



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108456683 B

(45) 授权公告日 2020.11.06

(21) 申请号 201710094236.X	CN 106047893 A,2016.10.26
(22) 申请日 2017.02.21	CN 104004070 A,2014.08.27
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 108456683 A	KR 101380049 B1,2014.04.01 Kawahara,Y. 等.Oryza sativa Japonica Group DNA, chromosome 2, cultivar: Nipponbare, complete sequence.《GenBank》.2015,Accession No. AP014958,REGION: 27316825..27325472.
(43) 申请公布日 2018.08.28	Deng L 等.Suppressor of rid1 (SID1) shares common targets with RID1 on florigen genes to initiate floral transition in rice.《PLoS Genet》.2017,第13卷(第2期),第1-24页.
(73) 专利权人 华中农业大学 地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号	白波 等.OsBBX14调节水稻抽穗期的机理研究.《2016年全国植物生物学大会摘要集》.2016,第133页.
(72) 发明人 吴昌银 邓利	黄骥 等.一个新的水稻C2H2型锌指蛋白cDNA的克隆与序列分析.《南京农业大学学报》.2002,第25卷(第2期),第110-112页.
(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001 代理人 张红兵	审查员 马家兴
(51) Int.Cl. C12N 15/29 (2006.01) C07K 14/415 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)	权利要求书1页 说明书13页 序列表9页 附图6页
(56) 对比文件 CN 106318968 A,2017.01.11 CN 102776201 A,2012.11.14 CN 101235378 A,2008.08.06	

(54) 发明名称

一个调控水稻抽穗期基因SID1的功能及应用

(57) 摘要

本发明属于植物基因工程技术领域。具体涉及一个调控水稻抽穗期基因SID1的功能及应用。本发明包括水稻抽穗期基因SID1的克隆、功能验证及应用。将所述的基因SID1或DNA片段转化到水稻植物内,能调控水稻的成花转换过程,从而调节水稻的抽穗时间,有利于提高产量形成及品种的地域分布。

CN 108456683 B

1. 水稻基因SID1在调控水稻抽穗期中的应用,其特征在于所述基因的核苷酸序列如序列表SEQ ID NO:1所示。

一个调控水稻抽穗期基因SID1的功能及应用

技术领域

[0001] 本发明属于植物基因工程技术领域。具体涉及一个调控植物(水稻)抽穗期基因SID1的克隆、功能验证及应用。将该基因或DNA片段转化到水稻植物内,能调控水稻的成花转换过程,从而调节水稻的抽穗时间,对水稻的产量形成及品种地域分布做出贡献。

背景技术

[0002] 开花(水稻上表现为抽穗)是显花植物由营养生长向生殖生长转换的一个重要的生长发育过程。由于人们对不同植物器官的使用需求不一样,就要求植物在合适的时间开花。水稻收获种子,在适宜时间开花,可以成功地完成生殖发育,避免霜冻、鸟虫害等不利因素的影响。木本果树开花、挂果、丰产时间是影响多年生果树经济适用性的重要因素,发掘和利用促进果木开花基因可以使果树提前开花见果,这就意味着农民可以提前获得收益,早见效、早收益提高了农民的种植积极性。菠菜、空心菜、山药等蔬菜作物主要收获其营养器官,延迟或避免这些植物开花可以提高有用的营养器官的得率。因此,调控植物开花时间对指导农作物品种改良及育种实践具有重要的应用意义。前期,本研究团队克隆了控制水稻成花转换的分子开关基因RID1(Rice Indeterminate 1)(RID1基因的克隆已在公开发表论文和申请专利中,见Wu等,RID1,encoding a Cys2/His2-type zinc finger transcription factor,acts as a master switch from vegetative to floral development in rice,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(2008):12915-12920;专利名称为:一个控制水稻成花转换及抽穗期基因RID1的克隆及应用,专利申请号:200810046989;公开号:CN101235378B)。通过遗传转化RID1的方法,可以调控水稻的成花转换。

[0003] 植物的开花时间受许多因素的影响,主要包括光周期、温度等外界因素和植物的生理状况(如年龄和叶片数)等内部因素(Baurle等,The timing of developmental transitions in plants,Cell(2006):655-664)。其中,光周期是影响植物开花最重要的环境调控因子之一。由于长日照条件促进拟南芥开花而短日照条件延迟拟南芥开花,所以拟南芥是一种长日照植物。大量的分子遗传学实验已经鉴定了一系列拟南芥开花调控的突变体并克隆了相关的突变基因,并根据相关突变基因的生物学功能,将拟南芥中控制开花的基因分属为6类调控路径:生物钟节律与光周期途径、春化途径、自主开花途径、年龄途径、赤霉素途径和海藻糖6磷酸(T6P)途径(Fornara等,SnapShot:Control of Flowering in Arabidopsis,Cell(2010):550,550e551-552;Wahl等,Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in Arabidopsis thaliana,Science(2013):704-707)。生物钟节律与光周期途径、春化途径主要受环境因素影响,而自主开花途径、年龄途径、赤霉素和T6P途径主要取决于植物发育年龄及内源激素、代谢物水平(Mouradov等,Control of flowering time:interacting pathways as a basis for diversity,Plant Cell(2002):S111-S130)。

[0004] 与拟南芥相反,水稻是一种典型的短日照模式植物,因此研究水稻开花的分子遗传学机理将有助于人们理解长日照植物与短日照植物在开花调控分子水平上的异同

(Izawa等,Comparative biology comes into bloom:genomic and genetic comparison of flowering pathways in rice and Arabidopsis,Curr Opin Plant Biol,(2003):113-120)。前人研究发现,水稻与拟南芥的光周期调控基因具有保守性,例如水稻的OsGI、Hd1及Hd3a等基因及它们的拟南芥同源基因GI、CO及FT在开花调控中起重要作用(Hayama等,Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice,Nature(2003):719-722;Yano等,Hd1,a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice,is closely related to the Arabidopsis flowering time gene CONSTANS,Plant Cell(2000):2473-2483;Kojima等,Hd3a,a rice ortholog of the Arabidopsis FT Gene,promotes transition to flowering downstream of Hd1 under short-day conditions.Plant Cell Physiol(2002):1096-1105)。但是,水稻与拟南芥在开花调控的分子机理上也有一些不同之处,比如在可诱导的光周期条件下,水稻的Hd1基因和其拟南芥同源基因CO均促进开花;但在非诱导的光周期条件下,水稻的Hd1基因延迟开花,而CO基因在拟南芥的开花调控中不起作用(Izawa等,Phytochrome mediates the external light signal to repress FT orthologs in photoperiodic flowering of rice,Genes Dev(2002):2006-2020;Hayama等,Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice,Nature(2003):719-722)。此外,有一些开花调控基因仅存在于水稻或拟南芥中。比如,水稻中Ehd1和Ehd4在长短日条件下起促进抽穗的作用,但在拟南芥中并不存在它们的同源基因;而拟南芥自主开花途径中关键调节基因FLC在水稻中也没有发现同源基因(Doi等,Ehd1,a B type response regulator in rice,confers short-day promotion of flowering and controls FT-like gene expression independently of Hd1,Genes Dev(2004):926-936;Gao等,Ehd4 encodes a novel and Oryza-Genus-Specific regulator of photoperiodic flowering in rice,Plos Genet(2013):e1003281;Michaels等,FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering,Plant Cell(1999):949-56)。

[0005] C2H2-类型锌指蛋白是真核生物中广泛存在的一大类转录因子家族,这类蛋白最主要的特点是N端含有保守的INDETERMINATE结构域,即IDD。研究表明植物中许多C2H2-类型锌指蛋白在植物生长发育过程中起着重要调节作用(Agarwal等,Genome-wide identification of C2H2zinc-finger gene family in rice and their phylogeny and expression analysis,Plant Mol.Biol(2007):467-485)。例如,玉米中克隆的ID1基因属于一类新的植物特异的IDD蛋白,这类IDD锌指蛋白含有一假定的核定位信号及四个不同的锌指模体。研究发现,ID1基因丧失功能突变体表现为开花延迟和花序突变为类似幼苗的营养器官(Colasanti等,The maize INDETERMINATE1 flowering time regulator defines a highly conserved zinc finger protein family in higher plants,BMC Genomics(2006):158;Colasanti等,The indeterminate gene encodes a zinc finger protein and regulates a leaf-generated signal required for the transition to flowering in maize,Cell(1998):593-603)。水稻中克隆的RID1基因是玉米ID1的直系同源基因,该基因突变体表现为不能完成营养生长向生殖生长转化,是水稻中鉴定的一个成花转换分子开关(Wu等,RID1,encoding a Cys2/His2-type zinc finger transcription

factor, acts as a master switch from vegetative to floral development in rice, Proc Natl Acad Sci U S A (2008):12915-12920; Park等, Rice Indeterminate 1 (OsId1) is necessary for the expression of Ehd1 (Early heading date 1) regardless of photoperiod, Plant J (2008):1018-1029; Matsubara等, Ehd2, a rice ortholog of the maize INDETERMINATE1 gene, promotes flowering by up-regulating Ehd1, Plant Physiol (2008):1425-1435)。本发明利用激活标签的技术在水稻中分离鉴定了rid1的抑制突变体基因SID1, SID1可以逆转rid1突变体不抽穗的表型, 该基因编码一种INDETERMINATE DOMAIN锌指蛋白, 突变体表型分析、基因表达分析和基因功能验证实验表明SID1是一个调控水稻抽穗期的新基因, 可用于分子调控水稻的抽穗时间。

发明内容

[0006] 本发明的目的是分离、克隆一个调控植物尤其是水稻抽穗期的新基因SID1及其编码蛋白, 通过遗传转化方法将SID1基因转化到水稻植物体内, 以调控植物(水稻)的开花期, 从而调节水稻的抽穗时间, 对水稻的产量形成及品种地域分布做出贡献。

[0007] 申请人将本发明克隆的调控植物(水稻)成花转换或/和抽穗期的新基因命名为Suppressor of rid1基因(简称SID1基因), 该基因的核苷酸序列如序列SEQ ID NO:1所示, 也可以是如本发明克隆的SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列有50%以上同源性的核苷酸序列, 当然还包括在所述的SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列中插入、替代或缺失一个或多个碱基而产生突变体的等位基因。依据上述发明思想, 本发明也可以是序列SEQ ID NO:3所示的SID1蛋白的氨基酸序列, 以及与SEQ ID NO:2所示基因对应的氨基酸序列中50%同源性以上的氨基酸序列, 包括在上述氨基酸序列中插入、替代或缺失一个或多个氨基酸而产生的功能改变的蛋白或蛋白类似物。

[0008] 本发明克隆的调控植物(水稻)抽穗期的基因SID1是通过激活标签的方法克隆的参与水稻抽穗期调控的基因。本发明已在组织器官上证明该基因主要在叶片中表达; 本发明克隆的SID1基因的Crispr缺失突变体表现为晚抽穗的表型, 正常的功能基因SID1转化rid1突变体后, 可以使rid1恢复开花抽穗。SID1蛋白含有保守的ID (INDETERMINATE DOMAIN) 结构域, ID结构域对rid1背景下的成花转化起决定性作用。

[0009] 本发明提供了一种利用SID1基因进行植物遗传转化从而改变植物开花时间的核苷酸序列和蛋白质序列。具体地说, 本发明提供了一种含有SEQ ID NO:1所示序列的基因或该基因的部分类似功能片段的载体, 所述的载体如图3中的A图所示的载体pU2300-SID1。

[0010] 本发明克隆的水稻抽穗期基因SID1可用于与其它调控元件, 例如组成型启动子(如Ubiquitin启动子)融合构建基因表达载体, 或与Cas9定点突变系统联用, 通过转基因技术、CRISPR/Cas9-Based基因编辑技术调控植物的开花特性(即提早开花、延迟开花或抑制成花等功能), 运用于改变品种的生育期、提高品种的地域适应范围、提高植物的营养器官的生物量等。

[0011] 本发明的技术方案如下所述:

[0012] 1、申请人前期利用T-DNA标签的方法克隆了控制水稻成花转换的分子开关基因RID1 (Rice Indeterminate 1) (Wu等, RID1, encoding a Cys2/His2-type zinc finger transcription factor, acts as a master switch from vegetative to floral

development in rice, Proc Natl Acad Sci U S A (2008):12915-12920), rid1 突变体的表型为永不抽穗。通过遗传筛选鉴定得到 rid1 的抑制突变体, 即 Suppressor of rid1 (sid1-D)。SID1 突变体的产生、筛选鉴定方法见实施例 1 中详细描述;

[0013] 2、利用 Tail-PCR 方法 (Liu 等, Efficient isolation and mapping of Arabidopsis thaliana T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR, Plant J (1995):457-463; Zhang 等, Non-random distribution of T-DNA insertions at various levels of the genome hierarchy as revealed by analyzing 13,804 T-DNA flanking sequences from an enhancer-trap mutant library, Plant J (2007):947-959) 分离 sid1-D 突变体 T-DNA 插入位点的侧翼序列, 序列分析显示 T-DNA 插入在 LOC_0s02g45054 (SID1) 和 LOC_0s02g45070 基因间区 (见图 2 中的 A 图);

[0014] 3、通过 T-DNA 插入与突变性状的共分离验证 (实施例 1 的第 3 部分) 及超表达互补实验 (实施例 1 的第 4 部分) 证明本发明获得的 SID1 基因恢复 rid1 正常抽穗;

[0015] 4、利用生物信息学分析 SID1 基因结构和蛋白质序列, SID1 含有典型的 C2H2 的锌指结构域和 IDD 结构域, 是植物特异的 IDD 蛋白家族新成员 (见图 4);

