

(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 7 月 23 日 (23.07.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/147113 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/29 (2006.01) *C07K 14/415* (2006.01)
C12N 15/84 (2006.01) *A01H 5/00* (2018.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/072349

(22) 国际申请日: 2019 年 1 月 18 日 (18.01.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 上海交通大学 (SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国上海市闵行区东川路 800 号, Shanghai 200240 (CN)。

(72) 发明人: 唐克轩 (TANG, Kexuan); 中国上海市闵行区东川路 800 号, Shanghai 200240 (CN)。谢利辉 (XIE, Lihui); 中国上海市闵行区东川路 800 号,

Shanghai 200240 (CN)。付雪晴 (FU, Xueqing); 中国上海市闵行区东川路 800 号, Shanghai 200240 (CN)。秦维 (QIN, Wei); 中国上海市闵行区东川路 800 号, Shanghai 200240 (CN)。黎凌 (LI, Ling); 中国上海市闵行区东川路 800 号, Shanghai 200240 (CN)。刘航 (LIU, Hang); 中国上海市闵行区东川路 800 号, Shanghai 200240 (CN)。陈甜甜 (CHEN, Tiantian); 中国上海市闵行区东川路 800 号, Shanghai 200240 (CN)。钱虹妹 (QIAN, Hongmei); 中国上海市闵行区东川路 800 号, Shanghai 200240 (CN)。孙小芬 (SUN, Xiaofen); 中国上海市闵行区东川路 800 号, Shanghai 200240 (CN)。

(74) 代理人: 上海旭诚知识产权代理有限公司 (SUNRAY INTELLECTUAL PROPERTY ATTORNEYS); 中国上海市浦东新区东

(54) **Title:** NUCLEOTIDE SEQUENCE AND APPLICATION THEREOF IN INCREASING SECRETION-TYPE GLANDULAR TRICHOME DENSITY OF PLANT

(54) 发明名称: 一种核苷酸序列及其在提高植物分泌型腺毛密度中的应用

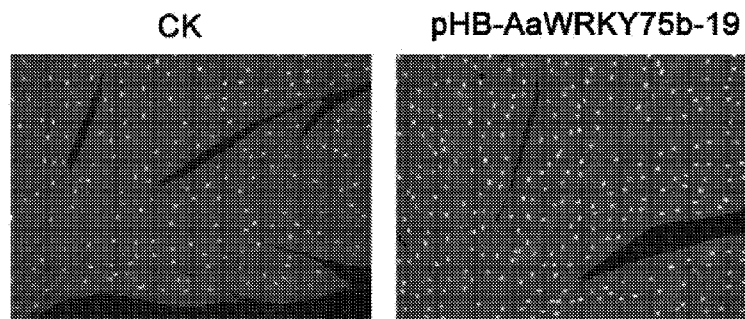


图 1

(57) **Abstract:** Provided is a nucleotide sequence and application thereof in increasing the secretion-type glandular trichome density of a plant, relating to the technical field of plant genetic engineering. The nucleotide sequence is selected from the following sequences: 1) the nucleotide sequence shown in any one of SEQ ID Nos: 1, 3, and 5; 2) the nucleotide sequence derived by substituting, deleting, or adding one or several nucleotides from the nucleotide sequence shown in any one of SEQ ID Nos: 1, 3, and 5; and 3) the nucleotide sequence that possesses at least 80% homology with any one of SEQ ID Nos: 1, 3, and 5. By transferring any one of the foregoing nucleotide sequences into a plant body in a genetic engineering means, the secretion-type glandular trichome density of the plant can be significantly improved, the potential of the nucleotide sequence in insect resistance and specific metabolite production is fully exerted, and the nucleotide sequence has extremely high practical application value.

(57) **摘要:** 提供一种核苷酸序列及其在提高植物分泌型腺毛密度中的应用, 涉及植物基因工程技术领域, 所述核苷酸序列选自如下序列: 1) SEQ ID NO: 1、3、5 中任一项所示的核苷酸序列; 2) SEQ ID NO: 1、3、5 中任一项所示的核苷酸序列通过一个或几个核苷酸的取代、缺失、或添加衍生产生的核苷酸序列; 3) 与 SEQ ID NO: 1、3、5 中的任一项具有至少 80% 同源性的核苷酸序列。通过基因工程手段将上述核苷酸序列中的任意一种转入植物体中, 能够显著提高植物分泌型腺毛密度, 充分发挥其在抗虫以及生产特定代谢物质上的潜力, 具有极高的实际生产应用价值。

方路 710 号汤臣金融大厦 1806 室, 郑立,
Shanghai 200122 (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))。

一种核苷酸序列及其在提高植物分泌型腺毛密度中的应用

技术领域

本发明涉及植物基因工程技术领域，尤其涉及一种核苷酸序列及其在提高植物分泌型腺毛密度中的应用。

背景技术

腺毛是衍生于植物表皮细胞的突起结构，根据腺毛是否能分泌和储存次生代谢产物将其分为非分泌型腺毛和分泌型腺毛。自然界约 30% 的维管植物的气生器官表皮上都分布有分泌型腺毛，例如唇形科植物薄荷和罗勒，菊科植物青蒿和向日葵，茄科植物烟草和番茄，豆科植物藜苣荬和紫花苣荬以及桑科植物啤酒花等都具有分泌型腺毛。分泌型腺毛不仅能帮助植物抵抗病虫害和紫外线伤害，还能分泌大量的化学物质，主要有萜类，类甲基苯烷类，黄酮类，甲基酮类，酰基糖类等，这些化学物质可以用来制药，生产农药以及精油等，具有很高的商业价值。所以分泌型腺毛也被称为植物工厂。这其中，青蒿 (*Artemisia annua*) 又名黄花蒿，是菊科蒿属一年生的传统中草药植物，青蒿具有分泌型腺毛 (glandular trichomes) 和 T-shape 非分泌型腺毛 (non-glandular trichomes)；青蒿素是一种含有过氧桥结构的倍半萜内酯化合物，青蒿素及其衍生物主要用于治疗疟疾，以青蒿素为基础的联合疗法是世界卫生组织推荐的治疗恶性疟疾最为有效的方法。而青蒿素只在青蒿的分泌型腺毛中合成和储存。

分泌型腺毛在植株中分布数量不一，在一些具有重要经济价值的作物中，分泌型腺毛的数量、密度的不足制约了其次生代谢产物的产量。

因此，本领域的技术人员致力于开发一种通过转基因技术手段提高植物分泌型腺毛密度的方法。

发明内容

有鉴于现有技术的上述缺陷，本发明所要解决的技术问题是如何提高植物分泌型腺毛密度。

为实现上述目的，本发明提供了一种核苷酸序列，所述核苷酸序列选自如下序列：

- 1) SEQ ID NO: 1、3、5 中任一项所示的核苷酸序列；
- 2) SEQ ID NO: 1、3、5 中任一项所示的核苷酸序列通过一个或几个核苷酸的取代、缺失、或添加衍生产生的核苷酸序列；
- 3) 与 SEQ ID NO: 1、3、5 中的任一项具有至少 80% 同源性的核苷酸序列。

另一方面，本发明还提供了一种氨基酸序列，所述氨基酸序列选自如下序列：

- 1) SEQ ID NO: 2、4、6 中任一项所示的氨基酸序列；

2) SEQ ID NO: 2、4、6 中任一项所示的氨基酸序列通过一个或几个氨基酸的取代、缺失、或添加衍生产生的氨基酸序列;

