

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020年9月17日 (17.09.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/182221 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 14/415 (2006.01) *C12N 15/31* (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01) *A01H 5/00* (2018.01)
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 1/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/082732

(22) 国际申请日: 2020年4月1日 (01.04.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201910174451.X 2019年3月8日 (08.03.2019) CN

(71) 申请人: 广东省农业科学院植物保护研究所 (PLANT PROTECTION RESEARCH INSTITUTE OF GUANGDONG ACADEMY OF AGRICULTURAL

SCIENCES) [CN/CN]; 中国广东省广州市天河区金颖路7号, Guangdong 510640 (CN)。

(72) 发明人: 汪聪颖(WANG, Congying); 中国广东省广州市天河区金颖路7号, Guangdong 510640 (CN)。朱小源(ZHU, Xiaoyuan); 中国广东省广州市天河区金颖路7号, Guangdong 510640 (CN)。陈深(CHEN, Shen); 中国广东省广州市天河区金颖路7号, Guangdong 510640 (CN)。苏菁(SU, Jing); 中国广东省广州市天河区金颖路7号, Guangdong 510640 (CN)。曾列先(ZENG, Liexian); 中国广东省广州市天河区金颖路7号, Guangdong 510640 (CN)。汪文娟(WANG, Wenjuan); 中国广东省广州市天河区金颖路7号, Guangdong 510640 (CN)。冯爱卿(FENG, Aiqing); 中国广东省广州市天河区金颖路7号, Guangdong 510640 (CN)。杨健源(YANG, Jianyuan); 中国广东省

(54) Title: RICE BACTERIAL LEAF STREAK-RESISTANT PROTEIN, AND ENCODING GENE AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种水稻抗白叶枯病蛋白及其编码基因与应用

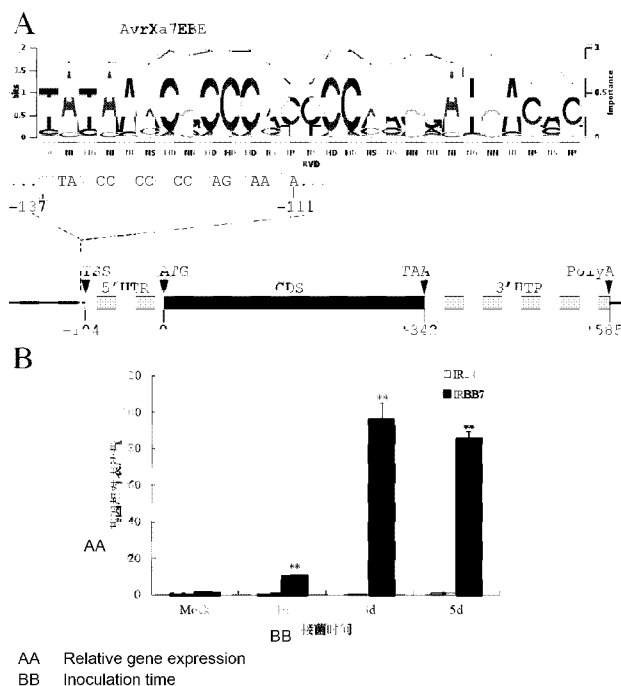


图 2

(57) Abstract: Provided is a rice bacterial leaf streak-resistant protein Xa7 protein, the amino acid sequence thereof being as shown in SEQ ID NO.1; the nucleotide sequence of the gene encoding said rice bacterial leaf streak-resistant protein is as shown in SEQ ID NO.2; and same is applicable in researching the mechanisms of rice bacterial leaf streak resistance, and is used for cultivating rice varieties resistant to rice bacterial leaf streak or for cultivating other disease-resistant crops.

WO 2020/182221 A1

广州市天河区金颖路7号, Guangdong 510640 (CN)。封金奇(FENG, Jinqi); 中国广东省广州市天河区金颖路7号, Guangdong 510640 (CN)。陈炳(CHEN, Bing); 中国广东省广州市天河区金颖路7号, Guangdong 510640 (CN)。伍圣远(WU, Shengyuan); 中国广东省广州市天河区金颖路7号, Guangdong 510640 (CN)。张梅英(ZHANG, Meiyang); 中国广东省广州市天河区金颖路7号, Guangdong 510640 (CN)。

(74) 代理人: 广州市华学知识产权代理有限公司(GUANGZHOU HUAXUE INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国广东省广州市天河区黄埔大道西100号之一富力盈泰广场A栋16楼1601-1605、1609-1611房, Guangdong 510627 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括关于请求恢复一项或多项优先权要求的信息, 受理局正就恢复优先权的请求作出决定, 一经收到将另行公布(细则26之二. 3和48. 2(j))。
- 包括说明书序列表部分(细则5. 2(a))。

(57) 摘要: 提供一种水稻抗白叶枯病蛋白Xa7蛋白, 其氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示, 编码该水稻抗白叶枯病蛋白的基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示, 可用于研究水稻抗白叶枯病的机制, 用于培育对水稻白叶枯病具有抗病性的水稻品种或者其它抗病性作物。

一种水稻抗白叶枯病蛋白及其编码基因与应用

技术领域

本发明属于生物技术领域，特别一种水稻抗白叶枯病蛋白及其编码基因与应用。

背景技术

白叶枯病 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo)) 是我国以及世界稻米主产区东南亚水稻的主要病害之一，严重威胁稻米安全生产。利用寄主抗性是控制该病害的有效措施。然而，由于病菌致病性变异，常造成品种抗性丧失，品种抗性的持效性及其机制成为当今抗病性研究的一个关键点，深入了解持久抗病性分子机制，对水稻品种获得持久抗性，持续有效地控制病害有着重要意义[伍尚忠, 1982, 《水稻白叶枯病及其防治》，上海科技出版社; Mew, 1987, Current status and future prospects of research on bacterial blight of rice. Ann. Rev. Phytopathol., 25: 359-382.]。在已鉴定的白叶枯病抗性基因中，*Xa7*被认为是一个持久抗病基因，能有效抵抗不同的致病型病原菌，在世界众多国家表现出优异而稳定的抗性[Ona *et al.*, 1998, Epidemic development of bacterial blight on rice carrying resistance genes *Xa-4*, *Xa-7*, and *Xa-10*. Plant Dis., 82: 1337-1340.; Adhikari *et al.*, 1999, Virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* on rice lines containing single resistance genes and gene combinations. Plant Dis., 83: 46-50; Vera *et al.*, 2000, Predicting durability of a disease resistance gene based on an assessment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. Proc. Natl. Acad. Sci., 97: 13500-13505.; 曾列先等, 2006, 水稻抗白叶枯病近等基因系对华南菌系的抗性研究. 植物病理学报, 36: 177-180]。

