



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107267480 A

(43)申请公布日 2017. 10. 20

(21)申请号 201710568506.6

(22)申请日 2017.07.13

(71)申请人 未名兴旺系统作物设计前沿实验室
(北京)有限公司

地址 102206 北京市昌平区中关村生命科
学园医疗产业园9号楼4层405

(72)发明人 王峥 周宽基 李健 马力耕
邓兴旺

(51)Int. Cl.

C12N 9/10(2006.01)

C12N 15/54(2006.01)

C12N 15/82(2006.01)

A01H 5/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页
序列表7页 附图3页

(54)发明名称

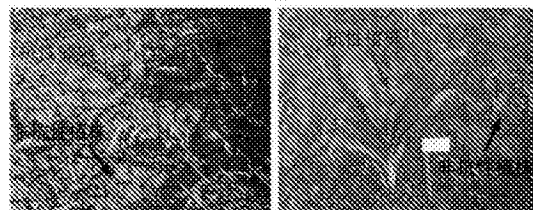
抗除草剂蛋白及其基因在植物育种中的应用

(57)摘要

本发明公开了一种抗除草剂蛋白及其基因在植物育种中的应用,属于植物生物技术领域,具体而言,本发明涉及能赋予植物除草剂抗性的蛋白及其在植物育种中的应用。本发明在玉米作物中构建了突变体库,从中筛选到一系列抗除草剂突变体,其中获得了对AHAS抑制剂类除草剂具有抗性的氨基酸序列SEQ ID NO:2和6,这些具有抗性的AHAS突变体,对于培育具有除草剂抗性的植物,尤其是农作物,具有重要的应用价值。



A



B

C

1. 一种具有除草剂抗性的AHAS突变体,其特征在於所述AHAS突变体的核苷酸序列选自下列组的序列之一:

- (a) 所述AHAS突变体的核苷酸编码的氨基酸序列上含有突变位点S621N突变;
- (b) 所述AHAS突变体的核苷酸序列上含有突变位点G1862A;
- (c) 所述AHAS突变体的核苷酸序列所编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:2或6所示;或
- (d) 所述AHAS突变体的核苷酸序列如SEQ ID NO:1 或5所示。

2. 根据权利要求1所述的AHAS突变体,其特征在於所述AHAS突变体还包含S653N、W574L、A122T和/或A155T等突变位点。

3. 一种表达盒、载体或细胞,其特征在於所述表达盒、载体或细胞包含权利要求1-2之任一所述的AHAS突变体的核苷酸序列。

4. 一种米制品,其包含权利要求1~2之任一所述的AHAS突变体。

5. 权利要求1~2之任一所述的AHAS突变体、权利要求3所述的表达盒、载体或细胞,在获得具有除草剂抗性的植物中的应用,优选其中除草剂是AHAS抑制剂类除草剂,更优选是咪唑啉酮类除草剂。

6. 一种使植物获得除草剂抗性的方法,其特在於所述除草剂抗性可以通过以下方法之一获得:

a) 通过突变植物内源的AHAS基因,使该植物体产生对AHAS抑制剂类除草剂具有抗性的G1862A突变位点;或

b) 将具有除草剂抗性的AHAS突变体核苷酸序列SEQ ID NO:1或5,通过转基因的方法转入目标植株,使目标植株获得对AHAS抑制剂类除草剂抗性;或

c) 通过杂交、转育、回交等方法,将已获得的AHAS突变植株中的G1862A突变位点转移到目标植株中,使目标植株获得对AHAS抑制剂类除草剂的抗性。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述的突变选自下列方法之一:物理或化学方法导致的基因突变,化学方法包括用EMS等诱变剂处理所导致的诱变,所述突变还可以是点突变,也可以是DNA缺失或插入突变,还可以是通过RNAi、基因定点突变等基因沉默手段产生,所述基因定点突变方法包括但不限于ZFN定点突变方法、TALEN定点突变方法、和/或CRISPR-Cas9等基因组定点突变方法。

8. 根据权利要求6或7所述的方法,其中所述的植株内源AHAS基因或是外源转入的AHAS突变体所编码的氨基酸序列除了包含S621N突变位点外,还包含S653N、W574L、A122T和/或A155T等突变位点。

9. 一种AHAS抑制剂类除草剂抗性植株的应用,所述除草剂抗性植株可以应用于杂交育种提纯,其特征在於:所述AHAS抑制剂类除草剂抗性植株中的AHAS突变体的核苷酸序列选自下列组的序列之一:

- (a) 所述AHAS突变体的核苷酸编码的氨基酸序列上含有突变位点S621N突变;
- (b) 所述AHAS突变体的核苷酸序列上含有突变位点G1862A;
- (c) 所述AHAS突变体的核苷酸序列所编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:2或6所示;或
- (d) 所述AHAS突变体的核苷酸序列如SEQ ID NO:1 或5所示。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在於其中所述的AHAS突变体所编码的氨基酸序列上还包含S653N、W574L、A122T和/或A155T等突变位点。

抗除草剂蛋白及其基因在植物育种中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于植物生物技术领域,具体而言,本发明涉及能赋予植物除草剂抗性的蛋白氨基酸序列及其在植物育种中的应用。

背景技术

[0002] 农田中杂草是影响农作物产量的最重要因素之一,而人工除草所需要消耗的人力资源和成本很高,而且不便于农业集约化生产,严重制约了农作物种植向高产、优质和低成本方向的发展进程。因此,除草剂就应运而生,其使用为解决农田草害、促进栽培方式的革新及增产中起了很大的作用。

[0003] 目前发展抗除草剂作物的途径主要有两种:一种是通过转基因手段将抗除草剂基因转入作物中,最成功的案例是美国孟山都公司开发的一系列转基因抗草甘膦除草剂作物品种农达 (RoundupReady®) 系列,包括抗农达大豆、玉米、棉花、油菜、向日葵和甜菜。但是利用转基因技术培育的抗除草剂的作物品种需要经过较长时间的安全性评价,而且,从品种选育成功到生产应用的周期较长。第二种是利用遗传学非转基因的手段筛选作物抗除草剂突变体。该方法代表了目前国际抗除草剂作物培育的新方向。首先通过遗传诱变的方法构建突变体库,从中筛选到抗除草剂突变体,这样得到的突变体可以直接作为抗除草剂新品种加以利用,或通过回交转育的方法杂交到其他栽培品种。其优点是非转基因作物,不需要经过安全评估直接应用,产业化所需的批准时间短。因此我们选择了后者作为获得抗除草剂作物的方法。

