



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111690048 B

(45) 授权公告日 2021.10.29

(21) 申请号 202010684695.5

C12N 15/29 (2006.01)

(22) 申请日 2020.07.16

C12N 15/82 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A01H 5/06 (2018.01)

申请公布号 CN 111690048 A

A01H 6/46 (2018.01)

(43) 申请公布日 2020.09.22

(56) 对比文件

(73) 专利权人 中国农业大学

CN 101481410 A, 2009.07.15

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

CN 101525621 A, 2009.09.09

(72) 发明人 辛明明 冯曼 孙其信 倪中福
彭惠茹 姚颖垠 胡兆荣 郭伟龙
杨光辉

审查员 蒋超

(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 何叶喧

(51) Int. Cl.

C07K 14/415 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

序列表2页 附图4页

(54) 发明名称

植物抗旱相关蛋白TaCLE3B及其编码基因与应用

(57) 摘要

本发明公开了植物抗旱相关蛋白TaCLE3B及其编码基因与应用。本发明提供的蛋白质,来源于小麦(*Triticum aestivum* L.),命名为TaCLE3B蛋白,是序列表中序列1所示的蛋白质。编码TaCLE3B蛋白的基因也属于本发明的保护范围。编码TaCLE3B蛋白的基因命名为TaCLE3B基因。本发明还保护TaCLE3B蛋白在调控植物侧根数目和/或调控植物抗旱性中的应用。本发明还保护TaCLE3B基因的应用,为如下(b1)和/或(b2):(b1)培育侧根数目增多的转基因植物;(b2)培育抗旱性增高的转基因植物。本发明对于植物侧根发育以及植物抗旱的研究和应用具有重要意义。

1. TaCLE3B蛋白在调控小麦属植物侧根数目和/或调控植物抗旱性中的应用；所述TaCLE3B蛋白是序列表中序列1所示的蛋白质。
2. 编码TaCLE3B蛋白的基因的应用,为如下(b1)和/或(b2):
 - (b1) 培育侧根数目增多的转基因小麦属植物;
 - (b2) 培育抗旱性增高的转基因小麦属植物;所述TaCLE3B蛋白是序列表中序列1所示的蛋白质。
3. 如权利要求2所述的应用,其特征在于:
所述编码TaCLE3B蛋白的基因是如下(1)或(2):
 - (1) 编码区如序列表中序列2所示的DNA分子;
 - (2) 序列表中序列3所示的DNA分子。
4. 一种培育转基因小麦属植物的方法,包括如下步骤:将编码TaCLE3B蛋白的基因导入受体小麦属植物中,得到侧根数目增多和/或抗旱性增高的转基因小麦属植物;所述TaCLE3B蛋白是序列表中序列1所示的蛋白质。
5. 如权利要求4所述的方法,其特征在于:
所述编码TaCLE3B蛋白的基因是如下(1)或(2):
 - (1) 编码区如序列表中序列2所示的DNA分子;
 - (2) 序列表中序列3所示的DNA分子。
6. 一种小麦属植物育种方法,包括如下步骤:增加目的小麦属植物中TaCLE3B蛋白的含量和/或活性,从而使小麦属植物的侧根数目增多和/或抗旱性增高;所述TaCLE3B蛋白是序列表中序列1所示的蛋白质。

植物抗旱相关蛋白TaCLE3B及其编码基因与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种植物抗旱相关蛋白TaCLE3B及其编码基因与应用。

背景技术

[0002] 侧根一般起源于中柱鞘建成细胞,是植物庞大根系吸收网络的重要组成部分,在固定植株、扩大根系吸收面积及增强根系生理功能等方面都具有重要作用。随着根系的发育,根的内部结构不断老化,木栓化程度加重,吸收能力急剧下降,供给作物生长所需的水分、养分就主要靠侧根来完成。

[0003] 小麦作为我国第二大口粮作物,在农业生产上具有重要地位,参与其侧根发育和抗旱机制的多肽激素基因尚未见报道。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种植物抗旱相关蛋白TaCLE3B及其编码基因与应用。

[0005] 本发明提供的蛋白质,来源于小麦(*Triticum aestivum* L.),命名为TaCLE3B蛋白,是如下(a1)或(a2)或(a4)或(a4)或(a5)或(a6):

[0006] (a1) 序列表中序列1所示的蛋白质;

[0007] (a2) 将序列表中序列1所示的蛋白质经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且与植物侧根数目相关的由其衍生的蛋白质;

[0008] (a3) 将序列表中序列1所示的蛋白质经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且与植物抗旱性相关的由其衍生的蛋白质;

[0009] (a4) 在(a1)所述蛋白质的N端或/和C端连接标签得到的融合蛋白;

