

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 01822084.3

[51] Int. Cl.

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/66 (2006.01)

C12N 15/05 (2006.01)

A01H 1/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 6 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 1260362C

[22] 申请日 2001.1.17 [21] 申请号 01822084.3

[86] 国际申请 PCT/SG2001/000022 2001.1.17

[87] 国际公布 WO2002/057470 英 2002.7.25

[85] 进入国家阶段日期 2003.7.17

[71] 专利权人 分子农业生物学院

地址 新加坡新加坡

[72] 发明人 刘建伟 李学宝 蔡 林 程宁辉

审查员 唐 莉

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 1 页 说明书 24 页 附图 5 页

[54] 发明名称

棉花中一种花药特异性启动子 (COFS) 的分离
和鉴定

[57] 摘要

本发明涉及一种花药特异性棉花基因 (CoFS) 及其活性启动子片段。这些启动子示出强花药特异活性。

-
1. 一种分离的核酸分子，其编码一种包含棉花 CoFS 基因的启动子的花药特异性启动子，所述核酸分子包含 SEQ ID NO: 2。

棉花中一种花药特异性启动子（COFS）的分离和鉴定

发明背景

1. 技术领域：

本发明涉及植物分子生物学领域。特别地，本发明涉及棉花启动子及其在产生转基因植物中的应用，特别涉及棉花花药特异性启动子。

2. 发明背景

棉花是纺织工业中应用最广泛的天然纤维。世界范围的棉花年产量超过 100 百万包，价值 450 亿美元。在过去的十年里尽管依靠传统培育在棉花品质和产量上已经明显改良，但由于品种相容性和可用性状的需求，通过传统培育进一步改良棉花性质受到限制。遗传工程提供了进一步改良棉花的新方法，通过导入基因产生具有高所需性状例如虫害抗性的新生殖质。

花药是开花植物中雄性生殖器官。花药发育可以分为两个一般阶段。在第一阶段，大多数特化细胞和组织分化，小孢子母细胞减数分裂及小孢子四分体形成。在第二阶段，小孢子从四分体中释出随后花粉粒成熟，组织退化，开裂及释出花粉。在少量植物物种中已经研究了在花药和花粉发育期间特异性表达的基因。Allen 和 Lonsdale, 植物杂志 3: 261-271,1993; Bird 等, 植物分子生物学 11: 651-662,1988; Brown and Crouch, 植物细胞 2: 263-274,1990; Grierson 等, 核酸研究 14: 8595-8603, 1986; Hanson 等, 植物细胞 1: 173-179,1989; Ursin 等, 植物细胞 1 : 727-736,1989; John 和 Petersen, 植物分子生物学 26 (6): 1989-1993,1994; Atanassov 等, 植物分子生

物学 38: 1169-1178, 1998; Liu 等, 植物分子生物学 33: 291-300, 1997; Treacy 等, 植物分子生物学 34: 603-611, 1997; Agnes 等, 植物分子生物学 40: 857-872, 1999。在烟草花药中表达的 20,000—25,000 个基因中, 只有 10,000 个基因是花药特异性的。Karnalay 和 Goldberg, 美国科学院院报 81: 2801-2805, 1984; Koltunow 等, 植物细胞 2: 1201-1224, 1990。

启动子是一种 DNA 片段, 其决定在植物和动物发育期间基因表达的时间及空间特异性。在过去的十年中, 从众多植物和动物中已经鉴别和分离了许多组织特异性基因及其启动子, 包括棉花组织特异性基因和启动子。Loguerico 等, 分子普通遗传学 261 (4/5): 660-671, 1999; Kawai 等, 植物细胞生理学 39 (12): 1380-1383, 1998; Song 和 Allen, 生物化学生物生理学 Acta 1351 (1): 305-312, 1997; Ma 等, 生物化学生物生理学 Acta 1344 (2): 111-114, 1997; John, 植物分子生物学, 30 (2): 297-306, 1996; Rinehart 等, 植物生理学 112 (3): 1331-1341, 1996; Hasenfratz 等, 植物生理学 108 (4): 1395-1404, 1995; John 和 Peterson, Plant Affiol. Biol. 26 (6): 1989-1993, 1994; John 和 Crow, 美国科学院院报 89 (13): 5769-5773, 1992。这些植物组织特异性启动子可以用于在转基因植物中以组织特异性方式控制外源基因表达, 其在大多数转基因作物第二代中是显性的。一些植物组织在所有所希望的组织或特定需要的组织中不表达高水平转基因。例如在转基因 Bt 棉花中, Bt 基因表达水平在花中包括在花药中非常低, 导致在这些组织中虫害抗性较低。为实现更好地控制棉花虫害, 鉴别在这些组织中可以产生较高水平的基因表达的花药特异性启动子是特别有益的。

发明概述

因此, 本发明提供了一种棉花花药特异性启动子, 其包含棉花

CoFS 基因的启动子。本发明还提供了一种棉花花药特异性启动子，其包含 SEQ ID NO: 2。在另一个实施方案中，本发明提供了一种转基因植物，其在棉花 CoFS 基因的棉花花药特异性启动子的控制下表达转基因。

附图简述

图 1 示出 CoFS cDNA 示差展示分析结果。

图 2 提供了示出 CoFS 基因表达的 Northern 印迹。

图 3 示出 CoFS 启动子载体构建体和棉花 CoFS 基因的示意图。

图 4 提供了在转基因烟草植物中在 CoFS 基因启动子控制下的 GUS 基因的表达分析结果。

图 5 示出在转基因烟草植物中在 CoFS 启动子控制下的 GUS 基因的表达分析结果。

优选实施方案详述

花药特异性基因(CoFS)及其相应启动子通过示差展示分析分离自棉花。所述分离的启动子的活性及组织特异性使用 CoFS 启动子控制 GUS 报告基因的表达在转基因烟草植物中证实。

得自多种棉花组织 cDNA 的 Northern 印迹分析示出包含 CoFS 基因的 cDNA 克隆在花药中高水平表达，而且在花瓣组织中也表达，但在其它组织中很少表达或不表达。见图 1 所示。

花药特异性基因(称为 CoFS)分离自棉花。所述分离的完整 CoFS cDNA 长度为 8.4 kb，见表 1。基于 CoFS cDNA 序列，分离到一个 CoFS 启动子片段(2.6 kb)。见表 2。将所述棉花 CoFS 基因的核苷酸序列和推定的多肽序列与公布的序列对比表明：所述基因与得自一些植物如 *Brassica napus* (X94624) 和 *Arabidopsis* (AL078468, AL161560)的酰基辅酶 A 合成酶(很可能是长链酸性 cCoA 连接酶，

EC 6.2.1.3)基因在氨基酸水平具有大约 54-58%相同性。在核苷酸水平发现同源性较低,表明 CoFS 是在棉花中发现的新基因。基于已知的酰基辅酶 A 合成酶的氨基酸序列,对 CoFS 序列分析表明在其开放读框中可能含有 9—10 个外显子和 8—9 个内含子。

将 CoFS 启动子片段与 GUS 基因融合构建基因表达载体,以分析所述启动子的功能。具有 CoFS 启动子/GUS 融合基因的转基因烟草植物通过 Southern 印迹杂交鉴别。在所研究的转基因植物中,在花药中检测到 GUS 活性,在子房,花柱和柱头中较弱,但在花瓣或其它组织中未检测到活性。这个结果结合 Northern 印迹分析结果表明 CoFS 启动子在棉花中是花药特异性的。所述启动子在棉花花药中在转录水平控制特异基因表达。所述分离的启动子可以用于改善所需基因在花药和植物性器官的相关组织中表达,以产生新的植物品种,从而通过基因操纵提高植物的品质和产量。

本发明的启动子可用于产生在花药组织中具有改良的转基因表达的转基因植物,尤其包括棉花。保护性基因如 Bt 基因在花药组织中的较好表达使植物对 Bt 敏感性有害物的抗性提高。可以在这个启动子控制下表达的基因包括适于此目的任何基因。

表 1: 棉花 CoFS 基因的序列(SEQ ID NO : 1).

```
CCTCACATTTAAGCGGAAAAAATATTA ACTAATTACTAATTACTAAGGT
CATGGGTTGCGCATTAAAGTTCACTGACGATTGTGCAAATGATGTTCCAT
AGAGCTTAATTGATGAAATGGGA ACTCATGACCCGCTTGAAGTAACTCG
ACTTGTAGAACTCATGAAGAAGCTTATCTACTTGAAGTTTTGGTAGCCCA
ATGAAATACTCTCGTAAATCTAGAGTTATTAGTGTA AACCTAAAGGGA
TCAAATTGTATAAATTTAAATCCCTTATGACTTTCAATTGTAGATAGACT
CTAATCTCGATCATGGATGTA ACTCAATCTATTTGTTGGGTTTGGGGTGA
TTACTTCAATTCATTCCATTCATAGTTGTGAATATATTTGAGAGTATTTAC
```

