

转基因玉米(36Ba3C42-1-3)大喇叭口期抗旱性的研究^{*}

罗安才¹, 李利霞¹, 党 辉¹, 林 清²

(1. 重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 401331;

2. 重庆市农业科学院生物技术中心/逆境农业研究重庆市市级重点实验室, 重庆 401329)

摘要:采用栅栽对照试验,对一种转基因玉米(36Ba3C42-1-3)及其受体在大喇叭口期进行了耐旱性鉴定。结果表明,干旱胁迫后,受试植株叶片相对含水量、叶绿素含量以及胁迫结束后花粉活力降低,细胞膜损伤程度增大;MDA 积累量、脯氨酸含量、SOD 活性升高;在上述指标中,除叶绿素含量变化表现出无显著性差异外,转基因植株均比受体植株表现出更好的耐受性。研究结果提示该转基因植株比受体植株具有更好的耐旱性。

关键词:转基因玉米;生理指标;耐旱性

中图分类号:Q945.78

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2015)04-0123-05

玉米(*Zea mays* L.)是世界上第三大粮食作物,可以作为人类食品、动物饲料、化工原料等^[1]。一些环境因素如含盐量^[2]、干旱^[3]、高温^[4]等均严重影响着玉米的产量,其中干旱是最重要的一个限制性因素。尤其在玉米生长至大喇叭口期阶段(开花前两周,从拔节到抽雄所经历的时期),玉米对水分胁迫最为敏感,此时缺水会造成玉米生长发育不良,常常导致花期玉米花粉发育不良或者败育^[1-2],导致减产甚至绝收。权瑞党等人^[5]通过花粉介导的方法,将编码胆碱脱氢酶的 *BADH* 基因(该基因表达产物可以增强植物细胞内甜菜碱的累积)转入玉米 *DH4866*;经检测它的纯合转基因株系(*betA/als*) 36Ba3C42-1-3 幼苗叶片中甜菜碱的含量增高。在中国西南如重庆等地区,严重的夏季干旱经常发生(发生概率为 60%~80%),并常常持续 30~50 d^[6],并覆盖了玉米大喇叭口期和后段时间^[6]。鉴于上述背景,本研究以转基因玉米(36Ba3C42-1-3)及其受体作为研究材料,分别检测它们在大喇叭口期阶段至花后 10 d 的抗旱评价指标,以评估和鉴定该转基因玉米材料的抗旱性以及在中国西南地区的适应性。

1 材料与方法

1.1 材料和栽培及水分管理

转基因玉米及其受体种子由山东大学张举仁教授惠赠。播种时间为 4 月中旬,选取饱满的种子经表面消毒,用水冲洗 1 h 后在温水中浸种 3 h。种子发芽 3 d,然后单粒种植到已预先称重并测定了其中盆土含水量的盆中,盆中土壤含水量为 20.58%,容重为(1.55±0.03) g·cm⁻³,pH 值为 6.01±0.01,团粒结构(8.15±0.03) mm。待幼苗生长到三叶期,移入温室,转基因及其受体玉米各个处理分别种植 45 株,按行距 1 m、穴距 0.33 m 排列;干旱胁迫组与正常供水的对照组中间设置水分隔离带 2 m,生长期间常规施肥及病虫害管理。

干旱胁迫组的转基因及其受体植株在开花前 15 d 左右进行干旱胁迫处理,此时气温高达 38~43 ℃,通过称重法控制浇水,调控土壤相对含水量在 15%~20%,同时对照组土壤相对含水量保持在 20%左右。控制浇水开始即记作干旱胁迫的第 0 d,连续处理 16 d 后,恢复正常浇水。其他时期同对照组相同,按照正常管理进行灌溉供水。

1.2 测定指标及方法

分别在控制浇水后第 0,2,4,8,16 d 以及浇水恢复正常后的第 7 d 时采集各处理组的新鲜叶片作为材料进

* 收稿日期:2014-12-16 修回日期:2015-03-04 网络出版时间:2015-5-15 10:56

资助项目:转基因生物新品种培育重大专项重大课题(No. 2008ZX080011-003)

