

转 *AhCMO* 基因棉花苗期对干旱胁迫的生理反应

朱玉庆^{1,2}, 罗 振¹, 张慧军³, 孔祥强¹, 陈受宜⁴, 董合忠^{1*}, 孙学振^{2*}

(1. 山东省农业科学院棉花研究中心, 济南 250100; 2. 山东农业大学农学院, 山东 泰安 271018; 3. 山西省农业科学院棉花研究所, 山西 运城 044000; 4. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101)

摘要:以转 *AhCMO* 基因的 2 个棉花品系 L1 和 L2 及其转化受体泗棉 3 号(SM3)为材料,研究了转 *AhCMO* 基因棉花对干旱胁迫的生理反应。试验采用盆栽方式在日光温室中进行,以维持土壤含水量为最大持水量的 45% 作为干旱处理,以正常供水维持土壤含水量为最大持水量的 75% 作为对照。结果表明,正常供水条件下转基因品系 L1 和 L2 与 SM3 生长表现一致。但是干旱胁迫下,转基因品系 L1 和 L2 的干物质积累量、平均净光合速率以及叶片叶绿素的含量都显著高于 SM3;而且 L1 和 L2 叶片中甜菜碱含量显著高于 SM3,过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)的活性也较 SM3 显著提高。说明 2 个转 *AhCMO* 基因品系的耐旱性得到明显提高,耐旱性的提高与甜菜碱积累量的增加、POD 和 SOD 活性的增强有关。

关键词:棉花; *AhCMO* 基因; 干旱胁迫; 生理反应

中图分类号:S562.048 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2010)05-0443-05

Physiological Responses of *AhCMO* Transgenic Cotton Seedlings to Water-Deficit

ZHU Yu-qing^{1,2}, LUO Zhen¹, ZHANG Hui-jun³, KONG Xiang-qiang¹, CHEN Shou-yi⁴, DONG He-zhong^{1*}, SUN Xue-zhen^{2*}

(1. Cotton Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China; 2. Agronomy College, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China; 3. Cotton Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Yuncheng, Shanxi 044000, China; 4. Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Water-deficit treatment was conducted on two *AhCMO* transgenic cotton lines (L1 and L2) and a non-transgenic cv. Simian 3 (SM3) to study the physiological responses in seedling stage of *AhCMO* transgenic cotton, by using pots filled with fertile soil in a green house. Soil moistures were maintained 45% and 75% of the soil water capacity as the drought-stressed treatment and the non-stressed control, respectively. No obvious morphological or developmental differences existed between the transgenic lines (L1 and L2) and field plants in the absence of drought stress. The contents of glycine betain, activities of antioxidant enzymes (POD and SOD), the biomass, net photosynthesis rates and leaf chlorophyll content of transgenic *AhCMO* cotton lines (L1 and L2) were observably higher than those of SM3 at 20 d after stress treatment had been applied. It is suggested that the enhanced accumulation of glycine betain and the increase of the activities of antioxidant enzymes (POD and SOD) improved water-deficit tolerance in transgenic cotton plants.

Key words: cotton; *AhCMO* gene; water-deficit; physiological response

棉花虽比较耐旱,但随着水资源的日益匮乏,干旱已成为发展棉花生产的重要自然灾害^[1]。干旱主要影响包括光合作用在内的多种生理活动,减缓或抑制棉株的生长发育,最终导致减产^[2]。

其中植物体内活性氧的产生与清除机制失衡是造成伤害的重要原因之一。甜菜碱(glycine betain, GB)是生物界广泛存在的一种非毒性渗透调节物质,它不但能够在逆境胁迫下维持细胞膨

收稿日期:2010-02-02 作者简介:朱玉庆(1983-),男,硕士;*通讯作者, donghz@saas.ac.cn; sunxz@sdau.edu.cn

基金项目:转基因生物新品种培育科技重大专项(2009ZX08005-018B);国家自然科学基金(30971720)和山东省农业良种工程重大课题(2009LZ005-05)

