

(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

2011 年 10 月 20 日 (20.10.2011)



PCT



(10) 国际公布号

W O 2011/127744 A I

- (51) 国际分类号 :
C07K 14/415 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01) C12N 5/14 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01) A01H 1/00 (2006.01)
- (21) 国际申请号 : PCT/CN20 11/000558
- (22) 国际申请日 : 2011 年 3 月 31 日 (31.03.2011)
- (25) 说明书 : 中文
- (26) 公布语言 : 中文
- (30) 优先权 :
201010146613.8 2010 年 4 月 12 日 (12.04.2010) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 中国科学院遗传与发育生物学研究所 (INSTITUTE OF GENETICS AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国北京市朝阳区北辰西路 1 号院 2 号, Beijing 100101 (CN)。

- (72) 发明人及
(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 李家洋 (LI, Jiayang) [CN/CN]; 中国北京市朝阳区北辰西路 1 号院 2 号, Beijing 100101 (CN)。钱前 (QIAN, Qian) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市体育场路 359 号, Zhejiang 310006 (CN)。王永红 (WANG, Yonghong) [CN/CN]; 中国北京市朝阳区北辰西路 1 号院 2 号, Beijing 100101 (CN)。矫永庆 (JIAO, Yongqing) [CN/CN]; 中国北京市朝阳区北辰西路 1 号院 2 号, Beijing 100101 (CN)。薛大伟 (XUE, Dawei) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市体育场路 359 号, Zhejiang 310006 (CN)。刘贵富 (LIU, Guifu) [CN/CN]; 中国北京市朝阳区北辰西路 1 号院 2 号, Beijing 100101 (CN)。王静 (WANG, Jing) [CN/CN]; 中国北京市朝阳区北辰西路 1 号院 2 号, Beijing 100101 (CN)。董国军 (DONG, Guojun) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市体育场路 359 号, Zhejiang 310006 (CN)。

[见续页]

- (54) Title: PROTEIN IPAI RELATED TO PLANT ARCHITECTURE, ITS CODING GENES AND USES
- (54) 发明名称 : 与植物株型相关的蛋白 IPAI 及其编码基因与应用

(57) Abstract: The present invention discloses a protein IPAI related to plant architecture, its coding genes and uses, wherein the protein is 1) or 2) as follows: 1) the protein consisting of the amino acid sequence showed by sequence 1 in the sequence list; 2) the protein derived from the protein of 1) by substitution and/or deletion and/or addition of one or several amino acid residues in the amino acid sequence defined in 1) and relating to plant architecture. IPAI gene can be used for molecular marker-assisted breeding, cultivating new rice varieties and improving rice yield.

[见续页]

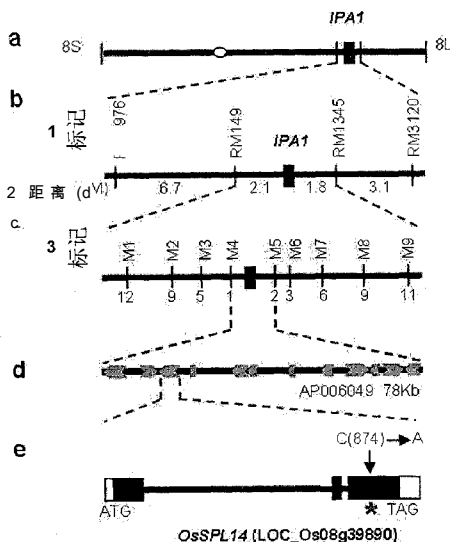


图 2 / Fig. 2

1 MARKERS
2 DISTANCES
3 MARKERS



WO 2011/127744 A1



- (74) 代理人:北京驰纳智财知识产权代理事务所(普通合伙)(BEIJING CHINA IP LTD);中国北京市朝阳区安慧东里15号楼天运写字楼C07, Beijing 100101 (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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(57) 摘要:

本发明公开了一种与植物株型相关的蛋白IPA1及其编码基因与应用,其中该蛋白是如下1)或2)的蛋白:1)由序列表中序列1所示的氨基酸序列组成的蛋白质;2)在1)中的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且与植物株型相关的由1)衍生的蛋白。IPA1基因可用于分子标记辅助育种、培育新的水稻品种和提高水稻的产量。

说明书

与植物株型相关的蛋白 IPA1 及其编码基因与应用

技术领域

本发明涉及植物基因工程技术领域，特别涉及与植物株型相关的蛋白 IPA1 及其编码基因与应用。

背景技术

水稻的株型包括分蘖数目、分蘖角度、穗型和株高等性状。良好的株型是提高水稻产量的关键因素。当前生产上应用的大部分栽培品种为含有半矮秆基因 *SD1* 的矮秆品种。与传统的高秆品种相比，矮秆品种具有较多的优势，因此掀起了第一次“绿色革命”，大幅度地提高了水稻的产量。但是，矮秆品种固有的缺点却限制了其产量的进一步提高，这包括无效分蘖较多、穗子较小、叶面积指数过高、叶片遮荫现象严重及冠层光合作用下降等缺点。为了克服当前大部分栽培品种增产潜力有限的缺点，进一步满足人们对粮食的需求，国际水稻所的育种学家提出了水稻新株型的概念，新株型的主要特点是分蘖少，没有无效分蘖；穗子大，穗粒数多；茎秆粗壮，抗倒伏。

水稻分蘖数目是水稻生产中的一个重要的农艺性状。单位面积的有效分蘖数决定了穗数，而穗数又是决定单位面积上水稻产量三个关键因素之一。因此，合理地控制水稻分蘖的发生，尽量减少无效分蘖具有重要的生产意义。

穗粒数是决定水稻产量的另外一个重要的因素。目前生产上应用的大部分高产品种具有的典型特征就是穗粒数显著增多。穗粒数增多的原因，主要是因为穗子上一级枝梗和二级枝梗数目较多，籽粒着生密度大。提高穗粒数对培育高产品种来说十分重要。千粒重是水稻产量的第三个决定性因素，直接反映了水稻籽粒干物质积累和灌浆的好坏，并且与籽粒的大小密切相关。

抗倒伏能力一直是水稻育种学家十分重视的方面。虽然其不能直接提高水稻的产量，但它对于产量的稳定具有十分重要的作用，是产量进一步提高的限制性因素。与传统高秆品种相比，矮秆品种通过降低株高，提高了植株的抗倒伏能力，从而保证了水稻的稳产，使产量的提高成为可能。因此，进一步增加植株的抗倒伏能力，是水稻更高产的前提。在这种情况下，改变茎秆的性状，培育更加粗壮，抗倒伏能力更强的品种一直是育种学家努力的目标。

