



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110592137 B

(45) 授权公告日 2021.02.23

(21) 申请号 201910966978.6

(56) 对比文件

(22) 申请日 2019.10.12

CA 2492859 A1, 2004.01.22

(65) 同一申请的已公布的文献号

审查员 琚羽

申请公布号 CN 110592137 A

(43) 申请公布日 2019.12.20

(73) 专利权人 中国科学院昆明植物研究所

地址 650201 云南省昆明市蓝黑路132号

(72) 发明人 贾艳霞 林亮 李唯奇 陈娟

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

代理人 董大媛

(51) Int. Cl.

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2018.01)

A01H 6/20 (2018.01)

权利要求书1页 说明书12页

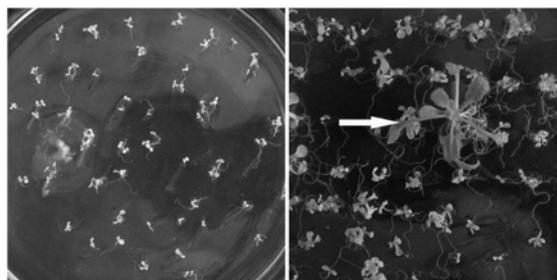
序列表4页 附图6页

(54) 发明名称

拟南芥AT5G10290基因及其突变体在提高植物耐旱性的应用

(57) 摘要

本发明提供了拟南芥AT5G10290基因及其突变体在提高植物耐旱性的应用,属于基因工程技术领域。拟南芥AT5G10290基因、包含拟南芥AT5G10290基因的过表达载体或包含拟南芥AT5G10290基因的组成型过表达突变体在提高植物干旱耐受性和/或渗透胁迫耐受性的应用。所述拟南芥AT5G10290基因、包含拟南芥AT5G10290基因的过表达载体在培育耐受干旱胁迫的转基因生物中的应用。基于AT5G10290基因组成型过表达突变体LOE5对脱落酸(ABA)表现为超敏感;过表达突变体LOE5对干旱胁迫比野生型植物更具耐受性。



1. 拟南芥AT5G10290基因、包含拟南芥AT5G10290基因的过表达载体或包含拟南芥AT5G10290基因的组成型过表达突变体在提高植物干旱耐受性的应用；所述拟南芥AT5G10290基因的编码蛋白的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

2. 根据权利要求1所述应用，其特征在于，所述拟南芥AT5G10290基因的核苷酸序列如SEQ ID No.2所示。

3. 根据权利要求1或2所述应用，其特征在于，所述包含拟南芥AT5G10290基因的过表达载体包括拟南芥AT5G10290基因和pEGAD载体；所述拟南芥AT5G10290基因插入在pEGAD载体的EcoRI/SmaI多克隆位点处。

4. 根据权利要求1所述应用，其特征在于，所述包含拟南芥AT5G10290基因的组成型过表达突变体为含有拟南芥AT5G10290基因或所述过表达载体的转基因植物。

5. 根据权利要求1所述应用，其特征在于，所述植物包括拟南芥、水稻、油菜或芥兰。

6. 拟南芥AT5G10290基因、包含拟南芥AT5G10290基因的过表达载体在培育耐受干旱胁迫的转基因植物中的应用；所述拟南芥AT5G10290基因的编码蛋白的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

7. 根据权利要求6所述应用，其特征在于，所述包含拟南芥AT5G10290基因的过表达载体包括AT5G10290基因和pEGAD载体；所述AT5G10290基因插入在pEGAD载体的EcoRI和SmaI多克隆位点处；所述拟南芥AT5G10290基因的核苷酸序列如SEQ ID No.2所示。

拟南芥AT5G10290基因及其突变体在提高植物耐旱性的应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程技术领域,具体涉及拟南芥AT5G10290基因及其突变体在提高植物耐旱性的应用。

背景技术

[0002] 近几年来,在干旱胁迫条件下植物细胞分子水平的信号传递与生理反应变化以及相关基因的表达等方面的研究取得了很大的进展,但是仍有许多问题有待于探讨,如仍有一些关键信号组分以及起调控作用的组织特异性基因未鉴定,信号分子之间上下游关系等也需深入探究。干旱胁迫响应基因的筛选、克隆及功能挖掘将有助于进一步更深入的解析干旱胁迫中信号转导途径。深入研究植物在干旱胁迫下信号转导途径对深入研究植物抗旱机理,对调控其在干旱逆境中的生长发育,提高抗旱性具有重要的指导意义。

[0003] 目前,用于提高植物耐旱能力的基因报道的很多,例如,拟南芥糖基转移酶基因UGT79B2、拟南芥糖基转移酶基因UGT76C2、拟南芥糖基转移酶基因UGT87A2和大豆圣豆9号NAC转录因子基因GmST1等,研究表明含有上述基因的转基因植株比非转基因植株的耐旱能力有很大程度的提高;同时还有关于双基因协同抗旱作用的报道,例如RNA结合蛋白PwRBP1和NAC转录因子PwNAC1蛋白能够互作形成异源二聚体,共同导入拟南芥后其耐旱性和耐盐性得到显著提高。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种新的具有抗旱能力的基因-拟南芥AT5G10290基因及其突变体在抗旱中的应用,所述拟南芥AT5G10290基因在提高植物干旱耐受性和渗透胁迫耐受性方面具有较好的生物学功能。

[0005] 本发明提供了拟南芥AT5G10290基因、包含拟南芥AT5G10290基因的过表达载体或包含拟南芥AT5G10290基因的组成型过表达突变体在提高植物干旱耐受性和/或渗透胁迫耐受性的应用;所述拟南芥AT5G10290基因的编码蛋白的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

[0006] 优选的,所述拟南芥AT5G10290基因的核苷酸序列如SEQ ID No.2所示。

[0007] 优选的,所述包含拟南芥AT5G10290基因的过表达载体包括拟南芥AT5G10290基因和pEGAD载体;所述拟南芥AT5G10290基因插入在pEGAD载体的EcoRI/SmaI多克隆位点处。

[0008] 优选的,所述包含拟南芥AT5G10290基因的组成型过表达突变体为含有拟南芥AT5G10290基因或所述过表达载体的转基因植物。

[0009] 优选的,所述植物包括拟南芥、水稻、油菜或芥兰。

[0010] 本发明还提供了拟南芥AT5G10290基因、包含拟南芥AT5G10290基因的过表达载体在培育耐受干旱胁迫的转基因生物中的应用;所述拟南芥AT5G10290基因的编码蛋白的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

[0011] 优选的,所述包含拟南芥AT5G10290基因的过表达载体包括AT5G10290 基因和pEGAD载体;所述AT5G10290基因插入在pEGAD载体的EcoRI 和SmaI多克隆位点处;所述拟南芥AT5G10290基因的核苷酸序列如SEQ ID No.2所示。

[0012] 优选的,所述转基因生物包括转基因植物、转基因动物或转基因微生物。

[0013] 本发明提供了拟南芥AT5G10290基因、包含拟南芥AT5G10290基因的 过表达载体或包含拟南芥AT5G10290基因的组成型过表达突变体在提高植 物干旱耐受性和/或渗透胁迫耐受性的应用。在外源脱落酸(ABA)存在情 况下,AT5G10290过表达突变体LOE-5的萌发率显著低于野生型和 AT5G10290基因缺失型,说明过表达突变体LOE5对ABA超敏感。同时将拟南芥的AT5G10290基因在油菜中过表达得到AT5G10290基因过表达油 菜,将土培的野生油菜和AT5G10290基因过表达油菜受干旱胁迫后,在叶 片萎蔫、叶片失水率和丙二醛(malonyldialdehyde,MDA)含量等方面进行 比较,结果表明,AT5G10290基因过表达油菜的叶片失水率、叶片萎蔫程度 和MDA含量显著低于野生型油菜,说明AT5G10290基因过表达油菜的干旱 过程中受氧化胁迫程度较低,AT5G10290基因过表达油菜具有较高保水能 力,有利于提高植株干旱耐受性。

附图说明

[0014] 图1为草铵膦筛选得到阳性株F1代图,其中箭头所指为拟阳性株;

[0015] 图2为草铵膦筛选得到阳性株F1代图,其中箭头所指为拟阳性株;

[0016] 图3为AT5G10290基因的亚细胞定位结果;

[0017] 图4为初筛得到拟正丁醇不敏感突变体图;

[0018] 图5为复筛得到的拟正丁醇不敏感突变体在含有0.4%正丁醇的培养基 上培养10天结果;

[0019] 图6为卡那霉素抗性筛选结果;

[0020] 图7为TAIL-PCR扩增突变体的T-DNA侧翼序列电泳图;

[0021] 图8为bis8突变体的对正丁醇不敏感与雌二醇存在与否无关的结果;

[0022] 图9为三种基因型拟南芥种子在ABA处理下的萌发表型结果;