压,而且还具有稳定酶的活性和细胞膜结构、清除自由基等作用^[3-4]。在高等植物中,甜菜碱的合成是以胆碱为底物经胆碱单氧化物酶(CMO)催化生成甜菜碱醛,然后甜菜碱醛经甜菜碱醛脱氢酶(BADH)催化生成甜菜碱。其中,由胆碱单氧化物酶催化的第一步反应是限速步骤^[5]。沈义国等^[6]克隆了山菠菜CMO基因并将其与35S启动子连接后转化烟草,转基因植株在200 mmol·L⁻¹ NaCl的胁迫下生长良好。张慧军等^[7]证明过量表达AhCMO基因提高了棉花的耐盐性。植物耐盐和耐旱具有许多相似的机制,其中,在植物中积累渗透保护物质可以同时提高植物的耐盐和耐旱能力。沈义国等^[8]通过向烟草转入AhCMO基因提高了烟草的耐旱性。本试验以转基因受体泗棉3号(SM3)为对照,研究了干旱胁迫下携带山菠菜AhCMO基因的棉花品系的生理表现,以期鉴定转AhCMO基因棉花的耐旱性,并探索耐旱性变化的生理学机制。

1 材料和方法

1.1 试验材料与设计

2个转基因品系L1和L2是以陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.)品种泗棉3号(SM3)为转化受体,通过组织培养和农杆菌介导的方法转入从山菠菜(*Atriplex hortensis*)中克隆的AhCMO基因而得到的^[7]。L1、L2和SM3的种子经硫酸脱绒,清水冲洗后晾干。

试验采用10 L塑料盆(上直径25 cm,下直径15 cm),装入肥沃土壤(1.2%有机质,500 mg·kg⁻¹全氮,15 mg·kg⁻¹有效磷和120 mg·kg⁻¹有效钾)。取上述种子30粒播入塑料盆中。种子发芽出苗、棉苗生长以及干旱处理等均在山东棉花研究中心楼顶日光温室内完成。温室温度(夜/昼)保持在(20~25)/(30~35)℃。待棉苗长到2片真叶时,以维持土壤含水量为最大持水量的45%作为干旱处理,以正常供水维持土壤含水量为最大持水量的75%作为对照。每处理重复4次。每天早晚各称重1次,通过及时补水维持设计的土壤含水量。处理后20 d取样,样品称重后冷冻保存于超低温冰箱中。

1.2 测定项目及方法

1.2.1 光合参数测定。以LI-6400(美国LI-COR

公司)于处理后20 d 9:00-11:00测定主茎倒3叶的光合速率(Pn)、气孔导度(Gs)、胞间CO₂浓度(Ci)和蒸腾速率(Tr)等光合参数。每处理测定5株棉花。

1.2.2 荧光参数测定。

采用德国Mini-PAM脉冲调制式叶绿素荧光仪,于处理后20 d 9:00-11:00测定倒3叶的光合参数。

1.2.3 叶绿素含量测定。

参照邹琦的方法^[9],称取适量倒3叶剪碎,以96%乙醇提取,放置暗处浸提48 h后,用Tu-1901型双光束紫外可见分光光度计分别在波长663 nm、646 nm和470 nm处比色,测定吸光度,并计算叶绿素含量。

1.2.4 SOD、POD活性测定。

参照Bartoli等^[10]的方法测定。

1.2.5 MDA含量测定。

参照李合生的方法^[11]进行测定。

1.2.6 甜菜碱含量的测定。

参考Gorham等^[12]的方法提取和测定甜菜碱。称取0.5 g冷冻材料,加入2 mL甲醇-氯仿-KHCO₃试剂(甲醇、氯仿、0.2 mmol·L⁻¹ KHCO₃体积比为12:5:1),充分研磨后,转入10 mL塑料离心管中,每次加2 mL相同的试剂,将研钵洗涤2次;60℃恒温震荡水浴20 min,冷却后4℃离心10000×g 10 min;转移上清液到50 mL离心管中,对沉淀再提取2次,一次用与上述相同的试剂,一次用甲醇-水试剂(甲醇:水=1:1),合并上清液,加2 mL氯仿和4 mL蒸馏水,充分摇匀,4℃离心10000×g 10 min,吸取上层水相到10 mL量筒中,用蒸馏水定容至10 mL,为甜菜碱的粗提液。将粗提液过离子交换混合柱(1 mL Amberlite CG50的阳离子交换树脂,100~200目;2 mL Dowex1-X2的阴离子交换树脂,50~100目),粗提液全部过柱后,先用3 mL蒸馏水,再用4 mL 4 mmol·L⁻¹ NH₄OH洗脱。收集洗脱液,旋转蒸发器减压蒸馏干燥,2 mL甲醇溶解残渣,微孔滤膜过滤,利用岛津LC-6A型高效液相色谱仪(Hypersil SCX 10 μm柱,4.6 mm×250 mm),0.2 mmol·L⁻¹ NH₄H₂PO₄ (50%甲醇配制)为洗脱液,流速1 mL·min⁻¹,检测波长为195 nm,进样量15 μL测定甜菜碱含量。以Sigma公司的甘氨酸甜菜碱纯品为标样。

