

转 *OvDREB2B* 基因陆地棉鉴定 及其对水分渗透胁迫的分析

沈海涛^{1,2},冯玉杰^{1,2},王爱英^{1,2},李予霞¹,胡鸢雷³,祝建波^{1,2*}

(1 石河子大学 生命科学学院,新疆石河子 832003;2 石河子大学 农业生物技术重点实验室,新疆石河子 832003;3 北京大学 生命科学学院,北京 100871)

摘要:通过花粉管通道技术,以该实验室自育陆地棉品系 TH₁ 和 TH₂ 为材料,将诸葛菜(*Orychophragmus vidaceus*)抗逆转录因子 *OvDREB2B* 基因构建到植物表达载体后,导入棉花基因组,经卡那霉素筛选和分子鉴定表明目的基因已整合到棉花基因组中并表达。将 T₁ 代转基因植株和受体对照在温室内栽培,待植株生长至四叶一心时,用不同渗透势的 PEG-6000 水溶液进行渗透胁迫处理,分析探讨转基因植株的抗旱效果及其抗旱机理。结果显示:当渗透势为 0 和 0.5 MPa 处理时,转基因植株和对照无明显差异;当渗透势为 0.8 MPa 和 1.1 MPa 处理时转基因植株较对照抗旱性明显提高。当渗透势为 1.1 MPa 处理 96 h 时,对照植株 F_v/F_m 降至 0.2 左右,而转基因植株仍正常生长, F_v/F_m 值约为 0.51,而且初始荧光(F_0)值、净光合速率(P_n)、胞间 CO₂ 浓度(C_i)、蒸腾速率(T_r)等一系列参数转基因植株都明显优于对照,表明 *DREB2B* 基因能够提高棉花对水分胁迫的耐受性。

关键词:二月兰; *OvDREB2B*; 棉花; 抗旱; PEG-6000

中图分类号:Q789;Q945.78 文献标志码:A

Identify and Analysis of Transgenic Upland Cotton with *OvDREB2B* Gene under Osmotic Stress

SHEN Haitao^{1,2}, FENG Yujie^{1,2}, WANG Aiying^{1,2}, LI Yuxia¹, HU Yuanlei³, ZHU Jianbo^{1,2*}

(1 College of Life Sciences of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China; 2 Key Agriculture Biotechnology of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China; 3 Life Sciences College, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: In this study, two upland cotton lines TH₁ and TH₂ were employed. The anti-retroelement OVDREB2B in *Orychophragmus vidaceus* was integrated into plant expression vector and the transformation of cotton was conducted by pollen-tube pathway. The results of Kanamycin selection and molecular analysis showed that the transgenic cotton lines with *OvDREB2B* were obtained. T₁ and receptor plants were grown in greenhouse and treated by a serial of PEG-6000 osmotic potential at seedling stage. The results indicated that the obvious difference induced by different osmotic potential (0 and 0.5 MPa) was not observed in transgenic lines and control plants. However, the transgenic lines exposed to higher osmotic potential (0.8 and 1.1 MPa) displayed a significantly better resistance to drought. Meanwhile, the transgenic plants showed the significantly higher initial fluorescence, net photosynthetic rate, intercellular CO₂ concentration and transpiration rate than did the control plants under 1.1 MPa condition for 96 h. Based on this fact, *DREB2B* gene resulted in the development of transgenic lines resistant to drought stress.

收稿日期:2013-04-16;修改稿收到日期:2013-11-27

基金项目:国家转基因专项(2011zx08011-002);兵团青年科技创新资金专项(2013cb010)

作者简介:沈海涛(1980—),男,硕士,助理研究员,主要从事植物基因工程研究。E-mail:ghost521@126.com

* 通信作者:祝建波,研究员,主要从事植物基因工程研究。E-mail:274831213@qq.com

Key words: *Orychophragmus vidaceus*; *OvDREB2B*; *Gossypium hirsutum*; drought resistance; PEG-6000

