

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 247148 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **438703**

(22) Data zgłoszenia: **2021.08.06**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.02.13 BUP 07/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.05.19 WUP 20/2025**

(51) MKP:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet Jagielloński, Kraków, PL
Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk, Poznań, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

SHAYAN SARKAR, Kraków, PL
ARPAN KUMAR BASAK, Kraków, PL
KENJI YAMADA, Kraków, PL
JAKUB BIZAN, Pleszew, PL
PAWEŁ BEDNAREK, Poznań, PL
PAWEŁ CZERNIAWSKI, Poznań, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Rafał Witek, Wrocław, PL

Uwaga: Wykaz sekwencji w postaci elektronicznej jest dostępny
na stronie internetowej Urzędu Patentowego RP

(54) Tytuł:

Promotor aktywowany przez białka MYB47 i MYB95 oraz zawierający go system ekspresyjny

PL 247148 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest promotor aktywowany przez białka MYB47 i MYB95 oraz zawierający go system ekspresyjny, który może być wykorzystany w biotechnologii roślin.

Od kiedy ludzie wybierali i rozwijali uprawy rolne, aby wykazywały wysokie plony i dobry smak, uprawy rolne stały się słabsze niż rośliny dzikie pod względem oporności na szkodniki i choroby. Dużym problemem jest to, jak możemy kontrolować szkodniki roślin w celu utrzymania wystarczającej dostępności pożywienia. Dlatego nadal pożądane jest zwiększenie zestawu oporności dostępnych u roślin.

Gatunki roślin Brassicaceae i ich bliscy krewni rozwinęli unikalne struktury pochodzące z retikulum endoplazmatycznego (ER), a mianowicie ciała ER (znane również jako rozszerzone cysterny lub ciała wrzecionowate) (Iversen, 1970; Ridge i wsp., 1999; Matsushima i wsp., 2003). Ciała ER są subdomenami retikulum endoplazmatycznego gromadzącymi β -glukozydazy (BGLU), które posiadają sygnał retencji w ER (Bonnett Jr i Newcomb, 1965; Matsushima i wsp., 2003).

Liście rozety gromadzą ciała ER w niektórych większych komórkach epidermy (Nakazaki i wsp., 2019b; Nakazaki i wsp., 2019a). Zranienie liści rozety wywołuje jednak akumulację ciałek ER w całej epidermie liścia za pośrednictwem hormonu zranienia jasmonianu (JA) po zranieniu liścia (Matsushima i wsp., 2002; Matsushima i wsp., 2003). Rola JA i zranienia w tworzeniu ciałek ER dodatkowo sugeruje związek ciałek ER z obroną roślin (Yamada i wsp., 2011; Nakano i wsp., 2014). Tworzenie indukowalnych przez JA ciałek ER obejmuje indukcję *TSA1* i *BGLU18* (Ogasawara i wsp., 2009; Stefanik i wsp., 2020).

Czynniki transkrypcyjne MYB obejmują dużą rodzinę białek, które zawierają konserwatywną domenę wiążącą DNA i działają w różnych procesach biologicznych (Martin i Paz-Ares, 1997; Jin i Martin, 1999; Stracke i wsp., 2001; Dubos i wsp., 2010). U roślin lądowych większość czynników transkrypcyjnych MYB jest podzielona na podkłady zachowane u różnych gatunków (Stracke i wsp., 2001; Miliard i wsp., 2019; Jiang i Rao, 2020). Niektóre czynniki transkrypcyjne MYB są jednak unikalne dla określonych linii rodowych i tworzą podkłady specyficzne dla linii rodowej. U *Arabidopsis* kład MYB47/95 jest specyficzny dla linii rodowej (Jiang i Rao, 2020).

Wynalazek ma na celu dostarczenie nowych narzędzi, które można wykorzystać w biotechnologii roślin.

Nieoczekiwanie, problem określony powyżej został rozwiązany w niniejszym wynalazku.

Przedmiotem wynalazku jest promotor aktywowany przez białka MYB47 i MYB95 mający sekwencję przedstawioną jako Sekw. Id. nr 13.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest system ekspresyjny zawierający kasetę efektorową i kasetę reporterową charakteryzujący się tym, że kasetę efektorową zawiera gen kodujący białko MYB47 lub MYB95 lub gen kodujący białko fuzyjne zawierające białko MYB47 lub MYB95 pod kontrolą dowolnego znanego, korzystnie indukowalnego promotora, a kasetę reporterową zawiera gen kodujący białko reporterowe pod kontrolą promotora aktywowanego przez białko MYB47 lub MYB95, przy czym promotor aktywowany przez białko MYB47 lub MYB95 ma sekwencję przedstawioną jako Sekw. Id. nr 13. Korzystnie, gen kodujący białko MYB47 koduje białko o sekwencji przedstawionej jako Sekw. Id. nr 7. Korzystnie, gen kodujący białko MYB95 koduje białko o sekwencji przedstawionej jako Sekw. Id. nr 8. Korzystnie, gen kodujący białko MYB47 ma sekwencję przedstawioną jako Sekw. Id. nr 5. Korzystnie, gen kodujący białko MYB95 ma sekwencję przedstawioną jako Sekw. Id. nr 6. Korzystnie, gen kodujący białko fuzyjne zawierające białko MYB47 koduje białko o sekwencji przedstawionej jako Sekw. Id. nr 11. Korzystnie, gen kodujący białko fuzyjne zawierające białko MYB95 koduje białko o sekwencji przedstawionej jako Sekw. Id. nr 12. Korzystnie, gen kodujący białko fuzyjne zawierające białko MYB47 ma sekwencję przedstawioną jako Sekw. Id. nr 9. Korzystnie, gen kodujący białko fuzyjne zawierające białko MYB95 ma sekwencję przedstawioną jako Sekw. Id. nr 10. Korzystnie, kasetę efektorową ma sekwencję przedstawioną jako Sekw. Id. nr 2 lub 3. Korzystnie, kasetę reporterową ma sekwencję przedstawioną jako Sekw. Id. nr 4.

Wynalazcy donoszą, że MYB47 i MYB95 regulują ekspresję *TSA1* i *BGLU18* oraz indukowane przez JA tworzenie ciałek ER u *Arabidopsis*. Zarówno MYB47, jak i MYB95 rozpoznawały motyw DNA w promotorze *TSA1* *in vitro* oraz aktywowały promotor genu *TSA1* *in vivo*. Przedmiotowy wynalazek może być bardzo przydatny dla przemysłu rolniczego, zwiększając „zestaw narzędzi” do produkcji roślin opornych na szkodniki.

Porównanie sekwencji promotorowych homologów *TSA1* z rodziny Brassicaceae ujawniło dwa konserwatywne motywy, box1 (CACGTTTA) i box2 (GTTAGTT), w regionie bliskim kodonu start (Stefanik i wsp., 2020). Zbadaliśmy zatem, czy MYB47 i MYB95 wiążą się z box1 i box2 w celu regulacji ekspresji *TSA1* u *Arabidopsis*. Wynalazcy odkryli, że obydwa czynniki transkrypcyjne *in vitro* wiązały się z box2, lecz nie z box1. Tę specyficzność wiązania można było przewidzieć, ponieważ sekwencja box2 jest taka sama jak sekwencja miejsca wiązania DNA MYB (element Myb1) znaleziona w promotorach genów związanych z obroną u tytoniu i pomidora (Pontier i wsp., 2001; Chakravarthy i wsp., 2003). W przeciwieństwie do testów *in vitro*, wynalazcy stwierdzili, że zarówno element box1, jak i box2 są niezbędne do aktywacji promotora *TSA1* przez MYB47 i MYB95 *in vivo*. To odkrycie wskazuje, że box1 może odgrywać pewną rolę w regulacji *TSA1* przez MYB47 i MYB95. Sugeruje to, że MYB47 i MYB95 ulegają modyfikacjom potranslacyjnym lub są powiązane z dodatkowym(i) czynnikiem(ami), co zmienia ich specyficzność wiązania DNA w celu aktywacji promotora *TSA1* w komórkach roślinnych. Łącznie wyniki te pokazują, że *TSA1* jest bezpośrednim celem dla MYB47 i MYB95. BGLU18 jest składnikiem ciałek ER indukowanych przez JA (Ogasawara i wsp., 2009), co sugeruje, że MYB47 i MYB95 bezpośrednio regulują gen BGLU18.

Ten opis jest dokładniej wyjaśniony na załączonym rysunku.

Figura 1. MYB47 i MYB95 aktywują promotor *TSA1*.

