

研究报告

Research Report

转硅转运蛋白(*OsLsi1* 和 *OsLsi2*)基因美女樱及抗寒性分析

胡翠平[✉], 赵然[✉], 张焕[✉], 张美恒[✉], 王秀刚[✉], 樊金萍[✉]

东北农业大学园艺学院, 园林植物与观赏园艺重点实验室, 哈尔滨, 150030

✉ 通讯作者: fan_xuer2000@yahoo.com.cn ✉ 作者

分子植物育种, 2012 年, 第 10 卷, 第 74 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0074

收稿日期: 2012 年 06 月 22 日

接受日期: 2012 年 07 月 08 日

发表日期: 2012 年 12 月 22 日

文首次发表在《分子植物育种》(2012 年第 10 卷第 6 期 740-746 页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

胡翠平等, 2012, 转硅转运蛋白(*OsLsi1* 和 *OsLsi2*)基因美女樱及抗寒性分析, 分子植物育种(online) Vol.10 No.74 pp.1542-1548 (doi:10.5376/mpb.cn.2012.10.0074)

引用格式(英文):

Hu et al., 2012, Transgenic Verbena Nybrida with Silicon Transporter Protein (*OsLsi1*, *OsLsi2*) Gene and Its Freezing Resistance, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.74 pp. 1542-1548 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0074)

摘要 蔗将硅转运蛋白基因 *OsLsi1* 和 *OsLsi2* 转入美女樱中, 研究该基因对美女樱抗寒性的影响。对经 PCR 鉴定的阳性转基因美女樱植株进行 RT-PCR 检测, 结果表明转运蛋白基因 *OsLsi1* 和 *OsLsi2* 在转基因美女樱中能够正常转录并表达, 说明这两个基因已经整合到美女樱中; 在 0℃ 低温下进行 0、4 d 和 7 d 低温处理, 测定丙二醛(MDA)含量、脯氨酸含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性和过氧化物酶(POD), 结果发现, 转基因植株的抗寒性比非转基因的高, 且转 *OsLsi1* 基因植株比 *OsLsi2* 基因抗寒能力强, 为创建美女樱抗寒种质资源奠定了基础。

关键词 水稻; 候选基因; 抽穗期; 单核苷酸多态性; 哈尼梯田

Transgenic *Verbena Nybrida* with Silicon Transporter Protein (*OsLsi1*, *OsLsi2*) Gene and Its Freezing Resistance

Hu Cuiping[✉], Zhao Ran[✉], Zhang Huan[✉], Zhang Meiheng[✉], Wang Xiugang[✉], Fan Jinping[✉]

Key Laboratory of Garden Plant & Ornamental Horticulture, Horticulture Colleges, Northeast Agricultural University, Harbin, 150030, P.R. China

✉ Corresponding author, fan_xuer2000@yahoo.com.cn; ✉ Authors

Abstract The Silicon transporter protein *OsLsi1* and *OsLsi2* gene were transformed into *Verbena nybrida* to study the impacts on *Verbena nybrida*. The PCR results showed that the Silicon transporter protein *OsLsi1* and *OsLsi2* gene were successfully transferred into *Verbena nybrida* and the Normal transcription and expression of the Silicon transporter protein *OsLsi1* and *OsLsi2* gene in transgenic *Verbena nybrida* were indentified by RT-PCR. The MDA (malondialdehyde), proline content, and SOD, POD activity of *Verbena nybrida* were respectively tested on 0, 4 d, 7 d under the condition of 0℃ treatment. These results strongly suggested that the cold resistance of the transgenic *Verbena nybrida* was higher than non-transgenic *Verbena nybrida*., and the cold tolerance of *OsLsi1* gene transformed plants higher than the plants transformed with *OsLsi2*, which provided freezing-resistance germplasm of *Verbena nybrida*., to some extent.

