



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116970049 A

(43) 申请公布日 2023. 10. 31

(21) 申请号 202310811585.4

A01H 5/10 (2018.01)

(22) 申请日 2023.07.04

A01H 5/06 (2018.01)

(71) 申请人 广东省林业科学研究院

A01H 5/00 (2018.01)

地址 510520 广东省广州市天河区龙洞街
道广汕一路233号

A01H 6/20 (2018.01)

C12Q 1/6895 (2018.01)

(72) 发明人 尧俊 张谦 蔡燕灵 朱刚

何波祥 汪迎利 连辉明 李兵

(74) 专利代理机构 广州专理知识产权代理事务
所(普通合伙) 44493

专利代理师 张凤

(51) Int. Cl.

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/84 (2006.01)

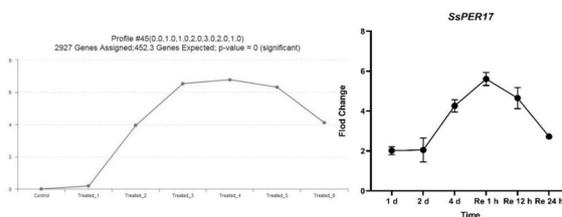
权利要求书1页 说明书8页
序列表(电子公布) 附图6页

(54) 发明名称

一种木荷抗旱基因SsPER17及其应用

(57) 摘要

本发明属于植物基因筛选的技术领域,具体涉及一种木荷抗旱基因SsPER17及其应用。所述SsPER17为将共有差异基因的深入分析,通过具有显著变化趋势的时序表达模型同GO注释相关联,与干旱复水试验预期基因差异模型时序特点相结合筛选得到,该基因表达存在时空特异性,随着干旱胁迫的加剧,基因表达呈现显著上升趋势,复水后基因表达水平降低,说明目的基因能被干旱诱导,与干旱胁迫密切相关;芽和根中表达显著最高,在叶中显著表达最低,说明目的基因主要在根和芽中表达;通过转基因拟南芥植株能在高渗透势使种子正常保持萌发,保持种子活性,促进根系伸长,表明SsPER17通过提高种子活性促进根系生长来增强自身的抗旱性能。



1. 一种木荷抗旱基因SsPER17,其特征在于,所述木荷抗旱基因SsPER17的核酸序列如SEQ ID NO.1所示。
2. 一种权利要求1所述木荷抗旱基因SsPER17编码的蛋白质。
3. 根据权利要求2所述的蛋白质,其特征在于,所述蛋白质的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。
4. 一种用于权利要求1所述木荷抗旱基因SsPER17的引物对,其特征在于,所述引物对包括正向引物和反向引物,其核酸序列分别如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示。
5. 一种权利要求1所述木荷抗旱基因SsPER17在提高植物抗旱性的应用,其特征在于,所述植物包括木荷或拟南芥。
6. 根据权利要求5所述木荷抗旱基因SsPER17在提高植物抗旱性的应用,其特征在于,其应用方法为将木荷抗旱基因SsPER17通过遗传转化的方法,通过连接表达载体,转化至菌株表达得到重组载体转入植物的基因组中,得到抗旱植物。

一种木荷抗旱基因SsPER17及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于植物基因筛选的技术领域,具体涉及一种木荷抗旱基因SsPER17及其应用。

背景技术

[0002] 植物应对干旱胁迫时最明显的表征是萎蔫程度,一旦植物失水过多将导致永久萎蔫,经研究显示,木荷幼苗在96h后萎蔫强度最高,同时复水后能迅速得到恢复,同样的研究结果在植物叶片含水量和气孔开度中得到体现,植物叶片含水量及气孔开度在复水后能迅速恢复至正常水平,气孔调节是植物应对干旱最直接的机制之一,通过气孔调节蒸腾作用和光合作用,减少与外界的水分交换。说明木荷对干旱胁迫适应及恢复能力较强。植物在应对干旱胁迫时叶绿素含量常用来评估植物耐受性,干旱胁迫使敏感的植物叶绿素含量降低(Zhu, 2020),导致光合作用减少,最终抑制植物的生长(Xue, 2018),也有研究表明干旱胁迫会使植物叶片叶绿素含量升高(代微然, 2010)。

[0003] SOD是细胞内重要的氧自由基清除剂,能催化超氧化物阴离子发生歧化作用,生成 H_2O_2 和 O_2 ,也是 H_2O_2 主要生成酶,在生物抗氧化系统中具有重要作用,CAT、APX、POD和GPX能清除细胞内产生的有毒的 H_2O_2 ,植物细胞通过一系列的酶来对抗水分胁迫下细胞膜的毒害。这些抗氧化酶活性的升高是植物有效的抗旱机制之一(Farooq, 2009)。众多实验研究表明,植物抗氧化酶的活性高低与应对非生物胁迫相关,包括干旱胁迫和盐胁迫(Bor, 2003; Demiral, 2005)。比如:耐旱植物比如菜豆、向日葵和高粱在干旱胁迫下比敏感植物具有较高POD活性(Shigeoka, 2002),北美红栎通过提高SOD和POD的活性以应对幼苗的短期干旱胁迫(汪俊峰, 2021)。植物通过一系列的抗氧化酶作用以减轻干旱对细胞的损害,从而提高对逆境的生存能力,达到应对干旱胁迫的目的。

