

陆地棉 *GhrbcMT* 基因克隆、表达与功能初步分析

张梦娜 沈丽 Nnaemeka Ekene Vitalis 孙玉强 柯丽萍*

(浙江理工大学生命科学院, 浙江省植物次生代谢调控重点实验室,
植物基因组学与彩色纤维分子改良实验室, 杭州 310018)

摘要 植物的 *rbcMT* 基因编码核酮糖1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶大亚基N-甲基转移酶 (ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ϵ -N-methyltransferase, *rbcMT*), 可能催化双功能酶核酮糖1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶大亚基14位赖氨酸的 ϵ -氨基的甲基化过程, 目前在豌豆、小麦、烟草等中被鉴定出, 可能参与调控植物生长发育, 但有关 *GhrbcMT* 基因生物学功能研究尚未报道。该研究以陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L.) 为材料, 提取叶片总RNA, 反转录合成cDNA, 利用PCR技术克隆棉花核酮糖1,5-二磷酸加氧酶/羧化酶大亚基甲基转移酶基因 (*GhrbcMT*) 全长cDNA, 对该基因进行生物信息学分析, 采用荧光定量PCR (qRT-PCR) 对 *GhrbcMT* 基因进行组织特异性表达分析, 并用病毒诱导的基因沉默 (virus-induced gene silencing, VIGS) 技术降低 *GhrbcMT* 在植株中的表达水平, 同时用乙醇浸泡法提取野生型与 *GhrbcMT* 干涉株系的叶片叶绿素进行含量分析。结果显示, *GhrbcMT* 蛋白质序列存在多个潜在磷酸化与糖基化位点, Loop结构占56.94%, 构象灵活。 *GhrbcMT* 基因在棉花叶片中特异性表达, *GhrbcMT* 干涉株系的 *GhrbcMT* 表达水平显著降低, 棉花出现明显的生长缓慢、节间距缩短、植株矮小、花药败育等表型, *GhrbcMT* 基因表达水平的降低对棉花植株的营养生长和育性具有显著影响。该研究通过对1,5-二磷酸核酮糖加氧酶/羧化酶大亚基甲基转移酶功能初步探究, 为进一步探究植株生长发育和育性调控机理提供参考。

关键词 陆地棉; *GhrbcMT*; 表达分析; 生长发育; 育性

Cloning, Expression and Functional Analysis of *GhrbcMT*

Zhang Mengna, Shen Li, Nnaemeka Ekene Vitalis, Sun Yuqiang, Ke Liping*

(Laboratory of Plant Genome and Coloured Fiber Molecular Improvement, School of Life Science
Zhejiang Sci & Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract The plant *rbcMT* gene probably encoded bifunctional enzyme as ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (LS) N-methyltransferase, which catalyzes methylation of the ϵ -amino group of lys-14 in the LS of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco). The *rbcMT* gene was identified in peas, wheat, tobacco, possibly involved in plant growth and development, the function of *GhrbcMT* gene has not been reported. In this study, total RNA was extracted from *G. hirsutum* cv. C312, and cDNA was synthesized by reverse transcription. The full-length cDNA of *GhrbcMT* was isolated by utilizing PCR and analyzed by bioinformatics. The *GhrbcMT* gene was detected by real-time PCR (qRT-PCR) for gene expression pattern analysis. *GhrbcMT* was interferenced by virus induced gene silence (VIGS) technique in C312. The leaf chlorophyll of wild-type and

收稿日期: 2019-03-15 接受日期: 2019-04-12

国家自然科学基金(批准号: 31671738)和国家重点研发计划(批准号: 2018YFD0100401)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-86843335, E-mail: keliping@zstu.edu.cn

Received: March 15, 2019 Accepted: April 12, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31671738) and the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2018YFD0100401)

*Corresponding author. Tel: +86-571-86843335, E-mail: keliping@zstu.edu.cn

网络出版时间: 2019-05-30 15:52:23 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.q.20190530.1552.002.html>

GhrbcMT-silenced cotton plants was extracted by ethanol soaking. The results showed that there were multiple potential phosphorylation and glycosylation sites in *GhrbcMT* protein. Loop structure accounted for 56.94% which indicated the conformation of *GhrbcMT* was flexible. The *GhrbcMT* gene was specifically expressed in cotton leaves. The *GhrbcMTi* cotton plants significantly grew slowly, became wrinkled and sterile with *GhrbcMT* decreased expression. The *GhrbcMT* gene had significant effect on cotton growth, development and fertility. This study focused on exploring the function of *GhrbcMT*, which provides a reference for further exploring the mechanism of the growth and development even sterility in plants.

Keywords *G. hirsutum* L.; *GhrbcMT*; expression analysis; growth and development; fertility

棉花作为重要的纤维作物和油料作物, 是世界上最主要的经济作物之一。中国作为最大的棉花生产国和消费国, 棉花产量占世界总量的四分之一, 并且消费量占世界总量的三分之一, 棉花在我国国民经济和日常生活中占有举足轻重的地位。但我国不是陆地棉的起源中心, 遗传基础薄弱, 目前棉花栽培种包括两个二倍体和两个四倍体棉种, 分别是草棉(*G. herbaceum* L)、亚洲棉(*G. arboreum* L)、陆地棉(*G. hirsutum* L)和海岛棉(*G. barbadense* L)。陆地棉是最广泛栽培的异源四倍体棉种, 占全球棉花年产量的90%。但由于陆地棉的基因组复杂、功能基因的挖掘以及功能基因解析不足, 阻碍了利用遗传资源和遗传转化等创造棉花新种质资源。本文探究的陆地棉核酮糖1,5-二磷酸加氧酶/羧化酶大亚基甲基转移酶基因(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ϵ -N-methyltransferase, *GhrbcMT*), 是本实验室前期通过转录组分析筛选得到的育性相关差异表达基因, 通过比较棉花雄性不育系*ms1*和背景植株C312不同发育时期的花器官转录组, 获得高丰度差异表达的基因。其中*GhrbcMT*基因是在野生型中表达而在雄性不育系中不表达的差异表达基因之一。

核酮糖1,5-二磷酸加氧酶/羧化酶大亚基甲基转移酶, 最早是在豌豆中鉴定出来的^[1]。rbcMT可能参与1,5-二磷酸核酮糖加氧酶/羧化酶大亚基(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, Rubisco LS) 14位赖氨酸残基 ϵ -氨基的翻译后甲基化过程, 在植物叶片中特异性表达。来自烟草、甜瓜、豌豆和其他几个物种的Rubisco LS在rbcMT催化下通过14位赖氨酸的 ϵ -氨基三甲基化进行翻译后修饰^[2]。而菠菜、小麦的Rubisco LS的第14位赖氨酸发生二甲基化过程^[3-4]。目前, 棉花中的*Rubisco LSMT*基因的克隆与功能研究并没有被报

道。同时, rbcMT是双功能甲基转移酶, 它不仅具有催化Rubisco大亚基甲基化的作用, 通过体外试验发现它同样能催化Rubisco小亚基甲基化过程^[5]。这些甲基转移酶具有高度的底物特异性^[6]。根据作用对象甲基转移酶分为遗传物质甲基转移酶与非遗传物质甲基转移酶, 目前对于催化遗传物质甲基化的甲基转移酶的研究比较广泛与深入, 而对于催化非遗传物质如激素类、蛋白质残基、黄酮、叶绿素等的甲基转移酶的研究才刚刚兴起^[7], 然而此类甲基转移酶种类繁多, 彼此间没有明显的序列同源性, 这给研究工作带来了诸多困难, 一方面没有特征性序列导致甲基转移酶的预测工作无法高效进行; 另一方面, 零碎的甲基转移酶序列无法分类规整, 深入研究蛋白质高级功能非常困难。因而蛋白质甲基化的翻译后修饰过程虽然广泛存在, 但关于翻译后修饰的蛋白质甲基化过程在细胞内发挥的作用和非遗传物质甲基转移酶rbcMT对植物生理生化过程的影响还不清楚, 亟待进一步研究。