[0016] 5、定点突变 SID1 蛋白 ID domain 锌指基序中的保守氨基酸不能逆转 rid1 不抽穗表型, 证明 SID1 蛋白 ID domain 锌指基序对于启动成花转化过程、调控水稻抽穗期是必需的 (参见实施例 2 的第 2 部分);

[0017] 6、SID1 基因启动子融合报告基因 GUS 组织细胞定位结果表明 SID1 基因在感受光信号的叶片中表达丰度高, 与已经报道的开花基因表达部位相同。SID1 定位于细胞核内, 有转录激活活性 (见实施例 3);

[0018] 7、利用 CRISPR-Cas 基因编辑技术 (Feng 等, Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system, Cell Res (2013):1229-1232) 定点突变 SID1 基因 (见实施例 4), 并且获得 SID1 位点突变的植株;

[0019] 8、利用定量 RT-PCR 技术分析 sid1 突变体和野生型植株中抽穗期相关基因的表达 (见实施例 4);

[0020] 更详细的技术方案将由下述实施例给出。

附图说明

[0021] 下面结合附图对理解本发明作进一步的详细描述, 但并非对本发明作出限定。

[0022] 序列 SEQ ID NO:1 是本发明克隆的 SID1 基因的核苷酸序列 (1-8648bp)。

[0023] 序列 SEQ ID NO:2 是本发明克隆的 SID1 基因的编码区即 CDS 的核苷酸序列 (1-1848bp)。

[0024] 序列 SEQ ID NO:3 是本发明克隆的 SID1 基因的编码区即 CDS 的核苷酸序列 (1-1848bp) 和对应的氨基酸序列 (1-615aa), 其编码 615 个氨基酸。

[0025] 图 1: rid1 抑制突变体 sid1-D 的筛选获得。附图标记说明: 图 1 中的 A 图: pUBQ::RID1 转基因抽穗单株 RID1 的表达量检测 (lanes 1 to 7)。line 4 (sid1-D) 没有检测到 RID1 的表达。rid1 作为阴性对照。GAPDH 作为内参。KAN 扩增 T-DNA 载体边界的 Kanamycin 序列。pUBQ, 玉米 Ubiquitin 启动子; 图 1 中的 B 图: 依次为水稻 “中花 11 号” (ZH11), rid1, sid1-D 抽穗期的表型, 标尺为 15cm; 图 1 中的 C 图: ZH11, rid1, sid1-D 在不同日照条件下的抽穗期统计 (n=10)。

NLD,自然长日照;SD,短日照;LD,长日照。

[0026] 图2: *sid1-D*的侧翼序列分离与共分离检测结果。附图标记说明:图2中的A图: *sid1-D*突变体中,T-DNA插入位点旁侧基因及T-DNA插入结构区的模式图。转化载体的部分T-DNA结构区,包括T-DNA左边界LB,CaMV 35S启动子驱动的筛选标记基因Kanamycin,部分RID1 3' UTR区域,转入*rid1*基因组。P4,P5,P6为*sid1-D*共分离检测引物;图2中的B图:*sid1-D*材料的表型与基因型共分离检测结果。其中:P1,P2,P3为鉴定*rid1*T-DNA插入位点的共分离检测引物;P4,P5,P6为鉴定*rid1*背景下,*sid1-D* T-DNA插入位点的共分离检测引物。图2中的C图:*sid1-D*与*rid1*背景下,T-DNA插入位点旁侧基因的表达量检测。SID1 (LOC_0s02g45054) 表达量在*sid1-D*背景下显著上升。Ubiquitin (UBQ) 作为内参。

[0027] 图3:SID1基因的遗传互补分析。附图标记说明:图3中的A图:超量表达载体pUBQ::SID1构建示意图,一个包含SID1基因全长编码区和起始密码子前805bp和终止密码子后125bp的区域连接到pU2301载体上;图3中的B图:*rid1*pUBQ::SID1转基因T0代,恢复抽穗单株SID1基因表达量检测。Control,转基因阴性植株;图3中的C图:ZH11,*rid1*,*sid1-D*,*rid1*pUBQ::SID1材料在抽穗期的表型照片。标尺为15cm;图3中的D图:转化用的空载体(阴性对照)植株不抽穗。标尺为15cm。

[0028] 图4.SID1基因的结构及进化树分析。附图标记说明:图4中的A图:SID1基因结构示意图;图4中的B图:SID1蛋白结构示意图;图4中的C图:水稻中IDD蛋白的进化树分析。系统发生分析采用进化树构建软件MEGA5.1。来源于水稻的15个IDD同源基因序列用于进化树构建。具体参数为N-J bootstrap N-J,1000replicates。

[0029] 图5.SID1 ID domain 4个锌指基序对于逆转*rid1*不抽穗表型是必需的。图5中的A图:用于转基因研究的SID1定点突变蛋白结构示意图。SID1蛋白的ID结构域结构简图位于顶部位置。C和H分别代表标识锌指基序的半胱氨酸与组氨酸残基。数字表示SID1蛋白中C和H所处的位置。锌指基序(ZF1、ZF2、ZF3、ZF4)用有颜色的方框表示。“X”代表突变的锌指基序。ZF1M、ZF2M、ZF3M、ZF4M分别代表锌指基序ZF1、ZF2、ZF3、ZF4突变后的形式。图5中的B图:SID1蛋白的锌指基序突变后不能使*rid1*恢复抽穗。超量表达SID1CDs的阳性对照可以使*rid1*恢复抽穗。标尺,15cm。

[0030] 图6.SID1基因的表达部位分析。附图标记说明:图6中的A图:自然长日照条件下种植用于SID1表达谱分析的野生型植株。其中:ML为成熟叶;YL为幼叶;ASA为茎顶端分生区。标尺为15cm;图6中的B图:SID1在各个组织的表达量检测结果。图6中的C图至图6中的I图:pSID1::GUS转基因株系各个组织器官GUS染色模式图。标记6C为根尖;6D为成熟叶片;6E为幼叶;6F为叶鞘;6G为茎顶端分生组织纵切面;6H为茎;6I为小花。标尺,2mm。

[0031] 图7.SID1基因的亚细胞定位与转录活性检测。附图标记说明:图7中的A图:SID1的亚细胞定位分析。SID1蛋白融合绿色荧光蛋白(GFP),核定位蛋白Ghd7融合青色荧光蛋白(CFP),二者共转入水稻原生质体。标尺为10 μ m;图7中的B图:野生型水稻品种中花11号原生质体中,不同长度的SID1截短蛋白转录活性检测。其中SID1截短蛋白序列如左侧示意图所示。SID1N末端的灰色条纹柱代表4个锌指结构。所有荧光素酶活性均参考GAL4BD空载体活性。

[0032] 图8.SID1Crispr突变体构建及晚抽穗表型考察。附图标记说明:图8中的A图:位于SID1第一个外显子的非保守区域作为CRISPR-Cas9系统的靶位点。PAM序列用绿色字母标

示,sgRNA靶标用青色字母标示;图8中的B图:CELI酶切检测CRISPR诱导产生的T0代转基因植株潜在突变位点。红色箭头代表CELI酶切产生的目的条带。图8中的C图:突变位点的测序分析。D1,缺失1bp;D5,缺失5bp;D7,缺失7bp;图8中的D图:大田长日照条件下野生型植株与sid1突变体的抽穗期表型。红色箭头代表已抽出的稻穗;图8中的E图:大田长日照条件下野生型植株与sid1突变体的抽穗期统计分析;图8中的F图:利用qRT-PCR方法分析Hd3a,RFT1,Ehd1,Hd1基因在野生型和sid1突变体植株中的表达。UBQ作为内参。平均值取自三次生物学重复,且每次生物学重复含两次技术重复。Student's t测验用于分析显著性差异(* $P < 0.05$)。

具体实施方式

[0033] 实施例1:SID1基因具有恢复rid1正常抽穗的功能

[0034] 1、rid1抑制突变体sid1-D的鉴定

[0035] 本发明鉴定的突变体来自rid1背景下,通过超量表达RID1全长cDNA,获得1株载体序列检测为阳性且出现抽穗表型,但RID1基因没有检测到表达的阴性单株,申请人将该突变体命名为水稻突变体sid1-D(RID1基因的克隆已在公开发表论文和申请专利中,见Wu等,Development of enhancer trap lines for functional analysis of the rice genome,Plant J(2003):418-427;Zhang等,Non-random distribution of T-DNA insertions at various levels of the genome hierarchy as revealed by analyzing 13,804T-DNA flanking sequences from an enhancer-trap mutant library,Plant J(2007):947-959;Wu等,RID1,encoding a Cys2/His2-type zinc finger transcription factor,acts as a master switch from vegetative to floral development in rice,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(2008):12915-12920;专利名称为:一个控制水稻成花转换及抽穗期基因RID1的克隆及应用,专利申请号:200810046989;公开号:CN101235378B)。sid1-D突变体的获取:申请人所在的课题组前期利用T-DNA标签的方法克隆了控制水稻成花转换的分子开关基因RID1(Rice Indeterminate 1),RID1基因编码一个C2H2类锌指结构转录因子,它调控水稻从营养生长到生殖生长的转换,可能是禾本科植物保守的成花分子开关(Wu等,RID1,encoding a Cys2/His2-type zinc finger transcription factor,acts as a master switch from vegetative to floral development in rice,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(2008):12915-12920)。据Wu等报道,T-DNA插入RID1第一个内含子,导致RID1功能缺失,进而产生永不抽穗的表型;将包括基因编码区和启动子区在内的5.7KB基因组区域转入rid1突变体愈伤组织,可以互补rid1不抽穗的表型,说明rid1突变体不抽穗的表型确实是由于RID1基因突变造成。为了验证RID1内含子区是否对水稻成花转化有影响,申请人将RID1全长cDNA转入rid1突变体愈伤,观察抽穗期表型。超量表达RID1全长cDNA获得80株独立转化苗,利用引物KAN-F/R(KAN-F:CGGCGATACCGTAAAGCAC;KAN-R:ACTGAAGCGGAAGGGACT)检测得到6株阳性苗出现抽穗表型且RID1表达量上升,说明RID1全长cDNA能够启动水稻营养生长向生殖生长的转化。在互补转基因的植株中,获得1株载体引物检测为阳性且出现抽穗表型,但RID1基因没有检测到表达的阴性单株(#4),该材料命名为sid1-D(dominant suppressor of rid1)(见图1中的A图)。将sid1-D材料T0代转基因水稻种子,经过常规的浸种、催芽程序(为常规方法)种植于大田后得到200棵植株,植株按5寸

×8寸的间距种植于武汉华中农业大学的试验田(长日照条件,日照长度12-14小时),按常规的水稻种植方法进行田间管理。200株sid1-D T1代分离群体中,抽穗与不抽穗单株呈现3:1(143:57, $x^2=1.13<3.84$)分离比(见图1中的B图),说明该突变体可能是由单位点显性突变产生;且抽穗表型与载体筛选标记Kanamycin基因共分离,由此我们认为这个单基因控制的显性突变可能与T-DNA插入事件共分离。为此,申请人对sid1-D材料进行了更详细的表型考察,在自然长日照条件下,sid1-D与ZH11的抽穗期分别为88天和78天;在人工控制的短日照条件下,sid1-D与ZH11的抽穗期分别为72天和58天;在人工控制的长日照条件下,sid1-D与ZH11的抽穗期分别为101天和83天(见图1中的C图)。说明sid1-D是显性突变引起的表型回复,sid1-D显性突变可以互补rid1不抽穗的表型。

[0036] 2、sid1-D突变体T-DNA插入位点的侧翼序列分离

[0037] sid1-D T1代分离群体抽穗与不抽穗单株呈现3:1分离比,且抽穗表型与载体筛选标记Kanamycin基因共分离,因此推测sid1-D抽穗表型由单基因控制的显性突变导致且与T-DNA插入共分离,于是分离了sid1-D材料的侧翼序列。由于Kanamycin基因序列在sid1-D材料中可以被检测到,因此,申请人以Kanamycin基因序列为模板,顺次设计3条侧翼序列分离引物,利用Tail-PCR技术(参照Liu等, Efficient isolation and mapping of Arabidopsis thaliana T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR, Plant J (1995):457-463; Zhang等, Non-random distribution of T-DNA insertions at various levels of the genome hierarchy as revealed by analyzing 13,804 T-DNA flanking sequences from an enhancer-trap mutant library, Plant J (2007):947-959)分离了sid1-D突变体T-DNA插入位点的侧翼序列。经过序列分析发现,该侧翼序列定位于水稻第2染色体LOC_0s02g45054和LOC_0s02g45070基因间区(见图2中的A图)。

[0038] 通过Tail-PCR技术分离得到的sid1-D突变体T-DNA插入位点的侧翼序列如下:

[0039] CTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGGATCGATCCTCTAGCTAGAGTCGATCGACAAGCTCGAGTTTCTCCATAATAATGTGTGAGTAGTCCCAGATAAGGGAATTAGGGTTCCTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCCTAGTATGTATTTGTATTTGTAAAATACTTCTATCAATAAAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAAATCCAGTACTAAAATCCAGATCCCCGAATTAATTCGGCGTTAATTCAGTACATTAATAAAACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTCTAAGCGTCAATTTGTTTACACCACAATGTTCTACTAGTTCGTACATGCATGAGCATAGTAAAAATTTGTCTCTCTTGCCCTTACCGAGGCCCATCTTCAAGTGTCTGCATTGCGTCGAAATCATCCTTTAAGTCATATAACTGCTTGTCTCTGTGCCTAGATTTCTCATCATCTCACAGTAATAAGCATTTCAACATGAATCACTACTACAAAACCAAGTTGTACATACGGCTAGAATAGATTTTTTTTTTTCATATATACATGCTGTTGGAGGGTCCGCCTATAACTTAAAAACCTATAAAAATAGTTGATTTTACATATGGCTCGATCCACCGCCGTCTACAAAATTGATTTGGGCGCGCCACCCAGTGAAGGCAAGGTGAATCAAATCTTATGGCTTTGAACTCCTTGTTAA

