

外源纤维素合酶基因对棉纤维品质的改良作用

张海平^{1,2}, 王学德^{1*}, 邵明彦¹, 袁淑娜¹, 李 晓¹

(1. 浙江大学农业与生物技术学院农学系, 杭州 310029; 2. 山西省农业科学院
农作物品种资源研究所, 太原 030031)

摘要:为改良棉花纤维品质, 将由 35S 启动子驱动的本醋杆菌纤维素合酶基因 *acsA* 和 *acsB*, 用子房注射法和花粉粒媒介法转化棕色棉 G007 和白色棉 X003, 并检测后代棉纤维品质。研究表明, 子房注射法的基因转化效率高于花粉粒媒介法。通过 PCR 和 southern blot 检测, 最终获得转基因植株共 11 株。根据农艺性状表现, 选出 4 个优良单株。对转基因当代及后代的检测结果表明, 棕色棉纤维长度、比强度、纤维素含量和衣分都显著增加, 而白色棉只有纤维比强度和纤维素含量显著增加。纤维长度和衣分没有变化。导入由 35S 启动子驱动的本醋杆菌纤维素合酶基因 *acsA* 和 *acsB*, 提高了转基因后代的棉纤维品质。

关键词:棉花; 纤维素合酶基因; 纤维品质改良; 基因转化

中图分类号: S562.035.3 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2008)02-0110-06

Study on Role of Foreign Cellulose Synthase Genes in Improvement of Cotton Fiber Quality

ZHANG Hai-ping^{1,2}, WANG Xue-de¹, SHAO Ming-yan¹, YUAN Shu-na¹, LI Xiao¹

(1. Department of Agronomy, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2. Institute of Crop Germplasm Resources of Shan xi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China)

Abstract: In order to improve cotton fiber quality, the foreign cellulose synthase genes (*acsA* and *acsB*) which were from *Acetobacter xylinum*, driven by CaMV35S promoter, were introduced into brown color cotton G007, and white color cotton X003, by two means of pollen tube-mediated transformation (ovary injection and pollen grain mediation). Ovary injection, compared to pollen grain mediation, resulted in higher transformation frequencies. Intergration of *acsA* and *acsB* genes was confirmed by PCR and southern blot, the result indicated that 11 plants possessed *acsA* and *acsB* genes. Four plants with better agronomic traits and fiber quality were selected from transformants. Analysis of transgenic plants and their progenies indicated that some of their fiber properties were improved. The length, strength, cellulose content and lint percent of brown color cotton fiber were increased significantly. However, for white color cotton, although the strength and cellulose content of fiber were increased significantly, the length and lint percent weren't changed. The fact suggested that induction and expression of *acsA* and *acsB* improved fiber quality of transgenic cotton plants.

Key words: Cotton (*Gossypium hirsutum* L.); Cellulose-synthase gene; Fiber quality improvement; Gene transformation

收稿日期: 2007-05-08 作者简介: 张海平(1978-), 女, 在读博士, 助理研究员. * 通讯作者, xdwang@zju.edu.cn

基金项目: 国家“863”计划项目(2004AA212100)、国家“973”项目(2004CB11730502(1))、国家自然科学基金(30170058)和浙江省重点项目(2005C22G2010011)

随着棉花纺织工业的发展和人民生活水平的提高,人们对棉花纤维品质提出了更高的要求。利用转基因技术,将外源基因导入棉花中表达,以提高棉花纤维品质,是近年来开创的棉花品质育种的新途径。美国 John 等人将从细菌 *Alcaligenes eutrophus* 中分离得到的可降解热塑的 2 个关键酶基因 *phaB* 和 *phaC* 导入棉花中,获得的转基因棉纤维比对照纤维的吸热率高 12%,导热率明显低于对照,从而使棉纤维保暖性明显好于对照^[1]。Amor 等人把蔗糖合酶基因导入棉花,不仅提高了棉花产量,而且显著改善了棉花的纤维品质^[2]。John 等人把从棉花中克隆出的过氧化物酶基因连接到棉纤维发育的专化启动子 E6 和 B8 后,导入棉花,转基因棉花的纤维强度显著改善^[3]。张震林等人将兔角蛋白基因转入棉花,转基因棉纤维比强度比对照增加^[4]。

