



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116656698 A

(43) 申请公布日 2023. 08. 29

(21) 申请号 202310926763.8

C12N 15/82 (2006.01)

(22) 申请日 2023.07.27

A01H 5/00 (2018.01)

A01H 6/20 (2018.01)

(71) 申请人 河南大学三亚研究院

地址 572024 海南省三亚市崖州区崖州湾  
科技城雅布伦产业园一号楼四楼402  
室

申请人 河南大学

(72) 发明人 李保珠 宋纯鹏 陈婷婷 刘炯  
田亚男 刘茹南 焦富航 李家兴  
贾腾飞 李迎雪 张翔宇

(74) 专利代理机构 河南豫龙律师事务所 41177  
专利代理师 游国战

(51) Int. Cl.

C12N 15/29 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

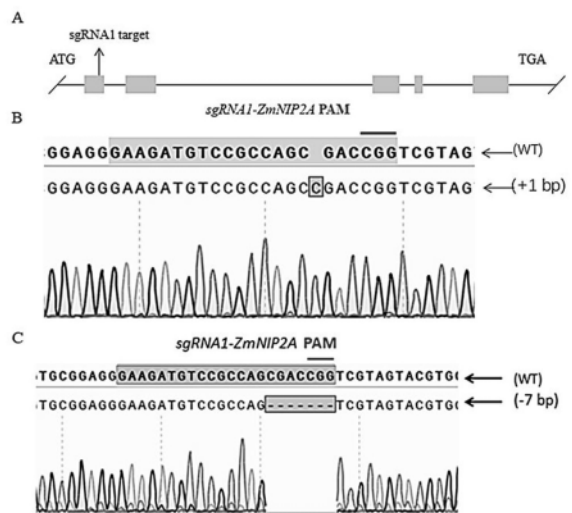
权利要求书1页 说明书6页  
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

玉米基因Zm00001d018037在提高单子叶农作物抗旱性能方面的应用

(57) 摘要

本发明属于植物生物技术领域,公开了玉米基因Zm00001d018037在提高单子叶农作物抗旱性能方面的应用,尤其是在提高玉米抗旱性能方面的应用,以及应用于种质资源改良、遗传育种、制备相应的抗旱转基因农作物中。还公开了该基因在酵母中的表达促进酵母细胞对于山梨醇引起的渗透胁迫耐性,在拟南芥中超表达促进转基因植物渗透胁迫下的萌发。本发明通过创制基因编辑突变体、转基因超表达玉米遗传材料及干旱耐性表型检测,证实了玉米基因Zm00001d018037拥有提高玉米抵御干旱胁迫的功能,从而为抗旱玉米新品系的培育及种质资源创新提供了新的技术手段,因而本发明具有重要的农业应用价值和广阔的实用前景。



1. 玉米基因Zm00001d018037在提高单子叶农作物抗旱性能方面的应用。
2. 如权利要求1所述的应用,其特征在於,所述单子叶农作物为玉米。
3. 如权利要求1或2所述的应用,其特征在於,应用于种质资源改良中。
4. 如权利要求1或2所述的应用,其特征在於,应用于遗传育种中。
5. 如权利要求1或2所述的应用,其特征在於,应用于制备相应的抗旱转基因农作物中。
6. 一种提高单子叶农作物抵御干旱胁迫反应的方法,其特征在於,将权利要求1中所述的玉米基因Zm00001d018037整合到单子叶农作物细胞、组织或器官中,并使其过量表达。
7. 如权利要求6所述的提高单子叶农作物抵御干旱胁迫反应的方法,其特征在於,所述的单子叶农作物为玉米。
8. 一种培育高抗旱玉米的方法,其特征在於,包括如下步骤:将玉米基因Zm00001d018037转化至玉米幼胚中,通过共培养、抗性筛选、愈伤组织诱导、继代和分化,获得 $T_0$ 代转基因玉米,通过连续自交及目的基因PCR检测获得稳定的 $T_3$ 代纯合转基因株系,获得过量表达玉米Zm00001d018037的玉米,即为高抗旱玉米。
9. 玉米基因Zm00001d018037在提高酵母细胞渗透胁迫耐性方面的应用,其特征在於,使玉米基因Zm00001d018037在酵母中表达,提高酵母细胞渗透胁迫耐性。
10. 玉米基因Zm00001d018037在提高拟南芥渗透胁迫下的种子萌发能力方面的应用,其特征在於,使玉米基因Zm00001d018037在拟南芥中表达,提高转基因拟南芥渗透胁迫下的种子萌发的能力。

## 玉米基因Zm00001d018037在提高单子叶农作物抗旱性能方面的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及玉米基因Zm00001d018037在提高单子叶农作物抗旱性能方面的应用,特别是在提高玉米抗旱性能方面的应用。

