



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106957855 A

(43)申请公布日 2017.07.18

(21)申请号 201710082775.1

(22)申请日 2017.02.16

(71)申请人 上海市农业科学院

地址 201403 上海市奉贤区金齐路1000号

(72)发明人 储黄伟 曹黎明

(74)专利代理机构 杭州千克知识产权代理有限公司 33246

代理人 黎双华

(51)Int.Cl.

C12N 15/84(2006.01)

A01H 5/00(2006.01)

C12N 9/22(2006.01)

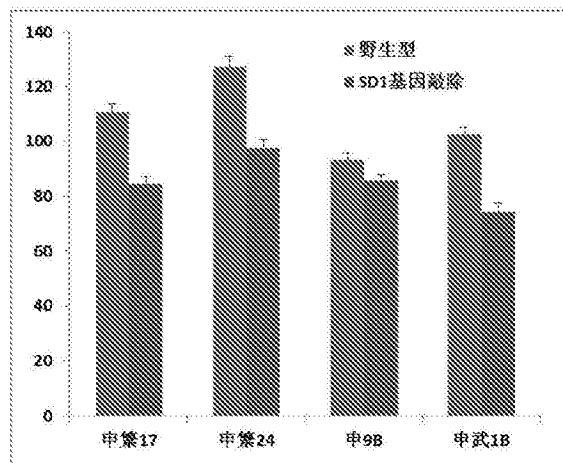
权利要求书1页 说明书4页
序列表5页 附图1页

(54)发明名称

使用CRISPR/Cas9技术靶向敲除水稻矮秆基因SD1的方法

(57)摘要

本发明公开了一种使用CRISPR/Cas9技术靶向敲除水稻矮秆基因SD1的方法,根据CRISPR/Cas9的设计原则,在水稻SD1基因编码区确定CRISPR/Cas9系统编辑的靶位点,根据靶位点的序列设计引物,构建CRISPR/Cas9载体,用农杆菌介导的方法转化水稻愈伤组织,通过筛选鉴定,最后获得SD1突变的不含转基因DNA片段的矮秆水稻品系。该方法应用于矮秆水稻品种的选育,可以免去杂交选育的工作,大大缩短矮秆品种选育的周期。



1. 使用CRISPR/Cas9技术靶向敲除水稻矮秆基因SD1的方法,其特征在于,包括如下步骤:

a) 选择SD1基因编码区第108至127核酸序列作为CRISPR/Cas9系统的靶序列(SEQ ID NO.1):AGGATGGAGCCCAAGATCC;

根据靶序列设计两条单核苷酸引物:

SD1-F1 (SEQ ID NO.2):TGTGTGAGGATGGAGCCCAAGATCC

SD1-R1 (SEQ ID NO.3):AAACGGATCTTGGGCTCCATCCTCA;

b) 将单核苷酸引物SD1-F1和SD1-R1混合,通过退火反应形成二聚体结构,然后与载体片段BGK03进行连接,构建得到含有水稻SD1基因靶序列的质粒BGK03-SD1;

c) 用含有BGK03-SD1质粒的根癌农杆菌EHA105侵染水稻的愈伤组织,通过潮霉素筛选,再生获得转基因水稻植株;

d) 利用如SEQ ID NO.4和SEQ ID NO.5所示的水稻SD1基因的特异引物,扩增基因组片段进行测序,筛选突变植株;

SEQ ID NO.4:GGGTCATTGATTCGACCATC

SEQ ID NO.5:GTGCTCGACACCTGGAAGAAC。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述水稻品种为申繁17、申繁24、申9B或申武1B。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,申繁17突变植株SD1基因突变序列如SEQ ID NO.7所示。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,申繁24突变植株SD1基因突变序列如SEQ ID NO.8所示。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,申9B突变植株SD1基因突变序列如SEQ ID NO.9所示。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,申武1B突变植株SD1基因突变序列如SEQ ID NO.10所示。

