

分 类 号: Q78
学 号: 20202306004

密 级: 公开
单位代码: 10759

石河子大学

博 士 学 位 论 文



天山雪莲 *SiFBA4* 基因提高陆地棉光合效率的研究及种质材料创制

学 位 申 请 人	张泽星
指 导 教 师	祝建波 研究员
	刘瑞娜 副教授
申请学位门类级别	工学博士
专 业 名 称	农业工程
研 究 领 域	农业生物环境与能源工程
所 在 学 院	生命科学学院

中国 新疆 · 石河子
2025 年 7 月

分 类 号: Q78
学 号: 20202306004

密 级: 公开
单位代码: 10759

石河子大学

博 士 学 位 论 文



天山雪莲 *SiFBA4* 基因提高陆地棉光合效率的研究及种质材料创制

学 位 申 请 人	张泽星
指 导 教 师	祝建波 研究员
	刘瑞娜 副教授
申请学位门类级别	工学博士
专 业 名 称	农业工程
研 究 领 域	农业生物环境与能源工程
所 在 学 院	生命科学学院

中国 新疆 · 石河子
2025 年 7 月

**Improvement of photosynthetic efficiency of Upland cotton by *SiFBA4*
gene of *Saussurella-Tianshan* and creation of germplasm materials**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

for the Degree

Doctor of Engineering

By

Zhang Zexing

(Agricultural engineering)

Dissertation Supervisor:

Professor ZhuJianbo

July, 2025

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：张译星

时间：2025年5月23日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：张译星

时间：2025年5月23日

导师签名：祝连华

时间：2025年5月23日

摘要

目的：棉花（*Gossypium hirsutum*）作为新疆主要经济作物，提高其产量对农业可持续发展具有重要意义。作物产量的形成 95%来源于光合作用，光合作用碳同化的核心途径是卡尔文循环，果糖-1,6-二磷酸醛缩酶（Fructose-1, 6-bisphosphate aldolase, FBA）是卡尔文循环的关键调节因子，催化果糖-1,6-二磷酸生成磷酸二羟丙酮和甘油醛-3-磷酸的可逆反应，可以作为改善光合作用的重要靶点。本课题组前期研究发现天山雪莲（*Saussurea involucreata*）*SiFBA4* 基因在烟草和番茄中能够显著加快植株的生长，但其在棉花中的功能尚未明确。本研究采用农杆菌介导的棉花遗传转化体系将 *SiFBA4* 基因进行过表达，并对农艺性状和生理生化指标进行调查和测定，分析转 *SiFBA4* 基因棉花的光合效率和生长发育特征。进一步通过转录组和代谢组联合分析，解析 *SiFBA4* 基因在棉花光合效率和产量形成方面可能的调节机制，为棉花育种提供重要的理论依据和基因资源。

方法：本研究采用农杆菌介导的遗传转化体系将 *SiFBA4* 基因转入棉花中，利用 PCR、RT-PCR 和 Western blot 等分子生物学技术鉴定分析稳定表达的转基因棉花株系。并通过连续两个世代田间试验，测定 *SiFBA4* 基因过表达对棉花光合生理、农艺性状、产量以及纤维品质的影响。进一步通过转录和代谢网络分析，初步分析 *SiFBA4* 基因在棉花中可能的调控机制。

结果：（1）本研究共获得 14 个棉花阳性转化体，经 RT-PCR 和 Western blot 鉴定发现 *SiFBA4*-OE-4、*SiFBA4*-OE-14 和 *SiFBA4*-OE-17 中 *SiFBA4* 基因的表达丰度高于其他株系，其中 OE-4 株系的蛋白表达水平最高，选择该材料用于后续研究。

（2）转基因株系的光合能力显著增强，其中，OE-4 株系的净光合速率达到 $34.22 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ，较 WT 提高 17.47%；叶绿素含量较 WT 增加 0.3 mg/g 。结果表明，*SiFBA4* 基因过表达能够有效提高棉花的光合速率。转基因株系 OE-4 和 OE-17 各生长发育阶段生物量均显著高于 WT ($p \leq 0.002$)。其中，苗期、蕾期和铃期单株平均生物量分别为 1.27、32.95 和 115.63 g，分别较 WT 增加 23.30%、49.75%和 42.40%，结果表明 *SiFBA4* 基因过表达促进了棉花生物量的积累。

（3）通过测定三个株系的农艺性状，转 *SiFBA4* 基因棉花的株高、节间数、果枝数、蕾铃数和叶面积指数等指标较 WT 均显著增加，三个株系果枝数和棉铃数的平均值分别达到 10.61 和 15.27 个，较 WT 提高 20.58%和 69.00%；下胚轴长度、节间长度及果枝夹角等性状显著减小。产量和纤维分析表明，转基因株系 OE-4、OE-14 和 OE-17 的籽棉产量分别为 5.78 、 5.60 和 $5.68 \times 10^3 \text{ kg/ha}$ ，较 WT ($4.77 \times 10^3 \text{ kg/ha}$) 显著提高 (19.22%)，但单铃重无显著差异，纤维长度和强度分别降低 6.67% 和 4.86% ($p < 0.05$)，纤维品级由 A 级降至 C2 级。结果表明 *SiFBA4* 基因通过增加果枝和棉铃数实现产量的提高，而纤维品质降低。

（4）OE-4 株系转录组分析发现，在棉花中过表达 *SiFBA4* 基因显著上调了卡尔文循环关键酶基因 *FBP*、*TKL*、*PGK* 和 *GAPDH* 的表达量；增强了光合作用 PSI 和 PSII 复合物亚基 PSAs/PSBs 和叶

绿素 a/b 光捕获复合体亚基 LHCA_s/LHCB_s 基因的表达;促进了叶绿素合成途径相关基因 *PROA*、*CHL_s* 和 *NOL/NYC1* 的上调表达;卡尔文循环关键酶 FBA 和 FBP 的酶活性显著增加,这些结果表明 *SiFBA4* 基因可以通过增强棉花光合作用光反应和暗反应过程,进而促进光合作用,为固定 CO₂ 提供了较多的 ATP 和 NADPH。

(5) OE-4 株系代谢组分析发现,转 *SiFBA4* 基因株系叶片中可溶性糖和淀粉含量降低,卡尔文循环中间产物果糖-6-磷酸、赤藓糖-4-磷酸、景天庚酮糖-7-磷酸和核酮糖-5-磷酸的积累量显著减少;根系吡喃葡萄糖、景天庚酮糖、葡糖二酸-1-磷酸和景天庚酮糖-7-磷酸等糖类物质含量增加,淀粉含量减少。结合转录组数据中糖转运相关基因 *SWEETs*、*SUCs* 和 *STPs* 普遍上调表达,推测 *SiFBA4* 基因可能通过调控棉花糖转运相关基因的表达,促进光合产物从“源”到“库”的定向转运。

结论:本研究通过生理、农艺、转录组和代谢组的多维度整合分析,初步分析了在陆地棉中异源表达 *SiFBA4* 基因对棉花生长发育的影响及其可能的作用机制。*SiFBA4* 基因可以通过增强卡尔文循环关键酶活性和光反应相关基因表达,提高光合效率。并通过促进糖转运蛋白基因表达,优化光合产物从源到库的分配,最终实现生物量和产量的同步提升。这些研究揭示了 *SiFBA4* 基因通过卡尔文循环在棉花生长发育中的关键作用,为棉花育种提供了新的基因资源和理论依据。

关键词: 陆地棉; *SiFBA4*; 光合效率; 糖转运; 产量

Abstract

Objective: Cotton (*Gossypium hirsutum*) is a major cash crop in Xinjiang and improving its yield is of great significance for sustainable agricultural development. Approximately 95% of the crop yield comes from photosynthesis, and the core pathway of photosynthetic carbon assimilation is the Calvin cycle. Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA) is a key regulator of the Calvin cycle, which catalyzes the formation of dihydroxyacetone phosphate (DAP) and glyceraldehyde-3-phosphate (G-3-phosphate) from fructose-1,6-bisphosphate and can be used as a reversible reaction for the formation of fructose-3-phosphate and G-3-phosphate. phosphate, which could be an important target for improving photosynthesis. In our previous study, we found that the *SiFBA4* gene of Tianshan snow lotus (*Saussurea involucrata*) could significantly accelerate plant growth in tobacco and tomato; however, its function in cotton has not been clarified. In this study, the *SiFBA4* gene was overexpressed using an *Agrobacterium*-mediated cotton genetic transformation system, and agronomic traits and physiological and biochemical indices were investigated and measured to analyze the photosynthetic efficiency, growth, and developmental characteristics of cotton with the trans-*SiFBA4* gene. Further, through joint transcriptome and metabolome analysis, we will analyze the possible regulatory mechanism of the *SiFBA4* gene in cotton photosynthetic efficiency and yield formation, which will provide an important theoretical basis and genetic resources for cotton breeding.

Methods: In this study, we used an *Agrobacterium*-mediated genetic transformation system to transfer the *SiFBA4* gene into cotton, and utilized molecular biology techniques, such as PCR, RT-PCR, and Western blotting, to identify and analyze stably expressed genes. Transgenic cotton lines were analyzed using molecular biology techniques, such as PCR, RT-PCR and Western blotting. The effects of *SiFBA4* overexpression on the photosynthetic physiology, agronomic traits, yield, and fiber quality of cotton were also determined by two consecutive generations of field experiments. The possible regulatory mechanisms of the *SiFBA4* gene in cotton were further analyzed using transcriptional and metabolic network analyses.

Results: (1) Fourteen cotton-positive transformants were obtained in this study and were identified by RT-PCR and Western blotting to reveal that *SiFBA4*-OE-4, *SiFBA4*-OE-14 and *SiFBA4* -OE-17 had significantly higher expression levels of the *SiFBA4* gene than the other strains, with the OE-4 strain having the highest protein expression level, which was selected for subsequent studies.

(2) The photosynthetic capacity of the transgenic strains was significantly enhanced, in which the OE-4 line showed a net photosynthetic rate of 34.22 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, which was increased by 17.47% compared with that of the WT; and the chlorophyll content increased by 0.3 mg/g. The results indicated that the overexpression of *SiFBA4* gene could effectively increase the photosynthetic rate of cotton. The biomass of transgenic lines OE-4 and OE-17 was significantly higher than that of WT at all growth and development stages

($p \leq 0.002$). The average biomass of a single plant at the seedling, bud, and boll stages was 1.27, 32.95 and 115.63 g, which increased by 23.30%, 49.75%, and 42.40%, respectively, compared with that of the WT. These results indicated that overexpression of the *SiFBA4* gene promoted the accumulation of cotton biomass.

(3) By determining the agronomic traits of the three strains, the indicators of plant height, number of internodes, number of fruiting shoots, number of buds and bolls and leaf area index of cotton transfected with the *SiFBA4* gene were significantly increased compared with that of WT, and the average values of the number of fruiting shoots and bolls of the three strains. The average values of the number of fruiting branches and the number of cotton bolls of the three lines reached 10.61 and 15.27, respectively, which were 20.58% and 69.00% higher than that of WT; the traits of hypocotyl length, internode length and the angle of fruiting branches were significantly reduced. Yield and fiber analyses showed that the seed cotton yields of transgenic lines OE-4, OE-14, and OE-17 were 5.78 , 5.60 , and 5.68×10^3 kg/ha, respectively, which were significantly higher (19.22%) than that of WT (4.77×10^3 kg/ha), but there was no significant difference in boll weight. The fiber length and strength were reduced by 6.67% and 4.86%, respectively ($p < 0.05$), and the fiber grade decreased from A to C2. The results indicated that the *SiFBA4* gene achieved a higher yield by increasing the number of fruiting branches and bolls, while reducing fiber quality.

(4) Transcriptome analysis of the OE-4 line revealed that overexpression of the *SiFBA4* gene in cotton significantly upregulated the expression of the key enzymes of the Calvin cycle, FBP, TKL, PGK, and GAPDH; enhanced the expression of photosynthesis PSI and PSII complex subunits PSA/PSBs and chlorophyll a/b light-trapping complex subunits LHCA/LHCB genes; promoted the upregulated expression of chlorophyll synthesis pathway-related genes *PROA*, *CHLs*, and *NOL/NYC1*; and significantly increased the enzyme activities of the key enzymes of the Calvin cycle FBA and FBP. These results indicate that the *SiFBA4* gene could provide more ATP and NADPH for CO₂ fixation by enhancing the processes of light and dark reactions of cotton photosynthesis, which in turn promotes photosynthesis.

(5) OE-4 line metabolome analysis revealed that the soluble sugar and starch contents in the leaves of the transgenic *SiFBA4* strain were reduced, the accumulation of the Calvin cycle intermediates fructose-6-phosphate, erythrose-4-phosphate, nectarine heptulose-7-phosphate, and ribulose-5-phosphate were significantly reduced, and the root system sugars such as glucopyranose, nectarine heptulose, glucurono-dicarboxylic acid-1-phosphate, and nectarine heptulose-7-phosphate content increased and starch content decreased. Combined with the generally up-regulated expression of sugar transport-related genes *SWEETs*, *SUCs* and *STPs* in the transcriptome data, it was hypothesized that the *SiFBA4* gene might promote the directional transport of photosynthesis products from the “source” to the “sink” by regulating the expression of cotton sugar transport-related genes. The *SiFBA4* gene may regulate the expression of

genes related to marshmallow transport by promoting the targeted transport of photosynthetic products from “source” to “sink”.

Conclusion: This study conducted a preliminary analysis of the heterologous expression of *SiFBA4* in relation to cotton growth and development, as well as its potential mechanisms of action. Key enzyme activity and light-response-related gene expression to improve photosynthetic efficiency. By promoting the expression of sugar transporter protein genes, it can optimize the distribution of photosynthetic products from the source to the reservoir, and ultimately achieve the simultaneous enhancement of biomass and yield. These studies reveal the key role of the *SiFBA4* gene in cotton growth and development through the Calvin cycle and provide new genetic resources and a theoretical basis for cotton breeding.

Key words: *Gossypium hirsutum*; *SiFBA4*; photosynthetic efficiency; sugar transport; yield

目录

摘要	I
目录	VI
第 1 章 文献综述	1
1.1 棉花育种研究概述	1
1.1.1 棉花传统育种技术	1
1.1.2 棉花生物育种技术	3
1.1.3 棉花光合效率研究进展	4
1.2 植物光合作用概述	5
1.2.1 植物光合作用的定义和过程	5
1.2.2 植物光合作用的机制	6
1.3 卡尔文循环及其相关酶的研究进展	8
1.3.1 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶 (Rubisco)	9
1.3.2 景天庚酮糖-1,7-二磷酸酶 (SBPase)	10
1.3.3 果糖-1,6-二磷酸酶 (FBPase)	11
1.4 果糖-1,6-二磷酸醛缩酶 (FBA 或 FBPA) 的研究	12
1.4.1 果糖-1,6-二磷酸醛缩酶的分类和结构特性	12
1.4.2 果糖-1,6-二磷酸醛缩酶基因家族的研究概况	12
1.4.3 果糖-1,6-二磷酸醛缩酶的功能研究	13
1.5 研究目的意义、研究内容及技术路线	14
1.5.1 研究目的意义	14
1.5.2 研究内容	15
1.5.3 技术路线	16
第 2 章 转 <i>SiFBA4</i> 基因棉花的获得	17
2.1 引言	17
2.2 研究材料	17
2.2.1 主要仪器	17
2.2.2 主要材料及来源	17
2.3 方法	18
2.3.1 <i>SiFBA4</i> 基因表达载体的构建	18
2.3.2 重组载体导入农杆菌	20

2.3.3 转基因植株的获得.....	21
2.3.4 转基因植株验证分析.....	22
2.4 结果与分析	26
2.4.1 <i>SiFBA4</i> 基因棉花转化体的获得与嫁接	26
2.4.2 转基因株系的分子验证.....	27
2.5 讨论	29
2.6 小结	29
第 3 章 转 <i>SiFBA4</i> 基因棉花生长发育及生理分析	31
3.1 前言	31
3.2 材料	31
3.2.1 主要仪器.....	31
3.2.2 试验材料.....	31
3.3 方法	32
3.3.1 试验设计及试验地概况.....	32
3.3.2 种子萌发及生育期观测.....	32
3.3.3 光合生理参数测定.....	33
3.3.4 叶绿素含量.....	33
3.3.5 叶面积测定.....	34
3.3.6 生产潜力参数.....	34
3.3.7 生物量测定.....	34
3.3.8 农艺性状与纤维品质分析.....	35
3.3.9 棉花气孔特征.....	35
3.3.10 光合作用关键酶活性测定.....	35
3.3.11 淀粉含量测定.....	38
3.3.12 统计分析.....	39
3.4 结果分析	39
3.4.1 生物量积累.....	40
3.4.2 光合生理.....	45
3.4.3 转基因棉花农艺性状.....	52
3.4.4 成熟期产量与纤维品质性状.....	61
3.5 讨论	65
3.5.1 <i>SiFBA4</i> 基因促进棉花生物量积累	66
3.5.2 <i>SiFBA4</i> 基因过表达提高棉花光合效率	66
3.5.3 <i>SiFBA4</i> 基因过表达优化棉花株型结构	67

3.5.4 <i>SiFBA4</i> 基因过表达促进棉花产量形成	68
3.6 小结	69
第 4 章 <i>SiFBA4</i> 基因对棉花生物量和产量形成的机制分析	70
4.1 引言	70
4.2 材料	70
4.2.1 主要仪器.....	70
4.2.2 植物材料.....	70
4.3 方法	71
4.3.1 转录组学和代谢组学检测和分析.....	71
4.3.2 qRT-PCR 验证转录组.....	71
4.4 结果分析	72
4.4.1 转录组测序分析.....	72
4.4.2 代谢组数据分析.....	88
4.4.3 转基因棉花转录代谢网络调控机制解析.....	93
4.5 讨论	97
4.5.1 转基因株系碳水化合物代谢网络构建与调控机制解析.....	97
4.5.2 <i>SiFBA4</i> 基因促进棉花源-库糖转运效率	102
4.5.3 <i>SiFBA4</i> 基因调控光合碳代谢网络的分子机制及其育种创新性	103
4.6 小结	105
第 5 章 总结和展望	107
5.1 结论	107
5.2 创新点	108
5.3 展望	108
参考文献	110
致谢	128
附录	129
附录 A.棉花培养基配方	129
附录 B. SDS-PAGE 分离胶和浓缩胶.....	130
附录 C.2023 年和 2024 年月平均温度和月平均降水量.....	131
附录 D.转录组测序及分析方法	132
D.1 样品收集和准备.....	132
D.2 数据分析.....	133
附录 E.代谢组学测序及分析方法	135
E.1 标准品与试剂	135

E.2 样品提取流程	135
E.3 数据结果评估	136
E.4 数据结果分析	137
作者简介	140

部分缩写中英文对照

英文缩写 English abbreviation	英文全称 English name	中文全称 Chinese name
MS	Murashige & Skoog culture medium	MS 培养基
LB	Luria-Bertani culture medium	LB 培养基
WT	Wild type	野生型
OE	Over-expression	过表达
bp	Base pair	碱基对
kDa	kilodalton	千道尔顿
rpm	Rotation per minute	每分钟转速
s	second	秒
h	hour	小时
min	minute	分钟
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
cDNA	Complementary DNA	互补 DNA
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
RT-PCR	Reverse transcriptative PCR	反转录 PCR
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR	实时定量 PCR
FC	Fold chang	倍数变化
DEGs	Differentially expressed genes	差异表达基因
DAMs	Differentially accumulated metabolites	差异积累代谢物
GO	Gene ontology	基因本体论
KEGG	Kyoto encyclopedia of genes and genomes	京都基因与基因组百科全书

第 1 章 文献综述

棉花作为全球最重要的天然纤维作物，对纺织工业的稳定发展具有重要意义，提高棉花产量和品质是棉花育种工作的重要目标^[1]。中国作为世界上最大棉花生产国和消费国，纺织品是我国出口创汇的大宗产品，能够直接影响国民经济和外汇储备。同时，棉花作为经济欠发达地区农民的主要经济来源，对农民收入和农村经济发展具有深远影响^[2]。新疆作为我国最大的商品棉生产基地，棉花产业已成为当地经济的支柱产业，根据国家统计局和联合国粮农组织数据库（FAOSTAT）统计，近十年新疆地区棉花产量占全国总产量的 80%以上，占全球总产量的 18%左右。然而，随着全球人口的增长和国际贸易环境的复杂化，棉花产业面临着重大的挑战。因此，实现高产稳产成为棉花及其他作物育种的主要任务。一直以来，杂交选育等传统育种技术为农业的发展做出了突出的贡献，不断地改善了作物的产量和品质，但其时间成本高、效率有限等特点难以满足当前农业发展的需求^[3]。近年来，转基因技术和基因编辑技术等新的育种策略和技术手段被育种学家所推崇，极大地促进了育种领域的发展。

光合作用作为作物产量形成的基础，提高作物光能利用率成为提高作物产量的关键途径^[4,5]。相关研究报道，自然环境下，植物光合作用固定的 CO_2 有 22.26%，有效截获的光能仅占 5%左右^[6]。在农业生产中，如何充分的利用太阳辐射能进行光合作用，增强植物对光能的利用效率，以及增强光合碳固定能力，成为了一个亟需探索和发展的科学研究问题。自 20 世纪 60 年代 Bonner 提出提高作物光合效率可以增加产量的设想以来，科学家们不断地探索着高光效作物的筛选与鉴定标准^[7]。2010 年沈允钢和程建峰通过分析光能截获、光能吸收与转化、光合碳同化、光合产物的积累与分配以及干物质转运和分配等光能利用过程，汇总了高光效作物筛选与鉴定的性状指标，为高光效育种提供了理论依据（表 1-1）^[8]。因此，从提高光合效率的角度，培育高光效中间种质材料，以应对当前棉花产业面临的挑战，具有非常重要的理论和实践意义。

1.1 棉花育种研究概述

1.1.1 棉花常规育种技术

棉花是粮食作物以外最重要的战略物资之一，发挥着重要的社会和经济价值。近代以来，我国棉花育种经历了从引种到自主创新的转变，以陆地棉的引入取代传统的亚洲

棉，通过系谱选育法培育出了如“徐州 1818”、“洞庭 1 号”和“中棉所 3 号”等优良品种，极大地推动了我国棉花产业的发展^[9]。然而，系谱选育法纯粹依赖自然变异，存在效率低、周期长等局限性。20 世纪 70 年代起，杂交育种技术逐渐被采用，通过品种间杂交和远缘杂交，使棉花在产量、纤维品质和环境适应性等方面表现出显著的杂种优势^[10-12]。棉花细胞质雄性不育“三系”（不育系、保持系和恢复系）制种技术等方面均取得新突破，显著提升了育种效率，降低了制种成本^[13]。早期研究主要通过分析产量、纤维品质等数量性状来讨论棉花杂种优势的具体表现，后来逐步涉及棉花的生物量以及早熟性和抗病性等功能表现的研究^[10]。

表 1-1 高光效作物筛选与鉴定的性状和指标^[8]
Table 1-1 Characters and indexes of high-efficiency crop screening and identification

光能利用过程	简要理论基础		植株性状		生理指标
光能截获	减少植物消光系数		株型逐趋紧凑，矮秆， 叶片宽、短、厚、挺		高气孔导度，高叶绿体密度，多叶绿体基粒片层
	增大植株叶面积		多叶、多分蘖		
光能吸收与转化	改善叶片内在结构	形成较多的同化力（ATP 和 NADPH）	高气孔密度、厚栅栏组织		光合单位密度大，高 Chl、Chl a 和 Chl a/Chl b 高 $F_v/F_m(F_o)$ 、 Φ_{PSII} 和 q_P ，低 q_N ，强 PSII 反应中心 D1 蛋白合成能力
	高效利用和转化激发能		叶色浓绿 叶片抗衰老	叶片寿命及光合功能期长	
	耐光抑制和光转化				
光合碳同化	维持光合碳循环的高效运转，形成更多的光合产物		比叶面积小（比叶重大）		高 RuBP 羧化酶和 C ₄ 途径关键酶活性，低 RuBPOase 活性，高光饱和点，低 CO ₂ 补偿点，高净光合速率
光合产物的积累与分配	90%~95%植株生物量来自光合产物		合适的生育期，单株生物量大		低暗呼吸，高 FBPase、SBPase 和 SPSase 活性，单株总糖含量
干物质转运和分配	光合产物是作物产量的物质基础		高粒/叶、高鞘重/叶重，灌浆速度快，高经济系数（收获指数）		

传统育种主要基于自然规律的稳定性和遗传多样性的逐渐积累,对我国农业的发展做出了较为突出的贡献(如杂交水稻和小麦的高产突破),但面对产量、品质和株型改良、以及生物和非生物胁迫环境等方面的巨大挑战,进展缓慢,已难以满足当前农业的发展需求^[14-17]。

1.1.2 棉花生物育种技术

随着生物学技术的发展,分子生物学、生物信息学和高通量测序等新型生物学科快速发展,作物育种领域也逐渐步入分子育种阶段。就棉花而言,棉花育种已经进入了分子水平,转基因育种、分子辅助育种以及分子设计育种已逐步走向成熟。棉花作为兼具经济价值与战略意义的纤维作物,其遗传改良面临多重挑战,“棉粮争地”矛盾加剧背景下对单产突破的迫切需求;纤维品质与生物量的负相关特性;以及生物/非生物胁迫的叠加效应等。但是,以转基因技术创制的抗虫(Bt 棉)与抗除草剂(EPSPS)棉花品种,是棉花分子育种技术的典型应用,突破了传统育种方法的限制,在棉花品种改良中展现精准调控优势^[18, 19],不仅提高了棉花的产量和品质,还显著降低了农业生产成本,极大地促进了棉花种业的发展,但对光合效率等复杂数量性状控制的分子育种仍处于探索阶段。

我国抗虫转基因的研制开始于 20 世纪 90 年代初,随着转基因技术的发展,才得以迅猛发展和广泛应用。转基因抗虫棉基因类型主要有苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白基因(Bt)、蛋白酶抑制剂基因(Pi)、植物外源凝集素类基因(lectin)三种。1992 年,我国科学家通过人工设计合成了 Bt 杀虫基因序列,并在 1994 年将该基因成功导入棉花,使我国成为了世界上第二个研制出转基因抗虫棉的国家,之后又创制了双价 Cry1Ac 和 CpTI 转基因棉花新种质^[20]。双价转基因抗虫棉的推广,为广谱抗虫棉的研制奠定了扎实的理论与实践基础。我国转基因棉花研究经过 30 年的发展取得丰硕的成果,继抗虫棉之后,还成功研究出具有除草剂抗性的棉花,并且已经进入转基因生物安全性评价阶段^[21]。目前,我国已进入大面积推广种植,如 2023 年《转 *gr79epsps* 和 *gat* 基因耐除草剂棉花 GGK2 生产应用安全证书》的颁发。与此同时,对于极端温度、干旱、盐碱等非生物胁迫的转基因棉花亦进行大量的研究,尚未在农业生产中应用。新疆“三山夹两盆”的地形和荒漠化,以及生育期平均温度低于棉花适宜温度(25~32℃)等因素,极大的制约着当地棉花产业的发展。因此,寻找能够在非适宜温度下促进棉花产量形成的调控基因,并利用转基因工程等技术进行棉花育种的开发和应用,对于新疆棉花产业的发展具有重要的影响。

基因编辑技术和高通量测序技术的出现,使基因工程育种跨入分子设计育种阶段,以基因编辑技术为核心的分子设计育种可以更精确、更高效,更有目的地改造和创制新

的作物种质,为实现精准育种提供了高效的技术手段^[22]。2017年,张献龙团队将 *GhCLA1* 基因作为靶点,利用 CRISPR/Cas9 系统进行基因编辑,再生植株出现白化现象,标志着棉花 CRISPR/Cas9 编辑系统建立,棉花育种进入分子设计育种阶段^[23]。紧接着,该团队再次开发出胞苷碱基编辑器(CBEs)和腺嘌呤碱基编辑器(ABEs),并提出单碱基编辑系统对棉花的基因组编辑具有特异性且能够稳定遗传^[24, 25]。

随着生命科学和生物信息学的发展,越来越多的外源基因显著提升了棉花的抗逆性、产量、纤维品质以及环境适应性^[26-32]。未来的基因工程育种将更多依赖于“生物技术+信息技术+人工智能”的集成应用,进一步提升棉花育种的效率和准确性。

1.1.3 棉花光合效率研究进展

光合作用是棉花产量形成的关键生理过程,光合效率直接影响棉花的生物量积累、产量和纤维品质。随着全球气候变化与耕地资源约束加剧,提升光合效率已成为棉花育种与栽培技术革新的关键方向。近年来,从光合生理机制、遗传改良、环境响应及非叶器官贡献等多方面,揭示了棉花光合系统的调控特点。

全基因组解析结果表明,阔叶棉中多个光合作用相关基因家族(如 PF00421、PF02392)呈现显著扩张特征, A02 和 A08 染色体特异的倒位变异事件,以及 Ghi_D06G01951 基因上游调控区的序列缺失,可能通过调控光周期响应相关基因的表达网络,促进栽培棉光合适应性的演化进程^[33]。在光合生理调控机制方面,研究揭示棉花幼叶与成熟叶的光能利用存在差异,幼叶在叶绿素含量和气孔导度显著低于成熟叶的情况下,通过建立类胡萝卜素介导的非光化学淬灭(NPQ)、光呼吸代谢、热耗散及 PSI 循环电子流等多级防御系统,有效缓解高光胁迫;而成熟叶则依赖增强型 PSI 循环电子流促进 ATP 合成,维持其高光合能力^[34]。从进化发育生物学视角分析,野生棉种虽能通过萜烯类次生代谢物应对环境胁迫,但其光合速率显著低于栽培种。相较于野生棉种,驯化过程中气孔密度的降低与叶肉细胞结构的协同进化,使 CO₂在叶肉导度提升,这可能是栽培棉光合性能提升的关键进化事件^[35]。在遗传改良研究方面,通过优化铃叶系统(包括主茎叶、果枝叶及苞叶等非叶器官)的光合面积与光合速率(Pn)的时空配置,发现主茎叶 Pn 与单位面积铃数呈显著正相关,而果枝叶 Pn 与单铃重关联性更强。通过优化光合产物分配模式(如生殖器官优先策略)与光响应中心效能参数(如 ψ_{Eo}/ϕ_{Eo} 比值),可实现产量与纤维品质的协同提升^[36]。通过分析铃叶系统光合功能和棉铃发育的变化,揭示了棉铃发育过程中的光合作用规律,为分析棉花产量形成的机制和调控提供了新的依据^[37]。

关于棉花光合作用相关基因的研究中,叶绿素代谢调控方面,通过分析棉花芽黄突变体与正常植株光合色素合成基因显示,突变体叶绿素含量低于正常植株,随着芽黄突

变体叶片转绿, 其 SGR、CAO 和 ZEP 编码基因表达量降低^[38]。基因功能验证方面, 通过 VIGS 技术敲除棉花叶绿素合成的 GGPS 基因家族成员 *Gohir.A13G151300*, 植物的叶绿素含量显著降低, 表明该基因可能参与了棉花中光合色素的合成, 该基因的沉默导致光合系统受损, 从而导致叶片白化病和生长不良^[39]。*GhSBPase* 表达与叶绿素荧光参数呈正相关, 表明 *GhSBPase* 表达的变化在提高棉花光合效率的育种中具有潜在的适用性^[40]。在杂种优势机理研究方面, 通过比较杂交棉 H318 及其亲本双叶期的光合作用速率以及蔗糖和淀粉的含量, H318 光合作用速率相对于其亲本系, 光合作用过程相关的 Rubisco 激活酶 (RCA)、光系统 II 亚基 X (PSBX)、光系统 I 亚基 L (PSAL) 和磷酸盐激酶 (PRK) 基因的表达趋势与光合速率高度一致, 表明 H318 的光合速率相对于其亲本系增强^[41]。这些研究为解析棉花光合作用调控网络和培育高光效品种提供了重要理论支撑与分子育种靶点。

1.2 植物光合作用概述

1.2.1 植物光合作用的定义和过程

植物光合作用, 是指绿色植物在整个生理过程中, 将光能转化成化学能, 并利用化学能将二氧化碳 (CO_2) 和水 (H_2O) 转化为植物生长发育所需能量的有机物, 同时释放出氧气的生理生化过程^[42, 43]。光合作用作为地球上生命存在、繁衍和发展的根本源泉, 是生命的发动机, 也是当前新绿色革命的核心问题。

光合作用作为植物能量代谢的核心过程, 根据是否需要光照被分为光反应和暗反应阶段, 二者通过能量载体与还原力的传递实现功能耦联^[44]。光反应发生在叶绿体类囊体膜上, 包括原初反应、电子传递和光合磷酸化三个阶段, 具体过程为, 在光照条件下, 植物光系统 II (PSII) 通过叶绿体中的光合色素吸收光能, 导致 H_2O 分子光解产生高能电子, 传递给光系统 I (PSI), PSI 再将电子传递给电子受体, 形成电子传递链, 将 NADP^+ 生成还原型 NADPH; 同时, 另一部分电子被质子醌从类囊体基质带到外膜, 促使 ADP 发生磷酸化形成 ATP。暗反应阶段 (即卡尔文循环) 是光合作用中将 CO_2 转化为有机物的关键过程, 发生于叶绿体基质中, 主要分为羧化、还原和再生三个阶段。在羧化阶段, CO_2 与二磷酸核酮糖 (RuBP) 结合生成不稳定的六碳化合物, 随后分解为三磷酸甘油酸 (PGA); 还原阶段则利用光反应提供的 ATP 和 NADPH, 将 PGA 还原为三碳糖 (如甘油醛-3-磷酸), 同时 NADPH 被氧化为 NADP^+ , ATP 水解为 ADP 和 P_i ; 最后的再生阶段通过一系列酶促反应, 将部分三碳糖重新转化为 RuBP 以维持循环持续进行, 其余三碳糖则用于合成葡萄糖等碳水化合物。其化学反应可概括为: NADPH 、 H^+ 、ATP 与 CO_2

在酶催化下生成碳水化合物 (CH_2O), 并伴随 NADP^+ 、 Pi 和 ADP 的再生^[45]。光合作用的总反应式可概括为: 在光能与叶绿体的共同驱动下, H_2O 与 CO_2 通过光反应和暗反应的协同作用, 最终生成 O_2 及以 CH_2O 为代表的有机物质 (如葡萄糖)。其中, 暗反应的还原阶段作为光反应与暗反应的关键连接点, 通过消耗光反应产生的 ATP 和 NADPH , 将 CO_2 中的碳元素固定为有机物, 实现光能向化学能的转化。这一过程不仅完成碳的有机化, 还通过再生 ADP 、 Pi 和 NADP^+ 为光反应持续供能提供原料, 形成能量物质循环^[46]。这种光反应和暗反应协同调控的过程, 能够维持光合系统在不同环境条件下的高效运转, 其分子机制研究对提高作物光能利用率具有重要指导意义。

1.2.2 植物光合作用的机制

光合作用实质上是大自然一系列能量转化和物质循环的问题, 根据是否需要光照被分成光反应和暗反应两个阶段, 包括三大步骤, 即原初反应、电子传递和光合磷酸化、碳同化三个步骤。

原初反应(Primary photochemistry)是光合作用最初的关键的步骤, 从光合色素分子被光激发开始, 直到引起第一个光化学反应为止的过程, 它包括光能吸收、传递和转化^[47]。光反应从天线系统对光的吸收开始, 该系统将获得的激发能量传递给 PSI 和 PSII , 它们是多聚体色素-蛋白质复合物, 二者含有一个称为反应中心 (Reaction Center, RC) 的中心区域。反应中心利用特殊的光活性色素分子捕获激发能, 这些色素分子进行初级光化学反应, 形成一个带正电的分子和一个带负电的分子, 从而将光能转化为电能^[48]。这一过程的发生与植物光合色素的积累呈现一种正向调节作用, 因此从如何提高作物光合色素的含量的角度出发, 可能极大的改善作物的光合效率, 为作物高光效育种提供新的研究方向。

光合电子传递链又称为光合链, 是指定位在光合膜上, 主要由 PSII 、 Cytb_6f 和 PSI 三个电子传递系统组成, 多个电子传递体组成的电子传递总轨道。电子传递通过两个光系统按氧化还原电位高低排列, 即 $\text{P680} \rightarrow \text{P680}^*$ 、 $\text{P700} \rightarrow \text{P700}^*$, 呈侧写的“Z”字, 故又称为“Z”链^[49], 如图 1-1。根据电子在铁氧还蛋白 (Fd) 分岔口后的传递途径, 将光合电子传递分为线性电子传递、环式电子传递两种类型^[50]。线性电子传递指电子在 H_2O 中从 PSII 、 Cytb_6f 和 PSI , 到 NADP^+ 的电子传递途径, 整个过程中质子跨膜转运形成的梯度可驱动合成 ATP ^[51]。环式电子传递指 PSI 中电子传递给 Fd, 再到 Cytb_6f , 然后经 PC (含铜蛋白质体蓝素) 返回到 PSI 的传递过程。环式电子传递途径可能还存在 Fd 直接传给 Cytb_6f , 或经铁氧还蛋白- NADP^+ 还原酶 (FNR) 传递给质醌, 或经 NADP^+ 传递给质体醌 (PQ), 是一条闭合通路。另外, 还存在一种假环式电子传递, 即 H_2O 中的电子由 PSII 与 PSI 传给 Fd 后再传给 O_2 的电子传递途径, 是一条开放的通路。这一过程

在强光照射下, 没有足够的 NADP^+ 供应的情况下发生, 是光合细胞产生超氧阴离子自由基的主要途径^[52]。绿色植物中, 非环式电子传递链占主导地位^[53]。已有诸多研究表明, 增加 PSII、和 PSI 三个电子传递系统相关蛋白活性, 不仅能够提高光合生物的光保护作用, 也能够反馈调节光合色素的积累, 进而提高光合生物的光合效率^[54-58]。因此, 作物高光效育种策略的实现与光合电子传递链组成系统的高效表达相关。

光合作用利用储存在类囊体膜的质子梯度, 把 ADP 和 P_i 合成为 ATP 的过程, 称为光合磷酸化^[49]。光合磷酸化与电子传递相偶联, 因此它也被相应地分为非循环光合磷酸化、循环光合磷酸化和假环式光合磷酸化三种类型^[59]。非循环光合磷酸化是指 H_2O 光解产生的电子经光系统的作用中心和一系列的电子传递体将电子传递给 NADP^+ , 形成 NADPH, 并生成 O_2 和 ATP, 它是光合电子传递的主要形式, 也是高等植物体内使光能转变为化学能的主要形式。循环光合磷酸化是指电子在一系列电子传递体的传递下, 从 PSI 开始, 最终又回到 PSI 的一个闭合回路传递的过程, 这个过程中只形成 ATP, 没有 H_2O 的光解和 O_2 的释放。其中, ATP 合成过程需要 ATP 合酶参与, ATP 合酶能够调节 PSI 中反应中心叶绿素 P700 的氧化还原状态, 并抑制光合作用过程中 PSI 中 ROS 的产生^[60]。由此可见, 从光合磷酸化角度考虑, 提高光反应过程 ATP 和 NADPH 的合成速率, 可以极大地改善光合生物的光能利用效率, 从而促进光合生物的生长发育过程中能量和物质高效利用。

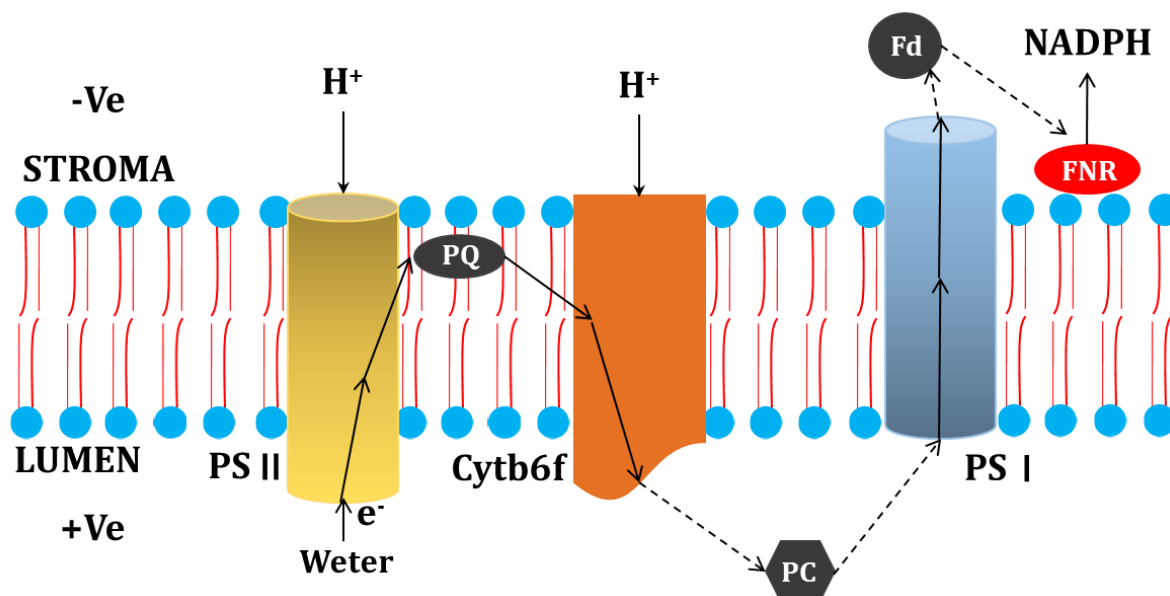


图 1-1 光合作用中光反应的“Z”型光合电子传递链示意图

Figure 1-1 Schematic diagram of the “Z” type photosynthetic electron transport chain of the light reaction in photosynthesis

CO_2 同化, 也称为碳同化, 是指植物利用光反应中形成的同化力 (ATP 和 NADPH) 将 CO_2 固定和还原, 转化成碳水化合物, 从而使活跃的的化学能转变为稳定化学能的过程。高等植物中存在三条 CO_2 固定的过程, 即卡尔文循环、 C_4 途径和景天科酸代谢 (CAM)

[61]。卡尔文循环理论由卡尔文等利用放射性同位素示踪和双向纸层析等方法, 历经 10 年的系统研究, 在 20 世纪 50 年代提出, 由于 CO_2 的受体是一种戊糖(核酮糖二磷酸), 故称为还原戊糖磷酸途径(Reductive pentose phosphate pathway, RPPP)。又因为这个途径中 CO_2 被固定形成的最初产物是一种三碳化合物, 故又称为 C_3 途径。 C_3 途径包括羧化、还原和再生三个阶段[62]。在 20 世纪 60 年代, 发现如甘蔗、玉米等起源于热带的植物, 除了具有卡尔文循环以外, 还存在一条固定 CO_2 的途径。它固定 CO_2 的最初产物是含四个碳的二羧酸, 故称为 C_4 -二羧酸途径(C_4 -dicarboxylic acid pathway), 简称 C_4 途径。 C_4 途径基本上可分为羧化、还原或转氨、脱羧和底物再生四个阶段[63]。根据植物所形成的 C_4 -二羧酸的种类以及脱羧反应参与的酶类, 又可把 C_4 途径又分三种亚类型。一是依赖 NADP-苹果酸酶(Malic enzyme)的苹果酸型(NADP-ME 型); 二是依赖 NAD-苹果酸酶的天冬氨酸型(NAD-ME 型); 三是具有 PEP 羧激酶(PEP carboxy kinase, PCK)的天冬氨酸型。NADP-ME 型的初期产物是苹果酸(MAL), 而 NAD-ME 型和 PCK 型的初期产物是天冬氨酸[64, 65]。CAM 是适应旱生环境的一种光合类型, 一般气孔在白天关闭, 在夜间进行气体交换, 在同化 CO_2 的同时能够避免水分过度流失。它固定 CO_2 的机制是由磷酸烯醇式丙酮酸(PEPC)和核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(Rubisco)催化的羧化反应, 分别在白天、夜晚形成时间上的分离。同时, 气孔的开关性质对水分利用效率也有了极大的提高[66]。植物暗反应过程相关调节酶的研究已经表明该过程对逆境和生长发育等方面具有积极的调节作用[67-71], 为提高作物光合效率和产量的研究提供了参考依据。

光呼吸(Photorespiration)作用是植物初级代谢的重要组成部分, 描述了 C_3 植物在光诱导下释放 CO_2 和吸收 O_2 的过程[72]。光呼吸代谢主要用于去除 2-磷酸乙醇酸盐(2PG), 在光照条件下, 低 CO_2/O_2 比值存在下, Rubisco 进行加氧酶副反应, 导致大量 2-磷酸乙醇酸的形成。这一过程至关重要, 因为 2PG 严重抑制碳同化和利用途径的关键酶, 如卡尔文循环、糖酵解和淀粉代谢[73]。因此, 光呼吸通量的加速, 既 2PG 降解的加快, 刺激上述途径的运行, 最终提高光合作用、生长和非生物胁迫耐受性。此外, 光呼吸对细胞整体氧化还原稳态、气孔运动均有显著影响, 并可能在光保护中发挥作用。因此, 光呼吸作用对植物在不同发育阶段的代谢稳健性起着重要作用[74-78]。

1.3 卡尔文循环及其相关酶的研究进展

卡尔文循环形成于约 20 亿年前, 就氮资源而言, 它是地球上最丰富的生物化学途径, 并且在全球碳和氧的循环中起着主导作用[78, 79]。该循环包括三个主要阶段: 核酮糖-1,5-二磷酸(RuBP)的羧化、3-磷酸甘油酸的还原和 CO_2 受体 RuBP 的再生[80]。卡尔文

循环利用光合作用的光反应产物 ATP 和 NADPH，将大气中的 CO_2 固定到碳骨架中，直接用于淀粉和蔗糖的生物合成。这个循环由 11 种不同的酶组成，催化 13 个反应（如图 1-2 所示），由核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶（Rubisco）启动，该酶催化 CO_2 受体分子 RuBP 的羧化。然后利用该反应生成的 3-磷酸甘油酸酯（3-PGA）通过消耗 ATP 和 NADPH 的两个反应生成磷酸三糖，即磷酸甘油醛（G-3P）和磷酸二羟丙酮（DHAP）。循环的再生阶段涉及一系列反应，将磷酸三糖转化为 CO_2 受体分子 RuBP。卡尔文循环中产生的大部分磷酸三糖仍留在循环中以再生 RuBP^[81]。在这个循环中产生的碳化合物对植物的生长和发育是必不可少的，磷酸三糖被用来合成蔗糖和淀粉。卡尔文循环还为叶绿体中的一系列其他途径提供中间体，包括氨基酸和木质素生物合成的莽草酸途径、类异戊二烯的生物合成以及核苷酸新陈代谢和细胞壁合成的前体^[82]。目前对卡尔文循环中酶的研究主要有 Rubisco、景天庚酮糖 1,7-二磷酸酶（SBPase）和果糖 1,6-二磷酸酶（FBPase），这三个酶对卡尔文循环均非常重要^[83-85]。

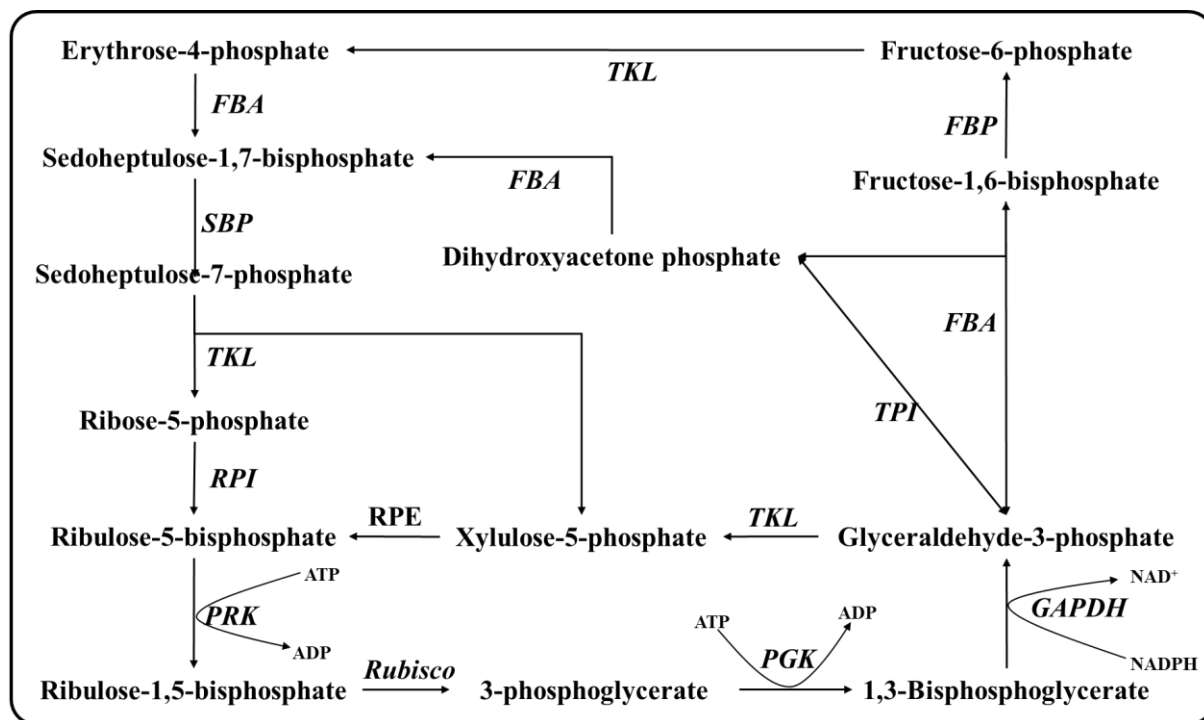


图 1-2 光合作用卡尔文循环示意图

Figure 1-2 Schematic diagram of Calvin cycle of photosynthesis

1.3.1 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶（Rubisco）

Rubisco 是将 CO_2 固定到生物圈中的主要酶^[86]，同时 Rubisco 催化与 O_2 相关的反应，与 CO_2 反应竞争，导致光合固定的碳通过光呼吸损失^[87, 88]，Rubisco 被广泛地认为是一种低效的催化剂^[69, 89]。Rubisco 的结构是由 8 个大亚基（RbcL）和 8 个小亚基（RbcS）

组成的十六聚体, RbcL 的分子量为 50~55 kDa, 由叶绿体基因编码, 具有催化的功能, 而 RbcS 的分子量为 12~18 kDa, 由核基因编码, 具有调节的功能^[90]。RbcL 包括 N、C 两个结构域, N 结构域从 N-末端开始, 由 137 个氨基酸残基组成, 有 5 个 β -折叠结构, C 结构域由 8 个 α -螺旋和 8 个 β -折叠, 而且彼此连接成 8 个环。连接两者 8 个环组成的 α/β 桶状结构域 (α/β barrel domain) 引起科学家们广泛地关注^[91]。

通过基因工程技术改善 Rubisco 在叶绿体中的碳同化作用取得显著突破。研究表明, 将红藻 Rubisco 的小亚基编码基因 *RbcS* 导入烟草叶绿体, 得到高效表达, 但是表达的小亚基却不能与烟草本身的大亚基组装成 Rubisco 全酶^[92]。在水稻中过表达 *RbcS* 增加了 Rubisco 含量, 尽管 Rubisco 含量最多增加 30%, 但无论在高或低 CO_2 浓度下均未观察到光合速率的提高^[93]。这些研究说明了单纯提高 Rubisco 组分大小亚基的表达并不能有效的改善光合效率。水稻 *OsrbcS2-5* 突变在田间条件下表现出生长受抑制、抽穗延迟和产量降低, Rubisco 含量和活性降低, 以及光合效率显著降低等现象^[68]。在玉米中关于突变体的研究确定了 Rubisco 组装和幼苗存活所需的四个伴侣: Cpn60 α 1、CPS212、BSD2、Raf1 和 Raf2^[94, 95]。进一步研究发现, Raf1 能够拮抗支架蛋白 CcmM 介导的 Rubisco 堆积及相变过程, 进而参与调控 Rubisco 的堆积和羧酶体内核的形成^[96]。由此可见, 探索 C_3 植物中参与 Rubisco 生物发生的装配因子, 能够为光合速率的改善带来了新的突破口。变形菌的 Rubisco 取代天然烟草叶绿体中 Rubisco, 在 1% CO_2 浓度下无需外源伴侣能够保证转基因植物的自养生长速度与野生型植物相似^[69], 表明在叶绿体中安装功能性细菌的 Rubisco, 可以更快、更高效地改善 Rubisco 羧化, 从而在全球范围内提高作物光合作用和作物产量。

1.3.2 景天庚酮糖-1,7-二磷酸酶 (SBPase)

SBPase 由核基因编码, 在细胞质中合成, 在 N 端叶绿体靶向肽的引导下进入叶绿体。SBPase 为同型二聚体, 两个亚基配对形成一个有功能的蛋白二聚体。每个亚基的分子量为 35~38 kDa, 均有一系列的 α -螺旋和 β -折叠通过无规则卷曲联系在一起, 酶的活性位点在两亚基的分界线上^[97]。SBPase 在卡尔文循环的再生阶段起作用, 在这个分支点, 被同化的碳要么进入再生阶段, 在循环中产生 CO_2 受体分子 RuBP, 要么从循环中输出, 用于蔗糖或暂时性淀粉的生物合成。高等植物的光合碳还原循环位于叶绿体基质中^[98]。这个位置突出了 SBPase 在卡尔文循环中调节碳流量的重要性。

SBPase 是光合生物特有的, 它催化景天庚酮糖-1,7-二磷酸去磷酸化到景天庚酮糖-7-磷酸。SBPase 活性受 pH、 Mg^{2+} 等多种因素的高度调控。此外, 与其他卡尔文循环酶一样, SBPase 通过铁氧还蛋白/硫氧还蛋白系统在光的作用下被激活^[67]。研究表明, 通过在植株中过表达 *SBPase* 基因, 可以提高光合效率, 进而增加产量。在烟草中过表达拟

南芥 *SBPase* 基因,发现转基因植株的光合作用得到显著提高,在植株生长以及生物量提高^[99]。弱光胁迫下观察到水稻 *SBPase* 活性与籽粒产量、净同化率、电子传递速率、生物量和籽粒重量的显著相关性^[100]。另外通过 *SBPase* 反义转基因烟草实验证实了,当该基因表达量减少时,植株的光合效率明显降低,淀粉含量减少,生物量下降^[101]。有关 *SBPase* 基因的低温耐受性方面的研究表明, *SBPase* 基因在低温耐受性中起到作用,在番茄中过表达拟南芥 *SBPase* 发现过表达的植株在生长状况,光合效率,及低温耐受性方面有部分提高^[102]。*GhSBPase* 在响应于干旱、盐分、高温和低温胁迫的表达模式不同。其表达与叶绿素荧光参数呈正相关,表明 *GhSBPase* 表达的变化在提高棉花光合效率的育种中具有潜在的适用性^[40]。这些结果将有助于理解 *SBPase* 基因在光合作用中的功能以及植物对外部胁迫的适应性,为未来作物的高产育种提供重要的基因信息。

1.3.3 果糖-1,6-二磷酸酶 (FBPase)

FBPase 催化果糖-1,6-二磷酸分解为果糖-6-磷酸和无机磷酸,在碳固定途径中起着关键的调控作用。这个反应表现出高的负自由能变化,这使它不可逆^[103]。在高等植物中,FBPase 至少有两种同工酶被鉴定,分别存在于叶绿体和胞质中^[104]。非光合组织中,调节糖酵解的速率;光合组织中,两种 FBPase 同工酶在碳同化和代谢中起关键作用。胞质 FBPase 是蔗糖生物合成途径中的调节酶之一,叶绿体 FBPase 是受光转录调控的蛋白质之一^[105],AMP 和果糖-1,6-二磷酸 (FBP) 不同程度地抑制叶绿体 FBPase 和胞质 FBPase 的酶活性^[106]。从初级结构来看,胞质 FBPases 的同源性约为 80%,而叶绿体 FBPases 的同源性高达 80%~90%。虽然胞质和叶绿体 FBPases 之间的同源性不超过 50%,而且它们之间缺乏免疫交叉反应,但它们都显示出相似的三级结构。两种 FBPase 亚型都是约 340~360 个氨基酸的同型四聚体,每个亚基的分子质量约为 40 kDa。每个亚基 (约 150~200 个氨基酸) 的 N 端支持 5 个 α 螺旋和 8 个 β 折叠,是 AMP 结合胞质酶的位点^[103]。

研究表明,将土豆 *CpFBPase* 基因转化到土豆块茎的造粉体中表达,转基因土豆块茎与野生型的土豆块茎相比 *CpFBPase* 的酶活性较高,并且块茎中合成的淀粉含量增加^[71],该研究为生物高效合成淀粉提供了一条新的途径和方法。拟南芥 *cfbp1* 和 *cpfbp-cfbp1* 突变体表现出较小的莲座和较低的光合作用速率,并且导致可溶性糖含量较低、淀粉积累较少和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性升高,*cpfbp* 突变株在叶绿体中表现出较高的淀粉含量,表明缺乏 *cpFBPase* 会导致植物发育的显著减少,而 *cFBPase* 的缺失会增加淀粉含量而不影响表型^[70]。*cFBPase* 不属于卡尔文循环,是光合器官蔗糖合成途径中的关键酶,也是糖酵解中调控流动的一个控制点,卡尔文循环中产生的三碳化合物—丙糖磷酸穿过叶绿体膜进入细胞质,参与蔗糖合成途径,*cFBPase* 催化果糖-1,6-二磷酸分解为

果糖-6-磷酸和 Pi, 调控蔗糖合成途径中必需单糖的生成^[107]。*FBPase* 基因的研究为调控卡尔文循环、增加作物产量以及控制 CO₂ 固定和碳元素分配开辟了一条新的途径。

1.4 果糖-1,6-二磷酸醛缩酶 (FBA 或 FBPA) 的研究

FBA, 也称为醛缩酶(ALD), 自 1934 年 Meyerhof 和 Lohmann 首次发现 FBA 开始, 科研工作者对 FBA 的探索研究正在逐步的深入。FBA 是能量代谢的关键调节因子, 特别是在光合生物的卡尔文循环和糖酵解/糖异生中^[108], 催化果糖-1,6-二磷酸 (FBP) 生成磷酸二羟丙酮 (DHAP) 和甘油醛-3-磷酸 (G3P) 的可逆反应^[109]。FBA 和甘氨酸脱羧酶-H 蛋白 (GDC-H) 基因已被认定可作为改善光合作用的靶点^[110]。

1.4.1 果糖-1,6-二磷酸醛缩酶的分类和结构特性

根据 FBA 的催化机制和在物种进化中的普遍程度, FBAs 可大致分为 I 和 II 两类。I 类 FBA 通常为四聚体, 以底物为中间体形成席夫碱, 并利用赖氨酸残基从 DHAP 生成亲核的烯胺, 不受 EDTA 的抑制或钾离子的影响。II 类 FBA 则是同源二聚体, 需要二价阳离子作为辅助因子来稳定参与醛醇缩合反应的 DHAP 烯胺中间体, 并被 EDTA 抑制, 属于 (α/β) 8-TIM 桶酶家族。II 类根据其氨基酸序列分为 “A” 和 “B” 两个亚组。A 型醛缩酶是锌依赖性的, 参与糖酵解和糖异生, 而 B 型醛缩酶具有不同的二价金属辅因子、代谢作用和底物特异性。I 类 FBAs 存在于一些细菌、动物和植物中, 而 II 类 FBAs 存在于大多数细菌、酵母和真菌中。植物的 FBA 是属于 I 类, 分为质体型 FBA 和胞质型 FBA 两种类型^[111-114]。叶绿体 FBA 是卡尔文循环中必不可少的酶, 其活性产生淀粉生物合成的代谢物, 对 FBA 的抑制导致光合作用和生长的抑制。相反, 胞质型 FBA 是蔗糖生物合成和糖异生途径的一部分, 在此过程中催化 FBP 的产生^[115]。

1.4.2 果糖-1,6-二磷酸醛缩酶基因家族的研究概况

FBA 基因家族的不同成员已经在不同的植物中被鉴定和描述, 目前 FBA 基因家族已在拟南芥^[116]、小麦^[113]、番茄^[115]、棉花^[117]、杨树^[118]等植物中利用生物信息学手段和分子生物技术完成了分析。

