

陆地棉 GDSL 脂肪酶基因 *GhGELP23D* 对植物细胞伸长发育的影响

陈豪华, 陈港, 冯健庭, 解静, 李倩倩, 王斐[✉], 李鸿彬[✉]

石河子大学生命科学学院, 新疆石河子 832003

摘要:【目的】GDSL 脂肪酶 (GDSL esterase/lipase, GELP) 家族是一类多功能水解酶, 具有广泛的底物识别与催化能力, 在植物生长发育中具有重要作用。在棉纤维伸长发育中, 陆地棉 GDSL 脂肪酶基因 *GhGELP23D* 显著高表达, 分析其影响植物细胞伸长发育的功能, 为 GELP 调控植物细胞发育的机制解析提供一定参考。【方法】以陆地棉纤维为材料克隆 *GhGELP23D*。采用生物信息学方法分析 *GhGELP23D* 蛋白的理化性质、结构特征及系统进化关系, 利用 PlantCARE 预测其启动子顺式作用元件, 结合公共转录组数据和 RT-qPCR 数据分析基因的表达特征。构建 *GhGELP23D* 启动子 *GUS* 报告载体, 在拟南芥稳定转化体系中检测 *GhGELP23D* 的组织表达特异性。通过烟草叶片瞬时表达系统, 对 *GhGELP23D* 蛋白进行亚细胞定位。利用花序浸染法获得异源表达 *GhGELP23D* 的转基因拟南芥株系 *GhGELP23D-OE*, 并分析其表型变化。同时, 利用病毒诱导基因沉默 (VIGS) 技术在陆地棉中沉默 *GhGELP23D*, 通过 RT-qPCR 检测其沉默效率, 并观察 *GhGELP23D-VIGS* 株系纤维长度的变化。【结果】*GhGELP23D* 编码一个由 356 个氨基酸组成的稳定、弱碱性、亲水性蛋白, 其结构包含典型信号肽。转录组表达和 RT-qPCR 数据显示, *GhGELP23D* 在纤维伸长期高表达。亚细胞定位结果表明, *GhGELP23D* 蛋白定位在胞外间隙。启动子组成分析显示, *GhGELP23D* 包含光、激素和胁迫等多种顺式作用元件; 组织染色结果显示, *GhGELP23D* 启动子在拟南芥多种组织中均可驱动报告基因表达, 表明其具有广泛的组织表达特性。在异源表达 *GhGELP23D* 拟南芥中显著促进植株生长发育, *GhGELP23D-OE* 拟南芥株系的株高显著增加, 主根和根毛的长度显著提升, 在突变体背景中回补表达 *GhGELP23D* 后, 其主根和根毛长度得到明显恢复并基本达到野生型水平。*GhGELP23D-VIGS* 棉花株系的纤维长度较空载对照植株显著降低, 平均下降约 13.14%。【结论】*GhGELP23D* 编码一类定位于胞外间隙的 GDSL 脂肪酶, 在棉纤维伸长期高表达, 并影响植物细胞伸长发育过程。

关键词: 陆地棉; GDSL 脂肪酶; 细胞伸长; *GhGELP23D*; 亚细胞定位; 病毒诱导基因沉默

Effects of the GDSL Lipase Gene *GhGELP23D* from *Gossypium hirsutum* on Plant Cell Elongation Development

CHEN HaoHua, CHEN Gang, FENG JianTing, XIE Jing, LI QianQian, WANG Fei[✉], LI HongBin[✉]

College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang

Abstract: 【Objective】The GDSL esterase/lipase (GELP) family comprises a group of multifunctional hydrolases with broad substrate specificity and catalytic versatility, playing an essential role in plant growth and developmental processes. The GDSL lipase gene *GhGELP23D* from *Gossypium hirsutum* is highly expressed during cotton fiber elongation development. This study aims to investigate its function in plant cell elongation and provides references for the mechanism elucidation of GELP-mediated regulation of cell growth. 【Method】The *GhGELP23D* was cloned from upland cotton fibers. Bioinformatic analyses were performed to characterize its physicochemical properties, structural features, and phylogenetic relationships. The promoter region was analyzed with PlantCARE to identify putative *cis*-elements. Expression patterns were detected based on public transcriptomic data and

收稿日期: 2026-01-06; 接受日期: 2026-03-05

基金项目: 新疆维吾尔自治区天山英才项目 (2022TSYCCX0121)、国家自然科学基金面上项目 (32570642)、新疆维吾尔自治区科技项目 (2024A02002-3)、新疆生产建设兵团科技项目 (2023ZD052)、石河子大学科技项目 (RCZK202471, GJHZ202302, CXBJ202309)

联系方式: 陈豪华, E-mail: chenhaohua2020@163.com. 通信作者王斐, E-mail: feiw@shzu.edu.cn. 通信作者李鸿彬, E-mail: lihb@shzu.edu.cn

RT-qPCR validation. A *GUS* reporter construct driven by the *GhGELP23D* promoter was generated to examine the tissue-specific expression of *GhGELP23D* in stably transformed *Arabidopsis*. Subcellular localization of *GhGELP23D* was determined through transient expression in *Nicotiana benthamiana* leaves. Transgenic *Arabidopsis* lines heterologously expressing *GhGELP23D* (*GhGELP23D-OE*) were obtained using the floral-dip method, and phenotypic analyses were conducted. Additionally, virus-induced gene silencing (VIGS) was employed to suppress *GhGELP23D* expression in cotton. Silencing efficiency was verified by RT-qPCR, and the resulting changes in fiber length were assessed in *GhGELP23D-VIGS* plants. 【Result】*GhGELP23D* encodes a 356-amino-acid protein that is stable, weakly basic, and hydrophilic, containing a typical signal peptide but no transmembrane domain. Transcriptomic analysis and RT-qPCR detection showed that *GhGELP23D* was highly expressed during cotton fiber elongation. Subcellular localization analysis revealed that *GhGELP23D* is predominantly localized to the extracellular space. Analysis of the *GhGELP23D* promoter indicated the presence of multiple *cis*-elements related to light responsiveness, hormone signaling, and stress response. Histochemical *GUS* staining showed that the *GhGELP23D* promoter can drive reporter gene expression in various *Arabidopsis* tissues, indicating broad tissue expression activity. Heterologous expression of *GhGELP23D* in *Arabidopsis* (*GhGELP23D-OE*) significantly enhanced plant growth and development, resulting in increased plant height and longer primary roots and root hairs. Furthermore, complementation of *GhGELP23D* in the mutant resulted in a pronounced recovery of primary root and root hair length similar to that of the wild type (WT). In cotton, the fiber length of *GhGELP23D-VIGS* lines was significantly reduced compared with that of empty-vector control plants, with an average decrease of approximately 13.14%.

【Conclusion】*GhGELP23D* encodes an extracellular GDSL lipase that is highly expressed during the fiber elongation stage of upland cotton and plays an important role in plant cell elongation development.

Key words: *Gossypium hirsutum*; GDSL lipase; cell elongation; *GhGELP23D*; subcellular localization; VIGS

0 引言

【研究意义】陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L.) 是全球广泛栽培的纤维作物, 为纺织工业提供了主要的植物纤维原料^[1]。棉纤维是一种由胚珠表皮发育而来的独特单细胞结构, 不仅具有重要的经济价值, 还被广泛用作探究单细胞伸长与细胞壁合成的经典生物学模型^[2]。棉纤维发育可分为 4 个重叠过程: 纤维起始、伸长、次生壁加厚和成熟^[3]。其中, 快速伸长期决定了纤维的长度和品质, 是影响棉花经济性状的关键时期。因此, 探索纤维伸长的调控机制, 为提升棉花纤维品质、推动纺织产业发展提供了关键支撑。【前人研究进展】植物细胞伸长是一个高度协调的过程, 受到多层次转录调控和激素信号影响。*GhMYB201* 和 *GhMYB212* 等转录因子可以通过激活细胞壁松弛基因、调控超长链脂肪酸合成、促进蔗糖转运等途径促进纤维伸长^[4-5]。生长素通过调控 *AUX/IAA* 和 *ARF* 家族基因, 促进纤维细胞极性生长^[6]。在拟南芥根发育过程中, 伸长区通过扩展蛋白和木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶 (xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase, XTH) 协同作用松弛细胞壁, 以促进细胞纵向伸长; 而分化区则通过果胶脱酯化、木质素沉积等方式加固细胞壁, 以适应特定功能^[7]。Liu 等^[8]研究表明在干旱胁迫条件下,

