



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104093842 B

(45)授权公告日 2016.12.07

(21)申请号 201280053864.9

(22)申请日 2012.10.29

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104093842 A

(43)申请公布日 2014.10.08

(30)优先权数据  
61/553443 2011.10.31 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2014.04.30

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2012/062392 2012.10.29

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02013/066805 EN 2013.05.10

(73)专利权人 先锋国际良种公司  
地址 美国依阿华州

(72)发明人 R.L.阿奇巴德 郭梅 R.古普塔  
M.鲁佩 K.舍尔林 史金瑞  
C.R.西蒙斯 王海音 武璟瑞

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001

代理人 李波 李炳爱

(51)Int. Cl.  
C12N 15/82(2006.01)  
C07K 14/415(2006.01)

(56)对比文件  
WO 2007115064 A2, 2007.10.11,  
US 2010162440 A1, 2010.06.24,  
NCBI.ACESSION NO: B6SLZ6.《NCBI》.2008,  
全文.

审查员 滕文静

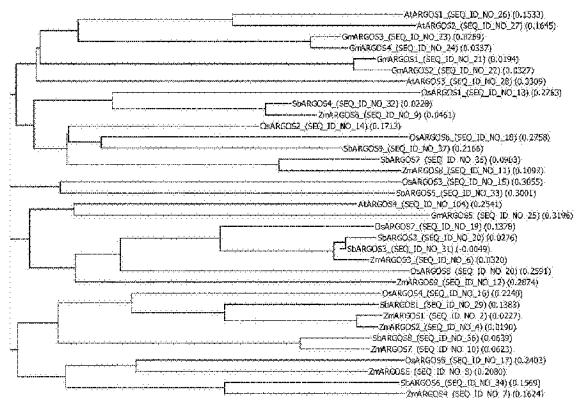
权利要求书2页 说明书73页  
序列表64页 附图25页

(54)发明名称

改善植物耐旱性、氮利用效率和产量

(57)摘要

本发明提供了用于修饰植物中乙烯敏感性的多核苷酸和相关多肽。在缺水和低氮环境中,乙烯不敏感转基因玉米植物产生比非转基因植物更高的谷粒产量。通过转基因在所需组织和器官,或特定植物发育期中的受控表达,改变乙烯感知和信号转导,从而建立了在非生物胁迫下产量更佳的转基因植物。



1. 一种调节植物中乙烯敏感性的方法,包括:
  - a. 在植物细胞中引入包含编码跨膜蛋白质的多核苷酸的重组构建体,所述跨膜蛋白质包含如序列PPLXPPPX(SEQ ID NO:96)所示的脯氨酸富含基序,其中所述脯氨酸富含基序位于第一跨膜序列与第二跨膜序列之间,所述多核苷酸可操作地连接至启动子;以及
  - b. 表达所述多核苷酸以调节所述植物中的乙烯敏感性的水平。
2. 一种调节植物中乙烯敏感性的方法,包括:
  - a. 在植物细胞中引入包含编码跨膜蛋白质的多核苷酸的重组构建体,所述跨膜蛋白质包含如SEQ ID NO:88或SEQ ID NO:102所示的脯氨酸富含基序,其中所述脯氨酸富含基序位于第一跨膜序列与第二跨膜序列之间,所述多核苷酸可操作地连接至启动子;以及
  - b. 表达所述多核苷酸以调节所述植物中的乙烯敏感性的水平。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述植物选自:玉米、大豆、高粱、卡诺拉油菜、小麦、苜蓿、棉花、水稻、大麦、小米、花生、甘蔗、芒草、禾本科、可可、亚麻荠、番薯和茄属。
4. 一种调节植物中乙烯敏感性的方法,包括:
  - a. 在植物细胞中引入包含编码TM1SEQ ID NO:90或TM2SEQ ID NO:91的TPT结构域的多核苷酸的核苷酸构建体,所述多核苷酸可操作地连接至启动子,所述TPT结构域还包括根据权利要求2中所述的脯氨酸基序;以及
  - b. 将所述植物种植在干旱或低氮条件下。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述植物选自:玉米、大豆、高粱、卡诺拉油菜、小麦、苜蓿、棉花、水稻、大麦、小米、花生、甘蔗、禾本科、可可、亚麻荠、番薯和茄属。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述植物细胞来自单子叶植物。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述植物细胞来自玉米。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述乙烯敏感性降低。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述构建体为过表达构建体。
10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述构建体包含SEQ ID NO:88或SEQ ID NO:102。
11. 一种分离蛋白质,其由以下组成:
  - a. SEQ ID NO:89的多肽;或
  - b. 权利要求1中所述的多核苷酸所编码的至少一个多肽。
12. 一种分离的多核苷酸序列,其编码具有乙烯调控活性且如SEQ ID NO:89的序列所示的蛋白质。
13. 一种具有乙烯调控活性且如SEQ ID NO:89的序列所示的多肽。
14. 一种增加作物植物的产量的方法,所述方法包括
  - a. 表达包含编码多肽的多核苷酸的重组构建体,所述多肽包含SEQ ID NO:11,所述多核苷酸可操作地连接至启动子;以及
  - b. 增加所述作物植物的产量,  
其中所述植物选自:玉米、大豆、高粱、卡诺拉油菜、小麦、苜蓿、棉花、水稻、大麦、小米、花生、甘蔗、禾本科、可可、亚麻荠、番薯和茄属。
15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述作物植物是玉米。
16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述玉米是杂交玉米。
17. 一种改善玉米植物的农艺参数的方法,所述方法包括

a. 表达包含编码跨膜蛋白质的多核苷酸的重组构建体,所述跨膜蛋白质包含如序列PPLXPPPX(SEQ ID NO:96)所示的脯氨酸富含基序,其中所述脯氨酸富含结构域位于第一跨膜序列和第二跨膜序列之间,所述多核苷酸可操作地连接至启动子;以及

b. 改善至少一个选自根生长、苗生物量、根生物量、籽粒数、穗大小和干旱胁迫的农艺参数。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述农艺参数在低氮水平下改善。

19. 一种玉米植物的标记辅助选择的方法,所述玉米植物表现出改变的内源基因表达模式,所述方法包括:

a. 获得在编码跨膜蛋白质的多核苷酸的基因组区域中包含等位变异的玉米植物,所述跨膜蛋白质包含如序列PPLXPPPX(SEQ IDNO:96)所示的脯氨酸富含基序,其中所述多核苷酸的表达与不具有所述变异的对照玉米植物相比增加;

b. 选择包含所述变异的所述玉米植物;以及

c. 通过标记辅助选择方法建立包含所述变异的玉米植物的群体。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述变异存在于所述基因组区域的调控区。

21. 根据权利要求19所述的方法,其中所述变异存在于所述多核苷酸的编码区。

22. 根据权利要求19所述的方法,其中所述变异存在于所述基因组区域的非编码区。

23. 根据权利要求19所述的方法,其中所述多核苷酸的表达在不同遗传背景下差别性地增加。

## 改善植物耐旱性、氮利用效率和产量

### 技术领域

[0001] 本发明总体上涉及分子生物学领域。

[0002] 背景

[0003] 许多植物的驯化已与产量显著增加相关。自然群体中发生的大多数表型变异是连续的并通过多种基因影响来实现。对造成驯化植物中产量显著不同的特定基因的鉴别已成为农业研究的重要焦点。

[0004] 乙烯(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)是影响植物中的多个发育过程和适应性反应,例如发芽、花和叶衰老、果实成熟、叶或果实脱落、根结瘤、程序性细胞死亡以及反应胁迫和病原体攻击的气态植物激素。另外的乙烯影响包括水生植物的茎延伸、根中气室(通气组织)的发育、叶偏上弯曲、茎和苗膨大(与发育迟缓相关)、枯萎中的雌性特征、某些物种中的果实生长、黄化苗中的顶端弯钩闭合、根毛形成、凤梨科(Bromeliaceae)的开花、黄化苗的横生以及基因表达(如,聚半乳糖醛酸酶、纤维素酶、几丁质酶、β-1,3-葡聚糖酶等)的增加。这些效应有时受到生物和非生物作用,如其他植物激素、其他生理信号和环境的影响。

[0005] 乙烯通过成熟果实释放,还通过大多数植物组织,如对胁迫(如,干旱、拥挤、病原体攻击、温度胁迫、创伤等)作出反应以及在成熟和衰老器官中产生。遗传筛选鉴别了十几个涉及植物中乙烯反应的基因。

[0006] 乙烯由确定的途径从甲硫氨酸产生,该途径涉及S-腺苷-L-甲硫氨酸(SAM或Ado Met)转化为环状氨基酸1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC),该转化由ACC合酶推进。然后通过ACC氧化酶的作用由ACC的氧化产生乙烯。或者,ACC可通过ACC脱氨酶的作用转化为α-酮丁酸和氨气。

[0007] 植物激素乙烯调节植物生长和发育以及植物中的生物和非生物胁迫反应。此处示出的实验活动显示ARGOS基因的异位表达赋予植物乙烯不敏感性。与具有正常乙烯敏感性的非转基因植物相比,乙烯不敏感性玉米植物在缺水和低氮环境下产生更高的谷粒产量。通过ARGOS转基因在所需组织和器官,或特定植物发育期中的受控表达,通过设计改变乙烯感知和信号转导,从而建立了在非生物胁迫下产量更佳的转基因植物。

### 发明内容

[0008] 通过本发明体现的方法包括:调节植物中的乙烯敏感性的方法,其包括:向植物细胞中引入包含编码跨膜蛋白质的多核苷酸的重组构建体,所述跨膜蛋白质包含具有序列PPLXPPPX(SEQ ID NO:96)的富脯氨酸基序,其中富脯氨酸结构域位于第一跨膜序列和第二跨膜序列之间,所述多核苷酸有效连接至启动子;以及表达所述多核苷酸以调节所述植物中的乙烯敏感性水平,同样其中富脯氨酸基序(PRM)序列包括原始PRM(SEQ ID NO:88)或变体PRM(SEQ ID NO:102)。

[0009] 另外该方法其中:植物选自:玉米、大豆、高粱、卡诺拉油菜、小麦、苜蓿、棉花、水稻、大麦、小米、花生、甘蔗、芒草、禾本科、可可、亚麻荠、番薯和茄属;乙烯敏感性减少;所述构建体为过表达构建体;所述构建体包含SEQ ID NO:88或SEQ ID NO:102。

[0010] 另一个实施例包括调节植物中的乙烯敏感性的方法,其包括:向植物细胞中引入包含编码TPT结构域的多核苷酸的核苷酸构建体,所述TPT结构域与TM1SEQ ID NO:90或TM2SEQ ID NO:91具有至少50%的序列同一性,所述多核苷酸有效连接至启动子,所述TPT结构域还包括前述脯氨酸基序,以及将所述植物在干旱或低氮条件下种植;其中植物选自:玉米、大豆、高粱、卡诺拉油菜、小麦、苜蓿、棉花、水稻、大麦、小米、花生、甘蔗、禾本科、可可、亚麻芥、番薯和茄属,来自单子叶植物,来自玉米。

[0011] 实施例还包括由前述方法产生的植物,包括:其中在与未经转化的植物进行比较时,该植物具有降低的乙烯敏感性;其中该植物具有降低的对非生物胁迫的敏感性;其中该植物具有降低的对干旱胁迫的敏感性;其中该植物具有降低的对拥挤胁迫的敏感性;其中该植物具有降低的对淹水胁迫的敏感性。

[0012] 另外的实施例包括分离的蛋白质,其包含:来自SEQ ID NO:89的多肽的至少20个连续氨基酸的多肽;SEQ ID NO:89的多肽;与SEQ ID NO:89的多肽具有至少80%序列同一性且与其具有共同的至少一个线性表位的多肽,其中所述序列同一性使用BLAST2.0在默认参数下测定;以及至少一个如前述实施例中所述的多肽。

[0013] 本发明的实施例包括:编码具有乙烯调控活性且具有SEQ ID NO:89的序列的蛋白质的分离的多核苷酸序列,以及具有乙烯调控活性且具有SEQ ID NO:89的序列的多肽。

[0014] 提供了ARGOS基因在植物中异位表达以影响植物的乙烯敏感性的方法。ZmARGOS构建体显示出改善的耐旱性、氮利用效率以及降低的植物的乙烯敏感性。

[0015] 提供了用于控制植物生长以增加植物在胁迫下的产量的组合物和方法。所述组合物包括来自玉米、大豆、拟南芥、水稻和高粱的ARGOS序列。本发明的组合物包含选自SEQ ID NO:1-37、40-91和96的氨基酸序列和核苷酸序列及其变体和片段。

[0016] 编码ARGOS序列的多核苷酸在DNA构建体中提供以便在所关注的植物中表达。还提供了包含本发明的序列的表达盒、植物、植物细胞、植物部分和种子。在具体的实施例中,该多核苷酸有效连接到组成型启动子。

[0017] 提供了调节植物或植物部分中ARGOS序列水平的方法。所述方法包括将包含本发明ARGOS序列的异源多核苷酸引入到植物或植物部分中。ARGOS多肽的水平可被提高或降低。此类方法可用于增加植物的产量;在一个实施例中,该方法用于增加谷类的谷粒产量。

[0018] 增加作物产量的方法,该方法包括表达包含多核苷酸的重组构建体,所述多核苷酸编码包含具有序列PPLXPPPX(SEQ ID NO:96)的富脯氨酸基序的跨膜蛋白质,其中富脯氨酸结构域位于第一跨膜序列和第二跨膜序列之间,所述多核苷酸有效连接至启动子;以及增加作物的产量,其中所述产量在低于正常氮水平下增加。在一个实施例中,较低氮水平与正常氮水平相比少约10%至约40%。在一个实施例中,较低氮水平减少至与正常氮水平相比少约50%。在一个实施例中,所施用的氮水平在植物的后生殖期减少。在一个实施例中,作物是玉米并且是杂交玉米。

[0019] 改善玉米植物的农艺参数的方法,该方法包括表达包含多核苷酸的重组构建体,所述多核苷酸编码包含具有序列PPLXPPPX(SEQ ID NO:96)的富脯氨酸基序的跨膜蛋白质,其中富脯氨酸结构域位于第一跨膜序列和第二跨膜序列之间,所述多核苷酸有效连接至启动子;以及改善至少一个选自根生长、苗生物量、根生物量、籽粒数、穗大小以及干旱胁迫的农艺参数。

[0020] 玉米植物的标记辅助选择的方法,所述玉米植物表现出改变的内源基因表达模式,该方法包括获得在编码跨膜蛋白质的多核苷酸的基因组区域中包含等位变异的玉米植物,所述跨膜蛋白质包含具有序列PPLXPPPX(SEQ ID NO:96)的富脯氨酸基序,其中多核苷酸的表达与不具有变异的对照玉米植物相比增加;选择包含变异的玉米植物;以及通过标记辅助选择方法建立包含变异的玉米植物的群体。在一个实施例中,变异存在于基因组区域的调控区。在一个实施例中,变异存在于多核苷酸的编码区。在一个实施例中,变异存在于基因组区域的非编码区。在一个实施例中,多核苷酸的表达在不同的遗传背景下差别性增加。

## 附图说明

[0021] 图1:示出来自各种植物物种的本发明ARGOS多肽之间关系的系统树图:玉米、水稻、大豆、高粱和拟南芥。

[0022] 图2:具有鉴定保守区的玉米、水稻、大豆、高粱和拟南芥多肽序列的比对。蛋白质具有C-端附近的非常保守的富脯氨酸区。N-端通常是有差异的。蛋白质很短,在58至146个氨基酸的范围内,平均110个氨基酸。

[0023] 图3:ZmARGOS1、2和3与AtARGOS1和4的比对,其共有区和保守置换突出显示。

[0024] 图4:ARGOS8转化到近交系。从T1近交系田间观察结果收集数据。(A)代表性穗、(C)穗长度、(B)植株高度、(D)茎秆直径测量。

[0025] 图5:ZmARGOS1(SEQ ID NO:2)与ZmARGOS8(SEQ ID NO:44)的序列比对。

[0026] 图6:ZmARGOS1和ZmARGOS8的预测蛋白结构。

[0027] 图7:在幼苗期3倍氮浓度下ZmARGOS8对植物生物量积累的影响。\*表示与非转基因无效植物具有统计学显著差异,其中 $p < 0.05$ 。

[0028] 图8:转基因ZmARGOS8在多个位置试验中的田间谷粒产量。含\*事件表示与非转基因无效植物具有统计学显著差异,其中 $p < 0.1$ 。

[0029] 图9:在2mM硝酸浓度下ZmARGOS8对植物和穗生长的影响。\*表示与非转基因无效植物具有统计学显著差异,其中 $p < 0.05$ 。

[0030] 图10:在6.5mM硝酸浓度下ZmARGOS8对植物和穗生长的影响。\*表示与非转基因无效植物具有统计学显著差异,其中 $p < 0.05$ 。

[0031] 图11:ZmARGOS1过表达对玉米植物中乙烯生物合成和反应、含TPT结构域跨膜ARGOS蛋白的结构以及玉米中ARGOS基因表达的激素调节的影响。

[0032] (A)Ubi:ZmARGOS1玉米转基因植物中乙烯产量的增加。分析近交系PHWWE的V7植物的两个最上方围绕叶。经过20小时的时间收集乙烯,随后使用气相色谱测量。转基因植物(TR)和野生型分离群体(WT)中的乙烯产量根据组织鲜重计算。确定六次重复的平均值±标准偏差。显示了三个转基因事件(E1、E2和E3)。

[0033] (B)在存在0(上)、25(中)或100 $\mu$ M(下)乙烯前体ACC的情况下在黑暗中发芽的ZmARGOS1转基因植物(TR)和野生型分离群体(WT)的五天龄玉米幼苗。显示了一个代表性事件。

[0034] (C)玉米ARGOS蛋白和拟南芥同源物结构的示意性图示。玉米ZmARGOS1中的TPT结构域由两个预测跨膜螺旋(TM1, aa79-101; TM2, aa110-134)和富脯氨酸基序(PRM,

aa102PPLPPPS109)(上)组成。跨膜螺旋(TM1和TM2)、连接环(富脯氨酸基序,PRM)以及膜中N-和C-端序列的预测取向在下图中示出。

[0035] (D)ZmARGOS1和ZmARGOS8基因表达通过激素处理诱导。给玉米V3幼苗喷洒50 $\mu$ M ACC、50 $\mu$ M ABA、20 $\mu$ M细胞分裂素(N-6-苄基氨基嘌呤)、100 $\mu$ M茉莉酸(JA)和10 $\mu$ M IAA。收集2和4小时的叶组织用于RNA提取。溴化乙锭染色的凝胶作为加样对照示出。

[0036] 图12:ARGOS基因的序列比对显示了草物种之间家族成员和同源物中的保守区。保守区鉴别为LX1X2LPLX3LPPLX4X5PP(SEQ ID NO:86),其中X1=L、V、I;X2=L、V、I、F;X3=V、L、A;X4=P、Q、S;X5=P、A。

[0037] 图13:ZmARGOS1的过表达赋予拟南芥乙烯不敏感性

[0038] (A)在存在或不存在乙烯前体ACC(10 $\mu$ M)的情况下发芽的3天龄黑暗生长幼苗的比较。显示了野生型Co1-0(WT)代表性幼苗、载体对照和ZmARGOS1转基因植物。

[0039] (B)在存在10、50或100ppm气态乙烯的情况下发芽的3天龄黄化幼苗的比较。

[0040] (C)在24 $^{\circ}$ C光照(16小时照明,强度大约120 $\mu$ E m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>)和23 $^{\circ}$ C黑暗(8小时)的生长室中生长的ZmARGOS1转基因植物(右)和载体对照(左)。

[0041] 上图,种植16天后(DAP)的植物显示出转基因植物中的较小莲座;下图,39-DAP植物显示出延迟开花和叶衰老表型。

[0042] (D)在与(A)中相同的条件下生长的ZmARGOS1转基因(右上)和载体对照植物(左上)的花序。转基因植物显示出寿命延长和花被器官保留。ZmARGOS1转基因植物的花瓣和萼片保持饱满(右下),而在载体对照植物(左下)中,花序上的相同位置花的花被器官脱落。

[0043] 图14:ZmARGOS1过表达对拟南芥中eto1-1突变体表型的影响。

[0044] (A)过表达ZmARGOS1的三天龄黄化eto1-1幼苗(右)缺乏eto1-1突变体(左)的组成型乙烯反应表型。

[0045] (B)光照生长的eto1-1突变体植物(右)、过表达ZmARGOS1的eto1-1植物(左)和载体对照(中)的形态。

[0046] 图15:在过表达ZmARGOS1的拟南芥中乙烯产量的增加和乙烯诱导基因表达的减少。

[0047] (A)在种植20天后在光照下生长的ZmARGOS1转基因事件(E1、E2和E3)、载体对照(Vec)和野生型Co1-0(WT)莲座叶中的乙烯产量。经过22小时的时间收集乙烯,随后使用气相色谱测量。乙烯产量根据组织鲜重计算。误差线为标准偏差(n=4)。

[0048] (B)过表达ZmARGOS1的转基因植物中乙烯反应基因表达的下调。总RNA从3周龄植物的莲座叶中提取。三个ZmARGOS1事件(E1、E2和E3)和载体对照(Vec)的RNA印迹分析使用10 $\mu$ gRNA/道进行,用乙烯诱导基因EBF2和AtERF5检测。溴化乙锭染色的凝胶在底部作为加样对照示出。

[0049] 图16:玉米ARGOS1在ctr1-1突变体背景中的过表达。

[0050] (A)过表达ZmARGOS1或载体对照的ctr1-1突变体植物的三天龄黄化幼苗在不存在外源乙烯的情况下显示出三倍反应。

[0051] (B)过表达ZmARGOS1或载体对照的三十天龄ctr1-1突变体植物显示出组成型乙烯反应表型。

[0052] 图17:玉米和拟南芥含TPT结构域的跨膜ARGOS蛋白的过表达赋予降低的乙烯敏感

性。

[0053] (A)过表达玉米ZmARGOS1、ZmARGOS9、ZmARGOS8和ZmARGOS7以及拟南芥同源基因AtARGOS3和AtARGOS4的3天龄黄化幼苗中乙烯敏感性降低的表型。幼苗在存在10 $\mu$ M ACC的情况下生长。显示了代表性转基因T1幼苗。

[0054] (B)拟南芥AtARGOS2的过表达降低乙烯敏感性。四个随机选择转基因事件(E1-E4)和野生型Co1-0(WT)的T3幼苗在存在0、1.0和2.5 $\mu$ M ACC的情况下在黑暗中生长3天。显示了20株幼苗的下胚轴和根的相对长度平均值。在0 $\mu$ M ACC下的下胚轴和根长度设定为100%。星号表示WT和转基因植物之间存在统计学显著差异,其中P<0.01(t检验)。误差线为标准偏差(n=20)。

[0055] 图18:转基因拟南芥中截短和突变ZmARGOS1的功能分析。

[0056] (A)ZmARGOS1变体的示意图。ZmARGOS1的N-和C-端序列截短分别生成TR-n1(aa31-144)、n2(aa62-144)和n3(aa92-144)以及TR-c1(aa1-134)、c2(aa1-124)和c3(aa1-114)。TR-nc(aa62-134)的N-和C-端序列截短。TM1m包含第一跨膜结构域(TM1)中的P83D和A84D的氨基酸置换。TM2m携带第二跨膜结构域(TM2)中的L120D、L121D和L122D突变。L104D表示富脯氨酸基序(PRM)中L104D的单个氨基酸置换。

[0057] (B)在存在10 $\mu$ M ACC的情况下过表达ZmARGOS1和截短和突变ZmARGOS1的野生型对照和转基因拟南芥的3天龄黄化幼苗的下胚轴和根长度的测量值。示出了12-20株T1苗/构建体的平均值 $\pm$ SD。

[0058] 图19:ZmARGOS1中富脯氨酸基序的单个氨基酸置换分析。

[0059] 玉米ZmARGOS1基因的富脯氨酸基序(aa102PPLPPPPS109)中的八个氨基酸的每个被天冬氨酸置换。在拟南芥中突变ZmARGOS1变体和野生型ZmARGOS1在CaMV35S启动子的控制下过表达。根据黄色荧光蛋白标记基因的表达针对每个构建体随机选择二十五个T1种子。在存在10 $\mu$ M ACC的情况下使用黄化幼苗测定乙烯反应。野生型Co1-0植物(WT)作为对照。示出了代表性幼苗。

[0060] 图20:ZmARGOS1蛋白在内质网和高尔基体膜中的定位。

[0061] (A)过表达带FLAG-HA表位标签的ZmARGOS1(ZmARGOS1)和无标签ZmARGOS1对照(CK)的拟南芥细胞级分的蛋白质印迹分析。将总(T)匀浆超离心,以分离可溶性(S)和微粒体膜(M)级分。蛋白质印迹分析用抗FLAG抗体进行。

[0062] (B)表达带AcGFP标签的ZmARGOS1的稳定转基因拟南芥的代表性下胚轴细胞的落射荧光显微术显示出与内质网和高尔基体膜相关的绿色荧光。

[0063] (C)含内质网标记的带AcGFP标签的ZmARGOS1在瞬时转化的洋葱表皮细胞中的共定位。

[0064] (D)含高尔基体标记的AcGFP标记ZmARGOS1在瞬时转化的洋葱表皮细胞中的共定位。

[0065] 图21:来自多个物种的ARGOS多肽序列的比对鉴定保守跨膜片段。信息标记如下:

[0066] ID=SEQ ID,但草物种按照表1被标识为argos#

[0067] St=比对序列组中的序列起始编号,

[0068] Ed=比对序列组中的序列结束编号,

[0069] TMH1/2=跨膜片段,



[0070] Ident/TMH1,2=同一性比率。

[0071] 利用Clustalw产生比对图谱形式的与ZmARGOS8(SEQ ID NO:44)的比对。同一性计算是与ZmARGOS8作为比较。

[0072] 图22:在2mM硝酸浓度下ZmARGOS8转基因对植物生长的影响。

[0073] 使三个UBI:ZmARGOS8转基因事件以及无效对照在10升罐中生长,在田间用2mM硝酸处理。对八株植物/事件取样,并收集以鲜重(g)计的苗和根生物量。(A)V7期的平均苗(上)和根生物量(下);(B)R3期的平均苗(上)和根生物量(下)。星号表示显著性, $p < 0.05$ 。

[0074] 图23:在干旱胁迫下ZmARGOS8的过表达增加玉米产量。该图描述了10个独立事件的相对于非转基因对照的产量增加,单位为蒲式耳/英亩。

[0075] 发明详述

[0076] 一直存在对调节植物中乙烯敏感性和乙烯反应通路,以对植物发育或胁迫反应进行操纵的需要。

[0077] 本发明涉及用于调节改善植物中的产量和/或胁迫耐受性的基因的鉴定、表征和操纵。产量和/或胁迫耐性的改善可通过调节乙烯敏感性实现。

[0078] 本发明包括改变作物例如玉米的遗传组成,使得此类作物可具有更高产量和/或使其更能耐受胁迫条件的方法。此类公开的用途是通过乙烯敏感性调节和/或乙烯反应调节同时增加产量和改善胁迫耐受性。

[0079] 乙烯反应的调节包括但不限于:拥挤耐受性、结实和发育、在紧实土壤中生长、淹水耐受性、成熟和衰老、耐旱性和抗病性。本发明提供引起植物中的乙烯敏感性或乙烯反应的各种改变的方法和组合物,所述植物在正常或胁迫条件下产生改善的农学性能。本发明所公开的植物与对照植物相比具有改变的乙烯敏感性。在一些植物中,改变的乙烯敏感性涉及营养组织、生殖组织、或营养组织和生殖组织。本发明的植物可具有至少一种如下表型,包括但不限于:与未转化的植物相比在拥挤耐受性、结实和发育、在紧实土壤中生长、淹水耐受性、耐旱性、成熟和衰老以及抗病性方面的差异。

[0080] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语均具有本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。除非另外提出,否则本文所采用或所考虑的技术是本领域普通技术人员所熟知的标准方法。材料、方法和实例仅为示例性的而不是限制性的。以下内容以举例说明的方式给出,而非意在限制本发明的范围。

[0081] 借助前面的描述和随附的附图中给出的教导,这些公开内容所属领域的技术人员将会想到本文所述公开内容的许多修改形式和其他实施例。因此,应当了解,这些公开内容不限于所公开的特定实施例,并旨在将修改形式和其他实施例包括在本文末尾所附权利要求的范围内。虽然本文采用了特定术语,但它们仅以一般性和描述性含义使用而不出于限制目的。

[0082] 除非另外指明,否则本发明的实施将采用植物学、微生物学、组织培养、分子生物学、化学、生物化学和重组DNA技术的常规技术,这些技术处于本领域技能范围内。这类技术在文献中有完全的解释。参见例如Langenheim and Thimann, BOTANY: PLANT BIOLOGY AND ITS RELATION TO HUMAN AFFAIRS, John Wiley(1982)(Langenheim和Thimann,《植物学:植物生物学及其与人类事务的关系》,约翰威立出版社,1982年);CELL CULTURE AND SOMATIC CELL GENETICS OF PLANTS, vol. 1, Vasil, ed.(1984)(《植物细胞培养与体细胞遗传学》,第

1卷,Vasil编辑,1984年);Stanier,et al.,THE MICROBIAL WORLD,5<sup>th</sup>ed.,Prentice-Hall (1986)(Stanier等人,《微生物世界》,第5版,普伦蒂斯·霍尔出版社,1986年);Dhringra and Sinclair,BASIC PLANT PATHOLOGY METHODS,CRC Press(1985)(Dhringra和 Sinclair,《植物病理学基本方法》,CRC出版社,1985年);Maniatis,et al.,MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL(1982)(Maniatis等人,《分子克隆实验指南》,1982年);DNA CLONING,vols.I and II,Glover,ed.(1985)(《DNA克隆》,第I卷和II卷,Glover编辑,1985年);OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS,Gait,ed.(1984)(《寡核苷酸合成》,Gait编辑,1984年);NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION,Hames and Higgins,eds.(1984)(《核酸杂交》,Hames和 Higgins编辑,1984年)和丛书METHODS IN ENZYMOLOGY,Colowick and Kaplan,eds, Academic Press,Inc.,San Diego,CA(《酶学方法》,Colowick和Kaplan编辑,学术出版社,加利福尼亚州圣地亚哥)。

[0083] 单位、前缀和符号可以它们SI接受的形式表示。除非另外指明,核酸以5'到3'的方向从左向右书写;而氨基酸序列以氨基到羧基的方向从左向右书写。数值范围包括限定该范围的数字。氨基酸在本文中可通过它们通常知道的三字母符号表示或通过IUPAC-IUB生化命名委员会(IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission)推荐的单字母符号表示。同样,核苷酸可通过它们通常接受的单字母密码表示。下面定义的术语通过参考本说明书整体进行更完整的定义。

[0084] 在描述本发明时,将采用下面的术语,并且旨在如下文所指出的进行定义。

[0085] 所谓“微生物”意指任何微生物(包括真核微生物和原核微生物),如真菌、酵母、细菌、放线菌、藻类和原生动物以及其他单细胞结构。

[0086] 所谓“扩增”意指构建核酸序列的多个拷贝或与该核酸序列互补的多个拷贝,该构建是利用所述核酸序列中的至少一者作为模板进行。扩增系统包括聚合酶链式反应(PCR)系统、连接酶链式反应(LCR)系统、基于核酸序列的扩增(安大略省米西索加市加拿大基因公司(Cangene, Mississauga, Ontario))、Q-β复制酶系统、基于转录的扩增系统(TAS)和链置换扩增(SDA)。参见例如DIAGNOSTIC MOLECULAR MICROBIOLOGY:PRINCIPLES AND APPLICATIONS,Persing,et al.,eds.,American Society for Microbiology, Washington,DC(1993)(《诊断分子微生物学:原理和应用》,Persing等人编辑,《美国微生物学会》,华盛顿,1993年)。扩增的产物称为扩增子。

[0087] 术语“保守修饰的变体”同时适用于氨基酸序列和核酸序列二者。就特定核酸序列而言,保守修饰的变体指编码氨基酸序列的相同的或保守修饰的变体的那些核酸。由于遗传密码的简并性,大量功能上相同的核酸编码任何给定蛋白质。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU全部编码丙氨酸这种氨基酸。因而,在每个由密码子规定丙氨酸的位置,可将该密码子变更为所描述的相应密码子的任一种而不会改变所编码的多肽。这种核酸变异为“沉默变异”,代表保守修饰变异的一种。编码多肽的本文每种核酸序列还描述了该核酸的每种可能的沉默变异。普通技术人员将认识到,核酸中的每个密码子(除了AUG,它通常是甲硫氨酸的唯一密码子;一个例外是微球菌(*Micrococcus rubens*),对于它来说GTG是甲硫氨酸密码子(Ishizuka,et al.,(1993)J. Gen.Microbiol.139:425-32(Ishizuka等人,1993年,《普通微生物学杂志》,第139卷,第425-432页))可进行修饰以产生功能上相同的分子。因此,编码本发明多肽的核酸的每种沉默变异均隐含在每种所描述的多肽序列中并以引用的方式

并入本文。

[0088] 对于氨基酸序列,技术人员将认识到,对核酸、肽、多肽或蛋白质序列作出的会改变、添加或缺失所编码的序列中的单个氨基酸或一小部分氨基酸的各个置换、缺失或添加,在该变更导致氨基酸为化学类似的氨基酸所置换时,为“保守修饰的变体”。因而,还可变更选自1至15的整数的任何数目的氨基酸残基。因而,例如,可作出1、2、3、4、5、7或10个变更。保守修饰的变体通常提供与它们所源自的未经修饰的多肽序列类似的生物活性。例如,底物特异性、酶活性或配体/受体结合通常为天然蛋白质对于其天然底物的至少30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%,优选60-90%。提供功能上相似的氨基酸的保守置换表是本领域所熟知的。

[0089] 下面的六个组各含有对彼此而言是保守置换的氨基酸:

[0090] 1)丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T);

[0091] 2)天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);

[0092] 3)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);

[0093] 4)精氨酸(R)、赖氨酸(K);

[0094] 5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);以及

[0095] 6)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)。

[0096] 还可参见Creighton,PROTEINS,W.H.Freeman and Co.(1984)(Creighton,《蛋白质》,弗里曼公司,1984年)。

[0097] 本文所用的“基本上由.....组成”意指在如下情况下目标多核苷酸可包括额外的序列:该额外的序列在严格杂交条件下不会选择性地杂交至与该多核苷酸相同的cDNA,且该杂交条件包括在0.1X SSC和0.1%十二烷基硫酸钠中在65°C下进行的洗涤步骤。

[0098] 就指定的核酸而言,所谓“编码”意指包含翻译成指定蛋白质的信息。编码蛋白质的核酸可在该核酸的翻译区内包含非翻译序列(例如内含子),或可缺少这种居间的非翻译序列(例如,如在cDNA中)。据以编码蛋白质的信息是通过使用密码子来确定的。通常,氨基酸序列由核酸利用“通用”遗传密码来编码。然而,可使用如在某些植物、动物和真菌线粒体、细菌山羊支原体(*Mycoplasma capricolum*)(Yamao,et al.,(1985) Proc.Natl.Acad.Sci.USA82:2306-9(Yamao等人,1985年,《美国国家科学院院刊》,第82卷,第2306-2309页)),或纤毛虫大核(ciliate Macronucleus)中存在的通用密码的变体,当用这些生物体表达该核酸时。

[0099] 当通过合成法制备或改变核酸时,可利用将在其中表达核酸的预期宿主的已知密码子偏好性。例如,尽管本发明的核酸序列在单子叶植物物种和双子叶植物物种中都可表达,但可对序列进行修饰以解决单子叶植物或双子叶植物的特定密码子偏好性和GC含量偏好性,因为这些偏好性已被证实不同(Murray,et al.,(1989)Nucleic AcidsRes.17:477-98(Murray等人,1989年,《核酸研究》,第17卷,第477-498页),将其以引用的方式并入本文)。因而,具体氨基酸的玉米偏好密码子可由来自玉米的已知基因序列得出。关于来自玉米植物的28种基因的玉米密码子使用在Murray等人(出处同上)的表4中列出。

[0100] 如本文所用,针对核酸的“异源”为起源于外来物种的核酸,或者,如果起源于相同物种的话,则为通过蓄意的人为干预对其天然形式在组成和/或基因座方面进行了实质性修饰的核酸。例如,有效连接至异源结构基因的启动子是来自不同于衍生该结构基因的物

种的物种,或者如果是来自相同的物种,则对一者或二者由其初始形式进行了实质性的修饰。异源蛋白质可起源于外来物种,或者,如果起源于相同物种,则通过蓄意的人为干预对其天然形式进行了实质性的修饰。

[0101] 所谓“宿主细胞”意指含有载体并且支持该表达载体的复制和/或表达的细胞。宿主细胞可以是原核细胞如大肠杆菌(*E. coli*),或真核细胞如酵母、昆虫、植物、两栖动物或哺乳动物细胞。优选地,宿主细胞是单子叶植物细胞或双子叶植物细胞,包括但不限于玉米、高粱、向日葵、大豆、小麦、苜蓿、水稻、棉花、卡诺拉油菜、大麦、小米和番茄。特别优选的单子叶宿主细胞是玉米宿主细胞。

[0102] 术语“杂交复合体”包括指由两条相互选择性杂交的单链核酸序列形成的双链核酸结构。

[0103] 在将核酸插入细胞的语境中,术语“引入”意指“转染”或“转化”或“转导”,包括指核酸掺入进真核或原核细胞中,其中该核酸可掺入进细胞的基因组(例如染色体、质粒、质体或线粒体DNA)中,转化成自主复制子或瞬时表达(例如,转染的mRNA)。

[0104] 术语“分离的”指诸如核酸或蛋白质之类的物质,该物质实质上或基本上不含在其天然存在的环境中发现的通常与其相伴随或与其相互作用的组分。分离的物质任选包含未发现在其天然环境中与其一起的物质。如本文所定义,“分离的”核酸也称为“异源”核酸。除非另有规定,否则术语“ARGOS核酸”意指包含编码ARGOS多肽的多核苷酸(“ARGOS多核苷酸”)的核酸。

[0105] 如本文所用,“核酸”包括指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物,并且除非另外限制,否则涵盖在以下方面具有天然核苷酸的基本性质的已知类似物:其与天然存在的核苷酸(例如肽核酸)相似的方式杂交至单链核酸。

[0106] 所谓“核酸文库”意指分离的DNA或RNA分子的集合,其包含且实质上代表指定生物体的基因组的整个被转录的部分。示例性的核酸文库如基因组文库和cDNA文库的构建在标准的分子生物学参考书有教导,如Berger and Kimmel, *GUIDE TO MOLECULAR CLONING TECHNIQUES* (Berger和Kimmel,《分子克隆技术指南》),选自丛书 *METHODS IN ENZYMOLOGY*, vol.152, Academic Press, Inc., San Diego, CA (1987) (《酶学方法》,第152卷,学术出版社,加利福尼亚州圣地亚哥,1987年); Sambrook, et al., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2<sup>nd</sup> ed., vols. 1-3 (1989) (Sambrook等人,《分子克隆实验指南》,第2版,第1-3卷,1989年); 以及 *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, Ausubel, et al., eds, *Current Protocols*, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc. (1994 Supplement) (《最新分子生物学实验方法汇编》, Ausubel等人编辑,选自《实验室指南》,格林出版联合公司与约翰威立父子出版公司的合资公司)。

[0107] 如本文所用,“有效连接”包括指第一序列(如启动子)和第二序列之间的功能性连接,其中启动子序列起始或介导对应第二序列的DNA的转录。一般来讲,有效连接意指被连接的核酸序列是连续的,并且如果有必要连接两个蛋白质编码区的话,是连续的且在相同的阅读框内。

[0108] 如本文所用,术语“植物”包括指整个植物、植物器官(例如叶、茎、根等)、种子和植物细胞和它们的子代。如本文所用,植物细胞包括但不限于种子悬浮培养物、胚、分生组织区、愈伤组织、叶、根、苗、配子体、孢子体、花粉和小孢子。可用于本发明方法的植物种类通

常与适用于转化技术的高等植物种类一样宽泛,包括单子叶植物和双子叶植物,包括以下属的种:南瓜属(*Cucurbita*)、蔷薇属(*Rosa*)、葡萄属(*Vitis*)、胡桃属(*Juglans*)、草莓属(*Fragaria*)、百脉根属(*Lotus*)、苜蓿属(*Medicago*)、驴食草属(*Onobrychis*)、三叶草属(*Trifolium*)、胡芦巴属(*Trigonella*)、豇豆属(*Vigna*)、柑桔属(*Citrus*)、亚麻属(*Linum*)、老鹳草属(*Geranium*)、木薯属(*Manihot*)、胡萝卜属(*Daucus*)、拟南芥属(拟南芥)、芸苔属(*Brassica*)、萝卜属(*Raphanus*)、白芥属(*Sinapis*)、颠茄属(*Atropa*)、辣椒属(*Capsicum*)、曼陀罗属(*Datura*)、天仙子属(*Hyoscyamus*)、番茄属(*Lycopersicon*)、烟草属(*Nicotiana*)、茄属(茄属)、碧冬茄属(*Petunia*)、毛地黄属(*Digitalis*)、马珠草属(*Majorana*)、菊苣属(*Cichorium*)、向日葵属(*Helianthus*)、莴苣属(*Lactuca*)、雀麦属(*Bromus*)、天门冬属(*Asparagus*)、金鱼草属(*Antirrhinum*)、萱草属(*Heterocallis*)、*Nemesis*、天竺葵属(*Pelargonium*)、黍属(*Panteum*)、狼尾草属(*Pennisetum*)、毛茛属(*Ranunculus*)、千里光属(*Senecio*)、蛾蝶花属(*Salpiglossis*)、黄瓜属(*Cucumis*)、布洛华丽属(*Browaalia*)、大豆属(*Glycine*)、豌豆属(*Pisum*)、菜豆属(*Phaseolus*)、黑麦草属(*Lolium*)、稻属(*Oryza*)、燕麦属(*Avena*)、大麦属(*Hordeum*)、黑麦属(*Secale*)、葱属(*Allium*)和小麦属(*Triticum*)。特别优选的植物是玉米(*Zea mays*)。

[0109] 如本文所用,“产量”包括指收获时针对谷粒水分(通常是15%)进行了调整后的每英亩谷类作物的蒲式耳数。谷粒水分是在收获时的谷粒中测量。谷粒的经调整的测试重量确定为针对收获时的谷粒水分水平进行了调整的重量,单位磅/蒲式耳。

[0110] 如本文所用,“多核苷酸”包括指脱氧核糖多核苷酸、核糖多核苷酸或其类似物,所述类似物在如下方面具有天然核糖核苷酸的基本性质:在严格杂交条件下其所杂交的核苷酸序列与天然存在的核苷酸所杂交的核苷酸序列基本上相同,和/或可翻译成与天然存在的核苷酸所翻译的氨基酸相同的氨基酸。多核苷酸可以是天然或异源结构基因或调控基因的全长序列或其亚序列。除非另外指明,否则该术语包括指指定的序列及其互补序列。因而,为了稳定性或为了其他原因对主链进行了修饰的DNA或RNA是如该术语在本文所意指的“多核苷酸”。此外,包含稀有碱基(如次黄嘌呤核苷)或修饰碱基(如三苯甲基化的碱基)(仅举两个例子)的DNA或RNA是多核苷酸(如该术语在本文所用的)。应当理解,已对DNA和RNA进行了很多种修饰,这些修饰起到本领域技术人员已知的许多有用目的。本文所用的术语多核苷酸涵盖多核苷酸的这类经化学修饰、酶修饰或代谢修饰的形式,以及病毒和细胞(包括特别是简单细胞和复杂细胞)特征性的DNA和RNA的化学形式。

[0111] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指氨基酸残基的聚合物。这些术语适用于其中一个或多个氨基酸残基为相应的天然存在的氨基酸的人工化学类似物的氨基酸聚合物,以及适用于天然存在的氨基酸聚合物。

[0112] 本文所用的“启动子”包括指DNA的在转录起始的上游并涉及RNA聚合酶和其他蛋白质的识别和结合以起始转录的区域。“植物启动子”是能够引发在植物细胞中的转录的启动子。示例性的植物启动子包括但不限于从植物、植物病毒和包含在植物细胞中表达的基因的细菌获得的那些启动子,所述细菌如农杆菌(*Agrobacterium*)或根瘤菌(*Rhizobium*)。例子为优先起始在某些组织,例如叶、根、种子、纤维、木质部导管、管胞或厚壁组织中的转录的启动子。这种启动子被称为“组织偏好的”。“细胞类型”特异性启动子主要驱动在一个或多个器官中某些细胞类型中的表达,例如根或叶中的维管细胞。“诱导型”或“调控型”启

动子是处于环境控制下的启动子。可实现通过诱导型启动子进行的转录的环境条件的例子包括无氧条件或光的存在。另一类型的启动子是发育调节启动子,例如在花粉发育过程中驱动表达的启动子。组织偏好的、细胞类型特异性的、发育调节的和诱导型的启动子构成了“非组成型”启动子类别。“组成型”启动子是在大多数环境条件下活跃的启动子。

[0113] 术语“ARGOS多肽”指一条或多条氨基酸序列。该术语还包括其片段、变体、同源物、等位基因或前体(例如原前蛋白或前蛋白)。“ARGOS蛋白”包括ARGOS多肽。除非另有规定,否则术语“ARGOS核酸”意指包含编码ARGOS多肽的多核苷酸(“ARGOS多核苷酸”)的核酸。

[0114] 如本文所用,“重组的”包括指已通过引入异源核酸进行修饰的细胞或载体,或者源于经这样修饰过的细胞的细胞。因而,例如,重组细胞表达不以天然(非重组)形式的细胞内的相同形式存在的基因,或因为蓄意人为干预而表达原本异常表达、表达不足或根本不表达的天然基因。本文所用的术语“重组的”不涵盖通过天然发生的事件(例如自发突变、天然转化/转导/转座)进行的细胞或载体的变更,所述事件为例如在没有蓄意人为干预的情况下发生的那些。

[0115] 本文所用的“重组表达盒”是具有一系列规定核酸元件的通过重组法或合成法产生的核酸构建体,其允许特定核酸在靶细胞中转录。可将重组表达盒掺入到质粒、染色体、线粒体DNA、质体DNA、病毒或核酸片段中。通常,除了别的序列以外,表达载体的重组表达盒部分还包含待转录的核酸和启动子。

[0116] 术语“残基”或“氨基酸残基”或“氨基酸”在本文中可互换使用,指掺入进蛋白质、多肽或肽(统称“蛋白质”)中的氨基酸。氨基酸可以是天然存在的氨基酸,除非另外进行限制,否则可涵盖可以以与天然存在的氨基酸类似的方式发挥功能的天然氨基酸已知类似物。

[0117] 应当理解,本领域的技术人员将会知道,本发明不仅仅涵盖特定的示例性序列。在给定位点产生化学等同的氨基酸,但不影响编码多肽的功能特性的核酸片段变化是本领域熟知的。例如,疏水氨基酸丙氨酸的密码子可被编码另一个疏水性较小的残基例如甘氨酸,或疏水性较大的残基例如缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸的密码子置换。类似地,还可预期一个带负电的残基置换为另一个,例如天冬氨酸置换为谷氨酸,或一个带正电的残基置换为另一个,例如赖氨酸置换为精氨酸的变化产生功能等同的产物。还可预期使多肽分子的N-端和C-端部分改变的核苷酸变化不会改变多肽的活性。每个所推荐的改变均在本领域的常规技术内,正如确定编码产物的生物活性的保留。

[0118] 本发明的蛋白质也可以是包含这样氨基酸序列的蛋白质,所述氨基酸序列包含选自表1中列出的SEQ ID NO的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸的缺失、置换、插入和/或添加。置换可以是保守的,意指某氨基酸残基被另一个具有类似物理和化学特性的残基替代。保守置换的非限制性例子包括含脂族基团氨基酸残基例如Ile、Val、Leu或Ala之间的替代,以及极性残基之间的替代,例如Lys-Arg、Glu-Asp或Gln-Asn替代。

[0119] 来源于氨基酸缺失、置换、插入和/或添加的蛋白质可在编码其野生型蛋白质的DNA受到例如已知的定点诱变时制备(参见例如Nucleic Acid Research10(20):6487-6500(1982)(《核酸研究》,第10卷,第20期,第6487-6500页,1982年),该文献全文据此以引用方式并入)。如本文所用,术语“一个或多个氨基酸”旨在意指可通过定点诱变缺失、置换、插入和/或添加的氨基酸的可能数量。

[0120] 定点诱变可以例如如下使用与待突变的单链噬菌体DNA互补,不同的是具有特定错配(即,所需突变)的合成寡核苷酸引物实现。也就是说,上述合成寡核苷酸用作引起互补链通过噬菌体合成的引物,然后所得的双链DNA用于转化宿主细胞。将转化细胞培养物置于琼脂上,从而允许噬菌斑从含噬菌体的单个细胞形成。因此,理论上,50%的新菌落包含突变为单链的噬菌体,而其余50%具有原始序列。在允许与具有上述所需突变的DNA完全相同的DNA杂交,但不与具有原始链的DNA杂交的温度下,允许所得的噬菌斑与通过激酶处理标记的合成探针杂交。随后,拾取与探针杂交的噬菌斑并培养以收集其DNA。

[0121] 允许生物活性肽例如酶的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸缺失、置换、插入和/或添加,同时保持其活性的技术包括上述定点诱变,以及其他技术,例如用诱变剂处理基因的那些,以及其中基因选择性裂解以移除、置换、插入或添加所选的一个或多个核苷酸然后连接的那些。

[0122] 本发明的蛋白质也可以是包含这样的核苷酸序列的核酸编码的蛋白质,其包含选自表1中列出的SEQ ID NO的核苷酸序列中的一个或多个核苷酸的缺失、置换、插入和/或添加。核苷酸缺失、置换、插入和/或添加可通过定点诱变或上述其他技术实现。

[0123] 本发明的蛋白质也可以是包含这样的核苷酸序列的核酸编码的蛋白质,其在严格条件下与选自表1中列出的SEQ ID NO的核苷酸序列的互补链杂交。

[0124] 术语“在严格条件下”意指两个序列在中等或高度严格条件下杂交。更具体地讲,本领域的普通技术人员可以例如根据DNA的长度轻松地确定中等严格条件。基本条件在 Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third edition, chapters 6 and 7, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 (Sambrook 等人,《分子克隆实验指南》,第三版,第6和7章,冷泉港实验室出版社,2001年)中示出,并且包括使用硝化纤维过滤器的预洗涤溶液 5xSSC、0.5% SDS、1.0mM EDTA (pH 8.0), 约50% 甲酰胺、2xSSC 至 6xSSC、约40-50°C 的杂交条件(或其他类似杂交溶液,例如 Stark 溶液,约50% 甲酰胺、约42°C)以及例如约40-60°C、0.5-6xSSC、0.1% SDS 的洗涤条件。优选地,中等严格条件包括在约50°C 和6xSSC 下杂交(和洗涤)。本领域的技术人员也可以例如根据DNA的长度轻松地确定高度严格条件。

[0125] 一般来讲,此类条件包括与中等严格条件相比,在较高温度和/或较低盐浓度下杂交和/或洗涤(例如在约65°C, 6xSSC 至 0.2xSSC, 优选地 6xSSC, 更优选地 2xSSC, 最优选地 0.2xSSC 下杂交)。例如,高度严格条件可包括如上所定义的杂交,并且在大约65-68°C、0.2xSSC、0.1% SDS 下洗涤。在杂交和洗涤缓冲液中 SSPE (1xSSPE 为 0.15M NaCl、10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 1.25mM EDTA, pH 7.4) 可代替 SSC (1xSSC 为 0.15M NaCl 和 15mM 柠檬酸钠); 在杂交完成后进行洗涤 15 分钟。

[0126] 使用商购获得的杂交试剂盒也是可能的,其不使用放射性物质作为探针。具体例子包括用 ECL 直接标记和检测系统(安玛西亚公司(Amersham))杂交。严格条件包括例如使用包括在试剂盒中的杂交缓冲液在 42°C 下杂交 4 小时,该缓冲液补充有 5% (w/v) 阻断试剂和 0.5M NaCl, 并且在 0.4% SDS、0.5xSSC 中 55°C 下洗涤 20 分钟两次,在 2xSSC 中室温下洗涤 5 分钟一次。

[0127] 术语“选择性杂交”包括指在严格杂交条件下核酸序列与指定的核酸靶序列杂交的程度比其与非靶序列杂交的程度可检测地更高(例如,至少 2 倍于背景),并且基本上排除

非靶核酸。选择性杂交的序列通常相互具有约至少40%的序列同一性,优选60-90%的序列同一性,最优选100%的序列同一性(即互补性)。

[0128] 术语“严格条件”或“严格杂交条件”包括指探针与其靶序列杂交的程度将比它与其他序列杂交的程度可检测地更高(例如,至少2倍于背景)的条件。严格条件是序列依赖性的,并且将在不同环境下不同。通过控制杂交和/或洗涤条件的严格性,可鉴别与探针可最高达100%互补的靶序列(同源探测)。或者,可以调节严格性条件以允许序列中的一些错配,从而检测到较低程度的相似性(异源探测)。优选地,探针长为大约500个核苷酸,但长度可变化很大,从小于500个核苷酸到等于靶序列的整个长度。

[0129] 如本文所用,“转基因植物”包括指在其基因组内包含异源多核苷酸的植物。一般来讲,异源多核苷酸稳定地整合在基因组内使得该多核苷酸得以传递到连续世代。异源多核苷酸可单独整合进基因组中,或者作为重组表达盒的一部分整合进基因组中。“转基因”在本文中用来包括任何其基因型已因异源核酸的存在而被变更的细胞、细胞系、愈伤组织、组织、植物部分或植物,包括那些最初如此变更的转基因以及那些通过从最初的转基因进行有性杂交或无性繁殖而产生的转基因在内。本文所用的术语“转基因”不涵盖通过常规植物育种方法或通过诸如随机异花受精、非重组病毒感染、非重组细菌转化、非重组转座或自发突变之类的自然发生事件导致的基因组(染色体基因组或染色体外基因组)的改变。

[0130] 如本文所用,“载体”包括指用于转染宿主细胞并可在其中插入多核苷酸的核酸。载体常常是复制子。表达载体允许插入其中的核酸转录。

[0131] 以下术语用于说明两个或更多个核酸或多核苷酸或多肽之间的序列关系:(a)“参考序列”、(b)“比较窗口”、(c)“序列同一性”、(d)“序列同一性百分比”和(e)“实质上相同”。

[0132] 如本文所用,“参考序列”是用作序列比较基准的确定的序列。参考序列可以是指定序列的子集或全部;例如全长cDNA或基因序列的片段或完整的cDNA或基因序列。

[0133] 如本文所用,“比较窗口”意指包括指多核苷酸序列的连续和指定的区段,其中该比较窗口中的该多核苷酸序列相比于参考序列(不包含添加或缺失)可包含添加或缺失(即空位),以便两个多核苷酸的最佳比对。通常,比较窗口长度为至少20个连续的核苷酸,任选可为30、40、50、100个或更长。本领域技术人员认识到,为避免由于在多核苷酸序列中纳入空位所致的与参考序列的高度相似性,通常引入空位罚分并从匹配数扣除空位罚分。

[0134] 将核苷酸和氨基酸序列进行比对以作比较的方法是本领域公知的。局部同源性算法(BESTFIT)(Smith and Waterman,(1981)Adv. Appl. Math 2:482(Smith和Waterman,1981年,《应用数学进展》,第2卷,第482页))可以对用于比较的序列进行最佳比对;Needleman and Wunsch,(1970)J. Mol. Biol. 48:443-53(Needleman和Wunsch,1970年,《分子生物学杂志》,第48卷,第443-453页)的同源性比对算法(GAP);相似性搜索方法(Tfasta和Fasta)(Pearson and Lipman,(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444(Pearson和Lipman,1988年,《美国国家科学院院刊》,第85卷,第2444页));这些算法的计算机化实施包括,但不限于:加利福尼亚州山景城Intelligenetics公司(Intelligenetics, Mountain View, California)的PC/Gene程序中的CLUSTAL,威斯康星遗传学软件包(Wisconsin Genetics Software Package<sup>®</sup>)第8版(可得自遗传学计算机组,GCG<sup>®</sup>程序,加利福尼亚州圣地亚哥Accelrys公司(Genetics Computer Group, GCG<sup>®</sup> programs, Accelrys, Inc.,



