DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.04251

转 P_{SAG12} - IPT 基因对棉花叶片衰老及产量和纤维品质的影响

王 晔^{1,2,**} 刘 钊^{2,**} 肖 爽² 李芳军² 吴 霞³ 王保民²
田晓莉^{2,*}

¹ 北京农学院植物科学技术学院, 北京 102206; ² 中国农业大学农学院 / 植物生长调节剂教育部工程研究中心, 北京 100193; ³ 山西农业大学 / 山西农业科学院棉花研究所, 山西运城 044000

摘 要: 探讨 P_{SAG12} - IPT 基因导入对棉花叶片衰老性状、产量和纤维品质的影响。本研究以 9 个转化事件的纯合阳性株系为试验材料, 于 2011—2012 年在中国农业大学上庄实验站开展研究。结果表明, 转基因株系叶片衰老阶段 IPT 基因表达量大幅上调, Z+ZR 类细胞分裂素含量显著高于野生型冀合 321。根据 Z+ZR 类细胞分裂素含量将 9 个转 P_{SAG12} - IPT 基因株系聚类分为抗衰老能力强、弱和中间型 3 大类, 不同类型株系在叶片衰老阶段的叶绿素和可溶性蛋白含量较野生型增加幅度不同。转基因株系单株成铃数(直径 ≥ 2 cm)和铃重与野生型相当或高于野生型, 但各株系第一次收获时的吐絮率显著低于野生型, 且降低幅度与抗衰老能力成正比。这导致抗衰老能力较强和中等的 P_{SAG12} - IPT 过表达株系(OE-37 和 OE-38)因有效吐絮铃少而减产, 而抗衰老能力弱的株系(OE-30)籽棉产量与野生型相当。 P_{SAG12} - IPT 基因过表达株系的纤维长度整齐度指数显著高于野生型, 马克隆值有增加趋势, 其他品质指标与野生型差别不大。

关键词: 棉花; P_{SAG12} - IPT 基因; 细胞分裂素; 产量; 纤维品质

Effects of P_{SAG12} - IPT gene expression on leaf senescence, yield, and fiber quality in cotton

WANG Ye^{1,2,**}, LIU Zhao^{2,**}, XIAO Shuang², LI Fang-Jun², WU Xia³, WANG Bao-Min², and TIAN Xiao-Li^{2,*}

¹ College of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; ² College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University / China Engineering Research Center of Plant Growth Regulator, Ministry of Education, Beijing 100193, China; ³ Shanxi Agricultural University / Cotton Research Institute Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Yuncheng 044000, Shanxi, China

Abstract: A chimeric gene of bacterial IPT and the senescence-specific $SAG12$ promoter from *Arabidopsis* (P_{SAG12} - IPT) was overexpressed in cotton, and nine independent transgenic lines were obtained. To identify the leaf senescence characteristics, yield, and fiber quality of P_{SAG12} - IPT cotton plants, we performed the experiments at the Shangzhuang Experimental Station of China Agricultural University in 2011 and 2012. The results showed that the expression of IPT genes in transgenic lines was dramatically up-regulated at leaf aging stage, and the content of Z+ZR-type cytokinin was significantly higher than that of wild type Jihe 321. According to the content of Z+ZR-type cytokinin, nine transgenic lines were clustered into three categories with strong, weak, and moderate anti-aging ability. During leaf senescence period, the contents of chlorophyll and soluble proteins in transgenic lines were positively related to the content of Z+ZR-type cytokinin. Compared to wild type, transgenic lines had a higher or equal number of bolls (diameter ≥ 2 cm) per plant and boll weigh, but their boll-opening rate at the first harvest was significantly decreased, and the extent of reduction was positively related to the anti-aging ability. Consequently, the seed cotton yield of P_{SAG12} - IPT lines (OE-37 and OE-38) with strong or moderate anti-aging ability decreased due to less opened bolls, while the line

本研究由国家转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08005-004-008)和国家自然科学基金项目(31701337)资助。

This study was supported by the National Major Project for Developing New GM Crops (2011ZX08005-004-008) and the National Natural Science Foundation of China (31701337).

* 通信作者(Corresponding author): 田晓莉, E-mail: tianxl@cau.edu.cn

** 同等贡献(Contributed equally to this work)

第一作者联系方式: 王晔, E-mail: wangyebua@126.com

Received (收稿日期): 2020-11-21; Accepted (接受日期): 2021-04-26; Published online (网络出版日期): 2021-06-09.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20210609.1105.004.html>

(OE-30) with weak anti-aging ability had a comparable yield to that of wild type. The fiber length uniformity of P_{SAG12} -IPT cotton lines was significantly higher than that of wild type. Compared with wild type, the micronaire results of transgenic lines revealed an increasing trend, and fiber length, breaking strength, and breaking elongation was not significantly different from that of wild type.