棉花成熟纤维细胞的成份主要是纤维素,约占 90% 左右,是棉花品质的关键因子。一种名为木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*)的细菌也有合成纤维素的能力,其合成的细菌纤维素与植物纤维素相比,纤维素含量高,物理性质好,机械性能强,结晶度高,聚合度高,分子取向好^[5]。木醋杆菌纤维素的合成主要由纤维素合酶调控,该纤维素合酶操纵子包含四个基因(*acsA*、*acsB*、*acsC* 和 *acsD*);其中 *acsA* 基因和 *acsB* 基因是调控该菌纤维素合成的主要基因^[6]。为此,本研究从木醋杆菌中克隆获得 *acsA* 和 *acsB* 基因,采用花粉管通道的转基因技术转化棕色棉和白色棉,以研究外源纤维素合酶基因对棉纤维品质改良的作用,为培育优质棉花提供理论依据和新种质。

1 材料和方法

1.1 棉花品种

棕色棉 G007 和白色棉 X003 作为转基因的受体品种,种植于浙江大学实验农场,常规栽培管理。

1.2 基因表达载体

本研究所用的基因表达载体为双元质粒载体 pCAMBIA1301-acs(由北京大学朱玉贤教授惠赠)。包含 *acsA* 和 *acsB* 两个基因。质粒还带有 *gus* 报告基因和潮霉素抗性基因,基因的表达均由 CaMV35S 启动子驱动(如图 1)。

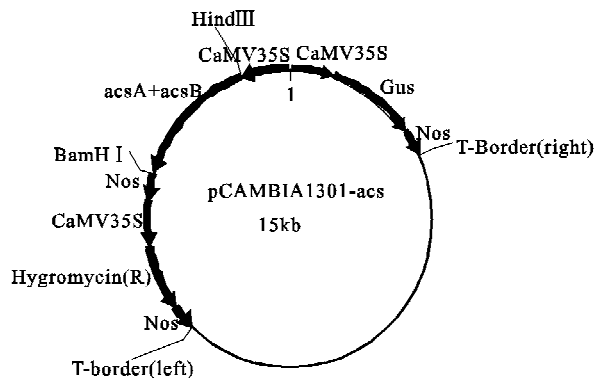


图 1 pCAMBIA1301-acs 质粒结构简图

Fig 1 Map of plasmid pCAMBIA1301-acs

1.3 基因转化

1.3.1 子房注射法。用无菌纯水将质粒 DNA 配成浓度约为 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,置 -20°C 冰箱中备用。本研究采用的是两步注射法。选择自花授粉后 20~24 h 左右、花冠呈粉红色的棉花花朵,将花柱、雄蕊和花冠一起剥离,仅剩裸露的幼铃。将供体 DNA 溶液用微量注射器针头从子房顶端沿纵轴向下插入约 0.5 cm 注射大半 DNA 溶液,然后抽出约一半的距离再注射剩余的 DNA 溶液,一般每铃注射 5~7 μL 。

1.3.2 花粉粒媒介法。将质粒 DNA 溶于含有 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸钠的溶液中,使质粒的终浓度为 $300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。选择发育正常的开花前一天的花蕾,去雄套袋隔离,同时采集花粉贮存于 4°C 。次日上午,打开隔离袋将 DNA 溶液涂在柱头上后,立即将花粉洒落于该柱头上,再套袋隔离。

1.4 潮霉素抗性检测

先设置潮霉素梯度浓度 (150 mg 、 300 mg 、 500 mg 、 700 mg 、 $900 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),涂抹非转基因对照植株的第 3 片真叶,用叶片出现干枯斑点的潮霉素浓度筛选转化体。用所选浓度的潮霉素溶液涂抹转化体的第 3 片真叶,弃掉出现干枯斑点的棉苗。

1.5 转化体的 GUS 组织化学检测

将经过潮霉素检测筛选出的棉株叶片或幼茎切段(制成徒手切片),放于 1.5 mL Eppendorf 管中,加入适量的 GUS 染色液,使组织完全浸泡于染色液中,并抽真空 (-80 pa , 15 min),使染色液充分渗入细胞, 37°C 保温过夜,染色后的组织于 FAA 脱色液中进行脱色,至阴性对照材料呈白色为止,然后观察或制成石蜡切片进行观察。呈现蓝色的叶、茎切断的植株为阳性反应植株。

