

(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10日 (10.09.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/177560 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 6/46* (2018.01)
C12N 15/82 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2020/076319
- (22) 国际申请日: 2020年2月24日 (24.02.2020)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201910160206.3 2019年3月4日 (04.03.2019) CN
- (71) 申请人: 中国农业大学(CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国北京市海淀区圆明园西路2号, Beijing 100193 (CN)。
- (72) 发明人: 徐明良(XU, Ming Liang); 中国北京市海淀区圆明园西路2号, Beijing 100193 (CN)。朱芒(ZHU, Mang); 中国北京市海淀区圆明园西路2号, Beijing 100193 (CN)。番兴明(FAN, Xing Ming); 中国北京市海淀区圆明园西路2号, Beijing 100193 (CN)。钟涛(ZHONG, Tao); 中国北京市海淀区圆明园西路2号, Beijing 100193 (CN)。徐凌(XU, Ling); 中国北京市海淀区圆明园西路2号, Beijing 100193 (CN)。张艳(ZHANG, Yan); 中国北京市海淀区圆明园西路2号, Beijing 100193 (CN)。刘丽(LIU, Li); 中国北京市海淀区圆明园西路2号, Beijing 100193 (CN)。
- (74) 代理人: 北京纪凯知识产权代理有限公司(JEKKAI&PARTNERS); 中国北京市丰台区广安路9号5号楼15A层, Beijing 100055 (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))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: METHOD FOR CULTIVATING PLANT RESISTANT TO GRAY LEAF SPOT

(54) 发明名称: 一种培育抗灰斑病植物的方法

(57) Abstract: The present invention discloses a method for cultivating a plant resistant to gray leaf spot. The proteins provided by the present invention are obtained from maize and named as ZMPK protein, and are the proteins represented by seq. 2, seq. 4, seq. 7 or seq. 9 in the sequence list. Nucleic acid molecules encoding the ZMPK proteins are also within the scope of the present invention. The invention further sets forth a method for preparing a transgenic plant, comprising the step of: introducing the nucleic acid molecules into a starting plant to obtain the transgenic plant with reduced resistance to gray leaf spot. The invention further sets forth a method for preparing a transgenic plant, comprising the step of: knocking out or inhibiting the expression of the nucleic acid molecules in a starting plant to obtain the transgenic plant with increased resistance to gray leaf spot. The present invention is of great application value to the breeding of maize resistant to gray leaf spot.

(57) 摘要: 本发明公开了一种培育抗灰斑病植物的方法。本发明提供的蛋白质, 获自玉米, 命名为ZmPK蛋白, 为序列表中序列2、序列4、序列7或序列9所示的蛋白质。编码ZmPK蛋白的核酸分子也属于本发明的保护范围。本发明还保护一种制备转基因植物的方法, 包括如下步骤: 在出发植物中导入所述核酸分子, 得到灰斑病抗病性降低的转基因植物。本发明还保护一种制备转基因植物的方法, 包括如下步骤: 敲除或抑制出发植物中所述核酸分子的表达, 得到灰斑病抗病性增高的转基因植物。本发明对于玉米的抗灰斑病育种具有重大的应用价值。

WO 2020/177560 A1

一种培育抗灰斑病植物的方法

技术领域

本发明属于生物技术领域，具体涉及一种培育抗灰斑病植物的方法，更具
5 体涉及一种通过表达 *ZmPK* 基因对植物进行遗传改良以得到抗灰斑病植物的方
法。

背景技术

玉米灰斑病是一种世界性的玉米叶部真菌性病害，最早于 1925 年在美国伊
10 利诺伊州亚历山大县发现，严重影响玉米的产量。玉米灰斑病于 1991 年首次在我
国辽宁省丹东市发生，之后在吉林、河北以及云南等地均有报道。近年来，
灰斑病已经成为我国玉米生产上主要的叶部病害之一，其中西南玉米产区尤为
严重。玉米灰斑病的发生一般会导致玉米减产 10-30%，严重时可达 60-80%甚至
绝收，严重制约着我国玉米的生产。

目前研究认为造成玉米灰斑病的致病菌主要有玉蜀黍尾孢菌 (*Cercospora*
15 *zeae-maydis*, *Czm*) 和玉米尾孢菌 (*Cercospora zeina*, *Cz*) 两种。长期以来，
国内研究者认为我国玉米灰斑病的致病菌是 *Czm*。Liu 等在云南地区取样并进行
病菌形态学、致病性、ITS 序列和组蛋白 H3 的基因序列分析后发现，我国云南
地区玉米灰斑病的致病菌是 *Cz*。病斑首先出现在下部叶片，且叶片上的症状最
20 为明显。发病初期，病斑呈水渍状褪绿斑，之后扩展成灰褐色，近似矩形且与
叶脉平行，发病严重时，病斑会扩展成片，导致叶片枯萎。使用杀真菌剂等化
学防治手段效果不明显，培育抗灰斑病品种是控制此病最经济有效的途径。

发明公开

本发明提供了一种培育抗灰斑病植物的方法。。

本发明提供的蛋白质，获自玉米，命名为 *ZmPK* 蛋白，为如下 (a1) 或 (a2)
25 或 (a3) 或 (a4) 或 (a5) 或 (a6) 或 (a7) 或 (a8)：

(a1) 序列表中序列 2 所示的蛋白质；

(a2) 序列表中序列 4 所示的蛋白质；

(a3) 序列表中序列 7 所示的蛋白质；

(a4) 序列表中序列 9 所示的蛋白质；

30 (a5) 在 (a1) 至 (a4) 中任一所述蛋白质的 N 端或/和 C 端连接标签得到的
融合蛋白；

(a6) 自 N 末端至 C 末端依次由如下三个区段组成的蛋白质：(a1) 至 (a4)
中任一所述蛋白质、连接肽、EGFP 蛋白；

(a7) 将 (a1) 至 (a6) 中任一所述蛋白质经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与植物灰斑病抗病性相关的蛋白质;

(a8) 来源于玉米且与 (a1) 至 (a4) 中任一所述蛋白质具有 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 以上同一性且与植物灰斑病抗病性相关的蛋白质。

5 标签具体如表1所示。

表1 标签的序列

标签	残基	序列
Poly-Arg	5-6 (通常为5个)	RRRRR
Poly-His	2-10 (通常为6个)	HHHHHH
FLAG	8	DYKDDDDK
Strep-tag II	8	WSHPQFEK
c-myc	10	EQKLISEEDL
HA	9	YPYDVPDYA
EGFP	239	序列15

EGFP 蛋白具体如序列表的序列 15 所示。连接肽具体可如序列表的序列 19 所示。

10 蛋白质可人工合成,也可先合成其编码基因,再进行生物表达得到。编码 ZmPK 蛋白的核酸分子也属于本发明的保护范围。

所述核酸分子为如下 (b1) 至 (b15) 中的任意一种:

(b1) 编码区如序列表的序列 3 中第 56-1618 位核苷酸所示的 DNA 分子;

(b2) 序列表中序列 3 所示的 DNA 分子;

15 (b3) 编码区如序列表的序列 5 中第 56-1624 位核苷酸所示的 DNA 分子;

(b4) 序列表中序列 5 所示的 DNA 分子;

(b5) 序列表中序列 1 所示的 DNA 分子;

(b6) 编码区如序列表的序列 8 中第 56-1618 位核苷酸所示的 DNA 分子;

(b7) 序列表中序列 8 所示的 DNA 分子;

20 (b8) 编码区如序列表的序列 10 中第 56-1624 位核苷酸所示的 DNA 分子;

(b9) 序列表中序列 10 所示的 DNA 分子;

(b10) 序列表中序列 6 所示的 DNA 分子;

(b11) 序列表中序列 12 所示的 DNA 分子;

(b12) 序列表中序列 13 所示的 DNA 分子;

25 (b13) 序列表中序列 14 所示的 DNA 分子;

(b14) 来源于玉米且与 (b1) 至 (b13) 中的任意一种具有 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 以上同一性且编码所述蛋白质的 DNA 分子;

(b15) 在严格条件下与 (b1) 至 (b13) 中的任意一种杂交且编码所述蛋白质的 DNA 分子。

所述严格条件是在 $2\times\text{SSC}$, 0.1% SDS 的溶液中, 在 68°C 下杂交并洗膜 2 次, 每次 5min, 又于 $0.5\times\text{SSC}$, 0.1% SDS 的溶液中, 在 68°C 下杂交并洗膜 2 次, 每次 15min。

含有所述核酸分子的表达盒、重组载体或重组微生物均属于本发明的保护范围。

可用现有的表达载体构建含有所述核酸分子的重组表达载体。使用所述核酸分子构建重组表达载体时, 可在其转录起始核苷酸前加上任何一种增强型、组成型、组织特异型或诱导型启动子, 它们可单独使用或与其它植物启动子结合使用; 此外, 使用所述核酸分子构建重组表达载体时, 还可使用增强子, 包括翻译增强子或转录增强子, 这些增强子区域可以是 ATG 起始密码子或邻接区域起始密码子等, 但必需与编码序列的阅读框相同, 以保证整个序列的正确翻译。所述翻译控制信号和起始密码子的来源是广泛的, 可以是天然的, 也可以是合成的。翻译起始区域可以来自转录起始区域或结构基因。为了便于对转基因植物或转基因微生物进行鉴定及筛选, 可对所用表达载体进行加工, 如加入在植物或微生物中表达可产生颜色变化的酶或发光化合物的基因、具有抗性的抗生素标记物或是抗化学试剂标记基因等。从转基因安全性考虑, 可不加任何选择性标记基因, 直接以表型筛选转化植物或微生物。

