



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105524154 B

(45)授权公告日 2019.07.09

(21)申请号 201610029274.2

A01H 6/46(2018.01)

(22)申请日 2016.01.14

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105524154 A

EP 2119787 A2,2009.11.18,

US 2007061911 A9,2007.03.15,

CN 1821406 A,2006.08.23,

(43)申请公布日 2016.04.27

CN 104292336 A,2015.01.21,

(73)专利权人 华南农业大学

Kikuchi,S.,et al..UniProtKB - Q53RJ0

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483号

(Q53RJ0_ORYSJ).《EBI database》.2005,
Sequence.

(72)发明人 王加峰 刘浩 董双玉 陈志强
王慧

Yoji Kawano,et al..Activation of a
Rac GTPase by the NLR Family Disease
Resistance Protein Pit Plays a Critical
Role in Rice Innate Immunity.《Cell Host &
Microbe》.2010,第7卷(第5期),362-375.

(74)专利代理机构 广州市华学知识产权代理有
限公司 44245

陈志强.稻瘟病抗性机制研究综述.《华南农
业大学学报》.1989,第10卷(第8期),82-91.

代理人 裘晖

审查员 高赞

(51)Int.Cl.

C07K 14/415(2006.01)

C12N 15/29(2006.01)

C12N 15/82(2006.01)

A01H 5/00(2018.01)

权利要求书1页 说明书4页

序列表7页 附图3页

(54)发明名称

稻瘟病抗性相关基因OsCOL9的应用

(57)摘要

本发明公开一种稻瘟病抗性相关基因OsCOL9的应用,属于植物基因工程技术领域。该OsCOL9基因受稻瘟病病原菌诱导后表达量增加。该基因受水稻稻瘟病菌的诱导后上调表达,过量表达能明显提高水稻稻瘟病的抗性。将OsCOL9与Ubi启动子构建植物过表达载体转化水稻,结果该基因过量表达可以显著提高稻瘟病抗性。可以利用本发明基因构建成表达载体,应用于水稻抗稻瘟病育种中。本发明有助于更好地了解OsCOL9的作用机制,OsCOL9的克隆为进一步了解水稻-稻瘟病菌互作,抗病信号传导通路奠定基础,在育种中有较大的应用价值。

pOX-OsCOL9

中二软占



1. 稻瘟病抗性相关基因OsCOL9在提高水稻对稻瘟病抗性中的应用,其特征在于:所述稻瘟病抗性相关基因OsCOL9编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。
2. 稻瘟病抗性相关基因OsCOL9在水稻抗稻瘟病育种中的应用,其特征在于:所述稻瘟病抗性相关基因OsCOL9编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。
3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:
所述的稻瘟病抗性相关基因OsCOL9的cDNA全长序列如SEQ ID NO:2所示。
4. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:
所述的稻瘟病抗性相关基因OsCOL9的全长基因组序列如SEQ ID NO:1所示。
5. 一种含有权利要求1、3或4所述的OsCOL9基因的表达载体在提高水稻对稻瘟病抗性中的应用。
6. 一种含有权利要求5所述的表达载体的宿主菌在提高水稻对稻瘟病抗性中的应用。
7. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于:
所述的稻瘟病抗性相关基因OsCOL9的cDNA全长序列如SEQ ID NO:2所示。
8. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于:
所述的稻瘟病抗性相关基因OsCOL9的全长基因组序列如SEQ ID NO:1所示。
9. 一种含有权利要求2、7或8所述的OsCOL9基因的表达载体在水稻抗稻瘟病育种中的应用。
10. 一种含有权利要求9所述的表达载体的宿主菌在水稻抗稻瘟病育种中的应用。

