



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105658663 A

(43) 申请公布日 2016.06.08

(21) 申请号 201480034810.7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014.04.29

*C07K 14/415*(2006.01)

(30) 优先权数据

*C12N 15/29*(2006.01)

61/817,415 2013.04.30 US

*A01H 5/00*(2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

*A01N 47/44*(2006.01)

2015.12.18

*A01P 3/00*(2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/035786 2014.04.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/179260 EN 2014.11.06

(71) 申请人 唐纳德丹佛斯植物科学中心

地址 美国密苏里州

(72) 发明人 D·沙

(74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

代理人 孟锐

权利要求书2页 说明书55页

序列表27页 附图2页

(54) 发明名称

抗真菌植物蛋白质、肽和使用方法

(57) 摘要

提供表达 MtDef5 抗真菌蛋白质和肽的,展现对易感真菌的高抗性水平的转基因植物。所述转基因植物含有包含可操作地连接于编码这些分子的核酸序列的天然或异源性信号肽序列的重组 DNA 构建体。也提供产生所述植物的方法;保护植物免遭易感真菌性感染和损害的方法;以及可施用于植物的场所,包含表达这些分子的微生物或这些分子自身的组合物;以及含有这些分子的药物组合物。本发明也涵盖 MtDef5 抗真菌蛋白质和肽治疗易感真菌性感染的人和兽医学治疗用途。

1. 一种分离的纯化蛋白质或肽,其包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列。

2. 如权利要求1所述的分离的纯化蛋白质或肽,其在它的N末端包含植物物质外体、液泡或内质网靶向氨基酸序列。

3. 如权利要求2所述的分离的纯化蛋白质或肽,其中所述靶向序列包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:30-35和42-48中所示的氨基酸序列。

4. 一种分离的核苷酸序列,其编码权利要求1至3中任一项的所述分离的纯化蛋白质或肽。

5. 如权利要求4所述的分离的核苷酸序列,其针对在目标植物中表达加以密码子优化。

6. 如权利要求4或5所述的分离的核苷酸序列,其中所述目标植物是粮食作物植物。

7. 如权利要求6所述的分离的核苷酸序列,其中所述粮食作物植物选自由以下组成的组:大豆、小麦、玉米、甘蔗、稻和马铃薯。

8. 一种转基因植物,其细胞含有包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的蛋白质或肽:SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列。

9. 如权利要求8所述的转基因植物,其中所述蛋白质或肽在它的N末端进一步包含植物物质外体、液泡或内质网靶向氨基酸序列。

10. 如权利要求8或9所述的转基因植物,其基因组进一步包含:

编码选自由MsDef1、MtDef2、MtDef4、NaD1、Rs-AFP1、Rs-AFP2、KP4和KP6组成的组的植物防御素的DNA,其中所述DNA被表达,并且产生抗真菌有效量的所述防御素,和/或

编码苏云金杆菌内毒素的DNA,其中所述DNA被表达,并且产生抗昆虫有效量的所述苏云金杆菌内毒素,和/或

编码对所述植物赋予除草剂抗性的蛋白质的DNA,其中所述DNA被表达,并且产生抗除草剂有效量的赋予除草剂抗性的所述蛋白质。

11. 一种组合物,其包含含有与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的蛋白质或肽及其任何组合:SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列。

12. 如权利要求11所述的组合物,其进一步包含农业上或药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

13. 如权利要求11或12所述的组合物,其被配制在一种或多种选自由以下组成的组的其它活性剂的混合物中:杀虫活性物质、肥料、杀虫剂、引诱剂、灭菌剂、杀螨剂、杀线虫剂、除草剂和生长调控剂。

14. 一种预防、处理、控制、抗击、降低或抑制对易感于来自选自由以下组成的组的真菌物种的损害的植物的损害的方法:链格孢属种、壳二孢属种、曲霉属种、葡萄孢属种;尾孢属种、刺盘孢属种、色二孢属种、白粉菌属种、镰刀菌属种、顶囊壳属种、长蠕孢属种、壳球孢属种、丛赤壳属种、霜霉属种、层锈菌属种、茎点霉属种、瘤梗孢属种、疫霉属种、单轴霉属种、柄锈菌属种、叉丝单囊壳属种、核腔菌属种、梨孢属种、腐霉属种、丝核菌属种、小菌核属种、核盘菌属种、壳针孢属种、根串珠霉属种、钩丝壳属种、黑星菌属种和轮枝孢菌属种,所述方

法包括向所述易感植物的场所提供抗真菌有效量的包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的抗真菌蛋白质或肽及其任何组合:SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列。

15. 如权利要求14所述的方法,其中通过在所述易感植物的细胞内表达编码所述抗真菌蛋白质或肽的DNA来向所述易感植物场所提供所述抗真菌蛋白质或肽。

16. 如权利要求14所述的方法,其中通过向所述植物施用包含所述抗真菌蛋白质或肽的组合物来向所述易感植物场所提供所述抗真菌蛋白质或肽。

17. 如权利要求14所述的方法,其中通过产生所述抗真菌蛋白质或肽的植物定殖微生物来向所述易感植物场所提供所述抗真菌蛋白质或肽。

18. 如权利要求14所述的方法,其中通过以下方式来向所述易感植物场所提供所述抗真菌蛋白质或肽:施用包含产生所述抗真菌蛋白质或肽的植物定殖微生物的组合物,或向其施用所述抗真菌蛋白质或肽自身。

19. 如权利要求18所述的方法,其中所述组合物包含农业上可接受的稀释剂、赋形剂或载体。

20. 如权利要求14至19中任一项所述的方法,其中所述易感植物选自由以下组成的组:玉米、大豆、小麦、甘蔗、稻和马铃薯。

## 抗真菌植物蛋白质、肽和使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2013年4月30日提交的美国临时申请序列号61/817,415的优先权权益,所述美国临时申请的内容以引用的方式整体并入本文。

[0003] 发明背景

### 发明领域

[0004] 本发明涉及源于蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)(Barrel Medic、Barrel Medick或Barrel Clover)的抗真菌小蛋白质和肽,即MtDef5防御素(Defensin);以及用于控制易感于这些分子的抗真菌活性的病原性真菌的方法。抗真菌蛋白质和肽可作为抗真菌组合物的组分直接施用于植物,以产生蛋白质或肽的微生物形式施用于植物,或植物自身可被遗传修饰以产生蛋白质或肽。本发明也涉及适用于控制病原性植物和其它真菌的DNA构建体、微生物、和用DNA构建体转化的植物、以及组合物。

[0005] 相关技术的描述

[0006] 保护在农业上重要的作物免遭病原性真菌在改进作物产量方面是至关重要的。真菌性感染是潮湿气候下的特定问题,并且可变为作物储存期间的主要关心问题,其中所述感染可导致粮食或饲料产品腐败以及被真菌毒素污染。不幸的是,现代生长方法以及收获和储存系统可促进植物病原体感染。

[0007] 控制植物病原体因需要同时控制多种不同属真菌而进一步复杂。举例来说,如链格孢属(*Alternaria*);曲霉属(*Aspergillus*);壳二孢属(*Ascochyta*);葡萄孢属(*Botrytis*);尾孢属(*Cercospora*);刺盘孢属(*Colletotrichum*);色二孢属(*Diplodia*);白粉菌属(*Erysiphe*);镰刀菌属(*Fusarium*);顶囊壳属(*Gaeumanomyces*);长蠕孢属(*Helminthosporium*);壳球孢属(*Macrophomina*);丛赤壳属(*Nectria*);霜霉属(*Peronospora*);层锈菌属(*Phakopsora*);茎点霉属(*Phoma*);瘤梗孢属(*Phymatotrichum*);疫霉属(*Phytophthora*);单轴霉属(*Plasmopara*);叉丝单囊壳属(*Podosphaera*);柄锈菌属(*Puccinia*);腐霉属(*Pythium*);核腔菌属(*Pyrenophora*);梨孢属(*Pyricularia*);丝核菌属(*Rhizoctonia*);小菌核属(*Scerotium*);核盘菌属(*Sclerotinia*);壳针孢属(*Septoria*);根串珠霉属(*Thielaviopsis*);钩丝壳属(*Uncinula*);黑星菌属(*Venturia*);和轮枝孢菌属(*Verticillium*)物种的真菌是所有认定的植物病原体。因此,仅控制一子组有限真菌病原体的抗性作物植物种类或杀真菌剂在其中存在多种病原体的条件下可能不能递送充分保护。进一步预期植物病原性真菌可变得对现存杀真菌剂以及转基因和非转基因作物种类具有抗性,从而使得必须引入具有用以抗击抗性真菌的不同作用模式的真菌控制剂。

[0008] 一种用以抑制植物病原性真菌活性的方法已在于鉴定和分离展现针对植物病原性真菌的抗真菌活性的肽、多肽和蛋白质(Bowles, 1990; Brears等, 1994)。包括几丁质酶(chitinase)、富含半胱氨酸的几丁质结合蛋白、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶、permatin(包括zeamatin)、硫素(thionin)、核糖体失活蛋白和非特异性脂质转移蛋白的抗真菌肽、多肽和蛋白质据信在针对真菌性感染的植物防御中起重要作用。在转基因植物中使用这些蛋白质

产物来控制植物病原体已例如报道于欧洲专利申请0 392 225中。

[0009] 称为防御素的另一组肽已显示会抑制植物病原体。防御素是具有45-54个氨基酸的富含半胱氨酸的小肽,其构成植物的先天免疫性的重要组分(Thomma等,2002;Lay和Anderson,2005)。在植物中广泛分布,防御素在它们的氨基酸组成方面极大变化。然而,它们都具有通过四个或五个分子内二硫键来稳定的紧实形状。已充分研究植物防御素在植物防御中的作用。一些植物防御素在微摩尔浓度下抑制广泛范围的真菌的生长(Broekaert等,1995;Broekaert等,1997;da Silva Conceicao和Broekaert,1999),并且当在转基因植物中表达时赋予对真菌病原体的强烈抗性(da Silva Conceicao和Broekaert,1999;Thomma等,2002;Lay和Anderson,2005)。当添加纯蛋白质至体外抗真菌测定培养基中时,两种从萝卜种子分离的富含半胱氨酸的小蛋白质Rs-AFP1和Rs-AFP2抑制许多病原性真菌的生长(美国专利号5,538,525)。发现含有编码Rs-AFP2蛋白的基因的转基因烟草植物比非转化植物对真菌攻击具有更大抗性。

[0010] 抗真菌防御素蛋白也已在苜蓿(紫苜蓿(*Medicago sativa*))中被鉴定,并且在体外测试中以及在转基因植物中均显示会抑制植物病原体,如镰刀菌属和轮枝孢菌属(美国专利号6,916,970)。在低盐体外测定条件下,苜蓿防御素AlfAFP1在1 $\mu$ g/ml下使大刀镰刀菌(*Fusarium culmorum*)生长抑制50%,并且在4 $\mu$ g/ml下使大丽花轮枝孢(*Verticillium dahliae*)生长抑制50%(即IC<sub>50</sub>值分别是1 $\mu$ g/ml和4 $\mu$ g/ml)。在转基因马铃薯植物中表达AlfAFP1蛋白也在温室测试与田地测试两者中均显示会赋予对大丽花轮枝孢的抗性(Gao等,2000)。作用模式分析也已显示AlfAFP1(其或者被称为代表紫苜蓿防御素1(*Medicago sativa* Defensin 1)的MsDef1)诱导禾谷镰刀菌(*F.graminearum*)高度分支,并且可阻断L型钙通道(Spelbrink等,2004)。

[0011] 其它防御素基因也已在豆科植物蒺藜苜蓿中被鉴定(Hanks等,2005)。已通过体外实验证明克隆的MtDef2蛋白具有少许或不具有抗真菌活性(Spelbrink等,2004)。序列数据库搜索分析鉴定与已知苜蓿属防御素基因具有同源性的10个假定共有序列(由多个EST表示的10个独特防御素编码基因)和6个单例(即由单一EST表示的6个独特防御素基因)。一个假定共有序列被鉴定为TC85327,并且显示在模拟处理的蒺藜苜蓿根与菌根真菌感染的蒺藜苜蓿根两者中均表达。在这个研究中不存在由任何TC85327蒺藜苜蓿序列编码的蛋白质具有抗真菌活性的证明(Hanks等,2005)。

[0012] 尽管如AlfAFP1(MsDef1)和Rs-AFP2的防御素蛋白已用于获得对真菌性感染具有抗性的转基因植物,但需要提供抗性水平增加的其它蛋白质。具体来说,针对真菌病原体的特异性活性增加的蛋白质将特别适用于改进在转基因植物中获得的真菌抗性的水平。此外,通过不同作用模式抑制真菌病原体的蛋白质也将适用于抗击已变得对如AlfAFP1(MsDef1)和Rs-AFP2的防御素蛋白具有抗性的真菌病原体。

[0013] 本发明通过提供来自蒺藜苜蓿的新型抗真菌小蛋白质和肽家族,MtDef5.1-5.6(SEQ ID NO:1,3-9,16-22、和49-64)来满足这个需要。

[0014] 发明概述

[0015] 因此,本发明在它的各个方面提供以下事项。

[0016] 1.一种分离的纯化抗真菌蛋白质或肽,其包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:1,3-9,16-22和49-64中所示的氨基

酸序列。

[0017] 2. 如1所述的分离的纯化抗真菌蛋白质或肽,其在它的N末端包含植物物质外体、液泡或内质网靶向氨基酸序列。

[0018] 3. 如2所述的分离的纯化抗真菌蛋白质或肽,其中所述靶向序列包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:30-35和42-48中所示的氨基酸序列。

[0019] 4. 一种分离的纯化核苷酸序列,其编码1-3中的任一个的所述分离的纯化抗真菌蛋白质或肽。

[0020] 5. 如4所述的分离的纯化核苷酸序列,其针对在目标植物中表达加以密码子优化。

[0021] 6. 如4或5所述的分离的纯化核苷酸序列,其中所述目标植物是粮食作物植物。

[0022] 7. 如6所述的分离的纯化核苷酸序列,其中所述粮食作物植物选自由以下组成的组:大豆、小麦、玉米、甘蔗、稻和马铃薯。

[0023] 8. 一种转基因植物,其细胞含有包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的抗真菌蛋白质或肽:SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列。

[0024] 9. 如8所述的转基因植物,其中所述抗真菌蛋白质或肽在它的N末端进一步包含植物物质外体、液泡或内质网靶向氨基酸序列。

[0025] 10. 如8或9所述的转基因植物,其中所述抗真菌蛋白质或肽以抗真菌有效量存在于所述细胞中。

[0026] 11. 如8至10中任一个所述的转基因植物,其中所述细胞是根细胞。

[0027] 12. 如8至11中任一个所述的转基因植物,其中所述抗真菌蛋白质或肽抑制由选自由以下组成的组的真菌物种引起的对所述植物的损害:链格孢属种、壳二孢属种、曲霉属种、葡萄孢属种;尾孢属种、刺盘孢属种、色二孢属种、白粉菌属种、镰刀菌属种、顶囊壳属种、长蠕孢属种、壳球孢属种、丛赤壳属种、霜霉属种、层锈菌属种、茎点霉属种、瘤梗孢属种、疫霉属种、单轴霉属种、柄锈菌属种、叉丝单囊壳属种、核腔菌属种、梨孢属种、腐霉属种、丝核菌属种、小菌核属种、核盘菌属种、壳针孢属种、根串珠霉属种、钩丝壳属种、黑星菌属种和轮枝孢菌属种。

[0028] 13. 如8至12中任一个所述的转基因植物,其基因组进一步包含:

[0029] 编码选自由MsDef1、MtDef2、MtDef4、NaD1、Rs-AFP1、Rs-AFP2、KP4和KP6组成的组的植物防御素的DNA,其中所述DNA被表达,并且产生抗真菌有效量的所述防御素,和/或

[0030] 编码苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)内毒素的DNA,其中所述DNA被表达,并且产生抗昆虫有效量的所述苏云金杆菌内毒素,和/或

[0031] 编码对所述植物赋予除草剂抗性的蛋白质的DNA,其中所述DNA被表达,并且产生抗除草剂有效量的赋予除草剂抗性的所述蛋白质。

[0032] 14. 如8至13中任一个所述的转基因植物,其通过包括以下的方法来产生:

[0033] a) 向植物细胞的基因组中插入重组双链DNA分子,其包含可操作地连接以达成表达的:

[0034] (i) 在植物细胞中起导致邻近编码序列转录成RNA的作用的启动子序列;

[0035] (ii) 任选地,内含子;

[0036] (iii)编码抗真菌蛋白质或肽的编码序列,所述抗真菌蛋白质或肽包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列,并且在它的N末端包含植物物质外体、液泡或内质网靶向氨基酸序列;

[0037] (iv)在植物细胞中起导致转录终止以及向所述转录RNA的3'末端添加多聚腺苷酸核苷酸的作用的3'非翻译序列;

[0038] b)获得转化植物细胞;以及

[0039] c)从所述转化植物细胞再生遗传转化植物,其细胞表达所述抗真菌蛋白质或肽。

[0040] 15.如14所述的转基因植物,其中所述抗真菌蛋白质或肽以抗真菌有效量在所述转化植物的细胞中表达。

[0041] 16.如14或15所述的转基因植物,其中所述编码序列包含与选自由以下组成的组的核苷酸序列具有足以使得所述编码序列能够编码所述抗真菌蛋白质或肽的序列同一性的核苷酸序列:SEQ ID NO:10-15、23-29和65-78中所示的核苷酸序列;或包括所述编码序列的用以使其在所述植物中的表达最优化的密码子优化形式。

[0042] 17.如14至16中任一个所述的转基因植物,其中所述启动子是根特异性启动子。

[0043] 18.如17所述的转基因植物,其中所述根特异性启动子选自由以下组成的组:RB7、RD2、ROOT1、ROOT2、ROOT3、ROOT4、ROOT5、ROOT6、ROOT7和ROOT8。

[0044] 19.如8至18中任一个所述的转基因植物,其选自由以下组成的组:玉米、大豆、小麦、甘蔗、稻和马铃薯。

[0045] 20.一种8至19中的任一个的所述转基因植物的部分。

[0046] 21.如20所述的部分,其选自由以下组成的组:原生质体、细胞、组织、器官、扦插物和外植体。

[0047] 22.如21所述的部分,其选自由以下组成的组:花序、花朵、萼片、花瓣、雌蕊、柱头、花柱、子房、胚珠、胚、花托、种子、果实、雄蕊、花丝、花粉囊、雄性或雌性配子体、花粉粒、分生组织、顶芽、腋芽、叶、茎干、根、块根、根茎、块茎、匍匐枝、球茎、球根、短匍茎、培养的所述植物的细胞、培养的所述植物的组织、培养的所述植物的器官、以及愈伤组织。

[0048] 23.8至19中的任一个的所述转基因植物的子代。

[0049] 24.8至19中的任一个的所述转基因植物的种子。

[0050] 25.一种转基因植物,其细胞包含编码包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的抗真菌蛋白质或肽的核苷酸编码序列:SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列。

[0051] 26.如25所述的转基因植物,其中所述核苷酸编码序列进一步编码在所述抗真菌蛋白质或肽的N末端的植物物质外体、液泡或内质网靶向氨基酸序列。

[0052] 27.如25或26所述的转基因植物,其中所述抗真菌蛋白质或肽以抗真菌有效量在所述细胞中表达。

[0053] 28.如25至27中任一个所述的转基因植物,其中所述细胞是根细胞。

[0054] 29.如25至28中任一个所述的转基因植物,其通过包括以下的方法来产生:

[0055] a)向植物细胞的基因组中插入重组双链DNA分子,其包含可操作地连接以达成表达的:

- [0056] (i)在植物细胞中起导致邻近编码序列转录成RNA的作用的启动子;
- [0057] (ii)任选地,内含子;
- [0058] (iii)编码抗真菌蛋白质或肽的编码序列,所述抗真菌蛋白质或肽包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列,并且在它的N末端包含植物物质外体、液泡或内质网靶向氨基酸序列;和
- [0059] (iv)在植物细胞中起导致转录终止以及向所述转录RNA的3'末端添加多聚腺苷酸核苷酸的作用的3'非翻译区域;
- [0060] b)获得转化植物细胞;以及
- [0061] c)从所述转化植物细胞再生遗传转化植物,其细胞表达所述抗真菌蛋白质或肽。
- [0062] 30.如29所述的转基因植物,其中所述抗真菌蛋白质或肽以抗真菌有效量在所述植物的细胞中表达。
- [0063] 31.如29或30所述的转基因植物,其中所述编码序列包含与选自由以下组成的组的核苷酸序列具有足以使得所述编码序列能够编码所述抗真菌蛋白质或肽的序列同一性的核苷酸序列:SEQ ID NO:10-15、23-29、和65-78中所示的核苷酸序列;或包括所述编码序列的用以使其在所述植物中的表达最优化的密码子优化形式。
- [0064] 32.如29至31中任一个所述的转基因植物,其中所述启动子是根特异性启动子。
- [0065] 33.如32所述的转基因植物,其中所述根特异性启动子选自由以下组成的组:RB7、RD2、ROOT1、ROOT2、ROOT3、ROOT4、ROOT5、ROOT6、ROOT7和ROOT8。
- [0066] 34.如29至33中任一个所述的转基因植物,其基因组进一步包含:
- [0067] 编码选自由以下组成的组的植物防御素的DNA:MsDef1、MtDef2、MtDef4、NaD1、Rs-AFP1、Rs-AFP2、KP4和KP6,其中所述DNA被表达,并且产生抗真菌有效量的所述防御素,和/或
- [0068] 编码苏云金杆菌内毒素的DNA,其中所述DNA被表达,并且产生抗昆虫有效量的所述苏云金杆菌内毒素,和/或
- [0069] 编码对所述植物赋予除草剂抗性的蛋白质的DNA,其中所述DNA被表达,并且产生抗除草剂有效量的赋予除草剂抗性的所述蛋白质。
- [0070] 35.如29至34中任一个所述的转基因植物,其选自由以下组成的组:玉米、大豆、小麦、甘蔗、稻和马铃薯。
- [0071] 36.一种通常易感于来自选自由以下组成的组的真菌物种的损害的植物:链格孢属种、壳二孢属种、曲霉属种、葡萄孢属种;尾孢属种、刺盘孢属种、色二孢属种、白粉菌属种、镰刀菌属种、顶囊壳属种、长蠕孢属种、壳球孢属种、丛赤壳属种、霜霉属种、层锈菌属种、茎点霉属种、瘤梗孢属种、疫霉属种、单轴霉属种、柄锈菌属种、叉丝单囊壳属种、核腔菌属种、梨孢属种、腐霉属种、丝核菌属种、小菌核属种、核盘菌属种、壳针孢属种、根串珠霉属种、钩丝壳属种、黑星菌属种和轮枝孢菌属种,所述植物的细胞含有编码包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的抗真菌蛋白质或肽的编码序列:SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列。
- [0072] 37.如36所述的植物,其中所述抗真菌蛋白质或肽在它的N末端进一步包含植物物质外体、液泡或内质网靶向氨基酸序列。



[0073] 38. 如36或37所述的植物,其中所述抗真菌蛋白质或肽以抗真菌有效量存在于所述细胞中。

[0074] 39. 如36至38中任一个所述的植物,其中所述细胞是根细胞。

[0075] 40. 如36至39中任一个所述的植物,其选自由以下组成的组:玉米、大豆、小麦、甘蔗、稻和马铃薯。

[0076] 41. 一种预防、处理、控制、抗击、降低或抑制对易感于来自选自由以下组成的组的真菌物种的损害的植物的损害的方法:链格孢属种、壳二孢属种、曲霉属种、葡萄孢属种;尾孢属种、刺盘孢属种、色二孢属种、白粉菌属种、镰刀菌属种、顶囊壳属种、长蠕孢属种、壳孢属种、丛赤壳属种、霜霉属种、层锈菌属种、茎点霉属种、瘤梗孢属种、疫霉属种、单轴霉属种、柄锈菌属种、叉丝单囊壳属种、核腔菌属种、梨孢属种、腐霉属种、丝核菌属种、小菌核属种、核盘菌属种、壳针孢属种、根串珠霉属种、钩丝壳属种、黑星菌属种和轮枝孢菌属种,所述方法包括向所述易感植物的场所提供抗真菌有效量的包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的抗真菌蛋白质或肽及其任何组合:SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列。

[0077] 42. 如41所述的方法,其中通过在所述易感植物的细胞内表达编码所述抗真菌蛋白质或肽的DNA来向所述易感植物场所提供所述抗真菌蛋白质或肽。

[0078] 43. 如42所述的方法,其中编码所述抗真菌蛋白质或肽的所述DNA包含与选自由以下组成的组的核苷酸序列具有足以使得所述编码序列能够编码所述抗真菌蛋白质或肽的序列同一性的核苷酸序列:SEQ ID NO:10-15、23-29、和65-78中所示的核苷酸序列;或包含所述编码序列的用以使其在所述植物中的表达最优化的密码子优化形式。

[0079] 44. 如43所述的方法,其中所述DNA进一步包含编码在所述抗真菌蛋白质或肽的N末端的植物外体、液泡或内质网靶向氨基酸序列的核苷酸序列。

[0080] 45. 如41至44中任一个所述的方法,其中所述细胞是根细胞。

[0081] 46. 如41所述的方法,其中通过产生所述抗真菌蛋白质或肽的植物定殖微生物来向所述易感植物场所提供所述抗真菌蛋白质或肽。

[0082] 47. 如41所述的方法,其中通过以下方式来向所述易感植物场所提供所述抗真菌蛋白质或肽:施用包含产生所述抗真菌蛋白质或肽的植物定殖微生物的组合物,或向其施用所述抗真菌蛋白质或肽自身。

[0083] 48. 如47所述的方法,其中所述组合物包含农业上可接受的稀释剂、赋形剂或载体。

[0084] 49. 如41至48中任一个所述的方法,其中所述易感植物选自由以下组成的组:玉米、大豆、小麦、甘蔗、稻和马铃薯。

[0085] 50. 一种预防、处理、控制、抗击、降低或抑制对易感于来自选自由以下组成的组的真菌物种的损害的植物的损害的方法:链格孢属种、壳二孢属种、曲霉属种、葡萄孢属种;尾孢属种、刺盘孢属种、色二孢属种、白粉菌属种、镰刀菌属种、顶囊壳属种、长蠕孢属种、壳孢属种、丛赤壳属种、霜霉属种、层锈菌属种、茎点霉属种、瘤梗孢属种、疫霉属种、单轴霉属种、柄锈菌属种、叉丝单囊壳属种、核腔菌属种、梨孢属种、腐霉属种、丝核菌属种、小菌核属种、核盘菌属种、壳针孢属种、根串珠霉属种、钩丝壳属种、黑星菌属种和轮枝孢菌属种,所述方法包括在所述易感植物的细胞中在足以抑制所述真菌损害的水平下表达包含编码蛋

白质或肽及其任何组合的核苷酸序列的DNA,所述蛋白质或肽包含与选自以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列。

[0086] 51.如50所述的方法,其中所述抗真菌蛋白质或肽被靶向所述易感植物的细胞的质外体、液泡或内质网。

[0087] 52.如50或51所述的方法,其中所述抗真菌蛋白质或肽由以下核苷酸序列编码:与选自以下组成的组的核苷酸序列具有足以使得所述核苷酸序列能够编码所述抗真菌蛋白质或肽的序列同一性的核苷酸序列:SEQ ID NO:10-15、23-29和65-78中所示的核苷酸序列;或所述核苷酸序列的用以使其在所述植物中的表达最优化的密码子优化形式。

[0088] 53.如50至52中任一个所述的方法,其中所述细胞是根细胞。

[0089] 54.如50至53中任一个所述的方法,其中所述易感植物选自以下组成的组:玉米、大豆、小麦、甘蔗、稻和马铃薯。

[0090] 55.一种抑制对易感于来自选自以下组成的组的真菌物种的损害的植物的损害的方法:链格孢属种、壳二孢属种、曲霉属种、葡萄孢属种;尾孢属种、刺盘孢属种、色二孢属种、白粉菌属种、镰刀菌属种、顶囊壳属种、长蠕孢属种、壳球孢属种、丛赤壳属种、霜霉属种、层锈菌属种、茎点霉属种、瘤梗孢属种、疫霉属种、单轴霉属种、柄锈菌属种、叉丝单囊壳属种、核腔菌属种、梨孢属种、腐霉属种、丝核菌属种、小菌核属种、核盘菌属种、壳针孢属种、根串珠霉属种、钩丝壳属种、黑星菌属种和轮枝孢菌属种,

[0091] 所述方法包括:

[0092] a)向植物细胞的基因组中插入重组双链DNA分子,其包含可操作地连接以达成表达的:

[0093] (i)在植物细胞中起导致邻近编码序列转录成RNA的作用的启动子;

[0094] (ii)任选地,内含子;

[0095] (iii)包含编码包含与选自以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的抗真菌蛋白质或肽的核苷酸序列的编码序列:SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列;和

[0096] (iv)在所述植物细胞中起导致转录终止以及向所述转录RNA的3'末端添加多聚腺苷酸核苷酸的作用的3'非翻译区域;

[0097] b)获得转化植物细胞;以及

[0098] c)从所述转化植物细胞再生遗传转化植物,其细胞表达所述抗真菌蛋白质或肽。

[0099] 56.如55所述的方法,其中所述抗真菌蛋白质或肽以抗真菌量在所述转化植物的细胞中表达。

[0100] 57.如55或56所述的方法,其中所述抗真菌蛋白质或肽被靶向所述转化植物的细胞的质外体、液泡或内质网。

[0101] 58.如55至57中任一个所述的方法,其中编码所述抗真菌蛋白质或肽的所述核苷酸序列是与选自以下组成的组的核苷酸序列具有足以使得所述核苷酸序列能够编码所述抗真菌蛋白质或肽的序列同一性的核苷酸序列:SEQ ID NO:10-15、23-29、和65-78中所示的核苷酸序列;或是所述核苷酸序列的用以使其在所述植物中的表达最优化的密码子优化形式。