作者简介:罗安才,副教授,博士,研究方向为植物生理学,E-mail: XINLAC2013@aliyun.com;通信作者:林清,研究员,E-mail: linqingcq@

126.com

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.n.20150515.1056.011.html>

行抗旱生理指标测定。其中,相对含水量(Relative water content)采用文献[7]的方法,具体计算公式为:

$$\text{相对含水量} = (\text{鲜质量} - \text{干质量}) / (\text{饱和鲜质量} - \text{干质量}) \times 100\%$$

叶绿素含量(Chlorophyll contents)采用乙醇浸提比色法^[8],称取样品 0.2 g,加入 95%乙醇 3 mL,避光浸提 24 h。以 95%乙醇为空白,测定 665 nm、649 nm 下吸光度;细胞膜损伤程度(Membrane damage)采用电导率法(Electrolyte leakage)^[7];游离脯氨酸含量(Free proline content)的测定采用磺基水杨酸法^[7];超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活性采用氮蓝四唑(NBT)化还原法^[7];丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量测定采用硫代巴比妥酸(TBA)法^[7];花粉活力(Pollen activity detection)测定采用氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法^[9]。

1.3 数据分析

所有数据均用“平均值±标准误”来表示,采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析,显著性水平为 $p < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 相对含水量的变化

叶片相对含水量可以揭示植物对水分的吸收和保持能力^[10]。研究结果表明(图 1),未进行水分胁迫的对照组中,转基因植株与受体植株相比叶片相对含水量无显著的差异;在干旱胁迫下,无论是转基因植株还是受体植株的叶片相对含水量都显著降低($p < 0.05$),而在胁迫初期,转基因植株对胁迫的敏感程度相对低于受体植株;一段时间后,转基因植株叶片相对含水量趋于稳定,而受体植株叶片相对含水量则呈现出持续的下降的趋势;浇水恢复正常后,相对含水量增加。

2.2 叶绿素含量的变化

叶绿素是光合作用过程中捕获光的主要成分,它的含量高低可以直接影响光合速率。干旱胁迫能够一定程度上加速叶片的衰老从而加快了叶绿素的分解速率^[11]。图 2 反映了不同处理下植株的叶绿素含量变化:在受到干旱胁迫后,转基因植株及受体植株叶片叶绿素含量都有一定的降低,但二者的降低程度并不存在显著差异;但是总体上受体植株叶片叶绿素含量要低于转基因植株。

2.3 电导率变化

干旱胁迫会导致细胞质膜的损伤,造成细胞膜稳定性降低,通透性的增大,进而造成生理代谢紊乱。测定植物叶片电导率的变化,能够间接揭示品种的抗旱能力。如图 3 所示,在测定期间转基因植株及受体植株叶片相对电导率均有升高,表明此期的高温,对叶片均有一定损伤,但转基因植相对电导率始终低于受体植株。