Keywords *Verbena nybrida*; PCR detection; RT-PCR detection; Physiological index detection

研究背景

低温胁迫是植物栽培中常遇到的一种灾害。由于低温在植物整个生育过程中均会造成不利影响, 严重影响植物的正常生长, 降低植物的品质及观赏性。因此, 提高植物抗低温的能力成为解决如冷害造成的植株苗弱、生长迟缓、品质下降等问题的重要方法之一。

目前, 随着现代生物技术的发展, 通过植物基因工程将特异基因导入植物, 在不改变原有优良性状

的基础上提高植物的抗逆性, 已经在多种植物上获得成功, 但关于花卉抗性基因工程方面的研究报道并不多(李静和车代弟, 2004; 李美如等, 2003)。

美女樱(*Verbena nybrida*)是马鞭草科马鞭草属多年生草本花卉, 其姿态优美, 花色丰富, 色彩艳丽。美女樱株丛矮密, 花繁色艳, 花期为 5~11 月, 由于花期长可用作花坛、花境材料, 也可作盆花大面积栽植于园林隙地、树坛中(包满珠, 2005, 中国农业出版社, pp.193-194)。但是美女樱的耐寒能力较弱,

且高温高湿的环境下易发生如白粉病、霜霉病的病害、抗性较弱,本研究通过基因工程的方法来改良其抗寒性。

硅是地壳和土壤含量第二丰富的元素,被认为是植物生长发育的准必需元素。绝大多数的植物组织中都含有硅(李莉等, 2010)。植物体中可溶性硅能提高植株抗寒抗旱、防治病虫害和抗倒伏的能力,激发多个防御反应机制(房江育和马雪泷, 2005)。据报道,在水稻中克隆出一类硅转运蛋白基因(陈虞超等, 2009),与硅在植物中的转运及利用有关。其中 *Lsi1* (Low silicon rice 1) 基因主要负责编码参与植物对土壤中硅的吸收的硅转运蛋白; *Lsi2* (Low silicon rice 2) 基因主要负责编码硅从植物中释放到外界的硅转运蛋白,这两个基因相辅相成维持植物体内硅的平衡。

本研究将硅转运蛋白基因 *OsLsi1* 和 *OsLsi2* 转入美女樱中,研究该基因对美女抗寒性的影响。对经 PCR 鉴定的阳性转基因美女樱植株进行 RT-PCR 检测,结果表明硅转运蛋白基因 *OsLsi1* 和 *OsLsi2* 在美女樱中能够正常转录并表达,说明这两个基因已经整合到美女樱中,之后进行低温处理并测定相关生理指标,研究转基因美女樱的抗寒性,也为创建美女樱抗寒种质资源奠定基础。

1 结果分析

1.1 转 *OsLsi1* 基因抗性植株的 PCR 及 RT-PCR 检测

对获得的 51 株再生植株用 CTAB 法提取 DNA,以待测转基因植株叶片 DNA 为模板, *OsLsi1* 基因质粒为阳性对照,未转化的美女樱叶片 DNA 和水分别为阴性对照和负对照,使用 *OsLsi1* 基因特异引物进行 PCR 扩增,转基因植株可扩增出约 1 200 bp 的目的片段,而未转化植株的无扩增条带(图 1),其中检测出 26 株为阳性植株,阳性率为 70%,初步证明了

OsLsi1 基因已经整合到美女樱中。

RT-PCR 检测结果如图 2 所示,观察到阴性对照无扩增带,而阳性对照和转基因 PCR 呈阳性的植株均能扩增出约 1 200 bp 的目的片段,与之前 PCR 检测的结果一致,说明 *OsLsi1* 基因已经整合到美女樱中。

1.2 转 *OsLsi2* 基因的 PCR 及 RT-PCR 检测

对获得的 60 株再生植株用 CTAB 法提取 DNA,以待测转基因植株叶片 DNA 为模板, *OsLsi2* 基因质粒为阳性对照,未转化的美女樱叶片 DNA 和水分别为阴性对照和负对照,使用 *OsLsi2* 基因特异引物进行 PCR 扩增,转基因植株可扩增出约 1 715 bp 的目的片段,而未转化的植株无扩增条带(图 3),其中检测出 42 株为阳性植株,阳性率为 70%,初步证明了 *OsLsi2* 基因已经整合到美女樱中。

RT-PCR 检测结果如图 4 所示,在对 PCR 检测初步证明 42 株阳性植株中,有 32 株转基因美女樱叶片的 RNA 在 1 715 bp 附近扩增出与质粒对照一致的条带,证明了目的基因已经整合到美女樱中。但有 10 株美女樱叶片的 RNA 没有得到转录,这说明在 PCR 在检测时出现了假阳性,同时也说明 PCR 检测只能作为转基因分子检测的初筛,进一步检测证明基因的转入是非常有必要的。

1.3 低温胁迫下转基因美女樱相关生理指标的测定

1.3.1 低温胁迫下转基因美女樱丙二醛(Maleic dialdehyde, MDA)含量的分析

低温胁迫下丙二醛(MDA)能使酶失活并且对细胞膜等生物膜造成损伤,使其透性增大透性增大(李合生, 2002, 高等教育出版, pp.415-419)。因此,MDA 含量的高低反应出植物细胞抗氧化能力的强弱,间接反映出物细胞受损程度和植物抗寒能力。

