

引用格式: 刘永昌, 马晓梅, 吴忠新, 等. 陆地棉 *SAURX* 克隆及表达模式分析[J]. 西北植物学报, 2024, 44(5): 0751-0759. [LIU Y C, MA X M, WU Z X, et al. Cloning and expression analysis of the *SAURX* gene in *Gossypium hirsutum*[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2024, 44(5): 0751-0759.] DOI:10.7606/j.issn.1000-4025.20230591

# 陆地棉 *SAURX* 克隆及表达模式分析

刘永昌<sup>1</sup>, 马晓梅<sup>2</sup>, 吴忠新<sup>1</sup>, 孙玉进<sup>1</sup>, 陈 纳<sup>1</sup>

(1 荆楚理工学院 生物工程学院, 湖北荆门 448000; 2 新疆农垦科学院 棉花研究所, 新疆石河子 832000)

**摘要** 【目的】生长素上调的小 RNA (*SAURs*) 是一类生长素原初响应基因, 在细胞伸长的过程中具有重要作用。克隆纤维发育相关的 *SAUR* 基因, 研究其表达模式和生物学功能对探究纤维发育的机理具有重要意义。【方法】从陆地棉中克隆到 1 个编码 *SAUR* 蛋白的基因, 命名为 *GhSAURX*, 通过表达模式分析、亚细胞定位、转基因拟南芥表型分析及生长素相关基因表达分析初步研究其功能。【结果】进化树分析表明: *GhSAURX* 与拟南芥 *SAUR76*、*SAUR77* 和 *SAUR78* 关系较近, 属于 *SAUR76* 亚家族。qPCR 结果发现, *GhSAURX* 基因在快速伸长的纤维中表达量较高, 即开花后 15, 18, 21 d。同时, *GhSAURX* 在长纤维品种中的表达水平明显高于短纤维。亚细胞定位分析显示, *GhSAURX* 定位在细胞膜和细胞核中。异源表达 *GhSAURX* 可以提高 *YUCCA6*、*ARF7* 及 *PIN4* 的表达, 增加拟南芥的主根长度和黑暗条件下胚轴的长度。【结论】*GhSAURX* 可能在生长素调控细胞伸长的过程中具有重要作用。

**关键词** 陆地棉; 生长素; *SAUR*; 细胞伸长; 表达分析

**中图分类号** Q785; Q786; S562 **文献标志码** A

## Cloning and expression analysis of the *SAURX* gene in *Gossypium hirsutum*

LIU Yongchang<sup>1</sup>, MA Xiaomei<sup>2</sup>, WU Zhongxin<sup>1</sup>, SUN Yujin<sup>1</sup>, CHEN Na<sup>1</sup>

(1 College of Bioengineering, Jingchu University of Technology, Jingmen, Hubei 448000, China; 2 Cotton Research Institute, Xinjiang Science Academy of Agriculture and Reclamation, Shihezi, Xinjiang 832000, China)

**Abstract** [Objective] Small auxin up RNAs (*SAURs*), which belong to a kind of auxin early response gene, play an key role in plant cell elongation. This study aims to clone fiber development-related *SAUR* genes, study their expression pattern and biological function. There is of great significance for exploring the mechanism of fiber development. [Methods] A gene encoding *SAUR* protein was cloned from *Gossypium hirsutum*, and was named *GhSAURX*. Expression pattern, subcellular localization, phenotypic identification of the transgenic *Arabidopsis*, and expression of auxin-related genes were performed. [Results] Phylogenetic analysis revealed that *GhSAURX* had close relationship with *SAUR76*, *SAUR77*, and *SAUR78* in *Arabidopsis*, and was belonged to the *SAUR76* subfamily. qRT-PCR showed that the highest expression level of *GhSAURX* was observed in fiber of 15, 18 and 21 DPA, when fiber was elongating fast. Meanwhile, *GhSAURX* showed much higher expression level in varieties with long fiber than that in varieties with short fiber. Analysis of subcellular localization indicated that *GhSAURX* was distributed in

收稿日期: 2023-09-20; 修改稿收到日期: 2023-12-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31960439); 荆楚理工学院科学研究项目 (ZD202301); 特色花卉生物育种湖北省工程中心重大项目 (2023TD004)

作者简介: 刘永昌 (1982-), 男, 博士, 副教授, 主要从事作物遗传育种研究。E-mail: liuyongchang2003@126.com

cytoplasm and nucleus. Overexpression of *GhSAURX* promoted the elongation of the primary roots and hypocotyls under dark condition in *Arabidopsis*, and enhanced the expression of auxin-related genes, such as *YUCCA6*, *ARF7*, and *PIN4*. [Conclusion] Our results indicated that *GhSAURX* functions in the cell elongation mediated by auxin.

**Key words** *Gossypium hirsutum*; auxin; SAUR; cell elongation; expression analysis

生长素作为最重要的植物激素之一,能够调控细胞延伸、分裂和分化,从而影响植物生长和发育。*SMALL AUXIN UP RNAs* (*SAURs*)是一类生长素原初响应基因,广泛存在于植物中。从苔藓到裸子和被子植物都有大量的 *SAURs*,而且 *SAURs* 的数量和序列与植物进化密切相关。2010 年以来陆续从凤仙花、龙眼、菠萝、竹子、西瓜、杨树、苜蓿、梨等<sup>[1-8]</sup> 十种植物中鉴定到 *SAURs*,为全面揭示 *SAURs* 生物学功能奠定基础。下胚轴的伸长是植物避荫性最显著的反应,是植物通过调控生长素的合成、运输、代谢等途径而控制的,*SAURs* 在这一过程中具有重要的作用。在拟南芥中,bHLH 转录因子 *PAR1* 和 *PAR2* 可以直接抑制 *SAUR15* 和 *SAUR67* 表达,也可以通过抑制 *PIF4* 来抑制 *SAUR15* 表达,最终负调控了植物避荫性<sup>[9]</sup>。*PIF4* 也可以直接调控生长素合成关键基因 *TAA1*、*CYP79B2* 和 *YUCCA8*,促进了高温条件下生长素的合成,提高 *SAURs* 的表达<sup>[10-11]</sup>。另外,*PIF4* 直接激活 *SAUR19* 和 *SAUR26* 亚组基因的表达,如 *SAUR26/27/28*<sup>[12]</sup>。在遮光的情况下,*SAUR19*、*SAUR21*、*SAUR23* 和 *SAUR24* 在伸长的下胚轴中快速诱导表达<sup>[13-14]</sup>。有的 *SAURs* 负调控了细胞的伸长,如 *SAUR32*。由于能够抑制细胞的伸长,过表达 *SAUR32* 的拟南芥下胚轴较短,顶点钩弯曲不明显。除了促进下胚轴伸长,*SAURs* 调控根和茎两侧不均衡生长,进而控制根的向地性、茎的向光性及顶点钩的维持与打开。在向性刺激下,*SAURs* 在伸长的细胞中表达。重力刺激可以使 *SAURs* 的转录产物由对称分布变为非对称分布,集中在下胚轴的底部。过表达 *SAUR19* 和 *SAUR41* 都能改变茎的向光性和根的弯曲生长<sup>[13,15]</sup>。综上,*SAURs* 通过促进细胞伸长增加下胚轴长度,使植物具有避荫性和向性。除了生长素外,很多因子通过调控 *SAURs* 而影响植物生长,如赤霉素和乙烯等<sup>[16]</sup>。在赤霉素信号转导过程中,*SAURs* 也起了重要作用。多个 *SAURs* 的表达受 GA 诱导<sup>[17]</sup>。*DELLAs* 是赤霉素信号转导的负调控因子,能够与 *ARF*、*PIF* 和 *BZR1/BES1* 相互作用,抑制其结合到 *SAURs* 的启动子上。赤霉素促进 *DELLAs* 的降解,加强转录因