[0023] 图10为三种基因型拟南芥种子在ABA处理下萌发率的结果;

[0024] 图11为三种基因型拟南芥种子在ABA处理5天后的萌发率的结果;

[0025] 图12为干旱处理14天后,油菜叶片萎蔫程度的结果;

[0026] 图13为野生型和基因过表达型转基因油菜的叶片失水率变化情况的结 果;

[0027] 图14为野生型和基因过表达型转基因油菜中MDA含量柱形图。

具体实施方式

[0028] 本发明提供了拟南芥AT5G10290基因、包含拟南芥AT5G10290基因的 过表达载体或包含拟南芥AT5G10290基因的组成型过表达突变体在提高植 物干旱耐受性和/或渗透胁迫耐受性的应用;所述拟南芥AT5G10290基因的 编码蛋白的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示 (MRMFSLQKMAMAFTLLFFACLCSFVSPDAQGDALFALRISLRALPNQL SDWNQNQVNPCTWSQVICDDKNF VTSLTSLDMNFSGTLSSRVGILENLKT LTLKNGITGEIPEDFGNLTSLTSLDLEDNQLTGRIPSTIGNLKKLQF LTLS RNKLNGTIPESLTGLPNLLNLLDLSNSLSGQIPQSLFEIPKYNFTSNNLNCG GRQPHPCVSAVAHSGDSS

KPKTGIIAGVVAGVTVVLFGILLFLFCKDRHKG YRRDVFVDVAGEVDRRIAFGQLKRFWRELQLATDNFSEKNV
LGQGGFG KVKYKGLPDNTKVAVKRLTDFESPGGDAAFQREVEMISVAVHRNLLRLIG FCTTQTERLLVYPFMQN
LSLAHRLREIKAGDPVLDWETRKRIALGAARGF EYLHEHCNPKI IHRDVKAANVLLEDFEAVVGDVGLAKLV
RRTNVTT QVRGTMGHIAPEYLSTGKSSERTDVFYGYIMLLELVTGQRAIDFSRLEEED DVLLLDHVKKLEREKR
LGAIVDKNLDGEYIKKEEVEMMIQVALLCTQGSP EDRPVMSEVVRMLEGEGLAERWEEWQNVETRREHEFERLQRR
FDWGE DSMHNQDAIELSGGR)。

[0029] 在本发明中,拟南芥AT5G10290基因属于leucine-rich repeat transmembrane protein kinase family protein(富含亮氨酸重复跨膜蛋白激酶家族蛋白),在 GenBank 中的编号是AT5G10290,该基因的CDS长1842bp,核苷酸序列如 SEQ ID No.2所示,编码613 个氨基酸,氨基酸序列如SEQ ID No.1所示 (atgagaatgttcagcttcgagaagatggctatggcttt tactctcttgttttttgcctgtttatgctcatttgtgtctccag atgctcaaggggatgactgtttgcgttgag gatctccttacgtgcattaccgaatcagctaagtgactggaatcagaa ccaagttaatccttgcacttggtecca agttatgtgtgatgacaaaaactttgtcacttctcttacattgtcagatatgaact tctcgggaacctgtcttc aagagtaggaatcctagaaaaatcctcaagactcttactttaaagggaaatggaattacggg tgaataccagaaga ctttgaaatctgactagcttgactagtttgatttgaggacaatcagctaactggctgtatac catccactat cggtaatctcaagaaacttcagttcttgaccttgagttaggaacaaacttaatgggactattccggagtca ctcac tggctcttccaaacctgttaaacctgctgcttgattccaatagctctcagtggtcagattcctcaaagtctgtttgaga tcccaaatataatttcacgtcaacaacttgaattgtggcggtcgtcaacctcacccttgtgtatccgcggttgc ccatt caggtgattcaagcaagcctaaaactggcattattgctggagttgttctggagttacagttgttctctt tggaatcttggt gtttctgttctgcaaggataggcataaaggatatagacgtgatgtgtttgtggatgttgcagg tgaagtggacaggag aattgcatttggacagttgaaaaggttgcagtgagagagctccagtttagcgacagataa cttcagcgaaaagaatgt acttggcaaggaggctttgggaaagtttacaaggagtgcttccggataacaccaa agttgctgtgaagagattgac ggatttcgaaagtcctggaggatgctgcttccaaaggaagtagagatgat aagtgtagctgttcataggaatcta ctccgtcttatcgggttctgcaccacacaaacagaacgccttttggttta tcccttcatgcagaatctaagtcttgacat cgtctgagagagatcaaagcaggcgaccggttctagattggga gacgaggaaacggattgccttaggagcagc gcgtggttttgagtatcttcatgaacattgcaatccgaagatcat acatcgtgatgtgaaagcagctaattgtgttactag atgaagatgttgaagcagtggttggtgattttggtttagc caagctagtagatgttagaaggactaatgtgactactcaa gttcgaggaacaatgggtcattgcaccagaata tttatcaacagggaaatcatcagagagaaccgatgttttcggg tatggaattatgcttcttgagcttgttacagg acaacgcgcaatagacttttcacgtttggaggaagaagatgatgtctt gttacttgaccacgtgaagaaactgga aagagagaagagattaggagcaatcgtagataagaatgttgatggagag tatataaaagaagaagtagagatgat gatacaagtggtttgtgttacacaaggttcaccagaagaccgaccagtg atgtctgaagttgtgaggatgtt agaaggagaagggcttgcggagagatgggaagagtggaacacgtggaagtc acgagacgtcatgagtttgaacg gttgcagaggagatttgattgggggtgaagattctatgcataaccaagatgccatt gaattatctggtggaagatga)。本发明对所述拟南芥AT5G10290基因的来源没有特殊限制,采用本领域所熟知的拟南芥AT5G10290基因的来源即可。在本发明实施例中,所述拟南芥 AT5G10290基因委托基因合成公司合成。

[0030] 本发明对所述包含拟南芥AT5G10290基因的过表达载体没有特殊限制,采用本领域所熟知的能够使拟南芥AT5G10290基因过表达的载体即可。所述包含拟南芥AT5G10290

基因的过表达载体优选包括拟南芥AT5G10290基因和pEGAD载体;所述pEGAD载体含有一个EGFP报告基因和一个除草剂抗性基因(草铵膦抗性基因),这两个基因是独立开的,受各自前端的CaMV 35S启动子的控制。所述拟南芥AT5G10290基因插入在pEGAD载体的EcoRI/SmaI多克隆位点处。

[0031] 在本发明中,所述包含拟南芥AT5G10290基因的过表达载体的构建方法优选包括以下步骤:将AT5G10290基因和pEGAD载体分别用EcoRI和SmaI双酶切,得到带有粘性末端的基因片段和线性质粒,连接过夜,转化至大肠杆菌DH5 α 中,通过草铵膦抗性LA固体培养基筛选,挑取单菌落,提取质粒,经过单酶切、双酶切和PCR鉴定方法验证外源片段的插入位置与目标插入位置一致,得到包含拟南芥AT5G10290基因的过表达载体。

[0032] 在本发明中,所述包含拟南芥AT5G10290基因的组成型过表达突变体优选为含有拟南芥AT5G10290基因或所述过表达载体的转基因植物。本发明对所述转基因植物的种类没有特殊限制,采用本领域所熟知的植物种类即可。所述植物优选包括拟南芥、水稻、油菜或芥兰。

[0033] 在本发明中,含有拟南芥AT5G10290基因或所述过表达载体的转基因植物的制备方法优选包括以下步骤:

[0034] 将拟南芥AT5G10290基因插入基础载体中得到拟南芥AT5G10290基因过表达载体;

[0035] 将所述拟南芥AT5G10290基因过表达载体通过农杆菌介导转化至植物中,验证后得到转基因植物。所述转基因植物携带拟南芥AT5G10290基因后与野生型相比,对ABA超敏感;同时得到的转基因植物经过干旱胁迫后,在叶片萎蔫、叶片含水率以及MDA含量方面均显著高于野生型,这说明转基因植物取得了较强的抗旱能力。

[0036] 本发明还提供了拟南芥AT5G10290基因、包含拟南芥AT5G10290基因的过表达载体在培育耐受干旱胁迫的转基因生物中的应用;所述拟南芥AT5G10290基因的编码蛋白的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

[0037] 在本发明中,所述包含拟南芥AT5G10290基因的过表达载体及其制备方法同上述过表达载体及其制备方法,在此不做赘述。

[0038] 在本发明中,所述转基因生物优选包括转基因植物、转基因动物或转基因微生物。所述拟南芥AT5G10290基因在转化动物和微生物中,得到的转基因动物或转基因微生物均能提高其耐受干旱的能力。本发明以转基因植物培育方法为例说明培育过程,但这并不能理解为本发明保护范围的限制,同时实施例中转基因植物的培育过程以培育转基因拟南芥为例加以说明。在本发明中,所述转基因植物的培育方法同上述含有拟南芥AT5G10290基因或所述过表达载体的转基因植物的制备方法,在此不做赘述。