San Diego,CA))中的GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA和TFASTA。CLUSTAL程序由如下文献详细说明:Higginsh and Sharp,(1988)Gene73:237-44(Higgins和Sharp,1988年,《基因》,第7卷,第237-244页);Higgins and Sharp,(1989)CABIOS5:151-3(Higgins和Sharp,1989年,《计算机在生物科学中的应用》,第5卷,第151-153页);Corpet,et al.,(1988)Nucleic Acids Res.16:10881-90(Corpet等人,1988年,《核酸研究》,第16卷,第10881-10890页);Huang,et al.,(1992)Computer Applications in the Biosciences8:155-65(Huang等人,1992年,《计算机在生物科学中的应用》,第8卷,第155-165页)以及Pearson et al.,(1994)Meth.Mol.Biol.24:307-31(Pearson等人,1994年,《分子生物学方法》,第24卷,第307-331页)。用于多个序列的最佳全局比对的优选程序是PileUp(Feng and Doolittle,(1987)J. Mol.Evol.,25:351-60(Feng和Doolittle,1987年,《分子进化学杂志》,第25卷,第351-360页),其类似于Higgins and Sharp,(1989)CABIOS5:151-53(Higgins和Sharp,1989年,《计算机在生物科学中的应用》,第5卷,第151-153页)中描述的方法,将文献以引用的方式并入本文。可用于数据库相似性搜索的BLAST家族程序包括:BLASTN,用于核苷酸查询序列针对核苷酸数据库序列进行查询;BLASTX,用于核苷酸查询序列针对蛋白质数据库序列进行查询;BLASTP,用于蛋白质查询序列针对蛋白质数据库序列进行查询;TBLASTN,用于蛋白质查询序列针对核苷酸数据库序列进行查询;以及TBLASTX,用于核苷酸查询序列针对核苷酸数据库序列进行查询。参见CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,Chapter19, Ausubel,et al.,eds.,Greene Publishing and Wiley-Interscience,New York(1995)(《最新分子生物学实验方法汇编》,第19章,Ausubel等人编辑,格林出版和威利-英特科学出版公司,纽约,1995年)。

[0135] GAP利用Needleman和Wunsch(出处同上)的算法来寻找两个完整序列的比对,该比对使匹配数最大而使空位数最小。GAP考虑所有可能的比对和空位位置,并产生具有最大数目的匹配碱基和最少的空位的比对。它允许提供以匹配碱基数为单位的空位产生罚分和空位延伸罚分。GAP对于其插入的每个空位,必须利用匹配的空位产生罚分数。如果选择大于零的空位延伸罚分,GAP对于每个插入的空位必须另外利用空位长度乘以空位延伸罚分。威斯康星遗传学软件包(Wisconsin Genetics Software Package<sup>®</sup>)第10版中的默认空位产生罚分值和空位延伸罚分值分别为8和2。空位产生和空位延伸罚分可以以选自0-100的整数来表示。因而,例如,空位产生和空位延伸罚分可以是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50或更大。

[0136] GAP给出具有最佳比对的家族中的一个成员。可能存在这个家族的许多成员,但其他成员没有更好的品质。GAP显示用于比对的四个优值因子:品质、比率、同一性和相似性。品质是为了比对序列而最大化的度量(metric)。比率是品质除以较短区段中的碱基数。同一性百分数是实际匹配的符号的百分数。相似性百分数是相似的符号的百分数。将对应于空位的符号忽略。当一对符号的评分矩阵值大于或等于0.50(相似性阈值)时,评定为相似性。威斯康星遗传学软件包(Wisconsin Genetics Software Package<sup>®</sup>)第10版中所用的评分矩阵为BLOSUM62(参见Henikoff and Henikoff,(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA89:10915(Henikoff和Henikoff,1989年,《美国国家科学院院刊》,第89卷,第10915页))。

[0137] 除非另外指明,否则本文所提供的序列同一性/相似性值指用BLAST2.0程序包,采

用默认参数获得的值(Altschul, et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402 (Altschul等人, 1997年, 《核酸研究》, 第25卷, 第3389-3402页)。

[0138] 如本领域普通技术人员将会理解的, BLAST搜索假定蛋白质可以随机序列建模。然而, 许多真实蛋白质包含非随机序列区, 该非随机序列可为同聚段、短周期重复或富含一种或多种氨基酸的区域。这种低复杂性区域可在不相关的蛋白质之间比对, 尽管该蛋白质的其他区域完全不相似。可采用多种低复杂性过滤程序来减少这种低复杂性比对。例如, 可单独使用或联合使用SEG(Wooten and Federhen, (1993) *Comput. Chem.* 17:149-63 (Wooten和Federhen, 1993年, 《计算化学》, 第17卷, 第149-163页)) 和XNU(Claverie and States, (1993) *Comput. Chem.* 17:191-201 (Claverie和States, 1993年, 《计算化学》, 第17卷, 第191-201页)) 低复杂性过滤程序。

[0139] 在两条核酸或多肽序列的情形中, 本文所用的“序列同一性”或“同一性”是指当在指定的比较窗口上进行比对以获得最大对应时两个序列中相同的残基。当序列同一性百分数针对蛋白质使用时, 认识到不相同的残基位置往往差别在于保守氨基酸置换, 其中氨基酸残基由具有相似化学性质(例如电荷或疏水性)的其他氨基酸残基置换, 因此不会改变分子的功能性质。如果序列差别在于保守置换, 则可上调百分比序列同一性以校正置换的保守性质。差别在于这种保守置换的序列被说成具有“序列相似性”或“相似性”。作出这个调节的方法是本领域技术人员所熟知的。通常, 这涉及将保守置换评定为部分错配而不是完全错配, 从而增加序列同一性百分数。因而, 例如, 如果相同的氨基酸给予1分, 非保守置换给予0分, 则保守置换给予0至1之间的分数。例如, 根据Meyers and Miller, (1988) *Computer Applic. Biol. Sci.* 4:11-17 (Meyers和Miller, 1988年, 《计算机在生物科学中的应用》, 第4卷, 第11-17页) 的算法计算保守置换的分数, 例如如在程序PC/GENE(美国加利福尼亚州山景城Intelligenetics公司(Intelligenetics, Mountain View, California, USA)) 中所实现的。

[0140] 本文所用的“序列同一性百分数”意指通过在比较窗口上比较两个最佳比对的序列所确定的数值, 其中多核苷酸序列在比较窗口中的部分与参考序列(不包含添加或缺失)相比包含添加或缺失(即空位), 以便两个序列的最佳比对。该百分数是这样计算的: 确定在两个序列中出现相同核酸碱基或氨基酸残基的位置的数目以得到匹配的位置的数目, 将匹配的位置的数目除以比较窗口中的位置的总数目, 然后将结果乘以100以得到序列同一性百分数。

[0141] 术语多核苷酸序列的“实质上相同”意指利用所描述的比对程序之一采用标准参数与参考序列比较时, 多核苷酸包含具有50-100%之间的序列同一性, 优选至少50%的序列同一性, 优选至少60%的序列同一性, 优选至少70%, 更优选至少80%, 更优选至少90%且最优选至少95%序列同一性的序列。技术人员将会认识到, 可通过考虑密码子简并性、氨基酸相似性、阅读框定位等等适当调整这些值以确定两个核苷酸序列所编码的蛋白质的相应同一性。用于这些目的的氨基酸序列的实质同一性通常意指55-100%之间的序列同一性, 优选至少55%, 优选至少60%, 更优选至少70%、80%、90%, 最优选至少95%。

[0142] 在肽的情形中, 术语“实质相同”指肽包含在指定比较窗口上与参考序列具有55-100%之间的序列同一性; 优选与参考序列具有至少55%的序列同一性, 优选60%, 优选70%, 更优选80%, 最优选至少90%或95%的序列同一性。优选地, 利用Needleman和Wunsch

(出处同上)的同源比对算法进行最佳比对。两条肽序列是实质上相同的指示是,一种肽可与针对第二种肽产生的抗体发生免疫反应。因而,例如,如果某种肽与第二种肽差别仅在于保守置换的话,则这两种肽实质上相同。此外,当某种肽与第二种肽差别在于非保守变化时,如果抗体识别的表位实质上相同,则它们实质上相同。“实质上相似的”肽共有如上所述的序列,例外的是不相同的残基位置差别可在于保守氨基酸变化。

[0143] 本发明公开了ARGOS多核苷酸和多肽。本发明的新型核苷酸和蛋白质具有表明它们调控细胞数量并因而在植物发育中起重要作用的表达模式。该多核苷酸在多种植物组织中表达。该多核苷酸和多肽因而提供了操纵植物发育来改变种子和营养组织发育、时间安排或组成的机会。这可用于产生不育植物、无种子植物或具有改变的胚乳组成的植物。

[0144] 核酸

[0145] 本发明特别提供包括ARGOS多核苷酸在内的RNA、DNA及它们的类似物和/或嵌合体的分离的核酸。

[0146] 本发明还包括为在不同生物体中表达而经优化的多核苷酸。例如,对于多核苷酸在玉米植物中的表达,可变更该序列以解决特定的密码子偏好性和改变GC含量,如根据Murray等人(出处同上)所述。关于来自玉米植物的28种基因的玉米密码子使用在Murray等人(出处同上)的表4中列出。

[0147] 本发明的ARGOS核酸包括分离的ARGOS多核苷酸,所述多核苷酸包括:

[0148] (a)编码ARGOS多肽及其经保守修饰的和多态性的变体的多核苷酸;

[0149] (b)与(a)或(b)的多核苷酸具有至少70%序列同一性的多核苷酸;

[0150] (c)(a)或(b)的多核苷酸的互补序列。

[0151] 下面的表1列出了本文公开的多核苷酸和多肽的具体成份

[0152] 表1.

[0153]

基因名	植物物种	多核苷酸/多肽	SEQ ID NO:
ZmARGOS1	玉米	多核苷酸 多肽 基因组序列	SEQ ID NO: 1 SEQ ID NO: 2 SEQ ID NO: 71
ZmARGOS2 (ZmARGOS1 的 等位变体)	玉米	多核苷酸 多肽	SEQ ID NO: 3 SEQ ID NO: 4
ZmARGOS3	玉米	多核苷酸 多肽	SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 6
ZmARGOS4	玉米	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 7 SEQ ID NO: 40
ZmARGOS5	玉米	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 8 SEQ ID NO: 41
ZmARGOS6	玉米	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 9 SEQ ID NO: 42
ZmARGOS7	玉米	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 10 SEQ ID NO: 43
ZmARGOS8	玉米	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 11 SEQ ID NO: 44
ZmARGOS9	玉米	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 12 SEQ ID NO: 45
OsARGOS1	水稻(Oryza sativa)	多肽 多核苷酸	SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 46
OsARGOS2	水稻	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 14 SEQ ID NO: 47
OsARGOS3	水稻	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 15 SEQ ID NO: 48
OsARGOS4	水稻	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 16 SEQ ID NO: 49
OsARGOS5	水稻	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 17 SEQ ID NO: 50
OsARGOS6	水稻	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 18 SEQ ID NO: 51
OsARGOS7	水稻	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 19 SEQ ID NO: 52
OsARGOS8	水稻	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 20 SEQ ID NO: 53
GmARGOS1	大豆(Glycine max)	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 21 SEQ ID NO: 54

[0154]

GmARGOS2	大豆	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 22 SEQ ID NO: 55
GmARGOS3	大豆	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 23 SEQ ID NO: 56
GmARGOS4	大豆	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 24 SEQ ID NO: 57
GmARGOS5	大豆	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 25 SEQ ID NO: 58
SbARGOS1	高粱(Sorghum bicolor)	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 29 SEQ ID NO: 62
SbARGOS2	高粱	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 30 SEQ ID NO: 63
SbARGOS3	高粱	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 31 SEQ ID NO: 64
SbARGOS4	高粱	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 32 SEQ ID NO: 65
SbARGOS5	高粱	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 33 SEQ ID NO: 66
SbARGOS6	高粱	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 34 SEQ ID NO: 67
SbARGOS7	高粱	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 35 SEQ ID NO: 68
SbARGOS8	高粱	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 36 SEQ ID NO: 69
SbARGOS9	高粱	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 37 SEQ ID NO: 70
AtARGOS1	拟南芥 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 26 SEQ ID NO: 59
AtARGOS2	拟南芥	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 27 SEQ ID NO: 60
AtARGOS3	拟南芥	多肽多核苷酸	SEQ ID NO: 28 SEQ ID NO: 61
引物	人工序列	多核苷酸	SEQ ID NO: 38
引物	人工序列	多核苷酸	SEQ ID NO: 39
百喜草 ARGOS1 assm_NODE_91017	百喜草	多核苷酸 多肽	SEQ ID NO: 72 SEQ ID NO: 73
百喜草 ARGOS9 assm_NODE_247924	百喜草	多核苷酸 多肽	SEQ ID NO: 74 SEQ ID NO: 75
百喜草 ARGOS3 182675_186771_con	百喜草	多核苷酸 多肽	SEQ ID NO: 76 SEQ ID NO: 77
百喜草 ARGOS6 assm_NODE_583424	百喜草	多核苷酸 多肽	SEQ ID NO: 78 SEQ ID NO: 79
复活草 ARGOS8 Con2_incomplete	复活草	多核苷酸 多肽	SEQ ID NO: 80 SEQ ID NO: 81

[0155]

复活草 ARGOS7 assm_NODE_128576	复活草	多核苷酸 多肽	SEQ ID NO:82 SEQ ID NO:83
苏丹草 Assm Node 32838 部分	苏丹草	多肽	SEQ ID NO:84
来自富脯氨酸区的共有 序列	人工序列-共有序 列	多肽	SEQ ID NO: 85
来自富脯氨酸区的共有 序列, 标示可变区	人工序列-标记可 变区的共有序列	多肽	SEQ ID NO: 86
截短的 ZmARGOS8	玉米	多肽	SEQ ID NO:87
富脯氨酸基序 PRM ZmARGOS1a	玉米	多肽	SEQ ID NO:88
TPT 结构域 ZmARGOS1a	玉米	多肽	SEQ ID NO:89
TM1	玉米	多肽	SEQ ID NO: 90
TM2	玉米	多肽	SEQ ID NO: 91
引物	人工序列	多肽	SEQ ID NO: 92
接头	人工序列	多肽	SEQ ID NO: 93
5' bar 引物	人工序列	多核苷酸	SEQ ID NO: 94
3' bar 引物	人工序列	多核苷酸	SEQ ID NO: 95
具有已鉴别的可变区的 PRM 序列	玉米	多肽	SEQ ID NO: 96
SB04G023130.1 保守区	高粱	多肽	SEQ ID NO:97
SB05G0d6900.1 保守区	高粱	多肽	SEQ ID NO:98
SB06G017750.1 保守区	高粱	多肽	SEQ ID NO:99
SB7G001405.1 保守区	高粱	多肽	SEQ ID NO:100
SB09G020520.1 保守区	高粱	多肽	SEQ ID NO:101
变体 PRM	人工序列	多肽	SEQ ID NO:102
AtARGOS4	拟南芥	多核苷酸	SEQ ID NO: 103
AtARGOS4	拟南芥	多肽	SEQ ID NO: 104

[0156] 核酸的构建

[0157] 可用(a)标准的重组方法、(b)合成技术或二者的组合产生分离的本发明核酸。在一些实施例中,本发明的多核苷酸将从真菌或细菌克隆、扩增或以别的方式构建。

[0158] 构建核酸的合成方法

[0159] 分离的本发明的核酸也可以通过直接化学合成制备,例如用磷酸三酯方法(Narang, et al., (1979)Meth.Enzymol.68:90-9(Narang等人,1979年,《酶学方法》,第68卷,第90-99页));磷酸二酯方法(Brown, et al., (1979)Meth.Enzymol.68:109-51(Brown等人,1979年,《酶学方法》,第68卷,第109-151页));二乙基亚磷酰胺方法(Beaucage, et al., (1981)Tetra.Letts.22(20):1859-62(Beaucage等人,1981年,《四面体通讯》,第22卷,第20期,第1859-1862页));Beaucage等人(出处同上)描述的固相亚磷酰胺三酯方法,如使用自动化合成仪,例如Needham-VanDevanter, et al., (1984)Nucleic Acids Res.12:6159-68(Needham-VanDevanter等人,1984年,《核酸研究》,第12卷,第6159-6168页)中所述,以及美

国专利No.4,458,066的固相支持体方法。化学合成通常产生单链寡核苷酸。这可通过与互补序列杂交或通过将该单链作为模板用DNA聚合酶进行聚合来转变为双链DNA。技术人员将会认识到,虽然DNA的化学合成局限于约100个碱基的序列,但可通过连接较短的序列来获得较长的序列。

#### [0160] UTR和密码子偏好性

[0161] 一般而言,已发现翻译效率受RNA的5'非编码区或非翻译区(5'UTR)中的特定序列元件的调控。正序列基序包括翻译起始共有序列(Kozak,(1987)*Nucleic Acids Res.*15:8125(Kozak,1987年,《核酸研究》,第15卷,第8125页)) and 5'G<sup>7</sup>甲基GpppG RNA帽结构(Drummond,et al.,(1985)*Nucleic Acids Res.*13:7375(Drummond等人,1985年,《核酸研究》,第13卷,第7375页))。负元件包括稳定的分子内5'UTR茎-环结构(Muesing,et al.,(1987)*Cell*48:691(Muesing等人,1987年,《细胞》,第48卷,第691页)) and 5'UTR中的AUG序列或前面有适当AUG的短开放阅读框(Kozak(出处同上)、Rao,et al.,(1988)*Mol. and Cell. Biol.*8:284(Rao等人,1988年,《分子和细胞生物学》,第8卷,第284页))。因此,本发明提供了用于调节异源编码序列的翻译的5'和/或3'UTR区。

[0162] 另外,可修饰本发明多核苷酸的多肽编码区段以改变密码子使用。可采用改变了的密码子使用,来改变翻译效率和/或优化编码序列在所需宿主中的表达或为了在玉米中表达而优化异源序列中的密码子使用。本发明的多核苷酸的编码区中的密码子使用可用可商购获得的软件包(如可得自威斯康星大学遗传学计算机组(University of Wisconsin Genetics Computer Group)的“密码子偏好性(Codon Preference)”)进行统计分析。参见Devereaux,et al.,(1984)*Nucleic Acids Res.*12:387-395(Devereaux等人,1984年,《核酸研究》,第12卷,第387-395页);或MacVector4.1(康涅狄格州纽黑文的伊士曼柯达公司(Eastman Kodak Co.,New Haven,Conn.))。因而,本发明提供了本发明多核苷酸中的至少一者的编码区的密码子使用频率特性。可用于确定密码子使用频率的多核苷酸的数目(每个氨基酸3个核苷酸)可以为从3至本文所提供的本发明多核苷酸的数目的任何整数。任选地,多核苷酸将为全长序列。用于统计分析的序列的示例性数目可以为至少1、5、10、20、50或100。

#### [0163] 序列改组

[0164] 本发明提供了使用本发明多核苷酸进行序列改组的方法以及由此得到的组合物。序列改组在PCT公开No.1996/19256中有描述。也可参见Zhang,et al.,(1997)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*94:4504-9(Zhang等人,1997年,《美国国家科学院院刊》,第94卷,第4504-4509页)和Zhao,et al.,(1998)*Nature Biotech*16:258-61(Zhao等人,1998年,《自然生物技术》,第16卷,第258-261页)。一般来讲,序列改组提供出用于产生具有所需特性的多核苷酸的文库的手段,可对该文库进行选择或筛选。从一群包含具有实质序列同一性并可在体外或体内进行同源重组的序列区的相关序列多核苷酸产生重组多核苷酸的文库。序列重组的多核苷酸的群体包含具有所需的或有利的特性并且可通过合适的选择或筛选方法来选择的核苷酸的亚群。所述特性可以是能用筛选系统选择或检测的任何性质或属性,可以包括如下性质:所编码的蛋白质、转录元件、控制转录的序列、RNA加工、RNA稳定性、染色质构象、基因或转基因的翻译或其他表达性质、复制元件、蛋白质结合元件等等的性质,例如赋予可选择或可检测性质的任何特征。在一些实施例中,选择的特性将为相对于本

文所提供的野生型蛋白质而言改变了的 $K_m$ 和/或 $K_{cat}$ 。在其他实施例中,序列改组所产生的蛋白质或多核苷酸具有的配体结合亲和力将比非改组的野生型多核苷酸的高。在另外其他实施例中,与非改组的野生型多核苷酸相比,序列改组所产生的蛋白质或多核苷酸将具有改变了的最佳pH。这类性质的提高可占野生型值的至少110%、120%、130%、140%或高于150%。

#### [0165] 重组表达盒

[0166] 本发明还提供包含本发明的核酸的重组表达盒。可将编码所需的本发明多核苷酸的核酸序列,例如编码长度足以编码本发明的活性蛋白质的多肽的cDNA或基因组序列用于构建重组表达盒,可将该表达盒引入所需的宿主细胞。重组表达盒将通常包含有效连接至转录起始调控序列的本发明多核苷酸,所述转录起始调控序列将引导所述多核苷酸在预期的宿主细胞(如转化植物的组织)中的转录。

[0167] 例如,植物表达载体可包含(1)处于5'和3'调控序列的转录控制下的克隆植物基因和(2)显性选择性标记。如果需要,这种植物表达载体还可含有启动子调控区(例如,赋予诱导型表达或组成型表达,由环境或发育调节的表达,或细胞或组织特异性/选择性表达的启动子调控区)、转录起始位点、核糖体结合位点、RNA加工信号、转录终止位点和/或多腺苷酸化信号。

[0168] 可采用会引导本发明多核苷酸在再生植物的所有组织中表达的植物启动子片段。这种启动子在本文中称为“组成型”启动子并且在大多数环境条件和发育或细胞分化状态下是活跃的。组成型启动子的例子包括源于根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的T-DNA的1'或2'启动子、Smas启动子、肉桂醇脱氢酶启动子(美国专利No.5,683,439)、Nos启动子、rubisco启动子、GRP1-8启动子、来自花椰菜花叶病毒(CaMV)的35S启动子,如Ode11, et al.,(1985)Nature313:810-2(Ode11等人,1985年,《自然》,第313卷,第810-812页)中所述;水稻肌动蛋白(McElroy, et al.,(1990)Plant Cell163-171(McElroy等人,1990年,《植物细胞》,第163-171页));泛素(Christensen, et al.,(1992)Plant Mol.Biol.12:619-632(Christensen等人,1992年,《植物分子生物学》,第12卷,第619-632页)和Christensen, et al.,(1992)Plant Mol.Biol.18:675-89(Christensen等人,1992年,《植物分子生物学》,第18卷,第675-689页));pEMU(Last, et al.,(1991)Theor.Appl.Genet.81:581-8(Last等人,1991年,《理论和应用遗传学》,第81卷,第581-588页));MAS(Velten, et al.,(1984)EMBO J.3:2723-30(Velten等人,1984年,《欧洲分子生物学组织杂志》,第3卷,第2723-2730页))以及玉米H3组蛋白(Lepetit, et al.,(1992)Mol.Gen.Genet.231:276-85(Lepetit等人,1992年,《分子遗传学和基因组学》,第231卷,第276-285页)和Atanassova et al.,(1992)Plant Journal2(3):291-300(Atanassova等人,1992年,《植物杂志》,第2卷,第3期,第291-300页));ALS启动子,如PCT专利申请No.WO1996/30530中所述;GOS2(美国专利No.6,504,083)和其他来自本领域技术人员已知的多种植物基因的转录起始区。对于本发明而言,泛素启动子是用于单子叶植物中表达的优选启动子。

[0169] 或者,植物启动子可指导本发明的多核苷酸在特定组织中的表达或者可另外在更精确的环境或发育控制下的表达。这种启动子在本文中称为“诱导型”启动子(Rab17、RAD29)。可通过诱导型启动子实现转录的环境条件包括病原体攻击、厌氧条件或光线的存在。诱导型启动子的例子为Adh1启动子(其可由低氧或冷胁迫诱导)、Hsp70启动子(其可由



热胁迫诱导)和PPDK启动子(其可由光诱导)。

[0170] 在发育控制下的启动子的例子包括仅仅或优先在某些组织(如叶、根、果实、种子或花)中起始转录的启动子。取决于启动子在基因组的位置,启动子的操作也可以变化。因而,诱导型启动子在某些位置可变为完全或部分组成型的。

[0171] 如果多肽表达是所需的,则通常期望在多核苷酸编码区的3'-端包括多腺苷酸化区。该多腺苷酸化区可源于多种植物基因,或源于T-DNA。待添加的3'端序列可源于(例如)胭脂氨酸合酶或章鱼氨酸合酶基因,或者源于另一植物基因,或较不优选地,源自任何其他真核基因。这种调控元件的例子包括但不限于3'末端和/或聚腺苷酸化区域,如根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)胭脂氨酸合酶(nos)基因的那些(Bevan, et al., (1983) *Nucleic Acids Res.* 12:369-85(Bevan等人,1983年,《核酸研究》,第12卷,第369-385页));马铃薯蛋白酶抑制剂II(PINII)基因(Keil, et al., (1986) *Nucleic Acids Res.* 14:5641-50(Keil等人,1986年,《核酸研究》,第14卷,第5641-5650页)以及An, et al., (1989) *Plant Cell* 1:115-22(An等人,1989年,《植物细胞》,第1卷,第115-122页)和CaMV19S基因(Mogen, et al., (1990) *Plant Cell* 2:1261-72(Mogen等人,1990年,《植物细胞》,第2卷,第1261-1272页))。

[0172] 可将内含子序列添加至部分编码序列的5'非翻译区或编码序列以增加在胞质溶胶中积聚的成熟信息的量。在动物和植物表达构建体中的转录单位中包含可剪接的内含子,已证实在mRNA水平上和蛋白质水平上都能增加基因表达最高达1000倍(Buchman and Berg, (1988) *Mol. Cell Biol.* 8:4395-4405(Buchman和Berg,1988年,《分子细胞生物学》,第8卷,第4395-4405页);Callis, et al., (1987) *Genes Dev.* 1:1183-200(Callis等人,1987年,《基因和发育》,第1卷,第1183-1200页))。当设置在接近转录单位的5'端时,这种基因表达的内含子增强通常是最大的。玉米内含子Adh1-S内含子1、Adh1-S内含子2和Adh1-S内含子6、Bronze-1内含子的使用是本领域已知的。一般参见THE MAIZE HANDBOOK, Chapter 116, Freeling and Walbot, eds., Springer, New York (1994)(《玉米手册》,第116章, Freeling和Walbot(编辑),施普林格,纽约,1994年)。

[0173] 植物信号序列包括但不限于:编码将蛋白质靶向植物细胞的胞外基质的信号肽的DNA/RNA序列(Drathewka-Kos, et al., (1989) *J. Biol. Chem.* 264:4896-900(Drathewka-Kos等人,1989年,《生物化学杂志》,第264卷,第4896-4900页)),例如皱叶烟草(*Nicotiana glauca*)延伸基因(DeLoose et al., (1991) *Gene* 99:95-100(DeLoose等人,1991年,《基因》,第99卷,第95-100页));将蛋白质靶向液泡的信号肽,例如甘薯贮藏蛋白基因(Matsuka, et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:834(Matsuka等人,1991年,《美国国家科学院院刊》,第88卷,第834页))和大麦凝集素基因(Wilkins, et al., (1990) *Plant Cell*, 2:301-13(Wilkins等人,1990年,《植物细胞》,第2卷,第301-313页));导致蛋白质被分泌的信号肽,例如PR1b信号肽(Lind, et al., (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:47-53(Lind等人,1992年,《植物分子生物学》,第18卷,第47-53页))或大麦 $\alpha$ 淀粉酶(BAA)(Rahmatullah, et al., (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:119(Rahmatullah等人,1989年,《植物分子生物学》,第12卷,第119页),以引用方式并入本文)或者将蛋白质靶向质体的信号肽,例如油菜烯脂酰ACP还原酶(Verwaert, et al., (1994) *Plant Mol. Biol.* 26:189-202(Verwaert等人,1994年,《植物分子生物学》,第26卷,第189-202页))可用于本发明中。融合至ARGOS多核苷酸的

大麦 $\alpha$ 淀粉酶信号序列是本发明的用于在玉米中表达的优选构建体。

[0174] 包含来自本发明多核苷酸的序列的载体将通常包含标记基因,该标记基因可在植物细胞上赋予选择性表型。通常,选择性标记基因将编码抗生素抗性,合适的基因包括编码对壮观霉素这种抗生素的抗性的基因(例如aada基因)、编码链霉素抗性的链霉素磷酸转移酶(SPT)基因、编码卡那霉素或遗传霉素抗性的新霉素磷酸转移酶(NPTII)基因、编码潮霉素抗性的潮霉素磷酸转移酶(HPT)基因、编码对起到抑制乙酰乳酸合酶(ALS)的作用的除草剂,特别是磺酰脲类除草剂的抗性的基因(例如含有导致这种抗性的突变特别是S4和/或Hra突变的乙酰乳酸合酶(ALS)基因)、编码对起到抑制谷氨酰胺合酶的作用的除草剂如草胺膦或basta的抗性的基因(例如bar基因),或本领域已知的其他这种基因。bar基因编码对除草剂basta的抗性,ALS基因编码对除草剂氯磺隆的抗性。

[0175] 可用于在高等植物中表达基因的典型载体是本领域公知的,包括源自根瘤农杆菌的肿瘤诱导(Ti)质粒的载体,如Rogers,et al.,(1987)*Meth.Enzymol.*153:253-77(Rogers等人,1987年,《酶学方法》,第153卷,第253-277页)所描述。这些载体是植物整合型载体,因为在转化时,这些载体将载体DNA的一部分整合进宿主植物的基因组中。可用于本发明的示例性的根瘤农杆菌载体是Schardl,et al.,(1987)*Gene*61:1-11(Schardl等人,1987年,《基因》,第61卷,第1-11页)和Berger,et al.,(1989)*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,86:8402-6(Berger等人,1989年,《美国国家科学院院刊》,第86卷,第8402-8406页)的质粒pKYLX6和pKYLX7。本发明中可用的另一种载体是质粒pBI101.2,其可得自加利福尼亚州帕罗奥图克隆达生物技术实验室有限公司(CLONTECH Laboratories,Inc.(Palo Alto,CA))。

#### [0176] 蛋白质在宿主细胞中的表达

[0177] 使用本发明的核酸,可以在重组工程改造的细胞如细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞、哺乳动物细胞或优选植物细胞中表达本发明的蛋白质。这类细胞在非天然条件下(例如,在数量、组成、位置和/或时间方面)产生蛋白质,因为它们已通过人为干预被遗传改变成在非天然条件下产生蛋白质。

[0178] 可以预期,本领域的技术人员知晓多种可用于表达编码本发明的蛋白质的核酸的表达体系。无意于详细描述已知用于在原核生物或真核生物中表达蛋白质的各种方法。

[0179] 简单概括而言,编码本发明蛋白质的分离核酸的表达通常可通过使例如DNA或cDNA有效连接至启动子(组成型或诱导型)、然后整合进表达载体中来实现。该载体可适合于在原核生物或真核生物中复制和整合。典型的表达载体含有可用于调控编码本发明蛋白质的DNA的表达的转录和翻译终止子、起始序列和启动子。为了获得克隆基因的高水平表达,期望构建表达载体,该表达载体在最低程度上含有用以指导转录的强启动子(如泛素启动子)、用于翻译起始的核糖体结合位点和转录/翻译终止子。组成型启动子被分类为可提供一系列组成型表达。因此,一些是弱的组成型启动子,其他是强的组成型启动子。一般来讲,所谓“弱启动子”意指驱动编码序列以低水平表达的启动子。所谓“低水平”意指处于约1/10,000个转录物至约1/100,000个转录物至约1/500,000个转录物的水平。相反,“强启动子”驱动编码序列以“高水平”或约1/10个转录物至约1/100个转录物至约1/1,000个转录物进行表达。

[0180] 技术人员将认识到,可对本发明的蛋白质进行修饰而不减低其生物活性。可进行某些修饰以有利于目标分子的克隆、表达或掺入进融合蛋白中。这种修饰是本领域技术人

员所熟知的,包括例如在氨基末端添加甲硫氨酸以提供起始位点,或在任一端设置额外的氨基酸(例如多聚His)以产生便利地定位的限制性位点或终止密码子或纯化序列。

#### [0181] 在原核生物中的表达

[0182] 原核细胞可用作表达的宿主。原核生物最通常由大肠杆菌的各种菌株代表;然而,也可使用其他微生物株。在本文中定义为包括用于转录起始的启动子(任选具有操纵子)以及核糖体结合位点序列的常用原核生物控制序列,包括诸如以下的常用启动子: $\beta$ -内酰胺酶(青霉素酶)启动子系统和乳糖(lac)启动子系统(Chang, et al., (1977) *Nature* 198:1056 (Chang等人, 1977年,《自然》,第198卷,第1056页))、色氨酸(trp)启动子系统(Goeddel, et al., (1980) *Nucleic Acids Res.* 8:4057 (Goeddel等人, 1980年,《核酸研究》,第8卷,第4057页)) and  $\lambda$ 衍生PL启动子之类的常用启动子和N-基因核糖体结合位点(Shimatake, et al., (1981) *Nature* 292:128 (Shimatake等人, 1981年,《自然》,第292卷,第128页))。在转染进大肠杆菌中的DNA载体中包含选择标记也是有用的。这种标记的例子包括规定对氨苄青霉素、四环素或氯霉素的抗性的基因。

[0183] 选择载体以使得将所关注基因引入到适当的宿主细胞中。细菌载体通常是质粒或噬菌体起源的。将适当的细菌细胞用噬菌体载体颗粒转染或用裸噬菌体载体DNA转染。如果使用质粒载体,则将细菌细胞用质粒载体DNA转染。用于表达本发明的蛋白质的表达系统可用芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)和沙门氏菌属(*Salmonella*) (Palva, et al., (1983) *Gene* 22:229-35 (Palva等人, 1983年,《基因》,第22卷,第229-235页); Mosbach, et al., (1983) *Nature* 302:543-5 (Mosbach等人, 1983年,《自然》,第302卷,第543-545页))。得自法玛西亚(Pharmacia)的pGEX-4T-1质粒载体是本发明的优选大肠杆菌表达载体。

#### [0184] 在真核生物中的表达

[0185] 多种真核表达系统如酵母、昆虫细胞系、植物和哺乳动物细胞是本领域技术人员已知的。如下面简单解释的,本发明可在这些真核系统中表达。在一些实施例中,将转化的/转染的植物细胞(如下文所论述的)用作表达系统,用于产生本发明的蛋白质。

[0186] 异源蛋白质在酵母中的合成是众所周知的。Sherman, et al., (1982) *METHODS IN YEAST GENETICS*, Cold Spring Harbor Laboratory (Sherman等人, 1982年,《酵母遗传学方法》,冷泉港实验室)是描述多种可用于在酵母中产生蛋白质的方法的广泛认可的著作。两种广泛采用的用于产生真核蛋白质的酵母是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)。用于在酵母属(*Saccharomyces*)和毕赤酵母属(*Pichia*)中表达的载体、菌株和方法是本领域已知的并可从商业供应商(例如英杰公司(Invitrogen))获得。根据需要,合适的载体通常具有表达控制序列,例如启动子(包括3-磷酸甘油酸激酶或醇氧化酶启动子)和复制起始区、终止序列等等。

[0187] 本发明的蛋白质,一旦表达,可通过裂解细胞并向溶胞产物或离心沉淀物应用标准蛋白质分离技术来从酵母分离。可通过使用蛋白质印记技术或其他标准免疫测定技术的放射免疫测定法来完成对纯化过程的监测。

[0188] 用于在昆虫细胞中表达本发明的蛋白质的适当载体通常源于SF9杆状病毒。合适的昆虫细胞系包括蚊幼虫、蚕、行军虫、蛾和果蝇(*Drosophila*)细胞系,例如Schneider细胞系(参见例如Schneider, (1987) *J. Embryol. Exp. Morphol.* 27:353-65 (Schneider, 1987年,《胚胎学和实验形态学杂志》,第27卷,第353-365页))。

[0189] 如使用酵母一样,当采用高等动物或植物宿主细胞时,通常将多腺苷酸化或转录终止子序列整合进载体中。终止子序列的例子是来自牛生长激素基因的多聚腺苷酸化序列。还可包括用于转录物的精确剪接的序列。剪接序列的例子是来自SV40的VP1内含子(Sprague, et al., (1983) *J. Virol.* 45:773-81 (Sprague等人, 1983年,《病毒学杂志》,第45卷,第773-781页))。另外,可将控制在宿主细胞中的复制的基因序列整合进载体,如牛乳头瘤病毒类型的载体中存在的那些(Saveria-Campo, “Bovine Papilloma Virus DNA a Eukaryotic Cloning Vector”(牛乳头瘤病毒DNA:一种真核克隆载体),载于DNA CLONING: A PRACTICAL APPROACH, vol. II, Glover, ed., IRL Press, Arlington, VA, pp. 213-38 (1985)(《DNA克隆:一种实用方法》,第II卷, Glover编辑, IRL出版社,弗吉尼亚州阿灵顿,第213-238页, 1985年))。

[0190] 另外,可将置于适当植物表达载体中的ARGOS基因用于转化植物细胞。然后可从植物愈伤组织分离多肽或可将转化的细胞用于再生转基因植物。可收获这种转基因植物,将适当的组织(例如,种子或叶)进行大规模蛋白质提取和纯化技术。

#### [0191] 植物转化方法

[0192] 有多种用于将外来基因引入植物中的方法是公知的并可用来将ARGOS多核苷酸插入植物宿主中,这包括生物学和物理学的植物转化方案。参见例如Miki, et al., “Procedure for Introducing Foreign DNA into Plants,” in *METHODS IN PLANT MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, Glick and Thompson, eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 67-88 (1993) (Miki等人, “外源DNA引入植物的方法”, 载于《植物分子生物学和生物技术方法》, Glick和Thompson编辑, CRC出版社, 博卡拉顿, 第67-88页, 1993年)。所选择的方法随宿主植物而变化,包括化学转染方法如磷酸钙介导的基因转移、微生物介导的基因转移如农杆菌介导的基因转移(Horsch, et al., (1985) *Science* 227:1229-31 (Horsch等人, 1985年,《科学》,第227卷,第1229-1231页))、电穿孔、显微注射和基因枪轰击。

[0193] 用于植物细胞或组织转化和植物再生的表达盒和载体以及体外培养方法是已知的并可获得。参见例如Gruber, et al., “Vectors for Plant Transformation,” in *METHODS IN PLANT MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, supra, pp. 89-119 (Gruber等人, “植物转化的载体”, 载于《植物分子生物学和生物技术方法》, 同上, 第89-119页)。

[0194] 可通过一种或多种通常用于直接递送进细胞的技术将分离的多核苷酸或多肽引入植物中。取决于要进行基因修饰的生物体、细胞、植物或植物细胞的类型(即单子叶植物或双子叶植物),这种方案可不同。转化植物细胞的合适方法包括显微注射(Crossway, et al., (1986) *Biotechniques* 4:320-334 (Crossway等人, 1986年,《生物技术》,第4卷,第320-334页)和美国专利No. 6,300,543)、电穿孔(Riggs, et al., (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5602-5606 (Riggs等人, 1986年,《美国国家科学院院刊》,第83卷,第5602-5606页));直接基因转移(Paszkowski, et al., (1984) *EMBO J.* 3:2717-2722 (Paszkowski等人, 1984年,《欧洲分子生物学组织杂志》,第3卷,第2717-2722页))以及弹道粒子加速(参见例如美国专利No. 4,945,050; W01991/10725和McCabe, et al., (1988) *Biotechnology* 6:923-926 (McCabe等人, 1988年,《生物技术》,第6卷,第923-926页))。还可参见Tomes, et al., *Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells Via Microprojectile*

Bombardment, pp.197-213 in *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Fundamental Methods* eds. G. Gamborg and P. Phillips, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1995 (Tomes 等人, “通过微粒轰击直接将DNA转移到完整植物细胞中”, 第197-213页, 载于《植物细胞、组织和器官培养: 基本方法》, Gamborg和Phillips编辑, 施普林格出版社柏林海德堡纽约, 1995年); 美国专利No. 5, 736, 369 (分生组织); Weissinger, et al., (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22: 421-477 (Weissinger 等人, 1988年, 《遗传学年鉴》, 第22卷, 第421-477页); Sanford, et al., (1987) *Particulate Science and Technology* 5: 27-37 (Sanford 等人, 1987年, 《粒子科学与技术》, 第5卷, 第27-37页) (洋葱); Christou, et al., (1988) *Plant Physiol.* 87: 671-674 (Christou 等人, 1988年, 《植物生理学》, 第87卷, 第671-674页) (大豆); Datta, et al., (1990) *Biotechnology* 8: 736-740 (Datta 等人, 1990年, 《生物技术》, 第8卷, 第736-740页) (水稻); Klein, et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4305-4309 (Klein 等人, 1988年, 《美国国家科学院院刊》, 第85卷, 第4305-4309页) (玉米); Klein, et al., (1988) *Biotechnology* 6: 559-563 (Klein 等人, 1988年, 《生物技术》, 第6卷, 第559-563页) (玉米); W01991/10725 (玉米); Klein, et al., (1988) *Plant Physiol.* 91: 440-444 (Klein 等人, 1988年, 《植物生理学》, 第91卷, 第440-444页) (玉米); Fromm, et al., (1990) *Biotechnology* 8: 833-839 (Fromm 等人, 1990年, 《生物技术》, 第8卷, 第833-839页) 和 Gordon-Kamm, et al., (1990) *Plant Cell* 2: 603-618 (Gordon-Kamm 等人, 1990年, 《植物细胞》, 第2卷, 第603-618页) (玉米); Hooydaas-Van Slogteren and Hooykaas, (1984) *Nature (London)* 311: 763-764 (Hooydaas-Van Slogteren和Hooykaas, 1984年, 《自然》(伦敦), 第311卷, 第763-764页); Bytebier, et al., (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5345-5349 (Bytebier 等人, 1987年, 《美国国家科学院院刊》, 第84卷, 第5345-5349页) (百合科); De Wet, et al., (1985) In *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. Chapman, et al., pp. 197-209; Longman, NY (De Wet 等人, 1985年, 载于《胚珠组织的实验操作》, Chapman 等人编辑, 第197-209页, 朗文公司, 纽约) (花粉); Kaeppler, et al., (1990) *Plant Cell Reports* 9: 415-418 (Kaeppler 等人, 1990年, 《植物细胞报道》, 第9卷, 第415-418页); 和 Kaeppler, et al., (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84: 560-566 (Kaeppler 等人, 1992年, 《理论和应用遗传学》, 第84卷, 第560-566页) (触须介导的转化); 美国专利No. 5, 693, 512 (超声处理); D'Halluin, et al., (1992) *Plant Cell* 4: 1495-1505 (D'Halluin 等人, 1992年, 《植物细胞》, 第4卷, 第1495-1505页) (电穿孔); Li, et al., (1993) *Plant Cell Reports* 12: 250-255 (Li 等人, 1993年, 《植物细胞报道》, 第12卷, 第250-255页) 以及 Christou and Ford, (1995) *Annals of Botany* 75: 407-413 (Christou和Ford, 1995年, 《植物学年鉴》, 第75卷, 第407-413页) (水稻); Osjoda, et al., (1996) *Nature Biotech.* 14: 745-750 (Osjoda 等人, 1996年, 《自然生物技术》, 第14卷, 第745-750页); 农杆菌介导的玉米转化 (美国专利No. 5, 981, 840); 碳化硅晶须方法 (Frame, et al., (1994) *Plant J.* 6: 941-948 (Frame 等人, 1994年, 《植物杂志》, 第6卷, 第941-948页)); 激光方法 (Guo, et al., (1995) *Physiologia Plantarum* 93: 19-24 (Guo 等人, 1995年, 《植物生理学》, 第93卷, 第19-24页)); 超声处理方法 (Bao, et al., (1997) *Ultrasound in Medicine & Biology* 23: 953-959 (Bao 等人, 1997年, 《医学与生物学超声》, 第23卷, 第953-959页); Fiher and Fiher, (2000) *Lett Appl Microbiol.* 30: 406-10 (Fiher和Fiher, 2000年, 《应用微生物学通讯》, 第30卷,

第406-410页);Amoah,et al.,(2001)*J Exp Bot*52:1135-42(AMOAH等人,2001年,《实验植物学杂志》,第52卷,第1135-1142页));聚乙二醇方法(Krens,et al.,(1982)*Nature*296:72-77(Krens等人,1982年,《自然》,第296卷,第72-77页));单子叶和双子叶植物细胞的原生质可以用电穿孔(Fromm,et al.,(1985)*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*82:5824-5828(Fromm等人,1985年,《美国国家科学院院刊》,第82卷,第5824-5828页))和显微注射(Crossway,et al.,(1986)*Mol.Gen.Genet.*202:179-185(Crossway等人,1986年,《分子遗传学和基因组学》,第202卷,第179-185页)进行转化;将这些文献全部以引用的方式并入本文。

#### [0195] 农杆菌介导的转化

[0196] 将表达载体引入植物中的最广泛使用的方法是基于农杆菌的天然转化系统。根瘤农杆菌和毛根农杆菌是植物病原性土壤细菌,其能遗传转化植物细胞。根瘤农杆菌和毛根农杆菌各自的Ti和Ri质粒携带负责植物的遗传转化的基因。参见例如Kado,(1991)*Crit.Rev.Plant Sci.*10:1(Kado,1991年,《植物科学评论》,第10卷,第1页)。

[0197] 相似地,可将基因插入源于根瘤农杆菌或毛根农杆菌各自的Ti或Ri质粒的T-DNA区。因而,可使用这些质粒,如上构建表达盒。已知有许多控制序列,其在偶联至异源编码序列并转化进宿主生物体中时,在初始编码序列的组织/器官特异性方面显示出基因表达的保真性。参见例如Benfeyand Chua,(1989)*Science*244:174-81(Benfey和Chua,1984年,《科学》,第244卷,第174-181页)。用于这些质粒中的特别合适的控制序列是用于基因在各种靶植物中的组成型叶特异性表达的启动子。其他可用的控制序列包括来自胭脂氨酸合酶基因(NOS)的启动子和终止子。NOS启动子和终止子存在于质粒pARC2中,该质粒可得自美国典型培养物保藏中心,指定的ATCC存放号为67238。如果使用这种系统,则来自Ti或Ri质粒的毒力(vir)基因必须也存在,要么与T-DNA部分一起存在,要么通过双元系统存在,在该系统中该vir基因存在于一另外的载体上。这类系统、其中所用的载体、以及转化植物细胞的方法描述在美国专利No.4,658,082;1986年10月1日提交的第913,914号美国专利申请,其公布于1993年11月16日的美国专利No.5,262,306中引用,和Simpson,et al.,(1986)*Plant Mol.Biol.*6:403-15(Simpson等人,1986年,《植物分子生物学》,第6卷,第403-415页)(也在‘306专利中引用),所有文献均全文以引用方式并入。

[0198] 一旦构建,可将这些质粒置于毛根农杆菌或根瘤农杆菌中并将这些载体用于转化植物物种的细胞,所述植物物种的细胞通常对镰孢属(*Fusarium*)或链格孢属(*Alternaria*)感染而言是易感的。本发明还可以想到若干其他转基因植物,包括但不限于大豆、玉米、高粱、苜蓿、水稻、三叶草、卷心菜、香蕉、咖啡、芹菜、烟草、豇豆、棉花、甜瓜和胡椒。根瘤农杆菌或者毛根农杆菌的选择将取决于用其转化的植物。通常,根瘤农杆菌是用于转化的优选生物体。大多数双子叶植物、一些裸子植物和少数单子叶植物(例如百合目(Liliales)和天南星目(Arales)的某些成员)对根瘤农杆菌感染是易感的。毛根农杆菌也具有广泛的宿主,包括大多数双子叶植物和一些裸子植物,其包括豆科(Legummosae)、菊科(Compositae)和藜科(Chenopodiaceae)的成员在内。单子叶植物现在可以一定的成功率进行转化。欧洲专利申请No.604662A1公开了用农杆菌转化单子叶植物的方法。欧洲专利申请No.672752A1公开了使用未成熟胚的盾片用农杆菌转化单子叶植物的方法。Ishida等人论述了通过使未成熟胚暴露于根瘤农杆菌来转化玉米的方法(*Nature Biotechnology*14:745-50(1996))(《自然生物技术》,第14卷,第745-750页,1996年)。

[0199] 一旦转化,可将这些细胞用于再生转基因植物。例如,整个植物可通过使该植物产生伤口,然后将载体引入该伤口位点来用这些载体进行感染。可使植物的任何部分产生伤口,包括叶、茎和根。或者,可将外植体形式的植物组织如子叶组织或叶圆片用这些载体接种,并在可促进植物再生的条件下培养。可通过用毛根农杆菌或根瘤农杆菌(含有编码伏马毒素降解酶的基因)接种植物组织而转化的根或苗用作植物来源,以通过体细胞胚胎发生或器官发生来再生伏马毒素抗性转基因植物。再生植物组织的此类方法的例子公开于Shahin,(1985)*Theor. Appl. Genet.* 69:235-40(Shahin,1985年,《理论和应用遗传学》,第69卷,第235-240页);美国专利No.4,658,082;Simpson,et al.,supra(Simpson等人,同上);和均于1986年10月1日提交的美国专利申请No.913,913和913,914,如公布于1993年11月16日的美国专利No.5,262,306引用,将上述文献的全部公开内容以引用的方式并入本文。

#### [0200] 直接基因转移

[0201] 尽管农杆菌介导的转化的宿主范围广泛,但一些主要的谷类作物物种和裸子植物总体上对该基因转移模式而言是顽拗的,尽管最近已在稻中获得了一定的成功(Hiei,et al.,(1994)*The Plant Journal*6:271-82(Hiei等人,1994年,《植物杂志》,第6卷,第271-282页))。已开发了几种植物转化的方法(统称为直接基因转移)作为对农杆菌介导的转化的替代方案。

[0202] 一般适用的植物转化方法是微抛射体(microprojectile)介导的转化,其中DNA携带在约1至4 $\mu$ m的微抛射体的表面上。用基因枪装置(biolistic device)将表达载体引入植物组织中,该基因枪装置将微抛射体加速至300-600m/s的速度,该速度足以穿透植物细胞壁和膜(Sanford,et al.,(1987)*Part Sci. Technol.* 5:27(Sanford等人,1987年,《粒子科学与技术》,第5卷,第27页));Sanford,(1988)*Trends Biotech*6:299(Sanford,1988年,《生物技术趋势》,第6卷,第299页));Sanford,(1990)*Physiol. Plant*79:206(Sanford,1990年,《植物生理学》,第79卷,第206页)和Klein,et al.,(1992)*Biotechnology*10:268(Klein等人,1992年,《生物技术》,第10卷,第268页))。

[0203] 物理递送DNA至植物的另一种方法是如Zang,et al.,(1991)*BioTechnology*9:996(Zang等人,1991年,《生物技术》,第9卷,第996页)中所述的对靶细胞的超声处理。或者,脂质体或原生质球融合已用于将表达载体引入植物中。参见例如Deshayes,et al.,(1985)*EMBO J.*4:2731(Deshayes等人,1985年,《欧洲分子生物学组织杂志》,第4卷,第2731页)和Christou,et al.,(1987)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*84:3962(Christou等人,1987年,《美国国家科学院院刊》,第84卷,第3962页)。利用CaCl<sub>2</sub>沉淀、聚乙烯醇或聚-L-鸟氨酸直接将DNA摄入原生质体中已有报道。参见例如Hain,et al.,(1985)*Mol. Gen. Genet.* 199:161(Hain等人,1985年,《分子遗传学和基因组学》,第199卷,第161页)和Draper,et al.,(1982)*Plant Cell Physiol.* 23:451(Draper等人,1982年,《植物细胞生理学》,第23卷,第451页)。

[0204] 原生质体和完整细胞和组织的电穿孔也已有描述。参见例如Donn,et al.,(1990) in *Abstracts of the VIIth Int'l. Congress on Plant Cell and Tissue Culture IAPTC*,A2-38,p.53(Donn等人,1990年,载于《第VII届植物细胞与组织培养IAPTC会议摘要》,A2-38,第53页);D'Halluin,et al.,(1992)*Plant Cell*4:1495-505(D'Halluin等人,1992年,《植物细胞》,第4卷,第1495-1505页)和Spencer,et al.,(1994)*Plant Mol. Biol.* 24:51-61(Spencer等人,1994年,《植物分子生物学》,第24卷,第51-61页)。

[0205] 增加ARGOS多肽的活性和/或水平

[0206] 提供了用于增加本发明的ARGOS多肽的活性和/或水平的方法。可通过将ARGOS多肽提供给植物,来实现本发明的ARGOS多肽的水平和/或活性的增加。该ARGOS多肽可通过如下方式来提供:将编码该ARGOS多肽的氨基酸序列引入该植物中,将编码ARGOS多肽的核苷酸序列引入该植物中,或者修饰编码本发明的ARGOS多肽的基因组座位。

[0207] 如本文别处所论述过的,本领域已知有多种方法用于将多肽提供给植物,包括但不限于将多肽直接引入植物中,将编码具有细胞数目调控活性的多肽的多核苷酸构建体引入植物中(短暂引入或稳定引入)。还认识到,本发明的方法可采用不能够在转化的植物中引导蛋白质或RNA的表达的多核苷酸。因此,可通过变更编码ARGOS多肽的基因或其启动子来提高ARGOS多肽的水平或活性。参见例如:Kmiec,美国专利No.5,565,350;Zarling等人,PCT/US9303868。因此,提供了携带ARGOS基因中的突变的诱变的植物,其中所述突变增加ARGOS基因的表达或增加编码的ARGOS多肽的植物生长和/或器官发育活性。

[0208] 拥挤耐受性

[0209] 作物植物的农学性能通常随其耐受种植密度的程度而变化。植物过度拥挤会导致生长不良,因此古老的做法是稀释和控制种植密度。过度拥挤胁迫可能是由于简单地限制营养物、水和阳光。拥挤胁迫也可能是由于增加植物之间的接触。植物通常通过减缓生长以及增厚其组织而对物理接触作出反应。

[0210] 乙烯与植物拥挤耐受性有关联。例如,乙烯不敏感性烟草属植物在接触相邻植物时不减慢生长(Knoester, et al., (1998) PNAS USA 95:1933-1937 (Knoester等人, 1998年,《美国国家科学院院刊》,第95卷,第1933-1937页))。还有证据显示,乙烯以及植物对其的反应涉及缺水胁迫,并且乙烯可导致限制其生长以及加剧超过缺水本身的干旱胁迫症状的植物中的变化。

[0211] 本发明通过提供和/或调节一个或多个ARGOS多核苷酸或其蛋白产物的表达/活性来提供植物尤其是谷类如玉米中的乙烯敏感性减少,从而促进胁迫减少和产量损失的密植耐受性。本文公开的表达Argos的植物可以高种植密度在田间种植。

[0212] 玉米中的结实和发育

[0213] 乙烯在种子发育中具有多个作用。例如,在玉米中,乙烯与发育的胚乳细胞的程序性细胞死亡相关(Young, et al., (1997) Plant Physiol 115:737-751 (Young等人, 1997年,《植物生理学》,第115卷,第737-751页))。此外,乙烯与籽粒败育有关,例如出现在穗尖,尤其是在胁迫条件下生长的植物中(Cheng and Lur, (1997) Physiol. Plant 98:245-252 (Cheng和Lur, 1997年,《植物生理学》,第98卷,第245-252页))。籽粒结实减少无疑是产量减少的影响因素。因此,本发明提供植物,尤其是通过在转基因植物中提供本发明多核苷酸的过表达而降低乙烯敏感性的玉米植物。

[0214] 在紧实土壤中的生长

[0215] 植物生长受到土壤密度和紧实度的影响。更密集、更紧实的土壤通常导致植物生长不良。在种植和栽培实施之前,农业趋向于更微型的趋势,出于节约土壤和能源的目的,对于这些条件下表现良好的作物的需要逐渐增加。

[0216] 乙烯可影响植物生长和发育是熟知的,并且乙烯的一个作用是在遇到机械胁迫例如紧实土壤时促进组织增厚和生长延缓。这可同时影响根和苗。推测该影响适于一些环境,



因为其产生更强、更紧实的组织,可强行通过或围绕障碍物例如紧实土壤。然而,在此类条件下,乙烯的产生和乙烯通路的活化可超越紧实土壤的机械胁迫的适应调节需要。当然,所产生的任何不必要生长抑制均是不期望的农学结果。

[0217] 本发明通过提供和/或调节一个或多个多核苷酸或其蛋白产物的表达/活性来提供植物尤其是谷类如玉米中的乙烯敏感性减少。此类调节植物在紧实土壤中更好地生长和发芽,得到更高的直立计数,预示着更高的产量。

