

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810029748.9

[51] Int. Cl.

C12N 15/29 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 12 月 31 日

[11] 公开号 CN 101333533A

[51] Int. Cl. (续)

C12Q 1/68 (2006.01)

[22] 申请日 2008.7.25

[21] 申请号 200810029748.9

[71] 申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山华南
农业大学

[72] 发明人 庄楚雄 周海 姜大刚 李静
唐佩君 卢森 吴平 刘勤坚
朱丽雅 刘耀光 梅曼彤

[74] 专利代理机构 广州粤高专利代理有限公司
代理人 林丽明

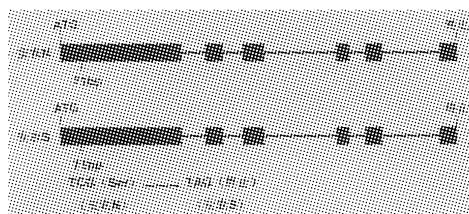
权利要求书 1 页 说明书 19 页 附图 4 页

[54] 发明名称

一种温敏雄性育性基因及其应用

[57] 摘要

本发明公开了一种温敏雄性育性基因及其应用，还公开了上述温敏雄性育性基因的遗传标记，提供了上述温敏雄性育性基因所编码的蛋白质和含有上述温敏雄性育性基因的载体及重组微生物。本发明还公开了上述温敏雄性育性基因在培育温敏雄性不育系中的应用和上述遗传标记在水稻育种中的应用。本发明通过图位克隆技术安农 S-1 温敏不育基因座 *tms5* 获得了温敏育性基因 *TSSNR*，通过转基因实验验证了此基因的功能，并提出了 RNAi 或反义 RNA 或过表达负显性原理的转基因技术，可使正常水稻品种中的 *TSSRZ* 基因功能丧失，培育温敏雄性不育系，具有重要的应用价值。



1. 一种温敏雄性育性基因,其核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:4。
2. 含有权利要求 1 所述温敏雄性育性基因的遗传标记,其特征
在于第 71 位的碱基 C 突变为 A。
3. 权利要求 1 所述温敏雄性育性基因所编码的蛋白质,其特征
在于编码蛋白质的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:5。
4. 含有权利要求 1 所述温敏雄性育性基因的载体。
5. 含有权利要求 1 所述温敏雄性育性基因的重组微生物。
6. 权利要求 1 所述温敏雄性育性基因在培育植物温敏不育系中
的应用。
7. 如权利要求 6 所述的应用,其特征
在于所述的温敏不育系是温敏雄性不育系。
8. 权利要求 2 所述遗传标记在水稻育种中的应用。

一种温敏雄性育性基因及其应用

技术领域

本发明涉及一种温敏雄性育性基因及其应用，属于基因工程领域。

背景技术

植物通过不同品种间的杂交产生杂种。杂种在生长势、适应性、产量等方面具有优势，称为杂种优势。利用杂种优势可以提高农作物的产量、品质和抗性。水稻育种利用杂种优势的途径主要是通过杂交水稻育种，而杂交水稻育种的方式主要有两系法和三系法。三系法育种需要不育系、保持系和恢复系，而两系法只需要不育系和恢复系。两系法中的不育系具有育性转换的特点，其雄性的不育或可育受控于外界的光周期和温度条件，不育系在不同光温条件下可以作为保持系。与三系法相比，两系法具有三大优越性：一是不育系一系两用，不需要保持系，简化了种子生产程序，减少了生产环节和不育系繁殖面积，降低了种子成本；二是配组自由，绝大多数常规品种都可成为恢复系，扩大了杂种优势利用的种质范围，大大提高了选到优良组合的概率；三是不育系的不育性遗传行为简单，较容易转育到其他性状优良的水稻品种（系）中，有利于改良品质、抗性等性状，同时其不育性受细胞核控制，从而避免了细胞质不育对杂种优势的负效应，以及因细胞质单一化而导致某种毁灭性病虫害爆发的潜在威胁（袁隆平，1987）。

目前，在水稻两系法中应用的不育系主要有光敏不育系和温敏不育系。光敏不育系的花粉育性主要受日照长度的控制，在长日照的条件下，

水稻花粉表现为不育，而在短日照条件下，花粉可育；温敏不育系的花粉育性主要受环境温度控制。当环境温度高于某一温度时，水稻花粉表现为不育，而当环境温度低于某一温度时，表现为可育。已发现并定位的光敏不育基因有 3 个，分别是 *pms1* (Zhang 等 1994, Proc Natl Acad Sci U S A. 91:8675-9)、*pms2* (Zhang 等 1994, Proc Natl Acad Sci U S A. 91:8675-9; Liu 等 2001, Mol Genet Genomics 266:271-5) 和 *pms3* (Mei 等 1999, Sci China (Ser C) 42:316-322; Li 等 2001, Euphytica 119:343-348; Li 等 2002, Acta Agron Sin 28:310-314; Lu 等 2005, Mol Genet Genomics 273:507-11)。已发现并定位的温敏不育基因共有 8 个，分别是 *tms1* (Wang 等 1995, Theor Appl Genet 91:1111-1114), *tms2* (Yamaguchi 等 1997, Breed Sci 47:371-373), *tms3* (Subudhi 等 1997, Genome 40:188-194), *tms4* (Dong 等 2000, Theor Appl Genet 100:727-734), *tms5* (Wang 等 2003, Theor Appl Genet 107:917-921; Jiang 等 2006, Chinese Science Bulletin 51:417-420; Yang 等 2007, Planta 225:321-30), *tms6* (Lee 等 2005, Theor Appl Genet 111:1271-1277), *rtms1* (Jia 等 2001, Theor Appl Genet 103:607-612) 和 *Ms-h* (Koh 等 1999, Euphytica 106:57-62)。

温敏不育系安农 S-1 是从安农中发现的自然突变体，其温敏不育性是受一对隐性核基因所控制，其育性转换主要受温度控制，转换温度的起始点为 25°C，即环境温度高于 25°C 时，其花粉表现为不育，而环境温度低于 25°C 时，表现为可育（邓华凤等，1999）。安农 S-1 是目前在两系法育种中广泛应用的两个温敏不育基因之一，以安农 S-1 为温敏不

育基因的供体，已培养多个温敏不育系，广泛应用于水稻育种中。安农 S-1 所携带的温敏不育基因座为 *tms5*，已定位于第二染色体(Wang 等 2003, *Theor Appl Genet* 107:917-921; Jiang 等 2006, *Chinese Science Bulletin* 51:417-420 ; Jiang 等 2006, *Chinese Science Bulletin* 51:417-420; Yang 等 2007, *Planta* 225:321-30)。目前尚未有水稻温敏不育基因 *tms5* 被分离克隆的报道，安农 S-1 温敏不育的分子基础还不清楚，已有技术还不能明确和分离克隆温敏不育基因 *tms5*，不能更好地选育水稻。

发明内容

本发明通过图位克隆 (*map-based cloning*) 技术安农 S-1 温敏不育基因座 *tms5* 获得了温敏育性基因 *TSSNR*，通过转基因实验验证了此基因的功能，并提出了 RNAi (*RNA interference, RNAi*) 或反义 RNA (*anti-sense RNA*) 或过表达负显性 (*dominant negative, DN*) 原理的转基因技术，可使正常水稻品种中的 *TSSRZ* 基因功能丧失，培育温敏雄性不育系。

本发明为克服已有技术的不足，目的在于提供一种温敏雄性育性基因。

本发明的另一个目的是提供上述温敏雄性育性基因的遗传标记。

本发明的另一个目的是提供上述温敏雄性育性基因所编码的蛋白质。

本发明的另一个目的是提供含有上述温敏雄性育性基因的载体。

本发明的另一个目的在于提供含有温敏雄性育性基因的重组微生物。

本发明的另一个目的是提供上述温敏雄性育性基因在培育温敏雄性

不育系中的应用。

本发明的另一个目的是提供上述遗传标记在水稻育种中的应用。

本发明通过以下技术方案实现上述目的。

一种温敏雄性育性基因，其核苷酸序列如 SEQ ID No.1 或 SEQ ID No.4。

上述温敏雄性育性基因的遗传标记，确定第 71 位的碱基 C 突变为 A。

含有上述温敏雄性育性基因所编码的蛋白质，序列为 SEQ ID No.2 或 SEQ ID No.5，或替换、减少或添加一个或几个氨基酸残基形成的具有同等功能的氨基酸序列。