稻瘟病抗性相关基因OsCOL9的应用

技术领域

[0001] 本发明属于植物基因工程技术领域,涉及一种水稻抗病基因的应用,具体涉及一种稻瘟病抗性相关基因OsCOL9的应用。

背景技术

[0002] 水稻(*Oryza Sativa*)是世界上重要的粮食作物之一,养活着全球半数以上的人口(Khush,2005),也是我国近一半人口的主要食物来源(刘国权等,2004)。由稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)侵染引起的稻瘟病,是水稻生产上的重要限制因素(Liu et al,2013),它具有传播速度快、发生范围广、危害严重等特点。流行年份,稻瘟病重病区一般造成水稻减产10%~20%,有时达40%~50%,局部田块甚至颗粒无收,严重威胁着水稻的生产(Pennisi,2010)。聚合多个主效抗病基因培育水稻新品种是目前防治稻瘟病最为经济有效的手段(雷财林等,2004)。在长期与稻瘟病共同进化的过程中,水稻演化出许多针对不同稻瘟病菌生理小种的抗病基因,通过遗传鉴定已报道了68个位点约83个基因,其中绝大多数基因都编码含有核苷酸结合位点与富亮氨酸重复序列的蛋白(Liu et al,2013)。受稻瘟病菌侵染后,水稻会通过PTI(PAMP trigger immunity)与ETI(effector trigger immunity)两个途径实现免疫反应。PTI主要是受病原菌关联分子模式(PAMP)诱发的免疫反应,真菌细胞壁的几丁质,细菌外层的肽聚糖、鞭毛蛋白等小分子物质都能够激活水稻细胞膜受体蛋白从而诱发初级免疫系统PTI。ETI由病原菌释放的效应蛋白触发细胞内环境免疫反应,ETI发生后植物会出现ROS爆发、释放植保素、形成组织局部坏死等多种反应,该途径是植物最主要的免疫形式(Jabs et al,1997;Friedman and Baker,2007;Dangl and Jones,2001)。

[0003] 不论PTI还是ETI途径,转录因子都参与了抗病信号传导,如Xa21是PAMP的病程识别蛋白,通过与AvrXa21相互作用介导白叶枯抗性,Xa21在体内剪切释放胞内激酶,该结构域与锌指蛋白转录因子WRKY62发生互作产生抗病反应。Pb1编码NBS-LRR类蛋白,且具有持久的抗穗颈瘟特性,Pb1与WRKY45互作,使水杨酸表达量升高,Pb1所介导的抗病通路必须有WRKY45的参与,该免疫反应主要在ETI水平上进行调节。转录因子的类型也非常丰富,包括锌指蛋白、同源异性结构域、亮氨酸拉链、MYB等多个家族。这类转录因子在调控植物感受昼夜节律变化及开花过程中发挥着重要作用,已有研究表明香蕉MaCOL1参与调控植物响应生物及非生物胁迫反应,但CO、COL类蛋白是否参与调控稻瘟病抗性的有关研究未见报道。

[0004] 鉴定抗病相关基因有助于深入揭示水稻的抗病机理及水稻与病原菌的具体互作机制,进一步的选育或者培育相关的抗病品种,可以更好的更好地控制和降低稻瘟病菌对水稻的危害,增强植物的抗病性。这些研究对水稻基因功能研究及抗病水稻育种都具有重要的应用价值。

发明内容

[0005] 为了克服现有技术的缺点与不足,本发明的目的在于提供一种稻瘟病抗性相关基

因OsCOL9的应用。该基因属于COL家族转录因子,受稻瘟病菌诱导后表达量增加。该基因过量表达可以显著提高水稻稻瘟病抗性。可以利用本发明基因构建水稻过表达载体,应用于提高水稻的稻瘟病抗性。

[0006] 本发明的目的通过下述技术方案实现:

[0007] 本发明提供一种稻瘟病抗性相关基因OsCOL9在提高水稻对稻瘟病抗性中的应用。

[0008] 本发明提供一种稻瘟病抗性相关基因OsCOL9在水稻抗稻瘟病育种中的应用。

[0009] 本发明在稻瘟病菌接种后水稻的差异转录组学分析发现了一个可被稻瘟病菌显著诱导的基因OsCOL9,该基因编码蛋白含有保守的CCT/B Box Znic Finger Transcription Factor结构域,属于CO (CONSTANS)、COL (CONSTANS-like) 家族的成员。

[0010] 本发明涉及植物基因克隆以及功能分析,提供了一个提高水稻稻瘟病抗性的新基因OsCOL9,该基因位于3号染色体上,基因座位号为LOC_0s03g50310 (MSU登录号),其全长基因组序列为2759bp (SEQ ID NO:1) 括5'非翻译区(5'UTR)、2个外显子、1个内含子和3'非翻译区(3'UTR) (图1)。其cDNA全长1266bp (SEQ ID NO:2),编码421个氨基酸。OsCOL9编码的蛋白质序列如SEQ ID NO:3所示,存在有CCT/B Box结构域。

[0011] 本发明还提供了含有本发明基因的表达载体和宿主菌以及扩增该基因的任一片段的引物。

[0012] 本发明稻瘟病抗性相关基因OsCOL9的应用,该基因受稻瘟病菌诱导后表达量增加。该基因受水稻稻瘟病菌的诱导后上调表达,过量表达能明显提高水稻稻瘟病的抗性。