3) 与 SEQ ID NO: 2、4、6 中的任一项具有至少 80%同源性的氨基酸序列。

另一方面, 本发明还提供了上述核苷酸序列或氨基酸序列在提高植物分泌型腺毛密度中的应用。

进一步地, 上述植物为唇形科植物、豆科植物、菊科植物中一种或几种。

进一步地, 上述植物为野薄荷 (*Mentha haplocalyx Briq*)、留兰香薄荷 (*Mentha spicata Linn*)、朝鲜蓟 (*Cynara cardunculus var. scolymus*)、向日葵 (*Helianthus annuus*)、番茄 (*Solanum lycopersicum*)、野生种潘那利番茄 (*Solanum pennellii*) 和马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 中的一种或多种。

另一方面, 在一个具体实施方式中, 本发明还提供了一种转基因提高植物分泌型腺毛密度的方法, 包括以下步骤:

(1) 采用基因克隆方法获得目的基因, 所述目的基因为上述核苷酸序列中的任意一种;

(2) 构建具有所述目的基因的植物表达载体;

(3) 将所述具有目的基因的植物表达载体转化根癌农杆菌, 获得含目的基因植物表达载体的根癌农杆菌菌株;

(4) 将含目的基因植物表达载体的根癌农杆菌菌株转化植物, PCR 检测获得整合了所述目的基因的转基因植物植株;

(5) 统计整合了目的基因的转基因植物叶片上的腺毛密度, 获得腺毛密度提高的植物植株。

进一步地, 在步骤 (1) 中, 基因克隆方法包括以下步骤: 提取植物基因组总 RNA, 反转录合成 cDNA, 根据目的基因序列设计引物进行 PCR 扩增并测序, 获得目的基因。

进一步地, 在步骤 (2) 中, 构建具有目的基因的植物表达载体包括以下步骤: 高保真酶扩增目的基因基因序列, 并在目的基因前后分别引入 *BamH* I 和 *Xba* I 酶切位点, 利用连接酶将目的基因与载体连接, 转化宿主细胞, 挑取单克隆, 提质粒做 PCR 检测和酶切验证。

进一步地, 在步骤 (3) 中, 转化根癌农杆菌包括以下步骤: 采用冻融法将具有目的基因的植物表达载体转入根癌农杆菌, PCR 验证。

进一步地, 在所骤 (4) 中, 转化包括以下步骤: 外植体的预培养; 农杆菌与外植体的共培养; 利用抗性培养基筛选含有目的基因的再生植株。

进一步地, 在一个具体实施方式中, 上述植物为青蒿。

进一步地, 上述目的基因为青蒿 *AaWRKY75b* 基因、野薄荷 *MhWRKY75b* 基因和留兰香薄荷 *MsWRKY75b* 基因中的任意一种。

进一步地, 青蒿 *AaWRKY75b* 基因序列如 SEQ ID NO.1 所示; 野薄荷 *MhWRKY75b*

基因序列如 SEQ ID NO.3 所示；留兰香薄荷 *MsWRKY75b* 基因如序列如 SEQ ID NO.5 所示。

进一步地，青蒿 *AaWRKY75b* 基因编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示；野薄荷 *MhWRKY75b* 基因编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO.4 所示；留兰香薄荷 *MsWRKY75b* 基因编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO.6 所示。

进一步地，在步骤（1）中，引物序列如 SEQ ID NO：7 和 8 所示。

进一步地，cDNA 在反转录酶 PowerScript 的作用下合成。

进一步地，外植体的预培养包括以下步骤：青蒿种子用 75%乙醇浸泡 1 min，再用 20% NaClO 浸泡 20 min，无菌水冲洗 3-4 次，用无菌吸水纸吸干表面水分，接种于无激素的 MS 固体培养基中，25℃、16 小时光照/8 小时黑暗条件下培养，获得青蒿无菌苗，待苗长至 5 cm 左右后，剪取无菌苗叶片外植体用于转化；

进一步地，农杆菌与外植体的共培养包括以下步骤：将叶片外植体转到添加乙酰丁香酮（AS）的共培养培养基中，滴加活化好的含目的基因植物表达载体的根癌农杆菌的 1/2MS 菌液，使所述叶片外植体与所述菌液充分接触，28℃暗培养 3 天。

进一步地，抗性再生植株的筛选包括以下步骤：将共培养 3 天的叶片外植体转入到的发芽筛选培养基中，所述发芽筛选培养基含有 6-苄氨基嘌呤（6-BA）、萘乙酸（NAA）、潮霉素（Hyg）和羧苄青霉素（Cb）；25℃、16 小时光照/8 小时黑暗条件下培养，每两周继代培养一次，经过 2-3 次继代后获得 Hyg 抗性丛生芽，将生长良好的抗性丛生芽剪下转入生根培养基上培养至生根，获得 Hyg 抗性再生青蒿植株。

进一步地，还包括步骤（6）对转基因青蒿中青蒿素含量进行 HPLC-ELSD 测定，筛选获得青蒿素含量提高的转基因青蒿植株。

本发明的具体实施方式中，通过转基因手段在具有分泌型腺毛的植物中过量表达青蒿 *AaWRKY75b* 基因或与之具有 80%及以上同源性的基因（比如野薄荷 *MhWRKY75b* 基因或留兰香薄荷 *MsWRKY75b* 基因），显著提高了转基因植株中分泌型腺毛的密度，从而提高了其中次生代谢产物如青蒿素的含量，具有极高的实际生产应用价值。对于植物青蒿，获得叶片表面分泌型腺毛的密度得到显著提高转基因植株，从而将青蒿的分泌型腺毛转化为高产量的生化工厂，而通过 HPLC-ELSD 测定也表明分泌型腺毛的密度提高的植株青蒿素含量也显著提高，充分发挥植物在抗虫以及生产特定代谢物质上的潜力，具有极高的实际生产应用价值。

以下将结合附图对本发明的构思、具体实施步骤以及产生的技术效果作进一步说明，以充分地了解本发明的目的、特征和效果。

附图说明

图 1 是本发明的一个实施例中转 *AaWRKY75b* 基因青蒿和野生型青蒿叶片腺毛密度对比图；

图 2 是本发明的一个实施例中转 *AaWRKY75b* 基因青蒿和野生型青蒿叶片腺毛密度统计结果图；

图 3 是本发明的一个实施例中转 *AaWRKY75b* 基因青蒿和野生型青蒿青蒿素含量检测结果图；

图 4 是本发明的一个实施例中转 *MhWRKY75b* 基因或 *MsWRKY75b* 基因青蒿和野生型青蒿叶片腺毛密度对比图；

图 5 是本发明的一个实施例中转 *MhWRKY75b* 基因青蒿和野生型青蒿叶片腺毛密度统计结果图；

图 6 是本发明的一个实施例中转 *MsWRKY75b* 基因青蒿和野生型青蒿叶片腺毛密度统计结果图。

具体实施方式

下面结合附图和实施例对本发明的技术内容做进一步的说明。以下实施例将有助于本领域的技术人员进一步理解本发明，但不以任何形式限制本发明。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如 Sambrook 等分子克隆：实验室手册见 New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 的 1989 年版中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

本发明涉及的根癌农杆菌 EHA105 已在《黄亚丽，蒋细良，田云龙，郭萍，朱昌雄；根癌农杆菌介导的哈茨木霉菌遗传转化的研究，中国生物工程杂志，2008，28（3）：38-43》文献中公开。根癌农杆菌 EHA105 可通过公开市售的商业渠道取得，如可以从澳大利亚 CAMBIA 公司购得，菌株编号为 Gambar1。