含有上述温敏雄性育性基因的载体。所述的载体包括含有所述核苷酸序列或其片段的克隆载体或表达载体。

含有温敏雄性育性基因的重组微生物。所述的重组微生物是含有所述载体的细菌细胞、含有所述核苷酸序列或其片段的转化的植物细胞。

上述温敏雄性育性基因在培育植物温敏不育系中的应用。所述温敏不育系可以是温敏雄性不育系。

上述遗传标记在水稻育种中的应用。

本发明首先采用分子标记的方法完成安农 S-1 温敏不育基因的精细定位，将安农 S-1 温敏不育基因定位于 8.4 kb 的区域，根据已测定的水稻基因组的序列，该区域只有 3 个编码蛋白的基因。根据水稻基因组测序的结果，设计引物采用 PCR 的方法扩增正常品种安农和温敏不育系安农 S-1 的这 3 个基因的基因组全序列（包括启动子和编码区的序列），将扩增的序列进行测序。比较安农 N 和安农 S-1 的这 3 个基因的全基因组序列，发

现只有一个编码核酸酶 Z (nuclear ribonuclease Z, 简称为 RNase Z 或 RZ) 的基因在安农 N 和安农 S-1 间有差异, 即安农 S-1 中编码区的第 71 位核苷酸由 C 突变为 A, 导致第 24 位的密码子由 TCG 突变为终止密码子 TAG。用 PCR 方法, 从正常品种安农中扩增 RZ 基因的基因组全序列克隆到植物转化载体, 将该载体用农杆菌介导的方法转化安农 S-1 转育的温敏不育系, T₀ 代时, 被转化的温敏不育系即使在高温条件其花粉育性恢复正常, 在 T₁ 代中不同单株的花粉育性在高温条件下出现分离, 即含有转基因的单株花粉育性正常, 而不含转基因的单株花粉不育。同时, 采用 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)的方法降低正常品种中 RZ 基因的表达, 在 T₀ 代中 RZ 基因的表达量下降, 导致正常品种的花粉育性转变为高温(28-35°C)不育和适温(19-24°C)可育。在 T₁ 代中不同单株在高温下出现花粉育性分离, 含有转基因的单株, 表现为温敏雄性不育, 而不含转基因的单株表现雄性育性正常。为了检验这种机制的普遍性, 同样采用 RNA 干扰的方法降低拟南芥中 RZ 同源基因 NUZ (核苷酸水平同源性的 67%) 的表达, 导致拟南芥的花粉育性在高温条件下不育, 而在适温条件下花粉可育, 同样表现为温敏雄性不育。这些结果说明突变的 RZ 基因是温敏不育基因, 将该基因命名为 temperature-sensitive sterile RZ, 其野生型和突变型分别简称为 TSSRZ (SEQ ID NO: 1)和 tssrz (SEQ ID NO: 3)。TSSRZ 及其在其它植物的同源基因如双子叶模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的同源基因序列 NUZ(SEQ ID NO: 4)的表达抑制或其功能缺失突变型表达异常的蛋白, 能导致植物温敏雄性不育。

与已有技术相比, 本发明的具有以下有益效果: (1) 阐明了安农 S-1

的温敏不育的分子机理，获得了安农 S-1 温敏不育基因 *tms5*；(2) 本发明提供的温敏育性基因具有重要的应用价值，是根据所述基因序列信息产生特异性的分子标记或其紧密连锁标记，包括但不限于 SNP（单核苷酸多态）、InDel(插入缺失多态)、RFLP（限制性内切酶长度多态）、CAP（切割扩增片段多态），用这些标记可鉴定水稻或野生稻或杂交后代植株的基因型，用于分子标记辅助选择育种，从而提高育种的选择效率；同时利用已阐明的温敏不育的分子机理培育植物温敏雄性不育系，即利用 RNAi 或反义 RNA (anti-sense RNA) 或过表达负显性 (dominant negative, DN) 原理的转基因技术使正常水稻品种中的 *TSSRZ* 基因和其它植物的 *TSSRZ* 同源基因的功能丧失，实现培育温敏雄性不育系的方法。

附图说明

图 1 是实施例 1 水稻温敏不育基因座 *tms5* 的染色体连锁定位图。

图 2 是实施例 2 正常水稻品种安农 N 的 *TSSRZ* (RA-ANcDNA) 和温敏不育系安农 S-1 的 *tssrz* (RA-AScDNA) 编码区的差异示意图。

图 3 和图 4 是实施例 2 用反转录 PCR 技术检测温敏不育基因 *TSSRZ* 在幼穗的表达，其中图 3 为 *TSSRZ* RT-PCR 扩增的结果图；图 4 为 *actin* RT-PCR 扩增的结果图。两图中，1 为花粉母细胞时期穗，2 为减数分裂时期穗，3 为小孢子早期穗，4 为小孢子晚期穗。

图 5 和图 6 是实施例 3 将正常水稻品种(中化 11)中的 *TSSRZ* 基因导入安农 S-1, 获得的 T0 转化体在高温(28-35°C)下的花粉恢复可育的照片。其中图 5 为未导入 *TSSRZ* 基因的安农 S-1 在高温(28-35°C)下花粉的育性照片；图 6 为导入 *TSSRZ* 基因的安农 S-1 在高温(28-35°C)下花粉的育性

照片。

图 7 为实施例 4 利用 RNAi 技术抑制水稻品种中化 11 的 TSSRZ 表达后, 在高温(28-35°C) 条件下产生不育的照片。

图 8 为实施例 4 利用 RNAi 技术抑制水稻品种中化 11 的 TSSRZ 表达在适温 (19-24°C)下表现花粉可育的照片。

图 9 和图 10 所示为实施例 4 利用 RNAi 技术抑制水稻品种中化 11 的 TSSRZ 表达。图 9 为用 TSSRZ 作为探针 Northern 杂交的结果图, 显示 RNAi 转化系中 TSSRZ 表达水平明显下降, 图 10 为总 RNA 电泳结果图。图中 CK 为未转化的中花 11, 1 和 2 分别为 RNAi 转化株系,

图 11 和图 12 所示是实施例 5 利用 RNAi 技术抑制拟南芥(哥伦比亚生态型)的同源基因 NUZ 的表达。其中, 图 11 为用拟南芥 TSSRZ 作为探针 Northern 杂交的结果图, 图 12 为总 RNA 电泳结果图。图中 CK 为未转化的拟南芥(哥伦比亚生态型), 1 为 RNAi 转化株系。

图 13 和图 14 为实施例 5 利用 RNAi 技术抑制拟南芥的同源基因 NUZ 的表达后, 不同温度条件下花粉萌发的结果。其中, 图 11 为适温 (25°C) 下花粉可以萌发的照片; 图 12 为高温(30°C) 条件下的花粉不能萌发的照片。

图 15 所示为实施例 6 用 SNP 标记 RA1 鉴定正常水稻品种安农 N (AN)和温敏不育系安农 S-1(AS)的温敏育性基因的基因型, 图中 RANR 和 RASR 分别为 TSSRZ 和 tssrz 的特异引物。

具体实施方式

实施例 1 tms5 的精细定位(多态性分子标记的筛选和 tms5 基因的连锁

定位)

根据公开的水稻基因组序列数据库的资料 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 在该区域发展了多个分子标记, 如表 1 所示:

表 1 与 *tms5* 紧密连锁或共分离的多态性分子标记

| 分子标记 | 引物名称 | 引物序列 |
|------|-------|-----------------------------|
| AN1 | AN1F | 5'-CGAGGCCTTGGCAAGGTAG-3' |
| | AN1R | 5'-TACTGAATCAATCTCCGTCTG-3' |
| PL1 | PL1F | 5'-GTTTCATGCATTGAAGGAAGG-3' |
| | PL1R | 5'-GAGTTCTTGGTACATGAGTG-3' |
| NAC1 | NAC1F | 5'-AGCGCACATAGGACAGATAG-3' |
| | NAC1R | 5'-GGTCTTCGTTGGTAACCTCCG-3' |
| RA1 | RA1F | 5'-CAACCTCTTACAGGCTAGATG-3' |
| | RA1R | 5'-AAGATGACGCAGGTCTCCTG-3' |
| | RASR | 5'-TGAGGGGCGGCGCCTTCT-3' |
| | RANR | 5'-TGAGGGGCGGCGCCTTCG-3' |

