

网络出版日期:2017-06-05

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20170605.1715.014.html>

海岛棉 *GbHCT* 基因的表达分析

加得拉·吐留汗,倪志勇,邱迎风,曲延英,陈全家

(新疆农业大学 农学院,农业生物技术重点实验室,乌鲁木齐 830052)

摘 要 通过海岛棉基因组数据库和 GSDS 2.0 在线生物信息学软件,分析 *GbHCT* 基因的结构,利用实时荧光定量 PCR 技术,检测 *GbHCT* 基因在海岛棉不同组织和棉纤维不同发育时间的表达量。结果表明,该基因 DNA 序列长度为 1 953 bp,开放阅读框长度为 1 311 bp,编码 436 个氨基酸,在海岛棉基因组中对应 scaffold3453 序列,含有 1 个内含子和 2 个外显子。*GbHCT* 基因在不同组织和纤维发育不同时期中均有表达,在各个组织中,苞叶和花中表达量最高,在棉纤维不同发育时期开花后 5 d 和 25 d 表达量最强。该基因可能参与棉纤维发育伸长期和次生壁增厚期。为深入研究该基因的功能,构建植物表达载体 pEGAD-*GbHCT* 并转入根癌农杆菌,为下一步研究奠定试验基础。

关键词 海岛棉;*GbHCT*;棉花纤维基因表达;植物表达载体

中图分类号 Q786

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2017)06-0849-06

木质素(lignin)是自然界中仅次于纤维素的大分子物质,是植物细胞壁的重要组成成分^[1]。主要由对-羟基苯基木质素(p-hydroxyphenyl lignin, H 木质素)、愈创木基木质素(guaiacyl lignin, G 木质素)和紫丁香基木质素(syringyl lignin, S 木质素)3种单体分别聚合形成^[2]。莽草酸/奎宁酸羟基肉桂酰转移酶(shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transferase, HCT)是木质素生物合成途径中控制木质素 G/S-单体生物合成的关键限速酶,该酶通过调节木质素 H-单体与 G/S-单体的生物转化从而达到调控植物体木质素单体组成^[3-4]。Hoffmann 等^[5]从烟草茎的抽提物中克隆 HCT 基因,葛文雅等^[6]和王雪霞等^[7]在拟南芥、烟草、大麦、毛果杨、黄瓜、高粱、玉米等植物中得到 HCT 基因。前人用 RNA 干扰(RNAi)技术和烟草脆裂病毒(tobacco rattle virus, TRV)侵染的方法抑制拟南芥和烟草中 HCT 基因表达,发现转基因植株表现出植株矮小的特征^[8]。

陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.)和海岛棉(*Gossypium barbadense* L.)是商业价值最高的

栽培品种。棉纤维由棉花种子的表皮毛发育而成,是一种优良的天然纤维。一般经历 45~50 d,根据其形成和发育过程可分为纤维起始分化、纤维伸长及初生壁合成、次生壁合成和脱水成熟 4 个时期^[9-10]。有研究证明,纤维品质优越的海岛棉中木质素总体含量低于其他棉种,这可能是海岛棉棉纤维比其他品种更细的原因^[11]。通过基因工程手段降低木质素含量,从而实现纤维品质的改良是一个可行的方法。改变植物木质素生物合成调控的途径有两种方法,一种是降低木质素含量,另一种方法是改变木质素的组成结构^[12]。棉花不同基因型和不同发育时期有上千个可调控基因,仅有少数基因被分离鉴定。目前,研究者们对于 HCT 基因的研究更多的是在模式植物中,棉花中研究主要集中在基因的克隆和生物信息学分析等方面。因此,在棉花中分离并鉴定与纤维发育相关基因,分析这些基因在纤维发育中具有的功能,阐明棉纤维发育的分子机理,对于棉花纤维品质的改良和产量的提高具有非常重要的理论和经济意义。