1.6 转基因植株的 PCR 检测。用 CTAB 法提取 *GUS* 阳性植株和非转基因植株 DNA, 用于 PCR 扩增。*acsA*(P_1, P_2)、*acsB*(P_3, P_4) 引物序列由上海生工合成, 序列如下:

P_1 : 5'GCGGATCCGAACCGTGAAAATGGTTTCG 3';

P_2 : 5'GGTTGTTTCGTATCGTCAGAC 3';

P_3 : 5'GAACCGTGAAAATGGTTTCG 3';

P_4 : 5'CCCAAGCTTTCGTTTATGGGTCACGACTT 3'。

反应程序为: 95℃ 5 min; 然后 94℃ 30 s, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min, 共 30 个循环; 72℃ 10 min。

1.7 转基因植株的 PCR-Southern 杂交检测

经 PCR 检测后的阳性植株用于 PCR-southern 杂交。杂交方法详见《植物基因工程》^[7]。

1.8 纤维品质分析

用于纤维品质分析的棉铃在开花期挂牌标记, 成熟后收获皮棉。

T_0 代取样方法: 选取 4 个优势单株(T_0)的中部 3 个果枝靠近主枝的 2 个果节上的棉铃, 将皮棉混匀, 称重后备用。 T_1 代取样方法: 将 4 个转基因单株分别单株统收, 收回的种子种成株行, 然后对每一株行中的单株进行潮霉素鉴定、PCR 检

测和 PCR-southern 杂交。选取每个株行内的 southern 杂交阳性植株, 取中部 3 个果枝靠近主枝的棉铃, 将皮棉混匀, 取 15 g 备用。

将上述皮棉送农业部棉花品质监督检验测试中心进行品质测试。纤维素含量的测定采用 HNO_3 /乙醇法^[8-9]。

2 结果与分析

2.1 两种花粉管通道法转化的效果

表 1 可知, 在同样的环境条件下, 采用花粉粒媒介法转化的当代棉铃生长吐絮正常, 发生畸形铃率低, 仅有 4.4%, 且不孕籽率为 7.8%, 最终得到转基因植株 4 株, 转化率为 0.9%; 而子房注射法的当代棉铃大部分发生畸形, 畸形铃表现囊室减少, 只有 1~3 室, 有的成僵瓣, 僵瓣的棉子大部分为不孕子, 不孕籽率为 24.3%, 最终得到转化株 7 株, 转化率为 3.2%。而基因工程的目的是为了获得更多的转化后代, 即需要较高的转化率, 因此在以花粉管通道法介导的棉花基因工程中利用子房注射法更好。

表 1 两种不同基因转化方法效果的比较

Table 1 Comparison of two different transgenic methods

转化方法	试验总数/个	结铃数/个	结铃率/%	畸形铃数/个	畸形铃率/%	不孕籽率/%	转化率/%
子房注射法	942	214	22.7	237	25.2	24.3	3.2
花粉粒媒介法	934	404	43.3	41	4.4	7.8	0.9

2.2 转基因植株对潮霉素的抗性检测

用于筛选的潮霉素浓度确定。在对照棉苗的第 3 片真叶上涂抹新鲜配制的潮霉素梯度浓度溶液。7~10 d 后发现, 用 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的潮霉素溶液涂抹叶片后, 未发生明显的反应; $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 涂抹的叶片部分、全部出现了褐色的干枯斑点; $700 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $900 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 涂抹的叶片则出现了大范围的干枯坏死斑。因此, 我们选用 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的潮霉素浓度筛选转化苗。

转基因苗的潮霉素抗性检测。转化收获的棉花种子种于温室, 待 3 叶期时用潮霉素涂抹。7~10 d 后, 发现有相当一部分苗的幼叶上出现了褐色干枯斑点, 齐去这一部分棉苗, 留下无坏死斑的为抗性苗, 共 20 株, 移至田间让其生长发育以供进一步检测。