[0010] (a5) 来源于小麦且与(a1)具有98%以上同一性且与植物侧根数目相关的蛋白质;

[0011] (a6) 来源于小麦且与(a1)具有98%以上同一性且与植物抗旱性相关的蛋白质。

[0012] 标签具体如表1所示。

[0013] 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
HA	9	YPYDVPDYA

[0015] 编码TaCLE3B蛋白的基因也属于本发明的保护范围。

[0016] 编码TaCLE3B蛋白的基因命名为TaCLE3B基因。

[0017] TaCLE3B基因是如下(1)或(2)或(3)或(4):

- [0018] (1) 编码区如序列表中序列2所示的DNA分子；
- [0019] (2) 序列表中序列3所示的DNA分子；
- [0020] (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；
- [0021] (4) 来源于小麦且与(1)或(2)限定的DNA分子至少具有70%、至少具有75%、至少具有80%、至少具有85%、至少具有90%、至少具有95%、至少具有96%、至少具有97%、至少具有98%或至少具有99%同源性且编码所述蛋白质的DNA分子。
- [0022] 所述严格条件是在 $2 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS的溶液中, 在 68°C 下杂交并洗膜2次, 每次5min, 又于 $0.5 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS的溶液中, 在 68°C 下杂交并洗膜2次, 每次15min。
- [0023] 含有TaCLE3B基因的重组载体、含有TaCLE3B基因的表达盒或含有TaCLE3B基因的重组菌均属于本发明的保护范围。
- [0024] 可用现有的植物表达载体构建含有TaCLE3B基因的重组表达载体。
- [0025] 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, 它们可单独使用或与其它植物启动子结合使用。此外, 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, 这些增强子区域可以是ATG起始密码子或邻接区域起始密码子等, 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进行鉴定及筛选, 可对所用表达载体进行加工, 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、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物。
- [0026] 所述植物表达载体具体可为载体载体pMWB111。
- [0027] 含有TaCLE3B基因的重组载体具体可为在载体pMWB111的Hind III酶切位点插入序列表的序列3所示的双链DNA分子得到的重组质粒pMWB111-TaCLE3B。
- [0028] 本发明还保护TaCLE3B蛋白在调控植物侧根数目和/或调控植物抗旱性中的应用。
- [0029] 本发明还保护TaCLE3B基因、含有TaCLE3B基因的重组载体或含有TaCLE3B基因的表达盒的应用, 为如下(b1)和/或(b2):
- [0030] (b1) 培育侧根数目增多的转基因植物；
- [0031] (b2) 培育抗旱性增高的转基因植物。
- [0032] 本发明还保护一种培育转基因植物的方法, 包括如下步骤: 将TaCLE3B基因导入受体植物中, 得到侧根数目增多的转基因植物。将TaCLE3B基因导入受体植物, 具体通过将重组质粒pMWB111-TaCLE3B导入受体植物实现。
- [0033] 本发明还保护一种培育转基因植物的方法, 包括如下步骤: 将TaCLE3B基因导入受体植物中, 得到抗旱性增高的转基因植物。将TaCLE3B基因导入受体植物, 具体通过将重组质粒pMWB111-TaCLE3B导入受体植物实现。
- [0034] 本发明还保护一种植物育种方法, 包括如下步骤: 增加目的植物中TaCLE3B蛋白的含量和/或活性, 从而使植物侧根数目增多。
- [0035] 本发明还保护一种植物育种方法, 包括如下步骤: 增加目的植物中TaCLE3B蛋白的含量和/或活性, 从而使植物抗旱性增高。
- [0036] 以上任一所述受体植物为单子叶植物或双子叶植物。以上任一所述受体植物为禾

本科植物。以上任一所述受体植物为小麦属植物。以上任一所述受体植物为六倍体小麦。以上任一所述受体植物为小麦CB037。

[0037] 以上任一所述目的植物为单子叶植物或双子叶植物。以上任一所述目的植物为禾本科植物。以上任一所述目的植物为小麦属植物。以上任一所述目的植物为六倍体小麦。以上任一所述目的植物为小麦CB037。

[0038] 本发明发现,将TaCLE3B基因导入小麦,可以使小麦的侧根数目显著增多且耐旱性显著提高。本发明对于植物侧根发育以及植物抗旱的研究和应用具有重要意义。

附图说明

[0039] 图1为TaCLE3B基因表达具有组织特异性的结果。

[0040] 图2为部分植株进行PCR鉴定的电泳图。

[0041] 图3为部分植株的TaCLE3B基因的相对表达量结果。

[0042] 图4为根系扫描的结果。

[0043] 图5为侧根数目统计结果。

[0044] 图6为干旱处理组的表型照片。

[0045] 图7为干旱处理组的存活率统计结果。

具体实施方式

[0046] 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。如无特殊说明,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。

