

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810081508.3

[51] Int. Cl.

A01N 63/02 (2006.01)

A01N 63/04 (2006.01)

C07K 14/21 (2006.01)

C07K 14/27 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 1 月 14 日

[11] 公开号 CN 101341886A

[22] 申请日 1998.1.27

[21] 申请号 200810081508.3

分案原申请号 98803654.1

[30] 优先权

[32] 1997.1.27 [33] US [31] 60/036048

[71] 申请人 康乃尔研究基金会有限公司

地址 美国纽约州

[72] 发明人 D·W·丘 Z·-M·韦

S·V·贝尔

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘 玥

权利要求书 4 页 说明书 79 页 附图 2 页

[54] 发明名称

植物生长的增强

[57] 摘要

本发明涉及植物生长的增强。这涉及在一定条件下施用非感染型的过敏反应诱发剂多肽或蛋白于植物或植物种子，其中所述条件能有效增强所述植物或由所述植物种子长成的植物的生长。或者，可以提供用编码过敏反应诱发剂多肽或蛋白的 DNA 分子转化的转基因植物或转基因植物种子，并在有效增强植物生长的条件下，培育所述转基因植物或由所述转基因植物种子产生的植物。

1. 一种增强植物生长的方法, 包括:

向植物或植物种子施用来源于细菌性植物病原体的过敏反应诱发剂多肽或蛋白, 其中所述施用能增强所述植物或由所述植物种子长成的植物的生长。

2. 权利要求1的方法, 其中所述过敏反应诱发剂多肽或蛋白来源于选自以下的细菌性植物病原体: 欧文氏菌属、假单胞菌属、黄单胞菌属以及它们的混合物。

3. 权利要求2的方法, 其中所述过敏反应诱发剂多肽或蛋白来源于菊欧文氏菌或解淀粉欧文氏菌。

4. 权利要求2的方法, 其中所述过敏反应诱发剂多肽或蛋白来源于茄假单胞菌或丁香假单胞菌。

5. 权利要求2的方法, 其中所述过敏反应诱发剂多肽或蛋白来源于野油菜黄单胞菌。

6. 权利要求1的方法, 其中所述植物选自双子叶植物和单子叶植物。

7. 权利要求6的方法, 其中所述植物选自: 稻、小麦、大麦、黑麦、棉花、向日葵、花生、玉米、马铃薯、甘薯、菜豆、豌豆、菊苣、莴苣、苣荬菜、甘蓝、花椰菜、硬花球花椰菜、芜菁、萝卜、菠菜、洋葱、大蒜、茄子、胡椒、芹菜、胡萝卜、南瓜、西葫芦、绿皮南瓜、黄瓜、苹果、梨、瓜、草莓、葡萄、树莓、菠萝、大豆、烟草、番茄、蜀黍以及甘蔗。

8. 权利要求1的方法, 其中在通过喷洒、注入或磨擦叶面进行所述施用期间, 在接近所述施用开始的时刻处理植物。

9. 权利要求1的方法, 其中在通过喷洒、注入、包被、撒粉或浸渍进行所述施用期间处理植物种子。

10. 权利要求1的方法, 其中以还包含一种载体的组合物将所述

过敏反应诱发剂多肽或蛋白施用于植物或植物种子。

11. 权利要求 10 的方法，其中所述载体选自：水、水溶液、浆液和粉末。

12. 权利要求 10 的方法，其中所述组合物包含浓度大于 0.5nM 的过敏反应诱发剂多肽或蛋白。

13. 权利要求 10 的方法，其中所述组合物还包含选自以下的添加剂：肥料、杀虫剂、杀真菌剂、杀线虫剂以及它们的混合物。

14. 权利要求 1 的方法，其中所述过敏反应诱发剂多肽或蛋白是以已分离的形式施用的。

15. 权利要求 1 的方法，其中所述施用导致所述多肽或蛋白渗透进植物。

16. 权利要求 1 的方法，其中所述施用导致株高增加。

17. 权利要求 16 的方法，其中在所述施用期间植株受到处理。

18. 权利要求 16 的方法，其中在所述施用期间植物种子受到处理，所述方法另外还包括：

将用所述过敏反应诱发剂处理过的种子种植在天然或人工土壤中，并从种植在土壤中的种子繁殖出植株。

19. 权利要求 1 的方法，其中在所述施用期间植物种子受到处理，来增加发芽的植物种子的数量，所述方法还包括：

将用所述过敏反应诱发剂蛋白或多肽处理过的种子种植在天然或人工土壤中，并

从种植在土壤中的种子繁殖出植株。

20. 权利要求 1 的方法，其中所述施用导致产量提高。

21. 权利要求 20 的方法，其中在所述施用期间植株受到处理。

22. 权利要求 20 的方法，其中在所述施用期间植物种子受到处理，所述方法另外还包括：

将用所述过敏反应诱发剂蛋白或多肽处理过的种子种植在天然或人工土壤中，并

从种植在土壤中的种子繁殖出植株。

23. 权利要求 1 的方法，其中所述施用导致发芽更早。

24. 权利要求 23 的方法，其中在所述施用期间植物种子受到处理，所述方法另外还包括：

将用所述过敏反应诱发剂蛋白或多肽处理过的种子种植在天然或人工土壤中，并

从种植在土壤中的种子繁殖出植株。

25. 权利要求 23 的方法，其中所述施用导致成熟更早。

26. 权利要求 25 的方法，其中在所述施用期间植株受到处理。

27. 权利要求 25 的方法，其中在所述施用期间植物种子受到处理，所述方法另外还包括：

将用所述过敏反应诱发剂蛋白或多肽处理过的种子种植在天然或人工土壤中，并

从种植在土壤中的种子繁殖出植株。

28. 权利要求 1 的方法，其中在所述施用期间植物种子受到处理，所述方法另外还包括：

将用所述过敏反应诱发剂蛋白或多肽处理过的种子种植在天然或人工土壤中，并

从种植在土壤中的种子繁殖出植株。

29. 权利要求 28 的方法，所述方法另外还包括：

将所述过敏反应诱发剂蛋白或多肽以非感染的形式施用于所繁殖出的植株以进一步增强生长。

30. 权利要求 1 的方法，其中所述施用导致果实和植株着色更早。

31. 权利要求 30 的方法，其中在所述施用期间植物种子受到处理，所述方法另外还包括：

将用所述过敏反应诱发剂蛋白或多肽处理过的种子种植在天然或人工土壤中，并

从种植在土壤中的种子繁殖出植株。

32. 一种增强植物生长的方法，包括：

用编码一种来源于细菌性植物病原体的过敏反应诱发剂多肽或蛋白的DNA分子转化植物或植物种子，其中过敏反应诱发剂蛋白被表达，并增强被转化的植物或由被转化的种子长成的植物的生长。

33. 权利要求32的方法，其中所述过敏反应诱发剂多肽或蛋白来源于选自以下的细菌性植物病原体：欧文氏菌属、假单胞菌属、黄单胞菌属以及它们的混合物。

34. 权利要求33的方法，其中所述过敏反应诱发剂多肽或蛋白来源于菊欧文氏菌或解淀粉欧文氏菌。

35. 权利要求33的方法，其中所述过敏反应诱发剂多肽或蛋白来源于茄假单胞菌或丁香假单胞菌。

36. 权利要求33的方法，其中所述过敏反应诱发剂多肽或蛋白来源于野油菜黄单胞菌。

37. 权利要求32的方法，其中所述植物选自双子叶植物和单子叶植物。

38. 权利要求37的方法，其中所述植物选自：稻、小麦、大麦、黑麦、棉花、向日葵、花生、玉米、马铃薯、甘薯、菜豆、豌豆、菊苣、莴苣、苣荬菜、甘蓝、花椰菜、硬花球花椰菜、芜菁、萝卜、菠菜、洋葱、大蒜、茄子、胡椒、芹菜、胡萝卜、南瓜、西葫芦、绿皮南瓜、黄瓜、苹果、梨、瓜、草莓、葡萄、树莓、菠萝、大豆、烟草、番茄、蜀黍以及甘蔗。

39. 权利要求32的方法，其中转化在植物中进行。

40. 权利要求32的方法，其中转化在植物种子中进行。

41. 权利要求32的方法，所述方法还包括：

向被转化的植物或植物种子施用来源于细菌性植物病原体的过敏反应诱发剂多肽或蛋白，所述施用进一步增强被转化的植物或由被转化的植物种子长成的植物的生长。

植物生长的增强

本申请是申请日为1998年1月27日，申请号为98803654.1，发明名称为“植物生长的增强”的发明专利申请的分案申请。

本申请要求获得1997年1月27日申请的美国临时专利申请序号60/036,048的权益。

本发明是在美国政府的资助下完成的(USDA NRI 竞争性研究拨款第91-37303-6430号)。

发明领域

本发明涉及增强植物的生长。

发明背景

几个世纪以来，人们已经知道并实行施用有机肥料来改善植物生长(H. Marschner, “Mineral Nutrition of Higher Plants,” Academic Press: New York 第674页(1986))。现代人类已经发展了复杂的无机肥料生产系统，生产出栽培者和农民可以施用于土壤或生长中的作物、通过增强生长来改善生产性能的易用产品。通过施用肥料产品，植株大小、着色、成熟和产量都可以得到改善。无机肥料包括普遍使用的化学品如硝酸铵。有机肥料可以包括厩肥和堆肥草渣(composted lawn debris)以及许多其它资源。

在最近几年，研究者已经寻求通过使用生物制品来改善植物生长。如白僵菌(*Beauveria bassiana*)和 *Trichoderma harizamum* 的病虫害防治剂已经注册用于防治病虫害问题，并因此间接改善植物的生长及生产性能(Fravel 等人, “防治植物病害的微生物制剂,” Formulation of Microbial Biopesticides, Beneficial Microorganisms, and Nematodes, H. D. Burges 编辑, Chapman and Hall: London (1996))。

现在有一些通过应用微生物或微生物副产品来直接增强植物生长的迹象。人们已经在将豆科作物的种子引入一个新生境(site)时，

向其加入结瘤细菌(Weaver 等人, “根瘤菌(*Rhizobium*),” Methods of Soil Analysis, 第2部分, Chemical and Microbiological Properties, 第二版, American Society of Agronomy: Madison(1982))。这些细菌可以改善植物的结瘤效率, 并因此改善植物将游离氮转化为一种可利用形式的的能力(这个过程叫固氮作用)。通常非豆科作物并不从这样的处理中受益。加入的细菌如根瘤菌(*Rhizobium*)直接寄生于根毛, 然后开始一种互利共生关系: 提供给植物好处, 同时获得保护与支持。

菌根真菌被认为是许多作物(特别是在营养缺乏的土壤中的针叶树)随意生长(optional growth)所必需的微生物。人们已经提出了包括植物激素的生物合成(Frankenberger 等人, “松 Ectomycorrhizal 真菌彩色豆马勃(*Pisolithus tinctorius*)生物合成吲哚-3-乙酸,” Appl. Environ. Microbiol. 53:2908-13(1987))、矿物质的摄入增加(Harley 等人, “切下的山毛榉的菌根根摄入磷酸盐,” New Phytologist 49:388-97 (1950)和 Harley 等人, “切下的山毛榉的菌根根摄入磷酸盐, IV. 氧浓度对宿主和真菌的影响,” New Phytologist 52:124-32 (1953))和水的摄入增加(A. B. Hatch, “松属(*Pinus*)菌根营养的物理基础,” Black Rock Forest Bull. No. 6, 第168页(1937))等机制。由于对于任何给定的菌根菌株都有可变和不一致的结果, 以及对这类生物研究的困难, 菌根真菌并未获得象结瘤细菌一样的使用频率。

