

生长素结合蛋白 *ABP1* 基因在棉纤维伸长中的功能

黄丽华¹, 赵燕¹, 彭珍子¹, 曾潜², 胡超¹, 张学文^{1*}

(1.湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南省棉花科学研究所, 湖南 常德 415101)

摘 要:以‘湘杂棉 14’为材料,采用 RT-PCR 方法克隆了棉花 *ABP1* 基因全长 cDNA 序列。序列全长 792 bp,与 GenBank 中陆地棉 *ABP1* 基因序列的同源性为 99%。半定量分析表明,该基因在棉花叶、花及纤维中都有表达,其中叶中的表达量最高,花和纤维中的表达量稍低。*ABP1* 基因在纤维快速伸长期表达水平较高,纤维发育的其他时期的表达水平较低。将 *ABP1* 基因 cDNA 构建成棉花 *ABP1* 过表达载体,并以 NPT II 作为选择标记,经农杆菌介导转化棉花,获得了 6 株 Kan 抗性植株,其中 3 株 *ABP1* 表达水平提高。*ABP1* 过表达植株生长发育正常,但纤维长度变化不显著,说明 *ABP1* 棉纤维细胞中提高表达水平对其细胞伸长没有显著作用。

关 键 词:棉花;生长素结合蛋白 *ABP1* 基因;纤维伸长;功能

中图分类号: S562; Q786

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2013)06-0604-05

On functions of auxin binding protein *ABP1* gene in cotton fiber elongation

HUANG Li-hua¹, ZHAO Yan¹, PENG Zhen-zi¹, ZENG Qian², HU Chao¹, ZHANG Xue-wen^{1*}

(1.College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.Institute of Cotton Sciences of Hunan Province, Changde, Hunan 415101, China)

Abstract: In this paper, using the ‘Xiangzamian 14’ as materials, we have cloned the full-length cDNA sequence of *ABP1* gene of cotton by RT-PCR method. The sequence is 792 bp in length and shares a 99% identity with the cDNA sequence of *ABP1* gene of the Upland Cotton in GenBank. Semi quantitative analysis shows that, the gene is expressed in cotton leaves, flowers and fibers, the expression amount in leaves is the highest, those in flowers and fibers are a little lower. *ABP1* gene is highly expressed in the term of rapid elongation of cotton fiber while it is lower expressed in other terms of fiber development. By constructing the *ABP1* gene cDNA into the carrier of the cotton *ABP1* over expression vector and taking the NPT II as selection marker, by *Agrobacterium* mediated transformation of cotton, we have obtained 6 Kan resistant plants, including 3 plants whose *ABP1* expression level has been raised. The plants with *ABP1* overexpressing show normal growth and development, but the change of their fiber length is not significant, which indicates that the increase of the expression level in *ABP1* cotton fiber cells has no significant effect on the cell elongation. The results have shown that *ABP1* gene may not be a key regulate factor in fiber elongation.

Key words: cotton; auxin binding protein *ABP1* gene; fiber elongation; function

棉花纤维是胚珠表皮细胞经分化突起、伸长、次生壁加厚和脱水成熟发育而成的单细胞纤维,其作为单细胞的伸长生长十分明显,而纤维的伸长又决定着纤维的最终长度,进而决定着纤维的品质^[1]。

棉纤维伸长主要由细胞膨压和细胞壁松弛驱动^[2],生长素能松弛细胞壁和增加细胞膨压而促进细胞伸长^[3],由此可以推导生长素在棉纤维伸长中发挥重要作用^[4-5]。生长素促进细胞伸长的功能被认为是

收稿日期: 2013-02-28

基金项目: 湖南省教育厅项目(11C0665); 湖南省教育厅研究生创新基金项目(CX2009B140)

作者简介: 黄丽华(1974—),女,湖南衡阳人,博士研究生,主要从事分子细胞生物学研究,lihua30001@sina.com; *通信作者, xwzhang@hunau.edu.cn

由生长素结合蛋白(ABP1)介导的。以拟南芥和烟草为材料的研究表明,细胞内ABP1的水平与细胞伸长密切相关^[6-8]。目前,ABP1在棉花纤维伸长中的功能仍缺少研究。研究者在分析棉纤维发育过程的基因表达时发现,棉花生长素结合蛋白(GhABP)只在伸长纤维细胞中存在,而在未分化的表皮细胞和无绒毛突变体中不存在^[9]。为了验证ABP1对棉纤维细胞伸长中的功能,笔者以湘杂棉14为材料,通过转基因技术,在棉纤维中特异提高ABP1基因的表达量,探讨了ABP1基因在棉纤维伸长中的功能,可进一步认识生长素及其结合蛋白对棉纤维伸长的作用,并为棉花的品质改良提供新的参考。