*Xa7*基因最初是由国际水稻所 (IRRI) 在水稻品种DV85上鉴定出来的[Sidhu *et al.*, 1978 Genetic analysis of bacterial blight resistance in seventy-four cultivars of rice, *Oryza sativa* L. Theor Appl Genet, 53: 105-111.]。Ogawa等通过DV85与IR24重复回交，把基因*Xa7*导入近等基因系IRBB7中[Ogawa *et al.*, 1991, Breeding of near-isogenic lines of rice with single genes for resistance to bacterial blight pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. Jpn J Breed, 41: 523-529.]。Hopkins等研究表明*Xa7*是与一个无毒基因家族直接相对应的显性抗性基因[Hopkins *et al.*, 1992, Identification of a family of avirulence genes from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Mol Plant Microbe Interact, 5: 451-459.]，Kaji and Ogawa 将该基因标记定位于第6染色体RGP图谱107.5 cM位置，与G1091标记的重组率为8%[Kaji R and Ogawa T. Identification of the located chromosome of the resistance gene, *Xa-7*, to bacterial leaf blight in rice. Breed. Sci., 1995, 45(Suppl. 1):79.]，Porter等对*Xa7*进行了精细定位，但由于当时水稻基因组测序尚为完善，无法对目标基因区域的候选基因进行分析及预测[Porter *et al.*, 2003, Development and mapping of markers linked to the rice bacterial blight resistance gene *Xa7*. Crop Science, 43: 1484-1493.]。本课题组通过大群体分析，将*Xa7*基因更精细地界定于分子标记GDSSR02和RM20593之间，同样由于水稻基因组已测序品种代表性的局限，该基因定位的区域存在较大间隙 (Gap)，仍然未能克隆目的基因 [Chen *et al.*, High-resolution mapping and gene prediction of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* resistance gene *Xa7*. Molecular Breeding, 2008, 3: 433-441.]。

发明内容

本发明的首要目的在于克服现有技术的缺点与不足，提供一种水稻抗白叶枯病蛋白。

本发明的另一目的在于提供编码上述水稻抗白叶枯病蛋白的基因。

本发明的再一目的在于提供上述基因的启动子区病原诱导调控元件。

本发明的再一目的还在于提供上述蛋白、基因以及启动子区病原诱导调控元件的应用。

本发明的目的通过下述技术方案实现：一种水稻抗白叶枯病蛋白，名称为Xa7蛋白，其氨基酸序列如下所示：

MAAADHPDRMPVAVAGLRHHYAFPANLRPAARLLTVNSGVFLISTAGAIVLVHTAGNPPAIDNDPAYALVAFVFLFL
LGIWLMSIALVADQFPRAAGVAVAIARALQDYLIIGN.

编码上述水稻抗白叶枯病蛋白的基因，名称为Xa7基因，其核苷酸序列如下所示：

ATGGCGGCCGCTGATCATCCTGATCGTATGCCCGTTGCAGTTGCAGGCTTGCGCCACCATTACGCCTTCCCTGCAA
ACCTTCGCCCCGCCGCTCGACTGCTGACCGTCAACTCCGGCGTCTTCCCTCATCTCCACCGCCGGGCCATCGTCCTCGTC
CACACCGCCGTAACCCACCCGCCATCGACAACGATCCAGCCTACGCCTTGGTGCATTCGTGCTCTTCCCTCGGAAT
CTGGCTCATGTCTATTGCCCTCGTCGCCGACCAGTTCCCGCGCGCCGCTGGGGTCGCCGTTGCCAGGGCGCTGC
AGGATTACCTCATCGGTGGCAATTAA.

编码上述水稻抗白叶枯病蛋白的基因的启动子区病原诱导调控元件，其核苷酸序列如下所示：TATAACCCCCCCCCCCCCAGATAACCA。

所述的水稻抗白叶枯病蛋白可通过化学合成法合成得到；或是通过将编码所述的水稻抗白叶枯病蛋白的基因克隆入表达载体中，得到的重组表达载体转化宿主细胞，表达后纯化得到。

所述的编码水稻抗白叶枯病蛋白的基因的制备，可通过以下方式实现：通过化学合成方式获得；或者设计引物，以DV85、IRBB7或其他携带Xa7基因的水稻品种基因组DNA为模板，PCR扩增获得；或者从携带Xa7基因的质粒中酶切、筛选获得。

所述的编码水稻抗白叶枯病蛋白的基因的应用，可用于研究水稻抗白叶枯病的机制，也可用于培育对水稻白叶枯病具有抗病性的水稻品种或者其它抗病性作物，或是将其作为分子标记，用于选育对水稻白叶枯病具有抗病性的水稻品种。

所述的用于培育对水稻白叶枯病具有抗病性的水稻品种或者其它抗病性作物的步骤优选如下：将上述编码水稻抗白叶枯病蛋白的基因和上述启动子区病原诱导调控元件导入易感病的水稻或其它作物中，得到具有抗病性的水稻或抗病性作物；或者将组成型表达启动子或其它病原诱导型启动子与上述基因的编码序列串联，导入易感病的水稻或其它作物中，得到具有抗病性的水稻或抗病性作物。

所述的用于选育对水稻白叶枯病具有抗病性的水稻品种的步骤优选如下：将携带上述基因的水稻品种作为供体亲本，与易感白叶枯病的水稻品种进行花粉杂交，得到的一系列后代利用Xa7作为分子标记进行筛选，鉴定得到抗白叶枯病水稻品种。

所述的供体亲本优选为DV85或IRBB7。

编码上述水稻抗白叶枯病蛋白的基因的启动子区病原诱导调控元件的应用，可用于研究水稻抗白叶枯病的机制，也可用于培育对水稻白叶枯病具有抗病性的水稻品种或者其它抗病性作物。

所述的用于培育对水稻白叶枯病具有抗病性的水稻品种或者其它抗病性作物的步骤优选如下：将上述编码水稻抗白叶枯病蛋白的基因和上述启动子区病原诱导调控元件导入易感病的水稻或其它作物中，得到具有抗病性的水稻或抗病性作物；或者将上述启动子区病原诱导调控元件与其它抗病基因编码序列串联，导入易感病的水稻或其它作物中，得到具有抗病性的水稻或抗病性作物。