#### [0218] 淹水耐受性

[0219] 淹水和积水土壤每年在世界范围内导致作物产量的大量损失。淹水可以是广泛的或局部的、短暂的或长期的。乙烯与淹水导致的损坏有关联。实际上,在淹水条件下乙烯产量可增加。该增加有两个主要原因:1)在此类淹水条件下,造成缺氧,植物产生更多的乙烯,以及2)在淹水条件下,乙烯离开植物的扩散减缓,因为乙烯微溶于水,使植物间乙烯水平升高。

[0220] 淹水玉米根中的乙烯也可抑制向重性,其通常适于发芽期间,因为它使根向下、苗向上。向重性是确定根构型的因素,继而在土壤资源获取中具有重要作用。乙烯水平的操纵可用于影响耐旱性、淹水耐受性、提高抗倒伏性和/或改善营养物摄入的根角度。例如,根以更直的角度(更陡)生长可能在土壤中长得更深,从而获得更大深度处的水分,改善耐旱性。在不存在干旱胁迫的情况下,可作出更平行于土壤表面的根在土壤剖面上层中更有效地摄入营养物和水的相反论点。一般来讲,几乎竖直(陡峭)角度的根比根倒伏耐受性更强的浅角(平行于表面)根对根倒伏更敏感。

[0221] 除抑制向重性之外,可能淹水条件下的乙烯释放还抑制生长,尤其是根的生长。此类抑制可能导致植物总体生长不良,因此是不利的农学性状。

[0222] 本发明通过提供和/或调节一个或多个多核苷酸或其蛋白产物的表达/活性来提供植物尤其是谷类如玉米中的乙烯敏感性减少。此类植物在淹水条件下或积水土壤中更好地生长和发芽,得到更高的直立计数。

#### [0223] 植物成熟和衰老

[0224] 已知乙烯涉及衰老控制、果实成熟和脱落。乙烯在果实成熟中的作用是非常确定的并且在行业中有所应用。基于先例的预测将是乙烯产量不足/不敏感性导致种子成熟减缓,相反可导致种子更迅速成熟。脱落主要针对双子叶植物进行研究,明显很少应用于单子叶植物例如谷类。乙烯介导的衰老大多数也在双子叶植物中研究,但衰老的控制对于双子叶植物和单子叶植物作物物种二者也具有农学重要性。乙烯不敏感性可使衰老延缓,但不阻止衰老。乙烯介导的衰老过程与疾病症状和脱落区的细胞死亡过程具有一些相似性。

[0225] 通过控制本发明的一个或多个多核苷酸来控制乙烯敏感性可调节作物植物例如玉米的成熟速率。

[0226] 本发明通过提供和/或调节有助于推迟植物成熟的一个或多个多核苷酸或其蛋白质产物的表达/活性来提供植物、尤其是谷类如玉米中的乙烯敏感性的减少,其对于将作物品种置于不同成熟区是所期望的。

#### [0227] 其他非生物胁迫的耐受性

[0228] 植物的多个胁迫导致诱导乙烯生成(参见Morgan and Drew,(1997) *Physiol.Plant*100:620-630(Morgan和Drew,1997年,《植物生理学》,第100卷,第620-630

页))。这些胁迫可以是冷、热、创伤、污染、干旱和高矿化度。机械阻抗(土壤压实)和淹水胁迫如上所述。似乎多个这些胁迫通过共同机制例如缺水发挥作用。明显干旱导致缺水,拥挤胁迫也可导致缺水。另外,在玉米中,冷冻可导致乙烯产量和活性升高,并且该诱导明显是由于冷却引起的细胞中缺水(Janowaik and Dorffling,(1995)J.Plant Physiol.147:257-262(Janowaik和Dorffling,1995年,《植物生理学杂志》,第147卷,第257-262页))。

[0229] 胁迫后的一些乙烯生成可通过调节植物中的乙烯介导的过程服务于适应性目的,该过程使得以此类方式重组的植物更好地适应所遇到的胁迫。然而,有证据表明,胁迫期间的乙烯生成可导致胁迫例如黄化、组织死亡和衰老产生的阴性症状恶化。

[0230] 在某种程度上,胁迫期间的乙烯生成导致或增强阴性胁迫相关症状,其对于产生对乙烯敏感性低的作物是所期望的。为实现该目标,本发明通过提供和/或调节一个或多个多核苷酸或其蛋白质产物的表达/活性来提供植物中尤其是谷类如玉米中的乙烯敏感性减少,以生成对乙烯介导效应的敏感性较小的植物。

#### [0231] 调节植物胁迫反应的试剂盒

[0232] 本发明的某些实施例可任选作为试剂盒提供给使用者。例如,本发明的试剂盒可含有本文所述的一个或多个核酸、多肽、抗体、诊断用核酸或多肽例如抗体、探针组例如cDNA微阵列、一个或多个载体和/或细胞系。试剂盒常常包装在合适的容器中。试剂盒通常还包含一种或多种另外的试剂,例如底物、用于标记表达产物的标记物、引物等,管子和/或其他附件、用于收集样品的试剂、缓冲液、杂交室、盖玻片等。试剂盒任选还包括说明书或用户手册,详细说明使用试剂盒组件来发现或应用基因集(gene set)的优选方法。当按照说明书使用时,试剂盒可例如用于评估植物样品中的表达或多态性,例如评估乙烯敏感性、胁迫反应潜力、拥挤抗性潜力、不育性等。或者,可按照说明书使用试剂盒以使用至少一条多核苷酸序列控制植物的乙烯敏感性。

#### [0233] 减少ARGOS多肽的活性和/或水平

[0234] 提供了方法来通过用表达可抑制ARGOS多肽的表达的多核苷酸的表达盒转化植物细胞,降低或消除本发明的ARGOS多肽的活性。该多核苷酸可通过防止ARGOS信使RNA的翻译来直接抑制ARGOS多肽的表达,或者通过编码能抑制编码ARGOS多肽的ARGOS基因的转录或翻译的多肽来间接抑制ARGOS多肽的表达。用于抑制或消除基因在植物中的表达的方法是本领域所熟知的,任何这种方法可用于本发明中来抑制ARGOS多肽的表达。

[0235] 根据本发明,如果ARGOS多肽的蛋白质水平为该同一ARGOS多肽在未经过遗传修饰或诱变以抑制该ARGOS多肽的表达的植物中的蛋白质水平的不到70%,则ARGOS多肽的表达被抑制。在本发明的具体实施例中,该ARGOS多肽在根据发明的经修饰的植物中的蛋白质水平,为该同一ARGOS多肽在不属于突变体的植物或者未经过遗传修饰以抑制该ARGOS多肽的表达的植物中的蛋白质水平的不到60%、不到50%、不到40%、不到30%、不到20%、不到10%、不到5%或不到2%。ARGOS多肽的表达水平可例如通过检测植物细胞或植物中表达的ARGOS多肽的水平来直接测量,或者例如通过测量植物细胞或植物中的ARGOS多肽的植物生长和/或器官发育活性,或通过测量植物中的生物量来间接测量。进行这种测定的方法在本文的其他地方进行了描述。

[0236] 在本发明的其他实施例中,通过用表达盒转化植物细胞来降低或消除ARGOS多肽的活性,所述表达盒包含编码可抑制ARGOS多肽活性的多肽的多核苷酸。根据本发明,如果

ARGOS多肽的植物生长和/或器官发育活性为该同一ARGOS多肽在未经过修饰以抑制该ARGOS多肽的植物生长和/或器官发育活性的植物中的植物生长和/或器官发育活性的不到70%，则ARGOS多肽的植物生长和/或器官发育活性被抑制。在本发明的具体实施例中，该ARGOS多肽在根据本发明的经修饰的植物中的植物生长和/或器官发育活性，为该同一ARGOS多肽在未经过修饰以抑制该ARGOS多肽的表达的植物中的植物生长和/或器官发育活性的不到60%、不到50%、不到40%、不到30%、不到20%、不到10%或不到5%。当ARGOS多肽的植物生长和/或器官发育活性不能通过本文其他地方所描述的检测法测定时，则根据本发明该活性被“消除”了。确定ARGOS多肽的植物生长和/或器官发育活性的方法在本文其他地方进行了描述。

[0237] 在其他实施例中，可通过破坏编码ARGOS多肽的基因来降低或消除ARGOS多肽的活性。本发明涵盖携带ARGOS基因中的突变的诱变的植物，其中所述突变减少ARGOS基因的表达或抑制编码的ARGOS多肽的植物生长和/或器官发育活性。

[0238] 因而，有许多方法可用于降低或消除ARGOS多肽的活性。此外，有不只一种方法可用于减少单种ARGOS多肽的活性。降低或消除ARGOS多肽的表达的方法的非限制性例子在下面给出。

[0239] 1. 基于多核苷酸的方法：

[0240] 在本发明的一些实施例中，用表达盒转化植物，该表达盒能够表达可抑制本发明的ARGOS多肽的表达的多核苷酸。本文所用的术语“表达”指基因产物的生物合成，包括所述基因产物的转录和/或翻译。例如，出于本发明的目的，能够表达可抑制至少一种ARGOS多肽的表达的多核苷酸的表达盒，是能够产生可抑制本发明的至少一种ARGOS多肽的转录和/或翻译的RNA分子的表达盒。蛋白质或多肽从DNA分子的“表达”或“产生”指该编码序列转录和翻译而产生该蛋白质或多肽，而蛋白质或多肽从RNA分子“表达”或“产生”指该RNA编码序列翻译而产生蛋白质或多肽。

[0241] 可抑制ARGOS多肽的表达的多核苷酸的例子在下面给出。

[0242] i. 有义抑制/共抑制

[0243] 在本发明的一些实施例中，ARGOS多肽表达的抑制可通过有义抑制或共抑制获得。对于共抑制，将表达盒设计为表达这样的RNA分子，该RNA分子以“有义”取向对应于编码ARGOS多肽的信使RNA的全部或部分。该RNA分子的过表达可导致天然基因的表达减少。因此，对用该共抑制表达盒转化的多个植株进行筛选以鉴别那些显示出对ARGOS多肽表达的最大抑制的植株。

[0244] 用于共抑制的多核苷酸可对应于编码ARGOS多肽的序列的全部或部分、ARGOS多肽转录物的5'和/或3'非翻译区的全部或部分、或者编码ARGOS多肽的转录物的编码序列和非翻译区二者的全部或部分。在其中该多核苷酸包含ARGOS多肽的编码区的全部或部分的一些实施例中，将表达盒设计为消除该多核苷酸的起始密码子，使得不会翻译出蛋白质产物。

[0245] 共抑制可用来抑制植物基因的表达以产生对于由这些基因编码的蛋白质而言具有不可检测的蛋白质水平的植物。参见例如Broin, et al., (2002) Plant Cell 14:1417-1432 (Broin等人, 2002年, 《植物细胞》, 第14卷, 第1417-1432页)。共抑制还可用来抑制同一植物中的多种蛋白质的表达。参见(例如)美国专利No. 5,942,657。使用共抑制来抑制植物中的内源基因的表达的方法在以下文献和专利中有描述: Flavell, et al., (1994)

Proc.Natl.Acad.Sci.USA91:3490-3496(Flavell等人,1994年,《美国国家科学院院刊》,第91卷,第3490-3496页);Jorgensen,et al.,(1996)Plant Mol.Biol.31:957-973(Jorgensen等人,1996年,《植物分子生物学》,第31卷,第957-973页);Johansen and Carrington,(2001)Plant Physiol.126:930-938(Johansen和Carrington,2001年,《植物生理学》,第126卷,第930-938页);Broin,et al.,(2002)Plant Cell14:1417-1432(Broin等人,2002年,《植物细胞》,第14卷,第1417-1432页);Stoutjesdijk,et al.,(2002)Plant Physiol.129:1723-1731(Stoutjesdijk等人,2002年,《植物生理学》,第129卷,第1723-1731页);Yu,et al.,(2003)Phytochemistry63:753-763(Yu等人,2003年,《植物化学》,第63卷,第753-763页)和美国专利No.5,034,323,5,283,184和5,942,657,将这些文献和专利以引用方式并入本文。共抑制的效率可通过在表达盒中在有义序列的3'和聚腺苷酸化信号的5'位置包括poly-dT区来提高。参见美国专利申请公开No.2002/0048814,将其以引用的方式并入本文。通常,这种核苷酸序列与内源基因的转录物的序列具有相当大的序列同一性,优选的是高于约65%的序列同一性,更优选的是高于约85%的序列同一性,最优选的是高于约95%的序列同一性。参见美国专利No.5,283,184和5,034,323,将它们以引用的方式并入本文。

#### [0246] ii.反义抑制

[0247] 在本发明的一些实施例中,对ARGOS多肽表达的抑制可通过反义抑制获得。对于反义抑制,将表达盒设计为表达与编码该ARGOS多肽的信使RNA的全部或部分互补的RNA分子。该反义RNA分子的过表达可导致天然基因的表达减少。因此,对用反义抑制表达盒转化的多个植株进行筛选以鉴别那些显示出对ARGOS多肽表达的最大抑制的植株。

[0248] 用于反义抑制的多核苷酸可对应于编码ARGOS多肽的序列的互补序列的全部或部分、ARGOS转录物的5'和/或3'非翻译区的互补序列的全部或部分、或者编码ARGOS多肽的转录物的编码序列和非翻译区二者的互补序列的全部或部分。此外,反义多核苷酸可与目标序列完全互补(即与目标序列的互补序列100%相同)或部分互补(即与目标序列的互补序列的同一性低于100%)。反义抑制还可用来抑制同一植物中的多种蛋白质的表达。参见(例如)美国专利No.5,942,657。此外,反义核苷酸的部分可用来破坏靶基因的表达。一般来讲,可使用至少50个核苷酸、100个核苷酸、200个核苷酸、300、400、450、500、550或更多个核苷酸的序列。使用反义抑制来抑制植物中的内源基因的表达的方法在例如如下文献和专利中有描述:Liu,et al.,(2002)Plant Physiol.129:1732-1743(Liu等人,2002年,《植物生理学》,第129卷,第1732-1743页),以及美国专利No.5,759,829和5,942,657,将这些参考文献和专利的每一个以引用的方式并入本文。反义抑制的效率可通过在表达盒中在反义序列的3'和聚腺苷酸化信号的5'位置处包括poly-dT区来提高。参见美国专利申请公开No.2002/0048814,将其以引用的方式并入本文。

#### [0249] iii.双链RNA干扰

[0250] 在本发明的一些实施例中,对ARGOS多肽表达的抑制可通过双链RNA(dsRNA)干扰来获得。对于dsRNA干扰,有义RNA分子(如上文针对共抑制所描述)和与该有义RNA分子完全或部分互补的反义RNA分子在同一细胞中表达,从而导致对应的内源信使RNA的表达的抑制。

[0251] 有义和反义分子的表达可通过将表达盒设计为同时包含有义序列和反义序列来

实现。或者,可将单独的表达盒分别用于有义序列和反义序列。然后对用dsRNA干扰表达盒转化的多个植株进行筛选以鉴别显示出对ARGOS多肽表达的最大抑制的植株。使用dsRNA干扰来抑制内源植物基因的表达的方法在以下文献和专利中有描述:Waterhouse, et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13959-13964 (Waterhouse等人, 1998年,《美国国家科学院院刊》,第95卷,第13959-13964页), Liu, et al., (2002) Plant Physiol. 129:1732-1743 (Liu等人, 2002年,《植物生理学》,第129卷,第1732-1743页)以及W01999/49029、W01999/53050、W01999/61631和W02000/49035,将每个文献和专利以引用方式并入本文。

[0252] iv. 发夹RNA干扰和含内含子的发夹RNA干扰

[0253] 在本发明的一些实施例中,对ARGOS多肽表达的抑制可通过发夹RNA(hpRNA)干扰或含内含子的发夹RNA(ihpRNA)干扰来获得。这些方法在抑制内源基因表达方面是高度有效的。参见Waterhouse and Helliwell, (2003) Nat. Rev. Genet. 4:29-38 (Waterhouse和Helliwell, 2003年,《自然综述遗传学》,第4卷,第29-38页)及其中引用的参考文献中有描述。

[0254] 对于hpRNA干扰,将表达盒设计为表达这样的RNA分子,该RNA分子自身杂交而形成包括单链环区和碱基配对茎的发夹结构。该碱基配对茎区包含对应于编码要对其表达进行抑制的基因的内源信使RNA的全部或部分的有义序列和与该有义序列完全或部分互补的反义序列。因此,该分子的碱基配对茎区通常确定了RNA干扰的特异性。hpRNA在抑制内源基因表达中很高效,它们诱导的RNA干扰被植物后代继承。参见例如Chuang and Meyerowitz, (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:4985-4990 (Chuang和Meyerowitz, 2000年,《美国国家科学院院刊》,第97卷,第4985-4990页); Stoutjesdijk, et al., (2002) Plant Physiol. 129:1723-1731 (Stoutjesdijk等人, 2002年,《植物生理学》,第129卷,第1723-1731页)以及Waterhouse and Helliwell, (2003) Nat. Rev. Genet. 4:29-38 (Waterhouse和Helliwell, 2003年,《自然综述遗传学》,第4卷,第29-38页)。使用hpRNA干扰来抑制或消除基因表达的方法在例如以下文献和专利中有描述:Chuang and Meyerowitz, (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:4985-4990 (Chuang和Meyerowitz, 2000年,《美国国家科学院院刊》,第97卷,第4985-4990页); Stoutjesdijk, et al., (2002) Plant Physiol. 129:1723-1731 (Stoutjesdijk等人, 2002年,《植物生理学》,第129卷,第1723-1731页); Waterhouse and Helliwell, (2003) Nat. Rev. Genet. 4:29-38 (Waterhouse和Helliwell, 2003年,《自然综述遗传学》,第4卷,第29-38页); Pandolfini, et al., BMC Biotechnology 3:7 (Pandolfini等人,《BMC生物技术》,第3卷,第7页)以及美国专利申请公布No. 2003/0175965,以上每个文献和专利以引用方式并入本文。hpRNA构建体沉默体内基因表达的效率的瞬时测定法已在以下文献中描述:Panstruga, et al., (2003) Mol. Biol. Rep. 30:135-140 (Panstruga等人, 2003年,《分子生物学报道》,第30卷,第135-140页),该文献以引用方式并入本文。

[0255] 对于ihpRNA,干扰分子具有与hpRNA相同的总体结构,但该RNA分子另外包含内含子,该内含子能够在表达该ihpRNA的细胞中被剪接。内含子的使用使得发夹RNA分子中的环的大小在剪接后最小化,这可提高干扰的效率。参见,例如,Smith, et al., (2000) Nature 407:319-320 (Smith等人, 2000年,《自然》,第407卷,第319-320页)。事实上,Smith等人证实使用ihpRNA介导的干扰,内源基因表达受到100%抑制。使用ihpRNA干扰来抑制内源

植物基因的表达的方法例如在Smith, et al., (2000) Nature 407: 319-320 (Smith等人, 2000年, 《自然》, 第407卷, 第319-320页); Wesley, et al., (2001) Plant J. 27: 581-590 (Wesley等人, 2001年, 《植物杂志》, 第27卷, 第581-590页); Wang and Waterhouse, (2001) Curr. Opin. Plant Biol. 5: 146-150 (Wang和Waterhouse, 2001年, 《当代植物生物学观点》, 第5卷, 第146-150页); Waterhouse and Helliwell, (2003) Nat. Rev. Genet. 4: 29-38 (Waterhouse和Helliwell, 2003年, 《自然综述遗传学》, 第4卷, 第29-38页); Helliwell and Waterhouse, (2003) Methods 30: 289-295 (Helliwell和Waterhouse, 2003年, 《方法》, 第30卷, 第289-295页)和美国专利申请公布No. 2003/0180945中有所描述, 以上每个文献和专利以引用方式并入本文。

[0256] 还可对用于hpRNA干扰的表达盒进行设计, 使得有义序列和反义序列不对应于内源RNA。在这个实施例中, 该反义和有义序列在这样的环序列的旁侧, 该环序列包含对应于靶基因的内源信使RNA的全部或部分的核苷酸序列。因而, 是环区决定了RNA干扰的特异性。参见例如W02002/00904, 以引用的方式将其并入本文。

#### [0257] v. 扩增子介导的干扰

[0258] 扩增子表达盒包含源自植物病毒的序列, 该序列含有靶基因的全部或部分但通常不含有该天然病毒的基因的全部。存在于表达盒的转录产物中的病毒序列使得该转录产物能指导其自身的复制。由该扩增子产生的转录物相对于目标序列(即ARGOS多肽的信使RNA)可以是有义或反义的。使用扩增子来抑制内源植物基因的表达的方法例如在以下文献和专利中有描述: Angell and Baulcombe, (1997) EMBO J. 16: 3675-3684 (Angell和Baulcombe, 1997年, 《欧洲分子生物学组织杂志》, 第16卷, 第3675-3684页), Angell and Baulcombe, (1999) Plant J. 20: 357-362 (Angell和Baulcombe, 1999年, 《植物杂志》, 第20卷, 第357-362页)以及美国专利No. 6,646,805, 以上每个文献和专利以引用方式并入本文。

#### [0259] vi. 核酶

[0260] 在一些实施例中, 由本发明的表达盒表达的多核苷酸是ARGOS多肽的信使RNA特异性的催化性RNA或具有ARGOS多肽的信使RNA特异性的核酶活性。因而, 该多核苷酸引起内源信使RNA的降解, 从而导致ARGOS多肽表达的降低。这个方法例如在美国专利No. 4,987,071中进行了描述, 将该专利以引用的方式并入本文。

#### [0261] vii. 小干扰RNA或微RNA

[0262] 在本发明的一些实施例中, ARGOS多肽表达的抑制可通过表达编码微RNA(miRNA)的基因经RNA干扰获得。miRNA是由约22个核糖核苷酸组成的调控剂, miRNA在抑制内源基因表达方面很高效。参见例如Javier, et al., (2003) Nature 425: 257-263 (Javier等人, 2003年, 《自然》, 第425卷, 第257-263页), 该文献以引用的方式并入本文。

[0263] 对于miRNA干扰, 将表达盒设计成表达模仿内源miRNA基因的RNA分子。该miRNA基因编码可形成发夹结构的RNA, 该发夹结构含有与另一内源基因(靶序列)互补的22核苷酸序列。为抑制ARGOS表达, 所述22个核苷酸的序列选自ARGOS转录物序列并包含所述ARGOS序列有义方向的22个核苷酸和与所述有义序列互补的相应的反义序列的21个核苷酸。miRNA分子在抑制内源基因的表达上很高效, 它们诱导的RNA干扰被植物后代继承。

#### [0264] 2. 基因表达的基于多肽的抑制

[0265] 在一个实施例中, 所述多核苷酸编码与编码ARGOS多肽的基因结合的锌指蛋白, 从

而导致所述基因的表达降低。在特定实施例中,该锌指蛋白结合至ARGOS基因的调控区。在其他实施例中,该锌指蛋白结合至编码ARGOS多肽的信使RNA并防止其翻译。选择被锌指蛋白靶向的位点的方法已例如在美国专利No.6,453,242进行了描述,利用锌指蛋白来抑制植物中的基因表达的方法例如在美国专利申请公开No.2003/0037355中进行了描述,将这些专利每一者以引用的方式并入本文。

### [0266] 3. 蛋白质活性的基于多肽的抑制

[0267] 在一些本发明的实施例中,多核苷酸编码结合至少一条ARGOS多肽并且降低ARGOS多肽的细胞数量调控因子活性的抗体。在另一个实施例中,抗体的结合导致由细胞质量控制机制进行的抗体-ARGOS复合物的周转增加。抗体在植物细胞中的表达以及通过抗体表达并结合至植物细胞中的蛋白质来抑制分子途径是本领域所熟知的。参见例如Conrad and Sonnewald,(2003)Nature Biotech.21:35-36(Conrad和Sonnewald,2003年,《自然生物技术》,第21卷,第35-36页),将该文献以引用的方式并入本文。

### [0268] 4. 基因破坏

[0269] 在本发明的一些实施例中,通过破坏编码ARGOS多肽的基因,降低或消除ARGOS多肽的活性。可通过本领域已知的任何方法来破坏编码ARGOS多肽的基因。例如,在一个实施例中,通过转座子标签法破坏所述基因。在另一个实施例中,通过利用随机诱变或定向诱变来对植物进行诱变处理并选择具有降低的细胞数量调控因子活性的植物来破坏所述基因。

#### [0270] i. 转座子标签法

[0271] 在本发明的一个实施例中,使用转座子标签法降低或消除一个或多个ARGOS多肽的ARGOS活性。转座子标签法包括在内源ARGOS基因内插入转座子以降低或消除所述ARGOS多肽的表达。“ARGOS基因”意指编码根据本发明的ARGOS多肽的基因。

[0272] 在该实施例中,通过在编码ARGOS多肽的基因的调控区或编码区内插入转座子来降低或消除一种或多种ARGOS多肽的表达。处于ARGOS基因的外显子、内含子、5'或3'非翻译序列、启动子或任何其他调控序列内的转座子可用于降低或消除所编码ARGOS多肽的表达和/或活性。

[0273] 用于对植物中的特定基因进行转座子标签的方法是本领域所熟知的。参见例如Maes,et al.,(1999)Trends Plant Sci.4:90-96(Maes等人,1999年,《植物科学趋势》,第4卷,第90-96页);Dharmapuri and Sonti,(1999)FEMS Microbiol.Lett.179:53-59(Dharmapuri和Sonti,1999年,《欧洲微生物学会联合会微生物学快报》,第179卷,第53-59页);Meissner,et al.,(2000)Plant J.22:265-274(Meissner等人,2000年,《植物杂志》,第22卷,第265-274页);Phogat,et al.,(2000)J. Biosci.25:57-63(Phogat等人,2000年,《生物科学杂志》,第25卷,第57-63页);Walbot,(2000)Curr.Opin.Plant Biol.2:103-107(Walbot,2000年,《当代植物生物学观点》,第2卷,第103-107页);Gai,et al.,(2000)NucleicAcidsRes.28:94-96(Gai等人,2000年,《核酸研究》,第28卷,第94-96页);Fitzmaurice,et al.,(1999)Genetics153:1919-1928(Fitzmaurice等人,1999年,《遗传学》,第153卷,第1919-1928页)。此外,在Bensen,et al.,(1995)Plant Cell17:75-84(Bensen等人,1995年,《植物细胞》,第7卷,第75-84页);Mena,et al.,(1996)Science274:1537-1540(Mena等人,1996年,《科学》,第274卷,第1537-1540页)和美国专利No.5,962,764中描述了在选择的基因中选择Mu插入的TUSC方法,以上每个文献和专利以引用的方式并入

本文。

[0274] ii. 活性降低的突变体植物

[0275] 用于降低或消除植物中的内源基因的表达的另外方法也是本领域已知的,并且可类似地应用于本发明。这些方法包括其他形式的诱变,例如甲磺酸乙酯诱导的诱变、缺失诱变和快中子缺失诱变,快中子缺失诱变以反向遗传学方式(使用PCR)用于鉴别其中内源基因已缺失的植物。如需这些方法的例子,请参见Ohshima, et al., (1998) *Virology* 243:472-481(Ohshima等人,1998年,《病毒学》,第243卷,第472-481页); Okubara, et al., (1994) *Genetics* 137:867-874(Okubara等人,1994年,《遗传学》,第137卷,第867-874页)和 Quesada, et al., (2000) *Genetics* 154:421-436(Quesada等人,2000年,《遗传学》,第154卷,第421-436页),以上每个文献以引用的方式并入本文。此外,一种用于筛选化学诱导的突变的快速且可自动化的方法TILLING(Targeting Induced Local Lesions In Genomes(定向诱导基因组局部突变))也适用于本发明,该方法利用变性HPLC或者对选定的PCR产物的选择性内切核酸酶消化。参见McCallum, et al., (2000) *Nat. Biotechnol.* 18:455-457(McCallum等人,2000年,《自然生物技术》,第18卷,第455-457页),以引用方式并入本文。

[0276] 影响基因表达或干扰所编码的蛋白质的功能(细胞数量调控因子活性)的突变是本领域所熟知的。基因外显子中的插入突变通常导致无效突变体。保守残基的突变在抑制所编码的蛋白质的细胞数量调控因子活性方面是特别有效的。植物ARGOS多肽的适于以消除细胞数量调控因子活性为目标来进行诱变的保守残基已得到描述。可根据熟知的程序分离这种突变体,并且可通过遗传杂交对不同ARGOS基因座中的突变进行堆叠。参见例如Gruis, et al., (2002) *Plant Cell* 14:2863-2882(Gruis等人,2002年,《植物细胞》,第14卷,第2863-2882页)。

[0277] 在本发明的另一个实施例中,显性突变体由于基因倒位和重复基因座的重组可用于引发RNA沉默。参见例如Kusaba, et al., (2003) *Plant Cell* 15:1455-1467(Kusaba等人,2003年,《植物细胞》,第15卷,第1455-1467页)。

[0278] 本发明涵盖另外的用于降低或消除一种或多种ARGOS多肽的活性的方法。用于改变或突变植物中的基因组核苷酸序列的其他方法的例子是本领域已知的,包括但不限于使用RNA:DNA载体、RNA:DNA突变载体、RNA:DNA修复载体、混合双链寡核苷酸、自互补RNA:DNA寡核苷酸以及重组工程寡核碱基(recombinogenic oligonucleobase)。这种载体和使用方法是本领域已知的。参见例如美国专利No. 5,565,350; 5,731,181; 5,756,325; 5,760,012; 5,795,972和5,871,984,以上每个专利以引用的方式并入本文。另参见W01998/49350、W01999/07865、W01999/25821和Beetham, et al., (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:8774-8778(Beetham等人,1999年,《美国国家科学院院刊》,第96卷,第8774-8778页),以上每个文献和专利以引用的方式并入本文。

[0279] iii. 调节细胞生长和/或器官发育活性

[0280] 在特定的方法中,通过增加植物中的ARGOS多肽的水平或活性来增加植物中细胞数量调控因子的水平和/或活性。增加植物中的ARGOS多肽的水平或活性的方法在本文其他地方进行了论述。简而言之,这种方法包括提供本发明的ARGOS多肽给植物,从而增加该ARGOS多肽的水平或活性。在其他实施例中,可通过这样来提供编码ARGOS多肽的ARGOS核苷酸序列:向植物中引入包含本发明的ARGOS核苷酸序列的多核苷酸,表达该ARGOS



序列,增加该ARGOS多肽的活性,并因此增加植物或植物部分中的组织细胞的数目。在其他实施例中,引入植物中的ARGOS核苷酸构建体被稳定的整合到植物的基因组中。

[0281] 在其他方法中,通过增加植物中的ARGOS多肽的水平和/或活性来增加植物组织的细胞数目和生物量。这种方法在本文其他地方进行了详细公开。在一个这样的方法中,将ARGOS核苷酸序列引入植物中,所述ARGOS核苷酸序列的表达可降低ARGOS多肽的活性并从而增加植物或植物部分中的植物生长和/或器官发育。在其他实施例中,引入植物中的ARGOS核苷酸构建体被稳定的整合到植物的基因组中。

[0282] 如上面所论述的,技术人员会认识到,可将适当的启动子用于调节植物中的植物生长和/或器官发育多核苷酸和多肽的水平/活性。在本文其他地方已经公开了该实施例的示例性启动子。

[0283] 因此,本发明还提供了当与对照植物组织的植物生长和/或器官发育比较时具有变更的植物生长和/或器官发育的植物。在一个实施例中,本发明的植物具有增加的本发明的ARGOS多肽的水平/活性,因而在植物组织中具有增加的植物生长和/或器官发育。在其他实施例中,本发明的植物具有降低或消除的本发明的ARGOS多肽的水平,因而在植物组织中具有降低的植物生长和/或器官发育。在其他实施例中,这种植物在其基因组中稳定整合了包含本发明的ARGOS核苷酸序列的核酸分子,该序列有效连接至能驱动在该植物细胞中的表达的启动子。

#### [0284] iv. 调节根发育

[0285] 提供了用于调节植物中的根发育的方法。所谓“调节根发育”意指在与对照植物比较时植物根的发育的任何改变。根发育的这种改变包括但不限于:初生根的生长速率、根鲜重、侧根和不定根形成的程度、维管系统、分生组织发育或径向扩张。

[0286] 提供了用于调节植物中的根发育的方法。所述方法包括调节该ARGOS多肽在植物中的水平和/或活性。在一种方法中,将本发明的ARGOS序列提供给植物。在另一种方法中,通过这样来提供ARGOS核苷酸序列:将包含本发明的ARGOS核苷酸序列的多核苷酸引入植物中,表达该ARGOS序列,从而变更根发育。在另外其他的方法中,引入植物中的ARGOS核苷酸构建体被稳定掺入植物的基因组中。

[0287] 在其他方法中,通过改变ARGOS多肽在植物中的水平或活性来调节根发育。当与对照植物比较时ARGOS活性的增加可导致至少一种或多种如下对根发育的变更,包括但不限于:较大的根分生组织、根生长增加、增强的径向扩张、增强的维管系统、增加的根分支、更多的不定根和/或鲜根重的增加。

[0288] 本文所用的“根生长”涵盖单子叶植物和双子叶植物中构成根系的不同部分在根系发育的不同阶段的生长的所有方面。应当理解,根生长增强可由其各部分(包括初生根、侧根、不定根等)中的一者或多者的生长增强引起。

[0289] 测量根系中的这种发育改变的方法是本领域已知的。参见例如美国专利申请公开No. 2003/0074698和Werner, et al., (2001)PNAS18:10487-10492(Werner等人,2001年,《美国国家科学院院刊》,第18卷,第10487-10492页),将这两篇文献以引用的方式并入本文。

[0290] 如上面所论述的,技术人员将会认识用于调节植物中的根发育的适当启动子。用于这个实施例的示例性启动子包括组成型启动子和根优选的启动子。示例性的根优选的启动子已在本文别处公开。

[0291] 通过增加ARGOS多肽的活性和/或水平来刺激根生长和增加根的重量也在改善植物的抗倒伏性方面得到应用。术语“耐倒伏性”或“抗倒伏性”指植物使其自身固定至土壤的能力。对于具有竖立或半竖立生长习性的植物,该术语还指在不利(环境)条件下保持直立位置的能力。该性状涉及根系的尺寸、深度和形态。此外,通过增加ARGOS多肽的水平和/或活性来刺激根生长和增加根重量也在促进外植体的体外繁殖方面得到应用。

[0292] 此外,由于增加的ARGOS活性的水平和/或活性引起的较高的根部生物量对产量具有直接效果以及对由根细胞或转基因根细胞或所述转基因根细胞的细胞培养物产生的化合物的产生具有间接的影响。在根培养物中产生的关注化合物的一个例子是紫草素(shikonin),其产量可通过所述方法有利地增强。

[0293] 因此,本发明还提供了与对照植物的根发育相比较时具有受调节的根发育的植物。在一些实施例中,本发明的植物具有提高了的本发明的ARGOS多肽的水平/活性和具有增强了的根生长和/或根生物量。在其他实施例中,这种植物在其基因组中稳定整合了包含本发明的ARGOS核苷酸序列的核酸分子,该序列有效连接至能驱动在该植物细胞中的表达的启动子。

#### [0294] v. 调节苗和叶发育

[0295] 还提供了用于调节植物中的苗和叶发育的方法。所谓“调节苗和/或叶发育”其意指植物苗和/或叶的发育的任何改变。苗和/或叶发育中的这种改变包括但不限于在苗分生组织发育方面、在叶数目、叶尺寸、叶和茎维管系统、节间长度和叶衰老方面的改变。本文所用的“叶发育”和“苗发育”涵盖在单子叶植物和双子叶植物中分别构成叶系统和苗系统的不同部分在这些系统发育的不同阶段中的生长的所有方面。测量苗和叶系统中的这种发育改变的方法是本领域已知的。参见例如Werner, et al., (2001) PNAS 98:10487-10492 (Werner等人, 2001年,《美国国家科学院院刊》,第98卷,第10487-10492页)和美国专利申请公开No. 2003/0074698,将这两篇文献各以引用的方式并入本文。

[0296] 调节植物中苗和/或叶发育的方法包括调节本发明的ARGOS多肽的活性和/或水平。在一个实施例中,提供本发明的ARGOS序列。在其他实施例中,可如下来提供该ARGOS核苷酸序列:将包含本发明的ARGOS核苷酸序列的多核苷酸引入植物中,表达该ARGOS序列,从而变更苗和/或叶发育。在其他实施例中,引入植物中的ARGOS核苷酸构建体被稳定的整合到植物的基因组中。

[0297] 在具体的实施例中,通过降低植物中的ARGOS多肽的水平和/或活性来调节苗或叶发育。当与对照植物比较时,ARGOS活性的降低可导致至少一种或多种如下苗和/或叶发育的改变,包括但不限于:叶数目减少、叶表面降低、维管减少、节间较短以及生长矮小和叶老化延缓。

[0298] 如上面所论述的,技术人员将会认识到用于调节植物的苗和叶发育的适当启动子。用于这个实施例的示例性启动子包括组成型启动子、苗偏好的启动子、苗分生组织偏好的启动子和叶偏好的启动子。示例性的启动子已在本文别处公开。

[0299] 降低植物中的ARGOS活性和/或水平会导致节间较短和生长矮小。因而,本发明的方法可在产生矮秆植物方面有应用。另外,如上面所论述的,植物中的ARGOS活性的调节可调节根和苗二者的生长。因而,本发明还提供了用于改变根/苗比的方法。可进一步通过降低植物中的ARGOS多肽的水平和/或活性来调节苗或叶发育。

[0300] 因此,本发明还提供了与对照植物相比较时具有受调节的苗和/或叶发育的植物。在一些实施例中,本发明的植物具有提高了的本发明的ARGOS多肽的水平/活性,改变了苗和/或叶的发育。这种改变包括但不限于与对照植物相比较,叶数目增加、叶表面增加、维管结构增加、节间更长和植物株高增加以及叶老化改变。在其他实施例中,本发明的植物具有降低了的本发明的ARGOS多肽的水平/活性。

[0301] vi调节繁殖组织发育

[0302] 提供了用于调节繁殖组织发育的方法。在一个实施例中,提供了用于调节植物中的花发育的方法。所谓“调节花发育”意指与其中ARGOS多肽的活性或水平还未受调节的对照植物相比,植物的生殖组织的结构的任何改变。“调节花发育”还包括与其中ARGOS多肽的活性或水平未受调节的对照植物相比,植物生殖组织发育的时刻的任何改变(即花发育时刻的延迟或提前)。宏观改变可包括在环境胁迫时的如下变化:繁殖器官的尺寸、形状、数目或位置,这些结构形成的发育时间周期,或者维持或发展经过开花过程的能力。微观改变可包括构成繁殖器官的细胞的类型或形状的改变。

[0303] 调节植物中的花发育的方法包括调节植物中的ARGOS活性。在一种方法中,提供本发明的ARGOS序列。可以通过这样来提供ARGOS核苷酸序列:将包含本发明的ARGOS核苷酸序列的多核苷酸引入植物中,表达该ARGOS序列,从而变更花的发育。在其他实施例中,引入植物中的ARGOS核苷酸构建体被稳定的整合到植物的基因组中。

[0304] 在具体的方法中,通过降低植物中的ARGOS多肽的水平或活性来调节花发育。当与对照植物比较时,ARGOS活性的降低可导致至少一种或多种如下的花发育改变,包括但不限于:开花延迟、花数目减少、部分雄性不育和结籽减少。诱导开花延迟或抑制开花可用于增强诸如苜蓿之类的饲料作物的产量。用于测量花发育的这种发育改变的方法是本领域已知的。参见例如Mouradov, et al., (2002) *The Plant Cell* S111-S130 (Mouradov等人, 2002年,《植物细胞》,第S111-S130页),将该文献以引用的方式并入本文。

[0305] 如上面所论述的,技术人员将会认识用于调节植物中的花发育的适当启动子。用于该实施例的示例性启动子包括组成型启动子、诱导型启动子、苗偏好的启动子、花序偏好的启动子。

[0306] 在其他方法中,通过增加本发明的ARGOS序列的水平和/或活性来调节花发育。这种方法可包括将ARGOS核苷酸序列引入植物从而增加ARGOS多肽的活性。在其他方法中,引入植物中的ARGOS核苷酸构建体被稳定的整合到植物的基因组中。增加本发明的ARGOS序列的表达能调节胁迫期间的花发育。这种方法在本文别处进行了描述。因此,本发明还提供了与对照植物的花发育相比具有受调节的花发育的植物。组合物包括具有增加的本发明的ARGOS多肽的水平/活性且具有改变的花发育的植物。组合物还包括具有增加的本发明的ARGOS多肽的水平/活性的植物,其中所述植物在胁迫时保持或继续开花过程。

[0307] 还提供了使用本发明的ARGOS序列来增加种子大小和/或重量的方法。该方法包括提高植物或植物部分例如种子中的ARGOS序列的活性。种子大小和/或重量的增加包括种子大小或重量增加和/或一个或多个种子部分(包括例如胚芽、胚乳、种皮、糊粉或子叶)的大小或重量增加。

[0308] 如上面所论述的,技术人员将认识到用于增加种子大小和/或种子重量的适当启动子。该实施例的示例性启动子包括组成型启动子、诱导型启动子、种子偏好的启动子、胚

偏好的启动子和胚乳偏好的启动子。

[0309] 降低植物中的种子大小和/或种子重量的方法包括降低该植物中的ARGOS活性。在一个实施例中,可如下来提供该ARGOS核苷酸序列:将包含本发明的ARGOS核苷酸序列的多核苷酸引入植物中,表达该ARGOS序列,从而降低种子重量和/或大小。在其他实施例中,引入植物中的ARGOS核苷酸构建体被稳定的整合到植物的基因组中。

[0310] 还认识到,增加种子大小和/或重量可以还伴随有幼苗生长速度的增加或早期活力的增加。本文所用的术语“早期活力”是指植物在早期发育过程中快速生长的能力,涉及到发芽之后发育良好的根系和发育良好的光合器的成功建立。此外,当与对照比较时,种子大小和/或重量的增加还可导致植物产量的增加。

[0311] 因此,本发明还提供了当与对照植物比较时具有增加的种子重量和/或种子大小的植物。在其他实施方案中,还提供了具有增加的活力和植物产量的植物。在一些实施例中,本发明的植物具有提高了的本发明的ARGOS多肽的水平/活性和具有增加了的种子重量和/或种子大小。在其他实施例中,这种植物在其基因组中稳定整合了包含本发明的ARGOS核苷酸序列的核酸分子,该序列有效连接至能驱动在该植物细胞中的表达的启动子。

[0312] vii. ARGOS启动子多核苷酸的使用方法

[0313] 当与DNA构建体装配使得ARGOS启动子序列有效连接至包含所关注的多核苷酸的核苷酸序列时,包含本发明中所公开的ARGOS启动子的多核苷酸以及其变体和片段可用于任何宿主细胞(优选植物细胞)的遗传操纵。这样,本发明的ARGOS启动子多核苷酸连同所关注的多核苷酸序列一起在表达盒中提供用于在所关注的宿主细胞中表达。如下面实例2所述,本发明的ARGOS启动子序列在多种组织中表达,因此该启动子序列可用于调控所关注多核苷酸的时间和/或空间表达。

[0314] 合成的杂合启动子区是本领域已知的。这种区域包含有效连接至另一多核苷酸的启动子元件的一多核苷酸的上游启动子元件。在本发明的一个实施例中,通过合成的杂合启动子控制异源序列表达,该合成的杂合启动子包含有效连接至来自异源启动子的上游启动子元件的本发明的ARGOS启动子序列或其变体或片段。涉及植物防御系统的上游启动子元件已被鉴定并可用于产生合成启动子。参见例如Rushton, et al., (1998) *Curr. Opin. Plant Biol.* 1:311-315 (Rushton等人, 1998年,《当代植物生物学观点》,第1卷,第311-315页)。或者,合成的ARGOS启动子序列可包含ARGOS启动子序列内存在的上游启动子元件的重复。

[0315] 已经认识到,本发明的启动子序列可与其天然的ARGOS编码序列使用。包含与其天然ARGOS基因有效连接的ARGOS启动子的DNA构建体可用于转化任何所关注的植物来引起所需的表型变化,例如调节细胞数目、调节根、苗、叶、花和胚的发育、胁迫耐受性和本文其他地方描述的任何其他表型。

[0316] 本文所公开的启动子核苷酸序列和方法可用于调控任何异源核苷酸序列在宿主植物中的表达以便改变植物表型。有多种表型变化是值得关注的,包括修饰植物中的脂肪酸组成、改变植物的氨基酸含量、改变植物的病原体防御机制等等。这些结果可通过在植物中表达异源产物或增加内源产物的表达来实现。或者,这些结果可通过在植物中减少一种或多种内源产物(特别是酶或辅因子)的表达来实现。这些改变导致转化植物的表型变化。

[0317] 一般来讲,修改或改变宿主内源性ARGOS DNA的方法是可用的。这包括改变宿主天

然DNA序列或预先存在的转基因序列,所述转基因序列包括调控元件、编码和非编码序列。这些方法也用于使核酸靶向基因组中预先工程改造的靶标识别序列。例如,本文所述的经过遗传修饰的细胞或植物使用“定制的”大范围核酸酶生成,所述大范围核酸酶的产生用于修饰植物基因组(参见例如W02009/114321;Gao,et al.,(2010)Plant Journal1:176-187(Gao等人,2010年,《植物杂志》,第1卷,第176-187页))。另一个定点工程改造通过使用限制性酶的限制特性结合的锌指结构域识别。参见例如Urnov,et al.,(2010)Nat Rev Genet.11(9):636-46(Urnov等人,2010年,《自然综述遗传学》,第11卷,第9期,第636-646页);Shukla,et al.,(2009)Nature459(7245):437-41(Shukla等人,2009年,《自然》,第459卷,第7245期,第437-441页)。类转录激活因子(TAL)效应物-DNA修饰酶(TALE或TALEN)也用于植物基因组中进行工程变更。参见例如美国专利申请公布No.2011/0145940,Cermak,et al.,(2011)Nucleic Acids Res.39(12)(Cermak等人,2011年,《核酸研究》,第39卷,第12期)和Boch,et al.,(2009)Science326(5959):1509-12(Boch等人,2009年,《科学》,第326卷,第5959期,第1509-1512页)。

[0318] 所关注基因反映了作物开发的参与者的商业市场和利益。目的作物和市场在变化,并且随着发展中国家面向世界市场,也将出现新的作物和技术。另外,随着我们对农学性状和特性如产量和杂种优势的理解的增加,对用于转化的基因的选择将会相应变化。所关注基因的大体类别包括例如涉及信息的那些基因(如锌指)、涉及通信的那些基因(如激酶)和涉及看家的那些基因(如热休克蛋白)。转基因的更具体类别例如包括编码对农学、昆虫抗性、病害抗性、除草剂抗性、不育性、谷粒特征和商业产品重要的性状的基因。一般而言,所关注的基因包括涉及油脂、淀粉、碳水化合物或营养物质代谢的那些以及影响籽粒大小、蔗糖载量等的那些。

[0319] 在某些实施例中,可将本发明的核酸序列与所关注的其他多核苷酸序列联合(“堆叠”)使用,以便产生具有所需表型的植物。生成的组合可包括所关注多核苷酸中的任何一者或多者的多个拷贝。本发明的多核苷酸可以与任何基因或基因的组合堆叠以产生具有多种所需的性状组合的植物,所述性状包括但不限于动物饲料所需的性状例如高油基因(例如美国专利No.6,232,529);平衡的氨基酸(例如hordothionins(美国专利No.5,990,389;5,885,801、5,885,802和5,703,409);大麦高赖氨酸(Williamson,et al.,(1987)Eur.J. Biochem.165:99-106(Williamson等人,1987年,《欧洲生物化学杂志》,第165卷,第99-106页)和W01998/20122)以及高甲硫氨酸蛋白(Pedersen,et al.,(1986)J. Biol.Chem.261:6279(Pedersen等人,1986年,《生物化学杂志》,第261卷,第6279页);Kirihara,et al.,(1988)Gene71:359(Kirihara等人,1988年,《基因》,第71卷,第359页)和Musumura,et al.,(1989)Plant Mol.Biol.12:123(Musumura等人,1989年,《植物分子生物学》,第12卷,第123页));提高了的消化性(例如经修饰贮藏蛋白(于2001年11月7日提交的美国专利申请No.10/053,410)和硫氧还蛋白(于2001年12月3日提交的美国专利申请No.10/005,429)),将上述公开内容以引用的方式并入本文。本发明的多核苷酸也可与抗虫、抗病或抗除草剂所需的性状堆叠(例如苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)毒性蛋白质(美国专利No.5,366,892、5,747,450、5,737,514、5723,756、5,593,881;Geiser,et al.,(1986)Gene48:109(Geiser等人,1986年,《基因》,第48卷,第109页));凝集素(Van Damme,et al.,(1994)Plant Mol.Biol.24:825(Van Damme等人,1994年,《植物分子生物学》,第24卷,第

825页));伏马毒素解毒基因(美国专利No.5,792,931);无毒基因和抗病基因(Jones,et al.,(1994)Science266:789(Jones等人,1994年,《科学》,第266卷,第789页);Martin,et al.,(1993)Science262:1432(Martin等人,1993年,《科学》,第262卷,第1432页);Mindrinos,et al.,(1994)Cell78:1089(Mindrinos等人,1994年,《细胞》,第78卷,第1089页));导致除草剂抗性的乙酰乳酸合成酶(ALS)突变体,例如S4和/或Hra突变;谷氨酰胺合成酶抑制剂例如草胺膦或basta(例如bar基因)和草甘磷抗性(EPSPS基因))以及加工或处理产品所需的性状例如高油(例如美国专利No.6,232,529);改性油(例如脂肪酸去饱和酶基因(美国专利No.5,952,544;W01994/11516));改性淀粉(例如ADPG焦磷酸化酶(AGPase)、淀粉合成酶(SS)、淀粉分支酶(SBE)和淀粉去分支酶(SDBE))和聚合物或生物塑料(例如美国专利No.5.602,321); $\beta$ -酮基硫解酶、聚羟基丁酸合酶和乙酰乙酰基-CoA还原酶(Schubert,et al.,(1988)J. Bacteriol.170:5837-5847(Schubert等人,1988年,《细菌学杂志》,第170卷,第5837-5847页))有利于聚羟基链烷酸酯(PHA)的表达),上述公开内容以引用的方式并入本文。还可以将本发明的多核苷酸与影响例如雄性不育(例如参见美国专利No.5.583,210)、茎秆强度、开花时间之类的农艺性状或者例如细胞周期调控或基因靶向(例如W01999/61619;W02000/17364;W01999/25821)之类的转化技术性状的多核苷酸组合,以上公开内容以引用的方式并入本文。

[0320] 在一个实施例中,所关注序列可改善植物生长和/或作物产量。例如,所关注序列包括可导致初生根系或侧根系改善的农学上重要的基因。这类基因包括但不限于营养物质/水转运蛋白和生长诱导。这类基因的例子包括但不限于玉米质膜 $H^+$ ATP酶(MHA2)(Frias,et al.,(1996)Plant Cell18:1533-44(Frias等人,1996年,《植物细胞》,第8卷,第1533-1544页));AKT1,即拟南芥中钾摄取组织的组分(Spalding,et al.,(1999)J Gen Physiol113:909-18(Spalding等人,1999年,《普通生理学杂志》,第113卷,第909-918页));RML基因,其在根尖细胞中激活细胞分裂周期(Cheng,et al.,(1995)Plant Physiol108:881(Cheng等人,1995年,《植物生理学》,第108卷,第881页));玉米谷氨酰胺合成酶基因(Sukanya,et al.,(1994)Plant Mol Biol26:1935-46(Sukanya等人,1994年,《植物分子生物学》,第26卷,第1935-1946页))和血红蛋白(Duff,et al.,(1997)J. Biol.Chem27:16749-16752(Duff等人,1997年,《生物化学杂志》,第27卷,第16749-16752页);Arredondo-Peter,et al.,(1997)Plant Physiol.115:1259-1266(Arredondo-Peter等人,1997年,《植物生理学》,第115卷,第1259-1266页);Arredondo-Peter,et al.,(1997)Plant Physiol114:493-500(Arredondo-Peter等人,1997年,《植物生理学》,第114卷,第493-500页)和本文引用的参考文献)。所关注序列还可用于表达负面影响根发育的基因反义核苷酸序列。

[0321] 另外,除了利用传统的育种方法外,还可遗传改变诸如油脂、淀粉和蛋白质含量之类的农学上重要的性状。修饰包括增加油酸、饱和或不饱和油的含量、增加赖氨酸或硫的水平、提供必需氨基酸以及修饰淀粉。美国专利No.5,703,049、5,885,801、5,885,802和5,990,389中描述了Hordothionin蛋白修饰,将这些文献以引用的方式并入本文。另一个例子是美国专利No.5,850,016中所描述的由大豆2S白蛋白编码的富赖氨酸和/或富硫种子蛋白,和Williamson,et al.,(1987)Eur. J. Biochem.165:99-106(Williamson等人,1987年,《欧洲生物化学杂志》,第165卷,第99-106页),将所述专利和文献的公开内容以引用方式并

入本文。

[0322] 可通过定点诱变产生编码序列的衍生物来增加预选氨基酸在所编码的多肽中的水平。例如,编码大麦高赖氨酸多肽的基因(BHL)源于大麦胰凝乳蛋白酶抑制剂,参见于1996年11月1日提交的美国专利申请No.08/740,682和W01998/20133,将这两篇文献的公开内容以引用的方式并入本文。其他蛋白质包括富含甲硫氨酸的植物蛋白质例如来自向日葵籽(Lilley, et al., (1989) Proceedings of the World Congress on Vegetable Protein Utilization in Human Foods and Animal feedstuffs, ed. Applewhite (American Oil Chemists Society, Champaign, Illinois), pp. 497-502 (Lilley等人, 1989年,《关于人类食物和动物饲料中植物蛋白利用的世界大会论文集》, Applewhite编辑(美国油脂化学家协会, 伊利诺伊香槟), 第497-502页), 其以引用方式并入本文); 玉米(Pedersen, et al., (1986) J. Biol. Chem. 261:6279 (Pedersen等人, 1986年,《生物化学杂志》, 第261卷, 第6279页); Kirihara, et al., (1988) Gene 71:359 (Kirihara等人, 1988年,《基因》, 第71卷, 第359页), 这两篇文献均以引用方式并入本文) 和 水稻 (Musumura, et al., (1989) Plant Mol. Biol. 12:123 (Musumura等人, 1989年,《植物分子生物学》, 第12卷, 第123页), 将其以引用方式并入本文)。其他农学上重要的基因编码胶乳、Floury2、生长因子、种子贮藏因子和转录因子。

[0323] 昆虫抗性基因可编码针对会导致产量大跌的害虫(如根虫、切根虫、欧洲玉米螟等)的抗性。这类基因包括例如苏云金芽孢杆菌毒性蛋白质基因(美国专利No. 5,366,892、5,747,450、5,736,514、5,723,756、5,593,881和Geiser, et al., (1986) Gene 48:109 (Geiser等人, 1986年,《基因》, 第48卷, 第109页))等等。

[0324] 编码抗病性状的基因包括解毒基因,例如对抗伏马毒素的基因(美国专利No. 5,792,931);无毒(avr)和抗病性(R)基因(Jones, et al., (1994) Science 266:789 (Jones等人, 1994年,《科学》, 第266卷, 第789页); Martin, et al., (1993) Science 262:1432 (Martin等人, 1993年,《科学》, 第262卷, 第1432页); 以及 Mindrinos, et al., (1994) Cell 78:1089 (Mindrinos等人, 1994年,《细胞》, 第78卷, 第1089页))等等。

[0325] 除草剂抗性性状可包括编码对能抑制乙酰乳酸合酶(ALS)的作用的除草剂的抗性的基因,特别是磺酰脲型除草剂(例如含有导致这种抗性的突变特别是S4和/或Hra突变的乙酰乳酸合酶(ALS)基因);编码对能抑制谷氨酰胺合酶的作用的除草剂的抗性的基因,如草胺膦或basta(例如bar基因);或者本领域知道的其他此类基因。bar基因编码针对除草剂basta的抗性,nptII基因编码针对抗生素卡那霉素和遗传霉素的抗性,ALS基因突变编码针对除草剂氯磺隆的抗性。

[0326] 不育基因也可编码在表达盒中,为物理去雄提供另选方案。可以这类方式使用的基因的例子包括雄性组织偏好的基因和具有雄性不育表型的基因如QM,其在美国专利No. 5,583,210中进行了描述。其他基因包括激酶和编码对雄性或雌性配子体发育有毒的化合物的那些。