近年来已经认定植物生长促进根瘤细菌(“PGPR”)能改善植物的生长和发育。假说的机制从直接影响(如营养摄入增加)到间接机制(如病原体排代(pathogen displacement)置换)都有。应用 PGPR 得到的生长增强通常是指将一种活细菌接种到根系统, 通过细菌产生的激素作用、铁载体获得改善的生长, 或通过产生抗生素或竞争而预防病害, 从而获得改善的生长。在所有上面的情况中, 结果都是通过根定居, 有时是通过应用种子包被产生的。有有限信息表明, 一些 PGPR 菌株可能是直接的生长促进剂, 在悉生条件下增强根的延长(Anderson 等人, “在水培系统中菜豆对恶臭假单胞菌(*Pseudomonas*

putida)根部定居的应答,” Phytopathology 75:992-95(1985), Lifshitz 等人, “在悉生条件下恶臭假单胞菌菌株对 Canola (油菜籽)幼苗的生长促进作用,” Can. J. Microbiol. 33:390-95 (1987), Young 等人, “PGPR: 在植物生长调节剂和植物生长刺激或生物活性之间有关系吗?,” Promoting Rhizobacteria: Progress and Prospects, Second International Workshop on Plant Growth-promoting Rhizobacteria, 第182-86页(1991), Loper 等人, “吲哚-3-乙酸的细菌来源对糖甜菜根延伸的影响,” Phytopathology 76:386-89(1986), 和 Müller 等人, “玉米(*Zea mays* L.)根际中的激素相互作用以及它们对植物发育的作用,” Z. Pflanzenernahrung Bodenkunde 152:247-54(1989)); 然而, 也有人已经提出植物生长调节剂的产生是介导这些作用的机制。许多细菌在体外产生各种植物生长调节剂(Atzorn 等人, “菜豆根瘤菌(*Rhizobium phaseol*)产生赤霉素和吲哚-3-乙酸与 *Phaseolus vulgaris* 根部结瘤有关,” Planta 175:532-38 (1988)和 M. E. Brown, “固体和根际微生物(Microorganism of Solid and Rhizosphere)产生的植物生长刺激素,” J. Appl. Bact. 35:443-51(1972))或抗生素(Gardner 等人, “产生抗生素的荧光假单胞菌对柑桔类根部的生长促进和抑制,” Plant Soil 77: 103-11(1984))。铁载体的产生是针对一些 PGPR 菌株提出的另一种机制(Ahl 等人, “参与荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)菌株对根串珠霉(*Thiaveliopsis basicola*)抑制的铁结合铁载体、氰酸和抗生素,” J. Phytopathol. 116:121-34 (1986), Kloepper 等人, “促进植物生长的根瘤细菌产生的铁载体增强植物生长,” Nature 286:885-86 (1980), 和 Kloepper 等人, “假单胞菌铁载体(*Pseudomonas siderophores*): 解释病害抑制性土壤的机制,” Curr. Microbiol. 4:317-20 (1980))。在根表面定居并因此在表面与病原细菌直接竞争是另一种作用机制(Kloepper 等人, “促进植物生长的根瘤细菌在体外对植物生长的抗生作用和根部微生物区系的排代作用的关系,” Phytopathology 71:1020-24 (1981), Weller 等人, “通过用荧光假单胞菌处理种子提高小麦的

生长以及腐霉属(*Pythium*)防治的含意,” Can. J. Microbiol. 8:328-34 (1986), 和 Suslow 等人, “糖甜菜的根瘤细菌: 种子施肥和根部定居对产量的影响,” Phytopathology 72:199-206 (1982)). Canola (油菜籽) 研究已经表明 PGPR 增强植物的生长参数, 包括产量、出苗率和活力、早季植物生长(叶的数目和主长匍枝的长度)以及叶面积(Kloepper 等人, “Canola (油菜籽)上促进植物生长的根瘤细菌,” Plant Disease 72:42-46 (1988)). 对土豆的研究表明, 当将假单胞菌属(*Pseudomonas*) 菌株应用于种用马铃薯时, 产量提高(Burr 等人, “用特殊的荧光假单胞菌(*Pseudomonas Fluorescens*)和恶臭假单胞菌(*P. Putida*)菌株处理块茎提高马铃薯的产量,” Phytopathology 68:1377-83 (1978), Kloepper 等人, “块茎接种促进植物生长的根瘤细菌对马铃薯根部上和子块茎中胡萝卜软腐欧文氏菌(*Erwinia carotovora*)群体的作用,” Phytopathology 73:217-19 (1983), Geels 等人, “在用拮抗的种名待定的荧光假单胞菌(*Fluorescent Pseudomonas spp.*)处理种用块茎后使高频马铃薯种植土壤中的产量降低还原,” Phytopathol. Z. 108:207-38 (1983), Howie 等人, “根瘤细菌: 栽培品种和土壤类型对马铃薯的植物生长和产量的影响,” Soil Biol. Biochem. 15:127-32 (1983), 和 Vransy 等人, “接种根际细菌的马铃薯植株的生长和产量,” Folia Microbiol. 29:248-53 (1984)). 增产明显地是由于 PGPR 的竞争作用(有可能是抗生素作用)除去了种用块茎上的病原细菌(Kloepper 等人, “块茎接种促进植物生长的根瘤细菌对马铃薯根部上和子块茎中胡萝卜软腐欧文氏菌群体的作用,” Phytopathology 73:217-19(1983), Kloepper 等人, “促进植物生长的根瘤细菌在根际定居对马铃薯植物发育和产量的作用,” Phytopathology 70:1078-82 (1980), Kloepper 等人, “促进出土的根瘤细菌: 对于农业的描述和含意,” 第 155-164 页, Iron, Siderophores, and Plant Disease, T. R. Swinburne 编辑, Plenum, New York (1986), 和 Kloepper 等人, “促进植物生长的根瘤细菌对植物生长的抗生素作用和根微生物区系的排代作用的关系,”

Phytopathology 71:1020-24 (1981))。在一些研究中, 使用 PGPR 后植株的出土得到改善(Tipping 等人, “促进出土的根瘤细菌对于超甜玉米的发育,” Phytopathology 76: 938-41 (1990)(摘要)和 Kloepper 等人, “促进出土的根瘤细菌: 对于农业的描述和含意,” 第 155-164 页, Iron, Siderophores, and Plant Disease, T. R. Swinburne 编辑, Plenum, New York (1986))。许多其它研究表明, 用根瘤细菌处理后, 由于对植物病原体进行生物防治, 植物健康得到改善(B. Schippers, “用根瘤细菌生物防治病原体,” Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 318:283-93 (1988), Schroth 等人, “病害抑制性土壤和根部定居的细菌,” Science 216:1376-81 (1982), Stutz 等人, “参与抑制烟草青霉病的天然存在的荧光假单胞菌,” Phytopathology 76:181-85 (1986), 和 D. M. Weller, “用细菌生物防治根际中的土传植物病原体,” Annu. Rev. Phytopathol. 26:379-407 (1988))。

已经发现对植物的病原体诱导的免疫促进生长。外部注射 *Peronospora tabacina* 到烟草木质部不仅减轻矮化, 而且促进生长和发育。免疫后的烟草植物在温室试验和大田试验中, 比对照植物约高 40%, 干重增加 40%, 鲜重增加 30%, 并多 4-6 片叶子(Tuzun, S. 等人, “茎注射 *Peronospora tabacina* 并且进行 Metalaxyl 处理对大田中烟草生长和抵抗青霉病的保护作用的影响,” Phytopathology, 74:804 (1984))。这些植株大约比对照植株早开花 2-3 周(Tuzun, S. 等人, “系统保护抵抗青霉病的因子在接种 *Peronospora tabacina* Adam 的烟草中的运动,” Physiological Plant Pathology, 26:321-30 (1985))。

本发明涉及在先前的植物生长增强方法范围内的改进。

发明概述

本发明涉及一种增强植物生长的方法。这种方法涉及在一定条件下施用非感染型的过敏反应诱发剂(elicitor)多肽或蛋白于植物或植物种子, 以赋予所述植物或由所述植物种子长成的植物以增强的生

长。

为赋予植物或由植物种子长成的植物以增强的生长，除施用过敏反应诱发剂多肽或蛋白于所述植物或所述植物种子外，一种可以选择的方法是可以利用转基因植物或植物种子。当利用转基因植物时，这涉及到：提供用编码一种过敏反应诱发剂多肽或蛋白的 DNA 分子转化的转基因植物，并在有效允许所述 DNA 分子增强生长的条件下培育所述植物。用另一种方法，可以提供用编码一种过敏反应诱发剂多肽或蛋白的 DNA 分子转化的转基因植物种子并种植在土壤中。然后在有效允许所述 DNA 分子增强生长的条件下，由种植的种子繁殖出植物。

本发明的目标在于产生任何形式的植物生长增强或促进。这可以发生在早至从种子开始的植物生长，迟至植物的生活中。例如，依照本发明的植物生长包括产量更高、所产生种子的质量提高、种子发芽率提高、植物大小增加、生物量更高、果实更多和更大、果实着色更早、以及果实和植株成熟更早。结果是本发明为栽培者提供显著的经济效益。例如，早发芽和早成熟使得作物能够生长在生长季节短暂的地区，而在其它情况下短暂的生长季节会阻碍它们在当地的生长。种子发芽率的提高导致改善的作物林分(stand)以及更有效的种子使用。产量更高、大小增加和生物量生产增强使得给定的小块土地上年产出(revenue generation)更高。因此显然，本发明构成农业效率上的一个显著进步。

附图简述

图 1 是质粒载体 pCPP2139 的图，所述质粒载体包含解淀粉欧文氏菌(*Erwinia amylovora*)过敏反应诱发剂基因。

图 2 是质粒 pCPP50 的图，所述质粒载体不包含解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂基因，但其它方面则与图 1 所示的质粒载体 pCPP2139 相同。参见 Masui 等人, Bio/Technology 2:81-85 (1984)，特此通过引

用结合到本文中。

发明详述

本发明涉及一种增强植物生长的方法。这种方法涉及在一定条件下将非感染型的过敏反应诱发剂多肽或蛋白施用于整株植物或植物部分、或施用于植物种子，以赋予所述植物或由所述植物种子长成的植物以增强的生长。或者，可以用这种方法处理植物来产生种子，然后种下种子，赋予子代植物增强的生长。

为赋予植物或由植物种子长成的植物以增强的生长，除施用过敏反应诱发剂多肽或蛋白于所述植物或所述植物种子外，一种可选择的方法是利用转基因植物或植物种子。当利用转基因植物时，这就涉及到提供用编码一种过敏反应诱发剂多肽或蛋白的 DNA 分子转化的转基因植物，并在有效允许所述 DNA 分子增强生长的条件下培育所述植物。或者，可以提供用编码一种过敏反应诱发剂多肽或蛋白的 DNA 分子转化的转基因植物种子并将其种植在土壤中。然后在有效允许所述 DNA 分子增强生长的条件下，从所述种植的种子繁殖出植物。

本发明中利用的过敏反应诱发剂多肽或蛋白可以对应于由广泛种类的真菌病原体或细菌病原体得到的过敏反应诱发剂多肽或蛋白。这样的多肽或蛋白能在所述诱发剂接触的植物组织中诱发(elicit)局部坏死。

合适的多肽或蛋白诱发剂的细菌来源的例子包括欧文氏菌属、假单胞菌属以及单胞菌属(如下列细菌：解淀粉欧文氏菌、菊欧文氏菌(*Erwinia chrysanthemi*)、斯氏欧文氏菌(*Erwinia stewartii*)、胡萝卜软腐欧文氏菌、丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)、茄假单胞菌(*Pseudomonas solanacearum*)、野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)及它们的组合)。

过敏反应诱发剂多肽或蛋白的真菌来源的一个例子是疫霉属

(*Phytophthora*), 合适的疫霉属种包括 *Phytophthora pythium*、隐地疫霉(*Phytophthora cryptogea*)、樟疫霉(*Phytophthora cinnamomi*)、辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)、大雄疫霉(*Phytophthora megasperma*)以及柑桔褐腐疫霉(*Phytophthora citrophthora*)。

可以用多种方法实施本发明的将过敏反应诱发剂多肽或蛋白施用于植物或植物种子的实施方案, 包括: 1)施用一种分离的诱发剂多肽或蛋白; 2)施用不致病并且用编码过敏反应诱发剂多肽或蛋白的基因转化的细菌; 以及 3)施用在一些植物种中致病(但并不在其所施用的物种中致病)、并且天然包含编码所述过敏反应诱发剂多肽或蛋白的基因的细菌。另外, 从用依照本发明的过敏反应诱发剂蛋白或多肽处理过的植株上, 可以回收依照本发明的种子。

在本发明的一个实施方案中, 所述过敏反应诱发剂多肽或蛋白可以从它们相应的生物中分离得到, 并施用于植物或植物种子。这样的分离程序是广为人知的, 如 Arlat, M., F. Van Gijsegem, J. C. Huet, J. C. Pemollet, 和 C. A. Boucher, “PopA1, 为在特殊牵牛花基因型中诱导过敏样反应的一种蛋白, 它通过茄假单胞菌的 Hrp 途径分泌,” *EMBO J.* 13:543-553 (1994); He, S. Y., H. C. Huang, 和 A. Collmer, “丁香假单胞菌丁香致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*)的 harpin_{pss}: 通过 Hrp 途径分泌、并在植物中诱发过敏反应的一种蛋白,” *Cell* 73:1255-1266 (1993); 和 Wei, Z. -M., R. J. Laby, C. H. Zumoff, D. W. Bauer, S. -Y. He, A. Collmer, 和 S. V. Beer, “由植物病原体解淀粉欧文氏菌产生的过敏反应的 harpin 诱发剂,” *Science* 257:85-88 (1992) 所述, 特此通过引用结合到本文中。还可参见未决的美国专利申请序号 08/200,024 和 08/062,064, 特此通过引用结合到本文中。然而, 本发明分离得到的过敏反应诱发剂多肽或蛋白最好如下所述重组产生并纯化。