所述重组表达载体具体可为: 将序列表的序列 12 所示双链 DNA 分子插入 pCAMBIA3301 载体的多克隆位点 (例如 *Bam*HI 位点) 得到的重组质粒。

所述重组表达载体具体可为在 pBCXUN 载体的多克隆位点 (例如 *Xcm*I 酶切位点) 插入所述核酸分子得到的重组质粒。

本发明还保护 ZmPK 蛋白的应用, 为如下 (c1) 或 (c2): (c1) 调控植物的灰斑病抗病性; (c2) 降低植物的灰斑病抗病性。

本发明还保护所述核酸分子的应用, 为如下 (d1) 或 (d2): (d1) 培育灰斑病抗病性改变的转基因植物; (d2) 培育灰斑病抗病性降低的转基因植物。

所述核酸分子的应用, 还包括以所述核酸分子为靶标降低所述核酸分子的表达量。实现方式包括但不限于: RNAi 干扰、基因敲除等。实现方式还包括: 启动子区域的插入、缺失或编辑, 启动子互换等。等方式对靶标实现方式包括但不限于: 使用表达较低或活性较弱的编辑或突变等位基因等。

本发明还保护用于抑制植物中 ZmPK 蛋白的活性和/或用于降低植物中 ZmPK 蛋白的丰度的物质的应用, 为增强植物的灰斑病抗病性。

本发明还保护用于抑制所述核酸分子转录和/或用于抑制所述核酸分子表达和/或用于对所述核酸分子进行基因编辑的物质的应用，为增强植物的灰斑病抗病性。所述“对所述核酸分子进行基因编辑的物质”具体可为后面任一所述的干扰载体或者后面任一所述的基因编辑载体。

5 本发明还保护一种制备转基因植物的方法，包括如下步骤：在出发植物中导入所述核酸分子，得到灰斑病抗病性降低的转基因植物。所述核酸分子具体可通过以上任一所述重组表达载体导入所述出发植物。携带有所述核酸分子的重组表达载体可通过 Ti 质粒、Ri 质粒、植物病毒载体、直接 DNA 转化、显微注射、电导、农杆菌介导等常规生物学方法转化到出发植物中。将所述转基因植物
10 与现有玉米品种进行杂交（包括单次杂交和多次杂交，例如连续杂交三次），得到的转基因后代植株同样为灰斑病抗病性降低的转基因植物。所述现有玉米品种具体可为玉米自交系 Q11。

本发明还保护一种植物育种方法，包括如下步骤：增加目的植物中 ZmPK 蛋白的含量和/或活性，从而降低目的植物的灰斑病抗病性。

15 本发明还保护一种制备转基因植物的方法，包括如下步骤：抑制出发植物中所述核酸分子的表达，得到灰斑病抗病性增高的转基因植物。抑制出发植物中所述核酸分子的表达具体可通过导入干扰载体实现。所述干扰载体具体可为如下重组质粒：具有正向片段、间隔片段和反向片段的重组质粒；所述间隔片段用于间隔正向片段和反向片段；正向片段和反向片段为反向互补的关系；正向片段如序列表的序列 11 所示。所述干扰载体具体可为如下重组质粒：以
20 pGreen-HY104 载体为出发载体，不同多克隆位点分别插入正向片段和反向片段得到的重组质粒；正向片段和反向片段为反向互补的关系；正向片段如序列表的序列 11 所示。所述干扰载体具体可为如下重组质粒：以 pGreen-HY104 载体为出发载体，在 *Bam*HI 和 *Xba*I 酶切位点之间插入正向片段，在 *Hind*III 和 *Eco*RI
25 酶切位点之间插入反向片段，得到 RNAi 干扰载体；正向片段和反向片段为反向互补的关系。正向片段如序列表的序列 11 所示。所述干扰载体可通过 Ti 质粒、Ri 质粒、植物病毒载体、直接 DNA 转化、显微注射、电导、农杆菌介导等常规生物学方法转化到出发植物中。将所述转基因植物与现有玉米品种进行杂交（包括单次杂交和多次杂交，例如连续杂交三次），得到的转基因后代植株同样为
30 灰斑病抗病性增高的转基因植物。所述现有玉米品种具体可为玉米自交系 Q11。

本发明还保护一种植物育种方法，包括如下步骤：降低目的植物中 ZmPK 蛋白的含量和/或活性，从而增高目的植物的灰斑病抗病性。

本发明还保护一种植物育种方法，包括如下步骤：对出发植物基因组中的

特定基因进行基因编辑（引起特定基因内发生移码突变），从而增高目的植物的灰斑病抗病性；所述特定基因编码 ZmPK 蛋白。

所述基因编辑具体通过 Cas9 技术实现。

所述基因编辑具体通过两个 sgRNA 和 Cas9 蛋白实现。其中一个 sgRNA 的靶序列结合区如序列列表的序列 17 所示，另一个 sgRNA 的靶序列结合区如序列列表的序列 18 所示。

所述基因编辑具体通过导入基因编辑载体实现。基因编辑载体具体可为如下重组质粒：在 pBUE411 载体的 *Bsa*I 酶切位点插入序列列表的序列 16 所示的双链 DNA 分子。

以上任一所述植物为双子叶植物或单子叶植物。所述单子叶植物可为禾本科植物。所述禾本科植物可为玉蜀黍属植物。所述玉蜀黍属植物具体可为玉米，例如玉米自交系 B73 或玉米自交系 B73-329。

以上任一所述灰斑病具体可为玉米尾孢菌引起的灰斑病。

附图说明

- 15 图 1 为 pBCXUN 载体的结构示意图。
图 2 为实施例 2 中基因表达水平鉴定的结果。
图 3 为实施例 2 中抗病性鉴定的结果。
图 4 为 RNAi 干扰载体的结构示意图。
图 5 为实施例 3 中基因表达水平鉴定的结果。
20 图 6 为实施例 3 中抗病性鉴定的结果。
图 7 为 *ZmPK* 基因的表达量与灰斑病病情等级之间的相关性的结果。
图 8 为 pCAMBIA3301 载体的结构示意图。
图 9 为实施例 5 中基因表达水平鉴定的结果。
图 10 为实施例 5 中抗病性鉴定的结果。
25 图 11 为重组质粒 E 和重组质粒 F 的结构示意图。
图 12 为实施例 6 中基因表达水平鉴定的结果。
图 13 为实施例 6 中抗病性鉴定的结果。
图 14 为两株基因编辑植株的测序结果。
图 15 为实施例 7 中抗病性鉴定的结果。

30 实施发明的最佳方式

以下的实施例便于更好地理解本发明，但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料，如无特殊说明，均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试

验，均设置三次重复实验，结果取平均值。

玉米自交系Y32，为高抗玉米灰斑病的玉米自交系。玉米自交系Y32 (line Y32)，记载于如下文献：QTL mapping of resistance to gray leaf spot in maize, Yan Zhang ect., Theor Appl Genet DOI 10.1007/s00122-012-1954-z。

5 玉米自交系Q11，为高感灰斑病的玉米自交系。玉米自交系Q11 (line Q11)，记载于如下文献：QTL mapping of resistance to gray leaf spot in maize, Yan Zhang ect., Theor Appl Genet DOI 10.1007/s00122-012-1954-z。

玉米自交系B73(B73inbred lines)，记载于如下文献：The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics, Patrick S. Schnable ect.,
10 Science(2009) 326: 1112-1115. DOI: 10.1126/science.1178534; The tin1 gene retains the function of promoting tillering in maize, Zhang ect., Nature communications(2019) 5608. DOI:10.1038/s41467-019-134225-6。

玉米自交系B73-329 (B73-329 inbred lines)，记载于如下文献：A retrotransposon in an HKT1 family sodium transporter causes variation
15 of leaf Na⁺ exclusion and salt tolerance in maize, Ming Zhang ect., New Phytologist (2018) 217: 1161 - 1176 doi: 10.1111/nph.14882。

玉米尾孢菌 (*Cercospora zeina*)，记载于如下文献：First Report of Gray Leaf Spot of Maize Caused by *Cercospora zeina* in China, Plant Disease/Vol. 97 No. 12。

20 pBCXUN载体 (pBCXUN vector)，记载于如下文献：ZmHAK5 and ZmHAK1 function in K⁺ uptake and distribution in maize under low K⁺ conditions. Journal of Intergrative Plant Biology (2018) doi:10.1111/jipb.12756。pBCXUN载体的结构示意图见图1。

25 pGreen-HY104载体 (vector pGreen-HY104)，记载于如下文献：A maize wall-associated kinase confers quantitative resistance to head smut, Nature Genetics(2015) 47:151-157。

pCAMBIA3301载体 (bivalent expression vector *pCAMBIA3301*)，记载于如下文献：Pyramiding of nine transgenes in maize generates high-level resistance against necrotrophic maize pathogens。

30 pBUE411载体 (pBUE411 vector)，记载于如下文献：ZmCCT9 enhances maize adaptation to higher latitudes. Huang ect., PNAS (2018) 115(2):E334-E341 DOI:10.1073/pnas.1718058115。

实施例1、ZmPK蛋白及其编码基因的发现

用玉米自交系 Y32（作为供体亲本）和玉米自交系 Q11（作为轮回亲本），构建初定位群体和精细定位群体。利用位于精细定位的区域的分子标记，通过 PCR 的方法筛选抗病亲本 Y32 BAC 文库。进行 BAC 克隆指纹图谱分析，构建覆盖整个基因区段的 BAC 重叠群。选择能够覆盖基因区域最少的克隆，用于测序。

