



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113999863 A

(43) 申请公布日 2022. 02. 01

(21) 申请号 202111283433.9

(22) 申请日 2021.11.01

(71) 申请人 浙江大学

地址 310058 浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号

(72) 发明人 师恺 王萍 丁淑婷 王娇 喻景权

(74) 专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限公司 33224

代理人 沈金龙 胡红娟

(51) Int. Cl.

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/84 (2006.01)

A01H 5/00 (2018.01)

A01H 6/82 (2018.01)

权利要求书1页 说明书5页
序列表6页 附图2页

(54) 发明名称

一种提高番茄作物水分利用效率的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种提高番茄作物水分利用效率的方法,属于生物技术领域。所述方法具体为将番茄作物中的S1ALD1基因敲除或沉默。本发明利用CRISPR/Cas9基因编辑技术获得番茄S1ald1基因突变体,发现该突变体能够显著提高植株的水分利用效率,增强对干旱的抗性,可用于高水分利用效率的番茄种质选育。

对照	TGTTCTCCAACAATCCCCTGGTCAT	
S1ald1#1	TGTTCTCCAACAATCC--ACTGGTCATG	-1bp
S1ald1#2	-----TTCCACTGGTCATG	-91bp

1. S1ALD1基因在提高番茄作物水分利用效率中的应用,其特征在于,所述S1ALD1基因的蛋白编码区的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

2. S1ALD1基因编码的蛋白在提高番茄作物水分利用效率中的应用,其特征在于,所述S1ALD1基因编码的蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

3. 一种提高番茄作物水分利用效率的方法,其特征在于,将番茄作物中的S1ALD1基因敲除或沉默。

4. 如权利要求3所述的方法,其特征在于,所述S1ALD1基因的蛋白编码区的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

5. 如权利要求3所述的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 在番茄S1ALD1基因的蛋白编码区选取用于基因敲除的靶标片段,进行引物设计,构建用于敲除S1ALD1基因的载体;

(2) 构建含步骤(1)所述用于敲除S1ALD1基因的载体的农杆菌基因工程菌;

(3) 将步骤(2)所述农杆菌基因工程菌转化到番茄细胞中,培养获得不含外源蛋白且稳定遗传的纯合突变体株系。

6. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,所述用于敲除S1ALD1基因的载体为CRISPR/Cas9载体。

7. 如权利要求6所述的方法,其特征在于,构建CRISPR/Cas9载体的上游引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示,下游引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示。

8. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,用于基因敲除的靶标片段为含有PAM结构的靶标片段,且靶标片段PAM结构前20个碱基的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

9. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,所述农杆菌基因工程菌为农杆菌GV3101菌株。

一种提高番茄作物水分利用效率的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种提高番茄作物水分利用效率的方法。

背景技术

[0002] 番茄(*Solanum lycopersicum* L.),茄科茄属,是世界上栽培面积最广的蔬菜和经济作物之一。因其口感鲜美,富含具有抗氧化保健功能的番茄红素,广受消费者喜爱。然而,番茄植株株体相对高大,且连续开花坐果,需水量较普通绿叶蔬菜高,对土壤水分条件较为敏感。

[0003] 随着全球气候变暖,地区降雨差异和排水不良等,淡水资源越来越稀缺。干旱正成为农业可持续发展面临的最严峻的环境挑战之一。干旱胁迫改变了番茄植株的各种生理、生化和形态特征。干旱通常导致叶片气孔关闭,光合作用显著抑制,细胞质膜损伤,活性氧过多导致氧化胁迫,叶片萎蔫,茎伸长受限,落花落果等,严重影响番茄的生长以及果实的产量和品质。番茄一旦遭受干旱胁迫,可导致减产甚至绝收,危害极大。因此,培育水分利用效率更高的抗旱番茄植株,以最大限度地减少干旱造成的产量损失非常重要。植物水分利用效率是指植物消耗单位质量水分所固定的CO₂(或生产的干物质)的量,即植物生理活动过程中光合碳同化率与蒸腾速率的比值,反映了植物的耗水性和对水分亏缺条件的适应性。植株单株的水分利用效率计算公式:植物水分利用效率=生物产量/耗水量。植物水分利用效率目前已经逐渐成为作物抗旱节水的一个重要评判标准。因此,高水分利用效率种质资源的创制对需水量较大的番茄植株的生长发育具有重要的作用。