在本发明的其它实施方案中, 可以通过施用包含编码过敏反应诱发剂多肽或蛋白的基因的细菌, 将本发明的过敏反应诱发剂多肽

或蛋白施用于植物或植物种子。这样的细菌必须能够分泌或输出所述多肽或蛋白，以便所述诱发剂能接触植物细胞或植物种子细胞。在这些实施方案中，所述过敏反应诱发剂多肽或蛋白由所述细菌在植株中或种子上产生，或恰好在将所述细菌引入所述植物或植物种子之前产生。

在本发明的细菌应用模式的一个实施方案中，所述细菌并不致病，并且已经用编码一种过敏反应诱发剂多肽或蛋白的基因转化(如通过重组)。例如，大肠杆菌并不在植物中诱发过敏反应，可以用编码一种过敏反应诱发剂多肽或蛋白的基因转化大肠杆菌，然后将其施用于植物。大肠杆菌外的其它细菌物种也可用于本发明的这个实施方案中。

在本发明的细菌应用模式的另一个实施方案中，所述细菌致病，并且天然包含编码一种过敏反应诱发剂多肽或蛋白的基因。这样的细菌的例子已经在上面提过。然而，在该实施方案中，这些细菌施用于对所述细菌导致的疾病并不易感的植物或其种子。例如，解淀粉欧文氏菌在苹果或梨中致病，但并不在番茄中致病。然而，这样的细菌会在番茄中诱发过敏反应。因此，依照本发明的该实施方案，解淀粉欧文氏菌可以施用于番茄植株或种子以增强生长，而不会在该物种中致病。

得自菊欧文氏菌的过敏反应诱发剂多肽或蛋白具有对应于 SEQ. ID. No. 1 的氨基酸序列，如下所示：

Met Gln Ile Thr Ile Lys Ala His Ile Gly Gly Asp Leu Gly Val Ser
 1 5 10 15
 Gly Leu Gly Ala Gln Gly Leu Lys Gly Leu Asn Ser Ala Ala Ser Ser
 20 25 30
 Leu Gly Ser Ser Val Asp Lys Leu Ser Ser Thr Ile Asp Lys Leu Thr
 35 40 45
 Ser Ala Leu Thr Ser Met Met Phe Gly Gly Ala Leu Ala Gln Gly Leu
 50 55 60
 Gly Ala Ser Ser Lys Gly Leu Gly Met Ser Asn Gln Leu Gly Gln Ser
 65 70 75 80
 Phe Gly Asn Gly Ala Gln Gly Ala Ser Asn Leu Leu Ser Val Pro Lys
 85 90 95

 Ser Gly Gly Asp Ala Leu Ser Lys Met Phe Asp Lys Ala Leu Asp Asp
 100 105 110
 Leu Leu Gly His Asp Thr Val Thr Lys Leu Thr Asn Gln Ser Asn Gln
 115 120 125
 Leu Ala Asn Ser Met Leu Asn Ala Ser Gln Met Thr Gln Gly Asn Met
 130 135 140
 Asn Ala Phe Gly Ser Gly Val Asn Asn Ala Leu Ser Ser Ile Leu Gly
 145 150 155 160
 Asn Gly Leu Gly Gln Ser Met Ser Gly Phe Ser Gln Pro Ser Leu Gly
 165 170 175
 Ala Gly Gly Leu Gln Gly Leu Ser Gly Ala Gly Ala Phe Asn Gln Leu
 180 185 190
 Gly Asn Ala Ile Gly Met Gly Val Gly Gln Asn Ala Ala Leu Ser Ala
 195 200 205
 Leu Ser Asn Val Ser Thr His Val Asp Gly Asn Asn Arg His Phe Val
 210 215 220
 Asp Lys Glu Asp Arg Gly Met Ala Lys Glu Ile Gly Gln Phe Met Asp
 225 230 235 240
 Gln Tyr Pro Glu Ile Phe Gly Lys Pro Glu Tyr Gln Lys Asp Gly Trp
 245 250 255
 Ser Ser Pro Lys Thr Asp Asp Lys Ser Trp Ala Lys Ala Leu Ser Lys
 260 265 270
 Pro Asp Asp Asp Gly Met Thr Gly Ala Ser Met Asp Lys Phe Arg Gln
 275 280 285
 Ala Met Gly Met Ile Lys Ser Ala Val Ala Gly Asp Thr Gly Asn Thr
 290 295 300
 Asn Leu Asn Leu Arg Gly Ala Gly Gly Ala Ser Leu Gly Ile Asp Ala
 305 310 315 320
 Ala Val Val Gly Asp Lys Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Lys Leu Ala
 325 330 335
 Asn Ala

这种过敏反应诱发剂多肽或蛋白的分子量为 34kDa，对热稳定，其甘氨酸含量大于 16%，并且基本不包含半胱氨酸。菊欧文氏菌的过敏反应诱发剂多肽或蛋白是由其核苷酸序列对应于 SEQ. ID. No. 2 的 DNA 分子编码，如下所示：

CGATTTTACC CGGGTGAACG TGCTATGACC GACAGCATCA CGGTATTGCA CACCGTTACG	60
GCGTTTATGG CCGCGATGAA CCGGCATCAG GCGGCGCGCT GGTGCGCCGA ATCCGGCGTC	120
GATCTGGTAT TTCAGTTTGG GGACACCGGG CGTGAACTCA TGATGCAGAT TCAGCCGGGG	180
CAGCAATATC CCGGCATGTT GCGCACGCTG CTCGCTCGTC GTTATCAGCA GGCGGCAGAG	240
TGCGATGGCT GCCATCTGTG CCTGAACGGC AGCGATGTAT TGATCCTCTG GTGGCCGCTG	300
CCGTCGGATC CCGGCAGTTA TCCGCAGGTG ATCGAACGTT TGTTTGAAC TGGCGGAATG	360
ACGTTGCCGT CGCTATCCAT AGCACCGACG GCGCGTCCGC AGACAGGGAA CGGACGCGCC	420
CGATCATTAA GATAAAGGCG GCTTTTTTTA TTGCAAAACG GTAACGGTGA GGAACCGTTT	480
CACCGTCGGC GTCATCAGT AACAAGTATC CATCATGATG CCTACATCGG GATCGGCGTG	540
GGCATCCGTT GCAGATACTT TTGCGAACAC CTGACATGAA TGAGGAAACG AAATTATGCA	600
AATTACGATC AAAGCGCACA TCGGCGGTGA TTTGGGCGTC TCCGGTCTGG GGCTGGGTGC	660
TCAGGGACTG AAAGGACTGA ATTCCGCGGC TTCATCGCTG GGTTCAGCG TGGATAAACT	720
GAGCAGCACC ATCGATAAGT TGACCTCCGC GCTGACTTCG ATGATGTTTG GCGGCGCGCT	780
GGCGCAGGGG CTGGGCGCCA GCTCGAAGGG GCTGGGGATG AGCAATCAAC TGGGCCAGTC	840
TTTCGGCAAT GGCGCGCAGG GTGCGAGCAA CCTGCTATCC GTACCGAAAT CCGGCGGCGA	900
TGCGTTGTCA AAAATGTTTG ATAAAGCGCT GGACGATCTG CTGGGTCATG ACACCGTGAC	960
CAAGCTGACT AACCAGAGCA ACCAACTGGC TAATTCAATG CTGAACGCCA GCCAGATGAC	1020
CCAGGGTAAT ATGAATGCGT TCGGCAGCGG TGTGAACAAC GCACTGTCGT CCATTCTCGG	1080
CAACGGTCTC GGCCAGTCGA TGAGTGGCTT CTCTCAGCCT TCTCTGGGG CAGGCGGCTT	1140
GCAGGGCCTG AGCGGCGCGG GTGCATTCAA CCAGTTGGGT AATGCCATCG GCATGGGCGT	1200
GGGGCAGAAT GCTGCGCTGA GTGCGTTGAG TAACGTCAGC ACCCACGTAG ACGGTAACAA	1260
CCGCCACTTT GTAGATAAAG AAGATCGCGG CATGGCGAAA GAGATCGGCC AGTTTATGGA	1320
TCAGTATCCG GAAATATTCG GTAAACCGGA ATACCAGAAA GATGGCTGGA GTTCGCCGAA	1380
GACGGACGAC AAATCCTGGG CTAAAGCGCT GAGTAAACCG GATGATGACG GTATGACCGG	1440

```

CGCCAGCATG GACAAATTCC GTCAGGCGAT GGGTATGATC AAAAGCGCGG TGGCGGGTGA      1500
TACCGGCAAT ACCAACCTGA ACCTGCGTGG CCGGGGCGGT GCATCGCTGG GTATCGATGC      1560
GGCTGTCGTC GGCATAAAA TAGCCAACAT GTCGCTGGGT AAGCTGGCCA ACGCCTGATA      1620
ATCTGTGCTG GCCTGATAAA GCGGAAACGA AAAAAGAGAC GGGGAAGCCT GTCTCTTTTC      1680
TTATTATGCG GTTTATGCGG TTACCTGGAC CGGTTAATCA TCGTCATCGA TCTGGTACAA      1740
ACGCACATTT TCCCGTTCAT TCGCGTCGTT ACGCGCCACA ATCGCGATGG CATCTTCCTC      1800
GTCGCTCAGA TTGCGCGGCT GATGGGGAAC GCCGGGTGGA ATATAGAGAA ACTCGCCGGC      1860
CAGATGGAGA CACGTCTGCG ATAAATCTGT GCCGTAACGT GTTTCTATCC GCCCCTTTAG      1920
CAGATAGATT GCGGTTTCGT AATCAACATG GTAATGCGGT TCCGCCTGTG CGCCGGCCGG      1980
GATCACCACA ATATTCATAG AAAGCTGTCT TGCACCTACC GTATCGCGGG AGATACCGAC      2040
AAAATAGGGC AGTTTTTGCG TGGTATCCGT GGGGTGTTCC GGCCTGACAA TCTTGACTTG      2100
GTTCGTCATC ATCTTTCTCC ATCTGGCGA CCTGATCGGT T                                2141

```

得自解淀粉欧文氏菌的过敏反应诱发剂多肽或蛋白的氨基酸序列对应于 SEQ. ID. No. 3, 如下所示:

```

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

```

```

Leu Gly Ser Lys Gly Gly Asn Asn Thr Thr Ser Thr Thr Asn Ser Pro
   115                               120 .                               125
Leu Asp Gln Ala Leu Gly Ile Asn Ser Thr Ser Gln Asn Asp Asp Ser
   130                               135                               140
Thr Ser Gly Thr Asp Ser Thr Ser Asp Ser Ser Asp Pro Met Gln Gln
   145                               150                               155                               160
Leu Leu Lys Met Phe Ser Glu Ile Met Gln Ser Leu Phe Gly Asp Gly
   165                               170                               175
Gln Asp Gly Thr Gln Gly Ser Ser Ser Gly Gly Lys Gln Pro Thr Glu
   180                               185                               190
Gly Glu Gln Asn Ala Tyr Lys Lys Gly Val Thr Asp Ala Leu Ser Gly
   195                               200                               205
Leu Met Gly Asn Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gly Asn Gly Gly Leu Gly
   210                               215                               220
Gly Gly Gln Gly Gly Asn Ala Gly Thr Gly Leu Asp Gly Ser Ser Leu
   225                               230                               235                               240
Gly Gly Lys Gly Leu Gln Asn Leu Ser Gly Pro Val Asp Tyr Gln Gln
   245                               250                               255
Leu Gly Asn Ala Val Gly Thr Gly Ile Gly Met Lys Ala Gly Ile Gln
   260                               265                               270
Ala Leu Asn Asp Ile Gly Thr His Arg His Ser Ser Thr Arg Ser Phe
   275                               280                               285
Val Asn Lys Gly Asp Arg Ala Met Ala Lys Glu Ile Gly Gln Phe Met
   290                               295                               300
Asp Gln Tyr Pro Glu Val Phe Gly Lys Pro Gln Tyr Gln Lys Gly Pro
   305                               310                               315                               320
Gly Gln Glu Val Lys Thr Asp Asp Lys Ser Trp Ala Lys Ala Leu Ser
   325                               330                               335
Lys Pro Asp Asp Asp Gly Met Thr Pro Ala Ser Met Glu Gln Phe Asn
   340                               345                               350
Lys Ala Lys Gly Met Ile Lys Arg Pro Met Ala Gly Asp Thr Gly Asn
   355                               360                               365
Gly Asn Leu Gln Ala Arg Gly Ala Gly Gly Ser Ser Leu Gly Ile Asp
   370                               375                               380
Ala Met Met Ala Gly Asp Ala Ile Asn Asn Met Ala Leu Gly Lys Leu
   385                               390                               395                               400
Gly Ala Ala

```

这种过敏反应诱发剂多肽或蛋白的分子量约为 39kDa, pI 约为 4.3, 可在 100℃ 热稳定至少 10 分钟。这种过敏反应诱发剂多肽或蛋白基本不含半胱氨酸。得自解淀粉欧文氏菌的过敏反应诱发剂多肽或蛋白在 Wei, Z. -M., R. J. Laby, C. H. Zumoff, D. W. Bauer, S. -Y. He, A. Collmer, 和 S. V. Beer, “harpin, 由植物病原体解淀粉欧文氏菌产

