

(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 6 月 4 日 (04.06.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/108031 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 14/415 (2006.01) *A01H 5/00* (2018.01)
C12N 15/29 (2006.01) *A01H 6/54* (2018.01)
C12N 15/82 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2019/106583
- (22) 国际申请日: 2019 年 9 月 19 日 (19.09.2019)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201811439049.1 2018 年 11 月 28 日 (28.11.2018) CN
- (71) 申请人: 中国农业科学院作物科学研究所 (INSITUTE OF CROP SCIENCE, CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES) [CN/

CN]; 中国北京市海淀区中关村南大街 12 号, Beijing 100081 (CN)。

- (72) 发明人: 傅永福 (FU, Yongfu); 中国北京市海淀区中关村南大街 12 号, Beijing 100081 (CN)。 张晓玫 (ZHANG, Xiaomei); 中国北京市海淀区中关村南大街 12 号, Beijing 100081 (CN)。 陈福禄 (CHEN, Fulu); 中国北京市海淀区中关村南大街 12 号, Beijing 100081 (CN)。 徐坤 (XU, Kun); 中国北京市海淀区中关村南大街 12 号, Beijing 100081 (CN)。 禹国龙 (YU, Guolong); 中国北京市海淀区中关村南大街 12 号, Beijing 100081 (CN)。 陆明洋 (LU, Mingyang); 中国北京市海淀区中关村南大街 12 号, Beijing 100081 (CN)。

- (74) 代理人: 北京路浩知识产权代理有限公司 (CN-KNOWHOW INTELLECTUAL PROPERTY AGENT

(54) Title: SOYBEAN PHOTOSYNTHESIS-RELATED GENE GMGRF5-1, CODED PROTEIN THEREOF AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 大豆光合作用相关基因GmGRF5-1及其编码蛋白与应用

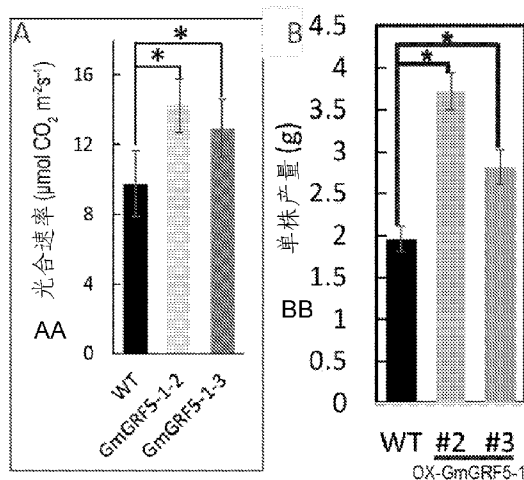


图 7

AA Photosynthetic rate
BB Yield per plant

(57) Abstract: The present invention provides a soybean GmGRF5-1 protein, which is: 1) a protein consisting of the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO. 1, or 2) a protein derived from 1) that is obtained by means of substitution, deletion, or addition of one or more amino acids in the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO.1 and has equivalent activities. The present invention also provides gene GmGRF5-1 coding said protein having a nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO. 2. Overexpression of the gene can delay plant flowering, promote photosynthesis, and increase plant yield, having potential application value in agricultural production.

LIMITED); 中国北京市海淀区苏州街29号维亚大厦12层12130室, Beijing 100080 (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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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))。
- 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

(57) 摘要: 本发明提供了一种大豆GmGRF5-1蛋白, 其为: 1)由SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列组成的蛋白质, 或2)在SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列中经取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且具有同等活性的由1)衍生的蛋白质。本发明同时提供了编码上述蛋白的基因GmGRF5-1, 其核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示, 过表达所述基因可延迟植物开花, 促进光合作用, 提高植物产量, 在农业生产中具有潜在的应用价值。

大豆光合作用相关基因 GmGRF5-1 及其编码蛋白与应用

交叉引用

本申请要求2018年11月28日提交的专利名称为“大豆光合作用相关基因GmGRF5-1及其编码蛋白与应用”的第201811439049.1号中国专利申请的
5 优先权，其全部公开内容通过引用整体并入本文。

技术领域

本发明涉及基因工程领域，特别是涉及大豆光合作用相关基因、其编码的蛋白及其在植物开花时间及光合作用调控中的应用。

背景技术

10 大豆是我国五大农作物之一，但近十年来大豆的净进口量已显著超过国内大豆的生产量，且年进口量呈快速增长趋势，我国的大豆生产安全面临严峻的挑战。另一方面，从全球看，世界人口的增长导致到了2050年大豆产量必须翻倍才能满足总体需求，但是按照现阶段产量增加的幅度，到那时仅能达到一半的需求（Tilman D 等，2011；Ray 等，2013）。通过
15 扩大种植面积提高产量既不现实也不可能，因为生态安全和土地沙漠化等因素迫使退耕还林已是大势所趋。因此提高大豆单产是必经之路，对我国大豆的安全生产具有重要的战略意义。

作物高产途径不外乎培育高产品种、施加有机肥和增产剂以及改善栽培耕作方式等。培育高产品种的手段有传统的杂交育种和现代的分
20 子育种（包括转基因育种）。转基因育种是在对目标基因的功能及作用机制有较明确认识的前提下进行的，因而周期较短、增产效率较高。在大豆中也有很多通过转基因提高大豆产量和抗性的报道。如过表达 Ncl 基因（Na⁺、K⁺和 Cl⁻转运蛋白）的大豆具有较高的耐盐性，在高盐地区的产量比野生型提高 3.6~5.5 倍（Do 等，2016）；LOS5/ABA3（脱落酸醛脱氢氧化酶
25 活性相关基因）转基因大豆在干旱条件下气孔开放大小及蒸腾速率降低，抗旱性明显增强，在干旱条件下的产量比野生型约提高 21%（Li 等，2013）；

