



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102351950 A

(43) 申请公布日 2012. 02. 15

(21) 申请号 201110332996. 2

*C12N 1/21* (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 10. 28

*A01H 5/00* (2006. 01)

(71) 申请人 湖南农业大学

地址 410128 湖南省长沙市芙蓉区东湖湖南  
农业大学

(72) 发明人 周小云 陈信波 刘爱玲 张先文  
邹杰

(74) 专利代理机构 长沙正奇专利事务所有限责  
任公司 43113

代理人 何为 袁颖华

(51) Int. Cl.

*C07K 14/415* (2006. 01)

*C12N 15/29* (2006. 01)

*C12N 15/63* (2006. 01)

*C12N 5/10* (2006. 01)

*C12N 1/15* (2006. 01)

*C12N 1/19* (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页  
序列表 3 页 附图 3 页

(54) 发明名称

水稻抗旱相关转录因子基因 OsWTF1 及其编  
码蛋白与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种水稻抗旱相关转录因子基  
因 OsWTF1 及其编码蛋白与应用, 该水稻抗旱相关  
蛋白, 是如下 (a) 或 (b) 的蛋白质: (a) 由序列表  
中 SEQ ID No :2 所示的氨基酸序列组成的蛋白  
质; (b) 将序列表中 SEQ ID No :2 的氨基酸序列经  
过一个或几个氨基酸残基的取代和 / 或缺失和 /  
或添加且与植物抗逆性相关的由 (a) 衍生的蛋白  
质。该水稻抗旱相关蛋白及其编码基因可用于培  
育抗旱水稻。

1. 一种蛋白,是如下 (a) 或 (b) 的蛋白质:
  - (a) 由序列表中 SEQ ID No :2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质;
  - (b) 将序列表中 SEQ ID No :2 的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和 / 或缺失和 / 或添加且与植物抗逆性相关的由 (a) 衍生的蛋白质。
2. 根据权利要求 1 所述的蛋白,其特征在于:所述一个或几个氨基酸残基的取代和 / 或缺失和 / 或添加是指在 SEQ ID No :2 的第 1 位氨基酸至第 206 位氨基酸进行取代和 / 或缺失和 / 或添加。
3. 权利要求 1 或 2 所述蛋白的编码基因。
4. 根据权利要求 3 所述的基因,其特征在于:如下 (a) 或 (b) 或 (c) 的基因:
  - (a) 其核苷酸序列为序列表中 SEQ ID No :1 自 5' 末端第 1 位至第 912 位脱氧核糖核苷酸所示的 DNA 分子,
  - (b) 其核苷酸序列为序列表中 SEQ ID No :1 所示的 DNA 分子,
  - (c) 在严格条件下与 (a) 限定的 DNA 序列杂交的编码所述蛋白质的 DNA 分子。
5. 含有权利要求 3 或 4 所述基因的重组表达载体。
6. 根据权利要求 5 所述的重组表达载体,其特征在于:所述重组表达载体为 pCambia1300M-0sWTF1,所述 pCambia1300M-0sWTF1 是在 pCambia1300M 载体的多克隆位点插入权利要求 3 或 4 所述基因得到的重组表达载体。
7. 含有权利要求 3 或 4 所述基因的转基因细胞系或重组菌。
8. 一种培育抗旱水稻的方法,是将权利要求 5 或 6 所述的重组表达载体导入水稻细胞中,得到抗旱水稻。

## 水稻抗旱相关转录因子基因 OsWTF1 及其编码蛋白与应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及植物生物技术领域,具体涉及一个水稻转录因子家族 AP2/ERF 超家族 ERF 亚家族蜡质相关基因的分离克隆、功能验证和应用。

### 背景技术

[0002] 水稻是我国最重要的粮食作物,水稻也是农业耗水的第一大户。近年来由于生态环境和气候变暖的影响,水资源匮乏严重制约了我国粮食的生产,并已成为水稻减产的主要原因。为培育抗干旱的水稻新品系,人们尝试通过生物技术途径来认识植物对干旱的反应机制,并利用分子生物学手段来提高植物的抗旱性。研究表明,植物能分泌蜡质到角质层表面或者角质层内,限制植物非气孔性水分丧失,具有保水抗旱的作用。另一方面,对植物转录因子的深入研究也发现含有 58-59 个高度保守氨基酸结构域的 ERF 转录因子能参与调节植物对生物及非生物因素胁迫的应答过程,提高植物对干旱、病虫、低温逆境等胁迫的耐受作用。针对我国正面临的越来越严重的缺水问题,能找到调控水稻蜡质相关基因表达的 ERF 类转录因子,将对培育新型抗旱的水稻品种,提高水稻产量具有重要的意义。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种与水稻抗旱性相关的蜡质转录因子基因及其编码蛋白。本发明所提供的与水稻抗旱性相关的蜡质转录因子基因,名称为 OsWTF1(与拟南芥中 WIN1 同源),该基因在水稻基因组数据库 TIGR 中的编号为 Os02g0202000,编码一个含有“AP2”结构域的 ERF 类型水稻蜡质代谢转录因子,该基因的 CDS 全长 618bp,编码 205aa 的蛋白。到目前还没有任何关于 OsWTF1 功能的研究报道。本发明所述基因即是水稻基因组数据库 TIGR 中的编号为 Os02g0202000 的基因,是下列核苷酸序列之一:

[0004] 1) 序列表 SEQ ID No :1 的 DNA 序列;

[0005] 2) 编码序列中 SEQ ID No :2 蛋白质序列的多核苷酸;

