



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101802190 A

(43) 申请公布日 2010.08.11

(21) 申请号 200880103295.8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008.06.19

C12N 15/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

A01H 3/00 (2006.01)

2007903309 2007.06.20 AU

A01H 5/00 (2006.01)

2008901466 2008.03.26 AU

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.02.12

(86) PCT申请的申请数据

PCT/AU2008/000895 2008.06.19

(87) PCT申请的公布数据

W02008/154695 EN 2008.12.24

(71) 申请人 澳大利亚国立大学

地址 澳大利亚澳大利亚首都直辖区

(72) 发明人 巴里·J·波格森

菲利普·B·威尔逊 简·B·罗塞尔

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 刘蕾 沙捷

权利要求书 3 页 说明书 45 页 序列表 36 页

附图 31 页

(54) 发明名称

提高植物胁迫抗性的方法和材料

(57) 摘要

本发明提供用于获得植物的方法,所述植物相对于野生型植物具有更高的胁迫抗性,方法包括:(a) 将至少一个突变或外源性核酸导入一个或多个植物细胞的基因组中,所述至少一个突变或外源性核酸使所述一个或多个植物细胞中与SAL1或其同源物有关的活性降低;(b) 从所述一个或多个植物细胞再生一个或多个植物;和(c) 选择相对于野生型植物的胁迫抗性提高的一个或多个植物。

1. 用于获得相对于野生型植物胁迫抗性提高的植物的方法,其包括:
 - (a) 将至少一个突变或外源性核酸导入一个或多个植物细胞的基因组中,所述至少一个突变或外源性核酸使所述一个或多个植物细胞中与 SAL1 或其同源物有关的活性降低;
 - (b) 从所述一个或多个植物细胞再生一个或多个植物;和
 - (c) 选择相对于野生型植物胁迫抗性提高的一个或多个植物。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中通过使所述一个或多个植物细胞受化学或物理诱变方法或插入突变方法如转座子或 T-DNA 的作用而导入所述至少一个突变。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其中通过重组方法导入所述至少一个突变。
4. 如权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法,其中所述方法包括向 SAL1 基因或其同源物中导入至少一个突变,或者抑制或阻抑 SAL1 基因或其同源物的表达。
5. 如权利要求 4 所述的方法,其包括向所述一个或多个植物细胞中编码 SAL1 或其同源物的核苷酸序列中导入突变。
6. 如权利要求 5 所述的方法,其中所述突变包括一个或多个核苷酸的插入、缺失或替代。
7. 如权利要求 5 所述的方法,其中所述突变包括在 SEQ ID NO :1 的核苷酸 731 至 745、1226、1518、1519 和 1690 的区域中,或在 SEQ ID NO :1 的至少核苷酸 191-1991 的同源物中 等同位置处的一个或多个核苷酸的插入、缺失或替代。
8. 如权利要求 5 或 6 所述的方法,其中所述突变包括在 SEQ ID NO :1 的位置 1226 处,或在 SEQ ID NO :1 的至少核苷酸 191-1991 的同源物中 等同位置处的由鸟嘌呤至腺嘌呤的突变。
9. 如权利要求 8 所述的方法,其中所述突变导致 SEQ ID NO :2 的位置 217 处发生由甘氨酸至天门冬氨酸的氨基酸变化。
10. 如权利要求 5 或 6 所述的方法,其中所述突变包括在 SEQ ID NO :1 的位置 734 和 735 之间,或在 SEQ ID NO :1 的至少核苷酸 191-1991 的同源物中 等同位置处插入一个或多个核苷酸。
11. 如权利要求 5 或 6 的方法,其中所述突变包括用一个或多个核苷酸替代 SEQ ID NO :1 的核苷酸 735-745,或 SEQ ID NO :1 的至少核苷酸 191-1991 的同源物中 等同的核苷酸。
12. 如权利要求 5 或 6 的方法,其中所述突变包括在 SEQ ID NO :1 的位置 1518 和 1519 之间或包含位置 1518 和 1519,或在 SEQ ID NO :1 的至少核苷酸 191-1991 的同源物中 等同位置处插入一个或多个核苷酸。
13. 如权利要求 10 至 12 中任一项的方法,其中所述一个或多个插入或替代的核苷酸包 括 T-DNA 插入。
14. 如权利要求 5 或 6 所述的方法,其中所述突变包括在 SEQ ID NO :1 的位置 731 处,或在 SEQ ID NO :1 的至少核苷酸 191-1991 的同源物中 等同位置处由胞嘧啶至胸腺嘧啶的突变。
15. 如权利要求 5 或 6 所述的方法,其中所述突变包括在 SEQ ID NO :1 的位置 736 处,或在 SEQ ID NO :1 的至少核苷酸 191-1991 的同源物中 等同位置处由鸟嘌呤至腺嘌呤的突 变。
16. 如权利要求 5 或 6 所述的方法,其中所述突变包括在 SEQ ID NO :1 的位置 1690 处,

或在 SEQ ID NO :1 的至少核苷酸 191-1991 的同源物中相同位置处由鸟嘌呤至腺嘌呤的突变。

17. 如权利要求 5 或 6 所述的方法,其中所述突变是 SAL1 无效突变。

18. 如权利要求 4 所述的方法,其包括向所述一个或多个植物细胞导入阻抑内源性 SAL1 蛋白质或其同源物的表达的外源性核酸。

19. 如权利要求 18 所述的方法,其中所述外源性核酸包括与内源性 SAL1- 编码序列或其同源物的至少一部分同源或互补的核酸序列。

20. 如权利要求 18 或 19 的方法,其中所述外源性核酸与胁迫诱导启动子可操作地连接。

21. 如权利要求 4 所述的方法,其包括向所述一个或多个植物细胞导入用外源蛋白质的表达替代内源性 SAL1 蛋白质或其同源物的表达的外源性核酸。

22. 如权利要求 1 至 21 中任一项所述的方法,其中所得到的植物相对于野生型植物对干旱、盐、温度胁迫或光胁迫、或它们的组合的抗性提高。

23. 如权利要求 22 所述的方法,其中所得到的植物相对于野生型植物至少抗旱性提高。

24. 如权利要求 1 至 23 中任一项所述的方法,其中所述植物选自伞形科、紫菀科、十字花科、藜科 / 苋科、菊科、葫芦科、蝶形花科、禾本科、豆科、早熟禾科、蔷薇科或茄科。

25. 如权利要求 24 所述的方法,其中所述植物是十字花科的成员。

26. 由权利要求 1 至 25 中任一项所述的方法获得的相对于野生型植物胁迫抗性提高的植物。

27. 如权利要求 26 所述的植物,其相对于野生型植物对干旱、盐、温度胁迫或光胁迫、或它们的任何组合的抗性提高。

28. 如权利要求 27 所述的植物,其相对于野生型植物至少抗旱性提高。

29. 如权利要求 26 至 28 中任一项所述的植物,其中所述植物选自伞形科、紫菀科、十字花科、藜科 / 苋科、菊科、葫芦科、蝶形花科、禾本科、豆科、早熟禾科、蔷薇科或茄科。

30. 如权利要求 29 所述的植物,其中所述植物是十字花科的成员。

31. 如权利要求 1 至 25 中任一项所述的方法,其中得到的植物开花时间延迟。

32. 用于获得相对于野生型植物开花时间改变的植物的方法,所述方法包括:

(a) 将至少一个突变或外源性核酸导入一个或多个植物细胞的基因组中,所述至少一个突变或外源性核酸使所述一个或多个植物细胞中与 SAL1 或其同源物有关的活性改变;

(b) 从所述一个或多个植物细胞再生一个或多个植物;和

(c) 选择相对于野生型植物开花时间改变的一个或多个植物。

33. 如权利要求 33 的方法,其中所述至少一个突变或外源性核酸导致与 SAL1 或其同源物有关的活性降低,并且所述方法导致植物开花时间延迟。

34. 如权利要求 31 至 33 中任一项所述的方法,其中所述开花时间延迟约 7 天至约 100 天。

35. 由权利要求 31 至 34 中任一项所述的方法获得的相对于野生型植物开花时间改变的植物。

36. 由权利要求 31 至 34 中任一项所述的方法获得的相对于野生型植物开花时间延迟

的植物。

37. 如权利要求 1 至 25 中任一项所述的方法,其中所得到的植物叶片表型发生变化。

38. 用于获得相对于野生型植物叶片表型变化的植物的方法,所述方法包括:

(a) 将至少一个突变或外源性核酸导入一个或多个植物细胞的基因组中,所述至少一个突变或外源性核酸使所述一个或多个植物细胞中与 SAL1 或其同源物有关的活性降低;

(b) 从所述一个或多个植物细胞再生一个或多个植物;和

(c) 选择相对于野生型植物叶片表型改变的一个或多个植物。

39. 如权利要求 37 或 38 所述的方法,其中所述改变的叶片表型包括更厚叶、更短叶、更圆叶、具有更多浅裂叶缘的叶子,或具有选自下组的两种或多种改变的表型变化的叶片:更厚叶、更短叶、更圆叶和浅裂叶缘叶。

40. 如根据权利要求 37 至 39 中任一项所述的方法获得的相对于野生型植物叶片表型发生变化的植物。

41. 如权利要求 26 至 30、36 或 40 中任一项所述的植物中得到的植物部位或突变 / 转基因种子。

42. 用于筛选植物的方法,所述植物中存在编码 SAL1 或其同源物的核苷酸序列的至少一个突变等位基因,所述方法包括使用至少一个适合作为探针或引物的核酸分子分析植物 DNA,所述探针或引物能在严格条件下与 SAL1 基因或其同源物杂交。

43. 如权利要求 42 所述的方法,包括使用适于扩增 SAL1 基因或其同源物的区域的至少一个寡核苷酸引物对,所述引物对包括检测所述区域中是否存在突变的正向引物和反向引物。

44. 如权利要求 43 所述的方法,其中所述区域包含完整的 SAL1 基因或其同源物。

45. 如权利要求 43 所述的方法,其中所述区域包含 SAL1 基因或其同源物的一部分。

46. 如权利要求 45 所述的方法,其中所述区域包含外显子 3、外显子 3 和 4 之间的内含子、外显子 5、外显子 5 和 6 之间的内含子和外显子 6 和 7 之间的内含子、或它们的任何组合。

提高植物胁迫抗性的方法和材料

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2007 年 6 月 20 日提出的澳大利亚临时专利申请 2007903309 和 2008 年 3 月 26 日提出的澳大利亚临时专利申请 2008901466 的优先权, 每篇文献的全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及植物中的胁迫抗性, 比如抗旱性、抗盐性、抗热或抗旱性、抗光性和抗 pH 性, 以及用于提高植物中胁迫抗性和用于筛选植物中与提高胁迫抗性提高相关的突变的方法和材料。本发明还涉及用于延迟植物中开始开花和改变植物叶片形状的方法和材料。

背景技术

[0004] 全世界作物产量最大的限制因素是非生物胁迫, 导致平均有超过 50% 的潜在产量损失 (Boyer, J. S. (1982), "Plant Productivity and Environment" Science 218(4571) : 443-448)。非生物胁迫包括极端温度、盐度、酸性土壤、高光强、干旱及其组合。

[0005] 因为植物是固定的, 不能逃离这些胁迫条件, 所以它们通过改变蛋白质和代谢物组成、形状和生理而作出响应。这些改变允许植物通过适应胁迫条件而使所受损伤受到限制, 还可以修复由胁迫引起的损伤。

[0006] 这些改变由过程介导, 所述过程可感知胁迫和 / 或其对植物的影响, 并激活多个复杂的信号传导通路。依赖于经历的胁迫条件的类型, 由植物激活不同的通路, 但是通路间经常重叠并且相互作用。这种重叠能引起交叉抗性, 即尽管只接触一种胁迫条件, 却对多种类型胁迫产生抗性。这很重要, 因为胁迫很少单独发生。例如低温胁迫还会导致高光胁迫, 因为尽管低温会引起植物代谢变慢, 但如果光能和从前一样多, 植物还是能丰收。同样地, 干旱能引起高温胁迫, 因为要关闭气孔保持水分, 但是因此牺牲了蒸发的冷却作用, 导致高温胁迫。此外, 在自然中, 胁迫条件很少单独存在。在澳大利亚, 作物同时经历干旱和高光胁迫是可以理解的。

[0007] 尽管已经研究了胁迫信号传导通路的一些组分, 但是由于胁迫响应通路的复杂性, 对这些组分在通路中的位置和它们与其它组分的相互作用知之甚少, 并且因此现有的改善植物胁迫抗性的方法有限。

[0008] 因此, 需要新方法生产胁迫抗性提高的植物。

发明内容

[0009] 本研究令人惊讶地显示了 SAL1 基因中的突变, 所述突变可导致与 SAL1 蛋白质有关的活性降低或消失, 使突变体植物的胁迫抗性提高。

[0010] 因此, 根据本发明的一个方面, 提供用于获得相对于野生型植物的胁迫抗性提高的植物的方法, 方法包括:

[0011] (a) 将至少一个突变或外源性核酸导入一个或多个植物细胞的基因组, 所述至少

一个突变或外源性核酸导致在所述一个或多个植物细胞中与 SAL1 或其同源物有关的活性降低；

[0012] (b) 从所述一个或多个植物细胞再生一个或多个植物；和

[0013] (c) 选择一个或多个相对于野生型植物的胁迫抗性提高的植物。

[0014] 可以通过本领域已知的任何适当方法将至少一个突变或外源性核酸导入。例如，可以通过化学或物理诱变技术，或使用插入突变方法如转座子或 T-DNA，导入突变，并且可以通过重组方法，使用例如化学辅助细胞渗透（使用，例如钙、锂、PEG）、电穿孔、微注射、脂质体介导的转染、微粒轰击（生物弹道）、农杆菌介导的转化、病毒感染、原生质体融合或本领域已知的任何其它合适的方法导入外源性核酸。

[0015] 根据本发明的实施方式，所述方法包括将至少一个突变导入 SAL1 基因或其同源物，或者抑制或阻抑 SAL1 基因或其同源物的表达。

[0016] 可以将至少一个突变导入一个或多个植物细胞中编码 SAL1 或其同源物的核苷酸序列中，并且可以包含一个或多个核苷酸的插入、缺失或替代。

[0017] 根据另一个实施方式，突变可以包括位于 SEQ ID NO :1 的核苷酸 731 至 745、1226、1518、1519 和 1690 区域中，或在 SEQ ID NO :1 的至少核苷酸 191-1991 的同源物中等同位置处的一个或多个核苷酸的插入、缺失或替代。

[0018] 根据另一个实施方式，突变可以包括在 SEQ ID NO :1 的位置 1226 处，或 SEQ ID NO :1 的至少核苷酸 191-1991 的同源物中等同位置处由鸟嘌呤至腺嘌呤的突变。产生的突变可以导致 SEQ ID NO :2 的位置 217 处由甘氨酸至天冬氨酸的氨基酸变化。

[0019] 根据另一个实施方式，突变可以包括在 SEQ ID NO :1 的位置 731 处，或 SEQ ID NO :1 的至少核苷酸 191-1991 的同源物中等同位置处由胞嘧啶至胸腺嘧啶的突变。产生的突变可以导致 SEQ ID NO :2 的位置 124 处由丙氨酸至缬氨酸的氨基酸变化。

[0020] 根据另一个实施方式，突变可以包括在 SEQ ID NO :1 的位置 736 处，或 SEQ ID NO :1 的至少核苷酸 191-1991 的同源物中等同位置处由鸟嘌呤至腺嘌呤的突变。产生的突变可以导致 SEQ ID NO :2 的位置 217 处由谷氨酸至赖氨酸的氨基酸变化。

[0021] 根据另一个实施方式，突变可以包括在 SEQ ID NO :1 的位置 1690 处，或 SEQ ID NO :1 的至少核苷酸 191-1991 的同源物中等同位置处由鸟嘌呤至腺嘌呤的突变。

[0022] 根据另一个实施方式，突变可以包括在 SEQ ID NO :1 的位置 734 和 735 之间，或 SEQ ID NO :1 的至少核苷酸 191-1991 的同源物中等同位置处一个或多个核苷酸的插入，或者突变可以包括用一个或多个核苷酸替代 SEQ ID NO :1 的核苷酸 734-735，或 SEQ ID NO :1 的至少核苷酸 191-1991 的同源物中等同的核苷酸。

[0023] 根据另一个实施方式，突变可以包括在 SEQ ID NO :1 的位置 1518 和 1519 之间或包含位置 1518 和 1519，或在 SEQ ID NO :1 的至少核苷酸 191-1991 的同源物中等同位置处插入一个或多个核苷酸。

[0024] 根据一个实施方式，突变可以是 SAL1 无效突变。

[0025] 根据另一个实施方式，本发明的方法可以包含向所述一个或多个植物细胞导入外源性核酸，所述外源性核酸能抑制内源性 SAL1 或其同源物的表达，或者用外源性蛋白质的表达替代内源性 SAL1 或其同源物的表达。外源性蛋白质可以是外源性突变 SAL1 或其同源物，或者任何其它合适的蛋白质，比如提供可筛选的表型的蛋白质。

[0026] 由根据本发明方法产生的植物对很多非生物胁迫的抗性相对于野生型植物提高,所述胁迫包括,但不限于,干旱、盐、温度胁迫、光胁迫、土壤 pH 和矿物质毒性、或它们的任何组合。相对于野生型植物,所述植物对生物胁迫的抗性提高,所述胁迫由动物(包括食草动物和宠物或寄生生物体)、细菌、真菌和病毒或它们的任何组合诱导,但不限于此。

[0027] 根据一个实施方式,产生的植物相对于野生型植物至少抗旱性提高。

[0028] 根据本发明的方法的另一个实施方式,产生的植物的开花时间延迟。

[0029] 根据本发明的方法的另一个实施方式,产生的植物的叶片表型改变。

[0030] 根据本发明的另一个实施方式,提供用于获得相对于野生型植物的开花时间改变的植物的方法,方法包含:

[0031] (a) 将至少一个突变或外源性核酸导入一个或多个植物细胞的基因组,所述至少一个突变或外源性核酸使所述一个或多个植物细胞中与 SAL1 或其同源物有关的活性降低;

[0032] (b) 从所述一个或多个植物细胞再生一种或多种植物;和

[0033] (c) 选择相对于野生型植物的开花时间改变的一种或多种植物。

[0034] 根据本发明的另一个实施方式,提供用于获得相对于野生型植物叶片表型改变的植物的方法,方法包括:

[0035] (a) 将至少一个突变或外源性核酸导入一个或多个植物细胞的基因组,所述至少一个突变或外源性核酸使所述一个或多个植物细胞中与 SAL1 或其同源物有关的活性降低;

[0036] (b) 从所述一个或多个植物细胞再生一种或多种植物;和

[0037] (c) 选择相对于野生型植物的叶片表型改变的一种或多种植物。

[0038] 还提供通过本发明的方法获得的植物,和植物部位(包括叶、茎、根、块茎、花、果实及其部分)和来自植物的突变体/转基因种子。

[0039] 根据本发明的另一个实施方式,提供筛选存在核苷酸序列的至少一个突变等位基因的植物的方法,所述核苷酸序列编码 SAL1 或其同源物,所述方法包括使用至少一个适合作为探针或引物的核酸分子分析植物的 DNA,所述探针或引物能在严格条件下与 SAL1 基因或其同源物杂交。

[0040] 根据更具体的实施方式,筛选方法可以包括使用适于扩增 SAL1 基因或其同源物区域的至少一个寡核苷酸引物对,所述引物对包括正向引物和反向引物,检测所述区域中是否存在突变。所述区域包含完整的 SAL1 基因或其同源物,或者可以仅包含其中一部分,比如,例如(参照图 10),核苷酸区域,其包含外显子 3、外显子 3 和 4 之间的内含子、外显子 5、外显子 5 和 6 之间的内含子、和外显子 6 和 7 之间的内含子、或它们的任何组合。

[0041] 核酸分子,或寡核苷酸引物对的成员,可以是适于在严格条件下与靶标核苷酸序列特异性杂交的任意长短,并且包含从约 15 个核苷酸到约 100 个核苷酸,但是长度更通常地从约 15 至约 30 个核苷酸。

附图说明

[0042] 图 1-a1x8 中 SAL 基因中点突变的鉴定

[0043] A. 色谱图谱,表示 Col-0 野生型和由逆代杂交得到的多个 a1x8 个体以及

包含 APX2-LUC 构建体的 Col-0 野生型中点突变区域的序列。下划线表示由 Contig Express (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 计算得到的一致性序列。第二个下划线表示来自 Arabidopsis Information Resource (TAIR; www.arabidopsis.org) 的 SAL1 基因序列。点划线框表示点突变的位点, 并且实线框表示为 dCAPS 引物导入的突变。除 APX2-LUC 之外的所有序列为反向, 即 3' 到 5'。

[0044] B. 来自 TAIR 的所有 alx8 个体和 SAL1 基因 +3kb 启动子的所有序列的比对。箭头表示基因序列 5' 到 3' 的方向。

[0045] 图 2-alx8 中 SAL1 基因中点突变的验证

[0046] 将来自拟南芥信息资源 (TAIR) 的 T8H11BAC 的 SAL1 基因和约 1.07kb 的启动子消化并连接进 pCAM2300 文库载体 (CAMBIA, Canberra, Australia)。通过农杆菌介导转化而转化 Col-0 野生型和 alx8 植物。分离得到用基因的野生型拷贝回补的 alx8 的两系。还分离得到七个系的包含构建体的 Col-0 野生型, 并且所述野生型未表现出可见的表型。

[0047] 图 3-alx8 SAL1 基因组序列 (TAIR 登录序列: 4010730406; 名称: AT5G63980.1; 序列长度 (bp): 2122; 最后修正日期: 2007-04-17)。这个序列在序列表中鉴定为 SEQ ID NO: 1。这个基因组序列是此前的 TAIR 登录号 2160829 的更新版本, 并且其位于 TAIR 登录号 2160829 中预测的起始密码子上游 162 个核苷酸处。

[0048] alx8 中的点突变 (g1226a)、起始密码子 (atg) 和终止密码子 (tga) 高亮显示。

[0049] 图 4-alx8 氨基酸序列 (TAIR 登录号: AA 序列: 4010745380; 名称: AT5G63980.1; 长度: 407aa; 最后修订日期: 2007-08-16)。这个序列在序列表中鉴定为 SEQ ID NO: 2。

[0050] alx8 中的氨基酸变化 (G217D) 高亮显示。

[0051] 图 5- 与 SAL1 同源的蛋白质的比对

[0052] 使用 blastp 工具, 在国家生物技术信息中心网站 (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov) 鉴定与 SAL1 同源的蛋白质。然后使用 ClustalW, 在欧洲生物信息研究所 (EMBL-EBI; www.ebi.ac.uk) 比对这些蛋白质。登录号如下: SAL1, AY03894/Q42546 (SEQ ID NO: 46); 水稻 (*Oryza sativa*), NP_001066326/NM_001072858 (SEQ ID NO: 44); 玉米 (*Zea mays*), AAK57915/AF288075 (SEQ ID NO: 45)。“*”表示列中的残基在所有序列中都一样,“:”表示观察到保守替代, 并且“.”表示观察到半保守替代。

[0053] 图 6-EST 与 SAL1mRNA 的同源性

[0054] A. 在基因索引软件网站 (TGI; www.compbio.dfci.harvard.edu) 使用 blastn, 发现 EST 与 SAL1mRNA 具有同源性。通过同样的软件计算得到百分比同一性。

[0055] B. A 中列出的 EST 的序列比对, 在 EMBL-EBI 网站使用 ClustalW 比对序列。“*”表示列中的核苷酸在比对的所有序列中相同。鉴定了序列表中的下述序列: 云杉 (SEQ ID NO: 47); 松树 (SEQ ID NO: 48); 苜蓿 (SEQ ID NO: 49); 莲花 (SEQ ID NO: 50); 大豆 (SEQ ID NO: 51); SAL1 (SEQ ID NO: 52); 油籽 (油菜籽) (SEQ ID NO: 53); 白杨 (SEQ ID NO: 54); 棉花 (SEQ ID NO: 55); 西红柿 (SEQ ID NO: 56); 马铃薯 (SEQ ID NO: 57); 洋葱 (SEQ ID NO: 58); 小麦 (SEQ ID NO: 59); 大麦 (SEQ ID NO: 60); 稻米 (SEQ ID NO: 61); 和玉米 (SEQ ID NO: 62)。

[0056] C. 进化分支图, 显示根据 B 中的比对对共同祖先的估计。由 EMBL-EBI 网站计算。

[0057] 图 7- 干旱条件对 Col-0 野生型、fry1-1 和 alx8 的影响。

[0058] 在 21°C, 150 微摩尔光子 $m^{-2}s^{-1}$, 16 小时白昼 / 8 小时黑夜, 保持水分 13 天。对于每种生态型, 由 5 个生物复制样本作为代表。所有植物都是大概相同的发育年龄, 并且在干旱时期开始时尚未开花: 野生型植物 4 周龄, 而 alx8 和 fry1-1 植物为 8 周龄。

[0059] 图 8-fry1-1 和 alx8 耐旱。

[0060] 4 周龄植物接触干旱条件 25 天, 条件为 21°C, 150 微摩尔光子 $m^{-2}s^{-1}$, 12 小时白昼 / 12 小时黑夜。

[0061] A) 0、10、17、21 和 25 天后, fry1-1、C24 野生型、alx8 和 Col-0 野生型植物接触干旱条件。在两个单独的实验中, 每个基因型由五株植物作为代表。

[0062] B) 由盆重量随时间的变化估计土壤的水流失。给出了 A) 中植物的盆重量和平均盆重量。误差条为五个生物副本之间的标准偏差。

[0063] 图 9- 来自耐干旱拟南芥突变体 SALK-020882 的 SAL1 基因组序列 (突出显示起始密码子 (atg) 和终止密码子 (tga))。从拟南芥生物资源中心 (ABRC) 获得 Col-0 生态型中的 T-DNA 插入系。突变与 alx8 等位。

[0064] A) TAIR 给出的插入位点。通过从 T-DNA 插入的 LB 单次测序而建立。这给出了互补序列, 即朝向基因的 5' 末端。(SEQ ID NO :3)

[0065] B) 为了确认插入的位置, 来自一个植物的 DNA 上的插入的左边界开始进行热不对称交错 PCR (TAIL-PCR)。由两侧获得序列, 表明出现双插入的可能性。获得的序列还表明在插入位点附近缺失 11bp。(SEQ ID NO :4)

[0066] 图 10-SAL1 基因的大规模描述。外显子用方框表示, 内含子用线表示, 箭头代表设计用于扩增的引物 (参见表 1), 还给出了 salk 和 fry1-3 插入的位置, 和 fry1-1、fry1-2、hos2 和鉴别的 alx8 点突变的位置。

[0067] 图 11-SAL1 的 western 印迹。使用抗 SAL1 抗体和来自 Col-0 和 alx8 的全叶蛋白质, 将来自 Col-0、C24、alx8 和 fry1-1 的体内全可溶叶蛋白质提取物中的 SAL1 蛋白质丰度与 5ng 重组 SAL1 蛋白质比较 (图 11B)。使用由 Ponceau 染色检测的二磷酸核酮糖羧化酶的大亚基作为上样对照 (loading control)。分析每个基因型的两株植物, 并标明蛋白质标记的分子量。

[0068] 图 12- 从左至右为下述照片: alx8 突变体、fry1-1 突变体、Col-0 野生型、C24 野生型和 salk_020882 突变体拟南芥植物, 表示与对应于 C24 野生型的叶形改变相比, salk_020882 突变体和 alx8 突变体叶形的改变和 fry1-1 突变体叶形的改变相似。

[0069] 图 13- 表示植物无水存活平均天数的条形图。突变体 salk_020882 表现出最大的耐干旱性, 平均存活 18.4 天, alx8 突变体为 16.3 天, 野生型为 12.0 天 (样品大小: 三株野生型和 alx8 植物和六株 salk_020882 植物)

[0070] 图 14- 照片表示: 最下面一行 - 干旱测试; 最上面一行 - 对照; 从左至右: 野生型植物 (11 天, 干旱胁迫植物即将死亡前), salk_020882 突变体和 alx8 突变体 (两种突变体在 14 天干旱处理后仍然存活)。

[0071] 图 15A 和 15B- 图 15A 显示下述照片, 从左至右为, 在接触干旱条件 0、14、16 和 18 天后 (从上至下), 然后重新浇灌后三天的 Col-0 野生型、alx8、salk_020882、fry1-1 和 C24 野生型植物。重新浇灌三天后, alx8 和 fry1-1 突变植物表现出较强的恢复, 包括叶片绿色并膨胀, 同时野生型植物如果有任何恢复的迹象, 也是表现为大多数叶子变黄和枯萎。所示

植物是三次重复实验的代表,实验涉及每个基因型的五株植物。图 15B 显示干旱处理过程中的土壤水含量 (SWC)。

[0072] 图 16A 和 16B- 图 16A 显示叶片相对水含量 (RWC), 并且图 16B 显示在非胁迫条件下和干旱 12 天后 Col-0 和 alx8 的叶片中的叶片水势。柱为至少四株植物的平均值 \pm 标准偏差 (SD)。

[0073] 图 17- 显示下述照片: 2、3、5 和 8 周龄 Col-0 野生型植物 (上图) 和 alx8 植物 (下图), 表明 alx8 植物中存在发育延迟。还证明 8 周龄 Col-0 野生型植物正在开花 (花籽为证), 同时 alx8 植物还没有开花。

[0074] 图 18-A 显示 Col-0 野生型叶片和 alx8 叶片的叶片厚度的条形图;

[0075] B 显示典型的 Col-0 野生型叶片和 alx8 叶片的横截面。

[0076] 图 19- 表示早晨 (上图) 和晚上 (下图) fry1-1、C24 野生型、alx8 和 Col-0 野生型植物叶片碘染色的结果, 表明这些 SAL1 突变体叶绿体中的淀粉含量显著降低。

[0077] 图 20-SAL1 突变体及其野生型的代谢物谱的主成份分析 (PCA)。使用每个生态型的至少四株生物副本中的超过 150 个代谢物的丰度计算 PCA。绘制出由主成份 1 和 2 (PC1 和 PC2) 考查的总方差百分比。

[0078] 图 21- 显示大小、发育和形态对抗旱性的影响。(A) 在相同发育阶段 (开始开花) 时 Col-0、alx8 和 salk_020882 的抗旱性; 显示了 27 株 alx8 和 5 株 fry1-1 植物在干旱的第 0 天和第 9 天的代表图像。植物每天生长 12 小时。(B) 在发育的相同生长阶段 (成熟绿色) 植物的抗旱性, alx8 和 fry1-1 为四周龄, Col-0 为八周龄。植物为每个生态型的五株生物副本的代表, 生长条件为每天 16 小时。(C) 测量 (A) 的盆重量, 并绘制成初始重量的百分比; 绘制了五个家系中每个的平均值 \pm S. D.。(D) 针对干旱活力, 绘制在两个单独实验中生长的一些 30 日龄 Col-0 植物的莲座区域。生长条件为每天 8 小时。(E) 分离的莲座的脱水。数据为四个生物副本的平均值 \pm SD。实验重复三次。(F) 在相同年龄的 Col-0 (每盆一株植物) 和 alx8 (每盆两株植物) 进行 9 天保水。生长条件为每天 16 小时。

[0079] 缩写

[0080] ABA- 脱落酸

[0081] IP₃-1, 4, 5 三磷酸肌醇

[0082] I(1, 4)P₂-1, 4 二磷酸肌醇

[0083] I(4, 5)P₂-4, 5 二磷酸肌醇

[0084] PAP-3' 多腺苷 5' 磷酸酯

[0085] ROS- 活性氧部分

[0086] WT- 野生型

[0087] 定义

[0088] 如本文所使用的, 术语“包含”表示“主要包括, 但不一定仅包括”。单词“包含”的变化形式, 具有相对应的相似含义。

[0089] 如本文所使用的, 术语“基因”, 指位于基因组中的确定区域, 并且可以包含负责控制表达, 即编码部分的转录和翻译的控制性核苷酸序列。基因还可以包含其它 5' 和 3' 未翻译序列和终止序列。可以存在的其它元件为例如内含子。

[0090] 如本文所使用的, 在描述蛋白质时, 术语“同源”表示在不同部分基本具有相同功

能和相似性质的蛋白质,并且其在至少部分区域中,共享至少 50%氨基酸同一性。这种同源蛋白质可以在完整的氨基酸序列中共享至少约 30%氨基酸同一性,至少约 40%氨基酸同一性,至少约 50%氨基酸同一性,至少约 60%氨基酸同一性,至少约 70%氨基酸同一性,至少约 80%氨基酸同一性,至少约 90%氨基酸同一性或至少约 95%氨基酸同一性。相似地,核苷酸分子的同源性是编码在不同部分基本具有相同功能和相似性质的蛋白质的核酸分子,其中所述编码的蛋白质在至少部分区域中,共享至少 50%氨基酸同一性(这种核酸同源性由于基因编码的简并性和不同植物种属之间优选密码子用途之间的差异而共享显著少于 50%的同一性),可以在完整的氨基酸序列中共享至少约 30%氨基酸同一性,至少约 40%氨基酸同一性,至少约 50%氨基酸同一性,至少约 60%氨基酸同一性,至少约 70%氨基酸同一性,至少约 80%氨基酸同一性,至少约 90%氨基酸同一性或至少约 95%氨基酸同一性。

[0091] 如本文所使用的,术语“突变”表示相对于野生型多肽或核酸分子,多肽或核酸分子中的任何变化,由这种变化产生“突变体”,并且“突变体”可以例如包含单个或多个氨基酸或核苷酸变化,或者同时包含核苷酸和氨基酸变化,包括点突变、无效突变、移框突变,并且可以包含一个或多个核苷酸或氨基酸的缺失、插入或替代,其可以包含天然或非天然发生的核苷酸或氨基酸或其类似物。

[0092] “核酸”,如本文所表示的,指脱氧核糖核酸或核糖核酸及其单链、双链或三重形式的聚合物。该术语可以包括包含天然核苷酸的类似物的核酸,所述天然核酸与参照核酸具有相似的结合活性。特定的核酸序列还可以包含其经过保守修饰的变体(例如简并密码子替代物)和互补序列。术语“核酸”、“核酸序列”或“多核苷酸”也可以与基因、cDNA 和由基因编码的 mRNA 交替使用。

[0093] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可以交替使用,指氨基酸残基的聚合物。这些术语的范围中包括聚合物,其中一个或多个氨基酸残基可以包含相应天然发生的氨基酸的人工化学类似物,以及,或者替代天然发生的氨基酸聚合物。术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”还可以包括包括修饰的聚合物,比如,但不限于,糖基化、脂质吸附、硫酸化、谷氨酸残基的 γ 羧化作用、羟基化和 ADP-核糖基化。

[0094] 术语 SAL1 和 FRY1 如本文所使用的,可互换,术语 SAL1 和 FRY1 亦然,这些术语指相同的蛋白质和编码核苷酸序列。

具体实施方式

[0095] 本发明基于下述发现:在 SAL1 编码基因中具有突变的植物对胁迫的耐受性提高,包括提高抗旱性。

[0096] SAL1 蛋白质是双功能的,具有肌醇多磷酸酯 1-磷酸酶活性和 3'(2'),5'-二磷酸核苷酸酶活性,并且参与 IP_3 的分解代谢, IP_3 是涉及压力信号传导的小分子。有多种肌醇磷酸酶或 P₁ase,其都从 IP_3 分子上的不同位置剪切磷酸酯。这些不同的活性,除了全部导致 IP_3 降低外,经常产生不同表型,可能是由于水解产物的功能功能,比如 I(1,4) P_2 和 I(4,5) P_2 。表型差异还可能由于这些已经被极大削弱的酶的第二种活性,比如 SAL1 的核苷酸酶活性。此外,酶的定位和表达水平的差异可能影响表型。令人惊讶的是,SAL1 对 IP_3 的体外活性相对较低(特别是和它的核苷酸酶比较)。

[0097] 已经分离了 SAL1 中的多个突变体,并称为 fry1 突变体 (fieryl;Ishitani, M., L. M. Xiong 等 (1997),“Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in Arabidopsis: Interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways”, *Plant Cell* 9(11):1935-1949; Xiong, L. M., B. H. Lee 等 (2001),“FIERY1 encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in Arabidopsis”, *Genes & Development* 15(15):1971-1984) 或 hos2 突变体 (“high expression of osmotic stress regulated gene expression 2”; Lee, H., L. Xiong 等 (1999),“Cold-regulated gene expression and freezing tolerance in an Arabidopsis thaliana mutant”, *The Plant Journal* 17(3):301-308; Xiong, L., H. Lee, 等 (2004),“A single amino acid substitution in the Arabidopsis FIERY1/HOS2 protein confers cold signaling specificity and lithium tolerance”, *The Plant Journal* 40:536-545)。如先前所报道的,在选择胁迫响应基因 RD29A 的表达变化中分离这些突变体。在正常条件下 fry1-1 突变体的 RD29A 表达增加,在低温、盐和渗透胁迫和 ABA 处理后也是如此。据报道这是由于点突变产生 SAL1 蛋白质 (At5g63980) 的第六个外显子中的终止密码子,产生截短型蛋白质,其不包含保守的 α -螺旋, α -螺旋包含 WD-X₁₁-GG 基序,是金属离子和磷酸盐的协调以及亲核水活化所需的。结果是蛋白质对 IP₃ 或 PAP 无活性。据报道 fry1-1 突变体对盐、低温和渗透压的胁迫敏感性增加 (Xiong 等, 2001)。胁迫响应基因表达,比如 HSP70 (At1g16030)、COR15A (At2g42540)、KIN1 (At5g15960) 和 ADH (At1g77120),与野生型相比,在对胁迫响应时在突变体中也增加 (Xiong 等, 2001),使人们相信 SAL1 作为压力胁迫途径的负调节子。也报道了其它 fry1 突变体, fry1-2 和 fry1-3,是具有相似性质的无效突变 (Xiong 等, 2001)。hos2-1 突变体是温度敏感突变体,其中胁迫响应基因表达在低温改变,并且是低温胁迫敏感型 (Xiong 等, 2004)。与野生型植物相比,这个突变体的基因表达在正常条件下或通过渗透或 ABA 胁迫不会改变 (Lee 等, 1999)。在 fry1 或 hos2 突变体中未报道干旱、盐、光、冷或热耐受性。

[0098] 本发明人先前在正常条件和高光胁迫后筛选抗氧化酶抗坏血酸过氧化物酶 2 (APX2) 诱导变化的突变体中,已经分离了拟南芥突变体, alx8。在两种条件下 alx8 突变体的 APX2 表达均增加,并且叶形变化,抗旱性增加 (Rossel, J. B., P. B. Walter 等. (2006),“A mutation affecting ASCORBATE PEROXIDASE 2 gene expression reveals a link between responses to high light and drought tolerance”, *Plant, Cell and Environment* 29(2):269-281)。发现这些性质共分离 (co-segregating),表明它们是单点突变的结果。还发现 alx8 改变了多个胁迫响应基因的表达,表明参与拟南芥中干旱胁迫响应信号传导的多个途径的差异调节。然而,这个突变体的本质至今为止尚未确定。在突变体的定位克隆后,发现突变位于先前鉴别的 SAL1 基因中。对这个基因的无效突变体 fry1-1 的研究,现在表明还增加了抗旱性。另一个拟南芥突变体,命名为 salk_020882,其在 SAL1 基因中包含约 10kb T-DNA 插入,对其已经进行了研究,发现相对于野生型植物增加了抗旱性。因此,通过修饰这个基因的表达可能改善农业上具有重要意义的植物品种的抗旱性。

[0099] 因此,本发明提供用于获得相对于野生型植物的胁迫抗性提高的植物,包括:(a) 将至少一个突变或外源性核酸导入一个或多个植物细胞的基因组中,使所述一个或多个植

物细胞中与 SAL1 或其同源物有关的活性降低 ;(b) 从所述一个或多个植物细胞再生一个或多个植物 ;和 (c) 选择相对于野生型植物的胁迫抗性提高的一个或多个植物。根据实施方式,方法包括向 SAL1 基因或其同源物导入至少一个突变,或者抑制或阻抑 SAL1 基因或其同源物的表达。

[0100] 可以通过本领域已知的任何合适的方法,将导致一个或多个植物细胞与 SAL1 或其同源物有关的活性降低的突变导入所述一个或多个植物细胞中,例如,合适的方法可以包括使一个或多个植物细胞(其可以是植物种子细胞,或植物部位的细胞,以及分离的植物细胞)接触化学或物理突变手段,或插入突变手段如转座子、还原转座子、逆转录病毒或 T-DNA。合适的用于将突变导入植物基因组的材料和方法也在例如国际专利公开 W098/26082, "Arabidopsis Protocols"(2nd Edition, Salinas, J. 和 Sanchez-Serrano, J., eds, Methods in Molecular Biology 323(2006), Humana Press), 和 "Current Protocols in Molecular Biology"(Ausubel 等 (eds), John Wiley & Sons (2000)) 中描述,其通过引用并入本文。

[0101] 还通过用野生型植物与包含突变的植物(如先前通过基因筛选和/或分析所确定的-包含期望突变的植物可以已经存在于提供的植物种质/培养物/种子收集物/变体中)杂交而将突变导入一个或多个植物细胞,并且植物可以由得到的种子产生,然后筛选突变继承。

[0102] 根据本发明的实施方式,将突变导入所述一个或多个植物细胞中编码 SAL1 的核苷酸序列或其同源物,并且突变可以包括编码 SAL1 的核苷酸序列或其同源物中一个或多个核苷酸的插入、缺失或替代。在一个实施方式中,突变是 SAL1 无效突变。或者,突变可以产生表达产物,然而其与 SAL1 或其同源物有关的活性至少降低。在本研究过程中鉴别的 SAL1 突变导致相对于野生型植物,包括 fry1-1、alx8 和 salk_02882 突变体,拟南芥植物的抗旱性至少提高。fry1-1 突变导致从色氨酸到终止密码子的第 341 个氨基酸的变化,产生缺失 α 5 螺旋的截短型蛋白质,所述螺旋是酶活性所需要的 (At5g63980)。alx8 突变体具有点突变,包括在 At5g63980.1 基因组序列中第 1226 个碱基对上鸟嘌呤到腺嘌呤的变化 (TAIR 序列 :4010730406 (2007 年 4 月 17 日), 登录号 :NM_125794.4 :SEQ ID NO :1 的 1226 位置)。alx8 突变体表达突变的 SAL1 蛋白质,包含氨基酸序列的第 217 个氨基酸上甘氨酸到天冬氨酸的氨基酸变化 (TAIR 序列 :4010745380 (2007 年 8 月 16 日), 登录号 :NP_201203.2 :SEQ ID NO :2), 并且 salk_02882 突变体在 SEQ ID NO :1 的位置 734 和 735 之间包含约 10kb T-DNA 插入或替代 SEQ ID NO :1 的核苷酸 735 至 745。期望具有更高胁迫抗性的其它突变体,包括抗旱性更高的突变体,是 fry1-2、fry1-3 和 hos2 突变体。fry1-2 突变体包括在 At5g63980.1 基因组序列中第 736 个碱基对上鸟嘌呤到腺嘌呤的变化 (TAIR 序列 :4010730406, 登录号 :NM_125794.4 :SEQ ID NO :1 的 736 位置), 导致位置 126 (SEQ ID NO :2) 的谷氨酸残基替代成赖氨酸,产生无活性蛋白质。fry1-3 突变体在 At5g63980.1 基因组序列中第 1518 个碱基对上第五个和第六个外显子之间包含 6.7kb T-DNA 插入 (TAIR 序列 :4010730406, 登录号 :NM_125794.4 :SEQ ID NO :1 的 1518 位置), 导致没有 RNA 转录本。hos2-1 突变体在 At5g63980.1 基因组序列中第 731 个碱基对上包含胞嘧啶到胸腺嘧啶的突变 (TAIR 序列 :4010730406, 登录号 :NM_125794.4 :SEQ ID NO :1 的 731 位置), 导致位置 124 (SEQ ID NO :2) 的丙氨酸残基由缬氨酸替代,产生具有温度敏感活性的表达蛋白质。

[0103] 根据本文提供的教导,仅通过常规实验,可以获得或产生 SAL1 的其它突变体,或其同源物,并且,例如,这种核苷酸序列(和编码蛋白质)表现出高保守程度-参见,例如,图 5 和 6。

[0104] 本发明的方法能应用本领域已知的任何诱变剂(使用本领域同样已知的方法),包括,但不限于紫外光、X-射线辐射、 γ 辐射或快中子突变、N-乙基-N-亚硝基脲(ENU)、甲基亚硝基脲(MNU)、甲苄肼(PCR)、三乙撑蜜胺(TEM)、丙烯酰胺单体(AA)、苯丁酸氮芥(CHL)、美法仑(MLP)、环磷酰胺(CPP)、二乙基磺酸(DES)、乙基甲磺酸(EMS)、甲基甲磺酸(MMS)、6-巯基嘌呤(6-MP)、丝裂霉素 C(MMC)、N-甲基-N'-亚硝基-N-亚硝基胍(MNNG)、 $^3\text{H}_2\text{O}$ 和尿烷(UR)。

[0105] 接触一种或多种诱变剂的基因修饰率可以通过改变处理剂量和/或重复次数而调节,并且能为具体应用定制。在一个实施方式中,处理剂量和方案基本不诱导对于一个或多个细胞的细胞毒性。

[0106] SAL1 或其同源物中的突变,可以检测,然后(在后面几代中)通过使用本领域公知的技术,用已知的 SAL1 DNA 序列,和根据编码 SAL1 或其同源物的基因或核苷酸序列的合适探针或引物检测。如果突变在 SAL1 以外的基因中,在植物传代中跟踪/追踪之前需要鉴别、定位和/或识别突变。用于鉴别、定位和识别未知突变的合适方法对于本领域人员已知,并且在很多公知的标准文本中描述,比如 Sambrook, J. 等, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), Sambrook, J. 和 Russell, D. W. (2001), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 和本文引用的文献,和 Ausubel 等 (eds) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (2000)。还参见 Rossel, J. B., Cuttriss, A. 和 Pogson, B. J. "Identifying Photoprotection Mutants in *Arabidopsis thaliana*" in *Methods in Molecular Biology* 274 :287-299 (Carpentier, R. Ed, Humana Press)。鉴别突变等位基因的更新的方法包括 "Tilling" 和高分辨熔融 (HRM)。

