



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106800594 A

(43) 申请公布日 2017. 06. 06

(21) 申请号 201510845652. X

(22) 申请日 2015. 11. 26

(71) 申请人 中国农业科学院作物科学研究所
地址 100081 北京市海淀区中关村南大街
12 号重大科学工程楼 212

(72) 发明人 孔秀英 贾继增 夏川 张立超
段佳磊 吴佳洁 刘越 肖建会

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 何叶喧

(51) Int. Cl.

C07K 14/415(2006. 01)

C12N 15/29(2006. 01)

C12N 15/82(2006. 01)

C12N 1/21(2006. 01)

A01H 5/00(2006. 01)

权利要求书1页 说明书11页
序列表4页 附图6页

(54) 发明名称

小麦太谷核不育基因 *ms2* 及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种小麦太谷核不育基因 *ms2* 及其应用。本发明提供的蛋白质,命名为 *ms2* 蛋白,是如下 (a) 或 (b): (a) 由序列表中序列 1 所示的氨基酸序列组成的蛋白质; (b) 将序列 1 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 / 或添加且与植物雄性不育和 / 或致死相关的由序列 1 衍生的蛋白质。本发明提供了具有致死作用的 *ms2* 蛋白及其编码基因,用花药特异性启动子或花药特异性启动子驱动 *ms2* 基因在出发植物中表达,可以获得具有雄性不育表型的转基因植物。本发明对于植物育种具有重大价值。

1. 一种蛋白质,是如下 (a) 或 (b) :
 - (a) 由序列表中序列 1 所示的氨基酸序列组成的蛋白质 ;
 - (b) 将序列 1 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 / 或添加且与植物雄性不育和 / 或致死相关的由序列 1 衍生的蛋白质。
2. 编码权利要求 1 所述蛋白质的基因。
3. 如权利要求 2 所述的基因,其特征在于 :所述基因为如下 1) 或 2) 或 3) 的 DNA 分子 :
 - 1) 编码区如序列表中序列 2 所示的 DNA 分子 ;
 - 2) 在严格条件下与 1) 限定的 DNA 序列杂交且编码植物雄性不育和 / 或致死相关蛋白的 DNA 分子 ;
 - 3) 与 1) 或 2) 限定的 DNA 序列具有 90% 以上同源性且编码植物植物雄性不育和 / 或致死相关蛋白的 DNA 分子。
4. 含有权利要求 2 或 3 所述基因的重组表达载体、表达盒、转基因细胞系或重组菌。
5. 权利要求 1 所述蛋白质的应用,为如下 (c1) 至 (c5) 中的至少一种 :
 - (c1) 促使植物发生雄性不育 ;
 - (c2) 致死植物组织 ;
 - (c3) 致死植物花药 ;
 - (c4) 致死植物花粉 ;
 - (c5) 致死植物。
6. 一种培育转基因植物的方法,是将权利要求 2 或 3 所述基因导入目的植物中,得到雄性不育的转基因植物。
7. 一种培育转基因植物的方法,是将特异表达盒导入目的植物中,得到转基因植物 ;所述特异表达盒中,由组织特异性启动子驱动权利要求 2 或 3 所述基因的表达 ;所述转基因植物中,与所述组织特异性启动子对应的组织被致死。
8. 如权利要求 7 所述的方法,其特征在于 :所述组织特异性启动子为花药特异性启动子或花粉特异性启动子。
9. 权利要求 1 所述蛋白质,或,权利要求 2 或 3 所述基因,或权利要求 4 所述重组表达载体、表达盒、转基因细胞系或重组菌,或,权利要求 6 或 7 或 8 所述方法,在植物育种中的应用。
10. 如权利要求 9 所述的应用,其特征在于 :所述植物育种的目的是培育雄性不育植物或特异组织被致死的植物。

小麦太谷核不育基因 ms2 及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种小麦太谷核不育基因 ms2 及其应用。

背景技术

[0002] 植物雄性不育是一种常见的自然现象。雄性不育在农业生产上有着十分广泛的用途,包括杂种优势的利用,轮回选择育种等,因此具有巨大的经济价值。雄性不育通常受基因控制,按不育的显隐性可分为显性不育突变与隐性不育突变两大类,其中显性核不育突变更为少见,目前还没有显性核不育基因被图位克隆的报道,因此还不清楚其败育产生的机制。

[0003] 小麦是我国的主要粮食作物,在小麦中已鉴定并命名的核不育基因有 17 个。ms1 为隐性不育基因,位于 4BS 染色体上,它有 7 个等位基因。ms2(也有写作 Ms2),即太谷核不育基因,显性核不育基因,位于 4DS 染色体上。ms3,显性核不育基因,位于 5AS 染色体上。ms4,显性核不育基因,位于 4DS 染色体上,根据与着丝粒之间的重组距离判断 ms4 不同于 ms2。ms5,位于 3A 染色体上。光温敏核不育基因 wptms1 (5B)、wptms2 (2B)、wtms1 (2B) 分别位于 5B、2B 和 2B 染色体上。显性核不育基因 Ms1376 和在杂交小麦中不育基因 Shw 尚未被定位。上述基因均尚未被克隆。

[0004] 太谷核不育小麦是我国科技人员高忠丽 1972 年在小麦高代品系繁殖田中发现的单显性核基因天然突变体,其特点是雄性败育稳定、彻底、异交结实率高,稳定性好,不受环境条件影响,是世界上发现的第一个小麦显性核不育材料,在国内外引起了很大的影响,被称为我国的“国宝”,严禁对外交换与提供。1980 年,中国农业科学院作物科学研究所的王琳清、邓景阳先生将控制太谷核不育小麦性状的基因分别命名为 223、Ta1。1986 年该所刘秉华先生等利用端体分析等方法将 Ta1 定位到小麦 4D 染色体的短臂上距着丝点 31.16 个交换单位,同年国际小麦遗传组织正式给予的基因符号为 ms2。太谷核不育小麦是进行轮回选择育种的非常有价值的育种材料。自太谷核不育材料发现以来,我国成立了太谷核不育轮回选择育种协作组,育成了一批优良小麦新品种。刘秉华等(1991)利用我国特有的矮秆资源矮变一号(携带的矮秆基因为 Rht10)与太谷核不育小麦做杂交,培育了矮败小麦。在矮败小麦中,矮秆基因 Rht10 与不育基因 ms2 紧密连锁,因此,矮败小麦是具有矮秆基因标记的太谷核不育小麦,它继承了太谷核不育小麦雄性败育彻底、不育性稳定、异交结实率高的优点,克服了太谷核不育小麦早期育性难于鉴定的困难,同时也避免了轮选群体株高渐升的弊端,是理想的轮回选择工具。利用矮败小麦,刘秉华先生创立了矮败小麦轮回选择技术,构建矮败小麦高效育种平台,利用矮败小麦可以使数十个甚至上千个亲本的基因进行大规模的反复重组,并不断优化,进而使群体得到改良,极大地提高育种效率。矮败小麦创制以来,利用矮败小麦高效育种方法育成国家或省级审定新品种 42 个,累计推广 1.85 亿亩,累计增产小麦 56 亿公斤,创造了巨大的社会效益和经济效益。“矮败小麦及其高效育种方法的创建与应用”获 2010 年国家科技进步一等奖。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种小麦太谷核不育基因 ms2 及其应用。

[0006] 本发明提供的蛋白质, 获自矮败小麦, 命名为 ms2 蛋白, 是如下 (a) 或 (b) :

[0007] (a) 由序列表中序列 1 所示的氨基酸序列组成的蛋白质 ;

[0008] (b) 将序列 1 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 / 或添加且与植物雄性不育和 / 或致死相关的由序列 1 衍生的蛋白质。

[0009] 为了使 (a) 中的蛋白质便于纯化, 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。

[0010] 表 1 标签的序列

[0011]

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

[0012] 上述 (b) 中的蛋白质可人工合成, 也可先合成其编码基因, 再进行生物表达得到。上述 (b) 中的蛋白质的编码基因可通过将序列表中序列 2 所示的 DNA 序列中缺失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。

[0013] 编码所述 ms2 蛋白的基因 (命名为 ms2 基因) 也属于本发明的保护范围。

[0014] 所述基因具体可为如下 1) 或 2) 或 3) 的 DNA 分子 :

[0015] 1) 编码区如序列表中序列 2 所示的 DNA 分子 ;

[0016] 2) 在严格条件下与 1) 限定的 DNA 序列杂交且编码植物雄性不育和 / 或致死相关蛋白的 DNA 分子 ;

[0017] 3) 与 1) 或 2) 限定的 DNA 序列具有 90% 以上同源性且编码植物植物雄性不育和 / 或致死相关蛋白的 DNA 分子。

[0018] 上述严格条件可为在 $6\times\text{SSC}$ 、0.5% SDS 的溶液中, 在 65°C 下杂交, 然后用 $2\times\text{SSC}$ 、0.1% SDS 和 $1\times\text{SSC}$ 、0.1% SDS 各洗膜一次。

