



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101541165 B

(45) 授权公告日 2013.05.15

(21) 申请号 200780030028.8

C12Q 1/68 (2006.01)

(22) 申请日 2007.08.20

A01P 21/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

60/838,769 2006.08.18 US

(56) 对比文件

WO 03020914 A2, 2003.03.13, 全文.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.02.12

del Pozo J.C. et.al. A type 5 acid phosphatase gene from arabidopsis thaliana is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilising/oxidative stress conditions. 《PLANT J.》. 1999, 第 19 卷 579-589.

(86) PCT申请的申请数据

PCT/CN2007/002518 2007.08.20

Hong Liao et.al. GmPAP3, a novel purple acid phosphatase-like gene in soybean induced by NaCl stress but not phosphorus deficiency. 《Gene》. 2003, 第 318 卷摘要, 第 104 页左栏; 第 110 页倒数第 1 段; 第 111 页左栏倒数第 1 段; 附图 1、6 及表 1.

(87) PCT申请的公布数据

W02008/022570 EN 2008.02.28

审查员 劳芳

(73) 专利权人 香港中文大学

地址 中国香港新界沙田

(72) 发明人 林汉明 辛世文 邵桂花

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int. Cl.

A01H 1/00 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

权利要求书1页 说明书12页 附图7页

(54) 发明名称

减轻植物非生物胁迫的方法

(57) 摘要

本发明公开了保护植物或植物细胞免遭由盐度和干旱以及氧化胁迫引起的非生物胁迫的方法,包括修饰所述植物或植物细胞,以产生具有靶向线粒体的紫色酸性磷酸酶(PAP)活性的酶。具体来说,将诸如 GmPAP3 的编码大豆紫色酸性磷酸酶的核苷酸序列或与所述核苷酸序列基本相同的序列用于本发明的方法或构建体中。

CN 101541165 B

1. 保护植物或植物细胞免遭非生物胁迫的方法,包括修饰所述植物或植物细胞以产生大豆 GmPAP3。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述非生物胁迫是选自渗透胁迫和氧化胁迫中的一种或多种状况。
3. 如权利要求 2 所述的方法,其中所述渗透胁迫是盐度增加胁迫。
4. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述植物或植物细胞已被修饰以包含异源核酸,所述异源核酸是编码大豆 GmPAP3 的核苷酸序列。
5. 如权利要求 4 所述的方法,其中所述核苷酸序列与在植物细胞中可操作的调控序列可操作地连接。
6. 如权利要求 5 所述的方法,其中所述核苷酸序列与所述调控序列是异源的。
7. 如权利要求 1-6 中任一项所述的方法,其中所述保护导致完整线粒体的维持和 / 或减少 ROS 和 / 或维持生存力。
8. 重组核酸构建体在保护植物或植物细胞免受非生物胁迫中的用途,其中所述构建体包含编码大豆 GmPAP3 的核苷酸序列,所述序列与在植物细胞中可操作的调控序列可操作地连接。
9. 如权利要求 8 所述的核酸构建体,其中所述调控序列与编码大豆 GmPAP3 的核苷酸序列是异源的。
10. 权利要求 9 所述的核酸构建体还包括第二核苷酸序列,其编码与在植物中可操作的调控序列可操作地连接的目的蛋白。
11. 选择转化的细胞或植物的方法,其中所述方法包括向经作为选择标记的重组构建体转化的细胞或植物施加非生物胁迫,由此选择对所述非生物胁迫有抗性的细胞或植物,所述重组构建体包含编码大豆 GmPAP3 的核苷酸序列。
12. 如权利要求 11 所述的方法,其中所述非生物胁迫是渗透胁迫和 / 或氧化胁迫。
13. 如权利要求 12 所述的方法,其中所述渗透胁迫是盐度增加胁迫。
14. 制备抵抗非生物胁迫的植物或植物细胞的方法,其包括修饰植物或植物细胞,以产生大豆 GmPAP3。
15. 如权利要求 14 所述的方法,其中所述非生物胁迫是选自渗透胁迫和氧化胁迫中的一种或多种状况。
16. 如权利要求 15 所述的方法,其中所述渗透胁迫是盐度增加胁迫。
17. 如权利要求 14 所述的方法,其中所述植物或植物细胞已被修饰以包含异源核酸,所述异源核酸是编码 GmPAP3 的核苷酸序列。
18. 如权利要求 17 所述的方法,其中所述核苷酸序列与在植物细胞中可操作的调控序列可操作地连接。
19. 如权利要求 18 所述的方法,其中所述调控序列与所述编码 GmPAP3 的核苷酸序列部分是异源的。

减轻植物非生物胁迫的方法

技术领域

[0001] 本发明属于植物基因工程领域。具体来说,本发明涉及靶向线粒体的紫色酸性磷酸酶 (purple acid phosphatase, PAP) 减轻由盐度和干旱以及氧化胁迫引起的胁迫的用途。

背景技术

[0002] 植物可经历种类繁多的胁迫状况,这些胁迫状况是由非生命媒介或诸如干旱、盐度增加、温度胁迫等的环境引起的。在任一方面偏离标准,都将构成非生物胁迫。可以理解,高盐浓度和干旱通过活性氧分子 (reactive oxygen species, ROS) 的累积引起氧化胁迫,且作为这些胁迫状况的结果,植物通常会发生代谢变化。在看起来是基于同一件申请的美国专利公布 2002-0160378 和 2004-0009476 中,对受胁迫调节的基因进行了综合讨论。

[0003] 本发明人在 2003 年发表的一篇文章 (Liao, H, et al., GENE (2003) 318 :103-111) 中,克隆了大豆中新的紫色酸性磷酸酶样基因,并对其进行了测序,该基因被命名为 GmPAP3,其受增加的盐度诱导,但和许多 PAP 基因不一样,GmPAP3 不受磷缺乏诱导。作者还指出,编码这种蛋白的核苷酸序列包括推定的线粒体靶向转运肽 (mitochondrion targeting transitpeptide, MTTP),并推测该蛋白可能主要存在于线粒体中。

[0004] 本申请已经证实,表达的 GmPAP3 蛋白位于线粒体内,并且赋予植物或植物细胞对非生物胁迫状况的耐受性。

[0005] 发明概述

[0006] 发明人已经证明,大豆的紫色酸性磷酸酶主要存在于植物细胞的线粒体中,并能阻止活性氧分子 (ROS) 的累积。因此,靶向线粒体的 PAP 蛋白能通过增加保持完整线粒体的细胞的百分比、减少死亡细胞的百分比以及降低 ROS 累积来对抗非生物胁迫。这对适应除草剂的应用诱导根部更好的生长和较少的脂质过氧化也具有效果。

[0007] 因此,本发明一方面涉及保护植物或植物细胞免遭非生物胁迫的方法,其中所述方法包括修饰所述植物或植物细胞,以产生具有靶向线粒体的紫色酸性磷酸酶 (PAP) 活性的酶。

[0008] 本发明另一方面涉及重组表达系统,其包括用于修饰植物或植物细胞以实施本发明方法的构建体。在本发明的实施方案中,所述构建体用于表达具有靶向线粒体的 PAP 活性的酶。

[0009] 本发明另一方面涉及重组表达系统作为选择标记的用途。

[0010] 本发明另一方面涉及转基因植物或植物细胞,其包含本发明的编码具有 PAP 活性的酶的核苷酸序列或本发明的构建体。

[0011] 本发明另一方面涉及具有靶向线粒体的 PAP 活性的酶在制备含有该酶的构建体或植物或植物细胞中的用途。

[0012] 本发明再一方面涉及具有靶向线粒体的 PAP 活性的酶在生产用于制备含有该酶的构建体或植物或植物细胞的试剂或试剂盒中的用途。

[0013] 本发明另一方面涉及制备或产生抵抗非生物胁迫的植物或植物细胞的方法,包括修饰植物或植物细胞,以产生具有靶向线粒体的 PAP 活性的酶。因此,根据本发明的方法,获得抵抗非生物胁迫的植物或植物细胞。

[0014] 附图简要说明

[0015] 图 1A-1H 显示野生型烟草 BY-2 细胞(图 1A、1C、1E 和 1G)与转基因烟草 BY-2 细胞(图 1B、1D、1F 以及 1H)的比较,所述转基因烟草 BY-2 细胞已经被修饰,含有 GmPAP3-T7 融合蛋白的表达载体。

[0016] 图 2A-2B 显示 GmPAP3 的免疫检测结果。图 2A 显示了指示大豆 GmPAP3 蛋白在 GmPAP3-T7 转基因 BY-2 细胞系的线粒体富集的蛋白部分中存在的 Western 印迹。

[0017] 图 2B 显示在两个独立的 GmPAP3-T7 转基因细胞系(1535-1, 1535-2)中利用图 2A 中使用的 GmPAP3 抗体的电子显微镜检测结果。箭头指示主要在线粒体中发现的金粒的位置。比例尺=200nm。