GCAAACATTTGGTGTGTGCTATTTTTCCTTTGGTCTTTTGTCTTCGTTGC
CCATTCGTTTCGAGTTTGCTTTCGCTATATTTTAATGCCTTAGAAAATTTTT
GCGAGAATTCTCATTTTTGTGAGAGTTAAGCGAACTTAGAATTATTTTTTT
TAAAATCGCTTAAGGCTGTATGGTCTGTGAGACTAAAATTCTAGTCTCGT
AACACTAATACAATCACAAGTAATTTACATTGTTCAAGTTCTTATTCACA
TAAGCGGTTGGATAAAGAAAATTAAAAAAAAACAATCGGATATAATTAC
AAAAAATAAATTGAAATGTGCAATAATACAAATAATAATTATTGCTAA
AGGTAAATAAAAAATGTAAATAATTATCAATGAAGTTTGAAACCTTAA
TGGTGAAGTTTGTGTCAACTAATAGAAGAAAAAATAAATTATTTATATA
ACTCTACTAATGTATTATTTTATTTTGTAATAATTGATTTATTTATATTATT
TCTACTAAATTGATGTGGAATTAGTGATATCTACTTAATTAAGTATATAT
AATTATAATGAATCTCCGGGACTGTGACTGGTCAAAGATCATAAAGTGG
TATCCAATAAATTTAAAATGCACTTGTAATAATTAGACTCATGATGGCA
CTGAGGCGGAGGTGAAGAGGCGGCAAAGCACATGGAGAAGCTATATAG
AAAATTCTTTCACGAAAAAGGCAACTCTTGGCTTGTGTGTTGGGAATTGT
GTTAAGAACTGGATTATATAAAAAACAATTATATGGGGAAAGGAAATGGT
CCACTGTCAATAGTTTACTATAAGCAAGTTGGAGATATAAAATTAAATAT
ATATTCAGTACATATACGAGTTTGAGCAACAAAATTAGAGATCTTTTTTG
TCAAGTTGATATCTTCAATTTTATAACGTAAATGTTCTTTTGAAGGCAAC
AGTAATGATATATATATATGTAGAAGAAATTTAACTAAAAATAGATAAT
TAGGCTTAATTTAATTAATTCAAGTGCAATTGTTTTATCATAATATATATT
ACATTACAAGGCTTGAATTATTCATATTTTAAATTTATTTATTAGTTAACA
AAGTAATTATTGGTGCAAAAATAAATAAATTATTACCCCATTTATCTATTT
TCTTAAATAAAAAAATATATTATATATGCCATTTACTCTCTTTAAAAAAA
TTTAATTTACAAATAAACTAATAAATTTGTATATGATGATTTCGAATGAG
GGTTTTAATACAGTTATCATGATGATTTCAATACAATGGTTCCAAATGAA
TAAGGATTCCACTACAACATTAACTCACCATAATGGTGATTCCAATTGA

GTGTTCTACATAATTATCATCATAATTCTTACTTGGCAGGATACAAAA
ATAATAATGGGTAAGGTAATTAAAAATTAAAATAATTATCAATAAAGTT
TTTATTATGGTGACAAAGTTTGATAATCATTATTAAATTATTAATTGAGT
AAAATATTTAAATATAGTAATGTATATATAATGAATCTCCGGCGATGTTG
GCTGTTCAAAGATCATAAAATCCAATACATTTAAAATGCAGCTGTAAAA
TATGATGTAAAGGGCGGATAAAGCACATGGAGAAGCCATATAGAAATTT
CTTCCATGAAAAAGGCGACTCTTAGCTTGTGTGTTGGGAATTGTGTAAAG
TTATATGGGAAAGGAAATATTCCACTGTCAATAGTTTATTATAAGCAAGT
GGGAGAAACAAAATTAAATATGTTATTTTGAAGGCAACAGTAATAATAT
AATTATAAATTAAAATAACATAATTTAGGCTTAATTTAATTAATGGTAAA
CTATAAAAAAAGTCATTTTTGTTTGCTTCAGATTACATTTTAGTCACTTA
TGTTTGAAATGTTACGTTTTAGTCACTTACATTACCGTTTTGTTACGAAGT
GGTCACTTTACCATTAAACTCTATTACCTCCCTAACGACAGTCCTACGTG
GCAGTCAAATGAATTTTAAATGCTAACTTGGACGTCCAGTTGCTGGGA
CATTTTCCGGTTCACCTACAGCCACCTAATACTTAGGCGCTATATATTTTC
CCAAAATTATTCTCCACATTTCACTCCCAGAGCCCTCCATCTATGTAGAG
AGCTGTAAGAGAGAATATAAAAAAGGGAAAGCTAGCTGAGGATCGTTT
GATTTTGGACATTTTGATGAAACGGCCTGGAAATAATTTTGTAAAGAGG
TAGAGAAAGGTAAAGACCCCAGCGATGGACAGCCGTCGATCGGTCCTGT
TTATCGCAGTTCTTTTGCTGCTAATGGATTCCCTGCTCCGATTCCTGGAAT
GGAGAGTTGCTGGGACATTTTCCGGTTCGTTTTTAGCTTTCTCTTTTTTAC
TTTACGCTTCTTGCTTGGCTGCTAAGAAAATAAGGATACTAGGAGAAGA
TTTGACTTCTTCTATTCTTTGCTTTGATTTTCAGATGGCTTTCGCAATAGTT
GCCATTTTTTTTGAATTTTTACTTCCCCTTTTTTAAGTTGAGTAGATTTTTC
TTCTAATTTGTTGGCTTTGTTATTTTTTTATTTTCGCGACGAGGTGGCGATG
AAATCGAGAAACGTACTTTTAAGGATCCTATGAGAAAGTTATATGCAAG
ATCGAAACGCCTAATATTTGAAACTATTGAATTTTAACGCTCACACAGAG

CAAGAATCGAGTTACTGGTATTTCCATTCTTATAGCTGAAAGATTGATGG
CTTTCATTCAACTCAATGTAAACTGTGAAATAAATTGTTTAATAGTAGT
AATTATTTTGGTTTTGATGCTTATGTGATGTGGAGATTAAAATATTGCCT
CCTTATAACTTAGCTGAACCGTAGATATGGGCTGATTGAACTTGCTAACT
AACTGTATGACAGCTCCTATTTACGAAAAAGTAATATTTTATTTGAGGAT
GATGATTTTCGATTTTCATTTTCTCCTTGCAGTATGTCAGTTGAGAAATATCC
TGACAACCATATGCTTGGTCGCCGACAGATTGTGGATGGGAAAGTATGT
TGCTGCTGCAGTTTCCTTTTTTCTTGTTACTTTTGC GTTCTGTTTGTAGTGC
GGCCTTTGACTTTTAGTTCATGTATCTAAATTGACATGCTTTGATTGCAG
GCTGGAAAATACGTGTGGCAAACCTACAGAGAAGTTTATGACATTGTAA
CAAAAGTTGGGAATTCCATCCGAAGTTGTGATGTTGTGGAAGTAATGCTT
TAACCTCCTTTTTTCTTTTTAATTGTAAAATTATTGTCAATTTTTTTTATAA
CAAATATCCTATTTCTGGGGATCAATATCCACCCACAATTGATGCTAATA
AAAAAAAAAATTAAGCTTTTTATTCTTGCTTACAGGGAGGAAAGTGTGG
TATTTATGGTGCCAATTGCCCAGAATGGATAATTAGCATGGAGGTATGAT
CATTCTGGCATGTTTCATCTGATTTGCACAGTGGACATCCCAAGTTACTT
AGATGTCGCTATAACTTGTTTCTTTGGATCATACTATTTGCTACCAAATTG
CTTGTTGCCCGAAATGTTTACTAATGTTGCAAGATTGATACAGGCCTGCA
ACGCTCATGGACTCTATTGTGTTCTTTTATATGACACTTTGGGTATTTCTT
CTTGAGATCCAACAAAAGCATTCTTTCAGTTTTTGCCAAACAACCTACCTT
TCTCTAACAACCATCTTATGTGTATTATGTACTCTTCATATAGTCTGTGAT
CATAATATCCTTAAACTCTTTAAATTATTCTTGCAATCCAACGCGCCTGCT
ACTCTTTTTGAATGTTTGATACGTTGCTACATATTTGTAGGTGCCGGTGCT
GTGGAGTTTATCATATGCCATGCAGAAATTTCTATTGCTTTTGTAGAGGA
AAAGAAGATTAATGAGGTATGCCTGTTTACATCTATATTTGAAACCCTAG
TAGTGATATGGCAACTACTGGGAAAGATACTTCTAGATACTTGCAAAAA
TAAGATATCTATCTACAAAATAGATTCGATGTTTTATTTTATTATCAGC