- [0102] 59. 如55至58中任一个所述的方法,其中所述启动子是根特异性启动子。
- [0103] 60. 如59所述的方法,其中所述根特异性启动子选自自由以下组成的组:RB7、RD2、ROOT1、ROOT2、ROOT3、ROOT4、ROOT5、ROOT6、ROOT7和ROOT8。
- [0104] 61. 如55至60中任一个所述的方法,其中所述易感植物选自自由以下组成的组:玉米、大豆、小麦、甘蔗、稻和马铃薯。
- [0105] 62. 一种控制、抗击或抑制选自自由以下组成的组的真菌物种的方法:链格孢属种、壳二孢属种、曲霉属种、葡萄孢属种;尾孢属种、刺盘孢属种、色二孢属种、白粉菌属种、镰刀菌属种、顶囊壳属种、长蠕孢属种、壳球孢属种、丛赤壳属种、霜霉属种、层锈菌属种、茎点霉属种、瘤梗孢属种、疫霉属种、单轴霉属种、柄锈菌属种、叉丝单囊壳属种、核腔菌属种、梨孢属种、腐霉属种、丝核菌属种、小菌核属种、核盘菌属种、壳针孢属种、根串珠霉属种、钩丝壳属种、黑星菌属种和轮枝孢菌属种,所述方法包括使所述真菌物种与包含抗真菌有效量的抗真菌蛋白质或肽及其任何组合的组合物接触,所述抗真菌蛋白质或肽包含与选自自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列。
- [0106] 63. 如62所述的方法,其中所述组合物包含所述抗真菌蛋白质或肽以及农业上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。
- [0107] 64. 如62所述的方法,其中所述组合物包含表达所述抗真菌蛋白质或肽的微生物。
- [0108] 65. 一种预防、处理、控制、抗击、降低或抑制由真菌引起的对植物的损害的方法,其包括:
- [0109] a) 向植物细胞的基因组中插入重组双链DNA分子,其包含可操作地连接以达成表达的:
- [0110] (i) 在植物细胞中起导致邻近编码序列转录成RNA的作用的启动子;
- [0111] (ii) 任选地,内含子;
- [0112] (iii) 包含编码包含与选自自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的抗真菌蛋白质或肽的核苷酸序列的编码序列:SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列;和
- [0113] (iv) 在所述植物细胞中起导致转录终止以及向所述转录RNA的3'末端添加多聚腺苷酸核苷酸的作用的3'非翻译区域;
- [0114] b) 获得转化植物细胞;以及
- [0115] c) 从所述转化植物细胞再生遗传转化植物,其细胞表达所述抗真菌蛋白质或肽。
- [0116] 66. 如65所述的方法,其中所述抗真菌蛋白质或肽以抗真菌有效量在所述转化植物的细胞中表达。
- [0117] 67. 如65或66所述的方法,其中所述编码序列进一步包含编码在所述抗真菌蛋白质或肽的N末端的植物物质外体、液泡或内质网靶向氨基酸序列的核苷酸序列。
- [0118] 68. 如65至67中任一个所述的方法,其中编码所述抗真菌蛋白质或肽的所述核苷酸序列包括与选自自由以下组成的组的核苷酸序列具有足以使得所述编码序列能够编码所述抗真菌蛋白质或肽的序列同一性的核苷酸序列:SEQ ID NO:10-15、23-29、和65-78中所示的核苷酸序列;或包括所述编码序列的用以使其在所述植物中的表达最优化的密码子优化形式。

- [0119] 69. 如65至68中任一个所述的方法,其中所述启动子是根特异性启动子。
- [0120] 70. 如69所述的方法,其中所述根特异性启动子选自由以下组成的组:RB7、RD2、ROOT1、ROOT2、ROOT3、ROOT4、ROOT5、ROOT6、ROOT7和ROOT8。
- [0121] 71. 如65至70中任一个所述的方法,其中所述真菌是选自由以下组成的组的物种:链格孢属种、壳二孢属种、曲霉属种、葡萄孢属种;尾孢属种、刺盘孢属种、色二孢属种、白粉菌属种、镰刀菌属种、顶囊壳属种、长蠕孢属种、壳球孢属种、丛赤壳属种、霜霉属种、层锈菌属种、茎点霉属种、瘤梗孢属种、疫霉属种、单轴霉属种、柄锈菌属种、叉丝单囊壳属种、核腔菌属种、梨孢属种、腐霉属种、丝核菌属种、小菌核属种、核盘菌属种、壳针孢属种、根串珠霉属种、钩丝壳属种、黑星菌属种和轮枝孢菌属种。
- [0122] 72. 如65至71中任一个所述的方法,其中所述植物选自由以下组成的组:玉米、大豆、小麦、甘蔗、稻和马铃薯。
- [0123] 73. 一种预防、处理、控制、抗击、降低或抑制由真菌引起的对植物的损害的方法,其包括:
- [0124] 用编码抗真菌蛋白质或肽的DNA分子转化植物以产生转化植物,所述抗真菌蛋白质或肽包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列,并且在所述抗真菌蛋白质或肽的N末端包含物质外体、液泡或内质网靶向氨基酸序列,
- [0125] 其中所述转化植物的细胞产生所述抗真菌蛋白质或肽,并且
- [0126] 其中当使两种植物与类似量的所述真菌接触,并且在相同条件下生长时,所述转化植物展现相较于不产生所述抗真菌蛋白质或肽的另外相同的未转化对照植物的真菌损害,降低的真菌损害。
- [0127] 74. 如73所述的方法,其中所述细胞是根细胞。
- [0128] 75. 如73或74所述的方法,其中所述真菌是选自由以下组成的组的物种:链格孢属种、壳二孢属种、曲霉属种、葡萄孢属种;尾孢属种、刺盘孢属种、色二孢属种、白粉菌属种、镰刀菌属种、顶囊壳属种、长蠕孢属种、壳球孢属种、丛赤壳属种、霜霉属种、层锈菌属种、茎点霉属种、瘤梗孢属种、疫霉属种、单轴霉属种、柄锈菌属种、叉丝单囊壳属种、核腔菌属种、梨孢属种、腐霉属种、丝核菌属种、小菌核属种、核盘菌属种、壳针孢属种、根串珠霉属种、钩丝壳属种、黑星菌属种和轮枝孢菌属种。
- [0129] 76. 如73至75中任一个所述的方法,其中所述植物选自由以下组成的组:玉米、大豆、小麦、甘蔗、稻和马铃薯。
- [0130] 77. 一种降低或抑制土壤的真菌污染的方法,其包括在所述土壤中栽培转基因植物,所述植物在所述转基因植物的根的细胞中表达包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的抗真菌蛋白质或肽:SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列。
- [0131] 78. 如77所述的方法,其中所述根细胞以抗真菌有效量产生所述抗真菌蛋白质或肽。
- [0132] 79. 如77或78所述的方法,其中所述抗真菌蛋白质或肽被靶向所述根细胞的质外体、液泡或内质网。
- [0133] 80. 如77至79中任一个所述的方法,其中所述真菌是选自由以下组成的组的物种:

链格孢属种、壳二孢属种、曲霉属种、葡萄孢属种、尾孢属种、刺盘孢属种、色二孢属种、白粉菌属种、镰刀菌属种、顶囊壳属种、长蠕孢属种、壳球孢属种、丛赤壳属种、霜霉属种、层锈菌属种、茎点霉属种、瘤梗孢属种、疫霉属种、单轴霉属种、柄锈菌属种、叉丝单囊壳属种、核腔菌属种、梨孢属种、腐霉属种、丝核菌属种、小菌核属种、核盘菌属种、壳针孢属种、根串珠霉属种、钩丝壳属种、黑星菌属种和轮枝孢菌属种。

[0134] 81. 如77至80中任一个所述的方法,其中所述转基因植物是转基因粮食作物植物。

[0135] 82. 如81所述的方法,其中所述转基因粮食作物植物选自由以下组成的组:玉米、大豆、小麦、甘蔗、稻和马铃薯。

[0136] 83. 一种重组双链DNA分子,其包含操作性地连接以达成表达的:

[0137] a)在植物细胞中起导致邻近编码序列转录成RNA的作用的启动子;

[0138] b)任选地,内含子;

[0139] c)编码抗真菌蛋白质或肽的核苷酸序列,所述抗真菌蛋白质或肽包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列,并且在所述抗真菌蛋白质或肽的N末端包含植物物质外体、液泡或内质网靶向氨基酸序列;和

[0140] d)在植物细胞中起导致转录终止以及向所述转录RNA的3'末端添加多聚腺苷酸核苷酸的作用的3'非翻译序列。

[0141] 84. 如83所述的重组双链DNA分子,其中所述启动子是根特异性启动子。

[0142] 85. 如84所述的重组双链DNA分子,其中所述根特异性启动子选自由以下组成的组:RB7、RD2、ROOT1、ROOT2、ROOT3、ROOT4、ROOT5、ROOT6、ROOT7和ROOT8。

[0143] 86. 如83至85中任一个所述的重组双链DNA分子,其针对在目标植物中的表达加以密码子优化。

[0144] 87. 如86所述的重组双链DNA分子,其中所述目标植物选自由以下组成的组:玉米、大豆、小麦、甘蔗、稻和马铃薯。

[0145] 88. 一种包含重组双链DNA分子的表达构建体,所述分子包含可操作地连接以达成表达的:

[0146] a)在植物细胞中起导致邻近编码序列转录成RNA的作用的启动子;

[0147] b)任选地,内含子;

[0148] c)编码抗真菌蛋白质或肽的核苷酸序列,所述抗真菌蛋白质或肽包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列,并且在所述抗真菌蛋白质或肽的N末端包含植物物质外体、液泡或内质网靶向氨基酸序列;和

[0149] d)在植物细胞中起导致转录终止以及向所述转录RNA的3'末端添加多聚腺苷酸核苷酸的作用的3'非翻译序列。

[0150] 89. 如88所述的表达构建体,其中所述启动子是根特异性启动子。

[0151] 90. 如89所述的表达构建体,其中所述根特异性启动子选自由以下组成的组:RB7、RD2、ROOT1、ROOT2、ROOT3、ROOT4、ROOT5、ROOT6、ROOT7和ROOT8。

[0152] 91. 如89至90中任一个所述的表达构建体,其中所述重组双链DNA分子针对在目标植物中的表达加以密码子优化。

[0153] 92. 如91所述的表达构建体,其中所述目标植物选自由以下组成的组:玉米、大豆、小麦、甘蔗、稻和马铃薯。

[0154] 93. 一种植物转化载体,其包含83至87中的任一个的所述重组双链DNA分子、或88至92中的任一个的所述表达构建体、以及用于选择转化植物细胞的可选择或可评分标志物。

[0155] 94. 一种抗真菌组合物,其包含抗真菌蛋白质或肽及其任何组合,所述抗真菌蛋白质或肽包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列。

[0156] 95. 如94所述的抗真菌组合物,其中所述抗真菌蛋白质或肽或其组合以抗真菌有效量存在。

[0157] 96. 如94或95所述的抗真菌组合物,其进一步包含农业上或药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0158] 97. 如94至96中任一个所述的抗真菌组合物,其中所述抗真菌蛋白质或肽或其组合以在每毫升约0.1微克至每毫升约500毫克的范围内的浓度存在。

[0159] 98. 如94至96中任一个所述的抗真菌组合物,其中所述抗真菌蛋白质或肽或其组合以在每毫升约5微克至每毫升约250毫克的范围内的浓度存在。

[0160] 99. 如94至98中任一个所述的抗真菌组合物,其具有在约3至约9的范围内的pH。

[0161] 100. 如94至99中任一个所述的抗真菌组合物,其与一种或多种选自由以下组成的组的添加剂一起配制:惰性物质、表面活性剂和溶剂。

[0162] 101. 如94至100中任一个所述的抗真菌组合物,其被配制在一种或多种选自由以下组成的组的其它活性剂的混合物中:杀虫活性物质、肥料、杀虫剂、引诱剂、灭菌剂、杀螨剂、杀线虫剂、除草剂和生长调控剂。

[0163] 102. 如101所述的抗真菌组合物,其中所述杀虫活性物质选自由以下组成的组:真菌抗生素和化学杀真菌剂。

[0164] 103. 如102所述的抗真菌组合物,其中所述真菌抗生素或化学杀真菌剂选自由以下组成的组:多氧霉素(polyoxine)、尼柯霉素(nikkomycine)、氨基甲酰胺、芳族碳水化合物、萎锈灵(carboxine)、吗啉、固醇生物合成抑制剂和有机磷酸酯。

[0165] 104. 94-103中的任一个的所述抗真菌组合物的用途,其用以抑制易感真菌物种的生长。

[0166] 105. 如104所述的用途,其中所述易感真菌物种选自由以下组成的组:链格孢属种、壳二孢属种、曲霉属种、葡萄孢属种、尾孢属种、刺盘孢属种、色二孢属种、白粉菌属种、镰刀菌属种、顶囊壳属种、长蠕孢属种、壳球孢属种、丛赤壳属种、霜霉属种、层锈菌属种、茎点霉属种、瘤梗孢属种、疫霉属种、单轴霉属种、柄锈菌属种、叉丝单囊壳属种、核腔菌属种、梨孢属种、腐霉属种、丝核菌属种、小菌核属种、核盘菌属种、壳针孢属种、根串珠霉属种、钩丝壳属种、黑星菌属种和轮枝孢菌属种。

[0167] 106. 如94至103中任一个所述的抗真菌组合物,其用于抑制易感真菌物种的生长。

[0168] 107. 如106所述的用途,其中所述易感真菌物种选自由以下组成的组:链格孢属种、壳二孢属种、曲霉属种、葡萄孢属种、尾孢属种、刺盘孢属种、色二孢属种、白粉菌属种、镰刀菌属种、顶囊壳属种、长蠕孢属种、壳球孢属种、丛赤壳属种、霜霉属种、层锈菌属种、茎

点霉属种、瘤梗孢属种、疫霉属种、单轴霉属种、柄锈菌属种、叉丝单囊壳属种、核腔菌属种、梨孢属种、腐霉属种、丝核菌属种、小菌核属种、核盘菌属种、壳针孢属种、根串珠霉属种、钩丝壳属种、黑星菌属种和轮枝孢菌属种。

[0169] 108. 如94至103中任一个所述的抗真菌组合物,其通过产生所述蛋白质、肽或其组合的植物定殖微生物,或通过包含所述植物定殖微生物的组合物来向植物场所提供。

[0170] 109. 如94或95所述的抗真菌组合物,其中所述蛋白质、肽或其组合由编码所述蛋白质、肽或其组合的DNA在转基因植物的细胞内表达。

[0171] 110. 一种控制、抗击或抑制易感真菌的方法,其包括使所述易感真菌与转基因植物接触,所述植物的细胞包含并表达编码抗真菌蛋白质或肽的核苷酸序列,所述抗真菌蛋白质或肽包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列,并且在所述抗真菌蛋白质或肽的N末端包含植物外体、液泡或内质网靶向氨基酸序列。

[0172] 111. 如110所述的方法,其中所述抗真菌蛋白质或肽在所述转基因植物的根的细胞中表达。

[0173] 112. 如111所述的方法,其中所述抗真菌蛋白质或肽由所述根细胞以抗真菌有效量表达。

[0174] 113. 如110至112中任一个所述的方法,其中所述易感真菌是选自由以下组成的组的物种:链格孢属种、壳二孢属种、曲霉属种、葡萄孢属种、尾孢属种、刺盘孢属种、色二孢属种、白粉菌属种、镰刀菌属种、顶囊壳属种、长蠕孢属种、壳球孢属种、丛赤壳属种、霜霉属种、层锈菌属种、茎点霉属种、瘤梗孢属种、疫霉属种、单轴霉属种、柄锈菌属种、叉丝单囊壳属种、核腔菌属种、梨孢属种、腐霉属种、丝核菌属种、小菌核属种、核盘菌属种、壳针孢属种、根串珠霉属种、钩丝壳属种、黑星菌属种和轮枝孢菌属种。

[0175] 114. 如110至113中任一个所述的方法,其中所述转基因植物选自由以下组成的组:玉米、大豆、小麦、甘蔗、稻和马铃薯。

[0176] 115. 一种包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的抗真菌蛋白质或肽:SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列,所述抗真菌蛋白质或肽用于人疗法中。

[0177] 116. 一种包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的抗真菌蛋白质或肽:SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列,所述抗真菌蛋白质或肽用于治疗易感真菌性感染。

[0178] 117. 包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的抗真菌蛋白质或肽的用途:SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列,所述抗真菌蛋白质或肽用于人疗法中。

[0179] 118. 包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的抗真菌蛋白质或肽的用途:SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列,所述抗真菌蛋白质或肽用于治疗易感真菌性感染。

[0180] 119. 包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的抗真菌蛋白质或肽的用途:SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列,所述抗真菌蛋白质或肽用于制造用以治疗易感真菌性感染的药剂。

[0181] 120.一种治疗有需要的患者的易感真菌性感染的方法,其包括向所述患者施用抗真菌有效量的包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的抗真菌蛋白质或肽及其任何组合:SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列。

[0182] 121.如120所述的方法,其中所述施用是经表面进行的。

[0183] 本发明的其它可适用性范围将根据以下提供的详细描述和附图而变得明显。然而,应了解尽管指示本发明的优选实施方案,但详细描述和特定实施例通过仅说明的方式给出,因为在本发明的精神和范围内的各种变化和修改将根据这个详细描述而变得对本领域技术人员明显。

[0184] 附图简述

[0185] 本发明的以上和其它方面、特征和优势将根据连同附图一起进行的以下详细描述而被更充分了解,所述详细描述和附图都通过仅说明的方式给出,并且不限制本发明,其中:

[0186] 图1显示用于制备MtDef5表达性大豆株系的转化载体AKK/FMV/Def5。“LB”=T-DNA左侧边界;“T-DNA RB”=T-DNA右侧边界;“tNOS”=胭脂碱合成酶终止子序列;“FMV”=玄参花叶病毒35S;“SU内含子”=超泛素内含子;“BAR”=双丙氨磷(Bialophos)抗性基因;“NOS”=胭脂碱合成酶启动子;“Ori”=复制起点;“TraF”=转移F;“Tet(R)”=四环素抗性基因;“Kan(R)”=卡那霉素抗性基因;“TrfA”=T-DNA复制因子,并且“Def5”表示MtDef5蛋白或肽编码序列。

[0187] 图2显示用于制备MtDef5表达性小麦株系的转化载体pZP212-Def5。“LB”=T-DNA左侧边界;“T-DNA RB”=T-DNA右侧边界;nptII=新霉素磷酸转移酶II;35S=CaMV35S启动子;Ubi和Ubi内含子=玉米Ubi1A启动子和内含子;TEV=烟草蚀刻病毒前导序列;Def5=MtDef5蛋白或肽编码序列;ter=CaMV 35S终止信号。

[0188] 图3显示在使禾谷镰刀菌PH-1分生孢子与肽一起孵育之后24小时,MtDef5.1a的化学合成GMA-5C肽GACHRQGFACFCYKK C(SEQ ID NO:58)的体外抗真菌活性的定量评估。值是三次重复的平均值。误差棒指示标准偏差。如先前所述测定肽的体外抗真菌活性(Ramamoorthy等(2007)Cellular Microbiology 9:1491-1506)。

[0189] 发明详述

[0190] 提供以下发明详述以辅助本领域技术人员实施本发明。即使如此,以下详细描述也不应解释为不适当地限制本发明,因为可由本领域普通技术人员在不脱离本发明发现的精神或范围下进行在本文实施方案中讨论的修改和变化。

[0191] 本说明书中讨论的各参考文献(包括其中引用的参考文献)的内容以引用的方式整体并入本文。

[0192] 本文所述的任何特征或特征的组合都包括在本公开的范围,条件是如将根据上下文、本说明书以及本领域普通技术人员的知识所显而易见,以任何所述组合包括的特征不互相不一致。本公开的其它优势和方面在以下详细描述和权利要求中是明显的。

[0193] MtDef5蛋白和肽的氨基酸和核苷酸序列以及适用于本发明的构建体、方法和生物体中的其它元件的氨基酸和核苷酸序列可见于说明书的末尾。由本发明涵盖的所有氨基酸和核苷酸序列都包括由以下组成、基本上由以下组成或包含以下的序列:明确公开的序列。



如将由本领域普通技术人员所了解,由于遗传密码的简并性,存在编码本文公开的蛋白质和肽分子的许多核苷酸序列。这些多核苷酸中的一些可携带与任何天然编码序列的核苷酸序列的最小同源性。

[0194] 此外,由于密码子使用差异而不同的多核苷酸由本发明明确涵盖,并且包括针对在单子叶植物、双子叶植物、酵母或细菌中表达加以优化的那些。Nakamura等(2000) *Nucl. Acids Res.* 28(1):292讨论并入优选密码子以增强多核苷酸在各种生物体中的表达。各种单子叶植物或双子叶植物基因中的密码子使用已公开于Kawabe和Miyashita(2003) “Patterns of codon usage bias in three dicot and four monocot plant species”, *Genes Genet. Syst.* 78:343-352以及Murray等(1989) “Codon Usage in Plant Genes” *NAR* 17:477-498中。用于优化植物中的密码子使用的方法也公开于美国专利号5,500,365;5,689,052;5,500,365;和5,689,052中。

[0195] MtDef5蛋白和肽编码核苷酸序列以及用于驱动它们的表达的启动子核苷酸序列可为基因组或非基因组核苷酸序列。编码MtDef5蛋白和肽以及启动子的基因组和非基因组核苷酸序列包括例如天然存在的mRNA、合成产生的mRNA、编码MtDef5蛋白和肽以及启动子的天然存在的核苷酸序列、或编码MtDef5蛋白和肽以及启动子的合成产生的核苷酸序列。合成核苷酸序列可通过本领域中熟知的手段,包括例如通过化学或酶促合成寡核苷酸来产生,并且包括例如cDNA、用于在不同转基因植物中高效表达,反映所述植物中的密码子使用样式的密码子优化序列、含有不不利影响它们的正常活性的保守性(或非保守性)氨基酸取代的变体、PCR扩增核苷酸序列等。

#### [0196] 定义

[0197] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与由本发明所属领域中的普通技术人员通常理解相同的含义。与本文所述的方法和材料类似或等效的任何方法和材料都可替代本文所述的方法和材料用于实施或测试本发明。

[0198] 出于本发明的目的,下文定义以下术语。

[0199] 本文公开的方法和组合物可应用于的术语“粮食作物植物”是指可直接食用或产生可食用产物,以及惯常用于直接或通过动物间接喂食人的植物。所述植物的非限制性实例包括:

[0200] 1. 谷类作物:小麦、稻、玉米(maize/corn)、大麦、燕麦、高粱、黑麦和粟;

[0201] 2. 蛋白质作物:花生、鹰嘴豆、扁豆、菜豆、大豆、利马豆;

[0202] 3. 根和块茎:马铃薯、甜薯和木薯;

[0203] 4. 油料作物:玉米、大豆、加拿大油菜(油菜籽)、小麦、花生、棕榈、椰子、红花、棉籽、向日葵、亚麻、橄榄和红花;

[0204] 5. 糖料作物:甘蔗和糖用甜菜;

[0205] 6. 果实作物:香蕉、橙、苹果、梨、面包果、菠萝和樱桃;

[0206] 7. 蔬菜作物和块茎:番茄、莴苣、胡萝卜、甜瓜、芦笋等

[0207] 8. 坚果:腰果、花生、胡桃、开心果(pistachio nut)、杏仁;

[0208] 9. 草料和草皮草;

[0209] 10. 草料豆科植物:苜蓿、三叶草;

[0210] 11. 药用作物:咖啡、可可、可乐果、罂粟;

[0211] 12. 香料和调味作物: 香草、鼠尾草、百里香、茴香、藏红花、薄荷醇、胡椒薄荷、绿薄荷、芫荽

[0212] 本发明方法和组合物也可应用于的术语“生物燃料作物”或“能量作物”包括以上条目4.中所列的油料作物,并且进一步包括如甘蔗、蓖麻子、亚麻芥属(*Camelina*)、柳枝稷、芒属(*Miscanthus*)和麻风树属(*Jatropha*)的植物。

[0213] 除非上下文另外明确指示,否则单数术语“一”和“所述”包括复数个指示物。类似地,除非上下文另外明确指示,否则用词“或”意图包括“和”。因此,包含A或B意指包括A或B、或A和B。

[0214] 就“约”来说,其意指量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、数量、重量、长度等相较于参照量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、数量、重量、长度等变化多达±30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1%。

[0215] 本文公开的针对相同组分或性质的所有范围的终点都是包括性的以及可独立组合的(例如“多达约25wt%,或更具体来说,约5wt%至约20wt%”的范围包括终点以及“约5wt%至约25wt%”等的范围的所有中间值)。

[0216] 如本文权利要求中所用的术语“包含”是开端的,并且意指权利要求必须具有其中明确叙述的所有特征,但不存在关于也存在未叙述的其它特征的阻挡。术语“包含”使权利要求开放以甚至大量包括未指定的成分。术语“基本上由…组成”在权利要求中意指本发明必定包括所列成分,并且对不实质上影响本发明的基本和新型性质的未列成分开放。“基本上由…组成”权利要求占据以闭合“由…组成”格式书写的闭合权利要求与以“包含”格式起草的完全开放权利要求之间的中间地段。如果以及当此举可变得必要时,那么这些术语可在本文中可互换使用。

[0217] 此外,术语“包括(including)”以及其它相关形式(如“includes”和“included”)的使用不具有限制性。

[0218] 术语“异源性”是指核酸片段或蛋白质对它的周围事物来说是外来的。在核酸片段的情形下,这通常通过将源于一种来源的所述片段引入不同宿主中来实现。异源性核酸片段,如已被插入宿主生物体中的编码序列,通常不见于宿主生物体的遗传互补体中。如本文所用,术语“异源性”也指核酸片段源于相同生物体,但位于这个生物体的基因组内的不同(例如非天然)位置中。因此,在基因组内,并且此外,在植物细胞的情况下,在细胞内的不同基因组内,例如在核基因组中以及也在质体或线粒体基因组内,生物体可具有超过通常拷贝数的位于它的(它们的)正常位置中的所述片段。关于它已被插入或转移至其中的生物体是异源性的核酸片段有时被称为“转基因”。

[0219] “异源性”MtDef5蛋白或肽编码核苷酸序列可为一个或多个额外拷贝的内源性MtDef5蛋白或肽编码核苷酸序列或来自另一植物或其它来源的核苷酸序列。此外,这些可为基因组或非基因组核苷酸序列。编码MtDef5蛋白或肽的非基因组核苷酸序列包括例如天然存在的mRNA;例如通过酶促合成或化学寡核苷酸合成产生的合成mRNA;合成产生的MtDef5蛋白或肽编码DNA序列,包括例如通过化学寡核苷酸合成或酶促合成制备的那些,包括例如cDNA;用于在不同转基因植物中高效表达,反映所述植物中的密码子使用样式的密码子优化序列;由于遗传密码的简并性而不同于天然存在的基因组序列,但仍然编码本文公开的MtDef5蛋白或肽的核苷酸序列;编码包含不不利影响它们的正常抗真菌活性的保守

性(或非保守性)氨基酸取代的MtDef5蛋白或肽的核苷酸序列;PCR扩增核苷酸序列;和为本领域普通技术人员所熟悉的其它非基因组形式的核苷酸序列。

[0220] 如转基因植物的“转基因”生物体是已被遗传工程改造以含有一种或多种异源性核酸片段,包括核苷酸编码序列、表达盒、载体等的宿主生物体。将异源性核酸引入宿主细胞中以产生转基因细胞不限于任何特定递送模式,并且包括例如显微注射、吸收、电穿孔、粒子枪轰击、晶须介导的转化、脂质体介导的递送、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)介导的转移、使用病毒和逆转录病毒载体等,如为本领域技术人员所熟知。

[0221] 术语“基因组”可总体指代植物细胞内的不同基因组,即核基因组、质体(例如叶绿体基因组)和线粒体基因组的总体,或当明确指示时单独指代这些个别基因组中的各个。除非另外指示,否则如本文所用,术语“基因组”是指核基因组。对于用于本发明重组方法和植物中的MtDef5蛋白或肽的表达来说的“基因组”是核基因组。然而,本公开也涵盖在例如叶绿体基因组的质体基因组中表达,或通过使用质体靶向序列使MtDef5蛋白或肽靶向如叶绿体的质体基因组。

[0222] 术语“对照植物”是指未引入性状改进重组DNA的植物。对照植物用作测量和比较包含所述性状改进重组DNA的转基因植物的性状改进所针对的标准。一种适合类型的对照植物是用于产生转基因植物的亲本株系的非转基因植物,即另外相同的野生型植物。另一类型的适合对照植物是包含无特定性状产生DNA的重组DNA,例如仅空载体的转基因植物。

[0223] 如本文所用的短语“抗真菌蛋白质”或“抗真菌肽”是指展现任何一种或多种以下特征的蛋白质和肽:抑制或延缓真菌细胞的生长;杀灭真菌细胞;破坏或延缓真菌生命周期的阶段,如孢子萌发、孢子形成或交配;和/或破坏真菌细胞在植物内的感染、渗透或散布。因此,净作用在于限制、降低或消除真菌发病机理和/或对植物的损害。

[0224] 如本文所用的短语“生物功能性等效物”等是指含有与本发明的MtDef5蛋白或肽的序列或结构特征类似或相同的序列或结构特征,并且展现本发明的MtDef5蛋白或肽的相同或类似(例如约±30%)抗真菌活性的肽、多肽和蛋白质。生物功能性等效物也包括与针对如本文公开的MtDef5蛋白或肽产生的单克隆和/或多克隆抗体反应(即特异性结合),并且与本发明的MtDef5蛋白或肽展现相同或类似(例如约±30%)抗真菌活性的肽、多肽和蛋白质。

[0225] 如本文所用的短语“抗击真菌损害”、“抗击或控制真菌损害”、“控制真菌损害”等是指降低由于受真菌病原体感染而对作物植物或作物植物产物的损害。更通常地,这些短语是指降低因在作物植物中存在非所需真菌而引起的不利影响。真菌生长的不利影响应理解为包括任何类型的植物组织损害或坏死、任何类型的植物产量降低、作物植物产物的任何价值降低、和/或产生不合需要的真菌代谢物或真菌生长副产物,包括但不限于霉菌毒素。