使用CRISPR/Cas9技术靶向敲除水稻矮秆基因SD1的方法

技术领域

[0001] 本发明属于植物分子生物学与生物技术领域,具体涉及一种基于CRISPR/Cas9基因组编辑技术靶向敲除水稻矮秆基因SD1的方法。

背景技术

[0002] 水稻原产于中国,是世界主要粮食作物之一。中国水稻播种面占全国粮食作物的1/4,而产量则占一半以上,为我国重要粮食作物。

[0003] 人类在大约一万年开始驯化水稻时,就选择出了一个与高产有关的重要基因。这个基因叫做半矮秆基因SD1,它使水稻长得较矮,从而能结出更多谷粒,并且抗倒伏的能力更强。围绕这个基因进行的水稻矮化育种,是20世纪中期全球第一次绿色革命的关键内容。

[0004] SD1参与赤霉素的生物合成,编码由389个氨基酸组成的GA20氧化酶(GA20ox)。GA20ox是赤霉素合成途径中的关键酶,催化GA53转换为GA20。SD1基因的突变引起的GA20ox活性的下降,会使水稻植株矮化。

[0005] CRISPR/CAS9系统是近年来发展起来的一种基因组DNA编辑技术,它的原理是利用一段靶基因序列特异的sgRNA,引导Cas9核酸内切酶,对靶基因的DNA进行切割、编辑。CRISPR/Cas9技术已经被证明可以非常有效的在第一代转基因水稻中编辑靶基因序列,并且编辑后的序列可以稳定的遗传。CRISPR/Cas9系统与ZFNs(锌指核酸酶)和TALENs(转录激活因子样效应物核酸酶)等基因编辑技术相比,具有设计和构建简单、突变效率高、多靶点同时编辑等优点。

[0006] 过去,水稻矮化育种主要通过诱变获得矮化水稻品种,或者通过杂交的方法将矮秆基因导入到其它的水稻品种中,这两个方法获得矮秆水稻株系的周期较长、工作量大、成本高。通过CRISPR/Cas9基因编辑系统直接对水稻的SD1基因进行定点突变,创制水稻矮秆株系,可以大大的缩短矮秆育种的周期。

发明内容

[0007] 本发明针对现有技术的不足,提供一种基于CRISPR/Cas9系统的水稻SD1基因定点敲除的方法,及利用该方法在不同水稻品种中创制矮秆水稻株系的应用。本发明利用SD1基因编码的GA20氧化酶是赤霉素合成途径中的关键酶的特点及CRISPR/Cas9系统基因组定点编辑功能,定点突变SD1基因的核苷酸序列,改变SD1基因编码的GA20氧化酶活性,从而得到矮秆的水稻株系。

[0008] 使用CRISPR/Cas9技术靶向敲除水稻矮秆基因SD1的方法,其特征在于,包括如下步骤:

[0009] a) 选择SD1基因编码区第108至127核酸序列作为CRISPR/Cas9系统的靶序列(SEQ ID NO.1):AGGATGGAGCCCAAGATCC;

[0010] 根据靶序列设计两条单核苷酸引物:

[0011] SD1-F1 (SEQ ID NO.2) :TGTGTGAGGATGGAGCCCAAGATCC

[0012] SD1-R1 (SEQ ID NO.3) :AAACGGATCTTGGGCTCCATCCTCA;

[0013] b) 将单核苷酸引物SD1-F1和SD1-R1混合,通过退火反应形成二聚体结构,然后与载体片段BGK03进行连接,构建得到含有水稻SD1基因靶序列的质粒BGK03-SD1;

[0014] c) 用含有BGK03-SD1质粒的根癌农杆菌EHA105侵染水稻的愈伤组织,通过潮霉素筛选,再生获得转基因水稻植株;

[0015] d) 利用如SEQ ID NO.4和SEQ ID NO.5所示的水稻SD1基因的特异引物,扩增基因组片段进行测序,筛选突变植株;

[0016] SEQ ID NO.4:GGGTCATTGATTGACCATC

[0017] SEQ ID NO.5:GTGCTCGGACACCTGGAAGAAC。

[0018] 进一步地,所述水稻品种为申繁17、申繁24、申9B或申武1B。

[0019] CRISPR/Cas9系统采用的靶序列为SD1编码序列中包括5' -GN(19)NGG-3' 的核酸序列,其中N为A、T、G、C中的任意一个碱基。靶序列 (SEQ ID NO.1) :AGGATGGAGCCCAAGATCC在水稻的基因组中是唯一的。