5 通过序列比对和表达分析发现了一个新基因。

玉米自交系 Y32 的基因组 DNA 中的 *ZmPK* 基因如序列表的序列 1 所示。*ZmPK* 基因存在两个转录本，第一个转录本编码序列表的序列 2 所示的蛋白质，第二个转录本编码序列表的序列 4 所示的蛋白质。玉米自交系 Y32 的 cDNA 中第一个转录本对应的开放阅读框如序列表的序列 3 中第 56-1618 位核苷酸所示。玉米
10 自交系 Y32 的 cDNA 中第二个转录本对应的开放阅读框如序列表的序列 5 中第 56-1624 位核苷酸所示。

三个玉米自交系（三个玉米自交系指的是玉米自交系 B73 和玉米自交系 B73-329 和玉米自交系 Q11，下同）的基因组 DNA 中的 *ZmPK* 基因如序列表的序列 6 所示。*ZmPK* 基因存在两个转录本，第一个转录本编码序列表的序列 7 所示的蛋白质，第二个转录本编码序列表的序列 9 所示的蛋白质。三个玉米自交系的 cDNA 中第一个转录本对应的开放阅读框如序列表的序列 8 中第 56-1618 位核苷酸所示。三个玉米自交系的 cDNA 中第二个转录本对应的开放阅读框如序列表的序列 10 中第 56-1624 位核苷酸所示。

实施例 2、过表达植物的获得和鉴定

20 一、重组表达载体的构建

1、取玉米自交系 Y32 的新鲜叶片，提取总 RNA，反转录得到 cDNA。

2、以步骤 1 得到的 cDNA 为模板，采用 ZmPK-OE-F 和 ZmPK-OE-R 组成的引物对进行 PCR 扩增，得到 PCR 扩增产物。

ZmPK-OE-F: 5' -ATGGGCGCTTGCTTCTCCTC-3' ;

25 ZmPK-OE-R: 5' -TCACAGAGCCTGAGGGTTTGG-3' 。

3、取 pBCXUN 载体，采用限制性内切酶 XcmI 进行酶切，回收载体骨架。

4、将步骤 2 得到的 PCR 扩增产物和步骤 3 得到的载体骨架连接，得到重组质粒甲和重组质粒乙。根据测序结果，对重组质粒甲进行结构描述如下：在 pBCXUN 载体的 XcmI 酶切位点插入了序列表的序列 3 中第 56-1618 位核苷酸所示的 DNA 分子。根据测序结果，对重组质粒乙进行结构描述如下：在 pBCXUN 载体的 XcmI 酶切位点插入了序列表的序列 5 中第 56-1624 位核苷酸所示的 DNA 分子。
30 由于模板中同时存在两种序列且差异仅为 6 个核苷酸，重组质粒甲和重组质粒乙的构建方式相同并且同时产生，需要通过测序鉴别。实际应用中，也可以分

别直接合成两个外源片段然后插入 pBCXUN 载体的 XcmI 酶切位点，从而得到重组质粒甲和重组质粒乙。

5、取玉米自交系 Q11 的新鲜叶片，提取总 RNA，反转录得到 cDNA。

6、以步骤 5 得到的 cDNA 为模板，采用 ZmPK-OE-F 和 ZmPK-OE-R 组成的引物对进行 PCR 扩增，得到 PCR 扩增产物。

7、将步骤 6 得到的 PCR 扩增产物和步骤 3 得到的载体骨架连接，得到重组质粒丙。根据测序结果，对重组质粒丙进行结构描述如下：在 pBCXUN 载体的 XcmI 酶切位点插入了序列列表的序列 8 中第 56-1618 位核苷酸所示的 DNA 分子。

二、过表达植物的获得

10 1、将重组质粒导入农杆菌 EHA105，得到重组农杆菌。

2、取步骤 1 得到的重组农杆菌，采用农杆菌介导法对玉米自交系 B73-329 的幼胚进行遗传转化，得到 T0 代植株。

3、将 T0 代植株进行 PCR 鉴定。

15 PCR 鉴定方法：取植株叶片，提取基因组 DNA，采用 bar-F 和 bar-R 组成的引物对进行 PCR 扩增，如果得到约 262bp 的扩增产物、PCR 鉴定为阳性、该植株为转基因植株，如果没有得到扩增产物、PCR 鉴定为阴性、该植株为非转基因植株。

bar-F: GAAGGCACGCAACGCCTACGA; bar-R: CCAGAAACCCACGTCATGCCA。

20 采用重组质粒甲进行步骤二，对随机取的三个转基因植株进行命名，分别为 YT1-1 植株、YT1-2 植株、YT1-3 植株。采用重组质粒乙进行步骤二，对随机取的三个转基因植株进行命名，分别为 YT2-1 植株、YT2-2 植株、YT2-3 植株。采用重组质粒丙进行步骤二，对随机取的三个转基因植株进行命名，分别为 QT1-1 植株、QT1-2 植株、QT1-3 植株。

三、回交分离后代的获得

25 T0 代植株自交，收获籽粒，将籽粒培育为植株，即为 T1 代植株；从 T1 代植株中筛选转基因植株，PCR 鉴定方法同步骤二的 3；将 T1 代转基因植株作为母本，玉米自交系 Q11 作为父本，进行杂交，收获籽粒，将籽粒培育为植株，即为 F1 代植株；从 F1 代植株中筛选转基因植株，PCR 鉴定方法同步骤二的 3；将 F1 代转基因植株作为母本，玉米自交系 Q11 作为父本，进行杂交，收获籽粒，
30 将籽粒培育为植株，即为 BC₁F₁ 代植株；从 BC₁F₁ 代植株中筛选转基因植株和非转基因植株，PCR 鉴定方法同步骤二的 3；将 BC₁F₁ 代转基因植株作为母本，玉米自交系 Q11 作为父本，进行杂交，收获籽粒，将籽粒培育为植株，即为 BC₂F₁ 代植株；从 BC₂F₁ 代植株中筛选转基因植株和非转基因植株，PCR 鉴定方法同步骤二

的 3；将 BC₂F₁ 代转基因植株作为母本，玉米自交系 Q11 作为父本，进行杂交，收获籽粒，将籽粒培育为植株，即为 BC₃F₁ 代植株；从 BC₃F₁ 代植株中筛选转基因植株和非转基因植株，PCR 鉴定方法同步骤二的 3。

T0 代植株分别为：YT1-1 植株、YT1-2 植株、YT1-3 植株、YT2-1 植株、YT2-2 植株、YT2-3 植株、QT1-1 植株、QT1-2 植株、QT1-3 植株。

四、植株的抗病性鉴定

供试植株为：YT1-1 植株的 BC₃F₁ 代转基因植株和非转基因植株、YT1-2 植株的 BC₃F₁ 代转基因植株和非转基因植株、YT1-3 植株的 BC₃F₁ 代转基因植株和非转基因植株、YT2-1 植株的 BC₁F₁ 代转基因植株和非转基因植株、YT2-2 植株的 BC₁F₁ 代转基因植株和非转基因植株、YT2-3 植株的 BC₁F₁ 代转基因植株和非转基因植株、QT1-1 植株的 BC₃F₁ 代转基因植株和非转基因植株、QT1-2 植株的 BC₁F₁ 代转基因植株和非转基因植株、QT1-3 植株的 BC₃F₁ 代转基因植株和非转基因植株。

1、基因表达水平鉴定

提取供试植株叶片的总 RNA 并反转录得到 cDNA，以 GAPDH 基因为内参基因，通过 qPCR 检测 *ZmPK* 基因的相对表达水平。结果见图 2。

用于检测 *ZmPK* 基因的引物对：

ZmPK-F：GCGTTGCCGTCAAGCGCAT；ZmPK-R：GCTCCATCACAATGTACACGT。

用于检测 GAPDH 基因的引物对：

GAPDH-F：ATCAACGGCTTCGGAAGGAT；GAPDH-R：CCGTGGACGGTGTCGTACTT。

2、抗病性鉴定

抗病性鉴定在中国农业大学上庄实验基地进行。

灰斑病致病菌：玉米尾孢菌 (*Cercospora zeina*)。

正常培养供试植株，喇叭口期接种致病菌，然后继续正常培养，授粉两周后进行表型调查，采用分级调查计算病情指数 (DSI)。接种致病菌的具体方法 (菌液灌心法)：用无菌水悬浮灰斑病致病菌的孢子，得到孢子浓度为 $2-4 \times 10^5$ 个/mL 的孢子悬液，利用注射器将孢子悬液灌注于玉米喇叭口中，每株玉米灌注 5ml。

病情等级的分级标准 (X 代表病斑面积占叶片面积的百分比)：

- 1 级 (赋值为 0)： $X \leq 5\%$;
- 3 级 (赋值为 0.25)： $5\% < X \leq 10\%$;
- 5 级 (赋值为 0.5)： $10\% < X \leq 30\%$;
- 7 级 (赋值为 0.75)： $30\% < X \leq 70\%$;
- 9 级 (赋值为 1)： $70\% < X \leq 100\%$ 。

$$\text{病情指数 (DSI) (\%)} = \frac{\sum (\text{病情等级对应的赋值} \times \text{该等级的植株数}) \times 100}{1 \times \text{总株数}}$$