[0006] 3) 与序列表中 SEQ ID No :1 限定的 DNA 序列具有 90% 以上的同源性,且编码相同功能蛋白质的 DNA 序列。

[0007] 序列表中 SEQ ID No :1 的 DNA 序列由 912 个碱基组成,含有 2 个外显子,分别为自 5' 端第 154 位到第 236 位碱基和自 5' 端第 357 位到第 892 位碱基。该序列编码 SEQ ID No :2 的核苷酸残基序列。

[0008] 与水稻耐旱性相关的基因 OsWTF1 的编码蛋白 OsWTF1,是具有序列表中 SEQ ID No :2 氨基酸残基序列的蛋白质,或者是将 SEQ ID No :2 的氨基酸序列经过一个或者几个氨基酸残基的取代、缺失或添加且具有与 SEQ ID No :2 的氨基酸残基序列相同活性的由 SEQ ID No :2 衍生的蛋白质。

[0009] 序列表中 SEQ ID No :2 氨基酸残基序列是由 205 个氨基酸残基组成的蛋白质。

[0010] 含有本发明基因 OsWTF1 的表达载体、转基因细胞系及寄主菌均属于本发明的保护范围。

[0011] 扩增 OsWTF1 中任一片段的引物对也在本发明的保护范围之内。

[0012] 本发明的另一个目的是提供一种改良植物抗旱性的方法。

[0013] 本发明所提供的改良植物抗旱性的方法,是将所述与抗旱性相关基因 OsWTF1 构建过表达载体导入植物组织或细胞,改良植物的抗旱性。

[0014] 用于构建所述植物表达载体的出发载体包括双元农杆菌载体和可用于植物微弹轰击的载体等。利用任意一种可以引导外缘基因在植物中表达的载体,将本发明的 OsWTF1 基因在植物中超量表达表现出耐旱特征。

[0015] 本发明的基因在构建到植物表达载体上时,可在其转录起始核苷酸前加上任何一个强启动子或诱导性启动子,也可使用增强子。

[0016] 携带有本发明 OsWTF1 基因的表达载体可通过使用 Ti 质粒、Ri 质粒、植物病毒载体、直接 DNA 转化、微注射以及电穿孔等常规生物技术方法转入植物细胞,并培育出抗旱性得到改良的植物。被转化的植物寄主可以是水稻、玉米、小麦等单子叶植物,也适用于烟草、大豆等双子叶植物,培育抗旱的植物品种。

[0017] 下面结合附图和具体实施例对本发明做进一步详细说明。

#### 附图说明

[0018] 图 1 是采用 ClustalW 软件(公开使用软件)将水稻 OsWTF1 蛋白与其拟南芥中同源蛋白进行同源性比较结果。

[0019] 其中:黑色表示高度保守的氨基酸。

[0020] 图 2 是 OsWTF1 基因编码蛋白的保守域分析图。

[0021] 图 3 是 OsWTF1 的全长 cDNA 克隆

[0022] 图中从左到右依次为:M,分子量大小 Marker;1,5' RACE 扩增产物;2,5' RACE 扩增的阴性对照;3,3' RACE 扩增产物;4,3' RACE 扩增的阴性对照。5' RACE 扩增得到约 750bp 左右的片段,3' RACE 扩增得到约 300bp 左右的片段,将 5' RACE 和 3' RACE 产物切胶回收,并转入 pGEM-T Easy Vector,经测序拼接获得 791bp 全长 cDNA,编码区长度 618bp,预测编码蛋白质为 205aa。克隆全长 cDNA 在 Genbank 登录(DQ468387, ABE98440)。

[0023] 图 4 是干旱和紫外辐射条件下 OsWTF1 的基因表达分析图。

[0024] 其中:CK 表示未处理的日本晴叶片中 OsWTF1 基因的表达,1 表示干旱处理后水稻叶片中 OsWTF1 基因的表达,2 表示紫外处理条件下,水稻叶片中 OsWTF1 基因的表达。OsActin 基因的表达被作为内参(OsActin 的表达一轮,28cycles)。

[0025] 图 5 是 OsWTF1 超量表达转基因植物的 PCR 和 RT-PCR 检测结果图。

[0026] 其中:A:OsWTF1 超量表达转基因植物的 PCR 检测。P 表示含有 OsWTF1 基因片段的质粒作为阳性对照;1,2 为非转基因植株作为隐性对照;3-16 为独立转基因植株株系。

[0027] B:OsWTF1 超量表达转基因植物的 RT-PCR 检测。P 表示含有 OsWTF1 基因片段的质粒;CK1 和 CK2 为非转基因对照植株,其余为独立转基因株系,OsActin 基因被作为内参。

[0028] 图 6 是 OsWTF1 超表达水稻植株叶片表皮蜡质晶体的扫描电镜观察结果。

[0029] 其中:a<sub>1</sub> 为野生型对照植株叶片腹面;a<sub>2</sub> 为野生型对照植株叶片背面;b<sub>1</sub> 为 OsWTF1 超表达转基因水稻叶片腹面;b<sub>2</sub> 为 OsWTF1 超表达转基因水稻叶片背面。

[0030] 图 7 是 OsWTF1 超量表达转基因植株叶片的叶绿素浸提率分析图。

[0031] 图 8 是 OsWTF1 转基因植物对干旱的抗性反应显示图。是对培养于温室的分蘖期水稻植株进行抗旱处理实验。

[0032] 其中 :a 为野生型 (WT) 日本晴植株, b 为 OsWTF1 转基因植株。

[0033] 如图分别为 :干旱处理前, OsWTF1 超表达转基因水稻 b<sub>1</sub> 与野生型 a<sub>1</sub> 的比较 ;

[0034] 干旱处理一周后, OsWTF1 超表达转基因水稻 b<sub>2</sub> 与野生型 a<sub>2</sub> 的比较 ;