[0020] 本发明根据CRISPR/Cas9的设计原则,在水稻SD1基因编码区确定CRISPR/Cas9系统编辑的靶位点,根据靶位点的序列设计引物,构建CRISPR/Cas9载体,用农杆菌介导的方法转化水稻愈伤组织,通过筛选鉴定,最后获得SD1突变的不含转基因DNA片段的矮秆水稻品系。该方法应用于矮秆水稻品种的选育,可以免去杂交选育的工作,大大缩短矮秆品种选育的周期。

附图说明

[0021] 图1是突变植株SD1测序图。

[0022] 图2是潮霉素基因PCR检测电泳图。其中“M”是DL2000分子标记,“+”是质粒阳性对照,1-6是选取的部分T1代转基因株系。

[0023] 图3是水稻野生型与SD1基因敲除突变植株的主茎高度对比图。

具体实施方式

[0024] 下面结合具体实施例对本发明的技术方案做进一步详细说明。

[0025] 实施例1

[0026] 水稻SD1基因的编码区序列如SEQ ID NO.6所示。

[0027] 本实施例CRISPR/Cas9编辑靶序列长度为20bp,位于SD1编码区的第108至127碱基位,编辑的靶序列为SEQ ID NO.1:AGGATGGAGCCCAAGATCC。

[0028] 根据靶序列合成两条单核苷酸引物:

[0029] SD1-F1 (SEQ ID NO.2) :TGTGTGAGGATGGAGCCCAAGATCC

[0030] SD1-R1 (SEQ ID NO.3) :AAACGGATCTTGGGCTCCATCCTCA;

[0031] 通过退火反应使得引物SD1-F1和SD1-R1形成二聚体结构,然后与BGK03载体片段进行连接,构建成含有水稻SD1基因靶序列的质粒BGK03-SD1。

[0032] 用电激法将BGK03-SD1质粒转化如农杆菌EHA105,将含有BGK03-SD1质粒的农杆菌EHA105在含有Kan (50 μ g/ μ l)的LB平板上划线,获得单菌落。挑单菌落接种到3ml含利福平

(25mg/L) 和 Kan (50mg/L) 的 LB 液体培养基中 28℃ 摇菌培养过夜; 第二天将菌液按 1:20 的比例接种于含利福平 (25mg/L)、Kan (50mg/L) 和乙酰丁香酮 (20mg/L) 的 AB 液体培养基中, 28℃, 200rpm 摇菌培养大约 4h。离心收集农杆菌, 加等体积含乙酰丁香酮 (20mg/L) 的 AAM 液体培养基重悬, 即可用于转化水稻的受体材料。

[0033] 本实施例以粳稻 3 系杂交稻的恢复系申繁 17 和申繁 24, 保持系申 9B 和申武 1B 为受体材料进行农杆菌转化。每个品种去成熟的种子 1000 粒左右, 去壳后用 75% 的乙醇浸泡 1 分钟, 倒掉 75% 乙醇后用 30% 安替福民溶液消毒 30 分钟, 用无菌水洗 6 次, 用灭菌纱布吸干水分后将种子种到含 2, 4D (2mg/L) 的 NB 培养基上 26℃ 避光培养 2 周。将诱导出的愈伤组织切下, 放入新的含 2, 4D (2mg/L) 的 NB 培养基上, 26℃ 培养 7 天。挑取状态较好的愈伤组织, 于准备好的农杆菌菌液中浸泡 8min, 期间不时摇晃。吸出或倒掉菌液, 将愈伤组织用无菌滤纸吸干, 接种于共培养中 (含 100μM 乙酰丁香酮) 28℃ 暗培养 72h。取出愈伤组织, 转入含有 25mg/L 潮霉素的筛选培养基上培养, 2 周后转入含有 50mg/L 潮霉素的筛选培养基上继续筛选。2 周后将愈伤转入预分化培养基上培养 1 周后, 再转入分化培养基光照培养, 分化成苗后将小苗用 1/2MS 培养基生根壮苗获得 T0 代植株, 移入田间种植。