实施例 1

青蒿总 RNA 提取

取青蒿叶片在液氮中迅速研磨成粉末，使用 TIANGEN 公司的 RNA 试剂盒，按照该试剂盒的实验步骤说明提取青蒿总 RNA。得到的 RNA 溶液取部分进行琼脂糖凝胶电泳检测鉴定总 RNA 质量及分光光度计浓度测定 RNA 含量，剩余部分-80℃保存。

实施例 2

青蒿 *AaWRKY75b* 基因的克隆

以实施例 1 中提取的总 RNA 为模板，利用 PowerScript 反转录酶合成 cDNA；根据青蒿 *AaWRKY75b* 基因（GenBank 登录号：KX465129.1）的序列设计基因特异性引物，引物序列如表 1 所示，通过 PCR 从总 cDNA 中扩增得到青蒿的 *AaWRKY75b* 基因，PCR 反应体系如表 2 所示，扩增产物凝胶电泳回收后进行 DNA 测序。测序后获得该基因的全长编码序列，如 SEQ ID NO: 1 所示，其中，起始密码子为 ATG，终止密码子为 TAG，并推导出其蛋白编码序列，如 SEQ ID NO: 2 所示。

表 1 *AaWRKY75b* 基因克隆 PCR 引物

引物名称	引物序列 (5'→3')	数字标识符
AaWRKY75b-FP	ATGGACAATTTTGTTCCTGTTTTT	SEQ ID NO: 7
AaWRKY75b-RP	CTAAAACAAAGGTGGATCTTGTA	SEQ ID NO: 8

表 2 PCR 的反应体系

青蒿 cDNA	1 μ L
10 $\times$ KOD Plus Buffer	5 μ L
dNTP	5 μ L
MgSO ₄	2 μ L
AaWRKY75b-FP	1 μ L
AaWRKY75b-RP	1 μ L
KOD Plus	1 μ L
ddH ₂ O	34 μ L
总体积	50 μ L

实施例 3

含 *AaWRKY75b* 基因的植物过表达载体的构建

通过高保真酶扩增 *AaWRKY75b* 基因序列, 扩增引物序列如表 3 所示, 其中, 正向引物中引入了 *Bam*HI 的酶切位点, 反向引物中引入了 *Xba*I 的酶切位点, 再通过连接酶连接到 pCAMbia 1305.1 载体 (购自优宝生物) 上, 进行测序确认基因的正确性。

表 3 *AaWRKY75b*-pCAMbia 1305.1 载体构建的 PCR 引物

引物名称	引物序列 (5'→3')	数字标识符
BamHI-AaWRKY75b-FP	CGGGATCCATGGACAATTTTGTTCCTGTTTTT	SEQ ID NO: 9
AaWRKY75b-XbaI-RP	GCTCTAGACTAAAACAAAGGTGGATCTTGTA	SEQ ID NO: 10

实施例 4

含 *AaWRKY75b* 过量表达的根癌农杆菌工程菌的获得

将实施例 3 中含 *AaWRKY75b* 基因的植物过表达载体采用冻融法转入根癌农杆菌, 并进行 PCR 验证, 验证引物如 SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 12 所示。获得含 *AaWRKY75b* 基因的植物过表达载体的根癌农杆菌菌株。

实施例 5: 根癌农杆菌介导 *AaWRKY75b* 基因转化青蒿

(1) 外植体的预培养

青蒿种子用 75%乙醇浸泡 1 min, 再用 20% NaClO 浸泡 20 min, 无菌水冲洗 3-4 次, 用无菌吸水纸吸干表面水分, 接种于无激素的 MS (Murashige and Skoog, 1962) 固体培养基中, 25℃、16h/8h (光照/黑暗) 光照培养 5-7 天, 即可获得青蒿无菌苗。待苗长至 5 cm 左右后, 剪取无菌苗叶片外植体用于转化。

(2) 农杆菌与外植体的共培养

将所述叶片外植体, 转到添加乙酰丁香酮 (AS) 的共培养培养基 (1/2 MS + AS 100 μ mol/L) 中, 滴加含活化好的所述含 *AaWRKY75b* 植物过量表达载体的根癌农杆菌工程菌的 1/2MS 悬液, 使外植体与菌液充分接触, 28℃暗培养 3 天。以滴加不带有目的基因的根癌农杆菌的 1/2 MS 液体培养基悬液的叶片外植体为对照。

(3) 抗性再生植株的筛选

将所述共培养 3 天的青蒿外植体转入到添加 6-苄氨基嘌呤 (6-BA)、萘乙酸 (NAA)、潮霉素 (Hyg)、羧苄青霉素 (Cb) 的发芽筛选培养基 (MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L + Hyg (过表达) 50 mg/L + Cb 500 mg/L) 上于 25℃、16h/8h (光照/黑暗) 光照培养, 每两周继代培养一次, 经过 2-3 次继代后即可获得 Hyg 抗性丛生芽。将生长良好的抗性丛生芽剪下转入生根培养基 (1/2MS + Cb 125 mg/L) 上培养至生根, 从而获得 Hyg 抗性再生青蒿植株。

实施例 6

转基因青蒿植株的 PCR 检测

根据目的基因所在表达盒上游的 35S 启动子区域和 *AaWRKY75b* 分别设计正向引物 (35SF: GAAGATGCCTCTGCCGACAGTG; SEQ ID NO: 11) 和反向引物 (AaWRKY75b-RP: GCTCTAGACTAAAACAAAGGTGGATCTTGTA; SEQ ID NO: 12) 对目的基因进行检测。结果表明, 利用所设计的 PCR 特异引物, 能扩增出特异 DNA 片段。而以非转化青蒿基因组 DNA 为模板时, 没有扩增出任何片段。

本实施例将所述的植物表达载体转化根癌农杆菌, 获得用于转化青蒿的含 *AaWRKY75b* 植物过量表达载体的根癌农杆菌菌株, 利用所构建的根癌农杆菌菌株转化青蒿, 获得经 PCR 检测的转基因青蒿植株。转基因青蒿植株可直接用于筛选分泌型腺毛密度增加并且青蒿素含量升高的青蒿植株。

实施例 7:

转基因青蒿表皮腺毛密度和总腺毛数量的统计

使用奥林巴斯公司的 BX51 型号显微镜, 在波长为 450nm-480nm 的激发光下观察非转基因青蒿和 *AaWRKY75b* 过量表达转基因青蒿的叶片。取同等大小的青蒿叶片, 在不同的 5 个位置随机取样, 利用 ImageJ 软件测量青蒿叶片总面积, 统计腺毛密度, 结果如图 1 和图 2 所示, 其中 CK 表示野生型对照组, 转 *AaWRKY75b* 基因青蒿植株叶片腺毛密度显著高于野生型青蒿, 最高为 41.59 个/mm², 野生型青蒿为 20.65, 约为野生型青蒿的 2 倍。

实施例 8

利用 HPLC-ELSD 测定转基因青蒿中青蒿素含量

(1) HPLC-ELSD 条件及系统适用性以及标准溶液的配制

HPLC: 采用 water alliance 2695 系统, 色谱柱为 C-18 反相硅胶柱 (SymmetryShield TM C18, 5 μ m, 250 x 4.6 mm, Waters), 流动相为甲醇:水, 甲醇:水的体积比为 70:30, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 流速 1.0 mL/min, 进样量 10 μ L, 灵敏度 (AUFS=1.0), 理论塔板数按青蒿素峰计算不低于 2000。