ATTGCTTCTATGCTTGCTGCTCACTTATGCATAGTTGATATTGATACAAG
AATCTGTAATTTACAAATTTTCTGTTCTTTTTCTTTGGGTTTCTCATGT
AAGGTTTTTCTTTTCCTTTCAGCTGTTCAAAACATTTCCAGCCTCAACAG
AACACTTGAAAAGTAAGCTATCTGATTATTTAGGGGGATTCTTGAAATA
GTACGTTACAAATTATTTATGTCCATGTATTTTGCTATGCAGCAATTGTT
AGCTTCGGGAAGGTAACACCTGAGCAGAAGGCAGAAGCTGAGAAGCAT
GGTTTGAAGATATATCCTTGGGAGGAATTTTGCAACTGGTAAGCTCTTT
GCTCTGTTATTTTCCACTTCAATTTATCAGAAATAAAATTTATTCTGCTGA
ACTAATTGTGTCTATTTTAGCAGACTGCCATCCTGTTAGTTACGAGTTCA
GATGAAGCCATATGGCTGTAGAAAACATGCTTCTGGCAGTGCTTAATAT
GAACTAGGCTTCATTACATTTTCATGCATGCGCCTATATCTTTTTTCCTTA
GCTAACCGTTATTGGATTGATGGATTTTAACCTGTAGATGACTTATGTTT
TGATTTAAGCTCTTATGTCTGTTTCTTGCAGGGAGAAAATAAGAATTATG
GTCTTCCGGTGAAGAAGAAAACCTGATATCTGCACGATAATGTATACTAG
TGGAACAACCTGGTGATCCAAAGGGAGTATTGATTTCAAATGATAGTATT
GTTACTCTTATAGCAGGGGTGAAACGCCTGCTGGGGAGTGTAATGAAC
AGGTGACCTTTTCATTTTATTTTGACCATTTACCAGTCACTTGGTTTGA
TCTGTCGTTTCTTTTCTTTCCTCCACCAAATTTGACATGATTGTTCCCTTGT
TTTCCCTTTCTCATTTGTTTGTTTCTTGTGAAATTTACAGTTGACTATGAA
GGATGTATATATTTCTTATCTTCCTCTTGCTCATATCTTTGACCGGGTGAT
TGAGGAATTATTTATTTTCGCATGGTGCTTCAATAGGATTTTGGCGTGGGG
TAAGCATGATTAGTTAGTACTCTGACAACAAATACGGGTTTCATTCAAATC
AGCAAGTGCTTATTTGTTTCATCTTCAGGATGTGAAACTATTGGTCTGAAG
ATATTGGAGAGCTAAAGCCAAGTATCTTCTGTGCTGTTCTCGTGTCTTA
GATAGAATTTATTCAGGTAAACTTTCTTATATTCGTGGATTAGGCAATGT
CATTTTTGGGTTGTTTGTGGAGGTTATACTAAGCAACCTGGAACATGTAC
TAGCTGGAAAACCTTGCTTAATTTACTTATTTTAGTATTTATAAATGAA

ACAAAAGTAGATTGATTCACTTTTCTGTAAATACAATGAATATATACTC
AGCTTTTTTCAGAAGATGCATGTTCTCAGCTGTGAGATTGTCATAACCTT
TGTACATTATCAGGTTTACTACAGAAGATTTCTTGCGGGCGGCTTATTGA
AAAAGAAGATGTTTGATTTAGCATACACATAGTAAGTTACTCTCATATTT
TCAGTTTCTTATGTGAAGCTGTTCATTTTATCTGCTGGCCGCCCAAAAAT
ATTGATTGGAAATAGAGTTAAATTGCTCTATTAGTTCTGCCACTGCAGAC
TCACCGGAGTAAAGGAAAATAAAAGATATTTGGGCATTCTCTAACAAGC
AACAGGGTCAAAAGCATATTTTTCTTGTAGACAAATATAGAATTTGTTA
GAGTTGTGTGACCCAAATTCTAGTTAAAAAAAAGTGGCAAGATAGGGGG
ATTTGTGGGGGCATCGGAGGCCCCACGGTACGGTACAGACTGCACAAG
TGGAATTCGTATAAAAGTACACTTCTTCTATTTGATATTGATTTGAATAA
GGTGTTTCAACCTTATTGCATTGCTTCTATTAGGTTTTGATTAGAATAAG
GTTTATAGGTCGTCGTCTCTCTGCCCCGTGGTTTTGTGTGTTATATTTTT
ACCCTCTTTCTTTACGATTCATTGTCATTATCGAGGTTTGTTTTTCACAGA
ATTGTCTCAATCCCTTTGGGTTTATGAGCTTTTGCATTAGTAGAGATCCAT
TTGCAGTCTGTGATTGCACTTTTCGTGAATATGTTTAACAGAGTTACTGA
ATCAGGATTACGGTTTCTTGGCTTTGATTTTACTAATATCTGACATCTGTG
ATAACCTACAGCAAATACTACAACATGAAGAAGGGCCGCAAACATGGA
GAAGCATCTCCAATTTGTGACAAAATTGTATTTAGTAAGGTGATGAAAG
TCTTCATTGATACATTATATGCACGAGGCTCCTTGAATATTGGCCAAAAG
CCCATTAATCACATTTACCTGCAACATAATCCTCTTGACTACTCAAATC
TCATGTTGAGTTGTAATTTTTCTCAGGTAAAGCAAGGATTGGGAGGGAAT
GTGCGGCTTATTCTATCTGGTGCAGCACCTCTTTCAGCTCATGTGGAAGA
GTTCTTGCGAGTTGTGGCATGTTGTCATGTTCTGCAAGGATATGGTATAG
TTGAAGTCAGCCTTTGTGCTTGTGATAAGTTCTTTTTTTCCCTTTACCAGC
TGTGCACACTGGCTGCAACATGAACATTTATTATTATGTTGATCCAAATG
TAGGTCTGACGGAGAGTTGTGCGGGGAGTTTTGTCTCTTTACCTAATGAA

TTGTCAATGCTTGGTACTGTGGGGCCTCCCAGTACCAAACATAGATGTAC
 GCCTGGAATCTGTTCCCGAAATGAATTATGATGCCCTTGCTAGCACACCA
 CGGGGGGAAATTTGTATCAAAGGAAATACATTATTCTCAGGATACTACA
 AACGTGAAGACCTCACCCGTGAAGTATTGATTGATGGATGGTTCCACAC
 AGGTCTTCCAACCTTTTGTCTTTTAAGGTTCTATGCATTATTAGTTTTTA
 TCTATAAGTTGAAGACCTTGAATCTTTGTGCATTAGGGGATATTGGAGAG
 TGGCAACCTAATGGAAGCATGAAGATTATTGATCGAAAGAAGAACATTT
 TTAAGCTTTCACAAGGTGAATATGTTGCTGTTGAGAACCTGGAGAACATT
 TACGGTCTCGTGTGCTAGCTATTGATTCCGTACATCTCTTATGCTCTCTTTGA
 TACATTAACATACTGCTTCTCGGATATGTAGCCATGCACTGAATGTTG
 GTCAAACGTAAAATTGATTTTGAAATGATTGGCAAATTAAACATTTTCTT
 TCTTATGTTACCTTATGATTGCATTCCTTTTTTAGCACTAGGTTTCAACCC
 ATTGCCATTGATGGTTGCTTGATTGAACAAAAATAAACATAATAATCGA
 AATATGCATGTCATGTTACAGTGTTTTTATCGTATCAGTTGTGTAAACAT
 GTGTCAAATCCTTTAACAGAAATATGACAAATGTAATAATATGTTAA
 ATCATGCTTAAGCGCATCATATGGTATCTAAATTTGTCATACATATATGT
 CATGGAAGTGATGTAAAATAAACTATAGTTTATGTCAGATTTGTAATTTA
 CTTGCTGGAGATTGGCATTCTTTTAACTTTTCAGTTTCATGTCTTTATCA
 ATTTGAGATATGGATTTACGGAAACAGCTTTGAGTCGTTCTTGTTGCGG
 TTGTTAACCCCAATAAGGAAGCACTTGAAAGCTGGGGTGCCGACAATAA
 CGTAAGTGGTGACTTCGAGTCCCTCTGTCAAACCCCAAGGCCAAAGAG
 TTCATACTTGGGGAGCTCGCAAAGACTGGCAAAGAGAAAAAGGTTAGTT
 ATTCATGCTTTTTGCCCCCTTTTTTATTTTTCAAATTTATGAAATATGGG
 TTTATCAATTCATACTGAAATATTATAATCTTTACTCAGCTAAAAGGTTTT
 GAATTCTTTGGATCC

表 2. 棉花 CoFS 启动子的序列(SEQ ID NO : 2).