子与 *SAURs* 启动子的结合,提高 *SAURs* 表达量<sup>[18]</sup>。但是,赤霉素促进 *DELLA* 蛋白 *RGL2* 的降解,抑制 *SAUR36* 的表达<sup>[19]</sup>。*SAUR76*、*SAUR77* 和 *SAUR78* 受生长素和乙烯诱导,参与乙烯信号通路及植物生长调控。过量或抑制 1 个或 2 个基因的表达量能够改变细胞的面积、子叶和下胚轴长度及莲座叶直径<sup>[20]</sup>。因此,*SAURs* 在环境和激素等调控细胞伸展引起的植物生长过程中处于核心位置。

棉花纤维是由种子表皮细胞特化而成,长达 6 cm,是其直径的 1 000~3 000 倍,所以被认为是研究细胞伸长的理想模型。虽然很多棉花纤维伸长相关的基因被克隆出来,但其伸长的具体机制,尤其激素调控棉花伸长的过程仍不清楚。*SAURs* 作为生长素信号转导途径中原初响应基因及下游因子影响植物对生长素的响应及生长素与其他植物激素或信号分子的互作。陆地棉中有 214 个 *SAURs*,其中多个成员在纤维中特异或优势表达,如 *GhSAURY6*、*GhSAUR72*、*GhSAURX10* 等<sup>[21]</sup>。有研究发现,*GhSAUR68* 转基因拟南芥植株生长缓慢、生育期推迟及叶片早衰,且叶片表皮毛凸起比野生型明显。*GhSAUR-like2* 转基因拟南芥根长变短、侧根数目增加,叶片表皮毛减少<sup>[22]</sup>。在棉花中,干扰 *GhSAUR33* 的表达导致成熟纤维变短<sup>[23]</sup>。以上研究显示,*SAURs* 可能调控棉花纤维发育,但其是否在激素调控纤维发育过程中发挥作用及调控机理仍有待进一步研究。本研究从陆地棉中克隆了 1 个 *SAUR* 基因,命名为 *GhSAURX*,进一步分析其表达模式和亚细胞定位。通过分析 *GhSAURX* 转基因拟南芥的表型及生长素相关基因表达,研究其生物学功能。研究结果为深入探索 *SAURs* 的生物学功能,尤其是在棉花纤维发育过程中的作用提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

陆地棉(*Gossypium hirsutum*):‘新陆早 33 号’、16m2-6(M,低衣分)、1195673(L,高衣分)‘晋棉 11 号’(J,短纤维)、34-103(H,长纤维),其中 16m2-6、1195673 和 34-103 为新疆农垦科学院棉花所自育

品系,纤维长度和衣分有明显差异(表 1);拟南芥(*Arabidopsis thaliana*):哥伦比亚(col-0);烟草:本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)。研究所用主要酶和试剂:M-MLV(聚合美)、限制性内切酶 *EcoRV* (NEB)、pMD19-T(TaKaRa)、DNAaseI(TaKaRa)、SYB Green mix(聚合美),引物由生物工程(上海)有限公司合成,其他试剂均为分析纯。

表 1 5 个品种的纤维长度和衣分

Table 1 Fiber length and lint percentage of five cultivars

品种 Cultivar	纤维长度 Fiber length/mm	衣分 Lint percentage/%
‘新陆早 33 号’ ‘Xinluzao 33’	30.20	39.50
16m2-6(M)	27.65	36.30
1195673(L)	30.16	48.00
‘晋棉 11 号’ ‘Jinmian 11’(J)	22.38	38.00
34-103(H)	32.20	43.50

5 个陆地棉品种均种植在新疆农垦科学院棉花所试验站,按照常规田间栽培措施进行管理。在花期开始挂牌,分别收集‘新陆早 33 号’的花冠、开花当天的胚珠及开花后 3, 6, 9, 12, 18, 21, 24, 27, 30 d 的棉铃,从胚珠上剥离棉花纤维。将籽粒饱满且无霉菌的‘新陆早 33 号’棉花种子,用 75% 的乙醇消毒 5 min,再用 NaClO 原液消毒 40 min,最后用灭菌蒸馏水冲洗 5 次。将灭菌后的棉花种子种植于蛭石中,置于 28 °C 培养箱中进行培养。幼苗长出 3 片真叶时,将长势一致幼苗拔出,蛭石清洗掉,放入营养液继续培养 1 周,然后收集幼苗的根、茎、叶,用于检测 *GhSAURX* 在不同组织的表达水平。部分幼苗用 200  $\mu\text{mol/L}$  的吲哚乙酸(IAA)处理 0, 0.5, 1, 1.5, 3, 6, 12, 24 h,将幼苗剪碎,收集,用于检测 *GhSAURX* 在生长素诱导下的表达水平。按照上述方法收集 M、L、J、H 4 个品种开花后 0, 3, 6, 9, 15 d 的纤维,用于检测 *GhSAURX* 在不同品种中的表达水平。将收集的样品用液氮冷冻后保存到 -80 °C,用于总提取 RNA。通过 CTAB 法提取不同样品总 RNA,去除基因组 DNA 后,反转录成 cDNA,保存在 -80 °C 冰箱中备用。