[0107] TILLING (基因组中的靶向诱导局部损伤) 是分子生物学中的方法,允许特定基因中突变的定向鉴别。方法将标准技术(例如,用化学诱变剂如乙基甲磺酸(EMS)诱变)与可以鉴别靶基因中单碱基突变(也称作点突变)的敏感的 DNA 筛选技术相结合。第一篇描述拟南芥中 TILLING 的论文 (McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S, "Targeted screening for induced mutations", *Nat Biotechnol.* (2000) Apr ;18(4) :455-7, 通过交叉引用并入本文) 使用 dHPLC HPLC 鉴别突变。所述方法通过使用限制性酶 *Cel-I* 结合基于凝胶的系统鉴别突变而获得更高的通量 (Colbert T, Till BJ, Tompa R, Reynolds S, Steine MN, Yeung AT, McCallum CM, Comai L, Henikoff S, "High-throughput screening for induced point mutations", *Plant Physiol.* (2001) Jun ;126(2) :480-4, 也通过交叉引用并入本文)。其它突变检测,比如重测序 DNA, 已经与 TILLING 结合。已经使用 TILLING 作为其它生物体如斑马鱼、玉米、小麦、稻米、大豆、马铃薯和莴笋中的反向基因方法。还参见 :McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S. "Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics" *Plant Physiol.* (2000) Jun ; 123(2) :439-42 ;Colbert T, Till BJ, Tompa R, Reynolds S, Steine MN, Yeung AT, McCallum CM, Comai L, Henikoff S. High-throughput screening for induced point mutations",

Plant Physiol. (2001) Jun ;126(2) :480-4 ;Draper BW, McCallum CM, Stout JL, Slade AJ, Moens CB, "A high-throughput method for identifying N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-induced point mutations in zebrafish", *Methods Cell Biol.* (2004) ;77 :91-112 ;和 Slade AJ, Fuerstenberg SI, Loeffler D, Steine MN, Facciotti D, "A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING", *Nat Biotechnol.* (2005) Jan ;23(1) :75-81, 也通过交叉引用并入本文。

[0108] HRM(高分辨熔融)是近来的进展,其能通过利用高分辨熔融设备最近的进展和双链特异性 DNA(dsDNA)结合染料的进展的优势,极大地扩展传统 DNA 熔融分析的用途,其中所述染料能以足够高的浓度使用,使 PCR 过程中产生的所有双链位点饱和(参见 http://www.corbettlifescience.com/control.cfm?page=Introduction_4&bhcp=1),以及:Dufresne SD, Belloni DR, Wells WA, Tsongalis GJ, "BRCA1 and BRCA2 Mutation Screening using SmartCyclerII high-resolution melt curve analysis", *Arch Pathol Lab Med* (2006) 130 :185-187 ;Graham R, Liew M, Meadows C, Lyon E, Wittwer CT, "Distinguishing different DNA heterozygotes by high resolution melting", *Clinical Chemistry* (2005) 51 :1295-1298 ;Hermann MG, Durtschl JD, Bromley K, Wittwer CT, Voelkerding KV, "Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes", *Clinical Chemistry* (2006) 52 :494-503 ;Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, Wittwer C, "Genotyping of single nucleotide polymorphisms by high resolution melting of small amplicons", *Clinical Chemistry* (2004) 50 :1156-1164 ;Margraf RL, Mao R, Highsmith WE, Holtegaard LM, Wittwer CT, "Mutation Scanning of the RET protooncogene using high resolution melting analysis", *Clinical Chemistry* (2006) 52 :138-141 ;NGRL (Wessex) Reference Reagent Report January 2006, "Plasmid based generic mutation detection reference reagents; production and performance indicator field trial" (www.ngrl.org.uk/Wessex/downloads.htm) ; NGRL (Wessex) Reference Reagent Report January 2006, "Production and field trial evaluation of reference reagents for mutation screening of BRCA1, BRCA2, hMLH1 and MSH2" (www.ngrl.org.uk/Wessex/downloads.htm) ; NGRL (Wessex) Reference Reagent Report January 2006, "Mutation Scanning by High Resolution Melts: Evaluation of Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Science), HR-1™ and 384 well LightScanner™ (Idaho Technology)" (www.ngrl.org.uk/Wessex/downloads.htm) ;Reed GH, Wittwer CT, "Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high resolution melting analysis", *Clinical Chemistry* (2004) 50 :1748-1754 ;Willmore-Payne C, Holden JA, Tripp S, Layfield LJ, "Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis", *Human Pathology* (2005) 36 :486-493 ;Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ, "High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen" *Clinical Chemistry* (2003) 49 :853-860 ;Worm J, Aggerholm A, Guldborg P, "In-tube DNA methylation profiling by fluorescence melting curve

analysis”*Clinical Chemistry*(2001)47 :1183-1189 ;Zhou L,Myers AN,Vandersteen JG,Wang L,Wittwer CT,“Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye”*Clinical Chemistry*(2004)50 :1328-1335; 和 Zhou L,Wang L,Palais R,Pryor R,Wittwer CT,“High-resolution DNA melting analysis for simultaneous mutation scanning and genotyping in solution”*Clinical Chemistry*(2005)51 :1770-1777。

[0109] 可以设计寡核苷酸引物或用其它技术选择 SAL1 基因或其同源物中突变 / 插入的家系。通过培养,然后开发植物家系,其中 SAL1 基因或其同源物的突变拷贝同源。为此可以设计 PCR 引物,使大部分 SAL1 基因(或其同源物)的编码序列使用来自待检测种属的 SAL1 基因或其同源物的序列特异性扩增(参见,例如,Baumann 等(1998),“Successful PCR-based reverse genetics screens using an En-1-mutagenised *Arabidopsis thaliana* population generated via single-seed descent”,*Theor. Appl. Genet.* 97 :729-734)。

[0110] 可以从突变体群落或现有种质,使用按照本发明表征的不同基因型(比如抗旱性、SAL1 相关活性降低,或与野生型植物相比基因表达的变化),分离其它 SAL1- 类突变体。在合适的生长时期并施加合适的非生物胁迫如保水后,可以选择 SAL1 突变体的基因型。然后由 SAL1 基因或其同源物中的突变引起的基因型可以通过本领域公知的分子手段构建。

[0111] SAL1- 类突变体,包括等位基因杂合的突变体,并且其可以表达胁迫抗性基因型,也可以如后所述筛选,并且筛选用于培养过程将突变渗入同源系的突变体或为产生突变体植物而在重组技术中分离并使用的突变体基因。

[0112] 本发明的突变体可以通过随机诱变产生(或者已经存在),任何植物都可以重组改造,使其表现出相似的基因型,例如一旦确定了突变如突变的 SAL1 基因的基因基础。对于植物转化和再生的常规描述可参见,例如,Walbot 等(1983)in “Genetic Engineering of Plants”,Kosug 等(eds)Plenum Publishing Corporation,1983 和“Plant Cell,Tissue and Organ Culture :Fundamental Methods”,Gambor 和 Phillips(Eds.),Springer-Verlag,Berlin(1995)。还可参见 Sambrook J. 等,*Molecular Cloning*,Cold Spring Harbor Laboratory(1989),Sambrook J. 和 Russell,D.W.(2001),“*Molecular Cloning :A Laboratory Manual*”,3rd edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,和其中引用的文献,和 Ausubel 的(eds)*Current Protocols in Molecular Biology*,John Wiley & Sons(2000)。

[0113] 例如,本发明的方法包含向所述一个或多个植物细胞插入外源性核酸,所述核酸抑制内源 SAL1 或其同源物的活性的表达(例如,通过调节区域,其调控 SAL1 或其同源物、SAL1- 编码序列或其同源物,或由 SAL1- 编码序列或其同源物翻译的 mRNA 的表达),或者用外源蛋白质的表达替代内源 SAL1 或其同源物的表达。外源蛋白质可以是外源的突变 SAL1 或其同源物,或者任何合适的蛋白质,比如提供可筛选基因型的蛋白质。

[0114] 在一个实施方式中,外源性核酸可以包含寡核苷酸或多核苷酸,其向编码 SAL1 或其同源物的内源核苷酸序列中,通过同源重组导入包含单个或多个核苷酸插入、缺失或替代的突变。

[0115] 可以通过用导入的靶向核苷酸序列与靶突变位点重组而导入单个或多个核苷酸插入、缺失或替代。例如,这样的导入核苷酸序列可以包含待导入的核苷酸序列,其任一側

为与靶序列同源连续序列所侧翼包围,或者其位于期望的突变插入位点任一侧。按照本发明的方法,待导入基因组的核苷酸序列还可以包括与期望的调节域可操作连接的选择性标记(其可以包括,例如,胁迫诱导启动子)。

[0116] 与靶序列同源的核苷酸序列可以与靶序列同基因,从而提高同源重组的效率。

[0117] 还可以使用并非严格与靶序列同基因的同源核苷酸序列。尽管同源核苷酸序列和靶序列之间的错配能降低同源重组效率,但是不严格要求同基因,基本同源即足够。就本发明而言,同源序列和靶序列之间同源水平可以是至少约 90% 同一性,至少约 95% 同一性,至少约 99% 同一性或 100% 同一性。

[0118] 靶核苷酸序列可以包含于载体中。代表性载体包括质粒、粘粒和病毒载体。载体还可以包含包括表达调控元件的核酸,比如转录/翻译调控信号、复制起点、多腺苷化信号、内部核糖体进入位点、启动子、增强子等,其中调控元件与编码基因产物的核苷酸可操作地相关。这些和其它常用载体元件的筛选是常规的,并且很多这样的序列源自商业提供载体。参见,例如,Sambrook, J. 等, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), Sambrook, J. 和 Russell, D. W. (2001), “*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*”, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 和其中引用的文献和 Ausubel 等 (eds) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (2000)。

[0119] 可以使用本领域已知的任何合适的用于将 DNA 导入细胞的方法,将靶向载体导入靶向细胞,包括但不限于微注射、电穿孔、磷酸钙沉淀、脂质体介导的传递、病毒感染、原生质体融合和颗粒介导的摄入。

[0120] 可选地,用重组酶例如 recA, 将靶向 DNA 共施用与靶细胞,从而增强同源重组的效率。必要时,靶细胞可以已经包含,或已经通过转化而包含合适的靶序列。例如,可以如美国专利 6, 255, 113 所述将重组酶蛋白质载于靶向 DNA 上。为了增强载入过程,靶向 DNA 可以包含一个或多个同源核酸序列。靶向 DNA 还可以通过将靶向多核苷酸与重组酶一起孵育而包被重组酶蛋白质,其中重组酶与多核苷酸是非共价结合。参见,例如, A. Vergunst 等 (1998), *Nucleic Acids Res.* 26 :2729 和 A. Vergunst 和 P. Hooykaas (1998), *Plant Molec. Biol.* 38 :393-406, 国际专利公开 WO 99/25821, WO 99/25840, WO 99/25855, 和 WO 99/25854 和美国专利 5, 780, 296, 6, 255, 113, 和 6, 686, 515。

[0121] 根据进行本发明方法的另一个实施方式,可以通过由 RNA 干扰 (RNAi)、反义或翻译后基因沉默技术抑制 SAL1 mRNA (或其同源物) 的翻译而产生相对于野生型植物的胁迫抗性提高的植物。可以使用来自物种的靶向下调 SAL1 基因或其同源物,或其片段,调控编码蛋白质的产生。为此可使用全长反义分子。或者,可以使用双链寡核苷酸、正义和/或反义寡核苷酸,或它们的组合靶向 SAL1 编码 RNA 特定区域。使用寡核苷酸分子降低预定基因的表达水平在本领域中已知(参见,例如,Hamilton, A. J. 和 Baulcombe, D. C. (1999), “A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants”, *Science* 286 :950-952; Waterhouse P. M. 等 (1998), “Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 :13959-13964; 和国际专利公开 WO 99/53050, WO 99/49029, WO 99/32619)。可以通过用 DNA 构建体转化植物细胞而原位提供寡核苷酸分子,其一旦转录,可产生双链和/或反义 RNA 序列,所述序列可以是全长或部分

序列。基因沉默技术可以通过过量产生正义和 / 或反义序列 (可以是全长或部分) 而增强, 从而产生大量 dsRNA。

[0122] 可以使用本领域技术人员已知的标准植物转化方法产生具有上述转基因之一的转基因植物, 例如, 农杆菌介导的转化、原生质体的阳离子或聚乙二醇处理、电穿孔、微粒轰击、用包被转化 DNA 的微球或微粒搅拌溶液中的细胞悬浮液、直接 DNA 摄入、脂质体介导的 DNA 摄入等, 如很多公开文本中所述, 比如: “Methods for Plant Molecular Biology” (Weissbach & Weissbach, eds., 1988); Clough, S. J. 和 Bent, A. F. (1998) “Flora dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*” *Plant J.* 16, 735-743; “Methods in Plant Molecular Biology” (Schuler & Zielinski, eds., 1989); “Plant Molecular Biology Manual” (Gelvin, Schilperoort, Verma, eds., 1993); 和 “Methods in Plant Molecular Biology—A Laboratory Manual” (Maliga, Klessig, Cashmore, Gruissem & Varuer, eds., 1994)。还参见 Sambrook, J. 等, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), Sambrook J. 和 Russell, D. W. (2001), “*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*”, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 和其中引用的文献和 Ausubel 等 (eds) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (2000), 这些文献通过交叉引用并入本文。

[0123] 转化的优选方法依赖于待转化的植物。经常使用农杆菌载体转化双子叶物种。对于单子叶物种的转化, 经常使用基因枪轰击包被转化 DNA 的颗粒和包被转化 DNA 的硅纤维, 用于核转化。然而, 现在已知农杆菌介导转化单子叶植物包括小麦的方法 (参见, 例如, 国际专利公开 WO 97/48814; 还参见 Hiei, Y 等 (1994), *Plant J.* 6(2): 271-282 和国际专利公开 WO 92/06205)。

[0124] 用于转化选择的植物的 DNA 构建体可以包含与合适的 5' 调节序列 (例如, 启动子和翻译调节序列) 和 3' 调节序列 (例如, 终止子) 可操作连接的目的编码序列。在优选的实施方式中, 编码域位于有效的组成型启动子之下, 比如花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 启动子或玄参花叶病毒 35S 启动子。期望用于本发明的其它组成型启动子包括, 但不限于: T-DNA 甘露氨酸合成酶、胭脂氨酸合成酶 (NOS) 和章鱼碱合成酶 (OCS) 启动子。

[0125] 在本发明的范围中也期望在诱导型启动子下表达正义或反义 SAL1- 编码序列的转基因植物。本发明特别期望胁迫诱导型启动子, 比如高光、干旱、盐度或温度诱导型启动子。根据本发明可以使用的启动子包括, 例如, 用于在光合作用组织中表达的二磷酸核酮糖羧化酶 (RuBisCo) 小亚基基因启动子或叶绿素 a/b 结合蛋白质 (CAB) 基因启动子; 用于在种子中表达的各种种子储存蛋白质基因启动子; 或者用于在转化植物的根系统中表达的根-特异性谷氨酰胺合成酶基因启动子。

[0126] 编码域还与合适的 3' 调节序列可操作地连接。例如, 可以使用胭脂氨酸合成酶 (NOS) 多腺苷化域或章鱼碱合成酶 (OCS) 多腺苷化域。

[0127] 使用农杆菌二元载体系统进行转化, 在如上所述的组成型或诱导型启动子调控下的选择的编码域, 可以与核药物抗性标记连接, 比如卡那霉素抗性。其它选择性标记系统包括, 但不限于: 携带抗生素抗性 (例如, 对潮霉素或双丙氨磷抗性) 或杀虫剂抗性 (例如, 对磺酰脲、草丁膦或草甘膦的抗性) 的其它基因。

[0128] 可以使用本发明的方法转化任何植物细胞。用这种方式,可以获得基因修饰的植物、植物细胞、植物组织、种子等。根据一个实施方式,待转化的植物细胞可以选自经济和/或农业经济上重要的植物家族,包括伞形科 (Apiaceae)、紫菀科 (Asteraceae)、十字花科 (Brassicaceae)、藜科 (Chenopodiaceae)/ 苋科 (Amaranthaceae)、菊科 (Compositae)、葫芦科 (Cucurbitaceae)、蝶形花科 (Fabaceae)、禾本科 (Gramineae)、豆科 (Leguminosae)、早熟禾科 (Poaceae)、蔷薇科 (Rosaceae) 或茄科 (Solanaceae)。

[0129] 已经转化的细胞可以按照本领域已知的常规方法在植物中生长(参见,例如,McCormick, S. 等 (1986), Plant Cell Reports 5 :81-84)。得到的植物可以使自花授粉,用同样的转化株或不同转化株或混合株授粉,并且鉴别与 SAL1 或其同源物有关的活性降低或失活的植物。可以生长两代或多代,确保这种基因型特性能稳定保持。或者,在生长繁殖的作物中,通过剪切或通过组织培养技术产生相同的植物,可以繁殖成熟突变体/转基因植物。可以进行突变体/转基因植物的选择,并且可以获得并繁殖新品种用于商业用途。

[0130] 可以根据缺少 SAL1 蛋白质或其同源物或其活性,或通过增加胁迫(比如干旱)抗性,使用特异性寡核苷酸探针和/或靶基因的扩增,筛选通过本发明的方法转化/突变的植物。

[0131] 根据本发明的实施方式,得到的植物相对于野生型植物,对干旱、温度胁迫、光胁迫或任何其它非生物或生物胁迫,或它们的任何组合的抗性提高。根据本发明的具体实施方式,得到的植物至少相对于野生型植物的抗旱性提高。

[0132] 在本研究的过程中,还发现影响植物中 SAL1 活性的突变可以以特有的方式影响开花时间,以及叶形,并且与野生型相比,显著影响突变植物的代谢。

[0133] 具体地,研究的所有 SAL1 突变体中的开花时间都显著延迟,研究的植物延迟约 4-5 周(从而使开花时间延迟约 100%)。依赖于引起开花时间延迟的突变或内源核酸,和突变或外源性核酸导入的植物,可以期望开花时间延迟不同时间,例如开花时间可以延迟从约 7 天至约 100 天,比如约 14 天至约 80 天,约 21 天至约 60 天,约 25 天至约 50 天,约 30 天至约 40 天,约 10 天,约 20 天,约 25 天,约 30 天,约 35 天,约 40 天,约 45 天,约 50 天,约 60 天,约 80 天或约 100 天。SAL1 活性改变,其包括但不限于过表达,也可以以近似的时间推迟开花时间。

[0134] 叶形也受到显著影响,导致叶片厚度比野生型植物厚,并且还更短、更圆,浅裂叶缘更多。观察到的叶片表面有起伏,并且叶柄长度减小,使叶莲座变成卷心菜样外观。叶片表明的起伏增加能增加边界层效应,减少蒸发。

[0135] 代谢组学分析表明,两种突变体都表现出相似的明显代谢重建,包括暗示胁迫抗性的多胺、腐胺的水平增加,和很多未知的可能的渗透保护剂糖衍生物的积累。

[0136] 还提供由本发明的方法获得的植物部位,包括但不限于获得自植物的叶、茎、根、块茎、花、果实和种子。

[0137] 检测 SAL1 或其同源物中突变的方法

[0138] 筛选存在编码 SAL1 或其同源序列至少一个突变等位基因的植物,可以包含使用至少一个适合作为探针或引物的核酸分子分析植物的 DNA,所述探针或引物能与 SAL1 基因或其同源物在严紧条件下杂交。在更具体的方法中,筛选方法可以包括使用至少一个适合扩增 SAL1 基因或其同源物的寡核苷酸引物对,其中包含正向引物和反向引物,检测在所述

区域中是否存在突变。区域可以包括完整的 SAL1 基因或其同源物,或者可以仅包括其中部分,比如,例如(并参照图 10),包含下述的核苷酸区域:外显子 3,外显子 3 和 4 之间的内含子,外显子 5,外显子 5 和 6 之间的内含子,外显子 6,和外显子 6 和 7 之间的内含子,或它们的任何组合。

[0139] 来自待评价客体的 DNA 可以通过本领域技术人员已知的很多合适的方法提取,比如很多公知文本所述,包括(但不限于)Sambrook, J. 等, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), Sambrook, J. 和 Russell, D. W. (2001), “*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*”, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 和其中引用的文献, 和 Ausubel 等 (eds) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (2000), 其通过交叉引用并入本文。还参见 Lukowitz, W., Gillmor, C. S. 和 Scheble, W-R. (2000) “*Positional Cloning in Arabidopsis: Why It Feels Good to Have a Genome Initiative Working for You*” *Plant Physiology* 123, 795-805 中所述方法, 和其中引用的文献。

[0140] 一旦已分离合适的 DNA, 可以通过本领域已知的任何合适方法分析是否存在突变, 并且使用何种方法 / 策略依赖于期望的特异性, 和是否可用合适的序列和 / 或酶进行限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析。合适的方法可以涉及在突变特异性探针和至少部分 SAL1 基因或其同源物之间标记的杂交产物, 或者更通常地, 通过使用引物和合适的探针, 或使用用于 SAL1 基因或其同源物的特异性部分扩增的一对引物 (正向和反向引物) 扩增至少部分 SAL1 基因或其同源物, 然后进行扩增 DNA 的直接部分和 / 或完全测序, 或其 RFLP 分析。用于扩增 SAL1 基因的的部分的合适引物对提供于表 1 中 (还参见图 10) - 可以根据 SEQ ID NO: 1 设计其它合适的引物或引物对用于分析 SAL1 基因或其同源物, 所述序列以 At5g63980 (TAIR 序列: 4010730406, 登录号: NM_125794. 4) 或其同源物 (参见, 例如, 图 6B) 提供。

[0141] 用于 PCR 扩增反应中的方法和试剂为本领域技术人员所公知。合适的规程和试剂在很大程度上依赖于个体环境。可以从多种来源获得指南, 比如例如 Sambrook, J. 等, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), Sambrook, J. 和 Russell, D. W. (2001), “*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*”, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 和其中引用的文献, 和 Ausubel 等 (eds) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (2000), 其通过交叉引用并入本文。

[0142] 本领域的技术人员将容易理解的是, 可以改变 PCR 反应的各种参数而不影响扩增期望产物的能力。例如 Mg^{2+} 浓度和使用的温度可以改变。类似地, 用作模板的基因组 DNA 的量还可以依赖于提供的 DNA 的量而改变。

[0143] 分析扩增的 DNA 以确定是否存在突变的其它方法为本领域中技术人员所公知。例如, 在用合适的限制性酶消化扩增的 DNA 以检测 SAL1 基因或其同源物中的突变后, 可以通过多种合适的方法包括电泳分析 DNA。特别是琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳, 这是本领域的技术人员常用的技术, 用来根据大小分离 DNA 片段。凝胶中琼脂糖或聚丙烯酰胺的浓度在很大程度上决定了凝胶的解析能力, 并且因此琼脂糖或聚丙烯酰胺的合适的浓度将依赖于待识别的 DNA 片段的大小。

[0144] SAL1 基因或其同源物中突变存在的检测和 / 或确定可以使用任何合适的软件由

计算机分析辅助进行。合适的用于比较已确定核苷酸序列的软件包在本领域中公知,并且容易获得。

[0145] 现在描述本发明的优选形式,仅通过实施例的方式,参照下述实施例,包括可比数据,并且其不应视为以任何方式对本发明的范围或精神的限制。

实施例

[0146] 实施例 1- 材料与方法

[0147] 植物和生长条件

[0148] 用甲磺酸乙酯 (EMS) 诱变已经用 APX2 启动子 - 荧光素酶报告子基因 (APX2 :LUC) 构建体转化的拟南芥种子 (Karpinski, S. 等 (1999), *Science* 284 :654-657), 并且从源自 500M1 亲本的植物池中筛选 M2 植物 (参见 Ball, L. 等 (2004), *Plant Cell* 16 :2448-2462)。如 Rosset, J. B. 等 (2004), *Methods in Molecular Biology* 274 :287-300 所述, 使用发光计数器为 96 孔微孔板中每株幼苗发射的光子计数, 进行突变体筛选。为了确认改变的 APX2 表达的重复性, 使用冷却 CCD 照相机 (Model DV 435, Andor Technology, Tokyo, Japan), 将包含 APX2 :LUC 的四周龄拟南芥植物成像。在成像前, 用包含几滴 Tween80 的 1mM D- 荧光素 (BIOSYNTH, Staad, Switzerland) 溶液喷洒植物, 并保持生长光条件 5 分钟。使用 Image-Pro 软件 (Media Cybernetics ;Carlsbad, CA, USA) 分析用 CCD 照相机获得的图像。鉴别了几株 APX2 :LUC 表达改变的突变体, 包括突变体 a1x8, 其中 APX2 :LUC 表达增加, 并且还表现出抗旱性提高, 以及叶形改变。

[0149] 对于 fry1-1 无效突变的种子保存液, 由拟南芥生物资源中心 (Columbus, Ohio) 获得 salk 020882 插入突变体和野生型 (WT) 哥伦比亚植物。此处的 WT 所有参照请参照哥伦比亚生态型 ;salk1 和 salk2 指来自 salk_020882 家系种子保存液的 T3 代的两株相同植物。fry1-1 突变是在 C24 野生型背景中发生的, 并且是第三次逆代杂交。

[0150] 对于在土壤中的生长, 在早期实验中, 将一些拟南芥种子洒在盆 (4cm×4cm×6cm) 中的无菌土壤 (1 份蛭石对 4 份土壤) 上, 并且在后期实验中, 植物在 metro mix 土壤 (35% 加拿大泥煤苔, 19% 珍珠岩 500, 40% 蛭石, 1.5g L⁻¹ 石灰) 上生长。在 4°C, 黑暗中保持 72 至 96 小时, 人工促进种子开花结果。然后将幼苗转移至生长室, 在约 21±2°C, 以 100-160 微摩尔光子 m⁻²s⁻¹ 进行 12 小时光照 /12 小时黑暗的循环。选择光照较短的循环以促进生长。为了促进开花, 在同样的条件下生长植物, 但是用 16 小时光照。使用保鲜膜保持环境湿度, 直至幼苗生成。使幼苗稀疏至每盆一株, 定位群体除外, 其每盆两株生长。用 0.5× 荷格兰特 (Hoaglands) 培养基每十四天晚上为植物杀菌一次 (Hoaglands 和 Arnon, 1950)。还将底盘从边缘旋转至光源的中心, 保持所有植物都具有相似的生长条件。而且, 在可能时, 将进行相同实验的植物紧挨着在相同的底盘中生长, 使它们经历相同的生长条件。

[0151] 对于在组织培养基上发芽的种子, 在层流中完成表面杀菌。将种子置于 1.5mL Eppendorf 管中, 并用 1mL 70% 乙醇洗涤 3 分钟。将种子在台式离心机 (14,000rpm) 中旋转 30 秒, 并去除乙醇。在 1mL 漂白溶液 (3% 次氯酸钠, 75% H₂O+1 滴 Tween-20 清洁剂) 中重新悬浮并洗涤种子 5 分钟。如前旋转种子。进行 5 个洗涤和离心步骤, 每次洗涤使用 1mL 无菌水, 每次旋转后弃去水。在涂布在 Murashige 和 Skoog (MS) (GibcoBRL, USA) 植物应用琼脂上之前将种子重新悬浮于无菌水中。MS 琼脂由下述组成 :4.3g/L MS 盐、20g/L 蔗糖、

1mL/L 维生素、7g/L 植物凝胶,用 KOH 将 pH 调至 5.8,溶于 MilliQ 处理后的水中。当需要进行筛选时,琼脂中包含抗生素:30–50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素 (MP Biomedical, Solon, OH, USA),或 30 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素 (GibcoBRL)。用铝箔包被平板,并将平板置于 4°C 72 小时以促进开花,然后放置在 21°C 的生长柜中,24 小时光照,100 微摩尔光子 $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$,或者在与土壤中植物相同的条件下生长。

[0152] 胁迫条件

[0153] 对于干旱胁迫实验,在正常条件下放置底盘,并在底盘上随机分布生物副本,每两天轮换一次,以控制光密度、温度和空气接触的差异。在处理前一天和 $t = 0$ 天浇灌植物,将过量的水倒出底盘,表明植物在干旱实验开始时相对土壤水含量为 100%。每天为每个盆称重,如下计算得到相对水损失%:

[0154]

$$\frac{(\text{初始重量(g)} - \text{目前重量(g)}) \times 100}{\text{初始重量(g)}} = \text{相对土壤水损失(\%)}$$

[0155] 对于低温胁迫,土壤中生长的植物接触 24 小时低温胁迫 (4°C),使用 1 微摩尔光子 $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的光照。

[0156] 对于盐胁迫,土壤中生长的植物从下用 NaCl 溶液浇灌,每两天浇灌一次。

[0157] 培养基上生长的植物的胁迫处理

[0158] 在涂布在包含适当浓度的蔗糖、甘露醇、LiCl、NaCl 或甲基紫罗碱的培养基上之前,如常将种子杀菌。然后如常人工促进平板发育和生长。观察对于发芽和幼苗生长的影响。

[0159] DNA 操作

[0160] 拟南芥 DNA 提取

[0161] DNA 粗提

[0162] 向小量植物组织中加入 40 μL 0.25M NaOH。使用黄色 P20 枪尖研磨样品,直至色素溶入溶液。加热样品至 100°C 30 秒钟,然后加入 20 μL 0.5M Tris-HCl、pH 8 和 0.25% Triton X-100。通过倒置混合样品,然后加热至 100°C 2 分钟。

[0163] DNA 的提取方法

[0164] 本提取方法改编自 Weigel 和 Glazebrook, *Arabidopsis: a laboratory manual*, (Cold Spring Harbor Press, 2002)。使用油漆搅拌器和两个玻璃珠,在 2mL 管中震荡组织和提取缓冲液 (220mM Tris-HCl pH 7.5, 250mM NaCl, 25mMEDTA, 0.5% SDS)。如此研磨并裂解组织。然后在微型离心机中用最大速度离心 5 分钟,并将 300 μL 上清液转移至 1.5mL Eppendorf 管中。加入 300 μL 异丙醇沉淀 DNA,然后通过以最大速度 (Eppendorf 离心机) 离心 5 分钟而使 DNA 成球。弃去上清液,并用 70% 乙醇洗涤 DNA 球。然后将 DNA 溶于 100 μL TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA) 中。

[0165] DNA 的 CTAB 提取

[0166] 从每株植物富集少量植物组织,所述组织为叶或花。向每个样品加入 300 μL CTAB 缓冲液 (2% (w/v) 溴化十六烷基三甲胺 (CTAB)、1.4M NaCl、100mM Tris HCl pH 8.0、20mM EDTA),伴随使用 1/8" 滚珠。然后在 **TissueLyser®** (Qiagen, Hilden, Germany) 以 30/秒的频率裂解样品 2 分钟。然后在 65°C 培育样品,时间在 30 分钟和几小时之间。使样品冷

却,然后加入 300 μ l 氯仿并剧烈漩涡震荡。在 14,000rpm 旋转样品 1 分钟,并将上面的水层转移至新的 Eppendorf 管中。向每个样品加入 300 μ l 异丙醇,并通过倒置几次而混合。以 14,000rpm 将样品旋转 5 分钟,以成球。倒去上清液,并用 500 μ l 70%乙醇洗涤小球。将样品风干,然后溶于 100 μ l TE 缓冲液 (10mM Tris HCl pH 8.0,1mM EDTA) 中。

[0167] 针对 96 孔模式的适应

[0168] 如下改编 CTAB 提取方法,用于 96 孔板 :使用板底座 (Qiagen,Hilden,Germany) 通过台式 4-15°C 离心机离心沉淀的 DNA,并使用多通道多次分配移液器。

[0169] PCR 扩增和凝胶电泳

[0170] 引物设计

[0171] 除了参照论文之外,可以佳用在 TAIR 网站 (www.arabidopsis.org) 上公开的序列和 Primer3 程序 (www.frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) 设计引物。使用下述条件设计引物 :50mM 盐浓度 ;GC 含量约 50%;最大自互补为 8 ;并且最大 3' 自互补为 3。通常,引物的 T_m 为 55-60°C,并且长约 20bp。在 NCBI 网站 (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) 上通过使用 BLASTn 的“短,接近完全匹配”测试引物结合并扩增其它产物的可能性。

[0172] 用于扩增和测序的引物的实例 (正向 -F- 和反向 -R) 提供于表 1 中,并且图 10 中提供了对 SAL1 基因的大规模描述,其中表示了内含子、外显子、引物杂交位置,以及 fry1-3 和 sal1_020882 T-DNA 插入、fry1-1、fry1-2 和 alx8 突变的位置。

[0173] 表 1- 用于部分 SAL1 基因扩增的引物

[0174]

引物名称	序列 5' -3'	T_m (°C)
1F (SEQ ID NO :5)	CGGACGCAAGTCTTCTTCTC	60.13
1R (SEQ ID NO :6)	CCACCAATGAAAAGGGTTCA	60.72
2F (SEQ ID NO :7)	CCAGTGACCGTTGCTGATTA	59.72
2R (SEQ ID NO :8)	TGAAAATGCTCAGTGTGAGGA	59.43
3F (SEQ ID NO :9)	ACACTTTGGCTACCGAGGAA	59.73
3R (SEQ ID NO :10)	GTGGAGCTTTGACACCGAGT	50.31
4F (SEQ ID NO :11)	TTCTCCTGTAAAAGTGCAAGTCTC	59.13
4R (SEQ ID NO :12)	TGGTGAAATTCGGTGAAAGA	59.10
5F (SEQ ID NO :13)	TGGCTTACGAGAAAGAGCTTG	59.78
5R (SEQ ID NO :14)	AGCAAAGAAGAGGCATCCAA	59.96

引物名称	序列 5' -3'	T _m (°C)
6F (SEQ ID NO :15)	CTGAGGGGAGATCAATACGC	59.65
6R (SEQ ID NO :16)	TGCTCAGCTATGGAGTCACG	60.16
proF (SEQ ID NO :17)	ACACGCCATCATCAATCTA	54.85
1-2R (SEQ ID NO :18)	CCCTTTATACTTAGCCCAAA	54
FRY1 外显子 1F (SEQ ID NO :19)	ACTCGCTGCTCGTCTCTGTC	60.00
实时 FRY1R (SEQ ID NO :20)	AGAACGATGCCTCTTCAGGA	59.95

[0175]

[0176] 对于 SSCP 绘制, 如 Monsanto SNP 和 Ler Collections 在 TAIR 网站上公布的, 围绕 InDels 设计引物。在 TAIR 多态性数据库中还发现了一些多态性。设计引物以产生 200-300bp 的产物, T_m 为 57°C。所述区域的序列取自合适的 BAC。对于 SNP, 使用在线程序 dCAPS Finder 2.0 (www.helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html; Neff 等, 2002)、合适的 BAC 序列和 Primer 3 设计 dCAPS 引物。对于 alx8 突变体特异性的 dCAPS 引物 (其在 alx8 突变体产物中产生限制性位点, 但在野生型中则没有, 并且其通过 XbaI 限制性酶表征) 如下: F: 5' -GAGGAAGGGAAAGTAGTTCTAG-3' (SEQ ID NO :21); R: 5' -TGCACTTTTACAGGAGAAGA-3' (SEQ ID NO :22)。然后在 NEBCutter V2.0 (www.tools.neb.com/NEBcutter2/index.php; Vinzce 等, 2003) 中模拟测试消化结果。

[0177] 对于重组载体构建, 如上设计引物, 但是向引物的 5' 末端加入合适的间隔段和重组位点。

[0178] 引物获得自 ProliGo (Lismore, Australia) 或 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)。

[0179] 标准的 PCR 条件

[0180] 使用标准 PCR 条件进行构建体的绘制、确认和聚集群落的筛选。所有 PCR 反应在 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, BIORAD, Waltham, MA, USA) 或 Palm-Cycler (Corbett Research, Sydney, Australia) 中进行。在阳性克隆的 PCR 不产生任何产物或多个产物时, 优化扩增条件。在 Palm-Cycler 上运行有 12 个不同温度的温度梯度, MgCl₂ 含量从 1-2.5mM 不等, 并且测试了不同 Taq 聚合酶的优先性。反应液通常包含下述成分: 0.2mM dNTP、1X Taq 缓冲液 (酌情)、0.5 μM 每条引物、2mM MgCl₂ (FisherBiotech, WA, Australia)、1-2 μl 样品 DNA 和 0.25U Taq (酌情)。典型的循环条件为 94°C 2 分钟; 94°C 30 秒钟, T_m-2°C 30 秒钟和 72°C 30 秒钟的 40 个循环; 72°C 2 分钟。

[0181] 高保真 PCR 条件

[0182] 对于测序和构建体产生, 需要非常精确和 / 或长的 PCR 产物。在这些情况下, 根据生产商的说明, 使用校对聚合酶。这些酶是 Pfu DNA 聚合酶 (Promega, Madison, WI), Platinum Pfx Taq 聚合酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 和 Phusion 高保真 DNA 聚合酶

(Finnzyme, Espoo, Finland)。

[0183] 电泳

[0184] 对于核酸分离和定量,用精确分子量标准梯度 (BioRad, USA) 和 1kbDNA 梯度 (Promega, USA), 在琼脂糖凝胶上跑样。还使用了用 HindIII 和 EcoRI 消化的自制 λ DNA 梯度。对于标准 PCR, 电泳在 0.5-2% (w/v) 琼脂糖凝胶 (Fisher Biotech, WA, Australia) 中进行, 凝胶中包括 0.5ng/mL 溴化乙啶 (Biorad) 用于成像。当需要高分辨率时, 比如 dCAPS 分离, 用琼脂糖 -1000 (GibcoBRL, Invitrogen, Rockville, MD, USA) 制成 3-4% (w/v) 凝胶。用 1×TBE 缓冲液 (89mM Tris 碱、89mM 硼酸、2mM EDTA, pH 8.0) 或 1×TAE 缓冲液 (40mM Tris-乙酸、20mM Na₂EDTA, pH 8.5) 制胶并跑样。在传统的电泳设备或超级 120 高效凝胶系统 (6mgel, Biokeystone, El Monte, CA, USA) 中跑胶。对于质粒消化物的分离, 将 0.7-1.0% 凝胶在 4°C 100V 跑样 6 小时。

[0185] 在上样前向 PCR 产物加入上样缓冲液 (70% 甘油、30% H₂O、溴酚蓝)。通过 UV 光源使凝胶成像。

[0186] DNA 片段的纯化和凝胶提取

[0187] 在用于连接或测序前, 从琼脂糖凝胶或 PCR 混合物中纯化 DNA 片段。这个过程可去除引物、核苷酸、酶、矿物油、盐、琼脂糖、溴化乙啶和其它杂质。

[0188] 对于 70-10kp 的小片段, 按照生产商的说明使用 **Wizard®** SV 凝胶和 PCR Clean-Up 系统或 QIAquick 凝胶提取试剂盒或 PCR Clean-Up 试剂盒 (Qiagen)。总而言之, 从凝胶上切下合适的条带, 并将其溶于包含异硫氰酸胍的缓冲液中。然后使溶解的凝胶或 PCR 产物在存在高离液盐的情况下通过包含硅膜的柱。然后洗涤结合 DNA 的膜, 之后将 DNA 洗脱在无菌 dH₂O 中。

[0189] 对于 100bp-10kbp 的 DNA 片段的凝胶提取, 也按照生产商的说明使用 Ultrafree-DA 离心过滤单元 (Millipore)。这个试剂盒与凝胶喷雾器不同, 使用凝胶压缩来从琼脂糖提取 DNA。然后通过加入 1/10 体积的 3M 乙酸钠, 加入 2.5 体积的 100% 乙醇并在 -20°C 沉淀 DNA 3 小时而纯化 DNA。通过在台式离心机中以最大速度离心 15 分钟而使 DNA 成球。用 70% 乙醇洗涤小球。然后将 DNA 溶于无菌 dH₂O 中。

[0190] 使用 QIAEX II 试剂盒进行已知大于 10kb 的条带的凝胶提取, 并且按照生产商的说明使用。这个试剂盒使用硅珠结合 DNA, 而不是使用硅膜, 当较大的 DNA 片段通过膜时可防止片段发生剪切。

[0191] 然后使用 nanodrop 分光光度计 (Genomic Solutions, Melbourne, Australia) 将产量定量。

[0192] 定位克隆和互补

[0193] 从 alx8 (Col-0 背景) 和野生型 Landsberg erecta 之间杂交的 F2 群落提取基因组 DNA。使用 F2 的叶片表型, 或野生型 F2 的后代, 确定它们在 alx8 突变位点的表型。使用由 Lukowitz 等 (Lukowitz, W., C. S. Gillmor, 等 (2000), "Positional cloning in Arabidopsis. Why it feels good to have a genome initiative working for you", Plant Physiology 123 (3): 795-805)。在 Cereon 数据库 (www.arabidopsis.org) 中发现的 SSLP 和 SNP 附近设计标记。在 dCAPS Finder 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>; Neff 等, 2002) 的帮助下设计 dCAPS 引物。使用标准方法进行 PCR、消化和凝胶电泳。

[0194] 载体操作**[0195] 限制性消化**

[0196] 所有酶都来自 Promega, 并且按照生产商的说明使用, 只做了一些修正。为了精细的绘制而使用 dCAPS 标志进行限制性消化。在这个情况下, 用 1 单位合适的酶在 37°C 将 10 μ l 消化一小时到过夜。质粒如 BACS 的限制性消化, 在 1 μ g DNA 和 5 单位酶上进行。通过在 65°C 加热 15 分钟或在 -20°C 冷冻而停止消化。

[0197] 去磷酸化

[0198] 按照生产商的说明, 使用小牛肠碱性磷酸酶 (CIAP ;Promega) 将消化的片段去磷酸化。反应重复两次, 然后使用提供的终止缓冲液停止。然后通过苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25 : 24 : 1) 提取液和乙酸钠和 100% 乙醇沉淀而净化溶液。在 70% 乙醇中洗涤小球, 然后风干, 并重新悬浮于无菌水中。

[0199] 载体连接

[0200] 按照生产商的说明, 使用 T4 连接酶连接制备的插入片段和质粒。主要使用插入片段: 载体 DNA 为 3 : 1 的比例, 其优于 1 : 1 或 1 : 3 比例, 并且在 4°C 过夜进行连接。

[0201] 载体重组

[0202] 对于需要重组的载体, 使用高保真条件和包含 attB 重组序列的引物扩增插入片段。按照生产商的说明, 使用 Gateway® 系统 (Invitrogen) 进行重组反应。总而言之, 使用 10 μ l 反应液中的 2 μ l BP 克隆酶, 将 50fmol 合适的插入片段与 50fmol 载体 pDONR/Zeo (Invitrogen) 重组, 所述载体包含相应的 attP 重组序列。这可以参照 BP 反应, 并产生 attL 重组序列。反应在 25°C 过夜, 然后通过与 1-2 μ g 蛋白酶 K 在 37°C 孵育 10 分钟而停止。在转化感受态大肠杆菌并在筛选条件系孵育后, 纯化质粒并确认插入片段。然后在 LR 反应中使分离的质粒与目的载体重组。目的载体, 比如 pHellsGate 8 (pHG8 ; 由 Peter Waterhouse 和 Chris Helliwell, PI, CSIRO 捐赠), 包含 attR 重组序列。然后将这些与包含插入片段的供体质粒中的 attL 位点重组, 再次得到 sttB 序列。LR 反应与 BP 反应相同, 但是需要 LR 克隆酶。再次将相同摩尔数的 pDONR- 插入片段和 pHG8 过夜重组, 得到 pHG8- 插入片段。然后使用这个质粒转化大肠杆菌, 在筛选条件下扩增, 分离并确认。

[0203] 感受态大肠杆菌

[0204] 为了产生感受态大肠杆菌, 用 5 μ l DH5 α 细胞接种 5mL LB, 并在 37°C 以适度的震荡 (200rpm) 过夜培养。然后使用这个起始培养物接种 200mLLB, 其于 37°C 以适度震荡培养 3-4 小时, 直至培养物的 OD600 为 0.6。然后在冰上孵育培养物 30 分钟, 之后以约 3,000g 在 4°C 离心 20 分钟使其成球。将小球重新悬浮于 200mL 冰冷的水中, 然后再次以相同的条件成球。这个循环再重复两次, 其中最后一次重新悬浮于 20mL 冰冷的 10% 甘油中。再次在 4°C 将细胞成球, 但是为 2,000g 10 分钟, 并且重新悬浮于 1mL 冰冷的 10% 甘油中。然后将这个重新悬浮液稀释于 50 μ L 等分试样中, 其在液氮中急速冷冻, 并保存于 -80°C。

[0205] 大肠杆菌转化

[0206] 对于较难的转化, 使用商业感受态细胞, One Shot® OmniMAX™-T1R 化学感受态大肠杆菌 (Invitrogen)。将 100 μ l 细胞在冰上解冻, 并加入 100ng 连接混合物。然后将细胞置于冰上 30 分钟, 之后在 42°C 热击 30 秒钟。然后将细胞放回冰上 2 分钟, 之后加入提供的 250 μ l SOC 培养基。然后在 37°C 震荡回收细胞 1-2 小时。

[0207] 对于大多数转化,使用自制的感受态细胞。将 100 μ L 感受态细胞在冰上解冻,并加入 100ng 质粒 DNA,用移液器枪尖混合。然后在液氮中将细胞急冻,之后在 37 $^{\circ}$ C 水浴中培育五分钟。然后向细胞中加入 1mL LB,并在 37 $^{\circ}$ C 震荡培养 1-2 分钟。然后将两个不同体积的细胞涂布在合适的选择性培养基上并在 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。

[0208] 细菌生长和甘油储备 (glycerol stock)

[0209] 所有细菌液体培养物都在 Luria-Bertani (LB) 培养基中生长,所述培养基由下述组成:10g/L 细菌用胰蛋白胨 (BactoLaboratories, Australia),5g/L 酵母提取物 (BactoLaboratories) 和 5g/L NaCl 的 MilliQ 处理的水溶液。如果需要 LB 琼脂,向肉汤中加入 15g/L 琼脂 (Lerner Davis Gelatin, Australia)。所有培养基在使用前通过高压而灭菌。以下述浓度使用抗生素:100 μ g/mL 壮观霉素 (Sigma),100 μ g/mL 氨苄青霉素 (Sigma) 和 150 μ g/mL 利福平 (Sigma),30-50 μ g/mL 卡那霉素 (MP Biomedical, Solon, OH, USA),50g/mL 新霉素 (zeomycin) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)。对于新霉素筛选,使用低盐 LB:10g/L 细菌用胰蛋白胨 (BactoLaboratories, Australia),5g/L 酵母提取物 (BactoLaboratories) 和 5g/L NaCl 的 MilliQ 处理的水溶液。对于蓝-白筛选,平板还包含 0.5mM IPTG (异丙基 β -D-硫代半乳糖苷;Fisher Biotech) 和 80 μ g/mL X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚基- β -D-吡喃半乳糖苷;Progen Bioscience, QLD, Australia)。