[0013] 将OsCOL9与Ubi启动子构建植物过表达载体转化水稻,结果该基因过量表达可以显著提高稻瘟病抗性。可以利用本发明基因构建表达载体,应用于水稻抗稻瘟病育种中。

[0014] 本发明相对于现有技术,具有如下的优点及效果:

[0015] 本发明方法利用反转录PCR技术从水稻中克隆到了一个含CCT/B BOX结构域蛋白的基因OsCOL9,证实OsCOL9参与了水稻对稻瘟病菌的防御反应,是一种重要的参与水稻抗病性的基因。本发明有助于更好地了解OsCOL9的作用机制,OsCOL9的克隆为进一步了解水稻-稻瘟病菌互作,抗病信号传导通路奠定基础,在育种中较大的应用价值。

附图说明

[0016] 图1是OsCOL9全长基因组结构示意图;其中,黑色区域为外显子,空白长方格区域为5'非翻译区与3'非翻译区。

[0017] 图2是OsCOL9与其它COL家族蛋白氨基酸序列相似性比较;其中,黑色背景区域为保守的结构域BBOX与CCT。

[0018] 图3是OsCOL9在抗病材料中的表达受到稻瘟病菌的诱导的结果图。

[0019] 图4是pOX-OsCOL9过量表达载体的构建;其中,泳道M为1kb DNA Marker,泳道1~4为过量表达载体pOX-OsCOL9酶切(KpnI/BamHI) 鉴定结果。

[0020] 图5是接种稻瘟病菌8d后pOX-OsCOL9转化植株的病情调查;其中,中二软占为未转化植株;pOX-OsCOL9为OsCOL9过表达转化株。

具体实施方式

[0021] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限

于此。

[0022] 本发明所使用的各种原料及各项设备均为常规市售产品,均能够通过市场购买直接获得,所用引物序列均由上海英俊生物技术有限公司合成。

[0023] 所述的中二软占在文献“优质高产水稻新品种中二软占[J].广东农业科学,2001,(06):49.”中公开。

[0024] 所述的水稻高抗稻瘟病株系H4在文献“水稻抗稻瘟病蛋白Pik₂-H4基因的克隆及互作蛋白的筛选[J].广东农业科学,2014,(04):156-160.”中公开。

[0025] 所述的稻瘟病菌(Magnaporthe oryzae)GD0193在文献“3个空间诱变水稻品系的稻瘟病抗性评价及抗性遗传分析[J].华南农业大学学报,2012,33(03):273-276.”中公开。

[0026] 所述的过量表达载体pOX在文献“水稻SDG711和SDG723的克隆与功能分析[D].华南农业大学,2012”中公开。

[0027] 实施例1 水稻OsCOL9基因的克隆以及序列分析

[0028] 1) 水稻总RNA的提取

[0029] 取中二软占(Zhongerruanzhan)(在文献“优质高产水稻新品种中二软占[J].中国农业科学,2001,(06):49.”中公开)及其水稻高抗稻瘟病株系H4(近等基因系H4)(在文献“水稻抗稻瘟病蛋白Pik₂-H4基因的克隆及互作蛋白的筛选[J].广东农业科学,2014,(04):156-160.”中公开)四叶期水稻幼苗,在陶瓷研钵中用液氮冷冻并研磨成粉状,转入1.5mL离心管,并按照每100mg材料加入1mL提取试剂的比例加入Trizol试剂(Invitrogen公司),混合均匀;按照每100mg材料加入200μL氯仿的比例加入氯仿,混合均匀10000g,4℃离心15min,弃去中间层及下层有机相,收集上层水相转到新的离心管内;加入600μL异丙醇,混合均匀,室温静置20min,10000g,4℃离心15min,收集沉淀,待异丙醇挥发后溶于无RNA酶的超纯水中,-80℃冻存备用。

[0030] 2) OsCOL9基因的克隆

[0031] A. 第一链cDNA的合成

[0032] 取出-80℃保存的水稻叶片总RNA,加入2μL的Oligo(dT)₁₆(10mM),混匀后置于70℃中水浴5min;水浴5min后,在冰上向EP管中先后加入dNTP Mixture(10mM)2μL、5×RT Buffer 4μL、RNase抑制剂1μL(10U/μL)、RNase-free ddH₂O 8μL、ReverTraAce 1μL;将EP管置于PCR仪中,按30℃10min,42℃60min,99℃5min,40℃5min反应后,得到第一链的单链cDNA,于-20℃冰箱保存。