在美国和阿根廷等国家的实验表明,在大豆中过表达向日葵 Hahb-4 (乙烯信号转导途径基因),能延缓大豆衰老,在干旱等逆境下产量提高 7-15% (Waltz 等, 2013); 孟山都公司报道,在大豆中过表达拟南芥的 BBX32 开花基因,产量增加 5-7% (Preuss 等, 2012); 过表达蓝细菌 FBP/SBPase (Bifunctional fructose-1,6/sedoheptulose-1,7- biphosphatase) 基因的大豆,在高 CO₂ 浓度、高温等逆境(即:未来潜在的环境条件)下保持稳产(Kohler 等, 2016); 下调大豆 BS1 (Big Seed 1) 同源基因的表达,显著增加大豆种子大小,干重增加 45%以上 (Ge 等, 2016)。APETALA2-like 基因 GmTOE4a 的过表达转基因大豆具有株高及节间缩短、茎秆粗壮等高产潜质的农艺性状 (Zhao 等, 2016)。

生长调节因子(GROWTH-REGULATING FACTOR, GRF)对植物的生长发育具有重要的调控作用。目前对 GRF 的功能研究主要集中在拟南芥、水稻和玉米等植物中,大豆中关于该家族基因的功能研究尚未见报道。

发明内容

本发明的目的是提供大豆光合作用相关基因 *GmGRF5-1*、其编码的蛋白及其在植物开花时间、光合作用及单株产量调控中的应用。

本发明提供的大豆 *GmGRF5-1* 蛋白,其氨基酸序列含有: 1) 由 SEQ ID No.1 所示的氨基酸序列; 或 2) 在 SEQ ID No.1 所示的氨基酸序列中经取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且具有同等活性的由 1) 衍生的蛋白质的氨基酸序列。

应当理解,本领域技术人员可根据本发明公开的氨基酸序列,在不影响其活性的前提下,取代、缺失和/或增加一个或几个氨基酸,得到所述蛋白的突变序列。因此,本发明的大豆 *GmGRF5-1* 蛋白还包括 SEQ ID No.1 所示氨基酸序列经取代、替换和/或增加一个或几个氨基酸,具有大豆 *GmGRF5-1* 蛋白同等活性的由大豆 *GmGRF5-1* 蛋白衍生得到的蛋白质。

本发明的另一目的是提供编码上述的大豆 *GmGRF5-1* 蛋白的

GmGRF5-1 基因。

GmGRF5-1 (全称为 *GROWTH-REGULATING FACTOR*) 基因具有 SEQ ID No.2 所示的核苷酸序列或与 SEQ ID No.2 所示的核苷酸序列具有 95% 及以上同源性的核苷酸序列。本发明的大豆 *GmGRF5-1* 基因是从大豆天隆 1 号中通过 RT-PCR 克隆到的。

本发明基因包括编码所述蛋白的核酸序列。此外, 应理解, 考虑到密码子的简并性以及不同物种密码子的偏爱性, 本领域技术人员可以根据需要使用适合特定物种表达的密码子。

本发明的另一个目的是提供携带 *GmGRF5-1* 基因的生物材料, 所述生物材料为表达盒、表达载体、宿主细胞或宿主菌。

本发明的所述的植物表达载体为 pSoy1。

本发明将 *GmGRF5-1* 基因构建到表达载体 pSoy1 上, 并在大肠杆菌 DH5 α 中扩繁。通过农杆菌介导转化方法, 将 pSoy1 携带的 *GmGRF5-1* 基因转入大豆天隆 1 号中, 获得过表达 *GmGRF5-1* 的转基因大豆。结果表明, *GmGRF5-1* 具有提高植物光合作用、提高植物产量及延迟植物开花的功能。

本发明还提供含有 *GmGRF5-1* 核苷酸序列或其片段的克隆载体或各类表达载体、含有所述载体的宿主细胞、含有所述核苷酸序列或其特异片段的转化植物细胞和转基因植物。

本发明的另一个目的是提供 *GmGRF5-1* 基因及其编码蛋白 *GmGRF5-1* 在植物开花时间及光合作用调控中的应用。

本发明提供了大豆 *GmGRF5-1* 蛋白或其编码基因或含有该基因的生物材料在延迟植物开花时间中的应用。

本发明提供了大豆 *GmGRF5-1* 蛋白或其编码基因或含有该基因的生物材料在调节植物光合作用和/或提高植物产量中的应用。

本发明提供了大豆 *GmGRF5-1* 蛋白或其编码基因或含有该基因的生物材料在植物种质资源改良或杂交育种中的应用。利用 *GmGRF5-1* 蛋白

能够延迟植物开花的功能能够解决杂交育种中的花期不遇的问题。

本发明提供了大豆 *GmGRF5-1* 蛋白或其编码基因或含有该基因的生物材料在制备转基因植物中的应用。

所述转基因植物为相对于野生型植物开花时间延迟、叶绿素含量增加、叶黄素含量增加、光合作用速率提高和/或产量提高的转基因植物。
所述叶绿素为叶绿素 a 和/或叶绿素 b。

本发明还提供了一种制备开花时间延迟、叶绿素含量增加、叶黄素含量增加、光合作用速率提高和/或产量提高的转基因植物的方法，是在植物基因组中引入或过表达本发明所述的大豆 *GmGRF5-1* 基因。

10 本发明的有益效果在于：

(1) 提供了大豆 *GmGRF5-1* 基因及其编码蛋白 *GmGRF5-1*；

(2) 通过在植物中过表达 *GmGRF5-1* 基因延迟植物开花，促进光合作用（光合作用速率增加，叶绿素和叶黄素含量增加），提高植物产量。

因此，*GmGRF5-1* 基因及其编码的蛋白可以调节花期，可用于解决杂交育种中的花期不遇的问题，促进植物光合作用，提高产量。
15

附图说明

图1为本发明大豆光合作用相关基因*GmGRF5-1*编码蛋白的氨基酸序列与拟南芥GRF5基因编码蛋白的氨基酸序列的比较。

图2为本发明实施例2的克隆中间载体pGWCm的结构示意图。

20 图3为本发明实施例3的植物表达载体pSoy1的结构示意图。

图4为本发明大豆光合作用相关基因*GmGRF5-1*编码的蛋白在烟草中的亚细胞定位。从左到右图示依次为*GmGRF5-1*-GFP在细胞核中的定位；细胞核marker基因AHL22-RFP的定位；叶绿体；明场；前四个图像的叠加图。