[0004] 丙二醛(MDA)膜脂过氧化物产物,MDA的积累一定程度上反应细胞膜脂过氧化的重要指标(毛永成, 2016),MDA含量升高有助于植物逆境生物自我保护(Zhang, 2008; 汪俊峰, 2021),研究中木荷的MDA含量在干旱时显著升高,复水恢复后MDA含量恢复正常水平,说明在干旱时细胞膜系统受到较大伤害,复水后MDA含量恢复正常水平,说明木荷在经过长时间的干旱胁迫后膜系统的伤害是可以恢复的,具有较强的恢复能力。谷胱甘肽S-转移酶(GST),保护细胞免受氧化应激和有毒外来化学物质(Hayes, 2000),降低活性氧水平,在保护细胞免受亲电子化合物的损伤中发挥着重要作用(王光勇, 2010),GST活性变化随着干旱胁迫时间的增加而升高,96h下显著最高,这表明木荷干旱胁迫下细胞受到损害,GST能显著提高以抵御受到的亲电子化合物的损害,同时在复水后,GST活性恢复正常水平,说明损伤经过得以迅速恢复,减轻了失水对植物的伤害。研究表明,GST蛋白可能定位与叶绿体,在根中的表达量更高(乔光, 2017),转GST基因能提高核桃和番茄植株对非生物胁迫的抗性(Xu, 2015; Yang, 2016),因此植物通过积累MDA和提高GST活性,以达到应对干旱胁迫,提高机体耐受性。

发明内容

[0005] 针对上述问题,本发明的目的在于提供一种木荷抗旱基因SsPER17及其应用。

[0006] 本发明的技术内容如下:

[0007] 本发明提供了一种木荷抗旱基因SsPER17(自命名所得),所述木荷抗旱基因SsPER17的核酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0008] 本发明还提供了一种上述木荷抗旱基因SsPER17编码的蛋白质,所述蛋白质的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,其最后一个氨基酸为终止密码子,包括TGA、TAA、TAG的一种。

[0009] 本发明还提供了一种上述木荷抗旱基因SsPER17的引物对,所述引物对包括正向引物和反向引物,其核酸序列分别如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示。

[0010] 本发明还提供了一种上述木荷抗旱基因SsPER17在提高植物抗旱性的应用,所述植物包括木荷或拟南芥;

[0011] 其应用方法为将木荷抗旱基因SsPER17通过遗传转化的方法,通过连接表达载体,转化至菌株表达得到重组载体转入植物的基因组中,得到抗旱植物;

[0012] 所述表达载体包括pGB0,来源于北京林业大学;

[0013] 所述菌株包括大肠杆菌和农杆菌感受态,型号分别为DH5 α 和GV3101。

[0014] 本发明的有益效果如下:

[0015] 本发明的木荷抗旱基因SsPER17,通过对木荷幼苗干旱及复水时期的转录测序,利用差异化表达分析、KEGG功能富集分析、GO注释分析和时序化表达分析,筛选出与植物抗旱相关且时序表达和干旱胁迫模式相一致的SsPER17基因,同时通过qRT-PCR技术检测分析,结果显示基因表达模式与测序结果基本一致,表明SsPER17与干旱调控相关,通过生物信息学在线分析工具发现,SsPER17编码蛋白分子量3.713KD,分子式为C₁₆₃₈H₂₆₂₂N₄₆₆O₄₈₄S₁₇,理论pI=9.22,属于不稳定蛋白,表明编码的蛋白为分泌蛋白;对SsPER17上游2000bp启动子序列分析表明,启动子中含有大量光响应元件、激素响应相关元件、逆境响应相关元件,其中可能与干旱胁迫相关的顺式作用元件为MYB/MYC,MYB类转录因子在植物中广泛存在;

[0016] 通过qRT-PCR技术对SsPER17基因在木荷不同干旱时段、不同组织中基因表达分析发现,SsPER17基因表达存在时空特异性,随着干旱胁迫的加剧,基因表达呈现显著上升趋势,复水后基因表达水平降低,说明目的基因能被干旱诱导,与干旱胁迫密切相关;芽和根中表达显著最高,在叶中显著表达最低,说明目的基因主要在根和芽中表达;通过转SsPER17基因拟南芥植株能在高渗透势使种子正常保持萌发,保持种子活性,促进根系伸长,表明SsPER17通过提高种子活性促进根系生长来增强自身的抗旱性能;通过对AtPRX、AtAPX1功能基因转录水平分析发现,干旱能显著诱导这些与干旱胁迫相关的功能基因,处理后抗逆功能基因AtPRX在SsPER17转基因拟南芥中转录水平显著高于野生型植株,而AtAPX1显著低于野生型植株。这表明SsPER17基因在干旱诱导下促进AtPRX表达,而抑制AtAPX1的表达。通过对清除活性氧AtPRX和AtAPX1功能基因相关的植物过氧化物酶和抗坏血酸过氧化物酶活性的研究发现,干旱处理后酶活性显著变化,在SsPER17转基因拟南芥中POD活性显著高于野生型,而APX活性显著低于野生型,这与功能基因转录显著水平相一致。;通过SsPER17基因过表达使AtPRX正表达而AtAPX1呈现负表达,可能其中存在有补偿机制,以上均表明SsPER17基因在干旱胁迫中起到重要调节作用,主要依赖清除ROS途径。

附图说明

- [0017] 图1为木荷抗旱基因筛选中的KEGG富集分析结果图；
- [0018] 图2为木荷抗旱基因筛选中的GO注释分析结果图；
- [0019] 图3为木荷抗旱基因筛选中共有差异基因时序表达模型分析结果图；
- [0020] 图4为筛选的SsPER17基因时序表达趋势及验证结果图；
- [0021] 图5为SsPER17编码蛋白信号肽预测图；
- [0022] 图6为SsPER17跨膜区域预测
- [0023] 图7为SsPER17在木荷不同组织中的表达结果图；
- [0024] 图8为SsPER17基因克隆的PCR电泳图；
- [0025] 图9为阳性菌株鉴定的结果图；
- [0026] 图10为T1代拟南芥的生长照片以及叶片筛选；
- [0027] 图11为T1代转基因阳性植株的PCR结果图；
- [0028] 图12为拟南芥转基因阳性苗不同株系发芽情况；
- [0029] 图13为不同株系发芽表型和发芽势；
- [0030] 图14为根系表型和根系长度比较；
- [0031] 图15为拟南芥转基因阳性苗AtPRX和AtAPX1基因相对表达量变化；
- [0032] 图16为拟南芥转基因阳性苗POD和APX酶活性变化。