DREB类转录因子是植物所特有的一类在非生物逆境胁迫应答中起重要作用的蛋白分子。此类转录因子含有一个由58个氨基酸组成的AP2/EREBP保守结构域,该结构域能与耐逆基因启动子中的DRE/CRT顺式原件特异结合,启动基因表达,因而DREB转录因子被认为可能与植物对干旱、高盐和低温应答的基因调控有重要关系^[1]。目前,已从拟南芥、水稻、玉米、小麦、黑麦、大豆、西红柿和油菜等几十种植物中分离并鉴定出调控干旱、高盐及低温耐性的DREB基因,并利用这些基因得到了抗逆性增强的拟南芥、油菜、西红柿、小麦以及杨树等转基因植株。转基因结果表明DREB转录因子家族在双子叶植物、单子叶植物、草本植物及木本植物抗逆品种改良中均具有重要的应用价值^[2]。拟南芥中DREB类基因分为DREB1和DREB2两类,DREB1类基因被低温胁迫诱导,但不被干旱和高盐胁迫诱导,而DREB2类基因可被干旱和高盐胁迫诱导,不被低温胁迫诱导^[3]。Kazuo Nakashima在拟南芥中利用拟南芥DREB2A和DREB2B启动子融合GUS基因在拟南芥中表达,发现干旱胁迫后DREB2A启动子驱动GUS表达量高于DREB2B,说明DREB2A可能对提高植物干旱胁迫更有效^[4]。然而,Matsukura等利用启动子rd29A驱动水稻OsDREB2B和OsDREB2A转化拟南芥,转基因拟南芥经水分胁迫后OsDREB2B表达量显著增加^[5],而OsDREB2A未被检测到,这可能是拟南芥中基因转录后修饰系统与水稻不同,导致水稻的OsDREB2A在转化拟南芥后不能正常表达^[6]。所以,外源DREB2B转化植株后受植株本身的转录后修饰导致基因沉默的风险可能小于DREB2A。

植物在水分胁迫下,植物叶片荧光参数和光合速率是反映植物抗旱性的重要指标。植物受水分胁迫后,羧化反应相关酶的活性和中间产物的合成受到抑制,导致光合机构的光抑制,严重时还可引起光破坏^[7-8],干旱胁迫加重时放氧复合体OEC会受到损害,随之PSⅡ活性降低会导致激发能的上升,活性氧自由基ROS浓度升高,伤害PSⅡ与PSⅠ之间的电子传递链以及PSⅡ供、受体侧和反应中心,使活性氧代谢失调,破坏生物膜结构,最终引起光合作用下降^[9-10]。所以,植物在水分胁迫下测定光合参数和荧光参数是反映植物抗旱性的重要指标。本研

究将来源于耐旱、耐寒的诸葛菜(*Orychophragmus vidaceus*)的转录因子基因OvDREB2B导入新疆陆地棉品种系TH₁和TH₂,使其能够表达并稳定遗传。采用PEG-6000作为水分渗透胁迫剂处理转基因植株和对照植株,利用Li-6400和Handy PEA检测处理植株的光合及荧光各项指标,分析转OvDREB2B基因棉花抗旱性,以期为新疆陆地棉抗旱育种提供新材料,创造新种质资源。

1 材料和方法

1.1 材料

诸葛菜OvDREB2B基因由北京大学生命科学学院林忠平教授提供。转基因受体为本实验室自育陆地棉品种系TH₁和TH₂。大肠杆菌TOP10、农杆菌GV3101、植物表达载体pCAMBIA-2300由本实验室保存。Taq DNA聚合酶、T₄ DNA连接酶、限制性内切酶、DNA Marker、pGM-T载体和DNA片段回收试剂盒均购自大连TaKaRa公司;大肠杆菌感受态细胞TOP10和反转录试剂盒购自天根生物技术有限公司;基因序列测定由华大基因公司完成;卡那霉素、高纯度质粒大提试剂盒购自天根生化科技有限公司;其他化学试剂为国产分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 植物表达载体构建及鉴定 根据OvDREB2B基因序列设计引物,上游引物P₁(5'-AATCTAGGC-CTCGAGCAGACG-3'),下游引物P₂(5'-TACAGTA-AGCGGCTCCGACG-3')。20 μL PCR体系包含克隆载体质粒DNA 2 μL、10×buffer 2 μL、dNTP(25 mmol/L)0.3 μL、MgCl₂(25 mmol/L)1 μL、上游引物(20 mmol/L)0.5 μL、下游引物(20 mmol/L)0.5 μL、Tap酶0.3 μL(2.5~5 U/μL)、ddH₂O 13.4 μL。反应程序:94 °C预变性5 min,94 °C变性30 s,55 °C退火45 s,72 °C延伸30 s,30个循环后延伸7 min,琼脂糖凝胶电泳分离后,获得690 bp左右的DNA片段,回收目的片段。将回收的目的片段与克隆载体pGM-T连接,将连接产物转化TOP10感受态细胞。通过抗生素及α互补筛选,挑取阳性克隆,用SDS碱裂解法小量提取质粒,PCR检测。利用EcoRI和BamHI双酶切克隆载体和植物表达载体pCAMBIA-2300,并进行连接,获得植物表达载体pCAMBIA-2300-OvDREB2B(图1),利用电转化法将该载体转化农杆菌GV3101,挑取阳性克隆进行PCR鉴定。