[0018] 图 3A-3L 显示 GmPAP3 对转基因 BY-2 细胞在盐度和渗透胁迫下存活能力的影响。

[0019] 图 4A-4L 显示 GmPAP3 对 BY-2 细胞系在盐度或渗透胁迫的情况下保持存活能力的影响。

[0020] 图 5A-5L 是线粒体靶向的 GmPAP3 的表达对 BY-2 细胞中 ROS 累积影响的代表性图像。

[0021] 图 6 是图 5A-5L 结果的图示,表示线粒体靶向的 GmPAP3 的表达对 BY-2 细胞中 ROS 累积的影响。

[0022] 图 7 显示 GmPAP3 对盐胁迫下的转基因拟南芥 (*Arabidopsis*) 根部生长的影响。

[0023] 图 8 显示 GmPAP3 对渗透胁迫下的转基因拟南芥的影响,通过根部生长来测量。

[0024] 图 9 显示在由除草剂百草枯 (Paraquat) 引起的氧化胁迫下, GmPAP3 对转基因拟南芥根部生长的影响。

[0025] 图 10 是显示 GmPAP3 对氧化处理下转基因拟南芥的影响的图表,所述影响通过脂质过氧化来测量。

[0026] 发明的详细描述

[0027] 定义

[0028] 为易于解释本发明,提出如下定义。

[0029] 本文所用的术语“紫色酸性磷酸酶 (PAPs)”,表示存在于某些细菌、植物以及动物优选植物中的紫色酸性磷酸酶。这个家族的所有成员均含有一组特征性的与金属连接有关的 7 个氨基酸残基。本发明的 PAPs 特别是指具有过氧化物酶活性或可由包括高盐度、干旱和氧化胁迫的胁迫诱导的那些 PAPs。此类 PAPs 的实例包括但不限于大豆 GmPAP3(Liao et al., 2003 Gene 318 :103-111)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) AtACP5(del Pozo et al., 1999 Plant J. 19(5) :579-589)、番茄 IAP(Bozzo et al., 2004 Biochem J. 377 :419-428)、番茄 SAP1 和 SAP2(Bozzo et al., 2002 Eur. J. Biochem 269 :6278-6286)。优选地, PAP 是大豆 GmPAP3。

[0030] 本文用于描述核苷酸序列之间相似程度的术语“基本上相同的”指,当比较和比对最大相似性时,具有至少约 60%、优选至少约 70%、更优选至少约 80%、更优选约 90% 至约 99%、仍更优选约 95% 至约 99% 以及最优选约 99% 的核苷酸同一性的 2 条或更多条序

列。最优选地,基本上相同存在于包含全长编码序列的核苷酸序列中。本文所用术语“全长”指编码功能性 PAP 多肽或蛋白或所述多肽或蛋白的氨基酸序列的完整可读框。优选地,本发明的核苷酸序列包含编码酶的核苷酸序列或基本上与其相同的序列,所述酶选自自由大豆 GmPAP3(Liao, H, et al., GENE (2003) 318 :103-111)、拟南芥 AtACP5(Accession No. : AJ133747) 和番茄 IAP 组成的组。

[0031] 两条核苷酸序列基本上相同的另一个标志是,所述两个分子在严紧条件下彼此特异性地或充分地杂交。

[0032] 诸如 Southern 和 Northern 印迹分析的核酸杂交实验环境下的“严紧杂交条件”和“严紧杂交洗涤条件”既是序列依赖性的又是环境依赖性的。较长的序列在较高的温度下特异性杂交。有关核酸杂交的详细指导见于 Tijssen(1993)Laboratory Techniques in Biochemistry and MolecularBiology-Hybridization with Nucleic Acid Probes(生物化学和分子生物学实验技术-核酸探针杂交), part I chapter 2, Elsevier, New York, N. Y. 中。通常,选择的高度严紧杂交和洗涤条件比在确定的离子强度和 pH 下特定序列的热熔点 (thermal melting point, T_m) 低约 5°C。

[0033] 术语“活性氧分子 (ROS)”指氧部分还原或激活的衍生物,如单线态氧、超氧阴离子、过氧化氢和羟基自由基。在低水平时,这些分子在细胞信号传递过程中起作用。在较高水平时,这些分子是高活性和有毒的,并能导致细胞的氧化破坏。

[0034] 本文所用术语“非生物胁迫”指对植物或植物细胞施加了不利影响的非生命环境因子。在大多数情况下,根据植物存活、农作物产量、生长(生物量累积)或与植物的全面生长有关的主要的同化作用过程(CO_2 和矿质吸收)来测量胁迫。非生物胁迫的实例包括但不限于高盐度、干旱、氧化胁迫以及极端的寒冷或热。特别是,“非生物胁迫”在本发明上下文中指其不利影响是经由 ROS 产生的胁迫。

[0035] 本文所用术语“启动子”或“转录调控序列”或“转录调节序列”指距基因 5' 端一小段距离的调节区域,其作为 RNA 聚合酶的结合位点。此类序列具有指导或者调节直接位于其下游的核酸序列转录的功能。存在各种类型的启动子,包括组成型启动子、组织特异性启动子、诱导启动子以及受特定生理条件如高水平的活性氧分子触发的启动子。可用于本发明的启动子的实例包括但不限于 CaMV 35S、Ubi、SAG12 启动子等。更适宜的启动子见于 PlantProm 数据库 (Shahmuradov et al., Nucleic Acids Research, 2003, Vol. 31, No. 1114-1117) 中。

[0036] 本文所用术语“线粒体靶向转运肽 (MTTP)”,指迁移进入线粒体的信号肽。通过其迁移,融合于其 3' 端的多肽也进入线粒体。线粒体靶向转运肽可见于在细胞质中合成的蛋白的 N 末端,随后被转运至线粒体中,如 ATP 合成酶 β -亚单位的 N 末端。

[0037] 本文用于描述表达构建体的术语“构建体”,指表达载体,还包含有效插入所述载体的核苷酸序列,以便表达所述核苷酸序列。

[0038] 本文所用术语“载体”,指核酸分子,优选来自例如质粒、细菌噬菌体或植物病毒的 DNA 分子,核酸序列可插入或克隆于所述核酸分子中。载体优选包含 1 个或多个独特的限制位点,并且能在限定的宿主细胞包括靶细胞或组织或其祖细胞或组织内自主复制,或可以与限定宿主的基因组整合以便克隆的序列能复制。因此,所述载体可以是自主复制载体,即,作为染色体外实体存在的载体,该载体的复制不依赖于染色体的复制,例如,线性或闭

环式质粒、染色体外元件、微型染色体或人工染色体。所述载体可以包含确保自我复制的任何元件。可选地,载体可以是这样一个载体,即当导入细胞时,其整合于受体细胞的基因组,并与其整合的染色体一起复制。载体系统可包含单个载体或质粒,2个或更多载体或质粒,它们共同包含待导入宿主细胞基因组的总DNA,或包含转座子。载体的选择通常取决于载体与待导入该载体的细胞的相容性。载体还可以包括选择标记,诸如用于选择适宜的转化体的抗生素抗性基因。此类抗性基因的实例对本领域技术人员来说是熟知的。在本发明中,术语“构建体”和“载体”可交换使用。

[0039] 文本所用“异源核酸”是指本质上彼此没有可操作地连接或毗邻的核酸。通常,异源核酸指来自诸如不同物种的组织或DNA的不同来源的序列。例如,来自拟南芥的线粒体靶向肽,被认为与大豆的编码结构域序列是异源的。来自大豆以外物种的启动子也被认为与大豆的编码序列是异源的。

[0040] 本文所用术语“可操作地连接”指,以下述方式相对于编码多肽的多核苷酸定位转录和翻译调节核酸:在所述调节核酸的调控下转录所述多核苷酸,并且任选地翻译所述多肽。

[0041] 本文所用短语“在植物细胞中可操作的”意指启动子或调控序列能在植物细胞中执行其正常功能,即指导和/或调节直接在其下游的编码序列的表达,其中所述植物细胞可以是活着的植物的一部分或位于细胞培养物中。

[0042] 本文所用术语“选择标记”意指赋予表达标记基因的细胞独特的表型并由此使得此类转化细胞不同于不具有所述标记的细胞的基因。选择标记基因可赋予基于对选择媒介(如除草剂、抗生素、辐射、热或破坏未转化的细胞的其他处理,包括非生物胁迫)的抗性而选择的特性。可筛选的标记基因(或报道基因)赋予可通过观察或检测即通过“筛选”而鉴定的特性或表型(如未转化的细胞中不存在的 β 葡糖苷酸酶、荧光素酶或其他酶活性)。

[0043] 实现本发明的实施方案

[0044] 在本发明中,已经发现靶向线粒体的PAP活性可成功地赋予植物细胞或植物对非生物胁迫因子以及特别是高盐度、渗透和氧化胁迫的耐受性,其中氧化胁迫可通过活性氧分子(ROS)的累积来展示且可以是对主要胁迫因子的继发反应。植物和植物细胞可根据包括本发明的表达系统或构建体的转基因修饰展示这种耐受性,所述表达系统或构建体导致将PAP活性靶向线粒体的蛋白的产生。这在下文的烟草植物细胞和拟南芥植物中进行了说明,但决不是限于这些实例。任何高等植物或高等植物的细胞都是本发明方法和材料的适宜对象。

[0045] 本发明的方法可应用于任何植物,优选属于被子植物门(Angiospermae)和裸子植物门(Gymnospermae)阶元(class)的高等植物。双子叶植物纲(Dicotyledonae)和单子叶植物纲(Monocotyledonae)亚阶元(subclass)的植物特别适宜。双子叶植物属于下列目:木兰目(Magnioliales)、八角目(Illiciales)、樟目(Laurales)、胡椒目(Piperiales)、马兜铃目(Aristolochiales)、睡莲目(Nymphaeales)、毛茛目(Ranunculales)、罂粟目(Papaverales)、瓶子草科(Sarraceniaceae)、昆栏树目(Trochodendrales)、金缕梅目(Hamamelidales)、杜仲目(Eucommiales)、塞子木目(Leitneriales)、杨梅目(Myricales)、壳斗目(Fagales)、木麻黄目(Casuarinales)、石竹目(Caryophyllales)、肉穗果目(Batales)、蓼目(Polygonales)、蓝雪目