本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果：

本发明是在前期研究基础上，通过构建水稻品种IRBB7的基因组BAC文库，文库筛选、候选插入片段测序、目标插入片段序列对AvrXa7识别位点预测、以及一系列的转基因功能互补试验、基因敲除试验，最终完成了Xa7功能基因的克隆。本发明首次提供了Xa7功能基因的序列。

附图说明

图1是亚克隆片段位置示意图及其转基因株系抗病表型图；其中，图A为用于转基因功

能互补实验的亚克隆片段重叠区位置与序列示意图，图 B 为亚克隆转基因水稻株系对白叶枯病菌 PXO86 的抗性表型照片图；图 C 为亚克隆转基因水稻株系对白叶枯病菌 PXO86 的病斑长度统计结果图。

图 2 是 *Xa7* 基因结构特征与抗性表达模式图；其中，图 A 为 *Xa7* 基因序列结构特征示意图，图 B 为 *Xa7* 基因对白叶枯病菌 PXO86 的抗性表达模式图。

图 3 是 *Xa7* 基因启动子区病原诱导元件敲除功能验证结果图；其中，图 A 为 *Xa7* 基因启动子区病原诱导元件进行基因编辑后的突变纯合株系序列，图 B 为各突变株系对白叶枯病菌 PXO86 的抗性表达模式图，图 C 为各突变株系对白叶枯病菌 PXO86 的抗病表型照片图。

图 4 是 *Xa7* 基因编码区敲除功能验证结果图；其中，图 A 为 *Xa7* 基因编码区进行基因编辑后的突变纯合株系序列，图 4 为各突变株系对白叶枯病菌 PXO86 的抗性表达模式，图 C 为各突变株系对白叶枯病菌 PXO86 的抗病表型。

具体实施方式

以下结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述，但本发明的实施方式并不限于此。若未特别指明，实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。在本发明的实施例部分，阐述了 *Xa7* 基因的分离克隆、功能特征及其功能验证。

实施例1 *Xa7*基因的分离克隆

在本发明前期研究基础上，发现 *Xa7* 基因位点附近的基因组序列与常见的水稻参考基因组日本晴、9311、明恢63和珍汕97等均存在很大差异。明确该区域基因组序列是实现该基因克隆的前提基础。本发明通过构建 *Xa7* 抗源品种 IRBB7 基因组 BAC 文库，用 *Xa7* 两侧紧密连锁分子标记筛选文库，钓取阳性克隆，并对阳性克隆插入片段进行测序，从而获得该区域完整、精确的基因组序列。

水稻品种 IRBB7 已在文献 “Ogawa *et al.*, 1991, Breeding of near-isogenic lines of rice with single genes for resistance to bacterial blight pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. Japan J Breed, 41: 523-529.” 中公开。

构建基因组 BAC 文库的植物材料为含有 *Xa7* 基因的近等基因系 IRBB7，载体为 Epicentre 公司的 CopyControl™ pCC1BAC™，亚克隆与转基因表达载体为 pYLTAC747H/sacB（已在文献 “Xu *et al.*, 2008, Construction and characterization of the transformation-competent artificial chromosome (TAC) libraries of *Leymus multicaulis*. Science in China (Series C: Life Sciences), (07): 604-613.” 中公开)。

BAC 文库构建：按照文献 “Liu *et al.*, 2002, Development of new transformation-competent artificial chromosome vectors and rice genomic libraries for efficient gene cloning. Gene, 282(1):247-255.” 报道的实验步骤操作。于苗期提取 IRBB7 基因组 DNA，用 *Hind*III 限制性内切酶部分酶切，用脉冲场电泳分离 120-140kb 长度的 DNA 片段，纯化后与 BAC 载体 pCC1BAC™ 进行连接。75 ng BAC 载体分别与五组基因组 DNA 酶切产物混合 (A: 30 ng、B: 60 ng、C: 120 ng、D: 160 ng、E: 350 ng)，按 NEB® T4 DNA 连接酶 50μL 体系配制反应体系，在 PCR 仪里用变温连接程序进行连接反应：10℃ 3 min，3 min 升至 16℃，16℃ 5 min，30 s 升至 18℃，18℃ 30 s，30 s 升至 20℃，20℃ 30 s，8 s 降至 4℃，4℃ 3 min，5 min 从 4℃ 升温至 22℃，22℃ 1min 降到 10℃，如此循环 20 次，最后 65℃ 5 min。连接产物用 MILLIPORE™ 的 VSWP 膜 (0.025μM) 在 4℃，1/4×TE 溶液上透析约 2~3 h。透析产物电击转化 DH10B 大肠杆菌感受态细胞（为 Invitrogen™ 的 ElectroMAX™ DH10B™ Cells）。取 1 μL 透析产物和 20 μL 电转感受态细胞混匀，转入预冷的 0.1cm 电击杯，在 BioRad GenePulser® 电击仪上电击转化（参数为：电压 2.0 kV，电阻 200 Ω，电容 25 μF）。电击后，迅速加入 1 mL S.O.C. 培养基，37℃、200rpm 摇床恢复培养 1 小时。取 10~100 μL 之间十个梯度的菌液量分别涂于含 25 μg/mL 卡那霉素和 5% 蔗糖的 LB 半固体培养基，于 37℃ 培养 12~16 h，计算克隆数。然后以每平板约 500 个克隆的菌液量按相同方式涂板培养，并整板刮取混合菌落，分装到 96 孔深孔板构建 “BAC 克隆混合池”。每孔

按照大概450个原始单克隆计，总克隆数约为45000个，平均每个克隆插入片段100kb，相对于水稻全基因组430Mb来推算，该文库覆盖率大于10倍。

BAC阳性克隆筛选：用碱裂解法提取各个“BAC克隆混合池”质粒DNA，以混合池质粒为模板，扩增Xa7两侧紧密连锁分子标记U05-indel和POZ-indel，其中，扩增分子标记U05-indel的引物对为U05-indel Fw和U05-indel Rv，扩增分子标记POZ-indel的引物对为POZ-indel Fw和POZ-indel Rv。检测到阳性的混合池后，将阳性池稀释40000倍，按每孔5×倍率分装到384孔板，培养过夜后取菌液为模板，再次用对应的分子标记引物进行PCR扩增筛选，直至筛选到阳性单克隆。经过多轮筛选，鉴定分离到三个阳性克隆：P1-10G、P3-12F和P2-9D。经酶切和电泳检测，这三个BAC克隆插入片段分别为150kb、125kb和107kb。