[0210] 大肠杆菌的液体培养物在 37 $^{\circ}$ C 震荡过夜培养,大肠杆菌的平板在 37 $^{\circ}$ C 过夜培养,农杆菌的平板在 28 $^{\circ}$ C 培养几天,并且农杆菌的液体培养物在 28 $^{\circ}$ C 震荡培养 16-20 小时。

[0211] 细菌培养物的甘油储备通过将 700 μ L 的培养物与 700 μ L 甘油溶液 (65% 甘油 v/v, 0.1M MgSO₄, 0.025M Tris-Cl, pH8) 相混合而得到。随后将储备保存在 -80 $^{\circ}$ C。

[0212] 菌落 PCR

[0213] 进行菌落 PCR,筛选存在质粒和插入片段的菌落。PCR 条件与平常一样,但是每个反应的体积为 20 μ l,并且使用移液器枪尖将少量细胞从菌落转移至 PCR。

[0214] 质粒分离

[0215] 对于大多数应用,使用 GeneEluteTM 质粒小提试剂盒 (Sigma) 从 3-5mL 液体培养物分离质粒,所述培养物来自单菌落或甘油储备的过夜生长。总而言之,使细胞成球并使用修正的碱-SDS 裂解方法裂解。然后在存在高盐的情况下将质粒 DNA 吸附至硅膜上。然后洗涤膜,之后用无菌 dH₂O 洗脱质粒 DNA。

[0216] 对于需要大量质粒的应用,比如 BAC DNA 的制备,使用大规模碱裂解规程。这个操作规程基于获得自 NIH 细胞和分子调控实验室 (Bethesda, MA, USA) 的规程。将包含筛选物的 500mL 培养物在 37 $^{\circ}$ C 和 200rpm 过夜生长。然后在 4 $^{\circ}$ C 6000g 离心 15 分钟使 250mL 细胞成球,弃去上清液,将瓶置于冰上。然后将细胞悬浮于 20mL 室温的 10mM EDTA, pH 8.0 中,并置于室温 5 分钟。然后加入 40mL 裂解溶液 (0.2M NaOH, 1% SDS),并将瓶置于室温 5 分钟。然后加入 30mL 冰冷的中和溶液 (11.5% (体积比) 乙酸, 1.9M 乙酸钾),并将瓶置于冰上 15 分钟。然后在 4 $^{\circ}$ C 30,000g 离心 20 分钟使细胞碎片成球。将上清液移至新瓶并重复上述过程。然后通过加入 45mL 异丙醇使 DNA 从上清液沉淀出来,并在 6,500g 离心 15 分钟使其成球。然后将小球溶于 9mL 10mM tris/50mM EDTA 中并加入 4.5mL 7.5M 乙酸钾。然后在 -70 $^{\circ}$ C 冷冻溶液 30 分钟,解冻并在 4,000g 离心 10 分钟。然后通过加入 27mL 100%

乙醇而沉淀 DNA,并在 4,000g 离心 10 分钟而使 DNA 成球。然后将小球溶于 700 μ L 50mM Tris/50mM EDTA,pH 8.0 中,并加入 10 μ L 的 10ng/ μ L RNase。然后在 37°C 培育样品 1 小时,使 RNA 分解。然后通过加入 700 μ L 苯酚:氯仿:异戊醇 (25 : 24 : 1),混合并在微型离心机中以 14,000rpm 离心 5 分钟而净化样品。然后再次在 700 μ L 氯仿:异戊醇中净化顶层。然后通过加入 700 μ L 异丙醇而将 DNA 从顶层沉淀出来,并通过在 14,000rpm 离心 20 分钟而使 DNA 成球。去除上清液并用 500 μ L 70%乙醇洗涤小球,并在 14,000rpm 旋转 10 分钟。再次去除上清液,并风干小球,然后重新悬浮于 100 μ L 无菌 H₂O 中。

[0217] 消化物判断

[0218] 为了确认质粒和是否存在插入片段,过夜消化分离的质粒并在 1%琼脂糖凝胶上跑样。使用 NEB cutter V2.0(www.tools.neb.com/NEBcutter2/index.php;New England Biolabs) 鉴别条带的期望模式。

[0219] 感受态农杆菌

[0220] 由在 28°C 过夜生长的 500mL 培养物产生感受态根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)。然后将 250mL 培养物在冰上冷藏,并在 4°C 以 3,000g 离心 5 分钟而成球。将小球重新悬浮于 1mL 冰冷的 20mM CaCl₂ 中,并分成 0.1mL 等分试样,然后在液氮中冷冻并于 -80°C 保存。

[0221] 农杆菌转化

[0222] 用分离的质粒转化自制的感受态根癌农杆菌细胞。将 100 μ L 感受态细胞在冰上解冻,并加入 1 μ g 质粒。然后在 37°C 热击细胞 5 分钟,然后加入 1mL 液体 LB。在 28°C 震荡回收细胞 2-4 小时。包括无任何质粒的感受态农杆菌细胞阴性对照。然后将细胞涂布在 LB 琼脂平板上,平板包含用于筛选质粒的卡那霉素 (50 μ g/mL);和用于筛选农杆菌的利福平 (100 μ g/mL) 和庆大霉素 (25 μ g/mL)。然后在 28°C 培养平板 2-3 天或直至菌落出现。通过菌落 PCR,使用插入片段的特异性引物筛选包含插入片段的菌落。这些菌落还用于接种于包含筛选物 (50 μ g/mL 卡那霉素,100 μ g/mL 利福平,25 μ g/mL 庆大霉素) 的 5mL 液体 LB 发酵剂。培养物在 28°C 过夜震荡生长。

[0223] 拟南芥转化

[0224] 待转化的拟南芥在土壤上生长,并修剪第一个开花的花苞,以促进多个二次花苞出现。当有很多花丛时将植物浸湿并剪去任何已发育的果实。然后使用来自 Clough 和 Bent (1998) 的规程的修正规程转化拟南芥。使用包含筛选物的 5mL 发酵剂接种 500mL 液体 LB。然后在 28°C 震荡过夜生长。

[0225] 在 RC 5C Plus 离心机 (Sorvall) 中使用 SLA-3000 转头,以 4,000rpm 在室温离心 20 分钟,使 500mL 培养物成球。然后将小球重新悬浮于 500mL 5% (w/v) 蔗糖溶液中。然后加入清洁剂 Silwet L-77 (lehle Seeds, Round Rock, TX, USA) 至终浓度 0.05% (体积比)。将花浸入溶液中 5-10 秒钟,伴有温和搅拌,然后平放在保鲜膜下的底盘中保湿。第二天静置植物,并在一周后重复所述过程。种子放置两周后,将植物转移至黑暗的干燥柜中干燥种子。

[0226] 将种子置于筛选剂上分离转化体,然后将其转移至土壤上。

[0227] 测序

[0228] 将 DNA 片段或质粒与合适的引物一起送至 Biomolecular

Resource Facility (JCSMR, ANU, Canberra) 或 Australian Genomic Resource Facility (UQ, Queensland) 测序。

[0229] 或者,在 20 μ L 测序反应液中制备 DNA,所述反应液由下述组成:0.5 μ M 引物,1 \times 缓冲液,2 μ L DNA 和 1.5 μ L Big Dye。如下进行反应:96 $^{\circ}$ C 2 分钟和下述共 40 个循环:96 $^{\circ}$ C 5 秒钟,50 $^{\circ}$ C 15 秒钟,60 $^{\circ}$ C 3.5 分钟。然后使用 EDTA 纯化方法纯化 PCR 产物。加入 5 μ L 0.125M EDTA 和 60 μ L 室温 100%乙醇至 20 μ L。混合样品并覆盖锡箔纸在室温静置沉淀 40 分钟。然后以最大速度离心 20 分钟,使标记的 DNA 成球,并用 70%乙醇洗涤,之后再离心 5 分钟。去除上清液,并使用 Speedi-Vac 干燥小球。然后将样品送给 Yang 测序。

[0230] 热不对称互动式 (Tail)-PCR

[0231] 改编了来自 (Liu Y-G, Mitsukawa N, Oosumi T 和 Whittler, RF (1995) "Efficient isolation and mapping of Arabidopsis thaliana T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR", The Plant Journal 8:457-463) 的操作规程。如 Liu 等 1995 所述,顺序使用三个对 T-DNA 插入片段左边界特异性的引物 (LBa1-5'-TGTTTACGTAGTGGGC CATCG-3' (SEQ ID NO:23); LBb1-5'-GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT-3' (SEQ ID NO:24); 和 LBc1-5'-GGACTCTTGTTCCTCAAACTGG-3' (SEQ ID NO:25)) 和随机简并引物, AD2 (5'-NGTCGA (G/C) (A/T) GANA (A/T) GAA-3', 128 倍简并, 其将结合至拟南芥序列中), 进行了一系列三个 PCR 反应。第一次的反应液为 20 μ L, 包含 1 \times PCR 缓冲液, 200 μ M 每种 dNTP, 2mM MgCl₂, 0.2 μ M LBa1, 3 μ M AD2, 0.8U F1 Taq 和约 20ng 基因组 DNA。每个样品进行两次平行反应, 一个稀释 50 倍以进行下一次 PCR, 另一个保留以在最后的凝胶上跑样。

[0232] 第二次的反应液为 20 μ L。包含 1 \times PCR 缓冲液, 200 μ M 每种 dNTP, 2mM MgCl₂, 0.2 μ M LBc1, 2 μ M AD2, 0.6U F1 Taq 和 1 μ L 来自第一次反应的稀释 PCR 产物。每个样品进行两次平行反应, 一个稀释 10 倍以进行下一次 PCR, 另一个保留以在最后的凝胶上跑样。第三次反应为 100 μ L, 并且除了使用第三条 LB 特异性引物和 AD2 之外, 条件和第二次反应相同。

[0233] 通过琼脂糖凝胶电泳分析所有扩增产物。通过第二次和第三次反应中条带之间的大小差异鉴别插入特异性产物。使用 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 从凝胶上切下合适的条带并测序 (AGRF, Brisbane, Australia)。

[0234] SAL1 蛋白质分析

[0235] 为了产生重组 SAL1 蛋白质, 使用 Plant RNeasy Kit, 用柱上 DNase 消化步骤 (Qiagen, www.qiagen.org) 从 Col-0 和 alx8 叶片提取总 RNA, 并按照生产商的说明用于第一链 cDNA 合成 (SuperScript II, Invitrogen, www.invitrogen.com)。从克隆的 Col-0 和 alx8 SAL1 cDNA, 用引物 SacII-SAL1F1 (5'-ctccgcggttggtatggcttacgagaaagagc-3') (SEQ ID NO:26) 和 EcoRI-SAL1 (5'-gctegaattctcagagagctgaagctttctc-3') (SEQ ID NO:27), 扩增完整的 SAL1 编码序列, 然后克隆进 pHUE 载体 (Baker 等, 2005)。在用 1mM IPTG 诱导后在大肠杆菌 BL21 (DE3) (Novagen, www.emdbiosciences.com) 中表达重组蛋白质, 并使用 His- 结合树脂, 根据生产商 (Novagen) 的说明通过亲和色谱纯化。通过酶裂解回收无标签的真正 SAL1 蛋白质, 并测定对于磷酸腺苷 5' 磷酸酯 (PAP) 的磷酸酶活性 (Murguia 等, (1995), Science 267, 232-234), 并通过免疫亲和纯化从接种的兔血清 IgG 部分分离抗 SAL1 多克隆抗体 (IMVS, Adelaide)。

[0236] 对于 western 印迹,将 20 μ g 叶片蛋白质提取物溶于梯度凝胶中,电转移至硝酸纤维素膜,并用 1 : 1,000 稀释的针对重组 SAL1 蛋白质的纯化单克隆抗体进行检测。在用 0.05% (体积百分比) Tween PBS 洗涤后,用 1 : 10,000 稀释的 HRP- 结合羊抗兔 IgG 孵育印迹,并使用 Super Signal West FemtoChemiluminescent 检测试剂盒 (Pierce) 展开。

[0237] 基因表达分析

[0238] 处理 RNA 时的注意事项

[0239] 因为环境中存在大量 RNase 酶,所以要注意很多事情以避免 RNA 发生降解。在处理 RNA 时始终戴手套,并且尽可能在干净的环境中谨慎操作。样品保持置于冰上,于 -80°C 保存,并限制冻融次数。无 RNase 的水可以购买或通过用 0.2% (体积百分比) 焦磷酸二乙酯 (DEPC, Sigma) 处理 MilliQ H₂O 而产生。在使用前,用 DEPC 处理的水过夜搅拌,然后高压灭菌,以破坏任何残余的 DEPC。玻璃容器在 180°C 过夜烘焙,塑料容器在稀释的 H₂O₂ 中过夜浸泡,然后用 DEPC 处理过的水冲洗几次。

[0240] RNA 提取

[0241] 使用 Plant RNeasy 试剂盒 (Qiagen, Germany) 提取 RNA。总而言之,使用无菌微型杵将不超过 100mg 的冷冻组织研磨成粉末。裂解样品并在提供的包含异硫氰酸胍 (GITC) 的缓冲液中变性,所述缓冲液也可使任何 RNase 失活。然后将样品应用于 QIAshredder,去除不溶材料并剪切基因组 DNA。洗脱液与 100% 乙醇混合,沉淀 RNA,并使混合物通过 RNeasy 微型柱, RNA 在其中结合硅凝胶膜。洗涤膜并用无 RNase 的 DNase I (Qiagen) 处理约 20 分钟,并在用无 RNase H₂O 洗脱 RNA 前再次洗涤。

[0242] RNA 沉淀

[0243] 为了浓缩并纯化 RNA,使用了分子生物学 (Ausubel 等, 1998) 中当前的规程。概述之,向 RNA 加入 1/10 体积的乙酸钠, pH 5.2。将样品短暂漩涡震荡而混合,然后加入 2.5 体积的冰冷的 100% 乙醇。再次通过漩涡震荡混合样品,并置于 -20°C 30 分钟以促进 RNA 沉淀。然后在台式离心机中以最大速度离心 5 分钟而使 RNA 成球。去除上清液,并用 70% 乙醇洗涤小球,然后再次离心。去除上清液,并在 Speedi-Vac 中以中热干燥 RNA 5 分钟,然后溶于无 RNase 的 H₂O 中。

[0244] eDNA 合成

[0245] 根据获得自 Christian Delessert (Plant Industry, CSIRO, Canberra, Australia) 的规程进行 cDNA 合成。向 1 μ g DNA 中加入 1 μ g T23V 引物,并在 70°C 孵育 10 分钟,使引物结合。然后反应液由下述组成 30 μ L : 1 \times 合适的缓冲液, 10mM 二硫苏糖醇, 0.17mM 无 RNase 的 dNTP (Invitrogen), 100 单位的 SuperScript II (Invitrogen) 和无 RNase 的 H₂O 至 30 μ L。然后在 45°C 孵育反应物 2 小时,并在无菌 milliQ H₂O 中稀释至 200 μ L。然后准备 cDNA 进行实时 RT-PCR 分析。

[0246] 实时 RT-PCR

[0247] 使用实时反转录聚合酶链式反应 (实时 RT-PCR) 测定转录本丰度。

[0248] 引物设计

[0249] 使用 Primer3 程序 (www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi), 用下述条件设计用于实时 RT-PCR 的合适的引物:

[0250] 产物大小约 250bp

[0251] 熔融温度 (T_m) 约 60°C

[0252] GC 含量约 50%

[0253] 最大自互补为 4

[0254] 最大 3' 自互补为 3

[0255] 使用的基因序列为拼接的 cDNA 序列, 获得自 TAIR(www.arabidopsis.org)。可能时, 设计引物使其位于内含子的任一边, 以检测 DNA 的污染。通过“Blastn”, 在国家生物技术中心网站 (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上搜索, 检查引物的特异性。所有引物都订购自 Proligo (Australia)。使用的一些引物的实例在 (Rossel, J. B., P. B. Walter 等 (2006), *Plant, Cell and Environment* 29(2):269-281) 中给出。使用的其它引物的实例包括:

[0256] APX2 (At3g09640), 5' -GGCTGGGACATTTGATGTG-3' (SEQ ID NO:28) 和 5' -AGGGAACAGCTCCTTGATAGG-3' (SEQ ID NO:29);

[0257] APX1 (At1g07890), 5' -CCACTCGCATTTCTCCAGAT-3' (SEQ ID NO:30) 和 5' -TCGAAAGTTCCAGCAGAGTG-3' (SEQ ID NO:31);

[0258] sHSP (At2g29500), 5' -CCTGGATTGAAGAAGGAGGAAG-3' (SEQ IDNO:32) 和 5' -TAGGC ACCGTAACAGTCAACAC-3' (SEQ ID NO:33);

[0259] ZAT10 (At1g27730), 5' -AGGCTCTTACATCACCAGATTAG-3' (SEQ IDNO:34) 和 5' -TACACTTG TAGCTCAACTTCTCCA-3' (SEQ ID NO:35);

[0260] 亲环蛋白 (At2g29960), 5' -TCTTCCTCTTCGGAGCCATA-3' (SEQ ID NO:36) 和 5' -AAGCTGGGAATGATTCGATG-3' (SEQ ID NO:37);

[0261] DREB2A (At5g05410), 5' -AGACTATGGTTGGCCCAATG-3' (SEQ ID NO:38) 和 5' -TCGAGCTGAAACGGAGGTAT-3' (SEQ ID NO:39);

[0262] HSP70 (At3g09440), 5' -GCTGCTATTGCTTACGGTCTTG-3' (SEQ ID NO:40) 和 5' -CTCTCGGGTTTCCACTAATGTC-3' (SEQ ID NO:41)。

[0263] 为了检查引物的精确度和有效性, 用 100、25、5 和 1ng cDNA 制作标准曲线。每个浓度重复两次。通过 **Rotorgene®** 5 程序自动生成 R2 值、反应效率和熔融曲线。对于精确的引物, R2 值必须 > 0.99, 反应效率必须 > 95%, 并且熔融曲线必须说明只扩增一个产物。只有在这些条件都满足时, 这些引物才可用于实时 RT-PCR。

[0264] 实时 RT-PCR 过程建立

[0265] 在 **Rotor-Gene®** 2000 或 **Rotor-Gene®** 3000 (Corbett Research, Australia) 中进行实时 RT-PCR 反应。在某些情况下, 每个 cDNA 样品重复三次实验。或者, 重复两次反转录, 并且每个反转录有两次技术重复, 所以每个 RNA 样品有四个重复。

[0266] 用针对目的基因和针对“管家”基因的引物测试每个样品。在相对于管家基因 (其表达不改变) 进行各种处理后, 实时 RT-PCR 可以定量具体组织中的 mRNA 丰度。这可以如下进行: 通过测定转录本中荧光染料 SYBR 绿的合并而测定转录本经过重复循环后的扩增速率。这种染料可以结合所有 dsDNA 分子, 并且在结合时仅发出荧光信号。

[0267] 为了进行反应, 按照生产商的说明使用 **SYBR®** Green JumpStart™ TaqReadyMix™ (SigmaAldrich) 或 Roche LightCycler4800 SYBR Master (Roche, Basel, Switzerland)。对于 Sigma 产品, 混合物包含 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 3.5mM

MgCl₂, 0.2mM 每种 dNTP, 0.25 单位 Taq DNA 聚合酶, JumpStart Taq 抗体和 SYBR 绿 I。对于 Roche 产品, 混合物的内容物未公开。通常 10 μL 反应液包含 25ng cDNA, 0.2 μM 每条引物和 0.9X Master 混合物。典型的循环条件如下:

[0268] 95°C 2 分钟 (Taq DNA 聚合酶的初始活化)

[0269] 循环重复 45 次: 95°C 15 秒钟 (变性), 55°C 30 秒钟 (引物结合), 72°C 30 秒钟 (延长和荧光读数) 和 80°C 15 秒钟 (荧光读数)

[0270] 60°C 2 分钟 (最后的延迟步骤)

[0271] 通过升至 99°C, 每 5 秒钟增加 1°C, 从而进行熔融曲线分析。

[0272] 分析

[0273] 使用 **Rotor-Gene®** 5 程序 (Corbett Research) 分析实时 RT-PCR 结果。对于每次反应, 查看熔融曲线, 确保每组引物产生单一的产物, 并且产物进行了有效扩增。用于实时 RT-PCR 的分析方法如前所述 (Rossel, J. B., P. B. Walter 等 (2006), *Plant, Cell and Environment* 29(2):269-281; Pfaffl, M. W. (2001), "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR", *Nucleic Acids Research* 29(9))。

[0274] 对于可比的 Ct 方法, 将扩增反应的阈值设定为所有样品以指数速率扩增的点。阈值循环 (Ct) 值是特定样品达到阈值而进行的循环数, 其中每个样品的荧光量相同, 并且从而 dsRNA 量相同。然后将这些 Ct 值转化成 Excel (Microsoft, USA)。删除每组三个重复中 Ct 值相差超过 0.5 的异常值。然后通过某个时间点和条件比较目的基因的表达和相同时间和条件的管家基因的表达, 将得到的数据集归一化。这可以通过从目的基因三个重复的每个 Ct 值减去该样品中管家基因的平均 Ct 值而得到:

[0275] $\Delta Ct = Ct(\text{目的基因}) - \text{平均 Ct}(\text{管家基因})$

[0276] 然后将这些数值与对照样品比较, 通常 $t = 0$ 。这可以通过从每个样品值减去对照值而得到 $\Delta \Delta Ct$ 。

[0277] $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct(\text{目的基因}) - \Delta Ct(\text{对照})$

[0278] 然后使用这些数值, 用公式 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 计算绝对值。结果是, 对照值成为 1, 并且所有其它样品给出相对于对照值的数值。

[0279] 对于可比定量方法, 将程序分析的样品与用户确定的对照样品比较, 通常 $t = 0$ 。然后使用下述公式计算可比浓度:

[0280] 可比浓度 = 扩增 (对照 take off - 本样品 take off)

[0281] 使用随循环增加的荧光速率而计算 take off 值。最大速率为峰值速率, 并且 take off 速率是峰值速率的 80% 以下。Take off 值是当反应到达 take off 速率时已进行的循环数。

[0282] 扩增是对于特定引物组, 所有样品的评价扩增效率。可以以到达 take-off 点后四个循环中荧光增加的平均倍数而计算。理想地, 这个数值在反应的指数期为 2。对每个引物组, 给出了平均扩增效率和置信区间, 并且置信区间值增加, 说明样品之间波动更大。

[0283] 然后将每个引物源自计算机的可比浓度输出至 Excel, 并针对管家基因归一化。这导致表达量相对于对照的百分比或倍数改变。使用 Excel 功能计算每组平行实验的标准偏差。然后使用 Excel 将结果绘成柱状图。适当的时候, 将多个生物副本的结果平均, 并使用 STDEVPA 功能计算实验间的标准偏差, 其根据全群落确定标准偏差作为参数。

[0284] Northern 印迹

[0285] 使用 Northern 印迹研究基因表达的程度和是否出现拼接变体。

[0286] 使用 RNeasy 试剂盒,如上进行 RNA 提取,每个生物副本仅使用三个 QIAshredder 柱,并且通过一个 RNeasy 柱洗脱,使得到的洗脱液浓度最大。然后如上将每个样品的 20 μ g RNA 沉淀,并重新悬浮于 5 μ L 无 RNase 的水中。

[0287] 用浓缩的 RNA 在无 RNase 的条件下进行凝胶电泳。通过在 125mLDEPC 处理的 H₂O 中使 2.25g 琼脂糖融化而制胶。冷却混合物,然后加入 15mL 10 \times MOPS(0.4M MOPS,0.1M 乙酸钠,0.01M EDTA),7.5mL 甲醛和 2 μ L 溴化乙啶 (EtBr)。将凝胶置于正常凝胶电泳槽中,然后用加入 1 μ L/100mL EtBr 的 1 \times MOPS 平衡。

[0288] 向每 20 μ g RNA 中加入 9 μ L 甲醛、25 μ L 甲酰胺和 4.2 μ L 10 \times MOPS。然后将样品漩涡震荡而混合,并在 55 $^{\circ}$ C 加热使 RNA 变性。在向凝胶上样前,向每个样品加入 0.5 μ L EtBr 和 2 μ L 上样缓冲液 (1mM EDTA pH 8.0,50%甘油,2.5mg/mL 溴酚蓝,2.5mg/mL 二甲苯蓝)。以 100V 跑胶几小时,直至染料沿凝胶移动 2/3。然后在 UV 照射下快速给 RNA 照相,查看 RNA 的质量和数量。

[0289] 通过用 20 \times SCC 过夜重力印迹,将 RNA 转移至尼龙膜 (Hybond-N, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)。然后用保鲜膜将尼龙膜包起来,并通过 UV 以 1200V 照射而将 RNA 固定于膜上。然后在黑暗中保存膜备用。

[0290] 通过使用引物 Fry1-1F(5' -AACCATTGTTGATAATCTCC-3') (SEQ IDNO :42) 和 Fry1-rt2R(5' -CAGAGAAACAAAGAACGTACGAGA-3') (SEQ IDNO :43) 和 40 μ L 反应液,从 Co1-0 WT cDNA 扩增 SAL1 而产生探针。在凝胶上将 PCR 产物跑样,并使用凝胶提取试剂盒纯化。然后使用 Prime-a-gene 标记系统 (Promega),按照生产商的说明,用放射性 α 32P-dCTP 标记探针。如 (Rossel J. B., Wilson I. W 和 Pogson B. J. (2002), "Global changes in gene expression in response to high light in Arabidopsis", Plant Physiol. 130 :1109-1120) 中所述进行过程。

[0291] 微阵列

[0292] 使用 RNeasy 试剂盒如上提取 RNA 用于微阵列。然后使用 Nanodrop 分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度。还通过 3 μ g RNA 的凝胶电泳检查 RNA 的数量。概述之,通过在 1 \times MOPS 缓冲液中融化高保真琼脂糖 -1000 而制成 1%凝胶。在 55 $^{\circ}$ C 冷却混合物,然后加入温的甲醛至终浓度 18% (体积百分比) 并倒入凝胶槽中。凝固后用 1 \times MOPS 跑样缓冲液平衡凝胶。将 10 μ L 的 RNA 与 20 μ L 上样缓冲液 (52%甲酰胺,1 \times MOPS,17%甲醛,7%甘油,0.02mg/mL EtBr,少许溴酚蓝),在 70 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟,然后在冰上冷却 2 分钟。然后在凝胶中在 90V 跑样几小时,直至染料走过凝胶长度的 2/3。

[0293] 如果需要更浓的 RNA,以中热在 Speedi-Vac 中短时间降低体积。也在 RNA 6000 Nano LabChip[®] 上,根据生产商的说明,使用 Agilent 2100Bioanalyser 系统 (Santa Clara, CA, USA) 测试 RNA 的质量和数量。这个系统由通过毛细管中凝胶基质上电泳的 RNA 分子大小而分离 RNA 分子。在不同的管中跑样之前加热使每个样品和梯度变性。凝胶基质中的插入染料可以标记 RNA,并在通过毛细管时读出数量和重量。

[0294] 一旦确认了 RNA 的质量,使用生产商试剂盒和说明制备 RNA 用于 Affymetrix GeneChip 表达分析系统 (Santa Clara, CA, USA) 中。概述之,使用 T7-01igo(dT) 引物和

Superscript II, 将 5 μ g RNA 反转录, 称为第一链合成。这使 RNA 结合在互补的 DNA 链上。然后合成 cDNA 的第二链, 替代第二链合成中的 RNA。这个合成使用 RNase H 去除 RNA, 然后使用 T4DNA 聚合酶如 DNA 一样重建第二链。然后通过使用 cDNA 结合柱而从 cDNA 去除反应组分, 所述柱经过洗涤、干燥并洗脱 cDNA。

[0295] 然后使用体外转录 (IVT) 过程, 从 cDNA 扩增用生物素标记的 cRNA。这个过程使用生物素化核苷酸类似物 / 核苷酸混合物和 T7RNA 聚合酶。然后使用可以结合 cRNA 的柱纯化 cRNA, 并允许少量等分试样通过 Bioanalyser, 确认产物的质量和数量。

[0296] 也通过 nanodrop 分光光度计定量用生物素标记的 cRNA, 并确认纯度。由于初始样品中使用总 RNA, 针对存在的未标记 RNA 而调整产量。使用下述公式进行:

[0297] 调整的 cRNA 产量 = $\text{RNA}_m - \text{总 RNA}_i$

[0298] 其中 RNA_m 是在 IVT 反应和净化后测得的 cRNA 的量 (μ g), 并且 总 RNA_i 是 RNA 的初始起始量 (μ g)。

[0299] 然后通过 Mg^{2+} 离子诱导的水解, 将 20 μ g cRNA 分解成 35-200bp 的片段。在 Bioanalyser 中允许少量等分试样通过, 确认发生了分解。

[0300] 为了确认 RNA 的质量, 然后将来自一个样品的少量片段化 cRNA 与 TestArray3 杂交。过程与针对 ATH1 芯片的过程相同。

[0301] 对于 ATH1 GeneChip, 将 15 μ g 片段化 cRNA 的每个样品在 45°C 过夜 (16 小时) 旋转杂交。然后使用 Fluidics Satation 400, 用非严谨洗涤方式洗涤 GeneChip。然后用链霉亲和素藻红蛋白 (SAPE) 将 GeneChip 染色, SAPE 可与生物素标记的 cRNA 结合。然后通过加入可以结合 SAPE 的一抗而放大信号。然后加入可以结合一抗的生物素化二抗, 并最后加入可以结合二抗的 SAPE。藻红蛋白在 570nm 发荧光, 所以在这个波长扫描 GeneChip。然后分析结果。

[0302] 在上述步骤中加入很多对照。在第一链合成过程中加入四个 polyA RNA 对照, 以确保有效产生标记的 cRNA。这些对照来自枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 的四个基因, 其不存在于真核细胞中。还以不同浓度加入, 以确保过程对于低、中和高丰度转录本有效。在阵列的最终分析中, 这些基因的强度读数应与它们的初始浓度成线性关系。

[0303] 在杂交前向片段化 cRNA 加入一组杂交对照。这些也以一定浓度范围加入, 确保杂交和信号强度成线性关系。一些对照来自大肠杆菌, 并且还有一个对照来自 P1 噬菌体。

[0304] 最后, 还向杂交混合物中加入生物素化 B2 寡核苷酸。这些可以以交错的方式结合在阵列外部附近, 允许自动对其格线来鉴别探针组。

[0305] 如前所述 (Rossel 等 (2007), *The Plant Cell*, 10. 1105/tpc. 1106. 045898) 进行分析, 包括 MAS5 归一化, 统计学分析和错误发现改正率。

[0306] 形态和生理学测量

[0307] 叶片测量

[0308] 使用定制的热电偶干湿计测量总水势 (Morgan, (1991), *Australian Journal of Plant Physiology*, 18, 249-257)。将叶盘在 22°C 置于平衡室中 4 小时。将珀尔帖冷却电流通过热电偶并在微伏计 (HR 33 Dew Point, Wescor, www.wescor.com/environmental) 中根据指针的偏向读出电动势 (emf)。通过将 emf 插入标准曲线而计算叶片水势 (MPa)。使用压力盘设备测定土壤水势 (Klute (1986), *Methods of Soil Analysis, Part 1, Physical*

and Mineralogical Methods—Agronomy Monograph no. 9 (Klute, A., ed. Madison, WI, USA : American Society of Agronomy—Soil Science Society of America, pp. 635–662)。

[0309] 还对叶片样品进行了多种生理学测量。记录叶片的厚度和表面积。在早期实验中,通过记录鲜重,在纸袋中在 60℃干燥 3 天,然后记录干重,从而测量叶片样品的相对水含量。然后使用下式计算它们的相对水含量 (RWC) :

$$[0310] \quad RWC(\%) = (FW - DW) / FW$$

[0311] 在后期实验中,从相同的植物切下莲座叶,记录鲜重 (Fw) 并在 4℃在水中黑暗培养至少 4 小时。印迹叶片并测定膨胀重量 (Dw)。如 (Jones, (2007), Journal of Experimental Botany, 58, 119–130) 计算相对水含量 :

$$[0312] \quad RWC = (Fw - Dw) / (Tw - Dw)$$

[0313] 气体交换

[0314] 在白昼光照生长 12 小时的植物上进行气体交换测定,促进生长并因此得到较大的叶片。唯一的例外是在干旱实验中的植物,其在白昼生长 16 小时。用 Li-6400 (Li-Cor, Lincoln, NE, USA), 按照生产商的说明进行气体交换。这个设备使叶片附着于植物上,植物固定在腔室中,并测定多个参数。在腔室中,可以控制光强度、波谱、温度、湿度和 CO₂ 浓度。通过比较进入腔室的和离开腔室的 CO₂ 和水蒸气量,可以推断光合作用的量和气孔的通透性。通过改变条件如光强度和 CO₂ 浓度,我们能看到气孔如何通过安排叶片的平均导度而作出响应。腔室为 2cm²,所以如果拟南芥叶片不完全覆盖这个区域,则导度将针对腔室内部的叶片区域而调整。

[0315] 高效液相色谱 (HPLC)

[0316] 通过 HPLC 分析叶片材料的类胡萝卜素谱。总而言之,在 500 μL 丙酮 / 乙酸乙酯的 60/40 (体积百分比) 混合物中研磨叶片材料。用 400 μL dH₂O 稀释,并在台式离心机中以最大速度离心 3 分钟。分级提取类胡萝卜素,并如 (Pogson, B. J., Niyogi, K. K., Bjorkman, O. 和 DellaPenna, D. (1998), “Altered xanthophylls compositions adversely affect chlorophyll accumulation and nonphotochemical quenching in Arabidopsis mutants”, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95 : 13324–13329) 所述使用 Agilent HPLC 和光电二极管阵列检测器分析。通过与标准品比较波谱和保留时间而鉴别类胡萝卜素,并使用极性消光系数记录峰面积用于定量。

[0317] C-13 测量

[0318] 叶片组织中 ¹³C 的量可以指示植物生命过程中的平均气孔大小,因为当气孔打开时,将更倾向于 ¹²C 而不是 ¹³C。称重叶片样品,得到鲜重,并于 60℃在纸袋中干燥 3 天。然后使用研钵和杵研磨干燥样品,并使用粉末测定样品中 ¹²C 对 ¹³C 的比例。

[0319] 叶绿素含量

[0320] 通过测定光吸收而测量总叶绿素含量,其中在 647nm 处测量叶绿素 a,在 663nm 处测量叶绿素 b。为了提取叶绿素,用滚珠和 700 μL 提取缓冲液 (80%丙酮, 2.5mM 磷酸钠缓冲液 pH 7.8) 在组织研磨仪中研磨 10–20 μg 叶片组织。然后在台式离心机中以最大速度将样品离心 5 分钟。然后在 647nm、663nm 和 750nm 处测量提取物的吸收值。在 750nm 处的吸收是背景吸收,因此从 647nm 和 663nm 处的吸收值减去背景吸收值。为了计算总叶绿素含量,使用下述等式 :

[0321] 总叶绿素 ($\mu\text{g}/\text{mg FW}$) = $17.76(A647-A750)+7.34(A663-A750)$

[0322] 花青素含量

[0323] 由 530nm 处的吸收值测定总花青素含量。在组织研磨仪中使用滚珠在 300 μL 酸化的乙醇 (1% HCl) 中研磨约 30mg 组织。为了提取花青素, 加入 250 μL 氯仿和 200 μL MilliQ H_2O 并漩涡震荡。然后在台式离心机中以最大速度将混合物离心 5 分钟。然后去除 200 μL 水相并在 530nm 和 657nm 处的吸收值。使用 96 孔板在读板仪中或在单独的比色杯中测定吸收值。然后通过从 530nm 处的吸收值减去样品雾化产生的吸收值 (657nm 处) 而计算花青素的吸收值。通过下述等式测定花青素的浓度:

[0324] $C = A / \epsilon L \times \text{体积} / 1000 \times \text{MW} \times 1 / \text{重量} \times D \times 106$

[0325] 其中 C 是浓度 ($\mu\text{g}/\text{g}$); A 是吸收值; ϵ 为 269000, 对于最丰富的花青素即矢车菊素-3-葡萄糖苷是常数; L 是比色杯的通路长度; 体积是提取物的总体积 (mL); MW 是 449, 矢车菊素-3-葡萄糖苷的分子量; 重量是初始的样品重量 (g); 并且 D 是稀释因子 (如果使用的话)。

[0326] 抗坏血酸实验

[0327] 测定冷冻叶片组织的抗坏血酸含量和抗坏血酸池的氧化还原状态。使用研钵和杵在液氮中研磨组织, 然后称出约 50mg 粉末放在冷冻的 1.5mLEppendorf 管中。加入四倍体积的提取缓冲液 (2% w/v 偏磷酸的 milliQ H_2O 溶液; SigmaUltra, SigmaAldrich, St. Louis, MT, USA), 并将样品漩涡震荡以彻底混合。然后在台式离心机中以最大速度 (16.1xg) 将样品在 4°C 离心 4 分钟。然后向 485 μL 实验缓冲液 (67.5mM KH_2PO_4 , 32.9mM K_2HPO_4 , 1.27mMEDTA) 中加入 50 μL 提取物, 并轻拍以混合。然后通过 265nm 和 415nm 处的吸收值测定还原的抗坏血酸含量。然后通过加入 33.3U 抗坏血酸氧化酶的实验缓冲液 (5 μL 6.67U/ μL , Calzyme Laboratories, San Luis Obispo, CA, USA) 溶液而氧化抗坏血酸池, 并测定吸收值。用 5 μL 0.2M 二硫苏糖醇的实验缓冲液溶液将另一个样品还原 20 分钟, 并测量吸收值。使用合适的空白。还计算了提取物的总体积。

[0328] 为了确定存在的抗坏血酸的量, 将 265nm 处的吸收值针对背景吸收和在 415nm 处的吸收值归一化。这样得到的抗坏血酸浓度能用来计算 mg/100gFW 组织。可以用初始样品浓度减去氧化的样品浓度计算还原的抗坏血酸池的量。可以用还原的样品浓度减去氧化的样品浓度测量存在的抗坏血酸的总量。

[0329] 氧自由基吸收能力 (ORAC) 实验

[0330] ORAC 实验测量物质的抗氧化能力, 并且广泛用于确定食品的抗氧化能力。对于拟南芥, 测试植物材料的提取物。这个提取物可以是膜结合的; 来自质膜、叶绿体类囊体和其它内膜上; 或者可溶; 来自胞液、液泡、叶绿体气孔等。实验测量抗氧化敏感荧光分子藻红蛋白 (R-PE; Sigma) 的荧光。向 R-PE 加入自由基产生剂 AAPH (Sapphire, BioScience), 结果使荧光缓慢下降。然后加入植物提取物, 或者降低下降速率, 或者增加下降速率, 依赖于是否分别具有更大的抗氧化能力或氧化能力。抗氧化剂 Trolox (Fluka) 用作标准, 替代植物提取物。Trolox 是维生素 E 衍生物。然后通过比较每条曲线的面积而以微摩尔 Trolox 当量 /g 鲜重组织将提取物的抗氧化能力定量。

[0331] 为了产生提取物, 将 20-100mg 成熟但未开始衰老的叶片在液氮中冷冻, 并在预先称重的 Eppendorf 管中测定它们的鲜重。然后将冷冻的组织研磨成细粉, 并重新悬浮于

400 μ L 无菌 milliQ H_2O 中。在台式离心机中以最大速度在 4°C 离心 30 分钟,使不溶于水的材料成球。去除上清液并用 PBS(磷酸缓冲盐;75mM, pH 7.0) 中稀释至浓度为 10mg 初始鲜重/mL。对于脂溶性提取物,在 dH_2O 中洗涤上述小球两次,然后重新悬浮于 400 μ L 丙酮中。然后在台式离心机中以最大速度在室温离心 10 分钟使固体材料成球。去除上清液并用 PBS 稀释至浓度为 10mg 鲜重/mL。

[0332] 对于实验本身,使用 Eclipse 分光光度计 (Cary),其能使用小搅拌棒在比色杯中混合样品,并且能同时测定四个样品的荧光。因此可以同时运行空白、标准和两个样品。这些由下述组成:

[0333] 1. 空白 -2738 μ L 3.38mg/L R-PE+150 μ L 1 \times PBS+150 μ L 320mMAAPH

[0334] 2. 标准 -2738 μ L 3.38mg/L R-PE+150 μ L 20 μ M Trolox+150 μ L 320mMAAPH

[0335] 3. 样品 -2738 μ L 3.38mg/L R-PE PBS+150 μ L 样品 +150 μ L 320mMAAPH

[0336] 首先,向搅拌的比色杯加入 R-PE 和样品/Trolox/PBS,并将荧光稳定在 \sim 800 超过大约 20 分钟。然后向所有比色杯快速加入 AAPH 并测定荧光强度的下降直至到达零。将每条曲线下的面积积分,针对稀释因子调整并计算抗氧化能力。

[0337] ABA 测量

[0338] 使用基于 Phytodetek Eliza 的实验 (Agdia, Elkhart, Indiana, USA) 测量叶片中的 ABA 含量。对于 ABA 提取物,富集约 100mg 叶片组织,并立即在液氮中冷冻。使用 Qiagen 组织研磨仪和滚珠将组织研磨成细粉。将冷冻的粉末悬浮于 1mL 提取溶液 (80% HPLC 级甲醇,100mg/L 丁羟甲苯,500mg/L 柠檬酸一水合物) 中,然后在暗处在 4°C 旋转 24 小时。然后在 1000 \times g 将样品离心 20 分钟,然后将上清液转移至新管中。将上清液在暗处使用 SpeediVac 以中热去除甲醇,干燥至约 50 μ L。然后用 TBS 缓冲液 (3.03g/L Tris 碱,5.84g/L 氯化钠,0.2g/L 七水合硫酸镁,0.2g/L 叠氮化钠, pH 7.5) 将剩余的液体稀释至 1mL。使用每个样品的 1 : 100 的 TBS 缓冲液稀释液进行实验。按照生产商的说明进行实验。在读板仪中在 405nm 处读板。

[0339] 试验了很多不同的提取操作规程,包括在重新悬浮前彻底干燥样品,过滤提取物和离心提取物。还试验了 20、100 和 200mg 的组织重量和 1 : 10 和 1 : 100 的稀释度。

[0340] 成像

[0341] 扫描电子显微镜

[0342] 在 Dr. Cheng Huang, ANU Electron Microscopy Unit 的帮助下进行过程。

[0343] 使用冷冻扫描电子显微镜将叶侧表面成像。概述之,将小片成熟叶片用组织冷冻培养基和碳糊的混合物固定粘附,帮助导电。然后在真空中将样品在液氮中冷冻,以快速冷冻并防止形成水晶体。然后在真空中将样品加热至 -90°C 至腐蚀,即除去样品表面的水晶体。然后使样品回到 -160°C,之后包被金颗粒。然后在 Cambridge S360 (SEM;1987;Leica/Cambridge, Wetzlar, Germany) 中将样品成像。

[0344] 使用相同的过程查看花苞和成熟叶片的横截面。然而这些样品冷冻后断裂。概述之,一旦固定并在真空中冷冻,敲打样品顶部,使样品断裂并露出横截面。

[0345] 透射式电子显微镜

[0346] 固定叶片样品

[0347] 将小片成熟叶片嵌入树脂中,用电子显微镜观察叶片横截面。首先用由 0.1M

cacolydehyde, 4% 甲醛和 2.5% 戊二醛组成的缓冲液在弱真空中将 3mm×3mm 的样品洗涤 2 小时。然后去除缓冲液并用 0.1M cacolydehyde 将样品洗涤三次共 15 分钟。然后用 0.1M oacic acid 和 0.05M cacolydehyde 缓冲液将样品固定 90 分钟。然后用水洗涤样品三次共 15 分钟。然后使样品通过甲醇梯度, 开始为 70% 甲醇, 然后通过 80%, 90%, 95% 和第三批 100% 甲醇。每次洗涤保持至少 15 分钟。然后用 100% 丙酮洗涤样品 15 分钟以替代甲醇。然后使样品接触水平不断升高的树脂(环氧树脂醛)中, 所述树脂用丙酮稀释。首先为 1/3 树脂: 2/3 丙酮, 然后是 1/2 树脂: 1/2 丙酮, 然后 2/3 树脂: 1/3 丙酮。每次至少 30 分钟, 并且旋转以混合。然后使样品接触纯树脂三次, 超过 2 小时, 去除任何酮。然后将样品和新树脂载于样品模子中, 在 60°C 过夜烘焙。

[0348] 切片和染色

[0349] 将嵌入的叶片材料切成薄片进行 TEM 并使用 Ultracuts Ultramicrotome (Reichert, Depew, NY, USA) 光学显微镜观察。制作玻璃刀将切片切下放在水上。在挑取至标本支撑格上之前用热使切片变平。然后将样品过夜放置干燥, 然后在暗处用 6% (体积百分比) 乙酸铀酰的水溶液染色 20 分钟。用 dH₂O 冲洗样品几次, 然后在柠檬酸铅中染色 10 分钟。在干燥前通过用 dH₂O 冲洗而去除染料。

[0350] 成像

[0351] 使用附着于 SIS Megaview III Widefield CCD 照相机 (1300×1024 像素, 12 字节; Soft Imaging Systems Corporations, Lakewood, CO, USA) 的 Hitachi H7100FA (125kV TEM; 1995; Tokyo, Japan) 摄取图像。

[0352] 光学显微镜

[0353] 在 Lily Shen, ANU Electron Microscopy Unit 的帮助下进行过程。

[0354] 用 ultramicrotome 切开的叶片横截面在玻片上干燥并用甲苯胺蓝染色, 然后用 dH₂O 冲洗。使用配备 SPOT CCD 照相机 (1300×1240, 36 字节色彩; Spot Images Corporation, Chantilly, VA, USA) 的 Zeiss Axioskop (Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Germany) 从下面获得固定玻片狭缝的图像。然后用 SPOT 高级软件处理图像。

[0355] 荧光素酶成像

[0356] 使用冷 CCD 照相机在体内检测转基因植物的荧光素酶活性。用 0.5mM 荧光素 (Biosynth, Switzerland) 喷灌植物, 所述荧光素为水溶液, 并且包含几滴 Tween-80 (Laboratory Supply, Australia), 均处理 15 分钟并立即成像。将植物置于暗处几分钟直至叶绿体荧光下降, 然后曝光 2 至 10 秒的不同时间。然后将这些整合, 以增加图像强度。使用冷 CCD 照相机 (Andor Technology, Japan) 并使用 ImagePro® Plus 4.5.1 (Media Cybernetics, USA) 处理图像。

