之外还有草棉 (*Gossypium herbaceum*) 和亚洲棉 (*Gossypium arboreum*)。其中陆地棉是目前最为广泛种植的, 产量约占世界棉花总产量的 90%, 也是我国的主要种植品种, 主要是因为陆地棉的纤维品质好、产量高以及生长周期短 (李, 2007)。

棉花从出苗到棉铃成熟吐絮的生长周期一般为 5~7 个月, 主要分为五个生长时期, 分别为萌芽出苗期 (约需 10~15 天)、苗期 (约需 40~45 天)、蕾期 (约需 25~30 天)、花铃期 (约需 50~60 天) 和吐絮期 (约需 30~70 天) (靳, 2011)。棉花的最大价值体现在棉纤维上。棉花胚珠外珠被细胞发育形成的单细胞纤维即棉纤维, 大部分的表皮细胞可以分化为纤维细胞, 但只有 25~30% 的表皮细胞能够分化伸长成为纤维 (Xue-de et al., 2002)。棉纤维细胞的分化和发育是一个非常复杂的过程, 一般包括四个时期: 纤维起始, 细胞伸长, 次生壁 (secondary cell wall, SCW) 加厚及脱水成熟。每个时期都有不同的特点, 但相邻时期又有重叠的特征 (Huang et al., 2021; Basra et al., 1984; Beasley et al., 1975; Wen et al., 2023; Wilkins et al., 2005)。

棉花纤维起始期包括分化和突起两个过程, 纤维细胞在 -1 DPA 时已完成分化形成纤维原始细胞; 0 DPA 时, 胚珠表面可以观察到球状突起的纤维原基的形成, 这也标志着进入细胞快速扩张阶段 (杜等, 2000; Berlin, 2012)。细胞伸长期在 5~25 DPA, 该时期唯一的特征是初生壁 (primary cell wall, PCW) 的合成, 其中含有 23% 纤维素、22% 蛋白质以及其他不同含量的多糖, 包括木葡聚糖和果胶。次生壁加厚在 20~45 DPA。棉铃在 45~60 DPA 期间自然开裂从而导致纤维迅速失水 (图 1-1) (Qin YM and Zhu YX, 2011; Singh et al., 2009; Jan et al., 2022)。

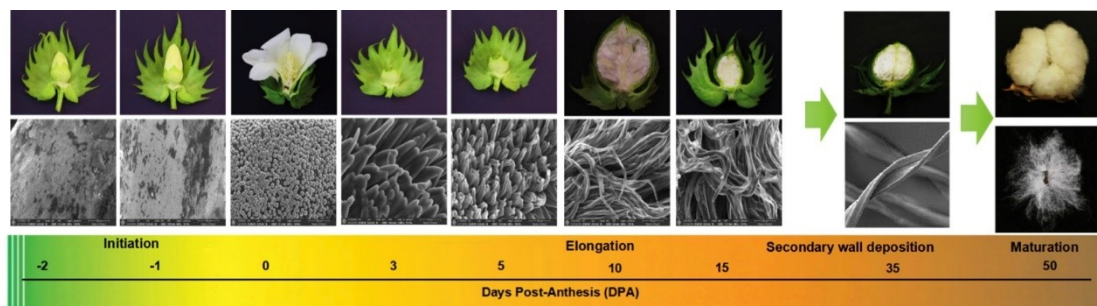


图 1-1 棉花纤维发育不同阶段（引自 Jan et al., 2022）

Fig.1-1 Different stages of cotton fiber development (Cited from Jan et al., 2022)

## 1.2 植物细胞壁的结构和生长

细胞壁（cell wall, CW）位于植物细胞最外部，是病原菌侵染植物所必需突破的屏障，也是影响细胞生长发育的亚细胞结构。植物的细胞壁是在细胞活动中始终保持变化的动态代谢区室，是其功能的关键。在具有活跃细胞伸长过程的发育组织中，植物细胞被初生壁（PCW）包围，该细胞壁由纤维素、半纤维素、果胶、蛋白质和芳香族化合物组成（Loqué et al., 2015）。在相邻细胞初生壁之间存在的分界面是中胶层（middle lamella），该层在细胞分裂过程中形成的，当母细胞的细胞质被新形成的细胞板分割成两个子细胞时，成为两个细胞壁之间的富含果胶的粘附区。在初生壁扩增过程中，物质会被不断添加到中胶层中（Zamil and Geitmann, 2017）。最后，在细胞分化的过程中，许多细胞如管胞和纤维细胞等在初生壁内构建起明显的次生壁（SCW），形成独特的，与细胞功能相匹配的复杂结构。