U05-indel Fw: 5'-CAGACAAGTGTTGTTTCATGTTTCG-3';

U05-indel Rv: 5'-GAAGTCCGAGCTGGGGACGATGTAC-3';

POZ-indel Fw: 5'-CCAAGAAAGGTCCAACCTCGCTTAG-3';

POZ-indel Rv: 5'-GAACAGTCCTCAGAATTCGACCAC-3'。

阳性克隆BAC质粒测序及序列分析：用Omega公司的BAC/PAC DNA Maxi Kit提取P1-10G、P3-12F和P2-9D克隆的质粒，构建350bp小片段文库，采用HiSeq PE150测序平台进行二代测序，每个克隆的测序数据量为1Gb。测序数据进行Denovo无参组装，并剔除载体pCC1BAC™的骨架序列，分别获得这三个阳性质粒的插入片段序列。这三个插入片段序列经拼接组装后得到相互间首尾有重叠交错的307.5kb片段。与国际通用的水稻基因组序列比对，发现该片段对应于粳稻品种日本晴基因组增加了101.1kb，对应于籼稻品种明恢63基因组增加了80kb。利用Softberry的Fgenesh工具 (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesh&group=programs&subgroup=gfind>)对307.5kb的拼接序列进行预测，得到82个开放阅读框(ORF)。为进一步缩小目标范围，通过Galaxy的TALgetter工具 (<http://galaxy2.informatik.uni-halle.de:8976>)在拼接序列中预测AvrXa7的识别结合位点(AvrXa7EBE)。结果检索到四个识别结合位点的P-Value小于 $1.0E^{-6}$ ，其中仅有一个AvrXa7EBE位于ORF上游的启动子区。这个ORF编号为52，该候选基因命名为CG52，其序列如SEQ ID NO.4所示。

BAC亚克隆文库构建与功能互补实验：将携带有CG52基因的BAC质粒P1-10G和P3-12F的插入片段分别用BamHI和Sau3A I不完全酶切，连接到亚克隆载体pYLTAC747H/sacB上。分别用CG52启动子区和CDS区扩增引物筛选文库，阳性亚克隆再分别提取质粒进行末端测序，确定插入片段的序列。根据序列信息挑选四个亚克隆BAC质粒通过农杆菌EHA105(购于北京华越洋生物科技有限公司，质粒转化农杆菌步骤按文献“Hood et al., 1993, New Agrobacterium helper plasmids for gene transfer to plants. Transgenic Res, 2, 208-218”操作)介导，转化籼稻感病品种IR24(水稻品种IR24在文献“Ogawa et al. 1991. Breeding of near-isogenic lines of rice with single genes for resistance to bacterial blight pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. Japan J Breed. 41:523-529.”中公开)，籼稻品种的遗传转化按照文献“Lin and Zhang, 2005, Optimising the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice. Plant Cell Rep, 23: 540-547.”报道的方法操作。转基因水稻孕穗期以“剪叶法”(按文献“伍尚忠等, 1985, 华南及菲律宾稻白叶枯病病原菌株致病性比较研究, 植物病理学报, 15-2: 65-72.”操作)接种水稻白叶枯菌PXO86(菌株已在文献“Mew TW et al. 1982, Pathotypes of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* in Asia. IRRI Research Paper Series, No75.”中公开)，于接菌后21天进行抗病表型调查，参照国际水稻所INGER的方法调查评价抗性(按文献“INGER Genetic Resources Center, 1996, Standard Evaluation System for rice(4th edition)[M]. Philippines: International Rice Research Institute Press, p20-21.”操作)。

用作功能互补遗传转化的四个亚克隆的插入片段位置信息如图1A所示。L235和L239克隆覆盖率CG52基因全长，这两个克隆的转基因水稻株系均表现抗病；L236克隆的序列与L235片段的5'端重合，其3'端只包含了CG52基因的部分启动子区，在AvrXa7EBE上游213bp位置，其转基因水稻株系表现感病；而L240克隆3'端与L235克隆重合，其5'端仅包含CG52

的CDS区和13bp的UTR序列，缺失了AvrXa7EBE序列，其转基因水稻株系表现感病。由此可知，CG52基因就是抗病功能基因，而且启动子区AvrXa7EBE和完整的CDS序列都是该基因功能不可或缺的部分。（图1B和图1C）。

实施例2 Xa7基因的序列结构与表达特征

*Xa7*基因的序列结构分析：用携带*Xa7*基因的近等基因系IRBB7提取总RNA，通过Invitrogen™的GeneRacer™ Kit分别扩增*Xa7*的5'端和3'端全长。其中，5' RACE扩增特异引物为5'-TGCCACCGATGAGGTAATCCTGC-3'，3' RACE扩增特异引物为5'-CCTCCTCGGAATCTGGCTCATGTC-3'。RACE产物通过TRANS®的pEASY™-Blunt Zero Cloning Kit进行克隆。测序后确定*Xa7*的转录起始位点（TSS）位于起始密码子（ATG）上游的104bp处；同时确定了*Xa7*的3' UTR长度为253bp（图2A）。

*Xa7*基因的表达模式分析：IRBB7和IR24在孕穗期以“剪叶法”接种白叶枯菌（PXO86）后分别于0、1、3、5天后取样，提取总RNA。用Takara™的PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser反转录成cDNA，通过SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)试剂在Bio-Rad荧光定量PCR仪CFX96™上进行基因定量分析。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算基因的相对表达量。

目的基因*Xa7*的扩增引物对如下：

Xa7 Fw: 5'-GATCGTATGCCCGTTGCAGTTGC-3'；

Xa7 Rv: 5'-GGAGTTGACGGTCAGCAGTCGAG-3'。

内参基因TF2的扩增引物对如下：

TF2 Fw: 5'-GCCTGAAGTGTACTGTACCACCAC-3'；

TF2 Rv: 5'-CAAAGGGTTCAGAAATGAGGAA GG-3'。

结果如图2B所示，*Xa7*基因在接菌前表达水平很低，接菌1天后表达量开始上调，3天后达到峰值，5天后表达量开始回落。因此，*Xa7*基因的表达模式是病原菌诱导激活型的。