[0035] 干旱处理一周后再复水一周, OsWTF1 超表达转基因水稻 b<sub>3</sub> 与野生型 a<sub>3</sub> 的比较。

### 具体实施方式

[0036] 下述实施例中的实验方法, 如无特殊说明, 均为常规方法。

[0037] 实施例 1、植物抗逆性相关蛋白 OsWTF1 及其编码基因的获得

[0038] 微阵列 (Microarray) 分析的结果表明水稻 Os02g0202000 基因是一个 AP2 型的转录因子基因, 编码一个含有“AP2”结构域的 ERF 类型水稻蜡质代谢转录因子。利用 BLAST 程序发现它与拟南芥中 WIN1 高度同源, 对 WIN1 的研究表明它是参与蜡质代谢途径的一个转录因子。于是我们将 Os02g0202000 基因命名为 OsWTF1。根据水稻已公布的 BAC 文库 AP004869 序列设计 5' RACE 扩增引物 :WTF1R1 和 WTF1XbaR, 3' RACE 扩增引物 :WTF1F1 和 WTF1BamF, 进行 OsWTF1 基因的全长 cDNA 扩增。

[0039] 扩增条件参照 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 说明进行操作。

[0040] 5' RACE :在 Superscript III 逆转录酶的作用下, 以 4 μ L 水稻幼穗总 RNA 为模板、5' CDS primer 和 SMARTII A oligo 为引物, 合成 5' RACE 的单链 cDNA。

[0041] 3' RACE :在 Superscript III 逆转录酶的作用下, 以 4 μ L 水稻幼穗总 RNA 为模板, 加入 3' CDS primer A 和 DTT、dNTP 及 First-strand Buffer, 42℃ 加入 1.5h, 合成 3' RACE 的单链 cDNA。

[0042] 5' RACE 单链 cDNA 和 3' RACE 单链 cDNA 合成后, 稀释反转录产物 100 倍, 5' RACE 以 5' RACE 单链 cDNA 为模板, 以 UPM 和 WTF1R1 为引物 ; 3' RACE 以 3' RACE 单链 cDNA 为模板, 以 UPM 和 WTF1F1 为引物进行降落 PCR, 反应条件 :94℃ 5s, 72℃ 3min, 5 循环 ; 4℃ 5s, 70℃ 10s, 72℃ 3min, 5 循环 ; 94℃ 5s, 68℃ 10s, 72℃ 3min, 25 循环 ; 4℃ 保存。将第一轮 PCR 产物分别以 UPM、WTF1XbaR 和 UPM、WTF1BamF 进行 PCR 反应, 扩增条件为 94℃ 3min ; 94℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 1min, 35 循环 ; 72℃ 5min ; 4℃ 保存。

[0043] 对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收 5' RACE 和 3' RACE 片段, 将回收片段与载体 pGEM-T Easy 连接, 将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 根据 pGEM-T Easy 载体上的羧苄青霉素抗性标记筛选阳性克隆, 得到含有回收片段的重组质粒。以该重组质粒载体上的 T7 和 SP6 启动子序列为引物对其进行核苷酸序列测定, 结合图 3, 测序结果表明扩增到了 OsWTF1 基因 5' 端和 3' 端的蛋白编码区片段, 然后再从 2 个有相互重叠序列的 3' -RACE 和 5' -RACE 产物中获得全长 OsWTF1 基因的全长 cDNA。OsWTF1 基因的蛋白编码区序列如 SEQ No :3 所示, 由 618 个脱氧核糖核苷酸组成, 编码 SEQ No :2 所示的蛋白。

[0044] 特异性引物信息如下 :

[0045] 上游引物 WTF1BamF 5' -AT GGATCC ATCTCTGCCTCCCCTGTCCTTC-3', 加粗带下划线的碱基为 BamHI 酶切位点,

[0046] 下游引物 WTF1XbaR 5' -AT **TCTAGA** CGTCGTTTCATCCAAGCCTTTC-3', 加粗带下划线的碱基为 XbaI 酶切位点;

[0047] 上游引物 WTF1F1 :5' -GACTCCAACCTGGGTGATGACGGTG-3',

[0048] 下游引物 WTF1R1 :5' -TTGCTACGGGCGTCCTGGTCTGC-3'。

[0049] 实施列 2、OsWTF1 基因的 Blast 比对, 编码蛋白的亚细胞定位和保守结构域分析

[0050] 参见图 1 及图 2, 通过 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> 网站的 CLUSTAL W 和 DNAMAN 软件进行同源性分析。水稻 OsWTF1 基因与拟南芥蜡质代谢转录因子基因 WIN1 (SHN1) 的同源性较高, OsWTF1 与拟南芥基因 WIN1 (at1g15360) 氨基酸的同源性是 61%, 与 At5g25390 的氨基酸同源性是 54%, 与 At5g11190 的氨基酸同源性是 55%。拟南芥基因 WIN1 (SHN1, at1g15360)、At5g11190、At5g25390 基因为调控蜡质代谢相关基因, 推测 OsWTF1 基因可能与水稻蜡质代谢相关。通过 <http://wolfsort.org/> 网站亚细胞定位分析软件分析, 找到与 OsWTF1 同源性较高的已知基因有 11 个定位在细胞核中, 2 个定位在叶绿体中。初步确定, OsWTF1 基因编码的蛋白定位在细胞核中。根据水稻 OsWTF1 基因编码蛋白的序列保守区用 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> 提供的软件进行功能分析, 并用 <http://swissmodel.expasy.org/> 软件进行蛋白质结构预测, 发现 OsWTF1 有一个 AP2 结构域, 在 6-66aa 处, 属于 EREF 类的转录因子。