2 试验结果

2.1 干旱胁迫对棉花苗期叶片甜菜碱含量的影响

由表 1 可知,土壤水分保持正常状态时,L1 叶片中甜菜碱含量与 SM3 差异不显著,L2 叶片中甜菜碱含量高于 SM3,且达到差异显著水平。

表 1 干旱胁迫对棉花苗期叶片甜菜碱含量的影响

处理	SM3	L1	L2
对照	8.93d	11.04d	15.04c
干旱	10.04d	28.00b	36.64a

注:数值为胁迫 20 d 后的测定值(以鲜重计);数值后字母不同者表示在 $P=0.05$ 上的显著差异,下同。

2.2 干旱胁迫对棉花苗期叶片膜脂氧化及抗氧化酶活性的影响

MDA 是膜脂发生氧化作用后的最终产物,SOD、POD 是水—水循环(米勒反应)的 2 个关键酶,具有清除活性氧、缓解质膜氧化伤害的作用。由表 2 可以看出,干旱胁迫后,L1 和 L2 叶片中

表 2 干旱胁迫对棉花苗期叶片 MDA 含量及 SOD、POD 活性的影响

品系	MDA $(\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1})$	SOD $(\text{U}\cdot\text{mg}^{-1})$	POD $(\Delta A_{470}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1})$
SM3	13.60a	348.62b	187.50c
L1	13.17a	402.15a	231.50b
L2	7.84b	360.26b	428.00a

2.3 干旱胁迫对棉花苗期光合参数的影响

处理 20 d 后,在控制温度、光照和 CO_2 浓度条件下测定各处理的瞬间光合参数。由表 3 可以看出,土壤水分保持正常状态时,L1、L2 与 SM3 相比各项指标差别均不显著。干旱胁迫下,三者的各项光合参数除叶绿素总量外均显著下降,但 L1 和 L2 叶片光合速率显著高于 SM3。虽然 L1

表 3 干旱胁迫对棉花苗期叶片苗期光合参数的影响

处理	品系	光合速率 $(\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1})$	气孔导度 $(\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1})$	胞内 CO_2 浓度 $(\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1})$	叶绿素总量 $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	蒸腾速率 $(\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1})$
对照	SM3	21.0a	0.45a	314a	1.42b	7.2a
	L1	20.2a	0.46a	292a	1.49b	6.6a
	L2	20.8a	0.41a	289a	1.26c	6.5a
干旱	SM3	9.6c	0.12d	247b	1.30bc	4.1b
	L1	14.8b	0.19c	267b	1.75a	5.2ab
	L2	15.1b	0.24bc	252b	1.67a	5.8ab

2.4 干旱胁迫对棉花苗期荧光动力学参数的影响

在荧光诱导动力学参数的测定中, F_v/F_m 代

干旱胁迫后,L1 和 L2 叶片中甜菜碱含量分别比未受胁迫状态增加了 153.62% 和 143.62%,达到差异显著水平,SM3 叶片中甜菜碱含量也有所增加但变化不明显;L1 和 L2 叶片中甜菜碱含量分别比 SM3 高 178.88%、264.94%。

的 MDA 含量都低于 SM3,但只有 L2 达到差异显著水平;L1 和 L2 叶片中的 SOD 活性都高于 SM3,但只有 L1 达到差异显著水平;L1、L2 叶片中的 POD 活性均显著高于 SM3,同时 L2 显著高于 L1。

和 L2 叶片气孔导度显著高于 SM3,但胞内 CO_2 浓度三者间无明显差异,说明对转基因株系叶片气孔限制因子仍然存在。从叶片叶绿素总量来看,L1 和 L2 保持了较高的叶绿素总量,甚至显著高于土壤水分保持正常状态下的叶绿素总量,可能是由于细胞液水分含量减少所致;而 SM3 的叶绿素总量则显著下降。

表 PS II 原初光能转化效率,而 F_v/F_0 可代表光系统 II (PS II) 的潜在活性,ETR 是光合电子传递速率,NPQ 反映的是 PS II 天线色素吸收的光能不

能用于光合电子传递而以热的形式耗散的部分。由表 3 可以看出,经过 20 d 干旱胁迫后,L2 的所有指标与 SM3 差异显著,其中 F_v/F_m 、 F_v/F_0 、ETR 分别是 SM3 的 109.29%、141.44%、106.61%,NPQ