[0004] 拟南芥ALD1是转氨酶AGD2类防御反应蛋白1,能够去除L型赖氨酸中的 α -氨基,催化合成哌啶酸(Pipecolic acid,Pip)(*Biochemical principles and functional aspects of pipecolic acid biosynthesis in plant immunity, Plant Physiol*, 2017.)。哌啶酸的合成通路在不同物种间具有保守性,番茄中也有相同的信号通路(*An engineered pathway for N-hydroxy-pipecolic acid synthesis enhances systemic acquired resistance in tomato, Science Signaling*, 2019.)。近年来,哌啶酸作为一种新发现的能够显著提高植物对病原菌抗性的物质受到广泛研究,其生物合成以及下游羟基化修饰路径已研究较为清楚(*Flavin monooxygenase-generated n-hydroxypipecolic acid is a critical element of plant systemic immunity, Cell*, 2018.)。但是关于其在非生物胁迫中的抗性却鲜有报道。番茄SlALD1基因是从拟南芥ALD1基因同源比对而来,哌啶酸的生物合成通路在番茄中同样保守,但是关于其在干旱抗性中的尚无研究。

[0005] 近年来发展迅速的基因编辑技术——规律成簇的间隔短回文重复序列(CRISPR)/CRISPR相关蛋白9(Cas9),受到人们的高度重视,成为目前最热的基因编辑系统。CRISPR/Cas9基因编辑技术能够特异性识别靶位点,从而定点编辑目的基因,获得基因敲除材料,后代可以自交筛选目的基因发生编辑且不含Cas9的株系,避免了使用目前颇具争议的引入外源基因的转基因技术。CRISPR/Cas9基因编辑技术通过精准敲除基因,从而精确改变农作物性状,快速获得理想种质,大大改善了传统杂交育种面临的周期长,结果不可控等问题。

发明内容

[0006] 本发明提供了一种提高番茄作物水分利用效率的方法,为培育高水分利用效率的番茄品种提供依据。

[0007] 本发明提供了S1ALD1基因在提高番茄作物水分利用效率中的应用,所述S1ALD1基因的蛋白编码区的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,其蛋白编码区长度为1311bp,全基因DNA序列如SEQ ID NO.6所示。

[0008] 进一步地,本发明还提供了S1ALD1基因编码的蛋白在提高番茄作物水分利用效率中的应用,所述S1ALD1基因编码的蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0009] 该S1ALD1基因编码的蛋白为一种介导嘧啶酸生物合成的酶,由436个氨基酸组成,是一种转氨酶。

[0010] 本发明首先对拟南芥ALD1基因(基因编号:AT2G13810,TAIR网站“<https://www.arabidopsis.org/>”)进行同源序列比对得到番茄中与其同源性最高的S1ALD1基因(基因编号:XM_004250704.4,NCBI网站“<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>”)。通过CRISPR P2.0网站(<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>)对S1ALD1基因进行序列分析,查找PAM序列,将NGG前的20个bp的序列定义为sgRNA,选择定位于基因蛋白编码区上且具有高度特异性的sgRNA编码序列,该特异性靶向S1ALD1基因蛋白编码区的sgRNA的DNA序列如SEQ ID NO.3所示。

[0011] 本发明还提供了一种提高番茄作物水分利用效率的方法,具体为将番茄作物中的S1ALD1基因敲除或沉默。

[0012] 优选的,所述S1ALD1基因的蛋白编码区的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0013] 具体的,包括以下步骤:

[0014] (1) 在番茄S1ALD1基因的蛋白编码区选取用于基因敲除的靶标片段,进行引物设计,构建用于敲除S1ALD1基因的载体;

[0015] (2) 构建含步骤(1)所述用于敲除S1ALD1基因的载体的农杆菌基因工程菌;

[0016] (3) 将步骤(2)所述农杆菌基因工程菌转化到番茄作物细胞中,培养获得不含外源蛋白且稳定遗传的纯合突变体株系。

[0017] 优选的,所述用于敲除S1ALD1基因的载体为CRISPR/Cas9载体。

[0018] 进一步地,构建CRISPR/Cas9载体的上游引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示,下游引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示。

[0019] 具体的,用于基因敲除的靶标片段为含有PAM结构的靶标片段,且靶标片段PAM结构前20个碱基的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0020] 优选的,所述农杆菌为农杆菌GV3101。

[0021] 本发明通过测定番茄叶片过氧化氢含量发现,干旱条件下S1ald1基因突变体植株内的过氧化氢含量较对照植株明显下降。

[0022] 进一步地,所述基因通过影响植物体内过氧化氢的含量,从而调控番茄对干旱的抗性。

[0023] 所述的调控是指S1ALD1基因通过影响植物体内过氧化氢含量,改变植物体内的活性氧稳态,削弱植物对干旱的抗性。

[0024] 本发明测定长期中度水分亏缺条件下植株水分利用效率发现,S1ald1基因突变体

能够显著提高植株的水分利用效率。

[0025] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0026] 本发明利用CRISPR/Cas9基因编辑技术获得番茄Slald1基因突变体,发现该突变体能够显著提高植株的水分利用效率,增强对干旱的抗性,可用于高水分利用效率的番茄种质选育。