## 1.2 *GhSAURX* 基因克隆与序列分析

用转录组测序获得的 *GhSAURX* 部分序列为探针序列,在 NCBI 中的陆地棉转录组进行比对,获取完整的编码序列。用 Primer 5.0 设计引物,以棉花 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。扩增产物通过 1% 的琼脂糖凝胶进行分离,然后切取目的条带,用凝胶回收试剂盒进行回收。回收产物连接到 pMD19-T 上,在生物工程(上海)有限公司进行测序。用线上

软件 ClustalW 对 *GhSAURX* 与拟南芥 SAURs 的氨基酸序列进行比对分析,然后利用 GeneDoc 对比对结果进行编辑。从 TAIR 及 NCBI 数据库中获取拟南芥中 SAURs 的蛋白序列,用软件 MEGA6.0 构建系统进化树,用邻接法(bootstrap=1 000)。用 SWISS-MODEL 构建 *GhSAURX* 的三维结构图(<https://swissmodel.expasy.org/interactive>),全球模型质量评估(GMQE)>0.5,序列一致性大于 90%。

## 1.3 *GhSAURX* 载体构建及亚细胞定位观察

将 pWA(V)KS-*GhSAURX*-GFP 和空载体(伯远生物科技有限公司)通过电击的方法转入农杆菌 EHA105 中,将含有质粒的农杆菌注射到烟草的叶片中,瞬时表达 *GhSAURX*-GFP 融合蛋白和 GFP。注射 3 d 后,撕取烟草表皮用荧光共聚焦显微镜观察蛋白的亚细胞定位。

## 1.4 *GhSAURX* 拟南芥的遗传转化与表型分析

将含表达载体质粒的农杆菌接种到含有抗生素的 LB 培养基平板上,28 °C 倒置培养 2~3 d。菌落长出后,挑取单菌落接种于含 50 mg/mL 卡那霉素的液体 LB 培养基中,180 r/min 转速下 28 °C 振荡培养至 OD 值为 0.6~0.8,离心收集菌体并用 MS 液体培养基重悬至 OD 值为 0.6~0.8,加入 0.01% 的 Silwet L-77 及乙酰丁香酮,混匀后静止 2~3 h。选取长势旺盛的拟南芥剪去下部的角果,将花序浸入菌液中 90 s。侵染后用塑料袋套好,黑暗条件下过夜,然后放到培养间正常生长。利用卡那霉素筛选、基因组 PCR 和 qPCR 进行筛选和鉴定,得到 T<sub>2</sub> 代纯合株系,用于后续表型分析。拟南芥种子用 15% 次氯酸钠溶液消毒 15 min,用灭菌水清洗 3~5 次,然后用 0.2% 的灭菌琼脂粉溶液重悬,将灭菌后的种子铺在含有 1.2% 的 1/2 MS 固体培养基上,4 °C 处理 24 h,黑暗垂直培养,统计主根长度和下胚轴长度。用 Excel 进行数据处理和作图。

## 1.5 qPCR 检测基因表达

取正常生长 *GhSAURX* 转基因株系和野生型的幼苗,提取总 RNA,反转录合成 cDNA,用于检测 *GhSAURX* 和生长素相关基因的表达。以不同样品 cDNA 为模板,用 *GhSAURX* 特异性引物进行 qPCR, *GhUBI* 作为内参检测棉花中 *GhSAURX* 的表达, *AtACTIN* 作为内参检测转基因拟南芥中 *GhSAURX* 的表达及生长素相关基因的表达(表 2),具体流程:预变性 94 °C, 1 min;变性 95 °C, 15 s;退火 55 °C, 20 s,延伸 72 °C 30 s,总共 45 个循环。设置 3 次重复,用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  分析基因表达量。



表2 研究中用到的引物序列

Table 2 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	用途 Usage
GhSAURX-F	TCTAGAATGGCTAAAGCGGCAAT	基因克隆 Gene cloning
GhSAURX-R	TCTAGAAACAAGCGTAAACTCGA	
GhSAURX-2F	ATTTGGAGAGAACACGGGGG ACTTTGCAACATGGCTAAAG CGCGCAATAAGCTGA	载体构建 Vector construction
GhSAURX-2R	AGCGGCGCTGTACAACAAGCGTAA	
qGhSAURX-F	ATGGCTAAAGCGGCAAT	荧光定量 PCR qRT-PCR
qGhSAURX-R	ACAAGCGTAAACTCGA	
qGhUBI-F	CAGATCTTCGTCAAAACCCT	
qGhUBI-R	GACTCCTTCTGGATGTTGTA	
qAtACTIN2-F	ATCCTTGTATGCTAGCGGTCGA	
qAtACTIN2-R	ATCCAACGGAGGATAGCATG	
qYUCCA-2F	CAAGATCAAATGCGGAAAGAC	
qYUCCA-2R	TCTACTCTCCATCAACAAACTC	
qYUCCA-6F	GGGCTGTCCATGTTCTACTGAA	
qYUCCA-6R	CGGGAAACAACAAAAGGAA	
qPIN3-F	CCCAGATCAATCTCACACG	
qPIN3-R	CCGGCGAAACTAAATGTTG	
qPIN4-F	TTGTCTCTGATCAACCTCGA	
qPIN4-R	ATCAAGACCGCGATATCAT	
qARF6-F	TTGGCGATCTGTCAAGGTTG	
qARF6-R	AAACCTTGGCTGTCTCTCTC	
qARF7-F	TCAAGGTCACAGTGAGCAAGTCG	
qARF7-R	TGTGGAGCATGCATATGAGCTTG	
qARF8-F	AGGGTCACAGTGAACAGGTAGC	
qARF8-R	TGGTGGTAGCTTGGGTAATTG	
qAUX1-F	CGCTCACATGCTCACTACC	
qAUX1-R	GCATAAAGAACGGTGGCTTC	
oligo dT	TTTTTTTTTTTTTTTTT	

## 2 结果与分析

### 2.1 GhSAURX 克隆与序列分析

进化树分析表明,SAURs 分为 3 组,GhSAURX 与 AtSAUR76、AtSAUR77 和 AtSAUR78 分为 1 个亚家族,与 AtSAUR76 进化关系最近,但是与棉花中已报道的 SAURs 均不在一亚组内(图 1)。

GhSAURX 开放阅读框为 375 bp,编码 124 aa。不同 SAURs 序列的保守性较低,尤其是蛋白的 N 端和 C 端,但位于蛋白中部的亮氨酸却极为保守(图 2)。