(Plumbaginales)、五桠果目 (Dilleniales)、茶目 (Theales)、锦葵目 (Malvales)、荨麻目 (Urticales)、玉蕊目 (Lecythidales)、堇菜目 (Violales)、杨柳目 (Salicales)、白花菜目 (Capparales)、杜鹃花目 (Ericales)、岩梅目 (Diapensiales)、柿树目 (Ebenales)、报春花目 (Primulales)、蔷薇目 (Rosales)、豆目 (Fabales)、川草目 (Podostemales)、小二仙草目 (Haloragales)、桃金娘目 (Myrtales)、山茱萸目 (Cornales)、山龙眼目 (Proteales)、檀香目 (Santales)、大花草目 (Rafflesiales)、卫矛目 (Celastrales)、大戟目 (Euphorbiales)、鼠李目 (Rhamnales)、无患子目 (Sapindales)、胡桃目 (Juglandales)、牻牛儿苗目 (Geraniales)、远志目 (Polygalales)、伞形目 (Umbellales)、龙胆目 (Gentianales)、花荵目 (Polemoniales)、唇形目 (Lamiales)、车前目 (Plantaginales)、玄参目 (Scrophulariales)、桔梗目 (Campanulales)、茜草目 (Rubiales)、续断目 (Dipsacales) 以及菊目 (Asterales)。单子叶植物属于下列目: 泽泻目 (Alismatales)、天南星目 (Arales)、棕榈目 (Arecales)、凤梨目 (Bromeliales)、鸭跖草目 (Commelinales)、巴拿马草目 (Cyclanthales)、莎草目 (Cyperales)、谷精草目 (Eriocaulales)、水鳖目 (Hydrocharitales)、灯心草目 (Juncales)、茨藻目 (Najadales)、绳草目 (Restionales)、禾草目 (Poales)、霉草目 (Triuridales)、香蒲目 (Typhales)、姜目 (Zingiberales)、露兜树目 (Pandanales)、百合目 (Liliales) 和兰目 (Orchidales)。属于裸子植物门阶元的植物是苏铁目 (Cycadales)、松目 (Pinales)、银杏目 (Ginkgoales) 和买麻藤目 (Gnetales)。

[0046] 本发明的方法优选用于对农业、园艺、能源工业、生物量转化和 / 或森林重要或有利的植物。实例有烟草 (tobacco)、油菜 (oilseed rape)、甜菜 (sugar beet)、马铃薯 (potatoes)、番茄 (tomatoes)、黄瓜 (cucumbers)、胡椒 (peppers)、豆类 (beans)、豌豆 (peas)、柑桔 (citrus fruits)、鳄梨 (avocados)、桃 (peaches)、苹果 (apples)、梨 (pears)、浆果 (berries)、李子 (plums)、瓜类 (melons)、茄子 (eggplants)、棉花 (cotton)、大豆 (soybean)、向日葵 (sunflowers)、玫瑰 (roses)、猩猩木 (poinsettia)、矮牵牛 (petunia)、银胶菊 (guayule)、甘蓝 (cabbages)、菠菜 (spinach)、紫花苜蓿 (alfalfa)、朝鲜蓟 (artichokes)、谷物 (corn)、小麦 (wheat)、稻米 (rice)、黑麦 (rye)、大麦 (barley)、草 (grasses) 如柳枝稷 (switch grass) 或草坪草 (turf grass)、粟 (millet)、大麻 (hemp)、香蕉 (bananas)、白杨 (poplars)、桉树 (eucalyptus trees) 以及松类 (conifers)。

[0047] 为了提供所需的靶向 PAP 蛋白, 修饰植物细胞或植物, 以包含编码诸如 PAP 或 MTTP-PAP 的相关蛋白的核苷酸序列, 所述核苷酸序列任选地可操作地连接于在植物中可操作的调控序列或者整合于基因组, 以便在内源调控序列的调控下得以表达。

[0048] 在本发明的一个实施方案中, 用本发明的核酸构建体或载体转染或转化植物细胞或植物。优选地, 核酸构建体可以包含在植物中可操作的调控序列, 该序列可操作地连接于 MTTP-PAP 编码序列, 其中可以选择所述调控序列, 以产生组成型、组织特异性或非组织特异性或可诱导的表达。种类繁多的此类调控序列可在本领域中获得, 并且基因修饰的适当载体也是熟知的, 当然也可以商购。

[0049] 在本发明的一个实施方案中, 来自农杆菌 (Agrobacteria) Ti 质粒的二元系统特别适合本发明。二元系统通常包括不同大小的 2 种载体。较大的载体是辅助载体 (helper vector), 其包含较小载体携带的 T-DNA 整合入植物细胞基因组中所需的基因。较小的载体, 通常称为二元载体, 携带待插入或克隆的基因。通常, 将辅助载体提前转化到适宜的农

杆菌属 (*Agrobacterium*) 菌株。许多此类农杆菌属菌株在本领域内是熟知的, 如 LBA4404、GV3101、EHA101、EHA 105、ABI 等 (*Plant Molecular Biology Manual* (植物分子生物学手册). S. B. Gelvin 和 R. A. Schilperoort 编辑, 第二版, Springer, 1994)。同样, 有许多可用于实施本发明的二元载体, 如 pBR322、pUC 系列、pBI 系列、pMON 系列、pCambia 系列、pGreen 系列等。二元载体的选择取决于待转化的植物种类。有关选择适宜载体的知识在本领域普通技术人员的能力范围内, 并且可见于例如 *Plant Molecular Biology Manual* (植物分子生物学手册) (S. B. Gelvin 和 R. A. Schilperoort 编辑, 第二版, Springer, 1994) 中。

[0050] 同样, 目前实现植物细胞的基因修饰和重建完整植物的技术在本领域内是熟知的。在此方面, 有关本领域技术状况的有用总结, 包括构成本发明主旨的植物和植物细胞类型的相当广泛的名录, 见于上文提及的于 2004 年 1 月 14 日出版的美国专利公布 2004-0009476 中, 所述美国专利以参考的方式并入本文, 其公布了有关植物基因操作的适当技术以及适用这些技术的植物和植物细胞的范围。

[0051] 此外, 因为本发明的修饰细胞和植物对由渗透、高盐度和 / 或氧化胁迫引起的胁迫有抗性, 所以含有核苷酸序列的表达系统或构建体可用作成功转化细胞的选择标记, 所述核苷酸序列编码可操作地连接于在植物中可操作的调控序列的 MTTP-PAP 融合物。成功的转化体具有更高的抗性, 并且因为标记赋予其对施加的胁迫的耐受性而能幸免于此胁迫。因此, 可根据转化体幸免于此类胁迫状况的能力来鉴定成功的转化体。

[0052] 本发明的 MTTP-PAP 融合蛋白包含赋予 PAP 活性的氨基酸序列和影响所述融合蛋白向线粒体转运的序列, 所述线粒体是以这样的方式定位的, 即 MTTP 有效运输融合蛋白。1 种此类融合蛋白如上文所述天然存在于大豆中, 并被 Liao, H. 等 (同上) 称为 GmPAP3。然而, 其他来源的编码具有 PAP 活性的蛋白的核苷酸序列或基本上与其相同的核苷酸序列, 或者来自大豆的其他 PAP 编码序列, 例如拟南芥 AtACP5 以及番茄 IAP, 也可通过制备构建体而用于本发明, 所述构建体包括与其可操作连接的 MTTP 编码序列。因此, 本发明包括此类构建体。

[0053] MTTP-PAP 融合赋予对高盐度、渗透胁迫和 / 或诸如由除草剂百草枯导致的氧化胁迫耐受性的能力表现为多个方面, 包括 ROS 改善、完整线粒体的保留、生存力的维持、各种植物部分生长的增加以及细胞健康的总体改善。

[0054] 下文的实施例和结果证实和说明了本发明的方法和构建体是成功的。

[0055] 下述实验方案产生了下文实施例 1-6 的数据。

[0056] 转基因烟草 BY-2 细胞系和转基因拟南芥的建立

[0057] 在组成型花椰菜花叶病毒 (*Cauliflower Mosaic Virus*) 35S 启动子的调控下, 将包含 GmPAP3 或 GmPAP3-T7 的重组构建体克隆至二元载体 (Brears et al, *Plant Physiol.* (1993) 103 :1285-1290), 并导入农杆菌 (*Agrobacterium*)。利用共培养法 (An, G., *Plant Physiol.* (1985) 79 :568-570) 或真空渗透方案 (Bechtold and Pelletier, J. Martinez-Zapater, J. Salinas, eds, *Arabidopsis Protocols* (拟南芥方案). Humana Press Inc., Totowa (1993) pp259-266), 将构建体分别转化入 BY-2 细胞 (GmPAP3 和 GmPAP3-T7) 或拟南芥 (GmPAP3) 中。在含有抗生素的培养基上选择转化体后, 进行用基因特异性引物的 PCR 筛选, 来证实转基因已成功地整合于基因组中; 并进行 Northern 印迹分析来证实转基因在转基因细胞和植物品系中的表达。对于转基因拟南芥, 获得具有单个插入