(A) Oczyszczone z wykorzystaniem powinowactwa białka fuzyjne znakowane GST poddano SDS-PAGE, a następnie barwieniu Coomassie.

(B) Promotor *TSA1 Arabidopsis* zawiera konserwatywne sekwencje (box1 i box2), oprócz sekwencji inicjatora (Inr). Wskazano sekwencje box1 i box2 w oligonukleotydach kompetycyjnych (pTSA1, pTSA1-m1, pTSA1-m2 i pTSA1-m1/m2). Małe litery oznaczają zmutowane nukleotydy.

(C) Wiązanie MYB47 do promotora *TSA1 in vitro*. Zastosowano częściowo oczyszczone białko fuzyjne GST-MYB47 (Fig. 3) i biotynylowaną sondę pTSA1.

(D) Wiązanie MYB95 do promotora *TSA1 in vitro*. Zastosowano częściowo oczyszczone białko fuzyjne GST-MYB95 (Fig. 3) i biotynylowaną sondę pTSA1.

Figura 2. Aktywacja promotora *TSA1* przez MYB47 i MYB95 w liściach *Nicotiana benthamiana*.

(A) *Agrobacterium* niosące konstrukt efektorowy poddano wspólnej infiltracji do liści *N. benthamiana* razem z *Agrobacterium* niosącym konstrukt reporterowy. Obrazy przedstawiają barwienie liści *N. benthamiana* oparte o GUS. Pasek skali = 0,5 cm.

(B) Aktywacja promotora *TSA1* przez MYB47 i MYB95 *in planta*. Wykres przedstawia stosunki aktywności β -glukuronidazy/lucyferazy (GUS/LUC) mierzone 3 dni po agroinfiltracji liści *N. benthamiana* konstruktami efektorowym, reporterowym i *Prom35S:LUC*. Słupki błędów przedstawiają SE (n = 6). Różne małe litery wskazują na różnice istotne ($p < 0,05$; test Tukeya).

Figura 3. Jądrowa lokalizacja MYB47 i MYB95.

(A) Analiza immunoblot białek fuzyjnych GFP-MYB47 i GFP-MYB95 wyekstrahowanych z liści *Nicotiana benthamiana*. Białka wyekstrahowano z liści infiltrowanych *Agrobacterium* niosącymi wskazanymi konstrukty i poddano analizie immunoblot z przeciwciałem anti-GFP. Grot strzałki wskazuje białko fuzyjne GFP-MYB47 lub GFP-MYB95. Barwienie Coomassie ukazuje ilość białka nakładanego na każdą ścieżkę.

(B) Obraz z konfokalnego laserowego mikroskopu skaningowego przedstawiający sygnał GFP w liściach *N. benthamiana* agroinfiltrowanych wskazanymi konstruktyami. Pasek skali = 50 μ m.

METODY

Materiały roślinne i warunki wzrostu

Eksperymenty z agroinfiltracją prowadzono na roślinach *Nicotiana benthamiana*. Nasiona *N. benthamiana* kiełkowano w szklarni w 22°C przy fotoperiodzie 16 godzin światła/8 godzin ciemności.

Konstrukcja plazmidów

Do skonstruowania *Prom35S:GFP-MYB47* i *Prom35S:GFP-MYB95* wykorzystano binarny wektor Gateway *pGWB406* (dar od T. Nakagawy). Regiony kodujące *MYB47* i *MYB95* przeniesiono z odpowiednich wektorów wejściowych do wektora docelowego *pGWB406* przy pomocy klonazy LR, wytwarzając w ten sposób odpowiednio wektory *pGWB406/MYB47* i *pGWB406/MYB95*. Podobnie do skonstruowania *Prom35S:tagRFP-MYC2*, *Prom35S:tagRFP-MYC3* i *Prom35S:tagRFP-MYC4* wykorzystano binarny wektor Gateway *pGWB561* (dar od T. Nakagawy). Regiony kodujące *MYC2*, *MYC3* i *MYC4* przeniesiono z odpowiednich wektorów wejściowych do wektora docelowego *pGWB561* dla wytworzenia odpowiednio wektorów *pGWB561/MYC2*, *pGWB561/MYC3* i *pGWB561/MYC4*.

Sekwencję promotora *TSA1* (~635 pz) powielono z genomowego DNA *Arabidopsis* ekotypu Col-0 przy pomocy PCR z użyciem starterów pTSA1HindIII (AGACAAGCTTGTCTGTCCATGGATTGATAT) i pTSA1BamHI (ACAGGGATCCAGCTTGAAGAAGCATCAC). Produkt PCR wklonowano do wektora binarnego pBI121 przy użyciu endonukleaz restrykcyjnych *HindIII* i *BamHI* w celu wytworzenia konstruktów *pBI121/PromTSA1:GUS*. Dwie zmutowane wersje promotora *TSA1* wytworzono w reakcji PCR z wydłużaniem nakładających się odcinków (ang. *overlap extension PCR*) przy użyciu par starterów pTSA1HindIII/mbox-pTSA1-R (mbox1-pTSA1-R, GAATGAAATCTTTCCCCAAGTTAGTTACAACGGTTT; mbox2-pTSA1-R, GAATGAAATCCACGTTTAACCCCTTTACAACGGTTT; mbox1mbox2-pTSA1-R, AAACCGTTGTAAAGGGGTTGGGGAAAGATTTTCATTC) i pTSA1BamHI/mbox-pTSA1-F (mbox1-pTSA1-F, GAATGAAATCTTTCCCCAAGTTAGTTACAACGGTTT; mbox2-pTSA1-F, GAATGAATCCACGTTTAACCCCTTTACAACGGTTT; mbox1mbox2-pTSA1-F, GAATGAAATCTTTCCCCAACCCCTTTACAACGGTTT). Produkty PCR z dwóch reakcji połączono i poddano kolejnej rundzie PCR przy użyciu pary starterów pTSA1HindIII/pTSA1BamHI. Zmutowane wersje promotora *TSA1* wklonowano do wektora pBI121 przy użyciu enzymów *HindIII* i *BamHI* w celu wytworzenia plazmidów *pBI121/m1-PromTSA1:GUS*, *pBI121/m2-PromTSA1:GUS* i *pBI121/m1/m2-PromTSA1:GUS*.

Produkcja białek rekombinowanych

Rekombinowane białka fuzyjne GST-MYB47 i GST-MYB95 wytworzono w komórkach *E. coli* Rosetta 2 (DE3) (Merck) przy użyciu pożywki autoindukcyjnej ZYP-5052, która zawiera pożywkę TB uzupełnioną 1 M MgSO₄, 50x 5052 (0,5% [wag./obj.] glicerolu, 0,05% [wag./obj.] glukozy i 0,2% [wag./obj.] laktozy), 20x NPS (0,5 M (NH₄)₂SO₄, 1 M K₂HPO₄ i 1 M NaH₂PO₄) (Studier, 2005). Komórki noszące plazmid *pDEST15/MYB47* lub *pDEST15/MYB95* hodowano wstępnie w pożywce TB, a następnie przeniesiono do pożywki indukcyjnej. W celu otrzymania GST-MYB47, komórki hodowano w temperaturze 30°C. W celu otrzymania GST-MYB95, komórki najpierw hodowano w 37°C przez 4–5 godzin (do uzyskania OD₆₀₀>1,0), a następnie w 30°C przez noc. Następnie komórki zebrano i przechowywano w -80°C.

Agroinfiltracja

Szczepy *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 i GV3101(pMP90RK) hodowano wstępnie w pożywce LB, a następnie przenoszono do pożywki indukcyjnej (1 g/l NH₄Cl, 0,3 g/l MgSO₄·7H₂O, 0,15 g/l KCl, 10 mg/l CaCl₂, 2,5 mg/l FeSO₄·7H₂O, 2 mM fosforan sodu [pH 7,2], 20% [wag./obj.] glukozy, 20 mM bufor MES-KOH [pH 5,5] i 100 µM acetosyringon) uzupełnione odpowiednimi antybiotykami (Winans i wsp., 1988). Agroinfiltrację liści *N. benthamiana* przeprowadzono jak opisano wcześniej (Sarkar i wsp., 2021). W skrócie, komórki *Agrobacterium* ponownie zawieszono w pożywce do infiltracji (0,5% [wag./obj.] glukozy, 10 mM MES-KOH [pH 5,5], 10 mM MgCl₂ i 200 µM acetosyringon) (OD₆₀₀ = 1,0). Komórki *Agrobacterium* noszące supresor wyciszający p19 (dar od W. Strzałki) ponownie zawieszono w pożywce do infiltracji (OD₆₀₀ = 0,5). Równe objętości tych zawiesin komórek *Agrobacterium* mieszały i infiltrowano do liści 4–5-tygodniowych roślin *N. benthamiana*.