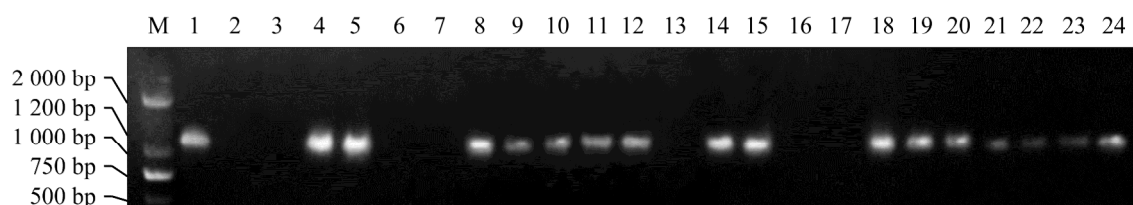


图 1 转 *OsLsi1* 基因抗性植株的 PCR 检测

注: M: DL2000 marker; 1: 阳性对照; 2~3: 阴性对照和负对照; 4~24: 抗性植株

Figure 1 PCR analysis of regenerated plant with *OsLsi1* gene

Note: M: DL2000 marker; 1: Pitive control; 2~3: Negative control; 4~24: Regeneration plants

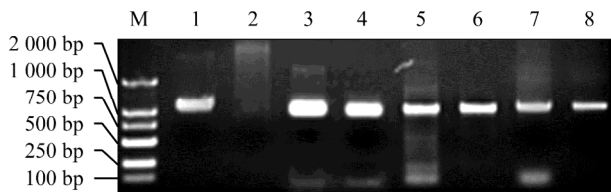


图2 PCR 阳性植株的 RT-PCR 检测

注: M: DL2000 marker; 1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3~8: 抗性植株

Figure 2 RT-PCR analysis of PCR-positive plants

Note: M: DL2000 marker; 1: Positive control; 2: Negative control; 3~8: Regenerated plants

检测发现, 低温胁迫 0~4 d 时, CK、L2 株系的 MDA 含量一直呈上升趋势, 而 L1 株系呈先上升后下降趋势, 1 d 时 L1 株系 MDA 含量达到最高值, 出现这种情况可能是由于, 低温胁迫 1 d 时, 转化美女樱的自身抵抗机制还未能完全启动, 而在胁迫 4 d 时由于 *OsLsi1* 基因的转化对土壤中硅的大量吸收, 使硅起到保护植物的作用, 胁迫 4~7 d 时, CK、L1、L2 株系的 MDA 含量也一直呈上升趋势, 但 CK、L2 株系 MDA 含量都明显高于 L1 株系(图 5)。与对照相比较, L2 株系的 MDA 含量明显高于 L1 株系, 由此可以推测, 转 *OsLsi1* 基因美女樱的抗寒能力比转 *OsLsi2* 基因美女樱抗寒能力高。

通过多重比较分析发现(表 1), 在低温胁迫 0 d 时, CK 与 L2 株系差异并不显著, 而 L1 株系与 CK、L2 株系相比差异性显著。在胁迫 1 d 时, 三个株系差异性均不显著, 而在胁迫 4 d 以后一直保持着显著地差异性。

由此说明, *OsLsi1* 基因的导入可以显著降低低温胁迫的美女樱 MDA 的含量, 植物的抗寒能力有所提高; 相反, *OsLsi2* 基因的导入可以提高低温胁迫美女樱的 MDA 的含量, 使植物抗寒能力降低, 间接证明硅可以提高植物抗寒能力。

1.3.2 低温胁迫下转基因美女樱脯氨酸含量的分析

游离脯氨酸是一种小分子渗透调节物质, 是水溶性最大的氨基酸。植物在逆境胁迫条件下, 均积累高水平的脯氨酸(朱虹等, 2007)。

检测发现, 低温胁迫 0~4 d 时, CK、L1 株系的游离脯氨酸的含量一直呈上升趋势, 4 d 时 CK 株系达到最高值, 之后呈下降趋势; 胁迫 4~7 d 时, L1 株系的游离脯氨酸含量一直是上升趋势, 且在 7 d 出现

