

(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
2014 年 6 月 12 日 (12.06.2014)



(10) 国际公布号
WO 2014/086100 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 14/415 (2006.01) *C12N 5/14* (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2013/001504
- (22) 国际申请日: 2013 年 12 月 5 日 (05.12.2013)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201210515449.2 2012 年 12 月 5 日 (05.12.2012) CN
- (71) 申请人: 浙江大学 (ZHEJIANG UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。 广东省农业科学院水稻研究所 (RICE RESEARCH INSTITUTE, GUANGDONG ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES) [CN/CN]; 中国广东省广州市天河区金颖东一街 3 号, Guangdong 510640 (CN)。
- (72) 发明人: 涂巨民 (TU, Jumin); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号浙江大学农业与生物技术学院作物科学研究所, Zhejiang 310058 (CN)。 钟旭华 (ZHONG, Xuhua); 中国广东省广州市天河区金颖东一街 3 号广东省农科院水稻研究所, Guangdong

510640 (CN)。 刘建平 (LIU, Jianping); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号浙江大学农业与生物技术学院作物科学研究所, Zhejiang 310058 (CN)。 黄农荣 (HUANG, Nongrong); 中国广东省广州市天河区金颖东一街 3 号广东省农科院水稻研究所, Guangdong 510640 (CN)。

(74) 代理人: 中国专利代理(香港)有限公司 (CHINA PATENT AGENT (H.K.) LTD.); 中国香港特别行政区湾仔港湾道 23 号鹰君中心 22 号楼, Hong Kong (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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,

[见续页]

(54) Title: HEAT-RESISTANT RICE GENE OSZFP, SCREENING MARKER AND SEPARATION METHOD THEREOF

(54) 发明名称: 水稻抗高温相关基因 OsZFP、筛选标记及其分离方法

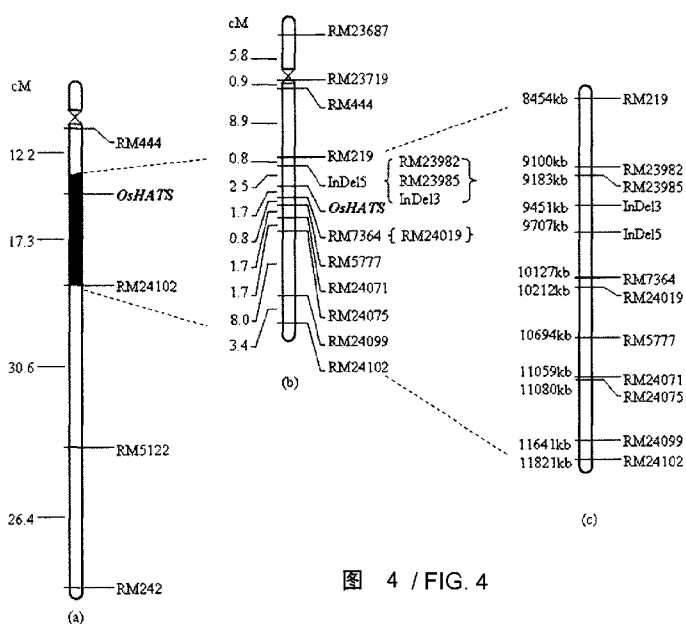


图 4 / FIG. 4

(57) Abstract: Provided in the present invention are a separated endogenous rice gene resistant to high temperature (hereinafter referred to as the OsZFP gene for short) and a polypeptide encoded thereby, optimizing rice cells comprising the heat-resistant gene of the present invention or the polypeptide encoded thereby, and the plant cell preparation method thereof. Further provided are new methods and technologies for breeding new varieties of heat-resistant crops, comprising the related regulatory sequence for heat-resistance and a closely linked molecular marker denoting the heat-resistant gene and the sequence thereof.

(57) 摘要: 本发明提供一种经分离的水稻内源抗高温基因 (简称 OsZFP 基因) 及其所编码的多肽; 包含本发明的抗高温基因或其所编码的多肽的优选水稻细胞以及所述植物细胞的制备方法。并进一步提供选育作物抗高温新品种的新方法和新技术包括抗高温基因的调控序列和标定所述抗高温基因的紧密连锁分子标记及其序列。



RW, SD, SL, 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))。

水稻抗高温相关基因 OsZFP、筛选标记及其分离方法

技术领域

5 本发明涉及植物基因工程和分子育种技术领域。具体地说，更具体而言，涉及植物抗高温基因的定位、分离、功能分析、序列特征化、调控序列鉴定和共分离分子标记筛选与创造及其在改良水稻等作物的抗逆性方面的应用水稻中的一种抗高温基因的遗传转化和分子标记辅助选择方法与程序。此外本发明还涉及借助所述利用抗高温基因来改良水稻等作物的抗逆性方面的应用。

10 背景技术

水稻是最重要的粮食农作物，而且是世界上一半以上人口的主要食物来源（Khush, 2005），报道显示，水稻产量以每年 0.6-0.9% 增长速率才能在 2050 年满足人们生活的需求（Carriger and Vallee, 2007）。作物产量的增加依赖农田，农业生产的可持续发展需要避免环境的恶
15 化、生态平衡的破坏以及生物多样性的丧失（Cassman, 1999; Tilman et al., 2002）。作物产量主要是由光合作用和呼吸作用决定的，然而，光合作用和呼吸作用均对温度敏感（Yoshida, 1981），此外还受空气中 CO₂ 浓度（Baker et al., 1990）、臭氧层（Maggs and Ashmore, 1998）的影响，这些因素也和温室效应有关（Rosenzweig and Parry, 1994）。

20 气候的持续变暖已经给水稻生产带来灾难性的影响。2006 和 2007 年，中国长江中下游的重庆、湖北、湖南、安徽、浙江和广东等省区连续两年出现大范围持续 38℃ 以上的高温天气，导致水稻等粮食作物大面积减产，严重的使其结实率不到 50%。因此，育种上迫切需要可资利用的抗高温遗传资源用以应对全球升温给水稻生产带来的严重威胁。
25 因此，广泛开展耐热研究、深入挖掘抗高温遗传资源，努力从植物耐热新品种选育角度应对全球升温给水稻生产带来的严重威胁无疑在理论上和实践上都有重要意义。

近年来，国内外就水稻孕穗期（赵志刚等，2006）、抽穗期（张永生等，2009; Zhang et al., 2009）、开花期（曹立勇等，2003, 2002; 盘毅等，2005; 陈庆全等，2008; 张涛等，2008; 奎丽梅等，2008; Zhang
30 et al., 2009; Jagadish et al., 2010;）、灌浆期（朱昌兰等，2005）以及稻米直链淀粉含量合成和胶稠度形成（朱昌兰等，2006）等时期的抗

高温特性进行了大量的遗传分析和染色体定位，定位到的耐热水稻数量形状（简称 QTL）涉及水稻的每一条染色体，其中，遗传效应最显著的一个 QTL 位点是来自巴基斯坦的品系 Bala，其对表型变异的解释率达 18%。然而，由于不同的研究者使用的试验材料 and 高温处理程序与方法的⁵不同，所获得的实验数据彼此难以相互印证和重演，所定位的 QTL 区间相对较大，以致无法确定候选基因和进行相关的分子克隆及功能互补验证。因此，对上述定位的耐热 QTL 而言，不仅在理论上缺乏必要的¹⁰数据支持，而且在生产实践上也难以有效利用。

此外，一些研究者还通过同源克隆法对水稻耐热相关基因进行了¹⁰研究。Yamanouchi 等（2002）利用图位克隆法定位并克隆了一个关于水稻斑点基因 Sp17，发现它的一个阅读框和热胁迫转录因子高度相似，在热胁迫条件下，突变体和野生型 Sp17 的表达量都上调。Yokotani 等（2008）把水稻编码 OsHsfA2e 的耐热基因转移到拟南芥中去，转基因拟南芥对环境胁迫的耐性增强。对非胁迫条件下过量表达的拟南芥植株进行芯片分析，发现与胁迫相关的一些基因表达量升高，这其中包括¹⁵几类热激蛋白。

一般认为，热激蛋白（heat shock protein, HSP）与高温响应相关。已有的报道结果显示 rHsp90 对盐、干旱及高温等几种胁迫均有响应，且 42℃ 和 50℃ 的高温处理 30 分钟能使 rHsp90 表达量显著增加（Liu²⁰等，2006）。另有报道结果显示水稻中有 40 个包含 α -晶体的基因，其中，23 种为热激蛋白（Sarkar 等，2009）。对其进行芯片和 RT-PCR 分析表明，23 个热激蛋白中的 19 个在高温下表达量上调。另外，Chang 等人（2007）把水稻热激蛋白 Hsp101 转到烟草中，发现过量表达的植株在高温下存活情况比野生型对照要好。Wu 等（2009）用²⁵HSP10 启动子驱动 OsWRKY11 表达，发现水稻转基因植株热处理后叶片萎焉较慢，存活率高。Yokotani 等人（2011）通过在拟南芥中过量表达水稻 OsCEST（叶绿体蛋白-能增强胁迫耐性）基因，发现转基因植株不仅耐盐胁迫，而且抗旱和抗高温。

锌指蛋白（Zinc finger protein）是一个庞大的转录因子家族，在基因³⁰表达调控、细胞分化、胚胎发育等生命过程中（Gerisman & Pabo, 1997; Laity et al., 2001），特别是在抗逆基因表达调控中起重要作用（Li & Chen, 2000）。根据锌指蛋白中半胱氨酸（C）和组氨酸（H）

残基的数目和位置，可将含锌指蛋白结构域的转录因子分为 C2H2，C2C2，C3H，C3HC4（即 RING finger），C3HC5（即 LM finger）等亚类。其中，C2H2 型锌指蛋白是锌指蛋白中研究最为清楚的一类，由两个半胱氨酸和两个组氨酸与 Zn^{2+} 形成配位键，进而形成一个包含 β 折叠和一个 α 螺旋的紧密指状结构。Kim 等（2001）从大豆 cDNA 文库中分离到冷诱导锌指蛋白基因 SCOF-1，其编码产物含有两个典型的 C2H2 锌指结构，SCOF-1 的表达受低温和 ABA 的特异性诱导，而不受盐胁迫诱导，转基因研究证实 SCOF-1 的过量表达可以增强拟南芥和烟草的耐冷性。刘萌萌等（2007）克隆的一个大豆 C2H2 型锌指蛋白转录因子基因 GmC2H2 的表达与低温、ABA 的胁迫诱导相关。至于 C3HC4 型兼 CHY 型锌指蛋白只在拟南芥、水稻、球莴苣、沙蒿、玉米、菠萝、大豆等几种植物中有成功分离的报道（Stone et al., 2005; Ohyanagi et al., 2006; Rensing et al., 2008; Yang et al., 2008; Alexandrov et al., 2009; 杨祥燕等, 2009; 吴学闯等, 2010）。沙蒿 AdZFP1 基因是编码这类锌指蛋白的典型例子（Yang 等 2008），半定量 PCR 分析表明，AdZFP1 基因受外源 ABA 的强烈诱导，同时在一定程度上受高盐、低温和高温的诱导。吴学闯等（2010）从大豆旱处 cDNA 文库中也筛选到一个编码 C3HC4 型锌指蛋白基因 GmRZFP1，研究结果显示，该基因主要受高温和干旱的诱导，当高温胁迫 1-6 小时，GmRZFP1 基因表达量与处理时间成正相关，胁迫 12 小时有所下降，到 24 小时时，其表达量最高。这些研究结果因此表明 GmRZFP1 基因受多种胁迫处理的诱导，可能涉及到多种逆境胁迫信号传导。

此外，Huang 等（2008）在粳稻上找到 12 个 A20/AN1 类型的锌指蛋白，芯片分析发现低温、干旱和 H_2O_2 分别诱导其中的四个基因（ZFP177, ZEP181, ZFP176, ZFP173）、两个基因（ZEP181 和 ZFP176）和一个基因（ZFP157）表达。进一步的研究表明 ZFP177 对低温和高温胁迫均有响应。对 ZFP177 基因进行过量表达，所获得的转基因烟草能耐 $2^{\circ}C$ 的低温和 $55^{\circ}C$ 的高温，但对盐胁迫和干旱胁迫反而更敏感，这说明 ZFP177 在植物各种非生物胁迫中起着重要的作用，但是不同的胁迫作用可能有不同的响应机理。

参考文献:

曹立勇，赵建根，占小登，李登楼，何立斌，程式华. 水稻耐热性

的 QTL 定位及耐热性与光合速率的相关性.中国水稻科学, 2003, 17(3): 223-227.