国际水稻所新株型的基本特点为少蘖、粗秆和大穗。模拟研究表明，在热带地区、干季的条件下，具有新株型品种的产量可以比当前品种再提高 25%。因此，阐明分蘖、茎秆和穗子发育的遗传基础和分子机理，对于获得更加高产的品种具有十分重要的意义。当前，尽管人们已经克隆了许多产量相关的基因，但是能够从整体上系统地改变

说明书

水稻的株型，使之产生新株型特点的基因还未见报道。

发明内容

本发明的目的是提供一种与植物株型相关的蛋白及其编码基因。

本发明所提供的与植物株型相关的蛋白，名称为IPA1，来源于水稻 (*Oryza sativa* L.)，是如下1)或2)的蛋白质：

- 1) 由序列表中序列1所示的氨基酸序列组成的蛋白质；
- 2) 将序列表中序列1的氨基酸残基序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加与植物株型相关的由1)衍生的蛋白质。

为了使1)中的IPA1便于纯化，可在由序列表中序列1所示的氨基酸序列组成的蛋白质的氨基末端或羧基末端连接上如表1所示的标签。

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

上述2)中的IPA1可人工合成，也可先合成其编码基因，再进行生物表达得到。上述2)中的IPA1的编码基因可通过将序列表中序列2自5'末端第124位到第1377位碱基所示的DNA序列中缺失或添加一个或几个氨基酸残基的密码子，和/或进行一个或几个碱基对的错义突变，和/或在其5'端和/或3'端连上表1所示的标签的编码序列得到。

上述与植物株型相关蛋白的编码基因(命名为IPA1基因)也属于本发明的保护范围。

与植物株型相关的编码基因具体可为如下1)-5)中任一所述的基因：

- 1) 其编码序列如序列表中序列2的自5'末端第124位到第1377位所示；
- 2) 其核苷酸序列是序列表中的序列2；
- 3) 其基因组DNA的核苷酸序列如序列表中的序列3的自5'末端第1-7229位所示；
- 4) 在严格条件下与1)或2)或3)的基因杂交且编码所述蛋白的基因；
- 5) 与1)或2)或3)的基因具有90%以上的同源性且编码所述蛋白的基因。

序列表中的序列2由1624个碱基组成，其开放阅读框架(ORF)为自5'末端第124

说明书

位到第 1377 位碱基，编码具有序列表中序列 1 的氨基酸序列的 IPA1 蛋白。

上述严格条件可为用 0.1xSSPE (或 0.1xSSC), 0.1 %SDS 的溶液, 在 DNA 或者 RNA 杂交实验中 65°C 下杂交并洗膜。

扩增上述 *IPA1* 基因全长或其任一片段的引物对也属于本发明的保护范围。

含有上述与植物株型相关蛋白的编码基因的表达盒、重组载体、转基因细胞系和重组菌也属于本发明的保护范围。

可用现有的植物表达载体构建含有 $H\frac{3}{4}I$ 基因的重组表达载体。所述植物表达载体包括双元农杆菌载体和可用于植物微弹轰击的载体等, 如 pCAMBIA3301、pCAMBIA1300、pBI121、pBin19、pCAMBIA230K、pCAMBIA1301-UbiN 或其它衍生植物表达载体。

使用 IPA1 基因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, 如花椰菜花叶病毒 (CAMV) 35S 启动子、泛素 (Ubiquitin) 基因启动子 (pUbi) 等, 它们可单独使用或与其它植物启动子结合使用; 此外, 使用本发明的基因构建植物表达载体时, 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 起始密码子或邻界区域起始密码子等, 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细胞或植物进行鉴定及筛选, 可对所用植物表达载体进行加工, 如加入在植物中表达可产生颜色变化的酶或发光化合物的基因 (GUS 基因、GFP 基因、萤光素酶基因等)、具有抗性的抗生素标记物 (庆大霉素标记物、卡那霉素标记物等) 或是抗化学试剂标记基因 (如抗除草剂基因) 等。

所述重组表达载体具体可为在植物表达载体 PCAMBIA1300 的多克隆位点间插入上述与植物株型相关蛋白的编码基因得到的重组表达载体。

本发明的另一个目的是提供一种培育转基因植物的方法。

本发明所提供的培育转基因植物的方法, 是将上述与植物株型相关蛋白的编码基因 IPA1 或基因组 DNA 导入植物中, 得到转基因植物; 所述转基因植物与所述目的植物相比, 分蘖减少、茎秆粗壮、穗子枝梗数增多, 穗粒数增多。

所述与植物株型相关蛋白的编码基因 IPA1 是通过上述重组表达载体导入目的植物中的。

携带有本发明的与植物株型相关蛋白编码基因的植物表达载体可通过 H 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植物细胞或组织中。被转化的植物宿主 (目的植物) 为双子叶植物

明

或单子叶植株，优选是水稻，更优选是日本晴。

本发明的又一目的在于提供一种培育转基因植物的方法。该方法是将干扰载体导入目的植物中，得到转基因植物；所述转基因植物与所述目的植物相比，分蘖显著增多，茎秆变细，一级枝梗数和穗粒数显著减少；所述干扰载体是将序列表中序列4所示的核苷酸序列和序列表中序列5所示的核苷酸序列依次插入pTCK303载体的 ErfII 和 KpnI 位点以及 SpeI 和 SacI 位点之间得到的重组载体。该目的植物可以是双子叶植物或单子叶植株，优选是水稻，所述水稻优选是日22。

序列4是序列2第1014bp到1623bp片段，序列5是序列4的反向互补序列。序列4和序列5经全基因组比对分析确认在水稻基因组中无其它同源序列。

本发明通过图位克隆的方法，分离了一个可以同时控制分蘖数目，茎秆和穗子发育的多效性基因 IPA1 ，并且通过转基因功能互补实验验证了该基因的功能。

实验证明：将本发明保护的基因在水稻中过量表达后，水稻分蘖减少、茎秆粗壮、穗子枝梗数增多，穗粒数增多；而将本发明保护的基因在水稻中失活或降低活性后，株高降低，分蘖增多，茎秆变细，枝梗数和穗粒数减少，说明该基因可控制水稻的株型。因此， IPA1 基因为分子标记辅助育种及利用基因工程的方法培育新株型水稻品种，从而进一步提高水稻的产量提供了有力的手段，具有重要的理论意义和巨大的应用潜力。

附图说明

图1 水稻少分蘖材料少蘖梗(SNJ)和常规籼稻品种TN1的表型。

图2 IPA1 基因的图位克隆，图2a和图2b是利用 BC_2F_2 进行QTL分析和定位图；图2c是精细定位图谱；标记下面的数字代表重组的个体；图2d 78kb范围内预测的基因，箭头代表预测的基因；图2e本发明克隆的 IPA1 基因的结构示意图，白色空心的方框代表5'和3'非翻译区，黑色方框代表外显子，中间横线代表内含子，红色星号代表miRNA156靶位点。方框上面的碱基变化代表在少蘖梗材料中所发生的碱基突变。括号内的数字代表发生变化的碱基的位置。