25 图5显示大豆光合作用相关基因 *GmGRF5-1* 转化大豆，导致延迟开花，左图为野生型（已结荚）和 *GmGRF5-1* 转基因大豆（开花期）植株照片，右图为植株开花时间统计结果。

图 6 显示大豆光合作用相关基因 *GmGRF5-1* 转化大豆，导致大豆叶色加深 (A)，叶绿素含量增加 (B) 及叶绿体基质片层发达 (C)。

图 7 显示大豆光合作用相关基因 *GmGRF5-1* 转化大豆，导致大豆光合速率加快 (A)，单株产量提高 (B)。

5 具体实施方式

以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的范围。

实施例 1 大豆光合作用相关基因 *GmGRF5-1* 的克隆

分别利用正向引物 5'-ATGATGAGTGCAAGTGCAAGAA-3'和反向引物 5'-TCATTCATCGGTTTGGATTCTG-3'从大豆天隆 1 号 (*Glycine max* L. Tianlong 1) 中克隆并测序获得 *GmGRF5-1* 基因，其基因序列如 SEQ ID NO.2 所示；由其编码的蛋白质的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。

PCR 反应程序为：95°C 5min 预变性，94°C 30s，55°C 35s，72°C 1min30s，25 个循环，72°C 10min 延伸。

大豆光合作用相关基因 *GmGRF5-1* 的蛋白序列与拟南芥 GRF5 蛋白的氨基酸序列之间的相似性为 42%。氨基酸序列比较见图 1。

实施例 2 大豆光合作用相关基因 *GmGRF5-1* 的克隆载体

从实施例 1 中扩增获得的 PCR 产物直接按照 TA 克隆方法克隆到如图 2 所示的 pGWCm 载体上。先将 pGWCm 载体用 Ahd I 内切酶水解后用凝胶回收试剂盒回收酶切产物以获得 T 载体。然后 PCR 产物和 T 载体于 16°C 进行连接，将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ，并在其中扩增，筛选阳性克隆并测序。

实施例 3 大豆光合作用相关基因 *GmGRF5-1* 的植物表达载体

将从实施例 2 中得到的大豆开花基因 *GmGRF5-1* 的克隆载体与如图 3 所示的植物表达载体 pSoy1 等比例混合后通过 LR 反应 (质粒各 50ng，LR 酶 1 μ l，补 H₂O 至终体积 5 μ l，混匀后 25°C 反应 6 小时以上)，将 *GmGRF5-1* 构建在 pSoy1 上，用于在植物中过表达大豆光合作用相关基因 *GmGRF5-1*，研究其功能。植物的转化方法采用农杆菌介导法进行。植

物中的筛选标记为 Bar。

实施例 4 大豆光合作用相关基因 *GmGRF5-1* 编码蛋白在转基因植物中的定位

- 挑取-80℃保存的含有目标载体 *GmGRF5-1*-GFP 的农杆菌于 3 mL 含有相应抗性的液体 LB 培养基，28℃、200 rpm 震荡培养过夜；
- (1) 用移液器吸取 200 μ L 菌液接种到 50 mL 含有相应抗性的液体 LB 培养基，28℃、200 rpm 震荡培养过夜，此时菌液 OD600 值约为 1；
- (2) 将菌液分装于灭菌的 50 mL 离心管，室温 4000 rpm 离心 10 min，弃上清；
- (3) 用注射 buffer (10 mM MES; 150 μ M AS; 100mM MgCl₂) 重悬菌体使最终菌液的 OD600 值约为 1；
- (4) 用 1 mL 的注射器吸取部分菌液，在烟草的背面进行注射。注射完成后用黑色塑料袋将烟草罩上，第二天揭去塑料袋移至光下再培养两天后，用激光共聚焦显微镜 Zeiss LSM700 观察 YFP 荧光信号。
- 结果显示 *GmGRF5-1* 定位于细胞核，见图 4。

实施例 5 大豆光合作用相关基因 *GmGRF5-1* 延迟大豆开花

- 参照王侃等人 (Paz, M., Wang, K. Soybean transformation and regeneration using half-seed explants. US Patent #7,473,822 (Issued January 6, 2009)) 的大豆转化方法获得过表达转基因大豆 OX-*GmGRF5-1* 共两个转基因株系 (#2 和 #3)，对野生型天隆 1 号及两个株系分别统计了 10-15 株植株的开花时间。图 5 显示大豆光合作用相关基因 *GmGRF5-1* 转化大豆会导致大豆延迟开花。如图 5 所示，其中最左侧代表对照野生型天隆 1 号，右侧两株代表转基因大豆的两个株系。开花时间统计结果显示，野生型天隆 1 号从播种到首花平均天数为 26 天左右，两个转基因大豆株系从播种到首花平均天数为 36 天，过表达 *GmGRF5-1* 导致花期约延迟约 10 天。转基因大豆与野生型大豆的花期差异显著。

实施例 6 大豆光合作用相关基因 *GmGRF5-1* 引起大豆叶色及叶绿体结构的改变

过表达转基因大豆 *OX-GmGRF5-1* 的两个独立的转基因株系均表现出叶色加深的表型，因此对其叶绿素含量进行了测定，并制作了超薄切片对其叶绿体结构进行了观察。叶绿素含量测定方法如下：

以自然光温室盆栽的 *OX-GmGRF5-1* (#2 和 #3) 和天隆 1 号完全展开的第三个和第七个复叶的中间小叶为样品，#2、#3 和天隆 1 号各采集 5 株植株，在相应的叶片上用打孔器 ($d = 6 \text{ mm}$) 取 4 个圆孔，获得的 20 个叶片圆孔组成一份测量样品。样品放在 25 mL 80% 的丙酮中，黑暗条件下室温萃取 5 天。取 1 mL 上清液用紫外分光光度计测量液体在 663 和 645 nm 下的吸光度，并根据下面的公式计算出叶绿素的含量：

$$\text{叶绿素 a (Chl a)} = (11.24A_{662} - 2.04A_{645}) \times V / W$$

$$\text{叶绿素 b (Chl b)} = (20.13A_{645} - 4.19A_{662}) \times V / W$$

$$\text{叶黄素 (Car)} = ((1000A_{470} - 1.90 \text{ Chl a} - 63.14 \text{ Chl b}) / 214) \times V / W$$