曹立勇, 朱军, 赵松涛. 水稻籼粳交 DH 群体耐热性的 QTLs 定位. 农业生物技术学报, 2002, 10(3): 210-214.

5 陈庆全, 余四斌, 李春海, 牟同敏. 水稻抽穗开花期耐热性 QTL 的定位分析. 中国农业科学, 2008, 41(2): 315-32.

奎丽梅, 谭禄宾, 涂建, 卢义宣, 孙传清. 云南元江野生稻抽穗开花期耐热 QTL 定位. 农业生物技术学报, 2008, 16 (3): 461-464.

刘萌萌.大豆 C2H2 型锌指蛋白转录因子基因的克隆与鉴定.北京: 10 中国农业学院, 2007.

盘毅, 罗丽华, 邓华并, 张桂莲, 唐文邦, 陈立云, 肖应辉. 水稻开花期高温胁迫下的花粉育性 QTL 定位. 中国水稻科学, 2011, 25(1): 99-102.

吴学闯, 曹新有, 陈明, 张晓科, 刘阳娜, 徐兆师, 李连城, 马 15 有志.大豆 C3HC4 型 RING 锌指蛋白基因 GmRZFP1 克隆与表达分析, 植物遗传资源学报, 2010, 11 (3) : 343-348.

杨祥燕, 蔡元保, 吴青松, 孙光明.菠萝锌指蛋白基因 AcRCHY1 的克隆与表达分析. 园艺学报, 2009, 36 (11) : 1589-1596.

张涛, 杨莉, 蒋开锋, 黄敏, 孙群, 陈温福, 郑家奎. 水稻抽穗扬 20 花期耐热性 QTL 分析. 分子植物育种, 2008, 6 (5) : 867-873.

张永生, 刘喜, 江玲, 陈亮明, 刘世家, 翟虎渠, 万建民. 利用南京 11 X 越光 RIL 群体进行抽穗期 QTL 定位分析. 江苏农业学报, 2009, 2 (1) : 6-12.

赵志刚, 江玲, 肖应辉, 张文伟, 翟虎渠. 水稻孕穗期耐热性 QTLs 25 分析 (*Oryza sativa* L.). 作物学报, 2006, 32(5): 640-644.

朱昌兰, 江玲, 张文伟, 王春明, 翟虎渠, 万建民. 稻米直链淀粉含量和胶稠度对高温耐性的 QTL 分析. 中国水稻科学, 2006, 20(3): 248-250.

朱昌兰, 肖应辉, 王春明, 江玲, 翟虎渠. 水稻灌浆期耐热害的数 30 量性状基因位点分析. 中国水稻科学, 2005, 19(2): 117-121.

Alexandrov N N, Broer V V, Freidin S, Troukhan M E, Tatarinova T V, Zhang H, Swaller T J, Lu Y P, Bouck J, Flavell R B, Feldmann K A.

(2009) Insights into com genes derived from large-scale cDNA sequencing. *Plant Molecular Biology*. 69:179-194.

Baker J.T., Allen L. H., J., Boote K. J. (1990) Growth and yield responses of rice to carbon dioxide concentration. *J. Agric. Sci.*
5 115,313-320.

Carriger S., Vallee D. (2007) More crop per drop. *Rice Today*. 6:10-13.

Cassman, K. G. (1999) Ecological intensification of cereal production systems: Yield potential, soil quality, and precision agriculture. *Proc. Natl.*
10 *Acad. Sci. USA* 96: 5952-5959.

Chang C.C., Huang P.S., Lin H.R., Lu C.H. (2007) Transactivation of protein expression by rice HSP101 in planta and using Hsp101 as a selection marker for transformation. *Plant Cell Physiol*. 48(8):1098-1107.

Gerisman H.A, Pabo C. (1997). A general strategy for
15 selecting high-affinity zinc finger protein for diverse DNA target sites. *Science*. 275:657-661.

Jagadish S.V.K., Cairnsb J., Lafitte R., Wheeler T.R., Price A.H., Craufurd P.Q. (2010a) Genetic analysis of heat tolerance at anthesis in rice. *Crop Science*. 50(5):1633-1641.

20 Khush G.S. (2005) What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. *Plant Mol Biol*. 59: 1-6.

Kim J.C., Lee S.H., Cheong Y.H., Yoo C.M., Lee S.I., Chun H.J., Yun D.Y., Hong J.C., Lee S.Y., Lim C.O., Cho M.J. (2001) A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1,
25 enhances cold tolerance in transgenic plants. *The Plant Journal*. 25(3):247-259.

Liu D., Zhang X., Cheng Y., Takano T., Liu S. (2006) rHsp90 gene expression in response to several environmental stresses in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiol Biochem*. 44: 380-386.

30 Maggs, R., Ashmore, M. R. (1998) Growth and yield responses of Pakistan rice (*Oryza sativa* L.) cultivars to O₃ and NO₂. *Environmental Pollution*. 103: 159-170.

Ohyanagi H., Tanaka T., Sakai H., Shigemoto Y., Yamaguchi K., Habara T., Fujii Y., Antonio B.A., Nagamura Y., Imanishi T., Ikeo K.,

Rensing S.A., Zimmer A.D., Terry A., Salamov A., Salamov A., Shapiro H., Nishiyama T., Perroud P.F., Lindquist E.A., Kamisugi Y., Tanahashi T. (2008) The physomitrella genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science*. 319(5859):64-69.

Rosenzweig C., Parry M.L. (1994) Potential impact of climate change on world food supply. *Nature*. 367: 133-138.

Sarkar N.K., Kim Y.K., Grover A. (2009) Rice sHsp genes: genomics organization and expression profiling under stress and development. *BMC Genomics*. 10:1-18.

Stone S L., Hauksdottir H., Troy A., Herschleb J., Kraft E., Callis J. (2005) Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 137(1):13-30.

Tilman D., Cassman K. G., Matson P.A., Naylor, R., Polasky S. (2002) Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418, 671 - 677.

Wu X.L., Yoko S., Sachie K., Yukihiro I., Kinya T. (2009) Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing OsWRKY11 under the control of HSP101 promoter. *Plant Cell Rep*. 28: 21-30.

Yamanouchi U., Yano M., Lin H., Ashikari M., Yamada K. (2002) A rice spotted leaf gene, *Spl7*, encodes a heat stress transcription factor protein. *PNAS*. 99(11): 7530-7535.

Yang X.H., Sun C., Hu Y.L., Lin Z.P. (2008). Molecular cloning and characterization of a gene encoding RING zinc finger ankyrin protein from drought-tolerant *Artemisia desertorum*. *Journal of Biosciences*. 33(1):103-112.

Yokotani N., Higuchi M., Kondou Y., Ichikawa T., Iwabuchi M., Hirochika H., Matsui M., Oda K. (2011) A novel chloroplast protein, CEST induces tolerance to multiple environmental stresses and reduces photooxidative damage in transgenic *Arabidopsis*. *Journal of Experimental*

Botany. 62(2):557-569.

Yokotani N., Ichikawa T., Kondou Y., Matsui M., Hirochika H., Iwabuchi M., Oda K. (2008) Expression of rice heat stress transcription factor OsHsfA2e enhances tolerance to environmental stresses in transgenic Arabidopsis. *Planta*, 227:957-967.

Yoshida S. (1981) *Fundamentals of Rice Crop Science* (International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines). pp69-83.

Zhang G.L., Chen L.Y., Xiao G.Y., Xiao Y.H., Chen X.B., Zhang S.T. (2009) Bulk segregant analysis to detect QTL related to heat tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) using SSR markers. *Agricultural Sciences in China*. 8(4):482-487.

发明概述

为解决上述问题，本申请的发明人通过锐意研究，开发出一种优化的定位植物抗逆性基因，尤其是抗高温基因的方法，提供了多种新的基因筛选、定位标记，并精确定位了一种水稻抗高温新基因，由此提供了将温度敏感型植物恢复为非温度敏感型植物、将普通植物转化为抗高温植物的育种方法。具体而言，本发明涉及下述方面：

1). 一种多肽，其为选自下述任一：

A) 包含如 SEQ ID NO.3 所示的氨基酸序列的多肽；

B) 包含在如 SEQ ID NO.3 所示的氨基酸序列中或经缺失、替换、插入一个或多个氨基酸所得的氨基酸序列，所述多肽具有抗高温功能；

C) 具有 SEQ ID NO.3 所示的氨基酸序列的多肽；

D) 氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示的多肽。

2). 一种基因该基因的多核苷酸序列为选自以下任一的多核苷酸序列：

A) 包含如 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列的多核苷酸；

B) 包含对应于如 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列中的第 2360 到 2371 位核苷酸为 GGGGGGGGGGGG 保持不变，在除此之外的核苷酸序列中经缺失、替换、插入一个或多个核苷酸所得的多核苷酸序列，其所编码的多肽具有抗高温功能；

C) 具有 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列的多核苷酸；

D) 核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的多核苷酸；

E) 编码如项 1 所述任一种的多肽的多核苷酸序列。

3) . 包含项 2 所述的基因的载体。

4) . 一种宿主细胞, 其特征在于所述的细胞包含项 1 所述的多肽, 或者项 2 所述的基因, 或者项 3 所述的载体, 所述宿主细胞优选真核生物细胞, 更优选植物细胞和酵母细胞, 所述植物细胞优选禾本科植物细胞, 特别优选水稻 (*Oryza sativa* L.) 细胞。

5) . 用于筛选、定位、分离新核苷酸序列的分子标记, 所述标记选自:

A) 插入/缺失标记 InDel5, 该标记位于水稻第九染色体距短臂端 9130-9150kb 之间, 所述标记的扩增产物具有长度多态性;

B) SNP 标记, 简称 RBsp1407, 在感高温水稻和抗高温水稻植株中, 基于 SEQ ID NO.1 所述多核苷酸序列, 所述标记对应序列分别为 TGT705ACA 和 TGG705ACA;

C) 微卫星 DNA 标记 RM7364, 该标记位于水稻第九染色体距短臂端 9440-9450kb 之间, 所述标记经引物的扩增产物具有长度多态性。

6) . 项 5 所述的标记在筛选、定位、分离抗/感高温基因中的应用, 其中所述的高温优选 42℃或以上, 45℃或以上, 48℃或以上, 或 50℃或以上。

7) . 植物育种方法, 所述方法包含应用项 2 所述的基因, 或应用项 1 所述的多肽, 或项 3 所述的载体, 或项 4 所述的宿主细胞, 或项 5 或 6 所述的标记。

8) . 使温度敏感型水稻恢复为非温度敏感型水稻的方法, 该方法包括通过遗传操作使温度敏感型水稻基因组第 9 号染色体中相应于 SEQ ID NO.1 第 705 位的核苷酸突变为 G。

9) . 诱导水稻抗高温表型的方法, 该方法包括通过遗传操作使不具备抗高温表型的水稻基因组第 9 号染色体中相应于 SEQ ID NO.1 第 2360 位的 5' 端插入 G, 其中, 所述的高温优选 42℃或以上, 45℃或以上, 48℃或以上, 或 50℃或以上。

10) . 使温度敏感型水稻为抗高温型水稻的方法, 该方法包括通过遗传操作使温度敏感型水稻基因组第 9 号染色体中相应于 SEQ ID NO.1 第 705 位的核苷酸突变为 G, 并且使其温度敏感型水稻基因组第 9 号染色体中第 2360 位的 5' 端上游插入一个 G, 使所得核苷酸序列

与 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列中的第 2360 到 2371 位核苷酸相同，即自 2360 位起远离起始密码子方向序列包含连续的 12 个 G，其中，所述的高温优选 42℃或以上，45℃或以上，48℃或以上，或 50℃或以上。

5 11) 本发明涉及用于鉴定植物抗高温特性的方法，所述方法可概括如下：即以两叶一心期至三叶一心期的土培秧苗，经 45-48℃高温处理 79h，恢复 5d 后观察温度反应结果，作为耐高温鉴定的标准程序，相对湿度和其它栽条件设置在相同水平上。

