



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117431267 A

(43) 申请公布日 2024. 01. 23

(21) 申请号 202311355434.9

A01H 6/20 (2018.01)

(22) 申请日 2023.10.17

(71) 申请人 四川农业大学

地址 625000 四川省雅安市雨城区新康路
46号

(72) 发明人 张勇 周璇 尧婉甜 雷迪雅
汤浩茹

(74) 专利代理机构 北京正华智诚专利代理事务
所(普通合伙) 11870

专利代理师 屈小虹

(51) Int. Cl.

C12N 15/84 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

A01H 5/00 (2018.01)

权利要求书1页 说明书8页

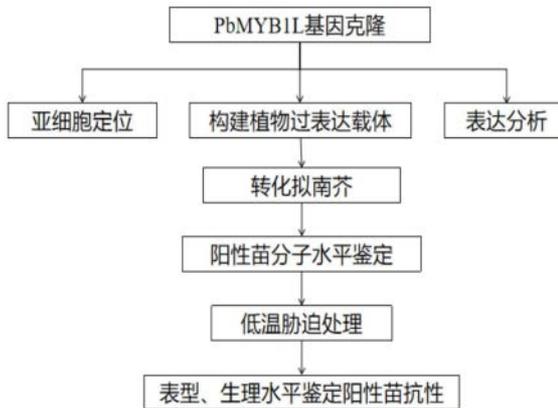
序列表(电子公布) 附图7页

(54) 发明名称

红早酥梨PbMYB1L基因在植物耐低温遗传改良中的应用

(57) 摘要

本发明公开了红早酥梨PbMYB1L基因在植物耐低温遗传改良中的应用,涉及基因工程技术领域,该PbMYB1L基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示,该基因编码的蛋白质的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。本发明构建植物过表达载体,通过农杆菌介导的遗传转化将PbMYB1L基因导入植物中,获得转基因植物。本发明利用PbMYB1L基因,提高植物耐冷性,从而筛选出耐低温性程度更高的梨品种,为植物抗逆分子设计育种提供了新的基因资源,提高了植物对于非生物逆境的抗性,有效解决了低温所导致的梨产业减产的问题。



1. 红早酥梨PbMYB1L基因在植物耐低温遗传改良中的应用。
2. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述PbMYB1L基因的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示。
3. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述PbMYB1L基因编码的蛋白质的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。
4. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述PbMYB1L基因在提高植物低温胁迫耐受性中的应用。
5. 一种利用权利要求1所述的红早酥梨PbMYB1L基因提高植物低温胁迫耐受性的方法,其特征在于,包括以下步骤:
 - S1、提取PbMYB1L基因,构建植物过表达载体,转化感受态细胞,得重组菌株;
 - S2、用步骤S1所得重组菌株转化植物并筛选,得转PbMYB1L基因植物。
6. 如权利要求5所述的利用红早酥梨PbMYB1L基因提高植物低温胁迫耐受性的方法,其特征在于,采用农杆菌介导的遗传转化方法将PbMYB1L基因导入植物中。
7. 如权利要求5所述的利用红早酥梨PbMYB1L基因提高植物低温胁迫耐受性的方法,其特征在于,步骤S1中,所述植物过表达载体所使用的载体为pCAMBIA1301。
8. 如权利要求5所述的利用红早酥梨PbMYB1L基因提高植物低温胁迫耐受性的方法,其特征在于,步骤S1中,采用冻融法转化感受态细胞,所述感受态细胞为农杆菌GV3101。
9. 如权利要求5所述的利用红早酥梨PbMYB1L基因提高植物低温胁迫耐受性的方法,其特征在于,步骤S2中,采用浸花法转化植物。
10. 如权利要求5所述的利用红早酥梨PbMYB1L基因提高植物低温胁迫耐受性的方法,其特征在于,步骤S2中,所述植物为拟南芥。

红早酥梨PbMYB1L基因在植物耐低温遗传改良中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程技术领域,具体涉及到红早酥梨PbMYB1L基因在植物耐低温遗传改良中的应用。

背景技术

[0002] 梨是当今世界广泛栽种的果树经济作物,因为其独特的营养风味和口感受到广大人民群众喜爱。据统计,梨是世界和我国的主要栽培树种之一,但其极易受外界环境条件的影响,如温度,水分,光照以及土壤与地势条件等。因此,选育抗逆性强、综合性状优良的新品种已经成为梨产业发展最关键的因素。

[0003] 在实际的栽培生产时常常会受到低温、干旱和涝害等非生物胁迫的危害。低温是限制果树生长发育的主要环境因子之一,而梨树也不例外,低温对梨树的影响主要集中在花期。梨树花粉发芽的温度要求在10℃以上,最适温度为18~25℃。花期天气晴朗,气温较高,授粉受精良好,可望丰产;花期连续阴雨或温度变化过大,会导致授粉受精不良,落花落果严重,必然导致减产。因此,选育耐低温的梨栽培品种已然迫在眉睫,其可有效地减少低温对梨产业造成的危害。

发明内容

[0004] 针对现有技术中的上述不足,本发明提供了红早酥梨PbMYB1L基因在植物耐低温遗传改良中的应用,该PbMYB1L基因具有提高植物耐冷性的功能,为植物抗逆分子设计育种提供新的基因资源,能有效提高植物对于非生物逆境的抗性,有效解决了低温所导致的梨产业减产的问题。

[0005] 为实现上述目的,本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:提供红早酥梨PbMYB1L基因在植物耐低温遗传改良中的应用。

[0006] 进一步,该PbMYB1L基因的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示。

[0007] 进一步,该PbMYB1L基因编码的蛋白质的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0008] 进一步,PbMYB1L基因在提高植物低温胁迫耐受性中的应用。

[0009] 本发明还提供了一种利用PbMYB1L基因提高植物低温胁迫耐受性的方法,包括以下步骤:

[0010] S1、提取PbMYB1L基因,构建植物过表达载体,转化感受态细胞,得重组菌株;

[0011] S2、用步骤S1所得重组菌株转化植物并筛选,得转PbMYB1L基因植物。

[0012] 进一步,采用农杆菌介导的遗传转化方法将PbMYB1L基因导入植物中。

[0013] 进一步,步骤S1中,植物过表达载体所使用的载体为pCambia1301。

[0014] 进一步,步骤S1中,采用冻融法转化感受态细胞。

[0015] 进一步,步骤S1中,所使用的感受态细胞为农杆菌GV3101。

[0016] 进一步,步骤S2中,采用浸花法转化拟南芥。

[0017] 进一步,步骤S2中,所述植物为拟南芥。

[0018] 本发明具有以下有益效果:

[0019] 1、本发明所克隆的PbMYB1L基因具有提高植物耐冷性的功能,转PbMYB1L基因拟南芥植株耐冷性明显提高。该基因的发现,为植物抗逆分子设计育种提供新的基因资源,能有效提高植物对于非生物逆境的抗性。

[0020] 2、通过探索低温胁迫对梨种质资源的影响,并从形态指标以及测定生理生化指标来评定多种耐低温性程度,从而选出耐低温性程度更高的梨品种,为研究梨耐低温分子机理等提供理论依据。

[0021] 3、通过分析在低温处理前后PbMYB1L转基因株系的表型及相关生理指标,可以得出结论:相对于非转PbMYB1L基因株系,PbMYB1L转基因株系具有明显的优势,例如主根长度较长、叶绿素含量较高,而超氧阴离子含量、过氧化氢含量以及丙二醛含量较低。野生型株系则与之相反,表明PbMYB1L基因是一个潜在的耐低温育种基因,可用于植物耐低温遗传改良。

