

转 CBF_1 基因棉花的耐旱生理研究

孔德真, 崔郑龙, 柴秀娟, 祝建波, 沈海涛, 王爱英*

(新疆石河子大学 生命科学学院, 新疆石河子 832000)

摘要:以转 CBF_1 基因棉花及其野生型棉花为材料, 设置轻度(900 mL)、中度(400 mL)、重度(300 mL)和对照(1 200 mL)浇水处理的不同干旱胁迫和复水处理, 考察各种处理后对盆栽植株不同部位叶片光合性能和离体叶片在暗处理条件下叶绿素含量的变化, 以及在大田苗期、蕾期、花期、铃期断水胁迫对棉花产量的影响, 为转基因抗旱棉花新品种的培育提供理论依据。结果表明: (1) 在盆栽试验中, 随着干旱胁迫时间的延长和复水 3 d 处理, 各浇水处理的转基因和野生型棉花叶片净光合速率(P_n)、原初光能转化效率(F_v/F_m)表现出先降低后增加的变化趋势, 受到胁迫后对顶部叶片的影响比中部叶片大, 且转基因棉花叶片保留数量显著高于野生型棉花; 它们的离体叶片叶绿素 a、叶绿素 b 的含量随着干旱胁迫时间的延长而逐渐下降, 但转基因棉花的下降速率显著低于野生型棉花。(2) 在田间试验的苗期、蕾期、花期、铃期干旱胁迫下, 各干旱胁迫处理的转基因植株的皮棉产量、衣分、种子质量、株高均显著高于野生型棉花; 转基因棉花的籽棉产量分别比正常灌溉处理降低了 78.4%、55.1%、12.7%、8.3%, 野生型棉花则分别降低了 80.4%、55.4%、19.2%、14.4%, 不同时期的水分胁迫严重影响了棉花籽棉产量, 但是转基因棉花的籽棉产量显著高于野生型棉花。研究认为, 在不同干旱胁迫条件下, 转 CBF_1 基因棉花表现出优良的生长和生理优势, 可提高棉花的耐旱性。

关键词: 转基因棉花; 耐旱性; CBF_1 ; 光合效率; 叶绿素含量

中图分类号: Q945.79

文献标志码: A

Drought-tolerant Physiology of CBF_1 Transgenic Cotton

KONG Dezhen, CUI Zhenglong, CHAI Xiujuan, ZHU Jianbo, SHEN Haitao, WANG Aiying*

(College of Life Science, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China)

Abstract: In this study, the effects of mild(900 mL), moderate(400 mL), severe(300 mL) and CK(1 200 mL) drought stress and rewatering on CBF_1 transgenic cotton (24C-1) and wild type (TH_1) by different sites of leaf photosynthetic parameter and chlorophyll content changes of vitro leaf in dark conditions, and field experiment at seedling stage, bud stage, flowering stage, the bell stage with water stress treatments on production. The results showed that: (1) From the drought stress with different times to re-water 3 d, the net photosynthetic rate(P_n) and maximal photochemical efficiency(F_v/F_m) showed a trend of increasing firstly, decreasing then. Leaf retain number were significantly higher than that of wild type plant, at the top of the leaves is greatly damage to compare middle leaves under drought stress; with the stress time extended that Chl a, Chl b contents decreased, the decreased rate were significantly higher than that of wild type plant. (2) For the date of field experiment compared with normal irrigation treatment water stress at the seedling stage, bud stage, flower stage, bell stage the lint yield, seed index, seed quality, plant height of cotton decreased significantly, transgenic and wild type of the seed cotton yield reduced by 78.4%, 55.1%,

收稿日期: 2014-12-15; 修改稿收到日期: 2015-11-05

基金项目: 转基因专项(2016ZX08011)转基因棉花环境安全评价技术

作者简介: 孔德真(1987—), 男, 在读硕士研究生, 主要从事环境生物技术研究工作。

* 通信作者: 王爱英, 副研究员, 主要从事环境生物技术以及安全性评价的相关研究。E-mail: way-sh@126.com

12.7%, 8.3% and 80.4%, 55.4%, 19.2%, 14.4%, respectively. The cotton yields of different stages have been affected by the water stress. But transgenic cotton yields are still significantly higher than that of wild type. These results demonstrated that the *CBF₁* gene expression enhanced the growth and development of the transgenic cotton plant, and indicated that the *CBF₁* transgenic cotton could improve the drought resistance.

Key words: GM cotton; drought tolerance; *CBF₁*; photosynthetic efficiency; chlorophyll contents

气候变暖导致气候灾害中干旱对农业生产的危害越来越严重,并成为影响作物产量的一个重要逆境。植物受到干旱胁迫后,植物启动一系列干旱胁迫相关基因的表达,从分子水平、细胞水平和生理生化水平做出应答反应,从而实现抗(耐)性反应^[1];干旱胁迫也是影响植物光合作用的最重要因素之一,它能导致植物光合器官的损伤,从而抑制光合作用^[2]。棉花是一种世界范围内的经济作物,其产区主要分布在干旱和半干旱地区,水分供应不足是影响棉花产量的一个重要因素^[3]。通过转基因技术,获得具有耐旱性的转基因棉花,采用不同方法的干旱胁迫来评价转基因棉花的耐旱性,对获得具有耐旱性的新型棉花品种具有重要作用。

