

## 陆地棉 *GhDGAT1* 基因干涉载体构建与遗传转化

刘正杰<sup>1</sup> 张园<sup>1</sup> 王玉美<sup>2</sup> 梁伟<sup>1</sup> 华金平<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院/杂种优势研究与利用教育部重点实验室/  
作物遗传改良北京市重点实验室,北京 100193;  
2. 湖北省农业科学院 经济作物研究所,武汉 430064)

**摘要** 二酰基甘油酰基转移酶(DGAT)是生物体内三酰甘油(TAG)合成过程中的关键酶。本研究克隆陆地棉 *GhDGAT1* 基因 308 bp 片段,构建了该基因内含子结构的 hpRNA 干涉载体;应用花粉管通道法转化棉花,研究内源基因 *GhDGAT1* 沉默对棉花油分含量的影响。结果表明:1)经 PCR 及 Southern 杂交鉴定,转基因种子中 *GhDGAT1* 基因表达量受到显著抑制,种仁含油量下降,最多下降 3.13%。2)种子油脂量显著减少的株系中,总蛋白含量及可溶性糖分含量,分别相对提高 4.31%~9.77%和 11.67%~23.01%。3)与野生型相比,转基因株系幼胚在发育后期鲜重降低,而可溶性蛋白含量升高。4)与对照相比,转基因植株的株高、第一果枝高度、果枝数均显著降低,但其他农艺性状与主要的经济性状均未受到显著影响。研究表明,通过调控 *GhDGAT1* 基因的表达可影响陆地棉的油脂合成,调节棉籽油分含量。

**关键词** 陆地棉; *GhDGAT1*; RNAi; 载体构建; 遗传转化

中图分类号 S 562 文章编号 1007-4333(2013)05-0001-08 文献标志码 A

## Construction and transformation of RNAi vector of gene *GhDGAT1* in upland cotton

LIU Zheng-jie<sup>1</sup>, ZHANG Yuan<sup>1</sup>, WANG Yu-mei<sup>2</sup>, LIANG Wei<sup>1</sup>, HUA Jin-ping<sup>1\*</sup>

(1. College of Agronomy and Biotechnology/Key Laboratory of Crop Heterosis and Utilization of Ministry of Education/  
Beijing Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, China Agricultural University, Beijing 100193, China;  
2. Institute of Cash Crops, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China)

**Abstract** A 308-bp fragment of cotton *GhDGAT1* gene was used to create intron-containing construct expressing hpRNA vector, and transferred to cotton via pollen tube path way, for studying the impact on oil content by silencing the endogenous *GhDGAT1* gene of cotton. Results indicated that: 1) After PCR and Southern blotting, the expression of *GhDGAT1* gene were inhibited significantly in T<sub>3</sub> transgenic seeds, and the oil contents of seeds were decreased up to 3.13 percent. 2) In transgenic lines with lipids contents decreased, the protein contents and soluble sugar contents were relatively increased 4.31% - 9.77% and 11.67% - 23.01%, respectively. 3) Compare to wild type, the fresh weights of immature embryos in transgenic lines were reduced in the later stages of embryos development, but increased in soluble protein contents. 4) Compare to wild type, the plant height, height of primary branch and branch number in transgenic lines were decreased significantly, but have no significantly changes in other agronomic traits and the main economical traits. The finding that *GhDGAT1* gene influenced the lipids synthesis in cotton could be used to regulate oil contents in kernels by modulating the expression of *GhDGAT1*.

**Key words** upland cotton; *GhDGAT1*; RNAi; vector construction; genetic transformation

收稿日期: 2013-05-03

基金项目: 国家重大专项项目(2011ZX08005-003, 2009ZX08005-024B); 国家自然科学基金资助项目(30871563)

第一作者: 刘正杰, 博士研究生, E-mail: lzj1022@163.com

通讯作者: 华金平, 教授, 主要从事棉花遗传育种研究, E-mail: jinping\_hua@cau.edu.cn

油脂是细胞膜结构的重要组分,其化学成分是脂肪酸与甘油形成的酯,在植物的生命活动中起重要作用。大多数油料作物种子贮藏脂类主要以三酰甘油(TAG)的形式存在,并作为重要碳源供给种子萌发后幼苗生长发育。二酰基甘油酰基转移酶(DGAT)是生物体内TAG合成过程中的关键酶,它催化二酰甘油加上脂肪酸酰基形成三酰甘油,也是TAG合成途径中的限速酶,因而通过调控DGAT活性来调节种子含油量具有重要意义。