附图说明

[0022] 图1为本发明的技术流程图;

[0023] 图2为本发明的蛋白PbMYB1L在低温胁迫下的表达示意图;

[0024] 图3为PbMYB1L基因亚细胞定位示意图;

[0025] 图4为过表达PbMYB1L基因拟南芥植株PCR扩增结果;

[0026] 图5为野生型拟南芥与转基因拟南芥的根长表型;

[0027] 图6为野生型拟南芥与转基因拟南芥的主根长度;

[0028] 图7为4℃低温下野生型拟南芥与转基因拟南芥的表型;

[0029] 图8为野生型拟南芥与转基因拟南芥叶片细胞中的叶绿素含量;

[0030] 图9为4℃低温胁迫24h内6个时间点野生型拟南芥与转基因拟南芥的丙二醛含量;

[0031] 图10为4℃低温胁迫1h后野生型拟南芥与转基因拟南芥的硝基蓝四唑染色图像;

[0032] 图11为4℃低温胁迫1h后野生型拟南芥与转基因拟南芥的二氨基联苯胺染色图像;

[0033] 图12为4℃低温胁迫24h内6个时间点野生型拟南芥与转基因拟南芥的抗超氧阴离子含量;

[0034] 图13为4℃低温胁迫24h内6个时间点野生型拟南芥与转基因拟南芥的过氧化氢含量。

具体实施方式

[0035] 下面结合实施例对本发明进行进一步的说明,但并不构成对本发明的限定。

[0036] 实施例1 PbMYB1L基因克隆及过表达载体构建

[0037] 1、RNA提取

[0038] 研究材料红早酥梨种植在四川农业大学现代农业研发基地,采取花后120d成熟果实。削取果实的果皮,迅速用液氮进行速冻。RNA的提取采用CTAB法,具体方法如下:

[0039] (1) 样品处理:取新鲜或-80℃冻存组织在液氮中研磨,加入PVPP粉末,研磨后在1.5mL离心管中称取0.1g样品,加入1mL 3wt%CTAB裂解液和10 μ L β -巯基乙醇后震荡混匀;

- [0040] (2) 将加入提取液的样品在65℃水浴35min,使得核酸蛋白复合物完全分离;每10min摇匀一次;
- [0041] (3) 在室温放置10min冷却,吸取700uL上清液到新的离心管中,加入700uL氯仿,盖好管盖,剧烈振荡混匀,16000g离心5min;
- [0042] (4) 吸取上清液600uL到新的离心管中,不要吸到沉淀;再加入600uL氯仿,盖好管盖,剧烈振荡混匀,16000g离心5min;
- [0043] (5) 吸取上清液400uL到新的离心管中,加入等体积的8M LiCl,上下颠倒混匀;
- [0044] (6) 放入4℃冰箱中,沉淀1~1.5h;
- [0045] (7) 4℃16000g离心10min;
- [0046] (8) 弃上清液,吸干残液,注意不要碰到沉淀,立即加入1mL 75vt%酒精,轻轻的上下颠倒使沉淀浮起来,至少洗5min;
- [0047] (9) 轻轻倒掉酒精,注意沉淀位置,不要倒出沉淀,瞬离;
- [0048] (10) 重复步骤(8)与步骤(9),将残液彻底吸干,放入超净工作台,打开管盖,吹干酒精;
- [0049] (11) 酒精吹干后,加入50μL的RNase free ddH₂O,盖上管盖,弹击管子使液体遍布管壁,瞬离后放置于冰上,即得到红早酥果皮的RNA。

[0050] 将提取到的杜梨RNA立即于-80℃超低温冰箱中保存以备用。取2μL红早酥RNA用于琼脂糖凝胶电泳,1μL用微量蛋白仪进行浓度检测。

[0051] 2、基因扩增

[0052] 取1μg红早酥RNA进行反转录。cDNA第一链的合成参照北京全式金(Transgen)生物技术有限公司的反转录试剂盒 **TransScript® All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for PCR** 使用手册操作。PCR程序为:42℃,30min;85℃,5s,12℃∞。所得的第一链cDNA用于PbMYB1L基因的扩增。PCR扩增体系如表1所示。

[0053] 表1 PCR扩增体系

	试剂	用量 (μL)
	cDNA	2
[0054]	正向引物	2
	反向引物	2
	2×Trans HiFi PCR SuperMix II	25
	无菌水	19

[0055] 注:正、反向引物均为经过Snapgene软件设计后的带酶切位点同源臂的引物。

[0056] 正向引物:TCGAGGGGGGCCCCGTACCATGACGGCCCCAAACGAC

[0057] 反向引物:AAGACCGGCAACAGGATTC

[0058] PCR按以下程序完成:94℃预变性3min;94℃变性30s,57℃退火30s,72℃延伸60s,35个循环,循环完成后72℃延伸5min。

[0059] 3、过表达载体构建

[0060] 采用生工生物工程(上海)有限公司的SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒,具体操作参考说明书。把纯化的DNA片段和经过双酶切后回收的线性化载体(pCAMBIA1301)进行连接,

采用热击法将连接产物转化到大肠杆菌感受态DH5 α 中,采用北京全式金生物技术有限公司生产的大肠感受态,以目的基因序列引物进行PCR验证并测序(由生工生物工程(上海)股份有限公司完成)。过表达载体双酶切体系见表2,连接体系见表3。

[0061] 表2双酶切体系

	试剂	用量 (μL)
	10 \times FlyCut $\text{\textcircled{R}}$ Buffer	5
	BamH I	1
[0062]	Kpn I	1
	ddH $_2$ O	Variable
	pCAMBIA1301-35s-Nos 质粒	$\leq 2\mu\text{g}$
	Total volume	50

[0063] 表3连接体系

	试剂	用量 (μL)
	2 \times Basic Assembly Mix	5
[0064]	Linearized vector(5-100ng)	x*
	Inserts	y*
	Nuclease-free Water	To 10

[0065] 注:*10 μL 反应体系中,载体与各个插入片段加入量建议均在0.01~0.25pmols,载体与各个插入片段的最佳摩尔比为1:2,pmols=质量ng/(片段长度bp \times 0.65kDa)。

[0066] 轻轻混合,50 $^{\circ}\text{C}$ 反应15min。反应结束后将离心管置于冰上冷却数秒。之后可将重组产物保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 或直接用于转化。

[0067] 测序结果正确的大肠杆菌菌液扩大培养后,用生工生物的SanPrep Column Plasmid Mini-Preps Kit质粒提取试剂盒提取质粒,然后用BamHI和KpnI限制性内切酶进行双酶切,电泳检测是否出现目的基因条带。提取的质粒于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,提取方法按照详见说明书。质粒命名为35S-PbMYB1L。将构建好的测序正确35S-PbMYB1L重组载体采用冻融法转入农杆菌感受态细胞(GV3101)备用。

[0068] 实施例2 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下PbMYB1L基因的qRT PCR分析