研究表明, 在拟南芥中有 8 个 *FBA* 家族基因 (*AtFBA1-8*)。这些基因具有高度保守的醛缩酶型 TIM 桶状结构域和 C 端肽, 但具有可变的 N 端肽。基于拟南芥等植物 FBA 蛋白序列的系统发育分析, 将 *AtFBA* 家族分为 2 个亚家族, 其中 3 个亚家族 (*AtFBA1-3*)

与发生在叶绿体上的 *FBA*s 高度相似, 5 个亚家族 (*AtFBA4-8*) 与发生在细胞质上的 *FBA*s 高度相似^[116]。在小麦中共鉴定出 21 个 *TaFBA* 基因, 其中 I 类 *FBA* 基因 18 个, II 类 *FBA* 基因 3 个, 被定位在 4 个同源类群的 12 条染色体上, 大多数 *TaFBA* 基因位点有 3 个拷贝, 分布在小麦的 3 个基因组中^[113]。水稻基因组包含至少四个编码醛缩酶同工酶的独立位点。其中, 醛缩酶 P (*ALPP*) 基因是编码叶绿体醛缩酶的核基因, 主要在水稻叶片叶肉细胞中表达^[119]。在番茄基因组中共鉴定出 8 个基因属于 *SIFBA* 家族成员。所鉴定的 *SIFBA* 基因编码的蛋白质从 136 个 (*SIFBA5*) 到 397 个 (*SIFBA1*) 氨基酸, 等电点 (PI) 从 5.01 (*SIFBA3*) 到 5.26 (*SIFBA5*), 分子量从 33.8 kDa (*SIFBA5*) 到 99.5 kDa (*SIFBA1*)。每条染色体上的 *SIFBA* 基因数量为 0~2 个。10 号染色体上有 2 个 *SIFBA* 基因, 2 号染色体上有 2 个 *SIFBA* 基因, 1 号、5 号、7 号和 9 号染色体上各有 1 个 *SIFBA* 基因。在叶绿体中发现 5 个 *SIFBA*s (*SIFBA1*、2、3、4 和 5); *SIFBA6*、7 和 8 定位于细胞质中^[115]。陆地棉中共鉴定出 17 个 *GhFBA*s 基因。根据功能域、系统发育关系和基因结构的分析, 将 *GhFBA*s 基因分为两个亚群。9 个 *GhFBA*s 位于叶绿体中, 8 个位于细胞质中^[117]。杨树中共鉴定出 9 个 *FBA* 家族基因, 序列长度差异较大, 其中最长 3482 bp (*PtFBA5*), 而最短 1842 bp (*PtFBA3*), PI 范围为 6.62~8.78。有 5 个 *PtFBA*s (2、4、5 和 6) 被定为在叶绿体上, 4 个 *PtFBA*s (1、3、8 和 9) 被定位在细胞质中, 9 个 *PtFBA*s 基因无规律的分布在 9 条染色体上^[118]。由此可见, *FBA*s 基因家族成员分布较广, 在揭示生物进化机制、解析基因功能分化以及指导分子育种等方面具有重要的理论价值和应用前景。

1.4.3 果糖-1,6-二磷酸醛缩酶的功能研究

FBA 是参与糖酵解/糖异生和卡尔文循环的重要酶, 参与低温、强光、干旱、高温、高盐等非生物胁迫响应^[109, 120-126], CO_2 固定^[71], 同时调节植物生长发育等生理生化过程。

研究表明, 将番茄 *SIFBA7* 基因的 RNA 干扰 (RNAi) 载体转化番茄, 与野生型相比, *RNAi-SIFBA7* 植株的净光合速率、RuBP、可溶性糖含量、茎粗、生物量和种子大小均有所下降。*RNAi-SIFBA7* 表达的下降导致 *FBA* 和其他主要酶在卡尔文循环中的活性降低。*RNAi-SIFBA7* 植株获得的种子发芽率与野生型相比, 也有明显的降低。并且在低温弱光下, 过氧化物与超氧阴离子含量也高于野生型植株。*SIFBA7* 在调控番茄幼苗生长和耐冷性方面的重要作用, 说明 *FBA* 在卡尔文循环中的催化活性对温度敏感^[123]。马齿苋 *SpFBA* 基因在海水和 NaCl 胁迫条件下表达上调, 其转录产物在海水和 NaCl 胁迫 12 h 时达到峰值。PEG 和外源 ABA 对马齿苋根系处理, 发现 *SpFBA* 在 0.5 h 迅速上调, 其转录本积累量显著增加, 当 PEG-8000 浓度为 20% 时, *SpFBA* 基因在 2 h 时在根中强烈表达, 12 h 时转录本几乎无法检测到, 24 h 时则下降到低于对照的水平, 海水胁迫下

根系 *SpFBA* 表达变化与 NaCl 胁迫下根系 *SpFBA* 表达变化密切相关。原核表达重组 *SpFBA* 提高了酵母对干旱和盐的耐受性, *SpFBA* 在响应盐胁迫及相关非生物刺激、提高马齿苋在高盐和干旱条件下的生存能力方面发挥着重要作用^[125]。杉木在缺氧应激、过氧化氢和低温处理后 2~8 h 内均可引起 *ClAldC* 的显著诱导。在 NaCl、伤、光、暗四种胁迫下均无诱导作用。*ClAldC* 对 3 种非生物刺激的积极响应表明, 杉木 *ClAldC* 可能有助于抵御缺氧、低温和氧化应激等环境胁迫^[121]。NaCl 处理 3 h 和 6 h 后, 花生的根和叶中 *AhFBA* 表达量最高。与对照相比, 转化 *AhFBA* 的大肠杆菌耐盐性和存活率显著提高。转基因烟草过表达 *AhFBA* 基因后, 和野生型相比, 过氧化氢含量、电导率、丙二醛含量降低, 光合效率、净光合速率、相对含水量、蔗糖和脯氨酸含量提高。*AhFBA* 可能通过维持渗透平衡和清除过氧化氢, 增强了大肠杆菌和烟草对盐胁迫的耐受性^[109]。烟草中过表达 *AtFBA* 结果显示, 转基因烟草醛缩酶活性比野生型高 1.4~1.9 倍, 且 CO₂ 固定能力也提高了 1.5 倍^[71]。水稻叶绿素缺乏突变体 *ygd1-1* 在生育期表现出持续黄绿色表型, 其叶绿体发育异常表现为基粒片层结构紊乱, 叶绿素和胡萝卜素的含量降低, Chl a/b 比值增加。序列分析发现, 一段 T-DNA 插入 *OsFBA* 基因启动子区域导致该基因转录水平显著下调。初级碳代谢物分析显示, 突变体叶片中的蔗糖和果糖含量显著降低, 而葡萄糖含量与野生型植物相似。表明 *OsFBA* 通过影响水稻叶片的光合速率和糖代谢, 参与水稻叶绿素积累、叶绿体发育和植株生长^[127]。低 CO₂ 环境下, 转基因黄瓜光合作用、荧光参数和酶学指标表明, *Csβ-CA1*、*Csβ-CA4*、*CsSBP* 和 *CsFBA* 在光合碳同化中具有累积效应, 这 4 个基因共表达可以增加 Rubisco 的羧化活性, 促进 RuBP 的再生, 转基因植株表现出较高的净光合速率和产量, 证明了通过调控参与光合碳同化代谢途径的基因来培育高光合效率作物的可能性^[128]。

综上所述, *FBA* 在植物光合作用中表现出有利于植物生长发育的正向调节, 并影响植物生物量和种子形成。所以, 将该基因用于作物育种领域, 对培育优质高产的作物及其种质材料具有重要的意义。

1.5 研究目的意义、研究内容及技术路线

1.5.1 研究目的意义

棉花作为重要的天然纤维作物, 是全球大宗作物之一, 对国民经济发展具有重要影响。然而, 随着人口数量的增加, “棉粮争地”矛盾日益突出。新疆作为我国主要的棉花产区, 受“三山夹两盆”地形和荒漠化影响, 适宜耕种的面积有限。因此, 如何在有限耕地面积上提高棉花产量以满足社会需求, 成为当前棉花育种的重要目标之一。自高

光效作物育种概念提出以来,已有诸多研究证明卡尔文循环关键酶基因能够提高植物的光合效率,并促进生物量积累和产量形成。实验室前期研究也表明,天山雪莲 *SiFBA4* 基因可增强烟草和番茄植株的光合速率、生物量和产量。本研究利用农杆菌介导的遗传转化体系,将天山雪莲 *SiFBA4* 基因整合到陆地棉 R15 基因组中,并通过生理、农艺、转录和代谢网络分析,初步揭示高光效棉花种质材料的生理机制。

1.5.2 研究内容

(1) 转 *SiFBA4* 基因棉花株系的获得与分子验证

本研究以陆地棉 R15 品系为受体材料,采用农杆菌介导棉花遗传转化体系将天山雪莲 *SiFBA4* 基因转化到棉花中。嫁接植株叶片完全伸展后,提取叶片 DNA 进行 PCR 鉴定,筛选阳性转基因株系,并通过 RT-PCR 和 Western Blot 技术进行分子验证。经传代培养,获得可稳定遗传的高代 ($\geq T_3$) 转基因棉花株系。

(2) 转 *SiFBA4* 基因棉花田间试验

以转基因和野生型棉花种子为材料,在田间播种。通过在苗期测定生理生化指标和气孔参数,铃期测定光合生理指标,同时在苗期(室外盆栽)、蕾期和铃期分别测定农艺性状指标。在棉花吐絮期测定产量,并对籽棉进行衣分和纤维品质测定,分析 *SiFBA4* 基因对棉花光合效率和产量形成的影响。

(3) 转 *SiFBA4* 基因棉花转录组和代谢组分析

以苗期转基因和野生型棉花为材料,每个株系设置三个生物学重复,取样后于 -80°C 保存,用于转录组测序和代谢组检测。结合转录组和代谢组数据,初步阐述 *SiFBA4* 基因提高棉花光合效率和产量的生理机制。

1.5.3 技术路线

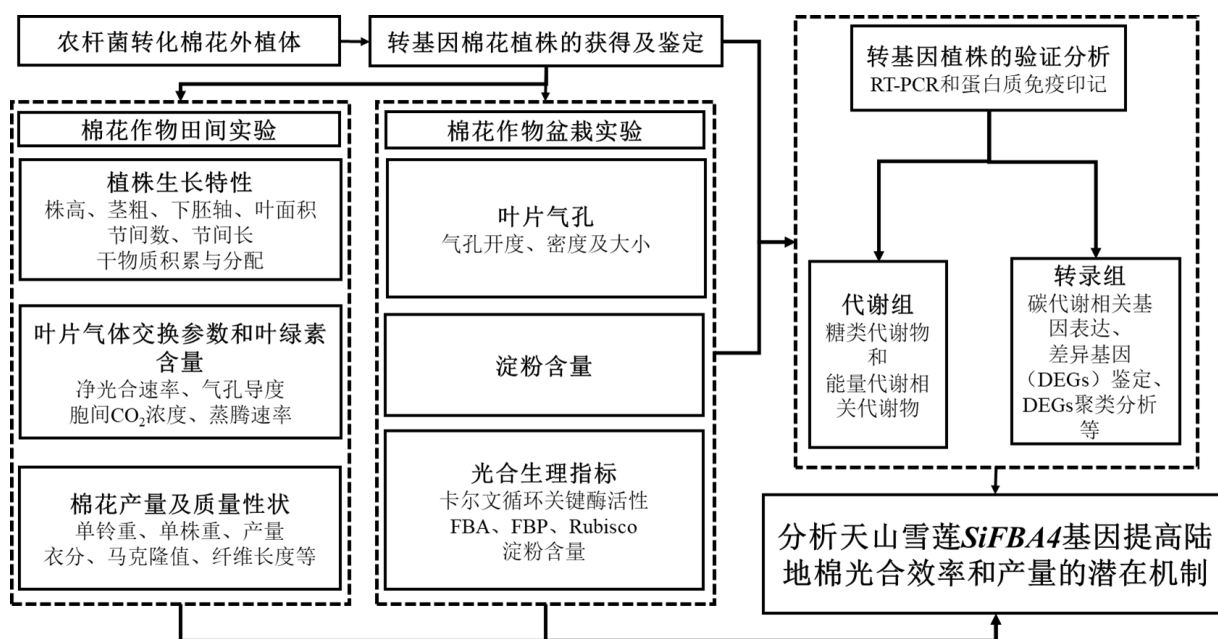


图 1-3 技术路线图

Figure 1-3 The technoLogY roadmap

第2章 转 *SiFBA4* 基因棉花的获得

2.1 引言

转基因技术在高等植物中的应用已较为成熟。本研究克隆了天山雪莲卡尔文循环关键酶基因——果糖-1,6-二磷酸醛缩酶（FBA）基因家族成员 *SiFBA4*，构建植物过表达载体，并通过农杆菌介导法侵染陆地棉 R15 的下胚轴。利用棉花遗传转化体系和 MS 系列诱导培养基创制转基因种质材料。获得转化体幼苗，并通过优化嫁接技术进行育苗，再通过卡那霉素筛选抗性植株，并将其种植于田间。利用 RT-PCR 和 Western blot 等分子检测技术筛选出 *SiFBA4* 基因及其编码蛋白表达的株系，通过传代培养获得纯合度较高的转基因株系后代。

2.2 研究材料

2.2.1 主要仪器

超净工作台（孚夏 SW-CJ-1FD，浙江）、PCR 仪（Bio-RAD icycler，美国）、恒温摇床（ZWY-A211D，上海）、电泳仪（DYY-8B，上海）、凝胶成像系统（Bio-RAD，美国）、实时荧光定量 PCR 仪（Bio-Rad iQ5，美国）等。

2.2.2 主要材料及来源

陆地棉 R15（晋棉 7 号），来源于山西省农业科学院棉花研究所；大肠杆菌 *E.coli* DH5 α 菌株和 LBA4404 根癌农杆菌菌株来源于本实验室库存。

2.3 方法

2.3.1 *SiFBA4* 基因表达载体的构建

2.3.1.1 质粒提取及鉴定

从超低温冰箱（-80℃）中取出保存的 *pMD-19T-SiFBA4* 载体进行活化（划线法），通过 PCR 鉴定阳性菌株，测序样品送往青岛睿博兴科生物技术有限公司进行测序。测序结果确认无误后，按照 Fast Pure[®] Gel DNA Extraction Mini Kit 试剂盒的操作方法提取质粒，并进行酶切鉴定。

2.3.1.2 酶切质粒 *pCAMBIA2300* 和 *pMD-19T-SiFBA4*

分别对 *pCAMBIA2300* 质粒与 *pMD-19T-SiFBA4* 重组质粒进行 *Kpn* I 和 *Sal* I 双酶切反应，酶切体系如表 2-1 所示，酶切产物通过琼脂糖凝胶电泳进行验证。

2.3.1.3 片段回收及连接表达载体

在凝胶成像系统中定位目的条带，切胶并使用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收扩增产物。回收步骤按照 Fast Pure[®] Gel DNA Extraction Mini Kit 试剂盒的说明进行，具体步骤如下：

- （1）将琼脂糖凝胶中的目的条带切下，置于 1.5 mL 离心管中；
- （2）加入与凝胶等体积的 Buffer GDP，55℃水浴 8~10 min，直至凝胶完全溶解；
- （3）将溶解液转移至吸附柱中，12,000 rpm 离心 60 s，弃废液；
- （4）加入 300 μ L Buffer GDP，静置 2 min，12,000 rpm 离心 60 s，弃废液；
- （5）加入 600 μ L Buffer GW，12,000 rpm 离心 60 s，弃废液。重复两次后，12,000 rpm 离心 2 min，除去残留乙醇；
- （6）将吸附柱置于 1.5 mL 灭菌离心管中，加入 30 μ L Elution Buffer，静置 2 min，12,000 rpm 离心 2 min，收集 DNA 溶液，保存于-20℃备用。

将回收的 *pCAMBIA2300* 和 *pMD-19T-SiFBA4* 片段用 *T₄* DNA 连接酶连接，构建重组质粒，反应体系如表 2-2 所示。

表 2-1 酶切体系

Table 2-1 Enzyme digestion system

酶切体系	体积 (μL)
ddH ₂ O	8.0
质粒	8.0
Buffer	2.0
<i>Kpn</i> I	1.0
<i>Sal</i> I	1.0
总体积	20.0

注：酶反应体系需要在 37°C 进行。

表 2-2 pCAMBIA2300-SiFBA4 重组质粒连接体系

Table 2-2 The ligation system of *pCAMBIA2300-SiFBA4* recombinant vector

反应体系	体积 (μL)
<i>pMD-19T-SiFBA4</i> (小片段)	6.0
<i>pCAMBIA2300</i> (大片段)	2.0
T ₄ DNA 连接酶 Buffer	1.0
T ₄ DNA 连接酶	1.0
总体积	10.0

注：连接反应体系需要在 4°C 过夜。

2.3.1.4 大肠杆菌感受态细胞制备

感受态细胞制备使用大肠杆菌 DH5 α 菌株，具体步骤如下：

- (1) 从超低温冰箱 (-80°C) 中的 DH5 α 甘油管，接种到 20 mL LB 液体培养基中，37°C，200 rpm 培养 6~8 h 活化菌株；
- (2) 取 0.1~0.2 μL 培养物均匀的涂布在 20 mL LB 固体培养基中，37°C 培养 6~8 h；
- (3) 挑取单菌落接种到 2 mL 新鲜 LB 液体培养基中，37°C 培养 2~3 h；
- (4) 将培养物接种到 50 mL 新鲜 LB 液体培养基中，37°C，200 rpm 培养 4~5 h，检测 OD₅₉₀ 值达到 0.3~0.4；
- (5) 将培养物转移至预冷的 50 mL 的无菌离心管中，冰浴 10 min，4°C，5,000 rpm 离心 5 min；
- (6) 弃上清，用 0.1 mol/L CaCl₂ 溶液重悬细胞沉淀，4°C，5,000 rpm 离心 5 min；
- (7) 重复步骤 6，收集细胞沉淀；
- (8) 用 2~3 mL 0.1 mol/L 的 10% 甘油 CaCl₂ 溶液重悬，以 100 μL /管分装，-80°C 保存备用。

2.3.1.5 重组质粒转化大肠杆菌

- (1) 从超低温冰箱（-80℃）中取出 DH5α 感受态细胞，置于冰上；
- (2) 在无菌条件下，将 5 μL 连接产物与 100 μL 大肠杆菌感受态细胞混合，冰浴 20 min；
- (3) 42℃水浴热激 90 s，迅速冰浴 3 min；
- (4) 加入 800 μL LB 液体培养基，37℃，200 rpm 恒温摇床培养 1 h；
- (5) 5,000 rpm 离心 2 min，弃上清，保留 50~100 μL 上清悬浮菌体；
- (6) 将菌液均匀涂布在含 50 mg L⁻¹ 卡那霉素（Kan）的 LB 固体培养基上，37℃ 培养 6~8 h。

2.3.1.6 阳性克隆的鉴定

采用 PCR 扩增方法鉴定阳性克隆：

- (1) 挑取单菌落接种到 800 μL 含 Kan 的 LB 液体培养基中，37℃，200 rpm 培养 3~4 h；
- (2) 以培养物为模板进行 PCR，反应体系如表 2-3 所示；
- (3) 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物；
- (4) 提取阳性单克隆的质粒，送至青岛睿博兴科生物技术有限公司测序；
- (5) 保存测序正确的菌液于-80℃冰箱备用。

表 2-3 菌液 PCR 反应体系

Table 2-3 PCR reaction system of bacteria liquid

成份	体积（μL）
ddH ₂ O	8.0
Mix（TM、dNTP、ATP）	10.0
引物	1.0
菌液	1.0
总体积	20.0

注：以未转化的大肠杆菌作为阴性对照，雪莲 cDNA 为阳性对照。

2.3.2 重组载体导入农杆菌

2.3.2.1 农杆菌菌株 LBA4404 感受态细胞的制备

参考 2.3.1.4 步骤，培养温度为 28℃。

2.3.2.2 冻融法转化农杆菌菌株 LBA4404

- (1) 在 100 μL 的农杆菌感受态细胞中加入 5 μL ，冰浴 30 min;
- (2) 液氮速冻 5 min，37°C 水浴 5 min，冰浴 5 min;
- (3) 加入 800 μL 液体 LB 培养基，28°C，200 rpm 培养 4 h;
- (4) 5,000 rpm，离心 5 min，弃上清，100~200 μL 上清悬浮菌体;
- (5) 将菌液涂布在含利福平 (Rif) 和卡那霉素的 LB 固体培养基上，28°C 培养 1~2 d。

2.3.2.3 阳性克隆的鉴定及序列测定

参考 2.3.1.6 步骤，培养温度为 28°C。

2.3.3 转基因植株的获得

采用农杆菌介导的遗传转化体系进行实验，培养基配方见附录 A。

2.3.3.1 种子处理及外植体的培养

挑选饱满无虫害无损伤的种子，用 75% 酒精浸泡 30~45 s，无菌水冲洗 2~3 次，15% 的过氧化氢溶液消毒 2~3 h，无菌水冲洗 3~5 次。将种子置于无菌水中，28°C 浸泡至露白，剥去种皮，接种在 1/2MS 培养基上，28°C 黑暗培养 2 d 后转移至弱光环境培养 4~5 d。

2.3.3.2 棉花外植体的获取及侵染转化

挑选出生长旺盛的无菌苗，将含有 *SiFBA4* 基因的农杆菌菌液离心，菌体沉淀与 1/2MS 液体培养基混匀。将下胚轴切为 7~10 mm 茎段，浸泡在侵染液中摇晃 7~10 min，吸干液体后置于共培养培养基上，28°C 黑暗培养 2 d。

2.3.3.3 分化培养

将茎段转接到含有抗生素的愈伤诱导培养基上，28°C 培养 3 个月，每 25 d 继代一次。挑选淡黄色、米粒状球形胚转移到胚状体诱导培养基中，继续培养至形成完整植株。

2.3.3.4 生根培养和炼苗

将发育状况良好的幼苗转移到生根培养基中，光照培养至茎部木质化，打开瓶盖，温室适应 3~5 d。

2.3.3.5 嫁接及移栽

采用劈接法嫁接，将转基因幼苗作为接穗插入砧木切口，固定后置于托盘中浇水，覆盖地膜保持湿度。3 d 后开口通气，7 d 后撤去地膜，待植株稳定后移栽至田间，收获 T₀ 代种子。

2.3.4 转基因植株验证分析

2.3.4.1 转基因植株基因组 DNA 的提取

使用 DNA secure 新型植物基因组 DNA 提取试剂盒（DNA secure Plant Kit）提取 DNA，具体步骤如下：

- （1）取 100 mg 新鲜叶片，液氮研磨后加入 400 μ L 缓冲液 LP1 和 6 μ L RNAase，振荡 1 min，室温放置 10 min；
- （2）加入 130 μ L 缓冲液 LP2，振荡 1 min，12,000 rpm 离心 5 min，取上清液；
- （3）加入 1.5 倍体积缓冲液 LP3，振荡 15 s，加入吸附柱 CB3，12,000 rpm 离心 30 s；
- （4）加入 600 μ L 漂洗液 PW，12,000 rpm 离心 30 s，重复两次；
- （5）12,000 rpm，离心 2 min，将吸附柱 CB3 置于室温晾干，加入 50 μ L 洗脱缓冲液 TE，放置 2~5 min，12,000 rpm 离心 2 min，收集 DNA，-20℃冰箱保存。

2.3.4.2 PCR 检测转基因植株

根据目的基因序列设计引物（表 2-4）。PCR 反应体系如表 2-5 所示，反应程序如表 2-6 所示。PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳检测，筛选阳性转基因株系。

表 2-4 转基因棉花鉴定引物

Table 2-4 Primers for identification of transgenic cotton

引物名称	引物序列（5'→3'）
<i>SiFBA4-F</i>	ATGGCCTCAACATTCTCTTC
<i>SiFBA4-R</i>	CTTAGTAGACATAGCCCTTAACG

表 2-5 鉴定转基因棉花的 PCR 体系

Table 2-5 PCR system for identifying transgenic cotton

试剂	体积 (μL)
MIX	10
ddH ₂ O	8
3' 端引物	0.5
5' 端引物	0.5
DNA	1
共计	20

表 2-6 PCR 扩增反应程序

Table 2-6 PCR amplification reaction procedure

步骤	程序	循环
预变性	95°C, 5 min	1
变性	95°C, 30 s	35
退火	58°C, 45 s	
延伸	72°C, 1 min15 s	
延伸	72°C, 7 min	1
保存	4°C	1

2.3.4.3 RT-PCR 检测

(1) 转基因棉花总 RNA 的提取

1) 取 *SiFBA4* 转化体棉花叶片 50 mg, 液氮研磨后加入 1 mL TRIzol, 振荡 15 s, 冰上静置;

2) 取上清加入 200 μL 的氯仿, 振荡 15 s, 振荡 3 次, 室温静置 10 min;

3) 12,000 rpm 离心 15 min, 取上清并加入等体积 (500 μL) 的异丙醇, 混匀, 静置 10 min;

4) 4°C, 12,000 rpm 离心 15 min, 弃上清;

5) 分别加入 1 mL 75%和 100%的乙醇洗涤, 4°C, 7,500 rpm 离心 5 min;

6) 干燥后加入 50 μL DEPC 水, -80°C保存。

(2) cDNA 链的合成

cDNA 链的合成使用 BIOGENE 公司 BIOGOLD qRT Super-Mix for qPCR (+gDNA wiper)试剂盒, 按说明书进行逆转录反应:

1)基因组 DNA 去除:取 1.5 mL 无 RNA 酶的 EP 管,分别加入 4 μL 的 4×gDNA wiper Mix 和 1 μg 的模板 RNA, 并且添加 RNase-free ddH₂O 至 16 μL, 轻轻吹打混匀, 42℃ 水浴 2 min;

2) 水浴结束后, 在上述 EP 管中加入 4 μL 的 5×Biogold q-RT Super-Mix II, 轻轻吹打混匀后进行逆转录反应 (反应条件为: 50℃水浴 15 min, 85℃水浴 5 s)。

(3) RT-PCR 扩增

以 cDNA 为模板, *SiFBA4* 和 *GhUBQ7* 的特异引物进行扩增 (表 2-7), 反应体系如表 2-8 所示, 反应程序如表 2-9 所示。

表 2-7 转基因棉花 RT-PCR 鉴定引物

Table 2-7 RT-PCR primers for identification of transgenic cotton

引物名称	引物序列 (5'→3')
<i>q-SiFBA4-F</i>	CCAACAGGGTGCTCGTTTTG
<i>q-SiFBA4-R</i>	TCAGGCTCGACAATTGGGAC
<i>GhUBQ7-F</i>	CGTCAAAACCCTAACGGGGA
<i>GhUBQ7-R</i>	CATCTTCGAGTTGCTTGCCG

表 2-8 鉴定转基因棉花的 PCR 体系

Table 2-8 PCR system for identifying transgenic cotton

试剂	体积 (μL)
MIX	10
ddH ₂ O	8
3' 端引物	0.5
5' 端引物	0.5
cDNA	1
共计	20

表 2-9 PCR 扩增反应程序

Table 2-9 PCR amplification reaction procedure

步骤	程序	循环
预变性	95℃, 5 min	1
变性	95℃, 30 s	35
退火	58℃, 45 s	
延伸	72℃, 20 s	
延伸	72℃, 7 min	1
保存	4℃	1

2.3.4.4 Western blot 检测目的蛋白

(1) 蛋白提取

取适量的植物组织样本置于研钵中，加入适量的液氮充分研磨，尽量使组织研磨成粉状，用天平称取适量研磨好的植物粉状组织，加入 5 倍于组织体积的蛋白提取试剂（使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂），振荡，放在 4℃裂解过夜。4℃，12,000 rpm 离心 5 min，收集上清。

(2) 蛋白浓度定量

使用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒测定样品蛋白浓度。

(3) SDS-PAGE 电泳

1) 样品处理

①根据样品浓度确定需要点样的量，保证每个样品总蛋白点样的量相同（每孔至少 20 μg）；

②在蛋白样品中加入适当量的 5×蛋白样品缓冲液，95~100℃沸水浴 5 min。

2) 制胶与上样

①配制分离胶（见附录 B），加入 TEMED 后立即摇匀后进行灌胶。在胶面上缓慢加入适量水以压平胶面，约 45 min 后倒去胶上层水并用吸水纸将剩余水吸干；

②配制浓缩胶（见附录 B），加入 TEMED 后立即摇匀后再灌胶。将剩余空间灌满浓缩胶然后将梳子插入浓缩胶中；

③拔出梳子，将电泳架放入电泳槽中，加入电泳缓冲液，将样品加入点样孔中；

④按浓缩胶 80 V、分离胶 120 V 进行恒压电泳，至溴酚蓝到达胶板下沿。

(4) 转膜

1) 准备滤纸和 PVDF 膜，PVDF 膜在使用之前先用甲醇活化，活化时间 3 min；

2) 按照正负极的方向依次摆放海绵、3 层滤纸、PVDF 膜、胶、3 层滤纸、海绵，形成“三明治”样的结构进行转膜，摆放过程中要除尽各层中气泡；

3) 按 300 mA 恒定电流转膜，时间根据目的蛋白分子量大小调整。

(5) 抗体孵育

1) 结束转膜，将 PVDF 膜放入封闭液室温封闭 1 h；

2) 除去封闭液，加入用 I 抗稀释液稀释好的 I 抗 4℃过夜；

3) 回收已稀释的 I 抗，用 TBST 洗三次，每次 5 min；

4) 加入用 II 抗稀释液稀释好的 II 抗，室温孵育 30 min，用 TBST 在室温下摇床上洗四次，每次 5 min。

(6) 化学发光检测

- 1) 滴加新鲜配制的 ECL 混合溶液 (A:B=1:1) 到 PVDF 膜的蛋白面侧, 暗室中曝光;
- 2) 根据不同的光强度调整曝光条件, 显影、定影。
- (7) 结果分析
- 将胶片进行扫描存档, Alpha Ease FC 软件处理系统分析目标带的光密度值。

2.4 结果与分析

2.4.1 *SiFBA4* 基因棉花转化体的获得与嫁接

通过农杆菌介导的遗传转化体系, 成功将天山雪莲 *SiFBA4* 基因导入陆地棉 R15 基因组中。

如图 2-1 所示, 无菌条件下处理的棉花种子经去种皮后接种于 1/2MS 培养基 (图 2-1A), 在弱光下生长 5~6 d 后将下胚轴切段 (7~10 mm), 经过与农杆菌共培养和愈伤组织诱导图 (2-1B-C)。通过胚性愈伤组织脱分化及胚状体诱导 (图 2-1D-F), 最终获得鱼形胚 (图 2-1G) 并发育为完整植株 (图 2-1H)。因为直接移栽的幼苗成活率低且生殖器官发育迟缓, 所以采用嫁接法将木质化幼苗 (接穗) 与不同发育阶段的砧木 (R15 受体) 结合 (图 2-1I)。

如表 2-10 所示, 以子叶期砧木 (S0) 嫁接的成活率显著高于一叶一心 (S1) 和两叶一心 (S2) 阶段 ($p<0.05$)。S0 砧木的接穗成活率达 80.95% (17/21), 而 S1 和 S2 阶段分别为 61.11% (11/18) 和 50.00% (17/34), 表明子叶期砧木更适于维持接穗的生理活性与维管束连接效率。

表 2-10 不同发育阶段砧木对嫁接成活率的影响

Table 2-10 Survival rate of grafted seedlings with rootstocks at different developmental stages			
砧木发育阶段	嫁接苗数 (株)	成活苗数 (株)	成活率 (%)
S0	21	17	80.95 a
S1	18	11	61.11 b
S2	34	17	50.00 c

注: 不同字母表示组间差异显著 ($p<0.05$)。



图 2-1 棉花 R15 品系遗传转化体系

Figure 2-1 Genetic transformation system of cotton R15 line

注：A. 播种无菌 R15 棉花种子；B. 棉花下胚轴茎段进行愈伤组织诱导；C. 愈伤组织；D-E. 将愈伤组织脱分化诱导胚状体；F. 胚状体诱导鱼形胚；G. 鱼形胚；H. 幼苗；I. 嫁接。

Note: A. Sowing of sterile R15 cotton seeds; B. Healing tissue induction in stem segments of cotton hypocotyls; C. Healing tissues; D-E. Dedifferentiation of healing tissues to induce embryos; F. Induction of ichthyogenic embryos from embryos; G. Fish embryos; H. Seedlings; I. Grafting.

2.4.2 转基因株系的分子验证

通过基因组 DNA (gDNA)、cDNA 及蛋白水平的验证，共获得 14 个 *SiFBA4* 基因阳性转化体。如图 2-2A-B 所示，通过农杆菌介导的棉花遗传转化和嫁接共获得 22 个棉花转化体，PCR 扩增和 RT-PCR 检测分别在 gDNA 和 cDNA 水平证实外源基因的整合与转录。其中，OE-4、OE-14 和 OE-17 三个株系表现出较高的转录水平(图 2-2B)。SDS-PAGE

电泳技术和蛋白质免疫印记（Western blot）分析进一步验证了 *SiFBA4* 蛋白的表达（图 2-2D-E）。SDS-PAGE 电泳显示，OE-4、OE-14 和 OE-17 株系中检测到分子量约 40 kDa 的特异性条带（图 2-2D），与天山雪莲 *FBA4* 蛋白预测大小一致。灰度分析表明，OE-4 株系的 *FBA4* 蛋白相对表达量（灰度比 0.776）高于 OE-14（0.320）和 OE-17（0.416）（图 2-2E）。值得注意的是，WT 植株中检测到微弱信号（灰度比 0.014），可能与内源 *FBA* 蛋白的交叉反应或非特异性结合有关。

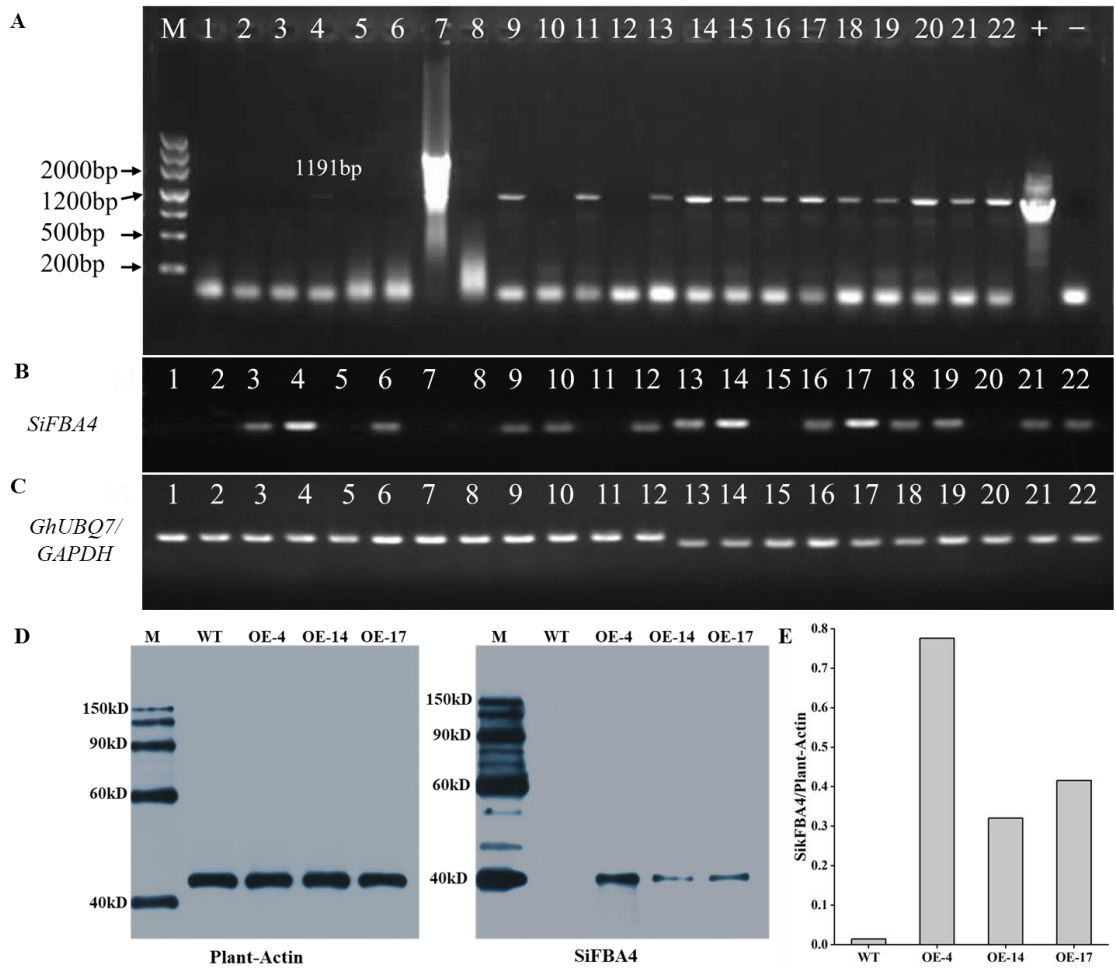


图 2-2 转基因棉花的分子鉴定

Figure 2-2 Molecular characterization of cotton

注：A. gDNA 水平 PCR 检测，M: DNA 标记；+: 阳性对照；-: 阴性对照；1-14: 转化体；B. cDNA 水平 RT-PCR 检测；C. 内参基因 *GhUBQ7/GAPDH* 的 RT-PCR 验证；D. SDS-PSGE 电泳图，M. SDS-PAGE 及 Western blot 结果，M: 蛋白标记；WT: 野生型；OE-4/OE-14/OE-17: 转基因株系；Actin: 内参蛋白；E. Western blot 灰度值定量分析。

Note: A. gDNA level PCR detection, M: DNA marker; +: positive control; WT: wild type; 1-14: transformant; B. cDNA level RT-PCR detection; C. RT-PCR verification of internal reference gene *GhUBQ7/GAPDH*; D. SDS-PSGE electrophoresis, M. SDS-PAGE and Western blot results, M: protein label; WT: wild type; OE-4/OE-14/OE-17: transgenic strain; Actin: internal reference protein; E. Western blot quantitative analysis of gray value.

2.5 讨论

本研究通过农杆菌介导的棉花遗传转化体系进行 *SiFBA4* 转基因棉花种质材料的创制。棉花下胚轴是诱导愈伤组织较容易的外植体^[129]，在技术体系优化过程中，受体材料（R15 品系）胚根伸长后，从黑暗培养 2 d 后，转移至弱光条件下培养 4~5 d 获得的下胚轴更利于农杆菌的侵染和愈伤组织的诱导，而且能够减轻外植体和愈伤组织的褐变程度。这一现象与葡萄幼嫩茎段在 0~1500 Lux 光照强度下的愈伤组织诱导率（92%）和褐变率优于 2000~4000 Lux 的实验结果相似^[130]。幼苗培养超过 5 d 的下胚轴出现木质化，且愈伤组织诱导困难。枸杞下胚轴和节间茎段诱导愈伤组织的实验叶印证了这一点^[131]。为避免组织褐变坏死，将愈伤组织剥离下胚轴时最大限度的减少对愈伤组织的机械损伤。剥离后的愈伤组织先接种于与抗性愈伤诱导培养基成分一致的培养基中，经过两次继代培养（50 d）过渡后转移至胚性愈伤诱导培养基，有助于提高愈伤组织的分化，并有效防止农杆菌溢出造成的污染。根据前人经验，在培养基表面铺设滤纸进行适度胁迫诱导，能够促进成苗过程并降低鱼形胚玻璃化现象的发生^[132]。当幼苗出现胚根后，及时转移至生根培养基（1/2MS）中，能够促进根系发育，并提高幼苗的成活率。

通过植物组织培养获得的棉花幼苗在移栽至土壤后存在生长缓慢、繁殖力弱、存活率低等问题。为解决这一问题，本研究将嫁接技术应用于转基因棉花的培育体系。嫁接作为一种传统的农业技术，在提高作物生产力及增强环境胁迫抗性方面已得到广泛应用^[133-135]。通过比较不同嫁接部位的效果，发现子叶期子叶节点处作为接口嫁接的成活率（80.95%）显著高于一叶一心和两叶一心茎秆中部嫁接（55.55%），此差异可能是因为顶端优势生长素和细胞分裂素等激素的积累^[136, 137]，进而缩短了接穗与砧木之间的愈合期，增加了嫁接苗的成活率。为优化转基因棉花培育体系提供了重要的技术支撑，也为其他双子叶作物的遗传转化研究提供了参考。

棉花是遗传转化难度较高的作物，受内在因素基因型、外在因素农杆菌菌株、培养基、激素、抗生素、共培养条件、培养时间、继代时间等环境以及外源基因整合位点甲基化等因素影响，导致基因容易丢失^[138, 139]。为确保实验顺利进行，本研究通过系列分子生物学手段，在 DNA（PCR）、RNA（RT-PCR）和蛋白质（Western blot）三个水平进行验证，筛选到 3 株正常表达且蛋白水平表达量较高的转 *SiFBA4* 基因棉花株系。

2.6 小结

- （1）通过农杆菌介导的遗传转化体系获得 14 个转化体。

(2) 为了保证存活率, 对组培苗采用嫁接法提高存活率, 以子叶期子叶节点为砧木显著提高了嫁接幼苗的成活率 (80.95%)。

(3) 对 14 个转化体进行 DNA、RNA 和蛋白质水平的分子鉴定, 筛选到 3 个株系用于本研究试验。

第3章 转 *SiFBA4* 基因棉花生长发育及生理分析

3.1 前言

棉花作为重要的经济作物，其生长发育特征和生理指标直接影响产量和纤维品质，而改造和优化光合作用是提高棉花产量的有效途径之一。本课题组前期研究表明，天山雪莲 *SiFBA5* 基因可增强加工番茄（亚心 87-5）的低温耐受性，且转 *SiFBA4* 基因烟草和番茄表现出生长进程加快的现象，但其是否能提高棉花产量尚未明确。本章利用已获得的遗传稳定的高代转基因株系，对 T_3 和 T_4 代转基因植株的光合生理、农艺、产量、纤维品质及 FBA 相关酶活性进行了系统性分析。

3.2 材料

3.2.1 主要仪器

Li-6400TX 便携式光合测定仪（LI-COR Biosciences，美国）、紫外/可见分光光度计（UV-5100，上海）、显微镜（OLYMPUS-CX21，日本）、低温离心机（M1324R，瑞沃德）、电子天平（舜宇恒平 FA224，上海）、HVI 1000 纤维品质测定仪（USTER TechnoLogies，瑞士）。

3.2.2 试验材料

陆地棉 R15 品系（WT）； T_3 和 T_4 代转 *SiFBA4* 基因棉花株系（OE-4、OE-14 和 OE-17）。

3.3 方法

3.3.1 试验设计及试验地概况

本研究于新疆石河子大学农学试验站转基因生物安全评价试验田(45°19'N, 86°03'E)开展。试验田位于天山北麓中段, 属温带大陆性气候, 2023-2024 年试验期间, 年均温度分别为 9.10℃和 8.97℃, 年降水量分别为 128.90 和 265.40 mm (附录 C)。田间种植采用覆膜滴灌模式(图 3-1), 采用随机区组设计(Randomized Complete Block Design, RCBD), 设置 5 个生物学重复, 小区行长 5 m, 面积 10 m², 行距 76 cm, 株距 10 cm, 每穴播种 2 粒, 苗期定苗至单株。田间管理(灌溉、施肥、病虫害防治)严格遵循当地田间农业生产管理。

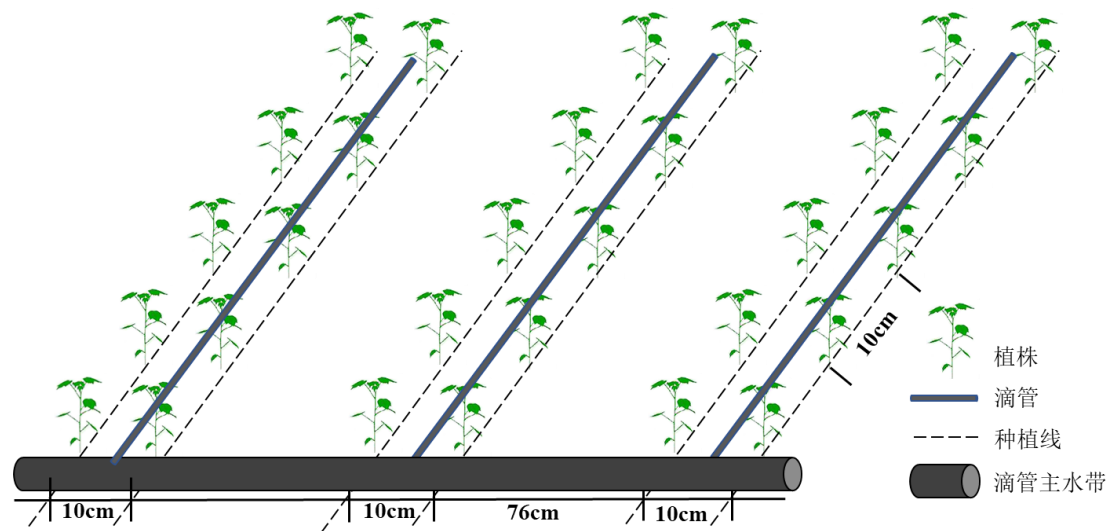


图 3-1 田间种植模式图
Figure 3-1 Plot of planting pattern in the field

3.3.2 种子萌发及生育期观测

3.3.2.1 室内发芽动态

选取野生型(WT)与转基因株系饱满种子各 300 粒(每组 100 粒×3 重复), 经 75%乙醇表面消毒后, 浸种至胚根突破种皮。根据中华人民共和国国家标准农作物种子检验规程发芽试验(GB/T3543.4-1995), 将种子均匀放置于铺有滤纸的发芽盒中, 25~28℃暗培养, 分别于第 3 天和第 7 天统计发芽数, 根据叶武威等^[140]的方法按公式(3-1)和(3-2)计算发芽率(Germination Rate, GR)和发芽势(Germination Potential, GP):

$$GR(\%) = \frac{\text{发芽种子数}}{\text{种子数量}} \times 100 \quad (3-1)$$

$$GP(\%) = \frac{\text{第三天发芽种子数量}}{\text{种子数量}} \times 100 \quad (3-2)$$

3.3.2.2 田间出苗动态

选取饱满无病害的棉花种子在田间播种（人工点种），每小区人工点播 600 粒种子（2 粒/穴），于播后 7 d 和 14 d 统计出苗数，按公式（3-1）和（3-2）计算田间种子的发芽率和发芽势。

3.3.2.3 生育期监测

记录关键生育期：出苗期（50%子叶出土）、现蕾期（50%植株第一果枝现蕾）、开花期（50%植株第一果枝开花）及吐絮期（50%棉铃完全开裂），计算各生育阶段持续时间（Days After Sowing, DAS）。

3.3.3 光合生理参数测定

于铃期晴天 10:00~12:00，采用 Li-6400TX 便携式光合仪测定主茎倒 4 叶（打顶后倒 3 叶）光合参数：净光合速率（ P_n , $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ）、气孔导度（ G_s , $\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ）、胞间 CO_2 浓度（ C_i , $\mu\text{mol}/\text{mol}$ ）及蒸腾速率（ T_r , $\text{mmol}/\text{m}^2/\text{s}$ ）。仪器参数设定：光强 1,200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ， CO_2 浓度 400 ppm，叶室温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ，相对湿度 $60 \pm 5\%$ 。每株系测定 10 株，每叶片重复 3 次，取均值分析。

3.3.4 叶绿素含量

采用乙醇提取-分光光度法：取铃期功能叶（主茎倒 4 叶）叶盘（ $\Phi=10\text{ mm}$, 20 mg）浸于 25 mL 95%乙醇，避光浸提 48 h 至组织脱色。上清液于分光光度计测定 663 nm 和 645 nm 吸光值，根据杨敏文^[141]的方法及公式（3-3）-（3-6）计算叶绿素含量：

$$C_{\text{Chl } a} = 12.71 \times A_{663} - 2.59 \times A_{645} \quad (3-3)$$

$$C_{\text{Chl } b} = 22.88 \times A_{645} - 4.67 \times A_{663} \quad (3-4)$$

$$C_{\text{Chl } T} = C_{\text{Chl } a} + C_{\text{Chl } b} \quad (3-5)$$

$$\text{色素含量(mg/g)} = C \times V \div W \quad (3-6)$$

式中, C 表示色素浓度 (mg/L), V 表示提取液体积 (mL), W 表示样品鲜重 (mg)。

3.3.5 叶面积测定

群体叶面积指数 (LAI): 于苗期、蕾期和铃期, 每小区选取 1 m^2 样方, 统计总株数后随机选取 10 株, 采用 Image J 图像分析法 (NIH, USA) 测定单株叶面积, 按公式 (3-7) 和 (3-8) 计算:

$$\text{群体叶面积} = \text{样方面积总株数} \times \text{单株叶面积均值} \quad (3-7)$$

$$LAI = \frac{\text{群体叶面积}}{\text{土地面积}} \quad (3-8)$$

3.3.6 生产潜力参数

基于干物质积累和叶面积动态, 计算以下指标:

叶片光合势 (LAD, Leaf Area Duration):

$$LAD = \frac{1}{2} \times (LA_2 + LA_1) \times (T_2 - T_1) \quad (3-9)$$

群体净同化率 (NAR, Net Assimilation Rate):

$$NAR = \frac{M_2 - M_1}{T_2 - T_1} \times \frac{1nLA_2 - 1nLA_1}{LA_2 - LA_1} \quad (3-10)$$

作物生长率 (CGR, Crop Growth Rate):

$$CGR = \frac{M_2 - M_1}{T_2 - T_1} \quad (3-11)$$

其中 T_1 和 T_2 表示时间; LA_1 和 LA_2 表示 T_1 、 T_2 时的叶面积; M_1 和 M_2 分别表示 T_1 、 T_2 时的干物质。

3.3.7 生物量测定

于苗期 (室外盆栽)、蕾期和铃期, 连续取样 10 株, 分离根、茎、叶、蕾、花和铃, 105°C 杀青 30 min 后 80°C 烘干至恒重, 称量各器官干重 (精确至 0.01 g), 分析基因型对生物量分配的影响。

3.3.8 农艺性状与纤维品质分析

3.3.8.1 形态指标

每生育期标记 10 株，测定株高（地面至生长点）、茎粗（游标卡尺测定子叶节下 1 cm 处直径）、节间长度、果枝夹角、果枝数和蕾铃数等。吐絮期每小区采收 50 铃测定单铃重，轧花后计算衣分及籽指。

3.3.8.2 产量与纤维品质

全小区收获计产，籽棉产量换算为 kg/ha。随机选取 15 株皮棉样品送新疆农科院检测中心，采用 HVI 1000 测定纤维长度、强度、整齐度、伸长率及马克隆值，参照国际棉花校准标准（ICC）执行。

3.3.9 棉花气孔特征

取 5~6 叶期功能叶，撕取下表皮制片，在显微镜下寻找清晰的气孔视野。拍照记录，根据显微镜目镜视场数（10×/18）和物镜放大倍数（10 倍），Image J 软件量化气孔密度（个/mm²）、长度（μm）、宽度（μm）及开度（μm）。其中气孔长度为保卫细胞两端之间的距离，气孔宽度为两个保卫细胞的最大距离，气孔开度为两个保卫细胞“哑铃型”中轴之间气孔张开的距离，气孔密度为一个完整视野内含有的气孔数量与视野面积的比值。

3.3.10 光合作用关键酶活性测定

光合作用关键酶活性测定使用苏州格锐思生物科技有限公司提供的试剂盒（Cat. No. G0517F, G0518W, G0520T），紫外分光光度法测定酶活，在棉花生长至 5~6 片真叶时取样检测。所有的酶活定义为：每克组织每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位（nmol/min/g）。

3.3.10.1 果糖-1,6-二磷酸醛缩酶活性测定

（1）样本制备

称取 0.1 g 的棉花叶片，将其迅速放入预冷的研钵中，并加入提取液 1 进行冰浴匀浆，转入 1.5 mL 的离心管中，定容至 1 mL，4℃，13,000 rpm 离心 5 min，取上清液进行测定。

(2) 紫外分光光度计检测

将紫外分光光度计预热 30 min 后，依次将样本和试剂加入光径为 1 cm 的石英比色皿中，轻轻混匀，2 min 时在 340 nm 波长下读取吸光度值，记为 A_1 ，15 min 时再次读取吸光度值，记为 A_2 。酶活性计算和检测试剂加入顺序按表 3-1 试剂顺序。

(3) 酶活计算（鲜重）

$$U_{FBA} = \frac{\Delta A \times V_2 \times 10^9 \times V \times T}{(\varepsilon \times d) \times W \times V_1} = \frac{156.5 \times \Delta A}{W} \quad (3-12)$$

式中 U_{FBA} 表示 FBA 酶活性（单位：nmol/min/g）； ΔA 表示 $A_2 - A_1$ ； V_2 表示反应体系总体积（0.73 mL）； V 表示加入提取液体积（1 mL）； T 表示反应时间（15 min）； ε 表示 NADH 摩尔消光系数（ 6.22×10^3 L/mol/cm）； d 表示比色皿光径（1 cm）； W 表示样本质量（g）； V_1 表示加入样本体积（0.05 mL）。

表 3-1 检测试剂加入顺序和用量

Table 3-1 Adding sequence and dosage of test reagents

试剂名称	比色皿（ μ L）
样本	50
试剂 1	40
试剂 2	40
试剂 3	40
试剂 4	480
试剂 5	80

3.3.10.2 果糖-1,6-二磷酸酶活性测定

(1) 样本制备：同 3.3.9.1

(2) 紫外分光光度计检测

将紫外分光光度计预热 30 min 后，依次将样本和试剂按照表 3-2 内容加入光径为 1 cm 的石英比色皿中，轻轻混匀，1 min 时在 340 nm 波长下读取吸光度值，记为 A_1 ，20 min 后再次读取吸光度值，记为 A_2 。

(3) 酶活计算（鲜重）

$$U_{FBP} = \frac{\Delta A \times V_2 \times 10^9 \times V \times T}{(\varepsilon \times d) \times W \times V_1} = \frac{281.4 \times \Delta A}{W} \quad (3-13)$$

式中 U_{FBP} 表示 FBP 酶活性 (单位: nmol/min/g); V_1 表示加入样本体积 (0.08 mL); 其他参考 3.3.9.1。

表 3-2 检测试剂加入顺序和用量
Table 3-2 Adding sequence and dosage of test reagents

试剂名称	比色皿 (μL)
样本	80
试剂 1	40
试剂 2	40
试剂 3	460
加入试剂 3 后轻轻混匀, 在室温条件下孵育 10 min。	
试剂 4	80

3.3.10.3 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/氧化酶 (Rubisco) 活性测定

(1) 样本制备

快速称取 0.1 g 的棉花叶片, 将其迅速放入预冷的研钵中, 并加入提取液进行冰浴匀浆, 转入 1.5 mL 的离心管中, 定容至 1 mL, 4℃, 12,000 rpm 离心 10 min, 取上清液进行测定。

(2) 紫外分光光度计检测

将紫外分光光度计预热 30 min 后, 依次将样本和试剂按照表 3-3 内容加入光径为 1 cm 的石英比色皿中, 轻轻混匀, 10 s 时在 340 nm 波长下读取吸光度值, 记为 A_1 , 10 min 后再次读取吸光度值, 记为 A_2 。

(3) 酶活计算 (鲜重)

$$U_{Rubisco} = \frac{\Delta A \times V_2 \times 10^9 \times V \times T}{(\epsilon \times d) \times W \times V_1} = \frac{92.44 \times \Delta A}{W}$$

(3-14)

式中 $U_{Rubisco}$ 表示 Rubisco 酶活性 (单位: nmol/min/g); ΔA 表示 $A_1 - A_2$; V_2 表示反应体系总体积 (0.69 mL); V 表示加入提取液体积 (1 mL); T 表示反应时间 (20 min); ϵ 表示 NADPH 摩尔消光系数 (6.22×10^3 L/mol/cm); d 表示比色皿光径 (1 cm); W 表示样本质量 (g); V_1 表示加入样本体积 (0.03 mL)。

表 3-3 检测试剂加入顺序和用量

Table 3-3 Adding sequence and dosage of test reagents

试剂名称	比色皿 (μL)
样本	30
试剂 1	40
试剂 2	40
试剂 3	40
试剂 4	500, 混匀后孵育 15 min。
试剂 5	40

3.3.11 淀粉含量测定

淀粉含量测定使用苏州格锐思生物科技有限公司提供的试剂盒 (Cat. No. G0551F, 酶法), 紫外分光光度法测定。

3.3.11.1 样本制备

各株系分别取三株棉花叶片和根系, 50°C 烘干至恒重, 研磨过 60 目筛, 得到待检测均匀粉末样本。

(1) 除脂: 分别称取 10 mg 粉末样本至 2 mL 离心管中, 并加入 500 μL 石油醚, 研磨匀浆, 50°C 水浴 30 min (每 3 min 振荡一次), 12,000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 留沉淀。

(2) 除糖: 加入 1 mL 80%乙醇, 悬浮沉淀, 50°C 水浴 20 min (每 3 min 振荡一次), 冷却后, 12,000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 留沉淀。此步骤重复两次。

(3) 加入 500 μL DMSO, 悬浮沉淀, 沸水浴至样本呈分散溶解状态 (每 3 min 振荡一次)。

(4) 冷却后加入加入 1 mL 无水乙醇, 立即旋涡振荡, 在加入 500 μL 无水乙醇混匀, 静止 5 min, 5,000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 留沉淀, 吸干剩余乙醇。

(5) 加入 1 mL DMSO, 悬浮沉淀, 沸水浴 15 min (每 3 min 振荡一次), 冷却后, 3,000 rpm 离心 5 min, 取上清备用。

3.3.11.2 分光光度检测

将紫外分光光度计预热 30 min 后, 依次将样本和试剂按照表 3-4 内容加入试剂。

表 3-4 检测试剂加入顺序及用量
Table 3-4 Adding sequence and dosage of test reagents

试剂名称	测定管 (μL)	空白管 (μL)	标准管 (μL)
待测液	40		16
试剂 2	300	160	144
试剂 3	50		
混合液, 40℃水浴 30 min,			
混合液	160	160	160
试剂 4	80	80	80
试剂 5	560	560	560
40℃避光水浴 20 min, 以蒸馏水调零, 于 510 nm 处读取吸光值 A。			

3.3.11.3 含量计算

按照公式 3-15 计算棉花叶片和根系总淀粉含量 (mg/g):

总淀粉含量 =
$$\frac{C \times V_1 \times V_2 \times (A_1 - A_0) \times (A_2 - A_0) \times W \times 2.18}{V}$$
 (3-15)

式中 C 表示标准品浓度; V_1 表示待检测淀粉体积 (40 μL); V_2 表示显色反应中标准品体积 (160 μL); A_0 表示空白管吸光度值; A_1 表示测定管吸光度值; A_2 表示标准管吸光度值; W 表示样本质量 (mg); V 表示检测液体积 (1 mL)。

3.3.12 统计分析

使用 SPSS 26 和 Excel 2010 软件对数据进行统计分析, 采用单因素方差分析和邓肯多重比较 ($p<0.05$), 所有数据至少设置 3 个生物学重复。使用 Origin 2021pro 软件对统计数据进行绘图, 数据用平均值±标准差表示。使用 Adobe Photoshop 2021、Adobe Illustrator 2021 和 Image J 软件进行图像处理。

3.4 结果分析

基于 3 个 *SiFBA4* 稳定表达株系 (OE-4、OE-14、OE-17), 本研究系统分析了转基因棉花在不同生育期的生物量积累、生理特性与农艺表现。结果显示 *SiFBA4* 过表达对棉花生长发育、光合效率及产量构成因素产生积极影响, 但是显著降低了棉花纤维品质。

3.4.1 生物量积累

生物量是作物产量形成的基础。因此，本研究对转 *SiFBA4* 基因棉花苗期、蕾期和铃期的生物量进行了分析。

3.4.1.1 转基因棉花苗期生物量

苗期试验生物量统计数据显示（图 3-2），2023 年转基因株系在生物量分配中呈现基因型特异性差异。转基因株系 OE-4 (1.27 ± 0.058 g) 与 OE-17 (1.38 ± 0.061 g) 较 WT (0.97 ± 0.014 g) 分别显著增加 31.20% ($p=0.002$) 与 42.56% ($p<0.001$)，OE-14 (1.00 ± 0.083 g) 增加 3.72%（图 3-2A, $p=0.672$ ）。OE-17 根生物量 (0.13 ± 0.007 g) 较 WT (0.08 ± 0.005 g) 显著增加 59.52% ($p<0.001$)，OE-4 (0.11 ± 0.007 g) 增幅次之 (35.71%, $p<0.05$)，OE-14 (0.09 ± 0.010 g) 增加 9.52%（图 3-2B, $p=0.508$ ）。OE-4 茎生物量 (0.41 ± 0.021 g) 较 WT (0.32 ± 0.009 g) 增加 27.27% ($p=0.013$)，OE-17 (0.44 ± 0.020 g) 增加 36.67% ($p=0.002$)，OE-14 (0.31 ± 0.032 g) 减少 4.07%（图 3-2C, $p>0.05$ ）。OE-4 (0.75 ± 0.033 g) 与 OE-17 (0.81 ± 0.038 g) 叶生物量较 WT (0.56 ± 0.014 g) 显著增加 32.98% 和 43.62% ($p<0.001$)，OE-14 (0.61 ± 0.043 g) 增加 7.45%（图 3-2D, $p=0.386$ ）。根冠比在各基因型间无显著差异 ($p>0.05$)，表明生物量积累的提升未显著改变器官间分配比例（图 3-2E）。

2024 年试验数据数据显示（图 3-2），转基因株系在生物量分配中呈现基因型特异性差异。转基因株系 OE-4 (1.42 ± 0.047 g) 与 OE-17 (1.34 ± 0.019 g) 较 WT (1.08 ± 0.010 g) 分别显著增加 30.81% 与 23.62% ($p<0.001$)，OE-14 (1.18 ± 0.022 g) 增加 9.23%（图 3-2A, $p=0.023$ ）。如图 3-2B-D 所示，OE-4 根生物量 (0.14 ± 0.005 g) 较 WT (0.11 ± 0.008 g) 显著增加 19.30% ($p=0.028$)，OE-14 (0.13 ± 0.007 g, 12.28%) 与 OE-17 (0.13 ± 0.005 g, 14.04%) 差异不显著 ($p>0.05$)。WT 茎生物量为 0.35 ± 0.012 g，叶生物量为 0.62 ± 0.020 g，OE-4 茎生物量 (0.46 ± 0.017 g) 增加 28.81% ($p<0.001$)，叶生物量 (0.83 ± 0.032 g) 增加 34.09% ($p<0.001$)；OE-17 茎生物量 (0.43 ± 0.016 g) 增加 20.90% ($p=0.003$)，叶生物量 (0.78 ± 0.010 g) 增加 26.95% ($p<0.001$)；OE-14 茎生物量 (0.37 ± 0.014 g) 增加 3.39% ($p>0.05$)，叶生物量 (0.69 ± 0.018 g) 增加 12.01% ($p<0.05$)，OE-4 和 OE-17 与 WT 之间差异显著。根冠比在转基因株系中显著升高 (OE-4: 24.42%, $p<0.001$; OE-14: 40.70%, $p=0.012$; OE-17: 24.42%, $p=0.015$)，表明根系生物量积累比例相对增加，分别为 0.086 (WT)、0.107、0.121 和 0.107（图 3-2E）。

综合两年试验结果显示，*SiFBA4* 转基因株系苗期生物量积累及分配方面差异显著。与 WT 相比，OE-4 和 OE-17 株系总生物量在 2023 年显著增加 31.20%~42.56% ($p \leq 0.002$)，

2024 年增加 23.62%~30.81% ($p<0.001$), OE-14 增幅较低 (3.72%~9.23%)。茎和叶生物量在 OE-4 和 OE-17 株系均显著提升(2023 年茎: 27.27%~36.67%, 叶: 32.98%~43.62%; 2024 年茎: 20.90%~28.81%, 叶: 26.95%~34.09%), 根生物量增幅存在年度波动 (2023 年 35.71%~59.52%, 2024 年 OE-4 增加 19.30%)。根冠比在 2023 年无显著变化($p>0.05$), 而 2024 年转基因株系显著升高 (24.42%~40.70%, $p\leq0.015$), 表明根系生物量比例相对增加。数据分析表明 *SiFBA4* 过表达可调控生物量积累与器官分配模式, 叶片与根系生物量协同增加可能与糖转运途径有关。

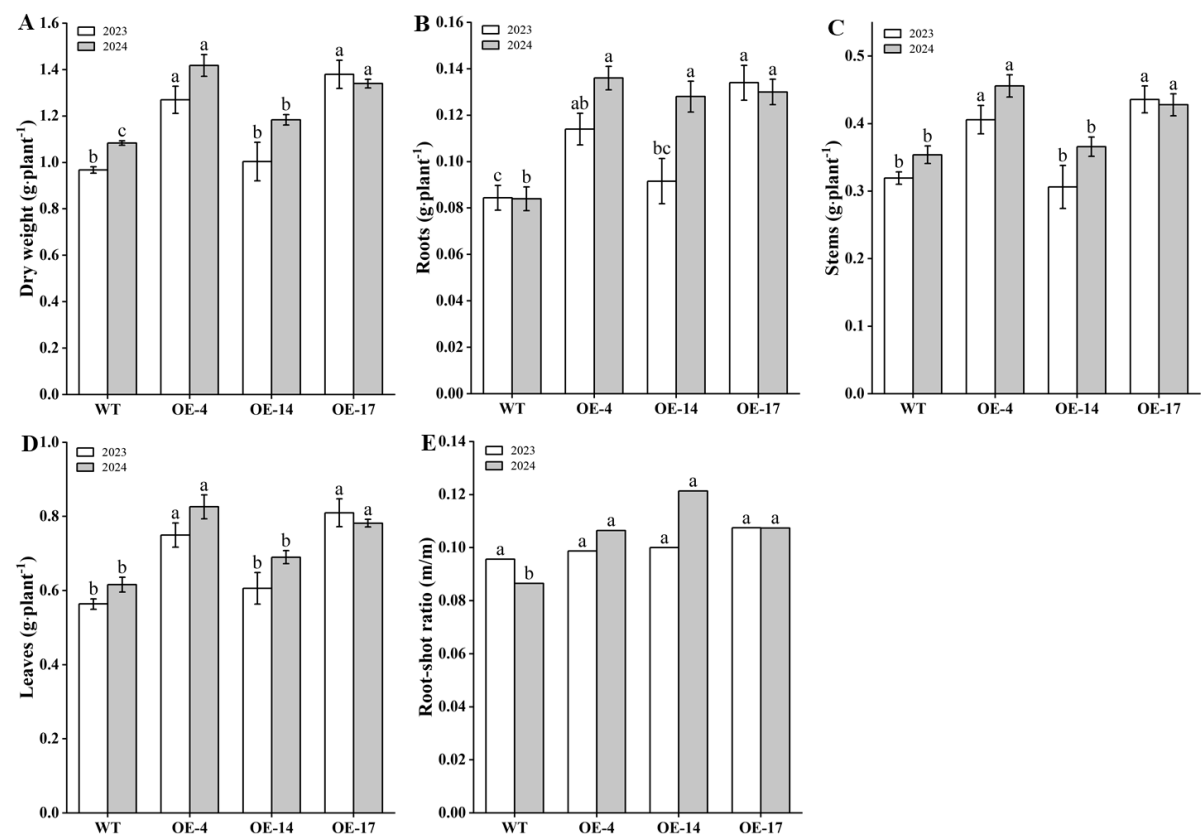


图 3-2 2023 年和 2024 年转基因棉花苗期生物量

Figure 3-2 Seedling biomass of transgenic cotton in 2023 and 2024

注: A. 单株生物量; B. 单株根生物量; C. 单株茎生物量; D. 单株叶生物量; E. 根冠比。数据采用单因素方差分析和邓肯多重比较, 用平均值±标准差表示, 显著性差异用 a、b 和 c 表示, $p<0.05$ 。

Note: A. Biomass per plant; B. Root biomass per plant; C. Stem biomass per plant; D. Leaf biomass per plant; E. root-shoot ratio. Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple comparisons, expressed as mean ± standard deviation, and significant differences are expressed as a, b, and c, $p<0.05$.