具体实施方式

[0033] 以下通过具体的实施案例以及附图说明对本发明作进一步详细的描述,应理解这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的保护范围,在阅读了本发明之后,本领域技术人员对本发明的各种等价形式的修改均落于本申请所附权利要求所限定。

[0034] 若无特殊说明,本发明的所有原料和试剂均为常规市场的原料、试剂。

[0035] 实施例

[0036] 一种木荷抗旱基因SsPER17及其应用

[0037] 1. 抗寒基因的筛选

[0038] 1) 木荷干旱复水处理

[0039] 将1-2年生木荷幼苗(来源于广东省林业科学研究院苗圃(23°11'59'N,113°22'11'E))放置在培养箱中培养,温度保持在25℃,湿度维持在70%,光周期为16h光照/8h黑暗,光照强度为600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。试验开始时浇透水,然后后续干旱处理,处理时间点为0h、1d、2d、4d,干旱4d后做复水处理,复水处理时间点为1h、12h和24h。

[0040] 2) 转录组测序

[0041] 通过北京泉熙特生物科技有限公司进行木荷转录组测序,通过其生物云平台完成数据分析。

[0042] 对木荷不同干旱时期21份样品(转录组测序步骤1)的7个不同处理,每个处理三个重复)进行转录组测序,共获得165.72Gb Clean Data,Q30碱基百分比在94%以上,组装得到的unigene个数为:155493,Transcription个数为:247211,平均长度:853.18bp,N50长度为:1254bp。

[0043] 根据以上表达量的定量结果,进行木荷不同处理组间差异基因分析,使用使用

DESeq2分析软件 ($|\log_2FC| \geq 1$ & $\text{padjust} < 0.01$), 结果如表1所示:

[0044] 表1组间差异表达的基因分析

序号	不同组	总 DET	up	down
1	Control_vs_Treated_1	4113	1394	2719
2	Control_vs_Treated_2	4833	2367	2466
3	Control_vs_Treated_3	20028	11635	8393
4	Control_vs_Treated_4	19298	9304	9994
5	Control_vs_Treated_5	6884	2688	4196
6	Control_vs_Treated_6	1972	799	1173
7	Treated_1_vs_Treated_2	3018	2121	897
8	Treated_1_vs_Treated_3	17718	10854	6864
[0045] 9	Treated_1_vs_Treated_4	16879	8771	8108
10	Treated_1_vs_Treated_5	6567	3409	3158
11	Treated_1_vs_Treated_6	1834	988	846
12	Treated_2_vs_Treated_3	19192	11511	7681
13	Treated_2_vs_Treated_4	18913	9846	9067
14	Treated_2_vs_Treated_5	9514	4907	4607
15	Treated_2_vs_Treated_6	3467	1762	1705
16	Treated_3_vs_Treated_4	108	40	68
17	Treated_3_vs_Treated_5	12304	4218	8086
18	Treated_3_vs_Treated_6	15986	6219	9767
19	Treated_4_vs_Treated_5	12024	6337	5687
[0046] 20	Treated_4_vs_Treated_6	14834	7784	7050
21	Treated_5_vs_Treated_6	2952	1709	1243

[0047] 3) 干旱基因的筛选

[0048] 基于以上表达量定量结果, 进行对照组与实验组进行差异基因分析 ($|\log_2FC| \geq 1$ & $\text{padjust} < 0.01$), 如表1所示, 差异化表达的差异化上下调表达的基因主要集中在干旱96h和复水1h上, 约2万条, 干旱胁迫前期和复水恢复后的差异基因数量仅有4千条左右, 同时差异化表达的基因数量呈现时序变化, 随着干旱的急剧而升高, 随着复水时间延长而下降。对比差异基因最高的干旱96h处理, KEGG分析显示 (如图1), 可见植物激素信号转导是功能富集的主要部分。

[0049] 将干旱处理前后差异基因建立基因集, 进行Venn分析, 共筛选到714条共有差异基因, 建立新基因集进行GO注释分析 (如图2)。分析结果发现, 在生物进程中主要注释在细胞和代谢过程, 在细胞组分中主要注释到膜部分, 在分子功能中主要注释到催化活性。

[0050] 将共有差异基因进行深入分析, 通过具有显著变化趋势的时序表达模型同GO注释相关联, 与干旱复水试验预期基因差异模型时序特点相结合, 结果如图3, 获得SsPER17基因, 且符合预期目标;

[0051] 通过qRT-PCR对比分析及验证SsPER17基因, 如图4, 可见基因表达模式基本一致, 同时符合预期表达模型, 最终初步确认SsPER17是木荷响应干旱胁迫的关键基因。

[0052] 所述实时荧光定量 (qRT-PCR) 的反应体系如下:

[0053] 1) 在冰上配制如下反应液:

[0054] 表2实时荧光定量PCR反应体系

	试剂	用量
	2×MltraSYBR Mixture	12.5 μL
	Forward Primer, 10 μM	0.5 μL
[0055]	Reverse Primer, 10 μM	0.5 μL
	Template DNA	2.0 μL
	ddH ₂ O	up to 25μL

[0056] 2) 将上述反应体系加入到专用96孔qPCR板内,光学密封薄膜进行密封;

[0057] 3) 反应程序

[0058] 表3实时荧光定量PCR反应程序

	步骤	温度	时间	循环圈数
	预变性	95°C	3min	1
[0059]	循环反应	95°C	5s	30-35
		60°C	30-40s	
	熔解曲线	仪器默认设置		

[0060] 2. 干旱基因的生物信息学分析

[0061] 2.1 SsPER17编码蛋白质理化性质

[0062] 利用ExPASy ProtParam对木荷SsPER17进行蛋白理化性质的初步分析,结果显示SsPER17基因蛋白分子量3.713KD,分子式为C₁₆₃₈H₂₆₂₂N₄₆₆O₄₈₄S₁₇,理论pI=9.22,通过氨基酸组分分析发现SsPER17基因中亮氨酸Leu(10.7%),丝氨酸Ser(9.2%),丙氨酸Ala(8.6%)比重最高,不稳定系数43.99,属于不稳定蛋白。