### 背景技术

[0002] 干旱胁迫严重影响植物的生长发育及作物的产量,已成为植物逆境胁迫的重要研究课题。玉米是全球的第一大作物,其产量和质量影响着人类社会的生存与发展,但玉米的生长发育及产量也受到干旱胁迫的严重威胁。在长期的干旱研究中,已经鉴定出许多植物干旱胁迫反应中发挥重要作用的组分,但是对于这些组分的鉴定及作用途径的研究主要是通过模式植物拟南芥等实现,在重要的农作物玉米、水稻、小麦中的干旱胁迫重要功能及提高组分的研究相对较少,鉴定它们响应干旱胁迫中的重要组分及干旱反应途径则更具理论及现实意义。

[0003] 玉米Zm00001d018037基因所编码的蛋白质属于NIP通道蛋白家族成员,玉米Zm00001d018037基因 CDS长度为885 bp,其编码295个氨基酸的NIP类通道蛋白,目前,现有技术中尚未见到有关该基因在玉米干旱胁迫反应中的研究报道。

### 发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是如何减轻干旱胁迫对单子叶农作物尤其是对玉米的生长发育及产量的影响,即如何提高玉米的抗干旱胁迫的性能。

[0005] 本发明的技术方案是:提供玉米基因Zm00001d018037在提高单子叶农作物抗旱性能方面的应用,优选于在提高玉米抗旱性能方面的应用。

[0006] 本发明还提供玉米基因Zm00001d018037应用于种质资源改良中、遗传育种中、于制备相应的抗旱转基因农作物中。

[0007] 进一步地,本发明还提供一种提高单子叶农作物干旱胁迫反应的方法,把所述的玉米基因Zm00001d018037整合到单子叶农作物细胞、组织或器官中,并使其过量表达,所述的单子叶农作物优选为玉米。

[0008] 本发明还提供一种培育高抗旱玉米的方法,包括如下步骤:将玉米基因Zm00001d018037转化至玉米幼胚中,通过共培养、抗性筛选、愈伤组织诱导、继代和分化,获得T<sub>0</sub>代转基因玉米,通过连续自交及目的基因PCR检测获得稳定的T<sub>3</sub>代纯合转基因株系,获得过量表达玉米Zm00001d018037的玉米,即为高抗旱玉米。

[0009] 由于渗透胁迫是植物遭受干旱胁迫的一个最重要的方面,本发明还提供玉米基因Zm00001d018037在提高酵母细胞渗透胁迫耐性方面的应用,使玉米基因Zm00001d018037在酵母中表达,提高酵母细胞渗透胁迫耐性。

[0010] 本发明还提供玉米基因Zm00001d018037在提高拟南芥渗透胁迫下的种子萌发能力方面的应用,使玉米基因Zm00001d018037在拟南芥中表达,提高转基因拟南芥渗透胁迫

下的种子萌发能力。

[0011] 现有技术预测玉米基因Zm00001d018037编码一个NIP通道蛋白,但关于其在植物非生物胁迫中的作用尚未有报道。发明人通过创制玉米基因Zm00001d018037基因编辑突变体株系,发现了所述的基因编辑突变体株系均引起三联体密码子移位,并通过实验揭示了玉米基因Zm00001d018037的基因编辑突变体株系,表现出干旱胁迫敏感表型,而玉米基因Zm00001d018037在转基因玉米中超表达,促进转基因玉米干旱耐性增强。表明该基因在植物应对干旱胁迫反应中发挥重要作用,从而为利用这一基因来培育干旱耐性增强的优良作物品种提供了新的技术手段。

[0012] 本发明具有如下有益效果:通过提供了玉米基因Zm00001d018037在提高单子叶农作物抗旱性能方面的应用,尤其是在提高玉米抗旱性能方面的应用,以及应用于种质资源改良、遗传育种、制备相应的抗旱转基因农作物中,以及还提供了该基因在酵母中的表达促进酵母细胞对于山梨醇引起的渗透胁迫耐性,在拟南芥中超表达促进转基因植物渗透胁迫下的萌发的技术方案,对于培育高抗旱性能方面的玉米新品种以及优良玉米种质资源的创新,提供了新的技术手段,因而本发明具有重要的农业应用价值和广阔的实用前景。

## 附图说明

[0013] 图1为对玉米基因Zm00001d018037的基本结构、基因编辑靶点位置及其基因编辑突变体Zm00001d018037-d1株系、Zm00001d018037-d2株系基因编辑类型测序鉴定的说明;其中A为对玉米基因Zm00001d018037的基本结构及基因编辑靶点位置的说明,B为对玉米基因Zm00001d018037-d1株系基因编辑类型测序鉴定的说明,C为对玉米基因Zm00001d018037-d2株系基因编辑类型测序鉴定的说明。