[0004] 乙酰羟基合成酶 (AHAS, EC2.2.1.6) 或者叫乙酰乳酸合成酶 (ALS) 是支链氨基酸 (缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸) 生物合成途径的第一个酶,也是几种重要除草剂的靶位点,主要包括:咪唑啉酮类除草剂、磺酰胺类除草剂、三唑并嘧啶类除草剂、嘧啶基氧基苯甲酸酯类除草剂和磺酰基氨基羧基三唑啉酮类除草剂。这五类除草剂与其靶位点乙酰羟基合成酶结合后,能够抑制蛋白活性,从而阻止易感植物的生长发育。在模式植物拟南芥中的研究表明, AHAS蛋白某些氨基酸突变后能够使拟南芥获得除草剂抗性,突变后的蛋白不再与除草剂结合,同时又保持原有的生物学活性。

[0005] 正是基于以上原理,本发明人通过长期而艰苦的研究实践,在玉米作物中构建了突变体库,并从中筛选到一系列抗除草剂突变体,并鉴定出赋予其除草剂抗性的蛋白。本发明人还开发了这些蛋白及其编码基因在转基因或者非转基因植物育种中的应用,可用于培育具有除草剂抗性的植物,尤其是农作物,如抗除草剂玉米、水稻、小麦、高粱等。

发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题在于提供新的使植物具有除草剂抗性的蛋白质氨基酸序列和核苷酸序列,弥补原有专利或技术的不足。另外,本发明还提供了编码这些蛋白质的核酸以及基因工程中间体(如,表达盒、载体和细胞等),获得具有除草剂抗性的植物的方法和应用,并且提供了判断植物是否采用本发明方法或提供的抗性蛋白获得抗性的鉴定方

法。

[0007] 具体而言,本发明提供了一种对乙酰羟酸合酶(Acetoxy acid synthase, AHAS)类抑制剂具有耐受性的突变体植株,所述突变体植株的基因组DNA发生了突变,与野生型对照相比,突变位点发生在AHAS基因编码框的第1862bp,该位点发生了由G到A的点突变,从而导致该基因编码的蛋白质第621位氨基酸由丝氨酸(Ser,S)变为天冬酰胺(Asn,N),具有该突变位点的植株可以耐受AHAS抑制剂类除草剂。

[0008] 在本发明中,AHAS抑制剂类除草剂包括磺酰脲类、咪唑啉酮类、嘧啶并三唑类、水杨酸嘧啶类等除草剂(Peter Babczinski,Thomas Zelinski.Mode of action herbicidal ALS-inhibitors on acetolactate synthase from green plant cell cultures,yeast, and Escherichia coli.Pesticide science,1991,31:305-323;郑培忠,沈健英.乙酰乳酸合成酶抑制剂的种类及其耐药性研究进展.杂草科学,2009,2:4-8)。因此,在本发明中除草剂抗性指的是对包括磺酰脲类、咪唑啉酮类、嘧啶并三唑类、水杨酸嘧啶类在内的除草剂具有耐受性。优选在本发明中,除草剂是咪唑啉酮类除草剂,如在本发明的具体实施方式中,除草剂是咪唑乙烟酸。即优选在本发明中,除草剂抗性是咪唑啉酮类除草剂抗性,更优选是咪唑乙烟酸抗性。

[0009] 在大部分玉米作物中,由于不同品种间的AHAS基因具有单核苷酸多态性(SNP),具有上述突变且具有除草剂抗性的AHAS突变体的蛋白氨基酸序列如图3中的SEQ ID NO:6所示,其核苷酸序列如图4中的SEQ ID NO:5所示。在其中一个玉米品种“郑单958”母本系中,其野生型的AHAS基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示,其编码的蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示;突变后具有除草剂抗性的AHAS突变体的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示,其编码的蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0010] 本发明还提供了一种使植物组织细胞、植株、品种、品系或杂交种获得除草剂抗性的方法,并通过此方法获得具有除草剂抗性的植物组织细胞、植株、品种、品系或杂交种。所述方法包括以下几种实施方式。

[0011] 获得除草剂抗性的实施方式之一,通过突变玉米内源的AHAS基因,使该植物体获得G1862A位突变,产生对AHAS抑制剂类除草剂抗性的过程。所述“突变”包括但不限于以下方法,如用物理或化学的方法导致的基因突变,化学方法包括用EMS等诱变剂处理所导致的诱变,所述突变还可以是点突变,也可以是DNA缺失或插入突变,还可以是通过RNAi、基因定点突变等基因沉默手段产生。所述基因定点突变的方法包括但不限于ZFN定点突变方法、TALEN定点突变方法、和/或CRISPR-Cas9等基因组定点突变方法。本领域技术人员应该知晓,在本发明公开了玉米内源的AHAS基因组序列,及其突变后具有除草剂抗性的位点后,可以通过ZFN、TALEN和/或CRISPR-Cas9等基因修饰的方法得到本发明所提供的突变体核苷酸序列和蛋白序列及突变体植株。

[0012] 获得除草剂抗性植株的实施方式之一,还包括通过转基因的方法获得,具体是指将本发明获得的具有除草剂抗性的AHAS突变体核苷酸序列,如SEQ ID NO:1或5,通过转基因的方法转入目标植株,使目标植株获得对AHAS抑制剂类除草剂抗性。还可将包含本发明所提供的突变位点G1862A的抗性植株,通过杂交、转育、回交等方法,将本发明中获得的AHAS突变位点转移到目标植株中,使目标植株获得对AHAS抑制剂类的除草剂抗性。更具体的,可以将该AHAS突变体将作为亲本材料,与其它优良玉米品种杂交并进一步回交,把抗除

草剂性状进一步转育到其它目标品种。

[0013] 本发明上述的将本发明获得的具有除草剂抗性的AHAS突变体核苷酸序列,如SEQ ID NO:1或5,通过转基因的方法转入目标植株,以获得具有AHAS抑制剂类除草剂抗性的目标植株的方法,其中所述的转基因方法可以通过植物生物技术领域已知的转化方法制备,所述植物基因转化方法或植物遗传转化方法可分为两大类:一类是直接基因转移技术,包括基因枪法、原生质体法、脂质体法、花粉管通道法、电激转化法、PEG介导转化方法等,其中基因枪转化法是代表。另一类是生物介导的转化方法,主要有农杆菌介导和病毒介导两种转化方法,其中农杆菌介导的转化方法操作简便、成本低、转化率高,广泛应用于双单子叶植物的遗传转化。本发明所提供的AHAS突变体核苷酸序列可被转入到任一植物和植物细胞中,优选的尤其适用于转入到农作物植物细胞,如玉米、小麦、大麦、高粱、黍、水稻、谷子等禾本科植物。