附图说明

[0027] 图1为实施例2中获得的T1代突变体植株的基因编辑位点图,其中,Slald1#1相较于对照缺失一个碱基,Slald1#2相较于对照缺失91个碱基。

[0028] 图2为对照组和Slald1基因突变型番茄在干旱胁迫下的植株图。

[0029] 图3为对照组和Slald1基因突变型番茄在干旱胁迫下的电导率图,其中,小写字母a、b代表不同植株之间在5%水平上的差异显著。

[0030] 图4为对照组和Slald1基因突变型番茄体内的过氧化氢含量变化图。

[0031] 图5为长期中度水分亏缺条件下对照组和Slald1基因突变型番茄的水分利用效率图。

具体实施方式

[0032] 下面结合具体实施例对本发明作进一步描述,以下列举的仅是本发明的具体实施例,但本发明的保护范围不仅限于此。若未特别指明,实施例中所用的技术手段均为本领域技术人员所熟知,所用原料、试剂盒均为市售商品。

[0033] 下述实施例中采用的基因编辑番茄背景为番茄常规野生型品种CR (Condine Red),将未经基因编辑的CR番茄作为对照。

[0034] 实施例1

[0035] 含特异sgRNA的CRISPR/Cas9载体的构建。

[0036] (1) 在NCBI网站“<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>”上找到SlALD1基因 (GenBank号:XM_004250704.4) 的DNA序列,其序列如SEQ ID NO.6所示,输入“<http://crispr.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR2/CRISPR>”网站,找出on score得分高,且GC含量>40%,位于蛋白编码区的一段PAM结构前的20bp碱基序列 (SEQ ID NO.3)。

[0037] 设计CRISPR引物,如下所示:

[0038] CRISPR前引物 (SEQ ID NO.4):GATTGTGTTCTCCAAACAATCCCAC;

[0039] CRISPR后引物 (SEQ ID NO.5):AAACGTGGGATTGTTTGGAGAACAC;

[0040] (2) 取上述CRISPR前引物和后引物各5 μ L,混匀后用PCR仪退火成双链,用于编码单导向RNA (sgRNA),即sgRNA编码序列。

[0041] (3) 中间载体pMD18-T经BbsI单酶切,普通DNA纯化试剂盒纯化后,将退火成的双链与载体用T4连接酶连接,16 $^{\circ}$ C连接过夜。42 $^{\circ}$ C热激转化涂板,载体pMD18-T抗性为氨苄青霉素。

[0042] (4) 挑选单克隆菌落,用CRISPR前引物和载体后引物 (SEQ ID NO.7),进行PCR验证。

[0043] (5) 将条带大小正确的菌液送至公司测序,测序结果显示载体包含sgRNA编码序

列,提质粒,经Hind III与Kpn I双酶切后,连接至双元表达载体pCAMBIA1301上。再次测序结果显示终载体包含sgRNA编码序列,将所得最终质粒电击转入GV3101农杆菌感受态里,28℃培养两天后挑斑进行PCR验证,获得可用于构建其CRISPR/Cas9基因编辑材料的农杆菌菌株。

[0044] 实施例2

[0045] Sla1d1基因突变体材料制备与鉴定。

[0046] 在播种培养基播种已消毒的番茄种子,7天后切子叶。采用农杆菌侵染法将实施例1制备的最终质粒转化入子叶中,利用植物细胞的全能性,获得T₀代基因编辑番茄。

[0047] T₀代基因编辑番茄苗检测。利用CTAB法提取T₀代植株的基因组DNA并以其为模板,在包含sgRNA编码序列的DNA序列前后约200bp处设计如下引物,进行PCR扩增测序验证:

[0048] 验证前引物(SEQ ID NO.8):CATTTCAGTGAGTTACTCT;

[0049] 验证后引物(SEQ ID NO.9):CTTTCTAGAACCCGGGATTT;

[0050] 所得PCR产物送公司测序。测序结果与该段基因原序列利用Snapgene软件进行比对,选取sgRNA编码序列发生碱基缺失、且测序显示单峰的植株,自交繁种,获得T₀代的种子。

[0051] 上述T₀代种子种植于生长室中,获得T₁代植株,利用上述同样方法检测T₁代植株的sgRNA编码序列碱基编辑情况。同时,利用CRISPR前引物(SEQ ID NO.4)和载体后引物(SEQ ID NO.7)对T₁代植株的DNA进行PCR扩增,检测是否含有Cas9序列。选取sgRNA发生突变,且不含Cas9蛋白的T₁代植株,确定为基因编辑植株的两个株系,分别命名为Sla1d1#1和Sla1d1#2,其基因编辑位点如图1所示。Sla1d1#1相较对照植株缺失一个碱基,Sla1d1#2相较对照植株缺失91个碱基。上述两个株系T₁代种子自交繁种后,获得不含外源基因Cas9,且sgRNA发生突变的稳定遗传T₂代植株。