[0014] 图2为对严重干旱处理后玉米基因Zm00001d018037基因编辑突变体(ZmNIP2a-d1和ZmNIP2a-d2)干旱耐性检测、严重干旱处理前后植物组织含水量检测、严重干旱处理前后植物组织膜质氧化产物(MDA)积累检测的说明;其中A为对严重干旱处理后玉米基因Zm00001d018037基因编辑突变体(ZmNIP2a-d1和ZmNIP2a-d2)干旱耐性检测的说明,B为对严重干旱处理前后植物组织含水量检测的说明,C为对严重干旱处理前后植物组织膜质氧化产物(MDA)积累检测的说明。

[0015] 图3为对玉米基因Zm00001d018037超表达玉米株系转录子水平的PCR检测的说明。

[0016] 图4为对玉米基因Zm00001d018037基因编辑及转基因超表达遗传材料苗期干旱耐性表型鉴定的说明。

[0017] 图5为对ZmNIP2a在酵母中表达促进酵母渗透胁迫耐性的说明。

[0018] 图6为对ZmNIP2a基因促进模式植物拟南芥萌发过程中的渗透胁迫耐性及转ZmNIP2a基因超表达拟南芥渗透胁迫4天后的萌发率统计的说明;其中A为对ZmNIP2a基因促进模式植物拟南芥萌发过程中的渗透胁迫耐性的说明,B为对转ZmNIP2a基因超表达拟南芥渗透胁迫4天后的萌发率统计的说明。

## 具体实施方式

[0019] 下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技

术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范  
围。

[0020] 实施例所用方法如无特别说明均为本领域的技术人员所知晓的常规方法,所用的  
试剂等材料,如无特别说明,均为市售购买产品。本发明的玉米基因编辑突变体及转基因超  
表达材料来自于河南大学省部共建作物逆境适应与改良国家重点实验室玉米分子育种及  
基因编辑平台,基中玉米B73-329为实验基础材料。

[0021] 为了方便表述及实验记录的简洁明了,本发明把玉米Zm00001d018037基因简单表  
示为ZmNIP2a,其核苷酸序列为在 ST.26序列表中 NO.1所示;玉米Zm00001d018037基因的  
单核苷酸添加(+1 bp)基因编辑突变体表示为ZmNIP2a-d1,其核苷酸序列为在 ST.26序列  
表中 NO.2所示;玉米Zm00001d018037基因的片段缺失(-7 bp)基因编辑突变体表示为  
ZmNIP2a-d2,其核苷酸序列为在 ST.26序列表中 NO.3所示。

[0022] 创制基因编辑突变体及转基因超表达玉米遗传材料

(1)根据玉米 Zm00001d018037基因的基因编码序列,选择靶点(双靶点,靶点1序  
列:ACGCCGTCGGACACATCTC,靶点2序列:GAAGATGTCCGCCAGCGAC,其中以靶点1为主),根据靶  
点序列设计引物(四条引物序列分别为:Zm00001d018037MT1T2-F:AATAATGGTCTCAGGCGACG  
CCGTCGGACACATCTC;Zm00001d018037MT1T2-F0: GACGCCGTCGGACACATCTCGTTTTAGAGCTAGAA  
ATAGC;Zm00001d018037MT1T2-R0:GTCGCTGGCGGACATCTTCCGCTTCTTGGTGCC;  
Zm00001d018037MT1T2-R:ATTATTGGTCTCTAAACGTCGCTGGCGGACATCTTC),以中间载体pCBC-  
MT1T2为模板,进行四引物PCR扩增,纯化PCR扩增片段。将所扩增片段与基因编辑终载体  
pBUE411进行酶切连接,体系如下:

成分	体积 ( $\mu\text{L}$ )	反应条件
1. 纯化的 PCR 片段	2	37°C 5 小时; 50°C 5 分钟; 80°C 10 分钟
2. 基因编辑终载体 pBUE411	2	
3. 10xNEB T4 连接酶缓冲液	1.5	
4. 10xBSA	1.5	
5. Bsal (NEB)	1	
6. T4 DNA 连接酶 (NEB)/高浓度	1	
7. 去离子水	6	
8. 总体积	15	

[0023] 取5  $\mu\text{L}$ 上述液体,酶切、连接产物转化大肠杆菌感受态细胞,在含有卡那霉素的抗  
生素LB培养基上过夜培养,筛选阳性克隆。将所筛选的阳性转化菌株在液体LB培养基上进  
行摇菌过夜培养(37°C,220 rpm)。提取连接成功的重组质粒DNA,并进行测序,确认所设计  
靶点序列在重组载体中的存在。将转化构建成功的基因编辑载体至农杆菌EHA105菌株中,  
提交河南大学省部共建作物逆境适应与改良国家重点实验室玉米分子育种及基因编辑平  
台进行遗传材料创制工作。将创制的基因编辑T0代材料进行繁种,获得T1代基因编辑种质。  
种植基因编辑株系,取所述株系玉米叶片,进行DNA提取。