Keywords: cotton; P_{SAG12} -IPT; cytokinin; yield; fiber quality

棉花早衰是指叶片在花铃盛期过早黄化、干枯和脱落^[1-2], 早衰发生严重的年份减产幅度可达 20%~50%^[3], 并导致棉花纤维强度下降和纤维长度变短^[4]。

植物生理学的传统观点认为, 根系是细胞分裂素(cytokinin, CTKs)的主要合成部位, 可以通过木质部向地上部输送CTKs调节叶片衰老^[5]。有研究表明, 根系供应的CTKs减少可能是大豆^[6]和向日葵^[7]叶片衰老的主要原因。Barry等^[8]首次从根癌农杆菌中分离出异戊烯基转移酶基因 *IPT* (Isopentenyl-transferase gene), 其产物异戊烯基转移酶是细胞分裂素生物合成的关键酶, 催化细胞分裂素从头合成的第一步反应, 促使 5'-AMP 和异戊烯基焦磷酸合成异戊烯基腺核苷酸, 之后转化为各种细胞分裂素。Lohman等^[9]从拟南芥中克隆出一组衰老相关基因 *SAG* (senescence-associated gene), 并证明其中的 *SAG12* 受衰老高度特异正调控, 仅在自然衰老状态下的组织中表达。Gan和Amasino^[10]进一步将 *SAG12* 启动子与来自根癌农杆菌的编码 *IPT* 基因构建成嵌合基因(P_{SAG12} -IPT)转入烟草。该嵌合基因具有自动调控特性, 即当衰老发生时, P_{SAG12} 驱动 *IPT* 基因表达, 植株体内 CTKs 含量增加, 衰老受到抑制; 当 CTKs 的含量达到一定水平时, P_{SAG12} 的活性受到抑制, *IPT* 基因关闭; 当衰老再次开始时, P_{SAG12} -IPT 再度表达。因此, 转基因植株体内的 CTKs 始终维持在一定的水平, 叶片则表现出较高的光合作用和较长的寿命, 衰老得到延缓^[10]。此后, 嵌合基因 P_{SAG12} -IPT 被陆续转入到生菜^[11]、水稻^[12]、小麦^[13]和苕麻^[14]等多种作物中, 不仅延缓了叶片的衰老, 而且在一定程度上改善了作物的农艺性状和抗逆能力。

Yu等^[15]利用种子特异表达的菜豆蛋白启动子(Ph/P)与 *IPT* 基因构建载体转化棉花, 改变了棉花纤维的长度, 且转 *IPT* 基因棉花种子中的 CTKs 含量明显提高, 根系发达, 次生根数目增多。李静等^[16]利用花粉管通道技术将含有嵌合基因 P_{SAG12} -IPT 的 pBG121 质粒转入早衰型陆地棉品种中棉所 10 号中, 测定 T₁ 代植株的叶绿素和 CTKs 含量, 发现转基因植

株的衰老得到延缓。Liu等^[17]通过农杆菌介导法获得转 *IPT* 基因棉株, 其叶绿素和 CTKs 含量及清除活性氧的酶活性显著增加。目前, 对转 *IPT* 基因棉花的抗早衰功能研究相对较多, 对产量和品质等经济性状及抗早衰能力与经济性状间的关系研究较少。本研究以陆地棉品种冀合 321 为受体, 获得了 9 个转 P_{SAG12} -IPT 基因纯合株系, 在田间条件下研究了转基因株系的抗衰老能力及产量和纤维品质性状, 分析了抗衰老能力与产量性状的联系, 旨在为培育高产优质抗早衰棉花品种提供基础材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

所用质粒 PSG529 来自于 Wisconsin 大学 Richard M Amasino 教授实验室, 经该实验室许可后由中国农业大学付永彩老师转赠。该质粒含有拟南芥衰老特异性启动子 P_{SAG12} 和根癌农杆菌的异戊烯基转移酶基因 *IPT*, 筛选基因为 *NPT II* (图 1)。山西省农业科学院棉花研究所采用农杆菌侵染法, 向野生型陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.)冀合 321 中导入该质粒, 获得转基因当代株系, 经逐年筛选、鉴定和繁育, 共获得 9 个转化事件的纯合阳性 T₃ 代株系用于本研究, 株系编号分别为 OE-9、OE-17、OE-19B、OE-19L、OE-22、OE-27、OE-30、OE-37、OE-38。图 2 为各株系目的基因 *IPT* 和标记基因 *NPT II* 的 PCR 鉴定结果, 其中 *IPT* 基因的上、下游引物分别为 5'-GCGTCTAATTTTCGGTCCAA-3' 和 5'-AATGGATGACCTTCGAATCC-3', *NPT II* 基因的上、下游引物分别为 5'-TCCGCGCCGCTTGGGTGGAGAG-3' 和 5'-CTGGCGCGAGCCCCTGATGCT-3', 结果表明目的基因和标记基因已整合到棉花基因组中。

图 1 质粒 PSG529 结构图

Fig. 1 Construction of plasmid PSG529

图 2 转 P_{SAG12} -IPT 基因棉花植株的 PCR 检测

Fig. 2 PCR detection of transgenic cotton plants with P_{SAG12} -IPT gene

A: 叶片中 IPT 基因的 PCR 结果; B: 叶片中 NPT II 基因的 PCR 结果; C: 根系中 NPT II 基因的 PCR 结果。

A: PCR detection of IPT genes in the leaves of transgenic plants; B: PCR detection of NPT II gene in the leaves of transgenic plants; C: PCR detection of NPT II gene in the roots of transgenic plants.