[0014] 本发明还提供了一种AHAS突变体蛋白,具体而言,本发明提供了使植物具有AHAS抑制剂类除草剂抗性的AHAS突变蛋白质,该蛋白质能使所有植物具有AHAS类除草剂抗性,具体的,通过转入本发明AHAS突变体蛋白,可以获得除草剂抗性的植物包括但不限于水稻、玉米、小麦、高粱、大麦芸苔属、两节芥属、白芥、蓖麻、芝麻、棉籽、亚麻、大豆、拟南芥属、菜豆属、花生、苜蓿、燕麦、油菜、燕麦、黑麦(Rye)、粟、蜀黍、小黑麦、单粒小麦、斯佩尔特小麦(Spe1t)、双粒小麦、亚麻、假蜀黍、羊茅、多年生麦草、甘蔗、红莓苔子、番木瓜、香蕉、红花、油棕、香瓜、苹果、黄瓜、石斛、剑兰、菊花、百合科、棉花、桉、向日葵、芸苔、甜菜、咖啡、观赏植物和松类等。优选地,植物包括玉米、大豆、芥菜、小麦、大麦、黑麦、稻、棉花和高粱。

[0015] 本发明还提供了一种提高杂交种子纯度的杂交育种方法,所述方法包括将本发明提供的具有抗AHAS类除草剂性状的植株作为父本,或是通过传统杂交回交手段转育到杂交育种父本植物中,与不抗AHAS抑制类除草剂的母本杂交,产生的种子用AHAS抑制剂类除草剂处理,清除母本自交产生的种子,从而提高杂交种子纯度。本发明所提供的AHAS突变体蛋白、核酸和突变体植株,为培育玉米杂交新品种、提高杂交种子纯度提供了新方法和新材料。

[0016] 本发明所提供的对AHAS抑制剂类除草剂具有抗性的基因序列,本领域技术人员可以通过常规的分子生物学技术,就可以制备出取代、添加或缺失了氨基酸残基的AHAS蛋白质,这些方法记载于《分子克隆实验指南》(北京:科学出版社,2002年)等文献中。通过转基因技术,将编码这些具有AHAS抑制剂类除草剂抗性蛋白质的基因序列导入植物中,优选导入禾本科植株中,更具体的导入玉米、水稻、小麦等植株中,从而赋予植物对AHAS抑制剂类除草剂的抗性。

[0017] 本发明取得的有益效果在于获得可替代现有技术的使植物具有除草剂抗性的蛋白质、核酸、表达盒、载体、细胞、植物、获得具有除草剂抗性的植物的应用和方法、以及鉴定本发明的植物的方法,并且可以通过转基因或非转基因方法获得具有除草剂抗性的植物品种,尤其是禾本科植物品种,优选为玉米、水稻品种。

[0018] 本发明还提供了一种表达盒、表达载体或工程菌株,所述表达盒、表达载体或工程菌株含有本发明所提供的AHAS突变体核苷酸序列,更具体的含有本发明所提供的突变位点G1862A,或是含有编码本发明所提供的氨基酸序列SEQ ID NO:2的核苷酸序列,或是包含本发明所提的核苷酸序列SEQ ID NO:1或5,所述表达盒、表达载体或工程菌株可以用于使植

株或植株细胞获得对AHAS抑制剂类除草剂抗性。

[0019] 本发明还提供了一种使植物具有增强的AHAS抑制剂类除草剂抗性的方法,所述方法通过以下方法获得,方法一是将本发明所获得的AHAS基因上具有G1862A突变的植株,再进行“突变”,所述“突变”包括但不限于以下方法,如用物理或化学的方法导致的基因突变,化学方法包括用EMS等诱变剂处理所导致的诱变,所述突变还可以是点突变,也可以是DNA缺失或插入突变,还可以是通过RNAi、基因定点突变等基因沉默手段产生。所述基因定点突变的方法包括但不限于ZFN定点突变方法、TALEN定点突变方法、和/或CRISPR-Cas9等基因组定点突变方法。再突变后获得的突变体植株,其AHAS基因除了具有S621N(G1862A)突变位点外,还可以进一步包含S653N、W574L、A122T和/或A155T等抗性位点。

[0020] 本发明还提供了一种使植物叠加不同除草剂抗性的方法,所述方法包括,在通过上述方法获得本发明所提供的AHAS除草剂抗性突变体后,再通过转基因、或基因组编辑、或物理化学诱变的方法,或是通过与具有其他除草剂抗性的植株进行杂交、回交,从而目标植株获得两种或两种以上除草剂抗性的方法,所述除草剂抗性包括ACCase基因突变产生的对ACCase抑制剂类除草剂的抗性,或是通过转入抗草甘膦、草铵膦、莠去津、溴苯腈、2,4-D、咪唑啉酮和磺酰脲类等除草剂的基因而获得多重抗性,所述除草剂抗性基因包括但不限于aroA基因、EPSP基因、Bar基因、tfdA基因等。

[0021] 此外,本发明所提供的AHAS突变体还可以叠加其他性状,所述性状包括但不限于抗虫性状,例如BtCry和其他对于鞘翅类、鳞翅类、线虫类或其他害虫具有杀虫活性的蛋白质;提高营养或药用价值的性状,例如改变油含量或油成分的性状、高蛋白质或高氨基酸浓度性状,和其他本领域中已知的性状类型;增加生物产量的性状,例如光合产量、谷粒产量、淀粉含量、油含量或蛋白质含量等;对于干旱、盐、高温等非生物逆境产生耐受性的性状;或是对害虫、病毒性病原体等生物逆境产生耐受性的性状。

[0022] 更具体的,本发明提供了获得具有除草剂抗性的植物的方法,其包括如下步骤:

[0023] (1) 使植物包含本发明所提供AHAS突变位点G1862A;和/或,

[0024] (2) 测定所述植物是否包含本发明所提供的核苷酸序列SEQ ID NO:1或5;和/或,

[0025] (3) 使植物表达本发明的蛋白质氨基酸序列SEQ ID NO:2或6。

[0026] 可以采用前述或者本领域技术人员能获知的转基因和非转基因方法,使植物包含本发明所提供的核酸序列SEQ ID NO:1或5,或者使植物表达本发明所提供的蛋白质氨基酸序列SEQ ID NO:2或6。所述获得除草剂抗性的方法可以采用的步骤包括转基因、杂交、回交、自交或无性繁殖步骤。这些步骤本身对于转基因或非转基因育种领域的技术人员来说,都是可以获知并实施的。

[0027] 本发明还提供了鉴定本发明所提供的抗除草剂植物的方法,其包括如下步骤:

[0028] (1) 测定所述植物是否包含本发明所提供的AHAS突变位点G1862A;和/或,

[0029] (2) 测定所述植物是否包含本发明所提供的核苷酸序列SEQ ID NO:1或5;和/或,

[0030] (3) 测定所述植物是否表达本发明所提供的氨基酸序列SEQ ID NO:2或6。

[0031] 通过该方法,可以判断植物是否属于本发明所提供的植物或是通过本发明所提供的方法获得了该除草剂抗性植株。测定的步骤可以通过常规的核酸检测和/或蛋白质检测方法来进行,只需要能够检测出蛋白质或其编码核酸带有G1862A突变或其相应核酸突变的方法都可以。示例性的方法包括蛋白质测序、核酸测序、聚合酶链式反应(PCR)检测、探针杂

交检测等。

[0032] 本发明取得的有益效果在于获得可替代现有技术的使植物具有除草剂抗性的蛋白质、核酸、表达盒、载体、细胞、植物、获得具有除草剂抗性的植物的应用和方法、以及鉴定本发明的植物的方法,并且可以通过转基因或非转基因方法获得具有除草剂抗性的植物品种,尤其是玉米、水稻品种。

[0033] 本发明引用了公开文献,这些文献是为了更清楚地描述本发明,它们的全文内容均纳入本文进行参考,就好像它们的全文已经在本文中重复叙述过一样。为了便于理解,以下将通过具体的附图和实施例对本发明进行详细地描述。需要特别指出的是,这些描述仅仅是示例性的描述,并不构成对本发明范围的限制。依据本说明书的论述,本发明的许多变化、改变对所属领域技术人员来说都是显而易见的了。

附图说明

[0034] 图1显示了抗咪唑啉酮类除草剂的玉米突变植株,其中图1A为除草剂喷洒过程,图1B 为喷洒后10天阳性单株,图1C为喷洒后3周阳性单株。

[0035] 图2是诱变后抗性株系的测序检测结果。

[0036] 图3如SEQ ID NO:6所示的来自不同玉米品种中的AHAS突变基因的蛋白氨基酸序列。

[0037] 图4如SEQ ID NO:5所示的来自不同玉米品种中的AHAS突变基因的核苷酸序列。

具体实施方式

[0038] 下述实施例中所用方法如无特别说明,均为常用分子生物学、组织培养技术和农学手册所记载的方法。例如,具体步骤可参见:《Molecular Cloning:A Laboratory Manual (3rd edition)》(Sambrook,J.,Russell,David W.,2001,Cold Spring Harbor),《Plant Propagation by Tissue Culture》(Edwin F.George,Michael A.Hall,Geert-Jan De Klerk,2008,Springer)。

[0039] 实施例1、从玉米EMS诱变库M1代群体中筛选抗性植株

[0040] 为了对玉米突变体库进行大规模筛选,我们提前通过EMS诱变成熟玉米花粉的方法构建玉米突变体库【EMS对玉米花粉诱变效应的研究,祝丽英等,河北农业大学学报,2002年 01期】。除草剂选择“牧草净”,这是一类咪唑啉酮类除草剂,购自山东先达化工有限公司,为5%咪唑乙烟酸(imazethapyr)含量水剂,推荐施用剂量为100ml/亩。播种M1代玉米突变体24万个单株,在玉米幼苗三叶期,田间喷施不同浓度牧草净,对其中12万单株以200ml/亩剂量喷洒,另外12万单株群体以400ml/亩剂量喷洒,筛选过程见图1。除草剂喷施10天后,绝大多数玉米幼苗停止生长,只有极少数幼苗正常生长;除草剂喷施3周后,几乎所有玉米幼苗已经死亡,只有3株存活并且正常生长(见图1),因此我们获得了3个疑似抗除草剂阳性单株。

[0041] 疑似抗除草剂阳性单株自交获得F2代种子,萌发后喷施除草剂,成活株与死亡株的分离比例为3:1,符合单显性基因的遗传规律。即,突变基因为显性遗传,单基因控制。

[0042] 实施例2、玉米抗除草剂阳性植株的分子鉴定

[0043] 对筛选得到的3个疑似抗除草剂玉米单株进行了分子水平的检测。玉米中编码了

咪唑啉酮类除草剂靶基因2个,分别是位于4号染色体的AHAS109和位于5号染色体的AHAS108。取3个抗除草剂阳性单株叶片和诱变前“郑单958”母本系叶片,分别提取基因组DNA,对2个目标基因进行PCR扩增、委托北京三博远志生物技术有限公司进行测序,经过序列比对,我们在3个抗除草剂阳性植株中均检测到同一个突变位点发生了点突变,突变位点发生在AHAS108基因编码框的第1862bp,该位点发生了由G到A的点突变,从而导致该基因编码的蛋白质第621位氨基酸由丝氨酸(Ser,S)变为天冬酰胺(Asn,N)(见图2),即突变植株的AHAS108基因突变后的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示,其编码的ALS蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0044] 实施例3.抗除草剂阳性植株后代田间咪唑啉酮类除草剂的耐受表型

[0045] 将鉴定为纯合突变体的株系后代单株收种,在田间种约一平方米的小区,同时旁边种植野生型作为对照。待玉米长至三叶期时,按照200ml/亩的用量喷施5%的咪唑乙烟酸。喷施一个月后调查秧苗枯死情况,发现野生型对照在喷施咪唑乙烟酸之后几乎停止生长,新长出来的叶片完全枯黄,进而逐渐枯死,而筛选到的抗除草剂阳性苗则全部呈现对咪唑乙烟酸完全耐受的表型,其正常的生长发育没有受到影响,最终正常拔节抽穗。这表明我们筛选到的抗除草剂突变体能够稳定地遗传其对咪唑啉酮类除草剂的抗性。

[0046] 实施例4、不同玉米品种中的突变体序列克隆

[0047] 发明人对已有的多份玉米基因组序列进行分析,发现在不同的玉米品种中,其AHAS基因上存在多个SNP位点,在其编码的蛋白氨基酸序列上,这些SNP位点如图3中的SEQ ID NO:6所示,以第4位的氨基酸为例,在不同的玉米品种中,其第4位的氨基酸存在A/T两种分型,附图3中用方括号[]将该SNP位点标出,“/”两侧的字母表示可能出现的氨基酸类型。来自不同玉米品种中的AHAS基因突变体的核苷酸序列如图4中的SEQ ID NO:5所示。这些不同的SNP位点不会影响AHAS基因的正常功能,其第621位氨基酸由丝氨酸(Ser,S)变为天冬酰胺(Asn,N)后,获得对AHAS抑制剂类除草剂的抗性。

[0048] 实施例5、抗性突变体序列的转基因功能验证

[0049] 本发明通过人工合成的方式,合成了实施例2中的AHAS突变体序列,具体如SEQ ID NO:1所示,将该序列用组成型启动子ubi进行驱动表达,转入野生型玉米中,获得转基因阳性苗后,进行苗期的喷施实验,按照200ml/亩的用量喷施5%的咪唑乙烟酸,结果发现:野生型对照全部死亡,而转基因阳性苗的生长不受除草剂喷施的影响,表明该具有G1862A突变位点的突变体序列转入植株中,也可以赋予所转入植株对AHAS抑制剂类除草剂的抗性。