[0357] 代谢物 / 溶质的提取和分析

[0358] 提取约 50mg 鲜重的叶片组织并基本如 Roessner-Tunali 等 (2003), Plant Physiology, 133:84-99 所述通过 GC-MS 分析。概述之, 在液氮中将组织冷冻, 然后在 Retsch 球磨中以 15 次振动 / 秒钟研磨 3 分钟。然后在 70°C 用 0.5mL 85% (体积百分比) MeOH/H₂O 提取组织粉末 (约 50mg) 15 分钟, 所述提取液中包含 0.2mg/mL 核糖醇作为内标。然后通过 20,000g 离心 10 分钟而使不溶材料成球。然后在真空下将 100 μL 上清液等分试样干燥, 并通过用 20 μL 20mg/mL 盐酸甲氧胺的无水吡啶溶液通过甲氧化而衍生干燥的

代谢物提取物 (30°C, 90 分钟)。为了将包含活性氢的活性功能团转化成它们的三甲基硅烷基 (TMS) 衍生物, 向反应混合物加入 30 μ L MSTFA, 并在 37°C 反应 30 分钟。然后将反应平衡至少 4 小时, 之后进行 GC-MS 分析。向 GC-MS 中注入 1 μ L, 并且使用 45 分钟温度程序在配备 10m 整合保护柱的 30mVarian Factor Four 5ms GC 柱上分离分析物。用从 40 至 600m/z 的扫描范围中, 以全扫描模式获得四极柱 -MS 数据。

[0359] 通过使用免费提供的 AMDIS 软件自动去卷积和整合峰, 进行数据分析, 所述软件可以与真正的质谱和保留指数的内部数据库相竞争。使用定制的 PHP 脚本自动处理 AMDIS 批次报告并在 Microsoft Excel 中可视化, 从而进行统计学分析。

[0360] 实施例 2- 结果

[0361] 在 EMS 诱变拟南芥种子后, 鉴别了 APX2 :LUC 表达改变的几株突变体, 包括 APX2 :LUC 表达增加的突变体 alx8。三株植物表现出抗旱性增加 - 保水 9 天后, alx8 突变体的叶片保持膨胀、绿色并且有活力, 而野生型叶片已枯萎死亡 (参见图 7)。发现 ABA 水平在 alx8 中更高, 尽管在相同时间, ABA- 依赖和 ABA- 无关途径中的组分都上调了 (Rosset, J. B., P. B. Walter 等 (2006), *Plant, Cell and Environment* 29(2) :269-281)。例如高光响应基因, ZAT10 和 APX2, 在 alx8 中均上调。然而, 认为 ZAT10 存在于 ABA- 无关途径中 (Zhang, J. Z. 等 (2004), "From Laboratory to Field. Using Information from Arabidopsis to Engineer Salt, Cold, and Drought Tolerance in Crops", *Plant Physiol.* 135(2) :615-621), 而 APX2 为 ABA 依赖的 (Rosset 等, 2006)。胁迫抗性基因的上调与先前的 fry1 突变体一致, 尽管每个突变体中上调的胁迫抗性基因不同, 例如 RD29A4 在 fry1-1 中上调 (Xiong, L. M. 等 (2001), "FIERY1 encoding inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in Arabidopsis" *Genes & Development* 15(15) :1971-1984), 但是在 alx8 中则没有 (Rosset 等, 2006)。相似地, 在 alx8 中观察到的胁迫抗性提高是新线索。alx8 还具有不寻常的莴笋样叶形。F1 和 F2 植物的研究表明, APX2 :LUC 表达增加和其它胁迫基因上调, 抗旱性和叶形改变共分离。

[0362] alx8 是 SAL1 中的点突变

[0363] 通过定位克隆和测序鉴别 alx8 点突变的位置。通过将 Col-0 背景中的 alx8 野生型 Landsberg erecta 杂交, 产生定位群体。F1 的叶形、发育和 APX2 表达为野生型 (未给出数据), 证明为隐性突变。F1 个体自体繁殖, 并且将分离的 F2 代播种在土壤上。通过叶形从 F2 代鉴别 alx8 突变均一的个体, 其表现为与抗旱性分离并且 APX2 表达增加 (Rosset 等, 2006)。用 400 个突变 F2 个体, 用遍布与拟南芥基因组中的 22 条引物进行第一次通过定位。这说明突变与染色体 5 的下半部相关。在这个区域用更多的标记进行深入的连接分析, 得到 617kb 的目的区域。用 617kb 区域侧翼的两个标记物 MUB3 和 MMI9, 对约 4000 个 F2 个体进行精确定位。

[0364] 为了确认 alx8 突变的位置, 使用 SAL1 基因和启动子的野生型拷贝补充突变体表型。两个确认的单独 alx8 转化体均具有野生型叶形和发育。互补的 alx8 的后代与 alx8 突变体表型有明显区别, 并且表现为正常的野生型叶形 (参见图 2)。这确认了 SAL1 中的突变的确负责突变体表型。还用这个构建体转化野生型植物, 但是叶形、APX2 表达或发育没有变化。

[0365] alx8 基因和 2kb 启动子的测序表明在 At5g63980.1 基因组序列 (TAIR 序列: 4010730406(2007 年 4 月 17 日), 登录号: NM_125794.4; SEQ ID NO:1; 图 3) 的第 1226 个碱基对存在鸟嘌呤到腺嘌呤的单个核苷酸多态性。这在编码序列 (TAIR 登录号: 4010745380(2007 年 8 月 16 日); SEQ ID NO:2, 图 4) 的第 217 个氨基酸处产生了甘氨酸到天冬氨酸的氨基酸变化。通过对多个突变植物的启动子和基因组序列的进一步测序, 确认这个突变为 SAL1 中的唯一突变。还通过使用衍生的裂解多态序列 (dCAPS) 标记物, 在四代逆交中筛选突变, 确认突变体继承叶形 (参见图 1A)。即, 植物中没有其它突变导致突变体表型。

[0366] 先前已鉴别了多个 SAL1 中的突变体, 包括温度敏感突变、渗透压胁迫调节基因表达 2 的高表达 (hos2; Xiong 等, 2004) 和 fry1 突变体 (fry1; Xiong 等, 2001)。fry1-1 突变导致第 341 个氨基酸从色氨酸变为终止密码子, 产生缺失 α 5 螺旋的截短蛋白质, 所述螺旋为酶活性所必需的 (Xiong 等, 2001)。使用针对酵母相似物 HAL2 的已知结构进行模拟蛋白质建模, 将 alx8 突变定位于蛋白质内部的保守 β -折叠。这个域没有已知的功能。

[0367] Salk_020882 突变体

[0368] 在 alx8 突变体的基因分型过程中, 对重组体的进一步基因分型和表型分型使目的区域缩小至 BAC 克隆 MBM17 和七个基因。为了确定 alx8 表型, 针对这些基因订购了很多 T-DNA 插入系。一个系, SALK_020882, 模拟 alx8 叶形改变和发育延迟的表型 (参见图 10)。这个系在 AT5G63980 基因中包含插入, 已知为 SAL1 (FRY1/HOS2)。为了确认等位性, 在 alx8 和 SALK_020882 之间杂交。所有后代都具有和两个亲本相同的叶形变化和同样延迟的发育, 表明两个突变体为等位的。还发现 SALK_020882 植物 (本文研究了两个特定系, 称为 salk1 和 salk2) 比 Col-0 野生型植物更能耐受干旱 (图 12 和 15)。这些突变体在获得自拟南芥生物资源中心 (ABRC) 的 Col-0 生态型中包含 T-DNA 插入系。同源植物具有改变的卷心菜样叶形, 如 alx8 (参见图 10), 并且具有卡那霉素抗性。突变与 alx8 是等位的, 并且这些突变体表现出抗旱性 (参见图 11、12 和 15)。Northern 印迹表明与 Col-0 野生型相比, 在 SALK_020882 系中仍然存在 SAL1 mRNA, 但是存在多个拼接变体, 并且 alx8 变体只有一个。

[0369] 由拟南芥信息资源 (TAIR) 给出的插入位点如图 9A 所示。通过从 T-DNA 插入的 LB 单次传递测序而建立。给出了互补序列, 即朝向基因的 5' 末端。

[0370] 为了确认插入的位置, 从来自一株植物的 DNA 上插入的 LB 进行 Tai1PCR。这导致如图 9B 所示的插入位点。由两侧获得的序列表明可能发生双插入。获得的序列还表明在插入位点附近缺失 11bp (参见图 9B, 与图 9A 相比较)。

[0371] 在 alx8 和 fry1-1 中不存在 SAL1 蛋白质

[0372] 由融合至多组氨酸标签泛素而为野生型 SAL1 和突变的 ALX8 产生重组蛋白质。在大肠杆菌中成功地产生两个融合蛋白质, 并且它们计算所得质量 (约 52kD) 对应于氨基酸序列加 14kD 标签的期望大小 (未给出数据)。尽管尝试了很多不同的诱导条件, 但是只有 SAL1 (野生型) 融合基因成功地从可溶组分中纯化得到。这个蛋白质还表现出与先前报道相似的 PAP 磷酸酶活性 ($16.6 \pm SE 3.65$ 微摩尔 PAP $h^{-1}mg$ 蛋白质, $n = 3$) (Xiong 等, 2001)。

[0373] 进行 Western 印迹分析, 确定野生型和突变植物中 SAL1 蛋白质的丰度。在裂解使多肽具有基于氨基酸序列的期望分子量 (37kD) 的标签后, 回收真实的 SAL1 重组蛋白质

(图 11A,泳道 10)。使用这个蛋白质增加多克隆抗体,其针对 SAL1 免疫亲和纯化。单一的 37kD 条带,其大小对应于重组蛋白质,在野生型植物的总可溶蛋白质提取物中检测得到,但是在突变体中则检测不到(图 11A)。此外,SAL1 蛋白质不存在于 alx8 的总蛋白质提取物中,但是存在于野生型 Col-0 中(图 11B)。

[0374] alx8、salk_020882 和 fry1-1 抗干旱

[0375] fry1-1 突变体是突变拟南芥系,其在正常条件下和低温、盐和渗透压和 ABA 处理后,胁迫抗性基因 RD29A 的表达增加。发现这是由于 SAL1 蛋白质 (At5g63980) 的第六个外显子中的终止密码子中产生点突变。这产生了不包含保守 α -螺旋的截短型蛋白质,其中所述螺旋包含金属离子和磷酸盐的协调以及亲核水活化所需的 WD-X₁₁-GG 基序。结果蛋白质对于 IP₃ 或 PAP 无活性。已报道 fry1-1 突变体对于盐、低温和渗透压的胁迫敏感增加 (Xiong L.M. 等, (2001), Genes & Development 15(15):1971-1984)。这个突变体还与 alx8 和 salk_020882 突变体显示的叶形变化相似。在本研究中,发现 fry1-1 植物同 alx8 和 salk_020882 突变体相似,在相似的发育阶段(参见图 7)或实龄(图 8A)接受干旱处理时,与野生型植物比较,具有相似的抗旱性。图 8A 显示,当 Col-0 和 C24 野生型植物在脱水 21 天后表现出萎黄病并且叶片枯萎时,alx8 和 fry1-1 植物在 25 天后仅表现出枯萎的迹象,并且图 15A 显示,alx8、salk_020882 和 fry1-1 植物在 18 天后未出现枯萎或变色迹象,但是野生型植物 (Col-0 和 Col-24 植物) 在 18 天后表现出枯萎和变色。如图 15A 所示,图中表示了 18 天脱水,然后再重新浇灌 3 天的结果,alx8、salk_020882 和 fry1-1 植物在 3 天内恢复活力,同时 Col-0 和 C24 野生型即使有恢复迹象也很少,大多数叶片变白并枯萎。这种模式在超过 10 次不同的实验中重现,每次实验至少有四株植物。

[0376] alx8、salk_020882 和 fry1-1 和抗旱性

[0377] 除了 alx8 和 fry1-1 丢失功能等位基因(并且推测 salk_020882 丢失功能等位基因)之外,已经描述了 fry1-1 的幼苗期对干旱敏感 (Xiong 等,2001),同时在土壤上生长的成熟 alx8 植物可耐受干旱 (Rosset 等,2006),如 salk_020882 植物一样。对 fry1-1 的描述基于从 1 周龄幼苗的离子泄漏向包含 PEG 溶液中浸入增加。然而未见到 fry1-1 和 C24 野生型的独立嫩枝的蒸发率有差别,表明气孔控制没有变化。为了研究 fry1-1 和 alx8 在这方面的差别,通过水分损失而监控 alx8、fry1-1、Col-0 野生型和 C24 野生型独立莲座的蒸发。在初始阶段或二级阶段,四种类型之间均未看到显著差异,表明表皮相似。

[0378] 然后通过成熟植物保水 28 天而测试 fry1-1 突变体基于土壤的抗旱性。在多次实验中,fry1-1 比 C24 野生型更能耐受干旱(参见,例如,图 7、8A 和 15A)。为了确保两组植物都接触相同的胁迫条件,通过将盆重量计算为初始盆重量的百分比而近似计算土壤的相对水含量。在实验过程中,fry1-1 和 C24 野生型植物之间土壤水含量没有显著差异(图 8B)。将这转化为土壤水势,并且土壤水势之间仍然没有显著差异。

[0379] 类似地,在多次实验中未见到 alx8 或 salk-020882 植物和 Col-0 野生型的土壤水含量之间有显著差异(图 8B、15B 和 21C)。为了确保和 alx8 的耐受结果不仅仅是发育延迟或尺寸更小的结果,测试了在多个发育阶段的 alx8 的抗旱性。在 2、4、6 和 8 周龄,alx8 比 Col-0 野生型更耐干旱。当两种植物类型都具有六片叶子;都是成熟植物时;和当两者处于相同发育阶段,刚刚开始结花苞时,alx8 也比 Col-0 野生型更耐干旱(图 21)。当植物刚刚开始开花时(图 21A),植物基本具有相同的莲座区域和大小,但是在保水 9 天后,alx8

和 sal1k-020882 比野生型 Col-0 更膨胀并呈现绿色, 尽管水损失率相似 (图 21C)。类似地, 生长至发育的相同成熟绿色阶段的 alx8 和 fry1-1 植物更耐干旱, 在这个阶段野生型植物为 8 周龄, alx8 植物为 4 周龄 (图 21B)。测定四种基因型的独立莲座水损失, 以确定叶片和莲座形状是否会改变损失率或水损失, 或者它们是否有区别地调节通过气孔控制的水量 (水损失的初始阶段) 和蒸发 (水损失的第二阶段)。在任何阶段, 四系植物之间未见到显著差异 (图 21E)。因此, 叶形和莲座形状的改变不影响水从独立植物损失的速率。最后, 评价相同年龄植物的抗旱性, 其中将 1 株 Col-0 植物每盆与 2 株 alx8 植物每盆比较, 使植物大小之间的差异相等, 并且 alx8 比 Col-0 更耐干旱, 可保水。这表明不是 alx8 的发育延迟或土壤水含量的差异导致 alx8 的抗旱性。此外, 从切下莲座蒸发不总是与土壤中生长的植物的抗旱性相关。

[0380] 为了将 alx8 植物的耐干旱程度定量, 使用叶绿素荧光测定植物活力。alx8 植物表现出的干旱存活时间比 Col-0 长 40-50% (未给出数据)。

[0381] 在不同的实验中, 在无胁迫条件下和干旱 12 天后测定叶片相对水含量 (RWC) (图 16A)。如同期望的, alx8 的叶片 RWC 在干旱期间未显著改变, 而野生型的叶片 RWC 显著下降。针对相同的植物, 使用热电偶湿度计计算叶片水势, 或者用水的化学势除以偏摩尔体积 (图 16B)。在干旱条件下生长的 psychrometer 植物的水势更高, 与保持的膨胀性相对应, 而水胁迫的野生型植物的叶片水势显著降低。

[0382] 最后, 针对 fry1-1 和 alx8 突变体和它们各自野生型 (C24 和 Col-0) 测定独立莲座的水损失, 以确定是否差异性调节通过气孔控制的水量, 即初始阶段水损失, 或蒸发, 即第二阶段水损失。在任何阶段均未见到显著的差异 (数据未给出)。

[0383] SAL1 是高度保守的蛋白质

[0384] SAL1 在所有生物体之间高度保守。因此同源性存在于所有作物种类中, 这些作物种类的基本序列信息可获得。理想的是, SAL1 及其同源物存在于所有植物种类中。这可通过植物中已测序的同源蛋白质的图 5 中的比对而阐释。搜索其它植物种类的表达序列标签 (EST), 查找 SAL1 mRNA, 并且发现了很多同源序列 (图 6A-6C)。

[0385] 拟南芥基因组中也存在几个同 SAL1 同源的基因。

[0386] alx8 突变的分子效应

[0387] 在 fry1-1 和 alx8 中测定了 13 个胁迫响应基因的表达。这些基因中只有有限数量的基因在正常条件下在突变体中的表达增加: fry1-1 中的 COR47; 和 alx8 中的 APX2、RAP2.6、ZAT10、ZAT12 和 DREB2A。RD29A 在 fry1-1 中的表达增加, 但是在 alx8 中没有增加。在正常条件下, 在 fry1-1 中, 胁迫响应基因 HSP70、KIN1、COR15A 和 ADH 基本未上调 (Xiong 等, 2001)。类似地, 在正常条件下, 在 alx8 中, 胁迫响应基因 sHSP、GST6 和 APX1 基本未上调。这令人惊讶地在这些突变体中得到了 IP_3 更高的组成水平, 并且表明 IP_3 信号传导可以仅涉及部分胁迫响应途径。为了进一步研究胁迫响应途径的上调, 以及其它非胁迫相关途径, 通过微阵列测定了全局表达。

[0388] 在 ATH 1GeneChip (Affymetrix, Santa Clara, Ca, USA) 上定量的约 24,000 个基因产物中, 相对于在 Col-0 野生型中的表达, 1414 个基因在 alx8 叶片组织中显著上调超过 2 倍。1033 个基因显著下调超过 2 倍。在正常生长条件系, 在 fry1-1 中, 相对于 C24 野生型, 1099 个基因显著上调, 并且 745 个下调, 超过 2 倍。这种对上调的偏向性符合 SAL1 作为

信号传导通路的负调节子的推测目的。alx8 和 fry1-1 中表达变化之间的重叠令人惊讶地限于上调基因,两个突变体之间仅有 727 个基因相同,在下调基因中,仅有 395 个相同。调节的这些差异不同于 C24 和 Col-0 野生型之间的差异。因此,这证明相似突变能在不同生态型中引起多大程度的不同表达模式。

[0389] alx8 中很多胁迫响应基因上调,包括 ABA- 依赖型途径中涉及的那些基因,例如:

[0390] - 液泡膜水通道蛋白 (TIP5 ;1) 的上调,其通常由蔗糖、盐和 H₂O₂ 下调,但是由 ABA 上调;和

[0391] - 开花的负调节子 CONSTANS-LIKE 9 (COL9) 在 alx8 中高度上调。COL9 的过量表达导致 CO 和 FT 的下调,和延迟开花,而 T-DNA 敲除使开花较早 (Xiao-Fei Cheng, Zeng-Yu Wang (2005), "Overexpression of COL9, a CONSTANS-LIKE gene, delays flowering by reducing expression of CO and FT in Arabidopsis thaliana" The Plant Journal 43 (5) :758-768)。这个结果与在这些研究过程中的观察相对应,表明研究的 SAL1 突变体中开花与野生型植物相比延迟了四到五周。图 15 表示在 2、3、5 和 8 周龄时的 alx8 和其相应的 Col-0 野生型植物。

[0392] 在 alx8 中 APX2 (倍数变化 = 9.3, p 值 = 0.003); ZAT10 (倍数变化 = 5.00, p 值 = 0.028) 和 RAP2.6 (倍数变化 = 3.1, 但是标准偏差较大) 的表达增加。有趣的是,在 alx8 或 fry1-1 中, COR47 和 RD29A 的表达都没有显著增加。通过实时 RT-PCR 确认了缺乏 RD29A 的诱导。因此可能是实验操作过程中环境中生长或干扰的差异诱导了 fry1-1 中的这两个基因。在水分充足条件下 alx8 中针对 NCED3、GST6、APX1、RD29A 和 DREB2A 的阵列中没有任何变化,这与已发表的结果一致 (Rosset 等, 2006)。

[0393] alx8 中很多胁迫响应基因上调,包括转录因子如 ZAT10、ZAT12、MYC2 和 HB6。上调的其它胁迫响应因子包括:几个早期光诱导蛋白质, ELIP; 水通道蛋白 TIP5 ;1; 胁迫信号激酶 SnRK2.2; 胁迫诱导蛋白质, VSP1 和 VSP2; 和抗氧化酶 CSD1 和 CSD2。

[0394] 为了进一步研究在 alx8 中组成型上调的途径的类型,使用 Genevestigator, 将表达量上调超过 25 倍的基因与公共数据库中保存的在其它阵列中的表达比较。除了 alx8 的 ABA 含量增加之外, alx8 的表达模式和胁迫 ABA 之间没有较强的关联。只有 10% 的基因也由 ABA 上调,数目与通常由 ABA 下调的数目相似。在任何激素处理之间没有较强的关联。在 alx8 的表达模式和对非生物胁迫比如渗透、创伤、热、氧化、低温和盐之间有一些关联,但不强。alx8 中百分之二十的上调基因为 ABA 诱导的,但是数目和由 ABA 下调的基因数目相似。相似地,其它激素处理之间没有较强的关联,除了与茉莉酸处理之间存在轻微的关联。

[0395] SAL1 对气孔的作用

[0396] 先前, alx8 表现出相对于 Col-0 野生型在不同的光强度范围具有较低的气孔导度 (Rosset 等, 2006)。这种降低可能由多个因素导致,包括植物的形态、生理和分子谱的变化。

[0397] 导度下降可能由于 alx8 气孔的密度、大小和 / 或形态改变。因此用冷冻扫描电子显微镜 (SEM) 观察气孔。气孔外观正常,并且不像气孔发育出现突变的其它突变体中见到的聚集现象。气孔不是位于凹陷中,这会由于边界层效应而增加阻力,从而降低导度。alx8 的大小与 Col-0 野生型中相似。使用 SEM, 计算叶侧表面上的气孔密度,发现在 alx8 中略高于 Col-0 野生型植物。与突变体如气孔密度和分布 1 (ssd1 ;AT1G04110) 相比,这种增加小得多, ssd1 叶侧气孔密度提高 2.5 倍 (Schluter 等, 2003)。此外, alx8 和 Col-0 野生型

中表皮细胞数目增加,导致出现相似的气孔指数。这进一步由不同实验中生长的 a1x8 和 Col-0 野生型植物中气孔的表皮而确认。此时 Col-0 野生型和 a1x8 之间的气孔密度没有显著差异。再次比较了两种植物类型之间的气孔指数。这里强调了气孔指数作为气孔数目的度量值在比较发育发生变化的植物组织中的作用。除了叶片具有相似年龄外,它们的扩展阶段可能不同,导致细胞密度更高。如果气孔数目是 a1x8 耐干旱性的因子,可以期望 a1x8 比 Col-0 野生型的气孔指数低。事实并非如此,并且因此气孔的功能可能改变。

[0398] 通过降低气孔开度也可以降低导度。使用碳-13 歧视 (discrimination) 了解植物生命过程中平均气孔开度是否有差异。当气孔打开并且气体自由地在气孔内外交换时,由于 RUBISCO 的区别,植物优先固定 $^{12}\text{CO}_2$, 而不是 $^{13}\text{CO}_2$ 。然而当气孔关闭时,气体路径受限,并且植物被迫使用 $^{13}\text{CO}_2$ 。因此可以使用植物中 $^{13}\text{CO}_2$ 对 $^{12}\text{CO}_2$ 的比例表明植物的平均气孔导度。在正常生长条件下,发现在野生型和 a1x8 之间的 $^{13}\text{CO}_2$ 利用上没有差异。这表明在正常生长条件下,野生型和 a1x8 之间的平均气孔开度可比。通过历时九小时的叶片表皮剥落而测定气孔开度,从而确认了这一结果。同样地,在这个时间段,a1x8 和 Col-0 野生型之间未见到开度有显著差异。

[0399] 为了了解对于干旱的响应,气孔开度是否有任何显著差异,对于已经在干旱胁迫下 20 天的植物进行了 $^{13}\text{CO}_2$ 歧视研究。只富集了干旱处理过程中发育的组织。受干旱影响的植物的 $\delta^{13}\text{C}$ 高于对照植物,对照植物为 Col-0 野生型和 a1x8,表明气孔开度降低。受干旱影响的 a1x8 的 $\delta^{13}\text{C}$ 未高于受干旱影响的 Col-0 野生型,表明在干旱过程中 a1x8 的气孔开度未减小。因此可以看出对于 a1x8,观察到的导度减小是由于气孔开度以外的因素引起的。

[0400] 叶形

[0401] 已经确认,形态变化,比如多汁、叶毛增加,能改变抗旱性。a1x8 的叶形改变成 Col-0 野生型植物的叶形。叶子更短、更圆,并且浅裂叶缘更多。叶片表面经常有起伏,并且叶柄长度降低,得到莴笋样外观的莲座。SALK_020882 突变体的叶形与 fry1-1 突变体相似(参见,例如,图 7 和 8A)。叶片表明起伏度增加能增加边界层效应,减小蒸发。

[0402] 测量了叶片厚度,发现 a1x8 中的叶片厚度显著大于 Col-0 野生型植物(图 18A 和 B)。这个厚度意味着水蒸气到达气孔开放处的距离更长,并且可以抑制叶片的水分丢失。叶片厚度的增加还导致表面积对体积的比例下降,这可以降低表皮上的水分丢失。通过光学显微镜观察的叶片横截面也表明 a1x8 中叶片内部结构有很多变化,包括无序的维管束、细胞形状改变和叶绿粒更小(图 18B)。表皮是另一个水分从叶片损失的来源。然而与 Col-0 野生型相比,a1x8 中的表皮厚度或结构没有可见的差异。此外,相对于 Col-0 野生型,在 a1x8 中的表皮合成基因如 WAX2 (At5g57800)、CUT1/CER6 (At1g68530) 和 CER1 (At1g02205) 没有显著变化。

[0403] 尽管发育延迟并且由于叶片和莲座形态的变化看起来更小,但是 a1x8 植物和野生型通过八周的生长积累了相似的莲座鲜重和干重(未给出数据)。

[0404] 细胞形态和渗透势

[0405] 通过透射式电子显微镜更近地观察了 Col-0 野生型和 a1x8 的叶绿粒,并且发现 a1x8 叶绿粒缺乏淀粉颗粒。这种淀粉积累的抑制进一步通过碘染色在 a1x8 以及 fry1-1 中得到确认(图 19)。植物通常在白昼在叶片中积累暂时性淀粉,并在夜间将其分解。如同期

望的,野生型叶片在夜晚比早晨的淀粉多。相似地,alx8 和 fry1-1 叶片在夜间比早晨积累更多的淀粉。然而,在水分充足的条件下,野生型植物中存在的量基本较少。

[0406] 淀粉的减少与 alx8 中 β -淀粉酶, BMY1 和 BMY8 的表达增加有关。这些酶将暂时性淀粉水解成麦芽糖和 β -限糊精,其可以增加植物细胞的胞内渗透势。

[0407] 通过 GC-MS 分析了 alx8、fry1-1 和它们各自的野生型在水分充足的生长条件下的代谢谱。

[0408] 所有四个系具有不同的谱,如由主成份分析 (PCA) 所表明的, C24 和 Co1-0 之间有一定程度的重叠 (图 20)。两种突变体由第一主成份 (PC1 ; 占总变异的 47.2%) 而明显区别于它们各自的野生型, 第一主成份代表由 PCA 可见的最大分类别。有趣的是, 第二主成份 (PC 2 ; 占总变异的 25.1%) 清晰地将 alx8 和 fry1-1 区别开来, 而两种野生型则没有。在 SAL1 突变体中, alx8 和 fry1-1 中的多胺、腐胺的水平明显增加 (表 2)。这与限速多胺生物合成基因精氨酸羧化酶 ADC2 表达增加 (6.43 倍) 和可将亚精胺转化成精胺的酶 ACL5 的表达下降 (-3.90 倍) 有关。相对于 Co1-0, 除了脯氨酸生物合成基因, 吡咯啉-5-羧化还原酶增加 (3.61 倍) 外, alx8 中的脯氨酸丰度没有显著差异。在 alx8 和 fry1-1 中, 大量糖的丰度有变化, 包括果糖、半乳糖、葡萄糖纤维二糖和大量未知糖和糖衍生物的水平极大下降 ; 和大量未知糖 / 糖衍生物的加大积累, 所述未知糖 / 糖衍生物在野生型植物中的水平检测不到或几乎检测不到 (表 2)。还令人吃惊的是, 有机酸柠檬酸、异柠檬酸、延胡索酸和苹果酸的极大下降和大量未知类别代谢物的极大增加, 其中一些与吲哚相关化合物有特别的同源性 (表 2)。

[0409] 表 2-SAL1 突变体的特色代谢谱

[0410]

代谢物类别	代谢物名称	<i>alx8</i> 对Col-0		<i>fry1-1</i> 对C24	
		倍数差异	p-值	倍数差异	p-值
有机酸	柠檬酸	<0.01	<0.001	0.09	0.009
	延胡索酸	0.03	0.003	0.08	0.001
	异柠檬酸	0.05	0.014	0.03	0.004
	苹果酸	0.08	<0.001	0.21	0.021
多胺	腐胺	15.2	0.008	5.23	0.001
糖	[未知二糖] RI=2869	0.01	<0.001	0.01	<0.001
	葡萄糖	0.03	<0.001	0.09	<0.001
	[未知二糖] RI=1946.9	0.04	0.001	0.11	<0.001
	[未知糖] RI=2116.9	0.05	<0.001	0.19	0.001
	[未知糖] RI=2122.6	0.05	<0.001	0.16	0.001
	纤维二糖	0.06	0.047	0.06	0.007
	半乳糖	0.11	0.001	0.09	<0.001
	果糖	0.16	<0.001	0.29	0.002
	[未知二糖] RI=2730.9	0.16	0.044	0.3	0.035
	[未知单糖] RI=1777.7	0.32	0.002	0.14	0.001
	[未知, 与半乳糖醇类似] RI=2963	0.41	0.007	0.07	0.003
	[未知糖] RI=2094.1	0.45	0.012	0.66	0.041
	[未知的假定二糖] RI=2836.1	0.45	0.009	0.22	<0.001

[0411]

	[未知二糖] RI=2534.4	5.63	<0.001	5.97	0.001
	[未知二糖] RI=2544.4	13.92	<0.001	5.39	0.002
	[未知的假定二糖] RI=2808.4	50.86	<0.001	22.62	0.002
	[未知的假定二糖] RI=2923.4	75.11	0.001	26.13	0.018
	[未知的假定二糖] RI=2898.4	155.75	<0.001	227.13	0.001
	[未知糖] RI=2149.9	168.5	<0.001	60.67	0.001
	[未知的可能二糖] RI=2748.9	313.1	<0.001	136.59	<0.001
	[未知的假定二糖] RI=2997.5	2767.48	<0.001	5684.57	<0.001
	[未知的假定二糖] RI=2915.4	4624.26	<0.001	456.97	0.001
未知类	[未知] RI=2656.2	13.33	<0.001	34.94	0.026
	[未知] RI=3116.0	778.55	<0.001	92.18	<0.001
	[未知] RI=2656.2	1027.05	<0.001	1100.47	0.006
	[未知, 可能与吲哚有关] RI=1404.6	99.82	0.002	26.54	0.005
	[未知, 与色胺有关] RI=1505.1	16.38	0.003	32.48	0.001
	[未知, 可能与吲哚有关] RI=1389.1	200.04	<0.001	104.69	0.002

[0412] 给出了 alx8 和 fry1-1 共有的主要 (最大的) 代谢物差异的倍数差异和 p- 值 ($n = 5$)。根据质谱与 NIST05 质谱库中参照谱的相似性对未知代谢物 (方括号中的内容) 进行了注释。为未知的代谢物给出了保留指数。RI = “保留指数”。

[0413] 讨论

[0414] alx8 突变体的抗旱性表现出是由于在胁迫条件下蒸发的减少, 导致叶片和土壤中相对水含量更高。然而, 蒸发的减少似乎不是由于干旱诱导的气孔关闭引起的。碳歧视和切下莲座脱水实验都表明在干旱条件下, 与 Col-0 野生型相比, alx8 中气孔关闭较少。因此水分损失的减少是由于 alx8 中其它形态、生理或分子变化, 或者它们的组合。

[0415] alx8 的结构形态变化能引起干旱胁迫下水分损失的减少。叶片厚度增加和无序的维管束可以使水在植物中移动和水蒸气在气孔下的扩散减慢。相似地, alx8 的根形态发生变化, 在水胁迫条件下改变水分摄取和移动。

[0416] 除了缺乏对已知胁迫响应基因的诱导之外, 在 alx8 的代谢谱中仍然有很多变化,

这些变化与胁迫响应有关,包括多胺、海藻糖和甘油的增加。

[0417] *alx8* 和 *fry1-1* 中渗透压保护剂的积累可能是导致它们的抗旱性的因素。*alx8* 中的多胺,腐胺的水平比其相应的野生型 *Col-0* 高 15.2 倍 (p -值 = 0.008)。相应地,*alx8* 中多胺生物合成酶 ADC2 的表达更高,所述酶通常上调而响应渗透压胁迫 (Perez-Amador, M. A. 等 (2002), *Plant Physiology*, 130, 1454-1463)。在多种耐干旱小麦和耐氧化胁迫的各种杂草,香丝草中已经报道了组成型的高腐胺水平 (Ye 等, (1997), *Plant Physiology*, 15, 1443-1451)。先前,通过过表达生物合成基因而增加多胺水平已经显示出可诱导对于各种非生物胁迫的耐受性,包括干旱 (Kurepa 等, (1998), *Plant Cell Physiology*, 39, 987-992; Kasukabe 等, (2004), *Plant and Cell Physiology*, 45, 712-722)。尽管腐胺在耐受性中的确切作用尚不确定,已经报道可能的作用是直接或间接的抗氧化防御 (Ye 等, 1997) 和作为干旱过程中精胺和亚精胺合成的调控子,以全植物水平提供抗衰老作用,得到表型正常的植物 (Capell 等, (2004), *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 101, 9909-9914)。

[0418] 在 *alx8* 叶片组织中很多糖的水平也发生了改变,包括很多未鉴别的糖的大幅增加 (表 2)。这些变化与 *alx8* 的叶绿粒中暂时性淀粉的积累下降 (图 19) 负相关。糖在渗透胁迫响应中可能具有重要作用,作为渗透压保护剂,保护大分子和防止膜融合 (Bartels 和 Sunkar, (2005), *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24, 23-58)。因此,*alx8* 叶片组织中糖组分的变化可能与其抗旱性有关。

[0419] 对于干旱条件的预适应和 *alx8* 的发育改变不影响植物在水分充足条件下的水分平衡。然而,这可以解释 *alx8* 的暂时生长延迟,因为资源分配给胁迫抗性机制,不能进入生长。这种影响是暂时性的,因为到发育后期,*alx8* 和 *fry1-1* 的莲座干重与其相应的野生型相似。

[0420] 对于 *alx8* 和 *fry1-1* 突变体,在代谢物中观察到的差异在正常生长条件下已经存在,表明对干旱的预适应。突变体的这种预适应不影响植物在水分充足条件下的水分平衡。在叶片水势或相对含水量上未见到差异。*alx8* 和 *Col-0* 野生型之间在这些条件下还存在相似的气孔开度,如碳歧视和表皮叶片剥落所示。

[0421] 因为在这些条件下 *alx8* 和 *Col-0* 野生型之间的光合作用速率相似,所以 *alx8* 的发育延迟可能是由于资源的重新分配和生长抑制途径的活化,而不是资源匮乏。

[0422] *SAL1* 中丧失功能的突变导致与野生型植物相比,在无胁迫生长条件下, > 1000 个基因上调和 500-1000 个基因下调。*SAL1* 作为胁迫和发育中的基因表达调控子的作用再次由其在翻译后基因沉默中的负作用 (Gy 等, (2007), *Plant Cell*, tpc. 107. 055319) 和 *SAL1* 突变体的形态和开花时间变化而得到证实。事实上,在 *alx8* 中受到差异调控的 2447 个基因中只有 7.6% 划分为胁迫响应基因 (未给出数据),并且其中大部分都不受 ABA 的诱导。这表明不是所有的胁迫响应途径在无胁迫生长条件下在 *alx8* 中都是组成型活化的。例如,在无胁迫叶片中,APX2、RAP2.6、sHSP 和 DREB2A 诱导倍数在 2 和 20 倍之间,但是高光胁迫 (HL) 导致相同基因的 25 至 700 倍诱导,证明调控这些基因的其他途径为胁迫诱导型 (Rossel 等, 2006)。第二,脱水响应的 RD22 的表达由 ABA 上调 (Yamaguchi-Shinozaki 等, (1992), *Plant and Cell Physiology*, 33, 217-224),并且这种诱导部分依赖于转录因子 MYC2,其过量表达时会导致 RD22 的组成型诱导 (Abe 等, (1997), *Plant Cell*, 9, 1859-1868; Abe 等,

(2003), *Plant Cell*, 15, 63-78)。然而在 *alx8* 中,除了 MYC2 表达增加 8.2 倍之外, RD22 的表达下调 3.7 倍。相似地,没有 ADH1 或 KIN2/COR6.6 的显著诱导,其已经表现为 ABA 响应型和受 MYC2 调节 (Abe 等, 2003)。这表明为完全活化胁迫响应,除了 *alx8* 和 *fry1* 中组成型活化的与 ABA 无关的途径之外,还需要多个途径之间的互相作用。

[0423] 在已知的胁迫响应转录因子中,在无胁迫条件下 *alx8* 中一个小子集显著上调,包括两个锌指转录因子, ZAT10 和 ZAT12。ZAT10 和 ZAT12 都参与非生物胁迫响应途径比如干旱和高光 (Sakamoto 等, (2004), *Plant Physiology*, 136, 2734-2746 ;Davletova 等, (2005), *Plant Physiology*, 139, 847-856 ;Rosset 等, (2007), *The Plant Cell*, 10. 1105/tpc. 1106. 045898)。ZAT10 的过量表达诱导的 APX2 表达,并且使 HL 中 18% 的基因上调 (Rosset 等, 2007)。相应地, *alx8* 中 24.6% 的基因也由 HL 诱导上调,进一步突出了干旱和 HL 胁迫响应网络之间存在重叠。SAL1 在维管组织中的高水平表达 (Xiong 等, 2001), 表明其在干旱胁迫过程中具有信号转导的作用。这种定位和在维管束鞘所见到的 H₂O₂ 生产与抗氧化酶表达的增加以应对其它非生物胁迫如 HL 有关 (Karpinski 等, (1999), *Science*, 284, 654-657 ;Rosset 等, 2007)。此外, APX2 和 ZAT10 表达主要集中在维管,这可以说明 SAL1 在相似的 ROS 介导的响应调控中的作用。

[0424] 干旱诱导 ABA 的增加,并且通常限速 ABA 生物合成酶 NCED3 和 NCED1 表达相应增加 (Iuchi 等, (2001), *Plant Journal*, 27, 325-333)。然而这些基因在 *alx8* 中未上调,基因的下调也和 ABA 分解代谢无关,事实上分解代谢酶 CYP707A1-4 上调 (未给出数据)。因此, *alx8* 中 ABA 含量的增加 (Rosset 等 2006) 未表现出受转录调节。

[0425] 与野生型相比, *fry1-1* 中大多数上调 (66%) 和下调 (53%) 基因在 *alx8* 中共表达。然而, *alx8* 和 *fry1-1* 之间的基因表达和代谢谱有差异,它们都在相同的基因中发生功能丧失的突变,因此这个结果很有趣。C24 和 Co1-0 具有独特尽管相似的代谢谱,并且因此生态型差异微妙地改变 SAL1 的作用和其丧失对每个生态型的影响。

[0426] 在这些研究中另一个有趣的观察结果是研究的 SAL1 突变体相对于野生型植物的开花时间延迟,并且这与开花的负调控子 CONSTANS-LIKE 9 (COL9) 的强烈上调相关联。这可以用于农业的很多方面中,包括牧场植物开花延迟 (并且因此,通常衰老),产生生长期延长的植物,其可以获得更高产量或者更大的部位 (比如花、茎、叶、块茎等)。增加植物中 SAL1 的表达可以具有相反的作用。

[0427] 结论

[0428] SAL1 突变体在长时间干旱后的存活率比野生型植物高 40-50%,并且虽然发育发生了改变,但是完全成熟的植物中叶片和茎的生物量未变。不希望受到理论的束缚,我们假设 SAL1 蛋白质在调控形态、生理和分子变化的途径中有负调控作用,其获得导致胁迫网络诱导加强。结果增强了对干旱的耐受性而不是不做响应。这可以由一定程度的预适应说明,比如胁迫响应基因如抗氧化 APX2 的组成型上调,渗透压保护剂如多胺和糖的积累,和无胁迫条件下脱落酸的积累。因此, SAL1 表现出可负调节抗旱性并且因此,突变体在水胁迫下保持完全的膨胀和水势。

[0429] 应理解的是,尽管本文为阐述目的而描述了本发明的特定实施方式,但是在不偏离如下述权利要求所定义的本发明的精神和范围的情况下可以作出各种修正。

<110> 澳大利亚国立大学

<120> 提高植物胁迫抗性的方法和材料

<130>805290C

<150>2007903309

<151>2007-06-20

<150>2008901466

<151>2008-03-26

<160>62

<170>PatentIn version 3.2

<210>1

<211>2122

<212>DNA

<213> 拟南芥属

<220>

<221>misc_feature

<222>(29).. (31)

<223> 起始密码子

<220>

<221>misc_feature

<222>(1226).. (1226)

<223>alx8(g1226a) 中的点突变

<220>

<221>misc_feature

<222>(1989).. (1991)

<223> 终止密码子

<400>1

gacatatatt	tatcttcttg	aaaagecaat	gatgtctata	aattgttttc	gaacagcgaa	60
ggctccgctt	caatcatttg	tagcagtaag	aacgaattcg	agacctagaa	attcatcgaa	120
ccgtctcggt	tctgtattcg	gacgcaagtc	ttcttctcct	tcatttgta	ctctcagagt	180
tgtttcatcg	atggcttacg	agaaagagct	tgatgctgct	aagaaagctg	cttcactcgc	240
tgctcgtctc	tgtcaggtta	gggttttttc	gattcaatca	tgacctatag	attctaaagt	300
ttgattcttt	aagaaacca	ttttgtaaat	cttccaaatt	tcgtttaaca	ttttgtgttt	360
attgtgcatt	gcatctgtaa	ttgggaatag	attctagtga	tatagtgtaa	tggtcctcta	420
catacgaagc	tcgtgtaaat	ctttgatcaa	aatcttatct	ttgtgttttg	ggtttgtttc	480
agaaagttca	aaaggctttg	ttgcaatcag	atgtgcaatc	aaaatctgat	aaaagtccag	540
tgaccgttgc	tgattatggg	tagtttgta	tacctgtccc	tgattagaaa	aagctcttct	600
ctttgaatgt	tactgagatt	gtaggaaat	cacttaattt	gatctgtcct	gtgttgaatt	660
tcaggttcac	aagcagttgt	tagtttagtc	ttagaaaaag	agctcagttc	tgaacctttt	720
tcattgggtg	ctgaagaggt	gaaactgctt	aataaatcct	tgtagatgt	ctcacacttt	780
acttatcttt	gagtttgtgt	ttatggactc	acattgtcta	aaatgatcta	tataggactc	840
aggcgatcta	cgcaaggatg	gttctcagga	tactctggag	cgcatcacia	aactcgtgaa	900
cgacactttg	gctaccgagg	aatcgtttaa	tggtctact	ttgtctactg	atgatctact	960
tagagccatt	gactgtggaa	catctgaagg	tggtccaaat	ggctgacact	gggtcttggg	1020
tccaattgat	ggcactaaag	ggtacgtttt	aaaactaact	agcctaaagt	caaatcttct	1080
tatttcagag	aaaatgtaaa	tttgatagaa	tgttgagtca	gatgttatgt	tcctgacact	1140
gagcattttc	atgatttttag	atttctgagg	ggagatcaat	acgcagtagc	actaggattg	1200
ctcgaggaag	ggaaagtagt	tttaggtgtg	cttgcttgtc	caaacttgcc	gtagcatcc	1260
atagcaggaa	acaacaagaa	caaatcttcg	tcagacgaaa	ttggatgcct	cttctttgct	1320
acaattgggt	caggacata	tatgcagctc	ctagattcaa	aatcttctcc	tgtaaaagtg	1380
caagtctcta	gtgttgagaa	tctgaagag	gcatcgttct	tcgagtcatt	cgaaggagct	1440
cactctctac	atgacttate	cagctccatt	gccaatgtaa	attgcttctt	tccttccatg	1500
tgattccagc	taatagctaa	ctaattttcc	tcattccattt	gatcatgttc	tatgttgtaa	1560
tatacagaaa	ctcgggtgtca	aagctccacc	agtccgtatt	gatagccaag	caaagtatgg	1620
agctttatca	agaggagatg	gagctatata	cttacggttt	cctcataaag	gataccgcga	1680
aaagatttgg	gaccatgtcg	ctgggtctat	agttgttaca	ggtaacatta	aagcttactc	1740
tctatgaagc	taattttata	gtgtcgacat	gcggatgtaa	atagataagg	aatgcaaggt	1800
tgattcttct	ttttgggtgca	gaggcgggtg	gaatagtac	agatgcagca	ggaaagccac	1860
tgattttctc	gaaagggagat	tatttgattt	ggacacagg	cattatcggt	gtaaacgaga	1920
agctaatgcc	tctgcttttg	aaagcagttc	gtgactccat	agctgagcaa	gagaaagctt	1980
cagctctctg	atttgttttt	ttctctcgta	cgttctttgt	ttctctgtaa	ctgttgtttc	2040
attttctttc	accgaatttc	accagtgaga	atttcttcca	ttttcgaaaa	agaaataaaa	2100
atgaaattct	gttttgggct	aa				2122

<210>2

<211>407

<212>PRT

<213> 拟南芥属

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(217).. (217)