[0069] 为了分析红早酥梨中PbMYB1L基因对低温胁迫的反应,使用Real-time PCR技术对PbMYB1L基因的表达模式进行分析。

[0070] 采用CTAB法提取RNA(提取方法参照实施例1)。cDNA第一链的合成参照北京全式金(Transgen)生物技术有限公司的反转录试剂盒 **TransScript $\text{\textcircled{R}}$** All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR使用手册操作。PCR程序为:42 $^{\circ}\text{C}$,15min;85 $^{\circ}\text{C}$,5s,12 $^{\circ}\text{C}$ ∞ 。

[0071] 定量PCR检测体系如表4所示。

[0072] 表4定量PCR检测体系

	试剂	用量 (μL)
[0073]	2×Mix	10
	cDNA	1
	上游引物	1
	下游引物	1
	无菌水	7

[0074] 注:以Actin为内参引物,长度为124bp。

[0075] 定量PCR的程序:95℃预变性3min;95℃变性10s,57℃退火20s,72℃延伸30s,39个循环,循环完成后65℃延伸5s。

[0076] 处理过程如下:

[0077] 将拟南芥种子春化后播种于MS培养基上,发芽后将一部分幼苗移栽至方形培养基上垂直放置,观察拟南芥的根系生长情况;其余一部分移栽至穴盘中,用于观察拟南芥在低温下的生长表型和抗氧化物质含量的测定;每个处理,最少选用30株拟南芥苗,采集叶片的方法为随机混合采样,快速放入液氮中进行速冻,所采样品均保存在-80℃超低温冰箱。

[0078] 低温处理:将预培养后的拟南芥材料同培养皿一起直接放入4℃培养室内进行低温处理,取样时间分别是0h、1h、3h、6h、12h和24h;

[0079] 为确定PbMYB1L基因在低温胁迫中的应答程度,选用荧光定量PCR检测其表达情况,结果如图2所示。

[0080] 由图2可知,4℃低温处理植株时,表达量在3h迅速增高至峰值,而后逐渐下降,说明PbMYB1L基因对低温胁迫响应强烈。可以看出,本发明所述的PbMYB1L基因可以在低温胁迫中发挥作用,对于提高植物抗冷能力有显著影响,本发明主要探讨该基因在低温胁迫环境中的反应。

[0081] 实施例3 PbMYB1L基因亚细胞定位

[0082] 1、亚细胞定位载体的构建

[0083] 根据Snapgene软件设计PbMYB1L基因带同源臂的引物。以实施例1中测序成功的质粒为模板,用带同源臂的引物对其进行PCR扩增。PCR产物经1wt%琼脂糖凝胶电泳检测后,目的条带用试剂盒回收。pEGFP载体采用SpeI进行双酶切,回收纯化。将酶切后的载体与片段进行连接转化,菌液PCR呈阳性的菌液送去测序,测序成功后提取质粒转化农杆菌备用(GV3101)。

[0084] 2、烟草转化法进行亚细胞定位

[0085] (1) 菌液制备:选择测序正确的菌株加入5ml的LB液体培养基(50mg/mL kanamycin and 50mg/mL rifampicin,10mmol·L⁻¹MES,20 μmol /L acetosyringone),28℃过夜培养。将过夜的菌液加入LB培养基补至50mL继续28℃过夜培养,测定菌液光密度值0.8-1.0(OD600)左右。

[0086] (2) 侵染液制备:离心(5000r/min,5min,20℃)收集细胞,倒去所有上清,加入50ml渗透缓冲液(10mmol/L MgCl₂,10mmol/L MES,20 μmol /L acetosyringone),振荡重悬后再次离心(5000r/min,5min,20℃)收集细胞。倒去所有上清,加入渗透缓冲液30ml,28℃下50r/min温育4h后,取出调整光密度值为0.4(OD600)制成侵染液备用。

[0087] (3) 材料准备:选择生长状态良好的28d龄烟草。

[0088] (4) 侵染烟草:使用1ml的注射器,去除针头,用拇指按压注射器反板将液体从叶片下表皮注射到烟草叶片内。注射后,烟草叶片会出现湿润的现象。注射完成后的烟草在黑暗中培养24h后,转入培养箱中正常培养。

[0089] (5) 荧光信号检测:注射后2-3d,在Nikon A1激光共聚焦显微镜上进行荧光蛋白观察并拍照,激发波长为488nm,发射波长为520nm。

[0090] 为了确定PbMYB1L基因的亚细胞定位,以GFP作为对照,结果如图3所示。

[0091] 由图3可知,GFP在细胞质和细胞核中均有表达,而PbMYB1L GFP只在细胞核中表达,表明PbMYB1L基因的亚细胞定位在细胞核上。

[0092] 实施例4拟南芥的遗传转化及阳性鉴定

[0093] 1、拟南芥的遗传转化

[0094] 选取30~40d苗龄,生长健壮的拟南芥进行遗传转化,转化前剪掉已开花序刺激腋生花序的发生,当较多腋生花序生长至1~10cm长时进行转化。具体操作方法如下:

[0095] (1) 在含抗性的LB液体培养基中对农杆菌35S-PbMYB1L菌株活化培养,OD600达0.8-1.0时6000rpm离心5min收集菌液;

[0096] (2) 用重悬渗透培养液悬浮菌体至OD600约为0.8;重悬渗透培养液配方如下(1L):1/2MS培养基,500 μ L Silwet L-77,50g蔗糖,0.5g MES,用KOH调pH至5.7。

[0097] (3) 将重悬菌液倒入烧杯中,将拟南芥植株倒扣在烧杯上,使花序浸没在液体中,5min后取出植株,横放在塑料盘中,用塑料薄膜覆盖保湿,培养约24h后去除薄膜,直立放置培养。

[0098] (4) 将侵染结束后的拟南芥于暗处放置24h后转入正常的生长环境。继续培养3至5周,种子成熟后收集种子(T0代),自然干燥后保存。

[0099] 2、转基因植株的筛选及鉴定

[0100] 经浸花法转化拟南芥之后将得到T0代种子,将T0代种子于4 $^{\circ}$ C低温春化3d打破休眠,表面灭菌后播种。具体步骤如下:称量0.1g拟南芥种子置于1.5mL离心管内,于超净工作台内用75vt%酒精浸泡并吸打种子1min,之后用双蒸水清洗3-5次;用10%次氯酸钠充分振荡消毒5min,弃次氯酸钠溶液,双蒸水清洗4-5次,最后将种子平铺在含50mg/L潮霉素的MS固体培养基上并时常观察其生长情况,在培养基中可正常生长的拟南芥苗即为转基因阳性苗,将其移栽至穴盘中,正常生长,成熟后分单株收种子(T1)。

[0101] 称取基质中生长了15d左右的拟南芥叶片0.1g液氮研磨后装入1.5mL离心管,加入1ml 2wt%CTAB溶液(65 $^{\circ}$ C预热)和10 μ L β -巯基乙醇,快速充分震荡,避免组织在裂解液中结块,65 $^{\circ}$ C恒温水浴40min,期间上下颠倒5-8次;冰上冷却静止10min,13000rpm,5min离心,吸取700 μ L上清,加入700 μ L三氯甲烷,混匀后充分震荡,抽提两次,之后13000rpm室温离心10min;之后将800 μ L上清转移至新的1.5mL离心管中,加入等体积的异丙醇溶液,轻柔颠倒混匀后室温静置5min,-20 $^{\circ}$ C静置1h,沉淀结束后,13000rpm室温离心10min;离心后倒掉上清,切勿将管底白色絮状沉淀掉出,加1ml 75vt%无水乙醇清洗2次,重悬沉淀,上下轻柔颠倒20-30次,4 $^{\circ}$ C,13000rpm离心3min,弃上清;重复上一步操作,打开管盖,放入超净工作台待酒精挥发完全后加入50 μ L双蒸水以及1 μ L去RNA酶,37 $^{\circ}$ C水浴1h;用微量蛋白仪检测DNA浓度,将浓度调至50ng/ μ L;1wt%凝胶电泳检测DNA质量;