DGAT在植物不同器官组织中广泛存在,包括叶片、花瓣、果实、花粉囊以及发育的种子等<sup>[1]</sup>。目前,根据DGAT的结构及定位的差异,发现该酶存在4种类型:DGAT1、DGAT2、胞质内DGAT和WS/DGAT。在氨基酸序列上这4种DGAT类型之间的相似性很低,但是都具有类似DGAT蛋白功能基序,推测DGAT家族可能为功能趋同进化<sup>[2]</sup>。其中,DGAT1基因家族存在于植物和动物中<sup>[1-3]</sup>,DGAT2基因家族在植物<sup>[4]</sup>、动物<sup>[5]</sup>和酵母<sup>[6]</sup>中都存在。胞质内DGAT只在花生<sup>[2]</sup>报道;WS/DGAT则在溶血不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)<sup>[7]</sup>中研究报道。对于DGAT在调控油脂合成方面的研究,主要集中于DGAT1与DGAT2基因家族,尽管这2种DGAT的蛋白序列存在差异,但它们都具备催化二酰甘油结合脂酰-CoA形成三酰甘油的功能。一般来说,在大部分植物中DGAT1在三酰甘油合成代谢中的作用更加广泛,而DGAT2更侧重于特殊脂肪酸的积累,两者的作用并不相互排斥<sup>[8]</sup>。Wurie等<sup>[9]</sup>研究发现DGAT2作用于DGAT1基因的上游,影响TAG合成与储藏。研究表明,DGAT的表达影响植物种子发育,并影响种子含油量、脂肪酸组成与种子粒重等<sup>[5,10-15]</sup>。Lock等<sup>[16]</sup>以反义技术将油菜DGAT基因表达下调,降低了油分含量,并能影响种子产量与萌发率。Zhang等<sup>[17]</sup>以烟草DGAT基因序列,利用RNAi沉默烟草DGAT基因,能降低种子内油分含量,同时提高种子内糖分与蛋白的含量。拟南芥中DGAT1基因位点发生突变后,导致种子含油量下降,种子萌发及苗期生长时期对部分非生物胁迫更加敏感<sup>[18]</sup>。棉花中已克隆DGAT2及DGAT3基因,对其功能研究正在进行之中。但是,目前还未有克隆棉花DGAT1基因的报道,也没有关于DGAT1基因影响油脂合成的相关研究。

事实上,棉花的遗传改良研究主要集中在棉纤维产量和品质改良,而对棉籽油分代谢却一直不够

重视<sup>[19-20]</sup>。本研究根据其他作物DGAT1基因信息,经比对获得棉花*GhDGAT1*基因部分序列,并根据其序列的保守区域设计引物,扩增干涉片段,构建带发卡结构的RNA干涉载体,转化棉花受体11-0513,经PCR及Southern杂交获得T<sub>1</sub>代转基因阳性植株,自交纯化获得后代株系;不同株系的T<sub>3</sub>代转基因种子中油分含量降低,且总蛋白含量、可溶性糖分含量均不同程度增加。本研究可为分析陆地棉*GhDGAT1*基因调控棉花油分含量机理提供新结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

供试陆地棉(*Gossypium hirsutum* L)品种Coker201,取三叶一心幼嫩植株真叶用于提取RNA。陆地棉(*Gossypium hirsutum* L)品种11-0513,采用98%浓硫酸脱绒后,种子清洗风干备用。

反转录试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司;LA Taq酶、dNTP、T<sub>4</sub>-DNA连接酶购自TaKaRa公司;各种限制性内切酶购自NEB公司;PCR引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

### 1.2 菌株与质粒

大肠杆菌DH5 $\alpha$ 由本实验室保存,植物干涉载体pKANNIBAL、pART27由中国农业大学植物生长调节剂教育部工程研究中心惠赠。

### 1.3 棉花DNA、RNA提取与反转录

采用CTAB法提取烟草及棉花DNA<sup>[21]</sup>,利用改良的CTAB-PVP法提取棉花RNA<sup>[22]</sup>。采用1%琼脂糖凝胶检测DNA及RNA质量。RNA反转录采用天根cDNA第一链反转录试剂盒。

### 1.4 引物设计

将NCBI(National Center for Biotechnology Information)上已提交的其他物种的DGAT1基因序列,与棉花的EST数据库进行比对,选择同源性最高的EST序列进行拼接获得1010 bp的contig,根据该拼接序列设计引物DGAT1F1和DGAT1R1,以陆地棉Coker201 cDNA为模板扩增*GhDGAT1*基因相对保守的308 bp序列。根据测序获得的*GhDGAT1*基因308 bp序列,设计引物DT308zF1和DT308zR1、DT308fF1和DT308fR1,构建干涉载体pARTDGATi。本研究所用引物序列见表1。

表 1 本研究所使用的引物  
Table 1 Primers used in this research

引物名称 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequents (5'→3')	$T_m/^\circ\text{C}$	说明 Introductions
DGAT1F1	CTTGTTGTAGGAGTATTGG	56	扩增 <i>GhDGAT1</i> cDNA 片段
DGAT1R1	GTTGACCAAGAATGCAGAAT	55	
DT308zF1	<u>CCCTCGAGGG</u> CCTTGTGTAGGAGTATTGG	56	构建 <i>GhDGAT1</i> RNA 干涉载体
DT308zR1	GGGGT <u>TACCC</u> GTTGACCAAGAATGCAGAAT	55	
DT308fF1	<u>CGGGATCC</u> CCTTGTGTAGGAGTATTGG	56	
DT308fR1	CC <u>ATCGAT</u> GGGTTGACCAAGAATGCAGAAT	55	
Kan1F	CACTGAAGCGGGAAGGGACT	60	扩增 <i>Kan</i> 抗性标记基因
Kan1R	CGATACCGTAAAGCACGAGGAA	60	
UBQ7F	GAAGGCATTCCACCTGACCAAC	60	<i>GhDGAT1</i> 荧光定量 PCR 内标
UBQ7R	CTTGACCTTCTTCTTCTGTGCTTG	59	
DGATqF	AAGTTATGGGCTTTCTTTGGC	59	<i>GhDGAT1</i> 荧光定量 PCR
DGATqF	ATCTGCTGATCCTTTGCGATT	60	