本研究利用实时荧光定量 PCR 技术从海岛

收稿日期:2016-03-31 **修回日期**:2016-05-23

基金项目:自治区高技术研究发展计划(201411103)。

第一作者:加得拉·吐留汗,女,硕士研究生,研究方向为棉花纤维品质改良。E-mail:jaderatoleuhan@163.com

通信作者:陈全家,男,教授,主要从事棉花分子育种研究。E-mail:chqjia@126.com

棉‘新海 21’中克隆棉花 *GbHCT* 基因,并对其进行生物信息学分析。通过实时荧光定量 PCR 技术对海岛棉不同组织和纤维发育不同时期的表达量进行分析并成功构建 pEGAD-*GbHCT* 植物表达载体,为研究 *GbHCT* 基因的功能提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 在棉花生长盛花期(7月至8月中旬)于新疆阿克苏地区收集‘新海 21’海岛棉的苞叶、花及棉纤维不同发育时期即开花后 8 个不同时间 0、5、10、15、20、25、30、35 d 的纤维。室内种植‘新海 21’,待长出 2~3 片叶后取根、茎和叶。

1.1.2 菌种、载体与试剂 10×buffer 含(Mg^{2+})、dNTP、*Taq* DNA 聚合酶、DNA marker DL 2000、DNA marker DL 15000、琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒、RNA plant plus reagent 试剂盒、多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司;TransStart® Tip Green qPCRSuperMix、大肠杆菌(*E. coli*) DH5α 感受态购自北京全式金生物科技有限公司;pMD19-T 载体和限制性内切酶 T_4 连接酶购自 TaKaRa 公司;*EcoR* I、*Hind* III、ThermoRevertAid First strand cDNA Synthesis Kit 购自 Thermo Fisher Scientific 公司;农杆菌 EH105 菌株、pEGAD 载体均由新疆农业大学农业生物技术重点实验室保存;其他试剂均为国产分析纯;引物合成由北京华大生物科技公司完成;测序工作由上海美季生物科技公司完成。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成 利用 TianGen 公司 RNA plant plus reagent 试剂盒,提取‘新海 21’海岛棉根、茎、叶、苞叶、花的总 RNA,参照 TianGen 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒说明书,提取不同发育时期棉纤维总 RNA。参照 ThermoRevertAid First strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒操作步骤合成 cDNA 第一条链,-20℃保存,备用。

1.2.2 目标基因的克隆 根据棉纤维发育转录组库中筛选得到的目标 Unigene 序列 Unigene30610,利用 primer premier 5.0 软件设计特异引物: *GbHCT*-F: 5'-ATGGAGATTAC-TATAAAGGAGTCTGC-3' 和 *GbHCT*-R: 5'-

TTAAAACTCATAAATAAGTTTTTCAAAAA-3'送华大科技合成,合成后引物进行 RT-PCR 扩增。反应条件为:10×Buffer 含(Mg^{2+}) 5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 4 μL,10 μmol/L 上游引物和下游引物各 2 μL,cDNA 1.5 μL,*Taq* 酶(5 U/μL)0.5 μL,ddH₂O 35 μL,总体积为 50 μL。反应程序为:预变性 94℃ 4 min;变性 94℃ 30 s,退火 50℃ 30 s,延伸 72℃ 1 min,35 个循环;再延伸 72℃ 10 min,结束反应。取 4 μL PCR 产物进行电泳检测。采用普通 DNA 产物纯化试剂盒纯化 PCR 产物与 pMD19-T 连接,转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,涂布于含有氨苄青霉素(50 mg/mL)的 LB 固体培养基上,37℃培养 12~14 h 后挑取单菌落,PCR 和双酶切鉴定阳性克隆送上海美季公司测序。

1.2.3 序列分析 用已获得的 *GbHCT* 基因的 cDNA 序列作为探针在 *Gossypium barbadence* Annotation Project([Http://cotton.cropdb.org](http://cotton.cropdb.org))检索获得对应海岛棉基因组 DNA 序列,采用 GSDS 2.0(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/index.php>)分析基因的结构^[13]。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 分析 根据 *GbHCT* 序列设计实时荧光定量 PCR 引物。序列为 *GbHCT*-F: 5'-AAGTCGACTATTCTGGAGGAA-TATCTTC-3' 和 *GbHCT*-R: 5'-ATGGTACAA-TGGCAGGCGTCA-3'。以棉花 *GhUBQ7* 为内参基因。序列 *GhUBQ7*-F 为:5'-GACCTACAC-CAAGCCCAAGAAG-3',*GhUBQ7*-R:5'-TGA-GCCCACACTTACCACAATAGT-3'。采用 Trans Start Tip Green qPCR SuperMix 试剂盒。反应体系为 20 μL,模板 cDNA 1.5 μL,10 μmol/L 上下游引物各 0.4 μL,2×TransStartTip Green qPCR Super Mix 10 μL,Passive Reference Dye(50×) 0.4 μL,加 ddH₂O 至 20 μL。利用 7500 Fast Real-Time PCR 仪扩增反应程序采用两步法:预变性 95℃ 20 s,95℃ 3 s,退火 60℃ 30 s 收集荧光。目的基因与内参基因分别设 3 个技术重复。试验结果按照 $2^{-\Delta\Delta Q}$ 法进行数据分析。