[0024] 具体的上述株系玉米DNA的SLS提取方法如下:取0.1 g上述株系玉米叶片置于预  
先灭菌并装有小钢珠的2 mL离心管中,于液氮中速冻;将速冻后的样品于研磨仪中以60 Hz

频率下震荡1 min,向样品中加入750  $\mu$ L的SLS DNA提取液(1% SLS,0.02 M EDTA (pH=8.0),0.1 M Tris-HCl (pH=8.0),0.1 M NaCl),剧烈震荡使其充分混匀。加入750  $\mu$ L酚:氯仿:异戊醇(25: 24: 1)并充分震荡,室温下静置5 min后于4 $^{\circ}$ C、12,000 rpm的条件下高速离心10 min;将上清液转移至1.5 mL的离心管中,并加入等体积的异丙醇,上下颠倒混匀并放于4 $^{\circ}$ C冰箱中静置30 min;4 $^{\circ}$ C、12,000 rpm条件下高速离心10 min,以沉淀DNA;用75%乙醇洗涤DNA 2次;用加入100  $\mu$ L灭过菌的超纯水溶解DNA,即可做为模板使用。以特异引物扩增(正向引物:GCAGTGC GTAGGAAGGAAGCT;反向引物:GGTGTGCGTTGTTATACGCC),对所扩增的DNA片段进行测序比对,确认所创制基因编辑株系的基因编辑类型(如图1B所示)。

[0025] (2) 基因编辑突变体干旱耐性检测:

将野生型B73-329与*ZmNIP2a-d1*、*ZmNIP2a-d2*突变体分别种植于营养钵中,每个营养钵中的营养土重量相同,在温室中进行培养。生长10天后,停止浇水,进行干旱处理,同时观察处理过程中的干旱表型。干旱处理5天后,两种基因编辑株系表现出更为严重的叶片萎蔫卷曲表型,而响应对照B73-329则无明显叶片卷曲(图2A)。检测此时植物叶片相对含水量(方法如下),两个基因编辑突变体叶片相对含水量显著低于B73-329(图2B)。活性氧积累、氧化伤害是干旱对于植物的重要危害之一。检测正常及干旱处理后B73-329与*ZmNIP2a-d1*、*ZmNIP2a-d2*突变体中膜质氧化产物丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量,结果显示,干旱处理后两个基因编辑株系组织MDA含量显著高于对照B73-329(图2C),表面受干旱胁迫危害更为严重。

[0026] 相对含水量检测方法:称取植物组织鲜重,记录为W1,然后将之置于烘箱中65 $^{\circ}$ C充分烘干,称量获得干重,记录获得W2,利用公式[相对含水量=(W1-W2)/W1\*100%]即可获得植物组织相对含水量。

[0027] MDA(膜质氧化产物丙二醛(malondialdehyde, MDA)量测定:称取0.2 g实验材料放入提前装好钢珠的离心管中,在液氮速冻后立即放入高通量组织研磨仪中,8,000 rpm震荡研磨1 min;随后加入2 mL 10%的TCA(三氯乙酸)溶液,4 $^{\circ}$ C,4,000 rpm,离心10 min,吸取1 mL上清液加入1 mL 0.5%的TBA溶液混匀,在沸水浴中反应15 min,冷却后,4 $^{\circ}$ C,10,000 rpm,离心10 min,离心后转移上清液200  $\mu$ L至酶标板中,于酶标仪中测定532 nm、600 nm和450 nm三处的吸光值并按照如下公式计算MDA含量: MDA含量( $\mu$ mol/g)=MDA浓度( $\mu$ mol/L)  $\times$  提取液体积(mL)/样本重量(g)。

[0028] (3) 转基因超表达遗传种质创制及表达检测:

利用玉米野生型B73-329的cDNA为模板,设计特异引物,(引物序列如下:

F: gcgcgccattttaataactagtATGTGCGACCAACTCGAGGTCCAAGCTC;