[0051] 实施列 3、OsWTF1 基因在逆境条件下的表达差异分析

[0052] 为检验 OsWTF1 基因在逆境条件下的反应, 采用干旱和紫外辐射方法处理水稻叶片并检测处理后植株中 OsWTF1 基因的表达。

[0053] 常规栽培的水稻至分蘖末期分成三组, 一组对照, 在自然光下生长; 紫外处理组在自然光照条件下另加 UVB 管提供 UVB 辐射 (15W, 上海顾村光电仪器厂)。紫外灯管定位于植物上端 20-30cm, UVB 辐射光期 8h/d (处理时间为每天 9:00-17:00), 处理一周时间。干旱处理组则在自然光下生长另加 6 天干旱处理。处理后取叶片采用 Invitrogen 公司的 Trizol 抽提液提取总 RNA, 并以总 RNA 为模板对逆境处理后叶片中 OsWTF1 基因的表达进行 RT-PCR 分析。反转录体系: 2  $\mu$ L 50ng/ $\mu$ L Olig(dt), 4.0  $\mu$ L 5X first strand buffer, 0.4  $\mu$ L 100mmol/L DDT, 2.0  $\mu$ L 10mmol/L dNTP, 1.0  $\mu$ L M-MLV 200U/ $\mu$ L, 再加入 DEPC 处理的 H<sub>2</sub>O 至 20  $\mu$ L。于 37°C 水浴 1h。置于 95°C 下 5min, 灭活 M-MLV, 加入 2  $\mu$ L TE (pH = 8.0), 合成单链 cDNA。以合成的各 cDNA 第一链为模板, 用 WTF1BamF 和 WTF1XbaR 检测 OsWTF1 基因的表达。发现正常栽培条件下, OsWTF1 基因在水稻叶片中的表达较低, 反转录的 cDNA 经过两轮 PCR (第一轮 28cycles 第二轮 30cycles) 后才见表达的条带。

[0054] 以 OsActin 基因被作为内参, 反应条件为: 94°C 预变性 3min; 94°C 30sec, 60°C 30sec; 72°C 35sec, 28 个循环; 72°C 延伸 10min。其特异性引物如下:

[0055] ActinBamF :5' -ATGGATCCAGGTAATAAGATCTTCAACAC-3'

[0056] ActinSpeR :5' -ATACTAGTACCTGGAAACACACAAGACA-3'

[0057] 如图 4 所示, 经一段时间的紫外和干旱处理后, 水稻叶片中 OsWTF1 基因的表达均比对照明显增加, 干旱处理对 OsWTF1 表达的增加比经紫外处理更显著。

[0058] 实施列 4、OsWTF1 基因超量表达载体的构建和转化

[0059] 为了能更好地阐明 OsWTF1 基因的功能, 申请人将其在水稻中超量表达, 从转基因植物的表型来进行 OsWTF1 基因的功能验证。

[0060] 超量表达载体构建方法如下:将全长OsWTF1全长cDNA(SEQ ID No:3)定向克隆到pCambia1300M载体35S启动子下游,用于构建水稻35S-OsWTF1超量表达的植物二元表达载体。经冻融法转入农杆菌EHA105中后,通过农杆菌介导的水稻遗传转化方法将其导入到水稻品种“日本晴”中,经过预培养、侵染、共培养、筛选具有潮霉素抗性的愈伤、分化、生根、炼苗移栽,得到转基因植株。农杆菌介导的水稻遗传转化方法应用Qu等人报道的方法(Qu et al.,2006)。

[0061] 实施列5、OsWTF1基因超量表达转基因植物的分子检测

[0062] 本发明OsWTF1基因超量表达转基因分子检测采用PCR和RT-PCR法进行。

[0063] 5.10sWTF1基因超量表达转基因植株DNA层面上的PCR分子检测

[0064] 用CTAB法提取水稻基因组DNA:剪取水稻叶片约100mg在研钵中用液氮磨成粉状后,加入60℃预热的600μL DNA提取缓冲液,60℃水浴保温30-60min,不时温和摇动。加入600μL等体积氯仿/异戊醇,颠倒混匀,室温下静置5-10min,使水相和有机相分层。室温下10000r/min离心30min。取上清液至另一1.5mL eppendorf管,加入一倍体积异丙醇,混匀,-20℃放置30min后10000r/min离心10min;70%酒精洗两遍,晾干,加入100μL TE溶液溶解。

[0065] OsWTF1基因超量表达转基因植株的PCR鉴定:

[0066] 取具有潮霉素抗性的转OsWTF1水稻植株基因组DNA100ng,以HygF和HygR引物进行PCR扩增鉴定潮霉素编码基因,以引物WTF1BamF和WTF1XbaR进行PCR扩增鉴定,同时设置过表达质粒为阳性对照,未转基因植株基因组DNA为阴性对照。结果如图5中A所示,所有转基因阳性植株都能扩增出水稻基因组本身具有的约820bp带内含子的DNA片段和插入到水稻基因组中的OsWTF1全长约700bp的cDNA片段,而未转基因的阴性对照植株和转基因阴性植株都只能扩增到约820bp带内含子的水稻基因组自身带有的DNA片段,质粒对照也能扩出约700bp的OsWTF1全长cDNA片段。PCR检测获得转OsWTF1全长cDNA的阳性植株22株。

[0067] 5.20sWTF1基因超量表达转基因植株RNA层面上的RT-PCR分子检测

[0068] 提取DNA水平上检测为阳性植株的幼穗部总RNA和未转基因的日本晴幼穗总RNA,反转录成cDNA为模板,用WTF1BamF和WTF1XaR为引物进行PCR,分析目的基因在转录水平上的表达情况,并以ACTIN基因的表达作为内参。RNA的提取和RT-PCR反应的方法同实施列3中的RT-PCR方法。结果如图5中B所示,与未转基因植株相比,OsWTF1已经在部分转基因植株中得到不同表达程度的增强表达,其中6号转基因植株获得强表达,可以用于进一步表型鉴定。