ELSD: 采用 water alliance 2420 系统, 蒸发光散射检测器漂移管温度 40 $^{\circ}$ C, 放大系数 (gain) 为 7, 载气压力 5 bar;

精密称取青蒿素标准品 (Sigma 公司) 2.0 mg 用 1 mL 甲醇完全溶解, 得到 2 mg/mL 青蒿素标准品溶液, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

本发明中流动相为甲醇 (methanol): 水, 比例为 70%: 30% 时, 青蒿素的保留时间为 5.1 min, 峰型良好。理论塔板数按青蒿素计算不低于 2000。

(2) 标准曲线的制作

将所述对照品溶液在相应色谱条件下分别进样 2 μ L, 4 μ L, 6 μ L, 8 μ L, 10 μ L 记录图谱及色谱参数, 分别以峰面积 (Y) 对标准品含量 (X, μ g) 进行回归分析。通过研究, 本实施例中青蒿素在 4-20 g 范围内呈现良好的 log-log 线性关系。青蒿素对照品的 log-log 线性回归方程为: $Y=1.28e+000X+4.71e+000$, $R^2=0.979546$ 。

(3) 样品的制备和青蒿素含量的测定

在青蒿植株的上、中和下部共取 2 g 新鲜的青蒿叶片, 于 45 $^{\circ}$ C 烘箱中烘至恒重。然后从烘干的枝条上敲下叶片磨成粉末。称取约 0.1 g 干粉于 2 mL Eppendorf 管中, 加入 2 mL 乙醇, 用 40 W 超声波处理 30 min, 5000 rpm 离心 10 min, 取上清用 0.22 μ m 滤膜过滤, 即可用于 HPLC-ELSD 测定青蒿素的含量。

采用 HPLC-ELSD 测定青蒿素含量, 样品进样体积为 20 μ L, 根据峰面积代入线性回归方程计算出样品中的青蒿素含量 (mg), 再除以样品的青蒿叶干重 (g), 从而计算出青蒿植株中青蒿素的含量。结果如图 2 所示, 转 *AaWRKY75b* 基因青蒿植株的青蒿素含量与腺毛密度呈明显相关性, 随着分泌型腺毛密度的提高, 青蒿素含量提高至 18.8mg/g, 野生型为 10.5mg/g, 约为野生型的 1.8 倍。

实施例 9

青蒿 *AaWRKY75b* 基因序列同源性比对

利用 NCBI 数据库, 将如 SEQ ID NO: 1 所示的 *AaWRKY75b* 基因序列进行核酸序列同源性比对, 结果显示, 该段序列与朝鲜蓟 (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) probable WRKY transcription factor 75 的序列同源性为 89%; 与向日葵 (*Helianthus annuus*) probable WRKY transcription factor 75 的序列同源性为 86%; 与番茄 (*Solanum lycopersicum*) WRKY transcription factor 75 序列同源性 86%; 与野生种潘那利番茄 (*Solanum pennellii*) probable WRKY transcription factor 75 的序列同源性为 86%; 与马铃薯 (*Solanum tuberosum*) WRKY1 gene 序列同源性为 85%; 与留兰香薄荷 (*Mentha spicata* Linn) 同源基因 *MsWRKY75b* (GenBank 登录号: KT372786.1) 序列同源性为 80%; 与野薄荷 (*Mentha haplocalyx* Briq) 同源基因 *MhWRKY75b* (如 SEQ ID NO: 3 所示) 序列同源性为 80%。

实施例 10

留兰香薄荷和野薄荷总 RNA 的提取

具体操作按照实施例 1 中的步骤进行。

实施例 11

野薄荷 *MhWRKY75b* 基因和留兰香薄荷 *MsWRKY75b* 基因的克隆

具体操作按照实施例 2 中的步骤进行, 其中所用引物如表 4 示, 获得的留兰香薄荷 *MsWRKY75b* 基因的全长编码序列如 SEQ ID NO: 3 所示, 并推导出其蛋白编码序列如 SEQ ID NO: 4 所示, 获得了野薄荷 *MhWRKY75b* 基因的全长编码序列如 SEQ ID NO: 5 所示, 并推导出其蛋白编码序列如 SEQ ID NO: 6 所示。

表 4 *MhWRKY75b* 基因和 *MsWRKY75b* 基因克隆 PCR 引物

引物名称	引物序列 (5'→3')	数字标识符
MsWRKY75b-FP	ATGGATAACTATTCCCAACCTTCTT	SEQ ID NO: 13
MsWRKY75b-RP	TTAGAAGGCAGTATAAATCTGCATT	SEQ ID NO: 14
MhWRKY75b-FP	ATGGATAACTATTCCCAACCTTCTT	SEQ ID NO: 15
MhWRKY75b-RP	TTAGAAGGCAGTATAAATCTGCATT	SEQ ID NO: 16

实施例 12

含 *MsWRKY75b* 基因或 *MhWRKY75b* 基因的植物过表达载体的构建

具体操作按照实施例 3 中的步骤进行, 所用引物序列如表 5 所示。获得的植物过量表达载体为 *MhWRKY75b*-pCAMbia 1305.1 载体和 *MsWRKY75b*-pCAMbia 1305.1 载体。

表 5 *MhWRKY75b*-pCAMbia 1305.1 载体和 *MsWRKY75b*-pCAMbia 1305.1 载体构建 PCR 引物

引物名称	引物序列 (5'→3')	数字标识符
BamHI- <i>MsWRKY75b</i> -FP	CGGGATCCATGGATAACT ATTCCCAACCTTCTT	SEQ ID NO: 17
<i>MsWRKY75b</i> -XbaI-RP	GCTCTAGATTAGAAGGCA GTATAAATCTGCATT	SEQ ID NO: 18
BamHI- <i>MhWRKY75b</i> -FP	CGGGATCCATGGATAACT ATTCCCAACCTTCTT	SEQ ID NO: 19
<i>MhWRKY75b</i> -XbaI-RP	GCTCTAGATTAGAAGGCA GTATAAATCTGCATT	SEQ ID NO: 20

实施例 13

含 *MhWRKY75b* 基因或 *MsWRKY75b* 基因过量表达的根癌农杆菌工程菌的获得
具体操作按照实施例 4 中的步骤进行。验证引物如 SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 18 所示。

实施例 14

根癌农杆菌介导 *MsWRKY75b* 基因或 *MhWRKY75b* 基因转化青蒿
具体操作按照实施例 5 中的步骤进行。

实施例 15

转 *MsWRKY75b* 基因或 *MhWRKY75b* 基因青蒿植株的 PCR 检测
具体操作按照实施例 6 中的步骤进行。其中用于鉴定的引物如 SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 18 所示。

实施例 16

转 *MsWRKY75b* 基因或 *MhWRKY75b* 基因青蒿表皮腺毛密度和总腺毛数量的统计
具体操作按照实施例 7 中的步骤进行, 结果如图 4、图 5 及图 6 所示, 其中 CK 表示野生型对照组, 转 *MsWRKY75b* 基因青蒿植株叶片腺毛密度明显高于野生型青蒿, 最高为 38.65 个/mm², 野生型为 20.34 个/mm² 达到野生型青蒿的 1.9 倍; 转 *MhWRKY75b* 基因青蒿植株叶片腺毛密度显著高于野生型青蒿, 最高为 36.45 个/mm², 20.10 个/mm², 约为野生型青蒿的 1.8 倍。

以上详细描述了本发明的较佳具体实施例。应当理解, 本领域的普通技术无需创

造性劳动就可以根据本发明的构思作出诸多修改和变化。因此，凡本技术领域中技术人员依本发明的构思在现有技术的基础上通过逻辑分析、推理或者有限的实验可以得到的技术方案，皆应在由权利要求书所确定的保护范围内。

序列表

<110> 上海交通大学

<120> 一种核苷酸序列及其在提高植物分泌型腺毛密度中的应用

<130> 01335-18225PPCT

<160> 20

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 588

<212> DNA

<213> 青蒿 (Artemisia annua L.)