[0102] 所提DNA用特异性引物进行PCR扩增程序,用于鉴定阳性苗。进行检测时,若出现预期大小的片段,且其扩增片段亮度比野生型拟南芥片段高的株系,则为阳性植株。引物设计如下:

[0103] 正向引物F:5' ATGACGGCCCAACG 3'

[0104] 反向引物R:5' CTAGGTAGTGGCAGCTGCT 3'

[0105] PCR反应体系如表5所示。

[0106] 表5 PCR反应体系

	试剂	用量 (μL)
	DNA	10
[0107]	上游引物	1
	下游引物	1
	无菌水	7
	2×M5 HiPer plus Taq HiFi PCR mix	10

[0108] 注:2×M5 HiPer plus Taq HiFi PCR mix(with blue dye)。

[0109] PCR反应程序:95℃,3min;94℃,25s;58℃,25s;72℃,15s;34个循环,循环结束了72℃,5min;4℃保存;

[0110] 用农杆菌介导方法将PbMYB1L基因稳定转化到拟南芥内,将转化的T0代拟南芥种子经消毒后种在含有终浓度为50mg/L的潮霉素抗性的MS培养基中进行下一步筛选,其中抗性苗长势良好且生长速度快,而非抗性苗则生长缓慢且逐渐黄化并陆续死亡,待阳性苗长长至一定大小后将其移入基质营养土中进行培养。采集T0代拟南芥叶片和野生型拟南芥叶片提取DNA并进行阳性鉴定,最终检测到6株阳性植株。

[0111] 拟南芥的过表达系鉴定:将DNA鉴定得到的阳性拟南芥苗进行RNA提取和反转录,采用RT-PCR进行过表达分析,以未经处理的野生型拟南芥cDNA为阴性对照,用基因特异性引物进行扩增。扩增结束后用1wt%琼脂糖凝胶电泳,通过查看目的条带的亮度来判断基因在转化苗中表达量的高低,条带越亮则说明PbMYB1L基因表达量越高,结果如图4所示。

[0112] 由图4可知,本实验亮度最高,也就是表达量最高的Line4过表达植物株系为OE-6,因此选择OE-6作为后期实验的母本拟南芥植株,继续培养过表达系植株并进行收种、烘干。

[0113] 将T1代拟南芥种子经春化作用打破休眠后,消毒并种于含有潮霉素抗生素的MS培养基中以待观察。

[0114] 实施例5 PbMYB1L基因耐冷性分析及相应指标测定

[0115] 1、PbMYB1L转基因植株的抗性分析

[0116] 为验证过表达PbMYB1L基因拟南芥与低温胁迫之间的关系,将烘干后的转基因系OE-6与野生型WT种子经消毒后用移液枪分别点播于MS固体培养基中,待8~10d后,于超净工作台内挑取几乎一致的拟南芥平铺于方形培养基中,垂直放置并做好标记。观察统计转基因株系与野生型株系的主根长度,结果如图5-6所示。

[0117] 由图5-6可知,转基因拟南芥的主根长度长于野生型拟南芥。

[0118] 2、PbMYB1L转基因植株的耐冷性分析

[0119] 将MS培养基中长至2-4片叶的拟南芥幼苗移入基质营养土中进行培养,生长14d

后,将其转入4℃培养箱,在培养箱中培养14d后观察其表型,如图7所示,并测定低温胁迫14d之后拟南芥叶片细胞中的叶绿素含量,结果如图8所示;而对丙二醛(MDA)含量的测定采用低温处理后24h内6个不同时间点的样品,从而分析其细胞中在低温处理后24h内的动态变化情况,结果如图9所示。

[0120] MDA含量的测定:使用苏州格瑞思生物科技有限公司的试剂盒(G0109F),详细操作步骤见说明书。抗超氧阴离子自由基活性的测定:使用苏州格瑞思生物科技有限公司的试剂盒(G0116F),详细操作步骤见说明书。 H_2O_2 含量的测定:使用苏州格瑞思生物科技有限公司的试剂盒(G0112F),详细操作步骤见说明书。

[0121] 由图7可知,转基因株系及野生型拟南芥苗处理前生长状态基本一致。

[0122] 由图8可知,通过测定低温胁迫14d之后拟南芥叶片细胞中的叶绿素含量发现,转基因株系拟南芥叶绿素含量略微高于呈野生型拟南芥,转基因株系拟南芥的叶片均呈深绿色且差别不大。

[0123] 由图9可知,通过测定丙二醛含量发现,转基因株系的丙二醛含量在处理3h后开始逐渐显著高于野生型,说明转基因型拟南芥的膜脂过氧化程度更低,细胞膜受到盐胁迫的损伤更小,通过分析可以得出PbMYB1L转基因株系增强了植株的光合速率,很大程度上提高了植株的耐冷性。

[0124] 4、转基因植株低温胁迫后活性氧分析

[0125] 对PbMYB1L转基因拟南芥进行硝基蓝四唑(NBT)和二氨基联苯胺(DAB)染色,用以表现植株低温胁迫后的活性氧($O_2^{\cdot -}$ 和 H_2O_2)的剩余情况。由于植株活性氧的含量跟其氧化胁迫密切相关,因此植株体内活性氧的清除有利于其更好地生长。

[0126] 将苗龄为30d左右的过表达PbMYB1L基因拟南芥与野生型拟南芥经低温胁迫1h后,选取大小基本一致的叶片放入硝基蓝四唑(NBT)和二氨基联苯胺(DAB)染液中进行染色。结果如图10-11所示。

[0127] 由图10-11可知,过表达PbMYB1L基因拟南芥叶片的NBT和DAB染色后颜色较野生型拟南芥叶片浅。

[0128] 为了验证NBT和DAB染色结果的可靠性,我们采用试剂盒法来测定经低温处理24h内不同时间点的转基因拟南芥与野生型拟南芥中抗超氧阴离子($O_2^{\cdot -}$)含量及过氧化氢(H_2O_2)含量,结果如图12-13所示。

[0129] 由图12-13可知,转基因株系拟南芥的抗超氧阴离子含量和过氧化氢含量均在低温处理1h后开始逐渐低于野生型拟南芥。由以上实验结果可以看出,在低温胁迫条件下PbMYB1L转基因拟南芥比野生型拟南芥能更及时消除其体内有毒的氧化物,使得植株受到低温胁迫的损伤更低,从而提高了植株的耐冷性。

[0130] 综上所述,本发明提供的PbMYB1L基因参与了植物非生物胁迫中低温胁迫的过程,并起着重要的正调控作用。

[0131] 虽然结合附图对本发明的具体实施方式进行了详细地描述,但不应理解为对本专利的保护范围的限定。在权利要求书所描述的范围,本领域技术人员不经创造性劳动即可作出的各种修改和变形仍属本专利的保护范围。