1.2.2 花粉管通道法转化棉花 花粉管通道法参照马盾等采用的方法^[11]。在棉花植株开花受精后12 h内,将外源基因溶液涂抹在柱头上,或用微量注射器顺着花粉管通道注射进入卵细胞。

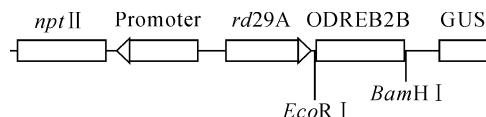


图1 质粒pCAMBIA-2300-OvDREB2B构建图

Fig. 1 Structure of plasmid pCAMBIA-2300-OvDREB2B

1.2.3 转基因棉花卡那霉素筛选 将部分收获的棉花种子在石河子大学试验场进行田间种植,种植密度为30株/m²。待植株第二片真叶展开时进行第一次卡那霉素抗性筛选,检测浓度为2 500 mg/L。1周后观察检测结果,拔除卡那霉素检测呈阴性即叶片表面出现黄色斑点的植株,余下植株每隔1周重复上一次卡那霉素检测操作,连续3次,检测浓度依次为3 000、5 000和7 000 mg/L。将4次卡那霉素检测呈阳性的植株挂牌标记。利用PCR和RT-PCR技术对卡那霉素检测阳性植株进行分子检测,分子检测为阴性植株去牌淘汰。

1.2.4 分子检测 PCR检测:取卡那霉素检测呈阳性的植株幼嫩叶片,参照CTAB法提取叶片总DNA,用OvDREB2B基因特异性引物P₁和P₂进行PCR和RT-PCR检测。

拷贝数检测:随机选取一部分独立来源的经PCR验证的T₀转基因植株和非转化对照植株大量提取基因组DNA。取转基因植株DNA,用Hind III酶切后,在0.8%琼脂糖凝胶上电泳分离,然后转移到Hybond-N+尼龙膜上。根据OvDREB2B基因序列设计引物制备探针、PCR扩增体系及程序见1.2.1。分子杂交和信号检测采用Amersham Pharmacia Biotech公司生产的ECL试剂盒,方法依照操作手册。

1.2.5 转基因棉花渗透胁迫处理 用0.1%HgCl₂溶液处理供试棉种5 min,自来水冲洗干净后,置于28℃培养箱催芽,选发芽程度一致的种子,播种于装有河沙的塑料盆中,在生长室内培养。幼苗出土后用1/2浓度Hoagland营养液浇灌。每天光照时间14 h, Li-250A光照计测得为1 074 lx,昼夜温度28℃/20℃。幼苗生长至四叶一心时,选取长势一致的转基因幼苗和受体对照,用PEG-6000配成0 MPa(0 g/L)、0.5 MPa(193 g/L)、0.8 MPa(251 g/L)和1.1 MPa(298 g/L)4种不同水势的

1/2浓度Hoagland溶液进行水分胁迫处理,每个处理9个重复。处理后0、24、48和96 h测定各处理植株倒四叶的光合参数和荧光特性。

1.2.6 光合特性和荧光特性分析 天气晴朗的正午12:00~16:00,气温在22℃~24℃之间,将待测植株从生长室移至室外,光适应30 min,利用调整好的光合仪Li-6400进行相关光合参数的测定。将待测植株暗适应处理20 min后,用Handy PEA荧光测定仪(英国Hansatech公司)测定荧光特性。