病毒诱导的基因沉默(virus induced gene silencing, VIGS)技术基于植物先天防御系统的转录后基因沉默原理, 抵抗细胞内病毒增殖和细胞外病毒侵入, 将修饰的病毒基因组与部分植物目标基因组合, 通过农杆菌Ti质粒转化到植物中沉默目的基因, 这种方法因其高效的沉默效率、简便的操作在植物功能基因研究中得到广泛应用。八氢番茄红素脱氢酶(phytoene desaturase, PDS)是类胡萝卜素合成过程中的关键酶, 降低PDS基因的表达量, 植株会出现明显的光漂白现象, 因而*GhPDS*作为棉花VIGS技术的一个指示基因, *GhPDS*-VIGS株系作为阳性对照^[8]。目前通过VIGS进行棉花基因功能研究已经取得较大进展, VIGS技术为棉花功能基因研究提供了良好的研究手段^[9-10]。

本研究基于前期转录组测序数据, 对*GhrbcMT*

基因进行生物信息学分析并检测该基因在不同组织中的表达水平。利用VIGS技术降低*GhrbcMT*基因在陆地棉C312中的表达水平, 探究*GhrbcMT*基因对棉花植株生长发育和育性的影响, 为进一步研究*GhrbcMT*基因功能及其调控棉花生理过程的分子机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器

病毒载体pCLCrVA和pCLCrVB载体经本实验室保存, 由中国农业科学院植物保护研究所周雪平教授提供。陆地棉C312及雄性不育突变体*ms1*由本实验室提供。棉花在恒温恒湿温室内培养, 种子的萌发及幼苗生长条件为28 °C、14 h光照/10 h黑暗, 病毒转化后棉花植株培养条件为21~23 °C、14 h光照/10 h黑暗。采集野生型植株和干涉株系开花当天的叶片、茎、苞叶、萼片、花瓣、子房、雄蕊和柱头于2 mL EP管后放置液氮速冻, -80 °C保存待用, 用于提取RNA。每个实验3次重复, 并在超低温冰箱(-80 °C)保存备用。

多糖多酚植物总RNA提取试剂盒、FastQuant cDNA合成试剂盒、DNA marker、Quant qRT-PCR (SYBR Green) Kit试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司, 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒为美国ABI产品。pGEM-T Easy Vector作为TA克隆载体购自Promega公司。其他试剂均为国产分析纯。引物

合成与克隆测序委托杭州有康生物科技有限公司完成。

QuantStudio 3荧光定量PCR仪购自美国ABI公司; Eppendorf 5424型高速离心机、Eppendorf PCR扩增仪购自德国Eppendorf公司; Tanon-3500凝胶成像分析系统购自上海天能公司; UV-2600分光光度计(SHIMADZU)购自日本岛津公司, 普通光学显微镜购自德国卡尔蔡司公司。

1.2 *GhrbcMT* cDNA序列获得

从前期育性相关的转录组数据比较中, 筛选得到陆地棉C312与棉花雄性不育突变体*ms1*花器官高丰度差异性表达基因, 并将该基因序列在NCBI网站棉花基因组数据库中用BLAST工具进行序列比对, 得到基因注释与序列信息为核酮糖1,5-二磷酸加氧酶/羧化酶大亚基甲基转移酶基因*GhrbcMT*。根据*GhrbcMT*基因序列, 使用Primer 5.0软件设计基因特异性引物(表1), 上下游引物分别位于*GhrbcMT* cDNA的起始密码子与终止密码子两侧, 接着利用PCR技术从棉花各组织混合cDNA库中扩增出*GhrbcMT*基因, 测序确定。通过BioEdit、DNASTAR等软件比对分析测序结果, 再利用ORF Finder工具分析得到*GhrbcMT* cDNA序列。

1.3 基因序列和氨基酸序列的生物信息学分析

利用蛋白分析系统ExPASy中的ProtParam工具对*GhrbcMT*氨基酸序列分子量、亲疏水性、等电点、半衰期、消光系数、蛋白质不稳定系数等基本

表1 本实验中所用引物信息

Table 1 Primer information used in this experiment

引物用途	引物名称	序列(5'→3')
Usage	Primer name	Primer sequence (5'→3')
Gene cloning	<i>GhrbcMT</i> -F	AGA GCC TCT CGC TTG GGA
	<i>GhrbcMT</i> -R	GAC GCT TGA ATC GTG AAA GA
VIGS	V- <i>GhrbcMT</i> -F	GGA <u>CTA</u> <u>GTA</u> GAA AGC ACC ACG CCC AGT
	V- <i>GhrbcMT</i> -R	TTG <u>GCG</u> <u>CGC</u> <u>CTC</u> CTC TCT CCC CTA CTG CCA C
VIGS	V- <i>GhPDS</i> -F	GGA <u>CTA</u> <u>GTG</u> <u>CCT</u> GAA GAC TGG AGA GAG ATT T
	V- <i>GhPDS</i> -R	TTG <u>GCG</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> TTT ACT CTG ATC CGC AGA TAT T
Detection	A-F	ATT TTG CGC CTG ACT AGC CT
	A-R	CGA ATT TTC AAC GTT GCA TAC A
qRT-PCR	T- <i>GhrbcMT</i> -F	TCT CTC AAG AAA GCA CCA CG
	T- <i>GhrbcMT</i> -R	AAG GAA TCA ATG TCG CAG CC
Reference gene	T- <i>UBQ7</i> -F	GAA GGC ATT CCA CCT GAC CAA C
	T- <i>UBQ7</i> -R	CTT GAC CTT CTT CTT CTT GTG CTT G

斜体部分为保护碱基, 下划线部分为酶切位点。

Italic sections are protective bases, and underlined sequences are restriction enzyme sites.

理化性质进行分析, 预测蛋白质高级结构; 采用Pfam程序对GhrbcMT氨基酸序列进行保守性分析; 利用TMHMM在线预测跨膜结构域; 通过Cell-PLoc 2.0和WoLF PSORT工具进一步预测该蛋白的亚细胞定位。通过SignalP 4.1 Server预测蛋白信号肽序列; 采用PredictProtein预测GhrbcMT蛋白二级结构; 利用YinOYang1.2分析GhrbcMT糖基化位点; 用NetPhosk预测氨基酸序列磷酸化位点; 使用MEGA7.0软件以邻接法进行系统发育分析, Bootstrap实行1 000次重复, 增加系统发育树的可靠性。

1.4 基因干涉病毒载体的构建

(1)收集陆地棉C312各组织材料, 提取RNA, 将RNA反转录得到cDNA。(2)根据基因的序列特异区, 设计病毒载体构建引物, *GhPDS*和*GhrbcMT*基因的扩增片段为400~500 bp, 在引物两端分别加上*Spe* I和*Asc* I的酶切位点和保护碱基(表1); 用PCR技术扩增基因干涉片段, PCR体系为: 25 μ L 2 \times TaqMix、上下游引物各1 μ L、5 μ L cDNA模板, 加水至50 μ L。PCR程序为: 95 $^{\circ}$ C 5min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 进行30个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C保存。(3)TA连接转化大肠杆菌, 检测阳性片段, 测序, 结果正确的样品提取质粒保存; 接着将病毒载体pCLCrVA和pCLCrVB转化大肠杆菌, 测序, 确定酶切位点无突变后提取质粒。(4)将含目的片段的质粒和病毒载体pCLCrVA分别进行*Spe* I、*Asc* I双酶切, 酶切条件为37 $^{\circ}$ C 6 h, 酶切体系为: 10 μ L 10 \times Cut Smart Buffer、1.5 μ L *Spe* I、1.5 μ L *Asc* I、质粒约5 μ g, 用ddH₂O补足100 μ L。(5)分别回收酶切产物, 将目的片段连接到pCLCrVA载体上, 连接条件为4 $^{\circ}$ C 16 h, 连接体系为: 5 μ L 2 \times T4 DNA Ligase buffer、1 μ L T4 DNA Ligase、目的片段双酶切产物1 μ L、pCLCrVA双酶切产物3 μ L。(6)将连接好的产物转化至大肠杆菌, 在含卡那霉素抗性的LB平板上筛选克隆, 挑选单斑, 以A-F/A-R为引物用PCR技术检测菌落阴阳性, 选取阳性单克隆测序, 测序结果正确的菌株提取质粒保存。(7)将质粒pCLCrVA-*GhrbcMT*、pCLCrVA-*GhPDS*、空载体pCLCrVA、pCLCrVB质粒通过热击法转化农杆菌GV3101, 在含卡那霉素抗性的LB平板上筛选克隆, 挑选单斑, 检测得阳性菌株进行扩大培养, 保存备用。