<400> 1

atggacaatt ttgtttctgt tttccatac aataattcct catcttcaac ttcaccacat 60

ctatcaactta acttgatgaa cgattactcg tatagtagtg atcaaaacaa tacgtacgat 120

cacctagagg acgatcatga gcatgggtta gttgagaaaa accctatttc tagctcagaa 180

gaagtigtgc tagatcatgt ttctcccacg agtagcgggt taggtaatag tgatggaaat 240

gatatgagtt cggtctccgg gtctcggaag attagtatta agaaaggcga aaagaagatt 300

agaaaaccta agtgtgcgtt tcaaacgaga agccaagttg atatacttga tgatgggttat 360

agatggagga agtatggcca aaaggctgtt aagaataata agttcccaag gagctattac 420

cgctgtacgt atcaaggatg taacgtgaag aaacaagtcc aaaggctatc aaaagacgag 480

ggagtcgttg tgacaactta cgaaggaatg cattcacatc caatcgagaa atctaccgat 540

aactttgagc atattttgac tcaaatgcaa atctattctt catgctag 588

<210> 2

<211> 195

<212> PRT

<213> 青蒿 (Artemisia annua L.)

<400> 2

Met Asp Asn Phe Val Ser Val Phe Pro Tyr Asn Asn Ser Ser Ser Ser

1 5 10 15

Thr Ser Pro His Leu Ser Leu Asn Leu Met Asn Asp Tyr Ser Tyr Ser

20 25 30

Ser Asp Gln Asn Asn Thr Tyr Asp His Leu Glu Asp Asp His Glu His

35 40 45

Gly Leu Val Glu Lys Asn Pro Ile Ser Ser Ser Glu Glu Val Val Leu

50 55 60

Asp His Val Ser Pro Thr Ser Ser Gly Leu Gly Asn Ser Asp Gly Asn

65 70 75 80

Asp Met Ser Ser Ala Ser Gly Ser Arg Lys Ile Ser Ile Lys Lys Gly

85 90 95

Glu Lys Lys Ile Arg Lys Pro Lys Cys Ala Phe Gln Thr Arg Ser Gln

100 105 110

Val Asp Ile Leu Asp Asp Gly Tyr Arg Trp Arg Lys Tyr Gly Gln Lys

115 120 125

Ala Val Lys Asn Asn Lys Phe Pro Arg Ser Tyr Tyr Arg Cys Thr Tyr

130 135 140

Gln Gly Cys Asn Val Lys Lys Gln Val Gln Arg Leu Ser Lys Asp Glu

145 150 155 160

Gly Val Val Val Thr Thr Tyr Glu Gly Met His Ser His Pro Ile Glu

165 170 175

Lys Ser Thr Asp Asn Phe Glu His Ile Leu Thr Gln Met Gln Ile Tyr

180 185 190

Ser Ser Cys

195

<210> 3

<211> 549

<212> DNA

<213> 野薄荷 (Mentha haplocalyx Briq.)

<400> 3

```

atggataact attcccaacc ttcttcgtct tcatcaacte ttgcacaaag ctctcatata      60
tccatgctca acatgatgat gaactctcaa ccacacgata atcaactatt ccagcatctt      120
gatcagaata atggacacgt gggttcatac cegtcggttg aaaataatga tcataagcct      180
agetccgccc tcgagggtgg tgggtggtcc gagccggaaa acgaggcgga aggcgggcaag      240
agaaaggggg agaagaagtc taagaaacct aggtttgcct tccaaacaag aagccaagtt      300
gatatacttg atgatggata taggtggagg aaatatggtc aaaaggcagt caagaacaat      360
agatttccca ggagctacta cagatgcaca caacaagggt gcaatgtaaa gaaacaagtg      420
caaaggctat caaaagatga agggatagtg gtgactactt atgaaggagt ccattctcat      480
ccaatccaaa aatctacaga caatttgac cacattctta gtcaaatgca gatttatact      540
gccttctaa                                         549

```

<210> 4

<211> 182

<212> PRT

<213> 野薄荷 (Mentha haplocalyx Briq)

<400> 4

Met Asp Asn Tyr Ser Gln Pro Ser Ser Ser Ser Thr Leu Ala Gln

1 5 10 15

Ser Ser His Ile Ser Met Leu Asn Met Met Met Asn Ser Gln Pro His

20 25 30

Asp His Gln Leu Phe Gln His Leu Asp Gln Asn Asn Gly His Val Gly

35 40 45

Phe Ile Pro Ser Val Glu Asn Asn Asp His Lys Pro Ser Ser Ala Val

50 55 60

aaacaagtgc agaggctatc aaaagacgaa ggaatagtgg tgactactta tgaaggcgtc 480
cattctcattc ctatccaaaa atctaccgac aatttgacc acatccttag tcaaatgcag 540
atttatactg ccttctaa 558

<210> 6

<211> 185

<212> PRT

<213> 留兰香薄荷 (Mentha spicata Linn)

<400> 6

Met Asp Asn Tyr Ser Gln Pro Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ala Gln Ser
1 5 10 15
Ser His Leu Ser Met Leu Asn Met Met Met Asn Ser Gln Pro His Asp
20 25 30
His Gln Leu Phe Gln His Leu Asp Gln Asn Asn Gly His Val Gly Phe
35 40 45
Ile Pro Ser Val Glu Asn Asn Asp Asp His Lys Ser Ser Ser Ala Ala
50 55 60
Val Glu Val Glu Gly Gly Gly Gly Ala Glu Ala Glu Asn Glu Ala Glu
65 70 75 80
Gly Gly Lys Arg Lys Gly Glu Lys Lys Ser Lys Lys Pro Arg Phe Ala
85 90 95
Phe Gln Thr Arg Ser Gln Val Asp Ile Leu Asp Asp Gly Tyr Arg Trp
100 105 110
Arg Lys Tyr Gly Gln Lys Ala Val Lys Asn Asn Arg Phe Pro Arg Ser
115 120 125
Tyr Tyr Arg Cys Thr His Gln Gly Cys Asn Val Lys Lys Gln Val Gln
130 135 140
Arg Leu Ser Lys Asp Glu Gly Ile Val Val Thr Thr Tyr Glu Gly Val
145 150 155 160
His Ser His Pro Ile Gln Lys Ser Thr Asp Asn Phe Asp His Ile Leu
165 170 175