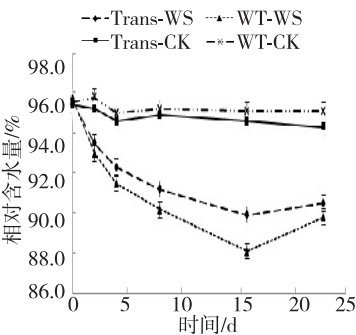


图 1 相对含水量变化

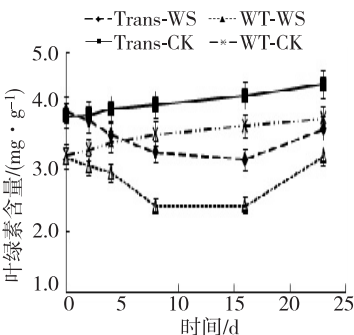


图 2 叶绿素含量变化

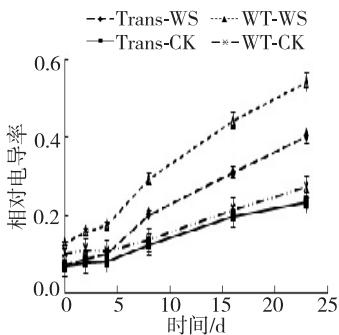


图 3 相对电导率变化

2.4 游离脯氨酸的含量变化

游离脯氨酸在植物中主要作为一种渗透调节物质,它的累积可以增强组织的抗脱水能力,而且它的偶极性也保护了膜蛋白结构的完整性^[12]。由图 4 可知,在未受到干旱胁迫时,无论是转基因植株还是受体植株叶片游离脯氨酸含量相对比较稳定,转基因植株虽然略高于受体植株,但差异不显著;在受到干旱胁迫之后,两种植株叶片游离脯氨酸含量都急剧升高,其中转基因植株升高幅度较大而且含量较高;在持续干旱胁迫之后转基因植株和受体植株游离脯氨酸含量均有不同程度的下降,然而受体植株下降幅度较大,在干旱胁迫第 16 d 时已达未受胁迫时的水平;在恢复正常浇水后,虽然转基因胁迫植株叶片游离脯氨酸含量逐渐下降,并达到较低的水平,但是其对照组仍高于胁迫组——而此时受体胁迫组与受体对照组之间该指标无显著差异。

2.5 SOD 活性变化

SOD 可以有效清除活性氧,保护生物膜。植物受到胁迫之后,SOD 活性会出现一定程度的升高。由图 5 可以看出,实验起见,未受到干旱胁迫的两种植株对照组一直增长趋于缓和,不存在显著差异;而在干旱胁迫初期,转基因植株和受体植株叶片的 SOD 活性都有升高的趋势,但是差异却不显著;在持续干旱胁迫后,两种植株叶片 SOD 活性都有下降,但是下降程度各异,受体植株比转基因植株下降幅度大;解除胁迫后,两者叶片 SOD 活性逐渐降低,恢复到略高于对照组水平。

2.6 MDA 含量变化

MDA 作为膜脂过氧化产物,它的累积含量的高低表明了膜系统受伤害的程度。图 6 反应了干旱胁迫后 MDA 的含量变化。干旱胁迫初期,不论转基因植株还是受体植株,其叶片 MDA 含量均呈现一定程度的上升;持续干旱胁迫后期,受体植株叶片 MDA 累积量显著大于转基因植株($p<0.05$);恢复正常浇水后,两种植株的 MDA 积累量逐渐趋近各自的对照水平。

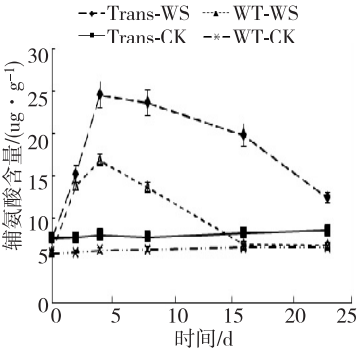


图 4 脯氨酸含量变化

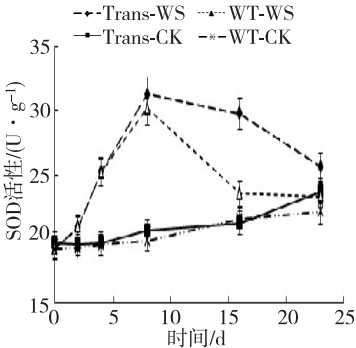


图 5 SOD 活性变化

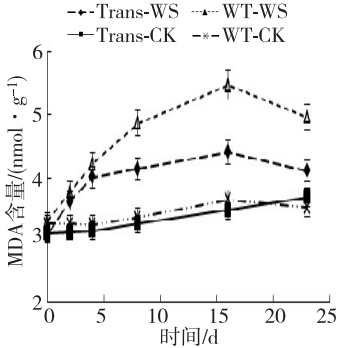


图 6 MDA 含量变化

2.7 花粉活力差异

花粉的活力表现可以直观的显示干旱胁迫对植株的影响。表 1 反映了每一个处理阶段植株的花粉活力。其中可见,两种植株的花粉活力都受到了一定程度的影响,受体植株的花粉活力损伤率要高于转基因植株。