图3 IPA1 基因的cDNA和蛋白序列图，蓝色的核苷酸代表5'和3'非编码区，下划线所标注的蛋白序列代表SBP结构域，红色星号代表miRNA156靶位点，红色字母代表在少蘖梗材料中所发生的核苷酸突变以及由此引发的氨基酸变化。

图4 g IPA1 载体图谱及功能互补试验的转基因水稻表型及农艺性状统计，图4a g IPA1 基因图谱；图4b g IPA1 转基因水稻表型；图4c通过RT-PCR检测 IPA1 的表达量；图4d g IPA1 转基因材料相关农艺性状的统计比较，T检验，单星代表显著；双星代表极显著；图4b、图4c和图4d中的日本晴是野生型对照，g IPA1 是转基因植株。

图5 RNA干扰的转基因水稻表型及相关农艺性状比较，图5a RNA干扰的转基因水

说明书

稻表型；图 5b 通过 RT-PCR 检测转基因植株中 *IPA1* 的表达量；图 5c RNA 干扰的转基因水稻相关农艺性状比较，T 检验，双星代表极显著；图 5a、图 5b 和图 5c 中的日 22 是非转基因对照，*IPA1*-RNAi 是转基因植株。

具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明作进一步说明，但本发明并不限于以下实施例。

下述实施例中，如无特殊说明，均为常规方法。

下述实施例中水稻是按照如下方法栽培得到的：(1) 水稻材料的田间栽培：水稻种子在水中浸种 2 天后，移入 37°C 培养间催芽 3 天，然后将露白的种子播在苗床上进行育秧，到 4 叶期时将水稻秧苗移栽入水田。

实施例 1、基因的发现

将水稻 (*Oryza sativa* L.) 少蘗、粗杆、大穗的材料少蘗梗的种子以及常规籼稻品种 TN1 的种子分别按照上述田间栽培方法进行栽培，成熟植株的形态如图 1 所示。然后取叶片进行 DNA 的提取。

水稻基因组 DNA 的提取：

采用改进的 CTAB 方法 (Mou Z, He Y, Dai Y, et al. Deficiency in fatty acid synthase leads to premature cell death and dramatic alterations in plant morphology. *The Plant Cell*. 2000, 12, 405-418.) 从水稻叶片中提取基因组 DNA。取 100 mg 水稻叶片，经液氮冷冻，在直径 5cm 的小研钵中磨成粉状，转移到 1.5 ml 离心管里提取 DNA，获得的 DNA 沉淀溶解于 100 μ l MQ H₂O 中。

按照如下步骤进行图位克隆：

1、*IPA1* 基因的初步定位。

为了分离 *IPA1* 基因，本发明首先利用少蘗梗和 TN1 构建定位群体。进而，利用该分离群体的 BC₂F₂ 个体进行 QTL 分析和定位。定位结果表明，*IPA1* 初步定位在第 8 染色体上，处于 RM149 和 RM1345 两个标记之间，遗传距离分别为 2.1 cM 和 1.8 cM (图 2a 和图 2b)。

2、*IPA1* 基因的精细定位

为了进一步缩小目的基因的界定区域，从 BC₂F₂ 分离群体中，选取了 5500 个株型近于 TN1 的单株进行了精细定位。同时，利用已经公布的 93-11 和日本晴在定位区间内籼粳稻亚种间基因组序列，寻找差异位点，开发新的 STS 和 SSR 标记。在进行精细定位时，首先用标记 RM149 和 RM1345 筛选与目的基因之间发生交换的单株，然后用新的分子标记对这些交换单株继续进行筛选，最后发现分子标记 M3 和 M6 与目的基因紧密连锁，与目的基因之间分别有 5 个和 3 个交换单株。最终，*IPA1* 被精确定位在分子

明

标记 M4 和 M5 之间约 78kb 的范围之内 (图 2c 和图 2d)。

3、候选基因的鉴定和序列分析

对该 78kb 区域进行候选基因预测并在 TN1 和少稃粳材料间进行测序比对。结果发现,在少稃粳材料中,基因 *OsSPL14* (LOC—0s08g39890) 在第 3 个外显子上发生了一个 C 到 A 的点突变。而日本晴,中花 11 等品种在该区域均无突变。深入的分析发现,该突变位位于 miRNA156 的靶位点,因此可能影响了 miRNA156 对该基因的调控 (图 2e)。综合以上信息,该基因确定为候选基因。该候选基因在 KOME 数据库内有对应的全长 cDNA 序列 AK107191。蛋白序列分析表明,该候选基因含有保守的 SBP (SQUAMOSA promoter binding protein) 结构域 (图 2f)。

实施例 2、转基因植物的获得及其检测 书

一、转基因植物的获得

1、重组表达载体的构建

1) 基因的克隆

利用表 2 中的 gIPA11F/gIPA11R 引物组合,从日本晴 (公众可从中国科学院遗传与发育生物学研究所获得,记载过该材料的非专利文献是 Lin H, Wang R, Qian Q, et al. DWARF27, an iron-containing protein required for the biosynthesis of strigolactones, regulates rice tiller bud outgrowth. Plant Cell 2009, 21, 1512-1525.) 基因组 DNA 中扩增出了包含 *IPA1* 基因的 DNA 预备片段 (测序表明,预备片段的核苷酸序列如序列表中序列 3 所示)。将该预备片段通过 Kpn I 和 Xba I 酶切并进行回收,得到包含全长 *IPA1* 的最终基因组 DNA 片段 (核苷酸序列如序列表中序列 3 的自 5' 端第 1-7229 位所示)。

序列 3 第 1bp 到 7229bp 所示的基因组 DNA 中,第 1118 位到 1566 位为第 1 个外显子,第 1567 位到 3996 位为第 1 个内含子,第 3997 位到 4130 位为第 2 个外显子,第 4131 到 4232 位为第 2 个内含子,第 4233 位到 4903 位为第 3 个外显子。

序列 3 第 1bp 到 7229bp 所示的基因组 DNA 对应的 cDNA 的核苷酸序列如序列表中序列 2 所示。序列 2 由 1624 个碱基组成,其开放阅读框架 (ORF) 为自 5' 末端第 124 位到第 1377 位碱基,编码具有序列表中序列 1 的氨基酸序列的 IPA1 蛋白。