GGGAAGCTTATCTACTTGAAGTTTTGGTAGCCCAATGAAATACTCTCGTA
AATCTAGAGTTATTAGTGTA AACCTAAAGGGATCAAATTGTATAAATTT
AAATCCCTTATGACTTTCAATTGTAGATAGACTCTAATCTCGATCATGGA
TGTA ACTCAATCTATTTGTTGGGTTTGGGGTGATTACTTCAATTCATTCCA
TTCATAGTTGTGAATATATTTGAGAGTATTTACGCAAACATTTGGTGTGT
GCTATTTTTCTTTGGTCTTTTGTCTTCGTTGCCCATTCGTTGAGTTTGC
TTTCGCTATATTTTAATGCCTTAGAAAATTTTGGCGAGAATTCTCATTTTG
TGAGAGTTAAGCGAACTTAGAATTATTTTTTTTAAAATCGCTTAAGGCTG
TATGGTCTGTGAGACTAAAATTCTAGTCTCGTAACACTAATACAATCACA
AGTAATTTACATTGTTCAAGTTCTTATTCACATAAGCGGTTGGATAAAGA
AAATTAAAAAAAACAATCGGATATAATTACAAAAAATAAATTGAAAT
GTGCAATAATACAAATAATAATTATTGCTAAAGGTAAATAAAAAATGTA
AATAATTATCAATGAAGTTTGAAACCTTAAATGGTGAAGTTTGTGTCAAC
TAATAGAAGAAAAAATAAATTATTTATATAACTCTACTAATGTATTATTT
TATTTTGTA AAATTGATTTATTTATATTATTTCTACTAAATTGATGTGGAA
TTAGTGATATCTACTTAATTA ACTATATATAATTATAATGAATCTCCGGG
ACTGTGACTGGTCAAAGATCATAAAGTGGTATCCAATAAATTTAAAATG
CACTTGTA AAATATTAGACTCATGATGGCACTGAGGCGGAGGTGAAGAG
GCGGCAAAGCACATGGAGAAGCTATATAGAAAATTCTTTCACGAAAAAG
GCAACTCTTGGCTTGTGTGTTGGGAATTGTGTTAAGAACTGGATTATATA
AAAACAATTATATGGGGAAAGGAAATGGTCCACTGTCAATAGTTTACTA
TAAGCAAGTTGGAGATATAAAATTAAATATATATTCAGTACATATACGA
GTTTGAGCAACAAAATTAGAGATCTTTTTTGTCAAGTTGATATCTTCAAT
TTTATAACGTAAATGTTCTTTTGAAGGCAACAGTAATGATATATATATAT
GTAGAAGAAATTTAACTAAAAATAGATAATTAGGCTTAATTTAATTAATT
CAAGTGCAATTGTTTTATCATAATATATATTACATTACAAGGCTTGAATT
ATTCATATTTTAAATTTATTTATTAGTTAACAAAGTAATTATTGGTGCAA

AAATAAATAAATTATTACCCATTATCTATTTTCTTAAATAAAAAAATAT
ATTATATATGCCATTTACTCTCTTTAAAAAATTTAATTTACAAATAAAC
TAATAAATTTGTATATGATGATTTTGAATGAGGGTTTTAATACAGTTATC
ATGATGATTTCAATACAATGGTTCCAAATGAATAAGGATTCCACTACAA
CATTAAACTCACCATAATGGTGATTCCAATTGAGTGTTCTACATAATTA
TCATCATAATTCTTACTTGGCAGGATACAAAAATAATAATGGGTAAGG
TAATTAATAAATTAAATAATTATCAATAAAGTTTTTATTATGGTGACAAA
GTTTGATAATCATTATTAAATTATTAATTGAGTAAAATATTTAAATATAG
TAATGTATATATAATGAATCTCCGGCGATGTTGGCTGTTCAAAGATCATA
AAATCCAATACATTTAAAATGCAGCTGTAAAATATGATGTGAAGGGCGG
ATACCACACATGGAGAAGCCATATAGAAATTTCTTCCGGTACCATGAAA
AAGGCGACTCTTAGCTTGTGTGTTGGGAATTGTGTTAAGTTATATGGGAA
AGGAAATATTCCACTGTCAATAGTTTATTATAAGCAAGTGGGAGAAACA
AAATTAAATATGTTATTTTGAAGGCAACAGTAATAATATAATTATAAATT
AAAATAACATAATTTAGGCTTAATTTAATTAATGGTAAACTATAAAAAA
AAGTCATTTTTGTTTGCTTCAGATTACATTTTAGTCACTTATGTTTGAAAT
GTTACGTTTTAGTCACTTACATTACCGTTTTGTTACGAAGTGGTCACTTTA
CCATTAAACTCTATTACCTCCCTAACGACAGTCCTACGTGGCAGTCAAAA
TGAATTTTAAATGCTAACTTGGACGTCCAGTTGCTGGGACATTTTCCGGT
TCACCTACAGCCACCTAATACTTAGGCGCTATATATTTTCCCAAATTAT
TCTCCACATTTCACTCCCAGAGCCCTCCATCTATGTAGAGAGCTGTAAGA
GAGAATATAAAAAAGGGAAAGCTAGCTGAGGATCGTTTGATTTTGGACA
TTTTGGGATCC

表 3. CoFS 的一 275 bp cDNA 片段的序列 (SEQ ID NO:3).

```
GGTCACTGTGACGTGCCGTGGCTACTGTGAAACGAGCCGTGGCTACTGT  
GAACGTGCCGTGGCTACTGTGAACGAGCCGTGGCTACTGTGAACGTGCC  
GTGGCTACTGTGAACGTGCCGTGGCTACTGTGAACGAGCCGTGGTCACT  
GTGATACGTGCCGGGAGTTTTGTCTCTTTACCTAATGAATTGTCAATGCT  
TGGTACTGTGGGGCCCCATACCAAACATAGATGTACGCCTGGAATCTGTT  
CCGAAAAAAAAAAAACTGAATTCCGAGT
```

以下非限制性实施例举例示出了本发明。

实施例 1: 编码在棉花花药中表达的 CoFS 序列的花药特异性 cDNA 的分离

将棉花种子表面用 70%乙醇灭菌 30—60 秒, 及用 10% H₂O₂ 灭菌 30—60 分钟, 随后用无菌水冲洗。将种子在 1/2 MS 培养基上, 在 28℃光照 16 小时而萌发。从灭菌秧苗上切下子叶和胚轴, 作为转化外植体材料。将棉花植物生长于花盆中以进行 DNA 和 RNA 提取。使用硫氰酸胍方法或 SV 总 RNA 分离系统(Promega), 从棉花的幼纤维, 子房, 花药, 花瓣, 萼片, 叶和根提取总 RNA。使用得自 mRNA 纯化试剂盒(Pharmacia Biotech)的寡(dT)-纤维素旋转柱纯化聚(A) +RNA。得自棉花不同组织的总 RNA 用于逆转录第一链 cDNA。这些 cDNA 在示差展示 PCR 中用作模板。

用示差展示试剂盒(Clontech)进行示差展示分析。用 2pg 总 RNA 作为逆转录起始物及寡(dT)作为引物, 在 42° C 反应 1 小时合成第一链 cDNA。示差展示 PCR 反应如下进行: 初始循环包括 94° C 5 分钟, 40° C 5 分钟, 及 68° C 5 分钟, 随后进行两次 94° C 2 分钟, 40° C 5 分钟及 68° C 5 分钟循环, 然后进行 25 次 94° C 1 分钟, 60° C 1 分钟及 68° C 2 分钟循环, 最后在 68° C 延伸 7 分钟。切下目的示差展示条带并再扩增以进一步分析。将 PCR 片段, DNA 和 cDNA 片段亚克隆入载体中, 并将用 Qiagen 质粒试剂盒制备的质

粒 DNA 和噬菌粒 DNA 在 PCR 中用作模板。PCR 产物通过自动测序仪测序。

棉花 cDNA 使用 cDNA 合成试剂盒(Stratagene)合成。棉花 cDNA 文库通过将所述 cDNA 片段插入 ZAP 表达载体(Stratagene)中构建。对重复性的花药及花瓣特异性示差展示产物（见图 1）进一步分析。收获每个目的条带中的 cDNA 并通过 PCR 扩增而再生。随后将分离的 cDNA 亚克隆入载体中并测序。

为确定哪种 cDNA 转录物在棉花花药中特异积聚，使用得自所述 cDNA 克隆的探针通过与分离自棉花纤维，子房，花药，花瓣，萼片，干，叶和根的总 RNA 进行 Northern 印迹杂交分析 cDNA 表达模式。为进行 Northern 印迹分析，得自不同棉花组织的 RNA 样品在琼脂糖-甲醛凝胶上分离，并通过毛细管印迹移至 Hybond-N 尼龙膜上。将 RNA Northern 印迹在 ExpressHyb 溶液(Clontech)中，在 68° C 与通过随机标记制备的 ³²P-cDNA 探针(Prime-a-Gene Labelling System, Promega)杂交。杂交后，将印迹在 68° C，在 0.1 x SSC, 0.5% SDS 中洗 30—60 分钟。

一个克隆经鉴别为 275 bp CoFS cDNA 片段（见表 3）。发现此 cDNA 片段与 *Brassica napus* 的酰基辅酶 A 合成酶基因 (X94624) 在开放读框的 33 个氨基酸区域内呈现 73% 同源性。Northern 印迹杂交证实此 CoFS cDNA 转录物在棉花花药中大量积聚，而且在花瓣中也或多或少积聚，但这些转录物在来自纤维，子房，干，叶和根的 RNA 中未检测到（见图 2）。这个结果示出 CoFS cDNA 表达在棉花中是花药特异性的。

实施例 2：CoFS 基因的分离及结构分析

如实施例 1 所述制备来自棉花的植物材料。将烟草种子表面用 70%乙醇灭菌 30—60 秒，及用 0.1% HgCl₂ 灭菌 15 分钟，随后用无

菌水冲洗。将所述种子在 1/2 MS 培养基上在 28° C 光照萌发，并将从无菌秧苗上切下的叶用作实验材料。

根据以下方法从棉花和烟草植物叶中提取并纯化总 DNA。将叶组织（2—4g）在液氮中彻底匀浆。将匀浆组织置于具有 20ml 冰冻的提取缓冲液的 50ml 试管中，并以 2500rpm 沉淀 15 分钟。在除去上清后，将沉淀再悬浮于 10ml 裂解缓冲液中，在 65° C 温育 30 分钟。向每个试管加入 10ml 氯仿并与样品混合。然后将样品在 3500rpm 沉淀 10 分钟。将上清移至一个清洁试管中，再一次用氯仿提取。将上清移至一个清洁试管中，并向每个试管中加入 0.6 体积的异丙醇以沉淀 DNA。在 3500rpm 离心 30 分钟后，将 DNA 用 70%乙醇冲洗。然后将分离的基因组 DNA 溶解于无菌水中以应用。