果胶合成缺陷的拟南芥突变体未观察到根细胞伸长反应, 纤维素合成缺陷突变体的伸长表型与野生型无明显差异, 提示细胞壁中果胶含量的变化可能影响胁迫条件下拟南芥的根细胞伸长。GDSL 脂肪酶是一个具有广泛底物识别的脂肪酶亚家族, 属于一类热稳定性极佳的水解酶, 均包含一个保守的 GDSL 基序, 在 N 端带有催化位点, 对非水溶性和长链脂肪酸酯底物具有偏好, 这与具有 GxSxG 保守序列的其他酯酶类型不同^[9]。GDSL 脂肪酶家族包含众多成员, 在植物的形态建成、脂质代谢和生长发育中具有重要的生物学功能^[10]。拟南芥 *TBR* 和 *TBL3* 包含 GDSL 结构域, 通过调控果胶酯化状态影响次生细胞壁纤维素的积累, 从而在细胞壁构建和细胞生长等过程中发挥重要作用^[11]。Ji 等^[12]发现 GDSL 脂肪酶家族成员 *BrEXL6* 在可育花蕾的花药中高水平表达, 特别是在花粉发育阶段的花药中表达最为显著, 表明 *BrEXL6* 与花粉发育密切相关。水稻 *BS1* 是一种典型的 GDSL 酯酶, 通过调控次生细胞壁木聚糖乙酰化, 从而影响细胞壁结构与维管组织形态^[13]。此外, 脂肪酸在棉花纤维伸长中发挥着重要作用。外源施加棕榈酸 (C16:0) 显著促进棉纤维分化与伸长, 尤其在 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下纤维平均长度较对照增加 53.4%。木蜡酸也对纤维伸长有显著促进作用^[14]。超长链脂肪酸 (very long chain

fatty acid, VLCFA) 在棉花细胞伸长中起着重要作用, 通过调节乙烯的合成进一步促进纤维的生长和发育^[15]。【本研究切入点】目前, 已有研究表明, GDSL 脂肪酶在植物细胞伸长和细胞壁修饰过程中可能发挥重要作用, 然而, 在棉花纤维发育过程中的具体功能和调控机制仍不明确。基于前期工作中发现陆地棉 GDSL 脂肪酶基因 *GhGELP23D* 在棉纤维快速伸长期呈显著上调表达, 提示其可能参与纤维细胞伸长相关过程。【拟解决的关键问题】本研究围绕 *GhGELP23D* 开展研究, 进行序列特征分析、启动子顺式作用元件预测、亚细胞定位验证等分析, 开展该基因在拟南芥和棉花中的遗传功能验证, 为阐明 GDSL 脂肪酶影响植物细胞伸长发育的功能和分子调控机制提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2024—2025 年在石河子大学生命科学学院完成。

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L.) 品种中棉 49, 以及质粒载体 pCAMBIA1391、pCAMBIA1300 和 pCLCrVA 均由石河子大学生命科学学院农业生物技术重点实验室提供。*GhGELP23D* 同源基因突变体拟南芥 (SALK_091361C) 购买于福州爱若莎生物科技有限公司。

1.2 陆地棉 *GhGELP23D* 的克隆与表达分析

提取棉花叶片 RNA, 并反转录合成 cDNA。根据实验室陆地棉基因组数据, 用 SnapGene 7.1.2 软件设计该基因 CDS 片段的上、下游引物 (附表 1), 进行 PCR 扩增, 检测目的条带大小。纯化后的产物与 C601 载体连接, 转化, 挑取阳性克隆进行测序。

根据从棉花公共转录组数据中提取的每千碱基映射片段 (Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads, FPKM) 值, 分析棉花不同组织中 *GhGELP23D* 的表达水平。采集陆地棉不同发育阶段的胚珠和纤维样品, 胚珠取样时间为 -3 和 0 DPA, 纤维取样时间为 5、10、15、20 和 25 DPA。使用 SnapGene 7.1.2 软件设计 *GhGELP23D* 特异性引物, 以 *GhUBQ7* 为内参基因, 进行 RT-qPCR 检测分析, 3 次生物学重复和 3 次技术重复。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[16] 计算基因相对表达量。

1.3 *GhGELP23D* 的生物信息学分析

从 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)

分析蛋白序列的理化性质; 用 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 分析亲疏水性; 分别用 TMHMM 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 和 SignalP-6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>) 分析跨膜结构域和信号肽; 用 Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Plant-multi/>) 分析亚细胞定位; 利用 SOPMA (https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsaautomat.pl?page=/NPSA/Npsa_sopma.html) 和 AlphaFold (<https://alphafold.com/>) 预测蛋白质结构。分别通过 MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 和 CD-Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) 分析蛋白的保守基序和保守域, 利用 TBtools 工具完成可视化; 利用 DNAMAN 8.0 和 GeneDoc 软件进行多序列比对, 用 MEGA 11.0 软件构建系统发育树。利用实验室数据库调取 *GhGELP23D* 转录起始位点上游 2 000 bp 的序列作为基因启动子序列。利用 PlantCARE (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行顺式作用元件预测。

1.4 植物表达载体的构建

用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切植物表达载体 pCAMBIA1300-eGFP, 并将酶切成功的载体片段与 *GhGELP23D* 的 CDS 序列重组连接, 构建 35S::*GhGELP23D*::eGFP 融合载体。通过 PCR 获得 *GhGELP23D* 的启动子片段, 并与 *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切的 pCAMBIA1391-GUS 载体连接, 构建 p*GhGELP23D*::GUS 重组载体。根据 SGN VIGS Tool (<https://vigs.solgenomics.net/>) 网站选择特异的病毒诱导基因沉默 (virus-induced gene silencing, VIGS) 片段^[17], 通过 PCR 获得 VIGS 片段, 并与 *Spe* I 和 *Asc* I 双酶切的 pCLCrVA 载体连接, 构建 pCLCrVA::*GhGELP23D* 沉默载体。

1.5 *GhGELP23D* 启动子的特异性分析

将含 *GhGELP23D* 启动子的重组载体 p*GhGELP23D*::GUS 转化农杆菌 GV3101, 获得阳性菌株。按照花序浸染法^[18] 侵染野生型拟南芥 (WT)。收取的成熟种子经潮霉素抗性筛选鉴定, 获得 T₃ 代稳定转基因株系。利用 GUS 染色试剂盒对转基因拟南芥的幼苗、花、茎生叶和果荚 4 种组织染色, 经 70% 乙醇脱色 3 次后, 拍照观察, 以 35S::GUS 转基因拟南芥为阳性对照。

1.6 *GhGELP23D* 蛋白的亚细胞定位分析

根据生物信息学分析结果, *GhGELP23D* 蛋白可

能定位于胞外间隙。为验证其具体位置, 构建 35S::GhGELP23D::eGFP 重组载体, 并以 35S::eGFP 空载体为对照。实验室提供的胞外间隙定位标记载体 (mCherry 标记)^[19]用于共定位分析。将上述载体分别转化农杆菌 GV3101, 获得阳性菌株后, 在生长 4—5 周的烟草叶片中进行瞬时表达。侵染后, 黑暗静置过夜, 然后正常培养 48—72 h。使用激光共聚焦显微镜观察荧光信号的分布, 并对图像进行拍摄与分析。

1.7 异源表达 *GhGELP23D* 转基因拟南芥的获得

将构建成功的重组载体 35S::GhGELP23D::eGFP 转化农杆菌 GV3101, 获得阳性菌株。*GhGELP23D* 在拟南芥中的同源基因为 *AtGELP67*。按照花序浸染法分别转化野生型拟南芥和 *atgelp67-1* 突变体拟南芥。经潮霉素抗性筛选, 获得 T₃ 代稳定转基因株系, 用于后续分析。

1.8 *GhGELP23D* 的 VIGS 沉默体系的构建与表达分析

以陆地棉品种中棉 49 为材料, 选取生长约一周、子叶完全展开的幼苗叶片进行侵染。将 pCLCrVB (辅助载体)、pCLCrVA 空载载体、pCLCrVA::GhPDS (阳性对照) 和 pCLCrVA::GhGELP23D 重组载体分别转化农杆菌 LBA4404。将含有 pCLCrVB 与其他 3 种载体的农杆菌侵染液按等比例混合, 注入棉花子叶。侵染后, 将植株黑暗过夜, 然后正常培养 18—20 d, 观察阳性对照植株是否出现白化表型, 以验证 VIGS 体系构建的有效性。白化表型出现后, 用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 *GhGELP23D* 沉默植株 (*GhGELP23D*-VIGS)、空载对照植株和野生型植株中 *GhGELP23D* 的表达水平。以 *GhUBQ7* 为内参基因。