[0047] 小麦CB037属于普通六倍体小麦(在文献中提及为“wheat cultivar, cvCB037”),载体pMWB111(在文献中提及为“pMWB111 vector”),均记载于如下文献:Ning Zhang, Yujing Yin, Xinye Liu, Shaoming Tong, Jiewen Xing, Yuan Zhang, Ramesh N. Pudake, Edenys Miranda Izquierdo, Huiru Peng, Mingming Xin, Zhaorong Hu, Zhongfu Ni, Qixin Sun, Yingyin Yao. (2017). The E3 Ligase TaSAP5 Alters Drought Stress Responses by Promoting the Degradation of DRIP Proteins. *Plant Physiology*, 175, 1878-1892.。

[0048] 实施例1、

[0049] 一、TaCLE3B蛋白及其编码基因的发现

[0050] 从水培8天的小麦CB037的根系中发现一个新蛋白,如序列表的序列1所示,命名为TaCLE3B蛋白。将编码TaCLE3B蛋白的基因命名TaCLE3B基因。TaCLE3B基因位于小麦5BL染色体。小麦CB037的cDNA中,TaCLE3B基因(开放阅读框)如序列表的序列2所示。

[0051] 二、TaCLE3基因表达具有组织特异性

[0052] 供试材料为:小麦CB037的根、茎、穗下节、叶片、芒、颖壳、外稃、内稃、雄蕊、雌蕊、胚乳。

[0053] 提取供试材料的总RNA并反转录得到cDNA。以cDNA为模板进行荧光定量PCR。

[0054] 用于检测TaCLE3A基因(A基因组中的同源基因)的引物对如下:

- [0055] TaCLE3-AF:CTGTGCTTCTGCGTCTGTTC;
- [0056] TaCLE3-AR:GCCTCTGGAGGTCCATAA。
- [0057] 用于检测TaCLE3B基因的引物对如下:
- [0058] TaCLE3-BF:GTGCTTCTGCGTCTGCTTG;
- [0059] TaCLE3-BR:CCAGATCGGTGATCTCTTGCT。
- [0060] 用于检测TaCLE3D基因(D基因组中的同源基因)的引物对如下:
- [0061] TaCLE3-DF:TTAGTCGTCCTTCTCCTCGCT;
- [0062] TaCLE3-DR:GGTCCCATAGACGACCAGG。
- [0063] 用于检测内参基因(β -Actin基因)的引物对如下:
- [0064] β -Actin-F:GGAATCCATGAGACCACCTAC;
- [0065] β -Actin-R:GACCCAGACAACCTCGCAAC。
- [0066] $C = 2^{-\Delta Ct}$, $\Delta Ct = Ct_{\text{目标基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$ 。计算三个重复的C值的平均值作为目的基因的相对表达水平。
- [0067] 结果见图1。
- [0068] 三、重组质粒的构建
- [0069] 将序列列表的序列3所示的双链DNA分子插入载体pMWB111的Hind III酶切位点,得到重组质粒pMWB111-TaCLE3B。重组质粒pMWB111-TaCLE3B已进行测序验证。
- [0070] 四、制备转基因植物
- [0071] 1、将重组质粒pMWB111-TaCLE3B导入根癌农杆菌EHA105,得到重组农杆菌。
- [0072] 2、采用步骤1得到的重组农杆菌对小麦CB037的胚性愈伤组织进行侵染,然后依次进行分化培养、生根培养、除草剂抗性筛选(筛选浓度为250mg/L),得到23株 T_0 代再生植株。
- [0073] 3、步骤2得到的23株 T_0 代再生植株,分别进行PCR鉴定。
- [0074] PCR鉴定的方法:取植株叶片,提取基因组DNA,采用pMWB111-F和TaCLE3-111-R组成的引物对进行PCR扩增,如果得到扩增产物,鉴定结果为阳性,该植株为转基因植株。
- [0075] pMWB111-F:5'-TAGCCCTGCCTTCATACGCT-3';
- [0076] TaCLE3-111-R:5'-CGAGCTCTCAGTGGTGGTG-3'。
- [0077] 23株 T_0 代再生植株中,16株为转基因植株。
- [0078] 部分植株进行PCR鉴定的电泳图见图2。图2中,M为分子量标记,#1至#7分别代表不同的转基因植株,+代表重组质粒pMWB111-TaCLE3B(阳性对照),WT代表小麦CB037植株。
- [0079] 4、步骤3筛选到的16株转基因植株,通过实时定量PCR鉴定TaCLE3B基因的相对表达量。将小麦CB037植株作为转基因植株的对照。
- [0080] (1)取植株叶片,提取总RNA,反转录得到cDNA。
- [0081] (2)以cDNA为模板,以actin基因为内参基因,采用AceQ Qpcr SYBR Green Master Mix试剂盒(vazyme,南京),采用CFX96™Real-Time System(BIO-RAD)荧光定量仪,进行实时定量PCR。
- [0082] 用于鉴定TaCLE3B基因的引物对如下:
- [0083] qTaCLE3-F:5'-GTGCTTCTGCGTCTGCTTG-3';
- [0084] qTaCLE3-R:5'-CCAGATCGGTGATCTCTTGCT-3'。
- [0085] 用于鉴定actin基因的引物对如下:

[0086] actin-F:5'-GACCGTATGAGCAAGGAGAT-3';

[0087] actin-R:5'-CAATCGCTGGACCTGACTC-3'.

[0088] 实时定量PCR的反应体系(10 μ l):2 \times Green Master Mix 5 μ l,引物F(2 μ M) 1 μ l,引物R(2 μ M) 1 μ l,cDNA模版1 μ l,ddH₂O 2 μ l。

[0089] 实时定量PCR的反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性5min;94 $^{\circ}$ C 20s、60 $^{\circ}$ C 20s、72 $^{\circ}$ C 25s,40次循环;72 $^{\circ}$ C 5min;60 $^{\circ}$ C-95 $^{\circ}$ C,每隔0.2 $^{\circ}$ C读板做溶解曲线。

[0090] 采用比较阈值法对荧光实时定量PCR结果进行分析, $C=2^{-\Delta Ct}$, $\Delta Ct=Ct$ (目的基因)- Ct (内参基因)。采用双尾等方差t测验的方法进行显著性检测($P<0.05$)。

[0091] 部分结果见图3。图3中,WT代表小麦CB037植株,#1、#2、#3、#4、#9、#11、#26、#28、#33、#34分别代表不同的转基因植株。小麦CB037植株的叶片中未检测到TaCLE3B基因表达,转基因植株的叶片中可以检测到TaCLE3B基因表达。

[0092] 5、自交获得后代。

[0093] 转基因植株自交并获得种子,即为T₁代种子,T₁代种子培育为植株即为T₁代植株。T₁代植株自交并获得种子,即为T₂代种子,T₂代种子培育为植株即为T₂代植株。将T₁代植株和T₂代植株进行PCR鉴定(方法同步骤3)。对于某一T₁代植株,如果该植株及其自交得到的T₂代植株均为PCR鉴定阳性的转基因植株,该T₁代植株及其后代为一个纯合的转基因株系。

[0094] 随机取2个转基因株系(OE2株系和OE34株系)进行步骤六的鉴定。

[0095] 五、制备转空载体植物

[0096] 用载体pMWB111代替重组质粒pMWB111-TaCLE3B,参照步骤四进行操作,得到转空载体株系。

[0097] 六、表型鉴定

[0098] 供试种子:OE2株系的T₃代种子、OE34株系的T₃代种子、小麦CB037的种子、转空载体株系的T₃代种子。

[0099] 1、苗期侧根性状鉴定

[0100] 培养条件:22 $^{\circ}$ C、16h光照/8h黑暗。

[0101] (1)取供试种子,用1%次氯酸钠水溶液浸泡消毒15min,然后用蒸馏水清洗6次。

[0102] (2)取完成步骤(1)的种子,4 $^{\circ}$ C下避光放置3天。

[0103] (3)取完成步骤(2)的种子,培养至幼苗萌发2天。

[0104] (4)取长势一致的幼苗,转移到pH6.0的Hogland营养液进行水培(每2天更换一次营养液),水培6天后观察植株的侧根生长状态,用扫描仪对根系扫描,统计植株侧根数目。

[0105] 进行三次试验,每次重复试验每种供试种子设置20个生物学重复。

[0106] 扫描的结果见图4。侧根数目见图5。与小麦CB037相比,OE2株系和OE34株系植株的侧根数目均显著增多。与小麦CB037相比,转空载体株系植株的侧根数目无显著差异。

[0107] 2、抗旱性鉴定

[0108] 长方体培养钵(尺寸为43cm*16cm*14cm),装有土壤800g。

[0109] 每个培养钵播种27粒种子。

[0110] 正常组:在培养钵中播种供试种子(0时刻),然后浇灌至土壤水分饱和,之后每周浇水1次。

[0111] 干旱处理组:在培养钵中播种供试种子,然后浇灌至土壤水分饱和,然后持续不浇

水3周(此时可观察到植株濒临萎蔫的状态),之后每周浇水1次。

[0112] 培养条件:22℃、16h光照/8h黑暗。

[0113] 从0时刻开始计天数,每24小时作为1天,统计第35天的存活率。

[0114] 进行三次重复试验,每次重复试验中每种供试种子设置54粒生物学重复。

[0115] 正常组:0E2株系、0E34株系、小麦CB037和转空载体株系植株的生长状况均无显著差异。干旱处理组:小麦CB037和转空载体株系植株大量萎蔫死亡,0E2株系、0E34株系的植株的存活率显著高于小麦CB037和转空载体株系植株。