2.3 转基因苗的 *GUS* 表达

图 2 所示的用于 *GUS* 染色的叶、茎、胚珠和纤维均取自于同一转基因单株和对照非转基因单

株, 其中转基因单株的组织都出现不同程度的显色反应, 而对照植株的组织都未出现任何 *GUS* 显色反应。但不同组织的 *GUS* 显色深浅度却差异很大, 其中幼小胚珠蓝色最深, 未发育完全的纤维其次, 幼叶再次, 茎切片的显色程度最低, 即蓝色最浅。这种同一个体的不同组织 *GUS* 表达的强弱, 可能与细胞老化程度、代谢活性和染色底物的渗入等有关。对潮霉素抗性植株进行 *GUS* 检测, 得到 15 株染色阳性植株。

2.4 转基因植株的 PCR 检测

对所有 *GUS* 阳性植株进行 PCR 检测(如图 3), 以质粒 DNA 为阳性对照, 以非转基因植株为阴性对照, 检测到转基因植株 11 株。淘汰 4 株 *GUS* 假阳性植株。存在 *GUS* 假阳性的原因可能是有转基因嵌合体植株, 或植株生长过程中转基因片段丢失。

2.5 转基因植株的 PCR-Southern 杂交分析

选取上述转基因 PCR 阳性转化体, 以 *acsA*

(2. 2kb) 和 *acsB* (2. 45kb) 基因片段作探针, 对 PCR 产物进行 Southern 杂交。其中图 4 中所示的泳道 1 和 2 分别是两个转基因的转化体, 与图 5 中的泳道 3 和 4 对应。在图 4 中泳道 1 和 2 都

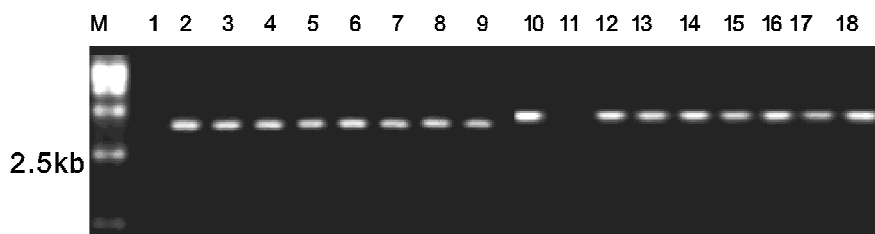
杂交出了与 *acsA* 基因(阳性对照)相同大小的清晰条带, 而阴性对照却没有。同样, 在图 5 中也杂交出了与 *acsB* 基因相同大小的条带。这说明该双价基因已被整合进相对应的转化体。



1 转基因植株叶片, 2 非转基因植株叶片, 3 转基因植株茎切片, 4 非转基因植株茎切片, 5 转基因植株胚珠
6 非转基因植株胚珠, 7 转基因植株纤维, 8 非转基因植株纤维

图 2 转基因苗不同部位的 GUS 表达

Fig. 2 Histochemical GUS expression for different tissues from a transformed cotton plant



M 为 marker; 1, 11 为阴性对照; 2, 10 为阳性对照;

3-9 为转基因植株的 *acsA* 检测; 12~18 为转基因植株的 *acsB* 检测

图 3 部分转 *acs(A+B)* 双价基因植株的 PCR 检测

Fig. 3 PCR analysis for *acs(A+B)* gene in some of putatively transgenic plants.



1-2 被检测的转化体; 3 阴性对照 4 阳性对照

图 4 以 *acsA* 基因片段为探针的部分转基因植株 PCR-Southern 杂交

Fig. 4 PCR-Southern blot hybridization of cotton genomic DNA, The fragments were hybridized with a [³²P]-labeled *acsA* gene probe.

1 阳性对照; 2 阴性对照, 3-4 为被检测的转化体

图 5 以 *acsB* 基因片段为探针的部分转基因植株 PCR-Southern 杂交

Fig. 5 PCR-Southern blot hybridization of cotton genomic DNA, The fragments were hybridized with a [³²P]-labeled *acsB* gene probe

2.6 转基因植株农艺性状的表现

由表 2 可知, 外源基因的导入, 与对照植株相比, 株高和生育期变化不大, 有 2 株出现育性变弱; 果枝数、果节数和有效铃数明显减少且变异幅度较大; 大部分植株纤维长度都有不同程度的增加, 只有 G19 纤维变短; 衣分含量则变化不规律, 增长率最高的为 G17 达到 29. 59%, 有的植株出现负增长, 最多达到负 22. 85%。由此可知, 纤维长度增长率高的单株其衣分含量的增长率不一定高。但同时也可以看出, 纤维长度呈负增长的其衣分含量也呈负增长。