表 2、引物序列

引物名称	引物序列 (5' -3')
gIPA11F	AGGTACCGCAATGTAGAGCCACGTAGGCAAG
gIPA11R	AGGGCCCCTTACCAGCTATTGGTTACACATATT

gIPA11F 引物的 5' 端加 Kpn I 酶切位点, gIPA11R 引物的 5' 端加 Xba I 酶切位

说 明 书

点。

2) 构建表达载体

将步骤 1) 得到的包含全长 *IPA1* 基因的最终基因组 DNA 片段插入载体 pCAMBIA1300 (购自 Cambia 公司) 的 *ori* 和 Xba I 酶切位点之间, 得到重组表达载体 gIPA1 (图 4a), 经验证载体构建正确。

2、转基因植物的获得

将质粒 gIPA1 通过电击的方法转入农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 株系 EHA105 (公众可从中国科学院遗传与发育生物学研究所获得, 记载过该材料的非专利文献是 Lin H, Wang R, Qian Q, et al. DWARF27, an iron-containing protein required for the biosynthesis of strigolactones, regulates rice tiller bud outgrowth. *Plant Cell* 2009, 21, 1512-1525.) 中, 筛选得到含有重组质粒 gIPA1 的重组农杆菌株。

用含有重组质粒 gIPA1 的重组农杆菌菌株侵染日本晴愈伤组织, 在黑暗处 25°C 培养 3 天后, 在含有 50 mg/L 潮霉素的选择培养基上筛选抗性愈伤和转基因植株。将潮霉素抗性植株在阴凉处炼苗, 后移栽到水田中, 获得的转基因植株为 T₀ 代。收获 T₀ 代植株的种子, 按照上述田间栽培的方法进行栽培, 并通过常规分子检测, 获得转 gIPA1 的 T₁ 代转基因植株。

按照获得转 gIPA1 的 T₁ 代转基因植株的方法, 将空载体 pCAMBIA1300 转化日本晴, 得到空载体对照植株。

二、转基因植物的株型检测

1、通过 RT-PCR 检测 *IPA1* 基因的表达量

利用 TRIZOL (购自 Irwitrogen 公司) 提取转基因植株和对照日本晴植株的植物总 RNA, 并利用反转录试剂盒 (购自 Promega 公司) 进行反转录, 得到 cDNA。利用引物 IPA1RT1F 和 IPA1RT1R 进行 PCR 检测 *IPA1* 基因的表达 (扩增片段序列为序列 2 的自 5' 端第 681bp 到 1362bp 片段)。利用引物 UbiRTF 和 UbiRTR 扩增 Ubiquitin 基因作为内标, 引物序列如表 3。结果显示转基因植株中 *IPA1* 表达量增加 (图 4c)。

表 3、引物序列

引物名称	引物序列 (5' -3')
IPA1RT1F	CGGTCGACTAGCTGCATCTGTTGG
IPA1RT1R	CATCGTGTTGCTGGTTTGGTCGAAG
UbiRTF	CCCTCCACCTCGTCCTCAG
UbiRTR	AGATAACAACGGAAGCATAAAAGTC

说 明 书

2、转基因植物的株型检测

对转 *gIP41* 的 T₁代转基因植株、日本晴对照植株和空载体对照进行株型的统计，每种材料统计 10 个单株。结果如图 4b 和图 4d (图 4b 和图 4d 中空载体对照与日本晴对照表型一致，图中省略) 所示，转 *gIP41* 的 T₁代转基因植株与日本晴对照植株以及空载体对照相比，其分蘖数目降低 (平均从 11.9 个降到 6.7 个)，一级枝梗数显著增多 (平均从 10.8 个增加到 15.5 个)，二级枝梗数显著增多 (平均从 21.9 个增加到 25.6 个)，茎秆加粗 (第 3 节直径平均从 0.35 厘米增加到 0.47 厘米)，穗粒数显著增多 (平均从 117.1 粒增加到 135.7 粒)。

实施例 3、转基因植物的获得及其检测

一、转基因植物的获得

1、干扰片段的获得

利用 KOME 全长 cDNA 克隆 (编号为 : AK107191) 为模板 (从日本 Genome Resource Center, National Institute of Agrobiological Science 购买)，分别用表 4 中的引物对 RNAi1F/RNAi1R 和引物对 RNAi2F/RNAi2R 进行 PCR 扩增，获得的产物进行测序。两对引物分别扩增得到的基因片段的核苷酸序列如序列表中序列 4 和序列 5。

表 4、引物序列

引物名称	引物序列(5' -3')
RNAi1F	AGGATCCCCAGCCATGGGATACTACTACC
RNAi1R	AGGTACCCAGCATTAACACTGATACTTAAA
RNAi2F	AACTAGTCAGCATTAACACTGATACTTAAA
RNAi2R	AGAGCTCCCAGCCATGGGATACTACTACC

RNAi 1 的前后引物 5' 端分别加 *Bam*HI 和 *Kpn*I 接头，RNAi 2 的前后引物 5' 端分别加 *Spe*I 和 *Sac*I 接头。

序列 4 是序列 2 第 1014bp 到 1623bp 片段，序列 5 是序列 4 的反向互补序列。序列 4 和序列 5 经全基因组比对分析确认在水稻基因组中无其它同源序列。

2、干扰载体的构建

将引物对 RNAi1F/RNAi1R 扩增得到的产物用 *Bam*HI 和 *Kpn*I 进行酶切，插入带有 Ubiquitin 启动子的载体 pTCK303 (公众可从中国科学院遗传与发育生物学研究所获得，记载过该材料的非专利文献是 Wang Z, Chen C, Xu Y, et al. A practical vector for efficient knockdown of gene expression in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol.*

说明书

Biol. Rep. 2004, 22, 409-417.) 的 *Bam*HI 和 *Kpn*I 位点, 得到载体 1; 将引物对 RNAi2F/RNAi2R 扩增得到的产物用 *Spe*I 和 *Sac*I 进行酶切, 插入得到载体 1 的 *Spe*I 和 *Sac*I 位点, 得到重组表达载体 *IPAI*-RNAi (即干扰载体 *IPAI*-RNAi), 插入片段表达后形成发夹结构。

3、转基因植物的获得

将干扰载体 *IPAI*-RNAi 通过电击的方法转入农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 株系 EHA105 中, 筛选得到含有干扰载体 *IPAI*-RNAi 的重组农杆菌菌株。

将含有点突变基因 *ipal* 的材料日 22 的成熟种子脱壳灭菌, 接种到诱导愈伤的培养基中, 培养 3 周后, 从盾片处生长出愈伤组织, 挑选生长旺盛, 颜色浅黄, 比较松散的胚性愈伤组织, 用作转化的受体。

用含有干扰载体 *IPAI*-RNAi 的重组农杆菌菌株侵染日 22 水稻愈伤组织。在黑暗处 25°C 培养 3 天后, 在含有 50 mg/L 潮霉素的选择培养基上筛选抗性愈伤和转基因植株。将潮霉素抗性植株在阴凉处炼苗, 后移栽到水田中, 获得的转基因植株为 T₀代, 将 T₀代收的转基因种子进行种植, 得到转 *IPAI*-RNAi 的 T₁代转基因植株。