[0069] 实施列6、OsWTF1基因超量表达转基因植株叶片表面蜡质的扫描电镜观察

[0070] 取同一生长期超量表达转OsWTF1基因植株和未转基因的对照植株的水稻全展叶叶片用戊二醛固定,保存于4℃的冰箱内,按扫描电镜的要求脱水、干燥后,将样品于JEOL JFC-1600镀膜机上喷金镀膜,于JSM-6360LV扫描电镜下观察并拍照。结果如图6所示:OsWTF1超量表达植株叶片背面(b2)和腹面(b1)都有表皮蜡质明显增厚、乳突增多增大、乳突形态发生改变,乳突高度明显增加,变成接近圆柱体的形状等形态上的变化,而且这些变化在转OsWTF1基因水稻叶片的腹面(b1)表现更加明显。

[0071] 实施列7、OsWTF1基因超量表达转基因植株叶片的叶绿素浸提率

[0072] 转 OsWTF1 基因植株叶片的叶绿素浸提率按一定时间内叶绿素浸提量占叶绿素总量的百分比进行。

[0073] 取 OsWTF1 基因超量表达转基因植株和对照植株（未转基因的野生型植株）在同一抽穗期剑叶下第一片功能叶，自来水冲洗后称重，各取 5g 放入三角瓶中，加入 30mL 80% 的乙醇，置于黑暗条件下偶尔摇动。前 1h 每隔 10min 从各个样品中各取 400  $\mu$ L 浸提液，然后在 90min、120min 再各取 400  $\mu$ L 浸提液，测量其在  $\lambda$  664nm 和  $\lambda$  647nm 波长下的吸收值。按公式计算叶绿素总量 ( $\text{mmol/g}$ ) =  $7.93A_{664} + 19.53A_{647}$ 。结果如图 7 所示，随着时间的推移，转基因和对照野生型植株的叶绿素浸提率逐渐提高，但在浸提的全部过程中，转 OsWTF1 基因植株的叶片叶绿素浸提率一直都比对照低，酒精浸提 120min 后，未转基因野生型植株叶片中大约 80% 的叶绿素被浸提出来，而转 OsWTF1 基因植株的叶片浸提率却不到 40%，表明转基因植株对叶绿素的通透性降低。

[0074] 实施列 8、OsWTF1 基因超量表达转基因植物对干旱处理的反应

[0075] 在实施例 5 结果前提下，本发明首先对 OsWTF1 基因超量表达转基因植物 T3 代植物进行了纯合体筛选。具体步骤如下：每个植株选取 30 粒种子去壳，70% 乙醇表面消毒 1min，30% 漂白液消毒 30min，灭菌水洗 5 遍，用无菌镊子播种在含潮霉素的 1/2MS (Murashige & Skong) 培养基平皿上进行筛选，野生型日本晴作为对照，培养条件为 28 $^{\circ}$ C，持续光照强度为 2500lux，16h 光照 / 8h 黑暗。两周后统计发芽及成活率，本发明默认 100% 成活率的植株为纯合体，每个纯合体植物单独取样并进行相应的分子检测。取分子检测和潮霉素筛选结果一致的株系用于接下来的表型鉴定。

[0076] 本发明选取三条独立的超量表达转基因纯和水稻用于表型筛选。取纯和转基因株系种子和野生型日本晴种子发芽并常规培养至分蘖期中期，不浇水进行干旱处理。

[0077] 干旱一周后，如图 8 所示，OsWTF1 超表达植物基本保持着正常的生长状态 ( $b_2$ )，而对照野生型 ( $a_2$ ) 大多数萎焉，叶片下垂，出现严重的旱胁迫表现。

[0078] 干旱一周后复水一周，如图 8 所示，绝大多数对照野生型植物叶片出现不可恢复的干枯，仅有少数的两个分蘖返青，见  $a_3$ ；而 OsWTF1 超表达植物均可恢复至正常生长状态，见  $b_3$ 。植物在干旱后的复水能力也是抗旱的一个重要指标。干旱及复水实验表明，OsWTF1 超量表达增强了植物的耐旱性，结果证实 OsWTF1 对干旱的响应起了重要的作用。



[0001]

## 序列表

&lt;110&gt; 湖南农业大学

&lt;120&gt; 水稻抗旱相关转录因子基因 OsWTF1 及其编码蛋白与应用

&lt;130&gt; PHW111113

&lt;160&gt; 3

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 912

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; OsWTF1 基因的的基因组 DNA 序列

&lt;400&gt; 1

```

gccgcagcag tttatattca ctcaacaag tgctttctc ctccccaca cctcctcctg      60
tcagttcaga ggcgcctage aatagcagct cattgcctca tctctgctc ccctgtcctt      120
ctgggggcag agaatctctc cactgctgga aaaatggtac agccaaagaa gaagtttctg      180
ggagtcaggc agcggcactg ggctccttg gtctctgaga tcagacacc cctcctgtaa      240
gctcttctat caacatcct ctaattttct gctaataatg ttatgttttg atgtgtctaa      300
tactetaatc taataagtaa taagtctcaa tgcatatggt gtttgcaact aatgcagtaa      360
aaggagggtg tggctgggca ctttgagac ggccgaggag gctgcgcgag cctacgatga      420
ggctgctgtg ctgatgagtg gccgcaacgc caagaccaac tccccctgc agaggaactc      480
caccggtgat ctgccacgg ccgcagacca ggacgccctg agcaatggcg gtagcaggaa      540
ctcctcegeg ggcaacctgt cacagattct cagtgctaag ctccgcaagt gctgcaaggc      600
gccatctcgg tecttaacct gctcctcct cgacccccgag aagteccaca ttggcgtgtg      660
gcaaaagcgc gcaggggccc gtgctgactc caactgggtg atgacggtgg agctcaacaa      720
agaggtagaa ccaactgaac ctgcagctca gccacatca acagcaacag ctccgcaagt      780