1.2 试验设计

田间试验于 2011 年和 2012 年在中国农业大学上庄试验站(40°08'N, 116°10'E)进行。试验地土壤为壤土。试验采用完全随机区组设计, 重复 3 次。小区行长 5.0 m, 行距 0.9 m, 2011 年为 2 行区, 小区面积 9.0 m²; 2012 年为 4 行区, 小区面积 18.0 m²。2011 年和 2012 年分别于 5 月 10 日和 5 月 8 日播种, 种植密度为 37,500 株 hm⁻²。试验地四周设 4 行保护行, 栽培管理措施同一般生产田。

1.3 测定项目与方法

2011 年和 2012 年分别于 7 月 23 日和 8 月 4 日打顶, 打顶当天标记刚平展的主茎叶片, 叶龄记为 0 d。2011 年取叶龄 0 d (7 月 23 日)、20 d (8 月 12 日)、36 d (8 月 28 日)、47 d (9 月 8 日)和 62 d (9 月 23 日)的叶片, 2012 年取叶龄 0 d (8 月 4 日)、14 d (8 月 18 日)、28 d (9 月 1 日)、42 d (9 月 15 日)和 56 d (9 月 29 日)的叶片, 用于测定相关指标。

1.3.1 IPT 基因相对表达量检测 用 TRIzol 试剂盒(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)提取叶片 RNA, 用

Primer Premier 5.0 软件(Primer Biosoft International, Palo Alto, CA, US)设计引物。以 $UBQ7$ 为内参基因, 引物序列为 Sense: 5'-atccgctcctgcataagaga-3', AntiSense: 5'-tcccggctatgtcatctttc-3'。实时荧光定量 PCR (ABI 7500 Real-Time PCR System): 用 TaKaRa 公司 SYBR Green I (Molecular probes)做为荧光指示探针。RT-PCR 反应体系为 15 μ L, 在荧光定量 PCR 仪上按照两步法扩增程序, 即 95℃预变性 30 s; 95℃变性 5 s, 60℃退火 30 s, 40 个循环; 最后进行溶解曲线的检测收集。根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法^[18]计算基因相对表达量。

1.3.2 生理指标测定 采用间接酶联免疫吸附分析法^[19]测定玉米素和玉米素核苷(Zeatin+Zeatin riboside, Z+ZR)类的细胞分裂素含量, 抗体由中国农业大学作物化控研究中心提供。参照 Arnon^[20]的方法测定叶绿素含量, 参考 Read 等^[21]的方法测定可溶性蛋白含量。

1.3.3 产量及产量构成因素 小区实收测产, 收获 2 次。2011 年的收获时间为 10 月 8 日和 10 月 25 日, 2012 年为 10 月 11 日和 10 月 28 日。第 1 次收获时, 在每小区选取生长一致的棉株 8 株测定株高、果枝始节、果枝数、铃数、吐絮率等, 称量标记植株的吐絮铃重量, 计算平均铃重, 之后轧花测定衣分。

1.3.4 纤维品质 第 1 次收获时, 在每小区随机选取棉株中部果枝内围铃(第 1~2 果节) 30 个左右, 轧花后由农业部棉花品质监督检验测试中心用 HVI900 系统进行测定。

1.4 数据统计

采用 SPSS18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)进行聚类分析和方差分析(ANOVA), 用 Duncan's 法进行多重比较($P < 0.05$), 用 SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc, Washington St, USA)绘图。

2 结果与分析

2.1 转 P_{SAG12} -IPT 基因对棉花叶片衰老阶段 IPT 基因表达量和 Z+ZR 含量的影响

与野生型相比, 转基因株系叶片在开始衰老阶段(叶龄 62 d, 2011 年; 叶龄 56 d, 2012 年)异源 IPT 基因的相对表达量均有提高, 差异达显著水平, 且不同株系提高幅度存在差异, 其中 OE-38 相对表达量最高、OE-30 相对表达量最少, 2 年结果趋势一致(图 3)。

从图 4 可以看出, 在叶片开始衰老阶段(叶龄 62

d, 2011 年; 叶龄 56 d, 2012 年), P_{SAG12} -IPT 基因导入使各转基因株系叶片中 Z+ZR 含量显著升高(2011 年 OE-9 株系除外), 其中 OE-38 的增幅最高, 达到 71.5%~79.4%。

2.2 转 P_{SAG12} -IPT 基因棉花株系的聚类分析

根据叶片 Z+ZR 含量进行聚类分析, 当聚类数为 3 时, 各类群之间方差达到显著水平。I 类为低 Z+ZR 型, 包括 OE-9 和 OE-30 2 个株系, 抗衰老能

力较弱; II 类为中等 Z+ZR 型, 包括 6 个株系; III 类为高 Z+ZR 型, 只有 OE-38 1 个株系, 抗衰老能力最强。对 9 个转基因株系叶片衰老阶段 IPT 表达量进行聚类分析得到相同结果(数据未列出)。从 3 个类型中各选 1 个代表性株系, 即抗衰老能力较弱的 OE-30、抗衰老能力最强的 OE-38 和抗衰老能力介于二者之间的 OE-37, 用于叶片功能和产量及纤维品质研究。

图 3 棉花叶片衰老阶段 P_{SAG12} -IPT 基因在转基因株系中的表达分析
Fig. 3 Relative expression of P_{SAG12} -IPT gene in different transgenic lines of cotton at leaf senescence stage
柱上不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。
Different lowercase letters above the bars indicate significant difference at the 0.05 probability level.