注：字母斜体加下划线标示酶切位点位置。

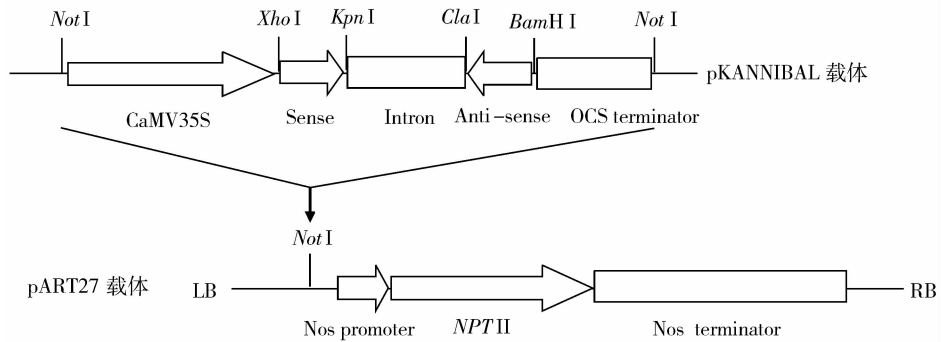
Note: Letters with underline in and in italic were restriction enzyme cutting site.

### 1.5 *GhDGAT1* 基因部分序列的扩增与干涉载体的构建

取陆地棉 Coker201 三叶一心幼苗的真叶部分，提取 RNA，并参照天根反转录试剂盒说明书合成 cDNA 第一链。以 Coker201 的 cDNA 为模板，引物 DGAT1F1 和 DGAT1R1 扩增 *GhDGAT1* 基因部分序列。PCR 体系包含 DNA 或 cDNA 模板 10 ng，10 × PCR Buffer 2.5 μL，10 mmol/L dNTP Mixture 2 μL，2 μmol/L 的上下游引物各 0.5 μL

*Taq*DNA 聚合酶 1.25 U，ddH<sub>2</sub>O 补齐至总体积 25 μL。PCR 反应条件为：94 °C 预变性 4 min；94 °C 变性 30 s，53~56 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 1~3 min，30 个循环；72 °C 延伸 10 min。回收 PCR 产物，连接至 pMD18-T 载体，热激法转化大肠杆菌 DH5α，经“蓝白斑筛选”实验，挑取阳性克隆送上海英俊测序公司测序。测序结果利用 ClustalW2 软件与 GenBank 中相应序列比对分析(图 1)。

扩增 308 bp 的正向片段，并在 5'端和 3'端分别



LB:左边界;CaMV35S:CaMV35S 启动子;Sense:正向片段;Intron:内含子;Anti-sense:反向片段;OCS terminator:OCS 终止子;Nos promoter;Nos 启动子;NPT II:新霉素磷酸转移酶基因;NOS terminator;NOS 终止子;RB:右边界。

LB:left border;CaMV35S:CaMV35S promoter;Sense:fragment in sense orientation;Intron:intron;Anti-sense:fragment in anti-sense orientation;OCS terminator;OCS terminator;Nos promoter;Nos promoter;NPT II:neomycin phosphotransferase gene;NOS terminator;NOS terminator;RB:Right Border.

图 1 干涉载体结构示意图

Fig. 1 Structure diagram of interference vectors

引入 *Xho* I 和 *Kpn* I 酶切位点。经 *Xho* I 和 *Kpn* I 酶切,回收酶切产物,以  $T_4$  连接酶连接至 pKANNIBAL 中间载体,命名为 pKANNIBAL-308S。同时,扩增反向片段,并在 5'端和 3'端分别引入 *Cal* I 和 *Bam*H I 酶切位点。经 *Cal* I 和 *Bam*H I 酶切,回收酶切产物,以  $T_4$  连接酶连接至 pKANNIBAL-308S 载体,命名为 pKANNIBAL-308SA。将 pKANNIBAL-601SA 以 *Not* I 酶切,经琼脂糖凝胶电泳后切胶回收目的片段,连接至同样以 *Not* I 酶切的 pART27 载体,构建 *DGAT1* 基因 ihpRNA 干扰载体 pARTDGATi。

### 1.6 遗传转化与阳性植株鉴定

采用花粉管通道法进行遗传转化,转化方法参考石雅丽等<sup>[23]</sup>。受体 11-0513 是非转基因材料,种植于河北曲周中国农业大学曲周实验站。选择果枝和花位较好、开花后 20~24 h 的幼子房作为转化对象,使用质粒 DNA 注射,质粒 DNA 浓度一般为 0.01~0.02  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,每朵花注射 10  $\mu\text{L}$  即可(0.1~0.2  $\mu\text{g}$ );涂抹赤霉素保铃并挂牌标记。收获  $T_0$  代种子播种,植株叶片涂抹 3 mg/mL 的卡那霉素鉴定筛选 3 次:第 1 次筛选在子叶期,第 2 次在 2~4 片真叶期,第 3 次在成株期,涂抹后 7 d 左右鉴定,拔除有斑点的植株,保留无斑点的抗性植株。取叶片样品,PCR 检测新霉素磷酸转移酶基因 *NPT* II,能扩增出目的基因片段的即为转基因阳性植株。

