



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105505946 B

(45)授权公告日 2019.04.23

(21)申请号 201510828431.1

C07K 14/415(2006.01)

(22)申请日 2015.11.25

C12N 15/82(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A01H 5/00(2018.01)

申请公布号 CN 105505946 A

A01H 6/46(2018.01)

(43)申请公布日 2016.04.20

(56)对比文件

(73)专利权人 广东省农业科学院水稻研究所

WO 01/77355 A2,2001.10.18,

地址 510640 广东省广州市天河区金颖东  
一街3号

Patricia M. Manosalva et al..Rice 14-3-3 protein (GF14e) negatively affects cell death and disease resistance.《The Plant Journal》.2011,第68卷第777-787页.

(72)发明人 刘清 朱小源 刘斌 赵均良

Adachi,J. et al..GenBank: AK068248.1.

毛兴学 王晓飞

《NCBI》.2008,FEATURES,ORIGIN.

(74)专利代理机构 广州容大专利代理事务所

Adachi,J. et al..GenBank: AK104907.1.

(普通合伙) 44326

《NCBI》.2008,FEATURES,ORIGIN.

代理人 刘新年

审查员 王炜晨

(51)Int.Cl.

权利要求书1页 说明书4页

C12N 15/29(2006.01)

序列表3页 附图2页

(54)发明名称

一种提高水稻穗瘟抗性的基因GF14e、蛋白及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种提高水稻穗瘟抗性的基因GF14e、蛋白及其应用,所述基因具有如SEQ ID No:1所示的核苷酸序列。本发明首次证明了水稻基因GF14e是水稻穗瘟抗性的功能基因,该基因的克隆和生物学功能验证对于水稻稻瘟病抗性的分子机制研究有重要的参考意义;过表达GF14e基因的水稻转化过表达载体转化水稻后能大幅提高GF14e的表达量,伴随着表达量的提高,转化植株的稻瘟病穗瘟抗性明显增强,并且转基因植株在生长状态及农艺性状上没有明显的改变。本发明过表达GF14e的技术可以应用于水稻的基因遗传工程育种,并能够应用于生产实践中,改良水稻的稻瘟病抗性,从而保障目前水稻病害频发的气候条件下的水稻生产安全。

1. 一种提高水稻穗瘟抗性的基因GF14e在提高水稻穗瘟的抗性方面的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述基因GF14e的核苷酸序列如序列表中SEQ ID NO:1所示。
3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述基因GF14e编码一种提高水稻穗瘟抗性的蛋白,所述蛋白的氨基酸序列如序列表中SEQ ID NO:2所示。

## 一种提高水稻穗瘟抗性的基因GF14e、蛋白及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于作物遗传技术领域,更具体地,本发明涉及一种提高水稻穗瘟抗性的基因GF14e、蛋白及其应用。

### 背景技术

[0002] 由真菌Magnaporthe grisea (Hebert) Barr引起的水稻稻瘟病是世界各稻区危害最严重的水稻病害之一,对全球稻作栽培产生毁灭性的影响。全球每年因稻瘟病造成的产量损失达11~30%,直接经济损失约50亿美元,损失的粮食足以养活6000万人口。在我国,凡有水稻栽培的地方都有稻瘟病发生。南北稻区每年均受到不同程度危害,一般减产10~20%,重的达40~50%,局部田块甚至颗粒无收。

[0003] 目前,利用品种的抗性,开展稻瘟病抗性育种被认为是最经济、有效和环境友好的防治途径。近年来,育种学家们利用常规育种技术培育出了许多水稻稻瘟病抗病品种。但是,大部分抗病品种推广应用2~3年后即丧失其稻瘟病抗性。如高抗稻瘟病品种“窄叶青8号”推广种植不到三年便丧失抗性,高产抗病优质品种“粳粳89”推广不到四年,其抗病性也明显下降。由此可见,水稻品种稻瘟病抗性周期短是水稻生产中一个普遍而突出的问题,延长水稻品种稻瘟病的持性寿命已成为我国乃至各水稻生产国水稻改良中需要优先解决的问题。