Ser Gln Met Gln Ile Tyr Thr Ala Phe
 180 185

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 7

atggacaatt ttgtttctgt tttt

24

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 8

ctaaaacaaa ggtggatctt gta

23

<210> 9

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 9

cgggateccat ggacaatttt gtttctgttt tt

32

<210> 10

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 10	
gctctagact aaaacaaagg tggatcttgt a	31
<210> 11	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 11	
gaagatgcct ctgcgacag tg	22
<210> 12	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 12	
gctctagact aaaacaaagg tggatcttgt a	31
<210> 13	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 13	
atggataact atteccaacc ttctt	25
<210> 14	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	

<400> 14	
ttagaaggca gtataaatet gcatt	25
<210> 15	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 15	
atggataact attceccaacc ttctt	25
<210> 16	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 16	
ttagaaggca gtataaatet gcatt	25
<210> 17	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 17	
cgggatccat ggataactat tceccaacctt ctt	33
<210> 18	
<211> 33	
<212> DNA	

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 18

gctctagatt agaaggcagt ataaatctgc att

33

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 19

cgggateccat ggataactat tcccaacctt ctt

33

<210> 20

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 20

gctctagatt agaaggcagt ataaatctgc att

33

权 利 要 求 书

- 1、一种核苷酸序列，其特征在于，所述核苷酸序列选自如下序列：
 - 1) SEQ ID NO: 1、3、5 中任一项所示的核苷酸序列；
 - 2) SEQ ID NO: 1、3、5 中任一项所示的核苷酸序列通过一个或几个核苷酸的取代、缺失、或添加衍生产生的核苷酸序列；
 - 3) 与 SEQ ID NO: 1、3、5 中的任一项具有至少 80%同源性的核苷酸序列。
- 2、一种氨基酸序列，其特征在于，所述氨基酸序列选自如下序列：
 - 1) SEQ ID NO: 2、4、6 中任一项所示的氨基酸序列；
 - 2) SEQ ID NO: 2、4、6 中任一项所示的氨基酸序列通过一个或几个氨基酸的取代、缺失、或添加衍生产生的氨基酸序列；
 - 3) 与 SEQ ID NO: 2、4、6 中的任一项具有至少 80%同源性的氨基酸序列。
- 3、如权利要求 1 所述的核苷酸序列或如权利要求 2 所述的氨基酸序列在提高植物分泌型腺毛密度中的应用。
- 4、如权利要求 3 所述的应用，其特征在于，所述植物为野薄荷 (*Mentha haplocalyx* Briq)、留兰香薄荷 (*Mentha spicata* Linn)、朝鲜蓟 (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*)、向日葵 (*Helianthus annuus*)、番茄 (*Solanum lycopersicum*)、野生种潘那利番茄 (*Solanum pennellii*) 和马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 中的一种或多种。
- 5、一种转基因提高植物分泌型腺毛密度的方法，其特征在于，包括以下步骤：
 - (1) 采用基因克隆方法获得目的基因，所述目的基因为权利要求 1 所述的核苷酸序列中的任意一种；
 - (2) 构建具有所述目的基因的植物表达载体；
 - (3) 将所述具有目的基因的植物表达载体转化根癌农杆菌，获得含目的基因植物表达载体的根癌农杆菌菌株；
 - (4) 将所述含目的基因植物表达载体的根癌农杆菌菌株转化植物，PCR 检测获得整合了所述目的基因的转基因植物植株；
 - (5) 统计整合了目的基因的转基因植物叶片上的腺毛密度，获得腺毛密度提高的植物植株。
- 6、如权利要求 5 所述的转基因提高植物分泌型腺毛密度的方法，其特征在于，在步骤 (1) 中，所述基因克隆方法包括以下步骤：提取植物基因组总 RNA，反转录合成 cDNA，以 SEQ ID NO: 7 和 8 所示的核苷酸序列为引物进行 PCR 扩增并测序，获得目的基因。
- 7、如权利要求 5 所述的转基因提高植物分泌型腺毛密度的方法，其特征在于，在步骤 (2) 中，所述构建具有目的基因的植物表达载体包括以下步骤：高保真酶扩增目的基因基因序列，并在目的基因前后分别引入 *Bam*H I 和 *Xba* I 酶切位点，利用连接

酶将目的基因与载体连接，转化宿主细胞，挑取单克隆，提质粒做 PCR 检测和酶切验证。

8、如权利要求 5 所述的转基因提高植物分泌型腺毛密度的方法，其特征在于，在步骤（3）中，所述转化根癌农杆菌包括以下步骤：采用冻融法将具有目的基因的植物表达载体转入根癌农杆菌，PCR 验证。

9、如权利要求 5 所述的转基因提高植物分泌型腺毛密度的方法，其特征在于，在步骤（4）中，所述转化包括以下步骤：外植体的预培养；农杆菌与外植体的共培养；利用抗性培养基筛选含有目的基因的再生植株。

10、如权利要求 5 所述的转基因提高植物分泌型腺毛密度的方法，其特征在于，所述植物为青蒿，所述方法还包括步骤（6）对转基因青蒿中青蒿素含量进行 HPLC-ELSD 测定，筛选获得青蒿素含量提高的转基因青蒿植株。