[0019] 含有所述 ms2 基因的重组表达载体、表达盒、转基因细胞系或重组菌均属于本发明的保护范围。

[0020] 可用现有的植物表达载体构建含有 ms2 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。所述植物表达载体还可包含外源基因的 3' 端非翻译区域, 即包含聚腺苷酸信号和任何其它参与 mRNA 加工或基因表达的 DNA 片段。所述聚腺苷酸信号可引导聚腺苷酸加入到 mRNA 前体的 3' 端。使用 ms2 基因构建重

组表达载体时,在其转录起始核苷酸前可加上任何一种增强型启动子或组成型启动子或组织特异性启动子(例如花粉特异性启动子),它们可单独使用或与其它植物启动子结合使用;此外,使用 ms2 基因构建重组表达载体时,还可使用增强子,包括翻译增强子或转录增强子,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,如加入可在植物中表达的编码可产生颜色变化的酶或发光化合物的基因、具有抗性的抗生素标记物或是抗化学试剂标记基因等。从转基因植物的安全性考虑,可不加任何选择性标记基因,直接以表型筛选转化植株。

[0021] 所述重组表达载体具体可为重组质粒 pGW-CUbi1390-ms2。

[0022] 重组质粒 pGW-CUbi1390-ms2 的构建方法具体如下:

[0023] (1) 以矮败小麦的花药的 cDNA 为模板,采用 F1 和 R1 组成的引物对进行 PCR 扩增,得到 PCR 扩增产物;F1 :5' -GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT ATGGCAGGGCACCACAG-3';R1 :5' -GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TCAACTTGAGAATGCTG-3' ;

[0024] (2) 使步骤(1)得到的 PCR 扩增产物与入门载体 Gateway® pDONR™/Zeo 发生 BP 反应,得到含有序列表的序列 2 所示双链 DNA 分子的重组质粒。

[0025] (3) 取步骤(2)得到的重组质粒,使其与目标载体 pGW-CUbi1390 发生 LR 反应,得到在目标载体 pGW-CUbi1390 中插入序列列表的序列 2 所示双链 DNA 分子的重组质粒,即为重组质粒 pGW-CUbi1390-ms2。

[0026] 目标载体 pGW-CUbi1390 的构建方法:用限制性内切酶 PmlI 酶切 pCUbi1390 载体,得到线性化载体;利用 Gateway® Vector Conversion System,将 gateway cassette A(平端)连入线性化载体,得到目标载体 pGW-CUbi1390。

[0027] 本发明还保护所述 ms2 蛋白的应用,为如下(c1)至(c5)中的至少一种:

[0028] (c1) 促使植物发生雄性不育;

[0029] (c2) 致死植物组织;

[0030] (c3) 致死植物花药;

[0031] (c4) 致死植物花粉;

[0032] (c5) 致死植物。

[0033] 所述植物可为单子叶植物或双子叶植物。所述单子叶植物具体可为小麦,例如 Fielder 小麦。

[0034] 本发明还保护一种培育转基因植物的方法,是将所述 ms2 基因导入目的植物中,得到雄性不育的转基因植物。所述植物可为单子叶植物或双子叶植物。所述单子叶植物具体可为小麦,例如 Fielder 小麦。所述方法中,所述 ms2 基因由花药特异性启动子或花粉特异性启动子驱动表达。

[0035] 本发明还保护一种培育转基因植物的方法,是将特异表达盒导入目的植物中,得到转基因植物;所述特异表达盒中,由组织特异性启动子驱动所述 ms2 基因的表达;所述转基因植物中,与所述组织特异性启动子对应的组织被致死。所述组织特异性启动子具体可为花药特异性启动子或花粉特异性启动子。所述转基因植物具体可为具有雄性不育表型的植物。所述植物可为单子叶植物或双子叶植物。所述单子叶植物具体可为小麦,例如

Fielder 小麦。

[0036] 本发明还保护所述 ms2 蛋白、所述 ms2 基因、所述重组表达载体、所述表达盒、所述转基因细胞系、所述重组菌或所述方法,在植物育种中的应用。所述植物育种的目的是为培育雄性不育植物或特异组织被致死的植物。所述特异组织具体可为花药或花粉。

[0037] 作为基因符号, ms2 基因早就被提出来了,但其序列一直未被发现。本发明提供了具有致死作用的 ms2 蛋白及其编码基因,用花药特异性启动子或花药特异性启动子驱动 ms2 基因在出发植物中表达,可以获得具有雄性不育表型的转基因植物。本发明对于植物育种具有重大价值。

附图说明

[0038] 图 1 为雄性可育单株和雄性不育单株花药的形态和开花时穗子形态。

[0039] 图 2 为雄性可育单株和雄性不育单株花药发育减速分裂时期的显微结构。

[0040] 图 3 为雄性可育单株和雄性不育单株花药表面扫描电镜图。

[0041] 图 4 为矮败小麦 / 中国春小麦近等基因系 BAC 文库插入片段脉冲电泳检测及插入片段频率分布图。

[0042] 图 5 为太谷核不育基因区域物理图谱构建及比较分析。

[0043] 图 6 为 ms2 基因在太谷核不育小麦近等基因系中的表达分析。

[0044] 图 7 为 ms2 基因的结构示意图。

[0045] 图 8 为实施例 4 中 ms2 基因的致死效应的结果 ;A :再生培养过程中的照片 ;B :PCR 鉴定结果,泳道 N 代表以水为模板的空白对照。

[0046] 图 9 为实施例 5 中 ms2 基因与雄性不育的关系的结果。

具体实施方式

[0047] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0048] 太谷核不育小麦:参考文献:邓景扬,高忠丽,小麦显性核不育基因的发现与利用-太谷核不育小麦鉴定总结,作物学报,1980,(2):85-98;公众可从中国农业科学院作物科学研究所获得,该生物材料只为重复本发明的相关实验所用,不可作为其它用途使用。

[0049] 中国春小麦 (Chinese Spring):参考文献:P. Sourdille, T. Cadalen, H. Guyomarc'h, J. Snape, M. Perretant, G. Charmet, C. Boeuf, S. Bernard and M. Bernard. (2003) An update of the Courtot×Chinese Spring intervarietal molecular marker linkage map for the QTL detection of agronomic traits in wheat. Theoretical and Applied Genetics 106 (3):530-538;公众可从中国农业科学院作物科学研究所获得,该生物材料只为重复本发明的相关实验所用,不可作为其它用途使用。

[0050] 矮败小麦:参考文献:刘秉华,杨丽.“矮败”小麦的选育及利用前景.科学通报,1991,36(4):306-308.;公众可从中国农业科学院作物科学研究所获得,该生物材料只为重复本发明的相关实验所用,不可作为其它用途使用。

[0051] Fielder 小麦 (*Triticumaestivum* L.): Yuji Ishida, Masako Tsunashima, YukohHiei, Toshihiko Komari; Wheat (*Triticumaestivum* L.) transformation using immature embryos.; Methods in Molecular Biology, Volume 1223, 2015, pp 189-198; Editors: Kan Wang; Publisher: Springer, New York; doi:10.1007/978-1-4939-1695-5_15; 公众可从中国农业科学院作物科学研究所获得, 该生物材料只为重复本发明的相关实验所用, 不可作为其它用途使用。

[0052] Gateway® BP Clonase® II Enzyme mix 为 Life Technologies 的产品, 产品目录号为 11789-020。Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix 为 Life Technologies 的产品, 产品目录号为 11791-020。Gateway® Vector Conversion System 为 Life Technologies 的产品, 产品目录号为 11828-019。入门载体 Gateway® pDONR™/Zeo Vector 为 Life Technologies 的产品, 产品目录号为 12535-035。大肠杆菌 TOP10 感受态细胞为北京全式金生物技术有限公司的产品。根癌农杆菌 EHA105 为北京华越洋生物科技有限公司的产品, 产品目录号为 GX0133-100。Zeocin 即博来霉素。

[0053] pCubi1390 载体: 参考文献: 彭昊. 利用 T-DNA 插入突变和 RNA 干扰技术研究水稻基因功能. 中国农业科学院博士学位论文 P43-44. 2005; 公众可从中国农业科学院作物科学研究所获得, 该生物材料只为重复本发明的相关实验所用, 不可作为其它用途使用。

