



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105622736 A

(43) 申请公布日 2016.06.01

(21) 申请号 201410586620.8

(22) 申请日 2014.10.28

(71) 申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72) 发明人 李自超 刘鹏丽 段俊枝 熊海燕

李金杰 张洪亮

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 关畅 陈晓庆

(51) Int. Cl.

C07K 14/415(2006.01)

C12N 15/29(2006.01)

C12N 15/82(2006.01)

A01H 5/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

序列表6页 附图5页

(54) 发明名称

OsQR1 蛋白及其编码基因与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种 OsQR1 蛋白及其编码基因与应用。本发明公开一种蛋白,为如下 (1) 或 (2) 所示:(1)SEQ ID No. 4所示的蛋白;(2)将SEQ ID No. 4所示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/或添加且功能相同的蛋白质。本发明提供的 OsQR1 蛋白及其编码基因为水稻抗旱分子育种提供了新基因和新材料,对改良水稻及其他作物的抗旱具有重要意义。

1. 一种蛋白,为如下(1)或(2)所示:
 - (1) SEQ ID No. 4 所示的蛋白;
 - (2) 将 SEQ ID No. 4 所示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 / 或添加且功能相同的蛋白质。
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:所述编码基因为如下中至少一种:
 - 1) SEQ ID No. 3 所示的 DNA 分子;
 - 2) SEQ ID No. 3 中自 5' 末端起第 79 位至第 690 位核苷酸所示的 DNA 分子;
 - 3) 在严格条件下与 1) 或 2) 限定的 DNA 分子杂交且编码权利要求 1 所述蛋白质的 DNA 分子;
 - 4) 与 1) 或 2) 或 3) 限定的 DNA 分子具有 90% 以上的同一性且编码权利要求 1 所述蛋白质的 DNA 分子。
4. 含有权利要求 2 或 3 所述编码基因的重组载体、表达盒、转基因细胞系或重组菌。
5. 一种制备转基因植物的方法,包括如下步骤:将权利要求 2 或 3 所述编码基因导入出发植物中,得到转基因植物;与出发植物相比,转基因植物的耐旱性和 / 或渗透压耐性增强。
6. 根据权利要求 5 所述的方法,其特征在于:所述编码基因是通过重组表达载体导入的,所述重组表达载体是将所述编码基因插入出发载体 pMDC83 的 PacI 和 SacI 位点间得到的。
7. 根据权利要求 5 或 6 所述的方法,其特征在于:所述植物为水稻。
8. 权利要求 1 所述的蛋白、权利要求 2 或 3 所述的编码基因在增强植物耐旱性中的应用。
9. 权利要求 1 所述的蛋白、权利要求 2 或 3 所述的编码基因在增强植物渗透压耐性中的应用。
10. 根据权利要求 8 或 9 所述的应用,其特征在于:所述植物为水稻。

OsQR1 蛋白及其编码基因与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种 OsQR1 蛋白及其编码基因与应用,属于生物技术领域。

背景技术

[0002] 非生物逆境是影响植物正常生长发育,限制着作物产量提高的主要胁迫因子。目前,干旱对世界作物产量的影响,居于各胁迫因素的首位,其对作物生长的危害相当于所有自然灾害之和,在许多地方已经成为农业发展的瓶颈。水稻是世界上的主要粮食作物之一,是我国 60% 以上人口的主粮。据统计,水稻用水占农业用水的 70% 左右,我国水稻栽培面积从 1997 年以来持续缩减,并且每年还有 2 千多万亩水稻受旱,甚至还有上千万亩水稻无法种植。因此,克服干旱逆境胁迫对植物的伤害,创制抗旱植物新种质、选育抗旱品种、改良农作物的耐旱性,已成为近年来植物抗旱遗传育种研究的热点之一。

[0003] 利用传统育种方法培育抗旱水稻品种周期长、偶然性大,所培育的品种不稳定,进展比较缓慢,而利用基因工程技术可以直接在基因水平上改造植物的遗传背景,定向改造植物的遗传性状。外源基因的转入丰富了基因资源,弥补了常规育种方法的不足,是抗旱品种选育的有效途径之一。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种 OsQR1 蛋白及其编码基因与应用。

[0005] 本发明提供一种蛋白,为如下 (1) 或 (2) 所示:

[0006] (1) SEQ ID No. 4 所示的蛋白;

[0007] (2) 将 SEQ ID No. 4 所示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 / 或添加且功能相同的蛋白质。

[0008] 上述蛋白的编码基因也属于本发明的保护范围。

[0009] 上述编码基因中,所述编码基因为如下中至少一种:

[0010] 1) SEQ ID No. 3 所示的 DNA 分子;

[0011] 2) SEQ ID No. 3 中自 5' 末端起第 79 位至第 690 位核苷酸所示的 DNA 分子;

[0012] 3) 在严格条件下与 1) 或 2) 限定的 DNA 分子杂交且编码所述蛋白质的 DNA 分子;

[0013] 4) 与 1) 或 2) 或 3) 限定的 DNA 分子具有 90% 以上的同一性且编码所述蛋白质的 DNA 分子。

[0014] 含有上述任一所述编码基因的重组载体、表达盒、转基因细胞系或重组菌也属于本发明的保护范围。

[0015] 一种制备转基因植物的方法也属于本发明的保护范围,包括如下步骤:将上述任一所述编码基因导入出发植物中,得到转基因植物;与出发植物相比,转基因植物的耐旱性和 / 或渗透压耐性增强。

[0016] 上述方法中,所述编码基因是通过重组表达载体导入的,所述重组表达载体是将所述编码基因插入出发载体 pMDC83 的 PacI 和 SacI 位点间得到的。

- [0017] 上述任一所述的方法中,所述植物为水稻。
- [0018] 上述蛋白、上述任一所述的编码基因在增强植物耐旱性中的应用也属于本发明的保护范围。
- [0019] 上述蛋白、上述任一所述的编码基因在增强植物渗透压耐性中的应用也属于本发明的保护范围。
- [0020] 上述任一所述的应用中,所述植物为水稻。
- [0021] 本发明提供的 OsQR1 蛋白及其编码基因为水稻抗旱分子育种提供了新基因和新材料,对改良水稻及其他作物的抗旱具有重要意义。