按照获得转 *IPAI*-RNAi 的 T₁代转基因植株的方法, 将空载体 PTCK303 转化日 22, 得到空载体对照植株。

二、转基因植物的检测

1、通过 RT-PCR 检测 *IPAI* 基因的表达量

利用 TRIZOL (购自 Invitrogen 公司) 提取转基因植株和对照植株日 22 的植物总 RNA, 并利用反转录试剂盒 (购自 Promega 公司) 进行反转录, 得到 cDNA。利用的引物 IPA1RT1F 和 IPA1RT1R 进行 PCR 检测 *IPAI* 基因的表达。利用 UbiRTF 和 UbiRTR 扩增 Ubiquitin 基因作为内标, 引物序列如表 3。结果显示, 在转基因植株中, *IPAI* 的表达量降低 (图 5b)。

2、转基因植物的株型检测

对转 *IPAI*-RNAi 的 T₁代转基因植株、日 22 对照植株和空载体对照进行株型的统计, 每种材料统计 10 个单株。结果如图 5a 和图 5c (图 5a 和图 5c 中空载体对照与日本晴对照表型一致, 图中省略) 所示, 与日 22 对照植株和空载体对照相比, 转 *IPAI*-RNAi 的 T₁代转基因植株株高降低 (平均从 115.7 厘米降到 91.2 厘米), 分蘖数显著增多 (平均从 3.7 个增加到 23.3 个), 一级枝梗数显著减少 (平均从 15.2 个降到 6.2 个), 二级枝梗数显著减少 (平均从 57.5 个降到 9.7 个), 穗粒数显著减少 (平均从 259.6 粒降到 54.6 粒), 茎秆变细 (第二节直径平均从 0.68 厘米降到 0.29 厘米)。

权 利 要 求 书

- 1、一种蛋白，是如下1) 或2) 的蛋白质：
 - 1) 由序列表中序列1所示的氨基酸序列组成的蛋白质；
 - 2) 将序列表中序列1的氨基酸残基序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且与植物株型相关的由1) 衍生的蛋白质。
- 2、权利要求1所述蛋白的编码基因。
- 3、根据权利要求2所述的编码基因，其特征在于：所述蛋白的编码基因为如下1)-5) 中任一所述的基因：
 - 1) 其编码序列如序列表中序列2的自5'末端第124-1377位所示；
 - 2) 其核苷酸序列是序列表中的序列2；
 - 3) 其基因组DNA的核苷酸序列如序列表中的序列3的自5'末端第1-7229位所示；
 - 4) 在严格条件下与1) 或2) 或3) 的基因杂交且编码权利要求1所述蛋白的基因；
 - 5) 与1) 或2) 或3) 的基因具有90%以上的同源性且编码权利要求1所述蛋白的基因。
- 4、含有权利要求2或3所述基因的表达盒、重组载体、转基因细胞系或重组菌。
- 5、根据权利要求4所述的重组载体，其特征在于：所述重组载体为在pCAMBIA1300的多克隆位点间插入权利要求2或3所述基因得到的重组表达载体。
- 6、一种培育转基因植物的方法，是将权利要求2或3所述的编码基因转入目的植物中，得到转基因植物；所述转基因植物与所述目的植物相比，分蘖减少、茎秆粗壮、穗子枝梗数增多，穗粒数增多。
- 7、根据权利要求6所述的方法，其特征在于：权利要求2或3所述的编码基因是通过权利要求4或5所述的重组表达载体导入目的植物中。
- 8、根据权利要求6或7所述的方法，其特征在于：所述目的植物为双子叶植物或单子叶植株，优选是水稻；所述水稻优选是日本晴。
- 9、一种培育转基因植物的方法，是将干扰载体导入目的植物中，得到转基因植物；所述转基因植物与所述目的植物相比，株高降低，分蘖增多，茎秆变细，枝梗数和穗粒数减少；所述干扰载体是将序列表中序列4所示的核苷酸序列和序列表中序列5所示的核苷酸序列依次插入PTCK303载体的 *Bam*HI 和 *Kpn*I 位点以及 *Spe* I 和 *Sac*I 位点之间得到的重组载体。
- 10、根据权利要求9所述的方法，其特征在于：所述目的植物为双子叶植物或单子叶植株，优选是水稻；所述水稻优选是日22。