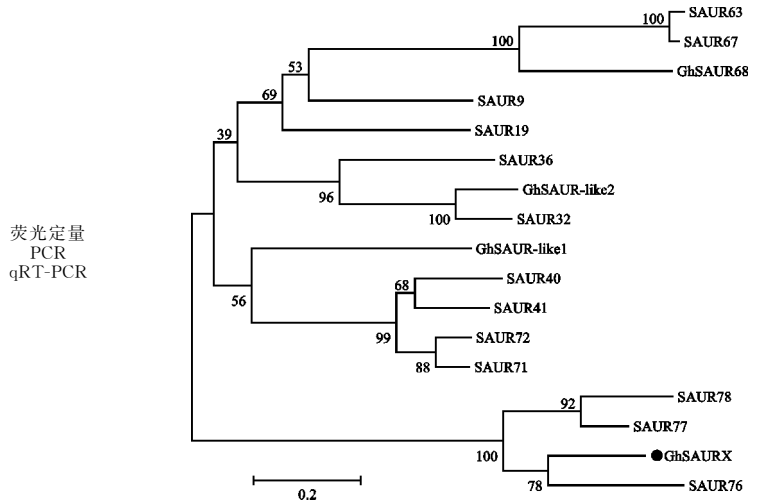


图 1 陆地棉和拟南芥中 SAUR 蛋白进化分析

Fig. 1 Phylogenetic tree analysis of SAUR proteins in cotton and *Arabidopsis*

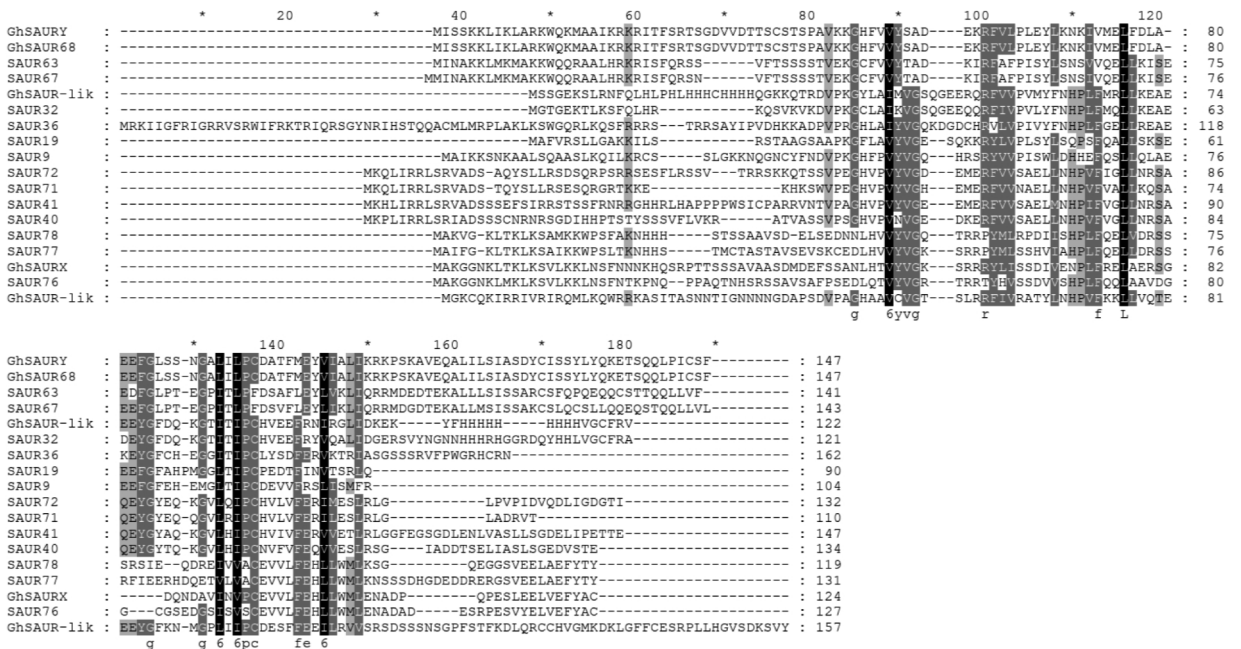


图 2 陆地棉和拟南芥中 SAUR 蛋白序列比对

Fig. 2 Alignment of amino acid sequences of SAUR proteins in cotton and *Arabidopsis*

三维结构图分析发现,GhSAURX 与 AtSAUR76-78 的结构相似,均由 1 个头部、尾部及相连接的转折区段组成。头部均由 4 个螺旋和若干折叠组成,位于近 C 端(图 3)。

## 2.2 GhSAURX 的表达模式分析

为研究 GhSAURX 的生物学功能,用 qPCR 技术分析了其在不同组织中的表达模式。结果表明:GhSAURX 在根、茎、叶中的表达水平很低,主要在花和纤维中表达,其表达水平随着棉纤维的发育呈现波动变化,在开花后 15,18,21 d 达到最高(图 4, A)。GhSAURX 的表达受到 IAA 快速诱导,诱导 0.5 h 后表达量迅速升高,然后降低,诱导 6 h 后达第 2 个高峰(图 4, B)。为分析 GhSAURX 的表达与棉花纤维发育的关系,检测 GhSAURX 在纤维长度具有明显差异的不同品种或品系中的表达量。