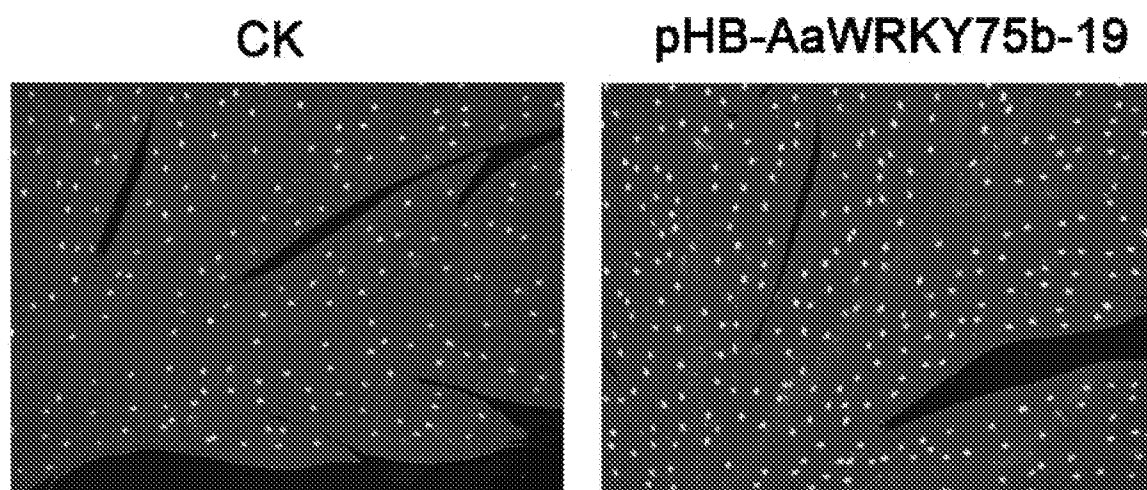


图 1

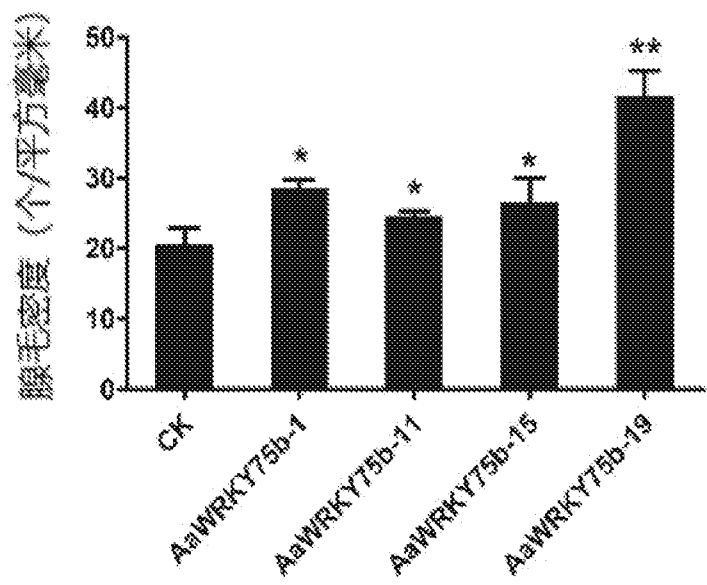


图 2

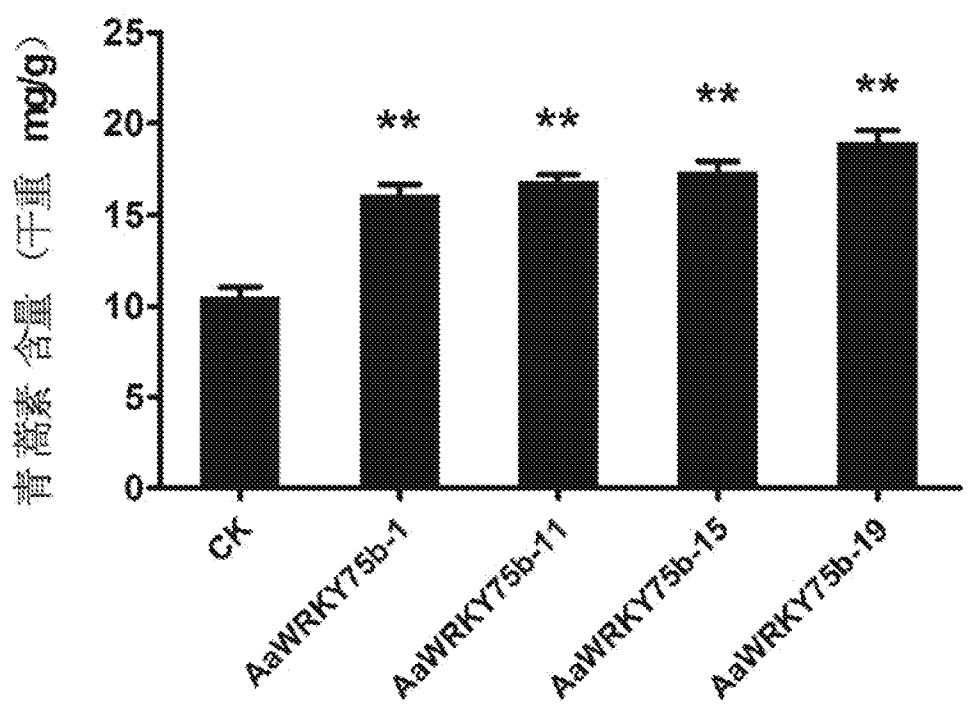


图 3

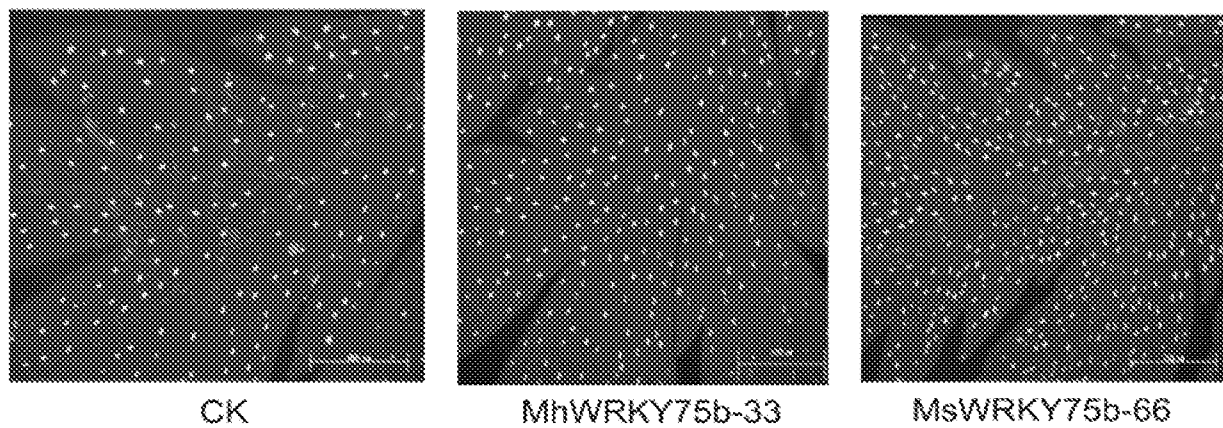


图 4

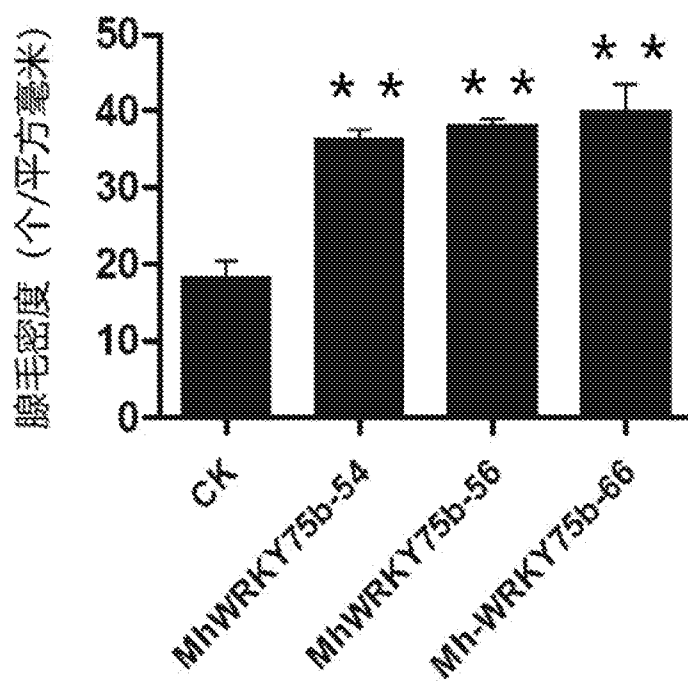


图 5

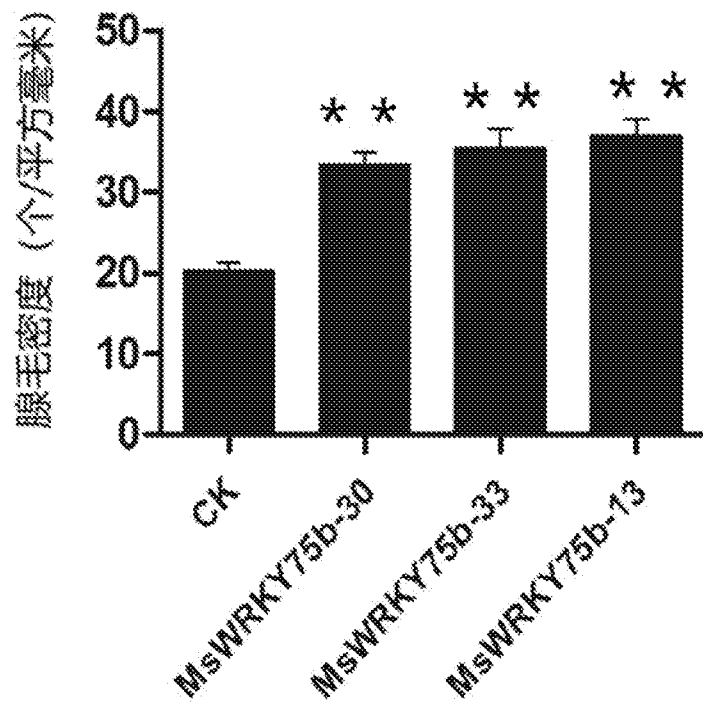


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/072349

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/29(2006.01)i; C12N 15/84(2006.01)i; C07K 14/415(2006.01)i; A01H 5/00(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)