从棉花植物叶中构建棉花基因组 DNA 文库。将 DNA 用 BamHI 部分消化，将所述 DNA 片段克隆在 ZAP 表达载体(Stratagene)的 BamHI 位点。使用通过基因组步查 PCR 分离的 CoFS 基因片段作为探针，筛选所述棉花基因组 DNA 文库。

使用通用基因组步查试剂盒(Clontech)构建基因组步查文库。将来自棉花植物叶的基因组 DNA 分别用 5 种限制酶消化，通过苯酚/氯仿提取纯化，并在乙醇中沉淀。将消化的 DNA 与基因组步查衔接物连接。

相继进行两个基因组步查聚合酶链反应：将 1 μ l 每种基因组步查 DNA 文库在第一个 PCR 中用作模板，并将第一个 PCR 产物在第二个 PCR 中用作模板。所述 PCR 在 95° C 1 分钟开始，随后进行 35 次 95° C 15 秒及 68° C 4 分钟的循环，最后在 68° C 延伸 6 分钟。使用 GeneClean 试剂盒(Bio 101)纯化靶 DNA 条带。

筛选揭示了两个 CoFS 基因阳性克隆。一个克隆含有一个 4.801 kb 棉花 CoFS 基因区域，另一个克隆含有一个 3.913 kb 棉花 DNA 片段，其携带部分 CoFS 启动子区域。从棉花基因组步查文库中分

离 3 个 CoFS 启动子片段(分别为 0.7, 1.4 和 2.6 kb)。分离自棉花的完整 CoFS 基因长度为 8.4 kb, 包括一个 2.6 kb 启动子区域。序列示于表 1 表 2。

实施例 3: CoFS 启动子的功能分析

为定性 CoFS 启动子在 CoFS 基因的花药特异性表达中的功能, 在基因表达载体 pBI121 中将 CoFS 启动子的 0.7 kb 片段, 1.4 kb 片段和 2.5 kb 片段(代替 CaMV35S 启动子)与 GUS 编码序列分别融合, 见图 3。

载体如下构建。通过 PCR 分别在 0.7, 1.4 和 2.4kb CoFS 启动子片段的 5'和 3'末端产生一个 Hind III 位点和一个 BamHI 位点。将 Hind III/BamHI 片段最初亚克隆入 pGEM-T 载体(Promega)中。将含有 CoFS 启动子片段的 DNA 用 Hind III 和 BamHI 消化, 并将消化的片段通过琼脂糖凝胶电泳分离。三个嵌合的 CoFS 启动子/GUS 构建体通过分别将 0.7, 1.4 或 2.4kb 片段代替 CaMV35S 启动子插入 pBI121 载体的 Hind III/BamH I 位点中而产生。

所述 CoFS 启动子/GUS 融合基因构建体通过农杆菌介导的基因转移用于转化烟草, 使用含有 CaMV35S 启动子/GUS 融合蛋白的 pBI121 载体作为阳性对照。所述 CaMV35S 启动子是组成型启动子, 在所有植物组织中均有活性。Odell 等, 自然 313: 810-812,1985; Ow 等, 美国科学院院报 84 : 4870-4874,1987; McCabe 和 Martinell, 生物技术 11: 596-598,1993。

将含有 CoFS 启动子/GUS 融合基因的二元载体移至根癌农杆菌菌株 LBA 4404 中。使用叶一盘方法(Horsch 等, 1985)进行烟草转化。将烟草叶切成大约 2×2 cm, 并浸入农杆菌悬浮液中 5 分钟。将感染的烟草移植物在 MS 培养基上用 1 mg/L 6-BA 在 28° C 培养 48 小时, 并移至含有 100 mg/L 卡那霉素和 1 mg/L 6-BA 的选择 MS 培养

基上培养 20—30 天。选择卡那霉素抗性（转化的）芽。将转化的芽从愈伤组织切下，并在具有 50-100 mg/L 卡那霉素的 MS 培养基上生根。将转化的植物移至土壤中生长成熟。

通过 DNA Southern 印迹杂交及通过 GUS 组织化学测定分析具有嵌合 CoFS 启动子/GUS 基因（或 35S/GUS 基因）的转基因烟草植物及阴性对照未转化的植物。为进行 Southern 印迹分析，将来自转基因烟草植物叶的总基因组 DNA 用限制酶消化，在琼脂糖凝胶上分离，并通过毛细管印迹移至 Hybond-N 尼龙膜上。将 DNA Southern 印迹在 ExpressHyb 溶液(Clontech)中在 68° C 与通过随机标记制备的 ^{32}P -DNA 探针(Promega Prime-a-Gene Labelling System)杂交。杂交后，将印迹在 68° C 在 $0.1\times\text{SSC}$, 0.5% SDS 中洗 30—60 分钟。将 ^{32}P -标记的尼龙膜在 -70° C 曝光于 X-光片以放射自显影。见图 4 结果。

根据先前 Jefferson, 植物分子生物学报 5: 387-405, 1987 所述加以一些修改，在转基因烟草植物中进行 GUS 活性组织活性分析。将得自所述植物的新鲜组织在 X-gluc(5-溴-4-氯-3-吲哚葡萄糖苷酸)溶液中温育过夜，所述溶液由 0.1 M 磷酸钠 (pH 7.0), 10 mM 乙二胺四乙酸(EDTA), 0.5 mM 亚铁氰化钾 和 0.1% X-gluc (Clontech 化学制品)组成。然后将染色的植物材料清亮并通过用 100%和 70%乙醇彻底漂洗而固定，直接或在显微镜下观测样品并拍照。见图 5。

印迹分析结果表明 CoFS 启动子/GUS 基因整合入烟草基因组中。获得 50 多种烟草转基因植物并移植土壤中生长成熟。与棉花 Northern 印迹分析结果一致，由 CoFS 启动子驱动的 GUS 基因在烟草花药中特异性并强有力表达。在子房，花柱和柱头中也检测到在 CoFS 启动子驱动下 GUS 基因的微弱活性，但在花瓣及研究的所有转基因烟草植物的其它组织中未检测到 GUS 活性。这个结果结合上述 Northern 印迹分析提示 CoFS 启动子在植物花药中能在转录水

平控制特异性基因表达。

参考文献

Odell JT, Nagy F, Chua N-H, 1985. 花椰菜花叶病毒 35S 启动子活性所需的 DNA 序列的鉴别, 自然 313: 810-2。

Ow DW, Jacobs JD, Howell SH, 1987. 通过使用萤火虫荧光素酶基因作为启动子活性的受体确定的花椰菜花叶病毒 35S RNA 启动子的功能区域, 美国科学院院报 84: 4870-4。

McCabe DE 和 Martinell BJ, 1993. 通过粒子轰击分生组织转化原种棉花栽培品种, 生物技术 11: 596-8。

John ME, 1996. 相当于棉花纤维 mRNA 的基因 E6 的结构定性: 通过反义基因降低转基因植物中 E6 蛋白, 植物分子生物学 30 (2): 297—306。

Kawai M, Aotsuka S, Uchimiya H, 1998. 分离棉花 CAP 基因: 在纤维延长期间高水平表达的腺苷酸环化酶相关蛋白的同源物, 植物细胞生理学 39 (12): 1380-3。

Song P 和 Allen RD, 1997. 通过示差展示鉴别棉花纤维特异性酰基载体蛋白 cDNA, 生物化学生物生理学 Acta, 1351 (1): 305-12。

Ma dp, Liu HC, Tan H, Creech RG, Jenkins JN, Chang YF, 1997. 在纤维细胞中特异表达的棉花脂质转移蛋白基因的克隆和定性, 生物化学生物生理学 Acta, 1344 (2): 111-4。

Rinehart JA, Peterson MW, John ME, 1996. 棉花基因 FbL2A 的组织特异性和发育调节, 转基因植物中启动子活性的证实, 植物生理学 112 (3): 1331-41。

John ME 和 Crow LJ, 1992. 棉花纤维中基因表达: mRNA 的克隆, 美国科学院院报 89 (13): 5769-73。

Jefferson RA, 1987. 分析植物中嵌合基因: GUS 基因融合系统,

植物分子生物学研究 5: 387-405。

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW, 1987. GUS 融合：葡萄糖苷酸酶作为高等植物中灵敏的及通用的基因融合标记，EMBO 杂志 6: 3901-7。

Loguerico LL, Zhang JQ, Wilkins TA, 1999. Differential regulation of six novel MYB-domain genes def two distinct expression patterns in allotetraploid cotton. 分子普通遗传学 261 (4/5): 660-71。

Hasenfratz MP, Tsou CL, Wilkins TA, 1995. 两个相关空泡 H (+)-ATPase16kD 蛋白脂质基因的表达以组织特异性方式被差异调节. 植物生理学 108 (4): 1395-404。