峰值, 而 L1、L2 株系的游离脯氨酸的含量则呈下降趋势(图 6)。与对照组相比较, L1 株系的游离脯氨酸含量明显高于 L2 株系, 由此可以推测, 转 *OsLsi1* 基因美女樱的抗寒能力比转 *OsLsi2* 基因美女樱抗寒能力高。

经过多重比对发现(表 2), 低温胁迫 0 d 时, CK 株系与 L1、L2 株系呈现显著差异, L1 与 L2 之间差异性不显著; 在胁迫 1 d、4 d、7 d 时, 三个株系都达到差异显著水平。由此推断 *OsLsi1* 基因可以提高美女樱体内游离脯氨酸的含量, 从而提高植物的抗寒能力; *OsLsi2* 基因的转入降低了游离脯氨酸的含量, 使植物抗寒能力降低。

1.3.3 低温胁迫下转基因美女樱 SOD 活性的分析

超氧化物歧化酶(SOD)是一种植物体内重要的酶类, 其活性与植物的抗寒能力密切相关, 可以反映出物对逆境的适应(史雨刚等, 2007)。

检测发现, 低温胁迫 0~4 d 时, CK、L1、L2 株系的 SOD 活性都呈上升趋势; 胁迫 4~7 d 时 L1 株系一直是上升趋势, 且在 7 d 出现峰值, 而 L1、L2 株系的 SOD 活性则呈下降趋势。与对照相比较, L1 株系的 SOD 活性明显高于 L2 株系, 由此可以推测, 转 *OsLsi1* 基因美女樱的抗寒能力比转 *OsLsi2* 基因美女樱抗寒能力高(图 7)。

经过多重比对发现(表 3), 低温胁迫 0 d 时, CK 与 L1、L2 株系呈现显著差异; 低温胁迫 1、4、7 d 时, CK 与 L1、L2 株系也呈现显著差异, L1 和 L2 株系在低温胁迫 4 d 后 SOD 活性均呈现下降趋势。由此分析可以说明, *OsLsi1* 基因可以使美女樱 SOD 酶系统不受破坏, 从而提高美女樱对低温的抵抗力; 而 *OsLsi2* 基因导致 SOD 活性降低, 使美女樱抗寒能力降低。

1.3.4 低温胁迫下转基因美女樱 POD 活性的分析

POD 与 SOD 相似, 也是植物防御膜质过氧化机制中其重要作用的保护酶, 有研究表明, POD 的活性与植物抗寒能力呈正相关。

检测发现, 低温胁迫 0~4 d 时, CK 株系 POD 活性呈先上升后下降趋势, L1 株系的 POD 活性呈上升趋势, 而 L2 株系则一直保持下降趋势; 胁迫 4~7 d 时 L1 株系一直呈上升趋势, 且在 7 d 出现峰值, 而 L1、L2 株系的 POD 活性则呈下降趋势。与对照相比较, L1 株系的 POD 活性明显高于 L2 株系, 由此可以推测, 转 *OsLsi1* 基因美女樱的抗寒能

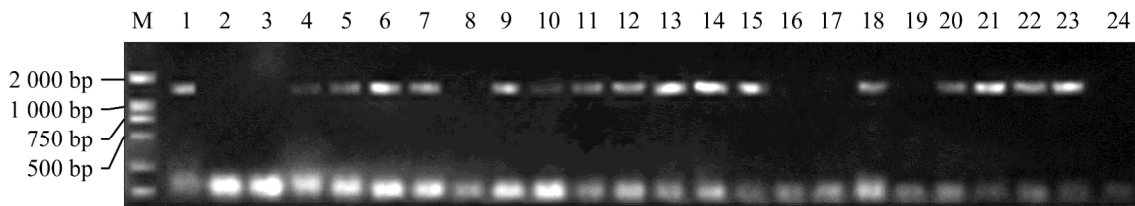


图3 转 *OsLsi2* 基因抗性植株的 PCR

注: M: DL2000 marker; 1: 阳性对照; 2~3: 阴性对照和负对照; 4~24: 抗性植株

Figure 3 PCR analysis of regenerated plant with *OsLsi2* gene

Note: M: DL2000 marker; 1: Positive control; 2~3: Negative control; 4~24: Regenerated plants

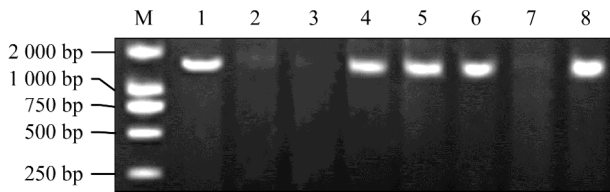


图4 PCR 阳性植株的 RT-PCR 检测

注: M: DL2000 marker; 1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3~8: 抗性植株