纤维素（Cellulose），半纤维素和果胶多糖构成了初生壁（PCW）的大部分干质量，比例大约为 1:1:2，但是细胞壁的组成可能因发育阶段、组织和物种的不同而有所变化（Burton et al., 2010; van et al., 2017）。这三种多糖具有如下所述的独特特性。

纤维素（Cellulose）是由  $\beta$ -1,4-糖苷键连接的 D-葡萄糖聚合物。在植物中，多个平行的（1 $\rightarrow$ 4）- $\beta$ -D-葡聚糖链聚合排列形成微纤丝（microfibrils）这种微纤丝具有机械强度和高度抗酶性，几乎是理想的支架材料（Cosgrove, 2005）。微纤丝由纤维素合成酶 A（cellulose synthase A enzymes, CESA）聚合，这些酶被组织成多聚体纤维素合成酶复合物（cellulose synthase complexes, CSCs）（Wilson et al., 2021; Pedersen et al., 2023; Purushotham et al., 2020）。纤维素合酶复合物（CSCs）在质膜中移动，将纤维素微纤丝挤压到外膜表面（Speicher et al., 2018）。连接蛋白将 CSC 与皮质微管连接起来，引导 CSC 的运动方向（Paredez et al., 2006; Duncombe et al., 2022; Li et al., 2012）。一些未连接的 CSC 在没有微管引导的情况下合成纤维素（图 1-2）。

半纤维素（Hemicelluloses）通常由线性主链组成，主链是通过  $\beta$ -1,4-糖苷键连接的葡聚糖，短侧链由 1-3 个糖残基修饰（Cosgrove, 2024）。它们在高尔基体中合成，分选成囊泡，并通过胞吐作用传递到胞外（Wang et al., 2017; Hofmann et al., 2021）。PCW 的半纤维素通常由木葡聚糖和少量的阿拉伯木聚糖组成，而 SCW 则以其他半纤维素为主（Scheller and Ulvskov, 2010）。

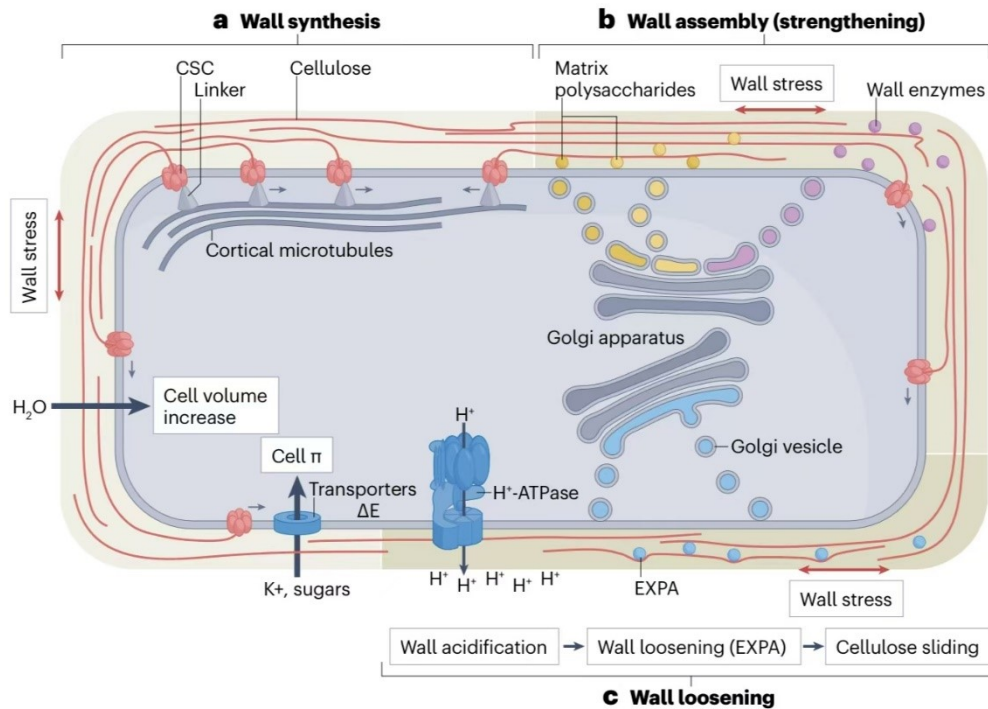


图 1-2 支持壁生长的细胞过程（引自 Cosgrove, 2024）

Fig. 1-2 Cellular processes supporting wall growth (Cited from Cosgrove, 2024)