表 1 中的 AN1、PL1 和 NAC1 为插入/缺失(InDel)标记; RA1 为单核苷酸多态性 (SNP) 标记。SNP 标记的检测方法为: 第 1 次 PCR 用引物“RA1F”与“RA1R”扩增 33 个循环, 然后取 0.5 μ l PCR 产物为第 2 次 PCR 的模板, 每个样品配制 2 个反应, 即用引物“RA1F”与“RASR”为温敏不育基因型的特异反应, 用引物“RA1F”与“RANR”为野生基因型的特异反应, 扩增 8—10 个循环, 用 6% 聚丙烯酰胺凝胶检测 PCR 产物, 见 13 和图 14。

分子标记与目标恢复基因的重组事件越多, 表示两者的遗传距离越远, 反之其遗传距离越近。利用这种遗传作图的方法和安农 S-1 与粳籼 89 杂交的 6000 多株 F_2 植株构建了一个 *tms5* 基因的遗传连锁图, 见图 1。图中 2 个标记 ANIDL76 和 DLNAC1 与 *tms5* 之间分别只有 1 个重组事件

和3个重组事件,而标记IDLPL与tms5基因是零重组即共分离。ANIDL76和DLNAC1之间的物理距离约为8.4 kb。所述的定位区域位于已公开的水稻细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC) OJ1006_D05 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)的约36-45 kb处。

实施例2 tms5的克隆与序列分析

根据GenBank公开的水稻(粳稻)基因组DNA序列和RiceGAAS软件(<http://ricegaas.dna.affrc.go.jp>)分析,在定位的8.4 kb区域内只存在2个预测的基因,这2个基因分别是果胶裂解酶(Pectate lyase, 简称为PL)和核酸酶Z(RNase Z, 简称为RZ)。其中果胶裂解酶基因编码1个446氨基酸的蛋白质,而核酸酶Z基因编码1个302氨基酸的蛋白质。

使用引物PLf (5'-CTCCTCTCGATGCACTCATG-3')与 PLr (5'-GATAGCATGACATGGCATTG-3') 和 RZf (5'-CACGTCGTCAACAACGACTAC-3') 与 RZr (5'-CCTGTTAACCGGTTGAGGTG-3') 从正常品种安农N和温敏不育系安农S-1用PCR技术扩增出PL和RZ基因组全序列(包括启动子与编码区),克隆到质粒载体pUC18。经测序分析,发现PL的DNA序列在安农N和安农S-1之间没有差异,而RZ的DNA序列在安农N和安农S-1之间只有1个核苷酸的差异。并通过测定安农S-1和正常品种间RZ基因的cDNA序列,发现此核苷酸的变异发生在安农S-1的编码区的第71位,即由C突变为A,结果导致密码子由TCG (Ser) 突变为终止密码TAG,产生一个只编码23个氨基酸的截断短肽,见图2。用反转录PCR技术检测到RZ基因在花粉母细

胞时期的幼穗表达，其它时期的幼穗不表达，见图3和图4。因此，此突变的RZ基因可能是产生温敏不育的基因。

实施例3 遗传转化鉴定目标基因的功能

用引物 RZf (5'-GTTCGGTGTGTGAAGGGGTG-3') 与 RZr (5'-CCTGTTAACCGGTTGAGGTG-3') 将从安农 N 扩增的 4 kb 的 RZ 基因片段（包含启动子区、编码区、及其下游区序列）克隆到双元转化载体 pCAMBIA1300。用电激法将该表达载体导入常用的土壤根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 EHA105。通过根癌农杆菌介导法 (Hiei 等, *Plant J.* **6**: 271-282) 转化由安农 S-1 转育的温敏不育系，获得 T₀ 代转基因植株。经分子检测，获得含有外源基因的转化体，这些转化体在高温条件下(28-35°C)花粉育性正常，见图 5 和图 6。

收获 T₀ 代种子，种植 T₁ 代，在高温条件下(28-35°C) T₁ 代花粉育性出现分离，即含有转基因的植株花粉可育，而不含转基因的植株花粉败育。这些结果证明了突变的 RZ 是温敏不育基因。本发明将此基因的野生型和突变型分别命名为 TSSRZ 和 tssrz (temperature-sensitive sterile RZ)。

实施例4 用 RNAi 技术抑制 TSSRZ 基因的表达产生温敏不育转化体

植物转化 RNAi 载体的构建按公开的载体和方法（胡旭霞和刘耀光，植物分子育种，4: 1-6）进行，此 RNAi 载体由组成型的玉米泛素基因启动子控制目的双链 RNA 的产生。用引物 RAZif (5'-aaaaAAGCTTcatggaccagtccgagctc-3') 和 RAZir (5'-aaaaGAATTCgtc

acactgattcagtatctc-3')对花粉母细胞时期的幼穗 cDNA 进行扩增。将扩增得到的 TSSRZ 的 cDNA 片段用 BamH I 和 Hind III 进行双酶切, 连接到 pRNAi-ubi 载体(胡旭霞和刘耀光, 植物分子育种, 4: 1-6)的第一克隆位点。用电激法转化大肠杆菌 Top10F', 再用 pRNAi-ubi 载体通用引物 RNAi-Mlu (5'-CACCCCTGACGCGTGGTGTACTTCTG AAGAGG-3')和 RNAi-Pst (5'-ACTAGAACTGCAGCCTCAGATCTAC CATGGTTC G-3')对克隆的目的片段进行 PCR 扩增, 获得末端含有 Mlu I 和 Pst I 酶切位点的目的片段。将目的片段用 Mlu I 和 Pst I 酶切, 克隆到第一轮阳性载体(也用同样的酶切好)的第二克隆位点, 然后将其转化大肠杆菌 DH10B。将构建好的 RNAi 载体电击转化到农杆菌 EHA105, 用根癌农杆菌介导法(Hiei 等, Plant J. 6: 271-282)转化正常可育水稻品种中花 11, 经筛选获得了含有转基因的 24 株 T₀ 代体。将每个 T₀ 转化体的分蘖分开种植, 在生殖发育对温度敏感的花粉母细胞时期进行高温处理(28-35°C)和适温(19-24°C)处理 7 天。结果高温处理的产生败育花粉且花粉量很少, 而经适温处理的可育花粉量达 50%以上, 结果见图 7 和图 8。适温处理的 T₀ 转化体能结实获得 T₁ 植株。再次对 T₁ 植株进行花粉母细胞发育时期的高温处理(28-35°C)7 天。结果 T₁ 植株的花粉育性出现分离, 即含有 RNAi 转基因的单株花粉败育, 而不含 RNAi 转基因的单株花粉可育。RT-PCR 检测结果表明, 携带 RNAi 转基因的 T₁ 转化体的 TSSRZ 表达受到抑制, 见图 9 和图 10。这些结果说明抑制 TSSRZ 基因的表达产生温敏不育。

实施例 5 拟南芥 TMS5 同源基因 RNAi 载体构建及转化后代分析

用 TSSRZ 基因序列对生物数据库进行同源性搜索 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 获得双子叶模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的同源基因序列 NUZ (SEQ ID NO: 3)。利用 NUZ 特异引物 NUZif (5'-aaaaAAGCTTcacatggatcatatcggtgg-3') 和 NUZir (5'-aaaaGGATCCtccttcactgtataccgagc3') PCR 扩增拟南芥花的 cDNA。将扩增得到的目的片段用 BamH I 和 Hind III 进行双酶切。按实施例 4 相同的方法步骤构建 RNAi 载体。将构建好的 RNAi 载体电击转化到农杆菌 EHA105, 用花器官浸泡法(Clough and Bent 1998, Plant J. 16, 735-743)转化拟南芥(哥伦比亚生态型), 收获的 T₀代拟南芥种子均匀播种在含有潮霉素的培养基上, 在筛选培养基上萌发并存活的植株即为 T₁代阳性植株。在 T₁植株生长到抽苔后的花粉母细胞发育时期, 部分植株进行高温(28-35°C)处理 7 天, 部分植株进行适温(19-24°C)处理。结果高温处理的植株产生花粉败育, 适温处理的植株花粉可育, 见图 11 和图 12。经适温处理的 T₁植株获得 T₂代种子。再次在 T₂植株抽苔后的花粉母细胞发育时期进行高温条件处理, 结果 T₂植株得花粉育性出现分离, 含有 RNAi 转基因的植株花粉败育, 而不含转基因的植株花粉可育。RT-PCR 检测结果表明, 携带 RNAi 转基因的 T₂转化体的 NUZ 表达受到抑制, 见图 13 和图 14。这些结果说明, 采用基因工程方法抑制 TSSRZ 或其同源基因得表达, 或筛选这些基因的自然突变或人工诱变突变体, 可以在单子叶植物和双子叶植物培育温敏雄性不育系, 用于杂交种子生产。