实施例3 由CRISPR/Cas9介导的基因敲除验证*Xa7*基因的关键功能位点

为进一步验证*Xa7*启动子区AvrXa7EBE和CDS区序列的功能，本发明还利用CRISPR/Cas9系统构建这两个功能区域的基因敲除转基因株系。基因敲除所用的载体是华南农业大学刘耀光实验室提供的双元表达载体pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H（已在文献“Ma *et al.* 2015, A robust CRISPR/Cas9 system for convenient high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. Mol. Plant. 8, 1274-1284.”中公开），中间载体pYLsgRNA-OsU6aL（已在文献“Ma *et al.* 2015, A robust CRISPR/Cas9 system for convenient high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. Mol. Plant. 8, 1274-1284.”中公开），pYLsgRNA-OsU3aL（已在文献“Ma *et al.* 2015, A robust CRISPR/Cas9 system for convenient high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. Mol. Plant. 8, 1274-1284.”中公开）和pYLsgRNA-OsU6c（已在文献“Ma *et al.* 2015, A robust CRISPR/Cas9 system for convenient high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. Mol. Plant. 8, 1274-1284.”中公开）。编辑位点sgRNA靶向序列的选择和设计是采用在线工具CRISPR-P（<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR/>）辅助完成。

首先通过CRISPR-P在*Xa7*启动子区AvrXa7EBE和CDS区检索PAM（protospacer adjacent motif）序列，选择编辑的靶位点，根据靶位点序列设计sgRNA靶标接头。相应靶标接头序列如下：

Target1（靶向AvrXa7EBE，靶序列位于图3A的-126~-107位置）：

OsU6aT1F: 5'-gccgTATGTGGTTATCTGGGGGGG-3'；

OsU6aT1R: 5'-aaacCCCCCCAGATAACACATA-3'；

Target2（靶向AvrXa7EBE，靶序列位于图3A的-121~-102位置）：

OsU6aT2F: 5'-gccgTTCGTATGTGGTTATCTGG-3'；

OsU6aT2R: 5'-aaacCCAGATAACCACATACGAA-3';

Target3 (靶向CDS区, 靶序列位于图4A的+22~+41位置):

OsU3T3F: 5'-ggcaCTGCAACGGGCATACGATC-3';

OsU3T3R: 5'-aaacGATCGTATGCCCGTTGCAG-3';

Target4 (靶向CDS区, 靶序列位于图4A的+94~+113位置):

OsU6cT4F: 5'-tcagCGACTGCTGACCGTCAACTC-3';

OsU6cT4R: 5'-aaacGAGTTGACGGTCAGCAGTCG-3'。

按照文献“Ma *et al.* 2015, A robust CRISPR/Cas9 system for convenient high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol. Plant.* 8, 1274-1284.”报道的实验步骤, 分别将靶标接头连接到相应的*Bsa* I 酶切sgRNA中间载体, 经过两轮PCR反应及产物退火、巢式PCR扩增得到特异的sgRNA表达盒模板。表达盒再通过连接反应组装进双元表达载体。其中, Target1和Target2分别独立构建双元表达载体, Target3和Target4一起构建到同一个双元表达载体。这三个基因编辑表达载体分别通过EHA105农杆菌介导, 转入IRBB7品种中。

各基因敲除转基因家系用引物(QC Fw: 5'-GAACTGCTCTGCTCAAGTGCCTC-3'; QC Rv: 5'-TGCCACCGATGAGGTAATCCTGC-3') PCR扩增靶向位点后测序, 在T₀代、T₁代筛选编辑成功的纯合株系。

如图3A所示, Target1编辑转基因获得的W6-4和W7-4纯合株系, Target2编辑转基因获得的W8-7和W9-6纯合株系, 都分别在*Xa7*启动子区Arv*Xa7*EBE元件产生了碱基缺失。这些转基因株系的基因表达分析表明(图3B), Arv*Xa7*EBE元件的缺失会造成*Xa7*受病原诱导表达的功能丧失, 从而对病原菌表现感病(图3C)。

Target3和Target4编辑转基因获得的W12-1、W12-6、W13-4和W15-3纯合株系, 分别在*Xa7*基因CDS区产生了不同类型的碱基缺失、插入和替换突变(图4A), 导致*Xa7*突变后的编码蛋白发生提前终止、移码、替换等突变。尽管基因CDS区突变后, 其转录仍受病原菌激活表达(图4B), 但这些突变纯合株系对病原菌的抗性仍旧丧失了(图4C)。

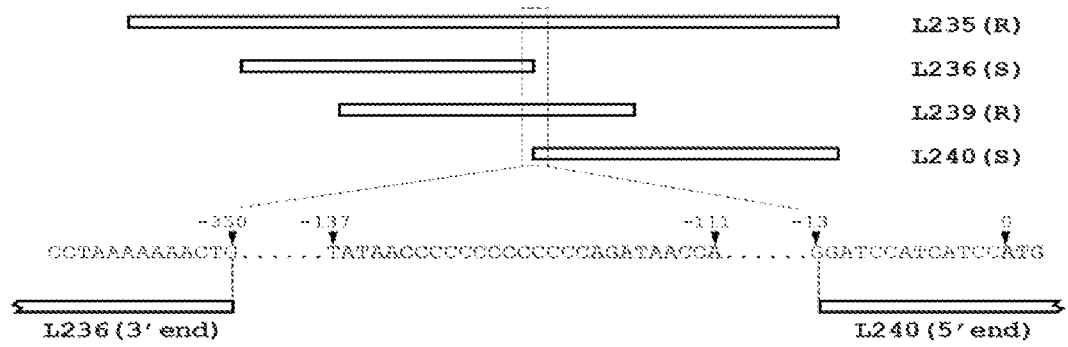
本实施例一方面反向验证了*Xa7*的功能基因, 另一方面阐明了*Xa7*基因的抗病功能由两个必要因素构成: 一是其启动子区Arv*Xa7*EBE元件在病原诱导下的转录激活功能, 另一个是完整的*Xa7*基因编码蛋白执行抗病反应。

上述实施例为本发明较佳的实施方式, 但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制, 其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化, 均应为等效的置换方式, 都包含在本发明的保护范围之内。