生的过敏反应的诱发剂,” Science 257:85-88 (1992)中有更完全的描述, 特此通过引用结合到本文中。编码这种多肽或蛋白的 DNA 分子具有对应于 SEQ. ID. No. 4 的核苷酸序列, 如下所示:

AAGCTTCGGC ATGGCACGTT TGACCGTTGG GTCGGCAGGG TACGTTTGAA TTATTCATAA	60
GAGGAATACG TTATGAGTCT GAATACAAGT GGGCTGGGAG CGTCAACGAT GCAAATTTCT	120
ATCGGCGGTG CGGGCGGAAA TAACGGGTTG CTGGGTACCA GTCGCCAGAA TGCTGGGTTG	180
GGTGGCAATT CTGCACTGGG GCTGGGCGGC GGTAATCAAA ATGATACCGT CAATCAGCTG	240
GCTGGCTTAC TCACCGGCAT GATGATGATG ATGAGCATGA TGGGCGGTGG TGGGCTGATG	300
GGCGGTGGCT TAGGCGGTGG CTTAGGTAAT GGCTTGGGTG GCTCAGGTGG CCTGGGCGAA	360
GGACTGTGCA ACGCGCTGAA CGATATGTTA GGCGGTTCGC TGAACACGCT GGGCTCGAAA	420
GGCGGCAACA ATACCACTTC AACAACAAAT TCCCCGCTGG ACCAGGCGCT GGGTATTAAC	480
TCAACGTCCC AAAACGACGA TTCCACCTCC GGCACAGATT CCACCTCAGA CTCCAGCGAC	540
CCGATGCAGC AGCTGCTGAA GATGTTTACG GAGATAATGC AAAGCCTGTT TGGTGATGGG	600
CAAGATGGCA CCCAGGGCAG TTCCTCTGGG GGCAAGCAGC CGACCGAAGG CGAGCAGAAC	660
GCCTATAAAA AAGGAGTCAC TGATGCGCTG TCGGGCCTGA TGGGTAATGG TCTGAGCCAG	720
CTCCTTGGCA ACGGGGGACT GGGAGGTGGT CAGGGCGGTA ATGCTGGCAC GGGTCTTGAC	780
GGTTCGTCGC TGGGCGGCAA AGGGCTGCAA AACCTGAGCG GGCCGGTGGA CTACCAGCAG	840
TTAGGTAACG CCGTGGGTAC CGGTATCGGT ATGAAAGCGG GCATTTCAGGC GCTGAATGAT	900
ATCGGTACGC ACAGGCACAG TTCAACCCGT TCTTTCGTCA ATAAAGGCGA TCGGGCGATG	960
GCGAAGGAAA TCGGTCAGTT CATGGACCAG TATCCTGAGG TGTTTGCAA GCCGCAGTAC	1020
CAGAAAGGCC CGGGTCAGGA GGTGAAAACC GATGACAAAT CATGGGCAA AGCACTGAGC	1080
AAGCCAGATG ACGACGGAAT GACACCAGCC AGTATGGAGC AGTTCAACAA AGCCAAGGGC	1140
ATGATCAAAA GGCCCATGGC GGGTGATACC GGCAACGGCA ACCTGCAGGC ACGCGGTGCC	1200
GGTGGTTCTT CGCTGGGTAT TGATGCCATG ATGGCCGGTG ATGCCATTAA CAATATGGCA	1260
CTTGGCAAGC TGGGCGCGGC TTAAGCTT	1288

得自丁香假单胞菌的过敏反应诱发剂多肽或蛋白具有对应于 SEQ. ID. No. 5 的氨基酸序列, 如下所示:

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

```

Asp Leu Asp Gln Leu Leu Gly Gly Leu Leu Leu Lys Gly Leu Glu Ala
290                               295                               300
Thr Leu Lys Asp Ala Gly Gln Thr Gly Thr Asp Val Gln Ser Ser Ala
305                               310                               315                               320
Ala Gln Ile Ala Thr Leu Leu Val Ser Thr Leu Leu Gln Gly Thr Arg
                               325                               330                               335
Asn Gln Ala Ala Ala
                               340

```

这种过敏反应诱发剂多肽或蛋白的分子量为 34-35kDa。含丰富的甘氨酸(约 13.5%)，缺乏半胱氨酸和酪氨酸。关于得自丁香假单胞菌的过敏反应诱发剂的其它信息可以在 He, S. Y., H. C. Huang, 和 A. Collmer, “丁香假单胞菌丁香致病变种的 harpin_{pss}: 通过 Hrp 途径分泌、并在植物中诱发过敏反应的一种蛋白,” *Cell* 73:1255-1266(1993) 中找到，特此通过引用结合到本文中。编码得自丁香假单胞菌的过敏反应诱发剂的 DNA 分子具有对应于 SEQ. ID. No. 6 的核苷酸序列，如下所示：

```

ATGCAGAGTC TCAGTCTTAA CAGCAGCTCG CTGCAAACCC CGGCAATGGC CCTTGTCTCTG      60
GTACGTCCTG AAGCCGAGAC GACTGGCAGT ACGTCGAGCA AGGCGCTTCA GGAAGTTGTC      120
GTGAAGCTGG CCGAGGAACT GATGCGCAAT GGTCAACTCG ACGACAGCTC GCCATTGGGA      180
AAACTGTTGG CCAAGTCGAT GGCCGAGAT GGCAAGGCGG GCGGCGGTAT TGAGGATGTC      240
ATCGCTGCGC TGGACAAGCT GATCCATGAA AAGCTCGGTG ACAACTTCGG CGCGTCTGCG      300
GACAGCGCCT CGGGTACCGG ACAGCAGGAC CTGATGACTC AGGTGCTCAA TGGCCTGGCC      360
AAGTCGATGC TCGATGATCT TCTGACCAAG CAGGATGGCG GGACAAGCTT CTCCGAAGAC      420
GATATGCCGA TGCTGAACAA GATCGCGCAG TTCATGGATG ACAATCCCGC ACAGTTTCCC      480
AAGCCGGAAT CGGGCTCCTG GGTGAACGAA CTCAAGGAAG ACAACTTCCT TGATGGCGAC      540
GAAACGGCTG CGTTCCGTTC GGCACTCGAC ATCATTGGCC AGCAACTGGG TAATCAGCAG      600
AGTGACGCTG GCAGTCTGGC AGGGACGGGT GGAGGTCTGG GCACTCCGAG CAGTTTTTCC      660
AACAACTCGT CCGTGATGGG TGATCCGCTG ATCGACGCCA ATACCGGTCC CGGTGACAGC      720
GGCAATACCC GTGGTGAAGC GGGGCAACTG ATCGGCGAGC TTATCGACCG TGGCCTGCAA      780
TCGGTATTGG CCGGTGGTGG ACTGGGCACA CCGGTAAACA CCGGCAGAC CGGTACGTCTG      840

```

```

GCGAATGGCG GACAGTCCGC TCAGGATCTT GATCAGTTGC TGGGCGGCTT GCTGCTCAAG      900
GGCCTGGAGG CAACGCTCAA GGATGCCGGG CAAACAGGCA CCGACGTGCA GTCGAGCGCT      960
GCGCAAATCG CCACCTTGCT GGTCAGTACG CTGCTGCAAG GCACCCGCAA TCAGGCTGCA      1020
GCCTGA                                          1026

```

得自茄假单胞菌的过敏反应诱发剂多肽或蛋白具有对应于 SEQ.
ID. No. 7 的氨基酸序列，如下所示：

```

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

```


Boucher, “PopA1, 为在特殊牵牛花基因型中诱导过敏样反应的一种蛋白, 它通过茄假单胞菌的 Hrp 途径分泌,” *EMBO J.* 13:543-533 (1994)中陈述, 特此通过引用结合到本文中。

得自野油菜黄单胞菌大豆致病变种(*Xanthomonas campestris* pv. *glycines*)的过敏反应诱发剂多肽或蛋白具有对应于 SEQ. ID. No. 9 的氨基酸序列, 如下所示:

```

Thr Leu Ile Glu Leu Met Ile Val Val Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala
1           5           10           15
Ala Ile Ala Leu Pro Ala Tyr Gln Asp Tyr
                20           25

```

该序列是得自野油菜黄单胞菌大豆致病变种的过敏反应诱发剂多肽或蛋白的仅含有 26 个残基的氨基末端序列。它对应于在其它野油菜黄单胞菌致病变种中确定的菌毛亚基蛋白。

得自野油菜黄单胞菌天竺葵致病变种(*Xanthomonas campestris* pv. *Pelargonii*)的过敏反应诱发剂多肽或蛋白对热稳定、对蛋白酶敏感、分子量为 20kDa。它包含一段对应于 SEQ. ID. No. 10 的氨基酸序列, 如下所示:

```

Ser Ser Gln Gln Ser Pro Ser Ala Gly Ser Glu Gln Gln Leu Asp Gln
1           5           10           15
Leu Leu Ala Met
                20

```

胡萝卜软腐欧文氏菌过敏反应诱发剂蛋白或多肽的分离在 Cui 等人, “The RsmA Mutants of 胡萝卜软腐欧文氏菌胡萝卜软腐亚种 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) 菌株 Ecc71 的 RsmA 突变体在烟草叶中过量表达 hrp N_{Ecc} 并诱发过敏反应样应答,” *MPMI*, 9(7):565-73 (1996)中陈述, 特此通过引用结合到本文中。所述过敏反应诱发剂蛋白或多肽在 Ahmad 等人, “harpin 对于斯氏欧文氏菌对

玉米的致病性不是必需的,” 8th Int’ l. Cong. Molec. Plant-Microbe Interact., July 14-19,1996 和 Ahmad 等人, “harpin 对于斯氏欧文氏菌对玉米的致病性不是必需的,” Ann. Mtg. Am. Phytopath. Soc., 7月27-31,1996 中展示, 特此通过引用结合到本文中。

得自寄生疫霉(*Phytophthora parasitica*)、隐地疫霉、樟疫霉、辣椒疫霉、大雄疫霉和柑桔褐腐疫霉的过敏反应诱发剂蛋白或多肽在 Kaman 等人, “来自疫霉属的胞外蛋白诱发剂: 对细菌性和真菌性植物病原菌抗性的大多数特异性和诱导,” Molec. Plant-Microbe Interact., 6(1):15-25 (1993), Ricci 等人, “来自致病真菌疫霉属、在烟草中诱发坏死和获得性抗性的蛋白的结构和活性,” Eur. J. Biochem., 183:555-63 (1989), Ricci 等人, “寄生疫霉分离菌在烟草中差别性产生 parasiticein 以及坏死和抗性的诱发剂,” Plant Path. 41:298-307 (1992), Baillreul 等人, “一种新的烟草过敏反应的诱发剂: 一种真菌糖蛋白诱发细胞死亡、表达防御基因、产生水杨酸并诱导系统获得性抗性,” Plant J., 8(4):551-60 (1995), 和 Bonnet 等人, “诱发剂在烟草和其它植物中触发的获得性抗性,” Eur. J. Plant Path., 102:181-92 (1996) 中陈述, 特此通过引用结合到本文中。

上面的诱发剂都是典型的。其它诱发剂可以如下鉴定: 在编码诱发剂的基因得到表达的条件下, 培养诱发过敏反应的真菌或细菌。将从培养物上清得到的无细胞制备物浸润合适的植物组织, 测试诱发剂活性(即局部坏死)。

在本发明的方法中, 还有可能使用上述过敏反应诱发剂多肽或蛋白的片段以及来自其它病原体的全长的诱发剂的片段。

可以用几种方法产生合适的片段。第一种方法, 采用常规分子遗传操作, 亚克隆编码一种已知诱发剂蛋白的基因的片段, 产生该基因的亚克隆。然后将所述亚克隆体外表达或在细菌细胞内体内表达, 产生小一些的蛋白或肽, 所述蛋白或肽可以依照后面所述程序测试诱发剂活性。

另一种可选择的方法是：用蛋白酶如胰凝乳蛋白酶或葡萄球菌 A 蛋白酶、或胰蛋白酶消化全长的诱发剂蛋白，产生所述诱发剂蛋白的片段。根据所述诱发剂蛋白的氨基酸序列，不同的蛋白酶有可能在不同位点切割所述诱发剂蛋白。一些得自蛋白水解的片段可能是抗性的活性诱发剂。

在另一种方法中，根据对所述蛋白的一级结构的知识，使用 PCR 技术以及选定的代表所述蛋白特定部分的特异性引物组，可以合成所述诱发剂蛋白基因的片段。然后将这些片段克隆进一种合适的载体，以增殖和表达一种截短的肽或蛋白。