[0039] 下面结合实施例对本发明提供的拟南芥AT5G10290基因及其突变体在提高植物耐旱性的应用进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0040] 实施例1

[0041] AT5G10290基因过表达载体(35S::AT5G10290)的构建方法

[0042] AT5G10290基因和pEGAD载体分别用EcoRI和SmaI双酶切,分别切成带有粘性末端的片段,两个片段在16 $^{\circ}$ C连接过夜,得到的连接产物转化入大肠杆菌DH5 α 中。转化后的大肠杆菌在草铵膦抗性LA固体培养基中筛选,挑取单菌落,提取质粒,经过单酶切、双酶切和

PCR鉴定外源片段的插入情况。pEGAD载体含有一个EGFP报告基因和一个除草剂抗性基因，这两个基因是独立开的，受各自前端的CaMV 35S启动子的控制。具体操作步骤如下：

[0043] 1、AT5G10290基因片段和pEGAD载体分别用EcoRI和SmaI双酶切，切成粘性末端，双酶切体系如下：

	10 × T Buffer	2 μl
[0044]	0.1 % BSA	2 μl
	pEGAD (或 AT5G10290 基因片段)	5 μl
	SmaI	1 μl
	EcoRI	1 μl
[0045]	ddH ₂ O	9 μl
	总体系	20 μl

[0046] 反应条件：先加入SmaI, 30℃反应4h, 再加入EcoRI, 37℃反应2h, 之后用1% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物, 并使用DNA凝胶回收试剂盒回收并纯化酶切产物。

[0047] 2、AT5G10290基因回收片段与pEGAD载体的连接

[0048] 将酶切后纯化回收的AT5G10290基因片段与pEGAD载体过夜连接，连接体系如下：

	DNA ligation Kit	10 μl
	pEGAD 酶切片段	4 μl
[0049]	AT5G10290 基因回收片段	6 μl
	总体系	20 μl

[0050] 反应条件：16℃连接过夜。

[0051] 3、氯化钙法制备大肠杆菌DH5α感受态细胞

[0052] (1) 挑取大肠杆菌DH5α单菌落接于20ml LB液体培养基中, 37℃培养过夜。次日取1ml菌液于100ml的LB液体培养基中, 37℃ 200rpm振荡培养2~3h, 至OD₆₀₀约为0.3~0.5。

[0053] (2) 将100ml细菌培养物在无菌条件下转移至50ml预冷的离心管, 分装成两管, 置于冰上10min。

[0054] (3) 4℃, 4000g离心10min, 弃上清(尽可能将所有的上清液去净), 收集菌体沉淀。

[0055] (4) 每管加入20ml在冰上预冷的0.1M CaCl₂溶液, 重新悬浮菌体, 使菌体分散均匀, 之后置冰浴中30min。

[0056] (5) 重复步骤(4)一次。

[0057] (6) 4℃, 4000g离心10min, 弃上清(尽可能将所有的上清液去净), 收集菌体沉淀。

[0058] (7) 沉淀用2ml预冷的0.1M CaCl₂溶液轻轻悬浮, 并加入一定量的甘油至终浓度10%, 分装100μl每管。之后置于-80℃保存。

[0059] 4、重组质粒载体的大肠杆菌转化：

[0060] (1) 取-80℃保存的大肠杆菌感受态细胞DH5α于冰上融化, 轻弹管壁使细胞均匀分散。

[0061] (2) 在100μl感受态细胞中加入5μl连接产物, 混匀, 置于冰上30min。

- [0062] (3) 42℃水浴热激90s,立即冰浴2min。
- [0063] (4) 加入新配制的LB液体培养基800μl,混匀后在37℃摇床(125rpm) 预培养1h。
- [0064] (5) 取200μl转化液涂布在含卡那霉素(Kan+) 50mg/l的LA固体培养基平板上,37℃倒置培养16~24h。
- [0065] (6) 观察平板,挑取白色菌落。
- [0066] 5、质粒DNA的小量提取-碱裂解法(使用天根的普通质粒小提试剂盒)
- [0067] (1) 从平板上挑取单菌落接种于10ml含25mg/l Kan的LB液体培养基中,37℃振荡培养过夜(约12h)。
- [0068] (2) 取4ml菌液,加入离心管中,使用常规台式离心机,12000rpm 离心2min,尽量除去上清(重复两次)。
- [0069] (3) 向留有菌体沉淀的离心管中加入250μl溶液P1,使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀。
- [0070] (4) 向离心管中加入250μl溶液P2,温和地上下翻转6~8次使菌体充分裂解。
- [0071] (5) 向离心管中加入350μl溶液P3,立即温和地上下翻转6~8次,充分混匀,此时将出现白色絮状沉淀。12000rpm离心10min,此时在离心管底部形成沉淀。
- [0072] (6) 柱平衡步骤:向吸附柱CP3中(吸附柱放入收集管中)加入500μl 的平衡液BL,12000rpm离心1min,倒掉收集管中的废液,将吸附柱重新放回收集管中。
- [0073] (7) 将(4)中收集的上清液用移液器转移到吸附柱CP3中,注意尽量不要吸出沉淀。
- [0074] (8) 向吸附柱CP3中加入500μl去蛋白液PD,12000rpm离心1min,倒掉收集管中的废液,将吸附柱CP3重新放回收集管中。
- [0075] (9) 向吸附柱CP3中加入600μl漂洗液PW,12000rpm离心1min,倒掉收集管中的废液,将吸附柱CP3放入收集管中。
- [0076] (10) 向吸附柱CP3中加入600μl漂洗液PW,12000rpm离心1min,倒掉收集管中的废液。
- [0077] (11) 将吸附柱CP3放入收集管中,12000rpm离心2min,目的是向吸附柱中残余的漂洗液去除,此时将吸附柱CP3开盖,置于室温放置数min,以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。
- [0078] (12) 将吸附柱CP3置于一个干净的离心管中,向吸附膜的中间部位滴加100μl洗脱缓冲液EB,室温放置2min,12000rpm离心1min,将质粒溶液收集到离心管中。再将离心管中收集到的溶液重新吸回到吸附柱中,再次12000rpm离心1min,将质粒溶液收集到离心管中。重组质粒 pEGAD/AT5G10290的PCR鉴定利用PCR扩增的方法检测提取到的重组质粒 pEGAD-AT5G10290中是否含有目的基因片段,20μl的体系如下:

	10×Buffer	2 μl
	dNTP	0.8 μl
	ddH ₂ O	15.8 μl
[0079]	primer AT5G10290 clone FP	0.2 μl
	primer AT5G10290 clone RP	0.2 μl
	rtaq DNA Polymerase	0.2 μl
	重组质粒 pEGAD-AT5G10290	0.8 μl
	总体系	20 μl

[0080] 反应条件:95℃育变性4min后,95℃变性30s,58℃退火40s,72℃ 延伸3min,共30个循环,最后72℃延伸10min,后置于4℃。

[0081] 6、重组质粒的酶切鉴定

[0082] 双酶切鉴定:同时用EcoRI和SmaI双酶切鉴定载体 pEGAD-AT5G10290,鉴定目的片段的插入情况,建立10μl的酶切体系如下:

	10×T Buffer	1 μl
	0.1% BSA	1μl
	SmaI	0.5 μl
[0083]	EcoRI	0.5 μl
	重组质粒 pEGAD-AT5G10290	4 μl
	ddH ₂ O	3 μl
	总体系	10 μl

[0084] 反应条件:先加入SmaI,30℃反应1h,再加入EcoRI,37℃反应1h,用1% (v/w) 琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物。

[0085] 单酶切鉴定:用EcoRI酶切pEGAD-AT5G10290,鉴定目的片段的插入 情况,建立10μl的酶切体系如下:

	10×H Buffer	1 μl
	EcoRI	0.5 μl
[0086]	重组质粒 pEGAD-AT5G10290	4 μl
	ddH ₂ O	4.5 μl
	总体系	10μl

[0087] 反应条件:37℃反应2h,用1% (v/w) 琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物。

[0088] 7、重组质粒测序及序列分析

[0089] 分别选取几个已通过酶切和PCR鉴定的阳性重组质粒进行测序,测序 工作由华大基因完成,应用DNAMAN (版本6.0) 软件分析测序结果。结果 表明克隆的AT5G10290基因片段与预期目标片段完全一致。