图 4 转 P_{SAG12} -IPT 基因对棉花叶片衰老阶段细胞分裂素含量的影响
Fig. 4 Effects of P_{SAG12} -IPT gene overexpression on cytokinin concentration of cotton leaves at leaf senescence stage
柱上不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。
Different lowercase letters above the bars indicate significant difference at the 0.05 probability level.

表 1 不同转基因棉花株系叶片细胞分裂素的聚类分析
Table 1 Cluster analysis of cytokinin concentration in leaves of different transgenic cotton lines

类群 Cluster	株系代号 Code of line	株系个数 Number of lines	频率 Frequency (%)	类平均标准差 Mean of cluster (nmol g ⁻¹)	变幅 Range (nmol g ⁻¹)
I	OE-9, OE-30	2	22.22	75.66 c	75.45–75.88
II	OE-17, OE-19B, OE-19L, OE-22, OE-27, OE-37	6	66.67	87.43 b	82.23–93.19
III	OE-38	1	11.11	113.62 a	113.62

同列不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。
Different lowercase letters in a column indicate significant difference at the 0.05 probability level.

2.3 转 P_{SAG12} -IPT 基因株系叶片 IPT 基因表达量和 Z+ZR 含量变化动态

由图5可知, P_{SAG12} -IPT 基因在 *OE*-30、*OE*-37 和 *OE*-38 号转基因株系标记叶片的不同生长时期均有

表达, 随着叶片的衰老其表达量增加。与叶片展开当天(叶龄0 d)相比, *OE*-30、*OE*-37 和 *OE*-38 株系进入衰老阶段的叶片(叶龄56~62 d)其 P_{SAG12} -IPT 基因表达量分别增加了6.6~6.8倍、3.4~7.8倍、9.3~11.4倍。

图 5 P_{SAG12} -IPT 基因在转基因棉株叶片中相对表达量变化动态

Fig. 5 Relative expression profile of P_{SAG12} -IPT gene in leaves of transgenic cotton lines

由图6可知, 野生型叶片 Z+ZR 含量随叶龄增长呈先增加再下降的趋势, *IPT* 过表达株系 *OE*-30 (抗旱能力弱) 和 *OE*-37 (抗旱能力中等) 的变化趋势与野生型相同, 但 Z+ZR 含量高于野生型, 且提高幅度随叶龄增长而增大。抗旱能力最强的 *OE*-38, 其叶片 Z+ZR 含量随叶龄增长先快速增加后缓慢增加, 且在叶龄20 d (2011年) 或28 d (2012年) 及以后显著高于野生型和其他2个过表达株系, 其

中2011年在叶龄62 d、2012年在叶龄56 d时较野生型增加71.5%和96.5%。

2.4 转 P_{SAG12} -IPT 基因株系叶片叶绿素和可溶性蛋白含量变化动态

由图7可知, 棉花叶片叶绿素含量自叶片展开后即逐渐下降。*IPT* 过表达株系的叶片持绿性较好, 其叶绿素含量在叶片生长的中后期不同程度高于野生型。

图 6 转基因株系和野生型棉株叶片细胞分裂素含量变化动态

Fig. 6 Dynamic variations of cytokinin concentrations in leaves of wild type and transgenic cotton lines

图 7 转基因株系和野生型棉株叶片叶绿素含量变化动态
Fig. 7 Dynamic variations of chlorophyll contents in leaves of wild type and transgenic cotton lines

蛋白质的降解是叶片衰老的基本特征之一。由图 8 可知, 叶片展开后可溶性蛋白含量快速上升, 但 2~3 周后即开始下降。与野生型相比, *OE*-38 和

OE-37 株系的叶片可溶性蛋白含量在叶龄 56~62 d 之间分别增加了 30.3%~43.5%和 22.1%~37.6%, *OE*-30 与野生型的差异较小。

图 8 转基因株系和野生型棉株叶片可溶性蛋白含量变化动态
Fig. 8 Dynamic variations of soluble protein concentrations in leaves of wild type and transgenic cotton lines

2.5 转 *P_{SAG12}-IPT* 基因对棉花农艺性状的影响

与野生型相比, *IPT*过表达株系株高呈降低趋势, 其中2011年达显著水平(表2)。 *OE*-30、*OE*-37和*OE*-38的果枝始节均较野生型显著提高,