2.7 转基因当代(T₀)及后代(T₁)纤维品质分析

根据表 2 中纤维品质和田间各方面农艺性状的指标综合评价该 11 个转基因单株, 选出 4 个优势单株(G14、G15、G17 和 X20), 测定其 T₀ 及 T₁ 代的纤维品质(表 3)。结果表明, 转基因棕色棉的 T₀ 和 T₁ 代的纤维长度、比强度、纤维素含量、衣分都有增加。纤维长度增加了 16. 15%, 达到极显著水平, 比强度、纤维素含量和衣分分别增加了 14. 89%、5. 26% 和 16. 97%, 达到显著水平; 而白色棉只有比强度和纤维素含量达到显著水平, 分别增加了 18. 95% 和 8. 42%, 纤维长度和衣分变化不显著。另外, 白色棉和棕色棉的麦克隆值都没有显著变化。

表 2 转基因当代植株农艺性状的表现

Table 2 Agronomic characteristics of transgenic plants growing in field

转基因植株	纤维颜色	株高/cm	果枝数/个	果节数/个	株铃数/个	生育期/d	育性	纤维长度增长率/%	衣分增长率/%
CK	棕	112	15	48	30	129	F	0	0
G1	棕	100	2	9	3	143	WF	5.69	-22.85
G2	棕	121	10	30	13	129	F	8.33	3.17
G3	棕	132	7	23	7	131	F	1.63	-22.60
G12	浅棕	110	8	17	7	136	F	3.66	-21.52
G14	浅棕	112	13	42	27	127	F	19.67	12.06
G15	棕	135	12	40	25	130	F	18.29	6.67
G17	浅棕	110	10	44	30	130	F	15.04	29.59
G18	浅棕	112	9	26	13	135	WF	10.16	12.54
G19	浅棕	115	11	28	15	131	F	-4.47	-14.92
CK	白	115	14	53	17	130	F	0	0
X4	白	120	12	40	17	129	F	2.97	0.45
X20	白	113	15	51	32	128	F	12.34	18.39

注：“F”和“WF”分别表示可育和弱育

表 3 转基因 T₀ 及 T₁ 代的纤维品质分析

Table 3 Fiber properties of the transgenic plants and the offspring plants

项目	纤维长度/mm	比强度/(cN·tex ⁻¹)	麦克隆值	纤维素含量/%	衣分/%
CK ₀	24.70	21.12	4.40	80.31	31.53
CK ₁	25.30	20.39	4.10	84.62	32.05
平均值(CK _B)	25.00	20.76	4.25	82.47	31.79
棕色棉 T ₀	28.94	22.87	3.60	85.66	35.01
T ₁	29.13	24.82	3.95	87.95	39.37
平均值(T _B)	29.04	23.85	3.78	86.81	37.19
T _B -CK _B	4.04**	3.09*	-0.47	4.34*	5.40*
CK ₀	29.83	24.29	4.65	85.25	37.49
CK ₁	27.84	22.26	4.30	81.35	38.50
平均值(CK _W)	28.84	23.28	4.48	83.30	38.00
白色棉 T ₀	31.75	27.44	4.10	90.07	41.27
T ₁	30.63	27.93	4.45	90.56	38.28
平均值(T _W)	31.19	27.69	4.28	90.31	39.78
T _W -CK _W	2.35	4.41*	-0.2	7.01*	1.78

注：* 和 ** 分别代表在 0.05 和 0.01 水平上的显著。CK₀ 是 T₀ 的对照；CK₁ 是 T₁ 的对照

3 讨论

纤维素是棉纤维的主要成分，其含量是衡量棉纤维品质的重要生化指标。棉花纤维素的合成受环境和遗传两个方面影响，环境的效应约为 1/3，遗传的效应约为 2/3。环境往往是难以控制，因此，培育优良品种是提高纤维素含量的重要途径。而纤维素含量的常规有性杂交的育种改良难度很大。因此，有必要用转基因手段来提高纤维素含量。本研究表明，通过转木醋杆菌纤维素