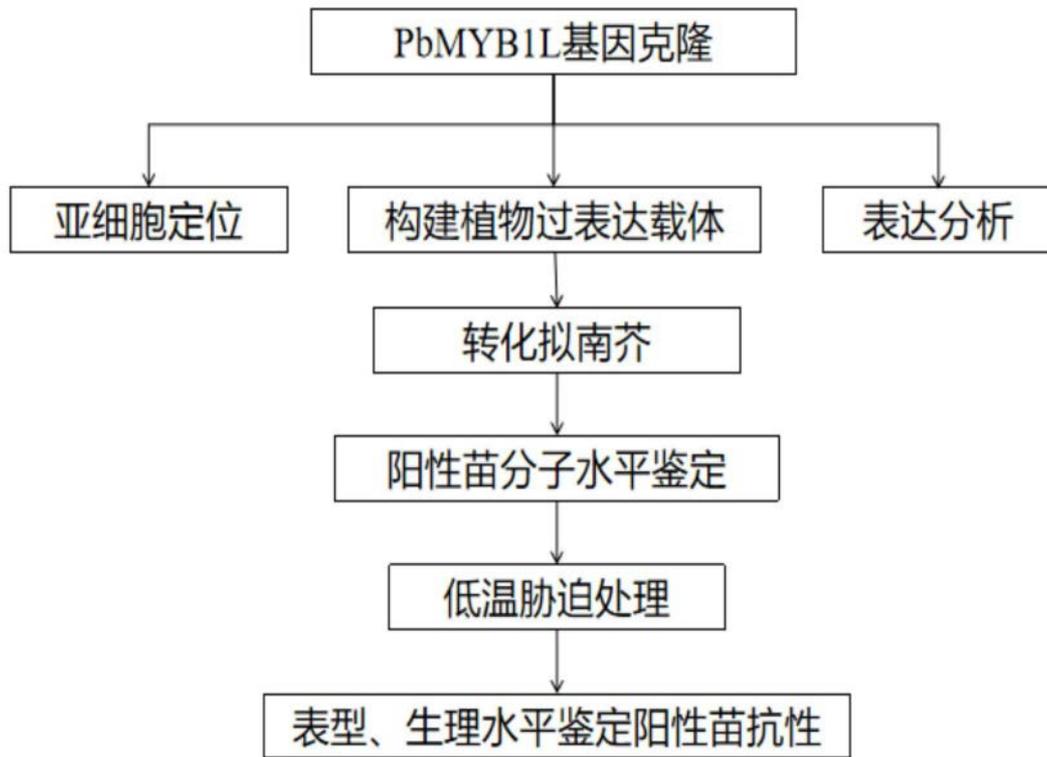


图1

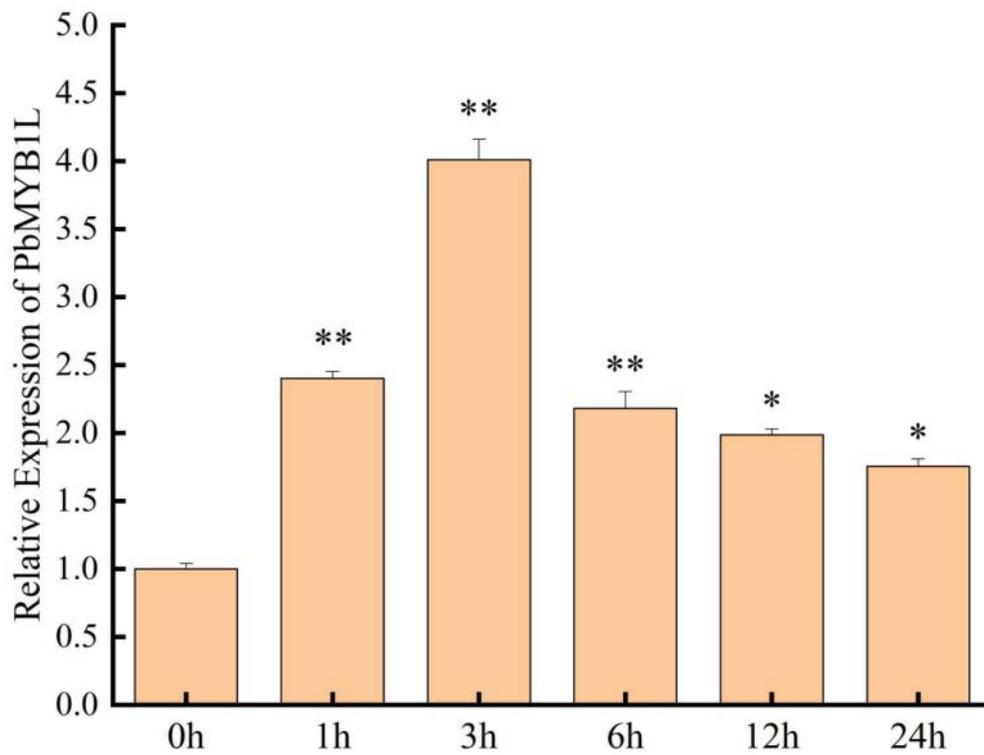


图2

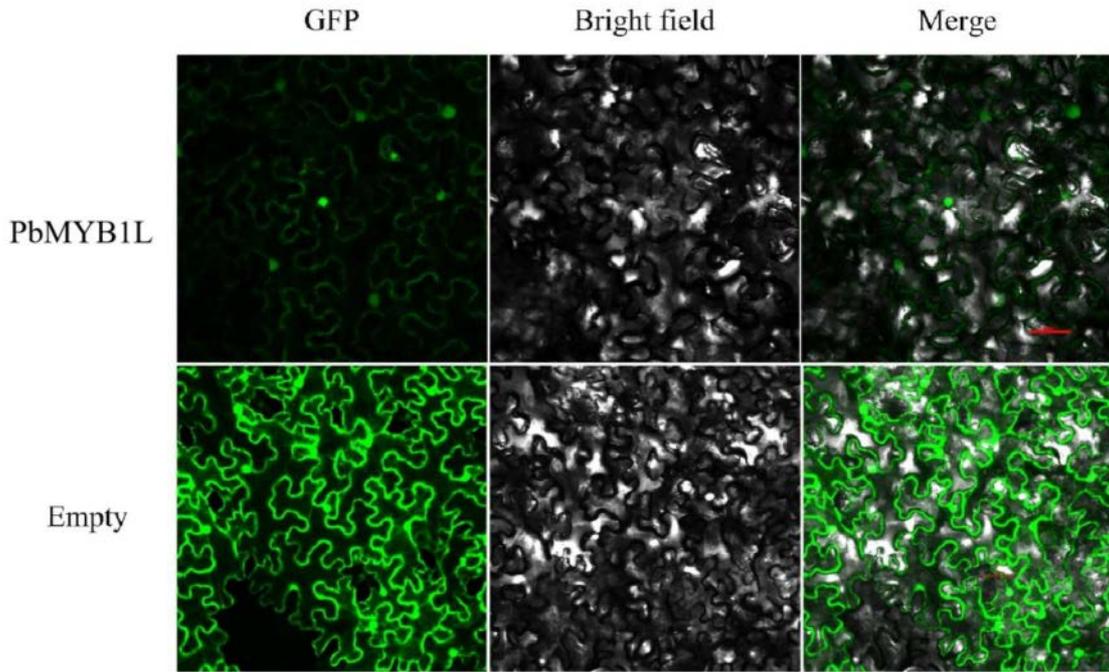


图3