[0116] 第35天,干旱处理组的照片见图6,存活率见图7。小麦CB037植株的存活率为8.3%,转空载体株系植株的存活率为8.2%,0E2株系植株的存活率为50%,0E34株系的存活率为45.8%。

[0117] 结果表明,过表达TaCLE3B基因能够显著提高小麦的抗旱性。

[0001] SEQUENCE LISTING

[0002] <110> 中国农业大学

[0003] <120> 植物抗旱相关蛋白TaCLE3B及其编码基因与应用

[0004] <130> GNCYX201947

[0005] <160> 3

[0006] <170> PatentIn version 3.5

[0007] <210> 1

[0008] <211> 88

[0009] <212> PRT

[0010] <213> Triticum aestivum L.

[0011] <400> 1

[0012] Met Met Arg Leu Leu Pro Cys Phe Cys Val Cys Leu Val Val Val Leu

[0013] 1 5 10 15

[0014] Leu Val Gly Ser Ser Pro Ala Asp Leu Leu Ala Gly Arg Cys Pro Leu

[0015] 20 25 30

[0016] His His Arg Arg Gln Leu Glu Asp Val Asp Ser Gly Gly Gly Leu Gln

[0017] 35 40 45

[0018] Ala Thr Ala Val Ala Ser Thr Thr Ala Ala Val Arg Pro Gln Gln Glu

[0019] 50 55 60

[0020] Ile Thr Asp Leu Val Val Tyr Gly Thr Ser Lys Arg Leu Ser Pro Gly

[0021] 65 70 75 80

[0022] Gly Ser Asn Pro Gln His His His

[0023] 85

[0024] <210> 2

[0025] <211> 267

[0026] <212> DNA

[0027] <213> Triticum aestivum L.