[0054] 实施例 1、近等基因系的获得

[0055] 一、太谷核不育小麦 / 中国春近等基因系的获得

[0056] 1、将太谷核不育小麦 (母本) 和中国春 (父本) 进行杂交, 收获子代。

[0057] 2、将步骤 1 收获的子代中的雄性不育株 (母本) 和中国春 (父本) 进行回交, 收获子代。

[0058] 3、将步骤 2 收获的子代中的雄性不育株 (母本) 和中国春 (父本) 进行回交, 收获子代。

[0059] 4、将步骤 3 收获的子代中的雄性不育株 (母本) 和中国春 (父本) 进行回交, 收获子代。

[0060] 5、将步骤 4 收获的子代中的雄性不育株 (母本) 和中国春 (父本) 进行回交, 收获子代。

[0061] 6、将步骤 5 收获的子代中的雄性不育株 (母本) 和中国春 (父本) 进行回交, 收获子代。

[0062] 7、将步骤 6 收获的子代中的雄性不育株 (母本) 和中国春 (父本) 进行回交, 收获子代。

[0063] 8、将步骤 7 收获的子代中的雄性不育株 (母本) 和中国春 (父本) 进行回交, 收获子代。

[0064] 9、将步骤 8 收获的子代中的雄性不育株 (母本) 和中国春 (父本) 进行回交, 收获子代。

[0065] 10、将步骤 9 收获的子代中的雄性不育株 (母本) 和中国春 (父本) 进行回交, 收获子代。

[0066] 11、将步骤 10 收获的子代中的雄性不育株 (母本) 和中国春 (父本) 进行回交,

收获子代（该子代群体即为太谷核不育小麦 / 中国春近等基因系）。

[0067] 二、其他近等基因系的获得

[0068] 采用不同的父本和 / 或母本，其他同步骤一。

[0069] 实施例 2、花药发育的形态及显微和电镜结构观察

[0070] 在太谷核不育小麦 / 中国春近等基因系植株的旗叶抽出后，分别采集雄性可育单株和雄性不育单株的不同长度的小麦幼穗，利用体式显微镜观察花药发育不同时期的形态。照片见图 1。在幼穗小于 3cm 时（花药由花药原基逐渐分化出五层细胞），雄性不育株和雄性可育株的小穗中花药的形态相似，无明显差异。在 3.2cm 幼穗中（花药五层细胞已分化完全，花粉母细胞进入减数分裂前期），雄性不育株和雄性可育株的花药的颜色、花药大小表现出差异。在 4.5cm 幼穗中（花粉母细胞即将完成减数分裂），雄性不育株和雄性可育株的花药的颜色、花药大小差异更加明显，雄性可育株花药继续发育，而雄性不育株花药的大小不再变化。在 10cm 幼穗中（花药中小孢子发育成熟），雄性可育株花药即将成熟开裂，雄性不育株花药已经完全干瘪退化。散粉时，观察雄性不育株和雄性可育株成熟的穗子和花药，可以看出雄性不育株的穗子蓬松、颖壳保持张开、没有花药，雄性可育株开花正常、花丝伸长好、花药正常散粉、散粉后颖壳闭合。

[0071] 分别取太谷核不育小麦 / 中国春近等基因系中的雄性可育单株和雄性不育单株，对生长至不同长度的小穗进行固定，观察花药在不同发育时期半薄切片的结果。照片见图 2(A-E:可育单株;F-J:不育单株;A,F:细线期;B,G:双线期;C,H:减数分裂 I 中期;D,I:二分体;E,J:单核液泡化中期;Bar = 50 μ M)。当花药发育至减数分裂 I 前期时（图 2A、2B、2F、2G），雄性可育株和雄性不育株的花药在结构上没有区别，雄性不育株的花药同样可以正常分化出表皮、药室内壁、中层、绒毡层和花粉母细胞五层细胞，雄性可育株和雄性不育株的花药的各层细胞发育都没有明显差异。当花药发育至减数分裂 I 中期时（图 2C、2H）：雄性可育株的花药中花粉母细胞形成纺锤体，染色体排列于赤道面上，细胞沿纺锤体两极延伸，其余四层细胞结构完整排列整齐；雄性不育株的花药的结构形态则产生了明显异常，花粉母细胞的形状不规则，纺锤体虽然形成但是结构不清晰，中层细胞提前退化，从这一时期开始不育花药的发育明显受到了影响。当花药发育至减数分裂 I 末期即二分体时期时（图 2D、2I）：雄性可育株花药花粉母细胞形成二分体，其余四层细胞结构均完整；雄性不育株花药的各层细胞已经发生了剧烈的变异，大部分二分体细胞逐渐解体，中层细胞消失，表皮、药室内壁、绒毡层的细胞向药室内塌陷，雄性不育株花药无法完成减数分裂过程。当雄性可育株花药发育至单核小孢子时期时（2E），雄性不育株花药的花粉母细胞连同中层以及绒毡层都已经逐渐退化消失（2J），只剩下萎缩在一起的药室内壁和表皮。

[0072] 分别取太谷核不育小麦 / 中国春近等基因系中的雄性可育单株和雄性不育单株，对来自 4-6cm 幼穗的花药表面进行电镜扫描观察。照片见图 3(A, C:4cm 可育幼穗的花药;E, G:4cm 可育幼穗的花药表面的局部放大;B, D:6cm 不育幼穗的花药;F, H:6cm 不育幼穗的花药表面的局部放大)。来自 4cm 幼穗的雄性不育株花药比雄性可育株花药略小，但是花药外壁结构并无明显差异。来自 6cm 幼穗的雄性可育株与雄性不育株花药大小以及外壁结构有明显差异，雄性可育株花药长度约为雄性不育株花药的 2 倍，并且花药外壁有大量角质累积，雄性不育株花药外壁仍光滑。

[0073] 实施例 3、太谷核不育基因（ms2 基因）的发现过程

[0074] 一、以矮败小麦 / 中国春近等基因系为材料构建 BAC 文库。

[0075] 将矮败小麦 / 中国春小麦近等基因系的种子置于湿润的滤纸上,并于培养皿内萌发,萌发的种子播种于营养土中,生长一周后喷洒 50ppm 的赤霉酸 (GA3) 处理幼苗,一周后即可区分出矮秆植株和高秆植株。当幼苗生长到三周后,取矮秆植株幼苗迅速用液氮冷冻,保存于超低温冰箱中备用。提取高质量大片段基因组 DNA,经 HindIII 部分酶切、100-400kb 的 DNA 片段选择、电洗脱、DNA 与载体 pIndigo BAC-5 (Epicentre, BACH095H) 的连接、连接产物的电转化 (将 2 μ l 连接产物与 18-20 μ l Gibco BRL 公司的 ElectroMax DH10BTM 感受态细胞混匀,加入到经过处理的电转化杯中进行,采用 Gibco BRL 公司的 Cell-Porator Electroporation System 进行转化)、电击,结束后将垫片中的感受态细胞取出,加入 1ml SOC 培养基中,于 37 $^{\circ}$ C, 225rpm 下复苏 1 小时,取适量复苏液涂布于含有 12.5 μ g/ml 的氯霉素 (CMR)、14 μ g/ml IPTG 和 60 μ g/ml X-gal 的 LB 固体选择培养基 (X/I/C) 表面,于 37 $^{\circ}$ C 培养 24-36 小时。利用所建立的高效 BAC 文库转化体系将上述连接液进行大量转化。转化后每 250 μ l SOC 复苏液涂一块平板,以使其生长的克隆数在 2500 左右。用 LB 液体选择培养基将菌落全部冲洗下来,混匀后加甘油使其终浓度达到 15% 制成 BAC 混合池。总共收集了 497 个 BAC 混合池。矮败 / 中国春近等基因系 BAC 文库约有 1945460 个 BAC 克隆,平均插入片段为 118Kb (见图 4;图 4 中, A 为 BAC 文库插入片段脉冲电泳检测, M 为 Lamda ladder PFG Marker, Vector 为带有 HindIII 克隆位点的 pIndigoBAC-5;图 4 中, B 为 BAC 文库插入片段频率分布图),覆盖小麦基因组的大约 12.7 倍。

[0076] 利用 PCR 方法,依据小麦与水稻和短柄草共线性关系,选择目标基因区域内的基因,设计 4D 特异的引物,用于 BAC 文库的筛选。构建 BAC shotgun 文库和 BAC 亚克隆测序。利用 BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit,在 ABI3730XL 测序仪上进行测序 (Applied Biosystems, Foster, CA)。每个 BAC 测 10 倍以上的覆盖率,用 Lasergene suite 7.1 中的 SeqMan 软件 (DNASTAR, Madison, AL) 对序列进行组装。

[0077] 二、太谷核不育基因 (ms2 基因) 的克隆

[0078] 1、在目标基因区域开发新的分子标记

[0079] 基因图位克隆的关键是不断寻找在遗传距离上逐渐靠近目标基因的分子标记。太谷核不育基因位于小麦 4DS 染色体上,该染色体在小麦中多态性最低,因此开发新的分子标记逼近 ms2 基因的难度非常大。主要是通过水稻、短柄草、粗山羊草 D 基因组序列比对分析、BAC 文库筛选及 BAC 亚克隆测序、目标区段基因及基因间的 PCR 扩增测序、太谷核不育近等基因系 RNA-Seq 测序的方法,开发 SSR、ISBP、SNP 等分子标记来逼近目标基因。