片段的 T3 纯系的种子,并用于随后的生理研究。

[0058] 基因表达研究

[0059] 为了研究在 NaCl 和 PEG 处理下 GmPAP3 的基因表达模式,首先,将表面灭菌的大豆 (*Glycine max* L. Merr. cv. Union) 种子在含有改良的霍格兰溶液 (Hoagland' s solution: 4.5mM KNO_3 、3.6mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、1.2mM NH_4NO_3 、3.0mM MgSO_4 、1.2mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.25mM KH_2PO_4 、4.5 μM MnSO_4 、4.5 μM ZnSO_4 、1.5 μM CuSO_4 、0.4 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 、0.09mM Fe-EDTA 以及 1.5 μM H_3BO_3) 的滤纸上萌发。萌发后,将统一生长阶段的一周龄的种苗转移至含有相同培养基的液体培养系统中。在最初的三叶打开之后,分别用补充了 125mM NaCl 和 5% PEG 的改良的霍格兰溶液处理种苗。48 小时后,收集经处理的植物的最嫩的完全展开的三叶,用于提取总 RNA。为了研究在 PQ 处理下 GmPAP3 的基因表达模式,将表面灭菌的种子在含有一半霍格兰溶液的石英砂上萌发。萌发后,将统一生长阶段的 10 日龄的种苗转移至含有相同培养基的液体培养系统中。在将种苗平衡 24 日后,将 10mM PQ 溶液喷洒于三叶的两面,并在 4 小时后,收集叶子样品。

[0060] 进行 Northern 印迹分析,以地高辛 (Digoxigenin, DIG) (Roche, Mannheim, Germany) 标记的反义单链 DNA 探针作为探针。因为已将 GmPAP3 克隆入 pBluescript II KS(+) 载体中,所以使用 T3-(5' -AATTAACCCTCACTAAAGGG-S') 和 T7-(5' -GTAATACGACTC ACTATAGGGC-S') 启动子引物合成 PCR 探针。

[0061] 线粒体完整性分析

[0062] 在用 10 $\mu\text{g/ml}$ 若丹明 123 (Rh123) (R302, Molecular Probes) 染色前,将细胞用 200mM NaCl 处理 1 小时或用 2% PEG 处理 1 小时。Rh123 的信号通过绿色 HeNe 激光在 543nm 处激发。使用 HQ590/70 过滤装置,并通过 Bio-Rad Radiance 2100 系统收集共焦图像。对于每个样品,计数 10-25 个细胞用于统计分析。

[0063] 细胞生存力分析

[0064] 在用 0.4% 的台盼蓝 (T8154, Sigma) 染色前,将细胞用 200mM NaCl 或 2% PEG 处理 24 小时。在光学显微镜下观察染色的细胞。对于每个样品,计数约 200 个细胞。

[0065] ROS 检测

[0066] 化学探针 H_2DCFDA 作为细胞内 ROS 非侵入性的体内测量手段,已经被广泛使用 (Allan, et al., *Plant Cell* (1997) 9:1559-1572; D. P. Maxwell et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* (1999) 96:8271-8276)。在用 200mM NaCl 处理 1 小时或用 2% PEG 处理 1 小时前,先用二氯双氢荧光素二乙酸酯 (dichlorodihydrofluorescein diacetate, H_2DCFDA) 将细胞预染色 30 分钟。 H_2DCFDA 信号通过 488nm 氩激光激发,并使用 HQ 515/30 过滤装置。对于每个分析的细胞,使用相同水平的激光激发、光圈 (Iris) 和增益 (Gain)。 H_2DCFDA 的荧光强度通过使用在美国国立卫生研究院网站 <http://rsb.info.nih.gov/ij/> 上描述的程序进行评估。通过追踪完整细胞 (利用选择工具) 进行定量分析,并测量总荧光强度。随后用细胞区域面积除以该荧光强度测量值 (以像素表示),以获得平均像素荧光强度。另外,测量同一视野的背景荧光强度,并将之减去。对于每个样品,分析 10-20 个细胞进行统计分析。

[0067] GmPAP3 的亚细胞定位

[0068] 使用 GmPAP3-T7 融合蛋白,研究 GmPAP3 的亚细胞定位。通过用 FITC 的二抗进行的免疫标记使 T7 标签的位置可视化。根据 Jiang and Rogers, *J. Cell Biol.* (1998) 143:

1183-1199 中的描述,同时作了微小更改后,进行 BY-2 细胞固定和共焦免疫荧光检验。在固定和免疫标记前,先将细胞用线粒体标记物橙色线粒体示踪剂™(MitoTracker Orange™)(M7510, Molecular Probes) 预染色。橙色线粒体示踪剂的信号通过 543nm 绿色 HeNe 激光激发,并使用 HQ 590/70 过滤装置。FITC 的信号通过 488nm 氩激光激发,并使用 HQ 515/30 过滤装置。所有的共焦图像均由 Bio-Rad Radiance 2100 系统采集。

[0069] 为了对 FITC 和橙色线粒体示踪剂™ 信号的共定位进行量化,绿色 (FITC) 和红紫色 (橙色线粒体示踪剂™) 图像的叠加在绿色和红紫色信号重叠的地方产生了黄色。使用 Image J1.34n 程序 (Sukumvanich et al., 同上), 计算由绿色像素面积分割的黄色像素面积。分析来自双标记实验的至少 10 个不同细胞的图像,以计算 FITC 和橙色线粒体示踪剂™ 信号的共定位。

[0070] 线粒体蛋白的提取

[0071] 利用更改的 Douce 等 (Douce, R., et al. Methods Enzymol. (1987) 148 :403-415) 描述的差速离心法,提取线粒体蛋白。将植物材料在 2 体积冰冷的提取培养基 (0.25M 蔗糖、5mM EDTA、1mM EGTA、1mM 二硫赤鲜醇、0.1% BSA、含 0.6% PVPP pH 7.4 的 10mM HEPES-TRIS) 中轻轻地均质化。经 Miracloth™ 过滤匀浆液,并以 10,000g 离心 10 分钟,将线粒体直接从细胞质部分中分离。将所得的粗线粒体沉淀重悬浮于培养基 I (含 0.25M 蔗糖、5mM EDTA、1mM EGTA、0.1% BSA 的 pH 7.4 的 10mM HEPES-TRIS) 中,并以 600g 离心 5 分钟,除去细胞核和重细胞碎片。重复这种洗涤步骤 2 次。将经洗涤的线粒体重悬浮于培养基 II (含 0.25M 蔗糖,30 μM EGTA 的 pH 7.4 的 10mM HEPES-TRIS) 中,并保存于冰上。

[0072] 转基因拟南芥在盐处理下的根部生长分析

[0073] 将转基因系 (GmPAP3 和空载体) 及它们未转化的亲本哥伦比亚 -0 (Columbia-0, Col-0) 的种子播种于包含 3% 蔗糖和 0.9% (w/v) 琼脂的直立 MS 平板上。将种苗 (萌发后 7 天) 转移至对照 MS 琼脂平板或补充了 150mM NaCl 的 MS 琼脂平板上。记录处理前和处理后 7 天每颗种苗的根部长度的百分比。

[0074] 转基因拟南芥在 PEG 处理下的根部生长分析

[0075] 将转基因系 (GmPAP3 和空载体) 及它们未转化的亲本哥伦比亚 -0 (Col-0) 的种子播种于包含 3% 蔗糖和 0.9% (w/v) 琼脂的 MS 平板上。将种苗 (萌发后 7 天) 转移至对照 MS 琼脂平板或补充了 15% 聚乙二醇 6000 (PEG) 的 MS 琼脂平板上。记录处理前和处理后 7 天每颗种苗的根部长度的百分比。

[0076] 由于 PEG 在倒入平板前不能溶解于琼脂中 (PEG 会阻止琼脂聚合), 因此通过使用 PEG 浸渍的琼脂平板实现 PEG 处理。按 Verslues (Verslues, P.E., et al, The Plant Journal (2006) 47 :776-787) 的描述,且稍加改善后,制备 PEG 浸渍的琼脂平板。为 MS 琼脂培养基和所需平板数目的 PEG 覆盖物 (PEG overlay) 制备适量的 MS, 将其 pH 调整为 5.7。将 9g/L 琼脂加入到制备琼脂平板所用的溶液中。未向用于 PEG 覆盖物的溶液中加入琼脂,但改为直接高压蒸汽灭菌。高压蒸汽灭菌后,将 20ml MS 培养基倒入 100mm² 的平板上。对于 MS 培养基 (无琼脂), 加入 15% PEG。MS 琼脂平板凝固后,在每个平板上加入 30ml 的 PEG 覆盖物。将平板浸渍在 PEG 覆盖物中,并允许其平衡至少 16 小时。只在使用前,才倒掉 PEG 覆盖物,并直接使用 PEG 浸渍的平板。

[0077] 转基因拟南芥在百草枯处理下的根部生长分析

[0078] 将转基因系 (GmPAP3 和空载体) 及它们未转化的亲本 Co1-0 的种子播种于包含 3% 蔗糖和 0.9% (w/v) 琼脂的直立 MS 平板上。将种苗 (萌发后 7 天) 转移至对照 MS 琼脂平板或补充了 $1 \mu\text{m PQ}$ 的 MS 琼脂平板上。记录处理前和处理后 7 天每颗种苗的根部长度并计算根部生长的百分比。