CBF 又称为 DREB (DRE binding factor) 1 转录因子,在近年来植物非生物胁迫研究中受到了广泛的关注,成为最主要的研究热点^[4]。CBF (C-重复结合因子) 转录因子是一个包括 *CBF₁*、*CBF₂*、*CBF₃* 和 *CBF₄* 的小基因家族^[5-6]。利用 CBF 转录因子提高植株的抗旱能力是一条行之有效的途径。目前已经在水稻、小麦、玉米、棉花、烟草、黄瓜、番茄等许多植物中成功地获得了抗逆性提高的转 CBF 转录因子的植株^[7]。

棉花新品种的培育是一个长期的过程,并且其遗传稳定性要通过不同的逆境胁迫检测,以及多方面的生理性状的测定,最终考察其产量和品质。在生产实践中,通过对农艺性状的分析来评价转基因棉花抗旱性具有重要意义,尤其对棉花产量和品质影响最为明显^[8];而众多研究表明,在不同干旱条件下棉花叶片光合速率降低,光合产物合成减少^[9];在棉花不同生长时期通过测定光合数据可以反映棉花的生长状况^[10];通过对红花幼苗以不同干旱胁迫处理的研究发现,在不同胁迫条件下它的生长和生理特性具有明显地不同^[11]。而研究短期干旱胁迫解除前后对转基因和野生型棉花生理生态响应尚少见报道。本研究以转 *CBF₁* 基因的棉花及其野生型为材料,分别进行室内盆栽胁迫实验和大田干旱胁迫实验,测定在不同生育阶段棉苗的光合速率和叶绿

素荧光,以及干旱胁迫对转基因棉花的生理性状影响,为转基因棉花新品种的培育提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 植物材料

转基因 *CBF₁* (从拟南芥中克隆) 棉花 24C-1 为石河子大学农业生物技术重点实验室通过花粉管通道法获得,高代纯合并稳定遗传,分子鉴定为阳性株系,野生型对照 TH₁ 为培育的高代材料。

1.2 试验设计

1.2.1 不同水分环境干旱胁迫 选用 30 cm × 20 cm 的聚乙烯塑料花盆,每盆中装入相同重量的草炭土:蛭石:珍珠岩(2:1:1)的混合土,混合拌土浇入相同量的水;种子表面消毒后,无菌水浸泡,露白时选择发芽一致的种子播种,出苗后,选择在两叶一心时定苗,每盆中保留 3 棵长势一致的棉苗。待棉苗长到 6 片叶时,为了模拟棉花生长的不同水分环境,干旱处理前,对转基因(24C-1)和野生型(TH₁)棉花分别浇水 300、400、900、1 200 mL (正常浇水量,对照)进行不同水分环境处理;按照设计进行间断性浇水管理 15 d 后,使转基因和野生型材料都适应各设定水分生长环境,然后采用同时断水的干旱胁迫处理,并且在断水处理时间分别持续 3、7、14 d 和采用 1 200 mL 复水 3 d 后取样,测定 24C-1 和 TH₁ 植株的各项指标;每个处理 3 次重复,培养室温度维持在 28 ℃,空气相对湿度为 50%。

1.2.2 不同生育时期的干旱胁迫 试验地位于新疆石河子大学试验基地(44°20'N, 85°30'E),转基因棉花试验地四周用 3 m 围墙封闭。该区位于新疆北疆特早熟棉花种植生态区,气候为温带大陆性气候。一年中最高温度出现在 7 月份,平均温度为 25.5 ℃,最高气温达 42.2 ℃;最低气温出现在 1 月份,平均气温为 -17.1 ℃,最低气温达到 -36.8 ℃。无霜期 161~171 d。年均降水量 213 mm,年蒸发量 1 537 mm,降雨季节多出现在夏季,也是棉花生长的关键时期。

2013 年夏季降雨量为 40 mm,比历年同期平均

值偏少 20%~40%。大田划分(2.25 m×5 m)小区,采取膜下灌溉的方式,在 24C-1 和 TH₁ 棉花苗期、蕾期、花期和铃期剪断膜下滴灌带进行干旱胁迫处理,以整个生育期持续灌溉为对照,该处理灌水量与盆栽 1 200 mL 浇水的正常灌水处理相同。播期为 2013-4-20,人工挑播,行距 0.5 m,播深 2~3 cm,每穴播 2 粒,每处理播种 1 小区,小区行长 5 m,共 3 行,每处理重复 3 次,随机排列。每个小区的其他管理方式都与普通大田管理方式相同,各项产量指标在每个时期断水后进行测定。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 净光合速率 在盆栽苗干旱处理不同时间(3、7、14 d 和 1 200 mL 复水 3 d),采用 Li-6400(美国 Li-COR 公司)便携式光合仪测定棉株顶部(幼叶)和中部(成熟叶)叶片的净光合速率(P_n)。仪器使用开放式气路,测定光源为内置光源,光强为 $1\ 000\ \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。每次随即选取 3 株,每株选取一片叶测定,结果取平均值。