说明书附图

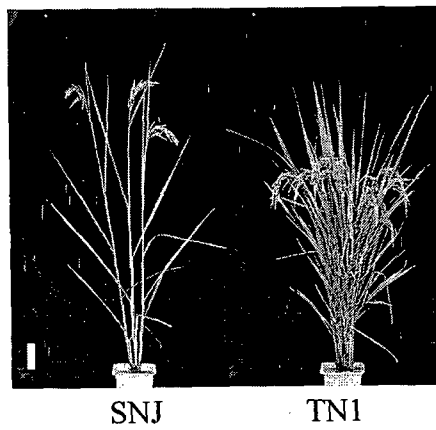


图 1

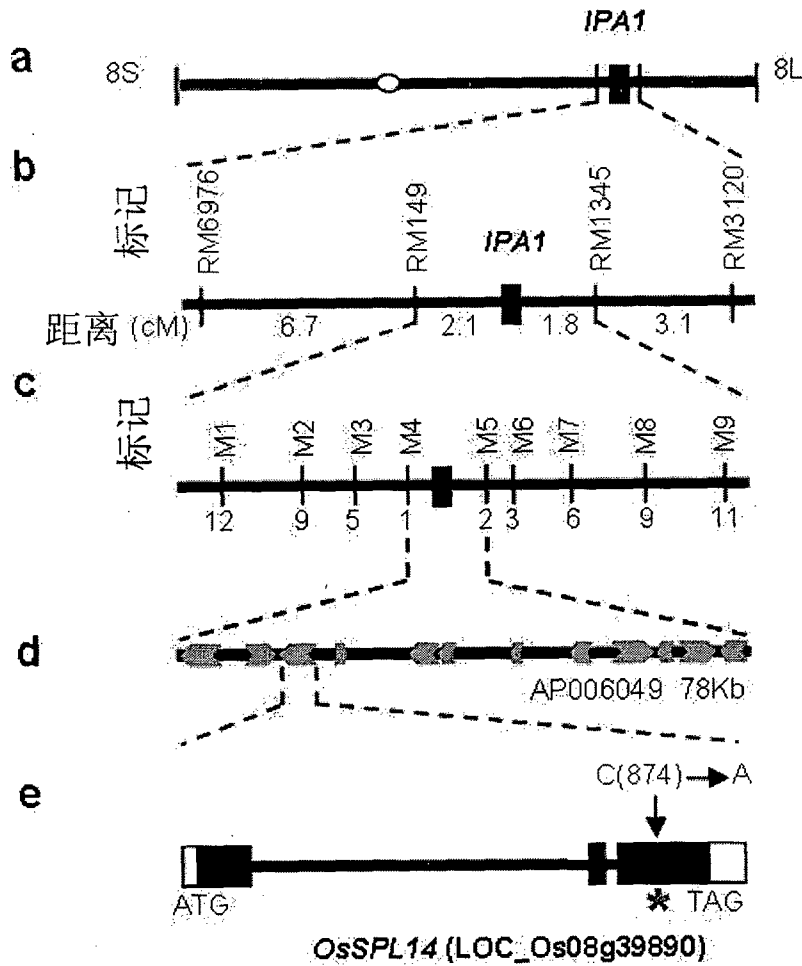


图 2

说明书附图

```

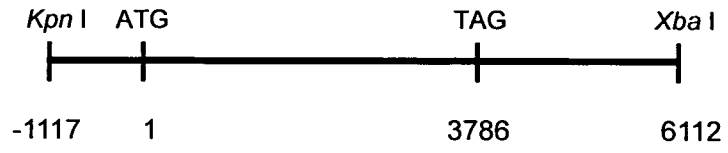
ttccgctctctttccctctctcttctctctccccctctccctggaggagagagaggagaagaggagggggggcccgccaaga 80
gccacgcygctacagtctcccttcccaccggcgaccgagcaATGGAGATGGCCAGTGGAGGAGGGCGCCGCCCGCCG 120
M E M A S G G G A A A A
CCGCGCGCGGAGTAGCGCGGAGCGCCGCGGTTGGTGGTGGAGGGGACGAGCAACGCCAGCTGCACGGTCTCAAGTTCCGC 240
A G G G V G G S G G G G G G D E H R Q L H G L K F G
AGAAGATCTACTTCGAGGACGCCGCCGCGGCGAGCGCGGGCGGCACTGGCAGTGGCAGTGGCAGCGCGAGCGCCGC 320
K K I Y F E D A A A A A G G G G T G S G S G S A S A A
GCCCGCGTCTCTGCTTCCAAAGGCGCGGGTGGTGGACCGCGGAGGGGGCAAGAACAAGGGGAAGGGCGTCCCGCGG 400
P P S S S S K A A G G G R G G G G K N K G K G V A A
CGCGCCACCGCCCGCCGCGCGCGGCGGTGCCAGTGGAGGGGTGCCGCGGATCTGAGCGGGATCAAGAACTAC 480
A A P P P P P P P R C Q V E G C G A D L S G I K N Y
TACIGCCGCCACAGGTGTGCTTCATGCATTCCARGGCTCCCGCGTCTGCTGCGCGGCGCTCGAGCAGCGCTTCTGCCA 560
Y C R H K V C F M H S K A P R V V V A G L E Q R F C Q
SCAGTGCAGCAGGTTCACCTGCTGCCTGAAATTTGACCAAGGAAACGCAGCTGCCGAGACGCCCTTGCAGGICATRAATG 640
Q C S R F H L L F E F D Q G K R S C R R R L A G H N
AGCGCCGAGGAGGGCGCAACCCCTTTGGCATCAGGCTACGGTCCGACTAGCTGCATCTGTTGGTGGCATCCGAGGTTG 720
E R R R R P Q T P L A S R Y G R L A A S V G E H R R F
AGAAGCTTTACGTGGATTTCTCTCCCAAGGGTTCCAAGCAGCGTAAGGAATGCATGGCCAGCAATTCACCCAGGCGA 800
R S F T L D F S Y P R V P S S V R N A W P A I Q P G D
TCGGATCTCCGGTGGTATCCAGTGGCACAGGAACGTAGCTCCCTCATGGTCACTCTAGTGCAGTGGCGGGATATGGTGCCA 880
R I S G G I Q W H R N V A P H G H S S A V A G Y G A
ACACATACAGCGCCCAAGGTAGCTCTTTCTTCAGGGCCACCGGTGTTCCGTGCGCCAAATCTCCCTCCAGGTGATGTCTC 960
N T Y S G Q G S S S S G P P V F A G P N L P P G G C L
GCAGGGGTGGTGGCGCCACCGACTCGAGCTGTGCTCTCTCTCTCTCTCAACCCAGCCATGGGATCTACTACCCACAG 1040
A (少探梗)
A G V G A A T D S S C A L S L L S T Q P W D T T T H S
I (少藤梗)
TGCGCTGCCAGCCACAACCAGGCTGCAGCCATGTCCACTACCCAGGCTTTGATGGCAATCTGTGGCACCCTCCGCCA 1120
A A A S H N Q A A A M S T T T S F D G N P V A P S A
TGCGGGTAGCTACATGCCACCAGCCCTGGACAGGTTCTCGGGCCATGAGGGTGGTGGTGGAGCGTGGCGCACCCAG 1200
M A G S Y M A P S F W T G S R G H E S G G R S V A H Q
CTACCACATGAAGTCTCACTTGATGAGGTGCACCCCTGCTCCTAGCCATCATGCCACTTCTCGGTTGAGCTTGAAGCTTGC 1280
L P H E V S L D E V H P G P S H H A H F S G E L E L A
TCTGCAGGGGAACGGTCCAGCCCGCAGCACCCATCGATCTCGGGTCCGGCAGCACCTTCGACCAACCAGCACACGA 1360
L Q G N G P A P A P R I D P G S G S T F D Q T S N T
TGAATTGGTCTCTGATAGgggtgttccagctgccatcgatctgtcgctcccgcaaggcgagtcgatggaactgaagaacctc 1440
M D W S L *
atgctgctgccccttatttgtgttcaaatcttccctccagctatggaaggaaattctaaggctgactggcgattaatct 1520
ccctgtgatgaataataatgcygccccttgaactcaattatgctgtgcccgcacccatctatgtaactctccatgaatt 1600
tttaagtatcagtgtaagtgtgt 1624