10 12) 上述第 11 项所述方法，优选还包括每次所用盆栽盆的大小均为长 43cm，宽 33cm 和高 10cm，盆栽土经称量后等量加入，栽培规格为每品种 5 行，每行 12 株，周围种植 1 行高温材料作为保护行，以消除边际影响，保护行和正式实验材料间预留清晰的界限；处理时生长箱内的湿度设定为 75%，光暗周期轮换的时长设定为 12h。

附图说明

15 图 1 高温胁迫处理试验和抗、感品种 HT54 及 HT13 的耐高温反应。图中所示为处在两叶一心期的土培苗经不同高温处理 79 小时恢复 5 天后的生长状况，A：42℃高温处理；B：45℃高温处理；C：48℃高温处理；从图中照片结果可以看出，抗高温品种 HT54 和感高温品种 HT13 对 45℃和 48℃高温处理的热激反应都呈现质的存活与死亡差异。

20 图 2 为水稻抗高温基因定位建立的微卫星分子标记 (SSLP) 连锁遗传图。标记间的图距为物理距离。

图 3 HT54 (抗) X HT13 (感) 杂种 F2 代抗高温位点的初步连锁群检测结果。所用的分子标记为位于水稻第九连锁群的 SSR 标记 RM444。图中，M 表示分子量标记；RP 为抗高温亲本；SP 为感高温亲本；RB 为抗高温极端单株 DNA 池；SB 为感高温极端单株 DNA 池；F1 为杂种一代植株；1-9 为 F2 隐性感高温极端单株。

30 图 4 抗高温基因 OsHTAS 在第 9 染色体上的连锁遗传图谱。(a): 由 61 株定位群体产生的连锁遗传图谱；(b): 由 131 株定位群体对(a) 图中黑色区段精细定位产生的连锁遗传图谱。

图 5 利用候选基因 (ZFP) 序列中于抗、感高温亲本间呈现的一个单核苷酸多态性 (SNP) 转换的 PCR-RFLP 标记对用 InDel5 和

RM7364 标记定位时作图群体中出现的交换株进行检测的结果。图中, M、RP、SP、S 分别表示分子量标记(DL2000)、抗高温亲本 HT54、感高温亲本 HT13 和 3 个交换株。

图 6 ZFP 抗、感等位基因对 42℃ 高温胁迫处理的动态表达模式分析。所用的分析方法为实时定量 PCR 分析法,以水稻肌动蛋白基因 actin 作为内标。图中红色实心柱表示 HT54(抗)在不同时间点 ZFP 表达量,相应的,蓝色实心柱表示 HT13(感)在不同时间点 ZFP 的表达量。图中可见,该基因在抗、感高温品种 HT54 和 HT13 中的表达变化模式基本一致,在 HT13 中该基因的表达量在处理 2 小时后上升至处理前(0h)的 3.68 倍,而此时 HT54 中的表达量仅仅上升至处理前的 1.64 倍。

图 7 抗高温基因 *OsZFP* 编码序列的亚细胞定位分析。图中显示:与对照 35S-YFP 相比,35S-ZFP-YFP 即抗高温基因编码产物与黄色荧光蛋白的融合蛋白主要定位于细胞膜上。

图 8 本申请中所涉及的抗高温基因 *OsZFP* DNA 序列、编码序列及其产物氨基酸列。

发明详述

为解决上述问题,本发明人经过锐意研究,在大量试验结果的基础上,完成了本发明。以下结合附图对本发明进行具体说明。

一、水稻苗期耐高温标准化鉴定程序

首先,发明人建立了水稻苗期耐高温标准化鉴定程序。该鉴定程序的突出优点是抗、感分型清楚、结果重衍性好、实际应用性强。因此,该程序的建立将为水稻抗高温种质资源材料的筛选、评价,抗高温基因的遗传分析、染色体定位与克隆提供良好的技术基础。具体鉴定内容请参见实施例 1 所述的内容。

二、水稻抗高温基因进行了分子定位

在以上试验结果的基础上,发明人利用抗高温水稻材料 HT54、感高温水稻材料 HT13 及其杂交后代 F1 和 F2 为示例性试验材料,对水稻抗高温基因进行了分子定位。

试验方法

(1). 亲本多态性标记的筛选

水稻抗高温基因的分子定位选用多态性高和重复性好的微卫星

DNA 长度多态性分子标记(SSLP)进行,所用 SSR 引物均根据 Gramene 数据库(www.gramene.org)和 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)数据库上公布的引物序列,由上海生物工程技术服务公司合成。

水稻基因组 DNA 的抽提采用 McCouch 等(1988)报道的小量 DNA 提取法。具体方法步骤如下:1)剪取一小片叶片 4-5 cm,加入 700 μ L 1.5 $\times$ CTAB (含 1.5% CTAB, 75 mM Tris-HCl, 15mM EDTA, 1.05 M NaCl), 充分研磨; 2)将研磨的匀浆转入 1.5 ml 的离心管, 56 $^{\circ}$ C 水浴 20 min 后冷却至室温; 3)加入等体积的氯仿: 异戊醇 (24:1), 摇匀; 4)最高速度 (13200 rpm) 离心 10 min; 5)将上清液转入新的离心管, 10 并加入两倍体积的预冷的 100%酒精, 静置 20 min 后离心收集 DNA; 6)去上清, 风干 DNA, 加 50-100 μ L 双蒸水, 于紫外分光光度计中检测, 稀释 DNA 浓度, 制备一套 DNA 工作溶液, 其浓度为 50-100ng/ μ L 左右, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

2) 定位群体的构建

15 2008 年秋在广东农科院水稻所试验基地以抗高温材料 HT54 为父本、高温敏感材料 HT13 为母本配制杂交组合。母本 HT13 以“温汤杀雄”的方法进行处理, 考虑到 HT13 是对温度敏感的材料, 温汤杀雄的温度的设定比通常情况低 2 $^{\circ}$ C, 以避免其雌蕊受到伤害。具体做法是: 于水稻抽穗期, 在晴天的上午 7: 30 左右, 选好母本 HT13 的穗子 (抽 20 出 2/3), 将水温调制到 43 $^{\circ}$ C 的暖水瓶倒置套住母穗, 并用棉花塞住瓶口保温, 8min 后取出穗子, 抖掉水珠, 有部分颖花 (已开花授粉或过几天才能开花) 不开, 应全部剪去, 并立即套上纸袋, 9: 00 左右取父本 HT54 的穗子, 穗柄插在装有自来水的瓶中, 以黑布罩住, 待一个小时候后, 父本上的大部分小花均盛开, 把花粉抖落在已进行高温杀雄并 25 且开颖良好的母穗柱头上, 重复 2-3 次授粉。授粉后立即给母穗套上牛皮纸袋, 袋口用回形针夹住, 但不要夹住穗梗, 挂上牌子, 记上名称及杂交日期, 待 8 天左右可以取下纸袋, 成熟时收获 F1 种子。

2008 年冬在海南种植杂种 F1, 待植株长大后取叶片提取 DNA, 利用两亲本具有多态性的 SSR 标记 3-4 对检验植株是否为真杂种, 并在植株抽穗后套袋自交收获 F2 种子用于后续抗高温鉴定, 通过高温处理后的抗、感比进行抗高温基因的遗传分析并对抗高温基因定位。

3) 高温处理程序

按照前述秧苗培养方法和标准化的高温处理程序对亲本、F1 和 F2 进行高温处理。具体步骤是：a.育苗盆准备，即向每盆育苗盆（大小为 43cm × 33cm × 10cm）中加入等量的、且已经过筛、并经充分混匀的稻田土；b. 播种，即把催芽的种子点播在盆中，11 行/盆，18 粒/行，同时，播种亲本各 1 行/盘作对照，周围设置 2 行保护行。肥水管理同一般盆栽水稻管理；C.取样，待秧苗长至三叶期时，每株取第 2 片叶约 2-3cm 置于-80℃冰箱，用于鉴定后对敏感单株提取 DNA。D.待秧苗恢复生长 2 天后，即第 3 片叶即将完全长出的前一天，移入人工气候箱进行高温处理。人工气候箱设置具体如下：33℃ 1h（光照 Light，简写为 L，下同）→ 36℃ 1h（L）→ 39℃ 1h（L）→ 42℃ 1h（L）→ 45℃ 1h（L）→ 48℃ 7h（L）→ 48℃ 12h（黑暗 Dark，简写为 D，下同）→ 48℃ 12h（L）→ 48℃ 12h（D）→ 48℃ 12h（L）→ 48℃ 12h（D）→ 48℃ 12h（L）。湿度 75%。

(4). PCR 反应程序及检测

SSR 分析主要参照 Wu 等（1993）的方法修订而成，PCR 为 25 μL 体系：2.5 μL 10 × 缓冲液(Mg²⁺)；0.5 μl 10Mm dNTP；1.0 μl 5 μM 5' -引物；1.0 μl 5 μM 3' -引物；0.5 μl *Taq* 聚合酶；1.0 μl DNA；18.5 μl ddH₂O。dNTP 订购于上海生工，*Taq* 聚合酶订购于鼎国。PCR 扩增程序为：94℃ 先预变性 5 min，然后开始 35 个循环（94℃ 变性 45s，选择引物适合的温度 50-60℃ 退火 45s，72℃ 延伸 45s），接着 72℃ 继续延伸 10 min。扩增产物用 3%的琼脂糖凝胶电泳（AGE）或 4%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）检测。

(5). 抗高温基因的初步定位

选用 F2 代分离群体构建作图群体，基因定位采用隐性极端群体法，所用分子标记为微卫星 DNA 多态性分子标记（SSLP）。其具体程序是，首先对 F2 分离群体进行高温处理，筛选出感高温的单株用作基因定位的作图群体。然后，从 F2 分离群体中，随机挑选抗、感高温类型单株各 10 株，将叶片等量混合后研磨抽提 DNA，用于构建感、抗高温的 DNA 池。之后，利用亲本间具有多态性的 SSLP 标记（Chen et al., 1997; Temnykh et al., 2000），对两个 DNA 池首先进行标记分析，筛选出在两个 DNA 池中具有多态性的标记，藉此，初步确定基因所在的连锁群。在此基础上，再用在 DNA 池中获得的多态性标记对上述 F2 分离世代

中隐性极端个体构建的作图群体逐一进行基因型测定，所获得的数据用于目标基因的初步定位。

(6). 抗高温基因的精细定位

在初步定位的基础上，进一步对定位区段进行标记加密分析，使其定位区段的长度至少，所用的 SSLP 标记或从禾本科基因组数据库中 (<http://www.gramene.org>) 获得，亦或是自己根据基因组序列设计合成，直到这类标记在目的基因涉及的连锁群上被用完为止。然后，利用生物学信息对标记区间（一般至少要小于或等于 0.5Mb）内的编码序列进行生物学功能预测和分子特征化（包括基序、功能域、保守序列和调控序列等）分析，以便确定出候选基因。之后，针对候选基因设计特异引物，并通过 TA 克隆对候选基因进行克隆与测序，根据是否存在差异预测出目的基因。

(7). 遗传距离的计算

将电泳图片结果进行数值统计转换：与 HT54 带型一致的记为 A，与 HT13 带型一致的记为 B，同时具有两亲本带型的记为 H，没有带的记为-。

连锁遗传分析采用 MAPMAKER3.0 软件 (Lander et al, 1987) 进行分析，计算遗传距离 (cM)，并进行遗传作图 Mapdraw2.1 (刘仁虎和孟金陵, 2003)，对抗高温基因进行定位分析。

为精确定位所述基因，发明还开发了一种新的定位标记，所述标记的制备示例请参见下文中的实施例 2。

遗传分析与基因定位结果

1) 亲本多态性筛选和分子图谱建立

总共使用了 2304 个 SSLP 分子标记对亲本进行了多态性筛选，从中筛选出 322 个在亲本间具有多态性的 SSLP 标记分子，其在染色体上的分布按照物理距离度量如图 6，除第 9 染色体和着丝点附近外，获得的多态性 SSLP 标记较均匀覆盖了各个染色体。