[0090] 实施例2

[0091] AT5G10290基因过表达载体的农杆菌转化及鉴定

[0092] 1、农杆菌EHA105感受态细胞制备方法

[0093] (1) 将农杆菌EHA105接种于20ml LB液体培养基中,28℃,220rpm 振荡培养过夜。

[0094] (2) 次日取活化的菌液1ml接种于100ml LB液体培养基中,28℃, 220rpm振荡培养至OD₆₀₀值为0.4~0.5。

[0095] (3) 将菌液置于冰浴中30min。

[0096] (4) 在4℃,12000rpm条件下离心10min,收集菌体。

[0097] (5) 沉淀用20ml 0.5M的预冷的NaCl溶液悬浮,冰浴20min。

[0098] (6) 在4℃,12000rpm条件下离心10min,收集菌体。

[0099] (7) 弃上清,用2ml 20mM的冰预冷的CaCl₂溶液悬浮,并加入终浓度为10%的甘油保存。

[0100] (8) 按每管100μl分装,液氮速冻后置于-80℃保存。

[0101] 2、液氮冻融法转化农杆菌EHA105

[0102] (1) 取0.1~1μg质粒DNA加到100μl冰上解冻的农杆菌EHA105感受态细胞中,轻轻混匀,冰浴30min。

[0103] (2) 液氮中速冻1min,37℃水浴5min,再迅速冰浴5min。

[0104] (3) 加入800μl LB液体培养基,在28℃,180rpm条件下振荡培养3~5 h。

[0105] (4) 取200μl菌液涂布于LA固体选择平板上(含50mg/l Kan⁺),28℃ 倒置培养2d后挑取单菌落鉴定。

[0106] 3、鉴定农杆菌EHA105中的表达载体

[0107] PCR检测挑取的农杆菌单菌落中是否含有AT5G10290基因目的片段,并提取农杆菌中的重组质粒,通过单酶切、双酶切以及质粒PCR的方法鉴定农杆菌中正确转化了表达载体,具体实验操作方法与上面在大肠杆菌中的操作相同。

[0108] 实施例3

[0109] 拟南芥的遗传转化(Floral dip法)

[0110] (1) 挑取带有重组质粒pEGAD-AT5G10290的农杆菌EHA105单菌落,接于LB液体培养基中(含有50mg/l卡那霉素以及50mg/l利福平),在28℃,220rpm条件振荡培养。

[0111] (2) 待菌液OD₆₀₀至1.5~2.0时,将培养液按1:10的比例转接培养(100 ml),使其OD₆₀₀约为2.0时,终止培养后离心收集菌体。

[0112] (3) 将100ml菌液分装在两个50ml的离心管中,室温4000rpm离心15min,去上清。

[0113] (4) 每管分别加入1/2MS液体培养基(含有5%蔗糖)20ml,悬起沉淀,室温4000rpm离心15min,去上清。

[0114] (5) 每管分别加入含有5%蔗糖,0.02%SilwetL-77的1/2MS液体培养基配置花序浸染菌液悬浮菌体,使其OD₆₀₀约为1.0。

[0115] (6) 花序浸染菌液配好后,立即浸染植物。方法是:选取初果期的健壮植株,一般以开花前5~10天为宜,使整个花序浸泡于浸染液中,而莲座叶片尽量不与浸染液接触。3~4s后将盆取下,放置于黑箱中16~24h,并保持较高的湿度。然后将处理过的拟南芥植株放于22~25℃的光照条件下正常生长。隔3d处理一次,如此将拟南芥处理数次后使其正常

开花结果,收获 种子。

[0116] 实施例4

[0117] 转基因植株的筛选鉴定及繁种:

[0118] 在获得T1代大量转基因种子后,根据表达载体上所携带的植物除草剂 抗性基因,将种子播种于加入除草剂Basta的培养基上,约2w后初步筛选 对除草剂有抗性的转化植株,并移栽到土壤里生长(图1)。经4-5w植物 长大后,提取叶片DNA结合PCR扩增目的片段的方法进一步鉴定转化植株 (图2)。经鉴定的植株单株收种子,之后再繁种一代重复以上筛选方法。直至所有转化植株都具有显著抗性且证明含有目的片段后,对其提取RNA 做基因表达检测。用T3或T4代的转基因植株进行后续试验,过表达株系命 名为LOE。

[0119] 实施例5

[0120] 拟南芥AT5G10290基因的细胞定位

[0121] 过表达植株的AT5G10290基因上含有一个EGFP报告基因,因此我们 可以通过检测EGFP的荧光信号来检测目的基因AT5G10290的亚细胞定位。把筛选得到的拟南芥AT5G10290基因播种在MS培养基上,22度光照培养 3-5天,去子叶放在载玻片上,在激光共聚焦扫描显微镜(Olympus FV1000) 上488nm激发光,520~560nm发射光下检测GFP信号。结果表明,AT5G10290 基因表达在细胞膜上(图3)。

[0122] 实施例6

[0123] AT5G10290基因的XVE诱导性标记激活的拟南芥T-DNA插入株系种 子,由中国科学院遗传与发育生物研究所免费提供。

[0124] 将XVE诱导性标记激活的T-DNA插入突变体的种子随机点在含有 0.04%浓度的正丁醇的培养基上,并筛选得到可以在含有正丁醇培养基上可 以生长的幼苗,并收集种子,再用同样的办法进行第二代的筛选,如此反复 三次,得到正丁醇抗性可以稳定遗传的株系,命名为bis8(butanol insensitive mutant 8)(图4和图5),同时经过正丁醇抗性筛选得到的株系还包括bis13、bis4、bis5和bis7。

[0125] 实施例7

[0126] bis8突变株的鉴定

[0127] 1、卡那霉素抗性鉴定

[0128] 将通过复筛获得的正丁醇突变体种子bis8播种于含有20mg/L卡那霉素 和10 μ mol/L17- β -雌二醇的MS培养基上。经2天春化处理,在培养室 萌发。5-7天后进行表型观察(图6),同时挑选抗性植株转移到常规MS 培养基上继续生长10天左右,再转移至营养土中扩繁种子。在含有卡那霉 素的培养基上生长7天后发现野生型(Co1)拟南芥幼苗表现为黄化,且主 根生长受抑制;而突变株bis8和bis13生长状态明显优于野生型。

[0129] 2、T-DNA插入位点的鉴定

[0130] 用简易微量的DNA提取法提取正丁醇不敏感突变体bis8T1代DNA, T-DNA插入位点的鉴定利用TAIL-PCR(Thermal Asymmetric Interlaced- Polymerase Chain Reaction)方法进行。

[0131] (1)引物

[0132] 根据pER16表达载体T-DNA插入片段的左边界设计巢式PCR引物为:

[0133] 巢式引物:

- [0134] LexA2:5'-CTAATCGCATTATCATCCCCTCG-3' (SEQ ID NO.3);
- [0135] LEXA4:5'-CTGGTTTTATATACAGCAGTCGACG-3' (SEQ ID NO.4);
- [0136] LEXA5:5'-AGTCGAGGTAAGATTAGATATGG-3' (SEQ ID NO.5);
- [0137] 四个随机引物:
- [0138] AD1:NTCGASTWTSWGTGTT (SEQ ID NO.6),
- [0139] AD2:NGTCGASWGANAWGAA (SEQ ID NO.7)
- [0140] AD3:WGTGNAGWANCANAGA (SEQ ID NO.8)
- [0141] AD4:AGWGNAGWANCAWAGG (SEQ ID No.9);
- [0142] 其中N表示A/T/C/G;S表示G/C;W表示A/T。
- [0143] 巢式PCR包括三轮,第一轮巢式引物为Lex2和从随机引物任选一条;第二轮巢式引物为Lex4和从随机引物任选一条;第三轮巢式引物为Lex5和随机引物任选一条。
- [0144] (2) 反应体系见表1,反应程序见表2。
- [0145] 表1反应体系

反应体系组分	第一反应体系	第三反应体系	第三反应体系
DNA10-100ng/ μ	1 μ l	1 μ l	1 μ l
10 \times PCR buffer	2 μ l	2 μ l	2 μ l
2.5 mM dNTPs	1.6 μ l	1.6 μ l	1.6 μ l
5 μ M Lex	0.8 μ l	0.8 μ l	0.8 μ l
5 μ M AD primer	12 μ l	8 μ l	8 μ l
H ₂ O	2.4 μ l	6.45 μ l	6.45 μ l
Taq 酶 (5 U/ μ l)	0.2 μ l	0.15 μ l	0.15 μ l

[0148] 表2反应程序

测序反应组分 (5 μ l 反应体系)			测序反应程序
dd H ₂ O	2.5 μ l	96 $^{\circ}$ C	10 s
mix (buffer)	0.5 μ l	50 $^{\circ}$ C	5 s
Primer	0.5 μ l	60 $^{\circ}$ C	4 min
DNA	1.5 μ l	30~35 循环	