```

[0002]

gacaatggat gatgaggaaa agattgcgct gcaaatgate gaggagttgc tgagcaggag 840  
 cagtccagct tcaccctcac atggagaggg agagggtage tttgtcatct gaaaggcttg 900  
 gatgaaacga cg 912

<210> 2

<211> 205

<212> PRT

<213> OsWTF1 基因编码的 OsWTF1 蛋白序列

<400> 2

Met Val Gln Pro Lys Lys Lys Phe Arg Gly Val Arg Gln Arg His Trp  
 1 5 10 15

Gly Ser Trp Val Ser Glu Ile Arg His Pro Leu Leu Lys Arg Arg Val  
 20 25 30

Trp Leu Gly Thr Phe Glu Thr Ala Glu Glu Ala Ala Arg Ala Tyr Asp  
 35 40 45

Glu Ala Ala Val Leu Met Ser Gly Arg Asn Ala Lys Thr Asn Phe Pro  
 50 55 60

Val Gln Arg Asn Ser Thr Gly Asp Leu Ala Thr Ala Ala Asp Gln Asp  
 65 70 75 80

Ala Arg Ser Asn Gly Gly Ser Arg Asn Ser Ser Ala Gly Asn Leu Ser  
 85 90 95

Gln Ile Leu Ser Ala Lys Leu Arg Lys Cys Cys Lys Ala Pro Ser Pro  
 100 105 110

Ser Leu Thr Cys Leu Arg Leu Asp Pro Glu Lys Ser His Ile Gly Val  
 115 120 125

Trp Gln Lys Arg Ala Gly Ala Arg Ala Asp Ser Asn Trp Val Met Thr  
 130 135 140

Val Glu Leu Asn Lys Glu Val Glu Pro Thr Glu Pro Ala Ala Gln Pro  
 145 150 155 160

[0003]

Thr	Ser	Thr	Ala	Thr	Ala	Ser	Gln	Val	Thr	Met	Asp	Asp	Glu	Glu	Lys
			165						170					175	
Ile	Ala	Leu	Gln	Met	Ile	Glu	Glu	Leu	Leu	Ser	Arg	Ser	Ser	Pro	Ala
			180						185					190	
Ser	Pro	Ser	His	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Ser	Phe	Val	Ile			
			195						200					205	

<210> 3

<211> 618

<212> DNA

<213> 0sWTF1 基因蛋白编码区

<400> 3

atggtacagc caaagaagaa gtttcgtgga gtcaggcagc ggcactgggg ctectgggtc	60
tctgagatca gacaccccct ccttaaaagg aggggtgtggc tgggcacctt tgagacggcc	120
gaggaggctg cgcgagccta cgatgaggct gctgtgctga tgagtggccg caacgccaaag	180
accaacttcc ccgatgcagag gaactccacc ggtgatctcg ccacggccgc agaccaggac	240
gcccgtagca atggcggtag caggaactcc tccgcgggca acctgtcaca gattctcagt	300
gctaagctcc gcaagtgctg caaggegccca tctccgtcct taacctgctt ccgctctgac	360
cccgagaagt cccacattgg cgtgtggcaa aagcgcgcag gggcccgtgc tgactccaac	420
tgggtgatga cgggtggagct caacaaagag gtagaaccaa ctgaacctgc agctcagccc	480
acatcaacag caacagcttc gcaagtgaca atggatgatg aggaaaagat tgcgctgcaa	540
atgatcgagg agttgctgag caggagcagt ccagcttcac cctcacatgg agaggagag	600
ggtagctttg tcattctga	618

```

OsWTF1      1  M Q P K K K F R G V R Q R H W G S W V S E I R H P L L K R R V W L G T F E T A E E A A R A Y D E A A V L M S G R N A K
At5g11190W2 1  - M V E S K K F R G V R Q R G W G S W V S E I R H P L L K R R V W L G T F E T A E E A A R A Y D E A A V L M S G R N A K
At5g25390W3 1  - M V E S K K F R G V R Q R G W G S W V S E I R H P L L K R R V W L G T F E T A E E A A R A Y D E A A V L M S G R N A K
at1g15360W1 1  - M V E S K K F R G V R Q R H W G S W V S E I R H P L L K R R V W L G T F E T A E E A A R A Y D E A A V L M S G R N A K

OsWTF1      61  T N F P V Q R N S T G D L A T A A D Q D I R - - - - - S N G G S R N S S A G N L S Q I L S A K L R K C C K A P
At5g11190W2 60  T N F P V Q S E E - - - - - G S D H V K D V Y S E L M S E K S L S E I L A K L R K C C K E L
At5g25390W3 60  T N F P V I R E N - - - - - G S N S L E I N S A L R S E K S L S E I L A K L R K C C K D Q
at1g15360W1 60  T N F P I N N N A I - - - - - E T S E G K T D I S A S S T N S E S S S S S L S I L S A K L R K C C K S P

OsWTF1      111  S P S L T C L R L I E P S H I G V W Q K R A G S K A D S W V M T V E L N K E V E P T P P A R Q E T I D A T A S - - -
At5g11190W2 103  T P S L T C L R L I I S S H I G V W Q K R A G S K T S P I W V M R E L G N V V N E S A V D L G I T E N K Q N W E K
At5g25390W3 101  T P E L T C L R L I N S S H I G V W Q K R A G S K T S P I W V M R V E L G D R V N A R P G D E I T N K M K V R N S D
at1g15360W1 110  S P S L T C L R L I T A S S H I G V W Q K R A G S K A D S W V M T V E L G P A S S S Q I T S K A Q D A I L A P T

OsWTF1      168  - - - - - Q V T I D D E E K I A L O M I E E L L S R S S P S P S S H E G E G S E V I
At5g11190W2 163  E E E E - - - - - E E A I S D E I Q A M M I E E L L M S - - - - -
At5g25390W3 161  V Q P - - - - - D - - - - - O M A O M I E E L L M W C P S G S I Q V - - - - -
at1g15360W1 170  E V P E G G S - - - - - R E E V I D E E K I A L O M I E E L L N E N - - - - -

OsWTF1      206  - - -
At5g11190W2  - - -
At5g25390W3  - - -
at1g15360W1  - - -
    
```