也可以使用化学合成来制备合适的片段。使用要产生的诱发剂的已知氨基酸序列来进行这样的合成。或者，将全长的诱发剂在高温高压下处理也会产生片段。然后可以用常规程序(如层析、SDS-PAGE)分离这些片段。

有用片段的一个例子是来自茄假单胞菌的过敏反应诱发剂多肽或蛋白的 popA1 片段，参见 Arlat, M., F. Van Gijsegem, J. C. Huet, J. C. Pemollet, 和 C. A. Boucher, “popA1, 为在特殊牵牛花基因型中诱导过敏样反应的一种蛋白，它通过茄假单胞菌的 Hrp 途径分泌,” *EMBO J.* 13:543-553 (1994)，特此通过引用结合到本文中。至于解淀粉欧文氏菌，一种合适的片段可以是，例如，或者 SEQ. ID. No. 3 的从氨基酸 1 延伸到 98 并且包括氨基酸 1 和氨基酸 98 的多肽，或者 SEQ. ID. No. 3 的从氨基酸 137 延伸到 204 并且包括氨基酸 137 和氨基酸 204 的多肽，或者二者都是。

也(或者)可以用例如那些对所述多肽的特性、二级结构和亲水性有最小影响的氨基酸的缺失或添加来修饰变形体。例如，可以将一段多肽连接到所述蛋白 N 末端指导所述蛋白共翻译转运或翻译后转运的信号(或前导)序列上。所述多肽也可以连接于一个接头或其它序列，以便于所述多肽的合成、纯化或鉴定。

本发明的蛋白或多肽最好是用常规技术以纯化过的形式产生(纯

度优选至少约 60%，更优选约 80%)。本发明的蛋白或多肽产生后一般并不分泌入重组宿主细胞的生长培养基中。另一种情况下，本发明的蛋白或多肽分泌入生长培养基中。在蛋白不分泌的情况下，为分离所述蛋白，繁殖带有重组质粒的宿主细胞(如大肠杆菌)，用超声处理、热处理或化学处理裂解细胞，离心匀浆物以去除细菌残渣。然后对上清液进行热处理，并通过离心分离过敏反应诱发剂蛋白。在一根尺寸合适的葡聚糖柱或聚丙烯酰胺柱上，对含有本发明的多肽或蛋白的上清液部分进行凝胶过滤，分离所述蛋白。如果需要，可以进一步用离子交换或 HPLC 纯化蛋白组分。

可以使用常规的重组 DNA 技术，将编码过敏反应诱发剂多肽或蛋白的 DNA 分子引入细胞。通常这涉及将所述 DNA 分子插入一个表达系统，对该表达系统来说所述 DNA 分子是异源的(即非正常存在的)。将所述异源 DNA 分子以正确的有义取向并在正确的阅读框中插入所述表达系统或载体。所述载体包含插入的蛋白编码序列转录和翻译所必需的元件。

Cohen 和 Boyer 的美国专利第 4,237,224 号描述了使用限制酶切割和用 DNA 连接酶连接，产生重组质粒形式的表达系统，特此通过引用结合到本文中。然后将这些重组质粒通过转化引入单细胞培养物并复制，其中所述单细胞培养物包括原核生物以及在组织培养中培育的真核细胞。

重组基因也可以引入病毒中，如痘苗病毒。用质粒转染已感染病毒的细胞，可以产生重组病毒。

合适的载体包括但不限于下面的病毒载体，如 λ 载体系统 gt11、gt WES.tB、Charon 4，以及质粒载体，如 pBR322、pBR325、pACYC177、pACYC1084、pUC8、pUC9、pUC18、pUC19、pLG339、pR290、pKC37、pKC101，SV 40、pBluescript II SK +/- 或 KS +/- (参见 Stratagene, La Jolla, Calif 的“Stratagene 克隆系统”目录(1993)，特此通过引用结合到本文中)、pQE、pIH821、pGEX、pET 系列(参

见 F. W. Studier 等人, “使用 T7 RNA 聚合酶指导克隆基因的表达,” Gene Expression Technology 第 185 卷(1990), 特此通过引用结合到本文中), 以及它们的任何衍生物。可以通过转化、特别是转导、细胞接合作用、带动转移(mobilization)或电穿孔, 将重组分子引入细胞。使用本领域内的标准克隆程序将所述 DNA 序列克隆进载体, 本领域内的标准克隆程序如 Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Laboratory, Cold Springs Harbor, New York (1989) 所述, 特此通过引用结合到本文中。

可以利用各种宿主-载体系统来表达单个或多个蛋白编码序列。主要是所述载体系统必须与所使用的宿主细胞相亲和。宿主-载体系统包括但不限于以下所列: 用噬菌体 DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 转化的细菌; 微生物如包含酵母载体的酵母; 感染病毒(如痘苗病毒、腺病毒等)的哺乳动物细胞系统; 感染病毒(如杆状病毒)的昆虫细胞系统; 以及感染细菌的植物细胞。这些载体的表达元件在其强度和特异性上有所不同。根据所利用的宿主-载体系统, 可以使用多种合适的转录和翻译元件中的任何一个。

不同的遗传信号和加工事件控制基因表达的多个水平(如 DNA 的转录和信使 RNA (mRNA)的翻译)。

DNA 的转录依赖于启动子的存在, 启动子就是一段指导 RNA 聚合酶的结合并因此促进 mRNA 合成的 DNA 序列。真核启动子的 DNA 序列与原核启动子的 DNA 序列不同。而且真核启动子及其伴随的遗传信号可能在原核系统中不被识别或不发挥功能, 此外, 原核启动子在真核细胞中不被识别并且不发挥功能。

类似地, mRNA 在原核细胞中的翻译依赖于恰当的原核信号的存在, 这些信号与真核细胞中的信号不同。mRNA 在真核细胞中的有效翻译需要 mRNA 上一个名为 Shine-Dalgarno (“SD”)序列的核糖体结合位点。这个序列是 mRNA 的一段短核苷酸序列, 位于起始密码子之前, 起始密码子通常是 AUG, 编码蛋白质氨基端的甲硫氨

酸。SD 序列与 16S rRNA (核糖体 RNA) 的 3' 端互补, 可能是通过与该 rRNA 形成双链体, 使核糖体能正确定位, 从而促进 mRNA 结合核糖体。关于使基因表达最大化的综述可参见 Roberts 和 Lauer, Methods in Enzymology, 68:473 (1979), 特此通过引用结合到本文中。

各种启动子的“强度”(即它们促进转录的能力)有所不同。为表达克隆基因的目的, 为了获得高水平的转录以及进而高水平的基因表达, 最好是使用强启动子。根据所利用的宿主细胞系统, 可以使用多种合适启动子中的任何一个。例如, 当在大肠杆菌、它的噬菌体或质粒中进行克隆时, 可以使用以下启动子来指导邻近 DNA 区段的高水平转录: 如 T7 噬菌体启动子、*lac* 启动子、*trp* 启动子、*recA* 启动子、核糖体 RNA 启动子、大肠杆菌 λ 的 P_R 和 P_L 启动子以及其它启动子, 包括但不限于 *lacUV5*、*ompF*、*bla*、*lpp* 等等。此外, 可以使用杂种 *trp-lacUV5 (tac)* 启动子或通过重组 DNA 技术或其它合成 DNA 技术产生的其它大肠杆菌启动子, 提供给插入基因的转录。

可以选择除非受到特异性诱导、否则抑制启动子作用的细菌宿主细胞株和表达载体。在某些操作中, 加入特异性诱导物对于插入 DNA 的有效转录是必要的。例如, 加入乳糖或 IPTG (异丙基- β -D-硫代半乳糖苷), 诱导 *lac* 操纵子。各种其它操纵子, 如 *trp*、*pro* 等, 处于不同的控制之下。

原核细胞中的有效基因转录和翻译还需要特异性的起始信号。这些转录和翻译的起始信号可能在“强度”上有差异, 它们的“强度”是分别根据合成的基因特异性的信使 RNA 的量以及蛋白的量来衡量的。包含一个启动子的 DNA 表达载体还可以包含任何组合的不同“强度”转录和/或翻译起始信号。例如, 大肠杆菌中的有效翻译要求距起始密码子(ATG) 5' 约 7-9 个碱基的一个 SD 序列, 来提供一个核糖体结合位点。因此, 可以使用任何能被宿主细胞核糖体利用的 SD-ATG 组合。这样的组合包括但不限于得自大肠杆菌噬菌体 λ 的 *cro* 基因或 *N* 基因、或得自大肠杆菌色氨酸 E、D、C、B 或 A

基因的 SD-ATG 组合。此外，可以使用任何用重组 DNA 技术或其它涉及插入合成核苷酸的技术产生的任何 SD-ATG 组合。

一旦已经将分离的编码过敏反应诱发剂多肽或蛋白的 DNA 分子克隆进表达系统，就可以将其引入宿主细胞。根据所使用的载体/宿主细胞系统，可以采用上面提到的各种形式的转化进行这样的引入。合适的宿主细胞包括但不限于细菌、病毒、酵母、哺乳动物细胞、昆虫、植物等等。

可以利用本发明的方法处理广泛种类的植物或它们的种子以促进生长。合适的植物包括双子叶植物和单子叶植物。更具体地说，有用的作物可以包括：稻、小麦、大麦、黑麦、棉花、向日葵、花生、玉米、马铃薯、甘薯、菜豆、豌豆、菊苣、莴苣、苦苣、甘蓝、花椰菜、硬花球花椰菜、芜菁、小萝卜(radish)、菠菜、洋葱、大蒜、茄子、胡椒、芹菜、胡萝卜、南瓜(squash)、西葫芦、绿皮南瓜、黄瓜、苹果、梨、瓜、草莓、葡萄、树莓、菠萝、大豆、烟草、番茄、蜀黍以及甘蔗。合适的观赏植物的例子有：玫瑰、非洲紫苣苔属(*Saintpaulia*)、牵牛花、天竺葵属植物、一品红、菊花、香石竹和百日草属。

本发明的涉及应用过敏反应诱发剂多肽或蛋白的方法在整株植株或植株部分，包括叶、茎、根等受到处理时，可以通过多种程序进行。这可以(但不是必须)涉及将过敏反应诱发剂多肽或蛋白渗入植株。合适的应用方法包括在即将应用诱发剂时表面施用(如高压或低压喷洒)、注入(injection)、撒粉、以及磨擦叶面。在处理植物种子时，根据本发明的应用实施方案，可以通过表面施用(高压或低压喷洒)、包被、浸渍、撒粉或注入，来应用过敏反应诱发剂多肽或蛋白。其它合适的应用方法可以由本领域内的技术人员设想出，只要它们能产生过敏反应诱发剂多肽或蛋白与植株或植物种子的细胞接触。一旦用本发明的过敏反应诱发剂处理后，种子就可以种植在天然或人工土壤中，用常规程序培育以产生植株。按照本发明处理的种子繁

殖出植株后，可以一次或多次施用过敏反应诱发剂多肽或蛋白来处理这些植株，从而增强植株的生长。这样繁殖出来的植株本身又可用于产生种子或无性繁殖体(如插条)，这些种子和无性繁殖体可产生生长增强的植株。

过敏反应诱发剂多肽或蛋白可以按照本发明地单独或与其它材料混合起来应用到植物或植物种子上。或者，可以在将过敏反应诱发剂多肽或蛋白单独应用于植物，而在不同时间施用其它材料。

适于按照本发明的应用实施方案处理植物或植物种子的组合物包含处于一种载体中的过敏反应诱发剂多肽或蛋白。合适的载体包括水、水溶液、浆液或干粉。在这个实施方案中，该组合物包含多于 0.5nM 的过敏反应诱发剂多肽或蛋白。

虽然并非必要，但这种组合物可以包含辅助的添加剂，包括肥料、杀虫剂、杀真菌剂、杀线虫剂、除草剂以及它们的混合物。合适的肥料包括 $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ 。合适的杀虫剂的一个例子是马拉硫磷。可用的杀真菌剂包括克菌丹。

其它合适的添加剂包括缓冲剂、润湿剂、包被剂和磨擦剂。这些材料可用于便利本发明的程序。另外，过敏反应诱发剂多肽或蛋白可以与其它常规种用制剂和处理材料(包括粘土和多糖)一起应用于植物种子。

在本发明另一种可选择的涉及使用转基因植物和转基因种子的实施方案中，不必将一种过敏反应诱发剂多肽或蛋白局部应用到植物或种子上。取而代之的是，依照本领域内广为人知的程序，如生物弹道学(biolistics)或农杆菌介导的转化，产生用编码一种过敏反应诱发剂多肽或蛋白的 DNA 分子转化的转基因植物。合适的过敏反应诱发剂多肽或蛋白的例子及它们的编码 DNA 的核酸序列如前所公开。一旦产生了这种类型的转基因植物，就可以按照常规程序培育这些植物，而编码过敏反应诱发剂的基因的存在会导致植物的生长增强。或者，从转基因植物中回收转基因种子。然后将这些种