结果见图 3。图 3 中，括号标注的是植株数量，分隔线前的数字为非转基因植株的数量，分隔线后的数字为转基因植株的数量。

5 结果表明，与非转基因植株相比，转基因植株中 *ZmPK* 基因的表达量显著增高，相应的转基因植株的病情指数显著增高。

实施例 3、抑制表达植物的获得和鉴定

一、抑制表达植物的获得

10 1、以 pGreen-HY104 载体为出发载体，在 *Bam*HI 和 *Xba*I 酶切位点之间插入正向片段，在 *Hind*III 和 *Eco*RI 酶切位点之间插入反向片段，得到 RNAi 干扰载体。RNAi 干扰载体已进行测序验证。正向片段和反向片段为反向互补的关系。正向片段如序列表的序列 11 所示。RNAi 干扰载体的结构示意图见图 4。

2、将步骤 1 得到的 RNAi 干扰载体导入农杆菌 EHA105，得到重组农杆菌。

3、取步骤 2 得到的重组农杆菌，采用农杆菌介导法对玉米自交系 B73-329 的幼胚进行遗传转化，得到 T0 代植株。

15 4、T0 代植株自交，收获籽粒，将籽粒培育为植株，即为 T1 代植株。

5、将 T0 代植株进行 PCR 鉴定。

PCR 鉴定方法同实施例 2 的步骤二的 3。

对随机取的三个转基因植株进行命名，分别为 RNAi#806 植株、RNAi#1065 植株、RNAi#581 植株。

20 二、回交分离群体的获得

PCR 鉴定方法均同实施例 2 的步骤二的 3。

T0 代植株自交，收获籽粒，将籽粒培育为植株，即为 T1 代植株；从 T1 代植株中筛选转基因植株（PCR 鉴定）；将 T1 代转基因植株作为母本，玉米自交系 Q11 作为父本，进行杂交，收获籽粒，将籽粒培育为植株，即为 F1 代植株；
25 从 F1 代植株中筛选转基因植株（PCR 鉴定）；将 F1 代转基因植株作为母本，玉米自交系 Q11 作为父本，进行杂交，收获籽粒，将籽粒培育为植株，即为 BC₁F₁ 代植株；从 BC₁F₁ 代植株中筛选转基因植株和非转基因植株（PCR 鉴定）；将 BC₁F₁ 代转基因植株作为母本，玉米自交系 Q11 作为父本，进行杂交，收获籽粒，将籽粒培育为植株，即为 BC₂F₁ 代植株；从 BC₂F₁ 代植株中筛选转基因植株和非转基因植株（PCR 鉴定）。
30

T0 代植株分别为：RNAi#806 植株、RNAi#1065 植株、RNAi#581 植株。

三、植株的抗病性鉴定

供试植株为：RNAi#806 植株的 BC₂F₁ 代转基因植株和非转基因植株、RNAi#1065 植株的 BC₂F₁ 代转基因植株和非转基因植株、RNAi#581 植株的 BC₂F₁ 代转基因植株和非转基因植株。

1、基因表达水平鉴定

5 方法同实施例 2 的步骤四的 1。

结果见图 5。

2、抗病性鉴定

方法同实施例 2 的步骤四的 2。

10 结果见图 6。图 6 中，括号标注的是植株数量，分隔线前的数字为非转基因植株的数量，分隔线后的数字为转基因植株的数量。

结果表明，与非转基因植株相比，转基因植株中 *ZmPK* 基因的表达量显著降低，相应的转基因植株的病情指数显著降低。

实施例 4、基因表达量与抗性相关性分析

15 定位群体的原始亲本是玉米自交系 Y32 和玉米自交系 Q11。通过不断杂交和回交构建高世代的回交分离群体。

20 随机选取了定位群体中病情等级为 1、3、5、7、9 的植株各 3 株，进行基因表达水平鉴定（方法同实施例 2 的步骤四的 1）和抗病性鉴定（方法同实施例 2 的步骤四的 2），计算 *ZmPK* 基因的表达量与灰斑病病情等级之间的相关性。结果见图 7。*ZmPK* 基因的表达量与灰斑病病情等级之间显著正相关，再次证明了 *ZmPK* 基因的表达量与植物灰斑病抗病性之间的负相关性。

实施例 5、互补转基因植物的获得和鉴定

一、重组表达载体的构建

25 制备重组质粒。根据测序结果，对重组质粒进行结构描述如下：在 pCAMBIA3301 载体的 *Bam*HI 酶切位点插入了序列列表的序列 12 所示的 DNA 分子。pCAMBIA3301 载体的结构示意图见图 8。

二、互补转基因植物的获得

1、将步骤一制备的重组质粒导入农杆菌 EHA105，得到重组农杆菌。

2、取步骤 1 得到的重组农杆菌，采用农杆菌介导法对玉米自交系 B73 的幼胚进行遗传转化，得到 T0 代植株。

30 3、将 T0 代植株进行 PCR 鉴定。

PCR 鉴定方法同实施例 2 的步骤二的 3。

对随机取的一个转基因植株进行命名，为 C#596 植株。

三、回交分离后代的获得

T0 代植株自交，收获籽粒，将籽粒培育为植株，即为 T1 代植株；从 T1 代植株中筛选转基因植株，PCR 鉴定方法同步骤二的 3；将 T1 代转基因植株作为母本，玉米自交系 Q11 作为父本，进行杂交，收获籽粒，将籽粒培育为植株，即为 F1 代植株；从 F1 代植株中筛选转基因植株，PCR 鉴定方法同步骤二的 3；
5 将 F1 代转基因植株作为母本，玉米自交系 Q11 作为父本，进行杂交，收获籽粒，将籽粒培育为植株，即为 BC₁F₁ 代植株。

四、植株的抗病性鉴定

供试植株为：C#595 植株的 BC₁F₁ 代转基因植株和非转基因植株，C#596 植株的 BC₁F₁ 代转基因植株和非转基因植株。

10 1、基因表达水平鉴定

方法同实施例 2 的步骤四的 1。

结果见图 9。

2、抗病性鉴定

方法同实施例 2 的步骤四的 2。

15 结果见图 10。图 10 中，括号标注的是植株数量，分隔线前的数字为非转基因植株的数量，分隔线后的数字为转基因植株的数量。

结果表明，与非转基因植株相比，转基因植株中 *ZmPK* 基因的表达量显著增高，相应的转基因植株的病情指数显著增高。

实施例 6、融合过表达植株纯系的获得和鉴定

20 一、重组表达载体的构建

分别制备重组质粒 E 和重组质粒 F。根据测序结果，对重组质粒 E 进行结构描述如下：在 pBCXUN 载体的 *XcmI* 酶切位点插入了序列表的序列 13 所示的 DNA 分子。根据测序结果，对重组质粒 F 进行结构描述如下：在 pBCXUN 载体的 *XcmI* 酶切位点插入了序列表的序列 14 所示的 DNA 分子。重组质粒 E 和重组质粒 F 的
25 结构示意图见图 11。

二、融合过表达植株纯系的获得

1、将重组质粒导入农杆菌 EHA105 中，得到重组农杆菌。

2、取步骤 1 得到的重组农杆菌，采用农杆菌介导法对玉米自交系 B73 的幼胚进行遗传转化，得到 T0 代植株。

30 3、将 T0 代植株进行 PCR 鉴定。

PCR 鉴定方法同实施例 2 的步骤二的 3。

采用重组质粒 E 进行步骤二，对随机选取的四个转基因植株进行命名，分别为：Y1#349 植株、Y1#350 植株、Y1#351 植株、Y1#354 植株。采用重组质粒 F

进行步骤二，对随机选取的三个转基因植株进行命名，分别为 Y2#731 植株、Y2#732 植株、Y2#735 植株。

4、T0 代植株自交，收获籽粒，将籽粒培育为植株，即为 T1 代植株。从 T1 代植株中筛选转基因植株（PCR 鉴定）进行自交，收获籽粒，将籽粒培育为植株即为 T2 代植株。从 T2 代植株中筛选转基因植株（PCR 鉴定）进行自交，收获籽粒，将籽粒培育为植株即为 T3 代植株。PCR 鉴定方法同实施例 2 的步骤二的 3。对于某一 T2 代植株，如果其自交得到的 T3 代植株均为转基因植株，该 T2 代植株为纯合的转基因植株。纯合的转基因植株自交得到的后代为纯合的转基因株系。

10 得到如下纯合的转基因株系：Y1#349 株系、Y1#350 株系、Y1#351 株系、Y1#354 株系、Y2#731 株系、Y2#732 株系、Y2#735 株系。

三、植株的抗病性鉴定

供试植株为：Y1#349 株系的 T3 代植株、Y1#350 株系的 T3 代植株、Y1#351 株系的 T3 代植株、Y1#354 株系的 T3 代植株、Y2#731 株系的 T3 代植株、Y2#732 株系的 T3 代植株、Y2#735 株系的 T3 代植株，以及玉米自交系 B73 植株。

1、基因表达水平鉴定

方法同实施例 2 的步骤四的 1。

结果见图 12。

2、抗病性鉴定

20 方法同实施例 2 的步骤四的 2。

结果见图 13。图 13 中，括号标注的是植株数量。

结果表明，与玉米自交系 B73 植株（对照非转基因植株）相比，转基因植株中 *ZmPK* 基因的表达量显著增高，相应的转基因植株的病情指数显著增高。

实施例 7、基因编辑植株的获得和鉴定

25 一、基因编辑载体的构建

构建基因编辑载体，即如下重组质粒：在 pBUE411 载体的 *BsaI* 酶切位点插入序列表的序列 16 所示的双链 DNA 分子。重组质粒已进行测序验证。基因编辑载体编码两个 sgRNA，其中一个 sgRNA 的靶序列结合区如序列表的序列 17 所示，另一个 sgRNA 的靶序列结合区如序列表的序列 18 所示。基因编辑载体中具有 30 Cas9 基因，并表达得到 Cas9 蛋白。