[0052] 以下实施例均以上述两个纯合株系T₂代植株作为材料进行实验。

[0053] 实施例3

[0054] Sla1d1基因突变体的抗旱性研究。

[0055] 选取长至4叶一心的番茄植株于托盘中,在盘底浇足水,确保植株都吸满水。3-5h后倒掉穴盘中未吸收的水分,开始控水干旱处理。环境温度控制在约25℃,空气相对湿度约75%,光强约400μmol/m²/s。干旱处理7天,观察植株萎蔫情况并拍照记录。植株的萎蔫情况可用叶片的相对电导率来表征,相对电导率高表征细胞膜透性较大,细胞受损严重,叶片萎蔫程度高,植株对于干旱更加敏感。

[0056] 由图2和图3可知,Sla1d1基因突变体能够显著提高番茄植株的干旱抗性。

[0057] 实施例4

[0058] Sla1d1基因突变体和对照组番茄过氧化氢含量测定。

[0059] (1) 提取过氧化氢:

[0060] 取番茄叶片0.3g液氮研磨,加入3mL HClO₄ (1M) 匀浆,充分涡旋混匀。4℃,6000rpm,离心5min,吸上清液2.5mL到新的离心管中,涡旋的同时逐滴加入4M KOH,直至pH为6-7。加入0.05g活性炭,充分涡旋30s,4℃,12000rpm,离心5min。吸取上清到干净离心管中,过0.22μm的滤膜,即为提取的过氧化氢。

[0061] (2) 配制反应缓冲液:

[0062] 向100mL的醋酸钾溶液(100mM,pH为4.4)中加入0.0548g ABTS制成反应缓冲液,超声溶解,避光保存。

[0063] (3) 测量过氧化氢含量:

[0064] 吸取1mL样品过氧化氢,1mL反应缓冲液和4 μ L 1*POD(过氧化氢酶),涡旋混匀,室温放置3min,吸取混合液于412nm的波段下测量过氧化氢的吸光值。根据过氧化氢的标准曲线计算即可得到过氧化氢的含量。

[0065] 由图4可知,干旱条件下,S1ald1基因突变体内的过氧化氢含量相较对照植株明显降低,活性氧的稳态得到保护,氧化胁迫程度降低,干旱抗性提高。

[0066] 实施例5

[0067] 长期中度水分亏缺条件下,S1ald1基因突变体和对照组番茄的水分利用效率变化。

[0068] 选取长至4叶一心的番茄植株进行长期中度水分亏缺处理,对照组CK(75%-85%的土壤相对含水量)和长期中度水分亏缺处理组Drought(45%-55%的土壤相对含水量),称重法监控土壤水分并记录每次灌水量。将长期中度水分亏缺处理第30d的植株根、茎和叶放入65 $^{\circ}$ C烘箱烘至恒重后测定其生物产量,根据公式计算得出植株的水分利用效率。图5为长期中度水分亏缺条件下S1ald1基因突变体和对照组番茄植株的水分利用效率变化。如图5所示,S1ald1基因突变体和对照组番茄植株在长期中度水分亏缺处理下,S1ald1基因突变体植株的水分利用效率明显高于对照组植株。这表明,在长期中度水分亏缺处理下,S1ald1基因突变体植株能够提高水分利用效率,从而提高植株的抗旱性,在实际生产上具有应用价值。

序列表

<110> 浙江大学

<120> 一种提高番茄作物水分利用效率的方法

<160> 9

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 1311

<212> DNA

<213> 番茄 (*Solanum lycopersicum* L.)

<400> 1

```

atgttttctc tttgcatgca acctagtgtc agtttgaaag ttcaaagaga ggaaactatt 60
gggagtagag gttataatta ttcaacaaga gtagctcgca atccaaactt gaaaaagttg 120
caaaccaact atttgtttcc tgagatatta gaaagggagc ttaaacaatgt ggagaagtac 180
ccaaatgcta aagtaattag cettggaatt ggtgatacca cgcagccatt accccaacct 240
gtagctttaa gcatgtctaa ttatgcacgt gctctttcaa cacctcaagg gtatactggc 300
tacggactgg aacaagggaa caaggaacta agaagagcaa ttgcagaaac aatatataaa 360
gatcttttgg tagaagaaac tgagatcttt gtgtctgatg gtgcacaatg tgatctctca 420
agagttcagc tcctcttagg ttccaatgtg tcaattgctg tacaggatcc atcatttcca 480
ggatatatag attcaagtgt gattatgggg cagagtgggtg atttgaagaa tgattcaggg 540
agatatggaa atataaaata catgaaatgc aacctagaga acgatttctt tccagatctg 600
tccaaaactg aaagaacaga tgttatcttc ttctgttctc caacaatcc cactggatct 660
gcagcatcta ggcaacaatt gcagcaactt gtagagtttg cacaagtaaa tggttcaatt 720
attgtgtatg atgcagctta ttctgcatat attcagact caagccctaa atcaatttat 780
gaaatcccgg gttctagaaa ggttgccatt gagatctcat ctttctcaa gacggctgga 840
ttcacaggcg ttcgtctagg atggactgta gtgcctaagg agctatttta tctaaatgga 900
tttctgttta tacacgattt caatgcata atatgtacta gctttaacgg tgcttccaat 960
atagctcagg ctggtggatt ggcttgcta tccccggaag gtttcaagga agttatgttt 1020
aaagtagact actataaaga gaatgcaagg atcttagttg aaactttcac ttactaggg 1080
tttcgagttt atggaggtag caatgcgect tatgtttggg tcattttcc aggttcgaaa 1140
tcatggaatg tgttcaattg gattcttgat aagactcaca tcattacagt tcctggaatt 1200
ggattttggtc cagctggtga aggatacata agggtttctg cttttggacg cagagagaac 1260
atcttggaag catctaaaag actcataacc ttactttgtc acacaaatta a 1311