1.2.5 构建植物表达载体 pEGAD-*GbHCT* pEGAD 载体和 *GbHCT* 序列设计 2 条添加酶切位点 *EcoR* I 和 *Hind* III 的引物序列为 *nTHCT*-F: 5'-TAAGAATTTCATGGAGATTACTATA-AAGGAGTCTGC-3' 和 *nTHCT*-R: 5'-TATA-

AGCTTTTAAACTCATAAATAAGTTTTT-CAAAAA-3'以 pMD19-T-*GbHCT* 重组质粒为模板,进行 PCR 扩增。将扩增得到的目标片段经凝胶纯化回收试剂盒纯化回收后,用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切回收产物与 pEGAD 载体,在 T_4 DNA 连接酶的作用下连接转化。酶切体系为: *EcoR* I 和 *Hind* III 各 1 μ L, Buffer 5 μ L, 回收的目的片段 pEGAD 质粒 13 μ L。连接体系: $10\times T_4$ ligase Buffer 1 μ L, pEGAD Vector 2 μ L, 目的 DNA 回收片段 6 μ L, T_4 DNA ligase 1 μ L, 总体积 10 μ L。放入 22 $^{\circ}\text{C}$ 连接仪连接 20 min, 转化大肠杆菌 DH5 α , 培养过夜后挑取单菌落, 进行菌液 PCR 和质粒双酶切鉴定后送至上海美季测序。

1.2.6 *GbHCT* 基因植物表达载体转化农杆菌
挑取根癌农杆菌 EHA105 单菌落于 5 mL YEB 液体培养基 (含 Rifampicin 50 mg/L) 中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 250 r/min 振荡培养, 吸取 2 mL 菌液加入 50 mL YEB 培养基至 OD₆₀₀ 为 0.6 左右, 制备农杆菌感

受态细胞, 采用冻融法把 pEGAD-*GbHCT* 质粒 DNA 转化到农杆菌感受态细胞, 接种于含有 50 mg/L Kan 和 50 mg/L Rif 的 YEB 固体平板上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养约 2 d, 挑单菌落, 接种于 YEB 液体培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜。经 PCR 鉴定得到 1 311 bp 条带的特异条带。

2 结果与分析

2.1 RNA 的提取与检测

分别提取海岛棉‘新海 21’的根、茎、叶、苞叶、花及 8 个纤维发育时期 (开花后时间) 0、5、10、15、20、25、30、35 d 的总 RNA, 利用 Colibri Spectrometer 紫外分光光度计检测 RNA 样品的质量浓度和完整性。结果显示: 提取的 RNA 样品 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值在 1.8~2.0, OD₂₆₀/OD₂₃₀ 比值均大于 1.8 (图 1、图 2)。经 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳后 28S rRNA、18S rRNA 和 5S rRNA 条带明亮, 清晰可用于后续试验。

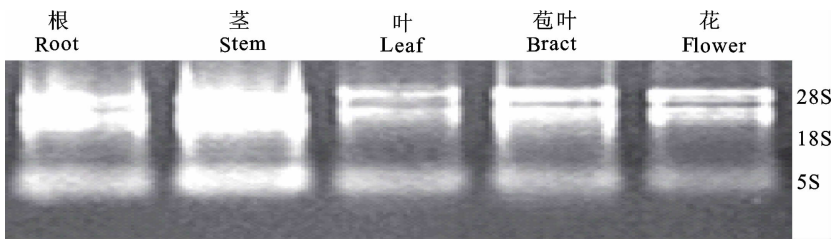


图 1 海岛棉不同组织 RNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of PCR product of RNA extracted from different tissues of *Gossypium barbadense* L.