SEQUENCE LISTING

<110> 未名兴旺系统作物设计前沿实验室(北京)有限公司

<120> 抗除草剂蛋白及其基因在植物育种中的应用

<130>

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1917

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 1

```

atggccacca ccgccgccgc gtctaccgcg ctactggcg cactaccgc tgcgccaag 60
gcgaggcgcc gggcgccact cctggccacc cgccgcgccc tcgcccgcgc catcaggtgc 120
tcagcggcgt caccgcgat gccgatgget cccccggcca ccccgtccg gccgtggggc 180
cccaccgagc cccgcaaggg tgetgacatc ctctctgagt cctctgagcg ctgcccgcgc 240
cgcgacgtct tcgctacc ccggcgccgc tccatggaga tccaccagc actcaccgc 300
tccccgtca tcgccaacca cctctccgc cagcagcaag gggaggcctt tgcgcctcc 360
ggctacgcgc gctcctcggg ccgcgtcggc gtctgcatcg ccacctccg ccccgccgc 420
accaacctag tctccgcgct cgccgacgcg ctctctgatt ccgtcccat ggtcgcctc 480
acgggacagg tgccgcgacg catgattggc accgacgct tccaggagc gcccatcgc 540
gaggtcacc gctccatcac caagcacaac tacctggtcc tcgacgtcga cgacatccc 600
cgcgctcgtc aggaggcttt ctctctcgc tctctggtc gaccggggc ggtgcttgc 660
gacatcccca aggacatcca gcagcagatg gcggtgctg tctgggaca gcccatgag 720
ctgcctgggt acattgcgcg ccttcccaag cccctcgcga ctgagttgct tgagcaggtg 780
ctgcgtcttg ttggtgaatc ccggcgcctt gttctttat ttggcggtgg ctgcccagca 840
tctggtgagg agttgcgacg ctttgtggag ctgactggaa tcccggtcac aactactctt 900
atgggcctcg gcaacttccc cagcgcgac cactgtctc tgcgcatgct tggatgcat 960
ggcacggtgt atgcaaatta tgcaagtggat aagccgacg tgttgcttgc atttggtgtg 1020
cggtttgatg atcgcgtgac aggaagatt gagcttttg caagcaggc taagattgtg 1080
cacgttgata ttgatcccgc tgagattggc aagaacaagc agccatgtg gtccatctgt 1140
gcagatgtta agcttgcttt gcagggcatg aatgctctc ttgaaggaag cacatcaaag 1200
aagagctttg actttggctc atggaacgat gagttggatc agcagaagag ggaattcccc 1260
cttgggtata aaacatctaa tgaggagatc cagccacaat atgctattca ggttcttgat 1320
gagctgacga aaggcgagc catcatcggc acaggtgttg ggcagacca gatgtgggcg 1380
gcacagtact aacttaciaa gcggccaagg cagtgttgt cttcagctgg tcttggggct 1440
atgggatttg gtttgcggc tgetgctggt gcttctgtgg ccaaccagg tgctactgtt 1500
gttgacatcg atggagatg tagctttctc atgaacgttc aggagctagc tatgatccga 1560
attgagaacc tcccgtgaa ggtctttgtg ctaacaacc agcacctggg gatggtggtg 1620

```

cagtgggagg acaggttcta taaggccaac agagegcaca catacttggg aaaccagag 1680
aatgaaagtg agatataatcc agatttcgtg acgategcca aagggttcaa cattccagcg 1740
gtccgtgtga caaagaagaa cgaagtccgc gcagcgataa agaagatgct cgagactcca 1800
gggccgtacc tcttgatat aatcgtcca caccaggagc atgtgttgcc tatgatccct 1860
aatggtgggg ctttcaagga tatgatcctg gatggtgatg gcaggactgt gtactga 1917

<210> 2

<211> 638

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 2

Met	Ala	Thr	Thr	Ala	Ala	Ala	Ser	Thr	Ala	Leu	Thr	Gly	Ala	Thr	Thr
1				5					10					15	
Ala	Ala	Pro	Lys	Ala	Arg	Arg	Arg	Ala	His	Leu	Leu	Ala	Thr	Arg	Arg
			20					25					30		
Ala	Leu	Ala	Ala	Pro	Ile	Arg	Cys	Ser	Ala	Ala	Ser	Pro	Ala	Met	Pro
			35				40					45			
Met	Ala	Pro	Pro	Ala	Thr	Pro	Leu	Arg	Pro	Trp	Gly	Pro	Thr	Glu	Pro
			50				55				60				
Arg	Lys	Gly	Ala	Asp	Ile	Leu	Val	Glu	Ser	Leu	Glu	Arg	Cys	Gly	Val
65					70					75					80
Arg	Asp	Val	Phe	Ala	Tyr	Pro	Gly	Gly	Ala	Ser	Met	Glu	Ile	His	Gln
				85					90						95
Ala	Leu	Thr	Arg	Ser	Pro	Val	Ile	Ala	Asn	His	Leu	Phe	Arg	His	Glu
				100					105					110	
Gln	Gly	Glu	Ala	Phe	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Arg	Ser	Ser	Gly	Arg
				115				120						125	
Val	Gly	Val	Cys	Ile	Ala	Thr	Ser	Gly	Pro	Gly	Ala	Thr	Asn	Leu	Val
				130				135					140		
Ser	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Leu	Asp	Ser	Val	Pro	Met	Val	Ala	Ile
145					150					155					160
Thr	Gly	Gln	Val	Pro	Arg	Arg	Met	Ile	Gly	Thr	Asp	Ala	Phe	Gln	Glu
					165					170					175
Thr	Pro	Ile	Val	Glu	Val	Thr	Arg	Ser	Ile	Thr	Lys	His	Asn	Tyr	Leu
				180					185					190	
Val	Leu	Asp	Val	Asp	Asp	Ile	Pro	Arg	Val	Val	Gln	Glu	Ala	Phe	Phe
				195				200						205	
Leu	Ala	Ser	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro	Val	Leu	Val	Asp	Ile	Pro	Lys
				210				215						220	
Asp	Ile	Gln	Gln	Gln	Met	Ala	Val	Pro	Val	Trp	Asp	Lys	Pro	Met	Ser