John ME 和 Peterson MW, 1994. 棉花花粉特异性多聚半乳糖醛酸酶 mRNA :在转基因植物中其启动子的组织和时间特异性 , 植物分子生物学 26 (6): 1989 93。

Goldberg R, Beals T, Sanders P, 1993. 花药发育：基本原理和实际应用，植物细胞 5: 1217-29。

Allen RL, Lonsdale DM, 1993.对在晚期花粉发育期间表达的玉米多聚半乳糖醛酸酶基因家族成员之一的分子定性，植物杂志 3: 261-71。

Bird CR, Smith CJS, Ray JA, Moureau P, Bevan MW, Bird AS, Hughes S, Morris PC, Grierson D, Schuch W, 1988. 马铃薯多聚半乳糖醛酸酶基因及在转基因植物中的 ripening 特异性表达，植物分子生物学 11: 651-62。

Brown SM, Crouch ML, 1990. 对在 *Oenothera* 器官发生性花粉中强烈表达的一个基因家族定性示出与多聚半乳糖醛酸酶的序列相似性，植物细胞 2: 263-74。

Grierson D, Tucker GA, Keen J, Ray J, Bird CR, Schuch W, 1986. 马铃薯多聚半乳糖醛酸酶的 cDNA 克隆的测序及鉴别，核酸研究 14:

8595-603。

Hanson DD, Hamilton DA, Travis JL, Bashe DM, Mascarenhas JP, 1989. 来自 *Zea mays* 的花粉特异性 cDNA 克隆的定性及其表达, 植物细胞 1: 173-79。

Ursin VM, Yamaguchi J, McCormick S, 1989. 发育中马铃薯花药中花药特异性基因的配子体和孢子体表达, 植物细胞 1: 727-36。

Kamalay JC, Goldberg RB, 1984. 烟草中器官特异性核 RNAs, 美国科学院院报 81: 2801-5。

Koltunow AM, Truettner J, Cox KH, Wallroth M, Goldberg RB, 1990. 在花药发育期间发生不同的时间和空间基因表达模式, 植物细胞 2: 1201-2。

Atanassov I, Russinova E, Antonov L, Atanassov A, 1998. *Nicotiana sylvestris* 中花药特异性查耳酮合酶样基因的表达与单核小孢子发育相关, 植物分子生物学 38: 1169-78。

Liu JQ, Seul U, Thompson R, 1997. 编码马铃薯 *Solanum berthaultii* 谷氨酸富集蛋白 (GARP) 的花粉特异性 cDNA 的克隆和定性, 植物分子生物学 33: 291-300。

Treacy BK, Hattori J, Prud'homme I, Barbour E, Boutilier K, Baszczynski CL, Huang B, Johnson DA, Miki BL, 1997. Bnml, 一种 *Brassica* 花粉特异性基因, 植物分子生物学 34: 603-11。

Agnes FN, Drouaud J, Haouazine N, Pelletier G, Guerche P, 1999. 分离在雄性基因型发育期间早期及特异性表达的油菜籽基因, 植物分子生物学 40: 857-72。

序列表

<110> 分子农业生物学院

<120> 棉花中一种花药特异性启动子 (COFS) 的分离和鉴定

<130> USLD0946

<140> PCT/SG01/00022

<141> 2001-1-17

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 8367

<212> DNA

<213> Arabidopsis sp.

<400> 1

```

cctcacattt aagcggaaaa aaatattaac taattactaa ttactaaggt catggggttgc 60
gcattaaagt tcactgacga ttgtgcaaat gatgttccat agagcttaat tgatgaaatg 120
ggaactcatg acccgcttga agtaactcga cttgtagaac tcatgaagaa gcttatctac 180
ttgaagtttt ggtagcccaa tgaaatactc tcgtaaatct agagttatta gtgtaaaccc 240
taaagggatc aaattgtata aatttaaadc ccttatgact ttcaattgta gatagactct 300
aatctcgatc atggatgtaa ctcaatctat ttgttgggtt tggggtgatt acttcaattc 360
attccattca tagttgtgaa tatatttgag agtatttacg caaacatttg gtgtgtgcta 420
tttttccttt ggtcttttgt tcttcgttgc ccattcgttc gagtttgctt tcgctatatt 480
ttaatgcctt agaaaaat tgcgagaatt ctcattttgt gagagttaag cgaacttaga 540
attatttttt ttaaaatcgc ttaaggctgt atggtctgtg agactaaaat tctagtctcg 600
taacactaat acaatcacia gtaatttaca ttgttcaagt tcttattcac ataagcgggt 660
ggataaagaa aattaaaaaa aaacaatcgg atataattac aaaaaataa attgaaatgt 720
gcaataatac aaataataat tattgctaaa ggtaataaaa aaatgtaaat aattatcaat 780
gaagtttgaa accttaaatg gtgaagtttg tgtcaactaa tagaagaaaa aataaattat 840
ttataaact ctactaatgt attattttat tttgtaaaaa tgatttattt atattatttc 900
tactaaattg atgtggaatt agtgatatct acttaattaa ctatatataa ttataatgaa 960
tctccgggac tgtgactggg caaagatcat aaagtgggat ccaataaatt taaaatgcac 1020
ttgtaaaata ttagactcat gatggcactg aggcggaggt gaagaggcgg caaagcacat 1080
ggagaagcta tatagaaaat tctttcacga aaaaggcaac tcttggcttg tgtgttggga 1140
attgtgttaa gaactggatt atataaaaac aatttatatg ggaaaggaaa tgggtccactg 1200
tcaatagttt actataagca agttggagat ataaaattaa atatatattc agtacatata 1260
cgagtttgag caacaaaatt agagatcttt tttgtcaagt tgatatcttc aattttataa 1320
cgtaaagtgt cttttgaagg caacagtaat gatatatata tatgtagaag aaatttaact 1380
aaaaatagat aattaggctt aatttaatta attcaagtgc aattgtttta tcataatata 1440
tattacatta caaggcttga attattcata ttttaaat ttttattagt taacaaagta 1500
attattgggtg caaaaataaa taaattatta cccattatc tattttctta aataaaaaaa 1560
tatattatat atgccattta ctctctttta aaaaatttaa tttacaaata aactaataaa 1620
tttgtatatg atgatttcga atgaggggtt taatacagtt atcatgatga tttcaatata 1680
atggttccaa atgaataagg attccactac aacattaaac tcaccataat ggtgattcca 1740
attgagtgtt cctacataat tatcatcata attcttactt ggcaggatac aaaaaataa 1800
aatgggtaag gtaattaaaa attaaaaata ttatcaataa agtttttatt atggtgacaa 1860
agtttgataa tcattattaa attattaatt gagtaaaata tttaaatata gtaatgtata 1920
tataatgaat ctccggcgat gttggctgtt caaagatcat aaaatccaat acatttataa 1980
tgcagctgta aaatagatg taaagggcgg ataaagcaca tggagaagcc atatagaat 2040
ttcttccatg aaaaaggcga ctcttagctt gtgtgttggg aattgtgtta agttatatgg 2100
gaaaggaaat attccactgt caatagttaa ttataagcaa gtgggagaaa caaaattaaa 2160
tatgtttatt tgaaggcaac agtaataata taattataaa ttaaaataac ataatttagg 2220
cttaatttaa ttaatggtaa actataaaaa aaagtcattt ttgtttgctt cagattacat 2280
tttagtcact tatgtttgaa atgttacgtt ttagtcactt acattaccgt tttgttacga 2340