1.3.2 最大光化学效率 用 Dual-PAM-100 荧光仪测定棉株顶部和中部叶片的 F_v/F_m 。每张叶片测定 3 次,结果取其平均值。

1.3.3 叶绿素含量 选取干旱胁迫处理前、盆栽 1 200 mL 浇水处理生长正常转基因和野生型棉花植株,取相同部位且叶面积大小相等的叶片,放入已经用水浸湿滤纸的培养皿中,分别在 28 °C 暗培养 0、2、4、6 d 后,取相同质量的叶片,参照邹琦^[12]方法测定叶片叶绿素 a、叶绿素 b 含量。

1.3.4 叶片数量 在测定净光合速率和最大光化学效率前,选取不同浇水处理的转基因和野生棉花植株,统计每个时间段的单株叶片数量,每次每个时期的叶片统计 3 次取平均值。

1.3.5 产量指标 大田试验干旱胁迫后在收获期采收,分别测定转基因 CBF_1 棉花和野生型对照棉花在苗期、蕾期、花期、铃期断水和全生育期浇水处理小区的籽棉、皮棉、子指、衣分。

1.4 数据处理

试验数据采用 Excel 2003 作图,用 SPSS 统计软件进行相关统计分析。

2 结果与分析

2.1 干旱胁迫对转基因棉花光合和荧光性能的影响

2.1.1 净光合速率 由表 1 可知,在同一浇水量条件下,随着断水胁迫时间的延长,转基因和 CK 棉花

的顶叶和中部叶片的 P_n 总体表现出逐渐降低的趋势,复水 3 d 后有所恢复,但仍显著低于断水胁迫前水平;与顶叶相比较,相应中部叶片 P_n 随胁迫时间的延长下降速率在正常浇水量条件下(1 200 mL)较高,而在不同缺水条件下(300~900 mL 灌水量)较低;与 CK 植株相比较,转基因棉花植株叶片 P_n 的下降幅度较低,且胁迫时间越长趋势越明显。如在 400 mL 浇水量条件下,转基因棉花的顶部和中部叶片净光合速率(P_n)断水胁迫期间分别比断水前下降了 2.3%~83.9%和 13.1%~73.3%,相应野生型棉花则分别降低了 13.1%~77.9%和 6.1%~81.3%。

另外,在同一胁迫时间内,随着浇水量的逐渐降低,转基因和野生型棉花的顶叶和中部叶片的净光合速率(P_n)总体表现出逐渐降低的趋势;转基因植株始终高于野生型棉花植株,且降低幅度较小;与顶部叶片相比,中部叶片的 P_n 在正常浇水量(1 200 mL)较低,在缺水(300~900 mL 灌水量)较高。如断水胁迫 14 d 时,转基因棉花植株顶部和中部叶片 P_n 在缺水处理(300~900 mL 灌水量)比正常浇水处理(1 200 mL)分别降低 67.6%~78.3%和 73.0%~84.0%,CK 棉花则分别降低 70.3%~94.0%和 73.3%~95.0%。以上结果表明,转基因和野生型棉花植株在受到不同程度的干旱胁迫后净光合速率都受到了很大的抑制,但野生型棉花植株的抑制程度较转基因植株严重,顶部叶片受到的影响较中部叶片大。

2.1.2 原初光能转化效率 叶绿素荧光是光合作用的探针,任何环境因子对光合作用的影响都可以通过叶绿素荧光动力学反映出来^[13]。原初光能转化效率(F_v/F_m)表示一个植物的最大潜在光合作用。当植物受到干旱胁迫变化时,植物自生潜在的 F_v/F_m 发生了变化,在这种环境下它反映了植物对逆境的一种适应能力,随着胁迫程度的不断加剧,转基因棉花和野生型棉花的 PS II 反应中心受到了可逆性的失活和破坏。

由表 2 可知,在同一浇水量条件下,随着断水胁迫时间的延长,转基因和野生型棉花的顶叶和中部叶片的原初光能转化效率(F_v/F_m)总体表现出逐渐降低的趋势,复水 3 d 后虽有所恢复,但仍极显著($P < 0.01$)低于断水胁迫前水平;与顶部叶片相比较,相应中部叶片 F_v/F_m 随胁迫时间的延长下降速率在正常浇水量条件下(1 200 mL)较高,而在不同缺水条件下(300~900 mL 灌水量)较低;与野生型植

表 1 盆栽转基因和野生型棉花在不同水分处理和时间对净光合速率的影响

Table 1 Effect of different drought treatments on the P_n of potting transgenic and the non-transgenic of cotton