[0327] 谷粒品质反映在诸如饱和和非饱和的油的水平和类型、必需氨基酸的品质和数量以及纤维素的水平之类的性状中。在玉米中,修饰的hordothionin蛋白在美国专利No. 5,703,049、5,885,801、5,885,802和5,990,389中进行了描述。

[0328] 还可在(一种或多种)基因上编码商业性状,所述基因可增加例如用于乙醇生产的

淀粉,或提供蛋白质的表达。转化植物的另一重要的商业用途是生产聚合物和生物塑料,如在美国专利No.5,602,321中描述的。诸如 $\beta$ -酮硫解酶、PHB酶(聚羟基丁酸酯合酶)和乙酰乙酰辅酶A还原酶之类的基因(参见Schubert,et al.,(1988)J. Bacteriol.170:5837-5847 (Schubert等人,1988年,《细菌学杂志》,第170卷,第5837-5847页)可促进聚羟基链烷酸酯(PHA)的表达。

[0329] 外源产物包括植物酶和产物以及来自包括原核生物和其他真核生物在内的其他来源的那些。这类产物包括酶、辅因子、激素等等。可增加蛋白质,特别是具有改善的氨基酸分布以改善植物营养价值的修饰蛋白质的水平。这可通过表达具有提高的氨基酸含量的这类蛋白质来实现。

[0330] 参考如下非限制性实例可更好地理解本发明。本领域技术人员将会理解,可以在不脱离本文所公开的并受权利要求书保护的发明的精神和范围的情况下实施本发明的其他实施例。

[0331] 实例

[0332] 实例1:ARGOS序列的分离

[0333] 采用鉴定基因家族的所有成员的常规方法搜索所关注ARGOS基因。以蛋白质序列制备基因家族的所有成员的不同组。该数据包括来自其他物种的序列。针对专有玉米序列数据组搜索这些物种,并鉴定重叠命中值(overlapping hit)的非冗余组。独立地,人们处理任何所关注基因的核苷酸序列,针对数据库进行搜索,并检索到所有重叠命中值的非冗余组。然后将蛋白命中值组和核苷酸命中值比较。如果该基因家族是完整的,那么所有蛋白命中值都包含于核苷酸命中值中。基因的ARGOS家族由3个拟南芥基因、8个水稻基因、9个玉米基因、9个高粱基因以及5个大豆基因构成。这些基因编码的蛋白质的相互关系的系统树图示以图1提供。

[0334] 实例2:ARGOS序列分析

[0335] 本发明的ZmARGOS多肽具有多种植物物种中的ARGOS基因的共同特点。多种植物物种的基因之间的关系在比对中示出,参见图2。图3包含ZmARGOS1、2、3和AtARGOS1(SEQ ID NO:2、4、6和26)。ARGOS基因所编码的蛋白质在邻近C端具有非常保守的富脯氨酸区。N端差异更大。这些蛋白质相对较短,平均110个氨基酸。

[0336] 实例3:转基因植物的转化和再生

[0337] 用质粒轰击来自温室供体植株的未成熟玉米胚,所述质粒含有可有效连接至干旱诱导型启动子RAB17启动子(Vilardell,et al.,(1990)Plant Mol Biol14:423-432 (Vilardell等人,1990年,《植物分子生物学》,第14卷,第423-432页))的ZmARGOS序列和赋予针对除草剂双丙氨磷的抗性的选择性标记基因PAT。或者,该选择性标记基因在单独的质粒上提供。如下进行转化。培养基配方见下文。

[0338] 靶标组织的制备

[0339] 将穗去壳并在30%Clorox<sup>®</sup>漂白剂加0.5%Micro去污剂中表面灭菌20分钟,然后用无菌水清洗两次。将未成熟胚切下,并以胚轴一侧朝下(盾片一侧朝上)放置,每板25个胚,在560Y培养基上放置4小时,然后在2.5cm靶区内排成一行准备进行轰击。

[0340] DNA的制备

[0341] 制备质粒载体,该质粒载体包含可有效连接至泛素启动子的ARGOS序列。使用如下



的CaCl<sub>2</sub>沉淀程序将该质粒DNA加上含有PAT选择性标记的质粒DNA沉淀于1.1 $\mu$ m(平均直径)的钨小球上:

[0342] 100 $\mu$ l制备的钨粒子水溶液

[0343] 10 $\mu$ l Tris EDTA缓冲液中的(1 $\mu$ g)DNA(1 $\mu$ g总DNA)

[0344] 100 $\mu$ l 2.5M CaCl<sub>2</sub>

[0345] 10 $\mu$ l 0.1M亚精胺

[0346] 将每种试剂依序加到钨粒子悬浮液,同时保持在复式管涡旋机上。将最终的混合物进行短暂超声处理,并且允许其在恒定漩涡混合下温育10分钟。在沉淀期后,将各管进行短暂离心,除去液体,用500ml 100%乙醇洗涤,离心30秒。再次除去液体,将105 $\mu$ l 100%乙醇加至最终的钨粒子小球。对于粒子枪轰击,将钨/DNA粒子进行短暂超声处理,并取10 $\mu$ l点滴到每个巨载体(macrocarrier)的中央上,让其干燥约2分钟后进行轰击。

[0347] 粒子枪处理

[0348] 将样品板在粒子枪#HE34-1或#HE34-2中以水平#4进行轰击。所有样品接受650PSI的单次射击,每管的制备粒子/DNA共取十个等分试样。

[0349] 后续处理

[0350] 在轰击之后,将胚保持在560Y培养基上2天,然后转移到含有3mg/L双丙氨磷的560R选择培养基,每隔2星期进行传代培养。在进行大约10个星期的选择后,将抗选择的愈伤组织克隆转移到288J培养基以引发植物再生。在体细胞胚成熟后(2-4个星期),将发育良好的体细胞胚转移到培养基中进行发芽并转移到有光照的培养室。大约7-10天后,将发育的小植株转移到管中的272V无激素培养基7-10天,直到小植株完全长好。然后将植株转移到含有盆栽土的平板衬垫(inserts in flats)(相当于2.5英寸盆),在生长室中生长1星期,随后在温室中再生长1-2个星期,然后转移到典型的600个盆(1.6加仑)并生长至成熟。针对增加的耐旱性对植株进行监测和评分。测量改善的耐旱性的测定法是本领域的常规工作,包括例如当与干旱条件下的对照玉米植株比较时在相同环境条件下的核仁-抽穗能力产量增加。作为另一种选择,可针对分生组织发育的调节(即穗上小穗形成的降低)监测转化植株。参见例如Bruce, et al., (2002) Journal of Experimental Botany 53:1-13 (Bruce等人, 2002年,《实验植物学杂志》,第53卷,第1-13页)。

[0351] 轰击法和培养基

[0352] 轰击培养基(560Y)包含4.0g/l N6基础盐(SIGMA C-1416)、1.0ml/l Eriksson维生素混合物(1000X SIGMA-1511)、0.5mg/l 盐酸硫胺、120.0g/l蔗糖、1.0mg/l 2,4-D和2.88g/l L-脯氨酸(用KOH调至pH5.8后用去离子水定容); 2.0g/l Gelrite<sup>®</sup>(在用去离子水定容后加入)和8.5mg/l 硝酸银(在培养基灭菌并冷却到室温后加入)。选择培养基(560R)包含4.0g/l N6基础盐(SIGMA C-1416)、1.0ml/l Eriksson维生素混合物(1000X SIGMA-1511)、0.5mg/l 盐酸硫胺、30.0g/l蔗糖和2.0mg/l 2,4-D(用KOH调至pH5.8后用去离子水定容); 3.0g/l Gelrite<sup>®</sup>(在用去离子水定容后加入)和0.85mg/l 硝酸银和3.0mg/l 双丙氨磷(均在培养基灭菌并冷却到室温后加入)。

[0353] 植物再生培养基(288J)包含4.3g/l MS盐(GIBC011117-074)、5.0ml/l MS维生素母液(0.100g烟酸、0.02g/l 盐酸硫胺、0.10g/l 盐酸吡哆辛和0.40g/l 甘氨酸,用精制去离子水定容)(Murashige and Skoog, (1962) Physiol. Plant. 15:473 (Murashige和Skoog, 1962

年,《植物生理学》,第15卷,第473页)、100mg/1肌醇、0.5mg/1玉米素、60g/1蔗糖和1.0ml/10.1mM脱落酸(调至pH5.6后用精制去离子水定容);3.0g/1 Gelrite<sup>®</sup>(在去离子水定容后加入);以及1.0mg/1吡啶乙酸和3.0mg/1双丙氨膦(在将培养基灭菌并冷却到60°C后加入)。无激素培养基(272V)包含4.3g/1 MS盐(GIBCO11117-074)、5.0ml/1 MS维生素母液(0.100g/1烟酸、0.02g/1盐酸硫胺、0.10g/1盐酸吡哆辛和0.40g/1甘氨酸,用精制去离子水定容)、0.1g/1肌醇和40.0g/1蔗糖(调节pH至5.6后用精制去离子水定容);以及6g/1bacto<sup>™</sup>琼脂(在用精制去离子水定容后加入),灭菌并冷却至60°C。

#### [0354] 实例4:农杆菌介导的转化

[0355] 对于用本发明的ZmARGOS序列的反义序列对玉米进行农杆菌介导的转化,优选的是采用Zhao的方法(美国专利No.5,981,840和PCT专利公布No.WO1998/32326,所述专利的内容据此以引用的方式并入本文)。简单而言,从玉米分离出未成熟胚并使胚与农杆菌的悬浮液接触,其中该细菌能够将ARGOS序列转移到至少一个未成熟胚的至少一个细胞(步骤1:感染步骤)。在该步骤中,优选将未成熟胚浸入农杆菌悬浮液中用于开始接种。将胚与农杆菌共培养一段时间(步骤2:共培养步骤)。优选地,在感染步骤之后,将未成熟胚在固体培养基上培养。在这个共培养期之后,设想到任选的“静息”步骤。在这个静息步骤中,将胚在至少一种已知能抑制农杆菌生长的抗生素的存在下进行温育,不添加植物转化体的选择剂(步骤3:静息步骤)。优选将未成熟胚在固体培养基上与抗生素一起培养,但不加选择剂,用于消除农杆菌以及为了受感染细胞的静息期。接着,将经接种的胚在含有选择剂的培养基上进行培养,回收生长出的转化愈伤组织(步骤4:选择步骤)。优选地,将未成熟胚在固体培养基上与选择剂一起进行培养,从而导致转化细胞的选择性生长。然后将愈伤组织再生为植株(步骤5:再生步骤),并优选将在选择性培养基上生长的愈伤组织在固体培养基上进行培养以再生出植株。针对分生组织发育的调节对植株进行监测并评分。例如,对苗和花分生组织的尺寸和外观的改变和/或叶、花和/或果实的产量增加进行监测。

#### [0356] 实例5:ZmARGOS的过表达影响植物大小和器官大小

[0357] 通过使用表达Ubi-ZmARGOS转基因的转基因植物来测试ZmARGOS基因的功能。通过使用转基因特异性引物RT-PCR(对于ARGOS,为SEQ ID NO:38;且对于PIN,为SEQ ID NO:39)来确认转基因表达。在田间评估了来自九个单拷贝事件的T1植物。转基因植物在若干方面均表现出正生长增强。

#### [0358] 营养生长和生物量积累

[0359] 与非转基因同科植物相比,转基因植物(处于T1代)在所有9个事件中表现出植株高度平均增加4%,并且在最高事件中表现出最多至12%。转基因植物的茎比非转基因同科植物更粗,如通过茎直径值所测量的,其中在9个事件中平均增加9%至22%。植株高度和茎粗细的增加导致转基因植物较大的植株高度和生物量。估计的生物量积累表明,与阴性同科植物相比,在转基因阳性品系中平均增加30%且最多至57%。

[0360] 已经发现ZmARGOS主要通过加快生长速率而不是延长生长周期而影响植物生长。增强的生长(即增加的植物尺寸和生物量积累)似乎主要是由于加快的生长速率而不是由于延长的生长周期,因为根据吐丝和开花日期,转基因植物的开花没有延迟。实际上,转基因植物开花时间早于非转基因同科植物。所有事件平均来说,开花天数缩短至介于30个热量单位(1-1.5天)与69个热量单位(2-2.5天)之间。因此,ZmARGOS基因的过表达加速了植物

的生长速率。加快的生长速率似乎与增加的细胞增殖速率相关。

[0361] 转基因植物中增加的营养生长、生物量积累和加快的生长速率进一步用对杂交和近交背景的后生世代(T3)的大量田间实验检测。转基因植物可重现地表现出,植物高度增加最多至18%,茎直径增加最多至10%,茎秆干质量增加最多至15%,叶面积增加最多至14%,总植物干质量增加最多至25%。在T1代中观察到的提前开花再次在T3代中观察到。

#### [0362] 生殖生长和谷粒产量

[0363] ZmARGOS1基因的过表达也增强了生殖器官生长。T1转基因植物表现出九个事件中穗长度平均增加约10%,对于最高事件而言增加最多至14%。单穗总籽粒重量平均增加13%,并且对于某个事件而言增加最多至70%。总籽粒重量的增加似乎应归因于增加的单穗籽粒数量和籽粒大小。九个事件平均表现出单穗籽粒数量增加8%,并且在最高事件中增加最多至50%。100籽粒重量平均增加5%,并且对于最高事件而言增加最多至13%。籽粒和穗特性的正变化与谷粒产量增加相关。

[0364] 转基因植物增加了的生殖生长和谷粒产量再次被对后生世代(T3)的大量田间实验所确认。在近交和杂交背景中都观察到了增强。与作为对照的非转基因同科植物相比,转基因植物表现出主穗干质量增加最多至60%,第二穗干质量增加最多至4.7倍,雄穗干质量增加最多至25%以及壳干质量增加最多至40%。转基因植物表现出单穗籽粒数量增加最多至13%,并且谷粒产量增加最多至13%。

[0365] 转基因植物还表现出ASI减小最多至40个热量单位,不育率减少最多至50%,并且败育籽粒数量减少最多至64%。当在高植物密度胁迫条件下培育植物时,减少程度更大。这些参数的减少量度通常与生物胁迫耐性有关。

[0366] 此外,转基因表达水平与穗干质量显著相关。

#### [0367] 实例6:UBIZM-ARGOS的T1分析结果-田间研究结果

[0368] ZmARGOS8表现出对产量的总体积极效应,而不具有与环境相互作用的特定模式,并且在任何环境中无显著负面相互作用或显著产量下降。因此,将其选择用于下一年中在干旱胁迫和施氮肥处理下的延期产量测试,以测试其在干旱和低氮胁迫下的潜能。转基因杂交种在这些处理下表现出总体产量优势,而在任何特定环境中无任何明显产量下降(图4)。根据多年产量试验,ZmARGOS8在多种环境中均显示出积极效应,并且不表现出与特定环境的任何负面相互作用。ZmARGOS8实际上不仅在“正常”条件下,而且在有限N施用和有限水供应或干旱胁迫条件下体现产量优势。

#### [0369] 实例7:ARGOS1与8的比较及二级结构

[0370] 玉米ARGOS8在氨基酸序列上与ZmARGOS1表现出总共24.8%同一性(图5),但富脯氨酸基序和两个跨膜螺旋在ZmARGOS8与ZmARGOS1之间高度保守。在富脯氨酸基序中,ZmARGOS1与ZmARGOS8之间8个氨基酸中有7个是相同的。该基序中唯一的氨基酸差异是丝氨酸变为苏氨酸,这被认为是保守的氨基酸变化,因为这两者均是含羟基的氨基酸。ZmARGOS8显示出与ZmARGOS1类似的预测蛋白质结构,但它们的总体同一性较低(图6)。

#### [0371] 实例8:在多种氮浓度下的生物量积累

[0372] 在优良玉米杂交种中,ZmARGOS8在玉米组成型泛素启动子下的表达增强了幼苗期的植物生长。在温室中将各自来自9个转基因玉米事件的总计10个转基因和10个非转基因无效植物随机种植在0.5mM、4mM和8mM硝酸盐浓度的Turface<sup>®</sup>中3周。收获植物并测定植物

干重(DWT)。在2mM和4mM硝酸盐浓度下,与无效植物(null)相比,所测试的9个事件中有3个表现出植物干重显著增加。在8mM高硝酸盐浓度下,9个事件中有5个表现出植物干重显著增加。例如,事件4.17表现出在4mM硝酸盐和8mM硝酸盐浓度下干重分别增加21.6%和20.1%(图7)。

#### [0373] 实例9:正常氮下的田间试验

[0374] 这些事件首先在美国中西部的4个正常氮地点(每个地点4个重复)的田间中进一步测试。随后,将田间测试扩大到3个正常氮地点(每个地点4-6个重复)、3个低氮地点(每个地点6个重复)和2个干旱地点(4-6个重复)。两年多地点分析表明,10个事件中有8个表现出在所有干旱、低N和正常N环境下谷粒产量显著增加,其中 $p < 0.1$ 。最佳事件表现出平均2.9蒲式耳每英亩相比于对照的产量优势(图8)。

#### [0375] 实例10:FastCorn产量构成分析

[0376] 为了弄清楚ZmARGOS8对产量构成的影响,将Ubi:ZmARGOS8构建体重新转化进快速周期玉米种质GS3XGaspe中。将来自3-4个事件的总计15个转基因T1植物和15个无效分离群体种植在自动温室中的2mM硝酸盐和6.5mM硝酸盐浓度下。通过图像技术测定植物相对生长速率(sgr)和最大总面积。使用穗光度测定法在吐丝后的8天测定穗长度、宽度和面积。在2mM硝酸盐下,4个事件中有2个表现出穗长度、穗面积和相对生长速率的显著增加,其中 $p < 0.05$ 。在6.5mM硝酸盐下,3个事件中有1个表现出穗长度、穗面积、穗宽度和最大总面积的显著增加,其中 $p < 0.05$ (图9和图10)。

#### [0377] 实例11:ARGOS1过表达降低了玉米的乙烯反应

[0378] 为了鉴定可用于改善玉米生产率的候选基因,使基因在玉米泛素1(Ubi)启动子的控制下在玉米中系统性过表达。此外,测定转基因事件中的植物激素的水平。已发现,过表达玉米ARGOS基因的转基因植物产生比野生型分离群体多50-80%的乙烯(图11A)。进一步研究了转基因植物对外源供应乙烯的反应。用乙烯前体ACC进行的处理降低了非转基因幼苗的根伸长率并影响了根向地性,但转基因事件的影响程度较小(图11B)。在25 $\mu$ M ACC下可检测到根生长受到抑制,并且随着ACC浓度增加,该表型的严重度增强。在不存在外源供应ACC的情况下,未在转基因与非转基因幼苗之间检测到幼苗生长的差异。转基因植物中增强的乙烯生物合成和降低的乙烯反应表明,该基因的过表达可影响玉米植物的乙烯敏感性。

#### [0379] 实例12:ARGOS1结构的分析

[0380] 玉米ARGOS1(SEQ ID NO:4)编码一种144个氨基酸残基的小型蛋白质。序列亲水性分析预测到两个跨膜 $\alpha$ 螺旋TM1(aa79-101)(SEQ ID NO:90)和TM2(aa110-134)(SEQ ID NO:91)(图11C)。连接TM1和TM2的肽段由八个氨基酸组成,其中六个氨基酸为脯氨酸(图11C)。因此,该环区(aa102-109,PPLPPPPS)被称为富脯氨酸基序(PRM)(SEQ ID NO:88)。经预测,N端和C端区位于细胞膜的细胞质侧,而PRM环位于细胞腔侧(图11C)。BLAST搜索表明,玉米基因组中的七个基因编码也包含TM1-PRM-TM2(TPT)结构域(SEQ ID NO:89)的蛋白质。PRM序列在玉米蛋白质间几乎相同,并且跨膜螺旋具有很高百分比的相同或类似氨基酸(图12)。在用IAA、细胞分裂素和茉莉酸处理的玉米幼苗中,ARGOS1基因的表达升高(图11D)。IAA、ACC、细胞分裂素和茉莉酸处理也增加了ARGOS8的转录本水平(图11D)。

[0381] 玉米ARGOS1和拟南芥ARGOS1具有36%的氨基酸序列同一性。使用qRT-PCR检测了ANT同源基因在Ubi:ARGOS1玉米中的表达,但未在转基因与野生型玉米植物之间观察到表

达的显著差异。

[0382] 实例13:玉米ARGOS1的异位表达赋予拟南芥的乙烯不敏感性

[0383] 为了进一步研究ARGOS对于植物对乙烯的反应的效应,使玉米ARGOS1基因在花椰菜花叶病毒(CaMV)35S启动子的控制下异位表达于拟南芥中。根据黄色荧光蛋白(YFP)和双丙氨酸抗性(BAR)选择标记基因的表达,来选择三十六个事件。ZmARGOS1在拟南芥中的表达通过十个事件的RNA印迹分析来确认(数据未示出)。将拟南芥种子在存在或不存在气态乙烯或ACC的情况下在黑暗中发芽。野生型Co1-0植物的黄化幼苗表现出下胚轴和根生长受抑制,顶端弯钩夸张弯曲以及下胚轴过分径向膨大(图13A和13B),这是拟南芥对乙烯接触的典型三重反应(Guzman和Ecker,1990年)。由空载体对照生成的转基因幼苗具有与野生型Co1-0相同的乙烯反应表型。然而,黄化35S:ZmARGOS1幼苗在存在乙烯或ACC的情况下显示根和下胚轴伸长(图13A和13B)。野生型植物中所表现的顶端弯钩夸张绷紧和下胚轴膨大的乙烯反应在35S:ARGOS1幼苗中不存在。当ACC浓度增加至50 $\mu$ M时,观察到一致表型(数据未示出)。这些结果证实,35S:ZmARGOS1转基因拟南芥植物对外源乙烯不敏感。

[0384] 在24 $^{\circ}$ C下16小时光期(大约120mE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>)和23 $^{\circ}$ C下8小时暗期的条件下,35S:ZmARGOS1植物生长速度比对照更慢。莲座直径更小,并且展开叶更宽但更短(图13C上图)。开花延迟3-10天的任何时间(图13C下图)。然而,到抽薹时,由于更长的生长期,35S:ZmARGOS1植物中的莲座叶比对照更宽且更长。在野生型Co1-0中,在授粉之后不久,花器官例如花瓣、萼片和雄蕊即脱落,并且花序通常具有三至五朵开放的花。相比之下,35S:ZmARGOS1植物的花瓣和萼片保持饱满和完整很长时间,并且花被器官的脱落延迟。因此,花序具有约10朵开放的花(图13D)。成熟转基因植物还表现出延迟的叶片衰老(图13C)。35S:ZmARGOS1幼苗和成熟植物的表型为乙烯不敏感突变体所特有。

[0385] 为了确认转基因植物对内源乙烯不敏感,用35S:ZmARGOS1转化乙烯过量生成的突变体eto1-1。eto1-1突变体的黄化幼苗在不存在外源乙烯的情况下表现出组成型乙烯反应的表型(图14A),这和预期一样(Chae等人,2003年;Guzman和Ecker,1990年)。光生长植物具有深绿色叶片,并且开花时间早于野生型植物。成熟植物中的莲座叶提早衰老。ZmARGOS1的过表达消除了暗处生长的eto1-1幼苗的组成型乙烯反应表型(图14A)。在抽薹时,光生长35S:ZmARGOS1植物的莲座叶比eto1-1突变体具有更大叶面。在35S:ZmARGOS1-eto1-1植物中,开花和莲座叶衰老延迟(图14B)。该表型类似于野生型背景的35S:ZmARGOS1的表型。该遗传分析证实,35S:ZmARGOS1植物对乙烯不敏感。

[0386] 实例14:在ZmARGOS1拟南芥植物中,乙烯生物合成增加,但乙烯反应基因的表达下调。

[0387] 由于在乙烯不敏感拟南芥突变体中乙烯生物合成增强(Guzman和Ecker,1990年),测定35S:ZmARGOS1植物中的乙烯释放量。转基因叶片的乙烯释放量是载体对照和野生型植物的5至7倍(图15A),证实过表达ZmARGOS1的拟南芥中乙烯生物合成活性增加。

[0388] 为了寻求ARGOS1所赋予的乙烯不敏感性的另外的分子证据,研究了乙烯调控的基因的表达。由于35S ZmARGOS1植物中乙烯生物合成增加,可以预测如果转基因植物在正常情况下感测到乙烯,则会引发乙烯反应基因的表达。拟南芥EIN3结合F-BOX2(EBF2)的表达受到EIN3转录因子调控,并且EBF2的转录本水平在乙烯不敏感突变体例如ein2、ein3和ein6中降低。RNA印迹分析表明,相对于对照,在35S:ARGOS1植物中,EBF2的mRNA的稳态水平

被下调(图15B和表2)。拟南芥ERF5是可被乙烯诱导的乙烯反应元件结合因子(ERF)。与载体对照相比,在35S:ARGOS1植物中,AtERF5的表达降低(图15B和表2)。使用RNA-Seq测定35S:ARGOS1植物和载体对照的19天龄的气生组织(莲座叶和顶端分生组织)中的其他ERF基因的表达水平。已发现,相对于载体对照,在35S:ARGOS1植物中,十一个ERF基因的转录本水平被下调至少50%(表2)。在ERF基因中,AtERF1、2、4、5、9、11、72和ERF1(At3g23240)可被乙烯诱导。AtERF3不对乙烯处理作出反应(Fujimoto等人,2000年),并且已确定与载体对照相比,在35S:ARGOS1植物中,AtERF3的表达不变化(表2)。正如预测的,ERF受调控的植物防御素基因的表达在ARGOS1转基因植物中也降低(表2)。另一组乙烯诱导型基因是EDF1/TEM1、EDF2/RAV2、EDF3和EDF4/RAV1。在35S:ARGOS1植物中,它们中的三个被下调(表2)。这些结果证实35S:ARGOS1植物不能正确感测内源乙烯,并表明ARGOS1可作用于EIN3上游的乙烯信号传导组分。

[0389] 表2示出了过表达TPTM1对拟南芥中的乙烯反应基因、成花基因和叶衰老基因的表达的影响。在抽薹前从19天龄的拟南芥植物的气生组织提取RNA。执行RNA-Seq,以便使用Illumina技术定量基因表达。序列读段通过bowtie对齐到拟南芥基因集并归一化为每千万份每千碱基的相对份数(RPKtM)。值为平均值±标准偏差,转基因植物为三个重复,而载体对照为四个重复。TR:35S:TPTM1转基因植物;Ve:载体对照。p:t检验统计(双侧)p值;PermQ:模拟运算法错误发现率q值。

[0390] 转录组的定量还表明,在35S:ARGOS1转基因植物中花抑制子FLO WERING LOCUS C (FLC)和MADS AFFECTING FLO WERING5(MAF5)的表达被上调,而花整合子SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSIONOFCONSTANS1(SOC1)和LEAFY(LFY)及花分生组织特征基因APETALA1(AP1) AP3和AGAMOUS的转录本水平被下调(表2)。这种表达模式与35S:ARGOS1植物中所显示的延迟的开花转型表型一致。FLC表达增强及SOC1、FLOWERING LOCUST(FT)和AP1表达降低在乙烯不敏感突变体etr1、ein2-1和ein3-1中有所报道。此外,相对于对照,在35S:ARGOS1转基因植物中,乙烯诱导型NAC转录因子AtNAC2/ORE1/ANAC092和AtNAP/ANAC029受到显著抑制(表2)。AtNAC2是拟南芥中的年龄依赖性衰老的中心调控因子,并且其在根中的表达在乙烯不敏感突变体etr1和ein2-1中被下调,而在乙烯过量生成突变体eto1-1中被上调(He等人,2005年)。AtNAP也在叶衰老中起到重要作用(Guo和Gan,2006年)。ARGOS1植物中降低的AtNAC2和AtANP表达与延迟的叶衰老表型一致。

[0391] 表2:基因表达谱

[0392]

基因	位点	TR (RPKtM)	Ve (RPKtM)	TR/Ve 比率	t 检验 p	PermQ
AtERF1	At4g17500	112.5±8.7	211.3±13.2	0.53	0.0001	0.0239
AtERF2	At5g47220	186.1±8.8	347.9±24.2	0.53	0.0000	0.0193
AtERF3	At1g50640	481.9±14.4	478.0±19.2	1.01	0.7744	0.9096
AtERF4	At3g15210	419.7±19.9	649.9±31.5	0.65	0.0001	0.0241
AtERF5	At5g47230	69.4±4.6	270.5±33.0	0.26	0.0000	0.0105
AtERF6	At4g17490	88.7±10.2	236.9±17.0	0.37	0.0000	0.0176
AtERF9	At5g44210	17.4±4.9	53.9±11.9	0.32	0.0019	0.0736
AtERF11	At1g28370	30.2±4.2	74.9±13.6	0.40	0.0010	0.0555
AtERF13	At2g44840	11.7±5.8	26.4±7.4	0.45	0.0524	0.2816
AtERF72	At3g16770	1079.2±196.3	2541.1±263.7	0.42	0.0004	0.0447
AtERF104	At5g61600	233.6±8.6	556.1±50.1	0.42	0.0000	0.0120
ERF1	At3g23240	2.5±0.3	5.2±3.2	0.48	0.2969	0.6048
PDF1.2	At5g44420	147.7±51.5	564.9±77.7	0.26	0.0009	0.0553
PDF1.2c	At5g44430	31.7±15.1	222.0±43.5	0.14	0.0005	0.0460
PDF1.2b	At2g26020	26.1±8.8	209.8±26.8	0.12	0.0001	0.0236
几丁质酶	At2g43590	52.6±9.3	127.5±40.8	0.41	0.0109	0.1497
CHI-B	At3g12500	37.2±5.7	57.8±11.8	0.64	0.0376	0.2466
PR4	At3g04720	779.0±44.8	1175.1±117.0	0.66	0.0014	0.0625
EBF2	At5g25350	305.8±25.2	737.8±43.0	0.41	0.0000	0.0105
EBF1	At2g25490	871.3±14.4	824.8±49.0	1.06	0.1733	0.4703
EDF1	At1g25560	416.5±29.7	733.3±37.6	0.57	0.0001	0.0205
EDF2	At1g68840	490.3±34.8	1200.1±36.0	0.41	0.0000	0.0064
EDF3	At3g25730	51.0±13.2	36.8±11.8	1.39	0.1640	0.4605
EDF4	At1g13260	795.6±15.8	1339.5±34.6	0.59	0.0000	0.0034
FLC	At5g10140	15.5±2.7	2.8±2.3	5.62	0.0138	0.1653
MAF5	At5g10140	121.1±21.1	13.0±4.8	9.33	0.0003	0.0388
SOC1	At2g45660	749.5±13.7	1019.7±36.0	0.74	0.0000	0.0183
LFY	At5g61850	1.5±0.9	4.2±1.6	0.35	0.0296	0.2248
FT	At1g65480	7.3±8.7	21.0±7.8	0.35	0.1143	0.3913
AP1	At1g69120	5.4±0.5	25.0±7.9	0.22	0.0004	0.0430
AP3	At3g54340	2.5±1.4	12.6±5.1	0.20	0.0118	0.1542
AG	At4g18960	10.4±2.0	19.2±2.4	0.54	0.0033	0.0899
ELF4	At2g40080	44.0±4.6	79.8±18.1	0.55	0.0106	0.1474
PI	At5g20240	8.9±1.9	21.5±5.2	0.41	0.0050	0.1077
NAC2	At5g61430	24.1±11.0	124.0±18.5	0.19	0.0011	0.0575
NAP	At1g69490	76.9±20.3	330.7±11.0	0.23	0.0001	0.0241

[0393] 实例15:ZmARGOS1在乙烯信号传导通路中很早就起作用

[0394] 为了确定ZmARGOS1在遗传学明确的乙烯信号传导通路中的何处起作用,通过将35S:ZmARGOS1构建体引入纯合ctr1-1突变体来执行遗传分析。分析了三十个事件的乙烯反应。过表达ZmARGOS1的光生长转基因植物表现出特征性的组成型乙烯反应表型,这与ctr1-1突变体一样(图16A)。在不存在ACC的情况下黄化幼苗表现出三重反应(图16B),表明CTR1

对ZmARGOS1存在上位作用。由于CTR1在乙烯信号传导通路中直接与乙烯受体相互作用,遗传分析表明ZmARGOS1在乙烯信号传导通路中很早就起作用。

[0395] 实例16:AtARGOS2、AtARGOS3和AtARGOS4的过表达降低了拟南芥中的乙烯敏感性

[0396] 为了确定其他含玉米和拟南芥TPT结构域的蛋白质是否可调节乙烯反应,在拟南芥中在CaMV35S启动子的控制下过表达玉米ARGOS7、ARGOS8和ARGOS9以及拟南芥AtARGOS2、AtARGOS3和AtARGOS4基因。对于每种构建体,根据YFP标记基因的表达,随机选择二十五颗转基因T1种子(每颗很可能是独立的事件),并且将其接种在含或不含ACC的1/2MS培养基上。在存在10 $\mu$ M ACC的情况下在3天龄的幼苗中,35S:ZmARGOS9和35S:ZmARGOS7植物表现出乙烯不敏感表型,这与35S:ZmARGOS1植物一样(图17A)。成熟植物表现出叶片扩大的表型。开花转型延迟3至8天,花被器官的脱落也延迟。在黄化幼苗中ZmARGOS8的过表达显著降低了乙烯反应,但该表型弱于ZmARGOS1的表型(图17A)。

[0397] 过表达拟南芥AtARGOS3和AtARGOS4的转基因拟南芥的黄化幼苗对10 $\mu$ M ACC不敏感(图17A)。成熟植物表现出与35S:ZmARGOS1转基因植物类似的表型。拟南芥AtARGOS2对乙烯敏感性的效应比AtARGOS3、AtARGOS4和玉米ZmARGOS1弱。在存在10 $\mu$ M ACC的情况下,黄化35S:AtARGOS2幼苗的形态类似于野生型Co1-0(数据未示出),但在1.0和2.5 $\mu$ M ACC下,下胚轴和根明显要比野生型对照植物中的长(图17B)。与野生型植物相比,光生长35S:AtARGOS2植物的开花平均延迟0.5至2.5天。

[0398] 实例17:在拟南芥中,TPT结构域足以赋予乙烯不敏感性

[0399] 由于所有玉米ARGOS基因均包含TM1-PRM-TM2结构域,可假设TPT结构域可能是这些基因具有调节乙烯反应的共同功能的原因。使用ARGOS1进行截短和突变实验以测试该假设。N端区(aa2-61)的缺失对于赋予拟南芥中乙烯不敏感性的ARGOS1功能无任何影响(图18)。C端序列缺失(aa135-144)也无任何影响。在黄化幼苗和光生长成熟植物中,表达已从N端移除61个氨基酸残基并从C端移除10个氨基酸残基的截短ZmARGOS1的转基因植物表现出与全长ZmARGOS1相同的乙烯不敏感表型。该功能性截短ZmARGOS1仅包含两个跨膜螺旋和八氨基酸富脯氨酸环。

[0400] 第一跨膜结构域(SEQ ID NO:90)中的两个氨基酸(P83D和A84D)的突变(这会破坏螺旋结构)消除了ZmARGOS1赋予乙烯不敏感性的能力(图18)。当通过置换螺旋区中的三个氨基酸(L120D、L121D和L122D)破坏第二跨膜结构域(SEQ ID NO:91)时,得到了相同的结果。这些结果表明,跨膜结构域是乙烯敏感性修饰的功能所需的。为了评估PRM(SEQ ID NO:88)的作用,所述八个氨基酸中的每个被替换为天冬氨酸并使变体在拟南芥中过表达。用10 $\mu$ M ACC进行的黄化幼苗分析表明,氨基酸L104、P106和P107对于赋予乙烯不敏感性是至关重要的(图19)。P102D、P103D和P108D的突变允许在存在ACC的情况下黄化幼苗的根和下胚轴伸长,但根和下胚轴要比野生型ZmARGOS1的短得多,表明这三个脯氨酸对于ARGOS1功能也很重要。就调节拟南芥中的乙烯敏感性而言,P105D和S109D的突变(SEQ ID NO:102,如SEQ ID NO:96所指示的可变区)对ARGOS1无任何影响。

[0401] 实例18:玉米ARGOS1定位于内质网膜

[0402] 序列分析预测,玉米ARGOS1和其他家族成员为膜蛋白,但据报道,在拟南芥中ARGOS1存在于细胞核、细胞质和细胞质膜中。为了弄清楚该差异,玉米ARGOS1在N端或C端带上FLAG-HA表位标签,并在拟南芥中在CaMV35S启动子的控制下过表达。表达N端带标签或C



端带标签的ZmARGOS1的转基因植物表现出的乙烯不敏感表型与不带标签的ZmARGOS1不可区分。执行细胞分级分离以分离可溶性和微粒体级分。使用抗FLAG抗体通过蛋白质印迹分析,在膜级分中而非在可溶性级分中检测到带标签的ZmARGOS1蛋白质(图20A),再次证实玉米ARGOS1是膜蛋白。

[0403] 通过使用绿色荧光蛋白(GFP)标签技术来确定ZmARGOS1的亚细胞定位。AcGFP融合到ZmARGOS1的C端不会影响ZmARGOS1赋予乙烯不敏感性的功能。然而,N端融合蛋白无活性。在落射荧光显微镜下检查过表达C端融合蛋白的转基因植物。绿色荧光与特定网络相关联,该网络形态上类似于瞬时表达ZmARGOS1-AcGFP融合蛋白的稳定转基因拟南芥植物的下胚轴细胞和洋葱表皮细胞中的内质网(图20B)。在洋葱表皮细胞中融合蛋白与内质网标记(ER-ck CD3-953)共定位(图20C)。还观察到粒状形式的绿色荧光(图20B和20D),其与高尔基体标记(G-ck CD3-961)共定位。细胞核不含绿色荧光,并且未获得细胞质膜或液泡膜中的融合蛋白的存在性的证据。

[0404] 实例19:植物材料和生长条件

[0405] 拟南芥突变体 $eto1-1$ 和 $ctr1-1$ 以哥伦比亚(Col-0)生态型为背景,并且得自俄亥俄州哥伦布的拟南芥生物资源中心(Arabidopsis Biological Resource Center (Columbus, OH))。将植物种植在生长箱中的荧光灯下并辅以白炽灯(大约 $120\text{mE m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ),采用 $24^{\circ}\text{C}$ 下的16小时光期和 $23^{\circ}\text{C}$ 下的8小时暗期以及50%相对湿度。将种子播种在土壤中,并在 $4^{\circ}\text{C}$ 下层积4天,之后再移入生长箱中。在开花时间用矿质养分对植物施肥一次。为了进行幼苗分析,将种子表面灭菌、层积并接种于含有半浓度MS无机盐、1%蔗糖和0.8%琼脂的培养基上。

[0406] 为了进行三重反应分析,使表面灭菌的种子发芽并将幼苗培养于存在乙烯气体(康乃狄克州丹伯里的普莱克斯公司(Praxair, Danbury, CT))的气密容器中含所述浓度的ACC(加利福尼亚州拉霍亚的Calbiochem公司(Calbiochem, La Jolla, CA))的培养基上。通过用数码相机对幼苗拍照并使用图像分析软件来测量下胚轴和根。

[0407] 为了分析玉米幼苗对ACC的反应,用滤纸方法使种子发芽。将滤纸在所述浓度的ACC水溶液中润湿,并将卷起的种子置于 $24^{\circ}\text{C}$ 下黑暗中的相同溶液中。对5天中的幼苗表型进行评分。为了进行基因表达分析,用多种激素喷洒种植在温室中的玉米V3植物,并将叶组织用于RNA提取。

[0408] 乙烯测量

[0409] 从3周龄的拟南芥切下完整叶片,并从V7玉米植物的两个最上方围绕叶冲切叶圆片。在使创伤诱导的乙烯突发减弱两小时后,再将叶片或叶圆片置于包含用 $50\mu\text{l}$ 蒸馏水润湿的滤纸圆片的 $9.77\text{ml}$ 琥珀色小瓶中并用铝质钳口盖密封。在20小时温育时间后,从每个密封小瓶的顶部空间取出 $1\text{ml}$ 样品。通过气相色谱法定量乙烯含量。乙烯生成速率表示为 $\text{nL}$ 每小时每克鲜重。

[0410] 通过RNA-Seq的基因表达分析

[0411] 通过使用用于总RNA分离的Qiagen RNeasy试剂盒(马里兰州日耳曼敦的凯杰公司(Qiagen, Germantown, MD)),从19天龄的拟南芥植物的气生组织中分离总RNA。使用TruSeq mRNA-Seq试剂盒根据制造商说明书(加利福尼亚大学圣地亚哥的亿明达公司(Illumina, San Diego, CA))制备来自所得总RNA的测序文库。简言之,mRNA通过连接到寡聚(dT)磁珠来

分离,片段化成150nt的平均大小,使用随机引物逆转录成cDNA,进行末端修复以形成平头末端片段,对3'加A尾,并与带有Illumina索引的TruSeq接头连接。使用Illumina TruSeq引物对连接的cDNA片段进行PCR扩增,并在安捷伦生物分析仪DNA7500(Agilent Bioanalyzer DNA7500)芯片(加利福尼亚州圣克拉拉的安捷伦科技公司(Agilent Technologies,Santa Clara,CA))上检查纯化PCR产物的质量和数量。产生由带有唯一索引的三种样品组成的十个纳摩尔样品池。使用带有TruSeq Illumina GAIIx索引的测序法对样品池进行测序。将三个样品池中的每个杂交至单个流动槽泳道,并使用Illumina cBot进行扩增、封闭、线性化和引物杂交。在基因组分析仪IIx(Genome Analyzer IIx)上完成测序。产生插入序列的五十个碱基对和索引序列的六个碱基对。根据质量评分修整序列,并根据索引标识符去卷积。所得序列通过bowtie对齐到拟南芥基因集并归一化为每千万份每千碱基的相对份数(RPKtM)。在GeneData Analyst软件(瑞士巴塞尔的Genedata公司(Genedata AG,Basel, Switzerland))中对所生成的RPKtM数据矩阵进行可视化并分析。

#### [0412] 核酸分析

[0413] 从拟南芥或玉米叶组织提取总RNA,通过在1%(w/v)琼脂糖/甲醛/MOPS凝胶中电泳进行分离,并转印至尼龙膜上。根据制造商说明书进行探针标记、杂交和洗涤。

#### [0414] 膜分级分离

[0415] 使用包含30mM Tris(pH7.6)、150mM NaCl、0.1mM EDTA、20%(v/v)甘油和蛋白酶抑制剂(密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO))的均质化缓冲液,从种植在生长箱中的3周龄的拟南芥植物分离微粒体膜和可溶性级分。将匀浆通过两层Miracloth过滤,并在5,000g下离心10分钟,以去除细胞碎片和细胞壁。然后将上清液在100,000g下离心90分钟,并将所得的膜沉淀物重悬于10mM Tris(pH7.6)、150mM NaCl、0.1mM EDTA、10%(v/v)甘油和蛋白酶抑制剂中。

#### [0416] 免疫印迹

[0417] 通过SDS-PAGE分离蛋白质,转印至PVDF膜上,并根据制造商说明书用单克隆抗FLAG(密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO))或多克隆抗BiP(加利福尼亚州圣克鲁兹的圣克鲁兹生物技术公司(Santa Cruz Biotechnology,Santa Cruz,CA))抗体检测。用Pierce快速蛋白质印迹试剂盒、ECL底物(Pierce Fast Western Blot Kit,ECL Substrate)(伊利诺伊州罗克福德的赛默飞世尔科技公司(Thermo Scientific,Rockford,IL))检测一抗。

#### [0418] 荧光显微术

[0419] 收获幼苗,并立即放置在用于显微镜观察的载玻片上的PBS(pH7.2)中。用配有汞光源的Leica(德国韦茨拉尔(Wetzlar,Germany))DMRXA落射荧光显微镜进行观察并拍摄图像。使用如下两种不同的荧光滤光片组监测AcGFP荧光:Alexa488#MF-105(激发波长486-500,二向色505LP,发射波长510-530)和红移GFP#41001(激发波长460-500,二向色505LP,发射波长510-560),两者均得自佛蒙特州贝洛斯福尔斯的科洛玛技术公司(Chroma Technology(Bellows Falls,VT))。用亚利桑那州图森光度计公司(Photometrics(Tucson,AZ))的CoolSNAP HQ CCD采集图像。控制相机和显微镜,并通过宾夕法尼亚州唐宁敦分子仪器公司(Molecular Devices(Downingtown,PA))的MetaMorph成像软件操作图像。

#### [0420] 实例20:多个物种的保守区的分析

[0421] 准备两个比对,示出多个物种间的富脯氨酸结构域和跨膜结构域。

[0422] 图12示出了ARGOS基因的序列比对,显示了草物种之间家族成员和同源物中的保守区。保守区鉴别为LX1X2LPLX3LPPLX4X5PP(SEQ ID NO:86),其中X1=L、V、I;X2=L、V、I、F;X3=V、L、A;X4=P、Q、S;X5=P、A。

[0423] 图21示出了来自多个物种的ARGOS多肽序列的比对,鉴别了保守跨膜片段。信息按照如下标记:

[0424] ID=SEQ ID,但草物种按照表1被标识为ARGOS#

[0425] St=比对序列组中的序列起始编号,

[0426] Ed=比对序列组中的序列结束编号,

[0427] TMH1/2=跨膜片段,

[0428] Ident/TMH1,2=同一性比率。

[0429] 利用Clustalw产生比对图谱形式的与ZmARGOS8(SEQ ID NO:44)的比对。同一性计算是以ZmARGOS8作为比较。

[0430] 实例21:用于ARGOS8的载体

[0431] 制备一系列载体以便将ZmARGOS8转化进植物组织。所选择的启动子包括但不限于:例如UBI、ROOTMET2、BSV(AY)TR、OsACTIN、ZmPEPC1、ZmCYCLO1、AtHSP,另外还有其他组织和瞬时表达的启动子。还使用了干旱诱导型启动子,例如Rab17。

[0432] 实例22:大豆胚转化

[0433] 如下所述,用含有有效连接至泛素启动子的ARGOS序列的质粒轰击大豆胚芽。为诱导体细胞胚,将从大豆栽培种A2872的经表面灭菌的不成熟种子切取的3-5mm长的子叶在适当的琼脂培养基中,在26℃下在光照或黑暗中培养六到十周。然后切取产生次级胚的体细胞胚并置于合适的液体培养基中。在反复选择作为早期球状阶段的胚繁殖的体细胞胚的簇之后,如下所述维持悬浮物。

[0434] 大豆胚发生悬浮培养物可在旋转振荡器上在150rpm、26℃下维持在35ml液体培养基中,以荧光灯按16:8小时白日/黑夜时间表进行维持。每隔两周,通过将大约35mg的组织接种到35ml的液体培养基中,将培养物进行传代培养。

[0435] 可然后通过粒子枪轰击方法(Klein,et al.,(1987)Nature(London)327:70-73(Klein等人,1987年,《自然》(伦敦),第327卷,第70-73页)、美国专利No.4,945,050)转化大豆胚发生悬浮培养物。可使用DuPont Biolistic PDS1000/HE仪器(氦改型)进行这些转化。

[0436] 可用于促进大豆转化的选择性标记基因,是由来自花椰菜花叶病毒的35S启动子(Odell,et al.,(1985)Nature313:810-812(Odell等人,1985年,《自然》,第313卷,第810-812页))、来自质粒pJR225(来自大肠杆菌;Gritz,et al.,(1983)Gene25:179-188(Gritz等人,1983年,《基因》,第25卷,第179-188页))的潮霉素磷酸转移酶基因和来自根瘤农杆菌的Ti质粒的T-DNA的胭脂碱合酶基因的3'区所组成的转基因。包含有效连接至泛素启动子的ARGOS有义序列的表达盒,可作为限制性片段分离。然后可将这个片段插入携带标记基因的载体的独特限制性酶切位点中。

[0437] 向50μL的60mg/ml 1μm金粒子悬浮液加入(按顺序):5μl DNA(1μg/μl)、20μl亚精胺(0.1M)和50μl CaCl<sub>2</sub>(2.5M)。然后将粒子制备物搅动三分钟,在微量离心机中离心10秒,移除上清液。然后将DNA包被的粒子在400μl 70%乙醇中洗涤一次并再悬浮于40μl无水乙醇

中。可将DNA/粒子悬浮液超声处理三次,每次1秒。然后将五微升DNA包被的金粒子加载至每个巨载体盘上。

[0438] 将大约300-400mg两周龄悬浮培养物置于空的60×15mm培养皿中,用移液管将残余液体从组织移除。对于每次转化实验,通常轰击大约5-10个组织平板。将膜破裂压力设定为1100psi,将室抽至28英寸汞柱的真空。将组织距离阻滞屏(retaining screen)大约3.5英寸放置,轰击三次。轰击后,可将组织一分为二并放回进液体中,如上所述进行培养。

[0439] 轰击后五至七天,可将液体培养基用新鲜培养基更换,轰击后十一至十二天用含有50mg/ml潮霉素的新鲜培养基更换。可每周更新这个选择培养基。轰击后七至八周,可观察到绿色的转化组织从未转化的坏死的胚发生簇长出来。移出分离的绿色组织并接种进单独的烧瓶中以产生新的、克隆繁殖的、转化的胚发生悬浮培养物。可将每一新品系当作独立的转化事件。然后可将这些悬浮物传代培养,并作为未成熟胚簇维持或者通过使各单独体细胞胚成熟和发芽而再生成完整植株。

[0440] 实例23:向日葵分生组织转化

[0441] 如下所述,用含有有效连接至泛素启动子的ARGOS序列的表达盒转化向日葵分生组织(另参见欧洲专利No. EP0486233(其以引用方式并入本文)和Malone-Schoneberg, et al., (1994) Plant Science 103:199-207(Malone-Schoneberg等人,1994年,《植物科学》,第103卷,第199-207页))。用单小麦头脱粒机(single wheat-head thresher)将成熟的向日葵种子(Helianthus annuus L.)脱壳。将种子在20% Clorox®漂白溶液中进行表面灭菌30分钟,每50ml溶液加入两滴Tween®20。将种子在无菌蒸馏水中清洗两次。

[0442] 通过Schrammeijer等人描述的程序(Schrammeijer, et al., (1990) Plant Cell Rep. 9:55-60(Schrammeijer等人,1990年,《植物细胞报告》,第9卷,第55-60页))的修改方案制备分裂胚轴外植体。在表面灭菌程序后,将种子在蒸馏水中浸60分钟。然后将每个种子的子叶折断,在胚轴的平面产生整齐的断裂。在切除根尖后,将外植体在初叶之间纵向对切。将两半以切面朝上放置在GBA培养基上,该培养基由Murashige和Skoog矿物元素(Murashige, et al., (1962) Physiol. Plant., 15:473-497(Murashige等人,1962年,《植物生理学》,第15卷,第473-497页))、Shepard维生素添加物(Shepard, (1980), Emergent Techniques for the Genetic Improvement of Crops(University of Minnesota Press, St. Paul, Minnesota)(Shepard, 1980年,《作物遗传改良的新技术》,明尼苏达大学出版社,明尼苏达州圣保罗))、40mg/l 硫酸腺嘌呤、30g/l 蔗糖、0.5mg/l 6-苄基-氨基嘌呤(BAP)、0.25mg/l 吲哚-3-乙酸(IAA)、0.1mg/l 赤霉素(GA<sub>3</sub>), pH5.6和8g/l Phytagar组成。

[0443] 外植体在进行农杆菌处理之前先进行微粒轰击(Bidney, et al., (1992) Plant Mol. Biol. 18:301-313(Bidney等人,1992年,《植物分子生物学》,第18卷,第301-313页))。将三十至四十个外植体放在60×20mm板的中央的圆圈中进行这个处理。将大约4.7mg的1.8mm钨微射弹重悬在25ml的无菌TE缓冲液(10mM Tris HCl, 1mM EDTA, pH8.0)中,每次轰击使用1.5ml等分试样。每个板通过150mm nytex屏轰击两次,该屏在PDS1000®粒子加速装置中放置在样品上方2cm处。

[0444] 在所有的转化实验中使用卸甲(disarmed)根瘤农杆菌菌株EHA105。通过冷冻-解冻将包含含有与泛素启动子有效连接的ARGOS基因的表达盒的二元质粒载体引入到农杆菌菌株EHA105中,如Holsters, et al., (1978) Mol. Gen. Genet. 163:181-187(Holsters等人,

1978年,《分子遗传学和基因组学》,第163卷,第181-187页)所述。此质粒还包含卡那霉素选择性标记基因(即nptII)。将植物转化实验用的细菌在液体YEP培养基(10g/1酵母膏、10g/1 Bacto<sup>®</sup>蛋白胨和5g/1 NaCl, pH7.0)中生长过夜(28℃和100RPM连续搅拌),该培养基含有细菌菌株和二元质粒维持所需要的适当抗生素。当悬浮液达到约0.4-0.8的OD<sub>600</sub>时进行使用。使农杆菌细胞沉淀并将其以0.5的最终OD<sup>600</sup>重悬于由12.5mm MES pH5.7、1g/1 NH<sub>4</sub>Cl和0.3g/1MgSO<sub>4</sub>组成的接种培养基中。

[0445] 将刚轰击的外植体放在农杆菌悬浮液中,混合并让其不受干扰地放置30分钟。然后将外植体转移到GBA培养基,并以切面朝下在26℃下进行共培养18小时。在三天的共培养后,将外植体转移到374B(缺乏生长调节物且蔗糖含量减低为1%的GBA培养基),该374B补加有250mg/1头孢噻肟和50mg/1硫酸卡那霉素。将外植体在选择上培养两到五周,然后转移到缺乏卡那霉素的新鲜374B培养基进行一到两周的连续发育。将具有分化的、耐抗生素的生长区域(未产生适合切除的苗)的外植体转移到含有250mg/1头孢噻肟的GBA培养基进行第二次3天植物激素处理。对得自绿色的耐卡那霉素的苗的叶样品,通过ELISA分析是否存在NPTII,并通过分析分生组织发育的调节(即苗和花分生组织的大小和外观的改变)来分析是否存在转基因表达。

[0446] 将NPTII阳性苗嫁接到Pioneer<sup>®</sup> hybrid6440试管生长的向日葵幼苗根茎。使经表面灭菌的种子在48-0培养基(半浓度Murashige和Skoog盐、0.5%蔗糖、0.3% gelrite<sup>®</sup>, pH5.6)中发芽,并在对外植体培养所描述的条件下生长。除去幼苗的上部分,在下胚轴中作出1cm垂直切片,将转化的苗插入到切口中。将整个区域用parafilm<sup>®</sup>包裹以对苗进行保护。在玻璃器内培养一周后,可将嫁接的植株转移到土壤。将土壤中的嫁接物维持在高湿度条件下,然后慢慢适应温室环境。通过NPTII ELISA和/或通过对叶提取物的ARGOS活性分析鉴定在温室中成熟的T<sub>0</sub>植株(亲代)的转化部分,而通过对干种子子叶的小部分的ARGOS活性分析鉴定从NPTII阳性T<sub>0</sub>植株收获的转基因种子。

[0447] 另选的向日葵转化方案使得可以不使用化学选择压力就能恢复转基因后代。将种子脱壳并在20% Clorox<sup>®</sup>漂白溶液中进行表面灭菌20分钟,每100ml溶液加入两到三滴 Tween<sup>®</sup> 20,然后用蒸馏水清洗三次。将经灭菌的种子在用水湿润的滤纸上在暗处26℃下吸水20小时。除去子叶和根(root radical),将分生组织外植体在374E(由MS盐、Shepard维生素、40mg/1硫酸腺嘌呤、3%蔗糖、0.5mg/16-BAP、0.25mg/1 IAA、0.1mg/1 GA和0.8% Phytagar(pH5.6)组成的GBA培养基)上在暗处培养24小时。除去初生叶以暴露顶端分生组织,将大约40个外植体以圆形顶部朝上放置在374M(含1.2%Phytagar的GBA培养基)的中央的2cm圆圈中,然后在培养基上在暗处培养24小时。

[0448] 将大约18.8mg的1.8μm钨粒子重悬在150μl无水乙醇中。超声处理后,取8μl滴在巨载体的表面的中央上。每个板用在第一架子中在26mmHg的氢枪真空下用650psi保险片(rupture disc)轰击两次。