[0150] 巢式PCR扩增产物电泳结果(图7)及测序、比对的结果表明(表3): bis8插入在AT5G10290基因的编码区。

[0151] 表3突变体的插入位点

突变	插入位点	基因注释结果
<i>bis8</i>	AT5G10290	Leucine-rich repeat family protein

[0153] 实施例8

[0154] 突变体bis8是缺失型突变

[0155] 17-β-雌二醇是本实验所使用的突变体库的化学诱导性激活剂。将突变体 bis8种子播种于MS+0.04%butanol+10μmol/L 17-β-雌二醇和MS+0.04% butanol两种培养基上,培养10d后,观察到突变体bis8在两种培养基上的长势一致,可推断,突变体bis8对正丁醇的抗性不依赖17-β-雌二醇的诱导,也就是说,突变体bis8并非功能获得型突变,而有可能是缺失型的突变。在上述的T-DNA插入位点鉴定中,表明突变体bis8插入在AT5G42230基因的编码区,这就从分子生物学层面进一步验证了,突变体bis8是缺失型突变(图8)。

[0156] 实施例9

[0157] 过表达突变体LOE5对ABA超敏感

[0158] 在干旱或高盐等胁迫条件下,ABA积累而促使植物体内发生一系列的适应性反应,如ABA应答基因的表达和气孔关闭,并诱导出许多基因表达和蛋白质合成,以增强植物对不利环境因素的抵御能力。鉴于ABA在很多生理过程和环境响应中都发挥很重要的作用,因此,检测过表达突变体LOE5对ABA的敏感程度,反映过表达突变体LOE5的抗旱能力。

[0159] 野生型/AT5G10290基因缺失型/AT5G10290过表达突变株这三种基因型拟南芥种子分别播种在正常MS培养基和含有0.5μM ABA、1μM ABA的培养基中22℃光照下培养。按标准发芽试验方法进行,每个处理设四个重复,以胚根伸出为萌发标准,6天计算萌发率。外源ABA存在情况下,而AT5G10290过表达突变体LOE-5的萌发率显著低于野生型,尤其是在1μM ABA处理5天后,野生型的萌发率约26%,过表达突变体的萌发率仅为10%(图9~图11)。

[0160] 实施例10

[0161] 按照实施例1的方法将拟南芥的AT5G10290基因过表达达到油菜中得到转基因油菜,检测转基因油菜的干旱耐受性

[0162] 1、叶片萎蔫比较:

[0163] 以土培的野生油菜和AT5G10290基因过表达油菜(过表达株系1和过表达株系2)作为实验材料,在充分浇水之后进行植物干旱胁迫,在干旱14天后发现过表达株系的叶片萎蔫程度大大低于野生型油菜,说明过表达油菜的干旱耐受性显著高于野生型油菜(图12);

[0164] 2、叶片失水率比较

[0165] 叶片失水率是衡量叶片干旱耐受性的一个指标。取正常生长2周的野生油菜和AT5G10290基因过表达油菜(LOE5)的叶片作为实验材料,选取生长时间相同且叶片大小相同的野生型油菜和AT5G10290基因过表达油菜叶片,叶片剪下后迅速用石蜡将叶柄处封住,称重,记为 W_0 ,每隔一定时间称重,记为 $W_{1,2,3,\dots}$ 。

[0166] 按照式I计算叶片失水率:

[0167] 失水率计算 = $(W_0 - W_1) / W_0$ 式I

[0168] 结果表明,AT5G10290基因过表达油菜叶片失水率相对与野生型油菜较低,AT5G10290基因过表达油菜的较高保水能力有利于提高植株干旱耐受性(图13)。

[0169] 3、丙二醛(malonyldialdehyde,MDA)含量比较

[0170] 植物细胞在干旱过程中伴随着氧化胁迫,丙二醛(malonyldialdehyde,MDA)是细胞中脂类过氧化的产物,因此在干旱过程中MDA含量会上升,而且上升越显著,说明植物受

干旱胁迫程度越大。

[0171] MDA含量测定：

[0172] 1) 0.2~0.5g离体叶片加入2ml10%三氯乙酸(thichloroacetic acid,TCA) 研磨提取2min;

[0173] 2) 提取液转入离心管,用3ml10%TCA分3次冲洗研钵,与提取液合并;

[0174] 3) 10000g离心15min,取上清液,用10%的TCA溶液定容至5ml;

[0175] 4) 取1ml上清液,加入1ml0.6%硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid,TBA), 100℃水浴加热20min,迅速冷却;

[0176] 5) 10,000g离心10min,取上清液在532nm,600nm,450nm测定吸光值(Abs)

[0177] 6) 按照式II计算MDA含量:

[0178] MDA的浓度(c) {MDA} = 6.45*(A₅₃₂-A₆₀₀) - 0.56*A₄₅₀ 式II

[0179] 其中样品中MDA的质量摩尔浓度(μmol/L) = C_c*N*W⁻¹

[0180] C…………MDA浓度(μmol/L);

[0181] N…………提取液体积(L)(本实验为0.005L);

[0182] W…………组织的鲜重或干重(g)。

[0183] 以土培的野生油菜和AT5G10290基因过表达油菜作为实验材料,在充分浇水之后进行植物干旱胁迫,在干旱14天后发现AT5G10290基因过表达油菜MDA含量显著低于野生油菜,这说明过表达油菜的干旱过程中受氧化胁迫程度较低,对干旱耐受性较强(图14)。

[0184] 由上述实施例结果可知,将拟南芥AT5G10290基因在植物中过表达,得到的突变体对脱落酸(ABA)表现为超敏感;过表达突变体LOE5对干旱胁迫比野生型植物更具耐受性,说明拟南芥AT5G10290基因能有效提高植物对干旱的耐受性。

[0185] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

[0001] 序列表
 [0002] <110> 中国科学院昆明植物研究所
 [0003] <120> 拟南芥AT5G10290基因及其突变体在提高植物耐旱性的应用
 [0004] <160> 9
 [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
 [0006] <210> 1
 [0007] <211> 613
 [0008] <212> PRT
 [0009] <213> Arabidopsis thaliana (L.) Heynh
 [0010] <400> 1
 [0011] Met Arg Met Phe Ser Leu Gln Lys Met Ala Met Ala Phe Thr Leu Leu
 [0012] 1 5 10 15
 [0013] Phe Phe Ala Cys Leu Cys Ser Phe Val Ser Pro Asp Ala Gln Gly Asp
 [0014] 20 25 30
 [0015] Ala Leu Phe Ala Leu Arg Ile Ser Leu Arg Ala Leu Pro Asn Gln Leu
 [0016] 35 40 45
 [0017] Ser Asp Trp Asn Gln Asn Gln Val Asn Pro Cys Thr Trp Ser Gln Val
 [0018] 50 55 60
 [0019] Ile Cys Asp Asp Lys Asn Phe Val Thr Ser Leu Thr Leu Ser Asp Met
 [0020] 65 70 75 80
 [0021] Asn Phe Ser Gly Thr Leu Ser Ser Arg Val Gly Ile Leu Glu Asn Leu
 [0022] 85 90 95
 [0023] Lys Thr Leu Thr Leu Lys Gly Asn Gly Ile Thr Gly Glu Ile Pro Glu
 [0024] 100 105 110
 [0025] Asp Phe Gly Asn Leu Thr Ser Leu Thr Ser Leu Asp Leu Glu Asp Asn
 [0026] 115 120 125
 [0027] Gln Leu Thr Gly Arg Ile Pro Ser Thr Ile Gly Asn Leu Lys Lys Leu
 [0028] 130 135 140
 [0029] Gln Phe Leu Thr Leu Ser Arg Asn Lys Leu Asn Gly Thr Ile Pro Glu
 [0030] 145 150 155 160
 [0031] Ser Leu Thr Gly Leu Pro Asn Leu Leu Asn Leu Leu Leu Asp Ser Asn
 [0032] 165 170 175
 [0033] Ser Leu Ser Gly Gln Ile Pro Gln Ser Leu Phe Glu Ile Pro Lys Tyr
 [0034] 180 185 190
 [0035] Asn Phe Thr Ser Asn Asn Leu Asn Cys Gly Gly Arg Gln Pro His Pro
 [0036] 195 200 205
 [0037] Cys Val Ser Ala Val Ala His Ser Gly Asp Ser Ser Lys Pro Lys Thr
 [0038] 210 215 220
 [0039] Gly Ile Ile Ala Gly Val Val Ala Gly Val Thr Val Val Leu Phe Gly
 [0040] 225 230 235 240
 [0041] Ile Leu Leu Phe Leu Phe Cys Lys Asp Arg His Lys Gly Tyr Arg Arg