公式中的 V 是指丙酮溶液的体积；W 是指样品的鲜重。检测结果见表 1，表中数据为 *OX-GmGRF5-1* (#2 和 #3) 和天隆 1 号各 10 个叶片的平均数据，且两个株系的转基因大豆中各 10 个叶片的叶绿素、叶黄素数据差异不显著，野生型大豆（天隆 1 号）10 个叶片的上述数据差异不显著。由表 1 的平均数据来看，过表达转基因大豆 *OX-GmGRF5-1* 的两个独立的转基因株系的叶绿素 a 的含量比野生型有显著提高、叶绿素 b 和叶黄素略有升高，但不显著。

表 1

	WT	GmGRF5-1 #2	GmGRF5-1 #3
Chl a	0.87±0.02	1.08±0.02	1.01±0.02
Chl b	0.40±0.01	0.46±0.01	0.46±0.01
Car	0.31	0.35±0.01	0.34

结合上述检测结果及超薄切片观察，如图 6 所示，转基因大豆叶色加深 (A)，叶绿素 a 含量增加 (B)，及叶绿体的基质片层结构更发达 (C)。

实施例 7 大豆光合作用相关基因 *GmGRF5-1* 引起大豆光合速率改变从而提高产量

选取转基因大豆及野生型天隆 1 号各 10 株，利用 LI-6400XT 光合作用测量系统对转基因大豆光合速率进行测定，测定方法参照该系统使用手册，每片叶子重复测量三次，测定结果见表 2。表 2 中数据为 OX-*GmGRF5-1* (#2 和 #3) 和天隆 1 号 (WT) 各 10 株光合速率的平均数据，且两个株系的转基因大豆中各 10 株之间的数据差异不显著，野生型大豆 (天隆 1 号) 10 株之间的光合作用速率数据差异不显著。由表 1 的平均数据来看，转基因大豆 OX-*GmGRF5-1* 的两个独立的转基因株系的光合速率均比野生型有显著提高。

表 2

	WT	GmGRF5-1 #2	GmGRF5-1 #3
Photo 值 ($\mu\text{mol}(\text{CO}_2)\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	9.76 $\pm$ 1.89	14.24 $\pm$ 1.53	12.93 $\pm$ 1.65

上述转基因植株和对照材料在人工气候室收获后本发明也对其单株产量进行了称重，测定结果见表 3。表 3 中数据为 OX-*GmGRF5-1* (#2 和 #3) 和天隆 1 号 (WT) 各 10 株单株产量的平均值。两个株系的转基因大豆中各 10 株之间的单株产量数据差异不显著，野生型大豆 (天隆 1 号) 10 株之间的单株产量数据差异不显著。但转基因大豆比野生型单株产量显著提高。

表 3

	WT	GmGRF5-1 #2	GmGRF5-1 #3
单株产量 (g)	1.96 $\pm$ 0.16	3.72 $\pm$ 0.23	2.82 $\pm$ 0.21

如图 7 所示，过表达 *GmGRF5-1* 会提高植物的净光合速率，进而显著提高植物的单株产量。

虽然，上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述，但在本发明基础上，可以对之作一些修改或改进，这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此，在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进，均属于本发明要求保护的范围。

工业实用性

本发明提供一种大豆 *GmGRF5-1* 蛋白。本发明所提供的大豆 *GmGRF5-1* 蛋白为：1) 由 SEQ ID NO.1 所示的氨基酸序列组成的蛋白质，或 2) 在 SEQ ID NO.1 所示的氨基酸序列中经取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且具有同等活性的由 1) 衍生的蛋白质。本发明同时提供了编码上述蛋白的基因 *GmGRF5-1*，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。过表达所述基因可延迟植物开花，促进光合作用，提高植物产量，在农业生产中具有有较好的经济价值和应用前景。

权 利 要 求 书

1. 一种大豆 GmGRF5-1 蛋白，其氨基酸序列含有：

1) SEQ ID NO.1 所示的氨基酸序列，或

2) 在 SEQ ID NO.1 所示的氨基酸序列中经取代、缺失或添加一个或
5 几个氨基酸且具有同等活性的由 1) 衍生的氨基酸序列。

2. 编码权利要求 1 所述大豆 GmGRF5-1 蛋白的基因。

3. 根据权利要求 2 所述的基因，其特征在于，其具有 SEQ ID NO.2
所示的核苷酸序列或与 SEQ ID NO.2 所示的核苷酸序列具有 95%及以上
同源性的核苷酸序列。

10 4. 含有权利要求 2 或 3 所述基因的生物材料，所述生物材料为表达
盒、载体、宿主细胞或宿主菌。

5. 权利要求 1 所述的大豆 GmGRF5-1 蛋白或其编码基因或权利要求
4 所述的生物材料在延迟植物开花时间中的应用。

6. 权利要求 1 所述的大豆 GmGRF5-1 蛋白或其编码基因或权利要求
15 4 所述的生物材料在调节植物光合作用和/或提高植物产量中的应用。

7. 权利要求 1 所述的大豆 GmGRF5-1 蛋白或其编码基因或权利要求
4 所述的生物材料在植物种质资源改良或杂交育种中的应用。

8. 权利要求 1 所述的大豆 GmGRF5-1 蛋白或其编码基因或权利要求
4 所述的生物材料在制备转基因植物中的应用。

20 9. 根据权利要求 8 所述的应用，其特征在于，所述转基因植物为相
对于野生型植物开花时间延迟、叶绿素含量增加、叶黄素含量增加、光合
作用速率提高和/或产量提高的转基因植物。

10. 一种制备开花时间延迟和/或产量提高的转基因植物的方法，其
特征在于，在植物基因组中引入或过表达权利要求 2 或 3 所述的编码大豆
25 GmGRF5-1 蛋白的基因。