1 材料和方法

1.1 材料

湘杂棉14,由湖南省棉花科学研究所提供。转基因过程及转基因棉种植在湖南省棉花科学研究所转基因棉基地完成。植物表达载体 pBI121、根癌农杆菌 LBA4404 等均为研究者实验室常规储存材料。

1.2 方法

1.2.1 棉花 ABP1 基因的克隆

取棉花幼嫩叶片,参照文献[10]方法提取总RNA。采用Fermentas公司反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA。根据GenBank中陆地棉‘新陆中5号’的ABP1基因序列(FJ609678),设计引物ABP1F1(5'-CAACACTGAAAGATGACTGGACCTTGCTTCAT-3')和ABP1R1(5'-CAAGGGAAACCATCAATTGAT

TTTGGAAGTGT-3'),PCR扩增ABP1基因。扩增片段通过AT连接克隆到pMD18-T(TaKaRa)载体,转化大肠杆菌INVαF'菌株,阳性克隆送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。序列分析通过NCBI网站在线进行。

1.2.2 ABP1 基因表达分析

根据棉花GhHis基因序列,设计引物GhHis1(5'-GAAGCCTCATCGATACCGTC-3')和GhHis2(5'-CTACCACTACCATCATGGC-3')。以该基因扩增为内标,采用半定量的RT-PCR分析棉花叶、花及开花后5、15和25 d纤维中ABP1的表达水平。ABP1基因表达分析引物为ABP1F2(5'-GAAGACACGCCCTTCACATGCT-3')和ABP1R2(5'-CAAGGGAAACCATCAATTGATTTTGGAAGT-3')。

1.2.3 ABP1 过表达载体的构建

ABP1过表达载体的构建如图1。根据棉花ABP1基因的酶切位点,结合表达载体pBI121克隆位点上的酶位点,设计引物GhABP1F(5'-GCTCTAGAATGACTGGACCTTGCT-3',含XbaI位点)和GhABP1R(5'-CGAGCTCTTAAAGCTCATCTTTCTGAG-3',含SacI位点),PCR扩增ABP1基因。PCR产物经XbaI和SacI双酶切后,与载体pBI121连接重组;重组分子转化大肠杆菌,菌落PCR和双酶切检测阳性克隆;构建正确的载体电激转化农杆菌LBA4404,用于棉花的遗传转化。



图1 植物表达载体 pBI121-GhABP1 的构建

Fig.1 Schematic diagram of the pBI121-GhABP1 expression vector

1.2.4 农杆菌介导法转化棉花

转化参照彭珍子等^[11]方法进行。采用微量注射器将10 μL约含1 000个细菌细胞的农杆菌菌液经花柱注入授粉后24 h的子房。收获转基因材料种子,种植于温室中,Kan抗性筛选和PCR检测转基因植株。

1.2.5 转基因植株的分子鉴定

采用CTAB法提取抗性植株的DNA,以pBI121载体上CaMV 35S启动子的一段序列为上游引物(35S-F,序列5'-AGTGGATTGATGTGATATCTCCACT-3'),目的基因一段为下游引物(GhABP1R,序列5'-CGAGCTCTTAAAGCTCATCTTTCTGAG-3'),