[0034] 取 T0 代植株叶片提取 DNA, 根据 SD1 基因的序列设计引物扩增, 对 PCR 产物进行测序, 确定靶序列发生突变的植株, 所用引物序列为:

[0035] SD1-F5 (SEQ ID NO. 4) : GGGTCATTGATTGACCATC

[0036] SD1-R3 (SEQ ID NO. 5) : GTGCTCGGACACCTGGAAGAAC。

[0037] 突变植株 SD1 测序图如图 1 所示。

[0038] 将 T0 代检测到有突变的植株收种, 然后种植 T1 代。采集 T1 代植株的叶片提取 DNA, 用引物 SD1-F5 和 SD1-R3 扩增测序, 确定靶序列突变类型为纯合突变或杂合突变; 同时根据潮霉素基因序列设计引物, 检测潮霉素基因序列的存在, 以此确定外源 T-DNA 片段是否存在。选择靶序列突变为纯合突变同时潮霉素检测为阴性的植株进行收种。所用的潮霉素基因检测引物序列为:

[0039] HptF (SEQ ID NO. 11) : CGTTATGTTTATCGGCACTTTG

[0040] HptR (SEQ ID NO. 12) : TTGGCGACCTCGTATTGG。

[0041] 图 2 是潮霉素基因 PCR 检测电泳图。其中 “M” 是 DL2000 分子标记, “+” 是质粒阳性对照, 1-6 是选取的部分 T1 代转基因株系。

[0042] 表 1 是水稻野生型与 SD1 基因敲除突变植株的主茎高度记录表, 图 3 是水稻野生型与 SD1 基因敲除突变植株的主茎高度对比图。

[0043]

编号	申繁 17	申繁 17 SD1 基 因敲除	申繁 24	申繁 24 SD1 基 因敲除	申 9B	申 9B SD1 基 因敲除	申武 1B	申武 1B SD1 基 因敲除
1	106	81	124	93	95	88	101	73
2	107	87	123	95	99	85	101	76
3	105	83	128	95	94	86	105	81
4	110	86	123	96	93	85	100	83
5	108	85	126	95	93	87	103	72
6	109	84	129	100	90	86	102	72
7	111	87	127	102	93	85	104	72
8	112	84	124	95	92	87	102	75
9	109	80	120	95	89	88	102	70
10	111	81	124	99	94	84	100	71
11	113	81	129	97	96	85	103	73
12	114	88	129	101	91	84	109	72
13	111	85	133	106	93	88	100	72
14	110	87	132	95	94	87	104	77
15	115	84	127	97	97	86	105	73
16	116	79	130	97	90	88	102	77
17	113	85	134	99	92	86	104	77
18	107	83	132	97	94	88	100	72
19	111	86	130	97	95	83	107	70
20	113	90	128	97	92	81	101	74
平均	110.55	84.3	128	97.4	93.3	85.9	102.8	74.1
标准差	2.9996	2.89	3.76	3.05	2.43	1.9	2.447	3.478

[0044] 从表1和附图3可以看出,水稻突变体主茎明显缩短。

[0045] 本发明通过本发明根据CRISPR/Cas9的设计原则,在水稻SD1基因编码区确定CRISPR/Cas9系统编辑的靶位点,根据靶位点的序列设计引物,构建CRISPR/Cas9载体,用农杆菌介导的方法转化水稻愈伤组织,通过筛选鉴定,最后获得SD1突变的不含转基因DNA片段的矮秆水稻品系。该方法应用于矮秆水稻品种的选育,可以免去杂交选育的工作,大大缩短矮秆品种选育的周期。