[0449] 如之前所述通过冷冻-解冻将所关注质粒引入根瘤农杆菌菌株EHA105中。将在液体YEP培养基(10g/1酵母膏、10g/1 Bacto<sup>®</sup>蛋白胨和5g/1 NaCl, pH7.0)中在50μg/1卡那霉素存在下在28℃过夜生长的细菌的沉淀重悬于接种培养基(12.5mM2-mM2-(N-吗啉代)乙磺酸、MES、1g/1 NH<sub>4</sub>Cl和0.3g/1 MgSO<sub>4</sub>(pH5.7)),以达到4.00D<sub>600</sub>的最终浓度。将经粒子轰击的

外植体转移到GBA培养基(374E),将一小滴细菌悬浮液直接放到分生组织的顶部上。将外植体在培养基上进行共培养4天,然后将外植体转移到374C培养基(具有1%蔗糖而不含BAP、IAA、GA3且补加250 $\mu$ g/ml头孢噻肟的GBA)。将小植株在培养基上在16小时白日和26 $^{\circ}$ C温育的条件下培养约两周。

[0450] 对来自374C培养基中的两星期培养物的外植体(大约2cm长)筛选分生组织发育的调节(即苗和花分生组织的大小和外观的改变)。鉴定了阳性(即ARGOS表达的变化)外植体后,弃去未显示ARGOS活性的改变的苗,将每个阳性外植体再分成节外植体。一个节外植体含有至少一个潜在的节。将各节段在GBA培养基上培养三到四天以促进从每个节形成腋芽。然后将它们转移到374C培养基并让其再发育四周。分离发育中的芽,在374C培养基上再培养四周。通过适当的蛋白质活性测定法,对来自每个新恢复的苗的集中在一起的叶样品再次进行筛选。此时,从单个节恢复的阳性苗将通常已富集了在节培养之前在初始测定中检测到的转基因部分。

[0451] 将ARGOS表达的改变呈阳性的恢复的苗嫁接到Pioneer<sup>®</sup> hybrid6440试管生长的向日葵幼苗根茎。根茎按以下方式制备。将种子脱壳并在20%Clorox<sup>®</sup>漂白溶液中进行表面灭菌20分钟,每100ml溶液加入两到三滴Tween<sup>®</sup> 20,然后用蒸馏水清洗三次。使经灭菌的种子在用水湿润的过滤器上发芽三天,然后将它们转移到48培养基(半浓度MS盐、0.5%蔗糖、0.3%gelrite<sup>®</sup>,pH5.0)中,在26 $^{\circ}$ C下暗处生长三天,然后在16小时白日培养条件下进行温育。除去选定的幼苗的上部分,在每个下胚轴中作出垂直切片,将转化的苗插入到V型切口中。切口区域用parafilm<sup>®</sup>包裹。在培养基上培养一周之后,将嫁接的植物转移到土壤。在前两周,将它们维持在高湿度条件下以使其适应温室环境。

[0452] 实例24:水稻愈伤组织转化

[0453] 一种本领域技术人员可用的将DNA转化至高等植物细胞中的方法,是使用包被有所关注核酸构建体的金属粒子进行的高速弹道轰击(参见Klein,et al.,(1987)Nature (London)327:70-73(Klein等人,1987年,《自然》(伦敦),第327卷,第70-73页)和参见美国专利No.4,945,050)。将Biolistic PDS-1000/He(加利福尼亚州赫拉克勒斯的伯乐公司(BioRAD Laboratories,Hercules,CA))用于这些互补实验。使用粒子轰击技术,用以下两种基因组DNA片段转化ZM-CIPK1突变体和野生型水稻:

[0454] 1)来自野生型的10.0kb MunI片段,其包括ZM-CIPK1基因的4.5kb上游区和3.8kb下游区,

[0455] 2)来自野生型的5.1kb EcoRI片段,其包括ZM-CIPK1基因的1.7kb上游区和1.7kb下游区,

[0456] 使用来自吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)的能赋予对抗生素的抗性的细菌潮霉素B磷酸转移酶(Hpt II)基因,作为水稻转化的选择性标记。在载体pML18中,Hpt II基因被工程连接上来自花椰菜花叶病毒的35S启动子和来自根瘤农杆菌的章鱼氨酸合酶基因的终止信号和聚腺苷酸化信号。pML18在1997年12月18日公布的WO1997/47731中有描述,该专利的公开内容以引用方式并入本文。

[0457] 衍自发芽的水稻种子的盾片的胚性愈伤组织培养物用作转化实验的原始材料。该材料是通过使无菌水稻种子在愈伤组织引发培养基(MS盐、Nitsch和Nitsch维生素、1.0mg/

12,4-D和10 $\mu$ M AgNO<sub>3</sub>)中于暗处27-28 $^{\circ}$ C下发芽来产生的。将从胚的盾片增殖的胚性愈伤组织转移到CM培养基(N6盐、Nitsch和Nitsch维生素、1mg/12,4-D,Chu, et al.,(1985) Sci.Sinica18:659-668(Chu等人,1985年,《中国科学》,第18卷,第659-668页))。将愈伤组织培养物通过以两个星期时间间隔进行常规传代培养维持在CM上,并在引发的10个星期内用于转化。

[0458] 愈伤组织是通过传代培养0.5-1.0mm的块来进行制备以供转化的,这些块相隔大约1mm,布置在Whatman<sup>®</sup>#541纸圆圈中央中的约4cm直径的圆形区域中,该纸放置在CM培养基上。将具有愈伤组织的板在暗处于27-28 $^{\circ}$ C下温育3-5天。在轰击之前,将具有愈伤组织的过滤器转移到补加有0.25M甘露醇和0.25M山梨醇的CM,置于暗处3小时。然后在无菌罩中将平皿盖保持微开20-45分钟,以让组织上的水分散发。

[0459] 将每个基因组DNA片段与含有用于水稻转化的选择性标记的pML18一起共沉淀到金粒子的表面上。为实现这一点,将总共10 $\mu$ g的DNA以性状DNA:选择性标记DNA为2:1的比例加到以60mg ml<sup>-1</sup>的浓度重悬的50 $\mu$ l金粒子等分试样。然后将氯化钙(50 $\mu$ l 2.5M溶液)和亚精胺(20 $\mu$ l 0.1M溶液)加至该金-DNA悬浮液,同时将管漩涡混合3分钟。将金粒子在微量离心机中离心1秒钟,除去上清液。然后将金粒子用1ml无水乙醇洗涤两次,接着重悬于50 $\mu$ l无水乙醇中,超声处理(浴超声器)1秒钟以使金粒子分散。将金分散液在-70 $^{\circ}$ C下温育五分钟,如果需要的话进行超声处理(浴超声器)以使粒子分散。然后将6 $\mu$ l的包被DNA的金粒子装载到聚酯薄膜巨载体碟(mylar macrocarrier disk)上,让乙醇蒸发。

[0460] 在干燥时间结束时,将含有组织的平皿放在PDS-1000/He的腔室中。然后将腔室中的空气抽真空成28-29英寸Hg。使用防爆膜以氦冲击波将该巨载体进行加速,该膜在冲击管中的氦压力达到1080-1100psi时破裂。将组织放置在离停止网大约8cm处,将愈伤组织轰击两次。用包被DNA的金粒子以此方式轰击两个至四个板的组织。在轰击之后,将愈伤组织转移到没有补加山梨醇或甘露醇的CM培养基。

[0461] 在轰击后3-5天内,将愈伤组织转移到SM培养基(含有50mg/1潮霉素的CM培养基)。为实现这一点,将愈伤组织从各板转移到无菌的50ml圆锥形管并称重。加入40 $^{\circ}$ C熔化的顶层琼脂,采用2.5ml顶层琼脂/100mg愈伤组织。将愈伤组织团块通过反复分配穿过10ml移液管来破碎成小于2mm直径的碎块。将3ml的愈伤组织悬浮液等分试样接种到新鲜SM培养基上,将各板在暗处于27-28 $^{\circ}$ C下温育4个星期。4个星期后,鉴定转基因愈伤组织事件,转移到新鲜的SM板,在暗处于27-28 $^{\circ}$ C下再生长2个星期。

[0462] 将生长的愈伤组织转移到RM1培养基(MS盐、Nitsch和Nitsch维生素、2%蔗糖、3%山梨醇、0.4% gelrite<sup>®</sup>+50ppm潮霉素B)在暗处于25 $^{\circ}$ C下放2个星期。2个星期后,将愈伤组织转移到RM2培养基(MS盐、Nitsch和Nitsch维生素、3%蔗糖、0.4% gelrite<sup>®</sup>+50ppm潮霉素B),并放置冷白色灯(约40 $\mu$ Em<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>)下,12小时光周期,温度25 $^{\circ}$ C,湿度30-40%。在光线下2-4个星期后,愈伤组织开始器官化并形成苗。将苗从周围的愈伤组织/培养基中取出,轻轻转移到phytatrays<sup>™</sup>(密苏里州圣路易斯的西格玛化工有限公司(Sigma Chemical Co., St.Louis,MO))中的RM3培养基(1/2 $\times$ MS盐、Nitsch和Nitsch维生素、1%蔗糖+50ppm潮霉素B),用前一步骤中所述的相同条件继续进行温育。

[0463] 在2-3个星期后当出现充分的根和苗生长时,将植株从RM3转移到含有Metro

mix350的4英寸盘。对获自转基因植株的种子检查构建体与含有ARGOS8基因的野生型基因组DNA的遗传互补情况。

[0464] 实例25:农杆菌介导的草转化

[0465] 可按照Luo, et al., (2004) Plant Cell Rep 22:645-652 (Luo等人, 2004年,《植物细胞报告》,第22卷,第645-652页)的农杆菌介导转化对草植株进行转化。

[0466] 材料和方法

[0467] 植株材料

[0468] 可使用俄勒冈州哈伯德的拓新种业(Turf-Seed(Hubbard, Ore.))所提供的匍匐翦股颖商业品种(*Agrostis stolonifera* L., cv. Penn-A-4)。将种子在4℃下保藏备用。

[0469] 细菌菌株和质粒

[0470] 使用含有3种质粒中的一种的农杆菌菌株。一种载体包括pUbi-gus/Act1-hyg构建体,其由驱动含内含子的 $\beta$ -葡糖醛酸酶(GUS)报道基因的玉米泛素(ubi)启动子和驱动潮霉素(hyg)抗性基因的水稻肌动蛋白1启动子组成。另两种pTAP-arts/35S-bar和pTAP-barnase/Ubi-bar构建体是这样的载体,其含有驱动水稻绒毡层特异性反义基因rts(Lee, et al., (1996) Int Rice Res News 121:2-3 (Lee等人, 1996年,《国际水稻研究所通讯》,第21卷,第2-3页))或核糖核酸酶基因barnase(Hartley, (1988) J Mol Biol 202:913-915 (Hartley, 1988年,《分子生物学杂志》,第202卷,第913-915页))的水稻绒毡层特异性启动子,该启动子连接到驱动作为选择性标记的除草剂抗性的bar基因的花椰菜花叶病毒35S启动子(CaMV35S)或水稻ubi启动子(Huq, et al., (1997) Plant Physiol 113:305 (Huq等人, 1997年,《植物生理学》,第113卷,第305页))。

[0471] 胚性愈伤组织和农杆菌介导的转化的诱导

[0472] 用砂纸将成熟种子脱壳,在10%(v/v)Clorox<sup>®</sup>漂白剂(6%次氯酸钠)加0.2%(v/v)Tween<sup>®</sup>20(聚山梨醇酯20)中剧烈搅拌下进行表面灭菌90分钟。在无菌蒸馏水中清洗五次后,将种子放到愈伤组织诱导培养基上,该培养基含有MS基础盐和和维生素(Murashige and Skoog, (1962) Physiol Plant 15:473-497 (Murashige和Skoog, 1962年,《植物生理学》,第15卷,第473-497页))、30g/l蔗糖、500mg/l酪蛋白水解物、6.6mg/l 3,6-二氯-邻茴香酸(麦草畏)、0.5mg/l 6-苄基氨基嘌呤(BAP)和2g/l Phytagel。将培养基的pH调节至5.7,然后在120℃下高压灭菌20分钟。将包含所制备的种子外植体的培养板在室温下暗处保持6周。目视选择胚性愈伤组织,将其在进行共培养之前在新鲜的愈伤组织诱导培养基上室温下暗处进行传代培养1周。

[0473] 转化

[0474] 转化过程分成五个顺序步骤:农杆菌感染、共培养、抗生素处理、选择和植株再生。在进行农杆菌感染前一天,将胚性愈伤组织分成1至2mm的片,放在含有100 $\mu$ M乙酰丁香酮的愈伤组织诱导培养基上。然后将农杆菌悬浮液(660nm处OD=1.0)的10ml等份试样施加到每片愈伤组织,接着在25℃下暗处进行共培养3天。对于抗生素处理步骤,然后将愈伤组织转移在愈伤组织诱导培养基加125mg/l头孢噻肟和250mg/l羧苄西林(用以抑制细菌生长)上进行培养2周。随后,对于选择,将愈伤组织转移到含有250mg/l头孢噻肟和10mg/l草胺磷(PPT)或200mg/l潮霉素的愈伤组织诱导培养基保持8周。抗生素处理和整个选择过程都在室温下在暗处进行。选择过程中的传代培养间隔通常为3周。对于植株再生,首先将增殖的



PPT抗性或潮霉素抗性愈伤组织转移到补加有头孢噻肟、PPT或潮霉素的再生培养基(MS基础培养基、30g/l蔗糖、100mg/l肌醇、1mg/l BAP和2g/l Phytigel)。将这些愈伤组织在室温下保持在暗处1周,然后转移到光线中2-3周以使苗发育。然后分离小苗,将其转移到含有PPT或潮霉素和头孢噻肟的无激素再生培养基以促进根生长,同时维持选择压力和抑制任何残余的农杆菌细胞。然后将具有发育良好的根的小植株(3-5周)转移到土壤,在温室中或田地中进行生长。

#### [0475] GUS活性染色

[0476] 用1mM5-溴-4-氯-3-吡啶基-b-d-葡糖醛酸(X-Gluc,瑞士塔尔的宝欧信特公司(Biosynth,Staad,Switzerland))进行组织化学染色,分析转化的愈伤组织中的GUS活性,如Jefferson,(1987)Plant Mol Biol Rep5:387-405(Jefferson,1987年,《植物分子生物学报告》,第5卷,第387-405页)中所述。将从选择存活下来的潮霉素抗性愈伤组织在100 $\mu$ l含有X-Gluc的反应缓冲液中37 $^{\circ}$ C温育过夜。然后通过摄影记录GUS表达。

#### [0477] 转基因植株的春化处理和异型杂交

[0478] 将转基因植株在户外维持在防护苗圃中(3-6个月),直到十二月冬至为止。然后将经春化的植株转移到温室并在25 $^{\circ}$ C下按16/8h[白日/光线(人造光)]光周期进行保持,在它们周围是非转基因野生型植株,这些野生型植株将它们与其他花粉来源物理分隔。植株在被转移回到温室后,将开始开花3-4周。将它们与来自周围的野生型植株的花粉进行异型杂交。使从每棵单独的转基因植株收集的种子在土壤中25 $^{\circ}$ C下发芽,将T1植株在温室中生长以供进一步分析。

#### [0479] 种子测试

#### [0480] 测试转基因植株及其后代的PPT抗性

[0481] 评估转基因植株及其后代对草胺磷(PPT)的耐性,这表示bar基因的功能表达。给苗喷洒两次浓度1-10%(v/v)Finale<sup>®</sup>(新泽西州蒙特威尔的美国艾格福公司(AgrEvo USA, Montvale,N.J.)),其含有11%草胺磷作为活性成分。在所有喷洒处理中,在施加Finale<sup>®</sup>后1周,可清楚区分抗性苗和敏感苗。

#### [0482] 统计分析

[0483] 通过每100个受感染的胚性愈伤组织回收到的PPT抗性事件的数目,估计给定的实验的转化效率,而再生效率则用每100个尝试过的事件的再生事件数目来确定。平均转化效率和再生效率基于从多个独立实验获得的数据来确定。可使用卡方检验(Chi-square)来确定当与来自未转化的野生型植株的花粉异型杂交时,在T1后代当中所观察到的作为单一基因座的bar基因的遗传的分离比是否符合预期的1:1比例。

#### [0484] DNA提取和分析

[0485] 基本上如Luo,et al.,(1995)Mol Breed1:51-63(Luo等人,1995年,《分子育种》,第1卷,第51-63页)所述,从大约0.5-2g的新鲜叶提取基因组DNA。将十微克的DNA用HindIII或BamHI按照供应商说明书(马萨诸塞州贝弗利的NEB公司(New England Biolabs, Beverly,Mass.))进行消化。将各片段按大小分离通过1.0%(w/v)琼脂糖凝胶,并转印到Hybond-N+膜(新泽西州皮斯卡特维的安玛西亚公司(Amersham Biosciences,Piscataway, N.J.))上。将通过限制性消化从pTAP-arts/35S-bar分离的bar基因用作DNA印迹分析的探针。如Sambrook,et al.,(1989)Molecular cloning:a laboratory manual,2nd edn.Cold

Spring Harbor Laboratory Press, New York (Sambrook 等人, 1989 年, 《分子克隆实验指南》, 第二版, 冷泉港实验室出版社, 纽约) 中所述, 用随机引物同位素标记试剂盒 (安玛西亚公司 (Amersham Biosciences)) 对 DNA 片段进行放射标记并对 DNA 印迹进行处理

#### [0486] 聚合酶链反应

[0487] 设计用来扩增 bar 基因的两条引物如下: 5'-GTCTGCACCATCGTCAACC-3' (SEQ ID NO: 94), 其对应于 bar 基因的 5' 端附近, 以及 5'-GAAGTCCAGCTGCCAGAAACC-3' (SEQ ID NO: 95), 其对应于 bar 编码区的 3' 端。使用这对引物扩增 bar 基因应产生出 0.44kb 的产物。反应混合物 (25 $\mu$ l 总体积) 的组成为: 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH8.8), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% (w/v) Triton X-100、各 200 $\mu$ M 的 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP、0.5 $\mu$ M 的各引物、0.2 $\mu$ g 的模板 DNA 和 1U TaqDNA 聚合酶 (加利福尼亚州瓦伦西亚的凯杰公司 (QIAGEN, Valencia, CA))。扩增是在 Stratagene Robocycler Gradient 96 热循环仪加利福尼亚州拉荷亚 (La Jolla, CA)) 中进行, 该热循环仪设定为: 94 $^{\circ}$ C 1 分钟 (变性)、55 $^{\circ}$ C 2 分钟 (杂交)、72 $^{\circ}$ C 3 分钟 (延伸), 25 个循环, 最后延伸步骤在 72 $^{\circ}$ C 下 10 分钟。在 1.5% (w/v) 琼脂糖凝胶上分离 PCR 产物, 通过用溴化乙锭染色进行检测。

#### [0488] 实例 26: 甘蔗转化

[0489] 该方案描述了用于产生转基因甘蔗品系的常规条件。相同的条件对于在轰击进甘蔗胚性愈伤组织中后瞬时表达的细胞的数目而言接近最佳。另参见 Bower, et al., (1996). *Molec Breed* 2: 239-249 (Bower 等人, 1996 年, 《分子育种》, 第 2 卷, 第 239-249 页); Birch and Bower, (1994). *Principles of gene transfer using particle bombardment*. In *Particle Bombardment Technology for Gene Transfer*, Yang and Christou, eds (New York: Oxford University Press), pp. 3-37 (Birch 和 Bower, 1994 年, 使用粒子轰击进行基因转移的原理, 载于: 《基因转移的粒子轰击技术》, Yang 和 Christou 编辑 (纽约: 牛津大学出版社), 第 3-37 页) 以及 Santosa, et al., (2004), *Molecular Biotechnology* 28: 113-119 (Santosa 等人, 2004 年, 《分子生物技术》, 第 28 卷, 第 113-119 页), 所述文献以引用方式并入本文。

#### [0490] 甘蔗转化规程

[0491] 1. 在轰击前 4 天, 在 MSC3 上对愈伤组织进行传代培养:

[0492] (a) 将活跃生长的胚性愈伤组织 (主要为球状原胚状体而不是更晚的分化阶段) 用于轰击以及通过随后的选择阶段。

[0493] (b) 在传代培养时将愈伤组织分成直径约 5mm 的小块并用镊子在琼脂表面产生小坑, 用于每块转化的愈伤组织块。

[0494] (c) 在 28 $^{\circ}$ C 下在深 (25mm) 培养皿中暗处温育, 使用微孔带密封件用于进行气体交换。

[0495] 2. 将胚性愈伤组织块放置在 MSC30sm 培养基上的圆圈 (约 2.5cm 直径) 中。温育 4 小时, 然后轰击。

[0496] 3. 将 0.7 $\mu$ m 直径的钨 (M-10 等级, Bio-Rad #165-2266) 在无水乙醇中灭菌。涡旋该悬浮液, 然后在微量离心机中将钨离心约 30 秒。抽取上清液并将粒子以相同浓度重悬于无菌 H<sub>2</sub>O 中。用无菌 H<sub>2</sub>O 重复洗涤步骤两次并彻底重悬粒子, 再将 50 $\mu$ l 等分试样转移到微量离心管中。

[0497] 4. 添加沉淀混合物组分:

[0498]

组分 (母液)	要添加的体积	混合物中的终浓度
钨 (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 水溶液)	50 $\mu\text{l}$	38.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	10 $\mu\text{l}$	0.38 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
CaCl <sub>2</sub> (2.5M 水溶液)	50 $\mu\text{l}$	963mM
亚精胺游离碱 (0.1M 水溶液)	20 $\mu\text{l}$	15mM

[0499] 5. 将混合物置于冰上5分钟。在此期间,完成如下步骤6-8。

[0500] 6. 通过用乙醇擦拭‘基因枪’靶室的内部进行消毒,让其干燥。

[0501] 7. 调节氦气筒处的出口压力至所需的轰击压力。

[0502] 8. 调节螺线管定时器至0.05秒。使足够的氦气通过以从供气管线除去空气(2-3次脉冲)。

[0503] 9. 在冰上5分钟后,从沉积的沉淀混合物移出(并弃去)100 $\mu\text{l}$ 上清液。

[0504] 10. 将粒子在剩余的溶液中充分分散。

[0505] 11. 立即将4 $\mu\text{l}$ 分散的钨-DNA制备物置于13mm塑料注射过滤器夹具中的支撑网的中央。

[0506] 12. 将过滤夹具附接至靶室中的氦气出口。

[0507] 13. 用无菌保护网替换靶组织上的封盖。将样品放置进靶室内,保持居中在粒子源下16.5cm,关闭门。

[0508] 14. 打开通向真空源的阀门。当室内真空达到28英寸汞柱时,按下按钮以施加加速气体脉冲,该脉冲将粒子排放进入靶室中。

[0509] 15. 关闭通向真空源的阀门。让空气通过灭菌过滤器慢慢返回至靶室内。打开门,用无菌封盖覆盖样品并从室内移出样品。

[0510] 16. 对于连续的靶板,使用相同的沉淀混合物、过滤器和网重复步骤10-15。

[0511] 17. 在轰击后大约4小时,将愈伤组织块从MSC30sm转移至MSC3。

[0512] 18. 在射击后两天,将愈伤组织转移至选择培养基上。在该转移过程中,将愈伤组织分成直径约5mm的块,在整个选择过程中每一块保持分离。

[0513] 19. 以2-3周的间隔对愈伤组织块进行传代培养。

[0514] 20. 当愈伤组织块生长至直径约5至10mm(通常是轰击后8至12周)时,转移至光照下的28 $^{\circ}\text{C}$ 再生培养基上。

[0515] 21. 当再生的苗为30-60mm高具有若干发育良好的根时,将它们转移进盆栽混合物(potting mix)中,保持惯例的警惕防止机械损伤、病原体攻击和干燥作用,直至在温室中确立小植株。

[0516] 实例27:拟南芥幼苗中的ZmARGOS8分析

[0517] 在3天龄黄化拟南芥幼苗中分析五个ZmARGOS8事件和一个ZmARGOS1事件。对暴露于10 $\mu\text{M}$  ACC的幼苗进行下胚轴长度和根长度的测量。结果表明,ZmARGOS8转基因拟南芥幼苗中存在降低的乙烯敏感性,并且ZmARGOS8植物的该表型弱于ZmARGOS1植物。对照植物的下胚轴长度为大约2mm,而ZmARGOS8植物在2.8-4mm的范围内,并且ZmARGOS1幼苗平均接近5mm。根长度测量值包括对照植物为1mm,ZmARGOS8幼苗在1.5-4.25mm的范围内以及ZmARGOS1幼苗平均为5.5mm。

[0518] 实例28:TPT结构域是乙烯不敏感表型的原因

[0519] 将用ZmARGOS8或截短ZmARGOS8(TR)转化的3天龄拟南芥幼苗及空载体对照在生长过程中暴露于10 $\mu$ M ACC。整个3组的幼苗发育的测量值表明,虽然ARGOS8和ARGOS8TR均具有增加的乙烯不敏感性和增强的组织生长,但与全长ZmARGOS8幼苗相比,截短形式的ARGOS8造成更强的表型反应。

[0520] 实例29:过表达ZmARGOS1的转基因杂交植物改善了与胁迫耐受性相关的性状

[0521] 种植在田间的过表达ZmARGOS1的转基因杂交植物表现出顶端籽粒败育减少、正常籽粒数量增加。转基因杂交植物还表现出减小的ASI(雌雄穗开花间隔)和不育率(不产生穗的植物的百分比)。所有这些都是与非生物胁迫耐受性相关的性状。当植物密度从10,000增加至40,000株植物/英亩时,这更为明显,例如具有正常籽粒的穗轴的长度或每籽粒行的正常籽粒数量。

[0522] 实例30:ZmARGOS转基因杂交系胁迫耐受性田间分析

[0523] 在多个地点的正常氮、低氮和干旱胁迫下进行ARGOS8转基因杂交系的田间研究。在每种胁迫环境中均观察到显著的产量增加。

[0524] 对开花和灌浆胁迫处理下的杂交ZmARGOS植物进行单独组的分析。ZmARGOS8表现出对产量的总体正面效应,而不具有与环境相互作用的特定模式。

[0525] 在从V6开始到成熟的五个阶段测量转基因ARGOS1杂交植物的植株高度。转基因植物表现出在生长季节期间植株高度增加,但在成熟时无差异,因此显示更快的生长速率。这与拟南芥ARGOS基因不同,其中增强的植物和器官生长的原因在于延长的生长期。通过定量RT-PCR对从田间取样的T3近交植物的转基因表达进行定量。在T2植物的转基因表达与主穗干质量之间观察到显著相关性。

[0526] 实例31:温室分析ZmARGOS1的增强的植物生长

[0527] 将两个独立事件培养于温室中并对植物的数量和长度进行表征。转基因植物与对照植物之间节间数量没有显著差异。以节之间的距离来测量节间长度,其中支柱根被视为第一节,并且雄穗基部被视为最后一节。

[0528] 来自两个独立事件的数据表明,叶或器官大小增加主要是由于细胞数量而非细胞大小增加。增强的细胞增殖也表现为叶表皮的不均匀外突。因此,ZmARGOS基因的过表达通过促进细胞分裂来促进植物和器官生长。

[0529] 在T2代,对过表达ZmARGOS1的转基因近交植物的生长的效应进行表征。植物生长测量值表明,近交植物具有增加的植株高度、茎秆直径、长成的穗和籽粒以及增加的主穗大小和第二穗生成速率-指示生长和活力增强。通过定量RT-PCR对从田间取样的T3近交植物的转基因表达进行定量。观察到转基因表达与R2期第二穗干质量的显著相关性。

[0530] 实例32:原位ZmARGOS1分析

[0531] 玉米籽粒组织的原位杂交表明,ZmARGOS1在小穗柄中表达。通过MPSS RNA谱图分析在小穗柄中还检测到ZmARGOS3。这些数据与过表达ZmARGOS1的转基因玉米杂交系中所观察到的灌浆改良和顶端籽粒败育减少一致。过表达ZmARGOS1显示与对照相比IAA含量有所下降,符合拟南芥中所报道的ARGOS基因功能涉及生长素调控。

[0532] 实例33:ZmARGOS1转基因影响产量并表现出转基因与环境的相互作用

[0533] 进行大量产量试验以测试过表达ZmARGOS1基因的玉米杂交系。在多地点且多年的

产量试验数据表明,在包括干旱胁迫的环境的特定环境类别下,ZmARGOS1转基因杂交系表现出与对照相比显著的产量增加。在产量方面深入分析转基因与环境的相互作用以弄清楚ZmARGOS1转基因杂交系在不同天气类别下的不同性能。在每个生长季节进行产量试验的各地点收集天气数据(包括雨量、温度和太阳辐射),根据该数据,将产量试验地点归类为每个季节的天气类别。根据产量性能和天气数据,ZmARGOS1转基因杂交系在温度高、雨量少和太阳辐射强的环境下表现出显著的产量增加。还显示出在干旱胁迫处理,即开花和灌浆胁迫两者下对产量的正面效应。然而,在过分潮湿和阴凉的条件下,转基因不具有产量增加或对产量有负面效应。基因型与环境的相互作用(G×E)是作物性能中的公认现象。然而,该数据提供了证据证明单个转基因(ZmARGOS1)对与特定环境或天气类别的产量相互作用具有效应。此外,G×E数据表明并支持该转基因的干旱胁迫耐受性效应。

[0534] 实例34:在正常氮和低氮条件下ZmARGOS8转基因杂交系增加了产量

[0535] 在多个正常氮地点和多个低氮地点的田间中测试九个ZmARGOS8转基因事件,每个地点4-6个重复,持续两年。将第二年田间测试扩大到3个遗传背景。总体产量测试表明,9个事件中有7个显示出两年中在正常N条件下谷粒产量显著增加,与对照相比具有 $p < 0.1$ 的平均3.0蒲式耳每英亩的产量优势。所有九个事件在低N条件下谷粒产量显著增加,与对照相比具有平均2.4蒲式耳每英亩的产量优势。

[0536] 实例35:在正常氮条件下ZmARGOS8转基因杂交系改善了产量构成

[0537] 为了弄清楚ZmARGOS8转基因的产量优势,将三个独立事件培养于正常氮条件下的田间中并对穗相关性状进行表征。三个事件中有两个显示出与其非转基因同科植物相比,单穗种子重量和单穗籽粒数量显著增加。

[0538] 在单独的田间观察实验中,与对照相比,在正常氮条件下,10个转基因事件中有3个从吐丝到14DAS(吐丝后的天数)所测得的穗生长速率要显著更快。从另一个正常氮田间实验也观察到十个转基因事件的穗长度显著增加,与对照相比具有 $p < 0.1$ 水平的平均1.1cm优势。

[0539] 实例36:在低氮条件下ZmARGOS8转基因杂交系增强了植物生长

[0540] 之前在正常生长条件下的田间中所测试的ZmARGOS8转基因植物未表现出对农业性状的任何负面影响。为了研究在低N条件下ZmARGOS8转基因对植物生长的效应,将三个独立事件培养于田间中用2mM硝酸盐处理的10升盆中,并在V7和R3发育期对植物的植物生物量进行表征。每个事件取样八株植物,并收集苗和根的鲜重。所有检测的三个事件显示出与对照相比V7和R3期的苗和根生物量显著增加,这表明ZmARGOS8转基因通过增强有限氮条件下的植物生长而改善源量(图22)。

[0541] 在单独实验中,ARGOS8转基因植物在不同N条件下趋于具有减小的气孔导度和减弱的光合作用。光合作用和气孔导度的5%显著减少仅从ARGOS8转基因最强表达的事件获得( $p < 0.1$ 水平)。

[0542] 实例37:在正常氮和低氮条件下ZmARGOS8转基因增强了根生长

[0543] 将三个独立事件培养于温室中用2mM硝酸盐或6mM硝酸盐处理的填充有Turface的盆中,并在V12期收获根以进行冠状根角度测量。每个事件测量了三株植物并且每株植物测量了4个冠状根角度。在6mM硝酸盐条件下的一个事件和在2mM硝酸盐条件下的所有三个事件具有与对照相比增大的冠状根角度,平均增加约15%( $p < 0.05$ (T检验))。

[0544] 在高管根分析实验中,在V5-6期对两个转基因事件和对照在低硝酸盐条件或正常氮条件下的根生长进行表征。为单独的完整根系拍摄32到40张图像,并对在五天如种植后的10、14、17、21和23天从每个事件的五株植物所拍摄的所有图像分析总根长度。还计算了根生长差值。数据表明,在正常N和低N条件下,与对照植物相比,两个ZmARGOS8转基因事件具有更多的由总根长度所表示的根生物量并且具有更深和更快的根生长。转基因植物的根系到达更深土壤,如地表下约4英尺,比对照早2-3天,并且在正常N条件下在该水平处观察到接近翻倍的总根长。该数据与低N条件下的根生物量增加一致(实例36)。

[0545] 还对过表达35S:ZmARGOS8的拟南芥品系进行了高N(8mM硝酸盐)和低N(1mM硝酸盐)条件下的根平板分析。与对照相比,从ZmARGOS8转基因品系始终观察到增加的根生物量,在低N和高N条件下每个处理32个重复中平均增加约15%。

[0546] 实例38:ZmARGOS8转基因增加了细胞数量/细胞大小

[0547] 将两个独立事件培养于正常氮条件下的温室中。将V6叶片的中间部分切片、染色并通过电子显微术成像。对叶肉细胞的数量进行计数。两个转基因事件的叶片的细胞比非转基因同科植物多约10%。数据表明,ZmARGOS8转基因通过促进细胞分裂而增大器官大小。然而,来自一个具有更高ZmARGOS8转基因表达的事件的叶片也比无效植物厚约25%,这意味着ZmARGOS8转基因的更强表达可能不仅增加细胞数量而且增大细胞大小。

[0548] 实例39:温室ZmARGOS1干旱分析

[0549] 进行温室实验以测试在干旱、水分充足的条件下或淹水时玉米植物中过表达ZmARGOS1会如何影响苗生长和根生长。该实验设计是每个处理内的随机化完全区组。ZmARGOS1的过表达尤其增强了在干旱和水分充足的条件下的根生长。在干旱和水分充足的条件下,转基因植物的苗鲜重分别增加6.7%和5.3%。在淹水、干旱和水分充足的条件下,玉米中ZmARGOS1的过表达使苗干重分别增加0.8%、1.1%和3.4%。转基因玉米植物还显示出改善了干旱条件下植物中的水分状况。阳性植物显示出比无效植物更高的含水率(3.8%)。

[0550] ZmARGOS1的过表达还增强了在水分充足的条件下的根生长。与非转基因对照相比,转基因事件中的根干重增加10.4%。

[0551] 表3

[0552]

ID	事件编号	处理	正面或负面	苗鲜重 (克/植株)	苗干重 (克/植株)	植株含水率(%)	根干重 (克/植株)
UBI:ZmARGOS1	30.1.3	淹水	无效	NT	57.59±1.43	NT	NT
			正面	NT	58.04±1.71	NT	NT
		干旱	无效	90.38±2.59	41.94±0.25	53.20±1.09	NT
			正面	96.44±3.75	42.42±0.27	55.23±1.47	NT
		水分充足	无效	275.72±9.64	58.10±1.09	78.72±0.48	8.52±1.46
			正面	290.35±11.41	60.07±1.24	79.02±0.56	9.42±1.20

[0553] 注释:NT=未测试。实验于2011年10月在温室B2中进行。

[0554] 实例40:ARGOS影响单穗籽粒数量和穗大小

[0555] 使用在田间条件下生长的转基因植物确定ARGOS过表达对玉米穗和籽粒的效应。

以成对的转基因事件和相应非转基因对照移栽三个ARGOS构建体,即Ubi::ZmARGOS1、Ubi::ZmARGOS5和Ubi::ZmARGOS8,每个构建体五个事件。每个地块有两行并且该实验有三个重复。用从行中间收获的每个地块十个穗进行穗光度测定。ZmARGOS1、ZmARGOS5和ZmARGOS8的过表达分别使单穗籽粒数量显著增加7.1%、7.6%和3.8%(表4)。转基因穗中较大数量的籽粒主要是由于成穗(ear ring)计数的增加。该结果与根据穗长度和平均籽粒宽度的测量所估计的增加的单行籽粒计数一致。转基因植物和非转基因对照之间未观察到籽粒重量和籽粒大小的显著差异(表4)。穗大小在两个ARGOS构建体中较大;ZmARGOS5和ZmARGOS8中的穗面积分别增加6.4%和3.4%。

[0556] 表4

[0557]

测量	构建体	平均值 转基因	平均值 非转基因	标准偏差 转基因	标准偏差 非转基因	差值 (%)	T检验 P值
单穗籽粒数量	Ubi::ZmARGOS1	539.32	503.68	28.32	30.99	7.1	0.0080
	Ubi::ZmARGOS5	535.84	498.01	19.52	24.12	7.6	0.0001
	Ubi::ZmARGOS8	524.66	505.29	29.83	21.08	3.8	0.0879
成穗计数	Ubi::ZmARGOS1	36.43	34.95	1.63	1.64	4.3	0.0331
	Ubi::ZmARGOS5	36.41	34.45	1.15	1.33	5.7	0.0005
	Ubi::ZmARGOS8	35.96	35.12	1.81	1.20	2.4	0.1499
单行籽粒数	Ubi::ZmARGOS1	33.61	32.62	1.54	1.69	3.0	0.1465
	Ubi::ZmARGOS5	33.87	32.13	1.00	1.30	5.4	0.0010
	Ubi::ZmARGOS8	33.49	32.69	1.80	1.20	2.4	0.1620
穗面积(cm <sup>2</sup> )	Ubi::ZmARGOS1	76.25	73.99	3.82	4.89	3.1	0.2260
	Ubi::ZmARGOS5	77.01	72.38	2.68	3.42	6.4	0.0015
	Ubi::ZmARGOS8	75.87	73.40	4.19	3.23	3.4	0.0725
平均单籽粒重量(g)	Ubi::ZmARGOS1	0.2626	0.2679	0.0090	0.0131	-2.0	0.2523
	Ubi::ZmARGOS5	0.2665	0.2610	0.0078	0.0094	2.1	0.1253
	Ubi::ZmARGOS8	0.2671	0.2634	0.0122	0.0102	1.4	0.2855
平均籽粒周长(cm)	Ubi::ZmARGOS1	2.38	2.41	0.03	0.03	-1.2	0.0038
	Ubi::ZmARGOS5	2.39	2.40	0.03	0.03	-0.1	0.7006
	Ubi::ZmARGOS8	2.40	2.40	0.03	0.04	-0.2	0.6623

[0558] 实例41:ZmARGOS的过表达改善了拟南芥植物的耐旱性。

[0559] 测试了35S::ZmARGOS5、35S::ZmARGOS8和35S::AtARL3的转基因拟南芥植物的耐旱性。如下文所述,用干旱分析对每个构建体的三个事件进行评估。当经受干旱胁迫时,拟南芥植物生长减缓,并且叶片逐渐失去叶绿素而变黄。在干旱分析中,过表达ZmARGOS5、ZmARGOS8和AtARGOS3的转基因植物相对于非转基因对照显示出黄色累积的显著延迟(表5)。ZmARGOS5、ZmARGOS8和AtARGOS3赋予拟南芥植物中的乙烯不敏感性。过表达突变形式的ZmARGOS8[ZmARGOS8(L67D)](其中富脯氨酸基序的第67个氨基酸残基亮氨酸被置换为天冬

氨酸)的转基因拟南芥具有正常的乙烯反应并且已发现植物不耐受干旱处理(表5)。

[0560] 表5

[0561]

基因	启动子	事件	评分( $2\sigma$ )	偏差
AtARGOS3	35S	E1	8.309	26.541
AtARGOS3	35S	E2	3.554	11.903
AtARGOS3	35S	E3	2.896	9.92
ZmARGOS5	35S	E1	6.769	22.399
ZmARGOS5	35S	E2	5.473	18.375
ZmARGOS5	35S	E3	2.35	8.106
ZmARGOS8	35S	E1	2.572	8.752
ZmARGOS8	35S	E2	2.501	8.359
ZmARGOS8(L67D)	35S	E1	0.488	1.479
ZmARGOS8(L67D)	35S	E2	0.344	1.055
ZmARGOS8(L67D)	35S	E3	0.719	0.244

[0562] 定量干旱分析:将36株草胺磷抗性T2植物和36株对照植物各自种在Scotts<sup>®</sup> Metro-Mix<sup>®</sup>360土壤上的单块平地中。平地各布置有8个方形盆。各方形盆用土壤填充到顶部。播种每个盆(或方格)以产生3×3阵列的9株幼苗。在平地内,4盆包括草胺磷抗性植物并且4盆包括对照植物。

[0563] 浇透土壤,然后将植物种植在标准条件下(即,16小时光照、8小时黑暗周期;22℃;约60%相对湿度)。不补加水。

[0564] 在出现可见的干旱胁迫症状时拍摄植物的数字图像。一天拍摄一次图像(每天的同一时间)直到植物显得干枯。通常,采集四个连续天数的数据。

[0565] 采用颜色分析来鉴别潜在的耐旱性品系。可使用颜色分析来测量落入黄色区的叶面积的百分比的增加。使用色调、饱和度和强度数据(“HSI”)时,黄色区由色调35至45组成。

[0566] 由于拟南芥叶片在干旱胁迫过程中枯萎,叶面积的保持也用作鉴别潜在的耐旱性品系的另一个标准。叶面积的保持可按照莲座叶面积随时间推移的减小量来测量。

[0567] 叶面积按照使用成像系统所获得的绿色像素数量来测量。将转基因和对照(如,野生型)植物并排种植在平地中,所述平地含有72株植物(9株植物/盆)。当枯萎开始时,测量数天的图像以监测枯萎过程。根据在四个连续天数所获得的转基因和相伴对照植物的绿色像素计数,从这些数据确定枯萎图谱。该图谱选自在造成最大枯萎程度的四天时间内的一系列测量值。按照与对照植物相比转基因植物抵抗枯萎的趋势来测量耐受干旱的能力。

[0568] 按照绿色像素数量获得拟南芥植物的叶面积的估计值。对每张图像的数据取平均值,从而获得转基因和野生型植物的绿色像素计数的平均值和标准偏差的估计值。使用一批中的所有图像的数据对平方差与平均像素计数进行直线回归,从而获得噪声函数的参数。使用噪声函数的拟合参数来计算平均像素计数数据的误差估计值。对转基因和野生型植物的平均像素计数求和,从而获得每张图像的总叶面积的估算值。通过选择与植物生长的最大差异对应的时间间隔来获得具有最大枯萎程度的四天时间间隔。使用该时间间隔中的第一天的绿色像素计数的值对数据进行归一化,从而获得转基因和野生型植物的单独枯



萎反应。通过对第二天至第四天内的转基因植物与野生型植物的枯萎反应之间的加权差值进行求和,从而对与野生型植物相比转基因植物的耐旱性进行评分;通过数据中误差的传递来估计权重。耐旱性正评分对应于与野生型植物相比枯萎较慢的转基因植物。从平方偏差的加权和得出转基因与野生型植物之间的枯萎反应差异的显著性。

[0569] 当转基因重复表现出与对照重复的显著差异(大于2的评分)时,品系的黄色累积显著延迟和/或莲座叶面积显著保持,则认为该品系是经验证的耐旱性品系。

[0570] 实例42:玉米ARGOS的过表达影响玉米中的乙烯信号传导和乙烯反应基因表达

[0571] 使用RNA-seq分析转基因玉米植物叶和无效对照中乙烯信号传导和乙烯反应基因的表达。ZmARGOS1和ZmARGOS5的过表达显著降低了乙烯受体ZmERS1的转录本水平。在ZmARGOS1、ZmARGOS5和ZmARGOS8植物中,乙烯受体互作蛋白ZmRTE1和ZmRTE3的表达也被下调。玉米EIN3是乙烯信号转导通路中的主转录因子,并发现调控EIN3蛋白降解的EIN3F-box结合蛋白ZmEBF1受到ZmARGOS过表达的影响。与无效对照相比,转基因叶片中的ZmEBF1mRNA被上调。ZmEBF1转录本水平的该变化可导致EIN3转录活性降低,从而改变乙烯反应基因的表达。和预期一样,发现在ZmARGOS1和ZmARGOS5植物中乙烯反应因子ZmEREBP1和ZmERF1被下调,而ZmERF2被上调。

[0572] 实例43:玉米ARGOS基因的过表达改善了干旱胁迫下的玉米产量

[0573] 在开花和灌浆期间在针对性的干旱胁迫下进行的产量试验中,评估了十个UBI:ZmARGOS5事件。在这些处理下对照的平均产量分别为159蒲式耳/英亩和176蒲式耳/英亩。在开花胁迫处理下,十个事件中有六个表现出相对于非转基因对照的显著的8蒲式耳/英亩产量增加。其他四个事件没有显著差异。在灌浆胁迫处理下,当与非转基因对照相比时,十个事件中有五个表现出13蒲式耳/英亩的平均显著增加。所述事件中有两个表现出显著的3蒲式耳/英亩降低,并且三个事件处于中性。

[0574] 在下一年,再次在另外的地点按照干旱测试计划评估前五个事件。所述构建体一共在六种环境中评估,所述六种环境包括位点A开花胁迫(167蒲式耳/英亩)、非常温和胁迫位点A(201蒲式耳/英亩)、位点B(162蒲式耳/英亩)、位点C(107蒲式耳/英亩)、位点D(38蒲式耳/英亩)和位点E(178蒲式耳/英亩)。在位点A温和胁迫和位点C环境中,五个事件中有四个表现出与非转基因对照相比的显著产量增加,平均分别为6蒲式耳/英亩和10蒲式耳/英亩。在其他环境中,转基因的效应为中性。在多地点分析中,五个事件中有三个表现出相对于对照的显著产量增加,平均为3蒲式耳/英亩。

[0575] 在干旱胁迫处理下在位点A开花(W0-FS)和灌浆(W0-GF)以及位点C中的严重胁迫(GC-FS)下用测试仪的各种组合评估过表达ZmARGOS8的转基因玉米植物。在W0-FS下,分别用HNNH9HBH2和GR1B5B9测试仪时UBI:ZmARGOS8表现出相对于批量无效对照(bulk null)的4.3蒲式耳/英亩和6.0蒲式耳/英亩增加。在构建体水平,与批量无效对照相比,任何其他测试仪x位点组合无显著差异。还在低和正常氮下评估了该事件。在所有低N环境中,构建体平均值比批量无效对照大2蒲式耳/英亩,这具有 $P < 0.10$ 的显著性。

[0576] 多年分析(2009-2010)鉴定出10个事件中有8个具有相对于对照的显著产量增加。这些优势在1.7蒲式耳/英亩至2.9蒲式耳/英亩(图23)范围内。

[0577] 实例44:ZmArgos1转基因影响不同遗传背景的根本生长和叶面积并且产量增加。

[0578] 在温室中的树脂玻璃生长箱中进行涉及表达ZmArgos1的转基因玉米植物的实验。

在5-6个叶片完全展开时收获植物,洗涤根系并转移到金属网格,在此处使用数字相机对这些根系成像。测量每株植物的叶面积。将叶、根和茎及叶鞘干燥至恒重。取两组转基因和非转基因对,并成对进行分析。除了别的性状以外,测量根的宽度与深度之间的比率(比率越高,根系越呈直角)和根角度。

[0579] ZmArgos1转基因影响所测试的两个遗传背景中的一者的生长。在其他遗传背景中,转基因的表达影响根角度和宽与长的比率。类似地,在所述遗传背景中的一者中,转基因增加叶展开度(+480cm<sup>2</sup>+/-106;df=15;P<0.05)、叶生物量(+1.7g+/-0.4;df=15;P<0.05)和地上部分总生物量(+3.1g+/-0.7;df=15;P<0.05)。叶面积与生物量的增加使得比叶面积(cm<sup>2</sup>/g)保持恒定。相比之下,在该遗传背景中,转基因不显著影响根生长并且在根生物量中未检测到显著差异(+1.4g+/-2.1;df=15)。在第二遗传背景中,转基因对根角度(-9.2度+/-2.9;df=15;P<0.05)和宽度与长度的比率(+0.015+/-0.006;df=15;P<0.05)的影响是明显且显著的。对于给定的深度,转基因植物的根系宽于非转基因(无效)。

[0580] 该实验得出的结果表明转基因可借助两种可能的机制影响玉米植物的产量:(a)受叶面积发育变化影响的水分利用方式(b)通过影响根角度和宽度与长度的比率实现的水分捕获(c)生长和(d)生长向地上部分生物量分配,当收获指数保持恒定时,生物量生成增加意味着产量增加。收获指数取决于环境胁迫的严重度和作物管理。

[0581] 实例45:ARGOS序列的变体

[0582] A. 不会改变所编码的氨基酸序列的ARGOS变体核苷酸序列

[0583] 用ARGOS核苷酸序列产生变体核苷酸序列,所述变体核苷酸序列所具有的开放阅读框核苷酸序列与相应的SEQ ID NO的起始未改变的ORF核苷酸序列相比具有约70%、75%、80%、85%、90%和95%核苷酸序列同一性。这些功能变体是用标准密码子表产生的。虽然变体的核苷酸序列被改变,但开放阅读框所编码的氨基酸序列没有改变。

[0584] B. ARGOS多肽的变体氨基酸序列

[0585] 产生了ARGOS多肽的变体氨基酸序列。在这个实例中,变更一个氨基酸。具体而言,观察开放阅读框以确定适当的氨基酸变更。通过考虑蛋白质比对(与其他直系同源物或来自各种物种的其他基因家族成员的比对)来选择氨基酸进行改变。选择出这样的氨基酸,其被认为不处在高选择压力下(不高度保守),且相当容易地被具有相似的化学特性(即相似的功能侧链)的氨基酸置换。使用图2、12和21中所示的蛋白质比对,可改变适当氨基酸。一旦鉴别出目标氨基酸,就随后进行如下C部分中所述的程序。使用这个方法产生出具有约70%、75%、80%、85%、90%和95%核酸序列同一性的变体。

[0586] C. ARGOS多肽的另外的变体氨基酸序列

[0587] 在该实例中,产生出相对于参比蛋白质序列而言具有80%、85%、90%和95%同一性的人工蛋白质序列。这后一尝试需要从图2、12和21所示的比对鉴定保守区和可变区域,然后明智地应用氨基酸置换表。这些部分将在下文中作更详细的讨论。

[0588] 主要地,基于ARGOS蛋白质之间或其他ARGOS多肽之间的保守区作出哪些氨基酸序列要进行改变的决定。基于序列比对,将ARGOS多肽的很可能要进行改变的不同区域以小写字母表示,而保守区域用大写字母表示。应认识到,可在以下保守区域中作出保守置换而又不改变功能。另外,技术人员会理解,本发明的ARGOS序列的功能变体可在保守结构域中具有微小的非保守氨基酸变更。

[0589] 然后产生出与原始蛋白质序列相差在80-85%、85-90%、90-95%和95-100%同一性范围内的人工蛋白质序列。目标定在这些范围的中点，正负偏差近似幅度例如为1%。氨基酸置换将通过定制的Perl脚本来实现。置换表在下表6中提供。

[0590] 表6. 置换表

[0591]

氨基酸	强相似的和最佳的置换	改变顺序排列	注释
I	L,V	1	50:50置换
L	I,V	2	50:50置换
V	I,L	3	50:50置换
A	G	4	
G	A	5	
D	E	6	
E	D	7	
W	Y	8	
Y	W	9	
S	T	10	
T	S	11	
K	R	12	
R	K	13	
N	Q	14	
Q	N	15	
F	Y	16	
M	L	17	第一个甲硫氨酸不能改变
H		Na	无好的置换物
C		Na	无好的置换物
P		Na	无好的置换物

[0592] 首先，鉴定出蛋白质中不应改变的任何保守氨基酸并“作上记号”以隔离开来不作置换。起始甲硫氨酸当然将自动被加到这个名单。接着，作出改变。

[0593] H、C和P在任何情况下都不改变。该改变将首先以异亮氨酸开始，从N端扫描至C端。然后是亮氨酸，如此按列表往下直至达到所需的目标。可作出中数置换(interim number substitution)，以便不造成改变的逆转。名单的顺序是1-17，因此按需以尽可能多的异亮氨酸变化开始，然后是亮氨酸，一直到甲硫氨酸。显然，按此方式，许多氨基酸将不需要改变。L、I和V将涉及两个交替的最佳置换的50:50置换。

[0594] 将变体氨基酸序列作为输出写出。用Perl脚本计算同一性百分数。使用这个程序，产生出与以下SEQ ID NO的起始未改变的ORF核苷酸序列具有约80%、85%、90%和95%氨基酸同一性的ARGOS多肽的变体：1-37、40-91和96-102。

[0595] 本说明书中的所有出版物和专利申请表明了本发明所属领域的普通技能水平。所有出版物和专利申请均以引用的方式并入本文，所引用的程度就如同每个单独的出版物或专利申请被具体地和独立地指出以引用的方式并入本文一样。

[0596] 藉着各个具体的和优选的实施例和技术描述了本发明。但是,应理解,在保持在本发明的精神和范围的前提下可以作出许多变化和修改。

## 序列表

<110>	先锋良种国际公司	
<120>	改善植物耐旱性、氮利用效率和产量	
<130>	4625-PCT	
<150>	US 61/553,443	
<151>	2011-10-31	
<160>	104	
<170>	PatentIn 版本 3.5	
<210>	1	
<211>	879	
<212>	DNA	
<213>	玉米(Zea mays)	
[0001]	<400> 1	
	tttttageta gctagatctg gcttgattcg cegatcgage ggtggtgaga eggagtgett	60
	eagctcaaaag actgctagtg gtaggctggg agctagetgt gtgctgtgt gcagtgtgca	120
	ctgccactgc atgecgggcg ccttggactt aagacggcag cacacgcacg egaggaggcg	180
	teggetgaag egagegctcc ggcggetccg cttegetcat caggttettg agcccggaa	240
	acgatgagca cgaccgggc ggaggacacc cagcaactga tcaacagtgc egcctctage	300
	cccaacegea gcgcaccgtc cgcgcgcgcc agcgatatgg agaggggcag eggaaccgcc	360
	gctctctegt cgcgccttc gacgaactct cactcccacc agagggccac ccacagggtg	420
	gtggaggagg aggaggagga ggagcctagt agcagccgtg gcggcgag cctctgctcc	480
	gggtacctgt cgtcccggc tctgtgctc gtcggcgca cgcgctgct ggtgactctc	540
	ccgctctcc tgcctccgct gccgcgcgc cgtctgatgc tgatctggt cccctgcca	600
	atgctgctcc tctgctctgt gctggccttc atgcccact cgtccaaccg eggcgcgggt	660

ggaaccggac cgacctacat gtagataatc acateggttt ttttttccct ttctttctct 720  
 tgctgctcctt tegtttggat tttgtgacag agggaggtct tgcgatggat cagttagtec 780  
 tcagctctctg ctctctctega tctgacgatg tctctgtctg gctaattaat ttgcataggg 840  
 gtatatatat gctgctctaga tcttaaaagt atctctgtgc 879

<210> 2  
 <211> 146  
 <212> PRT  
 <213> 玉米

<400> 2

Met Ser Thr Thr Arg Pro Glu Asp Thr Gln Gln Leu Ile Asn Ser Ala  
 1 5 10 15

[0002]

Ala Ala Ser Pro Asn Arg Ser Ala Pro Ser Ala Ala Pro Ser Asp Met  
 20 25 30

Glu Arg Gly Ser Gly Thr Ala Ala Ser Ser Ser Arg Ala Ser Thr Thr  
 35 40 45

Ser His Ser His Gln Arg Ala Thr His Arg Val Val Glu Glu Glu Glu  
 50 55 60

Glu Glu Glu Pro Ser Ser Ser Arg Gly Gly Gly Ser Leu Cys Ser Gly  
 65 70 75 80

Tyr Leu Ser Leu Pro Ala Leu Leu Leu Val Gly Val Thr Ala Ser Leu  
 85 90 95

Val Ile Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Ser Met  
 100 105 110