附图说明

- [0022] 图 1 为实时荧光定量 PCR 分析旱稻 IRAT109 和水稻品种日本晴内源 OsQR1 基因的相对表达量结果。
- [0023] 图 2 为 PCR 鉴定 T₀ 代转 OsQR1 基因的水稻植株。
- [0024] 图 3 为转 OsQR1 基因的水稻植株的实时荧光定量 PCR 检测结果。
- [0025] 图 4 为转 OsQR1 基因的水稻苗期 PEG 模拟断水胁迫实验结果。
- [0026] 图 5 为转 OsQR1 基因的水稻苗期培养基模拟渗透胁迫实验结果。
- [0027] 图 6 为转 OsQR1 基因的水稻苗期盆栽抗旱性鉴定结果。

具体实施方式

- [0028] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。
- [0029] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。
- [0030] 旱稻 IRAT109 (*Oryza. sativa* L. ssp. japonica) 在文献“夏志宏. 优质粳型旱稻 IRAT109 及其栽培技术. 安徽农业. 1994 年 06 期.”中公开过,公众可从中国农业大学获得。
- [0031] 水稻日本晴 (*Oryza. sativa* L. ssp. japonica) 在文献“水稻品种“日本晴”. 农业科技通讯. 1973 年 02 期”中公开过,公众可从中国农业大学获得。
- [0032] 载体 pMDC83 在文献“Mark D. Curtis and Ueli Grossniklaus. A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Plants. Plant Physiology, 2003, 133 (2) : 462-469”中公开过,公众可从中国农业大学获得。
- [0033] 根癌农杆菌 EHA105 在文献“高世武等. 影响根癌农杆菌 EHA105 感受态细胞转化效率因素的研究. 热带生物学报. 2012 年 3 月第 3 卷第 1 期”中公开过,公众可从中国农业大学获得。
- [0034] 实施例 1、旱稻抗旱性相关蛋白 OsQR1 编码基因的获得
- [0035] 一、取正常条件下培养的旱稻 IRAT109 幼苗的叶片, Trizol 法提取总 RNA, 并用 M-MLV 反转录酶进行反转录得到 cDNA。
- [0036] 二、以步骤一得到的 cDNA 为模板,用引物 F1 和引物 R1 进行 PCR 扩增,得到 PCR 扩增产物。
- [0037] 引物序列如下:
- [0038] F1 : 5' -GTAAATTAA CAATGGCGGTGAAGGTCT-3' (SEQ ID No. 1)

[0039] (下划线所示序列为限制性内切酶 PacI 的酶切识别位点)

[0040] R1 :5'-CGAGCTC TCAAGCGGACCCCTGA-3' (SEQ ID No. 2)

[0041] (下划线所示序列为限制性内切酶 SacI 的酶切识别位点)

[0042] 三、将 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,回收纯化 629bp 的 DNA 片段进行测序,目的片段中含有的基因序列如 SEQ ID No. 3 中自 5' 末端起第 79 位至第 690 位核苷酸所示,该基因为 OsQR1 基因,其编码的 OsQR1 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID No. 4 所示,OsQR1 基因的全长 cDNA 序列如 SEQ ID No. 3 所示。

[0043] 实施例 2、实时荧光定量 PCR 分析内源 OsQR1 基因的表达

[0044] 一、胁迫处理

[0045] 将水培的苗龄为 4 周的水稻品种日本晴和旱稻品种 IRAT109 幼苗,分别进行以下(一)至(四)的任一处理:

[0046] (一)ABA 处理:将幼苗根部浸泡于 100 μ M 的 ABA 的水溶液中,光照培养 1 小时、4 小时、6 小时、8 小时、9 小时、16 小时、24 小时后取叶片,用液氮速冻,-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0047] (二)H₂O₂ 处理:将幼苗根部浸泡于 1mM H₂O₂ 水溶液中,放置 1 小时、3 小时、6 小时、8 小时、9 小时、16 小时、24 小时后取叶片,用液氮速冻,-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0048] (三)PEG(干旱)处理:将幼苗根部浸泡于 200g/L 的聚乙二醇(PEG6000)水溶液浸泡 1 小时、2 小时、3 小时、8 小时、12 小时、16 小时、24 小时后取叶片,用液氮速冻,-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0049] (四)NaCl 处理:将幼苗根部浸泡于 200mM NaCl 的水溶液中,浸泡 1 小时、3 小时、6 小时、8 小时、16 小时、24 小时、36 小时后取叶片,用液氮速冻,-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0050] 对照组的处理:直接取未经任何处理的水培的苗龄为 4 周的水稻品种日本晴和旱稻品种 IRAT109 幼苗叶片 -80 $^{\circ}$ C 冻存作为对照。

[0051] 二、实时荧光定量 PCR

[0052] 取步骤一获得的各处理组以及对照组的叶片,分别提取其总 RNA,利用反转录酶 M-MLV 反转录合成 cDNA 第一链,以该 cDNA 第一链为模板,采用引物 5'-ATGGCGGTGAAGGTCTA-3' (SEQ ID No. 5) 和 5'-CATCTGGCTTAGGAGGC-3' (SEQ ID No. 6) 扩增 OsQR1 基因的特异片段(目的片段 178bp),采用引物 5'-ATTTGGCACCACACATTCTAC-3' (SEQ ID No. 7) 和 5'-ATAACCTTCGTAGATTGGGACT-3' (SEQ ID No. 8) 扩增出水稻 Actin 基因的特异片段(目的片段 255bp)以作为内参进行实时定量分析。

[0053] 实时荧光定量 PCR 在实时荧光定量 PCR 仪 Applied Biosystems 7500Real Time PCR system(ABI, USA) 上进行,一次平行试验设 3 次重复。利用 Livak KJ 和 Schmittgen TD(2001) 报道的方法,即 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算相对表达量。