Figure 4 RT-PCR analysis of PCR positive plants

Note: M: DL2000 marker; 1: Positive control; 2: Negative control; 3~8: Regenerated plants

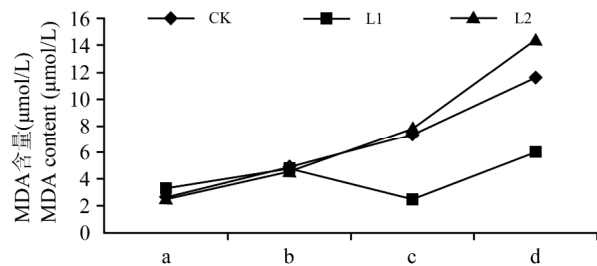


图5 低温胁迫不同时间各株系 MDA 含量比较

注: a: 胁迫0天; b: 胁迫1天; c: 胁迫4天; d: 胁迫7天

Figure 5 Comparison of MDA content in different transgenic lines under the stress of low temperature at different times

Note: a: Stress zero day; b: Stress one day; c: Stress four day; d: Stress seven day

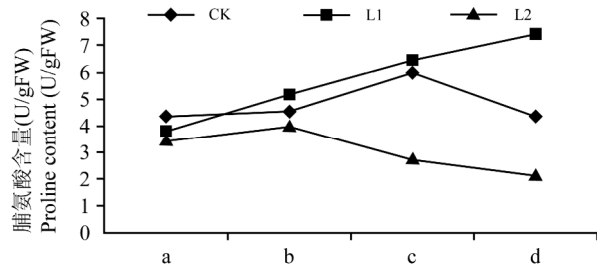


图6 低温胁迫不同时间各株系游离脯氨酸含量比较

注: a: 胁迫0天; b: 胁迫1天; c: 胁迫4天; d: 胁迫7天

Figure 6 Comparison of free proline content in different lines under the stress of low temperature at different times

Note: a: Stress zero day; b: Stress one day; c: Stress four day; d: Stress seven day

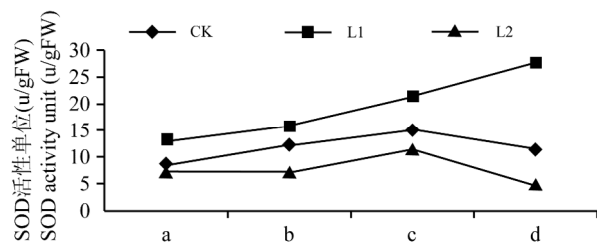


图7 低温胁迫不同时间各株系 SOD 活性比较

注: a: 胁迫0天; b: 胁迫1天; c: 胁迫4天; d: 胁迫7天

Figure 7 Comparison of SOD activity in different lines under the stress of low temperature at different times

Note: a: Stress zero day; b: Stress one day; c: Stress four day; d: Stress seven day

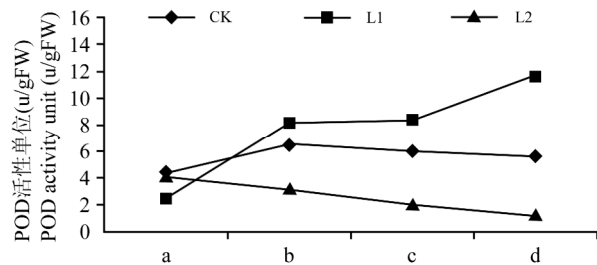


图8 低温胁迫不同时间各株系 POD 活性比较

注: a: 胁迫0天; b: 胁迫1天; c: 胁迫4天; d: 胁迫7天

Figure 8 Comparison of POD activity in different lines under the stress of low temperature at different times

Note: a: Stress zero day; b: Stress one day; c: Stress four day; d: Stress seven day

力比转 *OsLsi2* 基因美女樱抗寒能力高(图8)。

经过多重比对发现(表4), 低温胁迫0d时, L1与CK、L2这两个株系差异并不显著, CK与L2差异性显著;但随着低温胁迫天数的增加, 三个株系POD活性均出现差异性显著, 在胁迫4d时达到极显著水平。由分析可推测, *OsLsi1*可能保护了植物体内的抗氧化系统不受破坏, 从而增加了植物体内SOD、POD等保护酶类对活性氧清除能力;相反*OsLsi2*促使抗氧化系统的伤害, 降低植物抗寒能力。