[0080] 2、太谷核不育基因区域物理图谱的构建及候选基因确定

[0081] 利用目标基因两侧分子标记 S1102 和 S1277 比对水稻和短柄草基因组序列,将目标基因锁定在水稻第 9 染色体 22660725bp-22719930bp, (即在 59.2kb 区间内,该区间共有 17 个基因),对应短柄草的 43385015-43444531bp (即在 59.5kb 区间内,该区间共有 14 个基因,这一区段对应粗山羊草 D 基因组高密度遗传图第 4 染色体 bin2-bin5 之间的 scaffold)。利用上述共线性区段内的水稻、短柄草基因序列,比对粗山羊草 D 基因组的序列草图获得 scaffold 序列,利用所获得的 scaffold 序列开发了 707 对 SSR 引物,其中 Am3 近等基因系可育池和不育池之间具有多态性引物 79 个。利用这些 SSR 标记对 Am3 近等基因系群体的重组单株进行检测,将 ms2 基因锁定在 5 个 scaffold 序列的区段之内,其中 M3 和

M7 标记与 ms2 基因之间的遗传距离为 0,为进一步逼近 ms2 基因,进一步扩大群体以重组单株数目表示标记逼近目标基因的情况(见图 5)。在 Am3 大群体中 2-0-1 重组的标记位于 D 基因组的 3 个 scaffold 中(S7071、S118155、S80695),对应六倍小麦矮败中国春的 BAC E18 和 N6。再结合中国春各条染色体的测序结果(<https://urgi.versailles.inra.fr/blast/blast.php>),共在 2-0-1 重组区段的序列内预测出 20 余个基因。将这些基因比对太谷核不育小麦近等基因系转录组数据库,发现在目标区域内的 20 多个预测基因中只有 1 个基因表达量存在显著差异。

[0082] 利用 RT-PCR 和 Real-time PCR 对该基因在太谷核不育小麦/中国春近等基因系、太谷核不育小麦/豫麦 18 近等基因系、太谷核不育小麦/偃展 1 号近等基因系及太谷核不育小麦/郑麦 98 近等基因系的雄性可育株与雄性不育株花药中的表达量差异进行进一步的验证,该基因在雄性可育株花药中几乎不表达,在雄性不育株花药中高表达(见图 6:A-D:RT-PCR 结果;E-H:Real-time PCR 结果;1:雄性可育株花药;2:雄性不育株花药;A,E:太谷核不育小麦/中国春近等基因系;B,F:太谷核不育小麦/豫麦 18 近等基因系;C,G:太谷核不育小麦/偃展 1 号近等基因系;D,H:太谷核不育小麦/郑麦 98 近等基因系),因此推测该基因即为 ms2 基因。

[0083] 3、太谷核不育基因的序列与结构分析

[0084] ms2 基因的开放阅读框如序列表的序列 2 所示(882bp),编码序列表的序列 1 所示的蛋白质(由 293 个氨基酸残基组成)。

[0085] ms2 基因全长为 4078bp,由 8 个外显子组成,基因结构如图 7 所示(方框代表外显子,实线代表内含子)。ms2 基因与粗山羊草基因序列同源性为 99%,与乌拉尔图小麦基因序列的同源性为 89%。虽然 ms2 与乌拉尔图小麦对应的基因序列有较高的相似性,但预测出的基因编码区差异很大,编码的蛋白相似性很低。通过与 NCBI 数据中的 DNA 与蛋白序列的比对分析,ms2 基因序列及其编码的蛋白序列与其他物种的基因及蛋白均既没有同源性,也不含有保守的结构域,是一个特殊结构的基因。

[0086] 实施例 4、ms2 基因的致死效应

[0087] 一、重组质粒 pGW-CUbi1390-ms2 的构建

[0088] 1、attB 引物设计

[0089] 设计并合成如下引物:

[0090] F1 :5' -GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT ATGGCAGGGCACCACAG-3' ;

[0091] R1 :5' -GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TCAACTTGAGAATGCTG-3'。

[0092] F1 中的下划线标注 attB1 重组位点,R1 中的下划线标注 attB2 重组位点。

[0093] 2、提取矮败小麦的花药的总 RNA 并反转录为 cDNA。

[0094] 3、以步骤 2 得到的 cDNA 为模板,采用 F1 和 R1 组成的引物对进行 PCR 扩增,得到 PCR 扩增产物。经测序,PCR 扩增产物中,attB1 重组位点和 attB2 重组位点之间的核苷酸如序列表的序列 2 所示。

[0095] 4、进行 BP 反应,得到 BP 反应产物。

[0096] BP 反应体系:步骤 3 得到的 PCR 扩增产物 25ng、入门载体 Gateway® pDONR™/Zeo 40ng、Gateway® BP Clonase® II Enzyme mix 0.3 μL,加灭菌 ddH₂O 补足体系至 2.5 μL。

[0097] BP 反应程序:25℃ 反应 10h。

[0098] 5、将 2.5 μ L 步骤 4 得到的 BP 反应产物加入到 30 μ L 大肠杆菌 TOP10 感受态细胞液中,冰浴 15min,42 $^{\circ}$ C 热激 90s,然后迅速置于冰上 2min;加入 500 μ L SOC 培养基,在 37 $^{\circ}$ C、225rpm 条件下复苏 50min,得到复苏液;将复苏液均匀涂布于含 30 μ g/mL 博来霉素的 LB 固体培养基表面,37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜。入门载体 Gateway[®] pDONR[™]/Zeo 自身带有致死基因,携带入门载体 Gateway[®] pDONR[™]/Zeo 的重组菌不能在培养基上生存,通过 BP 反应目标基因片段会取代致死基因,所以在培养基上生存的重组菌即为含有序列表的序列 2 所示的目标基因的入门克隆 (entry clone)。

[0099] 6、取步骤 5 得到的入门克隆,提取质粒并进行双向测序验证,测序验证所用引物为入门载体 Gateway[®] pDONR[™]/Zeo 通用引物,序列如下:

[0100] M13F :5' -GTAAAACGACGGCCAG-3' ;

[0101] M13R :5' -CAGGAAACAGCTATGAC-3'。

[0102] 经测序验证正确的具有序列列表的序列 2 所示的双链 DNA 分子的重组质粒命名为入门质粒。

[0103] 7、进行 LR 反应,得到 LR 反应产物。

[0104] 目标载体 pGW-CUbi1390 的构建:用限制性内切酶 PmlI(平末端酶)酶切 pCUbi1390 载体,得到线性化载体;利用 Gateway[®] Vector Conversion System,将 gateway cassette A(平端)连入线性化载体(具体的方法为 Gateway[®] Vector Conversion System 标准流程,可从 Life Technologies 主页下载),得到目标载体 pGW-CUbi1390。

[0105] LR 反应体系:入门质粒 25ng、目标载体 pGW-CUbi1390 40ng、Gateway[®] LR Clonase[®] II Enzyme mix 0.3 μ L,加灭菌 ddH₂O 补足体系至 2.5 μ L。

[0106] LR 反应程序:25 $^{\circ}$ C 反应 10h。

[0107] 8、将 2.5 μ L 步骤 7 得到的 LR 反应产物加入 30 μ L 大肠杆菌 TOP10 感受态细胞液中,冰浴 15min,42 $^{\circ}$ C 热激 90s,然后迅速置于冰上 2min;加入 500 μ L SOC 培养基,在 37 $^{\circ}$ C、225rpm 条件下复苏 50min,得到复苏液;将复苏液均匀涂布于含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基表面,37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜。目标载体 pGW-CUbi1390 自身带有致死基因,携带目标载体 pGW-CUbi1390 的重组菌不能在培养基上生存,通过 LR 反应目标基因片段会取代致死基因,所以在培养基上生存的重组菌即为含有序列表的序列 2 所示的目标基因的目标克隆 (Destiantion clone)。

[0108] 9、取步骤 8 得到的目标克隆,提取质粒并进行双向测序验证,测序验证所用引物为 pGW-CUbi1390 载体插入片段两端启动子区及终止区引物,序列如下:

[0109] Pubi :5' -TTTGTCGATGCTCACCTG-3' ;

[0110] Tnos :5' -TTGCCAAATGTTTGAACGA-3'。

[0111] 将经测序验证正确的具有序列列表的序列 2 所示的双链 DNA 分子的重组质粒命名为 pGW-CUbi1390-ms2。重组质粒 pGW-CUbi1390-ms2 中,由玉米 Ubiquitin 启动子(组成型启动子)驱动 ms2 基因超表达。

[0112] 二、重组质粒 pGW-CUbi1390-gus 的构建

[0113] 用序列列表的序列 3 所示的 gus 基因代替序列列表的序列 2 所示的 ms2 基因,其他同步骤一,得到重组质粒 pGW-CUbi1390-gus。