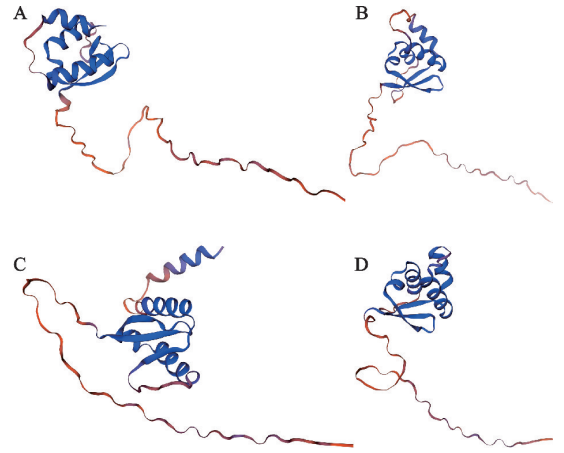
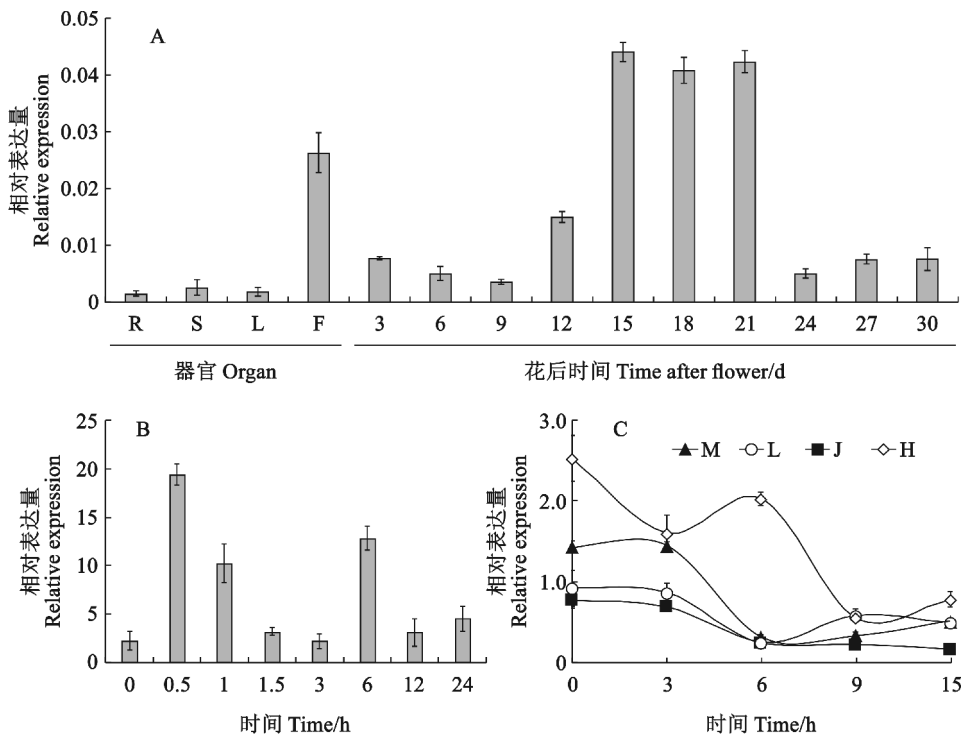


图 3 GhSAURX(A)和 AtSAUR76(B)、AtSAUR77(C)、AtSAUR78(D)的三维结构  
Fig. 3 Tertiary structures of GhSAURX (A) and AtSAUR76 (B), AtSAUR77 (C), AtSAUR78 (D) from cotton and Arabidopsis



A. GhSAURX 的组织表达模式。‘新陆早 33 号’的根、茎、叶、花和开花后 3,6,9,12,15,18,21,24,27,30 d 的棉花纤维;B. GhSAURX 的 IAA 诱导表达模式。0~24, IAA 处理 0~24 h 的‘新陆早 33 号’幼苗;

C. GhSAURX 在 4 个品系纤维发育中的表达分析。M、L、J 和 H 分别代表低衣分品种、高衣分品系、短纤维品种和长纤维品系。

图 4 GhSAURX 的组织 and 诱导表达模式

A. Expression of GhSAURX. R, roots; S, stems; L, leaves; F, flowers; 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, and 30 stand for 3, 6, 9, 12, 18, 21, 24, 27, and 30 DPA cotton fiber of ‘Xinluao 33’. B. Expression of GhSAURX under IAA treatment. 0~24 stand for seedlings of ‘Xinluao 33’ treated by IAA at different time. C. Expression of GhSAURX in four cultivars. M, L, J, and H represent the cultivars with low lint percentage, high lint percentage, short fiber length, and long fiber length, respectively.

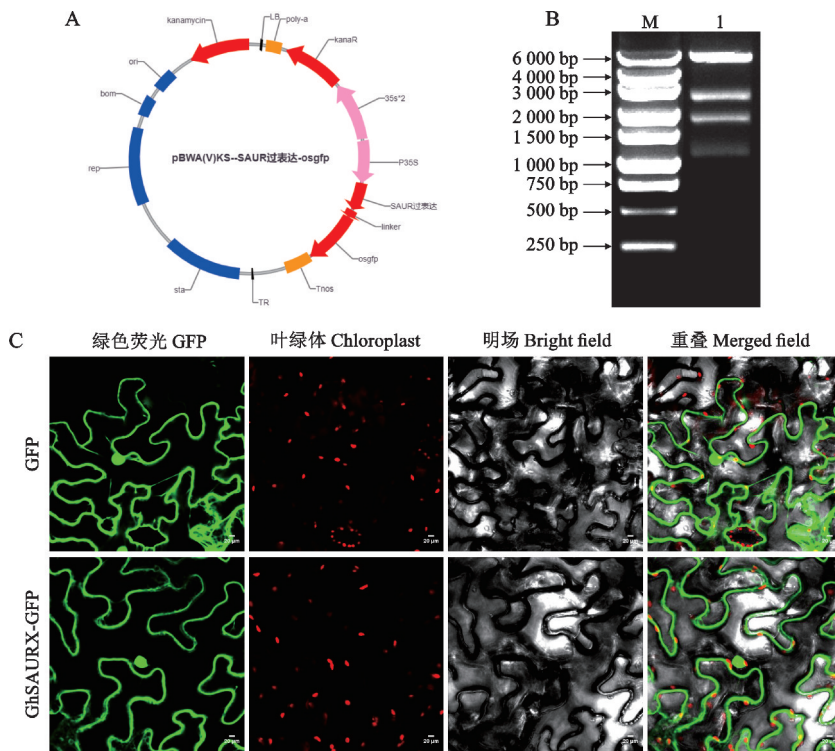
Fig. 4 Expression pattern of GhSAURX in different organs and under IAA treatment

在 L 和 H 中, *GhSAURX* 均在开花当天的胚珠中具最高的表达量, 但其在长纤维品种 H 中的表达量明显高于短纤维品种 J。在长纤维品种 H 中, *GhSAURX* 随着纤维发育呈先降低再升高再降低再升高, 而在短纤维品种中, *GhSAURX* 随着纤维发育持续降低(图 4, C)。

### 2.3 *GhSAURX* 的亚细胞定位分析

为研究 *GhSAURX* 的亚细胞定位, 将 *GhSAURX* 的编码序列同源重组进 pWA(V)KS 载体, 35S

启动子驱动基因表达, 以卡那霉素抗性为筛选标记, 构建 *GhSAURX*-GFP 融合表达载体(图 5, A)。构建好的载体用 *EcoRV* 进行酶切, 预计的结果相一致, 在 1 106、1 789、2 476、5 324 的位置共出现 4 条带(图 5, B)。用农杆菌介导的烟草叶片注射的方法瞬时表达融合蛋白, 以空载体作为对照, 用共聚焦显微镜进行观察。结果表明, *GhSAURX*-GFP 在细胞核、细胞质和细胞膜中均有分布, 与 GFP 的分布类似(图 5, C)。



A. 重组载体的示意图; B. *GhSAURX*-GFP 重组载体的酶切验证电泳图。M, DNA 分子标尺(MR IV)。

1, *EcoRV* 酶切条带; C. *GhSAURX*-GFP 荧光分布图。标尺为 20  $\mu\text{m}$ 。

图 5 *GhSAURX* 在烟草叶片中亚细胞定位分析

A. Construct map of the *GhSAURX*-GFP fusion vector. B. Electrophoretic analysis of fragments of *GhSAURX*-GFP digested by *EcoRV*. M. MR IV DNA marker. 1. products of recombinant vector digested by *EcoRV*.