225	230	235	240
Leu Pro Gly Tyr Ile	Ala Arg Leu Pro Lys	Pro Pro Ala Thr	Glu Leu
	245	250	255
Leu Glu Gln Val Leu	Arg Leu Val Gly Glu	Ser Arg Arg Pro	Val Leu
	260	265	270
Tyr Val Gly Gly Gly	Cys Ala Ala Ser Gly	Glu Glu Leu Arg	Arg Phe
	275	280	285
Val Glu Leu Thr Gly	Ile Pro Val Thr Thr	Thr Thr Leu Met	Gly Leu Gly
	290	295	300
Asn Phe Pro Ser Asp	Asp Pro Leu Ser Leu	Arg Met Leu Gly	Met His
305	310	315	320
Gly Thr Val Tyr Ala	Asn Tyr Ala Val Asp	Lys Ala Asp Leu	Leu Leu
	325	330	335
Ala Phe Gly Val Arg	Phe Asp Asp Arg Val	Thr Gly Lys Ile	Glu Ala
	340	345	350
Phe Ala Ser Arg Ala	Lys Ile Val His Val	Asp Ile Asp Pro	Ala Glu
	355	360	365
Ile Gly Lys Asn Lys	Gln Pro His Val Ser	Ile Cys Ala Asp	Val Lys
	370	375	380
Leu Ala Leu Gln Gly	Met Asn Ala Leu Leu	Glu Gly Ser Thr	Ser Lys
385	390	395	400
Lys Ser Phe Asp Phe	Gly Ser Trp Asn Asp	Glu Leu Asp Gln	Gln Lys
	405	410	415
Arg Glu Phe Pro Leu	Gly Tyr Lys Thr Ser	Asn Glu Glu Ile	Gln Pro
	420	425	430
Gln Tyr Ala Ile Gln	Val Leu Asp Glu Leu	Thr Lys Gly Glu	Ala Ile
	435	440	445
Ile Gly Thr Gly Val	Gly Gln His Gln Met	Trp Ala Ala Gln	Tyr Tyr
	450	455	460
Thr Tyr Lys Arg Pro	Arg Gln Trp Leu Ser	Ser Ala Gly Leu	Gly Ala
465	470	475	480
Met Gly Phe Gly Leu	Pro Ala Ala Ala Gly	Ala Ser Val Ala	Asn Pro
	485	490	495
Gly Val Thr Val Val	Asp Ile Asp Gly Asp	Gly Ser Phe Leu	Met Asn
	500	505	510
Val Gln Glu Leu Ala	Met Ile Arg Ile Glu	Asn Leu Pro Val	Lys Val
	515	520	525
Phe Val Leu Asn Asn	Gln His Leu Gly Met	Val Val Gln Trp	Glu Asp
	530	535	540

Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Glu
 545 550 555 560
 Asn Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val Thr Ile Ala Lys Gly Phe
 565 570 575
 Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys Asn Glu Val Arg Ala Ala
 580 585 590
 Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Ile Ile
 595 600 605
 Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Asn Gly Gly Ala
 610 615 620
 Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly Arg Thr Val Tyr
 625 630 635

<210> 3

<211> 1917

<212> DNA

<213> 玉米 (*Zea mays*)

<400> 3

atggccacca ccgccgccgc gtctaccgcg ctcaactggcg ccaactaccgc tgcgcccgaag 60
 gcgaggcgcc gggcgcacct cctggccacc cgccgcgccc tcgccgcgcc catcaggtgc 120
 tcagcggcgt caccgcgat gccgatgget cccccggcca ccccgtccg gccgtggggc 180
 cccaccgagc cccgcaaggg tgctgacatc ctctctgagt cctctgagcg ctgcggcgctc 240
 cgcgacgtct tcgcctaccg cgccggcgcg tccatggaga tccaccagcg actcaccgcg 300
 tcccccgtea tcgccaacca cctcttccgc cagcagcaag gggaggcctt tgccgcctcc 360
 ggctacgcgc gctcctcggg ccgcgtcggc gtctgcatcg ccacctccgg cccccggcgc 420
 accaacctag tctccgcgct cgccgacgcg ctgctcgatt ccgtccccat ggctcgccatc 480
 acgggacagg tgccgcgacg catgattggc accgacgctt tccaggagac gcccatcgctc 540
 gaggtcaccg gctccatcac caagcacaac tacctggctc tcgacgtcga cgacatcccc 600
 cgcgctcgtc aggaggcttt ctctctcgcg tctcttggtc gaccggggcc ggtgcttgctc 660
 gacatcccca aggacatcca gcagcagatg gcggtgctg tctgggacaa gcccatgagt 720
 ctgcctgggt acattgcgcg ccttcccaag ccccctgaga ctgagttgct tgagcaggtg 780
 ctgcgtcttg ttggtgaate ccggcgcctt gttctttatg ttggcggtgg ctgcgcagca 840
 tctggtgagg agttgcgacg ctttgtggag ctgactggaa tcccggteac aactactctt 900
 atgggcctcg gcaacttccc cagcgcgacg ccaactgtctc tgcgcatgct tggatgcat 960
 ggcaacggtg atgcaaatta tgcagtggat aagggcgatc tgttgcttgc atttgggtgtg 1020
 cggtttgatg atcgcgtgac aggggaagatt gaggttttg caagcagggc taagattgtg 1080
 cacgttgata ttgateccgc tgagattggc aagaacaage agccacatgt gtccatctgt 1140
 gcagatgtta agcttgcttt gcagggcgatg aatgctcttc ttgaaggaag cacatcaaag 1200
 aagagctttg actttgcttc atggaacgat gagttggatc agcagaagag ggaattcccc 1260
 cttgggtata aaacatctaa tgaggagatc cagccacaat atgctattca gtttcttgat 1320

gagctgacga aaggcgagge catcatcggc acaggtgttg ggcagcacca gatgtgggcg 1380
gcacagtact acacttaca gggccaagg cagtggttgt cttcagctgg tcttggggct 1440
atgggatttg gtttgccggc tgctgctggt gcttctgttg ccaaccagg tgtcactggt 1500
gttgacatcg atggagatgg tagctttctc atgaacgttc aggagctagc tatgatccga 1560
attgagaacc tcccggtgaa ggtctttgtg ctaaacaacc agcacctggg gatggtggtg 1620
cagtgaggagg acaggttcta taaggccaac agagcgcaca catacttggg aaaccagag 1680
aatgaaagtg agatataatcc agatttcgtg acgatcgcca aagggttcaa cattccagcg 1740
gtccgtgtga caaagaagaa cgaagtcgc gcagcgataa agaagatgct cgagactcca 1800
gggccgtacc tcttgatat aatcgtcca caccaggagc atgtgttgcc tatgatccct 1860
agtgtggggg ctttcaagga tatgatcctg gatggtgatg gcaggactgt gtactga 1917

<210> 4

<211> 638

<212> PRT

<213> 玉米 (*Zea mays*)