```

```

agtggctcact ttaccatttaa actctatttac ctccctaacg acagtcctac gtggcagtc 2400
aaatgaatttt taaatgctaa cttggacgtc cagttgctgg gacattttcc ggttcaccta 2460
cagccaccta atacttaggc gctatatatt ttcccaaat tattctccac atttcactcc 2520
cagagccctc catctatgta gagagctgta agagagaata taaaaaaggg aaagctagct 2580
gaggatcgtt tgatttttggg cattttgatg aaacggcctg gaaataattt tgtaatagag 2640
gtagagaaaag gtaaagaccc cagcgatgga cagccgtcga tcggtcctgt ttatcgcagt 2700
tcttttgctg ctaatggatt ccctgctccg attcctggaa tggagagtgt ctgggacatt 2760
ttccggttcg ttttttagctt tctctttttt actttacgct tcttgcttgg ctgctaagaa 2820
aataaggata ctaggagaag atttgacttc ttctattctt tgctttgatt tcagatggct 2880
ttcgcaatag ttgccatttt ttttgaattt ttacttcccc ttttttaagt tgagtagatt 2940
tttcttctaa tttgttggct ttgttatttt tttatttcgc gacgaggtgg cgatgaaatc 3000
gagaaaacgta cttttaagga tcctatgaga aggttatatg caagatcgaa acgcctaata 3060
tttgaaaacta ttgaatttta acgctcacac agagcaagaa tcgagttact ggtatttcca 3120
ttcttatagc tgaagatttg atggctttca ttcaactcaa tgtaaaactg tgaaataaat 3180
tgtttaatat tagtaattat tttgggtttg atgcttatgt gatgtggaga ttaaaatatt 3240
gcctccttat aacttagctg aaccgtagat atgggctgat tgaacttgct aactaactgt 3300
atgacagctc ctattttacga aaaagtaata ttttatttga ggatgatgat ttcgatttca 3360
ttttctcctt gcagtatgtc agttgagaaa tatcctgaca accatatgct tggctgcgca 3420
cagatttgtg atgggaaagt atgttgctgc tgcagtttcc ttttttcttg ttacttttgc 3480
gttctgtttg tagtgccggc tttgactttt agttcatgta tctaaattga catgctttga 3540
ttgcaggctg gaaaatacgt gtggcaaact tacagagaag tttatgacat tgtaacaaaa 3600
gttggaattt ccatccgaag ttgtgatgtt gtggaagtaa tgctttaacc tcttttttcc 3660
cttttaattg taaaattatt gtcaattttt ttataacaa atatcctatt tctggggatc 3720
aatatccacc cacaattgat gctaataaaa aaaaaatta agctttttat tcttgcttac 3780
agggaggaaa gtgtggtatt tatggtgcca attgcccaga atggataatt agcatggagg 3840
tatgatcatt ctggcatgtt tcatctgatt tgcacagtgg acatcccaag ttacttagat 3900
gtcgtataaa cttgtttctt tggatcatatc tatttgctac caaattgctt gttgcccga 3960
atgtttacta atgttgcaag attgatacag gcctgcaacg ctcatggact ctatttgttt 4020
cctttatatg acactttggg tatttcttct tgagatccaa caaaagcatt ctttcagttt 4080
ttgccaaaca actacctttc tctaacaacc atcttatgtg tattatgtac tcttcatata 4140
gtctgtgatc ataatactct taaactcttt aaattattct tgcattccaa cgcgcctgtc 4200
actctttttg aatgttttgc acgttgctac atattttag gtgcccgtgc tttggagttt 4260
atcatatgcc atgcagaaat ttctattgct tttgtagagg aaaagaagat taatgaggta 4320
tgctgtttta catctatatt tgaaacccta gtagtgatat ggcaactact gggaaagata 4380
cttctagata cttgcaaaaa taagatatct atctacaaaa tagattcgat gttttatttt 4440
tattatcagc atttgcttct atgcttgctg ctacttatg catagttgat attgatacaa 4500
gaatctgtaa tttcacaaat tttctgttct tttttctttt gggtttctca tgtaaggttt 4560
ttctttttcc tttcagctgt tcaaaacatt tccagcctca acagaacact tgaaaagtaa 4620
gctatctgat tatttagggg gattcttgaa atagtacgtt acaaattatt tatgtccatg 4680
tatttttgct atgcagcaat tgttagcttc gggaaggtaa cacctgagca gaaggcagaa 4740
gctgagaagc atgggttgaa gatatactct tgggaggaat ttttgcaact ggtaagctct 4800
ttgctctgtt attttccact tcaattttatc agaaataaaa tttattctgc tgaactaatt 4860
gtgtctatatt tagcagactg ccatcctgtt agttacgagt tcagatgaag ccatatggct 4920
gtagaaaaca tgcttctggc agtgcttaat atgaactagg cttcattaca ttttcatgca 4980
tgccctata tcttttttcc ttagctaacc gttattggat tgatggattt taacctgtag 5040
atgacttatg ttctgattta agctcttatg tctgtttctt gcaggagaa aataagaatt 5100
atggctcttc ggtgaagaag aaaactgata tctgcacgat aatgtatact agtggaacaa 5160
ctggtgatcc aaaggagta ttgatttcaa atgatagtat tgttactctt atagcagggg 5220
tgaaacgcct gctggggagt gtaaatgaac aggtgacctt ttcattttat ttttgacct 5280
ttcaccagtc acttggtttg atctgtcgtt tcttttcttt cctccaccaa atttgacatg 5340
attgttccct tgttttccct ttctcatttg tttgtttctt gtgaaattta cagttgacta 5400
tgaaggatgt atatatctt tatcttctc ttgctcatat ctttgaccgg gtgattgagg 5460
aattatttat ttcgcatggt gcttcaatag gattttggcg tggggtaaag atgattagtt 5520
agtactctga caacaaatac gggttcattc aaatcagcaa gtgcttattt gtttcatctt 5580
caggatgtga aactatttgt cgaagatatt ggagagctaa agccaagtat cttctgtgct 5640
gttctctgtg tcttagatag aatttattca ggtaaacttt cttatatctg tggattaggt 5700
aatgtcattt ttgggtgtt tgtggaggtt atactaagca acctggaaca tgtactagct 5760
ggaaaacttg tcttaattta cttattttta gtatttataa atgaaacaaa actagattga 5820
ttcacttttc tgtaaatac aatgaatata tactcagctt ttttcagaag atgcatgttc 5880
tcagctgtga gattgtcata acctttgtac attatcaggt ttactacaga agatttcttg 5940

```

```

cgggcggtt attgaaaaag aagatgtttg atttagcata cacatagtaa gttactctca 6000
tattttcagt ttcttatgtg aagctgttca ttttatctgc tggccgcccc aaaatatga 6060
ttggaaatag agttaaatg ctctattagt tctgccactg cagactcacc ggagtaaagg 6120
aaaataaaaag atatttgggc attctctaac aagcaacagg gtcaaaagca tatttttcct 6180
tgtagacaaa tatagaattt gttagagtgt tgtgacccaa attctagtta aaaaaaagt 6240
gcaagatagg gggatttgtg ggggcatcgg agggccccac ggtacggtac agactgcaca 6300
agtggaaattc gtataaaagt acacttcttc tatttgatat tgatttgaat aagggtgttc 6360
aaccttattg cattgcttct attaggtttt gattagaata aggtttatag gtcgtcgtct 6420
ctctctgccc gtggttttgt gtgttatatt ttaccctct ttctttacga ttcattgtca 6480
ttatcgaggt ttgtttttca cagaattgtc tcaatccctt tgggtttatg agcttttgca 6540
ttagtagaga tccatttgca gtctgtgatt gcacttttcg tgaatatgtt taacagagtt 6600
actgaatcag gattacggtt tcttggtttt gattttacta atatctgaca tctgtgataa 6660
cctacagcaa atactacaac atgaagaagg gccgcaaaac tggagaagca tctccaattt 6720
gtgacaaaat tgtatttagt aagggtgatg aagtcttcat tgatacatta tatgcacgag 6780
gctccttgaa tattggccaa aagccatta aatcacattt acctgcaaca taatcctctt 6840
gactactcaa atctcatgtt gagttgtaat ttttctcagg taaagcaagg attgggaggg 6900
aatgtgcggc ttattctatc tgggtgcagca cctctttcag ctcatgtgga agagtcttg 6960
cgagtgtgg catgttgtca tgttctgcaa ggatatggta tagttgaagt cagcctttgt 7020
gcttgtgata agttcttttt ttccctttac cagctgtgca cactggctgc aacatgaaca 7080
tttattatta tgttgatcca aatgtagggtc tgacggagag ttgtgcgggg agttttgtct 7140
ctttacctaa tgaattgtca atgcttggtc ctgtggggcc tcccagtacc aaacatagat 7200
gtacgcctgg aatctgttcc cgaaatgaat tatgatgccc ttgctagcac accacggggg 7260
gaaatttgta tcaaaggaaa tacattatct tcaggatact acaaacgtga agacctcacc 7320
cgtgaagtat tgattgatgg atggttccac acaggctctc caacttttgt ttcttttaag 7380
gttctatgca ttattagttt ttatctataa gttgaagacc ttgaatcttt gtgcattagg 7440
ggatattgga gagtggcaac ctaatggaag catgaagatt attgatcgaa agaagaacat 7500
ttttaagctt tcacaagggtg aatatgttgc tgttgagaac ctggagaaca ttacgggtct 7560
cgtgtcagct attgattcgg tacatctctt atgctctctt tgatacatta acatacactg 7620
cttctcggat atgtagccat gcaactgaatg ttggtcaaac gtaaaattga ttttgaaatg 7680
attggcaaat taaacatttt ctttcttatg ttaccttatg attgcattcc ttttttagca 7740
ctaggtttca acccattgcc attgatgggt gcttgattga acaaaaataa acataataat 7800
cgaaatatgc atgtcatgtt acagtgtttt tatcgtatca gttgtgtaaa catgtgtcaa 7860
aatcctttta cagaaatatg acaaatgtac taaatatgtt aaatcatgct taagcgcac 7920
atatgggtatc taaatttgtc atacatatat gtcattggaag tgatgtaaaa taaactatag 7980
tttatgtcag atttgttaatt tacttgctgg agattggcat tcttttaaac ttttcagttt 8040
catgtcttta tcaatttcag atatggattt acggaaacag ctttgagtcg ttccttggtg 8100
cggttgttaa cccaataaag gaagcacttg aaagctgggg tgccgacaat aacgtaagt 8160
gtgacttcga gtccctctgt caaaacccca aggccaaaga gttcatactt ggggagctcg 8220
caaagactgg caaagagaaa aagggttagtt attcatgctt tttgcccct tttttatttt 8280
tcaaaattta tgaatatatg gtttatcaat tcatactgaa atattataat ctttactcag 8340
ctaaaaggtt ttgaattctt tggatcc 8367

```

<210> 2

<211> 2454

<212> DNA

<213> Arabidopsis sp.