1.2.7 数据分析 利用SPSS 18.0对实验数据进行单变量多因素曲线图分析。

2 结果与分析

2.1 分子检测

利用特异性引物进行PCR扩增提取北京大学林忠平教授提供的OvDREB2B基因载体,连接克隆载体pGM-T,转化感受态细胞TOP₁₀并测序。将测序正确的目的基因连接到植物表达载体pCAMBIA-2300,通过花粉管通道技术将OvDREB2B基因导入本实验室自育陆地棉品种系TH₁和TH₂。后代植株经卡那霉素筛选获得转OvDREB2B基因的TH₁植株7株和转OvDREB2B基因的TH₂植株6株。用CTAB法提取13个转基因植株基因组DNA,并进行PCR扩增。结果表明,转基因受体TH₁和TH₂各有4个转基因植株(TH₁-O₁~TH₁-O₄和TH₂-O₁~TH₂-O₄)与质粒对照(pCAMBIA-2301-OvDREB2B)一致,在690 bp左右有目的条带(图2)。选取其中2个农艺性状和产量性状较好的转基因株系(TH₁-O₂和TH₂-O₄)为研究材料,在温室内进行种植,待

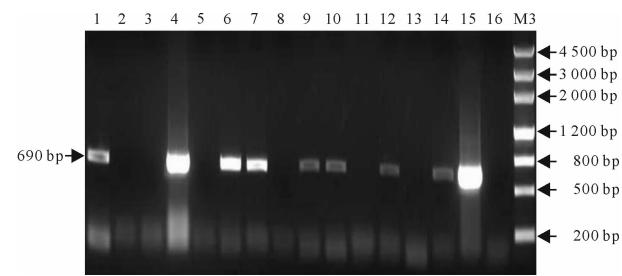


图2 转OvDREB2B基因棉花PCR检测

M3. Marker III; 1~7. 转OvDREB2B基因TH₁植株; 8. TH₁非转基因植株; 9~14. TH₂转OvDREB2B基因植株; 15. 质粒pCAMBIA-2301-OvDREB2B; 16. TH₂非转基因植株

Fig. 2 PCR test of transgenic cotton plants

M3. Marker III; 1~7. Transgenic OvDREB2B cotton TH₁; 8. Cotton TH₁; 9~14. Transgenic OvDREB2B cotton TH₂; 15. Plasmid pCAMBIA-2301-OvDREB2B; 16. Cotton TH₂

植株生长至四叶一心时,提取顶部新叶总RNA,进行RT-PCR检测鉴定(图3),表明OvDREB2B基因在转基因植株中成功表达。利用Southern杂交技术对转基因植株拷贝数进行分析,结果显示,转基因株系TH₁-O₂和TH₂-O₄各有2个杂交条带,说明OvDREB2B基因为双拷贝插入(图4)。

2.2 PEG胁迫下转OvDREB2B基因对棉花叶片最大光化学效率与初始荧光的变化

在不同浓度PEG-6000胁迫处理不同时间,棉花荧光动力学参数 F_v/F_m 影响线性关系,随着渗透势和处理时间的增加 F_v/F_m 值逐渐降低(图5~6)。渗透势为0 MPa和0.5 MPa时,转基因植株与对照在处理不同时间的差异并不明显,为0.6左右;当渗透势为0.8 MPa和1.1 MPa胁迫24 h,转基因株系荧光动力学参数下降幅度明显低于对照。渗透势1.1 MPa处理96 h,对照植株已严重脱水萎蔫, F_v/F_m 降至0.2左右,而转基因植株仍正常生长, F_v/F_m 值为约0.51,未出现脱水症状。

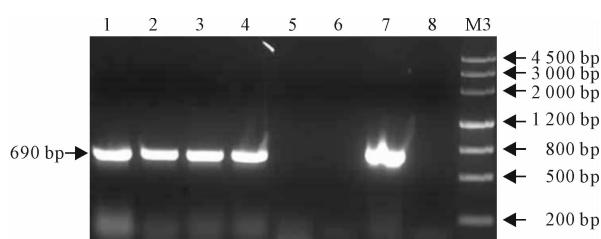


图3 转OvDREB2B基因棉花RT-PCR检测

M3. Marker III; 1,2. TH₁转OvDREB2B基因植株;3,4. TH₂转OvDREB2B基因植株;5. TH₁非转基因植株;6. TH₂非转基因植株;7. 质粒pCambia-2300-OvDREB2B;8. 空白质粒