```

<210> 2

<211> 436

<212> PRT

<213> 番茄 (*Solanum lycopersicum* L.)

<400> 2

Met Phe Ser Leu Cys Met Gln Pro Ser Ala Ser Leu Lys Val Gln Arg

1	5	10	15
Glu Glu Thr Ile Gly Ser Arg Gly Tyr Asn Tyr Ser Thr Arg Val Ala			
	20	25	30
Arg Asn Pro Asn Leu Lys Lys Leu Gln Thr Asn Tyr Leu Phe Pro Glu			
	35	40	45
Ile Leu Glu Arg Glu Leu Lys His Val Glu Lys Tyr Pro Asn Ala Lys			
	50	55	60
Val Ile Ser Leu Gly Ile Gly Asp Thr Thr Gln Pro Leu Pro Gln Pro			
65	70	75	80
Val Ala Leu Ser Met Ser Asn Tyr Ala Arg Ala Leu Ser Thr Pro Gln			
	85	90	95
Gly Tyr Thr Gly Tyr Gly Leu Glu Gln Gly Asn Lys Glu Leu Arg Arg			
	100	105	110
Ala Ile Ala Glu Thr Ile Tyr Lys Asp Leu Leu Val Glu Glu Thr Glu			
	115	120	125
Ile Phe Val Ser Asp Gly Ala Gln Cys Asp Leu Ser Arg Val Gln Leu			
	130	135	140
Leu Leu Gly Ser Asn Val Ser Ile Ala Val Gln Asp Pro Ser Phe Pro			
145	150	155	160
Gly Tyr Ile Asp Ser Ser Val Ile Met Gly Gln Ser Gly Asp Leu Lys			
	165	170	175
Asn Asp Ser Gly Arg Tyr Gly Asn Ile Lys Tyr Met Lys Cys Asn Leu			
	180	185	190
Glu Asn Asp Phe Phe Pro Asp Leu Ser Lys Thr Glu Arg Thr Asp Val			
	195	200	205
Ile Phe Phe Cys Ser Pro Asn Asn Pro Thr Gly His Ala Ala Ser Arg			
	210	215	220
Gln Gln Leu Gln Gln Leu Val Glu Phe Ala Gln Val Asn Gly Ser Ile			
225	230	235	240
Ile Val Tyr Asp Ala Ala Tyr Ser Ala Tyr Ile Ser Asp Ser Ser Pro			
	245	250	255
Lys Ser Ile Tyr Glu Ile Pro Gly Ser Arg Lys Val Ala Ile Glu Ile			
	260	265	270
Ser Ser Phe Ser Lys Thr Ala Gly Phe Thr Gly Val Arg Leu Gly Trp			
	275	280	285
Thr Val Val Pro Lys Glu Leu Phe Tyr Leu Asn Gly Phe Pro Val Ile			
	290	295	300
His Asp Phe Asn Arg Ile Ile Cys Thr Ser Phe Asn Gly Ala Ser Asn			
305	310	315	320

Ile Ala Gln Ala Gly Gly Leu Ala Cys Leu Ser Pro Glu Gly Phe Lys
 325 330 335
 Glu Val Met Phe Lys Val Asp Tyr Tyr Lys Glu Asn Ala Arg Ile Leu
 340 345 350
 Val Glu Thr Phe Thr Ser Leu Gly Phe Arg Val Tyr Gly Gly Ser Asn
 355 360 365
 Ala Pro Tyr Val Trp Val His Phe Pro Gly Ser Lys Ser Trp Asn Val
 370 375 380
 Phe Asn Trp Ile Leu Asp Lys Thr His Ile Ile Thr Val Pro Gly Ile
 385 390 395 400
 Gly Phe Gly Pro Ala Gly Glu Gly Tyr Ile Arg Val Ser Ala Phe Gly
 405 410 415
 Arg Arg Glu Asn Ile Leu Glu Ala Ser Lys Arg Leu Ile Thr Leu Leu
 420 425 430
 Cys His Thr Asn
 435

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 番茄 (Solanum lycopersicum L.)