### 1.7 Southern 杂交

应用地高辛(DIG)试剂盒,对部分经 PCR 验证的  $T_1$  植株提取 DNA,以扩增的新霉素磷酸转移酶基因 *NPT* II 的部分序列为探针,标记,进行 Southern 杂交,检测  $T_1$  代材料转基因拷贝数。操作步骤参照试剂盒说明。

### 1.8 转基因棉花植株 Real-Time PCR 表达分析

取陆地棉  $T_3$  代转基因幼胚的 cDNA 进行 Real-Time PCR 分析。其中以陆地棉 *GhUBQ7* 基因为内标基因。内标引物和目的基因荧光定量 PCR 引物分别为 UBQ7F、UBQ7R 及 DGATqF、DGATqR。PCR 体系包含 cDNA 模板 10 ng,  $2 \times$  SYBR Premix *Taq* 5  $\mu\text{L}$ ,  $50 \times$  ROX Reference DyeII 0.2  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{mol/L}$  的上下游引物各 0.4  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补齐至总体积 10  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  酶激活 30 s;然后 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,60  $^{\circ}\text{C}$  退火/延伸 35 s,40 个循环;最后加上溶解曲线分析步骤。

### 1.9 种子油分、总蛋白、可溶性蛋白与可溶性糖含量测定

应用索氏提取法提取测定棉花种子种仁油分含量。应用凯氏定氮法、考马斯亮蓝 G-250 染料结合法分别测定植物总蛋白含量、可溶性蛋白含量,应用苯酚法测定可溶性糖含量。

### 1.10 农艺性状调查与考察

成株期田间调查转基因植株的农艺性状,包括株高、第一果枝高度、果枝数、成铃数。收获转基因植株及对照 30 铃样品,考种。考察性状包括单铃重、衣分、籽指、衣指;取混合棉样 15 克,送农业部纤维检验测试中心测定纤维品质,包括纤维上半部平均长度(mm)、整齐度、断裂比强度(cN/tex)、伸长率和马克隆值。

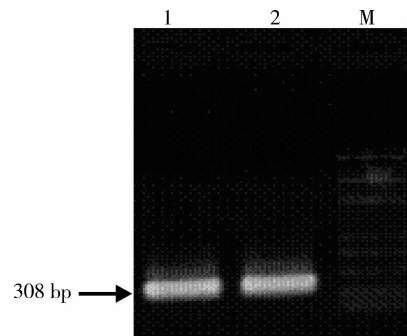
### 1.11 数据统计分析

采用 SPSS 16.0 进行数据处理和统计分析,在本文图示中以不同字母表示在 0.05 水平上差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 *GhDGAT1* 基因部分序列扩增与 RNAi 载体构建

以陆地棉 Coker201 cDNA 为模板,通过引物 DGAT1F1 和 DGAT1R1 进行特异扩增获得约 308 bp 的基因片段。将该片段连接至 pMD18-T 载体,获得重组后质粒 pMD18-T-DGAT308,测序验证。以 pMD18-T-DGAT308 为模板,扩增 308 bp 的正向与反向插入片段(图 2),构建 *GhDGAT1* 基因 RNAi 中间载体 pKANNIBAL-308SA。以 *Not* I 酶切 pKANNIBAL-308SA,并将目的片段连接至 pART27 载体,经酶切验证(图 3),获得 *GhDGAT1* 基因 RNAi 载体 pARTDGATi。

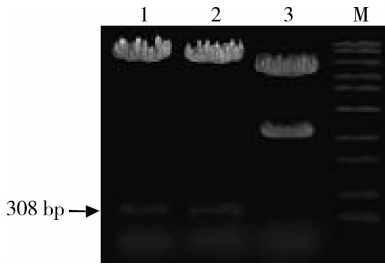


1. 正向片段;2. 反向片段;M. D2000 plus DNA ladder.

1. Forward fragments; 2. Reverse fragment; M. D2000 plus DNA ladder.

图 2 RNA 干扰片段的扩增

Fig. 2 Amplification of RNAi fragments



1. *Xho* I 和 *Kpn* I 双酶切 pARTDGATi 获得的正向片段; 2. *Cal* I 和 *Bam*H I 双酶切 pARTDGATi 获得的反向片段; 3. *Not* I 单酶切获得的正向片段 + Intron + 反向片段; M. D15000 plus DNA ladder.

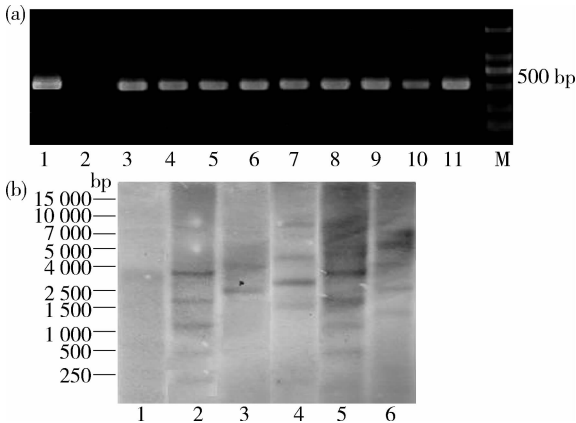
1. pARTDGATi double enzyme digestion with *Xho* I and *Kpn* I to obtain forward fragments; 2. pARTDGATi double enzyme digestion with *Cal* I and *Bam*H I to obtain reverse fragments; 3. pARTDGATi single enzyme digestion with *Not* I to obtain forward fragments + Intron + reverse fragments; M. D15000 plus DNA ladder.