2 结果

2.1 陆地棉 *GhGELP23D* 的克隆和生物信息学分析

经 PCR 扩增, 获得预期大小的目的条带 (附图 1), 经测序与序列比对, 成功获得 *GhGELP23D*。通过对 *GhGELP23D* 蛋白的基本特征进行分析, 结果显示, *GhGELP23D* 蛋白包含 356 个氨基酸, 理论分子量为 38.43 kDa, 理论等电点为 8.62; 脂溶指数为 82.84, 平均亲疏水性指数 (grand average of hydropathy, GRAVY) 为 -0.004, 表明该蛋白整体呈弱亲水性; 蛋白的不稳定指数为 18.65, 表明其为稳定蛋白。*GhGELP23D* 蛋白的亲水性指数为 -1.989—3.200, *GhGELP23D* 蛋白整体偏亲水性 (图 1-A)。

TMHMM 2.0 预测分析显示, *GhGELP23D* 蛋白为一个不含跨膜螺旋结构域的蛋白, 整条多肽链定位于胞外区域。说明 *GhGELP23D* 蛋白可能为分泌型蛋白 (图 1-C)。信号肽预测显示, 该蛋白含有典型的 Sec/SPI 型信号肽 (图 1-D)。Plant-mPLOC 网站分析显示, *GhGELP23D* 蛋白定位在胞外间隙。结构预测显示, 其构象以无规卷曲为主, 占比高达 46.07%; 同时含有较高比例的 α -螺旋 (38.20%) 和少量延伸链 (15.73%), 表明具有一定的结构灵活性。利用 AlphaFold 工具预测其三级结构, 与二级结构预测相符 (图 1-B)。

2.2 陆地棉 *GhGELP23D* 在纤维伸长期的高表达

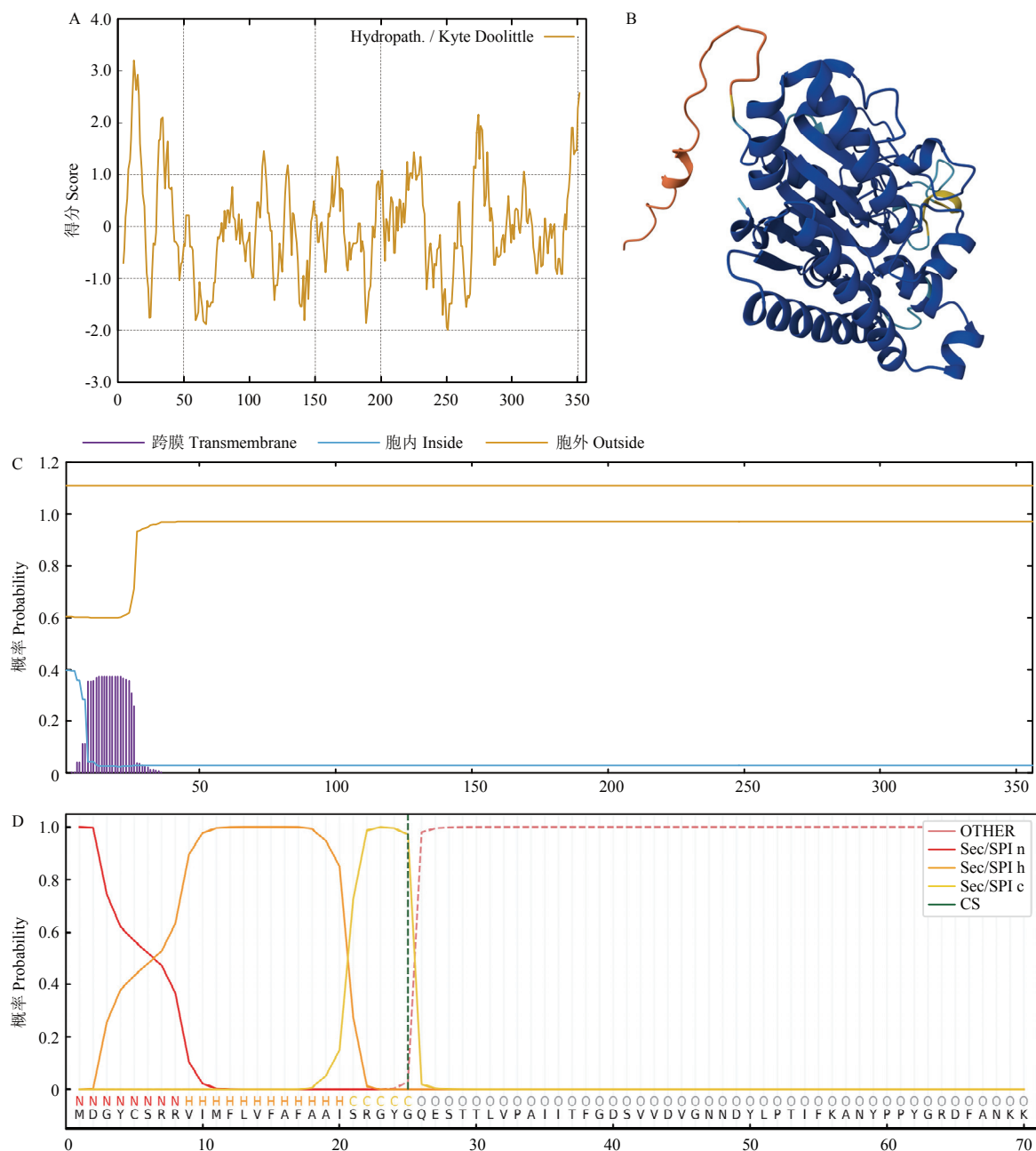
基于公共转录组数据, 分析陆地棉 *GhGELP23D* 在棉花组织中的表达特征。结果显示, 该基因在花萼和纤维发育阶段中表达水平较高 (图 2)。在纤维发育过程中, 其表达呈现动态变化, 在纤维发育快速伸长期 (3—10 DPA) 特异性高表达, 而在其他发育时期维持在相对较低水平。为进一步验证 *GhGELP23D* 在棉花纤维发育过程中的作用, 利用 RT-qPCR 检测 *GhGELP23D* 在不同发育阶段的胚珠和纤维中的表达水平。结果显示, *GhGELP23D* 在纤维伸长期显著上调, 尤其在 10 DPA 纤维中达到峰值, 表达水平提高了超过 200 倍, 该表达趋势与转录组分析结果呈现出较高的一致性。表明 *GhGELP23D* 可能在棉花纤维的快速伸长过程中发挥重要作用。

2.3 *GhGELP23D* 蛋白的保守性与进化分析

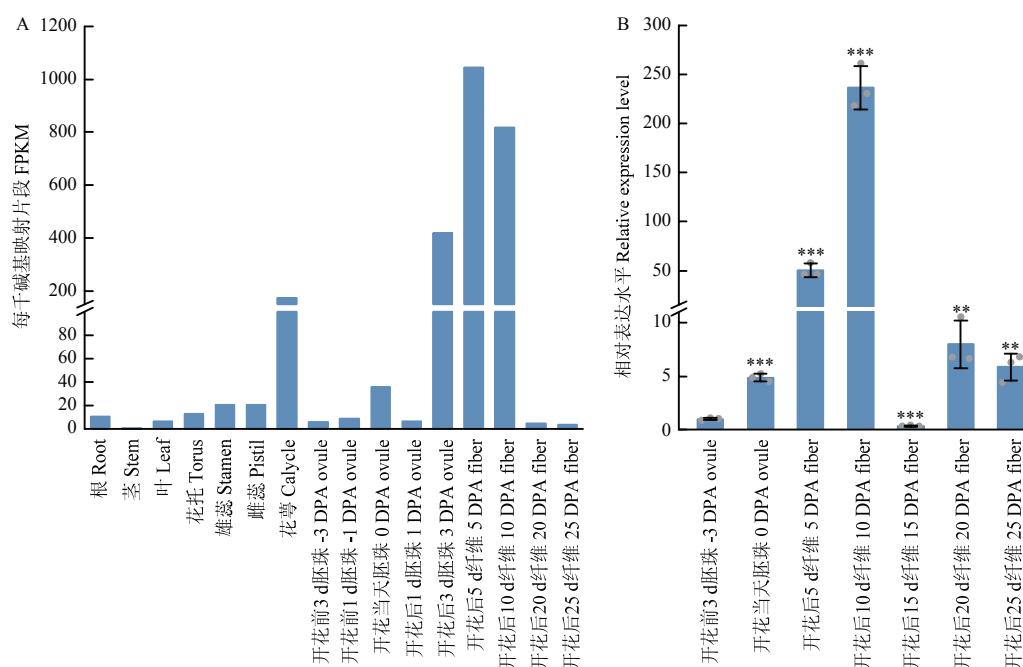
利用 NCBI 中 BLASTP 工具, 以 *GhGELP23D* 蛋白为查询序列, 收集了 13 个不同物种的同源蛋白序列, 经多序列比对和系统发育分析。结果显示, 蛋白整体相似度为 80.49%, 所有蛋白均包含一个 N 端的信号肽和核心的 SGNH_plant_lipase_like 结构域 (图 3-A), 表明 GELP 在不同植物物种中高度保守。系统发育树显示, 陆地棉 *GhGELP23D* 与大麻槿 (*Hibiscus cannabinus*) 的 HcGELP 聚为一支, 且序列相似度达 82.05% (图 3-B)。表明二者亲缘关系较近, 可能来源于共同祖先并在进化过程中保持了功能的保守性。这些结果与序列相似性分析相互印证, 共同说明植物 GDSL 家族脂酶类似蛋白在长期进化过程中保持了结构与功能的保守性。