<400> 4

Met	Ala	Thr	Thr	Ala	Ala	Ala	Ser	Thr	Ala	Leu	Thr	Gly	Ala	Thr	Thr
1				5						10				15	
Ala	Ala	Pro	Lys	Ala	Arg	Arg	Arg	Ala	His	Leu	Leu	Ala	Thr	Arg	Arg
			20					25					30		
Ala	Leu	Ala	Ala	Pro	Ile	Arg	Cys	Ser	Ala	Ala	Ser	Pro	Ala	Met	Pro
			35				40					45			
Met	Ala	Pro	Pro	Ala	Thr	Pro	Leu	Arg	Pro	Trp	Gly	Pro	Thr	Glu	Pro
			50			55					60				
Arg	Lys	Gly	Ala	Asp	Ile	Leu	Val	Glu	Ser	Leu	Glu	Arg	Cys	Gly	Val
65					70					75				80	
Arg	Asp	Val	Phe	Ala	Tyr	Pro	Gly	Gly	Ala	Ser	Met	Glu	Ile	His	Gln
				85					90					95	
Ala	Leu	Thr	Arg	Ser	Pro	Val	Ile	Ala	Asn	His	Leu	Phe	Arg	His	Glu
			100					105					110		
Gln	Gly	Glu	Ala	Phe	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Arg	Ser	Ser	Gly	Arg
			115					120					125		
Val	Gly	Val	Cys	Ile	Ala	Thr	Ser	Gly	Pro	Gly	Ala	Thr	Asn	Leu	Val
			130					135					140		
Ser	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Leu	Asp	Ser	Val	Pro	Met	Val	Ala	Ile
145					150					155				160	
Thr	Gly	Gln	Val	Pro	Arg	Arg	Met	Ile	Gly	Thr	Asp	Ala	Phe	Gln	Glu
					165					170				175	
Thr	Pro	Ile	Val	Glu	Val	Thr	Arg	Ser	Ile	Thr	Lys	His	Asn	Tyr	Leu
					180					185				190	

Val Leu Asp Val Asp Asp Ile Pro Arg Val Val Gln Glu Ala Phe Phe
 195 200 205
 Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp Ile Pro Lys
 210 215 220
 Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val Trp Asp Lys Pro Met Ser
 225 230 235 240
 Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys Pro Pro Ala Thr Glu Leu
 245 250 255
 Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu Ser Arg Arg Pro Val Leu
 260 265 270
 Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ala Ala Ser Gly Glu Glu Leu Arg Arg Phe
 275 280 285
 Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr Thr Leu Met Gly Leu Gly
 290 295 300
 Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu Arg Met Leu Gly Met His
 305 310 315 320
 Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu Leu
 325 330 335
 Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Ile Glu Ala
 340 345 350
 Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Val Asp Ile Asp Pro Ala Glu
 355 360 365
 Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala Asp Val Lys
 370 375 380
 Leu Ala Leu Gln Gly Met Asn Ala Leu Leu Glu Gly Ser Thr Ser Lys
 385 390 395 400
 Lys Ser Phe Asp Phe Gly Ser Trp Asn Asp Glu Leu Asp Gln Gln Lys
 405 410 415
 Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Ser Asn Glu Glu Ile Gln Pro
 420 425 430
 Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu Thr Lys Gly Glu Ala Ile
 435 440 445
 Ile Gly Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr
 450 455 460
 Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser Ser Ala Gly Leu Gly Ala
 465 470 475 480
 Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly Ala Ser Val Ala Asn Pro
 485 490 495
 Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Leu Met Asn

500	505	510
Val Gln Glu Leu Ala Met Ile Arg	Ile Glu Asn Leu Pro Val Lys Val	
515	520	525
Phe Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp		
530	535	540
Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Glu		
545	550	555
Asn Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val Thr Ile Ala Lys Gly Phe		
565	570	575
Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys Asn Glu Val Arg Ala Ala		
580	585	590
Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Ile Ile		
595	600	605
Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly Ala		
610	615	620
Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly Arg Thr Val Tyr		
625	630	635