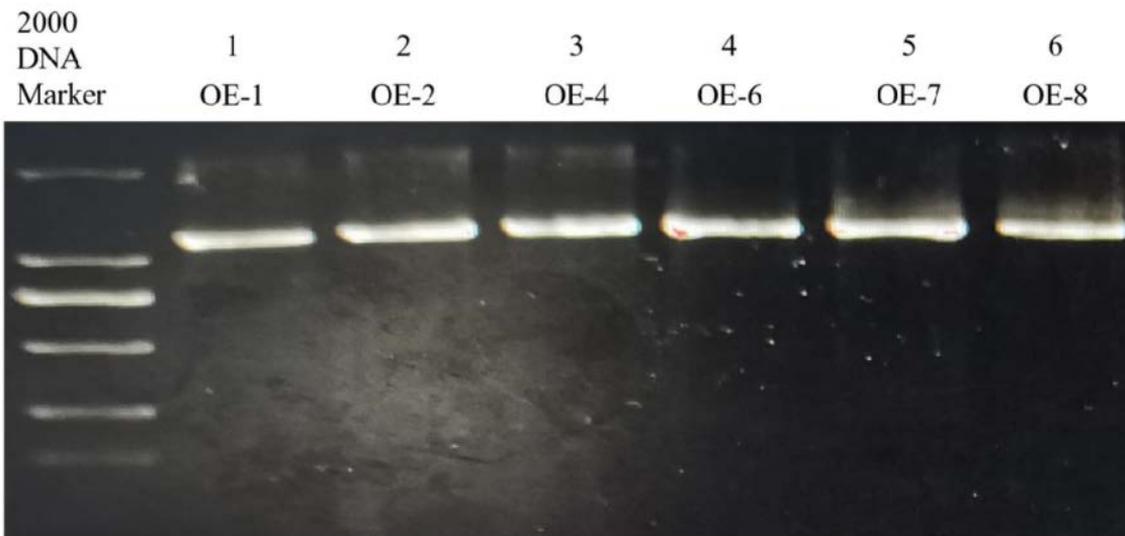


图4

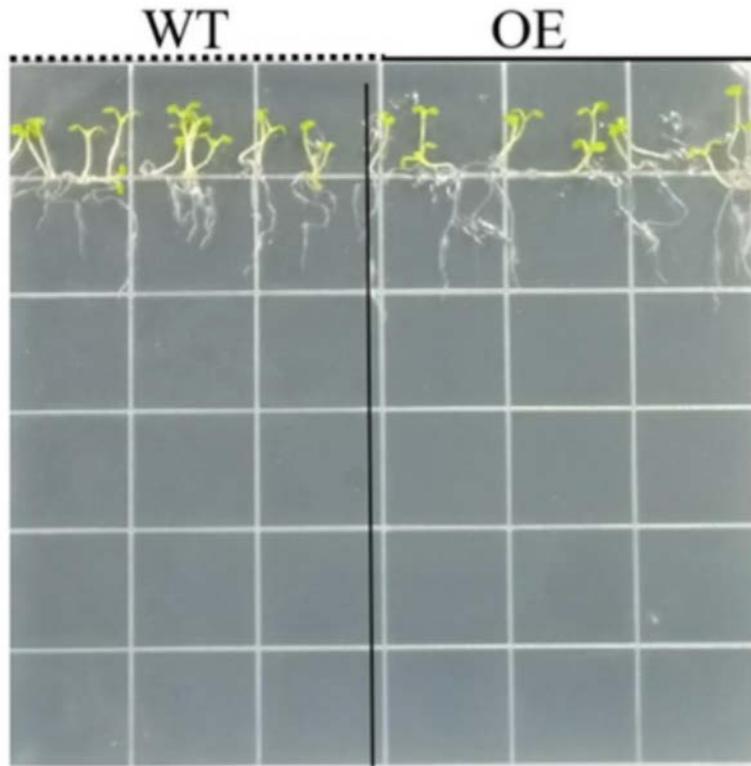


图5

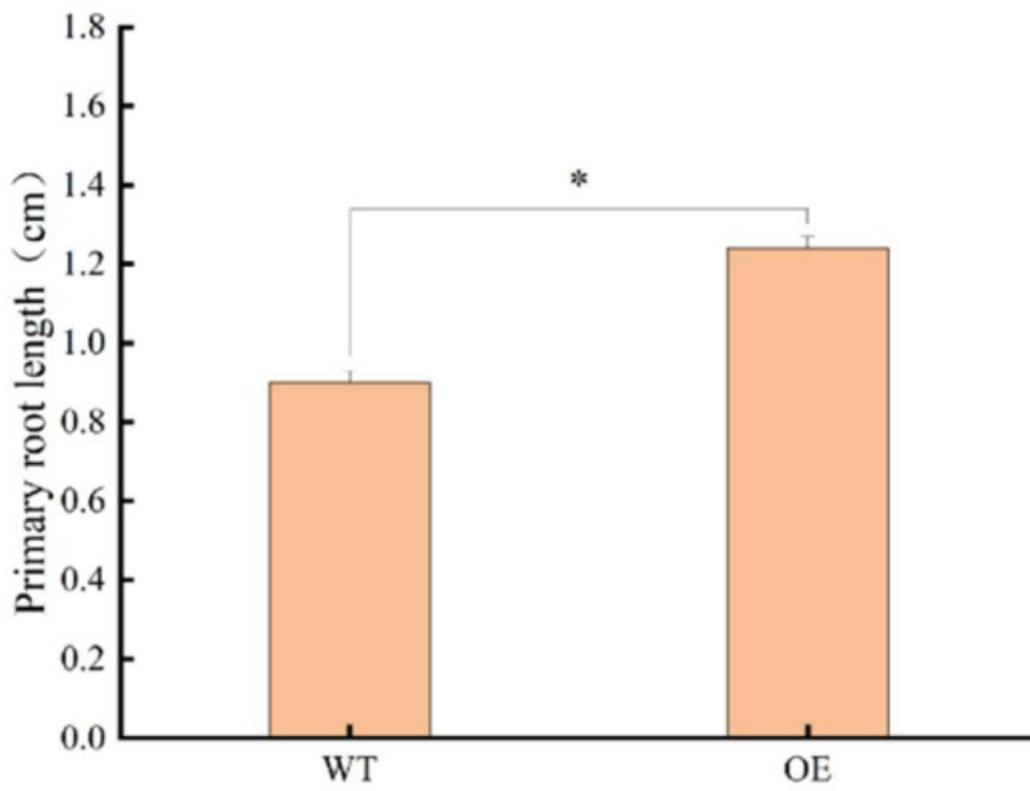


图6

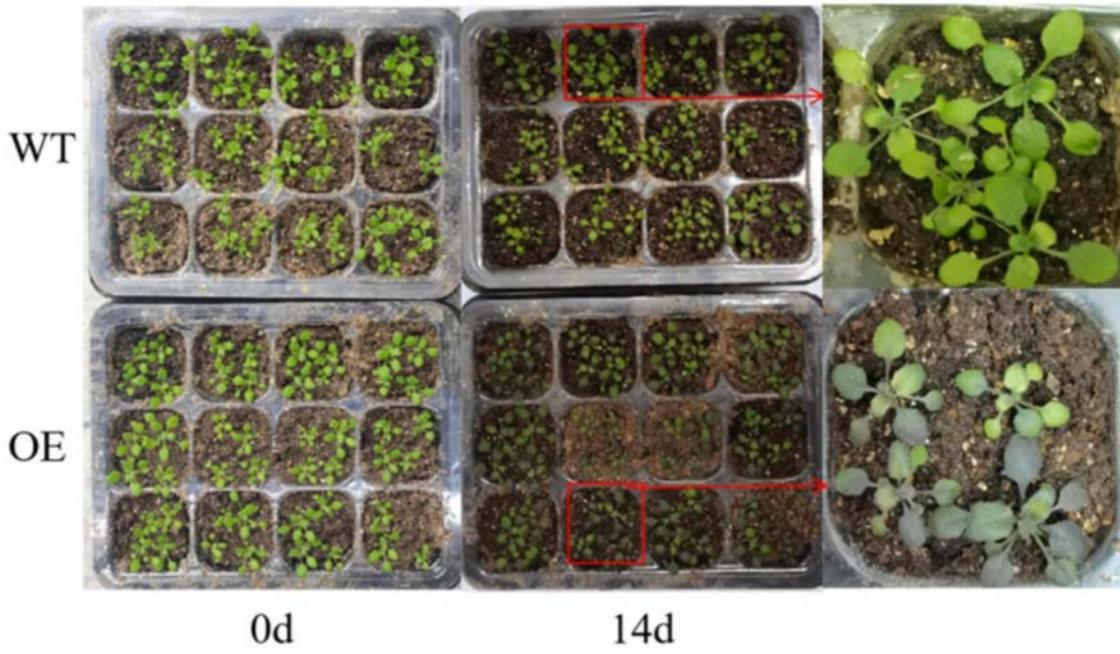