Oczyszczanie rekombinowanego białka fuzyjnego GST

Komórki *E. coli* wykazujące ekspresję białek fuzyjnych GST-MYB47 i GST-MYB95 zawieszono w buforze ekstrakcyjnym (bufor CellLytic B [Merck] zawierający 0,1% [wag./obj.] lizozymu, 0,01% [wag./obj.] DNazy I i 1 mM PMSF), inkubowano na lodzie przez 30 min i poddano lizie przez sonikację. Następnie lizat mieszały z równą objętością 1x soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS) zawierającej 0,1% (obj./obj.) Triton X-100 w 4°C przez 30 min, a nierozpuszczalne pozostałości bakteryjne usunęły przez odwirowanie. Następnie do nadsącza dodano DTT w końcowym stężeniu 1 mM, a rozpuszczalne frakcje inkubowały z perełkami glutation-sefaroza 4B (GE Healthcare) w 4°C przez 1,5 godziny z delikatnym obracaniem. Perełki przeniesiono na kolumnę, a następnie przemyły trzykrotnie 10x objętością PBS zawierającego 0,1% (obj./obj.) Triton X-100. Białka fuzyjne GST-MYB wymywano buforem zawierającym 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 200 mM NaCl i 20 µM glutation. Eluent zawierający GST-MYB47 poddano ultrafiltracji za pomocą Amicon Ultra Centrifugal Filter Unit Ultracel (3K MWCO, Merck) przez wymianę buforu na bufor do dializy (1x PBS, 1 mM DTT, 5% [obj./obj.] glicerolu). Eluent zawierający GST-MYB95 poddano dializie z buforem dializacyjnym w 4°C, a następnie zatężyły przez ultrafiltrację.

EMSA

Eksperymenty EMSA przeprowadzono zgodnie z wcześniejszym opisem (Sarkar i wsp., 2021). W skrócie, biotynylowaną dwuniciową sondą DNA o długości 36 pz oraz DNA kompetycyjny zostały wytworzone przez hybrydyzację 50 µM mieszaniny dwóch komplementarnych oligonukleotydów

(pTSA1-F, GAATGAAATCCACGTTTAAGTTAGTTAC AACGGTTT; pTSA1-R, AAACCGTTGTAAC TA-CTTAAACGTGGATTTCATTC) w 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM NaCl i 1 mM EDTA przez ogrzewanie do 95°C przez 5 min, a następnie powolne chłodzenie do temperatury pokojowej. Oczyszczone białko GST, GST-MYB47 lub GST-MYB95 (500 ng) inkubowano z sondą DNA w buforze wiążącym (10 mM Tris-HCl [pH 7,5], 50 mM KCl, 1 mM DTT, 2,5% [obj./obj.] glicerolu, 5 mM MgCl₂, 0,1% [wag./obj.] IGEPAL CA-630 i 0,05 µg/µl poli(dI-dC)) na lodzie. Do reakcji wiązania dodano oligonukleotydy kompetycyjne (20-krotny nadmiar w stosunku do sondy) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 20 min. Po dodaniu sondy pTSA1 w końcowym stężeniu 5 µM, mieszaninę dalej inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 min, a kompleksy DNA-białko rozdzielono metodą PAGE w 5% (wag./obj.) żelu akryloamid/bis-akryloamid w 0,5x buforze Tris/boran/EDTA (TBE). Próbkę przeniesiono elektroforetycznie z żelu na membranę nylonową (Hybond-N+, Merck). Membranę zablokowano 3% (wag./obj.) odtłuszczonym mlekiem, a biotynylowaną sondę DNA wykrywano koniugatem awidyna-HRP (ThermoFisher) dzięki wzmocnionej luminescencji chemicznej (SuperSignal West Femto, ThermoFisher).

Test transaktywacji promotor-reporter

Komórki *Agrobacterium* zawierające konstrukt efektorowy (*Prom35S:GFP*, *Prom35S:GFP-MYB47* lub *Prom35S:GFP-MYB95*), konstrukt reporterowy (*Prom TSA1:GUS*, *m1-PromTSA1:GUS*, *m2-PromTSA1:GUS* lub *m1/m2-PromTSA1:GUS*) i konstrukt genu lucyferazy (*Prom35S:LUC*) podano wspólnie na liście roślin *N. benthamiana*. Po 3 dniach zakażone liście zebrano i homogenizowano we wstępnie schłodzonym buforze CCRL (Promega). Próbkę odwirowano dwukrotnie po 15 min przy 10 000 obr./min w 4°C. Aktywność GUS została określona jak opisano wcześniej (Jefferson i wsp., 1987), z niewielkimi modyfikacjami. Próbkę każdego nadsącza (25 µl) inkubowano z 75 µl 10 mM 4-metylo-umbelliferylo-β-D-glukuronidem, 0,1% (wag./obj.) laurylosarkozyny sodu i 10 mM β-merkaptotetanolem w buforze CCRL w 37°C przez 0 min (kontrola) lub 30 min. Reakcje zakończono 180 µl 0,2 M Na₂CO₃. Ilość produktu (7-hydroksy-4-metylokumaryny) mierzono za pomocą czytnika mikroplętek (Infinite 200, Tecan, Szwajcaria), przy długościach fali wzbudzenia i emisji odpowiednio 355 i 460 nm. Próbkę powyższych nadsączy wykorzystano również do określenia aktywności LUC przy użyciu zestawu do oznaczania LUC (Promega). Stężenie białka w każdej próbce mierzono metodą Bradforda.

Procedurę barwienia w oparciu o GUS przeprowadzono jak opisano wcześniej (Jefferson i wsp., 1987), z niewielkimi modyfikacjami. W skrócie, liście pocięto na małe kawałki i infiltrowano próżniowo buforem do barwienia GUS (100 mM fosforan sodu [pH 7,0], 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolilo-β-D-glukuronid, 0,5 mM żelazocyjanek potasu, 0,5 mM żelazicyjanek potasu i 10 mM EDTA) przez 5 min. Próbkę liści inkubowano w buforze do barwienia GUS w 37°C przez 16 godzin. Zabarwione tkanki liścia przepłukano następnie etanolem i wodą w celu usunięcia chlorofilu.

Przykład 1

Z uwagi na to, że ekspresja *TSA1* była obniżona w mutancie z podwójnym nokautem *myb47 myb95*, zbadaliśmy rolę każdego białka MYB w aktywacji promotora *TSA1* przy użyciu dwóch podejść. Najpierw zbadaliśmy wiązanie MYB47 i MYB95 do promotora *TSA1* przy użyciu testów przesunięcia ruchliwości elektroforetycznej (ang. *electrophoretic mobility shift assay*, EMSA). Przeprowadzono oddzielną ekspresję MYB47 i MYB95 połączonych z S-transferazą glutationową (GST) w *Escherichia coli* (Figura 1A), a oczyszczone rekombinowane białka poddano EMSA. Jako biotynylowaną sondę DNA (dalej określaną jako pTSA1) zastosowano region promotora *TSA1* zawierający dwa elementy *cis*, box (CACGTTTA) i box2 (GTTAGTT), które są konserwatywne wśród gatunków roślin Brassicaceae (Stefanik i wsp., 2020) (Figura 1B). Zarówno MYB47, jak i MYB95 wiązały się z sondą DNA w sposób zależny od box2; sygnał od kompleksów sonda-białko był osłabiony po dodaniu nieznakowanego pTSA1 lub nieznakowanego pTSA1 zawierającego zmutowany box1 (pTSA1-m1), lecz nie był przy zmutowanym box2 (pTSA1-m2) (Figury 1C i 1D). Sekwencja pTSA1 została przedstawiona jako Sekw. Id. nr 1.

