

肌动蛋白基因在棉花纤维中的作用研究

范小平^{1,2}, 范博红², 李学宝³, 杨维才⁴, 徐子勤¹

(1. 西北大学 生命科学院, 陕西 西安 710069; 2. 山西省农业科学院 棉花研究所, 山西 运城 044000;

3. 华中师范大学 生命科学院, 湖北 武汉 430079; 4. 中国科学院 遗传与发育生物研究所, 北京 100101)

摘要:运用农杆菌介导法将肌动蛋白 RNAi 表达载体 PBII21- *GhACT1* 转化棉花, 经胚胎发生获得再生植株。非转化组培再生苗作为对照。以 NPTII 制备探针, Southern 杂交结果表明, 获得 8 个独立遗传转化系, 其中 3 个系有 2 个拷贝插入; 其余 6 个系为多拷贝。显微镜下观察开花后第 5 天的幼胚珠孔端, 对照纤维长度约是 RNAi 载体转基因的 3~5 倍。成熟后绒长 F 测验结果表明, RNAi 载体转化株与对照差异显著, RNAi 转基因植株的绒长显著短于对照。说明 *GhACT1* 基因对纤维有延缓和抑制作用, 并且主要作用于纤维发育早期。

关键词: RNAi 表达载体; 肌动蛋白; 转化; 绒长

中图分类号: S562.035 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2008)05-0073-03

Transformation of *GhACT1* RNAi and Its Effect on Fiber Length of Cotton (*Gossypium hirsutum*)

FAN Xiao-ping^{1,2}, FAN Bo-hong², LI Xue-bao³, YANG Wei-cai⁴, XU Zi-qin¹

(1. College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China;

2. Institute of Cotton Research, Shanxi Academy of Agriculture Sciences, Yuncheng

044000, China; 3. College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079, China;

4. Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Introduced the actin RNAi (interference) plasmid PBII21- *GhACT1* into Coker 312 by *Agrobacterium* mediate method, and obtained the regenerants through somatic embryogenesis. NPTII as probes to hybridize, Southern result showed that there were two copies inserted into A5, A6 and A14 transgenic lines, the other six lines had multiple copies insertion. That declared these lines were transgenic positive lines. Observed under microscope, the young fiber on RNAi transgenic seeds was 3-5 fold shorter than that on tissue culture immature seeds. Analysis mature fiber length by statistic F test, result showed that F value beyond $F_{0.05} = 4.10$, the fiber length of RNAi transgenic lines was significant shorter than tissue cultural fiber. This declared that the *GhACT1* gene played a significant role in fiber length, and function mainly at early elongation period.

Key words: RNAi construct; Actin; Transformation; Fiber length

肌动蛋白 (Actin) 是真核生物细胞中普遍存在的一种重要的蛋白质, 构成细胞骨架中的微丝系统。肌动蛋白骨架对植物高度特异化的细胞如花粉管、根毛、叶毛和气孔保卫细胞的形态发生和功能起着重要作用, 同时在高等植物形态发生的细胞分裂和伸长过程中起着关键的调节作用^[1]。Heslop-Harrison 等^[2]观察到, 英地百合未萌发的花粉和刚开始萌发时的肌动蛋白丝在花粉管中排列不同; 李岩等^[3]对麝香百合花粉萌发过程中微丝的变化进行了详尽

观察, 发现随着花粉萌发和花粉管的延伸, 微丝的分布与走向也在改变。说明构成微丝的肌动蛋白在花粉细胞生长与延伸过程中, 参与并起主要作用。Mathur 等^[4]研究肌动蛋白在拟南芥表皮毛中排列与分布时发现, 肌动蛋白对细胞形态与生长极性尤为重要, 在表皮毛发育过程中使用肌动蛋白反应药物鬼笔环肽可以破坏肌动蛋白的正常生长, 引起表皮毛弯曲和分支。在棉花纤维中, 1990 年 Seagull^[5]运用细胞松弛素处理正处于发育阶段的棉纤维, 使纤