表 1 不同处理下花粉活力比较

	对照	干旱胁迫	损伤率/%
转基因植株	0.934 0	0.888 5**	4.87
受体植株	0.845 6	0.768 3**	9.14

注:*表示 0.05 水平上差异显著;**表示 0.01 水平上差异显著。

3 讨论

玉米是一种亲水性植物,对水分胁迫异常敏感。已有大量学者对玉米萌芽期和苗期的抗旱性做了大量研究^[13-17],同时为了提高经济效益,有学者采用穴盘育苗这种可直接避开萌芽期和幼苗期的干旱问题的方法进行育苗^[18-19]。对玉米成株期的抗旱性研究大多是利用籽粒重、生物总量、产量等一些指标进行测定。笔者认为应特别注意玉米的水分临界期如大喇叭口期的抗旱性研究。因此,要评价玉米抗旱性或者某些品种在该地区的适应性也必须在此期间进行。

关于抗旱生理应该从多方面进行研究。一般认为,相对含水量降低可以改变细胞膜的结构^[20],而自由基理论^[21]则认为,干旱环境能够导致植物细胞内自由基的产生与清除过程失衡,自由基积累可引发细胞膜脂过氧化或脱脂反应^[22];与此同时不仅能引起叶片内水势下降,还可降低光合作用^[23],同时也在一定程度上引起叶绿素含量的降低。膜脂过氧化的发生导致体内 MDA 含量的大量积累,这使得膜中酶蛋白发生交联性失活,从而进一步增大细胞膜透性^[24],表现出组织浸泡液电导率的增大。同时,植物也会合成一些物质进行渗透调节,比如甜菜碱、游离氨基酸等一些物质的合成和积累^[25],其中以脯氨酸含量的变化最为突出。另外,氧自由基的积累一定程度上能够引起植物体内 SOD 表达量的增加,从而有助于抑制、清除氧自由基的产生和缓解脂质过氧化过程^[26]。因此上述指标在一定程度上可以代表植物的耐旱性。

本研究表明,干旱胁迫显著影响叶片相对含水量($p<0.05$),类似研究结果已在高粱和白杨中有报告^[27-28]。与其受体相比,转基因玉米叶片叶绿素含量偏高;在干旱胁迫时,转基因玉米叶片的相对含水量下降程度较低,脯氨酸含量升高幅度相对较大而且含量较高,MDA 累积量明显较小,相对电导率的增加幅度较低;而且在持续干旱胁迫之

后,转基因玉米叶片 SOD 活性下降速度明显较小。上述结果以及干旱胁迫后表现出来相对较高的花粉活力,均说明该转基因玉米比受体植株更适应大喇叭口期的干旱条件,同时还说明该转基因改造不只是造成该材料甜菜碱含量的增加,而且还导致了上述一系列生理生化变化,植株的耐旱性从总体上得到了进一步的提升。

在玉米的抗旱性评价方面,国内目前尚没有形成较为统一的鉴定方法,只有一些地方具有相关的鉴定标准^[29],大多数地方主要还是以存活率、产量等直观数据进行鉴定分析,虽然这些方法在产量上得到一定的成果,但是存在周期偏长等缺点。本研究从生理生化角度入手,并用花粉活力对其耐旱性进行检测,可以在较短时间内进行较为准确全面的鉴定。

参考文献:

- [1] Suganya K, Rajannan G. Effect of one time post-sown and pre-sown application of distillery spent wash on the growth and yield of maize crop[J]. Botany Research International, 2009, 2(4): 288-294.
- [2] Niu G, Xu W, Rodriguez D, et al. Growth and physiological responses of maize and sorghum genotypes to salt stress [EB/OL]. [2014-12-16]. <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/145072/>.
- [3] Bruce W B, Edmeades G O, Barker T C. Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance[J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53(366): 13-25.
- [4] Chen J, Xu W, Velten J, et al. Characterization of maize inbred lines for drought and heat tolerance[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2012, 67(5): 354-364.
- [5] 权瑞党. 农杆菌介导的玉米转化技术的改进及转 *betA* 基因玉米抗性分析[D]. 济南: 山东大学, 2003.
Quan R D. Improvement in techniques of maize transformation mediated by agrobacterium tumefaciens and analysis of atress tolerance of maize transformed with *betA* gene [D]. Jinan: Shang Dong University, 2003.
- [6] Zhu Z L, Zhao X J, Wang C T. The Rules of drought and the development of water-saving agriculture in Southwest China [J]. Ecology and Environment, 2006, 15(4): 876-880.
- [7] 张治安, 陈展宇. 植物生理学试验技术[M]. 长春: 吉林大学出版社, 2008.
Zhang Z A, Chen Z Y. Experimental technology of plant physiology [M]. Changchun: Jilin University Publisher, 2008.
- [8] 李志丹, 韩瑞宏, 廖桂兰, 等. 植物叶片中叶绿素提取方法的比较研究[J]. 广东第二师范学院学报, 2011, 31(3): 80-83.
Li Z D, Han R H, Liao G L, et al. A comparative study on the different extraction techniques about the chlorophyll concentration of plant leaf[J]. Journal of Guangdong University of Education, 2011, 31(3): 80-83.
- [9] 王艳哲, 崔彦宏, 张丽华, 等. 玉米花粉活力测定方法的比较研究[J]. 玉米科学, 2010, 18(3): 173-176.
Wang Y Z, Cui Y H, Zhang L H, et al. Comparative study on methods for testing pollen viability of maize[J]. Journal of Maize Sciences, 2010, 18(3): 173-176.
- [10] Mouss H R, Abdel-Aziz S M. Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress[J]. Australian Journal of Crop Science, 2008, 1(1): 31-36.
- [11] Ghorbanli M, Gafarabad M, Amirkian T, et al. Investigation of proline, total protein, chlorophyll, ascorbate and dehydroascorbate changes under drought stress in Akria and Mobil tomato cultivars[J]. Iranian Journal of Plant Physiology, 2012, 3(2): 651-658.
- [12] Farkhondeh R, Nabizadeh E, Jalilnezhad N. Effect of salinity stress on proline content, membrane stability and water relations in two sugar beet cultivars[J]. International Journal of Agriscience, 2012, 2(5): 385-392.
- [13] 范翠丽, 牛瑞明, 袁丁. 玉米苗期及萌芽期抗旱性评定方法筛选[J]. 河北北方学院学报: 自然科学版, 2006, 22(5): 30-34.
Fan C L, Niu R M, Yuan D. The filtration of identification methods of maize drought-tolerance during the germination stage and the seeding stage [J]. Journal of Hebei North University: Natural Science Edition, 2006, 22(5): 30-34.
- [14] 朴明鑫, 张春宵, 杨书华等. 69 份玉米自交系的苗期耐旱性分析[J]. 吉林农业科学, 2011, 36(3): 13-17.
Piao M X, Zhang C X, Yang S H, et al. Analysis of drought tolerance of sixty-nine maize inbred lines at seeding stage[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2011, 36(3): 13-17.
- [15] 李凤海. 玉米抗旱性指标的筛选及其遗传特性研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2011.
Li F H. Selection of Drought Resistance Index and Genetic Rresearch of Maize Breeding [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2011.
- [16] 高志军. 早熟玉米耐旱性鉴定及其抗旱性状的遗传参数分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2007.
Gao Z J. Early mature maize drought tolerance inentification and its analysis of hereditary paramenters of drought-resistance traits [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2007.
- [17] Khodarahmpour Z. Evaluation of maize (*Zea mays* L.)