Przykład 2

Następnie przeprowadzono test promotor-reporter w celu zbadania wpływu MYB47 i MYB95 na aktywność promotora *TSA1*. Aktywność β-glukuronidazy (GUS) indukowano w liściach *Nicotiana benthamiana* po koinokulacji z *Agrobacterium* niosącymi *Prom35S:GFP-MYB47* (Seku. Id. nr 2) lub *Prom35S:GFP-MYB95* (Seku. Id. nr 3) i *Agrobacterium* niosącymi konstrukt *PromTSA1:GUS* (Seku. Id. nr 4). (Figury 2A i 2B). Aby określić subkomórkową lokalizację białek MYB47 i MYB95, uzyskaliśmy przejściową ekspresję fuzji *GFP-MYB47* i *GFP-MYB95* w komórkach epidermy liści *N. benthamiana* (Figura 3A). Analiza metodą mikroskopii konfokalnej wykazała silny sygnał GFP w jądrze komórkowym, oprócz słabego sygnału w cytozolu (Figura 3B). Wyniki te wskazują, że MYB47 i MYB95 lokalizują się

w jądrze, zgodnie z ich funkcją jako czynników transkrypcyjnych. Zgodnie z wynikami EMSA *in vitro*, mutacja w box2 (*m2-PromTSA1:GUS*) drastycznie zmniejszyła aktywność promotora *TSA1* w testach promotor-reporter, pomimo obecności MYB47 lub MYB95 (Figury 2A i 2B). Nieoczekiwanie mutacja w box1 (*m1-PromTSA1:GUS*) również zmniejszyła aktywację promotora *TSA1* zależną od MYB47 i MYB95 (Figury 2A i 2B). Co więcej, mutacje zarówno w elemencie box1, jak i box2 (*m1/m2-PromTSA1:GUS*) całkowicie znosiły aktywność promotora *TSA1* (Figury 2A i 2B). Wyniki te wskazują, że MYB47 i MYB95 aktywują promotor *TSA1* w sposób zależny od box1 i box2 *in vivo*.

W opisanych przykładach wykonania zastosowano następujące elementy:

Sekwencja kodująca cDNA białek MYB47 i MYB95 została przedstawiona jako Sekw. Id. nr 5 i 6.

Koduje ona białka MYB47 i MYB95, których sekwencja aminokwasowa została przedstawiona jako Sekw. Id. nr 7 i 8.

Sekwencja kodująca dla białek fuzyjnych GFP-MYB47 i GFP-MYB95 została przedstawiona jako Sekw. Id. nr 9 i 10.

Koduje ona fuzje GFP-MYB47 i GFP-MYB95, których sekwencja aminokwasowa została przedstawiona jako Sekw. Id. nr 11 i 12.

Sekwencja promotora *TSA1* została przedstawiona jako Sekw. Id. nr 13.

Bibliografia

Bonnett Jr, H.T., and Newcomb, E.H. (1965). Polyribosomes and cisternal accumulations in root cells of radish. *J. Cell Biol.* **27**, 423–432.

Chakravarthy, S., Tuori, R.P., D'Ascenzo, M.D., Fobert, P.R., Després, C., and Martin, G.B. (2003). The tomato transcription factor Pti4 regulates defense-related gene expression via GCC box and non-GCC box cis elements. *Plant Cell* **15**, 3033–3050.

Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., and Lepiniec, L. (2010). MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* **15**, 573–581.

Iversen, T.H. (1970). The morphology, occurrence, and distribution of dilated cisternae of the endoplasmic reticulum in tissues of plants of the Cruciferae. *Protoplasma* **71**, 467–477.

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W. (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**, 3901–3907.

Jiang, C.-K., and Rao, G.-Y. (2020). Insights into the diversification and evolution of R2R3-MYB transcription factors in plants. *Plant Physiol.* **183**, 637–655.

Jin, H., and Martin, C. (1999). Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol. Biol.* **41**, 577–585.

Martin, C., and Paz-Ares, J. (1997). MYB transcription factors in plants. *Trends Genet.* **13**, 67–73.

Matsushima, R., Hayashi, Y., Kondo, M., Shimada, T., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2002). An endoplasmic reticulum-derived structure that is induced under stress conditions in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **130**, 1807–1814.

Matsushima, R., Hayashi, Y., Yamada, K., Shimada, T., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2003). The ER body, a novel endoplasmic reticulum-derived structure in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **44**, 661–666.

Millard, P.S., Kragelund, B.B., and Burow, M. (2019). R2R3 MYB transcription factors – Functions outside the DNA-binding domain. *Trends Plant Sci.* **24**, 934–946.

Nakano, R.T., Yamada, K., Bednarek, P., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2014). ER bodies in plants of the Brassicales order: Biogenesis and association with innate immunity. *Front. Plant Sci.* **5**, 73.

Nakazaki, A., Yamada, K., Kunieda, T., Tamura, K., Hara-Nishimura, I., and Shimada, T. (2019a). Biogenesis of leaf endoplasmic reticulum body is regulated by both jasmonate-dependent and independent pathways. *Plant Signal. Behav.* **14**, e1622982.

Nakazaki, A., Yamada, K., Kunieda, T., Sugiyama, R., Hirai, Y.M., Tamura, K., Hara-Nishimura, I., and Shimada, T. (2019b). Leaf endoplasmic reticulum bodies identified in Arabidopsis rosette leaves are involved in defense against herbivory. *Plant Physiol.* **179**, 1515–1524.

Ogasawara, K., Yamada, K., Christeller, J.T., Kondo, M., Hatsugai, N., Hara-Nishimura, I., and Nishimura, M. (2009). Constitutive and inducible ER bodies of *Arabidopsis thaliana* accumulate distinct β -glucosidases. *Plant Cell Physiol.* **50**, 480–488.

Pontier, D., Balagué, C., Bezombes-Marion, I., Tronchet, M., Deslandes, L., and Roby, D. (2001). Identification of a novel pathogen-responsive element in the promoter of the tobacco gene *HSR203J*, a molecular marker of the hypersensitive response. *Plant J.* **26**, 495–507.

Ridge, R.W., Uozumi, Y., Plazinski, J., Hurley, U.A., and Williamson, R.E. (1999). Developmental transitions and dynamics of the cortical ER of *Arabidopsis* cells seen with green fluorescent protein. *Plant Cell Physiol.* **10**, 1253–1261.

Sarkar, S., Stefanik, N., Kunieda, T., Hara-Nishimura, I., and Yamada, K. (2021). The *Arabidopsis* transcription factor *NAI1* activates the *NAI2* promoter by binding to the G-box motifs. *Plant Signal. Behav.* **16**, 1846928.

Stefanik, N., Bizan, J., Wilkens, A., Tarnawska-Glatt, K., Goto-Yamada, S., Strzałka, K., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I., and Yamada, K. (2020). *NAI2* and *TSA1* drive differentiation of constitutive and inducible ER body formation in Brassicaceae. *Plant Cell Physiol.* **61**, 722–734.

Stracke, R., Werber, M., and Weisshaar, B. (2001). The *R2R3-MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 447–456.

Studier, F.W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* **41**, 207–234.

Winans, S.C., Kerstetter, R.A., and Nester, E.W. (1988). Transcriptional regulation of the *virA* and *virG* genes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **170**, 4047–4054.

Yamada, K., Hara-Nishimura, I., and Nishimura, M. (2011). Unique defense strategy by the endoplasmic reticulum body in plants. *Plant Cell Physiol.* **52**, 2039–2049.

Wykaz sekwencji

Sekw. Id. nr 1

pTSA1

GAATGAAATCCACGTTTAAGTTAGTTACAACGGTTT

Sekw. Id. nr 2

Prom35S:GFP-MYB47

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACACGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGG
CGACGTGAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCA
AGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCCACCCTCGTG
ACCACCTTCACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGA
CTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACG
ACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATC
GAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAA
CTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACT
TCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC
ACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGC
CCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCG
CCGGGATCACTCACGGCATGGACGAGCTGTACATCACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCC
GCGGCCGCCCCCTTACCATGGGGAGGACGACATGGTTCGACGTCGACGGGATGAAGAAAGG
AGAGTGGACGGCAGAGGAAGACCAGAAGCTCGGCGCTTACATCAACGAGCATGGCGTTTGTG
ATTGGCGTTCCCTCCCCAAAAGAGCTGGTTTGCAGAGATGTGGAAGAGCTGCAGATTAAGG
TGGCTTAACTATCTAAAGCCTGGGATTAGAAGAGGCAAATTCACTCCTCAAGAAGAAGAAGA
AATCATCCAACCTTCATGCTGTTCTCGGAAACAGGTGGGCAGCCATGGCGAAGAAGATGCAGA
ATCGAACAGACAATGATATCAAGAACCATTGGAACCTTGTCTCAAGAAAAGACTTTCGAGA
AAGGGAATCGACCCTATGACCCACGAGCCCATCATCAAACACCTCACCGTCAATACCACTAA
CGCAGATTGTGGTAACTCTTCCACCACGACGTCCCCGTGACGACGGAAAGCTCTCCTTCCT
CCGGCTCGTCTCGTCTTCTTAACAAACTCGCCGCAGGTATCTCATCTAGACAACATAGTCTC
GATAGGATCAAGTACATCTTGTGCAATTCAATAATCGAAAGCAGTGATCAAGCAAAAGAGGA
AGAAGAAAAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAAGAGATTCAATGATGGGTCAGAAGATTGACGGTA
GTGAAGGAGAAGATATTAGATTGTTGGGGCGAGGAGGAAGTTAGGCGTTTAATGGAGATTGAT
GCAATGGATATGTACGAGATGACTTCGTACGACGCTGTCATGTACGAGAGTAGTCACATACT
TGATCATCTCTTTTGA