[0004] 稻瘟病在水稻生长各个时期都可能发生,尤以叶瘟和穗瘟最为常见。与叶瘟相比而言,穗瘟的危害更大,最严重的时候能导致颗粒无收。尽管已有的研究表明,水稻叶瘟抗性和穗瘟抗性有共通性,但是叶瘟抗性和穗瘟抗性也有不相同的地方。我们前期在用31个近等基因系检测其叶瘟和穗瘟抗性时发现,有一些基因系有叶瘟抗性但没有穗瘟抗性,反之亦然。此外,我们在用基因芯片技术挖掘水稻叶瘟和穗瘟响应的基因时发现,至少有40%的基因在叶瘟和穗瘟接种后的表达模式是不同的。

[0005] 综合以上的研究表明,水稻叶瘟抗性和穗瘟抗性在某种程度上是不同的。因此,为了解决水稻抗病性周期短的问题,解决水稻的穗瘟抗性也显得尤其重要。然而目前已知的研究基本上都是针对水稻叶瘟抗性的,而对穗瘟抗性的研究则非常少。目前,为了提高水稻的稻瘟病抗性,对于水稻穗瘟抗性的研究刻不容缓。

### 发明内容

[0006] 基于此,为了克服上述现有技术的缺陷,本发明提供了一种提高水稻穗瘟抗性的基因GF14e、蛋白及其应用。

[0007] 为了实现上述发明目的,本发明采取了如下具体的技术方案:

[0008] 一种提高水稻穗瘟抗性的基因GF14e,所述基因具有如SEQ ID No:1所示的核苷酸序列。

[0009] 本发明还提供了一种提高水稻穗瘟抗性的蛋白,所述蛋白具有如SEQ ID No:2所示的氨基酸序列。

- [0010] 在其中一些实施例中,所述蛋白由如SEQ ID No:1所示的核苷酸序列编码。
- [0011] 本发明还提供了所述提高水稻穗瘟抗性的基因GF14e在提高水稻穗瘟抗性方面的应用。
- [0012] 14-3-3基因家族是一类非常重要的防卫基因,在植物的抗病中发挥了重要作用。在水稻中,14-3-3基因家族共包括8个成员,即GF14a-h。已有的研究表明,GF14e在水稻叶瘟抗性中发挥负向的调控作用。用RNAi技术沉默GF14e 的表达会导致水稻叶片的稻瘟病抗性增加。然而,本发明的发明人在用基因芯片技术挖掘水稻叶瘟和穗瘟响应的基因时发现,GF14e在叶瘟和穗瘟接种后的响应是不同的。叶瘟接种后,GF14e的表达水平下调,这与之前的研究结果是一致的,但在穗瘟接种后,GF14e的表达水平却是上调的,这表明其在叶瘟和穗瘟抗性中可能发挥相反的作用。因此,GF14e有可能在穗瘟抗性中发挥正向的调控作用。
- [0013] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:
- [0014] 1. 本发明首次证明了水稻基因GF14e是水稻穗瘟抗性的功能基因,该基因的克隆和生物学功能验证对于水稻稻瘟病抗性的分子机制研究有重要的参考意义;
- [0015] 2. 本发明提供了利用Camv35S启动子过表达GF14e基因的水稻转化过表达载体。该载体转化水稻后能大幅提高GF14e的表达量,伴随着表达量的提高,转化植株的稻瘟病穗瘟抗性明显增强,并且转基因植株在生长状态及农艺性状上没有明显的改变。因此,本发明通过Camv35S启动子过表达GF14e的技术可以应用于水稻的基因遗传工程育种,并能够应用于生产实践中,改良水稻的稻瘟病抗性,从而保障目前水稻病害频发的气候条件下的水稻生产安全。