<400> 3

tgttctcaa acaatcccac 20

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 4

gattgtgttc tcaaacaat cccac 25

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 5

aaacgtggga ttgtttggag aacac 25

<210> 6

<211> 5857

<212> DNA

<213> 番茄 (Solanum lycopersicum L.)

<400> 6

atgttttctc tttgcatgca acctagtgtc aggtgaactt tttttatcac ttcaactctt 60
ttatttattt atttttttcc ttttctatca cttatttctt ctttcaaata atatatatgc 120
agtttgaaag ttcaaagaga ggaaactatt ggtatgagat ttttaattat tttaaattat 180
tattgttatt tttttataa agaatttatt ttaaattatt ttattgtctt tcattttcat 240
tatgatataat tgatgttatt attcatgcag ggagtagagg ttataattat tcaacaagag 300
tagctcgcaa tccaaacttg aaaaagttgc aaaccaacta tttgtttcct gaggttagta 360
taattatact atatactctg atagatcgtt tgggtgatag aataagaata aatagtattg 420
aatacgaaaa tagtttgaaa taaaattctg acgtcatggt tgggaataact tatttcatca 480
attatatcat agtattaagt aataggataa attattctat atacatgatc gaataagtta 540
tcgtagaata attaattcta agataacgta tttccaacca aacaacctcc ttagggcttt 600
catgcttggg tctttaattt atccttaaaa ttacatgagt cgagataggg ccatctgaat 660
aaggctgggg atgtaattaa tgtcaaattg atataatgat ataaaatagt gttgatattt 720
tagtaatatt tgaaacttga aaaagaaaca ccaaaaaata aatttaatat gcataaggtt 780
ttatcattta agaagcttta aaatattcaa taatgagaga ataaaaagag agaaaggcaa 840
atgaaaaaga taaatataaa aataataatg tagattcatg aaaatcataa tcagaatata 900
atcatgtaac aaaatagatt gtcatgtaag aaagaaatat tataattaac taaacactat 960
ttcatttctt ggattatctc aatgattctc atcttaaata aggtgaaaaa ataactttat 1020
atctcttacc aaaaaaattc tttttagatt tatcaataca tagagatttg cttacaacaaa 1080
taaggggccc gaaatatatt gagaactcaa gagattattt tagtattttt atgatcgatc 1140
tatccctgaa tctaggtaat tttttttttt tgctttttta tatatatata tatatatata 1200
tatatatata tatatatata tatatatata tatatatttg atggtgaggt attaattgtg 1260
tatttgtctt atttcacatg acagatatta gaaaggagc ttaaaccatgt ggagaagtac 1320
ccaaatgcta aagtaattag ccttggattt ggtgatacca cgcagccatt accccaacct 1380
gtagctttaa gcatgtctaa tgtgcgtaac ataaatcacc aactattttt actgctcaat 1440
gtgtttaaat tgacttgttt ttactgattt ttgattttta agttattttt gtttgtttgt 1500
tatagagcgt tcaaataata taaacgtttt aaaaagtatt ttgtaagctg aaaatgtact 1560
aaaatattac aagaatacaa aagtcagata tgggacattc ctaacatatt tttgactttt 1620
agcttatata tatatatcac gtttaaaaaa tcaatccaaa cacacaaata tatatattat 1680
aaatgttaca ataataattt tgatttacc ctaataagc tggatttttc aaatgctttt 1740
ggttgttaat attaccacaaa ggccaacgga tgggaataaaa taagtttgaa tattttaagc 1800
attttccaca aaaggatttc ggggaagttt aaggatttct cttgtctaaa agatcaaaaa 1860
taaattaatc taacatatac aactataat aaaatgacta ttagcgatat ttaattctta 1920
attatcgcta aaatataatc ttttagcaac aattgtcact ttttatata gtctctaaag 1980
tctttagcga caataatttt aataacatta aactaataca aataaaaact ttaaccctct 2040
ttattagtgt caatatttaa taccaataaa aattattttt attatagtaa tattagcaca 2100
tgtttttaaa aatattcgaa gaataattca aaattttaaa gaagaccata gagaaaccgg 2160
agttgacttc aaagtccaaa taatgtaatt ccacaacctt tatttttatg ttttgattta 2220
attttactgt catatcattc taaatgaaca cccctgtttt aacattgga ccctagacgt 2280
caaacaacaa aatcttttac tctaaaaatt attatgatat tttctttcgt cctattttat 2340