[0033] B. cDNA的PCR

[0034] 设计如下两条引物:OsCOL9-F:5'-GGTACCATGGCGAGCGCCGCCGGCG-3'(SEQ ID NO:4)(下划线标记部分为NEB公司限制性内切酶Kpn I酶切位点序列)、OsCOL9-R:5'-GGATCCTCAAAAACGGTAGCGCCCGTG-3'(SEQ ID NO:5)(下划线标记部分为NEB公司限制性内切酶序列BamHI酶切位点序列)。PCR反应体系为:cDNA模板2μL、上下游引物(10μM)各1.5μL、dNTP(2mM)5μL、10×KOD PCR buffer 5μL、MgSO₄(25mM)2μL、KOD Plus 1μL,补ddH₂O至50μL。扩增条件为:94℃变性3min、55℃30s、68℃2min 32个循环、72℃延伸10min,得到全长的OsCOL9cDNA,然后将其送往上海英俊公司进行测序分析。利用NCBI Blast Protein功能检测出OsCOL9氨基酸序列中含有两个保守的蛋白结构域,位于N端的BBOX(18~62aa)以及C端CCT(338~380aa)结构域(图2)。利用cNLS Mapper对OsCOL9的核定位信号进行预测,结

果显示在372~405aa处具有核定位保守的氨基酸序列,而该区段同样是CCT结构域的组成部分,这表明含有该结构域的转录因子具有核定位功能。NCBI上查找含有相同结构域的基因主要为拟南芥调控开花以及昼夜节律的CO、COL、TOC1家族,水稻中的同源基因为Hd1、OsCOL4,以及部分在其他植物中有报道的ZmCOL8、MaCOL1、PaCOL1等。利用DNA MAN软件对OsCOL9与检索到的基因蛋白进行氨基酸序列同源比对,OsCOL9与单子叶植物玉米的ZmCOL8同源性达到76%,但是与自身的Hd1、OsCOL4以及双子叶植物拟南芥的同源性较低(图2)。

[0035] 实施例2 稻瘟病菌接种后不同水稻的OsCOL9表达趋势分析

[0036] 利用定量RT-PCR技术对OsCOL9基因接种稻瘟病菌后的表达模式进行了分析。在抗病品种H4接种稻瘟病菌(Magnaporthe oryzae)GD0193(在文献“3个空间诱变水稻品系的稻瘟病抗性评价及抗性遗传分析[J].华南农业大学学报,2012,33(03):273-276.”中公开)后不同的时间点(0h、6h、12h、24h、36h、48h、72h)采集叶片并提取其总RNA,利用反转录试剂盒ReverTraAce进行反转录cDNA第一条链的合成。然后按照SYBR Premix ExTaq试剂盒说明进行利用AB StepOne Plus荧光定量PCR检测仪分析OsCOL9的表达量,Actin作为内参基因。

[0037] 所用引物为:

[0038] OsCOL9-RT-F:5'-CGATCCAGCGAGTCATG-3'(SEQ ID NO:6);

[0039] OsCOL9-RT-R:5'-GATCTTCTTGGCGAACAG-3'(SEQ ID NO:7);

[0040] Actin-RT-F:5'-GATCACTGCCTTGGCTCCTA-3'(SEQ ID NO:8);

[0041] Actin-RT-R:5'-GTACTCAGCCTTGGCAATCC-3'(SEQ ID NO:9);

[0042] 结果如图3所示,表明在抗病品种H4中OsCOL9的表达量在接种后6h开始增加,在24h后达到峰值,随后表达量呈现缓慢降低的趋势。而在感病品种中二软占中,OsCOL9的表达量并没有呈现出明显的变化趋势。这表明OsCOL9可能作用于抗病基因Pik-H4的下游,受NBS-LRR类抗病基因的调控。

[0043] 实施例3 水稻OsCOL9过量表达载体的构建及转基因苗的获得

[0044] 将利用OsCOL9-F与OsCOL9-R扩增的OsCOL9cDNA片段利用用KpnI(NEB)和BamHI(NEB)双酶切,连接到过量表达载体pOX(在文献“水稻SDG711和SDG723的克隆与功能分析[D].华南农业大学,2012”中公开)上相应位点中,连接产物转化大肠杆菌(E.coli)DH5 α 感受态细胞,同时将过量表达载体pOX酶切回收后的产物也转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞(作为对照);挑选阳性克隆提取质粒DNA,进行酶切鉴定(图4,1、3、4为正确的阳性pOX-OsCOL9质粒),最后得到在水稻Ubi启动子驱动下的OsCOL9过量表达载体pOX-OsCOL9。利用电激法将pOX-OsCOL9转化农杆菌(Agrobacterium),并参照Hiei等(1994)的方法利用农杆菌介导侵染水稻中二软占的愈伤组织,经共抗性愈伤的预分化、分化及幼苗的生根壮苗后得到过表达转基因苗。