[0054] $\Delta\Delta C_T = (C_{T, Target} - C_{T, Actin})_{Time x} - (C_{T, Target} - C_{T, Actin})_{Time 0}$

[0055] Time x 表示任意时间点,Time₀ 表示经 actin 校正后 1 倍量的目标基因表达。

[0056] 结果如图 1 所示。

[0057] 图 1 中, Nipponbare 为日本晴。

[0058] A 为 ABA 处理的日本晴和 IRAT109;

[0059] B 为 H₂O₂ 处理的日本晴和 IRAT109;

[0060] C 为 PEG(干旱)处理的日本晴和 IRAT109;

[0061] D 为 NaCl 处理的日本晴和 IRAT109。

[0062] (图 1 中 0h 的表达量即为各对照的结果)

[0063] 图 1 表明, OsQR1 基因能被干旱、H₂O₂、ABA 和 NaCl 诱导表达, 说明 OsQR1 基因是一个与抗旱相关的基因。

[0064] 实施例 3、重组表达载体的构建

[0065] PacI 和 SacI 双酶切实例 1 中步骤二获得的 PCR 扩增产物, 得到基因片段; PacI 和 SacI 双酶切载体 pMDC83, 得到载体大片段; 将基因片段与载体大片段连接, 得到重组载体 35S::OsQR1, 该重组载体 35S::OsQR1 是在载体 pMDC83 的 PacI 和 SacI 位点间(即双烟草花叶病毒启动子 35S 下游)插入了 SEQ ID No. 3 中自 5' 末端起第 79 位至第 690 位核苷酸所示的 DNA 片段, 将 35S::OsQR1 送测序, 结果正确。

[0066] 实施例 4、重组农杆菌的获得

[0067] 将实施例 3 获得的重组载体 35S::OsQR1 冻融法转化根癌农杆菌 EHA105, 获得含有重组载体 35S::OsQR1 的根癌农杆菌 EHA105, 将其命名为重组农杆菌 EHA105/35S::Os QR1。

[0068] 实施例 5、转基因植物的获得和鉴定

[0069] 一、转基因植物的获得

[0070] 用实施例 4 获得的重组农杆菌 EHA105/35S::OsQR1 侵染水稻日本晴的胚性愈伤组织, 得到 6 个 T₀ 代阳性转 OsQR1 基因株系, 具体方法如下:

[0071] (一) 侵染液的制备

[0072] 将重组农杆菌 EHA105/35S::OsQR1 平铺于含 50mg/L 卡那霉素和 20mg/L 利福平的 YEP 培养基中, 28℃ 培养 2-3 天。挑取单菌斑接种于 YEP 液体培养基中(含 50mg/L 卡那霉素和 20mg/L 利福平), 28℃, 240rpm 培养至 OD₆₀₀ 为 0.8-1.0, 按 1% 的接种量接种于 YEP 液体培养基中(含 50mg/L 卡那霉素和 20mg/L 利福平), 28℃, 240rpm 培养至 OD₆₀₀ 为 0.5-0.6, 离心收集菌体重悬于 AAM 培养基中 28℃, 240rpm 培养至 OD₆₀₀ 为 0.3-0.4 作为侵染液。

[0073] (二) 侵染和共培养

[0074] 选取良好的水稻日本晴的胚性愈伤组织用步骤(一)制备的侵染液浸泡 30 分钟后取出, 用无菌滤纸吸去多余菌液, 然后置于共培养培养基上培养 2-3 天。

[0075] (三) 筛选培养

[0076] 将经步骤(二)共培养的愈伤组织用无菌水振荡清洗 3-4 次, 再用 500mg/L 头孢霉素水溶液振荡洗涤 40 分钟, 直至上清液完全清洁为止; 取出愈伤组织, 放入只带滤纸的无菌培养皿中 0.4m/s 风干 4 小时; 转入延迟筛选培养基暗培养 3-7 天后再转入筛选培养基中筛选两轮(每轮 3-4 周)。

[0077] (四) 分化培养

[0078] 将经步骤(三)培养的愈伤组织在预分化培养基中暗培养 2-3 周后, 再移到分化培养基中光照培养 2-3 周, 待幼芽长至约 1cm 时转入壮苗培养基培养 30 天, 揭去封口膜炼苗培养一周, 然后移栽到土中, 获得 T₀ 代转 OsQR1 基因的水稻植株。

[0079] 上述培养基配方如表 1 所示。

[0080] 表 1 培养基配方

[0081]

名称	配方	PH 值
YEP培养基	10g/L蛋白胨+10g/L酵母提取物+5g/L NaCl+ 15g/L琼脂粉, 余量为水	7.0
AAM培养基	AA盐(AA大量、AA微量、铁盐)+MS维生素+AA氨基酸+500mg/L水解酪蛋白+68.5g/L蔗糖+36g/L葡萄糖+20mg/L乙酰丁香酮, 余量为水	5.2
共培养基培养基	NB培养基基本成分+ 2mg/L 2, 4-D+ 10g/L葡萄糖 + 20mg/L 乙酰丁香酮	5.4
延迟筛选培养基	NB培养基基本成分+ 2mg/L 2, 4-D+ 500mg/L 头孢霉素	5.8
第一轮筛选培养基	NB培养基基本成分+ 2mg/L 2, 4-D+ 500mg/L 头孢霉素+ 50mg/L 潮霉素	5.8

[0082]

第二轮筛选培养基	NB培养基基本成分+ 2mg/L 2, 4-D+ 50mg/L 潮霉素	5.8
预分化培养基	NB培养基基本成分+ 1mg/L 6-BA+ 2mg/L NAA+ 5mg/L ABA+ 50mg/L 潮霉素	5.8
分化培养基	NB培养基基本成分+ 2mg/L 6-BA+ 1mg/L NAA+ 1mg/L KT+ 50mg/L潮霉素	5.8
壮苗培养基	1/2MS培养基基本成分+0.5mg/L NAA+0.25mg/L 多效唑	5.8