二、基因编辑植株的获得

1、将基因编辑载体导入农杆菌 EHA105，得到重组农杆菌。

2、取步骤 1 得到的重组农杆菌，采用农杆菌介导法对玉米自交系 B73 的幼

胚进行遗传转化，得到 T0 代植株。

3、从 T0 代植株中筛选目标序列发生变异的植株。

具体方法：取植株叶片，提取基因组 DNA，采用 F 和 R 组成的引物对进行 PCR 扩增，回收 PCR 扩增产物并进行测序，将测序结果与野生型序列进行比较（野生型序列如序列列表的序列 12 中第 9599-10985 所示），筛选得到具有差异序列的植株。

F: 5' -TTGAGGTCATTGTCTCAGCC-3' ;

R: 5' -AGCAGCTTGGCAGCGTATG-3' 。

4、取步骤 3 筛选的 T0 代植株，自交并收获籽粒，将籽粒培育为植株，即为 T1 代植株。

5、从 T1 代植株中筛选基因编辑植株。

（1）将植株进行以基因编辑载体中的 bar 基因为靶标的 PCR 鉴定。PCR 鉴定方法：取植株叶片，提取基因组 DNA，采用 bar-F 和 bar-R 组成的引物对进行 PCR 扩增，如果没有得到扩增产物、PCR 鉴定为阴性。

（2）将植株进行以基因编辑目标区域为靶标的鉴定。鉴定方法同步骤 3。

如果某一植株步骤（1）PCR 鉴定为阴性，且步骤（2）的鉴定结果显示与野生型序列具有差异且为纯合型（且两条染色体一致），该植株为基因编辑植株。

获得了两株基因编辑植株，分别命名为 ZmPK-KO#1 植株、ZmPK-KO#2 植株。

两株基因编辑植株步骤（2）的测序结果见图 14。与 B73 相比，ZmPK-KO#1 植株中缺失了两个核苷酸，ZmPK-KO#2 植株中插入了一个核苷酸，均造成移码突变。

6、取基因编辑植株，自交，获得后代植株，即为基因编辑株系。

获得了两个基因编辑株系，分别命名为 ZmPK-KO#1 株系、ZmPK-KO#2 株系。

三、基因编辑植株的抗病性鉴定

供试植株为：ZmPK-KO#1 株系的 T2 代植株、ZmPK-KO#2 株系的 T2 代植株，玉米自交系 B73 植株。

方法同实施例 2 的步骤四的 2。

结果见图 15。图 15 中，括号标注的是植株数量。

相对于玉米自交系 B73 植株，基因编辑植株的病情指数显著降低。

30 工业应用

本发明提供了一个抗玉米灰斑病的主效基因 *ZmPK*，进一步通过转基因互补、过表达、CRISPR 敲除和 RNAi 干扰实验证明了该基因的抗灰斑病功能-负调控灰斑病抗性。本发明对于玉米的抗灰斑病育种具有重大的应用价值。

权利要求

- 1、一种蛋白质，为如下 (a1) 或 (a2) 或 (a3) 或 (a4) 或 (a5) 或 (a6) 或 (a7) 或 (a8)：
- 5 (a1) 序列表中序列 2 所示的蛋白质；
(a2) 序列表中序列 4 所示的蛋白质；
(a3) 序列表中序列 7 所示的蛋白质；
(a4) 序列表中序列 9 所示的蛋白质；
(a5) 在 (a1) 至 (a4) 中任一所述蛋白质的 N 端或/和 C 端连接标签得到
- 10 的融合蛋白；
(a6) 自 N 末端至 C 末端依次由如下三个区段组成的蛋白质：(a1) 至 (a4) 中任一所述蛋白质、连接肽、EGFP 蛋白；
(a7) 将 (a1) 至 (a6) 中任一所述蛋白质经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与植物灰斑病抗病性相关的蛋白质；
- 15 (a8) 来源于玉米且与 (a1) 至 (a4) 中任一所述蛋白质具有 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 以上同一性且与植物灰斑病抗病性相关的蛋白质。
- 2、编码权利要求 1 所述蛋白质的核酸分子。
- 3、如权利要求 2 所述的核酸分子，其特征在于：所述核酸分子为如下 (b1)
- 20 至 (b15) 中的任意一种：
- (b1) 编码区如序列表的序列 3 中第 56-1618 位核苷酸所示的 DNA 分子；
(b2) 序列表中序列 3 所示的 DNA 分子；
(b3) 编码区如序列表的序列 5 中第 56-1624 位核苷酸所示的 DNA 分子；
(b4) 序列表中序列 5 所示的 DNA 分子；
- 25 (b5) 序列表中序列 1 所示的 DNA 分子；
(b6) 编码区如序列表的序列 8 中第 56-1618 位核苷酸所示的 DNA 分子；
(b7) 序列表中序列 8 所示的 DNA 分子；
(b8) 编码区如序列表的序列 10 中第 56-1624 位核苷酸所示的 DNA 分子；
(b9) 序列表中序列 10 所示的 DNA 分子；
- 30 (b10) 序列表中序列 6 所示的 DNA 分子；
(b11) 序列表中序列 12 所示的 DNA 分子；
(b12) 序列表中序列 13 所示的 DNA 分子；
(b13) 序列表中序列 14 所示的 DNA 分子；

(b14) 来源于玉米且与 (b1) 至 (b13) 中的任意一种具有 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 以上同一性且编码所述蛋白质的 DNA 分子;

5 (b15) 在严格条件下与 (b1) 至 (b13) 中的任意一种杂交且编码所述蛋白质的 DNA 分子。

4、含有权利要求 2 或 3 所述核酸分子的表达盒、重组载体或重组微生物。

5、权利要求 1 所述蛋白质的应用, 为如下 (c1) 或 (c2):

(c1) 调控植物的灰斑病抗病性;

(c2) 降低植物的灰斑病抗病性。

10 6、如权利要求 5 所述的应用, 其特征在于: 所述植物为玉蜀黍属植物。

7、权利要求 2 或 3 所述核酸分子的应用, 为如下 (d1) 或 (d2):

(d1) 培育灰斑病抗病性改变的转基因植物;

(d2) 培育灰斑病抗病性降低的转基因植物。

8、如权利要求 7 所述的应用, 其特征在于: 所述植物为玉蜀黍属植物。

15 9、用于抑制植物中权利要求 1 所述蛋白质的活性和/或用于降低植物中权利要求 1 所述蛋白质的丰度的物质的应用, 为增强植物的灰斑病抗病性。

10、如权利要求 9 所述的应用, 其特征在于: 所述植物为玉蜀黍属植物。

11、用于抑制权利要求 2 或 3 所述核酸分子转录和/或用于抑制权利要求 2 或 3 所述核酸分子表达和/或用于对权利要求 2 或 3 所述核酸分子进行基因编辑
20 的物质的应用, 为增强植物的灰斑病抗病性。