检测转基因植株。PCR产物的预计大小为 694 bp。

1.2.6 转基因棉花 *ABP1* 基因转录表达分析

取开花后15 d的纤维,提取RNA,反转录成cDNA。以棉花*GhHis*基因为内参,分析转基因植株中*ABP1*的表达水平。

1.2.7 纤维长度的测定

于2010和2011年,于棉花开花期间选择中部第5、6果枝第1、2果节当日开放的花挂牌标记。于棉花收获期收取标记的成熟纤维,用光电纤维长度测定仪测定纤维长度。

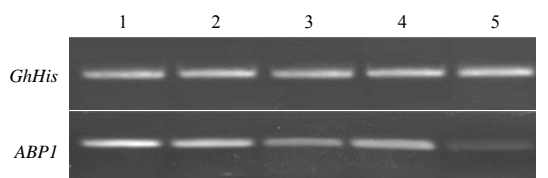
```
CAACACTGAAAGATGACTGGACCTTGCCCTCATTTTCTTCTCTCTCTTAAACTTGCTTCCATTCTTTCGAACCTCTCGAAGCTT
CCCCTGCTCCATCAAAGGGCTACCTCTGGTGGGGAACATTGCCGATCTTCCACAGGATAATTATGGAAGAGGAGTTTATCCCAT
ATAACTGTTGCTGGTTCTCTCTTGCATGGGTTGAAAGAAGTCGAGGTTTGGCTTCAAACATTTGCACCAGGATCGCGCACGCCGAT
CCATAGGCACTCTTGTGAAGAAGTTTTGTTGTTCTCAAGGGCAGTGGCACTCTATATCTCGCCTCGAGTTCTAATAAGTACCCTGG
AAAACCGGAGGAGCACTTTATATTTTGAATAGCAGCTTCATATCCCTGTCAATGATGTTTACCAGGTCTGGAATACAAATGAAC
ATGAGGATTTGCAATGCTTGTGATAATATCTCGGCCGCTATCAAAGTGTTTCAATATATGAAGATTGGTTGATGCCTCACACTGCA
GCTAAGTTGAAGTTTCCCTACTATTGGGATGAGCAGTGCTTTCAAGTACCTCAGAAAGATGAGCTTTAATTTTGAAGACACGCC
CTTACATGCTACTATATGAGCACTGTAATGGGGCCATTCCCATTTTACTGCTCGGATTACTTTACAAATTACATAAAGATTACAAC
ATCTTAGCTTAGTTGTATATTTCCCCCTCATTTGAAGTCTGAATCCATTTTCTATTTTCATTTGACACTTCCAAAATCAAT
TGATGGTTTCCCTTG
```

图2 克隆的‘湘杂棉14’*ABP1*基因cDNA序列

Fig.2 Nucleotide sequence of *ABP1* cloned from ‘Xiangzamian 14’

2.2 *ABP1* 基因在不同组织中的表达

以棉花*GhHis*基因为内参基因,RT-PCR分析*ABP1*基因在叶、花及开花后5、15和25 d纤维中的表达水平。结果(图3)可以看出,*ABP1*在叶、花及纤维中都有表达,叶中的表达量最高,花中的表达量稍有下降。*ABP1*在纤维发育的不同时期都有表达,其中开花后15 d的纤维中表达量较高,开花后25 d的纤维中表达量最低。表明*ABP1*基因在叶、花和纤维的发育中发挥作用。由于开花后15 d的棉纤维处于快速伸长期,所以*ABP1*可能对棉纤维的伸长影响较大。



1 叶; 2 花; 3 开花后5 d的纤维; 4 开花后15 d的纤维; 5 开花后25 d的纤维。

图3 *ABP1*基因在不同组织中的表达水平

Fig.3 Transcript levels of *ABP1* gene in different tissues and 3 stage of elongation fiber cell

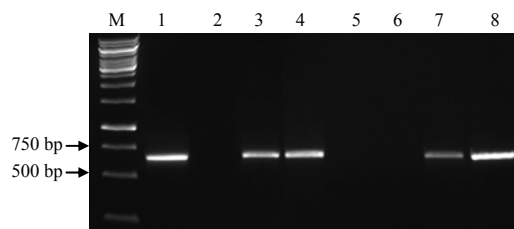
2 结果与分析

2.1 棉花 *ABP1* 基因的克隆及序列分析

RT-PCR克隆了棉花*ABP1*基因,测序结果表明,该基因大小为792 bp,与GenBank中已登录的棉花*ABP1*基因cDNA序列(登录号FJ609678)存在7个碱基的差别,但可以编码1个保守的*ABP1*同源蛋白(图2),碱基差异可能源于品种间单核苷酸位点多态性(SNP)。

2.3 *ABP1* 过表达植株的鉴定

经Kan抗性筛选,获得了6株抗性植株。以35S启动子序列为上游引物,*ABP1*基因序列为下游引物,对抗性植株DNA进行检测,其中4个植株扩增出预期带,而非转基因对照未扩增到条带(图4),说明目的基因已经整合至转基因棉花基因组中。