SEQUENCE LISTING

<110> 上海市农业科学院

<120> 使用CRISPR/Cas9技术靶向敲除水稻矮秆基因SD1的方法

<130>

<160> 12

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> SD1基因编码区108-127核酸序列

<400> 1

aggatggagc ccaagatcc 19

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

tgtgtgagga tggagcccaa gatcc 25

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

aaacggatct tgggctccat cctca 25

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

gggtcattga ttcgaccatc 20

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

gtgctcggac acctggaaga ac 22

<210> 6

<211> 1170

<212> DNA

<213> 水稻SD1基因编码区

<400> 6

```

atggtggccg agcacccac gccaccacag ccgaccaac caccgccc at ggactccacc 60
gccggctctg gcattgccgc cccggcggcg gcggcggtgt gcgacctgag gatggagccc 120
aagatcccgg agccattcgt gtggccgaac ggcgacgca ggccggcgtc ggcgcgagg 180
ctggacatgc ccgtggtcga cgtgggcgtg ctccgcgac gcgacgccga ggggctgcgc 240
cgcgccgcgg cgcaggtggc cgccgcgtgc gccacgcac ggttctcca ggtgtccgag 300
cacggcgtcg acgccgctct ggcgcgcgcc gcgctcgac gcgccagca cttcttccgc 360
ctcccgctcg ccgagaagcg ccgcgcgcgc cgcgtcccgg geaccgtgtc cggctacacc 420
agcggccacg ccgaccgctt cgctccaag ctccatgga aggagaccct ctcttccggc 480
ttccacgacc gcgccgcgc cccgctcgtc gccgactact tctccagca cctcggcccc 540
gacttcgcgc caatggggag ggtgtaccag aagtaactgc aggagatgaa ggagctgtcg 600
ctgacgatca tggaaactct ggagctgagc ctgggcgtgg agcgaggcta ctacaggag 660
ttcttcgcgg acagcagctc aatcatgcgg tgcaactact accgccc atg cccggagccc 720
gagcggacgc tcggcacggg cccgcaactgc gaccccacc cctcaccat cctctccag 780
gacgacgtcg gcggcctcga ggtcctcgtc gacggcgaat ggcgccccgt cagccccgtc 840
cccggcgcca tggatcaaa catcggcgac accttcatgg cgtgtcgaa cgggaggtat 900
aagagctgcc tgcacagggc ggtggtgaa cagcggcggg agcggcggtc gctggcgctc 960
ttctgtgcc cgcgggagga caggtggtg cggccgccgc cgagcggcgc caccgccag 1020
cactaccggg acttcaactg ggccgacctc atgcgcttca cgcagcgcca ctaccgcgc 1080
gacaccgca cgctcgacgc cttcacgcgc tggtcgcgc cgccggcgc cgacgccgc 1140
gcgacggcgc aggtcgaggc ggccagctga 1170

```

<210> 7

<211> 1145

<212> DNA

<213> 申繁17突变植株SD1基因突变序列

<400> 7

```

atggtggccg agcacccac gccaccacag ccgaccaac caccgccc at ggactccacc 60
gccggctctg gcattgccgc cccggcggcg gcggcggtgt gcgacctgag gatggatggc 120
cgaacggcga cgcgagggcg gcgtcggcgg cggagctgga catccccgtg gtcgacgtgg 180
gcgtgctccg cgacggcgac gccgaggggc tgcgccgcgc cgcggcgag gtggccgccg 240
cgtgcgccac gcacgggttc ttccaggtgt ccgagcacgg cgtcgacgcc gctctggcgc 300
gcgccgcgt cgacggcgcc agcgaattct tccgctccc gctcgccgag aagcggcgcg 360
cgcgccgcgt cccgggcacc gtgtccggt acaccagcgc ccacgccgac cgttctgct 420
ccaagctccc atggaaggag acctctctt tcggttcca cgaccgccc gccgccccg 480
tcgtcgccga ctacttctcc agcaccctcg gccccactt cgcgccaatg gggagggtgt 540
accagaagta ctgcgaggag atgaaggagc tgtcgtgac gatcatgaa ctctggagc 600
tgagcctggg cgtggagcga ggctactaca gggagttctt cgcggacagc agctcaatca 660

```

tgcggtgcaa ctactaccg ccatgcccgg agccggagcg gacgctcgge acgggcccgc 720
 actgcgacce caccgccctc accatcctcc tccaggacga cgtcggcgge ctcgaggtcc 780
 tcgtcgacgg cgaatggcgc cccgtcagcc ccgtccccgg cgccatggtc atcaacatcg 840
 gcgacacctt catggcgctg tcgaacggga ggtataagag ctgcctgcac agggcggtgg 900
 tgaaccagcg gcgggagcgg cggtcgctgg cgttcttctt gtgcccgcgg gaggacaggg 960
 tgggtcgggcc gccgccgagc gccgccacgc cgcagcacta cccggacttc acctggggcc 1020
 acctcatgcg cttcacgcag cgccactacc gcgccgacac ccgcacgctc gacgccttca 1080
 cgcgctggct cgcgccccgg gccgccgacg ccgccgcgac ggccgaggtc gaggcggcca 1140
 gctga 1145