图 3 pARTDGATi 载体酶切验证

Fig. 3 Enzyme digestion and verification of pARTDGATi vector

### 2.2 RNAi 载体转化棉花与阳性植株鉴定

纯化 pARTDGATi 载体质粒, 以非转基因材料 11-0513 为受体, 应用花粉管通道法将质粒注射至受体开花 20~24 h 的子房, 挂牌标记。收获  $T_0$  代种子播种, 经卡那霉素涂抹筛选、PCR 鉴定获得阳性植株(图 4(a))。选取部分  $T_1$  植株, 以扩增的



(a) 1, 阳性对照; 2, 阴性对照; 3~11, 转基因阳性植株; M, D2000 DNA ladder. (b) 1, 阴性对照; 2~6, 转基因拷贝数检测。

(a) 1, positive control; 2, negative control; 3-11, transgenic positive plants; M, D2000 DNA ladder. (b) 1, non-transformed plant as control. 2-6, transgenic individuals.

图 4 pARTDGATi  $T_1$  代转基因阳性植株鉴定与拷贝数检测

Fig. 4 PCR and Southern blotting analysis of pARTDGATi  $T_1$  transgenic plants

*NPT* II 基因部分序列为探针, 经地高辛标记, 转膜, 显色检测  $T_1$  代材料转基因拷贝数。经检测, 发现在转基因材料中转基因的拷贝数在 2~4 个之间, 如图 4(b) 所示。

### 2.3 转基因植株油分含量

为提高转基因后代的遗传稳定性, 选取插入拷贝数低的  $T_1$  代植株自交, 收获  $T_2$  代种子测定油分含量; 选取油分含量降低的  $T_2$  材料用于后续实验。田间播种  $T_2$  代转基因种子, 在苗期进行卡那霉素 (3 g/L) 涂抹, 去除检测为阴性的材料, 并取样、PCR 检测; 转基因株系材料自交, 收获  $T_3$  转基因种子, 应用近红外测定方法检测种仁含油量, 发现部分转基因株系含油量显著下降, 其中 LK063-3 株系中下降了 3.13% (图 5)。

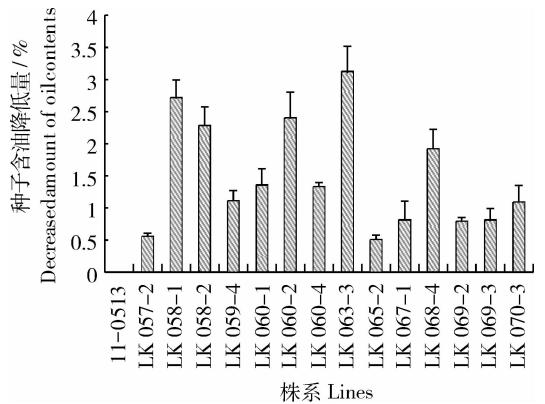


图 5 转基因株系种子油分降低量

Fig. 5 Decreased amount of oil contents in seeds of transgenic lines

### 2.4 pARTDGATi 转基因材料表达分析

选取转基因材料及对照开花后 30 d 的幼胚材料, 提取 RNA, 经反转录后, 应用 qRT-PCR 分析目的基因 *GhDGAT1* 基因的表达。与对照植株相比, *GhDGAT1* 基因在纯合的  $T_3$  代转基因幼胚中的表达量显著低于对照(图 6), 其中在株系 LK063-3 中的表达量降低 67.53%。

### 2.5 pARTDGATi 转基因株系种子的油脂、总蛋白及含糖量的测定

测定  $T_2$  代植株种子总蛋白以及可溶性糖含量, 发现种子油脂量显著减少的株系中, 总蛋白含量及可溶性糖含量分别相对提高了 4.31%~9.77% 和 11.67%~23.01% (图 7)。

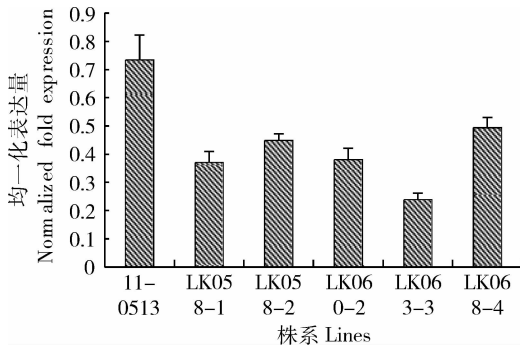


图6 *GhDGAT1* 在转基因  $T_3$  代幼胚中的表达情况

Fig. 6 *GhDGAT1* expression in  $T_3$  immature embryo of transformation plants

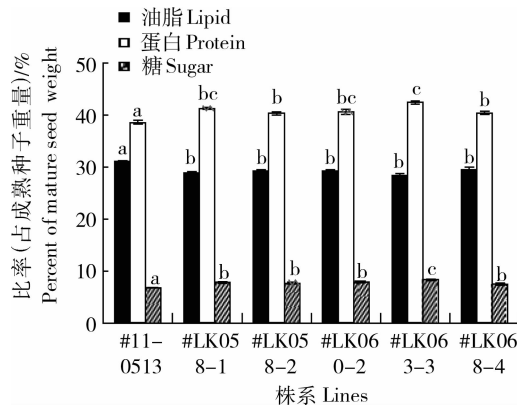


图7 pARTDGATi 转基因株系与野生性植株种子的油脂、总蛋白及含糖量

Fig. 7 Lipid, protein and sugar contents of pARTDGATi transgenic and wild type plants