<223>a1x8(G217D) 中的点突变

<400>2

```

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

```

225	230	235	240
Glu Ile Gly Cys Leu Phe Phe Ala Thr Ile Gly Ser Gly Thr Tyr Met			
	245	250	255
Gln Leu Leu Asp Ser Lys Ser Ser Pro Val Lys Val Gln Val Ser Ser			
	260	265	270
Val Glu Asn Pro Glu Glu Ala Ser Phe Phe Glu Ser Phe Glu Gly Ala			
	275	280	285
His Ser Leu His Asp Leu Ser Ser Ser Ile Ala Asn Lys Leu Gly Val			
	290	295	300
Lys Ala Pro Pro Val Arg Ile Asp Ser Gln Ala Lys Tyr Gly Ala Leu			
305	310	315	320
Ser Arg Gly Asp Gly Ala Ile Tyr Leu Arg Phe Pro His Lys Gly Tyr			
	325	330	335
Arg Glu Lys Ile Trp Asp His Val Ala Gly Ala Ile Val Val Thr Glu			
	340	345	350
Ala Gly Gly Ile Val Thr Asp Ala Ala Gly Lys Pro Leu Asp Phe Ser			
	355	360	365
Lys Gly Lys Tyr Leu Asp Leu Asp Thr Gly Ile Ile Val Ala Asn Glu			
	370	375	380
Lys Leu Met Pro Leu Leu Leu Lys Ala Val Arg Asp Ser Ile Ala Glu			
385	390	395	400
Gln Glu Lys Ala Ser Ala Leu			
	405		

<210>3

<211>2122

<212>DNA

<213> 拟南芥属

<220>

<221>misc_feature

<222>(734)..(735)

<223>SALK_020882T-DNA 插入位点

<400>3

gacatatatt tatcttcttg aaaagcgaat gatgtctata aattgttttc gaacagcgaa	60
ggctccgctt caatcatttg tagcagtaag aacgaattcg agacctagaa attcatcgaa	120
ccgtctcggtt tctgtattcg gacgcaagtc ttcttctcct tcatttgta ctctcagagt	180
tgtttcatcg atggcttacg agaaagagct tgatgctgct aagaaagctg cttcactcgc	240

tgctcgtctc	tgtcaggtta	gggttttttc	gattcaatca	tgacccatag	attctaaagt	300
ttgattcttt	aagaaacca	ttttgtaaat	cttccaaatt	tcgtttaaca	ttttgtgttt	360
attgtgcatt	gcatctgtaa	ttgggaatag	attctagtga	tatagtgtaa	tggtcctcta	420
catacgaagc	tcgtgtaaat	ctttgatcaa	aatcttatct	ttgtgttttg	ggtttgtttc	480
agaaagttca	aaaggctttg	ttgcaatcag	atgtgcaatc	aaaatctgat	aaaagtccag	540
tgaccgttgc	tgattatggg	tagtttgta	tacctgtccc	tgattagaaa	aagctcttct	600
ctttgaatgt	tactgagatt	gtaggaaat	cacttaattt	gatctgtctt	gtgttgaatt	660
tcaggttcac	aagcagttgt	tagtttagtc	ttagaaaaag	agctcagttc	tgaacccttt	720
tcattgggtg	ctgaagaggt	gaaactgctt	aataaatcct	tgtagatgt	ctcacacttt	780
acttatcttt	gagtttgtgt	ttatggactc	acattgtcta	aaatgatcta	tataggactc	840
aggcgatcta	cgcaaggatg	gttctcagga	tactctggag	cgcatcacia	aactcgtgaa	900
cgacactttg	gctaccgagg	aatcgtttaa	tggtctact	ttgtctactg	atgatctact	960
tagagccatt	gactgtggaa	catctgaagg	tggtccaaat	ggctcgaact	gggtcttggg	1020
tccaattgat	ggcactaaag	ggtacgtttt	aaaactaact	agcctaaagt	caaatcttct	1080
tatttcagag	aaaatgtaaa	tttgatagaa	tgttgagtca	gatgttatgt	tcctgacact	1140
gagcattttc	atgatttttag	atctctgagg	ggagatcaat	acgcagtagc	actaggattg	1200
ctcgaggaag	ggaaagtagt	tttaggtgtg	cttgcttgtc	caaacttgcc	gtagcatcc	1260
atagcaggaa	acaacaagaa	caaatcttcg	tcagacgaaa	ttggatgcct	cttctttgct	1320
acaattgggt	caggacata	tatgcagctc	ctagattcaa	aatcttctcc	tgtaaaagtg	1380
caagtctcta	gtgttgagaa	tcctgaagag	gcatcgttct	tcgagtcatt	cgaaggagct	1440
cactctctac	atgacttate	cagctccatt	gccaatgtaa	attgcttctt	tccttccatg	1500
tgattccagc	taatagctaa	ctaattttcc	tcatccattt	gatcatgttc	tatgttgtaa	1560
tatacagaaa	ctcgggtgca	aagctccacc	agtccgtatt	gatagccaag	caaagtatgg	1620
agctttatca	agaggagatg	gagctatata	cttacggttt	cctcataaag	gataccgcga	1680
aaagatttgg	gaccatgtcg	ctgggtctat	agttgttaca	ggtaacatta	aagcttactc	1740
tctatgaagc	taattttata	gtgtcgacat	gcggatgtaa	atagataagg	aatgcaaggt	1800
tgattcttct	ttttgggtgca	gaggcgggtg	gaatagtac	agatgcagca	ggaaagccac	1860
tggatttctc	gaaagggag	tatcttgatt	tggacacagg	cattatcggt	gctaacgaga	1920
agctaattgcc	tctgcttttg	aaagcagttc	gtgactccat	agctgagcaa	gagaaagctt	1980
cagctctctg	atctgttttt	ttctctcgta	cgttctttgt	ttctctgtaa	ctgttgtttc	2040
atcttctttc	accgaatttc	accagtgaga	atcttctcca	ttttcgaaaa	agaaataaaa	2100
atgaaattct	gttttgggct	aa				2122

<210>4

<211>2111

<212>DNA

<213> 拟南芥属

<220>

<221>misc_feature

<222>(734)..(735)

<223>SALK_020882T-DNA 插入位点

<400>4

gacatatatt	tatcttcttg	aaaagcgaat	gatgtctata	aattgttttc	gaacagcgaa	60
ggctccgctt	caatcatttg	tagcagtaag	aacgaattcg	agacctagaa	attcatcgaa	120
ccgtctcggt	tctgtattcg	gacgcaagtc	ttcttctcct	tcatttgta	ctctcagagt	180
tgtttcatcg	atggcttacg	agaaagagct	tgatgctgct	aagaaagctg	cttcaactcg	240
tgctcgtctc	tgtcaggtta	gggttttttc	gattcaatca	tgacctatag	attctaaagt	300
ttgattcttt	aagaaacca	ttttgtaaat	cttccaaatt	tcgtttaaca	ttttgtggtt	360
attgtgcatt	gcatctgtaa	ttgggaatag	attctagtga	tatagtgtaa	tggtcctcta	420
catacgaagc	tcgtgtaaat	ctttgatcaa	aatcttatct	ttgtgttttg	ggtttgtttc	480
agaaagttca	aaaggctttg	ttgcaatcag	atgtgcaatc	aaaatctgat	aaaagtccag	540
tgaccgttgc	tgattatggt	tagtttgta	tacctgtccc	tgattagaaa	aagctcttct	600
ctttgaatgt	tactgagatt	gtaggaaat	cacttaattt	gatctgtcct	gtgtgaatt	660
tcaggttcac	aagcagttgt	tagtttagtc	ttagaaaaag	agctcagttc	tgaacccttt	720
tcattgggtg	ctgatgctta	ataaatcctt	gtagatgtc	tcacacttta	cttatctttg	780
agtttgtggt	tatggactca	cattgtctaa	aatgatctat	ataggactca	ggcgatctac	840
gcaaggatgg	ttctcaggat	actctggagc	gcatcaca	aaactcgtg	gacactttgg	900
ctaccgagga	atcgttta	ggctctactt	tgtctactga	tgatctactt	agagccattg	960
actgtggaac	atctgaaggt	ggteccaaatg	gtcgacactg	ggctcttgat	ccaattgatg	1020
gcactaaagg	gtacgtttta	aaactaacta	gcctaaagtc	aaatcttctt	atttcagaga	1080
aaatgtaaat	ttgatagaat	gttgagtcag	atgttatggt	cctgacactg	agcattttca	1140
tgattttaga	tttctgaggg	gagatcaata	cgcagtagca	ctaggattgc	tcgaggaagg	1200
gaaagtagtt	ttaggtgtgc	ttgcttgtcc	aaacttgccg	ttagcatcca	tagcagggaa	1260
caacaagaac	aaatcttctg	cagacgaaat	tgatgcctc	ttctttgcta	caattgggtc	1320
agggacatat	atgcagctcc	tagattcaaa	atcttctcct	gtaaaagtgc	aagtctctag	1380
tgttgagaat	cctgaagagg	catcgttctt	cgagtcattc	gaaggagctc	actctctaca	1440
tgacttatec	agctccattg	ccaatgtaaa	ttgcttcttt	ccttccatgt	gattccagct	1500
aatagctaac	taattttcct	catccatttg	atcatgttct	atgttgtaat	atacagaaac	1560
tcggtgtcaa	agctccacca	gtccgtattg	atagccaagc	aaagtatgga	gctttatcaa	1620
gaggagatgg	agctatatac	ttacggtttc	ctcataaagg	ataccgcgaa	aagatttggg	1680
accatgtcgc	tggtgctata	gttgttacag	gtaacattaa	agcttactct	ctatgaaget	1740
aattttatag	tgctgacatg	cggatgtaaa	tagataagga	atgcaagggt	gattcttctt	1800
tttgggtgcag	aggcgggtgg	aatagtgaca	gatgcagcag	gaaagccact	ggatttctcg	1860
aaagggaagt	atcttgattt	ggacacaggc	attatcgttg	ctaacgagaa	gctaatgect	1920
ctgcttttga	aagcagttcg	tgactccata	gctgagcaag	agaaagcttc	agctctctga	1980
tttgtttttt	tctctcgtac	gttctttgtt	tctctgtaac	tgttgtttca	ttttctttca	2040

ccgaatttca ccagtgagaa ttttctccat tttcgaaaaa gaaataaaaa tgaaattctg 2100
 ttttgggcta a 2111

<210>5

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>SAL1 扩增用引物

<400>5

cggacgcaag tcttcttctc 20

<210>6

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>SAL1 基因扩增用引物

<400>6

ccaccaatga aaaggttca 20

<210>7

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>SAL1 基因扩增用引物

<400>7

ccagtgaccg ttgctgatta 20

<210>8

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>SAL1 基因扩增用引物

<400>8

tgaaaatgct cagtgtcagg a 21

<210>9

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>SAL1 基因扩增用引物

<400>9

acactttggc taccgaggaa 20

<210>10

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>SAL1 基因扩增用引物

<400>10

gtggagcttt gacaccgagt 20

<210>11

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>SAL1 基因扩增用引物

<400>11

ttctcctgta aaagtgcaag tctc 24

<210>12

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>SAL1 基因扩增用引物

<400>12

tggtgaaatt cggtgaaaga 20

<210>13

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>SAL1 基因扩增用引物

<400>13

tggttacga gaaagagctt g 21

<210>14

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>SAL1 基因扩增用引物

<400>14

agcaaagaag aggcat c caa 20

<210>15

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>		
<223>SAL1 基因扩增用引物		
<400>15		
ctgaggggag atcaatacgc	20	
<210>16		
<211>20		
<212>DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223>SAL1 基因扩增用引物		
<400>16		
tgctcagcta tggagtcacg	20	
<210>17		
<211>19		
<212>DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223>SAL1 基因扩增用引物		
<400>17		
acacgccatc atcaatcta	19	
<210>18		
<211>20		
<212>DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223>SAL1 基因扩增用引物		
<400>18		
ccctttatac ttageccaaa	20	

<210>19

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>SAL1 基因扩增用引物

<400>19

actcgctgct cgtctctgtc 20

<210>20

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>SAL1 基因扩增用引物

<400>20

agaacgatgc ctcttcagga 20

<210>21

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>a1x8 突变体的 dCAPS 引物

<400>21

gaggaaggga aagtagttct ag 22

<210>22

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>a1x8 突变体特异性 dCAPS 引物

<400>22

tgcactttta caggagaaga 20

<210>23

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>T-DNA 插入体特异性引物

<400>23

tggttcacgt agtgggcat cg 22

<210>24

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>T-DNA 插入体特异性引物

<400>24

gcgtggaccg cttgctgcaa ct 22

<210>25

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>T-DNA 插入体特异性引物

<400>25

ggactcttgt tccaaactgg 20

<210>26

<211>31

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 SacII-SAL1 F1

<400>26

ctccgcggtg gtatggctta cgagaaagag c 31

<210>27

<211>31

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 EcoRI-SAL1

<400>27

gctcgaattc tcagagagct gaagctttct c 31

<210>28

<211>19

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 APX2 (At3g09640)

<400>28

ggctgggaca tttgatgtg 19

<210>29

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 APX2 (At3g09640)

<400>29
agggaacagctccttgatag g 21

<210>30
<211>20
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 APX1 (At1g07890)

<400>30
ccactcgcat ttctccagat 20

<210>31
<211>20
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 APX1 (At1g07890)

<400>31
tcgaaagttc cagcagagtg 20

<210>32
<211>22
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 sHSP (At2g29500)

<400>32
cctggattga agaaggagga ag 22

<210>33
<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 sHSP (At2g29500)

<400>33

taggcaccgt aacagtcaac ac 22

<210>34

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 ZAT10 (At1g27730)

<400>34

aggctcttac atcaccaaga ttag 24

<210>35

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 ZAT10 (At1g27730)

<400>35

tacacttgta gctcaacttc tcca 24

<210>36

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物亲环蛋白 (At2g29960)

<400>36

tcttcctctt cggagccata 20

<210>37

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物亲环蛋白 (At2g29960)

<400>37

aagctgggaa tgattcgatg 20

<210>38

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 DREB2A (At5g05410)

<400>38

agactatggt tggcccaatg 20

<210>39

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 DREB2A (At5g05410)

<400>39

tcgagctgaa acggaggtat 20

<210>40

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 HSP70 (At3g09440)

<400>40

gctgctattg cttacggtct tg 22

<210>41

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 HSP70 (At3g09440)

<400>41

ctctcgggtt tccactaatg tc 22

<210>42

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 Fry1-1F

<400>42

aaccatttt gtaaattcttc c 21

<210>43

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 Fry1-rt2R

<400>43

cagagaaaca aagaacgtac gaga 24

<210>44

<211>358

<212>PRT

<213> 稻属

<400>44

```

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

```

	245	250	255
Pro Pro Val Arg Ile Asp Ser Gln Ala Lys Tyr Gly Ala Leu Ala Arg			
	260	265	270
Gly Asp Gly Ala Ile Tyr Leu Arg Phe Pro His Lys Gly Tyr Arg Glu			
	275	280	285
Lys Ile Trp Asp His Ala Ala Gly Ser Ile Val Val Thr Glu Ala Gly			
	290	295	300
Gly Leu Val Thr Asp Ala Ser Gly Asn Asp Leu Asp Phe Ser Lys Gly			
305	310	315	320
Arg Phe Leu Asp Leu Asp Thr Gly Ile Ile Ala Thr Asn Lys Gln Leu			
	325	330	335
Met Pro Ser Leu Leu Lys Ala Val Gln Asp Ala Ile Lys Glu Gln Asn			
	340	345	350
Gln Ala Ala Ser Pro Leu			
	355		

<210>45

<211>355

<212>PRT

<213> 玉米

<400>45

Met Ala Ser Gly Asn Pro Tyr Ala Ala Glu Leu Ala Ala Ala Lys Lys			
1	5	10	15
Ala Val Thr Leu Ala Ala Lys Leu Cys Gln Thr Val Gln Gln Asp Ile			
	20	25	30
Met His Ser Gly Val Gln Ala Lys Ala Asp Lys Ser Pro Val Thr Val			
	35	40	45
Ala Asp Tyr Gly Ser Gln Ile Leu Val Gly Phe Ser Leu Lys Met Asp			
	50	55	60
Val Ser Ser Gly Pro Phe Ser Leu Val Ala Glu Glu Ala Leu Asp Glu			
65	70	75	80
Leu Arg Lys Asp Gly Ala Glu Glu Ile Leu Glu Asp Ile Thr Asp Leu			
	85	90	95
Val Asn Glu Thr Ile Phe Asp Asp Gly Ser Tyr Asn Ile Ser Phe Thr			
	100	105	110
Lys Glu Gly Ile Leu Ser Ala Ile Asp Asp Gly Lys Ser Glu Gly Gly			
	115	120	125

Pro Ser Gly Arg His Trp Val Leu Asp Pro Ile Asp Gly Thr Lys Gly
 130 135 140
 Phe Leu Arg Gly Asp Gln Tyr Ala Ile Ala Leu Ala Leu Leu Asp Glu
 145 150 155 160
 Gly Lys Val Val Leu Gly Val Leu Ala Cys Pro Asn Leu Pro Leu Ser
 165 170 175
 Ser Ile Asn Asn Ile Asn Gly Asn Ser Ser Gly Asp Lys Val Gly Ala
 180 185 190
 Leu Phe Ser Ala Thr Ile Gly Cys Gly Ala Gln Val Glu Ser Leu Asp
 195 200 205
 Gly Ser Pro Pro Gln Lys Ile Ser Val Cys Ser Ile Asp Asn Pro Val
 210 215 220
 Asn Ala Ser Phe Phe Glu Ser Tyr Glu Ser Ala His Ser Met His Asp
 225 230 235 240
 Leu Thr Arg Ser Ile Ala Glu Lys Leu Gly Val Gln Ala Pro Pro Val
 245 250 255
 Arg Ile Asp Ser Gln Ala Lys Tyr Gly Ala Leu Ala Arg Gly Asp Gly
 260 265 270
 Ala Ile Tyr Leu Arg Phe Pro His Lys Gly Tyr Arg Glu Lys Ile Trp
 275 280 285
 Asp His Ala Gly Gly Ser Ile Val Val Thr Glu Ala Gly Gly Ile Val
 290 295 300
 Thr Asp Ala Ala Gly Lys Asp Leu Asp Phe Ser Lys Gly Arg Phe Leu
 305 310 315 320
 Asp Leu Asp Thr Gly Ile Ile Ala Thr Asn Lys Glu Leu Met Pro Ser
 325 330 335
 Leu Leu Lys Ala Val Gln Glu Ala Ile Lys Glu Thr Asn Gln Ala Ala
 340 345 350
 Ser Leu Leu
 355

<210>46

<211>353

<212>PRT

<213> 拟南芥

<400>46

Met Ala Tyr Glu Lys Glu Leu Asp Ala Ala Lys Lys Ala Ala Ser Leu

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

Leu Asp Thr Gly Ile Ile Val Ala Asn Glu Lys Leu Met Pro Leu Leu
 325 330 335
 Leu Lys Ala Val Arg Asp Ser Ile Ala Glu Gln Glu Lys Ala Ser Ala
 340 345 350
 Leu

<210>47

<211>1417

<212>DNA

<213> 云杉属

<400>47

ggttctctgc	gacttgtgtg	tataagtcta	taacatcaat	caatggcgtg	gtcgagccga	60
ttctcatttc	aatttacgag	gacttctagt	gccacctcat	ttgttttcct	tccaactaca	120
accctacctc	tacagataca	tttccccage	gtgagtgcga	ggaggagcat	caccaccaag	180
acaacaagag	cgaaaatgga	catcggtgca	tacgaacaag	atcttgccat	tgcaatcaag	240
gccgcctctc	tcgcagctcg	tctatgccag	tcggtgcaaa	agagcctttt	acaacagat	300
actcaagcca	agatggacag	ttctcctgtc	actgttgccg	attatggttc	tcaggcttta	360
gttagctttg	tgcttgagag	ggaactacaa	tcgggagtgt	tttccatggt	tgcagaagag	420
gattcaggag	atttacagaa	gaatgatgca	caagatatgg	tggaacgcat	tacagcactt	480
gtaaatgaaa	ccatttctaa	tgatagtgcc	tataatattt	ctccattaac	aacaggagat	540
gtacttgcag	caatagatag	aggcaaatct	gaaggagggc	cacatggtcg	gcactgggtt	600
ttggacceca	ttgatgggac	aaaaggattt	cttagaggag	accaatatgc	tgtagccttg	660
ggcttatttg	atgaaggaga	agttattttg	ggtgtgctgg	cctgcccana	tttgccctgg	720
acatcagtta	gcatcagtgc	ccgcccttca	aatgatccaa	ttggttgccct	tttttctgca	780
agaaaagtgc	cgttgaaaag	tctgaagatg	catctttctt	tgaatcatat	gaggcagcac	840
attccatgca	tgacttgaca	gctacaatag	caaagatcct	gggtgtaaaa	gcaccaccag	900
ttagaataga	tagtcaggca	aaatatggag	caatggcaag	gggtgatgga	gcaatataac	960
ttcgctttcc	tcgtccaggc	tatcgtgaaa	agatttgcca	tcattgcagct	ggttgcacgc	1020
taatccaaga	ggctgggtgt	gttgtgggtg	atgctgctgg	gaaacctctt	gatttctcac	1080
aggggaggta	tctggatgtg	gaaaggggta	taattgcaac	caatgccaaa	ctgatgcat	1140
tgctttctaa	tgcatgcaa	gctgctctga	aggaagaagg	aaatgttcga	aaggctgggt	1200
cctttagca	ccattcattt	attgaacctt	attaggatg	gaagtggaa	cttatgctga	1260
tgaaataaaa	caattctatt	tgcaaacagt	ccttccctta	agagatataa	ctgagtgtcg	1320
tggttaggtgt	gtcaactctc	tggtcttagt	cctggccaca	tttgcagtga	tagacaataa	1380
gttgaaaacg	gaagtacatt	aatttccctt	aatttttc			1417

<210>48

<211>1070

<212>DNA

<213> 松属

<400>48

caagagtgaa gatggagaac agggcatacg aacaagatct tgccattgca atcagggctg	60
cctctctggc agctcgtcta tgccagtcag tgcagaagag ccttttatac acagatactc	120
aagccaagac ggacagttct cctgtcactg ttgcagatta cggttctcag gctttagtta	180
gctttgtact tgaagggaa ttaccctcgg gattgttttc cttgggtgca gaagaggatt	240
caggagatth acagaagaat gatgcacaag atatggtgga acgcattaca gcacttgtaa	300
atgaaacat ttctaatagat ggtacctatg atatttctcc attaacaaca ggagatgtac	360
ttgcagcgat agatagaggt aaatctgaag gagggcccca tggtcggcat tgggttttag	420
acccattga tgggacaaag ggatttctta ggggagacca atatgctgta gccttaggct	480
tattggatga aggagaagtt attttgggtg tgctggcctg cccaaatttg ccctggacat	540
cagttagcat cagtgcctgc cttcaaatg atccaattgg ttgtcttttt tctgcaataa	600
aaggagctgg aactactgtg caatcattgg atggttctat acaacctaaa agggtttatg	660
taagtccat agaaaagtct gaagaagcat ctttttttga atcatacgag gcagcacatt	720
ccatgcatga cttgacggct acaatagcga agatcctggg tgtaaaagca cccccagta	780
gaatagatag tcaggcaaaa tatggtgcaa tggcaagggg tgatggagca atatatttct	840
gctttccttg tccaggctat cgtgaaaaga tttgggatca tgcagctggt tgtattgtaa	900
tccaagaaaa ttcatecgaa ttgcagaggc tgggtggtgt gtagttgatg ctgctggaaa	960
acctcttgat ttctcacggg ggaggtatct ggatgtggaa aagggtataa ttgcaaccaa	1020
tgccaaactg atgcattgc ttttaaatgc agtgcaagct gctctcaagg	1070

<210>49

<211>1544

<212>DNA

<213> 苜蓿属

<400>49

tggggacgca gagtttggtg ggaggaacaa gaacggtagt agcaataagg gattgttgcg	60
aatccataaa tacaataata ataatacagga aaaaatccac caccgtctct ggtttctcat	120
tatcatcate aacgacaaga agatcctctt cattgtattg tcgtcgttgg tcaccattaa	180
cgacaatact ttctttctt tctttaatgt cttcttacga gaaggaactc gctgctgcta	240
agaaagctgc cactctcgtc gctcgtcttt gccagaaagt acaaaaagct cttcttcaat	300
ctgatgttca ctctaaatct gacaaaactc ctgtcactgt tgctgattat ggttcgcaga	360
tcttggctcag cttgatgctt cagagagagc ttccttctga accattttca ttagtagctg	420
aggaggattc aggggatctt cgtaaggaaa gtggccaaga tacattgaag cgcattacag	480
atcttgtcaa tgatactctt gttaatgaag gatcacataa catttctgct ttaacaacag	540
atgacgtgct taatgccatt gataatggta agtccgaagg tggttccatt gggcggcact	600

gggttttggga tccgatagat ggtactaaag gttttgtaag aggagaccaa tatgcatag	660
cattagctct gctagatgaa gggaaagtgt tattgggtgt cttggcttgt ccaaacttc	720
cgctgggaac cattggcccg aatcaaccgc attcttcttc taatgaagt gggtgtcttt	780
tctttgccaa agttggcaat ggaacatata tgcaagcatt ggatggtact acacaaacta	840
aggtgaatgt tagtactgtt gacaatccag aagaagcatc attttttgaa tcttatgaag	900
cagcacactc ctcacatgac ttgtctagca ctattgcagt aaaactcggc gtcaaagcac	960
cgccagtcag aattgacagc caggcaaat acggagctct atccagagga gatggggcta	1020
tatatttgcg tttccccaac aaaggatacc gtgaaaaaat atgggatcat gctgctggtt	1080
gtattgttgt gagtgaagct ggaggtattg tctcagatgc tgccggaaac ctttggact	1140
tctcaaaagg aaagtccctt gatgttgata ctggtattat tgttacaaac cagaactga	1200
tgcttcgct tttgagagca gttaaagaat cactcaatga gaaagcatca tccttgaat	1260
atctgtcaag tgtatgattc tactactgag ctctctcatt ttgttgtcag ccagttatat	1320
gaaccttct ctcaattgtg ctacatttca tacgcgatct gatgaagcta agcatatgac	1380
tggacttctt ccaacacttt atttaaatca tatgcctgtt ctgctttttg cgtgtactgt	1440
cttcaagatt cttgtaattt aagcttgagt tntaggtcct tttcttctt gcaagtactt	1500
tttctctcc aactttctt tctattaata gatattttta tttc	1544

<210>50

<211>892

<212>DNA

<213> 百脉根

<220>

<221>misc_feature

<222>(25).. (25)

<223>n 是 a、c、g 或 t

<400>50

agaatctgga aaacaacat caccngttgt gatctttcat caagggaag aagaagaaga	60
ccagtttctt tgtcttgttg ttgttcatca ctttcttcaa tgccttacga gaaggagtc	120
gctgctgcca agaaagcagc cactctcgct gctcgtctct gtcagaaagt acaaaaaggt	180
cttctgcaat ccgatgtcca ctcaaaatca gacaaaagtc ctgtcaccgt cgtgattat	240
ggttcacaaa ctttggtcag ctttaactc gagagagaac ttccttctga accatttca	300
ttagtagctg aggaggattc aggcgatctg cgtgaggaaa gtggccacga tactttgaag	360
cggattacag aacttgtcaa tgatactctt gctaataag gatcaaatag cttttctact	420
ttaacaacag acaatgtgct tagagccatt gacaatggta agtctgaagg tggetctgtt	480
ggacggcact gggttttgga tccaatagat ggactaaag ggtttgtaag aggagaccaa	540
tacgctattg cattagcttt gctaaatgaa ggaaaagtgt tattgggtgt cttggettgc	600
ccgaatcttc cactggcctc cattgcctgt aatcagcagc attctacttc taatgaagtt	660

ggttgtcttt	tctttgctaa	agttggcgat	ggaacattta	tgcaaggcaat	ggatggttct	720
acacagacta	gggtgcatgt	cagtgtctatt	gataatccag	aagaggcatc	atTTTTtgag	780
tcttttgaag	cagegcactc	cttacctgac	ttgtctagct	ccattgcaga	aaaacttggt	840
gttaaggcac	cgccagtcag	aattgacagc	caagcaaaat	atggagctct	gt	892

<210>51

<211>1514

<212>DNA

<213> 大豆

<400>51

gaaaaagatg	ggtactcaaa	caacactttg	gtgtagagca	agaactacta	taagtgtagg	60
aggtgattgg	aagttgttcg	aatccagaat	ccgaaaaaag	ggcaccaccg	tgtaacaag	120
tagaagcaga	agctgttttt	gttcttcgcc	gctgacacta	atcgtttctt	caatgcctta	180
cgagaaggaa	ttcgccgctg	caaaaaaagc	agccactctc	gctgctcgtc	tctgcaagaa	240
agtacagaag	gctcttctgc	aatccgatgt	gcactcaaag	tcagacaaaa	gtcctgtcac	300
agtggtgat	tatggttcac	aagcattggt	cagctttata	cttgagagag	aacttccttc	360
tgaaccattt	tcattagtag	ctgaggagga	ttcaggatgat	cttcgtaagg	agagtggcca	420
ggatacgctg	aagegcatta	cagaacttgt	caatgatacc	cttgctagtg	aaggatcaaa	480
tagcttttct	actttaacaa	cagatgatgt	gcttgccggc	attgacgggtg	gtaaactctga	540
aggtggttca	gttggacggc	actgggtttt	ggatccgata	gatggtacta	aagggtttgt	600
aagaggagat	caatatgcta	tagegttagc	tttactagat	gaaggcaaaag	ttgtattggg	660
tgtcttggct	tgtccaaacc	ttccactggc	atccattggc	tccaatcagc	agcattcttc	720
ttcaaatgaa	gttggtttgc	tcttctttgc	taaagttggt	gatggaacat	atatgcaagc	780
actgggcggt	tctacacaaa	ctagggtgca	tgtctgtgat	attgataacc	cagaggaagc	840
atcatttttc	gaatcttttg	aagcagcaca	ctccttgcac	gacttatcta	gctcaatcgc	900
agaaaaactt	ggtgtcaaag	caccaccagt	cagaattgat	agccaagcaa	aatatggagc	960
tttgtcaaga	ggagatgggg	ctatatattt	gcgtttccct	cacagaggat	accgtgaaaa	1020
aatatgggat	catgctgctg	gcagcattgt	tgtgactgaa	gctggaggta	ttgccatgga	1080
tgctgcgggg	aacccttttg	acttttcaaa	aggaaagttt	cttgatgttg	tatctggtat	1140
tattgttaca	aaccagaaat	tgatgccatc	acttctgaca	gcagttaaag	aagcactcaa	1200
tgagaaagca	tcatecttgt	gatttccatt	taagcgaatg	attctacaaa	tgagcttget	1260
aacgttggtg	tcggctcgtg	ttatatgggg	ccttcccctc	aattgtgcta	tatttcattc	1320
tgatgaagtt	aaacaaatga	tgggacttcc	tctgatactt	cctttgtagc	agcagatttg	1380
tgctctgggt	ttttgcagct	gctattttct	tctccttcta	tataacctgc	cttttctctc	1440
cttttctatt	aataaacaga	gatgagagat	cttatittaa	acttgtttga	taattaatte	1500
ttctagatta	cttg					1514

<210>52

<211>1252

<212>DNA

<213> 拟南芥属

<400>52

gacatatatt tatcttcttg aaaagcgaat gatgtctata aattgttttc gaacagcgaa	60
ggctccgctt caatcatttg tagcagtaag aacgaattcg agacctagaa attcatcgaa	120
ccgtctcggt tctgtattcg gacgcaagtc ttcttctcct tcatttgta ctctcagagt	180
tgtttcatcg atggcttacg agaaagagct tgatgctgct aagaaagctg cttcactcgc	240
tgctcgtctc tgtcagaaaag ttcaaaaggc ttgttgcaa tcagatgtgc aatcaaaatc	300
tgataaaagt ccagtgaccg ttgctgatta tggttcaca gcagttgta gtttagtctt	360
agaaaaagag ctcaattctg aacccttttc attggtggct gaagaggact caggcgatct	420
acgcaaggat ggttctcagg atactctgga gcgcatcaca aaactcgtga acgacacttt	480
ggctaccgag gaatcgttta atggctctac ttgtctact gatgatctac ttagagccat	540
tgactgtgga acatctgaag gtggtccaaa tggctgacac tgggtcttgg atccaattga	600
tggcactaaa ggatttctga ggggagatca atacgcagta gcactaggat tgctcgagga	660
agggaaaagta gttttaggtg tgcttgcttg tccaaacttg ccgtagcat ccatagcagg	720
aaacaacaag aacaaatctt cgctcagacga aattggatgc ctcttctttg ctacaattgg	780
ttcagggaca tatatgcagc tcttagattc aaaatcttct cctgtaaaag tgcaagtctc	840
tagtgttgag aatcctgaag aggcatcggt ctctcagatca ttcgaaggag ctcaactctc	900
acatgactta tccagctcca ttgccaataa actcgggtgc aaagctccac cagtccgtat	960
tgatagccaa gcaaagtatg gagctttatc aagaggagat ggagctatat acttacggtt	1020
tcctcataaa ggataccgcg aaaagatttg ggaccatgtc gctgggtgcta tagttgttac	1080
agaggcgggt ggaatagtga cagatgcagc aggaaagcca ctggatttct cgaaagggaa	1140
gtatcttgat ttggacacag gcattatcgt tgctaacgag aagctaagtc ctctgctttt	1200
gaaagcagtt cgtgactcca tagctgagca agagaaaagct tcagctctct ga	1252

<210>53

<211>764

<212>DNA

<213> 甘蓝型油菜

<400>53

ggaacagecc aggcaccgct tcagacattc gcatcagttt cgaaattcag atattcaccg	60
aaccctateg tttctgtatt gagaaggaag tegtctcctt catttggtactctaagagta	120
gtctcatcca tggcttacga gaaagagctt gacgctgcta agaaagctgc ttcctcaca	180
gctcgtctct gtcagaaaagt tcaaaaggct ttgttgcaat cagatgttca atcaaaatct	240
gataaaagtc cagtcaccgt tgctgattat ggttcacaag cagttgtcag catagtcttg	300
gaaagggaac tcaacttctga acccttttca ttggctcgtg aagaggactc agcggatcta	360

cgcaaggatg gttctgagga tattcttcag cgcatcacga aactcgtcaa cgacactttg	420
gctactgagg atctaaccaa agccattgac tctactttaa ccacagatga tctactcaga	480
gccatcgact gtggcacatc tgaaggtggt cctaattggc gacactgggt cttggatcct	540
atcgaatggca ccaaaggatt ttgagggga gatcagtacg cggtagcact aggattactc	600
gaggaaggga aagtagtggt aggtgtgctt gcttgtccaa acttgccatt aacatccata	660
gcaggaacaa agaactcttc ttcttcagac gaaatcggat gcacttcttt gctacgattg	720
gtcagggaca tacatgcagc ccttagactc gaaatcgaac agtc	764

<210>54

<211>1340

<212>DNA

<213> 杨属

<400>54

gcgaaatcac aatcacgaaa aacccttttc ttgtttctc tcccccttta tttttctcta	60
acaaaaccaa aagcaaaacc tcaattccaa gagtattatc ctcttcaatg tcttacaata	120
aagaacttgc tgctgccaag aaagctgtct ctcttgctgc ccgctctgc cagaagatgc	180
aaaaagctat cttgcaatca gatgtccaat caaaatcaga taaaagtccc gtcactgttg	240
ctgattatgg ctctcaagca ctagttagtt atgctctgca gcgggagctt ccttctgaac	300
tattctcctt agtggcggag gaggattcag aagatctcct caaggatggt ggccaggaaa	360
cactagagcg aatcacaaaa cttgttaacg atattctagc taccgatgga tcataatagtg	420
attctacttt atccactgaa gatattgtca aggccattga ctgtggaaaa tctgaaggtg	480
ttctcgaggg cagacactgg gttctggacc caatagatgg cactaaaggg tttttaagag	540
gagatcaata tgcaatagct ttagcattgc tagatgaagg gacagtagtg ttgggcgtct	600
tggtttgtcc caatcttccg ttacctcca ttgctggtgg ctctcagcat tctttgcctg	660
gcgaagttgg ttgccttttc tttctgtag ttgggggtgg aacttacatg cagccactgg	720
atagctcttc agcagtgaag gtgcaagtca acgctactga caatcctgaa gaagcatcgc	780
tctttgaate atatgaagca gcacactcca tgcatgatct atctagtcca attgtcaaaa	840
aacttgggtgt caaagcacca ccagttagaa ttgatagcca agcaaagtat ggcgctctgt	900
ctagaggaga tggggtcata tacttgcgat ttccacataa aggttaccgt gagaaaatat	960
gggatcatgc tgctggatgc atagttgtat cagaagctgg gggactggc acagatgttg	1020
cggggaacce cttagatfff tcaagaggaa gatacctgga tcttgacaca ggcatcattg	1080
ttacgaatca gaaactgatg ccattacttt tgaaggcagt tagagaatcc atagaggaga	1140
aagcttcate attgtgattc ttactgatg aatgaagtca tttcctttgc taagtttgtt	1200
agcaactcaa atcagtttta cgtgacttga attttccact ctatgtttgc tcaatgtatg	1260
ttgagcatga aactcttgca acttgtgaag ttcaaatgta ttatccgatg cataatagta	1320
gtgtcattct gctaagctac	1340

<210>55

<211>1588

<212>DNA

<213> 棉属

<400>55

```

ggaat t t t t t c t   t a c g a a a t t t   t t g a a t t g c a   a a t t t a a t a a   a t g t c t a t a a   a t t g g t t g a g   60
a t t t g t t t c c   c c c t c t c t t a   a a a a g c c c c c   t e t t t t t c a t   c t c t g t c a c t   t g c c t c c t c c   120
t c c t c c t t c t   t e t t c t g c t g   t g a t t g t g g c   a a t g t c t t a t   g a t a a a g a a c   t g g c t g c t g c   180
a a a g a a a g c a   g c c t c t c t c g   c t g c t c g t c t   c t g t c a g a a a   g t a c a a a a t g   c t t t g c t g c a   240
a t c c g a t g t t   c a a t c a a a g a   a t g a t a a a a g   t c c t g t a a c t   g t t g c t g a t t   a t g g c t c a c a   300
a g c a c t g g t t   a g t t t t g t g c   t g c a g c a g g a   a t t t c c t g a t   a a c t t c t c a t   t a g t t g c t g a   360
g g a g g a t t c t   a a a g a t c t t c   g c a a g g a t g g   t g g c c a g g a a   a t a g t a g a g c   g c a t t a c a a a   420
a c t t g t g a a c   g a t t c t c t a a   c t a t t g a t g g   a t c a t a c a a t   g t t a c t t t a t   c c a c a g a a g a   480
t a t t c t c a g g   g c c a t t g a c a   a t g g c a g a t c   t g a a g g t g g t   t c c c a a g g t c   g a c a c t g g g t   540
t t t g g a t c c t   a t a g a t g g t a   c t a a a g g t t t   t e t g a g a g g a   g a t c a a t a t g   c a a t a g c a t t   600
g g c t t t g c t a   g a t g g a g g a a   a a g t t g t c c t   g g g t g t g c t g   g c t t g t c c a a   a t c t t c c a c t   660
a a c t t c c c t c   a g t g a t g c t g   g t c a g c a t t c   t c c a a a t a a t   a a a g t t g g c t   g c c t t t t c t t   720
t g c t g t a g t a   g g t g g t g g a a   c t t a t a t g c a   g c c a c t t g a t   g g t t c t t c g g   c a g t a a a g g t   780
g c a a g t a a g t   g c t g t t g a a a   a t c c t g a a g a   a g c a t c a t t c   t t t g a g t c t t   a t g a a g c a g c   840
a c a c t c c a t g   c a t g a t t t a t   c t a g c t t g a t   t g c c c a a a a a   c t c g g c g t c a   a a g c a c c a c c   900
g g t t a g a a t t   g a t a g c c a g g   c g a a g t a t g g   t g c t c t a t c c   a g a g g a g a t g   g a g c c a t a t a   960
t c t g c g t c t t   c c a c a c a a a g   g g t a t c g a g a   a a a a a t a t g g   g a t c a t g c t g   c t g g g t g t a t   1020
t g t t g t g a g t   g a a g c t g g g g   g t g t g g t c a c   a g a t g c t g c a   g g g c a g c c a t   t g g a t t t t t c   1080
a a a g g g a a a g   t a t c t t g a t c   t g g a c a c a g g   c a t c a t t g t c   a c c a a c c a g a   a g t t g a t g c c   1140
a t t a c t g t t t   a a t g c a g t t a   g a a a a t c t a t   c c a g g a g a a a   g c t t c a t c t t   t g t g a t t c a t   1200
t t t a g a g g c a   g g c t t c a t c c   t t t c e t c a t a   a c t t g c t c t g   t t a a g c t g g t   t g a a a c t t g a   1260
t t a t t t t t g c   c t t c a a t g c t   t g a a c t t t t a   t e a t t c t t c t   c c c c a a t g c t   t a t a g g a a g a   1320
t t t t c a t t t a   g c a t g c a t g a   a c a a g a a t g g   g a c c a a t a a a   t e t c a t c t c t   a c a a t t a a g a   1380
c a a t g t a a t t   g t a g a c t a g a   a c t t g a a a g c   a t g g t c c t a g   g c c t t g a g c c   t t t c t c t t t g   1440
t c c t a c c t g g   c a g t t g g g t t   t a g g t g t a a t   t a a t t a g a t a   a a g g a a c t g t   g t t g t t g a a t   1500
a c a a c a t a t   t a c a t t a t t a   c t a a a c t t a t   t t c a t g g t a a   a a c a a g t g t g   a a g t c e t c t c   1560
c t t c e c g a c c   g t t t a c c t t a   c a t g g t t t

```

<210>56

<211>1355

<212>DNA

<213> 番茄属

<400>56

aaaatacaaa	accccacttc	cccttttcac	ttttgctcac	tctaagagca	tctaaatcaa	60
ccttaagagc	tgttacaatg	tcgtatgata	aagaacttga	tgctgccaag	aatgctgctt	120
ctcttgctgc	tcgcctttgt	caaaaagtcc	aaaaagcact	gttgcaagca	gatgttcaat	180
caaagtctga	caaatctcca	gtgacggtgg	ctgattatgg	ctcacaggcc	gtggttagcg	240
ttgttttgca	gaaagagttg	tgttctgctt	cattttcatt	agtggtgag	gaggactctg	300
gagaccttcg	taatgaagag	ggaaaatcaa	cattacagcg	tatcatgaag	cttgtcaatg	360
aaacacttgc	tagtgatgga	acatatggta	ctgccccatt	atctgaagaa	gatgtccttg	420
ctgccattga	tagtggtaga	tctgaagggg	gtccttctgg	tcagcactgg	gtgttgatc	480
ctattgatgg	tactaaaggg	tttctaaggg	gagaccaata	tgcaattgca	ttgggattgc	540
tagatgaagg	gaaggtggtt	ttgggcgtct	tagcctgtcc	aaatcttcca	ttatcttctc	600
ttgcctccca	caatctacag	gatgatcaag	acaaagttgg	ttgccttttt	tatgccaag	660
ttggttctgg	aacttatatg	cagtctcttg	atggctctac	accaataaag	gtgcatgtaa	720
ctgatttaga	caaccctgaa	gaggcatctt	tttttgaatc	ttttgaagca	gcacattctt	780
tgcatgacct	atctagtttg	atagcaaaga	aacttgggtg	aaaagcccc	ccagttcgaa	840
tagacagcca	ggcaaagtat	ggtgctttgt	cccgtggaga	tgagcaata	tatctgcggt	900
ttcctcataa	aggctaccgc	gagaagatat	gggatcatgc	tgctggatat	ctcgttggtg	960
cagaagctgg	aggtgttgtc	tcagatgctg	caggaaacce	tttgacttc	tccaagggaa	1020
gataccttga	tttacacgaa	ggcataatcg	ttaccaatca	aaagctgatg	cctgctctcc	1080
tcaaggctgt	taaagaatct	ttgaatgaga	aagcttcac	cttgtgatga	tcaaaccaat	1140
aacaatacgc	tgcagctatc	ttattgtagt	tcccagaatg	gtacttgtag	ctgctcattt	1200
tcacctgttc	ttctcttctt	acacatttct	gatatacatt	tttagctctt	tgattgtcat	1260
ctcaactcag	ctttgataaa	cattttgttg	ttctctgggt	atgtcaactc	aactttgatt	1320
aaacattata	tatttctctt	ggtatgtttt	ttttt			1355

<210>57

<211>1058

<212>DNA

<213> 茄属

<220>

<221>misc_feature

<222>(970)..(970)

<223>n 是 a、c、g 或 t

<400>57

gctttcacat	tatcatctag	gactataaat	tccttgacac	aaaaaacct	gccattgtta	60
acaaaaaata	caaaacecca	tttccccctt	tcactttgtc	tcactctaag	agcatctaaa	120
tcaaccttaa	gagctgtttc	aatgtcgtat	gataaagaac	ttgatgctgc	caagaatget	180
gcttctcttg	ctgctcgcct	ctgtcaaaaa	gtccaaaaag	cactgttgca	agcagatggt	240
caatcaaagt	ctgacaaaac	tcctgtgacg	gtggctgatt	atggctcaca	ggccgtgggt	300

agcgttgttt	tcagaaaaga	gttgggttct	gcttcatttt	cattagtggc	tgaggaggac	360
tctggagatc	ttcgtaatga	aaagggaaaa	gcaacattac	agcgtatcat	gaagcttgtc	420
aatgaaacac	ttgctagtga	tggaacatat	ggtactgccc	cattatctga	agaagatgtc	480
cttgctgcca	ttgatagtgg	tagatctgaa	gggggtcctt	ctggtcagca	ctgggtgttg	540
gacccatttg	atggtactaa	agggtttctg	aggggagacc	aatatgcaat	tgcatgggga	600
ttgctagatg	aagggaaggt	ggttttgggc	gtcttatacct	gtccaaatct	tccattatct	660
tctcttgccct	cccacaatct	acaggatgat	caagacaaag	ttggttgccct	tttttatgcc	720
caagttgggtt	ctggaactta	tatgcagtct	cttgatggct	ctacaccaat	aaaggtgcat	780
gtaactgatt	tagacaacce	cttgaagagg	catctttttt	tgaaatcttt	tgaaagcaga	840
cacatttctt	tggcatgacc	taatctagtt	tggatagcaa	agaaaccttg	ggtggtaaaa	900
gccccgcagg	tcgatataca	cgccgggcaa	agaggggctt	cgccccggcg	aaaatggcac	960
aaataatctn	gggggtcccca	aaaagggacc	aggaaaaata	tcgggaccac	gggggagact	1020
cctggggcac	acagcggggg	gtccacacaa	ggcgacag			1058