2.4 *GhGELP23D* 蛋白保守结构特征及启动子顺式作用元件分析

保守基序与保守结构域分析显示, 所有蛋白均包



MYB-related、AuxRR-core、ABRE；与应激响应相关的元件 STRE、ARE、LTR；以及与次生代谢或防御反应相关的元件 W-box 和 chs-CMA2a（图 4-B）。表明 *GhGELP23D* 的转录调控可能受激素信号和胁迫等多种因素影响。



A: 转录组数据中 *GhGELP23D* 的表达特征; B: *GhGELP23D* 在纤维发育期的 RT-qPCR 分析。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

A: Analysis of the expression pattern of *GhGELP23D* based on transcriptome data; B: RT-qPCR analysis of *GhGELP23D* expression during fiber developmental stages. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图2 *GhGELP23D* 在纤维发育期的表达分析

Fig. 2 Expression analysis of *GhGELP23D* during fiber developmental stages

2.5 *GhGELP23D* 启动子的组织表达分析

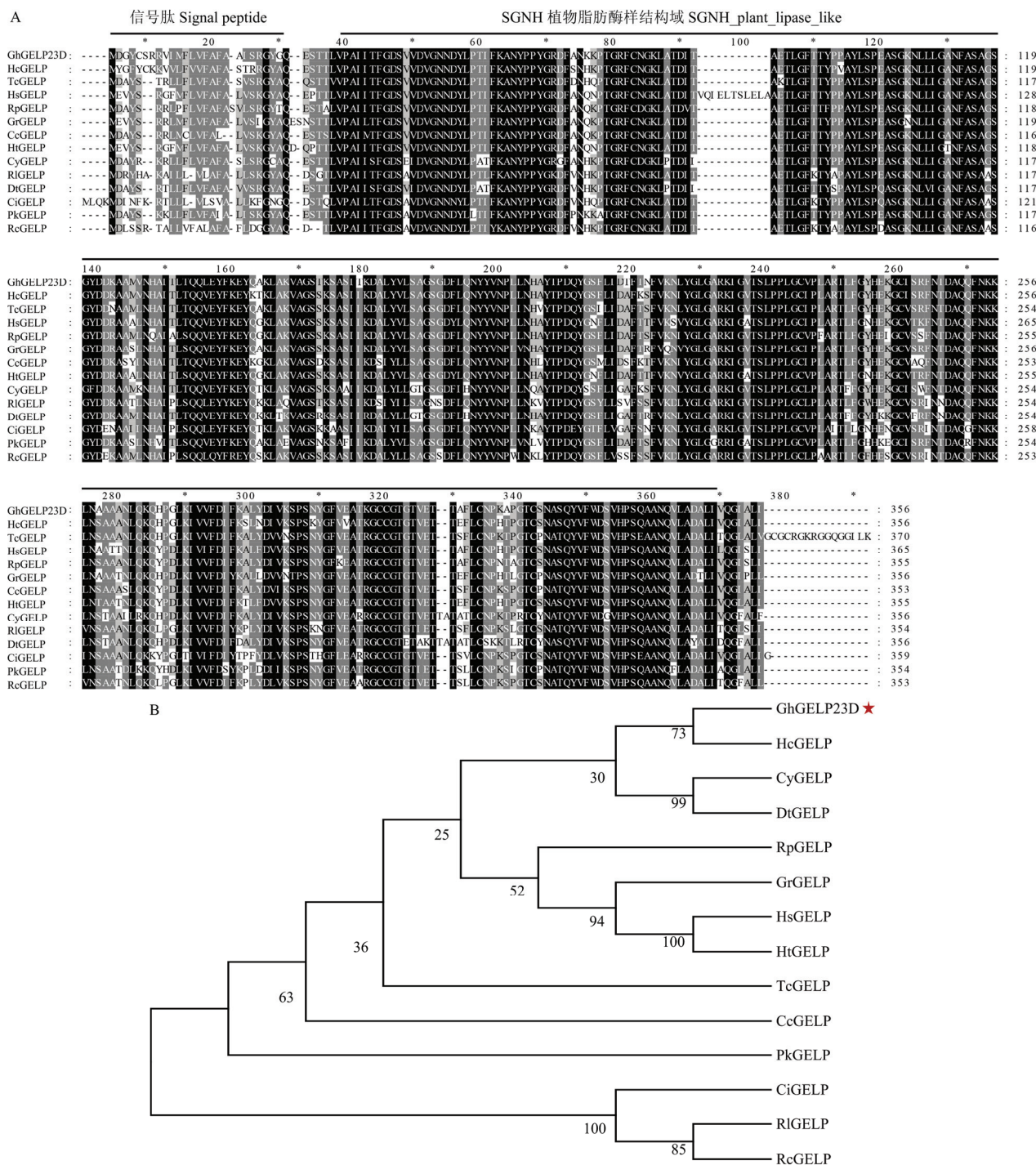
为分析 *GhGELP23D* 启动子在植物体内的组织表达特异性, 将全长启动子与 pCambia1391 载体连接, 并转化拟南芥。GUS 染色结果显示, *GhGELP23D* 启动子在转基因拟南芥幼苗的根、茎和莲座叶中具有较高的活性, 在成熟转基因拟南芥植株的茎生叶、花和果荚中同样具有较高的驱动活性 (图 5)。表明 *GhGELP23D* 启动子具有较广泛的组织表达特性, 可在拟南芥多种组织中驱动基因表达。

2.6 *GhGELP23D* 蛋白的亚细胞定位分析

为验证 *GhGELP23D* 蛋白的亚细胞定位, 构建 *GhGELP23D* 与 eGFP 的融合表达载体, 利用烟草叶片瞬时侵染技术进行定位分析 (图 6)。结果显示, 空载 35S::eGFP 在细胞核和细胞质中显示出绿色荧光。35S::*GhGELP23D*::eGFP 与胞外定位的阳性对照 (mCherry 标记) 共转化烟草叶片后, eGFP 信号与 mCherry 信号高度重叠, 表明 *GhGELP23D* 蛋白主要分布于胞外间隙。这一定位结果与生物信息学预测一致, 表明 *GhGELP23D* 蛋白可能通过分泌途径发挥其功能。

2.7 *GhGELP23D* 在拟南芥中的功能分析

为验证 *GhGELP23D* 的生物学功能, 构建 35S::*GhGELP23D* 载体, 并通过花序浸染法分别转化野生型拟南芥 (WT) 和 *atgelp67-1* 突变体, 获得 *GhGELP23D* 过表达株系 (*GhGELP23D*-OE), 以及在 *atgelp67-1* 突变体背景中由 CaMV 35S 启动子驱动的功能性回补株系 (*atgelp67-1/GhGELP23D*)。经拟南芥基因组 DNA 鉴定, 成功获得 *GhGELP23D* 转基因拟南芥株系 (附图 2)。通过对 WT、*GhGELP23D*-OE、*atgelp67-1* 和 *atgelp67-1/GhGELP23D* 的株高、主根长度和根毛长度的表型进行观察和统计 (图 7)。结果显示, 在异源表达 *GhGELP23D* 拟南芥中株高显著增加 (图 7-B、E); 与野生型相比, *GhGELP23D*-OE 株系主根长度和根毛长度均显著增加, 而 *atgelp67-1* 突变体主根和根毛长度均显著降低; 在 *atgelp67-1* 突变体中回补表达 *GhGELP23D* 后, 其主根和根毛长度得到一定恢复, 并基本达到 WT 的水平 (图 7-A、C、F)。表明 *GhGELP23D* 是一个功能性基因, 能正向调控拟南芥主根和根毛细胞的伸长发育。