GRF5-AT3G13960.pro	MMSLSGSSGRITGRPPFTTETQWDELEHQALIVKYMVSGVPVPPELIFSIERSLDTSLSVR	60
GmGRF5-1.pro	MMSAS---ARN--RSPFTQTQWCELEHQALVFKYMTGTPIPPDLIVSIKRSLDTSISSR	55
GRF5-AT3G13960.pro	LLPHQSLGWGCYQMGFGRRPDPEPGRCRRTDGKKWRCSREAYPDSKYCEKMHHRGRNRAR	120
GmGRF5-1.pro	LFPHHFIIGWGCEMGFGRKVDPEPGRCRRTDGKKWRCSKEAYPDSKYCEKMHHRGRNRSR	115
GRF5-AT3G13960.pro	KSLDQNTFTTTLTSLFSLFTNNNNPSTLSSSSSSNSSSTTYSASSSSMDAMNSNRFC	180
GmGRF5-1.pro	KPEVSSAIST-ATNTSCITPSSVTRNLSLTNPMTTPSSFFPSFLPSSMPDESQP--TS	172
GRF5-AT3G13960.pro	LGGSSSNTFCFNSHSLDYPYBSTSPKQQCQLHHSALSLHONTNSTSQFNVLASATPR	240
GmGRF5-1.pro	QSYQNSSLNFPFYSQS----TSSEFP-DALFPPQDATTHCLEMDSGSYS-----HDE	219
GRF5-AT3G13960.pro	KDFRYEQGIGERNVGGVGERTFFPEASRSEQDSFVHHHQCPLATVMNDEYHHCSTDHNRID	300
GmGRF5-1.pro	KNYRHVHGIRPDVD---PRAFFPEASGSAR--SYTESVQQLS--MSSYKSMNSNFEQNIN	272
GRF5-AT3G13960.pro	HHHTYSSSSSSQHLHEDDEHQQQCFVLGADMFNKPTRSVLANSSRODQNPDEKDSSE	360
GmGRF5-1.pro	DATTNP-----PQCEQQQQQCFVLGTL-EK-----STRETKENE---AEFA	310
GRF5-AT3G13960.pro	GSRKSLHHFFGEDWAQNRKSSDSWLDLSCHSRLDTCG.	398
GmGRF5-1.pro	TGQRELRHFFGE-WPP-KNTTDSWLDLASNSRIQDE.	346