<400> 2

```

gggaagctta tctacttgaa gttttggtag cccaatgaaa tactctcgta aatctagagt 60
tattagtgtg aaccctaaag ggatcaaatt gtataaattt aaatccctta tgactttcaa 120
ttgtagatag actctaattc cgatcatgga tgtaactcaa tctatttgtt gggtttgggg 180
tgattacttc aattcattcc attcatagtt gtgaatatat ttgagagtat ttacgcaaac 240
atltgggtgt tgctattttt cctttggtct tttgttcttc gttgccatt cgttcgaggt 300
tgctttcgct atatttttaat gccttagaaa atttttgcga gaattctcat tttgtgagag 360
ttaagcgaac ttagaattat tttttttaa atcgcttaag gctgtatggt ctgtgagact 420
aaaattctag tctcgtaaca ctaatacaat cacaagtaat ttacattgtt caagttctta 480
ttcacataag cggttgata aagaaaatta aaaaaaaca atcggatata attacaaaaa 540
aataaattga aatgtgcaat aatacaaaata ataattattg cttaaaggtaa ataaaaaatg 600
taaataatta tcaatgaagt ttgaaacctt aaatggtgaa gtttgtgtca actaatagaa 660

```

```

gaaaaaataa attatttata taactctact aatgtattat tttattttgt aaaattgatt 720
tatttatatt atttctacta aattgatgtg gaattagtga tatctactta attaactata 780
tataattata atgaatctcc gggactgtga ctggtcaaag atcataaagt ggtatccaat 840
aaatttataaa tgcacttgta aaatattaga ctcattgatgg cactgaggcg gaggtgaaga 900
ggcggcaaaag cacatggaga agctatatag aaaattcctt caccgaaaaag gcaactcctg 960
gcttggtgtgt tgggaattgt gttagaact ggattatata aaaacaatta tatggggaaa 1020
ggaaatggtc cactgtcaat agtttactat aagcaagttg gagatataaa attaaatata 1080
tattcagtag atatacagat ttgagcaaca aaattagaga tcttttttgt caagttgata 1140
tcttcaattt tataacgtaa atgttctttt gaaggcaaca gtaatgatat atatatatgt 1200
agaagaaatt taactaaaaa tagataatta ggcttaattt aattaattca agtgcaattg 1260
ttttatcata atatatatta cattacaagg cttgaattat tcataattta aattttattta 1320
ttagttaaca aagtaattat tggtgcaaaa ataaataaat tattaccca ttatctattt 1380
tcttaaataa aaaaatatat tatatatgcc atttactctc tttaaaaaaa tttaattttac 1440
aaataaacta ataaatttgt atatgatgat ttcgaatgag ggtttttaata cagttatcat 1500
gatgatttca atacaatggg tccaaatgaa taaggattcc actacaacat taaactcacc 1560
ataatgggtga ttccaattga gtgttctctac ataattatca tcataattct tacttggcag 1620
gatacaaaaa ataataatgg gtaaggtaat taaaaattaa aataattatc aataaagttt 1680
ttattatggg gacaaagttt gataatcatt attaaattat taattgagta aaatatttaa 1740
atatagtaat gtatatataa tgaatctccg gcgatgttg ctgttcaaag atcataaaat 1800
ccaatacatt taaaatgcag ctgtaaaata tgatgtgaag ggcggatacc acacatggag 1860
aagccatata gaaatttctt ccggtaccat gaaaaaggcg actcttagct tgtgtgttg 1920
gaattgtgtt aagttatatg ggaaaggaaa tattccactg tcaatagttt attataagca 1980
agtgaggaaa acaaaattaa atatgttatt ttgaaggcaa cagtaataat ataattataa 2040
attaaaaata cataatttag gcttaattta attaatggta aactataaaa aaaagtcatt 2100
tttgtttgc ttagattaca ttttagtcac ttatgtttga aatgttacgt ttagtcact 2160
tacattaccg tttgtttacg aagtggtcac tttaccatta aactctatta cctccctaac 2220
gacagtccta cgtggcagtc aaaatgaatt ttaaattgcta acttggacgt ccagttgctg 2280
ggacattttc cggttcacct acagccacct aatacttagg cgctatatat tttcccaaaa 2340
ttattctcca catttcactc ccagagccct ccacttatgt agagagctgt aagagagaat 2400
ataaaaaagg gaaagctagc tgaggatcgt ttgatttttg acattttggg atcc 2454

```

<210> 3
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis sp.

```

<400> 3
ggctactgtg acgtgccgtg gctactgtga aacgagccgt ggctactgtg aacgtgccgt 60
ggctactgtg aacgagccgt ggctactgtg aacgtgccgt ggctactgtg aacgtgccgt 120
ggctactgtg aacgagccgt ggctactgtg atacgtgccg ggagttttgt ctctttacct 180
aatgaattgt caatgcttgg tactgtgggg ccccatacca aacatagatg tacgcttggg 240
atctgttccg aaaaaaaaaa aactgaattc cgagt 275

```

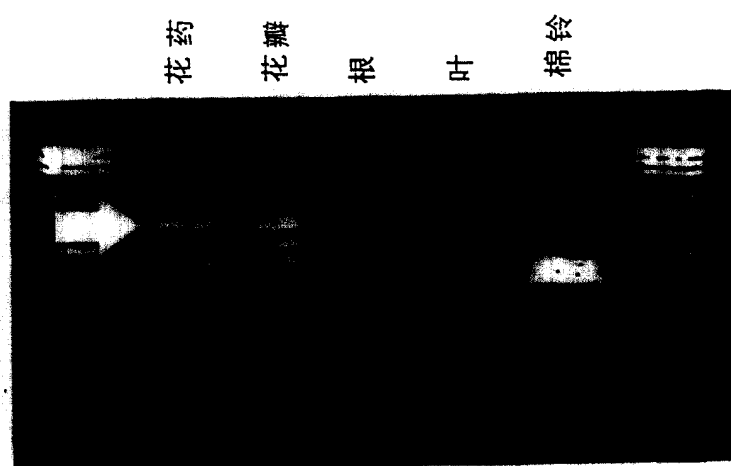


图1

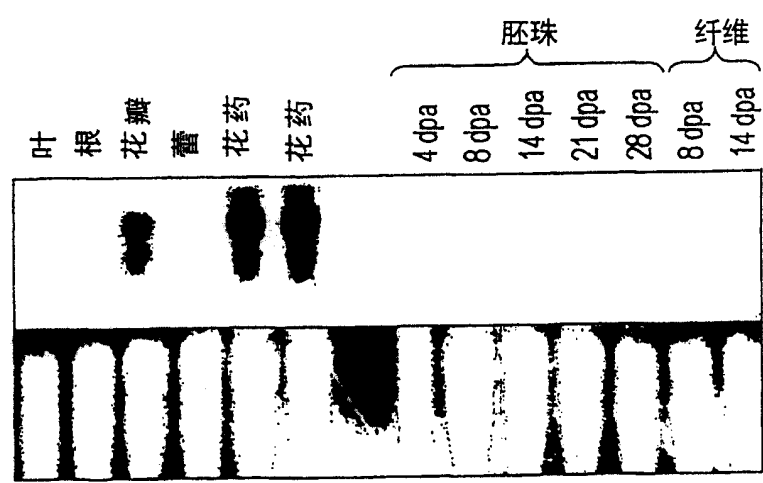


图2

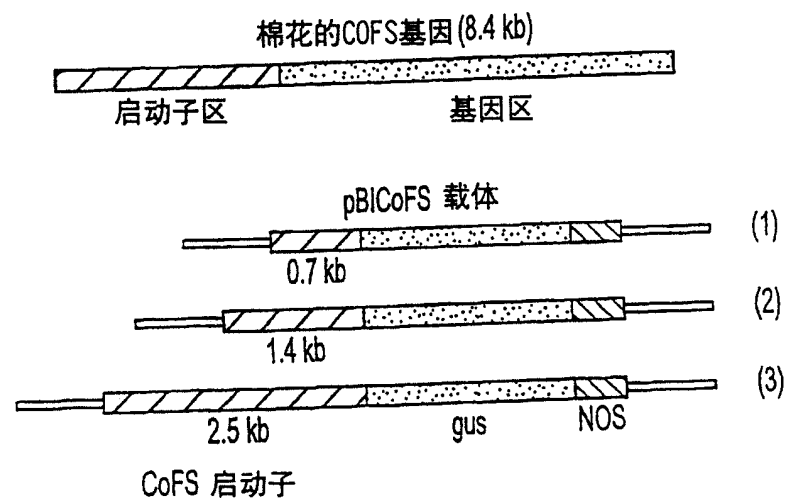


图3

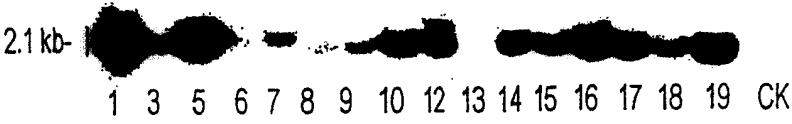


图4A

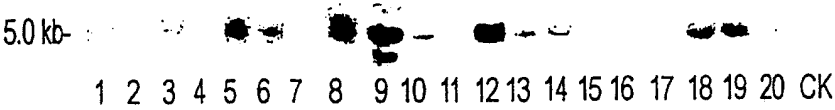


图4B



花

图5A



花

图5B



花药

图5C