[0114] 三、转 ms2 基因试验

[0115] 采用 PureWheat 方法进行农杆菌介导的小麦遗传转化 (Yuji Ishida, Masako Tsunashima, Yukoh Hiei, Toshihiko Komari Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using immature embryos. *Methods in Molecular Biology*, Volume 1223, 2015, pp 189-198 ;Editors: Kan Wang ;Publisher: Springer, New York ;doi:10.1007/978-1-4939-1695-5_15), 将重组质粒 pGW-CUbi1390-ms2 导入 Fielder 小麦的胚性愈伤组织, 具体步骤如下:

[0116] 1、将重组质粒 pGW-CUbi1390-ms2 导入根癌农杆菌 EHA105, 得到重组农杆菌。

[0117] 2、Fielder 小麦开花 15 天后, 取种子, 用 1% 次氯酸钠水溶液消毒 10 分钟后取幼胚。

[0118] 3、完成步骤 2 后, 取幼胚, 在步骤 1 得到的重组农杆菌的菌悬液中室温浸泡 5min。

[0119] 4、完成步骤 3 后, 取幼胚, 23℃、黑暗条件下共培养 5 天。

[0120] 5、完成步骤 4 后, 取幼胚, 25℃、黑暗条件下恢复培养 5 天。

[0121] 6、完成步骤 5 后, 取幼胚, 先置于 25℃、黑暗条件下筛选 14 天, 再置于 25℃、黑暗条件下筛选 21 天。筛选采用草铵膦进行, 第一次筛选的草铵膦浓度为 5mg/L, 第二次筛选的草铵膦浓度为 10mg/L。此时, 愈伤组织增殖, 开始形成幼芽。

[0122] 8、完成步骤 7 后, 取具有幼芽的幼胚, 25℃、光照 ($68 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) 条件下进行再生培养。发现所有幼芽均不能继续生长, 导致不能获得再生幼苗。照片见图 8A 的左图。

[0123] 9、取步骤 8 中不能继续生长的幼芽, 提取总 RNA 并反转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板, 采用 F2 和 R2 组成的引物对进行 PCR 鉴定, 以检测 ms2 基因的表达情况。采用 Tubulin 基因为内参基因 (用于检测内参基因的引物对由 F3 和 R3 组成)。PCR 鉴定的部分结果见图 8B 的泳道 1 至 3 (泳道 1 至 3 代表不同的幼芽)。不能继续生长的幼芽中均具有 ms2 基因的表达。

[0124] F2 :5' -CTGCTGCATCCGACTAACTATC-3' ;

[0125] R2 :5' -TGAGAATACTGTCCACCAAATC-3' 。

[0126] F3 :5' -TGAGGACTGGTGCTTACCGC-3' ;

[0127] R3 :5' -GCACCATCAAACCTCAGGGA-3' 。

[0128] 结果表明, ms2 基因具有致死效应。

[0129] 四、转 Gus 基因试验

[0130] 用重组质粒 pGW-CUbi1390-gus 代替重组质粒 pGW-CUbi1390-ms2, 步骤 1 至 8 同步骤三的步骤 1 至 8。进行步骤 8 的再生培养时, 所有幼芽均能继续生长并获得再生植株。照片见图 8B 的右图。

[0131] 9、取步骤 8 中能继续生长的幼芽, 提取总 RNA 并反转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板, 采用 F2 和 R2 组成的引物对进行 PCR 鉴定, 以检测 ms2 基因的表达情况。采用 Tubulin 基因为内参基因 (用于检测内参基因的引物对由 F3 和 R3 组成)。结果见图 8B 的泳道 4。能继续生长的幼芽中均不具有 ms2 基因的表达。

[0132] 实施例 5、ms2 基因与雄性不育的关系

[0133] 由于矮败小麦中的矮秆基因和太谷核不育基因紧密连锁, 矮败小麦本身的后代中所有矮秆植株的花药均败育, 不能产生花粉自交结实。为了再次验证确实是 ms2 基因的超

表达引起了花药的败育,进行 EMS 诱变的实验,具体步骤如下:

[0134] 一、配制溶液

[0135] pH7.0 磷酸缓冲液配制:取 60ml 溶液 A 和 40ml 溶液 B 混合,即 pH7.0 磷酸缓冲液;溶液 A:磷酸氢二钠 9.456 克,加水至 1000ml;溶液 B:磷酸二氢钾 9.07 克,加水至 1000ml。

[0136] 0.6% EMS 处理液配制:取 24ml 甲基磺酸乙酯,溶于 4L pH7.0 磷酸缓冲液。

[0137] 0.8% EMS 处理液配制:取 32ml 甲基磺酸乙酯,溶于 4L pH7.0 磷酸缓冲液。

[0138] 二、EMS 诱变

[0139] 采用的种子为矮败小麦(母本)与中国春小麦(父本)的杂交种子。

[0140] 1、取种子,用水室温浸泡 12 小时(2015 年 3 月 8 日 7:00 至 19:00)。

[0141] 2、完成步骤 1 后,将种子分为三组,第一组的 7200 粒种子用 0.6% EMS 处理液室温浸泡 16 小时(3 月 8 日 19:00 至 3 月 9 日 11:00),第二组的 4300 粒种子用 0.8% EMS 处理液室温浸泡 16 小时(3 月 8 日 19:00 至 3 月 9 日 11:00),第三组的 700 粒种子用 pH7.0 磷酸缓冲液室温浸泡 16 小时(3 月 8 日 19:00 至 3 月 9 日 11:00)。

[0142] 3、完成步骤 2 后,取种子,用水洗涤 16 小时。

[0143] 4、完成步骤 3 后,播种,并于播种 30 天后进行出苗率统计。

[0144] 第一组出苗 4431 株,致死率 $(100\% - 4431/7200) = 38.5\%$ 。

[0145] 第二组出苗 2214 株,致死率 $(100\% - 2214/4300) = 48.5\%$ 。

[0146] 第三组出苗 700 株,致死率 = 0%。

[0147] 5、对步骤 4 得到的 7345 株小麦进行花药形态的观察以及结实率的统计,发现多个矮秆植株能够长出含有花粉的花药,套袋后可自交结实。

[0148] 第三组得到的 700 株小麦中的矮秆小麦的自交结实率为 0。

[0149] 第一组和第二组得到的 6645 株小麦中,368 株矮秆小麦的自交结实率大于 0(9 株的自交结实率大于 50%,54 株的自交结实率达到 20% - 50%,64 株的自交结实率在 10% - 20%之间,241 株的自交结实率小于 10%),均在一定程度上恢复了雄性育性。

[0150] 从第一组和第二组得到的 6645 株小麦中,随机取 11 株自交结实率大于 0、花药形态正常的矮秆小麦,剥取花药,提取总 RNA 并反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板检测 ms2 基因的表达水平(方法同实施例 4 的步骤三的 9)。结果见图 9。图 9 中,1 至 11 代表 6645 株小麦中的 11 株自交结实率大于 0、花药形态正常的矮秆小麦,12 代表 6645 株小麦中的一株不育单株,13 代表中国春小麦,14 代表水。结果显示,11 株育性恢复的矮秆小麦中均检测不到 ms2 基因的表达,说明当 ms2 基因不表达时小麦的雄性育性得以恢复。

[0001]

序列表

<110> 中国农业科学院作物科学研究所

<120> 小麦太谷核不育基因 ms2 及其应用

<130> GNCYX151911

<160> 3

<210> 1

<211> 293

<212> PRT

<213> 小麦

<400> 1

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

[0002]

Phe Lys Arg Gly Gly Ser Ser Gly Arg Leu Phe Thr Ala Leu Glu Ile
 130 135 140
 His Leu Arg Asn Glu Pro Gln Val Ala Ile Cys Leu Leu His Pro Thr
 145 150 155 160
 Asn Tyr Leu Tyr Ser Ile Arg Asp Leu Arg Leu Tyr Ile Asp Gln Gly
 165 170 175
 Trp Phe Pro Gly Gly Thr Gln Ala Asn Leu Gly Ala Glu Gln Tyr Gln
 180 185 190
 Asp Pro Asp Val Pro Gly Phe Val Ser Gly Ser Arg Ala Asp Tyr Thr
 195 200 205
 Thr Ile Leu Phe Ser Ser Ser Glu Thr Ile Tyr Asp Gln Gln Ser Ile
 210 215 220
 His Ser Ser Gly Ala Ala Leu Pro Pro His Asp Ala Ser Leu Asp Ala
 225 230 235 240
 Ile Ser His His Leu Phe Ser Glu Asn Asn Ser Thr Pro Glu Phe Gly
 245 250 255
 Gly Gln Tyr Ser His Ala Asp Glu Ile Ser Ile Leu Asn Glu Tyr Tyr
 260 265 270
 Asn Thr Leu Met Gly Thr Asn Ser Asn Ser Gly Leu His Ala Leu Ser
 275 280 285
 Ala Ala Phe Ser Ser
 290