[0063] 信号肽位于起始密码子后,参与蛋白质的转运和定位,可使正在翻译的核糖体附着在rER膜上,将蛋白质引导到细胞含不同膜结构的亚细胞器内,利用SignalP 5.0对SsPER17基因编码蛋白进行信号肽预测,如图5,位置预测在22和23:AAA-AP,Sec/SPI=0.9809,表示具有信号肽存在。

[0064] 通过TMHMM 2.0对SsPER17基因编码蛋白质跨膜区域预测,结果如图6所示,预测1个跨膜螺旋数量,跨膜螺旋氨基酸残基数量的期望值为18.55,N-term位于膜细胞质侧的总概率为82.0%,氨基酸1-4位于膜内侧,跨膜螺旋区(TMhelix)位于5-24,而25-366位于膜外侧,表明编码的蛋白为跨膜蛋白;

[0065] 2.4启动子顺时元件预测分析

[0066] 通过本地blast获得目的基因SsPER17的上游2000bp启动子序列,利用plantCARE对启动子顺时元件进行预测,结果如表4,包含了大量光响应元件,如AE-box、AT1-motif、GT1-motif、Gap-box、TCCC-motif等;激素响应相关作用元件,如CGTCA-motif、ERE、GARE-motif、TGA-box、等;逆境响应相关作用元件,如AT-rich element、MYB/MYC、TGACG-motif、W box、WUN-motif、As-1。这表明SsPER17基因表达受到光调控、激素和逆境的诱导和调节。

[0067] 表4启动子顺式作用元件预测

	元件	元件核心序列	元件数	功能
	AAGAA-motif	GAAAGAA	1	development-related motifs
[0068]	AE-box	AGAAACTT	2	part of a module for light response cis-acting regulatory element
	ARE	AAACCA	2	essential for the anaerobic induction binding site of AT-rich DNA binding protein (ATBP-1)
	AT-rich element	ATAGAAATCAA AATTATTTTTTA	1	
	AT1-motif	TT	1	part of a light responsive module
	CCAAT-box	CAACGG	2	MYBHv1 binding site
	MYB	CAACCA	2	
	MYB recognition site	CCGTTG	2	
	Myb-binding site	CAACAG	1	
	MYC	CATTTG	5	
				cis-acting regulatory element
	CGTCA-motif	CGTCA	2	involved in the MeJA-responsiveness
	ERE	ATTTCATA	1	ethylene-responsive element
[0069]	GARE-motif	TCTGTTG	1	gibberellin-responsive element
	GT1-motif	GGTTAAT	2	light responsive element
		CAAATGAA(A/G)		
	Gap-box	A	1	part of a light responsive element
	TCCC-motif	TCTCCCT	2	part of a light responsive element
	TCT-motif	TCTTAC	2	part of a light responsive element
	TGA-box	TGACGTAA	1	part of an auxin-responsive element
				cis-acting regulatory element
	TGACG-motif	TGACG	2	involved in the MeJA-responsiveness
	W box	TTGACC	1	response to defense and stress stress responsiveness cis-regulatory elements
	WUN-motif	AAATTACT	4	
	As-1	TGACG	2	stress responsiveness cis-regulatory elements

[0070] 3. 干旱基因的功能鉴定

[0071] 3.1目的基因的组织特异性表达分析

[0072] 通过qRT-PCR (同表2、表3) 研究SsPER17基因在1-2年生的木荷的叶、芽、茎和根中表达情况,所采用的引物对序列为:

[0073] F引物:ATGTCTCCCGCTCTTCTTCCC;

[0074] R引物:TCAAGAGGATGAGGACTCCAAC);

[0075] 结果如图7,发现SsPER17基因在木荷不同组织中具有特异性表达,在芽和根中表达显著最高,在叶中显著表达最低,说明目的基因主要在根和芽中表达。

[0076] 3.2异源转化拟南芥

[0077] 1) SsPER17基因CDS序列扩增

[0078] 使用1-2年生木荷新鲜植物叶片提取mRNA,并反转录呈cDNA作为克隆模板,如图8所示,通过PCR克隆获得SsPER17基因目的大小的条带。

[0079] 2) 表达载体阳性菌液鉴定

[0080] 将目的基因SsPER17连接过表达载体pGB0,转化至DH5 α 感受态中,将长出的阳性菌落进行PCR验证,结果如图9,将条带正确的菌液测序,测序结果与基因的CDS区一致,可用于异源转化拟南芥。

[0081] 所述PCR验证的反应体系如下:

[0082] 表5PCR反应液

试剂	用量
PrimerSTAR Max Premix(2x)	12.5 μ L
Forward Primer	1 μ L
Reverse Primer	1 μ L
Template	1 μ L
ddH ₂ O	up to 25 μ L

[0084] 表6PCR扩增程序

步骤	温度	时间	圈数
初始变性	98 $^{\circ}$ C	2 min	1
变性	98 $^{\circ}$ C	10 s	32-35
退火	T _m \pm 5 $^{\circ}$ C	15 s	
延伸	72 $^{\circ}$ C	30 s	
最终衍生	72 $^{\circ}$ C	3 min	1
	4 $^{\circ}$ C	Hold	

[0087] 3) 拟南芥转基因阳性苗鉴定

[0088] 使用1/2MS固体培养基(含50mg/L Kana)筛选拟南芥T1种子Col-1(哥伦比亚野生型),转基因成功的拟南芥正常生长,如图10,使用擎科T5 Direct PCR Kit(Plant)对拟南芥转T1代转基因阳性植株叶片进行PCR检测,获得目的基因大小片段如图11,证明成功转入拟南芥中。