```

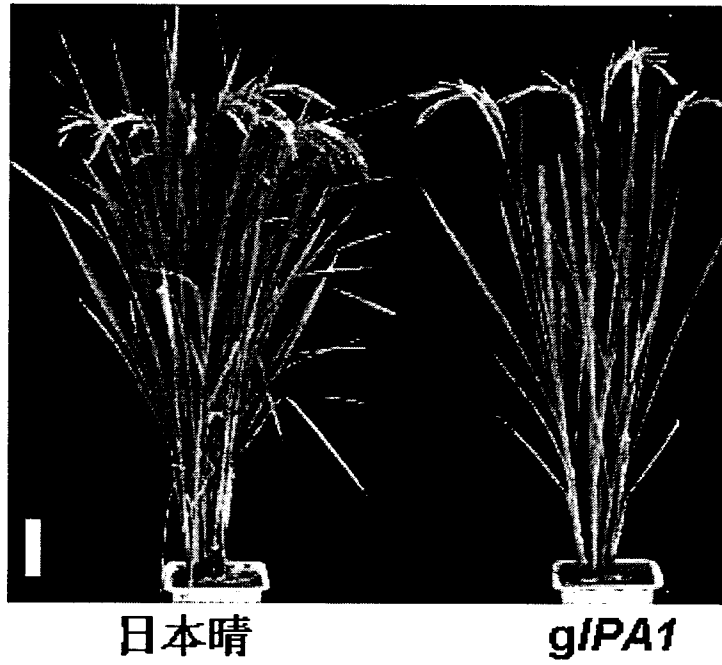
图 3

说明书附图

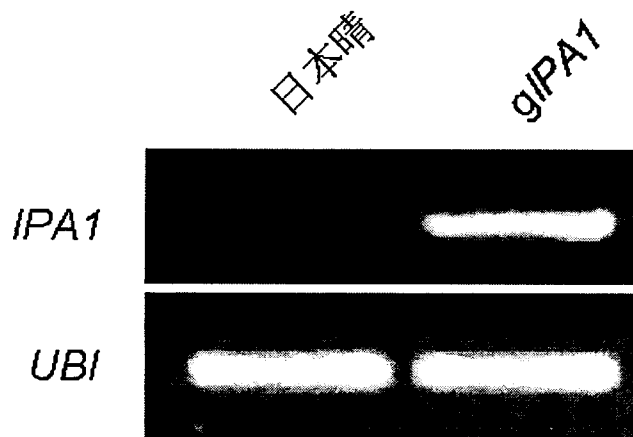
a



b



c



说明书附图

d

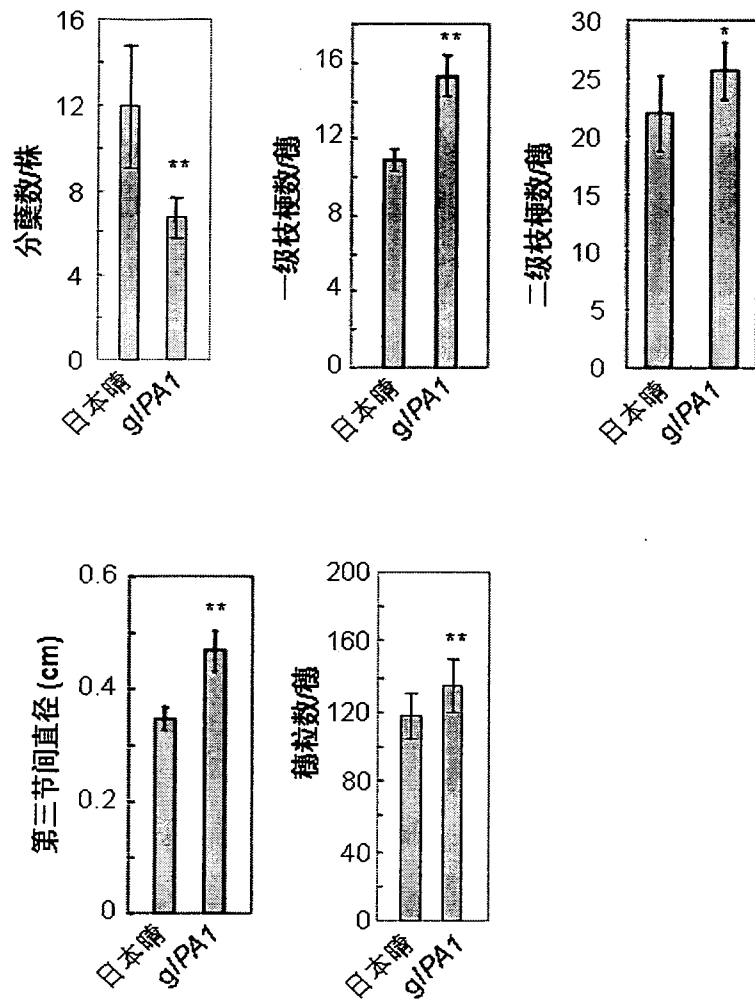


图 4

a

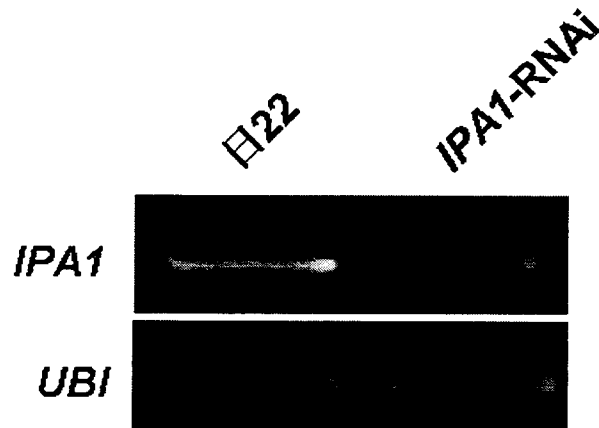


H22

IPA1-RNAi

说明书附图

b



c

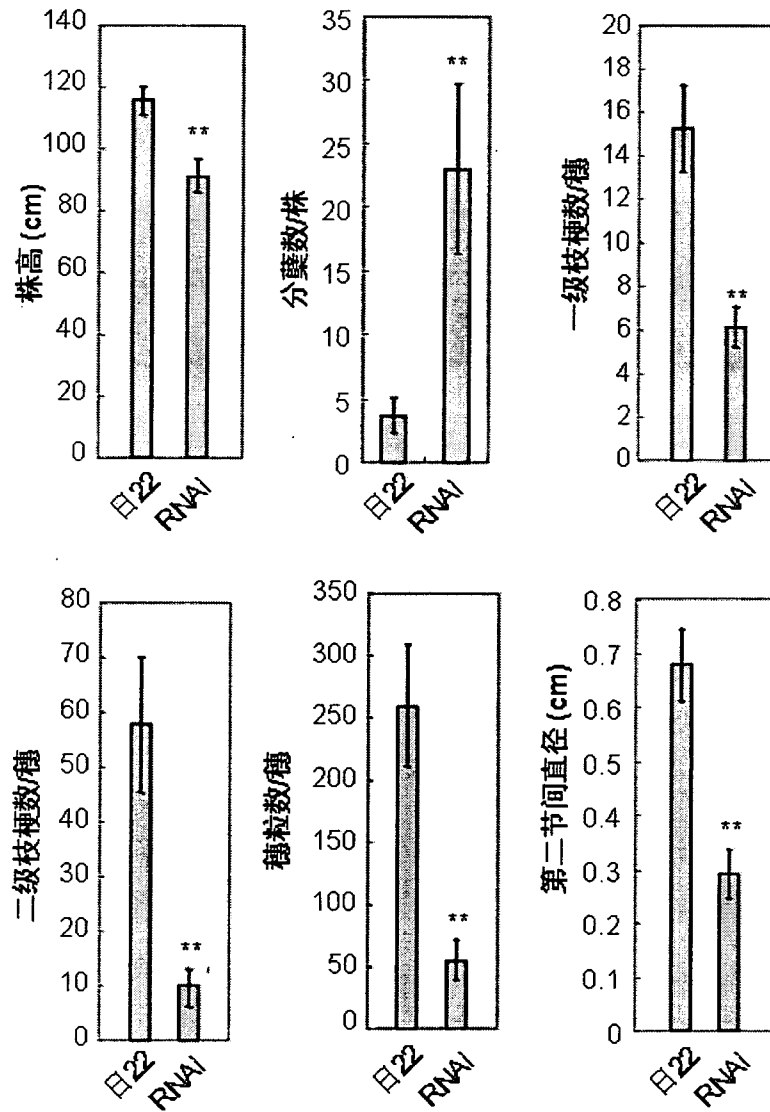


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN20 11/000558

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See 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; A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; CNKI; ISI Web of Knowledge; PubMed and search terms: IPAI, SPL14, SPL15, rice, architecture, development, yield, inventor name and the like;

GenBank, Retrieving System for Biological Sequence of Chinese Patent and searched sequences: sequences 1-5

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 AK107191, 04 Dec. 2008 (04.12.2008) [retrieved on 21.05.2011], Retrieved from NCBI [online]: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AK107191 > see the whole text	1-5

 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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"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	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 27 May 2011 (27.05.2011)	Date of mailing of the international search report 30 Jun. 2011 (30.06.2011)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer ZHOU, Xia Telephone No. (86-10)6241 1098

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN20 1/000558

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category:*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>XIE, K . et al., Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice, Plant Physiology, September 2006, Vol. 142, Pages 280-293</p> <p>see abstract, page 286, left column, the fourth paragraph to page 287, right column, the second paragraph, page 290, right column, the second paragraph to the third paragraph, page 291, right column, the third paragraph to the fifth paragraph, table 1, figures 5 and 6</p>	1-10
X	<p>CN101415829A (BASF PLANT SCI GMBH) 22 Apr. 2009 (22.04.2009)</p> <p>see page 7, line 16-page 24, line 16, page 36, line 19-page 42, line 11, page 130, line 2-page 138, line 18, figure 26 (continued), claims 119-139</p>	1-10
P, X	<p>CN101921321A (INST GENETICS&DEV BIOLOGY CHINESE ACAD)</p> <p>22 Dec.20 10 (22.12.2010), see claims 1-10, sequences 1-5</p>	1-10
P, X	<p>JIAO, Y. Q. et al., Regulation of OsSPL14 by OsmiR156 defines ideal plant in rice, Nature Genetics, 23 May 2010 (23 .05.2010), Vol. 42, No.6, Pages 541-544</p> <p>see page 541, right column, the fourth paragraph to page 542, left column, the first paragraph, "Online Methods" page, left column, the second paragraph and supplemental table 1</p>	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

International application No.
 PCT/CN20 1/000558