<210> 2

<211> 882

<212> DNA

<213> 小麦

<400> 2

atggcagggc accacagccc ctggcgggcc tggcactgc gtgaaaaaga cacgetggtg 60
 aggtgtctcg tgggatcagg tcccggcggc ggcgctcatg cggggacctt cggecgtgtg 120

[0003]

cggaacttcc tcatccagtt ccgcgaccaa ggaatcccct gggtccecat ctacgagtca	180
accccgggett ggcagcagca atccggcggg ctgctgatec aggattggga eggagacgcc	240
gcggcggagg gagccaaggt gttcttcacg ctcatcacca caaggagggg cggcgccatt	300
aacaggaggg cactgggagg cgggaectgg acaagcaagg ccgcgcccag ggtaggggac	360
gaggtcgccg tcagcacact gtacttcaaa cggggcgggt ccageggcag attattcacc	420
gccttggaga tccatctcag aaacgagecc caagttgcta tctgcctget gcatecgaet	480
aactatctgt atagcattcg ggatttgagg ctctacatcg accagggatg gttcccgga	540
ggaacteaag caaacctggg cgcggagcaa tatcaagate ctgatgttc tggattcgtg	600
agtggttcac gtgctgatta caccactatt ctgttttcta gcagtgagac tatttacgac	660
cagcaatcga ttcattcctc eggggetget ctgccacctc atgatgcac tctggatget	720
atttctcacc acctgttttc agaaaacaac tcaacgccag agtttggtgg acagtattct	780
catgetgatg aaatataaat ccttaatgaa tactacaata ccttgatggg gaccaactcc	840
aactcaggat tgcattgcctt atccgeagea ttctcaagtt ga	882

<210> 3

<211> 2026

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 3

atggatecct acagggtaaa tttctagttt ttctccttca tttcttggg taggaccctt	60
ttctcttttt atttttttga gctttgatct ttcttttaac tgatctattt titaattgat	120
tggttatggg gtaaatatta catagetttt actgataatc tgattaacttt atttcgtgtg	180
tctatgatga tgatgatagt tacagaaccg tcgactcgtc cgtcctgtag aaaceccaac	240
ccgtgaaatc aaaaaactcg acggcctgtg ggcattcagt ctggategeg aaaactgtgg	300
aattgatcag cgttgggtgg aaagcgcgtt acaagaaagc cgggcaattg ctgtgccagg	360
cagttttaac gatcagttcg ccgatgeaga tattcgtaat tatgegggea acgtctggta	420

[0004]

tcagcgcgaa gtcctttatac cgaaagggtg ggcaggccag cgtatcgtgc tgcgtttcga	480
tgcggteact cattacggca aagtgtgggt caataatcag gaagtgatgg agcatcaggg	540
cggtatacgc ccatttgaag ccgatgtcac gccgtatggt attgccggga aaagtgtacg	600
tatcaacegtt tgtgtgaaca acgaaactgaa ctggcagact atcccgcggg gaatggtgat	660
taccgacgaa aacggcaaga aaaagcagtc ttacttccat gatttcttta actatgccgg	720
aatccategc agcgtaatgc tctacaccac gccgaacacc tgggtggacg atatcacctg	780
ggtgacgeat gtcgcgcaag actgtaacca cgcgtctggt gaactggcagg tgggtggccaa	840
tgggtgatgc agcgttgaac tgcgtgatgc ggatcaacag gtgggtgcaa ctggacaagg	900
cactagcggg acttttgaag tgggtgaatcc gcacctctgg caaccgggtg aaggttatct	960
ctatgaactg tgcgtcacag ccaaaaagcca gacagagtgt gatacttacc cgcttcgcgt	1020
cggcatccgg tcagtggcag tgaagggega acagttctctg attaaccaca aaccgttcta	1080
ctttactggc tttggctgctc atgaagatgc ggacttgcgt ggcaaaggat tcgataacgt	1140
gctgatggtg cagcaccacg cattaatgga ctggattggg gccaaactct accgtacctc	1200
gcattacctt tacgctgaag agatgctega ctgggcagat gaacatggca tcgtggtgat	1260
tgatgaaact gctgctgtcg gctttaacct ctctttagge attggtttcg aagcgggcaa	1320
caagccgaaa gaactgtaca gcgaagaggc agtcaacggg gaaactcagc aagcgcactt	1380
acaggegatt aaagagctga tagcgegtga caaaaaccac ccaagegtgg tgatgtggag	1440
tattgccaac gaaccggata cccgtccgca aggtgcacgg gaatatttcg cgccactggc	1500
ggaageaacg cgtaaactcg acccgacgcg tccgatcacc tgcgtcaatg taatgttctg	1560
cgacgetcae accgatacca tcagcgatct ctttgatgtg ctgtgcctga accgttatta	1620
cggatggtat gtccaaagcg gcgatttga aacggcagag aaggtaactg aaaaagaact	1680
tctggcctgg caggagaaac tgcatacagc gattatcate accgaatacg gcgtggatac	1740
gttageccggg ctgcactcaa tgtacaccga catgtggagt gaagagtatc agtgtgcatg	1800
getggatatg tatcaacegg tctttgateg cgtcagegce gtcgtcggtg aacaggtatg	1860
gaatttcgcc gattttgcga cctcgaagg catattgcgc gttggcggtg acaagaaagg	1920
gatcttcaet cgcgaccgca aaccgaagtc ggcggctttt ctgctgcaaa aacgctggac	1980
tggcatgaac ttcgggtgaaa aaccgcagea gggaggcaaa caatga	2026