1.5 转化棉花及植株阴阳性检测

将四种转化的农杆菌菌体转接到含卡那霉素的LB液体培养基, 于28 $^{\circ}$ C、200 r/min摇床上扩大培养

约12 h, 使菌液 D 值在1.0左右; 4 $^{\circ}$ C、5 500 r/min离心后弃上清, 用配制好的侵染营养液按1:1比例体积加入管中, 充分悬浮菌体, 室温静置3 h; 将含pCLCrVA-*GhrbcMT*、pCLCrVA、pCLCrVA-*GhPDS*载体的农杆菌悬浮液分别与含pCLCrVB载体的农杆菌悬浮液按1:1体积混匀用于转化棉花幼苗; 将混匀的悬浮液注射到陆地棉C312完全展开的子叶背面, 相应的株系做好标记, 实验组标记为*GhrbcMTi*, 空载体对照组标记为CK, 阳性对照组标记为*GhPDSi*; 转化后的幼苗及野生型幼苗在14 h光照/10 h黑暗、21~23 $^{\circ}$ C恒温恒湿条件下培养; 注射四周后, 采集病毒干涉株系叶片, 用CTAB法提取DNA, 以A-F/A-R和组合引物进行PCR检测目的片段, 确定转基因棉花植株。

1.6 CTAB法提取棉花DNA

将植物叶片加液氮研磨成粉末, 装入1.5 mL离心管中, 快速加入65 $^{\circ}$ C预热的CTAB提取液600 μ L, 摇匀, 65 $^{\circ}$ C水浴1 h, 每隔10 min上下颠倒离心管; 再次放入65 $^{\circ}$ C水浴锅中; 12 000 r/min离心10 min, 取上清于1.5 mL离心管中; 再加入等体积的氯仿: 异戊醇(24:1), 上下颠倒充分混匀; 12 000 r/min离心, 取上清, 重复加入氯仿: 异戊醇(24:1), 充分混匀, 离心取上清, 加入2/3体积预冷的异丙醇, 轻轻上下摇匀, -20 $^{\circ}$ C冷冻30 min; 用枪头挑取絮状DNA, 加70%(V/V)乙醇浸泡洗涤2~3次, 倒掉乙醇溶液, 打开离心管盖子晾至乙醇完全挥发; 加入50 μ L ddH₂O溶解, -20 $^{\circ}$ C保存。

1.7 RNA提取与cDNA合成

采集野生型C312叶片、茎、苞叶、萼片、子房、开花当天花器官和干涉株系当天花器官于-80 $^{\circ}$ C冰箱冻存备用。选取天根公司的多糖多酚植物RNA提取试剂盒, 按照试剂盒的说明书进行RNA的提取, 测定所提取的总RNA浓度, 稀释至200 ng/ μ L, 随后取1 μ g用于合成cDNA, 参考FastQuant cDNA第一链合成试剂盒说明书反转录合成cDNA, 以试剂盒中FQ-RT Primer Mix为引物, 合成的cDNA稀释10倍, 用于qRT-PCR分析, 所用引物为*GhrbcMT-F*/*GhrbcMT-R*、*GhUBQ7*作为内参基因(表1)。

1.8 *GhrbcMT*基因在陆地棉不同组织中的表达分析

以陆地棉C312叶片、苞叶、萼片、子房、花瓣、雄蕊和柱头的cDNA作为模板, 以*GhUBQ7*作为内参基因, 分析*GhrbcMT*基因在陆地棉不同组织中的表达水平。反应体系如下: 5 μ L 2 \times SYBR solution、

0.2 μL引物F(10 μmol/L)、0.2 μL引物R(10 μmol/L)、2.5 μL cDNA、0.2 μL low ROX、ddH₂O加至10 μL。反应条件如下: 95 °C预变性2 min, 95 °C变性15 s, 60 °C退火30 s, 40个循环; 熔解曲线(95 °C 15 s, 60 °C 15 s)。生物学重复和技术重复各3次。采用2^{-ΔΔCt}方法分析*GhrbcMT*基因在陆地棉不同组织中的表达水平^[11]。

1.9 花粉活性染色观察

取植株开花当天新鲜的花粉于载玻片上, 吸取20 μL I₂-KI染色液滴在花粉上, 静置1 min, 于显微镜(ZEISS SteREO LuMar.V12, Germany)下观察、拍照, 统计花粉活力。

1.10 叶片叶绿素含量测定

采用乙醇浸泡法^[12], 提取叶片叶绿素。在长势一致的野生型棉花株系, 不同的干涉株系顶端的第三片叶子剪取0.1 g新鲜叶片, 剪成长度2 mm小碎条, 然后放入2 mL EP管中, 加入95%乙醇提取液1.5 mL, 避光浸提24 h, 提取液分别在665、649、470波长下比色, 测定D值, 重复3次。计算出相应叶绿素含量, 根据以下公式计算: $Ca=13.95 \times D_{665} - 6.88 \times D_{649}$, $Cb=24.96 \times D_{649} - 7.32 \times D_{665}$, $Cxc=(1\ 000 \times D_{470} - 2.05 \times Ca - 114.8 \times Cb)/245$, 叶绿体色素含量=色素的浓度(C)×提取液体积×稀释倍数/鲜重^[13], 生物学重复2次, 技术重复3次。

1.11 数据统计

实验数据以mean±S.D.形式表示, 显著性差异分析用SPSS 11.5软件进行。**P*<0.05为差异具有显著性, ***P*<0.01, ****P*<0.001为差异具有极显著性。

2 结果

2.1 *GhrbcMT*基因生物信息学分析

提取陆地棉野生型C312不同组织器官的总RNA, 将总RNA反转录得到cDNA, 混合不同组织的cDNA作为模板经PCR扩增后得到*GhrbcMT* cDNA序列, 用1%(w/V)琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增片段大小与基因组序列相同(1 663 bp)。随后回收测序, 序列通过BioEdit、DNASTAR等软件分析, 确定得到*GhrbcMT* cDNA全长序列, 通过ORF finding分析后发现完整*GhrbcMT*基因ORF长度为1 515 bp。基于*GhrbcMT*核酸序列利用DNAMAN软件预测*GhrbcMT*基因序列编码504个氨基酸(图1)。用ProtParam分析发现, *GhrbcMT*蛋白理论分子量为57.17 kDa,

属于不稳定, 亲水性蛋白。使用NetOGlyc 4.0预测*GhrbcMT*蛋白存在6个潜在的糖基化位点(图2), 并用NetPhosk预测得到*GhrbcMT*蛋白包含多个磷酸化位点(图3)。

采用Pfam对*GhrbcMT*氨基酸序列进行保守性分析, *GhrbcMT*序列包含两个保守结构域, 207~305 aa存在一个SET结构域, 343~471 aa之间存在一个RbcLSMT结构域。已有研究表明, SET结构域参与多种生理活动, 可能起调节生长发育、基因转录、染色质结构转换等作用^[14], 同时组蛋白赖氨酸甲基化是调节染色质功能和基因功能的表观遗传控制的组蛋白密码的关键部分^[15], 目前还没有RbcLSMT结构域生物功能的相关报道。利用TMHMM和Cell-PLoc 2.0分析发现, *GhrbcMT*蛋白没有跨膜结构域, 位于细胞质内。在豌豆中, WoLF PSORT预测*GhrbcMT*同源蛋白存在于叶绿体的类囊体膜上并参与ATP的合成; 在拟南芥中*rbcMT*蛋白存在于叶绿体基质上, 是参与DNA损伤修复过程的关键蛋白, 具有ATP结合位点; 棉花*GhrbcMT*蛋白与可可中的RBCMT蛋白较为相似, 同源性高, 主要存在于叶绿体中, 参与Rubisco LS蛋白14位赖氨酸的甲基化。利用SignalP 4.1分析表明, *GhrbcMT*不含有信号肽序列, 为非分泌蛋白。通过PredictProtein分析*GhrbcMT*二级结构, Loop结构占了56.94%; α螺旋占35.52%; 直链结构占7.54%。Loops多数位于蛋白质分子表面, 由大量亲水氨基酸组成, 具有灵活的构象, 由此推测*GhrbcMT*可能具有多个蛋白质结合位点以及酶催化位点。

