



## 棉花纤维发育的分子机理及品质改良研究进展

上官小霞<sup>1,2</sup>, 王凌健<sup>2</sup>, 李燕娥<sup>1</sup>, 梁运生<sup>1</sup>

(1. 山西省农业科学院棉花研究所, 运城 044000;

2. 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032)

**摘要:**棉花纤维细胞的分化与发育是一个复杂有序的过程,在不同的发育时期均有大量的基因表达,参与纤维细胞发育的调控。转录因子和植物激素在棉纤维细胞分化起始过程中起重要的作用。纤维细胞壁结构、细胞骨架和糖类、脂类代谢相关的基因以及激素信号分子与纤维细胞的伸长密切相关。棉纤维次生壁合成时期主要是纤维素的合成及沉积过程,蔗糖合成酶和纤维素合成酶等基因在这一时期起关键的调节作用。在棉纤维发育分子生物学研究的基础上,利用基因工程改良棉花纤维品质也取得了一些研究进展。

**关键词:**棉花;纤维发育;分子机理;品质改良

**中图分类号:**S562.01 **文献标识码:**A

**文章编号:**1002-7807(2008)01-0062-08

### Progress in Studies on Molecular Mechanism of Cotton Fiber Development and Quality Improvement

SHANGGUAN Xiao-xia<sup>1,2</sup>, WANG Ling-jian<sup>2</sup>, LI Yan-e<sup>1</sup>, LIANG Yun-sheng<sup>1</sup>

(1. Cotton Research Institute, Shanxi Agricultural Academy, Yuncheng, Shanxi 044000, China;

2. Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

**Abstract:** Cotton fiber development usually consists of four overlapping stages: fiber initiation, cell elongation, secondary cell wall formation, and maturation. Fiber length and strength are both key traits of its quality, and mainly depends on two biological processes: fiber elongation, secondary cell wall formation, respectively. Transcription factors and plant hormone play very important roles in the stage of fiber differentiation and initiation. The R2R3 MYB transcription factor *GaMYB2* and WRKY transcription factors *GhTTG1*, *GhTTG3*, have been demonstrated playing significant roles in control cell fate determination. The genes encoding predicted proteins involved in auxin, brassinosteroid (BR), gibberellin acid (GA), abscisic acid (ABA) and ethylene signaling pathway are up-regulated in the period of fiber cell initiation. During fiber cell elongation period, many genes that represent three majors functional groups, including: cell wall structure and biogenesis, cytoskeleton, lipid and carbohydrate metabolism, show higher expression level. Plant hormones also play some regulatory roles in cotton fiber elongation. BR and ethylene can promote the fiber cell elongation *in vitro* culture. The initiation and rapid elongation of fiber requires the expression of sucrose synthase (*SuSy*), suppression of this gene represses fiber and seed development. Cellulose synthesis is a predominant event in fiber cells during in the secondary cell wall synthesis stage, cellulose synthase genes and *SuSy* are key regulatory and play significant role in this period. Based on the research of cotton fiber development at molecular level, improvement of fiber quality through genetic engineering has made some progress. For

收稿日期:2007-05-24 作者简介:上官小霞(1974-),女,助研,在读博士,sgxx@sibs.ac.cn

基金项目:863计划(2006AA10Z102)

instance, over-producing spinach sucrose phosphate synthase to enhance fiber quality; transforming the *acsA* and *acsB* genes from *Acetobacter xylinum*, which are involved in cellulose synthesis, into cotton to improve the cotton fiber strength, etc. Color is also a main trait of cotton fiber and some progress has been made in produce color fiber through genetic engineering.

**Key words:** cotton; fiber development; molecular mechanism; quality improvement

棉纤维细胞由胚珠外珠被单个细胞分化而来,是高等植物中伸长最快、合成纤维素最多的模式单细胞。其分化和发育过程可分为纤维细胞分化与突起、纤维细胞的迅速伸长、次生壁的合成和脱水成熟 4 个时期,是多种基因共同表达调控的复杂过程。其中纤维伸长和次生壁合成两个时期部分重叠,对纤维的发育与品质形成关系密切。纤维的起始与伸长直接影响到纤维的数量与长度,而次生壁加厚期纤维素的合成则影响纤维的强度与克隆值等性状。棉纤维的品质主要包括纤维长度、强度、伸长率、克隆值等性状,这些性状主要受本身基因型控制。因此对棉纤维发育的分子生物学及相关基因表达调控的研究,对于利用基因工程改良棉花纤维品质具有重要的意义。

### 1 棉纤维细胞分化起始期基因的表达调控

转录因子在棉纤维细胞分化及起始过程中起重要作用。Samuel Yang 等对棉纤维发育早期棉花胚珠 EST 分析,约 10% 左右的基因编码转录因子,涵盖了除 MADS 类以外的其它类转录因子,包括 MYB、WRKY、AP2/EREBP、C2H2 和 bHLH 等家族成员。现有棉花 EST 数据库中包含 242 个推断的 MYB 类转录因子,其中 21 个(约 8.7%)为棉纤维起始早期 EST 数据库特有;197 个独立的 EST 序列编码 WRKY 类转录因子,其中 32 个(约 16.0%)为纤维发育早期 EST 数据库特有<sup>[1]</sup>。Suo 等从棉纤维起始早期胚珠分离到了 55 个包含不同 MYB 保守域的 DNA 序列,预示着 MYB 类转录因子在棉纤维起始与分化过程中的关键作用<sup>[2]</sup>。