C12N, C07K, 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)

CNTXT, CNABS, VEN, WOTXT, EPTXT, USTXT, PUBMED, GOOGLE, BAIDU, ISI Web of knowledge, CNKI, 上海交通大学, 唐克轩, 谢利辉, 付雪晴, 秦维, 黎凌, 刘航, 陈甜甜, 钱虹妹, 孙小芬, 青蒿, 转录因子, 腺毛, 促进, 提高, WRKY2, GSW2, WRKY 75b, glandular, trichomes, improve

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 106148357 A (SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY) 23 November 2016 (2016-11-23) claims 1-9, and description, paragraphs [0004]-[0028] and [0034]-[0071]	1-10
Y	CN 106148357 A (SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY) 23 November 2016 (2016-11-23) claims 1-9, and description, paragraphs [0004]-[0028]	3-10
X	"accession number: KX465129.1" GENBANK, 08 January 2017 (2017-01-08), entire document	1, 2
Y	"accession number: KX465129.1" GENBANK, 08 January 2017 (2017-01-08), entire document	3-10
X	"accession number: APR73463.1" GENBANK, 08 January 2017 (2017-01-08), entire document	1, 2

☒ 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

20 September 2019

Date of mailing of the international search report

15 October 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/CN2019/072349

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	"accession number: APR73463.1" <i>GENBANK</i> , 08 January 2017 (2017-01-08), entire document	3-10
X	"accession number: AMA07781.1" <i>GENBANK</i> , 26 January 2016 (2016-01-26), entire document	1, 2
Y	"accession number: AMA07781.1" <i>GENBANK</i> , 26 January 2016 (2016-01-26), entire document	3-10
X	"accession number: KT372786.1" <i>GENBANK</i> , 26 January 2016 (2016-01-26), entire document	1, 2
Y	"accession number: KT372786.1" <i>GENBANK</i> , 26 January 2016 (2016-01-26), entire document	3-10
A	CIOLOKOWSKI, I. et al. "Studies on DNA-binding Selectivity of WRKY Transcription Factors Lend Structural Clues into WRKY-domain Function" <i>Plant Molecular Biology</i> , Vol. 68, 04 June 2008 (2008-06-04), pp. 81-92	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/072349

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/CN2019/072349

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	106148357	A	23 November 2016	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/072349

A. 主题的分类 C12N 15/29(2006.01)i; C12N 15/84(2006.01)i; C07K 14/415(2006.01)i; A01H 5/00(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) C12N, C07K, 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)) CNTXT, CNABS, VEN, WOTXT, EPTXT, USTXT, PUBMED, GOOGLE, BAIDU, ISI Web of knowledge, CNKI, 上海交通大学, 唐克轩, 谢利辉, 付雪晴, 秦维, 黎凌, 刘航, 陈甜甜, 钱虹妹, 孙小芬, 青蒿, 转录因子, 腺毛, 促进, 提高, WRKY2, GSW2, WRKY 75b, glandular, trichomes, improve.																							
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>X</td> <td>CN 106148357 A (上海交通大学) 2016年 11月 23日 (2016 - 11 - 23) 权利要求1-9, 说明书第[0004]-[0028], [0034-0071]段</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 106148357 A (上海交通大学) 2016年 11月 23日 (2016 - 11 - 23) 权利要求1-9, 说明书第[0004]-[0028]段</td> <td>3-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>"登录号: KX465129.1" GENBANK, 2017年 1月 8日 (2017 - 01 - 08), 全文</td> <td>1-2</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>"登录号: KX465129.1" GENBANK, 2017年 1月 8日 (2017 - 01 - 08), 全文</td> <td>3-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>"登录号: APR73463.1" GENBANK, 2017年 1月 8日 (2017 - 01 - 08), 全文</td> <td>1-2</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>"登录号: APR73463.1" GENBANK, 2017年 1月 8日 (2017 - 01 - 08), 全文</td> <td>3-10</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	X	CN 106148357 A (上海交通大学) 2016年 11月 23日 (2016 - 11 - 23) 权利要求1-9, 说明书第[0004]-[0028], [0034-0071]段	1-10	Y	CN 106148357 A (上海交通大学) 2016年 11月 23日 (2016 - 11 - 23) 权利要求1-9, 说明书第[0004]-[0028]段	3-10	X	"登录号: KX465129.1" GENBANK, 2017年 1月 8日 (2017 - 01 - 08), 全文	1-2	Y	"登录号: KX465129.1" GENBANK, 2017年 1月 8日 (2017 - 01 - 08), 全文	3-10	X	"登录号: APR73463.1" GENBANK, 2017年 1月 8日 (2017 - 01 - 08), 全文	1-2	Y	"登录号: APR73463.1" GENBANK, 2017年 1月 8日 (2017 - 01 - 08), 全文	3-10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
X	CN 106148357 A (上海交通大学) 2016年 11月 23日 (2016 - 11 - 23) 权利要求1-9, 说明书第[0004]-[0028], [0034-0071]段	1-10																					
Y	CN 106148357 A (上海交通大学) 2016年 11月 23日 (2016 - 11 - 23) 权利要求1-9, 说明书第[0004]-[0028]段	3-10																					
X	"登录号: KX465129.1" GENBANK, 2017年 1月 8日 (2017 - 01 - 08), 全文	1-2																					
Y	"登录号: KX465129.1" GENBANK, 2017年 1月 8日 (2017 - 01 - 08), 全文	3-10																					
X	"登录号: APR73463.1" GENBANK, 2017年 1月 8日 (2017 - 01 - 08), 全文	1-2																					
Y	"登录号: APR73463.1" GENBANK, 2017年 1月 8日 (2017 - 01 - 08), 全文	3-10																					
☒ 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 "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 2019年 9月 20日		国际检索报告邮寄日期 2019年 10月 15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		受权官员 刘苗 电话号码 86-(10)-53961924																					

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
X	"登录号: AMA07781.1" GENBANK, 2016年 1月 26日 (2016 - 01 - 26), 全文	1-2
Y	"登录号: AMA07781.1" GENBANK, 2016年 1月 26日 (2016 - 01 - 26), 全文	3-10
X	"登录号: KT372786.1" GENBANK, 2016年 1月 26日 (2016 - 01 - 26), 全文	1-2
Y	"登录号: KT372786.1" GENBANK, 2016年 1月 26日 (2016 - 01 - 26), 全文	3-10
A	CIOLKOWSKI, I. 等. "Studies on DNA-binding selectivity of WRKY transcription factors lend structural clues into WRKY-domain function" Plant Mol. Biol., 第68卷, 2008年 6月 4日 (2008 - 06 - 04), 第81-92页	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/CN2019/072349

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 106148357 A	2016年 11月 23日	无	