R: catggtggatcccataactagtCACTTGGATGTGGTCGAGCTCGTCGTC,其中小写字母为转基因超表达载体上的接头序列,大写字母为Zm00001d018037基因编码序列中的引物),进行PCR扩增,纯化回收扩增片段。将纯化回收的扩增片段与利用限制性内切酶消化的转基因超表达空载体pCMBIA3300进行连接(诺唯赞一步克隆连接)。连接产物转化大肠杆菌感受态细胞并在含有卡那霉素的固体LB培养基上进行过夜培养,从而筛选到阳性转化子。提取连接成功的重组质粒DNA,并进行测序。转化重组载体至农杆菌EHA105菌株中,提交河南大学省部共建作物逆境适应与改良国家重点实验室玉米分子育种及基因编辑平台进行转基因超表达遗传种质创制工作。

[0029] 将重组农杆菌单菌落接种于2-3 mL含有100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素和50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 利福平的液体培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜。第二天转接于50 mL含有抗生素的液体培养基中震荡培养,重新悬浮至OD600在0.8-1.0之间获得重组农杆菌悬液。采用获得的重组农杆菌悬液侵染B73-329玉米幼胚后,然后依次进行共培养、抗性筛选(抗性筛选采用除草剂草丁膦)、预分化、分化、生根,得到T0代再生植株。将T0代中的转基因植株自交,获得T1代种子,T1代种子长成的植株即为T1代植株;植株自交直至获得T3代种子,即过表达转基因植株T3代种子,将其中不同T0代再生植株自交后获得的T3代株系分别命名为OE-1和OE-2,上述过程中以玉米B73-329作为对照植株,即野生性WT。

[0030] 将野生型玉米B73-329、转基因超表达等遗传材料达玉米株系(OE-1和OE-2)各4到6株,剪取少许叶片,提取总RNA。

[0031] 具体玉米RNA的提取方法:准备装有小钢珠的1.5 mL RNase-free离心管,取约0.5 g新鲜植物叶片同时置于离心管中盖紧盖子,液氮中速冻5-10秒后立即放入高通量组织研磨仪中,8,000 rpm震荡研磨1 min,使叶片充分破碎粉末(过程中戴口罩、手套,防止外源RNase的污染);向离心管中加入1 mL冰上预冷的Trizol,并迅速上下颠倒混匀,室温静置5 min;加入200  $\mu\text{L}$ 氯仿,剧烈震荡15 s,室温放置5 min左右,放入高速离心机4 $^{\circ}\text{C}$ ,1,200 rpm离心15 min;离心后混合物分为三层,将含RNA的上层透明水相转移到无RNase的1.5 mL离心管中,缓慢吸入避免吸到中下层有机相,弃沉淀;加入等体积的异丙醇,轻轻颠倒混匀,室温下放置10-20 min,沉淀RNA;12,000 rpm,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心10 min,离心管底部少量白色沉淀即为RNA,弃上清;加入1 mL 75%乙醇,吹打漂洗沉淀,12,000 rpm,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心5 min,弃上清,重复漂洗两次;将离心管开盖倒置于超净台中,自然晾干10 min,使酒精充分挥发;向离心管中加入50  $\mu\text{L}$  DEPC处理水,充分溶解RNA,并测定浓度后用于逆转录合成cDNA。

[0032] cDNA的制备:利用诺唯赞HiScript 3 RT SuperMix for qPCR试剂盒,将提取的RNA按如下体系在RNase-free离心管中进行混合

#### 基因组DNA去除体系

体系组分	体积
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	to 16 $\mu\text{L}$
4 $\times$ gDNA wiper buffer	4 $\mu\text{L}$
模板RNA	1 pg-1 $\mu\text{g}$

轻轻吹打混匀后,使用PCR仪42 $^{\circ}\text{C}$ ,反应2 min。反应结束后在反应管中直接加入5 $\times$ HiScript qRT SuperMix。

#### [0033] 逆转录反应体系

体系组分	体积
5 $\times$ HiScript qRT SuperMix	4 $\mu\text{L}$
第一步的反应液	16 $\mu\text{L}$

轻轻吹打混匀后,使用PCR仪37 $^{\circ}\text{C}$ 反应15 min,85 $^{\circ}\text{C}$ 反应5 s。产物测量浓度后可立即用于qPCR反应,或在-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

[0034] 反转录获取cDNA,并以之为模板,用特异引物进行PCR扩增,(特异引物序列为F:5'-GTACGTACGTGTGCTAGCTAG-3';R:5'-GATGTCATGGATCTCGTTGTTG-3'),获得扩增产物,对其进行检测,获得转基因超表达株系基因相对表达量,

[0035] 以反转录试剂盒制备的cDNA为模板,利用特异引物进行PCR扩增(F:5'-GTACGTACGTGTGCTAGCTAG-3';R:5'-GATGTCATGGATCTCGTTGTTG-3'),进行转基因超表达株系转录子水平鉴定工作。

[0036] 超表达株系OE-1及OE-2中NIP2a转录子水平远高于相应对照(B73-329),结果如图2所示:转基因超表达等遗传材料达玉米株系OE-1、OE-2分别高于B73-329野生性基因相对表达量的约20、25倍以上(图3)。