3.4.1.2 转基因棉花蕾期生物量

2023 年田间试验数据显示,转基因株系在单株及各器官生物量分配中呈现显著差异,如图 3-3 所示。转基因株系 OE-4 单株总生物量 (37.59 ± 2.163 g) 较 WT (19.65 ± 1.359 g) 显著增加 91.30% ($p < 0.001$), OE-17 (31.21 ± 2.233 g, 58.83%) 与 OE-14 (29.19 ± 2.226 g, 48.55%) 增幅显著 (图 3-3A, $p < 0.01$)。如图 3-3B-E 所示, OE-4 根生物量 (3.14 ± 0.166 g) 增加 50.24% ($p = 0.001$), OE-14 (2.76 ± 0.202 g, 32.06%, $p < 0.05$) 差异显著, OE-17 (2.48 ± 0.175 g, 18.66%, $p = 0.130$)。OE-4 茎生物量 (12.86 ± 0.934 g) 增加 87.19% ($p < 0.001$), OE-14 (10.12 ± 0.732 g, 47.31%) 与 OE-17 (10.67 ± 0.833 g, 55.31%) 差异显著 ($p < 0.05$)。OE-4 叶生物量 (20.63 ± 1.112 g) 增加 102.85% ($p < 0.001$), OE-14 (15.70 ± 1.392 g, 54.38%) 与 OE-17 (17.27 ± 1.332 g, 69.81%) 差异显著 ($p < 0.05$)。OE-4 蕾生物量 (0.96 ± 0.064 g) 较 WT (0.52 ± 0.072 g) 显著提升 84.62% ($p < 0.001$), OE-17 (0.80 ± 0.095 g) 增加 53.85% ($p < 0.05$), OE-14 (0.61 ± 0.030 g¹) 增加 17.31% ($p > 0.05$)。OE-4 (0.083) 与 OE-17 (0.090) 根冠比显著低于 WT (0.107, $p < 0.05$), OE-4 (0.095) 无显著差异 ($p = 0.077$)。

2024 年田间试验数据显示 (图 3-3), 转基因株系 OE-4 单株总生物量 (38.48 ± 0.362 g) 较 WT (24.35 ± 0.515 g) 显著增加 58.03% (图 3-3A, $p < 0.001$), OE-14 (30.14 ± 0.363 g, 23.78%) 与 OE-17 (31.08 ± 0.606 g, 23.53%) 增幅次之 ($p < 0.001$)。OE-4 根生物量 (3.54 ± 0.242 g) 增加 52.59% ($p < 0.001$), OE-17 (2.87 ± 0.179 g) 与 OE-14 (2.63 ± 0.117 g) 根生物量增加 23.71% ($p < 0.05$) 和 13.36% ($p = 0.229$)。OE-4 茎生物量 (13.06 ± 0.279 g) 增加 34.09% ($p < 0.001$), OE-17 (11.54 ± 0.500 g) 与 OE-14 (10.65 ± 0.196 g) 茎生物量增加 18.48% ($p = 0.001$) 和 9.34% ($p = 0.057$)。OE-4 叶生物量 (20.85 ± 0.476 g) 增加 81.30% ($p < 0.001$), OE-17 (15.81 ± 0.514 g) 与 OE-14 (16.02 ± 0.381 g) 叶生物量增加 37.48% 和 39.30% ($p < 0.001$), 差异显著。OE-4 蕾生物量 (1.02 ± 0.038 g) 较 WT (0.79 ± 0.050 g) 显著提升 29.11% ($p = 0.001$)。OE-17 (0.86 ± 0.030 g) 与 OE-14 (0.84 ± 0.030 g) 蕾生物量增加 8.86% 和 6.33%, 差异不显著 ($p > 0.05$)。根冠比在各基因型间无显著差异 ($p > 0.05$)。

2023 和 2024 年田间试验数据表明, OE-4 株系总生物量较 WT 增幅达 58.03~91.30% ($p < 0.001$), OE-17 (23.53~58.83%) 和 OE-14 (23.78~48.55%) 次之。各器官生物量积累差异显著, OE-4 根、茎、叶及蕾生物量在 2023 年分别增加 50.24%、87.19%、102.85% 和 84.62% ($p \leq 0.001$), 2024 年增加 52.59%、34.09%、81.30% 和 29.11% ($p \leq 0.001$); OE-17 与 OE-14 茎、叶生物量增幅显著 (9.34~69.81%), 但根和蕾生物量增幅存在年度波动 ($p = 0.057 \sim 0.229$)。2023 年 OE-4 和 OE-17 根冠比较 WT 显著降低 (15.89~24.30%, $p < 0.05$),

而 2024 年无显著差异。结果表明 *SiFBA4* 过表达可显著促进蕾期生物量积累，且 OE-4 株系差异最显著。

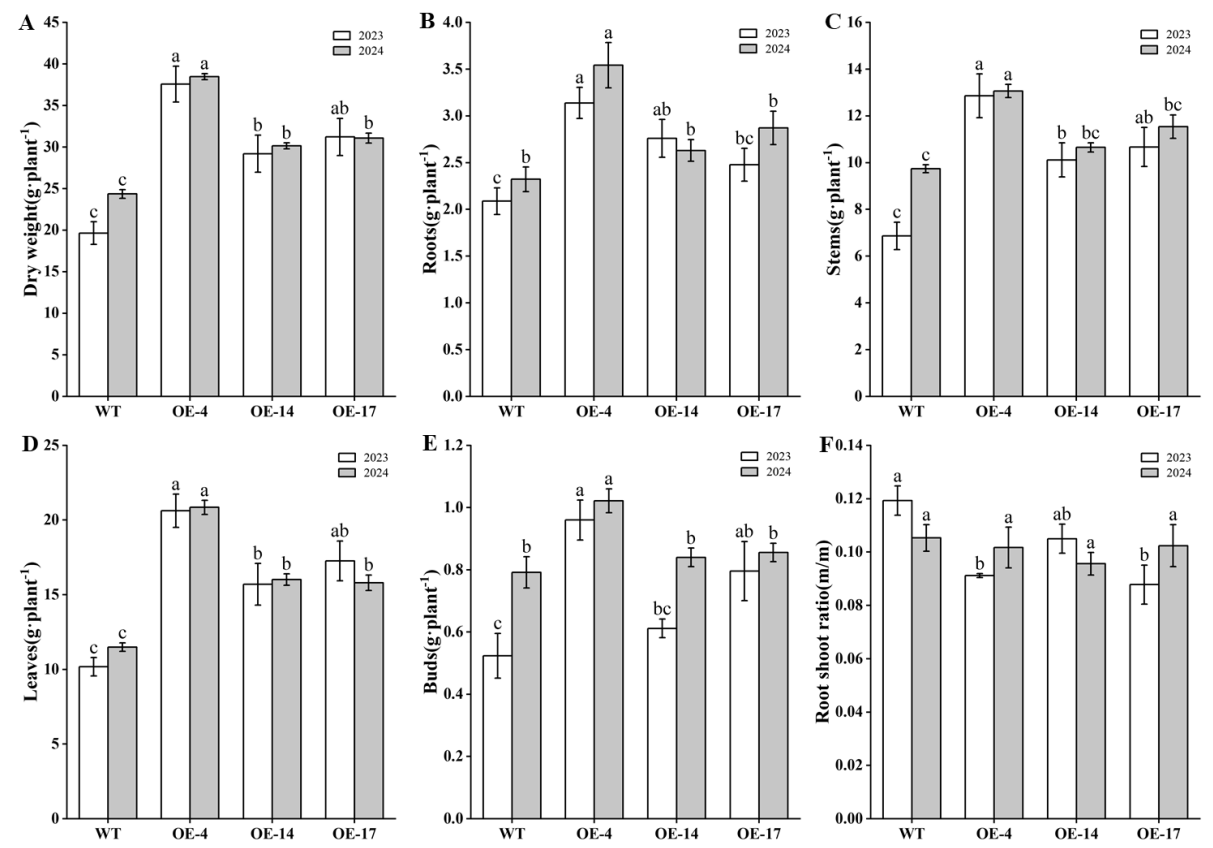


图 3-3 2023 和 2024 年转基因棉花蕾期生物量
Figure 3-3 Transgenic cotton biomass at bud stage in 2023 and 2024

注：A. 单株生物量；B. 单株根生物量；C. 单株茎生物量；D. 单株叶生物量；E. 单株蕾生物量；F. 根冠比。数据采用单因素方差分析和邓肯多重比较，用平均值±标准差表示，显著性差异用 a、b 和 c 表示， $p<0.05$ 。

Note: A. Biomass per plant; B. Root biomass per plant; C. Stem biomass per plant; D. Leaf biomass per plant; E. Biomass per bud; F. Root-shoot ratio. Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple comparisons, expressed as mean ± standard deviation, and significant differences are expressed as a, b, and c, $p<0.05$.

3.4.1.3 转基因棉花铃期生物量

如图 3-4 所示，本研究系统量化了过表达 *SiFBA4* 基因对棉花铃期生物量积累的影响。基于 2023 年田间试验数据分析，转基因株系在单株及各器官生物量分配中呈现显著基因型特异性差异。转基因株系 OE-4 株系单株生物量（ 135.90 ± 3.966 g）较 WT（ 86.87 ± 1.766 g）显著增加 56.47%（ $p<0.001$ ），OE-17 株系（ 128.82 ± 3.667 g）增幅达 48.32%（ $p<0.001$ ），OE-14 株系（ 104.51 ± 2.413 g）增加 20.33%（图 3-4A， $p=0.001$ ）。OE-4 和 OE-17 株系根、茎、叶和铃的生物量显著高于 WT（图 3-4B-E），WT 根、茎、

叶和花铃生物量分别为 5.09 ± 0.322 、 18.82 ± 0.643 、 17.52 ± 0.525 和 45.42 ± 2.032 g。根生物量分别较 WT 高 60.62% (8.18 ± 0.299 g) 和 57.05% (8.00 ± 0.229 g), OE-14 (6.80 ± 0.187 g) 增加 33.45% ($p < 0.001$)。茎生物量较 WT 高 52.36% (26.55 ± 1.429 g) 和 25.24% (23.62 ± 0.966 g, $p < 0.01$), OE-14 (21.22 ± 0.640 g) 增加 12.77% ($p = 0.101$)。叶生物量较 WT 高 52.36% (26.70 ± 1.837 g) 和 48.22% (25.97 ± 1.117 g, $p < 0.01$), OE-14 (20.65 ± 0.782 g) 增加 17.83% ($p = 0.078$)。OE-4 铃生物量 (74.47 ± 1.932 g) 较 WT (45.42 ± 2.031 g) 显著提升 63.96%, OE-17 (63.23 ± 1.782 g) 增加 39.20% ($p < 0.001$), OE-14 (55.85 ± 1.424 g) 增加 22.95% ($p = 0.001$)。根冠比在各基因型间无显著差异 ($p > 0.05$)。

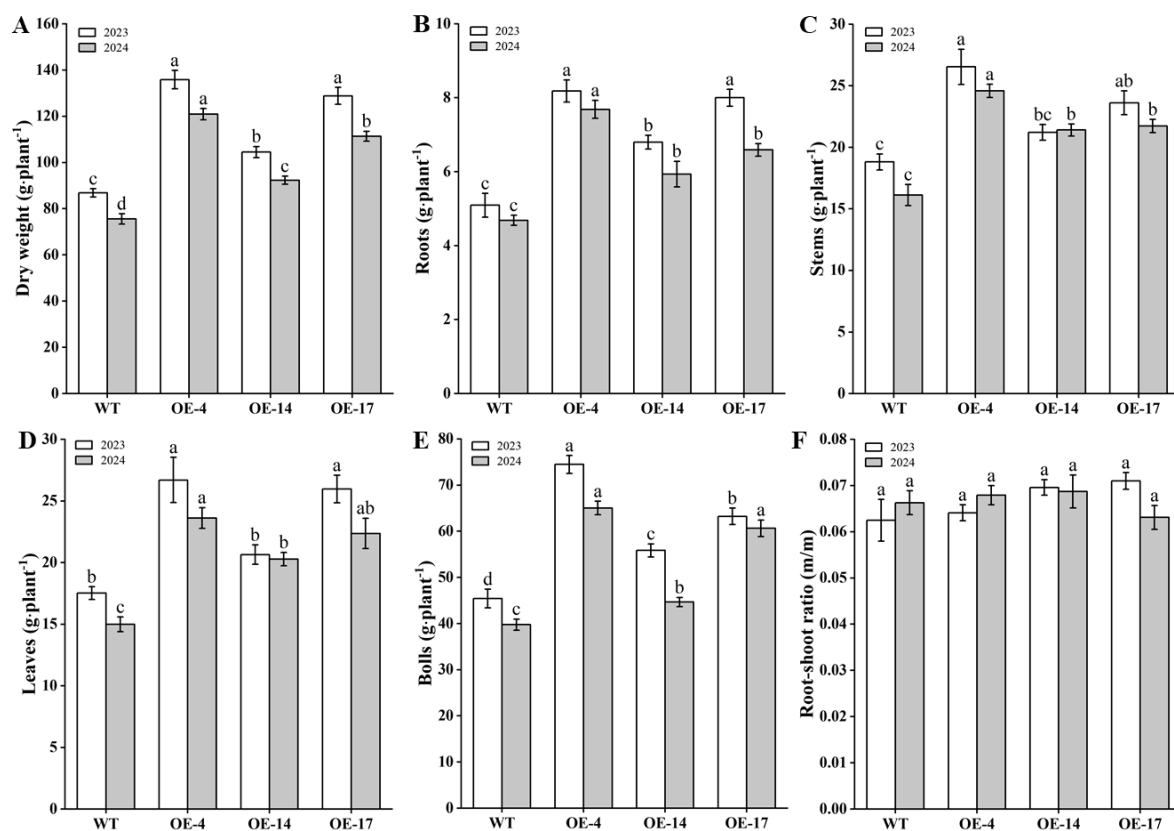


图 3-4 2023 和 2024 年转基因棉花铃期生物量

Figure 3-4 Transgenic cotton biomass at boll stage in 2023 and 2024

注：A. 单株生物量；B. 单株根生物量；C. 单株茎生物量；D. 单株叶生物量；E. 单株花铃生物量；F. 根冠比。数据采用单因素方差分析和邓肯多重比较，用平均值±标准差表示，显著性差异用 a、b 和 c 表示， $p < 0.05$ 。

Note: A. Biomass per plant; B. Root biomass per plant; C. Stem biomass per plant; D. Leaf biomass per plant; E. Flower-boll biomass per plant; F. Root-shoot ratio. Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple comparisons, expressed as mean $\pm$ standard deviation, and significant differences are expressed as a, b, and c, $p < 0.05$.

2024 年独立田间试验数据显示 (图 3-4), OE-4 株系单株生物量 (120.93 ± 2.420 g) 较 WT (75.55 ± 2.234 g) 显著增加 60.07% ($p < 0.001$); OE-17 株系 (111.32 ± 2.139 g) 增加 47.36% ($p < 0.001$), OE-14 株系 (92.30 ± 1.770 g) 增加 22.17% ($p < 0.001$)。转基

因株系各器官生物量显著高于 WT (图 3-4B-E), OE-4 根生物量 (7.69 ± 0.244 g) 较 WT (4.69 ± 0.135 g) 显著增加 63.97% ($p < 0.001$), OE-17 增加 40.51% ($p < 0.001$), OE-14 增幅 26.65% ($p = 0.002$)。OE-4 茎生物量 (24.59 ± 0.543 g) 增加 52.54%, OE-14 (21.41 ± 0.484 g) 增加 32.82%, OE-17 (21.73 ± 0.539 g) 增加 34.80% ($p < 0.001$), WT 为 16.12 ± 0.860 g。OE-4 叶生物量 (23.62 ± 0.843 g) 增加 57.68%, OE-17 (22.37 ± 1.235 g) 增加 49.33%, OE-14 (20.28 ± 0.543 g) 增加 35.38% ($p < 0.001$), WT 为 14.98 ± 0.598 g。OE-4 铃生物量 (65.03 ± 1.462 g) 较 WT (39.76 ± 1.211 g) 显著提升 63.56% ($p < 0.001$), OE-17 (60.64 ± 1.775 g) 增加 52.46% ($p < 0.001$), OE-14 (44.67 ± 0.985 g) 增加 12.35% ($p < 0.05$)。根冠比在各基因型间无显著差异 (图 3-4F, $p > 0.05$)。

本研究分析了过表达 *SiFBA4* 基因对棉花铃期生物量积累的影响。2023-2024 年田间试验表明, 转基因株系 OE-4 单株总生物量较野生型 (WT) 显著增加 56.47~60.07% ($p < 0.001$), OE-17 (47.36~48.32%) 和 OE-14 (20.33~22.17%) 次之。各器官生物量呈基因型特异性提升: OE-4 根、茎、叶及铃生物量在 2023 年分别增加 60.62%、52.36%、52.36% 和 63.96% ($p \leq 0.001$), 2024 年增幅为 63.97%、52.54%、57.68% 和 63.56% ($p < 0.001$); OE-17 茎、叶及铃生物量增幅达 25.24%~52.46% ($p < 0.001$); OE-14 根、茎生物量增幅为 26.65%~33.45% ($p \leq 0.002$)。根冠比在各株系间无显著差异 ($p > 0.05$)。结果表明, *SiFBA4* 过表达可显著促进铃期生物量积累。

3.4.2 光合生理

为了解 *SiFBA4* 转基因株系生物量增加的原因, 进一步对铃期的转 *SiFBA4* 基因棉花的气体交换参数进行了分析。

3.4.2.1 转基因棉花气体交换参数

2023 年统计数据显示 (图 3-5), 净光合速率 (P_n) 在转基因株系显著提高 (图 3-5A), WT 的 P_n 为 29.03 ± 1.018 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, OE-4、OE-14 和 OE-17 分别达到 34.22 ± 0.411 、 32.55 ± 0.399 和 33.65 ± 0.439 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 较 WT 显著增加 17.88%、12.13% 和 15.92% ($p < 0.001$)。气孔导度 (G_s) 在各株系间差异不显著 ($p = 0.148$), 但转基因株系 G_s ($0.11 \pm 0.008 \sim 0.14 \pm 0.008$ $\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) 高于 WT (0.10 ± 0.005 $\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 图 3-5B)。WT (121.25 ± 11.910 $\mu\text{mol}/\text{mol}$) 的胞间 CO_2 浓度 (C_i) 显著高于转基因株系 ($p < 0.01$), 其中 OE-4 和 OE-17 与 WT 差异显著, 分别降低 35.22% 和 33.44% (图 3-5C)。蒸腾速率 (T_r) 分析表明 (图 3-5D), OE-17 株系 (5.42 ± 0.210 $\text{mmol}/\text{m}^2/\text{s}$) 较 WT (4.05 ± 0.177

mmol/m²/s) 显著提高 33.80% ($p=0.032$), 而 OE-4 和 OE-14 株系的 Tr (4.71 ± 0.239 和 4.47 ± 0.125 mmol/m²/s) 与 WT 间无统计学差异 ($p>0.05$)。

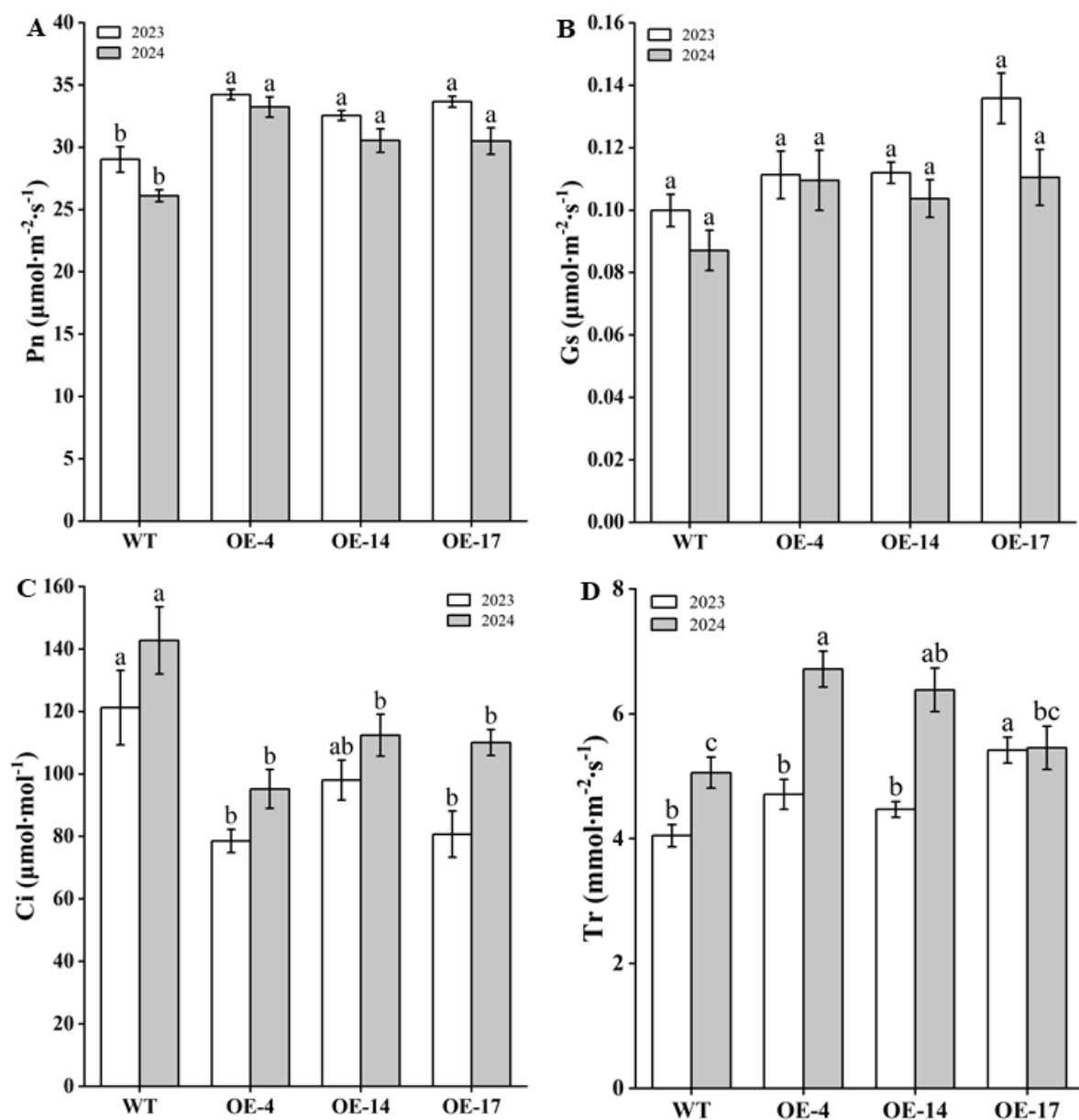


图 3-5 2023 年和 2024 年转基因棉花气体交换参数

Figure 3-5 Gas exchange parameters of transgenic cotton in 2023 and 2024

注: A. 净光合速率; B. 气孔导度; C. 胞间二氧化碳浓度; D. 蒸腾速率。数据采用单因素方差分析和邓肯多重比较, 用平均值±标准差表示, 显著性差异用 a、b 和 c 表示, $p<0.05$ 。

Note: A. Net photosynthetic rate; B. Stomatal conductance; C. Intercellular carbon dioxide concentration; D. Transpiration rate. Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple comparisons, expressed as mean ± standard deviation, and significant differences are expressed as a, b, and c, $p<0.05$.

基于 2024 年铃期光合参数,如图 3-5A 所示, P_n 在转基因株系中呈现显著提升, OE-4、OE-14、OE-17 分别达到 33.24 ± 0.816 、 30.55 ± 0.947 和 $30.49 \pm 1.058 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 较 WT ($26.11 \pm 0.479 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) 增加 27.31%、17.01% 和 16.78% ($p < 0.001$)。Gs 在各株系间无统计学差异 ($p = 0.203$), 但转基因株系 Gs 值 ($0.10 \sim 0.11 \text{ mol}/\text{m}^2/\text{s}$) 较 WT ($0.09 \text{ mol}/\text{m}^2/\text{s}$) 有所提高(图 3-5B)。Ci 数据显示(图 3-5C), WT ($142.76 \pm 10.747 \mu\text{mol}/\text{mol}$) 显著高于转基因株系 ($p < 0.01$), 其中 OE-4 株系的 Ci 降幅达 33.32% ($p < 0.001$)。Tr 分析表明(图 3-5D), OE-4 ($6.72 \pm 0.287 \text{ mmol}/\text{m}^2/\text{s}$) 和 OE-14 ($6.38 \pm 0.348 \text{ mmol}/\text{m}^2/\text{s}$) 株系较 WT ($5.06 \pm 0.247 \text{ mmol}/\text{m}^2/\text{s}$) 显著提高 32.76% 和 26.18% ($p < 0.05$), 而 OE-17 株系 ($5.46 \pm 0.348 \text{ mmol}/\text{m}^2/\text{s}$) 与 WT 间无显著差异 ($p = 0.124$)。

结合两年数据分析显示(2023-2024), 转基因株系平均 P_n 值较 WT 增加 $4.88 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ($p < 0.001$)。结果表明, *SiFBA4* 基因过表达可显著提高棉花光合效率, 具体表现为 P_n 提升与 Ci 降低。

3.4.2.2 转基因棉花光合色素含量变化

叶绿素作为光合色素, 在光化学反应中发挥着光能吸收的功能, 最大限度的保证将吸收的光量子转移到反应中心^[142]。因此, 进一步分析了转基因株系叶绿素含量的变化。

2023 年, 铃期叶绿素测定显示(图 3-6), 转基因株系在光合色素积累与组成比例上呈现显著改变 ($p < 0.05$)。转基因株系的叶绿素 a (Chl a) 含量分别为 1.22 ± 0.032 、 1.29 ± 0.022 和 $1.06 \pm 0.028 \text{ mg}/\text{g}$, 较 WT ($0.94 \pm 0.033 \text{ mg}/\text{g}$) 显著增加 30.19%、37.30% 和 13.05% (图 3-6A)。叶绿素 b (Chl b) 含量较 WT ($0.26 \pm 0.015 \text{ mg g}^{-1}$) 显著增加 9.60%~27.33% (图 3-6B)。转基因株系总叶绿素含量 ($1.34 \pm 0.031 \sim 1.61 \pm 0.014 \text{ mg}/\text{g}$) 较 WT ($1.19 \pm 0.048 \text{ mg}/\text{g}$) 提高 24.45%。OE-4 (4.32 ± 0.137) 的 Chl a/b 显著地高于 WT (3.65 ± 0.114), OE-14 和 OE-17 的 Chl a/b 分别为 3.94 ± 0.168 和 3.77 ± 0.182 , 差异不显著。

2024 年叶绿素含量数据显示(图 3-6), 转基因株系的 Chl a 含量分别为 1.24 ± 0.032 、 1.33 ± 0.068 和 $1.46 \pm 0.025 \text{ mg}/\text{g}$, WT 的 Chl a 为 $1.05 \pm 0.507 \text{ mg}/\text{g}$, 较野生型显著提升 18.10~38.09% ($p < 0.05$), 其中 OE-17 株系增幅最大(图 3-6A)。各株系 Chl b 含量差异未达显著水平, WT 为 $0.26 \pm 0.015 \text{ mg}/\text{g}$, 转基因株系为 $0.28 \pm 0.028 \sim 0.32 \pm 0.033 \text{ mg}/\text{g}$ (图 3-6B, $p > 0.05$)。WT 的 Chl T 为 $1.31 \pm 0.054 \text{ mg}/\text{g}$, 转基因株系分别较 WT 提高 19.15% ($1.56 \pm 0.015 \text{ mg}/\text{g}$)、24.76% ($1.63 \pm 0.053 \text{ mg}/\text{g}$) 和 33.04% ($1.74 \pm 0.053 \text{ mg}/\text{g}$), OE-17 株系积累量最高(图 3-6C)。各株系的 Chl a/b 比值分别为 3.36 ± 0.305 、 4.12 ± 0.333 、 4.05 ± 0.122 和 4.32 ± 0.136 , OE-17 株系显著高于 WT (28.77%, $p < 0.05$)。

连续两年实验数据显示, OE-17 株系 Chl a 增幅保持在 13.05~39.03%, Chl T 增幅达 12.30~35.15% ($p<0.01$)。Chl a/b 比值仅在 OE-4 和 OE-17 中稳定高于 WT ($p<0.05$), 表现出基因表达量的差异效应, Chl b 含量无显著变化 ($p>0.05$)。

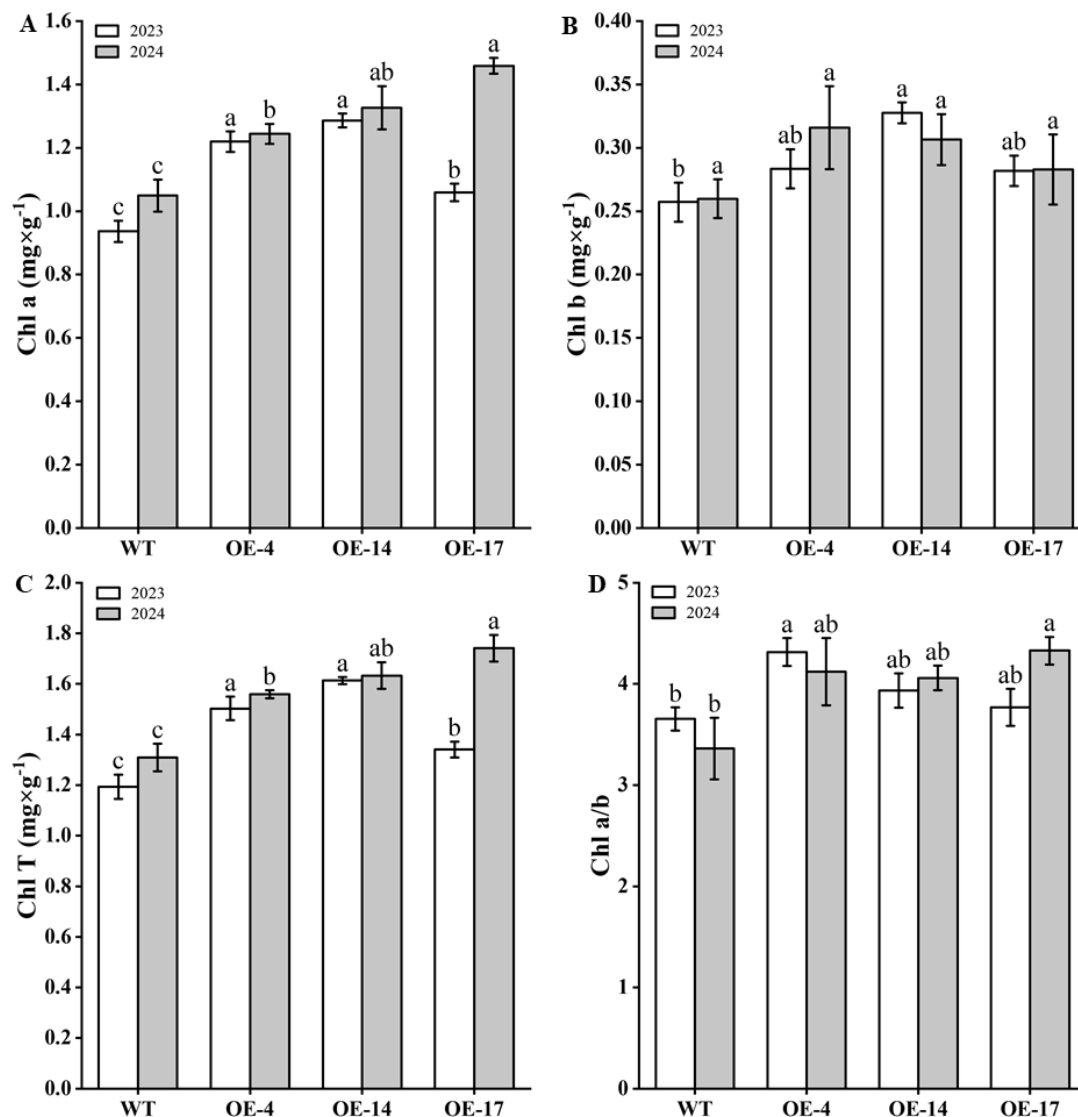


图 3-6 2023 年和 2024 年转基因棉花叶绿素含量

Figure 3-6 Pigment content of transgenic cotton at bud stage in 2023 and 2024

注: A. 叶绿素 a 含量; B. 叶绿素 b 含量; C. 叶绿素含量; D. 叶绿素 a/叶绿素 b。数据采用单因素方差分析和邓肯多重比较, 用平均值±标准差表示, 显著性差异用 a、b 和 c 表示, $p<0.05$ 。

Note: A. Chlorophyll a content; B. Chlorophyll b content; C. Chlorophyll content; D. Chlorophyll a/b. Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple comparisons, expressed as mean ± standard deviation, and significant differences are expressed as a, b, and c, $p<0.05$.

3.4.2.3 转基因棉花酶活性和淀粉含量分析

为了进一步了解因 *SiFBA4* 基因对棉花光合效率和光合产物的影响而引起的生理生化变化情况, 分别对棉花叶片的 FBA、FBP 和 Rubisco 酶活性和淀粉含量进行了测定。

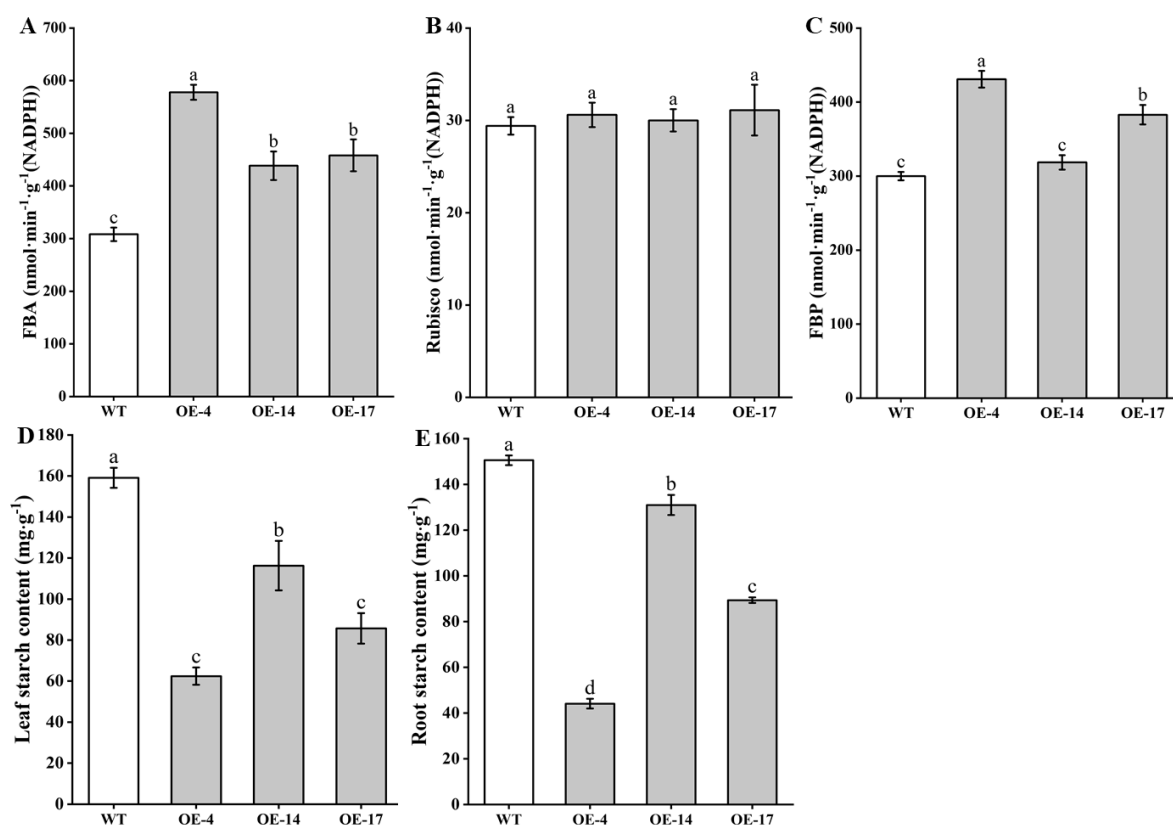


图 3-7 转基因棉花光合作用关键酶活性和淀粉含量

Figure 3-7 Photosynthetic key enzyme activities and starch content in transgenic cotton

注: A. 果糖-1,6-二磷酸醛缩酶活性; B. 核酮糖-1,5-二磷酸加氧酶/羧化酶活性; C. 果糖-1,6-二磷酸酶活性; D. 叶片淀粉含量; E. 根系淀粉含量。数据采用单因素方差分析和邓肯多重比较, 用平均值±标准差表示, 显著性差异用 a、b 和 c 表示, $p < 0.05$ 。

Note: A. Fructose-1, 6-diphosphate aldolase activity; B. Ribulose-1, 5-diphosphate oxygenase/carboxylase activity; C. Fructose-1, 6-biphosphatase activity; D. Leaf starch content; E. Root starch content. Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple comparisons, expressed as mean ± standard deviation, and significant differences are expressed as a, b, and c, $p < 0.05$.

酶活性测定 (图 3-7) 表明, 转基因株系的 FBA 酶活性分别为 578.03 ± 14.301 、 438.55 ± 27.098 和 458.07 ± 30.343 nmol/min/g, 而 WT 的为 308.20 ± 12.780 nmol/min/g (图 3-7A), FBA 酶活性在转基因株系中提高 42.23~87.55% ($p < 0.05$)。OE-4 株系 FBP 酶活性最高 (430.86 ± 11.267 nmol/min/g), OE-17 次之 (382.97 ± 13.120 nmol/min/g)。转基因株系 OE-4 和 OE-17 中 FBP 酶活性较 WT (300.00 ± 5.721 nmol/min/g) 显著提高

27.66~43.62% ($p<0.05$), 而 OE-14 中 FBP 酶活性 (318.55 ± 9.829 nmol/min/g) 与 WT 无统计学差异 (图 3-7C, $p>0.05$)。转基因株系 Rubisco 酶活性值处于 $30.00\pm1.217\sim31.11\pm2.743$ nmol/min/g 范围, 较 WT (29.41 ± 0.951 nmol/min/g) 提高 2.03~5.81%, 但差异未达显著水平 (图 3-7B, $p>0.05$)。

淀粉含量分析显示 (图 3-7D-E), 转基因株系叶片和根系淀粉含量 (叶片: $62.42\pm4.240\sim116.27\pm12.054$ mg/g; 根系: $44.06\pm2.120\sim130.95\pm4.413$ mg/g) 显著低于 WT (叶片: 159.12 ± 4.900 mg/g; 根系: 150.54 ± 2.120 mg/g), OE-4 株系降幅最大 ($p\leq0.005$)。结果表明, *SiFBA4* 过表达增强了 FBA 和 FBP 活性, 提高了光合效率, 降低了光合产物叶片和根系的淀粉含量。

3.4.2.4 转基因棉花生产潜力评估

为了分析 *SiFBA4* 基因对棉花在生物量和产量影响, 本研究通过各生长发育阶段的叶面积、生物量和生育期分析了转基因株系的光合势 (LAD)、作物生长率 (CGR) 及净同化率 (NAR)。统计分析显示 (图 3-8), 转基因株系在生产潜力方面显著优于 WT。

2023 年数据显示, 苗期至蕾期 (S-b 阶段) OE-4 和 OE-17 株系的 LAD (6.18 ± 0.256 和 5.54 ± 0.330 m²/d) 较 WT (3.58 ± 0.148 m²/d) 提高 72.92% 和 54.87% (图 3-8A, $p<0.05$)。CGR 分析表明 (图 3-8B), WT (0.29 ± 0.209 g/m²) 较转基因株系降低 32.81~48.92% (OE-4: 0.57 ± 0.033 g/m²; OE-14: 0.43 ± 0.035 g/m²; OE-17: 0.46 ± 0.035 g/m²)。NAR 仅在 OE-4 株系 (9.00 ± 0.920 g/m²/d) 与 WT (5.31 ± 0.562 g/m²/d) 间存在显著差异 (图 3-8C, $p<0.05$)。苗期至铃期 (S-B 阶段) 转基因株系 LAD ($7.92\pm0.356\sim11.40\pm0.613$ m²/d) 较 WT (6.58 ± 0.232 m²/d) 提高 16.84~42.25% (图 3-8D, $p<0.05$)。CGR 数据显示 (图 3-8E), WT (0.95 ± 0.020 g/m²) 显著低于转基因株系 (OE-4: 1.50 ± 0.044 g/m²; OE-14: 1.15 ± 0.026 g/m²; OE-17: 1.42 ± 0.040 g/m²)。OE-4 株系的 NAR (16.15 ± 0.313 g/m²/d) 较 WT (11.98 ± 0.877 g/m²/d) 提高 25.84%, 差异达显著水平 (图 3-8F, $p<0.05$)。

2024 年数据与 2023 年趋势一致, 转基因株系在 LAD、CGR 及 NAR 等参数持续表现显著优势 ($p<0.05$)。苗期至蕾期 (S-b 阶段) 转基因株系的 LAD ($4.53\pm0.245\sim5.45\pm0.156$ m²/d) 较 WT (3.56 ± 0.141 m²/d) 提高 27.00~53.00% (图 3-8A)。WT 的 CGR 显著低于转基因株系, 其中 OE-4 株系的 CGR 值 0.57 ± 0.005 g/m², WT、OE-14 和 OE-17 株系的 CGR 分别为 0.36 ± 0.008 、 0.44 ± 0.006 和 0.46 ± 0.009 g/m² (图 3-8B)。仅 OE-4 株系的 NAR 较 WT (6.59 ± 0.403 g/m²/d) 显著增加 20.93% ($p<0.05$), 转基因株系分别为 8.33 ± 0.441 、 5.78 ± 0.220 和 5.46 ± 0.193 g/m²/d (图 3-8C)。苗期至铃期 (S-B 阶段) 转基因株的 LAD 较 WT 显著提高 26.21~49.28%, WT 和转基因株系的 LAD 依次为 5.81 ± 0.208 (WT)、 11.45 ± 0.712 、 7.87 ± 0.299 和 8.50 ± 0.383 m²/d (图

3-8D)。WT 的 CGR ($0.83 \pm 0.025 \text{ m}^2/\text{d}$) 显著低于转基因株系, 转基因株系的 CGR 依次为 1.33 ± 0.027 、 1.01 ± 0.020 和 $1.22 \pm 0.024 \text{ g/m}^2/\text{d}$ (图 3-8E)。OE-4 ($13.01 \pm 0.439 \text{ g/m}^2/\text{d}$) 和 OE-17 ($12.86 \pm 0.425 \text{ g/m}^2/\text{d}$) 的 NAR 显著高于 WT ($10.61 \pm 0.717 \text{ g/m}^2/\text{d}$, $p < 0.05$), 而 OE-14 ($11.64 \pm 0.483 \text{ g/m}^2/\text{d}$) 与 WT 无显著差异 (图 3-8F)。

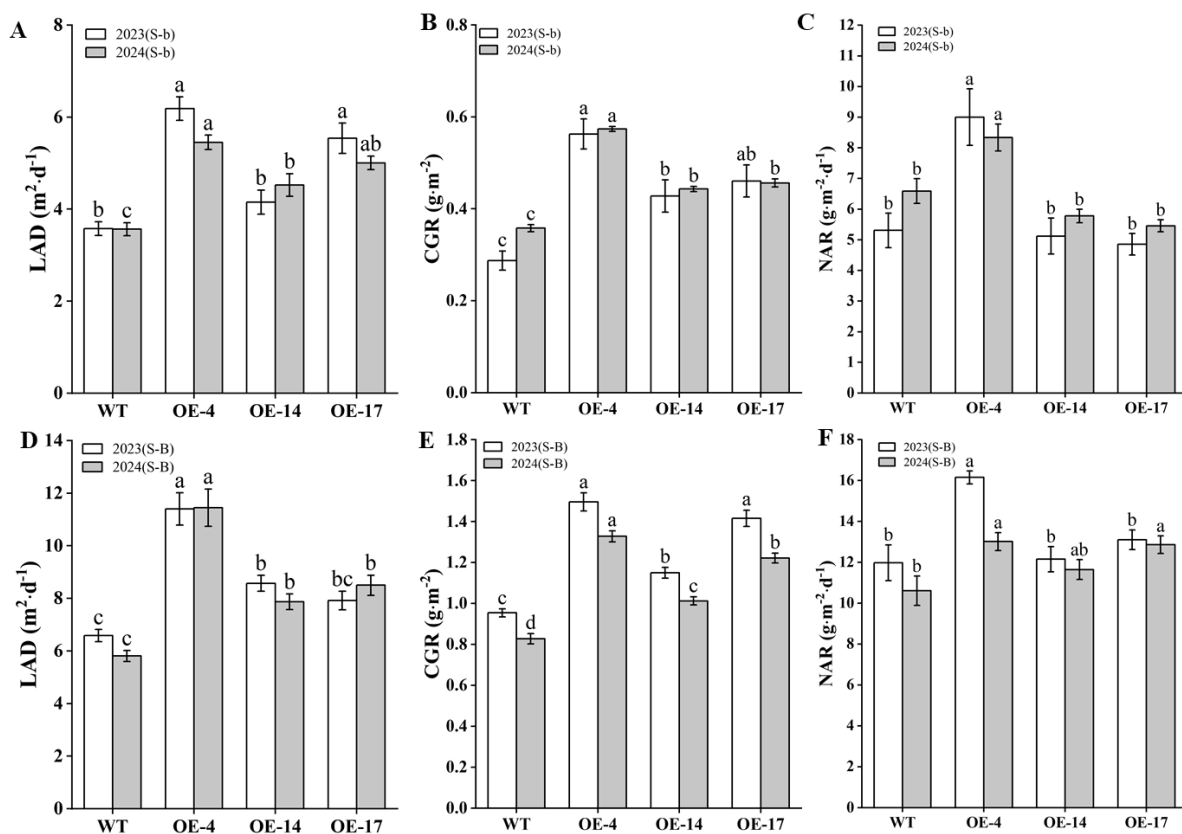


图 3-8 2023 年和 2024 年转基因棉花光合势、作物生长率和净同化率

Figure 3-8 Leaf area duration, crop growth rate, and net assimilation rate of transgenic cotton in 2023 and 2024

注: A. 苗期到蕾期的光合势; B. 苗期到蕾期的作物生长率; C. 苗期到蕾期的净同化率; D. 苗期到铃期的光合势; E. 苗期到铃期的作物生长率; F. 苗期到铃期的净同化率; S-b 表示苗期到蕾期, S-B 表示苗期到铃期。数据采用单因素方差分析和邓肯多重比较, 用平均值 $\pm$ 标准差表示, 显著性差异用 a、b 和 c 表示, $p < 0.05$ 。

Note: A. Leaf area duration from seedling to bud stage; B. Crop growth rate from seedling to bud stage; C. Net assimilation rate from seedling to bud stage; D. Leaf area duration from seedling to boll stage; E. Crop growth rate from seedling to boll stage; F. Net assimilation rate from seedling to boll stage; S-b represents seedling to bud stage, and S-B represents seedling to boll stage. Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple comparisons, expressed as mean $\pm$ standard deviation, and significant differences are expressed as a, b, and c, $p < 0.05$.

两年数据整合分析表明, 转基因株系在 LAD、CGR 及 NAR 等关键生理参数上呈现系统性优势 ($p < 0.05$)。苗期至蕾期 (S-b 阶段) 转基因株系平均 LAD 较 WT 提高 43.9%。CGR 较 WT 增加 51.02%, NAR 较 WT 提高 8.02%。苗期至铃期 (S-B 阶段) LAD 在转

基因株系较 WT 提高 49.87%。CGR 与 NAR 分别较 WT 提高 42.64%和 16.48%。结果表明，*SiFBA4* 基因过表达持续提升的生物量积累，为产量形成提供生理基础。

3.4.3 转基因棉花农艺性状

为了分析 *SiFBA4* 基因过表达对棉花生长发育的影响，连续两年（2023 年和 2024 年）分别对转基因株系在苗期（室外盆栽）、蕾期和铃期的农艺性状（株高、茎粗、蕾铃数和叶面积等）进行了统计分析。

3.4.3.1 转基因棉花叶片气孔特征

气孔作为植物叶片进行气体交换的主要通道，其形态特征和密度直接影响 CO₂ 同化能力。本研究通过显微镜观察，分析了转基因株系与 WT 的气孔表型参数。

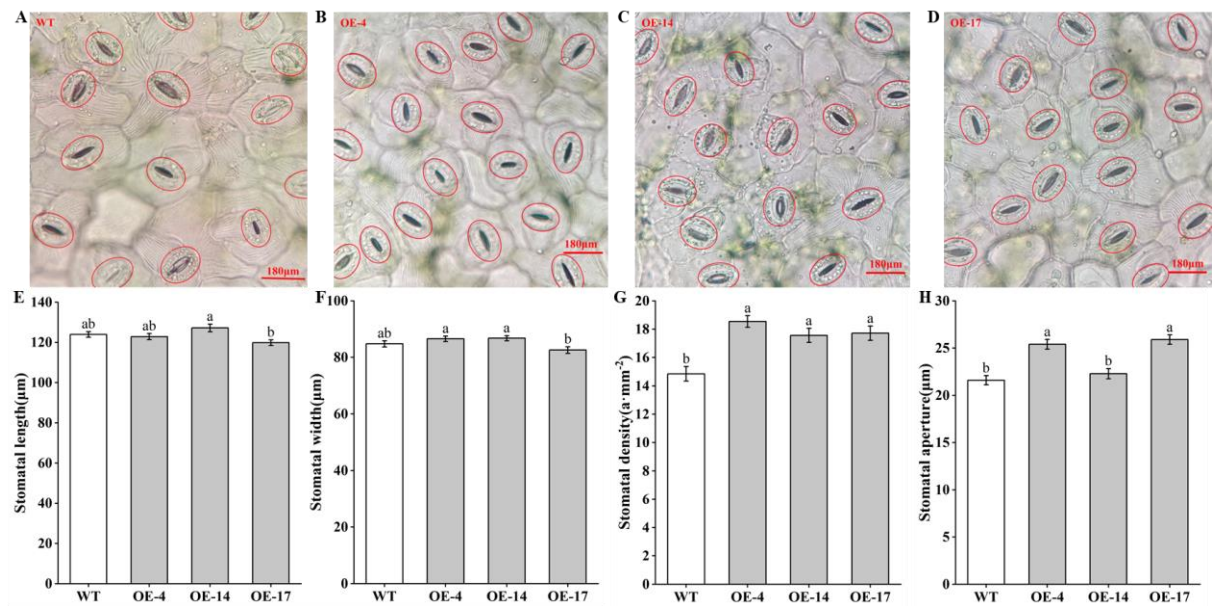


图 3-9 转基因棉花叶片气孔特征

Figure 3-9 Stomatal characteristics of transgenic cotton leaves

注：A. WT 气孔；B. OE-4 气孔；C. OE-14 气孔；D. OE-17 气孔；E. 气孔长度；F. 气孔宽度；G. 气孔密度；H. 气孔开度。数据采用单因素方差分析和邓肯多重比较，用平均值±标准差表示，显著性差异用 a、b 和 c 表示，*p*<0.05；红色标尺表示长度为 180µm。

Note: A. Stomata of WT; B. Stomata of OE-4; C. Stomata of OE-14; D. Stomata of OE-17; E. Stomatal length; F. Stomatal width; G. Stomatal density; H. Stomatal aperture. Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple comparisons, expressed as mean ± standard deviation, and significant differences are expressed as a, b, and c, *p*<0.05; Red bar indicates length of 180µm.