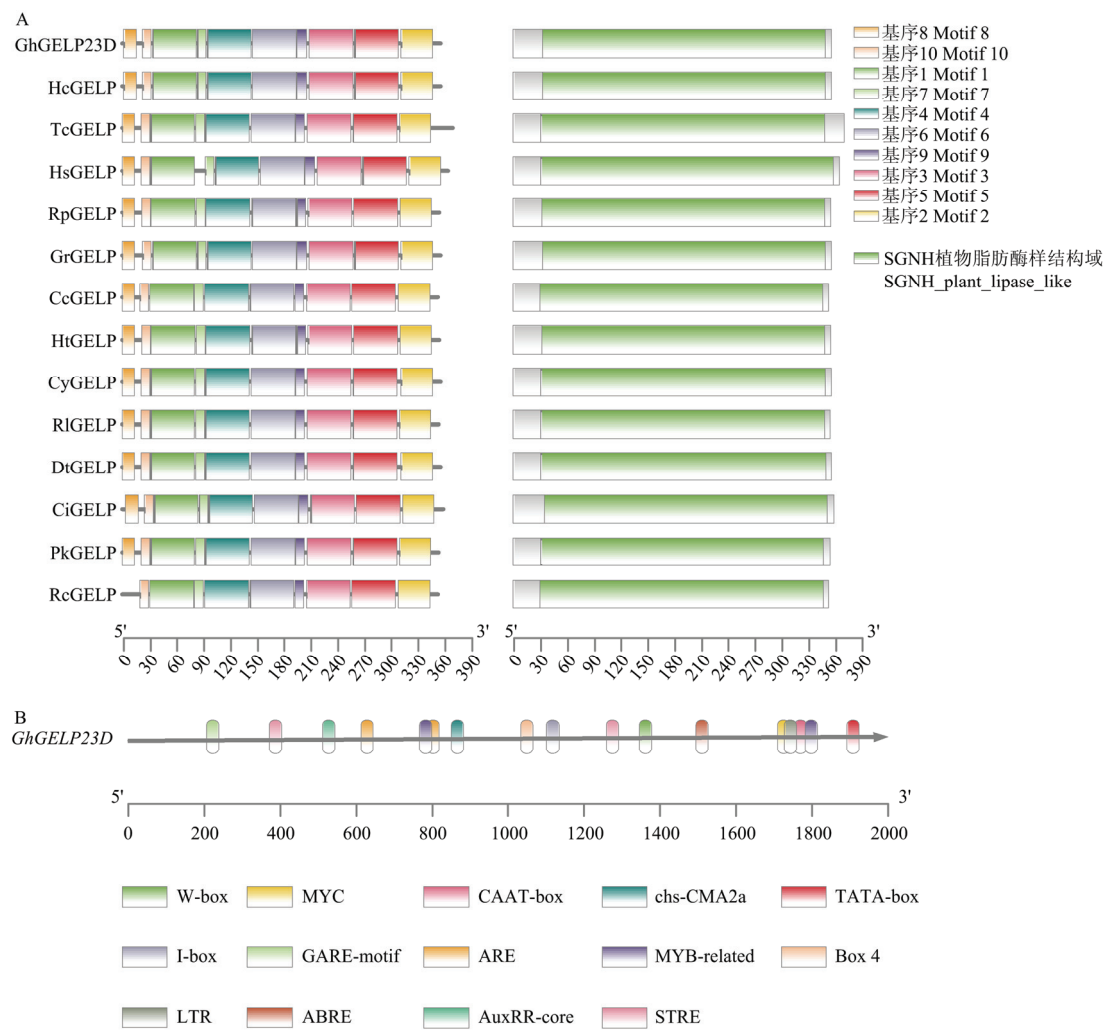


A: 蛋白多序列比对; B: 系统进化分析。Gh: 陆地棉, XP016688499.1; Hc: 大麻槿, KAL4332816.1; Cy: 滇桐, XWS18929.1; Dt: 海南椴, XVE88786.1; Rp: 梭罗树, XVF26876.1; Gr: 雷蒙德氏棉, XP012456097.1; Hs: 玫瑰茄, KAK8608411.1; Ht: 野西瓜苗, GMI77967.1; Tc: 可可, WRX26395.1; Cc: 黄麻, OMO70926.1; Pk: 景东翅子树, XVF86727.1; Ci: 薄壳山核桃, XP042949469.1; Ri: 红柳桉, GKV27208.1; Rc: 蓖麻, EEF46352.1

A: Multiple sequence alignment of proteins; B: Phylogenetic analysis. Gh: *Gossypium hirsutum*, XP016688499.1; Hc: *Hibiscus cannabinus*, KAL4332816.1; Cy: *Craigia yunnanensis*, XWS18929.1; Dt: *Diplodiscus trichospermus*, XVE88786.1; Rp: *Reevesia pubescens*, XVF26876.1; Gr: *Gossypium raimondii*, XP012456097.1; Hs: *Hibiscus sabdariffa*, KAK8608411.1; Ht: *Hibiscus trionum*, GMI77967.1; Tc: *Theobroma cacao*, WRX26395.1; Cc: *Corchorus capsularis*, OMO70926.1; Pk: *Pterospermum kingtungense*, XVF86727.1; Ci: *Carya illinoensis*, XP042949469.1; Ri: *Rubroshorea leprosula*, GKV27208.1; Rc: *Ricinus communis*, EEF46352.1

图 3 不同作物的 GELP 蛋白序列比对与进化分析

Fig. 3 Protein sequence alignment and phylogenetic analysis of GELP proteins from different crops



A: 蛋白保守基序分析与结构域预测; B: 启动子的顺式作用元件预测
A: Conserved motif analysis and domain prediction of proteins; B: *Cis*-element prediction in the promoter

图 4 *GhGELP23D* 蛋白的保守基序与启动子的顺式作用元件分析

Fig. 4 Analysis of conserved motifs of the *GhGELP23D* protein and *cis*-elements in its promoter

2.8 *GhGELP23D* 对棉纤维发育的影响

利用 VIGS 技术对陆地棉 *GhGELP23D* 进行基因表达沉默处理。在接种后 18—20 d，阳性对照（pCLCrVA::*GhPDS*）植株表现出明显的白化症状，并在后续棉铃发育阶段持续存在，说明基因沉默效果显著且稳定。随后分别取沉默株系 *GhGELP23D*-VIGS、空载对照（CLCrVA）植株和野生型棉花（WT）叶片进行 RT-qPCR 分析，结果显示，目标基因在 *GhGELP23D*-VIGS 中的表达量显著下降（图 8-B），说明 *GhGELP23D* 已被有效沉默。待棉株生长至结铃期后，观察到 *GhGELP23D*-VIGS 株系的株高较 CLCrVA 空载对照植株有所降低（图 8-A）。

纤维长度测定结果显示，*GhGELP23D*-VIGS 株系的纤维长度较空载对照植株显著降低，平均下降约 13.14%（图 8-C、D）。结果表明，*GhGELP23D* 可能影响棉纤维的伸长发育过程。

3 讨论

3.1 *GhGELP23D* 调控植物细胞伸长发育过程

GDSL 脂肪酶家族包含众多成员，在植物的形态建成、脂质代谢和生长发育中具有重要的生物学功能^[20-21]。奈婕菲等^[22]克隆获得毛果杨中一个 GDSL 家族基因，并构建其过表达载体遗传转化拟南芥，通过荧光信号分析发现该基因主要定位于根部细胞壁，表