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN101415829A	22.04.2009	WO2007113237A2 EP21 99398 A I CA2638978A1 MX2008010669A EP2004829A2 IN200805915P4	11.10.2007 23.06.2010 11.10.2007 30.09.2008 24.12.2008 27.03.2009
CN101921321A	22.12.2010	None	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN20 1 1/000558

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/415 (2006.01) i

C12N 15/29 (2006.01) i

C12N 15/82 (2006.01) i

C12N 1/21 (2006.01) i

C12N 5/14 (2006.01) i

A01H 1/00 (2006.01) i

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; A01H		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CNABS; CNKI; ISI Web of Knowledge; PubMed 和检索词: IPAI, SPL14, SPL15, 稻 ,rice, 株型 ,architecture, development, 产量 ,yield, 发明人等 ;		
GenBank, 中国专利生物序列检索系统和检索的序列 : 序列 1-5 。		
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	GenBank 登录号 AK107191 , 04. 12 月 2008 (04. 12.2008) , [检索于 21.05.201 1] , 检索自 NCBI [联机]: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AK107191> 参见全文	1-5
X	XIE, K.等 , Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice, Plant Physiology, 2006 年 9 月, 第 142 卷, 第 280-293 页 参见摘要, 第 286 页左栏第四段至第 287 页右栏第二段, 第 290 页右栏第二至三段, 第 291 页右栏第三至五段, 表 1, 图 5 和 6	1-10
因 其余文件在 c 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 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	"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	
"E" 在国际申请日的%公布在先申请或T %	"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	
"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)	"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	
"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件	"&" 同族专利的文件	
"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		
国际检索实际完成的日期 27. 5 月 201 1 (27.05.201 1)	国际检索报告邮寄日期 30.6 月 2011 (30.06.2011)	
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 10008S 传真号: (86-10)62019451	授权官员 周霞 电话号码: (86-10) 62411098	

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
X	CN101415829A (巴斯福植物科学有限公司)22. 4 月 2009 (22.04.2009) 参见说明书第 7 页第 16 行-第 24 页第 16 行，第 36 页第 19 行-第 42 页第 11 行，第 130 页第 2 行-第 138 页第 18 行，图 26 (续)，权利要求第 119-139 项	1-10
P, X	CN101921321A (中国科学院遗传与发育生物学研究所)22. 12 月 2010(22. 12.2010) 参见权利要求 1-10，序列 1-5	1-10
P, X	JIAO, Y. Q.等, Regulation of OsSPLM by OsmiR156 defines ideal plant architecture in rice, Nature Genetics, 23.5 月 2010 (23.05.2010), 第 42 卷, 第 6 期, 第 541-544 页, 参见第 541 页右栏第四段至 542 页左栏第一段, "在线方法" 页左栏第二段和补充表 1	1-10

国际检索报告

关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN20 11/000558

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN101415829A	22.04.2009	WO20071 13237A2 EP2199398A1 CA2638978A1 MX2008010669A EP2004829A2 IN200805915P4	11.10.2007 23.06.2010 11.10.2007 30.09.2008 24.12.2008 27.03.2009
CN101921321A	22.12.2010	无	

续: A. 主题的分类

C07K 16/15 (2006.01) !
D12N 15/29 (2006.01) !
C12N 15/82 (2006.01) !
C12N 12/1 (2006.01) !
C12N 5/14 (2006.01) !
A01H 1/00 (2006.01) !

国际 4%/5% 类

国际申请号
P3X/CN2011/000SS8