[0226] 如本文所用的短语“DNA构建体”是指其中两个或更多个通常不同的DNA序列已被共价连接的任何DNA分子。DNA构建体的实例包括但不限于质粒、粘粒、病毒、BAC(细菌人工染色体)、YAC(酵母人工染色体)、植物微型染色体、自主复制序列、噬菌体、或源于任何来源的能够进行基因组整合或自主复制的线性或环状单链或双链DNA序列。DNA构建体可通过多种方法来装配,所述方法包括但不限于重组DNA技术、DNA合成技术、PCR(聚合酶链反应)技术、或任何技术组合。

[0227] 如本文在表达MtDef5蛋白或肽的转基因植物或微生物、或用于抗真菌目的的含有MtDef5蛋白、肽或其任何组合的农业或药物组合物的情形下所用的短语“植物病原性真菌抑制量”或“抗真菌有效量”等视情况而定是指MtDef5蛋白和/或肽的以下量：其导致转基因植物中的真菌生长的任何可测量降低和/或由转基因植物中的真菌生长引起的不利影响的任何可测量降低，或在其中它被采用的特定应用中分别导致真菌生长的任何可测量降低和/或由真菌生长引起的不利影响的任何可测量降低。后者包括例如人和兽医学治疗应用。MtDef5蛋白或肽或其任何组合的抗真菌有效量是在向患者或受试者单次或多次剂量施用后提供所需预防或治疗的量或剂量。

[0228] 在转基因植物的情形下，MtDef5蛋白或肽的植物病原性真菌抑制量(抗真菌有效量)是至少约0.05PPM、至少约0.5PPM、至少约1.0PPM、或至少约2.0PPM，其中PPM是鲜重植物组织中存在的MtDef5蛋白或肽的“百万分率”，其中每1克鲜重植物组织1微克MtDef5蛋白或肽表示1PPM的浓度。

[0229] 如本文在DNA构建体的情形下所用的短语“异源性启动子”是指：i)源于不同于可操作地连接的结构编码序列的來源的启动子，或ii)与可操作地连接的结构基因源于相同來源的启动子，其中启动子的序列被从它的原始形式修饰。

[0230] 如本文所用的术语“同源物”是指就DNA序列或编码的蛋白质序列来说与第二基因相关的基因。作为同源物的基因可为通过物种形成事件而分离的基因(参见“直系同源物”)。作为同源物的基因也可为通过遗传复制事件而分离的基因(参见“旁系同源物”)。同源物可来自相同或不同生物体，并且可在相同或不同生物体中执行相同生物功能。

[0231] 如本文所用的短语“MtDef5蛋白或肽”是指：i)与本文公开的成熟MtDef5蛋白序列或肽序列具有至少约70%序列同一性的蛋白质或肽，和ii)与包含MtDef5信号肽和成熟MtDef5蛋白的MtDef5原蛋白序列具有至少约70%序列同一性的蛋白质。成熟MtDef5蛋白序列包括但不限于MtDef5.1a成熟蛋白质序列(SEQ ID NO:16)、MtDef5.1b成熟蛋白质序列(SEQ ID NO:17)、MtDef5.2成熟蛋白质序列(SEQ ID NO:18)、MtDef5.3成熟蛋白质序列(SEQ ID NO:19)、MtDef5.4成熟蛋白质序列(SEQ ID NO:20)、MtDef5.5成熟蛋白质序列(SEQ ID NO:21)和MtDef5.6成熟蛋白质序列(SEQ ID NO:22)以及其如分别通过SEQ ID NO:23-29例示的编码序列；与这些序列具有至少约70%序列同一性的蛋白质；以及这些序列的生物功能性等效物。MtDef5原蛋白序列包括但不限于MtDef5.1a原蛋白序列(SEQ ID NO:1)、MtDef5.1a-5.1b原蛋白序列(SEQ ID NO:4)、MtDef5.2原蛋白序列(SEQ ID NO:5)、MtDef5.3原蛋白序列(SEQ ID NO:6)、MtDef5.4原蛋白序列(SEQ ID NO:7)、MtDef5.5原蛋白序列(SEQ ID NO:8)和MtDef5.6原蛋白序列(SEQ ID NO:9)以及其如分别通过SEQ ID NO:10-15例示的编码序列；与这些序列具有至少约70%序列同一性的蛋白质；以及这些序列的生物功能性等效物。

[0232] 引起关注的是注意到成熟MtDef5.1a蛋白(SEQ ID NO:16)和成熟MtDef5.1b蛋白(SEQ ID NO:17)似乎以二聚体形式表达作为MtDef5.1a-MtDef5.1b原蛋白(SEQ ID NO:4)的组分，其中具有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列(即APKKVEP)的肽充当“连接体”。

[0233] 如本文所用的短语“抑制植物病原性真菌的生长”是指导致真菌生长的任何可测量降低的方法，其中真菌生长包括但不限于真菌细胞、孢子、分生孢子或菌丝体的数目和/或程度的任何可测量降低。如本文所用，“抑制植物病原性真菌的生长”也应理解为包括由

植物中的真菌生长引起的不利影响的任何可测量降低。植物中的真菌生长的不利影响包括任何类型的植物组织损害或坏死、任何类型的植物产量降低、作物植物产物的任何价值降低、和/或产生不合需要的真菌代谢物或真菌生长副产物,包括但不限于霉菌毒素。

[0234] 如本文所用的术语“直系同源物”是指不同物种中通过物种形成从共同祖先基因进化的两种或更多种同源基因。直系同源物可在不同物种中具有相同生物功能。

[0235] 如本文所用的短语“可操作地连接”是指使核酸序列接合以使一个序列可向连接的序列提供所需功能。在启动子的情形下,“可操作地连接”意指使启动子连接于目标序列以使那个目标序列的转录受那个启动子控制和调控。当目标序列编码蛋白质时,以及当需要表达那个蛋白质时,“可操作地连接”意指以所得转录物将被高效翻译的方式使启动子连接于序列。如果启动子连接于编码序列是转录性融合,并且需要表达编码的蛋白质,那么进行连接以使所得转录物中的第一翻译起始密码子是编码序列的起始密码子。或者,如果启动子连接于编码序列是翻译性融合,并且需要表达编码的蛋白质,那么进行连接以使与启动子和编码序列关联的5'未翻译序列中含有的第一翻译起始密码子被连接以使所得翻译产物与编码所需蛋白质的翻译开放阅读框同框。可被可操作地连接的核酸序列包括但不限于提供基因表达功能的序列(例如基因表达元件,如启动子、5'未翻译区域、内含子、蛋白质编码区域、3'未翻译区域、聚腺苷酸化位点和/或转录终止子)、提供DNA转移和/或整合功能的序列(例如T-DNA边界序列、位点特异性重组酶识别位点、整合酶识别位点)、提供选择性功能的序列(例如抗生素抗性标志物、生物合成基因)、提供可评分标志物功能的序列(例如报道体基因)、有助于体外或体内序列操作的序列(例如多聚连接体序列、位点特异性重组序列)和提供复制功能的序列(例如细菌复制起点、自主复制序列、着丝粒序列)。

[0236] 如本文所用的短语“同一性百分比”是指序列中在两个最优比对的DNA、RNA或蛋白质区段的确定长度内相同的基本单位(即氨基酸或核苷酸)的数目。为计算“同一性百分比”,相同基本单位的数目除以比对区段的确定长度中的基本单位总数,并且乘以100。当关于蛋白质使用同一性百分比时,应了解某些氨基酸残基可不相同,但仍然是反映具有类似化学性质的氨基酸残基(例如酸性或碱性、疏水性、亲水性、氢键供体或接受体残基)的取代的保守性氨基酸取代。所述取代可不改变分子的功能性质。因此,蛋白质序列的同一性百分比可被增加以虑及保守性氨基酸取代。

[0237] 如本文所用的术语“再生”是指从例如种子、原生质体、植物细胞、一组植物细胞、植物愈伤组织、或植物的切除碎片中的任一个获得完整植物的任何方法。

[0238] 术语“易感真菌(fungus)(或真菌(fungi))”、易感真菌性感染等是指对本文公开的MtDef5分子具有应答性,并且受所述分子的生长抑制或生长延缓作用和/或发病机理延缓作用不利影响的感染植物、人或动物患者或受试者的真菌或其真菌性感染。所述易感真菌可通过这些分子来杀灭,或它们的生命周期的阶段,如孢子萌发、孢子形成或交配;在植物或哺乳动物内的感染、渗透或散布通过MtDef5分子加以破坏或延缓。Def5分子对所述真菌和真菌性感染的净作用在于预防、限制、降低、处理、抑制或完全消除真菌发病机理和/或对与所述真菌接触的植物、人或动物的损害。易感真菌可通过任何本文公开的测定方法来鉴定。

[0239] 如本文所用的术语“转化”是指将外源性DNA序列(例如载体、重组DNA分子)引入细胞或原生质体中的过程,其中那个外源性DNA被并入染色体中,或能够自主复制。

[0240] 短语“转基因植物”是指源于转化植物细胞、原生质体或其它转化植物组织的植物或其子代,其中植物DNA含有最初不存在于相同物种的相应天然非转基因植物中的引入的外源性DNA分子。

[0241] 术语“治疗(treating)”(或“treat”或“treatment”)意指减缓、打断、遏止、控制、终止、减轻或逆转由植物或其它真菌病原体引起的症状、病症、病状或疾病的进展或严重性,并且可包括总体消除受影响植物或人或兽医学受试者的所有真菌性疾病相关的症状、病状或病症。

[0242] 如本文所用的术语“载体”是指能够在宿主细胞中复制和/或另一DNA或RNA区段可被操作性地与其连接以便导致连接的区段复制的DNA或RNA分子。质粒是一示例性载体。

[0243] 本发明提供适用于表达本文公开的MtDef5抗真菌蛋白质和肽的分离的DNA构建体。分离的DNA构建体包含异源性启动子、任选内含子、编码与SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中的任一个具有至少约85%序列同一性的MtDef5蛋白或肽的序列、和聚腺苷酸化序列,其中启动子、任选内含子、编码信号肽的序列、编码成熟MtDef5蛋白或肽的序列和聚腺苷酸化序列被可操作地连接以达成表达。

[0244] 本发明的分离的DNA构建体可进一步包含可操作地连接于编码MtDef5蛋白的序列的编码信号肽的序列。用于本发明的DNA构建体中的信号肽选自由以下组成的组:酵母信号肽、单子叶植物信号肽、双子叶植物信号肽和合成信号肽。酵母信号肽可选自由以下组成的组: $\alpha$ 因子信号肽、转化酶信号肽和PHO1信号肽。双子叶植物信号肽可选自由以下组成的组: MtDef1.1、MsDef1.6、MtDef2.1、MtDef4、MtDef5和烟草PR1b信号肽。单子叶植物信号肽可选自由以下组成的组:半胱氨酸胞内蛋白酶信号肽和 $\alpha$ -淀粉酶信号肽。MtDef5信号肽可选自由以下组成的组:SEQ ID NO:30-35信号肽序列。

[0245] 多种编码MtDef5蛋白和肽的DNA序列可用于本发明的DNA构建体中。一般来说,可使用编码与SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中的任一个具有至少约85%序列同一性的MtDef5蛋白或肽的序列。DNA构建体的编码的MtDef5蛋白或肽序列包括但不限于编码成熟MtDef5蛋白的序列。DNA构建体的编码的MtDef5蛋白和肽序列也包括编码包含MtDef5信号肽和成熟MtDef5蛋白的MtDef5原蛋白的核酸序列。MtDef5.1a-5.6原蛋白序列显示于SEQ ID NO:1和4-9中。本发明涵盖与这些序列具有至少70%序列同一性的蛋白质以及这些序列的生物功能性等效物。因此,由DNA构建体编码的MtDef5蛋白和肽可包含SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列。由DNA构建体编码的成熟MtDef5蛋白也可包含SEQ ID NO:16-22中所示的氨基酸序列。

[0246] 在本发明的某些实施方案中,分离的DNA构建体使用提供可操作地连接的序列在引入转基因植物中时的表达的启动子和聚腺苷酸化序列。编码与SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中的任一个至少约85%同一的MtDef5蛋白和肽的序列被可操作地连接于提供在转基因植物中的表达的启动子和聚腺苷酸化序列。提供在植物中的表达的启动子可选自由以下组成的组:组成性启动子、组织特异性启动子、应激诱导的启动子、时序启动子和真菌性感染诱导的启动子。组成性启动子选自由以下组成的组:CaMV35S启动子、FMV35S启动子、玉米泛素启动子和稻肌动蛋白启动子。聚腺苷酸化序列可选自由以下组成的组:CaMV35S、NOS、稻乳酸脱氢酶和小麦Hsp17聚腺苷酸化序列。

[0247] 在本发明的其它实施方案中,分离的DNA构建体可进一步包含内含子序列,其提供

可操作地连接的序列在引入植物的核基因组中时,以及在所述内含子序列可操作地连接于启动子、编码信号肽的序列、编码成熟MtDef5多肽的序列、和聚腺苷酸化序列时的表达。这个内含子序列可选自包含以下的组:稻肌动蛋白内含子、玉米hsp70内含子、玉米小亚单位RUBISCO内含子、玉米泛素内含子、玉米Adh1内含子、稻苯丙氨酸氨裂解酶内含子、蔗糖合成酶内含子、CAT-1内含子、pKANNIBAL内含子、PIV2内含子和超泛素内含子。

[0248] 提供成熟MtDef5蛋白在植物中的表达的DNA构建体可包含含有玉米泛素启动子和内含子、编码MtDef5信号肽与成熟MtDef5蛋白两者的合成MtDef5基因、和聚腺苷酸化信号的多核苷酸。提供成熟MtDef5蛋白在植物中的表达的另一DNA构建体可包含FMV启动子;超泛素内含子;编码信号肽、内含子和成熟MtDef5蛋白的基因组MtDef5序列;以及tNOS终止子。由本发明涵盖的DNA构建体包括提供MtDef5蛋白或肽在植物中的表达,进一步包含编码可操作地连接于MtDef5蛋白或肽的液泡靶向肽或内质网滞留肽的序列的DNA构建体。提供成熟MtDef5蛋白在植物中的表达的DNA构建体可包含FMV启动子;超泛素内含子;编码信号肽、内含子和可操作地连接于液泡或内质网靶向肽的成熟MtDef5蛋白的基因组MtDef5序列;以及tNOS终止子。

[0249] 本发明的DNA构建体可进一步包含编码可选择标志物的序列。这个可选择标志物通常用于选择含有DNA构建体的转基因植物。可选择标志物可选自由以下组成的组:新霉素磷酸转移酶蛋白、膦丝菌素(phosphinothricin)乙酰基转移酶蛋白、草甘膦抗性5-烯醇-丙酮酰基莽草酸-3-磷酸合成酶(EPSPS)蛋白、潮霉素磷酸转移酶蛋白、二氢蝶呤合成酶蛋白、磺酰脲不敏感性乙酰乳酸合成酶蛋白、莠去津(atrazine)不敏感性Q蛋白、能够降解溴苯腈的腈水解酶蛋白、能够降解茅草枯(dalapon)的脱卤素酶蛋白、2,4-二氯-苯氧基乙酸单氧合酶蛋白、甲氨蝶呤不敏感性二氢叶酸还原酶蛋白和氨基乙基半胱氨酸不敏感性章鱼碱(octopine)合成酶蛋白。

[0250] 本发明的DNA构建体可进一步包含编码可评分标志物的序列。这个可评分标志物通常用于鉴定含有DNA构建体的转基因植物。可评分标志物可选自由以下组成的组: $\beta$ -葡萄糖醛酸酶蛋白、绿色荧光蛋白、黄色荧光蛋白、 $\beta$ -半乳糖苷酶蛋白、由luc基因产生的荧光素酶蛋白、由lux基因产生的荧光素酶蛋白、唾液酸酶蛋白、链霉素磷酸转移酶蛋白、胭脂碱(nopaline)合成酶蛋白、章鱼碱合成酶蛋白和氯霉素乙酰基转移酶蛋白。

[0251] 本发明也提供转基因植物,其包含在所述植物中表达MtDef5蛋白和肽的以上提及的DNA构建体。转基因植物可为粮食作物植物或生物燃料作物植物以及单子叶植物或双子叶植物。本发明的转基因单子叶植物可选自由以下组成的组:大麦、玉米、亚麻、燕麦、稻、黑麦、高粱、草皮草、甘蔗和小麦。本发明的转基因双子叶植物可选自由以下组成的组:苜蓿、拟南芥属(*Arabidopsis*)、蒺藜苜蓿、香蕉、茎椰菜、菜豆、卷心菜、加拿大油菜、胡萝卜、木薯、花椰菜、芹菜、柑橘、棉花、葫芦、桉树、大蒜、葡萄、洋葱、莴苣、豌豆、花生、胡椒、马铃薯、白杨树、松树、向日葵、红花、大豆、草莓、糖用甜菜、甜薯、烟草和番茄。

[0252] 在本发明的其它实施方案中,DNA构建体使用提供可操作地连接的序列在引入酵母细胞中时的表达的启动子和聚腺苷酸化序列。这个启动子可选自由以下组成的组:AOX1启动子、AOX2启动子、PHO启动子、MOX启动子、DAS启动子、ADH启动子、GAPDH启动子和LAC4启动子。这个聚腺苷酸化序列可选自由以下组成的组:AOX1、AOX2、CYC1、p40、p76、MOX、LAC4和肌动蛋白聚腺苷酸化序列。DNA构建体可包含编码可操作地连接的AOX1启动子、酵母 $\alpha$ 因子

信号序列、成熟MtDef5防御素序列和AOX1聚腺苷酸化序列的多核苷酸。或者，DNA构建体可包含编码可操作地连接的AOX1启动子、酵母 $\alpha$ 因子信号序列、成熟MtDef5防御素序列和AOX1聚腺苷酸化序列的多核苷酸。

[0253] 用于在酵母中表达成熟MtDef5蛋白或肽的DNA构建体可进一步包含可选择或可评分标志物基因。可选择标志物基因可选自由编码以下的基因组成的组：ADE蛋白、HIS5蛋白、HIS4蛋白、LEU2蛋白、URA3蛋白、ARG4蛋白、TRP1蛋白、LYS2蛋白、赋予对博莱霉素(bleomycin)或腐草霉素(phleomycin)抗生素的抗性的蛋白质、赋予对氯霉素的抗性的蛋白质、赋予对G418或遗传霉素(geneticin)的抗性的蛋白质、赋予对潮霉素的抗性的蛋白质、赋予对甲氨蝶呤的抗性的蛋白质、ARO4-OFP蛋白和FZF1-4蛋白。

[0254] 可评分标志物基因可选自由编码以下的基因组成的组： $\beta$ -葡萄糖醛酸酶蛋白、绿色荧光蛋白、黄色荧光蛋白、 $\beta$ -半乳糖苷酶蛋白、由luc基因产生的荧光素酶蛋白、由lux基因产生的荧光素酶蛋白、唾液酸酶蛋白、链霉素磷酸转移酶蛋白、胭脂碱合成酶蛋白、章鱼碱合成酶蛋白和氯霉素乙酰基转移酶蛋白。

[0255] 本发明也提供包含以上提及的DNA构建体的酵母细胞，所述DNA构建体包含提供可操作地连接的编码MtDef5蛋白和肽的序列在酵母中的表达的启动子和聚腺苷酸化序列。酵母细胞可选自由以下组成的组：假丝酵母属(*Candida*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、汉逊酵母属(*Hansuela*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、酵母属(*Saccharomyces*)、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)和耶罗威亚酵母属(*Yarrowia*)。

[0256] 本发明进一步提供获得能够抑制植物病原性真菌的生长的转基因植物的方法。这些方法包括以下步骤：引入提供MtDef5蛋白或肽在植物、植物细胞或植物组织中的表达的DNA构建体，以及获得包含DNA构建体，表达植物病原性真菌抑制量的MtDef5蛋白或肽的转基因植物。为实施这个方法，可通过例如选自由以下组成的组的方法将DNA构建体引入植物中：粒子轰击、DNA转染、DNA电穿孔和T-DNA介导的转化。

[0257] 用于这个方法某些实施方案中的DNA构建体可进一步包含可选择标志物基因。当DNA构建体进一步包含可选择标志物基因时，通过使植物、植物细胞或植物组织在需要表达可选择标志物基因以达成植物生长的条件下生长来获得本发明的转基因植物。这个可选择标志物基因可选自由编码以下的基因组成的组：新霉素磷酸转移酶蛋白、磷丝菌素乙酰基转移酶蛋白、草甘膦抗性5-烯醇-丙酮酰基莽草酸-3-磷酸合成酶(EPSPS)蛋白、潮霉素磷酸转移酶蛋白、二氢蝶呤合成酶蛋白、磺酰脲不敏感性乙酰乳酸合成酶蛋白、莠去津不敏感性Q蛋白、能够降解溴苯腈的腈水解酶蛋白、能够降解茅草枯的脱卤素酶蛋白、2,4-二氯苯氧基乙酸单氧合酶蛋白、甲氨蝶呤不敏感性二氢叶酸还原酶蛋白和氨乙基半胱氨酸不敏感性章鱼碱合成酶蛋白。

[0258] 获得转基因植物的这些方法也可采用进一步包含在植物中起作用的可评分标志物基因的DNA构建体。在这个情况下，测定可评分标志物基因的表达以获得转基因植物细胞或再生转基因植物。可评分标志物基因可选自由编码以下的基因组成的组： $\beta$ -葡萄糖醛酸酶蛋白、绿色荧光蛋白、黄色荧光蛋白、 $\beta$ -半乳糖苷酶蛋白、由luc基因产生的荧光素酶蛋白、由lux基因产生的荧光素酶蛋白、唾液酸酶蛋白、链霉素磷酸转移酶蛋白、胭脂碱合成酶蛋白、章鱼碱合成酶蛋白和氯霉素乙酰基转移酶蛋白。

[0259] 在这个方法中，可通过测定MtDef5编码转基因在转基因植物中的表达来获得表达



植物病原性真菌抑制量的成熟MtDef5蛋白或肽的转基因植物。可通过例如选自由以下组成的组的方法来测定MtDef5编码转基因的表达：免疫测定、酶联免疫测定、基于通过RNA杂交进行的检测的测定、以及基于通过逆转录酶聚合酶链反应进行的检测的测定。或者，通过使转基因植物暴露于植物病原性真菌，以及确定植物病原性真菌的生长是否受抑制来测定MtDef5编码转基因的表达。成熟MtDef5蛋白的植物病原性真菌抑制量是至少约0.05PPM、约0.5PPM、约1.0PPM或约2.0PPM，其中PPM是鲜重植物组织中存在的MtDef5蛋白的“百万分率”。通常，每克鲜重的转基因植物组织存在微克量的MtDef5蛋白。在优选实施方案中，MtDef5蛋白的植物病原性真菌抑制量是至少约0.5PPM。在更优选实施方案中，MtDef5的植物病原性真菌抑制量是至少约1.0PPM。在最优选实施方案中，MtDef5的植物病原性真菌抑制量是至少约2.0PPM。

[0260] 这个方法提供对多种MtDef5分子易感植物病原性真菌的生长抑制。通过方法抑制的植物病原性真菌可选自由以下组成的组：链格孢属种、壳二孢属种、曲霉属种、葡萄孢属种；尾孢属种、刺盘孢属种、色二孢属种、白粉菌属种、镰刀菌属种、顶囊壳属种、长蠕孢属种、壳球孢属种、丛赤壳属种、霜霉属种、层锈菌属种、茎点霉属种、瘤梗孢属种、疫霉属种、单轴霉属种、柄锈菌属种、叉丝单囊壳属种、核腔菌属种、梨孢属种、腐霉属种、丝核菌属种、小菌核属种、核盘菌属种、壳针孢属种、根串珠霉属种、钩丝壳属种、黑星菌属种和轮枝孢菌属种。

[0261] 本发明也提供通过本文所述的方法产生的能够抑制植物病原性真菌的生长的转基因植物。因此，本发明也涵盖通过包括以下步骤的方法产生的转基因植物：将本发明的DNA构建体引入植物、植物细胞或植物组织中，以及获得包含DNA构建体，表达植物病原性真菌抑制量的MtDef5蛋白或肽的转基因植物。成熟MtDef5蛋白或肽的植物病原性真菌抑制量是至少约0.05PPM、0.5PPM、1.0PPM或2.0PPM，其中PPM是鲜重植物组织中存在的MtDef5蛋白的“百万分率”。

[0262] 本发明进一步提供产生与SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中所示的氨基酸序列具有至少约85%序列同一性的MtDef5蛋白或肽的方法。用于产生成熟MtDef5蛋白或肽的方法包括以下步骤：在其中酵母细胞表达MtDef5蛋白或肽的条件下培养包含提供MtDef5蛋白或肽在酵母中的表达的DNA构建体的酵母细胞，以及从先前步骤的培养物分离MtDef5蛋白或肽。MtDef5蛋白或肽可在第二步中从细胞培养基分离。或者，MtDef5蛋白或肽可从酵母细胞分离。在这个方法的某些实施方案中，MtDef5蛋白是成熟MtDef5蛋白。用于这个方法中的酵母细胞可为包含DNA构建体的毕赤酵母属细胞，所述DNA构建体含有可操作地连接于编码信号肽的序列的AOX1启动子和编码成熟MtDef5蛋白的序列，并且提供成熟MtDef5蛋白的表达的条件将包括在甲醇存在下培养毕赤酵母属细胞。

[0263] 本发明也提供一种识别与序列SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中的任一个具有至少约85%序列同一性的MtDef5蛋白或肽的抗体。本发明也提供用于特异性检测与SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中的任一个具有至少约85%序列同一性的MtDef5蛋白或肽的试剂盒，其包括识别与SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中的任一个具有至少约85%序列同一性的MtDef5蛋白或肽的抗体，以及用于检测抗体的试剂。

[0264] 本发明也提供某些分离的核苷酸序列。本发明的分离的核苷酸序列包括选自由SEQ ID NO:10-15、23-29、和65-78组成的组的MtDef5编码序列、以及选自由SEQ ID NO:30-

35和42-48组成的组的MtDef5或其它信号肽编码序列。进一步涵盖源于以上序列的寡核苷酸。所述寡核苷酸可用于鉴定含有指示的核苷酸序列的转基因植物,或鉴定从这些转基因植物获得的材料。也涵盖用于使用这些寡核苷酸鉴定转基因植物材料的方法和用于执行这些方法的试剂盒。

[0265] 本发明也提供如以各种方式显示于SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中的各种分离的纯化MtDef5原蛋白序列、成熟序列和肽序列;以及如SEQ ID NO:10-15、23-29、和65-78中所示的其编码序列,分别如上所指示。

[0266] 包含植物表达盒的DNA构建体

[0267] 用于单子叶或双子叶植物中的表达盒的构建是明确确定的。表达盒是其中各种启动子序列、编码序列和聚腺苷酸化序列被可操作地连接的DNA构建体。一般来说,表达盒通常包含可操作地连接于目标序列的启动子,所述目标序列可操作地连接于聚腺苷酸化或终止子区域。在包括但不限于在单子叶植物中表达转基因的某些情况下,也可适用的是包括内含子序列。当包括内含子序列时,它通常被放置在转基因的5'未翻译前导区域中。在某些情况下,也可适用的是在转基因中并入特定5'未翻译序列以增强转录物稳定性或促进转录物的高效翻译。

[0268] 启动子

[0269] 多种启动子可用于实施本发明。一类广泛、适用启动子被称为“组成性”启动子,因为它们在整个植物发育期间在大多数植物器官中具有活性。举例来说,启动子可为病毒启动子,如CaMV35S或FMV35S启动子。CaMV35S和FMV35S启动子在多种转化植物组织和大多数植物器官(例如愈伤组织、叶、种子和根)中具有活性。增强或重复形式的CaMV35S和FMV35S启动子特别适用于实施本发明(美国专利号5,378,619,以引用的方式整体并入本文)。其它适用启动子包括胭脂碱合成酶(NOS)和章鱼碱合成酶(OCS)启动子(其被携带在根癌土壤杆菌(*A. tumefaciens*)肿瘤诱发性质粒上)、花椰菜花叶病毒(CaMV)19S启动子、玉米泛素启动子、稻Act1启动子和玄参花叶病毒(FMV)35S启动子(参见例如美国专利号5,463,175,以引用的方式整体并入本文)。应了解这组示例性启动子是非限制性的,并且本领域技术人员可在本发明的实施中采用此处未明确引用的其它启动子。

[0270] 在某些植物组织中具有活性的启动子(即组织特异性启动子)也可用于驱动MtDef5蛋白和肽的表达。预期MtDef5蛋白和肽在通常受真菌病原体感染的组织中的表达是特别适用的。因此,在繁殖性组织、种子、根、茎干或叶中表达可特别适用于抗击某些作物中由某些真菌病原体对那些组织的感染。适用组织特异性发育调控启动子的实例包括但不限于 $\beta$ -伴大豆球蛋白7S启动子(Doyle等,1986)、种子特异性启动子(Lam和Chua,1991)、以及与油菜籽蛋白、菜豆蛋白、玉米蛋白、大豆胰蛋白酶抑制剂、ACP、硬脂酰基-ACP去饱和酶或油脂蛋白基因相关的启动子。根特异性启动子的实例包括但不限于分别描述于美国专利5,459,252和5,837,876中的RB7和RD2启动子。

[0271] 另一类适用启动子是由各种环境刺激物诱导的启动子。由环境刺激物诱导的启动子包括但不限于由热诱导的启动子(例如热激启动子,如Hsp70)、由光诱导的启动子(例如来自1,5-双磷酸核酮糖羧化酶的小亚单位ssRUBISCO(一种极其充足的植物多肽)的光诱导性启动子)、由冷诱导的启动子(例如COR启动子)、由氧化应激诱导的启动子(例如催化酶启动子)、由干旱诱导的启动子(例如小麦Em和稻rab16A启动子)、以及由多种环境信号诱导的