图 1

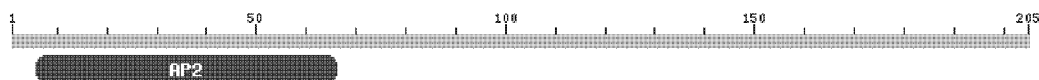


图 2

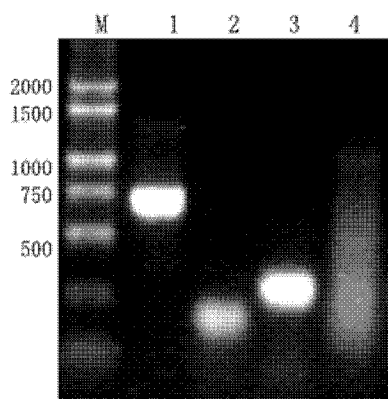


图 3

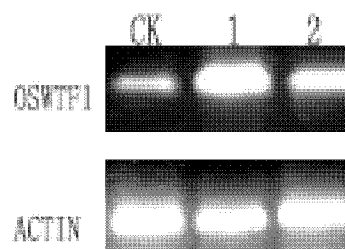


图 4

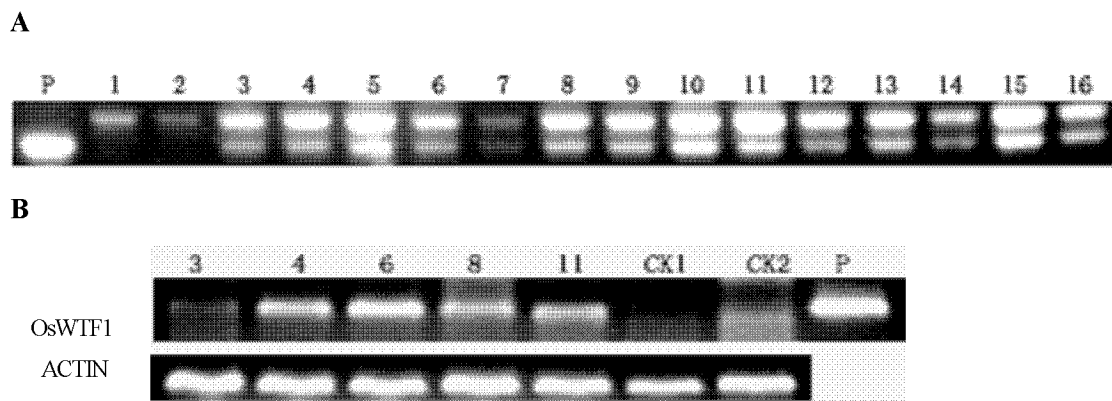


图 5

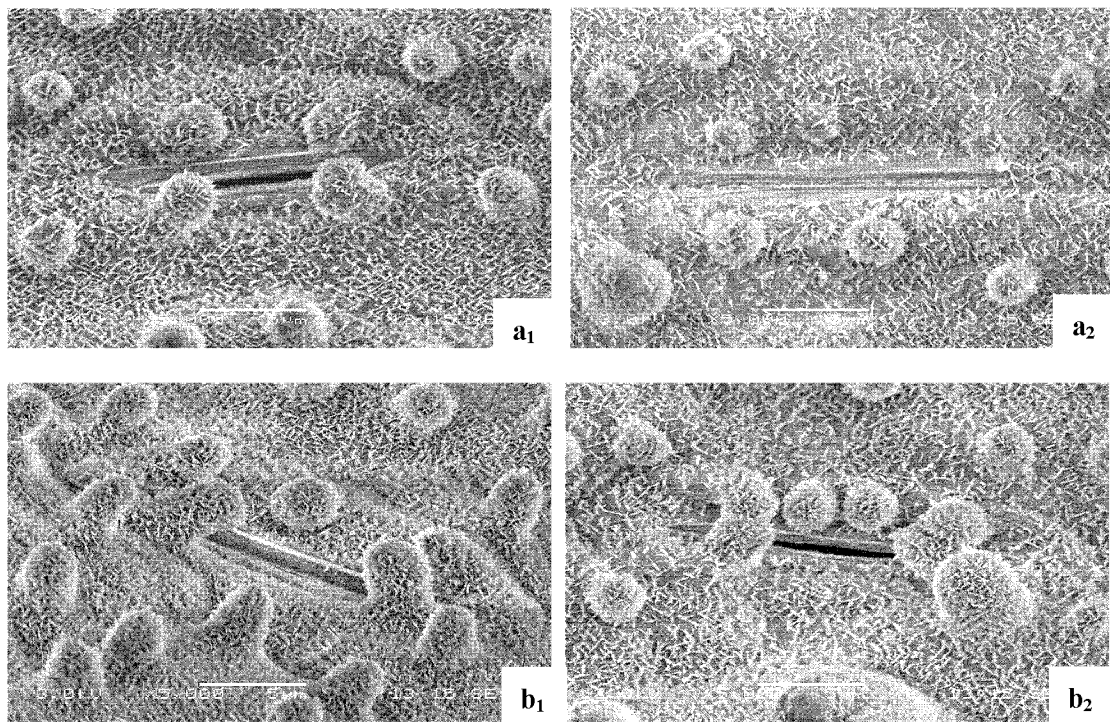


图 6

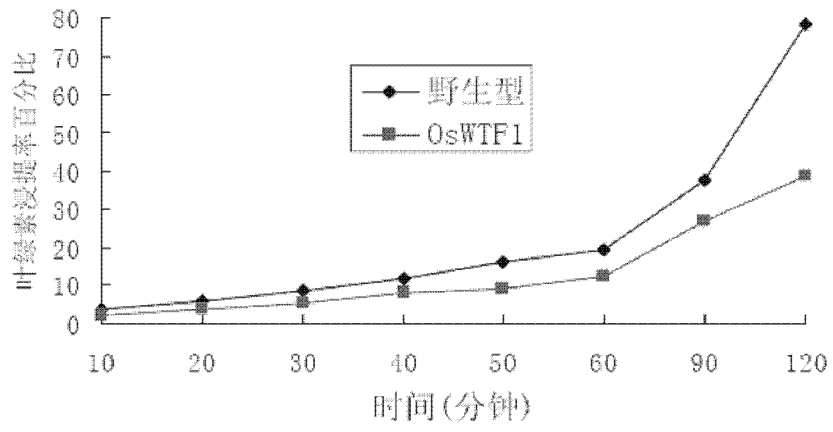


图 7

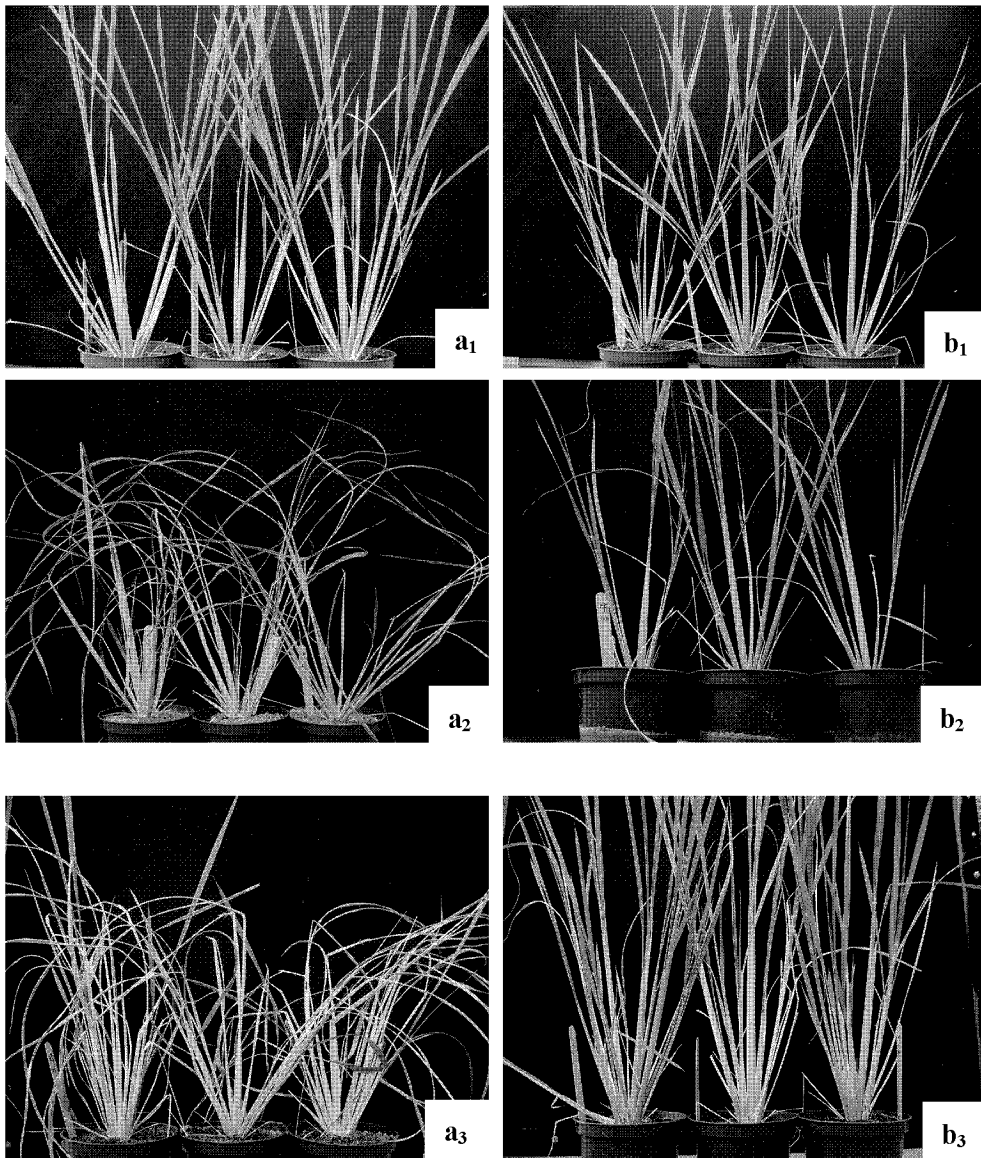


图 8