Fig. 3 RT-PCR of transgenic cotton

M3. Marker III; 1,2. Transgenic OvDREB2B cotton TH₁; 3,4. Transgenic OvDREB2B cotton TH₂; 5. Cotton TH₁; 6. Cotton TH₂; 7. Plasmid pCambia-2300-OvDREB2B; 8. Plasmid pCambia-2300

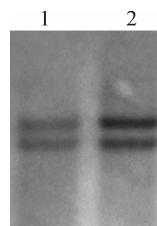


图4 转OvDREB2B基因棉花Southern检测

1. TH₁转OvDREB2B基因植株;
2. TH₂转OvDREB2B基因植株
Fig. 4 Southern blot of transgenic cotton
1. OvDREB2B transgenic cotton TH₁;
2. OvDREB2B transgenic cotton TH₂

转基因植株受到PEG-6000胁迫后, F_o 明显低于对照。对照植株TH₁和TH₂随渗透势和处理时间的增加, F_o 也逐渐增大,增幅远高于转基因植株,依次为TH₂-O₄<TH₁-O₂<TH₁<TH₂(图7)。

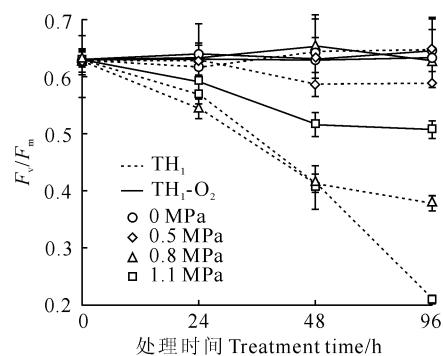


图5 水分渗透胁迫对TH₁以及转OvDREB2B基因棉花TH₁-O₂的 F_v/F_m 的影响

Fig. 5 Effects of PEG-6000 stress on F_v/F_m of OvDREB2B transgenic cotton and TH₁

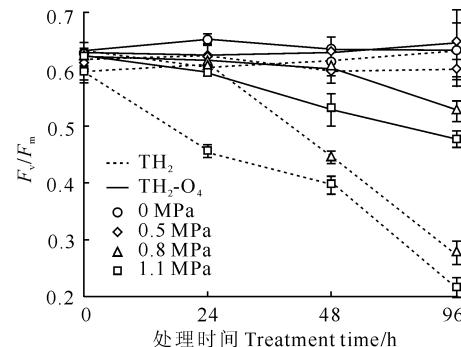


图6 水分渗透胁迫对TH₂以及转OvDREB2B基因棉花TH₂-O₄的 F_v/F_m 影响

Fig. 6 Effects of PEG-6000 stress on F_v/F_m of OvDREB2B transgenic cotton and TH₂

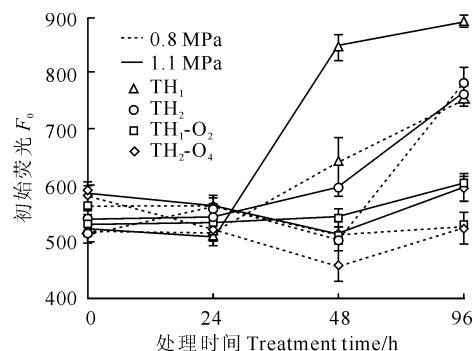


图7 水分渗透胁迫对TH₁、TH₂以及转OvDREB2B基因棉花 F_o 的影响

Fig. 7 Effect of PEG-6000 stress on F_o of OvDREB2B transgenic cotton and TH₁ and TH₂

2.3 PEG-6000 贯透胁迫对转OvDREB2B基因棉花叶片光合性能及蒸腾速率的影响

2.3.1 净光合速率 对照植株由于水分胁迫,光合速率随胁迫时间的延长逐渐降低,当渗透势为0.8

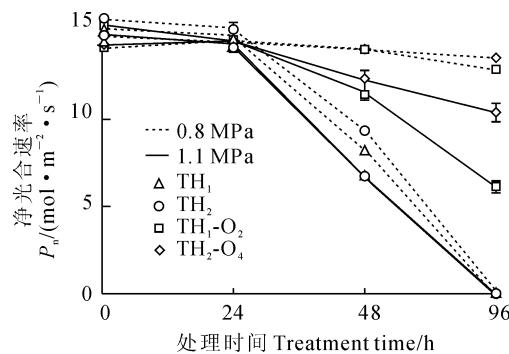


图8 水分渗透胁迫对TH₁、TH₂以及转OvDREB2B基因棉花P_n的影响

Fig. 8 Effect of PEG-6000 stress on P_n of OvDREB2B transgenic cotton and TH₁ and TH₂