[0040] 3、T-DNA插入与表型的共分离检测

[0041] 为了初步确定sid1-D的抽穗表型因T-DNA插入引起,申请人作了突变表型和T-DNA的共分离检测。抽提水稻突变体sid1-D植株的总DNA用作PCR反应模板,该DNA抽提的方法为CTAB法(参照Liu等, A genome-wide analysis of wide compatibility in rice and the precise location of the S5 locus in the molecular map, Theor Appl Genet (1997):809-814)。根据sid1-D突变体T-DNA插入位点的侧翼序列与水稻基因组的匹配情况,确定插入位点,在插入位点的两边设计一对引物:P4 (GGTGGGCCACTTCTAGCCGC)和P5

(GTCCCCAGCTAGCGGCATGC), 及T-DNA上设计一条引物P6 (GCTGACCGCTTCCTCGTGCTTT), (图2A)。引物P4、P5和P6用于PCR反应。PCR反应条件是:94°C 5min; 94°C 30sec, 58°C 45sec, 72°C 1min, 35cycles; 72°C 7min; 25°C 1min。在T1代分离群体中, T-DNA插入位点纯合时只有P4和P6配对可以扩增出目标产物, 因为P4与P5在插入的T-DNA区段两侧, 导致P4与P5配对的扩增产物太大(大于10kb)无法得到扩增片段; 没有T-DNA插入的野生型植株由于没有T-DNA的插入, 所以P4和P6配对扩增没有产物, 但可以利用引物P4与P5配对得到目标产物; 而T-DNA插入位点杂合的植株则P4和P5配对以及P4和P6配对时都可以扩增得到产物。因此, 在rid1背景下, T-DNA插入位点纯合及杂合的单株全部表现为抽穗表型, 其余植株呈现不抽穗表型, 说明sid1-D的抽穗表型与基因型共分离(见图2中的B图)。申请人进一步对插入序列进行测序分析发现, 仅有RID1 3' UTR区域162bp序列及CaMV35S启动子驱动的Kanamycin序列被检测到(见图2中的A图), 这就说明转化载体的T-DNA结构区没有完全转入到水稻基因组中, rid1不抽穗表型的逆转不是由于RID1基因的表达量上升引起而可能是由于插入位点旁侧基因超量表达所致。因此申请人又检测了T-DNA插入位点旁侧共6个基因的表达, 相对于rid1突变体, LOC_0s02g45054 (OsIDD4) 表达量在sid1-D材料背景下明显上升, 而其它旁侧基因的表达量无显著差异(见图2中的C图)。登陆号为LOC_0s02g45054 (OsIDD4) 的基因可能是使rid1回复抽穗的候选基因。本发明将该基因命名为Suppressor of rid1(简称SID1基因)。该基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0042] 4、SID1基因超量表达恢复rid1正常抽穗

[0043] 设计引物SID1 (G) -OX-F (K) /R (K), 以野生型水稻品种“中花11号”(来自中国农业科学院作物科学研究所) DNA为模板, 扩增得到包括整个SID1基因的9.6kb大小的目标片段(见图3中的A图, 其中包含805bp启动子序列; SID1基因全长8648bp, 其核苷酸列表SEQ ID NO:1中1-8648bp所示的序列; 该基因的编码区为SEQ ID NO:2所示的序列(序列长度为1848bp), 125bp 3' 非编码区), 用引物接头上的酶切位点KpnI (KpnI购自宝生物工程大连有限公司) 消化外源片段, 使用T4DNA连接酶 (T4DNA连接酶购自Fermentas公司, 具体用法与用量参考该公司产品的说明书) 连接到相同酶处理的超表达载体pU2301 (pU2301由本室游常军博士改造, 参照游常军, 水稻突变体库的利用、OsIRL基因家族分析以及水稻开花机理的研究, 武汉: 华中农业大学图书馆, (2009) [博士学位论文], [\[0044\] SID1 \(G\) -OX-F \(K\) : GGGGTACCGTAGAGTGTGGAAAGAAGGAAGCAAAAGGGGGAGA](http://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?dbcode=CDFD&dbname=CDFD0911&filename=2010271706.nh&uid=WEEvREcwSlJHSldRa1FhdXNXyXJvaUwwa2JvRTBSbDFob21Rb05KaFB1ST0=$9A4hF_YAuvQ5obgVAq_NKPCYcEjKensW4ggI8Fm4gTkoUKaID8j8gFw!!&v=Mjc3NTdXTTFGckNVUkwyZlp1ZHVGes9rVWI3SVYx_MjZlckcvSDliTXFaRWJQSVI4ZVgxTHV4WVM3RGgxVDNxVHI=), 连接产物通过电转化的方法(电转化仪为eppendorf公司产品, 本发明所用电压为1800V, 具体操作参考该仪器的使用说明书) 导入大肠杆菌DH5a(购自Promega公司) 中, 加800μl LB培养基复苏45分钟, 取200μl涂于含50mg/L的卡那霉素的LA培养基平板上, 37°C温箱培养14-16小时(LA与LB配方参考上述《分子克隆实验指南》)。挑取单克隆, 扩大培养并抽提质粒, 通过PCR筛选阳性克隆、酶切验证及测序验证后的质粒命名为pU2301-SID1(结构见图3中的A图)。构建SID1超表达载体所用的引物序列如下(下划线序列为酶切位点):</p>
</div>
<div data-bbox=)

[0045] SID1 (G) -OX-R (K) : GGGGTACCGAGGGTAACTGAATGACTGAAAGAGGACAAAAATAGAAAA

[0046] 将构建好的载体电转入农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 (购自CAMBIA公司, <http://www.cambia.org/daisy/cambia/materials/overview.html>) 菌株中, 采用农杆菌介导的遗传转化方法 (Hiei等, Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA, *Plant J* (1994): 271-282), 将含有pU2301-SID1载体的农杆菌株导入基于PCR检测的*rid1*突变体基因型背景的愈伤组织中, 经过侵染、共培养、筛选出具有G418 (购自北京原平皓生物技术有限公司) 抗性的愈伤组织, 通过分化、生根及炼苗步骤 (农杆菌介导的遗传转化试剂及配方见申请人已经公开的专利, 专利名称为: 水稻木质素合成基因FC1及应用, 申请号: 200610018105.5; 公开号: CN1995346), 将所得的转基因苗移栽大田获得*rid1*背景下SID1超表达植株。按照上述相同的农杆菌介导的遗传转化方法将空载体pU2301 (pU2301由本室游常军博士改造, 参照游常军, 水稻突变体库的利用、OsIRL基因家族分析以及水稻开花机理的研究, 武汉: 华中农业大学图书馆, (2009) [博士学位论文], [http://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?dbcode=CDFD&dbname=CDFD0911&filename=2010271706.nh&uid=WEEvREcwSlJHSldRa1FhdXNXYXJvaUwwa2JvRTBSbDFob21Rb05KaFB1ST0=\\$9A4hf_YAuvQ5obgVAq_NKPCYcEjKensW4ggI8Fm4gTkoUKaID8j8gFw!!&v=Mjc3NTdXTTFGckNVukwyZ1plZHVGeS9rVWI3SVYx_MjZlckcvSDliTXFaRWJQSVI4ZVgxTHV4WVM3RGgxVDNxVHI](http://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?dbcode=CDFD&dbname=CDFD0911&filename=2010271706.nh&uid=WEEvREcwSlJHSldRa1FhdXNXYXJvaUwwa2JvRTBSbDFob21Rb05KaFB1ST0=$9A4hf_YAuvQ5obgVAq_NKPCYcEjKensW4ggI8Fm4gTkoUKaID8j8gFw!!&v=Mjc3NTdXTTFGckNVukwyZ1plZHVGeS9rVWI3SVYx_MjZlckcvSDliTXFaRWJQSVI4ZVgxTHV4WVM3RGgxVDNxVHI)) 导入*rid1*突变体基因型背景的愈伤组织中, 得到的转基因植株作为阴性对照。

[0047] 转基因结果显示, 将pU2301-SID1菌株导入*rid1*突变体基因型背景的愈伤组织最后获得T0代互补转基因植株81株。在2012年湖北省武汉市夏季田间栽培条件下种植, 超量表达SID1的转基因家系能够使*rid1*恢复抽穗表型 (见图3中的B图、图3中的C图), 而且这些转基因植株的抽穗期并不完全一致, 详细的抽穗期数据见表1。此外, 由pU2301空载体导入*rid1*突变体基因型背景的愈伤组织, 得到80株对照转基因植株, 这80份对照材料仍然保持不抽穗的突变表型 (见图3中的D图)。恢复抽穗的植株后代, 抽穗表型与SID1转基因完全共分离, 即阳性单株抽穗, 阴性单株不抽穗。因此, 转基因结果表明SID1基因调控了水稻的成花转换, *rid1*突变体的不抽穗的表型性状可以通过超量表达SID1基因逆转; 同时SID1基因具有调控水稻抽穗期的功能。

[0048] 表1不同基因型植株抽穗期统计表

植 株	抽穗天数						总数
	70-90 天	90-110 天	110-130 天	130-170 天	171-200 天	>360 天	
[0049] 中花 11 号 (WT)	20						20
<i>rid1</i> 突变体						20	20
pU2301 转化 <i>rid1</i>						80	80
pU2301-SID1 转化 <i>rid1</i>	33	12	9	5	2	10	81

[0050] 实施例2: SID1编码一类IDD蛋白, 具有调控水稻抽穗期的功能

[0051] 1、SID1蛋白是水稻特异的IDD蛋白家族新成员

[0052] SID1基因编码一个典型的Cys-2/His-2锌指蛋白转录因子, 含有三个外显子和两个内含子, 基因编码区长1848bp, 编码615个氨基酸 (见图4中的A图、图4中的B图), SID1是水稻特异的ID domain家族成员, 进化树分析显示在水稻中共存在15个ID domain蛋白, SID1与RID1蛋白属于不同进化枝 (见图4中的C图), 说明SID1蛋白是水稻中新鉴定的一个IDD蛋白, 其功能尚未报道。

[0053] 2、SID1蛋白ID domain突变不能逆转rid1不抽穗表型

[0054] 为了进一步研究SID1蛋白ID domain 4个锌指基序对于回复rid1抽穗表型是否是必需的,申请人采用氨基酸替换的方式来突变SID1蛋白ID domain锌指基序,即用甘氨酸(Gly)替换保守氨基酸半胱氨酸(Cys)。ZF1M(C97A,C100A),ZF2M(C139A,C144A),ZF3M(C174A,C177A),ZF4M(C201A,C203A)分别代表SID1蛋白ID结构域第一个锌指基序(ZF1),第二个锌指基序(ZF2),第三个锌指基序(ZF3),第四个锌指基序(ZF4)突变。定点突变采用三步PCR完成。以SID1CDs作为模板进行第一轮、第二轮PCR扩增。第一轮PCR,使用正向引物SID1(CDs)-OX-F和带有突变位点的反向引物(引物名称末尾为R)扩增;第二轮PCR,使用带有突变位点的正向引物(该引物与第一轮PCR扩增反向引物序列互补,引物名称末尾为F)和反向引物SID1(CDs)-OX-R扩增。回收、纯化第一轮、第二轮PCR扩增产物,并将二者混合物作为第三轮PCR扩增的模板,引物使用SID1(CDs)-OX-F/SID1(CDs)-OX-R。第三轮PCR扩增产物片段,用引物接头上的酶切位点KpnI-BamHI消化、连接到相同酶处理的超表达载体pU2301(pU2301由本室游常军博士改造,参照游常军,水稻突变体库的利用、OsIRL基因家族分析以及水稻开花机理的研究,武汉:华中农业大学图书馆,(2009)[博士学位论文],[http://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?dbcode=CDFD&dbname=CDFD0911&filename=2010271706.nh&uid=WEEvREcwSlJHSldRa1FhdXNXYXJvaUwwa2JvRTBSbDFob21Rb05KaFB1ST0=\\$9A4hF_YAuvQ5obgVAq_NKPCYcEjKensW4ggI8Fm4gTkoUKaID8j8gFw!!&v=Mjc3NTdXTTFGckNVUkwyZ1plZHVGeS9rVWI3SVYx_MjZlckcvSDliTXFaRWJQSvI4ZVgxTHV4WVM3RGgxVDNxVHI](http://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?dbcode=CDFD&dbname=CDFD0911&filename=2010271706.nh&uid=WEEvREcwSlJHSldRa1FhdXNXYXJvaUwwa2JvRTBSbDFob21Rb05KaFB1ST0=$9A4hF_YAuvQ5obgVAq_NKPCYcEjKensW4ggI8Fm4gTkoUKaID8j8gFw!!&v=Mjc3NTdXTTFGckNVUkwyZ1plZHVGeS9rVWI3SVYx_MjZlckcvSDliTXFaRWJQSvI4ZVgxTHV4WVM3RGgxVDNxVHI))上,并测序,构建好的载体分别命名为pUBQ::SID1-ZF1M、pUBQ::SID1-ZF2M、pUBQ::SID1-ZF3M、pUBQ::SID1-ZF4M。以SID1的全长cDNA为模板,使用引物SID1(CDs)-OX-F(K)/R(B)扩增得到含有SID1全长CDS的片段,用引物接头上的酶切位点KpnI-BamHI消化、连接到相同酶处理的超表达载体pU2301上,构建好的载体命名为pUBQ::SID1(CDs),作为转基因阳性对照。构建SID1定点突变载体所用的引物序列如下(下划线序列为酶切或突变位点):