Sekw. Id. nr 3

Prom35S:GFP-MYB95

TGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCT
GTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGAT
AAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACC
CACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGAT
GTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCCTATCCTTCGCAAGACCCCTTCC
TCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGAACACGGGGGACTCTAGAGGATCCATGGTG
AGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGT
GAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGA
CCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCCACCTCGTGACCACC
TTCACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTT
CAAGTCCGCCATGCCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCA
ACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTG
AAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAA
CAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGA
TCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCC
ATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAG
CAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGA
TCACTCACGGCATGGACGAGCTGTACATCACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCGGCC
GCCCCCTTACCATGGGGAGGACGACGTGGTTGCAGCTTGACGGGTGAGGAAAGGAGAGTG
GACGGCGGAGGAAGACCGGAAGCTCGTGGTTTACATCAACGAACACGGTCTAGGCGAGTGGG
GTTCACTGCCTAAGAGAGCCGGTCTACAAAGATGTGGAAAGAGTTGTAGATTAAGATGGCTG
AATTATTTGAGGCCTGGGATTAAAAGAGGCAAGTTCACCTCCTCAGGAAGAAGAAGAAATCAT
CAAATACCATGCTCTTCTTGGAAACAGGTGGGCAGCAATAGCTAAGCAAATGCCAAACAGAA
CAGATAATGACATAAAGAACCATTGGAACATGCCTTAAGAAAAGACTTGCTAAAAAAGGA
ATCGATCCAATGACCCATGAGCCAACAACAACAAGCCTCACCGTCGATGTCACCTCCTC
ATCAACTACGTCGTCTCCTACACCGAGCCCTACTTCTTCTTCTTTTCTCCTGTTCTCTA
CTGGCTCTGCACGTTTCTTAACAAGCTCGCTGCTGGAATCTCGTCAAGAAAACACGGACTA
GAGAGTATCAAGACAGTGATATTGGCAGAACCAAGAGAAGCCGTTGATGAAGAGAAGAT
GATGACAATTAACATGAAAGAGAAGGAATTGATTAGTTGTTACATGGAGATTGATGAGACGA
TGAGTATTGATGAACTACCTTGTGATGACTCGACGTCTGGCTTCGTGGCTTTTGACGACTAC

TCATTAATCGACCCATACAGAGACGGTGTGTACGTATCTGATTTCTACGATGAGACTGAACA
CCTTGACCTGTTCCCTTCITTTGA

Sekw. Id. nr 4

PromTSA1:GUS

AAGCTTgtctgtccatggattgatatccaaattcatgactagacagaattaacgcaaaaaat
cgaaattccacaatattgacaaaatgaaatataaagtcattaatTTTTTTtagagttgtgagt
ttgtTTTTTTacgtaataatagtttttaaaaaatttaatttacataatagaaaactaataaaa
gtatTTTTTactatgtcaaaaaatataagaaaaacaaaccaacgtaacacataaaaaaatgaga
tgttcaaaaacgaatttgtagagcttgaccacttaactattgagcaatctgatttggaat
ggaaggcataaccaaaaaaaaaaagagatgtgtTTTTTaaaaaaattgactttatataataaa
tattttctatcttagttattccatcaatagttTTTTTTTTgtTTTTTTTcctatttccatgat
attattattttcaataaaaattataaaatgtcacatttactaataattaattataattttcac
atctagctgtttaactTTTTgctacacacaaaaatgagttatctagaagaagagccacgagata
aaagaatgaaatccacgtttaagttagttacaacggtttttattttataagcgtatccatagc
tatgtgatgcttcttcaagctGGATCCCCGGGTGGTCAGTCCCTTATGTTACGTCCTGTAGA
AACCCCAACCCGTGAAATCAAAAACTCGACGGCCTGTGGGCATTTCAGTCTGGATCGCGAAA
ACTGTGGAATTGATCAGCGTTGGTGGGAAAGCGCGTTACAAGAAAGCCGGGCAATTGCTGTG
CCAGGCAGTTTTTAACGATCAGTTCGCCGATGCAGATATTTCGTAATTATGCGGGCAACGTCTG
GTATCAGCGCGAAGTCTTTATACCGAAAGGTTGGGCAGGCCAGCGTATCGTGCTGCGTTTTCG
ATGCGGTCACCTATTACGGCAAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTGATGGAGCATCAGGGC
GGCTATACGCCATTTGAAGCCGATGTCACGCCGTATGTTATTGCCGGGAAAAGTGTACGTAT
CACCGTTTGTGTGAACAACGAAGTGAAGTGGCAGACTATCCCGCCGGGAATGGTGATTACCG
ACGAAAACGGCAAGAAAAAGCAGTCTTACTTCCATGATTTCTTTAACTATGCCGGAATCCAT
CGCAGCGTAATGCTCTACACCACGCCGAACACCTGGGTGGACGATATCACCGTGGTGACGCA
TGTCGCGCAAGACTGTAACCACGCGTCTGTTGACTGGCAGGTGGTGGCCAATGGTGATGTCA
GCGTTGAACTGCGTGATGCGGATCAACAGGTGGTTGCAACTGGACAAGGCACTAGCGGGACT
TTGCAAGTGGTGAATCCGCACCTCTGGCAACCGGGTGAAGGTTATCTCTATGAACTGTGCGT
CACAGCCAAAAGCCAGACAGAGTGTGATATCTACCCGCTTCGCGTCGGCATCCGGTCAGTGG
CAGTGAAGGGCGAACAGTTCCTGATTAACCACAAACCGTTCTACTTTACTGGCTTTGGTCGT
CATGAAGATGCGGACTTGCGTGGCAAAGGATTCGATAACGTGCTGATGGTGACGACCACGC
ATTAATGGACTGGATTGGGGCCAACTCCTACCGTACCTCGCATTACCCCTTACGCTGAAGAGA
TGCTCGACTGGGCAGATGAACATGGCATCGTGGTGATTGATGAACTGCTGCTGTGCGCTTT
AACCTCTCTTTAGGCATTGGTTTTCGAAGCGGGCAACAAGCCGAAAGAACTGTACAGCGAAGA

GGCAGTCAACGGGGAAACTCAGCAAGCGCACTTACAGGCGATTAAAGAGCTGATAGCGCGTG
ACAAAAACCACCCAAGCGTGGTGATGTGGAGTATTGCCAACGAACCGGATACCCGTCCGCAA
GGTGACGGGAATATTTTCGCGCCACTGGCGGAAGCAACGCGTAAACTCGACCCGACGCGTCC
GATCACCTGCGTCAATGTAATGTTCTGCGACGCTCACACCGATAACCATCAGCGATCTCTTTG
ATGTGCTGTGCCTGAACCGTTATTACGGATGGTATGTCCAAAGCGGCGATTTGGAAACGGCA
GAGAAGGTACTGGAAAAAGAACTTCTGGCCTGGCAGGAGAACTGCATCAGCCGATTATCAT
CACCGAATACGGCGTGGATACGTTAGCCGGGCTGCACTCAATGTACACCGACATGTGGAGTG
AAGAGTATCAGTGTGCATGGCTGGATATGTATCACCGCGTCTTTGATCGCGTCAGCGCCGTC
GTCGGTGAACAGGTATGGAATTTTCGCCGATTTTGCGACCTCGCAAGGCATATTGCGCGTTGG
CGGTAACAAGAAAGGGATCTTCACTCGCGACCGCAAACCGAAGTCGGCGGCTTTTCTGCTGC
AAAAACGCTGGACTGGCATGAACTTCGGTGAAAAACCGCAGCAGGGAGGCAAACAATGA