[0083] 注:NB培养基基本成分包括N6大量元素, B5微量元素, B5有机成分, 150mg/L肌醇, 300mg/L水解酪蛋白, 500mg/L谷氨酰胺, 600mg/L脯氨酸, 30g/L蔗糖, 3g/L植物凝胶, 余量为水。

[0084] (五)PCR鉴定

[0085] 对步骤(四)获得的 T_0 代转OsQR1基因的水稻植株进行DNA水平的PCR鉴定, 同时以pMDC83为阳性对照, 以野生型日本晴的基因组DNA为阴性对照。

[0086] PCR鉴定所用的引物为:5'-AAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACC-3'(SEQ ID No. 9)和5'-TCTACACAGCCATCGGTCCAGACG-3'(SEQ ID No. 10), 目的片段的大小为919bp(靶基因为HPT, 该基因位于pMDC83上), 扩增产物中含有目的片段的植株为阳性, 不含有目的片段的植株为阴性, 部分阳性样本的鉴定结果如图2所示。

[0087] 图2中, 泳道M为分子量标准, 从上至下的片段大小依次为5000、3000、2000、1500、800、500、300bp, A为以质粒pMDC83(阳性对照)为模板得到的PCR扩增产物, B为以野生型日本晴的基因组DNA为模板得到的PCR扩增产物, C-J为以 T_0 代转OsQR1基因的水稻植株的基因组DNA为模板得到的PCR扩增产物。

[0088] 图2表明, T_0 代转OsQR1基因的水稻植株构建成功。

[0089] T_0 代表转基因当代植株, T_1 代表 T_0 代自交产生的种子及由它所长成的植株, T_2 代表 T_1 代自交产生的种子及由它所长成的植株, T_3 代表 T_2 代自交产生的种子及由它所长成的植株。

[0090] 二、转基因植株的实时荧光定量PCR检测

[0091] 分别取野生型日本晴(WT)、步骤一PCR鉴定呈阳性的 T_2 代转OsQR1基因的水稻株系(T-1、T-11、T-30、T-32、T-33、T-39)在大田种植的植株叶片, 利用TRIZOL试剂提取总RNA, 以此RNA为模板, 使用M-MLV反转录酶进行反转录得到cDNA, 以此cDNA为模板, 以5'-ATGGCGGTGAAGGTCTA-3'(SEQ ID No. 5)和5'-CATCTGGCTTAGGAGGC-3'(SEQ ID No. 6)扩

增 OsQR1 基因的特异片段 (目的片段 178bp), 采用引物 5'-ATTGGCACCACACATTCTAC-3' (SEQ ID No. 7) 和 5'-ATAACCTTCGTAGATTGGGACT-3' (SEQ ID No. 8) 扩增出水稻 Actin 基因的特异片段 (目的片段 255bp) 以作为内参进行实时定量分析。

[0092] 实时荧光定量 PCR 在实时荧光定量 PCR 仪 Applied Biosystems 7500Real Time PCR system (ABI, USA) 上进行, 一次平行试验设 3 次重复。利用 Livak KJ 和 Schmittgen TD (2001) 报道的方法, 即 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算相对表达量。

[0093]
$$\Delta\Delta C_T = (C_{T, Target} - C_{T, Actin})_{Time\ x} - (C_{T, Target} - C_{T, Actin})_{Time\ 0}$$

[0094] Time x 表示任意时间点, Time₀ 表示经 actin 校正后 1 倍量的目标基因表达。

[0095] 结果如图 3 所示。

[0096] 图 3 表明, T₂ 代转 OsQR1 基因的水稻株系中 OsQR1 基因的表达量明显高于 WT 植株。选取表达量最高的 T-1、T-30、T-32 株系做后续表型分析。

[0097] 三、转基因植株的耐旱性鉴定

[0098] (一) 水稻苗期 PEG 模拟断水胁迫实验

[0099] 分别取野生型日本晴 (WT)、步骤一 PCR 鉴定呈阳性的 T₂ 代转 OsQR1 基因的 3 个水稻株系 (T-1、T-30、T-32) 进行了 PEG 模拟干旱胁迫处理, 具体步骤如下:

[0100] 1、将各株系种子分别用 20% 的 NaClO 消毒后, 将 T₂ 代转 OsQR1 基因的水稻株系 T-1、T-30 和 T-32 的种子用含有 50mg/L 潮霉素的无菌水浸泡 2 天, 将 WT 的种子晚一天浸泡于不含潮霉素的无菌水中浸泡 2 天。

[0101] 2、用含 50mg/L 潮霉素的无菌水清洗各株系种子, 去掉多余水分后催芽 2-3 天, 挑选长势一致的种子转移至底部镂空了的 PCR 板上。每个 PCR 板上分别种植 30 株 T-1、T-30 或 T-32 植株, 以种植 WT 为对照, 用 Hoagland 营养液 (营养液成分为: 1. 43mM NH₄NO₃, 0. 27mM NaH₂PO₄ · 2H₂O, 0. 51mM K₂SO₄, 1. 0mM CaCl₂, 1. 46mM MnSO₄ · 7H₂O, 0. 19mM Na₂SiO₃, 9. 5 μ M MnCl₂ · 4H₂O, 7. 5 × 10⁻² μ M (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O, 18. 8 μ M H₃BO₃, 0. 15 μ M ZnSO₄ · 7H₂O, 0. 16 μ M CuSO₄ · 5H₂O, 35. 6 μ M FeCl₃ · 6H₂O, pH 5. 5-6. 0) 在光照培养室生长至两叶一心期时, 将 PCR 板转移至含有 200g/L PEG6000 的水溶液中胁迫处理 3 天, 转移至水中 7 天后观察表型, 统计各株系的存活植株的数目, 计算存活率, 即存活植株的数目占进行胁迫处理的植株总数的百分比, 结果如图 4 和表 2 所示。

[0102] 表 2 苗期 PEG 模拟断水胁迫实验植株的存活率结果

[0103]