[0079] 脂质过氧化物检测

[0080] 如 Sattler 等 (Sattler et al., Plant Cell (2004) 16 :1419-1432) 所述, 用 FOX 分析测定脂质过氧化物。用 $400 \mu\text{L}$ 含有 0.05% 丁基羟基甲苯的甲醇:二氯甲烷 (1 : 1[v/v]) 和 $50 \mu\text{L}$ 的 150mM 乙酸提取 12 颗种苗。通过加入 $300 \mu\text{L}$ 水, 涡旋并以 3,750g 离心, 使脂质进入有机相。在室温下用 FOX 溶液孵育脂质提取物 30 分钟。孵育后, 用微板读数仪直接在 595nm 处测量吸光率。按制造商实验方案中所建议的, 使用过氧化氢绘制标准曲线。18 : 2 衍生的脂质氢过氧化物与 FOX 试剂的反应性几乎与过氧化氢相同 (DeLong et al., J, Agric. Food. Chem. (2002) 50 :248-254)。

[0081] 统计分析

[0082] 使用 SPSS (版本 12.0) 统计包, 分析数据。显示展示了显著差异 ($p < 0.01$) 的样品。

[0083] 实施例 1

[0084] GmPAP3 在线粒体中的定位

[0085] 将 Liao 等 (Liao, H. et al. Gene (2003) 318 :103-111, 同上) 所述的编码大豆 GmPAP3 的核苷酸序列克隆入与烟草细胞兼容的表达载体中, 作为上文所述的与 T7 的融合蛋白。这种表达载体用于转化烟草 BY-2 细胞。

[0086] 用共焦免疫荧光定位研究 GmPAP3 的亚细胞定位。用 FITC 偶联的二抗标记 BY-2 细胞中产生的 GmPAP3-T7 标签融合蛋白。用橙色线粒体示踪剂™ (MitoTracker-Orange™) 荧光染料特异性标记线粒体。FITC 和橙色线粒体示踪剂™ 信号共定位的百分比表示为与橙色线粒体示踪剂™ 信号共定位的 FITC 的量。对于分析的细胞数目而言, 共定位百分比表示为平均值 \pm 标准偏差 (SD), 如下表所示。

[0087]

GmPAP3 转基因细胞系	共定位的百分比 (平均值 \pm SD)	被分析的细胞数
1535-1	66.11 \pm 5.56%	29
1535-2	64.84 \pm 4.16%	31
1535-3	67.20 \pm 4.69%	27
1535-4	62.33 \pm 3.33%	17

[0088] 野生型和 1535-2 的结果也显示于图 1 中。

[0089] 实施例 2

[0090] GmPAP3 在线粒体中共定位的选择性测量

[0091] 培养实施例 1 中提供的转基因 BY-2 细胞,以产生 GmPAP3。提取线粒体蛋白,用 GmPAP3 特异性抗体进行免疫检测。结果显示于图 2A 中。其中,WT 表示来自野生型 BY-2 细胞系的线粒体蛋白部分;9111 和 9112 表示从 GmPAP3 转基因细胞系提取的线粒体蛋白;J23 表示从大豆栽培变种 J23 中提取的线粒体蛋白。正如所观察的,GmPAP3 位于线粒体部分。

[0092] 图 2B 显示 GmPAP3 在线粒体中定位的电子显微镜观察结果,其是图 2A 中结果的可选择性证实。按 Tse 等 (Tse YC, et al., Dynamic response of prevacuolar compartments to Brefeldin A in Plant Cells (植物细胞中的液泡前体对布雷菲德菌素 A 的动态反应). Plant Physiol. (2006) 142:1442-1459) 所述的方法,并稍加改善后,进行包埋和电镜观察。将样品在含有溶于 50mM pH 7.4 磷酸缓冲液的 0.25% (v/v) 戊二醛和 1.5% (v/w) 多聚甲醛的初级固定溶液中于室温下固定 15 分钟,而后在 4°C 孵育 16 小时。室温下用磷酸缓冲液洗涤后,将细胞在梯度乙醇中脱水,随后包埋于 Lowicryl[®] (HM20) 树脂中。而后使用 Ultra Cut S (Leica, Wetzlar, Germany), 用这些包埋块制备超薄切片。使用 GmPAP3 特异性抗体作为一抗,随后用金偶联的抗兔二抗检测。接着用 4% 的乙酸铀酰将免疫标记的切片进行后染色 (post-stained), 并用透射电子显微镜 (JEM-1200EXII, JEOL, Tokyo, Japan) 检测。

[0093] 实施例 3

[0094] 盐度和干旱胁迫下 GmPAP3 对线粒体膜完整性的影响

[0095] 培养实施例 1 中制备的转基因 BY-2 细胞系,以表达 GmPAP3 蛋白,并将其用上文所述的氯化钠或聚乙二醇 (PEG, 渗透胁迫) 处理,结果如图 3A-3L 所示。将线粒体完整性的结果与存在抗坏血酸时的影响进行比较。结果显示于下文的表中,该表概括了图 3A-3L 的数据。该数据是计数 10-25 个细胞以及重复 2 次的实验的结果。百分比表示为 3 次实验的平均值 \pm SD, 其中, ** 表示基于单因素方差分析 (one-way ANOVA) 及随后的 Tukey 检验 (Tukey test), 在相同处理条件下与野生型 BY-2 细胞的统计学差异 ($p < 0.01$)。

[0096]

细胞系	具有完整线粒体的细胞的百分比(%)		
	对照	NaCl	PEG
野生型 BY-2	100%	45.27 \pm 6.3	47.98 \pm 3.1
野生型 BY-2 + 10 mM 抗坏血酸	100%	86.20 \pm 3.3**	82.16 \pm 3.7**
GmPAP3 转基因细胞系 20	100%	81.36 \pm 3.9**	81.32 \pm 5.6**
GmPAP3 转基因细胞系 29	100%	80.40 \pm 4.7**	79.5 \pm 6.9**

[0097] 将未补充抗坏血酸的野生型 (wild type, WT) BY-2 细胞 (图 3A-3C) 和 GmPAP3 转基因 BY-2 细胞系 #20 和 #29 (分别为图 3G-3I & 3J-3L), 以及补充了 10mM 抗坏血酸 (+Asc) 的野生型 BY-2 细胞 (图 3D-3F), 在没有胁迫的细胞培养基 (图 3A、3D、3G 和 3J) 中、在含 200mM NaCl 的细胞培养基 (图 3B、3E、3H 和 3K) 中或在含 2% PEG 的细胞培养基 (图 3C、3F、3I 和 3L) 中预处理 1 小时, 然后再用 10 μ g/mL Rh123 染色 1 小时。使用共焦激光扫描显微镜, 观察 Rh123 的信号 (参见材料和方法)。对于每个细胞系, 计数 10-25 个细胞。比

例尺 = 50 μ m。

[0098] 实施例 4

[0099] 胁迫对 GmPAP3 提供的生存力保护的影响

[0100] 进行实施例 3 的实验,但使用生存力而不是线粒体完整性来评估。生存力通过用台盼蓝染色评估。在用台盼蓝染色前,将细胞用 200mM NaCl 或 2% PEG 处理 24 小时。如下文表中所示,将百分比表示为约 200 个细胞的平均值 \pm SD,其中 ** 表示基于单因素方差分析及随后的 Tukey 检验,在相同处理条件下与野生型 BY-2 细胞的统计学差异 ($p < 0.01$)。

[0101] 数 a 和 b 表示两组独立的实验。

[0102]

细胞系	存活细胞的百分比(%)		
	未处理	200 mM NaCl	2% PEG
野生型 BY-2 ^a	98.70 \pm 2.5	48.30 \pm 8.8	66.81 \pm 8.2
野生型 BY-2+ 10 mM 抗坏血酸 ^a	97.52 \pm 5.9	92.68 \pm 8.0**	94.87 \pm 9.2**
野生型 BY-2 ^b	93.41 \pm 10.6	42.14 \pm 6.9	60.63 \pm 13.2
GmPAP3 转基因细胞系 20 ^b	94.61 \pm 6.0	79.70 \pm 16.7**	95.96 \pm 6.1**
GmPAP3 转基因细胞系 29 ^b	98.14 \pm 2.6	85.97 \pm 18.1**	91.76 \pm 12.6**

[0103] 使用图 4A-4L 所示的组织学评估,获得了相似的结果。将未补充抗坏血酸的野生型 (WT)BY-2 细胞 (图 4A-4C) 和 GmPAP3 转基因 BY-2 细胞系 #20 和 #29 (分别为图 G-I & J-L),以及补充有 10mM 抗坏血酸 (+Asc) 的野生型 BY-2 细胞 (图 4D-4F),在没有胁迫的细胞培养基 (图 4A、4D、4G 和 4J) 中、在含有 200mM NaCl 的细胞培养基 (图 4B、4E、4H 和 4K) 中或在含有 2% PEG 的细胞培养基 (图 4C、4F、4I、4L) 中预处理 24 小时。用 0.4% 的台盼蓝对处理过的细胞进行染色。非存活细胞被染成了蓝色。对于每个细胞系,计数约 200 个细胞。比例尺 = 50 μ m。