Sekw. Id. nr 5

MYB47_cDNA

ATGGGGAGGACGACATGGTTCGACGTCGACGGGATGAAGAAAGGAGAGTGGACGGCAGAGGA
AGACCAGAAGCTCGGCGCTTACATCAACGAGCATGGCGTTTGTGATTGGCGTTCCCTCCCCA
AAAGAGCTGGTTTGCAGAGATGTGGAAAGAGCTGCAGATTAAGGTGGCTTAACCTATCTAAAG
CCTGGGATTAGAAGAGGCAAATTCACCTCCTCAAGAAGAAGAAGAAATCATCCAACCTTCATGC
TGTTCTCGGAAACAGGTGGGCAGCCATGGCGAAGAAGATGCAGAATCGAACAGACAATGATA
TCAAGAACCATTGGAACCTTGTCTCAAGAAAAGACTTTTCGAGAAAGGGAATCGACCCTATG
ACCCACGAGCCCATCATCAAACACCTCACCGTCAATACCACTAACGCAGATTGTGGTAACTC
TTCCACCACGACGTCCCCGTCGACGACGGAAAGCTCTCCTTCCTCCGGCTCGTCTCGTCTTC
TTAACAACTCGCCGCAGGTATCTCATCTAGACAACATAGTCTCGATAGGATCAAGTACATC
TTGTCTGAATTCAATAATCGAAAGCAGTGATCAAGCAAAGAGGAAGAAGAAAAAGAAGA
AGAAGAAGAAAGAGATTCAATGATGGGTGAGAAGATTGACGGTAGTGAAGGAGAAGATATTC
AGATTTGGGGCGAGGAGGAAGTTAGGCGTTTAAATGGAGATTGATGCAATGGATATGTACGAG
ATGACTTCGTACGACGCTGTCATGTACGAGAGTAGTCACATACTTGATCATCTCTTTTGA

Sekw. Id. nr 6

MYB95_cDNA

ATGGGGAGGACGACGTTGGTTCGACGTTGACGGGTTGAGGAAAGGAGAGTGGACGGCGGAGGA
AGACCGGAAGCTCGTGGTTTACATCAACGAACACGGTCTAGGCGAGTGGGGTTCACTGCCTA
AGAGAGCCGGTCTACAAAGATGTGGAAAGAGTTGTAGATTAAGATGGCTGAATTATTTGAGG
CCTGGGATTAAAAGAGGCAAGTTCACTCCTCAGGAAGAAGAAGAAATCATCAAATACCATGC

TCTTCTTGGAAACAGGTGGGCAGCAATAGCTAAGCAAATGCCAAACAGAACAGATAATGACA
TAAAGAACCATTGGAACCTCATGCCTTAAGAAAAGACTTGCTAAAAAAGGAATCGATCCAATG
ACCCATGAGCCAACAACAACAACAAGCCTCACCGTCGATGTCACCTCCTCATCAACTACGTC
GTCTCCTACACCGAGCCCTACTTCTTCTTTTTCCTCCTGTTCTCTACTGGCTCTGCAC
GTTTCCTTAACAAGCTCGCTGCTGGAATCTCGTCAAGAAAACACGGACTAGAGAGTATCAAG
ACAGTGATATTGGCAGAACCAAGAGAAGCCGTTGATGAAGAGAAGATGATGACAATTAA
CATGAAAGAGAAGGAATTGATTAGTTGTTACATGGAGATTGATGAGACGATGAGTATTGATG
AACTACCTTGTGATGACTCGACGTCTGGCTTCGTGGCTTTTGACGACTACTCATTAATCGAC
CCATACAGAGACGGTGTGTACGTATCTGATTTCTACGATGAGACTGAACACCTTGACCTGTT
CCTTCTTTGA

Sekw. Id. nr 7

MYB47_protein

MGRTTWFDVDGMKKGEWTAEEEDQKLGAYINEHGVCWRS LPKRAGLQRCGKSCRLRWLNLYLK
PGIRRGKFT PQEEEEIIQLHAVLGNRWAAAKMQNRDNDIKNHWNSCLKKRLSRKGIDPM
THEPIIKHLTVNTTNADCGNSSTTTSPSTTESSPSSGSSRLLNKLAAGISSRQHSLDRIKYI
LSNSIIESSDQAKEEEEEKEEEEEERDSMMGQKIDGSEGEDIQIWGEEEVRLMEIDAMDMYE
MTSYDAVMYESSHILDHLF*

Sekw. Id. nr 8

MYB95_protein

MGRTTWFDVDGLRKGEWTAEEEDRKLVVYINEHGLGEWGS LPKRAGLQRCGKSCRLRWLNLYLR
PGIKRGKFT PQEEEEIIKYHALLGNRWAAIAKQMPNRDNDIKNHWNSCLKKRLAKKGIDPM
THEPTTTTSLTVDTVSSSTTSSPTSPSTSSSFSSCSSTGSARFLNKLAAGISSRKHGLESIK
TVILAEQPREAVDEEKMMTINMKEKELISCYMEIDETMSIDELPCDDSTSGFVAFDDYSLID
PYRDGVYVSDFYDETEHLDLFL*

Sekw. Id. nr 9

GFP-MYB47_cDNA

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACACGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGG
CGACGTGAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCA
AGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCCACCCTCGTG
ACCACCTTACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGA
CTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACG

ACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATC
GAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAA
CTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACT
TCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC
ACCCCCATCGGGCAGCGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGC
CCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCG
CCGGGATCACTCACGGCATGGACGAGCTGTACATCACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCC
GCGGCCGCCCCCTTCACCATGGGGAGGACGACATGGTTCGACGTCGACGGGATGAAGAAAGG
AGAGTGGACGGCAGAGGAAGACCAGAAGCTCGGGCGTTACATCAACGAGCATGGCGTTTGTG
ATTGGCGTTCCCTCCCCAAAAGAGCTGGTTTGCAGAGATGTGGAAAGAGCTGCAGATTAAGG
TGGCTTAACATCTAAAGCCTGGGATTAGAAGAGGCAAATTCACTCCTCAAGAAGAAGAAGA
AATCATCCAACCTTCATGCTGTTCTCGGAAACAGGTGGGCAGCCATGGCGAAGAAGATGCAGA
ATCGAACAGACAATGATATCAAGAACCATTGGAACCTCTTGCTCAAGAAAAGACTTTCGAGA
AAGGGAATCGACCCCTATGACCCACGAGCCCATCATCAAACACCTCACCGTCAATACCACTAA
CGCAGATTGTGGTAACTCTTCCACCACGACGTCCCCGTGACGACGGAAAGCTCTCCTTCCT
CCGGCTCGTCTCGTCTTCTTAACAACTCGCCGAGGTATCTCATCTAGACAACATAGTCTC
GATAGGATCAAGTACATCTTGTGCAATTCAATAATCGAAAGCAGTGATCAAGCAAAAGAGGA
AGAAGAAAAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAAGAGATTCAATGATGGGTCAGAAGATTGACGGTA
GTGAAGGAGAAGATATTCAGATTTGGGGCGAGGAGGAAGTTAGGCGTTTAAATGGAGATTGAT
GCAATGGATATGTACGAGATGACTTCGTACGACGCTGTCATGTACGAGAGTAGTCACATACT
TGATCATCTCTTTTGA

Sekw. Id. nr 10

GFP-MYB95_cDNA

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGG
CGACGTGAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCA
AGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCCACCTCGTG
ACCACCTTCACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGA
CTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACG
ACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATC
GAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAA
CTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACT
TCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC
ACCCCCATCGGGCAGCGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGC

CCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCG
CCGGGATCACTCACGGCATGGACGAGCTGTACATCACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCC
GCGGCCGCCCCCTTCACCATGGGGAGGACGACGTGGTTCGACGTTGACGGGTTGAGGAAAGG
AGAGTGGACGGCGGAGGAAGACCGGAAGCTCGTGGTTTACATCAACGAACACGGTCTAGGCG
AGTGGGGTTCACTGCCTAAGAGAGCCGGTCTACAAAGATGTGGAAAGAGTTGTAGATTAAGA
TGGCTGAATTATTTGAGGCCTGGGATTAAAAGAGGCAAGTTCACTCCTCAGGAAGAAGAAGA
AATCATCAAATACCATGCTCTTCTTGGAACAGGTGGGCAGCAATAGCTAAGCAAATGCCAA
ACAGAACAGATAATGACATAAAGAACCATTGGAACCTCATGCCTTAAGAAAAGACTTGCTAAA
AAAGGAATCGATCCAATGACCCATGAGCCAACAACAACAAGCCTCACCGTCGATGTCAC
CTCCTCATCAACTACGTCGTCTCCTACACCGAGCCCTACTTCTTCTTCTTTTCTCCTGTT
CCTCTACTGGCTCTGCACGTTTCCTTAACAAGCTCGCTGCTGGAATCTCGTCAAGAAAACAC
GGACTAGAGAGTATCAAGACAGTGATATTGGCAGAACCAAGAGAAGCCGTTGATGAAGA
GAAGATGATGACAATTAACATGAAAAGAGAAGGAATTGATTAGTTGTTACATGGAGATTGATG
AGACGATGAGTATTGATGAACCTTGTGATGACTCGACGTCTGGCTTCGTGGCTTTTGAC
GACTACTCATTAATCGACCCATACAGAGACGGTGTGTACGTATCTGATTCTACGATGAGAC
TGAACACCTTGACCTGTTCTTCTTTGA