[0042]		245		250		255
[0043]	Asp Val Phe Val Asp Val Ala Gly Glu Val Asp Arg Arg Ile Ala Phe					
[0044]		260		265		270
[0045]	Gly Gln Leu Lys Arg Phe Ala Trp Arg Glu Leu Gln Leu Ala Thr Asp					
[0046]		275		280		285
[0047]	Asn Phe Ser Glu Lys Asn Val Leu Gly Gln Gly Gly Phe Gly Lys Val					
[0048]		290		295		300
[0049]	Tyr Lys Gly Val Leu Pro Asp Asn Thr Lys Val Ala Val Lys Arg Leu					
[0050]		305		310		315
[0051]	Thr Asp Phe Glu Ser Pro Gly Gly Asp Ala Ala Phe Gln Arg Glu Val					
[0052]		325		330		335
[0053]	Glu Met Ile Ser Val Ala Val His Arg Asn Leu Leu Arg Leu Ile Gly					
[0054]		340		345		350
[0055]	Phe Cys Thr Thr Gln Thr Glu Arg Leu Leu Val Tyr Pro Phe Met Gln					
[0056]		355		360		365
[0057]	Asn Leu Ser Leu Ala His Arg Leu Arg Glu Ile Lys Ala Gly Asp Pro					
[0058]		370		375		380
[0059]	Val Leu Asp Trp Glu Thr Arg Lys Arg Ile Ala Leu Gly Ala Ala Arg					
[0060]		385		390		395
[0061]	Gly Phe Glu Tyr Leu His Glu His Cys Asn Pro Lys Ile Ile His Arg					
[0062]		405		410		415
[0063]	Asp Val Lys Ala Ala Asn Val Leu Leu Asp Glu Asp Phe Glu Ala Val					
[0064]		420		425		430
[0065]	Val Gly Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Val Asp Val Arg Arg Thr Asn					
[0066]		435		440		445
[0067]	Val Thr Thr Gln Val Arg Gly Thr Met Gly His Ile Ala Pro Glu Tyr					
[0068]		450		455		460
[0069]	Leu Ser Thr Gly Lys Ser Ser Glu Arg Thr Asp Val Phe Gly Tyr Gly					
[0070]		465		470		475
[0071]	Ile Met Leu Leu Glu Leu Val Thr Gly Gln Arg Ala Ile Asp Phe Ser					
[0072]		485		490		495
[0073]	Arg Leu Glu Glu Glu Asp Asp Val Leu Leu Leu Asp His Val Lys Lys					
[0074]		500		505		510
[0075]	Leu Glu Arg Glu Lys Arg Leu Gly Ala Ile Val Asp Lys Asn Leu Asp					
[0076]		515		520		525
[0077]	Gly Glu Tyr Ile Lys Glu Glu Val Glu Met Met Ile Gln Val Ala Leu					
[0078]		530		535		540
[0079]	Leu Cys Thr Gln Gly Ser Pro Glu Asp Arg Pro Val Met Ser Glu Val					
[0080]		545		550		555
[0081]	Val Arg Met Leu Glu Gly Glu Gly Leu Ala Glu Arg Trp Glu Glu Trp					
[0082]		565		570		575
[0083]	Gln Asn Val Glu Val Thr Arg Arg His Glu Phe Glu Arg Leu Gln Arg					

[0084]	580	585	590
[0085]	Arg Phe Asp Trp Gly Glu Asp Ser Met His Asn Gln Asp Ala Ile Glu		
[0086]	595	600	605
[0087]	Leu Ser Gly Gly Arg		
[0088]	610		
[0089]	<210> 2		
[0090]	<211> 1842		
[0091]	<212> DNA		
[0092]	<213> Arabidopsis thaliana (L.) Heynh		
[0093]	<400> 2		
[0094]	atgagaatgt tcagcttgc gaagatggct atggctttta ctctcttgt ttttgctgt 60		
[0095]	ttatgetcat ttgtgtctcc agatgetcaa ggggatgcac tgtttgcgtt gaggatctcc 120		
[0096]	ttacgtgcat taccgaatca gctaagtac tggaatcaga accaagttaa tccttgact 180		
[0097]	tggtcccaag ttatttgtga tgacaaaaac tttgtcactt ctcttacatt gtcagatatg 240		
[0098]	aacttctcgg gaacctgtc ttcaagagta ggaatcctag aaaatctcaa gactcttact 300		
[0099]	ttaaaggga atggaattac gggatgaaata ccagaagact ttggaatct gactagcttg 360		
[0100]	actagtttg atttggagga caatcagcta actggtcgt taccatccac tatecgta 420		
[0101]	ctcaagaaac tcagttctt gacctgagt aggaacaaac ttaatggac tattccggag 480		
[0102]	tcactcactg gtcttccaaa cctgttaaac ctgctgctt attccaatag tctcagtggt 540		
[0103]	cagattcctc aaagtctgt tgagatcca aatataatt tcacgtcaa caacttgaat 600		
[0104]	tgtggcgtc gtcaacctc cccttgtga tccgcggtt ccattcagg tgattcaagc 660		
[0105]	aagcctaaa ctggcattat tgctggagt gttgctggag ttacagttg tctctttgga 720		
[0106]	atcttgtgt ttctgtctg caaggatagg cataaaggat atagacgtg tgtgtttgtg 780		
[0107]	gatgttcag gtgaagtga caggagaatt gcatctggac agttgaaaag gtttgcattg 840		
[0108]	agagagctc agttagcag agataactc agcgaaga atgtacttg tcaaggaggc 900		
[0109]	tttgggaaag ttacaaagg agtcttccg gataacacca aagttgctg gaagagattg 960		
[0110]	acgatttcg aaagtcctg tggagatgct gcttccaaa gggaagtaga gatgataagt 1020		
[0111]	gtagctgtc ataggaatct actcctctt atcgggttct gcaccacaca aacagaacgc 1080		
[0112]	cttttggtt atccttcat gcagaatcta agtcttgac atcgtctgag agagatcaa 1140		
[0113]	gcagcgacc cgttctaga ttgggagac aggaaacgga ttgccttagg agcagcgcgt 1200		
[0114]	ggttttgagt atcttcatga acattgcaat ccgaagatca tacatcgtg tgtgaaagca 1260		
[0115]	gctaagtgt tactagatga agattttgaa gcagtgggtg gtgattttg tttagccaag 1320		
[0116]	ctagtagatg ttagaaggac taatgtgact actcaagtc gaggaacaat gggtcacatt 1380		
[0117]	gcaccagaat atttatcaac agggaaatca tcagagagaa ccgatgttt cgggtatgga 1440		
[0118]	attatgctt ttgagctgt tacaggacaa cgcgcaatag acttttcacg tttggaggaa 1500		
[0119]	gaagatgat tctgttact tgaccactg aagaactgg aaagagagaa gagattagga 1560		
[0120]	gcaatcgtg ataagaattt ggatggagag tatataaaag aagaagtaga gatgatgata 1620		
[0121]	caagtggct tgctttgtac acaaggtca ccagaagacc gaccagtgat gtctgaagtt 1680		
[0122]	gtgaggatg tagaaggaga agggcttgc gagagatgg aagagtggca aaacgtggaa 1740		
[0123]	gtcacgagac gtcatgagtt tgaacggtg cagaggagat ttgattggg tgaagattct 1800		
[0124]	atgcataacc aagatgcat tgaattatct ggtggaagat ga 1842		
[0125]	<210> 3		

- [0126] <211> 23
[0127] <212> DNA
[0128] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
[0129] <400> 3
[0130] ctaatcgcattatcatcccc tcg 23
[0131] <210> 4
[0132] <211> 25
[0133] <212> DNA
[0134] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
[0135] <400> 4
[0136] ctggttttat atacagcagt cgacg 25
[0137] <210> 5
[0138] <211> 23
[0139] <212> DNA
[0140] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
[0141] <400> 5
[0142] agtcgaggta agattagata tgg 23
[0143] <210> 6
[0144] <211> 15
[0145] <212> DNA
[0146] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
[0147] <400> 6
[0148] ntcgastwts gwgtt 15
[0149] <210> 7
[0150] <211> 16
[0151] <212> DNA
[0152] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
[0153] <400> 7
[0154] ngtcgaswga nawgaa 16
[0155] <210> 8
[0156] <211> 16
[0157] <212> DNA
[0158] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
[0159] <400> 8
[0160] wgtgnagwan canaga 16
[0161] <210> 9
[0162] <211> 16
[0163] <212> DNA
[0164] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
[0165] <400> 9
[0166] agwgnagwan cawagg 16