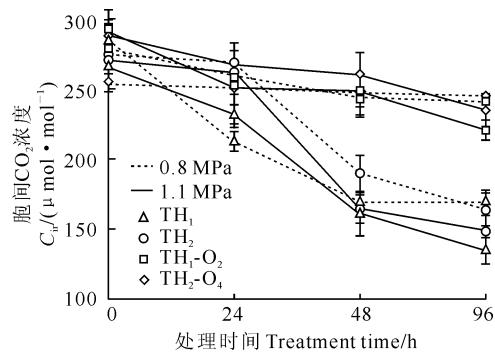


图9 水分渗透胁迫对TH₁、TH₂以及转OvDREB2B基因棉花C_i的影响

Fig. 9 Effect of PEG-6000 stress on C_i of OvDREB2B transgenic cotton and TH₁ and TH₂

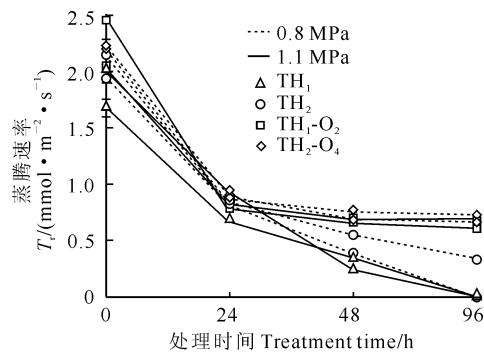


图10 水分渗透胁迫对TH₁、TH₂以及转OvDREB2B基因棉花T_r的影响

Fig. 10 Effect of PEG-6000 stress on T_r of OvDREB2B transgenic cotton and TH₁ and TH₂

MPa和1.1 MPa胁迫96 h后, P_n 降低至0。转基因植株 P_n 变化趋势与对照相似,但降低幅度明显小于对照,渗透势1.1 MPa胁迫转基因植株96 h,转基因植株 P_n 仍维持在5以上(图8)。

2.3.2 胞间CO₂浓度 经0.8 MPa和1.1 MPa水分渗透胁迫处理后,对照植株随胁迫时间的增加 C_i 呈逐渐降低趋势。说明对照植株短时间水分胁迫后气孔关闭,导致 C_i 降低,当处理24 h后,由于持续水分胁迫导致叶绿体受到损伤,PSⅡ系统受到破坏, C_i 持续下降,处理96 h后, C_i 达到150左右。转基因植株随胁迫时间的增加 C_i 一直呈缓慢下降趋势,下降速率明显小于对照,胁迫处理96 h后 C_i 处于240和260之间(图9)。

2.3.3 蒸腾速率 转基因植株和对照经水分渗透胁迫处理后, T_r 的变化趋势与 P_n 相似,都随渗透势的增大胁迫时间的增加而降低。对照植株 T_r 降低速率明显高于转基因植株,当渗透势为1.1 MPa 处理对照植株96 h后, T_r 降至0,而转基因植株 T_r 仍为0.75左右(图10)。

3 讨 论

本研究利用PEG-6000对转OvDREB2B基因棉花植株及对照植株进行渗透胁迫处理,研究OvDREB2B基因提高棉花抗旱方面的功能。结果显示:转基因植株受水分渗透胁迫后荧光参数和光合参数明显优于对照植株。当植株受水分胁迫,初始荧光 F_0 显著上升, F_v/F_m 陡然降低意味着干旱胁迫对棉花叶片光系统Ⅱ(PSⅡ)的活性中心产生伤害,破坏了对照植株PSⅡ的反应中心和部分蛋白复合体的结构^[12],抑制光合作用的原初反应,这对光合速率的下降起着非常重要的影响。而且,植株受水分胁迫后导致气孔关闭,胞间CO₂浓度降低,蒸腾速率也随之降低,从而进一步影响植株的光合效率^[13]。对照植株经渗透势1.1 MPa处理96 h后,光合速率几乎为0,光合作用基本停滞,而转基因植株经渗透胁迫处理后,荧光参数和光合参数的各项指标变化明显小于对照,即使渗透势为1.1 MPa处理96 h,转基因植株光合效率只降低30%~50%。OvDREB2B基因提高植物抗旱性的机理可能是由于在逆境胁迫下DREB2类基因不仅有转录因子的作用,而且可能还具有应急激活调节作用(如磷酸化酶)^[3]。DREB2B基因转录产物是植物受水分胁迫下激活rd29A和其他DRE/CRT调节的靶基因所必需^[4],从而提高植物对水分胁迫的耐受性。