[0037] 温室中条件下,土培野生型玉米(B73-329即野生性WT)、玉米 Zm00001d018037转基因超表达等遗传材料达玉米株系(OE-1和OE-2)各4到6株,为了比较,同时种植相应的基因编辑突变体株系(*ZmNIP2a-d1*; *ZmNIP2a-d2*)。正常生长10天,然后停止水分供应,进行干旱处理。干旱处理5天后,与相应对照材料野生性(B73-329即野生性WT)相比,玉米 Zm00001d018037基因编辑核苷酸缺失突变(*ZmNIP2a-d1*; 玉米 Zm00001d018037基因的编码序列移位突变体*ZmNIP2a-d2*)表现出敏感表型,耐旱性明显降低,而转基因超表达玉米株系(OE-1和OE-2)则表现为耐旱性明显增强(如图4所示),上述实验重复8次,结果完全一致。

[0038] 上述发明人的研究证实, Zm00001d018037基因的提高植物干旱胁迫反应,促进渗透胁迫耐性。该基因在植物干旱及渗透胁迫下的功能鉴定,体现出本发明的创新之处。这些成果对于促进植物干旱胁迫耐性等都具有重要的理论和生产意义。

[0039] 由于渗透胁迫是干旱胁迫的一个最重要的方面,本发明还研究了玉米 Zm00001d018037基因在酵母中表达并促进酵母在渗透胁迫条件下的生长情况。

[0040] 构建ZmNIP2a酵母表达融合载体(pYES2)载体系统,该载体中,ZmNIP2a基因受GAL启动子的驱动,而葡萄糖是该启动子抑制剂,所以在含有葡萄糖的培养基中,ZmNIP2a基因不能正常表达,在其他糖原培养基中,如在含有半乳糖的培养基中,ZmNIP2a能够表达,进而引起酵母渗透胁迫下长势的差异。

[0041] 把ZmNIP2a基因编码序列构建至pYES2所形成的融合载体中,然后,将构建好的融合载体转化至酵母(INSV1)菌株中。在含有葡萄糖的培养基上,山梨醇处理和未处理的转化子长势无明显差异,而在添加山梨醇的半乳糖酵母培养基上,随着酵母浓度梯度的稀释,携带ZmNIP2a重组转化子的酵母细胞长势显著优于转化pYES2空载体的酵母细胞,即ZmNIP2a促进了山梨醇引起的渗透胁迫下的酵母生长。(如图5所示)。

[0042] 由于渗透胁迫是干旱胁迫的一个最重要的方面,本发明还研究了玉米 Zm00001d018037基因促进拟南芥种子在渗透胁迫条件下的萌发情况。

[0043] 采用农杆菌侵染拟南芥的方法创制转ZmNIP2a基因超表达拟南芥,检测转基因超表达拟南芥株系在渗透胁迫下的表型。将正常拟南芥种子(野生型及转基因超表达)点种于MS及MS+山梨醇培养基上,种子萌发6天时的表型(A),萌发4天时萌发率统计(B)。上述实验结果表明,ZmNIP2a拟南芥中的超表达促进渗透胁迫下的萌发。“\*\*”表示差异极显著。

[0044] 与野生型拟南芥(Co1-0)相比,转基因超表达拟南芥株系(OE-4,OE-5)在种子萌发阶段表现出促进的渗透胁迫(MS+150 mM 山梨醇)耐性,生长4天时,转基因超表达株系等的萌发率显著高于WT(图6)。

[0045] 以上所述仅是本发明的优选具体实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,所做出的若干修改,都视为本发明的保护范围。