12、如权利要求 11 所述的应用, 其特征在于: 所述植物为玉蜀黍属植物。

13、一种制备转基因植物的方法, 包括如下步骤: 在出发植物中导入权利要求 2 或 3 所述核酸分子, 得到灰斑病抗病性降低的转基因植物。

25 14、如权利要求 13 所述的方法, 其特征在于: 所述出发植物为玉蜀黍属植物。

15、一种植物育种方法, 包括如下步骤: 增加目的植物中权利要求 1 所述蛋白质的含量和/或活性, 从而降低目的植物的灰斑病抗病性。

16、如权利要求 15 所述的方法, 其特征在于: 所述目的植物为玉蜀黍属植物。

30 17、一种制备转基因植物的方法, 包括如下步骤: 抑制出发植物中权利要求 2 或 3 所述核酸分子的表达, 得到灰斑病抗病性增高的转基因植物。

18、如权利要求 17 所述的方法, 其特征在于: 所述出发植物为玉蜀黍属植物。

19、一种植物育种方法，包括如下步骤：降低目的植物中权利要求 1 所述蛋白质的含量和/或活性，从而增高目的植物的灰斑病抗病性。

20、如权利要求 19 所述的方法，其特征在于：所述目的植物为玉蜀黍属植物。

5 21、一种植物育种方法，包括如下步骤：对出发植物基因组中的特定基因进行基因编辑，从而增高目的植物的灰斑病抗病性；所述特定基因编码权利要求 1 所述蛋白质。

22、如权利要求 21 所述的方法，其特征在于：所述出发植物为玉蜀黍属植物。

10

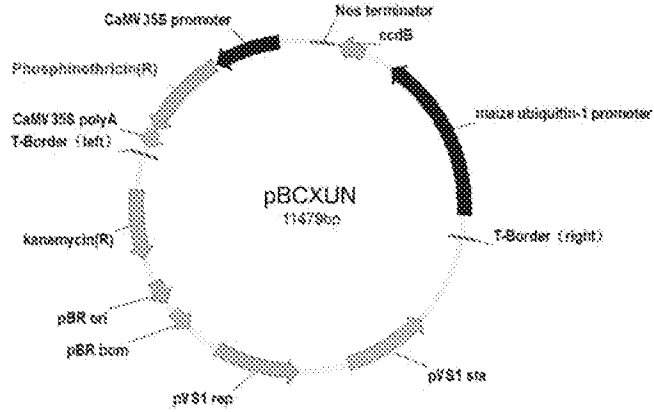


图 1

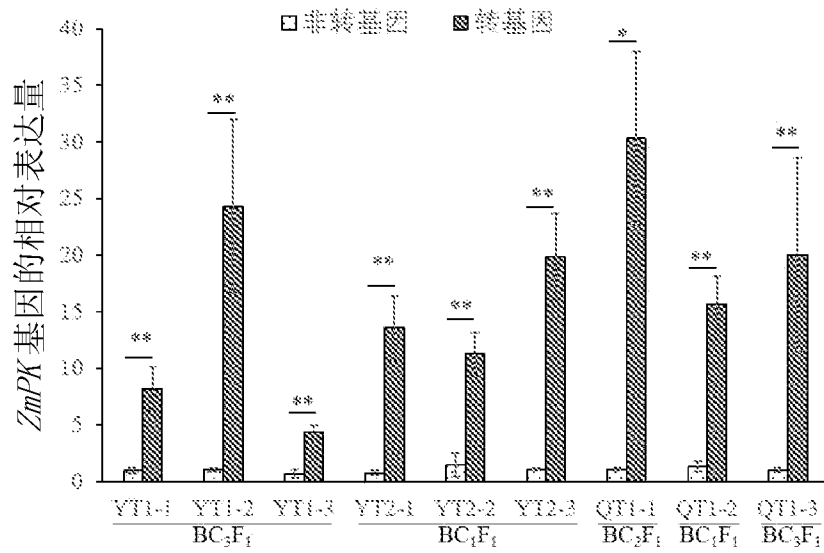


图 2

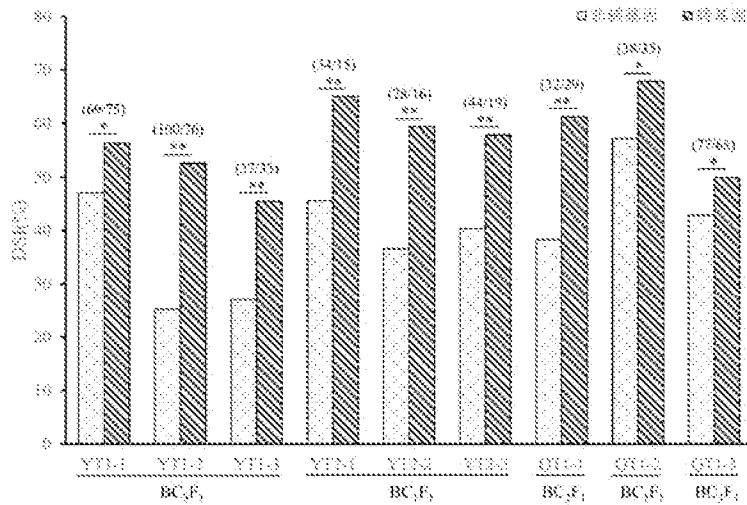


图 3



图 4

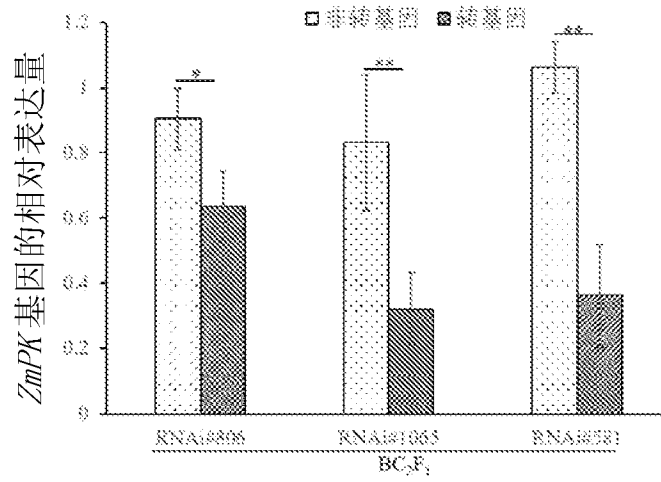


图 5

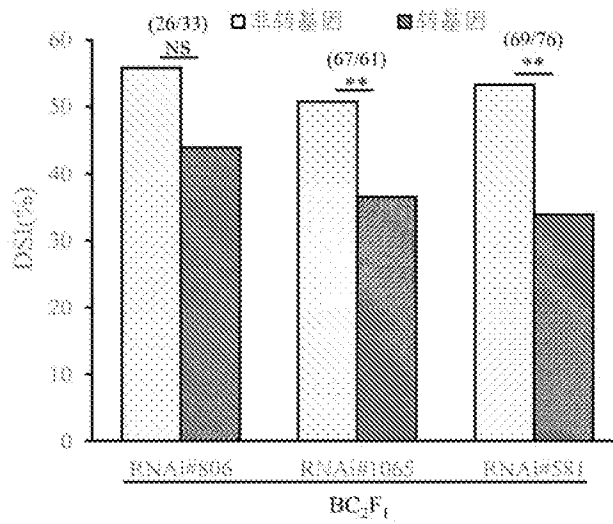


图 6

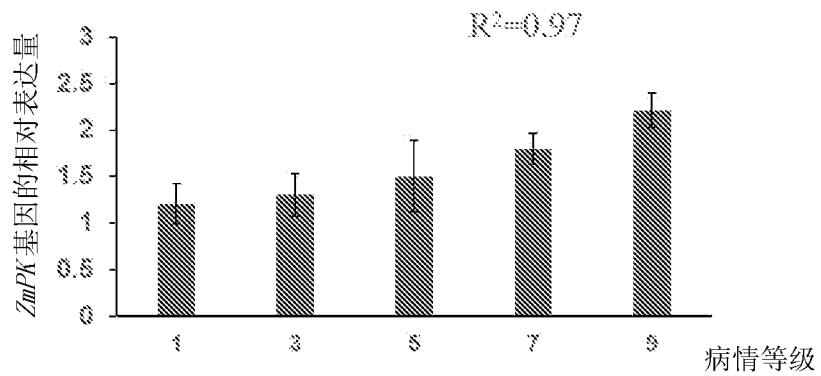


图 7

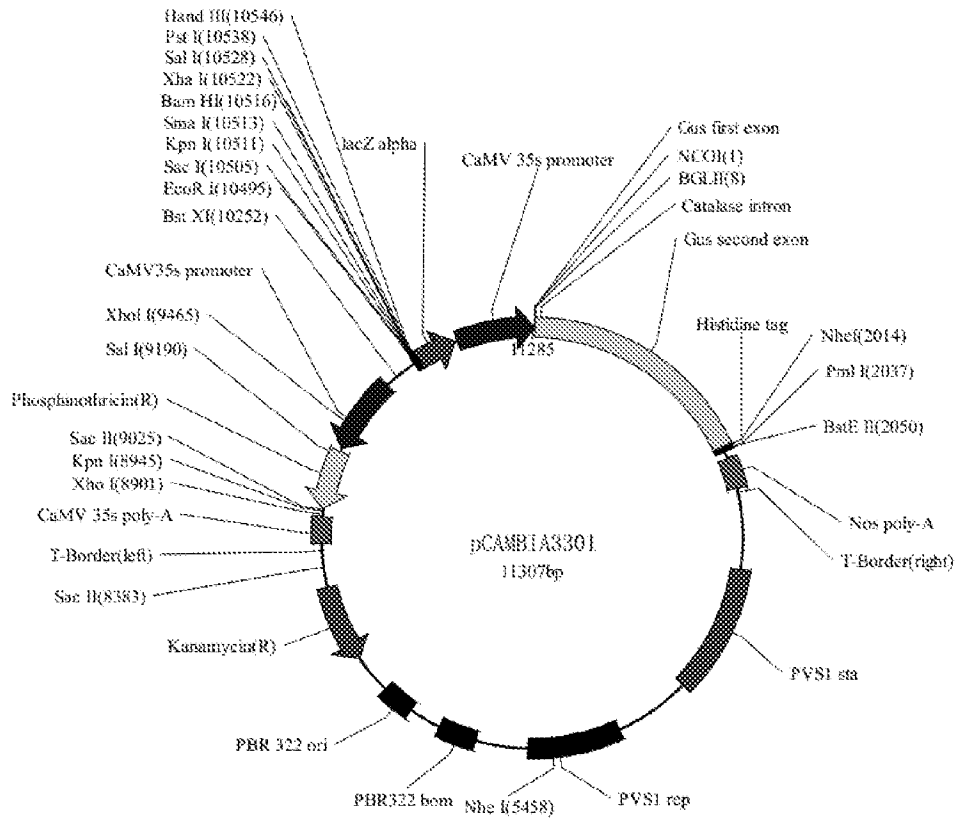


图 8

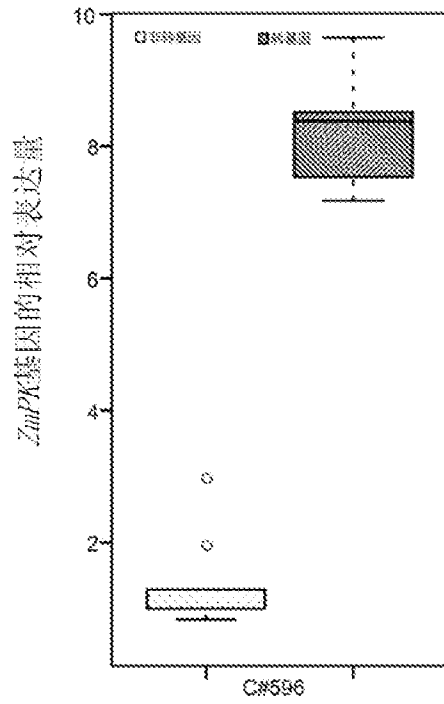


图 9

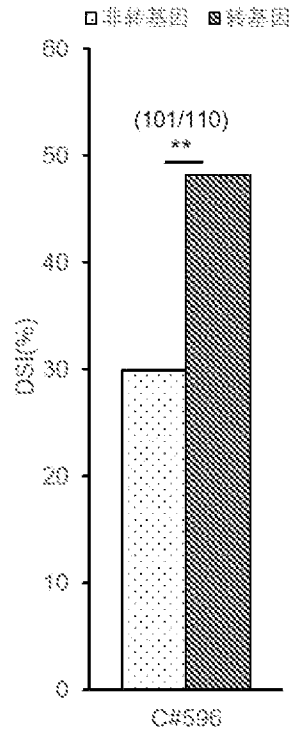


图 10

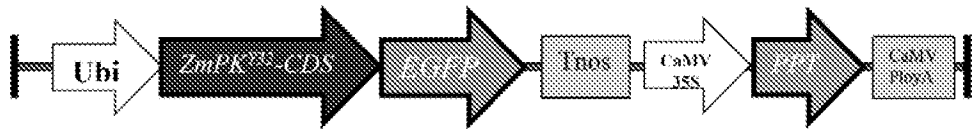


图 11

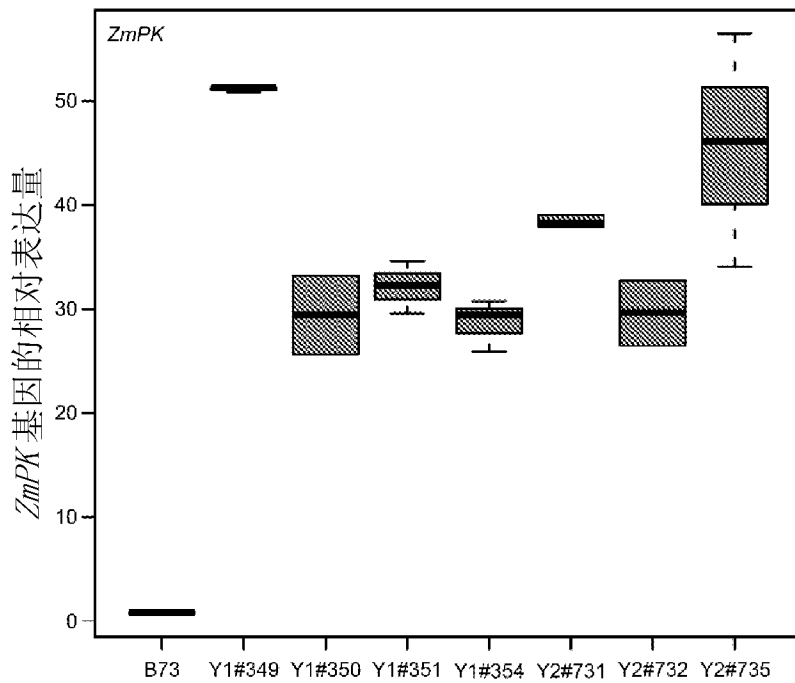


图 12

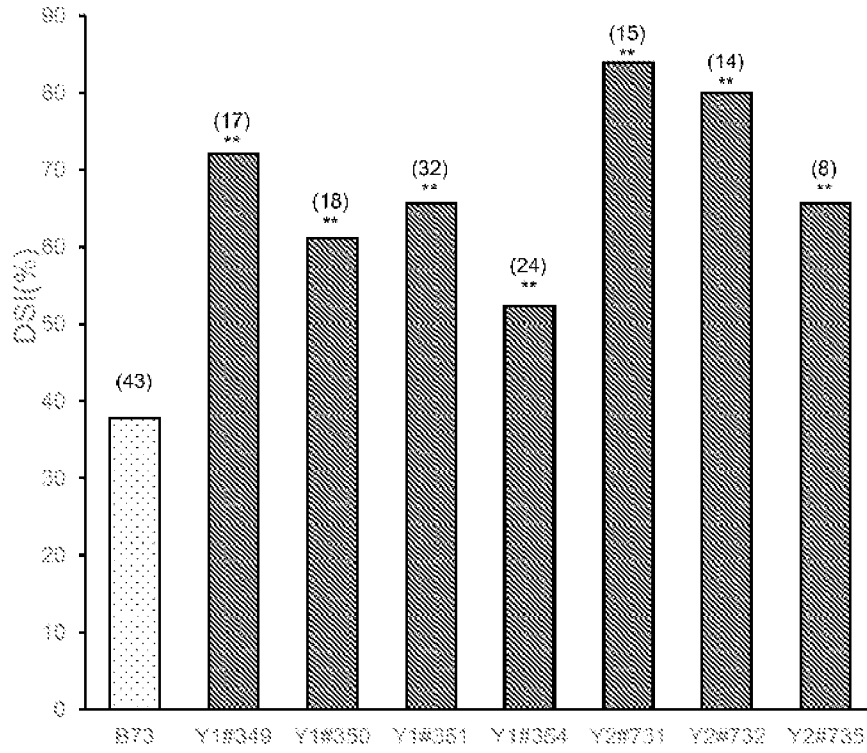


图 13

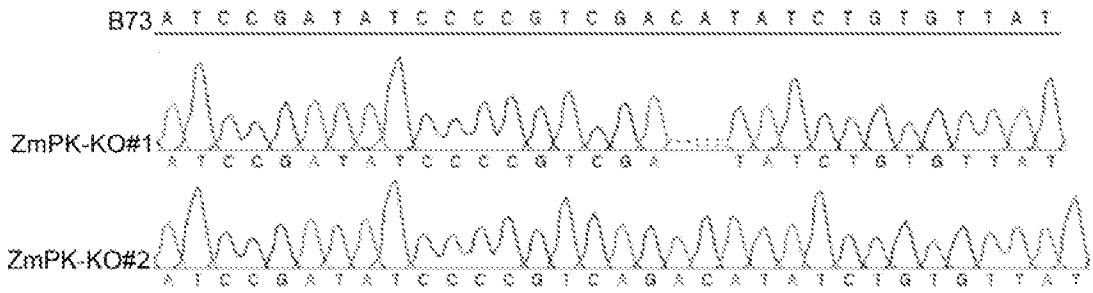


图 14

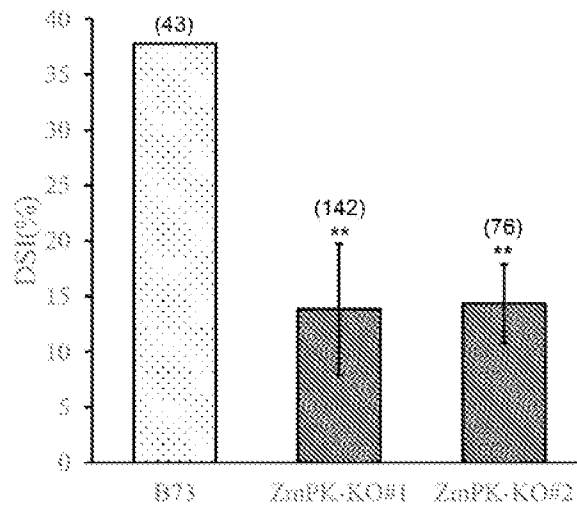


图 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/076319

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 6/46(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, DWPL, SIPOABS, CNKI: 玉米, 灰斑病, 钙依赖性蛋白激酶, maize, Zea mays, gray leaf spot, GLS, qRgls2, GRMZM2G157068, 等; Genbank: SEQ ID NO: 2-9		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 109705202 A (CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY) 03 May 2019 (2019-05-03) claims 1-10	1-22