rd29A 驱动 *DREB2B* 基因在转基因植株受水分胁迫后会在叶、根和茎中大量表达,脯氨酸、可溶性糖、甜菜碱等渗透调节物质明显增加^[4,14-16],从而减轻

在轻度或中度水分胁迫对植物叶肉细胞的伤害,降低水分胁迫对叶片 PSⅡ 系统的伤害,维持正常的细胞代谢活动。

参考文献:

- [1] RIECHMANN J L, HEARD J, MARTIN G, et al. *Arabidopsis* transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes [J]. *Science*, 2000, **290**(5 499): 2 105—2 110.
- [2] CHEN J H(陈金焕), XIA X L(夏新莉), YIN W L(尹伟伦). Advances on plant *DREB* transcription factors and their genetic transformation[J]. *Molecular Plant Breeding*(分子植物育种), 2007, **5**(6): 29—35(in Chinese).
- [3] LIU Q, ZHAO N M. Two transcription factors, *DREB1* and *DREB2*, with an *EREBP/AP2* DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 1998, **10**(8): 1 391—1 406.
- [4] KAZUO NAKASHIMA, ZABTA K SHINWARI, YOH SAKUMA, et al. Organization and expression of two *Arabidopsis* *DREB2* genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression[J]. *Plant Molecular Biology*, 2000, **42**(4): 657—665.
- [5] MATSUKURA S, MIZOI J, YOSHIDA T, et al. Comprehensive analysis of rice *DREB2*-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes[J]. *Mol. Genet Genomics*, 2010, **283**(2): 185—196.
- [6] DUBOUZET J G, SAKUMA Y, ITO Y, et al. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, highsalt- and cold-responsive gene expression[J]. *Plant J.*, 2003, **33**(4): 751—776.
- [7] QUICK W P, CHAVES M M, WENDLER R, et al. The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions[J]. *Plant and Cell Environment*, 1992, **15**(1): 25—35.
- [8] LONG S P, HUMPHRIES S, FALKOWSKI P G. Photoinhibition of photosynthesis in nature[J]. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1994, **45**: 633—662.
- [9] MÜLLER P, LI X P, NIYOGI K K. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy[J]. *Plant Physiology*, 2001, **125**(4): 1 558—1 566.
- [10] FOYER C H, NOCTOR G. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context[J]. *Plant and Cell Environment*, 2005, **28**(8): 1 056—1 071.
- [11] MA D(马盾), HUANG L P(黄乐平), HUANG Y SH(黄全生), et al. Study on improvement of pollen tube pathway transformation efficiency through field concrete operation[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*(西北农业学报), 2005, **14**(1): 10—12(in Chinese).
- [12] OUKARROUM A, SCHANSKER G, STRASSER R J. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl a fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance[J]. *Physiologia Plantarum*, 2009, **137**(2): 188—199.
- [13] ATTIPALLI R R, KOLLURU V C, MUNUSAMY V. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants[J]. *Plant Physiol.*, 2004, **136**(11): 1 189—1 202.
- [14] HAO X Y(郝晓燕), CHEN M(陈明), XU H J(徐惠君). Obtaining of transgenic wheats with GH-DREB gene and their physiological index analysis on drought tolerance[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*(西南植物学报), 2005, **18**(5): 616—620(in Chinese).
- [15] LIU Y Y(刘洋洋), GUO D(郭栋), CHU X SH(楚秀生). Determination of physiological index on drought tolerance for new transgenic wheat lines with *DREB* genes[J]. *Shandong Agricultural Sciences*(山东农业科学), 2013, **45**(3): 38—41(in Chinese).
- [16] 施肖堃. 转 *DREB* 基因甘蔗的抗旱性评价及其遗传稳定性分析[D]. 福州:福建农林大学, 2010.