## 2.6 pARTDGATi 转基因株系幼胚鲜重及可溶性蛋白含量测定

将不同转基因株系及野生型植株相同节位棉铃

挂牌标记, 取样测定 15~40 d 的棉花幼胚鲜重(10 个幼胚平均重量)及可溶性蛋白含量。与野生型相比, 转基因株系的幼胚鲜重在幼胚发育后期下降, 而可溶性蛋白含量有所升高(图 8)。

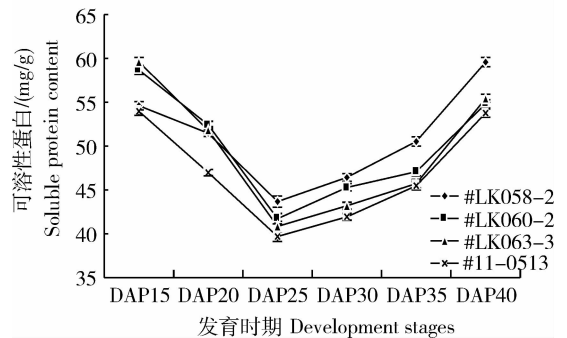
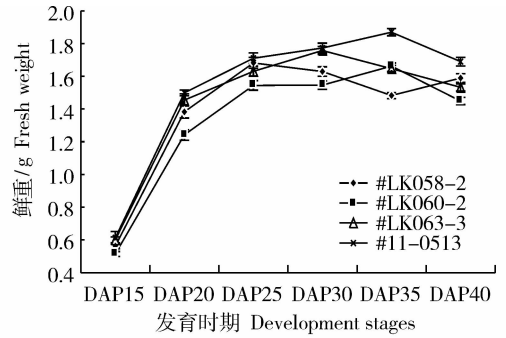


图8 pARTDGATi 转基因株系与野生性植株幼胚鲜重及可溶性蛋白含量

Fig. 8 Immature embryos fresh weights and soluble protein contents of pARTDGATi transgenic and wild type plants

## 2.7 转基因材料的表型鉴定

种植转基因  $T_2$  代种子, 调查、考察转基因株系主要农艺性状(表 2)。与对照相比, 转基因植株的

表2 pARTDGATi 转基因植株的主要农艺性状

Table 2 Main agronomic traits of pARTDGATi transgenic and wild type plants

性状 Trait	11-0513(CK)	LK060-2	LK063-3	LK065-2	LK067-1	LK170-3
株高/cm Plant height	121.00±4.24 a	106.20±5.56 bc	80.40±4.14 d	95.80±5.31 c	85.40±4.16 d	111.07±6.53 b
第一果枝高度/cm Height of primary branch	29.60±2.85 a	24.20±2.02 c	25.00±1.55 bc	23.80±2.27 c	24.20±1.01 c	26.60±1.71 b
果枝数 Branch number	13.20±0.44 a	9.40±1.52 bc	8.00±1.01 c	8.20±0.83 c	7.60±0.89 c	10.20±1.22 b
铃数 Boll number	26.60±2.30 a	28.40±4.83 a	26.80±4.02 a	30.40±4.21 a	29.60±5.04 a	26.60±2.88 a
铃重/g Boll weight	4.89±0.63 a	4.76±0.77 a	4.62±0.42 a	4.97±0.65 a	4.46±0.41 a	4.63±0.53 a
籽指/g Seed index	9.51±0.46 a	9.17±0.52 a	8.98±0.49 a	9.12±0.39 a	9.36±0.56 a	9.31±0.66 a
衣指/g Lint index	6.89±0.23 a	7.18±0.42 a	6.43±0.33 a	6.15±0.28 a	6.45±0.19 a	6.42±0.33 a
衣分/% Lint percent	39.01±1.21 a	40.49±1.77 a	42.34±1.79 a	39.89±1.21 a	39.51±2.32 a	39.87±1.35 a

续表

性状 Trait	11-0513(CK)	LK060-2	LK063-3	LK065-2	LK067-1	LK170-3
上半部平均长度/mm Upper half mean length	27.94±0.59 a	28.11±1.75 a	27.96±1.12 a	27.83±0.66 a	27.77±0.78 a	28.27±0.73 a
整齐度/% Uniformity index	84.33±1.26 a	84.61±1.78 a	83.21±0.89 a	84.34±1.48 a	84.23±1.32 a	82.76±0.72 a
断裂比强度/(cN/tex) Fracture strength	28.31±0.46 a	27.98±0.77 a	27.11±0.33 a	28.67±0.67 a	27.86±0.43 a	28.86±0.72 a
伸长率/% Elongation rate	6.49±0.22 a	6.48±0.21 a	6.49±0.23 a	6.46±0.23 a	6.49±0.20 a	6.48±0.22 a
马克隆值 Micronaire value	4.13±0.29 a	4.26±0.31 a	4.18±0.51 a	4.23±0.27 a	4.39±0.36 a	4.34±0.19 a
种子含油量/% Seed oil contents	31.14±0.13 a	28.84±0.37 b	29.22±0.29 b	29.10±0.39 b	28.38±0.38 b	29.43±0.41 b