浇水处理 Water treatment/mL	叶位 Leaf position	材料 Material	处理时间 Treatment time/d				
			CK	3	7	14	Re-water 3
1 200	顶部 Upper	24C-1	6.6±0.21a	6.4±0.35a	1.0±0.25ab**	1.4±0.17ab**	1.7±0.23a**
		TH ₁	6.6±0.11ab	4.1±0.06b*	1.5±0.02a**	1.5±0.06a**	1.4±0.07ab**
	中部 Middle	24C-1	7.5±0.14a	7.5±0.07a	1.2±0.15a**	1.3±0.03a**	1.9±0.01a**
		TH ₁	6.4±0.31b	1.5±0.14b**	0.6±0.48b**	0.5±0.15ab**	0.5±0.10b**
900	顶部 Upper	24C-1	5.7±0.35a	5.6±0.06a	1.8±0.44a**	0.5±0.04a**	1.8±0.01ab**
		TH ₁	4.4±0.14b	4.3±0.06b	1.7±0.44ab**	0.7±0.04ab**	1.9±0.01a**
	中部 Middle	24C-1	4.0±0.24a	3.9±0.11a	1.9±0.60a*	0.8±0.12ab**	2.0±0.08a*
		TH ₁	3.1±0.11ab	2.7±0.12b	1.5±0.61ab*	0.8±0.12a**	1.7±0.07ab*
400	顶部 Upper	24C-1	4.2±0.21a	4.1±0.04a*	1.7±0.18a**	1.2±0.11a**	1.9±0.04a*
		TH ₁	3.6±0.18b	3.1±0.05b	1.1±0.60ab**	0.8±0.06b**	1.5±0.03ab*
	中部 Middle	24C-1	3.1±0.23a	2.7±0.31a	1.5±0.05a*	0.8±0.10a**	1.2±0.05a*
		TH ₁	2.9±0.42ab	2.7±0.05ab	1.1±0.06ab*	0.5±0.06ab**	1.1±0.13ab*
300	顶部 Upper	24C-1	4.0±0.35a	3.9±0.65a	1.2±0.07a*	1.0±0.19a*	1.4±0.08a*
		TH ₁	0.5±0.45b	0.4±0.19b	0.3±0.31b*	0.2±0.19b**	0.3±0.16ab*
	中部 Middle	24C-1	4.0±0.15a	2.9±0.26a*	1.6±0.29a**	1.2±0.06a**	1.4±0.40a**
		TH ₁	0.5±0.23b	0.5±0.10b*	0.4±0.19b*	0.2±0.19b**	0.3±0.06b**

注:24C-1.转基因棉花;TH₁.野生型棉花;同列不同小写字母表示同一处理相同叶位转基因植株与野生型植株在0.05水平存在显著差异;同行*和**分别表示不同时间段的胁迫处理与胁迫前(CK)在0.05和0.01水平上存在差异性。下同。

Note:24C-1. Transgenic cotton; TH₁. Wild type cotton; Different normal letters in the same column mean significant difference among transgenic and wild type cotton at 0.05 level; * and ** within same row stand for significant difference between control and transgenic plant at 0.05 and 0.01 level, respectively. The same as blow.

表 2 不同浇水处理和时间对盆栽转基因和野生型棉花原初光能转化效率的影响

Table 2 Effect of different drought treatments on F_v/F_m of potting transgenic and the non-transgenic of cotton

浇水处理 Water treatment/mL	叶位 Leaf position	材料 Material	处理时间 Treatment time/d				
			CK	3	7	14	Re-water 3
1 200	顶部 Upper	24C-1	0.62±0.01a	0.59±0.06a	0.51±0.03a*	0.43±0.01a**	0.51±0.02a*
		TH ₁	0.55±0.03ab	0.54±0.02ab	0.51±0.02ab*	0.45±0.01ab**	0.47±0.02ab**
	中部 Middle	24C-1	0.59±0.02a	0.58±0.06a	0.53±0.02a*	0.47±0.01a**	0.53±0.02a*
		TH ₁	0.59±0.03ab	0.56±0.02ab	0.51±0.01ab*	0.46±0.02ab**	0.50±0.10b*
900	顶部 Upper	24C-1	0.58±0.02a	0.56±0.02a	0.50±0.03a*	0.42±0.02a**	0.51±0.02a*
		TH ₁	0.52±0.05b	0.51±0.02b	0.45±0.02b*	0.40±0.02b**	0.49±0.07b*
	中部 Middle	24C-1	0.54±0.04a	0.53±0.01a	0.52±0.04a	0.44±0.01ab**	0.50±0.02a*
		TH ₁	0.51±0.01ab	0.51±0.04b	0.47±0.01b*	0.47±0.02a*	0.50±0.05ab*
400	顶部 Upper	24C-1	0.53±0.05a	0.52±0.02a	0.51±0.03a	0.45±0.02a**	0.48±0.02a*
		TH ₁	0.51±0.04ab	0.46±0.02b*	0.44±0.05b*	0.44±0.02ab*	0.46±0.07ab
	中部 Middle	24C-1	0.53±0.05a	0.51±0.01a	0.50±0.01a*	0.46±0.01a	0.46±0.01a*
		TH ₁	0.50±0.05ab	0.50±0.04ab	0.45±0.04b*	0.42±0.02ab**	0.46±0.01ab*
300	顶部 Upper	24C-1	0.50±0.03a	0.54±0.02a	0.52±0.03a	0.43±0.02a**	0.51±0.02a*
		TH ₁	0.52±0.06ab	0.52±0.02ab	0.49±0.02b*	0.37±0.02b**	0.46±0.02b
	中部 Middle	24C-1	0.54±0.03a	0.53±0.01a	0.51±0.01a*	0.44±0.01a**	0.50±0.02a*
		TH ₁	0.52±0.05ab	0.51±0.07b	0.50±0.01ab*	0.41±0.04b**	0.42±0.07b**