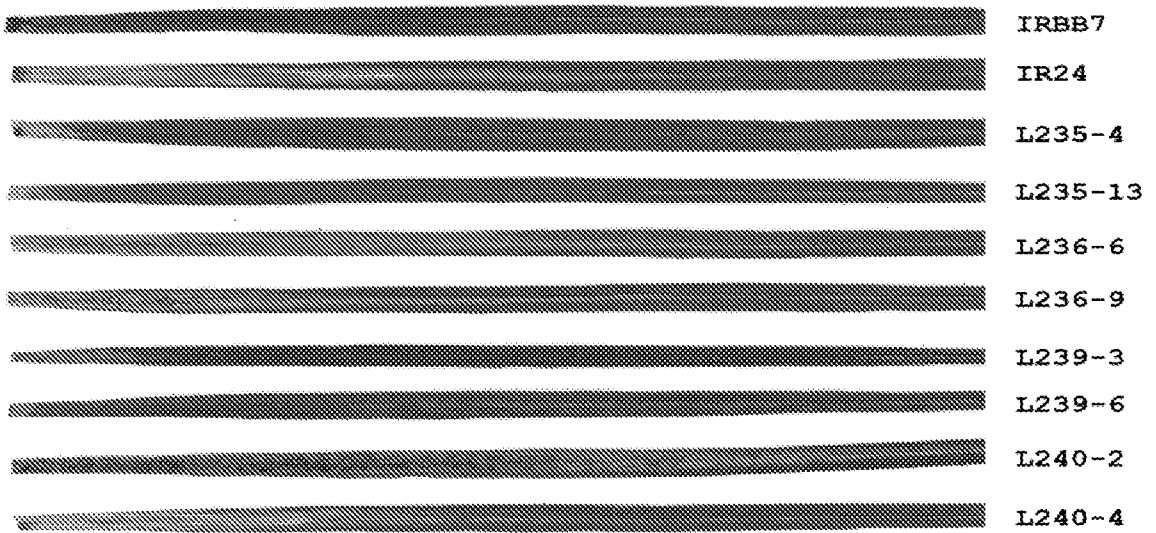
权 利 要 求 书

- 1、一种水稻抗白叶枯病蛋白，其特征在于：氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。
- 2、编码权利要求1所述的水稻抗白叶枯病蛋白的基因，其特征在于：核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。
- 3、根据权利要求2所述的基因，其特征在于：还包括核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示的启动子区病原诱导调控元件。
- 4、权利要求2所述的基因的应用，其特征在于：将所述的基因用于研究水稻抗白叶枯病的机制，用于培育对水稻白叶枯病具有抗病性的水稻品种或者其它抗病性作物，或是用于选育对水稻白叶枯病具有抗病性的水稻品种。
- 5、根据权利要求4所述的基因的应用，其特征在于：所述的用于培育对水稻白叶枯病具有抗病性的水稻品种或者其它抗病性作物的步骤如下：将权利要求2所述的基因和权利要求3所述的启动子区病原诱导调控元件导入易感病的水稻或其它作物中，得到具有抗病性的水稻或抗病性作物；或者将组成型表达启动子或其它病原诱导型启动子与权利要求2所述的基因串联，导入易感病的水稻或其它作物中，得到具有抗病性的水稻或抗病性作物。
- 6、根据权利要求4所述的基因的应用，其特征在于：所述的用于选育对水稻白叶枯病具有抗病性的水稻品种的步骤如下：将携带权利要求2所述的基因的水稻品种作为供体亲本，与易感白叶枯病的水稻品种进行花粉杂交，得到的一系列后代通过权利要求2所述的基因作为分子标记进行筛选，鉴定得到抗白叶枯病水稻品种。
- 7、权利要求2所述的基因的启动子区病原诱导调控元件，其特征在于：核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。
- 8、权利要求7所述的基因的启动子区病原诱导调控元件的应用，其特征在于：将所述的基因的启动子区病原诱导调控元件用于研究水稻抗白叶枯病的机制，或是用于培育对水稻白叶枯病具有抗病性的水稻品种或者其它抗病性作物。
- 9、根据权利要求8所述的基因的启动子区病原诱导调控元件的应用，其特征在于：所述的用于培育对水稻白叶枯病具有抗病性的水稻品种或者其它抗病性作物的步骤如下：将权利要求2所述的基因和权利要求7所述的启动子区病原诱导调控元件导入易感病的水稻或其它作物中，得到具有抗病性的水稻或抗病性作物；或者将权利要求7所述的启动子区病原诱导调控元件与其它抗病基因编码序列串联，导入易感病的水稻或其它作物中，得到具有抗病性的水稻或抗病性作物。