C. Distribution of *GhSAURX*-GFP in cells of tobacco leaves. Bar=20  $\mu\text{m}$ .

Fig. 5 Subcellular localization of *GhSAURX* in tobacco leaves

### 2.4 *GhSAURX* 转基因拟南芥的表型分析

为进一步研究 *GhSAURX* 的生物学功能, 创制 *GhSAURX* 的转基因拟南芥。qPCR 结果表明: 在 2 条转基因株系中, *GhSAURX* 的表达量为野生型的 16~21 倍(图 6, A)。将野生型和转基因株系种植进行竖直培养, 然后观察表型。结果显示, 2 个过表达转基因株系的主根长度明显要长于野生型, 约是野生型的 1.5 倍(图 6, B, C)。为了研究 *GhSAURX* 对生长素的响应, 将野生型和转基因株系进行

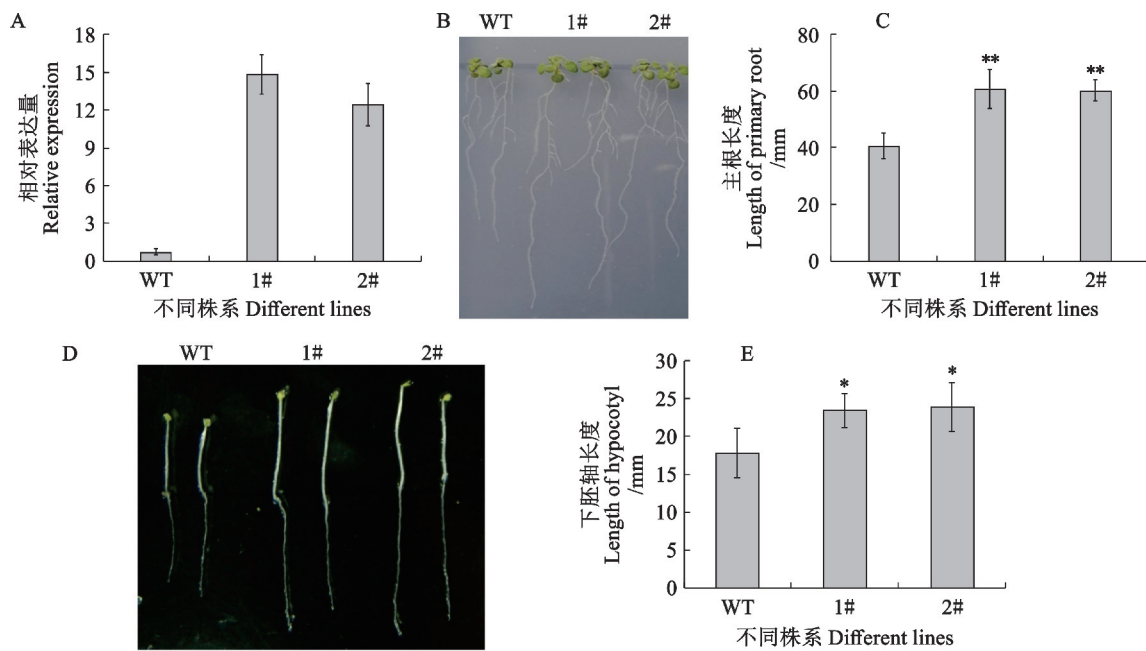
黑暗培养。结果发现, 处理 1 周后, 2 个转基因株系的下胚轴长度分别为 23.4 mm 和 24.1 mm, 明显长于野生型(17.2 mm)(图 6, D, E)。

### 2.5 生长素相关基因在转基因拟南芥中的表达分析

为探索 *GhSAURX* 在生长素合成和信号转导途径中的作用, 用 qPCR 检测生长素相关基因的表达水平。结果显示, 生长素合成过程中的关键基因 *YUCCA2* 在转基因拟南芥中的表达水平与野生型

差异不明显,但是 *YUCCA6* 在转基因株系中的表达水平约是野生型的 2.5 倍。生长素响应因子 ARF 在生长素信号转导过程中具有重要作用,通过激活下游基因表达传递生长素信号。qPCR 结果显示, *ARF7* 在 *GhSAURX* 转基因拟南芥中表达水平明

显提高,大约为野生型的 1.8 倍,而 *ARF6* 和 *ARF8* 则无明显变化。除此之外,生长素外运蛋白编码基因 *PIN3* 及内运蛋白编码基因 *AUX1* 的表达水平在转基因株系及野生型之间无明显变化, *PIN4* 在转基因株系中的表达略微升高(图 7)。



A. 转基因拟南芥中 *GhSAURX* 表达水平; B. *GhSAURX* 过表达拟南芥主根表型; C. 主根长度; D. 下胚轴表型; E. 下胚轴长度。\* 表示  $P < 0.05$ , \*\* 表示  $P < 0.01$ 。下同。

图 6 *GhSAURX* 过表达拟南芥表型分析

A. Transcription level of *GhSAURX* in the transgenic Arabidopsis. B. Primary roots of the overexpression line. C. Length of primary roots. D. Hypocotyl phenotypes. E. Hypocotyl length. \* indicates  $P < 0.05$ , \*\* indicates  $P < 0.01$ . The same as below.