X	GenBank. "Version NM_001359579.1" <i>GenBank Registration No. NM_001359579</i> , 05 May 2018 (2018-05-05), DEFINITION, FEATURES and ORIGIN parts	1-4
Y	GenBank. "Version NM_001359579.1" <i>GenBank Registration No. NM_001359579</i> , 05 May 2018 (2018-05-05), DEFINITION, FEATURES and ORIGIN parts	5-22
Y	徐凌 (XU, Ling). "玉米抗灰斑病主效QTL精细定位、基因预测及转录组分析 (Fine-mapping a Major QTL Resistance to Gray Leaf Spot in Maize, Gene Prediction and Transcriptome Analysis)" <i>中国博士学位论文全文数据库 (China Doctoral Dissertations Full-Text Database)</i> , 10 June 2018 (2018-06-10), abstract, page 34, section 3.2, table 3.1, and page 57, section 5.3	5-22
A	WO 2009088756 A1 (DU PONT et al.) 16 July 2009 (2009-07-16) entire document	1-22
<input checked="" 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 13 May 2020		Date of mailing of the international search report 03 June 2020
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/CN2020/076319

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 106701972 A (HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY; HUBEI TENGLONG SEED CO., LTD.) 24 May 2017 (2017-05-24) entire document	1-22
A	CN 101970669 A (E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY; PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC.) 09 February 2011 (2011-02-09) entire document	1-22
A	WO 2018013323 A1 (PIONEER HI-BRED INT INC) 18 January 2018 (2018-01-18) entire document	1-22

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 13ter.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 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.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/CN2020/076319