<210>58

<211>1196

<212>DNA

<213>葱属

<400>58

caatttgcaa	aagtcctctc	tcgtctacac	tgtgctaacc	tatccccctt	aatctcgatt	60
aaatgttccc	caattaatta	tctccctgtc	ttttctccca	ccaaatctag	ttcactttct	120
tgctcctccg	tatctcaatt	aaaagccaag	actgaatcta	gatctttatc	catttctgcc	180
atggcttcgt	acgagaaaaga	tcttaccgct	gccaagaagg	ctgcttact	ggctgctcgt	240
ctatgccaaa	cgggtgcagaa	ggcgatattg	cagtcggatg	tgcaactcaa	agcagataag	300
agtcctgtta	ctgtggccga	ttatggttcc	caagtattgg	tcagtcttgt	tttgagaaaa	360
gaacttcctt	ttgattcctt	ttcaatgggt	gctgaagagg	attcaggaga	cttgccaaca	420
gatgctggtc	aagaaacatt	gaaacgtatt	acgaagcttg	taaatagacac	tctttcttct	480
gatagtactt	ataatgatat	aattttatct	gaagaagata	tacttgtcgc	tattgatact	540
ggaaaatctg	aaggaggccc	tcatgggcga	cactgggtac	tggatcctat	agatggcacc	600
aaagggtttg	tacgaggaga	tcagtatgcc	attgcgcttg	cattgataga	tgaaggaaaa	660
gtagttctcg	gagttctttc	atgtccgaat	cttctcttta	ccccaatgg	tagttctaata	720
acaaatccta	ctgaaaacca	agttggctgt	cttttctctg	ctaaaattgg	ttgtggaaca	780
gagaatgcaa	tcactagaat	ggttcgggtg	cgtcaaaggt	acatgttagc	aatatcgaaa	840
atccagccga	cgcatacttc	tttgaatcat	atgaagctgc	tcattctcta	catgacttat	900
ctagctccat	agctaagaag	cttggcgctg	aagcaccgcc	tgtaagaatt	gatagccagg	960
caaaatatgg	tgctctttca	cgaggagatg	gtgctatata	tttacggttt	ccacataaag	1020
ggtaccgtga	gaaaatttgg	gatcatgcag	ctggctgcat	tgctcgtcaca	gaagctggag	1080
gggtagcaac	cgatgctgct	gggaatgcct	tagattctcg	aaaggaagta	tctttgatta	1140

atacaggcat attgtcacca acagagctga tgccaaaact tttggagccg tacaat

1196

<210>59

<211>2000

<212>DNA

<213> 小麦属

<220>

<221>misc_feature

<222>(1723).. (1723)

<223>n 是 a、c、g 或 t

<220>

<221>misc_feature

<222>(1793).. (1793)

<223>n 是 a、c、g 或 t

<220>

<221>misc_feature

<222>(1798).. (1798)

<223>n 是 a、c、g 或 t

<220>

<221>misc_feature

<222>(1812).. (1812)

<223>n 是 a、c、g 或 t

<220>

<221>misc_feature

<222>(1825).. (1825)

<223>n 是 a、c、g 或 t

<220>

<221>misc_feature

<222>(1864).. (1864)

<223>n 是 a、c、g 或 t

<220>

<221>misc_feature

<222>(1885).. (1885)

<223>n 是 a、c、g 或 t

<220>

<221>misc_feature

<222>(1891).. (1891)

<223>n 是 a、c、g 或 t

<220>

<221>misc_feature

<222>(1893).. (1893)

<223>n 是 a、c、g 或 t

<220>

<221>misc_feature

<222>(1946).. (1946)

<223>n 是 a、c、g 或 t

<220>

<221>misc_feature

<222>(1973).. (1973)

<223>n 是 a、c、g 或 t

<220>

<221>misc_feature

<222>(1975).. (1975)

<223>n 是 a、c、g 或 t

<220>

<221>misc_feature

<222>(1982).. (1982)

<223>n 是 a、c、g 或 t

<220>

<221>misc_feature

<222>(1985).. (1985)

<223>n 是 a、c、g 或 t

<400>59

ctcgtgccga	atteggcacg	aggegcgtgg	gcctcctcct	cgctccctcc	tcctcgcgcc	60
gaaaccacc	tegtgctegc	ctcccttate	ccctgccttc	ccaccacctt	ggccgcccc	120
cctaccgccg	attegcctcc	tecgcgcgc	tgcgctcccc	cctctggtgg	ccccgccaag	180
cgccaccctt	cttttccgcc	cgcgccatgt	cagggctccgc	cggtagcccc	ccgtacgccg	240
ccgagcttgc	agccgccaa	aaggccgtcg	cccttgccgc	ccgcctatgc	cagactgtac	300
aacaggaaat	tctgcaatca	gatattcagt	ccaaggcaga	taaaagtcct	gtgacagtag	360
ctgactatgg	atctcaagta	ttggtaagcc	ttgcgttaaa	tatggaagta	acttctggtt	420
cattttctat	ggtggccgaa	gaggactcag	aagacttgag	aaaggatagc	gctgaagaaa	480
ttctggaaca	tattactgat	cttgtaaata	aaactctcgc	tgaggatggt	tcatacaaca	540
ttactttatc	taaggaaggt	atcctctctg	caattgatac	tgggaagtct	gaaggagtc	600
catctggccg	acattggggt	ctggatccaa	ttgatgggac	taaaggtttc	ttgagaggag	660
gccaatatgc	aatcgcactg	gcactgcttg	atgagggcaa	agttgttttg	ggcgtgttgg	720
gatgtccaaa	tcttctttg	acatcaataa	gcaacctcaa	tggtagctca	tcaggagatc	780
aaacgggggc	cctcttttca	gctacaattg	gttgtgggtc	tgaagtagag	tcattagagg	840
gctctccacc	acaaaagatt	agtgtttgta	ccatcgacaa	tccagtgaat	gcctcgttct	900
ttgaatccta	tgaaggagca	cacacaatgc	atgatttaac	tggctctata	gcggagaaac	960
ttggtgtcca	agctcctcca	gtcagaatag	atagccaagc	aaaatatggt	gctctggccc	1020
gtggcgatgg	tgccatttac	ttgcgttttc	cacacaaggg	ttataaggaa	aagatatggg	1080
atcatgcagc	tggegcgaatt	gtcgtcacag	aagctggagg	tgtagtaaca	gatgcctcag	1140
gaaacgatct	cgatttctcg	aaagggagat	ttcttgatgt	tgacacaggc	atcattgcc	1200
caaataagca	gttgatgcc	tactgctga	agtctgtcca	ggaggccatc	aaggagaaaa	1260
gccaggcccc	tccccattg	tagaagcttt	tttggtttga	accttccctg	ttgtagttgg	1320
attgatccaa	aacaatgate	gcaatgccac	accttattca	cactgttcta	tgtgtaaata	1380
acctttttgt	tgggacaaa	gcaatccttg	ttgtatcaca	ttgtacatc	taaggagtgg	1440
tgacagccat	gtcttaata	aaagaggcat	ctgcctgcag	ttataaata	cttagcatag	1500
ctttgttcaa	cataaatgtc	agcaacaact	attctttgtg	tgagcaacag	ccaatctctt	1560
gtattatttc	tttcagagat	ttttgatgtg	cagtttatcc	ccccttgta	aattacatac	1620
aattcaagct	ataatcaata	ttaactctta	tggtagcaac	taaatcatca	ttcatgggta	1680
cttgcagact	caacattgca	gagctaaggc	taataggact	aancaggcac	atcagctgga	1740
tactctgcag	aatgcctttt	gatggatcc	agcagctacc	gctcttgctc	acnaagntg	1800
ggaagcattt	gntcatacac	atcantgaag	agctccgcaa	ggccgtgttt	tggaacctcc	1860
ggcnactgaa	tggcttgcag	gaacnttgcc	nanatgtcct	gagtaaacc	tgagtgcgca	1920
cacatcatec	ctgaacaatt	cgctcngaga	cggatcccgt	gtccaagcca	acnanaacgg	1980
cngantggtt	aactcgagcc					2000

<210>60

<211>1339

<212>DNA

<213> 大麦

<220>

<221>misc_feature

<222>(5).. (5)

<223>n 是 a、c、g 或 t

<220>

<221>misc_feature

<222>(1143).. (1143)

<223>n 是 a、c、g 或 t

<220>

<221>misc_feature

<222>(1152).. (1152)

<223>n 是 a、c、g 或 t

<220>

<221>misc_feature

<222>(1220).. (1220)

<223>n 是 a、c、g 或 t

<220>

<221>misc_feature

<222>(1270).. (1270)

<223>n 是 a、c、g 或 t

<400>60

caaanaatcc tcactagaag ggaaagacaa agttgcagcg tcagcgcgac ctgcccgtgc	60
ccgccccacc taccgccgcc ggccgccc aa tcgattggca atgtcgcggc ccgcccggaa	120
tcccccgtag gccgtcgagc tcggcgccgc gaagaaggcc gtctccctcg ccgcccgcct	180
atgccagacg gtgcagcagg aaatcgtgca gtcagacatt caatctaagg cggataagac	240
tcctgtcacc gtagctgatt atggatctca ggtattgggtg agtcttgtgt taaatatgga	300
agtaacctct ggttcctttt ctatggtggc cgaggaggat tcagaagact tgagaaagga	360
tggcgctgac gaaattctgg agcgcattac tgatctcgta aacaaaactc tcgctgagga	420
tggttcatac aacatthtat tatctaagga agctatcctc tctgcaactg ataccgggaa	480
gtccgagggt ggtccatctg gccgacattg ggttctagat ccaattgatg ggactaaagg	540
attcgtgaga ggaggccaat atgccattgc actggcactg cttgatgagg gcaaagtgtg	600
cttaggtgtg ttgggatgtc caaatcttcc tttgacatca ataagtaacc tcagtgatag	660
ctcatcaaga gatcaaaccg gggccctctt ttcagctgca atcggttgtg gtgetgaaga	720
gcagtctttg gatggctctc caccacaaaa gattagtgtt tgtaccatca ttgetacaaa	780

taaacagtca atgccatcag tccttgaage ctatcaagga gcacacacca agcgagaaaa	840
aacaggcccc gtagccaatg aaaaagggtg tccaacctcc tccagtcact gaagttagat	900
agccaaccaa aataatgate gctatgctac tccgtggaca tggatgcaca ctgttaatgg	960
cgtaaccac acgagggtta cagggaaaca atatgggatc atgcagctgg ctcaattgtc	1020
gtcacggaag ctggaggtgt agttaaagat gcctcaggaa acgatctcga tttctcga	1080
ggaagatttc ttgatecgtga cacaggcate attgctacaa ataaacagtt gatgccatca	1140
gtnctgaag tncgtgccag gaggcaatca aggagaaaa acaggcctct tctccattgt	1200
aaaaggtttt tttaaccttn ccctgttact gaagttggat tggccaataa taatgatcgc	1260
tatgctactn ccttgttcat ttattcacac tgtttatgtg taagtgacct tttgttggaa	1320
aaaatacaac ccttgttat	1339

<210>61

<211>1498

<212>DNA

<213> 稻属

<400>61

gtggaattcc ggtcgcgccc tgcatctcgt acgtgacggg gagggcgcc ctcaccagg	60
gatgctgcaa cggcgtcaag gggctgaaca acgccgccc caccaccgcc gaccgccagg	120
ccgcctgccg ctgccgcgag actccgcgcc agcgcaccca tgctgcaggc cgccgggaac	180
ccctacgccg ctgagctcgc cgccgccaag aaggccgtca ccctcgccc cgccctctgc	240
caggcgggtgc aaaaggacat tctgcagtct ggtgttcagt ctaaggcgga tcaaagtccg	300
gtgacagttg ccgattatgg gtctcaaata ttggtaagcc ttgtcttgaa aatggaagca	360
ccagcttctt ctctctctc tatggtggct gaggaggact cggaagaatt gaggaaagaa	420
ggcgcagaag aaatcttaga aaatatacacc gagctcgtaa acgaaactat ctagatgat	480
ggtacataca gcatttactt ctctaaggaa ggtatcctct ctgcaattga cgacggcaag	540
tctgagggag gtccatctgg gcaacactgg gtgctagatc caattgatgg gactaaaggt	600
ttcttaaggg gagaccaata tgctattgcc ctggctctgc ttgatgaggg taaagtgtt	660
ttgggtgtat tggcttgtcc caaccttct ttgggatcaa taggcaacct taatggtg	720
tcctcgggag atcaagttgg tgctctctt tctgctacta ttggttgg agctgaagta	780
gagcttttac agggctctcc agcacaanaag attagtgtct gttccatcga caatccagtc	840
gaagcttcat tctttgagtc ctacgaaggg gcacactcct tgcgtgattt aacaggctcc	900
attgcggaga aacttgggtg ccaagctcct ccagttagaa ttgatagcca agcaaaatac	960
ggtgccttag cccgaggtga cggtgccatt tacttgcgtt ttccacacaa aggttacaga	1020
gagaagatct gggatcatgc agctgggtca atcgtcgtga cagaagctgg aggtctggtg	1080
acagatgcat caggaaacga tttggatttc tcaaaggga gatttcttga tctcgacaca	1140
gggatcatcg cgacgaacaa gcagctgatg ccttactcc tgaaggctgt gcaagatgcc	1200
atcaaggagc aaaaccaggc tgcttcccc ttgtagtagc tgtctcaate cacaatccac	1260
aaatatacata atgtttccat ataataataa ttgcagtgtc gcttccccat caacattact	1320

ttaaattgtgt	gtacagcacc	actttgttgt	tgttgctgct	gcaaattcag	tatcttattg	1380
ttgcacattt	ctgcatctaa	ttggtgggtg	agctggcacc	acatgaatgt	tctttcatct	1440
ggattcagaa	gaaataatta	aattggcctg	attctcccta	actcggggca	atattgct	1498

<210>62

<211>1544

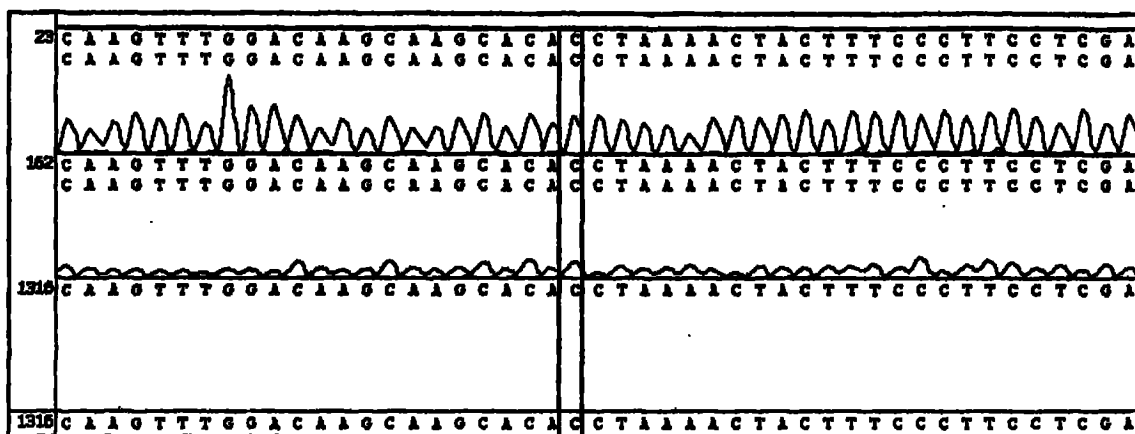
<212>DNA

<213> 玉米

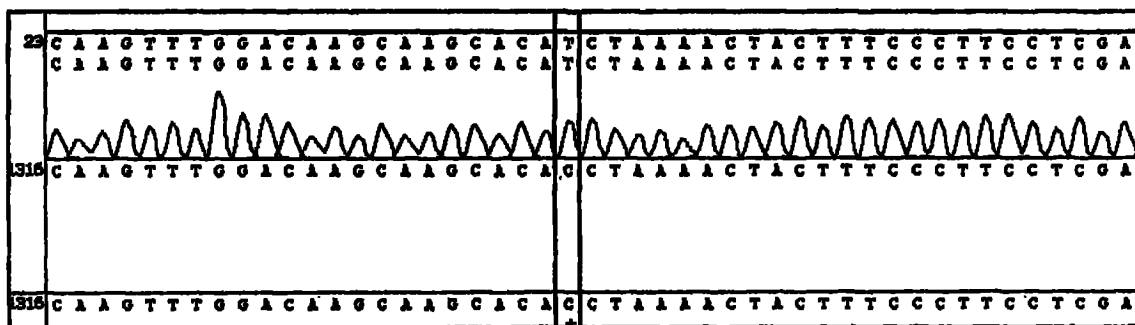
<400>62

cgcacatggc	tgcgcgctg	ggcctgctcc	cgcacgcgat	cctcgtctcc	tcccagctc	60
taccacgcc	ccgagctcgc	gtcccttate	ctcttccacc	cgctccctcc	tacctccgc	120
acgcctcctc	ctccgcctcc	cgctcctgcc	gcgcgctgcc	gcgttttgtc	gcagtccgcg	180
ccatggcttc	ggggaacccc	tacgccgccg	agctcgccgc	cgccaagaag	gccgtcacc	240
tcgccgcaa	actctgccag	acagttcaac	aggatattat	gcattctggc	gttcaggcta	300
aggcagacaa	aagtcctgtc	acagtggtg	attatggatc	tcaaatattg	gtcggttttt	360
ccttaaagat	ggatgtatca	tctggaccat	tttcattggt	ggctgaagag	gactcagatg	420
aattgagaaa	agatggcgtc	gaagaaat	tggaagatat	tactgacctt	gtcaatgaaa	480
ccatctttga	tgatggttca	tataacattt	cgtttacaaa	ggaaggata	ctctctgcaa	540
ttgatgatgg	gaagtctgag	ggagggtccat	ctggacgaca	ttgggtgctt	gatccgattg	600
acggtaacta	aggtttcttg	aggggcgacc	aatatgccat	tgcatggctt	ctgcttgatg	660
aaggtaaagt	tgttttgggt	gtattggctt	gtccaaatct	tccattgtca	tcaataaaca	720
acatcaatgg	taactcttcg	ggagataaag	ttggtgccct	gttttctgct	acaattggtt	780
gtggggctca	agtagagtcc	ttagatggct	ctccaccaca	aaagattagt	gtttgtctca	840
tcgacaatcc	tgtcaatgca	tcattttttg	aatcctatga	aagtgcacac	tccatgcatg	900
atgtgactgg	ctctattgca	gagaaacttg	gtgtccaagc	tcctccagtt	agaatcgaca	960
gccaagcaaa	atatggtgct	ctggcccag	gtgatggcgc	catttacttg	cgctttccac	1020
acaaaggtta	tagagagaaa	atatgggacc	atgcagcagg	atcaattgtc	gtgacagaag	1080
ctggaggcat	agtaacagat	gctgcgggaa	acgacttga	tttctccaaa	gggagatttc	1140
tggatctcga	cacaggcatc	atcgcaacca	acaaggagtt	gatgccgtcg	ctcctgaaag	1200
ctgtccaaga	ggctattaaa	gagacgaacc	aggctgcctc	cctcttatag	ctgtttagt	1260
ggtcgacaaa	aaagtagttg	caaaattttc	gtactggcaa	acaggtgtgc	atcatttctc	1320
cggtgtatta	cagagtctag	caaatttata	gcatcaacct	gattggtgat	cagacgtcca	1380
ttcgttttac	tgaatcacct	tcttgggtgca	gcattgctag	aagtggacaa	catgaataat	1440
ttgagtgagt	ccatagttgc	ctgaactcag	ccttggcatt	tgaactgggt	atagaaattg	1500
tgaataaatt	aatggatatt	tggaagacaa	acttgaactt	caag		1544

Col-0 野生型



alx8-原系 (M6池)



alx8-第一次逆交

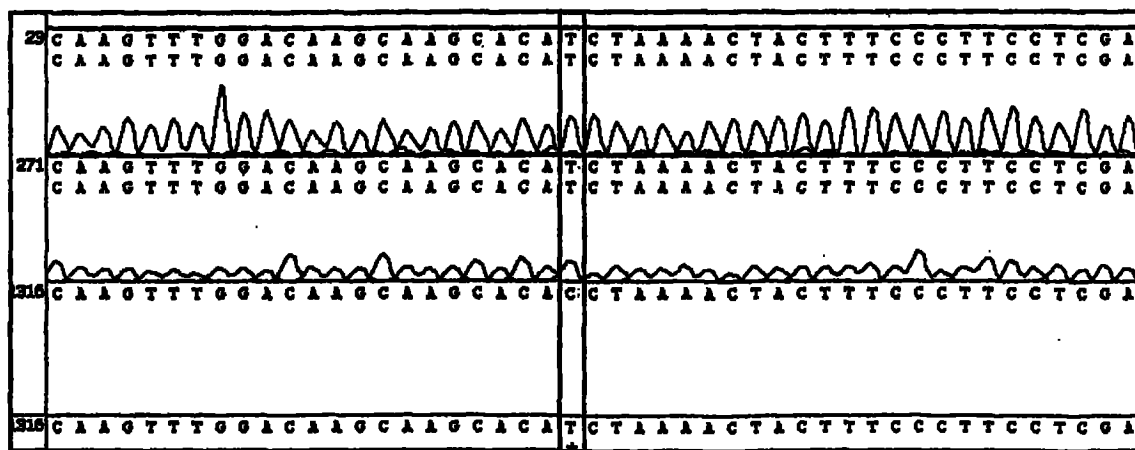
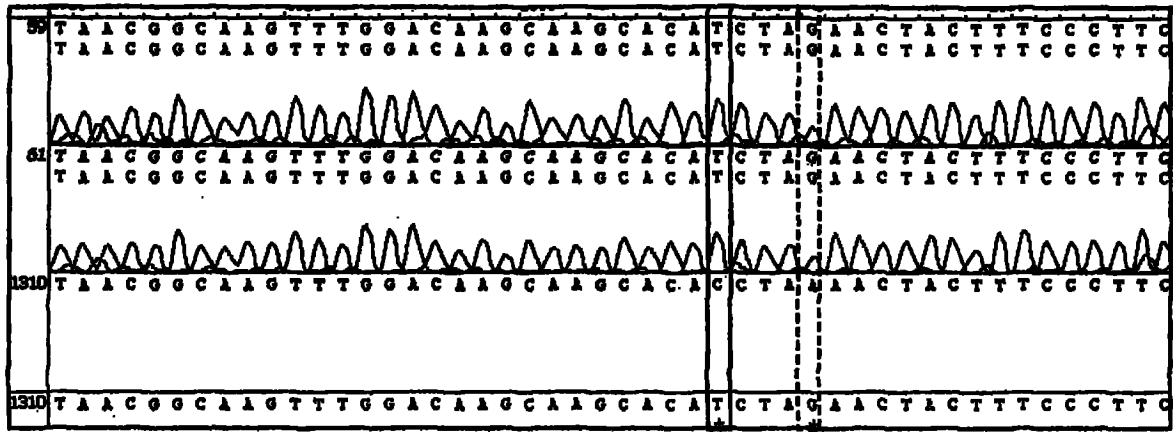
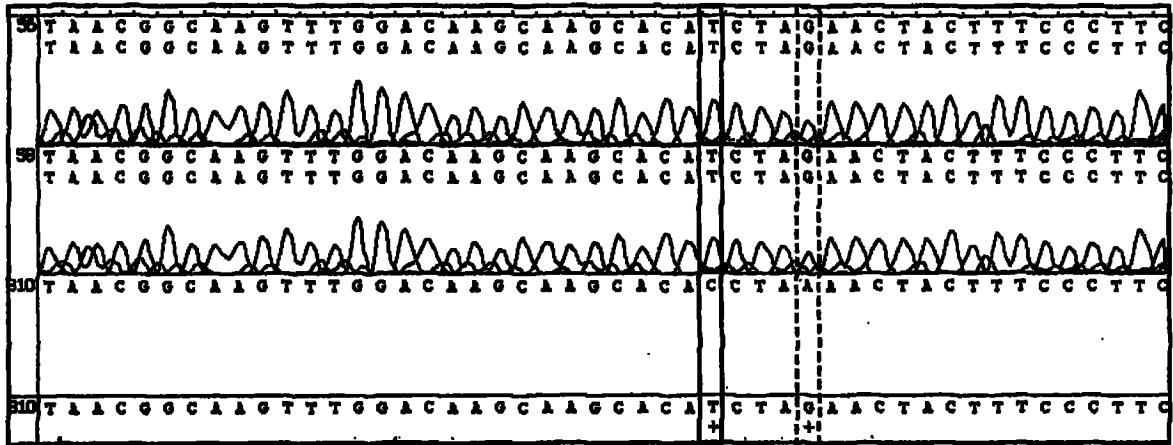


图 1A

alx8- 与 dCAPS 的第三次逆交 (a-g)



alx8- 与 dCAPS 的第四次逆交 (a-g)



包含 APX2-LUC 的 Col-0 WT

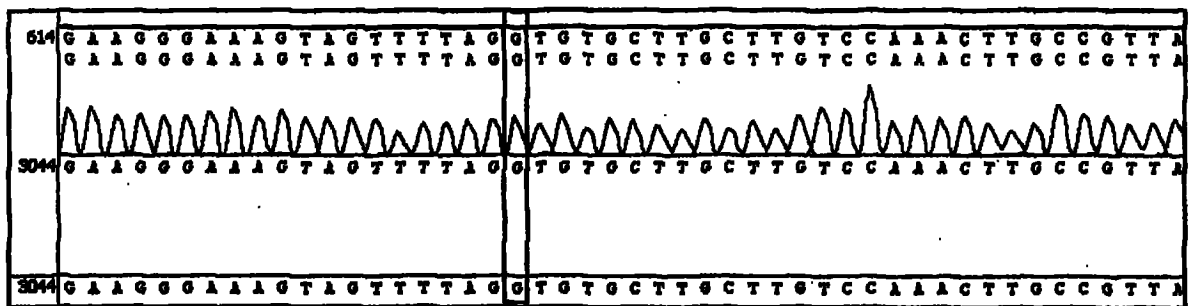


图 1A(续)

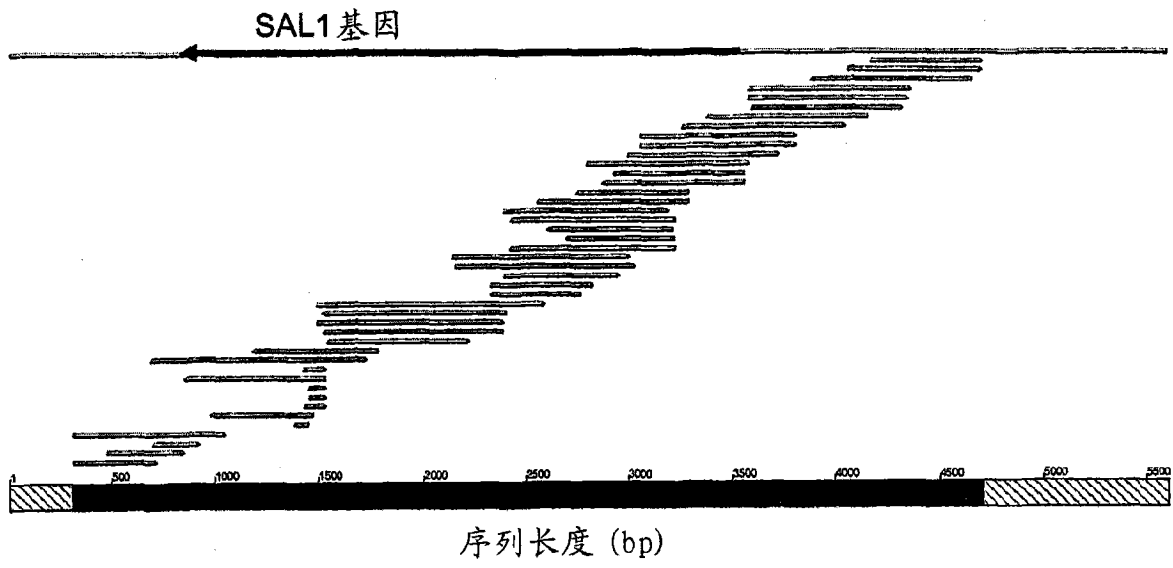


图 1B



图 2

图 3 - SAL1 的基因组核苷酸序列 -SEQ ID NO: 1

1 gacatatatt tatcttcttg aaaagcgaat gatgtctata aattgttttc gaacagcga
61 ggctccgctt caatcatttg tagcagtaag aacgaattcg agacctagaa attcatcgaa
121 ccgtctcggt tctgtattcg gacgcaagtc ttcttctcct tcatttggtta ctctcagagt
181 tgtttcatcg atggcttacg agaaagagct tgatgctgct aagaaagctg cttcactcgc
241 tgctcgtctc tgtcagggtta gggttttttc gattcaatca tgacctatag attctaaagt
301 ttgattcttt aagaaacca ttttgtaaat ctccaaatt tcgtttaaca ttttgtgttt
361 attgtgcatt gcatctgtaa ttgggaatag attctagtga tatagtgtaa tggctctcta
421 catacgaagc tcgtgtaaat cttgatcaa aatcttatct ttgtgttttg ggtttgtttc
481 agaaagtcca aaaggctttg ttgcaatcag atgtgcaatc aaaatctgat aaaagtccag
541 tgaccggtgc tgattatggt tagtttggtta tacctgtccc tgattagaaa aagctcttct
601 ctttgaatgt tactgagatt gttaggaat cacttaattt gatctgtctt gtgttgaatt
661 tcaggttcac aagcagttgt tagtttagtc ttagaaaaag agctcagttc tgaacccttt
721 tcattggtgg ctgaagaggt gaaactgctt aataaatcct tgttagatgt ctcacacttt
781 acttatcttt gagtttgtgt ttatggactc acattgtcta aaatgatcta tataggactc
841 aggcgatcta cgcaaggatg gttctcagga tactctggag cgcacacaa aactcgtgaa
901 cgacactttg gctaccgagg aatcgtttaa tggctctact ttgtctactg atgatctact
961 tagagccatt gactgtggaa catctgaagg tggccaaat ggtcgcact gggctctgga
1021 tccaattgat ggactaaag ggtacgtttt aaaactaact agcctaaagt caaatcttct
1081 tatttcagag aaaatgtaa tttgatagaa tgttgagtca gatgttatgt tcctgacact
1141 gagcattttc atgattttag atttctgagg ggagatcaat acgcagtagc actaggattg
1201 ctcgaggaag ggaaagtagt tttaggtgtg cttgcttgtc caaacttgcc gttagcatcc
1261 atagcaggaa acaacaagaa caaatcttctg tcagacgaaa ttggatgcct cttctttgct
1321 acaattgggt cagggacata tatgcagctc ctagattcaa aatcttctcc tgtaaaagtg
1381 caagtcteta gtgttgagaa tcctgaagag gcatcgttct tcgagtcatt cgaaggagct
1441 cactctctac atgacttatc cagctocatt gccaatgtaa attgcttctt tccttccatg
1501 tgattccagc taatagctaa ctaattttcc tcatccattt gatcatgttc tatgttgtaa
1561 tatacagaaa ctcggtgtca aagctocacc agtccgtatt gatagccaag caaagtatgg

图 3

```

1621 agctttatca agaggagatg gagctatata cttacggttt cctcataaag gataaccgga
1681 aaagatttgg gaccatgtcg ctggtgctat agttgttaca ggtaacatta aagcttactc
1741 tctatgaagc taattttata gtgtcgacat gcggatgtaa atagataagg aatgcaaggt
1801 tgattcttct ttttggtgca gaggcgggtg gaatagtgac agatgcagca ggaaagccac
1861 tggattttctc gaaaggaag tatcttgatt tggacacagg cattatcggt gctaacgaga
1921 agctaatgcc tctgcttttg aaagcagttc gtgactccat agctgagcaa gagaaagctt
1981 cagctctctg a tttgttttt ttctctcgta cgttctttgt ttctctgtaa ctggtgtttc
2041 attttctttc accgaatttc accagtgaga atttcttcca ttttcgaaaa agaaataaaa
2101 atgaaattct gttttgggct aa

```

图 3(续)

图 4-SAL1 的氨基酸序列 -SEQ ID NO: 2

```

1   MMSINCFRTA KAPLQSFVAV RTNSRPRNSS NRLVSVFGRK SSSPSFVTLR
51  VVSSMAYEKE LDKAAKKAASL AARLCQKVQK ALLQSDVQSK SDKSPVTVAD
101 YGSQAVVSLV LEKELSSEPF SLVAEEDSGD LRKDGSDQTL ERITKLVNDT
151 LATEESFNNGS TLSTDDLRA IDCSTSEGGP NGRHWVLDPI DGTKGFLRGD
201 QYAVALLGLE EGKVVLCVLA CPNLPLASIA GNNKNKSSSD EIGCLFFATI
251 GSGTYMQLLD SKSSPVKVQV SSVENPEEAS FFESFEGAHS LHDLSSSIAN
301 KLGVKAPPVR IDSQAKYGAL SRGDGAIYLR FPHKGYREKI WDHVAGAIIV
351 TEAGGIVTDA AGKPLDFSKG KYLDLDTGII VANEKLMPLL LKAVRDSIAE
401 QEKASAL*

```

图 4

CLUSTAL W (1.83) 多序列比对

```

稻      MSQAAGNPYAAELAAAKKAVTLAARLCQAVOKDILQSGVQSKADQSPVTVADYGSQILVS 60
玉米    --MASGNPYAAELAAAKKAVTLAAKLCQTVQODIMHSGVQAKADKSPVTVADYGSQILVG 58
拟南芥  -----MAYEKELDAAKKAASLAARLCQKQVQKALQSDVQSKSDKSPVTVADYGSQAVVS 54
          . *  ** *****,:***:*** **: :::*,**:*:*:***** :*,

稻      LVLKMEAPASSSFSSHVAEEDSEELRKEGAEIILENITELVNETIVDDGTYS-IYFSKEGI 119
玉米    FSLKNDV-SSGPFSLVAEEALDELKRDGAEIILEDITDLVNETIFDDGSYN-ISFTKEGI 116
拟南芥  LVLEKEL-SSEPFSLVAEEDSGDLRDKGSDTFLERITKLVNDTLATEESFNGSTLSTDDL 113
          : * : : * .**:* ** :***:*:: ** **,***:*: : :. : :. : :. : :

稻      LSAIDDGKSEGGPSGRHVLDPIDGTKGFLRGDQYAIALALLDEGKVVVLGVLACPNLSLG 179
玉米    LSAIDDGKSEGGPSGRHVLDPIDGTKGFLRGDQYAIALALLDEGKVVVLGVLACPNLPLS 176
拟南芥  LRAIDCGTSEGGPNGRHVLDPIDGTKGFLRGDQYAVALLGLEEGKVVVLGVLACPNLPLA 173
          * *** *.*****.*****.*****.*****.***,**:*****.**,

稻      SIGNLNGG-SSGDQVGFALFSATIGCGAEVESLQG-SPAQKISVCSIDNPVEASFFESYEG 237
玉米    SINNINGN-SSGDKVGFALFSATIGCGAQVESLDG-SPPQKISVCSIDNPVNASFFESYES 234
拟南芥  SIAGMNKKNSSSDEIGCLFFATIGSGTYMQLLDSKSSPVKVQVSSVENPEASFFESFEG 233
          ** . * . **,*,:*,** *****,*: : : *. *, *, *,*,*:** :*****,*

稻      AHSLRDLTGSIAEKLGVQAPPVVRIDSQAKYGALARGDGAIYLRFPKGYREKIWDHAAGS 297
玉米    AHSHDLTRSIAEKLGVQAPPVVRIDSQAKYGALARGDGAIYLRFPKGYREKIWDHAGGS 294
拟南芥  AHSLHDLSSSIANKLGVKAPPVVRIDSQAKYGALSRGDGAIYLRFPKGYREKIWDHVAGA 293
          ***:***: ***:***:*****.*****.*****.*****.*****.*****.**,

稻      IVVTEAGGLVTDASGNDLDFSKGRFLDLDTGIIATNKQLMPSLLKAVODAIKEONQAASF 357
玉米    IVVTEAGGIVTDAAGKDLDFSKGRFLDLDTGIIATNKELMPSLLKAVQEAIKETNQAASL 354
拟南芥  IVVTEAGGIVTDAAGKPLDFSKGKYLDLDTGIIIVANEKLMPLLLKAVRDSIAEQEKASAL 353
          *****:***:*: *****:*****.***:*** *****:*** * :*:

稻      L 358
玉米    L 355
拟南芥  -

```

图 5

物种	EST ID	同一性 (%)
<i>Hordeum vulgare</i> (大麦)	TC141977	64% & 62%
<i>Triticum aestivum</i> (小麦)	TC233967	68% & 68%
<i>Oryza sativa</i> (稻)	TC298407	66%
<i>Zea mays</i> (玉米)	TC320492	69% & 67%
<i>Solanum tuberosum</i> (马铃薯)	TC136604	69%
<i>Picea</i> (云杉)	TC17821	67% & 71%
<i>Pinus</i> (松树)	TC67647	65%
<i>Allium cepa</i> (洋葱)	TC448	72%
<i>Lycopersicon esculentum</i> (西红柿)	TC176257	73%
<i>Glycine Max</i> (大豆)	TC216235	74%
<i>Medicago truncatula</i> (蒺藜苜蓿)	TC95084	73%
<i>Gossypium hirsutum</i> (棉花)	TC28214	74% & 77%
杨树 (白杨)	TC45863	75%
<i>Brassica napus</i> (油菜籽)	TC9828	88%
<i>Lotus japonicus</i> (百脉根)	TC13858	74%

图 6A

CLUSTAL W (1.83) 多序列比对

云杉	-----GGTTCCTCGGACTTGTGTGTATAAGTCTATAACAT	36
松树	-----	
苜蓿	-----TGGGACGCAGAGTTTGT---GGGAGGAACAAGAACGGTAGTA	41
荷花	-----	
大豆	--GAAAAAGATGGGTACTCAAACAACACTTTGGTGTAGAGCAAGAACTACTATAAGTGTA	58
SAL1	-----GACATATAATTATCTTCTTGGAAA	23
油菜籽	-----	
白杨	-----	
棉花	-----	
西红柿	-----	
马铃薯	-----	
洋葱	-----CAATTTGCAAAAGTC	15
小麦	CTCGTGCCGAATTCGGCACGAGGCGCGTGGCCCTCCTCCTCGCTCCCTCCCTCGCCC	60
大麦	-----	
水稻	-----GTGGAATTCGGTC	14
玉米	-----CGCACATGGCTGCGCGCGTGGCCCTGC'TCCC	31
云杉	CAATCAATGGCGTGGTCGAGCCGATTCATTTCAATTTACGAGGACTTCTAGTGCCACC	96
松树	-----	
苜蓿	GCAATAAGGGATTGTTGCGAATCCATAAATACAATAATAATAATCAGGAAAAAATCCACC	101
荷花	-----AGAATCTGGAAAAACAACCATC	21
大豆	GGAG---GTGATTGGAAGTTG---TTCGAATCC-----AGAATCCGAAAAAAGGGCACC	106
SAL1	AGCGAATGATGTCTATAAAATGTTTTCGAACGAGCGAAGGCTCCGCTTCAATCATTTGTAG	83
油菜籽	-----GGAACAGCCCAGGCACCGCTTCAGACATTCGCAT	34
白杨	-----GCGAAATC	8
棉花	-----GGAAATTTCTTACGAAATTTTGAATTGCAAAATTAATAATGTCTAT	48
西红柿	-----	
马铃薯	-----GCTTTCACATTATCATCTAGGACTATAAAATCC'TTG	36
洋葱	CCTCCTCGTCTACACTGTGCTAACCTATCCCCCTAATCTCGATTAAATGTTCCCAAT	75
小麦	GAAACCCACCTCGTGC'TCGCTCCCTTATCCCTGCCTTCCACCACCTTGGCCGCCCA	120
大麦	-----CAAANAATCCTCACTA	16
水稻	GCGCCGTGCATCTCGTACGTGACGGGGAGGGCGGCCTCAC--CCAGGGATGCTGCAACG	72
玉米	GCACGGATCCTCGTCTCCTCCGAGCTCTACCCACGCCCGAGCTCGCGTCCCTTATCC	91
云杉	TCATTTGTTTTCTTCCAAC'TACAA--CCCTACCTCTACAGATACATTTCCCAGCGTGAG	155
松树	-----	
苜蓿	ACCGTCTCTGGTTTCTCATATCAT-CATCAACGACA-AGAAGATCCTCTCATTTGAT	159
荷花	ACCGTTGTGATCTTTCAT---CAA-GGGGAAGAAGA-AGAAGACCAGTTTCCCTTGTCTT	76
大豆	ACCG-----TGTCAA---CAA-GTAGAAGCAGA-AGCTGTTTTGTTCTTCGC--C	150
SAL1	CAGTRAGAACGAATTCGAGACCTAGAAATTCATCGAACCGTCTCGTTTTCTGTATTGGAC	143
油菜籽	CAGT-----TTCGAAATTCAGATATTCACCGAACCTATCGTTTTCTGTATTGAGAA	76
白杨	ACAATCAGGAAAAACC'TTCTTG-TTTCCTC-----TCCCCTTTTATTTTCTCTAA	61
棉花	AAATGGTTGAGATTTGTTTCCCC-TCTCTTAAAAA-GCCCCCTCTTTTTCATCTCTGT	106
西红柿	-----AAAATACA-AAACCCCACTTCCCCTTTTCAC	30
马铃薯	ACACAAAAACCCTGCCAATTGTTAA-CAAAAAATACA-AAACCCCACTTCCCCTTTTCAC	94
洋葱	AATATCTCCCTGTCTTTCTCCCA-CCAAATCTAGT-TCACTTCTTGCTCCTCCGTAT	133
小麦	CCTACCGCCGATTCGCCCTCTCCGCGCGGTGCGCTCCCCCTCTGGTGGCCCCGCCAAG	180
大麦	G--AAGGGAAAGACAAAGTTGCAGCGTCAGCGGA-CCTGCCCGTGCCCGCCACCTAC	73
水稻	GCGTCAAGGGGCTGAACAACGCCG-CCGCACCACCGCCGACCGCCAGGCCGCTGCCGC	131
玉米	TCTTCCACCCGCTCCCTTCTTACTC--CGCCACGCTCCTCCTCCGCTCCCGCTCTCTC	149

图 6B

云杉	TGCGAGGAGGAGCATCACCACCAAGACAACAAGAGCGAAAATGGACATCGGTG-CATACG	214
松树	-----CAAGAGTGAAGATGGAGAACAGGG-CATACG	30
首蓿	GTCGTCGTTGGTACCAATTAACGACAATACTTTCTTCTTCTTCTTTAATGTCTTCTTACG	219
荷花	GTTGTTGTTTCATCACT-----TTCTTCAATGCCT---TACG	109
大豆	GCTGACACTAATCGT-----TTCTTCAATGCCT---TACG	182
SAL1	GCAAGTC-TTCTTCTCCTTCAATTTGTTACTCTCAGAGTTGTTTCATCGATGGCT---TACG	200
油菜籽	GGAAGTC---GTCTCCTTCAATTTGTTACTCTAAGAGTAGTCTCATCCATGGCT---TACG	139
白杨	CAAAACCAAAGCAAACC--TCAATTCCAAGAGTATTATCCTTCTTCAATGTCT---TACA	117
棉花	CACTTGGCTCCTCCTCCTC-C-TTCTTCTTCTGCTGTGATTGTGG-CAATGTCT---TATG	161
西红柿	TTTTGCTCACTCTAAGAGCATCTAAATCAACC-TAAGAGCTGTTTCAATGTCTG---TATG	87
马铃薯	TTTTGCTCACTCTAAGAGCATCTAAATCAACC-TAAGAGCTGTTTCAATGTCTG---TATG	151
洋葱	CTCAATTAAGCCAAGACTGAATCTAGATCTTTATCCATTTCTGCCATGGCTTCGTACG	193
小麦	CGCCACC--CCTCTTTTCCGCCCGCCCATGTCTAGGGTCCGCCGGTAGCCCC-CGTACG	237
大麦	CGCCGCCGCCGCCCAATCGATTG-GCAATGTCCGGCCCGCCGGCAATCCCC-CGTACG	131
水稻	TGCCCGGAGACTCCGCCAGCCACCATGTCTCGCAGGCCCGCCGGGAACCCC---TACC	187
玉米	CGCCGTCGCCCGGTTTTTGTCCAGTCCGCCCATGG-CTTCGGGGAACCCC---TACC	204

云杉	AACAAGATCTTGCCATTGCAATCAAGGCCGCCTCTCTCGCAGCTCGTCTATGCCAGTCCG	274
松树	AACAAGATCTTGCCATTGCAATCAAGGCCGCCTCTCTCGCAGCTCGTCTATGCCAGTCCG	90
首蓿	AGAAGGAACCTCGCTGCTGCTAAGAAAGCTGCCACTCTCGCTGCTCGTCTTTGCCAGAAAG	279
荷花	AGAAGGAGCTCGCTGCTGCCAAGAAAGCAGCCACTCTCGCTGCTCGTCTCTGTCAAGAAAG	169
大豆	AGAAGGAATTCGCCGCTGCCAAAAAAGCAGCCACTCTCGCTGCTCGTCTCTGTCAAGAAAG	242
SAL1	AGAAAGAGCTTGATGCTGCTAAGAAAGCTGCTTCACTCGCTGCTCGTCTCTGTCAAGAAAG	260
油菜籽	AGAAAGAGCTTGACGCTGCTAAGAAAGCTGCTTCCCTCACAGCTCGTCTCTGTCAAGAAAG	199
白杨	ATAAAGAACCTTGCTGCTGCCAAGAAAGCTGTCTCTCTTGTGCTGCCCGCCTCTGCCAGAAGA	177
棉花	ATAAAGAACCTGGCTGCTGCCAAGAAAGCAGCCCTCTCTCGCTGCTCGTCTCTGTCAAGAAAG	221
西红柿	ATAAAGAACCTTGATGCTGCCAAGAAAGCTGCTGCTTCTCTCTTGTGCTGCCCTTGTCAAAAG	147
马铃薯	ATAAAGAACCTTGATGCTGCCAAGAAAGCTGCTGCTTCTCTCTTGTGCTGCCCTTGTCAAAAG	211
洋葱	AGAAAGATCTTACCCTGCCAAGAAAGCTGCTTCACTGGCTGCTCGTCTATGCCAAACGG	253
小麦	CCGCCGAGCTTGACGCGGCCAAGAAAGCCGCTGCCCTTGGCCGCCGCCCTATGCCAGACTG	297
大麦	CCGTCGAGCTCGGCCGCCGCAAGAAAGCCGCTGCCCTCGCCGCCGCCCTATGCCAGACGG	191
水稻	CCGCTGAGCTCGCCGCCGCCAAGAAAGCCGCTACCCCTCGCCGCCGCCCTTGTCCAGGCGG	247
玉米	CCGCCGAGCTCGCCGCCGCCAAGAAAGCCGCTACCCCTCGCCGCCCAAACCTTGCCAGACAG	264