实施例 6 温敏不育基因序列在分子标记辅助选择育种中的应用

利用本发明提供的序列信息可以产生水稻温敏不育基因 *tssrz* 及其紧密连锁的分子标记，用于鉴定水稻 *tms5* 位点的基因型，可在分子标记辅助选择育种中应用。例如，表 1 所示的标记 RA1 可用于鉴定水稻正常可育株和温敏不育株的基因型，结果见图 15，即某个品种用“RA1F”与“RASR”引物组合可以扩增出特异的条带，而用“RA1F”与“RANR”引物组合不能扩增出特异的条带，该品种为温敏不育系；相反即某个品种用“RA1F”与“RASR”引物组合不能扩增出特异的条带，而用“RA1F”与“RANR”引物组合可以扩增出特异的条带，该品种不是温敏不育系。

序列表

<110> 华南农业大学
 <120> 一种温敏雄性育性基因及其应用
 <130>
 <160> 5
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 4070
 <212> DNA
 <213> 正常水稻品种安农N(Oryza Sativa)

<220>
 <221> CDS
 <222> (2006).. (2485)

<223>
 <220>
 <221> CDS
 <222> (2591).. (2686)

<223>
 <220>
 <221> CDS
 <222> (2797).. (2910)

<223>
 <220>
 <221> CDS
 <222> (3288).. (3356)

<223>
 <220>
 <221> CDS
 <222> (3455).. (3529)

<223>
 <220>
 <221> CDS
 <222> (3826).. (3900)

<223>
 <400> 1

```

cctgttaacc ggttgaggtg gtggtgggac agccacgcgc gcgcgcgccg ggctgggccg      60
aggccttggc aaggtaggca ggcggctgct ctctctctct cgttttcatt ttgtaacaga      120
cggagattga ttcagtaatc aatttggttt taacgagagc gaattcattc gatgttaatc      180
atgtgattaa ttacgcagat tgaatccaag tgttatcctt gccttacaat tcctcccagc      240
aacagacaga ggagtaacat ctctctatgt cctagcggac tgtctacttc ctctcagatt      300
ccccttcctt ttcttgagct gcttctggct tccccggttc tgttcaactg cgcgcacggg      360
tgatcaggat gagcaggcct ccggaactcc gtccagttgc gtacctgcat gggtaggcgg      420
gcgatcaagt ttttggggag cgctcttggg cgcgactgct cctgttcgac aacggttcta      480
cactgctaca tcttcgcaa catgtcgacg gacaacacca acaactcgac tggcactgga      540
aagcctcaac tagtacatga gcgttctcag ggtatatgtc cattccctta ccgtaatta      600
tgctgctaga agatthttct gttaatgctt atcgcaatgt tacaattgcg ttactatgtg      660
aatgttatac ttatthttatg aaaagcatgc tcatgctgag caccatcact agatcaattc      720
tcattgcaaa tgcctatgtht attatcttgt tgggtggacct gcagccaatt ttgggtcaag      780
aagagaacga ggtagcggag aggtttgagg tgatgttggt tgggtggagaa atgcgtgaga      840
tgaggattgt gtccgatatt tcacttcgca ccggatgctc gatctgaagc atthttcggat      900
ttgtgattct atthttgaaca thttgtgtgt ggtactgaaa thttccgagat ttcagaaaaa      960
ctthtttaaaa taattcgaac taathtttagc caaatctaaa caaathttgga ccaaatcaaa      1020
aaaaagagaa aaaathttgaa aattatgacg aaatathtttg gtgtccgggtg aggggtccgaa      1080
atthttcgggaa thttccgaacga aaattataaaa cattgtgcat gggagthttaa ttacggggat      1140
gggaathttat cctcatgact ccttgccttt caatacgtctg ggggaattgg gaggaatttc      1200
atcttcactt aaaatctaath ttctttctat actacgtaag actatcggat tgaatccaath      1260
aaacttctaa actgcctaag atatctgtcc aaaattagag ataaattagc aacaccatac      1320
caaaccaacc aaaatgacaa atthaattctc agtccaaaath tacatgcatg gacagtgcag      1380

```


| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|------|
| caacaaccgg | catccatgaa | tccataaacc | gagagtggcc | aaacagctgc | tacttcacct | 1440 |
| gcaactgcaac | ttcttgcgaa | tccttaaccc | tctgaatctg | ataggttgct | aagataatct | 1500 |
| tgcaattgtg | gctttgacac | gacgacgatg | acgaacaccg | cctgattctg | atggagcaga | 1560 |
| agctgccatt | tcccgatggg | cacagcaagc | tattcgaccg | aggaatctct | accttcgctg | 1620 |
| ccgatgcaac | ctcttgcacc | ggcagcaagc | tggttatcgg | tgccgaggag | aagcccttct | 1680 |
| caatgttgat | gttattccaa | tacactccta | taatcgataa | tattgtaagc | taatatattg | 1740 |
| acgtgcaatt | cttttacgtc | ttcgcgaaaa | accggtaatg | tcgtaaggaa | atgcccccaa | 1800 |
| aagctcccac | gtgttcaccc | ttccaacctc | ttacaggcta | gatgttgaag | aagcatcctg | 1860 |
| ggccgttggg | tatcaatcca | acgccagcag | tagtcgaccg | agtagacatt | gacttggggc | 1920 |
| gtgcccggcc | cggcccatcg | tgcttcgtgc | caaaacgggc | cgtgccggaa | caacccccca | 1980 |
| ccacggcggc | ggcggcggcg | gcgccatggc | gaacagcggc | aagtcatcgc | cggcggcgac | 2040 |
| ctccaccacc | gcgccgccac | cgggtcggcc | gaagtccaag | gcgcccccc | tcaccgtcga | 2100 |
| gggctacccc | gtggagggca | tctccatcgg | cgggcaggag | acctgcgtca | tcttcccgac | 2160 |
| gctgagcggc | gccttcgaca | tcggccgggtg | cccgcagcgc | gccgtctcgc | aggagtctct | 2220 |
| cttcatctcc | cacgcccacc | tcgaccacat | cggcggcctc | cccatgtacg | tcgccaccgg | 2280 |
| gggcctctac | cggcagcggc | cgcccacat | cttcatcccc | gcctgcctca | gggaccccgt | 2340 |
| ggagcgcctc | ttcgagctcc | accgctccat | ggaccagtcc | gagctcagcc | acaacctcgt | 2400 |
| ccccctcgag | attggtcagg | agcacgagct | caggagggac | ctcaaagtga | aggccttcaa | 2460 |
| gacctaccac | gccattccca | gccagtgtaa | gggttcatca | gttcttgggt | cttctggatg | 2520 |
| aattattctt | gattgattga | tttggtcgga | aatgtgtggt | gaatttgggt | gagatgtgat | 2581 |
| gtgattgtag | gggtatgtga | tatacacggt | gaagcaaaag | ctcaagccag | agtatcttgg | 2640 |
| cctccctggg | agcgagatca | agcagctgaa | gctgtcaggt | gtggaggtct | gttgttgttt | 2700 |
| tttttttttt | tttgatattg | tggatgtctg | gatgaaatgg | aatacaattc | acaatttagt | 2760 |
| gatgttgggt | atgctgtcgc | tggttctggt | tttcagatta | cgaatacatt | gacgggtcct | 2820 |
| gagattgctt | ttaccggaga | tacgatggca | gatttcattc | ttgatcctga | taatcgggat | 2880 |
| gttttgaagg | cgaaaattct | tgtagtggag | gtattgcttc | ttatcgtcta | tatggttaat | 2940 |
| ttgtttgcaa | ttgtcattgt | tgctattcag | cctgagaaaa | aaaaaagagg | gaaactgttt | 3000 |
| cttcaagcac | ggatatcagt | atattaccaa | gattaatfff | atcaacagaa | ggaaaagcaa | 3060 |
| cagcctttgc | ttttcaggag | agattgattc | caactccata | ttaactgata | actgagtacc | 3120 |
| atfttttcaa | actaaaacct | ttgcggaacc | aattggcagc | aattagtggg | aactatgttg | 3180 |
| cctgaagcat | gtttcagttt | ccattctgaa | tatttattgt | ccttctcctg | acgaaaatftt | 3240 |
| aattatctcc | aaatfttaact | tagtgaactg | tgttctggaa | attgcagagt | actftttgttg | 3300 |
| atgactctgt | tacaattgag | catgcaagag | aatatgggca | cacctatctg | tttgaggfta | 3360 |
| ttcccaaatt | ttgcttattt | catatttctg | tggaaagaaa | acatttcacc | tagcattgct | 3420 |
| aatftttgccc | ttatctftttt | ttttatgtat | gcagatactg | aatcagftgtg | acaaaactftga | 3480 |
| aaacaaagct | attctgctaa | tccactftttc | tgctcgttat | accgcagagg | tgagctatct | 3540 |
| ctgtttgtaat | ccaattfttac | ttatatcatt | ttatcctgat | tcaattagta | atctgtatgc | 3600 |
| tttgtttcaa | ctctgtggat | ttattfttttg | tttcaagcaa | gtttcaccaa | tattgttatt | 3660 |
| ttftaatgcc | atcattatga | gcaggcaaaaa | tgtgccact | tttcttfttag | catectctct | 3720 |
| tcctctftaaa | agtacacatg | tttftgtttc | attctfttaca | aataaataca | tttattcttca | 3780 |
| atftftfttct | caccatcatt | aaacattftca | tcacatctct | ttcaggaaat | tgatatagca | 3840 |
| atcaataagt | tgccaccctc | tttcagaagt | agagttcatg | cattgaaagga | aggftttctga | 3900 |
| caaagatgaa | gtgatcaatc | agaaatgaag | cattcaacct | tactctctct | tcgatgcact | 3960 |
| catgtaccaa | gaactctftt | ttftftfttgg | gggggagggg | gggggatcga | atccttaact | 4020 |
| ctttagtctct | gaaacatttc | tgtagcaccc | cttcacacac | cgaacattaa | | 4070 |