合酶基因，T₀ 及 T₁ 代白色棉和彩色棉的纤维素含量都得到显著提高。

纤维强度是棉纤维品质的另一个重要指标。成熟纤维的强度主要取决于棉纤维的超分子结构和纤维素含量及沉积动态变化。当纤维素含量少于 90% 时，纤维素含量与衣分、纤维强度成正相关^[10]。目前大部分棉花品种的纤维素含量已经接近或超过 90%，因此，我们只能通过改变纤维的超分子结构和纤维素沉积特性来提高纤维比强度。不难理解，将外源相关蛋白质或酶基因转化

于棉花中将有可能达到此目的。Daniell 报道,将编码 Val—Gly—Val—GLy 重复单元的蛋白聚体基因 *PBP_s* 转化到棉花中,使棉纤维细胞中能特别地表达出 *PBP_s* 蛋白。具有 *PBP_s* 蛋白的棉纤维强度和弹性均得到改善^[11]。张震林等人将蚕丝芯蛋白基因转入棉花,使棉花的纤维比强度增加^[12]。在本研究中,因木醋杆菌合成的纤维,纤维素具有含量高、机械性能好、抗张强度高的特性,将调控该纤维素合成的两个主要基因 *acsA* 和 *acsB* 构建双价载体,分别转化白色棉和彩色棉,提高了棉花的纤维品质,并从转化体后代中筛选出 4 个优良单株。经繁殖和纤维品质测定表明,棕色棉的纤维长度、比强度、纤维素含量和衣分都显著增加,白色棉比强度和纤维素含量有显著的增加。

由于棉花纤维品质与产量之间存在遗传负相关性,给传统育种技术同步改良纤维品质与产量带来较大困难。本研究采用转基因方法得到的转基因植株,虽然在一定程度上打破了这一负相关,使转基因 T_0 及 T_1 代的纤维品质得到改善,但离生产应用仍有一定差距。可以看出,转基因育种对于改良某一特异性状是十分有效的,但也有可能因外源基因的引入带来一些不良性状或特性,如本研究中的棉株育性变弱和衣分变低等。因此,转基因植株的获得,通常是特异种质的创造,仍需要与传统育种技术结合进一步选育和提高,例如与其它品种进行杂交,再从后代中选育成新品种。目前,我们按照这个思路对获得的转基因棉株进行纯合选育和进一步的改良。

参考文献:

- [1] JOHN M E, Keller G. Metabolic pathway engineering in cotton; biosynthesis of polyhydroxybutyrate in fiber cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(23): 12768-12773.
- [2] AMOR Y, Haigler C H, Johnson S. A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(20): 9353-9357.
- [3] JOHN M E. Genetic engineering strategies for cotton fiber modification In[M]. // Basra A S. Cotton fibers: developmental biology, quality improvement and textile processing. New York: Food Products Press, 1999. 271-292.
- [4] 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.
- [5] ROSS P, Mayer R, Benzinan M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria[J]. Microbiological Reviews, 1991, 55(1): 35-58.
- [6] SAXENA I M, Kudlica K, Brown R M. Characterization of genes in the cellulose_synthetizing operon (*acs* operon) of *Acetobacter xylinum*: implications for cellulose crystallization [J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(18): 5735-5752.
- [7] 王关林,方宏筠.植物基因工程[M].北京:科学出版社,2004. 848-854.
- [8] 蒋淑丽,王学德.棉花纤维突变体胚珠发育过程中主要生化物质的积累特征[J].浙江大学学报:农业与生命科学版,2002,28(1):16-21.
- [9] 于晓玲,崔百明,卞海滨,等.基因枪转化法在棉纤维细胞中瞬时表达外源基因的研究[J].棉花学报,2007,19(6):419-423.
- [10] 赵瑞海,韩春丽,张旺锋.棉纤维超分子结构及与纤维品质的关系[J].棉花学报,2005,17(2):112-116.
- [11] DANIELL H. Genetic engineering of cotton to increase fiber strength, water absorption and dye binding [A]. Proceedings of Beltwide Cotton Conferences[C]. USA: National Cotton Council of America, 1998. 595-598.
- [12] 张震林,陈松,刘正奎.转蚕丝芯蛋白基因获得高强纤维棉花[J].江西农业学报,2004,16(1):15-19.