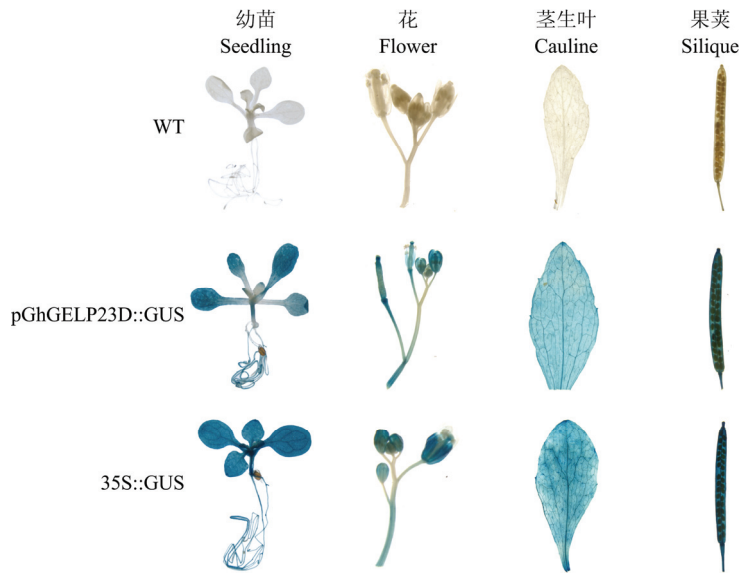


图 5 *GhGELP23D* 启动子的组织表达分析

Fig. 5 Tissue-specific expression pattern of the *GhGELP23D* promoter

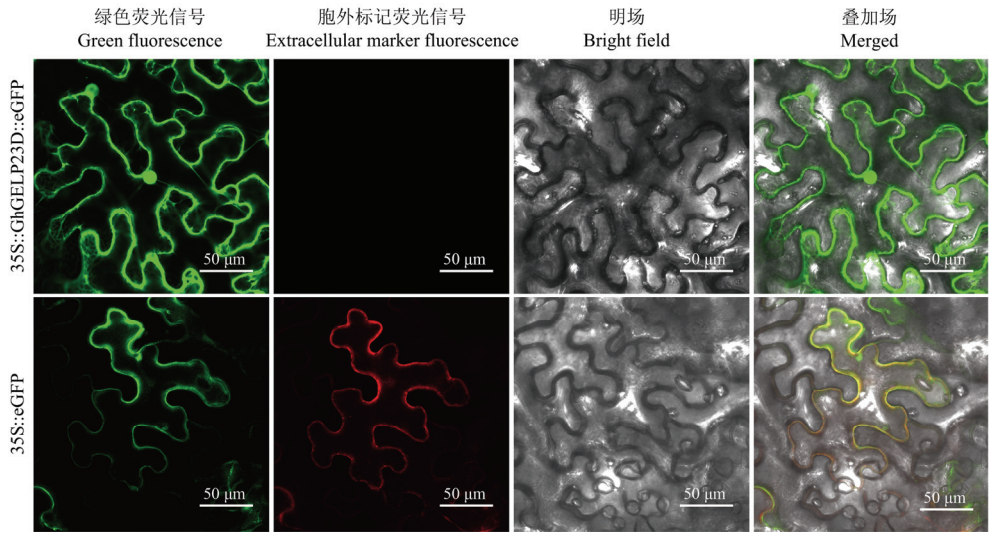
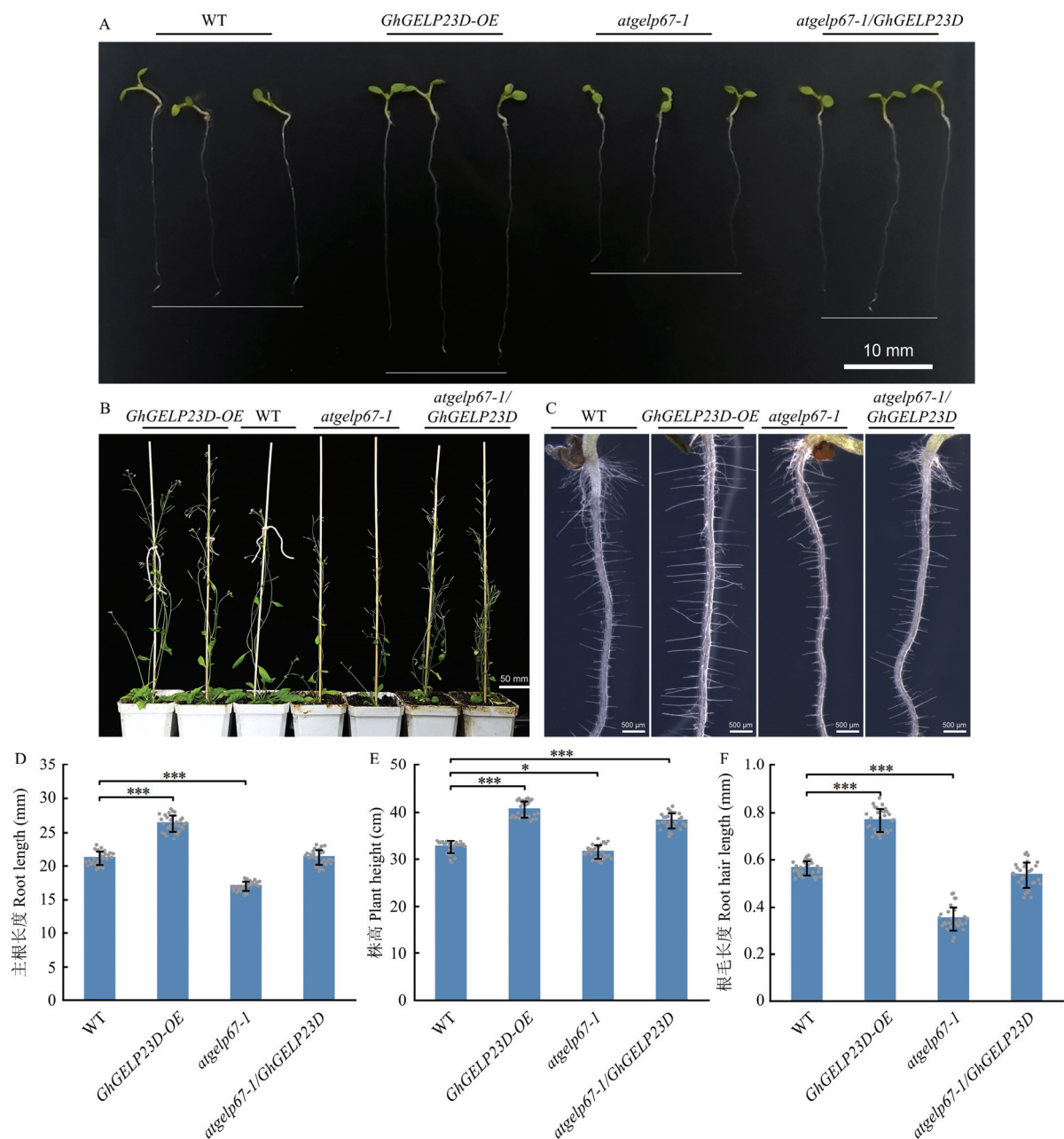


图 6 *GhGELP23D* 蛋白的亚细胞定位分析

Fig. 6 Subcellular localization analysis of the *GhGELP23D* protein

明其可能参与了毛果杨 (*Populus trichocarpa*) 生长相关的细胞壁构建或修饰过程。拟南芥 2 个 GDSL 脂肪酶成员——*CDEF1* 和 *EXL4* 参与了花粉水合、花粉管穿透和细胞壁降解，促进细胞扩展^[23-24]。QTL 定位和功能验证表明，*GbGELP* 的过表达能够促进根系生长和毛状体形成，而其沉默则显著抑制纤维伸长^[25]。基于前期工作结果，本研究以 *GhGELP23D* 为研究对象。转录组数据和 RT-qPCR 数据显示，其在纤维发育快速

伸长期 (3—10 DPA) 特异性高表达 (图 2)。通过在拟南芥中异源表达，*GhGELP23D* 能够影响植株营养生长，正向调控拟南芥主根和根毛细胞的伸长发育 (图 7)。鉴于棉纤维与拟南芥表皮毛在起源与伸长机制上的相似性^[26]，提示 *GhGELP23D* 可能在棉纤维伸长过程中发挥类似作用。为进一步验证其在棉纤维发育中的作用，研究利用病毒诱导的基因沉默技术，通过构建 VIGS 载体对 *GhGELP23D* 进行基因表达沉默处理。



A: 1 周龄野生型和转基因拟南芥的根长观察；比例尺：10 mm；B: 5 周龄野生型和转基因拟南芥的株高观察；比例尺：50 mm；C: 1 周龄野生型和转基因拟南芥的根毛观察；比例尺：500 μ m；D: 拟南芥主根长度的测量和统计分析；E: 拟南芥株高的测量和统计分析；F: 拟南芥根毛长度的测量和统计分析

A: Phenotypic observation of root in one-week-old wild-type and transgenic *Arabidopsis thaliana*; scale bar: 10 mm; B: Phenotypic observation of plant height in five-week-old mature wild-type and transgenic *Arabidopsis thaliana*; scale bar: 50 mm; C: Phenotypic observation of root hairs in one-week-old wild-type and transgenic *Arabidopsis thaliana*; scale bar: 500 μ m; D: Determination and statistical assessment of primary root length in *Arabidopsis thaliana*; E: Determination and statistical assessment of plant height in *Arabidopsis thaliana*; F: Determination and statistical assessment of root hair length in *Arabidopsis thaliana*