如图 3-9A-D 所示, 叶片气孔结构完整, 发育正常。形态特征数据显示, 转基因株系与 WT 在气孔长度 ($p=0.314$) 和宽度 ($p=0.465$) 方面无统计学差异 (图 3-9E-F)。但在气孔密度方面 (图 3-9G), OE-4、OE-14 和 OE-17 分别达到 18.54 ± 0.409 、 17.57 ± 0.497 和 17.72 ± 0.502 个/ mm^2 , 较 WT (14.85 ± 0.517 个/ mm^2) 显著增加 24.87%、18.25% 和 19.31% ($p<0.01$)。气孔开度分析显示 (图 3-9H), OE-4 ($25.40 \pm 0.520 \mu\text{m}$) 和 OE-17 ($25.90 \pm 0.500 \mu\text{m}$) 的开度显著高于 WT ($21.60 \pm 0.490 \mu\text{m}$, $p<0.05$), 分别增加 17.59% 和 19.91%。而 OE-14 株系 ($22.30 \pm 0.540 \mu\text{m}$) 与 WT 间无显著差异 ($p=0.236$)。结果表明, 转基因株系通过提高气孔密度 (平均增加 20.81%) 和气孔开度, 可能增强叶片表皮气体交换能力。气孔特征的改变与光合速率提升 (图 3-5A) 具有一致性, 提示气孔参数变化可能是影响碳同化效率原因之一。

3.4.3.2 转基因棉花萌发与生育期特征

为了解转基因株系的发芽状态和各生育期生长持续时间, 分别在室内和田间统计种子的发芽势和发芽率, 并对室内胚根长度和田间生育期进行了动态监测。

如图 3-10 所示, *SiFBA4* 过表达对转基因株系萌发特性及生育周期产生显著影响 ($p<0.05$)。室内萌发实验数据显示 (图 3-10B-C), 转基因株系 OE-4、OE-14 和 OE-17 的发芽势较 WT 下降 8.66~31.33% ($p<0.05$), 发芽率降低 3.67~6.00%。具体而言, WT 的发芽势和发芽率分别为 $93.33 \pm 1.202\%$ 和 $98.00 \pm 0.577\%$, 而 OE-4、OE-14、OE-17 的发芽势依次为 $84.67 \pm 1.202\%$ 、 $82.67 \pm 1.764\%$ 、 $62.00 \pm 1.528\%$, 发芽率分别为 $93.33 \pm 1.764\%$ 、 $94.67 \pm 0.333\%$ 、 $92.00 \pm 1.155\%$ 。胚根生长动态监测显示 (图 3-10F), 萌发初期 (第 1 天) 各基因型间胚根长度无统计学差异 ($p>0.05$), 但至第 3 天, 转基因株系胚根长度 ($3.55 \pm 0.242 \sim 3.86 \pm 0.295 \text{ cm}$) 较 WT ($4.14 \pm 0.334 \text{ cm}$) 减少 7.27~16.58% ($p<0.05$)。此差异持续至萌发第 7 天, WT 胚根长度为 $5.82 \pm 0.296 \text{ cm}$, 较 OE-4 ($4.91 \pm 0.205 \text{ cm}$)、OE-14 ($5.12 \pm 0.196 \text{ cm}$)、OE-17 ($5.00 \pm 0.278 \text{ cm}$) 分别长 0.91、0.70、0.82 cm。

田间出苗分析表明 (图 3-10D-E), WT 田间发芽势 ($71.97 \pm 1.017\%$) 较转基因株系高 24.58~25.14%, 发芽率 ($97.57 \pm 0.567\%$) 较转基因株系 ($88.67 \pm 1.571 \sim 89.64 \pm 1.765\%$) 高 7.93~8.90% ($p<0.05$)。生育周期观测数据 (图 3-10G) 显示, 转基因株系从播种至出苗所需时间较 WT 延长 2.3~3.1 d, 全生育期延长 5.8~7.2 d, 但现蕾期至花期的生殖生长阶段较 WT 缩短 1.5~2.3 d。

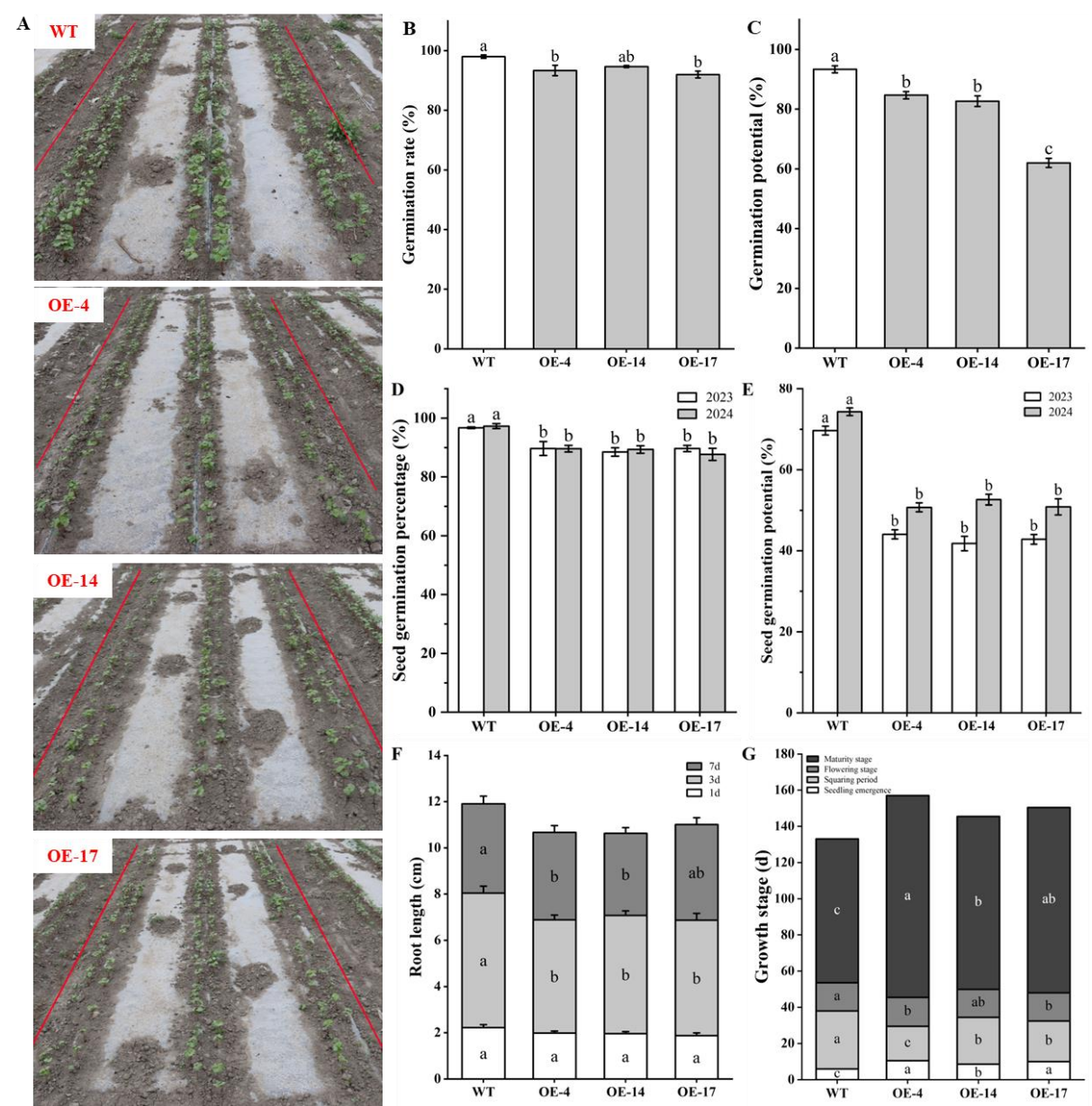


图 3-10 转基因棉花萌发状态与生育期特征

Figure 3-10 Germination status and growth period characteristics of transgenic cotton

注：A. 田间发芽状态；B. 室内发芽率；C. 室内发芽势；D. 田间发芽率；E. 田间发芽势；F. 种子室内发芽期间胚根长度统计；G. 生育期统计。数据采用单因素方差分析和邓肯多重比较，用平均值±标准差表示，显著性差异用 a、b 和 c 表示， $p<0.05$ 。

Note: A. Field germination status; B. Indoor germination rate; C. Indoor germination potential; D. Field germination rate; E. field germination potential; F. Radicle length statistics during germination in seed chamber; G. growth period statistics. Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple comparisons, expressed as mean ± standard deviation, and significant differences are expressed as a, b, and c, $p<0.05$.

3.4.3.3 转基因棉花苗期农艺性状

如图 3-11 所示, 转基因株系连续两年在株高、下胚轴、叶面积及群体叶面积指数等指标上表现出显著优势 ($p<0.05$)。

2023 年统计数据显示, 30 日龄转基因株系 OE-4 株高 (27.16 ± 0.671 cm) 较 WT (20.95 ± 0.455 cm) 显著增加 29.64% ($p<0.001$), OE-17 (25.43 ± 0.631 cm, 21.38%, $p<0.001$) 次之, OE-14 (20.41 ± 0.264 cm) 与 WT 无显著差异 ($p=0.476$) (图 3-11B)。转基因株系下胚轴长度较 WT (12.57 ± 0.190 cm) 显著缩短 (OE-4: 10.31 ± 0.396 cm, 17.98%; OE-14: 8.93 ± 0.364 cm, 28.96%; OE-17: 9.62 ± 0.256 cm, 23.47%, $p<0.001$, 图 3-11C)。OE-4 (2.91 ± 0.145 mm)、OE-17 (3.10 ± 0.062 mm) 与 OE-14 (2.66 ± 0.039 mm) 的茎粗较 WT (2.35 ± 0.073 mm) 分别显著增加 23.85%、13.25% 和 31.81% (图 3-11D, $p<0.05$)。OE-4 (4.60 ± 0.163 个) 与 OE-17 (4.7 ± 0.2130 个) 节间数较 WT (3.20 ± 0.133 个) 显著增加 43.75% 和 46.88%, OE-14 (4.00 ± 0.000 个) 增幅 25.00%, 差异显著 (图 3-11E, $p<0.01$)。叶面积方面 (图 3-11F-G), OE-4 单株叶面积 (178.51 ± 9.497 cm²) 较 WT (125.87 ± 5.183 cm²) 显著增加 41.81% ($p<0.001$), OE-17 (168.76 ± 7.431 cm²) 增幅 (34.07%) 次之, OE-14 (155.58 ± 8.478 cm²) 增幅 23.60%, 差异显著 ($p<0.05$)。OE-4 群体叶面积指数 (0.69 ± 0.025) 较 WT (0.50 ± 0.009) 提升 39.82% ($p<0.001$), OE-17 (0.65 ± 0.012) 与 OE-14 (0.59 ± 0.019) 增加 19.45% 和 30.51%, 差异显著 ($p<0.01$)。

2024 年苗期试验数据显示 (图 3-11), 转基因株系在株型参数中呈现基因型特异性差异。OE-4 (25.65 ± 0.336 cm) 与 OE-17 (25.57 ± 0.382 cm) 株高较 WT (20.11 ± 0.434 cm) 分别显著增加 27.55% 与 27.15% ($p<0.001$), OE-14 株高 (21.37 ± 0.576 cm) 与 WT 差异未达显著水平 (图 3-11B, $p=0.051$)。转基因株系下胚轴长度较 WT (13.71 ± 0.348 cm) 显著缩短 (OE-4: 25.31%; OE-14: 29.83%; OE-17: 28.67%, $p<0.001$, 图 3-11C)。转基因株系的茎粗较 WT (2.71 ± 0.069 mm) 增加 7.38% (2.91 ± 0.054 mm)、3.32% (2.80 ± 0.100 mm) 和 10.33% (2.99 ± 0.040 mm), 仅 OE-17 株系显著增加 (图 3-11D, $p<0.05$)。OE-4 (4.40 ± 0.163 个) 与 OE-17 (4.50 ± 0.224 个) 节间数较 WT (3.50 ± 0.167 个) 显著增加 25.71% 和 28.57% ($p<0.001$), OE-14 (3.70 ± 0.153 个) 增幅 5.71%, 差异不显著 (图 3-11E, $p=0.434$)。所有转基因株系单株叶面积显著高于 WT (OE-4: 38.39%; OE-14: 21.23%; OE-17: 33.91%, $p<0.001$)。WT 和转基因株系的单株叶面积依次为 134.90 ± 4.358 、 186.68 ± 7.239 、 163.53 ± 4.173 和 180.64 ± 2.356 cm² (图 3-11F)。OE-4 群体叶面积指数 (0.76 ± 0.029) 较 WT (0.52 ± 0.008) 提升 45.17% ($p<0.001$), OE-17 (0.66 ± 0.024) 与 OE-14 (0.63 ± 0.009) 增加 20.44% 和 26.05%, 差异显著 (图 3-11G, $p<0.01$)。

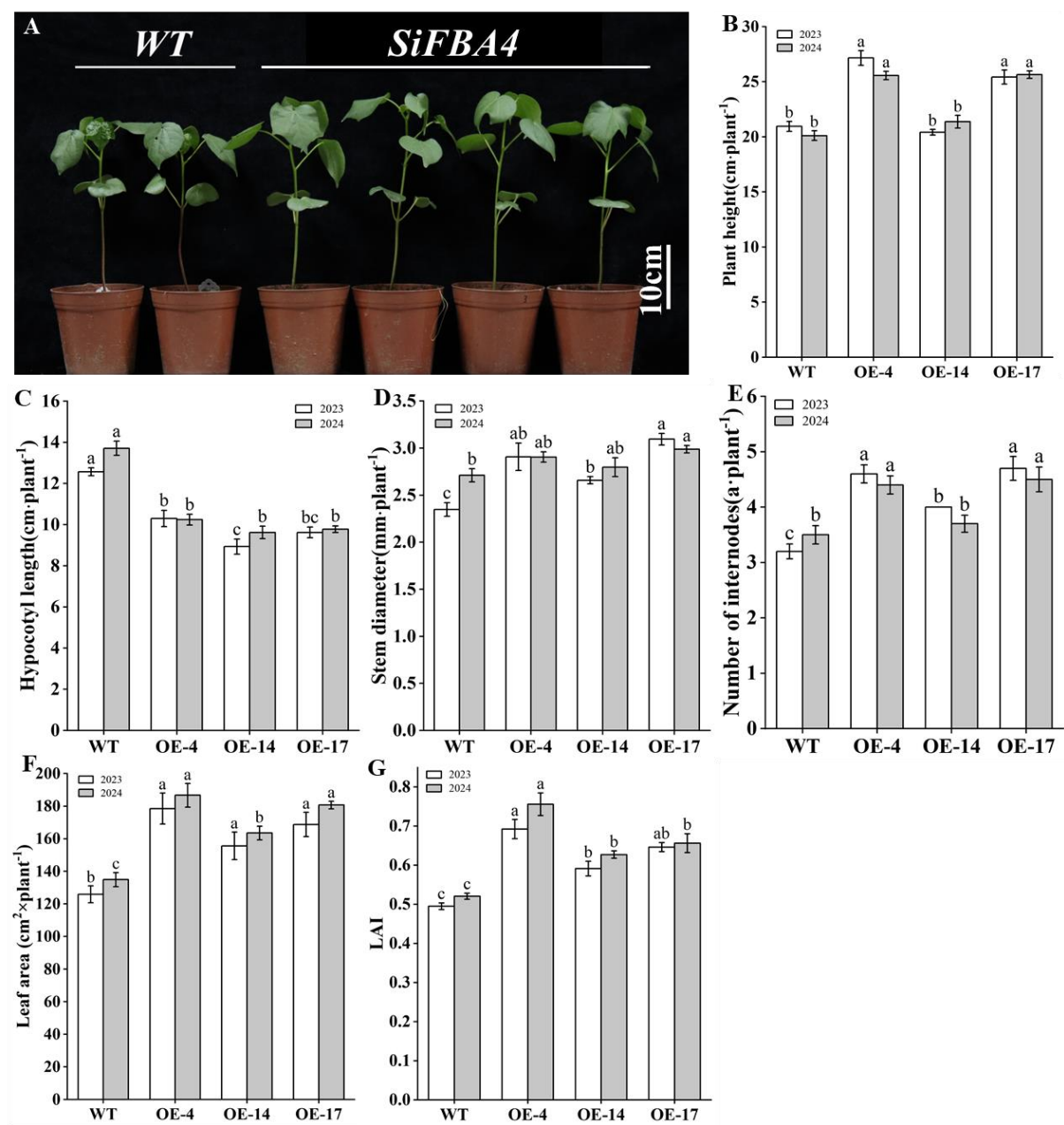


图 3-11 2023 年和 2024 年转基因棉花苗期农艺性状

Figure 3-11 Agronomic traits of transgenic cotton at seedling stage in 2023 and 2024

注：A. 生长表型；B. 株高；C. 下胚轴长度；D. 茎粗；E. 节间数量；F. 单株叶面积；G. 群体叶面积。数据采用单因素方差分析和邓肯多重比较，用平均值±标准差表示，显著性差异用 a、b 和 c 表示， $p<0.05$ 。

Note: A. Growth phenotypes; B. Plant height; C. Hypocotyl length; D. Stem diameter; E. number of internodes; F. Leaf area per plant; G. Population leaf area. Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple comparisons, expressed as mean ± standard deviation, and significant differences are expressed as a, b, and c, $p<0.05$.

综合两年试验结果显示，*SiFBA4* 转基因株系苗期农艺性状呈现显著基因型差异。与 WT 相比，OE-4 和 OE-17 株系株高在 2023 年和 2024 年分别增加 21.38~29.64%和 20.75~27.55% ($p<0.001$)，OE-14 株高无显著变化 ($p>0.05$)。转基因株系下胚轴长度较

WT 缩短 17.98~29.96% ($p<0.001$), 茎粗在部分株系及年度间呈显著增加 (最高达 31.81%)。单株叶面积和群体叶面积指数均显著提升, OE-4 叶面积指数增幅达 39.82~45.17%, 节间数增加 5.71~46.87%。数据表明 *SiFBA4* 过表达可调控棉花苗期株型参数, 对植株形态建成具有显著改良作用。

3.4.3.4 转基因棉花蕾期农艺性状

如图 3-12 所示, 基于 2023 年田间试验数据, 转基因株系在株高、茎粗及蕾数方面表现显著优势。转基因株系 OE-14 株高 (43.18 ± 0.996 cm) 较 WT (35.76 ± 0.511 cm) 显著增加 20.73% ($p<0.001$), OE-4 (39.26 ± 0.455 cm, 9.79%) 与 OE-17 (38.60 ± 0.617 cm, 7.94%) 增幅次之 (图 3-12B, $p<0.05$)。OE-4 茎粗 (7.53 ± 0.245 mm) 较 WT (5.80 ± 0.156 mm) 显著增加 29.83% ($p<0.001$), OE-17 (22.41%) 与 OE-14 (16.55%) 差异显著 (图 3-12C, $p<0.01$), OE-4 与 OE-17 果枝数 (4.30 ± 0.213 和 0.158 个) 较 WT (2.90 ± 0.180 个) 显著增加 38.71% (图 3-12D, $p<0.001$)。OE-17 蕾数 (5.70 ± 0.260 个) 较 WT (3.40 ± 0.163 个) 显著增加 67.65% ($p<0.001$), OE-4 (5.50 ± 0.342 个, 61.76%) 与 OE-14 (5.10 ± 0.277 个, 50.00%) 增幅显著 (图 3-12E, $p<0.01$)。OE-4 节间数 (5.60 ± 0.221 个) 较 WT (4.40 ± 0.267 个) 显著增加 21.60% ($p=0.003$), OE-17 (5.4 ± 0.221 个) 增加 19.20%, OE-14 (5.4 ± 0.221 个) 增加 10.40% (图 3-12F)。叶面积分析表明 (图 3-12 G-H), 转基因株系 OE-4 单株叶面积 (2081.15 ± 74.060 cm²) 较 WT (1226.19 ± 41.531 cm²) 显著增加 69.70% ($p<0.001$), OE-17 ($1,872.77\pm101.725$ cm², 52.73%, $p=0.014$) 差异显著, OE-14 ($1,433.26\pm77.579$ cm², 16.89%, $p=0.527$) 差异不显著。OE-4 群体叶面积指数 (13.67 ± 0.992) 较 WT (7.55 ± 0.252) 提高 81.00% ($p<0.001$), OE-17 (11.10 ± 0.977) 提高 46.94% ($p=0.008$), OE-14 (8.79 ± 0.263) 提高 16.37% ($p=0.259$)。

基于 2024 年田间试验数据 (图 3-12), 如图 3-12B 所示, 转基因株系 OE-4 株高 (43.67 ± 0.653 cm) 较 WT (37.34 ± 0.729 cm) 显著增加 16.94% ($p<0.001$), OE-17 (40.20 ± 0.440 cm, 7.65%) 与 OE-14 (39.44 ± 0.912 cm, 5.62%) 增幅次之 ($p<0.05$)。OE-4 茎粗 (7.92 ± 0.112 mm) 较 WT (6.63 ± 0.178 mm) 显著增加 19.46% ($p=0.002$), OE-14 (6.98 ± 0.182 mm) 与 OE-17 (6.98 ± 0.210 mm) 茎粗差异不显著 (图 3-12C, $p>0.05$)。转基因株系果枝数 ($5.30\pm0.193\sim5.60\pm0.210$ 个) 较 WT (3.70 ± 0.164 个) 增加 43.24%~51.35% ($p<0.01$), 其中 OE-4 增幅最显著 (图 3-12D, $p<0.001$)。OE-4 蕾数 (7.35 ± 0.196 个) 较 WT (4.20 ± 0.200 个) 显著增加 75.00% ($p<0.001$), OE-14 (6.70 ± 0.291 个, 59.52%) 与 OE-17 (6.40 ± 0.234 个, 52.38%) 差异显著 (图 3-12E, $p<0.01$)。转基因株系节间数 ($6.50\pm0.224\sim6.75\pm0.250$ 个) 较 WT (5.30 ± 0.193 个) 增加 22.64~27.36% (图 3-12F, $p<0.05$)。叶面积统计分析表明 (图 3-12G-H), OE-4 单株叶面积

($1864.33 \pm 54.395 \text{ cm}^2$) 较 WT ($1231.42 \pm 42.196 \text{ cm}^2$) 显著增加 59.21% ($p < 0.001$), OE-14 ($1556.09 \pm 75.576 \text{ cm}^2$) 增加 37.00% ($p = 0.02$), OE-17 ($1720.76 \pm 47.725 \text{ cm}^2$) 增加 47.63% ($p < 0.05$)。OE-4 群体叶面积指数 (12.48 ± 1.243) 较 WT (6.66 ± 0.280) 提高 87.44% ($p < 0.001$), OE-14 (9.08 ± 0.233) 提高 36.39%, OE-17 (9.58 ± 0.193) 提高 43.93% ($p < 0.05$)。

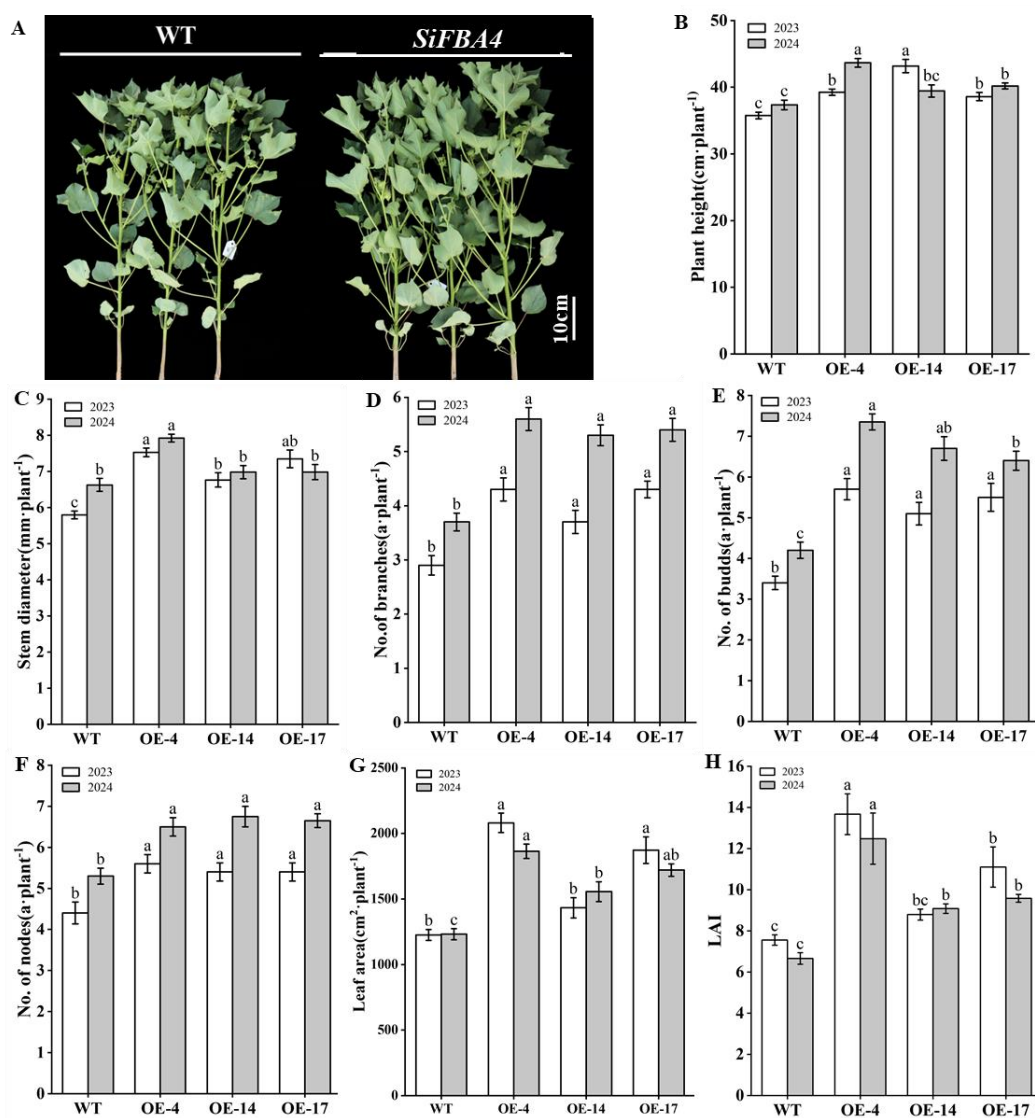


图 3-12 2023 年和 2024 年转基因棉花蕾期农艺性状

Figure 3-12 Agronomic traits of transgenic cotton at bud stage in 2023 and 2024

注: A. 生长表型; B. 株高; C. 茎粗; D. 果枝数; E. 蕾数; F. 节间数; G. 单株叶面积; H. 群体叶面积。数据采用单因素方差分析和邓肯多重比较, 用平均值±标准差表示, 显著性差异用 a、b 和 c 表示, $p < 0.05$ 。

Note: A. Growth phenotypes; B. Plant height; C. Stem diameter; D. Number of fruit branches; E. Number of buds; F. Number of internodes; G. Leaf area per plant; H. Leaf area index. Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple comparisons, expressed as mean $\pm$ standard deviation, and significant differences are expressed as a, b, and c, $p < 0.05$.

2023 和 2024 年田间试验表明,转基因株系 OE-4 和 OE-17 在株型参数(株高 9.79~29.83%、茎粗 19.46~29.83%)及生殖指标(果枝数 38.71~51.35%、蕾数 52.38~75.00%)上均较 WT 显著提升($p<0.05$)。单株叶面积增幅达 16.89%~69.70% (OE-4 最显著, $p<0.001$), 群体叶面积指数最大提升 87.44% ($p<0.001$)。OE-14 株系在茎粗(16.55%)及叶面积(16.37~37.00%)增幅较小。农艺性状分析表明, *SiFBA4* 过表达可促进棉花营养器官与生殖器官发育, 且 OE-4 株系改良效应最显著。

3.4.3.5 转基因棉花铃期农艺性状

如图 3-13 所示, 本研究在连续两年种植过程中调查了过表达 *SiFBA4* 基因对棉花铃期表型特征的调控效应, 基于 2023 年田间试验数据分析, 株高分别为 86.99 ± 1.012 (WT)、 87.51 ± 1.966 (OE-4)、 83.75 ± 1.459 (OE-14) 和 82.08 ± 0.919 cm (OE-17), 仅 OE-17 株高较 WT 显著降低 5.64% ($p=0.016$), 其他株系与 WT 无显著差异(图 3-13A, $p>0.05$)。转基因株系的茎粗显著地高于 WT (图 3-13B), 分别为 9.20 ± 0.229 (WT)、 11.97 ± 0.461 (OE-4)、 9.96 ± 0.261 (OE-14) 和 10.62 ± 0.421 mm (OE-17), OE-4 株系较 WT 显著增加 30.11% ($p<0.001$), OE-14 (8.26%, $p=0.136$) 与 OE-17 (15.43%, $p<0.05$) 增幅次之。转基因株系果枝夹角 ($44.54\pm0.593\sim46.70\pm0.178^\circ$) 较 WT ($55.60\pm0.498^\circ$) 显著减小 15.97%~20.00% ($p<0.001$), 株型更紧凑(图 3-13C)。同时 WT (79.48 ± 3.994 mm) 节间长度较转基因株系显著高 27.32%、24.29%和 24.12%, $p<0.01$ (图 3-13D)。OE-4 和 OE-17 株系的果枝数分别为 10.53 ± 0.424 个和 10.33 ± 0.444 个, 较 WT 显著增多 21.28% (1.83 个) ($p<0.001$), 而 OE-14 较 WT 多 0.40 个果枝 ($p=0.431$), 差异不显著(图 3-13E)。转基因株系的花铃数分别为 18.80 个、13.40 个和 15.00 个, WT 有 9.87 个, OE-4 和 OE-17 株系铃数增幅达 90.54% (OE-4) 和 52.03% (OE-17) ($p<0.001$)。果枝结铃数显著高于 WT, WT、OE-4、OE-14 和 OE-17 果枝的双铃率分别为 15.73%、43.28%、24.92%和 40.45%, OE-4 和 OE-17 双铃率较 WT 显著高出 175.07%和 157.10% ($p<0.001$), OE-14 增幅(58.42%)达显著水平(图 3-13F-G, $p=0.010$)。在叶面积方面(图 3-13H-I), 转基因株系 OE-4 单株叶面积较 WT 显著增加 70.64% ($p<0.001$), 单株叶面积分别为 $1,588.68\pm53.494$ (WT)、 $2,711.59\pm141.573$ (OE-4)、 $2,060.85\pm71.234$ (OE-14) 和 $1,927.86\pm86.143$ cm² (OE-17), 差异显著 ($p<0.05$)。OE-4 群体叶面积指数 (11.91 ± 0.590) 较 WT (6.43 ± 0.275) 提高 85.21% ($p<0.001$), OE-14 (8.69 ± 0.090) 提高 35.09% ($p=0.001$), OE-17 (8.98 ± 0.590) 提高 39.62% ($p=0.001$)。

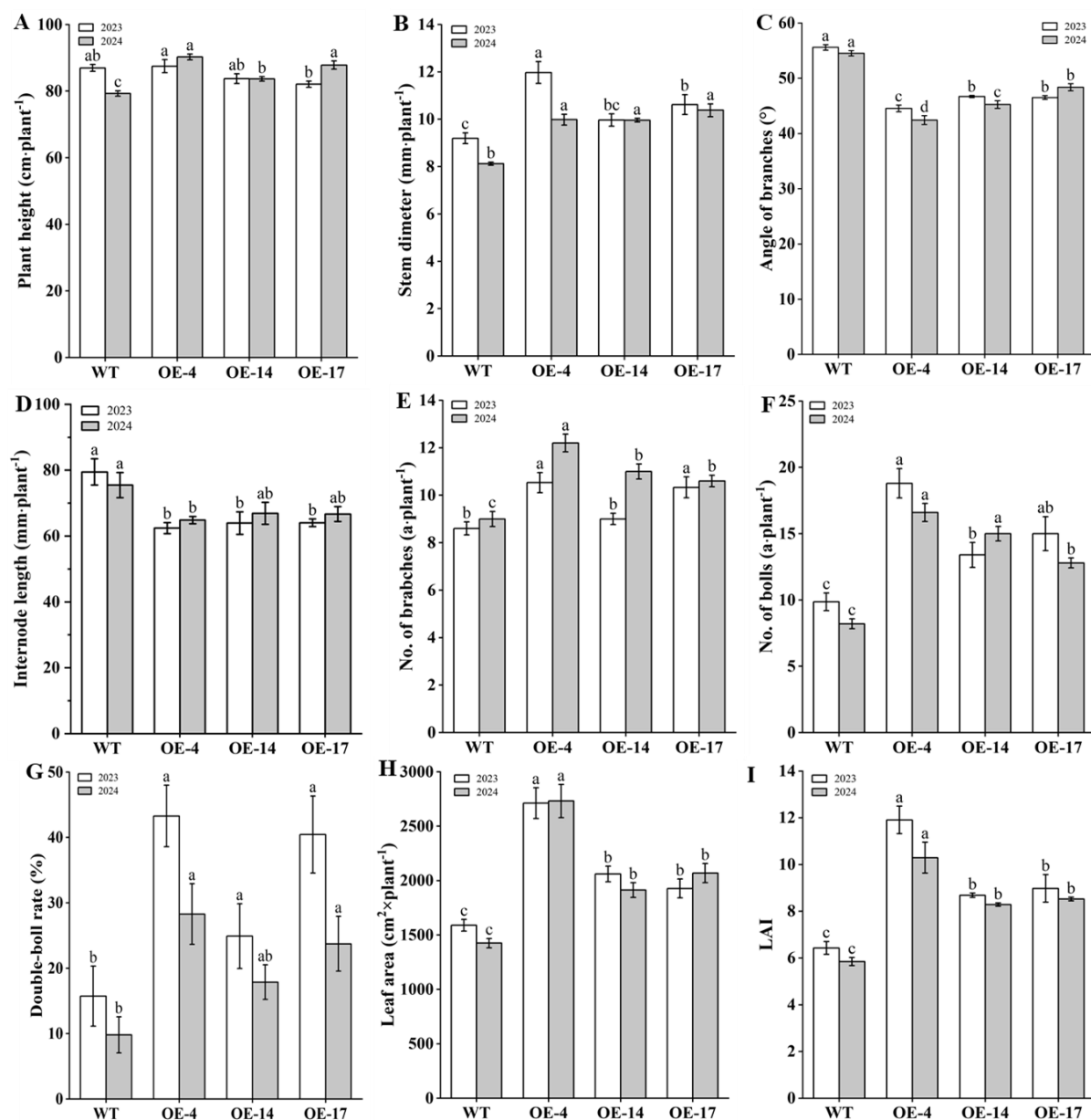


图 3-13 2023 年和 2024 年转基因棉花铃期农艺性状

Figure 3-13 Agronomic traits of transgenic cotton at boll stage in 2023 and 2024

注: A. 株高; B. 茎粗; C. 果枝与主茎夹角; D. 节间长度; E. 花铃数量; F. 果枝数量; G. 双铃率; H. 单株叶面积; I. 群体叶面积指数。数据采用单因素方差分析和邓肯多重比较, 用平均值±标准差表示, 显著性差异用 a、b 和 c 表示, $p < 0.05$ 。

Note: A. Plant height; B. stem diameter; C. Angle between fruit branch and main stem; D. Internode length; E. number of flowers and bolls; F. number of fruit branches; G. double boll rate; H. Leaf area per plant; I. Population leaf area index. Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple comparisons, expressed as mean ± standard deviation, and significant differences are expressed as a, b, and c, $p < 0.05$.

2024 年田间试验数据显示,转基因株系的株型结构与生殖参数表现出与 2023 年相似的模式。WT 的株高为 79.30 ± 0.828 cm, OE-4 株高 (90.28 ± 0.852 cm) 较 WT 显著增加 13.85% ($p < 0.001$), OE-17 株高增加 10.74% ($p < 0.001$), OE-14 与 WT 差异显著 (图 3-13A, $p = 0.004$)。转基因株系茎粗较 WT (8.12 ± 0.066 mm) 增加 22.67%~27.83% ($p < 0.001$),转基因株系依次为 9.98 ± 0.231 、 9.96 ± 0.075 和 10.38 ± 0.271 mm (图 3-13B)。转基因株系夹角 ($42.43 \pm 0.786 \sim 48.39 \pm 0.616^\circ$) 较 WT ($54.54 \pm 0.497^\circ$) 显著减小 11.27%~22.19% (图 3-13C, $p < 0.01$)。转基因株系节间长度 ($64.84 \pm 1.108 \sim 66.89 \pm 3.319$ mm) 较 WT (75.47 ± 3.836 mm) 显著减小 12.82%~16.40% (图 3-13D, $p < 0.05$)。相对于 2023 年,2024 年的果枝数普遍的增多,OE-4 果枝数 (12.20 ± 0.374 个) 较 WT (9.00 ± 0.316 个) 提升 35.56% ($p < 0.001$), OE-17 增加 17.78% ($p < 0.001$), OE-14 增加 22.22% (图 3-13E, $p < 0.01$)。转基因株系 OE-4 铃数 (16.60 ± 0.678 个) 较 WT (8.20 ± 0.374 个) 增幅达 102.44%, OE-14 (82.93%) 与 OE-17 (56.10%) ($p < 0.001$), 差异显著。WT、OE-4、OE-14 和 OE-17 果枝的双铃率分别为 9.8%、28.28%、17.87%和 23.73%, OE-4 和 OE-17 显著高于 WT (图 3-13F-G, $p < 0.01$)。在叶面积方面 (图 3-13H-I), 转基因株系 OE-4 单株叶面积较 WT 显著增加 70.64% ($p < 0.001$), 单株叶面积分别为 $1,425.36 \pm 43.375$ (WT)、 $1,912.42 \pm 67.890$ (OE-4)、 $2,069.36 \pm 87.468$ (OE-14) 和 $2,730.72 \pm 152.775$ cm² (OE-17), 差异显著 ($p < 0.01$)。OE-4 群体叶面积指数 (10.29 ± 0.662) 较 WT (5.85) 提高 76.06% ($p < 0.001$), OE-14 (8.29 ± 0.071) 提高 41.73% ($p = 0.001$), OE-17 (8.53 ± 0.076) 提高 45.83% ($p = 0.001$)。

2023-2024 年田间试验表明,转基因株系 OE-4 和 OE-17 茎粗较 WT 显著增加 15.43~30.11% ($p < 0.05$),果枝夹角减小 11.27~22.19% ($p < 0.01$),节间长度减小 12.82~27.32% ($p < 0.05$)。OE-4 果枝数较 WT 增加 21.28~35.56% ($p < 0.001$),花铃数增幅达 51.98~102.44% ($p < 0.001$), 双铃率显著提高 157.10~175.07% ($p < 0.01$)。单株叶面积及群体叶面积指数分别提升 70.64~85.21% (OE-4 最显著, $p < 0.001$)。结果表明, *SiFBA4* 基因过表达能够改变株型结构并提高生殖生长效率。

3.4.4 成熟期产量与纤维品质性状

为了解棉花产量和纤维品质的变化,本研究对成熟期产量性状(单铃重、单株重、棉铃数、产量)和纤维品质(长度、强度、整齐度、伸长率、马克隆)进行了统计分析。

3.4.4.1 转基因棉花产量分析

如图 3-14 所示, 基于 2023 年田间试验数据, 本研究分析了 *SiFBA4* 基因过表达对棉花产量构成因子的影响。转基因株系单位面积产量显著高于 WT (图 3-14B), OE-4、OE-14、OE-17 分别达到 5.81 ± 0.234 、 5.72 ± 0.142 和 $5.69 \pm 0.374 \times 10^3$ kg/ha, 较 WT ($4.80 \pm 0.167 \times 10^3$ kg/ha) 提升 20.99%、19.16% 和 18.58% ($p < 0.001$)。OE-4 株系单株棉铃数 (10.01 ± 0.429 个) 较 WT (7.95 ± 0.266 个) 显著增加 25.91% ($p < 0.01$), 而 OE-14 (8.90 ± 0.261 个) 和 OE-17 (9.05 ± 0.336 个) 株系与 WT 间差异未达显著水平 (图 3-14C, $p = 0.067 \sim 0.083$)。单株籽棉重仅 OE-4 株系 (58.27 ± 2.411 g) 较 WT (46.31 ± 1.522 g) 显著提升 25.83% ($p < 0.05$), OE-14 (51.37 ± 1.574 g) 和 OE-17 (51.42 ± 1.351 g) 株系与 WT 间无统计学差异 (图 3-14D, $p > 0.05$)。各株系单铃籽棉重 ($5.68 \pm 0.134 \sim 5.83 \pm 0.085$ g) 与 WT (5.83 ± 0.085 g) 无显著差异 (图 3-14E, $p = 0.456$)。

基于 2024 年田间试验数据 (图 3-14), 转基因株系单位面积产量呈现年度稳定性 (图 3-14B), OE-4 ($5.76 \pm 0.145 \times 10^3$ kg/ha) 和 OE-17 ($5.67 \pm 0.324 \times 10^3$ kg/ha) 较 WT ($4.77 \pm 0.124 \times 10^3$ kg/ha) 分别提升 20.75% 和 18.87% ($p < 0.001$), 而 OE-14 株系 ($5.49 \pm 0.267 \times 10^3$ kg/ha) 与 WT 间差异未达统计学显著水平 ($p = 0.052$)。转基因株系棉铃数均高于 WT (13.48~16.85%), 其中仅 OE-4 株系 (10.40 ± 0.373 个) 与 WT (8.90 ± 0.280 个) 差异显著 ($p = 0.007$), OE-14 (10.10 ± 0.422 个) 和 OE-17 (10.10 ± 0.497 个) 株系与 WT 间 p 值分别为 0.061 和 0.058 (图 3-14C)。转基因株系的单株籽棉重仅 OE-4 株系 (60.36 ± 2.224 g) 较 WT (50.52 ± 1.832 g) 显著增加 23.55% ($p = 0.013$), OE-14 (58.20 ± 2.613 g) 和 OE-17 (57.47 ± 2.870 g) 株系与 WT 差异未达显著水平 (图 3-14D, $p = 0.089$ 和 $p = 0.076$)。各株系单铃籽棉重 ($5.69 \pm 0.140 \sim 5.86 \pm 0.174$ g) 与 WT (5.69 ± 0.140 g) 无显著差异 ($p = 0.354$)。

2023 和 2024 年田间试验表明, OE-4 株系单位面积产量较野生型 (WT) 显著提升 20.75~20.99% ($p < 0.001$), OE-17 (18.58~18.87%) 次之。OE-4 单株棉铃数显著增加 (2023 年 25.91%, $p < 0.01$; 2024 年 16.85%, $p = 0.007$), OE-14 和 OE-17 增幅 (13.48~14.04%) 未达显著水平 ($p \geq 0.058$)。OE-4 单株籽棉重显著提高 23.55~25.83% ($p \leq 0.013$), 其他株系无统计学差异 ($p \geq 0.076$)。各株系单铃籽棉重与 WT 无显著差异 ($p \geq 0.354$)。结果表明, *SiFBA4* 过表达可显著提高棉花单位面积产量, 且棉铃数量增加显著, 而单铃重未受影响, 初步揭示了 *SiFBA4* 基因过表达能提高棉花产量。

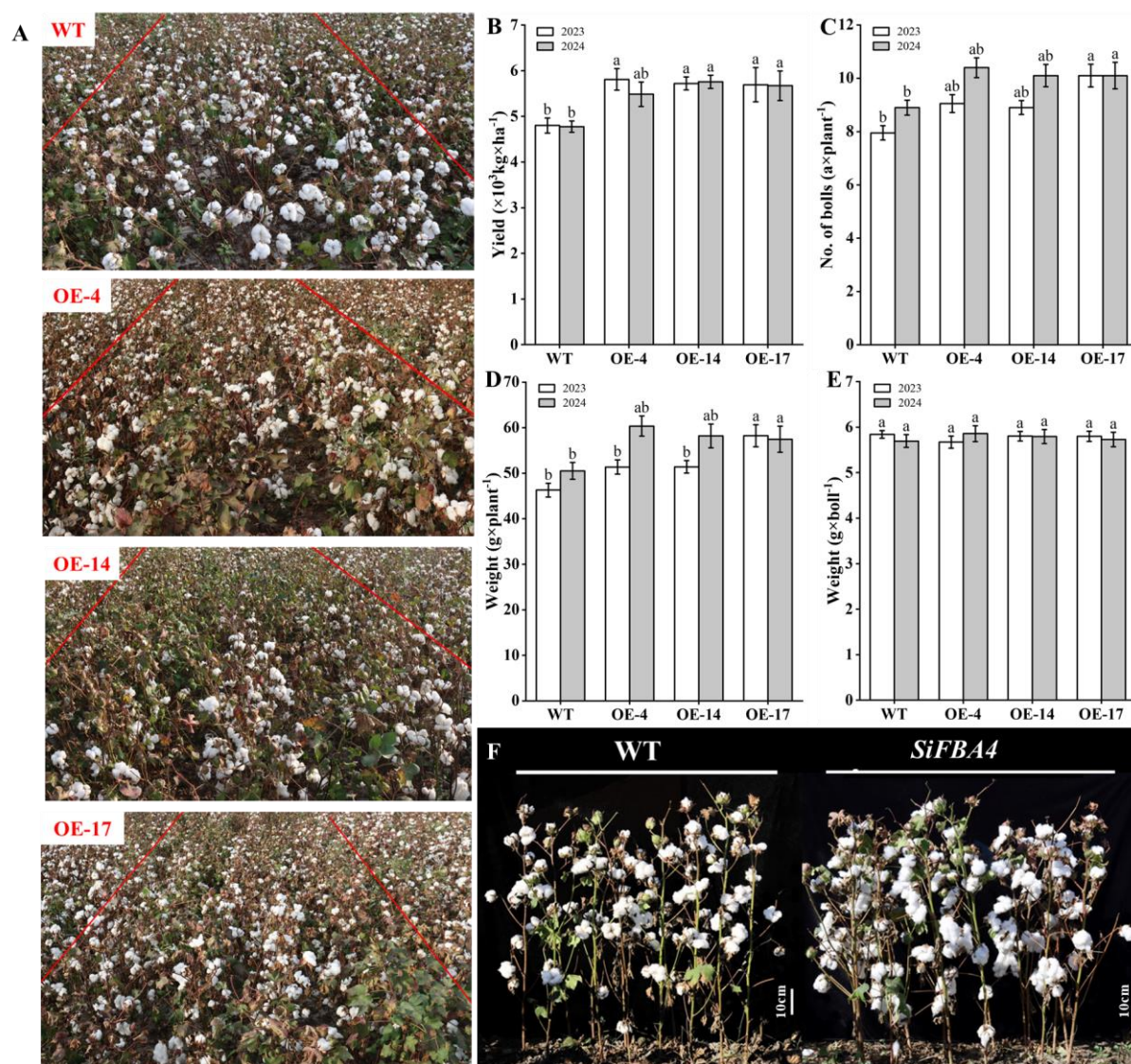


图 3-14 2023 年和 2024 年转基因棉花成熟期产量性状

Figure 3-14 Yield traits of transgenic cotton at maturity stage in 2023 and 2024

注：A. 生长表型；B. 单位面积产量；C. 单株吐絮棉铃数量；D. 单株籽棉重量；E. 单铃籽棉重量；F. 吐絮期完成表型。数据采用单因素方差分析和邓肯多重比较，用平均值 $\pm$ 标准差表示，显著性差异用 a、b 和 c 表示， $p < 0.05$ 。

Note: A. Growth phenotypes; B. Yield per unit area; C. Number of bolls per plant; D. Seed cotton weight per plant; E. Seed cotton weight of single boll; F. Boll spilling completes the phenotype. Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple comparisons, expressed as mean $\pm$ standard deviation, and significant differences are expressed as a, b, and c, $p < 0.05$.

3.4.4.2 转基因棉花纤维品质分析

如图 3-15 所示，本研究分析了 *SiFBA4* 基因过表达对棉花纤维品质的影响。2023 年田间试验数据显示，转基因株系的纤维长度显著低于 WT (图 3-15B)，OE-4、OE-14、

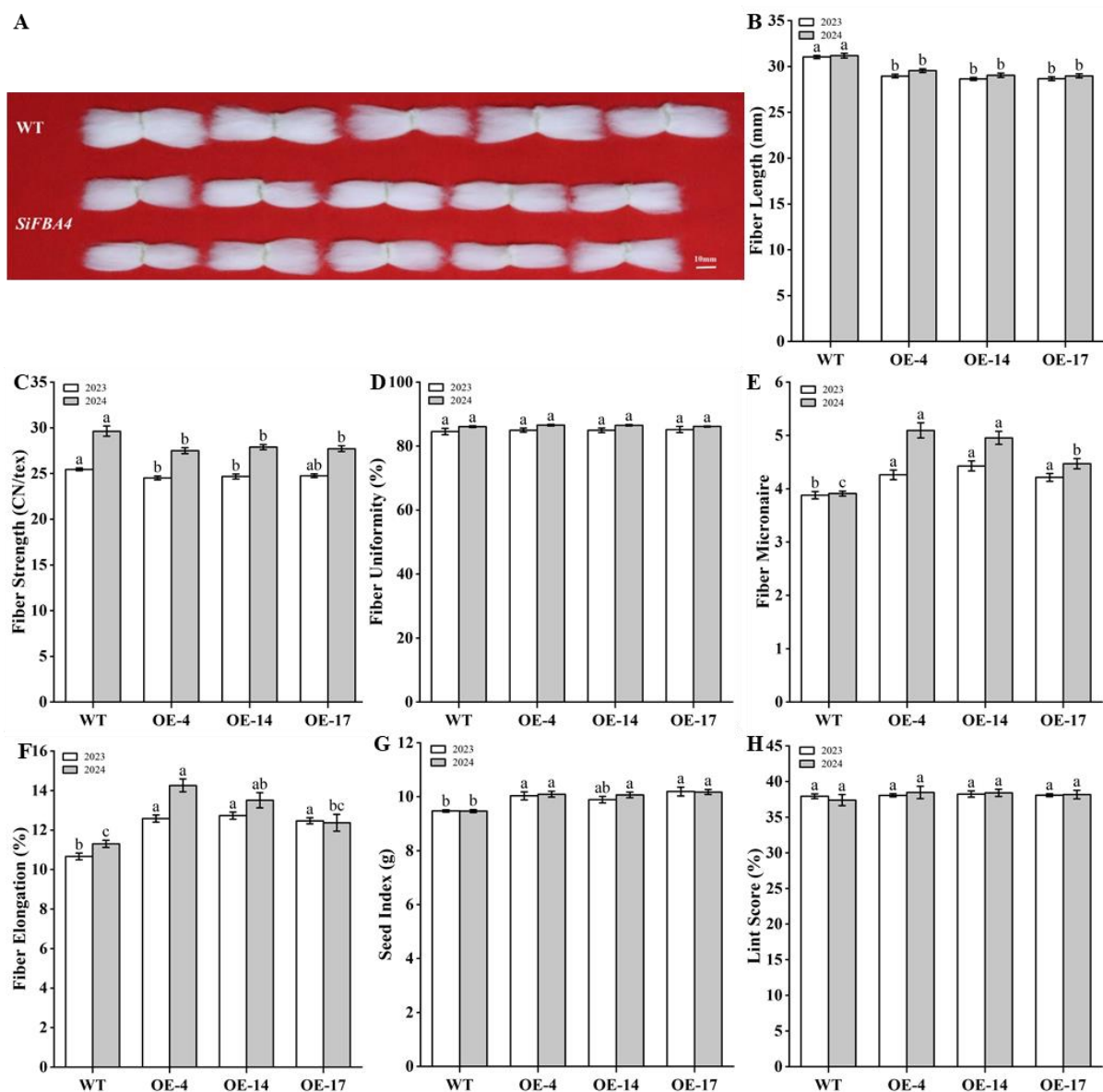


图 3-15 2023 年和 2024 年转基因棉花纤维品质

Figure 3-15 Fiber quality of transgenic cotton in 2023 and 2024

注：A. 纤维表型；B. 纤维上半部平均长度；C. 纤维强度；D. 纤维整齐度；E. 纤维马克隆；F. 纤维伸长率；G. 籽指；H. 衣分。数据采用单因素方差分析和邓肯多重比较，用平均值±标准差表示，显著性差异用 a、b 和 c 表示， $p<0.05$ 。

Note: A. Fiber phenotypes; B. Fiber Length; C. Fiber Strength; D. Fiber Uniformity; E. Fiber Micronaire; F. Fiber Elongation; G. Seed Index; H. Lint Score. Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple comparisons, expressed as mean ± standard deviation, and significant differences are expressed as a, b, and c, $p<0.05$.