<210> 8

<211> 1171

<212> DNA

<213> 申繁24突变植株SD1基因突变序列

<400> 8

atggtggcgg agcaccceac gccaccacag ccgcaccaac caccgcccatt ggactccacc 60
 gccggctctg gcattgccgc cccggcgggc gcggcggtgt gcgacctgag gatggagccc 120
 aagaatcccc gagccattcg tgtggccgaa cggcgacgcg aggccggcgt cggcgggcga 180
 gctggacatg cccgtggtcg acgtgggcgt gctccgcgac ggccgacccc aggggctgcg 240
 ccgcgcccg gcgcaggtgg ccgccgcgtg cgcacgcac gggtttctcc aggtgtccga 300
 gcacggcgtc gacgccgctc tggcgcgcg cgcgctcgac ggcccccagc acttcttccg 360
 cctcccgctc gccgagaagc gccgcgcgcg ccgcgtcccc ggccaccgtgt ccggctacac 420
 cagcgcceac gccgaccgct tcgcctcaa gctcccatgg aaggagacc tctcttccgg 480
 ctccacgac cgcgccccc cccccgtcgt cgcgcactac ttctccagca ccctcggccc 540
 cgacttcgcg ccaatgggga ggggttacca gaagtactgc gaggagatga aggagctgtc 600
 gctgacgatc atggaactcc tggagctgag cctgggcgtg gagcgaggct actacagga 660
 gttcttcgcg gacagcagct caatcatgcg gtgcaactac taccgccat gcccgagcc 720
 ggagcggacg ctcggcacgg gccgcactg cgcaccacc gccctacca tctctctcca 780
 ggacgacgct ggccggcctc aggtcctcgt cgacggcgaa tggcgccccg tcagccccgt 840
 ccccggcgcc atggtcatca acatcggcga caccttcatg gcgctgtcga acgggaggt 900
 taagagctgc ctgcacaggg cgggtgtgaa ccagcggcgg gagcggcggt cgctggcggt 960
 cttcctgtgc ccgcgggagg acagggtggt gcggcccccg ccgagcggcc ccacgccgca 1020
 gcaactaccg gacttcacct gggccgacct catgccttc acgcagcgc actaccgcgc 1080
 cgacaccgc acgctcgacg cttcacgcg ctggtctcgc ccgccggccg ccgacgccgc 1140
 cgcgacggcg caggctcaggg cggccagctg a 1171

<210> 9

<211> 1171

<212> DNA

<213> 申9B突变植株SD1基因突变序列

<400> 9

atggtggccg agcaccacac gccaccacag ccgcaccaac caccgcecat ggactccacc 60
 gccggctctg gcattgccgc cccggcggcg gcggcggtgt gcgacctgag gatggagccc 120
 aagaatcccg gagccattcg tgtggccgaa cggcgacgcg aggccggcgt cggcggcgga 180
 gctggacatg cccgtggtcg acgtgggctg gctccgcgac ggcgacgccg aggggctgcg 240
 ccgcgccgcg gcgcaggtgg ccgccgcgtg cgccacgcac gggttcttcc aggtgtccga 300
 gcacggcgtc gacgccgctc tggcgcgcgc cgcgctcgac ggcgccagcg acttcttccg 360
 cctcccgcctc gccgagaagc gccgcgcgcg ccgcgtcccg ggcaccgtgt ccggtacac 420
 cagcgcaccac gccgaccgct tcgctccaa gctcccattg aaggagacc tctccttcgg 480
 cttccacgac cgcgccgcg cccccgtcgt cgccgactac ttctccagca ccctcggccc 540
 cgacttcgcg ccaatgggga ggggtgacca gaagtaactgc gaggagatga aggagctgtc 600
 gctgacgac atggaactcc tggagctgag cctgggcgtg gagcgaggct actacagga 660
 gttcttcgcg gacagcagct caatcatgcg gtgcaactac taccgcecat gcccgagcc 720
 ggagcggacg ctcggcacgg gcccgcactg cgaccccacc gccctacca tctctctcca 780
 ggacgacgtc ggcgccctcg aggtcctcgt cgacggcgaa tggcgccccg tcagccccgt 840
 ccccgcgcc atggtcatca acatcgggca caccttcatt gcgctgtcga acgggagga 900
 taagagctgc ctgcacaggg cgggtggtgaa ccagcggcgg gagcggcggt cgctggcggt 960
 cttctgtgc ccgcgggagg acaggtggt gcggccgccg ccgagcggcg ccacgccga 1020
 gcactaccg gacttcacct gggccgacct catgccttc acgcagcgc actaccgcgc 1080
 cgacaccgc acgtcgcag ccttcacgcg ctggtcgcg ccgccggccg ccgacgccgc 1140
 cgcgacggcg caggtcgagg cggccagctg a 1171