启动子(例如rd29A启动子、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)启动子)。

[0272] 由植物中的真菌性感染诱导的启动子也可用于驱动MtDef5蛋白和肽的表达。由真菌性感染诱导的适用启动子包括与类苯丙烷代谢中涉及的基因(例如丙氨酸氨裂解酶、查耳酮(chalcone)合成酶启动子)、修饰植物细胞壁的基因(例如富含羟基脯氨酸的糖蛋白、富含甘氨酸的蛋白质和过氧化物酶启动子)、编码降解真菌细胞壁的酶的基因(例如几丁质酶或葡聚糖酶启动子)、编码索马甜(thaumatin)样蛋白启动子的基因、或编码在真菌性感染后显示显著诱导的功能未知蛋白质的基因相关的那些启动子。分别指定为Mis1和Fis1的玉米和亚麻启动子也由植物中的真菌性感染诱导,并且可被使用(美国专利申请20020115849)。

[0273] 视寻求保护所针对的真菌而定,本发明MtDef5蛋白和肽可在真菌攻击所处的植物中的任何组织或器官中表达。在例如镰刀菌属的情况下,优选表达部位在根中。在通过进入外部植物表面进行感染的那些真菌的情况下,MtDef5蛋白和肽在质外体中积累是优选的,并且这些分子可通过使用组织特异性启动子而在根、茎干、叶等中表达。

[0274] 在植物生命周期中的特定发育阶段具有活性的启动子也可用于在最需要对真菌性感染和/或损害的抗性时优化所述抗性。

[0275] 内含子

[0276] 内含子也可包括在DNA表达构建体中,尤其在当目标序列将在单子叶植物中表达时的情况下。对于单子叶植物使用,可使用如玉米hsp70内含子(美国专利号5,424,412;以引用的方式整体并入本文)、玉米泛素内含子、Adh内含子1(Callis等,1987)、蔗糖合成酶内含子(Vasil等,1989)或稻Act1内含子(McElroy等,1990)的内含子。适用的双子叶植物内含子包括已被可操作地整合至转基因中的内含子,如CAT-1内含子(Cazzonelli和Velten,2003)、pKANNIBAL内含子(Wesley等,2001;Collier等,2005)、PIV2内含子(Mankin等,1997)和“超泛素”内含子(美国专利号6,596,925,以引用的方式整体并入本文;Collier等,2005)。应了解这组示例性内含子是非限制性的,并且本领域技术人员可在本发明的实施中采用此处未明确引用的其它内含子。

[0277] 本发明的某些实施方案包括编码有助于成熟MtDef5蛋白或肽从植物细胞分泌的信号肽的序列。MtDef5.1a-5.6cDNA(SEQ ID NO:1和4-9)的部分含有编码可用于使MtDef5蛋白或肽从植物或其它细胞分泌的MtDef5信号肽的序列(SEQ ID NO:30-35)。

[0278] MtDef5信号肽-编码序列可以多种方式用于本发明的DNA构建体中。这些MtDef5信号序列可为在给定MtDef5cDNA或基因组克隆中与给定MtDef5原蛋白编码序列相关的MtDef5信号序列。或者,MtDef5信号肽可被可操作地连接于不同成熟MtDef5蛋白(或MtDef5肽)编码序列(即MtDef5信号肽和源于不同基因组或cDNA克隆的成熟蛋白质(或肽)编码序列可被可操作地连接)。在DNA构建体中,编码包含MtDef5信号肽与成熟MtDef5蛋白两者的任何MtDef5原蛋白的核苷酸序列也可替代两个不同信号肽和成熟MtDef5蛋白编码序列加以使用。由这些序列编码的MtDef5原蛋白包括但不限于包括SEQ ID NO:1和4-9的MtDef5原蛋白序列、与这些序列具有至少约70%序列同一性的蛋白质、以及这些序列的生物功能性等效物。预期MtDef5信号肽可用于使成熟MtDef5蛋白和肽从单子叶植物或双子叶植物细胞分泌。也可使用编码MtDef5信号肽序列的合成核苷酸序列。所述合成序列可通过应用遗传密码来从本文公开的MtDef5信号肽序列推演。表1提供可用于使成熟MtDef5或其它蛋白质

从细胞分泌的MtDef5和其它信号肽的清单。

[0279] 表1

[0280] MtDef5和MtDef4信号肽序列

SEQ ID NO:	氨基酸序列	来源
SEQ ID NO:30	MTSSASKFYTIFVCLAFLLFISTSEVEA	MtDef5.1a-5.1b
SEQ ID NO:31	MASSSPKLFITIFLFLILVLLFSTSEVQA	MtDef5.2
SEQ ID NO:32	MTSSATKFYTIFVCLALLISICEVEA	MtDef5.3
SEQ ID NO:33	MASSTLKFNTIFLFLSLALLFFFTLEVQG	MtDef5.4
SEQ ID NO:34	MASSALKYYTFFLFFILALILLPTLEVQG	MtDef5.5
SEQ ID NO:35	MVCTEVQA	MtDef5.6
[0281] SEQ ID NO:48	MARSVPLVSTIFVFLLLLIVATGPSMVAEA	MtDef4 信号肽共有序列
SEQ ID NO:42	MARSVPLVSTIFVFLLLLIVATGPSMVAEA	MtDef4.1(H33R)
SEQ ID NO:43	MARSVPLVSTIFVFFLLIVATEMGPMSVAA	MtDef4.2
SEQ ID NO:44	MARSVPLVSTIFVFFLLIVATEMGPIMVAEA	MtDef4.3
SEQ ID NO:45	MARSVFLVSTIFVFLLVIVATGPSMVAEA	AL385796*
SEQ ID NO:46	MARSVSLVFTIFVFLLLLIVATGPSMVAEA	AW573770*
SEQ ID NO:47	MARSVPLVSTIFVFLLLLIVATGPSMVGEA	BE999096*

[0282] \*GenBank登记号(包括信号肽和成熟肽序列)

[0283] 或者,可使用源于其它苜蓿属防御素蛋白的信号肽序列(Hanks等,2005)。所述其它苜蓿属防御素蛋白信号肽的实例包括但不限于MtDef1.1、MsDef1.6和MtDef2.1的信号肽。可用于单子叶植物中的适用信号肽编码序列的另一实例是源于大麦半胱氨酸胞内蛋白酶基因的信号肽(Koehler和Ho,1990)。可用于双子叶植物中的适用信号肽编码序列的另一实例是烟草PR1b信号肽。这组信号肽意图是示例性以及非限制性的,并且本领域技术人员可在本发明的实施中采用此处未明确引用的其它信号肽。

[0284] 在本发明中,编码成熟MtDef5蛋白或肽的序列通常被连接于信号肽编码序列。多种编码多种成熟MtDef5蛋白和肽的DNA序列可用于实施本发明。DNA序列可编码成熟MtDef5蛋白和肽,其包括但不限于SEQ ID NO:16-22和49-64中所示的氨基酸序列、以及任何前述氨基酸序列的生物功能性等效物。MtDef5原蛋白、成熟蛋白或肽的生物功能性等效物也包括但不限于与SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中的任一个具有至少约85%序列同一性的MtDef5原蛋白、成熟蛋白和肽。在本发明的某些实施方案中,成熟MtDef5蛋白或肽编码序列可源于或获得于从蒺藜苜蓿植物组织获得的基因组DNA或cDNA。已描述用于从蒺藜苜蓿获得类似防御素基因的所述方法(Hanks等,2005)。天然或内源性MtDef5编码核苷酸序列源于双子叶植物,其中它通常在内源性MtDef5启动子序列的控制下表达。因此,预期内源性或天然存在的MtDef5编码核苷酸序列可在植物中表达。一般来说,编码MtDef5蛋白和肽的核酸

可从MtDef5共有核苷酸序列;从通过MtDef5多肽序列的“回译”获得的合成MtDef5基因;从基因组克隆;从源于基因组克隆的推演编码序列;从cDNA或EST序列;以及从已经受诱变的任何前述序列获得。含有成熟MtDef5蛋白编码核苷酸序列的核酸的实例包括但不限于SEQ ID NO:10-15和23-29。编码各种MtDef5蛋白和肽的核苷酸序列也可通过移除推演内含子序列以获得MtDef5蛋白和肽的推演MtDef5编码序列来从基因组序列获得。从MtDef5基因组克隆移除内含子序列可通过体外诱变技术来实现。或者,内含子序列可被电子移除(在计算机文件中),并且通过标准DNA合成技术来合成所得推演编码序列。也应注意密切相关的植物紫苜蓿可为编码与本发明的MtDef5蛋白和肽相同或另外生物等效的MsDef4蛋白的MsDef4EST的来源。因此,编码本发明的MtDef5蛋白和肽的核苷酸序列也可源于如紫苜蓿的其它苜蓿属种,并且可用于本发明中。以上提及的含有编码成熟MtDef5蛋白和肽的序列的核苷酸序列的部分可通过标准重组DNA技术,或通过DNA合成方法来可操作地连接于它们通常与其连接的天然MtDef5信号肽序列,或可操作地连接于另一信号肽。

[0285] 在本发明的其它实施方案中,MtDef5编码核苷酸序列可根据本文公开的MtDef5蛋白或肽序列重新合成。MtDef5编码核苷酸序列的序列可通过使用遗传密码从MtDef5蛋白或肽序列推演。如“BackTranslate”(GCG™程序包,Acclerys,Inc.San Diego,CA)的计算机程序可用于将蛋白质或肽序列转换成编码所述蛋白质或肽的相应核苷酸序列。

[0286] 此外,合成MtDef5编码核苷酸序列可被设计以使它将在植物中最优表达。美国专利号5,500,365描述一种用于合成植物基因以使由合成基因编码的蛋白质的表达水平最优化的方法。这个方法涉及修饰外源性转基因的结构基因序列以使得它们更具“植物样”,并且因此由植物更高效转录、加工、翻译和表达。在植物中良好表达的基因的特征包括使用通常由植物宿主使用的密码子,以及消除可导致基因转录物的编码区域中的非所需内含子剪接或聚腺苷酸化的序列。一种用于获得转基因在单子叶植物中的增强表达的类似方法公开于美国专利号5,689,052中。此外,美国专利号5,500,365和美国专利号5,689,052中公开的合成设计方法也可用于合成针对一般来说在植物中,具体来说在单子叶植物中的表达加以优化的信号肽编码序列。

[0287] 在本发明的其它实施方案中,编码提供MtDef5定位在亚细胞器中的肽的序列可被可操作地连接于编码MtDef5蛋白或肽的序列。预期可操作地连接于信号肽的MtDef5蛋白和肽会进入分泌路径,并且可通过使适当滞留或靶向肽可操作地连接于MtDef5蛋白或肽的C末端来被如内质网(ER)的细胞器滞留,或靶向液泡。液泡靶向肽的实例包括但不限于来自大麦凝集素基因的CTPP液泡靶向信号。ER靶向肽的实例包括但不限于包含KDEL氨基酸序列的肽。

[0288] MtDef5蛋白和肽定位在内质网或液泡中可提供合乎需要的性质,如转基因植物中的表达增加和/或抑制转基因植物中的真菌生长的功效增加。

[0289] 如上所指示,目标序列也可被可操作地连接于含有聚腺苷酸化信号的3'非翻译区域。这个聚腺苷酸化信号提供向RNA的3'末端添加多聚腺苷酸序列。土壤杆菌属肿瘤诱发性(Ti)质粒胭脂碱合成酶(NOS)基因3'和豌豆ssRUBISCO E9基因3'非翻译区域含有多聚腺苷酸信号,并且表示可用于实施本发明的所述3'非翻译区域的非限制性实例。应了解这组示范性聚腺苷酸化区域是非限制性的,并且本领域技术人员可在本发明的实施中采用此处未明确引用的其它聚腺苷酸化区域。

[0290] 包含上述植物表达盒的DNA构建体通常维持在各种载体中。载体含有提供载体和共价连接的序列在宿主细胞中的复制的序列。举例来说,细菌载体将含有允许载体在一种或多种细菌宿主中复制的复制起点。土壤杆菌属介导的植物转化载体通常包含允许在大肠杆菌(*E.coli*)与土壤杆菌属两者中复制的序列以及一种或多种被定位以便允许表达盒整合至植物染色体中的“边界”序列。所述土壤杆菌属载体可适用于根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)或毛根土壤杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)中。赋予对抗生素的抗性的可选择标志物编码基因也通常包括在载体中以提供在细菌宿主中维持所述载体。

#### [0291] 用于获得抗真菌植物的方法

[0292] 本发明也提供获得能够抑制植物病原性真菌的生长的转基因植物的方法。首先,使用如本文所述的转化技术将适于在各种双子叶植物和单子叶植物中表达MtDef5蛋白或肽的表达载体引入植物、植物细胞、原生质体或植物组织中。接着,通过从接受表达载体的植物、植物细胞、原生质体或植物组织再生含有或包含MtDef5表达载体的转基因植物来获得那个转基因植物。最终步骤在于获得表达植物病原性真菌抑制量的成熟MtDef5蛋白或肽的转基因植物,其中“植物病原性真菌抑制量”是MtDef5蛋白或肽的足以提供转基因植物中的真菌生长的任何可测量降低和/或由转基因植物中的真菌生长引起的不利影响的任何可测量降低的水平。

[0293] 任何MtDef5表达载体都可通过如以下的方法来引入宿主植物的染色体中:土壤杆菌属介导的转化、根瘤菌属(*Rhizobium*)介导的转化、中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)介导的转化、粒子介导的转化、DNA转染、DNA电穿孔或“晶须”介导的转化。以上提及的引入转基因的方法为本领域技术人员所熟知,并且描述于美国专利申请号20050289673(土壤杆菌属介导的玉米转化)、美国专利号7,002,058(土壤杆菌属介导的大豆转化)、美国专利号6,365,807(粒子介导的稻转化)和美国专利号5,004,863(土壤杆菌属介导的棉花转化)中,所述专利各自以引用的方式整体并入本文。使用如根瘤菌属或中华根瘤菌属的细菌来转化植物的方法描述于Broothaerts,等,Nature.2005,10;433(7026):629-33中。应进一步了解MtDef5表达载体可包含由位点特异性重组酶(包括Cre、Flp、Gin、Pin、Sre、pinD、Int-B13和R)识别的顺式作用位点特异性重组位点。可接着使用通过使用位点特异性重组酶在转基因植物的基因组中的特定位置处整合DNA分子的方法(美国专利7,102,055)。本领域技术人员将进一步了解这些基因转移技术中的任一个都可用于将表达载体引入植物细胞、原生质体、植物组织或植物的染色体中。

[0294] 引入包含提供在转基因植物中维持重组微型染色体的植物着丝粒的植物微型染色体的方法也可用于实施本发明(美国专利6,972,197)。在本发明的这些实施方案中,转基因植物具有微型染色体作为不整合至宿主植物的染色体中的染色体外元件。

[0295] 通常通过以下方式来获得转基因植物:使目标基因(在这个情况下是MtDef5编码核苷酸序列)连接于可选择标志物基因,通过上述方法中的任一个来将连接的转基因引入植物细胞、原生质体、植物组织或植物中,以及在需要表达可选择标志物基因以达成植物生长的条件下再生或另外恢复转基因植物。可选择标志物基因可为编码以下的基因:新霉素磷酸转移酶蛋白、膦丝菌素乙酰基转移酶蛋白、草甘膦抗性5-烯醇-丙酮酰基莽草酸-3-磷酸合成酶(EPSPS)蛋白、潮霉素磷酸转移酶蛋白、二氢蝶呤合成酶蛋白、磺酰脲不敏感性乙

酰乳酸合成酶蛋白、莠去津不敏感性Q蛋白、能够降解溴苯腈的腈水解酶蛋白、能够降解茅草枯的脱卤素酶蛋白、2,4-二氯苯氧基乙酸单氧合酶蛋白、甲氨蝶呤不敏感性二氢叶酸还原酶蛋白、或氨乙基半胱氨酸不敏感性章鱼碱合成酶蛋白。连同各基因一起使用的相应选择剂可为：新霉素(用于新霉素磷酸转移酶蛋白选择)、膦丝菌素(用于膦丝菌素乙酰基转移酶蛋白选择)、草甘膦(用于草甘膦抗性5-烯醇-丙酮酰基莽草酸-3-磷酸合成酶(EPSPS)蛋白选择)、潮霉素(用于潮霉素磷酸转移酶蛋白选择)、磺胺嘧啶(sulfadiazine)(用于二氢蝶呤合成酶蛋白选择)、氯磺隆(chlorsulfuron)(用于磺酰脲不敏感性乙酰乳酸合成酶蛋白选择)、莠去津(用于莠去津不敏感性Q蛋白选择)、溴苯腈(bromoxynil)(用于腈水解酶蛋白选择)、茅草枯(用于脱卤素酶蛋白选择)、2,4-二氯苯氧基乙酸(用于2,4-二氯苯氧基乙酸单氧合酶蛋白选择)、甲氨蝶呤(用于甲氨蝶呤不敏感性二氢叶酸还原酶蛋白选择)、或氨乙基半胱氨酸(用于氨乙基半胱氨酸不敏感性章鱼碱合成酶蛋白选择)。

[0296] 也可通过以下方式来获得转基因植物：使目标基因(在这个情况下是MtDef5编码核苷酸序列)连接于可评分标志物基因,通过上述方法中的任一个来将连接的转基因引入植物细胞中,以及从就可评分标志物基因的表达来说是测试阳性的转化植物细胞再生转基因植物。可评分标志物基因可为编码以下的基因： $\beta$ -葡萄糖醛酸酶蛋白、绿色荧光蛋白、黄色荧光蛋白、 $\beta$ -半乳糖苷酶蛋白、由luc基因产生的荧光素酶蛋白、由lux基因产生的荧光素酶蛋白、唾液酸酶蛋白、链霉素磷酸转移酶蛋白、胭脂碱合成酶蛋白、章鱼碱合成酶蛋白或氯霉素乙酰基转移酶蛋白。

[0297] 当将表达载体引入植物细胞或植物组织中时,通常通过在促进形成完整植物的条件下培养这些细胞或组织来使转化细胞或组织再生成完整植物(即再生叶、茎干、根以及在某些植物中繁殖性组织的过程)。转基因植物从单一植物原生质体或各种外植体的发育或再生在本领域中是熟知的(Horsch, R. B. 等1985)。这个再生和生长过程通常包括选择转化细胞以及在将产生生根幼苗的条件下培养所选细胞的步骤。此后将所得转基因生根嫩芽种植在如土壤的适当植物生长培养基中。或者,也可将转基因引入分离的植物嫩芽分生组织中,并且在不经受愈伤组织阶段组织培养下再生植物(美国专利7,002,058)。当转基因被直接引入植物中,或更具体来说引入植物的分生组织中时,可从植物收获种子,并且针对转基因的存在进行选择或评分。在有性繁殖的转基因植物物种的情况下,可从已“自花授精”(自我受粉)或远交(即用作花粉供体或接受者)以建立和维持转基因植物株系的植物收集种子。不有性繁殖的转基因植物可无性繁殖以建立和维持转基因植物株系。如本文所用,“转基因植物株系”是指由转化事件产生的转基因植物,其中转基因已插入植物基因组中的一个或多个位置中。在一相关方面,本发明也涵盖由转化植物产生的种子、来自所述种子的子代、以及由根据以上方法产生的原始转基因植物的子代产生的种子。所述子代和种子将具有稳定并入它们的基因组中的MtDef5蛋白或肽编码转基因,并且所述子代植物将以孟德尔式方式(Mendelian fashion)遗传通过引入稳定转基因提供的性状。所有已在它们的基因组中并入编码一种或多种MtDef5蛋白或肽的转基因DNA区段的所述转基因植物都是本发明的方面。应进一步认识到可通过使用PCR或可特异性检测DNA构建体中的序列的其它方法来鉴定含有本文所述的DNA构建体的转基因植物以及由其产生的材料。

[0298] 鉴定转基因植物和定量MtDef5表达

[0299] 一旦再生或恢复转基因植物,多种方法即可用于鉴定或获得表达植物病原性真菌

抑制量的MtDef5的转基因植物。一组一般性方法在于进行测量所产生的MtDef5的量的测定。举例来说,各种采用识别MtDef5的抗体的抗体基检测方法可用于定量产生的MtDef5的量。所述抗体基测定的实例包括但不限于ELISA、RIA或其它方法,其中MtDef5识别抗体用酶、同位素、荧光团、镧系元素等可检测标记。通过在所述测定中使用纯化或分离的MtDef5蛋白或肽作为参照标准(即提供已知量的MtDef5),可测定植物组织中存在的MtDef5的以每克植物材料的摩尔数或每克植物材料的质量计的量。MtDef5蛋白或肽将通常在“百万分率”或“PPM”的水平下在转基因植物中表达,其中微克水平的MtDef5存在于克量的鲜重植物组织中。在这个情况下,每1克鲜重植物组织1微克MtDef5将表示1PPM的MtDef5浓度。MtDef5蛋白或肽的植物病原性真菌抑制量是至少约0.05PPM(即每克鲜重植物组织0.05 $\mu$ g MtDef5蛋白或肽)。在优选实施方案中,MtDef5的植物病原性真菌抑制量是至少约0.5PPM。在更优选实施方案中,MtDef5的量是至少约1.0PPM。在最优选实施方案中,MtDef5蛋白或肽的量是至少约2.0PPM。

[0300] 或者,可测定由转基因植物产生的MtDef5编码mRNA的量以鉴定表达植物病原性真菌抑制量的MtDef5的植物。用于使产生的蛋白质的量与产生的RNA的量相关联的技术为本领域技术人员所熟知,并且包括如构建使特定RNA水平(即MtDef5 mRNA)与MtDef5蛋白或肽的水平(通过免疫或其它方法测定)相关联的标准曲线的方法。定量MtDef5 mRNA的方法通常涉及使多核苷酸特异性杂交于MtDef5 mRNA或由MtDef5 RNA产生的cDNA(互补DNA)或PCR产物。所述多核苷酸探针可由MtDef5编码转基因的正义和/或反义链核苷酸序列产生。可通过包括但不限于以下的方法来检测多核苷酸探针杂交于MtDef5 mRNA或cDNA:使用用同位素、荧光团、镧系元素或半抗原(如生物素或地高辛)标记的探针。可当MtDef5 RNA在溶液或固定在如膜的固体载体上时检测标记的探针的杂交。当通过使用定量逆转录酶聚合酶链反应(qRT-PCR)定量MtDef5 RNA时,可通过以下方式来检测MtDef5源性PCR产物:使用任何以上提及的标记的多核苷酸探针;使用插入染料,如溴化乙锭或SYBR绿;或使用含有荧光团和淬灭剂以使来自荧光团的发射仅在荧光团通过用于PCR反应(即TaqMan™反应;Applied Biosystems,Foster City,CA)中的聚合酶的5'核酸酶活性来释放时,或在荧光团和淬灭剂通过聚合酶介导的互补链合成而被移置时(即Scorpion™或Molecular Beacon™探针)被检测的杂交探针。各种用于进行qRT-PCR分析以定量mRNA水平的方法是充分表征的(Bustin,S.A.;2002)。通过识别错配核酸复合物的酶的作用而活化的荧光探针(即Invader™,Third Wave Technologies,Madison,WI)也可用于定量RNA。本领域技术人员也将了解如定量核酸序列扩增(Q-NASBA™)的RNA定量技术可用于定量MtDef5编码mRNA以及鉴定表达性植物。

[0301] 表达植物病原性真菌抑制量的MtDef5蛋白或肽的转基因植物也可通过直接测定所述植物的对植物病原性真菌的生长抑制来鉴定。所述测定可独立地或连同MtDef5表达测定一起用于鉴定抗性转基因植物。某些植物被某些植物病原体真菌感染可导致对植物生长的易于观察的独特影响。因此,可通过仅用病原性植物真菌攻击用MtDef5编码转基因转化的所述植物,以及观察通常与所述感染相关的症状的减轻来区分MtDef5表达性转基因植物。通过以下方式有助于所述观察:用相同类型和剂量的用于感染含有MtDef5编码转基因的转基因植物的植物病原性真菌共同感染不含有MtDef5编码转基因的另外相同的非转基因对照植物。对控制或抗击真菌性感染的转基因植物的鉴定可基于疾病症状减轻的观察结果;受感染植物中的真菌生长降低的测量结果(例如通过测定每克受感染组织的集落形



成单位的数目);和/或通过测量受感染植物组织中存在的霉菌毒素的量来达成。已描述连同表达测定一起使用真菌性疾病严重性测定和集落形成测定来鉴定对大丽花轮枝孢具有抗性的转基因MsDef1表达性马铃薯植物(U.S.6,916,970以及Gao等,2000)。类似地预期多种抗击或控制真菌病原体的MtDef5表达性转基因植物可通过对转基因植物对感染那些植物的真菌病原体的抗性评分来鉴定。可通过观察疾病症状减轻或真菌生长降低来测定的MtDef5转基因赋予的真菌抗性的实例包括但不限于转基因玉米对轮枝样镰刀菌(*Fusarium verticillioides*)、串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)、玉米狭壳柱孢(*Stenocarpella maydis*)和/或玉蜀黍尾孢菌(*Cercospora zeae-maydis*)的抗性;转基因小麦对头部枯萎病(禾谷镰刀菌)、白粉病(禾白粉菌小麦小种(*Erysiphe graminis* f.sp.*tritici*))或叶锈病(叶锈病菌小麦小种(*Puccinia recondita* f.sp.*tritici*))的抗性;转基因棉花对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的抗性;转基因稻对稻瘟菌(*Magnaporthe grisea*)和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)的抗性;以及转基因大豆对亚洲大豆锈病(豆薯层锈菌(*Phakopsora pachyrhizi*))、疫霉属(*Phytophthora*)根腐病(疫霉属种)、白霉病(核盘菌属种(*Sclerotinia* sp.))、猝死综合征(腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*))和/或茎褐腐病(大豆茎褐腐病菌(*Phialophora gregata*))的抗性。

[0302] 表达植物病原性真菌抑制量的MtDef5的转基因植物也可通过测量由所述植物中的真菌生长引起的不利影响的降低来鉴定。所述降低可通过相对于不表达MtDef5的另外相同的非转基因对照植物来比较MtDef5表达性转基因植物中的不利影响的程度加以确定。植物中的真菌生长的可测量的不利影响包括任何类型的植物组织损害或坏死、任何类型的植物产量降低、作物植物产物的任何价值降低、和/或产生不合需要的真菌代谢物或真菌生长副产物,包括但不限于霉菌毒素。霉菌毒素包括由真菌物种产生的许多毒性分子,包括但不限于聚酮(包括黄曲毒素(aflatoxin)、去甲基柄曲霉素(demethylsterigmatocystin)、O-甲基柄曲霉素(O-methylsterigmatocystin)等)、伏马毒素(fumonisin)、阿普瑞辛(alperisin)(例如A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>)、鞘氨醇抗菌素(sphingofungin)(A、B、C和D)、新月毒素(trichothecene)、烟曲杀霉素(fumifungin)等。定量霉菌毒素水平的方法是被文献广泛记载的。此外,用于测量如黄曲毒素、伏马毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol)和玉米烯酮(zearalenone)的霉菌毒素的商业试剂盒也是可用的(VICAM, Watertown, MA, USA)。

#### [0303] 靶标植物/目标植物

[0304] 广泛多种植物可用MtDef5表达性载体转化以获得抗击或控制真菌性感染或抵抗所述感染的转基因植物。目标植物包括如上所列的粮食作物植物与生物燃料或能量作物植物两者。可通过本文所述的表达载体和方法获得的转基因单子叶植物包括但不限于大麦、玉米、亚麻、燕麦、稻、黑麦、高粱、草皮草、甘蔗和小麦。可通过本文所述的表达载体和方法获得的转基因双子叶植物包括但不限于苜蓿、拟南芥属、蒺藜苜蓿、香蕉、茎椰菜、菜豆、卷心菜、加拿大油菜、胡萝卜、木薯、花椰菜、芹菜、柑橘、棉花、葫芦、桉树、大蒜、葡萄、洋葱、莴苣、豌豆、花生、胡椒、马铃薯、白杨树、松树、向日葵、红花、大豆、草莓、糖用甜菜、甜薯、烟草和番茄。

#### [0305] 堆积基因:多重抗性

[0306] 在植物中同时共同表达多种抗真菌和/或其它抗病原体蛋白质是有利的,因为这利用超过一种植物病原体控制模式。这在表达两种或更多种抗真菌蛋白质时可使产生抗性

真菌物种的可能性最小,扩展抗性的范围,并且潜在导致协同抗真菌作用,由此增强抗性水平。

[0307] 可与编码本发明的MtDef5分子的DNA共同表达的赋予某些优势的其它蛋白质包括:(1)编码如葡萄糖氧化酶(其使葡萄糖转化成葡萄糖酸,伴随产生赋予对植物病原体的广谱抗性的过氧化氢);丙酮酸氧化酶;草酸氧化酶;胆固醇氧化酶;氨基酸氧化酶;和使用分子氧作为初级或二级底物以产生包括过氧化氢的过氧化物的其它氧化酶的酶的DNA;(2)发病机理相关蛋白质,如SAR8.2a和SAR8.2b蛋白;酸性和碱性形式的烟草PR-1a、PR-1b、PR-1c、PR-1'、PR-2、PR-3、PR-4、PR-5、PR-N、PR-O、PR-O'、PR-P、PR-Q、PR-S和PR-R蛋白;几丁质酶,如烟草碱性几丁质酶和黄瓜几丁质酶/溶菌酶;过氧化酶,如黄瓜碱性过氧化物酶;葡聚糖酶,如烟草碱性葡聚糖酶;渗透蛋白(osmotin)样蛋白质;(3)植物病毒的病毒壳体蛋白和复制酶;(4)植物R基因(抗性基因)及其同源物,包括但不限于拟南芥属RPS2(Bent等,1994)、拟南芥属RPM1(Grant等,1995)、烟草N-基因和N'-基因、番茄Cf-9、亚麻L6和稻Xa21;(5)可使用病原体或化学诱导性启动子表达的病原体Avr基因,如黄枝孢(*Cladosporium fulvum*)Avr9;(6)水杨酸的生物合成中涉及的基因,如苯甲酸2-羟化酶;和(7)抗真菌作用模式不同于MtDef5的作用模式的其它防御素蛋白,包括但不限于MsDef1、MtDef2、NaD1、Rs-AFP1和Rs-AFP2。可在转基因植物中与本发明MtDef5防御素共同表达以赋予对真菌病原体感染的抗性的其它抗真菌蛋白质包括KP4和KP6蛋白。