株相比较,转基因棉花植株叶片 F_v/F_m 下降幅度较低,且胁迫时间越长趋势越明显。如在 300 mL 浇水量条件下,转基因棉花的顶部和中部叶片原初光能转化效率(F_v/F_m)断水胁迫期间分别比断水前下降了1.8%~10.5%和1.6%~18.1%,相应野生型棉花则分别降低了0%~30.1%和2.1%~20.9%。

另外,在同一胁迫时间内,随着浇水量的逐渐降低,转基因和野生型棉花的顶叶和中部叶片的原初光能转化效率(F_v/F_m)总体表现出逐渐降低的趋势;转基因植株始终高于野生型棉花,且降低幅度较小;与顶部叶片相比,中部叶片在浇水量(1 200 mL)较低,在缺水(300~900 mL 灌水量)较高。如断水胁迫 14 d 时,转基因棉花植株顶部和中部叶片(F_v/F_m)在缺水处理(300~900 mL 灌水量)比正常浇水处理(1 200 mL)分别降低 0~6.1%和 0~13.8%,CK 棉花则分别降低 1.9%~4.5%和0.4%~15.0%。以上结果表明,转基因和野生型棉花植株在受到不同程度干旱胁迫后净光合速率都受到了很大抑制,但野生型棉花的抑制程度较转基因植株严重,顶部叶片受到的影响较中部叶片大。以上结果表明,干旱胁迫程度的逐渐加强,胁迫时间越长,野生型棉花植株 F_v/F_m 下降幅度显著($P<0.05$)大于转基因棉花,说明其光系统 II 反应中心受损更加严重;当采用相同浇水量和处理时间,干旱胁迫对顶部棉株叶片的 F_v/F_m 值大于中部叶片,表明中部叶片的影响较顶部叶片大。

2.2 干旱胁迫对转基因棉花叶片数量的影响

植物叶片的数量在一定程度上反映了植株的耐旱性。由表 3 可知,在同一浇水量条件下,随着断水胁迫时间的延长,转基因和野生型棉花的叶片保留数量总体表现出逐渐降低的趋势,复水 3 d 后仍然

没有恢复;与野生型棉花相比较,转基因棉花植株保留叶片的下降幅度较低,且胁迫时间越长趋势越明显。如在 300 mL 浇水量条件下,转基因棉花叶片保留数量在断水胁迫期间分别比断水前下降了 0~58.1%,相应野生型棉花则分别降低了 1.3%~62.1%。

另外,在同一胁迫时间内,随着浇水量的逐渐降低,转基因和野生型棉花的叶片保留数量总体表现出逐渐降低的趋势;转基因植株始终高于野生型植株,且降低幅度较小。如断水胁迫 14 d 时,转基因棉花植株在缺水处理(300~900 mL 灌水量)比正常浇水处理(1 200 mL)分别降低 4.1%~45.9%,野生型棉花则分别降低 12.5%~58.4%。以上结果表明,随着干旱的不断加剧,叶片保留数量逐渐减少,植物本身的总光合速率下降,生理速率减慢,从而积累干物质的量下降。

2.3 干旱胁迫对转基因棉花叶片叶绿素含量的影响

植物叶绿素的稳定性在一定程度上反映了植株的耐旱性。由图 1 可知,在同一暗处理条件下,随着处理时间的延长,转基因和野生型棉花的叶绿素 a 和叶绿素 b 总体表现出逐渐降低的趋势。与叶绿素 b 相比较,叶绿素 a 在相应叶片中的含量随胁迫时间的延长下降速率在处理前较高,而在不同的处理时间下(2~6 d)较低;与野生型棉花相比较,转基因棉花植株叶片中叶绿素含量的下降幅度较低,且胁迫时间越长趋势越明显。如在处理时间不断延长的条件下,转基因棉花叶片的叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量处理期间分别比处理前下降了 1.9%~15.5%和 1.6%~9.8%,相应野生型棉花则分别降低了 7.8%~26.6%和5.7%~5.8%。以上结果表明,

表 3 不同浇水处理和时间对盆栽转基因和野生型棉花叶片数量的影响
Table 3 Effect of different drought treatments on the leaf number of potting transgenic and the non-transgenic of cotton

浇水处理 Water treatment/mL	材料 Material	处理时间 Treatment time/d				
		CK	3	7	14	Re-water 3
1 200	24C-1	14.6±0.57a	14.6±0.57a	12.3±0.57a*	9.0±1.00a*	8.0±1.73a*
	TH ₁	14.6±0.57ab	14.3±0.57ab	12.9±0.57ab*	8.7±0.58ab*	8.0±1.73ab*
900	24C-1	14.3±0.57a	14.3±0.57a	11.3±0.57a*	8.0±0.00a**	7.7±0.57a**
	TH ₁	14.4±0.57ab	14.3±0.57ab	11.0±1.00ab*	7.3±1.15b**	7.0±0.57ab**
400	24C-1	10.6±0.57a	10.5±0.57a	8.7±0.57a*	6.0±1.00a**	4.7±0.57a**
	TH ₁	9.7±0.57ab	9.3±0.57ab	7.3±0.57ab*	4.3±0.58b**	4.0±0.00ab**
300	24C-1	10.3±0.57a	10.3±0.57a	7.7±0.58a*	5.3±0.58a**	4.3±0.57a**
	TH ₁	8.8±0.57b	8.6±0.57b	6.3±0.58ab*	4.3±0.58ab**	3.3±0.57b**