株系	第1组		第2组		第3组	
	T-1	WT	T-30	WT	T-32	WT
存活率(%)	67.95±5.61**	34.91±3.53	77.07±3.12**	30.89±2.21	65.47±2.39*	38.34±1.99

[0104] 注:**表示与 WT 相比 p < 0.01 差异极显著,*表示与 WT 相比, p < 0.05 差异显著。

[0105] 图 4 表明, 在 PEG 模拟断水胁迫实验前, 每组的 T₂ 代转 OsQR1 基因的水稻株系和对照株系 (WT) 的生长状况基本相同; 在 PEG 模拟断水胁迫实验后, 每组的 T₂ 代转 OsQR1 基

因的水稻株系的生长状况明显好于对照株系 (WT) 的生长状况。

[0106] 表 2 表明, 经 PEG 胁迫复水后, T₂ 代转 OsQR1 基因的水稻株系植株的存活率显著高于对照株系 (WT)。

[0107] 结果表明, OsQR1 基因的超表达提高了水稻对 PEG 模拟干旱胁迫的抗性。

[0108] (二) 苗期培养基模拟渗透胁迫实验

[0109] 分别取野生型日本晴 (WT)、步骤一 PCR 鉴定呈阳性的 T₂ 代转 OsQR1 基因的 3 个水稻株系 (T-1、T-30、T-32) 进行苗期培养基模拟渗透胁迫实验, 具体步骤如下:

[0110] 1、将株系 T-1、T-30、T-32 种子去壳消毒后在含有 50mg/L 潮霉素的 1/2MS 培养基上于 28℃、光周期为每天 12 小时光照、12 小时黑暗条件下发芽, 将 WT 种子去壳消毒后晚一天播于不含潮霉素的 1/2MS 培养基上发芽;

[0111] 2、2-3 天后从步骤 1 中挑选长势一致的发芽种子转移到含有 0mmoI/L 和 200mmoI/L 甘露醇的 1/2MS 培养基上, 28℃、光周期为每天 12 小时光照、12 小时黑暗条件下培养 7-10 天后观察表型, 测量植株的株高及鲜重。计算 200mmoI/L 甘露醇处理的各株系的株高占 0mmoI/L 甘露醇处理的株高的百分比, 记为相对株高 (%), 计算 200mmoI/L 甘露醇处理的各株系的植株鲜重占 0mmoI/L 甘露醇处理的植株鲜重的百分比, 记为相对鲜重 (%)。结果如图 5 和表 3 所示。

[0112] 表 3 200mmoI/L 甘露醇渗透胁迫下植株长势统计结果

[0113]

株系	WT	T-1	T-30	T-32
相对株高 (%)	81.94 ± 0.26	88.72 ± 1.61*	98.17 ± 0.89**	87.70 ± 1.06*
相对鲜重 (%)	92.22 ± 1.31	102.00 ± 2.09*	104.00 ± 2.23*	97.00 ± 1.91*

[0114] 注: 表中 ** 表示与 WT 相比 $p < 0.01$ 差异极显著, * 表示与 WT 相比, $p < 0.05$ 差异显著。

[0115] 图 5 和表 3 表明, 转 OsQR1 基因的水稻株系的相对株高及鲜重都明显高于 WT。

[0116] 结果表明, OsQR1 基因的超表达导致水稻的生长势对甘露醇引起的渗透胁迫耐受性增强。

[0117] (三) 苗期盆栽抗旱性鉴定

[0118] 分别取野生型日本晴 (WT)、步骤一 PCR 鉴定呈阳性的 T₂ 代转 OsQR1 基因的 3 个水稻株系 (T-1、T-30、T-32) 进行苗期盆栽抗旱性鉴定, 具体步骤如下:

[0119] 1、将各株系种子分别用 20% 的 NaClO 消毒后, 将 T₂ 代转 OsQR1 基因的水稻株系 T-1、T-30 和 T-32 的种子用含有 50mg/L 潮霉素的无菌水浸泡 2 天, 将 WT 的种子晚一天浸泡于不含潮霉素的无菌水中浸泡 2 天;

[0120] 2、用含 50mg/L 潮霉素的无菌水清洗各株系种子, 去掉多余水分后催芽 3-4 天, 挑选长势一致的幼苗栽至花盆中, 每盆种植 15 株转 OsQR1 基因的水稻株系 T-1、T-30 或 T-32 以及 15 株 WT。正常条件下生长至 4 叶期, 进行断水胁迫 1 周, 然后复水 10 天, 统计存活植株的数目, 计算各株系的存活率, 即存活植株的数目占进行胁迫处理的植株总数的百分比, 结果如图 6 和表 4 所示。

[0121] 表 4 苗期盆栽耐旱性鉴定的存活率结果

[0122]

株系	第1组		第2组		第3组	
	T-1	WT	T-30	WT	T-32	WT
存活率(%)	76.67±1.67*	53.33±6.67	78.33±1.67**	46.67±6.67	73.33±6.67*	46.67±6.67

[0123] 注:表中**表示与WT相比 $p < 0.01$ 差异极显著,*表示与WT相比, $p < 0.05$ 差异显著。

[0124] 图 6 表明,抗旱性鉴定实验前,每组的 T_2 代转 OsQR1 基因的水稻株系和对照株系的生长状况基本相同;在抗旱性鉴定实验后,每组的 T_2 代转 OsQR1 基因的水稻株系的生长状况明显好于对照株系(WT)的生长状况。

[0125] 结果表明,经断水胁迫复水后,转 OsQR1 基因的水稻株系植株的存活率显著高于 WT。说明 OsQR1 基因的超表达提高了水稻的抗旱性。

[0001]

序列表

<110>中国农业大学

<120>OsQR1 蛋白及其编码基因与应用

<160>10

<210>1

<211>27

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>1

gttaattaac aatggcgggtg aaggtct 27

<210>2

<211>24

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>2

cgagctctca agcggacccc ttga 24

[0002]

<210>3

<211>993

<212>DNA

<213>水稻 (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*)