GL1 基因为拟南芥中控制表皮毛细胞分化与发育的一个关键因子,其功能缺失突变体表现为无毛的表型。棉花中 *GaMYB2* 基因与 *GL1* 基因同源,在棉纤维发育早期高表达。*GaMYB2* 基因可互补拟南芥 *gl1* 突变体无毛的表型,并且可以诱导种子产生异位的表皮毛,表明 *GaMYB2* 与 *GL1* 在控制表皮毛起始过程中采用相似的调控机制,在棉纤维细胞分化与起始期起重要的作用<sup>[3]</sup>。*GhMYB109* 也编码一个 R2R3 类 MYB 转

录因子,与 *GL1* 蛋白有 51.2% 的同源性<sup>[2]</sup>,*GhMYB109* 在棉花开花当天转录本较低,在纤维快速伸长期高表达,*GL1::GhMYB109* 只能部分互补 *gl1* 突变体表型,说明 *GhMYB109* 不太可能参与纤维细胞发育早期的分化,而是与细胞伸长有关<sup>[3]</sup>。*TTG1* 是控制拟南芥表皮毛分化的另一个关键基因,编码一个含四个 WD40 重复的蛋白。*ttg1* 突变体的叶片和茎几乎没有表皮毛,只是在莲座叶和茎生叶片的边沿有少数表皮毛。棉花中与 *TTG1* 同源的基因 *GhTTG1*、*GhTTG3* 可以互补拟南芥 *ttg1* 突变体的表型,表明这类转录因子同样参与了棉纤维细胞分化与起始的调控<sup>[4]</sup>。

许多研究证明 *GL1-GL3-TTG1* 通过形成一个 MYB-bHLH-WD40 蛋白复合体来控制拟南芥表皮毛的起始,而后期生长由 HD-ZIP 蛋白 *GL2* 控制<sup>[5]</sup>。棉花中已经分离到了同源的 MYB 类和 WD40 类转录因子,尚未见棉纤维细胞起始与发育过程中 bHLH 类转录因子的文献报道,是否棉纤维细胞的起始也受到相似的 MYB-bHLH-WD40 蛋白复合体的调控还有待证实。但可推测在纤维细胞的起始分化过程中有与拟南芥 *GL3* 或 *EGL3* 同源的 bHLH 类蛋白的参与,*GaMYB2* 蛋白中包含着与 bHLH 蛋白相互作用的保守结构域,推测 *GaMYB2* 是通过与这类 bHLH 蛋白结合共同决定棉纤维细胞的命运<sup>[5]</sup>。*GL2* 基因位于 *GL1-GL3-TTG1* 复合体的下游,参与拟南芥表皮毛发育的调控。在棉花的 HOX 类蛋白中,*GhHOX1* (AF530913) 和 *GhHOX2* (AF530914) 与 *GL2* 蛋白分别有 66% 和 34% 的同源。在本实验室的陆地棉 EST 文库中找到一个 *GL2* 类蛋白,命名为 *GhHOX3*,它编码一个含 713 个氨基酸的 HOX 蛋白,与 *GL2* 蛋白有 37% 的同源,在棉纤维伸长期高表达。本实验室正在通过转基因棉花来验证这 3 个 HOX 基因在棉纤维发育过程中的作用。*GhMYB25* 在开花后 0~2 d 胚珠中高表达,以后表达量下降,在无纤维的突变体当天胚珠中表达量较低,表达位置和时间与纤维细胞起始的位置和时间一致,表明 *GhMYB25* 与纤维的起始有密切的关系<sup>[6]</sup>。烟草中

过量表达 *GhMYB25*, 导致叶片长茎表皮毛分叉数量增加, 而对叶片短毛及其它类型的表皮细胞无影响, 表明 *GhMYB25* 具有使烟草长茎表皮毛主杆细胞二次分化形成表皮毛的功能。 *GhMYB25* 与金鱼草中的 *MIXTA* 和矮牵牛中 *PhMYB1* 及拟南芥 *AtMYB106* 高度同源, 而与 *GL1* 及 *GaMYB2* 亲缘关系较远, 认为 *GhMYB25* 参与纤维细胞起始的调控与 MYB-bHLH-WD40 蛋白复合体调控模式不同<sup>[6]</sup>。

调控棉纤维细胞分化起始的另一类关键因子为植物激素信号相关的因子。棉纤维起始早期 EST 数据库中包含了 230 个与生长素 (Auxin)、油菜素内酯 (Brassinosteroid, BR)、赤霉素 (Gibberellin acid, GA)、乙烯 (Ethylene) 及脱落酸 (abscisic acid, ABA) 等信号相关的基因<sup>[11]</sup>。 *BES1* 为 BR 信号传导下游的因子, 过量表达 *BES1* 基因可促进拟南芥茎的伸长, 棉花中分离到了 2 个与 *BES1* 同源的基因, 只在棉纤维起始期表达, 预示着它们在棉纤维分化过程中的作用。一些与 GA 合成及信号传导相关的因子也被分离鉴定, 如棉花中与 *POTH1* 和 *GA2OX* 同源的基因只存在于棉纤维起始期的 EST 数据库中, 而在伸长期的数据库中未包含该类基因的 EST 序列。一些与生长素信号相关的因子如 *ARF1* (*TC76794*)、*ARF8* (*DT565265*) 和 *ARF12* (*TC64087*) 以及乙烯信号应答因子 *ERF1* (*TC66418*) 等, 同样在棉纤维起始期高表达。值得关注的是这些与植物激素合成或信号传导相关的因子表达较一些 MYB 类转录因子早, 表明激素信号可以加强转录因子对纤维细胞分化的调控<sup>[11]</sup>。植物激素在棉纤维细胞分化及发育过程中的作用早在 20 世纪 70 年代就有报道。生长素和 GA 对纤维细胞的发育是必需的, 而细胞分裂素和脱落酸对纤维的发育起抑制作用。BR 的抑制剂 Brz 处理过的花蕾可导致纤维细胞分化的完全终止, 说明 BR 对纤维起始和分化是必需的<sup>[7]</sup>。