A



B



C

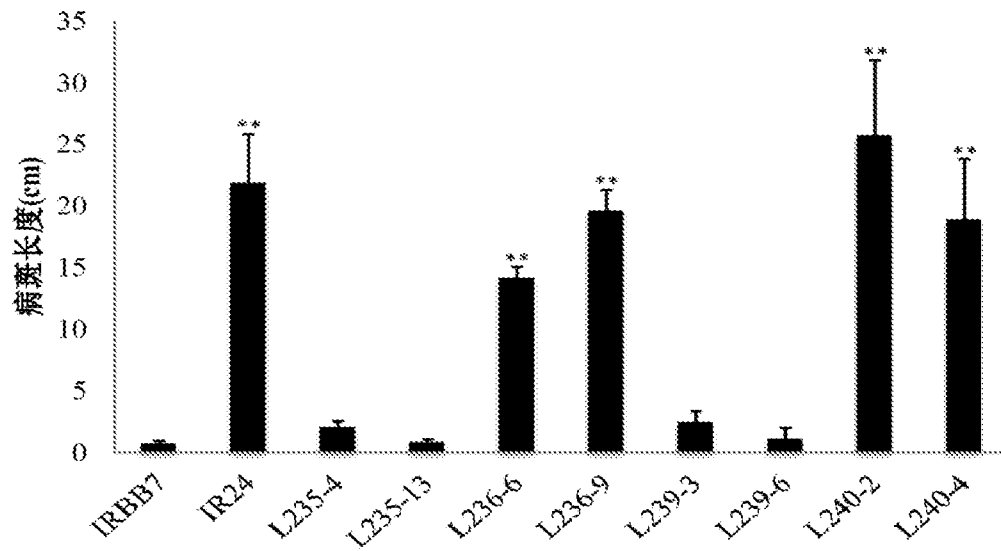


图 1

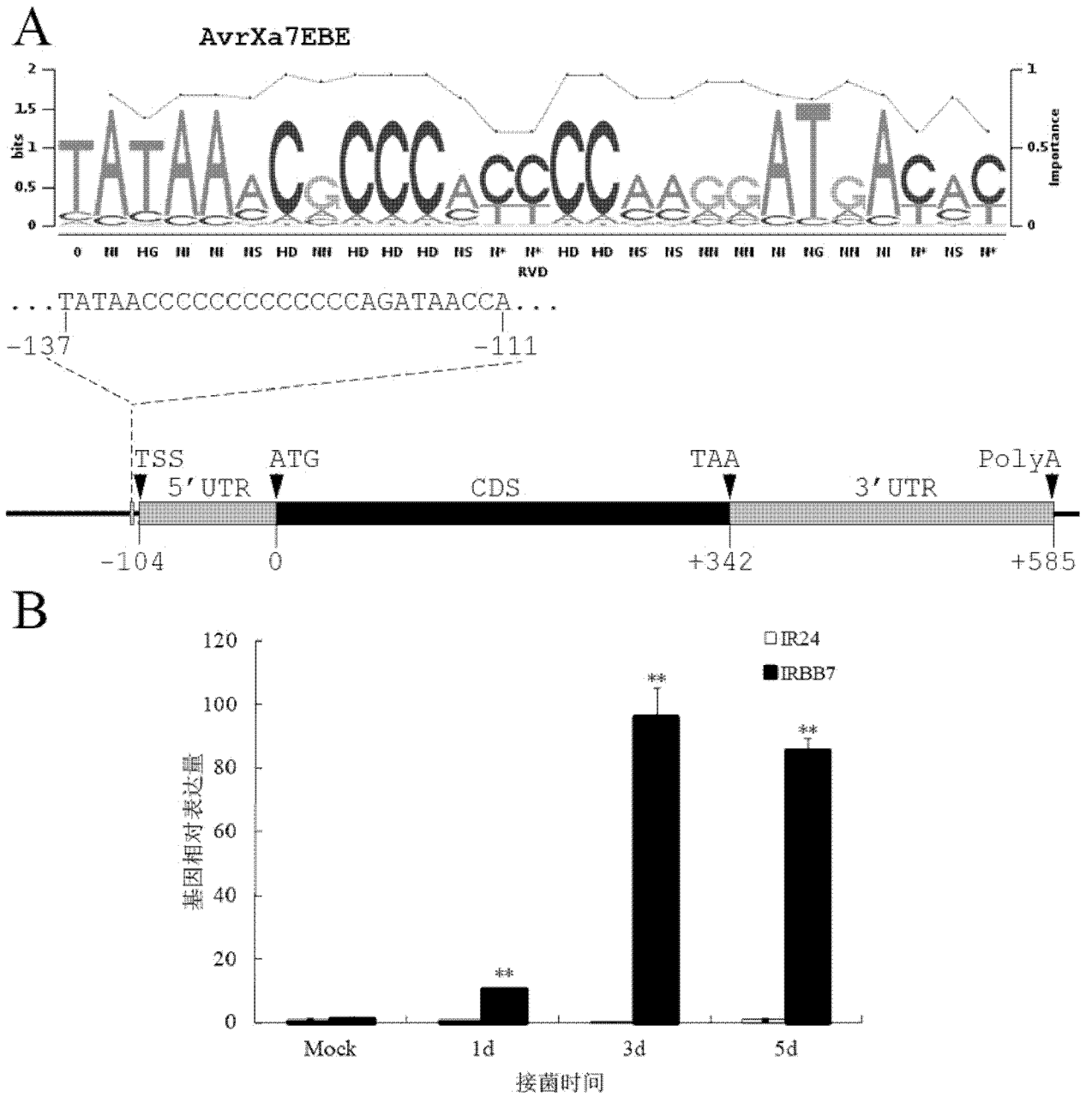


图 2

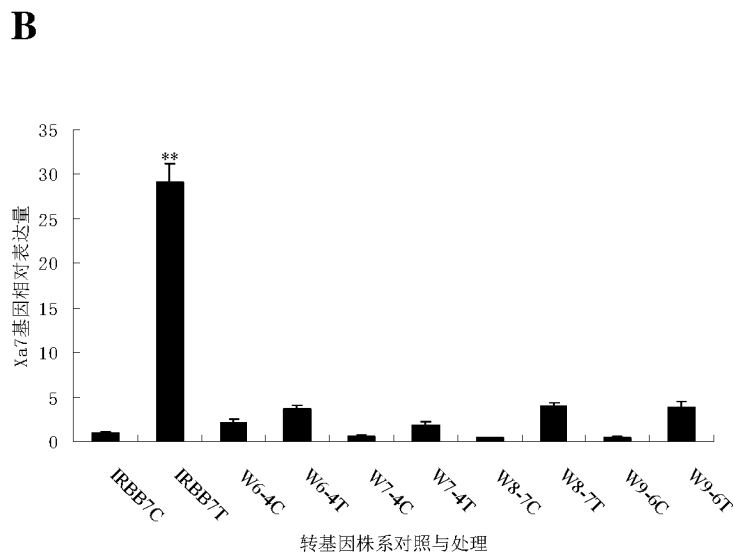
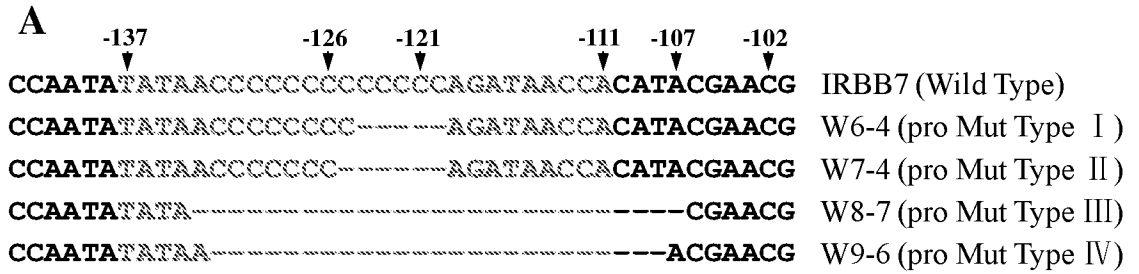