M DNA 分子量标准; 1 质粒阳性对照; 2 对照植株; 3~8 转基因植株。

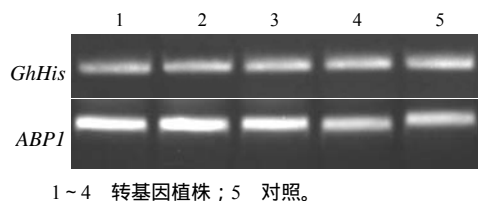
图4 转基因植株的PCR鉴定结果

Fig.4 PCR identification of independent transformants

2.4 转基因植株 *ABP1* 基因转录表达分析

以棉花*GhHis*基因为内参,对4株检测出转基因的阳性植株中*ABP1*表达水平进行半定量分析。结果(图5)显示,3个转基因植株中*ABP1*的表达水平明显

提高,另1株植株ABP1表达提高不明显。



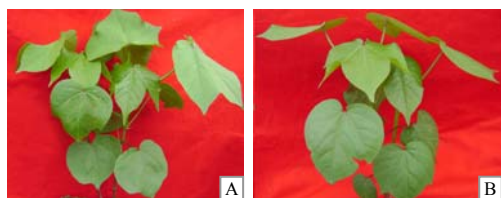
1~4 转基因植株;5 对照。

图5 转基因植株 ABP1 表达水平的半定量分析

Fig.5 The ABP1 expression analysis by semi-quantitative RT-PCR in correspondent individuals

2.5 ABP1 过表达对纤维长度的影响

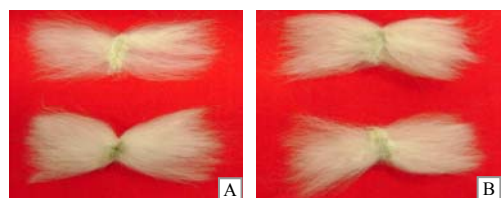
3株ABP1显著过表达转基因植株整体发育正常(图6),并于2010和2011年在湖南省棉花科学研究所进行种植,对其纤维的长度进行了测量。结果表明,转基因植株纤维长度未发生显著性变化(图7、图8)。



A 非转基因对照植株;B ABP1 过表达植株。

图6 ABP1 过表达棉花植株的表型

Fig.6 The phenotype of ABP1 overexpressing line in seedling stage is normal



A 非转基因对照纤维;B ABP1过表达植株纤维。

图7 ABP1 过表达植株成熟纤维的表型

Fig.7 Fiber phenotype of ABP1 overexpressing line

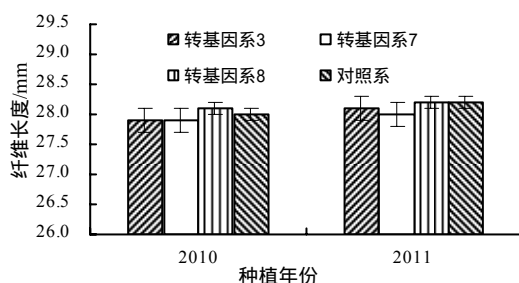


图8 连续2年种植的转基因棉花3个株系与对照的纤维长度

Fig.8 The fiber length without significant difference in two years planting in the ABP1 overexpressed transgenic cotton and its control

3 讨论

生长素信号途径中的一些成分被证明参与了棉纤维的伸长^[12]。ABP1是生长素信号途径中的新认识的受体,对模式植物拟南芥中的研究证实其参与细胞伸长生长调节^[6,13]。棉纤维细胞作为一种特化的单细胞,其发育涉及快速伸长的调控过程。根据ABP1的功能,有理由认为它在棉纤维伸长生长中发挥功能,但缺乏实际的研究报道。为探讨ABP1在棉纤维伸长中的功能,本研究以‘湘杂棉14’为材料,采用RT-PCR方法克隆了棉花ABP1基因,尽管克隆分子与GenBank 登录的ABP1基因cDNA序列存在7个碱基的差别,但能编码出功能保守的ABP1蛋白,其cDNA序列差异可能缘于品种间基因的单核苷酸多态性。ABP1基因在棉纤维发育的不同时期都有表达,但在开花后15 d的纤维中表达量最高,此时的棉纤维处于快速伸长期。其他研究者^[9]也发现棉花生长素结合蛋白(GhABP)只在伸长纤维细胞中存在,因此,推测ABP1可能参与了棉纤维伸长。A.M. Jones等^[6]报道植物中ABP1过表达使细胞增大,但植株整体生长发育正常。本研究采用转基因技术,提高棉纤维中ABP1的表达水平,观察其对棉纤维伸长的影响。连续2年的纤维长度测定结果都表明,转基因植株纤维长度没有发生显著改变。

棉花纤维的伸长是一个复杂的生物学过程,其中涉及的影响因素有很多。如细胞质和液泡中的苹果酸、钾离子、可溶性糖等渗透物质对其伸长都有影响^[14-15]。1,4-β-内葡聚糖酶、内木葡聚糖转移酶、膨胀素及微管蛋白等也参与了棉纤维伸长^[16-18]。这些过程似乎与生长素的调控关联不大。另外,除生长素外,其他激素如乙烯、赤霉素等对棉纤维伸长也有影响^[19]。这些因素可能相互作用,共同调控棉纤维的伸长。单一因素的改变对纤维伸长可能影响不大。此外,ABP1作为生长素信号途径中的成员,本身在棉花纤维细胞中尤其是细胞伸长期具有较高水平的表达,进一步提高表达水平对该信号途径作用不显著,即并不能表现出剂量效应。