gtgaggattt ttaatttggg ataaactttt taaatttttt ttttaaatt tatgatctag 2400
 aataaactat aaaaatttat gcaattgtag atcattttat taaaaataac ataaatattt 2460
 tagattaaat tattatttaa tataaaaaata tatcgttcat tataattttt acttgcagta 2520
 tgcacgtgct ctttcaacac ctcaagggtg tactggctac ggactggaac aagggaacaa 2580
 ggtgggtcat actctttctt tttttctga gttaaatata tttatatcga tgtgttttgt 2640
 acgaaagatc agaaaaatatt taaaaattat ttttttggat tgtagatgga tactttattt 2700
 tatattttgt atttgataaa taagtaagaa aatattattt caagggtact tcttcatatt 2760
 tattgaattt ataggacata tatattttatt aagaaaaata tttagggata taatttaaaa 2820
 ttatatTTTT cgctattatt cttttttaa atcataaaat ataatgttgc aagtagtgca 2880
 attaacctcc tagaatatat cacattttat taaaggaaaa aaataaatat gaaaaaaatt 2940
 taaatatcta tttaaacttt aaacaattta attattttga acaatgaaaa aaacctaaaa 3000
 aaacagttaa tatgaaatta agaaagtata ttttatctaa caaatacgt gcaaaaattt 3060
 caaagtgaag gttgaggggag gagccaagtg aatttggat atcacttgcg cacgtgtttt 3120
 ccctgctttt attagagaag ttattttttt ttttttgaga aactttgtat taacttgagg 3180
 gaaacagttt gactaaccaa acatagaaag attcaacta acgtacttcc tttttattgc 3240
 tgaccaaaaca aaattaaagt aatattattg attgaattg acaggaacta agaagagcaa 3300
 ttgcagaaac aatatataaa gatcttttgg tagaagaaac tgagatcttt gtgtctgatg 3360
 gtgcacaatg tgatctctca agagttcagg tatacttgc a tttttcatt tttaatcgg 3420
 ttaaaaaaga cataatttac aaacatgatt ttaacttga cgtcatccag taattatgac 3480
 atttaacttt ggatatgcac aagtagacat ttaacttgt ataaaattga acaaatagat 3540
 acattcgctc tacatgacat cctatatgat aattttactt cctacgtggc atcctacgtg 3600
 tactatgtca tataggacat gtgtgtttac ttattcattt ttatataagt ttaagtgtct 3660
 acttgtgcac actcaaaatt ggaggacata atttccgct gaagtcaagt taagaatcac 3720
 gtttatgtat tatgcctta aaaaacaatg ttgtctttct atatttgaaa gtaattgaac 3780
 tttaaacttt ttttatcct taatcaataa tttatagtcg ctcaaatatt aaagacaaga 3840
 tttataccac aaattctaga gatttttctt attgtactta ctaggggtgt taaaaatgag 3900
 gccaatata gataactcat ccaatccgtc caaaatttc agggttgaat ttaggcataa 3960
 tacataaata tagcctttaa cttggctttg aatcacattt ataccttca actttgggtg 4020
 tgcacaagta gacacttaa cttgtataaa gttgaacaaa tagacacatg tcctacgtat 4080
 catcctacat ttcaaatttt gtctacgtg tattgtgtca tgtagaattt atgtgtttat 4140
 ttatttaaaa gttggatagt taaaatgctt gcttgtgcat tatgaaagt gaaggtcaaa 4200
 gttaaaattt taagtcaagt ttaggtteta atatatgtat tatgccttga atttaagata 4260
 atttgaattg actataatct caattctca ctcattcgaa tcttaccga tttaaaagaa 4320
 aatctttaat tgaatccaac ttcattcteta atttcaacc attttaaaac ttttaattac 4380
 tatattatca catactccct agttgtcatt gacctgctt gtgccacaac aaattctttc 4440
 ttgcagctcc tcttaggttc caatgtgtca attgctgtac aggatccatc atttccagtg 4500
 agttactctt gctctcattt gtcttaatta aatttgcctt caacttaatt atttatactg 4560
 ttataaacag agatataggt ggaggtaggt ggagttcac ggttcggacg aatccactag 4620
 tttttcgtag attctatatt tgtgttagaa aaatttaaat aaatatatat atatatatta 4680