图 3

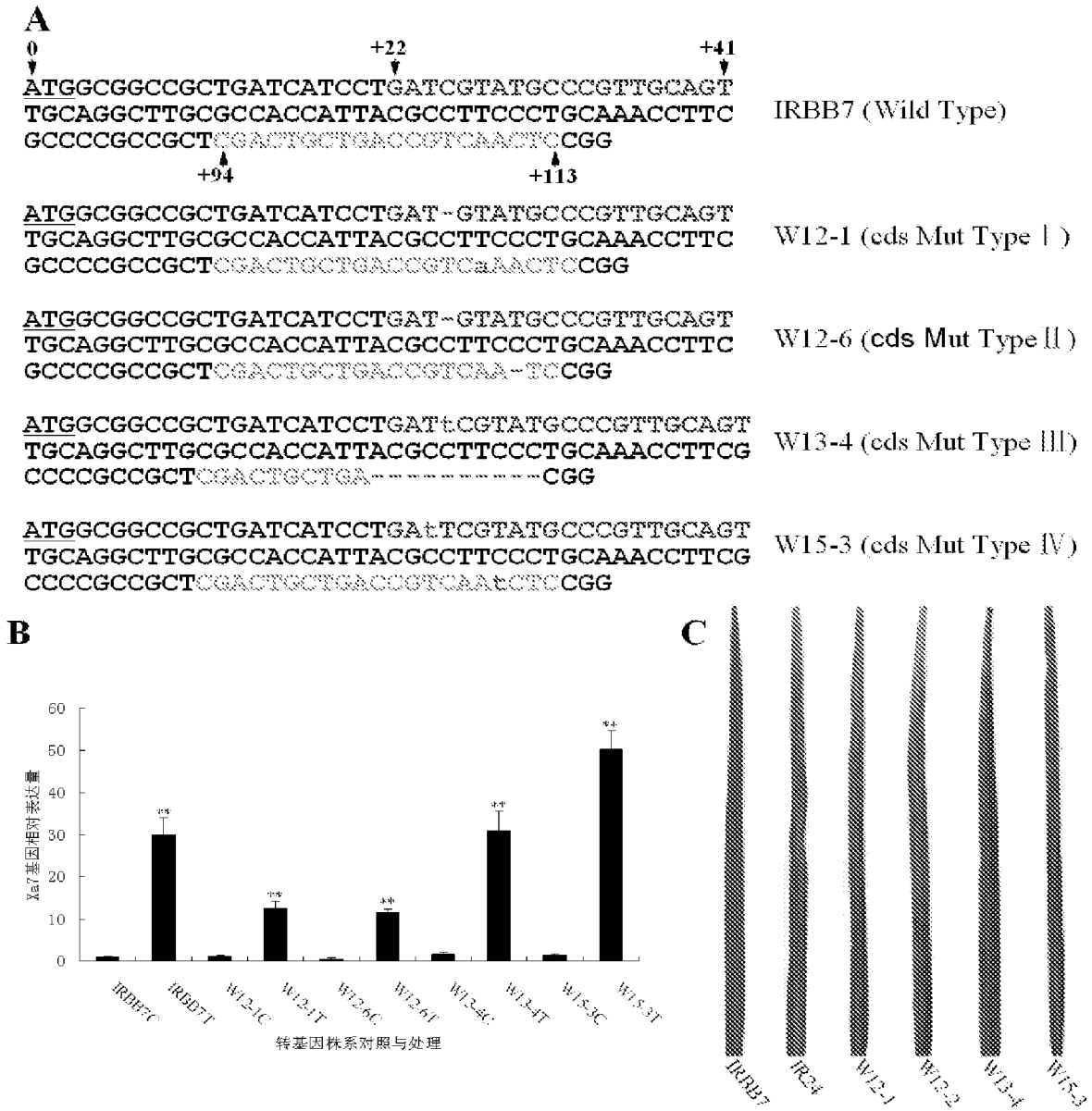


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/082732

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 14/415(2006.01)i; C12N 15/29(2006.01)i; C12N 15/82(2006.01)i; C12N 15/31(2006.01)i; A01H 5/00(2018.01)i; A01H 1/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K C12N A01H		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, CNKI, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT, NCBI, 中国专利生物序列检索系统, China Patent Biological Sequence Search System, Genbank, EMBL, STN and search terms: 水稻, Oryza sativa L., 白叶枯病, Xanthomonas, Xoo, SEQ ID Nos.: 1-3		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101974079 A (INSTITUTE OF CROP SCIENCE, CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES) 16 February 2011 (2011-02-16) claims 1-2	1-9
A	CN 103333231 A (INSTITUTE OF CROP SCIENCE, CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES) 02 October 2013 (2013-10-02) claims 1-9	1-9
A	CN 108220327 A (INSTITUTE OF GENETICS AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 29 June 2018 (2018-06-29) claim 1	1-9
A	CN 107475210 A (SICHUAN AGRICULTURAL UNIVERSITY) 15 December 2017 (2017-12-15) claims 1-2	1-9
A	CN 101451141 A (SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY) 10 June 2009 (2009-06-10) claims 1-3	1-9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 April 2020		Date of mailing of the international search report 15 June 2020
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/082732

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	101974079	A	16 February 2011	CN	101974079	B	26 June 2013
CN	103333231	A	02 October 2013	CN	103333231	B	24 June 2015
CN	108220327	A	29 June 2018	None			
CN	107475210	A	15 December 2017	None			
CN	101451141	A	10 June 2009	CN	101451141	B	03 November 2010

A. 主题的分类 C07K 14/415(2006.01)i; C12N 15/29(2006.01)i; C12N 15/82(2006.01)i; C12N 15/31(2006.01)i; A01H 5/00(2018.01)i; A01H 1/00(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K C12N A01H 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, CNKI, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT, NCBI, 中国专利生物序列检索系统, Genbank, EMBL, STN和检索项: 水稻, <i>Oryza sativa</i> L., 白叶枯病, <i>Xanthomonas</i> , Xoo, SEQ ID Nos.: 1-3		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 101974079 A (中国农业科学院作物科学研究所) 2011年 2月 16日 (2011 - 02 - 16) 权利要求1-2	1-9
A	CN 103333231 A (中国农业科学院作物科学研究所) 2013年 10月 2日 (2013 - 10 - 02) 权利要求1-9	1-9
A	CN 108220327 A (中国科学院遗传与发育生物学研究所) 2018年 6月 29日 (2018 - 06 - 29) 权利要求1	1-9
A	CN 107475210 A (四川农业大学) 2017年 12月 15日 (2017 - 12 - 15) 权利要求1-2	1-9
A	CN 101451141 A (上海交通大学) 2009年 6月 10日 (2009 - 06 - 10) 权利要求1-3	1-9
<input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期	
2020年 4月 24日	2020年 6月 15日	
ISA/CN的名称和邮寄地址	授权官员	
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	王翔宇 电话号码 62411992	

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2020/082732

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	101974079	A	2011年 2月 16日	CN 101974079 B	2013年 6月 26日
CN	103333231	A	2013年 10月 2日	CN 103333231 B	2015年 6月 24日
CN	108220327	A	2018年 6月 29日	无	
CN	107475210	A	2017年 12月 15日	无	
CN	101451141	A	2009年 6月 10日	CN 101451141 B	2010年 11月 3日