子种植于土壤中，用常规程序培育产生转基因植物。在可以有效赋予增强的生长的条件下，由所种植的转基因种子繁殖出转基因植物。尽管不希望被理论所束缚，但这样的生长增强可以由 RNA 介导或由于表达诱发剂多肽或蛋白而得到。

当依照本发明使用转基因植物和植物种子时，它们还可以另外用其它材料处理，所述材料与在应用过敏反应诱发剂多肽或蛋白物时用于处理植物和种子的材料相同。这些其它材料，包括过敏反应诱发剂，可以按上面提到的程序应用于转基因植物和植物种子，包括高压或低压喷洒、注射、包被、撒粉和浸渍。类似地，在从转基因植物种子繁殖出植物后，可以一次或多次施用过敏反应诱发剂处理这些植物来增强植物生长。这样的植物也可以用常规的植物处理剂(如杀虫剂、肥料等)进行处理。本发明的转基因植物能用于产生种子和无性繁殖体(如插条)，从所述种子或无性繁殖体可以产生生长增强的植株。

实施例

实施例 1 - 用解淀粉欧文氏菌的过敏反应诱发剂处理番茄种子对发芽率的影响

将 *Marglobe* 番茄变种的种子浸泡在 40ml 解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂溶液(“harpin”)中。harpin 如下制备：培养包含质粒 pCPP2139(参见图 1)的大肠杆菌株 DH5，超声处理裂解细胞，在沸水中保持 5 分钟进行热处理，离心除去细胞碎片，然后沉淀蛋白和其它热不稳定的成分。连续稀释得到的制备物(“CFEP”)。根据蛋白印迹分析，这些稀释物(1:40, 1:80, 1:160, 1:320 和 1:640)分别含有 20、10、5、2.5 和 1.25 μ gm/ml 的 harpin。在第 0 天，在一个生长室中，于 28 $^{\circ}$ C 下将种子在烧杯中的 harpin 或缓冲液中浸泡 24 小时。浸泡之后，在第 1 天将种子播种于装有人工土壤的萌发盆中。这个程序按每种处理 100 粒种子进行。

处理:

- 1. harpin (1:40)(20μgm/ml)浸泡种子。
- 2. harpin (1:80)(10μgm/ml)浸泡种子。
- 3. harpin (1:160)(5μgm/ml)浸泡种子。
- 4. harpin (1:320)(2.5μgm/ml)浸泡种子。
- 5. harpin (1:640)(1.25μgm/ml)浸泡种子。
- 6. 缓冲液(5mM KPO₄, pH 6.8)浸泡种子。

表 1 - 处理种子后幼苗的数目

处理	发芽种子的数目				
	第 0 天	第 1 天	第 5 天	第 7 天	第 9 天
harpin (20μgm/ml)浸泡种子		播种	43	57	59
harpin (10μgm/ml)浸泡种子		播种	43	52	52
harpin (5μgm/ml)浸泡种子		播种	40	47	51
harpin (2.5μgm/ml)浸泡种子		播种	43	56	58
harpin (1.25μgm/ml)浸泡种子		播种	38	53	57
缓冲液浸泡种子		播种	27	37	40

如表 1 所示，用解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂处理番茄种子，减少了发芽所需时间并大大增加了发芽率。

实施例 2 - 用解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂处理番茄种子对番茄株高的影响

第 0 天，在一个生长室中，于 28℃ 下将 *Marglobe* 番茄变种的种子浸泡于烧杯中的解淀粉欧文氏菌 harpin (1:15, 1:30, 1:60 以及 1:120) 或缓冲液中 24 小时。浸泡之后，在第 1 天将种子播种于装有人工土壤的萌发盘中。

每种处理随机选择十株表现一致的植株并测量。用直尺测量幼苗从土壤表面到植株顶端的高度。

处理:

-
1. harpin (1:15)(52 μ gm/ml)。
 2. harpin (1:30)(26 μ gm/ml)。
 3. harpin (1:60)(13 μ gm/ml)。
 4. harpin (1:120)(6.5 μ gm/ml)。
 5. 缓冲液(5mM KPO₄, pH 6.8)。

表 2 - 处理种子之后 15 天的幼苗高度(cm)

处理	植株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值
52μgm/ml	10	5.6	5.8	5.8	5.6	6.0	6.0	5.8	5.4	5.8	5.6	5.7
26μgm/ml	10	6.8	7.2	6.6	7.0	6.8	6.8	7.0	7.4	7.2	7.0	7.0
13μgm/ml	10	5.8	5.6	6.0	5.6	5.8	5.8	5.6	5.8	6.0	5.6	5.9
6.5μgm/ml	10	5.4	5.2	5.6	5.4	5.2	5.4	5.6	5.6	5.4	5.2	5.4
缓冲液	10	5.6	5.4	5.2	5.2	5.4	5.2	5.0	5.2	5.4	5.6	5.3

表 3 - 处理种子之后 21 天的幼苗高度(cm)

处理	植株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值
52μgm/ml	10	7.6	7.8	7.6	7.6	7.8	7.8	7.8	7.4	7.6	7.6	7.7
26μgm/ml	10	8.2	8.2	8.0	9.0	8.4	8.6	8.6	9.0	9.2	9.0	8.6
13μgm/ml	10	6.8	6.6	6.8	6.8	6.8	6.8	6.6	7.2	7.0	7.2	6.9
6.5μgm/ml	10	6.8	6.6	6.6	6.4	6.8	6.6	6.8	6.6	6.6	6.8	6.7
缓冲液	10	6.6	6.4	6.2	6.6	6.4	6.6	6.8	6.4	6.4	6.6	6.5

表 4 - 处理种子之后 27 天的幼苗高度(cm)

处理	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值
52µgm/ml	10.2	10.6	10.4	10.6	10.4	10.6	10.8	10.4	10.8	10.6	10.5
26µgm/ml	11.6	11.4	11.6	11.8	11.8	11.8	11.6	11.4	11.6	11.4	11.6
13µgm/ml	9.8	9.6	9.8	9.6	9.8	9.8	9.6	9.4	9.6	9.8	9.7
6.5µgm/ml	9.4	9.4	9.6	9.4	9.6	9.4	9.6	9.6	9.4	9.2	9.5
缓冲液	9.6	10.2	10.0	9.8	10.0	10.2	10.0	10.2	10.4	9.6	10.0

表 5 - 概要——处理后番茄植株的平均高度

处理	番茄植株的平均高度(cm)				
第 0 天	第 1 天	第 15 天	第 21 天	第 27 天	
harpin (1:15)浸泡种子	播种	5.7	7.7	10.5	
harpin (1:30)浸泡种子	播种	7.0	8.6	11.6	
harpin (1:60)浸泡种子	播种	5.9	6.9	9.7	
harpin (1:120)浸泡种子	播种	5.4	6.7	9.5	
缓冲液浸泡种子	播种	5.3	6.5	10.0	

如表 2-5 所示，用解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂处理番茄种子增强了植物生长。1:30 的稀释物作用最大——幼苗高度增加 16%。

实施例 3 - 用解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂处理番茄植株对番茄株高的影响

当 *Marglobe* 番茄植株 4 周大时，在一个生长室中，于 28℃ 下，每株植株喷洒 6ml 含 13 μ gm/ml (1:60) 或 8.7 μ gm/ml (1:90) harpin 的解淀粉欧文氏菌 harpin 溶液或喷洒 6ml 缓冲液(5mM KPO₄)。喷洒 harpin 2 周后(6 周大的番茄植株)以及 2 周又 5 天后，测量番茄植株的高度。每种处理随机选择十株表现一致的植株并测量。用直尺测量幼苗从土壤表面到植株顶端的高度。

处理：

1. harpin (1:60)(13 μ gm/ml)。
2. harpin (1:90)(8.7 μ gm/ml)。
3. 缓冲液(5mM KPO₄, pH 6.8)。

表 6 - harpin 处理后番茄植株的平均高度

操作与处理		番茄植株的平均高度(cm)		
第 0 天	第 14 天	第 28 天	第 42 天	第 47 天
播种	移栽	harpin 1:60 (13 μ gm/ml)	35.5	36.0
播种	移栽	harpin 1:90 (8.7 μ gm/ml)	35.7	36.5
播种	移栽	缓冲液	32.5	33.0

如表 6 所示, 用解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂喷洒番茄幼苗可以增强番茄植株的生长。与缓冲液处理对照相比, 记录到这两个剂量的待测过敏反应诱发剂有相似的生长增强。

实施例 4 - 用解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂处理番茄种子对番茄株高的影响

第 0 天, 在一个生长室中, 于 28℃ 下将 *Marglobe* 番茄种子浸泡于烧杯中的解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂溶液(“harpin”) (1:40, 1:80, 1:160, 1:320 以及 1:640)或缓冲液中 24 小时。在 harpin 或缓冲液中浸泡种子之后, 在第 1 天将它们播种于装有人工土壤的萌发盘中。每种处理随机选择十株表现一致的植株并测量。用直尺测量幼苗从土壤表面到植株顶端的高度。

处理:

1. harpin (1:40)(20 μ gm/ml)。
2. harpin (1:80)(10 μ gm/ml)。
3. harpin (1:160)(5 μ gm/ml)。
4. harpin (1:320)(2.5 μ gm/ml)。
5. harpin (1:640)(1.25 μ gm/ml)。
6. 缓冲液(5mM KPO₄, pH 6.8)。

表 7 - 处理种子之后 12 天的幼苗高度(cm)

处理	植株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值
20μgm/ml	10	6.5	6.8	6.8	6.5	6.4	6.4	6.8	6.4	6.8	6.6	6.6
10μgm/ml	10	6.8	6.2	6.6	6.4	6.8	6.8	6.6	6.4	6.8	6.4	6.6
5μgm/ml	10	6.2	6.6	6.0	6.6	6.4	6.2	6.6	6.2	6.0	6.6	6.3
2.5μgm/ml	10	6.4	6.2	6.6	6.0	6.2	6.4	6.0	6.0	6.2	6.2	6.2
1.25μgm/ml	10	6.2	6.2	6.0	6.4	6.0	6.0	6.4	6.2	6.4	6.2	6.2
缓冲液	10	5.8	6.0	6.2	6.2	5.8	5.8	6.0	6.2	6.0	6.0	6.0

表 8 - 处理种子之后 14 天的幼苗高度(cm)

处理	植株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值
20μgm/ml	10	7.8	7.8	8.2	8.0	8.2	8.4	7.8	8.4	7.6	7.8	8.0
10μgm/ml	10	8.6	8.8	8.4	9.2	8.4	8.6	7.8	7.8	8.4	8.4	8.4
5μgm/ml	10	9.8	9.2	9.8	9.6	9.2	9.4	8.6	9.2	9.0	8.6	9.2
2.5μgm/ml	10	8.8	8.6	8.6	8.4	7.8	8.6	8.4	9.0	8.0	7.8	8.4
1.25μgm/ml	10	8.4	7.8	8.4	8.0	8.6	8.4	8.0	8.2	8.4	8.2	8.2
缓冲液	10	7.2	8.2	7.4	7.6	7.8	7.6	7.8	7.4	7.8	7.6	7.6

表 9 - 处理种子之后 17 天的幼苗高度(cm)

处理	植株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值
20µgm/ml	10	11.2	11.6	11.4	11.6	11.4	11.2	11.8	11.4	11.8	11.6	11.5
10µgm/ml	10	13.4	13.4	13.8	13.2	13.4	12.6	12.4	13.4	13.2	13.4	13.2
5µgm/ml	10	13.6	12.8	13.6	13.2	14.2	13.8	12.6	13.4	13.8	13.6	13.5
2.5µgm/ml	10	11.6	12.4	12.4	11.8	11.6	12.2	12.6	11.8	12.0	11.6	12.0
1.25µgm/ml	10	12.8	12.6	12.0	12.4	11.6	11.8	12.2	11.4	11.2	11.4	11.9
缓冲液	10	10.0	10.4	10.6	10.6	10.4	10.4	10.8	10.2	10.4	10.0	10.4

表 10 - 概要——处理后番茄植株的平均高度

操作和处理		番茄植株的平均高度(cm)			
第 0 天	第 1 天	第 12 天	第 14 天	第 17 天	
harpin (20μgm/ml)浸泡种子	播种	6.6	8.0	11.5	
harpin (10μgm/ml)浸泡种子	播种	6.6	8.4	13.2	
harpin (5μgm/ml)浸泡种子	播种	6.3	9.2	13.5	
harpin (2.5μgm/ml)浸泡种子	播种	6.2	8.4	12.0	
harpin (1.25μgm/ml)浸泡种子	播种	6.2	8.2	11.9	
缓冲液浸泡种子	播种	6.0	7.6	10.4	

如表 7-10 所示，用解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂处理番茄种子可以增强番茄植株的生长。1:160 的稀释物(5 μ g/ml harpin)作用最大——幼苗高度比用缓冲液处理的植株增加超过 20%。