[0089] 4) 拟南芥转基因阳性苗表型分析

[0090] 将T2种子播种与1/2MS培养基上,保留正确分离比的纯合拟南芥,使用T3代做表型试验。将转SsPER17和野生型拟南芥播种于含200mM甘露醇的1/2MS培养基中,春化两天后放置于培养箱中培养,每天记录发芽情况,如图12,拟南芥4天完成发芽史,第二天发芽达到高峰,野生型拟南芥4天时发芽率在85%,而转SsPER17型拟南芥发芽率100%。

[0091] WT、PER17-1、PER17-2、PER17-3平均发芽势分别为36%、82.61%、82.61%和69.57%,如图13,WT发芽势显著最低,转基因拟南芥种子发芽势都显著高于野生型拟南芥。表明SsPER17基因对拟南芥种子发芽有促进作用,能使种子发芽的活力更高。

[0092] 将T3代拟南芥种子和野生型种子播种于1/2MS上,待长出两片真叶后移植到含200mM甘露醇的1/2MS培养基中,培养两周后测量根系长度对比,如图14,野生型拟南芥平均根系长度为8.88mm,转基因拟南芥平均根系长度为13.82mm显著高于野生型。表明SsPER17基因对拟南芥幼苗在渗透胁迫下能促进根系的生长,表明SsPER17通过提高种子活性促进根系生长以提高植物的抗旱性。

[0093] 5) 拟南芥转基因阳性苗目的基因相对表达量检测分析

[0094] 为了研究其可能的抗旱调控途径,将SsPER17阳性株同野生拟南芥干旱处理7d,选取了和抗旱相关的拟南芥响应基因PRX和APX1,利用qRT-PCR进行基因相对表达量进行分析,如图15,两个与干旱胁迫有关的基因都被显著诱导表达,干旱处理后基因的相对表达量都显著高于处理前。AtPRX和AtAPX1基因干旱处理前野生型拟南芥相对表达量与转基因植株无显著差异,干旱处理后不同株系之间表达量存在显著差异,其中AtPRX基因干旱处理后转基因株系相对表达量都显著高于野生型,AtAPX1基因干旱处理后转基因株系相对表达量都显著低于野生型,说明SsPER17转基因株系干旱处理能诱导AtPRX的表达,同时抑制AtAPX1基因表达。

[0095] 6) 拟南芥转基因阳性苗生化指标测定分析

[0096] AtPRX基因表达与植物过氧化物酶(POD)有关,而AtAPX1基因表达与植物抗坏血酸过氧化物酶(APX),为进一步探究其功能,使用紫外分光光度法测定其酶的活性,如图16,POD活性在干旱处理前后具有显著差异,干旱处理后显著高于处理前,在干旱处理前,转基因株系和野生型株系酶活性无显著差异,处理显著高于野生型拟南芥,这表明转基因株系过氧化物酶活性更高;APX活性同样在处理前后有显著差异,但在处理后野生型APX活性显著高于转基因株系,这表明转基因植株抗坏血酸过氧化物酶活性较低。

[0097] 由上可见,SsPER17基因的过表达使AtPRX正表达而AtAPX1呈现负表达,可能其中存在有补偿机制,在蝴蝶兰(*Phalaenopsis aphrodite*)中存在同样现象,蝴蝶兰外植体褐变前PhAPX表达下降,培养6h后恢复正常水平,而PhPRX则正好相反,褐变前表达升高之后下降(许传俊,2009),为这种补充机制提供了新的证据。以上结果表明SsPER17基因在干旱胁迫中起到重要调节作用,主要依赖清除ROS途径。