[0055] SID1(CDs)-OX-F(K):GGGGTACCCATGGCATCCAACTCATCAGCG

[0056] SID1(CDs)-OX-R(B):CGGGATCCCGTCATTGCATCCTGCCTCCGT

[0057] SID1-SM-ZF1-F:CCGGTTCGTGGCCGAGGTGGCCAACAAGGG

[0058] SID1-SM-ZF1-R:CCCTTGTTGGCCACCTCGGCCACGAACCGG

[0059] SID1-SM-ZF2-F:TACCTGGCCCCGGAGCCGACGGCCGTCCAC

[0060] SID1-SM-ZF2-R:GTGGACGGCCGTCGGCTCCGGGGCCAGGTA

[0061] SID1-SM-ZF3-F:GAAGTGAAGGCCGACAAGGCCTCCAAGCG

[0062] SID1-SM-ZF3-R:CGCTTGGAGGCCTTGTCGGCCTTCCACTTC

[0063] SID1-SM-ZF4-F:CGAGTACCGCGCCGACGCCGGCACCCTCTT

[0064] SID1-SM-ZF4-R:AAGAGGGTGCCGGCGTCCGGCGGGTACTCG

[0065] 构建好的载体转化rid1突变体愈伤,获得rid1背景下SID1zinc finger基序突变的超量表达单株,观察ID domain锌指基序突变后的SID1蛋白能否使rid1回复抽穗(见图5中的A图)。对转基因T0代植株进行抽穗期考察发现,超量表达定点突变ID domain锌指基序的SID1蛋白转基因家系不能使rid1抽穗,而转入pUBQ::SID1(CDs)的阳性对照植株能够重现sid1-D的抽穗表型(见图5中的B图),说明SID1蛋白ID domain锌指基序对于识别并结合下游靶基因,启动成花转化过程,调控水稻抽穗期是必需的。

[0066] 实施例3:SID1基因在叶片中表达,定位于细胞核内,具有转录激活活性

[0067] 本发明首先利用定量RT-PCR分析SID1基因的表达模式。植物(优选是水稻)组织中总RNA抽提、反转录及qRT-PCR反应条件见参考文献(Huang等,Down-Regulation of a SILENT INFORMATION REGULATOR2-Related Histone Deacetylase Gene,OsSRT1,Induces DNA Fragmentation and Cell Death in Rice,Plant Physiol(2007):1508-1519)。水稻总RNA取自自然长日照条件下种植的野生型水稻品种“中花11号”植株(见图6中的A图)。具体方法为:取发芽后35天的水稻倒一叶、倒二叶、倒三叶、未成熟叶片、根、茎尖组织、叶鞘提取总RNA。表达谱数据显示,SID1基因主要在水稻成熟叶片表达量较高(见图6中的B图)。为了进一步分析SID1基因的时空表达模式,本发明构建了pSID1::GUS载体,并通过农杆菌介导的遗传转化方法(Hiei等,Efficient transformation of rice(Oryza sativa L.) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA,Plant J(1994):271-282)将该启动子载体导入野生型水稻品种“中花11号”中。载体(pSID1::GUS)构建方法如下:以水稻品种“中花11号”DNA为模板,使用引物SID1-GUS-F(5'-CCCAAGCTTAGAACTCCATCCGGTCTCCTGTT-3')和SID1-GUS-R(5'-AACTGCAGAAATAGCGGCTTAATCTGGTCCTC')扩增出3kb长的启动子区间。使用引物接头两端的酶切位点HindⅢ和PstI(限制性内切酶HindⅢ和PstI购自Takara公司)消化目的片段,T4DNA连接酶(T4DNA连接酶购自Fermentas公司,具体用法与用量参考该公司产品的说明书)连接外源片段到相同酶处理的pC2300-EX-GUS载体(Zhao等,Tribenuron-Methyl induces male sterility through anther-specific inhibition of acetolactate synthase leading to autophagic cell death,Mol Plant(2015):1710-1724),即完成pSID1::GUS启动子载体的构建。构建好的载体转化野生型水稻品种“中花11号”愈伤组织,随机选取多个转基因阳性植株进行GUS染色模式分析,转基因植株GUS信号特异的出现在成熟叶片、幼叶、叶鞘、根尖等营养器官,且多个转基因阳性植株具有相同的表达模式(见图6中的C图至图6中的I图)。这些结果显示SID1基因主要在感受光信号的叶片中高丰度表达,预示着SID1基因参与水稻水稻抽穗期调控。

[0068] 为了分析SID1蛋白的亚细胞定位,本发明构建了一个亚细胞定位载体,命名为pM999-SID1-GFP。该亚细胞定位载体的具体构建方法如下:以水稻品种“中花11号”DNA为模板,通过引物SID1-pM999-F(5'CGGAATTCATGGCATCCAACATCATCAGCGGCA')和SID1-pM999-R(5'GGGGTACCTTGATCCTGCCTCCGTTGAAGGAC')PCR扩增出SID1全长CDs片段,并通过EcoRI和XbaI将该目标片段酶切后连接到pM999-GFP(Xu等,Differential expression of GS5regulates grain size in rice,J Exp Bot(2015):2611-2623)载体,使SID1蛋白与GFP报告基因融合。融合GFP的SID1蛋白与融合CFP的核蛋白Ghd7具有相同的亚细胞定位模式(见图7中的A图),说明SID1蛋白是一个核定位蛋白。SID1转录活性检测采用Dual Luciferase Reporter(DLR) assay system在水稻原生质体中进行(Bart等,A novel system for gene silencing using siRNAs in rice leaf and stem-derived protoplasts,Plant Methods(2006):1-9)。设计3对引物SID1-LUC-F(B)/SID1-LUC-R(E)、SID1-LUC-F(B)/SID1-LUC-N-R(E)、SID1-LUC-C-F(B)/SID1-LUC-R(E)分别扩增全长SID1序列、C端和N端截短SID1序列,连接到GAL4DB载体上,作为效应子蛋白(Effector)。5个串联重复的GAL4结合元件位于LUC基因minimal TATA box元件之前(35S-GAL4-LUC),作为顺式激

活子发挥作用(Reporter)。Ubi-Rennila LUC载体作为内参(GAL4DB、35S-GAL4-LUC、Ubi-Rennila LUC载体由中国科学院遗传与发育生物学研究所陈受宜教授提供)(Hao等,Plant NAC-type transcription factor proteins contain a NARD domain for repression of transcriptional activation,Planta(2010):1033-1043)。分别将载体组合GAL4DB-SID1/35S-GAL4-LUC、GAL4DB-SID1-N/35S-GAL4-LUC、GAL4DB-SID1-C/35S-GAL4-LUC转化入水稻品种“中花11号”原生质体内(见Zhang等,A highly efficient rice green tissue protoplast system for transient gene expression and studying light/chloroplast-related processes,Plant Methods(2011):1-14),室温培养12-16h,收集原生质体。相对荧光素酶活性测定使用Dual-Luciferase Reporter Assay System试剂盒(Promega),TECAN Infinite M200多功能酶标仪收集荧光值。结果表明,相对于空载体对照,SID1全长蛋白具有转录激活活性,且N端转录激活活性最强(见图7中的B图)。这些结果说明,SID1基因具有转录激活活性,能够激活下游基因的表达,通过人为改变其转录活性,可以有效调控SID1对靶基因的激活效应,进而影响水稻抽穗期。载体构建所用的引物及其序列如下(下划线序列为酶切位点):

[0069] SID1-LUC-F(B):CGGGATCCATGGCATCCAACATCATCAGCG

[0070] SID1-LUC-R(E):CGGAATTCTTGCATCCTGCCTCCGTTGA

[0071] SID1-LUC-N-R(E):CGGAATTCGAGGCTGAGCGCCATGTTG

[0072] SID1-LUC-C-F(B):CGGGATCCATGGCGCTCAGCCTCTCCC

[0073] 实施例4:利用CRISPR-Cas系统定点突变SID1基因,调控水稻抽穗期

[0074] 为了研究SID1基因的功能,本发明采用CRISPR-Cas系统(Feng等,Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system,Cell Res(2013):1229-1232)定点突变SID1基因。申请人在第一个外显子靠近ATG(34-43bp)非保守区域设计了gRNA位点(标准的靶位点识别形式是GN19NGG,其中NGG是蛋白结合基因组所需要的PAM序列,GN19的第一位的G是小RNA转录所需要的起始信号),通过在线BLAST规避脱靶效应。在sgRNA识别序列(不含有PAM序列)两端加上用于构建克隆的接头序列(针对本体系统用的OsU6启动子,此处上游引物5'端加上5'-GTGT-3'接头,下游引物5'端加上5'-AAAC-3'接头),合成引物。将合成的正反向引物退火形成含有粘性末端接头的双链核苷酸,连接入OsU6-SK中间载体。OsU6-SK(克隆了靶位点外源片段)、35S-Cas9-sk片段亚克隆到pCAMBIA1300载体(OsU6-SK、35S-Cas9-sk、pCAMBIA1300载体由中国科学院上海植物逆境生物学研究中心朱健康教授提供)(Feng等,Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system,Cell Res(2013):1229-1232),挑取正确的重组子保存菌株,进行遗传转化,转化受体为水稻品种中花11号(ZH11),转化步骤如实施例1第4部分所述。选取SID1基因第一个外显子的非保守区域作为CRISPR-Cas9系统的靶位点,获得97株独立的转基因植株(见图8中的A图)。设计PCR引物扩增含有靶序列的目标区段,CELI(Till等,A protocol for TILLING and Ecotilling in plants and animals,Nat Protoc(2006):2465-2477)酶切检测可能存在潜在突变位点的T0代单株(见图8中的B图)。CELI酶切检测获得目的条带的单株进一步对靶位点进行测序验证,获得SID1位点突变的植株sid1。测序结果显示靶位点区域含有小片段的碱基缺失(1-7bp),并选取缺失1bp(D1)、5bp(D5)、7bp(D7)的突变株进行后续研究(见图8中的C图)。sid1纯合突变体植株在大田自然长日照条件下种植,抽穗期比野生型延迟(D1抽

穗期: 82.1 ± 1.4 天; D5抽穗期: 81.6 ± 1.4 天; D7抽穗期: 81.5 ± 1.2 天; 野生型抽穗期: 79.2 ± 1.3 天) (见图8中的D图、图8中的E图)。这些结果说明SID1是长日照条件下的开花促进因子。为了进一步分析SID1基因调控水稻开花的分子机制, 在sid1突变体与野生型植株中分析开花相关基因Hd3a, RFT1, Ehd1和Hd1的表达。抽穗期相关基因的表达分析如实施例2所述。QRT-PCR结果显示, 与野生型植株ZH11表达量相比较, sid1背景下Hd3a和RFT1的表达量在长短日照条件下受到明显抑制; Ehd1的表达量在长日照条件下受到部分抑制; Hd1基因表达差异不明显(见图8中的F图)。由此, 申请人认为SID1基因主要通过调控成花素基因Hd3a和RFT1的表达进而影响水稻的抽穗期。SID1gRNA载体序列及检测引物序列如下:

[0075] SID1-Cas-F: GTGTGCGTTGTTTGAATTAGGGA

[0076] SID1-Cas-R: AAACCTCCCTAATTCCAAACAACGC

[0077] SID1-CE-F TTCTTGCTTGAGTTTGTATCG

[0078] SID1-CE-R TGAAACTCGCTCCAACCG

[0079] 由于rid1突变体植株表现为不抽穗的表型, 超量表达SID1基因水稻植株回复rid1突变体植株的开花特性, 说明SID1基因起到了开花的分子开关作用。rid1背景下, 超量表达SID1基因的转基因植株的抽穗期并不完全一致; 且sid1突变体材料呈现晚抽穗的表型, 说明SID1基因具有调控水稻抽穗期的功能。因此可以通过植物基因工程技术将SID1基因在水稻中特定组织部位或特定时期异位表达, 从而通过调控SID1基因的时空表达模式及表达量达到调控水稻抽穗期进而提高水稻品种的地区与季节适应性的目的。