[0308] 在表达MtDef5蛋白和肽的转基因植物中共同表达昆虫和除草剂抗性基因会赋予更进一步农业益处。因此,所述转基因植物的基因组可进一步包含:

[0309] 编码例如选自由MsDef1、MtDef2、MtDef4、NaD1、Rs-AFP1、Rs-AFP2、KP4和KP6组成的组的植物防御素的DNA,其中所述DNA被表达,并且产生抗真菌有效量的防御素,和/或

[0310] 编码苏云金杆菌内毒素的DNA,其中所述DNA被表达,并且产生抗昆虫有效量的苏云金杆菌内毒素,和/或

[0311] 编码对所述植物赋予除草剂抗性的蛋白质的DNA,其中所述DNA被表达,并且产生抗除草剂有效量的赋予除草剂抗性的蛋白质。

#### [0312] 酵母表达载体和转化系统

[0313] 在酵母中表达MtDef5蛋白和肽明确涵盖在本文中。用于在各种酵母属中产生异源性蛋白质的表达载体的构建是明确确定的。一般来说,所述表达载体通常包含可操作地连接于目标序列的启动子,所述目标序列可操作地连接于聚腺苷酸化或终止子区域。已用于成功表达异源性基因的酵母属的实例包括假丝酵母属、克鲁维酵母属、汉逊酵母属、毕赤酵母属、酵母属、裂殖酵母属和耶罗威亚酵母属。对用于酵母属的表达载体和转化系统的一般性描述见于Kingsman等(1985)中。适用于除酵母属以外的酵母的表达载体和转化系统描述于Reiser等(1990)中。

[0314] 一般来说,启动子和聚腺苷酸化区域基于它们在所需酵母宿主中的可操作性加以选择。举例来说,毕赤酵母属的AOX1或AOX2启动子可连同毕赤酵母属的AOX1、AOX2、p40或p76聚腺苷酸化序列一起用于表达异源性蛋白质,如MtDef5蛋白或肽。AOX1启动子与AOX2启动子两者均特别适用于毕赤酵母属中,因为两种启动子在通过向生长培养基中添加甲醇来诱导时均提供连接的异源性基因的充分表达。这些毕赤酵母属启动子和聚腺苷酸化序列的使用描述于美国专利4,855,231中,所述专利以引用的方式整体明确并入本文。

[0315] 类似地,汉逊酵母属MOX、DHAS或FMDH启动子可用于在汉逊酵母属中表达异源性蛋白质,如MtDef5。MOX、DHAS或FMDH启动子特别适用于汉逊酵母属中,因为这些启动子在通过向生长培养基中添加甲醇来诱导时提供连接的异源性基因的充分表达。MOX和DHAS启动子在汉逊酵母属中的使用描述于美国专利5,741,672中,而FMDH启动子在汉逊酵母属中的使用描述于美国专利5,389,525中,所述专利各自以引用的方式整体明确并入本文。

[0316] 对于克鲁维酵母属,乳糖酶启动子和聚腺苷酸化序列可用于表达异源性基因,如MtDef5。通过使克鲁维酵母属在半乳糖存在下生长来实现可操作地连接于乳糖酶启动子和聚腺苷酸化序列的异源性基因的表达。乳糖酶启动子和聚腺苷酸化序列在克鲁维酵母属中的使用描述于美国专利6,602,682中,所述专利以引用的方式整体明确并入本文。

[0317] 也涵盖提供如MtDef5的异源性蛋白质由转化酵母向生长培养基中分泌的酵母表达载体。通常通过使信号肽序列或信号肽和原肽序列可操作地连接于成熟MtDef5蛋白或肽编码序列来实现成熟MtDef5蛋白或肽的分泌。适用于使酵母中的异源性蛋白质分泌的信号肽的实例包括但不限于 $\alpha$ 因子信号肽、转化酶信号肽和PHO1信号肽,其全部源于酵母。 $\alpha$ 因子信号肽通常源于酵母属、克鲁维酵母属或假丝酵母属,而PHO1信号肽源于毕赤酵母属。

[0318] 特别适用于使酵母中的蛋白质分泌的信号肽序列或信号肽和原肽序列源于酿酒酵母(*S. cerevisiae*) $\alpha$ 因子,并且描述于美国专利4,546,082、4,588,684、4,870,008和5,602,034中。酿酒酵母 $\alpha$ 因子信号肽和原肽序列由酿酒酵母 $\alpha$ 交配因子基因(GenBank登记号:P01149)的初级未加工翻译产物的氨基酸1-83组成。在某些实施方案中,可使 $\alpha$ 交配因子的包含 $\alpha$ 交配因子原蛋白的氨基酸1直至约19至23的信号肽序列直接连接于成熟MtDef5蛋白的N末端以提供成熟MtDef5蛋白的分泌。在这个情况下,信号肽在分泌过程期间从成熟MtDef5蛋白裂解。或者,可通过间隔体序列使 $\alpha$ 交配因子的信号肽和原肽可操作地连接于成熟MtDef5编码序列。这个间隔体序列可包括提供对前导序列和目标基因的蛋白水解加工的多种序列。在天然酿酒酵母 $\alpha$ 交配因子基因中,间隔体序列对应于氨基酸残基84-89,并且由序列Lys84-Arg85-Glu86-Ala87-Glu88-Ala 89表示。序列Lys-Arg对应于KEX2蛋白酶识别位点,而Glu-Ala-Glu-Ala序列对应于重复二肽基氨基肽酶或STE13识别位点。在某些实施方案中,使编码89氨基酸酿酒酵母 $\alpha$ 因子信号、原肽编码区域和整个天然间隔体编码区域(即含有在残基84和85处的Lys-Arg KEX2蛋白酶裂解位点以及在残基86-89处的Glu-Ala-Glu-Ala二肽基氨基肽酶或STE13识别位点两者的 $\alpha$ 交配因子前体蛋白质的N末端89个氨基酸残基)的DNA片段可操作地连接于编码成熟MtDef5蛋白的序列。当使 $\alpha$ 交配因子前体蛋白质的N末端89个氨基酸融合于如MtDef5的异源性蛋白质的N末端时,通常通过由内源性酵母蛋白酶在KEX2或STE13识别位点处裂解来使原肽序列从异源性蛋白质解离。在其它实施方案中,使编码较小的85氨基酸酿酒酵母 $\alpha$ 因子信号肽、原肽和KEX2间隔体元件(即仅含有在残基84和85处的Lys-Arg KEX2蛋白酶裂解位点的 $\alpha$ 交配因子前体蛋白质的N末端85个氨基酸残基)的DNA片段可操作地连接于编码成熟MtDef5蛋白的序列。当使 $\alpha$ 交配因子前体蛋白质的N末端85个氨基酸融合于如MtDef5的异源性蛋白质的N末端时,通常通过由内源性酵母蛋白酶在KEX2识别位点处裂解来使原肽序列从异源性蛋白质解离。因此,MtDef5蛋白可在无glu-ala重复序列下表达。

[0319] 为获得表达MtDef5蛋白和肽的转化酵母,通常使酵母MtDef5表达盒(例如酵母启动子、酵母信号肽编码序列、成熟MtDef5蛋白序列和聚腺苷酸化序列)与提供对转化酵母的

选择的其它序列组合。适用可选择标志物基因的实例包括但不限于编码以下的基因：ADE蛋白、HIS5蛋白、HIS4蛋白、LEU2蛋白、URA3蛋白、ARG4蛋白、TRP1蛋白、LYS2蛋白、赋予对博来霉素或腐草霉素抗生素的抗性的蛋白质、赋予对氯霉素的抗性的蛋白质、赋予对G418或遗传霉素的抗性的蛋白质、赋予对潮霉素的抗性的蛋白质、赋予对甲氨蝶呤的抗性的蛋白质、ARO4-OFP蛋白和FZF1-4蛋白。

[0320] 通过如向酵母原生质球中转染或电穿孔的技术来将包含酵母MtDef5表达盒和可选择标志物基因的DNA分子引入酵母细胞中。在本发明的某些实施方案中，包含酵母MtDef5表达盒和可选择标志物基因的DNA分子以整合至转化酵母宿主细胞的基因组中的线性DNA片段形式引入。整合可发生在酵母宿主细胞基因组中的随机位点处或酵母宿主细胞基因组中的特定位点处。通常通过表达载体中含有的序列与酵母宿主细胞基因组中的序列之间的同源重组来实现整合在酵母宿主细胞基因组中的特定位点处。通常通过在同源序列内（例如当使表达载体整合至毕赤酵母属宿主细胞中的内源性AOX1基因中时，在毕赤酵母属表达载体的AOX1启动子序列内）使表达载体线性化来实现同源重组。在本发明的其它实施方案中，酵母表达盒也可包含其它序列，如提供含有表达盒的DNA作为染色体外（非整合）元件进行复制的自主复制序列（ARS）。所述染色体外元件通常通过针对连接的可选择标志物基因的存在进行连续选择而维持在酵母细胞中。含有提供复制和有丝分裂传输的序列的酵母人工染色体（YAC）是可用于在酵母宿主中维持DNA构建体的另一类型的载体。

#### [0321] 在酵母中产生MtDef5蛋白的方法

[0322] 用酵母MtDef5表达盒转化的酵母细胞可用于产生MtDef5蛋白和肽。这些MtDef5分子可直接用作抗真菌剂，用于产生可施用于植物的抗真菌组合物，用作用以产生识别MtDef5蛋白或肽的抗体的免疫原，或在用于测量各种样品中的MtDef5蛋白和肽的浓度的试剂盒中用作参照标准。表达MtDef5抗真菌分子的转化酵母细胞也可施用于植物以抗击/控制病原性真菌性感染。产生MtDef5蛋白和肽的方法通常首先包括在其中酵母细胞表达成熟MtDef5分子的条件培养用MtDef5表达盒转化的酵母细胞的步骤。一般来说，其中酵母细胞表达成熟MtDef5分子的条件是允许或特异性诱导在酵母表达盒中可操作地连接于MtDef5编码序列的酵母启动子的表达的条件。当酵母是毕赤酵母属，并且信号肽/MtDef5基因受控于AOX1或AOX2启动子时，向生长培养基中添加甲醇将提供成熟MtDef5蛋白的表达。类似地，当酵母是汉逊酵母属，并且信号肽/MtDef5基因受控于MOX、DHAS或FMDH启动子时，向生长培养基中添加甲醇将提供成熟MtDef5蛋白的表达。或者，当酵母是克鲁维酵母属，并且信号肽/MtDef5基因受控于乳糖酶启动子时，向生长培养基中添加半乳糖将提供成熟MtDef5蛋白的表达。

[0323] 一旦转化酵母培养物已在提供成熟MtDef5蛋白或肽的表达的条件下培养足够时期，即可从培养物分离成熟MtDef5分子。足够时期可通过定期收集培养物的部分或等分试样，以及测定MtDef5蛋白或肽的存在来确定。如用蛋白质染色进行的SDS-PAGE、蛋白质印迹（Western blot）分析、或任何免疫检测方法（例如像ELISA）的分析测定可用于监测MtDef5产量。举例来说，在甲醇存在下培养1天至8天之间足以提供成熟MtDef5蛋白在毕赤酵母属中由AOX1启动子表达。

[0324] 从培养物分离MtDef5蛋白或肽可为部分或完全的。对于其中酵母信号肽可操作地连接于编码成熟MtDef5蛋白的序列的MtDef5表达载体，可从酵母细胞培养基回收成熟

MtDef5蛋白。含有成熟MtDef5蛋白的酵母细胞培养基可通过离心或过滤来与酵母细胞分离,由此实现成熟MtDef5蛋白的分离。含有成熟MtDef5蛋白的酵母细胞培养基可通过透析和/或浓缩技术(例如沉淀、冻干、过滤)的任何组合来进一步处理以产生含有MtDef5蛋白的组合物。MtDef5蛋白的产生也可包括产生部分或完全纯净MtDef5蛋白制剂的其它纯化步骤。为实现所述纯化,可使用过滤尺寸排阻膜。或者,如尺寸排阻色谱法、离子交换色谱法或亲和色谱法的各种类型的色谱技术可用于产生部分或完全纯净MtDef5蛋白制剂。

[0325] 各种分离技术的组合也可用于产生成熟MtDef5蛋白。举例来说,细胞培养基可通过离心来与细胞分离,并且透析或调整。优选透析或调整缓冲液是在约pH 4.5-pH 6.0下的25mM乙酸钠缓冲液。接着使这个透析物经受离子交换色谱法。举例来说,可使用用在约pH 6.0下的25mM乙酸钠缓冲液平衡的阳离子交换树脂,如CM-Sephadex C-25。洗涤、接着洗脱结合于阳离子交换树脂的MtDef5蛋白。举例来说,以上提及的柱用在约pH 6.0下的25mM乙酸钠缓冲液洗涤,并且随后洗脱于1M NaCl、50mM Tris、pH 7.6中。通过测定或通过紫外吸光度来鉴定含有防御素蛋白的洗脱份,接着通过尺寸截断过滤膜来浓缩。接着透析浓缩MtDef5蛋白以获得于合乎需要的缓冲液中的基本上纯净MtDef5蛋白。合乎需要的缓冲液包括但不限于如10mM Tris(pH 7.6)的缓冲液。

[0326] 在MtDef5序列中含有保守性氨基酸变化的肽、多肽和蛋白质

[0327] 生物功能等效于MtDef5原蛋白、成熟蛋白和肽的肽、多肽和蛋白质包括但不限于在本文公开的MtDef5序列SEQ ID NO:1、3-9、16-22、和49-64中含有保守性氨基酸取代的氨基酸序列。在所述氨基酸序列中,序列中的一个或多个氨基酸被其电荷和极性类似于天然氨基酸的电荷和极性的另外氨基酸取代,即保守性氨基酸取代,从而导致沉默变化。

[0328] MtDef5序列内的氨基酸的取代物可选自天然存在的氨基酸所属类别的其它成员。氨基酸可被分成以下四组:(1)酸性氨基酸;(2)碱性氨基酸;(3)中性极性氨基酸;和(4)中性非极性氨基酸。这些各个组内的代表性氨基酸包括但不限于:(1)酸性(带负电荷)氨基酸,如天冬氨酸和谷氨酸;(2)碱性(带正电荷)氨基酸,如精氨酸、组氨酸和赖氨酸;(3)中性极性氨基酸,如甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺;(4)中性非极性(疏水性)氨基酸,如丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸。

[0329] MtDef5序列内的保守性氨基酸变化可通过用相同组内的另一氨基酸取代这些组中的一个内的一个氨基酸来进行。MtDef5的生物功能性等效物可具有10个或少于10个保守性氨基酸变化,更优选7个或少于7个保守性氨基酸变化,并且最优选5、4、3、2或1个保守性氨基酸变化。因此,编码核苷酸序列(例如基因、质粒DNA、cDNA或合成DNA)将具有相应碱基取代,从而允许它编码MtDef5分子的生物功能等效形式。

[0330] 本文涵盖的生物功能等效肽、多肽和蛋白质应与特定目标MtDef5蛋白或肽序列或所述序列内的相应部分的序列具有约70%或大于70%序列同一性,优选约85%或大于85%序列同一性,更优选约90%至约95%序列同一性,例如约90%、约91%、约92%、约93%、约94%或约95%序列同一性,并且甚至更优选大于约96%、97%或98%序列同一性、或约99%序列同一性。所述生物功能等效肽、多肽和蛋白质优选展现本文公开的相应MtDef5分子的约+30%的抗真菌活性,或甚至大于约±30%抗真菌活性,通过任何本文公开的抗真菌活性测定方法所测定。

[0331] 所述生物功能等效肽、多肽和蛋白质的编码序列应包含与选自以下组成的组的核苷酸序列具有足以使得编码序列能够编码生物功能等效抗真菌肽、多肽或蛋白质的序列同一性的核苷酸序列:SEQ ID NO:10-15、23-29、和65-78中所示的核苷酸序列;或包括所述编码序列的用以使其在植物中的表达最优化的密码子优化形式。

[0332] 用于确定序列同一性的方法

[0333] 供比较的序列的比对方法在本领域中是熟知的。供比较的序列的最优比对可通过Smith和Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981)的局部同源性算法;通过Needleman和Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443(1970)的同源性比对算法;通过Pearson和Lipman, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 85:2444(1988)的类似性搜索方法;通过这些算法的计算机化执行程序(包括但不限于:Intelligenetics, Mountain View, Calif.的PC/Gene程序中的CLUSTAL;以及来自Accelrys, Inc., San Diego, Calif.的GCG.RTM. Wisconsin Package.TM.中的GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA和TFASTA)来进行。

[0334] 可通过在缺省参数下执行BLAST(基本局部比对搜索工具;Altschul, S.F.,等,(1993)*J. Mol. Biol.* 215:403-410;也参见可从NCBI(National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, Md. 20894)获得的信息)搜索以获得与BLAST“nr”数据库(包含所有非冗余GenBank CDS翻译物,序列源于3维结构Brookhaven蛋白质数据库、最新主版本的SWISS-PROT蛋白质序列数据库、EMBL和DDBJ数据库)中含有的序列的类似性来确定基因身份。使用BLASTN程序分析cDNA序列与“nr”数据库中含有的所有可公开获得的DNA序列的类似性。翻译所有阅读框中的DNA序列,并且使用由NCBI提供的BLASTX程序(Gish, W.和States, D.J. *Nature Genetics* 3:266-272(1993))比较与“nr”数据库中含有的所有可公开获得的蛋白质序列的类似性。在一些情况下,来自两个或更多个含有重叠DNA区段的克隆的测序数据用于构建连续DNA序列。

[0335] 可使用软件,如可作为来自Accelrys, Inc., San Diego, Calif.的GCG.RTM. Wisconsin Package.TM.的一部分获得的GAP、BestFit、PileUp或Pretty进行序列比对和同一性百分比计算。使用GAP和BestFit成对比对多核苷酸序列的缺省参数是空位产生罚分=50,空位延伸罚分=3;nwsgapdna.cmp是评分矩阵。使用GAP和BestFit成对比对多肽序列的缺省参数是空位产生罚分=8,空位延伸罚分=2;BLOSUM62是评分矩阵。在多核苷酸或多肽比对物的末端不存在空位罚分。

[0336] 使用PileUp和Pretty进行多核苷酸序列比较的缺省参数是:空位产生罚分=5,空位延伸罚分=1。使用PileUp或Pretty进行多肽序列比较的缺省参数是空位产生罚分=8,空位延伸罚分=2;BLOSUM62是评分矩阵。

[0337] 序列比对也可用LASERGENE生物信息学计算套件(DNASTAR Inc., Madison, Wis.)的Megalign程序实现。可使用Clustal比对方法(Higgins和Sharp(1989)*CABIOS*. 5:151-153)以缺省参数(空位罚分=10,空位长度罚分=10)进行多重序列比对。使用Clustal方法成对比对的缺省参数是K元组1,空位罚分=3,窗口=5以及保留对角线=5。

[0338] 其它成对比较工具也是可用的,并且为本领域技术人员所知。

[0339] 如所指示,可在本发明的MtDef5蛋白和肽以及编码它们的DNA区段的结构中进行修饰和变化,并且仍然获得编码具有合乎需要的抗真菌特征的肽、多肽或蛋白质的功能性分子。以下是基于改变蛋白质的氨基酸以产生等效、或甚至改进的第二代分子的讨论。在本

发明的特定实施方案中,预期突变MtDef5蛋白或肽适用于增加这些分子的抗真菌活性,并且因此增加重组转基因在植物细胞中的抗真菌活性和/或表达。可通过根据表2中给出的密码子,改变DNA序列的密码子来实现氨基酸变化。

[0340] 表2

[0341]

氨基酸	氨基酸代码	密码子
丙氨酸	Ala(A)	GCA GCC GCG GCU
半胱氨酸	Cys(C)	UGC UGU
天冬氨酸	Asp(D)	GAC GAU
谷氨酸	Glu(E)	GAAGAG
苯丙氨酸	Phe(F)	UUCUUU
甘氨酸	Gly(G)	GGA GGC GGG GGU
组氨酸	His(H)	CAC CAU
异亮氨酸	Ile(I)	AUA AUC AUU
赖氨酸	Lys(K)	AAAAAG
亮氨酸	Leu(L)	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
甲硫氨酸	Met(M)	AUG
天冬酰胺	Asn(N)	AAC AAU
脯氨酸	Pro(P)	CCA CCC CCG CCU
谷氨酰胺	Gln(Q)	CAA CAG
精氨酸	Arg(R)	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
丝氨酸	Ser(S)	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
苏氨酸	Thr(T)	ACA ACC ACG ACU
缬氨酸	Val(V)	GUA GUC GUG GUU
色氨酸	Trp(W)	UGG
酪氨酸	Tyr(Y)	UAC UAU

[0342] 举例来说,蛋白质结构中的某些氨基酸可被取代成其它氨基酸而不可观损失生物化学或生物活性。因为蛋白质的相互作用能力和性质确定那个蛋白质的生物功能活性,所以可在蛋白质序列以及当然它的潜伏DNA编码序列中进行某些氨基酸序列取代,并且仍然获得具有类似性质的蛋白质。因此本发明者预期可在本发明的MtDef5蛋白序列或编码它们的相应DNA序列中进行各种变化,而不可观损失它们的生物效用或活性。

[0343] Betts和Russell((2003),“Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions”,Bioinformatics for Geneticists,Michael R.Barnes和Ian C.Gray编,John Wiley&Sons,Ltd,第14章,第289-316页)综述多种不同蛋白质情形下氨基酸突变和性质的特性,目的在于有助于预期和解释特定氨基酸变化将对蛋白质结构和功能所具有的影响。作者指出蛋白质的与考虑氨基酸突变相关的特征包括细胞环境、三维结构和进化,以及氨基酸基于进化、化学和结构原则的分类,和不同类别的氨基酸在不同情形下在蛋白质结构和功能中的作用。作者指示将氨基酸分类成涉及共同物理化学性质、尺寸、对水的亲和力(极性和非极性;带负电荷或带正电荷)、芳香性和脂性、氢键结能力、尖锐转动区域的倾向

等的种类(如他们的综述的图14.3中所示的种类)明确表明依赖于简单分类可为误导性的,并且表明替代性氨基酸可被工程改造至蛋白质中的各位置处。用于解释特定突变可能如何影响蛋白质结构和功能的准则概述于这个综述的章节14.7中,并且包括首先查究蛋白质,接着查究预期的特定氨基酸取代。

[0344] 作为进行氨基酸变化时的起始点,可考虑氨基酸的亲疏水性指数。亲疏水性氨基酸指数在对蛋白质赋予相互作用性生物功能方面的重要性通常在本领域中是被了解的(Kyte和Doolittle,1982,以引用的方式并入本文)。接受的是氨基酸的相对亲疏水性特性促成所得蛋白质的二级结构,其转而确定蛋白质与其它分子,例如酶、底物、受体、DNA、抗体、抗原等的相互作用。

[0345] 各氨基酸已基于它的疏水性和电荷特征而被指定亲疏水性指数(Kyte和Doolittle,1982)。这些指数是:异亮氨酸(+4.5);缬氨酸(+4.2);亮氨酸(+3.8);苯丙氨酸(+2.8);半胱氨酸/胱氨酸(+2.5);甲硫氨酸(+1.9);丙氨酸(+1.8);甘氨酸(-0.4);苏氨酸(-0.7);丝氨酸(-0.8);色氨酸(-0.9);酪氨酸(-1.3);脯氨酸(-1.6);组氨酸(-3.2);谷氨酸(-3.5);谷氨酰胺(-3.5);天冬氨酸(-3.5);天冬酰胺(-3.5);赖氨酸(-3.9);和精氨酸(-4.5)。

[0346] 本领域中已知的是某些氨基酸可被具有类似亲疏水性指数或评分的其它氨基酸取代,并且仍然产生具有类似生物活性的蛋白质,即仍然获得生物功能等效蛋白质。在进行所述变化时,亲疏水性指数在+2内的氨基酸的取代是优选的,在+1内的那些是特别优选的,并且在+0.5内的那些是甚至更特别优选的。

[0347] 在本领域中也应了解可基于亲水性有效进行类似氨基酸的取代。以引用的方式并入本文的美国专利号4,554,101陈述蛋白质的如由它的邻近氨基酸的亲水性支配的最大局部平均亲水性与蛋白质的生物性质相关联。

[0348] 如美国专利号4,554,101中所详述,以下亲水性值已指定给氨基酸残基:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0.+0.1);谷氨酸(+3.0.+0.1);丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5.+0.1);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);甲硫氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5);色氨酸(-3.4)。

[0349] MtDef5序列中的非保守性取代

[0350] 应进一步认识到可在MtDef5序列中进行非保守性取代以获得作为本文公开的MtDef5分子的功能性生物等效物的MtDef5蛋白和肽。在这些情况下,可仅测试非保守性取代对抑制真菌生长的影响以鉴定提供给定MtDef5蛋白或肽的功能性生物等效物的非保守性取代。

[0351] MtDef5蛋白和肽的片段和变体

[0352] 本发明的抗真菌防御素包括MtDef5原蛋白、成熟MtDef5蛋白和MtDef5肽。相较于这些MtDef5分子的抗真菌活性,这些序列的具有相同、类似或甚至更大抗真菌活性的片段和变体也由本发明涵盖。因此,本发明涵盖成熟MtDef5蛋白中展现抗真菌活性的具有至少8个或大于8个氨基酸的连续序列。MtDef5分子的由本发明涵盖的具有抗真菌活性的片段或变体也可在MtDef5序列中包含氨基酸取代、缺失、插入或添加。

[0353] 本发明也涵盖成熟MtDef5蛋白的片段,其可为截短形式,其中一个或多个氨基酸



从蛋白质的N末端、C末端、中间或其组合缺失,并且其具有抗真菌活性。这些片段可为MtDef5分子的天然存在或合成突变体,并且保留MtDef5的抗真菌活性,优选本文公开的相应MtDef5蛋白或肽的约±30%的抗真菌活性,或甚至大于约+30%抗真菌活性,通过任何本发明公开的抗真菌活性测定方法所测定。

[0354] MtDef5蛋白的变体包括其中一个或多个氨基酸已被插入天然序列中的形式。这些变体也可为MtDef5的天然存在或合成突变体,并且应保留本文公开的相应MtDef5蛋白的约±30%的抗真菌活性,或甚至大于约+30%抗真菌活性,通过任何本发明公开的抗真菌活性测定方法所测定。

[0355] 本发明也涵盖前述事项的组合,即抗真菌MtDef5防御素的含有氨基酸缺失与添加两者的形式。氨基酸取代也可存在于其中。

[0356] MtDef5蛋白的由本发明涵盖的片段和变体应优选与MtDef5序列或所述序列内的相应部分的序列具有约70-75%或大于75%序列同一性,优选约85%或大于85%序列同一性,更优选约90%至95%序列同一性,并且甚至更优选大于约96%、97%、98%或99%序列同一性。所述生物功能等效肽、多肽和蛋白质优选展现本文公开的相应MtDef5分子的约±30%的抗真菌活性,或甚至大于约+30%抗真菌活性。

[0357] 使用MtDef5防御素结构功能关系来设计MtDef5变体

[0358] MtDef5蛋白是防御素基因家族的成员,并且因此被预期具有由防御素共有的某些结构和生物化学性质。具体来说,预期MtDef5蛋白具有由通常在防御素蛋白中观察到的三个反平行β链和一个α螺旋组成的半胱氨酸稳定化α/β基序(Almeida等,J.Mol.Biol.(2002)315,749-757;Thomma等,Planta(2002)216:193-202)。在不受理论限制下,MtDef5与其它防御素之间的结构同源性可用于鉴定具有类似或甚至增加的抗真菌活性的变体。

[0359] 或者,MtDef5防御素的保守结构特征也可用于工程改造具有其它合乎需要的性质的变异MtDef5衍生物。举例来说,MtDef5的通常在防御素蛋白中形成二硫键的8个典型半胱氨酸残基将通常保持或维持在任何MtDef5变体中。MtDef5中预测的二硫键配对在半胱氨酸残基3与50、14与35、20与44、以及24与46之间。因此,预测Cys对1由Cys3-Cys50二硫键形成,预测Cys对2由Cys14-Cys35二硫键形成,预测Cys对3由Cys20-Cys44二硫键形成,并且预测Cys对4由Cys24-Cys46二硫键形成。在不受理论限制下,据信缺乏一个或多个二硫键的MtDef5半胱氨酸变体可对于在最终用作动物饲料或用作供人食用的粮食的转基因植物中使用是合乎需要的,因为预测所述变体更易于被食用转基因植物产品的动物或人消化。在理论上预期在动物或人的消化道中具有较短半衰期的MtDef5变异蛋白变为食物过敏原的潜力较小,同时保留它们的抗真菌活性。因此,将合乎需要的是设计具有较少二硫键,但保留抗真菌活性的MtDef5防御素衍生物。

[0360] MtDef5蛋白和肽的其它生物功能等效形式

[0361] MtDef5蛋白和肽的适用于本发明中的其它生物功能等效形式包括这些分子或其如上所述的生物功能等效物与其它肽、多肽或蛋白质的缀合物,从而与其形成相较于相应MtDef5分子的抗真菌活性,展现相同、类似或更大抗真菌活性的融合产物。

[0362] 如上在对堆积基因的讨论中所指示,在植物中同时共同表达多种抗真菌和/或其它抗病原体蛋白质是有利的,因为这利用超过一种植物病原体控制模式。这在表达两种或更多种抗真菌蛋白质时可使产生抗性真菌物种的可能性最小,扩展抗性的范围,并且潜在

导致协同抗真菌作用,由此增强抗性水平。

#### [0363] 位点特异性诱变

[0364] 位点特异性诱变是一种适用于通过特异性诱变编码分子的DNA来制备个别肽或生物功能等效肽、多肽或蛋白质的技术。所述技术进一步提供一种易于通过将个或多个核苷酸序列变化引入DNA中来制备和测试例如并入一个或多个前述考虑事项的序列变体的能力。位点特异性诱变允许通过使用编码DNA序列的特异性寡核苷酸序列来产生突变体,所述DNA序列具有所需突变以及足够数目的邻近核苷酸以提供具有足以在所横越的缺失接合点的两侧上形成稳定双链体的尺寸和序列复杂性的引物序列。通常,长度是约17至25个核苷酸的引物是优选的,其中在所改变的序列的接合点的两侧上有约5至10个残基。