#### 附图说明

- [0016] 图1为实施例1中所使用的过表达载体PHQSN的载体图谱;
- [0017] 图2为实施例2的转基因植株中GF14e表达水平检测图;
- [0018] 图3为实施例3中过表达GF14e对水稻植株的穗瘟抗性的影响,其中\*\* 表示与对照相比存在极显著差异。

#### 具体实施方式

- [0019] 以下实施例是对本发明的进一步说明,而不是对本发明的限制。下列实施例中未注明具体实验条件和方法,所采用的技术手段通常为本领域技术人员所熟知的常规手段。
- [0020] 实施例1提高水稻穗瘟抗性的基因及过表达载体的构建
- [0021] (1)、取水稻稻瘟病高抗品种三黄占2号(SHZ-2)的幼苗叶片部位,用TriZol Reagent (Invitrogen公司,其货号为:15596026)提取叶片总RNA,采用甲醛变性凝胶电泳和紫外分光光度计检测总RNA的纯度及量;
- [0022] (2)、取1 $\mu$ g的总RNA做起始逆转录反应,所采用的逆转录酶为PrimeScript (TAKARA公司),逆转录反应的步骤参考该逆转录酶的使用说明。以逆转录产物为模板,采用引物:F,ACGCGTCGACATATCTGGCCCAAGAGCAGTA (SEQ ID No:3);R,GGAATTCAGGCTCACAACCTGACA TACCG (SEQ ID No:4),进行PCR扩增,PCR所用的聚合酶为KOD FX (Toyobo公司)。反应体系为50 $\mu$ L,按照KOD FX的说明书配制PCR反应体系。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 30sec, 57 $^{\circ}$ C 30sec, 68 $^{\circ}$ C 80sec, 35个循环; 68 $^{\circ}$ C 10min。PCR扩增获得约1268bp的片段;

[0023] (3)、采用PCR产物直接纯化的方法回收该片段后,用SalI和EcoRI对片段和PHQSN载体(其载体图如图1所示,本领域技术人员可以参考文献:拟南芥AtNHX5基因的cDNA克隆及其正义、反义表达载体的构建;石乐义,李洪清,李美茹,陈贻竹;植物生理学通讯,2005年,第41卷,第5期构建而得)分别进行双酶切,37℃酶切6小时,酶切后分别回收目标片段和载体片段,用T4连接酶(NEB公司)16℃连接过夜,连接体系为:T4连接酶1ul,10×buffer 1ul,GF14e基因片段4ul(51ng),PHQSN载体2ul(50ng),灭菌水2ul;

[0024] (4)、取全部连接产物,用电击法转化到大肠杆菌DH5α中,转化产物涂布卡那霉素抗性的LB固体培养基。37℃培养过夜,挑6个阳性白色单克隆进行提取质粒,酶切鉴定,选择两个阳性克隆进行测序。测序结果表明:该序列全长1268个碱基,包含一个开放阅读框,即为GF14e基因,其大小为789个碱基,其核苷酸序列如SEQ ID No:1所示,其编码蛋白具有262个氨基酸残基,其氨基酸序列如SEQ ID No:2所示。

[0025] 实施例2 GF14e基因在转基因植株中的过表达效果鉴定

[0026] 采用农杆菌EHA105介导的遗传转化方法将过表达载体转入正常粳稻品种日本晴中。转化原代(T<sub>0</sub>代)通过PCR及定量PCR检测,从DNA水平和RNA水平鉴定阳性转化植株,证明目标基因GF14e已经转化入水稻中,并且实现目标基因GF14e的表达量提高。

[0027] 在受控的温室中把转基因阳性植株自交得到纯合阳性转基因1代(T<sub>1</sub>代)株系,每个株系选择10株经PCR检测为阳性的植株繁种,得到T<sub>2</sub>代植株,T<sub>2</sub>代株系再进行PCR检测,找到来源于不同T<sub>0</sub>代植株的T<sub>2</sub>代纯合株系3个(5-1、12-1、12-2)。对3个株系的幼苗叶片进行荧光定量PCR,检测目标基因GF14e的表达量,以野生型结果为对照。