提高范围为1~2个节位, 说明*IPT*过表达株系的花芽分化较晚, 有可能导致晚熟。几个转基因株系的果枝数与野生型相比有减少趋势, 但差异不显著。

表 2 *P_{SAG12}-IPT* 基因导入对棉花农艺性状的影响
Table 2 Effects of *P_{SAG12}-IPT* genes overexpression on agricultural traits of cotton plants

株系 Line	2011			2012		
	株高 Plant height (cm)	果枝始节 First node producing fruiting branch	果枝数 Number of fruiting branch	株高 Plant height (cm)	果枝始节 First node producing fruiting branch	果枝数 Number of fruiting branch
冀合 321 Jihe 321	103.3 a	6.3 b	14.0 a	134.5 a	7.6 b	16.9 a
<i>OE</i> -30	91.7 bc	8.0 a	12.3 a	127.1 a	9.5 a	16.5 a
<i>OE</i> -37	88.0 c	8.0 a	12.0 a	129.8 a	8.3 a	16.2 a
<i>OE</i> -38	100.3 b	8.3 a	13.0 a	123.4 a	9.6 a	15.0 a

同列不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。
Different lowercase letters in a column indicate significant difference at the 0.05 probability level.

2.6 转 P_{SAG12} -IPT 基因对棉花产量和纤维品质的影响

由表3可知，抗早衰能力较弱的OE-30的籽棉产量与野生型无显著差异，但抗早衰能力中等和较强的OE-37和OE-38的籽棉产量显著低于野生型，其中2011年分别降低35.2%和68.1%、2012年降低9.6%和14.1%。OE-37和OE-38的单株成铃数(直径 2 cm)未减少，OE-38在2011年的单株成铃数显著多于野生

型，其减产的主要原因在于晚熟，2011年10月8日第一次收获时OE-37和OE-38的吐絮率较野生型分别降低了43.6%和59.9%，2012年10月11日第一次收获时二者的吐絮率较野生型降低了54.5%和82.8%，这导致OE-37和OE-38的有效收获铃数大幅减少。此外，OE-37和OE-38的铃重也有低于野生型的趋势，这可能也是产量降低的原因之一。IPT过表达株系的衣分与野生型无显著差异。

表 3 P_{SAG12} -IPT 基因导入对棉花产量和产量构成因素的影响
Table 3 Effects of P_{SAG12} -IPT gene overexpression on yield and yield components of cotton

年份 Year	株系 Line	单株成铃数 Boll number per plant	铃重 Boll weight (g)	衣分 Lint percentage (%)	吐絮率 Boll opening percentage (%)	籽棉产量 Seed cotton yield (kg hm ⁻²)
2011	冀合 321 Jihe 321	12.4 b	4.2 ab	37 a	94.4 a	1257.0 a
	OE-30	18.6 a	4.6 a	36 a	71.5 b	1364.8 a
	OE-37	12.3 b	4.0 b	40 a	53.2 bc	814.9 b
	OE-38	17.7 a	3.8 b	34 a	37.9 c	401.3 c
2012	冀合 321 Jihe 321	24.2 a	4.3 a	35 a	49.9 a	1554.9 a
	OE-30	24.0 a	4.2 a	33 a	30.0 b	1605.9 a
	OE-37	21.0 a	4.0 a	33 a	22.7 c	1405.1 b
	OE-38	23.6 a	3.7 a	32 a	8.6 d	1335.5 b

同列不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。
Different lowercase letters in a column indicate significant difference at the 0.05 probability level.

由纤维品质2年均值(表4)可以看出，与野生型相比，IPT过表达株系的纤维长度和断裂比强度呈增加趋势但差异不显著，整齐度指数则显著提高；马克隆值与野生型持平或显著增加(OE-38)，断裂伸长率变化不大。

3 讨论

3.1 转 P_{SAG12} -IPT 基因延缓了棉花叶片衰老

叶片衰老伴随着叶绿素、蛋白质和核酸等的降解及光合速率下降。细胞分裂素(CTKs)对叶片衰老

有延缓作用^[22]， P_{SAG12} -IPT嵌合基因只在叶片开始衰老时才被诱导表达并具有自动调控功能^[10]，可以避免因组成型表达在全株范围内持续形成高浓度CTKs而影响植物生长发育和产量形成^[23-24]。在本研究中，与野生型冀合321相比，转 P_{SAG12} -IPT基因棉花株系在叶片衰老阶段IPT基因表达量大幅上调，Z+ZR类CTKs含量显著升高，CTKs调节编码感光叶绿素结合蛋白的基因的活性，并通过刺激衰老质体向叶绿体再分化的基因的表达，延缓叶绿素降解^[25-26]，衰老叶片的蛋白质被有效地转移至幼嫩组

表 4 P_{SAG12} -IPT 基因导入对棉花品质的影响
Table 4 Effects of P_{SAG12} -IPT gene overexpression on fiber qualities of cotton

株系 Line	纤维长度 Fiber length (mm)	整齐度指数 Uniformity index (%)	马克隆值 Micronaire value	断裂伸长率 Breaking elongation (%)	断裂比强度 Breaking strength (cN tex ⁻¹)
冀合 321 Jihe 321	29.2 a	82.9 c	4.1 b	6.5 a	29.5 a
OE-30	31.6 a	84.7 b	4.4 ab	6.2 a	30.6 a
OE-37	30.5 a	84.0 b	4.3 b	6.4 a	30.5 a
OE-38	29.5 a	85.3 a	4.7 a	6.3 a	29.8 a

同列不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。
Different lowercase letters in a column indicate significant difference at the 0.05 probability level.