[0104] 实施例 5

[0105] GmPAP3 对 ROS 的影响

[0106] 如图 5A-5L 所示,GmPAP3 可降低遭受盐和渗透胁迫的 BY-2 细胞中 ROS 的累积。将未补充抗坏血酸的野生型 (WT)BY-2 细胞 (图 5A-5C) 和 GmPAP3 转基因 BY-2 细胞系 #20 和 #29 (分别为图 5G-5I 和图 5J-5L),以及补充了 10mM 抗坏血酸 (+Asc) 的野生型 BY-2 细胞 (图 5D-5F),用 H₂DCFDA 预染色 30 分钟,然后将上述细胞置于无胁迫的细胞培养基 (图 5A、5D、5G、5J) 中、含有 200mM NaCl 的细胞培养基 (图 5B、5E、5H、5K) 中或含有 2% PEG 的细胞培养基中 1 小时 (图 5C、5F、5I、5L)。使用共焦激光扫描显微镜,观察 H₂DCFDA 的信号。对于每个细胞系,计数 10-20 个细胞。比例尺 = 50 μ m。

[0107] 这些结果也以图形的方式进行了显示,如图 6 所示。

[0108] 荧光强度通过 ImageJ 计算,并通过单因素方差分析 (one-way analysis of variance, ANOVA) 检验分析获得的数据,在此情况下,每个细胞系之间的显著差异通过

Tukey 检验测定。^{**} 表示均值差异（与野生型相比）在 $p < 0.01$ 的水平是显著的。

[0109] 实施例 6

[0110] GmPAP3 对拟南芥中胁迫应答的影响

[0111] 在这些实验中,使用已经被修饰以产生上文所述的 GmPAP3 的拟南芥品系 F42 和 C25。首先,研究了盐胁迫对拟南芥根部生长的影响。将来自野生型亲本 (Co10)、空载体转基因对照 (V7) 以及两种独立的 GmPAP3 转基因品系 (F42 和 C25) 的种子,播种于 MS 琼脂平板上。将幼小种苗转移至对照 MS 琼脂平板 (CT) 或补充了 150mM NaCl 的 MS 琼脂平板上。评估根部生长的百分比,并显示于图 7 中。误差棒 (error bar):标准误差。N = 48。通过单因素方差分析 (ANOVA) 检验分析获得的数据,在此情况下,单个品系之间的显著差异通过 Tukey 检验测定。^{**} 表示均值差异（与野生型相比）在 $p < 0.01$ 的水平下是显著的。

[0112] 如图 7 所示,尽管盐的存在削弱了野生型的生长,但却提高了转化株根部的生长。

[0113] 接下来研究了 PEG 胁迫对拟南芥根部生长的影响。将来自野生型亲本 (Co10)、空载体转基因对照 (V7) 以及两种独立的 GmPAP3 转基因品系 (F42 和 C25) 的种子,播种于 MS 琼脂平板上。将幼小种苗转移至对照 MS 琼脂平板 (CT) 或补充了 15% PEG 的 MS 琼脂平板上。评估根部生长的百分比,并显示于图 8 中。误差棒:标准误差。N = 48。通过单因素方差分析 (ANOVA) 检验分析获得的数据,在此情况下,单个品系之间的显著差异通过 Tukey 检验测定。^{**} 表示均值差异（与野生型相比）在 $p < 0.01$ 的水平下是显著的。

[0114] 研究了氧化胁迫对拟南芥根部生长的影响。将来自野生型亲本 (Co10)、空载体转基因对照 (V7) 以及两种独立的 GmPAP3 转基因品系 (F42 和 C25) 的种子,播种于 MS 琼脂平板上。将幼小种苗转移至对照 MS 琼脂平板 (CT) 或补充了 $1 \mu\text{M}$ 百草枯的 MS 琼脂平板上。根部生长的百分比显示于图 9 中。误差棒:标准误差。N = 48。通过单因素方差分析 (ANOVA) 检验分析获得的数据,在此情况下,单个品系之间的显著差异通过 Tukey 检验测定。^{**} 表示均值差异（与野生型相比）在 $p < 0.01$ 的水平下是显著的。

[0115] 研究了 GmPAP3 转基因拟南芥在氧化处理情况下的脂质过氧化。如上文所述,培养种苗并用百草枯处理。通过 FOX 分析测量脂质过氧化,并将结果显示于图 10 中。将 18 : 2 衍生的脂质氢过氧化物 (LOOHs) 水平的反应性表示为摩尔 LOOHs/g 鲜重 (fresh weight, FW)。误差棒:标准误差。N = 4(对于每个数据点,4 组 12 颗种苗)。通过单因素方差分析 (ANOVA) 检验分析获得的数据,在此情况下,单个品系之间的显著差异通过 Tukey 检验测定。^{**} 表示均值差异（与野生型相比）在 $p < 0.01$ 的水平是显著的。空心条形和实心条形分别表示未处理的对照和处理的样品。