棉花*GhrbcMT*氨基酸序列同源性分析显示, 棉花*GhrbcMT*(XP_016746532.1, *Gossypium hirsutum*)与榴莲(XP_022771655.1, *Durio zibethinus*)、哥伦比亚锦葵(XP_021275346.1, *Herrania umbratica*)、可可(XP_007049391.1, *Theobroma cacao*)、番木瓜(XP_021889929.1, *Carica papaya*)氨基酸序列相似度都很高, 分别为92.0%、90.5%、90.3%和80.2%(图4)。进一步分析棉花*GhrbcMT*与其他植物*rbcMT*的亲缘关系, 榴莲(XP_022771655.1, *DzrbcMT*)、哥伦比亚锦葵(XP_021275346.1, *DurbcMT*)、可可(XP_007049391.1, *TcrbcMT*)、麻风树(XP_012081511.1, *JcrbcMT*)、木薯(XP_021633756.1, *MerbcMT*)、蓖麻(XP_002532210.1, *RcrbcMT*)、番木瓜(XP_021889929.1, *CprbcMT*)、胡杨(XP_011008074.1, *PerbcMT*)、毛果杨(XP_024441106.1, *PtrbcMT*)、欧洲栓皮栎(XP_023898580.1, *Qsrbc-*

```

1  ATGSCGGAGCTTCTAGAATCTTCCATTCAAGCACTGATCCAACTCTCTGTACAAC
1  M A E A S R I F H S T L I P T L S L Q L
61  AGCAAGCCATGTTACAATTCTCAGGTTTACCCCTTCACTCTCTCTCAAGAAAGCACCAGGC
21  S K P C Y N S H V Y P S L S L K K A P R
121  CCAGTTCAATGCTCAGTTTCCACAGGCAACCAAAATCGACGCTCGTCCGAATCGGACCCAG
41  P V O C S V S T S E T K S T S S N A T O
181  GAAGTGCCTTGGGCTGCGACATTGATTCCTTGGAGAACGCAAGGCGCTTCAGAAATGG
61  E V F W G C D I D S L E N A E A L Q K W
241  CTTTCGAATTCAGGGTTGCCTCCCCAGAGATGGCCATAGACAAATGGCAGTAGGGGAG
81  L S N S G L P P Q K M A I D K V A V G E
301  AGAGGATTTGGTTCCTTGAAGAAATACAGGAGGGTGGAGAGCTTCTCTTTTGGCTCC
101  R G L V A L K N I R K G E K L L F V P P
361  TCGCTTTTCATCACTGCAGATTGAGAGTGGAGTCCCTCGAGGCTGCTAGTATTAAAA
121  S L F I T A D S E W S S P E A G L V L K
421  CAGTATTCGGTTCAGATTGGCCCTTGTAGCAACCTATCTTATTAGTGAAGCAAGTGGC
141  Q Y S V F D W F L L A T Y L I S E A S A
481  CAAAAATCTCAAGATGGTCCAAATATATTTCAGCCCTTCTCGGCAACCTATTCTCTT
161  Q K S S R W C N Y I S A L P R Q P Y S L
541  TTATCTGGACAGCTGCGAGGCTAGCAGGATCTTGAAGCATCTCAGATAGGCAAGGG
181  L Y H T R A E L D R Y L E A S Q I R Q R
601  GCTATCGAAGAGTACTGATGTTATCGAACAATGATGATTAGACTTAGGATATT
201  A T F R V T D V F G T Y N D L R L R I F
661  TCCAAGTATCGTATATATCCCGAAGAGGTATTCAATATGGAGACATTCAGATGGTCC
221  S K Y P D I F E E V F N M E T F R W S
721  TITGGCAITCTTTTCAGCAITGGTAAGGCTACCTCAATGGATGGAAAGTGGCTTG
241  F G I L F S R L V R L P S M D G K V A L
781  GTTCCTTGGCAGATATGCTCAATCAGAGCTGTGAGTGGAAAGCTTTTGGATTAGC
261  V P W A D M L N H S C E V E T F L D Y D
841  AAATCATCACAGGTTGTCTTACACAGATCGAGCTATCAGCCTGGTGGCAGGTT
281  K S S Q G V V F T T D R A Y Q D G E Q V
901  TTCATATCATAGGAAAAAATCTAATGGAGAGCTGTTTATCTTATGGATTTGTCCA
301  F I S Y G K K S N G E L L L S Y G F V P
961  AAGSAGGCGCTAATCCTAGTGAITCAGTAGAGCTACCTCATCCCTTAAAAAATCTGAT
321  K E G A N P S D S V E L P L S L K K S D
1021  AAATGCTATAAGGAGAGTGGAGGCTCTGAGGAGCATGGATTATCTACTTCAGTGT
341  K C Y K E K L E A L R K H G L S T S Q C
1081  TATCCCATCAAAATCACTGGTGGCCATTGGAGTTAATGGCATATGCTTACTTGGCAGTC
361  Y P I Q I T G W P L E L M A Y A Y L A V
1141  AGTCCCCCAAGCATGAGCAAGCAATTTGATGAGATGCGCCGTCAGCATCAAATAAATCT
381  S P P S M S K Q F D E I A A A A S N K S
1201  ACTATCAAAAAGSACTTAAATACCCGATATGAAAGAAAAGCACTGCAATTTATCTC
401  T I K K D L R Y P D I E E K A L Q F I L
1261  GATAGTTGGAATCAAGCATATCAAGTACTCCAAATTTTTCGAAGTAAAGTGGCTCATG
421  D S C E S S I S K Y S K F L Q V S G S M
1321  GATTTGGATGTGCAACTCCAAAGCAGTTGATCGAAGAGTGTTCCTGAAACAGCTAGCA
441  D L D V T T F K O L N R R V F L K O L A
1381  GTAGATTATGTCAAGTGGCAGAGAACTATTTCCGCTCAATATATCTGAGGAGG
461  V D L C T S E Q R I L F R A Q Y I L R R
1441  AGATTGAGGATATGAGGAGTGGTGAAGTGGAGCTTAAAGATCTTCGATGGATTGGGA
481  K L R E D H R S G E L R A L R I F D G L R
1501  AACATTTCAAAATAA*
501  N I F K
    
```

图中方框内是起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA), 星号表示翻译终止。
The initiation codon (ATG) and termination codon (TAA) were labeled by box. The asterisk indicated the translation was terminated.

图1 *GhrbcMT*基因全长序列及对应*GhrbcMT*氨基酸序列

Fig.1 Full length sequence and corresponding amino acid sequence of *GhrbcMT*

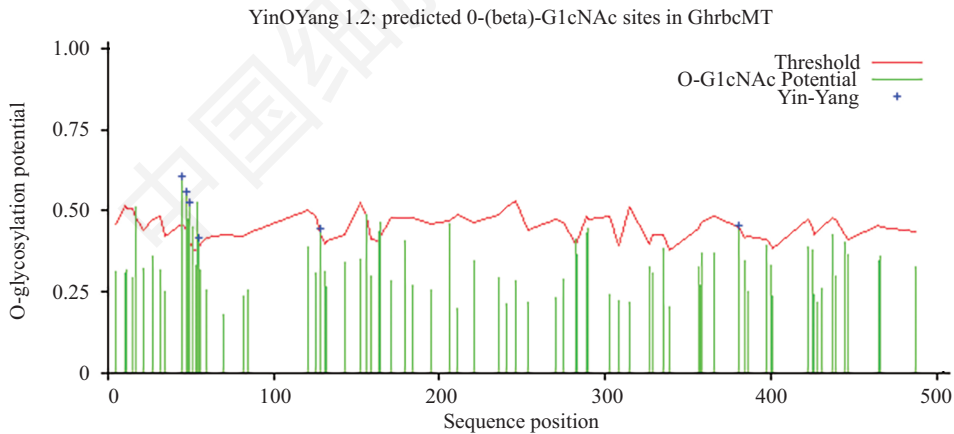


图2 *GhrbcMT*蛋白糖基化位点预测结果

Fig.2 *GhrbcMT* protein glycosylation site prediction

cMT)、月季(XP_024180195.1, *RcrbcMT*)、猕猴桃(PSS16073.1, *AcvrbcMT*)、相思子(XP_027343809.1, *AprbcMT*)、柚子(XP_006447826.1, *CcrbcMT*)、葡萄(XP_002267469.2, *VvrbcMT*)、芝麻(XP_011100517.1, *SirbcMT*)等17个同源蛋白的氨基酸序列同源性分析显示, 在氨基酸序列N-端同源性低, C-端蛋白质序