在形态上, 棉纤维的起始阶段伴随着胚珠表皮细胞的突出和膨胀, 而蔗糖合成酶基因 (*SuSy*) 在这一过程中起重要调节作用。原位杂交表明, 在开花当天突起的胚珠表皮细胞中可以检测到 *SuSy* mRNA 信号, 而在没有分化的表皮细胞及胚珠内表皮没有检测到 *SuSy* mRNA 的任何信号。 *SuSy* 基因在开花当天高表达, 转反义 *SuSy* 基因棉花开花当天胚珠表皮细胞中 *SuSy* 表达量下降, 纤维起始受到影响<sup>[8]</sup>。

与拟南芥表皮毛分化起始相似, 纤维细胞的分化起始同样涉及 DNA 的核内复制, 一个与细胞周期有关的基因 *CyclinD* 在棉纤维起始期高表达, 认为其参与了纤维细胞启动分化时的 DNA 核内复制<sup>[6]</sup>。

## 2 棉纤维伸长期基因的表达调控

棉纤维表皮细胞突起后, 即进入快速伸长期, 棉纤维的伸长可持续到花后 20~25 d。棉纤维细胞的伸长是一个复杂的生理过程, 涉及细胞壁的松弛, 液泡膨压的反作用力, 膜脂、细胞壁成分和相关蛋白的生物合成及运输过程, 受到许多基因的表达调控。

Li 等<sup>[9]</sup> 通过 cDNA 微阵列分析比较了陆地棉徐州 142 纤维与无绒无絮突变体胚珠的基因表达情况, 获得了一批棉纤维发育高表达的基因, 如 *GhSAHH*、*GhRDL1*、*GhWBC1* 等。 *GhRDL1* 基因与拟南芥中的 *AtRD22* 高度同源, 在棉纤维伸长早期高表达。拟南芥中 *RDL1* 启动子呈现出表皮毛特异表达的特性, 可以用于进行棉花基因工程改良<sup>[9]</sup>。 Arpat 等<sup>[10]</sup> 运用亚洲棉 (*Gossypium arboreum*) 花后 7~10 d 的纤维 cDNA 文库测序所得 46603 条 ESTs 序列, 设计了包括 14000 个单基因的寡聚核苷酸芯片, 功能分析表明细胞壁结构、细胞骨架、糖类及脂类代谢相关的基因在纤维细胞快速伸长期发挥了重要的作用。

在纤维伸长阶段, 初生壁的合成是一个非常重要的过程。棉纤维细胞的初生壁具有典型的双子叶植物细胞壁的组成成分, 主要包括纤维素、木葡聚糖、木聚糖、果胶多糖和蛋白质等成分, 其中的非纤维素多糖构成细胞初生壁的主要成分。高尔基体是非纤维素多糖合成的主要场所。非纤维素多糖的合成酶主要包括合成不同核苷糖的转换酶和合成非纤维素多糖的糖基转移酶<sup>[11]</sup>。 Zhao 等<sup>[12]</sup> 从陆地棉中克隆到一个编码可逆性糖基化多肽的基因 *GhRGP1*, 在棉纤维中优势表达, 推测该基因可能参与细胞壁非纤维素类的多糖合成。纤维发育过程中细胞壁的松弛与纤维细胞的伸长密切相关, 与细胞壁松弛相关的延伸蛋白 (Expansion) 家族成员在棉纤维细胞迅速伸长期高表达, 其转录水平随着纤维细胞的伸长速率减慢而降低。Expansion 蛋白能够打断纤维素微丝间的氢键, 从而使细胞壁疏松延展。棉纤维伸长期 EST 数据库分析, 4 个编码细胞膨胀素的基因在纤维细胞迅速伸长阶段表达水平较高, 在进入次

生壁合成期后表达量迅速下降<sup>[13]</sup>,暗示了它们主要在棉纤维细胞伸长时期发挥功能。1,4- $\beta$ -内葡聚糖酶在棉纤维伸长期高表达,在纤维细胞伸长停止时表达量明显降低,1,4- $\beta$ -内葡聚糖酶通过断裂纤维素-木葡聚糖的内-1,4- $\beta$ 键而调节纤维素-木葡聚糖网络,引起细胞壁的松弛与自溶,从而促使纤维细胞的伸长<sup>[14]</sup>。