- hybrids, seed germination and seedling characters in water stress conditions[J]. African Journal of Agricultural Research, 2012, 7(45): 6049-6053.
- [18] 熊飞. 玉米穴盘育苗常见问题与对策[J]. 农技服务, 1999, 7(2): 19.
- Xiong F. Problems and countermeasures of maize plug seedlings[J]. Agricultural Technology Service, 1999, 7(2): 19.
- [19] 孙杰. 大棚糯玉米穴盘育苗移栽生产技术[J]. 甘肃农业科技, 2008, 2(7): 62-63.
- Sun J. Technologies of glutinous maize plug seedlings in the greenhouse [J]. Gansu Agricultural Science and Technology, 2008, 2(7): 62-63.
- [20] Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt K V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress a review [J]. Annals of Botany, 2003, 91(2): 179-194.
- [21] Liang Z S, Yang J W, Shao H B, et al. Investigation on water consumption characteristics and water of poplar under soil water deficits on the Loess Plateau [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2006, 53(1): 23-28.
- [22] 葛体达, 隋方功, 白莉萍, 等. 不同土壤水分对玉米光合特性和产量的影响膜脂过氧化作用的影响 [J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2005, 23(2): 143-148.
- Ge T D, Sui F G, Bai P, et al. Effects of different soil water content on the photosynthetic character and POD yields of summer maize [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University: Agricultural Science, 2005, 23(2): 143-148.
- [23] 毕建杰, 刘建栋, 叶宝兴. 干旱胁迫对夏玉米叶片光合及叶绿素荧光的影响[J]. 气象与环境科学, 2008, 31(1): 10-14.
- Bi J J, Liu J D, Ye B X. Effects of drought stress on photosynthesis and chlorophyll fluorescence of the summer maize leaf [J]. Meteorological and Environmental Sciences, 2008, 31(1): 10-14.
- [24] Slatter D A, Murray M, Bailey A J. Formation of a dihydropyridine derivative as a potential cross-link derived from malondialdehyde in physiological systems [J]. FEBS Letters, 1998, 421(3): 180-184.
- [25] Subbarao G V, Chauhan Y S, Johansen C, et al. Patterns of osmotic adjustment in pigs on pea its importance as a mechanism of drought resistance[J]. European Journal of Agronomy, 2000, 12(34): 239-249.
- [26] 窦俊辉, 喻树迅, 范术丽, 等. SOD 与植物胁迫抗性[J]. 分子植物育种, 2010, 8(2): 359-364.
- Dou J H, Yu S X, Fan S L, et al. SOD and plant stress resistance[J]. Molecular Plant Breeding, 2010, 8(2): 359-364.
- [27] Singh G, Sharma N. Antioxidative response of various cultivars of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) to drought stress[J]. Journal of Stress Physiology & Biochemistry, 2013, 9(3): 139-151.
- [28] 张宪政. 作物生理研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1992: 207-208.
- Zhang X Z. The research method of crop physiology [M]. Beijing: Agriculture Press, 1992: 207-208.
- [29] 河北省质量技术监督局. DB13/T 1282-2010 玉米抗旱性鉴定技术规范[S/OL]. [2014-12-16]. [http://down. foodmate. net/standard/sort/15/25188. html](http://down.foodmate.net/standard/sort/15/25188.html).
- Hebei Provincial Bureau of Quality and Technical Supervision. DB13/T 1282-2010 Technical specification of identification for drought resistance in maize[S/OL]. [2014-12-16]. [http://down. foodmate. net/standard/sort/15/25188. html](http://down. foodmate. net/standard/sort/15/25188.html).

Drought Resistance of Transgenic Maize (36Ba3C42-1-3) Large Bell

LUO Ancai¹, LI Lixia¹, DANG Hui¹, LIN Qing²

(1. College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331;
2. Biotechnology Research Center, Chongqing Academy of Agricultural Sciences/Chongqing
Key Laboratory of Adversity Agriculture, Chongqing 401329, China)

Abstract: In this study, the effect of drought stress on physiological and biochemical criterion in maize at the bell-mouthed period and the identification of the drought tolerance power of a transgenic maize 36Ba3C42-1-3 were studied in pot culture with rainproof shelter. The results showed that under moderate drought stress, the relative water content, the chlorophyll content and after the stress the pollen viability also decreased. The damage on cell membrane increased; the accumulation of MDA, pralines content and SOD activity increased. Changes in the above indexes, except the contents of chlorophyll showed no significant difference, the transgenic plants than the receptor plants showed better tolerance. Therefore, this study suggests that the transgenic plants better than the receptor plant drought tolerance.

Key words: transgenic maize; physiological and biochemical indexes; drought resistance