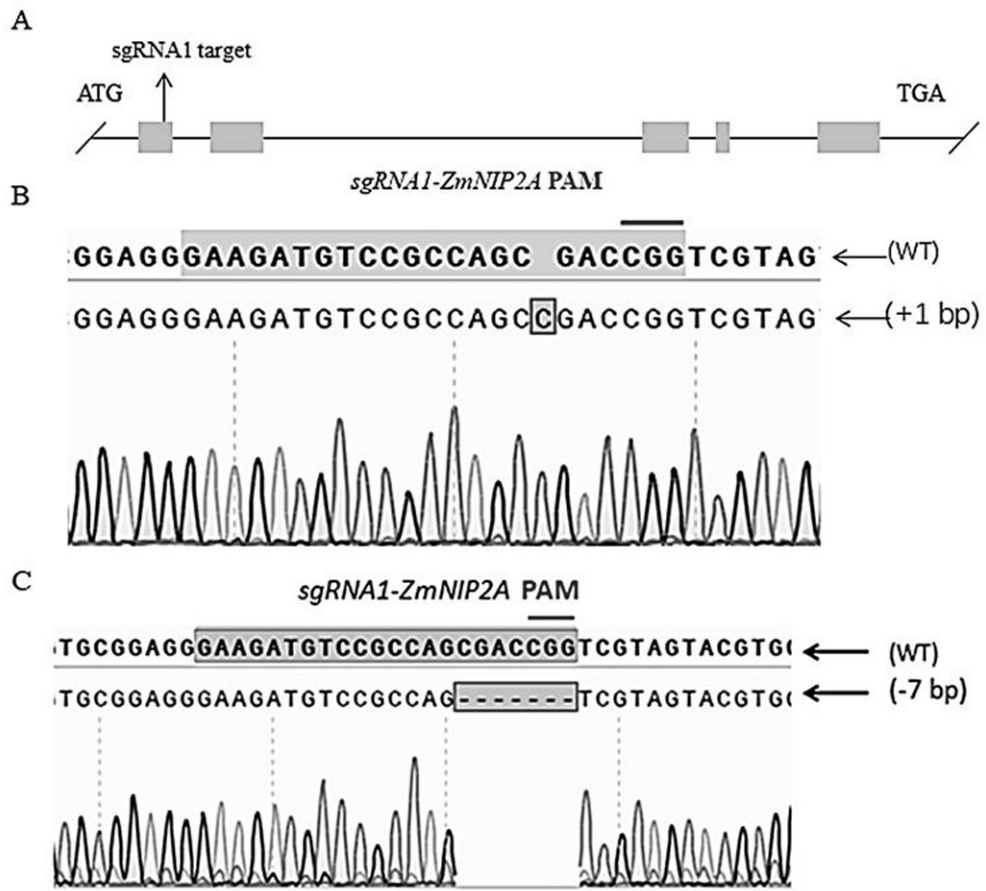


图 1

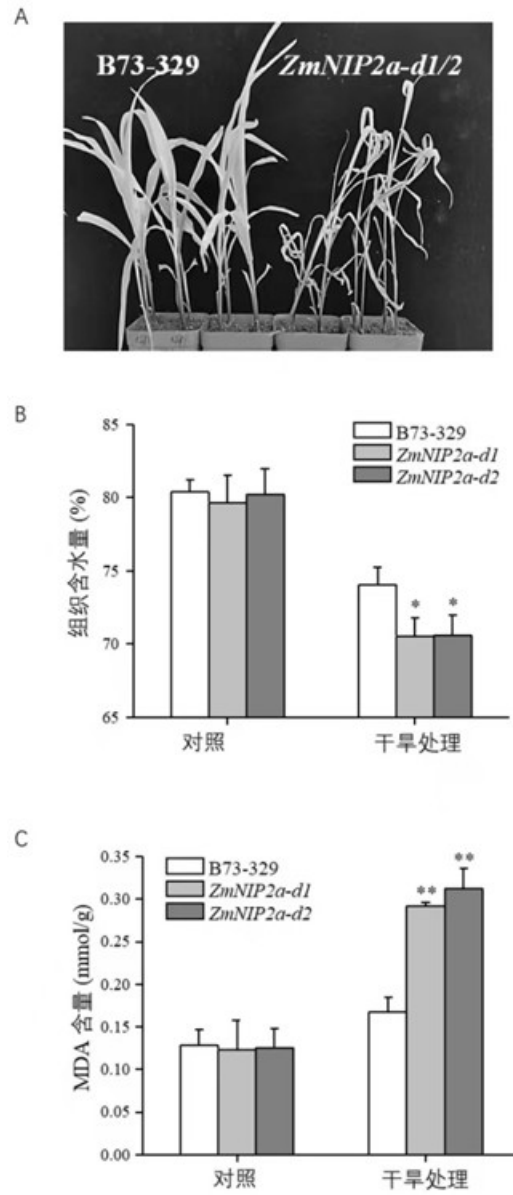


图 2

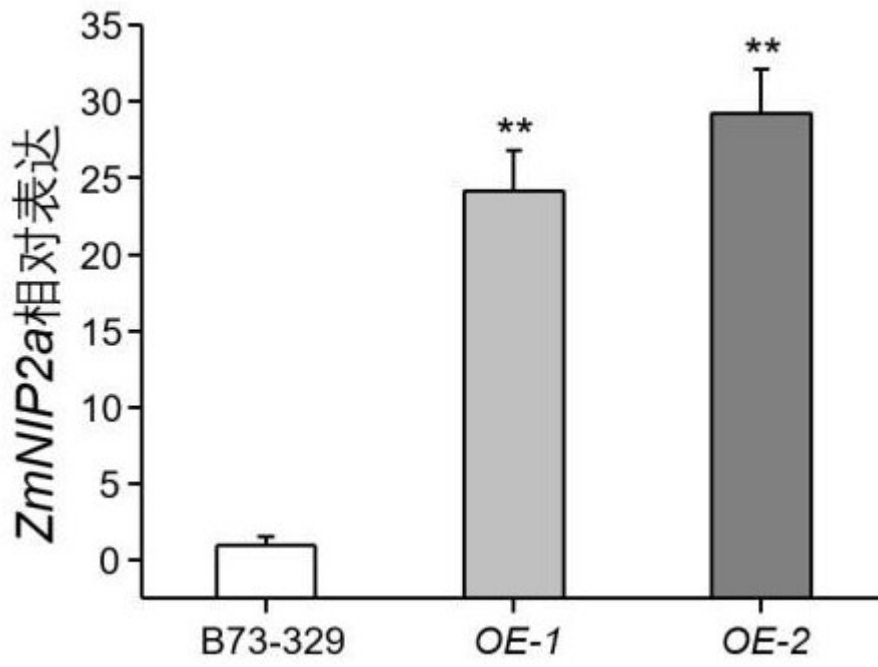


图 3