- <210> 2
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> 正常水稻品种安农N(Oryza Sativa)
 <400> 2

Met Ala Asn Ser Gly Lys Ser Ser Pro Ala Ala Thr Ser Thr Thr Ala
 1 5 10 15
 Pro Pro Pro Gly Arg Pro Lys Ser Lys Ala Pro Pro Leu Thr Val Glu
 20 25 30
 Gly Tyr Pro Val Glu Gly Ile Ser Ile Gly Gly Gln Glu Thr Cys Val
 35 40 45
 Ile Phe Pro Thr Leu Ser Ala Ala Phe Asp Ile Gly Arg Cys Pro Gln

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

<210> 3
 <211> 4070
 <212> DNA
 <213> 水稻温敏不育系安农S-1(Oryza Sativa)
 <220>
 <221> CDS
 <222> (2006).. (2485)
 <223>
 <220>
 <221> CDS
 <222> (2591).. (2686)
 <223>
 <220>
 <221> CDS
 <222> (2797).. (2910)
 <223>
 <220>
 <221> CDS
 <222> (3288).. (3356)
 <223>
 <220>
 <221> CDS
 <222> (3455).. (3529)
 <223>
 <220>
 <221> CDS

<222> (3826).. (3900)

<223>

<400> 3

| | | | | | | |
|------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
| cctgttaacc | ggttgagg | gtggtggg | agccacgc | gcgcgcgc | ggctggg | 60 |
| aggccttggc | aaggtagg | ggcggctg | ctctctct | cgttttcatt | ttgtaacaga | 120 |
| cggagattga | ttcagtaatc | aatttggtt | taacgagagc | gaattcattc | gatgttaatc | 180 |
| atgtgattaa | ttacgcagat | tgaatccaag | tgttatcctt | gcgctacaat | tcctcccagc | 240 |
| aacagacaga | ggagtaacat | ctctctatgt | cctagcggac | tgtctacttc | ctcctcgatt | 300 |
| ccccttcctt | ttcctgagct | gcttctggct | tccccggttc | tgttcacttg | cgcgcacggg | 360 |
| tgatcaggat | gagcaggcct | ccggaactcc | gtccagttgc | gtacctgcat | gggtaggcgg | 420 |
| gcgatcaagt | ttttggggag | cgctcttggg | cgcgactgct | cctgttcgac | aacggttcta | 480 |
| cactgctaca | tcttcgccaa | catgtcgacg | gacaacacca | acactcgcac | tggcactgga | 540 |
| aagcctcaac | tagtacatga | gcgttctcag | ggtatatgtc | cattccctta | ccgttaatta | 600 |
| tgctgctaga | agatttttct | gtaaatgctt | atcgcaatgt | tacaattgcg | ttactatgtg | 660 |
| aatgttatac | ttattttatg | aaaagcatgc | tcatgctgag | caccatcact | agatcaattc | 720 |
| tcattgcaaa | tgcatgttt | attatcttgt | tggtggacct | gcagccaatt | ttgggtcaag | 780 |
| aagagaacga | ggtagcggag | aggtttgagg | tgatgttgtg | tggtggagaa | atgcgtgaga | 840 |
| tgaggattgt | gtccgatatt | tcacttcgca | ccggatgctc | gatctgaagc | attttcggat | 900 |
| ttgtgattct | attttgaaca | tttgtgttgt | ggtactgaaa | tttccgagat | tcagaaaaa | 960 |
| ctttttaaaa | taattcgaac | taattttagc | caaactctaa | caaatttggg | ccaattcaa | 1020 |
| aaaaagagaa | aaaatttgaa | aattatgacg | aaatattttg | gtgtccggtg | agggtccgaa | 1080 |
| atttcgggaa | ttccgaacga | aaattataaa | cattgtgcat | gggagtttaa | ttaccgggat | 1140 |
| gggaatttat | cctcatgact | ccctgccttt | caatacgtg | ggggaattgg | gaggaaattc | 1200 |
| atcttcactt | aaaatcta | ttccttctat | actacgtaag | actatcggat | tgaatccaat | 1260 |
| aaacttctaa | actgcctaag | atatctgtcc | aaaattagag | ataaattagc | aacaccatac | 1320 |
| caaaccaacc | aaaatgacaa | attaattctc | agtccaaaat | tacatgcatg | gacagtgcag | 1380 |
| caacaaccgg | catccatgaa | tccataaacc | gagagtggcc | aaacagctgc | tacttcacct | 1440 |
| gcactgcaac | ttcttgcgaa | tccttaacc | tctgaatctg | ataggttgtc | aagataatct | 1500 |
| tgcatttgtg | gctttgacac | gacgacgatg | acgaacaccg | cctgattctg | atggagcaga | 1560 |
| agctgccatt | tcccgatggg | cacagcaagc | tattcgaccg | aggaatctct | accttegctg | 1620 |
| ccgatgcaac | ctcttgcaac | ggcagcaagc | tggttatcgg | tgccgaggag | aagcccttct | 1680 |
| caatgttgat | gttattccaa | tacactccta | taatcgataa | tattgtaagc | taatataattg | 1740 |
| acgtgcaatt | cttttacgtc | ttcgcgaaaa | accggtaatg | tcgtaaggaa | atgcccccaa | 1800 |
| aagctcccac | gtgttcaccc | ttccaacctc | ttacaggcta | gatgttgaag | aagcaterctg | 1860 |
| ggccgttgga | tatcaatcca | acgccagcag | tagtcgaccg | agtagacatt | gacttgggcc | 1920 |
| gtgcccggcc | cggcccatcg | tgcttcgtgc | caaaacgggc | cgtgccggaa | caacccccca | 1980 |
| ccacggcggc | ggcggcggcg | gcgcatggc | gaacagcggc | aagtcacgc | cggcggcgac | 2040 |
| ctccaccacc | gcgcgccacc | cgggtcggcc | gaagtagaag | gcgccgcccc | tcaccgtcga | 2100 |
| gggctacccc | gtggagggca | tctccatcgg | cgggcaggag | acctgcgtca | tcttcccagc | 2160 |
| gctgagcgc | gccttcgaca | tcggccgggtg | cccgcagcgc | gccgtctcgc | aggagtctct | 2220 |
| cttcatctcc | cacgcccacc | tcgaccacat | cggcggcctc | cccatgtacg | tcgccacccg | 2280 |
| gggcctctac | cggcagcgc | cgcccacat | cttcatcccc | gcctgcctca | gggaccccg | 2340 |
| ggagcgcctc | ttcgagctcc | accgctccat | ggaccagtec | gagctcagcc | acaacctcgt | 2400 |
| cccctcagag | attggtcagg | agcacgagct | caggagggac | ctcaaagtga | aggccttcaa | 2460 |
| gacctaccac | gccattccca | gccaggtgaa | gggttcatca | gttcttgggt | cttctgggatg | 2520 |
| aattattctt | gattgattga | tttggtcgga | aatgtgtggt | gaatttgggt | gagatgtgat | 2581 |
| gtgattgtag | gggtatgtga | tatacacggt | gaagcaaaag | ctcaagccag | agtatcttgg | 2640 |
| cctccctggg | agcgagatca | agcagctgaa | gctgtcaggt | gtggaggtct | ggtgtgtgtt | 2700 |
| ttttttttt | tttgatattg | tggtatgtctg | gatgaaatgg | aatacaattc | acaatttagt | 2760 |
| gatgttgttg | atgctgtgcg | tggttctgtt | tttcagatta | cgaatacatt | gacggtgcct | 2820 |
| gagattgctt | ttaccggaga | tacgatggca | gatttcattc | ttgatcctga | taatgcggat | 2880 |
| gttttgaagg | cgaaaattct | tgtagtggag | gtattgcttc | ttatcgtcta | tatggttaat | 2940 |
| ttgttgtcaa | ttgtcattgt | tgctattcag | cctgagaaaa | aaaaaagagg | gaaactgttt | 3000 |
| cttcaagcac | ggatatcagt | atattaccaa | gattaatttt | atcaacagaa | ggaaaagcaa | 3060 |
| cagcctttgc | ttttcaggag | agattgattc | caactccata | ttaactgata | actgagtacc | 3120 |
| attttttcaa | actaaaacct | ttgcggaacc | aattggcagc | aattagtggg | aactatgttg | 3180 |
| cctgaagcat | gtttcagttt | ccattctgaa | tatttattgt | ccttctctctg | acgaaatttt | 3240 |
| aattatctcc | aaatttaact | tagtgaactg | tgttctggaa | attgcagagt | acttttgttg | 3300 |

```

atgactctgt tacaattgag catgcaagag aatatgggca cacccatctg tttgaggtta 3360
ttcccaaatt ttgcttattt catatctctg tggaagaaaa acatttcacc tagcattgct 3420
aattttgccc ttatcttttt ttttatgtat gcagatactg aatcagtggtg acaaacttga 3480
aaacaaagct attctgctaa tccacttttc tgctcgttat accgcagagg tgagctatct 3540
ctgttgtaat ccaattttac ttatatacatt ttatcctgat tcaattagta atctgtatgc 3600
tttgtttcaa ctctgtggat ttatTTTTTg tttcaagcaa gtttcaccaa tattgttatt 3660
ttttaatgcc atcattatga gcaggcaaaa tgtgcccaact tttctttagtag cactctcctt 3720
tcctcttaaa agtacacatg tttgtgtttc attctttaca aataaataca tttatcttca 3780
atTTTTTct caccatcatt aaacatttca tcacatcctt ttcaggaaat tgatatagca 3840
atcaataagt tgccaccctc tttcagaagt agagttcatg cattgaagga aggtttctga 3900
caaagatgaa gtgatcaatc agaaatgaag cattcaacct tactctctc tcgatgcact 3960
catgtaccaa gaactctttt ttttttttgg gggggagggg gggggatcga atccttaact 4020
cttgagtctt gaaacatttc tgtagcacc cttcacacac cgaacattaa 4070

```

<210> 4
<211> 1009
<212> DNA
<213> 拟南芥 (哥伦比亚生态型) (Arabidopsis Thaliana)
<220>
<221> ORF
<222> (80)..(922)
<223>
<400> 4

```

atttcatcga acacttggtg atcaatattt gaaaacgaag agcacagcca aaattcgata 60
aacccaaagg aacagtgaga tggagaagaa gaaagcaatg caaattgaag gttacccgat 120
cgagggatgg tcgattgggt ggcacgagac gtgcatcata tttccatctc ttcggatagc 180
tttcgacatt ggtcgttgc cacaatcgcg aattttctca gacttcctct tcactctca 240
ctctcacatg gatcatalcg gtggattacc aatgtatggt gctactagag gcttgtaaa 300
aatgaagcct ccaacgatta tagtaccgc atccattaaa gaaactggtg agagtttatt 360
cgaagttcac agaaagttag attcttcaga gctaaagcac aatcttggtg gcttggacat 420
aggggaggag tttattataa ggaaagatct caaagtcaaa gcctttaaga cattccatgt 480
catccaaagc cagggttatg tagtgtattc aactaaatat aaactcaaga aggaatata 540
tggcctatct ggaaatgaaa ttaagaactt gaaggtttca ggtggtgaga ttacagacag 600
cataataact cctgaagttg cttttacggg agatacaacg tcggattttg tagttgatga 660
aactaatgct gatgctctca aggcaaaggt tctcgtcatg gagagcacat ttcttgatga 720
ttcggtatcg gtagagcatg cgagagatta tggacatata catatatctg agatagtaaa 780
tcatgctgaa aagtttgaaa acaaagcaat cctgctaate cacttttcgg ctcggtatac 840
agtgaaggaa atcgaagatg cggtttctgc attgectcca ccttttagagg gacgtgtgtt 900
tgcactaaca caaggattct aaacattata acactcttat aggttttaca tacttttgtt 960
tttgtattcc acatgtaaac attgtattct gttgtaatt ttaagattt 1009

```

<210> 5
<211> 280
<212> PRT
<213> 拟南芥 (哥伦比亚生态型) (Arabidopsis Thaliana)
<400> 5

```

Met Glu Lys Lys Lys Ala Met Gln Ile Glu Gly Tyr Pro Ile Glu Gly
1          5          10          15
Leu Ser Ile Gly His Glu Thr Cys Ile Ile Phe Pro Ser Leu Arg
20          25          30
Ile Ala Phe Asp Ile Gly Arg Cys Pro His Arg Ala Ile Ser Gln Asp
35          40          45
Phe Leu Phe Ile Ser His Ser His Met Asp His Ile Gly Gly Leu Pro
50          55          60
Met Tyr Val Ala Thr Arg Gly Leu Tyr Lys Met Lys Pro Pro Thr Ile
65          70          75          80
Ile Val Pro Ala Ser Ile Lys Glu Thr Val Glu Ser Leu Phe Glu Val