水稻抗高温基因定位建立的微卫星分子标记 (SSLP) 连锁遗传图如图 2 所示。标记间的图距为物理距离。

2) 遗传分析证实 HT54 在苗期的抗高温特性是受主效显性单基因控制

利用标准化的高温处理程序于两叶一心期对亲本、杂种 F1 和 F2

进行高温处理。结果表明：高温处理后的 F1 植株完全存活，F2 群体则呈现明显的抗、感分离，其中，抗高温植株 442 株，感高温植株 152 株，抗、感分离符合 3:1 的分离比率（见表 1），卡平方测验， $P>0.05$ ，表明差异未达显著水平。该结果因此说明 HT54 在苗期的抗高温特性是受主效显性单基因控制，该基因现被命名为 OsHTAS (*Oryza sativa* Heat Tolerance at Seedling stage)。

表 1 HT54 抗高温特性的遗传分析结果

抗高温 株数	感高温 株数	总株数	χ^2 (3:1) 检验	P 值
442	152	594	0.11	0.70-0.80

3) 初步定位显示抗高温基因位于水稻第 9 连锁群

在 322 对于亲本间有多态性的 SSLP 标记中，发现只有 RM444 检测抗高温 DNA 池时呈现杂合带型，且感高温 DNA 池和敏感亲本一致，这说明 RM444 可能与目标基因连锁（参见图 3）。另外，在 F1 的 PCR 扩增产物中，两个亲本带型扩增强度基本一致；抗高温 DNA 池带型为杂合型，但其中的 HT54 带型明显强于 HT13 的带，暗示抗高温 DNA 池可能包含抗高温纯合体和杂合体两种；而感高温 DNA 池带型基本上为 HT13 带型，说明该 DNA 池主要由感高温的隐性纯合单株的 DNA 组成，因而预示所用的分子标记与目标抗高温基因可能连锁。于是，从高温处理过的 F2 群体中选择了 61 株隐性极端感高温单株和 40 株抗高温单株构建了两个验证群体，进行 RM444 标记分析。结果显示：61 株隐性极端感高温单株中有 13 株为杂合带型，43 株为 HT13 带型，5 株为无带，0 株为 HT54 带型；而 40 抗高温植株中有 23 株为杂合带型，2 株为 HT13 带型，15 株为 HT54 带型。这些结果因而进一步验证了 RM444 标记是和抗高温基因 OsHTAS 连锁的。

4) 精细定位进一步将抗高温基因定位于两个分子标记 RM7364 和 InDel5 之间，该区间的实际物理距离为 420bp

从 www.gramene.org 网站上的数据库中搜寻第九号染色体的短臂端（即 RM444 上方）引物，进行亲本标记型分析，共找到 3 个在亲本间具有多态性的 SSLP 标记，它们分别是 RM23687、RM23719 和 RGNMS2991。利用这三个标记扫描之前用过的 61 株定位群体后，发

现 RM23719 和 RM23687 确实与抗高温的 OsHTAS 基因连锁(图 4a), 其连锁距离分别为 12.2 cM 和 13.1 cM, 而 RGNM2991 未能获得有效数据; 另外, 还发现 RM23719 紧邻地位于 RM444 的下方, 两者的遗传距离为 0.9 cM(图 4a), 但两者的实际物理距离为 4.48Mb; 而 RM23687 接近端点(两者相距 1.07Mp), 与 RM23719 相距 1.01Mb, 但检测到的与抗高温基因 OsHTAS 间的连锁遗传距离达到 17.9 cM 之多。根据禾本科基因组数据库列出的水稻第 9 染色体上的信息, 发现之所以检测到上述这种不正常的连锁遗传情况, 可能是由于 RM23719 靠近离着丝点的缘故。由此, 推测抗高温基因可能在 RM444 的下方, 即水稻第 9 染色体的长臂端。

接着, 从禾本科基因组数据库中搜索水稻第 9 染色体的长臂端(即 RM444 下面)引物, 共找到 114 对 SSLP 引物, 经亲本多态性分析, 共找到 10 对具有亲本多态性的引物, 它们分别是 RM23982、RM23985、RM7364、RM24019、RM5777、RM240712、RM24075、RM24099、RM24102、以及 RM24170。对抗、感 DNA 池进行标记分析的结果显示: RM23982、RM23985、RM7364 和 RM24019 在抗、感高温 DNA 池间也表现多态性, 接着用这些标记对 61 株 F₂ 定位群体作进一步的标记分析, 进而把抗高温基因 OsHTAS 定位在 RM23985 和 RM7364 (见图 8b) 之间。在未能在此区间进一步找到已知 SSLP 标记的情况下, 转而依据籼粳稻基因组的序列信息设计了 90 对插入/缺失 (Insertion/Deletion, InDel) 标记, 在对亲本进行标记分析后, 共找到 8 对具有亲本多态性的引物, 但只有 InDel3 和 InDel5 在亲本间的差异较大, 且易于进行定位群体带型的辨别。

抗高温基因 OsHTAS 在第 9 染色体上的连锁遗传图谱如图 4 所示。

这两个插入/缺失标记的引物序列分别是, InDel3F: 5' -GTTTGCG ACATTGGAGCCTTC-3' 和 InDel3R: 5' -AATGCTTGGGTATGCTAG GTGAA-3' ; InDel5F: 5' -TCCTCGGAGATGTTTGACCTTG-3' 和 InDel5R: 5' -CAGAAGGTGTACGCAACTCTTGT-3' 。

由此, 利用这两个自主设计的插入缺失标记进一步把水稻抗高温基因 OsHTAS 定位在 RM7364 和 InDel5 之间, 其基因和这两个紧密连锁标间的遗传距离分别为 2.5cM 和 1.7cM, 标记间的实际物理距离为

420Kb。然后，将定位群体扩大至 131 株，所检测到的 InDel3、InDel5、RM7364、RM24019 与抗高温基因 OsHTAS 间的遗传连锁距离分别为 4.0 cM、3.2 cM、1.2 cM 和 1.6 cM (图 4b)。这些定位结果基本与前述 61 株定位群体的定位结果一致。

5 5) 所确认的候选基因为锌指蛋白基因，其在抗、感高温亲本间有两处 SNP 差异，并与由其中之一开发展的 PCR-RFLP 标记共分离

由于在上述定位区间内难以再获得可供使用的多态性标记，转而利用现有的生物学数据库信息结合已公开发表的基因数据去筛选和确定候选基因。从 <http://rice.plantbiology.msu.edu/> 网站上搜索 420Kb 长的定位区段 (从 Indel5 到 RM7364) DNA 序列总计找到 60 个已知和未知基因，其中，15 个为编码反转录转座子蛋白的基因，6 个为编码转座子蛋白的基因，27 个为编码已知功能蛋白的基因，12 个为编码未知功能蛋白的基因。已有的报道结果表明：有关的泛素结合酶蛋白 (LOC_Os09g15320) 和锌指蛋白 (LOC_Os09g15430) 基因均与水稻耐高温性相关，因此，将其初步确定为候选基因；接着，我们对标准化后的芯片数据进行分析，在 8 个苗期表达超过 100 的基因[核苷碱基-抗坏血酸转运蛋白 (LOC_Os09g15170)、逆转座子蛋白 (LOC_Os09g15250)、泛素结合蛋白 (LOC_Os09g15320)、转运家族蛋白 (LOC_Os09g15330)、水解酶 (LOC_Os09g15340)、NAD 依赖表异构酶/脱水酶 (LOC_Os09g15420)、锌指蛋白 (LOC_Os09g15430) 和在 DGCR 区的富含丝氨酸/苏氨酸蛋白 T10 (LOC_Os09g15480)]中，泛素结合蛋白 (LOC_Os09g1532) 和锌指蛋白 (LOC_Os09g15430) 都是高量表达的，说明这两个基因对水稻苗期的生长发育起着重要的作用。于是，从抗、感亲本的幼苗叶组织中扩增这两个候选基因的 cDNA 序列和启动子及终止子基因组 DNA 序列进行测序，结果发现抗、感亲本的 cDNA 序列均没有差异，但锌指蛋白 (LOC_Os09g15430) 的 5' 端非翻译区及其启动子序列上各存在一处单碱基多态性 (SNP) 差异。由于启动子序列中的 SNP 差异导致一个限制性内切酶 Bsp1407 识别位点 (T↓GTACA) 的改变，籍此，设计了一个 PCR-RFLP (CAPs) 标记，记为 RBsp1407。

该标记的 PCR 扩增产物的大小为 580bp。对扩增后的 PCR 产物进行回收，然后利用内切酶 Bsp1407 I 酶 (Promega) 对此片段进行酶切，

结果显示：HT54 的扩增产物不能被酶切，片段大小依然为 580bp，而 HT13 和 131 株作图群体中呈现的所有交换株均能被酶切，切开后产生大小为 422bp 和 158bp 两个片段（图 5）。PRBsp1407I 标记在 InDel5 和 RM7364 之间呈现 0 交换株这一试验结果说明：在所用定位群体大小条件下该标记和抗高温基因 OsHTAS 呈现共分离，由此进一步将候选基因确定为锌指蛋白基因。

以下通过具体实施例的方式对本发明的技术方案进行详细描述。本领域技术人员明了，所述具体实施方案是为有利于本领域技术人员再现本发明所给出的示例性技术信息，其不作为对本申请请求保护的权利要求的限制，基于所述示例试验方案的改变，只要其技术方案和其所达到的有益效果不背离本发明的主旨，则经所述改变的技术方案均应包含在本申请的保护范围之内。

实施例

实施例 1 抗高温基因的鉴定

本实施例采用耐高温水稻品种 HT54 和高温敏感水稻品种 HT13（两者均为稻种籼亚种（*O.sativa ssp. indica*））为示例性试验材料。

1) 水稻秧苗的培育和抗高温处理条件的设定

(1). 秧苗培育

取同一地块水稻田土壤，自然风干后粉碎过筛，按相同重量分装在植物生长盆（26cm×18cm×6cm）中，加等量水浸泡一夜后用于播种。试验材料经浸种、催芽后播种。每盆分为两个部分，一半种 HT54，另一半种 HT13，每个品种 3 行，每行 8 株。

(2). 高温处理时期和处理温度及其它条件设置

高温处理时期为苗期，所用的人工气候箱为浙江宁波福实验仪器厂生产的智能人工气候箱 PRX-1000B，温度设置共分 42℃、45℃和 48℃三个处理，温度是从 33℃开始以 3℃/h 的速率上升，直至到达设定高温，所用湿度为 75%，其它栽培条件设置在相同的水平上。

(3). 水稻抗高温鉴定程序和标准化参数设定

水稻抗、感高温品种 HT54 和 HT13 秧苗经土培生长至两叶一心和三叶一心期移入生长箱，进行 3 种温度的高温处理，处理时间为 79h，待处理完毕并恢复 5 天后，观察秧苗对高温的反应。结果如图 1 所示。由图 1 的结果可以清楚地看出：当温度为 42℃时，处理后的抗、感高

温品种秧苗均完全存活；而当处理温度为 45℃ 和 48℃ 时，处理后的抗、感高温品种呈现质的存活与死亡差异（图 1），但显然 45℃ 不是抗高温品种 HT54 能忍耐的高限温度，因此，最终选定 48℃ 作为标准程序的温度设定值。于是，由该试验确定的水稻苗期抗高温鉴定程序可概括为：两叶一心的土培秧苗，48℃ 高温和 75% 相对湿度条件下处理 79h，恢复 5d 后，观察秧苗对高温的反应，并以能否存活作为水稻抗、感高温的鉴定指标。图中照片结果可以看出，抗高温品种 HT54 和感高温品种 HT13 对 45℃ 和 48℃ 高温处理的热激反应都呈现质的存活与死亡差异。

实施例 2 新基因标记的确认

为实现水稻抗高温基因的精确定位，显然现有技术中的 SSLP 不足以满足需要。为此，发明人开发了新的定位标记。具体而言，发明人通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 公布的粳稻日本晴和籼稻 9311 的全基因组序列差异寻找插入/缺失多态性 (Insertion/Deletion, InDel) 位点。根据此位点所在的两端 DNA 序列，利用 Primer5.0 设计合适的引物，通过 NCBI 在线 Primer blast 保证其引物的特异性。