[0045] 实施例4 过表达OsCOL9的稻瘟病抗性检测

[0046] 对经潮霉素鉴定为阳性的OsCOL9的过表达转基因水稻(中二软占)进行稻瘟病菌喷雾接种,8d后统计结果。结果表明(图5),未转基因原种中二软占单位叶片上病斑形成数目显著增多,而OsCOL9过表达转基因植株几乎没有病斑出现,表现出较高的抗病性。

[0047] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 华南农业大学

<120> 稻瘟病抗性相关基因 OsCOL9 的应用

<130> 1

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2759

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> OsCOL9 的全长基因组序列

<400> 1

```

aactactgt tccattttt ttttgtaac cgcgaaaagt gttgtgttgt ttgggtaggc      60
agggtgttcg acggaatggc gagcgccgcc gcggcgacgg gcgcggcgct gggggcgcgc      120
acggcgcggg cgtgcgacgg gtgcatgcgg cggcgggcgc ggtggcactg ccccgcgac      180
gacgcgttcc tgtgccaggc gtgcgacgcg tccgtgact cggcgaacce gctggcgcg      240
cggcaccacc gcgtgcgctt cccgtcgggc tctcctcgc cggcatcctc ccctcgctcg      300
gcgcccgctc cacgtgccgg atcagacgac cccgacgcgc cggcgtggct gcatgggctc      360
aagcggcggc cgcgcacgcc ccggaccaag cccgggggag gcggcaagca cgacgcctcc      420
gccgcgacgg tggcccgggc ggcggcgtcg gcggtcccgg acctcgaggc ggaggagtcc      480
gggatcgtgg gcgacaccga ccacgacgtc ggggaagagg acgacgagga cctgctgtac      540
cgcgtccccg tgttcgacce catgctcgcc gagctctaca acccgtggc ggccgacgac      600
gaggagcagc agatcgagca gaagcctgct gcacgcgtcg tgccgttctc ggagccgtcg      660
ccggagttcg cctccgctc ggtggaggcg gacggcctct ccggttcga cgtgccggac      720
atggagctcg ccagcttcgc ggcggacatg gagagcctcc tcatgggagt cgacgagggg      780
ttcgacgate tgggcttctt ggacgacgag aagcctcacg tgaactgga cctggacatg      840
gacatggact tcgctccat ctcgccggcg ccggcgccgg agcgggagga gaggaagagg      900
aagcggcccg agatgatact caagctcgac tacgagggcg tcatcgactc gtgggcccgc      960

```

[0002]

gacggagcct cgccgtggtt ccacggcgag cgcctcgcct tcgatcccag cgagtcattgg	1020
ccggacttcc cggtaagctc tcacgcagag atctgtagct ttctgcccga attggatttt	1080
catctctcga tggacatctc catcttagct cttttattcc gtattaccta ctcccctccgg	1140
ctaaaaaata taagcatttt taaaatagtg ttaagtcaac atttttaaaa ttttaactatt	1200
tatagtaaaa aaataataat aaaaaaagat taatcctgta aatttgatgt tactggatgt	1260
attattgaac aaactgtcat aatatgtaac tctttttatt tataatatct tagctttgta	1320
gatattgttg gtcgaagtag tatctcgacg accgtgtcga agtataaaaa tacttatatt	1380
ttaaaatgga tggagtaaat agttattatt tttttaagaa aatgataac atagattaat	1440
atgaaatgta tcacctccgc aagcatacaa ggcttaactt ttacaattgc aacgaaagga	1500
accaatcaaa ctgaaaatag ttcgtacatc tgcaattata ttttttcatg tttgttaaaa	1560
tttatagaag ctgaatttaa aactgtatgt ttataaagtg aaatatttaa attaatctat	1620
tttatttata tttttataa ctatttatta gatgatgaaa gcactttcct ctttctgcca	1680
ttttcttcac gacctagctt gtgtactgtt ctgagctatc ctatgctgct gtgcaggcgg	1740
gaagccgggg agggtcggc gcggcggtga cggcggtgac cggcggcgag agggaggcgc	1800
gggtgtcgcg gtacaggag aagcggcgga cgcgctgtt cgccaagaag atccggtacg	1860
aggtgcgcaa gctcaacgcc gagaagcggc cgcggatgaa gggccggttc gtcaagcgcg	1920
ccgccgcgct gccgccgctc ccgctgcccc ggcaccagca tccgccgccg ccgccgccgc	1980
gcgctctgcc gccggtgccg atgatgctcg cgcgcgcgg cgcgcacggg cgctaccggt	2040
tttgagagct accgctctcg atcggttcc gatgcgcatg cgcgcgctcg ctagctacat	2100
gcatgcatgc atgctagcga tagccgtttg cgtgatccaa caataagtac aaaaatacta	2160
ctatatatat atacaaacat acaaactcgt cgaatcatcg atcgtagcat gttggtttca	2220
ggtttaattg tttggggta gtgttagttt tgagcagaat taatctttgt gaattagggc	2280
gccctaccac tctactatac gtaccaaatg taccatgcat gtgtgcaactg aagcagccgg	2340
caggttgtgt acttgtcac aatttcatgt gcaaattaag taggtaagtt atgtgtgtgg	2400
tagctaggct aggatgtgta ctttcttggt tttctgtaag aaagatcctg ctaattataa	2460
aggttgtttg agattttgat cccgatcaa tgatgtaaa ggcctatatg tatatactgg	2520
tatatatata cagtgtttaa gatcaaagta gagaaattac aatgggagct tgtatagtta	2580
taagcatgta agtatgtaac tagaggatgt tgaagcggaa atggctagtg ttcttctatt	2640
tgtatgcatg cttccaatg ctttgttagt ttgttgggtg atctcaagag cactaactgt	2700
tgtaatcacg tgttaaataat ttttgataa aaaaactata gacatgttta tagtgata	2759