Sekw. Id. nr 11

GFP-MYB47_protein

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWP TLV
TTFTYGVQCFSRYPDHMKQHDFEKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRI
ELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN
TPIGDGPVLLPDNHVLTQSALS KDPNEKRDMVLLFVTAAGITHGMDELYITSLYKKAGS
AAPFTMGRTTWFDVDGMKKGEWTAEDQKLGAYINEHGVC DWRSLPKRAGLQRCGKSCRLR
WLNYLKP GIRRKF TPQEEEEIIQLHAVLGNRWAAAMAKMQNR TDNDIKNHWN SCLKKRLSR
KGIDPMTHEPIIKHLTVNTTNADCGNSSTTSPSTTESSPSSGSSRLLNKLAAGISSRQHSL
DRIKYILSNSIIESSDQAKEEEEKEEEEEERDSMMGQKIDGSEGEDIQIWGEEVRLMEID
AMDMEYMTSYDAVMYESSHILDHLF*

Sekw. Id. nr 12

GFP-MYB95_protein

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWP TLV
TTFTYGVQCFSRYPDHMKQHDFEKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRI
ELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN

TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDELYITSLYKKAGS
 AAAPFTMGRTTWFDVDGLRKGEWTAEDRKLVVYINEHGLGEWGSLPKRAGLQRCGKSCRLR
 WLNLYLRPGIKRGKFTPQEEEEIIKYHALLGNRWAAIAKQMPNRTDNDIKNHWNSCLKKRLAK
 KGIDPMTHEPTTTTSLTVDTVSSSTTSSPTPSPTSSSFSSCSSTGSARFLNKLAAGISSRKH
 GLESIKTVILAEQPREAVDEEKMMTINMKEKELISCYMEIDETMSIDELPCDDSTSGFVAFD
 DYSLIDPYRDGVYVSDFYDETEHLDLFLL*

Sekw. Id. nr 13

TSA1_promoter

Gtctgtccatggattgatatccaaattcatgactagacagaattaacgcaaaaaatcgaaat
 tccacaatattgacaaaatgaaatataaagtcattaatttttttagagttgtgagtttgttt
 ttttacgtaataatagtttttaaaaaatttaatttacataatagaaaactaataaaagtattt
 ttactatgtcaaaaaatataagaaaacaaaccaacgtaacacataaaaaaatgagatgttca
 aaaacgaatttgtagagcttgaccacttaactattgagcaatctgatttggaatggaagg
 cataaccccccccccaagagatgtgttttaaaaaaattgactttattaaaataaatatttc
 tatcttagttattccatcaatagtttttttttggtttttttctatttccatgatattatt
 attttcaataaaattataaaatgtcacatttactaatattaattatattttcacatctag
 ctgtttaacttttgctacacacaaaaatgagttatctagaagaagagccacgagataaaagaa
 tgaaatcCACGTTTAAAGTTAGTTacaacggttttattttataagcgtatccatagctatgtg
 atgcttccttcaagct

(podkreślono odpowiednio box1 i box2)

Zastrzeżenia patentowe

1. Promotor aktywowany przez białka MYB47 i MYB95 mający sekwencję przedstawioną jako Sekw. Id. nr 13.
2. System ekspresyjny zawierający kaseta efektorową i kaseta reporterową, **znamienny tym**, że kaseta efektorowa zawiera gen kodujący białko MYB47 lub MYB95 lub gen kodujący białko fuzyjne zawierające białko MYB47 lub MYB95 pod kontrolą dowolnego znanego, korzystnie indukowalnego promotora, a kaseta reporterowa zawiera gen kodujący białko reporterowe pod kontrolą promotora aktywowanego przez białko MYB47 lub MYB95, przy czym promotor aktywowany przez białko MYB47 lub MYB95 ma sekwencję przedstawioną jako Sekw. Id. nr 13.
3. System ekspresyjny według zastrz. 2, **znamienny tym**, że gen kodujący białko MYB47 koduje białko o sekwencji przedstawionej jako Sekw. Id. nr 7.
4. System ekspresyjny według zastrz. 2, **znamienny tym**, że gen kodujący białko MYB95 koduje białko o sekwencji przedstawionej jako Sekw. Id. nr 8.
5. System ekspresyjny według zastrz. 2, **znamienny tym**, że gen kodujący białko MYB47 ma sekwencję przedstawioną jako Sekw. Id. nr 5.
6. System ekspresyjny według zastrz. 2, **znamienny tym**, że gen kodujący białko MYB95 ma sekwencję przedstawioną jako Sekw. Id. nr 6.
7. System ekspresyjny według zastrz. 2, **znamienny tym**, że gen kodujący białko fuzyjne zawierające białko MYB47 koduje białko o sekwencji przedstawionej jako Sekw. Id. nr 11.
8. System ekspresyjny według zastrz. 2, **znamienny tym**, że gen kodujący białko fuzyjne zawierające białko MYB95 koduje białko o sekwencji przedstawionej jako Sekw. Id. nr 12.
9. System ekspresyjny według zastrz. 2, w którym gen kodujący białko fuzyjne zawierające białko MYB47 ma sekwencję przedstawioną jako Sekw. Id. nr 9.
10. System ekspresyjny według zastrz. 2, w którym gen kodujący białko fuzyjne zawierające białko MYB95 ma sekwencję przedstawioną jako Sekw. Id. nr 10.
11. System ekspresyjny według zastrz. 2, w którym kaseta efektorowa ma sekwencję przedstawioną jako Sekw. Id. nr 2 lub 3.
12. System ekspresyjny według zastrz. 2, w którym kaseta reporterowa ma sekwencję przedstawioną jako Sekw. Id. nr 4.