表 1 低温胁迫不同时间各株系 MDA 含量的差异性分析

Table 1 Differential analysis of MDA contents among lines at different times under the stress of low temperature

株系 Lines	MDA 含量(μmol/L) MDA content(μmol/L)			
	胁迫 0 d zero day Stress	胁迫 1 d one day Stress	胁迫 4 d four days Stress	胁迫 7 d seven days Stress
ck	2.573±0.188a	4.919±0.098a	7.412±0.292a	11.619±0.432a
L1	3.302±0.219b	4.583±0.444a	2.563±0.130b	6.008±0.021b
L2	2.563±0.170a	4.625±0.268a	7.855±0.110c	14.516±0.522c

注: 有相同字母的组合差异不显著(p>0.05); 无相同字母的组合差异显著(0.01<p<0.05)

Note: The same letters mean no significant difference (p>0.05); The different letters mean significant difference (0.01<p<0.05)

表 2 低温胁迫对植株游离脯氨酸含量的差异性分析

Table 2 Differential analysis of free proline content among lines at different times under the stress of low temperature

株系 Lines	游离脯氨酸含量(U/g FW) Free proline content (U/g FW)			
	胁迫 0 d Zero day stress	胁迫 1 d One day stress	胁迫 4 d Four days stress	胁迫 7 d Seven days stress
ck	4.228±0.194a	4.541±0.137a	5.980±0.099a	5.980±0.099a
L1	3.824±0.075b	5.133±0.111b	6.403±0.242b	6.403±0.242b
L2	3.553±0.136b	4.057±0.156c	2.842±0.109c	2.842±0.109c

表 3 低温胁迫对植株 SOD 活性差异性分析

Table 3 Differential analysis of SOD activity among lines at different times under the stress of low temperature

株系 Lines	SOD 活性(U/g FW) SOD activity (U/g FW)			
	胁迫 0 d Zero day stress	胁迫 1 d One day stress	胁迫 4 d Four days stress	胁迫 7 d Seven days stress
ck	9.037±0.074a	12.532±0.783a	15.087±0.215a	11.700±0.308a
L1	13.353±0.787b	16.063±0.167b	21.610±0.361b	27.607±0.414b
L2	7.433±0.496c	7.447±0.367c	11.677±0.299c	5.130±0.085c

表 4 低温胁迫对植株 POD 活性差异性分析

Table 4 Differential analysis of POD activity among lines at different times under the stress of low temperature

株系 Lines	POD 活性(U/g FW) POD activity (U/g FW)			
	胁迫 0 d Zero day Stress	胁迫 1 d One day Stress	胁迫 4 d Four days Stress	胁迫 7 d Seven days Stress
ck	4.347±0.112a	6.517±0.319a	6.087±0.146a	5.577±0.505a
L1	2.533±0.178ab	8.067±0.144b	8.320±0.192b	11.690±0.284b
L2	4.033±0.091b	3.167±0.265c	2.047±0.083c	1.287±0.168c

2 讨论

在对抗性植株分子检测时, PCR 一直是重要检测方法之一。其反应体系较小, 成本低而且灵敏性好, 但是 PCR 是在 DNA 水平上对外源基因进行检测极易出现假阳性, 本文利用根癌农杆菌介导的方法将

OsLsi1 基因和 *OsLsi2* 基因转化到美女樱中, 转 *OsLsi1* 基因的美女樱 RT-PCR 检测与 PCR 检测结果一直。但是转化 *OsLsi2* 基因的 60 株美女樱中经过 PCR 检测其中 42 株为阳性植株, 后期运用 RT-PCR 对呈阳性的 42 株植株进行检测, 发现只有 32 株呈

阳性,这说明在 PCR 检测时出现了假阳性。由此可以看出,对转化植株进行分子检测时,还需要 Southern 杂交、Northern 杂交、Western 杂交等更精确的检测手段进行更进一步的检测,来确定目的基因是否已经整合到受体植株中(贺熙勇等, 2008)。

低温是限制植物分布影响产量的主要原因,对植物冷害机理的研究表明:低温直接损伤膜结构,使膜脂及功能蛋白受到损伤,从而破坏细胞正常的生理生化过程,因此膜结构的稳定性与植物抗寒性直接相关,POD 和 SOD 作为内源活性氧清除剂能够在低温逆境中清除体内过量的活性氧,维持活性氧代谢平衡,保持膜结构的稳定性。从而消除或减轻伤害;低温锻炼可使酶的活性增强,使植物免受低温伤害,因而在低温逆境中 POD 和 SOD 活性的水平与植物的抗寒性强弱有着十分密切的关系,并可作为植物抗寒性检测的生理指标(张钰等, 1998)。