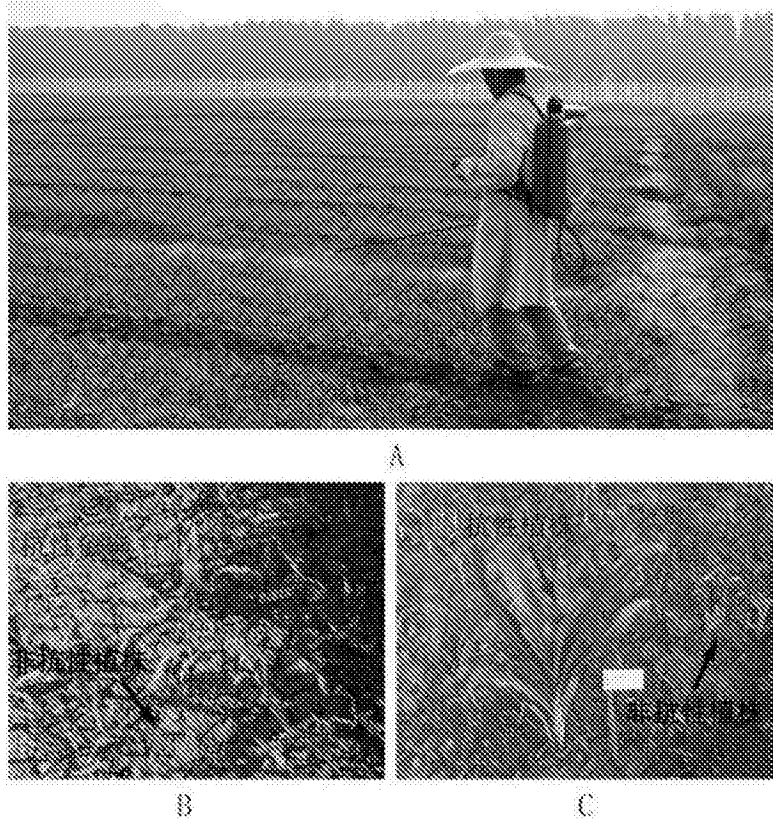


图1

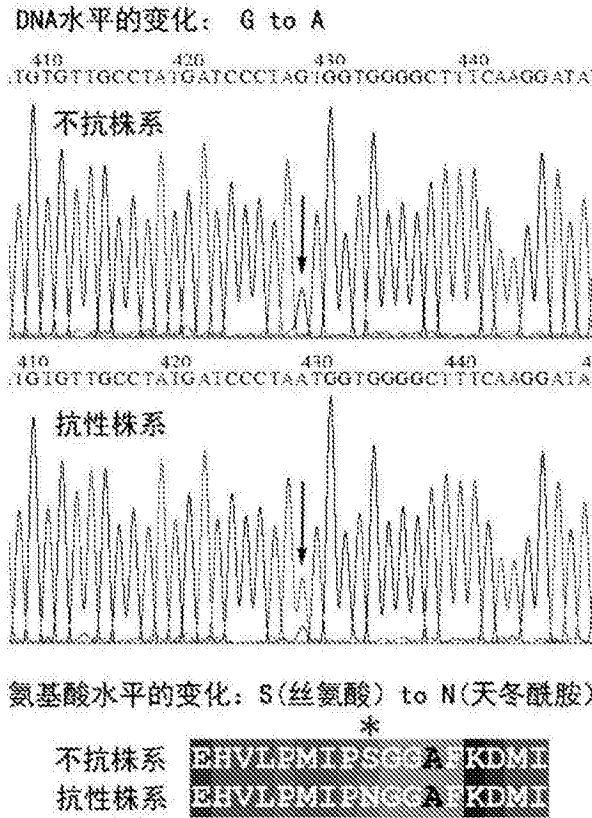


图2

MAT[A/T]AAASTALTGATTAAPKARRRAHLLATTRALAAPIRCSAASPAMPMAPP
 ATPLRPWGPT[D/E]PRKGADILVESLERCVRDVEAYPGGASMEIHQALTRSPVIA
 NHLFRHEQGEAFAASGYARSSGRVGVCIATSGPGATNLVSALADALLDSVPMVAI
 TGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVDDIPRVVQEAFFLASSGRPG
 PVLVDIPKDIQQMAVPVWWDKPMISLPGYIARLPKPPATELLEQVLRVVGESRRPVL
 YVGGGCAASGEELRRFVELTGIPVTTTLMGLGNFSPDDPLSLRMLGMHGTVYAN
 YAVDKADLLA[L/F]GVRFDDRVTGKIEAFASRAKIVHVDIDPAEIGKNKQPHVSI
 CADVKLALQGMNALLEGSTSKSFDGWSNDELDDQQKREFPLGYKTSNEEIQQQ
 YAIQVLDELTKGEAIIGTGVGQHQMWAQAQYYTYKRPRQWLSSAGLGAMGFGLP
 AAAGASVANPGVTVVDDIDGDSFLMNVQELAMIRIENLPVKVFVNNQHLGMV
 VQWEDRFYKANRAHTYLGNPENESEIYPDFVTIAKGFNIPAVRVTKKNEVRAAIK
 KMLETGPYLLDIIVPHQEHVLPMPNGGAFKDMILDGDGRTVY

图3

ATGGCCACC[G/A]CCGCCGCCGCTCTACCGCGCTCACTGGCGCCACTACCGCTGCGCCCAAGGCGAGGCGCCGGCGCACCTCCTGGCC
 ACCCGCCGCGCCCTCGCCGCGCCCATCAGGTGCTCAGCGGGTCACCCGCCATGCCGATGGCTCCCCGGCCACCCCGCTCCGGCCGTGGG
 GCCCAACCGA[T/G]CCCCGAAGGG[C/T]GC[C/T]GACATCCTCGTGGAGTCCCTCGAGCGCTGCGGCGTCCGCGACGTCTTCGCCTA
 CCCCggCGGCGCTCCATGGAGATCCACCAGGCACTCACCCGCTCCCCGTCATCGCCAACCACCTTTCCGCCACGAGCAAGGGGAGGCC
 TTTGC[G/C]GCCTCCGGCTACGCGCGCTCCTCGGGCCGCTCGGCGTCTGCATCGCCACCTCCGGCCCGGCGCCACCAACCT[T/A]GT
 CTCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTEGATTCCGTCCCATGGTCGCCATCACGGGACAGGTGCCGCGACGCATGATTGGCACCGACGCTTC
 CAGGAGACGCCCATCGTCGAGGTCACCCGCTCCATCACCAGCACAACTACCTGGTCTCGACGTCGACGACATCCCCCGGCTCGTGCAGG
 AGGCTTTCTTCTCGCTCTCTGGTCGACC[G/A]GGGCCGGTGTGTGCGACATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCGGTGCCTG
 TCTGGGACAAGCCCATGAGTCTGCCTGGGTACATTGCGCGCCTTCCCAAGCCCTGCGACTGAGTTGCTTGAGCAGGTGCTGCGTCTTGT
 TGGTGAATC[C/G]CGGCGCCCTGTCTTTATGTTGGCGGTGGGTGCGCAGCATCTGGTGAGGAGTTGCGACGCTTTGTGGAGCTGACTGG
 AATCCCGGTCACAACACTCTTATGGGCCCTCGGCAACTCCCCAGCCAGCACCCTACTGTCTTCCGCATGCT[A/T]GGTATGCATGG[C/
 G]ACGGTGTATGCAAATTATGCAGTGGATAAGGCCGATCTGTTGCTTGCA[C/T]TTGGTGTGCGGTTTGATGATCG[T/C]GTGACAGGG
 AAGATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCTAAGATTGTGCACGTTGATATTGATCC[G/C]GCTGAGATTGGCAAGAACAAGCAGCCACATGTG
 TCCATCTGTGCAGATGTTAAGCTTGCTTTGCAGGGCATGAATGCTCTTCTTGAAGGAAGCACATCAAAGAAGAGCTTTGACTTTGGCTCAT
 GGAACGATGAGTTGGATCAGCAGAAGAGGGAATCCCCCTTGGGTATAAAACATCTAATGAGGAGATCCAGCCACAATATGCTATTCAGGT
 TCTTGATGAGCTGACGAAAGGCGAGGCCATCATCGGCACAGGTGTTGGGCAGCACCAGATGTGGGCGGCACAGTACTACACTTACAAGCGG
 CCAAGGCAGTGGTTGCTTCAGCTGGTCTTGGGGCTATGGGATTTGGTTTGGCGGCTGCTGCTGGTGTCTTGTGGC[C/A]AACCAGGT
 GT[T/C]ACTGTTGTTGACATCGATGGAGATGGTAGCTTCTCATGAACGTTCAAGGAGCTAGCTATGATCCGAATTGAGAACCTCCC[G/A
]GTGAAGGTCTTTGTGCTAAACAACCAGCACCTGGGGATGGTGGTGCAGTGGGAGGACAGGTTCTATAAGGCCAACAGAGCGCACACATAC
 TTGGGAAACCAGAGAATGAAAGTGAGATATATCCAGATTTCTGTGACGATCGCCAAAGGGTTCAACATTCAGCGGTCCGTGTGACAAAGA
 AGAACGAAGTCCGCGCAGCGATAAAGAAGATGCTCGAGACTCCAGGCCGTACCTCTTGATATAATCGTCCCACACCAGGAGCATGTGTT
 GCCTATGATCCCTA[G/A]TGGTGGGGCTTTCAGGATATGATCCTGGATGGTGTGATGGCAGGACTGTGTACTGA

图4