图 7 *GhGELP23D* 影响拟南芥细胞伸长发育的功能分析

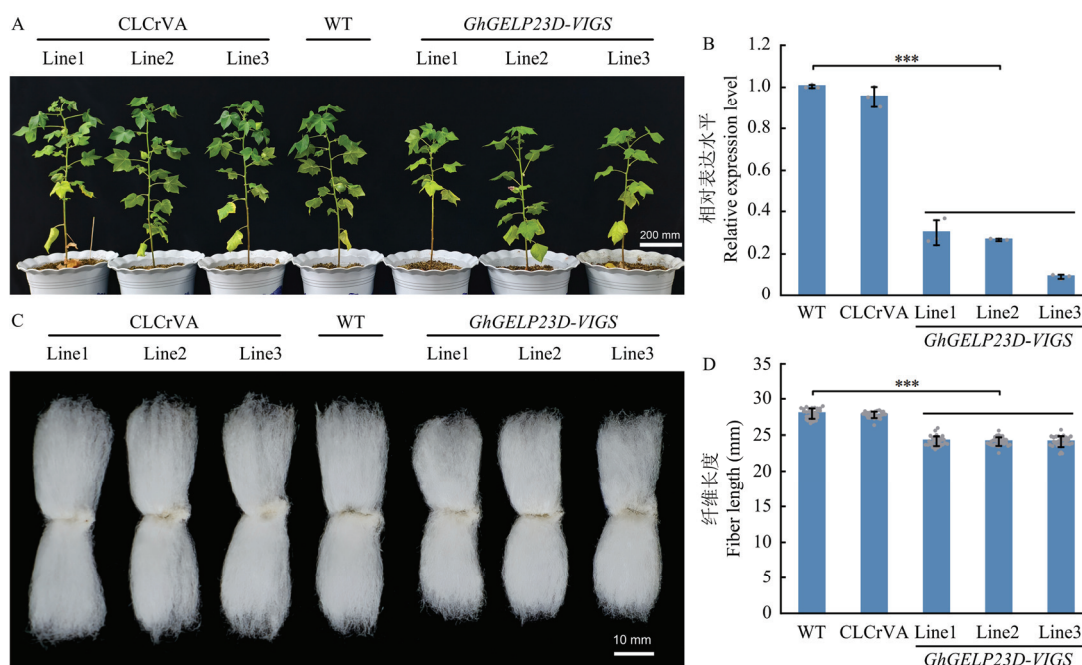
Fig. 7 Genetic function analysis of *GhGELP23D* in regulating *Arabidopsis* cell elongation

结果显示，*GhGELP23D-VIGS* 株系的纤维长度较空载对照显著降低，平均下降约 13.14%（图 8-C、D）。这些结果表明，*GhGELP23D* 在棉花纤维细胞的正常

伸长中发挥重要作用。

3.2 *GhGELP23D* 的胞外定位及潜在作用机制

已有研究表明，在山核桃(*Carya illinoensis*)GDSL



A: *GhGELP23D-VIGS* 株系与 CLCrVA 植株的整体表型, 比例尺: 200 mm; B: *GhGELP23D* 沉默效率的 RT-qPCR 分析; C: *GhGELP23D-VIGS* 株系与对照植株的纤维长度, 比例尺: 10 mm; D: 成熟纤维长度的测量和统计分析。WT: 野生型棉花。CLCrVA: pCLCrVA 空载对照植株。*GhGELP23D-VIGS*: *GhGELP23D* 沉默植株

A: Overall phenotype of *GhGELP23D-VIGS* lines compared with CLCrVA plants; Scale bar: 200 mm; B: RT-qPCR analysis of *GhGELP23D* gene silencing efficiency; C: Fiber length of *GhGELP23D-VIGS* lines and control plants; Scale bar: 10 mm; D: Determination and statistical assessment of mature cotton fiber length. WT: Wild-type cotton. CLCrVA: pCLCrVA empty vector control plants. *GhGELP23D-VIGS*: *GhGELP23D*-silenced plants

图 8 *GhGELP23D* 影响棉纤维发育的功能分析

Fig. 8 Genetic function analysis of *GhGELP23D* in regulating cotton fiber elongation

家族中, 亚细胞定位试验证实部分成员定位于胞外基质^[27]。类似地, 拟南芥 GDSL 脂肪酶 *AtGELP7* 被报道可分泌到胞外, 在质膜外侧催化木聚糖去乙酰化, 进而影响细胞壁结构^[28]。亚细胞定位结果显示, *GhGELP23D* 蛋白主要存在于胞外间隙(图 6)。此外, GDSL 脂肪酶作为广谱底物特异性的水解酶, 能够催化多种脂质底物的酯键断裂或重排, 参与细胞壁脂质和多糖的修饰, 从而调节细胞壁可塑性^[29-32]。结合其胞外定位特征, 推测 *GhGELP23D* 可能通过影响细胞壁结构或脂质代谢途径, 促进细胞的纵向伸长。

植物细胞伸长是一个由转录网络和激素信号精密协调调控的过程。bHLH 家族成员 *GhACE1* 促进纤维伸长, *GhFP2* 则拮抗其作用, 二者通过调控细胞膜蛋白和膨胀蛋白表达实现对伸长的精细调控^[33]。*GhWRKY16* 通过激活 *GhHOX3*、*GhMYB109* 等下游基因, 促进纤维起始和伸长^[34]。ARF 蛋白可直接结合目标基因启动子的 AuxRE (auxin response element), 调控 *GhCTR1* 和 *GhXTH9* 等基因的转录活性, 促进或抑制纤维细胞的生长^[35]。GA 不仅直接促进纤维伸长,

还通过上调独脚金内酯 (strigolactone, SL) 生物合成基因 (*DWARF27*), 增强 SL 信号, 形成 GA-SL 级联调控^[36]。*GhGELP23D* 启动子顺式作用元件分析显示, 其上游区域含有多种与激素和转录调控相关的顺式作用元件, 如 MYB-related、AuxRR-core 和 ABRE 等(图 4-B)。结果表明, *GhGELP23D* 可能通过激素信号通路及转录因子调控影响棉纤维伸长发育。

本研究表明, *GhGELP23D* 编码的蛋白质是一种定位于胞外间隙的 GDSL 脂肪酶, 在拟南芥中正向调控主根和根毛细胞的伸长发育, 而表达沉默则显著降低棉纤维长度。*GhGELP23D* 启动子区含有多种激素响应和转录因子结合元件, 其表达可能受到复杂的上游调控。综上所述, *GhGELP23D* 在植物细胞伸长发育过程中发挥重要作用, 并可能作为连接上游发育调控网络与下游细胞壁重塑及脂质代谢过程的关键调控节点。

4 结论

GhGELP23D 编码 356 个氨基酸, 蛋白定位于胞

外间隙。*GhGELP23D* 在棉纤维发育快速伸长期具有较高的表达水平。其启动子区域包含多种与光信号、激素和逆境响应相关的顺式作用元件,并在拟南芥多种组织中具有转录活性。在异源表达 *GhGELP23D* 拟南芥中显著增加株高并促进主根和根毛细胞的伸长发育。在陆地棉中沉默 *GhGELP23D* 显著降低纤维长度。*GhGELP23D* 在植物细胞伸长发育过程中发挥重要作用。

文章附图附表请见本刊官网:

<https://www.chinaagrisci.com/CN/0578-1752/home.shtml>

参考文献 References

- [1] Yuan B Z, Sun J. Bibliometric analysis of cotton research from plant sciences category based on web of science [J]. *Journal of Natural Fibers*, 2022, 19(14): 7579-7593.
- [2] Huang G, Huang J Q, Chen X Y, Zhu Y X. Recent advances and future perspectives in cotton research [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2021, 72: 437-462.
- [3] Kim H J, Triplett B A. Cotton fiber growth in planta and *in vitro*. Models for plant cell elongation and cell wall biogenesis [J]. *Plant Physiology*, 2001, 127(4): 1361-1366.
- [4] Sun W J, Gao Z Y, Wang J, Huang Y Q, Chen Y, Li J F, Lv M L, Wang J, Luo M, Zuo K J. Cotton fiber elongation requires the transcription factor GhMYB212 to regulate sucrose transportation into expanding fibers [J]. *The New Phytologist*, 2019, 222(2): 864-881.
- [5] Suo Q W, Fang N J, Zeng J Y, Yan F L, Zhu X, Wang Y, Yu W T, Chen J M, Liang A M, Li Y H, Kong J, Xiao Y H. R2R3 MYB transcription factor GhMYB201 promotes cotton fiber elongation via cell wall loosening and very-long-chain fatty acid synthesis [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(17): 9559.
- [6] Xiao G H, Zhao P, Zhang Y. A pivotal role of hormones in regulating cotton fiber development [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 87.
- [7] Somssich M, Khan G A, Persson S. Cell wall heterogeneity in root development of *Arabidopsis* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1242.
- [8] Liu X H, Cui H Y, Zhang B C, Song M, Chen S L, Xiao C W, Tang Y J, Liesche J. Reduced pectin content of cell walls prevents stress-induced root cell elongation in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2021, 72(4): 1073-1084.
- [9] Akoh C C, Lee G C, Liaw Y C, Huang T H, Shaw J F. GDSL family of serine esterases/lipases [J]. *Progress in Lipid Research*, 2004, 43(6): 534-552.
- [10] Shen G D, Sun W L, Chen Z C, Shi L, Hong J, Shi J X. Plant GDSL esterases/lipases: Evolutionary, physiological and molecular functions in plant development [J]. *Plants*, 2022, 11(4): 468.
- [11] Bischoff V, Nita S, Neumetzler L, Schindelasch D, Urbain A, Eshed R, Persson S, Delmer D, Scheible W R. TRICHOME BIREFRINGENCE and its homolog AT5G01360 encode plant-specific DUF231 proteins required for cellulose biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(2): 590-602.
- [12] Ji R, Wang H, Xin X, Peng S, Hur Y, Li Z, Feng H. BrEXL6, a GDSL lipase gene of *Brassica rapa*, functions in pollen development [J]. *Biologia Plantarum*, 2017, 61(4): 685-692.
- [13] Zhang B C, Zhang L J, Li F, Zhang D M, Liu X L, Wang H, Xu Z P, Chu C C, Zhou Y H. Control of secondary cell wall patterning involves xylan deacetylation by a GDSL esterase [J]. *Nature Plants*, 2017, 3: 17017.
- [14] 孙英超, 刘伟, 何秋伶, 祝水金, 陈进红. 不同脂肪酸种类及浓度对棉纤维分化发育的影响[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2014, 40(6): 621-626.
Sun Y C, Liu W, He Q L, Zhu S J, Chen J H. Effects of different kinds and concentrations of fatty acids on differentiation and development of cotton fiber [J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 2014, 40(6): 621-626. (in Chinese)
- [15] 梅文倩, 秦咏梅, 朱玉贤. 乙烯、超长链脂肪酸、活性氧、油菜素内酯和赤霉素相互作用调控棉纤维伸长发育的分子机制研究[J]. *生命科学*, 2010, 22(1): 7-14.
Mei W Q, Qin Y M, Zhu Y X. Cross-talk among ethylene, very long-chain fatty acids, reactive oxygen species, brassinosteroid and gibberellin mediates cotton fiber elongation [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2010, 22(1): 7-14. (in Chinese)
- [16] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [17] Fernandez-Pozo N, Rosli H G, Martin G B, Mueller L A. The SGN VIGS tool: User-friendly software to design virus-induced gene silencing (VIGS) constructs for functional genomics [J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(3): 486-488.
- [18] Zhang X R, Henriques R, Lin S S, Niu Q W, Chua N H. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method [J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(2): 641-646.
- [19] Oh I S, Park A R, Bae M S, Kwon S J, Kim Y S, Lee J E, Kang N Y, Lee S, Cheong H, Park O K. Secretome analysis reveals an *Arabidopsis* lipase involved in defense against *Alternaria brassicicola* [J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(10): 2832-2847.

- [20] 李志兰, 华水金, 蒋立希. 植物 GDSL 脂酶家族基因的研究进展[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(7): 916-924.
- Li Z L, Hua S J, Jiang L X. Advances in studying plant GDSL-type lipase genes [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2014, 22(7): 916-924. (in Chinese)
- [21] 周丽霞, 杨蒙迪, 李睿. 油棕 GDSL 酯酶/脂肪酶基因的全基因组鉴定及表达分析[J]. 分子植物育种, 2023, 21(14): 4545-4559.
- Zhou L X, Yang M D, Li R. Genome-wide identification and expression analysis of GDSL esterase/lipase genes in *Elaeis guineensis* [J]. Molecular Plant Breeding, 2023, 21(14): 4545-4559. (in Chinese)
- [22] 奈婕菲, 程玉祥. 一个杨树 GDSL 基因组织表达的特性及其在拟南芥异源的表达[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(3): 16-18.
- Nai J F, Cheng Y X. Characteristics of tissue expression of a poplar GDSL gene and its heterologous expression in *Arabidopsis thaliana* [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2014, 42(3): 16-18. (in Chinese)
- [23] Takahashi K, Shimada T, Kondo M, Tamai A, Mori M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. Ectopic expression of an esterase, which is a candidate for the unidentified plant cutinase, causes cuticular defects in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant & Cell Physiology, 2010, 51(1): 123-131.
- [24] Updegraff E P, Zhao F, Preuss D. The extracellular lipase EXL4 is required for efficient hydration of *Arabidopsis* pollen [J]. Sexual Plant Reproduction, 2009, 22(3): 197-204.
- [25] Wang Z Y, Cai C P, Yu Z H, Reyimu Y, Han X, Lv M, Zhang Z H, Li W X, Zhu G Z, Guo W Z. A GDSL esterase/lipase gene GbGELP identified from a fiber microne QTL qMIC-A11 modulates cell elongation and fiber development [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2025, 138(6): 126.
- [26] Serna L, Martin C. Trichomes: Different regulatory networks lead to convergent structures [J]. Trends in Plant Science, 2006, 11(6): 274-280.
- [27] Jiao Y, Zhang J H, Pan C D. Genome-wide analysis of the *GDSL* genes in pecan (*Carya illinoensis* K. Koch): Phylogeny, structure, promoter *Cis*-elements, co-expression networks, and response to salt stresses [J]. Genes, 2022, 13(7): 1103.
- [28] Rastogi L, Chaudhari A A, Sharma R, Pawar P A. *Arabidopsis* GELP7 functions as a plasma membrane-localized acetyl xylan esterase, and its overexpression improves saccharification efficiency [J]. Plant Molecular Biology, 2022, 109(6): 781-797.
- [29] Qin Y M, Hu C Y, Pang Y, Kastaniotis A J, Hiltunen J K, Zhu Y X. Saturated very-long-chain fatty acids promote cotton fiber and *Arabidopsis* cell elongation by activating ethylene biosynthesis [J]. The Plant Cell, 2007, 19(11): 3692-3704.
- [30] Huang L M, Lai C P, Chen L O, Chan M T, Shaw J F. *Arabidopsis* SFAR4 is a novel GDSL-type esterase involved in fatty acid degradation and glucose tolerance [J]. Botanical Studies, 2015, 56(1): 33.
- [31] Liu G J, Xiao G H, Liu N J, Liu D, Chen P S, Qin Y M, Zhu Y X. Targeted lipidomics studies reveal that linolenic acid promotes cotton fiber elongation by activating phosphatidylinositol and phosphatidylinositol monophosphate biosynthesis [J]. Molecular Plant, 2015, 8(6): 911-921.
- [32] Zhang Y J, Bai B, Lee M, Alfiko Y, Suwanto A, Yue G H. Cloning and characterization of EgGDSL, a gene associated with oil content in oil palm [J]. Scientific Reports, 2018, 8: 11406.
- [33] Lu R, Li Y, Zhang J, Wang Y, Zhang J, Li Y, Zheng Y, Li X B. The bHLH/HLH transcription factors GhFP2 and GhACE1 antagonistically regulate fiber elongation in cotton [J]. Plant Physiology, 2022, 189(2): 628-643.
- [34] Wang N N, Li Y, Chen Y H, Lu R, Zhou L, Wang Y, Zheng Y, Li X B. Phosphorylation of WRKY16 by MPK3-1 is essential for its transcriptional activity during fiber initiation and elongation in cotton (*Gossypium hirsutum*) [J]. The Plant Cell, 2021, 33(8): 2736-2752.
- [35] Jin F, Zhu L P, Hou L Y, Li H B, Li L, Xiao G H. Auxin resistant 2 and short hypocotyl 2 regulate cotton fiber initiation and elongation [J]. Plant Physiology, 2024, 195(3): 2032-2052.
- [36] Tian Z L, Zhang Y Z, Zhu L P, Jiang B, Wang H Q, Gao R X, Friml J, Xiao G H. Strigolactones act downstream of gibberellins to regulate fiber cell elongation and cell wall thickness in cotton (*Gossypium hirsutum*) [J]. The Plant Cell, 2022, 34(12): 4816-4839.

(责任编辑 李莉)