织和生殖器官^[11],从而延迟叶片衰老。这与前人在棉花^[17]、小麦^[13]和玉米^[27]中的报道一致。此外,本研究获得的转 P_{SAG12} - IPT 基因棉花株系抗衰老能力不同,这可能与外源 IPT 基因的插入位点^[28-29]、外源基因与受体基因的互作有关^[30],也不排除转基因过程自身所导致的差异。

3.2 转 P_{SAG12} - IPT 基因延迟了棉花的成熟

花芽分化时间是影响棉花熟性的重要因素之一^[31-32]。本研究中 3 个转 P_{SAG12} - IPT 基因株系(OE -30、 OE -37 和 OE -38)的果枝始节均显著高于野生型,2 年平均较野生型提高 1~2 个节位,说明转基因株系的花芽分化开始较晚。研究表明,在转 IPT 基因玉米中,衰老激活 IPT 基因表达,CTKs 的产生导致开花明显延迟^[27]。当植株内 CTKs、ABA 和 GAs 含量较高或 IAA 含量较低时都可以促进棉花的花芽分化,反之抑制花芽分化,植物激素的含量及其动态平衡对花芽分化起着重要的调控作用^[33-34]。本研究的 IPT 过表达株系在幼苗阶段可能也会影响生长点的 CTKs 含量及与其他植物激素的互作,从而打破了棉花花芽分化阶段植物激素的固有平衡,延迟了花芽分化。

此外,虽然 3 个株系(OE -30、 OE -37 和 OE -38)的果枝始节无显著差异(表 2),但 OE -37 和 OE -38 在 10 月 10 日左右的吐絮率低于 OE -30,晚熟现象更为严重(表 3)。株系间成熟阶段熟性的差异可能与棉铃的时空分布有关, OE -37 和 OE -38 株系的叶绿素、蛋白质和 CTKs 含量高于 OE -30,表明其营养生长势较强,这可能导致同化物向库器官的转移减少^[13],从而加重中下部和内围果节产量器官的脱落,使上部果枝和外围果节棉铃占总铃数的比例提高引起晚熟。

3.3 转 P_{SAG12} - IPT 基因对棉花产量和纤维品质的影响

通过过表达 IPT 基因^[35-36]、抑制 CTKs 降解酶(CKX)^[37]基因,或外源施加 CTKs 类调节剂激动素(KT, 6-furfurylaminopurine)^[38]提高植株 CTKs 含量,可以增加水稻和棉花的产量。本研究结果与此不同, OE -30 的籽棉产量与野生型持平,抗衰老能力强的 OE -37 和 OE -38 株系的籽棉产量反而显著低于野生型。从产量构成因素可知, OE -37 和 OE -38 的铃数和铃重与野生型相比并不低(表 3),其减产的原因主要由于晚熟导致部分棉铃在本试验条件下不能正常成熟形成有效产量。

早期报道中高浓度的 CTKs 抑制纤维的伸长^[15], Zhao 等^[37]研究表明,适度提高 CTKs 水平,棉花纤维长度与野生型对照相比差异并不显著。本试验中导入 P_{SAG12} - IPT 基因后,纤维长度整齐度指数显著提高,马克隆值和断裂比强度也表现出高于野生型的趋势,这可能与转基因株系在生育后期叶片功能较强、合成的同化物较多有关,也不排除纤维中的 CTKs 也得到提高后直接调控纤维发育过程。

综上, P_{SAG12} - IPT 嵌合基因的导入提高了棉花的抗衰老能力,但同时延缓了棉花的成熟。应用该基因对生产上有早衰缺陷的品种进行遗传改良时,需注意协调抗衰与早熟的关系,以同时达到早熟高产优质的生产目的。

4 结论

P_{SAG12} - IPT 基因的导入提高了棉花叶片衰老阶段 IPT 基因的表达量及叶片叶绿素、蛋白质和细胞分裂素(CTKs)含量、延迟了叶片的衰老。转 P_{SAG12} - IPT 基因延迟了棉花的花芽分化,且成熟阶段转基因株系的抗衰老能力越强、早熟性越差,抗衰老能力中等和较强的转基因株系因晚熟而降低产量。 P_{SAG12} - IPT 基因导入在一定程度上改善了棉花纤维品质。