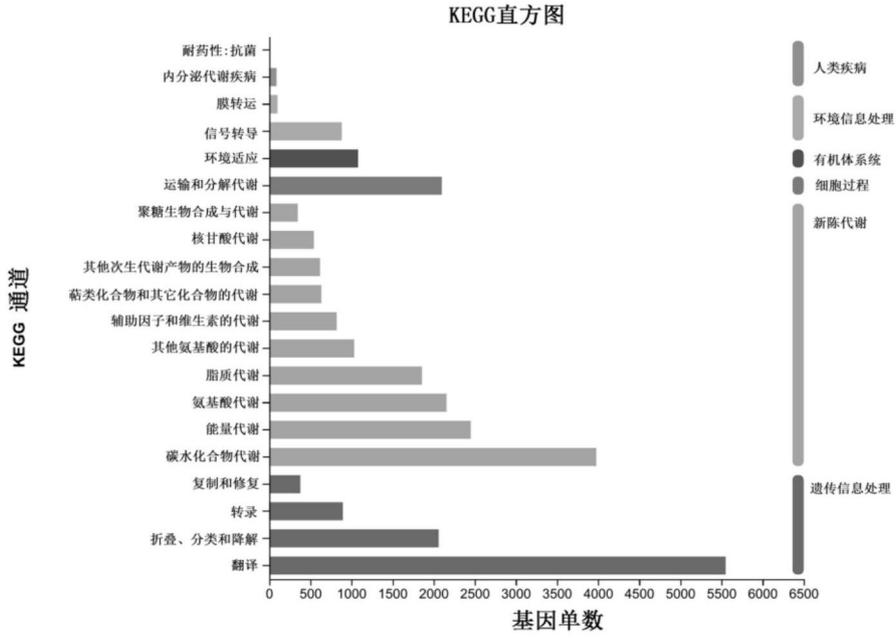


图1

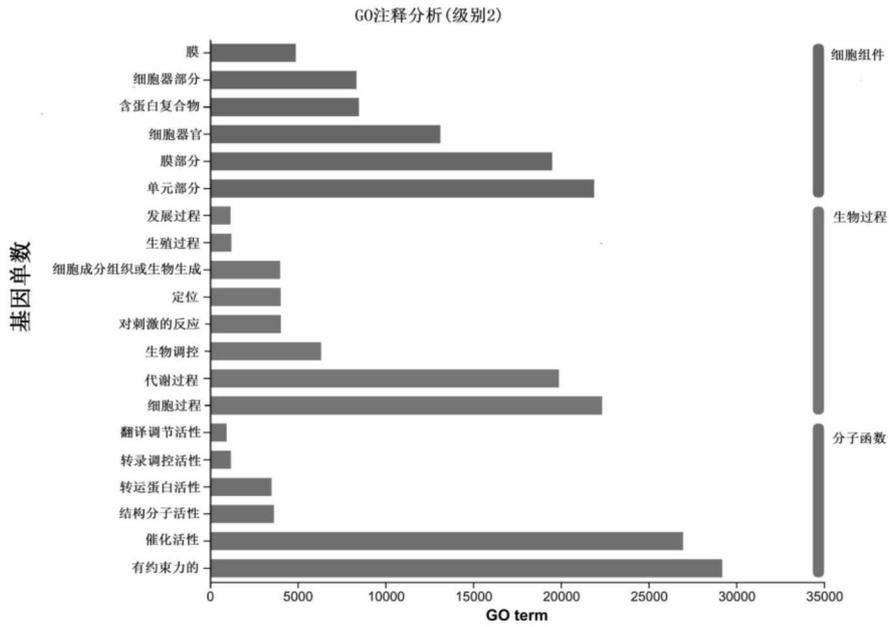


图2

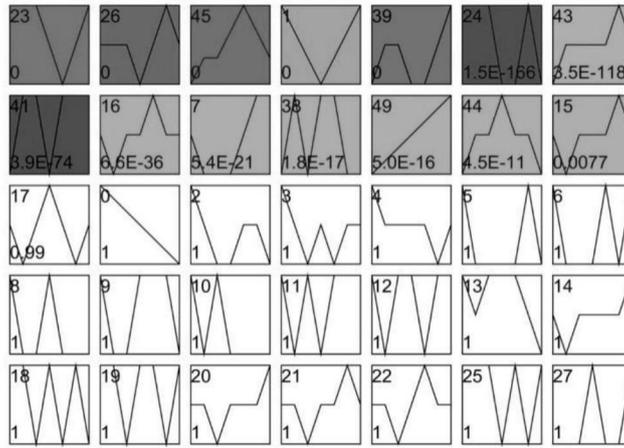


图3

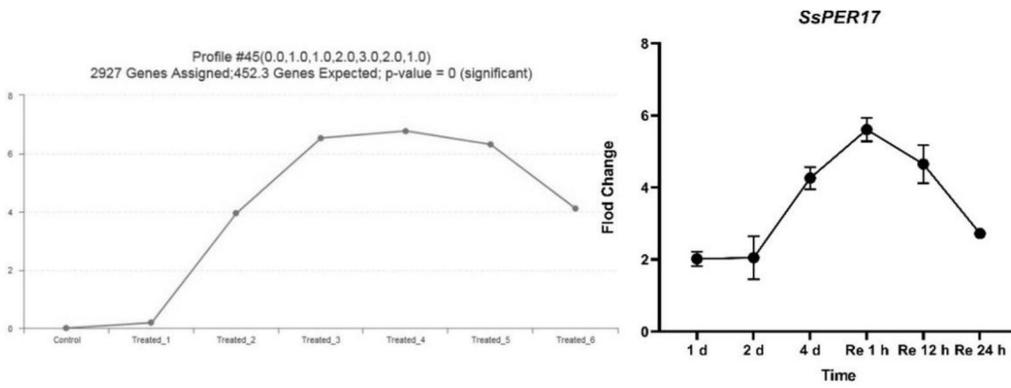


图4

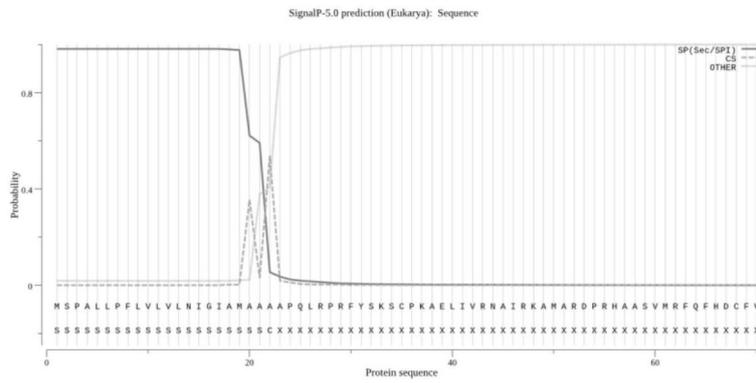


图5

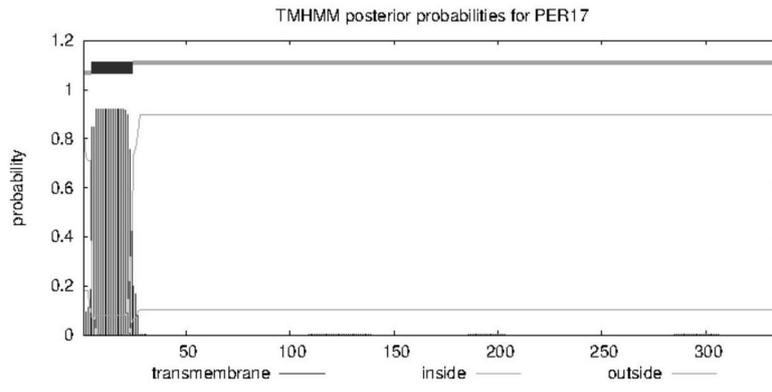