脂类代谢基因在棉纤维迅速伸长中也发挥了重要的作用。两个编码脂转移蛋白的基因 *LTP3* 和 *LTP6*,均在纤维快速伸长期优势表达。对烟草中脂类运输蛋白基因的研究表明,脂类运输蛋白具有疏松细胞壁的功能。抑制拟南芥酰基辅酶 A 还原酶基因的表达可以影响细胞的生长,表明长链脂肪酸合成代谢途径是细胞伸长必需的。参与脂类代谢的基因 *GhCER6* 在棉纤维细胞伸长期表达量较高,酵母菌株 *Saccharomyces cerevisiae elo3* 不能合成 26-C 脂肪酸,生长缓慢,该菌株中表达棉花 *GhCER6* 基因,可以弥补这一缺陷<sup>[15]</sup>。*GhKCR1* 和 *GhKCR2* 编码脂肪酸延伸所需要的 3-ketoacyl-CoA 还原酶,在棉纤维伸长期高表达。酵母单倍体 ybr159w  $\Delta$  突变体中 3-ketoacyl-CoA 还原酶活性较低,生长缓慢,该突变体中表达任意一个 *GhKCR* 基因,皆可使该突变体细胞生长速率恢复正常<sup>[16]</sup>。Gou 等<sup>[13]</sup> 的研究也表明,一些与脂肪酸合成及还原有关的基因在棉纤维伸长期表达量较高,到次生壁合成期开始表达量逐渐降低,代谢谱分析结果与基因表达结果一致,纤维伸长期细胞中的脂肪酸含量明显高于次生壁合成时期的含量。

细胞骨架是细胞的内部支撑,对细胞的形态建成有重要的影响。在植物细胞中主要包括微丝和微管。Profilin 是微丝骨架的超分子结构和功能的关键调节因子之一。棉花中 *GhPFN1* 基因在纤维细胞的快速延伸阶段表达量最高,裂殖酵母细胞中过量表达该基因导致细胞长度和形态发生显著变化,暗示 *GhPFN1* 基因可能在纤维细胞的极性延伸中具有功能<sup>[17]</sup>。通过 RNA 干扰,降低棉花纤维细胞中肌动蛋白基因 *GhACT1* 的表达,可使棉纤维中肌动蛋白减少,细胞骨架组装受影响,从而影响纤维细胞的伸长<sup>[18]</sup>。微管蛋白基因 *GhTUB1* 对棉纤维细胞的伸长也起了重要的作用<sup>[19]</sup>。郭媛等<sup>[20]</sup> 得到 GHCFE cDNA 序列,分析表明其在纤维伸长期表达量最高,可能与纤维细胞伸长有关,但与细胞的极性生长无关。拟南芥中的 Rac/Rop GTPase 通过细胞骨架的组装调

控根毛和花粉管的生长,棉花中的 *GhRac1* 基因与拟南芥中的 Rac/Rop 基因的第 IV 亚家族有很高的同源性,在棉纤维伸长期高表达,推断 *GhRac1* 基因同样参与纤维细胞伸长的调节<sup>[21]</sup>。

传统的观念认为纤维细胞的伸长是膨压驱动的结果,且苹果酸和  $K^+$  是膨压的主要来源。Ruan 等的研究结果补充和完善了传统认识,认为在不同发育阶段控制纤维伸长的因素是不同的,在开花后 0~9 d 纤维细胞的伸长主要靠细胞壁的松弛性,在此期间,与细胞壁松弛相关的基因(如伸展蛋白等)表达量增高,胞间连丝开放,蔗糖和  $K^+$  被大量运输到胞内。开花 10 d 后胞间连丝关闭,渗透压和膨压升高,成为驱动纤维快速伸长的动力。开花 16 d 后胞间连丝再开放,膨压丧失,同时由于纤维素开始大量合成并积累,细胞壁失去了弹性,最终结束了纤维的伸长<sup>[22]</sup>。蔗糖合成酶在维持纤维细胞渗透压方面起着重要作用,比较短纤维与正常纤维,突变体中蔗糖合成酶在纤维起始伸长后表达延迟,发育过程中胞间连丝开关的时间调控受到了影响,不能正常关闭胞间连丝,造成突变体中纤维伸长缓慢<sup>[23]</sup>。正常胚珠中,反义抑制蔗糖合成酶基因可以彻底破坏纤维细胞的伸长<sup>[8]</sup>。在纤维细胞迅速伸长期,很多与渗透压调节有关的基因已被报道,质膜质子腺苷三磷酸酶、液泡腺苷三磷酸酶、磷酸烯醇式丙酮羧化酶和水孔蛋白等基因在棉花开花后 5~15 d 表达量明显增高,随着棉纤维进入次生壁合成阶段而降低。这些结果表明渗透压调节在纤维细胞伸长过程中发挥了重要的作用。

激素信号相关基因在纤维细胞伸长过程中同样起重要的作用。低浓度的 BR 可以促进纤维细胞的伸长,而 BR 的抑制剂 Brz 则抑制纤维细胞的发育<sup>[7]</sup>。*BIN2* 基因在 BR 信号途径中起负调控作用,拟南芥中过量表达 *GhBIN2* 基因,植株表现出生长缓慢的表型<sup>[24]</sup>。*BRI1* 为 BR 信号传导的一个受体,*BRI1* 基因突变体植株矮小,对 BR 的敏感性降低。在拟南芥中表达棉花 *GhBRI1* 基因,可恢复 *BRI1* 基因突变体的表型。棉花中 *GhBRI1* 基因主要在下胚轴和纤维伸长期高表达,说明 BR 在促进纤维细胞伸长过程中起作用<sup>[25]</sup>。乙烯在棉纤维细胞发育过程中也发挥了重要作用。体外培养实验表明,外源的乙烯促进纤维细胞的伸长,而乙烯合成的抑制剂 AVG 则会抑制纤维细胞的伸长<sup>[26]</sup>。无长绒突变体(Ligon-lintless, li1)是一种显性突变体,其表型主