References

- [1] Bednarczyk C W, Oosterhuis D M. Plant potassium partitioning during progression of deficiency symptoms in cotton (*Gossypium hirsutum*). *Bett Crops Plant Food*, 1995, 79: 12–14.
- [2] 陈义珍, 董合忠. 棉花衰老和熟相形成的生理生态与调控研究进展. *应用生态学报*, 2016, 27: 643–651.
Chen Y Z, Dong H Z. Eco-physiology and regulation of leaf senescence and maturity performance in cotton: a review. *Chin J Appl Ecol*, 2016, 27: 643–651 (in Chinese with English abstract).
- [3] 张友昌, 余隆新, 夏松波, 张敦海, 王孝刚, 别墅. 长江流域棉区棉花早衰的成因分析及防控措施. *湖北农业科学*, 2011, 50: 3920–3923.
Zhang Y C, Yu L X, Xia S B, Zhang J H, Wang X G, Bie S. Causes and controlling measures of cotton premature senescence in Yangtze River cotton area. *Hubei Agric Sci*, 2011, 50: 3920–3923 (in Chinese with English abstract).
- [4] Shen F F, Yu S X, Han X L, Fan S L. Cloning and characterization of a gene encoding cysteine proteases from senescent leaves of *Gossypium hirsutum*. *Chin Sci Bull*, 2004, 49: 2601–2607.
- [5] Letham D S, Parker C W, Zhang R, Singh S, Upadhyaya M N, Dart P J, Palni L M S. Xylem-translocated Cytokinin: Metabolism and Function. Berlin: Springer Verlag Press, 1990. pp 275–281.
- [6] Noodén L D, Singh S, Letham D S. Correlation of xylem sap cytokinin levels with monocarpic senescence in soybean. *Plant*

- Physiol*, 1990, 93: 33–39.
- [7] Sitton D, Itai C, Kende H. Decreased cytokinin production in the roots as a factor in shoot senescence. *Planta*, 1967, 73: 296–300.
 - [8] Barry B F, Rorgers S G, Fraey R T, Brand L. Identification of a Cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 4776–4780.
 - [9] Lohman K N, Gan S S, John M C, Amasino R M. Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant*, 1994, 92: 322–328.
 - [10] Gan S, Amasino R M. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, 1995, 270: 1986–1988.
 - [11] McCabe M S, Garratt L C, Schepers F, Jordi W J R M. Effects of P_{SAG12} -IPT gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. *Plant Physiol*, 2001, 127: 505–516.
 - [12] Lin Y J, Cao M L, Xu C G, Chen H, Wei J, Zhang Q F. Cultivating rice with delaying leaf-senescence by P_{SAG12} -IPT gene transfection. *Acta Bot Sin*, 2002, 44: 1333–1338.
 - [13] Sýkorová B, Kurešová G, Daskalova S, Trčková M, Hoyerová K, Raimanová I, Motyka V, Trávníčková A, Elliott M C, Kamínek M. Senescence-induced ectopic expression of the *A. tumefaciens ipt* gene in wheat delays leaf senescence, increases cytokinin content, nitrate influx, and nitrate reductase activity, but does not affect grain yield. *J Exp Bot*, 2008, 59: 377–387.
 - [14] An X, Zhang J Y, Liao Y W, Liu L J, Peng D X, Wang B. Senescence is delayed when ramie (*Boehmeria nivea* L.) is transformed with the isopentenyl transferase (*ipt*) gene under control of the $SAG12$ promoter. *Febs Open Biol*, 2017, 7: 636–644.
 - [15] Yu X H, Zhu Y Q, Chen X Y, Xu Z H, Zhou B L, Shen X L. Alterations of root and fiber in transgenic cotton plants with chimeric Ph/P-*ipt* gene expression. *Acta Bot Sin*, 2000, 42: 59–63.
 - [16] 李静, 沈法富, 于东海, 韩秀兰. 转基因抗早衰棉的获得. 西北植物学报, 2004, 24: 1419–1423.
Li J, Shen F F, Yu D H, Han X L. The obtaining of transgenic cottons resistant to premature senescence. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2004, 24: 1419–1423 (in Chinese with English abstract).
 - [17] Liu Y D, Yin Z J, Yu J W, Li J, Wei H L, Han X L, Shen F F. Improved salt tolerance and delayed leaf senescence in transgenic cotton expressing the *Agrobacterium IPT* gene. *Biol Plant*, 2012, 56: 237–246.
 - [18] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 2001, 25: 402–408.
 - [19] 何钟佩. 农作物化学控制实验指导. 北京: 北京农业大学出版社, 1993. pp 6–8.
He Z P. Guidance of Chemical Control Experiments for Crops. Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1993. pp 6–8 (in Chinese)
 - [20] Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 1949, 24: 1–15.
 - [21] Read S M, Northcote D H. Minimization of variation in the response to different protein of the Coomassie blue G dye-binding: assay for protein. *Anal Biochem*, 1981, 116: 53–64.
 - [22] Hobbie L, Estelle M. Genetic approaches to auxin action. *Plant Cell Environ*, 1994, 17: 525–540.
 - [23] Wang J, Letham D S, Cornish E, Stevenson K R. Studies of cytokinin action and metabolism using tobacco plants expressing either the *ipt* or the *GUS* gene controlled by a chalcone synthase promoter: I. Developmental features of the transgenic plants. *Aust Plant Physiol*, 1997, 24: 661–672.
 - [24] Wang J, Letham D S, Cornish E, Stevenson K R. Studies of cytokinin action and metabolism using tobacco plants expressing either the *ipt* or the *GUS* gene controlled by a chalcone synthase promoter: II. *ipt* and *GUS* gene expression, cytokinin levels and metabolism. *Aust Plant Physiol*, 1997, 24: 673–683.
 - [25] Synková H, Semoradová S, Schnablová R, Wiitters E, Husak M, Valcke R. Cytokinin-induced activity of antioxidant enzymes in transgenic *Pssu-ipt* tobacco during plant ontogeny. *Biol Plant*, 2006, 50: 31–41.
 - [26] Joshi S, Choukimath A, Isenegger D, Panozzo J, Spangenberg G, Kant S. Improved wheat growth and yield by delayed leaf senescence using developmentally regulated expression of a cytokinin biosynthesis gene. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 1285.
 - [27] Robson P R, Donnison I S, Wang K, Frame B, Pegg S E, Thomas A, Thomas H. Leaf senescence is delayed in maize expressing the *Agrobacterium IPT* gene under the control of a novel maize senescence-enhanced promoter. *Plant Biotechnol J*, 2004, 2: 101–112.
 - [28] Barro F, Barcel P, Lazzeri P, Shewry P, Martin A, Ballesteros J. Field evaluation and agronomic performance of transgenic wheat. *Theor Appl Genet*, 2002, 105: 980–984.
 - [29] 贾莉莉, 吴鹏昊, 李娟, 汪志星, 陈全家, 王希东, 曲延英. *Bt* 基因导入对海岛棉农艺性状和产量性状影响的研究. 干旱地区农业研究, 2017, 35(2): 103–113.
Jia L L, Wu P H, Li J, Wang Z X, Chen Q J, Wang X D, Qu Y Y. Effects of introducing *Bt* gene on agronomic characters and yield characters of *Gossypium barbadense* L. *Agric Res Arid Areas*, 2017, 35(2): 103–113 (in Chinese with English abstract).
 - [30] 孙彩霞, 齐华, 孙加强, 张丽莉, 缪璐. 转基因棉花苗期光合特性研究. 作物学报, 2007, 33: 459–475.
Sun C X, Qi H, Sun J Q, Zhang L L, Miao L. Photosynthetic characteristics of *Bt* of *CpTI-Bt* Transgenic cotton at seedling stage. *Acta Agric Sin*, 2007, 33: 459–475 (in Chinese with English abstract).
 - [31] Reddy V R, Reddy K R, Acock B. Carbon dioxide and temperature interactions on stem extension, node initiation, and fruiting in cotton. *Agric Ecosys Environ*, 1995, 55: 17–28.
 - [32] 罗丹, 马晓蕾, 牛静, 刘安达, 张钊, 刘家浩, 杨国正. 棉花花芽分化及其影响因素研究进展. 中国棉花, 2020, 47(1): 1–5.
Luo D, Ma X L, Niu J, Liu A D, Zhang Z, Liu J H, Yang G Z. Advances in cotton floral bud differentiation and its influencing factors. *China Cotton*, 2020, 47(1): 1–5 (in Chinese with English abstract).
 - [33] 祁杰, 代建龙, 孙学振, 董合忠. 短季棉的早熟性机制及栽培利用. 棉花学报, 2018, 30: 406–413.
Qi J, Dai J L, Sun X Z, Dong H Z. Short-season cotton: mechanism of early maturity and its cultivation. *Cotton Sci*, 2018, 30: 406–413 (in Chinese with English abstract).