实验结果显示,转硅转运蛋白基因 *OsLsi1* 植株的 SOD 和 POD 的活性均高于对照植株,从而在低温胁迫下能够有效地清除细胞内过量的活性氧,保持膜结构的稳定性,表明转基因植株在生理生化水平上获得了有益的变异,并从生理生化水平上验证转基因植株抗寒性的增强。同时通过检测发现转 *OsLsi1* 基因的植株抗逆性明显强于转化 *OsLsi2* 基因的植株,可能是由于 *OsLsi1* 基因与植物从外界土壤环境中吸收硅有关,可以提高植物吸收硅的效率,增强植物抗逆能力;而 *OsLsi2* 基因与植物将自身的硅向外界环境释放有关,使植物抗逆能力减弱。

随着分子生物学技术的飞速发展,运用基因工程手段提高植物的抗逆性为抗性育种开辟了新途径(王侠礼, 2005, 北方园艺, 6: 14-15)。在大豆、玉米、棉花等农作物上(俞超等, 2008, 江苏农业科学, 4: 31-33; 曹桂艳和刘艳, 2001), 本研究利用农杆菌介导法将 *OsLsi1*、*OsLsi2* 基因转入美女樱中,经过分子检测之后测定相关生理指标,表明转基因美女樱的抗寒能力得到了进一步提高,对培育抗寒美女樱品种。

3 材料与方 法

3.1 植物材料、质粒及农杆菌菌株

美女樱(*Verbena nybrida nybrida*), 取自东北农业大学园艺实验站。农杆菌 GV3101, 质粒 pBI121 由东北农业大学园林育种研究室保存。pGEM-T Easy Vector 购自 Promega 公司。

3.2 转基因植株(*OsLsi1*, *OsLsi2*)基因 PCR、RT-PCR 检测

移栽于温室的转基因再生植株长至 10 cm 高时,

采用 CTAB 法提取转基因植株的叶片总 DNA, 根据基因序列引物进行 PCR 扩增, *OsLsi1* 基因序列引物, P1: 5'-AGGGATCCTAGCCAGCCAGTGTTA-GA-3'和 P2: 5'-TACGAGCTCACACGAACCACCA-AGCAA-3', *OsLsi2* 基因序列引物 P3: 5'-AGGGAT-CCAGGTGGTGGTTCGATCGAA-3'和 P4: 5'-TACG-AGCTCGCCAATTCAATTTCAAGCT-3', PCR 反应体系总体积为 25 μ L: 模板 DNA 1 μ L (约 100 ng) 2 μ L, 上、下游引物各 1 μ L, Taq (5 U/L) 0.3 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 2.5 μ L, Mg²⁺ (25 mmol/L) 2.4 μ L, 10 \times Buffer 2.5 μ L, ddH₂O 补足 25 μ L。

PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 7 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增后取 10 μ L 产物进行电泳检测。

RT-PCR 检测: 采用硼砂 SDS 法提取 RNA 并进行检测, 以反转录后产物为模板, 对转 *OsLsi1* 基因、*OsLsi2* 基因的植株进行 RT-PCR 检测, 反应体系及反应条件同 PCR 检测体系相同。

3.3 转 *OsLsi1*、*OsLsi2* 基因美女樱植株的低温胁迫抗性检测

3.3.1 待测材料的低温处理

将未转基因与转基因植株分别栽种于营养钵中, 待幼苗长至 4~6 片真叶时, 进行 0 $^{\circ}$ C 低温处理分别为 0、1 d、4 d、7 d 采样, 每处理重复三次, 然后测其相关生理指标。

3.3.2 生理指标的测定

(a)丙二醛(MDA)含量的测定: 硫代巴比妥酸法(邹琦, 2000, 中国农业出版社, 173-174)。

(b)游离游离脯氨酸(Pro)含量的测定: 酸性茚三酮法(邹琦, 2000, 中国农业出版社, 161-162)。

(c)超氧化物歧化酶(SOD)活性测定: 采用 NBT 法(李合生, 2003, 高等教育出版社, 191-205)。

(d)过氧化物酶(POD)活性测定: 采用愈创木酚法(李合生, 2003, 高等教育出版社, 191-205)。

上述实验均重复 3 次, 并进行统计分析。

作者贡献

胡翠平、赵然和张美恒是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 王秀刚、赵然和张焕完成数据分析; 张美恒参与实验设计, 试验结果分析; 胡翠平和樊金萍是项目的构思者和负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由黑龙江省研究生创新科研项目(YJSCX2-011-072HLJ)资助。感谢两位匿名的同行评审人的评审建议和修改建议。