[0001] SEQUENCE LISTING
 [0002] <110> 华中农业大学
 [0003] <120> 一个调控水稻抽穗期基因SID1的功能及应用
 [0004] <130>
 [0005] <141> 2017-02-10
 [0006] <160> 3
 [0007] <170> PatentIn version 3.1
 [0008] <210> 1
 [0009] <211> 8648
 [0010] <212> DNA
 [0011] <213> 水稻(*Oryza sativa*)
 [0012] <220>
 [0013] <221> gene
 [0014] <222> (1) .. (8648)
 [0015] <223>
 [0016] <400> 1
 [0017] atggcatcca actcatcagc ggcagctgtg gcggcgttgt ttggaattag ggatggcgac 60
 [0018] catgaggacc agattaagcc gctatttgcc cagcagcagc aacaccacca ccaccagcca 120
 [0019] cctatggcgc catccaacgc cgcggcggcg gcttctgcgg cagggtcggc ggccgggtaa 180
 [0020] gcggccgtgg cggegccacc agcgaagaag aagagaacct taccaggtaa tccatgcaaa 240
 [0021] gtttatccct tttttttgt tcagtttcag actttcagtc atgcatgcat ggatgccagc 300
 [0022] atagcattct tctatctcct tgctgatctt gtctcgattt atcggttgga gcgagtttca 360
 [0023] attcctttgt tttagcatgc acaagaagac agctagctac tgctagcttg tccaagattc 420
 [0024] acatggtttt tgtatcgatt ttaccgtgtt tgtctagtga tttttttct tggttttgaa 480
 [0025] atttttgatt cacatgcata atgtcttttt tggaagggat ttgtacgeta gcatagagtc 540
 [0026] caagatttgg ttcccttga tttaaattac atgaaatggt cctatatctt cttcggtttc 600
 [0027] taatttctct ctcttctcta gcttggcca atgaatttct tacgcacctg gattgtagtc 660
 [0028] acccagcaact acttcattta aagctttag tctcacctgg atgaatagta tagtcctcag 720
 [0029] ttcagtgaa ggtacaaaagc acaaaatgat ttcttgttt ttttttgtt ttttttctca 780
 [0030] tatgtcatta taaatcagac ttatttttca gtagatagat tggttccct aattatttct 840
 [0031] ttaccgcagt aaagttcctt aattcaaata gacaatcacc atcatttaat catcaattaa 900
 [0032] tcttagagat tttttggca agattccatg tacgtgagct gttctcctct tcacccttgc 960
 [0033] tggcctcttc ctttctctta ccaatcatga gagatgcaga tacgggcat gacatatgca 1020
 [0034] cgagcaatgt caattcattt gttccctaca tgctcttgc tgcaaaatta attctctttt 1080
 [0035] gcccccccc cctcctcat aatctcgtgc aaatattctc tttttgcctt aatttgtccc 1140
 [0036] tggctactaa aatcaaaagg aaaaaaatc actactccc attacaaatc atccttgcac 1200
 [0037] gcctaaccga tcttcatcac cataaatcta ctccgattgg gaaattcttt cgtgttaaga 1260
 [0038] aacatgcatg cgtttgtcat catcagccac actgcaattt ggttttgcac tcagtagtgc 1320
 [0039] ggcaagctgt actccttatt tctctctctt ctaatccca cataatgta aaaccaccgt 1380
 [0040] gcatctatat ctatataatc atctaaatta accattcaca tatatgcatc taatatttat 1440
 [0041] gttgaactaa cattttgatc aggtagtgc gcgcatgcat atgtatatac tcctatcttc 1500

[0042] taattaatac tactttgcac tagtactaat aagctgtact tgcattgcatt gcatgcgcag 1560
[0043] acccggacgc ggaggtgata gcgctgtcgc cgaagacgct gctggcgacg aaccggttcg 1620
[0044] tgtgcgaggt gtgcaacaag gggttccagc gggagcagaa cctgcagctg caccggcgcg 1680
[0045] ggcaaacct gccgtggaag ctgaagcaga agaaccgct gcaggcgagc cgccgccggg 1740
[0046] tgtacctgtg cccggagccg acgtgcgtcc accacgaccc ctcccgcgcc ctccggcgacc 1800
[0047] tcaccggcat caagaagcac ttctgccga agcacggcga gaagaagtgg aagtgcgaca 1860
[0048] agtgetccaa gcgctacgcc gtccagtcg actggaagc cactccaag atctgcggca 1920
[0049] cccgcgagta ccgctgcgac tgcggcacc tcttctccc gtaagcccac actctacca 1980
[0050] tctctctact acgtatata gtatggtgt tttcgcagct tgatttctcc atctgcatga 2040
[0051] gacgttgcatt gtgtgtgcgt gctagctagc gaagaatgt tagtagtgtg cgcacaaaaa 2100
[0052] tggcagcatg cagttcggc cggggttagg gttttgtctg ggtggtatag ttagtagtact 2160
[0053] taactaatct gttcacgagg gttaatggct agtgggagga gaagaattat cgatgtcgta 2220
[0054] cacacgtgta cgtaccgct ggtctgcagg atgcatatgc atatgtatgg gcgaagagca 2280
[0055] ttagggctac tgctgcacg tgatcttcc attgtcttc tgatgcaaat gttccaagc 2340
[0056] gttcttctgc tggcatgcat cgtcgtcaag cctggctgaa aaggcctccc gtctcttct 2400
[0057] catgtatata atattacaag tcacacaaat aaacgcgata tgtttatata tgtgtgcgag 2460
[0058] tgtgttatac tgattcatgg cccaattcg ggatcgatat gcccggaacg tcgacagcta 2520
[0059] gtagcacat tcttaattcg ttgggctgtc tgtctattca tcagacaact gaattttgaa 2580
[0060] atatctaagc ggtcagaatt attccaagat ccgtgcaata actatataata tatataata 2640
[0061] tacatatgta agacatgac caacagttct ctaaagtta ataattaaat atacactgta 2700
[0062] agacactctc ctacagttt ttccttaaaa aaagacaatg ctctaaata aaatccaacc 2760
[0063] ataaaaagat gggttttct atgaaaatta ggatccaaca attcccatgt agagatgata 2820
[0064] aaaaaaattt agcatccca actccgtttt tatcgttctc cacatctagg gaatggcaca 2880
[0065] cccaaaaaac tgatcatgcg tgggatgaga gctatcgaga tagcggcatg gaaggtgggc 2940
[0066] gagggagatc gcccatgagg agagaaggc ccctttttat tttaggaaat taagtttaga 3000
[0067] ctatctgta tagagatcaa ggtatattt atatcctaa attcttatta gagatttcaa 3060
[0068] ataagatatt tattagagga gaatattgga catttgttg ggatgcaata aaccacttcg 3120
[0069] atgcccggaa tctgatcca tctctgcct ccgctagctc ttcgatgat ctccacctta 3180
[0070] ttggaaggcg ccagaaatc cagctagttg tctctccat atcaaatcct ccatccacac 3240
[0071] catagcgta ttattgggt atatatagct tcatctatga tatacagctc atgcagctga 3300
[0072] agttcggatg tcgctggtc caagaggct taccaatgaa gtcactagtg atgttcttag 3360
[0073] tgagtcattc tttgcctcc ctcttctcc cgcacctc tcggtcggct agaggtagaa 3420
[0074] gatgcttgc acttgcgaa tcgctggatc aagatctca tagatcaatt ggccaagatt 3480
[0075] taagaaaca aatcccagtg gactagtaa tagaaaaatt gtcgtccata tatataaaaa 3540
[0076] tataataaa caagctata tgtgtggcac tacacgtctg cactatattt ttattttaat 3600
[0077] gaatcagcga gccgtcaatt ttattgaata tagaaggagt aaattgtaca aaagaaatga 3660
[0078] gctgtacag tctgattat acaccccat atgatgtaa ttggctaac tgttttgagc 3720
[0079] tgccatatag aagagtatg atatatatag tcttctgctg tgtatatcca cccgtggatt 3780
[0080] gagccgactt tctattata tctaaaaata atataatgca aactataact tatatcatgc 3840
[0081] agaatatgat atgtgaatgt gtgtgagctg gccggctaga tagatgtgcg gtgcaggcc 3900
[0082] tttcgttggc cttacgtgc agaagacct gtggttcacg cttcacacgg cttagatttc 3960
[0083] cctcggatac atgcatactc cgatccaggc cttacatct gatctcacga gtcacatggg 4020

[0084] tgcaacttcg cttgctagca gcagtgac gcatactgca gactctctct ctctctctct 4080
[0085] ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctcc agaatagcag caagtgttca 4140
[0086] cccctatctt tcacaactcg agcattttcc tctctggctt catggcatga cctctgcatg 4200
[0087] cagagttctt agcatcaata attttgatgc aatgggggcc tagccctata tatatgtgta 4260
[0088] ggcttttgta gttttgcatg tgttttttca tccatatata ttcttgttgg atcacccttt 4320
[0089] ggttccttgg aaaatgagct ttttacaag tcttctcatg tctccgggcg agttggcgtg 4380
[0090] tgcgtgtgct actgctctct accatggcga tgtccaatat gtctactact agtactagct 4440
[0091] agtagtagaa tttcttttcc cagcccttcc tcttgggaag cttcttgca ccatatatt 4500
[0092] aattaagaac ctatataat cggtagcgc atgctataat aatctgccta ctcttttctt 4560
[0093] cgttttcatc cctgattgac atgagtttct gggatctcga gcttcaattg agtgtgatag 4620
[0094] aagtcaagtg atgaaacgaa caggttttag tcaaccac acttgaaaac atgtagaatc 4680
[0095] actggtagat ttagattttt tttctaaaaa aaagatttat aattttttaa agtacctgca 4740
[0096] aacacaagta cgaacaatta tatatcaatg ttattgaaca cttcaatac aagacattat 4800
[0097] aaaaatgtga ttcatgaca accctgggtg gcctaggagc taccggggt cgctaggcat 4860
[0098] ttatctgcac cttgtagaa gttgtacata ttttagcct ttaaaggta ttctaaaata 4920
[0099] agaaggtcat tgcctcctt ttgcgtgctg cttacataat caataaaca ttaataactg 4980
[0100] atattgggtt gtcataatg taccctaca atatgtatg tcaaacctaa tttgaacaag 5040
[0101] tgggaaaaaa tataactgcg gaaatacac acacacacta ctttaattc atagtttaatt 5100
[0102] aggtttggtt tttctttgat gtaaatgaat ttggtcgtg atgtctgtac agtaatacat 5160
[0103] gcatgtgacg gcataatcct tatggccaaa tcttgttagc ttataactat ttagatttca 5220
[0104] tacatgaaac gagggcgcgc acgacacaca tcttggattt aatatactt aaaatactt 5280
[0105] tccaagatt tttttttcga gaactaac agtaggagtt gttacacgca atagataaaa 5340
[0106] ttcactact tgtagaagaa agaattaaag atatttcaac gatagtatat cacacagttc 5400
[0107] tactgtttag acgaccatta tttctctgac ccacctcaag tcatacgca agtgtacaca 5460
[0108] cattcatgca tcttgcctt ttactgtact agctagtact ccagcttcta actttttcgg 5520
[0109] tacaataata tggctgctct gtgtatgga cttggaatct tatcggttca aggcaagaat 5580
[0110] ggaacgtacg tactacgtct cctaaaagat gcaaatatat aattctttaa tacacattgc 5640
[0111] atctaattat tatagtctt ttttgcattg atttctgtac tgttgtgctt aacatgcaat 5700
[0112] tgattagaga aaaataatca ttttctcggg agtggatttt aaactctcga gaggatatcc 5760
[0113] cctcgttatt tgcattgcaat tcaaatagtt acgaaaaaaa tctaaataaa atatgagaag 5820
[0114] atgtattaat atgtgatata tcgctccaca aacatgcaag ttaaaattca actttttcat 5880
[0115] gtcgtaacga aaaaaataa atttaacct gaatatgcat taactagcta taatttaatt 5940
[0116] tttttcgtt gtgagatata gaagtcgaat ttgagcttca tgtttgtgga gtgatatac 6000
[0117] ccatattaat atatctttt atttttttaa aaaaaacaac tagactattt gaggatgcat 6060
[0118] caacaatta tgggacatcc ttctaagagt ttagaataaa aatactattt tctcaactct 6120
[0119] ctttgagagt ttgaggagag ggggattgag aagattggga agatacaca aacgaggtga 6180
[0120] gctattagcg catgattaat tgagtattaa ctatttttaa ttttaaaaat ggattaatat 6240
[0121] gattttttaa agcaacttt ctataaaaaa tttttacaaa aaatacaccg tctagtagtt 6300
[0122] tgggaagcgt gcacgcgga tacgatgctc ttttctcacc caatccccca gaactcatca 6360
[0123] caaagaacgc agccttagtt gttagtatcg atatgatcaa tgccttctt ccaatatata 6420
[0124] gtaaactagt cgatacaccg ctttttctg cggaatatgt cgatgaatgc atgttatata 6480
[0125] tcatagaat ggtaatgtat atgttttaaa aatgtaaaaa taatgtggag atattgattt 6540