[0028] <400> 2

[0029] atgatgaggc tactcccggtg cttctgcgtc tgcttggtcg tcgtcctcct cgtcggctcc 60

[0030] tccccggcgg atctcttggc cgggcgctgc ccgctgcacc accgtaggca gctcgaggac 120

[0031] gtcgacagcg gtggcggcct gcaggcaacg gcggtggcga gcaccacgcg tgctgtgcgg 180

[0032] ccacagcaag agatcaccga tctggtcgtc tatgggacct ccaagaggct cagtcttggga 240

[0033] ggatccaacc ctcagcacca cactga 267

[0034] <210> 3

[0035] <211> 2571

[0036] <212> DNA

[0037] <213> Artificial sequence

[0038] <400> 3

[0039] gcatgcctgc agtgcagcgt gaccgggtcg tgcccctctc tagagataat gagcattgca 60

[0040] tgtctaagtt ataaaaaatt accacatatt ttttttgta cacttgtttg aagtgcagtt 120

[0041] tatctatctt tatacatata tttaaacttt actctacgaa taatataatc tatagtacta 180

[0042]	caataatc agtgtttag agaatcatat aaatgaacag ttagacatgg tctaaaggac	240
[0043]	aattgagtat ttgacaaca ggactctaca gttttatctt tttagtgtgc atgtgttctc	300
[0044]	ctttttttt gcaaatagct tcacctatat aatacttcat ccattttatt agtacatcca	360
[0045]	tttagggttt agggttaatg gtttttatag actaattttt ttagtacatc tattttattc	420
[0046]	tattttagcc tctaaattaa gaaaactaaa actctatttt agttttttta tttaataatt	480
[0047]	tagatataaa atagaataaa ataaagtgac taaaaattaa acaaataccc ttttaagaaat	540
[0048]	taaaaaaact aaggaaacat ttttcttgtt tcgagtagat aatgccagcc tgttaaacgc	600
[0049]	cgtcgacgag tctaaccgac accaaccagc gaaccagcag cgtcgcgctc ggccaagcga	660
[0050]	agcagacggc acggcatctc tgtcgctgcc tctggacccc tctcgagagt tccgctccac	720
[0051]	cgttggactt gctccgctgt cggcatccag aaattgctgt gcggagcggc agacgtgagc	780
[0052]	cggcacggca ggggcctcc tcctctctc acggcaccgg cagctacggg ggattccttt	840
[0053]	cccaccgctc cttegtttc ctttctctc ccgccgtaat aaatagacac cccctccaca	900
[0054]	ccctctttcc ccaacctgt gttgttcgga gcgcacacac acacaaccag atctccccc	960
[0055]	aatccacccg tcggcacctc cgcttcaagg tacgccgctc gtctcccc cccccccct	1020
[0056]	ctctaccttc tctagatcgg cgttccggtc catggtagg gcccgtagt tctacttctg	1080
[0057]	ttcatgtttg tgtagatcc gtgtttgtgt tagatccgtg ctgctagcgt tcgtacacgg	1140
[0058]	atgcgacctg tacgtcagac acgttctgat tgctaactg ccagtgttc tctttgggga	1200
[0059]	atctgggat ggctctagcc gttccgcaga cgggatcgat ttcatgattt tttttgttc	1260
[0060]	gttgcatagg gtttggttg cccttttctt ttatttcaat atatgccgtg cacttgtttg	1320
[0061]	tcgggtcadc ttttcatgct ttttttgtc ttggttga tgatgtggtc tggttgggcg	1380
[0062]	gtcgttctag atcggagtag aattaattct gtttcaaact acctggtgga tttattaatt	1440
[0063]	ttggatctgt atgtgtgtgc catacatatt catagttagc aattgaagat gatggatgga	1500
[0064]	aatatcgatc taggataggt atacatgttg atgcggggtt tactgatgca tatacagaga	1560
[0065]	tgctttttgt tcgcttggtt gtgatgatgt ggtgtggttg ggcggtcgtt cattcgttct	1620
[0066]	agatcggagt agaatactgt ttcaaactac ctggtgtatt tattaatttt ggaactgtat	1680
[0067]	gtgtgtgtca tacatcttca tagttacgag tttaagatgg atggaaatat cgatctagga	1740
[0068]	taggtataca gttgatgtg ggttttactg atgcatatac atgatggcat atgcagcatc	1800
[0069]	tattcatatg cttaacctt gagtacctat ctattataat aaacaagat gttttataat	1860
[0070]	tattttgac ttgatatact tggatgatgg catatgcagc agctatatgt ggattttttt	1920
[0071]	agccctgect tcataccta tttatttctt tggtactgtt tcttttctc atgctcacc	1980
[0072]	tgttgtttgg tgttacttct gcaggctgac tctagaggat ccccggtatg atgaggctac	2040
[0073]	tcccgtgctt ctgcgtctgc ttggtcgtc tcctctctc cggtcctcc ccggcggatc	2100
[0074]	tctggccgg gcgtgcccg ctgcaccacc gtaggcagct cgaggacgtc gacagcggtg	2160
[0075]	gcggcctgca ggcaacggcg gtggcgagca ccacggctgc tgtgcggcca cagcaagaga	2220
[0076]	tcaccgatct ggtcgtctat gggacctca agaggctcag tcttgaggga tccaacctc	2280
[0077]	agcaccacca ctgagagctc gaatttccc gatcgttcaa acatttggca ataaagtctc	2340
[0078]	ttaagattga atcctgttgc cggctctg atgattatca tataatttct gttgaattac	2400
[0079]	gttaagcatg taataattaa catgtaatgc atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg	2460
[0080]	attagagtcc cgcaattata catttaatac gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac	2520
[0081]	taggataaat tatcgcgctc ggtgtcatct atgttactag atcgggaatt c	2571