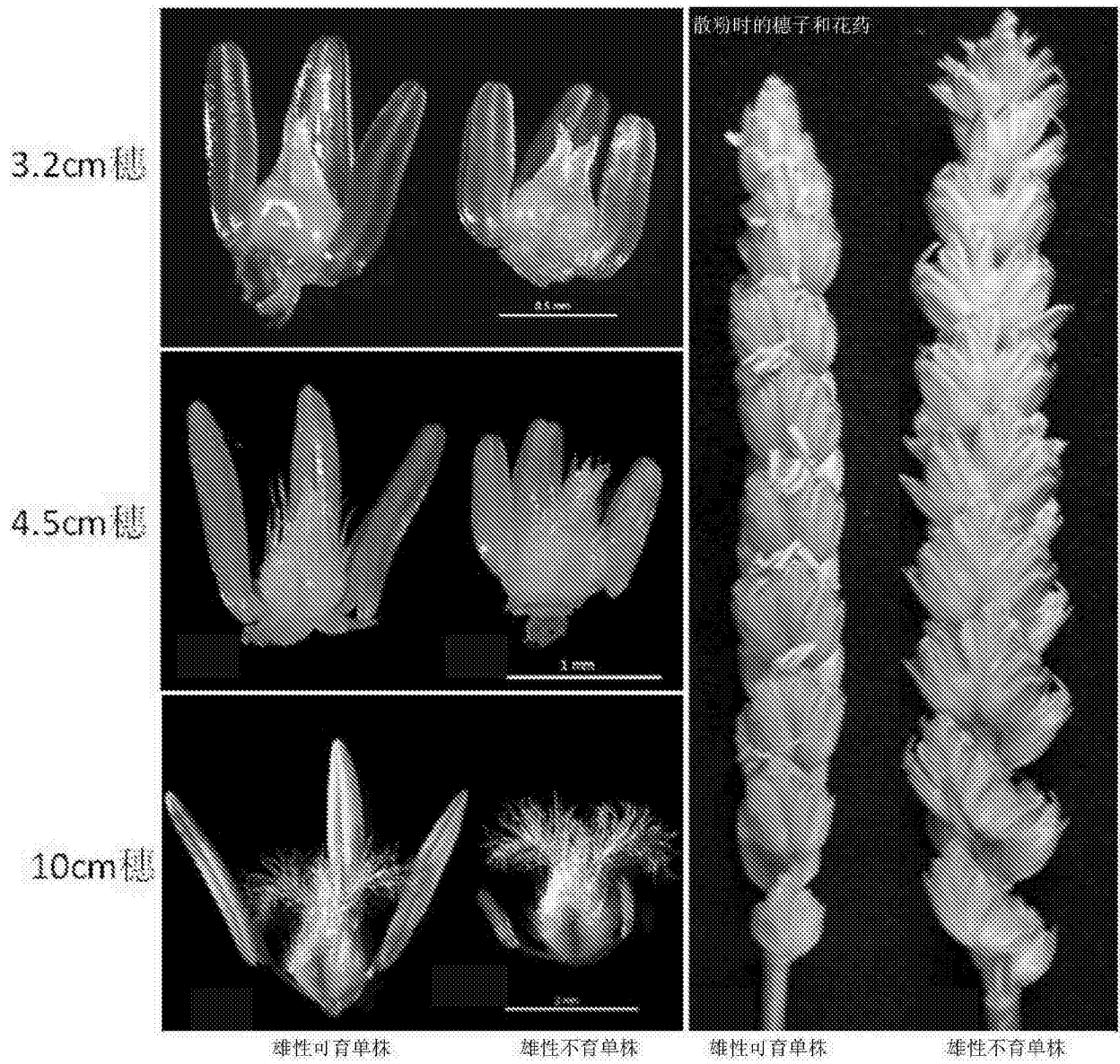


图 1

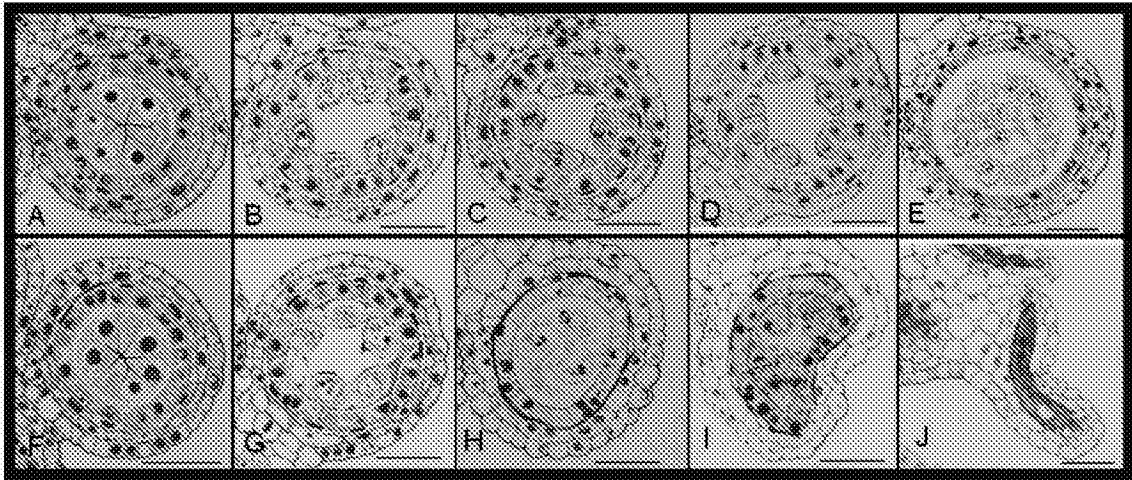


图 2

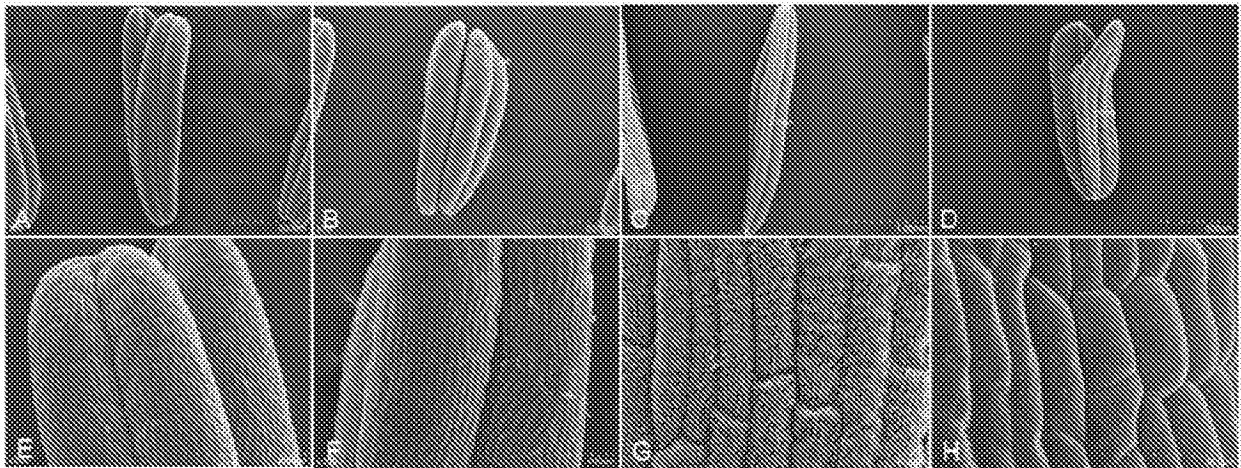


图 3

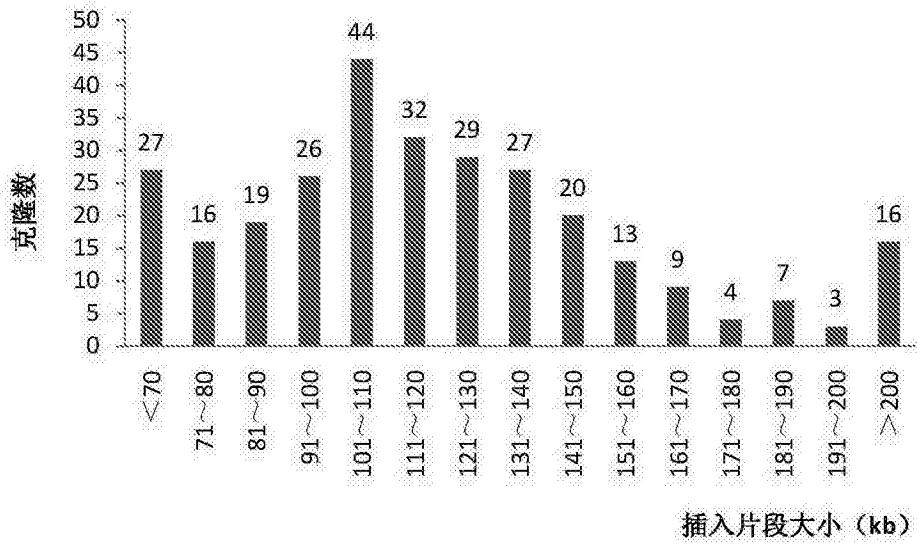
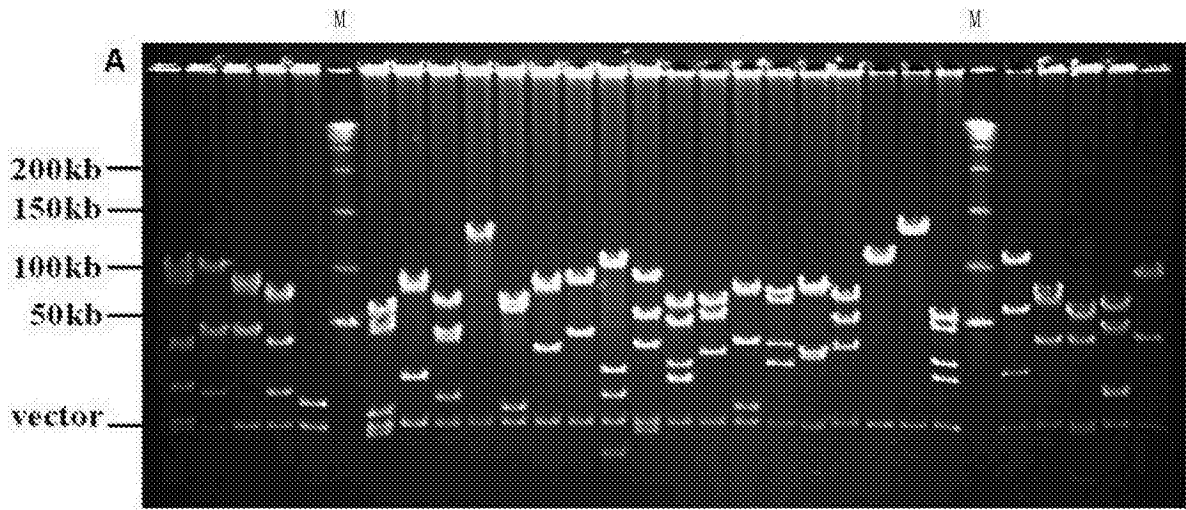
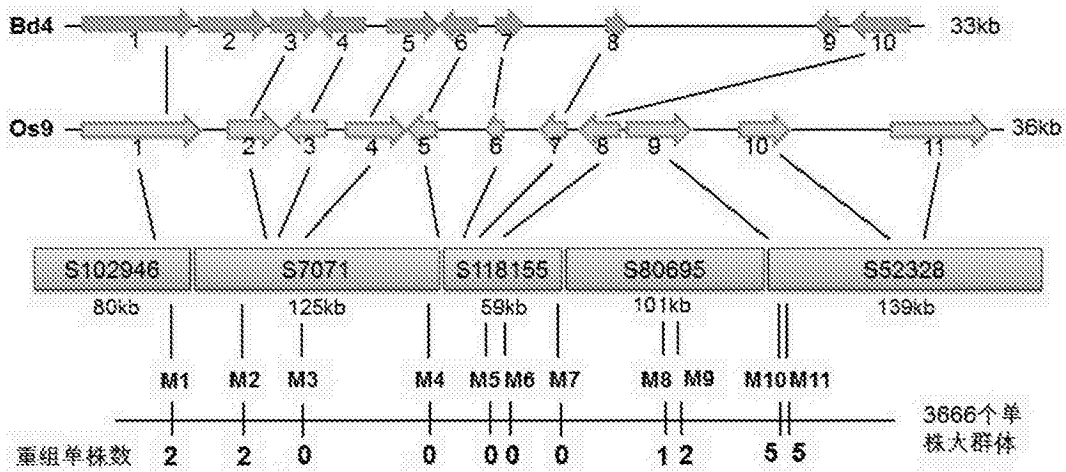