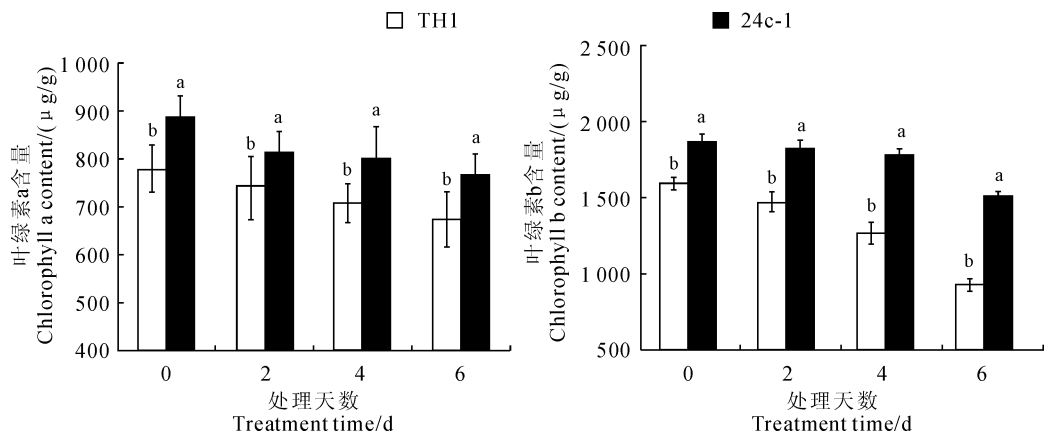


图 1 不同暗处理时间对盆栽转基因和对照棉花叶片鲜重叶绿素含量的影响

同期不同字母表示材料间在 0.05 水平存在显著差异

Fig. 1 Effect of chlorophyll contents of potting transgenic and the non-transgenic of cotton leaf fresh weight under different dark treatments

The different normal letters within the same stage mean significant difference between transgenic and wild type cotton at 0.05 level

表 4 不同时期的干旱胁迫处理对形态和产量的影响(2013)

Table 4 Effect of morphology and yield with drought treatments at different stages(2013)

品种(系) Variety(line)	处理期 Treatment period	株高 Plant height/cm	籽棉产量 Seed cotton yield/g	皮棉产量 Lint yield/g	子指 Seed index/g	种子质量 Seed quality/g	衣分 Fiber yield
苗期 Seedling stage	24C-1	9.0±1.2	92.6±4.1 *	41.3±1.7	7.8±0.4	48.8±2.4	0.45±0.01
	TH ₁	8.1±0.7	84.8±2.7	36.3±1.4	8.4±0.2	48.5±1.6	0.43±0.07
蕾期 Bud stage	24C-1	20.1±0.6 *	192.3±4.2	82.2±2.6	9.6±0.2	104.4±1.6	0.43±0.04 *
	TH ₁	17.3±1.3	191.2±5.6	76.5±1.9	8.6±0.3	114.7±3.7 *	0.40±0.00
花期 Flower stage	24C-1	37.7±2.5	374.2±7.3 *	148.0±2.4 *	9.7±0.1	226.2±5.2 *	0.40±0.03
	TH ₁	34.8±1.1	346.4±4.6	131.7±4.2	10.7±0.2	214.7±1.4	0.38±0.07
铃期 Fluid stage	24C-1	44.0±1.5	393.0±6.1 *	152.0±1.4 *	9.8±0.1d	241.0±4.6	0.39±0.02 *
	TH ₁	40.3±1.5	367.2±6.1	132.9±2.9	10.4±0.5 *	244.3±3.2	0.36±0.02
全生育期 Normal	24C-1	66.4±2.5	429.1±9.1	164.7±6.9	10.8±0.4	264.4±2.4 *	0.38±0.08
	TH ₁	69.9±1.4	428.7±2.2	162.0±0.6	9.9±0.2	250.2±2.5	0.38±0.02

注：* 和 ** 分别表示在同行野生型和转基因棉花在 0.05 和 0.01 水平存在显著性差异。

Note: * and ** in the same row stand for significant difference between wild type and transgenic plant at 0.05 and 0.01 level, respectively.

在胁迫条件下植物体内积累了大量的活性氧,叶绿素 a 对活性氧的反应较叶绿素 b 敏感,使得叶绿素 a 的降低幅度大于叶绿素 b,导致叶绿素含量降低,从而抑制了光合作用中光能的吸收和转化。

2.4 干旱胁迫对转基因棉花形态和产量的影响

由表 4 可知,受到水分干旱胁迫后,转基因和野生型棉花在苗期、蕾期、花期、铃期断水后株高、籽棉产量、皮棉产量、子指和种子质量总体表现出逐渐增加的趋势,而衣分表现出降低的趋势;与野生型棉花相比较,转基因棉花植株的下降幅度较低,且胁迫越严重趋势越明显。在不同时期的断水条件下,转基因棉花的株高、籽棉产量、皮棉产量、子指、种子质量和衣分在断水胁迫期间分别比全生育期减少率为