实施例 5 用解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂处理番茄种子对种子发芽率的影响

第 0 天，在一个生长室中，于 28℃ 下将 *Marglobe* 番茄种子浸泡于烧杯中的 40ml 解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂（“harpin”）溶液（来自大肠杆菌 DH5 (pCPP2139) 的 CFEP 的 1:50 或 1:100 稀释物，分别含有 8 μ g/ml 和 4 μ g/ml 的过敏反应诱发剂）或缓冲液中 24 小时。浸泡之后，在第 1 天将种子播种于装有人工土壤的萌发盘中。每种处理进行 4 盆，每盆内有 20 粒种子。

处理：

1. harpin (8 μ gm/ml)。
2. harpin (8 μ gm/ml)。
3. harpin (8 μ gm/ml)。
4. harpin (8 μ gm/ml)。
5. harpin (4 μ gm/ml)。
6. harpin (4 μ gm/ml)。
7. harpin (4 μ gm/ml)。
8. harpin (4 μ gm/ml)。
9. 缓冲液(5mM KPO₄, pH 6.8)。
10. 缓冲液(5mM KPO₄, pH 6.8)。
11. 缓冲液(5mM KPO₄, pH 6.8)。
12. 缓冲液(5mM KPO₄, pH 6.8)。

表 11 – harpin 处理后幼苗的数目

操作和处理		发芽的种子的数目(样本总数为 20)					
第 0 天	第 1 天	第 5 天		第 42 天		第 47 天	
			平均值		平均值		平均值
harpin (8 μ gm/ml)	播种	11		15		19	
harpin (8 μ gm/ml)	播种	13		17		20	
harpin (8 μ gm/ml)	播种	10		13		16	
harpin (8 μ gm/ml)	播种	9	10.8	15	15.0	16	17.8
harpin (4 μ gm/ml)	播种	11		17		17	
harpin (4 μ gm/ml)	播种	15		17		18	
harpin (4 μ gm/ml)	播种	9		12		14	
harpin (4 μ gm/ml)	播种	9	11.0	14	15.0	16	16.3
缓冲液	播种	11		11		14	
缓冲液	播种	9		14		15	
缓冲液	播种	10		14		14	
缓冲液	播种	10	10.0	12	12.8	14	14.3

如表 11 所示, 用解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂处理番茄种子可以提高番茄种子的发芽率和发芽水平。在试验最后看来, 所使用的更高剂量看来比缓冲液更有效。

实施例 6 – 用从包含过敏反应诱发剂编码构成物 pCPP2139 或质粒载体 pCPP50 的大肠杆菌制备的蛋白处理番茄种子对植株生长的影响

将 *Marglobe* 番茄种子浸泡在解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂 (“harpin”) (得自大肠杆菌 DH5 α (pCPP2139)(图 1))制备物中, 或浸泡于作为对照、添加了 BSA 蛋白的载体制备物(得自 DH5 α (pCPP50)(图 2))。所述对照载体制备物每 ml 包含 33.6 μ l BSA(10mg/ml), 以提供与 pCPP2139 制备物所包含的 harpin 等量的蛋白。第 1 天, 在烧杯中制备 1:50 (8.0 μ g/ml)、1:100 (4.0 μ g/ml)和 1:200 (2.0 μ g/ml)的稀释物, 并在一个受控制的环境室中于 28 $^{\circ}$ C 下将种子浸泡 24 小时。浸泡之后, 在第 2 天将种子种植在装有人工土壤的萌发

盘中。移栽后每种处理随机选择表现一致的 10 株植株，并在三个时间进行测量。用直尺测量幼苗从土壤表面到植株顶端的高度。

处理：

- | | | |
|-------------|-------|------------------|
| 1. harpin | 1:50 | (8.0 μ g/ml) |
| 2. harpin | 1:100 | (4.0 μ g/ml) |
| 3. harpin | 1:200 | (2.0 μ g/ml) |
| 4. 载体 + BSA | 1:50 | (0 harpin) |
| 5. 载体 + BSA | 1:100 | (0 harpin) |
| 6. 载体 + BSA | 1:200 | (0 harpin) |

表 12 - 种子处理后 18 天的幼苗高度(cm)

处理	harpin	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值
H1:50	8.0	3.6	5.0	4.8	5.0	4.2	5.2	5.8	4.6	4.0	4.8	4.7
H1:100	4.0	4.6	5.8	6.2	6.0	5.6	6.8	6.0	4.8	5.6	6.2	5.8
H1:200	2.0	4.0	5.8	5.8	4.6	5.4	5.0	5.8	4.6	4.6	5.8	5.1
V1:50	0	3.8	5.0	4.6	5.4	5.6	4.6	5.0	5.2	4.6	4.8	4.9
V1:100	0	4.4	5.2	4.6	4.4	5.4	4.8	5.0	4.6	4.4	5.2	4.8
V1:200	0	4.2	4.8	5.4	4.6	5.0	4.8	4.8	5.4	4.6	5.0	4.9

表 13 - 种子处理后 22 天的幼苗高度(cm)

处理	harpin	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值
H1:50	8.0	4.2	5.6	5.2	6.0	4.8	5.4	5.0	5.2	5.4	5.0	5.2
H1:100	4.0	7.6	6.8	7.0	7.2	6.8	7.4	7.6	7.0	6.8	7.4	7.2
H1:200	2.0	7.0	6.6	6.8	7.2	7.4	6.8	7.0	7.2	6.8	7.2	7.0
V1:50	0	5.6	5.8	6.2	6.4	5.6	5.2	5.6	5.8	6.0	5.8	5.8
V1:100	0	5.4	6.0	5.8	6.2	5.8	5.6	5.4	5.2	6.0	5.6	5.7
V1:200	0	5.2	6.2	5.8	5.4	6.2	6.0	5.6	6.4	5.8	6.0	5.9

表 14 – 种子处理后 26 天的幼苗高度(cm)

处理	harpin	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值
H1:50	8.0	7.6	8.4	8.8	6.8	9.6	8.2	7.4	9.8	9.2	9.0	8.5
H1:100	4.0	12.0	11.4	11.2	11.0	10.8	12.0	11.2	11.6	10.4	10.2	11.2
H1:200	2.0	10.6	11.2	11.6	10.2	11.0	10.8	10.0	11.8	10.2	10.6	10.8
V1:50	0	9.0	9.4	8.8	8.4	9.6	9.2	9.2	8.6	8.0	9.4	9.2
V1:100	0	9.2	10.0	9.8	9.6	8.4	9.4	9.6	9.8	8.0	9.6	9.3
V1:200	0	8.8	9.6	8.2	9.2	8.4	8.0	9.8	9.0	9.4	9.2	9.0

表 15 – 处理后番茄植株的平均高度

操作和处理		番茄植株的平均高度(cm)			
第 1 天	第 2 天	第 18 天	第 22 天	第 26 天	
harpin (1:50) (8.0μgm/ml)	播种	4.7	5.2	8.5	
harpin (1:100) (4.0μgm/ml)	播种	5.8	7.2	11.2	
harpin (1:200) (4.0μgm/ml)	播种	5.1	7.0	10.8	
载体 + BSA (1:50) (0)	播种	4.9	5.8	9.2	
载体 + BSA (1:100) (0)	播种	4.8	5.7	9.3	
载体 + BSA (1:200) (0)	播种	4.9	5.9	9.0	

如表 12-15 所示, 用包含编码解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂的基因的大肠杆菌处理, 可以增强番茄植株的生长。1:100 的稀释物 (4.0 μ g/ml)作用最大, 而更高浓度和更低浓度作用要小。用 4.0 μ g/ml harpin 处理与用含有类似量非 harpin 蛋白的载体对照制备物处理相比, 平均幼苗高度增加了约 20%。由大肠杆菌株 DH5 α (pCPP50)(其带有大肠杆菌株 DH5 α (pCPP2139)的 *hrpN* 基因的载体)得到的细胞裂解制备物的成分并不具有与包含 harpin 的制备物相同的生长促进作用, 即使假设其中补充了与含大量 harpin 蛋白的 DH5 α (pCPP2139)制备物相同水平的 BSA 蛋白。

实施例 7 - 用从包含过敏反应诱发剂编码构成物 pCPP2139 或其质粒载体 pCPP50 的大肠杆菌制备的蛋白处理番茄种子对番茄植株生长的影响

第 1 天, 在一个生长室中, 于 28 $^{\circ}$ C 下将 *Marglobe* 番茄种子浸泡于烧杯中的解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂溶液(“harpin”)(得自 harpin 编码质粒 pCPP2139 载体)以及包含 pCPP50 载体的溶液的 1:25、1:50、以及 1:100 的稀释物中 24 小时。浸泡种子之后, 在第 2 天, 将它们种植于装有人工土壤的萌发盘中。每种处理随机选择十株表现一致的植株并测量。用直尺测量幼苗从土壤表面到植株顶端的高度。

处理:

1. harpin 16 μ g/ml
2. harpin 8 μ g/ml
3. harpin 4 μ g/ml
4. 载体 16 μ g/ml
5. 载体 8 μ g/ml
6. 载体 4 μ g/ml

表 16 – 种子处理后 11 天的幼苗高度(cm)

处理	harpin	植株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值
H1:25	16µgm/ml	10	5.0	5.2	4.8	4.6	4.4	4.6	3.8	4.2	3.8	4.2	4.5
H1:50	8µgm/ml	10	5.6	5.4	6.0	5.8	4.8	6.8	5.8	5.0	5.2	4.8	5.5
H1:100	4µgm/ml	10	5.2	5.6	5.0	5.0	5.0	4.8	5.0	5.6	4.8	5.2	5.1
V1:25	0	10	4.4	4.4	4.8	4.6	4.8	4.6	4.0	4.8	4.4	4.6	4.5
V1:50	0	10	4.8	4.4	4.6	4.0	4.4	4.2	4.6	4.0	4.4	4.2	4.4
V1:100	0	10	4.6	4.2	4.8	4.4	4.4	4.0	4.2	4.0	4.4	4.0	4.3

表 17 - 种子处理后 14 天的幼苗高度(cm)

处理	harpin	植株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值
H1:25	16µgm/ml	10	7.6	7.6	7.2	7.4	7.8	7.8	7.6	7.0	7.4	7.0	7.4
H1:50	8µgm/ml	10	8.5	8.2	8.4	7.6	7.8	8.4	8.6	9.0	7.6	8.2	8.2
H1:100	4µgm/ml	10	7.2	8.4	8.2	7.4	8.0	7.6	7.6	8.0	8.6	7.6	7.9
V1:25	0	10	6.8	6.4	7.8	6.6	6.6	6.8	7.4	6.0	6.4	6.4	6.7
V1:50	0	10	6.6	5.8	6.4	7.6	7.4	7.2	6.8	6.6	6.4	5.8	6.7
V1:100	0	10	6.2	6.0	6.8	6.6	6.4	5.8	6.6	7.0	5.8	6.4	6.4

表 18 - 处理后番茄植株的平均高度

操作和处理	番茄植株的平均高度(cm)			
	第 1 天	第 2 天	第 11 天	第 14 天
harpin 浸泡种子(16 μ gm/ml)		播种	4.5	7.4
harpin 浸泡种子(8 μ gm/ml)		播种	5.5	8.2
harpin 浸泡种子(4 μ gm/ml)		播种	5.1	7.9
载体浸泡种子(16 μ gm/ml)		播种	4.5	6.7
载体浸泡种子(8 μ gm/ml)		播种	4.4	6.7
载体浸泡种子(4 μ gm/ml)		播种	4.3	6.4

如表 16-18 所示，用解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂处理可以增强番茄植株的生长。1:50 稀释物(8.0 μ g/ml 过敏反应诱发剂)作用最大，其中幼苗高度比对照增加了约 20%。

实施例 8 - 无细胞解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂对马铃薯生长的作用

在各自单独的容器中将马铃薯变种 *Norchip* 由块茎培养成 3 周大的植株。每株植株的叶面喷洒以 1:50、1:100 和 1:200 稀释的包含解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂 (“harpin”) 的溶液，或喷洒以 1:50、1:100 和 1:200 稀释的包含大肠杆菌蛋白和载体 pCPP50 的蛋白的对照溶液(“载体”)。在第 20 天，为以下每项处理随机选择 12 株表现一致的植株。将每种处理的一株植株在 16℃ 下维持在一个生长室中，两株植株在 18-25℃ 下维持在一个温室台上。处理后 25 天，分别测量所有植株的苗(茎)。

处理：

1. harpin 1:50 16 μ gm/ml
2. harpin 1:100 8 μ gm/ml
3. harpin 1:200 4 μ gm/ml
4. 载体 1:50 0 harpin
5. 载体 1:100 0 harpin
6. 载体 1:200 0 harpin