<210> 10

<211> 1168

<212> DNA

<213> 申武1B突变植株SD1基因突变序列

<400> 10

atggtggccg agcaccacac gccaccacag ccgcaccaac caccgcecat ggactccacc 60
 gccggctctg gcattgccgc cccggcggcg gcggcggtgt gcgacctgag gatggagccc 120
 aatcccggag ccattcgtgt ggccgaacgg cgacgcgagg ccggcgtcgg cggcggagct 180
 ggacatgcc gtggtcgacg tggcgctgct ccgcgacggc gacgccgagg ggctgcgccg 240
 cgccgcggcg caggtggccg ccgcgtgcgc caegcaggg ttcttccagg tgtccagca 300
 cggcgtcgac gccgctctgg cgcgcgccgc gctcgacggc gccagcact tcttccgct 360
 cccgctcgcc gagaagcgc gcgcgcgccg cgtcccgggc accgtgtccg gctacaccag 420
 cgcccacgcc gaccgcttcg cctccaaget cccatggaag gagacctct ccttcggctt 480
 ccacgaccgc gccgccgcc ccgtcgtcgc gactaacttcc tccagcacc tcggccccga 540
 cttcgcgcca atggggaggg tgtaccagaa gtactgcgag gagatgaagg agctgtcgt 600
 gacgatcatg gaactcctgg agctgagcct gggcgtggag cgaggctact acagggagtt 660
 cttcgcggac agcagctcaa tcatcggtg caactactac ccgcatgcc cggagccgga 720
 gcggacgctc ggcaagggcc cgcaactgca cccaccgcc ctcaccatcc tctccagga 780
 cgacgtcggc ggctcagagg tcctcgtcga cggcgaatgg cgccccgtea gcccgtccc 840

cggcgcatg gtcataaca tcggcgacac cttcatggcg ctgtcgaacg ggaggtataa 900
gagctgcctg cacagggcgg tggtaacca gcggcgggag cggcggtegc tggcgttctt 960
cctgtgccccg cgggaggaca ggggtggtgcg gccgcccgcg agcggcccca cgccgcagca 1020
ctaccgcgac ttcacctggg ccgacctcat gcgcttcacg cagegccact accgcgccga 1080
caccgcacg ctcgacgcct tcacgcgctg gctcgcgccg ccggcccgcg acgcccgcgc 1140
gacggcgacg gtcgaggcgg ccagctga 1168