图7

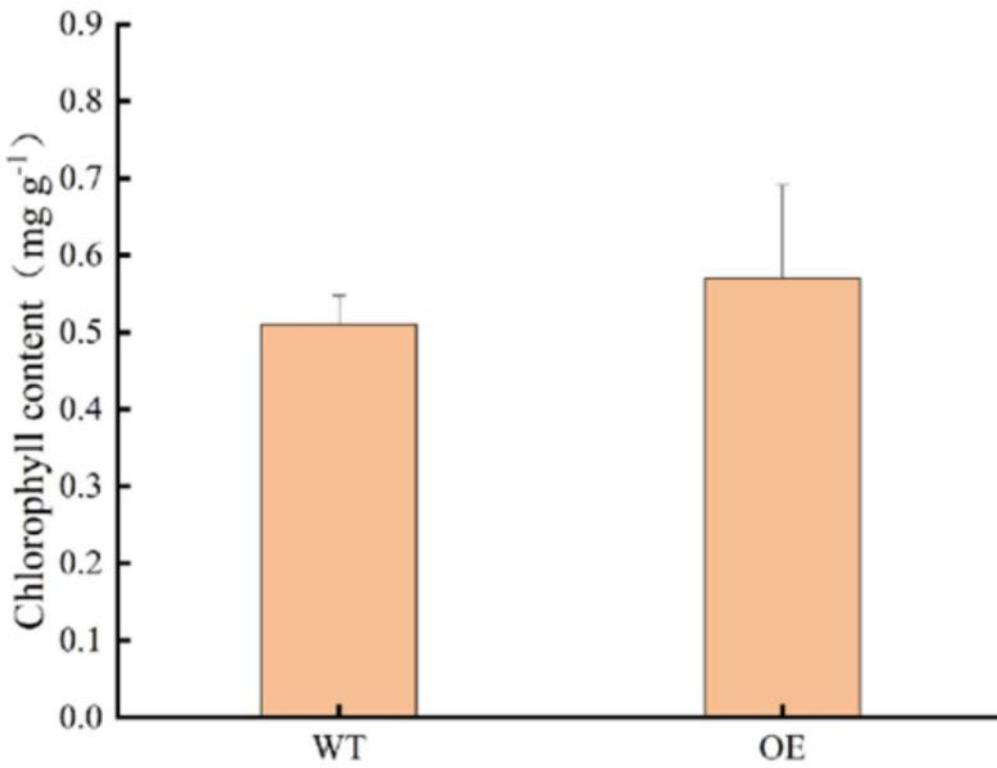


图8

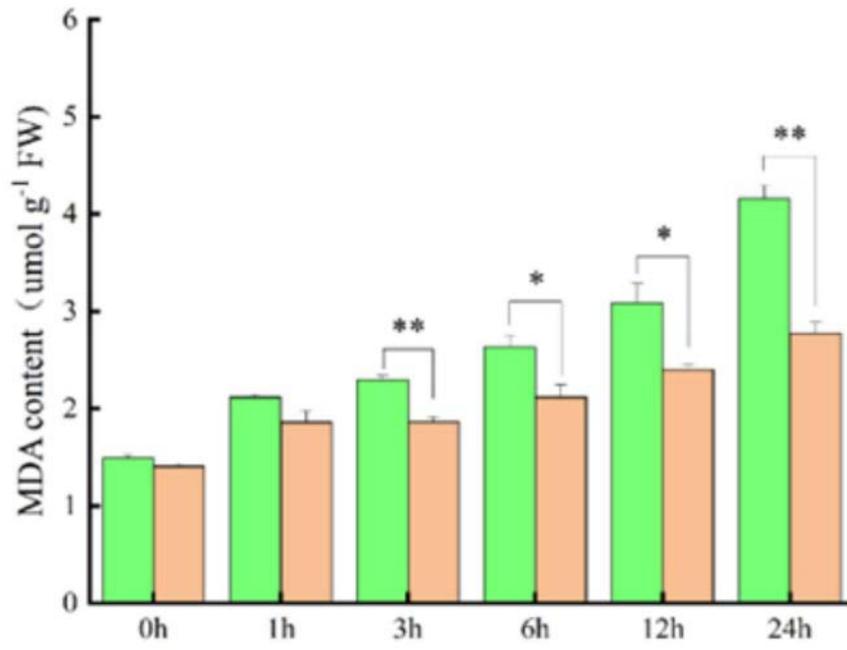


图9

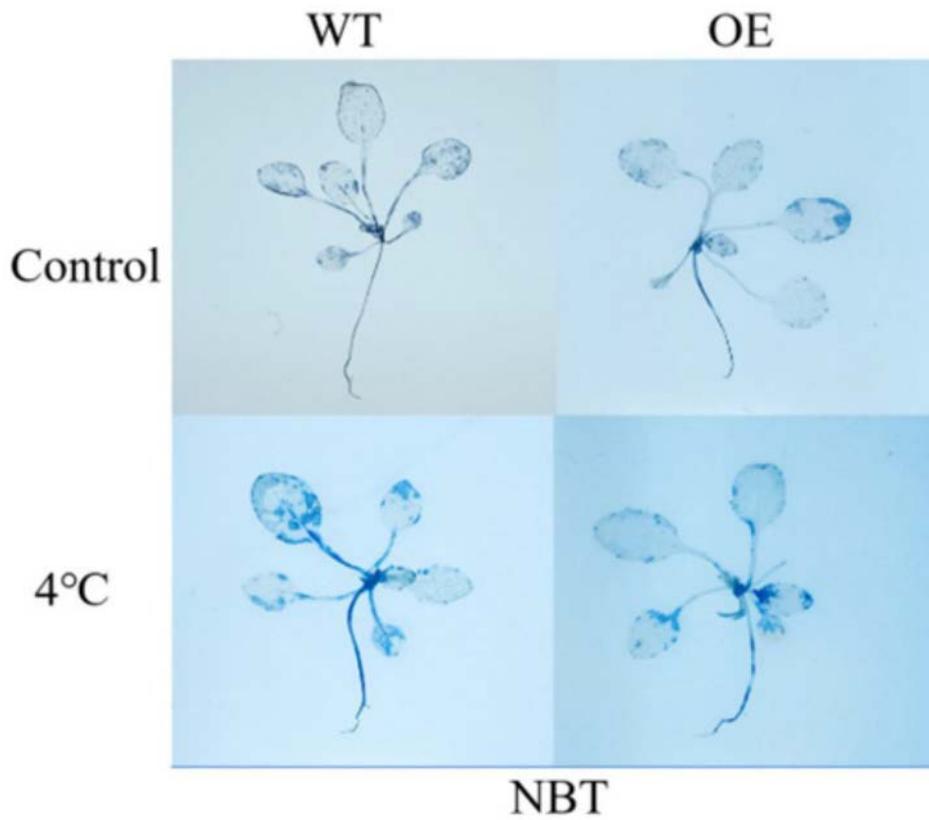