列同源性较高, 且富含不完全-LRX-亮氨酸基序如LRR、LRD、IRX和LRA等(图4)。RbcMT进化树显示, *GhrbcMT*与榴莲、哥伦比亚锦葵、可可亲缘关系最近(图5)。

2.2 *GhrbcMT*基因组织特异性表达分析

分别采集陆地棉C312叶片、苞叶、萼片、花瓣、

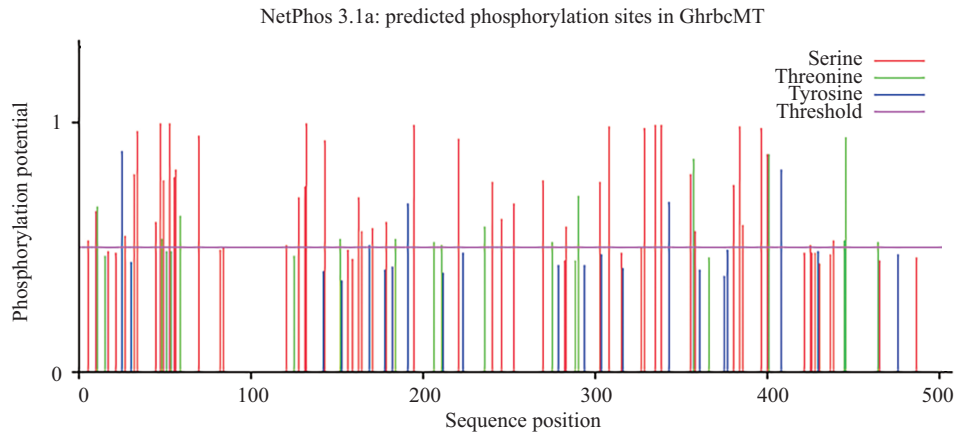


图3 *GhrbcMT*蛋白磷酸化位点预测结果

Fig.3 *GhrbcMT* protein phosphorylation site prediction

<i>Gossypium_hirsutum</i>	M A E A S R I F H - S T L F P T L S L Q L S K - - P C Y N - - S H V Y P S L S L K K A P R P V Q C S V S T S E T K - - - - S T S S N A T
<i>Durio_zibethinus</i>	M A E A F R F H - A T F L P T F S P Q L S K - - P P Y - - S H S Y P S L L C L K K V - R P I Q C S V S T S E T K - - - - P T S S N A T
<i>Herrania_umbratica</i>	M A F A S R F Q - A A I I P T F S P Q I H H - - K I R H S H S H T F P S I S I K K F R S V V Q C S V S T S F T K - - - - T S S N A T
<i>Theobroma_cacao</i>	M A E A S R F H - A T L L P T F S P Q L H H - - K L R H S H S H T F P S L S F K K F R S V V Q C S V S T S E T R - - - - T S S N T
<i>Carica_papaya</i>	M A E S S R L Q - T A L L P S F S S H Y K - - - - P Q K Q K - L S L S S Q T W F R H K Q L V H C S V S T S - - - - D T T K S T G T Q
<i>Jatropha_curcas</i>	M A K A S R V F Q - P T L F P T L S T L I I K P - - R T L S - - N A P T - I I I I K K Y P - T I R C S - - V S T S D - - S A I R C A T S A T
<i>Manihot_esculenta</i>	M V E A S R F Q - T T L F P S F S I L H K S - - C T L T - - Q S P S - F L R K K Y S T T I H C S S S V S T S D - - S A T E K A A S V T
<i>Ricinus_communis</i>	M A E A S R F Q - T T L L P T F S S L Q K P - - R L V S - - H H P P N L A H K K Y Q T I H C L S S S V S T S D D I T T A K A A T T V T
<i>Populus_euphratica</i>	M L E A C R I L N I I I F R P S L H S L H K I - - Q K K V - - S C S Q P F L P K R H P A I Q C S - - I S I S S - - D I K A A A K V S
<i>Populus_trichocarpa</i>	M A E A C R I L N I I I F L P S L H S L H K I - - H K K V - - S Y S Q P F L H K R H P A I Q C S - - I S I S S - - D I K A A A K V S
<i>Quercus_suber</i>	M A E A T R L F H T L I I P S F N P L H K T - - K P Y S - - Y S Q S P I I F H K R P I N C S V S T S D T - - - - T K A T V A
<i>Rosa_chinensis</i>	M A E A T R L Q - S S L I P S F H S H P P - - - - - S H T F Q S H P P S F R R H P I Q C S I S T T E S - - - - T K A R V A
<i>Actinidia_chinensis_var</i>	M A E A S R L H T A L I P N F S T L T Q - - K T P C S R S Q L I S L P R R - - - S T V R C S V S T T - - - - A A N - - - -
<i>Alnus_pincatorius</i>	M A F A S R M N - S T I V P C Y S P R I Q R - - T H H V - - - C Q P Q I T M R R K R H Q I H C S V S A S G A T - - - - Q G S V M
<i>Citrus_clementina</i>	M A E A S R T F H T I L L P S F S H L H K - - - A Q S P A G F T A F P R K R C G H R I V V H C S V S T N D A - - - S R T K T I V T Q
<i>Vitis_vinifera</i>	T A L T L T L P P S F S - - - Q T P S R I I S Q P - - - I P R R - - - I I P R R - - - I I P R R - - - D T A K T S V T -
<i>Sesamum_indicum</i>	M A E A S R L Q - T T L I S T F S Q N P S Q Y T L K A H S H H Y I P P S T S K R S N L F H R I R C S V S T A - - - - S T C G E S A T C
<i>Gossypium_hirsutum</i>	Q A S G S M D I D V T S P K Q I N R R V F I K Q I A V D I C T S E Q R I I F R A F Y I L R R R L R D M R S G E L R A L R I F D G F R N L F K
<i>Durio_zibethinus</i>	Q V S G S M D L D V T S P K Q L N R R V F L K Q L A V D L C T S E Q R I L F R A Q Y I L R R R L R D M R S G E L R A L R I F D G F R N L F K
<i>Herrania_umbratica</i>	Q A S C S M D L D V T S P K Q L N R R V F L K Q L A V D L C T S E Q R I L F R A Q Y I L R R R L R D M R S G E L R A L R I F D G F R N L F K
<i>Theobroma_cacao</i>	Q A S G S M D L D V T S P K Q L N R G V F L K Q L A V D L C T S E Q R I L F R A Q H I L R R R L R D M R S G E L R A L R I F D G F R N L F K
<i>Carica_papaya</i>	Q A S G S M D L D V T S P K Q L N R R L F L K Q L A V D L C T S E R R I L F R A Q Y I L R R R Q L R D I R S G E L K A L R I F D G F R N L F K
<i>Jatropha_curcas</i>	Q A S G S M D L D V T S P K Q L N R R V F L K Q L A V D L C N S E R R I L F R A Q N V L R R R L R D I K S G E L R A L K I F D G F R N L F K
<i>Manihot_esculenta</i>	Q A S G S M D L D V T S P K Q L N R R L F L K Q L A V D L C N S E R R I L F R A Q S V L R R R L R D I R S G E L R A L R I F D G F R N L F K
<i>Ricinus_communis</i>	Q A S G S M D I D V T S P K Q I N R R I F I K Q I A V D I C N S F Q R I I F R A Q N V L R R R L R D I R S G F R A I K I F D G F R N L F K
<i>Populus_euphratica</i>	Q A S G S M D L D V T S P K Q L N R R L F L K Q L A V D L C S S E R R I L F R A Q Y V L R R R L R D I R S G E L R A L K I F D G F R N L F G
<i>Populus_trichocarpa</i>	Q A S C S M D L D V T S P K Q L N R R L F L K Q L A V D L C S S E R R I L F R A Q Y V L R R R L R D I R S C E L R O L K I F N C F R N L F K
<i>Quercus_suber</i>	Q A S G S M D L D V T S P K Q L N R R L F L K Q L A V D L C T S E R R I L F R A Q Y I L R R R L R D I R S G E L R A L R I F D G L F R N L F K
<i>Rosa_chinensis</i>	Q A S G S M D L D V T S P K Q L N R R L F L K Q L A V D L C T S E Q R I L F R A Q Y I L R R R Q L R D I R K G E L R A L T I F D G F R K L F K
<i>Actinidia_chinensis_var</i>	Q A S G S M D L D V T S P K Q L N R K L F L K Q L A V D L C T S E Q R I L Y R S Q Y I L R R R L R D I R S G E L K A L R I F D G F R N L F K
<i>Alnus_pincatorius</i>	Q A S G S I D I D V T S P K Q I N R R I F I K Q I A V D I C N S F Q R I I F R A Q Y I L R R K I R D M R A G F I R A I N I F K G F R N L F Q
<i>Citrus_clementina</i>	Q A S G S M D L D T S P K Q L N R R V F L K Q L A V D L C T S E R R I L F R A Q Y I L R R R L R D I R S G E L R A L R I F D N F R N L F K
<i>Vitis_vinifera</i>	Q E S C S M D L D V T S P K Q L N R R V F L K Q L A V D L C T S E Q R I L F R T Q Y I L R R R L R D I R S S G E L R A L R I F D G F R N L F K
<i>Sesamum_indicum</i>	Q A S G S M D L D V T N P K L L N R K L F L K Q L A V D L C T S E Q R I L F R A Q Y I L R R R L R D I R S G E L R A L R I F D G F R K L F N