[0028] 荧光定量PCR鉴定GF14e基因在转基因植株中过表达效果程序如下:

[0029] 1、取PCR检测阳性的转基因植株始穗期的小穗进行总RNA提取,采用的试剂为TriZol Reagent(Invitrogen公司,其货号为:15596026),根据该试剂的说明书的步骤进行,并用甲醛变性凝胶电泳和紫外分光光度计检测总RNA的纯度及量;

[0030] 2、取1μg的总RNA做起始逆转录反应,所采用的逆转录酶为PrimeScript(Takara公司),逆转录反应的步骤参考该逆转录酶的使用说明。以逆转录产物为模板,采用引物GF14eF和GF14eR引物对检测GF14e基因的表达情况;引物序列如下:GF14eF,GATATTGCCCTGGCAGAGTTG(SEQ ID No:5);GF14eR,GAGATATCGGAAGTCCACAGC(SEQ ID No:6);

[0031] 3、采用水稻管家基因EF1α基因的EF1αF和EF1αR引物对检测水稻EF1α基因的表达作为内参,定量PCR试剂为SYBR®Premix Ex Taq™(TAKARA),定量PCR仪器为CFX 96(BioRAD公司),

[0032] EF1αF,TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT(SEQ ID No:7);

[0033] EF1αR,GACTTCCTTCACGATTTTCATCGTAA(SEQ ID No:8)。

[0034] 3个转基因纯合株系(5-1、12-1、12-2)和野生型植株中GF14e的相对mRNA表达水平结果如图2所示,图2结果表明3个株系相对于野生型,GF14e的表达量都大幅度提高10-40倍。

[0035] 实施例3 GF14e过表达转基因植株稻瘟病穗瘟抗性的鉴定

[0036] 把实施例2中纯合的3个过表达转基因T<sub>2</sub>代纯合株系(5-1、12-1、12-2)和野生型水稻种子在32℃发芽,2天后将幼芽分别移至装有泥土的塑料盘中播种,待其长到3叶期时

将幼苗移栽到大型塑料桶中,每桶种4株,每个株系至少种10株。网室中自然生长至抽穗期进行接种。采用的稻瘟病菌株为日本晴敏感的GD08-T13。

[0037] 待稻穗抽出2~8cm左右时,用手播出稻穗,取小片棉花包裹住稻穗的下缘1/3处,然后吸取2ml的孢子液( $1 \times 10^6$  spores/ml)注入到棉花中,棉花外面用锡箔纸包裹以防菌液蒸发。在网室中,每隔2小时喷水2分钟,以保证湿度利于孢子萌发。3周后调查发病结果。结果见图3所示,图3结果表明GF14e 过表达株穗瘟抗性明显增强,与野生型相比,稻穗主轴的感病长度明显减小。

[0038] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

## 序列表

<110> 广东省农业科学院水稻研究所

<120> 一种提高水稻穗瘟抗性的基因 GF14e、蛋白及其应用

<130> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 789

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

[0001]

```

atgtcgcagc ctgctgagct ttcccgtgag gagaatgtgt acatggctaa gcttgcagag      60
caggccgaga ggtatgagga gatggttgag ttcattgaga aggttgctaa gacagttgac      120
tctgaggagc tcaactgttga ggagcgcAAC cttctatcag ttgcttacia gaatgttatt      180
ggtgctcgcc gtgcgtcatg gcgcatacata tcatccattg aacagaagga agagagccgt      240
ggtaatgagg atcgttgcac gctcatcaag gaatacaggg gaaagattga aactgagctc      300
tccaagatct gtgatggcat cctcaagctt cttgactccc accttgtgcc ttcattcaact      360
gctccagagt ccaaggtctt ctacctcaag atgaaaggcg actactacag gtacctcgca      420
gagtttaaga ctggagctga gaggaaggat gctgctgaga acaccatggt ggcatacaaa      480
gccgctcagg atattgccct ggcagagttg cccccaactc atcctatcag acttgggctg      540
gccctcaact tctcgggtgtt ttattacgag atcctcaact ctctgaccg tgcttgaat      600
cttgcaaagc aggctttcga tgaggctatc tcagagctgg aactctgag tgaggaatcc      660
tacaaggaca gcactttgat catgcagctt ctgcgtgata acctgacgct gtggacttcc      720
gatatctcgg aggatgctgc tgaggaaatc aaggaggccc ccaagggcga atcaggagat      780
ggacagtga