图10

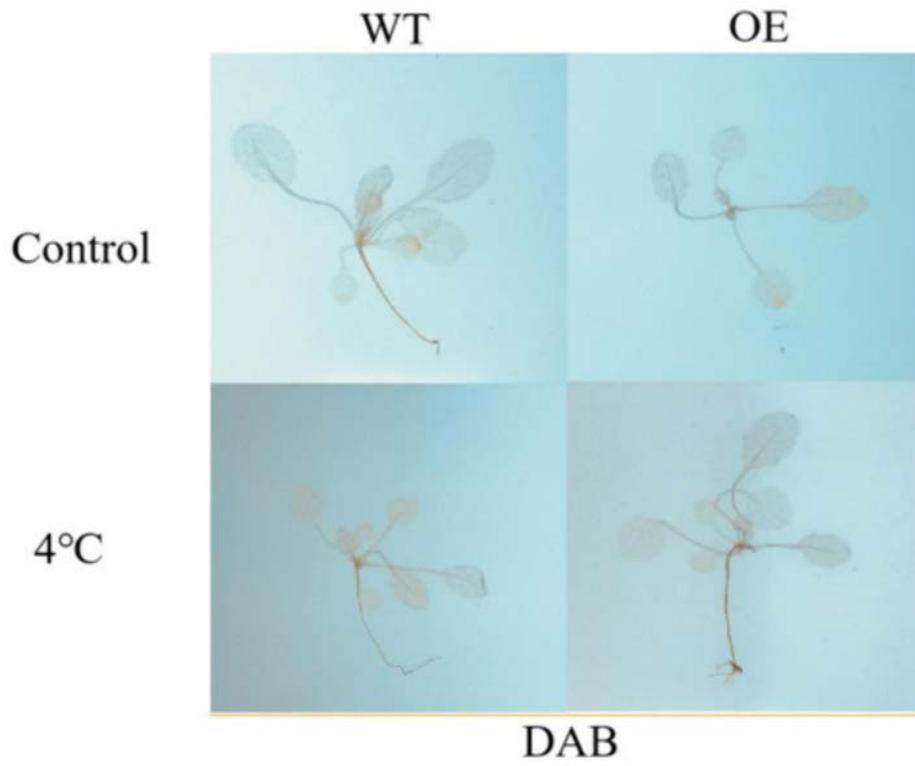


图11

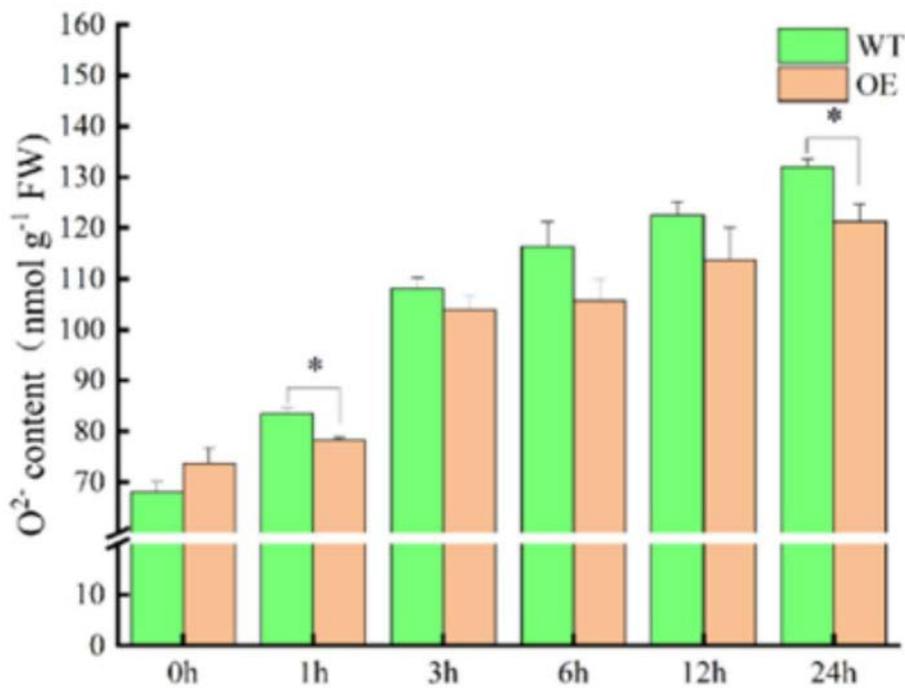


图12

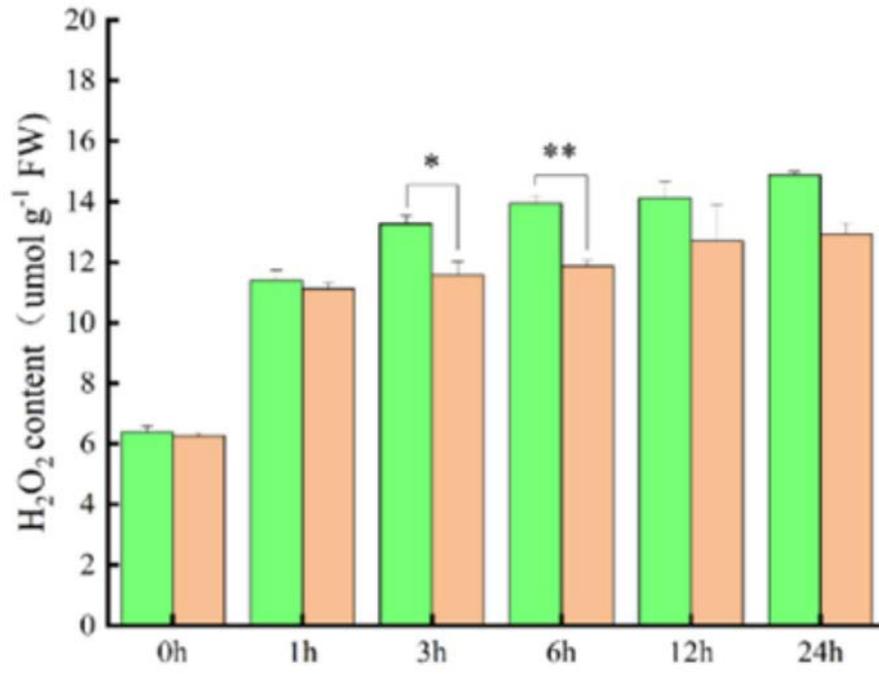


图13