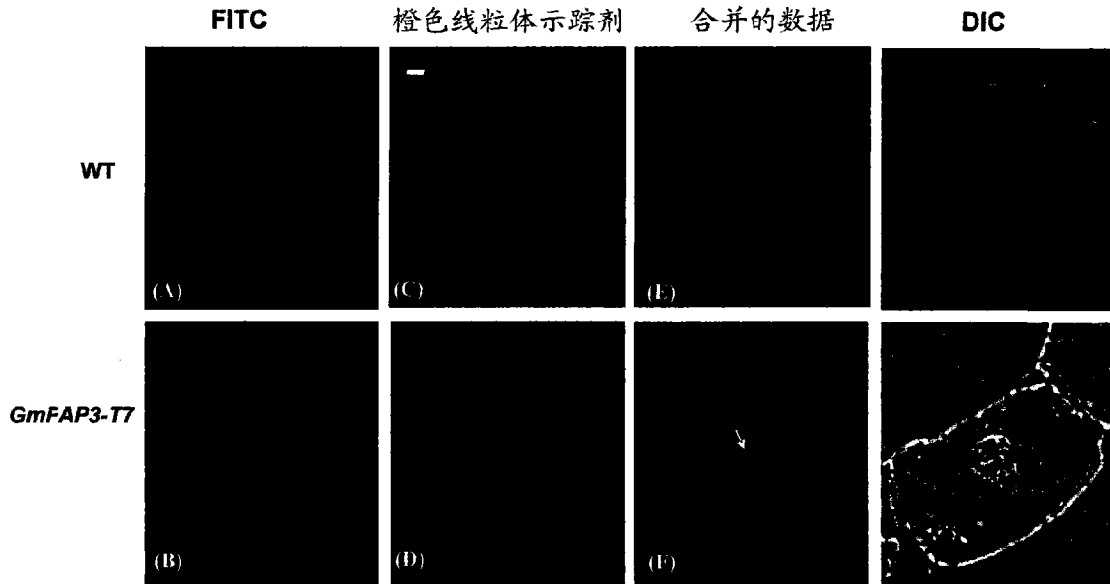


图 1

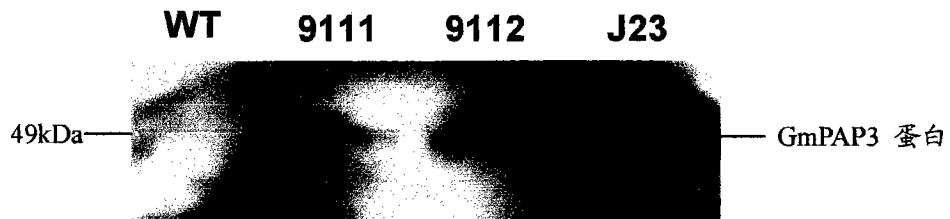


图 2A

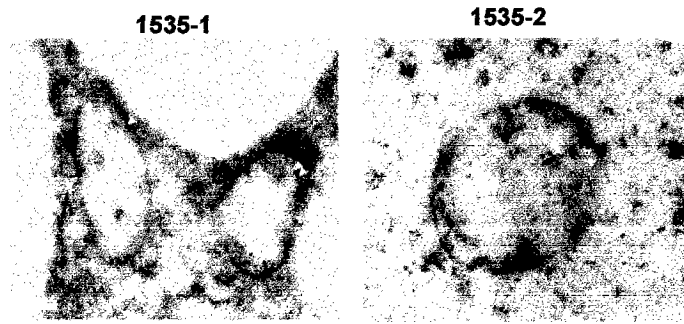


图 2B

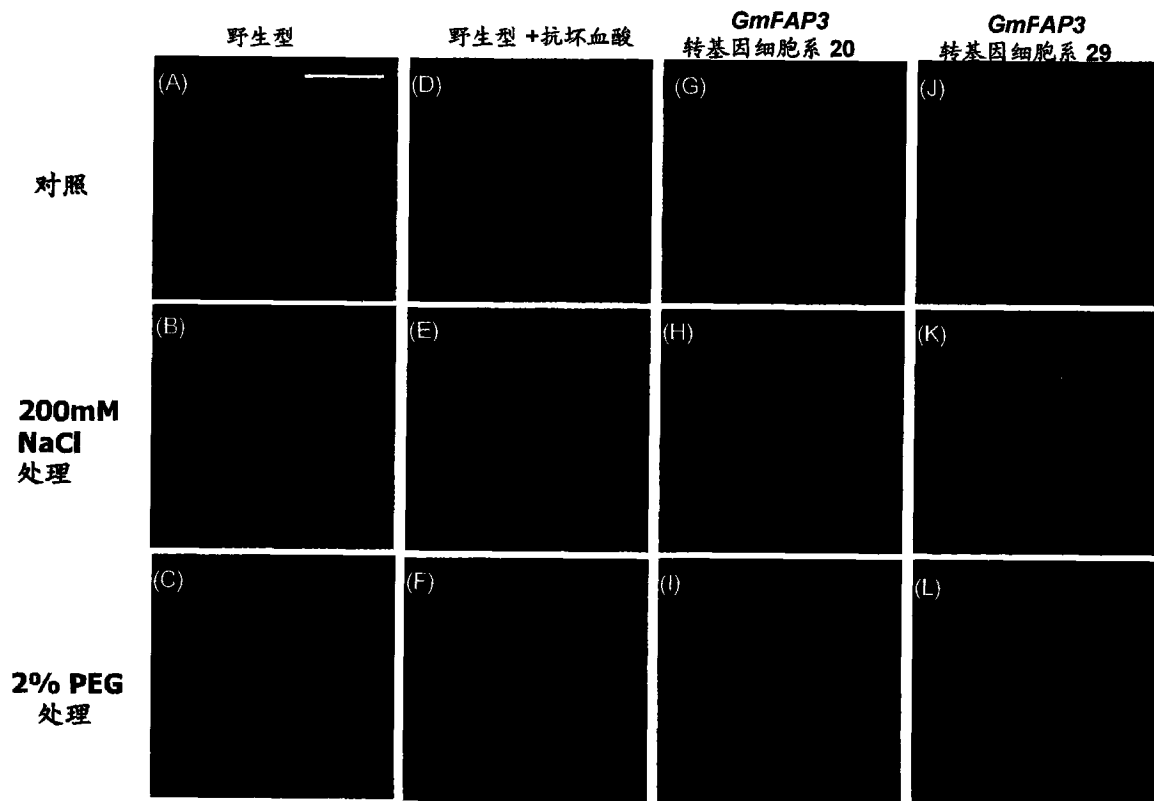


图 3

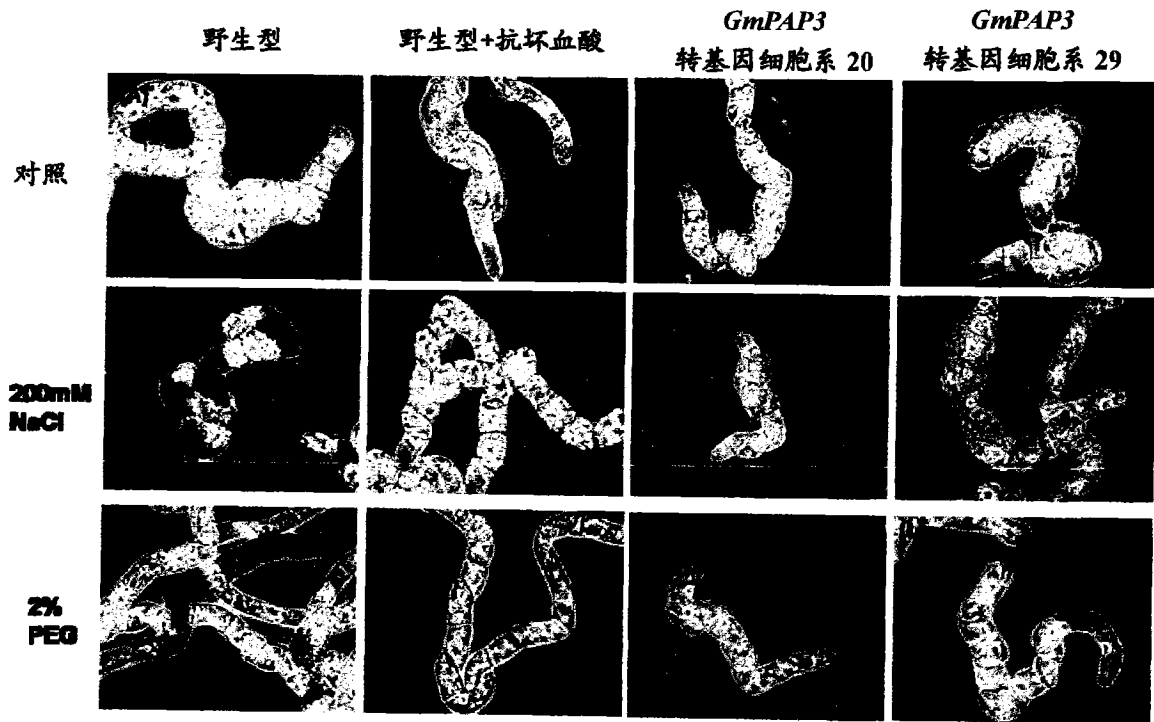


图 4

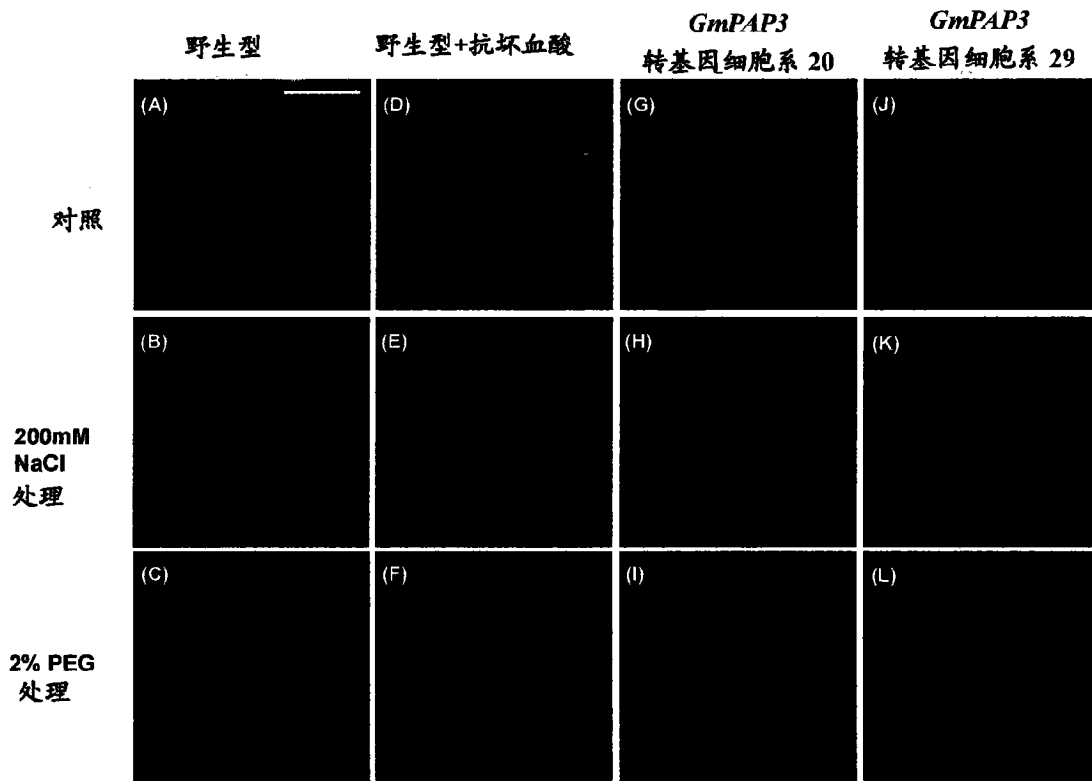


图 5

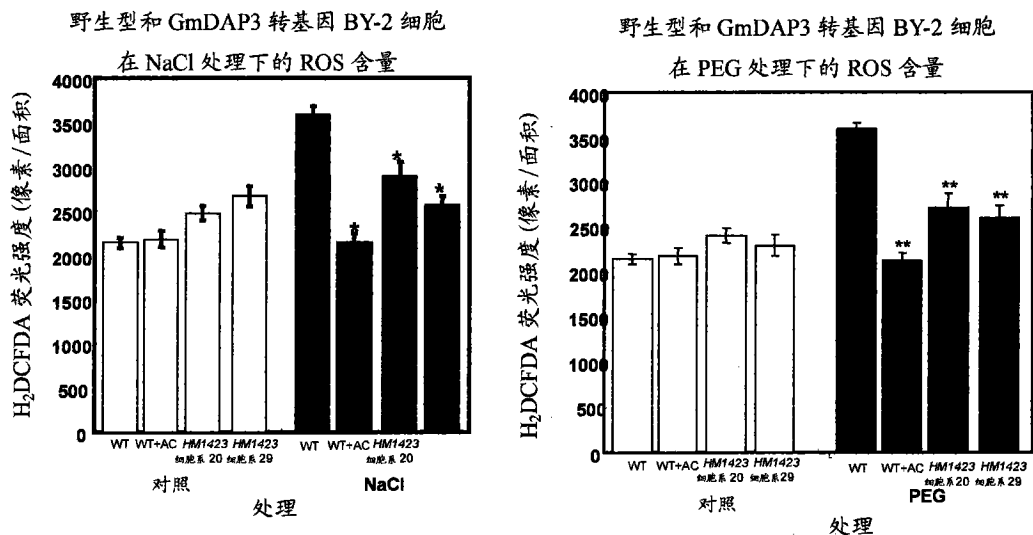