OE-17 分别为 28.96 ± 0.186 、 28.64 ± 0.158 和 28.66 ± 0.199 mm，较 WT (31.03 ± 0.172 mm) 降低 6.68%、7.70% 和 7.64% ($p<0.001$)。纤维强度分析显示（图 3-15C），转基因株系 ($24.52 \pm 0.219 \sim 24.76 \pm 0.201$ CN/tex) 显著低于 WT (25.46 ± 0.152 CN/tex, $p=0.003$)。纤维马克隆值、伸长率及籽指在转基因株系中显著升高 ($p<0.01$)，其中 OE-14 株系的

马克隆值 (4.43 ± 0.093) 和伸长率 ($12.73 \pm 0.181\%$) 增幅最大, 较 WT 分别提高 14.18% 和 19.42% (图 3-15E-F)。籽指方面 (图 3-15G), OE-17 株系 (10.19 ± 0.164 g) 较 WT (9.47 ± 0.043 g) 增加 7.60% ($p < 0.001$)。纤维整齐度 ($p = 0.541$) 与衣分 ($p = 0.396$) 在各株系间无显著差异 (图 3-15D, H)。

2024 年试验数据显示 (图 3-15), 转基因株系的纤维长度显著低于 WT (图 3-15B), OE-4、OE-14、OE-17 分别为 29.53 ± 0.207 、 29.04 ± 0.238 和 28.97 ± 0.219 mm, 较 WT (31.18 ± 0.251 mm) 降低 5.29%、6.86% 和 7.09% ($p < 0.001$)。纤维强度分析显示 (图 3-15C), 转基因株系 ($27.50 \pm 0.317 \sim 27.90 \pm 0.285$ CN/tex) 较 WT (29.63 ± 0.557 CN/tex) 显著降低 6.22%~7.19% ($p < 0.001$)。纤维马克隆值在转基因株系中显著升高 (图 3-15E), OE-4 株系 (5.09 ± 0.142) 较 WT (3.91 ± 0.047) 增幅达 30.18% ($p < 0.001$)。纤维伸长率与籽指同样呈现显著差异, OE-4 株系伸长率 ($14.25 \pm 0.324\%$) 较 WT ($11.31 \pm 0.180\%$) 提高 26.00% (图 3-15F)。OE-17 株系籽指 (10.17 ± 0.094 g) 较 WT (9.47 ± 0.057 g) 增加 7.39% (图 3-15G, $p < 0.01$)。纤维整齐度 ($p = 0.476$) 与衣分 ($p = 0.442$) 在各组间无统计学显著差异。

结合两年纤维品质参数, 转基因株系纤维长度连续两年显著低于 WT ($p < 0.001$), 平均降幅 6.37% (2023) 和 6.41% (2024)。纤维强度在 WT 中呈现显著年度正增长 (16.38%), 而转基因株系增幅较低 (11.95~13.09%), 导致其与 WT 的强度差距扩大 (2023: 2.83~3.22%; 2024: 6.21~7.76%)。马克隆值在转基因株系中持续升高, OE-4 株系两年累计增幅达 30.18% (2023: 9.79%; 2024: 19.48%)。纤维伸长率同步增加, OE-4 株系 2024 年伸长率 (14.25%) 较 2023 年 (12.58%) 显著提升 13.27% ($p = 0.008$)。上述结果表明, 过表达 *SiFBA4* 基因导致纤维长度、强度等纺织品质关键参数持续劣化, 同时伴随马克隆值和伸长率等加工参数的升高。

3.5 讨论

在棉花育种工作中, 产量和纤维品质是主要的性状目标。然而, 这些目标性状受到株型、生物量、早熟性以及抗病性等农艺性状的间接影响。当这些农艺性状发生改变时, 会直接对棉花的生产力产生作用, 进而影响棉花的产量和纤维品质。因此, 提高棉花产量和纤维品质作为核心育种目标, 需要密切关注相关农艺性状的变化, 因为它们的改变将直接左右棉花的生产水平^[80, 143]。卡尔文循环相关基因的过表达能够促进植物的光合速率、CO₂ 固定和碳水化合物积累, 从而提高作物产量^[71, 102, 122, 144, 145]。本研究通过统计分析 T₃ 和 T₄ 代转基因株系在苗期、蕾期、铃期和成熟期的生物量、生理学表现和农

艺性状,发现 *SiFBA4* 基因通过增强卡尔文循环速率显著提升生物量的积累与产量的形成,同时导致纤维品质下降。这一发现为高光效作物育种提供了新的目标。

3.5.1 *SiFBA4* 基因促进棉花生物量积累

棉花生物量作为产量和纤维品质形成的物质基础,本质上是植物光合碳同化与矿质营养吸收协同作用的结果^[146]。棉花生育期主要分为苗期、蕾期、铃期和吐絮期(成熟期),最终产量和纤维品质受生物量积累持续性的影响,尤其在蕾期至吐絮期期间^[147]。本研究对各发育时期转基因株系的生物量进行调查,发现转基因株系各生长阶段生物量均显著高于 WT。其中,苗期、蕾期和铃期单株平均生物量分别为 1.27、32.95 和 115.63 g,较 WT 显著增加 23.30%、49.75%和 42.40%。通过对 5 种生物量差异显著的烟草进行杂交配对和转录组分析表明,*LHCs*、*PsAs*、*RbcL* 等基因的上调促进了烟草的光合作用,并增加了生物量的积累^[148]。*C₄* 盐生植物的 NADP-苹果酸脱氢酶基因 *SmNADP-mdh* 过表达能够增强 *C₃* 植物的光合作用和生长^[149]。拟南芥中过表达 *TPT* 和 *cFBPase* 增加了转基因植株的生物量^[150]。这些光合作用相关基因的功能验证说明了 *SiFBA4* 基因提高棉花生物量积累的可能性。转基因株系中跨生育期持续增益现象进一步说明, *SiFBA4* 基因在生物量的积累方面的可持续性。从器官水平分析发现,转基因植株根、茎、叶等营养器官及蕾、铃等生殖器官的生物量同步增加,但根冠比维持稳定。表明 *SiFBA4* 基因可能在源-库器官协同发育中发挥作用,其过表达可能打破传统认知中“库强源弱”或“源强库弱”的代谢限制^[151, 152]。这表明过表达 *SiFBA4* 基因能够促进棉花生物量积累,为提升棉花产量和纤维品质提供必要条件。

3.5.2 *SiFBA4* 基因过表达提高棉花光合效率

植物生物量的积累本质上源于光合作用的能量转化过程,研究显示作物经济产量的物质基础中有 90~95%以上是通过光合碳同化途径获取^[8]。叶片作为光合作用的主要器官,其光合能力几乎反映了整个植株的光合作用能力^[153]。

转基因株系 OE-4 的 P_n 达到 $34.22 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$,较 WT 显著提升 17.47% ($p<0.01$),这一数值接近 *C₄* 植物玉米的光饱和点 ($35\sim40\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)^[154]。深入分析发现, *SiFBA4* 基因光合增益效应源于光反应和暗反应的协同调控,光反应层面叶绿素 a/b 比值由 WT 的 3.65 提升至 4.32 ($p<0.05$),叶绿素总量 (1.48 mg/g) 较 WT (1.16 mg/g) 稳定增加 27.59% ($p<0.05$),表明光系统 II (PSII) 捕光复合体结构发生优化;暗反应层面 FBA ($42.23\sim87.55\%$, $p<0.05$)、FBP ($6.18\sim43.62\%$, $p<0.05$) 和 Rubisco ($2.03\sim5.81\%$, $p>0.05$) 酶活性升高,促进单位叶面积 CO_2 同化量。这种多维度增效机制为高光效育种提供了新

的靶点。通过显微形态计量学分析发现,转基因株系气孔密度(17.94 个/ mm^2)较 WT (14.85 个/ mm^2) 显著增加 20.81% ($p<0.01$),气孔开度扩大 18.75% (WT: $21.60\ \mu\text{m}$),气孔开度减小可能与叶片蔗糖积累有关^[155]。这种气孔形态重构导致气孔导度 (G_s) 增加,促进 CO_2 扩散。但是 P_n/Tr 的比值低于 WT,表明转基因株系水分损耗较高。通过多代系验证揭示了 *SiFBA4* 基因对棉花光合系统的深度调控作用。

转基因株系淀粉含量降低(叶片 $26.92\sim 60.77\%$,根系 $13.01\sim 70.73\%$),但生物量增加 38.48% ,光合速率提高,表现出“低糖-高生长”表型。已有研究表明,蔗糖的合成要优先于碳分配,而淀粉的合成受蔗糖控制^[156]。源器官组织(叶片)合成的蔗糖通过分解代谢和转运,向库器官组织(根、茎和籽粒等)提供碳骨架和能量^[157]。莱氏衣藻 *CrFBA1* 过表达激活了糖酵解途径,促进了淀粉向脂肪酸的转化,淀粉含量降低^[108]的研究结果,与玉米 *FBA8* 缺失导致的淀粉含量增加^[158]进一步印证了 *SiFBA4* 基因过表达株系淀粉含量减少的现象。因此, *SiFBA4* 基因过表达可能通过某种代谢加速了淀粉或糖类向其它物质的转化,从而消耗了光合产物,降低了转基因棉花中的淀粉含量,而消耗的光合产物很可能用来供应棉花的快速生长。

3.5.3 *SiFBA4* 基因过表达优化棉花株型结构

农艺性状是评价作物产量形成的基础^[80],本研究通过分析 *SiFBA4* 基因过表达对棉花株型发育的影响,发现株型结构表现出相对紧凑的冠层结构。

转基因株系在苗期表现出生育进程加快的显著特征, T_3 和 T_4 代株系苗期节间数分别较 WT 增加 1.23 和 0.7 个 ($p<0.01$),出苗至四叶一心时间缩短 $2.3\sim 3.1\ \text{d}$ 。苗期转基因株系下胚轴长度较 WT 缩短 17.98% 、 28.96% 和 23.47% ($p<0.01$),铃期节间长度较 WT 缩短 $12.82\sim 27.32\%$ ($p<0.05$)。猜测该基因可能通过赤霉素^[159, 160]、细胞分裂素^[161]和油菜素内脂^[162]等信号途径,调控细胞的伸长与分裂,从而影响下胚轴和茎的伸长,为调控作物节间发育提供了新的靶点。在生殖生长阶段,转基因株系展现出显著的株型改良特征,蕾期和铃期的果枝数增加 20.58% 和 44.44% ($p<0.05$),果枝与主茎夹角减小 9.43° ,形成相对紧凑的冠层结构。源库关系分析表明,苗期、蕾期和铃期转基因植株叶面积指数提高 30.24% 、 52.01% 和 53.92% ,说明转基因株系单株蕾铃数增加 69.00% 和 65.09% ($p<0.01$),推测 *SiFBA4* 基因过表达增强了源器官光合效率和库器官同化物分配能力。

3.5.4 *SiFBA4* 基因过表达促进棉花产量形成

产量形成因素分析表明,转基因株系产量提高 19.22%,双铃果枝占比提升 20.49% ($p<0.01$),而单铃重无显著差异。拟南芥中过表达 *GDC-H*、*SBPase* 和 *FBA* 会增加拟南芥 CO_2 的同化、营养生物量和种子产量的研究^[163]为 *SiFBA4* 转基因株系产量的增加提供了依据。水稻低分蘖突变体 c6635 中发现卡尔文循环 *SBPase* 基因 C 端氨基酸 Gly-364 突变为 Asp,其生产穗数、粒数和结实率显著降低,导致产量急剧下降,但是其 *rbcS*、*FBAase* 和 *PRKase* 基因的表达水平显著上调,这与本研究结果相反^[164]。推测 *SBPase* 基因氨基酸的突变可能引起蛋白构象改变,导致异常的信号调控,进而激活了其他光合作用相关基因的补偿性表达。番茄中反义表达 *cpFBPase*,降低了 FBP 酶的活性,导致平均果实重量降低 20%^[165]。转 *SiFBA4* 基因株系 FBP 酶活性升高 (6.18~43.62%),产量增加,进一步揭示了 *SiFBA4* 基因调节的 FBP 酶活性在作物产量形成中的重要作用。上述结果共同为转 *SiFBA4* 基因棉花产量的增加提供了参考依据,推测 *SiFBA4* 基因可能通过调节 FBP 酶的活性,促进棉花产量的形成。

产量提升伴随纤维品质性状的显著改变,纤维长度和强度分别降低 6.67%和 4.86% ($p<0.05$),纤维品级由 A 级降至 C2 级,这一发现与棉花纤维发育相关的研究高度一致。棉花纤维性状是受多个基因控制复杂数量性状,在肌动蛋白细胞骨架和微管组织的调控下以高度极化的方式生长,与产量潜力往往呈现负相关关系^[166, 167]。纤维细胞的快速扩增需要持续的糖供应作为物质基础^[168]。蔗糖是纤维发育过程中唯一的光合同化碳源,不仅为细胞提供碳骨架,对棉花纤维伸长和细胞壁形成也至关重要。在蔗糖合酶作用下转化为果糖和尿苷二磷酸-葡萄糖等纤维素合成的底物^[169];通过转化酶催化蔗糖及其己糖衍生物产生渗透活性物质,为纤维细胞扩增提供必需的膨压^[170]。所以棉花长纤维的产生依赖于纤维扩增和纤维细胞中蔗糖的有效积累之间的协同功能相互作用。本研究结果表明, *SiFBA4* 基因过表达通过促进光合同化产物向源库器官的分配,显著增加了生物量积累所需的光合产物消耗,可能导致纤维发育关键时期的蔗糖供应相对不足;纤维素合成底物减少;以及细胞膨压降低,最终共同导致纤维品质下降。也为突破棉花育种中产量与品质协同改良的瓶颈问题提供了理论依据。未来可重点关注如何通过时空特异性调控糖代谢途径,在保证产量的同时维持纤维发育所需的碳源供应。

本研究通过分析 *SiFBA4* 基因对棉花生长发育的调控机制,证实该基因通过增强卡尔文循环关键酶 (FBA/FBP) 活性、促进光反应系统及气孔形态特征的改变,使转基因株系净光合速率提高 17.47%,揭示了 *SiFBA4* 基因提高光合效率的调控机制。淀粉含量降低 (叶片 26.92~60.77%,根系 13.01~70.73%),但促进了营养与生殖器官生物量积累,产量提升 19.22%,揭示其光合产物向结构物质的高效转化。由上述结果推测 *SiFBA4* 基

因可能通过促进糖转运在源-库协同中的调节作用, 实现生物量与产量同步提升, 为高光效育种提供新靶点。但产量与纤维品质的负相关可能与光合产物分配有关, 需结合代谢网络调控优化光合产物分配, 为突破多目标协同育种瓶颈提供理论框架。

3.6 小结

(1) 在生物量积累方面, 转基因株系各生育期的生物量均显著高于 WT。苗期 OE-4 和 OE-17 株系总生物量显著增加 23.62~42.56%, OE-14 株系增幅较低 (3.72~9.23%)。蕾期 OE-4 株系总生物量较 WT 增加 58.03~91.30%, OE-17 株系增加 23.53~58.83%, OE-14 株系增加 23.78~48.55%。铃期 OE-4 株系总生物量较 WT 显著增加 56.47~60.07%, OE-17 株系增加 47.36~48.32%, OE-14 株系增加 20.33~22.17%。其中蕾的生物量为 0.85 g, 较 WT 增加 18.97%, 棉铃的生物量为 60.65 g, 较 WT 增加 42.40%。

(2) 从生理水平分析, 过表达 *SiFBA4* 基因棉花表现出较高的光合速率, 最高达到 $34.22 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 较 WT 高 17.47%; 光合色素叶绿素含量较 WT 高 0.31 mg/g; 卡尔文循环酶活性表现出较高的水平, 其中 FBA 酶活性的平均值为 $491.55 \text{ nmol}/\text{min}/\text{g}$, 较 WT 高 59.49%, FBP 酶活性较 WT ($300.00 \text{ nmol}/\text{min}/\text{g}$) 显著提高 43.6~27.7%。

(3) 通过分析转基因棉花的农艺性状, 发现转基因棉花的发芽率和发芽势比 WT 低, 并且在三叶一心前期, 生长状态弱于 WT, 直至植株生长到三叶一心时, 转基因棉花的生长速度明显加快, 在短时间内超过 WT, 并始终保持着优势, 比如株高、节间数量、果枝数量、蕾铃数量以及叶面积均表现出增高的水平, 气孔密度和气孔开度也明显的大于 WT, 下胚轴长度、节间长度和果枝与主茎之间的夹角要低于 WT。

(4) 通过比较转基因棉花与 WT 之间的产量性状, 发现转基因棉花依赖单株结铃数量和单株籽棉重量, 使单位面积的总产量较 WT 高 19.22%。纤维长度和强度分别较 WT 减小 6.87%和 4.97%, 马克隆值较 WT 增加 17.34%, 使纤维品级由 A 级降至 C2 级。

第 4 章 *SiFBA4* 基因对棉花生物量和产量形成的机制分析

4.1 引言

研究表明, 卡尔文循环关键酶基因 (如 *SBP*、*FBP*、*FBA* 和 *RbcS* 等) 过表达能够有效提高光合碳同化效率, 促进光合作用, 使作物生物量和产量增加^[102, 171, 172]。第三章的实验结果表明, *SiFBA4* 基因过表达显著提高了转基因株系的生物量和产量。然而, *SiFBA4* 基因在促进生物量积累和产量方面形成, 以及导致纤维品质降低的机制尚未阐明。为此, 本研究通过构建转录和代谢网络, 初步解析了 *SiFBA4* 基因调控棉花生物量和产量形成的生理机制。

4.2 材料

4.2.1 主要仪器

Qubit 荧光定量仪 (Qubit 4.0, 美国), MD 酶标仪 (SpectraMax iD3, 美国), 高通量生物片段分析仪 (Qsep400, 中国), 测序仪 (NovaSeq 6000, Illumina, 美国), 离心机 (TDZ5-WS, 湖南), 漩涡震荡仪 (FV-2400, 拉脱维亚), 超高效液相色谱 UPLC (Shim-pack UFLC), 串联质谱 MS/MS (Applied Biosystems 4500 QTRAP), 冻干机 (Scientz-100F), 研磨仪 (MM40 Retsch), 电子天平 (MS105DM)。

4.2.2 植物材料

本研究以野生型棉花 R15 和 *SiFBA4* 转基因棉花 OE-4 为实验材料, 培养过程在人工气候培养箱中进行, 培养条件设置为: 恒温 28°C、相对湿度 50%、光周期 16 h/8 h (光照/黑暗)。转基因棉花幼苗的生长速率显著超过野生型时, 于光照处理 5 h 后分别采集各株系倒数第二片完全展开的叶片及完整的根系样品, 液氮速冻后于干冰条件下运输。

4.3 方法

4.3.1 转录组学和代谢组学检测和分析

检测和分析方法见附录 D 和附录 E。

4.3.2 qRT-PCR 验证转录组

根据 2.3.4.3 的方法将 RNA 样品反转录获得 cDNA，分别在叶片和根系随机选择 10 个 DEGs（5 个上调表达，5 个下调表达）进行 qRT-PCR 验证和转录组数据相关性分析，引物序列见表 4-1，内参基因 *GhUBQ7* 的特异引物见表 2-7，反应体系与表 2-3 相同。

表 4-1 qRT-PCR 验证引物序列

Table 4-1 Primer sequence for qRT-PCR validation

组织	序列编号	引物序列	
		正向引物（5'→3'）	反向引物（5'→3'）
叶片	Gh_D11G317500	GCACCACGAGTGTTGTAACG	AACGCGGAAGGATGGATTGT
	Gh_A04G043300	CCACTCCGTATGAGGCTGAC	GAGAGCCCAGCCACAAAGAT
	Gh_D09G017800	CCTCAGCACTGACGGCAATA	GGAAATGCAATGGCACGGTT
	Gh_D10G271200	TCCGTCTCTGGAACCA	TAAAGCATGCCGTGAGTGGT
	Gh_D08G137400	TGGCTTCTGTCCAGGAACAC	TCTGGCTCTGACGCAAAAGT
	Gh_D06G067400	GCAGAGATGCCCCAATGGAT	GTCGCATAGCTATCAGCAGGT
	Gh_A07G258400	GGGCCGGGCCAGACTAA	GATGCTGCACTGTAGAGGTGA
	Gh_A10G225500	GAGAATAAGGCGGAGCAAGGA	ACTCTGAGCACTTGTCTTTGAGA
	Gh_D13G177100	TCACATGGAGGGTTTCGGTG	TGTGGTTGGTTCCTCCGATG
	Gh_A13G232900	GGTCTCTCGCTAATCGCCAA	AGGCATTTGCAGGGGCTAAA
	Gh_D13G016000	TGAACAAGGAATCGTCCCCG	CAAAACGAGCACCTGTTGG
	Gh_A04G016600	GCAGTGAGTACACCCTTCACA	ATATGCACGAGCCGATCCAG
	Gh_D05G387200	ATCGCACCCAAGTCCGAGT	TCGATCCATAGGCACCCAAAG
	Gh_D10G246000	AGCCATGAAAAACAGTGACGG	AGGATCCAGGTTCCCAATGC
	Gh_D12G071300	GGGACGAATAGCTGAAAAGGG	CCCCGGCCAACCTAATCTTT
根系	Gh_D09G161200	GAGTTCCTCACTGGAACCGG	AGTGAGCATTGTCAAGCACTG
	Gh_A07G003300	GGGGCTTTCTTGATGTGGA	TTGAAATCTCCACGGCTTCA
	Gh_D02G028100	AATGGCCAATGCCATCATGC	GAGCCGCATTGTTTGATGC
	Gh_A06G156800	TAACGCAGCCCACCTGTATG	CAGTTGCCATACTTTGATGCCA
	Gh_D06G149100	CCACGGGTCTGCATAATTGG	CAATACACGCTTCAGAGTTCCA

4.4 结果分析

4.4.1 转录组测序分析

4.4.1.1 测序原始数据质量评估

对 12 个生物学重复样本进行 Illumina HiSeq 平台双端测序，经质控分析后共获得 84.16 Gb 有效数据(表 4-2)。质量评估显示，所有样本的 Clean Base 均超过 6 Gb(6.37~7.66 Gb)，测序错误率控制在 0.02%以内，Q30 碱基百分比大于 94%（94.45~95.14%），GC 含量分布符合双子叶植物转录组特征（43.65~45.13%）。样本间皮尔逊相关系数分析表明，生物学重复间具有良好的一致性（ $r=0.94\sim0.99$ ），支持后续差异基因分析（图 4-1）。

表 4-2 转录组测序质量参数统计表

Table 4-2 Summary statistics of transcriptome sequencing quality parameters					
Sample	Clean Reads	Clean Base(G)	Error Rate (%)	Q30(%)	GC Content (%)
WT-L1	44172106	6.63	0.02	94.46	45.11
WT-L2	43919354	6.59	0.02	94.45	44.97
WT-L3	51083828	7.66	0.02	94.85	44.97
WT-R1	50379374	7.56	0.02	94.48	43.74
WT-R2	47462456	7.12	0.02	94.84	43.70
WT-R3	47241900	7.09	0.02	94.66	43.71
FBA-L1	47352128	7.10	0.02	94.67	45.11
FBA-L2	47101988	7.07	0.02	94.86	45.13
FBA-L3	49867564	7.48	0.02	94.64	45.12
FBA-R1	46173408	6.93	0.02	94.61	43.65
FBA-R2	43727288	6.56	0.02	95.14	45.10
FBA-R3	42449260	6.37	0.02	94.78	43.65

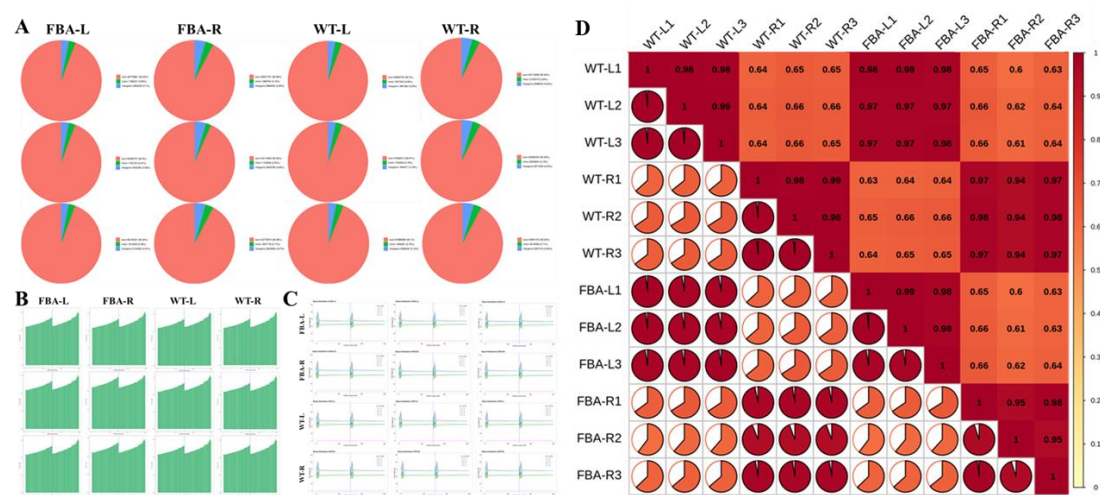


图 4-1 测序原始数据质量评估

Figure 4-1 Quality assessment of sequencing raw data

注：A. 原始数据比对；B. 测序错误率分布图；C. GC 含量分布图；D. 样品间相关性。

Note: A. Raw data comparison;B. Distribution of sequencing error rate; C. GCcontent distribution map; D. Between-sample correlation.

4.4.1.2 差异表达基因分析

基于 DESeq2 分析（阈值： $|\text{Log}_2\text{FC}| \geq 1$, $\text{FDR} < 0.05$ ），在转基因植株中检测到显著差异表达基因（Differentially Expressed Genes, DEGs）。其中叶片组织鉴定到 566 个 DEGs（上调 261 个，下调 305 个）（图 4-2A），根系组织鉴定到 1163 个 DEGs（上调 860 个，下调 303 个）（图 4-2B）。层级聚类分析显示，各处理组间基因表达模式呈现显著分离（图 4-3A-B）。值得注意的是，根系 DEGs 数量是叶片的 2.05 倍，提示 *SiFBA4* 基因可能在不同组织中的调控具有差异性。

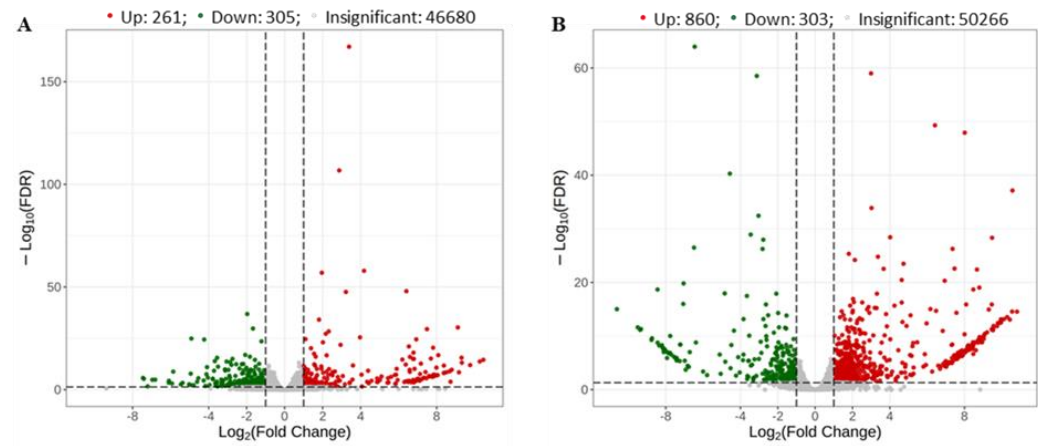


图 4-2 棉花叶片和根系差异表达基因火山图

Figure 4-2 Volcano plot of differentially expressed genes in cotton leaves and roots

注：A. 叶片；B. 根系。

Note: A. Leaves; B. Roots.

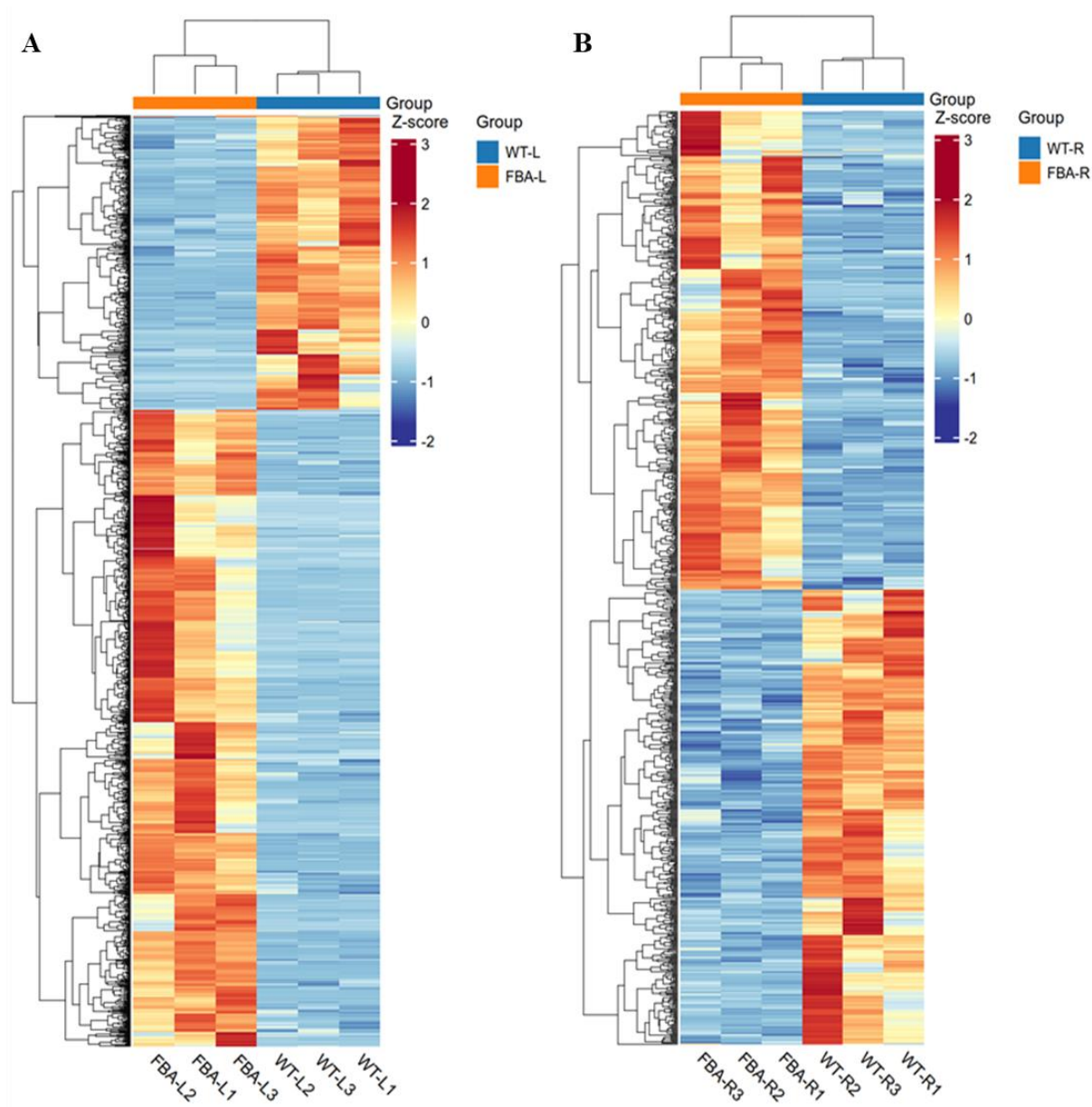


图 4-3 棉花叶片和根系差异表达基因聚类分析

Figure 4-3 Cluster analysis of differentially expressed genes in cotton leaves and roots

注：A. 叶片；B. 根系。

Note: A. Leaves; B. Roots.

4.4.1.3 转录组数据验证

通过 qRT-PCR 对随机选取的 20 个 DEGs（叶片 10 个，根系 10 个）进行验证。线性回归分析显示，转录组数据与 qRT-PCR 结果的 Log2FC 值呈显著正相关（叶片： $R^2=0.852$ ；根系： $R^2=0.951$ ， $p<0.001$ ），验证了测序数据的可靠性（图 4-4）。

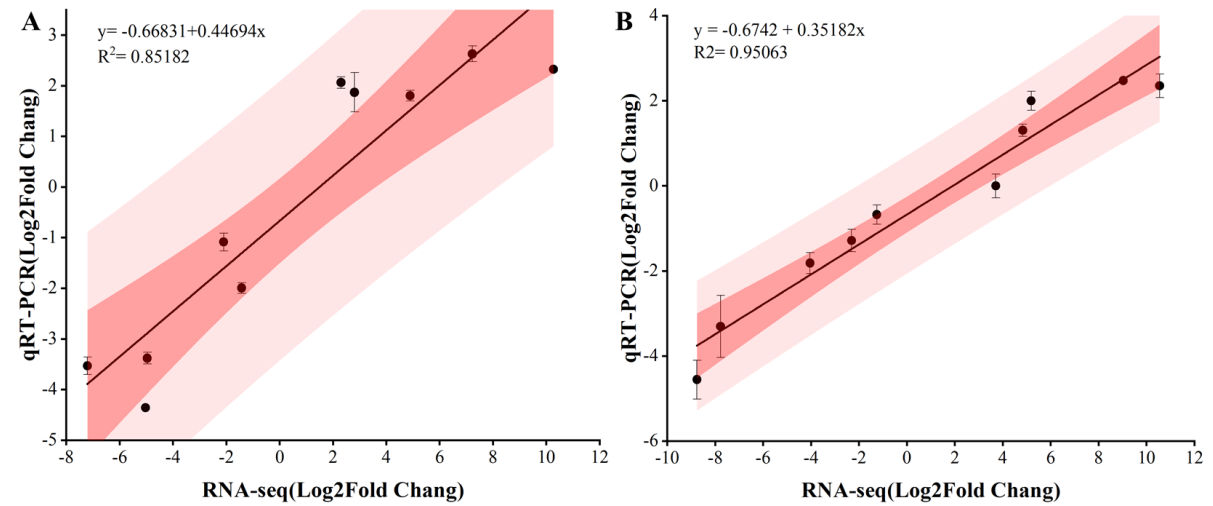


图 4-4 qRT-PCR 验证 RNA-Seq 数据

Figure 4-4 qRT-PCR validation of RNA-Seq data

注：A. 叶片 DEGs 通过 qRT-PCR 验证结果；B. 根系 DEGs 通过 qRT-PCR 验证结果，浅色表示预测区间，深色表示置信区间， $p<0.05$ 。

Note: A. Results of leaf DEGs validated by qRT-PCR; B. Results of root DEGs validated by qRT-PCR, light colors indicate prediction intervals, dark colors indicate confidence intervals, $p<0.05$.

4.4.1.4 叶片功能富集分析

基于 Gene Ontology 数据库的富集分析显示（图 4-5），叶片中上调表达的差异基因（DEGs）在生物过程（Biological Process）层面显著富集于以下条目：细胞过程（GO:0009987, $p=0.0175$ ）、生物合成过程（GO:0009058, $p=0.0066$ ）、有机循环化合物代谢过程（GO:1901360, $p=0.0007$ ）、细胞生物合成过程（GO:0044249, $p=0.0141$ ）和细胞芳香族化合物（GO:0006725, $p=0.0004$ ）等。细胞组分（Cellular Component）分析表明，差异基因主要定位于细胞内解剖结构（GO:0005622, $p=0.0024$ ）、细胞器（GO:0043226, $p=0.0020$ ）、细胞内的细胞器（GO:0043229, $p=0.0020$ ）、细胞质（GO:0005737, $p=0.0035$ ）和面上细胞器（GO:0043227, $p=0.0043$ ）。分子功能（Molecular Function）层面，核酸结合（GO:0003676, $p=0.0069$ ）、RNA 结合（GO:0003723, $p=0.0006$ ）、内切酶活性（GO:0004519, $p=0.0012$ ）、核酸酶活性（GO:0004518, $p=0.0277$ ）和催化活性（GO:0140640, $p=0.0277$ ）等呈现显著富集。对比分析显示（图 4-6），叶片下调 DEGs

呈现差异化的功能特征, 主要关联刺激响应 (GO:0050896, $p=0.0151$)、胁迫响应 (GO:0006950, $p=0.0059$)、生物调控过程 (GO:0050789, $p=0.0185$)、防御反应 (GO:0006952, $p=0.0013$) 和对外界刺激的反应 (GO:0009605, $p=0.0072$) 等生物过程。其细胞定位显著富集于膜 (GO:0016020, $p=0.0104$)、膜的固有成分 (GO:0031224, $p=0.0016$)、膜的积分分量 (GO:0016021, $p=0.0037$)、细胞周边 (GO:0071944, $p=0.0024$) 和质膜 (GO:0005886, $p=0.0008$) 等细胞组分。分子功能分析显示, 小分子结合 (GO:0036094, $p=0.0278$)、阴离子结合 (GO:0043168, $p=0.0180$)、核苷酸结合 (GO:0000166, $p=0.0396$)、核苷磷酸结合 (GO:1901265, $p=0.0396$) 和碳水化合物衍生物结合 (GO:0097367, $p=0.0176$) 等功能具有统计学显著性。

KEGG 通路分析揭示 (图 4-7, 4-8), 叶片 DEGs 呈现显著的组织特异性通路分布特征。叶片上调 DEGs 显著富集于核糖体 (ko03010)、内质网中的蛋白质加工 (ko04141)、碳代谢 (ko01200)、辅因子 (ko01240) 及氨基酸生物合成 (ko01230) 等通路 ($p<0.001$)。而下调 DEGs 显著富集于代谢途径 (ko01100, $p=0.0410$)、次生代谢物的生物合成 (ko01100, $p=0.0015$)、植物-病原互作 (ko01100, $p<0.001$)、MAPK 信号通路-植物 (ko04016, $p=0.0075$) 和色氨酸代谢 (ko00380, $p=0.0001$) 等通路。

4.4.1.5 根系功能富集分析

根系组织 GO 富集模式 (图 4-9) 显示, 上调 DEGs 在生物过程、细胞组分及分子功能层面的富集特征与叶片组织具有高度相似性, 主要富集于细胞过程 ($p=0.0175$)、生物合成过程 ($p=0.0066$) 和有机循环化合物代谢过程 ($p=0.0007$) 等生物过程。差异基因富集较多的细胞组分主要有细胞内解剖结构 ($p=0.0024$)、细胞器 ($p=0.0020$) 和细胞内的细胞器 ($p=0.0020$)。在分子功能方面主要有核酸结合 ($p=0.0069$)、RNA 结合 ($p=0.0006$) 和酶催化活性 ($p=0.0277$) 等。下调 DEGs (图 4-10) 主要富集于应激响应 ($p=0.0151$)、有机氮化合物代谢过程 ($p=0.0381$) 和生物调控 ($p=0.0216$) 等生物过程。主要富集在膜系统结构 ($p<0.005$) 和质膜 ($p=0.0008$) 等细胞组分。在分子功能方面主要富集在小分子结合 ($p=0.0277$) 和阴离子结合 ($p=0.0180$) 等。

根系 KEGG 富集图谱显示 (图 4-11, 4-12), 根系上调的 DEGs 主要富集在核糖体、内质网中的蛋白质加工、碳代谢、辅因子及氨基酸的生物合成等途径 ($p<0.001$)。下调的 DEGs 主要富集在代谢途径 ($p=0.0410$)、次生代谢物的生物合成 ($p=0.0015$)、植物-病原互作 ($p<0.001$)、MAPK 信号通路-植物 ($p=0.0075$) 和色氨酸代谢 ($p=0.0001$) 等途径。

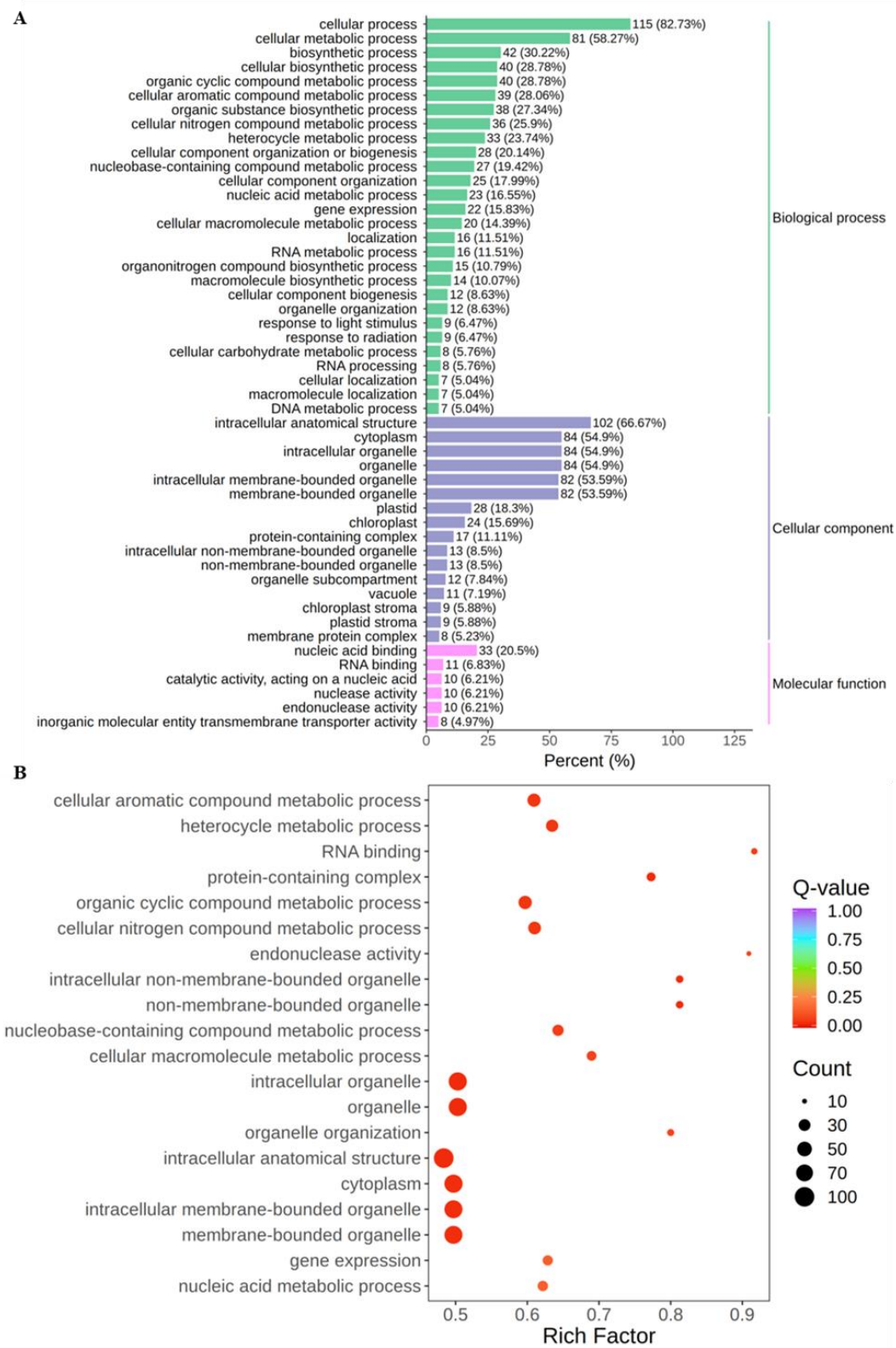


图 4-5 叶片上调差异表达基因 GO 富集

Figure 4-5 GO enrichment of up-regulated differentially expressed genes in leaves

注：A.柱状图；B.气泡图。

Note: A. Bar chart; B. Bubble diagram.

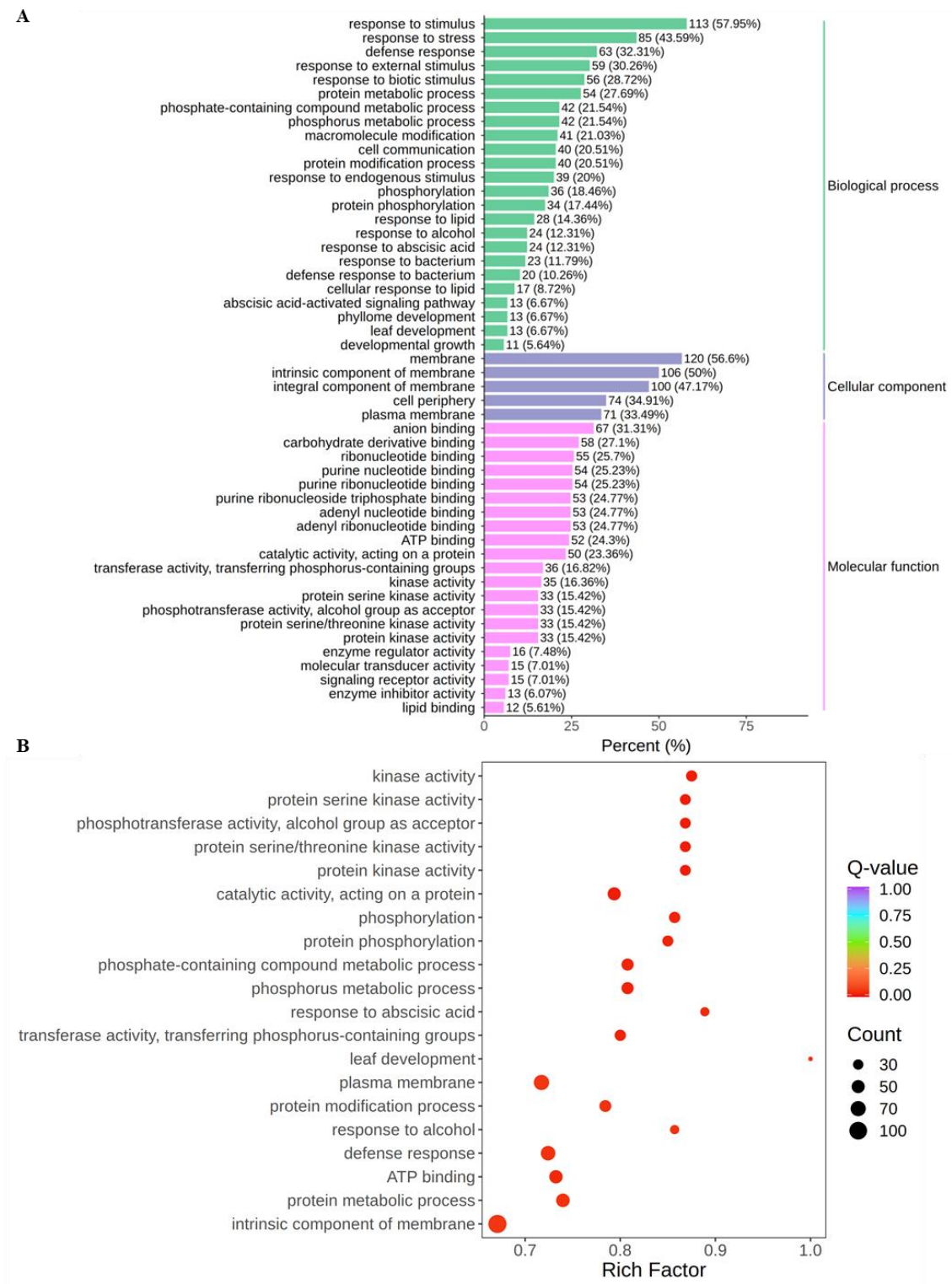


图 4-6 叶片下调差异表达基因 GO 富集

Figure 4-6 GO enrichment of down-regulated differentially expressed genes in leaves

注：A.柱状图；B.气泡图。

Note: A. Bar chart; B. Bubble diagram.

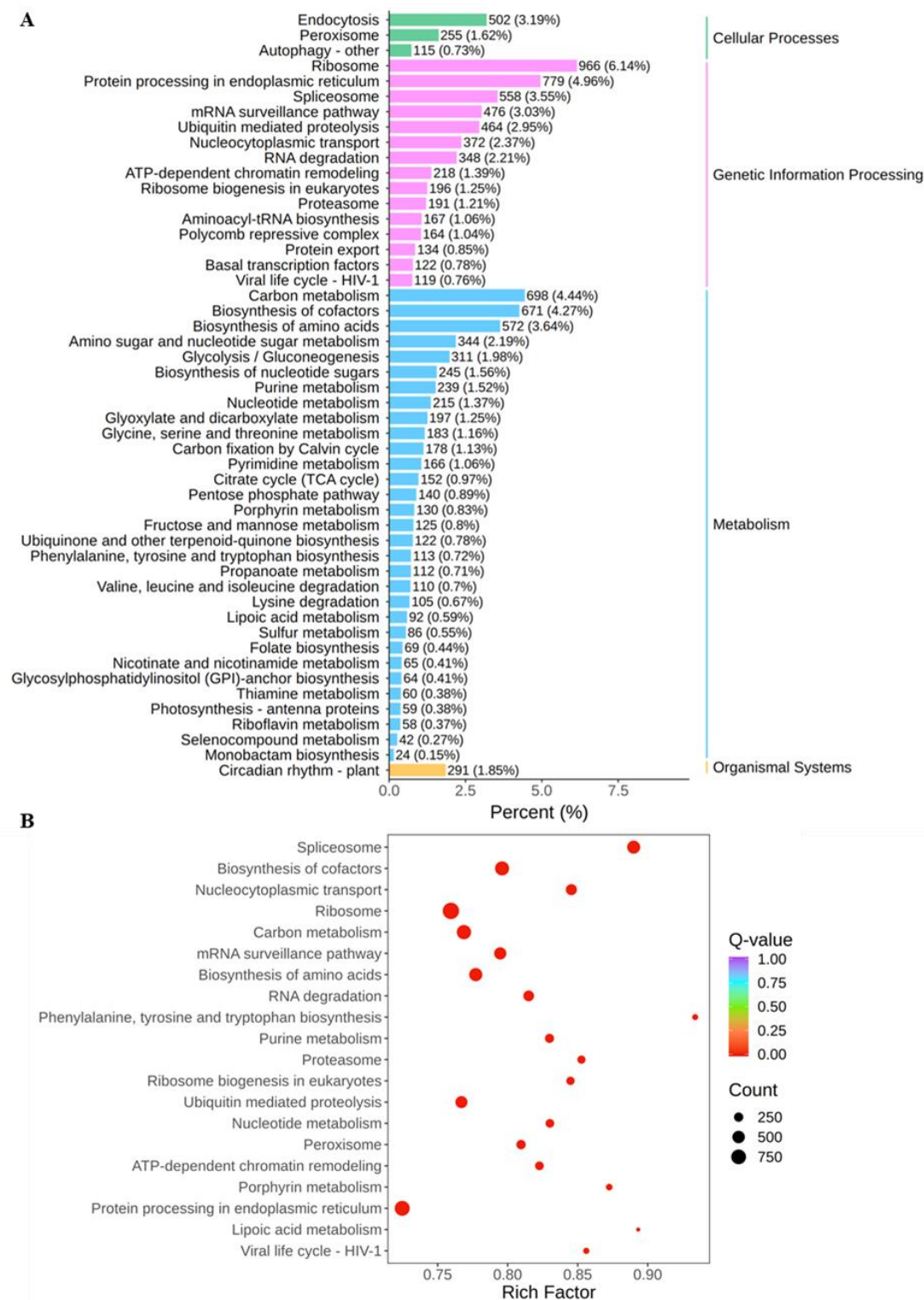


图 4-7 叶片上调差异表达基因 KEGG 富集

Figure 4-7 KEGG enrichment of up-regulated differentially expressed genes in leaves

注：A.柱状图；B.气泡图。

Note: A. Bar chart; B. Bubble diagram.



图 4-8 叶片下调差异表达基因 KEGG 富集

Figure 4-8 KEGG enrichment of down-regulated differentially expressed genes in leaves

注：A.柱状图；B.气泡图。

Note: A. Bar chart; B. Bubble diagram.

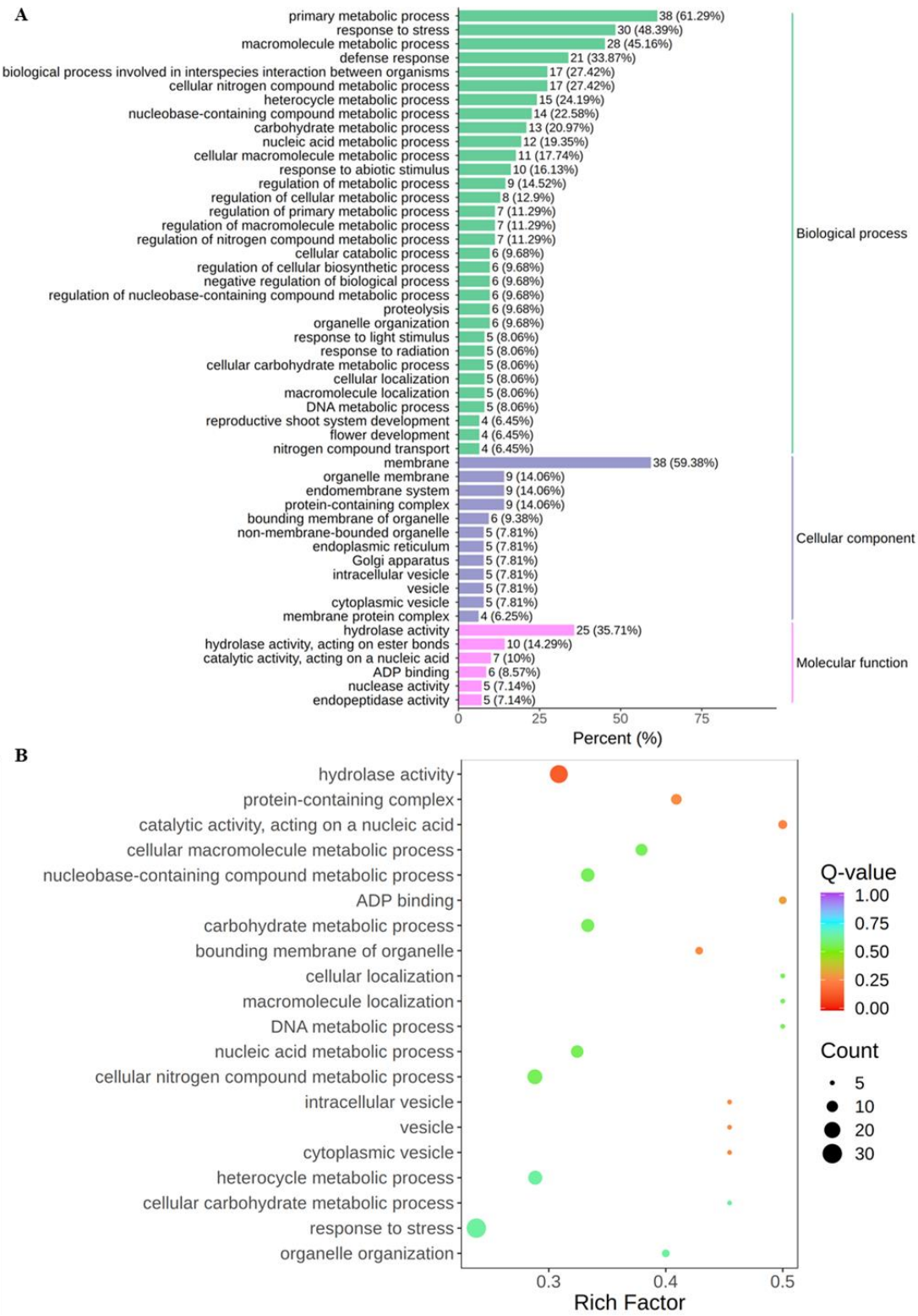


图 4-9 根系上调差异表达基因 GO 富集

Figure 4-9 GO enrichment of up-regulated differentially expressed genes in roots

注：A.柱状图；B.气泡图。

Note: A. Bar chart; B. Bubble diagram.

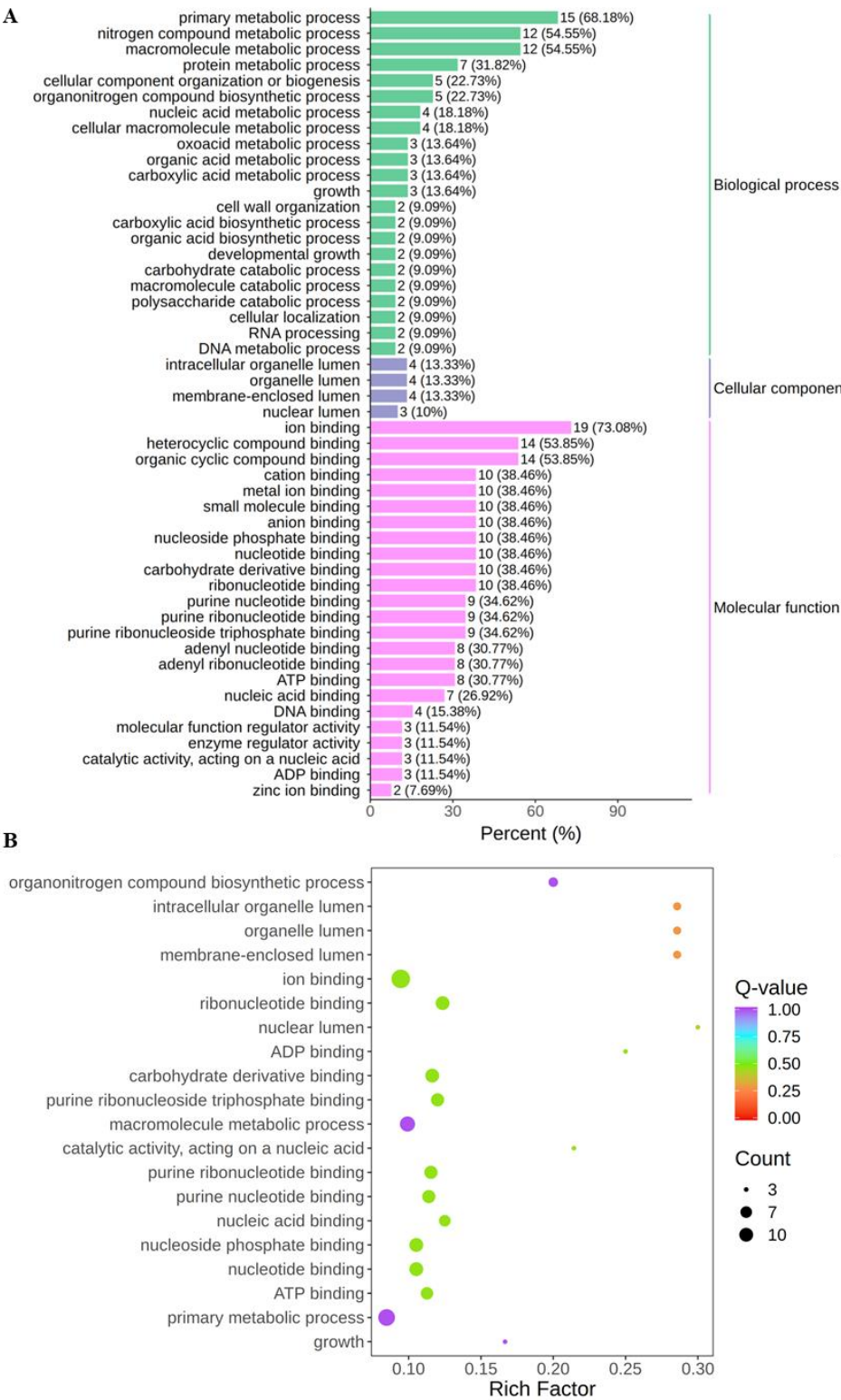


图 4-10 根系下调差异表达基因 GO 富集

Figure 4-10 GO enrichment of down-regulated differentially expressed genes in roots

注：A.柱状图；B.气泡图。

Note: A. Bar chart; B. Bubble diagram.

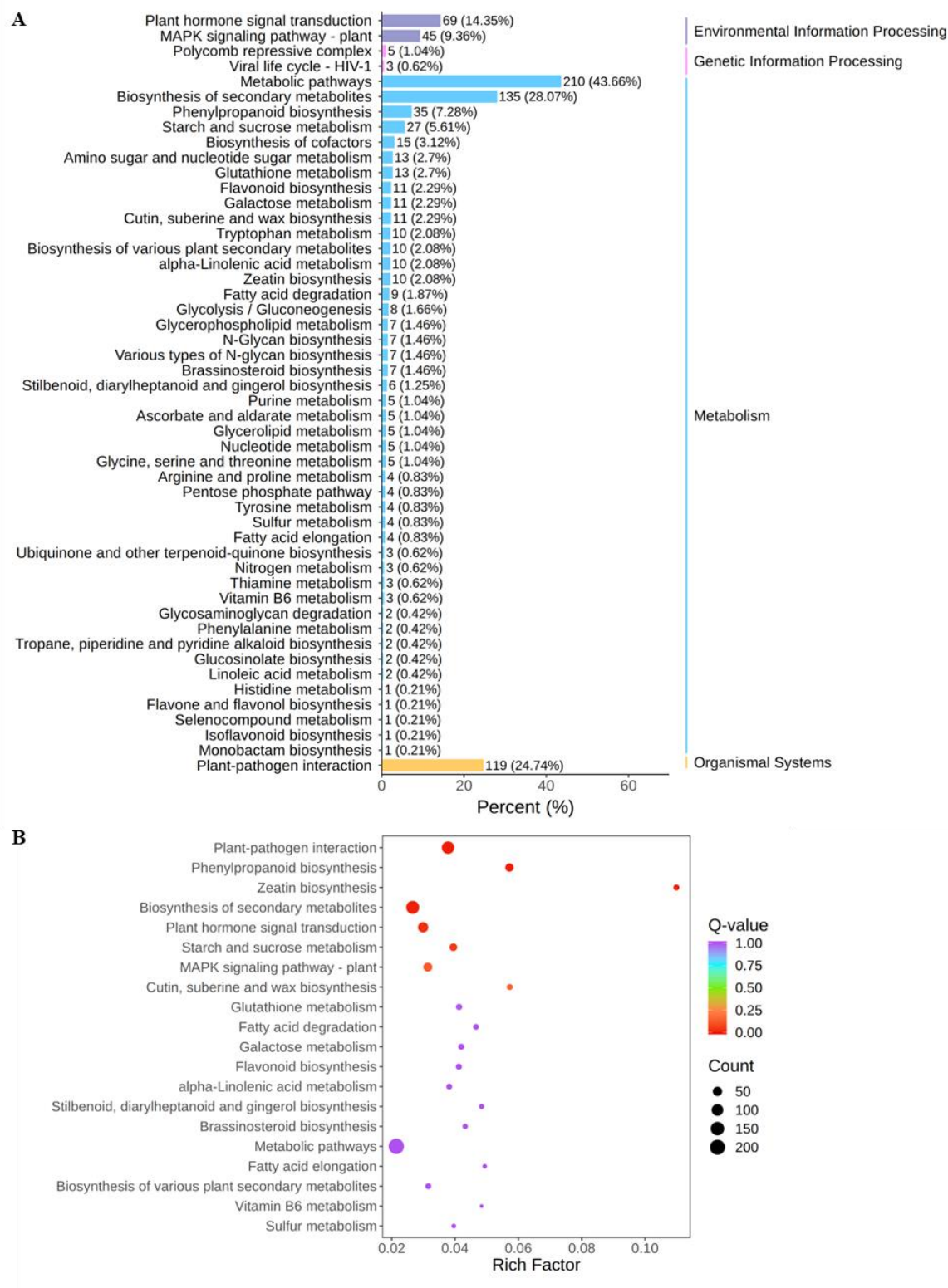


图 4-11 根系上调差异表达基因 KEGG 富集

Figure 4-11 KEGG enrichment of up-regulated differentially expressed genes in roots

注：A.柱状图；B.气泡图。

Note: A. Bar chart; B. Bubble diagram.

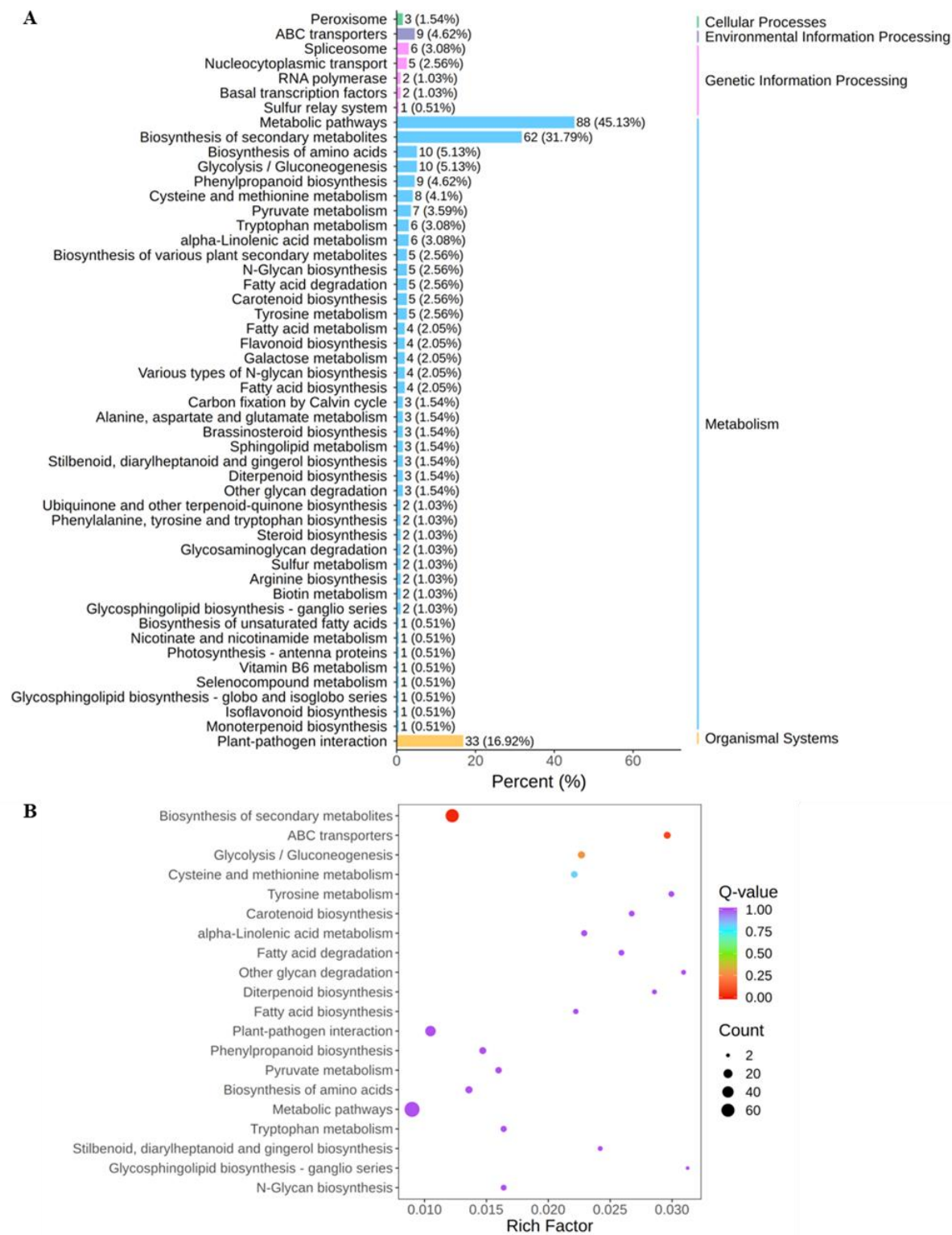


图 4-12 根系下调差异表达基因 KEGG 富集

Figure 4-12 KEGG enrichment of down-regulated differentially expressed genes in roots

注：A.柱状图；B.气泡图。

Note: A. Bar chart; B. Bubble diagram.