TA 克隆及测序分析

a) 加 A 反应：由于纯化的 PCR 产物是用 Proybest 酶扩增获得的，其末端为平末端，需要加上碱基 A，才能进行 TA 克隆。加 A 反应的总体系为 20μL，所要加入成分和体积为：10 × PCR 缓冲液，2μL；Taq 酶，0.5μL；dNTPs (10mM)，0.5μL；PCR 纯化产物，17μL。混匀放到 PCR 仪上，72℃ 30min，4℃ 保存。使用 Axy Prep PCR Clean-up Kit (Axygen) 纯化加 A 反应产物。

b) 连接：参照 pMD18-T 载体系统试剂盒 (TaKaRa) 说明书进行操作。取 4μL 纯化的加 A 反应产物与 5μL 连接混合液 (solution I) 和 1μL pMD18-T 载体混合，16℃ 下连接，恒温 1-2 小时 (恒温仪中进行)。

C) 连接产物大肠杆菌热击转化：从 -80℃ 取感受态细胞，加入 10μL 连接反应液，轻轻摇匀，于冰上放置 30min；42℃ 水浴热击 90s，立即置于冰上 2min；之后，每管加 800μL LB 培养基，37℃ 摇床低速震荡培养 45min (使细菌复苏，转速不超过 190rpm)；将上述菌液富集后涂布于 LB 筛选平板 (Amp/IPTG/X-Gal) 上；待菌液完全被培养基吸收后倒置培养皿，37℃ 过夜培养。

d) 转化子阳性克隆的鉴定: 挑取白色菌落, 利用载体测序通用引物进行 PCR 扩增鉴定。PCR 反应体系同上, 其反应程序为: 94℃ 5min 预变性, 之后 95℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 延伸 (具体时间根据目的基因大小确定), 共 30 个循环, 接着 72℃ 延伸 5min。

5 e) PCR 产物电泳鉴定: 阴性菌落的 PCR 产物长度为 156bp (仅载体上扩增的序列), 阳性菌落 PCR 产物片段大于 156bp (目的基因片段长度+156bp)。

F) 阳性克隆测序: 取 5mL 含 50μg/mL Amp 的 LB 液体培养基到 50 mL 离心管中, 接种菌落 PCR 呈阳性的菌落, 37℃, 220rpm 振荡培养过夜; 取培养的菌液到 1.5mL 离心管中, 12000rpm 离心 2min, 去上清, 将离心管倒置于吸水纸上, 使细菌沉淀尽可能干燥; 用 Axygen 质粒抽提试剂盒提取质粒 DNA。抽提的质粒 DNA 于 -20℃ 保存备用, 同时分别取 10μL 质粒对应的菌液进行测序验证 (上海英俊)。每个基因测序验证 3 个阳性转化子。本发明所述的新标记是由抗、感高温亲本在候选基因的启动子上出现的一个 SNP 发展而来。具体地说, 该 SNP 的出现导致了一个限制性内切酶 *Bsp1407 I* 识别位点的改变, 其在抗高温亲本上的序列为 5'-TGGACA-3', 不能被 *Bsp1407 I* 识别, 而在感高温亲本上的序列为 5'-TGTACA-3', 能被 *Bsp1407 I* 识别; 因此, 针对 SNP 所在的区域设计特异引物, 扩增出相应的基因组片段, 再用 *Bsp1407 I* 酶切, 即可检测这种多态性差异。

根据这个原理, 本实施例所设计的特异引物序列为, BspF: 5'-CCATCCAAACACGCCCTAA-3' 和 BspR: 5'-ATTGCCCCTTGCTATGG T-3', PCR 扩增的产物大小 580bp, 来自感高温亲本的 PCR 产物被 *Bsp1407 I* 酶切后得到的两个片大小分别为 422bp 和 158bp, 由此开发的 PCR-RFLP 标记记为 RBsp1407。

该标记在抗高温基因定位过程中已被证实是与目标基因共分离的。

在确认 RBsp1407 标记的试验中, 发明人用该标记对隐性极端定位群体经两个紧密连锁标记 RM7364 和 InDel5 分析后出现的 3 个重组单株进行了验证性检测, 结果出现了与隐性感高温亲本一致的结果如图 5 所示。由此, 发明人还开发出插入/缺失标记 InDel5, 该标记位于水稻第九染色体距短臂端 9130-9150kb 之间, 在抗、感亲本间所述标记具有

长度多态性；以及微卫星 DNA 标记 RM7364，该标记位于水稻第九染色体距短臂端 9440-9450kb 之间。对于标记 RM7364，设计引物 RM7364F: 5'-TTCGTGGATGGAGGGAGTAC-3'；和 RM7364R: 5'-RGCGTTTGTAGGAGTGCCAC-3'，同样，发现在抗、感亲本间所述
5 标记经引物的扩增产物具有长度多态性。

实施例 3 抗高温基因 OsHTAS 的确认

经前述的基因定位研究，本发明人所发现了定位于水稻基因组第 9 染色体上的新基因，即显性耐高温基因 *OsHTAS*。所述显性耐高温基因 *OsHTAS* 与隐性等位基因 *Oshtas* 在 DNA 序列上的差异仅为一个单核
10 苷酸多态性 (SNP) 的差异，发生在 *OsHTAS* 5'-端非翻译区与耐高温、耐盐和耐干旱相关的基序上 (11T12G)，*OsHTAS* (TTTTTTTTTTTTGGGGGGGGGGGG) 比 *Oshtas* (TTTTTTTTTTTTGGGGGGGGGGGG) 多一个 G；显性耐高温基因 (LOC_Os09g15430) *OsHTAS* 基因组序列全长 4784bp，编码序列
15 (CDS) 全长 1245bp，编码产物为 414aa，属于锌指家族蛋白；水稻 (*Oryza sativa*) ZFP 基因，具体序列如序列表中 SEQ ID NO:1 所示。

发明人在具体试验过程中对所述基因部分位点进行了插入、缺失、替换，对所获得的突变体实施了功能验证，结果表明因遗传密码子的简并以及部分位点的突变等操作后所获得突变体保持了与 SEQ ID
20 NO:1 所示基因同样的抗高温功能。更具体而言在对应于如 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列中的第 2360 到 2371 位核苷酸为 GGGGGGGGGGGG 保持不变，在除此之外的核苷酸序列中经缺失、替换、插入一个或多个核苷酸所得的多核苷酸序列所编码的多肽仍具有抗高温功能。所述的插入、缺失、替换依照本领域公知的遗传操作方法
25 法进行，经变化的核苷酸数目优选 1-100，更优选 1-50 个，1-20 个，更优选 1-10 个核苷酸的改变。

此外，发明人将本发明的抗高温基因与诱导型启动子连接，构建了表达载体，将其转化酵母 DY1455、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* Columbia) 等宿主细胞，成功获得了阳性转化子。

30 实施例 4 抗高温基因 OsHTAS 对高温胁迫的响应特点

用 42℃ 高温对不同抗、感高温品种进行 96 小时持续处理，并于 12 个时间点 (0h、1h、2h、4h、6h、8h、12h、24h、48h、72h、84h、

96h) 取样抽提 RNA。结束处理后, 所有植株放置 30℃ 进行恢复培养 1 小时, 并于 3 个时间点 (96h10m、96h45m、97h) 取样抽提 RNA。对候选基因 OsHTAS 进行实时定量 PCR 表达分析。结果显示: 该基因在抗、感高温品种 HT54 和 HT13 中的表达变化模式基本一致, 在 HT13 中该基因的表达量在处理 2 小时后上升至处理前 (0h) 的 3.68 倍, 而此时 HT54 中的表达量仅仅上升至处理前的 1.64 倍 (图 6)。

实施例 5、候选基因的功能验证: RNAi 敲除

将候选基因的 CDS 区和 UTR 区一段特异序列, 正反向连入 RNA 干扰载体 pTCK303 中, 利用农杆菌介导法将其导入日本晴和敏感品种 HT13 的基因组中, 各获得 5 个和三个阳性独立转化体。之后, 利用前述提到的人工气候箱对这些阳性独立转化体的土培苗于二叶一心至三叶一心期进行 79 小时的 48℃ 高温处理, 并以野生型植株为对照。处理完毕后移出生长箱于正常温度条件下恢复生长 5 天, 再观察记录秧苗对高温处理的反应。结果显示: 经高温处理后的干扰植株与野生型相比, 抗高温能力增强, 存活率更高, 该结果进一步表明所选择的候选基因确实与耐高温的特性相关。

实施例 7、候选基因 OsHTAS 的亚细胞定位分析

通过基因枪轰击洋葱表皮在共聚焦显微镜下的亚细胞定位结果表明, 与对照 35S-YFP 相比, 35S-ZFP-YFP 即候选基因与黄色荧光蛋白的融合蛋白主要定位于细胞膜上, 结果如图 7 所示, 该结果说明候选基因 ZFP 的编码产物是一种膜蛋白, 这与相当数量的膜蛋白参与逆境信号传导的结论十分吻合, 说明了一种亚细胞定位与功能表达之间的相关关系。图 7 所示结果显示: 与对照 35S-YFP 相比, 35S-ZFP-YFP 即候选基因与黄色荧光蛋白的融合蛋白主要定位于细胞膜上。

综上, 本申请所公开的发明结果可以增进本领域技术人员对抗高温性状基本遗传规律的了解, 同时, 该抗高温遗传位点的定位和候选基因的确认与克隆及其共分离标记的开发都将为后续候选基因的功能分析和在分子育种上的有效利用奠定了良好的理论和材料基础。

序列表独立文本

SEQ ID NO.1 OsHTAS 基因组序列;
SEQ ID NO.2 OsHTAS 基因编码序列;
SEQ ID NO.3 OsHTAS 蛋白多肽序列;

5 SEQ ID NO.4 人工引物序列;
SEQ ID NO.5 人工引物序列;
SEQ ID NO.6 人工引物序列;
SEQ ID NO.7 人工引物序列;
SEQ ID NO.8 人工引物序列;
SEQ ID NO.9 人工引物序列;
SEQ ID NO.10 人工引物序列;
SEQ ID NO.11 人工引物序列。

权 利 要 求

1. 一种多肽，其为选自下述任一：

A) 包含如 SEQ ID NO.3 所示的氨基酸序列的多肽；

5 B) 包含在如 SEQ ID NO.3 所示的氨基酸序列中或经缺失、替换、插入一个或多个氨基酸所得的氨基酸序列，所述多肽具有抗高温功能；

C) 具有 SEQ ID NO.3 所示的氨基酸序列的多肽；

D) 氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示的多肽。

10 2. 一种基因该基因的多核苷酸序列为选自以下任一的多核苷酸序列：

A) 包含如 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列的多核苷酸；

B) 包含对应于如 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列中的第 2360 到 2371 位核苷酸为 GGGGGGGGGGGG 保持不变，在除此之外的核苷酸序列中经缺失、替换、插入一个或多个核苷酸所得的多核苷酸序列，
15 其所编码的多肽具有抗高温功能；

C) 具有 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列的多核苷酸；

D) 核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的多核苷酸；

E) 编码如权利要求 1 所述任一种的多肽的多核苷酸序列。

3. 包含权利要求 2 所述的基因的载体。

20 4. 一种宿主细胞，其特征在于所述的细胞包含权利要求 1 所述的多肽，或者权利要求 2 所述的基因，或者权利要求 3 所述的载体，所述宿主细胞优选真核生物细胞，更优选植物细胞和酵母细胞，所述植物细胞优选禾本科植物细胞，特别优选水稻 (*Oryza sativa* L.) 细胞。

25 5. 用于筛选、定位、分离新核苷酸序列的分子标记，所述标记选自：

A) 插入/缺失标记 InDel5，该标记位于水稻第九染色体距短臂端 9130-9150kb 之间，所述标记的扩增产物具有长度多态性；

B) SNP 标记，简称 RBsp1407，在感高温水稻和抗高温水稻植株中，基于 SEQ ID NO.1 所述多核苷酸序列，所述标记对应序列分别为
30 TGT705ACA 和 TGG705ACA；

C) 微卫星 DNA 标记 RM7364，该标记位于水稻第九染色体距短臂端 9440-9450kb 之间，所述标记经引物的扩增产物具有长度多态性。

6. 权利要求 5 所述的标记在筛选、定位、分离抗/感高温基因中的应用，其中所述的高温优选 42℃或以上，45℃或以上，48℃或以上，或 50℃或以上。

7. 植物育种方法，所述方法包含应用权利要求 2 所述的基因，或应用权利要求 1 所述的多肽，或权利要求 3 所述的载体，或权利要求 4 所述的宿主细胞，或权利要求 5 或 6 所述的标记。