Leu Met Leu Val Pro Val Ala Met Leu Leu Leu Leu Leu Val Leu Ala  
 115 120 125

Phe Met Pro Thr Ser Ser Thr Gly Gly Arg Gly Gly Thr Gly Pro Thr  
 130 135 140

Tyr Met  
 145

<210> 3

<211> 936

<212> DNA

<213> 玉米

<400> 3

[0003]

caacgtccaa cccctettgt ctctcgteta cctctettct gccctctctg gtcctgtctt 60  
 ccctcgtcgt cctcgtcgtga ggctgacgac gaccagtcac aggatctggt cgttctctcat 120  
 gcgaaccagc tagctaaaae tggcatgcat ggacatgcta cgtcgtctgg tcaatccatc 180  
 tcaccagcag tcttagctag cttagctctg cctgattctc cgtctcagcg gtcctcctctt 240  
 agagactcag agttcatgag accgagctgt tcagctcaaa gactgctagt ggtagctagg 300  
 tagctcgttg cactgcatgc gcggcgcctt ggacttgaag aaaccgagcg ctccgatagt 360  
 ccgatccgga aacgatgagt gccgggcggg aggacacca gcagctgata aacagtgcct 420  
 ccctagccc caaccgcagc gcaccgtcct ccgcgccag cgtatggag aggggcagcg 480  
 gaaccgcctg gtcctcgtct cgcctctcga cagctcaca ctcccaccag agggccacce 540  
 acaggtggtt ggaggaggag gaggaggagc ctagtacgag ccgtggcctc gccagcctct 600  
 gctccgggta cctgtcctt ccgctctctc tctctctctg cgtcaccgct tctctggtga 660  
 tctctcctct cgtctcctc ccgctcctc cgcctcctc gttctctctg ctggctcctc 720  
 tggcaatgct gctcctctct ctctctctct cgttcatgct cactctctcc accggcggcc 780

gcggtggaac cggaccgacc tacatgtaga taatcacatc ggtttttttt tttttccttt 840  
 ctttctcttg tcgtcctttc gtttggattt tgtgacagag ggaggctcttg cgatggatea 900  
 gttagtcttc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 936

<210> 4

<211> 144

<212> PRT

<213> 玉米

<400> 4

Met Ser Ala Gly Pro Glu Asp Thr Gln Gln Leu Ile Asn Ser Ala Ala  
 1 5 10 15

Ala Ser Pro Asn Arg Ser Ala Pro Ser Ala Ala Pro Ser Asp Met Glu  
 20 25 30

[0004]

Arg Gly Ser Gly Thr Ala Ala Ser Ser Ser Arg Ala Ser Thr Thr Ser  
 35 40 45

His Ser His Gln Arg Ala Thr His Arg Val Val Glu Glu Glu Glu Glu  
 50 55 60

Glu Pro Ser Ser Ser Arg Gly Ala Gly Ser Leu Cys Ser Gly Tyr Leu  
 65 70 75 80

Ser Leu Pro Ala Leu Leu Leu Val Gly Val Thr Ala Ser Leu Val Ile  
 85 90 95

Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Ser Leu Leu Met  
 100 105 110

Leu Val Pro Val Ala Met Leu Leu Leu Leu Val Leu Ala Phe Met  
 115 120 125



Pro Thr Ser Ser Thr Gly Gly Arg Gly Gly Thr Gly Pro Thr Tyr Met  
 130 135 140

<210> 5

<211> 1067

<212> DNA

<213> 玉米

<400> 5

ctccatcett cccccggga gcaggagctg cagccaggag tegagtcggc gtcgtcacgg 60  
 gagatcag cttegetatc accgataccc ccctctctc cctccgcacc tcccattgct 120  
 getctctgtt ttcttccgg cccccggct gttgggtgct cgtccggcgg cgttgctggt 180  
 ggtgaatcc gaccccttga ggggtctccc gccgcgcgcg ctcttgagat ctctttattg 240  
 atctggaggg attaaagagg gattcttccc ttccactggt agcaagagaa aggggagaaac 300  
 [0005] gtgtttcttc agcgttggtt gaacagtgag gaccggagaa caatgcgagg ttccggattt 360  
 aagatgttct gcttttaggg gccgttcttc tgaagcaggg gacggcgcat tcgaccaccg 420  
 gagctcagat ctgattacaa aacgttcaga aaacacaagg cgttctcaca ccgccttcca 480  
 cttcttgett accttgcaa ccaactactg cgaactggtct ccacctccac ctacaceaaa 540  
 gaacacatgg caagccgate tagcgcgatg gaaggagggg cggcaataca aaggaggaat 600  
 gccgtgaagc ggcattctga gcagcgtcag caggaggcgg atttctcga caagaaggtc 660  
 atcgcgtcca cctacttcag catcggggcg ttctctgtgc tcgctgcct caccgtctcg 720  
 ctgctgatac tgcctctggt gctgcctccc ctgccgcgcg cgcctgctct gctgctgtgg 780  
 ctgccggtct gcctgctct cttgctggtt gtactggcct tcatgcccac agatgtgegc 840  
 agcatggcct cctcttacct gtaaantagat aaataggtct tgcccagatt ttctgtgttt 900  
 tgcagctgca ggattcgtcc taagacgagt catgagtgta atgtgaagca acttctccag 960

ggatagatct caaccaagtt tggtagccat acgaagttat tgactggaat ttagaacata 1020

tagttgtgca caatttcgaa catatcttgt agtggagagc gggccga 1067

<210> 6

<211> 105

<212> PRT

<213> 玉米

<400> 6

Met Ala Ser Arg Ser Ser Ala Met Glu Gly Gly Ala Ala Ile Gln Arg  
1 5 10 15

Arg Asn Ala Val Lys Arg His Leu Gln Gln Arg Gln Gln Glu Ala Asp  
20 25 30

Phe Leu Asp Lys Lys Val Ile Ala Ser Thr Tyr Phe Ser Ile Gly Ala  
35 40 45

[0006]

Phe Leu Val Leu Ala Cys Leu Thr Val Ser Leu Leu Ile Leu Pro Leu  
50 55 60

Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Ser Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
65 70 75 80

Val Cys Leu Leu Val Leu Leu Val Val Leu Ala Phe Met Pro Thr Asp  
85 90 95

Val Arg Ser Met Ala Ser Ser Tyr Leu  
100 105

<210> 7

<211> 152

<212> PRT

<213> 玉米

<400> 7

Met Cys Arg Gly Leu Pro Thr Pro Ala Pro Ala Pro Ala Leu Gln Phe  
1 5 10 15

Gln Ser Gln Asp Cys Ser Arg Gln Gln Arg Gly Thr Thr Gln Ala Pro  
20 25 30

Pro Gly Arg Ala Ser Glu Ser Val Arg Ala Cys Met Ala Ala Glu Arg  
35 40 45

Lys Ala Ala Ser Arg Pro Ala Ala Cys Gly Arg Met Arg Gly Ala Glu  
50 55 60

Gly Ala Lys Pro Arg Gly Arg Gln Ala Lys Ala Ala Arg Ala Pro Pro  
65 70 75 80

[0007]

Gly Gln Gly Tyr Phe Thr Ala Gly Leu Ala Ala Leu Phe Leu Cys Leu  
85 90 95

Thr Thr Leu Leu Val Phe Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro  
100 105 110

Pro Pro Leu Leu Leu Leu Val Pro Val Gly Leu Met Ala Val Leu  
115 120 125

Leu Ala Leu Ala Leu Val Pro Ser Asp Gly Arg Ala Ala Ala Ala Ala  
130 135 140

Val Ala Ser Ser Ser Cys Val Cys  
145 150

<210> 8

<211> 119  
 <212> PRT  
 <213> 玉米

<400> 8

Met His Leu Leu Asp Asp Leu Arg Gln Asp Arg Gly Gly Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

His Thr Gly Ser Arg Ser Arg Lys Pro Pro Pro Pro Leu Ala Ala Ala  
 20 25 30

Ala Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Ala Gly Ser Ser Thr Ala Ala Thr  
 35 40 45

Ala Thr His Leu Gly Pro Glu Ala Ala Ala Leu Leu Ala Cys Val Thr  
 50 55 60

[0008]

Ala Thr Leu Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro  
 65 70 75 80

Pro Pro Leu Leu Leu Leu Val Pro Val Ala Ile Phe Ala Val Leu Leu  
 85 90 95

Leu Leu Val Leu Leu Pro Ser Asp Ala Arg Ala Ala Val Ala Thr Pro  
 100 105 110

Thr Ser Ser Ala Ser Tyr Leu  
 115

<210> 9  
 <211> 64  
 <212> PRT  
 <213> 玉米

<400> 9

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

Leu Cys Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Leu Phe  
20 25 30

Leu Leu Phe Val Pro Val Val Met Met Leu Leu Leu Phe Ser Leu Val  
35 40 45

Phe Phe Pro Ser Asn His Cys Pro Cys Ser Ser Pro Thr Phe Thr Gln  
50 55 60

<210> 10

<211> 106

<212> PRT

<213> 玉米

[0009]

<400> 10

Met Pro Ser Ser Ser Glu Thr Pro Pro Pro Pro Val Gly Arg Thr Ala  
1 5 10 15

Ala His Gly Gly Arg His Lys His Asp Asp Asp Asp Pro Ser Thr Pro  
20 25 30

Arg Gly Phe Cys Ala Lys Tyr Phe Ser Arg Glu Ser Cys Leu Leu Leu  
35 40 45

Ala Leu Val Thr Val Leu Leu Val Val Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro  
50 55 60

Leu Pro Ala Pro Pro Leu Ala Leu Leu Leu Val Pro Val Ala Met Leu  
65 70 75 80

Ala Val Leu Leu Val Leu Ala Leu Met Pro Ala Ala Ala Gly Gly Arg  
 85 90 95

Asn Glu Ala Val Asp Pro Ala Ser Tyr Leu  
 100 105

<210> 11  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 玉米

<400> 11

Met Met Leu His Cys Thr Phe Ala Ile Ser Glu Ala Pro Ala Arg Ala  
 1 5 10 15

Leu Ala Leu Gly Gln Val Ser Val Met Arg Ala Met Pro Gln Glu Glu  
 20 25 30

[0010]

Glu Ala Ala Val Ala Thr Thr Thr Met Ala Gly Gly Lys Val Ala Ala  
 35 40 45

Leu Leu Ala Thr Ala Ala Ala Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu  
 50 55 60

Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Thr Gln Leu Leu Phe Val Pro Val Val  
 65 70 75 80

Leu Leu Leu Leu Val Ala Ser Leu Ala Phe Cys Pro Ala Ala Thr Ser  
 85 90 95

Ser Pro Ser Pro Met His Ala Ala Asp His Gly Ser Phe Gly Thr Thr  
 100 105 110

Gly Ser Pro His Leu Cys

115

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 玉米

&lt;400&gt; 12

Met Pro Val Ala Ser Ser Leu Met Ala Met Glu Leu Glu Thr Asp Gln  
 1                    5                    10                    15

Leu Ala Trp Ala Glu Gln Gln Arg Gln Gln Asn Arg Arg Gln Thr Met  
                   20                    25                    30

Val Val Cys Arg Lys Ser Asp Ala Ala Val Ala Lys Gly Gln Gln Arg  
           35                    40                    45

[0011]

Gln Asn Ala Ser Pro Pro Ser Pro Lys Pro Pro Pro Ala Gly Gly Leu  
       50                    55                    60

Ser Ala Glu Ala Phe Leu Val Leu Ala Cys Val Ala Val Ser Leu Ile  
 65                    70                    75                    80

Val Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Ser Pro Pro Pro Pro Leu Leu  
                   85                    90                    95

Leu Leu Val Pro Val Cys Leu Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ala Thr  
                   100                    105                    110

Phe Val Pro Ser Asp Val Arg Ser Met Pro Ser Ser Asn Leu  
           115                    120                    125

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 103

<212> PRT

<213> 水稻(Oryza sativa)

<400> 13

Met Lys Thr Thr Leu Ala Val Val Glu Gly Thr Arg Ala His Ile Val  
1 5 10 15

Asn Leu Ala Asn Ser Arg Ala Ser Arg Leu Asn Glu Arg Leu Ile Asp  
20 25 30

Pro Ala Ile Glu Ser Arg Ser Ile Ala Gly Ala Thr Pro Ala Pro Phe  
35 40 45

Glu Met Glu Thr Ala Met Val Leu Leu Leu Leu Ala Leu Val Ala Phe  
50 55 60

[0012]

Leu Leu Cys Tyr Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Ser Pro Pro  
65 70 75 80

Ala Leu Phe Ile Trp Ile Pro Val Phe Met Leu Leu Leu Leu Phe Ala  
85 90 95

Leu Ala Leu Phe Pro Val Gln  
100

<210> 14

<211> 68

<212> PRT

<213> 水稻

<400> 14

Met Val Met Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Val Leu Leu Leu Leu Leu  
1 5 10 15



Pro Leu Leu Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Ser Leu Leu Leu Leu  
 20 25 30

Val Pro Val Val Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ala Phe Leu Pro  
 35 40 45

Asn Arg Asp Val Val Val Tyr Gly Gln Gln Pro Ala Ala Asp Gln Phe  
 50 55 60

Phe Phe Arg Gln  
 65

<210> 15

<211> 147

<212> PRT

<213> 水稻

[0013]

<400> 15

Met Ser Phe Ala Ile Arg Ser Ser Glu Pro Glu Phe Trp Phe Leu Ile  
 1 5 10 15

Pro Ser Glu Glu Ala Ala Val Ala Val Ala Ala His Arg Leu Val Val  
 20 25 30

Met Asp Gln Arg Arg Ser Gly Ser Ala Tyr Arg Pro Lys Arg Thr His  
 35 40 45

Met Ala Ala Ala Glu Asp Glu His Arg Arg Pro Gly Thr Ser Ser Arg  
 50 55 60

Arg Arg Val Ala Pro Thr Pro Thr Thr Gln Thr Gln Thr Gln Thr Ala  
 65 70 75 80

Pro Gly Tyr Phe Thr Val Glu Leu Val Met Ala Phe Val Cys Val Thr

85

90

95

Ala Ser Leu Val Leu Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro  
 100 105 110

Pro Ser Leu Leu Leu Val Val Pro Val Cys Leu Leu Ala Val Leu Val  
 115 120 125

Ala Met Ala Phe Val Pro Leu Asp Ala Gln Ser Asn Val Val Gly Ser  
 130 135 140

Ser Cys Leu  
 145

[0014]

<210> 16  
 <211> 130  
 <212> PRT  
 <213> 水稻

<400> 16

Met Glu Lys Gly Arg Gly Lys Ala Cys Gly Gly Gly Ser Thr Ala Pro  
 1 5 10 15

Pro Pro Pro Pro Pro Ser Ser Ser Gly Lys Ser Gly Gly Gly Gly Gly  
 20 25 30

Ser Asn Ile Arg Glu Ala Ala Ala Ser Gly Gly Gly Gly Gly Val Trp  
 35 40 45

Gly Lys Tyr Phe Ser Val Glu Ser Leu Leu Leu Leu Val Cys Val Thr  
 50 55 60

Ala Ser Leu Val Ile Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro  
 65 70 75 80

Pro Ser Met Leu Met Leu Val Pro Val Ala Met Leu Val Leu Leu Leu  
 85 90 95

Ala Leu Ala Phe Met Pro Thr Thr Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ala Gly  
 100 105 110

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Asn Gly Ala Thr Thr Gly His Ala Pro  
 115 120 125

Tyr Leu  
 130

<210> 17

<211> 127

<212> PRT

<213> 水稻

[0015]

<400> 17

Met Arg Gly Val Ile Leu Leu Arg Tyr Glu Glu Asp Ala Met Ala Gly  
 1 5 10 15

His Arg Ser Thr Ala Ala Ala Thr Gly Gly Arg Leu Tyr Gly Gln Val  
 20 25 30

Gly Val Lys Arg Arg Val Val Glu Glu Thr Ala Ala Ala Val Glu Val  
 35 40 45

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Tyr Leu Gly Val Glu Ala Ala Val Leu Leu  
 50 55 60

Gly Val Val Thr Ala Thr Leu Leu Val Leu Pro Leu Leu Leu Pro Pro  
 65 70 75 80

Leu Pro Pro Pro Pro Pro Met Leu Leu Leu Val Pro Val Ala Ile Phe  
 85 90 95

Ala Val Leu Leu Leu Leu Val Leu Leu Pro Ser Asp Ala Lys Ser Ile  
 100 105 110

Ala Ala Ala Gly Arg Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Leu  
 115 120 125

<210> 18

<211> 105

<212> PRT

<213> 水稻

<400> 18

[0016] Met Gln Glu Glu Ala Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ser Pro Val  
 1 5 10 15

Met Asp Gly Gly Lys Ala Met Ala Val Leu Leu Ala Val Ala Ala Ala  
 20 25 30

Val Leu Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Pro Ser Leu Leu Leu Leu  
 35 40 45

Pro Val Val Leu Leu Leu Leu Val Val Ser Leu Ala Phe Phe Pro Ala  
 50 55 60

Ala Gly Ser Asp Gly Val Val Ala Ala Ala Ala Val Ala Gly Thr Tyr  
 65 70 75 80

Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ala Arg Ser Ser Pro Pro Pro Ser Ser  
 85 90 95

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Arg Gln Leu  
100 105

<210> 19

<211> 105

<212> PRT

<213> 水稻

<400> 19

Met Glu Gly Val Gly Ala Arg Gln Arg Arg Asn Pro Leu Ile Pro Arg  
1 5 10 15

Pro Asn Gly Ser Lys Arg His Leu Gln His Gln His Gln Pro Asn Ala  
20 25 30

Ala Glu Lys Lys Thr Ala Ala Thr Ser Asn Tyr Phe Ser Ile Glu Ala  
35 40 45

[0017]

Phe Leu Val Leu Val Phe Leu Thr Met Ser Leu Leu Ile Leu Pro Leu  
50 55 60

Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Ser Leu Leu Leu Leu Pro  
65 70 75 80

Val Cys Leu Leu Ile Leu Leu Val Val Leu Ala Phe Met Pro Thr Asp  
85 90 95

Val Arg Ser Met Ala Ser Ser Tyr Leu  
100 105

<210> 20

<211> 120

<212> PRT

<213> 水稻

<400> 20

Met Glu Glu Gln Met Phe Arg Glu Gln Gln Met Gln Arg Gly Gly Arg  
1                    5                    10                    15

His His Gln His His Thr Thr Arg Glu Gln Glu Gln Gln Gln Lys Gln  
                  20                    25                    30

Gln Gln Arg Arg Arg Leu Met Asn Asn Ala Thr Asn Gly Gly Gly Gly  
                  35                    40                    45

Asp Gly Gly Ser Arg Cys Tyr Phe Ser Thr Glu Ala Ile Leu Val Leu  
50                    55                    60

Ala Cys Val Thr Val Ser Leu Leu Val Leu Pro Leu Ile Leu Pro Pro  
65                    70                    75                    80

[0018]

Leu Pro Pro Pro Pro Thr Leu Leu Leu Leu Leu Pro Val Cys Leu Leu  
                  85                    90                    95

Ala Leu Leu Val Val Leu Ala Phe Met Pro Thr Asp Met Arg Thr Met  
                  100                    105                    110

Ala Ser Ser Tyr Phe Phe Cys Leu  
                  115                    120

<210> 21

<211> 96

<212> PRT

<213> 大豆(Glycine max)

<400> 21

Met Met Met Val His Pro Arg Asp Gln Val Gly Gly Glu Thr His Lys  
1                    5                    10                    15

Asn Leu Val Glu Pro Asn Val Ala Ala Ser Lys Lys Ala Arg Asn Cys  
 20 25 30

Ala Cys Met Val Ser Tyr Ser Val Leu Ile Leu Ala Leu Leu Thr Leu  
 35 40 45

Ser Ile Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro  
 50 55 60

Leu Leu Leu Leu Phe Val Pro Val Phe Ile Leu Val Val Leu Phe Phe  
 65 70 75 80

Leu Ala Phe Ser Pro Ser Thr Leu Pro Asn Met Ala Val Leu Thr Ser  
 85 90 95

[0019] <210> 22  
 <211> 96  
 <212> PRT  
 <213> 大豆

<400> 22

Met Met Met Val His Pro Arg Asp Gln Val Gly Gly Asp Thr His Lys  
 1 5 10 15

Asn Leu Val Ala Pro Asn Val Ala Ala Ser Lys Lys Ala Arg Asn Cys  
 20 25 30

Ala Cys Met Val Ser Tyr Ser Val Leu Ile Leu Ala Leu Leu Thr Leu  
 35 40 45

Phe Ile Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Ala Pro Pro  
 50 55 60

Leu Leu Leu Leu Phe Val Pro Val Phe Leu Leu Val Val Leu Phe Phe  
 65 70 75 80

Leu Ala Phe Ser Pro Ser Thr Leu Pro Asn Met Ala Val Leu Thr Ser  
 85 90 95

<210> 23

<211> 102

<212> PRT

<213> 大豆

<400> 23

Met Ala Arg Cys Phe Gly Leu Gly Ser Val Leu Val Leu Ala Ala Leu  
 1 5 10 15

Ala Ala Ser Met Val Val Leu Pro Leu Met Leu Pro Pro Leu Pro Pro  
 20 25 30

[0020]

Pro Pro Leu Val Leu Leu Phe Phe Pro Val Gly Ile Met Ala Ala Leu  
 35 40 45

Met Leu Leu Ala Phe Ser Pro Ser Asp Glu Asn Gly Val Val Tyr Ala  
 50 55 60

Ser Thr Arg Arg Trp Trp Glu Thr Gly Ser Ala Gly Ala Thr Phe Trp  
 65 70 75 80

Gly Phe Leu Lys Val Pro Met Gly Leu Leu Arg Phe Met Phe Phe Phe  
 85 90 95

Phe Phe Lys Leu Arg Cys  
 100

<210> 24



<211> 66

<212> PRT

<213> 大豆

<400> 24

Met Ala Arg Cys Phe Gly Leu Gly Ser Val Leu Val Leu Ala Ala Leu  
1                   5                   10                   15

Ala Ala Ser Met Val Val Leu Pro Leu Met Leu Pro Pro Leu Pro Pro  
                  20                   25                   30

Pro Pro Leu Val Phe Phe Phe Phe Pro Val Gly Ile Met Ala Ala Leu  
                  35                   40                   45

Met Leu Leu Val Phe Ser Pro Ser Asp Gln Asn Gly Val Val Tyr Ala  
                  50                   55                   60

[0021]

Thr Thr

65

<210> 25

<211> 90

<212> PRT

<213> 大豆

<400> 25

Met Ser Ser Trp Leu Ile His Tyr Asn Lys Arg Phe Ile Ile Ser Ile  
1                   5                   10                   15

Ser Leu Ala Phe Met Leu Arg Leu Phe Gly Phe Lys Ser Thr Met Phe  
                  20                   25                   30

Met Val Val Leu Thr Ile Ala Ile Leu Val Leu Pro Leu Met Leu Pro  
                  35                   40                   45

Pro Leu Pro Pro Pro Pro Met Ile Leu Met Leu Val Pro Leu Val Ile  
 50 55 60

Met Leu Leu Leu Val Lys Leu Ala Leu Tyr Ser Lys His Gly Pro Ala  
 65 70 75 80

Asp Val Ile Tyr Gln Cys Asn Phe Thr Trp  
 85 90

<210> 26

<211> 130

<212> PRT

<213> 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)

<400> 26

[0022] Met Ile Arg Glu Ile Ser Asn Leu Gln Lys Asp Ile Ile Asn Ile Gln  
 1 5 10 15

Asp Ser Tyr Ser Asn Asn Arg Val Met Asp Val Gly Arg Asn Asn Arg  
 20 25 30

Lys Asn Met Ser Phe Arg Ser Ser Pro Glu Lys Ser Lys Gln Glu Leu  
 35 40 45

Arg Arg Ser Phe Ser Ala Gln Lys Arg Met Met Ile Pro Ala Asn Tyr  
 50 55 60

Phe Ser Leu Glu Ser Leu Phe Leu Leu Val Gly Leu Thr Ala Ser Leu  
 65 70 75 80

Leu Ile Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Phe Met  
 85 90 95

Leu Leu Leu Val Pro Ile Gly Ile Met Val Leu Leu Val Val Leu Ala  
 100 105 110

Phe Met Pro Ser Ser His Ser Asn Ala Asn Thr Asp Val Thr Cys Asn  
 115 120 125

Phe Met  
 130

<210> 27

<211> 135

<212> PRT

<213> 拟南芥

<400> 27

Met Ile Arg Glu Phe Ser Ser Leu Gln Asn Asp Ile Ile Asn Ile Gln  
 1 5 10 15

[0023]

Glu His Tyr Ser Leu Asn Asn Asn Met Asp Val Arg Gly Asp His Asn  
 20 25 30

Arg Lys Asn Thr Ser Phe Arg Gly Ser Ala Pro Ala Pro Ile Met Gly  
 35 40 45

Lys Gln Glu Leu Phe Arg Thr Leu Ser Ser Gln Asn Ser Pro Arg Arg  
 50 55 60

Leu Ile Ser Ala Ser Tyr Phe Ser Leu Glu Ser Met Val Val Leu Val  
 65 70 75 80

Gly Leu Thr Ala Ser Leu Leu Ile Leu Pro Leu Ile Leu Pro Pro Leu  
 85 90 95

Pro Pro Pro Pro Phe Met Leu Leu Leu Ile Pro Ile Gly Ile Met Val

100

105

110

Leu Leu Met Val Leu Ala Phe Met Pro Ser Ser Asn Ser Lys His Val  
 115 120 125

Ser Ser Ser Ser Thr Phe Met  
 130 135

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 88

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 拟南芥

&lt;400&gt; 28

Met Arg Val His Asp Gln Arg Leu Arg Phe Asp Val Thr Pro Lys Pro  
 1 5 10 15

[0024]

Met Gly Leu Asn Gly Ser Ser Leu Ile Thr Ala Arg Ser Val Ala Leu  
 20 25 30

Leu Leu Phe Leu Ser Leu Leu Leu Leu Ile Leu Pro Pro Phe Leu Pro  
 35 40 45

Pro Leu Pro Pro Pro Pro Ala Thr Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu  
 50 55 60

Met Ile Leu Leu Ile Phe Leu Ala Phe Ser Pro Ser Asn Glu Pro Ser  
 65 70 75 80

Leu Ala Val Glu Pro Leu Asp Pro  
 85

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 146

<212> PRT

<213> 高粱(Sorghum bicolor)

<400> 29

Met Ser Thr Gly Arg Pro Glu Asp Ile Gln Glu Leu Ile Asn Ser Ala  
1 5 10 15

Thr Ser Ser Pro Asn Arg Thr Ser Pro Ser Ala Ser Pro Ser Asp Met  
20 25 30

Glu Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser Ser Pro Arg Ala Ser Thr Ser Asp  
35 40 45

Arg Arg Leu Glu Arg Ala Ala His Ser His Arg Glu Glu Trp Glu Pro  
50 55 60

[0025] Ala Ala Ala Ala Ser Gly Asp Gly Gly Thr Gly Ser Leu Trp Ser Arg  
65 70 75 80

Tyr Phe Ser Leu Pro Val Leu Leu Leu Val Gly Val Thr Ala Ser Leu  
85 90 95

Val Ile Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Ser Met  
100 105 110

Leu Met Leu Val Pro Val Ala Met Leu Val Leu Leu Leu Val Leu Ala  
115 120 125

Phe Met Pro Thr Ser Ser Val Arg Ala Gly Thr Gly Thr Gly Pro Thr  
130 135 140

Tyr Met  
145

<210> 30

<211> 107

<212> PRT

<213> 高粱

<400> 30

Met Ala Ser Arg Ser Ser Ala Leu Glu Gly Gly Gly Ala Ala Ile Gln  
1                   5                   10                   15

Arg Arg Asn Asn Ala Val Lys Arg His Leu Gln Gln Arg Gln Gln Glu  
                  20                   25                   30

Ala Asp Phe His Asp Lys Lys Val Ile Ala Ser Thr Tyr Phe Ser Ile  
          35                   40                   45

Gly Ala Phe Leu Val Leu Ala Cys Leu Thr Phe Ser Leu Leu Ile Leu  
      50                   55                   60

[0026]

Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Ser Leu Leu Leu Trp  
65                   70                   75                   80

Leu Pro Val Cys Leu Leu Val Leu Leu Val Val Leu Ala Phe Met Pro  
                  85                   90                   95

Thr Asp Val Arg Ser Val Ala Ala Ser Tyr Leu  
          100                   105

<210> 31

<211> 88

<212> PRT

<213> 高粱

<400> 31

Asn Ala Val Lys Arg His Leu Gln Gln Arg Gln Gln Glu Ala Asp Phe

1	5	10	15
His Asp Lys Lys Val Ile Ala Ser Thr Tyr Phe Ser Ile Gly Ala Phe			
	20	25	30
Leu Val Leu Ala Cys Leu Thr Phe Ser Leu Leu Ile Leu Pro Leu Val			
	35	40	45
Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Ser Leu Leu Leu Trp Leu Pro Val			
	50	55	60
Cys Leu Leu Val Leu Leu Val Val Leu Ala Phe Met Pro Thr Asp Val			
65	70	75	80
Arg Ser Met Ala Ser Ser Tyr Leu			
	85		

[0027]

<210>	32
<211>	58
<212>	PRT
<213>	高粱
<400>	32
Met Met Leu Leu Val Ala Thr Val Ile Leu Leu Cys Leu Pro Leu Val	
1	5 10 15
Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Leu Phe Leu Leu Phe Val Pro Val	
	20 25 30
Val Met Met Leu Leu Leu Phe Ser Leu Val Leu Phe Pro Ser His His	
	35 40 45
Cys Ala Cys Ser Ser Pro Thr Phe Thr Gln	
	50 55

<210> 33

<211> 148

<212> PRT

<213> 高粱

<400> 33

Met Ser Phe Val Ala Gly Ser Ser Glu Ala Asp Gln Leu Trp Phe Leu  
1                   5                   10                   15

Ile Pro Ser Glu Gln Ala Arg Ala His Ala Val Gln Pro His His Pro  
                  20                   25                   30

Leu Ala Met Asp Arg Arg Ser Ser Ala Arg Arg Arg Gly Asp Pro His  
                  35                   40                   45

[0028] Pro His Arg Arg Gly Ala Met His Gly Ala Ala Glu Gln Gln Lys Gln  
                  50                   55                   60

Gln Gln Gln Arg Gly Arg Pro Gln Gly Thr Arg Ala Ala Pro Pro Val  
65                   70                   75                   80

Pro Pro Gly Tyr Phe Thr Ala Glu Leu Val Leu Ala Phe Leu Phe Val  
                  85                   90                   95

Ala Val Ser Leu Ala Phe Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Ser Pro  
                  100                   105                   110

Pro Pro Phe Leu Leu Leu Leu Val Pro Val Gly Leu Leu Ala Val Leu  
                  115                   120                   125

Leu Ala Leu Ala Phe Val Pro Leu Asp Ala His Ser His Leu Val Val  
                  130                   135                   140



Gly Ser Ser Arg  
145

<210> 34  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> 高粱

<400> 34

Met Ala Glu Glu Arg Lys Gln Ala Gly Ser Arg Trp Pro Ala Gly Gly  
1                           5                           10                           15

Ser Gly Gly Gly Arg Met Arg Asp Ala Glu Gly Gly Ser Gly Lys Met  
                          20                           25                           30

[0029] Arg Gly Arg Gln Ala Thr Lys Ala Arg Pro Val Val Leu Ala Pro Pro  
                          35                           40                           45

Gly Gln Gly Tyr Phe Thr Ala Gly Leu Ala Ala Leu Phe Leu Cys Leu  
          50                           55                           60

Thr Ala Leu Leu Val Phe Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro  
65                           70                           75                           80

Pro Pro Tyr Leu Leu Leu Leu Val Pro Val Gly Leu Met Ala Val Leu  
                          85                           90                           95

Leu Ala Leu Val Ala Leu Val Pro Ser Asp Gly Arg Ala Ala Thr Ala  
                          100                           105                           110

Ala Val Ala Ser Ser Cys Val Cys  
          115                           120

<210> 35  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> 高粱

<400> 35

Met Arg Arg Ala Val Pro Gln Glu Glu Ala Val Ala Ala Ala Thr Thr  
 1                   5                   10                   15

Thr Thr Met Asp Gly Gly Lys Val Val Ala Leu Leu Ala Thr Ala Ala  
                   20                   25                   30

Ala Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro  
                   35                   40                   45

Pro Thr Gln Leu Leu Phe Val Pro Val Val Met Leu Leu Leu Val Ala  
                   50                   55                   60

[0030]

Ser Leu Ala Phe Cys Pro Thr Ala Ala Ser Ser Gly Gly Gly Gly Lys  
 65                   70                   75                   80

Ser Lys Leu Ala Asp Ala Asp His Gly Ser Ser Phe Arg Thr Thr Gly  
                   85                   90                   95

Ser Pro His Leu Arg  
                   100

<210> 36  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> 高粱

<400> 36

Met Pro Ser Pro Ser Gln Thr Ser Pro Pro Val Gly Arg Arg Thr Ala  
 1                   5                   10                   15

His Gly Gly Trp His Lys His Asp Asp Pro Ser Thr Pro Arg Gly Phe  
 20 25 30

Cys Thr Lys Tyr Phe Ser Val Glu Ser Cys Leu Leu Leu Ala Leu Val  
 35 40 45

Ala Val Leu Leu Leu Val Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro  
 50 55 60

Pro Pro Leu Ala Val Leu Leu Val Pro Val Ala Met Leu Ala Val Leu  
 65 70 75 80

Leu Val Leu Ala Leu Met Pro Val Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Arg  
 85 90 95

[0031] Asn Glu Val Val Asp Pro Ala Ser Tyr Leu  
 100 105

<210> 37

<211> 72

<212> PRT

<213> 高粱

<400> 37

Met Glu Arg Ser Met Val Thr Met Leu Leu Leu Ala Thr Ala Ala Val  
 1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Pro Ser Ser Leu Pro Pro Pro  
 20 25 30

Pro Ser Leu Leu Leu Val Val Pro Val Val Leu Leu Leu Ser Leu Leu  
 35 40 45

Ser Leu Ala Phe Leu Pro Thr Arg Asp Asp Asp Asp Ala Ile Ala Ile  
 50 55 60

Tyr Gly Ser Leu Arg Ser Val Gln  
 65 70

<210> 38  
 <211> 13  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列引物

<220>  
 <223> 引物

<400> 38  
 cgctagcccc aac 13

[0032] <210> 39  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列引物

<220>  
 <223> 引物

<400> 39  
 cacataaac acaactttga tgeccac 27

<210> 40  
 <211> 459  
 <212> DNA  
 <213> 玉米

<400> 40  
 atgtgcccgg gcctcccaac tccagctcea getccagegc ticaatttca gtcccaggat 60

tgcagtcggc agcagegagg tactaccocaa gcaccgcccg gccgagcgag cgagtcctgt 120

cgtgcgtgca tggcagcaga gaggaaggcg gcctcccgcc cggccgctg cgggcgaatg 180

	cgcgcgccg aggglgccaa gccgcggggc cgtcaggcaa aggcagcgcg ggcaccaccg	240
	ggccaggggt acttcaaggc ggggctggcg gcgctgttcc ttgacctac caegetgctc	300
	gtgttctgc ctctctgtct gccgcgctg ccgccgcgcg cgttgetgt getgetctg	360
	cccgtgggoc tcatgctgt actgettgog ctggcctcg tgcgctcga cggccgggoc	420
	gccgcgcgcg ccgtccttc ttcactgtgc gtgtgetga	459
	<210> 41	
	<211> 360	
	<212> DNA	
	<213> 玉米	
	<400> 41	
	atgcacctgc tgcagacct ccgccaagac cgcggcgcg cgcccgcca caccggcage	60
	cgcagtcga agccgcccc gcccttgcg gccgcgcgcg ccgcgcgcg gggggctccg	120
[0033]	ggggctctt caaccgcgc caccgcaacc cactgggccc cggaggcgge ggcctctctg	180
	gcgtgcgca egccaagct getgetctt ccctggctc tgcgccccct gccgcgcgcg	240
	ccgcgctcc tctctctgt gccgctgccc atcttgcgcg tctctact cctctctc	300
	ctccccccg acgcccgcg cgcgctgccc acgccaact cctcgcctc ctactttag	360
	<210> 42	
	<211> 195	
	<212> DNA	
	<213> 玉米	
	<400> 42	
	atgagcaaga gactactgat gatgttctg gcggcgacag tgatctctct gtgcctgcg	60
	ttgtctctc cacccttcc gccaccacc ctgtttctc tctctctcc tctgtctatg	120
	atgtctctc tctctctct ggtttctc cctctaac accgtctatg ctctctcc	180
	acctcactc agtaa	195

<210> 43  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> 玉米  
  
 <400> 43  
 atgcegtcat cgtcgcagac accgcegcg cggctegga ggactgetgc tcacggcggc 60  
 eggcacaage acgacgatga cgacccaage acgcegagg gcttctgegc caagtacttc 120  
 tccaggagat cgtgcctcct getegccctc gtcacegtgc tgettggtgt getcccctc 180  
 gtcttgcgc cgtcccggc gccgccgtt gccctgtgc tegtccggt cgaatgttg 240  
 geggtgetgc tgggtctgc getcatgcg gggcggeag gtggccgaa cgaggetgtg 300  
 gaccggcgt cgtacttgta g 321

[0034]

<210> 44  
 <211> 357  
 <212> DNA  
 <213> 玉米  
  
 <400> 44  
 atgatgetgc actgeacatt tctatatct gaggtcctg cgcgcctt gcccttggc 60  
 caggtgtctg tcatgctggc gatgcgcag gaagaagaag ccgctgtgc gacgacgac 120  
 atggccgggg geaaggtgc gccctgtct gccacggcg ccgctgtct getgtctct 180  
 ccgtggcgc tgcgccctt gccgccctt cccacgcgc tttgttctt cccctgtgc 240  
 ttgtctctt tctgtgctc cctgcctt gcgccgcgc cgacctctc gccctgcgc 300  
 atgatgcgc ccgaccacgc gctgttcgg accactgat caccgcacct atgttga 357

<210> 45  
 <211> 381  
 <212> DNA  
 <213> 玉米

<400> 45  
 atgcegggttg ctfcgctcgt aatggcgatg gagttggaga eggaccaact cgcctgggeg 60  
 gagcagcagc ggcagcagaa taggaggcag accatggteg tetgcagaaa gagegacgca 120  
 geggtggcca aagggcagca gcgtcagaae gcttcgcgcg cgtcgcccaa gcctccgccc 180  
 gegggcgggc tcagcgcgga ggcgttcttg gttctggcgt gcgtcgcctg gtcctcctc 240  
 gtctgcgcgc tggctctgcc gccctgtctg cccccgcgcg ctctgtctgt getgggtgag 300  
 gtgtgcctgc tctgtctct cgcgcgcctc gccaccttg tgcctcgga tgcaggagc 360  
 atgccatcct ccaacttgta a 381

<210> 46  
 <211> 312  
 <212> DNA  
 <213> 水稻

[0035]

<400> 46  
 atgaagacga ctttgctgt ggtggaagg accaggcac atattgttaa cctggcgaat 60  
 tcaaggcgt ctgatgaa cgaacggctg atgatccag caatcgatc tcatcgatt 120  
 gccggagcaa cacctgcgcg gttgagatg gagaaggcaa tggctctct getcttcca 180  
 ctggctcct tcttctctg ctacctctt gttctaccac cgtgcgcgcg ttgcctccg 240  
 gccctgtca tctggatacc ggtgttaig ctctctctg tcttcctct tgcctcttc 300  
 cctgttcagt aa 312

<210> 47  
 <211> 207  
 <212> DNA  
 <213> 水稻

<400> 47  
 atggatgacg ttctctctg tgcggcgcg gtctctctg tctctctcc getctctc 60

	ccgcegtgc cgccecgcc gtcgtgctg ctgctgtcc cgtctgtct gctgctggc	120
	ctctttccc tegtittct cccaacegc gacgtctgc tctacggaca gcagccagct	180
	gaggatcaat tcttttccg acaatga	207
	<210> 48	
	<211> 444	
	<212> DNA	
	<213> 水稻	
	<400> 48	
	atgagctttg caatcgcag ctctgagcct gaattctgt tcttgatccc gtcggaagag	60
	gcagcagtag cagtcgcag acatcgctg gtggtgatgg atcagaggag aagcggatca	120
	gcttategtc ctaagcggac acatattggc gggcggagg acgagcaccg gggcggggg	180
	acgtcagacc gcgcgggt ggcgcgacg ccgacgacg agacgcagc gcagacggc	240
[0036]	ccggetact tcaccgtcga gctggtgat gegttctct gctgaccgc gctctctgt	300
	ctgtcgcgc tegtctgcc gccgtgcgc ccgcgcctt cgtctctct ggtggtgcg	360
	gtgtcctgc tcgcctctt ggtggcatg gegttctcc cgtctcacc gcagagcaac	420
	gtctcggct cgtttgctt gtag	444
	<210> 49	
	<211> 537	
	<212> DNA	
	<213> 水稻	
	<400> 49	
	atgtaactgt tgagcccaag aatggcgac gaggaggacg aacaggagg aatccaggag	60
	ctgatcagcg acgacgacc gcccaatctc aagtggcat cctgcgccc tgcagccagc	120
	agcagcagca gcagcggcag cgacatggag aagggaagag gtaaagcctg cggcggcggg	180
	agtacggcgc cgcgcgcc cccgcgtcg tcgtcaggt aatccggcgg cggcggcggc	240



	agcaatatca gggaggeggc ggctagcggc ggcggcggcg gcgtgtgggg caagtacttc	300
	tcggtggagt cgetgctcct gctggtgtgc gtgacggcgt cgctggtgat cctcecgctc	360
	gtgetgcegc cgetgceccc gccgcgctcg atgctgatgc tgggtcegggt ggcgatgetg	420
	gtgetgctgc tggcctggtc gttcatgccc acgacgacgt cgtcgtcgtc gtcccgccgc	480
	ggcggcggcg gcggcgcccg caatggggcg acgacgggac atgctcccta cttgtag	537
	<210> 50	
	<211> 384	
	<212> DNA	
	<213> 水稻	
	<400> 50	
	atcgaggag teatettget gcgttacgag gaggacgcca tgcccgggca caggctccag	60
	gcggcggcga cgggaggag attgtacgga cagggtggag tgaagcggag agtgggtggag	120
[0037]	gagacggcgg cggcggtgga agtaggcgga ggaggaggag ggtacttggg ggtggaggcg	180
	gcggtgetgc tcggggtggt gacggcgaac ctgctggtgc tcccgetget getgcccgcg	240
	ctgcgcgcgc ccccgcgat gctgetgetc gtcccctcg ccatcttgc cgtgetctc	300
	ctctcgtcc tgetgcectc cgacccaag tccatcgccg ccgetggccg accctctct	360
	tectectect cctectact gtag	384
	<210> 51	
	<211> 318	
	<212> DNA	
	<213> 水稻	
	<400> 51	
	atgaagaag aagcggcgtc gtcgtcgtcg tcgtcggcgt cgcgggtgat ggacgggggc	60
	aaggcgatgg cgggtgetget ggcgggtggcg gccgcggtgc tgetgctget cccgctcgtg	120
	ctgcgctcgc tgetgctget cctcccctg gtgctgtccc tgetggtggt tcccctgcc	180

	tttctccccc eggccggcag cgacggcgtc gtegcgcgcg ccgegglegc eggcacclac	240
	cagccgcgcg cgcctccgco tgcctggctg tcaccgcgcg cgtcgtcgtc gtcgtcatcg	300
	tgcctcgggc agetgtga	318
	<210> 52	
	<211> 318	
	<212> DNA	
	<213> 水稻	
	<400> 52	
	atggaaggtg taggtgctag gcagaggagg aaccctctga taccagacc aaacggttca	60
	aagaggcacc tgcagcatac gcatcagcca aatgctgcgc agaagaagac cgcgcgcaca	120
	tgaattact tcagtataga ggcgttcctc gtgcctgctt tctcaccat gtcattgctc	180
	atacttccat tgggtcttcc cccattgcct ccgcgcacc cgtctctctt gctctctcca	240
[0038]	gtctctctc tcactctctt ggttctctc gcttctctc caacggatgt gggagcatg	300
	gcttctctt acttctaa	318
	<210> 53	
	<211> 363	
	<212> DNA	
	<213> 水稻	
	<400> 53	
	atggaggaac agatgttcag agagcagcaa atgcagagag gtggaaggca tcactcagat	60
	cacaccacaa gggaacaaga acaacagcag aagcagcagc agcggcgccg gctgatgaac	120
	aatgcagcca acggcgccgg ccgcagcggc ggcagcaggt gctacttcag cacggagccc	180
	atctgggtgc tggcatgctt caccgtgctg ctgctggctc tgcctctcat cctgcgcgcg	240
	ctgcgcgcgc cgcgcagctt gctctctctg ctgcctgctt gcttctctgc gctctctctg	300
	gtctctctt tcactcacc tcacatgagg accatgcct ctctctactt ttttctctt	360

	tga	363
	<210> 54	
	<211> 291	
	<212> DNA	
	<213> 大豆	
	<400> 54	
	atgatgatgg tgcatectcg tgaatcaagta ggiggagaga cacacaagaa ttgggggag	60
	ccaaacgtgg cagcttctaa gaaagctaga aattgtgcac gcatggtaag ttactcggcg	120
	ttgatattgg ctctctctcac ttgttcatt ttgttctac ctttgggttt acctctctg	180
	cggcaccac ccttgttget tctctttgtt ccagtttca tcttgggtt tctcttttc	240
	ttggcctttt caccctccac actaccacac atggctgttc ttacatcatg a	291
	<210> 55	
	<211> 291	
	<212> DNA	
	<213> 大豆	
	<400> 55	
	atgatgatgg tgcatectcg tgaatcaagta ggiggagaca cacacaagaa ttgggtggcg	60
	ccaaacgtgg cagcttctaa gaaagctaga aattgtgcac gcatggtaag ttatcggcg	120
	ttgatattgg ctctctctcac ttgttcatt ttgttctac ctttgggttt acctctctg	180
	cggcaccac ccttgttget tctctttgtt ccagtttca tcttgggtt tctcttttc	240
	ttggcctttt caccctccac actaccacac atggctgttc ttacatcatg a	291
	<210> 56	
	<211> 312	
	<212> DNA	
	<213> 大豆	
	<400> 56	
	atggcgcggt gttttggttt aggttccgtt ctggttctgg cggecctcgc ggcctcctg	60

[0039]

	gtggttctgc cgtgatgct gccgccgctc ccgccgccgc cactagttct tctcttcttc	120
	cccgteggga tcatggcggc gctcatgtg ctccgcttct cgcctcaga tcaaacgge	180
	gtcgtttacg cgtcgacgta gegaaggtag tgggaaaccg gatcagccgg tgcacattt	240
	tggggtttct tgaaggctcc gatgggatig cttegtttca tgtttttttt tttttttaag	300
	ttacggtggt aa	312
	<210> 57	
	<211> 201	
	<212> DNA	
	<213> 大豆	
	<400> 57	
	atggccgctt gttccgctt aggttccgct ctggttctgg ccgctctcgc ggcctcagc	60
	gtggtctcgc cgttgatgct ccgccgctc ccgccgccgc cgtcgttttt ttttttttctc	120
[0040]	cccgteggga tcatggcggc gctcatgtg ctctgttctt cgcctcaga tcaaacgge	180
	gtcgtttacg ccaccacgta a	201
	<210> 58	
	<211> 273	
	<212> DNA	
	<213> 大豆	
	<400> 58	
	atgagctctt ggttgattca ctacaacaag agattcataa taagcctctc attagcgttt	60
	atgetaagge tttttggggt taaatcaacc atgttcattg ttgtctgac catagcaatc	120
	tgggtctcgc cctgatgct accacctctc cctcaaccac caatgattct tatgttggcg	180
	cctcttctga taatctctct tctggtgaaa ttgcttttgt attcacaaca tgccctgca	240
	gatgctattt atcagtgtaa ttttacttgg tag	273

<210> 59  
 <211> 393  
 <212> DNA  
 <213> 拟南芥  
  
 <400> 59  
 atgattcgag aaatctcaaa ettacaaaa gatattataa acattcaaga cagttattcg 60  
 aacaaccgag tcatggacgt cggaagaaac aaccggaaaa acatgagctt tgaagttcg 120  
 ceggagaaaa gcaagcaaga gttacggcgg agttctcgg cgcagaaaag gatgatgate 180  
 ceggogaatt atttcagttt agagtctctg ttcctattgg ttggtctaac ggcctctctg 240  
 ttaatacttc cgttagtttt gcgcgcgta cctcgcctc cgtttatgct getattggtt 300  
 cccattggga ttatggtttt acctgctggt cttgccttca tgcctcttc tcaattcaat 360  
 gctaatacag atgtaacttg eaatttcag taa 393

[0041]

<210> 60  
 <211> 408  
 <212> DNA  
 <213> 拟南芥  
  
 <400> 60  
 atgattcgtg agttctccag tctacaaaac gacatcataa acattcaaga acattattct 60  
 ctcaacaaca acatggacgt gagaggagat cataaccgga aaaacaagag ttttcgtggt 120  
 tcagctccag ctccgattat ggggaagcaa gaattgttct ggacattgct gtcgcagaa 180  
 agtccaagga ggctaataat agcgagttac ttcagtttag aatcaatggt tgtgcttggt 240  
 ggtctcaag cactctctct gatcttaccg ttgattcttc caccattgcc tectctctct 300  
 tttatgctgc ttttgattcc tattgggatt atggttttgc ttatggttct tcttttcag 360  
 ccttcttcta attcaaaaca tgtttctctt tcttccactt ttatgtaa 408  
  
 <210> 61  
 <211> 267

	<212> DNA	
	<213> 拟南芥	
	<400> 61	
	atgagggggtc atgatecaacg gctgagattt gatgtcacac ccaagccgat gggtttgaac	60
	ggaagttctt tgatecaogge aagatecgtc gcaattcttc tctttctctc tatgtctctt	120
	ctgattctgc caccgttctt gccgcgctt ccacgcctc cggcgacct cctctctctt	180
	cctctactcc tcatgattct cctcatttcc ttgctttttt cctctctctc tgagccccagc	240
	ctcgcggttg aacctctctc cccctga	267
	<210> 62	
	<211> 441	
	<212> DNA	
	<213> 高粱	
	<400> 62	
[0042]	atgagcaccg gccgcgcgga ggacatccag cagctaatca acagtccac tagtagcccc	60
	aaccgcaacta gtcctcctgc ctgcctccagc gacatggaga gccgcggcgg aagcgcctcc	120
	tgcgcgcgcg ctctgacgtc cgaaccgcgc ctgcagaggg cgcctccacg tcacagggag	180
	gagtgggagc ctgtctctgc tcttagcggc gatggcgcca cgggtagcct ctggctccag	240
	tactctctgc tcccgctctt cctgtctctc ggcgtccacg cgtctctggt gatctctccg	300
	ctctgtctcc ccccgctacc gccgcgcgcg tcatgtctga tctgtctctc ggtggcaatg	360
	ctggtctctc tctctctctt ggcgtctctt ccgacgtctc gcgtctctctc tgggacgggg	420
	acggggccga cctacatgta g	441
	<210> 63	
	<211> 267	
	<212> DNA	
	<213> 高粱	
	<400> 63	

	aatgccgtga agcggcaect gcagcagegg cagcaggagg cggatttcca cgacaagaag	60
	gtcatogegt ccacctactt cagcatcggc gcgttcctgg tgctcgectg cctcaccttc	120
	tegetgetca tectgectct ggfgctgcgg ccgctgcgce cgcgcgctc getgetgetg	180
	tggetgcggg tetgctgett egctctgetg gttgtgctgg cctteatgce gacagatgtg	240
	cgcagcatgg cctcccttta ctgttaa	267
	<210> 64	
	<211> 324	
	<212> DNA	
	<213> 高粱	
	<400> 64	
	atggcaagcc gatctagcgc gctggaagga gggggggcag caatacagcg gaggaataat	60
	gccgtgaage ggcacctgca gcagcggcag caggaggcgg atttccacga caagaagtc	120
[0043]	atcgcgteca cctaettcag categgegcg ttectggtgc tegeetgeet caccttetcg	180
	ctgcteatcc tgcctctggt gctgcgcgcg ctgcgcgcgc cgcctctgct getgetgtgg	240
	ctgcgggtct gctctctgct cctgctggtt gtgetggcct tcatgcgcac agatgtgcgc	300
	agcgtggcgg cctcttaett gtaa	324
	<210> 65	
	<211> 177	
	<212> DNA	
	<213> 高粱	
	<400> 65	
	atgatgttgc tggfggcgac agtgcctctc ctgtgcctgc cattggtget gccaccaett	60
	ccgccaccac cgtgttctct tctcttcgtc cctgtgggta tgatgetect getctctccc	120
	ctggtctctt tcccgctcca ccactgtgca tgcctctctc caaccttcac tcaagtaa	177
	<210> 66	

<211> 447  
 <212> DNA  
 <213> 高粱  
  
 <400> 66  
 atgagctttg tggecggcag ctctgagget gateaactct ggttcttgat ccgcteggaa 60  
 caagcaagag ctcaacgggt acagccctcat cctccgttgg ccatggaccg gaggtctctg 120  
 ggcaggagga gagggatcc tcacctctac ccggggggcg caatgcacgg tgcgcgcag 180  
 cagcagaagc agcagcagca ggcgggccgg ccgcaggaa ccggggcggc gccgcctgtg 240  
 ccgcgggct acttcaaggc ggagctgggt ctggcgctcc tcttctgtgc cgtgtctgtg 300  
 gcttctctc cgtggtctc gcgcgcctg tcgcgcgcgc cgttctctg ctgctgtgtg 360  
 ccgctgggac tcttggcct gctctctcgc ctctcgttcg tgcctctga ccgcacagc 420  
 caactctgt tggctctc ccctga 447

[0044]

<210> 67  
 <211> 363  
 <212> DNA  
 <213> 高粱  
  
 <400> 67  
 atggcggagg agaggaagca ggcgggctcc cgttggcccg ccggaggcag ccgcggcggg 60  
 cgaatgcgcg acgccgaggg tggcagtggc aagatgcggg gccggcaggc aacaaaggca 120  
 aggcccgtag tactggcgc gccgggcccag ggttacttca ccggggggct ggcggcctg 180  
 ttctctgccc tcaccgcct gctggtgttc ctgccctctg tcttcccc cctgcccgcg 240  
 ccgcctata ttctgtgct cgtgccggtg ggcctcatgg ccgtaactgt gctctgtgtg 300  
 gcctctgtgc cgtccgacgg ccgggcgcgc accgcgcgcg tcgcctctgc gtgcctgtgc 360  
 tga 363  
  