云杉	TGCAAAAGAGCCTTTTACAAACAGATACTCAAGCCAAGATGGACAGTTCTCTGTCACTG	334
松树	TGCAGAAGAGCCTTTTACAAACAGATACTCAAGCCAAGACGGACAGTTCTCTGTCACTG	150
首蓿	TACAAAAAGCTCTTCTTCAATCTGATGTTCACTCTAAATCTGACAAAACCTCTGTCACTG	339
荷花	TACAAAAGGCTCTTCTGCAATCCGATGTCCACTCAAAATCAGACAAAAGTCTGTCAACCG	229
大豆	TACAGAAGGCTCTTCTGCAATCCGATGTGCACTCAAAGTCAGACAAAAGTCTGTCAACAG	302
SAL1	TTCAAAAAGGCTTTGTTGCAATCAGATGTGCAATCAAATCTGATAAAAAGTCCAGTGACCG	320
油菜籽	TTCAAAAAGGCTTTGTTGCAATCAGATGTCAATCAAATCTGATAAAAAGTCCAGTACCG	259
白杨	TGCAAAAAGCTATCTTGTGCAATCAGATGTCCAATCAAATCAGATAAAAAGTCCCGTCACTG	237
棉花	TACAAAATGCTTGTGCAATCCGATGTTCAATCAAAGAAATGATAAAAAGTCTGTCAACTG	281
西红柿	TCCAAAAGCACGTGTGCAAGCAGATGTTCAATCAAAGTCTGACAAAATCTCCAGTGACGG	207
马铃薯	TCCAAAAGCACGTGTGCAAGCAGATGTTCAATCAAAGTCTGACAAAATCTCTGTGACGG	271
洋葱	TGCAGAAGGCGATATTGTGCAAGTCCGATGTGCACTCAAAGCAGATAAAGTCTGTACTG	313
小麦	TACAACAGGAAATCTGCAATCAGATAATTCAGTCCAAGGCAGATAAAAAGTCTGTGACAG	357
大麦	TGCAGCAGGAAATCGTGCAGTCAAGATTTCAATCTAAGGCCGATAAAGTCTCTGTCAACCG	251
水稻	TGCAAAAAGGACATCTTGTGCAATCTGTTGTTCAAGTCTAAGGCCGATAAAGTCCCGTGACAG	307
玉米	TTCAACAGGATATTATGCAATCTGGCGTTCAAGGTAAGGCAGACAAAAGTCTGTCAACAG	324

图 6B(续)

云杉
松树
苜蓿
荷花
大豆
SAL1
油菜籽
白杨
棉花
西红柿
马铃薯
洋葱
小麦
水稻
玉米

TTGCCGATTATGGTTCTCAGGCTTTAGTTAGCTTTGTGCTTGAGAGGGAACATA---CAAT 391
 TTGCAGATTACGGTTCTCAGGCTTTAGTTAGCTTTGTACTTGAAAGGGAATTA---CCCT 207
 TTGCTGATTATGGTTTCGCAGATCTTGGTCAGCTTGATGCTTCAGAGAGAGCTT---CCTT 396
 TCGCTGATTATGGTTTCACAAACCTTGGTCAGCTTAATACTCGAGAGAGAACTT---CCTT 286
 TGGCTGATTATGGTTTCACAAGCATTGGTCAGCTTTATACTTGAGAGAGAACTT---CCTT 359
 TTGCTGATTATGGTTTCACAMGCAGTTGTAGTTAGTCTTAGAAAAAGAGCTC---AGTT 377
 TTGCTGATTATGGTTTCACAMGCAGTTGTAGCTTAGTCTTAGAAAAAGGAACTC---ACTT 316
 TTGCTGATTATGGCTCTCAAGCACTAGTTAGTTATGCTCTGCAGCGGGAGCTT---CCTT 294
 TTGCTGATTATGGCTCACAMGCAGTGGTTAGTTTGTGCTGCAGCAGGAATTT---CCTG 338
 TGGCTGATTATGGCTCACAGGCCGTGGTTAGCTTGTGTTTGCAGAAAGAGTTG---TGT 264
 TGGCTGATTATGGCTCACAGGCCGTGGTTAGCTTGTGTTTGCAGAAAGAGTTG---GGTT 328
 TGGCCGATTATGGTTCCCAAGTATTGGTCAGTCTTGTGTTTGCAGAAAGAACTT---CCTT 370
 TAGCTGACTATGGATCTCAAGTATTGGTAAGCCTTGCCTTAAATATGGAAGTA---ACTT 414
 TAGCTGATTATGGATCTCAGGTATTGGTGAGTCTTGTGTTAAATATGGAAGTA---ACCT 308
 TTGCCGATTATGGTTCTCAAATATTGGTAAGCCTTGTCTTGAANAATGGAAGCACCAGCTT 367
 TGGCTGATTATGGATCTCAAATATTGGTCGGTTTTCCTTAAAGATGGAATGTA---TCAT 381
 * * * * *

云杉
松树
苜蓿
荷花
大豆
SAL1
油菜籽
白杨
棉花
西红柿
马铃薯
洋葱
小麦
水稻
玉米

CGGGAGTGTTTCCATGGTTGCAGAAGAGGATTCAGGAGATTACAGAAGAATGATGCAC 451
 CGGGATTGTTTCCCTTGGTTGCAGAAGAGGATTCAGGAGATTACAGAAGAATGATGCAC 267
 CTGAACCATTTTCATTAGTAGCTGAGGAGGATTCAGGGGATCTTCGTAAGGAAAGTGGCC 456
 CTGAACCATTTTCATTAGTAGCTGAGGAGGATTCAGCGGATCTGCCTGAGGAAAGTGGCC 346
 CTGAACCATTTTCATTAGTAGCTGAGGAGGATTCAGGTGATCTTCGTAAGGAGAGTGGTC 419
 CTGAACCCTTTTCATTGGTTGGCTGAAGAGGACTCAGCGGATCTACGCAAGGATGGTTCTC 437
 CTGAACCCTTTTCATTGGTTGGCTGAAGAGGACTCAGCGGATCTACGCAAGGATGGTTCTG 376
 CTGAACCTATTCTCCTTAGTGGCCGAGAGGATTCAGAAGATCTCCTCAAGGATGGTGGCC 354
 ATAAC---TTCTCATTAGTTGCTGAGGAGGATTCATAAGATCTTCGCAAGGATGGTGGCC 395
 CTGCTTCAATTTTCATTAGTGGCTGAGGAGGACTCTGGAGACCTTCGTAATGAAGAGGGAA 324
 CTGCTTCAATTTTCATTAGTGGCTGAGGAGGACTCTGGAGATCTTCGTAATGAAGAGGGAA 388
 TTGATTCCCTTTTCATTGGTTGGCTGAAGAGGATTCAGGAGACTTGCGAACAGATGGTGGTC 430
 CTGGTTCAATTTTCATTGGTTGGCCGAGAGGACTCAGAAGACTTGAGAAAGGATGAGCGCTG 474
 TTGTTCCCTTTTCATTGGTTGGCTGAGGAGGATTCAGAAGACTTGAGAAAGGATGGCGCTG 368
 CTTCTTCTTCTCTATGGTTGGCTGAGGAGGACTCGGAAGAATTGAGGAAAGGAGGGCGAG 427
 CTGGACCATTTTTCATTGGTTGGCTGAAGAGGACTCAGATGAATTGAGAAAGGATGGCGCTG 441
 * * * * *

云杉
松树
苜蓿
荷花
大豆
SAL1
油菜籽
白杨
棉花
西红柿
马铃薯
洋葱
小麦
水稻
玉米

AAGATATGGTTGGAACGCATTACAGCACTTGTAAATGAAACCATTTCTAATGATAGTGCCT 511
 AAGATATGGTTGGAACGCATTACAGCACTTGTAAATGAAACCATTTCTAATGATGGTACCT 327
 AAGATACATTGAAGCGCATTACAGATCTTGTCAATGATACTCTTGTAAATGAAGGATCAC 516
 ACGATACTTTGAAGCGGATTACAGAACTTGTCAATGATACTCTTGTAAATGAAGGATCAA 406
 AGGATACGCTGAAGCGCATTACAGAACTTGTCAATGATACTCTTGTAGTGAAGGATCAA 479
 AGGATACTCTGGAGCGCATCACAAAACCTGTGAACGACACTTTGGCTACCGAGGAATCGT 497
 AGGATATCTTTCAGCGCATCACAAAACCTGTCAACGACACTTTGGCTACTGAGGATCTAA 436
 AGGAAACTTAGAGCGAATCACAAAACCTGTAAACGATATCTAGTACCGATGGATCAT 414
 AGGAAATAGTAGAGCGCATTACAAAACCTGTGAACGATCTCTAATGATGATGATCAT 455
 AATCAACATTACAGCGTATCATGAAGCTTGTCAATGAAACACTTTGCTAGTGAAGAACAT 384
 AAGCAACATTACAGCGTATCATGAAGCTTGTCAATGAAACACTTTGCTAGTGAAGAACAT 448
 AAGAAACATTGAAACGATATTACGAAGCTTGTAAATGACACTCTTTCTTCTGATAGTACTT 490
 AAGAAATCTGGAAACATATTACTGATCTTGTAAATGAAACTCTCGCTGAGGATGGTTTCAT 534
 ACGAAATCTGGAGCGCATTACTGATCTCGTAAACAAAACCTCTCGCTGAGGATGGTTTCAT 428
 AAGAAATTTTGAANAATATCACCAGCTCGTAAACGAAACTATCGTAGATGATGGTACAT 487
 AAGAAATTTTGAAGATATTACTGACCTTGTCAATGAAACCATCTTTGATGATGGTTTCAT 501
 * * * * *

图 6B(续)

云杉
松树
苜蓿
荷花
大豆
SAL1
油菜籽
白杨
棉花
西红柿
马铃薯
洋葱
小麦
大麦
水稻
玉米

ATAA-----TATTTCTCCATTAACAACAGGAGATGTACTTGCAGCAATAGATAGAGGCA 565
 ATGA-----TATTTCTCCATTAACAACAGGAGATGTACTTGCAGCGATAGATAGAGGTA 381
 ATAA-----CATTTCTGCTTTAACAACAGATGACGTTGCTTAAATGCCATTGATAATGGTA 570
 ATAG-----CTTTTCTACTTTAACAACAGACAATGTGCTTAGAGCCATTGACAATGGTA 460
 ATAG-----CTTTTCTACTTTAACAACAGATGATGTGCTTCCGGCCATTGACGGTGGTA 533
 TTAA-----TGGCTCTACTTTGTCTACTGATGATCTACTTAGAGCCATTGACTGTGGAA 551
 CCAAAGCCATTGACTCTACTTTAACCACAGATGATCTACTCAGAGCCATCGACTGTGGCA 496
 ATAG-----TGATTCTACTTTATCCACTGAAGATATTTGTCAGGGCCATTGACTGTGGAA 468
 ACAA-----TG---TTACTTTATCCACAGAAGATATTTCTCAGGGCCATTGACAATGGCA 506
 ATGG-----TACTGCCCCATTTATCTGAAGAAGATGTCTTGCCTGCCATTGATAGTGGTA 438
 ATGG-----TACTGCCCCATTTATCTGAAGAAGATGTCTTGCCTGCCATTGATAGTGGTA 502
 ATAA-----TGATATAATTTTATCTGAAGAAGATATACTTGTGCTTATTTGATACTGGAA 544
 ACAA-----CATTTACTTTATCTAAGGAAGGTATCCTCTCTGCAATTTGATACTGGAA 585
 ACAA-----CATTTTATTTATCTAAGGAAGCTATCCTCTCTGCACTTTGATAACCGGGA 479
 ACAG-----CATTTACTTTCTAAGGAAGGTATCCTCTCTGCAATTTGACGACGGCA 538
 ATAA-----CATTTCTGTTTCAAAGGAAGGTATACTCTCTGCAATTTGATGATGGGA 552
 ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

云杉
松树
苜蓿
荷花
大豆
SAL1
油菜籽
白杨
棉花
西红柿
马铃薯
洋葱
小麦
大麦
水稻
玉米

AATCTGAAGGAGGGCCACATGGTCCGGCACTGGGTTTGTGGACCCCAATTGATGGGACAAAAG 625
 AATCTGAAGGAGGGCCCAATGGTCCGGCACTGGGTTTGTGGACCCCAATTGATGGGACAAAAG 441
 AGTCCGAAGGTGGTTCCATTTGGGCGGCACTGGGTTTGTGGATCCGATAGATGGTACTAAAG 630
 AGTCTGAAGGTGGCTCTGTGGACGGGCACTGGGTTTGTGGATCCCAATAGATGGCACTAAAG 520
 AATCTGAAGGTGGTTCCATTTGGGCGGCACTGGGTTTGTGGATCCGATAGATGGTACTAAAG 593
 CATCTGAAGGTGGTCCAAATGGTCCGACACTGGGTTTGTGGATCCCAATTTGATGGCACTAAAG 611
 CATCTGAAGGTGGTCCAAATGGTCCGACACTGGGTTTGTGGATCCCAATTTGATGGCACTAAAG 556
 AATCTGAAGGTGGTTCTCGAGGGCAGACACTGGGTTTGTGGACCCCAATAGATGGCACTAAAG 528
 GATCTGAAGGTGGTTCCAAAGGTCCGACACTGGGTTTGTGGATCCCAATTTGATGGTACTAAAG 566
 GATCTGAAGGGGGTCCCTTCTGGTCAGCACTGGGTTTGTGGATCCCAATTTGATGGTACTAAAG 498
 GATCTGAAGGGGGTCCCTTCTGGTCAGCACTGGGTTTGTGGATCCCAATTTGATGGTACTAAAG 562
 AATCTGAAGGAGGCCCTCATGGGCGACACTGGGTTTGTGGATCCCAATTTGATGGCACCAAAAG 604
 AGTCTGAAGGAGGTCCATCTGGCCGACACTGGGTTTGTGGATCCCAATTTGATGGGACTAAAG 645
 AGTCCGAGGGTGGTCCATCTGGCCGACACTGGGTTTGTGGATCCCAATTTGATGGGACTAAAG 539
 AGTCTGAGGGAGGTCCATCTGGGCAACACTGGGTTTGTGGATCCCAATTTGATGGGACTAAAG 598
 AGTCTGAGGGAGGTCCATCTGGGCAACACTGGGTTTGTGGATCCCAATTTGATGGGACTAAAG 612
 * * * * * * * * * * * * * * * * * *

云杉
松树
苜蓿
荷花
大豆
SAL1
油菜籽
白杨
棉花
西红柿
马铃薯
洋葱
小麦
大麦
水稻
玉米

GATTTCTTAGAGGAGACCAATATGCTGTAGCCTTGGGCTTATTTGGATGAAGGAGAAGTTA 685
 GATTTCTTAGAGGAGACCAATATGCTGTAGCCTTGGGCTTATTTGGATGAAGGAGAAGTTA 501
 GTTTTGTAAAGAGGAGACCAATATGCCATAGCATTAGCTCTGTAGATGAAGGAAAAGTTG 690
 GGTTTGTAAAGAGGAGACCAATACGCTATTTGCATTAGCTTTGTAAATGAAGGAAAAGTTG 580
 GGTTTGTAAAGAGGAGATCAATATGCTATAGCGTTAGCTTTACTAGATGAAGGAAAAGTTG 653
 GATTTCTGAGGGGAGATCAATACGCTAGCATTAGGATTGCTCGAGGAAGGAAAAGTAG 671
 GATTTTGTAGGGGAGATCAGTACGCGGTAGCACTAGGATTACTCGAGGAAGGAAAAGTAG 616
 GGTTTTAAAGAGGAGATCAATATGCAATAGCTTTAGCAATTGCTAGATGAAGGACAGTAG 588
 GTTTTCTGAGAGGAGATCAATATGCAATAGCATTGGCTTTGCTAGATGGAGGAAAAGTTG 626
 GGTTTCTAAGGGGAGACCAATATGCAATTTGCATTGGGATTGCTAGATGAAGGAAAAGTTG 558
 GGTTTCTGAGGGGAGACCAATATGCAATTTGCATTGGGATTGCTAGATGAAGGAAAAGTTG 622
 GGTTTGTACGAGGAGATCAGTATGCCATTGCGCTTGCATTGATAGATGAAGGAAAAGTAG 664
 GTTTCTTAGAGAGGAGGCCAATATGCAATCGCACTGGCACTGCTTGTAGAGGGCAAAGTTG 705
 GATTCGTGAGAGGAGGCCAATATGCCATTGCACTGGCACTGCTTGTAGAGGGCAAAGTTG 599
 GTTTCTTAGAGGGGAGACCAATATGCTATTTGCCCTGGCTCTGCTTGTAGAGGGTAAAGTTG 658
 GTTTCTTAGAGGGGAGACCAATATGCCATTGCACTGGCTCTGCTTGTAGAGGTAAGTTG 672
 * * * * * * * * * * * * * * * * * *

图 6B(续)

云杉
松树
苜蓿
荷花
大豆
SAL1
油菜籽
白杨
棉花
西红柿
马铃薯
洋葱
小麦
大麦
稻
玉米

TTTTGGGTGTGCTGGCCTGCCCCAAATTTGCCCTGGACATCAGTTAGCATCAGTGC----- 740
 TTTTGGGTGTGCTGGCCTGCCCCAAATTTGCCCTGGACATCAGTTAGCATCAGTGC----- 556
 TATTGGGTGTCTTGGCTTGTCCAAATCTTCCGCTGGGAACCATTTGGCCGAATCA---AC 747
 TATTGGGTGTCTTGGCTTGTCCCGAATCTTCCACTGGCATCCATTTGCCTGTAATCA---GC 637
 TATTGGGTGTCTTGGCTTGTCCAAACCTTCCACTGGCATCCATTTGGCTCCAATCA---GC 710
 TTTTAGGTGTGCTTGCCTTGTCCAAACCTTCCGCTTAGCATCCATAGCAGGAAACAAACAAGA 731
 TGTTAGGTGTGCTTGCCTTGTCCAAACCTTCCATTAAACATCCATAGCAGGAAACAA---GA 673
 TGTGGGGCGTCTTGGCTTGTCCAAATCTTCCGTTACCTTCCATTTGCTGGTGGCTC---TC 645
 TCCTGGGTGTGCTGGCTTGTCCAAATCTTCCACTAACTTCCCTCAGTGATGCTGG---TC 683
 TTTTGGGCGTCTTAGCCTGTCCAAATCTTCCATTATCTTCTCTTGCCTCCACAA---TC 615
 TTTTGGGCGTCTTATCCTGTCCAAATCTTCCATTATCTTCTCTTGCCTCCACAA---TC 679
 TTCCTGGAGTCTTTTCATGTCCGAATCTTCCCTTACCCCAATTTGGTAGTTCTAA---TA 721
 TTTTGGGCGTGTGGGATGTCCAAATCTTCCCTTTGACATCAATAAGCAACCTCAA---TG 762
 TCTTAGGTGTGTGGGATGTCCAAATCTTCCCTTTGACATCAATAAGTAACCTCAG---TG 656
 TTTTGGGTGTATTGGCTTGTCCAAACCTTCCATTGTTCATCAATAAACCAACATCAA---TG 715
 TTTTGGGTGTATTGGCTTGTCCAAATCTTCCATTGTTCATCAATAAACCAACATCAA---TG 729
 * * * * *

云杉
松树
苜蓿
荷花
大豆
SAL1
油菜籽
白杨
棉花
西红柿
马铃薯
洋葱
小麦
大麦
稻
玉米

-CCGCCCTTCAAATGATCCAATTTGGTTGCCCTTTTCTGCAAGAAAAG----- 787
 -TCGCCCTTCAAATGATCCAATTTGGTTGTCTTTTCTGCAATAAAAGGAGCTGGAACATA 615
 CGCATTTCTTCTTAATGAAGTTGGGTGTCTTTTCTTTGCCAAAGTTGGCAATGGAACAT 807
 AGCATTTCTTCTTAATGAAGTTGGGTGTCTTTTCTTTGCTAAAGTTGGCGATGGAACAT 697
 AGCATTTCTTCTTAATGAAGTTGGGTGTCTTTTCTTTGCTAAAGTTGGTGTGTAAGAACAT 770
 ACAATCTTCTGTCAGACGAAATTTGGATGCCCTTCTTCTTTGCTACAAATTTGGTTTCAGGGACAT 791
 ACTCTTCTTCTTTCAGACGAAATTCGGATGCA-CTTCTTTGCTACGATTTGGT-CAGGGACAT 731
 AGCATTTCTTTGCCCTGGCGAAGTTGGTTGCCCTTTTCTTTTCTGTAGTTGGGGGTGGAACAT 705
 AGCATTTCTCAAATAATAAAAGTTGGCTGCCCTTTTCTTTGCTGTAGTAGTTGGTGGAACTTT 743
 TACAGGATGATCAAGACAAAGTTGGTTGCCCTTTTCTTTATGCCCAAGTTGGTCTGGAACAT 675
 TACAGGATGATCAAGACAAAGTTGGTTGCCCTTTTCTTTATGCCCAAGTTGGTCTGGAACAT 739
 CAAATCTACTGAAAACCAAGTTGGCTGTCTTTTCTCTGCTAAAATTTGGTTGTGGAACAG 781
 GTAGCTCATCAGGAGATCAAACGGGGGCCCTCTTTTCTCAGCTACAAATTTGGTTGTGGTGTCTG 822
 ATAGCTCATCAAGAGATCAAACGGGGGCCCTCTTTTCTCAGCTGCAATCGGTTGTGGTGTCTG 716
 GTGGCTCTCGGGAGATCAAGTTGGTGTCTCTTTTCTGCTACTATTGGTTGTGGAGCTG 775
 GTAACCTTTCGGGAGATAAAGTTGGTGGCCTGTTTTCTGCTACAAATTTGGTTGTGGGGCTC 789
 * ** * * *

云杉
松树
苜蓿
荷花
大豆
SAL1
油菜籽
白杨
棉花
西红柿
马铃薯
洋葱
小麦
大麦
稻
玉米

-----TGCCGTTG-- 795
 CTG-TGCAATCATTGGATGTTCTATAACAACCTAAAAGGGTTTATGTAAGTGCCATAG-- 672
 ATA-TGCAAGCATTGGAT---GGTACTACACAACTAAGGTGAATGTTAGTACTGTTG-- 861
 TTA-TGCAGGCAATGGAT---GGTCTACACAGACTAGGGTGCATGTCAGTGTCTATTG-- 751
 ATA-TGCAAGCACTGGGC---GGTCTACACAACTAGGGTGCATGTCGTGATATTG-- 824
 ATA-TGCAGCTCCTAGATTCAAATCTTCTCTGTAAAAGTGCAAGTCTCTAGTGTG-- 848
 ACA-TGCAGCCCTTAGACTCGAAATCGAACAGTC----- 764
 ACA-TGCAGCCACTGGAT---AGCTCTTTCAGCAGTGAAGGTGCAAGTCAACGCTACTG-- 759
 ATA-TGCAGCCACTTGGAT---GGTCTTTCGGCAGTAAAGGTGCAAGTAAAGTGTCTGTTG-- 797
 ATA-TGCAGTCTCTTGGAT---GGCTCTACACCAATAAAGGTGCATGTAAGTGAATTTAG-- 729
 ATA-TGCAGTCTCTTGGAT---GGCTCTACACCAATAAAGGTGCATGTAAGTGAATTTAG-- 793
 AGAATGCAATCACTAGAAT---GGTTCGGTGTCTCAAAGGTACATGTTAGCAATATCG-- 837
 AAG-TAGAGTCAATTAGAG---GGCTCTCCACCACAAAAGATTAGTGTTTGTACCATCG-- 876
 AAG-AGCAGTCTTTGGAT---GGCTCTCCACCACAAAAGATTAGTGTTTGTACCATCAT 772
 AAG-TAGAGTCTTTACAG---GGCTCTCCAGCACAAAAGATTAGTGTCTGTTCCATCG-- 829
 AAG-TAGAGTCTTTAGAT---GGCTCTCCACCACAAAAGATTAGTGTTTGTCTCCATCG-- 843

图 6B(续)

云杉	---AAAAGTC---TGAAGATGCA-TCTTTCTTTGAA-TCATATGAG-GCAG-CACATTCC	845
松树	---AAAAGTC---TGAAGAAGCA-TCTTTTTTTGAA-TCATACGAG-GCAG-CACATTCC	722
苜蓿	---ACAATCC---AGAAGAAGCA-TCATTTTTTTGAA-TCTTATGAA-GCAG-CACACTCC	911
荷花	---ATAATCC---AGAAGAGGCA-TCATTTTTTTGAG-TCTTTTGAA-GCAG-CGCACTCC	801
大豆	---ATAACCC---AGAGGAAGCA-TCATTTTTTCGAA-TCTTTTGAA-GCAG-CACACTCC	874
SAL1	---AGAATCC---TGAAGAGGCA-TCGTTCTTCGAG-TCATTTCGAA-GGAG-CTCACTCT	898
油菜籽	-----	-----
白杨	---ACAATCC---TGAAGAAGCA-TCGCTCTTTGAA-TCATATGAA-GCAG-CACACTCC	809
棉花	---AAAATCC---TGAAGAAGCA-TCATTCCTTTGAG-TCTTATGAA-GCAG-CACACTCC	847
西红柿	---ACAACCC---TGAAGAGGCA-TCTTTTTTTGAA-TCTTTTGAA-GCAG-CACATTCT	779
马铃薯	---ACAACCC---TGAAGAGGCA-TCTTTTTTTGAA-TCTTTTGAA-GCAG-CACATTCT	848
洋葱	---AAAATCC---AGCCGACGCA-TCATTCCTTTGAA-TCATATGAA-GCTG-CTCATTCT	887
小麦	---ACAATC---CAGTGAATGCC-TCGTTCTTTGAA-TCCTATGAA-GGAG-CACACACA	926
大麦	GCTACAAATAAACAGTCAATGCCATCAGTCCTTTGAA-GCCTATCAA-GGAG-CACACACC	829
稻	---ACAATC---CAGTCGAAGCT-TCATTCCTTTGAG-TCCTACGAA-GGGG-CACACTCC	879
玉米	---ACAATC---CTGTCAATGCA-TCATTTTTTTGAA-TCCTATGAA-AGTG-CACACTCC	893

云杉	AT--GCATGACTTG--ACAGCTACAATAGCAAA-GATCCTG--GGTGTAAAAGCACCACC	898
松树	AT--GCATGACTTG--ACGGCTACAATAGCGAA-GATCCTG--GGTGTAAAAGCACCACC	775
苜蓿	TC--ACATGACTTG--TCTAGCACT--ATTGCAGT-AAAATC--GGCGTCAAAGCACCACC	964
荷花	TT--ACATGACTTG--TCTAGCTCC--ATTGCAGA-AAAATC--GGTGTCAAAGCACCACC	854
大豆	TT--GCATGACTTA--TCTAGCTCA--ATCGCAGA-AAAATC--GGTGTCAAAGCACCACC	927
SAL1	CT--ACATGACTTA--TCCAGCTCC--ATTGCCAA-TAAATC--GGTGTCAAAGCTCCACC	951
油菜籽	-----	-----
白杨	AT--GCATGACTTA--TCTAGTTCA--ATTGTCAA-AAAATC--GGTGTCAAAGCACCACC	862
棉花	AT--GCATGACTTA--TCTAGCTTG--ATTGCCAA-AAAATC--GGCGTCAAAGCACCACC	900
西红柿	TT--GCATGACTTA--TCTAGTTTG--ATAGCAAA-GAAATC--GGTGTCAAAGCACCACC	832
马铃薯	TTTGGCATGACCTAATCTAGTTTGGATAGCAAA-GAAATC--GGTGTCAAAGCACCACC	907
洋葱	CT--ACATGACTTA--TCTAGCTCC--ATAGCTAA-GAAGCT--GGCGTCAAAGCACCACC	940
小麦	AT--GCATGACTTA--ACTGGCTCT--ATAGCGGA-GAAATC--GGTGTCAAAGCTCCTCC	979
大麦	AA--GCGAGAAAAA--ACAGGCCCC--GTAGCCAATGAAAAG--GGTGTCAAAGCTCCTCC	883
稻	TT--GCGTGACTTA--ACAGGCTCC--ATTGCAGA-GAAATC--GGTGTCAAAGCTCCTCC	932
玉米	AT--GCATGACTTG--ACTGGCTCT--ATTGCAGA-GAAATC--GGTGTCAAAGCTCCTCC	946

云杉	AGTTA--GAA--TAGATA-GTCAGGCAAAATA-----TGGAGCAATGGCAAG-GGGTGAT	947
松树	AGTTA--GAA--TAGATA-GTCAGGCAAAATA-----TGGTGCAATGGCAAG-GGGTGAT	824
苜蓿	AGTCA--GAA--TTGACA-GCCAGGCAAAATA-----CGGAGCTCTATCCAG-AGGAGAT	1013
荷花	AGTCA--GAA--TTGACA-GCCAAGCAAAATA-----TGGAGCTCTGT-----	892
大豆	AGTCA--GAA--TTGATA-GCCAAGCAAAATA-----TGGAGCTTTGTCAAG-AGGAGAT	976
SAL1	AGTCC--GTA--TTGATA-GCCAAGCAAAATA-----TGGAGCTTTATCAAG-AGGAGAT	1000
油菜籽	-----	-----
白杨	AGTTA--GAA--TTGATA-GCCAAGCAAAATA-----TGGCGCTCTGTCTAG-AGGAGAT	911
棉花	GGTTA--GAA--TTGATA-GCCAGGCGAAGTA-----TGGTGCTCTATCCAG-AGGAGAT	949
西红柿	AGTTC--GAA--TAGACA-GCCAGGCAAAATA-----TGGTGCTTTGTCCCG-TGGAGAT	881
马铃薯	AGGTC--GA--TATACAGCCGGGCAAAAGA-----GGGGCTTCGCCCCGGCAAAAT	955
洋葱	TGTA--GAA--TTGATA-GCCAGGCAAAATA-----TGGTGCTCTTTCCAG-AGGAGAT	989
小麦	AGTCA--GAA--TAGATA-GCCAAGCAAAATA-----TGGTGCTCTGGCCCG-TGGCGAT	1028
大麦	AGTCACTGAAGTTAGATA-GCCAACCAAAATAATGATCGCTATGCTACTCCG-TGGACAT	941
稻	AGTTA--GAA--TTGATA-GCCAAGCAAAATA-----CGGTGCCCTAGCCCG-AGGTGAT	981
玉米	AGTTA--GAA--TCGACA-GCCAAGCAAAATA-----TGGTGCTCTGGCCCG-AGGTGAT	995

图 6B(续)

云杉
松树
苜蓿
荷花
大豆
SAL1
油菜籽
白杨
棉花
西红柿
马铃薯
洋葱
小麦
大麦
水稻
玉米

GGAGCAAT----ATATCTTCGCTTTCCCTCCAGGCTATCGTGAAAAGATTTGGGATCA 1003
 GGAGCAAT----ATATTTTCGCTTTCCCTGTCAGGCTATCGTGAAAAGATTTGGGATCA 880
 GGGGCTAT----ATATTTGCGTTTCCCAACAAAGGATACCGTGAAAAAATATGGGATCA 1069

 GGGGCTAT----ATATTTGCGTTTCCCTCACAGAGGATACCGTGAAAAAATATGGGATCA 1032
 GGAGCTAT----ATACTTACCGTTTCCCTCATAAAGGATACCGCGAAAAGATTTGGGACCA 1056

 GGGGTCAT----ATACTTGGCGATTTCCACATAAAGGTTACCGTGAGAAAATATGGGATCA 967
 GGAGCCAT----ATATCTGCGTCTTCCACACAAAGGGTATCGAGAAAAAATATGGGATCA 1005
 GGAGCAAT----ATATCTGCGTTTCCCTCATAAAGGCTACCGCGAGAAGATATGGGATCA 937
 GGCACAAA----TAATCTNGGGTCCCAAAAAGGG--ACCAGGAAAATATCGGGACCA 1009
 GGTGCTAT----ATATTTACGTTTCCACATAAAGGTTACCGTGAGAAAATTTGGGATCA 1045
 GGTGCCAT----TTACTTGGCTTTTCCACACAAGGGTTATAAGGAAAAGATATGGGATCA 1084
 GGATGCACACTGTTAATGGCTTAAACCACACGAGGGTTACAGGGAAACAATATGGGATCA 1001
 GGTGCCAT----TTACTTGGCTTTTCCACACAAGGTTACAGAGAGAAGATCTGGGATCA 1037
 GGCGCCAT----TTACTTGGCTTTTCCACACAAGGTTATAGAGAGAAAATATGGGACCA 1051

云杉
松树
苜蓿
荷花
大豆
SAL1
油菜籽
白杨
棉花
西红柿
马铃薯
洋葱
小麦
大麦
水稻
玉米

TGCAGCTGGTTGCATCGTAATCCAAGA-----GCCTGGTGGTGT 1043
 TGCAGCTGGTTGTATTGTAATCCAAGAAAATTCATCCGAATTGCAGAGGCTGGTGGTGT 940
 TGCTGCTGGTTGTATTGTTGTGAGTGA-----AGCTGGAGGTATT 1109

 TGCTGCTGGCAGCATTTGTTGTGACTGA-----AGCTGGAGGTATT 1072
 TGTCGCTGGTGTATAGTTGTTACAGA-----GGCGGGTGAATA 1096

 TGCTGCTGGATGCATAGTTGTATCAGA-----AGCTGGGGGACTG 1007
 TGCTGCTGGGTGTATTGTTGTGAGTGA-----AGCTGGGGGTGTG 1045
 TGCTGCTGGATATCTCGTTGTTGCAGA-----AGCTGGAGGTGTT 977
 CG-----GGGAGACTCCTGGGGCACA-----CAGCGGGG-GTC 1043
 TGCAGCTGGCTGCATTTGTCGTACAGA-----AGCTGGAGGGGTA 1085
 TGCAGCTGGCGCAATTTGTCGTACAGA-----AGCTGGAGGTGTA 1124
 TGCAGCTGGCTCAATTTGTCGTACAGA-----AGCTGGAGGTGTA 1041
 TGCAGCTGGGTCAATCGTGTACAGA-----AGCTGGAGGTCTG 1077
 TGCAGCAGGATCAATTTGTCGTACAGA-----AGCTGGAGGCATA 1091

云杉
松树
苜蓿
荷花
大豆
SAL1
油菜籽
白杨
棉花
西红柿
马铃薯
洋葱
小麦
大麦
水稻
玉米

GTGGTTGATGCTGCTGGGAAACCTCTTGATTTCTCACAGGGGAGGTATCTGGATGTGGAA 1103
 GTAGTTGATGCTGCTGGGAAACCTCTTGATTTCTCACAGGGGAGGTATCTGGATGTGGAA 1000
 GTCTCAGATGCTGCCGAAACCTTTGGACTTCTCAAAGGAAAGTTCTTGATGTTGAT 1169

 GCCATGGATGCTGCGGGAAACCTTTGGACTTTTCAAAGGAAAGTTCTTGATGTTGTA 1132
 GTGACAGATGCAGCAGGAAAGCCACTGGATTTCTCGAAAGGAAAGTATCTTGATTTGGAC 1156

 GTCACAGATGTTGCGGGAAACCCCTTAGATTTTCAAAGGAAAGATACCTGGATCTTGAC 1067
 GTCACAGATGCTGCAGGGCAGCCATTGGATTTTCAAAGGAAAGTATCTTGATCTGGAC 1105
 GTCTCAGATGCTGCAGGAAACCTTTGGACTTCTCAAAGGAAAGATACCTTGATTTACAC 1037
 CACACAAG-GCGACAG----- 1058
 GCAACCGATGCTGCTGGGAATGCCTTAGA-TTCTCGAAAGGAAAGTATCTTTGAT--TAAT 1142
 GTAACAGATGCCCTCAGGAAACGATCTCGATTTCTCGAAAGGAAAGTATCTTGATCTGGAC 1184
 GTTAAAGATGCCCTCAGGAAACGATCTCGATTTCTCGAAAGGAAAGTATCTTGATCTGGAC 1101
 GTGACAGATGCATCAGGAAACGATTTGGATTTCTCAAAGGAAAGTATCTTGATCTGGAC 1137
 GTAACAGATGCTGCGGGAAACGACTTGGATTTCTCAAAGGAAAGTATCTTGATCTGGAC 1151

图 6B(续)

云杉	AGGGGTATAANTGCAACCAATGCCAAACTGATGCCATTGCTTC-TTAATGC-AGTGCAAG	1161
松树	AAGGGTATAANTGCAACCAATGCCAAACTGATGCCATTGCTTTT-TTAATGC-AGTGCAAG	1058
苜蓿	ACTGGTATTATTGTTACAAACCAGAACTTGATGCCTTCGCTTT-TGAGAGC-AGTTAAAG	1227
荷花	-----	
大豆	TC TGGTATTATTGTTACAAACCAGAAATGATGCCATCAC TTC-TGACAGC-AGTTAAAG	1190
SAL1	ACAGGCATTATCGTTGCTAACGAGAAGCTAATGCCTTCGCTTT-TGAAAGC-AGTTTCGTG	1214
油菜籽	-----	
白杨	ACAGGCATCATTGTTACGAATCAGAACTGATGCCATTACTTT-TGAAGGC-AGTTAGAG	1125
棉花	ACAGGCATCATTGTCACCAACCAGAACTGATGCCATTACTGT-TTAATGC-AGTTAGAA	1163
西红柿	GAAGCATAATCGTTACCAATCAAAGCTGATGCCTGCCTCC-TCAAGGC-TGTTAAAG	1095
马铃薯	-----	
洋葱	ACAGGCAT-ATTGTCACCAAC--AGAGCTGATGCCAAACTTT-TGGAGCC-GTACAAT-	1196
小麦	ACAGGCATCATTGCCACAATAAGCAGTTGATGCCATCACTGC-TGAAGTC-TGTCAGG	1242
大麦	ACAGGCATCATTGCTACAAATAACAGTTGATGCCATCAGTNCCTGAAGTNCCTGTCAGG	1161
水稻	ACAGGGATCATCGCGACGAACAAGCAGCTGATGCCTTCACTCC-TGAAGGC-TGTGCAAG	1195
玉米	ACAGGCATCATCGCAACCAACAAGGAGTTGATGCCGCTCGCTCC-TGAAAGC-TGTCCAAG	1209
云杉	CTGCTCTGAAGGAAGAAGGAAATGTTGAAAGGCTGGTTCCTTGTAGCACCATTCAATTA	1221
松树	CTGCTCTCAAGG-----	1070
苜蓿	AATCACTCAATGAGAAAGCATCATCCTTGTAATATCTGTC-AAGTGTATGATTCCTACTAC	1286
荷花	-----	
大豆	AAGCACTCAATGAGAAAGCATCATCCTTGTTGATTTCCATTTAAGCGAATGATTCTACAAA	1250
SAL1	ACTCCATAGCTGAGCAAGAGAAAGCTTCAGCTCTCTGA-----	1252
油菜籽	-----	
白杨	AATCCATAGAGGAGAAAGCTTCATCATTTGTGATTC--TTT--ACTGATGAATGAAGTCAT	1181
棉花	AATCTATCCAGGAGAAAGCTTCATCTTTGTGATTCATTTT--AGAGGCAGGCTTCATCCT	1221
西红柿	AATCTTTGAATGAGAAAGCTTCATCCTTGTTGATGATCAAA--CCAATAACAATACGCTGC	1153
马铃薯	-----	
洋葱	AGGCCATCAAGGAGAAAAGCCAGGCCCTTCCCCATTGTAGAAGCTTTTTTTGGTTTTGAAC	1302
小麦	AGGCAATCAAGGAGAAAAACAGGCCCTTCTCCCATGTAAGGTTTTTTTAACTTNC	1221
大麦	ATGCCATCAAGGAGCAAAACCAGGCTGCTTCCCCGTTGTAGTAGCTGTCCAATCCACAA	1255
水稻	AGGCTATTAAAGAGACGAACCAGGCTGCCTCCCTCTTATAGCTGTTGTAGTGGTCGACAA	1269
玉米	-----	
云杉	TTGAACCTAATTAGGGATGGAAGTTGGAACCTATGCTGATGAAATAAAACAATTCATTTT	1281
松树	-----	
苜蓿	TGAGCTTCCTCAATTTGTTGTGTCAGCCAGTTATAT---GAACCTTCCTCTCAATTTGTGCTA	1343
荷花	-----	
大豆	TGAGCTTGCTAACGTTGTTGTGCGGCTCGTGTATATGGGGCCTTCCCCTCAATTTGTGCTA	1310
SAL1	-----	
油菜籽	TTCCCT-----TTGCTAAGTT----TGTTAGCAACTCAAATCAGTTTTACGTG----ACT	1227
白杨	TTCCCTCATAACTTGCCTCTGTTAAGCTGGTTGAAACTTGA-TTATTTTTGCCTTCAATGCT	1280
棉花	AGCTATCTTATTGTAGTTCCAGAACTGTTACTTGCAGCTGCTCATTTTTACCTGTTCTTC	1213
西红柿	-----	
马铃薯	CTTCCCTGTTGTAGTTGGATTGATCCAAAACAATGAT-CGCAATGCCACACC-----	1353
洋葱	CCTGT-TACTGAAGTTGGATTGGTCCAAAATAATGAT-CGCTATGCTACTNCCTTGTTC	1279
小麦	TCCAC-AAATATCATAATGTTTCCATATAATAATAAT-TGCAGTGTGCTTCCCATCAA	1313
大麦	AAAAGTAGTTGCAAAATTTTCGTACTGGCAACAGGTTGTGCATCATTTCTCCGTTAT	1329
水稻	-----	
玉米	-----	

图 6B(续)

云杉
松树
苜蓿
荷花
大豆
SAL1
油菜籽
白杨
棉花
西红柿
马铃薯
洋葱
小麦
水稻
玉米

GCACAAGGTCCTTCCTTTAAGAGATATAACTGAGTGTGCGTGGTAGGTGTGTCAACTCTCT 1341

CATTTCATACGCGATCTGATGAAGCTAAGCATATGACTGGACTTCCTCCAACACTTTATT 1403

TATTTTCAT-----TCTGATGAAGTTAAACAAATGATGGGACTTCCTCTGATACTTCCTT 1364

TGAATTTTCCACTCTATGTTTGCTCAATGTATGTTGAGCATGAAACTCTTGCAACTTGTG 1287
TGAACTTTT-ATCATTCTTCTCCCAATGCTTAT--AGGAAGATTTTCATTTAGCATGC- 1336
TCCTTCTACACATTTCTGATATCATTFTTTAGCTCTTTGATGTCATCTCAACTCAGCTT 1273

--TTATTCACACTGT-TCTAT-GTGTAAAT--GACCTTTTTGTTGGGACAAAGGCAAT-C 1406
T-TTATTCACACTGT-T-TAT-GTGTAAAT--GACCTTTTT-GTTGAAAAAATACAAC-C 1331
CATTACTTTAAATGTGTGTACAGCACCACTTTGTGTTGTTGCTGTCTGCAAATTCAGTAT 1373
ACAGAGTCTAGCAA-TTTATAGCATCAACCTGATTGGTGATCAGACGTCCATTCTTTT 1388

云杉
松树
苜蓿
荷花
大豆
SAL1
油菜籽
白杨
棉花
西红柿
马铃薯
洋葱
小麦
水稻
玉米

GGCTCTAGTCCTGGCCACATTTGCAGTGATAGACAATAAGTTGAAAACGGAAGTACATTA 1401

TAAATCATATGCCTGTCTGCTTTTTGCGTGTACTGTCTTCAAGATTCCTGTAAATTAAG 1463

TGTAGCAGCAGATTTGTCTCTGGTTTTTTGCGAGCTGCTATTTCTTCTCCTTCTATATA 1424

AAGTTCAAATGTATTATCCGATGCATAATAGTAGTGTATTCTGCTAAGCTAC----- 1340
ATGAACAAGAATGGGA-CCAAATAATCTCATCTCTACAATTAAGACAATGTAATTTGAGA 1395
TGATAAACATTTTGTGTTCTCTGGTTATGTCAACTCAACTTTGATTA AACATTATATAT 1333

CTTGTGTATACATTTGTACATC-TAAGGAGTGGTGACAGCCATGTCT---TAAATAAA 1462
CTTGTAT----- 1339
CTTATTGTTGCACATTTCTGCATC-TA---ATTGGTGGGTGAGCTGGCA---CCACATGA 1426
ACTGAATCACCTTCTTGGTGCAGCATTGCTAGAAGTGGACAACATGAATAATTTGAGTGA 1448

云杉
松树
苜蓿
荷花
大豆
SAL1
油菜籽
白杨
棉花
西红柿
马铃薯
洋葱
小麦
水稻
玉米

ATTTCCPTTAATTTTC----- 1417

CTTGAGTTGTAGGTCCTTTTTCTTCTTGCAGTACTTTTTTCTCCCAACTTT---CTT 1519

CCTGTCTTTTTCTCTCCTTTTTCTATTAATAAACAGAGATGAGAGATCTTATTTTAACTT 1484

CTAGAACTTGAAAGCATGGTCCTAGGCCTTGAGCCTTTCTCTTTGTCTTACCTGGCAGTT 1455
TTCTCTTGGTATGTTTTTTTTTT----- 1355

AGAGGCATCTGCCTGCAGTTATAAATATC--TTAGCATAGCTTTGTTCAACATAAATGTC 1520

ATGTTCTTTTCATCTGGATTTCAGAAGAAATAAATAAATTGGCCTGATCTCCCTAACTCGG 1486
GTCCATAGTTGCCGTAAGTCAAGCTTTGGCATTGGAAGTGGTTATAGAAATTTGTGAA-ATA 1507

苜蓿
大豆
棉花
小麦
水稻
玉米

TTCTATTAATAGATATTTTTATTTTC----- 1544
GTTTGATAATTAATTTCTTCTAGATTACTTG----- 1514
GGGTTTAGGTGTAATTAATTAGATAAAGGAAGTGTGTTGTTGAATACAAACATATTACAT 1515
AGCAACAACATAATCTTTTGTGTGAGCAACAGCCAATCTCTTGTATTATTTCTTTCAGAGAT 1580
GGCAATATTGCT----- 1498
APTAATGGATATTTGGAAGACAAACTTGAAGTTCAAG----- 1544