要为棉花种子表面无长绒,茎秆扭曲,叶片卷曲,与拟南芥生长素极性运输突变体表型相似。在棉纤维阶段差异表达的基因中,有4个生长素响应家族的基因在棉纤维快速伸长期高表达,与生长素信号反应有关的一个 *ARF* 基因和 Basic HLH 转录因子也出现类似的表达特征<sup>[13]</sup>。棉花体外胚珠培养同样证明生长素可以促进离体培养的棉花纤维伸长。

### 3 棉纤维细胞壁增厚期基因的表达调控

棉纤维次生壁增厚期主要是纤维素的合成及沉积过程。成熟棉纤维中纤维素含量约占其干重的90%~95%,其余则为蜡质、脂肪、果胶等。纤维中的蜡质、脂肪在纺纱过程中可起润滑作用。次生壁增厚期纤维素的沉积量决定细胞壁的厚度,而原纤维的排列方式决定纤维素的结晶度,两者构成了纤维强度的结构基础。

棉纤维发育的一个重要特点是纤维伸长期与次生壁增厚期存在着相互重叠的区域(花后16~20 d)。Yang 等研究认为,内外源激素的平衡关系决定着纤维细胞的伸长和次生壁增厚。纤维细胞内源 ABA 含量的第一次高峰出现于花后16 d,而花后18 d 纤维素含量开始直线增长。因此认为内源 ABA 含量的跃升是次生壁增厚的起始信号<sup>[27]</sup>。周桂生等<sup>[28]</sup>对高品质陆地棉纤维品质形成特点研究同样表明,与对照相比,高品质的陆地棉开花后17 d 内源 ABA 含量较高,有利于实现以纤维伸长为主的生长向以次生壁加厚为主的生长的转变,花后24 d 内源 ABA/IAA 较高,利于次生壁的增厚。

纤维素生物合成的前体物质是二磷酸尿苷葡萄糖(UDPG),其主要来源是由 UDPG 焦磷酸化酶和蔗糖合成酶催化产生。棉纤维中,至少50%以上的蔗糖合成酶被紧密地结合在细胞膜上。在棉纤维次生壁合成期,蔗糖合成酶与纤维素沉积的螺旋方向平行,与纤维素合成酶复合体关系密切,纤维素合成酶仅能利用从蔗糖合成酶直接转移来的 UDPG,而胼胝质酶则更能直接利用自由态的 UDPG 合成胼胝质。Delmer 建立的棉纤维次生壁生物合成模型简要概括了从蔗糖到纤维素的生物合成过程:膜上的 SuSy(M-SuSy)分解蔗糖产生 UDP-Glc 和果糖,UDP-Glc 直接进入纤维素合成酶的催化亚基,将葡萄糖转移到生长的葡聚糖链上,形成葡聚糖多链即微纤丝,UDP 又被 M-SuSy 循环利用,果糖则通过一系列的酶促反

应最终再形成蔗糖进入循环反应<sup>[29]</sup>。虽然目前对纤维素合成中糖链的起始、延伸和终止仍没有较全面的解释,但在棉花纤维中合成的脂质谷甾醇- $\beta$ -葡糖苷作为葡聚糖链的初始引物,可引发葡聚糖的合成。

纤维素合成酶复合体促进纤维素的合成,棉花中的纤维素合成酶 *GhCesA-1* 和 *GhCesA-2* 基因,与细菌纤维素合成酶催化亚基之间的同源性达50%~60%,在次生壁增厚时期高表达,其功能可能是编码纤维素合酶的催化亚基<sup>[30]</sup>。*GhCesA1* 同样呈现出棉纤维次生壁加厚期高表达的特性。纤维素酶通过 N 端的锌结合结构域相互作用形成莲状六聚复合体行使催化功能,*GhCesA-1* 和 *GhCesA-2* 的 N 末端存在 Zn 结合蛋白的两个基序,它们在氧化条件下通过分子间的二硫键使纤维素酶分子之间发生聚集,而在还原状态下纤维素酶分子之间发生分离,被认为在纤维素合成莲状六聚复合体的组装中具有重要作用<sup>[30]</sup>。一个莲状的六聚体可产生36个 $\beta$ -葡聚糖链状分子,通过氢键相连聚合成直径为5~7 nm 的微纤丝,微纤丝聚合成束,以螺旋方式沉积,有左旋也有右旋,反复改变螺旋方向,导致成熟纤维脱水时胞壁不均匀收缩而使纤维发生扭曲<sup>[31]</sup>。

在棉纤维次生壁开始增厚时,1,3- $\beta$ -内葡聚糖酶基因的表达量迅速增加,说明棉纤维次生壁大量沉积纤维素需要1,3- $\beta$ -内葡聚糖酶具有较高活性<sup>[14]</sup>。张文静等对3类棉纤维比强度差异明显的品种在棉纤维次生壁增厚发育期的生理特性及基因表达差异分析表明,高纤维比强度的品种棉纤维中可溶性糖转化多,蔗糖合成酶和1,3- $\beta$ -内葡聚糖酶活性增强快,峰值高。1,3- $\beta$ -内葡聚糖含量剧增,可作为棉纤维进入次生壁加厚发育阶段的一个重要特征<sup>[32]</sup>。*H6* 基因在棉纤维中优势表达,其蛋白出现在纤维素合成的活跃期,暗示 *H6* 蛋白的功能与次生壁合成有关,该基因可能编码富含脯氨酸的次生壁结构蛋白。*GhPRP1* 基因在棉纤维及根中表达,与 *H6* 相似,编码富含脯氨酸的细胞壁蛋白<sup>[33]</sup>。*GhRLK1* 基因在纤维中特异表达并受发育调控,其表达峰值刚好处于次生壁的增厚期,可能对棉纤维次生壁的增厚起重要作用<sup>[34]</sup>。