[0126]	gacattgttt gcatattgag ttctaaaaat acaacaaaat tgtataagtc ttttgTTTT 6600
[0127]	ttctagTcaa cttattTaat tttgaccaag tttatagaaa aatataatag tattTaaaaa 6660
[0128]	ataaacatat tattagaata tatcaaatgt tagattTaat aaaattaatt tgatattTta 6720
[0129]	gatgtcgcta aatttttcta tacattTaaa agaaattgac gagggaaaaa aaatcaaata 6780
[0130]	acttacgta taaaatagag agagtactac tacattTgca cggatgacac agcaaaaatt 6840
[0131]	ttgcatctag ctgtctagct gatgagcacc actTcacgtg atttctgtat cagtaccgca 6900
[0132]	tactgtagtG acatgcactg tccttcgagt tatctTcact tttgcgtcgt acaattTcac 6960
[0133]	gtgcaaactt gtgccgcacg gacagtgatc agtttgatgg tacatcgcat gtgtccgtcg 7020
[0134]	tcgtccatgc aaatgcagga gggacagctt catcaccac cgcgcttct gcgacgcct 7080
[0135]	cgcccaggag agcgcgcggc tgccaccgc cgccgccggc cacctctacg gctccgccg 7140
[0136]	cgccccaac atggcgctca gcctctcca ggtcggtcc cacctcgct ccaccctca 7200
[0137]	ggaccaggc caccaccacc accatcacgg cgctccccg gacctctcc gcttcggcg 7260
[0138]	cagcggcgtt ggcgccatgg ctgcacgct cgagcacctc ctgtcgtcgt ccagcgcctc 7320
[0139]	cgcgttccgg cccctgcgc cgccgcagca gcagcctccg gcgccgttc tctcggcgc 7380
[0140]	ggcgccgag ggttcggcg acggcggcga cggcagtggt ccgcacggat tcttgagg 7440
[0141]	taagccgttc catggcctca tgcagctccc tgacctcaa gggaatggca ccggcgggc 7500
[0142]	gtcgcgtcg ggtccgggtc tctacaacct cggctacatc gccaacagcg cgaacagctc 7560
[0143]	gggtacttcc agccatggcc acgcgagcca gggacagatg acgaacaccg accagttcag 7620
[0144]	cgaaggagg ggtggtggcg gcggcggcg cggttcagag acatcgcgcg cggcgctgtt 7680
[0145]	cggcggcgtt gggaacttct ccggcggcga ccaccaccag gtttctctg ccgggatgta 7740
[0146]	cgcgaatgat caggccatga tgctgccga gatgtcggcg accgcgtgc tccagaaggc 7800
[0147]	ggcgcagatg ggctcgagca cgtcagcgc gaacggcgc ggcgctccg tgttcggcg 7860
[0148]	cggcttcgcc ggctcgtcgg cgccgtcgtc catcccgac ggccgcggga cgacctggt 7920
[0149]	cgaccaggg cagatgcacc tccagacct gatgaactc ctcgccggcg gtggcaacgc 7980
[0150]	cgaccaccag ggcatgtttg ggagtggcag catgattgac ccgaggctgt acgacatgga 8040
[0151]	ccagcacgag gtgaagtca gcctgcagcg cggcggcggc ggccggcggc acggcgact 8100
[0152]	gacgcgtgac ttctcggcg tcggcggcg cggtttcatg aggggatgt cgatggcgag 8160
[0153]	aggggagcac catggcgtg gcggcagcga catgcatgac accttgagg ccgagatgaa 8220
[0154]	gtcggcgtcg tcgtcttca acggaggcag gatgcaatga tctcttaagc atatatacgt 8280
[0155]	ggcacgttg catcaacatg catggcagga ataagttgtt gatttgagg ttgcaataca 8340
[0156]	atgctgtgac ttgtgacaca tgtgatagat gtttttgcac gcatccatgc aaaaggataa 8400
[0157]	agccagcttt gatgatgata caatcttagc gagagacatg gtgagcagaa gagcttctcc 8460
[0158]	tagactccta ctaatgcatg atgaagctag atcaacagga atcatgagac ttgagctgaa 8520
[0159]	gttagcggtt attactgaa tatactattc tgttctgat agatcttatt gctaaatttc 8580
[0160]	atTgaaaga ataggtcttg cTaaatgTaa ttgggtTaat Tgtactggat cagggataac 8640
[0161]	tgcaatga 8648
[0162]	<210> 2
[0163]	<211> 1848
[0164]	<212> DNA
[0165]	<213> 水稻(Oryza sativa)
[0166]	<220>
[0167]	<221> CDS

[0168] <222> (1) .. (1848)
 [0169] <223>
 [0170] <220>
 [0171] <221> gene
 [0172] <222> (1) .. (1848)
 [0173] <223>
 [0174] <400> 2
 [0175] atg gca tcc aac tca tca gcg gca gct gtg gcg gcg ttg ttt gga att 48
 [0176] Met Ala Ser Asn Ser Ser Ala Ala Ala Val Ala Ala Leu Phe Gly Ile
 [0177] 1 5 10 15
 [0178] agg gat ggc gac cat gag gac cag att aag ccg cta ttt gcc cag cag 96
 [0179] Arg Asp Gly Asp His Glu Asp Gln Ile Lys Pro Leu Phe Ala Gln Gln
 [0180] 20 25 30
 [0181] cag caa cac cac cac cac cag cca cct atg gcg cca tcc aac gcc gcg 144
 [0182] Gln Gln His His His His Gln Pro Pro Met Ala Pro Ser Asn Ala Ala
 [0183] 35 40 45
 [0184] gcg gcg gct tct gcg gca ggg tcg gcg gcc ggt caa gcg gcc gtg gcg 192
 [0185] Ala Ala Ala Ser Ala Ala Gly Ser Ala Ala Gly Gln Ala Ala Val Ala
 [0186] 50 55 60
 [0187] gcg cca cca gcg aag aag aag aga acc tta cca gac ccg gac gcg gag 240
 [0188] Ala Pro Pro Ala Lys Lys Lys Arg Thr Leu Pro Asp Pro Asp Ala Glu
 [0189] 65 70 75 80
 [0190] gtg ata gcg ctg tcg ccg aag acg ctg ctg gcg acg aac cgg ttc gtg 288
 [0191] Val Ile Ala Leu Ser Pro Lys Thr Leu Leu Ala Thr Asn Arg Phe Val
 [0192] 85 90 95
 [0193] tgc gag gtg tgc aac aag ggg ttc cag cgg gag cag aac ctg cag ctg 336
 [0194] Cys Glu Val Cys Asn Lys Gly Phe Gln Arg Glu Gln Asn Leu Gln Leu
 [0195] 100 105 110
 [0196] cac cgg cgc ggg cac aac ctg ccg tgg aag ctg aag cag aag aac ccg 384
 [0197] His Arg Arg Gly His Asn Leu Pro Trp Lys Leu Lys Gln Lys Asn Pro
 [0198] 115 120 125
 [0199] ctg cag gcg cag cgc cgc cgg gtg tac ctg tgc ccg gag ccg acg tgc 432
 [0200] Leu Gln Ala Gln Arg Arg Arg Val Tyr Leu Cys Pro Glu Pro Thr Cys
 [0201] 130 135 140
 [0202] gtc cac cac gac ccc tcc cgc gcc ctc ggc gac ctc acc ggc atc aag 480
 [0203] Val His His Asp Pro Ser Arg Ala Leu Gly Asp Leu Thr Gly Ile Lys
 [0204] 145 150 155 160
 [0205] aag cac ttc tgc cgc aag cac ggc gag aag aag tgg aag tgc gac aag 528
 [0206] Lys His Phe Cys Arg Lys His Gly Glu Lys Lys Trp Lys Cys Asp Lys
 [0207] 165 170 175
 [0208] tgc tcc aag cgc tac gcc gtc cag tcc gac tgg aag gcc cac tcc aag 576
 [0209] Cys Ser Lys Arg Tyr Ala Val Gln Ser Asp Trp Lys Ala His Ser Lys

[0210] 180 185 190
 [0211] atc tgc ggc acc cgc gag tac cgc tgc gac tgc ggc acc ctc ttc tcc 624
 [0212] Ile Cys Gly Thr Arg Glu Tyr Arg Cys Asp Cys Gly Thr Leu Phe Ser
 [0213] 195 200 205
 [0214] cgg agg gac agc ttc atc acc cac cgc gcc ttc tgc gac gcc ctc gcc 672
 [0215] Arg Arg Asp Ser Phe Ile Thr His Arg Ala Phe Cys Asp Ala Leu Ala
 [0216] 210 215 220
 [0217] cag gag agc gcg cgg ctg cca ccc gcc gcc gcc ggc cac ctc tac ggc 720
 [0218] Gln Glu Ser Ala Arg Leu Pro Pro Ala Ala Ala Gly His Leu Tyr Gly
 [0219] 225 230 235 240
 [0220] tcc gcc ggc gcc gcc aac atg gcg ctc agc ctc tcc cag gtc ggc tcc 768
 [0221] Ser Ala Gly Ala Ala Asn Met Ala Leu Ser Leu Ser Gln Val Gly Ser
 [0222] 245 250 255
 [0223] cac ctc gcc tcc acc ctc cag gac cac gcc cac cac cac cac cat cac 816
 [0224] His Leu Ala Ser Thr Leu Gln Asp His Gly His His His His His His
 [0225] 260 265 270
 [0226] ggc gcc tcc ccg gac ctc ctc cgc ttc ggc ggc agc ggc ggt ggc gcc 864
 [0227] Gly Ala Ser Pro Asp Leu Leu Arg Phe Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala
 [0228] 275 280 285
 [0229] atg gct gca cgc ctc gag cac ctc ctg tgc tgc tcc agc gcc tcc gcg 912
 [0230] Met Ala Ala Arg Leu Glu His Leu Leu Ser Ser Ser Ser Ala Ser Ala
 [0231] 290 295 300
 [0232] ttc cgg ccc ctg ccg ccg ccg cag cag cag cct ccg gcg ccg ttc ctc 960
 [0233] Phe Arg Pro Leu Pro Pro Pro Gln Gln Gln Pro Pro Ala Pro Phe Leu
 [0234] 305 310 315 320
 [0235] ctc ggc gcg gcg ccg cag ggg ttc ggc gac ggc ggc gac ggc agt ggt 1008
 [0236] Leu Gly Ala Ala Pro Gln Gly Phe Gly Asp Gly Gly Asp Gly Ser Gly
 [0237] 325 330 335
 [0238] ccg cac gga ttc ttg cag ggt aag ccg ttc cat ggc ctc atg cag ctc 1056
 [0239] Pro His Gly Phe Leu Gln Gly Lys Pro Phe His Gly Leu Met Gln Leu
 [0240] 340 345 350
 [0241] cct gac ctc caa ggg aat ggc acc ggc ggg ccg tgc ccg tgc ggt ccg 1104
 [0242] Pro Asp Leu Gln Gly Asn Gly Thr Gly Gly Pro Ser Pro Ser Gly Pro
 [0243] 355 360 365
 [0244] ggt ctc tac aac ctc ggc tac atc gcc aac agc gcg aac agc tgc ggt 1152
 [0245] Gly Leu Tyr Asn Leu Gly Tyr Ile Ala Asn Ser Ala Asn Ser Ser Gly
 [0246] 370 375 380
 [0247] act tcc agc cat ggc cac gcg agc cag gga cag atg acg aac acc gac 1200
 [0248] Thr Ser Ser His Gly His Ala Ser Gln Gly Gln Met Thr Asn Thr Asp
 [0249] 385 390 395 400
 [0250] cag ttc agc gaa gga ggg ggt ggt ggc ggc ggc ggc ggc ggt tca gag 1248
 [0251] Gln Phe Ser Glu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Glu

[0252] 405 410 415
 [0253] aca tcg gcg gcg gcg ctg ttc ggc gcc ggt ggg aac ttc tcc ggc gcc 1296
 [0254] Thr Ser Ala Ala Ala Leu Phe Gly Ala Gly Gly Asn Phe Ser Gly Gly
 [0255] 420 425 430
 [0256] gac cac cac cag gtt tct cct gcc ggg atg tac gcg aat gat cag gcc 1344
 [0257] Asp His His Gln Val Ser Pro Ala Gly Met Tyr Ala Asn Asp Gln Ala
 [0258] 435 440 445
 [0259] atg atg ctg ccg cag atg tcg gcg acc gcg ctg ctc cag aag gcg gcg 1392
 [0260] Met Met Leu Pro Gln Met Ser Ala Thr Ala Leu Leu Gln Lys Ala Ala
 [0261] 450 455 460
 [0262] cag atg ggc tcg agc acg tcg agc gcg aac ggc gcc ggc gcg tcc gtg 1440
 [0263] Gln Met Gly Ser Ser Thr Ser Ser Ala Asn Gly Ala Gly Ala Ser Val
 [0264] 465 470 475 480
 [0265] ttc ggc ggc ggc ttc gcc ggc tcg tcg gcg ccg tcg tcc atc ccg cac 1488
 [0266] Phe Gly Gly Gly Phe Ala Gly Ser Ser Ala Pro Ser Ser Ile Pro His
 [0267] 485 490 495
 [0268] ggc cgc ggg acg acc atg gtc gac cag ggg cag atg cac ctc cag agc 1536
 [0269] Gly Arg Gly Thr Thr Met Val Asp Gln Gly Gln Met His Leu Gln Ser
 [0270] 500 505 510
 [0271] ctg atg aac tcg ctc gcc ggc ggt ggc aac gcc gac cac cag ggc atg 1584
 [0272] Leu Met Asn Ser Leu Ala Gly Gly Gly Asn Ala Asp His Gln Gly Met
 [0273] 515 520 525
 [0274] ttt ggg agt ggc agc atg att gac ccg agg ctg tac gac atg gac cag 1632
 [0275] Phe Gly Ser Gly Ser Met Ile Asp Pro Arg Leu Tyr Asp Met Asp Gln
 [0276] 530 535 540
 [0277] cac gag gtg aag ttc agc ctg cag cgc ggc ggc ggc ggc ggc ggc gac 1680
 [0278] His Glu Val Lys Phe Ser Leu Gln Arg Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asp
 [0279] 545 550 555 560
 [0280] ggc gac gtg acg cgt gac ttc ctc ggc gtc ggc ggc ggc ggt ttc atg 1728
 [0281] Gly Asp Val Thr Arg Asp Phe Leu Gly Val Gly Gly Gly Gly Phe Met
 [0282] 565 570 575
 [0283] agg ggg atg tcg atg gcg aga ggg gag cac cat ggc ggt ggc ggc agc 1776
 [0284] Arg Gly Met Ser Met Ala Arg Gly Glu His His Gly Gly Gly Gly Ser
 [0285] 580 585 590
 [0286] gac atg cat ggc acc ttg gag gcc gag atg aag tcg gcg tcg tcg tcc 1824
 [0287] Asp Met His Gly Thr Leu Glu Ala Glu Met Lys Ser Ala Ser Ser Ser
 [0288] 595 600 605
 [0289] ttc aac gga ggc agg atg caa tga 1848
 [0290] Phe Asn Gly Gly Arg Met Gln
 [0291] 610 615
 [0292] <210> 3
 [0293] <211> 615