株高、第一果枝高度、果枝数均显著降低,但其他性状,包括成铃数、铃重以及主要的纤维品质性状没有明显差异;转基因株系籽指略有降低,部分株系衣分有所提高,但均未达到显著水平。

### 3 小结与讨论

二酰甘油乙酰转移酶(DGAT)是细胞中控制三酰甘油合成的关键酶(限速酶),研究 *DGAT* 基因的表达模式及其功能,对于调控植物(尤其是油料作物)种子中碳代谢、提高三酰甘油的含量具有重要意义。本研究应用 RNA 干涉技术抑制 *GhDGAT1* 基因表达,发现棉籽三酰甘油合成受阻,影响转基因株系籽指以及发育中幼胚的重量,同时种子中总蛋白与糖含量有所增高,并发现幼胚中可溶性蛋白含量有所升高。

本研究选用带发卡结构的 *hpRNA* 干涉载体沉默棉花内源基因 *GhDGAT1* 基因,原因是 *hpRNA* 沉默结构已经被广泛应用,并具备很好的沉默效应,该方法能有效应用下调目的基因表达而研究基因功能<sup>[24-25]</sup>。研究表明,在 *AS11* 突变体中,种子含油量的减少是由于 *DGAT* 活性的降低<sup>[26]</sup>。反之,在拟南芥中过量表达 *DGAT1* 基因,能够提高种子油分含量和粒重<sup>[10]</sup>。本研究也发现,与野生型对照相比,转基因株系中 *GhDGAT1* 基因表达水平的降低与种子中油分含量呈现一定的相关性,但油分含量降低的程度明显没有 *GhDGAT1* 基因表达下调的程度高(转基因株系 LK063-3 中 *GhDGAT1* 基因表达量最高降低 60% 以上),其原因可能是 *DGAT1* 表达虽然受到显著抑制,但对其活性影响不大;另外, *DGAT1* 其他基因家族(如 *DGAT2* 基因家族)等也参与三酰甘油的合成,导致部分转基因株系油分含量维

持相对较高的水平,具体机制还需深入研究。

本研究发现抑制 *DGAT1* 基因表达会降低种子油分含量,但对其他组织部位的影响还需要进一步研究。Zhang 等<sup>[17]</sup> 研究表明,在烟草中以 35S 启动子驱动 *DGAT1* 基因 RNA 干涉会降低不同组织的油分含量,但 TAG 的酰基组成没有发生显著变化。*AS11* 突变体中,种子中的油分含量显著降低, TAG 的酰基组成也发生改变,但在叶片及根组织中油脂的脂肪酸组成没有发生变化。

在种子的油脂积累过程中,以碳水化合物形式存在的光合作用产物进入种子胚。脂肪酸及油脂合成的前体物质乙酸盐和丙酮酸盐等均来源于糖酵解代谢。种子内大部分氨基酸合成的前体物质  $\alpha$ -酮戊二酸也来源于糖酵解代谢。因此,种子内 TAG 与蛋白质的生物合成均依赖于碳水化合物的分配。本研究表明,转基因株系中种子内油脂含量比对照显著降低,蛋白质含量及糖类物质含量升高。原因可能是由于 TAG 的生物合成被抑制,其前体物质被积累,负调控过多的进入油脂合成的糖酵解代谢,导致碳水化合物积累。由于 TAG 合成受阻,积累的碳水化合物经糖酵解产生更多用于氨基酸合成的前体物质,从而增加蛋白质含量。因此,三酰甘油的生物合成与碳源进入蛋白质代谢和糖代谢之间存在负相关的关系。

对转基因株系的表型调查,发现大部分株系高度比对照显著降低,并影响第一果枝高度及果枝数。由于棉花 *DGAT1* 基因的沉默降低种子油分含量,导致转基因植株在生长早期受到影响,进而影响植株高度,其原因有待深入研究。在油菜中抑制 *DGAT1* 基因的表达,也会影响植株的生长发育,包括种子萌发率和种子产量<sup>[16]</sup>。调查转基因株系及

对照开花后 15 至 40 d 幼胚性状,发现幼胚鲜重在发育后期比对照下降,但可溶性蛋白含量明显升高,说明抑制 *GhDGAT1* 表达会影响转基因株系幼胚中的基础代谢水平。但是,本研究中转基因株系的农艺性状,除籽指略有降低外,均未受到负面影响,且棉花纤维品质性状与对照相比也无显著变化。