棉纤维次生壁增厚期结束后,即进入脱水成熟期。迄今,对棉纤维细胞进入程序性死亡的分子生理机制知之甚少。已克隆的 *FbL2A* 基因在棉纤维发育过程中优势表达,该基因编码的亲水蛋白被推

测认为在纤维脱水成熟时可保护细胞结构。

#### 4 基因工程改良棉花纤维品质研究进展

植物激素在棉纤维细胞分化发育过程中起了重要作用。考虑到生长素对棉纤维细胞分化与发育的调节作用,John 将与生长素合成相关的基因 *iaaM* 和 *iaaH* 导入常规棉花中,虽然转基因棉纤维中 IAA 的含量显著地增加,然而纤维长度、细度和强度与对照相比没有显著差异。同样,转异戊烯基转移酶基因(*ipt*)棉花中,虽然提高了细胞分裂素水平,但棉纤维品质也未改变<sup>[35]</sup>。这些结果表明,不同激素间的平衡共同调控纤维细胞的分化与发育,单一激素水平的改变并不一定能引起纤维品质的同步提高。

纤维强度是衡量棉纤维品质的重要指标,棉花纤维强度主要取决于纤维次生壁形成过程中纤维素的合成及沉积过程。纤维素合成酶是调控纤维素合成的功能酶,其在棉纤维体内的表达直接影响到纤维素的合成功能,进而影响棉纤维的强度。一种革兰氏阴性细菌——木醋菌属(*Acetobacter xylinum*)的细胞可以形成纤维状物质。不同木醋菌属菌株中与细菌纤维素合成相关的纤维素合成酶操纵子基因,包括 *acsA*, *acsB*, *acsC* 和 *acsD* 基因已经被分离<sup>[36]</sup>。Li 等<sup>[37]</sup>通过真空渗透和农杆菌介导相结合的方法,将来源于木醋菌属的 *acsA* 和 *acsB* 基因导入棕色棉品种 G007 中,转基因棉纤维细胞中纤维素含量增加,纤维长度和比强度较对照增加 15% 左右。

蔗糖合成酶催化的反应提供合成纤维素的前体物质 UDPG。而蔗糖磷酸合酶(SPS)为蔗糖合成的限速酶。SPS 主要功能是调节光合细胞和贮藏器官中蔗糖的合成。Haigler 等<sup>[38]</sup>将菠菜蔗糖磷酸合酶基因(SPS)转入陆地棉 Coker312 中,在夜间温度 15~19℃ 的低温胁迫下,转 SPS 基因的棉花叶片和棉纤维中 SPS 酶活性增高,与野生型纤维相比,转基因棉纤维次生细胞壁增厚,麦克隆值和成熟度增加,单束纤维强度增大,短纤维(小于 12.7 mm)比例降低。

PHB 聚酯是一种天然的可生物降解的热性塑料。PHB 的生物合成涉及 3 种酶:β-酮硫解酶、乙酰 CoA 还原酶和 PHB 合酶。棉纤维本身含有内源性的 β-酮硫解酶。John 等<sup>[39]</sup>将乙酰 CoA 还原酶基因(*phaB*)和 PHB 合酶基因(*phaC*)导入到陆地棉栽培种中,转基因棉纤维品质如强度、长度等虽然没明显的改良,但转基因棉

花的吸热性和导热性能明显增加。有文献报道将合成 PHB 的三种酶基因导入亚麻,转基因亚麻纤维强度和弹性均明显增加,暗示了 PHB 在改良棉纤维品质方面的应用前景。

利用动物基因来改良棉花纤维品质也取得了一定进展。与棉纤维相比,动物毛发和蚕丝在光泽、强度、长度、手感等方面具有明显的优势。将兔角蛋白基因和蚕丝芯蛋白基因导入常规的陆地棉品种中,部分转基因后代棉花纤维强度增加<sup>[40-41]</sup>。

常规栽培种植的天然棉花纤维色泽较单一,主要为白色,虽然也有棕色和绿色彩色棉,但产量较低、棉纤维性状较差、色素遗传欠稳定,需要进一步的改良。近年来利用基因工程改良棉花色泽方面的研究也备受关注。将与黑色素合成相关的基因 *TYRA* 和 *ORF438* 转入烟草中,转基因烟草表皮毛中可观察到黑色素的沉积,通过花粉管通道法将棉纤维特异表达启动子 LTP3 驱动的这 2 个基因导入四倍体白色棉品种,转基因棉花纤维可呈现褐色表型<sup>[42]</sup>。中国科学院遗传与发育生物学研究所克隆了靛蓝色素相关基因 *BCE* 和红色花色素合成酶基因 *DFR*,并将它们分别和棉花纤维特异表达启动子相串联,导入常规白色棉中,获得了靛蓝色和红色纤维的棉花。彩色棉纤维中的色素主要为类黄酮类化合物。棕色棉中,与类黄酮合成相关的 5 个主要基因:查尔酮异构酶(*CHI*)、黄烷酮 3-羟化酶(*F3H*)、二氢黄酮醇 4-还原酶(*DFR*)、花色素合成酶(*ANS*)花色素还原酶(*ANR*)被分离克隆,可用于对白色棉色彩基因工程改良。