```

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| His | Arg | Lys | Leu | Asp | Ser | Ser | Glu | Leu | Lys | His | Asn | Leu | Val | Gly | Leu |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| Asp | Ile | Gly | Glu | Glu | Phe | Ile | Ile | Arg | Lys | Asp | Leu | Lys | Val | Lys | Ala |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| Phe | Lys | Thr | Phe | His | Val | Ile | Gln | Ser | Gln | Gly | Tyr | Val | Val | Tyr | Ser |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| Thr | Lys | Tyr | Lys | Leu | Lys | Lys | Glu | Tyr | Ile | Gly | Leu | Ser | Gly | Asn | Glu |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| Ile | Lys | Asn | Leu | Lys | Val | Ser | Gly | Val | Glu | Ile | Thr | Asp | Ser | Ile | Ile |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| Thr | Pro | Glu | Val | Ala | Phe | Thr | Gly | Asp | Thr | Thr | Ser | Asp | Phe | Val | Val |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | | 190 | |
| Asp | Glu | Thr | Asn | Ala | Asp | Ala | Leu | Lys | Ala | Lys | Val | Leu | Val | Met | Glu |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| Ser | Thr | Phe | Leu | Asp | Asp | Ser | Val | Ser | Val | Glu | His | Ala | Arg | Asp | Tyr |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| Gly | His | Ile | His | Ile | Ser | Glu | Ile | Val | Asn | His | Ala | Glu | Lys | Phe | Glu |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| Asn | Lys | Ala | Ile | Leu | Leu | Ile | His | Phe | Ser | Ala | Arg | Tyr | Thr | Val | Lys |
| | | | 245 | | | | | | 250 | | | | | 255 | |
| Glu | Ile | Glu | Asp | Ala | Val | Ser | Ala | Leu | Pro | Pro | Pro | Leu | Glu | Gly | Arg |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | |
| Val | Phe | Ala | Leu | Thr | Gln | Gly | Phe | | | | | | | | |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | | | | |

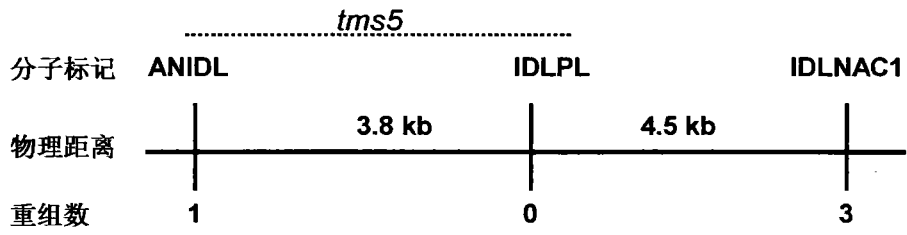


图 1

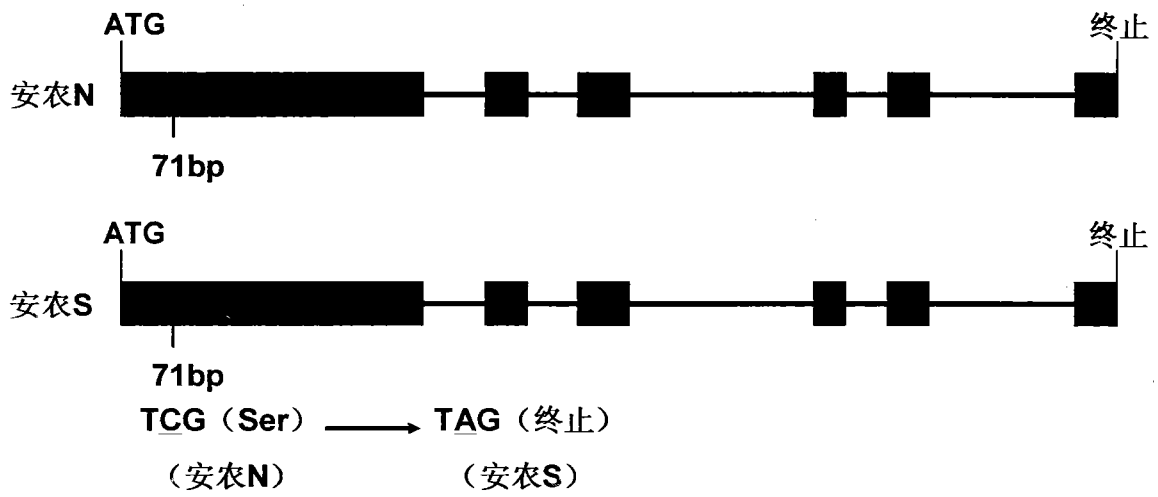


图 2

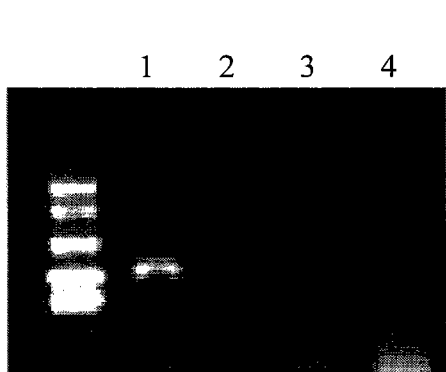


图 3

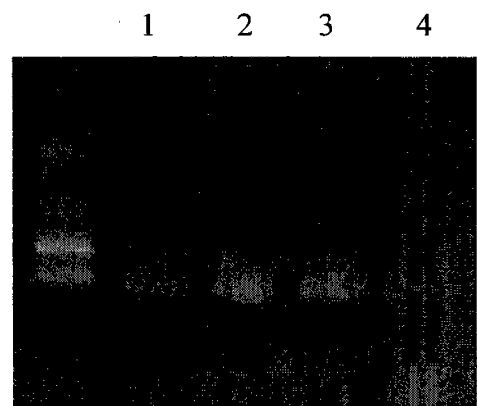


图 4



图 5

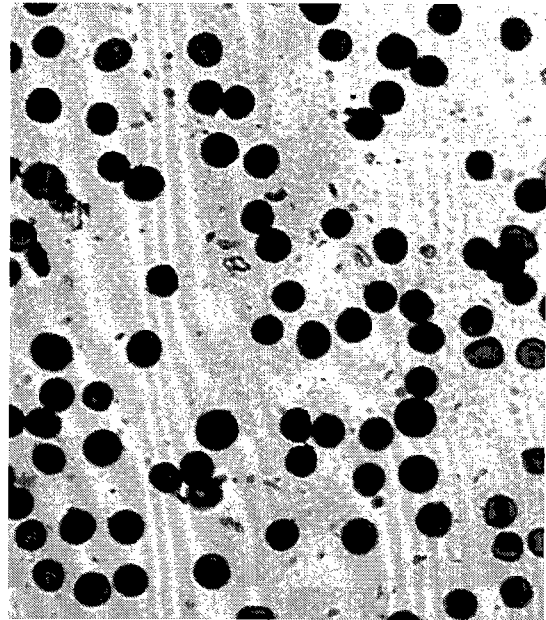


图 6

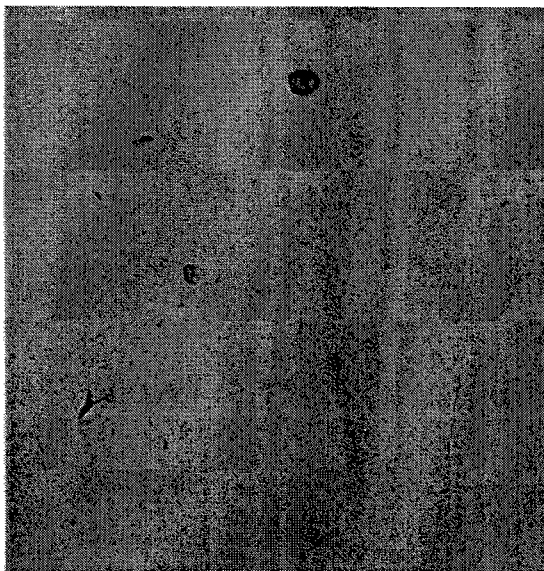


图 7

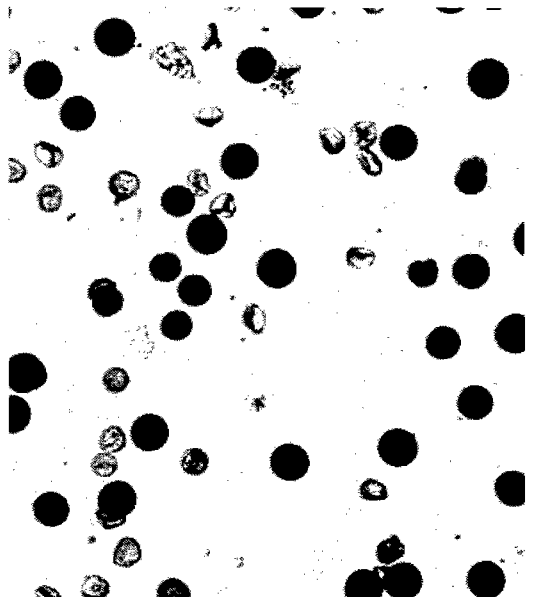


图 8