[0365] 一般来说,位点特异性诱变的技术在本领域中是熟知的,如由各种出版物所例示。如将了解,所述技术通常采用以单链和双链两种形式存在的噬菌体载体。适用于定点诱变中的典型载体包括如M13噬菌体的载体。这些噬菌体载体是可易于商购获得的,并且它们的使用通常为本领域技术人员所熟知。双链质粒也常规地用于定点诱变中,此消除将目标基因从质粒转移至噬菌体中的步骤。用于进行诱变的可商购获得的试剂盒也是可用的,并且可被使用。示例性试剂盒包括 **QuikChange®** 定点诱变试剂盒(Stratagene, La Jolla, CA, USA)。

[0366] 一般来说,通过首先获得单链载体或使双链载体的两个链解链分开来进行据此的定点诱变,所述载体在它的序列内包括编码所需肽的DNA序列。通常合成制备携带所需突变序列的寡核苷酸引物。接着使这个引物与单链载体退火,并且经受DNA聚合酶(如大肠杆菌聚合酶I克林诺片段(Klenow fragment))以完成突变携带链的合成。因此,形成异源双链体,其中一个链编码原始非突变序列,而第二链携带所需突变。这个异源双链体载体接着用于转化适当细胞,如大肠杆菌细胞,并且选择包括携带突变序列排列的重组载体的克隆。

[0367] 使用定点诱变制备所选肽编码DNA区段的序列变体是作为一种产生潜在适用物质的手段而提供,并且不意图具有限制性,因为存在可以其获得肽和编码它们的DNA序列的序列变体的其它方式。举例来说,编码所需肽序列的重组载体可用如羟胺的诱变剂处理以获得序列变体。

#### [0368] MtDef5抗体组合物和制备抗体的方法

[0369] 在特定实施方案中,本发明者预期使用结合本文公开的MtDef5蛋白和肽的单克隆或多克隆抗体。用于制备和表征抗体的手段在本领域中是熟知的(参见例如Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,1999;以及美国专利号4,196,265,两者均以引用的方式并入本文)。

#### [0370] MtDef5蛋白筛选和检测试剂盒

[0371] 本发明涵盖用于筛选怀疑含有MtDef5蛋白或肽;或MtDef5相关肽、多肽或蛋白质;或产生所述分子的细胞的样品的免疫检测方法和试剂盒。试剂盒可含有一种或多种本发明的抗体,并且也可含有用于检测样品与本发明的抗体之间的相互作用的试剂。提供的试剂可被放射、荧光或酶标记。试剂盒可含有能够与本发明的核酸或抗体结合或相互作用的已知放射性标记的试剂。可例如通过应用ELISA、RIA、免疫印迹(例如斑点印迹)、间接免疫荧光技术等来实现对免疫复合物形成的检测。

#### [0372] MtDef5农业和药物抗真菌组合物

[0373] 本发明涵盖农业和药物抗真菌组合物,其包含抗真菌植物、或抗真菌人或兽医学病原性真菌抑制量(“抗真菌有效量”)的一种或多种本发明的分离的纯化抗真菌MtDef5蛋白或肽或其生物功能性等效物。所述组合物可包含一种本文公开的MtDef5蛋白或肽或本文公开的MtDef5蛋白或肽的任何组合以及农业上或药学上/兽医学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。如以下所指示,在农业和治疗情形下相关的其它组分也可包括在所述组合物中。抗真菌组合物可用于抑制与植物或人或动物真菌性感染相关的MtDef5蛋白或肽易感病原性真菌的生长或杀灭所述病原性真菌。所述抗真菌组合物可被配制供表面施用,并且经表面施用于植物、植物环境(包括土壤)、或人或动物。

[0374] 包含MtDef5蛋白和肽的农业组合物以及蛋白质和肽产生性微生物

[0375] 可如例如Winnacker-Kuchler(1986)Chemical Technology,第4版,第7卷,Hanser Verlag,Munich;van Falkenberg(1972-1973)Pesticide Formulations,第2版,Marcel Dekker,N.Y.;以及K.Martens(1979)Spray Drying Handbook,第3版,G.Goodwin,Ltd.,London中所述配制包含单独或任何组合的本发明MtDef5分子中的任一个的农业组合物。必要配制助剂,如载体、惰性物质、表面活性剂、溶剂和其它添加剂在本领域中也是熟知的,并且例如描述于Watkins,Handbook of Insecticide Dust Diluents and Carriers,第2版,Darland Books,Caldwell,N.J.;以及Winnacker-Kuchler(1986)Chemical Technology,第4版,第7卷,Hanser Verlag,Munich中。使用这些制剂,也有可能以成品制剂或桶混制剂形式制备本发明MtDef5蛋白和肽与其它杀虫活性物质、肥料和/或生长调控剂等的混合物。

[0376] 无论单独或与其它活性剂组合,本发明抗真菌MtDef5蛋白和肽都可在约0.1 $\mu$ g/ml至约100mg/ml的范围内,优选在约5 $\mu$ g/ml与约5mg/ml之间的浓度下,在约3.0至约9.0的范围内的pH下施用。所述组合物可使用例如在约1mM与1M之间,优选在约10mM与100mM之间,更优选在约15mM与50mM之间的磷酸盐缓冲液加以缓冲。在低缓冲剂浓度的情况下,合乎需要的是添加盐以增加离子强度,优选是在约1mM至约1M,更优选约10mM至约100mM的范围内的NaCl。

[0377] 本发明MtDef5蛋白和肽可与其组合的众多常规真菌抗生素和化学杀真菌剂在本领域中是已知的,并且描述于Worthington和Walker(1983)The Pesticide Manual,第7版,British Crop Protection Council中。这些包括例如多氧霉素、尼柯霉素、羧基酰胺、芳族碳水化合物、萎锈灵、吗啉、固醇生物合成抑制剂和有机磷化合物。可与本发明抗真菌蛋白质和肽组合配制的其它活性成分包括例如杀虫剂、引诱剂、灭菌剂、杀螨剂、杀线虫剂和除草剂。美国专利5,421,839含有对如本发明抗真菌MtDef5蛋白和肽的物质可与其一起配制的许多活性剂的综合概述。

[0378] 预期MtDef5蛋白和肽及其生物功能性等效物适用于控制植物中的广泛多种易感真菌,其由以下属和种中的那些例示:链格孢属(甘蓝链格孢菌(*Alternaria brassicola*);茄链格孢(*Alternaria solani*));壳二孢属(豌豆壳二孢菌(*Ascochyta pisi*));曲霉属(黄曲霉(*Aspergillus flavus*));烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*));葡萄孢属(灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*));尾孢属(菊池尾孢(*Cercospora kikuchii*);玉蜀黍尾孢菌);刺盘孢属(豆刺盘孢(*Colletotrichum lindemuthianum*));色二孢属(玉米色二孢(*Diplodia maydis*));白粉菌属(禾白粉菌禾草小种(*Erysiphe graminis* f.sp.*graminis*);禾白粉菌大麦小种(*Erysiphe graminis* f.sp.*hordei*));镰刀菌属(雪腐镰刀菌(*Fusarium*

nivale);尖孢镰刀菌;禾谷镰刀菌;大刀镰刀菌(*Fusarium culmorum*);腐皮镰刀菌;串珠镰刀菌;粉红色镰刀菌(*Fusarium roseum*);顶囊壳属(禾顶囊壳小麦小种(*Gaeumanomyces graminis* f.sp.*tritici*));长蠕孢属(大斑长蠕孢菌(*Helminthosporium turcicum*);碳色长蠕孢菌(*Helminthosporium carbonum*);玉蜀黍长蠕孢菌(*Helminthosporium maydis*));壳孢属(菜豆壳孢(*Macrophomina phaseolina*);稻瘟菌(*Maganaporthe grisea*));丛赤壳属(赤球丛赤壳(*Nectria heamatococca*));霜霉属(东北霜霉(*Peronospora manshurica*);烟草霜霉(*Peronospora tabacina*));层锈菌属(豆薯层锈菌);茎点霉属(甜菜茎点霉(*Phoma betae*));瘤梗孢属(多主瘤梗孢(*Phymatotrichum omnivorum*));疫霉属(樟疫霉(*Phytophthora cinnamomi*);恶疫霉(*Phytophthora cactorum*);菜豆疫霉(*Phytophthora phaseoli*);寄生疫霉(*Phytophthora parasitica*);柑桔褐腐疫霉(*Phytophthora citrophthora*);大雄疫霉大豆小种(*Phytophthora megasperma* f.sp.*sojae*);致病疫霉(*Phytophthora infestans*));单轴霉属(葡萄生单轴霉(*Plasmopara viticola*));叉丝单囊壳属(白叉丝单囊壳(*Podospheera leucotricha*));柄锈菌属(高粱柄锈菌(*Puccinia sorghi*);条形柄锈菌(*Puccinia striiformis*);禾柄锈菌小麦小种;天门冬属柄锈菌(*Puccinia asparagi*);隐匿柄锈菌(*Puccinia recondite*);花生柄锈菌(*Puccinia arachidis*));腐霉属(瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum*));核腔菌属(麦褐斑核腔菌(*Pyrenophora tritici-repentens*));梨孢属(稻梨孢菌(*Pyricularia oryzae*));腐霉属(终极腐霉(*Pythium ultimum*));丝核菌属(立枯丝核菌;禾谷丝核菌(*Rhizoctonia cerealis*));小菌核属(齐整小核菌(*Scerotium rolfsii*));核盘菌属(核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*));壳针孢属(番茄壳针孢(*Septoria lycopersici*);大豆壳针孢(*Septoria glycines*);颖枯壳针孢(*Septoria nodorum*);小麦壳针孢(*Septoria tritici*));根串珠霉属(根串珠霉(*Thielaviopsis basicola*));钩丝壳属(葡萄钩丝壳(*Uncinula necator*));黑星菌属(苹果黑星菌(*Venturia inaequalis*));轮枝孢菌属(大丽花轮枝孢;黄萎轮枝孢(*Verticillium alboatrum*))。

[0379] 本文涵盖的农业上适用抗真菌组合物也包括呈能够产生MtDef5蛋白和肽,并且可定殖于植物(包括根、嫩芽、叶或植物的其它部分)的宿主细胞(如细菌和真菌细胞)形式的那些。

[0380] 术语“植物定殖微生物”在本文中用于指代能够定殖于“植物环境”,并且可在“植物环境”中表达本发明MtDef5抗真菌蛋白质和肽的微生物。植物定殖微生物是可与植物环境中的植物以共生或非不利关系存在的微生物。

[0381] 美国专利号5,229,112公开可适用于本文公开的MtDef5抗真菌蛋白质和肽的多种可被工程改造以表达抗真菌蛋白质的植物定殖微生物及其使用方法。表达适用于根据本发明抑制植物中的真菌性感染和损害的本发明公开的MtDef5抗真菌蛋白质和肽的植物定殖微生物包括例如选自由以下组成的组的细菌:选自芽孢杆菌科的孢子形成性生物体的属,例如杆菌属种,如苏云金杆菌、以色列杆菌(*Bacillus israelensis*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*);假单胞菌属(*Pseudomonas*);节杆菌属(*Arthrobacter*);固氮螺菌属(*Azospirillum*);棒形杆菌属(*Clavibacter*);埃希氏菌属(*Escherichia*);土壤杆菌属(*Agrobacterium*),例如放射形土壤杆菌(*A.radiobacter*);根瘤菌属(*Rhizobium*);欧文氏菌属(*Erwinia*);固氮菌属(*Azotobacter*);固氮螺菌属(*Azospirillum*);克雷伯氏菌属

(*Klebsiella*);产碱杆菌属(*Alcaligenes*);根际细菌属(*Rhizobacterium*);和黄杆菌属(*Flavobacterium*);以及选自由以下组成的组的酵母:酿酒酵母;巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*);和甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*)。

[0382] 术语“植物环境”包括植物的表面,例如叶、茎干、芽、茎、花部分或根表面;植物的内部和它的细胞;以及直至“根际”,即围绕植物的根,并且受植物的根影响的土壤。

[0383] 当需要向根际施用本发明MtDef5分子时,来自假单胞菌属的根际定殖细菌是特别适用的,尤其是尤其在植物根际中以及在大量定殖于植物根的表面方面具有竞争性的荧光性假单胞菌,例如荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)。适合叶面(叶)定殖细菌的实例是恶臭假单胞菌(*P.putida*)、丁香假单胞菌(*P.syringae*)和欧文氏菌属种。

[0384] 本发明的抗真菌植物定殖微生物可直接施用于植物环境,例如施用于叶、芽、根、嫩芽、花部分、种子等的表面,或施用于土壤。当用作种子包覆物时,本发明的植物定殖微生物在种植之前施用于植物种子。通常,少量抗真菌活性微生物将为处理所述种子所需。

[0385] 确定适用于本发明方法中的植物定殖微生物的为特定植物所需的抗真菌有效量属于本领域的技能,并且将取决于如以下的因素:植物物种、真菌病原体、种植方法和土壤类型(例如pH、有机物含量、水分含量)。

[0386] 在理论上,本发明的含有编码本文公开的MtDef5抗真菌蛋白质和肽的DNA的单一植物定殖微生物足以控制真菌病原体,因为它可生长成为具有足以表达抗真菌量的防御素的数目的克隆的集落。然而,实际上,由于可影响微生物的存活和繁殖的不同环境因素,应在植物环境(例如根或叶)中提供足够数目的植物定殖微生物以保证存活和/或增殖。举例来说,每个种子施用 $10^3$ 至 $10^{10}$ 个细菌或酵母可足以确保微生物定殖在根的表面。优选的是用足够细菌或其它植物定殖微生物对植物环境给药以维持表达50至250纳克防御素的群体。举例来说,每平方厘米植物表面 $10^5$ 至 $10^8$ 个细菌可足以控制真菌性感染。至少0.5纳克,优选1至100纳克抗真菌活性蛋白质或肽可足以控制对植物的真菌损害。

[0387] 本发明的含有抗真菌活性植物相关微生物的组合物可通过与佐剂、稀释剂、载体等一起配制生物活性微生物以提供呈精细分散颗粒固体、颗粒、丸粒、可湿润粉末、粉剂、水性混悬液、分散液或乳液形式的组合物来制备。说明性适合载体媒介物是:溶剂,例如水或有机溶剂;以及精细分散固体,例如高岭土、白垩、碳酸钙、滑石、硅酸盐和石膏。

[0388] 本发明也涵盖抗真菌植物定殖微生物以囊封形式用于本发明的方法和组合物中,例如植物定殖微生物可被囊封在聚合物、明胶、脂质等的壳壁内。例如像乳化剂、分散剂、表面活性剂、湿润剂、消泡剂和抗冻剂的其它配制助剂可被并入抗真菌组合物中,尤其是如果所述组合物在使用之前将被储存任何时期。

[0389] 除抗真菌活性植物定殖微生物之外,本发明的组合物可另外含有其它已知生物活性剂,例如像杀真菌剂、除草剂或杀虫剂。此外,可组合两种或更多种抗真菌活性植物定殖微生物。

[0390] 可通过常规技术,利用例如涂布器、动力撒粉器、杆式和手动喷雾器、喷雾撒粉器和颗粒施用器进行含有本发明的遗传工程改造植物定殖微生物作为活性剂的抗真菌组合物的施用。

[0391] 本发明的组合物以抗真菌有效量施用,所述抗真菌有效量将视例如像以下的因素而变化:待控制的特定真菌病原体、待处理的特定植物(和植物部分或土壤)、以及施用抗真

菌活性组合物的方法。

[0392] 含有MtDef5抗真菌蛋白质和肽的药物组合物

[0393] 本发明不仅涵盖表达MtDef5蛋白和肽的转基因植物和可施用于植物的场所的转化微生物,而且也涵盖可用于抑制感染人或动物的易感病原性真菌的生长,或杀灭所述病原性真菌的药物组合物,即通过向患者或其它有需要的受试者施用抗真菌有效量的MtDef5蛋白、肽或其生物功能性等效物来治疗所述真菌性感染。

[0394] 可通过常规方法来配制包含MtDef5蛋白和肽及其生物功能性等效物的所述药物组合物,所述方法如Remington:The Science and Practice of Pharmacy(2005),第21版,University of the Sciences in Philadelphia,Lippincott Williams&Wilkins中所述的那些。所述组合物可在约0.1 $\mu$ g/ml至约100mg/ml的范围内,优选在约5 $\mu$ g/ml与约5mg/ml之间的浓度下,在约3.0至约9.0的范围内的pH下含有MtDef5蛋白和肽及其各种组合。所述组合物可使用例如在约1mM与1M之间,优选在约10mM与100mM之间,更优选在约15mM与50mM之间的磷酸盐缓冲液加以缓冲。在低缓冲剂浓度的情况下,合乎需要的是添加盐以增加离子强度,优选是在约1mM至约1M,更优选约10mM至约100mM的范围内的NaCl。

[0395] MtDef5蛋白和肽可单独、以彼此任何组合配制,并且这些中的任一个可另外与其它常规抗真菌治疗性化合物组合配制,所述治疗性化合物非限制性地举例来说如多烯抗真菌剂;咪唑、三唑及噻唑抗真菌剂;烯丙胺;以及常规用于人医学和兽医学中的棘白菌素(echinocandin)。

[0396] 可通过多种常规途径实现本发明MtDef5分子的施用,其中表面施用是优选的。

[0397] 以下实施例描述本发明的各个方面,并且仅意图说明而非限制其中适用的化合物、组合物和方法。

[0398] 实施例1

[0399] 构建大豆转化载体AKK/FMV/MtDef5

[0400] 如图1中所示,将MtDef5基因或cDNA与它自身的信号肽一起以Nco I-Xba I片段形式克隆在大豆表达载体AKK1472(Hammes等(2005)Molecular Plant Microbe Interactions 18:1247-1257)中的玄参花叶病毒35S启动子(Sanger等(1990)Plant Molecular Biology14:433-443)与胭脂碱合成酶聚腺苷酸化信号(Gleave(1992)Plant Molecular Biology 20:1203-1207)之间。将含有MtDef5嵌合基因或cDNA以及作为可选择标志物基因的赋予Basta®抗性的bar基因(Thompson等(1985)EMBO Journal 6:2519-2523)的AKK1472载体转移至根癌土壤杆菌菌株EHA105中以用于转化大豆(Clemente等(2000)Crop Sci.40:797-803;Zhang等(1999)Plant Cell,Tiss.Organ Cult.56:37-46)。

[0401] 实施例2

[0402] 大豆转化和转基因植物再生

[0403] 先前已描述在这个实施例中用于使用土壤杆菌属产生转基因大豆株系的转化方案(Clemente等(2000)Crop Sci.40:797-803;Zhang等(1999)Plant Cell,Tiss.Organ Cult.56:37-46)。

[0404] 首先使用商业等级Clorox®(5%次氯酸钠NaClO水溶液)将种子(在这个情况下,大豆种类称为“Jack”)的外部灭菌过夜。接着使灭菌的种子在24°C下在发芽介质(GM;甘博格氏B5培养基(Gamborg's B5 medium)(Gamborg等(1968)Experimental Cell Research

50:151), 补充有2%蔗糖, pH 5.8, 用0.8%琼脂固化)中发芽5天(18/6光照方案)。通过低速离心收集用实施例1的载体转化的根癌土壤杆菌, 并且混悬于共培养培养基中直至最终OD<sub>650</sub>是0.6至1.0。共培养培养基是1/10的甘博格氏B5培养基, 补充有1.67mg/l 6-苯氨基基嘌呤(BAP)、0.25mg/l 赤霉素(GA3)、3%蔗糖、200μM乙酰丁香酮、20mM 2-(N-吗啉代)-乙烷磺酸(MES), pH 5.4。

[0405] 先前已描述以下方案(Clemente等(2000)(上文); Zhang等(1999)(上文))。

[0406] 将土壤杆菌属接种物与制备的外植体(来自受伤的发芽种子)一起放置在陪替氏平板(petri plate)中30分钟, 偶尔进行搅拌。接着将外植体放置在共培养板(陪替氏培养皿, 其含有0.76g甘博格基本盐混合物、7.4g MES、60g蔗糖, 使用1M KOH调整pH至5.4, 并且5g/L琼脂糖溶解于温热培养基中)上, 近轴侧向下。用帕拉膜(parafilm)包覆各板, 并且放置在24℃、18/6光照方案下3天。在共培养时期之后, 将外植体于补充有0.25mg/l GA3的液体嫩芽引发培养基(3.08g甘博格B5盐、30g蔗糖、0.56g MES, 使用1M KOH调整pH至5.6)中短暂洗涤。在前两周之后, 与发育结点齐平切割胚轴区域, 并且在不存在草铵膦下孵育两周。接着每两周将组织转移至具有3mg/l草铵膦的新鲜嫩芽引发培养基中, 持续总计约10周。使组织定向以使新鲜切割表面包埋在培养基中, 其中分化区域与表面齐平。在嫩芽引发时期结束时, 仅使用分化外植体。从外植体移除子叶, 并且在发育结点的基底处进行新鲜切割(水平), 将组织转移至嫩芽延伸培养基中, 并且在24℃下, 以18/6光照方案进行培养。嫩芽延伸培养基由补充有1mg/l玉米素核糖核苷、0.1mg/l吲哚乙酸(IAA)、0.5mg/l GA3、3%蔗糖、100mg/l焦谷氨酸、50mg/l天冬酰胺、3mM MES(pH 5.6)的MS盐/甘博格氏维生素组成, 用0.8%纯化琼脂固化。因为bar基因用作标志物, 所以添加3mg/l草铵膦。每两周将组织转移至新鲜嫩芽延伸培养基中。在各次转移时, 在组织的基底处进行新鲜水平切削。在不进一步选择下使延伸的嫩芽(大于3cm)在生根培养基上生根。生根培养基由4.33g Murashige和Skoog基本盐混合物、20g蔗糖、0.56g MES组成。使用1M KOH调整pH至5.6, 并且每升添加3g植物凝胶。热压处理溶液(20分钟), 并且当冷却时, 添加1ml甘博格B5维生素(1000×)、1ml L-天冬酰胺单水合物(50mg/ml储备物)和1ml L-焦谷氨酸(100mg/ml储备物)。

[0407] 接着使植物生长, 并且使用用以检测MtDef5基因或cDNA的存在的PCR进行选择。使用qRT-PCR测定来测定MtDef5基因或cDNA在RNA水平上的表达, 并且通过使用MtDef5多克隆抗体进行夹心式ELISA来测定MtDef5蛋白的表达。最终使用利用Promega GoTaq<sup>®</sup> qPCR主混合物(Promega Corporation, Madison, WI), 根据制造商说明书在AB StepOne Plus-实时PCR系统(Applied Biosystems, Carlsbad, CA)上进行的定量PCR选择纯合子。

[0408] 将获得、鉴定就MtDef5DNA构建体插入来说是纯合的转基因植物, 并且随后测试其对镰刀菌属头部枯萎病(如Chen等(1999)Theor. Appl. Genet. 99:755-760中所述); 叶锈病和条锈病(如Cheng等(2010)Theor. Appl. Genet. 121:195-204中所述); 和秆锈病(如Nirmala等(2011)PNAS 108:14676-14681中所述)的抗性。

[0409] 实施例3

[0410] 构建小麦转化载体pZP212/玉米Ubi1A启动子/MtDef5/35S 3'

[0411] 对于MtDef5在小麦中表达, 将基于单子叶植物优选密码子合成MtDef5基因或cDNA以使MtDef5信号肽和成熟蛋白质的氨基酸序列保持不变。合成MtDef5基因或cDNA将从GenScript Corporation(Piscataway, NJ, USA)获得。合成MtDef5基因将被放置在玉米泛素

(Ubi1)启动子/内含子与CaMV 35S聚腺苷酸化信号序列之间,并且克隆在二元植物表达载体pZP212(Hajdukiewicz等,1994)的T-DNA边界之间,如图2中所示。

[0412] 含有合成MtDef5基因或cDNA和新霉素磷酸转移酶可选择标志物基因(nptII)的pZP212载体将被引入Bobwhite和/或XC9小麦中。将如下在实施例4中所述获得转基因小麦。

[0413] 实施例4

[0414] 小麦转化和转基因植物再生

[0415] 用于小麦转化的方案先前由Cheng等(1997)Plant Physiology 115:971-980所述。

[0416] 对于这些转化,使用普通小麦(*Triticum aestivum*)Bobwhite栽培品种。在开花之后14天从植物收集不成熟颖果。无菌解剖不成熟胚,并且在具有100mg L<sup>-1</sup>抗坏血酸的半固体或液体CM4培养基(Zhou等(1995)Plant Cell Replication 15:159-163)(CM4C)上培养。将CM4培养基中的MS盐(Murashige和Skoog(1962)Physiology Plant.15:473-497)调整至完全强度(原始量)或十分之一强度(Fry等(1987)Plant Cell Reports 6:321-325)。培养不成熟胚3至4小时。通过在CM4C培养基上培养不成熟胚10至25天来制备胚胎发生愈伤组织。使用胚胎发生愈伤组织区段用根癌土壤杆菌接种源于不成熟胚的愈伤组织碎片。如上在实施例3中对于大豆转化所述来制备具有实施例3中所述的载体(图2)的根癌土壤杆菌C58(ABI)。使根癌土壤杆菌生长直至1至2的细胞密度A<sub>600</sub>以用于接种。将维持在CM4C培养基上的不成熟胚和胚胎发生愈伤组织转移至于陪替氏培养皿中的根癌土壤杆菌细胞混悬液中。在23至25℃下在黑暗中进行接种3小时。在接种之后,移除根癌土壤杆菌细胞,并且将外植体放置在具有液体CM4C的半固体培养基(脱乙酰吉兰糖胶(Gelrite))上,所述液体CM4C具有完全强度MS盐,并且补充有10g/L葡萄糖和200μM乙酰丁香酮。在24至26℃下在黑暗中进行共培养2或3天。在共培养之后,在不选择下在具有250mg/L羧苄西林的固体CM4C培养基上培养感染的未成熟胚和愈伤组织2至5天。接着将根癌土壤杆菌感染的外植体转移至补充有3mg/l草铵膦和250mg/L羧苄西林的CM4C培养基中以用于愈伤组织诱导。两周后,将外植体转移至第一再生培养基MMS0.2C(由MS盐和维生素、1.95g/L MES、0.2mg/L 2,4-二氯-苯氧基乙酸、100mg/L抗坏血酸和40g/L麦芽糖组成,通过补充有3mg/l草铵膦和250mg/L羧苄西林的2g/L脱乙酰吉兰糖胶固化)中。在转移至再生培养基中时,将源于一个不成熟胚的各片愈伤组织或一片接种的愈伤组织分成若干小片(约2mm)。在另外2周中,将幼小嫩芽和活愈伤组织转移至与MMS0.2C含有相同组分的第二再生培养基MMSOC(包括所有抗生素)中。当嫩芽发育成约3cm或更长幼苗时,将它们转移至含有再生培养基的更大培养容器中以达成进一步生长和选择。在这个阶段从一些幼苗获取叶样品以进行PCR测试。将具有高度草铵膦抗性的植物转移至土壤中。源于相同胚或同一片愈伤组织的所有植物都被视为给定事件的克隆。

[0417] 接着使植物生长,并且使用用以检测MtDef5基因或cDNA的存在的PCR进行选择。使用qRT-PCR测定来测定MtDef5基因或cDNA在RNA水平上的表达,并且通过使用MtDef5多克隆抗体进行夹心式ELISA来测定MtDef5蛋白的表达。最终使用利用Promega GoTaq<sup>®</sup> qPCR主混合物(Promega Corporation, Madison, WI),根据制造商说明书在AB StepOne Plus-实时PCR系统(Applied Biosystems, Carlsbad, CA)上进行的定量PCR选择纯合子。

[0418] 将获得、鉴定就MtDef5DNA构建体插入来说是纯合的转基因植物,并且随后测试其



对镰刀菌属头部枯萎病(如Chen等(1999)Theor.Appl.Genet.99:755-760中所述);叶锈病和条锈病(如Cheng等(2010)Theor.Appl.Genet.121:195-204中所述);和秆锈病(如Nirmala等(2011)PNAS 108:14676-14681中所述)的抗性。

[0419] 实施例5

[0420] 具有C末端延伸部分的化学合成MtDef5.1a $\gamma$ 核心肽(GMA-5C)(GACHRQGFACFCYKKC(SEQ ID NO:57))的体外抗真菌活性

[0421] 为确定源于全长MtDef5蛋白的小肽是否展现抗真菌活性,从Genemed, Inc., Texas获得由C末端18个氨基酸组成的肽,并且测试它针对禾谷镰刀菌PH-1的抗真菌活性。这个肽含有成熟MtDef5蛋白的 $\gamma$ 核心基序和最后6个氨基酸。

[0422] 使用具有氨基酸序列GACHRQGFACFCYKKC(SEQ ID NO:57)的化学合成GMA-5C肽评估MtDef5.1a的 $\gamma$ 核心基序的抗真菌活性。如Ramamoorthy等(2007)Cellular Microbiology 9:1491-1506中所述,在使禾谷镰刀菌PH-1分生孢子与肽一起孵育之后24小时评估对化学合成GMA-5C肽的体外抗真菌活性的定量评估。结果显示于图3中,其中报道的值是三次重复的平均值。误差棒指示标准偏差。

[0423] 数据说明这个肽的IC<sub>50</sub>(为50%抑制真菌生长所需的浓度)是约6-12 $\mu$ M,而IC<sub>100</sub>(为100%抑制真菌生长所需的浓度)是约24 $\mu$ M。

[0424] 尽管由此描述本发明,但将明显的是本发明可以许多方式加以改变。所述变化不应视为偏离本发明的精神和范围,并且如将对本领域技术人员明显的所有所述修改都意图包括在以下权利要求的范围内。