<210> 2

[0003]

<211> 1266

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> OsCOL9 的 cDNA 全长序列

<400> 2

```

atggcgagcg cgcgcccggc gacggggcgc gcgctggggg cgcgcacggc gcgggcgtgc      60
gacgggtgca tgcggcggcg ggcgcggtgg cactgccccg cggacgacgc gttcctgtgc      120
caggcgtgcg acgctccgt gcaactcggcg aaccgctgg cgcggcggca ccaccgctg      180
cgctcccgt cggcgtcctc ctgcccggca tctcccctc gctcggcggc cgtcccacgt      240
gccgatcag acgaccccga cgcgcccggc tggctgcatg ggctcaagcg gcggccgcgc      300
acgccccgga ccaagcccgg gggaggcggc aagcacgacg cctccgccc gacggtggcc      360
gcggcggcgg cgtcggcggc cccggacctc gaggcggagg agtccgggat cgtgggcgac      420
accgaccacg acgtcgggga agaggacgac gaggacctgc tgtaccgctg ccccggttc      480
gaccccatgc tcgccgagct ctacaacccc gtggcggccg acgacgagga gcagcagatc      540
gagcagaagc ctgctgcacg cgtcgtgccc ttctcggagc cgtcggcggg gttcgcctcc      600
ggctcgggtg aggcggacgg cctctccggc ttcgacgtgc cggacatgga gctcggcagg      660
ttcggcggcg acatggagag cctcctcatg ggagtcgacg aggggttcga cgatctgggc      720
ttcttgacg acgagaagcc tcacgtgaaa ctggacctgg acatggacat ggacttcgcc      780
tccatctcgc cggcggccgg gccggagcgg gaggagagga agaggaagcg gccggagatg      840
atactcaagc tcgactacga gggcgtcadc gactcgtggg cccgcgacgg agcctcggcc      900
tggttccacg gcgagcggc tcgcttcgat cccagcgagt catggccgga cttccggcg      960
ggaagccggg gagggctcgg cgcggcggtg acggcggtga ccggcggcga gagggaggcg      1020
cgggtgtcgc ggtacaggga gaagcggcgg acgcggctgt tcgccaagaa gatccggtac      1080
gaggtgcgca agctcaacgc cgagaagcgg ccgcggatga agggccggtt cgtcaagcgc      1140
gccgcccgcg tcggcccgt cccgctgccc aggcaccagc atccgcccgc gccgcccgcg      1200
cgcgctctgc cgcgggtgcc gatgatgctc gcgcccgcgc gcgcgcacgg gcgctaccgt      1260
ttttga                                           1266

```

<210> 3

<211> 421

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> OsCOL9 编码的蛋白质序列

<400> 3

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

[0004]