- [34] 任桂杰, 陈永哲, 董合忠, 陈穗云. 棉花花芽分化及部分内源激素变化规律的研究. 西北植物学报, 2000, 20: 847–851.
Ren G J, Chen Y Z, Dong H Z, Chen S Y. Studies on flower bud differentiation and changes of endogenous hormones of *Gossypium hirsutum*. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2000, 20: 847–851 (in Chinese with English abstract).
- [35] Ashikari M, Sakakibara H, Lin S, Yamamoto T, Takashi T, Nishimura A, Angeles E R, Qian Q, Kitano H, Matsuoka M. Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science*, 2005, 282: 741–745.
- [36] 付强. IPT 基因抑制水稻衰老的响应及其对产量的影响. 中国农业大学硕士学位论文, 北京, 2003.
Fu Q. Effect of IPT Gene on Senescence-inhibition and Yield in Rice (*Oryza sativa* L.). MS Thesis of China Agricultural University, Beijing, China, 2003 (in Chinese with English abstract).
- [37] Zhao J, Bai W Q, Zeng Q W, Song S Q, Zhang M, Li X B, Hou L, Xiao Y H, Luo M, Li D, Luo X Y, Pei Y. Moderately enhancing cytokinin level by down-regulation of *GhCKX* expression in cotton concurrently increases fiber and seed yield. *Mol Breed*, 2015, 35: 60
- [38] Sawan Z M, Mohamed A A, Sakr R A, Tarrad A M. Effect of kinetin concentration and methods of application on seed germination, yield components, yield and fiber properties of the Egyptian cotton (*Gossypium barbadense*). *Environ Exp Bot*, 2000, 44: 59–68.