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109705202	A	03 May 2019	None			
WO	2009088756	A1	16 July 2009	CN	101970669	B	12 June 2013
				BR	PI0819551	A2	10 March 2015
				US	8841509	B2	23 September 2014
				CN	101970669	A	09 February 2011
				EP	2653549	A1	23 October 2013
				US	2013177907	A1	11 July 2013
				ZA	201004402	B	31 August 2011
				US	9150933	B2	06 October 2015
				US	2015074841	A1	12 March 2015
				EP	2240588	A1	20 October 2010
				BR	PI0819551	B1	19 December 2017
				CA	2710529	C	29 August 2017
				MX	2010007258	A	16 August 2010
				EP	2653549	B1	30 March 2016
				CN	103477992	B	29 July 2015
				US	2009172845	A1	02 July 2009
				CN	103477992	A	01 January 2014
				US	8367899	B2	05 February 2013
				CA	2710529	A1	16 July 2009
				EP	2240588	B1	08 April 2015
CN	106701972	A	24 May 2017	CN	106701972	B	16 July 2019
CN	101970669	A	09 February 2011	CN	101970669	B	12 June 2013
				BR	PI0819551	A2	10 March 2015
				US	8841509	B2	23 September 2014
				EP	2653549	A1	23 October 2013
				US	2013177907	A1	11 July 2013
				ZA	201004402	B	31 August 2011
				US	9150933	B2	06 October 2015
				US	2015074841	A1	12 March 2015
				EP	2240588	A1	20 October 2010
				BR	PI0819551	B1	19 December 2017
				CA	2710529	C	29 August 2017
				MX	2010007258	A	16 August 2010
				EP	2653549	B1	30 March 2016
				CN	103477992	B	29 July 2015
				US	2009172845	A1	02 July 2009
				CN	103477992	A	01 January 2014
				US	8367899	B2	05 February 2013
				CA	2710529	A1	16 July 2009
				EP	2240588	B1	08 April 2015
				WO	2009088756	A1	16 July 2009
WO	2018013323	A1	18 January 2018	CN	109688805	A	26 April 2019
				BR	112019000579	A2	02 July 2019
				EP	3481176	A4	12 February 2020
				CA	3029819	A1	18 January 2018
				EA	201990256	A1	31 July 2019
				US	2019300969	A1	03 October 2019
				ZA	201900149	B	28 August 2019
				EP	3481176	A1	15 May 2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/076319

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/076319

<p>A. 主题的分类</p> <p>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 6/46(2018.01)i</p> <p>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</p>																							
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; C12N; A01H</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>CNABS, DWPI, SIPOABS, CNKI: 玉米, 灰斑病, 钙依赖性蛋白激酶, maize, Zea mays, gray leaf spot, GLS, qRg-1s2, GRMZM2G157068, 等; Genbank: SEQ ID NO: 2-9</p>																							
<p>C. 相关文件</p> <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 109705202 A (中国农业大学) 2019年 5月 3日 (2019 - 05 - 03) 权利要求1-10</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>GenBank. "版本NM_001359579.1" GenBank登记号NM_001359579, 2018年 5月 5日 (2018 - 05 - 05), DEFINITION、FEATURES和ORIGIN部分</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>GenBank. "版本NM_001359579.1" GenBank登记号NM_001359579, 2018年 5月 5日 (2018 - 05 - 05), DEFINITION、FEATURES和ORIGIN部分</td> <td>5-22</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>徐凌. "玉米抗灰斑病主效QTL精细定位、基因预测及转录组分析" 中国博士学位论文全文数据库, 2018年 6月 10日 (2018 - 06 - 10), 摘要, 第34页第3.2节, 表3.1, 第57页第5.3节</td> <td>5-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>W0 2009088756 A1 (DU PONT等) 2009年 7月 16日 (2009 - 07 - 16) 全文</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106701972 A (华中农业大学 湖北腾龙种业有限公司) 2017年 5月 24日 (2017 - 05 - 24) 全文</td> <td>1-22</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 109705202 A (中国农业大学) 2019年 5月 3日 (2019 - 05 - 03) 权利要求1-10	1-22	X	GenBank. "版本NM_001359579.1" GenBank登记号NM_001359579, 2018年 5月 5日 (2018 - 05 - 05), DEFINITION、FEATURES和ORIGIN部分	1-4	Y	GenBank. "版本NM_001359579.1" GenBank登记号NM_001359579, 2018年 5月 5日 (2018 - 05 - 05), DEFINITION、FEATURES和ORIGIN部分	5-22	Y	徐凌. "玉米抗灰斑病主效QTL精细定位、基因预测及转录组分析" 中国博士学位论文全文数据库, 2018年 6月 10日 (2018 - 06 - 10), 摘要, 第34页第3.2节, 表3.1, 第57页第5.3节	5-22	A	W0 2009088756 A1 (DU PONT等) 2009年 7月 16日 (2009 - 07 - 16) 全文	1-22	A	CN 106701972 A (华中农业大学 湖北腾龙种业有限公司) 2017年 5月 24日 (2017 - 05 - 24) 全文	1-22
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
PX	CN 109705202 A (中国农业大学) 2019年 5月 3日 (2019 - 05 - 03) 权利要求1-10	1-22																					
X	GenBank. "版本NM_001359579.1" GenBank登记号NM_001359579, 2018年 5月 5日 (2018 - 05 - 05), DEFINITION、FEATURES和ORIGIN部分	1-4																					
Y	GenBank. "版本NM_001359579.1" GenBank登记号NM_001359579, 2018年 5月 5日 (2018 - 05 - 05), DEFINITION、FEATURES和ORIGIN部分	5-22																					
Y	徐凌. "玉米抗灰斑病主效QTL精细定位、基因预测及转录组分析" 中国博士学位论文全文数据库, 2018年 6月 10日 (2018 - 06 - 10), 摘要, 第34页第3.2节, 表3.1, 第57页第5.3节	5-22																					
A	W0 2009088756 A1 (DU PONT等) 2009年 7月 16日 (2009 - 07 - 16) 全文	1-22																					
A	CN 106701972 A (华中农业大学 湖北腾龙种业有限公司) 2017年 5月 24日 (2017 - 05 - 24) 全文	1-22																					
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 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</p>																							
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2020年 5月 13日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2020年 6月 3日</p>																					
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>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</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>杨振宇</p> <p>电话号码 86-(10)-62412204</p>																					

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 101970669 A (纳慕尔杜邦公司 先锋国际良种公司) 2011年 2月 9日 (2011 - 02 - 09) 全文	1-22
A	WO 2018013323 A1 (PIONEER HI-BRED INT INC) 2018年 1月 18日 (2018 - 01 - 18) 全文	1-22

第1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/CN2020/076319

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	109705202	A	2019年 5月 3日	无			
WO	2009088756	A1	2009年 7月 16日	CN	101970669	B	2013年 6月 12日
				BR	PI0819551	A2	2015年 3月 10日
				US	8841509	B2	2014年 9月 23日
				CN	101970669	A	2011年 2月 9日
				EP	2653549	A1	2013年 10月 23日
				US	2013177907	A1	2013年 7月 11日
				ZA	201004402	B	2011年 8月 31日
				US	9150933	B2	2015年 10月 6日
				US	2015074841	A1	2015年 3月 12日
				EP	2240588	A1	2010年 10月 20日
				BR	PI0819551	B1	2017年 12月 19日
				CA	2710529	C	2017年 8月 29日
				MX	2010007258	A	2010年 8月 16日
				EP	2653549	B1	2016年 3月 30日
				CN	103477992	B	2015年 7月 29日
				US	2009172845	A1	2009年 7月 2日
				CN	103477992	A	2014年 1月 1日
				US	8367899	B2	2013年 2月 5日
				CA	2710529	A1	2009年 7月 16日
				EP	2240588	B1	2015年 4月 8日
CN	106701972	A	2017年 5月 24日	CN	106701972	B	2019年 7月 16日
CN	101970669	A	2011年 2月 9日	CN	101970669	B	2013年 6月 12日
				BR	PI0819551	A2	2015年 3月 10日
				US	8841509	B2	2014年 9月 23日
				EP	2653549	A1	2013年 10月 23日
				US	2013177907	A1	2013年 7月 11日
				ZA	201004402	B	2011年 8月 31日
				US	9150933	B2	2015年 10月 6日
				US	2015074841	A1	2015年 3月 12日
				EP	2240588	A1	2010年 10月 20日
				BR	PI0819551	B1	2017年 12月 19日
				CA	2710529	C	2017年 8月 29日
				MX	2010007258	A	2010年 8月 16日
				EP	2653549	B1	2016年 3月 30日
				CN	103477992	B	2015年 7月 29日
				US	2009172845	A1	2009年 7月 2日
				CN	103477992	A	2014年 1月 1日
				US	8367899	B2	2013年 2月 5日
				CA	2710529	A1	2009年 7月 16日
				EP	2240588	B1	2015年 4月 8日
				WO	2009088756	A1	2009年 7月 16日
WO	2018013323	A1	2018年 1月 18日	CN	109688805	A	2019年 4月 26日
				BR	112019000579	A2	2019年 7月 2日
				EP	3481176	A4	2020年 2月 12日
				CA	3029819	A1	2018年 1月 18日
				EA	201990256	A1	2019年 7月 31日
				US	2019300969	A1	2019年 10月 3日
				ZA	201900149	B	2019年 8月 28日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2020/076319

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)
<hr/> <p style="text-align: center;">EP 3481176 A1 2019年 5月 15日</p>			