参考文献

- Cao G.Y., and Liu Y., 2001, The resistance of different organs of transgenic-cotton lines to *Heliothis armigera*, *Shenyang Nongye Daxue Xuebao (Journal of Shenyang Agricultural University)*, 32(6): 411-413 (曹桂艳, 刘艳, 2001, 转基因棉花品系对棉铃虫抗性的研究, *沈阳农业大学学报*, 32(6): 411-413)
- Chen Y.C., Song Y.X., Shi L., and Chen X.J., 2009, Cloning and construction of expression vector of si transporter gene in rice, *Xibei Nongye Xuebao (Acta Griculturae Boreali-occidentalis Sinica)*, 18(4): 191-196 (陈虞超, 宋玉霞, 石磊, 陈晓军, 2009, 水稻硅转运子基因的克隆与表达载体的构建, *西北农业学报*, 18(4): 191-196)
- Fang J.Y., and Ma X.L., 2005, Progress silicon improving plant resistance to stress, *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 21(11): 304-306 (房江育, 马雪泷, 2005, 硅与植物的抗逆性研究进展, *中国农学通报*, 21(11): 304-306)
- He X.Y., Chen S.C., and Peng A.H., 2008, Review of molecular screening and detection methods of transgenic plants and improvement, *Redai Nongye Keji (Tropical Agricultural Science & Technology)*, 31(1): 39-44 (贺熙勇, 陈善春, 彭爱红, 2008, 转基因植物的分子检测与鉴定方法及进展, *热带农业科技*, 31(1): 39-44)
- Li J., and Che D.D., 2004, Progress in gene modified breeding of ornamental plants, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 2(1): 101-104 (李静, 车代弟, 2004, 花卉基因工程育种研究进展, *分子植物育种*, 2(1): 101-104)
- Li M.R., Chen J.T., Sun Z.J., and Li H.Q., 2003, Advances in molecular breeding of ornamental plants, *Redai Yaredai Zhiwu Xuebao (Journal of Tropical and Subropical Botany)*, 11(1): 87-92 (李美如, 陈金婷, 孙梓健, 李洪清, 2003, 花卉分子育种的研究进展, *热带亚热带植物学报*, 11(1): 87-92)
- Li L., Xu H.N., and Li K.Z., 2010, Advances in research of silicon transporters in rice, *Shengwu Jishu Tongbao (Biotechnology Bulletin)*, 2: 11-13 (李莉, 徐慧妮, 李昆志, 2010, 水稻硅转运蛋白研究进展, *生物技术通报*, 2: 11-13)
- Shi Y.G., Wu Z.G., and Ma J.H., 2007, Influence on SOD, POD enzyme activity of sorghum seedling by different density NaCl forces, *Shanxi Nongye Kexue (Journal of Shanxi Agricultural Sciences)*, 35(12): 71-73 (史雨刚, 吴治国, 马金虎, 2007, 不同浓度NaCl胁迫对高粱幼苗SOD、POD酶含量的影响, *山西农业科学*, 35(12): 71-73)
- Zang Y., Wu J.L., Huang Y.F., Fu G.R., Wang Q.Y., Zhao X.X., and Yang Z.X., 1998, The Determination of superoxidase, peroxidase and catalase activities in transgenic tomato, *Harbin Shifan Daxue Ziran Kexue Xuebao (Natural Sciences Journal of Harbin Normal University)*, 14(4): 85-87 (张钰, 吴加林, 黄永芬, 付桂荣, 汪清胤, 赵晓祥, 杨志兴, 1998, 转美洲拟蝶抗冻蛋白基因(afp)番茄过氧化物酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶活性测定, *哈尔滨师范大学自然科学学报*, 14(4): 85-87)
- Zhu H., Zhu Y.G., Wang W.J., and Yan Y.Q., 2007, Effect of proline on plant growth under different stress conditions, *Dongbei Linye Daxue Xuebao (Journal of Northeast Forestry University)*, 37(4): 86-89 (朱虹, 祖元刚, 王文杰, 阎永庆, 2007, 逆境胁迫条件下脯氨酸对植物生长的影响, *东北林业大学学报*, 37(4): 86-89)