收稿日期: 2008-05-06

基金项目: 国家“863”项目 (2006AA10A108)

作者简介: 范小平 (1968-), 女, 山西运城人, 博士, 主要从事棉花生物技术研究。

通讯作者: 徐子勤 (1966-), 男, 甘肃天水人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事植物基因工程研究。

维中微管方向发生改变,说明微丝有调控微管方向的作用。但是,肌动蛋白在纤维中如何调控纤维伸长与发育,仍缺乏直接证据。2005 年, Li 等^[6]通过筛选 cDNA 文库得到 15 个肌动蛋白的 cDNA 序列,其中 *GhACT1* 在纤维中特异表达。为进一步阐述 *GhACT1* 基因在纤维发育中的作用,补充和完善 *GhACT1* 基因的功能分析,运用反向遗传学方法 - 转录后基因沉默 (PTGS) 技术,对 RNAi 表达载体转基因棉花进行了观察与分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 RNAi 表达载体 用 Li 等^[6]构建的 RNAi 表达载体。以 *GhACT1* 的特异启动子序列替换 PBI121 载体上的 35 S 启动子;分别设计带有 *Bam*H^I, *Spe* I 5 至 3 末端的正义序列引物和另外一对带有 *Xba*, *Sac* 酶切位点的 3 末端至 5 端反义序列引物,扩增 *GhACT1* 3 末端 150 bp 的片段,分别酶切处理后,连接在 *Tubulin* 第一个内含子序列的两端,构建在 PBI121 的 *GUS* 位点。将载体转化农杆菌菌株 ACL1,用于转化棉花。非转化组织培养再生苗作为对照。

1.1.2 棉花的遗传转化 经表面消毒处理的 Coker312 无菌苗作为外植体。处理方法如以前所述^[7],将下胚轴切断浸泡在含有反义载体的 ACL1 农杆菌菌株的液体培养基中,共培养后,筛选,诱导出愈伤,胚性愈伤经胚胎发生长出幼芽和胚根。PCR 检测再生株为阳性的,缓苗后移栽至温室。幼苗有 6~8 片展开大叶时,摘取 1~2 片嫩叶提取 DNA,用于 Southern 鉴定。开花时,挂牌记录开花当天日期,方便采样计算种子发育期。成熟后,单铃收取,测绒长。

1.1.3 Southern 检测 根据 Roche 公司提供的使用说明,通过 PCR 法,用 Digoxigenin-11-dUTP 标记 NPTII 探针。

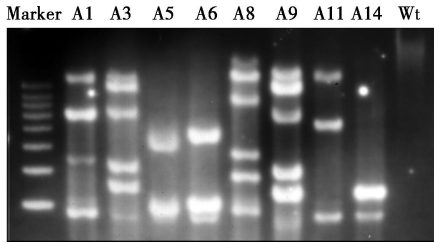
CTAB 法提取幼叶的 DNA,纯化后取 20 μg,在 200 μL 体系中加 3 μL *Bam*H^I 消化,37℃ 过夜。2 μL 样品电泳,检查消化是否彻底,若不彻底,加 1 μL 酶继续 37℃ 温浴数小时;消化彻底后,1%琼脂糖 40 V

电泳 16 h。把分离后定位在凝胶上的不同分子量 DNA 经碱变性处理,将凝胶中变性的 DNA 通过毛细管法转移到尼龙膜上。DIGeasy-hybridization 溶液中预杂交 2 h,将已经制备好的双链 DNA 探针提前在 100℃ 水煮变性 10 min 后,迅速放置冰上,然后吸取 20 ng/mL 加入杂交液,缓慢转动,42℃ 过夜,使标记的 NPTII 与固着于滤膜上的 DNA 发生同源性杂交。冲洗杂交膜严格在 68℃ 从 2 倍洗膜液到 0.1 ×SSC,1% SDS,15 min。加 anti-DIG-AP,在 37℃ 化学发光法显色 15 min。

2 结果与分析

2.1 Southern 结果

以 NPTII 为探针杂交结果如图 1。



1. Marker; 2~9. 转基因再生株系 A1, A2, A3, A4, A5, A10, A11, A12; 10. Coker 312。
1. Marker; 2~9. Transgenic lines of A1, A2, A3, A4, A5, A10, A11, A12; 10. control Coker 312.