为 SM3 的 54.64%。L1 的 F_v/F_0 与 SM3 相比差异不显著,其它指标达到差异显著水平。L2 与 L1 相比,除 ETR 显著高于 L1 以外,其它指标差异不显著。

表 4 干旱胁迫对棉花苗期荧光动力学参数的影响

Table 4 Effects of drought stress on the chlorophyll fluorescence parameters of cotton seedlings

品系	F_v/F_m	F_v/F_0	NPQ	ETR
SM3	0.71b	2.44b	0.64a	86.64c
L1	0.75a	2.95ab	0.34b	91.52b
L2	0.78a	3.45a	0.35b	92.35a

2.5 干旱胁迫对棉花苗期干物质积累的影响

由表 5 可以看出,土壤水分保持正常状态时,L1 和 L2 的干物质总量和 SM3 相比差异不显著。干旱胁迫后,L1、L2 和 SM3 的干物质总量与

保持土壤水分正常状态时相比均显著下降,分别降低了 16.6%、18.7%和 30.3%,其中地下部干物质重分别下降 12%、4.2%和 41.6%。L1 和 L2 的总干物质质量均显著高于 SM3。

表 5 干旱胁迫对棉花苗期干物质积累的影响

Table 5 Photosynthetic parameters of transgene *AhCMO* cotton strains at seedling stage under drought stress

处理	品系	地下部 /g	地上部 /g	总量 /g
对照	SM3	0.24a	1.66a	1.91a
	L1	0.25a	1.68a	1.92a
	L2	0.24a	1.68 a	1.92a
干旱	SM3	0.14c	1.18c	1.33b
	L1	0.22b	1.38b	1.60a
	L2	0.23ab	1.32b	1.56a

3 结论与讨论

锦葵科植物能够合成甜菜碱,在棉花的根、种子中都有甜菜碱^[13]。甜菜碱作为无毒害的渗透调节剂不仅维持细胞膨压,而且还能稳定酶活性和细胞膜结构,清除自由基等^[3-4],同时具有保护光合系统 II 复合物的作用^[14-15],能增强植物适应逆境的能力。本试验中,在未受胁迫的 SM3 中检测到甜菜碱,且干旱胁迫后甜菜碱含量略有增加。转入 *AhCMO* 基因后的 L1 和 L2 中甜菜碱含量与转化受体相比均显著增加,经受干旱胁迫后 L1 和 L2 叶片中的甜菜碱含量分别达到 SM3 的 279%、365%。说明转入 *CMO* 基因增加了棉花叶片中的甜菜碱含量,并且逆境胁迫可以激发甜菜碱的大量合成。可溶性糖和脯氨酸等也是常见的渗透调节剂,检测发现二者在 3 个品系的含量在处理前后并未出现显著差异。

赵新西等研究表明,根施甜菜碱能够提高干旱胁迫下小麦的甜菜碱含量,并能明显缓解干旱胁迫下小麦叶片类囊体膜类脂含量的下降,从而

对类囊体膜的功能起保护作用。甜菜碱可能通过在干旱胁迫下维持类囊体膜各类脂的含量及其脂肪酸配比来缓解叶绿素含量的降低,从而起到维持光合速率的作用^[16]。本试验结果表明,转 *CMO* 基因棉花品系不仅甜菜碱含量提高,而且其抗氧化酶的活性增强,更好地保护了细胞内的膜系统,使转 *CMO* 基因棉花品系在干旱胁迫下能保持较完整的光合系统。尽管干旱胁迫下转 *CMO* 基因棉花品系 L1、L2 和转基因受体 SM3 都受到气孔限制因子的作用,使它们的光合速率均显著下降,但转 *CMO* 基因品系 L1 和 L2 依靠较高的叶绿素含量、光系统 II (PS II) 的潜在活性、光合电子传递速率,和较低的热耗散 NPQ,其光合速率显著高于转基因受体 SM3,对干旱表现出更强的适应性。

干旱胁迫后,3 个供试品系的干物质质量显著下降,其中地下部分 L1、L2 和 SM3 分别下降 12%、4.2%和 41.6%,说明对转 *CMO* 基因品系而言,在干旱条件下拥有相对发达的根系,更有利于吸收水分。干旱条件下,根系的生长是否直接