图 6

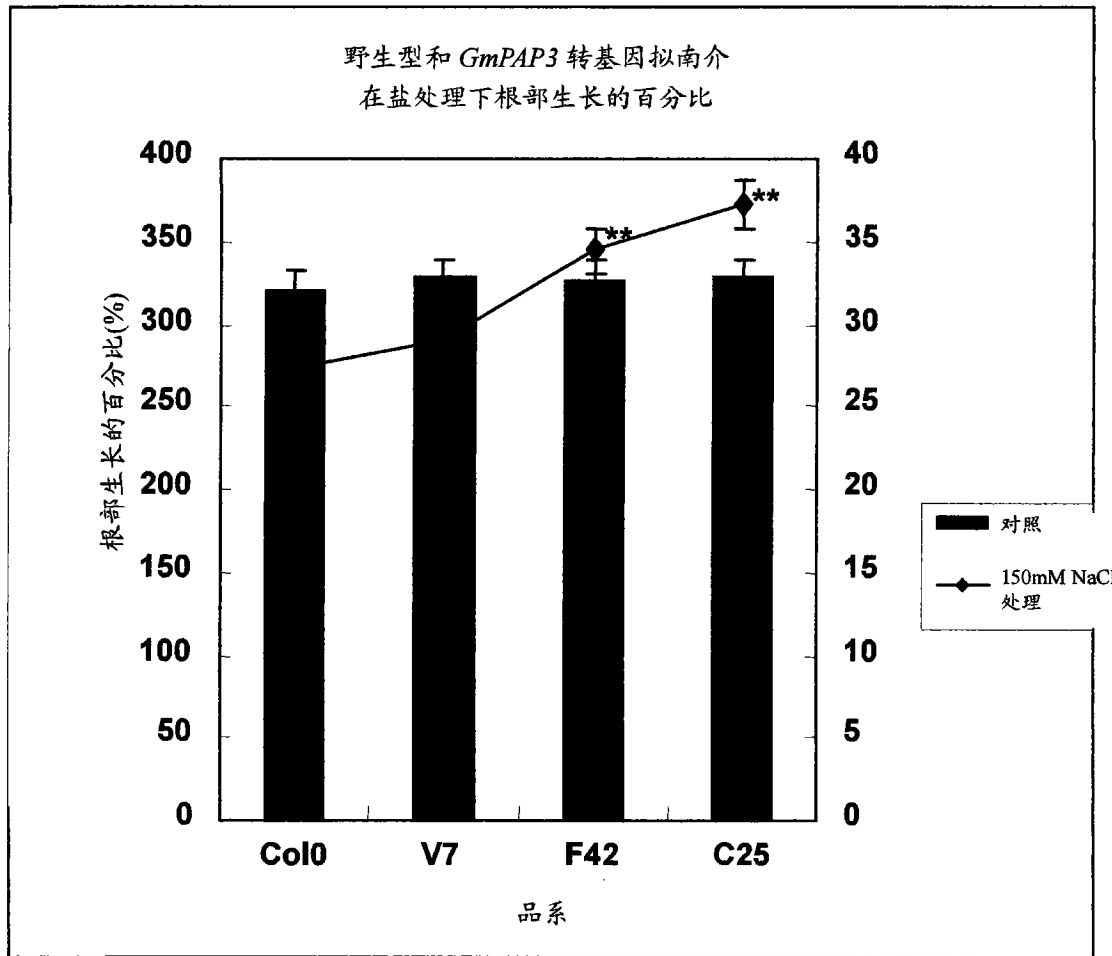


图 7

野生型和 *GmPAP3* 转基因拟南芥在 PEG 处理下根部生长的百分比

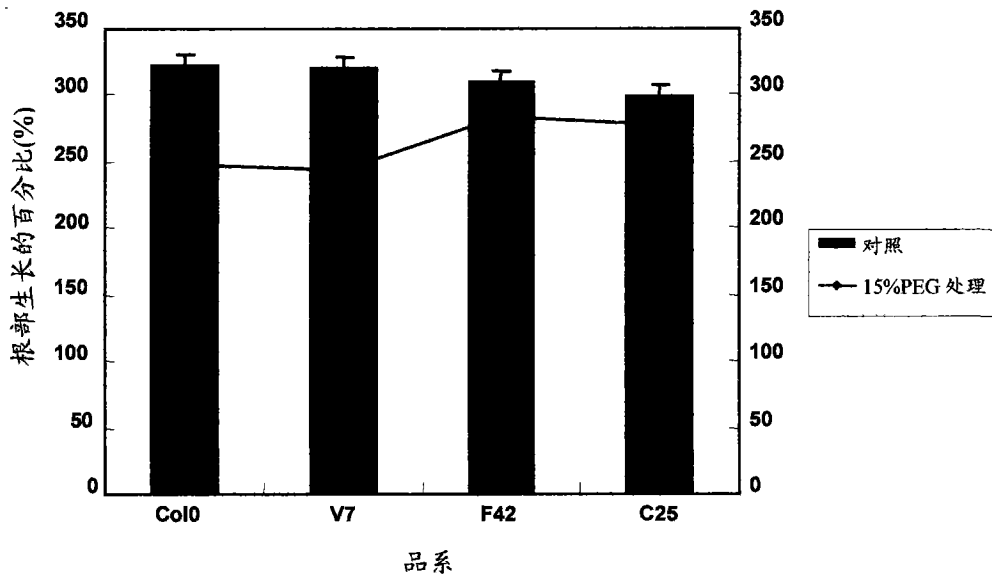


图 8

野生型和 GmPAP3 转基因拟南芥在 PQ 处理下根部生长的百分比

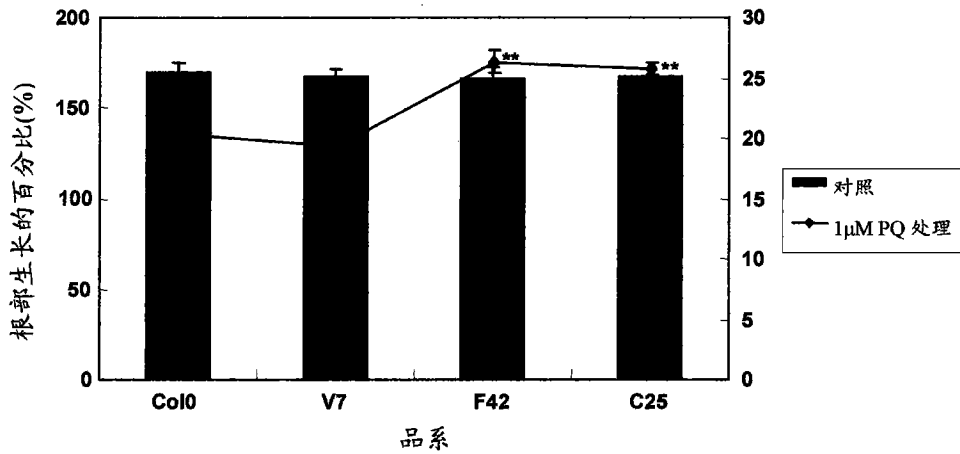


图 9

野生型和 GmPAP3 转基因拟南芥的脂质过氧化

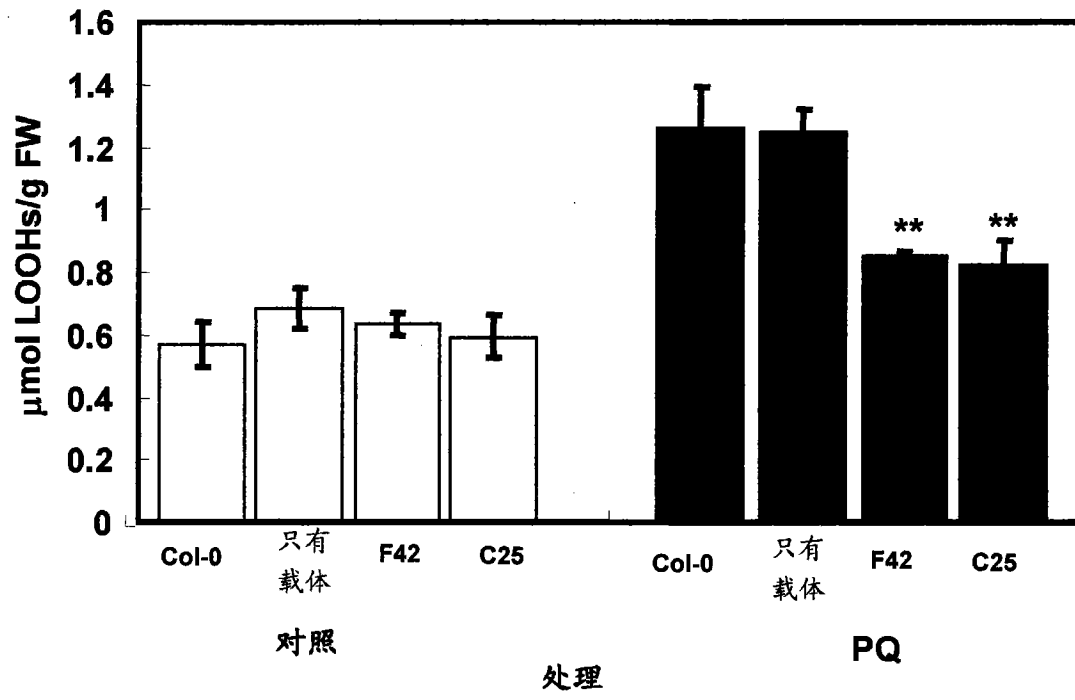


图 10