黄色部分是序列相同部分, 红色虚线框部分是来自榴莲、哥伦比亚锦葵、可可、番木瓜的*rbcMT*同源序列, 黑色方框表示不完全的亮氨酸基序。The yellow portion indicates same sequences among the other homologous sequences, the red dotted frame is the *rbcMT* homologous sequence from *D. zibethinus*, *H. umbratica*, *T. cacao*, *C. papaya*. The black squares indicates the incomplete leucine motif.

图4 榴莲、哥伦比亚锦葵、可可、番木瓜等物种中*GhrbcMT*同源蛋白质的多重序列比对

Fig.4 Multiple sequence alignment of *GhrbcMT* with homologous sequences from *D. zibethinus*, *H. umbratica*, *T. cacao*, *C. papaya* and other homologous sequences

雄蕊和柱头、子房和茎, 提取各组织总RNA, 反转得到各组织cDNA, 利用荧光定量PCR检测*GhrbcMT*基因在各个组织中的表达水平。结果如图6, *GhrbcMT*基因在棉花叶片中表达水平最高, 在子房、雄蕊和柱头中的表达量较低, 分别是叶片中表达水平的1/12和1/10, 表明*GhrbcMT*基因在茎和叶等营养器官中优势表达, 而在生殖器官中表达水平较低。

2.3 VIGS干涉载体的构建及遗传转化

通过VIGS技术转化陆地棉C312得到*GhrbcMT*干涉株系, 空载体转化株系作为阴性对照CK, *GhPDSi*株系作为阳性对照, 野生型株系作为空白对照。

在转化四周后, 利用PCR技术, 以A-F/A-R或A-F/A-R和基因特异引物组合为引物进行棉花干涉株系鉴定, 结果显示10株干涉株系, 其中7株转化成功, 再重复2次, 每次均有6~8株成功转化(图7)。在营养生长期, *GhrbcMTi*株系、*GhPDSi*株系、CK植株均出现叶片皱缩表型, 同时*GhrbcMTi*株系相较CK与WT植株生长缓慢, 植株矮小(图8)。随后统计C312野生型植株与*GhrbcMTi*株系植株节间距长度, 从下至上取10节, *GhrbcMT*干涉株系的节间距明显短于WT, 节间距差异极显著(图9)。在开花时期, *GhrbcMTi*株系花器官发育异常(图10), 相较CK、WT, 表现为花型

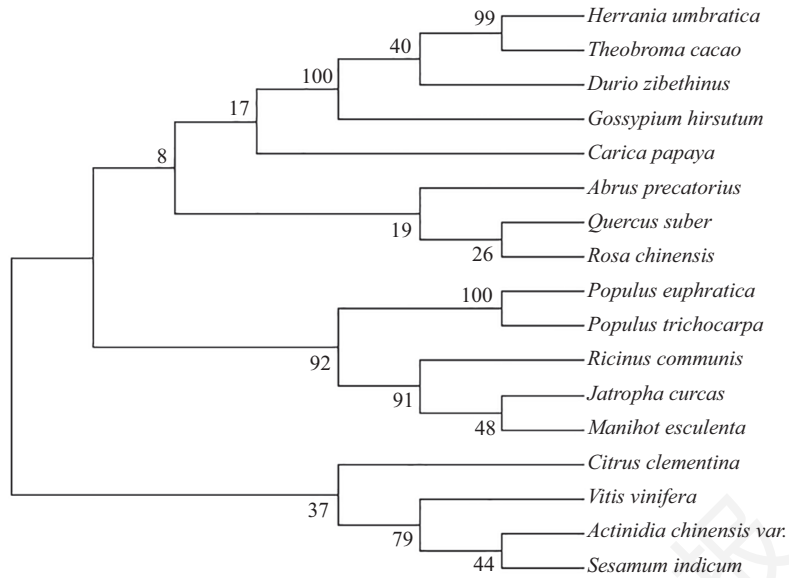
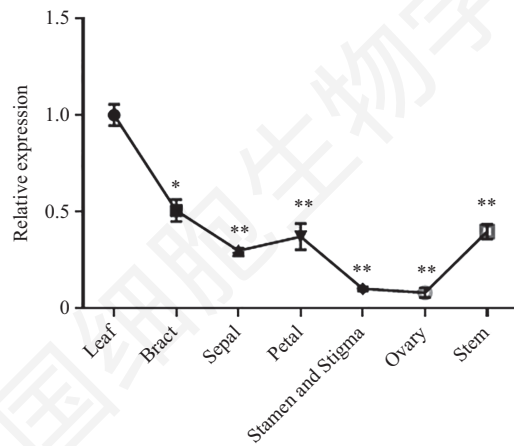


图5 邻接法分析GhrbcMT与其他17种植物rbcMT同源性和分子进化关系

Fig.5 Phylogenetic tree of GhrbcMT and 17 rbcMT homologous proteins from other plants by neighbor-joining

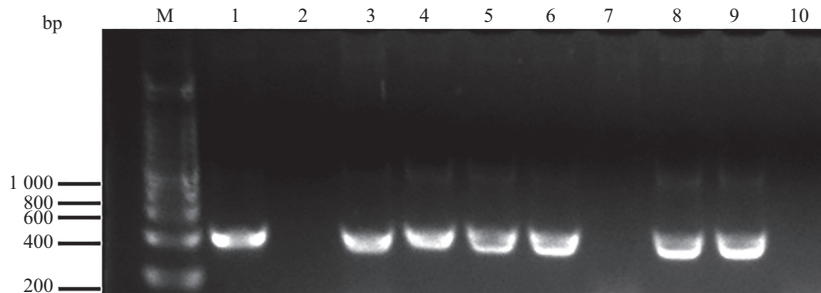


实验独立重复3次, 数据以mean±S.D.形式表示。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与叶片中GhrbcMT基因表达水平比较。

Each point represents the mean±S.D. of three experiments independent. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the GhrbcMT expression level of leaf.

图6 GhrbcMT基因在陆地棉C312各组织中的表达分析

Fig.6 The GhrbcMT gene expression pattern in upland cotton C312



M: DNA分子标记; 1~10: GhrbcMTi转化后株系的PCR检测, 引物由载体序列引物A-F+GhrbcMT-GSP-R(Gene specific primer)

M: DNA Marker; 1-10: the detection of GhrbcMTi plants by PCR, primer combination of vector primer A-F+GhrbcMT-GSP-R.