[0425] 氨基酸和核苷酸序列信息

[0426] 包含MtDef5信号肽(8-29个氨基酸,加下划线)和成熟MtDef5防御素蛋白(约50个氨基酸)的蒺藜苜蓿MtDef5.1a-MtDef5.6防御素原蛋白氨基酸序列,其中各MtDef5防御素的 $\gamma$ 核心基序以粗体、斜体、10点类型显示

[0427] MtDef5.1a:SEQ ID NO:1

[0428] MTSSASKFYTIFIFVCLAFLFISTSEVEAKLCQKRSTTWSGPCLNTGNCKRQCINVEHATF  
GACHRQGFACFCYKKC

[0429] MtDef5.1a-MtDef5.1b“连接体”:SEQ ID NO:2

[0430] APKKVEP

[0431] MtDef5.1b:SEQ ID NO:3

[0432] KLCERRSKTWSGPCLISGNCKRQCINVEHATSGACHRQGFACFCYKKC

[0433] MtDef5.1a-“连接体”-MtDef5.1b:SEQ ID NO:4

[0434] MTSSASKFYTIFIFVCLAFLFISTSEVEAKLCQKRSTTWSGPCLNTGNCKRQCINVEHATF  
GACHRQGFACFCYKCCAPKKVEPKLCERRSKTWSGPCLISGNCKRQCINVEHATSGACHRQGFACFCYKKC

[0435] MtDef5.2:SEQ ID NO:5

[0436] HASSPKLFTIFLFLILVLLFSTSEVQAKLCRGRSKLWSGPCINSKCKRQCINVERAVS  
GGCNLNTGVFCDFKC

[0437] MtDef5.3:SEQ ID NO:6

[0438] MTSSATKFYTIFVFLALLLISICEVEAKVCQKRSTTWSGPCLNTGNCKRQCVDVENATF  
GACHRQGFACFCYKKC

[0439] MtDef5.4:SEQ ID NO:7

[0440] MASSTLKFNTIFLFLSLALLLFFTLLEVQGNICKRKSTTWSGPCLNTGNCKNQICINVEHATF  
GACHQDGFQFACFCYFNC

[0441] MtDef5.5:SEQ ID NO:8

[0442] MASSALKYYTFFLFFTLALILLPTLEVQGNTCQRKSKTWSGPCLNTANCKNQICISKEPPATF  
GACHRDGIGFACFCYFNC

[0443] MtDef5.6:SEQ ID NO:9

[0444] MVCTEVQAKLCRGRSKLWSGPCINSKCKRQCINVERAVSGGCHLQNTGVVFCDFKC

[0445] 包含MtDef5信号肽(8-29个氨基酸)编码序列(加下划线)和成熟MtDef5蛋白(约50个氨基酸)编码序列的蒺藜苜蓿MtDef5.1a-MtDef5.6原蛋白cDNA编码序列.其中 $\gamma$ 核心基序编码序列以粗体类型显示

[0446] MtDef5.1a和MtDef5.1b cDNA(SEQ ID NO:10)。以粗体、斜体和加下划线显示的核苷酸序列编码“连接体”肽氨基酸序列APKKVEP:

[0447]

ATGACTTCCTCTGCTAGTAAATTCTATAACCATCTTCATTTTTGTCTGCCTTGCCTTTCTCTTTATTTCCACATCTGA  
GGTGAAGCAAAACTTTGTCAAAAGCGAAGTACAACATGGTCAGGACCTTGTCTTAACACAGGAAACTGCAAAAGAC  
AATGCATTAATGTGGAGCATGCTACTTTTTGGTGCCTTGTCAACCGTCAAGGC TTGGTTTTGCTTGCCTCTGCTACAAAAA  
TGTGCTCCAAAGAGGTGSAACTAAAACTTTGTGAAAGGCGAAGCAAAACATGGTCAGGACCTTGTCTTATCTCAGGAA  
ATTGTAAGACAGTGCATCAATGTTGAGCATGCAACTTCTGGTGCCTTGTCAACCGTCAAGGCATGGTTTTGCTTG  
TTCTGCAAGAAAAATGTTGA

[0448] MtDef5.2 cDNA(SEQ ID NO:11):

[0449]

ATGGCTTCCTCTTCTCCTAAATTGTTTACCATCTTTCTGTTTCTCATCCTTGTCGTGCTCCTTTTCTCAACTTCGGA  
GGTGAAGCAAAACTTTGTAGAGGGAGAAGCAAACTTTGGTCAGGACCTTGTATTAACCAAAATGCAAAAGACAAT  
G C A T C A A C G T G G A G C G C G C A G T T A G C GGGGTTGTCACTTGATAACACT GGAGTTTTTGT  
TTCTGCGACTTCAAATGCTGA

[0450] MtDef5.3 cDNA(SEQ ID NO:12):

[0451]

ATGACTTCCTCTGCTACTAAATTTTACACCATCTTTGTTTTTGTCTGCCTTGCCTTCTCCTTATTTCCATATGTGA  
GGTGAAGCAAAAGTGTGTCAAAAACGAAGTAAACGTGGTCAGGACCTTGTCTTAACACAGGAAACTGTAAAAGAC  
AATGCGTTGATGTGGAGAATGCAACCTTCGGTGCCTTGTCAACCGTCAAGGC TATGGTTTTGCTTGCCTCTGCTACAAAAAG  
TGTTGA

[0452] MtDef5.4 cDNA(SEQ ID NO:13):

[0453]

ATGGCTTCATCTACTCTTAAATTCAACACTATCTTTCTGTTTCTCAGCCTTGCACTTCTCCTGTTCTTACATTGGA  
GGTACAAGGAAATATTTGTAAAAGGAAAAGCACAACATGGTCAGGGCCATGTTTAAACACGGGAAACTGTAAAAATC  
AGTGCATCAATGTGGAACATGCTACTTTTTGGGGCATGCCACCAAGATGGA TTGGATTGCTTGCCTCTGCTACTTCAAT  
TGCTGA

[0454] MtDef5.5 cDNA(SEQ ID NO:14):

[0455]

ATGGCTTCCTCTGCTCTTAAATACTACACTTTCTTTCTGTTTTTCATCCTTGCACCTTATCCTGTTACCCACATTGGA  
 GGTACAAGGAAATACTTGTCAAAGGAAAAGCAAACATGGTCAGGGCCATGTTTAAACACGGCAAACCTGTAAAAATC  
 AGTGCATCAGTAAGGAACCAACCGGCAACATTTGGCCATGTCACCGTGAATGSCATTGGATTTGCTTGC  
 TTCTGTTACTTCAACTGCTAA

[0456] MtDef5.6 cDNA(SEQ ID NO:15):

[0457]

ATGGTGTGTACAGAGGTGCAAGCAAACTTTGTAGAGGGAGAAGCAAACCTTGGTCAGGGCCTTGTATTAACCTAAA  
 ATGCAAAAGACAATGCATCAACGTGGAGCGCGCAGTTAGCAGGGGTTGTACCTTGATAACACTGGAGTTTTTGT  
 TTCTGCGACTTCAAATGCTGA

[0458] 成熟蒺藜苜蓿MtDef5.1a-MtDef5.6防御素蛋白氨基酸序列

[0459] MtDef5.1a:SEQ ID NO:16

[0460] KLCQKRSTTWSGPCLNTGNCKRQCINVEHATFGACHRQGFACFCYKKC

[0461] MtDef5.1b:SEQ ID NO:17

[0462] KLCERRSKTWSGPCLISGNCKRQCINVEHATSGACHRQGIACFCCKKC

[0463] MtDef5.2:SEQ ID NO:18

[0464] KLCRGRSKLWSGPCINSKCKRQCINVERAVSGGCHLDNTGVFCDFKC

[0465] MtDef5.3:SEQ ID NO:19

[0466] KVCQKRSTTWSGPCLNTGNCKRQCVDVENATFGACHRQGYGFACFCYKKC

[0467] MtDef5.4:SEQ ID NO:20

[0468] NICKRKSTTWSGPCLNTGNCKNQCINVEHATFGACHQDGFACFCYFNC

[0469] MtDef5.5:SEQ ID NO:21

[0470] NTCQRKSKTWSGPCLNTANCKNQCISKEPPATFGACHRDGIGFACFCYFNC

[0471] MtDef5.6:SEQ ID NO:22

[0472] KLCRGRSKLWSGPCINSKCKRQCINVERAVSGGCHLDNTGVFCDFKC

[0473] 成熟蒺藜苜蓿MtDef5.1a-MtDef5.6防御素蛋白cDNA编码序列

[0474] MtDef5.1a:SEQ ID NO:23

[0475]

AAACTTTGTCAAAAGCGAAGTACAACATGGTCAGGACCTTGTCTTAACACAGGAACTGCAAAAGACAATGCATTAA  
 TGTGGAGCATGCTACTTTTGGTGCTTGTTCATCGTCAAGGCTTTGGTTTTGCTTGTCTTCTGCTACAAAAAATGT

[0476] MtDef5.1b:SEQ ID NO:24

[0477]

AAACTTTGTGAAAGGCGAAGCAAAACATGGTCAGGACCTTGTCTTATCTCAGGAAATTGTAAGACAGTGCATCAA  
 TGTTGAGCATGCAACTTCTGGTGCTTGTACCGTCAAGGCATTGGTTTTGCTTGTCTTCTGCAAGAAAAAATGT

[0478] MtDef5.2:SEQ ID NO:25

[0479]

AAACTTTGTAGAGGGAGAAGCAAACCTTGGTCAGGGCCTTGTATTAACCTAAAATGCAAAAGACAATGCATCAACGT  
 GGAGCGCGCAGTTAGCGGGGTTGTACCTTGATAAACTGGAGTTTTTTGTTTTCTGCGACTTCAAATGC

[0480] MtDef5.3:SEQ ID NO:26

[0481]

AAAGTGTGTCAAAAACGAAGTAAAACGTGGTCAGGACCTTGTCTTAACACAGGAAACTGTAAAAGACAATGCGTTGA  
TGTGGAGAATGCAACCTTCGGTGCTTGTACCGTCAAGGCTATGGTTTTGCTTGTCTCTGCTACAAAAAGTGT

[0482] MtDef5.4:SEQ ID NO:27

[0483]

AATATTTGTAAAAGGAAAAGCACAAACATGGTCAGGGCCATGTTTAAACACGGGAAACTGTAAAAATCAGTGCATCAA  
TGTGGAACATGCTACTTTTGGGGCATGCCACCAAGATGGATTTGGATTTGCTTGTCTCTGCTACTTCAATTGC

[0484] MtDef5.5:SEQ ID NO:28

[0485]

AATACTTGTCAAAGGAAAAGCAAAACATGGTCAGGGCCATGTTTAAACACGGCAAACACTGTAAAAATCAGTGCATCAG  
TAAGGAACCACCGCAACATTTGGGGCATGTACCGTGATGGCATTGGATTTGCTTGTCTCTGTTACTTCAACTGC

[0486] MtDef5.6:SEQ ID NO:29

[0487]

AAACTTTGTAGAGGGAGAAGCAAACCTTTGGTCAGGGCCTTGTATTAACCTCAAATGCAAAGACAATGCATCAACGT  
GGAGCGCGCAGTTAGCGGGGTTGTACCTTGATAACACTGGAGTTTTTTGTTTTCTGCGACTTCAAATGC

[0488] MtDef5.1a-5.6信号肽氨基酸序列

[0489] MtDef5.1a-5.1b信号肽序列:

[0490] MTSSASKFYTIFIVCLAFILFISTSEVEA(SEQ ID NO:30)

[0491] MtDef5.2信号肽序列:

[0492] MASSPKLFTIFLFLILVLLFSTSEVQA(SEQ ID NO:31)

[0493] MtDef5.3信号肽序列:

[0494] MTSSATKFYTIFVFLALLLISICEVEA(SEQ ID NO:32)

[0495] MtDef5.4信号肽序列:

[0496] MASSTLKFNTIFLFLSLALLLFTLEVQG(SEQ ID NO:33)

[0497] MtDef5.5信号肽序列:

[0498] MASSALKYYTFFLFFILALILLPTLEVQG(SEQ ID NO:34)

[0499] MtDef5.6推定信号肽序列:

[0500] MVCTEVQA(SEQ ID NO:35)

[0501] MtDef5.1a-5.6信号肽cDNA编码序列

[0502] MtDef5.1a-5.1b信号肽cDNA编码序列:

[0503]

ATGACTTCCTCTGCTAGTAAATTCTATACCATCTTCATTTTTGTCTGCCTTGCCTTCTCTTTATTTCCACATCTGA  
GGTGAAGCA(SEQ ID NO:36)

[0504] MtDef5.2信号肽cDNA编码序列:

[0505]

ATGGCTTCCTCTTCTCCTAAATTGTTTACCATCTTCTGTTTCTCATCCTTGTGCTGCTCCTTTCTCAACTTCGGA  
GGTGCAAGCA(SEQ ID NO:37)

[0506] MtDef5.3信号肽cDNA编码序列:

[0507]

ATGACTTCCTCTGCTACTAAATTTACACCATCTTGTTTTTGTCTGCCTTGCCTTCTCCTTATTTCCATATGTGA

GGTGAAGCA(SEQ ID NO:38)

[0508] MtDef5.4信号肽cDNA编码序列:

[0509]

ATGGCTTCATCTACTCTTAAATTCAACACTATCTTTCTGTTTCTCAGCCTTGCACTTCTCCTGTTCTTCACATTGGA  
GGTACAAGGA(SEQ ID NO:39)

[0510] MtDef5.5信号肽cDNA编码序列:

[0511]

ATGGCTTCCTCTGCTCTTAAATACTACACTTTCTTTCTGTTTTTCATCCTTGCACTTATCCTGTTACCCACATTGGA  
GGTACAAGGA(SEQ ID NO:40)

[0512] MtDef5.6信号肽cDNA编码序列:

[0513] ATGGTGTGTACAGAGGTGCAAGCA(SEQ ID NO:41)

[0514] MtDef4.1-4.3和其它信号肽氨基酸序列

[0515] MtDef4.1(H33R)信号肽序列:

[0516] MARSVPLVSTIFVFLLLLIVATGPSMVAEA(SEQ ID NO:42)

[0517] MtDef4.2信号肽序列:

[0518] MARSVPLVSTIFVFFLLIVATEMGPSMVAA(SEQ ID NO:43)

[0519] MtDef4.3信号肽序列:

[0520] MARSVPLVSTIFVFFLLLVATEMGPIMVAAEA(SEQ ID NO:44)

[0521] AL385796信号肽序列:

[0522] MARSVFLVSTIFVFLLVLVATGPSMVAAFA(SEQ ID NO:45)

[0523] AW573770信号肽序列:

[0524] MARSVSLVFTIFVFLLLLIVATGPSMVAEA(SEQ ID NO:46)

[0525] BE999096信号肽序列:

[0526] MARSVPLVSTIFVFLLLLIVATGPSMVGEA(SEQ ID NO:47)

[0527] MtDef4信号肽共有序列:

[0528] MARSVPLVSTIFVFLLLLIVATGPSMVAEA(SEQ ID NO:48)

[0529] MsDef1、MtDef4和MtDef5.1a-5.6  $\gamma$  核心基序(GXCX<sub>3-9</sub>C)肽氨基酸序列

[0530] MsDef1:GRCRDFRC(SEQ ID NO:49)

[0531] MtDef4:GRCRGFRRRC(SEQ ID NO:50)

[0532] MtDef5.1a:GACHRQGFAC(SEQ ID NO:51)

[0533] MtDef5.1b:GACHRQIGFAC(SEQ ID NO:52)

[0534] MtDef5.2:GGCHLDNTGVFC(SEQ ID NO:53)

[0535] MtDef5.3:GACHRQGYFAC(SEQ ID NO:54)

[0536] MtDef5.4:GACHQDGFAC(SEQ ID NO:55)

[0537] MtDef5.5:GACHRDGIGFAC(SEQ ID NO:56)

[0538] MtDef5.6:GGCHLDNTGVFC(SEQ ID NO:57)

[0539] 具有C末端延伸部分的MtDef5.1a-5.6  $\gamma$  核心肽(GMA-5C)

[0540] MtDef5.1a:GACHRQGFACFCYKKC(SEQ ID NO:58)

[0541] MtDef5.1b:GACHRQIGFACFCKKC(SEQ ID NO:59)

- [0542] MtDef5.2:GGCHLDNTGVFCFCDFKC(SEQ ID NO:60)
- [0543] MtDef5.3:GACHRQGYGFACFCYKKC(SEQ ID NO:61)
- [0544] MtDef5.4:GACHQDGFACFCYFNC(SEQ ID NO:62)
- [0545] MtDef5.5:GACHRDGIGFACFCYFNC(SEQ ID NO:63)
- [0546] MtDef5.6:GGCHLDNTGVFCFCDFKC(SEQ ID NO:64)
- [0547] MtDef5.1a-5.6  $\gamma$  核心基序(GXCX<sub>3-9</sub>C)肽氨基酸序列cDNA编码序列
- [0548] MtDef5.1a:GGTGCTTGTTCATCGTCAAGGCTTTGGTTTTGCTTGC(SEQ ID NO:65)
- [0549] MtDef5.1b:GGTGCTTGTTCACCGTCAAGGCATTGGTTTTGCTTGC(SEQ ID NO:66)
- [0550] MtDef5.2:GGGGTTGTACCTTGATAAACTGGAGTTTTTTGT(SEQ ID NO:67)
- [0551] MtDef5.3:GGTGCTTGTTCACCGTCAAGGCTATGGTTTTGCTTGC(SEQ ID NO:68)
- [0552] MtDef5.4:GGGGCATGCCACCAAGATGGATTTGGATTTGCTTGC(SEQ ID NO:69)
- [0553] MtDef5.5:GGGGCATGTTCACCGTATGGCATTGGATTTGCTTGC(SEQ ID NO:70)
- [0554] MtDef5.6:GGGGTTGTACCTTGATAAACTGGAGTTTTTTGT(SEQ ID NO:71)
- [0555] 具有C末端延伸部分的MtDef5.1a-5.6  $\gamma$  核心肽(GMA-5C)cDNA编码序列
- [0556] MtDef5.1a:GGTGCTTGTTCATCGTCAAGGCTTTGGTTTTGCTTGTCTGCTACAAAAAATGT(SEQ ID NO:72)
- [0557] MtDef5.1b:GGTGCTTGTTCACCGTCAAGGCATTGGTTTTGCTTGTCTGCAAGAAAAAATGT(SEQ ID NO:73)
- [0558] MtDef5.2:GGGGTTGTACCTTGATAAACTGGAGTTTTTTGTTTCTGCGACTTCAAATGC(SEQ ID NO:74)
- [0559] MtDef5.3:GGTGCTTGTTCACCGTCAAGGCTATGGTTTTGCTTGTCTGCTACAAAAAGTGT(SEQ ID NO:75)
- [0560] MtDef5.4:GGGGCATGCCACCAAGATGGATTTGGATTTGCTTGTCTGCTACTTCAATTGC(SEQ ID NO:76)
- [0561] MtDef5.5:GGGGCATGTTCACCGTATGGCATTGGATTTGCTTGTCTGTTACTTCAACTGC(SEQ ID NO:77)
- [0562] MtDef5.6:GGGGTTGTACCTTGATAAACTGGAGTTTTTTGTTTCTGCGACTTCAAATGC(SEQ ID No:78)
- [0563] 引用的非专利出版物
- [0564] 本文引用各种专利和非专利出版物,其各自的公开内容以引用的方式整体并入本文。
- [0565] Bent AF,Kunkel BN,Dahlbeck D,Brown KL,Schmidt R,Giraudat J,Leung J,Staskawicz BJ.(1994)RPS2 of Arabidopsis thaliana:a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes.Science 265(5180):1856-60.
- [0566] Broekaert,W.F.,Terras,F.R.,Cammue,B.P.,and Vanderleyden,J.(1990).An automated quantitative assay for fungal growth inhibition.FEMS Microbiology Letters 69,55-60.
- [0567] Broekaert,W.F.,Terras,F.R.,Cammue,B.P.,and Osborn,R.W.(1995).Plant defensins:novel antimicrobial peptides as components of the host defense

system. *Plant Physiol* 108, 1353–1358.

[0568] Broekaert, W.F., Cammue, B.P.A., De Bolle, M.F.C., Thevissen, K., De Samblanx, G.W., and Osborn, R.W. (1997). Antimicrobial peptides from plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 16, 297–323.

[0569] Broothaerts W, Mitchell HJ, Weir B, Kaines S, Smith LM, Yang W, Mayer JE, Roa-Rodriguez C, Jefierson RA. 2005. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. 2005. *Nature*. 433(7026):629–33.

[0570] Bustin, S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* (2002) 29, 23–39.

[0571] Callis, J., Fromm, M., Walbot, V. (1987) Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes Dev.* 1987 Dec; 1(10): 1183–200.

[0572] Cappellini, R.A., and Peterson, J.L. (1965). Macroconidium formation in submerged cultures by a non-sporulating strain of *Gibberella zeae*. *Mycologia* 57, 962–966.

[0573] Cazzonnelli, C.I. and J. Velten. (2003) Construction and Testing of an Intron-Containing Luciferase Reporter Gene From *Renilla reniformis*. *Plant Molecular Biology Reporter* 21: 271–280.

[0574] Collier, R., B. Fuchs, N. Walter, W.K. Lutke, and C.G. Taylor. (2005) Ex vitro composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology. *Plant J* 43: 449–457.

[0575] Correll, J.C., Klittich, C.J.R., and Leslie, J.F. (1987). Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium graminearum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* 77, 1640–1646.

[0576] da Silva Conceicao, A., and Broekaert, W.F. (1999). Plant Defensins. In *Pathogenesis-related proteins in plants*, S. Muthukrishnan, ed (New York: CRC Press), pp. 247–260.

[0577] Doyle JJ, Schuler MA, Godette WD, Zenger V, Beachy RN, Slightom JL. (1986) The glycosylated seed storage proteins of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*. Structural homologies of genes and proteins. *J Biol Chem.* 261(20): 9228–38.

[0578] Frame, B.R., Shou, H., Chikwamba, R.K., Zhang, Z., Xiang C., Fonger, T.M., Pegg SE, Li B, Nettleton DS, Pei D, and Wang K. (2002) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. *Plant Physiol.* 129(1): 13–22.

[0579] Gao, A., Hakimi, S.M., Mittanek, C.A., Wu, Y., Woerner, M.B., Stark, D.M., Shah, D.M., Liang, J., and Rommens, C.M.T. (2000). Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nature Biotechnology* 18, 1307–1310.

[0580] Grant MR, Godiard L, Straube E, Ashfield T, Lewald J, Sattler A, Innes RW,

Dangl, J.L. (1995) Structure of the Arabidopsis RPM1 gene enabling dual specificity disease Resistance Science. 269(5225):843-6.

[0581] Hammond-Kosack, K.E., Urban, M., Baldwin, T., Daudi, A., Rudd, J.J., Keon, J., Lucas, J.A., Maguire, K., Korniyukhin, D., Jing, H.-C., Bass, C., and Antoni, J. (2004) 4th International Crop Science Congress. In New directions for a diverse planet, T. Fischer, Turner, N., Angus, J., McIntyre, L., Robertson, M., Borrell, A., Lloyd, D., ed (Brisbane, Australia: The Regional Institute, Ltd, Gosford, Australia).

[0582] Hanks, J.N., Snyder, A.K., Graham, M.A., Shah, R.K., Blaylock, L.A., Harrison, M.J., and Shah, D.M. (2005). Defensin gene family in *Medicago truncatula*: structure, expression and induction by signal molecules. *Plant Mol Biol* 58, 385-399.

[0583] Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffman, N., et al. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*. 227:1229-1231

[0584] Kingsman SM, Kingsman AJ, Dobson MJ, Mellor J, Roberts NA. (1985) Heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 3:377-416.

[0585] Koehler SM, and Ho, TH. (1990) Hormonal regulation, processing, and secretion of cysteine proteinases in barley aleurone layers. *Plant Cell*. (8): 769-83.

[0586] Lam E, and Chua NH. (1991) Tetramer of a 21-base pair synthetic element confers seed expression and transcriptional enhancement in response to water stress and abscisic acid. *J Biol Chem*. 1991 Sep 15; 266(26):17131-5.

[0587] Lay, F.T., and Anderson, M.A. (2005). Defensins--components of the innate immune system in plants. *Curr Protein Pept Sci* 6, 85-101.

[0588] Liang, J., Shah, D.M., Wu, Y., Rosenberger, C.A., and Hakimi, S.M. U.S. Patent 6,916,970 for Transgenic plants comprising antifungal polypeptides from alfalfa and methods for controlling plant pathogenic fungi; issued July 12, 2005. Mankin, S.L., G.C. Allen, and W.F. Thompson. 1997. Introduction of a Plant Intron into the Luciferase Gene of *Photinus Pyralis*. *Plant Mol Biol Rep* 15(2): 186-196.

[0589] McElroy, D., Zhang W, Cao J, Wu R. 1990. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *The Plant Cell*, Vol. 2, 163-171

[0590] Reiser J, Glumoff V, Kalin M, Ochsner U. (1990) Transfer and expression of heterologous genes in yeasts other than *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv Biochem Eng Biotechnol.*; 43:75-102.

[0591] Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

[0592] Seong, K., Hou, Z., Tracy, M., Kistler, H.C., and Xu, J.-R. (2005). Random insertional mutagenesis identifies genes associated with virulence in the



wheat scab fungus *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* 95,744-750.

[0593] Sidorov, V., Gilbertson, L., Addae, P., and Duncan, D. (2006) Agrobacterium-mediated transformation of seedling-derived maize callus. *Plant Cell Rep.* 2006 Apr; 25(4):320-8. (Epub 2005 Oct 27)

[0594] Spelbrink, R.G., Dilmac, N., Allen, A., Smith, T.J., Shah, D.M., and Hockerman, G.H. (2004). Differential antifungal and calcium channel-blocking activity among structurally related plant defensins. *Plant Physiol* 135, 2055-2067.

[0595] Terras, F.R., Schoofs, H.M., De Bolle, M.F., Van Leuven, F., Rees, S.B., Vanderleyden, J., Cammue, B.P., and Broekaert, W.F. (1992). Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J Biol Chem* 267, 15301-15309.

[0596] Thevissen, K., Francois, I.E., Aerts, A.M., and Cammue, B.P. (2005). Fungal sphingolipids as targets for the development of selective antifungal therapeutics. *Curr Drug Targets* 6, 923-928.

[0597] Thevissen, K., Ghazi, A., De Samblanx, G.W., Brownlee, C., Osborn, R.W., and Broekaert, W.F. (1996). Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J Biol Chem* 271, 15018-15025.

[0598] Thevissen, K., Cammue, B.P., Lemaire, K., Winderickx, J., Dickson, R.C., Lester, R.L., Ferket, K.K., Van Even, F., Parret, A.H., and Broekaert, W.F. (2000). A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9531-9536.

[0599] Thevissen, K., Warnecke, D.C., Francois, I.E., Leipelt, M., Heinz, E., Ott, C., Zahringer, U., Thomma, B.P., Ferket, K.K., and Cammue, B.P. (2004). Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *J Biol Chem* 279, 3900-3905.

[0600] Thomma, B.P., Cammue, B.P., and Thevissen, K. (2003). Mode of action of plant defensins suggests therapeutic potential. *Curr Drug Targets Infect Disord* 3, 1-8.

[0601] Thomma, B.P.H.J., Cammue, B.P.A., and Thevissen, K. (2002). Plant defensins. *Planta* 216, 193-202.

[0602] *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. (1999). Ed. Harlow and Lane. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[0603] Vasil V, Clancy M, Ferl RJ, Vasil IK, Hannah LC. (1989) Increased Gene Expression by the First Intron of Maize Shrunken-1 Locus in Grass Species. *Plant Physiol*. 1989 Dec; 91(4):1575-1579.

[0604] Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG, Waterhouse PM. (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene

silencing in plants.Plant J.27(6):581-590.