果胶（pectin）是富含半乳糖醛酸的复合多糖，也是细胞壁多糖中最易溶解和最具动态性的，它们在纤维素微纤丝之间形成水合凝胶状基质。它们将微纤丝分开，在细胞生长过程中减轻其侧向滑动，而在生长停止时又将其固定到位（Cosgrove, 2005）。它们是细胞壁厚度、水合程度、孔隙度、离子交换能力和静电特性的主要决定因素（Jarvis, 1984; Jarvis, 1992; Thimm et al., 2009）。同聚半乳糖醛酸（Homogalacturonan, HG）是最丰富的果胶结构，它们是一种只含有  $\alpha$ -1,4-半乳糖醛酸多糖的聚合物，可占细胞壁果胶的 65%以上，与细胞壁的硬度有关（Ridley et al., 2001; Picczywek et al., 2021）。HG 在高尔基体中合成，由大量的糖基转移酶将单糖组装成多糖，然后以高度甲酯化的形式分泌到 CW 中（Harholt et al., 2010）。HG 的 C-6 位容易发生甲酯化，而 C-2 和 C-3 位会产生乙酰化的化学修饰（Levesque-Tremblay et al., 2015）。果胶甲酯酶（pectin methylesterase, PME）可将壁中的甲酯基除去，增加了 HG 的负电荷。六个或更多残基线性片段去酯化的 HG 能结合钙离子，会形成刚性增加的“蛋盒”结构，使果胶基质变硬（John et al., 2019; John et al., 2022; Willats et al., 2001）。第二个果胶基本成分是聚鼠李糖半乳糖醛酸 I（rhamnogalacturonan I, RG I），其具有鼠李糖和半乳糖醛酸

残基交替的主干。RG I 的骨架由各种寡糖（如半乳聚糖、阿拉伯聚糖和阿拉伯半乳聚糖）修饰（Williams et al., 2020），在某些情况下形成类似瓶刷的外观，并且可能与 HG 和糖蛋白共价连接（Cosgrove, 2024; Tan et al., 2023）。还有两种结构上经过修饰的 HG：聚木半乳糖醛酸（xylogalacturonan）和聚鼠李糖半乳糖醛酸 II（rhamnogalacturonan II, RG II）。

其他一些含量较少的细胞壁成分包括细胞壁蛋白（cell wall proteins, CWPs），占 5~10%（刘，2018）。虽然 CWPs 所占比重较小，但其在细胞代谢和发育调控、细胞壁组分修饰、信号转导、胁迫响应等生理过程中起着至关重要的作用（Carpita and Gibeaut, 1993; Cassab, 1998）。CWPs 是合成各种细胞壁成分所需的蛋白质和酶（Zhang et al., 2022）。细胞壁的扩展与重塑能力依赖于多种 CWPs 的活动。例如，扩张蛋白（expansins, EXPA）通过促进纤维素与半纤维素之间的滑动，诱导细胞壁松弛与扩大（图 1-2）（Cosgrove, 2024; Park and Cosgrove, 2015）。植物细胞壁能够保护植物细胞免受病原体的侵袭，而 CWPs 起到预先形成的结构性防御的作用。例如，植物多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白（Polygalacturonase inhibiting protein, PGIP）通过抑制真菌多聚半乳糖醛酸酶（Polygalacturonase, PG）活性，在植物抵御植物病原真菌过程中发挥关键作用（Wang et al., 2021）。

## 1.3 植物细胞壁蛋白质组学

### 1.3.1 植物细胞壁蛋白质组学研究进展

2000 年，随着首个植物基因组序列的问世（Goodman et al., 1995），植物细胞壁蛋白质组学研究也随即开始（San et al., 2022），二十多年来，细胞壁蛋白质组学已成为一种强有力的实验手段，揭示了细胞壁蛋白家族的多样性。San 等人提出，细胞壁蛋白不仅仅是存在于细胞壁中的蛋白质，还包括可能通过其他分泌途径指向细胞外空间的蛋白质（San et al., 2022）。迄今为止，人们已经进行了大量研究来鉴定和表征 CWPs，其中一半的研究涉及拟南芥。其他单子叶和双子叶以及苔藓植物，如地钱和小立碗藓也有研究。在地钱（Kolkas et al., 2022）和小立碗藓（Martínez-Cortés et al., 2014）分别鉴定到 409 和 19 个 CWPs（表 1-1）。

Calderan-Rodrigues 等人对单子叶植物和双子叶植物的细胞壁蛋白质组进行了比较，并讨论了前者的特异性。这种特异性与单子叶植物和双子叶植物细胞壁的组成和结构的差异有关，例如禾本科植物的细胞壁蛋白质组通常由较高比例的氧化还原酶组成，有人认为这是由于 II 型初生壁中存在芳香族化合物（Calderan-Rodrigues et al., 2019）。