33.7%~86.5%、8.3%~78.4%、7.7%~74.9%、9.2%~27.8%、8.8%~81.5%、5.5%~23.5%;相应野生型棉花则分别降低了 42.4%~88.4%、14.4%~80.4%、18.0%~77.6%、0~15.2%、2.5%~80.6%、0~12.0%。以上结果表明,干旱胁迫严重影响了棉花在自然条件下的形态和产量,转基因棉花在受到干旱胁迫后,表现出更强的生长优势,积累更多的生物量,来适应自然环境的变化。

3 讨论

通常认为,不同程度的干旱胁迫造成了光合中心结构受损,由于部分调控基因对光合中心具有修复的作用,从而使受损的光合中心能及时恢复功能,

光合作用也能达到一定水平^[14]。 CBF 是一个基因家族,在植物耐冷、耐旱、耐盐等抗逆反应中起着“开关”作用,过量表达 CBF_1 基因能活化所有带有 CRT/DRE 元件的冷诱导基因表达,调控下游的多个抗旱基因的表达,提高了植物的抗性。在本研究中选择 F_v/F_m 荧光参数,一方面主要说明干旱缺水条件能诱导 CBF_1 基因的表达,调节 1、5-二磷酸核酮糖羧化酶(rubisco)基因的过量表达,增大光电子的传递和电子的有效转化,另一方面与光电子吸收和传递相关的叶绿素含量的资料相互印证。植物光合速率和荧光速率下降的主要原因有两个方面:一是干旱直接影响光合结构和活性,类囊体膜的组分、透性和流动性,叶绿体的亚显微结构、叶绿素 a/b 值和光合作用中的光化学反应、羧化反应的变化;二是在干旱胁迫下,抗旱能力强的植株具有高的叶绿素含量和光合能力。多种因素调控气孔的运动,并影响光合速率及光合电子传递等其它光合生理过程^[15]。本研究通过 1 200、900、400 和 300 mL 浇水量处理模拟不同的干旱胁迫环境,随着断水处理时间的延长,干旱胁迫逐渐增强,当采用 900~300 mL 浇水处理时,转基因棉花和 CK 棉花的净光合速率和最大光化学效率显著地下降,但是较正常浇水处理(1 200 mL)下降的幅度显著低于野生型棉花。成熟度不同叶片对外界干旱环境的响应是不同的,在本研究中,分别对中部成熟叶片和顶部未完全成熟叶片,通过不同的干旱胁迫下净光合速率和最大光化学效率的变化进行了研究,在相同的水分条件下,随着干旱时间的增加,净光合速率和最大光化学效率在中部成熟叶片中变化较小,说明中部成熟叶片对干旱环境具有较强的适应能力, CBF_1 基因在成熟叶片中的表达量高于未成熟叶片。 CBF_1 基因是一个诱导表达基因,在不同干旱环境诱导下,基因表现出不同的表达水平,在本研究中转基因棉花耐旱性能显著高于 CK 棉花,这与文献资料上对番茄抗旱性的研究结果保持一致。 CBF_1 基因调控下游多个基因的过量表达,包括过氧化氢酶基因,消除植物体内过量的活性氧自由基,使植物内部光合结构的可逆性修复,从而提高了植物在逆境条件下的光合能力。干旱胁迫下转基因棉花的光合参数和荧光参数与抗旱性能密切相关,对棉花的抗旱性能的评价起一个指导性的作用。

植物在干旱逆境条件下,植物内部一些组织结构和酶的结构发生了可逆性的变化,叶绿素发生了可逆性的分解,从而使叶片的颜色发生变化,植物本

身的光合速率和产物积累下降。叶绿素是植物对逆境反应敏感性的生理指标,大量的研究表明,干旱胁迫通过抑制叶绿素合成,并加速其分解,导致叶绿素含量直线下降^[16]。本研究中棉花植株叶片叶绿素 a 和叶绿素 b 含量在脱离植株本身、处于胁迫缺水状态下时,随着时间的延长,胁迫越来越严重,叶绿素含量的下降比较明显。叶绿素含量的高低在一定程度上代表植物光合性能的高低,植物光合和荧光速率参数的大小,一方面由外部光照强度和 CO_2 浓度决定,另一方面由内部光合结构的完整性和叶绿素含量的高低决定。棉花叶片数量随着干旱胁迫时间的不断延长而逐渐减少,在干旱胁迫 14 d 时,由于中度(400 mL 浇水)和重度(300 mL 浇水)缺水环境下植物表现出了严重的不可逆脱水,使整个植物的总光合速率降至最低值。在进行相同水量的复水后,转基因和 CK 棉花都有不同程度的恢复,但转基因棉花较 CK 棉花恢复情况好,这与其光合速率和荧光速率的测定结果保持一致。在本试验中随着干旱胁迫处理时间的延长,转基因棉花和 CK 棉花的叶绿素含量和叶片数量都有一定的降低,但是 CK 棉花较转基因棉花下降率明显偏高。这与其光合与荧光参数的下降趋势保持一致。这可能与植物体内 CBF_1 基因调控下游与抗旱相关基因的过量表达有关。