Met	Glu	Ser	Leu	Leu	Met	Gly	Val	Asp	Glu	Gly	Phe	Asp	Asp	Leu	Gly	
225					230					235					240	
Phe	Leu	Asp	Asp	Glu	Lys	Pro	His	Val	Lys	Leu	Asp	Leu	Asp	Met	Asp	
				245						250					255	
Met	Asp	Phe	Ala	Ser	Ile	Ser	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Glu	Arg	Glu	Glu	
			260							265					270	
Arg	Lys	Arg	Lys	Arg	Pro	Glu	Met	Ile	Leu	Lys	Leu	Asp	Tyr	Glu	Gly	
			275							280					285	
Val	Ile	Asp	Ser	Trp	Ala	Arg	Asp	Gly	Ala	Ser	Pro	Trp	Phe	His	Gly	
			290												300	
Glu	Arg	Pro	Arg	Phe	Asp	Pro	Ser	Glu	Ser	Trp	Pro	Asp	Phe	Pro	Ala	
305					310										320	
Gly	Ser	Arg	Gly	Gly	Leu	Gly	Ala	Ala	Val	Thr	Ala	Val	Thr	Gly	Gly	
					325										335	
Glu	Arg	Glu	Ala	Arg	Val	Ser	Arg	Tyr	Arg	Glu	Lys	Arg	Arg	Thr	Arg	
					340										350	
[0005]	Leu	Phe	Ala	Lys	Lys	Ile	Arg	Tyr	Glu	Val	Arg	Lys	Leu	Asn	Ala	Glu
					355											365
Lys	Arg	Pro	Arg	Met	Lys	Gly	Arg	Phe	Val	Lys	Arg	Ala	Ala	Ala	Leu	
					370										380	
Pro	Pro	Leu	Pro	Leu	Pro	Arg	His	Gln	His	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	
385															400	
Arg	Ala	Leu	Pro	Pro	Val	Pro	Met	Met	Leu	Ala	Pro	Arg	Gly	Ala	His	
					405										415	
Gly	Arg	Tyr	Arg	Phe												
					420											

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

[0006]

<223> OsCOL9-F

<400> 4

ggtacatgg cgagcgccgc cgcggcg

27

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> OsCOL9-R

<400> 5

ggatcctcaa aaacggtagc gcccggtg

27

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> OsCOL9-RT-F

<400> 6

cgatcccagc gagtcatg

18

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> OsCOL9-RT-R

<400> 7

gatcttcttg gcgaacag

18

<210> 8

[0007]