Rysunki

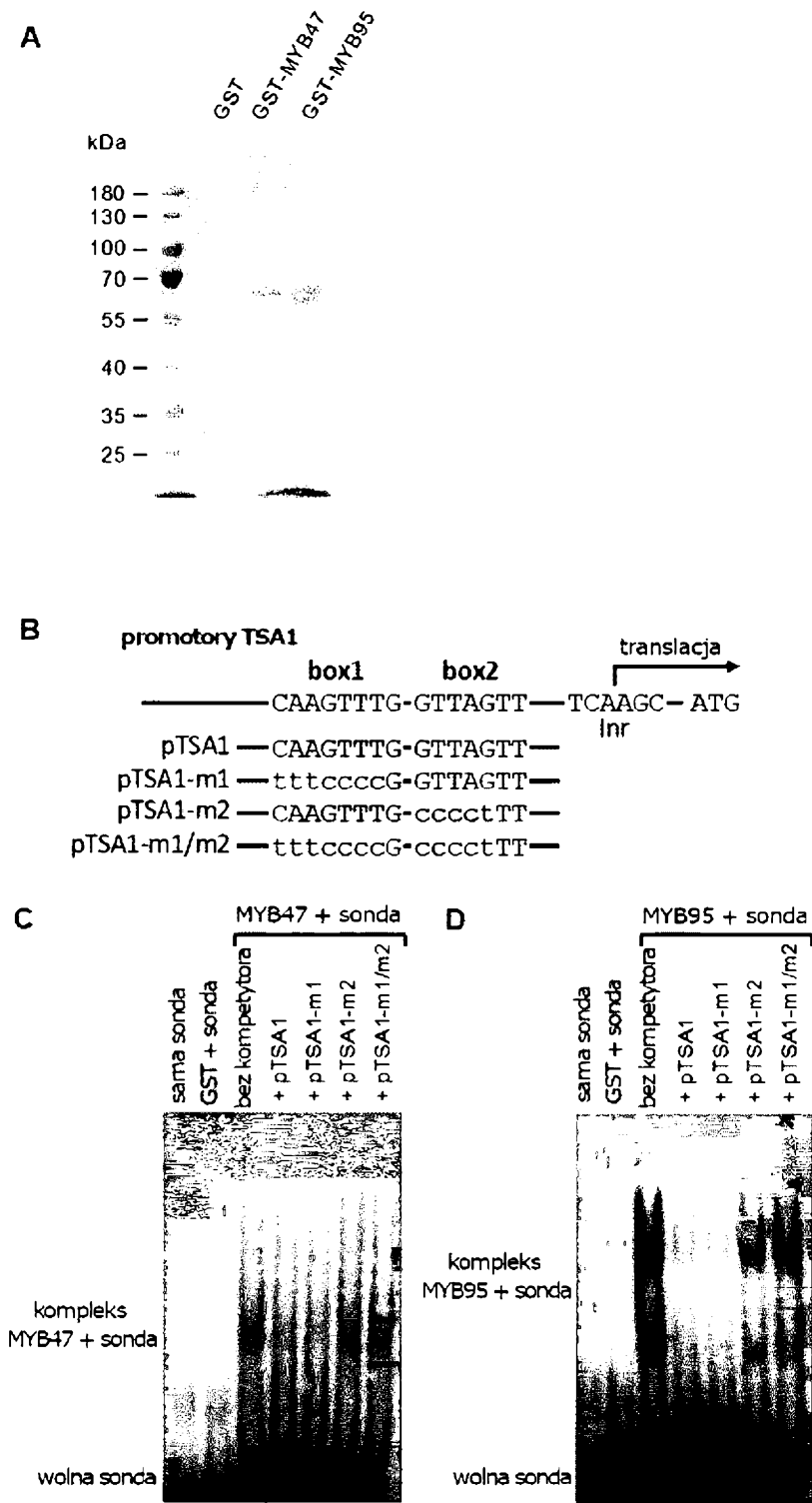


Fig. 1

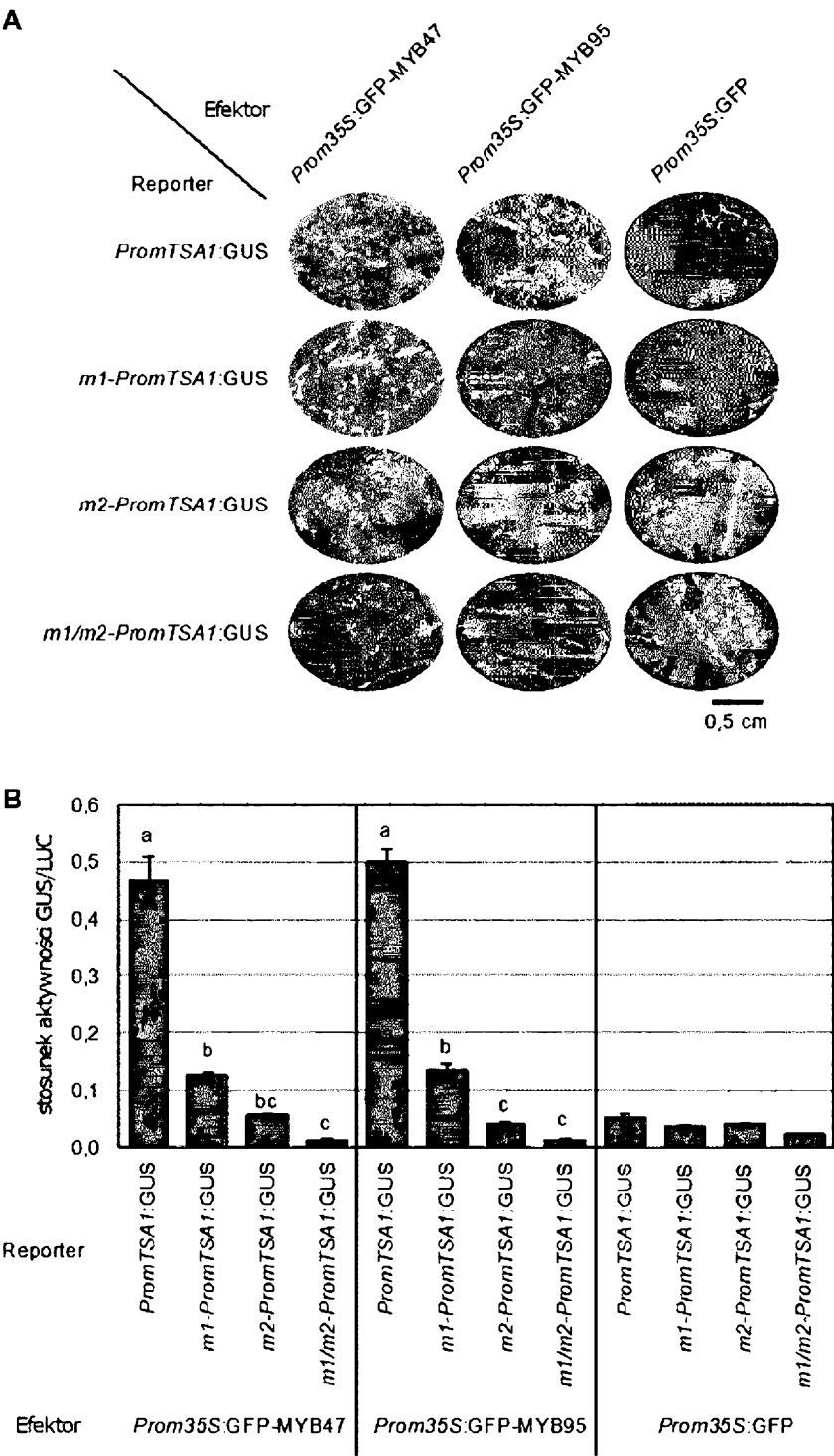
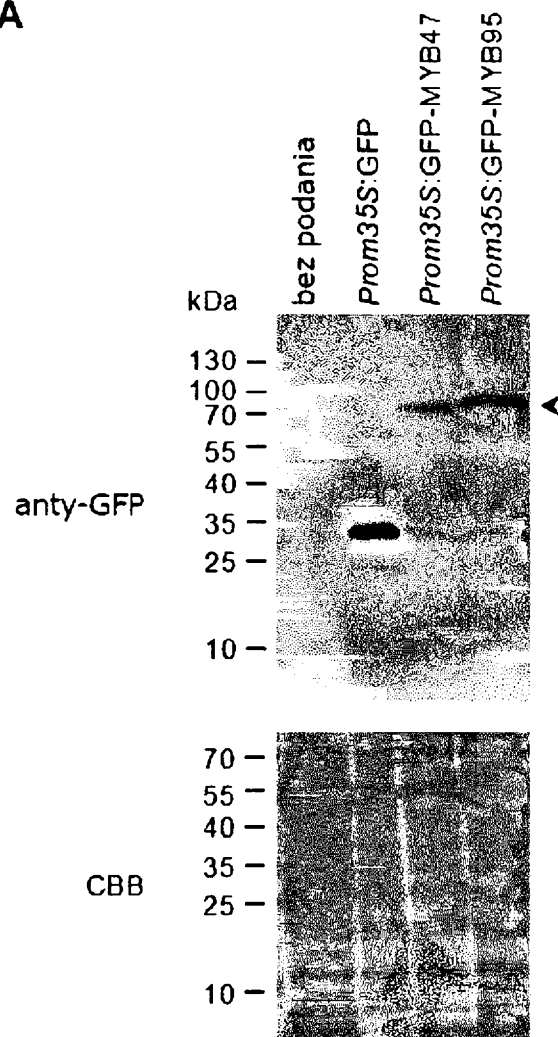
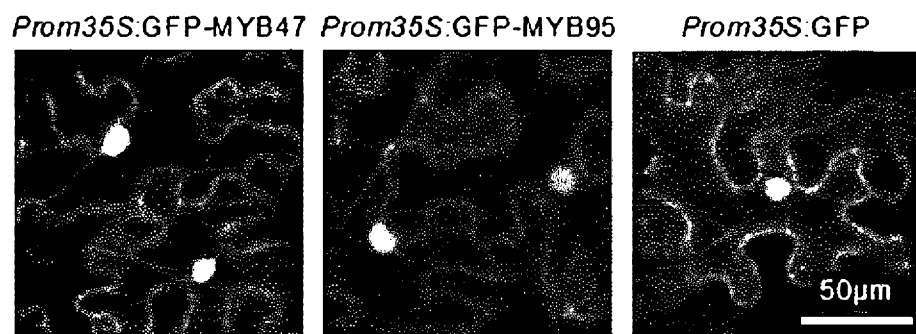


Fig. 2

A**B****Fig. 3**