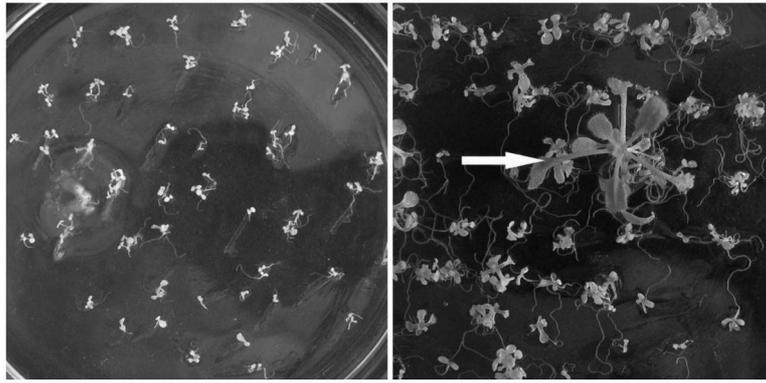


图1

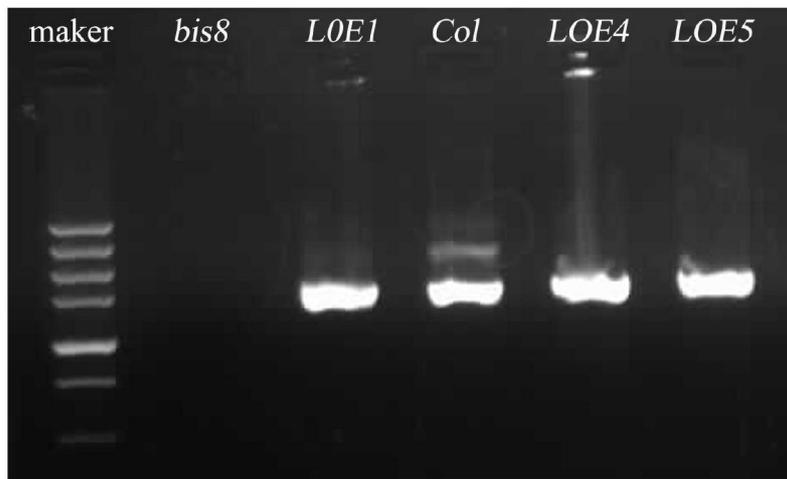


图2

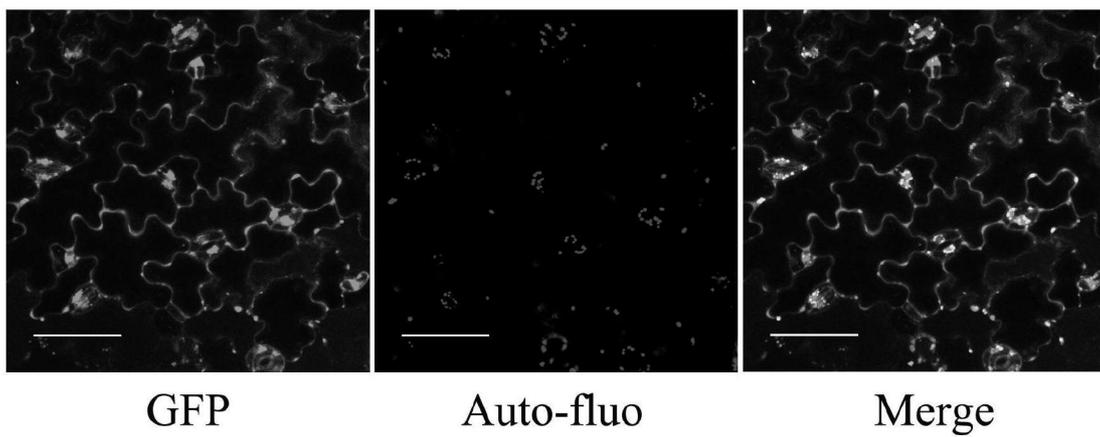
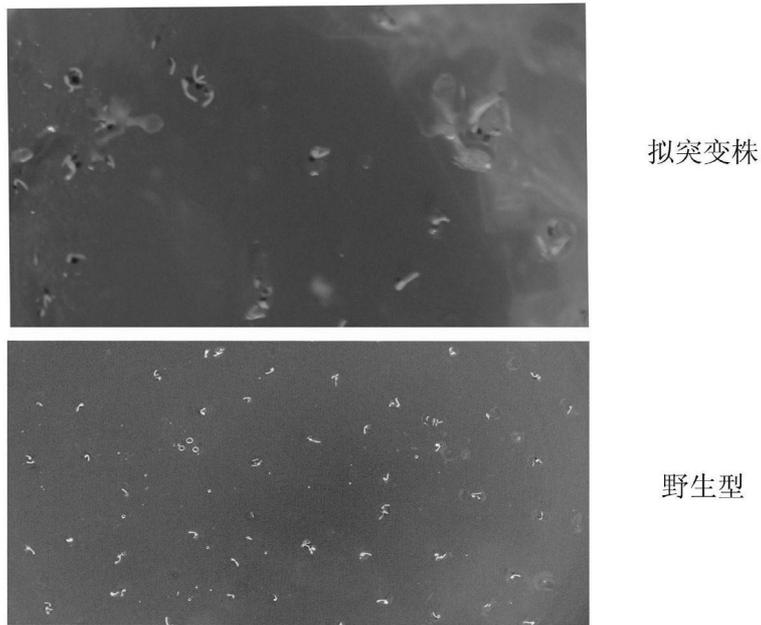