[0294] <212> PRT
 [0295] <213> 水稻(Oryza sativa)
 [0296] <400> 3
 [0297] Met Ala Ser Asn Ser Ser Ala Ala Ala Val Ala Ala Leu Phe Gly Ile
 [0298] 1 5 10 15
 [0299] Arg Asp Gly Asp His Glu Asp Gln Ile Lys Pro Leu Phe Ala Gln Gln
 [0300] 20 25 30
 [0301] Gln Gln His His His His Gln Pro Pro Met Ala Pro Ser Asn Ala Ala
 [0302] 35 40 45
 [0303] Ala Ala Ala Ser Ala Ala Gly Ser Ala Ala Gly Gln Ala Ala Val Ala
 [0304] 50 55 60
 [0305] Ala Pro Pro Ala Lys Lys Lys Arg Thr Leu Pro Asp Pro Asp Ala Glu
 [0306] 65 70 75 80
 [0307] Val Ile Ala Leu Ser Pro Lys Thr Leu Leu Ala Thr Asn Arg Phe Val
 [0308] 85 90 95
 [0309] Cys Glu Val Cys Asn Lys Gly Phe Gln Arg Glu Gln Asn Leu Gln Leu
 [0310] 100 105 110
 [0311] His Arg Arg Gly His Asn Leu Pro Trp Lys Leu Lys Gln Lys Asn Pro
 [0312] 115 120 125
 [0313] Leu Gln Ala Gln Arg Arg Arg Val Tyr Leu Cys Pro Glu Pro Thr Cys
 [0314] 130 135 140
 [0315] Val His His Asp Pro Ser Arg Ala Leu Gly Asp Leu Thr Gly Ile Lys
 [0316] 145 150 155 160
 [0317] Lys His Phe Cys Arg Lys His Gly Glu Lys Lys Trp Lys Cys Asp Lys
 [0318] 165 170 175
 [0319] Cys Ser Lys Arg Tyr Ala Val Gln Ser Asp Trp Lys Ala His Ser Lys
 [0320] 180 185 190
 [0321] Ile Cys Gly Thr Arg Glu Tyr Arg Cys Asp Cys Gly Thr Leu Phe Ser
 [0322] 195 200 205
 [0323] Arg Arg Asp Ser Phe Ile Thr His Arg Ala Phe Cys Asp Ala Leu Ala
 [0324] 210 215 220
 [0325] Gln Glu Ser Ala Arg Leu Pro Pro Ala Ala Ala Gly His Leu Tyr Gly
 [0326] 225 230 235 240
 [0327] Ser Ala Gly Ala Ala Asn Met Ala Leu Ser Leu Ser Gln Val Gly Ser
 [0328] 245 250 255
 [0329] His Leu Ala Ser Thr Leu Gln Asp His Gly His His His His His His
 [0330] 260 265 270
 [0331] Gly Ala Ser Pro Asp Leu Leu Arg Phe Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala
 [0332] 275 280 285
 [0333] Met Ala Ala Arg Leu Glu His Leu Leu Ser Ser Ser Ser Ala Ser Ala
 [0334] 290 295 300
 [0335] Phe Arg Pro Leu Pro Pro Pro Gln Gln Gln Pro Pro Ala Pro Phe Leu

[0336]	305	310	315	320
[0337]	Leu Gly Ala Ala Pro Gln Gly Phe Gly Asp Gly Gly Asp Gly Ser Gly			
[0338]		325	330	335
[0339]	Pro His Gly Phe Leu Gln Gly Lys Pro Phe His Gly Leu Met Gln Leu			
[0340]		340	345	350
[0341]	Pro Asp Leu Gln Gly Asn Gly Thr Gly Gly Pro Ser Pro Ser Gly Pro			
[0342]		355	360	365
[0343]	Gly Leu Tyr Asn Leu Gly Tyr Ile Ala Asn Ser Ala Asn Ser Ser Gly			
[0344]		370	375	380
[0345]	Thr Ser Ser His Gly His Ala Ser Gln Gly Gln Met Thr Asn Thr Asp			
[0346]	385	390	395	400
[0347]	Gln Phe Ser Glu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Glu			
[0348]		405	410	415
[0349]	Thr Ser Ala Ala Ala Leu Phe Gly Ala Gly Gly Asn Phe Ser Gly Gly			
[0350]		420	425	430
[0351]	Asp His His Gln Val Ser Pro Ala Gly Met Tyr Ala Asn Asp Gln Ala			
[0352]		435	440	445
[0353]	Met Met Leu Pro Gln Met Ser Ala Thr Ala Leu Leu Gln Lys Ala Ala			
[0354]		450	455	460
[0355]	Gln Met Gly Ser Ser Thr Ser Ser Ala Asn Gly Ala Gly Ala Ser Val			
[0356]	465	470	475	480
[0357]	Phe Gly Gly Gly Phe Ala Gly Ser Ser Ala Pro Ser Ser Ile Pro His			
[0358]		485	490	495
[0359]	Gly Arg Gly Thr Thr Met Val Asp Gln Gly Gln Met His Leu Gln Ser			
[0360]		500	505	510
[0361]	Leu Met Asn Ser Leu Ala Gly Gly Gly Asn Ala Asp His Gln Gly Met			
[0362]		515	520	525
[0363]	Phe Gly Ser Gly Ser Met Ile Asp Pro Arg Leu Tyr Asp Met Asp Gln			
[0364]		530	535	540
[0365]	His Glu Val Lys Phe Ser Leu Gln Arg Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asp			
[0366]	545	550	555	560
[0367]	Gly Asp Val Thr Arg Asp Phe Leu Gly Val Gly Gly Gly Gly Phe Met			
[0368]		565	570	575
[0369]	Arg Gly Met Ser Met Ala Arg Gly Glu His His Gly Gly Gly Gly Ser			
[0370]		580	585	590
[0371]	Asp Met His Gly Thr Leu Glu Ala Glu Met Lys Ser Ala Ser Ser Ser			
[0372]		595	600	605
[0373]	Phe Asn Gly Gly Arg Met Gln			
[0374]		610	615	