8. 使温度敏感型水稻恢复为非温度敏感型水稻的方法，该方法包括通过遗传操作使温度敏感型水稻基因组第 9 号染色体中相应于 SEQ ID NO.1 第 705 位的核苷酸突变为 G。

9. 诱导水稻抗高温表型的方法，该方法包括通过遗传操作使不具备抗高温表型的水稻基因组第 9 号染色体中相应于 SEQ ID NO.1 第 2360 位的 5' 端插入 G，其中，所述的高温优选 42℃或以上，45℃或以上，48℃或以上，或 50℃或以上。

10. 使温度敏感型水稻为抗高温型水稻的方法，该方法包括通过遗传操作使温度敏感型水稻基因组第 9 号染色体中相应于 SEQ ID NO.1 第 705 位的核苷酸突变为 G，并且使其温度敏感型水稻基因组第 9 号染色体中第 2360 位的 5' 端上游插入一个 G，使所得核苷酸序列与 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列中的第 2360 到 2371 位核苷酸相同，即自 2360 位起远离起始密码子方向序列包含连续的 12 个 G，其中，所述的高温优选 42℃或以上，45℃或以上，48℃或以上，或 50℃或以上。

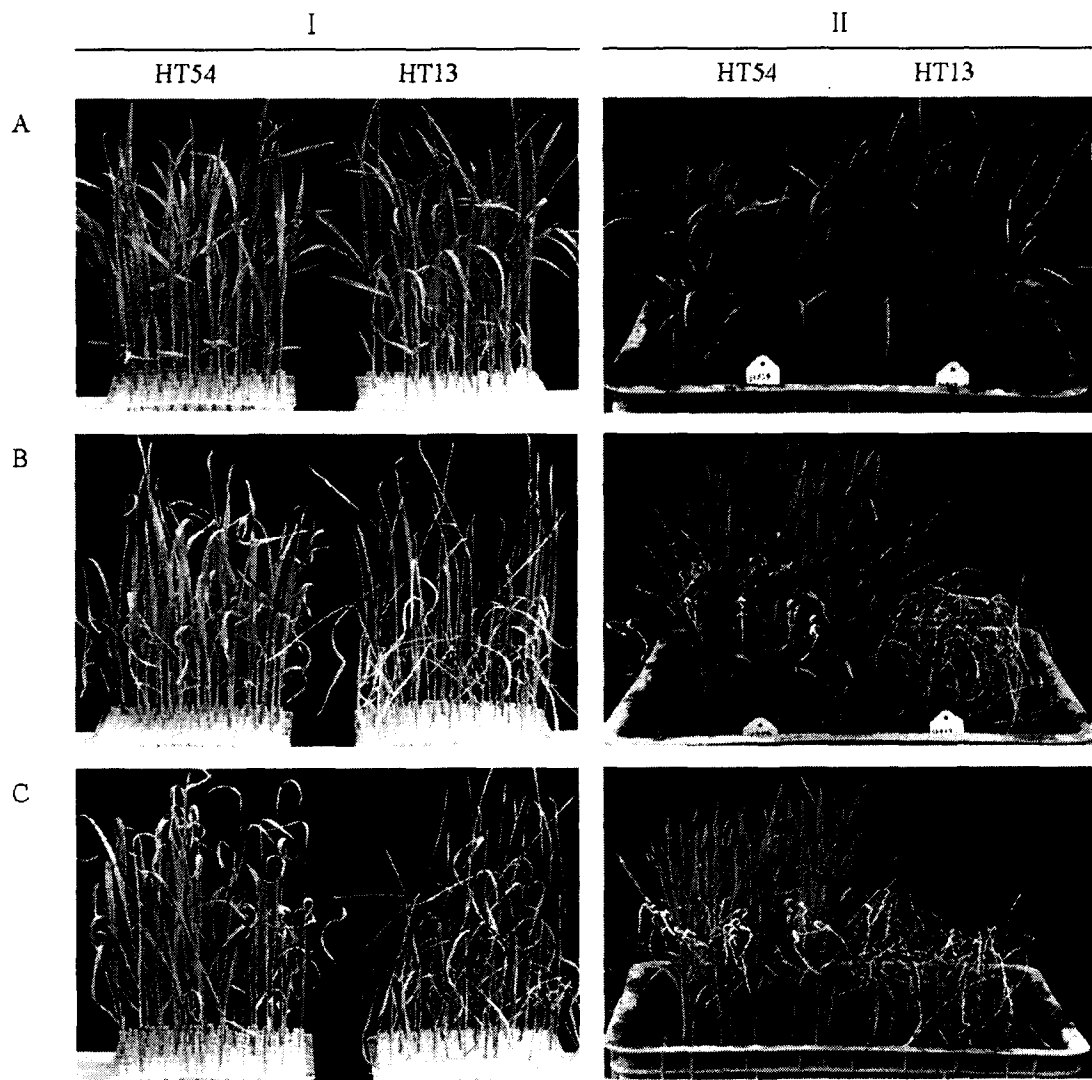


图 1

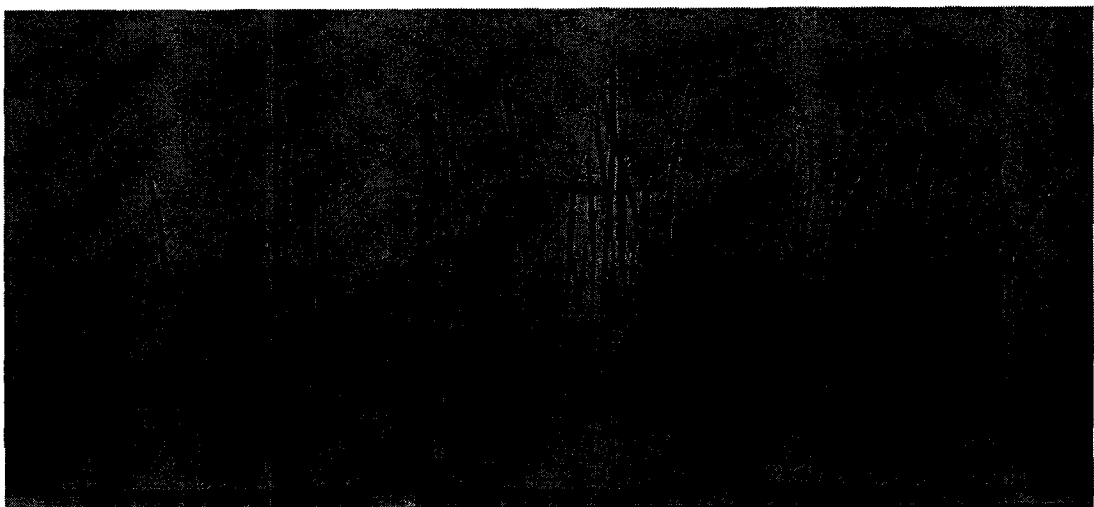


图 2

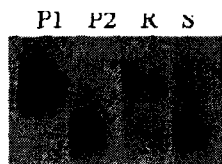


图 3

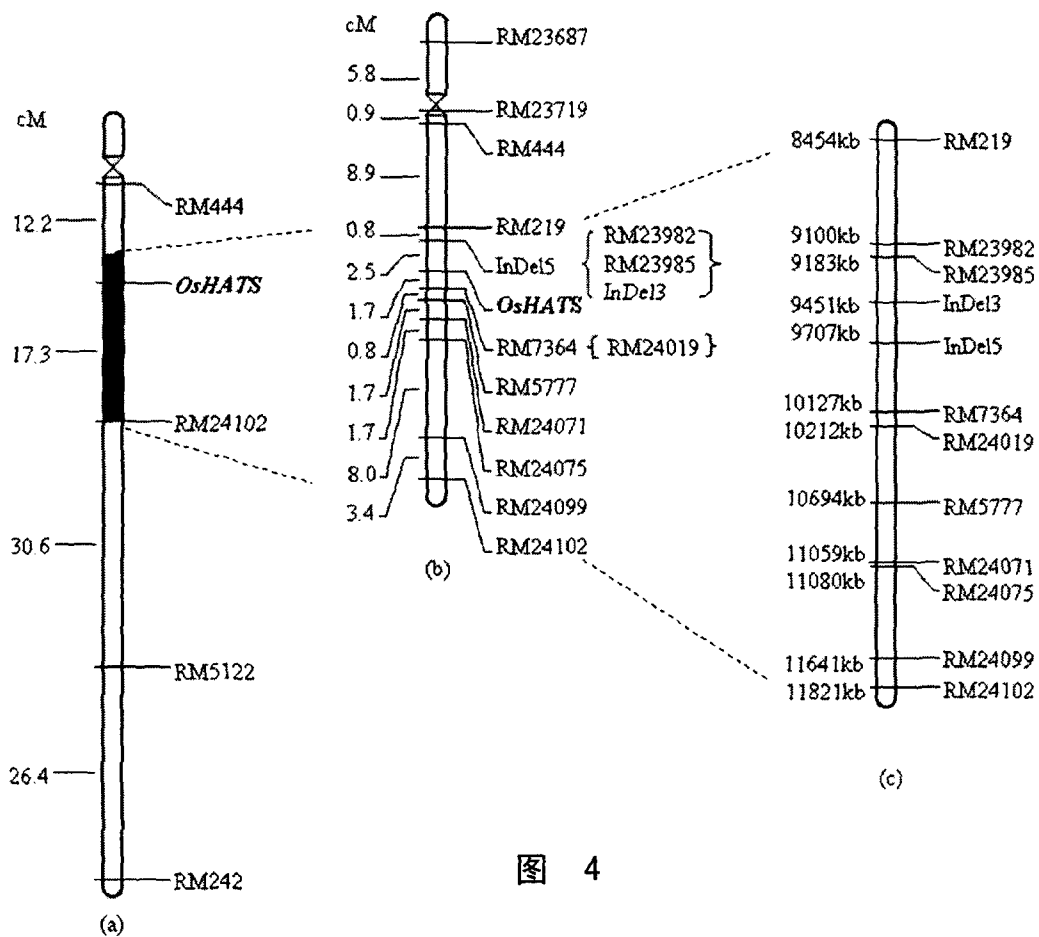


图 4

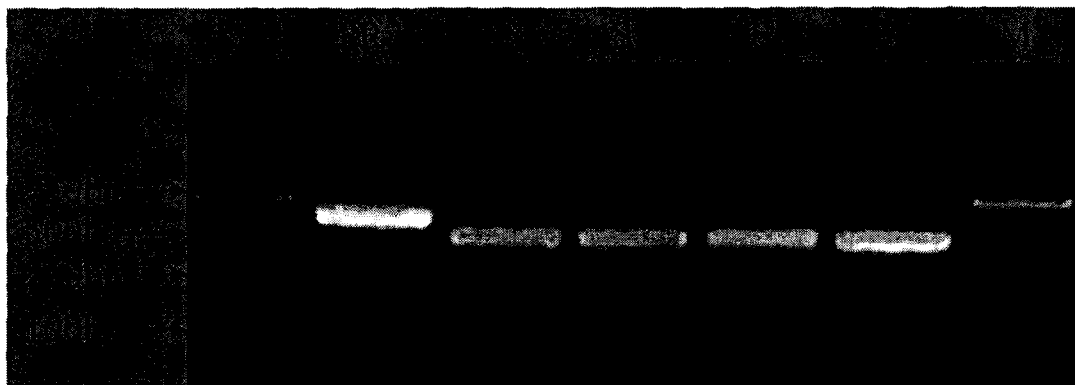


图 5

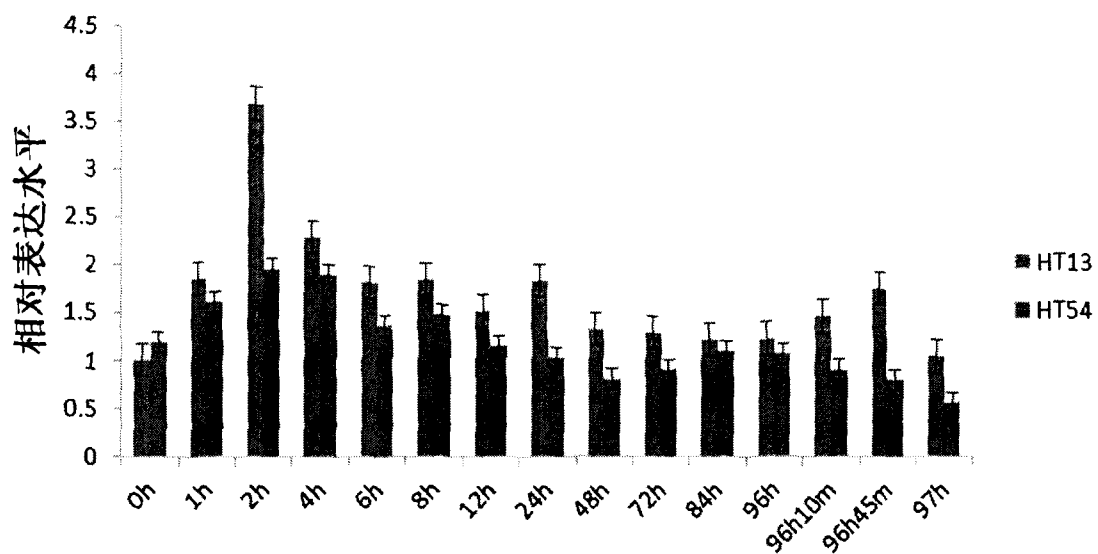


图 6

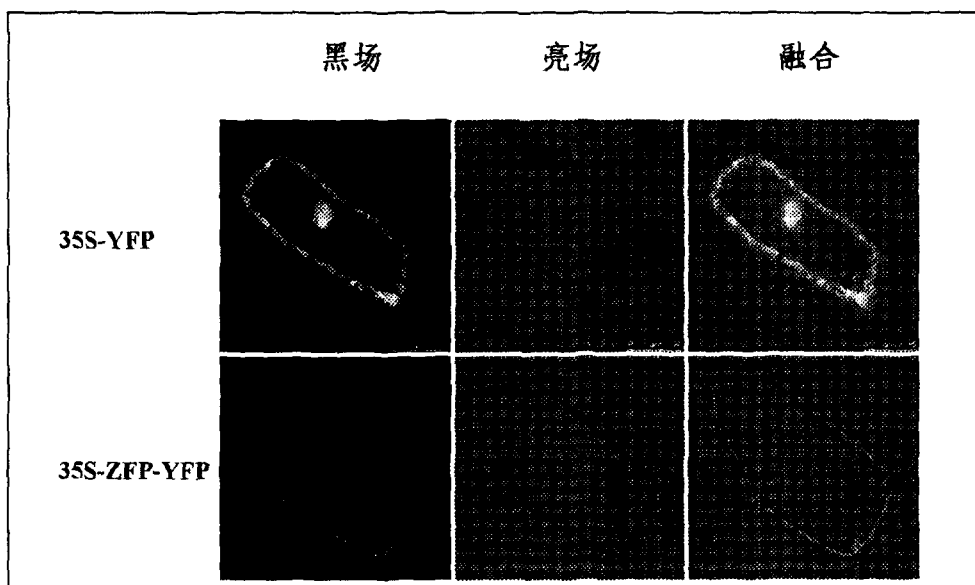


图 7

Putative Function: zinc finger family protein, putative, expressed

GAGAAGCGCCACAGGAAAAACGAGCCGCGTCGCTTTCCGCGAGAGAGGGGACACCTGCTCTGC
TTCGGCTTTCGCTTCCCCCTTCCTGAGTCTCTCGGCTCTCCCCCGTGGGCAACCCACACAC
CGCGGCTTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGATAGGGGAAATCCCCGTCGGCCGTCGGCTCGGC
GCGGAATCGATCCGCTGAGTGAGTGATTTAGTTTCGTCTGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
AATTATCAAGCTCTTGAATCGAGTCTAGTAGTAGTAGTGCTGACGAGGTCGTGGATGATTTG
GGTTTTTGGGGATTTTTTTTTTGGGGGGGGGGTGTTTGGGAACGTCTAGTGCCTTT
GTGGTATACGTGATGGGAGTTCTGTGCTAATGACCGGGTATTGGGAACTTTTAGGGT
TTTGTTTGGATGGATTTTTGGTTGTGGTTTTGTGAGGAATGGGTGTGGCGCACTTGGT
AGCTTTAGCTTTTTGAGAAATTTTTTCGCCCTGTGTTCTGTTCATGGTTCATCTTTAGT
TTCAGAGCAGAATCCTTCTAGCGTTTTTCTGAGAAATGAAACCTTTTTTTATGTTTTTA
TTTTTACGGGGCTATAAATTTTCCACTGCCTTTTGTGATTACTATTACATAATTACATGT
CCCTTTGATGAATAATGGATGTTGCTTCTTTGGCTAAAAGTCAAATTCGGACTTGAAGTA
GAAACGGGTGTACCTTGGGATTAAGTTGCCATCGCTGGAACTAGAGTTAAATATTGGTTTG
ATCATTTGTGCTTCGCGCTGGATATACATACTCGGTTTACGAGCTAGCATGACTAAATCA
TAGGAAGGCTACTATGATTGGAGAAACCTGGTGTGTATTAACGTGATTAGATTCTTTCAA
TATGATTTTCAGTTAGACCGCTCATTGGTTCAGGATCAGGGTCTTTTCAGTTCTCCAA
ATATTGCACTAATTTGTTTGGCAAATAATCATGAAAACTTACATGAGTGGTGGCATTAA
CTCTTTTATTCAAATACATGGTGTTCATAGTGGTATTAACTCTTCTATTCAAACGGGT
GTAAAAAATTAAGTGAATAATCTTGTCCGCTACTTAAAACTGATCAAGACTCAGATT
GGAACCATTTGGGGACTGAAGAAGTTTTATGGGACTTGGACGTGACATTACATGCAATG
CCCATGATACATTAAACAGGATGGATGTTCTATTCTGGAAGGTAAATATAATAGTTCTTA
GAAAGTTAGAGTTTTAGACCGGATGGTATGCTTGCATATATTTTGAAGTATCAAATAT
GATCAGAGTTCTTAAAGAAATTCGGTTGTAACTATGTTGAGTGCCTTCTACTATTAT
TTTACAGGTTTTTATTGTTTCATGGTGATATACTATAATGCATGAATAAGTTACAGTTATGT
AATATATATTCGGCAAGGCTGATAAGAACTTCAATTTGCTTAAATTTGTAGCTTAGCT
TCTTCTGCTTGGGCTCTTCCATGAAGCAAAAGAGTTTATAATGCACATCTAAATGTTCA
GTATATTACTGAGAACTCACTTTATTCTCAGCTGTATATACACTAGTATGCCAGCCAT
TGGTAGCTACTTGAAGGATTTGGTGAACCGCATATGATTACCAATGATGAGCATGTGTGTT
CCCTTTTTTTATTAGTGCTAAGCTGGAATCAATAAAATCCAAGATATTCATGGAGCATGC
TACCTGTGATGATGTGAGTGAAGTATGATATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
ATCAACCGACTCATCAAGATTTCGACAGTGAATCAGATGATTCATCAGGATGATAGGCC
TTCAACAAGCACACAAACCCCATCACCACAGTCTTCAGCATCAACTTCGCCCACTGCATA