#### 5 结语

棉纤维发育的分子生物学研究的主要进展是分离了一些棉纤维特异或高表达的基因。随着新技术和生物信息学的发展,以基因芯片为主要手段的表达谱分析在棉纤维发育研究中发挥了重要的作用。到目前为止,NCBI 的 EST 数据库中公布了棉花的约 23 万条 EST,主要分布在四倍体 AD<sub>1</sub> 基因组的陆地棉(*G. hirsutum*)、二倍体 A<sub>2</sub> 基因组的亚洲棉(*G. arboreum*)和二倍体 D<sub>5</sub> 基因组的雷蒙德棉(*G. raimondii*)。国际合作组将已有棉花的序列综合分析,共得到 51107 个独立的 EST,其中 33665 个是具有未翻译区的编码序列。丰富的序列信息加快了棉纤维发育的研究进展,许多在棉纤维和胚珠之间以及棉纤维发育各个阶

段存在差异表达的基因已经被分离鉴定,但是它们在棉纤维发育过程中发挥的功能还有待于进一步的分析。由于棉花遗传转化相对较难,许多基因的功能是通过模式植物拟南芥、烟草,或者在酵母中间接证明其与纤维细胞发育有关,迄今为止,只有蔗糖合成酶基因(*SuSy*)<sup>[8]</sup>和 *GhACT1*<sup>[18]</sup>基因在棉花中被证明与纤维细胞发育相关。利用转基因技术对纤维品质进行改良,虽然也取得了一些成就,但尚处于刚刚起步阶段。棉花功能基因组和分子育种研究的不断深入,有助于全面揭示棉纤维发育的复杂分子调控机制,并促进棉纤维品质遗传改良。

#### 参考文献:

- [1] SAMUEL YANG S, Cheung F, Lee J J, et al. Accumulation of genome-specific transcripts, transcription factors and phytohormonal regulators during early stages of fiber cell development in allotetraploid cotton [J]. *Plant J*, 2006, 47:761-775.
- [2] SUO Jin-feng, Liang Xiao-e, Pu Li, et al. Identification of GhMYB109 encoding a R2R3 MYB transcription factor that expressed specifically in fiber initials and elongating fibers of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1630:25-34.
- [3] WANG Shui, Wang Jia-wei, Yu Nan, et al. Control of plant trichome development by a cotton fiber MYB gene [J]. *Plant Cell*, 2004, 16:2323-2334.
- [4] HUMPHRIES J A, Walker A R, Timmis J N, et al. Two WD-repeat genes from cotton are functional homologues of the *Arabidopsis thaliana* TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1) gene [J]. *Plant Mol Biol*, 2005, 57:67-81.
- [5] SERNA L, Martin C. Trichomes; different regulatory networks lead to convergent structures [J]. *Trends Plant Sci*, 2006, 11:274-280.
- [6] WU Ying-ru, Machado A C, White R G, et al. Expression profiling identifies genes expressed early during lint fiber initiation in cotton [J]. *Plant cell physiology*, 2006, 47:107-127.
- [7] SUN Yan, Veerabomma S, Abdel-Mageed, H A, et al. Brassinosteroid regulates fiber development on cultured cotton ovules [J]. *Plant cell physiology*, 2005, 46:1384-1391.
- [8] RUAN Yong-ling, Llewellyn D J, Furbank R T. Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation, and seed development [J]. *Plant cell*, 2003, 15: 952-964.
- [9] LI Chun-hong, Zhu Yong-qing, Meng Yu-ling, et al. Isolation of genes preferentially expressed in cotton fibers by cDNA filter array and RT-PCR [J]. *Plant Sci*, 2002, 163: 1113-1120.
- [10] ARPAT A B, Waugh M, Sullivan J P, et al. Functional genomics of cell elongation in developing cotton fibers [J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 54:911-929.
- [11] 武耀廷,刘进元.棉纤维细胞发育过程中非纤维素多糖的生物合成[J]. *棉花学报*, 2004,16(3):189-193.
- [12] ZHAO Guang-rong, Liu Jin-yuan. Isolation of a cotton RGP gene; a homolog of reversibly glycosylated polypeptide highly expressed during fiber development [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1574:370-374.
- [13] GOU Jin-ying, Wang Ling-jian, Chen Shuang-ping, et al. Gene expression and metabolite profiles of cotton fiber during cell elongation and secondary cell wall synthesis [J]. *Cell Res*, 2007, 17:422-434.
- [14] SHIMIZU Y, Aotsuka S, Hasegawa O, et al. Changes in levels of mRNAs for cell wall-related enzymes in growing cotton fiber cell [J]. *Plant Cell Physiol*, 1997, 38, 375-378.
- [15] QIN Yong-mei, Pujol F M, Hu Chun-yang, et al. Genetic and biochemical studies in yeast reveal that the cotton fibre-specific *GhCER6* gene functions in fatty acid elongation [J]. *J Exp Bot*, 2007, 58: 473-481.
- [16] QIN Yong-mei, Pujol F M, Shi Yong-hui, et al. Cloning and functional characterization of two cDNAs encoding NADPH-dependent 3-ketoacyl-CoA reduced from developing cotton fibers [J]. *Cell Res*, 2005,15:465-473.
- [17] WANG Hai-yun, Yu Yi, Chen Zhi-ling, et al. Functional characterization of *Gossypium hirsutum* profilin 1 gene (*GhPFN1*) in tobacco suspension cells. Characterization of in vivo functions of a cotton profiling gene [J]. *Planta*,2005, 222:594-603.
- [18] LI Xue-bao, Fan Xiao-ping, Wang Xiu-lan, et al. The cotton *ACTIN1* gene is functionally expressed in fibers and participates in fiber elongation [J]. *Plant Cell*, 2005, 17:859-875.
- [19] LI Xue-bao, Cai Lin, Cheng Ning-hui, et al. Molecular characterization of the cotton *GhTUB1* gene that is preferentially expressed in fiber [J]. *Plant Physiol*, 2002, 130:666-674.
- [20] 郭 嫻,郭旺珍,张天真,一个新的棉纤维表达蛋白 cDNA 的克隆表达及功能初步分析[J]. *棉花学报*, 2006,(18)2:67-73.
- [21] KIM H J, Triplett B A. Characterization of *GhRacl* GTPase expressed in developing cotton (*Gossypium*