图3



0.04%的正丁醇处理拟南芥种子（培养10天）

图4

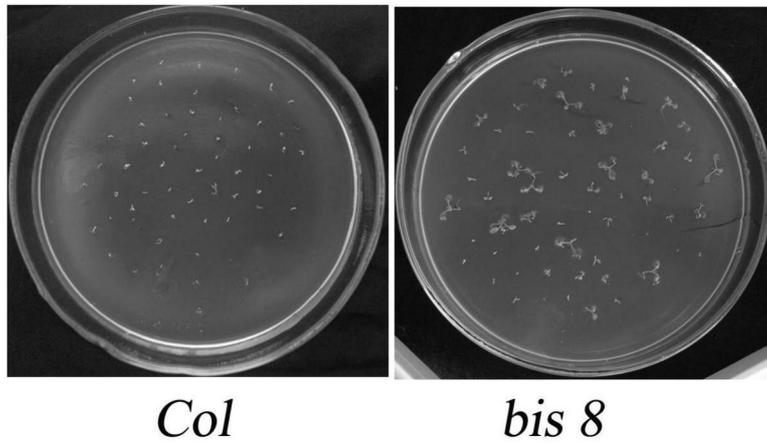


图5

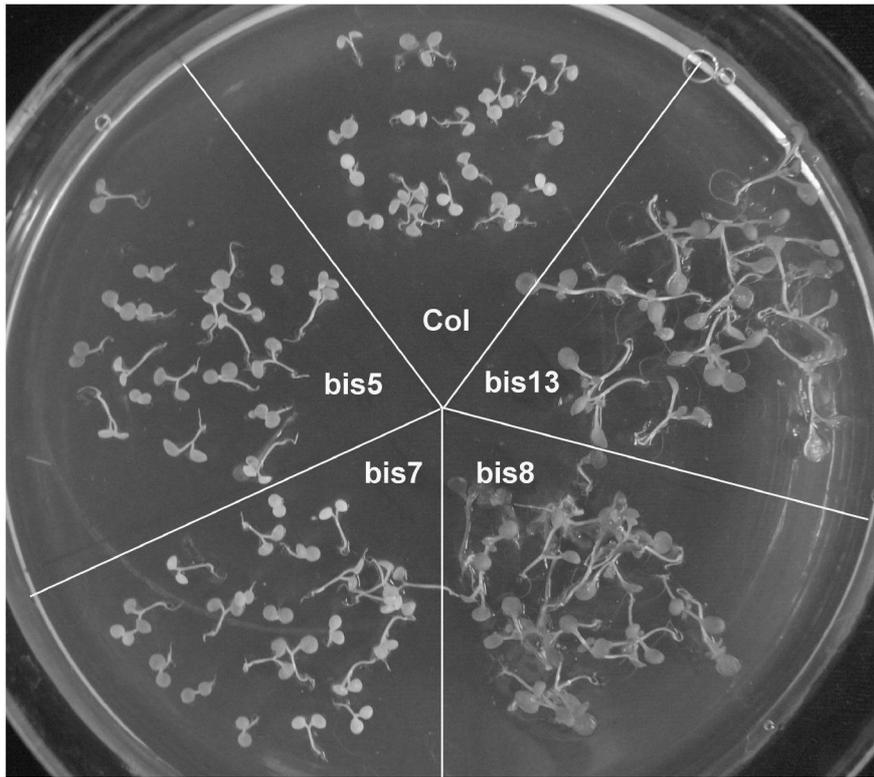


图6

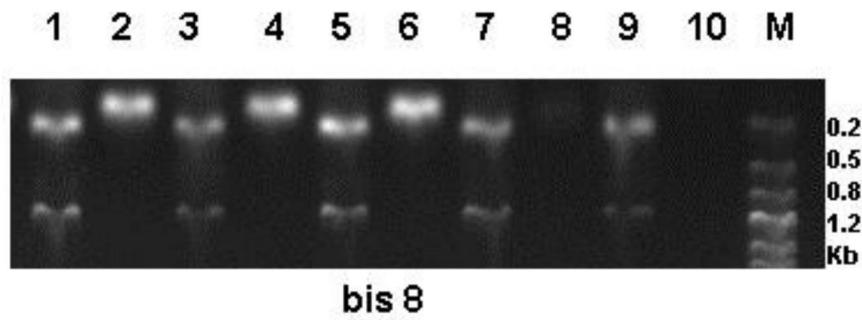


图7

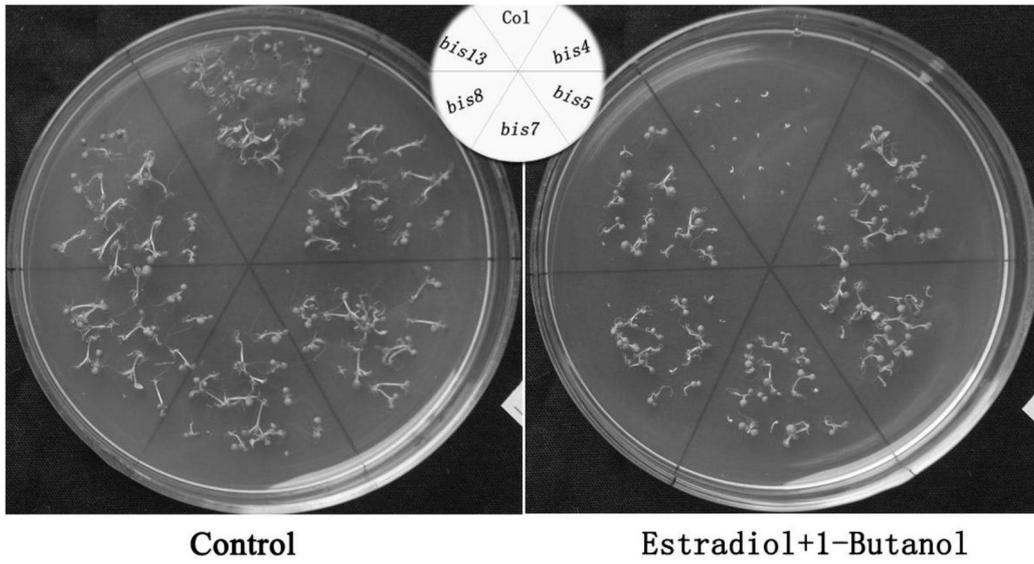


图8

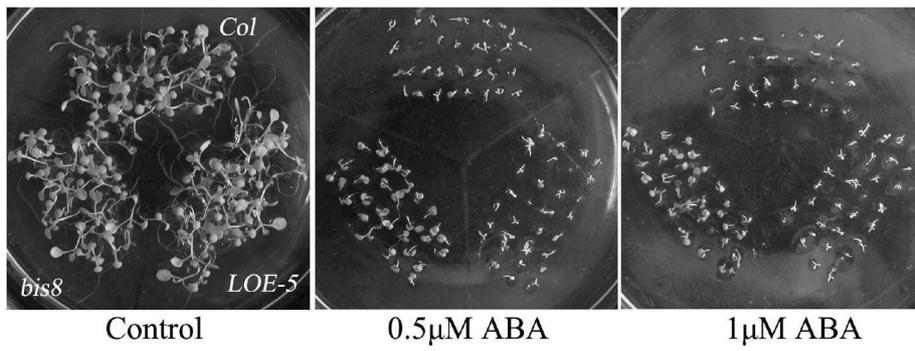


图9

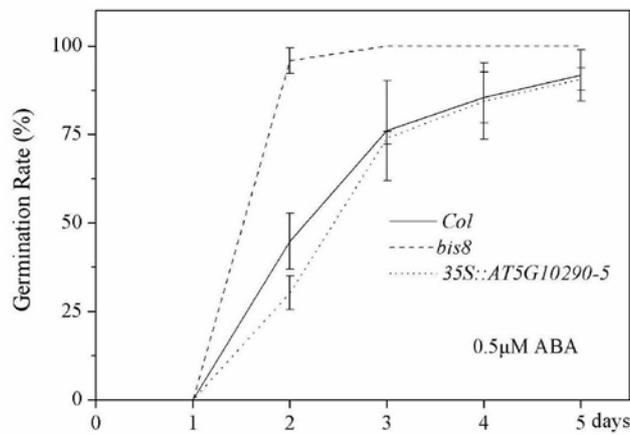


图10

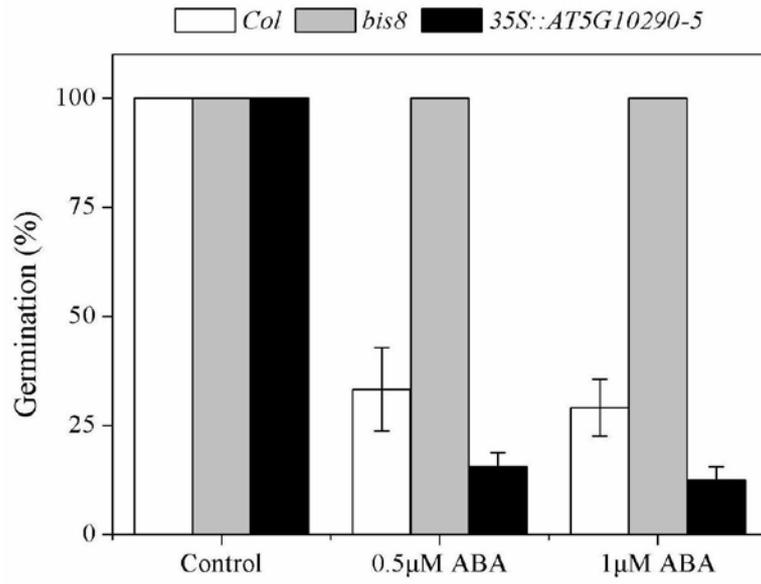


图11



图12

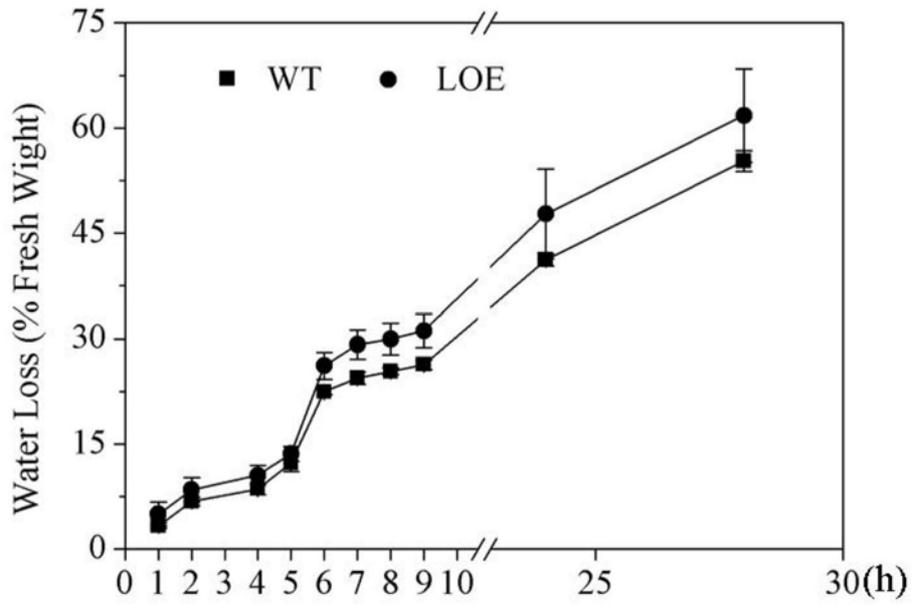


图13

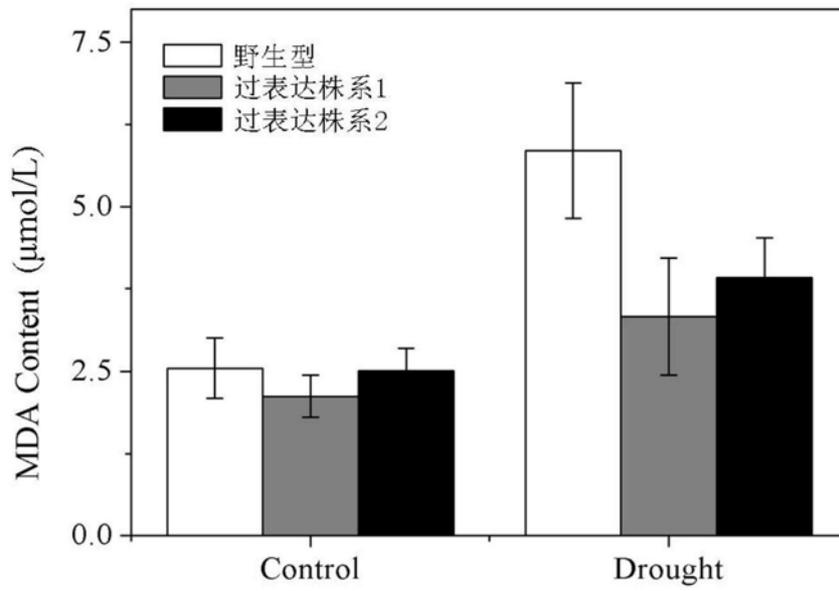


图14