图7 转GhrbcMT干涉株系的PCR检测

Fig.7 PCR products of GhrbcMT interference fragment

小, 花瓣发育畸形; 雄蕊花丝少, 花粉囊完全不开裂或者大部分不开裂; 花柱明显伸长, 柱头显著长于雄蕊。花粉染色观察结果显示, CK和WT的花粉形态饱满、大小均一、着色深、花粉活性高; *GhrbcMTi*株系的花粉发育异常, 形态不规则, 染色浅; 容易破裂, 育性很差; 一些植株花药不开裂不散粉, 没有花粉产生; 一些植株花丝减少, 花粉干瘪; 一些植株的花粉粒皱缩、大小不均一, 花粉活性较差(图11)。在后期结铃阶段, 这些*GhrbcMTi*株系在开花3天后花器官干枯, 随后出现棉铃掉落, 子房中胚珠褐化凋亡等现象。由此推测, *GhrbcMT*基因影响棉花植株营养生长和生殖器官的发育, 包括棉花茎的伸长、花器

官发育等。

2.4 野生株系与干涉株系的叶片叶绿素含量测定

Rubisco LS由叶绿体DNA编码, 在多种生物之间具有高度同源性^[16], 是Rubisco主要的催化和活性中心。rbcMT参与Rubisco LS的14位赖氨酸残基ε-氨基的翻译后甲基化过程。通过*GhrbcMT*基因组特异性表达分析表明, *GhrbcMT*基因在棉花叶片中特异性表达。利用乙醇浸泡法提取野生植株与*GhrbcMT*干涉植株的叶绿素, 结果显示, 野生型植株与*GhrbcMTi*株系的叶绿素a、叶绿素b以及叶绿素总含量没有显著差异(图12), 表明*GhrbcMT*基因表达量降低对叶片叶绿素的合成与代谢并没有显著影响。

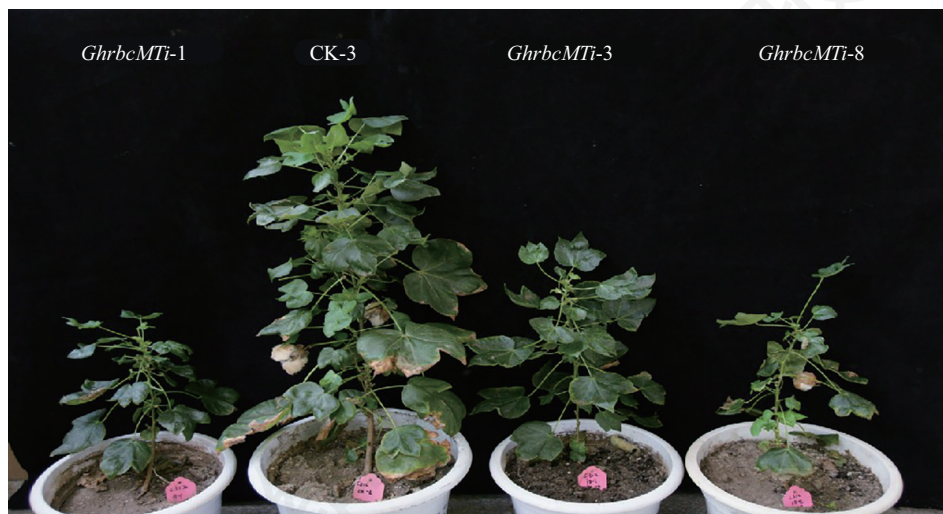
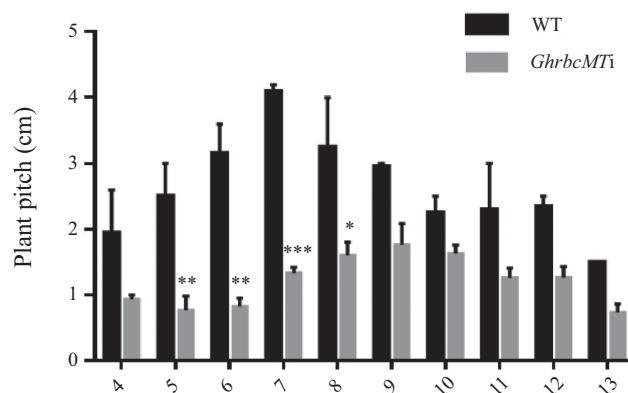


图8 *GhrbcMTi*转基因株系和CK株系表型分析

Fig.8 The phenotypes of *GhrbcMTi* plants and CK plants



横坐标4~13表示植株节间数。实验独立重复3次, 数据以mean±S.D.形式表示。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与野生型组比较。

X axis 4-13 indicate the number of plant internodes. Each point represents the mean±S.D. of three experiments independent. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs WT group.

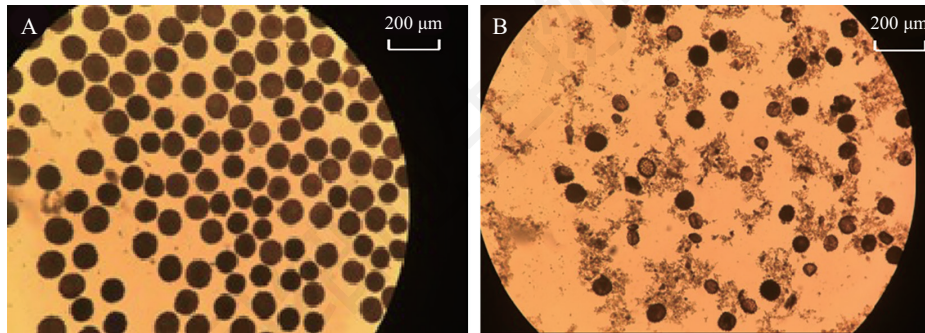
图9 *GhrbcMTi*株系与WT植株节间距比较

Fig.9 Comparison of plant pitches in the *GhrbcMTi* plants and WT plants



图10 *GhrbcMTi*植株与CK植株花器官形态分析

Fig.10 The morphological changes of the stamens and stigmas in *GhrbcMTi* plants and C312 plants

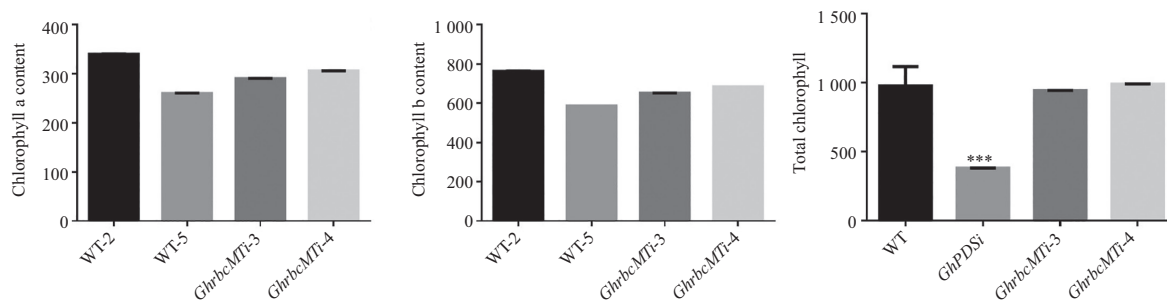


A: CK植株花粉染色观察结果; B: *GhrbcMTi*干涉株系花粉染色观察结果。

A: observation on pollen of CK plants stained with KI-I₂; B: observation on pollen of *GhrbcMTi* plants stained with KI-I₂

图11 *GhrbcMTi*植株与CK植株花粉染色分析

Fig.11 Observation on pollen of *GhrbcMTi* plants and CK plants stained with KI-I₂



实验独立重复3次, 数据以mean±S.D形式表示。*** $P < 0.001$, 与WT中叶绿素比较。

Each point represents the mean±S.D. of three experiments independent. *** $P < 0.001$ vs WT group.

图12 野生型C312植株与*GhrbcMTi*植株叶片叶绿素含量分析

Fig.12 Analysis of chlorophyll contents of leaves in wild plants and *GhrbcMTi* plants

3 讨论

Rubisco是植物进行光合作用的关键限速酶,是目前为止唯一一个同时由核DNA编码和叶绿体编码的蛋白质,能催化碳反应中CO₂固定以及光呼吸中RuBP氧化过程。Rubisco主要有四种存在形式,在高等植物中,一个Rubisco蛋白由8个Rubisco LS和8个Rubisco SS组成^[17]。研究表明,植物间的Rubisco LS同源性很高,非常保守,是Rubisco的主要催化与活性部位,小亚基可能起到调节催化反应的作用,而大小亚基的重新组合会影响Rubisco的氧化活性与羧化活性^[18]。据推测,在植物生理生化途径中*rbcMT*催化许多高等植物中Rubisco LS的14位赖氨酸的ε-氨基的翻译后甲基化过程,并未得到进一步证实。也有研究表明,蛋白甲基化修饰是广泛存在的翻译后修饰过程,由甲基转移酶依赖S-腺苷-L-甲硫氨酸作为甲基供体催化形成相对应的甲基化产物^[19]。目前Rubisco LSMT在豌豆、菠菜、烟草、番茄等植物中被鉴定出,研究主要集中在基因克隆、序列分析、启动子结构分析、大小亚基交叉互作、底物特异性分析方面,而在棉花中研究翻译后修饰的报道还较少,对于该基因在棉花不同时期,不同组织以及不同蛋白修饰类型的系统全面的解析是未来研究的重要目标。