- hirsutum* L.) fibers [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1679: 214-221.
- [22] RUAN Yong-ling, Llewellyn D J, Furbank R T. The control of single-celled cotton fiber elongation by developmentally reversible gating of plasmodesmata and coordinated expression of sucrose and K<sup>+</sup> transporters and expansin [J]. *Plant cell*, 2001, 13:47-60.
- [23] RUAN Yong-ling, Llewellyn D J, Furbank R T, et al. The delayed initiation and slow elongation of fuzz-like short fibre cells in relation to altered patterns of sucrose synthase expression and plasmodesmata gating in a lintless mutant of cotton [J]. *J Exp Bot*, 2005, 56: 977-984.
- [24] SUN Yan, Allen R D. Functional analysis of the *BIN2* genes of cotton [J]. *Mol Genet Genomics*, 2005, 274:51-59.
- [25] SUN Yan, Fokar M, Asami T, et al. Characterization of the brassinosteroid insensitive 1 genes of cotton [J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 54:221-232.
- [26] SHI Yong-hui, Zhu Sheng-wei, Mao Xi-zeng, et al. Transcriptome profiling, molecular biological, and physiological studies reveal a major role for ethylene in cotton fiber cell elongation [J]. *Plant cell*, 2006, 18:651-664.
- [27] YANG You-ming, Xu Chu-nian, Wang Bao-min, et al. Effects of plant growth regulators on the secondary wall thickening of cotton fiber [J]. *Plant Growth Regul*, 2001, 35: 233-237.
- [28] 周桂牛, 封超年, 周青, 等. 高品质陆地棉纤维品质形成特点的研究 [J]. *棉花学报*, 2005, 17(6):343-347.
- [29] Delmer D P, Haigler C H. The regulation of metabolic flux to cellulose, a major sink for carbon in plants [J]. *Metab Eng*, 2002, 4: 22-28.
- [30] PEAR J R, Kawagoe Y, Schreckengost W F, et al. Higher plants contain homologs of the bacterial *celA* genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase [J]. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1996, 93: 12637-12642.
- [31] 卞海云, 周治国, 陈兵林, 等. 棉纤维加厚发育期间纤维素生物合成研究进展 [J]. *棉花学报*, 2004, 16(6): 374-378.
- [32] 张文静, 胡宏标, 陈兵林, 等. 棉纤维加厚发育生理特性的基因型差异及对纤维比强度的影响 [J]. *作物学报*, 2007, 33(4):531-538.
- [33] TAN H, Creech R G, Jenkins J N, et al. Cloning and expression analysis of two cotton (*Gossypium hirsutum* L.) genes encoding cell wall proline-rich proteins [J]. *DNA Seq*, 2001, 12:367-380.
- [34] LI Yuan-li, Sun Jie, Xia Gui-xian. Cloning and characterization of a gene for an LRR receptor-like protein kinase associated with cotton fiber development [J]. *Mol Genet Genomics*, 2005, 273:217-224.
- [35] JOHN M E. Genetic engineering strategies for cotton fiber modification [M]. *Cotton fiber: developmental biology, quality improvement, and textile processing*. New York: Food Products Press, 1999.
- [36] 秦永华, 乔志新, 刘进元. 转基因技术在棉花育种上的应用 [J]. *棉花学报*, 2007, 19(6):482-488.
- [37] LI Xiao, Wang Xue-de, Zhao Xiang-qian, et al. Improvement of cotton fiber quality by transforming the *acsA* and *acsB* genes into *Gossypium hirsutum* L. by means of vacuum infiltration [J]. *Plant Cell Rep*, 2004, 22:691-697.
- [38] HAIGLER C H, Singh B, Zhang De-shui, et al. Transgenic cotton over-producing spinach sucrose phosphate synthase showed enhanced leaf sucrose synthesis and improved fiber quality under controlled environmental conditions [J]. *Plant Mol Biol*, 2007, 63:815-832.
- [39] JOHN M E, Keller G. Metabolic pathway engineering in cotton: biosynthesis of polyhydroxybutyrate in fiber cell [J]. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1996, 93:12678-12773.
- [40] 上官小霞, 王凌健, 李燕娥, 等. 对转蚕丝芯蛋白轻链基因棉花的分析 [J]. *作物学报*, 2007, 33(5):697-702.
- [41] 张震林, 刘正奎, 周宝良, 等. 转兔角蛋白基因改良棉纤维品质研究 [J]. *棉花学报*, 2004, 16(2):72-76.
- [42] XU Xiu-ping, Wu Ming-gang, Zhao Qian, et al. Designing and transgenic expression of melanin gene in tobacco trichome and cotton fiber [J]. *Plant Biol*, 2007, 9:41-48. ●