图6

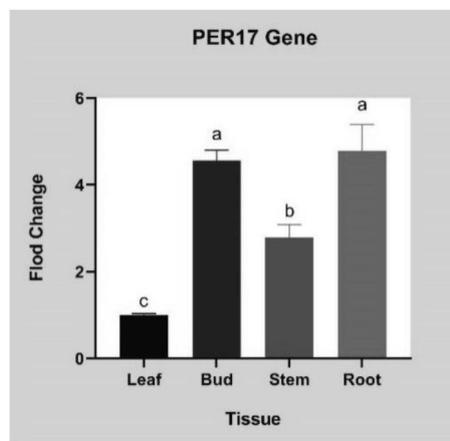


图7

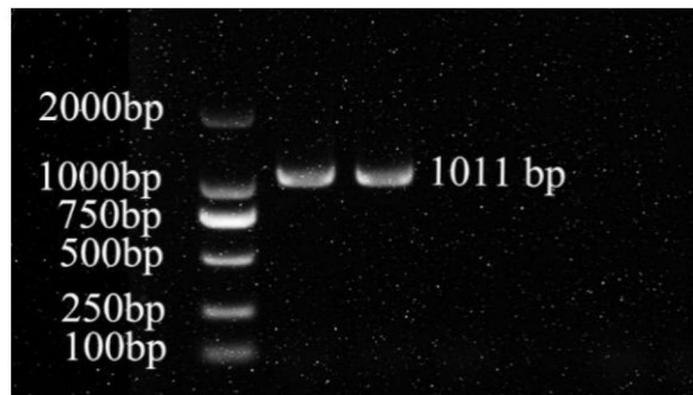


图8

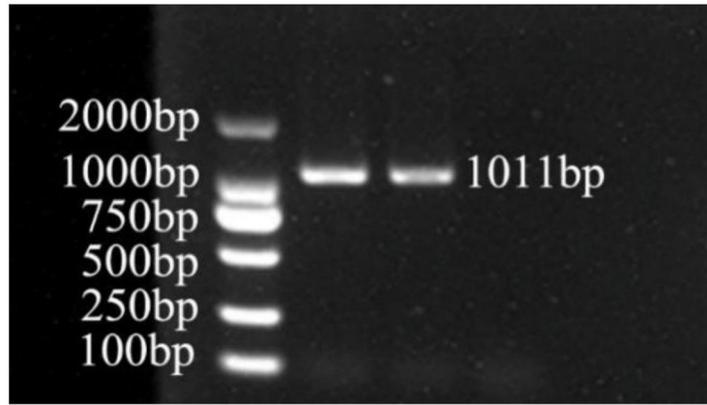


图9

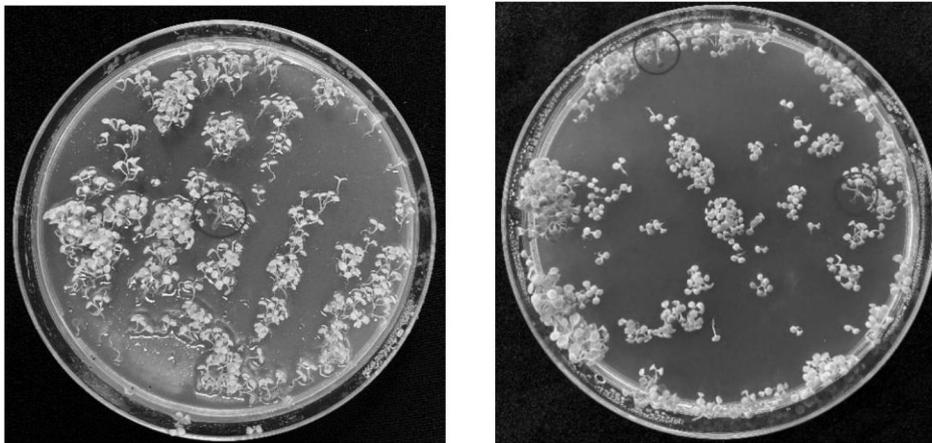


图10

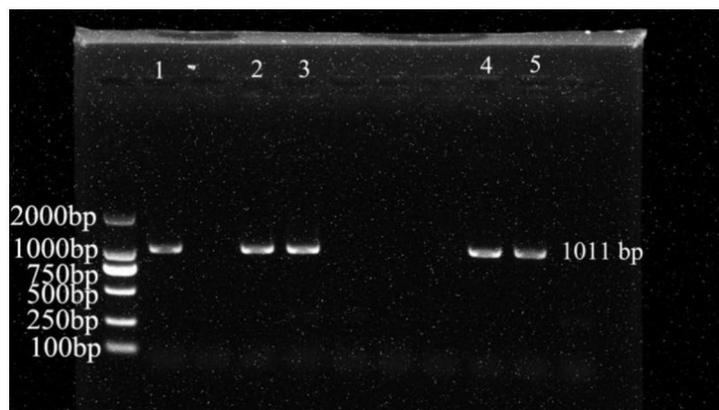


图11

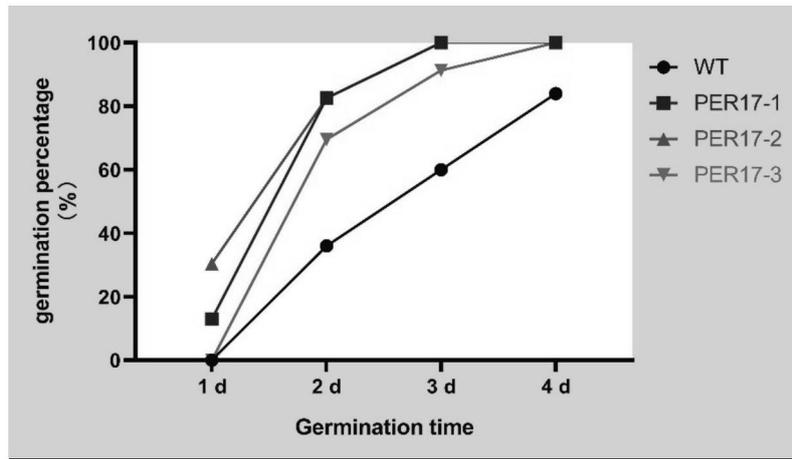