```

<210> 2

<211> 262

[0002]

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 2

MSQPAELSRE ENVYMAKLAE QAERYEEMVE FMEKVAKTVD SEELTVEERN LLSVAYKNVI	60
GARRASWRII SSIEQKEESR GNEDRCTLIK EYRGKIETEL SKICDGILKL LDSHLVPSST	120
APESKVFYLYL MKGDYYRYLA EFKTGAERKD AAENTMVAYK AAQDIALAEL PPTHPIRLGL	180
ALNFSVFYYE ILNSPDRACN LAKQAFDEAI SELDTLSEES YKDSTLIMQL LRDNLTLWTS	240
DISEDAEEI KEAPKGESGD GQ	262

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 3

acgcgctcgac atatctggcc caagagcagt a	31
-------------------------------------	----

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 4

ggaattcagg ctcaactg acataccg	28
------------------------------	----

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 5



[0003]

gatattgccc tggcagagtt g 21

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 6

gagatatcgg aagtccacag c 21

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 7

tttcactcctt ggtgtgaagc agat 24

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 8

gacttccttc acgatttcat cgtaa 25

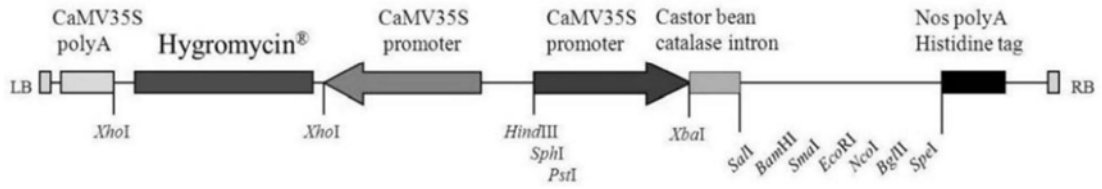


图1

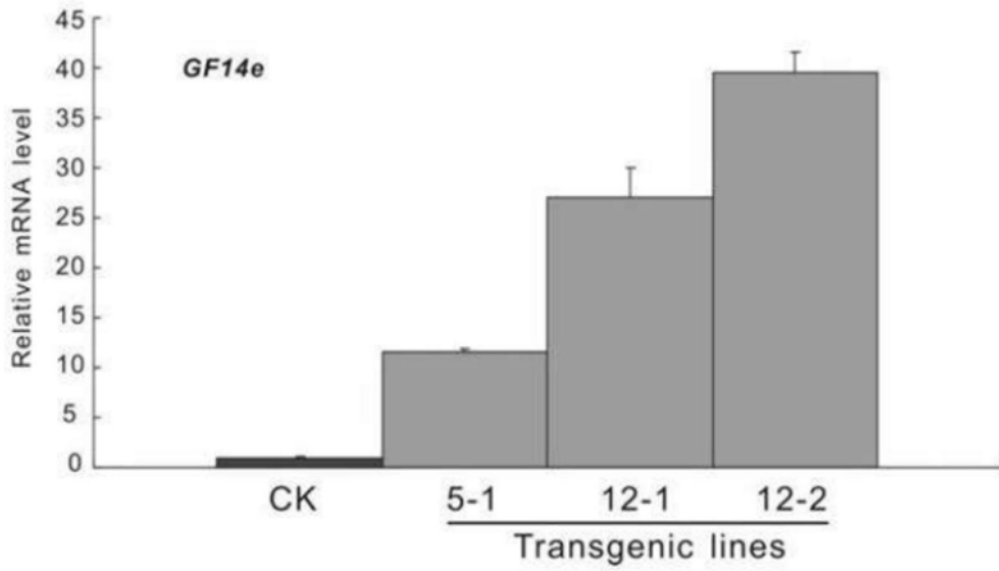


图2

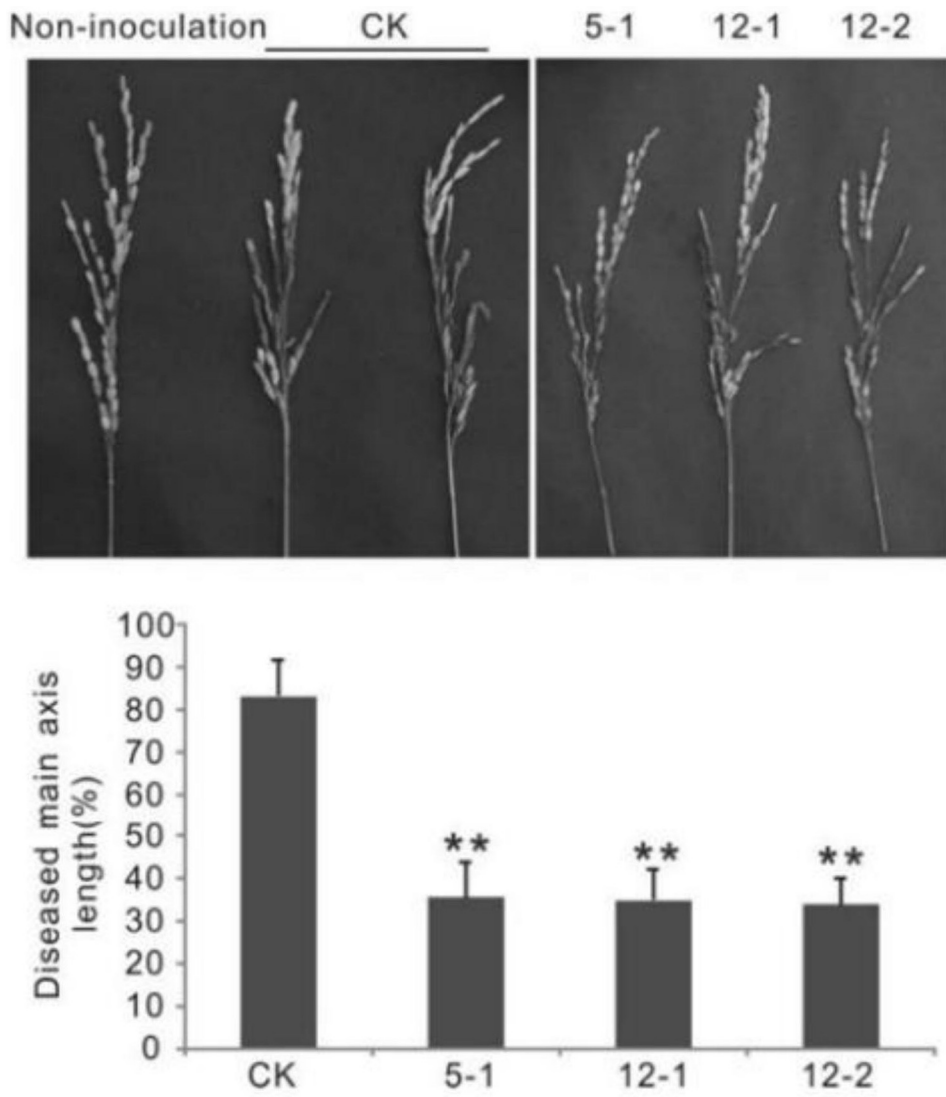


图3