棉花
小麦

TATTAATAAATTTATTTTCATGTTAAACAAGTGTGAAGTCTCTCTCTCCCGACCGTTTA 1575
TTTTGATGTGCAGTTTATCCCCCTTGTAAATTACATACAAATTCAGCTATAATCAATA 1640

图 6B(续)

棉花	CCTTACATGGTTT-----	1588
小麦	TTAACTCTTATGGTACCAACTAAATCATCATTCATGGGTACTTGCAGACTCAACATTGCA	1700
小麦	GAGCTAAGGCTAATAGGACTAANCAGGCACATCAGCTGGTACTCTGCAGAATGCTTTTT	1760
小麦	GATGGTATCCAGCAGCTACCGCTCTTGCPCACNAAGGNTGGGAAGCATTGNTCATAAC	1820
小麦	ATCANTGAAGAGCTCCGCAAGGCCGTGTTTTGGAACCTCCGGCNACTGAATGGCTTGCAG	1880
小麦	GAACNTTGCCNANATGTCCTGAGTAAACCCTGAGTGCGCACACATCATCCCTGAACAATT	1940
小麦	CGTCCNGAGACGGATCCCGTGTCCAAGCCAACNANAACGGCNGANTGGTTAACTCGAGCC	2000

图 6B(续)

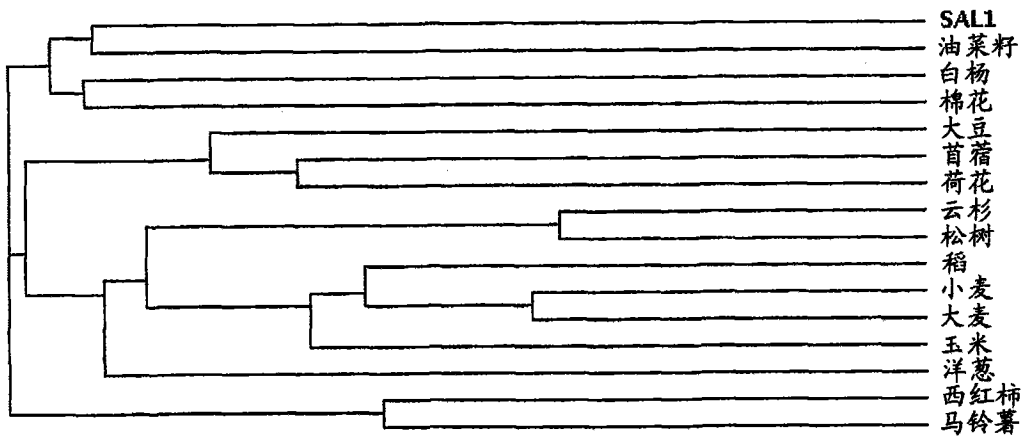


图 6C



<i>alx8</i>		<i>fry1-1</i>	
	Col-0		<i>alx8</i>
Col-0		<i>fry1-1</i>	

图 7

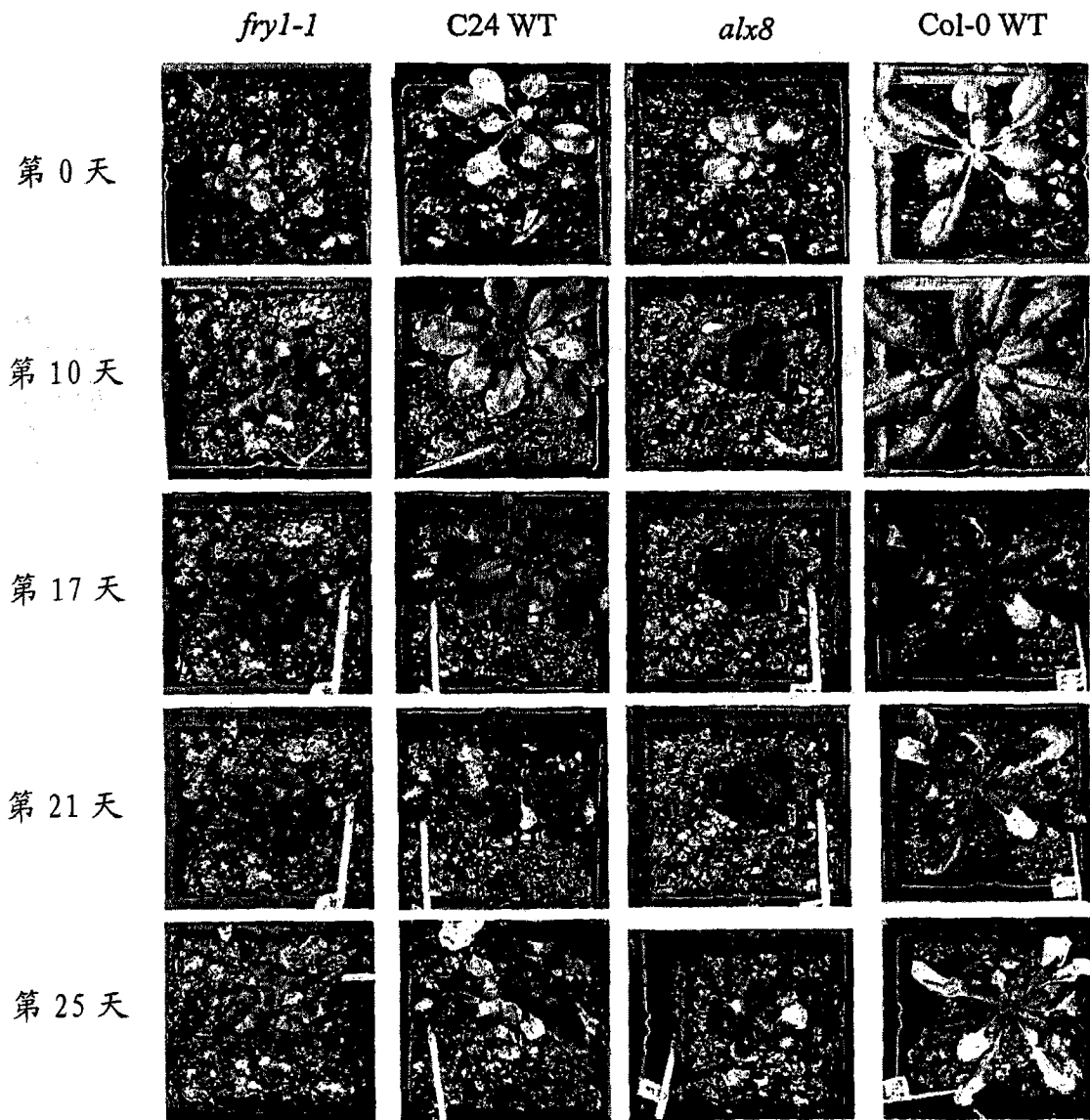


图 8A

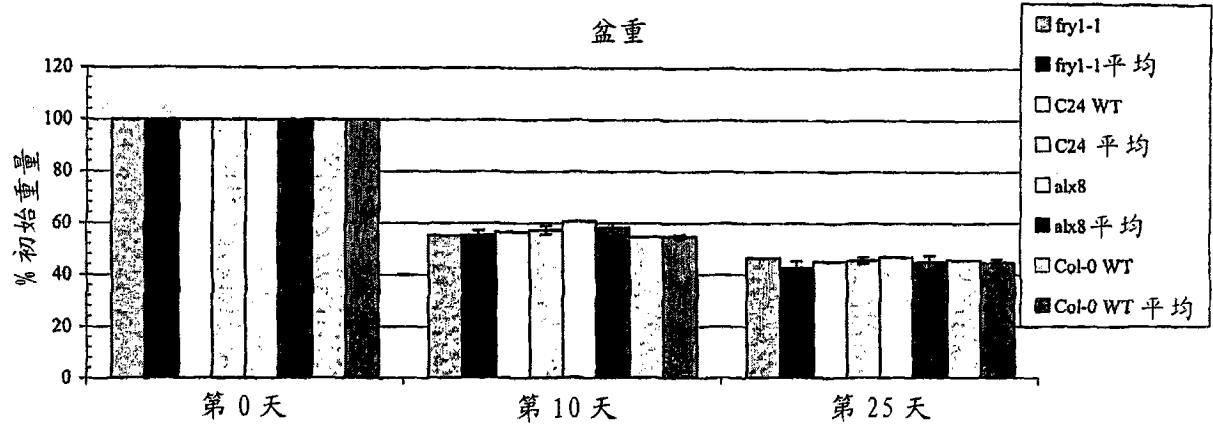


图 8B

SALK_020882 基因组序列 (SEQ ID NO: 3) - 根据 TAIR

```

1      GACATATATT TATCTTCTTG AAAAGCGA ██████████ ATGTCCTATA AATTGTTTTTC
51     GAACAGCGAA GGCTCCGCTT CAATCATTTG TAGCAGTAAG AACGAATTCG
101    AGACCTAGAA ATTCATCGAA CCGTCTCGTT TCTGTATTCG GACGCAAGTC
151    TTCTTCTCCT TCATTTGTTA CTCTCAGAGT TGTTCATCG ATGGCATTACG
201    AGAAAGAGCT TGATGCTGCT AAGAAAGCTG CTTCACTCGC TGCTCGTCTC
251    TGTCAGGTTA GGGTTTTTTC GATTCAATCA TGACCCATAG ATCTAAAGT
301    TTGATTCTTT AAGAAACCCA TTTTGTAAAT CTTCCAAATT TCGTTTAAACA
351    TTTTGTGTTT ATTGTGCATT GCATCTGTAA TTGGGAATAG ATCTAGTGA
401    TATAGTGTA  TGGTCTCTA CATA CGAAGC TCGTGTAAAT CTTTGTATCA
451    AATCTTATCT TTGTGTTTTG GGTTTGTTTC AGAAAGTTCA AAAGGCTTTG
501    TTGCAATCAG ATGTGCAATC AAAATCTGAT AAAAGTCCAG TGACCGTTGC
551    TGATTATGGT TAGTTTGTTA TACCTGTCCC TGATTAGAAA AAGCTCTTCT
601    CTTTGAATGT TACTGAGATT GTTAGGAAAT CACTTAAATTT GATCTGTCTT
651    GTTTGAATTT TCAGGTTTAC AAGCAGTTGT TAGTTTAGTC TTAGAAAAAG
701    AGCTCAGTTC TGAACCTTTT TCATTTGGTGG CTGA ██████████ AGAGGT
      GAAACTGCCT

751    AATAAATCCT TGTTAGATGT CTCACACTTT ACTTATCTTT GAGTTTGTGT
801    TTATGGACTC ACATTGTCTA AAATGATCTA TATAGGACTC AGGCGATCTA
851    CGCAAGGATG GTTCTCAGGA TACTCTGGAG CGCATCACAA AACCTCGTGA
901    CGACACTTTG GCTACCGAGG AATCGTTTAA TGGCTCTACT TTGTCTACTG
951    ATGATCTACT TAGAGCCATT GACTGTGGAA CATCTGAAGG TGGTCCAAAT
1001   GGTCGACACT GGGTCTTGGA TCCAATTGAT GGCCTAAAG GGTACGTTTT
1051   AAACTAACT  AGCCTAAAGT CAAATCTTCT TATTTAGAG AAATGTAAA
1101   TTTGATAGAA TGTGAGTCA GATGTTATGT TCCTGACACT GAGCATTTTC
1151   ATGATTTTAG ATTTCTGAGG GGAGATCAAT ACGCAGTAGC ACTAGGATTG
1201   CTCGAGGAAG GGAAAGTAGT TTTAGGTGTG CTTCCTTGTG CAAACTTGCC
1251   GTTAGCATCC ATAGCAGGAA ACAACAAGAA CAAATCTTCG TCAGACGAAA
1301   TTGGATGCCT CTTCTTTGCT ACAATTTGTT CAGGGACATA TATGCAGCTC
1351   CTAGATTCAA AATCTTCTCC TGTAAAAGTG CAAGTCTCTA GTGTTGAGAA
1401   TCCTGAAGAG GCATCGTTCT TCGAGTCATT CGAAGGAGCT CACTCTCTAC
1451   ATGACTTATC CAGCTCCATT GCCAATGTAA ATTGCCTTCT TCCTTCCATG
1501   TGATTCCAGC TAATAGCTAA CTAATTTTCC TCATCCATTT GATCATGTTT
1551   TATGTTGTAA TATACAGAAA CTCGGTGTCA AAGCTCCACC AGTCCGTATT
1601   GATAGCCAAG CAAAGTATGG AGCTTTATCA AGAGGAGATG GAGCTATATA
1651   CTTACGGTTT CCTCATAAAG GATACCGCGA AAAGATTTGG GACCATGTCT
1701   CTGGTGTCTAT AGTTGTTACA GGTAAACATTA AAGCTTACTC TCTATGAAGC
1751   TAATTTTATA GTGTCGACAT GCGGATGTAA ATAGATAAGG AATGCAAGGT
1801   TGATTCTTCT TTTTGGTGTCA GAGGCGGGTG GAATAGTGAC AGATGCAGCA
1851   GGAAAGCCAC TGGATTTCTC GAAAGGGAAG TATCTTGATT TGGACACAGG
1901   CATTATCGTT GCTAACGAGA AGCTAATGCC TCTGCTTTTG AAAGCAGTTC
1951   GTGACTCCAT AGCTGAGCAA GAGAAAGCTT CAGCTCTC ██████████ TTTGTTTTT
2001   TTCTCTCGTA CGTTCTTTGT TTCTCTGTAA CTGTTGTTTC ATTTCTTTC
2051   ACCGAATTTT ACCAGTGAGA ATTTCTTCCA TTTTCGAAA AGAAATAAAA
2101   ATGAAATCTT GTTTTGGGCT AA

```

图 9A

SALK_020882 基因组序列 (SEQ ID NO: 4) - 根据 Tail PCR 研究

```

1      GACATATATT TATCTTCTTG AAAAGCGA ██████████ ATGTCCTATA AATTGTTTTTC
51     GAACAGCGAA GGCTCCGCTT CAATCATTTG TAGCAGTAAG AACGAATTCG
101    AGACCTAGAA ATTTCATCGAA CCGTCTCGTT TCTGTATTCG GACGCAAGTC
151    TTCITCTCCT TCATTTGTTA CTCTCAGAGT TGTTTCATCG ATGGCITACG
201    AGAAAGAGCT TGATGCTGCT AAGAAAGCTG CTTCACTCGC TGCTCGTCTC
251    TGTCAGGTTA GGGTTTTTTC GATTCAATCA TGACCCATAG ATTCTAAAGT
301    TTGATTCTTT AAGAAACCCA TTTTGTAAAT CTCCCAAATT TCGTTTAAACA
351    TTTTGTGTTT ATTTGTCATT GCATCTGTAA TTGGGAATAG ATCTAGTGA
401    TATACGTATA TGGTCCCTCA CATAACGAAG TCGTGTAAAT CTTTGTATCA
451    AATCTTATCT TTGTGTTTTG GGTPTGTTTT AGAAAGTTCA AAAGGCTTTG
501    TTGCAATCAG ATGTGCAATC AAAATCTGAT AAAAGTCCAG TGACCGTTGC
551    TGATTATGGT TAGTTTGTTA TACCTGTCCC TGATTAGAAA AAGCTCTTCT
601    CTTTGAATGT TACTGAGATT GTTAGGAAAT CACTTAATTT GATCTGTCTT
651    GTGTTGAATT TCAGGTTTAC AAGCAGTTGT TAGTTTAGTC TTAGAAAAAG
701    AGCTCAGTTC TGAACCCTTT TCATTGGTGG CTGA ██████████ TGCTT
751    AATAAATCCT TGTTAGATGT CTCACACTTT ACTTATCTTT GAGTTTGTGT
801    TTATGGACTC ACATTGTCTA AAATGATCTA TATAGGACTC AGGCGATCTA
851    CGCAAGGATG GTTCTCAGGA TACTCTGGAG CGCATCACA AACTCGTGAA
901    CGACACTTTG GCTACCGAGG AATCGTTTAA TGGCTCTACT TTGTCTACTG
951    ATGATCTACT TAGAGCCATT GACTGTGGAA CATCTGAAGG TGGTCCAAAT
1001   GGTCGACACT GGGTCTTTGA TCCAAATGAT GGCACATAAG GGTACGTTTT
1051   AAACTAACT AGCCTAAAGT CAAATCTTCT TATTTAGAG AAAATGTAAA
1101   TTTGATAGAA TGTTGAGTCA GATTTATGT TCCTGACACT GAGCATTTTC
1151   ATGATTTTAG ATTTCTGAGG GGAGATCAAT ACGCAGTAGC ACTAGGATTG
1201   CTCGAGGAAG GGAAAGTAGT TTTAGGTGTG CTTGCTTGTG CAAACTTGCC
1251   GTTAGCATCC ATAGCAGGAA ACAACAAGAA CAAATCTTCG TCAGACGAAA
1301   TTGGATGCCT CTTCTTTGCT ACAATTTGTT CAGGGACATA TATGCAGCTC
1351   CTAGATTCAA AATCTTCTCC TGTAAAAGTG CAAGTCTCTA GTGTTGAGAA
1401   TCCTGAAGAG GCATCGTTCT TCGAGTCATT CGAAGGAGCT CACTCTCTAC
1451   ATGACTTATC CAGCTCCATT GCCAATGTAA ATTGCTTCTT TCCTTCCATG
1501   TGATTCCAGC TAATAGCTAA CTAATTTTCC TCATCCATTT GATCATGTTT
1551   TATGTTGTAA TATACAGAAA CTCGGTGTCA AAGCTCCACC AGTCCGTATT
1601   GATAGCCAAG CAAAGTATGG AGCTTTATCA AGAGGAGATG GAGCTATATA
1651   CTTACGGTTT CCTCATAAAG GATACCGCGA AAAGATTTGG GACCATGTCG
1701   CTGGTGCTAT AGTTGTTACA GGTAAACATTA AAGCTTACTC TCTATGAAGC
1751   TAATTTTATA GTGTCGACAT GCGGATGTAA ATAGATAAGG AATGCAAGGT
1801   TGATTCTTCT TTTTGGTGCA GAGGCGGGTG GAATAGTGAC AGATGCAGCA
1851   GGAAAGCCAC TGGATTTCTC GAAAGGGAAG TATCTTGATT TGGACACAGG
1901   CATTATCGTT GCTAACGAGA AGCTAATGCC TCTGCTTTTG AAAGCAGTTC
1951   GTGACTCCAT AGCTGAGCAA GAGAAAGCTT CAGCTCTC ██████████ TTTGTTTTT
2001   TTCTCTCGTA CGTTCTTTGT TTCTCTGTAA CTGTTGTTTC ATTTTCTTTC
2051   ACCGAATTTC ACCAGTGAGA ATTTCTTCCA TTTTCGAAAA AGAAATAAAA
2101   ATGAAATTCT GTTTTGGGCT AA

```

图 9B

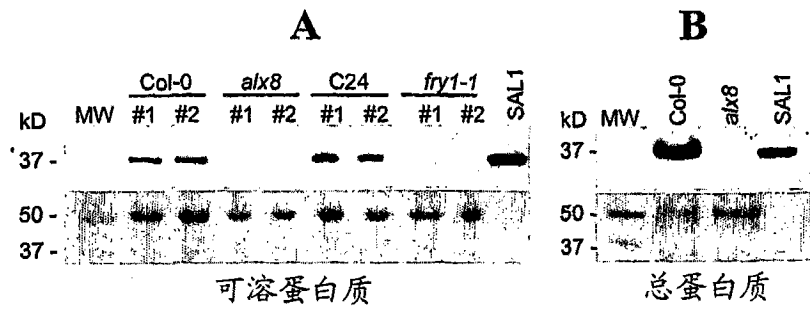


图 11

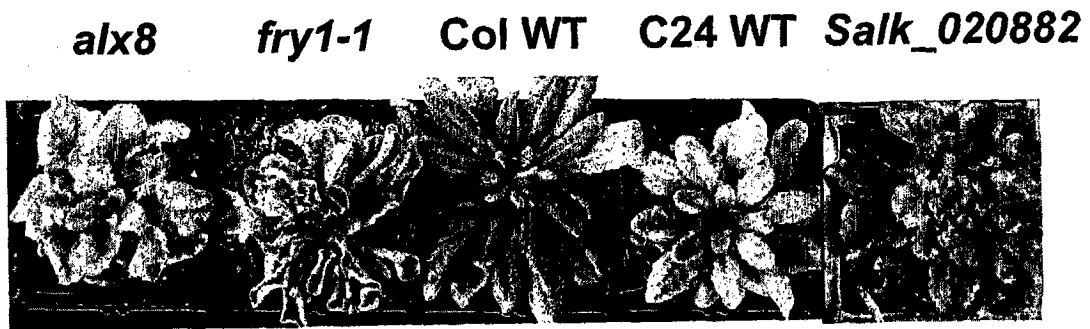


图 12

无水时植物的干旱存活

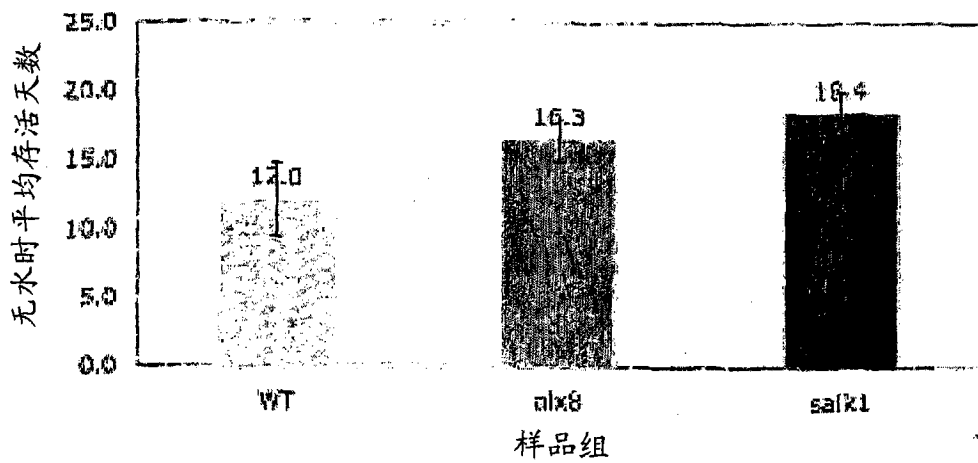


图 13

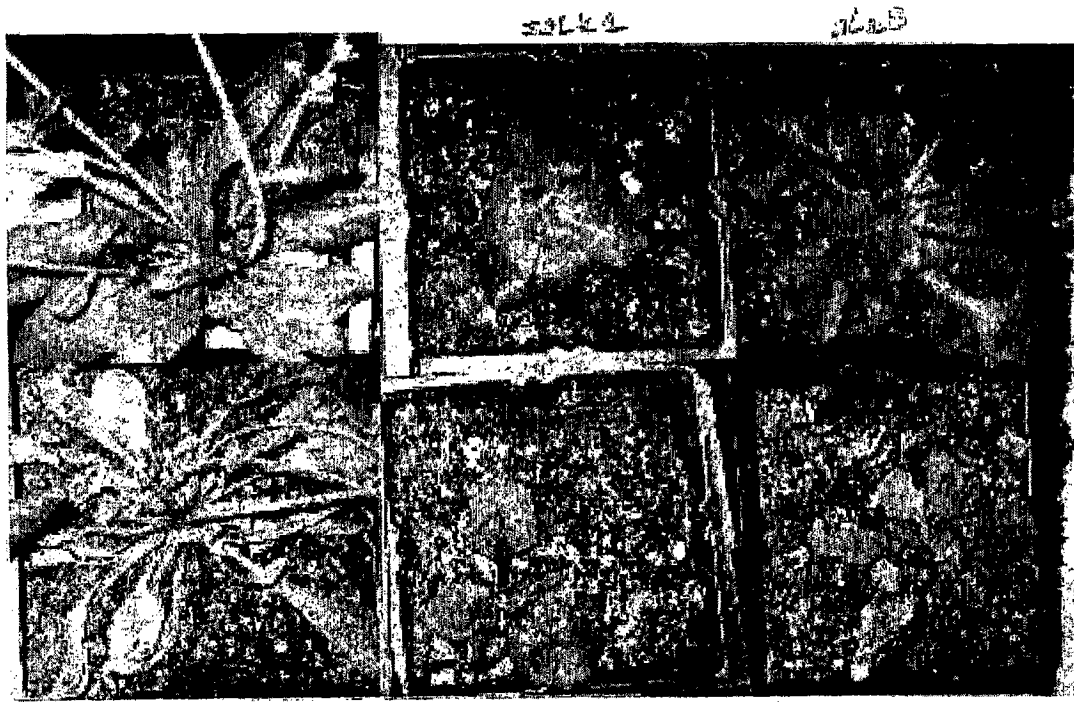


图 14

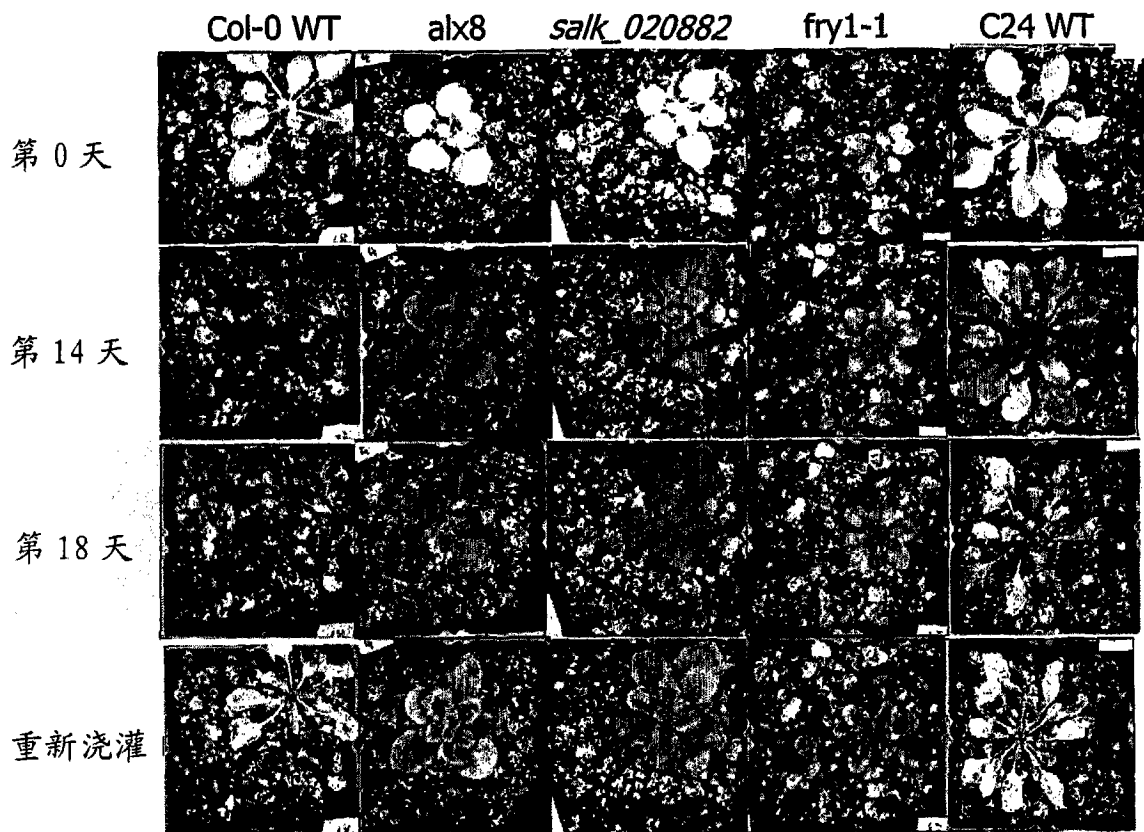


图 15A

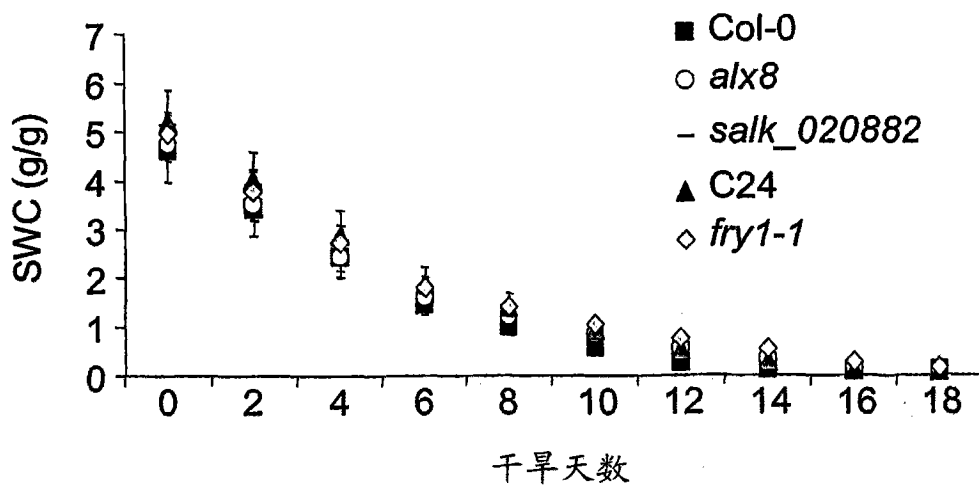


图 15B

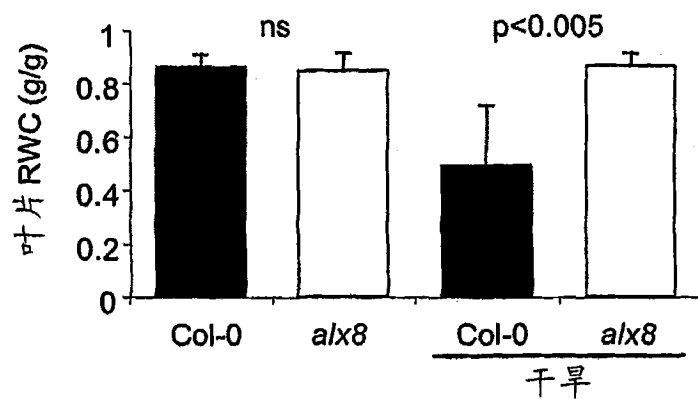


图 16A

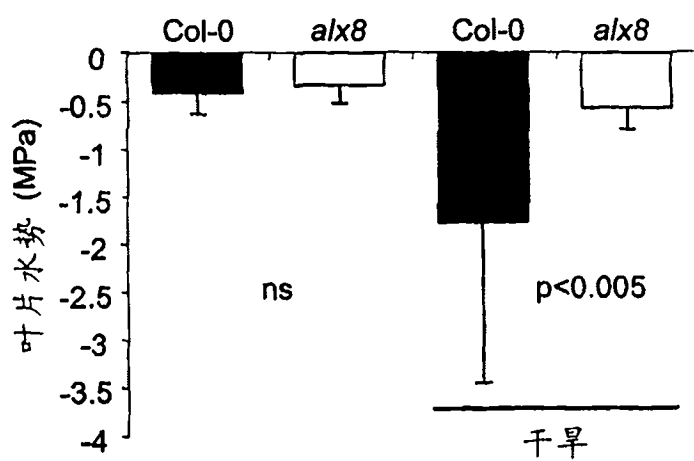


图 16B

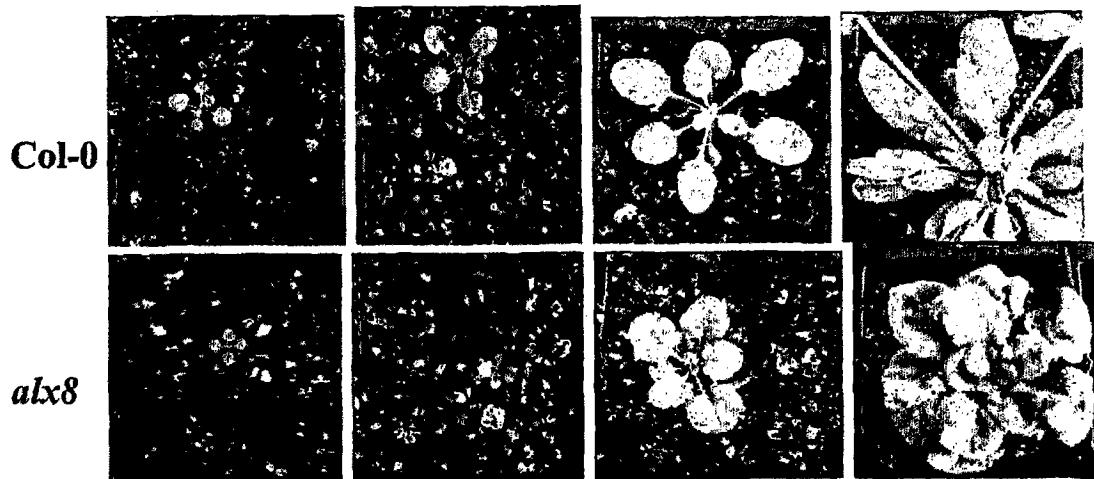


图 17

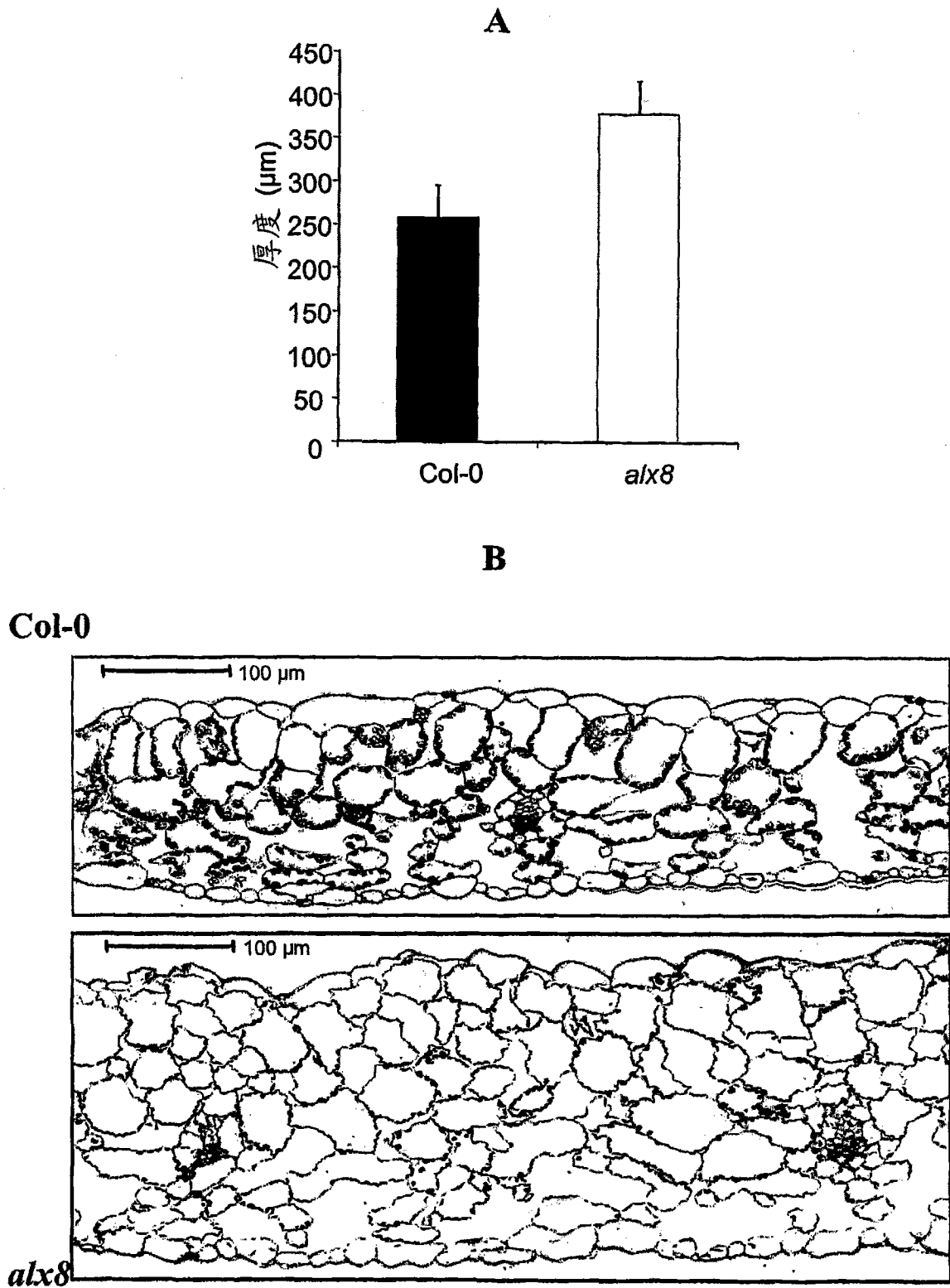


图 18

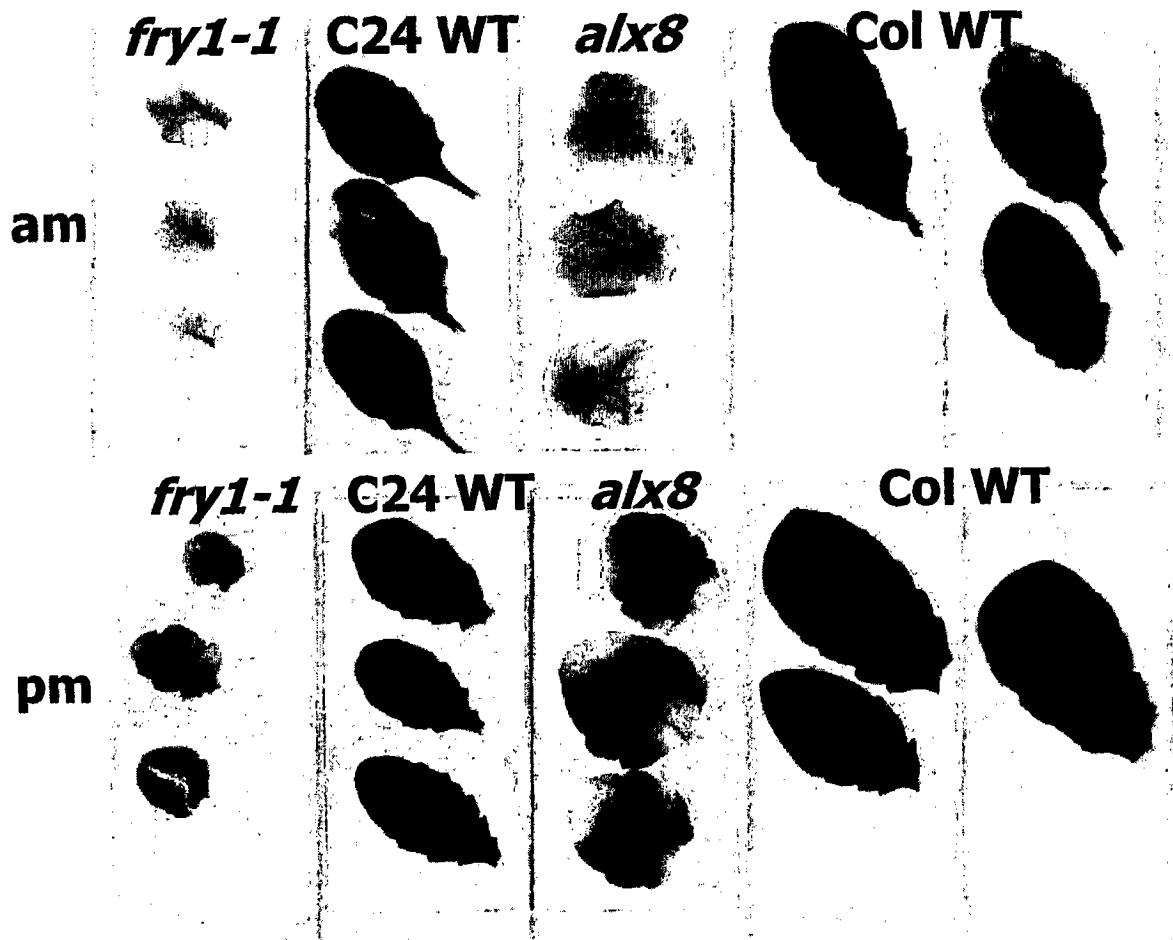


图 19

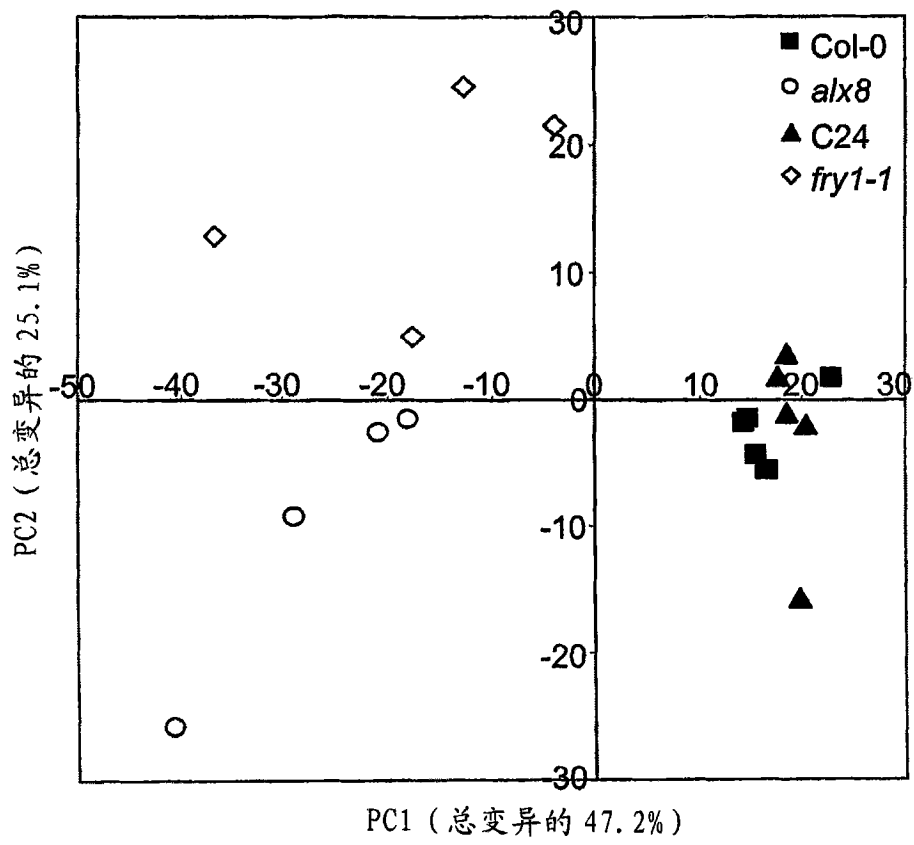


图 20

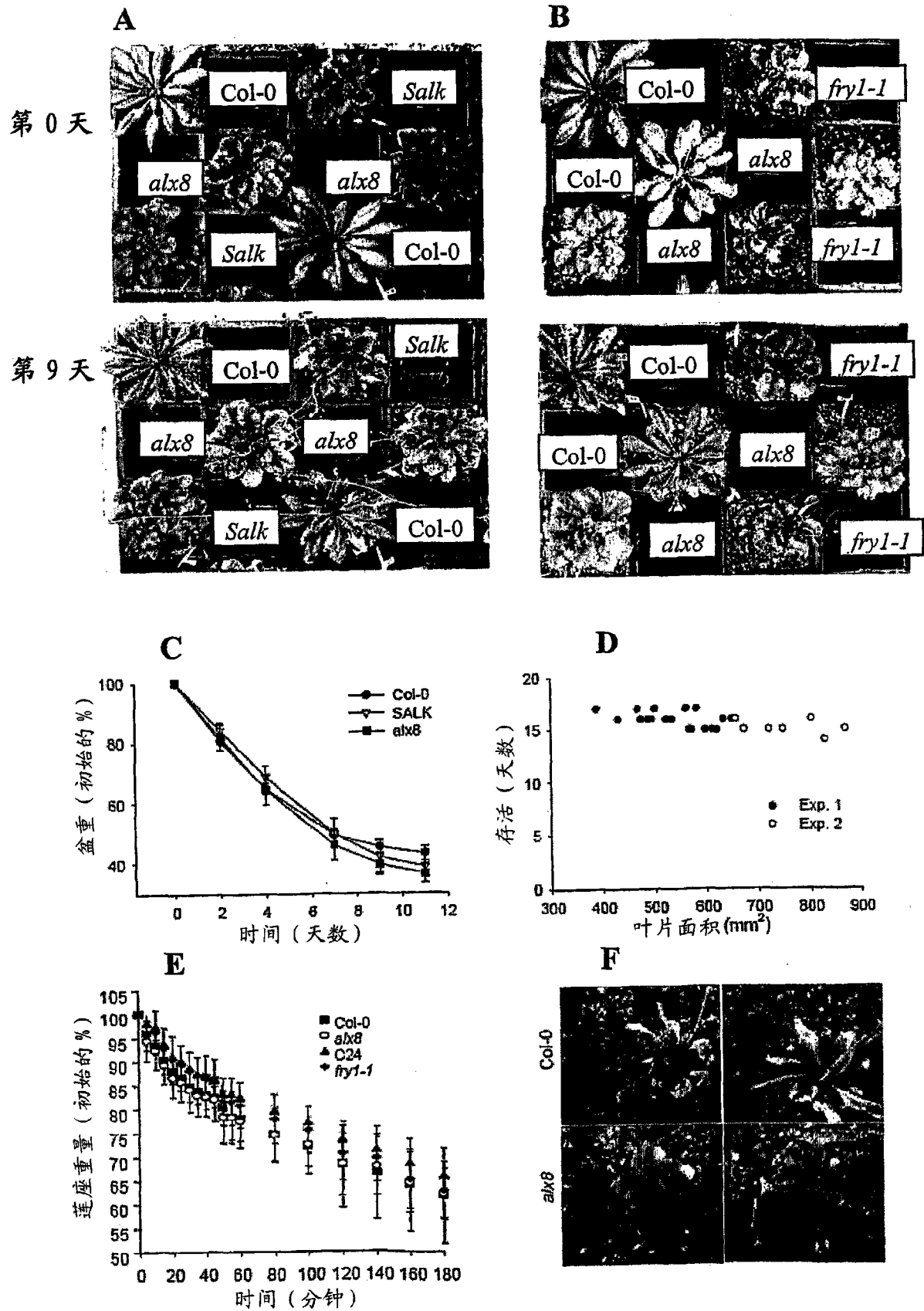


图 21