本研究通过前期转录组数据筛选和克隆*GhrbcMT*基因,得到*GhrbcMT*基因序列,同时利用生物信息学分析了该基因的氨基酸序列及其理化性质,为进一步探究*GhrbcMT*基因生物学功能与分子调节机制提供参考。糖基化与磷酸化是蛋白质翻译后修饰最常见的方式,对细胞内生理生化过程起着举足轻重的调控作用,是进行信号传导、细胞与蛋白质相互作用的结构基础,同时起到帮助蛋白质正确折叠以及影响蛋白质的稳定与溶解度的作用^[20]。在二穗短柄草幼苗叶中糖蛋白质组分析发现,蛋白糖基化作用可能参与调节植物的体内平衡,为蛋白质翻译后修饰过程提供了新的认识^[21]。近日,种康院士团队^[22]在拟南芥中发现一种O-GlcNAc糖基化表现遗传学修饰调控拟南芥开花机制,当拟南芥缺乏O-GlcNAc糖基转移酶时,出现早花表型。本研究通过蛋白质二级结构分析,*GhrbcMT*蛋白含有多个磷酸化与糖基化位点,据报道,蛋白质在发挥功能的过程中会发生多种的翻译后修饰,常见的有磷酸化、糖基化、乙酰化、甲基化等,这些修饰彼此之间相互

联系,相互影响,其中一种翻译后修饰相互作用是蛋白质的甲基化与磷酸化修饰之间的拮抗作用^[23],而Rubisco大亚基甲基化与*rbcMT*磷酸化两者之间是否也存在相互作用,以此调节Rubisco的催化活性或者影响Rubisco蛋白的稳定性,这还需要进一步研究。二级结构分析显示,*GhrbcMT*蛋白中Loop结构占了56.94%,由大量亲水氨基酸组成,表明*GhrbcMT*具有灵活的构象,可能参与多个细胞生命活动过程。Klein等^[1]研究发现,*rbcMT*转录物的最大积累发生在光诱导叶发育的初始阶段,黄化豌豆幼苗*rbcMT*转录水平在叶片发育早期具有光依赖性与短暂性,在生长成熟的叶组织中黄化豌豆幼苗与正常豌豆幼苗的*rbcMT*转录水平没有显著变化,但没有进一步验证豌豆幼苗黄化与*rbcMT*的表达水平的直接相关性,同时该基因在叶片发育早期的分子调节机制也有待深入探究。

本实验通过VIGS技术转化棉花幼苗获得*GhrbcMT*干涉株系,比较野生植株和*GhrbcMTi*植株叶片的叶绿素含量、花粉活性、植株节间距和*GhrbcMT*基因组织特异性表达分析,结果显示,在发育早期降低棉花的*GhrbcMT*表达水平对植株生长发育、新陈代谢有显著影响,直接影响棉花茎的伸长,表现为节间距缩短,进一步导致棉花的花器官发育异常,*GhrbcMTi*株系花药不开裂,花丝减少,花粉干瘪,最终导致棉花败育。该研究初步揭示了Rubisco大亚基甲基化修饰在棉花植株生长、开花、组织器官分化等过程中起重要作用,而这些过程对棉花的产量具有重要影响,但*GhrbcMT*基因在棉花叶片发育早期的调节机理有待研究者进一步探究。

参考文献 (References)

- 1 Klein RR, Houtz RL. Cloning and developmental expression of pea ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit N-methyltransferase. *Plant Mol Biol* 1995; 27: 249-61.
- 2 Houtz RL, Royer M, Salvucci ME. Partial purification and characterization of large subunit N-methyltransferase. *Plant Physiol* 1991; 97(3): 913-20.
- 3 Paik WK, Paik DC, Kim S. Historical review: the field of protein methylation. *Trends Biochem Sci* 2007; 32(3): 146-52.
- 4 Houtz RL, Poneleit L, Jones SB, Royer M, Stults JT. Posttranslational modifications in the amino-terminal region of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from several plant species. *Plant Physiol* 1992; 98(3): 1170-4.
- 5 Ying Z, Mulligan RM, Janney N, Houtz RL. Rubisco small and large subunit N-methyl-transferases. *J Biol Chem* 1999; 274(51): 36750-6.

- 6 Ying Z, Janney N, Houtz RL. Organization and characterization of the ribulose-1,5 -bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ϵ -N-methyltransferase gene in tobacco. *Plant Mol Biol* 1996; 32: 663-71.
- 7 田铃, 嵇保中, 刘曙雯, 金凤, 高洁. 甲基转移酶的功能与分类. 生命的化学(Tian Ling, Ji Baozhong, Liu Shuwen, Jin Feng, Gao Jie. Function and classification of methyltransferase. *Chemistry of Life*) 2007; 27(5): 425-7.
- 8 Tuttle JR, Idris AM, Brown JK, Haigler CH, Robertson D. Geminivirus-mediated gene silencing from cotton leaf crumple virus is enhanced by low temperature in cotton. *Plant Physiol* 2008; 148(1): 41-50.
- 9 Gu Z, Huang C, Li F, Zhou X. A versatile system for functional analysis of genes and microRNAs in cotton. *Plant Biotechnol J* 2014; 12(5): 638-49.
- 10 Fu W, Shen Y, Hao J, Wu J, Ke L, Wu C, *et al.* Acyl-CoA N-acyltransferase influences fertility by regulating lipid metabolism and jasmonic acid biogenesis in cotton. *Sci Rep* 2015; 5: 11790.
- 11 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001; 25(4): 402-8.
- 12 李志丹, 韩瑞宏, 廖桂兰, 张美华. 植物叶片中叶绿素提取方法的比较研究. 广东第二师范学院学报(Li Zhidan, Han Ruihong, Liao Guilan, Zhang Meihua. A comparative study on the different extraction techniques about the chlorophyll concentration of plant leaf. *Journal of Guangdong University of Education*) 2011; 31(3): 80-3.
- 13 张治安, 陈展宇. 植物生理学实验技术. 吉林: 吉林大学出版社, 2008: 156-7.
- 14 Cui X, De Vivo I, Slany R, Miyamoto A, Firestein R, Cleary ML. Association of SET domain and myotubularin-related proteins modulates growth control. *Nat Genet* 1998; 18(4): 331-7.
- 15 Helin K, Dhanak D. Chromatin proteins and modifications as drug targets. *Nature* 2013; 502(7472): 480-8.
- 16 孙崇荣, 棒崎一雄, 杉浦昌弘. 蚕豆核酮糖1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶大亚基基因5'区域核苷酸顺序的分析. 生物工程学报(Sun Songrong, Bang Qiyixiong, Shan Puchanghong. The sequence analysis of 5' region of the gene for the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from broad bean chloroplast. *Chin J Biotech*) 1987; 3(4): 254-9.
- 17 Spreitzer RJ, Salvucci ME. Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annu Rev Plant Biol* 2002; 53: 449-75.
- 18 缪有刚, 李立人. 水稻和烟草核酮糖1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶大小亚基之间的分子杂交. 植物生理学报(Liao Yougang, Li Liren. Molecular hybridization of rubisco subunits between rice and tobacco. *Plant Physiol J*) 1991; 22(1): 40-4.
- 19 Lam KC, Ibrahim RK, Behdad B, Dayanandan S. Structure, function and evolution of plant O-methyltransferases. *Genome* 2007; 50(11): 1001-13.
- 20 Wiederschain GY. Glycobiology: progress, problems, and perspectives. *Biochemistry (Moscow)* 2013; 78(7): 679-96.
- 21 Zhang M, Chen GX, Lü DW, Li XH, Yan YM. N-linked glycoproteome profiling of seedling leaf in *Brachypodium distachyon* L. *J Proteome Res* 2015; 14(4): 1727-38.
- 22 Xing L, Liu Y, Xu SJ, Xiao J, Wang B, Deng H, *et al.* *Arabidopsis* O-glcnaC transferase SEC activates histone methyltransferase ATX1 to regulate flowering. *EMBO J* 2018; 37(19): e98115.
- 23 Yamagata K, Daitoku H, Takahashi Y, Namiki K, Hisatake K, Kako K, *et al.* Arginine methylation of FOXO transcription factors inhibits their phosphorylation. *Mol Cell* 2008; 32(2): 221-31.