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 11

cgttatgttt atcggcactt tg 22

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 12

ttggcgacct cgtattgg 18

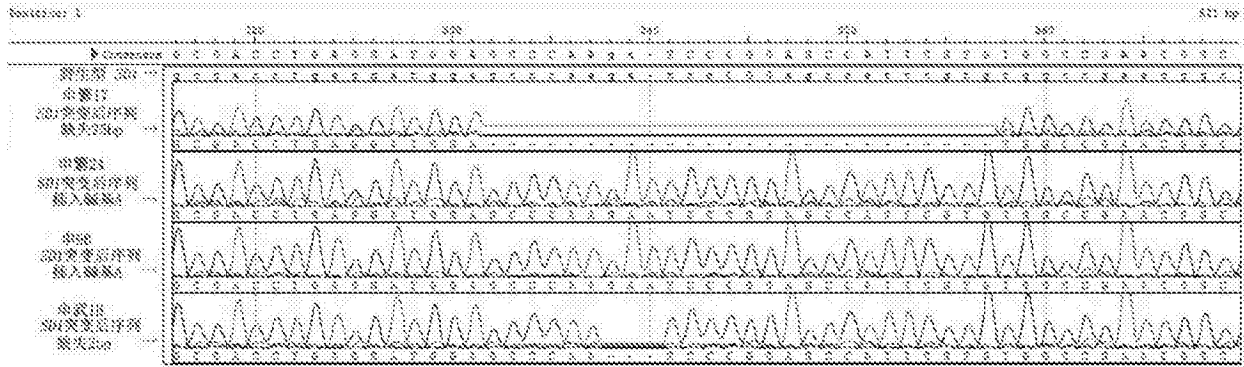


图1

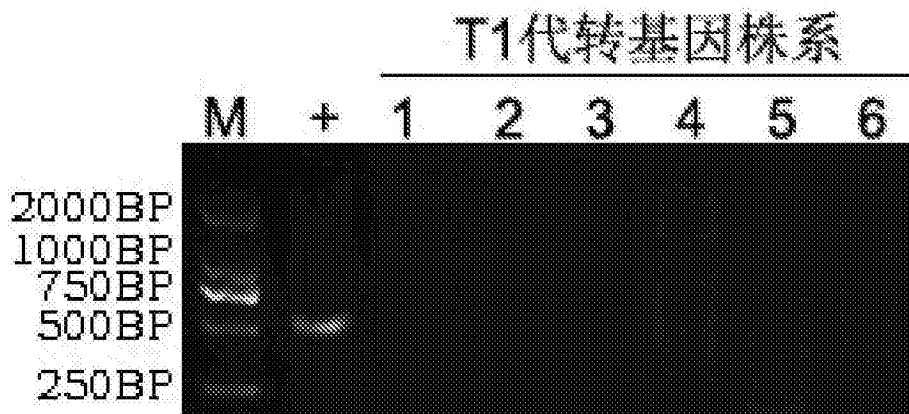


图2

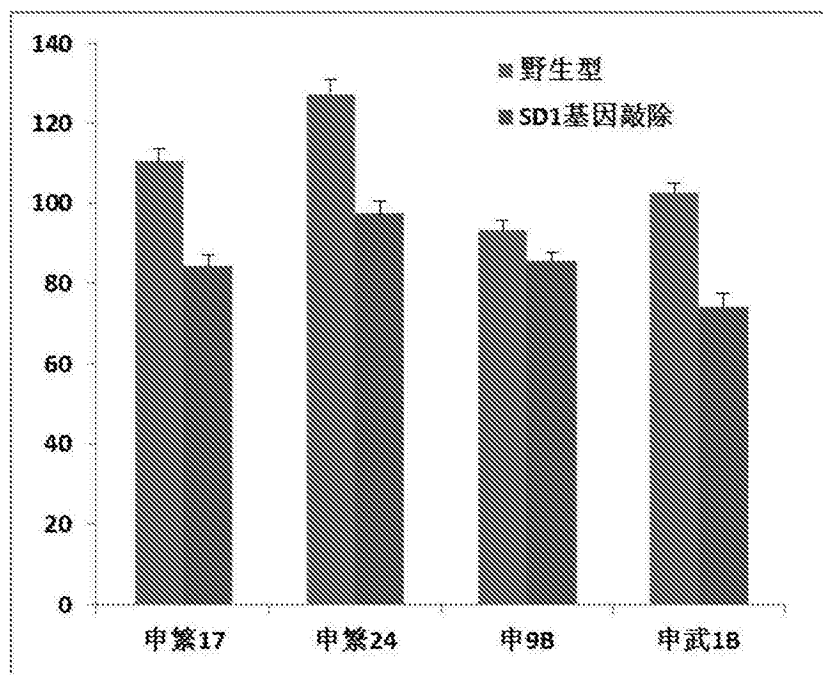


图3