4.4.1.6 叶片通路差异基因分析

基于转录组数据系统分析叶片中卡尔文循环、光反应系统、叶绿素代谢、淀粉/蔗糖代谢、糖酵解途径和 TCA 循环等相关的 DEGs ($|\text{Log}_2\text{FC}| \geq 0.2$) 表明 (图 4-13), *SiFBA4* 过表达对光合相关代谢通路产生显著影响。

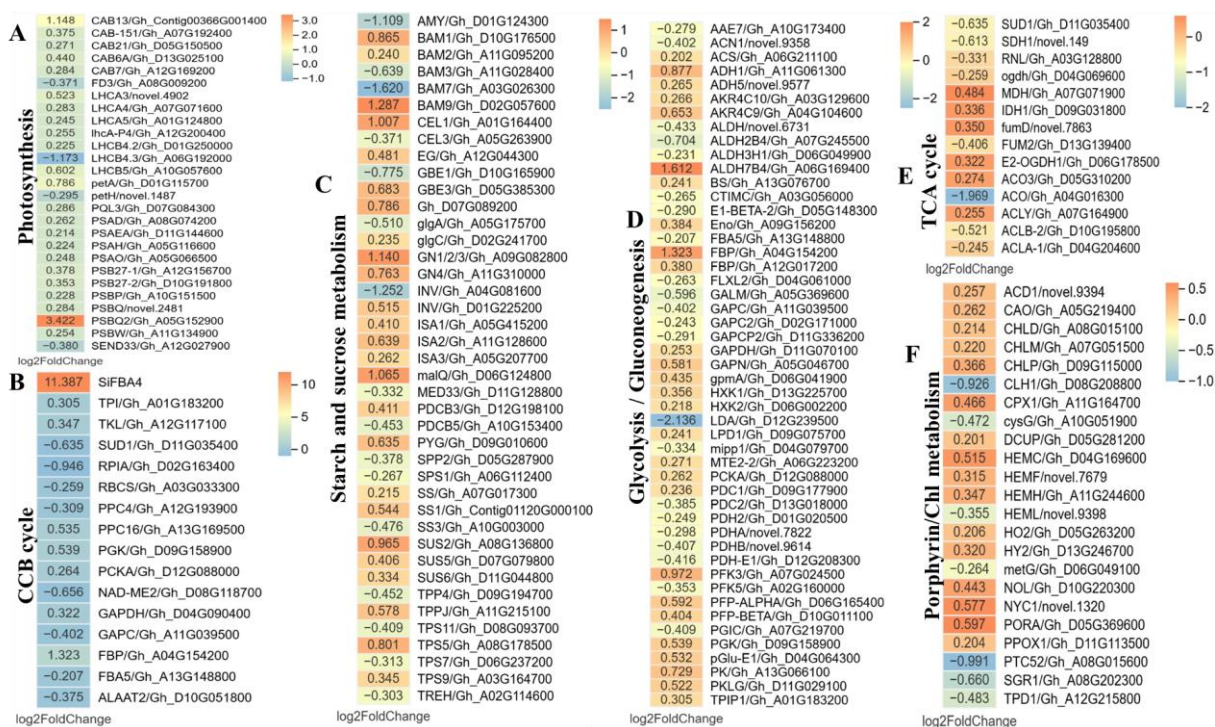


图 4-13 叶片光合作用和碳水化合物代谢相关途径的 DEGs

Figure 4-13 DEGs in pathways related to leaf photosynthesis and carbohydrate metabolism

注: A. 光合作用; B. 光合作用碳固定; C. 淀粉和蔗糖代谢途径; D. 糖酵解途径; E. TCA 循环; F. 卟啉和叶绿素代谢途径。

Note: A. Photosynthesis; B. Photosynthetic Carbon Fixation; C. Starch and Sucrose Metabolic Pathways; D. Glycolytic Pathways; E. TCA Cycle; F. Porphyrin and Chlorophyll Metabolic Pathways.

如图 4-13B 所示, 卡尔文循环中 *SiFBA4* 基因表达显著上调 ($\text{Log}_2\text{FC}=11.39$), 伴随果糖-1,6-二磷酸酶 (FBP, $\text{Log}_2\text{FC}=1.32$)、磷酸甘油酸激酶 (PGK, $\text{Log}_2\text{FC}=0.54$) 和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PPC16, $\text{Log}_2\text{FC}=0.54$) 等基因表达上调, 而核酮糖-5-磷酸异构酶 (RPIA, $\text{Log}_2\text{FC}=-0.95$) 和苹果酸酶 (NAD-ME2, $\text{Log}_2\text{FC}=-0.66$) 等基因表达下调。光反应系统中, 中心蛋白复合体相关基因 *PSBQ2* ($\text{Log}_2\text{FC}=3.42$)、叶绿素 a/b 结合蛋白 (CAB13, $\text{Log}_2\text{FC}=1.15$)、细胞色素 b6/f 复合体亚基 (*petA*, $\text{Log}_2\text{FC}=0.79$) 及捕光复合体 II (LHCB5, $\text{Log}_2\text{FC}=0.60$) 显著上调; 而 *petH* 基因 ($\text{Log}_2\text{FC}=-0.30$) 和铁氧还蛋白 (*FD3*, $\text{Log}_2\text{FC}=-0.37$) 等电子传递链及 *LHCB4.3* ($\text{Log}_2\text{FC}=-1.17$) 基因表达下调。碳水化合物代谢方面, 淀粉/蔗糖代谢途径中 β -淀粉酶 (*BAM9*, $\text{Log}_2\text{FC}=1.29$)、葡萄糖激

酶 (GN1/2/3, Log2FC=1.14) 和蔗糖合成酶 (SUS2, Log2FC=0.97) 显著上调; α -淀粉酶 (AMY, Log2FC=-1.11) 和糖原分支酶 (GBE1, Log2FC=-0.78) 等基因表达下调。糖酵解途径关键调控基因 FBP (Log2FC=1.32)、磷酸果糖激酶 (PFK3, Log2FC=0.97) 和丙酮酸激酶 (PK, Log2FC=0.73) 上调表达; 乳酸脱氢酶 (LDH, Log2FC=-2.14) 和丙酮酸脱氢酶 (PDH-E1, Log2FC=-0.42) 等表达下调。TCA 循环中苹果酸脱氢酶 (MDH, Log2FC=0.48) 和异柠檬酸脱氢酶 (IDH1, Log2FC=0.34) 等基因上调, 而顺乌头酸酶 (ACO, Log2FC=-1.97) 和琥珀酸脱氢酶 (SDH1, Log2FC=-0.61) 等基因表达下调。叶绿素代谢方面, 原叶绿素酸酯氧化还原酶 (PORA, Log2FC=0.60) 和尿卟啉原脱羧酶 (HEMC, Log2FC=0.52) 等合成相关基因显著上调; 而叶绿素降解调控基因 *SGR1* (Log2FC=-0.66) 和叶绿素酶 (CLH1, Log2FC=-0.93) 下调表达。

4.4.1.7 根系通路差异基因分析

进一步分析根系碳水化合物代谢途径的 DEGs 显示, 根系代谢通路呈现特异性调控特征。

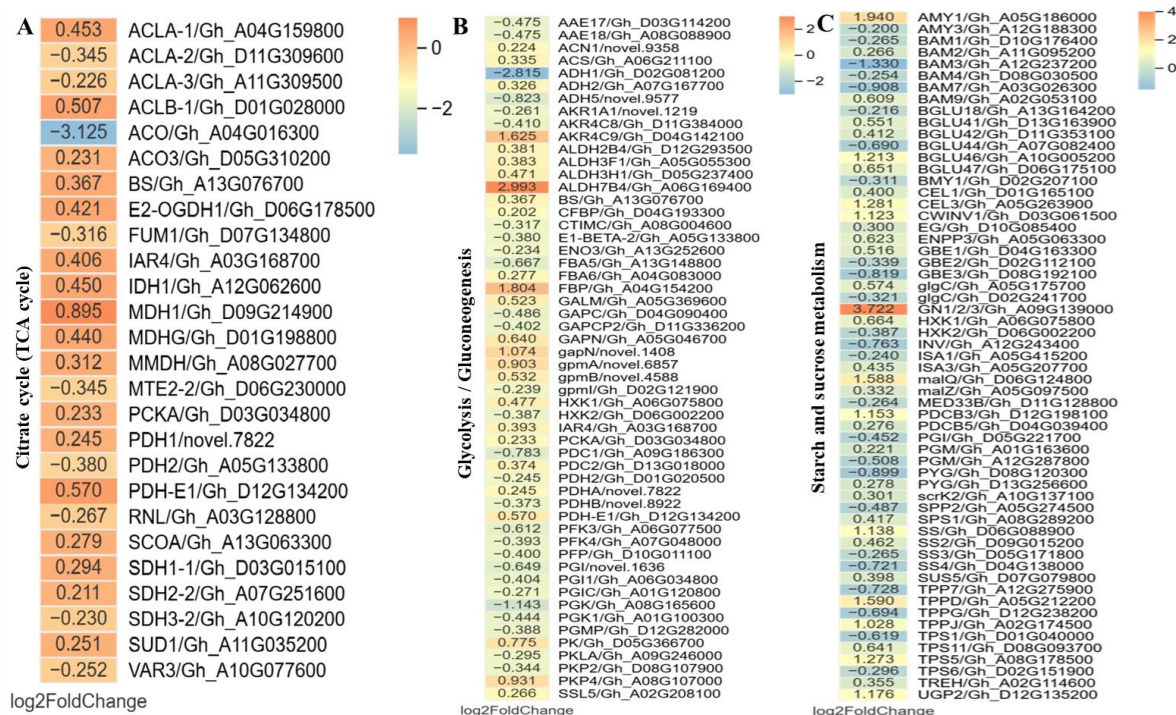


图 4-14 根系主要碳水化合物代谢途径的 DEGs

Figure 4-14 DEGs of major carbohydrate metabolic pathways in roots

注: A. TCA 循环; B. 糖酵解途径; C. 淀粉和蔗糖代谢途径。

Note: A. TCA cycle; B. glycolytic pathway; C. starch and sucrose metabolic pathways.

如图 4-14 所示，糖酵解途径中非磷酸化甘油醛脱氢酶（gapN, Log2FC=0.64）和丙酮酸激酶（PKP4, Log2FC=0.93）显著上调；乙醇脱氢酶（ADH1, Log2FC=-2.82）磷酸甘油酸激酶（PGK, Log2FC=-1.14）等基因表达下调。淀粉/蔗糖代谢途径中 α -淀粉酶（AMY1, Log2FC=1.94）和海藻糖-6-磷酸磷酸酶（TPPD, Log2FC=1.59）上调表达； β -淀粉酶（BAM3, Log2FC=-1.33）等基因表达下调。TCA 循环中苹果酸脱氢酶（MDH1, Log2FC=0.90）和异柠檬酸脱氢酶（IDH1, Log2FC=0.45）显著上调；而延胡索酸酶（FUM1, Log2FC=-0.32）等基因表达下调。

4.4.1.8 糖转运通路差异基因分析

糖转运系统呈现显著的组织特异性表达模式（图 4-15）。叶片转运系统中，*SWEET*s 家族基因（*SWEET17*, Log2FC=1.65）、蔗糖转运蛋白（*SUC3*, Log2FC=0.52）和质体葡萄糖转运体（pGlcT, Log2FC=0.97）显著上调；根系转运系统则表现为 *SWEET17*（Log2FC=0.93）、单糖转运蛋白（*STP5*, Log2FC=0.97）、质体单糖转运体（*MEX1*, Log2FC=0.43）和磷酸丙糖转运体（*TPT*, Log2FC=0.95）的显著上调，同时质体葡萄糖转运体（pGlcT, Log2FC=-1.93）表达显著下调。

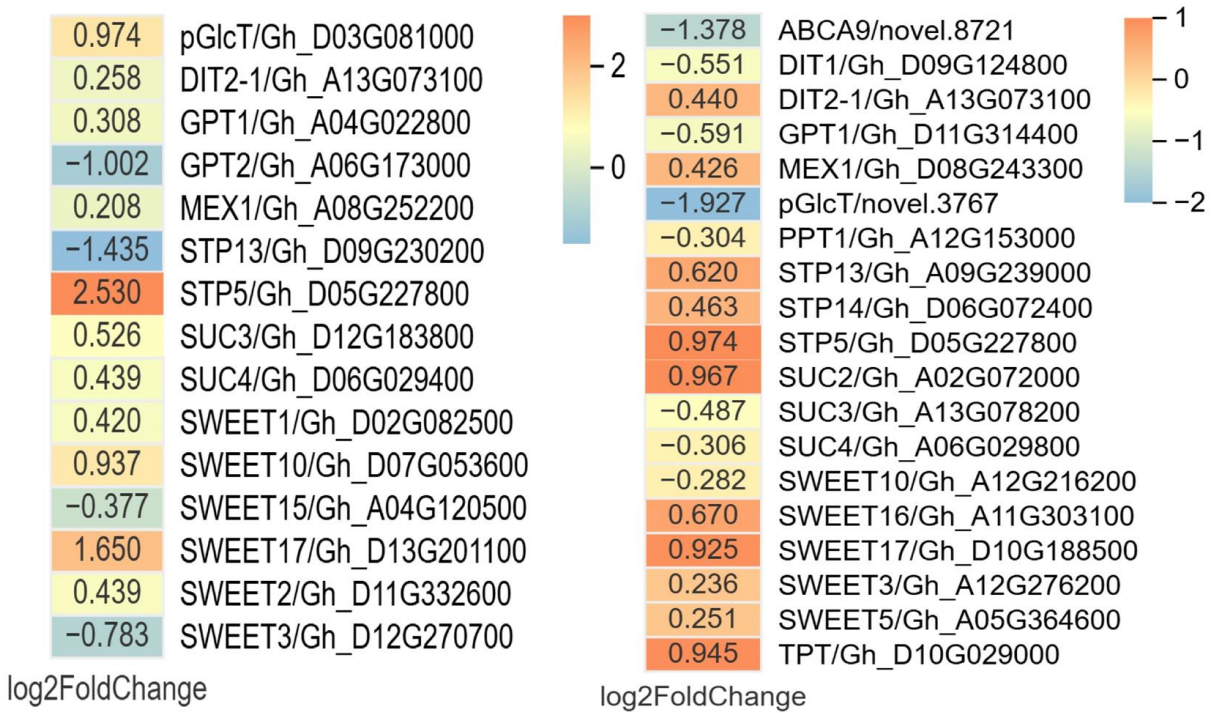


图 4-15 源库系统糖转运途径及相关的 DEGs

Figure 4-15 Source-sink system sugar transport pathways and related DEGs

注：A. 叶片糖转运相关 DEGs；B. 根系糖转运相关 DEGs。

Note: A. leaf sugar transport-associated DEGs; B. root sugar transport-associated DEGs.

4.4.2 代谢组数据分析

4.4.2.1 代谢物定性与相关性分析

基于超高效液相色谱-串联质谱（UHPLC-MS/MS）平台，采用 Analyst 1.6.3 软件进行代谢物检测与定量分析。质控样本（QC）的总离子流图（TIC）显示（图 4-16A），色谱峰分离度良好。多反应监测（MRM）模式下提取的离子流谱图（XIC）显示（图 4-16B），目标代谢物在保留时间维度具有良好分离度，基峰强度分布符合正态性检验。

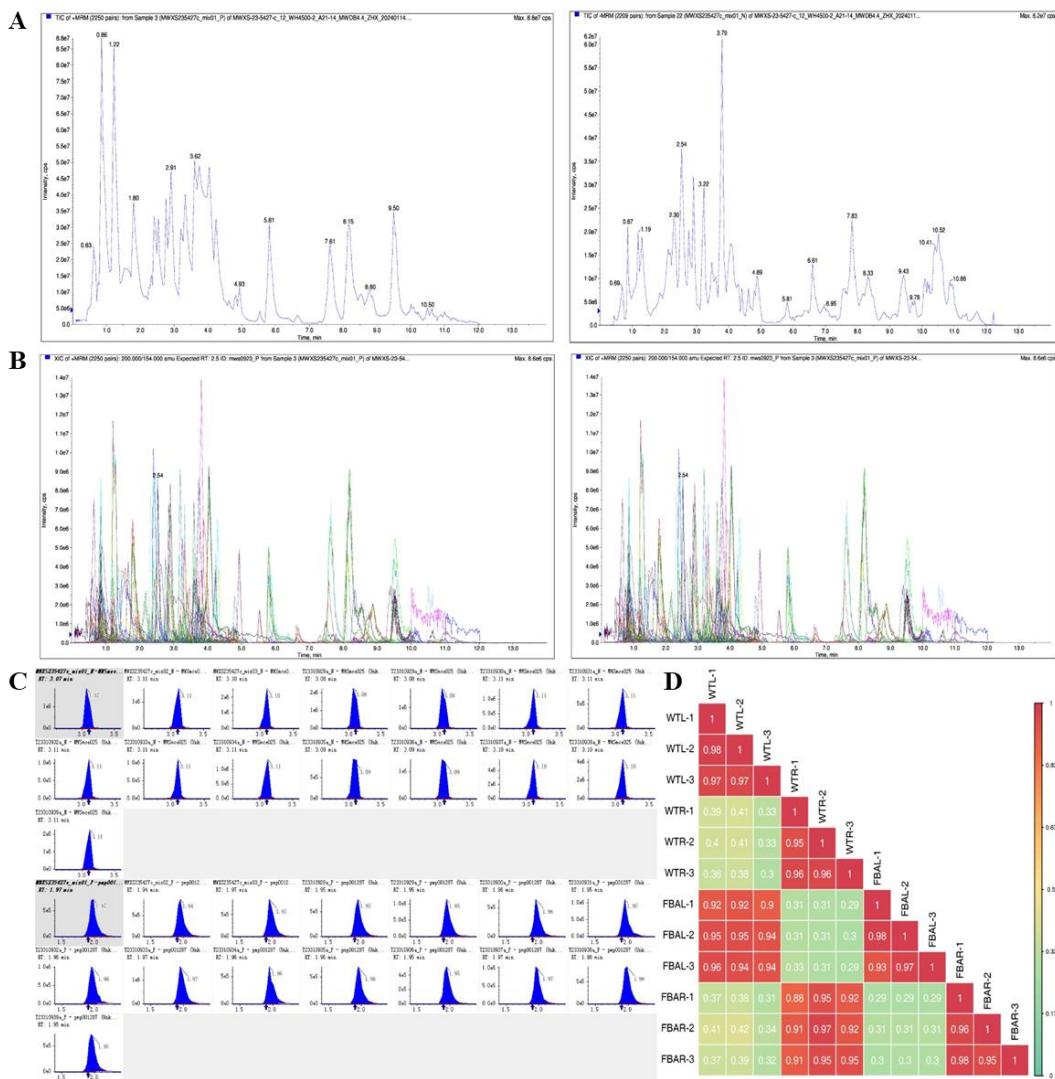


图 4-16 棉花代谢物定性定量和相关性分析

Figure 4-16 TIC diagram and ion flow spectrum of multi-substance extraction of cotton QC sample

注：A. TIC 图；B. 多物质提取的离子流谱图；C. 代谢物积分校正图；D. 样品间相关性图。

Note: A. TICplots; B. Ion flow spectra of multi-substance extractions; C. Metabolite integral correction plots; D. Inter-sample correlation plots.

为确保数据可靠性，本研究根据代谢物保留时间与峰型的信息，对每个代谢物在不同样本中检测到的色谱峰进行校正，以确保定性定量的准确。随机抽取的代谢物在不同样本中的定量分析积分校正结果（图 4-16C）。通过样品之间的相关性分析可以观察组内样品之间的生物学重复。同时组内样品相对组间样品的相关系数越高，获得的差异代谢物越可靠。本研究采用皮尔逊相关系数 r （Pearson's Correlation Coefficient）作为生物学重复相关性的评估指标。组内皮尔逊相关系数 $r=0.93\sim 1$ ，组间相关性系数 $r=0.29\sim 0.42$ （图 4-16D），证实实验体系具有良好重复性。

4.4.2.2 组织特异性代谢物差异分析

通过广泛靶向代谢组学技术，在棉花叶片和根系中鉴定到 11 类 388 种差异积累代谢物（Differentially accumulated metabolites, DAMs, $VIP>1, |Log_2FC| \geq 1$ ）。

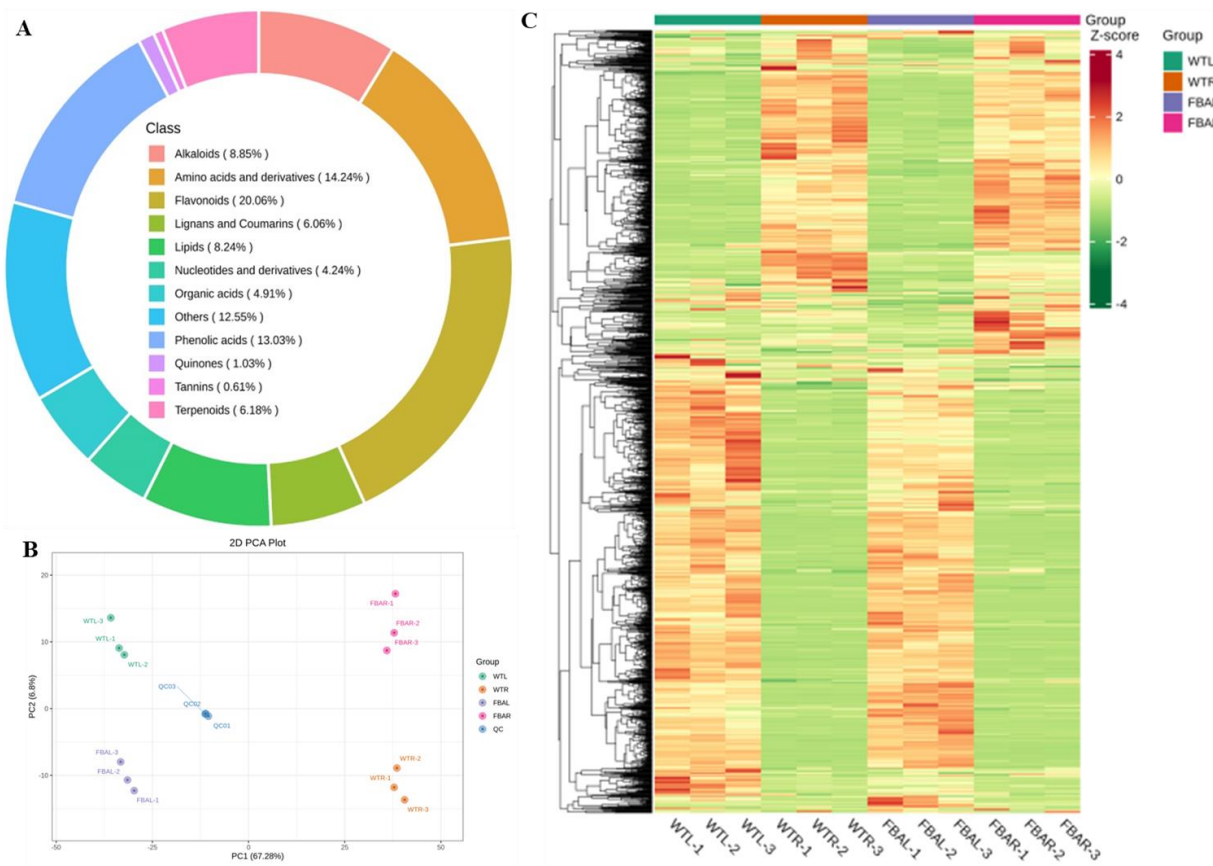


图 4-17 转基因棉花叶片和根系中的差异代谢物类别

Figure 4-17 Differential metabolite classes in transgenic cotton leaf and root

注：A. 差异代谢物分类；B. 主成分分析：蓝色点为 QC 样本，绿色点为野生型叶片样本，橙色点为野生型根系样本，紫色点为转基因叶片样本，粉色点为转基因根系样本，每个颜色的数量代表各样本的数量；C. 棉花叶片和根系差异代谢物聚类分析 heatmap；D. $VIP>1$ 和 $|Log_2FC|>1$ 时叶片中的差异代谢物火山图；E. $VIP>1$ 和 $|Log_2FC|>1$ 时根中的差异代谢物火山图。

Note: A. Differential metabolite categories; B. Principal component analysis: Blue dots are QC samples, green dots are wild-type leaf samples, orange dots are wild-type root samples, purple dots are transgenic leaf samples, pink dots are transgenic root samples, and the number of each color represents the number of samples; C. Cluster analysis heatmap.

叶片有 167 种 DAMs（上调 49，下调 118），根系 221 种（上调 158，下调 63）（图 4-17A, 4-18A-B）。代谢物分类统计显示：初级代谢产物有氨基酸及其衍生物 44 种、核苷酸及其衍生物 19 种、有机酸 18 种、脂质 11 种；次级代谢产物包括黄酮类 77 种、生物碱 18 种、酚酸类 50 种、萜类 32 种、木质素和香豆素 23 种、醌类 2 种、鞣质 2 种，和其他 48 种。主成分分析（PCA）结果显示（图 4-16B），QC 样本集中于坐标原点，证实数据稳定性。转基因样本在 PC1（67.28%）负向分布，WT 样本在 PC1 正向分布；转基因叶片样本沿 PC2（6.80%）负向分布，WT 叶片则分布于 PC2 正向，根系样本呈现相反分布模式，表明 WT 和转基因的代谢差异显著。层次聚类热图（图 4-17C）进一步揭示各组的生物学重复之间较为集中，样品间的生物学重复良好，且数据可靠性较高。

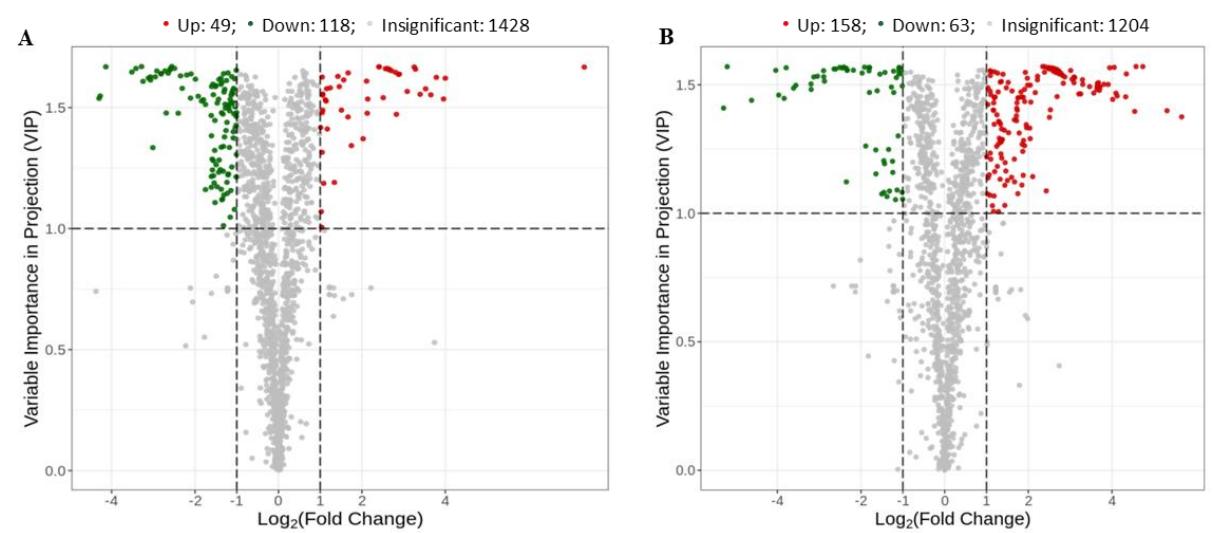


图 4-18 转基因棉花叶片和根系中的差异代谢物火山图

Figure 4-18 Volcano map of differential metabolites in transgenic cotton leaf and root tissues

注：A.. VIP>1 和|Log2FC|>1 时叶片中的差异代谢物火山图；B. VIP>1 和|Log2FC|>1 时根中的差异代谢物火山图。
Note: A. Differential metabolite volcano plots in leaves at VIP>1 and |Log2FC|>1; B. Differential metabolite volcano plots in roots at VIP>1 and |Log2FC|>1 (metabolite volcano plots).

4.4.2.3 代谢通路富集特征

基于 KEGG 数据库的富集分析显示（图 4-19, 4-20），差异代谢物呈现显著的器官组织特异性分布特征。

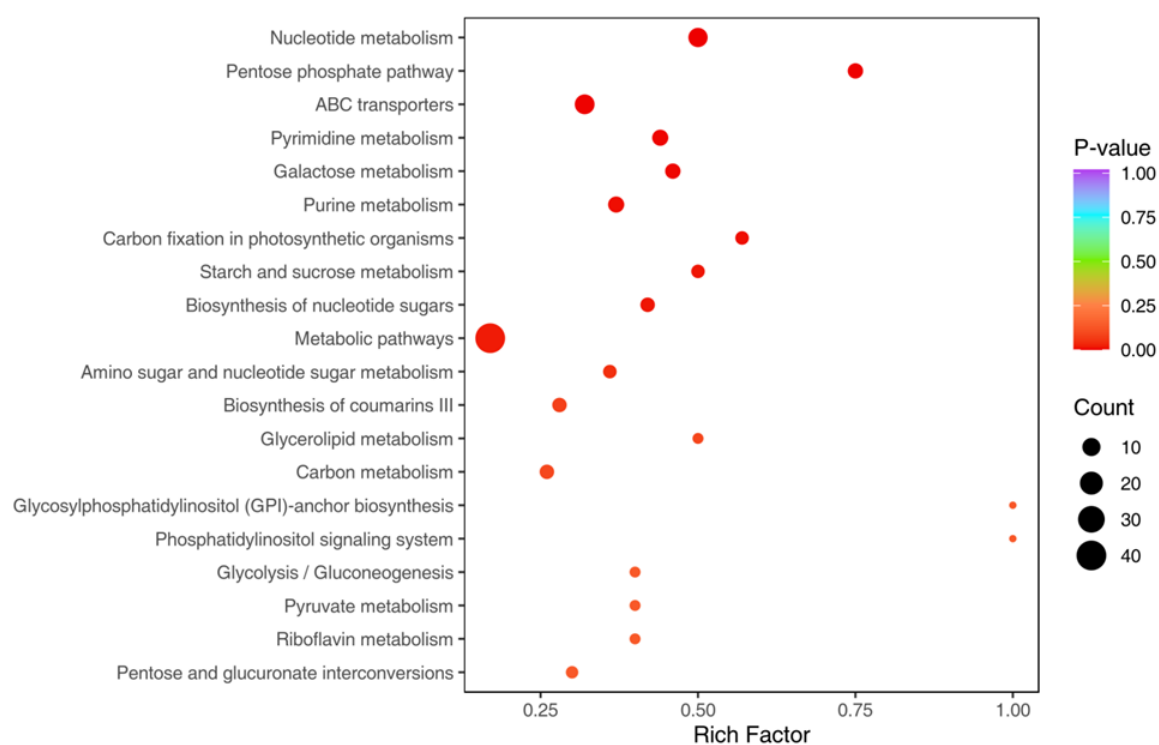


图 4-19 棉花叶片差异代谢物 KEGG 富集图

Figure 4-19 KEGG enrichment map of differential metabolites in cotton leaves

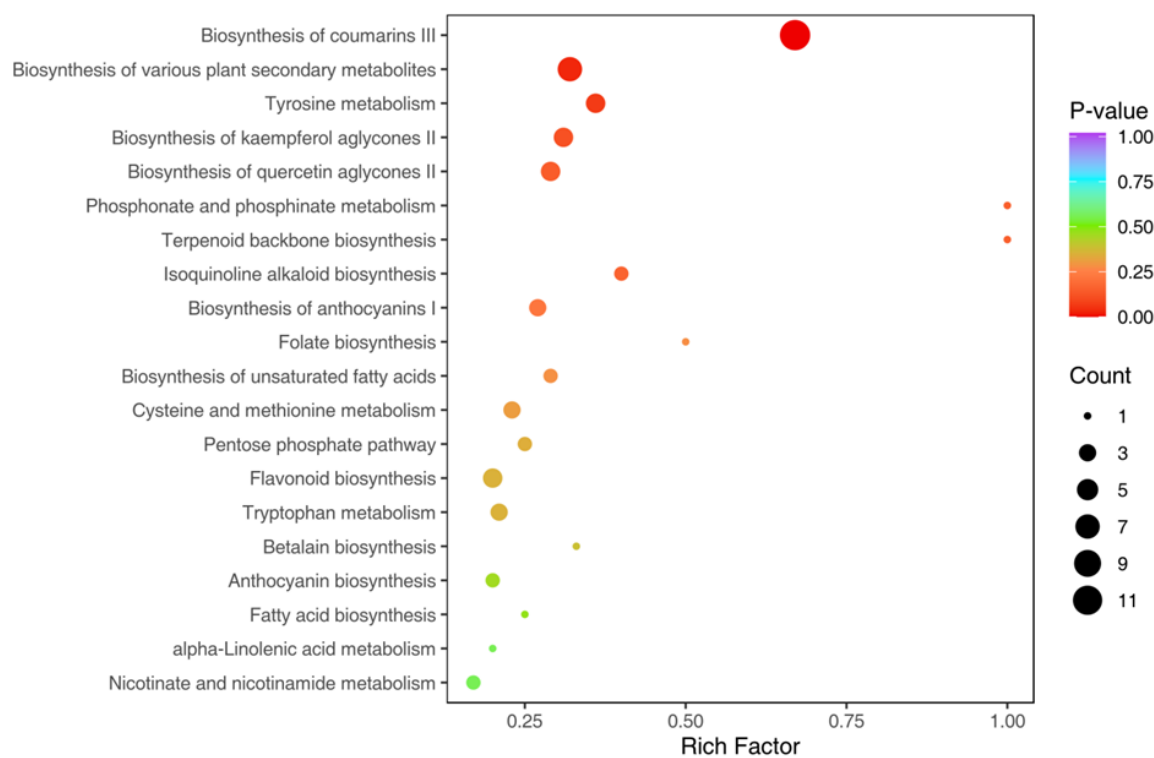


图 4-20 棉花根系差异代谢物 KEGG 富集图

Figure 4-20 KEGG enrichment map of differential metabolites in cotton roots

经超几何分布检验 ($FDR < 0.05$), 叶片中差异代谢物显著富集于 68 条代谢通路, 其中前 5 位核心通路为: 代谢途径 (ko01100, 67.80%); 次生代谢物生物合成 (ko01110, 32.20%); ABC 转运蛋白系统 (ko02010, 22.03%); 嘧啶代谢 (ko00240, 11.86%); 嘌呤代谢 (ko00230, 11.86%)。根系中差异代谢物主要富集于 38 条通路 ($FDR < 0.05$), 其显著富集通路包括: 初级代谢途径 (ko01100, 47.48%); 次生代谢物生物合成 (ko01110, 40.76%); 香豆素生物合成 (ko00944, 20.34%) 和辅酶因子合成 (ko01240, 8.47%)。

4.4.2.4 转基因棉花组织特异性糖代谢特征

基于谢组学的定量分析显示 (图 4-21), *SiFBA4* 过表达引发叶片与根系糖代谢的显著异质性变化。

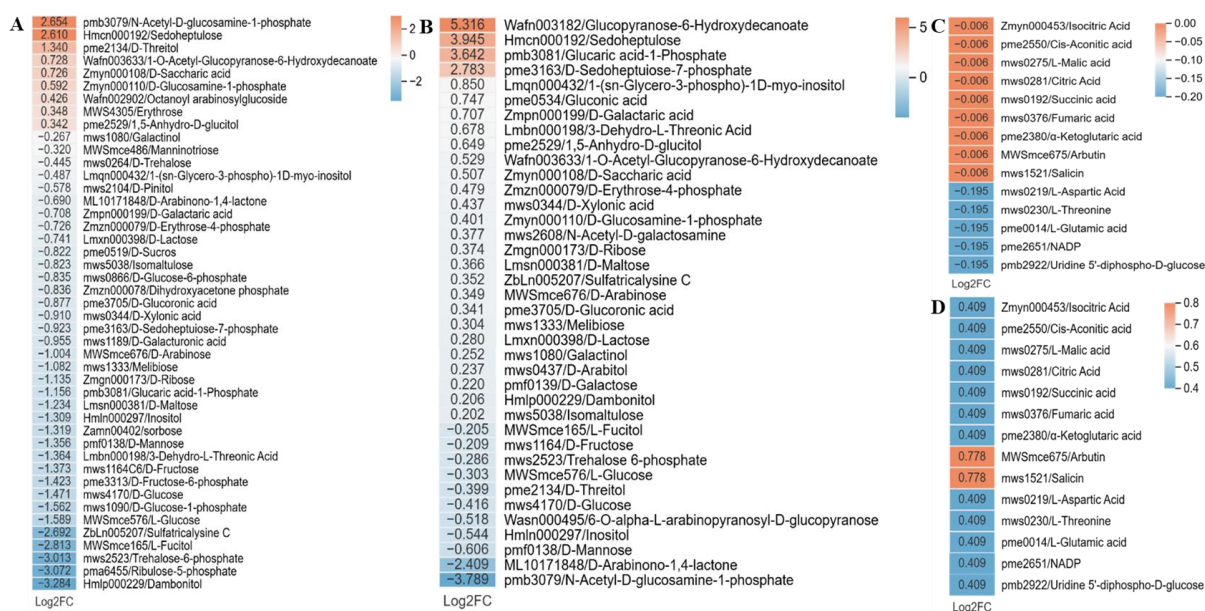


图 4-21 叶片和根系差异积累的糖类以及糖酵解和 TCA 循环其他代谢物

Figure 4-21 Differentially accumulated sugars and other metabolites of glycolysis and TCA cycle in leaves and roots

注: A. 叶片糖类代谢物; B. 根系糖类代谢物; C. 叶片糖酵解和 TCA 循环其他代谢物; D. 根系糖酵解和 TCA 循环其他代谢物。

Note: A. Leaf sugar metabolites; B. Root sugar metabolites; C. Leaf glycolysis and other metabolites of the TCA cycle; D. Root glycolysis and other metabolites of the TCA cycle.

在糖类代谢物层面 (图 4-21A-B), 叶片中检测到 29 种糖类呈现显著积累差异 ($FDR < 0.05$), 其中 9 种代谢物上调, 20 种下调: 含量上调的代谢物有 N-乙酰-D-葡萄糖胺-1-磷酸 ($\text{Log2FC} = 2.65$)、景天庚酮糖 ($\text{Log2FC} = 2.61$)、D-苏糖醇 ($\text{Log2FC} = 1.34$) 等。含量下调的代谢物有 D-阿拉伯糖 ($\text{Log2FC} = 1.00$)、蜜二糖 ($\text{Log2FC} = -1.08$)、D-

核糖 (Log2FC=-1.13)、葡糖二酸-1-磷酸 (Log2FC=-1.16)、D-麦芽糖 (Log2FC=-1.23)、肌醇 (Log2FC=-1.31)、山梨糖 (Log2FC=-1.32)、甘露糖 (Log2FC=-1.36)、3-脱氢-L-苏糖酸 (Log2FC=-1.36)、D-果糖 (Log2FC=-1.37)、D-果糖-6-磷酸 (Log2FC=-1.42)、D-葡萄糖 (Log2FC=-1.47)、D-葡萄糖-1-磷酸 (Log2FC=-1.56)、L-葡萄糖 (Log2FC=-1.59)、硫酸三叶草苷 C (Log2FC=-2.69)、L-岩藻糖醇 (Log2FC=-2.81)、海藻糖-6-磷酸 (Log2FC=-3.01)、核酮糖-5-磷酸 (Log2FC=-3.07) 和橡胶肌醇 (Log2FC=-3.28) 等糖类。根系共鉴定 22 种差异糖类, 含量上调的主要有吡喃葡萄糖 (Log2FC=5.32)、景天庚酮糖 (Log2FC=3.95)、葡糖二酸-1-磷酸 (Log2FC=3.64) 和 D-景天庚酮糖-7-磷酸 (Log2FC=2.78), 含量减少较多的糖类主要有 D-阿拉伯-1,4-内酯 (Log2FC=-2.41) 和 D-氨基葡萄糖-1-磷酸 (Log2FC=-3.79)。关键转运糖类呈现器官差异积累, 叶片中蔗糖 (Log2FC=-0.82) 含量降低, 根系对应糖类积累增加 (蔗糖 Log2FC=0.16)。

能量代谢通路分析 (图 4-21C-D) 显示, 叶片糖酵解和 TCA 循环中间代谢物未呈现显著变化, 而根系代谢显著增强, 具体表现为糖酵解产物尿苷 5'-二磷酸-D-葡萄糖 (Log2FC=0.41), TCA 循环中间体柠檬酸 (Log2FC=0.41) 和 α -酮戊二酸 (Log2FC=0.41), 以及有机酸 L-苹果酸 (Log2FC=0.41) 的显著积累。

4.4.3 转基因棉花转录代谢网络调控机制解析

为阐明 *SiFBA4* 基因过表达对棉花光合碳同化产物运输和产量形成的调控机制, 本研究通过分析叶片与根系差异表达基因 (DEGs) 及差异积累代谢物 (DAMs) 数据 (图 4-22, 4-23), 构建了源-库器官协同作用的代谢调控网络 (图 4-24)。

4.4.3.1 叶片光合碳同化与能量代谢调控

叶片是植物光合碳固定的主要器官, 大气中的 CO_2 由卡尔文循环碳固定开始, 形成蔗糖等有机物, 并经过糖酵解和淀粉/蔗糖代谢等途径调节植物的生长发育。

卡尔文循环作为光合碳同化的核心途径, 其三个关键阶段在转基因植株中表现出差异化调控特征 (图 4-22)。羧化阶段中, Rubisco 小亚基编码基因 *RbcS* (Log2FC=0.26) 表达下调, 但其底物 RuBP 含量保持稳定; 还原阶段调控基因未见显著变化; 再生阶段关键酶基因 (*FBP*, Log2FC=1.32; *PGK*, Log2FC=0.54) 表达显著上调, 而 *RPIA* 基因 (Log2FC=0.95) 表达降低, 其催化产物核酮糖-5-磷酸 (Log2FC=-3.07) 显著降低。值得注意的是, 尽管 *FBP* 等再生阶段酶基因表达上调, 但其催化产物 (果糖-6-磷酸, Log2FC=-1.42) 含量却显著降低。结合光系统相关基因 (*PSI/II* 核心亚基, Log2FC=0.21~3.42; *LHC* 蛋白编码基因 Log2FC=0.22~0.60) 的协同上调, 提示转基因

植株可能通过提升光能捕获效率（叶绿素 a/b 合成蛋白基因上调，Log2FC=0.21~0.59；*SGR1* 基因下调，Log2FC=-0.66），促进 ATP 和 NADPH 合成，进而加速卡尔文循环代谢和光反应过程，导致中间产物浓度降低而周转速率提升（图 4-23）。

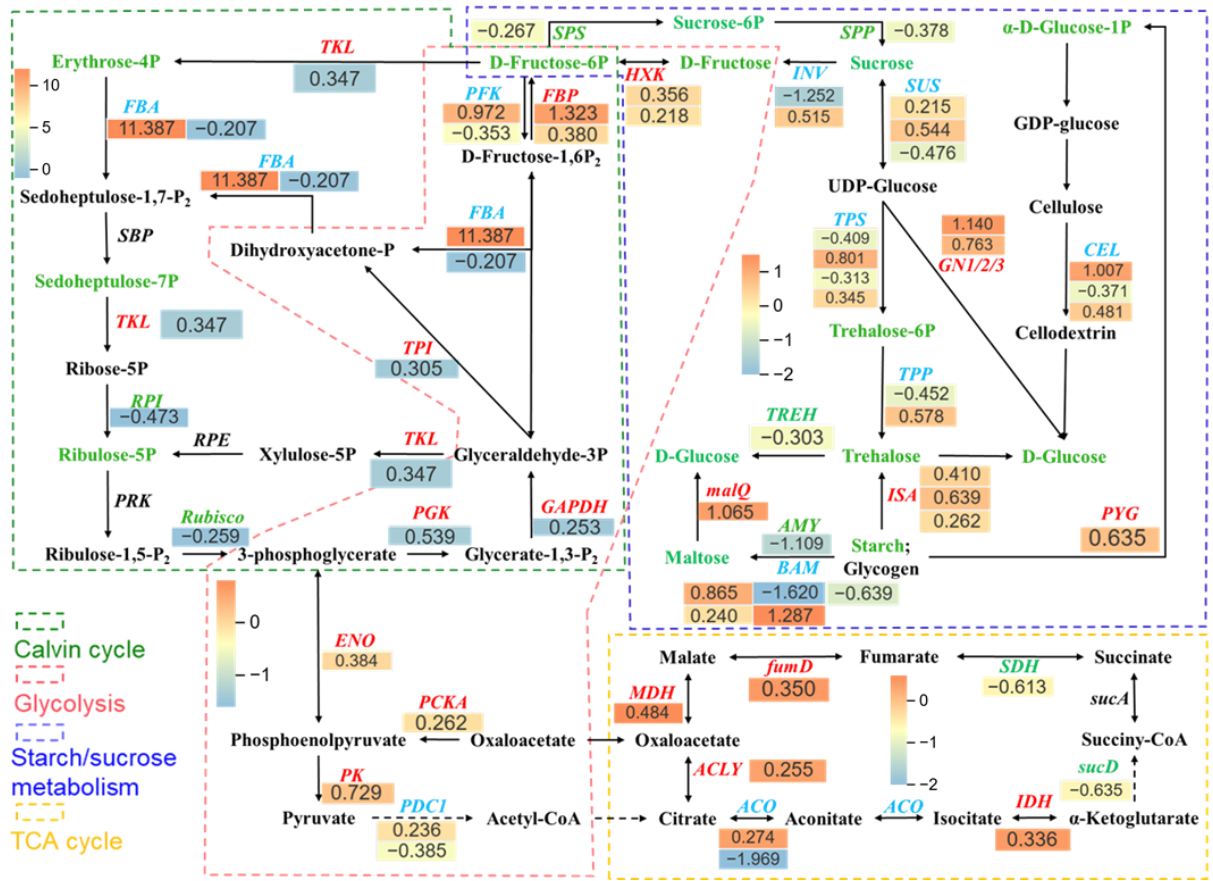


图 4-22 *SiFBA4* 转基因棉花叶片糖代谢相关基因表达和代谢调控机制图

Figure 4-22 Mapping of gene expression and metabolic regulatory mechanisms associated with sugar metabolism in *SiFBA4* transgenic cotton leaves

注：斜体表示基因，非斜体表示中间产物，红色字体表示表达水平提高，绿色表示表达水平降低，蓝色字体表示表达水平既有提高也有降低。

Note: Italicized text denotes genes, whereas non-italicized text represents intermediates. The red font signifies increased expression levels, the green font indicates decreased expression levels, and the blue font denotes both increased and decreased expression levels.

在碳代谢过程中，叶片中果糖-6-磷酸（Log2FC=-0.84）、葡萄糖（Log2FC=-1.47）等中间产物含量降低，而丙酮酸合成相关基因（*PK*, Log2FC=0.73）及 TCA 循环限速酶基因（*IDH1*, Log2FC=0.43；*MDH*, Log2FC=0.48）表达量升高，促进 NADH 生成。淀粉和蔗糖代谢通路中，尽管葡萄糖-1-磷酸（Log2FC=-1.56）等前体物质减少，但淀粉合成关键基因（*glgC*, Log2FC=0.24；*PYG*, Log2FC=0.64）与分解基因（*ISA*, Log2FC=0.64；*AMY*, Log2FC=1.11）上调，显示转基因植株通过合成和分解机制实现碳水化合物的代谢

平衡。蔗糖合成酶 SUS (Log2FC=0.97) 和己糖激酶 HKX (Log2FC=0.36) 的上调可能促进蔗糖进入其他代谢途径, 为进一步解析植物碳源-库关系提供了理论依据。

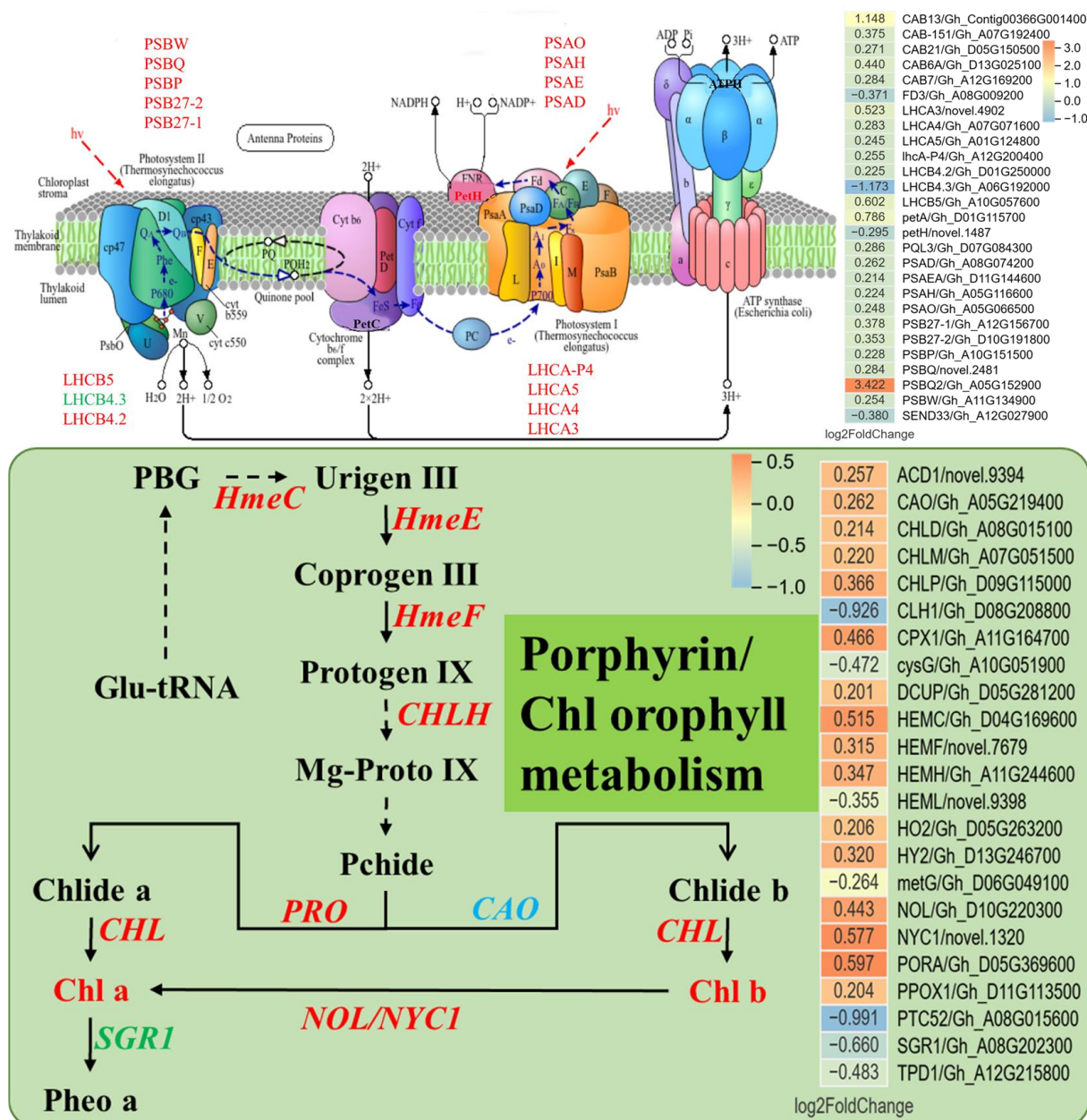


图 4-23 *SiFBA4* 转基因棉花叶片光反应相关基因表达和代谢调控机制图

Figure 4-23 Mapping of gene expression related to light response and the mechanism of metabolic regulation in *SiFBA4* transgenic cotton leaves

注：斜体表示基因，非斜体表示中间产物，红色字体表示表达水平提高，绿色表示表达水平降低，蓝色字体表示表达水平既有提高也有降低。

Note: Italicized text denotes genes, whereas non-italicized text represents intermediates. The red font signifies increased expression levels, the green font indicates decreased expression levels, and the blue font denotes both increased and decreased expression levels.

4.4.3.2 根系碳同化与能量代谢调控

与叶片碳代谢不同，根系糖酵解与 TCA 循环表现出显著地差异调控（图 4-24）。

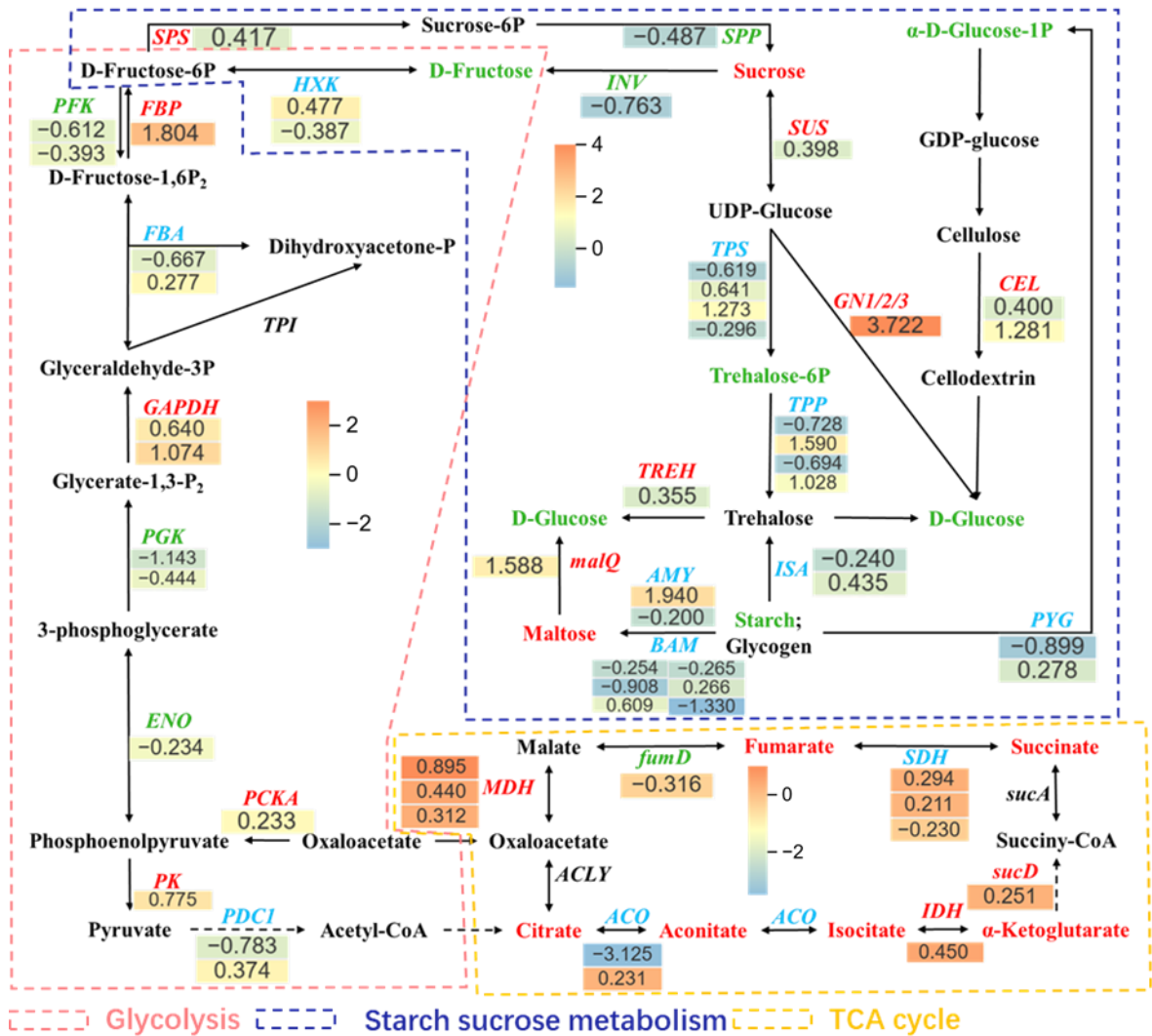


图 4-24 *SiFBA4* 转基因棉花根系基因和代谢调控机制图

Figure 4-24 General figure of *SiFBA4* transgenic cotton root regulatory mechanism

注：斜体表示基因，非斜体表示中间产物，红色字体表示表达水平提高，绿色表示表达水平降低，蓝色字体表示表达水平既有提高也有降低。

Note: Italicized text denotes genes, whereas non-italicized text represents intermediates. The red font signifies increased expression levels, the green font indicates decreased expression levels, and the blue font denotes both increased and decreased expression levels.