图 1 RNAi 载体转化植株的 Southern 检测结果
Fig. 1 Southern result of RNAi transgenic lines

2.2 在纤维伸长早期观察纤维的生长

显微镜下观察开花后第 5 天的纤维, RNAi 转基因幼胚表皮上大部分部位纤维才刚刚突起,珠孔端的纤维较长,约 0.5~1.0 mm,而组织培养再生苗较长,有 2.0~3.0 mm。

2.3 转基因再生棉花绒长的测量与计算

绒长测量结果如表 1,利用单因素组内观测次数相等的方差分析-F 测验^[8],统计检验两组数据间的显著性,结果如表 2, RNAi 载体再生株的绒长与组培再生苗之间 F 值小于 F_{0.05} = 4.10,差异显著,说明 RNAi 转基因棉纤维绒长显著短于对照绒长。

表 1 RNAi 转基因与对照棉纤维长度

Tab. 1 The fiber length of RNAi transgenic cotton and wild type

mm

材料 Materials	纤维长度 Fiber length																	
RNAi Antisense	16	21	19	20	20	18	17	15	16	18	16	19	18	15	16	16	15	13
对照 Coker 312	22	23	15	16	18	19	19	20	22	23	18	17	16	15	16	18	19	20

3 讨论

以 NPTII 作为探针杂交结果发现,除了 A5, A6

和 A14 为 2 个拷贝插入外,其余 5 个转基因系均为多拷贝。A8 和 A9 有 5~6 个拷贝插入。说明 8 个系全为转基因阳性苗。肌动蛋白功能研究多在动物

表 2 RNAi 转基因棉与对照棉纤维长度的方差分析

Tab.2 Analysis of variance in RNAi transgenic and wild type fiber length											
变异来源	Term	和 Σ	变量 n	平均数 \bar{x}	平方和 Σx^2	df	SS	S^2	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
RNAi		338	20	16.9	5 816						
对照	Coker 312	371	20	18.55	7 001						
材料间	Between groups					1	27.225	27.225 0	4.644 5	4.10	7.35
材料内	Intra-group					38	222.750	5.861 8			
总变异	Total varies					39	249.975				

中。O connor 等^[9]研究鱼视网膜棒状细胞时发现,细胞的伸长不依赖于微管,而依赖于肌动蛋白微丝的组装,说明是肌动蛋白在细胞伸长过程中起到了重要作用。而肌动蛋白在进化上高度保守,酵母与兔子肌肉的肌动蛋白有 88 % 的同源性。Baluska 等^[10]在研究拟南芥和 rye 幼苗时,用 Latrunculin B 处理后发现,对于高等植物,不同于其他真核生物,F-actin 对植物形态发生并不重要,没有 F-actin 条件下细胞一样可以分裂,但植物会变矮,说明 F-actin 是细胞伸长所必需。本试验中绒长测量与统计分析结果同样说明肌动蛋白基因在棉花纤维中有重要作用。通过 RNAi 序列构建载体转化棉花,使基因与其反向重复序列整合到植物体后,转录产物可以通过分子内序列互补形成发卡状(茎环结构)双链 RNA,被细胞内的核酸酶识别并切割成小片段双链 RNA (siRNA),这种小双链 RNA 会引起细胞内与此同源的 mRNA 降解,干扰相应的基因表达,使相应的基因功能丧失,植物生长表现异常。在 RNAi *GhACT1* 转基因再生棉株中,*GhACT1* 功能受到抑制,致使纤维伸长受阻,绒长变短。花后第 5 天的 *GhACT1* RNAi 转基因棉铃比对照短 3 ~ 5 倍。说明 RNAi 载体转基因植株棉纤维发育迟缓或受到抑制;绒长数据统计结果表明, $F < 4.10$,RNAi 载体转基因棉绒长显著短于对照。说明 *GhACT1* 主要在起始期与伸长期早期起作用,伸长期后期与次生壁形成期影响很小,即在 *GhACT1* 缺失的情况下,仍能继续生长至成熟,并且伸长至 17 mm 左右。说明 *GhACT1* 只是属于影响纤维生长的多基因中的一个,而不是唯一决定棉纤维长度的基因。Li 等从 cDNA 文库中筛选出 15 个 *actin* 基因中,real-time PCR 结果表明有 5 个肌动蛋白基因在纤维中特异表达。因此,推断在 *GhACT1* 缺失时,其他 4 个基因仍正常行使功能,弥补和维持纤维生长,使纤维继续伸长,尤其在伸长期后期 *GhACT1* 的缺失对纤维伸长的影响甚微。因此,*GhACT1* 基因在纤维早期行使功能,但对于整个纤维长度并没有决定性作用。也许与所选用的 RNAi 序列片段有关,说明这一段序列对纤维作用不明显;可以考虑换一段功能较强序列;或者将这 5 个纤维中特异表达肌