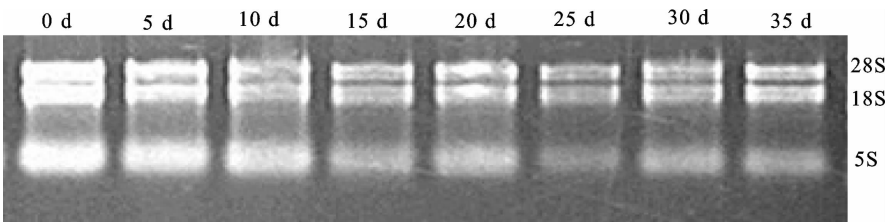


图 2 海岛棉纤维不同发育时期 RNA 电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of PCR product of RNA extracted from different development stages of *Gossypium barbadense* L.

2.2 *GbHCT* 基因的克隆和氨基酸序列分析

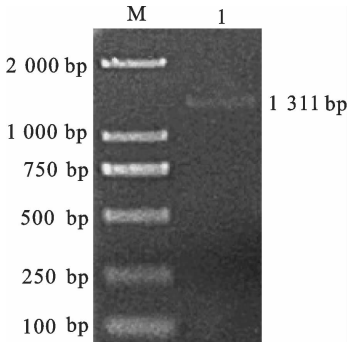
根据海岛棉转录组数据中的 HCT 序列设计引物, 将扩增产物克隆到 pMD19-T 载体上 (图 3) 测序, 结果表明: *GbHCT* 基因开放阅读框长度为 1 311 bp, 编码 436 个氨基酸, GenBank 登录号为 KT378286。预测的 *GbHCT* 蛋白质分子质量为 48.58 ku, 等电点为 6.03。 *GbHCT* 基因对应海岛棉基因组中的 Gbscaffold3453.1 序列, 含有 1

个长度为 91 bp 的内含子和 2 个长度分别为 410 bp 和 899 bp 的外显子。

2.3 *GbHCT* 基因的 q-PCR 分析

为揭示 *GbHCT* 基因在海岛棉中的表达特性, 以海岛棉‘新海 21’的根、茎、叶、苞叶、花、及花后 0、5、10、20、25、30、35 d 纤维的总 RNA 作为模板, 以 *UBQ7* 为内参基因, 进行不同组织和不同发育时期的表达分析, 试验结束后按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$

法进行数据分析。将叶和花后 20 d 设为对照组，表达量为 1。结果表明：*GbHCT* 基因在不同组织和不同发育时期均有表达，在不同组织中，苞叶和花中优势表达，根、茎和叶中表达量较低(图 4)。



M. DNA Marker; 1. PCR 产物 PCR products

图 3 RT-PCR 产物电泳图

Fig. 3 Electrophoresis of RT-PCR products

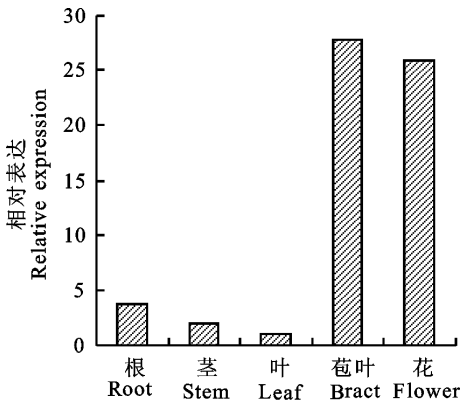
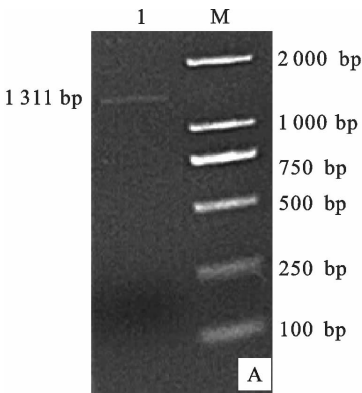


图 4 *GbHCT* 基因在海岛棉不同组织中的表达

Fig. 4 Expression of *GbHCT* in different tissues of *Gossypium barbadense* L.