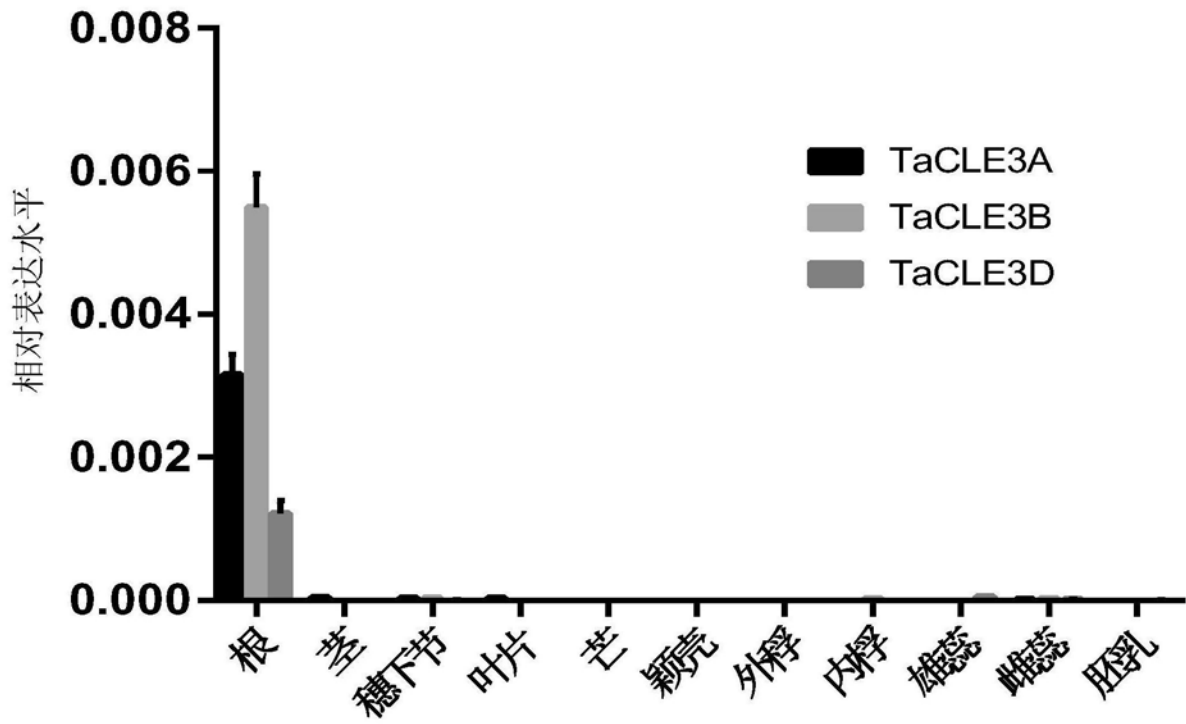


图1

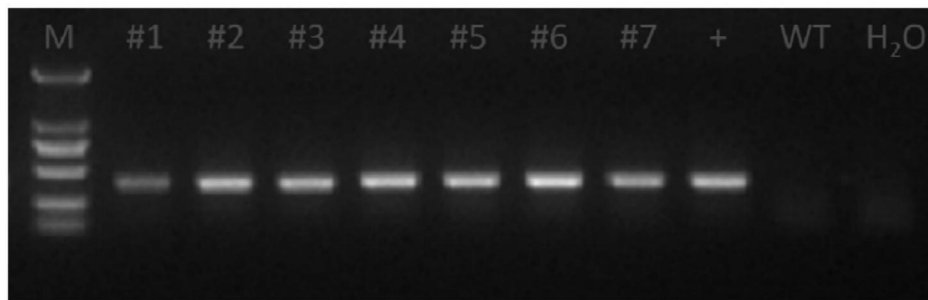


图2

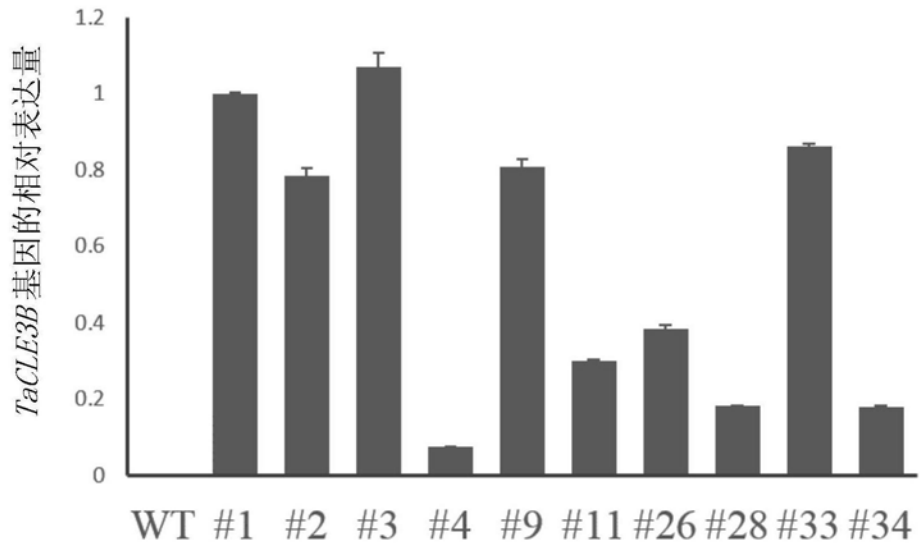


图3

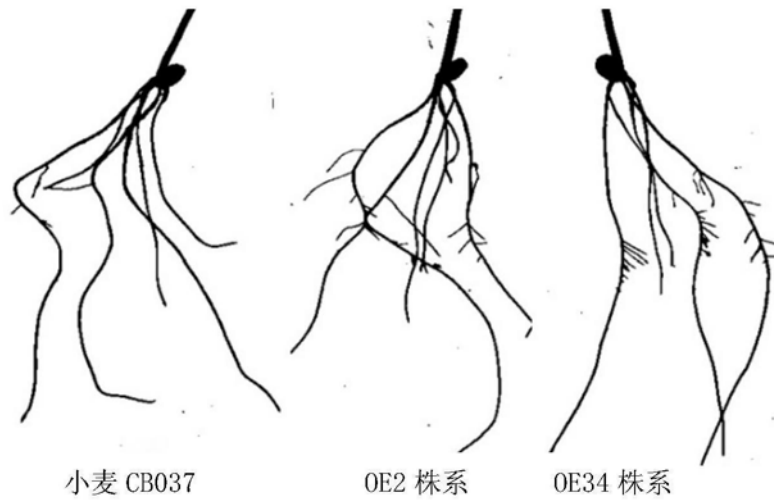