目前,通过外源基因的转化技术,将目的基因导入到棉花基因组中进行表达成为棉花遗传改良的重要手段,从而通过导入抗旱基因来提高棉花的抗旱性。棉花的抗旱性是多种因素综合作用的结果,水分通过影响包括生理代谢在内的各种作用进而影响了产量^[17]。棉花在不同时期的干旱胁迫处理下光合产物产量积累的高低可直接反映在棉花的产量上。在本研究中,选取遗传稳定的转基因棉花植株作为本试验的材料,采用室内盆栽不同的浇水量来模拟棉花不同生长环境和大田小区不同生长时期断水的方法,利用转基因植株农艺性状与生理指标相互补充与印证,更好地证明 CBF_1 基因能提高棉花生长过程中应对干旱胁迫的能力。本试验选取的各项指标是相关试验中比较成熟的指标体系,转基因棉花的各项指标都优于 CK 棉花,因此转 CBF_1 基因能有效提高棉花耐旱性。在后续的研究中将通过不同时期的断水和复水试验,来探究该时期的缺水对转基因棉花产量影响是否最大,为大田棉花生产节水提供依据。

参考文献:

- [1] SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, **58**(2): 221–227.
- [2] 许大全. 光合作用效率[M]. 上海: 上海科学技术出版, 2009: 2–42.
- [3] LI D X(李东晓), LI C D(李存东), SUN CH F(孙传范), *et al.* The effects of drought on endogenous hormone contents and balance in main stem leaves of cotton[J]. *Cotton Science*(棉花学报), 2010, **22**(3): 231–235(in Chinese).
- [4] ZHOU M Q, SHEN C, WU L H, *et al.* CBF-dependent signaling pathway: a key responder to low temperature stress in plants[J]. *Crit Rev. Biotechnol.*, 2011, **31**(2): 186–192.
- [5] HAAKE VOLKER DANIEL, RIECHMANN J L, *et al.* Transcription factor *CBF₁* is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2002, **130**(2): 639–648.
- [6] ZHAN G X, MANDAOKAR A, CHEN J P, *et al.* *Arabidopsis* *ESK1* encodes a novel regulator of freezing tolerance[J]. *The Plant Journal*, 2007, **49**: 786–799.
- [7] XU CH B(徐春波), WANG Y(王 勇), ZHAO H X(赵海霞), *et al.* Research progress on CBF transcription factor applied to genetic engineering China[J]. *Journal of Anhui Agri. Sci.*(安徽农业科学), 2010, **38**(4): 1 723–1 726(in Chinese).
- [8] CAI Y ZH(蔡永智), ZHU J B(祝建波), WANG A Y(王爱英), *et al.* Drought resistance of *KatG* transgenic cotton[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*(西北植物学报), 2013, **22**(12): 56–61(in Chinese).
- [9] LIU R X(刘瑞显), WANG Y H(王友华), CHEN B L(陈冰林), *et al.* Effects of nitrogen levels on photosynthesis and chlorophyll fluorescence characteristics under drought stress in cotton flowering and bollforming stage[J]. *Acta Agronomic Sinica*(作物学报), 2008, **34**(4): 675–683(in Chinese).
- [10] WANG H X(王海霞), YANG J(杨 晶), ZHANG Y M(张亚敏), *et al.* Drought resistance of cotton with *Escherichia coli* catlase gene *KatE*[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*(西北植物学报), 2014, **34**(10): 2 034–2 040(in Chinese).
- [11] SANG Z Y(桑子阳), MA L Y(马履一), CHEN F J(陈发菊), *et al.* Growth and physiological characteristics of *Magnolia wufengensis* seedlings under drought stress[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*(西北植物学报), 2012, **31**(1): 109–155(in Chinese).
- [12] YANG W Q(杨文权), GU M Y(顾沐宇), GUAN J C(冠建村), *et al.* Effects of drought and rewatering on the photosynthesis and chlorophyll fluorescence of *Coronilla varia*[J]. *Acta Agrestia Sinica*(草地学报), 2013, **6**(15): 1 007–1 0435(in Chinese).
- [13] MAXWELL K, JOHNSON G N. Chlorophyll fluorescence: a practical guide[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2000, **51**(345): 659–668.
- [14] 余叔文, 汤章城. 植物生理与分子生物学(2版)[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 126–128.
- [15] ZHOU Y F(周宇飞), WANG D Q(王德权), WANG N(王 娜), *et al.* Effects of drought stress on photosynthetic characteristics and endogenous hormone ABA and CTK contents in greenstayed sorghum[J]. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), 2014, **47**(4): 655–663(in Chinese).
- [16] LI F L(李芳兰), BAO W K(包维楷), WU N(吴 宁). Morphological and physiological responses of current *Sophoradavidii* seedlings to drought stress[J]. *Acta Ecologica Sinica*(生态学报), 2009, **29**(10): 5 406–5 416(in Chinese).
- [17] CAI H T(蔡红涛), TANG Y Z(汤一卒), DIAO P CH(刁品春), *et al.* Regulating effect of soil progressive drought on yield of cotton during blooming and bolling periods[J]. *Cotton Science*(棉花学报), 2008, **20**(4): 300–305(in Chinese).

(编辑: 裴阿卫)