在不同发育时期 5 d 和 25 d 出现 *GbHCT* 基因表达量最高峰，分别达到对照组的 69 倍和 36 倍，其次是 10 d 和 15 d。其他时期表达量微弱(图 5)。

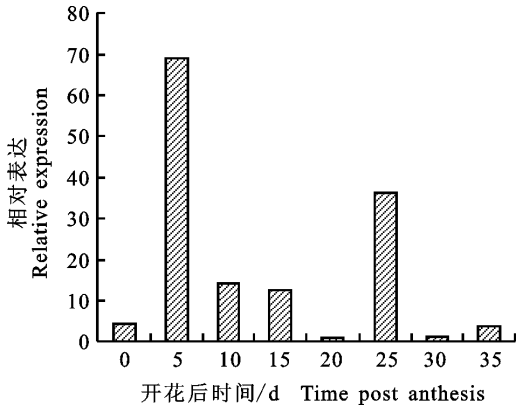
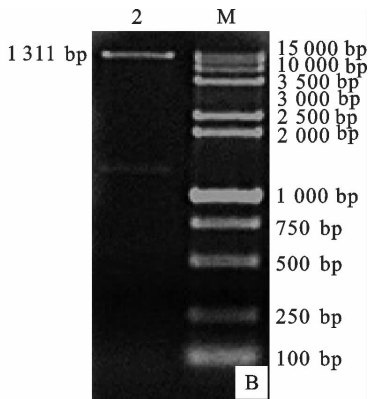


图 5 *GbHCT* 基因在海岛棉纤维不同发育时间的表达

Fig. 5 Expression of *GbHCT* different fiber development periods of *Gossypium barbadense* L.

2.4 *GbHCT* 基因植物表达载体的构建及农杆菌转化

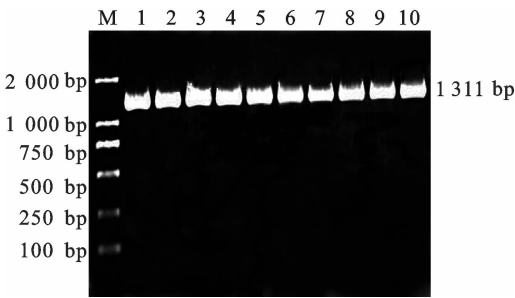
利用带酶切位点引物进行 PCR 扩增，获得目的片段(图 6-A)，利用 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切重组质粒，与相同酶切的植物表达载体连接转化。菌液 PCR、双酶切鉴定获得 1 311 bp 左右的片段，经上海美季测序证实目的基因已成功整合(图 6-B)。用测序正确的重组质粒 pEGAD-*GbHCT* 转化农杆菌 EHA105 菌株，进行菌液 PCR 鉴定，得到 1 311 bp 的目的条带，证明 pEGAD-*GbHCT* 重组质粒已经被成功转入农杆菌(图 7)。



M. DNA Marker; 1. 植物表达载体 PCR 产物 PCR products of plant expression vector; 2. 重组质粒的酶切鉴定 Restriction enzyme digestion of recombinant plasm

图 6 植物表达载体 pEGAD-*GbHCT* 的构建

Fig. 6 Construction of plant expression vector pEGAD-*GbHCT*



M, DNA marker;1~10. *GbHCT* 基因 *GbHCT* gene

图 7 转化农杆菌菌液 PCR 检测

Fig.7 Identification of transformed agrobacterial liquid with PCR

3 讨论

棉纤维发育的各个时期参与多个基因和转录因子,这些基因和转录因子在不同组织和不同发育时期的表达中有显著差异。明确这些基因在各个时期的表达特征,对改良纤维品质提供候选基因具有重要意义。有研究已证实,在成熟棉纤维细胞细胞壁形成过程中存在木质素的生物合成途径,而且在不同棉花亚种(海岛棉和陆地棉)及不同棉花类型(白色棉和彩色棉)木质素含量存在显著差异^[14]。曹双瑜等^[15]研究发育中棉纤维木质素的含量,得出单位棉铃木质素的含量随棉纤维发育的递增木质素含量越低,棉纤维断裂比强度越高。Fan 等^[16]研究表明,木质素沉积可能与减少细胞壁的增厚和影响细胞成熟过程中细胞壁停止生长有关。

本研究以海岛棉‘新海 21’的根、茎、叶、苞叶、花等组织和 8 个不同棉纤维发育时间即花后 0、5、10、15、20、25、30、35 d 为材料,通过实时荧光定量 PCR 检测 *GbHCT* 基因在海岛棉中的表达量。在材料选择上,本研究收集棉纤维发育的 4 个时期的纤维,为充分研究该基因在棉纤维发育各个时期的表达提供基础。利用实时荧光 PCR 检测这些组织和不同发育时期发现 *GbHCT* 基因在不同组织中苞叶和花中表达量最高,棉纤维发育时期 5 d 和 25 d 中具有很强的表达。棉花纤维次生壁的发育和苯丙烷代谢途径基因的表达量在时间上具有一致性,因此,*GbHCT* 基因在 25 d 具有较强的表达与预期的结果一致。肖向文等^[11]研究的 *GhHCT* 在棉纤维发育 16 d 出现最高峰与本文高表达出现的 25 d 都是细胞壁加厚期与本研究结果相似。而在 5 d 出现的高表达