图4

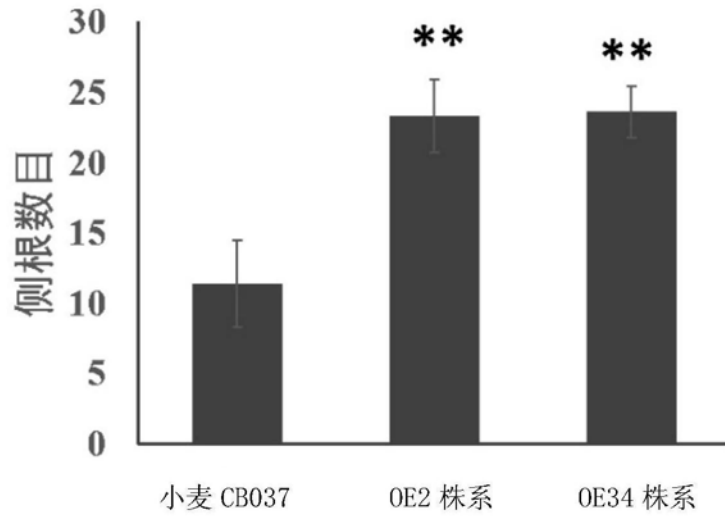


图5

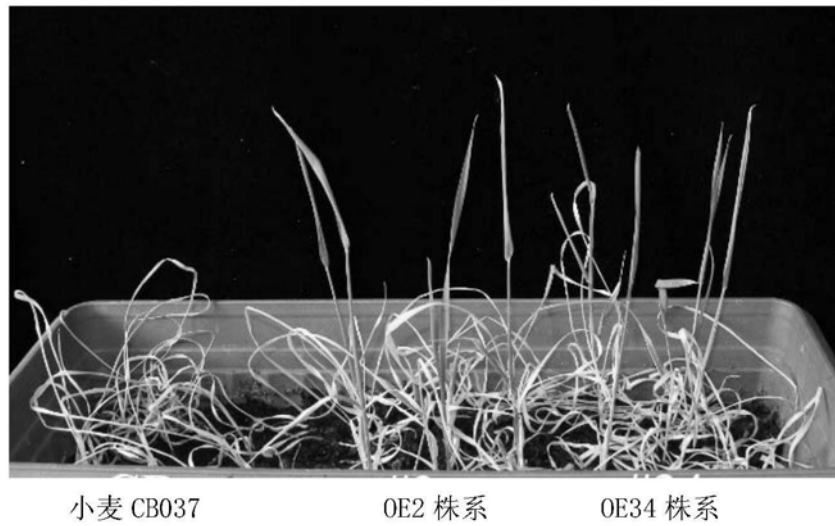


图6

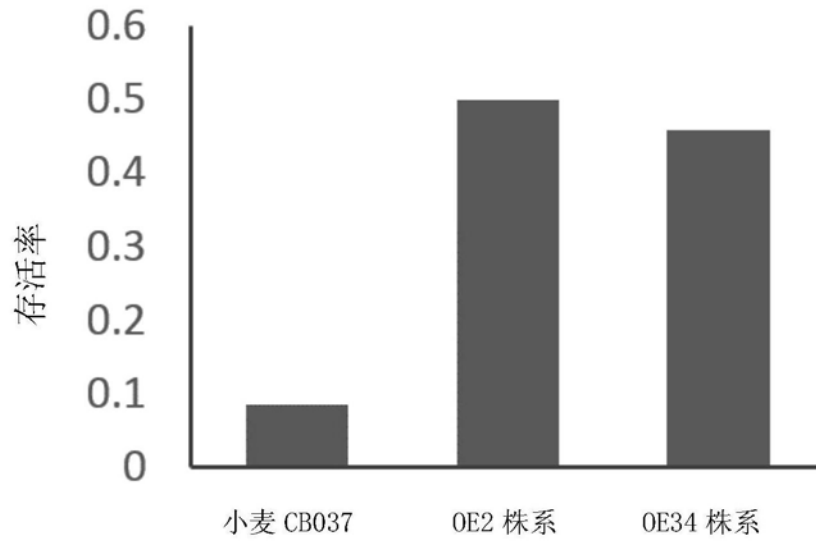


图7