动蛋白基因同时剔除是否能达到使纤维完全停止伸长的效果,有待进一步研究与探索。

RNAi 序列的选择也非常关键,尤其肌动蛋白的同源性特别高,若选用高度保守区域剔除,会产生植物整体不能生长与发育。该试验中所用 150 bp 序列,具有高度特异性,再生苗中未出现显著异常现象。另外,由于棉花转化组培时间较长,容易引起遗传物质的变异,对再生株的育性与品质都会有较大影响。因此,在转基因再生植株的 T_0 ,有可能出现品质退化和不育特性。因此,选用组织培养再生苗作为对照材料,有利于确保基因功能分析的准确性。

通过将构建 RNAi 序列的载体在棉花中的转化,Southern 杂交鉴定证明外援基因的整合,与对照相比绒长显著变短,说明 *GhACT1* 基因在纤维伸长早期具有功能,但不具有决定性功能。

参考文献:

[1] Dong C H,Xia G X,Hong Y,et al. ADF proteins are involved in the control of flowering and regulate F-actin organization, cell expansion, and organ growth in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell,2001,13(6):1333 - 1346.

[2] Heslop-harrison J,Heslop-harrison Y. Intracellular motility, the actin cytoskeleton and germinability in the pollen of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Sex Plant Reprod,1992(5):247 - 255.

[3] 李岩,阎隆飞,徐是雄. 百合花粉及花粉管内微丝和微管的分布[J]. 植物学报,1998,40(10):890 - 894.

[4] Mathur J,Spielhofer P,Kost B,et al. The actin cytoskeleton is required to elaborate and maintain spatial patterning during trichome cell morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*[J]. Development,1999,12(6):5559 - 5568.

[5] Seagull R W. The effects of microtubule and microfilament disrupting agents on cytoskeleton arrays and wall deposition in developing cotton fibers[J]. Protoplasma,1990,159:44 - 59.

[6] Li X B,Fan X P,Wang X L,et al. The cotton *ACTIN1* gene is functionally expressed in fibers and participates in fiber elongation[J]. The Plant Cell,2005,17:859 - 875.

[7] 赵俊侠,石跃进,桑瑜,等. 农杆菌介导外源基因在棉花中的表达[J]. 棉花学报,2001,13(3):146 - 148.

[8] 李春喜,王志和,王文林,生物统计学[M]. 第2版. 北京:科学出版社,2000:50 - 52.

[9] O connor P,Burnside B. Actin-dependent cell elongation in teleost retinal rods: requirement for actin filament assembly [J]. The Journal of Cell Biology,1981,89:517 - 524.

[10] Baluska F,Jasik J,Edelmann H G,et al. Latrunculin B-induced plant dwarfism: plant cell elongation is F-Actin-dependent[J]. Developmental Biology,2001,231(1):113 - 124.