Fig. 6 Phenotypes of the transgenic Arabidopsis

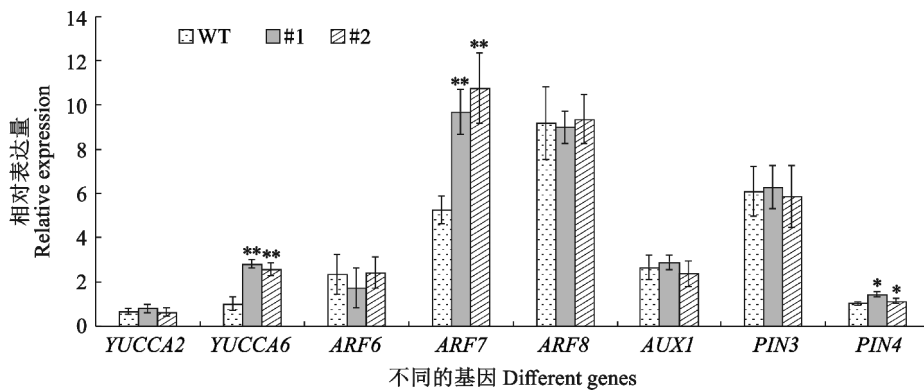


图 7 生长素相关基因的表达分析

Fig. 7 Expression analysis of auxin-related genes

## 3 讨论

### 3.1 GhSAURX 的结构特征分析

SAURs 是一类生长素原初响应基因,调控植物正常的生长和应对外部环境而进行的生长,且在植

物中广泛存在,而且成员众多,如玉米(79 个)、菠萝(52 个)、竹子(38 个)、西瓜(65 个)、杨树(105 个)、苜蓿(133 个)<sup>[2-8]</sup>。在雷蒙德氏棉、亚洲棉、陆地棉、海岛绵中分别有 145, 97, 214, 176 个 SAURs<sup>[21]</sup>。本研究中发现同一亚组不同 SAURs 的序列具有一定



保守性,但是 N 端不高,是蛋白进化的主要部位。近 C 端相对比较保守,是蛋白功能的主要部位,所以导致不同成员之间三维结构相似。保守的亮氨酸形成疏水核心,对于蛋白的折叠和功能具有重要的作用<sup>[7]</sup>。GhSAURX 与拟南芥 SAUR76、SAUR77 和 SAUR78 的亲缘关系较近。同时,GhSAURX 和 AtSAUR76-78 的三维结构显示出蛋白接近 C 端的序列形成螺旋和折叠,然后形成球状,这可能对于蛋白互作和稳定性具有影响,而近 N 端则呈线状。基因经过转录、翻译及加工修饰后,还需要分布到细胞的特定部位才能行使其生物学功能。SAURs 数量众多,其蛋白定位也显示了丰富的多样性,如细胞核、线粒体、细胞质、叶绿体、细胞膜及细胞外均有 SAURs 存在<sup>[6]</sup>。GhSAURX 在细胞膜、细胞质和细胞核中均有分布,与拟南芥 SAUR76、SAUR77 和 SAUR78 的定位<sup>[20]</sup>一致,所以推测 GhSAURX 与拟南芥 SAUR76、SAUR77 和 SAUR78 可能具有相似的生物学功能。综上,SAURs 的数量多、定位重叠、表达模式和结构相似等特点都暗示不同成员之间存在功能冗余或在相似的途径上起作用。

### 3.2 GhSAURX 受生长素的调控

生长素通过调控细胞伸展进而在器官生长、弯钩形成、向性弯曲、根发育、茎伸长等生物学过程中发挥重要作用<sup>[24]</sup>。很多研究表明,生长素是纤维分化的重要因子,可以直接与其他激素如赤霉素、乙烯、细胞分裂素和油菜素内酯相互作用,共同调节棉花纤维的发育。目前,已经在棉花中鉴定到很多生长素相关的基因,如 GhARF7<sup>[25]</sup>、GhARF18<sup>[26]</sup>、GhPIN1a<sub>Dt</sub>、GhPIN6<sub>At</sub> 和 GhPIN8<sub>At</sub><sup>[27]</sup>等。SAURs 是生长素原初响应基因家族,大部分成员均受生长素的诱导表达<sup>[6-7]</sup>。在棉花中,一些 SAURs 已经被鉴定出来,也可以受生长素调控<sup>[21]</sup>。在拟南芥中,SAUR76、SAUR77 和 SAUR78 的表达受到乙烯和萘乙酸(NAA)的诱导,可以与 EIN4 和 ETR2 互作,进而调控乙烯信号途径<sup>[20]</sup>。GhSAURX 的表达水平也受到 NAA 的诱导,且处理 0.5 h 后表达量就达到最高。结合序列、进化、结构及诱导表达的相似性,

推测 GhSAURX 可能也参与棉花对乙烯的响应。乙烯作为重要的植物激素,影响了植物根毛和表皮毛发育,也影响了棉花纤维的发育<sup>[28]</sup>。

### 3.3 GhSAURX 可能影响植物细胞伸长

在棉花中,一些 SAURs 已经被鉴定出来,其中一些可以影响表皮毛或纤维的发育,如 GhSAUR68、GhSAUR-like2 和 GhSAUR33<sup>[22-23]</sup>。拟南芥中,过量或抑制 SAUR76、SAUR77 和 SAUR78 中的 1 个或 2 个基因的表达量能够改变细胞的面积、子叶和下胚轴长度及莲座叶直径<sup>[20]</sup>。GhSAURX 在伸长期的纤维中表达水平很高,且在长纤维品种中的表达量明显高于短纤维品种。在拟南芥中,过量表达 GhSAURX 也可以增加下胚轴和主根的长度。很多研究表明,SAURs 能够调控生长素合成、代谢或信号转导途径关键基因表达。桃 PpSAUR5 的过量表达降低了拟南芥对 NAA 和 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)的敏感性,使转基因株系较野生型具有更长的叶柄、下胚轴和根<sup>[29]</sup>。AtSAUR15 可以正调控生长素合成相关基因 TAR4、YUC6、YUC7、AAO1、CYP71A13 及 NIT1 的表达,提高生长素的含量<sup>[30]</sup>。本文中,生长素合成和信号转导途径相关基因 YUCCA6、ARF7 及 PIN4 的表达水平在 GhSAURX 过表达株系中升高,可能与转基因拟南芥主根和下胚轴伸长有关。结果显示,GhSAURX 可能在生长素调控棉花纤维发育的过程中发挥作用。

## 4 结 论

(1)GhSAURX 开放阅读框为 375 bp,编码 124 aa,且编码蛋白与 AtSAUR76、AtSAUR77 和 AtSAUR78 分为 1 个亚家族,具有相似结构;

(2)GhSAURX 在开花后 15, 18, 21 d 达到最高,且受到 IAA 快速诱导,处理后 0.5 h 达到最高;

(3)GhSAURX 定位在细胞膜、细胞质和细胞核内;