TAACACCGAGAAATTTATCCTTTCCTAGAAGAGATAGTATGTATGGTCATGGAAGAAGTAT
TTGGAATTTCTGTTTTGTGGATCTCGTTTGAACCTGGTCATATGTAGTACAGATTGTAGC
TGCTATTTTTCGCTCTGTCTTTTCAAGAGCAAGCATCGCATGCCCTTTTATTGTCATG
GATAATTGGTTTACAAATTTGGCTGCATTGCAAGCAATTCCTTTATTGTTTGGCGCTGTGC
CCATCGAAACAGACCTTCGGAACAAGAACCTGAACAACCAACCCGACGCTATCCTAATTT
GACTTCTCTCAATCATCAGAAGGACGCAATCAGCGTAGCAGTGGTACTGTTTGCATTT
TGGATGTATCAAAATTTCTGCTCCAAAGTGAATTTGTAGTTCCATGTTATTTTCTATCTT
GAATTTCCCTAAAGTCTGTATGTGAACCTCGTGATGCAGTCTCACTCCTATGCATTTT
GAAGAAACCTGCTATCCATTTGCACTTTAATAACATATTTATGCTTTTCAAATTAACGAAAG
ATGCAACAAATAAACCTGATAGTTGAATTTGATTGAACTATCAACTCTAGGGCACTCTAAAT
TAGTTTATTTTTGATATTCCATTGGATCAGCGAGGTACCACAGTCTATGTTCTTGAGTT
GAGCCTTCTATTGTGCGTAGTACCACGATATGGAATCTACAAATATATTTTACGCAAT
TTGTTTTTTCTCAGTCATTCTGGAAGCTGTAGAAGATATATGCTCTTGTTTCTTGACAT
TAGGAATTTGAACATTTGTGAGCTTGTGAGCTCTTAAGATGTAAATATACAAATTTGCTGTGCA
GATACCTCATTACATTGGAGGGGAGGATGTTCCCTTTCTATTTGTTGTGCTTGACAAAT

AGCATTCAACATTGTGGAGCGTAATGTGTCTATTAACTGGAATTGGTCCTGTTGAAAA
 TTGTAAGTCTACTCTAAAGTATTAAGTAAATTTGAAGAAATGCCGAT
 GCGAGATCTTATAGTACTTAGTTTTGTGCTAAATTTGATATGGATGTATTAAGTGAAGTG
 ATTATACATTACAGGCCTAGCATATTGGCTTATCATTTCAAGACAGCTGTAGACTGTTTC
 TTTGCTGTATGGTTTTGTGTTGGCAATGTGTGGATTTTGGTGGGCACAGCACTTTGTCA
 GATTCTCAGGAAGCTCCCAATATGTATAGGTATTTCTTTCTATCATTCATAGCTTTTC
 TGAACCTCAATCAACTCATGCCTTACTTTGTTGGCTCTTGCTAGGCTATGCTTAGCATTCC
 TTGCATTAGTTGTGTTGGGTATGCTATTCCTTCGTATGTGTGCAGCCATATGCTGCT
 GCTTTCCATGCTTAATTTCTCTTCTGCGCCTTCAAGAGGATTTGGGTCTACTAGAGGAG
 CTACTCAAGAACTAATTGATGCACCTGCCAACCTACAAATTCAGCCAAAACGAAGCAAAA
 TGTGGGTGACCATGCTTCAAGCTCAGAGAATCTTAGCGAGGGTGGCATCCTGGGCCCAG
 GAACTAAAAAGGAAAGGATTGTTTCAGCTGAAGATGCTGTAGTATATTTACATTTTCA
 TATCATTTTTCATGTCTGATGATACCTGATTGCAATTAGTATTTGAGGGGGTTTCCGTAAA
 ACAAGTATTGATGGGATTCCTTGTATCGACCTTCATGTACCTTATAATTTAGTAATCATA
 ACTCCATTCAAGTGAATACTTAAGCAGCCTCTGTTATGCAGTAATATGTACTGTCTTA
 GCCTTATCTTATTTTGGAAATATATTAACAAAAGGTCTAGCTCGTGATGATGCTTTTACA
 CATCTTTTTCAGATAACAATGAGACTTCCCTTTTTCCTCAGTGAAAACATATAGTGTCT
 AGGTAAATATTCATTAAACAAAAGTGTTTTAGGGAAATATTCGTCTTATGAGAAATAGTT
 TTGTTTATATTACTACAGTATCTTTTTCTCGTGATCTTCAAACAGTTGTAGTTACA
 CTGCTTTTATAAGTCCCTTTCTAAATTCATTATTTCTTCAGTAACATGGGACCTCT
 TGGAATTTTCCAAGTTACCTGACTTACTGTCTGGATTATTTTGTAGCTCATTCAT
 TTGCCATTACTAACTTGAAAACAGGGTTCTCGAAATAATGTTATAGTTGTTTTAGTTTGA
 TTTCATAAGTCATAACATATAACTTTGTCAACATCTATTGATATCTGCAGGTGTGCTGCATC
 TGTCTTACTAAGTACGGAGATGATGATGAGCTCCGTGAGCTTCCCTGACCCACTTCTTT
 CATGTGCAATGTGTGATAAATGGCTCAAGATAAATGCAGTGTGCCACTCTGCAAGACC
 GAGATTGGGGGTGTGGTTGATCATTTTTTGGCTTGGCCTTTGGTGGCCGACGTGTTGAT
 AGGATGGCAGGAAGAGGTATAGCTAGCTCGAGATTCACTGTATAGAACACGTCTTCTCT
 CTAGCATGTTTGTCTTGTCTCATCTGCTCATATGCACATAAAAGACGTGCTCATGGAATGT
 AGTTTGTGATTTGCAATGAAAGCGATAATCTGCTTTCATCACCTTGGATTACCAAAAG
 TGATGACAGAAAAGTGGAGACCTGATGCTTGCAGTGACAAGTTTCTGCAGTACAGTACAA
 ACATAAGTATATTCTGATGTAACATTTGATGTCAAGATTGTAAATAAAGAGCACAAAGTT
 CACTTCGGGGGTGTATATCTGCATGTGTATGGGAAAGGAAAGCCTAATTAGTTAGTAACT
 TTGTGGGCATTTTATTGTGTGCAATCATTGATCTTGTTTTTCCC