受到甜菜碱含量的影响,二者有何关系还需要进一步研究。

总之,*AhCMO* 基因导入棉花,显著增加了甜菜碱的积累量,甜菜碱含量的提高稳定了细胞膜结构、增加了抗氧化酶活性,清除了自由基,保持了较高光合速率,增强了棉花的耐旱性。

参考文献:

- [1] 张士功,刘国栋,刘更另. 植物营养与作物抗旱性[J]. 植物学通报,2001,18(1):64-69.
ZHANG Shi-gong, Liu Guo-dong, Liu Geng-ling. Plant nutrition and drought resistance of crops[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2001, 18(1):64-69.
- [2] 董合忠,李维江,唐薇,等. 干旱和淹水对棉苗某些生理特性的影响[J]. 西北植物学报,2003,23(10):1695-1699.
DONG He-zhong, Li Wei-jiang, Tang Wei, et al. Effects of water-deficit and water-logging on some physiological characteristics of cotton seedlings[J]. Acta Bot Boreal Occident Sin, 2003, 23(10): 1695-1699.
- [3] WYN J R G. Phytochemical aspects of osmotic adaptation[J]. Recent Adv Phytochem, 1984, 18: 55-78.
- [4] 梁峥,赵原,汤岚,等. 甜菜碱对呼吸酶的保护效应[J]. 植物学报,1994,36(2):947-951.
LIANG Zheng, Zhao Yuan, Tang Lan, et al. Protective effect of betaine on respiratory enzymes[J]. Acta Botanica Sinica, 1994, 36(2):947-951.
- [5] MCNEIL S D, Nuccio M L, Hanson A D, et al. Betaines and related osmoprotectants targets for metabolic engineering of stress resistance [J]. Plant Physiol, 1999, 120:945-949.
- [6] 沈义国,杜保兴,张劲松,等. 山菠菜胆碱单氧化物酶基因(*CMO*)的克隆与分析[J]. 生物工程学报,2001(1):1-5.
SHEN Yi-guo, Du Bao-xing, Zhang Jin-song, et al. Molecular cloning and analysis of *CMO* gene of *Atriplex hortensis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2001(1): 1-5.
- [7] 张慧军,董合忠,石跃进,等. 山菠菜胆碱单加氧酶基因对棉花的遗传转化和耐盐性表达[J]. 作物学报,2007,33(7):1073-1078.
ZHANG Hui-jun, Dong He-zhong, Shi Yue-jin, et al. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) with *AhCMO* gene and the expression of salinity tolerance[J]. Acta Agronomica Sinica, 2007, 33(7): 1073-1078.
- [8] SHEN Yi-guo, Du Ban-xing, Zhang Wan-ke, et al. *AhCMO*, regulated by stresses in *Atriplex hortensis*, can improve drought tolerance in transgenic tobacco[J]. Theor Appl Genet, 2002, 105(6/7): 815-821.
- [9] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,2000.
ZOU Qi. Experiment instruction of plant physiology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000.
- [10] BARTOLI C G, Simontacchi M, Tambussi E, et al. Drought and watering-dependent oxidative stress: effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* leaves[J]. J Exp Bot, 1999, 50: 375-383.
- [11] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京:高等教育出版社,2000.
LI He-Sheng. Principles and techniques of plant physiological biochemical experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000.
- [12] GORHAM J, McDonnell E, Wyn J R G. Determination of betaines as ultraviolet-absorbing esters[J]. Anal Chim Acta, 1982, 138: 277-283.
- [13] SAKAMOTO A, Murata A N. Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetain and tolerance to salt and cold [J]. Plant Mol Biol, 1998, 38: 1011-1019.
- [14] 赵博生,衣艳君,刘家尧. 外源甜菜碱对干旱/盐胁迫下的小麦幼苗生长和光合功能的改善[J]. 植物学通报,2001,18(3): 378-380.
ZHAO Bo-sheng, Yi Yan-jun, Liu Jia-yao. Exogenous betaine improves the growth and photosynthesis of wheat seedlings under drought/salt stress[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2001, 18(3): 378-380.
- [15] 赵新西,马千全,杨兴洪,等. 根施甜菜碱对干旱胁迫下小麦幼苗类囊体膜组分和功能的影响[J]. 植物生理与分子生物学学报,2005,31(2):135-142.
ZHAO Xin-xi, Ma Qian-quan, Yang Xing-hong, et al. Effects of root-applied glycinebetaine on the composition and function of wheat thylakoid membrane under drought stress[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2005, 31(2): 135-142.