 <210> 68



	<211> 306	
	<212> DNA	
	<213> 高粱	
	<400> 68	
	atgegggggg egggtgcccga ggaggaagcc gtgggggggg cgacgacgac gaccatggac	60
	gggggcaagg tgggtgcccgt gctggcccac ggcccgcgcg tctctctctc cctcccctct	120
	gccttcccgc ccttcccgcg gcccgcacg cagctgctgt tcttcccgt cgtcatctct	180
	ctctctctgg cgtcccctgc cttctcccgc acccccgcga gcagcggcgg eggggcaag	240
	agcaagctcg ccgaccccga ccacgggtcg tctttctgga ctactggatc accgcacctg	300
	cgtctga	306
	<210> 69	
	<211> 321	
	<212> DNA	
[0045]	<213> 高粱	
	<400> 69	
	atgcctctgc cgtctcagac atcccgcgcg gtcgggagcc ggaatctca tggcggctgg	60
	cacaagcag atgacccaag caccgcgagg ggtctctca ccaagtactt ctccgtggag	120
	tcttcccctc tcttcccctt cgtcccctgt ctctctctgg tctcccctt cgtctccc	180
	ccctcccgc ccccctctt ggccgtctct ctcttcccgc tctcaatggt ggccgtctct	240
	ctgtctctgg cgtctatccc ggtggcggcg gcggcggcgg gtcccggaa ccaggtctct	300
	gaccggcgt cgtacttga g	321
	<210> 70	
	<211> 219	
	<212> DNA	
	<213> 高粱	
	<400> 70	
	atggaacgaa gcatggtgac gatgctctc ctcgcgacgg ccgcccgtgt gcttctctct	60

ctcecgctgc tgeteccttc ttccctgceg ceacegcegt cgctgctget ggtegtccct	120
gtcgtgetgc tgetctcget gctttccctc gctttccttc ceacecgega cgacgatgac	180
getattgeta tetacggate acetccgatec gtgcagtga	219
<210> 71	
<211> 2436	
<212> DNA	
<213> 玉米	
<400> 71	
aacaattctt getacatgac ataaaaataa taaatggteg actgacttgt tacaactgaca	60
gaaataacat ccaagtctcc caatccaatt ccccttaatg aagttagctt ttgttagcaa	120
ggcccatttt ctatgagcca cataaagaac ttgatttttg gtggtttttt ttctttacaa	180
atgigtttaa aatgtaaacc ggtttcattt ctagtaaggt attgtataca gatttgacag	240
[0046] aaaatcttcc atttttcta gatttccaga taatgettcc tggactgca ttaagatgga	300
acgacaccac ttgttctaa atcttatecc acatatatat acttgaggtc atccactaat	360
aattagattt ttggcacact tactttcttc ttggttacata attaataagg gectgtttag	420
ataccaggag ctaaagaaaa agtggttaaa gtttagtcaa tttaggggt taaagatcta	480
aaccggaaga atgagtgact aaaataataa aagtgtacce ttttagtcac ttttagctcc	540
taagaagaag ctaaccttta atcagtttgc ttttaacccc tggatecaaa caagtcctaa	600
atcaccggtg taactagcca caatgctca teagacagcc aactgccaat cccaaattct	660
actttgttgt ccatttctaa ttttaalgcc tetgectgea cgtatactat ttttgtttt	720
gattaagtea taccacatag gagaatcact caatttatta gtaattgtat tgtatgaact	780
gaatcatttg gcgtatattt ggctttcttt aagcacagcc aactgctac caaagcatt	840
aggegettaa gcatcaccct tgtggctggc acgagaacca tttgattcac gacagattta	900

	gcgcttgttt gaagtggtgg ctaaaactag caatctacag ggaagaacac catacattag	960
	factcctgct ggacaagcca ccacatgccg ctgaaatata tccgcaacga ttctcccagc	1020
	tgtttatagc tcagaagcaa gagccaaggc eggcagetaa ccaegactcg tctaatcacc	1080
	cctggaccat agegattaat aaattgatta agctagtaca tegeccctag atttccgga	1140
	gaattaagaa aaccgcgggc agcagagccg atgcccattg caacaaagaa gaaggggctg	1200
	ttggtactgc agccgcagtc tataaagata aaaattgtag aagtagtagg aagcttagcc	1260
	ggagctggca tggcaggetg ctgctgagtg agcagcggtg ggggcctcct ggctggcgcg	1320
	tggaaaaacc cgagcaaatg gcagcgtgaa gcacgtccga gactgaggtc aggcgtcggg	1380
	cgggggttgc gcccagggga gaegaatgaa cccctgccc cgcctggacc ccatcgcaaa	1440
	agccccctcc cctctcctgc ctctcctcat attatattcg cgcaccatcg cagcaacttg	1500
[0047]	cacggcgccc gatgactagt tgcgccagat gcactgcacc tgcctggcgt ggtgcctcca	1560
	acgtcaacc cctcttctct ttgtctctcg tctacctctc ttctgcccct ctgctcctg	1620
	gtctccatcg tctctctctc gtgaggttga cgcagaccag tcacaggacc tcttcttccc	1680
	tcctgcgacc cagctageta aaactggcat gcatggacat gctacgctgc tgcctcaacc	1740
	catctcaaca ggtacgctgc tgtacatgct gctacgagcc tacgactgat agcagttctg	1800
	gccttccctt gctcagctgc gatgtttacc tgcattgtat cgtattctga tgcacggccc	1860
	tccgccctct caagctgagt gctttttggf ggcccaccct tctatatac gctcctcagt	1920
	tcaetgaega cgatataacg actgtttggg ttcagaaaact acatattgtg gtctctgccc	1980
	gatctcttcc ttgtatattc ttcttattat tagtctctct ctctctgaaa gaacaaggaa	2040
	ctagatgtct tgttttgctc ctctctctct accctttgct gttttctctg ctcttctcca	2100
	tgcttttcca ccggtctgct ggggtgaagta atttacaagc atgtcttacc caccgcctcc	2160
	ttcagttgct cgcatactg atcataacat cgtctctctc atgtctgac gagatatttt	2220

	tcgccgccga gactgcagtg ctactagct agatctggcc tgattcgccg atcgagcgg	2280
	ggtgagacgg agtgcctcag ctcaaagaact gctagtggta ggcctgtage tagctgtgtg	2340
	cctgtgtgca gtgtgcactg ccactgcatg cggcgccct tggacttaag acggcagcac	2400
	acgcaogega ggaggcgtcg gctgaagcga gcctc	2436
	<210> 72	
	<211> 709	
	<212> DNA	
	<213> 百喜草(Paspalum notatum)	
	<400> 72	
	ggtggcggcg geggettaaf taactagatct ggcctgattc ggcggtcgge cgcgagcatg	60
	cagtcagaga tgatgagatc aagtgcctca gctgcaagac tctagctgca tgcgtgcct	120
	cgacttcaag aaggegcacg caaaggcaca ggccatgat cgcgaggtcg atcgactgga	180
[0048]	ccgatgcaac gctccgatec gatcgtctc aatcctcatg ttcttgagcc cgcggggag	240
	gaatgagcag cgggaggaca tccagcaact gateaacagc agegcctgtg gtcccagcct	300
	gaatccacct gccgcgcca gcagccccag cagcgacagc gacatgatgg tggagagcgg	360
	cgccggcgge ggacgcgct cctcgtctcc tcttgttgc acttcacga cgtccggcca	420
	gaggccccac agggaggagg aggagcttg cagccatgce ggcctgtgtg cgtccagcag	480
	cagcaggtac ttgtcctgc cgtcctgct gctcgtcgge gtcaccgcgc tctctgat	540
	cctccgctc gtctgcgcg cctgcccc ccgcgcctc atgctcatgc tggccccct	600
	ggcaatgctc gtgttctgc tctgtctgce gttcatgccc acgacgtccc gggccctgc	660
	tggcaccgcg gggccgacct acatgtagat aatcactct tttttttt	709
	<210> 73	
	<211> 192	
	<212> PRT	
	<213> 百喜草	

<400> 73

Met Arg Ala Val Asp Phe Lys Lys Ala His Ala Lys Gly Lys Gly Ile  
1 5 10 15

Asp Arg Glu Val Asp Arg Leu Asp Arg Ser Asn Ala Pro Ile Arg Ser  
20 25 30

Ser Ser Ile Leu Met Phe Leu Ser Pro Pro Gly Arg Asn Glu Gln Pro  
35 40 45

Glu Asp Ile Gln Gln Leu Ile Asn Ser Ser Ala Ala Gly Pro Ser Leu  
50 55 60

Asn Pro Pro Ala Ala Pro Ser Ser Pro Ser Ser Asp Ser Asp Met Met  
65 70 75 80

[0049]

Val Glu Ser Gly Gly Gly Gly Arg Ala Ser Ser Ser Pro Ala Cys  
85 90 95

Cys Thr Ser Ser Thr Ser Gly Glu Arg Ala His Arg Glu Glu Glu Glu  
100 105 110

Leu Cys Ser His Gly Gly Trp Trp Ser Ser Ser Ser Ser Arg Tyr Leu  
115 120 125

Ser Leu Pro Leu Leu Leu Leu Val Gly Val Thr Ala Leu Leu Leu Ile  
130 135 140

Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Ser Met Leu Met  
145 150 155 160

Leu Val Pro Val Ala Met Leu Val Leu Leu Leu Val Leu Ala Phe Met

	165	170	175	
	Pro Thr Thr Ser Gly Gly Arg Ala Gly Thr Ala Gly Pro Thr Tyr Met			
	180	185	190	
<210>	74			
<211>	656			
<212>	DNA			
<213>	百喜草			
<400>	74			
[0050]	aagcaactgcc aggetcgaga tcagagatac tattggcgca gatcttctta getgetgcag			60
	acctgcagtc agagcgccaa ggatccattt ctgaaaccga gtaggcaccg agctcagata			120
	gcategctcg tcggaataat tgagcaaget cattgctgcg cgttggatgc tggcagctga			180
	gttgcctctt ctcattgggca tggcaatgga gatggagcag atcgccaggg atcagcggcg			240
	ccccaggcgg cagcaggcca ggcggcaggc cgtgggtggtc gtctcgagca ggcacggcgg			300
	cgccggcgcg aagggacagc gtcagaaagt gccgcctgcg cccaggtcga cggetgetgc			360
	egggetcagc gggagggcgt tctctgtgct cgcctgcgtc gccgtctcgc tcactgtget			420
	gccgetggtc ctgccgcgcg tgcgcceccc gccgccttgc ctgctgctgg tgccectgtg			480
	actgetcttc ctctggcag cgetcgccac cttagtgcgc tccgatgtga agaccatggc			540
	gtctctctac atgtaaatgt ttctagtgtg agtcttgtaa tataaaaatt ttatttaate			600
	tgttcggct attctgtat gtttttgca taaaatgagt gcaacgaaat gaaatt			656
<210>	75			
<211>	129			
<212>	PRT			
<213>	百喜草			
<400>	75			
	Met Leu Ala Ala Glu Leu Leu Leu Met Gly Met Ala Met Glu Met			

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

[0051]

Pro Leu Leu Leu Leu Val Pro Val Cys Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala			
	100	105	110
Leu Ala Thr Phe Val Pro Ser Asp Val Lys Thr Met Ala Ser Ser Tyr			
	115	120	125

Met

&lt;210&gt; 76

&lt;211&gt; 343

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 百喜草

&lt;400&gt; 76

caaaatggca agcgaatccg gcgcgatgga agaaggcggc ggcgggaacga ggcagaggag 60

gagcccagca agtgctcaa agcggcaott tcagcagcag aggcagcagg aggcggattt 120

ctacgacagg aaggatgatgg cgtccacctc cttcagcacc ggcgccttcc tegtgtctgc 180  
 ctgcctcacc gtctcgtctgc tcactctgcc gctgggtctg ccgcctctgc cgcgcctgcc 240  
 gtcctctctg ctctggtctg ccgtctctct gctctctctg ctctctctgc tegtctctat 300  
 gccaccgat gtgcggagca tggcctctct ctacctgtaa ata 343

<210> 77

<211> 111

<212> PRT

<213> 百喜草

<400> 77

Met Ala Ser Arg Ser Gly Ala Met Glu Glu Gly Gly Gly Gly Thr Arg  
 1 5 10 15

[0052] Gln Arg Arg Ser Pro Ala Ser Ala Ala Lys Arg His Phe Gln Gln Gln  
 20 25 30

Arg Glu Gln Glu Ala Asp Phe Tyr Asp Arg Lys Val Met Ala Ser Thr  
 35 40 45

Tyr Phe Ser Ile Gly Ala Phe Leu Val Leu Ala Cys Leu Thr Val Ser  
 50 55 60

Leu Leu Ile Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Ser  
 65 70 75 80

Leu Leu Leu Trp Leu Pro Val Cys Leu Leu Leu Leu Leu Ile Val Leu  
 85 90 95

Ala Phe Met Pro Thr Asp Val Arg Ser Met Ala Ser Ser Tyr Leu  
 100 105 110



<210> 78  
 <211> 476  
 <212> DNA  
 <213> 百喜草  
  
 <400> 78  
 egcgccctca attttgtgga catatatata taggaacgacg ataccctctc tccctctcgc 60  
 ctaccctctc teagctcag cctctcagga cgcgcgcatg cacaaaacca caccgcaca 120  
 tacctaacct gacgacgctt cttgtagcca gctatggaag gaagcatggt gatgctgctc 180  
 gtcgccacag cggccgtggt gcttctgctg ctctctctgc tgcctcctcc cctgccegg 240  
 ccgccctcgc tctgctgat cgtcccgctc gtcctactgc tctcctctct tccctgget 300  
 ttctcctcca gtacaaagct ccatggatcg tcgactgate gttttatgca gcgagacgca 360  
 gcacaggcgt acgtgcgtgt ttaactctgc gctctctac ggcgctgcta ctttaattaca 420  
 atgaggcgag acgcatgctg gcacacaaga gactgatgca gctagcgtac gtcgctc 476

[0053]

<210> 79  
 <211> 76  
 <212> PRT  
 <213> 百喜草  
  
 <400> 79  
  
 Met Glu Gly Ser Met Val Met Leu Leu Val Ala Thr Ala Ala Val Val  
 1 5 10 15  
  
 Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Ser  
 20 25 30  
  
 Leu Leu Leu Ile Val Pro Val Val Leu Leu Leu Ser Leu Leu Ser Leu  
 35 40 45  
  
 Ala Phe Val Pro Ser Thr Lys Leu His Gly Ser Ser Thr Asp Arg Phe

50	55	60	
Met Gln Arg Asp Ala Ala Gln Ala Tyr Val Arg Val			
65	70	75	
<210> 80			
<211> 879			
<212> DNA			
<213> 禾本科物种(Poaceae sp)			
<400> 80			
ggggttcteg cctcaccggc gtctggtag cgcgcgcgaa ggacatccag caaccatccg		60	
accggttggg gaggcaaacc aacgccacag cctttgaage ggccgcacga gaatggagtc		120	
gccgcagggc gggagggcag ctcacctega cgcccgctc aagtaagag acccgagca		180	
gccgaggggc ttctgcgcca agtaactctc cgtgaagtc tgcctctac tcgccctgt		240	
[0054] caccgtctgt ctctgggtgc tcccctctgt cctgcgcgcg cteccgcgcg cgcgatgct		300	
gtctctctc gtcccggtgg ccatctctgc catctctct ctactggcgc tcaccgcgc		360	
gcctctccga cagaacgaag ctgtggagc gacatctaat tactctagg ttccagtttt		420	
gagcaagtta aaggcatac accatctcgg tgatcagcaa tgcacttaat ttgtttgtg		480	
tatataaate tatttttatg ttgtctact ccagtttttt atttccgaac atgggcatga		540	
cgtttaattgg acagttggac ttatctctac atggacctgg ttggacatc taattaagca		600	
tcacagaca gttctctctg tgaaatagcg ggggaacaac agcggagatg gatctaccg		660	
ctacgtagcg tactactaga tgacatgcca gcaaaacct tccttggggg tggtaaaata		720	
gacgtataa aggattcag ggtgttcaat gccaatatt gcagtaaat cagttcaaga		780	
ttactttaga ccctacgat agttttttag gtacaaattg agttttacca aattcatatg		840	
acaacgcct ggatgctttt acaagaaagc gttgtcagc		879	

<210> 81  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> 禾本科物种

<400> 81

Met Glu Ser Pro Gln Gly Gly Arg Ala Ala His Leu Asp Gly Arg Leu  
 1                    5                    10                    15

Lys Tyr Asp Asp Pro Ser Thr Pro Arg Gly Phe Cys Ala Lys Tyr Phe  
                   20                    25                    30

Ser Val Lys Ser Cys Leu Leu Leu Ala Val Val Thr Val Leu Leu Leu  
           35                    40                    45

Val Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Met Leu Leu  
       50                    55                    60

[0055]

Leu Leu Val Pro Val Ala Met Leu Ala Met Leu Leu Leu Leu Ala Leu  
 65                    70                    75                    80

Thr Pro Pro Arg Cys Arg Gln Asn Glu Ala Val Asp Ala Thr Ser Asn  
                   85                    90                    95

Tyr Leu

<210> 82  
 <211> 937  
 <212> DNA  
 <213> 禾本科物种

<400> 82

cgcTcaattc ctttaagttt cagccttgcc cgcceccacg ccgcctaaaag cggTgacacc    60

gcccaccgcc tccctctccc cgttcgcttc gctaccgctg cgcctgcagcc gcaggTgcgc    120

	attaagtctt ctgcgctttt tgeccggcgt gegtctcttt ggttcttctt gcacaactct	180
	getgetgctg ctgetggttt cctccagctc tgtttttctt tcegttcttt tctctctgtc	240
	agtcctggtc aaatccatcc tccattcttc ctggatcget tttggaaatt cccggggget	300
	gccgttcttg gtttgtgttc ttggtgggat taatctggag atccaatcac ttggggacga	360
	gatcaagacc gccaaagaaac agaacgggca aaagccggca tcgccaagct taacatcaga	420
	ggttgcgcgc tegetcatgg cgatggagtt ggagacggac caectcgcca ggccgcagca	480
	gagcaggagg caggccaagg gccagcagca gcagcagcag cagcgcagca acgcgcctc	540
	gcccaagcct cctgetccgg cggcggcggc agcggggggg ctgagcgcgc aggcgttctt	600
	ggccttggcg tgcctggcgc tgcctctctt cgtctctcgc ctctctctgc cgcctctgc	660
	gcccccgcgc ccctctctgc tgcctctgc cgtctctcgc ctctctctgc tgcctctgc	720
[0056]	cgcctctctgc gtgcctctgc cggatctcag gacctggcg tctctctact tgtaactage	780
	tcactagtgt ttagtgaga gtttatgat aattaattct ttcttttttg ttcctcgcgc	840
	ccctttctct ctgtgtatat ggataaaatg agtctaata tgaatggaa atcttctctt	900
	tttcttctct tctatttttc tttctctgaa acagaga	937

<210> 83

<211> 112

<212> PRT

<213> 禾本科物种

<400> 83

Met Ala Met Glu Leu Glu Thr Asp His Leu Ala Arg Arg Gln Gln Ser  
1                  5                                  10                                  15

Arg Arg Gln Ala Lys Gly Gln Gln Gln Gln Gln Gln Arg Gln Asn  
                  20                                  25                                  30

Ala Pro Ser Pro Lys Pro Pro Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly  
 35 40 45

Leu Ser Ala Glu Ala Phe Leu Ala Leu Ala Cys Val Ala Val Ser Leu  
 50 55 60

Val Val Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Leu  
 65 70 75 80

Leu Leu Leu Val Pro Val Cys Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ala  
 85 90 95

Thr Phe Val Pro Ser Ala Asp Val Arg Thr Met Ala Ser Ser Tyr Leu  
 100 105 110

[0057] <210> 84  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 禾本科物种

<400> 84

Leu Val Val Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro  
 1 5 10 15

<210> 85  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列共有序列

<220>  
 <223> 保守区

<400> 85

Leu Leu Val Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro  
 1 5 10 15

<210> 86  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列共有序列

<220>  
 <223> 具有可变区的保守区

<220>  
 <221> 其他特征  
 <222> (2).. (3)  
 <223> Xaa 可以为任何天然存在的氨基酸

<220>  
 <221> 其他特征  
 <222> (7).. (7)  
 <223> Xaa 可以为任何天然存在的氨基酸

[0058]

<220>  
 <221> 其他特征  
 <222> (12).. (13)  
 <223> Xaa 可以为任何天然存在的氨基酸

<400> 86

Leu Xaa Xaa Leu Pro Leu Xaa Leu Pro Pro Leu Xaa Xaa Pro Pro  
 1 5 10 15

<210> 87  
 <211> 72  
 <212> PRT  
 <213> 玉米

<400> 87

Met Val Ala Thr Thr Thr Met Ala Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Leu  
 1 5 10 15

Ala Thr Ala Ala Ala Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Pro Pro

20 25 30

Leu Pro Pro Pro Pro Thr Gln Leu Leu Phe Val Pro Val Val Leu Leu  
35 40 45

Leu Leu Val Ala Ser Leu Ala Phe Cys Pro Ala Ala Thr Ser Ser Pro  
50 55 60

Ser Pro Met His Ala Ala Asp His  
65 70

<210> 88

<211> 9

<212> PRT

<213> 玉米

<400> 88

[0059]

Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Ser  
1 5

<210> 89

<211> 56

<212> PRT

<213> 玉米

<400> 89

Ser Gly Tyr Leu Ser Leu Pro Ala Leu Leu Leu Val Gly Val Thr Ala  
1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro  
20 25 30

Ser Met Leu Met Leu Val Pro Val Ala Met Leu Leu Leu Leu Val  
35 40 45

Leu Ala Phe Met Pro Thr Ser Ser  
 50 55

<210> 90

<211> 23

<212> PRT

<213> 玉米

<400> 90

Ser Gly Tyr Leu Ser Leu Pro Ala Leu Leu Leu Val Gly Val Thr Ala  
 1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Leu Pro Leu  
 20

<210> 91

<211> 25

[0060] <212> PRT

<213> 玉米

<400> 91

Pro Ser Met Leu Met Leu Val Pro Val Ala Met Leu Leu Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

Val Leu Ala Phe Met Pro Thr Ser Ser  
 20 25

<210> 92

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列引物

<220>

<223> 引物

<400> 92



Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Val Lys Leu Tyr Pro Tyr Asp Val  
1 5 10 15

Pro Asp Tyr Ala Ala Ala  
20

<210> 93

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列接头

<220>

<223> 接头

<400> 93

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
1 5

[0061]

<210> 94

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列引物

<220>

<223> 引物

<400> 94

gtctgeacca tegtcaacc

19

<210> 95

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列引物

<220>

<223> 引物

<400> 95

gaagtcacgc tgcagaaac c

21

<210> 96

<211> 8

<212> PRT

<213> 玉米

<220>

<221> 其他特征

<222> (4).. (4)

<223> Xaa 可以为任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> 其他特征

<222> (8).. (8)

<223> Xaa 可以为任何天然存在的氨基酸

<400> 96

[0062]

Pro Pro Leu Xaa Pro Pro Pro Xaa

1 5

<210> 97

<211> 15

<212> PRT

<213> 高粱

<400> 97

Leu Leu Val Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro

1 5 10 15

<210> 98

<211> 15

<212> PRT

<213> 高粱

<400> 98

Leu Leu Ile Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro

1 5 10 15

<210> 99  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 高粱  
 <400> 99

Leu Val Ile Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro  
 1 5 10 15

<210> 100  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 高粱  
 <400> 100

[0063] Leu Leu Val Leu Pro Leu Leu Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro  
 1 5 10 15

<210> 101  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 高粱  
 <400> 101

Leu Val Phe Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro  
 1 5 10 15

<210> 102  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 共有序列

<400> 102

Pro Pro Leu Asp Pro Pro Pro Asp  
1 5

<210> 103

<211> 204

<212> DNA

<213> 拟南芥

<400> 103

atgtttgtga ttggagtggg gatggtgeta ttgggggttc ttccagccgt tctgcgcgcg 60  
cttccgcgcg cgcgatgat attgatggga attccgggtg tgetgatget aatgettatt 120  
taettagcca ttattatec acctcaca aa getcatttc tetcttcate ttctttgac 180  
actaattcta ggcattgaat gtga 204

[0064]

<210> 104

<211> 67

<212> PRT

<213> 拟南芥

<400> 104

Met Phe Val Ile Gly Val Val Met Val Leu Leu Ala Val Leu Pro Ala  
1 5 10 15

Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Met Ile Leu Met Gly Ile Pro  
20 25 30

Val Val Leu Met Leu Met Leu Ile Tyr Leu Ala Ile Tyr Tyr Pro Pro  
35 40 45

His Gln Ala His Phe Leu Ser Ser Ser Ser Phe Asp Thr Thr Ser Arg  
50 55 60

[0065]

His Val Met  
65

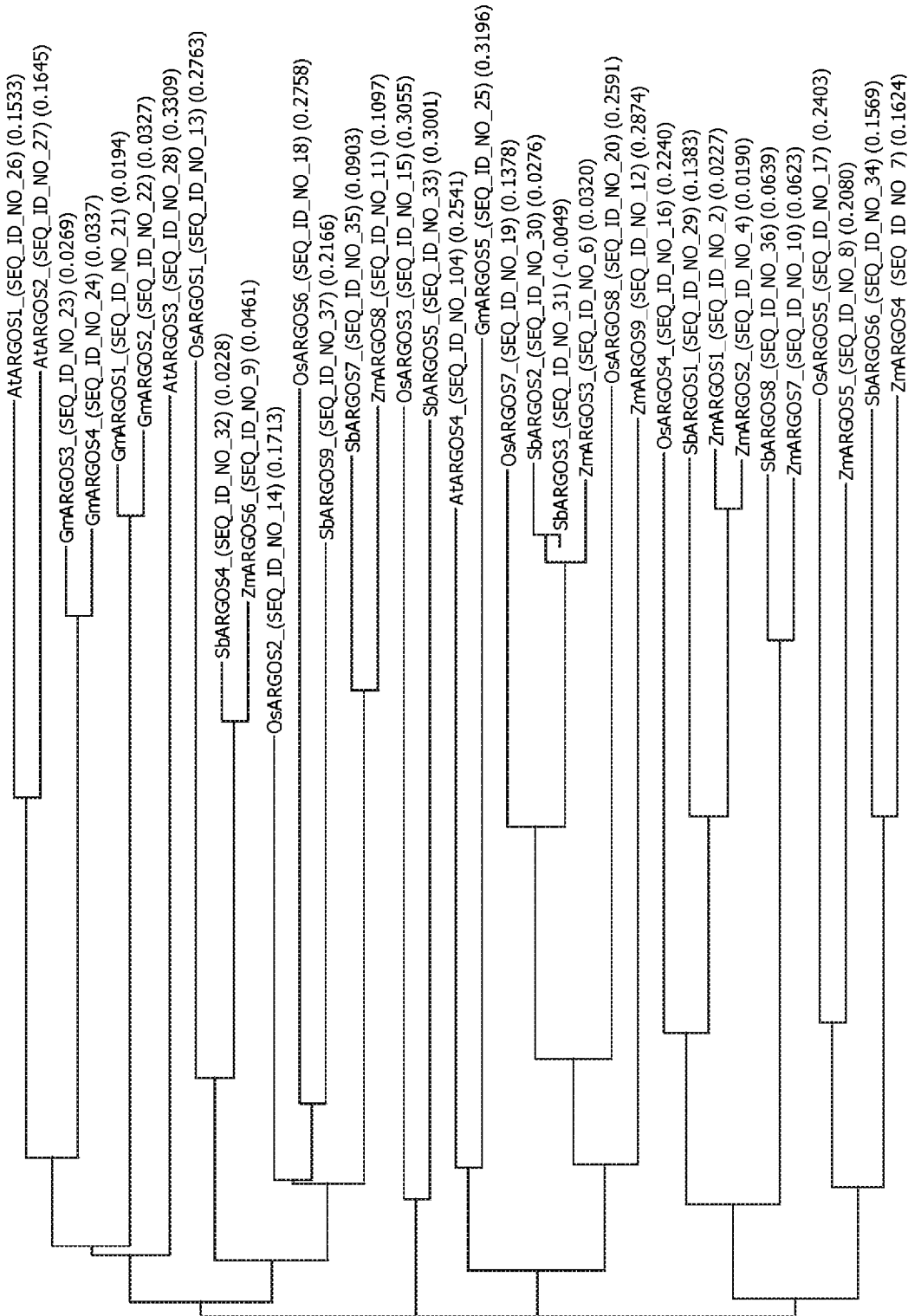


图 1

AtARGOS1	(SEQ ID NO 26)	(1)	-----MIREISNLQKDIINIQDYSNNRVMVVG--RNNRKNMSFR--	50
AtARGOS2	(SEQ ID NO 27)	(1)	-----MIREFSSLQNDIINIQEHYSLNNMMDVRGDHNRKNTSFRGS	
GmARGOS3	(SEQ ID NO 23)	(1)	-----	
GmARGOS4	(SEQ ID NO 24)	(1)	-----	
GmARGOS1	(SEQ ID NO 21)	(1)	-----MMVH	
GmARGOS2	(SEQ ID NO 22)	(1)	-----MMVH	
AtARGOS3	(SEQ ID NO 28)	(1)	-----	
OsARGOS1	(SEQ ID NO 13)	(1)	-----MKTTLAVVEGTRAHIV--NLAN	
SbARGOS4	(SEQ ID NO 32)	(1)	-----	
ZmARGOS6	(SEQ ID NO 9)	(1)	-----	
OsARGOS2	(SEQ ID NO 14)	(1)	-----	
OsARGOS6	(SEQ ID NO 18)	(1)	-----	
SbARGOS9	(SEQ ID NO 37)	(1)	-----	
SbARGOS7	(SEQ ID NO 35)	(1)	-----	
ZmARGOS8	(SEQ ID NO 11)	(1)	-----MMLHCTFAI--SEAP	
OsARGOS3	(SEQ ID NO 15)	(1)	-----MSFALRSSEPEFWFLIPSEAAVAHAHRLVVMQDRSGSAYRP	
SbARGOS5	(SEQ ID NO 33)	(1)	MSFVAGSSEADQLWFLIPSEQARAHAVQPHPLAMDRRSARRRQDPHPH	
AtARGOS4	(SEQ ID NO 104)	(1)	-----	
GmARGOS5	(SEQ ID NO 25)	(1)	-----	
OsARGOS7	(SEQ ID NO 19)	(1)	-----MEGVGARQRNP+--LIPR	
SbARGOS2	(SEQ ID NO 30)	(1)	-----MASRSSALEGGGAAIQRR--	
SbARGOS3	(SEQ ID NO 31)	(1)	-----	
ZmARGOS3	(SEQ ID NO 6)	(1)	-----MASRSSMEGGAAIQRR--	
OsARGOS8	(SEQ ID NO 20)	(1)	-----MEEQMFREQQMQRGRRHHQHT--TREQ	
ZmARGOS9	(SEQ ID NO 12)	(1)	-----MPVASSLMAMELETDLAWAEQQRQNRQ--TMVV	
OsARGOS4	(SEQ ID NO 16)	(1)	-----MEKGR--GKACGGGSTAPPPP--PPSS	
SbARGOS1	(SEQ ID NO 29)	(1)	-----MSTGRPEDIQQLINSATSSPNRTSPSA--SPSD	
ZmARGOS1	(SEQ ID NO 2)	(1)	-----MSTRPEDTQOLINSAASPNRSAPSA--APSD	
ZmARGOS2	(SEQ ID NO 4)	(1)	-----MSAGPDTQQLINSAASPNRSAPSA--APSD	
SbARGOS8	(SEQ ID NO 36)	(1)	-----MPSSQTFPPP--VGRR	
ZmARGOS7	(SEQ ID NO 10)	(1)	-----MPSSQTFPPP--VGRT	
OsARGOS5	(SEQ ID NO 17)	(1)	-----MRGVILLRYEEDAMAGHRSTAAATGGRLYGQ--VGVK	
ZmARGOS5	(SEQ ID NO 8)	(1)	-----MHLLDDLQDRGGAAAHGTSRSRK--PPPP	
SbARGOS6	(SEQ ID NO 34)	(1)	-----MAEERKQAGSRWPAGG--SGGG	
ZmARGOS4	(SEQ ID NO 7)	(1)	-----MCRGLPTPAPALQFQSDCSRQQRGTTQAPPGRASESVRACMAAER	

共有序列

51

100

图 2A

AtARGOS1	(SEQ ID NO 26)	(39)	--SSEKSKQELRRSFSQK-----RMMIPAN
AtARGOS2	(SEQ ID NO 27)	(42)	APAPIMGKQELFRILSSQNS-----PRRLISAS
GmARGOS3	(SEQ ID NO 23)	(1)	-----MAR
GmARGOS4	(SEQ ID NO 24)	(1)	-----MAR
GmARGOS1	(SEQ ID NO 21)	(6)	PRDQVGGETHKNLVEPNVAA-----SKKARNCA
GmARGOS2	(SEQ ID NO 22)	(6)	PRDQVGGDTHKNLVAENVAA-----SKKARNCA
AtARGOS3	(SEQ ID NO 28)	(1)	-----MRVHDQRLRFDFVTPK-----PMGLNGSS
OsARGOS1	(SEQ ID NO 13)	(21)	SRASRLNERLIDPAIESRS-----IAGATPAPF
SbARGOS4	(SEQ ID NO 32)	(1)	-----
ZmARGOS6	(SEQ ID NO 9)	(1)	-----
OsARGOS2	(SEQ ID NO 14)	(1)	-----
OsARGOS6	(SEQ ID NO 18)	(1)	-----MQEEAASS-----SSSSASPVM
SbARGOS9	(SEQ ID NO 37)	(1)	-----M
SbARGOS7	(SEQ ID NO 35)	(1)	-----MRRAVPQEE-----AVAAATTTT
ZmARGOS8	(SEQ ID NO 11)	(14)	ARALALGOVSNRAMPOE-----EAAAVATTT
OsARGOS3	(SEQ ID NO 15)	(45)	KRTHMAAEDEHRRPCTSSRRR-----VAPTPTTQTQTAPG
SbARGOS5	(SEQ ID NO 33)	(51)	RRGAMHGAAEQKQKQQRGPPQ-----GTRAAPPPPPG
AtARGOS4	(SEQ ID NO 104)	(1)	-----
GmARGOS5	(SEQ ID NO 25)	(1)	--MSSLIHYNKRFIIS-----LAFMLR
OsARGOS7	(SEQ ID NO 19)	(17)	PNGSKRHLOH--QHPNAA-----EKKTAATSN
SbARGOS2	(SEQ ID NO 30)	(19)	NNAVKRHLQO--RQEQADF-----HDKKVIAST
SbARGOS3	(SEQ ID NO 31)	(1)	-NAVKRHLQO--RQEQADF-----HDKKVIAST
ZmARGOS3	(SEQ ID NO 6)	(18)	-NAVKRHLQO--RQEQADF-----LDKKVIAST
OsARGOS8	(SEQ ID NO 20)	(27)	EQQKQOORRRLMNNATNG-----GGDGGGSR
ZmARGOS9	(SEQ ID NO 12)	(35)	CRKSDAAVAKGQQRQNASP-----PSPKPPPPAG
OsARGOS4	(SEQ ID NO 16)	(24)	SGKSGGGGGSNIREAAAS-----GGGGVWVGK
SbARGOS1	(SEQ ID NO 29)	(32)	MESG-GGSASSPRASTDRRLQRAAHSHREWEWEPAAAAAGDGGTGLWSR
ZmARGOS1	(SEQ ID NO 2)	(32)	MERGSGLAASSPRASTTSHSHQPATHRVVEEEEEEPSSRRGG-GSLCSG
ZmARGOS2	(SEQ ID NO 4)	(31)	MERGSGLAASSPRASTTSHSHQPATHRVVEEEEEEPSSRGA-GSLCSG
SbARGOS8	(SEQ ID NO 36)	(15)	TAHGGWHKHDD--PSTPR-----GFCTK
ZmARGOS7	(SEQ ID NO 10)	(16)	AAHGGRRKHDDDDPSTPR-----GFCAK
OsARGOS5	(SEQ ID NO 17)	(36)	RRVVEETAAAIVEVGGGGG-----
ZmARGOS5	(SEQ ID NO 8)	(29)	LAAAAAAAAGVPAGSSTAATA-----T
SbARGOS6	(SEQ ID NO 34)	(21)	RMRDAGGSGKMRGQATKAR-----PVLAPPQGG
ZmARGOS4	(SEQ ID NO 7)	(49)	KAAASPEAACGRMFGAEGAKPRGQA-----KAARAPPQGG
		(51)	

共有序列

101

150

图 2B

AtARGOS1	(SEQ ID NO 26)	(64)	YFSLESLFLLVGLTASLLIIPLVLPPLPPPP-FMILLVPIGIMVLLVWIA
AtARGOS2	(SEQ ID NO 27)	(70)	YFSLESMVVVINGLTASLLIIPLVLPPLPPPP-FMILLIIPIGIMVLLMVA
GmARGOS3	(SEQ ID NO 23)	(4)	CFLGLSVLVAAJAA SMVVLP LMPPLPPPP-LVLLFFPVGIMAAIMLVA
GmARGOS4	(SEQ ID NO 24)	(4)	CFLGLSVLVAAJAA SMVVLP LMPPLPPPP-LVFFFPPVGIMAAIMLV
GmARGOS1	(SEQ ID NO 21)	(34)	CMVSYSVLILALLTLISILLPLVLPPLPPPP-LLLLFVVPILVVLFFLA
GmARGOS2	(SEQ ID NO 22)	(34)	CMVSYSVLILALLTLIFILLPLVLPPLPAPP-LLLLFVVPVFLVVLFFLA
AtARGOS3	(SEQ ID NO 28)	(24)	LITARSVALLLFLSLLIIPPLPPPP-ATLILLPLIMILLIFIA
OsARGOS1	(SEQ ID NO 13)	(49)	EMETAMVLLLAVALFLLCYPLVLPPLPFP-PPFLIFVPMWMLLFSLV
SbARGOS4	(SEQ ID NO 32)	(1)	-----MMILVAVIILICLPLVLPPLP-PPFLIFVPMWMLLFSLV
ZmARGOS6	(SEQ ID NO 9)	(1)	-MSKRVLMMLLAAVILICLPLVLPPLP-PPFLIFVPMWMLLFSLV
OsARGOS2	(SEQ ID NO 14)	(1)	---MVMILLIAAAVILILLPLVLPPLPP-SILLVVPVILLALSIA
OsARGOS6	(SEQ ID NO 18)	(18)	DGGKAVLLAVAAVLLLLPLVLP-----SLLLLPWLILLVWVSLA
SbARGOS9	(SEQ ID NO 37)	(2)	ERSMVTMLLLATAAVVLLLLPLLLPSSLPPLPPSLLLVVPMILLISLSIA
SbARGOS7	(SEQ ID NO 35)	(19)	MDGGKVALLATAAALLLPLLALPLPLPPPP-TQLLFVPMILLVWVSLA
SbARGOS8	(SEQ ID NO 11)	(41)	MAGGKVAALLATAAALLLPLLALPLPLPPPP-TQLLFVPMILLVWVSLA
OsARGOS3	(SEQ ID NO 15)	(83)	YFTVELVMAFVCVIA SVLPLVLPPLPPPP-SLLLLVPMWMLLAVLVA
SbARGOS5	(SEQ ID NO 33)	(84)	YFTAEVLVAFVAVSIAFLVLPPLSPPP-FLLLLVPMWMLLAVLVA
AtARGOS4	(SEQ ID NO 104)	(1)	-----NFVIGVWVLA VPAVLPPLPPPP-MIIMGIPWIMMLLYLA
GmARGOS5	(SEQ ID NO 25)	(24)	LFGKSTMFVMTIALLVPIMLPPLPPPP-MIIMLVPIVIMILLKVA
OsARGOS7	(SEQ ID NO 19)	(43)	YFSIEAFVIVFVMTSLLIIPLVLPPLPPPP-SILLIIPVCLILLVWIA
SbARGOS2	(SEQ ID NO 30)	(45)	YFSIGAFVIACTFSLLIIPLVLPPLPPPP-SLLIIPVCLILLVWIA
SbARGOS3	(SEQ ID NO 31)	(26)	YFSIGAFVIACTFSLLIIPLVLPPLPPPP-SLLIIPVCLILLVWIA
ZmARGOS3	(SEQ ID NO 6)	(43)	YFSIGAFVIACTFSLLIIPLVLPPLPPPP-SLLIIPVCLILLVWIA
OsARGOS8	(SEQ ID NO 20)	(55)	YFSTEAILLVACVNSLLVPLVLPPLPPPP-TLLLLPVCILLIIVWIA
ZmARGOS9	(SEQ ID NO 12)	(63)	GLSAEAFVLAACVAVSLVLPVLPPLSPPP-PLLLLVPMWMLLAAVA
OsARGOS4	(SEQ ID NO 16)	(51)	YFSVE-SLLIIPVTA SVIPLVLPPLPPPP-SMIMLVPMWMLLAAVA
SbARGOS1	(SEQ ID NO 29)	(81)	YFSLP-VLLINGVTA SVIPLVLPPLPPPP-SMIMLVPMWMLLAAVA
ZmARGOS1	(SEQ ID NO 2)	(81)	YLSLP-ALLLVGVTA SVIPLVLPPLPPPP-SMIMLVPMWMLLAAVA
ZmARGOS2	(SEQ ID NO 4)	(79)	YLSLP-ALLLVGVTA SVIPLVLPPLPPPP-SMIMLVPMWMLLAAVA
SbARGOS8	(SEQ ID NO 36)	(36)	YFSVESCLIAAVAVIIPVLPPLPPPP-IAVILVPMWMLLAAVA
ZmARGOS7	(SEQ ID NO 10)	(39)	YFSRESCLIAAVAVIIPVLPPLPPPP-IAVILVPMWMLLAAVA
OsARGOS5	(SEQ ID NO 17)	(55)	YLGVEAAVLLGVTA TLLIIPLVLPPLPPPP-PMILLVPMWMLLAAVA
ZmARGOS5	(SEQ ID NO 8)	(51)	HUGPEAAALLACVTA TLLIIPLVLPPLPPPP-PLLLLVPMWMLLAAVA
SbARGOS6	(SEQ ID NO 34)	(52)	YFTAGLAAFLCLTALLVPLVLPPLPPPP-YLLLLVPMWMLLAAVA
ZmARGOS4	(SEQ ID NO 7)	(84)	YFTAGLAAFLCLTALLVPLVLPPLPPPP-LLLLLVPMWMLLAAVA
			(101) YFS SVLIIA LT SLLIIPLVLPPLPPPP LLLLLVPMWMLLAAVA

共有序列

151

200

图 2C



AtARGOS1	(SEQ ID NO 26)	(113)	FMPSHSNANTDVTICNFM
AtARGOS2	(SEQ ID NO 27)	(119)	FMPSNS-KHVSSSSTFM
GmARGOS3	(SEQ ID NO 23)	(53)	FS PSDONGVYKASTRRWNETGSAGATWGF LKVPMGLLRFMFFFFFKLR
GmARGOS4	(SEQ ID NO 24)	(53)	FS PSDONGVYKAST
GmARGOS1	(SEQ ID NO 21)	(83)	FS PS TLNNMVLTS
GmARGOS2	(SEQ ID NO 22)	(83)	FS PS TLNNMVLTS
AtARGOS3	(SEQ ID NO 28)	(73)	FS PSNEPSLAVEFLDP
OsARGOS1	(SEQ ID NO 13)	(99)	LFVQ
SbARGOS4	(SEQ ID NO 32)	(43)	LFPSHHCACSSPTFTQ
ZmARGOS6	(SEQ ID NO 9)	(49)	FFPSNHCPSSPTFTQ
OsARGOS2	(SEQ ID NO 14)	(46)	FLFNRDVVYGGQPAADQFFFRQ
OsARGOS6	(SEQ ID NO 18)	(61)	FFPAAGSDGVVAAAAGVAGTYQPPPPPARSSPPSSSSSRQL
SbARGOS9	(SEQ ID NO 37)	(52)	FLPTFDDDAIAYGLFSVQ
SbARGOS7	(SEQ ID NO 35)	(68)	FCPTAAASGGGKSLADADHGS
ZmARGOS8	(SEQ ID NO 11)	(90)	FCPAATSS---PSPMHAADHG
OsARGOS3	(SEQ ID NO 15)	(132)	FVPLDAQSNVVGSSCL
SbARGOS5	(SEQ ID NO 33)	(133)	FVPLDAHSHLVVGSRR
AtARGOS4	(SEQ ID NO 104)	(44)	IYYPHQAHFLSSSFDTISRHM
GmARGOS5	(SEQ ID NO 25)	(73)	LYSKHGPADEVYQCNFTW
OsARGOS7	(SEQ ID NO 19)	(92)	-FMP TDVRSMASSYL
SbARGOS2	(SEQ ID NO 30)	(94)	-FMP TDVRSVAASYL
SbARGOS3	(SEQ ID NO 31)	(75)	-FMP TDVRSMASSYL
ZmARGOS3	(SEQ ID NO 6)	(92)	-FMP TDVRSMASSYL
OsARGOS8	(SEQ ID NO 20)	(104)	-FMP TDVRSMASSYL
ZmARGOS9	(SEQ ID NO 12)	(112)	TFVPSDVRSMPSSNL
OsARGOS4	(SEQ ID NO 16)	(100)	FMPTTSSSSSAGGGGGRNGA
SbARGOS1	(SEQ ID NO 29)	(129)	FMPTSSVR---AGTGTG
ZmARGOS1	(SEQ ID NO 2)	(129)	FMPTSSTG---GRGGTG
ZmARGOS2	(SEQ ID NO 4)	(127)	FMPTSSTG---GRGGTG
SbARGOS8	(SEQ ID NO 36)	(85)	LMPVAAAAGARNEVVDP
ZmARGOS7	(SEQ ID NO 10)	(88)	LMP---AAAAGRNEAVDP
OsARGOS5	(SEQ ID NO 17)	(103)	VLLP SDAKSIAAAAGRPS
ZmARGOS5	(SEQ ID NO 8)	(99)	VLLP SARAATAAF--P
SbARGOS6	(SEQ ID NO 34)	(101)	ALVPSDGRAATAAVASS
ZmARGOS4	(SEQ ID NO 7)	(132)	ALVPSDGRAAAA AVASS
		(151)	F P S

共有序列

图 2D

AtARGOS1 (SEQ ID NO 26)	(1)	1	-----MIREISNLQKDIINI <b>QDSY</b> SNNRVMVGRNKRKN	50
AtARGOS4 (SEQ ID NO 104)	(1)		-----MIREISNLQKDIINI <b>QDSY</b> SNNRVMVGRNKRKN	50
ZmARGOS1 (SEQ ID NO 2)	(1)		MSTTRPEDTQQLINSAASAASPNRSAPSAAPSD <b>MERG</b> SGT <b>AA</b> SSSRASATISH	
ZmARGOS2 (SEQ ID NO 4)	(1)		-MSAGPEDTQQLINSAASAASPNRSAPSAAPSD <b>MERG</b> SGT <b>AA</b> SSSRASATISH	
ZmARGOS3 (SEQ ID NO 6)	(1)		----- <b>MA</b> SRSS <b>AMEGGA</b> AI	
	(1)		E S A SSS S	
		51		
AtARGOS1 (SEQ ID NO 26)	(35)		MSFR <b>SS</b> PEKSKQELRRSF <b>SAQ</b> KRMMIPANY <b>FS</b> LESLELLVGLTASLLILP	100
AtARGOS4 (SEQ ID NO 104)	(1)		----- <b>MF</b> VIGVVMVLLAVLP	
ZmARGOS1 (SEQ ID NO 2)	(51)		SHQR <b>A</b> THR <b>V</b> EEEEEEEP <b>SS</b> RGGGSL <b>C</b> SGYLSL <b>P</b> ALLLLVGV <b>T</b> AS <b>L</b> VL <b>P</b>	
ZmARGOS2 (SEQ ID NO 4)	(50)		SHQR <b>A</b> THR <b>V</b> EEEEEEF <b>P</b> SS <b>S</b> RGAGSL <b>C</b> SGYLSL <b>P</b> ALLLLVGV <b>T</b> AS <b>L</b> VL <b>P</b>	
ZmARGOS3 (SEQ ID NO 6)	(15)		QRN <b>A</b> V <b>K</b> R <b>H</b> L <b>Q</b> R <b>Q</b> E <b>-</b> ADFLDKK <b>V</b> IAS <b>T</b> <b>F</b> SIGAF <b>L</b> VIAC <b>L</b> TV <b>S</b> LL <b>L</b> LP	
	(51)		RAT R V E E SS R S F LLLVGV <b>T</b> AS <b>L</b> LL <b>L</b> LP	101
AtARGOS1 (SEQ ID NO 26)	(85)		LVL <b>P</b> PL <b>P</b> PP <b>F</b> M <b>L</b> LL <b>V</b> P <b>I</b> GIM <b>V</b> LL <b>V</b> L <b>V</b> L <b>A</b> F <b>M</b> P <b>S</b> SH <b>S</b> NANTD <b>V</b> T <b>C</b> N <b>F</b> M <b>-</b> ---	150
AtARGOS4 (SEQ ID NO 104)	(16)		AVL <b>P</b> PL <b>P</b> PP <b>P</b> M <b>L</b> MG <b>I</b> P <b>W</b> L <b>M</b> L <b>M</b> L <b>I</b> L <b>V</b> L <b>A</b> I <b>Y</b> Y <b>P</b> PH <b>Q</b> A <b>H</b> F <b>L</b> S <b>S</b> S <b>F</b> D <b>T</b> T <b>S</b> R <b>H</b>	
ZmARGOS1 (SEQ ID NO 2)	(101)		LVL <b>P</b> PL <b>P</b> PP <b>P</b> S <b>M</b> L <b>M</b> L <b>V</b> P <b>V</b> A <b>M</b> LL <b>L</b> L <b>L</b> V <b>L</b> A <b>F</b> M <b>P</b> T <b>S</b> S <b>T</b> G <b>R</b> G <b>G</b> T <b>G</b> P <b>T</b> <b>Y</b> M <b>-</b> ---	
ZmARGOS2 (SEQ ID NO 4)	(99)		LVL <b>P</b> PL <b>P</b> PP <b>P</b> S <b>L</b> L <b>M</b> L <b>V</b> P <b>V</b> A <b>M</b> LL <b>L</b> L <b>L</b> V <b>L</b> A <b>F</b> M <b>P</b> T <b>S</b> S <b>T</b> G <b>R</b> G <b>G</b> T <b>G</b> P <b>T</b> <b>Y</b> M <b>-</b> ---	
ZmARGOS3 (SEQ ID NO 6)	(64)		LVL <b>P</b> PL <b>P</b> PP <b>P</b> S <b>L</b> L <b>M</b> L <b>P</b> V <b>C</b> L <b>L</b> V <b>L</b> L <b>V</b> L <b>A</b> F <b>M</b> P <b>T</b> D <b>V</b> R <b>S</b> M <b>A</b> S <b>S</b> Y <b>L</b> -	
	(101)		LVL <b>P</b> PL <b>P</b> PP <b>P</b> S <b>L</b> L <b>M</b> L <b>V</b> P <b>V</b> A <b>L</b> L <b>L</b> L <b>L</b> L <b>L</b> L <b>L</b> V <b>L</b> A <b>F</b> M <b>P</b> T <b>S</b> T <b>G</b> G T Y M	151
AtARGOS1 (SEQ ID NO 26)	(131)		--	
AtARGOS4 (SEQ ID NO 104)	(66)		VM	
ZmARGOS1 (SEQ ID NO 2)	(147)		--	
ZmARGOS2 (SEQ ID NO 4)	(145)		--	
ZmARGOS3 (SEQ ID NO 6)	(106)		--	
	(151)		--	

3

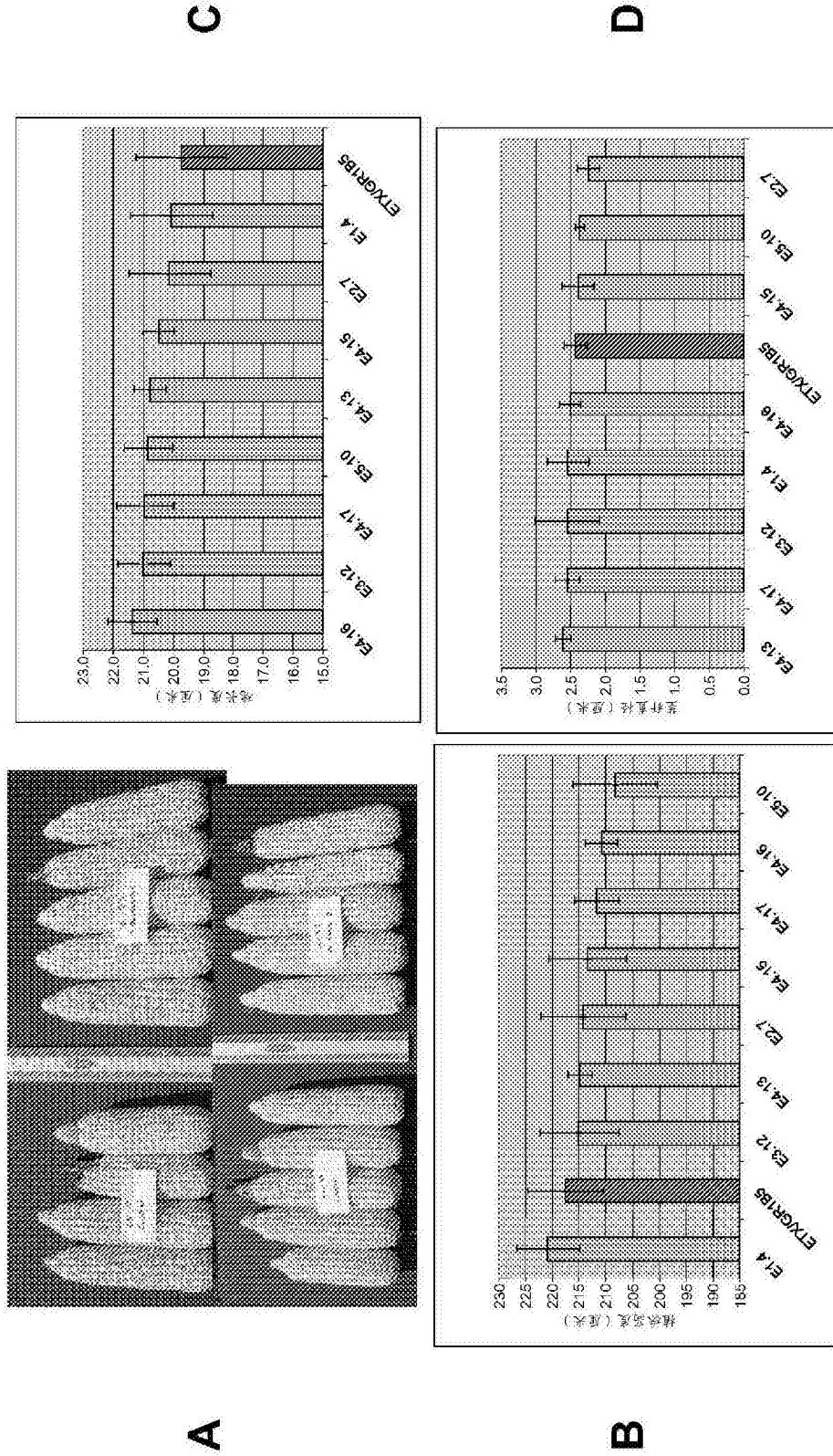


图 4

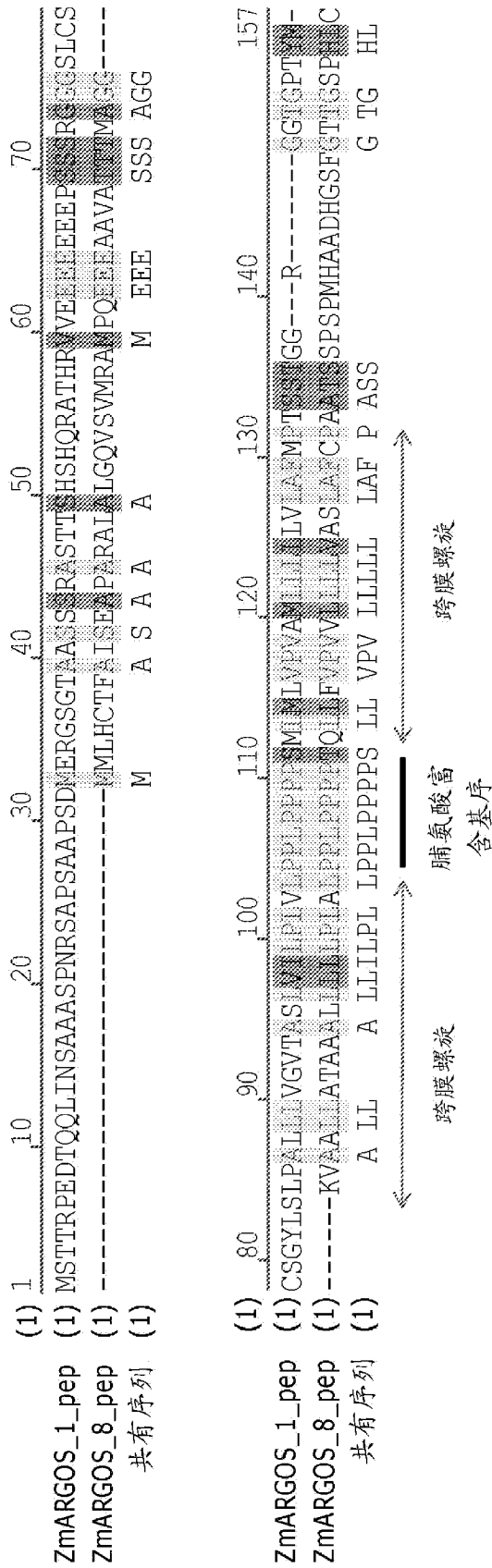


图 5

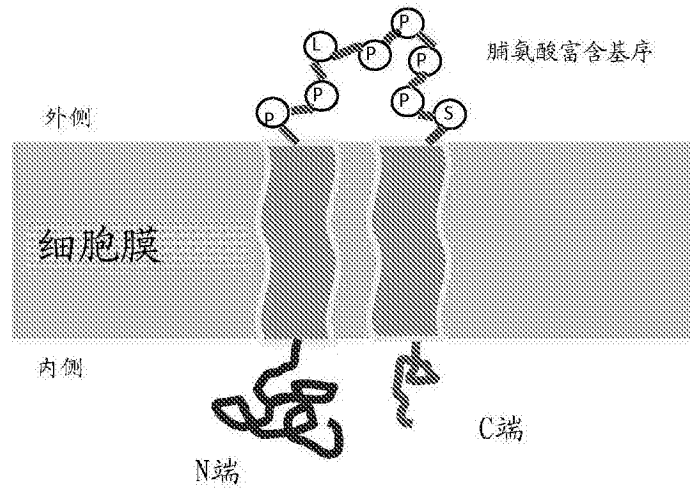
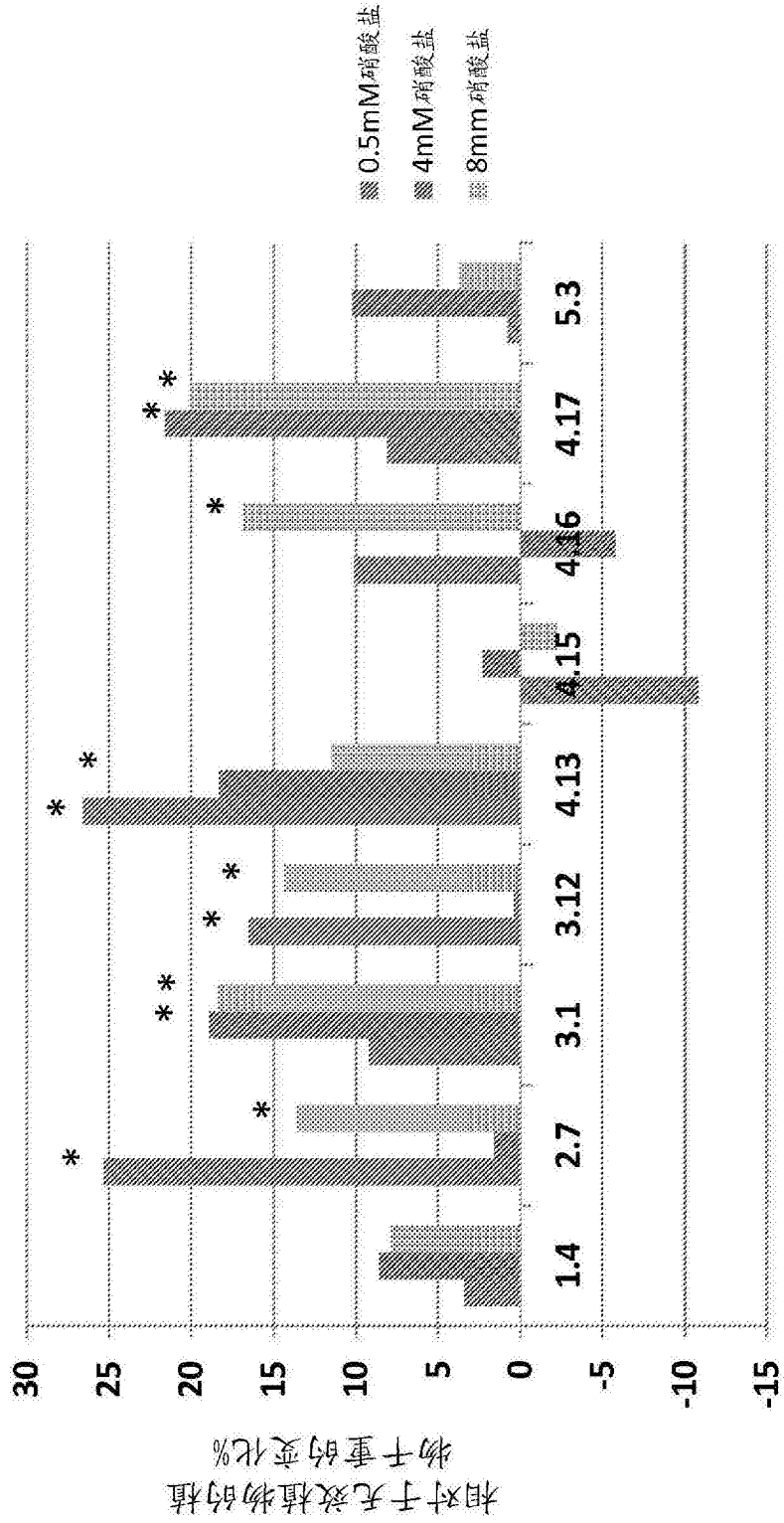