CDS

>13109. m01458

ATGGAGCATGCTACCTGTGATGATGTGCATGAGCATGCTATAAATGTATCACATGGAGAA
 ACTGCATCAACATCAACCAGTCATCAAGATTTGCACAGTGATTGAGATGATTCACATCAG
 GATGATAGGCCCTTCAACAAGCACACAAACCCCATCACCACAGTCTTCAGCATCAACTTCG
 CCCACTGCATATAACACCAGAAATTTATCCTTTCTAGAAGACATAGTATGTATGGTCAT
 GGAAGAAGTATTTGGAATTCGGTTTGTGGATCTCGTTTGAAGTGGTCATATATGTAGTA
 CAGATTGTAGCTGCTATTTTCTGCTTGTCTTTTCAAGAGACGAACATCCGCATGCCCT
 TTATTTGCATGGATAATTGGTTACACAATTGGCTGCATTGCAAGCATTCCTCTTATTTGT
 TGGCGCTGTGCCCATCGAAACAGACCTTCGGAACAAGAACCTGAACAACCACCCGACGCC
 TATCCTAATTTGACTTCTCTCAATCATCAGAAGCAAGCAATCAGCGTAGCAGTGCTACT
 GTTTTGCATTTTGGATGTATCACAATTTCTGTGCAAGGCTAGCATATTGGCTTATCAT
 TTCAAGACAGCTGTAGACTGTTTCTTTGCTGTATGGTTTGTGTTGGCAATGTGTGGATT
 TTTGGTGGGCACAGCACTTTGTGAGATTCTCAGGAAGCTCCCAATATGTATAGGCTATGC
 TTAGCATTCCTTGCACCTAGTTGTGTTGGGTATGCTATTCCTTCGTATGTGTGCAGCC
 ATATGCTGTGCTTTCCATGCTTAATTTCTCTTCTGCGCCTTCAAGAGGATTTGGGTGAT
 ACTAGAGGAGCTACTCAAGAACTAATTGATGCACCTGCCAACCTACAAATTCAGCCAAA
 CGAAGCAAAATGTGGGTGACCATGCTTCAAGCTCAGAGAATCTTAGCGAGGGTGGCATC
 CTGGGCCCAGGAACATAAAGGAAAGGATTGTTTCAGCTGAAGATGCTGTGTGCTGCATC
 TGTCTTACTAAGTACGGAGATGATGATGAGCTCCGTGAGCTTCCCTTGCACCCACTTCTTT
 CATGTGCAATGTGTGATAAATGGCTCAAGATAAATGCAGTGTGCCACTCTGCAAGACC
 GAGATTGGGGGTGTGGTTGATCATTTTTTGGCTTGGCCTTTGGTGGCCGACGTGTTGAT

图 8-2

AGGATGGCAGGAAGAGGTATAGCTAGCTCGACATTCACTGTATAG

Protein

>I3109.m01458

MEHATCDDVHEHATNVSHGETASTSTSHQDI.HSDSDDSHQDDRPSTSTQTPSPQSSASTS
PTAYNTRNLSFPRRDSMYGHGRSIWNSGLWISFELVIYVVQIVAAIFVLVFSRDEHPHAP
LFAWIIGYTIIGCIASIPLICWRCANRPSEQEPEQPPAAYPNLTSSQSSEGRNQRSSGT
VLHIFGCITISCPRPSILAYIIFKTAVDCFFAVWFVVGNVWIFGGHSTLSDSQEAPNMYRLC
LAFLALSCVGYAIPFVMCAAICCCFPCLISLLRLQEDLGHTRGATQELIDALPTYKFKPK
RSKMWVDHASSSENLEGGILGPGTKKERIVSAEDAVCCICLTKYGDDDELRELPCTHFF
IIVQCVDKWLKINAVCPLCKTEIGGVVRSFFGLPFGRRRVDRMAGRGIASSRFTV*

图 8-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2013/001504

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

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)

IPC: C07K; C12N

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)

CPRS, CNKI, CNTXT, WPI, EPODOC, MEDLINE, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT and searched terms: rice, Oryza sativa, high temperature, heat tolerance, temperature sensitive, molecular marker, genetic marker, zinc finger protein, co?segregation, link, polymorphism, OsZFP, OsHTAS, InDel5, SNP, RM7364, RBsp1407, HT54, RFLP, Oryza sativa heat tolerance at seeding stage etc. Retrieving System for Biological Sequence of Chinese Patent, Genbank, EMBL, STN and searched sequences: SEQ ID NOs: 1-3.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GenBank Accession Number NM_001069405, Version: NM_001069405.1, 08 June 2010 (08.06.2010) [retrieved on 14.02.2014], retrieved from NCBI [online]: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/115478552 >	1-4
A	DEFINITION, CDS, ORIGIN the whole document	5-10

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

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 14 February 2014 (14.02.2014)	Date of mailing of the international search report 13 March 2014 (13.03.2014)
--	--

Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer MA, Zhenlian Telephone No. (86-10) 62412131
---	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2013/001504

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	GenBank Accession Number NP_001062870, Version: NP_001062870.1, 08 June 2010 (08.06.2010) [retrieved on 14.02.2014], retrieved from NCBI [online]: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/115478553 >	
X	DEFINITION, CDS, ORIGIN	1-4
A	the whole document	5-10
	CN 102433334 A ((CROP-N) INST CROP SCI CHINESE ACAD AGRIC SCI) 02 May 2012 (02.05.2012)	
A	the whole document	1-10
	WO 2009029771 A2 (MONSANTO TECHNOLOGY LLC) 05 March 2009 (05.03.2009)	
A	the whole document	1-10
	WEI, He et al., A Dominant Major Locus in Chromosome 9 of Rice (<i>Oryza sativa</i> L.) Confers Tolerance to 48 °C High Temperature at Seedling Stage. Journal of Heredity. 20 December 2012 (20.12.2012), vol. 104, no. 2, pages 287-294.	
P, X	see the abstract, page 289, left column, paragraph [0002] to page 291, right column, paragraph [0002]	5, 6
	WEI, He, Evaluation Procedure Establishment and Gene Mapping of Rice High Temperature Resistance at Seeding Stage. Chinese Doctoral Dissertations Full-text Database (Doctor) (electronic journals), Agricultural Science. 15 August 2013 (15.08.2013), no. 8, pages D047-115, ISSN 1674-022X, China Doctoral Dissertations Full-text Database [online], [retrieved on 14 February 2014 (14.02.2014)]. Retrieved from: CNKI, Beijing, China	
P, X	see the abstract, pages 54-79	5, 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2013/001504

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102433334 A	02.05.2012	None	
WO 2009029771 A2	05.03.2009	US 2009070903 A1	12. 03.2009
		US 2012324599 A1	20. 12.2012
		US 2009064361 A1	05. 03.2009
		CA 2697860 A1	05. 03.2009
		EP 2476763 A3	06. 03.2013
		US 2009064360 A1	05. 03.2009
		US 20140007285 A1	02. 01.2014
		EP 2183392 A2	12. 05.2010
		EP 2476763 A2	18. 07.2012
		US 8273944 B2	25. 09.2012
		US 2013160170 A1	20. 06.2013
		CN 101821409 A	01. 09.2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/001504

Continuation of:

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/415 (2006.01) i

C12N 15/29 (2006.01) i

C12N 5/14 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2013/001504

A. 主题的分类

见附加页

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)

IPC: C07K; C12N

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))

CPRS; CNKI; CNTXT 和关键词: 水稻, 日本晴和籼稻, 高温, 温度敏感, 分子标记, 遗传标记, 锌指蛋白, 连锁, 多态性, OsZFP, OsHTAS, InDel5, SNP, RM7364, RBsp1407, HT54, RFLP 等;

WPI; EPODOC; MEDLINE; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT 和关键词: rice, Oryza sativa, high temperature, heat tolerance, temperature sensitive, molecular marker, genetic marker, zinc finger protein, co?segregation, polymorphism, Oryza sativa heat tolerance at seedling stage 等;

中国专利生物序列检索系统; Genbank; EMBL; STN 和检索的序列: SEQ ID NOs:1-3。

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X A	GenBank 登录号 NM_001069405, 版本: NM_001069405.1, 08.6 月 2010 (08.06.2010), [检索于 14.02.2014], 检索自 NCBI [联机]: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/115478552 > DEFINITION, CDS, ORIGIN 全文	1-4 5-10
X A	GenBank 登录号 NP_001062870, 版本: NP_001062870, 08.6 月 2010 (08.06.2010), [检索于 14.02.2014], 检索自 NCBI [联机]: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/115478553 > DEFINITION, CDS, ORIGIN 全文	1-4 5-10

☒ 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
14.2 月 2014 (14.02.2014)

国际检索报告邮寄日期
13.3 月 2014 (13.03.2014)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:
中华人民共和国国家知识产权局
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

马振莲
电话号码: (86-10) 62412131

C(续). 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 102433334 A (中国农业科学院作物科学研究所) 02.5 月 2012 (02.05.2012) 全文	1-10
A	WO 2009029771 A2 (MONSANTO TECHNOLOGY LLC) 05.3 月 2009 (05.03.2009) 全文	1-10
P, X	WEI, HE 等, A Dominant Major Locus in Chromosome 9 of Rice (<i>Oryza sativa</i> L.) Confers Tolerance to 48 °C High Temperature at Seedling Stage. Journal of Heredity. 20.12 月 2012 (20.12.2012), 第 104 卷, 第 2 期, 第 287-294 页 参见摘要, 第 289 页左栏第 2 段-第 291 页右栏第 2 段	5, 6
P, X	魏荷, 水稻苗期抗高温鉴定程序的建立及其基因定位, 中国博士学位论文全文数据库(电子期刊), 农业科学辑, 15.8 月 2013 (15.08.2013), 第 8 期, 第 D047-115 页, ISSN 1674-022X, 中国博士学位论文全文数据库[联机], [检索日期 14. 2 月 2014 (14.02.2014)], 检索自: CNKI, 北京, 中国 参见摘要, 第 54-79 页	5, 6

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2013/001504

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 102433334 A	02.05.2012	无	
WO 2009029771 A2	05.03.2009	US 2009070903 A1	12. 03.2009
		US 2012324599 A1	20. 12.2012
		US 2009064361 A1	05. 03.2009
		CA 2697860 A1	05. 03.2009
		EP 2476763 A3	06. 03.2013
		US 2009064360 A1	05. 03.2009
		US 20140007285 A1	02. 01.2014
		EP 2183392 A2	12. 05.2010
		EP 2476763 A2	18. 07.2012
		US 8273944 B2	25. 09.2012
		US 2013160170 A1	20. 06.2013
		CN 101821409 A	01. 09.2010

续: **A.** 主题的分类

C07K 14/415 (2006.01) i

C12N 15/29 (2006.01) i

C12N 5/14 (2006.01) i