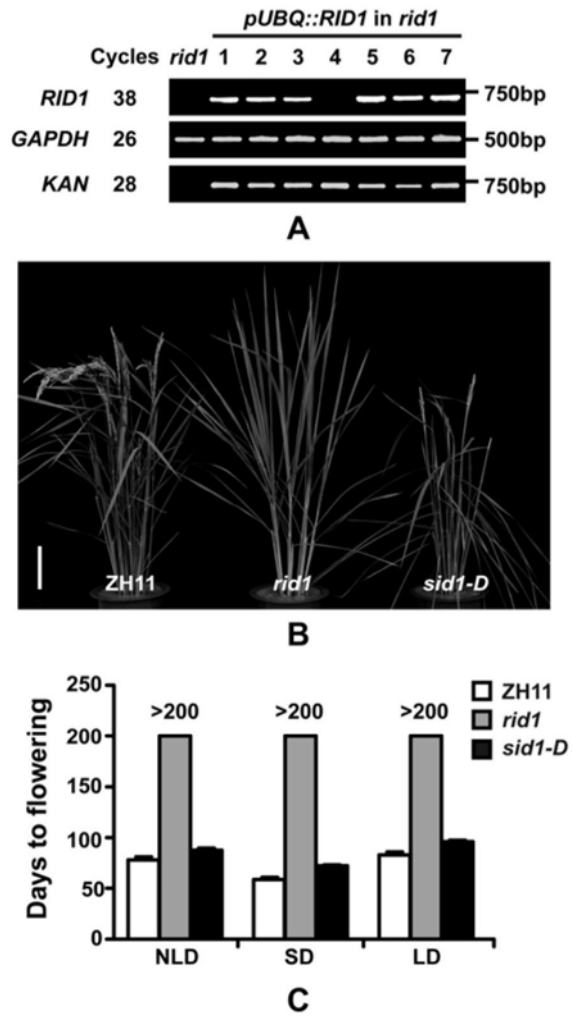


图1

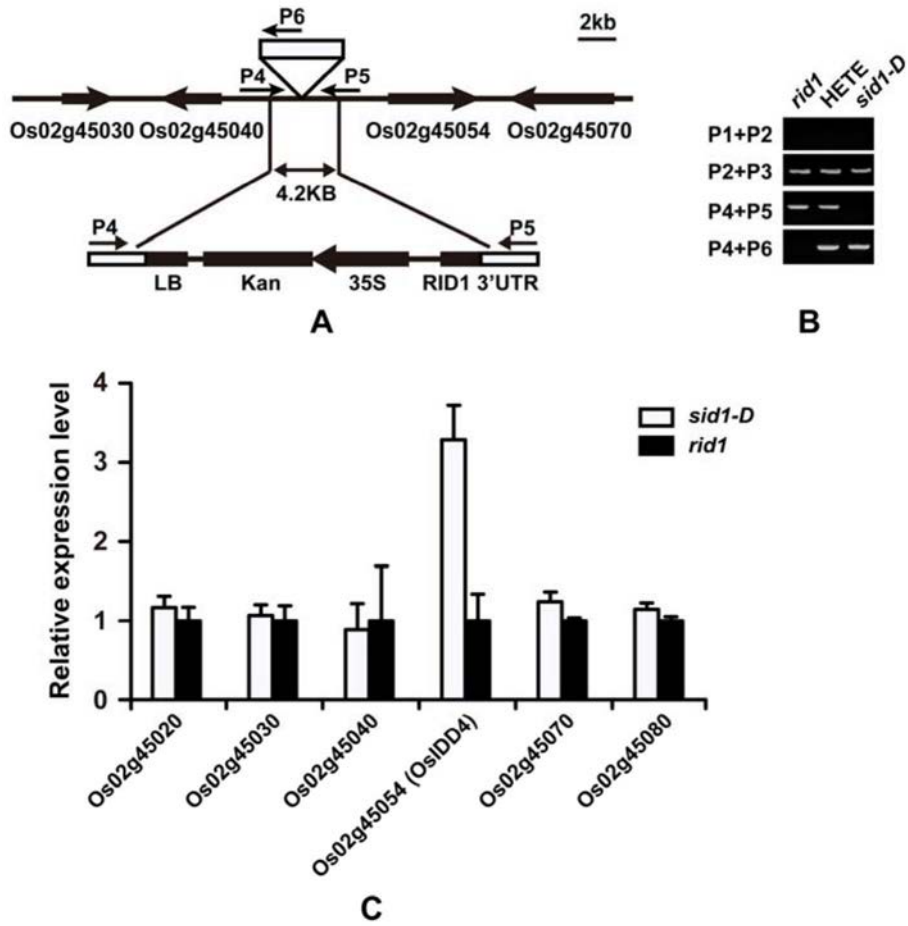


图2

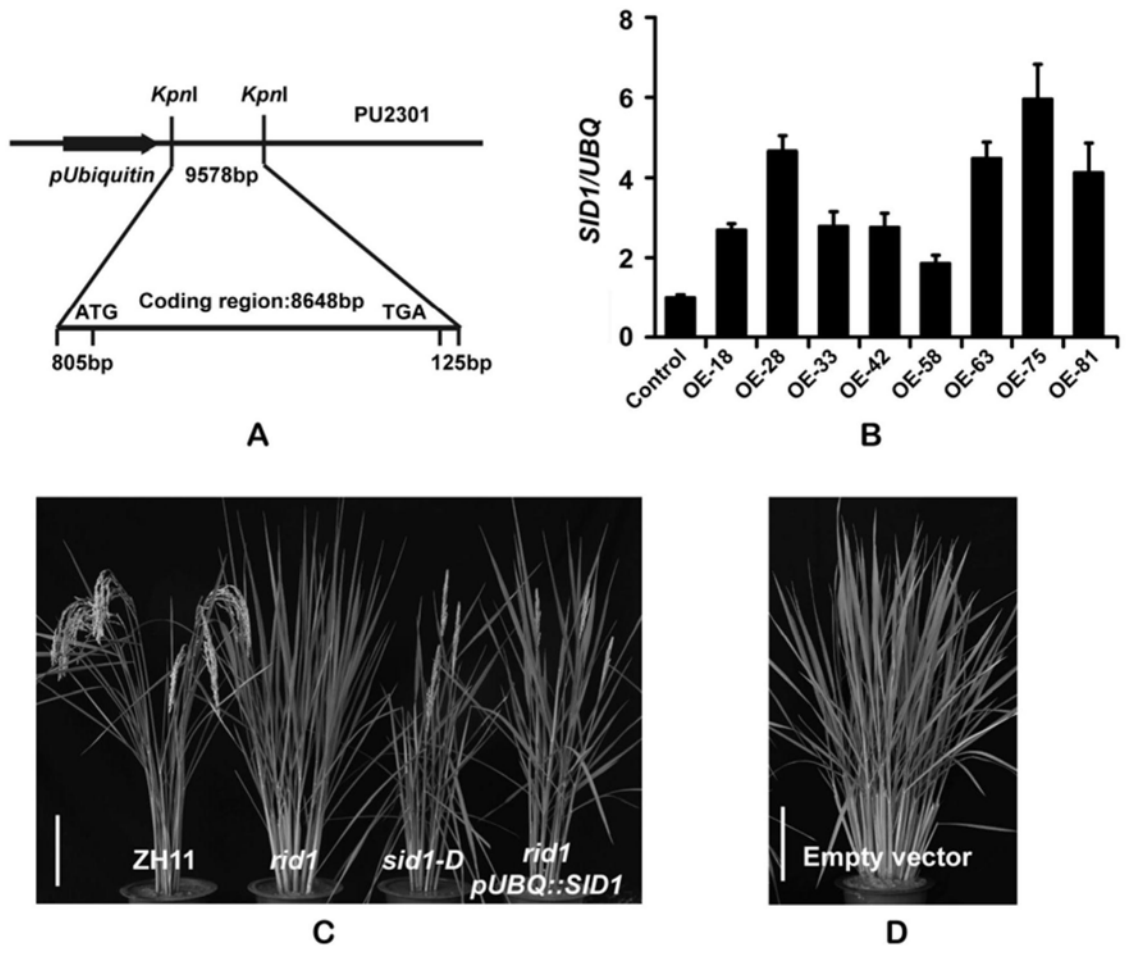


图3

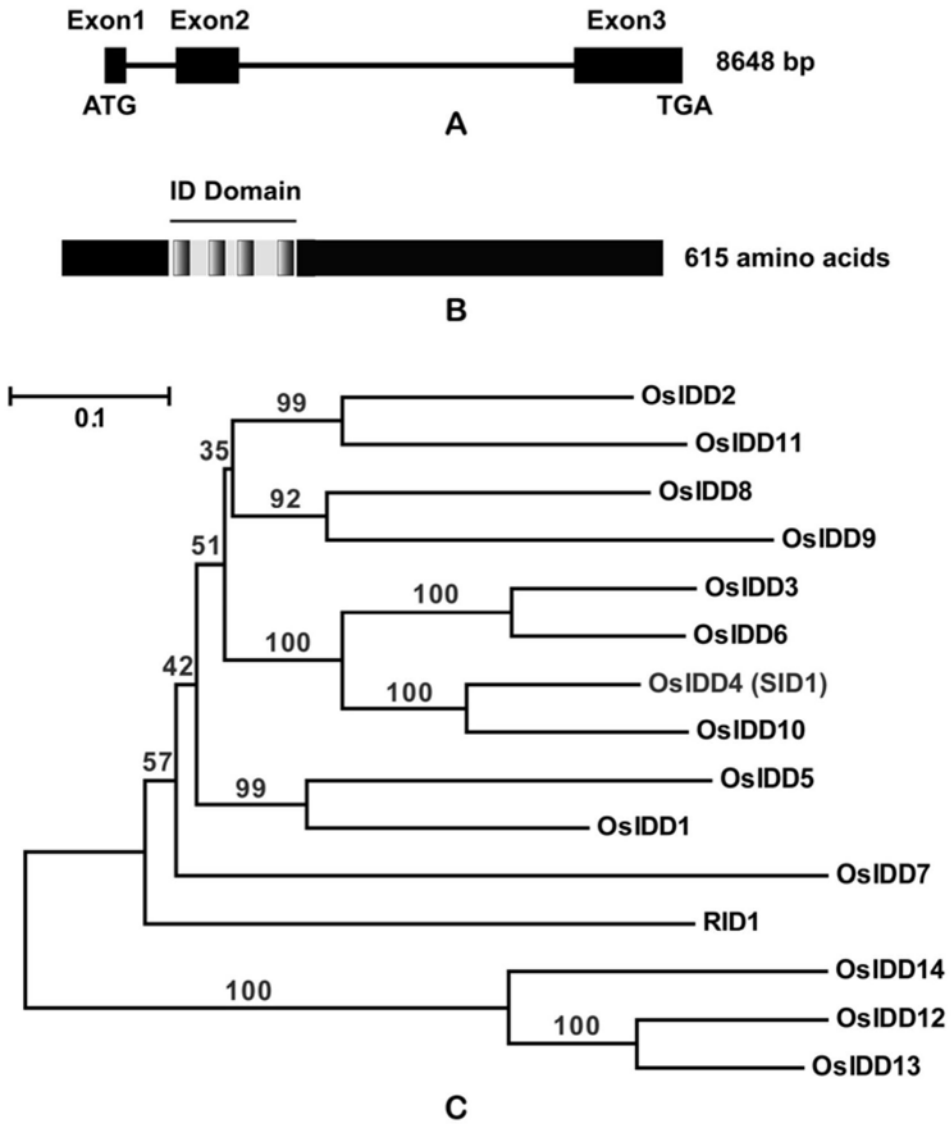


图4

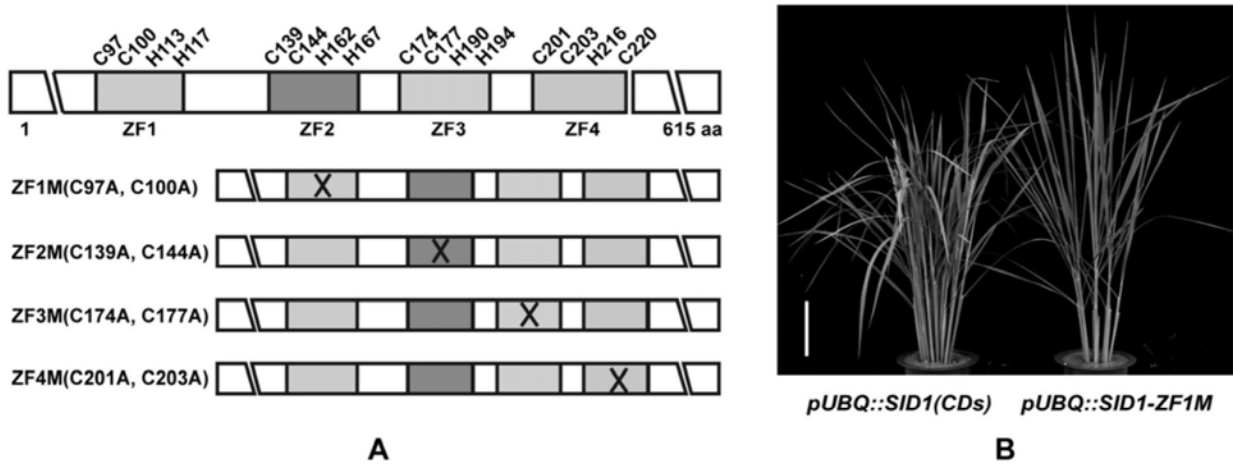


图5

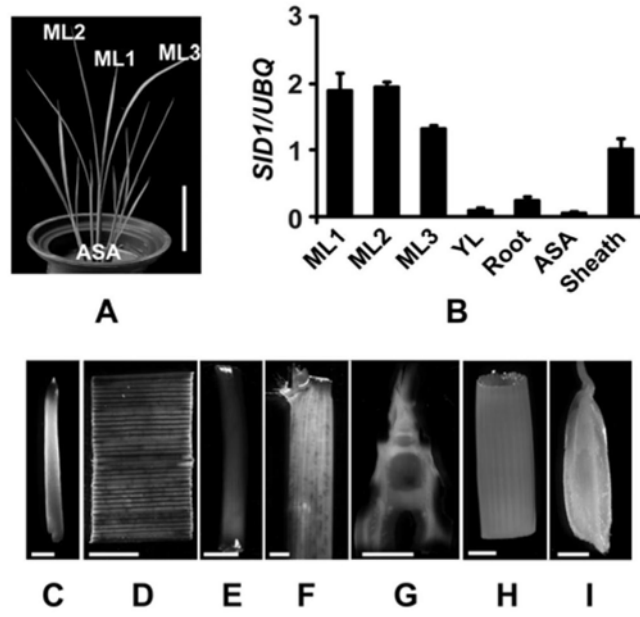


图6

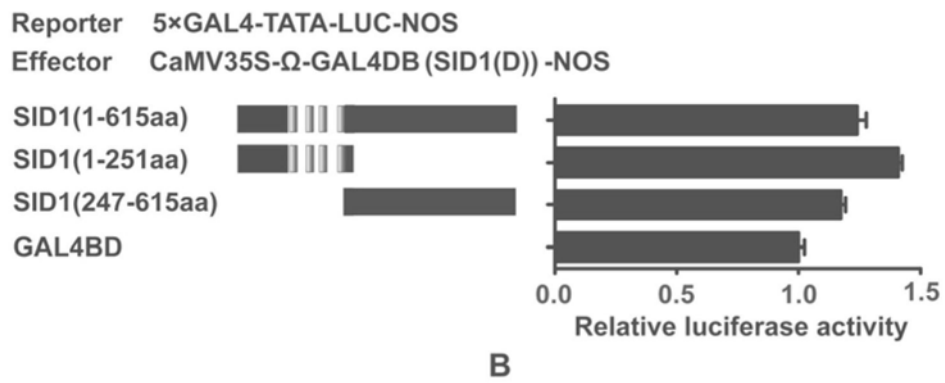
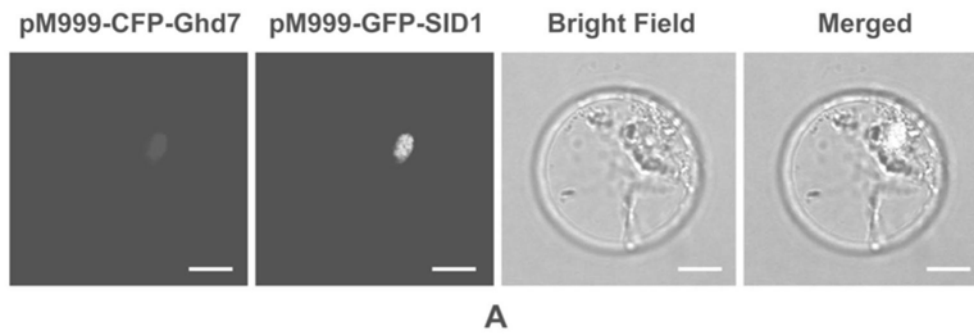


图7

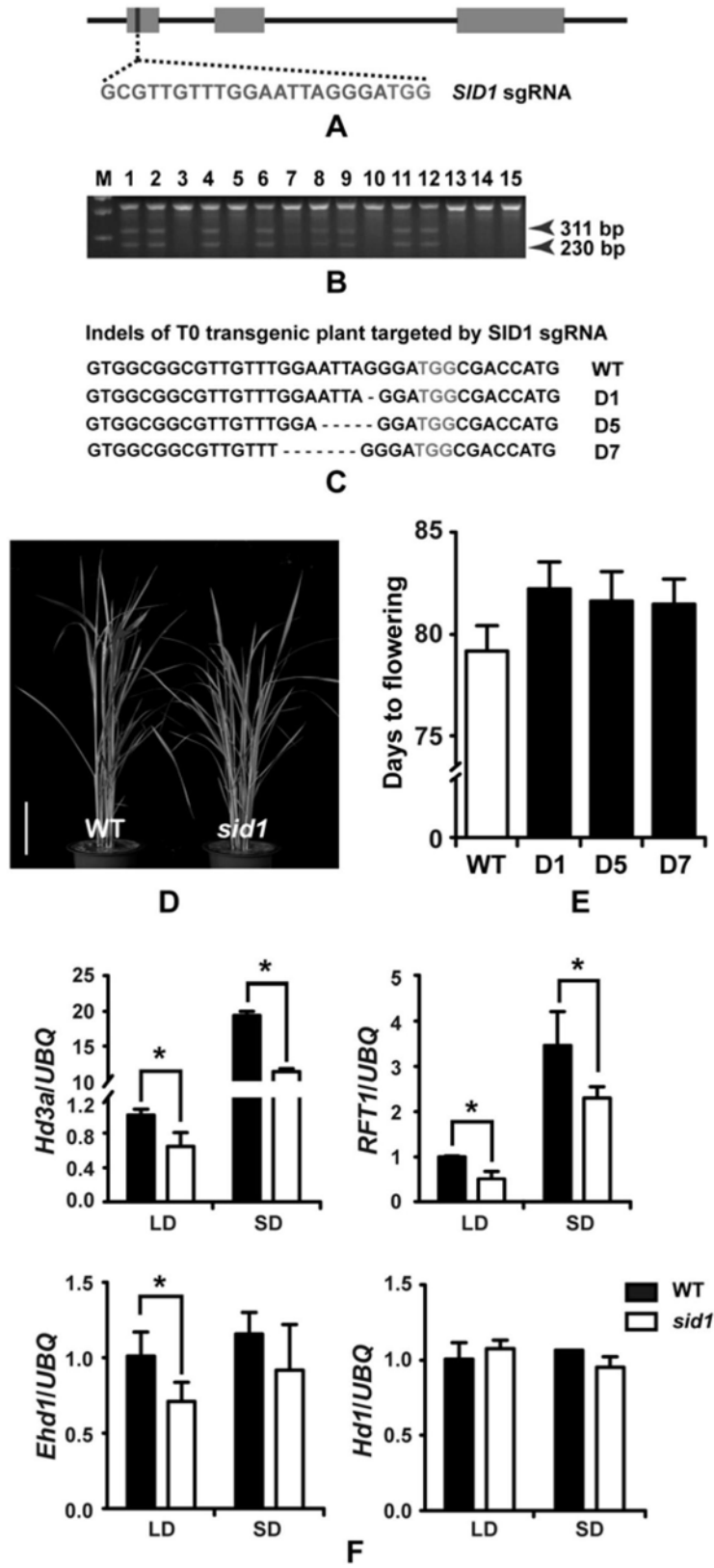


图8