量,初步推测 *GbHCT* 基因可能参与棉纤维起始。比较 *GbHCT* 基因在不同组织和不同棉纤维发育时期的表达可以发现,*GbHCT* 基因虽然在各个组织中均有表达,但 *GbHCT* 基因表达高峰期出现在棉纤维不同发育时期。表明 *GbHCT* 基因是一个与棉纤维发育相关的基因并参与棉纤维发育的伸长期和次生壁增后期。棉纤维的长度是由纤维伸长期决定,强度和细度由次生壁增后期决定,因此,可以初步断定 *GbHCT* 基因可能在棉纤维的长度、细度和强度等指标形成中有作用。

参考文献 Reference:

[1] 刘伟,李高,杨杞,等. 柠条锦鸡儿 *HCT* 基因克隆及序列分析[J]. 内蒙古农业大学学报,2014,35(1):77-82.
LIU W,LI G,YANG Q,*et al*. Cloning and sequence analysis of a hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transferase encoding gene from *Caragana korshinskii* kom[J]. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University*,2014,35(1):77-82 (in Chinese with English abstract).

[2] 聂明才,霍淑平,孔武. 木质素模型化合物的研究进展[J]. 林产化学与工业,2010,30(5):115-121.
NIE M C,HUO S H P,KONG W. Research progress of lignin model compounds[J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*,2010,30(5):115-121 (in Chinese with English abstract).

[3] 李宗梅. 小立碗藓羟基肉桂酰基转移酶基因功能及调控研究初探[D]. 武汉:华中农业大学,2013.
LI Z M. Identification and characterization of a novel hydroxycinnamoyl transferase from the *Physcomitrella patens* and the regulation of *P. patens* *HCT* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University,2013 (in Chinese with English abstract).

[4] 王雪霞,薛永常,赵文超. 木质素生物合成中 C3H/HCT 的研究进展[J]. 生命的化学,2008,28(5):650-653.
WANG X X,XUE Y CH,ZHAO W CH. Progresses C3H/HCT in lgnin biosynthesis[J]. *Chemistry of Life*,2008,28(5):650-653 (in Chinese with English abstract).

[5] HOFFMANN L,MAVRY S,MARTZ F,*et al*. Purification,cloning and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism[J]. *Journal of Biological Chemistry*,2003,278(1):95-103.

[6] 葛文雅,惠伟,闫洪波,等. 鸭梨 *PbHCT3* 基因的克隆及表达分析[J]. 西北植物学报,2012,32(5):0871-0875.
GE W Y,HUI W,YAN H B,*et al*. Cloning and expression analysis of *PbHCT3* gene in *Pyrus bretschneideri* Rehder. cv. ‘Yali’ [J]. *Acta Botanica Boreale-Occidentalia Sinica*,2012,32(5):871-875(in Chinese with English abstract).

[7] 王雪霞,曹方,薛永常. 杨树木质素合成酶 *hct* 基因的克隆及核苷酸序列分析[J]. 辽宁林业科技,2009,6(1):4-7.
WANG X X,CAO F,XUE Y CH. Cloning sequence analysis of lignin biosynthesis *hct* gene in poplar[J]. *Journal of Liaoning Forestry Science & Technology*,2009,6(1):4-7 (in Chinese with English abstract).

[8] HOFFMANN L,BESSEAU S,GEOFFROY P,*et al*. Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis[J]. *Plant Cell*,2004,16(6):1446-1465.