参考文献:

- [1] Jasdanwala R T, Singh Y D, Chinoy J J. Auxin metabolism in developing cotton hairs[J]. J Exp Bot,

- 1977, 28 : 1111–1116 .
- [2] Cosgrove D J . Growth of the plant cell wall[J] . Nature Reviews Molecular Cell Biology , 2005 , 6 : 850–861 .
- [3] Cleland R E , Prins H B , Harper J R , et al . Rapid hormone-induced hyperpolarization of the oat coleoptile transmembrane potential[J] . Plant Physiol , 1977 , 59 : 395–397 .
- [4] 韩焕勇, 罗宏海, 勾玲, 等 . 棉纤维发育过程中内源激素含量和过氧化物酶活性的变化及其与纤维素累积和纤维比强度关系的研究[J] . 石河子大学学报: 自然科学版, 2006 , 24(5) : 529–533 .
- [5] Gokani S J , Thaker V S . Physiological and biochemical changes associated with cotton fiber development IX. Role of IAA and PAA[J] . Field Crops Res , 2002 , 77 : 127–136 .
- [6] Jones A M , Im K H , Savka M A , et al . Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-binding protein 1[J] . Science , 1998 , 282 : 1114–1117 .
- [7] Chen J G , Ullah H , Young J C , et al . ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis[J] . Genes Dev , 2001 , 15 : 902–911 .
- [8] Braun N , Wyrzykowska J , Muller P , et al . Conditional repression of AUXIN BINDING PROTEIN1 reveals that it coordinates cell division and cell expansion during postembryonic shoot development in *Arabidopsis* and tobacco[J] . The Plant Cell , 2008 , 20 : 2746–2762 .
- [9] Ji S J , Lu Y C , Feng J X , et al . Isolation and analyses of genes preferentially expressed during early cotton fiber development by subtractive PCR and cDNA array[J] . Nucleic Acids Res , 2003 , 31 : 2534–2543 .
- [10] Zhu L F , Tu L L , Zhen F C , et al . An improved simple protocol for isolation of high quality RNA from *Gossypium* spp . suitable for cDNA library construction[J] . Acta Agronomica Sinica , 2005 , 31 : 1657–1659 .
- [11] 彭珍子, 赵燕, 曾潜, 等 . 农杆菌子房注射法对棉花的活体转化[J] . 棉花学报, 2011 , 23(4) : 311–316 .
- [12] Kim H J , Triplett B A . Characterization of *GhRac1* GTPase expressed in developing cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fibers[J] . Biochim Biophys Acta , 2004 , 1679(3) : 214–221 .
- [13] Chen J G , Shimomura S , Sitbon F , et al . The role of auxin-binding protein 1 in the expansion of tobacco leaf cells[J] . The Plant Journal , 2001 , 28(6) : 607–617 .
- [14] Li X R , Wang L , Ruan Y L . Developmental and molecular physiological evidence for the role of phosphoenolpyruvate carboxylase in rapid cotton fibre elongation[J] . J Exp Bot , 2010 , 61(1) : 287–295 .
- [15] Haigler C H , Ivanova-Datcheva M , Hogan P S , et al . Carbon partitioning to cellulose synthesis[J] . Plant mol Biol , 2001 , 47 : 29–51 .
- [16] Shimizu Y , Aotsuka S , Hasegawa O , et al . Changes in levels of mRNAs for cell wall-related enzymes in growing cotton fiber cells[J] . Plant Cell Physiol , 1997 , 38 : 375–378 .
- [17] Lee J , Burns T H , Light G , et al . Xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase genes in cotton and their role in fiber elongation[J] . Planta 2010 232 : 1191–1205 .
- [18] Ji S G , Lu Y C , Li J , et al . A β -tubulin-like cDNA expressed specifically in elongating cotton fibers induces longitudinal growth of fission yeast[J] . Biochem Bioph Res Co , 2002 , 296 : 1245–1250 .
- [19] Shi Y H , Zhu S W , Mao X Z , et al . Transcriptome profiling , molecular biological , and physiological studies reveal a major role for ethylene in cotton fiber cell elongation[J] . The Plant Cell , 2006 , 18 : 651–664 .

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 张 健