## 参 考 文 献

- [1] Settlage S B, Kwanyuen P, Wilson R F. Relation between diacylglycerol acyltransferase activity and oil concentration in soybean[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1998, 75(7): 775-781
- [2] Saha S, Enugutti B, Rajakumari S, et al. Cytosolic triacylglycerol biosynthetic pathway in oilseeds; Molecular cloning and expression of peanut cytosolic diacylglycerol acyltransferase[J]. *Plant Physiol*, 2006, 141(04): 1533-1543
- [3] 王龙龙, 彭振英, 邵媛媛, 等. 植物二酰甘油酰基转移酶基因 (*DGAT*) 研究进展[J]. *西北植物学报*, 2009, 29(9): 1924-1931
- [4] Bouvier-Navé P, Benveniste P, Oelkers P, et al. Expression in yeast and tobacco of plant cDNAs encoding acyl CoA: Diacylglycerol acyltransferase [J]. *Eur J Biochem*, 2000, 267(1): 85-96
- [5] Cases S, Smith S J, Zheng Y W. Identification of a gene encoding an acyl CoA: Diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 95(22): 13018-13023
- [6] Sandager L, Gustsvsson M H, Stehl U, et al. Storage lipid synthesis is non-essential in yeast[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(8): 6478-6482
- [7] Kalscheuer R, Steinbüchel A. A novel bifunctional wax ester synthase/acyl-coa:Diacylglycerol acyltransferase mediates wax ester and triacylglycerol biosynthesis in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1[J]. *J Boil Chem*, 2003, 278: 8075-8082
- [8] Shockey J M, Gidda S K, Chapital D C, et al. Tung Tree *DGAT1* and *DGAT2* have nonredundant functions in triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum[J]. *Plant Cell*, 2006, 18(9): 2294-2313
- [9] Wurie H R, Buckett L, Zammit V A. Diacylglycerol acyltransferase 2 acts upstream of diacylglycerol acyltransferase 1 and utilizes nascent diglycerides and de novo synthesized fatty acids in HepG2 cells[J]. *FEBS J*, 2012, 279(17): 3033-3047
- [10] Jako C, Kumar A, Wei Y, et al. Seed-specific over-expression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight[J]. *Plant Physiol*, 2001, 126: 861-874
- [11] Weselake R J, Shah S, Tang M, et al. Metabolic control analysis is helpful for informed genetic manipulation of oilseed rape (*Brassica napus*) to increase seed oil content[J]. *J Exp Bot*, 2008, 59: 3543-3549
- [12] Taylor D C, Zhang Y, Kumar A, et al. Molecular modification of triacylglycerol accumulation by over-expression of *DGAT1* to produce canola with increased seed oil content under field conditions[J]. *Botany*, 2009, 87: 533-543
- [13] Zheng P, Allen W B, Roesler K, et al. A phenylalanine in *DGAT* is a key determinant of oil content and composition in maize [J]. *Nat Genet*, 2008, 40: 367-372
- [14] Oakes J, Brackenridge D, Colletti R, et al. Expression of fungal *diacylglycerol acyltransferase2* genes to increase kernel oil in maize[J]. *Plant Physiol*, 2011, 155, 1146-1157
- [15] Vanhercke T, Tahchy A E, Shrestha P, et al. Synergistic effect of *WR11* and *DGAT1* coexpression on triacylglycerol biosynthesis in plants[J]. *FEBS Lett*, 2013, 587: 364-369
- [16] Lock Y Y, Snyder C L, Zhu W M, et al. Antisense suppression of type 1 diacylglycerol acyltransferase adversely affects plant development in *Brassica napus* [J]. *Physiol Plantarum*, 2009, 137: 61-71
- [17] Zhang F Y, Yang M F, Xu Y N. Silencing of *DGAT1* in tobacco causes a reduction in seed oil content[J]. *Plant Sci*, 2005, 169: 689-694
- [18] Lu C, Hills M J. *Arabidopsis* mutants deficient in diacylglycerol acyltransferase display increased sensitivity to abscisic acid, sugars, and osmotic stress during germination and seedling development[J]. *Plant Physiol*, 2002, 129: 1352-1358
- [19] 刘正杰, 张园, 王彦霞, 等. 陆地棉异质型 ACCase 基因的种子特异表达载体构建与遗传转化[J]. *分子植物育种*, 2011, 9(3): 270-277
- [20] 刘正杰, 郭宝生, 张园, 等. 棉籽油含量与成分研究与改良[J]. *分子植物育种* (online), 2012, 10 (6) : 1038-1048 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0006)
- [21] Paterson A H, Brubaker C L, Wendel J F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis[J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1993, 11: 122-127
- [22] Zhang X, Zhen J B, Li Z H, et al. Expression profile of early responsive genes under salt stress in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2011, 29: 626-637
- [23] 石雅丽. 棉花体细胞胚发生受体类激酶基因的克隆与功能分析 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2011
- [24] Wesley S V, Helliwell C A, Smith N A, et al. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants[J]. *Plant J*, 2001, 27: 581-590
- [25] Liu Q, Singh S P, Green A G. High-stearic and high-oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing [J]. *Plant Physiol*, 2002, 129: 1732-1743
- [26] Katavic V, Reed D W, Taylor D C, et al. Alteration of seed fatty acid composition by an ethylmethanesulfonate-induced mutation in *Arabidopsis thaliana* affecting diacylglycerol acyltransferase activity[J]. *Plant Physiol*, 1995, 108: 399-409