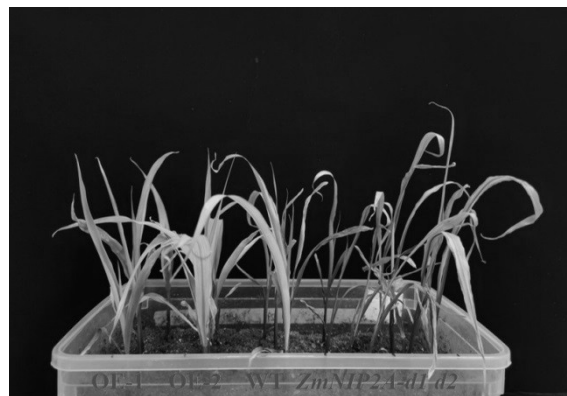


图 4

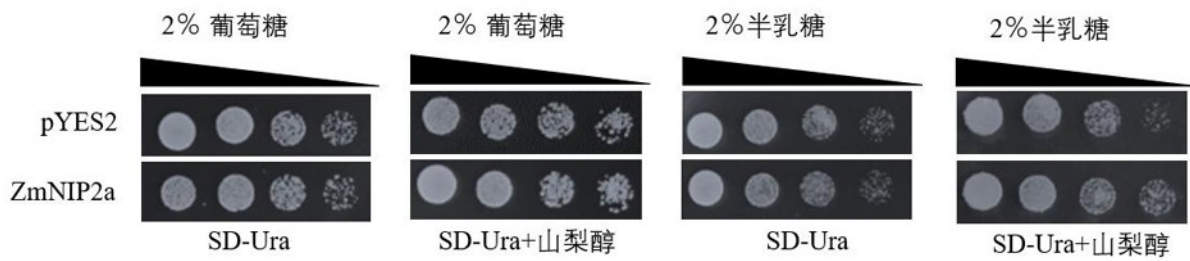


图 5

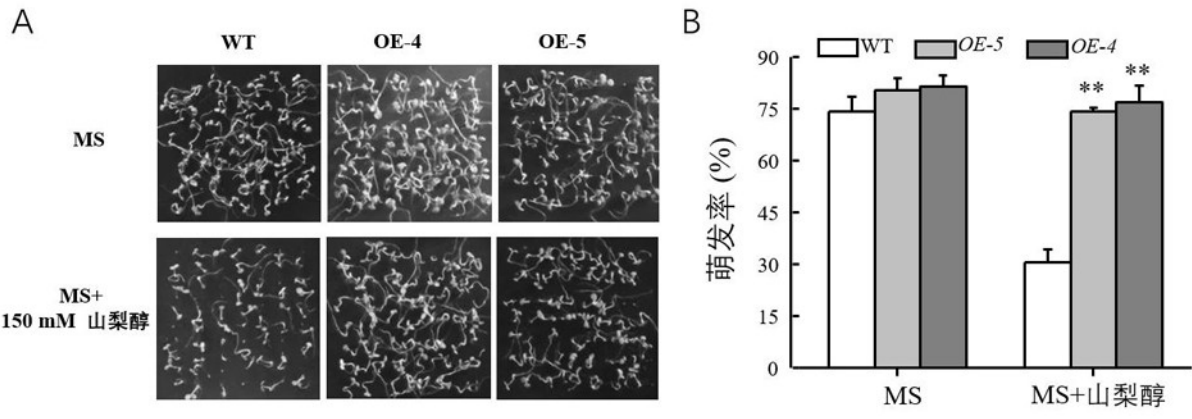


图 6