<400>3

```

agtatacaag cctttcttcc cctcctctgc tcatcccctc cccagatctc cagccccagg      60
agctccggag ggttcncaat ggcggfgaag gtctatgtcg tgtactactc tatgtatgga      120
catgttgcta aactagctga agagatcaag aaggggtgct catctattga aggtggttag      180
gctaaaatat ggcacgttcc tgaacctctc catgaggaag tacttggaaa gatgggcgag      240
cctcetaagc cagatgtgcc aacgatcaca ccacaagaac ttactgaggc tgatggaatc      300
ctgtttgggt tccctacaag gtttggcatg atggetgocg agatgaaagc attctttgat      360
gcaaccggtg gctctggag tgagcagagc cttgcaggea agcccggcgg catcttcttc      420
agcactggtc cccacggcgg tggtcaggag actacacngt tgacagcaat aactcagttg      480
actcaccacg gcctcgtggt cgtcccggtc gggtacacct tcggtgccaa gatgtttaac      540
atgggagaag ttcagggggg cagcccgtae ggcgcgggca cctttgcgcg egacggctcg      600
aggtggccga cggaaatgga gctggagcac gccttcacc aggggaagta cttcgcaggc      660
atcgcgaaga agctcaaggg gtcgccttga gatctccatt gggcaaatc aattgggcgt      720
gtcgcgtgct ctaccacaaa catcgtgagg catttcatac agctccaaac cataccgaca      780
tacagtcaat agcttggctt cttcttttgt ggtgtttctc gatgetatgt ggctctctcc      840
tgyaacttct cattcctgta cgeatgatat gattctgttc tacgctttgg tcagctgggt      900
gtaatttggc gtaacttctg ttattgtatt attggttccc ccgatgatata tattgattat      960
tgtacgggga gatctcttgg ttgccattcc gtc                                     993

```

<210>4

<211>203

<212> PRT

<213>水稻 (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*)

<400>4

```

Met Ala Val Lys Val Tyr Val Val Tyr Tyr Ser Met Tyr Gly His Val
1           5           10          15
Ala Lys Leu Ala Glu Glu Ile Lys Lys Gly Ala Ser Ser Ile Glu Gly
                20           25           30

```

[0003]

Val Glu Ala Lys Ile Trp Gln Val Pro Glu Thr Leu His Glu Glu Val
 35 40 45
 Leu Gly Lys Met Gly Ala Pro Pro Lys Pro Asp Val Pro Thr Ile Thr
 50 55 60
 Pro Gln Glu Leu Thr Glu Ala Asp Gly Ile Leu Phe Gly Phe Pro Thr
 65 70 75 80
 Arg Phe Gly Met Met Ala Ala Gln Met Lys Ala Phe Phe Asp Ala Thr
 85 90 95
 Gly Gly Leu Trp Ser Glu Gln Ser Leu Ala Gly Lys Pro Ala Gly Ile
 100 105 110
 Phe Phe Ser Thr Gly Thr Gln Gly Gly Gly Gln Glu Thr Thr Pro Leu
 115 120 125
 Thr Ala Ile Thr Gln Leu Thr His His Gly Met Val Phe Val Pro Val
 130 135 140
 Gly Tyr Thr Phe Gly Ala Lys Met Phe Asn Met Gly Glu Val Gln Gly
 145 150 155 160
 Gly Ser Pro Tyr Gly Ala Gly Thr Phe Ala Ala Asp Gly Ser Arg Trp
 165 170 175
 Pro Thr Glu Met Glu Leu Glu His Ala Phe His Gln Gly Lys Tyr Phe
 180 185 190
 Ala Gly Ile Ala Lys Lys Leu Lys Gly Ser Ala
 195 200

<210>5

[0004]

<211>17

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>5

atggcggtga aggtcta

17

<210>6

<211>17

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>6

catctggctc aggaggc

17

<210>7

<211>21

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>7

atttggcacc acacattcta c

21

[0005]