图 4



1: LOC_Os09g39462; 2: LOC_Os09g39474; 3: LOC_Os09g39490; 4: LOC_Os09g39500
 5: LOC_Os09g39510; 6: LOC_Os09g39520; 7: LOC_Os09g39530; 8: LOC_Os09g39540
 9: LOC_Os09g39550; 10: LOC_Os09g39560; 11: LOC_Os09g39570

1: Bradi4g38500; 2: Bradi4g38510; 3: Bradi4g38520; 4: Bradi4g38527; 5: Bradi4g38540
 6: Bradi4g38550; 7: Bradi4g38560; 8: Bradi4g38570; 9: Bradi4g38575; 10: Bradi4g38580

图 5

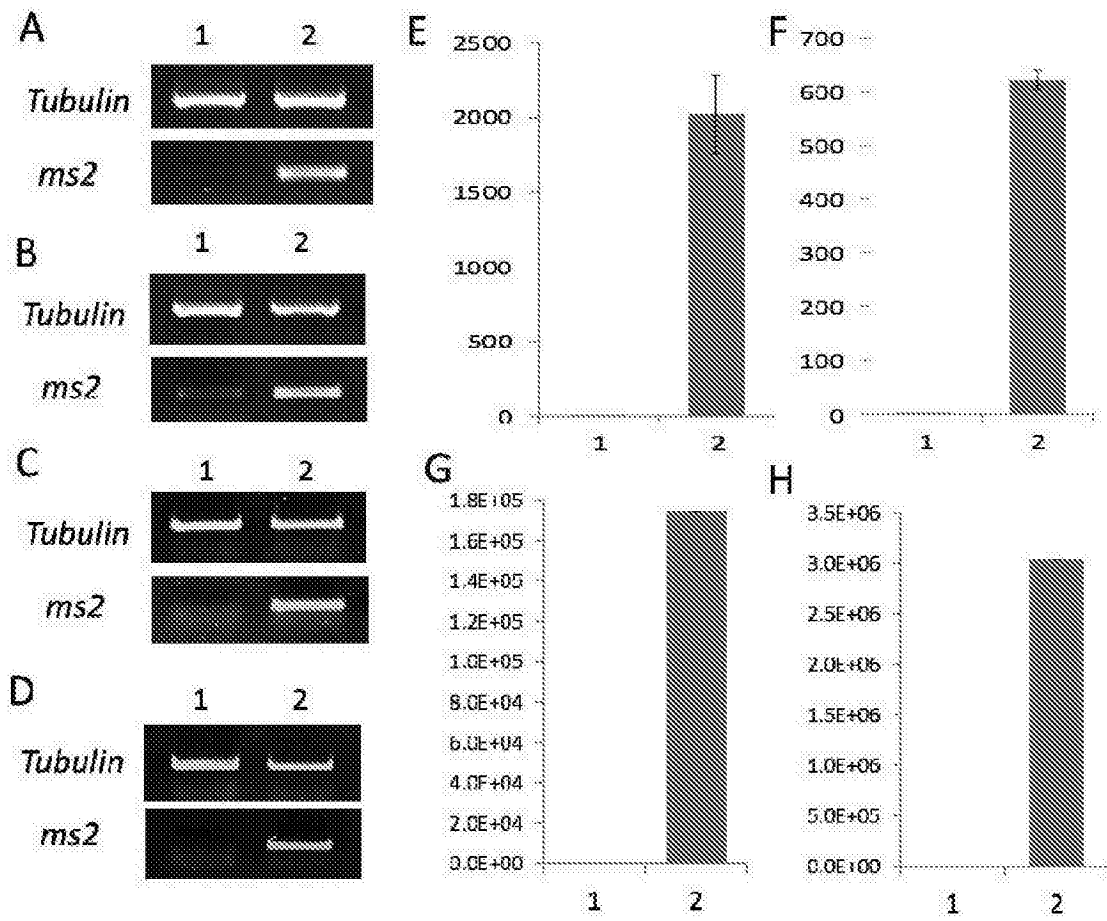


图 6

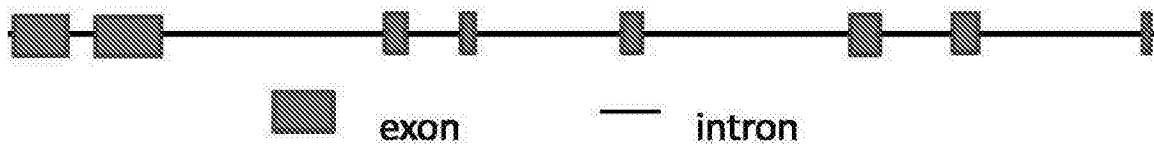


图 7

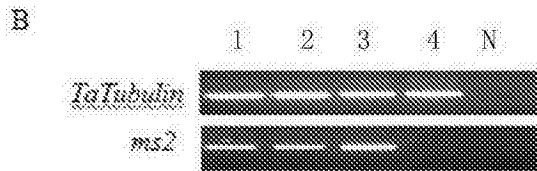
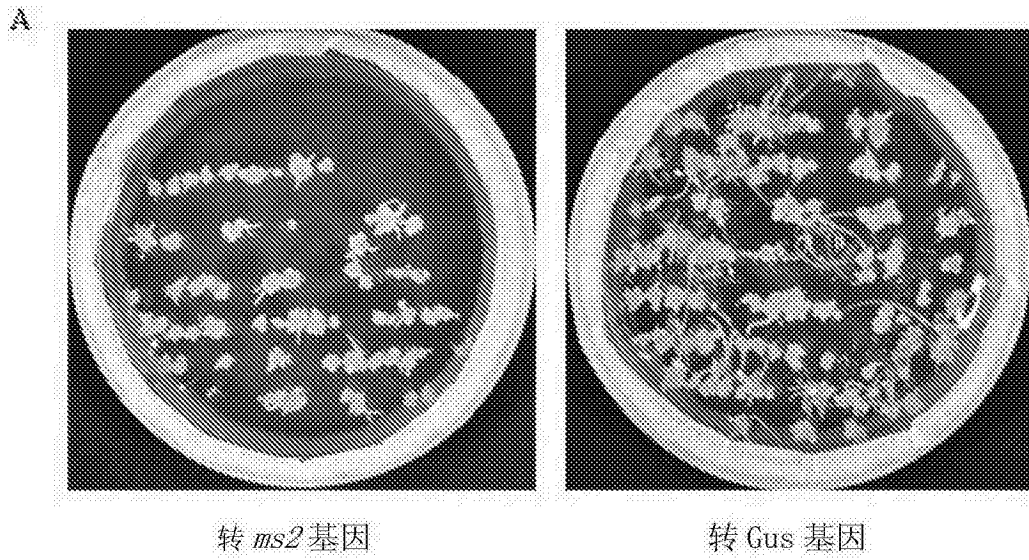


图 8

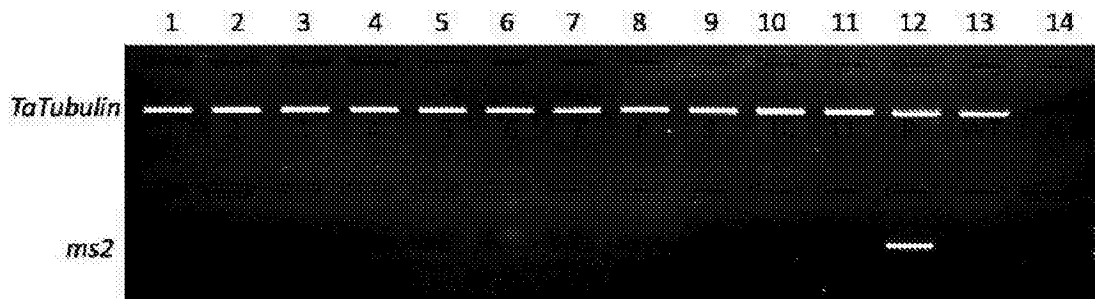


图 9