糖酵解主要代谢物(葡萄糖, Log2FC=-0.42)含量降低,可能因为 *FBP*(Log2FC=1.80)、*GAPN* (Log2FC=0.64)、*PCKA* (Log2FC=0.23) 和 *PK* (Log2FC=0.78) 等基因的上调改变了代谢水平。TCA 循环中间产物(柠檬酸、 α -酮戊二酸等, Log2FC=0.41)的积累与 *ACO* (Log2FC=-3.13) 下调表达与 *MDH* (Log2FC=0.90) 基因上调直接相关, 而 *IDH*

(Log2FC=0.45) 基因上调表达与 *SDH* 基因差异表达(部分亚基上调、部分下调)可能通过产生还原力(NADH 和 FADH₂), 提升能量代谢效率。值得注意的是, 根系淀粉/蔗糖代谢途径蔗糖合成酶基因 *SPS* (Log2FC=0.42) 和分解酶基因 *scrK* (Log2FC=0.31) 协同上调, 促进蔗糖快速转化为储存形式; 而 *GBE1/glgB* (Log2FC=0.52) 等糖原合成基因上调与 *BAMs* 基因表达分化, 提示根系可能通过改变糖原储存以维持根系碳代谢的稳态。

4.4.3.3 源-库协同运输机制解析

代谢组-转录组联合分析表明, *SiFBA4* 转基因株系通过促进糖转运系统实现源-库碳水化合物分配(图 4-25)。在源器官叶片中, *SWEETs* 家族基因的差异调控可能促进光合同化产物向韧皮部的装载, 与蔗糖转运蛋白 *SUC/T4* 的表达上调共同促进了光合同化产物向维管束的高效运输。库器官根系中, 细胞壁转化酶基因 *CWINV1* (Log2FC=1.12) 的上调表达可能促进蔗糖在质外体的分解, 而 *STP* 单糖转运蛋白(Log2FC=0.97) 则促进葡萄糖和果糖的跨膜吸收。值得关注的是, 韧皮部卸载环节中 *SWEETs* 家族基因的差异性表达, 可能通过建立跨膜浓度梯度驱动蔗糖的定向运输, 调控模式与质外体/共质体运输理论一致。

4.5 讨论

本研究从棉花农艺性状和生理学角度讨论了过表达 *SiFBA4* 基因对棉花生长发育及光合生理的影响, 过表达 *SiFBA4* 基因增加了棉花的光合效率, 同时也使棉花的生物量和产量得到提高, 纤维品质降低, 尚不清楚其生理机制。为此, 我们利用转录组和代谢组学分析了 OE-4 株系中 *SiFBA4* 基因在转录和代谢网络对棉花叶片和根系的影响, 通过比较光合作用和碳水化合物代谢等相关途径, 进一步揭示了 *SiFBA4* 基因能够促进棉花生物量和产量增加的生理机制。

4.5.1 转基因株系碳水化合物代谢网络构建与调控机制解析

光合作用作为植物能量转化的核心过程, 其效率直接影响作物碳同化能力及产量形成^[173]。本研究通过分析转录组和代谢组数据, 初步揭示了 *SiFBA4* 基因过表达引起的棉花光合代谢网络及其对碳分配的变化。转录组和代谢组联合分析表明, 转基因株系 OE-4 在叶片与根系中表现出显著的代谢差异。叶片中糖类物质含量降低, 而糖酵解和 TCA 循环中间产物无显著差异, 根系则表现出糖类积累与代谢增强的变化。这种器官间的差

异变化表明, *SiFBA4* 基因可能通过优化光合产物的运输分配(如将更多养分输送到棉铃等生殖器官)。

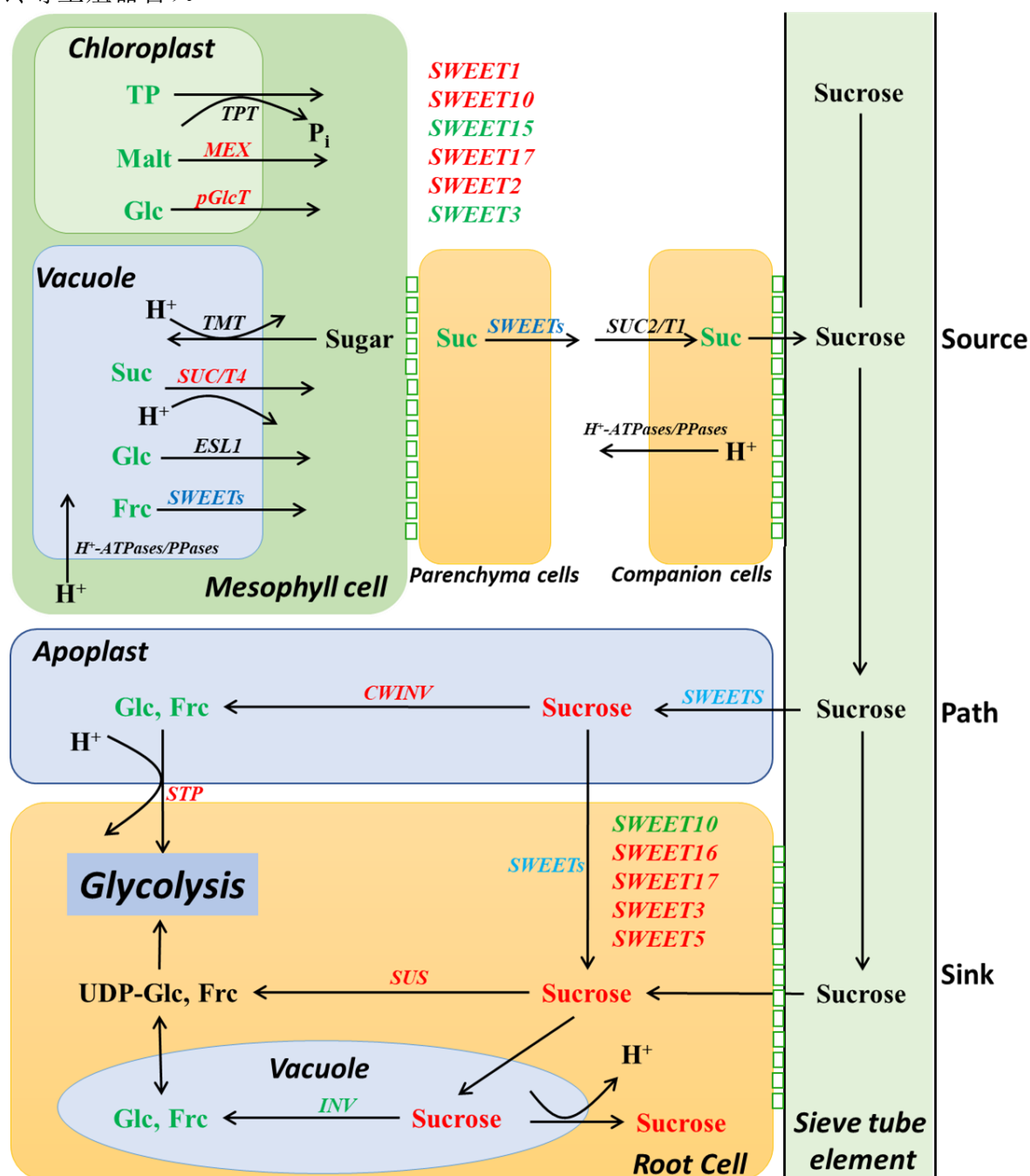


图 4-25 *SiFBA4* 转基因棉花糖转运机制图

Figure 4-25 Diagram of the *SiFBA4* transgenic cotton regulatory mechanism of sugar transport

注: 斜体表示基因, 非斜体表示中间产物, 红色字体表示表达水平提高, 绿色表示表达水平降低, 蓝色字体表示表达水平既有提高也有降低。

Note: Italicized text denotes genes, whereas non-italicized text represents intermediates. The red font signifies increased expression levels, the green font indicates decreased expression levels, and the blue font denotes both increased and decreased expression levels.

4.5.1.1 促进光合作用系统的调控

在光系统调控层面, *PSBs*、*PSAs*、*LHCBs* 和 *LHCAs* 等基因在光反应过程上调表达, 共同促进光能转化效率的优化。其中, *PSBQ2*、*CAB13* 和 *LHCB5* 基因在高光合能力的植株中均上调表达, 促进生物量的积累^[174, 175]。敲除 *LHCB5* 会导致类囊体排列紊乱, 基粒膜数量减少, 淀粉颗粒数量增加, 但是对电子传输速率影响较小^[176]。所以过表达 *SiFBA4* 基因可能通过激活光反应中心复合物和光捕获复合体组成亚基的活性, 协同增强光反应过程, 从而提升光能-化学能的转化效率。

叶片转录组数据显示, 叶绿素代谢途径上调的 DEGs 主要有 *PROA*、*NYC1*、*HEMC*、*CPX1* 和 *NOL* 等, 下调表达的 DEGs 有 *PTC52*、*CLH1*、*SGR1*、*TPD1* 和 *cysG*。其中, 原叶绿素氧化还原酶 (PRO) 在光照条件下催化原叶绿素还原为叶绿素, 是叶绿素生物合成过程中的关键步骤, 催化过程需要 NADPH、原叶绿素和光^[177, 178]。拟南芥中过表达 *BnGA2ox6* 增强了叶绿素 b 和总叶绿素积累, 参与叶绿素降解的 *CLH1* 和 *RCCR* 基因的 mRNA 表达水平降低^[179]。*SGR1* 在叶绿素降解中发挥作用, *sgr1* 敲除突变体在多种植物中表现出维持绿色的表型^[180, 181]。上述关于叶绿体合成和分解代谢途径的研究结果表明, *PROA*、*NYC1* 等叶绿素合成相关基因的激活 ($\text{Log2FC} > 0.58$) 可以促进叶绿素的合成, *SGR1* 等基因的下调表达 ($\text{Log2FC} = -0.66$) 抑制了叶绿素的降解途径。在分子层面揭示了 *SiFBA4* 过表达可能通过双向调控 (生物合成促进+降解抑制) 维持叶绿体功能稳态的机制, 该发现为高光效育种提供了重要靶点。

上述结果共同表明, *SiFBA4* 基因过表达能够促进光能的吸收、传递和转化, 优化了光反应系统, 在多基因协同作用下使棉花保持高效的光能利用效率, 进一步解释了田间试验中叶绿素含量的增加的结果。

4.5.1.2 加速碳代谢网络循环

深入解析卡尔文循环关键调控节点发现, *FBP*、*PGK*、*PPC16*、*TKL* 和 *GAPDH* 等基因上调, *RPIA*、*NAD-ME2*、*SUD1*、*GAPC* 和 *ALAAT2* 等基因下调。在高 CO_2 浓度下, 胞质 FBP 酶活性的增加能够影响糖的分配, 并使烟草植株的侧枝增加^[105], 而 PGK 具有 ATP 生成与 3-PGA 还原的双重作用^[182]。以及抑制硅藻 *PPC* 基因导致电子传输速率和光利用效率降低^[183]等结果, 为本研究中光合速率提升提供了酶动力学依据。核糖-5-磷酸异构酶 (RPI) 将核糖-5-磷酸异构化形成核酮糖-5-磷酸, 参与卡尔文循环中 Rubisco 底物的再生^[184]。与野生型相比, *OsGAPC7* 敲除突变体株高降低, *GBeI* 基因的表达比野生型植物高三倍, 而 *SS* 和 *PGK* 基因的表达显著降低, 淀粉和可溶性糖含量增加 60% 以上^[185], 为本研究中转基因株系下胚轴降低, 生物量增加的表型数据提供了证据。推测植

物可能通过激活替代途径（如糖酵解）维持能量稳态，为理解植物代谢网络可塑性提供了新视角。值得注意的是，本研究中 *GAPC* 基因下调表达，而 *GBEI* 下调表达，*SS* 和 *PGK* 基因上调表达。猜测 *GAPC* 基因活性降低，但依然像“代谢总开关”一样调控着其他关键基因的活动（如 *GBEI*、*SS* 和 *PGK*）。这种动态调控机制为理解作物如何精细调控养分储存提供了新视角。

糖酵解作为植物碳代谢的途径之一，通过 10 种关键酶的调控实现葡萄糖向丙酮酸的转化及 ATP 生成，其代谢过程对植物生长发育与逆境响应具有重要的影响。在糖代谢调控方面，发现 OE-4 株系 *HXK* 基因上调表达 ($\text{Log}_2\text{FC}=0.36$)，与番茄中过表达 *ZjHXK5* 和 *ZjHXK6* 导致可溶性糖含量降低的表现机制一致^[186, 187]。*HXK* 作为己糖磷酸化的限速酶，推测其表达水平的升高可能通过抑制质体糖转运蛋白活性，进而导致光合产物输出受阻。*pfk3/6* 突变体加速叶片的生长^[188]，推测 *PFK3*（叶 $\text{Log}_2\text{FC}=0.97$ ，根 $\text{Log}_2\text{FC}=-0.61$ ）可能通过调控果糖-1,6-二磷酸的生成，进而调节糖酵解与生物量积累和产量形成之间的关系。叶片和根系 *FBP* 表达水平上升（叶 $\text{Log}_2\text{FC}=1.32$ ，根 $\text{Log}_2\text{FC}=1.80$ ），根据蓝细菌 *FBP/SBPase* 基因过表达提高水稻的光合作用能力，并且显著地提高拟南芥的生物量和种子量^[110, 189]相关的研究，为转基因株系高光效、高生物量和高产的表现提供了有力的证明。*ADH1* 基因在根和叶的差异表达模式（叶： $\text{Log}_2\text{FC}=0.88$ ；根： $\text{Log}_2\text{FC}=-2.82$ ），与拟南芥中过表达 *ZaADH1* 增加植株总叶面积和叶绿素含量的作用机制一致^[190]，揭示了该基因在代谢调控中的双重角色：在叶片中可能通过增强乙醛脱氢酶活性促进叶绿体 NADPH 再生，而在根系可能通过调节乙醇代谢途径影响厌氧呼吸效率，为作物器官定向改良提供了理论依据。本研究通过构建 *SiFBA4* 基因过表达棉花株系，推测该基因可能通过改变糖酵解关键酶基因表达网络，实现碳水化合物再分配并提高棉花生物量的分子机制。

作为连接糖类、脂类和蛋白质三大物质代谢的核心枢纽，TCA 循环的酶系统通过氧化还原反应与电子传递链耦联，其代谢流量直接影响线粒体 ATP 生成效率^[191]。本研究发现转基因株系叶片转录组数据中 TCA 循环上调表达 DEGs 有 *MDH*、*fumD*、*IDH1*、*E2-OGDH1* 和 *ACO3* 等，下调表达的 DEGs 有 *ACO*、*SUD1*、*SDH1*、*ACLB-2* 和 *FUM2* 等。根系转录组数据中 TCA 循环 *MDH1*、*PDH-E1*、*ACLB-1*、*ACLA-1* 和 *IDH1* 等 DEGs 上调表达，*ACO*、*PDH2*、*MTE2-2*、*ACLA-2* 和 *FUM1* 下调表达。其中 *IDH1* 基因（叶： $\text{Log}_2\text{FC}=0.34$ ；根： $\text{Log}_2\text{FC}=0.45$ ）在叶片和根系中均上调表达，该基因编码的异柠檬酸脱氢酶作为 $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ 双辅酶依赖性酶，可能通过调控 α -酮戊二酸/异柠檬酸比值，影响组蛋白去甲基化酶的活性，从而在表观遗传层面调控碳代谢相关基因的表达。而番茄中反义表达线粒体 NAD 依赖性异柠檬酸脱氢酶基因 (*SIIDH1*)，导致在生长没有明显变化状态下，果实的大小和产量减少，最大光合效率 (Fv/Fm) 略有下降^[192]，揭示了该基因可能调控碳代谢方面的机制，为转基因株系产量的增加提供参考依据。*MDH1* 上调

表达（叶：Log2FC=0.48；根：Log2FC=0.90），与拟南芥和玉米 *MDH1* 过表达株系的叶绿素含量增加现象形成代谢机制层面的呼应^[193, 194]。除此之外，*ACO* 基因的下调表达（叶：Log2FC=-1.97；根：Log2FC=-3.13），可能与转基因株系全生育期延迟和糖代谢水平相关^[195, 196]，其作用机制可能涉及柠檬酸代谢通量的重新分配对糖代谢水平的影响。结果表明，TCA 循环 *IDH1* 和 *MDH1* 的上调表达，以及 *ACO* 的下调表达，通过调节异柠檬酸、苹果酸和柠檬酸的合成和分解，形成多层次调控网络影响植物碳代谢平衡，为解析本研究中转基因株系产量增加的分子机制提供了重要线索。

卡尔文循环、糖酵解/糖异生和 TCA 循环等碳代谢相关途径的调控变化结果表明，*SiFBA4* 基因过表达可能通过调节碳水化合物的再分配和还原力（ATP、NADH 和 FADH₂）的再生，加速碳水化合物的循环速率。

4.5.1.3 优化碳水化合物分配

本研究叶片 *BAM9*、*GN1/2/3*、*malQ*、*CEL1* 和 *SUS2* 等 DEGs 上调表达，*BAM7*、*INV*、*AMY*、*GBE1* 和 *BAM3* 等 DEGs 下调表达，根系 *GN1/2/3*、*AMY1*、*TPPD*、*malQ* 和 *CEL3* 等 DEGs 在淀粉和蔗糖代谢途径上调表达，下调表达的 DEGs 主要有 *BAM3*、*BAM7*、*PYG*、*GBE3* 和 *INV* 等。淀粉/蔗糖转录代谢网络揭示了淀粉在根和叶中可能得调控特征：叶片中 *BAM9*、*SUS2* 等淀粉降解基因的激活与根系 *GBE1*、*INV* 等合成基因的抑制，共同驱动碳源向生殖器官的再分配。

AMY 基因家族在根和叶器官中的表达异质性（叶片 Log2FC=-1.11，根系 Log2FC=1.94）揭示了其生物学功能的分化特征。结合 α -淀粉酶在植物中的功能理论^[197-199]，本研究认为在棉花生长过程中，*AMY* 既通过维持淀粉降解与能量供给的动态平衡（叶片上调），又通过参与碳源再动员（根系上调）以支持发育过程中提供所需的能量，以完成其生命周期。这种特异的功能分化现象为解析植物发育机制提供了新视角。叶片 *BAM9* 基因的显著上调（Log2FC=1.29）与 *BAM7* 基因的深度抑制（Log2FC=-1.62）形成此消彼长的调控模式，与拟南芥中 *BAM9* 过表达引发的淀粉降解增强现象具有保守性^[200]。*BAM1* 在叶片的特异上调（Log2FC=0.87）与根系（Log2FC=-0.27）的相对稳定表达形成组织分化特征，这可能与叶片作为碳源的功能密切相关，与 *bam1* 敲除突变体保卫细胞淀粉含量增加，气孔开度减小的现象相似^[201]，解释了转基因株系叶片气孔密度和开度增大的现象。

蔗糖合酶（*SUS*）在光合碳分配过程中发挥着重要的作用，在本研究中表现出多方面的调控特征。*SUS2* 基因参与 UDPG 的合成，其上调表达（Log2FC=0.97）验证了其在纤维素生物合成过程中的底物供给功能^[202]。*INV* 基因的下调表达（Log2FC=-1.25）与 *TPP/TPS*（*TPS5*, Log2FC=0.80）基因的上调，以及 *SUS2* 的表达模式通过抑制蔗糖的分

解和促进海藻糖的合成过程,提示植物可能通过抑制酸性转化酶途径来减少胞质蔗糖水解,进而强化海藻糖介导的碳缓冲机制^[203]。这种代谢模式的转变与 *ZmSUS1* 转基因玉米中观察到的光合增强效应的机制相似^[204]。此外,在狗尾草中过表达拟南芥 *AtCEL1* 提高了生物量和产量,促进早熟的研究现象^[205] (*CEL1*, Log2FC=1.01),进一步为 *SiFBA4* 转基因棉花生物量和产量增加提供了理论参考。

叶片和根系中 *PYG* (*WAXY*) 的差异表达(叶: Log2FC=0.64; 根: Log2FC=-0.90),以及 *ISA* 基因的上调表达(叶: Log2FC=0.63; 根: Log2FC=0.44),导致淀粉含量减少。其中 *PYG* 基因促进淀粉的合成,而 *ISA* 负责淀粉的降解,水稻 *waxy* 突变体和拟南芥 *isa* 突变体中淀粉含量的变化印证了这一现象^[206-208]。而 *GNs* 基因在根和叶中的表达上调(叶: Log2FC=1.14, 根: Log2FC=3.72)则推断其可能具有代谢-防御双重功能:在叶片中通过降解 β -1,3-葡聚糖参与碳源再活化,而在根系中则维持基础水平以应对病原胁迫。这种功能分化现象为理解植物代谢网络的生态适应性进化提供了新视角。关于 *GNs* 基因的研究集中在植物与病原体之间的相互作用,几乎没有研究报导关于该基因在植物生物量积累方面的研究^[209]。*GNs* 在许多植物物种中都大量存在,通过降解真菌细胞壁在对抗真菌病原体的防御反应中起主要作用,在真菌感染后与几丁质酶一起协调表达^[210]。

综上所述,本研究通过分析调节光合作用、糖酵解与 TCA 循环关键酶基因(*FBP*、*PFK3*、*IDH1* 等),从光合碳同化、糖酵解和线粒体代谢角度揭示了 *SiFBA4* 基因促进转基因株系生物量和产量增加的代谢调控模式。具体表现为,通过促进 *FBP* 基因上调,增强卡尔文循环再生阶段,提高 CO₂ 固定能力和光反应效率;通过调节 *PFK3* 等基因介导的糖酵解反应,促进碳水化合物(葡萄糖)合成丙酮酸;进而提高 *IDH1* 等基因的表达,催化 TCA 循环,加快线粒体 ATP 生成速率。淀粉/蔗糖代谢途径调控基因(*AMY*、*BAM9*、*BAM7*、*BAM1*、*PYG* 和 *GNs*)的异质性表达模式进一步解释了碳水化合物在源库器官分配的差异调控机制。为突破生物育种技术提供了参考方案。

4.5.2 *SiFBA4* 基因促进棉花源-库糖转运效率

植物光合碳同化产物的动态分配与再平衡是作物产量形成的关键调控节点,其中糖类物质不仅是能量载体,更是通过信号传导网络调控源-库关系的重要分子元件^[211, 212]。淀粉和蔗糖是植物中主要的碳水化合物,其中淀粉作为碳水化合物贮存在细胞质的淀粉粒中,而蔗糖以运输的形式通过维管组织在细胞和各组织之间输送^[213, 214]。然而,在蔗糖合成过程中释放的无机磷酸盐分子被返回到叶绿体中,用于合成更多的磷酸丙糖,如果蔗糖积累过多,光合作用会受到抑制^[215, 216]。

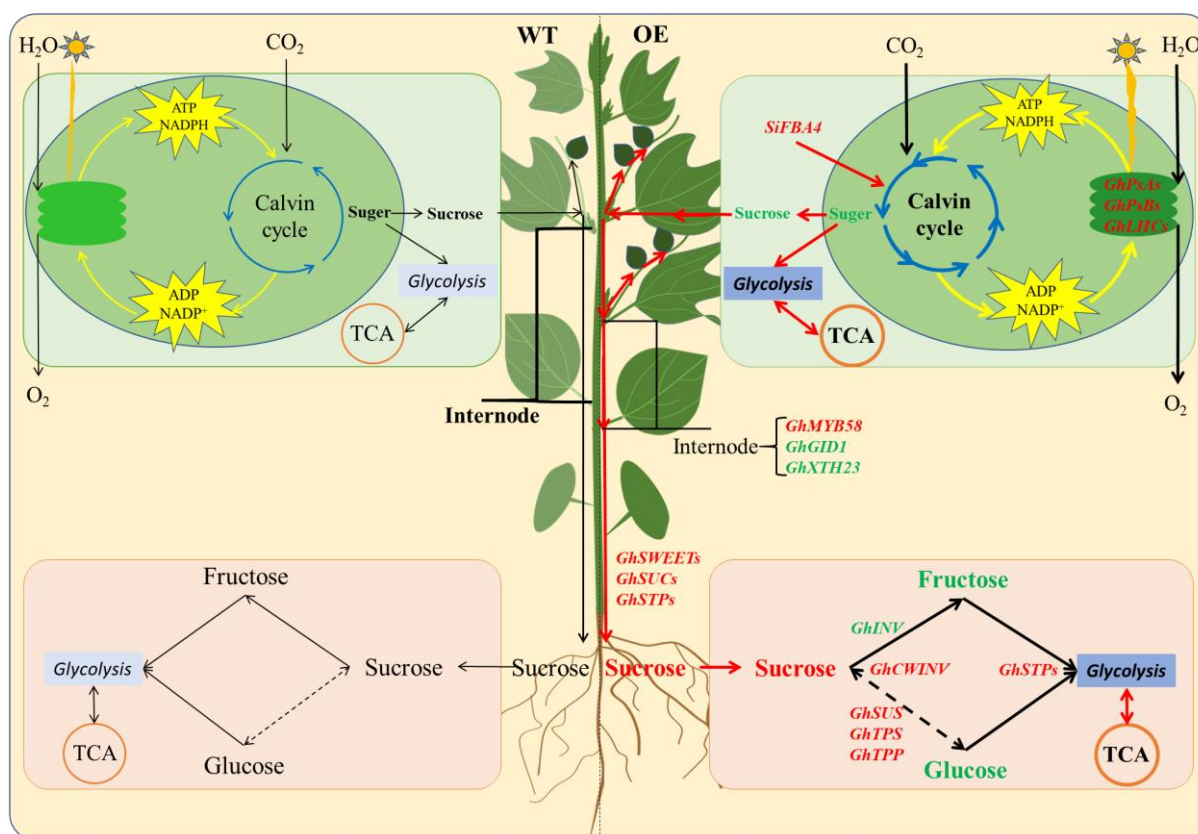
本研究发现,转 *SiFBA4* 基因棉花通过改变糖转运通路,显著改变了碳水化合物的分配模式。深入分析表明, *SWEET17* 在转基因株系叶片和根系的上调表达(叶

Log2FC=1.65, 根 Log2FC=0.93) 可能形成器官间的糖转运通道, 与 *SWEET17* 介导的液泡和质外体之间糖分循环机制一致^[217]。结合本研究中转 *SiFBA4* 基因棉花的 *STP5* 基因在叶片和根系的上调 (叶, Log2FC=2.53; 根, Log2FC=0.97), 有理由推测转基因株系调控植株发育进程也可能是通过激活 “*SWEET17-STP5*” 双模块, 前者通过液泡糖分释放维持渗透平衡, 后者介导单糖吸收和利用来促进细胞增殖^[218, 219]。*pGlcT* 基因呈现出叶片上调 (Log2FC=0.97) 和根系下调 (Log2FC=-1.93) 两种截然相反的趋势, 也进一步佐证了转基因株系可能改变了 “质体-液泡-质外体” 三位一体的糖转运网络, 增强源端的淀粉降解产物输出, 抑制库端的葡萄糖无效循环^[220]。尽管已有研究报导了泛素结合酶 34 (UBC34) 以光依赖性方式触发 *SUC2* 的周转模式^[221], 然而本研究中 *SUC2* 基因在根系特异上调 (Log2FC=0.97), 与 *UBC34* 基因的微弱表达变化 (Log2FC=0.04) 相矛盾。猜测 *SUC2* 基因在根系的调控可能独立于 *UBC34-SUC2* 泛素化降解途径, 或存在其他调控因子参与该基因的转录后修饰过程, 使 *SUC2* 的表达能够维持糖转运速率。这一猜测可以用转录因子 *EIN3* (Log2FC=-0.23) 通过与 *SUC2* 启动子结合直接抑制 *SUC2* 活性, 进而调节与根生长相关的葡萄糖信号传导机制^[222]来解释转基因株系根中 *SUC2* 基因的上调表达。为作物韧皮部装载的遗传改良提供了构建 *UBC34* 非依赖型 *SUC2* 表达系统的新思路, 可能突破源器官碳输出能力。

4.5.3 *SiFBA4* 基因调控光合碳代谢网络的分子机制及其育种创新性

转录组和代谢组学的生物信息学分析初步揭示了 *SiFBA4* 基因可能通过多个层级代谢网络协同重塑棉花光合碳分配格局的分子机制 (图 4-26), 具体体现在以下三个维度: 首先, *FBA*s 家族基因通过 “卡尔文循环-糖酵解-TCA 循环-糖转运” 的调控系统实现源-库协同增效的分子路径; *FBA*s 介导的碳代谢途径对糖信号网络的调控机制; 以及碳代谢与细胞发育基因调控对棉花株型结构和纤维发育的影响。这些分析不仅能够解释 C_3 作物光合碳分配的调控理论, 更为分子设计育种提供了新的思路和靶标系统。

从能量代谢网络角度, *SiFBA4* 过表达引发的卡尔文循环关键酶 (FBP、TPI、TKL、GAPDH) 和光吸收转化蛋白 (PSBs、PSAs、LHCs) 等协同上调形成 “代谢引擎”, 通过加速卡尔文循环速率, 使光合碳同化速率提高, 光反应进程加快。表明 *SiFBA4* 通过动态平衡光反应与暗反应的能荷状态, 实现了 C_3 作物高光合效率的目标。在碳代谢流分配层面, *SiFBA4* 通过 *BAM*s 激活叶绿体淀粉到胞质蔗糖的转化通道, 使源叶蔗糖输出通量提升; 并通过糖酵解和 TCA 循环的能量耦合网络, 使线粒体呼吸作用增强, ATP 合成速率提高。

图 4-26 *SiFBA4* 转基因棉花调控机制图Figure 4-26 Diagram of the regulatory mechanism of *SiFBA4* transgenic cotton

注：斜体表示基因，非斜体表示中间产物，红色字体表示表达水平提高，绿色表示表达水平降低。

Note: Italicized text denotes genes, whereas non-italicized text represents intermediates. The red font signifies increased expression levels, the green font indicates decreased expression levels.

从源-库关系角度，*SiFBA4* 通过 *SWEETs-STPs-SUCs* 转运系统实现光合产物的时空精准分配。*SWEET17* 在叶片和根系上调表达促进蔗糖向质外体卸载；*STP5* 在叶片和根系的高表达增强单糖吸收效率；*SUC2* 在根系细胞的持续激活维持运输效率；以及 *pGclT* 在叶片和根系差异表达，增强源端淀粉降解产物输出，并抑制库端葡萄糖无效循环。这种“源-渠-库”协同调控模式使转基因株系库器官（棉桃）数量增加 69.00%，产量提高 19.22%，这种由高效运输到产能提升的良性循环，为高光效棉花育种策略提供了参考依据。但是纤维品质降低，纤维长度和强度分别降低 6.67% 和 4.86% ($p < 0.05$)，纤维品级由 A 级降至 C2 级。转录组分析揭示，这一现象可能与库器官中细胞骨架相关基因的表达下调密切相关，特别是肌动蛋白关键调控基因 *ACT7* ($\text{Log}_2\text{FC} = -0.35$) 和 *FIM2* ($\text{Log}_2\text{FC} = -0.71$) 的表达水平显著降低。已有研究证实，*ghactin1* 的 RNA 干扰会破坏肌动蛋白细胞骨架网络，显著抑制纤维延伸生长^[223]。而 *GhFIM2* 的过表达则能通过促进肌动蛋白束形成来加速纤维生长^[224]。结合转录组数据中细胞壁酸性转化酶 (*CWINV*) 基因表达量显著上调 ($\text{log}_2\text{FC} = 1.12$)，其可能通过质外体途径将蔗糖分解为葡萄糖和果

糖, 导致胞外基质中可转运蔗糖浓度梯度降低, 从而削弱库器官的蔗糖卸载效率。这些结果在分子水平为纤维品质降低提供了参考依据。这种代谢特征虽然促进了生物量的快速积累, 但可能导致光合产物的过度消耗使得生殖生长后期可分配碳源相对不足。这种“代谢透支”现象可能是导致纤维品质下降的内在原因, 也凸显出棉花高产优质协同改良面临的生理瓶颈。这一发现提示, 在追求高产育种的同时, 需要建立更为精细的碳分配调控策略, 通过时空特异性地协调营养生长与生殖生长、产量形成与纤维发育之间的代谢平衡, 最终实现棉花产量与品质的同步提升。

此外, 多组学分析还初步揭示了棉花株型结构发生变化的可能调控机制: DELLA 蛋白基因 *GAI* 在转基因株系中的上调表达 ($\text{Log2FC}=1.00$), 可能是通过抑制赤霉素信号通路 (*GID1* 下调 $\text{Log2FC}=-1.23$) 实现节间缩短 (降低 12.82%~27.32%) 的 *GAI-GID1* 模块调控株型理论, 实现株型结构的改变^[225]; *XTHs* 基因家族差异表达 (*XTH23* 下调 $\text{Log2FC}=-1.40$, *XTH22* 上调 $\text{Log2FC}=1.68$), 极有可能是转基因株系通过动态调控细胞壁延展性, 引起了节间缩短, 并使果枝夹角减小 9.43°, 为构建紧凑株型的分子育种提供了新思路。为通过 CRISPR/Cas9 多靶点编辑系统协同优化植株碳代谢流的分配与重构株型结构, 有望打破棉花产量与纤维品质的遗传负相关连锁效应, 为植物分子育种提供了新的思路 and 方向。

4.6 小结

(1) 通过转录组测序技术, 在 *SiFBA4* 转基因棉花中筛选得到了 2305 个与光合作用和碳水化合物代谢相关的 DEGs, 其中, 叶片组织中有 1429 个 DEGs, 根系组织中有 876 个 DEGs。代谢组数据显示有 388 个差异积累的糖类代谢物, 叶片中有 167 个, 以下调为主, 根系有 221 个, 以上调为主。

(2) 光合作用光反应相关的 DEGs 分析发现, *SiFBA4* 基因可能通过促进卡尔文循环酶基因的表达, 增强卡尔文循环速率。光反应中 PSI 和 PSII 中编码蛋白质亚基和叶绿素 a/b 光捕获复合体亚基的基因上调表达, 增强了光捕获效率、提高了光能利用率。叶绿素合成相关基因上调表达, 促进叶绿素的积累, 增强了叶绿素的光能吸收、传递和转化效率。卡尔文循环速率增强、光反应效率提高和叶绿素含量增加共同促进棉花的光合效率提升。

(3) 分析还发现, 糖酵解途径受 *SiFBA4* 基因表达水平和光合产物的影响, 促进了丙酮酸和草酰乙酸合成过程中的相关调节酶基因的表达, 进而激活 TCA 循环, 积累生长代谢过程中所必需的物质和能量。

(4) *SiFBA4* 基因的过表达还影响了棉花的“源-库”分配关系。源器官产生的糖类化合物经蔗糖转运途径输送到库器官中，致使叶片糖类化合物含量减少，根系糖类化合物含量增加，棉铃数量增多，产量增加。

第5章 总结和展望

本研究以棉花为主要研究材料，天山雪莲卡尔文循环关键酶基因 *SiFBA4* 基因为目的基因，创制具有高光合效率的棉花种质材料。从生理学和农艺学角度对野生型和转基因棉花进行系统的研究，并通过转录组和代谢组生物信息学分析，初步解释了 *SiFBA4* 基因能够促进棉花生物量和产量的形成的分子机制，并构建了 *SiFBA4* 转基因棉花生物量和产量形成的代谢通路模型。

5.1 结论

(1) 以 *SiFBA4* 转基因棉花和野生型棉花 R15 为材料，分析棉花中光合作用相关的生理变化，发现过表达 *SiFBA4* 基因棉花的净光合速率显著地高于 WT。转基因棉花的叶绿素含量和卡尔文循环酶 FBA 和 FBP 的活性也表现出较高水平。表明过表达 *SiFBA4* 基因能够通过调节卡尔文循环酶活性提高棉花的光合效率。

(2) 分析 *SiFBA4* 转基因棉花和野生型棉花 R15 在苗期、蕾期和铃期的农艺性状和生物量。结果显示，*SiFBA4* 转基因棉花在各生长发育时期始终保持较高的生物量，各器官组织生物量的积累高于 WT，农艺性状指标也优于 WT。说明转基因棉花的光合效率提高，有助于积累更多的生物量，为棉花的产量的形成奠定基础。

(3) 转录组学和代谢分析发现，暗反应过程中，在 *SiFBA4* 基因的作用下，卡尔文循环调节基因上调表达，增强了卡尔文循环速率。光反应 PSI 和 PSII 中编码蛋白质亚基和叶绿素 a/b 光捕获复合体亚基的基因上调表达，增强棉花叶片的光能转化和利用效率，叶绿素含量的增加，增强了棉花吸收光能的能力。糖酵解途径调节基因 *FBP*、*PFK* 和 *PK* 等上调表达，促进丙酮酸和草酰乙酸合成过程基因的上调表达，激活 TCA 循环，产生 NADH 还原力。中间产物糖类经糖转运进入库器官中，导致叶片糖类化合物含量减少，根系糖类化合物含量增加，棉铃数量增多。表明 *SiFBA4* 基因主要通过提高棉花叶片光合效率和从源到库的糖转运效率，促进棉花生物量和产量的形成。

(4) 通过比较分析转基因棉花和 WT 之间的产量形成性状，发现转基因棉花依赖单株棉铃数量和单株籽棉重量使单位面积的总产量得到提高。但是，对棉纤维品质的比较分析发现，转基因棉花的纤维长度和强度减小，纤维品级降低。结果表明，*SiFBA4* 基因通过调控光合作用能力促进棉花产量的形成，导致棉花纤维品质降低。

综上所述,在棉花中过表达 *SiFBA4* 基因,能够增强棉花光合作用效率,并通过从“源”到“库”的高效糖转运效率,促进棉花生物量和产量的形成,实现了棉花高光效种质材料的创制。

5.2 创新点

(1) 首次将天山雪莲 *SiFBA4* 基因应用于棉花 R15 品系的遗传改良,为棉花高光效育种提供了理论和技术支撑;

(2) 初步揭示了 *SiFBA4* 通过调控光合作用和糖代谢网络提升棉花产量的生理机制。

5.3 展望

本文通过对 *SiFBA4* 转基因进行生理学、农艺学、转录组学和代谢组学方面的差异分析,初步揭示了过表达 *SiFBA4* 基因能够促进棉花生物量积累和产量形成的机制,然而还有一系列的问题需要深入探讨和研究。

(1) 在进行棉花嫁接时,我们发现不同时期的棉花幼苗作为砧木时,子叶期的棉花幼苗的嫁接成活率明显得高于一叶一心和两叶一心时的成活率,猜测可能是因为顶端优势引起生长素积累,加速了伤口的愈合,从而保证了较高的成活率。这一现象需要进一步采用转录组、代谢组和蛋白组等多种组学技术和其他实验手段进行验证分析。

(2) *SiFBA4* 基因前期在加工番茄的生理水平上表现出低温耐受性,本研究通过转录组和广泛靶向代谢组分析,在转基因棉花中也发现了响应低温胁迫的基因和代谢物质的差异表达,因此需要对转基因棉花进行低温胁迫处理,并结合生理变化和蛋白水平的差异来进一步验证 *SiFBA4* 基因是否具有广谱的低温耐受性,并阐释其低温耐受的机制机理。

(3) 诸多植物中证明 *FBA* 基因家族在植物的生长发育和胁迫响应方面发挥积极的作用,但是在棉花中尚未被证明是否具有相同的功能。Małgorzata Cieśla 等提出酵母 *FBA1* 参与 RNA 聚合酶III导向转录的控制^[226],并且直接作用于基因 *katG* 和 *rpoA* 转录调节,分别编码过氧化氢酶和 RNA 聚合酶亚基^[227]。但本文通过转录组数据分析未发现与 *SiFBA4* 基因存在互作关系的基因,所以可以将 *FBA*s 基因作为一个潜在调控因子进行深入的研究,发现并解析一些新的生物学理论。

(4) 在进行代谢组分析时，在叶片和根系发现景天庚酮糖含量增加，关于该物质在植物中几乎没有被研究，尚不确定该物质在植物中发挥着怎样的功能，无法对此进行深入讨论。因此，需要进一步对该物质进行功能和分子机理的解析。

参考文献

- [1]贾晓昀, 朱继杰, 赵红霞, 王士杰, 李妙, 王国印. 棉花产量相关性状 QTL 定位及候选基因筛选[J]. 华北农学报, 2021, 36(2): 54-61.
- [2]喻树迅, 魏晓文, 赵新华. 中国棉花生产与科技发展[J]. 棉花学报, 2000, (6): 327-329.
- [3]M. Tester, P. Langridge. Breeding technologies to increase crop production in a changing world[J]. Science, 2010, 327(5967): 818-822.
- [4]X. Zhu, S. P. Long, D. R. Ort. Improving photosynthetic efficiency for greater yield[J]. Annual Review of Plant Biology, 2010, 61(1): 235-261.
- [5]S. P. Long, A. Marshall Colon, X. G. Zhu. Meeting the global food demand of the future by engineering crop photosynthesis and yield potential[J]. Cell, 2015, 161(1): 56-66.
- [6]X. G. Zhu, S. P. Long, D. R. Ort. What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass?[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2008, 19(2): 153-159.
- [7]Bonner, J. The Upper Limit of Crop Yield: This classical problem may be analyzed as one of the photosynthetic efficiency of plants in arrays[J]. Science, 1962, 137(3523): 11.
- [8]程建峰, 沈允钢. 作物高光效之管见[J]. 作物学报, 2010, 8(36): 1235-1247.
- [9]李胄. 中国棉花育种研究 60 年的进展及展望[J]. 西北农业学报, 2017, 26(12): 1732-1753.
- [10]A. Stoilova, I. Saldzhiev. Interspecific hybridization in cotton and its use in breeding[J]. Agricultural Science and Technology, 2015, 7(1): 49-60.
- [11]张忠波, 刘贞贞, 平文超, 李洪民, 王安录, 李洪芹, 柴卫东. 棉花产量、纤维品质育种主要方法的简要剖析[J]. 农业科技通讯, 2020, (7): 279-281.
- [12]T. Zhang, L. Xuan, Y. Mao, Y. Hu. Cotton heterosis and hybrid cultivar development[J]. Theoretical and applied genetics, 2023, 136(4): 89.
- [13]李雪, 郭立平, 刘华林, 戚廷香, 王海林, 唐会妮, 邢朝柱. “三系”杂交棉组合 F1 花粉育性与产量和品质的相关性研究[J]. 中国棉花, 2018, 45(12): 20-24+36.
- [14]王韵婷. 农作物育种与栽培技术的创新应用[J]. 农村科学实验, 2024, (20): 196-198.
- [15]A. Hassen, F. Mekonnen, K. K. Zander, N. Seid, A. Mekonen, S. Ibrahim, S. Abebe. Recent advances in molecular breeding and key insights into major pulse improvement efforts for sustainable food security[J]. Gene Reports, 2024, (36): 101997.
- [16]J. Xie, Z. Xiao, X. Li, F. Cao, J. Chen, I. Ali, M. Huang. Stability differences of quality traits in high-quality hybrid rice[J]. Journal of Agriculture and Food Research, 2024, (18): 101346.

- [17]林曙东. 小麦常用育种技术研究进展[J]. 园艺与种苗, 2021, 41(5): 67-69.
- [18]S. Najeebullah, N. Umer, R. Z. Naqvi, M. Arshad, G. Jander, S. Asad, M. Asif. Transgenic cotton expressing *Allium sativum* leaf agglutinin exhibits resistance to whiteflies and aphids without negative effects on ladybugs[J]. Gene, 2024, (933): 148926.
- [19]B. K. Shehzad, A. M. Usman, R. A. Qayyum, K. Sarfraz, A. Farooq, B. Allah, A. G. Muhammad. From genes to fields: Environmental compatibility of herbicide tolerant transgenic cotton[J]. Industrial Crops & Products, 2024, (209): 117903.
- [20]赵俊杰, 任中英, 章志强, 张飞, 刘艳改, 贺昆仑, 杨代刚. 分子设计育种在棉花中的应用进展与展望[J]. 棉花学报, 2023, 35(5): 412-428.
- [21]梁成真, 金双侠. 导读我国耐除草剂棉花研发与育种应用[J]. 中国农业科学, 2023, 56(17): 3247-3250.
- [22]杨光琴, 王冠英, 余露, 张献龙, 聂新辉, 李建, 金双侠. 棉花基因编辑工具开发及分子育种进展与展望[J]. 科学通报, 2024, 1-14.
- [23]P. Wang, J. Zhang, L. Sun, Y. Ma, J. Xu, S. Liang, X. Zhang. High efficient multisites genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) using CRISPR/Cas9 system[J]. Plant Biotechnology Journal, 2017, 16(1): 137-150.
- [24]L. Qin, J. Li, Q. Wang, Z. Xu, L. Sun, M. Alariqi, S. Jin. High-efficient and precise base editing of C•G to T•A in the allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) genome using a modified CRISPR/Cas9 system[J]. Plant Biotechnology Journal, 2019, 18(1): 45-56.
- [25]G. Wang, Z. Xu, F. Wang, Y. Huang, Y. Xin, S. Liang, S. Jin. Development of an efficient and precise adenine base editor (ABE) with expanded target range in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*)[J]. BMC Biology, 2022, 20(1): 45.
- [26]L. Qin, H. He, L. Yang, H. Zhang, J. Li, Y. Zhu, S. Wu. AtZAT10/STZ1 improves drought tolerance and increases fiber yield in cotton[J]. Frontiers in Plant Science, 2024, 15(1464828-1464828).
- [27]Q. Wang, G. Pan, X. Wang, Z. Sun, H. Guo, X. Su, H. Cheng. Host-induced gene silencing of the *Verticillium dahliae* thiamine transporter protein gene (*VdThit*) confers resistance to *Verticillium* wilt in cotton[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2024, 23(10): 3358-3369.
- [28]B. Samina, Y. Amina, B. Rohina, B. Shanila, S. Naila, A. Saira, R. A. Qayyum. Barley chitinase genes expression revamp resistance against whitefly (*Bemisia Tabaci*) in transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. Journal of Cotton Research, 2024, 7(1):
- [29]J. S. Ullah, L. Ayesha, Z. Yonghong, L. Jing, Z. Huangyang, A. Mohnad, A. Alamin. *Arabidopsis* NLP7 improves nitrogen use efficiency and yield in cotton[J]. Journal of Cotton Research, 2022, 5(1):
- [30]S. Kamma, K. Arumilli, S. M. Anjum, P. V. H. Sai, M. Parimi, V. L. Dixitha, S. Veeravilli. Characterization and quality improvement of MNH992 and VH289 BT cotton seed

- varieties[J]. PLANT CELL BIOTECHNOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2021, 195-200.
- [31]A. A. Batcho, M. B. Sarwar, B. Rashid, S. Hassan, T. Husnain. Heat shock protein gene identified from *Agave sisalana* (*As HSP70*) confers heat stress tolerance in transgenic cotton (*Gossypium hirsutum*) [J]. Theoretical and Experimental Plant Physiology, 2021, 33(2): 1-16.
- [32]R. Liu, T. Jiao, J. Li, Y. Feng, A. Wang, S. Wu, Z. Jian-bo. Ectopic expression of the *Pseudomonas aeruginosa KatA* gene in cotton improves its drought tolerance and yield under drought stress[J]. Molecular Breeding, 2019, 39(8): 1-15.
- [33]C. Fu, N. Wang, Q. Meng, Z. Xu, Y. Le, X. Zhang, Z. Lin. *Gossypium latifolium* genome reveals the genetic basis of domestication of upland cotton from semi-wild races to cultivars[J]. The Crop Journal, 2025,
- [34]李维, 张亚黎, 胡渊渊, 杨美森, 吴洁, 张旺锋. 田间条件下棉花幼叶光合特性及光保护机制[J]. 植物生态学报, 2012, 36(07): 662-670.
- [35]Z. Lei, M. Jia, H. Wang, M. Carriqu í Ü. Niinemets, Y. Chen, Y. Zhang. Improvement in photosynthesis under different light intensities is highly linked to domestication stages in cotton[J]. The Plant Journal, 2024, 120(5): 2045-2056.
- [36]Y. Wang, Q. Lv, J. Tian, Y. Zhang, C. Jiang, W. Zhang. The high genetic yield of Xinjiang cotton is associated with improvements in boll-leaf system photosynthesis[J]. Field Crops Research, 2023, 304(109176).
- [37]M. Chen, F. Liang, Y. Yan, Y. Wang, Y. Zhang, J. Tian, W. Zhang. Boll-leaf system gas exchange and its application in the analysis of cotton photosynthetic function[J]. Photosynthesis research, 2021, 150(1-3): 251-262.
- [38]陈菲. 陆地棉芽黄突变体光合生理特性及光合色素合成代谢相关基因表达分析 [D].2022,
- [39]W. Feng, T. G. Mehari, H. Fang, M. Ji, Z. Qu, M. Jia, B. Wang. Genome-wide identification of the geranylgeranyl pyrophosphate synthase (GGPS) gene family involved in chlorophyll synthesis in cotton[J]. BMC Genomics, 2023, 24(1): 176.
- [40]M. Chao, G. Hu, J. Dong, Y. Chen, Y. Fu, J. Zhang, Q. Wang. Sequence characteristics and expression analysis of the gene encoding sedoheptulose-1, 7-Bisphosphatase, an important Calvin Cycle enzyme in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(7): 6648.
- [41]Y. Ding, R. Zhang, L. Zhu, M. Wang, Y. Ma, D. Yuan, X. Zhang. An enhanced photosynthesis and carbohydrate metabolic capability contributes to heterosis of the cotton (*Gossypium hirsutum*) hybrid 'Huaza Mian H318', as revealed by genome-wide gene expression analysis[J]. BMC Genomics, 2021, 22(1): 277.
- [42]E. M. D. Increasing crop productivity to meet global needs for feed, food, and fuel[J]. Plant Physiology, 2009, 149(1): 7-13.

- [43]W. Yamori, T. Shikanai. Physiological functions of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis and plant growth[J]. Annual Review of Plant Biology, 2016, 67(1): 81-106.
- [44]L. Ruiqi, H. Ying, C. Junyu, Z. Shaoyan, Z. Chuxiong. Research progress in improving photosynthetic efficiency[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(11): 9286.
- [45]T. D. Sharkey. Discovery of the canonical Calvin–Benson cycle[J]. Photosynthesis Research, 2018, 140(2): 235-252.
- [46]P. A. V, F. Jaume. Recent advances in understanding and improving photosynthesis[J]. Faculty reviews, 2020, (9): 5.
- [47]B. RUMBERG. Evidence for the participation of chlorophyll;in the primary reaction of photosynthesis[J]. Nature, 1964, 204(4961): 860.
- [48]D. Shevela, J. F. Kern, G. Govindjee, J. Messinger. Solar energy conversion by photosystem II: principles and structures[J]. Photosynthesis Research, 2023, 156(3): 279-307.
- [49]M. K. Murali, B. N. Mikhailovich, J. V. David, P. Abhinav, G. D. Andrew, M. Afsal. Structure-function correlations and system dynamics in oxygenic photosynthesis: classical perspectives and murburn precepts[J]. Journal of biomolecular structure & dynamics, 2021, 40(21): 21-27.
- [50]米华玲, 朱新广. 光合电子传递及其改善[J]. 生命科学, 2024, 36(9): 1168-1174.
- [51]G. Renger. Light induced oxidative water splitting in photosynthesis: Energetics, kinetics and mechanism[J]. Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology, 2011, 104(1): 35-43.
- [52]L. Na, W. W. Shing, F. Lei, W. Chunming, W. K. Shing, Z. Nianhui, H. JunXian. The thylakoid membrane protein NTA1 is an assembly factor of cytochrome b6f complex essential for chloroplast development in *Arabidopsis*[J]. Plant Communications, 2022, 4(1): 100509.
- [53]A. N. Tikhonov. The cytochrome b6f complex at the crossroad of photosynthetic electron transport pathways[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2014, (81): 163-183.
- [54]D. Vangelis. Protein-protein interactions within photosystem II under photoprotection: the synergy between CP29 minor antenna, subunit S (PsbS) and zeaxanthin at all-atom resolution[J]. Physical chemistry chemical physics : PCCP, 2018, 20(17): 11843-11855.
- [55]C. G. Viviana, P. Gereon, M. Michael, S. Kai, J. Peter. PsbS interactions involved in the activation of energy dissipation in *Arabidopsis*[J]. Nature Plants, 2016, 2(2): 15225.
- [56]K. Nath, R. L. Wessendorf, Y. Lu. A nitrogen-fixing subunit essential for accumulating 4Fe-4S-containing photosystem I core proteins[J]. Plant Physiology, 2016, 172(4): 2459-2470.
- [57]D. Damien, Q. Yujiao, L. Paolo, L. L. Linnka, J. Xenie, S. L. Christian, G. C. Michel. A nucleus-encoded chloroplast phosphoprotein governs expression of the photosystem I subunit PsbC in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. The Plant Cell, 2016, 28(5): 82-99.

- [58]Y. Jingjing, L. Xinyi, Y. Zixian, W. Yingqi, L. Yuerong, W. Kairong, Z. Xinqiang. The light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins of photosystem II family members are responsible for temperature sensitivity and leaf color phenotype in albino tea plant[J]. Journal of advanced research, 2023, (66): 87-104.
- [59]梅杨, 李海蓝, 罗红艺. 谈光合电子传递和光合磷酸化[J]. 高等函授学报(自然科学版), 2007, (3): 45-48.
- [60]T. Daisuke, A. Katsumi, H. Masaki, F. Hidehiro, I. Kimitsune, G. Tatsuki, M. Chikahiro. Chloroplastic ATP synthase builds up a proton motive force preventing production of reactive oxygen species in photosystem I[J]. The Plant journal : for cell and molecular biology, 2017, 91(2): 306-324.
- [61]P. G. Kroth. The biodiversity of carbon assimilation[J]. Journal of Plant Physiology, 2015, (172): 76-81.
- [62]T. D. Sharkey, S. E. Weise. The glucose-6-phosphate shunt around the Calvin-Benson cycle[J]. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(14): 4067-4077.
- [63]C. R. G. Sales, Y. Wang, J. B. Evers, J. Kromdijk. Improving C₄ photosynthesis to increase productivity under optimal and suboptimal conditions[J]. Journal of Experimental Botany, 2021, 72(17): 5942-5960.
- [64]H. Cui. Challenges and approaches to crop improvement through C₃-to-C₄ engineering[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, (12): 715391.
- [65]L. Zheng, C. Jinjin. C₄ rice engineering, beyond installing a C₄ cycle[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2024, (206): 108256.
- [66]B. Tan, S. Chen. Defining mechanisms of C₃ to CAM photosynthesis transition toward enhancing crop stress resilience[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(17): 13072.
- [67]F. Ding, M. Wang, S. Zhang, X. Ai. Changes in SBPase activity influence photosynthetic capacity, growth, and tolerance to chilling stress in transgenic tomato plants[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 32741.
- [68]Y. Zhou, L. Shi, X. Li, S. Wei, X. Ye, Y. Gao, W. Zhou. Genetic engineering of RuBisCO by multiplex CRISPR editing small subunits in rice[J]. Plant Biotechnology Journal, 2025, 23(3): 731-749.
- [69]T. Chen, S. Riaz, P. Davey, Z. Zhao, Y. Sun, G. F. Dykes, L. N. Liu. Producing fast and active Rubisco in tobacco to enhance photosynthesis[J]. PLANT CELL, 2023, 35(2): 795-807.
- [70]J. A. Rojas González, M. Soto Suárez, Á. García Dáz, M. C. Romero Puertas, L. M. Sandalio, Á. Mérida, M. Sahrawy. Disruption of both chloroplastic and cytosolic *FBPase* genes results in a dwarf phenotype and important starch and metabolite changes in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(9): 2673-2689.

- [71]K. Uematsu, N. Suzuki, T. Iwamae, M. Inui, H. Yukawa. Increased fructose 1, 6-bisphosphate aldolase in plastids enhances growth and photosynthesis of tobacco plants[J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(8): 3001-3009.
- [72]S. Timm, A. Nunes-Nesi, A. Florian, M. Eisenhut, K. Morgenthal, M. Wirtz, H. Bauwe. Metabolite profiling in *Arabidopsis thaliana* with moderately impaired photorespiration reveals novel metabolic links and compensatory mechanisms of photorespiration[J]. Metabolites, 2021, 11(6): 391.
- [73]S. Timm, M. Hagemann. Photorespiration-how is it regulated and how does it regulate overall plant metabolism?[J]. Journal of Experimental Botany, 2020, 71(14): 3955-3965.
- [74]L. Shey-Li, V. C. Pao, G. Xiaoqian, Y. Yi, G. Per, L. B. Leong. In planta study of photosynthesis and photorespiration using NADPH and NADH/NAD⁺ fluorescent protein sensors[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 3238.
- [75]S. Timm, F. Woitschach, C. Heise, M. Hagemann, H. Bauwe. Faster removal of 2-phosphoglycolate through photorespiration improves abiotic stress tolerance of *Arabidopsis*[J]. Plants, 2019, 8(12): 563.
- [76]A. Cyril, T. Guillaume. Plant sulphur metabolism is stimulated by photorespiration[J]. Communications biology, 2019, 2(18): 379.
- [77]F. Franziska, T. Stefan, A. St éphanie, F. Alexandra, S. Mark, F. A. R, B. Hermann. The photorespiratory metabolite 2-phosphoglycolate regulates photosynthesis and starch accumulation in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2017, 29(10): 2537-2551.
- [78]A. St éphanie, A. M. Thiago, O. Toshihiro, M. D. B, F. A. R, B. Alix, S. Mark. Metabolite profiles reveal interspecific variation in operation of the Calvin-Benson cycle in both C₄ and C₃ plants[J]. Journal of Experimental Botany, 2019, 70(6): 1843-1858.
- [79]J. A. Raven. Rubisco: still the most abundant protein of Earth?[J]. New Phytologist, 2013, 198(1): 1-3.
- [80]J. Ding, M. Ji, J. Alkahtani, H. Li, Y. Liu, F. Zhou, Y. Chen. Influence of population biomass accumulation during different growth periods on agronomic traits and cotton yield[J]. Agronomy, 2024, 14(11): 2625.
- [81]L. Michelet, M. Zaffagnini, S. Morisse, F. Sparla, M. E. P érez-P érez, F. Francia, S. D. Lemaire. Redox regulation of the Calvin-Benson cycle: something old, something new[J]. Frontiers in Plant Science, 2013, (4): 470.
- [82]C. A. Raines. The Calvin cycle revisited[J]. Photosynthesis Research, 2003, 75(1): 1-10.
- [83]M. T. Lin, D. J. Orr, D. Worrall, M. A. J. Parry, E. Carmo-Silva, M. R. Hanson. A procedure to introduce point mutations into the Rubisco large subunit gene in wild-type plants[J]. The Plant Journal, 2021, 106(3): 876-887.
- [84]I. H. K öhler, U. M. Ruiz-Vera, A. VanLoocke, M. L. Thomey, T. Clemente, S. P. Long, C. J. Bernacchi. Expression of *Cyanobacterial* FBP/SBPase in soybean prevents yield depression

- under future climate conditions[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 68(3): 715-726.
- [85]Y. Suzuki, S. Wada, E. Kondo, W. Yamori, A. Makino. Effects of co-overproduction of sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase and Rubisco on photosynthesis in rice[J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2018, 65(1): 36-40.
- [86]A. R. Portis, M. A. J. Parry. Discoveries in Rubisco (Ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase): a historical perspective[J]. *Photosynthesis Research*, 2007, 94(1): 121-143.
- [87]F. A. Busch. Photorespiration in the context of Rubisco biochemistry, CO₂ diffusion and metabolism[J]. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 2020, 101(4): 919-939.
- [88]G. Bowes, W. L. Ogren, R. H. Hageman. Phosphoglycolate production catalyzed by ribulose diphosphate carboxylase[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1971, 45(3): 716-722.
- [89]J. W. Bouvier, D. M. Emms, S. Kelly. Rubisco is evolving for improved catalytic efficiency and CO₂ assimilation in plants[J]. *PNAS of USA*, 2024, 121(11): 2321050121.
- [90]I. Andersson, A. Backlund. Structure and function of Rubisco[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2008, 46(3): 275-291.
- [91]M. Flecken, H. Wang, L. Popilka, F. U. Hartl, A. Bracher, M. Hayer-Hartl. Dual role of a Rubisco activase in metabolic repair and carboxysome organization[J]. *Cell Press*, 2020, 183(2): 457-473.
- [92]W. S. M, B. Rosemary, K. Celine, B. J. L, K. M. V. Improving recombinant Rubisco biogenesis, plant photosynthesis and growth by coexpressing its ancillary RAF1 chaperone[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(11): 3564-3569.
- [93]Y. Suzuki, M. Ohkubo, H. Hatakeyama, K. Ohashi, R. Yoshizawa, S. Kojima, A. Makino. Increased Rubisco content in transgenic rice transformed with the 'sense' *rbcS* gene[J]. *Plant Cell Physiology*, 2007, 48(4): 626-637.
- [94]F. Leila, W. C. Rosalind, W. Katia, B. Susan, B. Alice, S. D. B. Ribulose-1, 5-bis-phosphate carboxylase/oxygenase accumulation factor1 is required for holoenzyme assembly in maize[J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(8): 3435-3446.
- [95]L. Feiz, R. Williams Carrier, S. Belcher, M. Montano, A. Barkan, D. B. Stern. A protein with an inactive pterin-4a-carbinolamine dehydratase domain is required for Rubisco biogenesis in plants[J]. *The Plant Journal*, 2014, 80(5): 862-869.
- [96]L. Xia, Y. Jiang, W. Kong, H. Sun, W. Li, Y. Chen, C. Zhou. Molecular basis for the assembly of RuBisCO assisted by the chaperone Raf1[J]. *Nature Plants*, 2020, 6(6): 708-717.
- [97]D. Hahn, C. Kaltenbach, U. Kück. The Calvin cycle enzyme sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase is encoded by a light-regulated gene in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Plant Molecular Biology*, 1998, 36(6): 929-934.

- [98]A. J. Miles, S. C. Potts, N. M. Willingham, C. A. Raines, J. C. Lloyd. A light- and developmentally-regulated DNA-binding interaction is common to the upstream sequences of the wheat Calvin cycle bisphosphatase genes[J]. *Plant Molecular Biology*, 1993, 22(3): 507-516.
- [99]S. Lefebvre, T. Lawson, M. Fryer, O. V. Zakhleniuk, J. C. Lloyd, C. A. Raines. Increased sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase activity in transgenic tobacco plants stimulates photosynthesis and growth from an early stage in development[J]. *Plant Physiology*, 2005, 138(1): 451-460.
- [100]A. Kumar, D. Panda, S. Mohanty, M. Biswal, P. Dey, M. Dash, L. Behera. Role of sedoheptulose-1, 7 bisphosphatase in low light tolerance of rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2020, 26(12): 2465-2485.
- [101]E. P. Harrison, N. M. Willingham, J. C. Lloyd, C. A. Raines. Reduced sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase levels in transgenic tobacco lead to decreased photosynthetic capacity and altered carbohydrate accumulation[J]. *Planta*, 1997, 204(1): 27-36.
- [102]F. Ding, M. Wang, S. Zhang. Overexpression of a Calvin cycle enzyme SBPase improves tolerance to chilling-induced oxidative stress in tomato plants[J]. *Scientia Horticulturae*, 2017, (214): 27-33.
- [103]A. Chueca, M. Sahrawy, E. A. Pagano, J. L. o. Gorg é. Chloroplast fructose-1, 6-bisphosphatase: structure and function[J]. *Photosynthesis Research*, 2002, (74): 235-249.
- [104]Å. Strand, R. Zrenner, S. Trevanion, M. Stitt, P. Gustafsson, P. Gardeström. Decreased expression of two key enzymes in the sucrose biosynthesis pathway, cytosolic fructose-1, 6-bisphosphatase and sucrose phosphate synthase, has remarkably different consequences for photosynthetic carbon metabolism in transgenic *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Journal*, 2001, 23(6): 759-770.
- [105]M. Tamoi, Y. Hiramatsu, S. Nedachi, K. Otori, N. Tanabe, T. Maruta, S. Shigeoka. Increase in the activity of fructose-1, 6-bisphosphatase in cytosol affects sugar partitioning and increases the lateral shoots in tobacco plants at elevated CO₂ levels[J]. *Photosynthesis Research*, 2011, 108(1): 15-23.
- [106]A. J. Serrato, J. de Dios Barajas-Lopez, A. Chueca, M. Sahrawy. Changing sugar partitioning in FBPase-manipulated plants[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(10): 2923-2931.
- [107]J. Daie. Cytosolic fructose-1, 6-bisphosphatase: A key enzyme in the sucrose biosynthetic pathway[J]. *Photosynthesis Research*, 1993, 38(1): 5-14.
- [108]B. S. Lee, K. M. Koo, J. Ryu, M. J. Hong, S. H. Kim, S. J. Kwon, J. W. Ahn. Overexpression of fructose-1, 6-bisphosphate aldolase 1 enhances accumulation of fatty acids in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Algal Research*, 2020, (47): 101825.
- [109]Z. K. Du, Y. F. Hu, J. M. Li. Overexpression of a gene *AhFBA* from *Arachis hypogaea* confers salinity stress tolerance in *Escherichia coli* and tobacco[J]. *Biologia plantarum*, 2019,

63(1): 122-133.