acatgtgaac ctccaaacta ctaactttgg ctccgcctac agggatatat agattcaagt 4740
 gtgattatgg ggacagatgg tgatttgaag aatgattcag ggagatatgg aatataaaa 4800
 tacatgaaat gcaacctaga gaacgatttc tttccagatc tgtccaaaac tgaagaaca 4860
 gatgttatct tcttctgttc tccaaacaat cccactggtc atgcagcatc taggcaaca 4920
 ttgcagcaac ttgtagagtt tgcacaagta aatggttcaa ttattgtgta tgatgcagct 4980
 tattctgcat atatttcaga ctcaagcct aatcaattt atgaaatccc gggttctaga 5040
 aaghtaatat tatgaaactt ttttagtgaa aatgactcc tcccttccgt tttatatgac 5100
 tctgcacgaa gtttaaaaaa gtaaaagaaa cttgtggtcc aaaatgaatg atagaaattt 5160
 gtgtgattaa attgtaaate atttcattaa gtttaaaata aatattttat agttaaatag 5220
 ttactaatat aaaaacatgt cattcttttt gaaactaatt aaaaaggaaa gtaagtcaaa 5280
 taaattgaga cagaggaaat ataacttata gattcatctt taaactgatt attatttctt 5340
 actacaggtt gccattgaga tctcatcttt ctcaaagacg gctggattca caggcgttcg 5400
 tctaggatgg actgtagtgc ctaaggagct attttatcta aatggatttc ctgttataca 5460
 cgatttcaat cgcataatat gtactagctt taacggtgct tccaatatag ctcaggctgg 5520
 tggattggct tgcctatccc cggaaggttt caaggaagtt atgtttaaag tagactacta 5580
 taaagagaat gcaaggatct tagttgaaac tttcacttca ctagggtttc gagtttatgg 5640
 aggtagcaat gcgccttatg tttgggttca ttttccaggt tcgaaatcat ggaatgtgtt 5700
 caattggatt cttgataaga ctcacatcat tacagttcct ggaattggat ttggtccagc 5760
 tggatgaagga tacataaggg tttctgcttt tggacgcaga gagaacatct tggaagcatc 5820
 taaaagactc ataaccttac tttgtcacac aaattaa 5857

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 7

ctacttatcg tcatcgtctt tg 22

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 8

catttccagt gagttactct 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 9

ctttctagaa cccgggattt 20

对照	TGTTCTCCAAACAATCCCCTGGTCAT	
<i>Slald1#1</i>	TGTTCTCCAAACAATCC--ACTGGTCATG	-1bp
<i>Slald1#2</i>	-----TTCCCTGGTCATG	-91bp

图1



图2

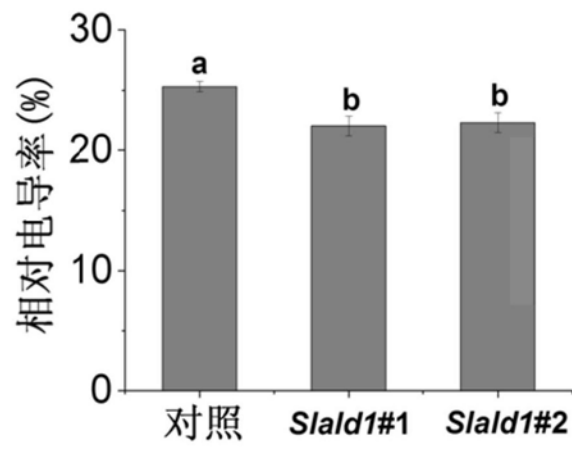


图3

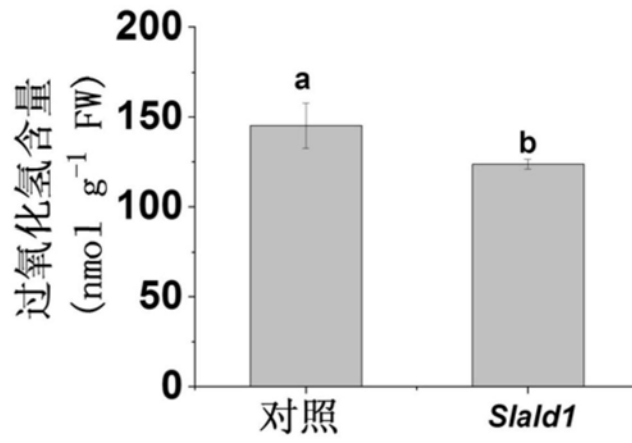


图4

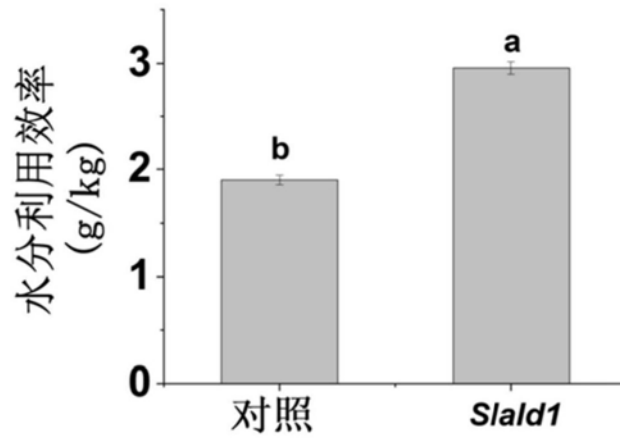


图5