图 6



转基因事件

图 7

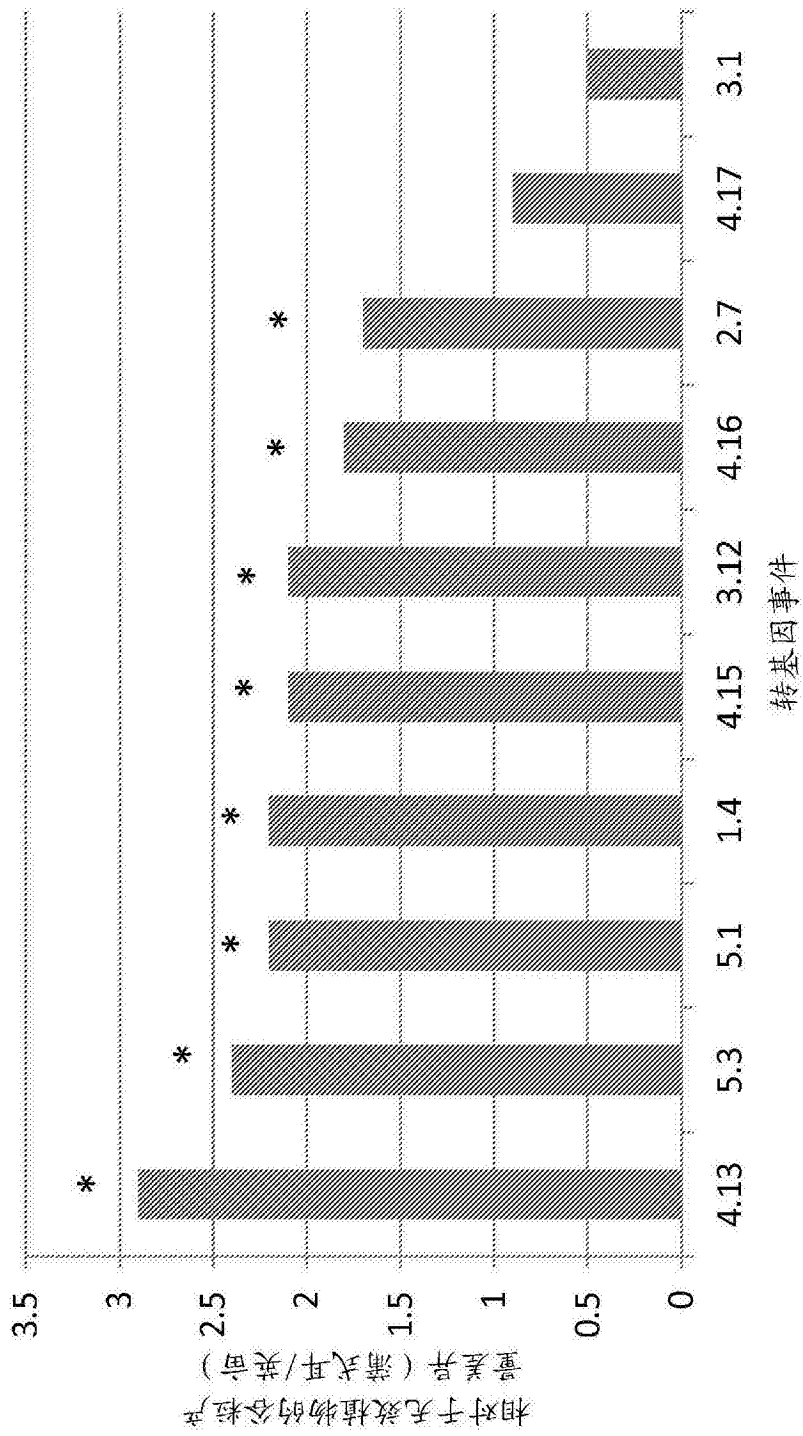
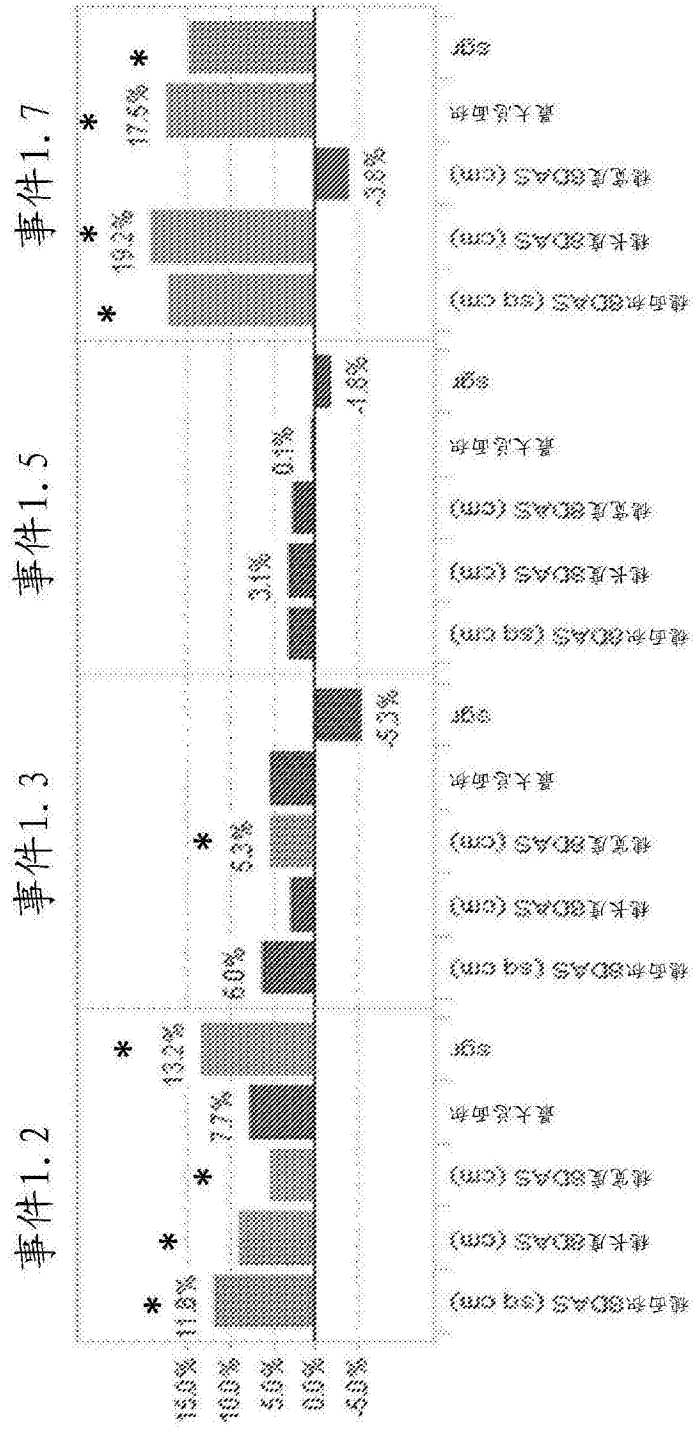


图 8

低硝酸盐-2mM



相对于无效植物的变化%

图 9



高硝酸盐-6.5mM

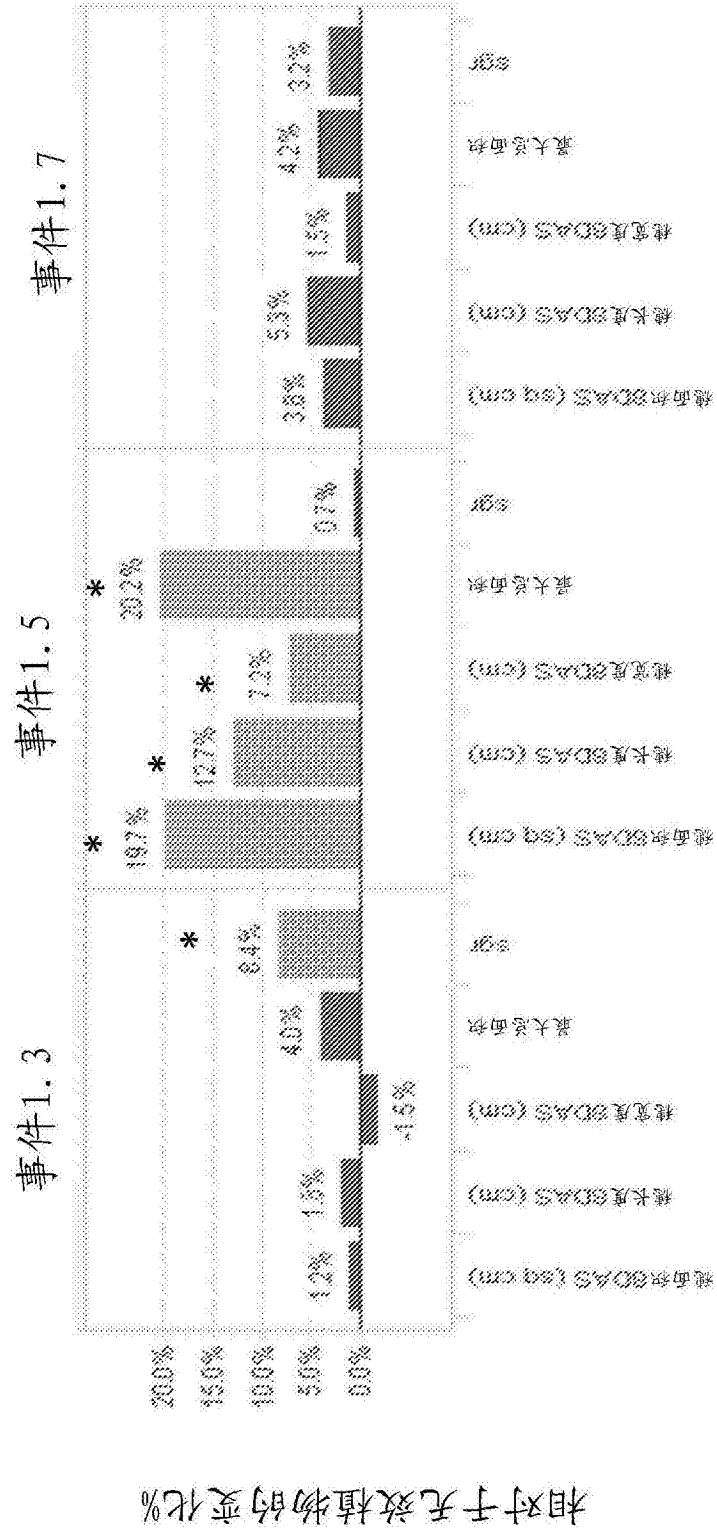


图 10

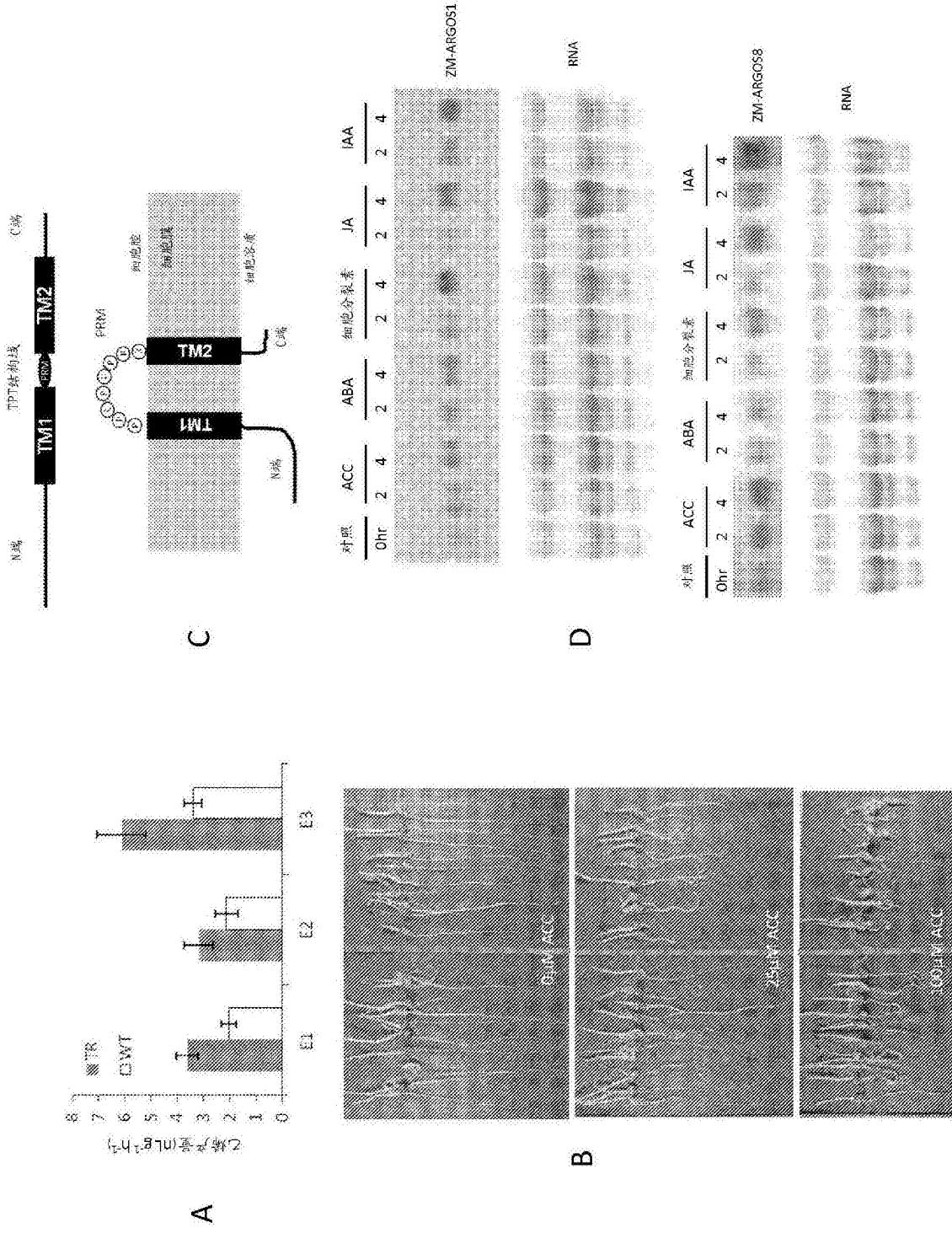


图 11

		151	165
BAHIAGRASS_ASSM_NODE_247924_RC	(82)	LIVLPI	LPPIPP
BAHIAGRASS_ASSM_NODE_583424	(17)	LIILPI	LPPIPP
BAHIAGRASS_ASSM_NODE_91017_RC	(142)	LIILPI	LPPIPP
BG_66629_182675_186771_CON	(65)	LIILPI	LPPIPP
RESCON2_INCOMPLETE	(32)	LIILPI	LPPIPP
RESURRECTIONGRASS_ASSM_NODE_128576	(47)	LLVLPI	LPPIPP
SB04G023130.1	(52)	LLVLPI	LPPIPP
SB05G006900.1	(61)	LIILPI	LPPIPP
SB06G017750.1	(96)	LVILPI	LPPIPP
SB07G001405.1	(65)	LLVLPI	LPPIPP
SB09G020520.1	(68)	LVFLPI	LPPIPP
SUDANGRASS_ASSM_NODE_32838	(64)	LVVLPI	LPPIPP
ZMARGOS_1_PEP	(96)	LVILPI	LPPIPP
ZMARGOS_3_PEP	(59)	LIILPI	LPPIPP
ZMARGOS_4_PEP	(100)	LVFLPI	LPPIPP
ZMARGOS_5_PEP	(67)	LIILPI	LPPIPP
ZMARGOS_6_PEP	(16)	LIILPI	LPPIPP
ZMARGOS_7_PEP	(55)	LVVLPI	LPPIPP
ZMARGOS_8_PEP	(57)	LIILPI	LPPIPP
ZMARGOS_9_PEP	(79)	LIVLPI	LPPIPP
共有序列	(151)	LLVLPLVLPPPLPPPP	

LX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>LPLX<sub>3</sub>LPPLX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>PP

X1 -- L, V, I

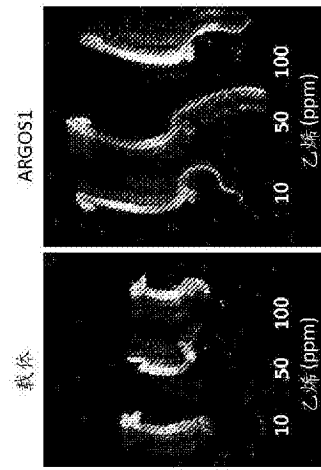
X2 -- L, V, I, F

X3 -- V, L, A

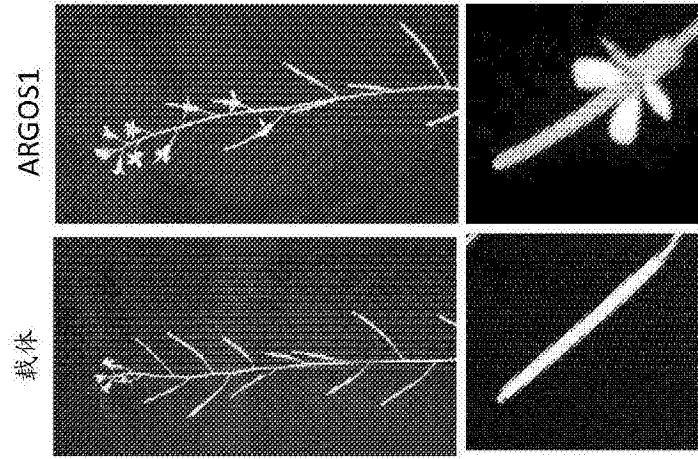
X4 -- P, Q, S

X5 -- P, A

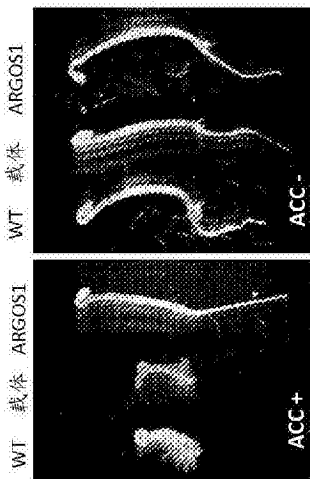
图 12



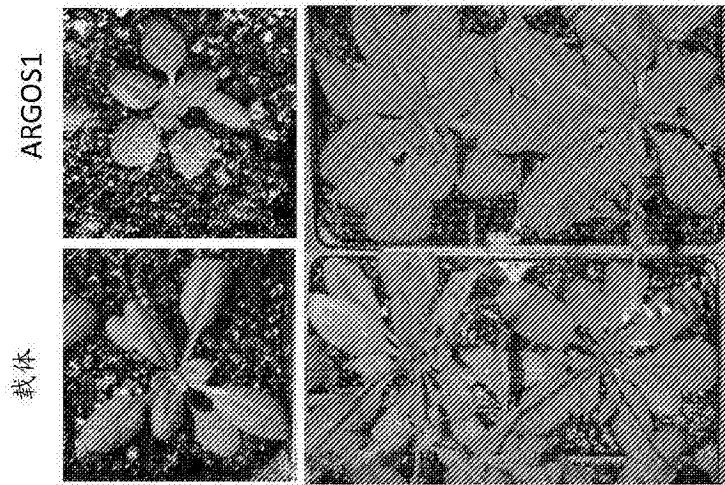
B



D



A



C

图 13

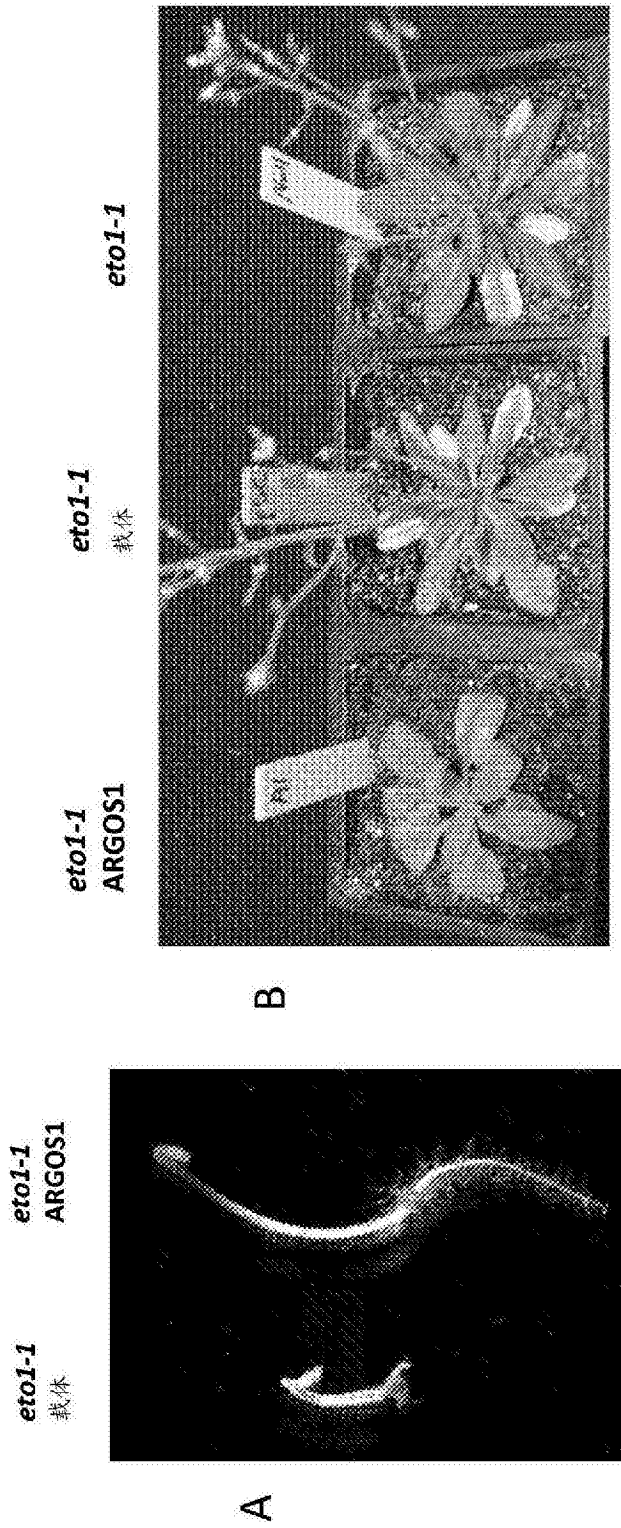


图 14

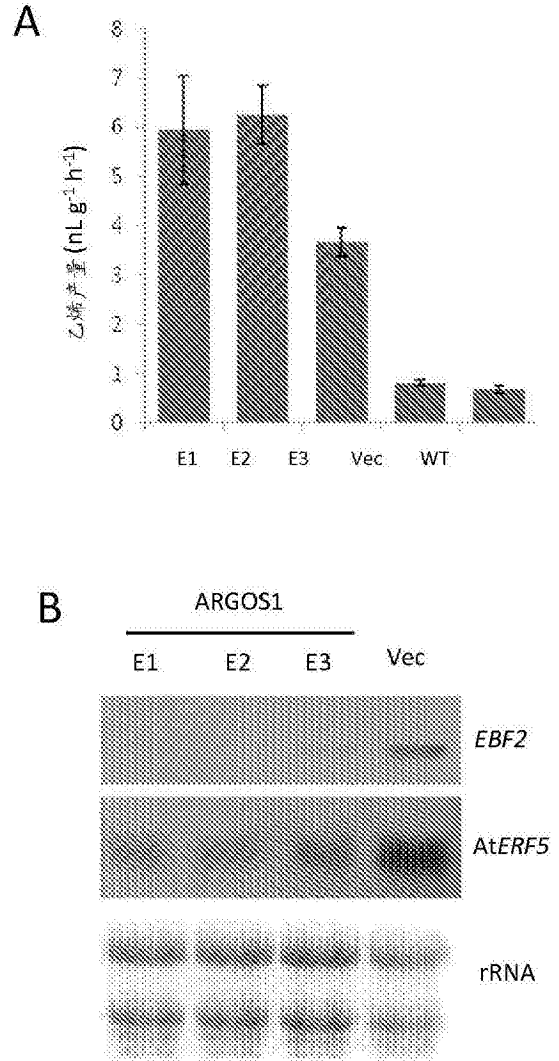
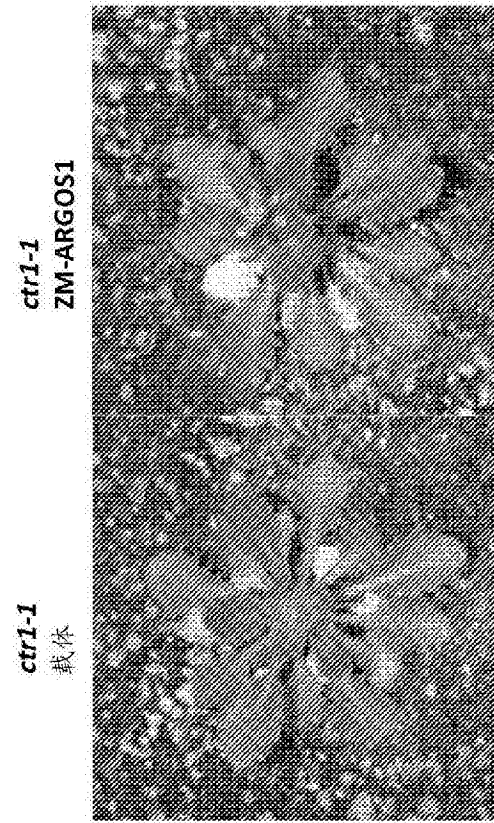


图 15



B



A

图 16

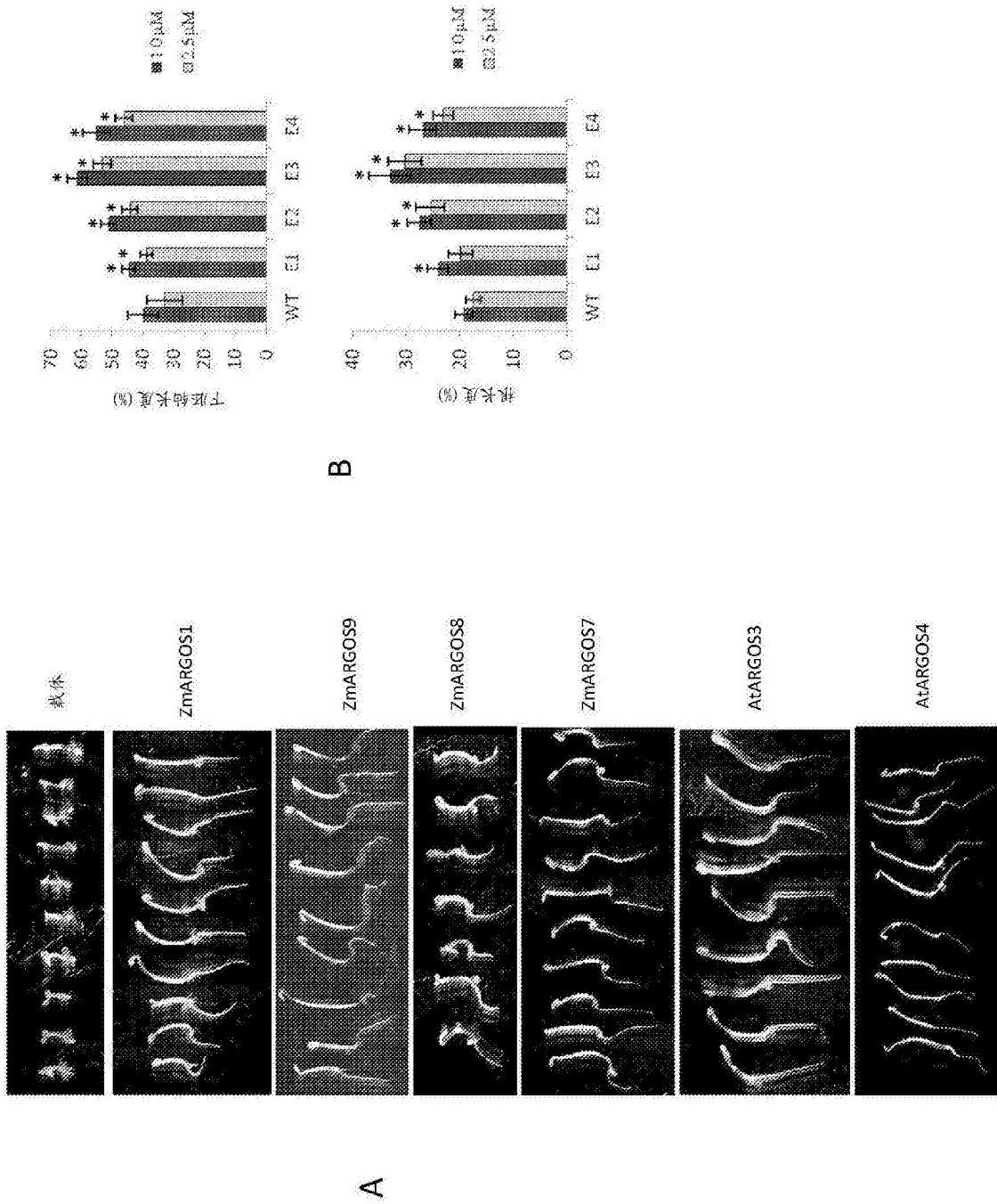


图 17

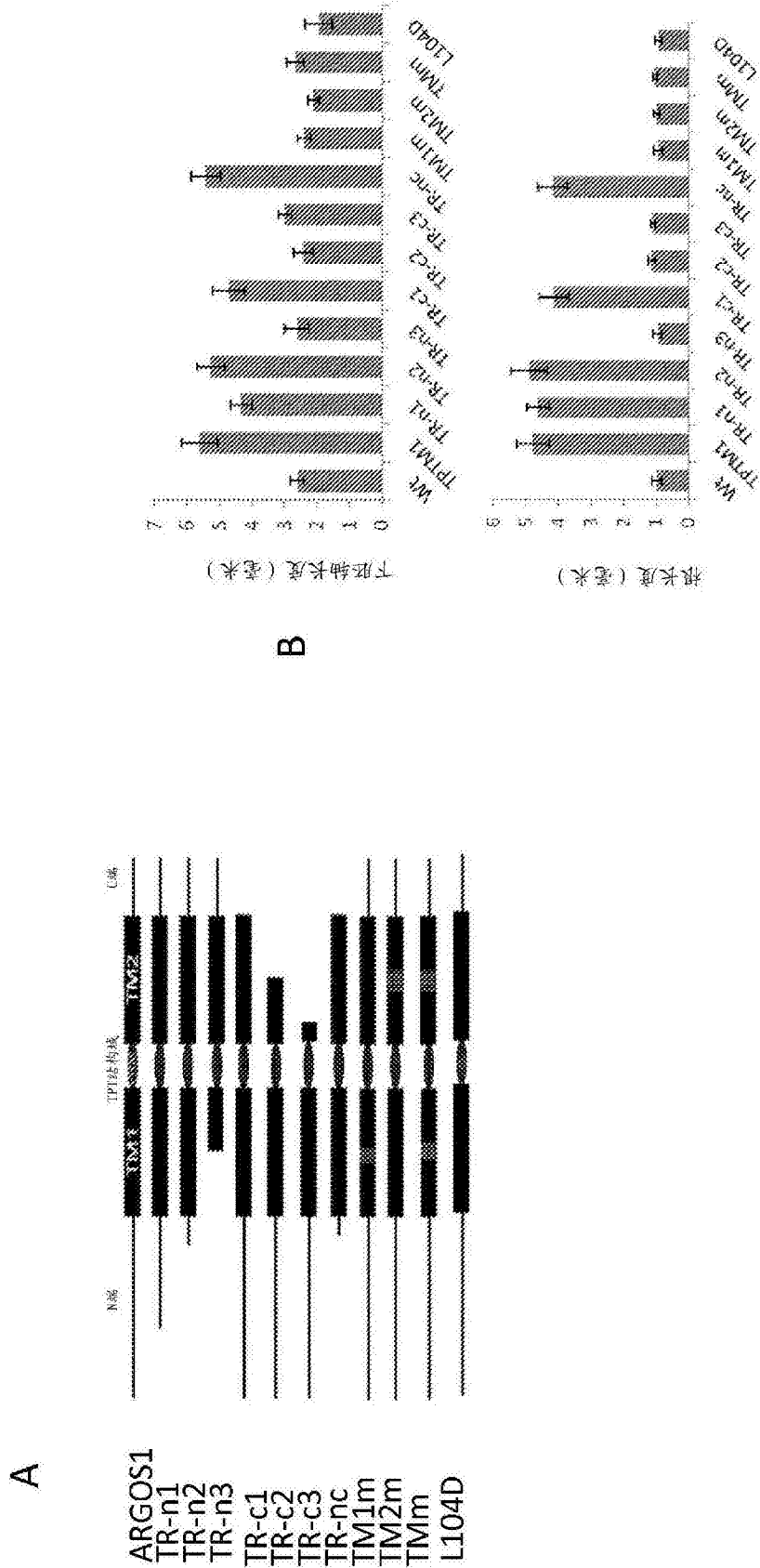


图 18



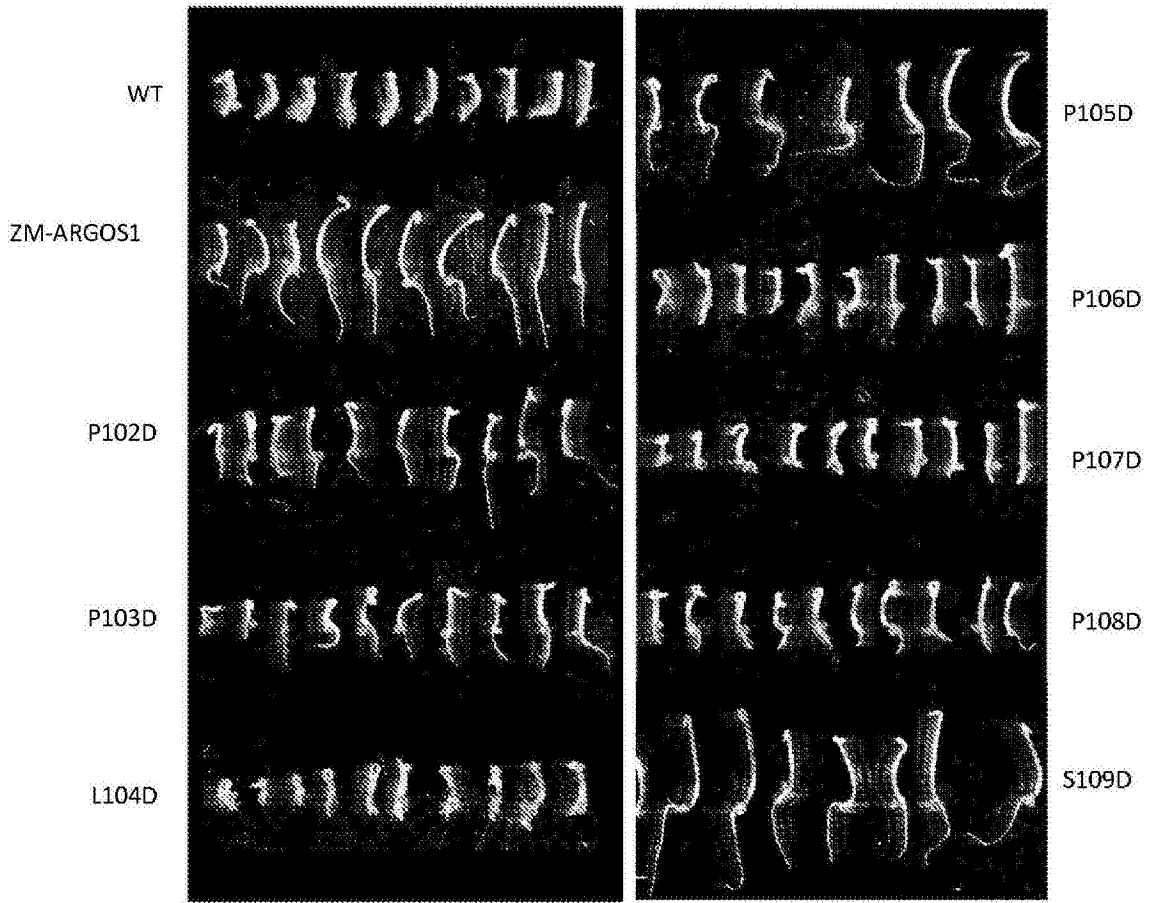


图 19

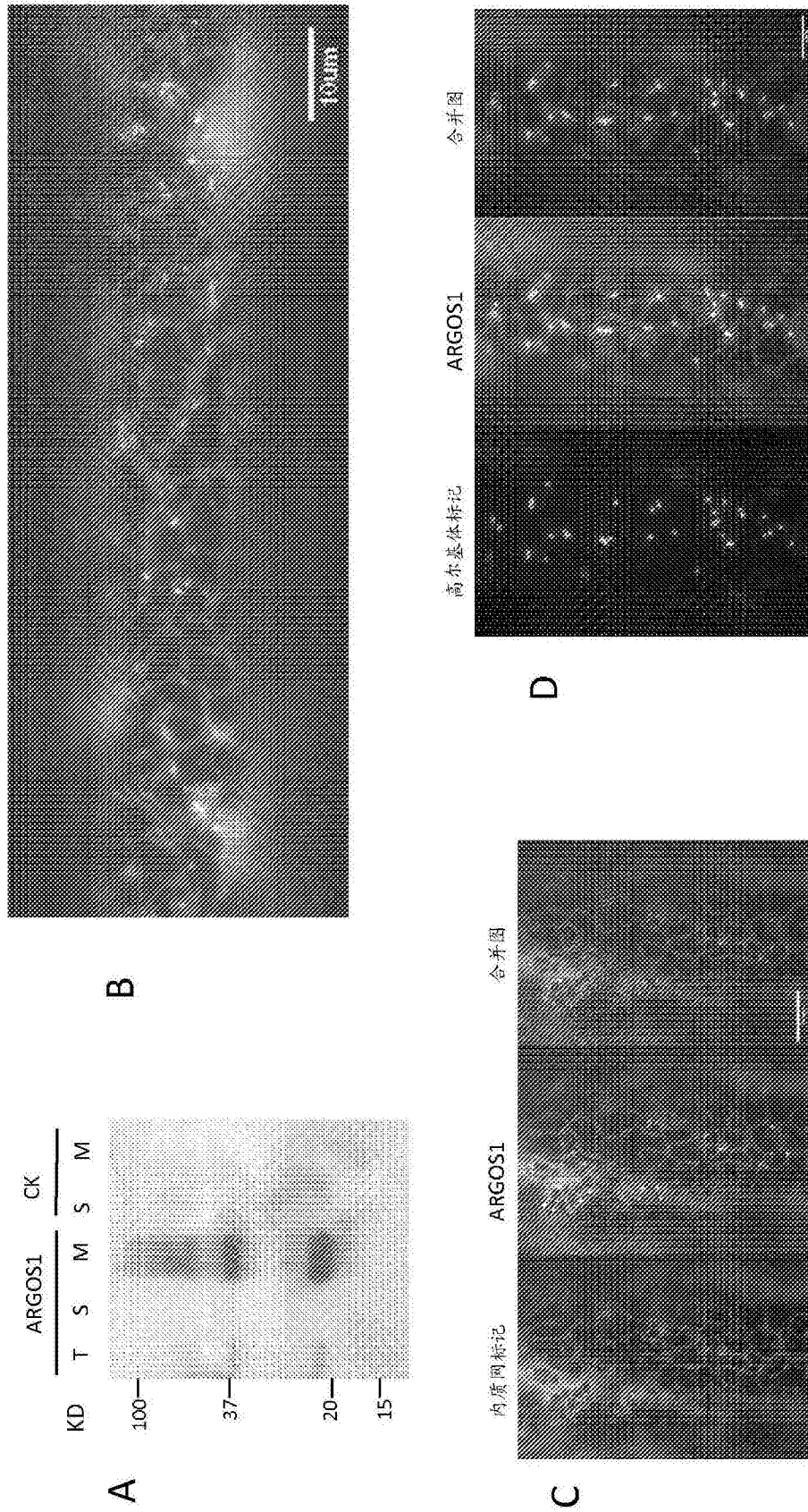


图 20

ID	Seq	TMSE1	TMSE2	Seq	同一性	同一性
					TMSE1	TMSE2
11	37	ATT-MAGKVAALLATAAALLLLLPLAPP-LPPPTQLLFFVPLLIVASLA-FCFA	93	1.00	1.00	
35	14	ATTTMDGKVAALLATAAALLLLLPLAPP-LPPPTQLLFFVPLLIVASLA-FCFA	71	0.95	0.90	
14	1	-----VMILLAAARAVLLHLLPLAPP-LPPPSLHLLVPLLIVASLA-FLFN	49	0.74	0.70	
37	6	-----VTMLLATAAVLLHLLPLAPP-LPPPSLHLLVPLLIVASLA-FLFN	53	0.68	0.70	
argos6	1	-----MEGSMVLLIVATAAVLLHLLPLAPP-LPPPSLHLLVPLLIVASLA-FVPS	55	0.68	0.70	
32	1	-----MMLIVAT--VILLCLPLVAPP-LPPPELHLLVPLLIVASLA-LFSS	46	0.47	0.60	
9	1	-----MSKVMMLLAATVILLCLPLVAPP-LPPPELHLLVPLLIVASLA-LFSS	52	0.47	0.65	
23	1	--MARCFGLGSLVLAALAASVVLPLMAPP-LPPPELHLLVPLLIVASLA-LFSS	56	0.42	0.45	
24	1	--MARCFGLGSLVLAALAASVVLPLMAPP-LPPPELHLLVPLLIVASLA-LFSS	56	0.42	0.30	
26	59	MIPANYFLESLLVGLTASLLHLLPLAPP-LPPPELHLLVPLLIVASLA-LFSS	116	0.47	0.45	
27	65	LISAYFLESMMVIVGLTASLLHLLPLAPP-LPPPELHLLVPLLIVASLA-LFSS	122	0.42	0.40	
21	29	ARNCACMYSYVLLIALLTLHLLPLAPP-LPPPELHLLVPLLIVASLA-LFSS	86	0.42	0.55	
22	29	ARNCACMYSYVLLIALLTLHLLPLAPP-LPPPELHLLVPLLIVASLA-LFSS	86	0.42	0.60	
30	21	VIASYFSGAFVLAACHTFLHLLPLAPP-LPPPSLHLLVPLLIVASLA-LFSS	78	0.42	0.55	
31	40	VIASYFSGAFVLAACHTFLHLLPLAPP-LPPPSLHLLVPLLIVASLA-LFSS	97	0.42	0.55	
6	38	VIASYFSGAFVLAACHTFLHLLPLAPP-LPPPSLHLLVPLLIVASLA-LFSS	95	0.42	0.55	
argos3	44	VMASYFSGAFVLAACHTFLHLLPLAPP-LPPPSLHLLVPLLIVASLA-LFSS	101	0.42	0.60	
19	38	AATSNYFSEAFVLAACHTFLHLLPLAPP-LPPPSLHLLVPLLIVASLA-LFSS	95	0.37	0.55	
20	50	GGRCYFSEAFVLAACHTFLHLLPLAPP-LPPPTQLLFFVPLLIVASLA-LFSS	107	0.42	0.55	
argos7	43	AAAAGLSAEAFVLAACHTFLHLLPLAPP-LPPPTQLLFFVPLLIVASLA-LFSS	101	0.42	0.70	
12	58	PPAGLSAEAFVLAACHTFLHLLPLAPP-LSPPPSLHLLVPLLIVASLA-LFSS	116	0.42	0.70	
argos9	61	STAAAGLSAEAFVLAACHTFLHLLPLAPP-LPPPSLHLLVPLLIVASLA-LFSS	119	0.42	0.70	
argos8	26	GFCARYFVSKSCLLAVVLLVPLAPP-LPPPSLHLLVPLLIVASLA-LFSS	83	0.53	0.45	
10	34	GFCARYFVSKSCLLAVVLLVPLAPP-LPPPSLHLLVPLLIVASLA-LFSS	91	0.47	0.50	
36	31	GFCARYFVSKSCLLAVVLLVPLAPP-LPPPSLHLLVPLLIVASLA-LFSS	88	0.58	0.40	
13	44	TPAFEMETAMVLLHLLVAVLLVPLAPP-LPPPSLHLLVPLLIVASLA-LFSS	102	0.42	0.40	
18	13	ASPVMDGKMAVLLAVAAVLLHLLPLAPP-LPPPSLHLLVPLLIVASLA-LFSS	64	0.74	0.80	
7	79	PPGQYFTAGLAALFLCHTLLVPLAPP-LPPPELHLLVPLLIVASLA-LVPS	136	0.47	0.45	
34	47	PPGQYFTAGLAALFLCHTLLVPLAPP-LPPPELHLLVPLLIVASLA-LVPS	105	0.53	0.40	
8	46	AATATHLGPFAAALLACVTATMLHLLPLAPP-LPPPSLHLLVPLLIVASLA-LFSS	103	0.68	0.35	
17	50	GGGGYLVGVAVLLGVVTAFLVPLAPP-LPPPSLHLLVPLLIVASLA-LFSS	107	0.53	0.35	
16	46	GVWGYFVSESLHLLVAVVTAFLVPLAPP-LPPPSLHLLVPLLIVASLA-LFSS	103	0.42	0.50	
2	75	GSLCSGYLSIFALLLVGVTASVILVPLAPP-LPPPSLHLLVPLLIVASLA-LFSS	132	0.47	0.55	
4	4	SLSGYSLS--LPALLLVGVTASVILVPLAPP-LPPPSLHLLVPLLIVASLA-LFSS	130	0.47	0.55	
29	75	GSLMSRYFSIFALLLVGVTASVILVPLAPP-LPPPSLHLLVPLLIVASLA-LFSS	132	0.42	0.50	
argos1	121	SSSSRYLSIFALLLVGVTASVILVPLAPP-LPPPSLHLLVPLLIVASLA-LFSS	178	0.53	0.50	
28	19	LNGSSLIARSVALLLFLSLLHLLPLAPP-LPPPSLHLLVPLLIVASLA-LFSS	76	0.47	0.45	
25	19	AFMLRFLGPKSMTMFMVLLTIAIVLPLMAPP-LPPPSLHLLVPLLIVASLA-LFSS	77	0.26	0.40	
15	78	QTAPCYFTVSELVMAFVAVVAVLAVLPLAPP-LPPPSLHLLVPLLIVASLA-LFSS	135	0.37	0.50	
33	79	FVPPCYFTVSELVMAFVAVVAVLAVLPLAPP-LPPPSLHLLVPLLIVASLA-LFSS	136	0.32	0.55	

图 21

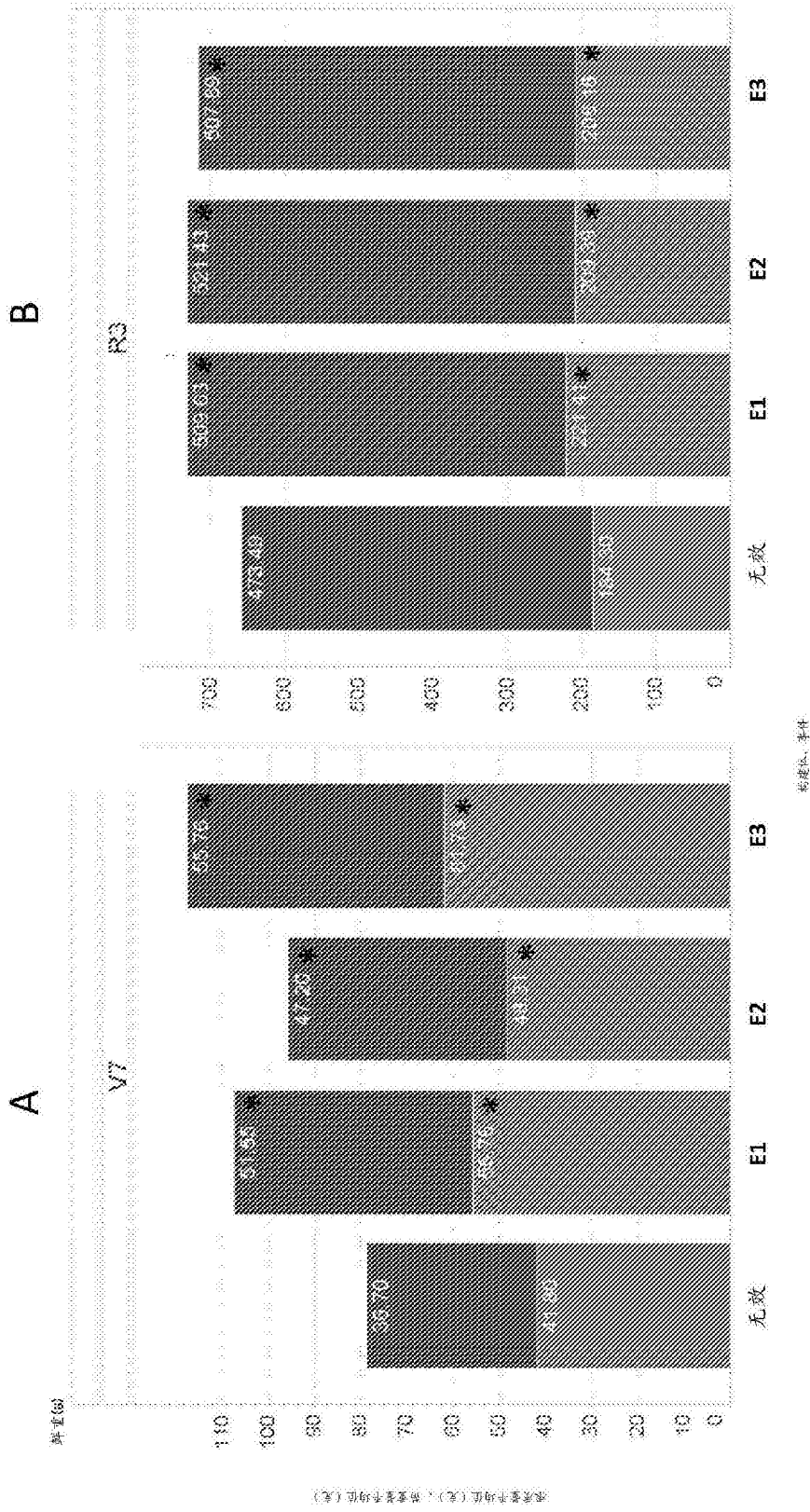


图 22

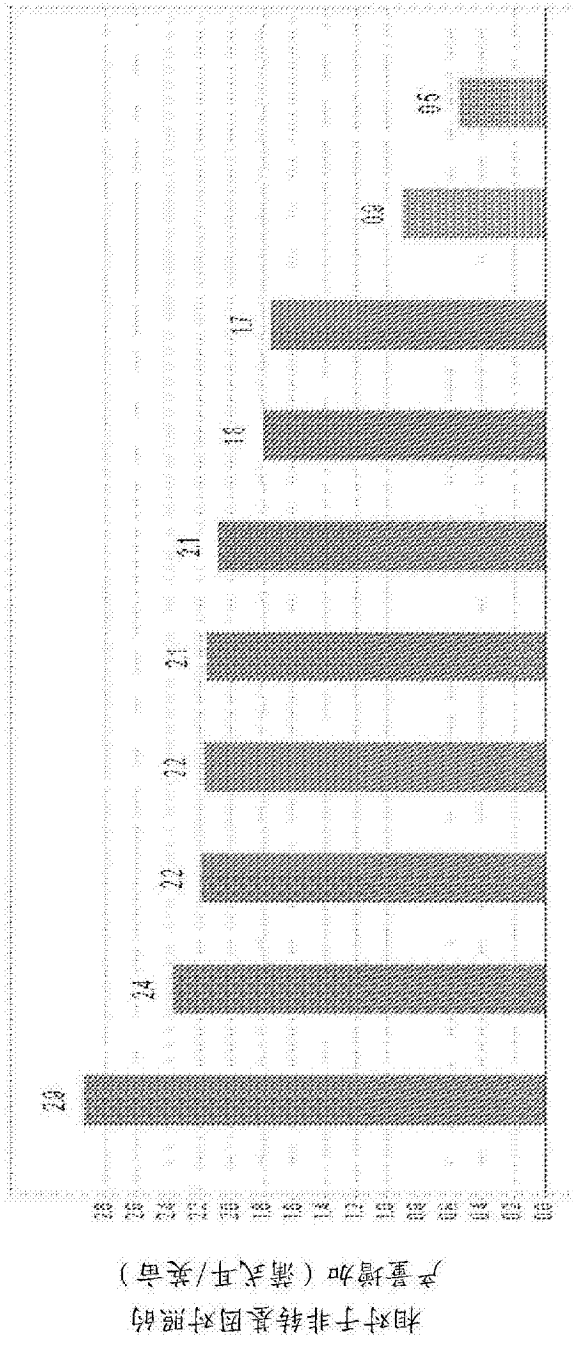


图 23