图12

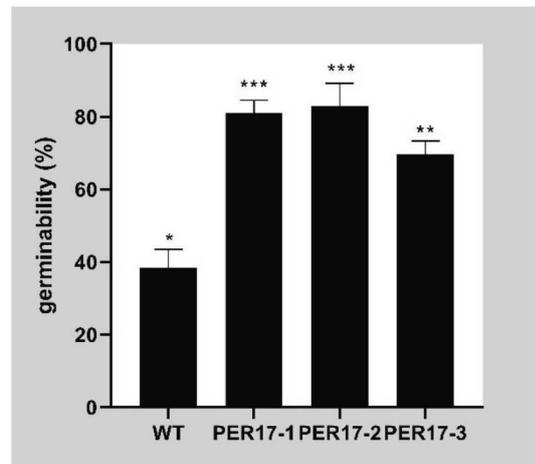
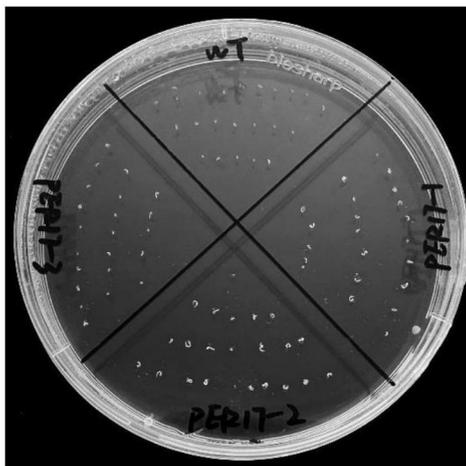


图13

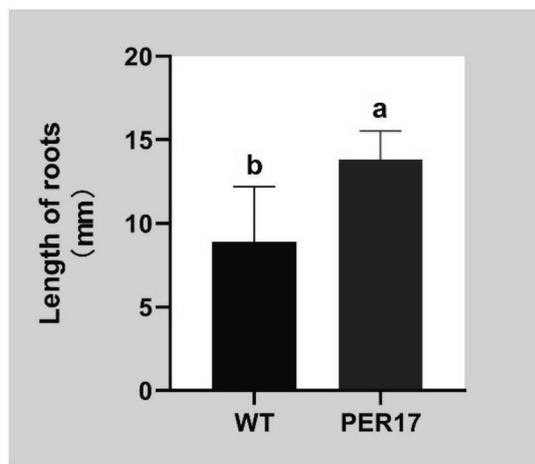
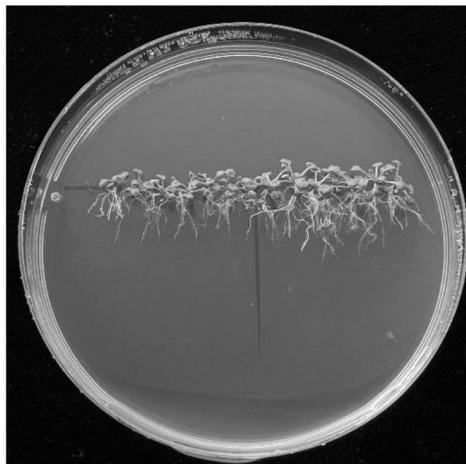


图14

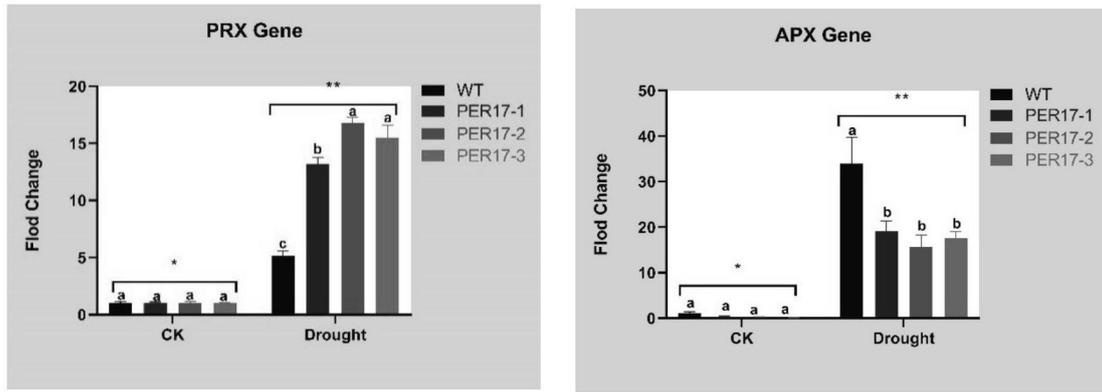


图15

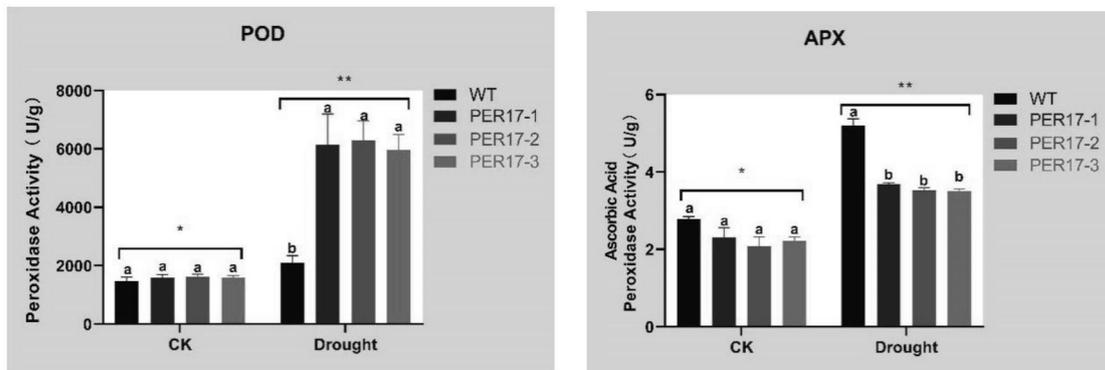


图16