

杨树细胞分裂素合成基因 IPT5 应答低温胁迫功能研究

张骐¹

(1 内蒙古农业大学)

摘要：低温制约着植物的生长发育和区域分布。河北杨(*Populus hopeiensis*)作为我国西北主要栽培的杨树品种，尽管其具有一定的抗逆性，但近年来极端天气频繁出现，对河北杨防护林的生态功能造成严重损失。为减少低温对杨树生长发育的损害，同时拓展其适宜引种区域，利用转基因技术调控植物细胞分裂素含量，在一定程度上可以有效提高耐低温能力。本研究克隆了 PtIPT5 基因，构建植物过表达载体，通过农杆菌介导法和叶盘法转化河北杨，并获得转基因株系，运用 PCR 技术、荧光定量 PCR 技术、低温胁迫处理以及代谢物定性定量检测，分别从 DNA 水平、生理水平和代谢水平对筛选出的高表达转基因株系进行鉴定与检测。结果显示，PtIPT5 基因转化河北杨可以有效提高其叶片中细胞分裂素含量，进而在一定程度上提高河北杨幼苗对低温的耐受能力。主要结果如下：(1)、克隆 PtIPT5 基因，对其进行生物信息学分析，结果表明该基因编码区(Coding sequence, CDS)长度为 984 bp，可编码 327 个氨基酸残基，具有 Cas3_I superfamily 结构域。(2)、构建植物过表达载体 pCambia1302::PtIPT5，利用农杆菌介导法和叶盘法对河北杨进行遗传转化，经潮霉素筛选，共计获得 26 个抗性株系，选取 7 个长势较好的株系，提取 DNA，进行 PCR 检测，结果表明 7 个转基因株系均含有目的基因条带；提取叶片 RNA，通过荧光定量 PCR 检测可知 PtIPT5 基因在 7 个转基因株系中均显著差异表达。(3)、对高表达转基因株系及非转基因对照进行低温胁迫处理，测定各株系叶片的相对电导率、叶绿素、光合速率、可溶性蛋白、过氧化物酶、超氧化物歧化酶、丙二醛等低温相关生理指标，通过隶属函数分析综合评价各株系耐低温能力有显著差异，得出排序为：1 号>2 号>CK。(4)、利用超高效液相色谱和串联质谱定性定量测定细胞分裂素类代谢物，转 PtIPT5 基因河北杨叶片中细胞分裂素类代谢物含量显著增加，低温使该类代谢物含量下降，但转基因株系中代谢物含量仍显著高于非转基因对照。PtIPT5 基因主要调控异戊烯基焦磷酸细胞分裂素代谢途径，合成 tZ、iP 和 DZ 型细胞分裂素。(5)、转 PtIPT5 基因河北杨在低温胁迫处理下其细胞分裂素类代谢物含量下降，PtIPT5 基因表达量与细胞分裂素含量呈正相关，其表达受低温负调控。过表达 PtIPT5 基因能有效提高内源细胞分裂素类代谢物含量进而影响河北杨幼苗的低温耐受性，提高河北杨耐低温胁迫能力。