<210>8

<211>22

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>8

ataaccttcg tagattgga ct

22

<210>9

<211>24

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>9

aaaagttoga cagcgtctcc gacc

24

<210>10

<211>24

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

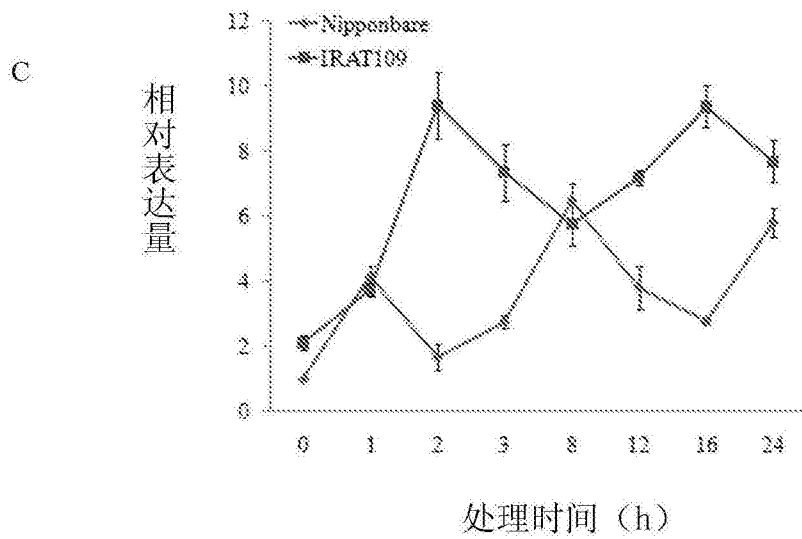
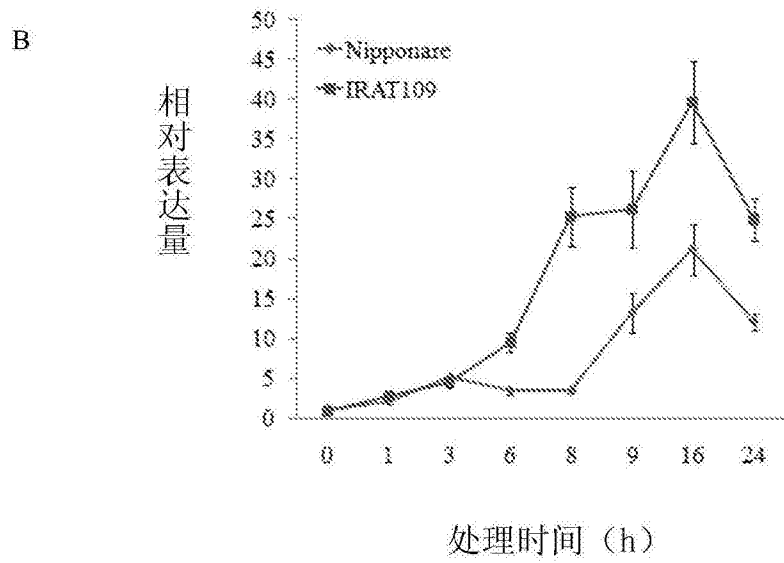
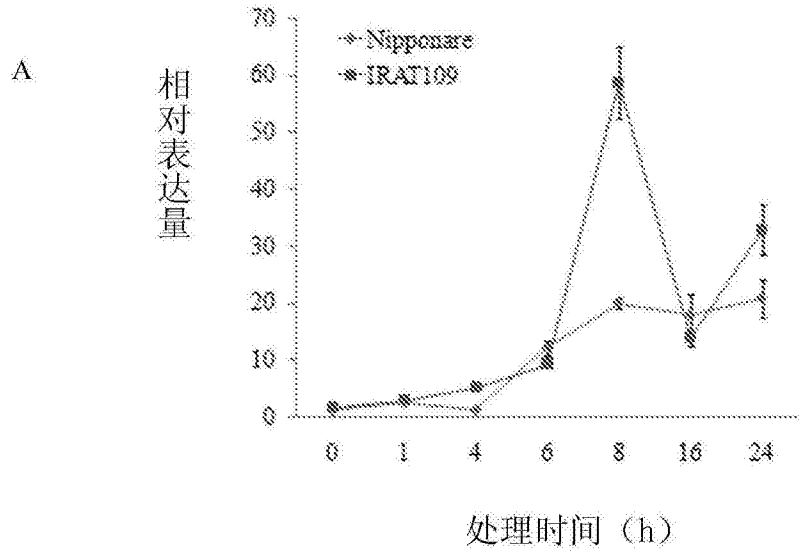
<223>

[0006]