图 1

5

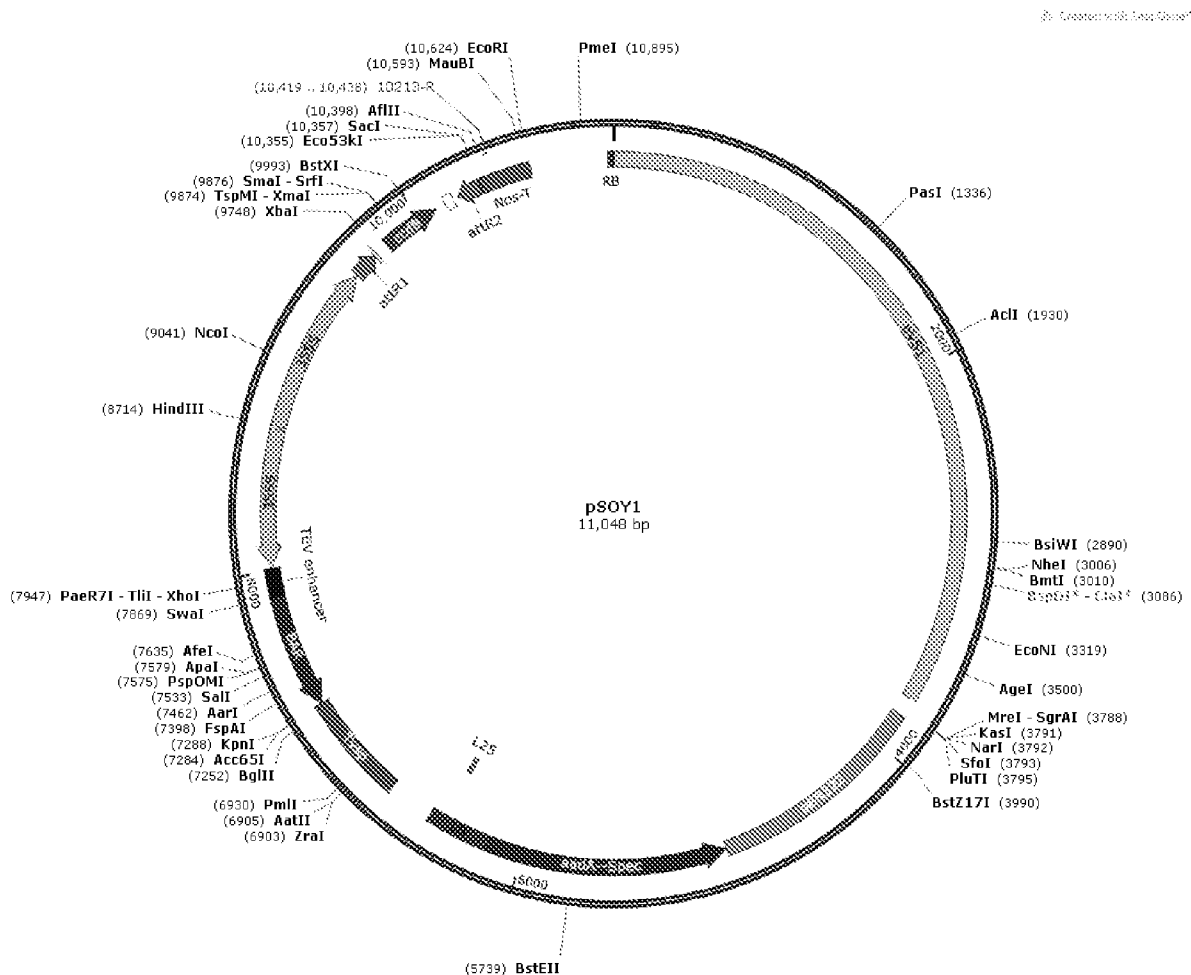


图 2

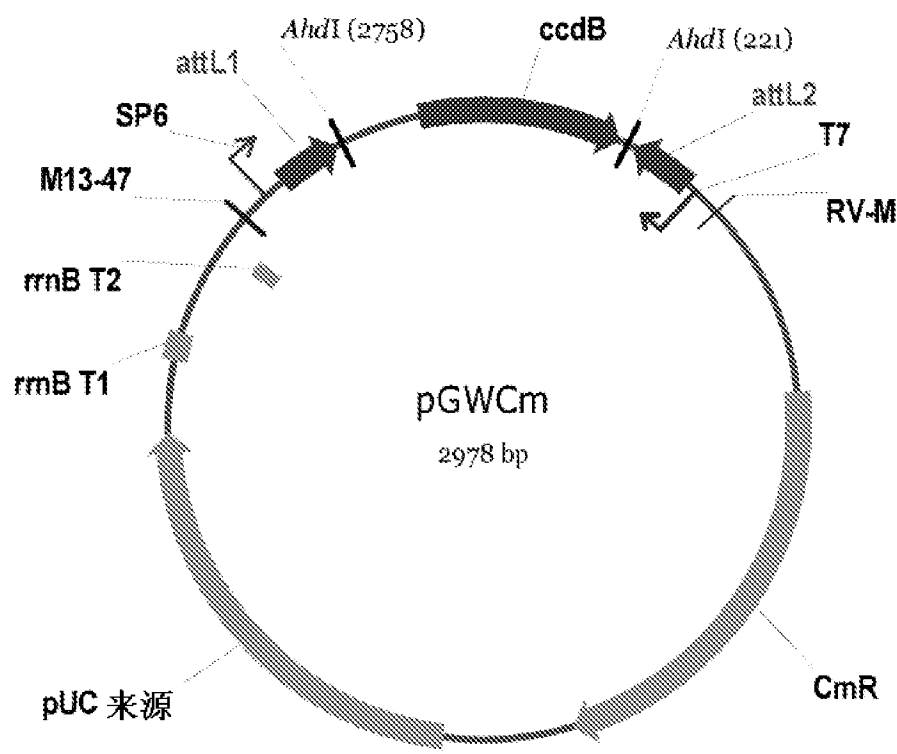


图 3

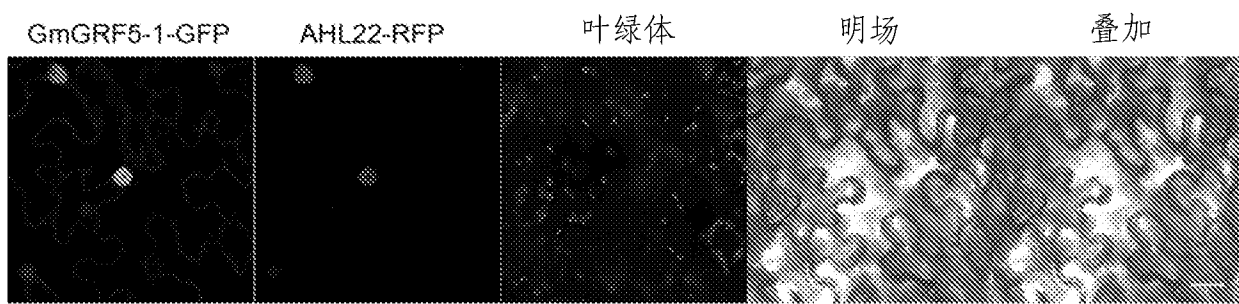


图 4

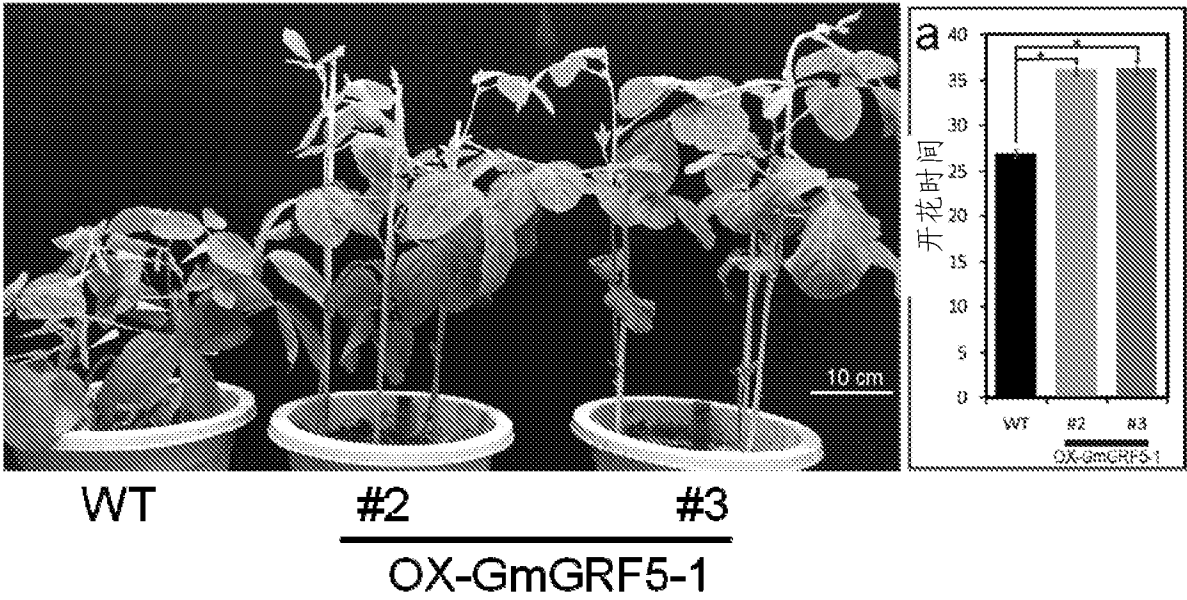


图 5

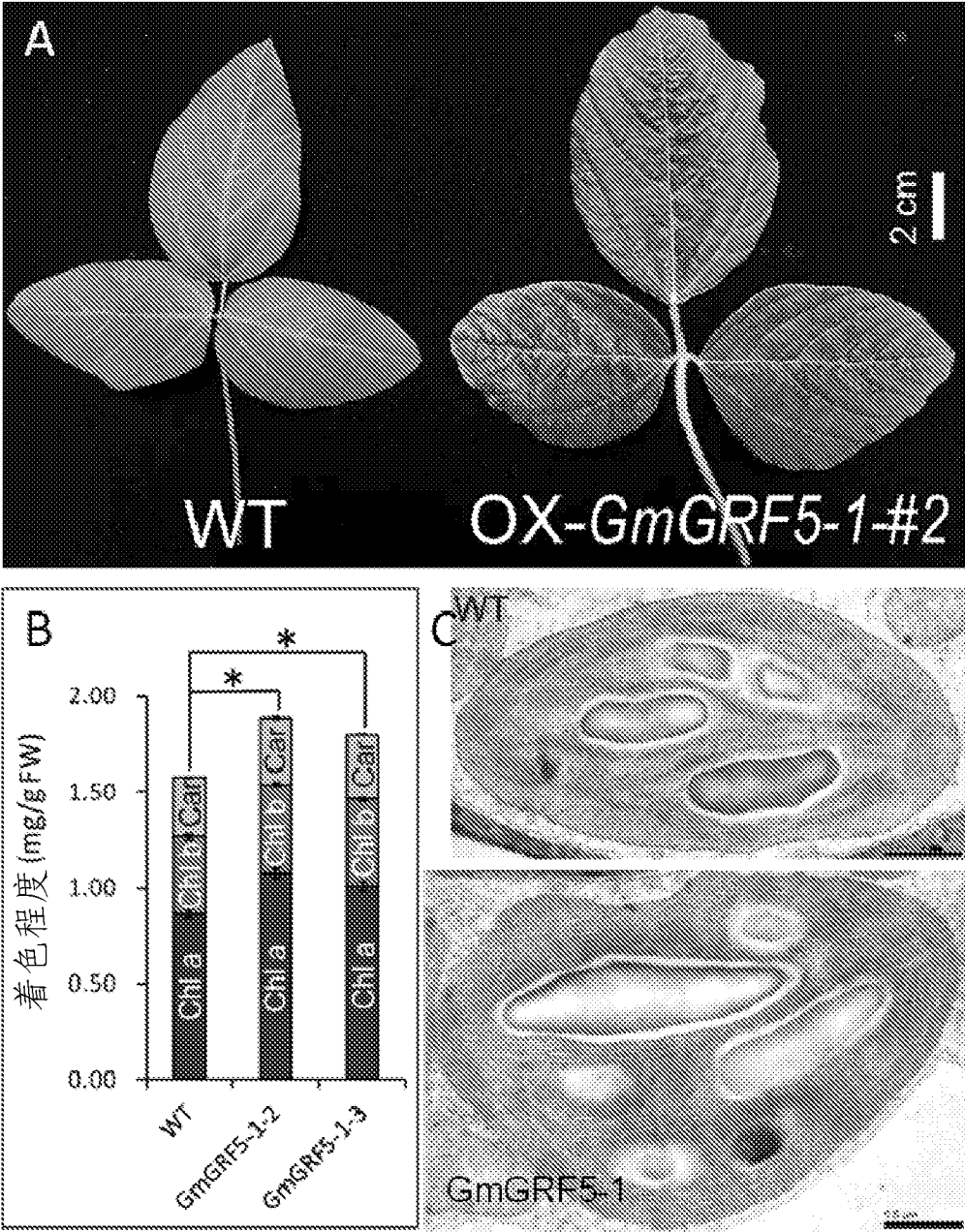


图 6

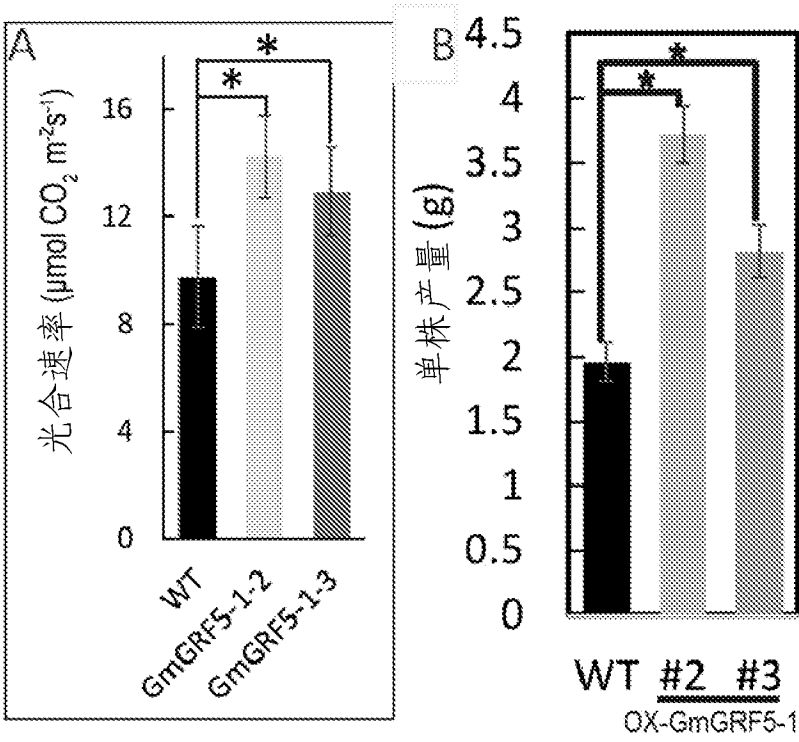


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/106583

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/415(2006.01)i; C12N 15/29(2006.01)i; C12N 15/82(2006.01)i; A01H 5/00(2018.01)i; A01H 6/54(2018.01)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; VEN; MEDLINE; EPTXT; USTXT; WOTXT; 生长调节因子, 大豆, GROWTH-REGULATING FACTOR, GRF5, soybean, yield, photosynthe+ et al. 中国专利生物序列检索系统; China Patents Biological Sequence Search System; Genbank; EMBL和检索的序列: SEQ ID NO: 1-2; EMBL and search for SEQ ID NOs: 1 and 2.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 109627302 A (INSTITUTE OF CROP SCIENCE, CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES) 16 April 2019 (2019-04-16) see claims 1-10	1-10
X	NCBI. "REDICTED: Glycine max growth-regulating factor 5 (LOC100806024), mRNA" NCBI Reference Sequence: XM_003529787.4, 31 August 2018 (2018-08-31), see FEATURES and ORIGIN	1-4
Y	NCBI. "REDICTED: Glycine max growth-regulating factor 5 (LOC100806024), mRNA" NCBI Reference Sequence: XM_003529787.4, 31 August 2018 (2018-08-31), see FEATURES and ORIGIN	6-10
Y	VERCRUYSEN, L. et al. "GROWTH REGULATING FACTOR5 Stimulates Arabidopsis Chloroplast Division, Photosynthesis, and Leaf Longevity" Plant Physiology, Vol. 167, 31 March 2015 (2015-03-31), see FEATURES and ORIGIN	6-10
A	WO 2013/02762 A1 (UNIV NAC DE ROSARIO et al.) 11 July 2013 (2013-07-11) see entire document	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ 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