(4)GhSAURX 促进了拟南芥主根及下胚轴伸长,提高了 YUCCA6、ARF7 及 PIN4 的表达水平。

## 参考文献:

- [1] 童楨开,李洋,蔡斌,等.滇水金凤 SAUR 基因的克隆及表达分析[J].西北植物学报,2022,42(1):21-28.  
TONG Z K, LI Y, CAI B, et al. Cloning and expression analysis of SAUR gene of *Impatiens uliginosa* Franch. [J]. *Acta*

- Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2022, 42(1): 21-28.  
[2] 傅卓然,李卓蕴,陈燕,等.龙眼体胚发生早期 SAUR63/64 基因克隆及表达分析[J].西北植物学报,2022,42(12):1991-2002.  
FU Z R, LI Z Y, CHEN Y, et al. Cloning and expression analysis of SAUR63/64 during the early somatic embryogene-



- sis of *Dimocarpus longan* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2022, 42(12): 1991-2002.
- [3] ZHANG Y F, YE T, SHE Z Y, *et al.* Small Auxin Up RNA (SAUR) gene family identification and functional genes exploration during the floral organ and fruit developmental stages in pineapple (*Ananas comosus* L.) and its response to salinity and drought stresses[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 237:124061.
- [4] BAI Q S, HOU D, LI L, *et al.* Genome-wide analysis and expression characteristics of small auxin-up RNA (SAUR) genes in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *Genome*, 2017, 60(4): 325-336.
- [5] ZHANG N, HUANG X, BAO Y N, *et al.* Genome-wide identification of SAUR genes in watermelon (*Citrullus lanatus*) [J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants: An International Journal of Functional Plant Biology*, 2017, 23(3): 619-628.
- [6] HU W F, YAN H W, LUO S S, *et al.* Genome-wide analysis of poplar SAUR gene family and expression profiles under cold, polyethylene glycol and indole-3-acetic acid treatments [J]. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 2018, 128: 50-65.
- [7] ZHANG H, YU Z J, YAO X D, *et al.* Genome-wide identification and characterization of small auxin-up RNA (SAUR) gene family in plants: Evolution and expression profiles during normal growth and stress response[J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 4.
- [8] WANG M N, MANZOOR M A, WANG X Y, *et al.* Comparative genomic analysis of SAUR gene family, cloning and functional characterization of two genes (*PbrSAUR13* and *PbrSAUR52*) in *Pyrus bretschneideri* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(13): 7054.
- [9] HAO Y Q, OH E, CHOI G, *et al.* Interactions between HLH and bHLH factors modulate light-regulated plant development[J]. *Molecular Plant*, 2012, 5(3): 688-697.
- [10] FRANKLIN K A, LEE S H, PATEL D, *et al.* Phytochrome-interacting factor 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(50): 20231-20235.
- [11] SUN Y, FAN X Y, CAO D M, *et al.* Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in *Arabidopsis* [J]. *Developmental Cell*, 2010, 19(5): 765-777.
- [12] WANG Z X, YANG L Y, LIU Z H, *et al.* Natural variations of growth thermo-responsiveness determined by SAUR26/27/28 proteins in *Arabidopsis thaliana* [J]. *The New Phytologist*, 2019, 224(1): 291-305.
- [13] SPARTZ A K, LEE S H, WENGER J P, *et al.* The SAUR19 subfamily of SMALL AUXIN UP RNA genes promote cell expansion[J]. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 2012, 70(6): 978-990.
- [14] SPARTZ A K, REN H, PARK M Y, *et al.* SAUR inhibition of PP2C-D phosphatases activates plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases to promote cell expansion in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(5): 2129-2142.
- [15] KONG Y Y, ZHU Y B, GAO C, *et al.* Tissue-specific expression of SMALL AUXIN UP RNA41 differentially regulates cell expansion and root meristem patterning in *Arabidopsis* [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2013, 54(4): 609-621.
- [16] FAVERO D S, LE K N, NEFF M M. Brassinosteroid signaling converges with suppressor of phytochrome B4-#3 to influence the expression of SMALL AUXIN UP RNA genes and hypocotyl growth[J]. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 2017, 89(6): 1133-1145.
- [17] BAI M Y, SHANG J X, OH E, *et al.* Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in *Arabidopsis* [J]. *Nature Cell Biology*, 2012, 14(8): 810-817.
- [18] FENG S H, MARTINEZ C, GUSMAROLI G, *et al.* Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins[J]. *Nature*, 2008, 451(7177): 475-479.
- [19] STAMM P, KUMAR P P. Auxin and gibberellin responsive *Arabidopsis* SMALL AUXIN UP RNA36 regulates hypocotyl elongation in the light[J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(6): 759-769.
- [20] LI Z G, CHEN H W, LI Q T, *et al.* Three SAUR proteins SAUR76, SAUR77 and SAUR78 promote plant growth in *Arabidopsis* [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 12477.
- [21] LI X H, LIU G Y, GENG Y H, *et al.* A genome-wide analysis of the small auxin-up RNA (SAUR) gene family in cotton [J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 815.
- [22] 赵娜. 棉花 3 个 SAUR 基因的克隆及其功能分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- [23] 李锡花. 棉花 SAUR 基因家族分析与功能验证[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [24] DU M M, SPALDING E P, GRAY W M. Rapid auxin-mediated cell expansion[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2020, 71: 379-402.
- [25] WANG Y, LI Y, HE S P, *et al.* The transcription factor ERF108 interacts with AUXIN RESPONSE FACTORS to mediate cotton fiber secondary cell wall biosynthesis[J]. *The Plant Cell*, 2023, 35(11): 4133-4154
- [26] ZHU L P, JIANG B, ZHU J J, *et al.* Auxin promotes fiber elongation by enhancing gibberellic acid biosynthesis in cotton [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(3): 423-425.
- [27] ZHANG Y Z, HE P, YANG Z R, *et al.* A genome-scale analysis of the PIN gene family reveals its functions in cotton fiber development[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 461.
- [28] YU D Q, LI X N, LI Y H, *et al.* Dynamic roles and intricate mechanisms of ethylene in epidermal hair development in *Arabidopsis* and cotton [J]. *The New Phytologist*, 2022, 234(2): 375-391.
- [29] 翟含含, 翟宇杰, 田义, 等. 桃 SAUR 家族基因分析及 *PpSAUR5* 功能鉴定[J]. *园艺学报*, 2023, 50(1): 1-14.
- ZHAI H H, ZHAI Y J, TIAN Y, *et al.* Genome-wide identification of peach SAUR gene family and characterization of *PpSAUR5* gene [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2023, 50(1): 1-14.
- [30] 李孟湛. SAUR15 调控植物侧根及不定根发育的功能及分子机理研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2022.