[9] 闫洪颖. 棉花纤维发育过程超微结构观察和次生壁木质素

- 含量的分析[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2009.
- YAN H Y. Itra-structural observation on fiber cell and lignin content analysis of secondary wall during cotton fiber development [D]. Urumqi: Xinjiang Agriculture University, 2009(in Chinese with English abstract).
- [10] 陈 蕾,崔百明,黎娟华,等. 棉花纤维品质分子改良研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2009,29(5):111-115.
- CHEN Q, CUI B M, LI J H. Progress on molecular improvement of cotton fiber qualities [J]. *China Biotechnology*, 2009, 29 (5) : 111-115 (in Chinese with English abstract).
- [11] 肖向文,朱奇朗,刘海峰,等. 棉花莽草酸/奎宁酸羟基肉桂酰转移酶基因(*GhHCT*)的克隆、生物信息学分析及表达特性[J]. 农业生物技术学报,2014,22(05):572-579.
- XIAO X W, ZHU Q L, LIU H F, *et al.* Cloning, bioinformatics analysis and expression characteristic of shikimate/ quinate hydroxycinnamoyl transferase gene (*GhHCT*) in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2014, 22 (5) : 572-579 (in Chinese with English abstract).
- [12] 刘 媛,黄真池,曾富华,等. 木质素单体生物合成途径研究进展[J]. 湛江师范学院学报,2007,28(6):87-99.
- LIU Y, HUANG ZH CH, ZENG F H, *et al.* Advances in study of the biosynthesis pathway of lignin monomer[J]. *Journal of Zhanjiang Normal College*, 2007, 28 (6) : 87-99((in Chinese with English abstract).
- [13] 汪晓东,陈 洋,于月华,等. 大豆 *GmNF-YA3* 基因结构及原核表达分析[J]. 作物杂志,2015(4):47-50.
- WANG X D, CHEN Y, YU Y H, *et al.* Structural and prokaryotic expression analysis of *GmNF-YA3* gene [J]. *Crops*, 2015(4):47-50(in Chinese with English abstract).
- [14] 胡文冉,范 玲,师维军,等. 一种确立棉花纤维中木质素含量和纤维品质相关关系的方法:中国,201010143263 [P]. 2010-08-11.
- HU W R, FAN L, SHI W J, *et al.* A method to establish the relationship between lignin content and fiber quality: China, 201010143263 [P]. 2010-08-11 (in Chinese).
- [15] 曹双瑜,胡文冉,范 玲. 发育中棉纤维硫酸木质素含量动态变化[J]. 新疆农业科学,2012,49(7):1184-1189.
- CAO SH Y, HU W R, FAN L. The dynamic changes of klason lignin contents during cotton fiber development[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2012, 49 (7) : 1184-1189 (in Chinese with English abstract).
- [16] FAN L, SHI W J, HU W R, *et al.* Molecular and biochemical evidence for phenylpropanoid synthesis and presence of wall-linked phenolics in cotton fibers[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2009, 51(7):626-637.

Expression Analysis of *GbHCT* Gene in *Gossypium barbadence* L.

Jiadela • Tuliuhan, NI Zhiyong, QIU Yingfeng, QU Yanying and CHEN Quanjia

(College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Key Laboratory of
Agricultural Biological Technology, Urumqi 830052, China)

Abstract In this study, the structure of gene *GbHCT* was analyzed by using an online bioinformatics software genomic database of *Gossypium barbadence* and GSDS 2. 0. The expression of *GbHCT* gene in different tissues and different fiber development stages of cotton was analyzed by real-time quantitative PCR. A length of 1 953 bp from genomic DNA of *GbHCT* was cloned by PCR. *GbHCT* contain open reading frames of 1 311 bp encoding proteins of 436 amino acid residues. The genomic DNA of *GbHCT* contained two exons and one intron which were located in the scaffold 3 453 of *Gossypium barbandense* L. Real-time quantitative PCR analysis revealed that *GbHCT* was expressed at higher level in bracts and flowers, and it was predominantly expressed in 5 d and 25 d during cotton fiber development, so we suggested that this gene may be involved in regulating fibre elongation and secondary wall thickening. Plant expression vector pEGAD-*GbHCT* was constructed and transferred into the *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 for further experiment.

Key words *Gosypium barbadense* L. ; *GbHCT*; Cotton fiber gene expression ; Plant expression vector

Received 2016-03-31 **Returned** 2016-05-23

Foundation item High-tech Research and Development Program of Xinjiang Uygur Autonomous Region (No. 20141103).

First author Jiadela • Tuliuhan, female, master student. Research area: quality of cotton fiber. E-mail: jaderatoleuhan@163. com

Corresponding author CHEN Quanjia, male, professor. Research area: cotton genetic breeding. E-mail: chqjia@126. com

(责任编辑:史亚歌 Responsible editor: SHI Yage)