[110]A. J. Simkin, P. E. Lopez Calcagno, P. A. Davey, L. R. Headland, T. Lawson, S. Timm, C. A. Raines. Simultaneous stimulation of sedoheptulose 1, 7-bisphosphatase, fructose 1, 6-bisphosphate aldolase and the photorespiratory glycine decarboxylase-H protein increases CO₂ assimilation, vegetative biomass and seed yield in Arabidopsis[J]. Plant Biotechnology Journal, 2017, 15(7): 805-816.

[111]W. Zhao, H. Liu, L. Zhang, Z. Hu, J. Liu, W. Hua, J. Liu. Genome-wide identification and characterization of FBA gene family in polyploid crop brassica napus[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(22): 5749.

[112]M. Shehzad, A. Ditta, X. Cai, Z. Zhou, X. Wang, Y. Xu, F. Liu. Genome wide characterization, evolution and expression analysis of *FBA* gene family under salt stress in *Gossypium species*[J]. Biologia, 2019, 74(11): 1539-1552.

[113]G. Lv, X. Guo, L. Xie, C. Xie, X. Zhang, Y. Yang, H. Xu. Molecular characterization, gene evolution, and expression analysis of the fructose-1, 6-bisphosphate aldolase (FBA) gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, (8): 1030.

[114]A. Flechner, W. Gross, W. F. Martin, C. Schnarrenberge. Chloroplast class I and class II aldolases are bifunctional for fructose-1, 6-bisphosphate and sedoheptulose-1, 7-bisphosphate cleavage in the Calvin cycle[J]. Federation of European Biochemical Societies, 1999, (447): 200-202.

[115]B. Cai, Q. Li, Y. Xu, L. Yang, H. Bi, X. Ai. Genome-wide analysis of the fructose 1, 6-bisphosphate aldolase (FBA) gene family and functional characterization of *FBA7* in tomato[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2016, (108): 251-265.

[116]W. Lu, X. Tang, Y. Huo, R. Xu, S. Qi, J. Huang, C. a. Wu. Identification and characterization of fructose 1, 6-bisphosphate aldolase genes in Arabidopsis reveal a gene family with diverse responses to abiotic stresses[J]. Gene, 2012, 503(1): 65-74.

[117]Z. Li, Y. Zhang, H. Li, T. Su, C. Liu, Z. Han, J. Zhu. Genome-wide characterization and expression analysis provide basis to the biological function of cotton *FBA* genes[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, (12): 696698.

[118]刘晗琪, 陈兴浩, 张新建, 程相军, 杨敏生, 王进茂. 杨树 *FBA* 基因家族的鉴定及生物信息学分析[J]. 分子植物育种, 2020, 18(18): 5982-5990.

[119]K. Kagaya, N. H. E. SI, T. KI, H. S. The promoter from the rice nuclear gene encoding chloroplast aldolase confers mesophyll-specific and light-regulated expression in transgenic tobacco[J]. Molecular & General Genetics Mgg, 1995, 248(6): 668-674.

[120]T. Patipong, S. Ngoennet, M. Honda, T. Hibino, R. Waditee-Sirisattha, H. Kageyama. A class I fructose-1, 6-bisphosphate aldolase is associated with salt stress tolerance in a halotolerant cyanobacterium *Halotheca* sp. *PCC 7418*[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2019, (672): 108059.

[121]M. Purev, M. K. Kim, N. Samdan, D. C. Yang. Isolation of a novel fructose-1,

- 6-bisphosphate aldolase gene from *Codonopsis lanceolata* and analysis of the response of this gene to abiotic stresses[J]. *Molecular Biology*, 2008, 42(2): 179-186.
- [122]H. Bi, F. Li, H. Wang, X. Ai. Overexpression of transketolase gene promotes chilling tolerance by increasing the activities of photosynthetic enzymes, alleviating oxidative damage and stabilizing cell structure in *Cucumis sativus L*[J]. *Physiologia Plantarum*, 2019, 167(4): 502-515.
- [123]B. Cai, Q. Li, F. Liu, H. Bi, X. Ai. Decreasing fructose-1, 6-bisphosphate aldolase activity reduces plant growth and tolerance to chilling stress in tomato seedlings[J]. *Physiologia Plantarum*, 2018, 163(2): 247-258.
- [124]N. Lebedev, G. Zhang, Y. Liu, Y. Ni, Z. Meng, T. Lu, T. Li. Exogenous calcium alleviates low night temperature stress on the photosynthetic apparatus of tomato leaves[J]. *Plos One*, 2014, 9(5): 97322.
- [125]W. Fan, Z. Zhang, Y. Zhang. Cloning and molecular characterization of fructose-1, 6-bisphosphate aldolase gene regulated by high-salinity and drought in *Sesuvium portulacastrum*[J]. *Plant Cell Reports*, 2009, 28(6): 975-984.
- [126]W. Lu, X. Tang, Y. Huo, R. Xu, S. Qi, J. Huang, C. A. Wu. Identification and characterization of fructose 1,6-bisphosphate aldolase genes in *Arabidopsis* reveal a gene family with diverse responses to abiotic stresses[J]. *Gene*, 2012, 503(1): 65-74.
- [127]F. Zhang, P. Zhang, Y. Zhang, S. Wang, L. Qu, X. Liu, J. Luo. Identification of a peroxisomal-targeted aldolase involved in chlorophyll biosynthesis and sugar metabolism in rice[J]. *Plant Science*, 2016, (250): 205-215.
- [128]Z. F. Chen, T. H. Wang, C. Y. Feng, H. F. Guo, X. X. Guan, T. L. Zhang, G. F. Tan. Multigene manipulation of photosynthetic carbon metabolism enhances the photosynthetic capacity and biomass yield of cucumber under low-CO₂ environment[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, (13): 1005261.
- [129]N. L. Trolinder, J. R. Goodin. Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*) I. Effects of source of explant and hormone regime[J]. *Plant Cell: Tissue and Organ Culture*, 1988, 12(1): 31-42.
- [130]R. Liu, G. Yang, Y. Wu, H. Rao, X. Li, M. Li, P. Qian. Effects of light intensity on associated enzyme activity and gene expression during callus formation of *Vitis vinifera*[J]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2015, 31(8): 1219-1229.
- [131]F. P. Karakas. Efficient plant regeneration and callus induction from nodal and hypocotyl explants of goji berry (*Lycium barbarum L.*) and comparison of phenolic profiles in calli formed under different combinations of plant growth regulators[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, (146): 384-391.
- [132]R. Liu, T. Jiao, J. Li, Y. Feng, A. Wang, S. Wu, Z. Jian-bo. Ectopic expression of the *Pseudomonas aeruginosa KatA* gene in cotton improves its drought tolerance and yield under drought stress[J]. *Molecular Breeding*, 2019, 12(8): 783134.

- [133]S. Argento, S. Treccarichi, D. Arena, G. F. Rizzo, F. Branca. Exploitation of a grafting technique for improving the water use efficiency of eggplant (*Solanum melongena* L.) grown in a cold greenhouse in mediterranean climatic conditions[J]. *Agronomy*, 2023, 13(11): 2705.
- [134]E. Latifah, S. S. Antarlina, S. Sugiono, W. Handayati, J. Mariyono. Grafting technology with locally selected eggplant rootstocks for improvement in tomato performance[J]. *Sustainability*, 2023, 15(1): 855.
- [135]S. Pandey, U. Koirala, P. Acharya, S. Shrestha. Management of bacterial wilt using grafting technique in tomato (*Ralstonia solanacearum*)[J]. *World Journal of Agricultural Research*, 2020, 8(4): 129-133.
- [136]Z. Mo, X. Yang, L. Hu, M. Zhai, J. Xuan. Histological, physio-biochemical, and transcriptomic analyses reveal the potential limiting factors for successful grafting of pecan[J]. *Journal of Forestry Research*, 2024, 35(1): 35.
- [137]D. Cao, T. Chabikwa, F. Barbier, E. A. Dun, F. Fichtner, L. Dong, C. A. Beveridge. Auxin-independent effects of apical dominance induce changes in phytohormones correlated with bud outgrowth[J]. *Plant Physiology*, 2023, 192(2): 1420-1434.
- [138]A. K. Shukla, S. K. Upadhyay, M. Mishra, S. Saurabh, R. Singh, H. Singh, P. K. Singh. Expression of an insecticidal fern protein in cotton protects against whitefly[J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(10): 1046-1051.
- [139]V. N. Juturu, G. K. Mekala, P. B. Kirti. Current status of tissue culture and genetic transformation research in cotton (*Gossypium spp.*)[J]. *Plant Cell: Tissue and Organ Culture*, 2014, 120(3): 813-839.
- [140]叶武威, 刘金定. 氯化钠和食用盐对棉花种子萌发的影响[J]. *中国棉花*, 1994, 03): 14-15.
- [141]杨敏文. 快速测定植物叶片叶绿素含量方法的探讨[J]. *光谱实验室*, 2002, 04): 478-481.
- [142]E. A. Cutolo, Z. Guardini, L. Dall'Osto, R. Bassi. A paler shade of green: engineering cellular chlorophyll content to enhance photosynthesis in crowded environments[J]. *New Phytologist*, 2023, 239(5): 1567-1583.
- [143]S. E. A. A., F. M. A., E. M. Y. A., E. A. A. A. A., A. A. A., F. A. M., L. S. F. Exploring agro-morphological and fiber traits diversity in cotton (*G. barbadense* L.)[J]. *BMC Plant Biology*, 2024, 24(1): 403.
- [144]L. Feng, K. Wang, Y. Li, Y. Tan, J. Kong, H. Li, Y. Zhu. Overexpression of *SBPase* enhances photosynthesis against high temperature stress in transgenic rice plants[J]. *Plant Cell Reports*, 2007, 26(9): 1635-1646.
- [145]D. K. Yoon, K. Ishiyama, M. Suganami, Y. Tazoe, M. Watanabe, S. Imaruoka, A. Makino. Transgenic rice overproducing Rubisco exhibits increased yields with improved nitrogen-use efficiency in an experimental paddy field[J]. *Nature Food*, 2020, 1(2): 134-139.

- [146]O. Hendrik Poorter. The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review[J]. Australian Journal of Plant Physiology, 2000, 27(6): 595-607.
- [147]F. R. Echer, C. A. Rosolem. Cotton yield and fiber quality affected by row spacing and shading at different growth stages[J]. European Journal of Agronomy, 2015, (65): 18-26.
- [148]L. Anbin, Z. Shuaibo, P. Kai, L. Benshan, M. Zejun, L. Renxiang. Transcriptome analysis reveals the key role of overdominant expression of photosynthetic and respiration-related genes in the formation of tobacco(*Nicotiana tabacum* L.) biomass heterosis[J]. BMC Genomics, 2024, 25(1): 598.
- [149]H. M. Intesaful, P. D. K., J. B., R. M. S. The NADP-malate dehydrogenase (SmNADP-mdh), a C₄ pathway gene from Suaeda monoica enhanced photosynthesis and biomass yield in C₃ plants[J]. Environmental and Experimental Botany, 2022, (201): 104966.
- [150]M. H. Cho, A. Jang, S. H. Bhoo, J. S. Jeon, T. R. Hahn. Manipulation of triose phosphate/phosphate translocator and cytosolic fructose-1, 6-bisphosphatase, the key components in photosynthetic sucrose synthesis, enhances the source capacity of transgenic *Arabidopsis* plants[J]. Photosynthesis Research, 2012, 111(3): 261-268.
- [151]Y. L. Ruan, Y. Jin, Y. J. Yang, G. J. Li, J. S. Boyer. Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to drought and heat[J]. Molecular Plant, 2010, 3(6): 942-955.
- [152]A. A. Albacete, C. Martínez-Andújar, F. Pérez Alfócea. Hormonal and metabolic regulation of source-sink relations under salinity and drought: from plant survival to crop yield stability[J]. Biotechnology Advances, 2014, 32(1): 12-30.
- [153]W. Batista Silva, P. da Fonseca Pereira, A. O. Martins, A. Zsögön, A. Nunes Nesi, W. L. Araújo. Engineering improved photosynthesis in the era of synthetic biology[J]. Plant Communications, 2020, 1(2): 100032.
- [154]M. D. Hatch. C₄ photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure[J]. Biochimica et Biophysica Acta: Reviews on Bioenergetics, 1987, 895(2): 81-106.
- [155]C. VI. The role of source-sink relations between photosynthetic and assimilate-consuming organs in regulation of plant photosynthesis[J]. Agricultural Research & Technology, 2017, 5(2): 555659.
- [156]M. Stitt, W. P. Quick. Photosynthetic carbon partitioning: its regulation and possibilities for manipulation[J]. Physiologia Plantarum, 1989, 77(4): 633-641.
- [157]J. Farrar, C. Pollock, J. Gallagher. Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants[J]. Plant Science, 2000, 154(1): 1-11.
- [158]Z. Zhang, X. Li, Y. Zhang, J. Zhou, Y. Chen, Y. Li, D. Ren. Identification of the fructose-1, 6-bisphosphate aldolase (FBA) family genes in maize and analysis of the phosphorylation regulation of *ZmFBA8*[J]. Plant science: an international journal of

- experimental plant biology, 2024, (350): 112311.
- [159]W. Shanshan, W. Yijun. Harnessing hormone gibberellin knowledge for plant height regulation[J]. Plant Cell Reports, 2022, 41(10): 1945-1953.
- [160]Z. Mei, L. Yakun, C. Zhuowei, Z. Xinyu, C. Chong, W. Huizhen, D. Yanfei. Important factors controlling gibberellin homeostasis in plant height regulation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(43): 15895-15907.
- [161]N. Xing, X. Li, S. Wu, Z. Wang. Transcriptome and metabolome reveal key genes from the plant hormone signal transduction pathway regulating plant height and leaf size in *Capsicum baccatum*[J]. Cells, 2024, 13(10): 827.
- [162]G. Castorina, G. Consonni. The role of brassinosteroids in controlling plant height in poaceae: A genetic perspective[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(4): 1191.
- [163]A. J. Simkin, P. E. Lopez Calcagno, P. A. Davey, L. R. Headland, T. Lawson, S. Timm, C. A. Raines. Simultaneous stimulation of sedoheptulose 1, 7-bisphosphatase, fructose 1, 6-bisphosphate aldolase and the photorespiratory glycine decarboxylase-H protein increases CO₂ assimilation, vegetative biomass and seed yield in *Arabidopsis*[J]. Plant Biotechnology Journal, 2017, 15(7): 805-816.
- [164]L. Chun, L. Na, H. Rui, C. Congping, G. Jia, Y. Xiaorong, W. Pingrong. A single nucleotide substitution at the 3'-end of *SBPase* gene involved in Calvin cycle severely affects plant growth and grain yield in rice[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 345.
- [165]H. Obiadalla Ali, A. R. Fernie, A. Lytovchenko, J. Kossmann, J. R. Lloyd. Inhibition of chloroplastic fructose 1, 6-bisphosphatase in tomato fruits leads to decreased fruit size, but only small changes in carbohydrate metabolism[J]. Planta, 2004, 219(3): 533-540.
- [166]B. Ijaz, N. Zhao, J. Kong, J. Hua. Fiber quality improvement in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.): Quantitative trait loci mapping and marker assisted selection application[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, (10): 1585.
- [167]G. Huang, J. Huang, X. Chen, Y. Zhu. Recent advances and future perspectives in cotton research[J]. Annual Review of Plant Biology, 2021, 72(1): 437-462.
- [168]Y. L. Ruan, P. S. Chourey, D. P. Delmer, L. Perez Grau. The differential expression of sucrose synthase in relation to diverse patterns of carbon partitioning in developing cotton seed[J]. Plant Physiology, 1997, 115(2): 375-385.
- [169]Y. L. Ruan, D. J. Llewellyn, R. T. Furbank. Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation, and seed development[J]. PLANT CELL, 2003, 15(4): 952-964.
- [170]W. Sun, Z. Gao, J. Wang, Y. Huang, Y. Chen, J. Li, K. Zuo. Cotton fiber elongation requires the transcription factor *GhMYB212* to regulate sucrose transportation into expanding fibers[J]. The New phytologist, 2019, 222(2): 864-881.

- [171]F. Liang, E. Englund, P. Lindberg, P. Lindblad. Engineered cyanobacteria with enhanced growth show increased ethanol production and higher biofuel to biomass ratio[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, (46): 51-59.
- [172]E. Martin Avila, Y. L. Lim, R. Birch, L. M. A. Dirk, S. Buck, T. Rhodes, S. M. Whitney. Modifying plant photosynthesis and growth via simultaneous chloroplast transformation of Rubisco large and small subunits[J]. *The Plant Cell*, 2020, 32(9): 2898-2916.
- [173]D. Leister. Enhancing the light reactions of photosynthesis: Strategies, controversies, and perspectives[J]. *Molecular Plant*, 2023, 16(1): 4-22.
- [174]R. Zeng, T. Chen, X. Wang, J. Cao, X. Li, X. Xu, L. Zhang. Physiological and expressional regulation on photosynthesis, starch and sucrose metabolism response to waterlogging stress in peanut[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, (12): 601771.
- [175]S. E. Flannery, F. Pastorelli, W. H. J. Wood, C. N. Hunter, M. J. Dickman, P. J. Jackson, M. P. Johnson. Comparative proteomics of thylakoids from *Arabidopsis* grown in laboratory and field conditions[J]. *Plant Direct*, 2021, 5(10): 355.
- [176]X. Peng, X. Deng, X. Tang, T. Tan, D. Zhang, B. Liu, H. Lin. Involvement of *Lhcb6* and *Lhcb5* in photosynthesis regulation in *Physcomitrella patens* response to abiotic stress[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(15): 3665.
- [177]J. L. O, T. Aoife, H. S. J. O, H. D. J, S. N. S, H. Sam. How photoactivation triggers protochlorophyllide reduction: Computational evidence of a stepwise hydride transfer during chlorophyll biosynthesis[J]. *ACS catalysis*, 2022, 12(7): 4141-4148.
- [178]G. E. Martin, M. P. Timko, H. M. Wilks. Purification and kinetic analysis of pea (*Pisum sativum* L.) NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase expressed as a fusion with maltose-binding protein in *Escherichia coli*[J]. *BIOCHEMICAL JOURNAL*, 1997, 325(1): 139-145.
- [179]J. Yan, X. Liao, R. He, M. Zhong, P. Feng, X. Li, X. Zhao. Ectopic expression of GA 2-oxidase 6 from rapeseed (*Brassica napus* L.) causes dwarfism, late flowering and enhanced chlorophyll accumulation in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, (111): 10-19.
- [180]Y. Sakuraba, S. Y. Park, N. C. Paek. The divergent roles of STAYGREEN (SGR) homologs in chlorophyll degradation[J]. *Molecules and cells*, 2015, 38(5): 390-395.
- [181]K. J. Young, K. J. Hee, J. Y. Hee, Y. Jihyeon, B. Sangsu, K. MeSun, K. K. Kyoo. Transcriptome and metabolite profiling of tomato SGR-knockout null lines using the CRISPR/Cas9 System[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 24(1): 109.
- [182]J. A. Massange-Sánchez, L. E. Casados-Vázquez, S. Juárez-Colunga, R. J. H. Sawers, A. Tiessen. The phosphoglyceratekinase (PGK) gene family of maize (*Zea mays* var. B73)[J]. *Plants (Basel)*, 2020, 9(12): 1639.
- [183]Y. Zhen, J. Zhu, M. Yue, T. Mi. Impacts of phosphoenolpyruvate carboxylase gene silencing on photosynthetic efficiency and carbon fixation in *Skeletonema costatum*[J]. *Gene*,

2024, (933): 148915.

[184]T. Le Moigne, P. Crozet, S. D. Lemaire, J. Henri. High-resolution crystal structure of chloroplastic ribose-5-phosphate isomerase from *Chlamydomonas reinhardtii*-an enzyme involved in the photosynthetic Calvin-Benson cycle[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(20): 7787.

[185]J. Y. Kim, Y. J. Lee, H. J. Lee, J. Y. Go, H. M. Lee, J. S. Park, K. K. Kang. Knockout of *OsGAPDHC7* gene encoding cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase affects energy metabolism in rice seeds[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(22): 12470.

[186]P. Tong, G. Liao, D. Lu, X. Zhou, W. Zhang, Q. Xu, J. Wang. *ZjHXX5* and *ZjHXX6* negatively regulate the sugar metabolism of *Ziziphus jujuba* Mill[J]. Frontiers in Plant Science, 2024, (15): 1335120.

[187]Wenyan Xiao, J. Sheen, J. C. Jang. The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development[J]. Plant Molecular Biology, 2000, (44): 451-461.

[188]L. L. Zhang, H. Zhu, C. Y. Chen, N. N. Shang, L. X. Sheng, J. Q. Yu. The function of an apple ATP-dependent Phosphofructokinase gene *MdPFK5* in regulating salt stress[J]. Physiologia Plantarum, 2024, 176(6): 14590.

[189]H. Y. Gong, Y. Li, G. Fang, D. H. Hu, Z. H. Wang, G. H. Yu, Y. S. Li. *ccaA* and *FBP/SBPase* derived from *Cyanobacteria* improved photosynthetic capacity in rice[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2017, 35(6): 619-633.

[190]J. Wu, H. Zheng, Y. Dong, F. Zhao, Y. Zhai, H. Yang, J. Wang. The conserved transcriptional regulation mechanism of *ADH1* gene in *Zanthoxylum armatum* to waterlogging stress[J]. Plant physiology and biochemistry : PPB, 2024, (216): 109133.

[191]A. P. K, F. L. W. S. Regulation and function of the mammalian tricarboxylic acid cycle[J]. The Journal of biological chemistry, 2022, 299(2): 102838.

[192]A. Sienkiewicz-Porzucek, R. Sulpice, S. Osorio, I. Krahnert, A. Leisse, E. Urbanczyk-Wochniak, A. Nunes-Nesi. Mild reductions in mitochondrial NAD-dependent isocitrate dehydrogenase activity result in altered nitrate assimilation and pigmentation but do not impact growth[J]. Molecular Plant, 2010, 3(1): 156-173.

[193]S. Beeler, H. C. Liu, M. Stadler, T. Schreier, S. Eicke, W. L. Lue, O. Köting. Plastidial NAD-dependent malate dehydrogenase is critical for embryo development and heterotrophic metabolism in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2014, 164(3): 1175-1190.

[194]Y. Zhang, Y. Wang, X. Sun, J. Yuan, Z. Zhao, J. Gao, Z. Li. Genome-wide Identification of MDH family genes and their association with salt tolerance in rice[J]. Plants (Basel), 2022, 11(11): 1498.

[195]H. Cao, J. Chen, M. Yue, C. Xu, W. Jian, Y. Liu, Z. Li. Tomato transcriptional repressor MYB70 directly regulates ethylene-dependent fruit ripening[J]. The Plant journal: for cell and molecular biology, 2020, 104(6): 1568-1581.

- [196]Y. Zhang, Y. Zhang, Z. Yu, H. Wang, B. Ping, Y. Liu, T. Zhao. Insights into ACO genes across rosaceae: evolution, expression, and regulatory networks in fruit development[J]. Genes & genomics, 2024, 46(10): 1-15.
- [197]G. J. MacNeill, S. Mehrpouyan, M. A. A. Minow, J. A. Patterson, I. J. Tetlow, M. J. Emes. Starch as a source, starch as a sink: the bifunctional role of starch in carbon allocation[J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68(16): 4433-4453.
- [198]E. J. Andersen, S. Ali, E. Byamukama, Y. Yen, M. P. Nepal. Disease resistance mechanisms in plants[J]. Genes (Basel), 2018, 9(7): 339.
- [199]F. A. Guzmán Ortiz, J. Castro Rosas, C. A. Gómez Aldapa, R. Mora Escobedo, A. Rojas León, M. L. Rodríguez Marín, A. D. Román Gutiérrez. Enzyme activity during germination of different cereals: A review[J]. Food Reviews International, 2019, 35(3): 177-200.
- [200]D. L. C, L. SangKyu, B. Eduard, A. M. R, F. Michaela, T. MarieAude, Z. S. C. Beta-amylase9 is a plastidial non-enzymatic regulator of leaf starch degradation[J]. Plant Physiology, 2021, 188(1): 191-207.
- [201]V. Concetta, C. Alex, M. Lucia, I. Emmanuelle, P. Paolo, T. Paolo, S. Francesca. Thioredoxin-regulated β -amylase (BAM1) triggers diurnal starch degradation in guard cells, and in mesophyll cells under osmotic stress[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(2): 545-555.
- [202]C. Fan, S. Feng, J. Huang, Y. Wang, L. Wu, X. Li, L. Peng. AtCesA8-driven OsSUS3 expression leads to largely enhanced biomass saccharification and lodging resistance by distinctively altering lignocellulose features in rice[J]. Biotechnology for Biofuels, 2017, (10): 221.
- [203]T. Lianfu, X. Zijong, L. Changqing, H. Xiaohua, W. Sha, H. Yuan, C. Liangbi. The trehalose-6-phosphate synthase TPS5 negatively regulates ABA signaling in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Cell Reports, 2019, 38(8): 869-882.
- [204]N. Xiao, H. Ma, W. Wang, Z. Sun, P. Li, T. Xia. Overexpression of *ZmSUS1* increased drought resistance of maize (*Zea mays* L.) by regulating sucrose metabolism and soluble sugar content[J]. Planta, 2024, 259(2): 43.
- [205]V. B. P., P. Robert, W. Rebecca, F. Armahni, B. Dylan, R. Sara, T. N. J. Heterologous overexpression of *Arabidopsis* cell1 enhances grain yield, biomass and early maturity in *Setaria viridis*[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, (11): 515078.
- [206]H. Wu, S. Wang, M. Wu. The *Waxy* gene has pleiotropic effects on hot water-soluble and -insoluble amylose contents in rice (*Oryza sativa*) grains[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(12): 6561.
- [207]Y. Yang, L. Zhou, L. Feng, J. Jiang, L. Huang, Q. Liu, Q. Liu. Deciphering the role of *Waxy* gene mutations in enhancing rice grain quality[J]. Foods, 2024, 13(11): 1624.
- [208]S. C. Zeeman, T. Umemoto, W. L. Lue, P. Au Yeung, C. Martin, A. M. Smith, J. Chen. A mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and

- phytoglycogen[J]. PLANT CELL, 1998, 10(10): 1699-1712.
- [209]Y. Okinaka, K. Mimori, K. Takeo, S. Kitamura, Y. Takeuchi, N. Yamaoka, M. Yoshikawa. A structural model for the mechanisms of elicitor release from fungal cell walls by plant beta-1, 3-endoglucanase[J]. Plant Physiology, 1995, 109(3): 839-845.
- [210]K. Atnafu, K. Mulugeta. In silico analysis of promoter region and regulatory elements of glucan endo-1, 3-beta-glucosidase encoding genes in *Solanum tuberosum*: cultivar DM 1-3 516 R44[J]. Journal, genetic engineering & biotechnology, 2021, 19(1): 145.
- [211]J. Yoon, L. H. Cho, W. Tun, J. S. Jeon, G. An. Sucrose signaling in higher plants[J]. Plant Science, 2021, (302): 110703.
- [212]N. G. Halford, T. Y. Curtis, N. Muttucumaru, J. Postles, D. S. Mottram. Sugars in crop plants[J]. Annals of Applied Biology, 2011, 158(1): 1-25.
- [213]J. Wu, X. Wang, L. Bian, Z. Li, X. Jiang, F. Shi, Z. Zhang. Starch and sucrose metabolism plays an important role in the stem development in *Medicago sativa*[J]. Functional plant biology : FPB, 2024, (51): 24073.
- [214]L. Cristal, J. Sheila, T. Samuel, M. Nayelli, G. C. Stewart, T. Axel. Analysis of global gene expression in maize (*Zea mays*) vegetative and reproductive tissues that differ in accumulation of starch and sucrose[J]. Plants, 2022, 11(3): 238.
- [215]M. Stitt, H. W. Heldt. Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose 2, 6-bisphosphate : VI. regulation of the cytosolic fructose 1, 6-bisphosphatase in spinach leaves by an interaction between metabolic intermediates and fructose 2, 6-bisphosphate[J]. Plant Physiology, 1985, 79(3): 599-608.
- [216]M. Stitt, I. Wilke, R. Feil, H. W. Heldt. Coarse control of sucrose-phosphate synthase in leaves: Alterations of the kinetic properties in response to the rate of photosynthesis and the accumulation of sucrose[J]. Planta, 1988, 174(2): 217-230.
- [217]M. Valifard, R. Le Hir, J. Müller, D. Scheuring, H. E. Neuhaus, B. Pommerrenig. Vacuolar fructose transporter *SWEET17* is critical for root development and drought tolerance[J]. Plant Physiology, 2021, 187(4): 2716-2730.
- [218]Q. Zhang, C. Feng, W. Li, Z. Qu, M. Zeng, W. Xi. Transcriptional regulatory networks controlling taste and aroma quality of apricot (*Prunus armeniaca* L.) fruit during ripening[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 45.
- [219]T. Rottmann, F. Klebl, S. Schneider, D. Kischka, D. Rücher, N. Sauer, R. Stadler. Sugar transporter *STP7* specificity for l-Arabinose and d-Xylose contrasts with the typical hexose Ttransporters *STP8* and *STP12*[J]. Plant Physiology, 2018, 176(3): 2330-2350.
- [220]M. H. Cho, H. Lim, D. H. Shin, J. S. Jeon, S. H. Bhoo, Y. I. Park, T. R. Hahn. Role of the plastidic glucose translocator in the export of starch degradation products from the chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*[J]. The New phytologist, 2011, 190(1): 101-112.
- [221]Q. Xu, S. Yin, Y. Ma, M. Song, Y. Song, S. Mu, J. Liesche. Carbon export from leaves is

controlled via ubiquitination and phosphorylation of sucrose transporter SUC2[J]. PNAS of USA, 2020, 117(11): 6223-6230.

[222]C. Tong, C. Li, X. Y. Cao, X. D. Sun, Q. X. Bao, X. R. Mu, L. S. Meng. Long-distance transport of sucrose in source leaves promotes sink root growth by the EIN3-SUC2 module[J]. PLoS Genet, 2022, 18(9): 1010424.

[223]X. B. Li, X. P. Fan, X. L. Wang, L. Cai, W. C. Yang. The cotton *ACTIN1* gene is functionally expressed in fibers and participates in fiber elongation[J]. PLANT CELL, 2005, 17(3): 859-875.

[224]M. Zhang, L. B. Han, W. Y. Wang, S. J. Wu, G. L. Jiao, L. Su, H. Y. Wang. Overexpression of *GhFIM2* propels cotton fiber development by enhancing actin bundle formation[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2017, 59(8): 531-534.

[225]A. Phokas, J. C. Coates. Evolution of DELLA function and signaling in land plants[J]. Evolution & development, 2021, 23(3): 137-154.

[226]M. Cieřła, J. Mierzejewska, M. Adamczyk, A. K. Ö. Farrants, M. Boguta. Fructose biphosphate aldolase is involved in the control of RNA polymerase III-directed transcription[J]. Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Cell Research, 2014, 1843(6): 1103-1110.

[227]Z. Jason, T. Fabiola, G. I. Chiara, C. Cerina, A. Mathilde, D. Marion, C. Alain. The metabolic enzyme fructose-1, 6-bisphosphate aldolase acts as a transcriptional regulator in pathogenic *Francisella*[J]. Nature Communications, 2017, 8(1): 853.

致谢

落笔至此，感慨万千，回望种种，无不悸动，唯有一书，致敬师门，致谢亲友。

辛丑九月，不知天高，不知地厚，求学石大，欲解学术之疑，踏足学术坦途。然学海无涯，其理至深，迷途不见来时路，终不得正解。幸遇恩师（祝建波研究员，王爱英教授），寒江引舟，自此方知，学术无空，需积跬步。先生治学，经纬分明，一丝不苟。初呈拙文，逻辑混沌，先生不厌其烦，字字斧正，句句点拨。先生训诫：为学先为人，心正则理明，寥寥数语，受用终身。师恩厚重，非笔墨可载，唯以余生勤勉，报此涓埃。

初入师门，懵懂无知，幸得（师兄焦天齐、郭新勇、李锦、张尧、王赛赛，师姐刘瑞娜、张丽、夏雯雯、李忠晴）倾囊相授。至暗时刻，数据无常，举步维艰，师门（师弟辛洪亮，师妹吴小燕、李倩琴、何萍）同行，伴我枯坐，常笑言道：此役已破，当大庆之。此间情谊，譬如雪中薪火，寂夜钟声。今朝别离，各赴山河，然同门之谊，当如松柏长青。

父母之爱，无声无痕，却如大地承托万物。少时无知，欲弃学从工，幸得严父厉斥，身无长技，安能立身。母慈若水，添衣加餐，絮絮叮咛。长兄如峻岭，蔽我风雨，亦如长风，助我展翼。妻若明月，独携稚女，孤夜长明。今文成稿，伊抱幼女，倍感欣慰。寸草之心，难报春晖，唯以余生，奉亲于堂，敬兄如父，护妻女如珍。

昔年球场逐日，汗浸青衫，君笑语“败便烧烤，胜则痛饮”；论文困于实证，君携烈酒迎门，以毒攻毒，至星斗满天，瘫卧草野，醉眼望天，竟得灵感飞渡。今墨将干，君来电约战球场：“胜者饮冰啤，败者诵论文”，长风掠过篮筐，恍见少年驰骋如昨。以此致谢陈斌、曹军军、张云川等挚友。

学问之道，寂如险峰，冷若寒江。初涉此道，自负才高，以为挥毫可破万卷。孰料文献如山，压碎轻狂；数据似锁，困死方寸。然终未弃笔，盖因深信：萤火虽微，可照旷野；跬步虽缓，能至千里。今拙论即成，非敢言功，唯求无愧于本心。

搁笔之际，东方既白。推窗远眺，见朝霞染云，恰如初见石大那日。此去经年，愿携师长之智、亲友之暖、己身之志，行稳致远。纵前路多艰，亦当如稼轩词云：“青山遮不住，毕竟东流去。”

附录

附录 A.棉花培养基配方

表 A-1 棉花 MS 培养基配方
Table A-1 Cotton MS medium formulation

成分	化合物	母液浓度 (g/L)	贮备液倍数	母液用量 (mL/L)
大量元素	CaCl ₂	6.6	10	100
	KNO ₃	38		
	KH ₂ PO ₄	3.4		
	NH ₄ NO ₃	33		
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.4		
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	10		
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2		
微量元素	H ₃ BO ₃	3	100	1
	KI	0.75		
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25		
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025		
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025		
	FeSO ₄	2.78		
	Na ₂ EDTA	3.73		
铁盐	肌醇	10	100	10
有机	VB ₁	0.1		
	VB _{pp}	0.1		
	VB ₆	0.1		

注：无菌苗培养基：1/2MS 培养基；共培养培养基：在 MS 培养基中加入 2,4-D 0.05 mg/L + IAA 0.05 mg/L + KT 0.1 mg/L；抗性愈伤诱导培养基：MS 培养基中加入 2,4-D 0.05 mg/L + KT 0.1 mg/L + Kan 50 mg/L + Tm 100 mg/L + Cb 200 mg/L；分化培养基：MS 培养基加 1.9 g/L 的硝酸钾；胚状体诱导培养基：MS 培养基中大量元素去除硝酸铵并加入 1.9 g/L 的硝酸钾和 1 g/L 的谷氨酰胺和 0.5 g/L 的天门冬酰胺。

附录 B. SDS-PAGE 分离胶和浓缩胶

表 B-1 SDS-PAGE 分离胶组成成分

Table B-1 Components of separation gels by SDS-PAGE

试剂	分离胶浓度					
	8%	10%	12%	15%	18%	20%
H ₂ O (mL)	4.63	4	3.3	2.3	1.3	0.63
30% 丙烯酰胺 (29: 1) (mL)	2.67	3.3	4	5	6	6.67
1.5M Tris-HCl(pH 8.8) (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
10% SDS (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
过硫酸铵 AP (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
TEMED (μL)	5	5	5	5	5	5
总体积 (mL)	10					

表 B-2 SDS-PAGE 浓缩胶组成成分

Table B-2 Composition of concentrated gels by SDS-PAGE

试剂	浓缩胶浓度 (5%)			
H ₂ O (mL)	2	3	4	6
30% 丙烯酰胺 (29: 1) (mL)	0.5	0.75	1	1.5
1M TRIS-HCl(pH 6.8) (mL)	0.5	0.75	1	1.5
10% SDS (μL)	40	60	80	120
过硫酸铵 AP (μL)	30	45	60	90
TEMED (μL)	4	6	8	12
总体积 (mL)	3	4.5	6	9

附录 C.2023 年和 2024 年月平均温度和月平均降水量

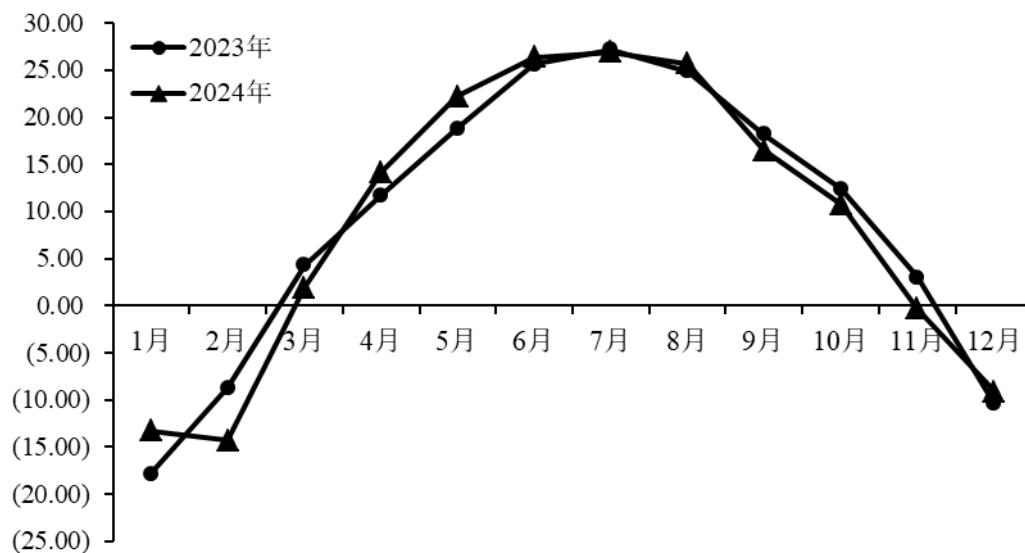


图 C01. 2023 年和 2024 年月平均温度

Figure C01. Mean monthly temperatures for 2023 and 2024

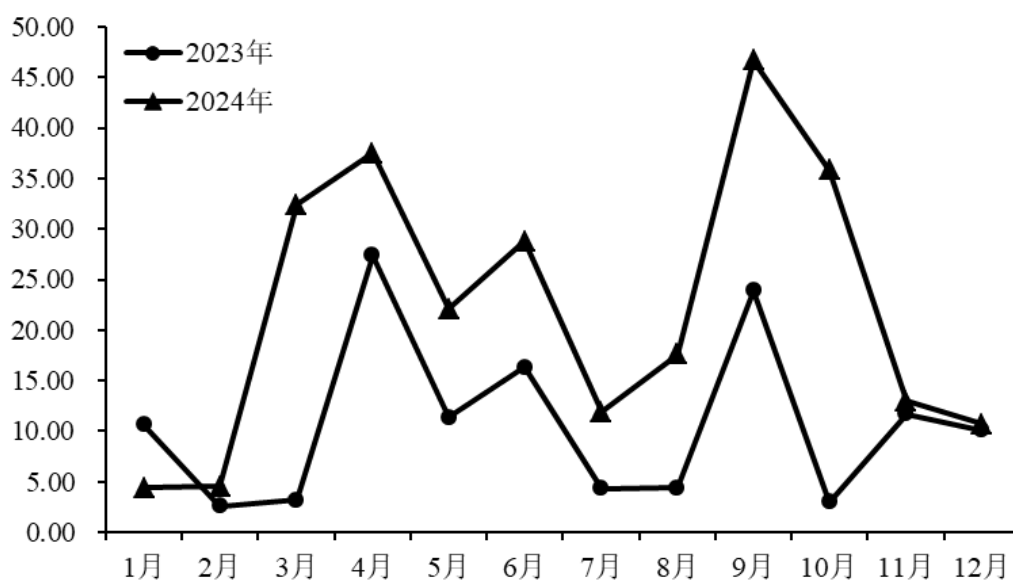


图 C02. 2023 年和 2024 年月平均降水量

Figure C02. Mean monthly precipitations for 2023 and 2024

附录 D.转录组测序及分析方法

D.1 样品收集和准备

D.1.1 RNA 提取与检测

植物样本采用乙醇沉淀法和 CTAB-PBIOZOL 进行提取，动物样本采用 Trizol 法进行提取。提取成功后的 RNA 加入 50 μ L DEPC 处理过的水溶解。随后，使用 Qubit 荧光定量仪和 Qsep400 高通量生物片段分析仪对总 RNA 进行鉴定和定量。

D.1.2 文库构建与质检

- (1) 利用真核生物大部分 mRNA 都带有 polyA 尾的结构特征，通过 Oligo (dT) 磁珠富集带有 polyA 尾的 mRNA；
- (2) 将纯化后的 mRNA 在适当温度下用片段缓冲液裂解成小片段；
- (3) 使用随机六聚体引物反转录生成第一链 cDNA；
- (4) 合成第二链 cDNA (链特异性文库：二链合成时，使用 dUTP 代替 dTTP，使 cDNA 第二链中掺入 dUTP，而本方法使用的高保真 DNA 聚合酶无法扩增含尿嘧啶的 DNA 模板，实现链特异性)，同时完成、末端修复和 dA-Tailing；
- (5) 进行测序接头连接 (Adapter Ligation)，连接完成后进行 DNA 磁珠纯化和片段选择，获得 250~350 bp 的插入片段的文库；
- (6) 将连接产物进行 PCR 扩增，并再次使用 DNA 磁珠纯化扩增产物，用 Nuclear Free Water 溶解产物；
- (7) 文库构建完成后，先使用 Qubit 荧光定量仪进行浓度检测，随后使用 Qsep400 高通量生物片段分析仪进行片段大小检测，最后使用 Q-PCR 方法对文库的有效浓度进行准确定量。

D.1.3 上机测序

库检合格后，把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求 pooling 后进行 Illumina 测序，并产生 150 bp 配对末端读数。测序的基本原理是边合成边测序 (Sequencing by Synthesis)。在测序的 flow cell 中加入四种荧光标记的 dNTP、DNA 聚合酶以及接头引物进行扩增，在每一个测序簇延伸互补链时，每加入一个被荧光标记的 dNTP 就能释

放出相对应的荧光，测序仪通过捕获荧光信号，并通过计算机软件将光信号转化为测序峰，从而获得待测片段的序列信息。

D.2 数据分析

D.2.1 数据质控

使用 fastp 对原始数据进行过滤，主要去除带接头(adapter)的 reads: 当任一测序 reads 中 N 含量超过该 reads 碱基数的 10%时，去除此 pairedreads; 当任一测序 reads 中含有的低质量($Q \leq 20$)碱基数超过该条 reads 碱基数的 50%时，去除此 paired reads。后续所有分析均是基于 clean reads.

D.2.2 序列比对到参考基因组

从指定网站上下载参考基因组及其注释文件，使用 HISAT 构建索引，并将 clean reads 比对到参考基因组。

D.2.3 新转录本预测

使用 StringTie 进行新基因预测，StringTie 应用网络流算法和可选的从头组装(de novo)来拼接转录本。与 Cufflinks 等软件相比，StringTie 能够拼接出更完整、更准确的转录本，拼接速度也更快。

D.2.4 基因表达水平定量

使用 featureCounts 对基因比对情况进行计算，然后根据基因长度计算每个基因的 FPKM。FPKM 是目前最常用的估计基因表达水平的方法。

D.2.5 差异分析

使用 DESeq2 进行两组之间的差异表达分析，使用 Benjamini & Hochberg 方法校正 P 值。校正后的 P 值以及 $|\text{Log}_2\text{FC}| \geq 1$ 作为显著差异表达的阈值。

D.2.6 差异基因富集分析

基于超几何检验进行富集分析，对于 KEGG，以 pathway 为单位进行超几何分布检验；对于 GO，则基于 GO term 进行。

D.2.7 差异可变剪切分析

使用 rMATS 分析可变剪切事件，主要包括 SE、RI、MXE、A5SS、A3SS 五种可变剪接事件。

D.2.8 SNP 分析

使用 GATK 进行变异位点分析，并用 annovar 对变异位点进行注释。

D.2.9 差异基因蛋白互作分析

差异表达基因的蛋白互作分析基于已知和预测蛋白质-蛋白质相互作用的 STRING 数据库。对于数据库中存在的物种，我们通过从数据库中提取目标基因列表来构建网络；否则，使用 blastx 将目标基因序列与选择的参考蛋白序列进行比对，然后根据所选参考物种的已知相互作用建立网络。

D.2.10 GSEA

使用 gsea 进行基因集富集分析。

D.2.11 WGCNA

使用 WGCNA 进行加权基因共表达网络分析。

附录 E.代谢组学测序及分析方法

E.1 标准品与试剂

表 E-1 标准品及试剂信息

Table E-1 Information on standards and reagents

试剂	级别	品牌
甲醇	色谱纯	Merck
乙腈	色谱纯	Merck
甲酸	色谱纯	Aladdin

E.2 样品提取流程

E.2.1 干样提取

- 1) 生物样品放置于冻干机 (Scientz-100F) 中真空冷冻干燥;
- 2) 利用研磨仪 (MM 400, Retsch) 研磨 (30 Hz, 1.5 min) 至粉末状;
- 3) 利用电子天平 (MS105DM) 称取 50mg 样本粉末, 加入 1,200 μ L, -20 $^{\circ}$ C 预冷的 70% 甲醇水内标提取液 (不足 50 mg 按每 50 mg 样本加入 1,200 μ L 提取剂的比例加入);
- 4) 每 30 min 涡旋一次, 每次持续 30 s, 共涡旋 6 次;
- 5) 离心 (转速 12,000 rpm, 3 min) 后, 吸取上清, 用微孔滤膜 (0.22 μ m pore size) 过滤样品, 并保存于进样瓶中, 用于 UPLC-MS/MS 分析。

E.2.2 色谱质谱采集条件

数据采集仪器系统主要包括超高效液相色谱 (Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC) (ExionLCTM AD, <https://sciex.com.cn/>) 和串联质谱 (Tandem mass spectrometry, MS/MS)。

E.2.2.1 液相条件

- 1) 色谱柱: Agilent SB-C18 1.8 μ m, 2.1 mm $\times$ 100 mm;
- 2) 流动相: A 相为超纯水 (加入 0.1% 的甲酸), B 相为乙腈 (加入 0.1% 的甲酸);
- 3) 洗脱梯度: 0.00 min B 相比比例为 5%, 9.00 min 内 B 相比比例线性增加到 95%, 并维持在 95% 1 min, 10.00~11.10 min, B 相比比例降为 5%, 并以 5% 平衡至 14 min;

4) 流速 0.35 mL min⁻¹; 柱温 40 ℃; 进样量 2 μL。

E.2.2.2 质谱条件

电喷雾离子源 (Electrospray ionization, ESI) 温度 550 ℃; 离子喷雾电压 (IS) 5,500 V (正离子模式) / -4500 V (负离子模式); 离子源气体 I (GSI), 气体 II (GSII) 和气帘气 (CUR) 分别设置为 50、60 和 25 psi, 碰撞诱导电离参数设置为高。QQQ 扫描使用 MRM 模式, 并将碰撞气体 (氮气) 设置为中等。通过进一步的去簇电压 (Declustering potential, DP) 和碰撞能 (Collision energy, CE) 优化, 完成了各个 MRM 离子对的 DP 和 CE。根据每个时期内洗脱的代谢物, 在每个时期监测一组特定的 MRM 离子对。

E.2.3 数据预处理

在所有代谢物的基础上, 首先使用每行 (代谢物) 最小值的 1/5 对缺失值进行填充, 然后计算 QC 样本 CV 值, 保留 CV 值小于 0.5 的物质得到最终数据。

E.3 数据结果评估

E.3.1 代谢物定性定量分析

基于本地代谢数据库, 利用软件 Analyst 1.6.3 处理质谱数据, 对样本的代谢物进行了质谱定性定量分析。通过三重四级杆筛选出每个物质的特征离子, 在检测器中获得特征离子的信号强度 (CPS), 用 MultiQuant 软件打开样本下机质谱文件, 进行色谱峰的积分和校正工作, 每个色谱峰的峰面积 (Area) 代表对应物质的相对含量, 最后导出所有色谱峰面积积分数据保存。

为了比较所有检测到的代谢物中每个代谢物在不同样本中的物质含量差异, 根据代谢物保留时间与峰型的信息, 对每个代谢物在不同样本中检测到的色谱峰进行校正, 以确保定性定量的准确。

代谢物的组成具有样本特异性, 不同类型的样本所包含的代谢物类别及比例不同; 此外, 在不同的处理或生物过程中, 代谢物组成也会发生改变。通过代谢物组成比例分析, 可以从整体上考察样本中的主要代谢物分布情况。

E.3.2 样本质控分析

质控样本（QC）由样本提取物混合制备而成，用于分析样本在相同的处理方法下的重复性。在仪器分析的过程中，一般每 10 个检测分析样本中插入一个质控样本，以监测分析过程的重复性。

E.3.3 主成分分析（PCA）

E.3.3.1 总体样本主成分分析

通过对样本（包括质控样品）进行主成分分析，以便初步了解各组样本之间的总体代谢物差异和组内样本之间的变异度大小。PCA 结果显示各组之间代谢组分离趋势，提示样品组内代谢组是否存在差异。

E.3.3.2 主成分单变量统计过程控制

基于每个样本检测到的离子峰，通过上述建立的 PCA 模型对 QC 样本进行监控，来判断仪器状态是否稳定。

E.3.4 聚类分析

代谢物含量数据采用 UV（unit variance scaling）处理（具体计算公式见附录），通过 R 软件 Complex Heatmap 包绘制热图，对代谢物在不同样本间的积累模式进行层次聚类分析（Hierarchical Cluster Analysis, HCA）。

E.3.5 重复相关性评估

通过样品之间的相关性分析可以观察组内样品之间的生物学重复。同时组内样品相对组间样品的相关系数越高，获得的差异代谢物越可靠。将皮尔逊相关系数 r （Pearson's Correlation Coefficient）作为生物学重复相关性的评估指标。皮尔逊相关系数利用 R 软件的内置 cor 函数计算， $|r|$ 越接近 1，说明两个重复样品相关性越强。

E.4 数据结果分析

E.4.1 分组主成分分析

在做差异分析前，首先对进行差异比较的分组样品进行主成分分析，观察差异分组之间和组内样本之间的变异度大小。

E.4.2 正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA)

正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 结合了正交信号校正 (OSC) 和 PLS-DA 方法, 能够将 X 矩阵信息分解成与 Y 相关和不相关的两类信息, 通过去除不相关的差异来筛选差异变量。OPLS-DA 在原始数据进行 log2 转换后, 再进行中心化处理。

E.4.3 OPLS-DA 模型验证

OPLS-DA 评价模型的预测参数有 R^2X , R^2Y 和 Q^2 , 其中 R^2X 和 R^2Y 分别表示所建模型对 X 和 Y 矩阵的解释率, Q^2 表示模型的预测能力, 这三个指标越接近于 1 时表示模型越稳定可靠, $Q^2 > 0.5$ 时可认为是有效的模型, $Q^2 > 0.9$ 时为出色的模型。

E.4.4 代谢物含量差异动态分布

为了更清楚、直观的展示总体代谢差异情况, 对比较组中代谢物进行差异倍数 (Fold Change, FC) 值计算, 计算之后根据 FC 值大小进行从小到大的排列, 绘制代谢物含量差异动态分布图, 对上调和下调前 10 个代谢物进行标注。

E.4.5 差异代谢物筛选

代谢组学数据具有“高维、海量”的特点, 因此需要结合单变量统计分析和多变量统计分析的方法, 并根据数据特性从多角度分析, 最终准确地挖掘差异代谢物。单变量统计分析方法包括假设检验 (Hypothesis testing) 和差异倍数 (Fold Change, FC) 分析。多变量统计分析方法包括主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA)、正交偏最小二乘法判别分析 (Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis, OPLS-DA) 等。基于 OPLS-DA 模型 (生物学重复 ≥ 3) 得到的变量重要性投影 (Variable Importance in Projection, VIP), 可以初步筛选出不同品种或组织间差异的代谢物。同时可以结合单变量分析的 P-value/FDR (生物学重复 ≥ 2) 或者 FC 值来进一步筛选出差异代谢物。本项目差异代谢物筛选标准为:

1. 选取 $VIP > 1$ 的代谢物。VIP 值表示对应代谢物的组间差异在模型中各组样本分类判别中的影响强度, 一般认为 $VIP > 1$ 的代谢物则为差异显著。

2. 选取 $fold\ change \geq 2$ 和 $fold\ change \leq 0.5$ 的代谢物。代谢物在对照组和实验组中差异为 2 倍以上或 0.5 以下, 则认为差异显著。

E.4.5.1 差异代谢物相关性分析

不同代谢物之间具有协同或互斥关系，相关性分析可以帮助衡量显著性差异代谢物之间的代谢密切程度（Metabolic Proximities），有利于进一步了解生物状态变化过程中代谢物之间的相互调节关系。通过皮尔逊相关分析方法对按照筛选标准鉴定得到的差异代谢物进行相关性分析。

E.4.5.2 K-Means 分析

为了研究代谢物在不同分组中的相对含量变化趋势，将所有比较组中按照筛选标准鉴定得到全部差异代谢物的相对含量进行 UV（Unit variance scaling）处理，随后进行 K 均值（K-Means）聚类分析。

E.4.5.3 差异代谢物 KEGG 和 MetMap 功能注释及富集分析

KEGG（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes）数据库有助于研究者把基因、表达信息以及代谢物含量作为一个整体网络进行研究。作为有关 Pathway 的主要公共数据库，KEGG 提供的整合代谢途径（Pathway）查询，包括碳水化合物、核苷酸、氨基酸等的代谢及有机物的生物降解，不仅提供了所有可能的代谢途径，而且对催化各步反应的酶进行了全面的注解，包含有氨基酸序列、PDB 库的链接等等，是进行生物体内代谢分析、代谢网络研究的强有力工具。

E.4.5.4 代谢物功能注释

代谢物在生物体内相互作用，形成不同的通路。利用 KEGG 数据库和 MetMap 数据库对代谢物进行注释。

E.4.5.5 差异代谢物富集分析

根据差异代谢物结果，进行通路富集分析，其中 Rich Factor 为对应通路中差异代谢物个数与该通路注释到的代谢物总数的比值，该值越大表示富集程度越大。P-value 为超几何检验 p 值，超几何分布的计算公式如下所示：

$$P = 1 - \sum_{i=0}^{m-1} \frac{\binom{M}{i} \binom{N-M}{n-i}}{\binom{N}{n}}$$

其中，N 代表全部代谢物中具有 KEGG 或 MetMap 注释的代谢物数量，n 代表 N 中差异代谢物的数量，M 代表 N 中某 KEGG 或 MetMap 通路的代谢物数量，m 代表 M 中某 KEGG 或 MetMap 通路的差异代谢物数量。P-value 越接近于 0，表示富集越显著。图中点的大小代表富集到相应通路上的差异显著代谢物个数。

作者简介

张泽星，男性，生于 1995 年 04 月，籍贯甘肃。2018 年毕业于河西学院农业与生物技术学院生物工程专业，获工学学士学位。2018 年 9 月起在石河子大学生物化学与分子生物专业学习，2020 年 9 月经硕博连读在石河子大学生命科学学院农业工程专业学习。

在学期间主要参与的研究项目

- 1、加工番茄 *COLD1* 与 *GPA1* 互作参与低温胁迫应答分子机制的研究。国家自然科学基金地区科学基金项目，2021 年。
- 2、天山雪莲 *sikFBA* 基因提高棉花低温光合生理机制的研究。兵团财政科技计划项目，2023 年。

在学期间发表的文章

- 1、Zexing Zhang, Hongliang Xin, Tianqi Jiao, Zhenhai Zhang, Ping He, Zhihui Yang, Jianbo Zhu, Ruina Liu. (2024) How photosynthetic performance impacts agricultural productivity in hybrid cotton offspring. *Heliyon*. (Q1, 中科院3区)
- 2、Liu R, Jiao T, Zhang Z, Yao Z, Li Z, Wang S, Xin H, Li Y, Wang A, Zhu J. Ectopic Expression of the *Allium cepa* 1-SST Gene in Cotton Improves Drought Tolerance and Yield Under Drought Stress in the Field. *Front Plant Sci*. (共同一作)
- 3、Zhang, L., Guo, X., Zhang, Z., Wang, A., & Zhu, J. (2020). Cold-regulated gene *lecor413pm2* confers cold stress tolerance in tomato plants. *Gene*. (共同一作)
- 4、Hongliang Xin 1, Qianqin Li 1, Saisai Wang, Zexing Zhang, Xiaoyan Wu, Ruina Liu, Jianbo Zhu, Jin Li. (2023) *Saussurea involucre* *PIP2;4* improves growth and drought tolerance in *Nicotiana tabacum* by increasing stomatal density and sensitivity. *Plant Science*. (参与)
- 5、吴保唐, 张光智, 史寒琪, 张泽星, 王赛赛, 吴小燕... & 刘瑞娜. (2024) 棉花 PLATZ 基因家族的鉴定与分析. 分子植物育种 1-18. (参与)
- 6、崔翠杰, 王赛赛, 张泽星. (2024). 陆地棉 NTL 转录因子全基因组鉴定及其在非生物胁迫下的表达分析. 分子植物育种. (参与)

石河子大学博士研究生学位论文

导师评阅表

研究生姓名	张泽星	学制	4 年
专业	农业工程	研究方向	农业生物环境与能源工程

学术评语:

该论文利用农杆菌介导的遗传转化体系,将天山雪莲 *SiFBA4* 基因整合到陆地棉 R15 基因组中,并通过生理、农艺、转录和代谢网络分析,初步揭示高光效棉花种质材料的生理机制。结果表明, *SiFBA4* 基因可以通过增强卡尔文循环关键酶活性和光反应相关基因表达,提高光合效率。并通过促进糖转运蛋白基因表达,优化光合产物从源到库的分配,最终实现生物量和产量的同步提升。这些研究揭示了 *SiFBA4* 基因通过卡尔文循环在棉花生长发育中的关键作用,为棉花育种提供了新的基因资源和理论依据。

该生理论基础扎实,动手能力较强,熟悉本工作的国内外研究动态,具有一定独立从事科研工作的能力。论文思路清晰,论据充分,分析严谨,结论可信。

指导教师签字:

祝建峰

2015 年 5 月 23 日