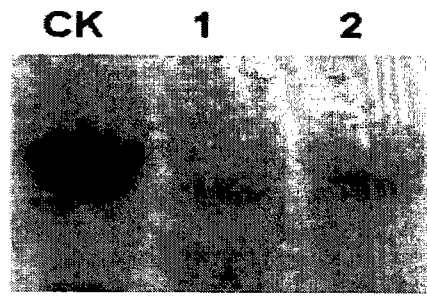


图 9

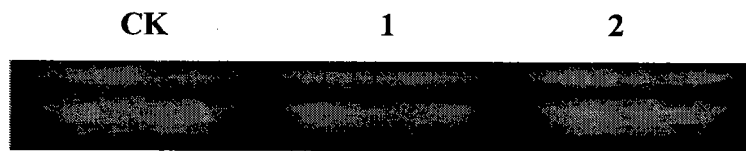


图 10

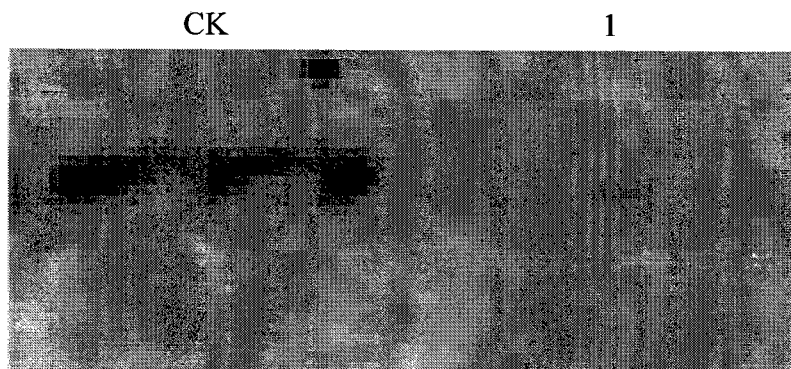


图 11

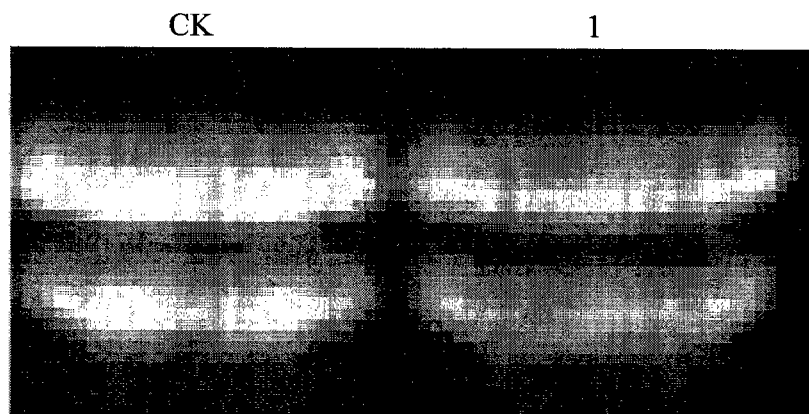


图 12

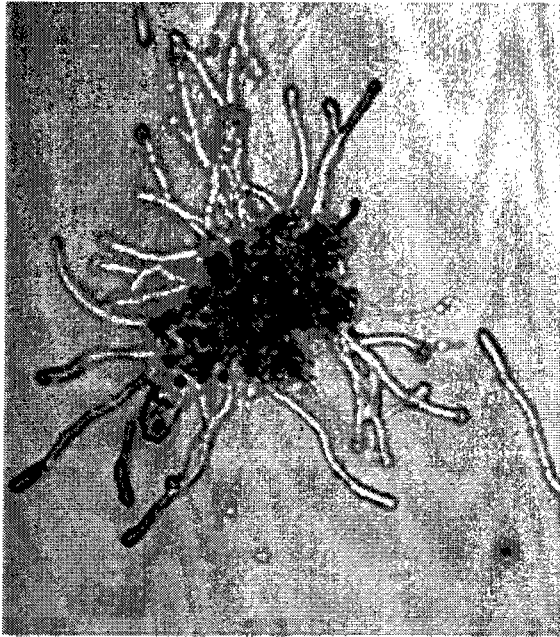


图 13

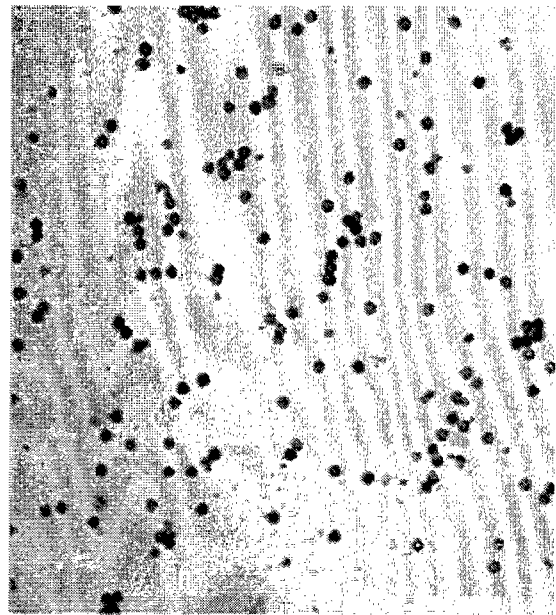


图 14

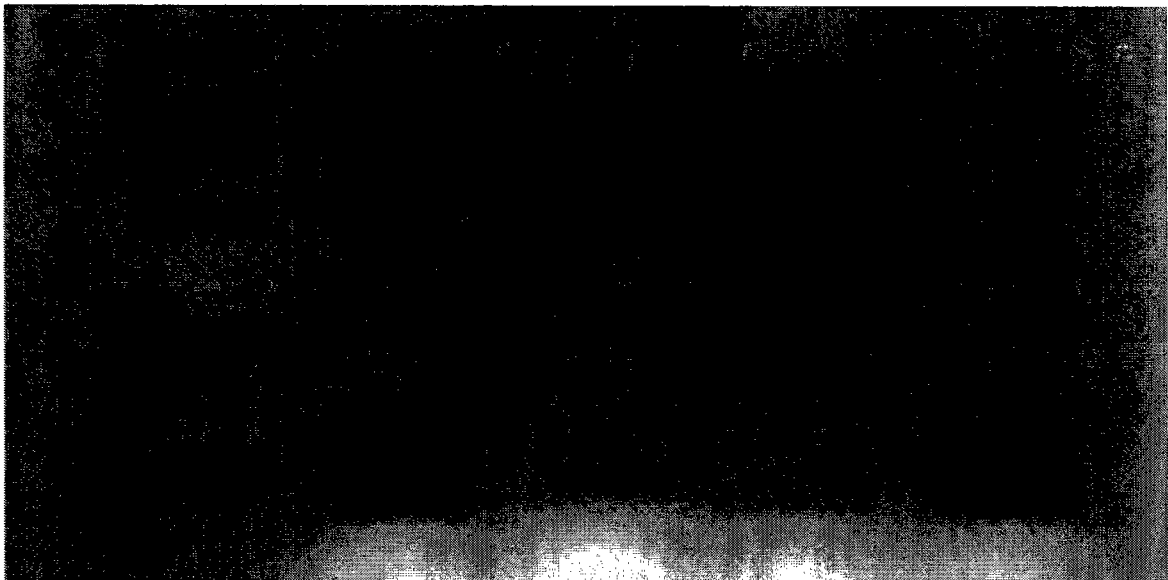
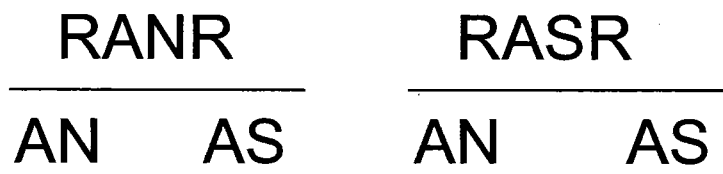


图 15