## 序列表

- <110> 唐纳德丹佛斯植物科学中心  
 <120> 抗真菌植物蛋白质、肽和使用方法  
 <130> DDPSC0049-401-PC  
 <150> 61/817,415  
 <151> 2013-04-30  
 <160> 78  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 79  
 <212> PRT  
 <213> 蒺藜苜蓿

<400> 1

[0001]

Met Thr Ser Ser Ala Ser Lys Phe Tyr Thr Ile Phe Ile Phe Val Cys  
 1                    5                    10                    15

Leu Ala Phe Leu Phe Ile Ser Thr Ser Glu Val Glu Ala Lys Leu Cys  
                   20                    25                    30

Gln Lys Arg Ser Thr Thr Trp Ser Gly Pro Cys Leu Asn Thr Gly Asn  
                   35                    40                    45

Cys Lys Arg Gln Cys Ile Asn Val Glu His Ala Thr Phe Gly Ala Cys  
                   50                    55                    60

His Arg Gln Gly Phe Gly Phe Ala Cys Phe Cys Tyr Lys Lys Cys  
 65                    70                    75

<210> 2

<211> 7

<212> PRT  
<213> 蒺藜苜蓿

<400> 2

Ala Pro Lys Lys Val Glu Pro  
1 5

<210> 3  
<211> 50  
<212> PRT  
<213> 蒺藜苜蓿

<400> 3

Lys Leu Cys Glu Arg Arg Ser Lys Thr Trp Ser Gly Pro Cys Leu Ile  
1 5 10 15

Ser Gly Asn Cys Lys Arg Gln Cys Ile Asn Val Glu His Ala Thr Ser  
20 25 30

[0002]

Gly Ala Cys His Arg Gln Gly Ile Gly Phe Ala Cys Phe Cys Lys Lys  
35 40 45

Lys Cys  
50

<210> 4  
<211> 136  
<212> PRT  
<213> 蒺藜苜蓿

<400> 4

Met Thr Ser Ser Ala Ser Lys Phe Tyr Thr Ile Phe Ile Phe Val Cys  
1 5 10 15

Leu Ala Phe Leu Phe Ile Ser Thr Ser Glu Val Glu Ala Lys Leu Cys

	20		25		30
Gln Lys Arg Ser Thr Thr Trp Ser Gly Pro Cys Leu Asn Thr Gly Asn					
	35		40		45
Cys Lys Arg Gln Cys Ile Asn Val Glu His Ala Thr Phe Gly Ala Cys					
	50		55		60
His Arg Gln Gly Phe Gly Phe Ala Cys Phe Cys Tyr Lys Lys Cys Ala					
65		70		75	80
Pro Lys Lys Val Glu Pro Lys Leu Cys Glu Arg Arg Ser Lys Thr Trp					
		85		90	95
Ser Gly Pro Cys Leu Ile Ser Gly Asn Cys Lys Arg Gln Cys Ile Asn					
	100		105		110

[0003]

Val Glu His Ala Thr Ser Gly Ala Cys His Arg Gln Gly Ile Gly Phe					
	115		120		125
Ala Cys Phe Cys Lys Lys Lys Cys					
	130		135		

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 78

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 茯苓首蓿

&lt;400&gt; 5

Met Ala Ser Ser Ser Pro Lys Leu Phe Thr Ile Phe Leu Phe Leu Ile					
1		5		10	15

Leu Val Val Leu Leu Phe Ser Thr Ser Glu Val Gln Ala Lys Leu Cys					
	20		25		30

Arg Gly Arg Ser Lys Leu Trp Ser Gly Pro Cys Ile Asn Ser Lys Cys  
 35 40 45

Lys Arg Gln Cys Ile Asn Val Glu Arg Ala Val Ser Gly Gly Cys His  
 50 55 60

Leu Asp Asn Thr Gly Val Phe Cys Phe Cys Asp Phe Lys Cys  
 65 70 75

<210> 6

<211> 79

<212> PRT

<213> 蒺藜苜蓿

<400> 6

[0004]

Met Thr Ser Ser Ala Thr Lys Phe Tyr Thr Ile Phe Val Phe Val Cys  
 1 5 10 15

Leu Ala Leu Leu Leu Ile Ser Ile Cys Glu Val Glu Ala Lys Val Cys  
 20 25 30

Gln Lys Arg Ser Lys Thr Trp Ser Gly Pro Cys Leu Asn Thr Gly Asn  
 35 40 45

Cys Lys Arg Gln Cys Val Asp Val Glu Asn Ala Thr Phe Gly Ala Cys  
 50 55 60

His Arg Gln Gly Tyr Gly Phe Ala Cys Phe Cys Tyr Lys Lys Cys  
 65 70 75

<210> 7

<211> 79

<212> PRT



50 55 60  
 Cys His Arg Asp Gly Ile Gly Phe Ala Cys Phe Cys Tyr Phe Asn Cys  
 65 70 75 80

<210> 9  
 <211> 57  
 <212> PRT  
 <213> 蒺藜苜蓿  
 <400> 9

Met Val Cys Thr Glu Val Gln Ala Lys Leu Cys Arg Gly Arg Ser Lys  
 1 5 10 15

Leu Trp Ser Gly Pro Cys Ile Asn Ser Lys Cys Lys Arg Gln Cys Ile  
 20 25 30

[0006]

Asn Val Glu Arg Ala Val Ser Gly Gly Cys His Leu Asp Asn Thr Gly  
 35 40 45

Val Phe Cys Phe Cys Asp Phe Lys Cys  
 50 55

<210> 10  
 <211> 411  
 <212> DNA  
 <213> 蒺藜苜蓿  
 <400> 10

atgacttctct ctgctagtaa attctataacc atcttcattt ttgtetgcct tgcctttctc 60  
 tttatttcca catctgaggt ggaagcaaaa ctttgtcaaa agcgaagtac aacatggtea 120  
 ggaccttgtc ttaacacagg aaactgcaaa agacaatgea ttaatgtgga gcatgetaet 180  
 tttggtgctt gtcactgtca aggccttgggt tttgcttget tctgetacaa aaaatgtget 240



ccaaagaagg tggaacctaa actttgtgaa aggcgaagca aaacatggtc aggaccttgt 300  
 cttatctcag gaaattgtaa aagacagtgc atcaatgttg agcatgcaac ttctgtgtct 360  
 tgteaccgtc aaggcatggg ttttgettgc ttctgcaaga aaaaatgttg a 411

<210> 11

<211> 237

<212> DNA

<213> 蒺藜苜蓿

<400> 11

atggetteet ettctcctaa attgtttacc atctttctgt ttctcctcct tgcctgtctc 60  
 cttttctcaa cttcggaggt gcaagcaaaa cttttagtag ggagaagcaa actttggtea 120  
 gggccttgia ttaacicaaa atgcaaaaaga caatgcatca acgiggagcg cgcagttagc 180  
 gggggttgtc accitgataa cacitggagt tttgtttctc gcgacticaa atgctga 237

[0007]

<210> 12

<211> 240

<212> DNA

<213> 蒺藜苜蓿

<400> 12

atgactteet ctgctactaa attttacacc atctttgttt ttgtctgctt tgccttctc 60  
 cttatttcca tatgtgaggt ggaagcaaaa gtgtgtcaaa aacgaagtaa aacgtgttca 120  
 ggaccttgtc ttaacacagg aaactgtaaa agacaatgag ttgatgtgga gaatgcaacc 180  
 ttcggtgctt gtcaccgtea aggcctatgg tttgettgtc tctgctacaa aaagtgttga 240

<210> 13

<211> 240

<212> DNA

<213> 蒺藜苜蓿

<400> 13

atggettcct ctactcttaa atccaacact atctttctgt ttctcagcct tgcacttctc 60

	ctgtttctca cattggaggt acaaggaaat atttgtaaaa ggaaaagcac aacatggcca	120
	gggccatggt taaacacggg aaactgtaaa aatcagtcca tcaatgtgga acatgctact	180
	tttggggcat gccaccaaga tggatttggg tttgcttgcg tctgctactt caattgctga	240
	<210> 14	
	<211> 243	
	<212> DNA	
	<213> 蒺藜苜蓿	
	<400> 14	
	atggcttccg ctgctcttaa ataactaacct ttctttctgt ttttcatect tgcacttate	60
	ctgttaccca cattggaggt acaaggaaat acttgcataa ggaaaagcaa aacatggcca	120
	gggccatggt taaacacggc aaactgtaaa aatcagtcca tcagtaagga accaccggca	180
	acatttgggg catgtcaccg tgatggcatt ggatttgcct gcttctgta ctcaactgc	240
[0008]	taa	243
	<210> 15	
	<211> 174	
	<212> DNA	
	<213> 蒺藜苜蓿	
	<400> 15	
	atgggtgtga cagaggtgca agcaaaactt tgtagaggga gaagcaaact ttggtcaggg	60
	ccttgattta actcaaaatg caaaagacaa tgcatacaac tggagcgcgc agttagcggg	120
	ggttgtcacc ttgataacac tggagttttt tgtttctgag acttcaaatg ctga	174
	<210> 16	
	<211> 50	
	<212> PRT	
	<213> 蒺藜苜蓿	
	<400> 16	

Lys Leu Cys Gln Lys Arg Ser Thr Thr Trp Ser Gly Pro Cys Leu Asn  
 1 5 10 15

Thr Gly Asn Cys Lys Arg Gln Cys Ile Asn Val Glu His Ala Thr Phe  
 20 25 30

Gly Ala Cys His Arg Gln Gly Phe Gly Phe Ala Cys Phe Cys Tyr Lys  
 35 40 45

Lys Cys  
 50

<210> 17

<211> 50

<212> PRT

<213> 蒺藜苜蓿

[0009] <400> 17

Lys Leu Cys Glu Arg Arg Ser Lys Thr Trp Ser Gly Pro Cys Leu Ile  
 1 5 10 15

Ser Gly Asn Cys Lys Arg Gln Cys Ile Asn Val Glu His Ala Thr Ser  
 20 25 30

Gly Ala Cys His Arg Gln Gly Ile Gly Phe Ala Cys Phe Cys Lys Lys  
 35 40 45

Lys Cys  
 50

<210> 18

<211> 49

<212> PRT

<213> 蒺藜苜蓿

<400> 18

Lys Leu Cys Arg Gly Arg Ser Lys Leu Trp Ser Gly Pro Cys Ile Asn  
1 5 10 15

Ser Lys Cys Lys Arg Gln Cys Ile Asn Val Glu Arg Ala Val Ser Gly  
20 25 30

Gly Cys His Leu Asp Asn Thr Gly Val Phe Cys Phe Cys Asp Phe Lys  
35 40 45

Cys

<210> 19

<211> 50

<212> PRT

[0010] <213> 蒺藜苜蓿

<400> 19

Lys Val Cys Gln Lys Arg Ser Lys Thr Trp Ser Gly Pro Cys Leu Asn  
1 5 10 15

Thr Gly Asn Cys Lys Arg Gln Cys Val Asp Val Glu Asn Ala Thr Phe  
20 25 30

Gly Ala Cys His Arg Gln Gly Tyr Gly Phe Ala Cys Phe Cys Tyr Lys  
35 40 45

Lys Cys  
50

<210> 20

<211> 50

<212> PRT

<213> 蒺藜苜蓿

<400> 20

Asn Ile Cys Lys Arg Lys Ser Thr Thr Trp Ser Gly Pro Cys Leu Asn  
1                    5                                    10                                    15

Thr Gly Asn Cys Lys Asn Gln Cys Ile Asn Val Glu His Ala Thr Phe  
                  20                                    25                                    30

Gly Ala Cys His Gln Asp Gly Phe Gly Phe Ala Cys Phe Cys Tyr Phe  
                  35                                    40                                    45

Asn Cys  
          50

[0011]

<210> 21

<211> 51

<212> PRT

<213> 蒺藜苜蓿

<400> 21

Asn Thr Cys Gln Arg Lys Ser Lys Thr Trp Ser Gly Pro Cys Leu Asn  
1                    5                                    10                                    15

Thr Ala Asn Cys Lys Asn Gln Cys Ile Ser Lys Glu Pro Pro Ala Thr  
                  20                                    25                                    30

Phe Gly Ala Cys His Arg Asp Gly Ile Gly Phe Ala Cys Phe Cys Tyr  
                  35                                    40                                    45

Phe Asn Cys  
          50

<210> 22

<211> 49

<212> PRT

<213> 蒺藜苜蓿

<400> 22

Lys	Leu	Cys	Arg	Gly	Arg	Ser	Lys	Leu	Trp	Ser	Gly	Pro	Cys	Ile	Asn
1				5					10					15	

Ser	Lys	Cys	Lys	Arg	Gln	Cys	Ile	Asn	Val	Glu	Arg	Ala	Val	Ser	Gly
			20					25					30		

Gly	Cys	His	Leu	Asp	Asn	Thr	Gly	Val	Phe	Cys	Phe	Cys	Asp	Phe	Lys
		35					40						45		

Cys

[0012]

<210> 23

<211> 150

<212> DNA

<213> 蒺藜苜蓿

<400> 23

aaactttgtc	aaaagcgaag	tacaacatgg	tcaggacctt	gtcttaacac	aggaaactgc	60
------------	------------	------------	------------	------------	------------	----

aaaagacaat	gcattaatgt	ggagcatgct	acttttgggtg	cttgcatcg	teaaggcttt	120
------------	------------	------------	-------------	-----------	------------	-----

ggttttgctt	gettctgcta	caaaaaatgt				150
------------	------------	------------	--	--	--	-----

<210> 24

<211> 150

<212> DNA

<213> 蒺藜苜蓿

<400> 24

aaactttgtg	aaaggcgaag	caaacatgg	tcaggacctt	gtcttatctc	aggaaattgt	60
------------	------------	-----------	------------	------------	------------	----

	aaaagacagt geatcaatgt tgagcatgca acttctgggtg cttgtcaccg tcaaggcatt	120
	ggttttgctt gcttctgcaa gaaaaaatgt	150
	<210> 25	
	<211> 147	
	<212> DNA	
	<213> 蒺藜苜蓿	
	<400> 25	
	aaactttgta gagggagaag caaactttgg tcagggcctt gtattaactc aaaatgcaaa	60
	agacaatgca tcaacgtgga ggcgcagtt agcgggggtt gtcacettga taacactgga	120
	gttttttgtt tctgcgactt caaatgc	147
	<210> 26	
	<211> 150	
	<212> DNA	
[0013]	<213> 蒺藜苜蓿	
	<400> 26	
	aaagtgtgtc aaaaacgaag taaaacgtgg tcaggacctt gtettaacac aggaaactgt	60
	aaaagacaat gcgttgatgt ggagaatgca accttcgggtg cttgtcaccg tcaaggctat	120
	ggttttgctt gcttctgcta caaaaagtgt	150
	<210> 27	
	<211> 150	
	<212> DNA	
	<213> 蒺藜苜蓿	
	<400> 27	
	aatatttgta aaaggaaaag cacaacatgg tcagggccat gtttaaacac gggaaactgt	60
	aaaaatcagt geatcaatgt ggaacatget acttttgggg catgccacca agatggattt	120
	ggatttgctt gcttctgcta ctccaattgc	150

<210> 28  
 <211> 153  
 <212> DNA  
 <213> 蒺藜苜蓿  
  
 <400> 28  
 aatacttgtc aaaggaaaag caaaacatgg tcagggccat gtttaaaccac ggcaaaactgt 60  
 aaaaatcagt gcacagtaa ggaaccaceg gcaacatttg gggcatgtca cegtgatggc 120  
 attggatttg cttgcttctg ttacttcaac tgc 153

<210> 29  
 <211> 147  
 <212> DNA  
 <213> 蒺藜苜蓿  
  
 <400> 29  
 aaactttgta gagggagaag caaacitttg tcagggcctt gtattaactc aaaatgcaaa 60  
 [0014] agacaafgca tcaacgtgga gcgcgcagtt agcggggggtt gtcaccttga taacactgga 120  
 gttttttggtt tctggaactt caaatgc 147

<210> 30  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> 蒺藜苜蓿

<400> 30

Met Thr Ser Ser Ala Ser Lys Phe Tyr Thr Ile Phe Ile Phe Val Cys  
 1                    5                    10                    15

Leu Ala Phe Leu Phe Ile Ser Thr Ser Glu Val Glu Ala  
                   20                    25

<210> 31  
 <211> 29  
 <212> PRT



<213> 蒺藜苜蓿

<400> 31

Met Ala Ser Ser Ser Pro Lys Leu Phe Thr Ile Phe Leu Phe Leu Ile  
1                   5                   10                   15

Leu Val Val Leu Leu Phe Ser Thr Ser Glu Val Gln Ala  
                  20                   25

<210> 32

<211> 29

<212> PRT

<213> 蒺藜苜蓿

<400> 32

Met Thr Ser Ser Ala Thr Lys Phe Tyr Thr Ile Phe Val Phe Val Cys  
1                   5                   10                   15

[0015]

Leu Ala Leu Leu Leu Ile Ser Ile Cys Glu Val Glu Ala  
                  20                   25

<210> 33

<211> 29

<212> PRT

<213> 蒺藜苜蓿

<400> 33

Met Ala Ser Ser Thr Leu Lys Phe Asn Thr Ile Phe Leu Phe Leu Ser  
1                   5                   10                   15

Leu Ala Leu Leu Leu Phe Phe Thr Leu Glu Val Gln Gly  
                  20                   25

<210> 34

<211> 29

<212> PRT  
 <213> 蒺藜苜蓿  
 <400> 34

Met Ala Ser Ser Ala Leu Lys Tyr Tyr Thr Phe Phe Leu Phe Phe Ile  
 1 5 10 15

Leu Ala Leu Ile Leu Leu Pro Thr Leu Glu Val Gln Gly  
 20 25

<210> 35  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 蒺藜苜蓿  
 <400> 35

Met Val Cys Thr Glu Val Gln Ala  
 1 5

[0016]

<210> 36  
 <211> 87  
 <212> DNA  
 <213> 蒺藜苜蓿  
 <400> 36

atgaattcct ctgctagtaa attctatacc atcttcattt ttgtctgect tgctttctc 60

tttatttcca catctgaggt ggaagca 87

<210> 37  
 <211> 87  
 <212> DNA  
 <213> 蒺藜苜蓿  
 <400> 37

atggettctt ctctctctaa attgittacc atctttctgt ttctcactct tgcgtgctc 60

cttttctcaa ctteggaggt gcaagca 87

	<210> 38	
	<211> 87	
	<212> DNA	
	<213> 蒺藜苜蓿	
	<400> 38	
	atgacttccct ctgctactaa attttacacc atctttgttt ttgtctgcct tgccttctc	60
	cttatttcca tatgtgaggt ggaagca	87
	<210> 39	
	<211> 87	
	<212> DNA	
	<213> 蒺藜苜蓿	
	<400> 39	
	atggttcat ctactcttaa attcaacact atctttctgt ttctcagcct tgcacttctc	60
[0017]	ctgtttctca cattggaggt acaagga	87
	<210> 40	
	<211> 87	
	<212> DNA	
	<213> 蒺藜苜蓿	
	<400> 40	
	atggttccct ctgctcttaa ataactaacct ttctttctgt tttctatcct tgcacttatc	60
	ctgttaccca cattggaggt acaagga	87
	<210> 41	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 蒺藜苜蓿	
	<400> 41	
	atgggtgtga cagaggtgca agca	24

<210> 42

<211> 29

<212> PRT

<213> 蒺藜苜蓿

<400> 42

Met	Ala	Arg	Ser	Val	Pro	Leu	Val	Ser	Thr	Ile	Phe	Val	Phe	Leu	Leu
1				5					10					15	

Leu	Leu	Val	Ala	Thr	Gly	Pro	Ser	Met	Val	Ala	Glu	Ala
			20					25				

<210> 43

<211> 30

<212> PRT

<213> 蒺藜苜蓿

<400> 43

[0018]

Met	Ala	Arg	Ser	Val	Pro	Leu	Val	Ser	Thr	Ile	Phe	Val	Phe	Phe	Leu
1				5					10					15	

Leu	Ile	Val	Ala	Thr	Glu	Met	Gly	Pro	Ser	Met	Val	Ala	Ala
			20					25					30

<210> 44

<211> 31

<212> PRT

<213> 蒺藜苜蓿

<400> 44

Met	Ala	Arg	Ser	Val	Pro	Leu	Val	Ser	Thr	Ile	Phe	Val	Phe	Phe	Leu
1				5					10					15	

Leu	Leu	Val	Ala	Thr	Glu	Met	Gly	Pro	Ile	Met	Val	Ala	Glu	Ala
			20					25						30

<210> 45  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> 蒺藜苜蓿

<400> 45

Met Ala Arg Ser Val Phe Leu Val Ser Thr Ile Phe Val Phe Leu Leu  
 |                   5                   10                   15

Val Leu Val Ala Thr Gly Pro Ser Met Val Ala Glu Ala  
                   20                   25

<210> 46  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> 蒺藜苜蓿

<400> 46

[0019]

Met Ala Arg Ser Val Ser Leu Val Phe Thr Ile Phe Val Phe Leu Leu  
 |                   5                   10                   15

Leu Val Val Ala Thr Gly Pro Ser Met Val Ala Glu Ala  
                   20                   25

<210> 47  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> 蒺藜苜蓿

<400> 47

Met Ala Arg Ser Val Pro Leu Val Ser Thr Ile Phe Val Phe Leu Leu  
 |                   5                   10                   15

Leu Leu Val Ala Thr Gly Pro Ser Met Val Gly Glu Ala  
                   20                   25

<210> 48  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> 蒺藜苜蓿

<400> 48

Met Ala Arg Ser Val Pro Leu Val Ser Thr Ile Phe Val Phe Leu Leu  
 1                    5                                    10                                    15

Leu Leu Val Ala Thr Gly Pro Ser Met Val Ala Glu Ala  
                   20                                    25

<210> 49  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 紫苜蓿

[0020] <400> 49

Gly Arg Cys Arg Asp Asp Phe Arg Cys  
 1                    5

<210> 50  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 蒺藜苜蓿

<400> 50

Gly Arg Cys Arg Gly Phe Arg Arg Arg Cys  
 1                    5                                    10

<210> 51  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 蒺藜苜蓿



<400> 55

Gly Ala Cys His Gln Asp Gly Phe Gly Phe Ala Cys  
1 5 10

<210> 56

<211> 12

<212> PRT

<213> 蒺藜苜蓿

<400> 56

Gly Ala Cys His Arg Asp Gly Ile Gly Phe Ala Cys  
1 5 10

<210> 57

<211> 12

<212> PRT

<213> 蒺藜苜蓿

[0022]

<400> 57

Gly Gly Cys His Leu Asp Asn Thr Gly Val Phe Cys  
1 5 10

<210> 58

<211> 18

<212> PRT

<213> 蒺藜苜蓿

<400> 58

Gly Ala Cys His Arg Gln Gly Phe Gly Phe Ala Cys Phe Cys Tyr Lys  
1 5 10 15

Lys Cys

<210> 59



<211> 18

<212> PRT

<213> 蒺藜苜蓿

<400> 59

Gly Ala Cys His Arg Gln Gly Ile Gly Phe Ala Cys Phe Cys Lys Lys  
 1                    5                    10                    15

Lys Cys

<210> 60

<211> 18

<212> PRT

<213> 蒺藜苜蓿

<400> 60

[0023]

Gly Gly Cys His Leu Asp Asn Thr Gly Val Phe Cys Phe Cys Asp Phe  
 1                    5                    10                    15

Lys Cys

<210> 61

<211> 18

<212> PRT

<213> 蒺藜苜蓿

<400> 61

Gly Ala Cys His Arg Gln Gly Tyr Gly Phe Ala Cys Phe Cys Tyr Lys  
 1                    5                    10                    15

Lys Cys

<210> 62  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 蒺藜苜蓿

<400> 62

Gly Ala Cys His Gln Asp Gly Phe Gly Phe Ala Cys Phe Cys Tyr Phe  
 1                    5                                    10                                    15

Asn Cys

<210> 63  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 蒺藜苜蓿

[0024] <400> 63

Gly Ala Cys His Arg Asp Gly Ile Gly Phe Ala Cys Phe Cys Tyr Phe  
 1                    5                                    10                                    15

Asn Cys

<210> 64  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 蒺藜苜蓿

<400> 64

Gly Gly Cys His Leu Asp Asn Thr Gly Val Phe Cys Phe Cys Asp Phe  
 1                    5                                    10                                    15

Lys Cys

	<210> 65	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 蒺藜苜蓿	
	<400> 65	
	ggtgcttgtc atcgtcaagg ctttggtttt gcttgc	36
	<210> 66	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 蒺藜苜蓿	
	<400> 66	
	ggtgcttgtc accgtcaagg cattggtttt gcttgc	36
	<210> 67	
	<211> 36	
	<212> DNA	
[0025]	<213> 蒺藜苜蓿	
	<400> 67	
	ggggcttgtc accttgataa cactggagtt itttgt	36
	<210> 68	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 蒺藜苜蓿	
	<400> 68	
	ggtgcttgtc accgtcaagg ctatggtttt gcttgc	36
	<210> 69	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 蒺藜苜蓿	
	<400> 69	
	ggggcatgcc accaagatgg atttggattt gcttgc	36

	<210> 70	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 蒺藜苜蓿	
	<400> 70	
	ggggcatgtc accgtgatgg cattggattt gcttgc	36
	<210> 71	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 蒺藜苜蓿	
	<400> 71	
	gggggttgtc accttgataa cactggagtt ttttgt	36
	<210> 72	
	<211> 54	
[0026]	<212> DNA	
	<213> 蒺藜苜蓿	
	<400> 72	
	ggtgcttgtc ategtcaagg ctttggtttt gcttgcttct gctacaaaa atgt	54
	<210> 73	
	<211> 54	
	<212> DNA	
	<213> 蒺藜苜蓿	
	<400> 73	
	ggtgcttgtc accgtcaagg catttggtttt gcttgcttct gcaagaaaa atgt	54
	<210> 74	
	<211> 54	
	<212> DNA	
	<213> 蒺藜苜蓿	
	<400> 74	

	gggggttgtc acctgataa cactggagtt tttgtttct gcgacttcaa atgc	54
	<210> 75	
	<211> 54	
	<212> DNA	
	<213> 蒺藜苜蓿	
	<400> 75	
	ggtgcttgtc accgtcaagg ctatggtttt gcttgettct gctacaaaaa gtgt	54
	<210> 76	
	<211> 54	
	<212> DNA	
	<213> 蒺藜苜蓿	
	<400> 76	
[0027]	ggggcatgcc accaagatgg atttggattt gcttgettct gctacttcaa ttgc	54
	<210> 77	
	<211> 54	
	<212> DNA	
	<213> 蒺藜苜蓿	
	<400> 77	
	ggggcatgtc accgtgatgg catttgattt gcttgettct gttacttcaa ctgc	54
	<210> 78	
	<211> 54	
	<212> DNA	
	<213> 蒺藜苜蓿	
	<400> 78	
	gggggttgtc acctgataa cactggagtt tttgtttct gcgacttcaa atgc	54

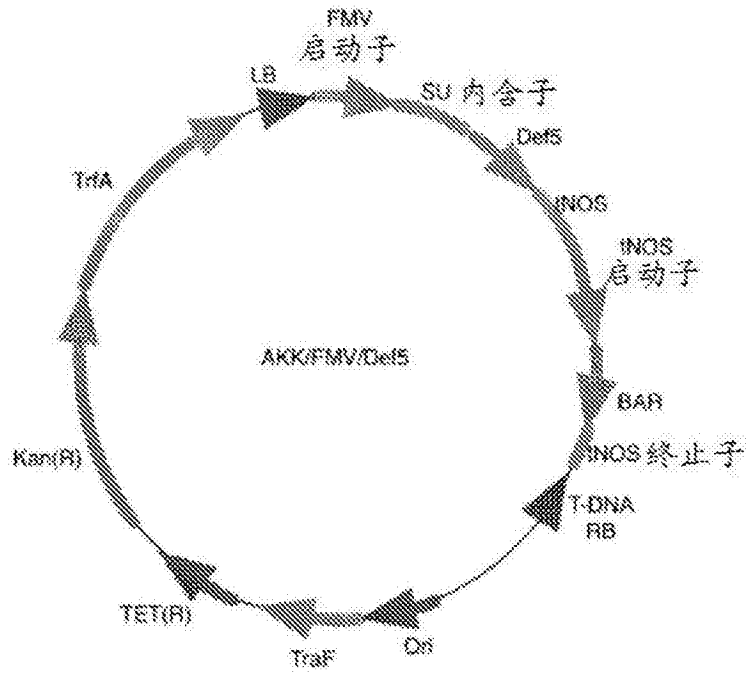


图1

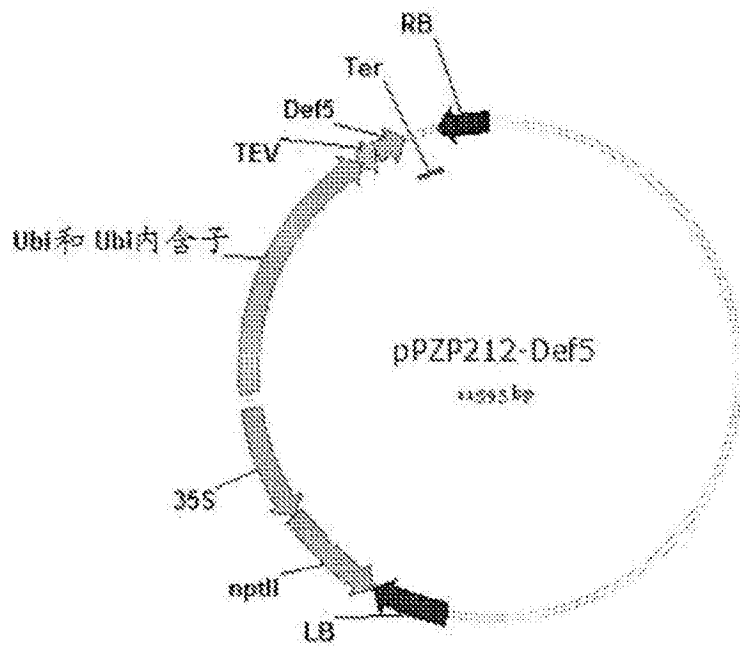


图2

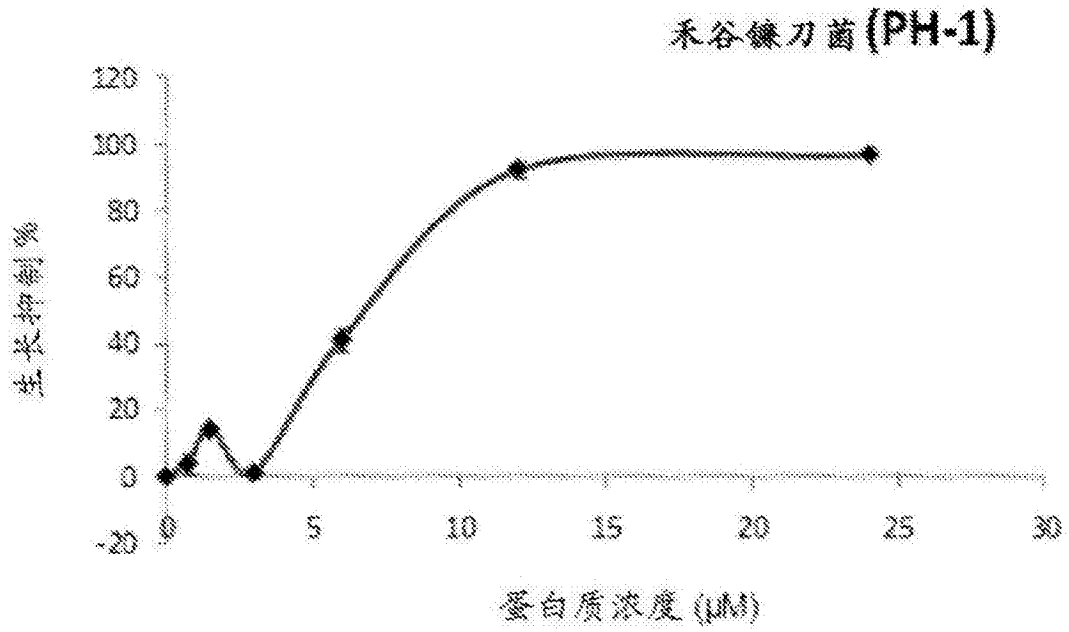


图3