<400>10

tctacacagc catcggtcca gaag

24



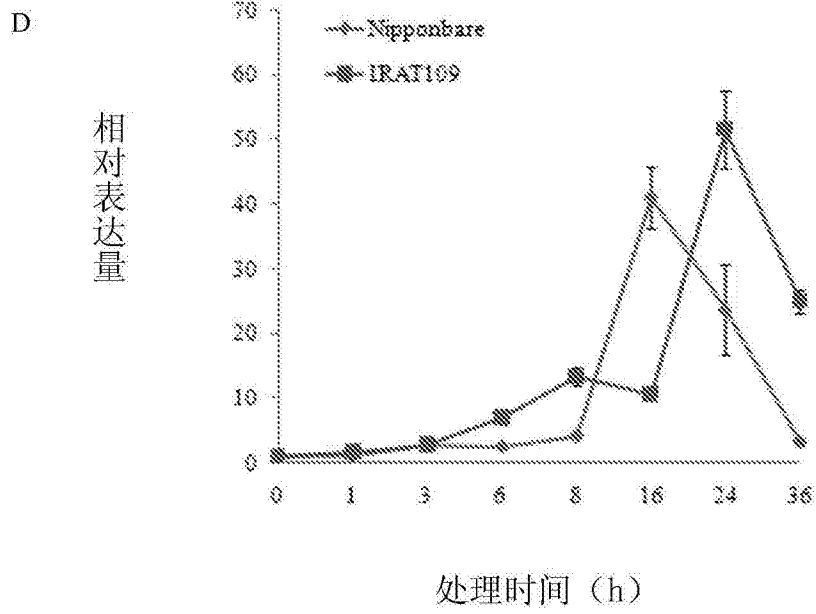


图 1

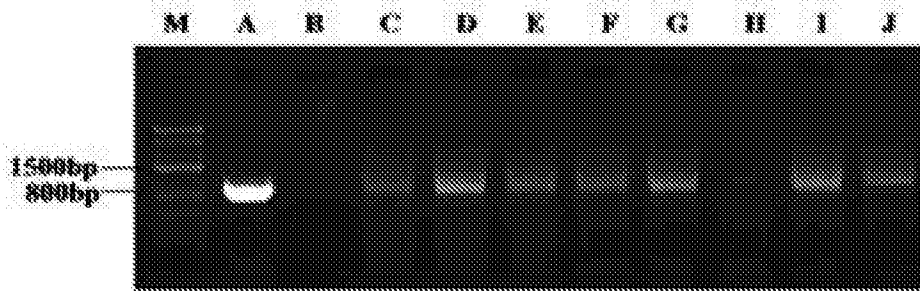


图 2

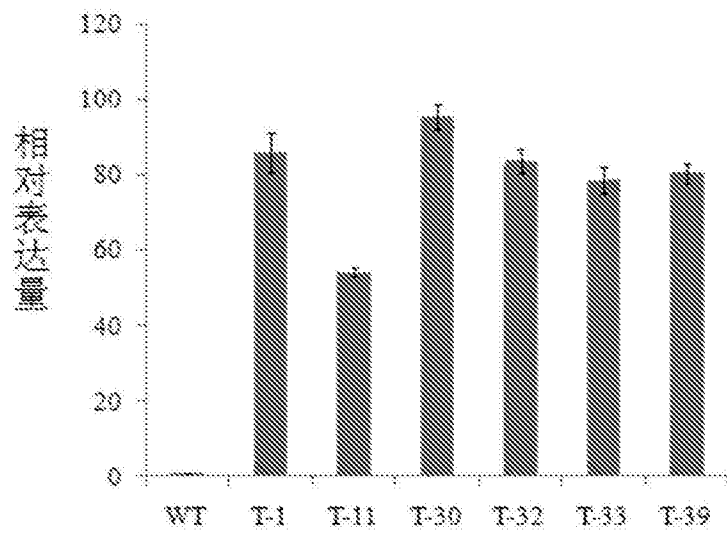


图 3

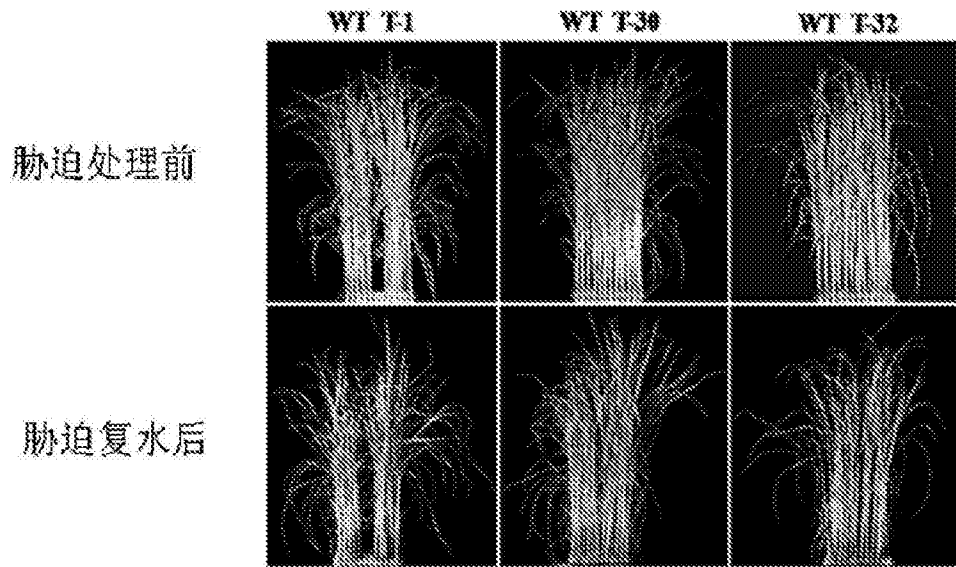


图 4

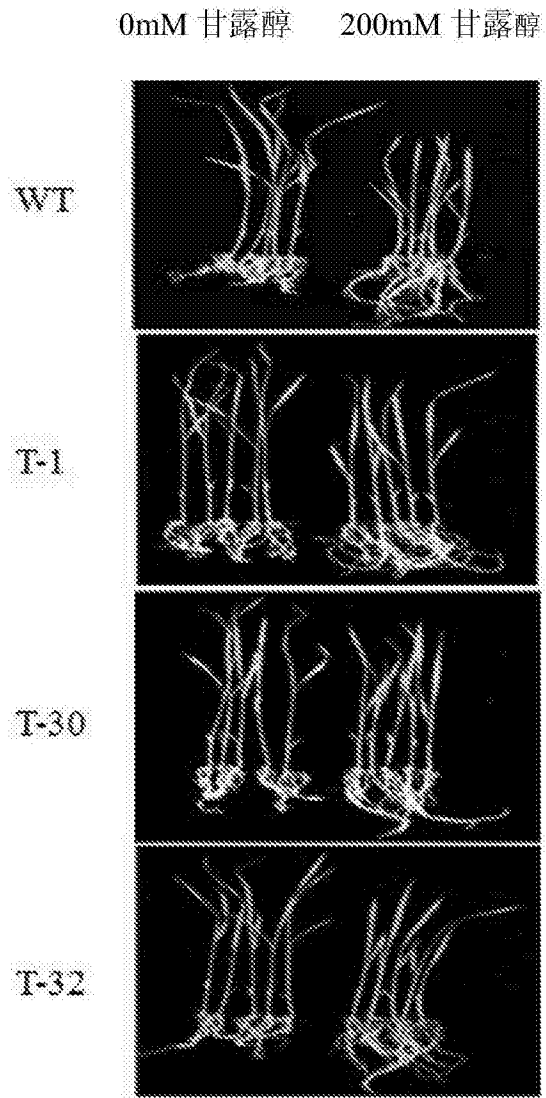


图 5

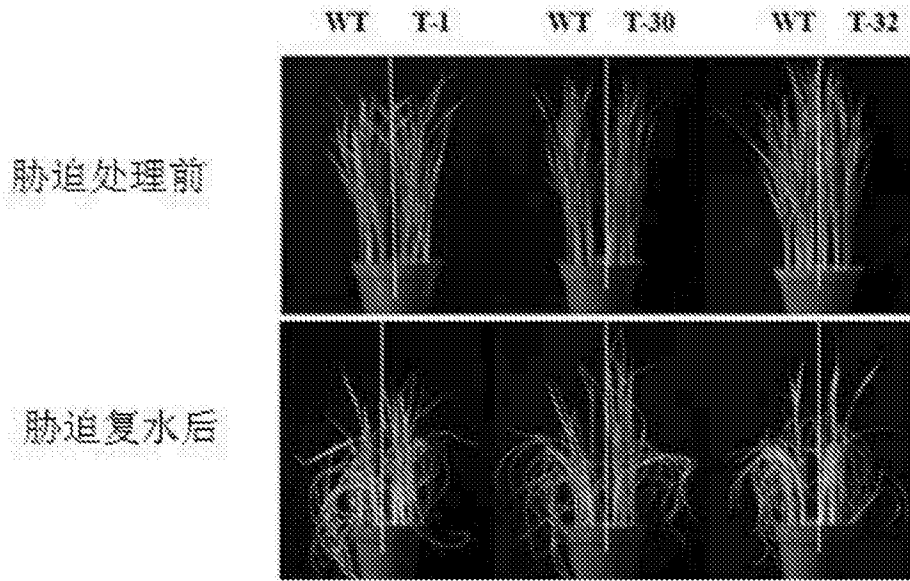


图 6