13 December 2019

Date of mailing of the international search report

20 December 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/106583

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/106583

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
CN	109627302	A	16 April 2019	None		
WO	2013102762	A1	11 July 2013	AU	2013207126	A1
				IN	4992CHN2014	A
				CA	2860112	A1
				AU	2013207126	B2
				EP	2800817	A1
				US	2015033413	A1
				BR	112014016523	A2
				AR	089661	A1
				GB	201200075	D0
				CN	104093844	A
				CN	104093844	B
				US	9890388	B2

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/106583

A. 主题的分类 C07K 14/415(2006.01)i; C12N 15/29(2006.01)i; C12N 15/82(2006.01)i; A01H 5/00(2018.01)i; A01H 6/54(2018.01)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; VEN; MEDLINE; EPTXT; USTXT; WOTXT和关键词: 生长调节因子, 大豆, GROWTH-REGULATING FACTOR, GRF5, soybean, yield, photosynthe+等 中国专利生物序列检索系统; Genbank; EMBL和检索的序列: SEQ ID NO:1-2																	
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 109627302 A (中国农业科学院作物科学研究所) 2019年 4月 16日 (2019 - 04 - 16) 见权利要求1-10</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>NCBI. "REDICTED: Glycine max growth-regulating factor 5 (LOC100806024), mRNA" NCBI Reference Sequence: XM_003529787.4, 2018年 8月 31日 (2018 - 08 - 31), 见FEATURES、ORIGIN</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>NCBI. "REDICTED: Glycine max growth-regulating factor 5 (LOC100806024), mRNA" NCBI Reference Sequence: XM_003529787.4, 2018年 8月 31日 (2018 - 08 - 31), 见FEATURES、ORIGIN</td> <td>6-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Liesbeth Vercruyssen等. "GROWTH REGULATING FACTOR5 Stimulates Arabidopsis Chloroplast Division, Photosynthesis, and Leaf Longevity" Plant Physiology, 第167卷, 2015年 3月 31日 (2015 - 03 - 31), 见FEATURES、ORIGIN</td> <td>6-10</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 109627302 A (中国农业科学院作物科学研究所) 2019年 4月 16日 (2019 - 04 - 16) 见权利要求1-10	1-10	X	NCBI. "REDICTED: Glycine max growth-regulating factor 5 (LOC100806024), mRNA" NCBI Reference Sequence: XM_003529787.4, 2018年 8月 31日 (2018 - 08 - 31), 见FEATURES、ORIGIN	1-4	Y	NCBI. "REDICTED: Glycine max growth-regulating factor 5 (LOC100806024), mRNA" NCBI Reference Sequence: XM_003529787.4, 2018年 8月 31日 (2018 - 08 - 31), 见FEATURES、ORIGIN	6-10	Y	Liesbeth Vercruyssen等. "GROWTH REGULATING FACTOR5 Stimulates Arabidopsis Chloroplast Division, Photosynthesis, and Leaf Longevity" Plant Physiology, 第167卷, 2015年 3月 31日 (2015 - 03 - 31), 见FEATURES、ORIGIN	6-10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
PX	CN 109627302 A (中国农业科学院作物科学研究所) 2019年 4月 16日 (2019 - 04 - 16) 见权利要求1-10	1-10															
X	NCBI. "REDICTED: Glycine max growth-regulating factor 5 (LOC100806024), mRNA" NCBI Reference Sequence: XM_003529787.4, 2018年 8月 31日 (2018 - 08 - 31), 见FEATURES、ORIGIN	1-4															
Y	NCBI. "REDICTED: Glycine max growth-regulating factor 5 (LOC100806024), mRNA" NCBI Reference Sequence: XM_003529787.4, 2018年 8月 31日 (2018 - 08 - 31), 见FEATURES、ORIGIN	6-10															
Y	Liesbeth Vercruyssen等. "GROWTH REGULATING FACTOR5 Stimulates Arabidopsis Chloroplast Division, Photosynthesis, and Leaf Longevity" Plant Physiology, 第167卷, 2015年 3月 31日 (2015 - 03 - 31), 见FEATURES、ORIGIN	6-10															
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 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 "D" 申请人在国际申请中引证的文件 "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 "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 "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 "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																	
国际检索实际完成的日期 2019年 12月 13日		国际检索报告邮寄日期 2019年 12月 20日															
ISA/CN的名称和邮寄地址 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		授权官员 王金凤 电话号码 (86-10)-62412282															

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	W0 2013102762 A1 (UNIV NAC DE ROSARIO等) 2013年 7月 11日 (2013 - 07 - 11) 见全文	1-10

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列 (续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/106583

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	109627302	A	2019年 4月 16日	无	
WO	2013102762	A1	2013年 7月 11日	AU	2013207126 A1 2014年 6月 19日
				IN	4992CHN2014 A 2015年 9月 18日
				CA	2860112 A1 2013年 7月 11日
				AU	2013207126 B2 2017年 8月 31日
				EP	2800817 A1 2014年 11月 12日
				US	2015033413 A1 2015年 1月 29日
				BR	112014016523 A2 2017年 6月 13日
				AR	089661 A1 2014年 9月 10日
				GB	201200075 D0 2012年 2月 15日
				CN	104093844 A 2014年 10月 8日
				CN	104093844 B 2018年 11月 2日
				US	9890388 B2 2018年 2月 13日