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Actin-RT-F

<400> 8

gatcactgcc ttggctccta

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Actin-RT-R

<400> 9

gtactcagcc ttggcaatcc

20

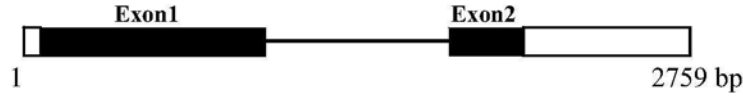


图1

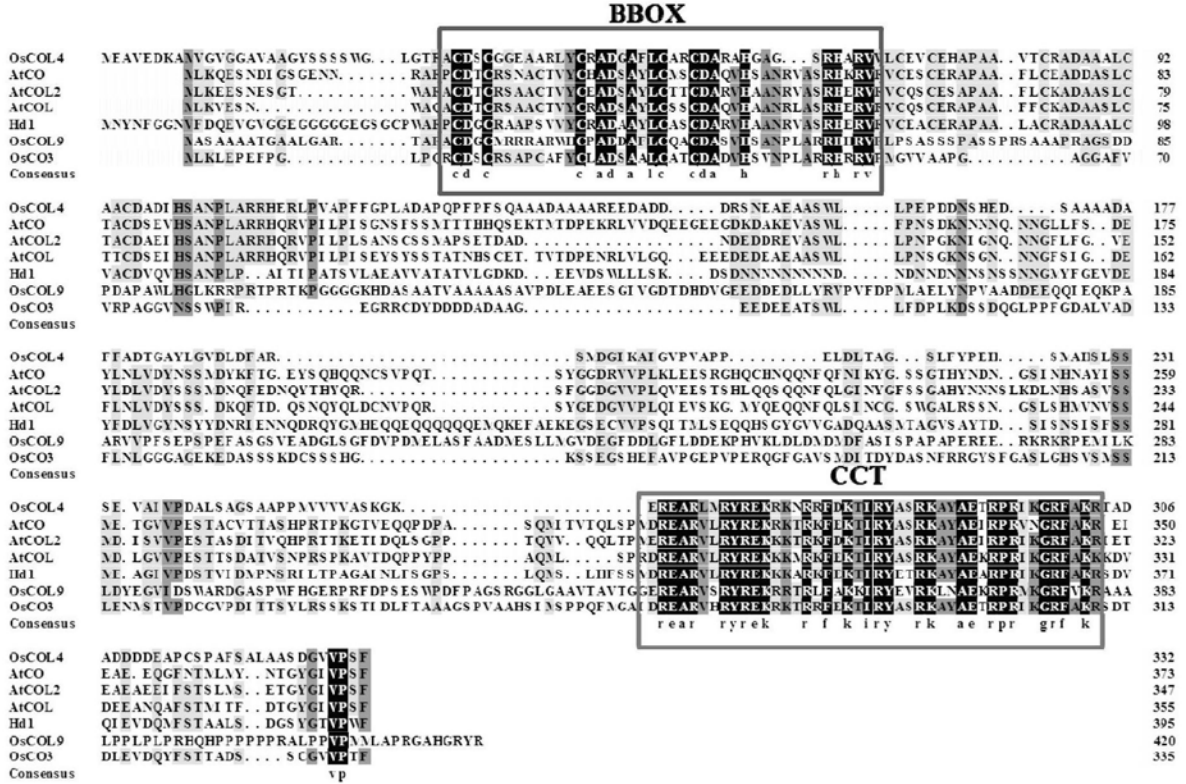


图2

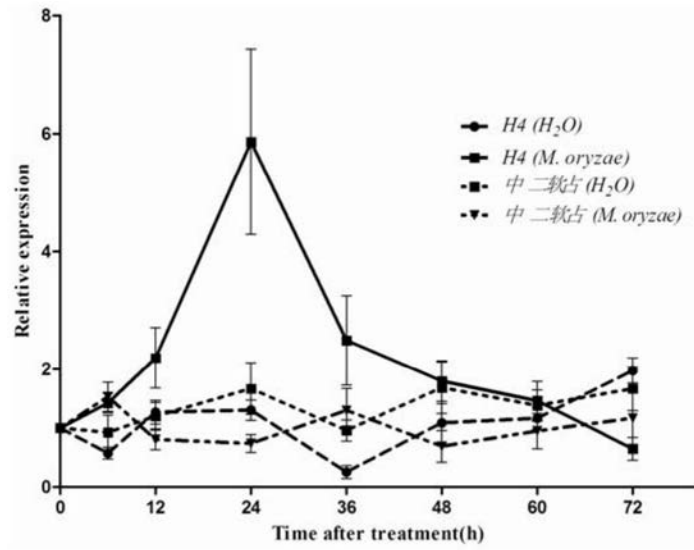


图3

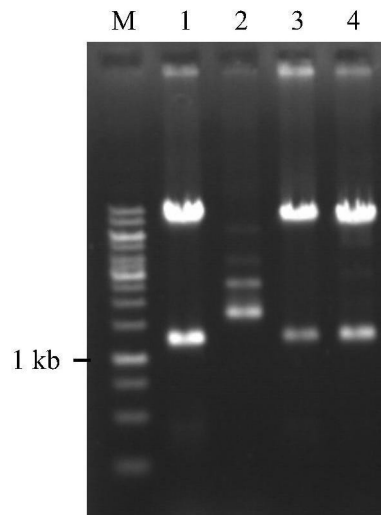


图4

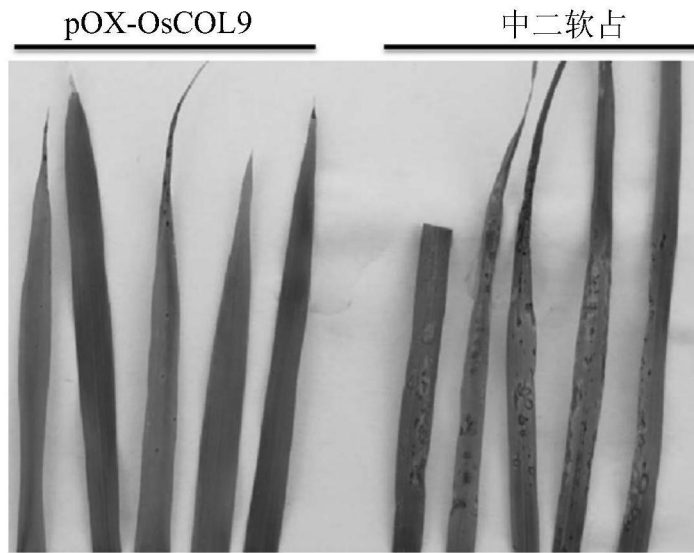


图5