表 19 - 16℃下马铃薯植株茎的长度

第 20 天的处理	第 45 天马铃薯茎的长度(cm)					
	茎 1	茎 2	茎 3	茎 4	茎 5	植株平均值
harpin 1:50	43.0	39.5	42.5	34.0	38.0	39.4
harpin 1:100	42.0	38.5	(2 分枝)			40.3
harpin 1:200	35.5	30.5	31.5	(3 分枝)		32.5
载体 1:50	34.0	32.0	31.5	28.0	27.5	30.6
载体 1:100	30.0	33.5	33.0	30.0	28.0	31.3
载体 1:200	33.5	31.5	32.5	(3 分枝)		32.5

表 20 - 温室台上马铃薯植株茎的长度

第 20 天的处理	第 45 天马铃薯茎的长度(cm)					
	茎 1	茎 2	茎 3	茎 4	茎 5	植株
harpin 1:50	65.5	58.5	57.5	62.5	68.5	62.5
harpin 1:100	62.5	67.0	65.0	69.0	(5 分枝)	65.9
harpin 1:100	70.5	73.5	74.0	80.5	(4 分枝)	74.6
harpin 1:100	83.0	80.5	76.5	76.0	(4 分枝)	79.5
harpin 1:200	56.5	59.5	50.5	53.0	81.5	53.9
harpin 1:200	57.0	59.5	69.5	(3 分枝)	55.5	62.0
载体 1:50	53.0	62.0	59.5	62.5	(4 分枝)	59.3
载体 1:50	52.0	46.0	61.5	56.5	61.5	55.8
载体 1:100	62.0	51.5	66.0	67.5	57.0	62.0
载体 1:100	61.5	62.5	59.0	65.5	63.0	62.5
载体 1:200	62.0	66.0	(2 分枝)		63.5	64.0
载体 1:200	61.0	60.0	63.5	(3 分枝)		61.5
						62.8

如表 19 和 20 所示, 用解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂处理马铃薯植株增强了苗(茎)的生长。因此, 根据茎的数目以及平均长度判断, 在温室和生长室培育的植株中, harpin 处理的植株的总生长都要强。用中等剂量 harpin ($8.0\mu\text{g/ml}$)处理的马铃薯植株看起来比用更高或更低剂量处理的植株在茎生长上增强更多。在两种生长条件下, 用中等剂量的 harpin 处理导致更强的生长。

实施例 9 - 用包含解淀粉欧文氏菌 harpin 的无细胞诱发剂制备物喷洒番茄的作用

将 *Marglobe* 植株移栽后 8 天, 喷洒 harpin 制备物(得自大肠杆菌 DH5 α (pCPP2139)), 或喷洒添加了 BSA 蛋白的载体制备物(得自大肠杆菌 DH5 α (pCPP50))作为对照。所述对照载体制备物每 ml 包含 $33.6\mu\text{l}$ BSA(10mg/ml), 以提供与 pCPP2139 制备物所包含的 harpin 等量的蛋白。制备 1:50($8.0\mu\text{g/ml}$)、1:100($4.0\mu\text{g/ml}$)和 1:200($2.0\mu\text{g/ml}$)的制备物, 并用一台电动喷雾器喷洒到植株上直至形成溢流。每种处理随机选择 15 株表现一致的植株并分配进行处理。将这些植株在处理前和处理后于 28°C 下维持在一个受控制的环境室中。

处理后几次测量从土壤表面到植株顶端的总高度。在接近土壤表面切断茎后, 立即称量番茄植株地上部分的重量。

处理: (稀释度和 harpin 含量)

- | | | |
|-------------|-------|-------------------------|
| 1. harpin | 1:50 | ($8.0\mu\text{g/ml}$) |
| 2. harpin | 1:100 | ($4.0\mu\text{g/ml}$) |
| 3. harpin | 1:200 | ($2.0\mu\text{g/ml}$) |
| 4. 载体 + BSA | 1:50 | (0 harpin) |
| 5. 载体 + BSA | 1:100 | (0 harpin) |
| 6. 载体 + BSA | 1:200 | (0 harpin) |

表 21 - 喷洒处理后 1 天的番茄株高(cm)

处理	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	平均值
H 50	5.4	5.0	5.6	5.0	5.2	4.8	5.0	5.2	5.4	5.0	5.6	4.8	4.6	5.0	5.8	5.16
H 100	5.0	5.2	5.0	5.4	5.4	5.0	5.2	4.8	5.6	5.2	5.4	5.0	4.8	5.0	5.2	5.15
H 200	5.0	4.6	5.4	4.6	5.0	5.2	5.4	4.8	5.0	5.2	5.4	5.2	5.0	5.2	5.0	5.13
V 50	5.2	4.6	4.8	5.0	5.6	4.8	5.0	5.2	5.6	5.4	5.2	5.8	5.0	4.8	5.2	5.15
V 100	5.2	4.8	5.2	5.0	5.6	4.8	5.4	5.2	5.0	4.8	5.0	4.8	5.6	5.2	5.4	5.13
V 200	5.2	5.4	5.0	5.4	5.2	5.4	5.0	5.2	5.4	5.2	4.6	4.8	5.2	5.0	5.4	5.16

表 22 - 喷洒处理后 15 天的番茄株高(cm)

处理	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	平均值
H 50	22.0	21.0	22.0	21.5	23.0	22.0	23.5	25.0	22.0	20.5	21.0	23.5	22.0	22.5	21.0	22.2
H 100	26.0	26.5	27.0	29.0	27.5	26.0	28.0	29.0	28.5	26.0	27.5	28.0	28.0	29.0	26.0	27.5
H 200	24.5	26.0	25.0	26.0	26.5	27.5	28.5	28.0	26.0	24.0	26.5	24.5	26.0	24.0	27.5	26.0
V 50	23.5	21.5	20.5	22.5	20.5	21.0	22.0	23.5	22.0	20.5	22.0	21.0	20.5	22.5	21.5	21.7
V 100	22.5	21.0	20.5	23.0	22.0	20.0	20.5	20.0	21.0	22.0	23.0	20.0	22.0	21.0	22.5	21.4
V 200	21.5	20.5	23.5	20.5	22.0	22.0	22.5	20.0	22.0	23.5	23.5	22.0	20.0	23.0	21.0	21.8

表 23 – 喷洒处理后 21 天的番茄株高(cm)

处理	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	平均值
H 50	28.5	28.0	27.5	26.0	27.0	28.5	28.5	29.0	30.0	28.5	29.0	27.0	28.5	28.0	27.0	28.1
H 100	37.0	38.0	37.5	39.0	37.0	38.5	36.0	38.0	37.0	38.5	37.0	36.0	37.0	37.0	38.5	37.5
H 200	34.5	34.0	36.0	33.5	32.0	34.5	32.5	34.0	32.0	36.5	30.5	32.0	30.0	32.5	34.0	33.2
V 50	30.0	28.0	28.0	28.5	30.0	27.0	26.5	28.0	29.5	28.5	26.5	28.5	27.0	29.5	28.5	28.3
V 100	28.0	27.5	30.0	29.5	28.5	29.0	30.0	26.5	27.5	28.0	30.0	29.0	28.5	28.0	29.5	28.6
V 200	28.5	30.5	27.0	29.0	28.5	27.5	29.0	30.0	28.0	28.5	29.0	30.5	27.5	28.5	28.0	28.7

表 24 – 喷洒后番茄植株的平均高度

处理(稀释度和 harpin 含量)		番茄植株的平均高度(cm)			
		处理后的天数			
		第 1 天		第 11 天	
				第 14 天	
harpin 1:50	(8.0µg/ml)	5.16		22.2	28.1
harpin 1:100	(4.0µg/ml)	5.15		27.5	37.5
harpin 1:200	(2.0µg/ml)	5.13		26.0	33.2
载体 + BSA 1:50	(0)	5.15		21.7	28.5
载体 + BSA 1:100	(0)	5.13		21.4	28.6
载体 + BSA 1:200	(0)	5.16		21.8	28.7

表 25 - 喷洒处理后 21 天番茄植株的鲜重(g/植株)

处理	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	平均值
H 50	65.4	60.3	58.9	73.2	63.8	70.1	58.4	60.1	62.7	55.6	58.3	68.9	58.2	64.2	56.4	62.3
H 100	84.3	68.8	74.6	66.7	78.5	58.9	76.4	78.6	84.8	78.4	86.4	66.5	76.5	82.4	80.5	76.2
H 200	80.1	76.5	68.4	79.5	64.8	79.6	76.4	80.2	66.8	72.5	78.8	72.3	62.8	76.4	73.2	73.9
V 50	64.0	56.8	69.4	72.3	56.7	66.8	71.2	62.3	61.0	62.5	63.4	58.3	72.1	67.8	67.0	64.7
V 100	62.8	58.4	70.2	64.2	58.1	72.7	68.4	53.6	67.5	66.3	59.3	68.2	71.2	65.2	59.2	64.4
V 200	64.2	59.6	70.2	66.6	64.3	60.4	60.8	56.7	71.8	60.6	63.6	58.9	68.3	57.2	60.0	62.9

通常，用 harpin 单次喷洒番茄幼苗比用补充了 BSA 蛋白的对照(载体)制备物喷洒处理导致更强的后续生长。harpin 处理的植株的增强的生长在株高测量和鲜重测量中都看得出来。在三个测试过的浓度中，两个较低浓度导致比高剂量(8.0 μ g/ml)更强的植株生长(基于两种测量中的任一种)。用两个较低浓度(2 和 4 μ g/ml)处理的植株之间的生长几乎没有区别。由大肠杆菌株 DH5 α (pCPP50)(其带有大肠杆菌株 DH5 α (pCPP2139)的 *hrpN* 基因的载体)得到的细胞裂解制备物的组分并不具有与包含 harpin 的制备物相同的生长促进作用，即使其中补充了与含大量 harpin 蛋白的 DH5 α (pCPP2139)制备物相同水平的 BSA 蛋白。因此，这个试验表明，harpin 是植物生长增强的原因。

实施例 10 - 小果的早着色和早熟

进行一个大田试验以评价过敏反应诱发剂(“harpin”)处理对草莓栽培品种 Candy 产量和成熟参数的作用。在每个 40 英尺长 $\times$ 3 英尺宽(1 植株宽)的小区中，移植生长(established)的植株用 harpin 以 2.5mg/10 平方英尺处理、不处理(“对照”)、或用工业标准化学品 Ronilan 以推荐比率处理(“Ronilan”)。处理重复四次并安排在同一个小试验田位点重复进行。处理在 5-10%开花时开始，然后以 7-10 天的间隔再施用两次。头两次收成用于评估病害的防治，由后两次收成收集果实产量数据。观察表明，harpin 处理的果实比不处理的果实更大并显示红色更深，这表明成熟被加速了 1-2 周。此时确定最少有 10 枚果实的每个树丛上成熟果实的数目并概括在表 26 中。harpin 处理的小区中每 10-莓树丛的成熟果实比对照或 Ronilan 处理的小区都多。而后两次收获的合并产量表明，用 harpin 处理以及用 Ronilan 处理的小区比未处理的对照产量增加(表 27)。

表 26—1996 年 6 月 20 日在有十枚或十枚以上浆果的植株上
每丛成熟树莓果实的数目

<u>处理</u>	<u>成熟果实/10 浆果丛</u>	<u>与对照相比的百分数%</u>
对照	2.75	100.0
Ronilan	2.75	100.0
harpin	7.25	263.6

表 27—综合最后两次收获的平均树莓果实产量(重量)(磅)

<u>处理</u>	<u>总产量</u>	<u>与对照相比的百分数%</u>
对照	32.5	100.0
Ronilan	37.5	115.4
harpin	39.5	121.5

实施例 11 - 对食荚菜豆的生长增强

采用各种方法处理食荚菜豆变种 Bush Blue Lake，并种植在装满商品化盆栽混合土的 25cm 直径的塑料盆中，放置于一个开放温室中，评价各生长参数。处理包括不处理的菜豆种子(“对照”)；用水作稀释剂制备的 1.5%甲基纤维素浆液处理种子(“M/C”)；先用 1.5%甲基纤维素处理种子、再叶上施用 0.125mg/ml 的过敏反应诱发剂(“harpin”)(“M/C+H”)；以及用 1.5%甲基纤维素处理加上每 50 粒种子 5.0 μ g harpin 喷洒 harpin 干粉、然后叶上施用 0.125mg/ml 的 harpin (“M/C-SD+H”)。在第 0 天播种种子，每盆 3 粒种子，在发芽时间苗至每盆 1 株植株。处理重复 10 次，并在一间开放温室内通过重复(by rep)来随机化。64 天后收获豆荚，收集具有可售大小(大小>10cm $\times$ 5cm)的豆荚的鲜重作为产量。采用用于区分处理平均值的 Fisher 氏 LSD 进行方差分析，分析数据。

表 28 – 采用各种方法用解淀粉欧文氏菌 harpin 处理
对市售大小的食荚菜豆豆荚产量的作用

处理	可售产量, g ¹	与不处理的植株(对照)相比的百分数%
M/C-SD+H	70.6 a	452
M/C-H	58.5 ab	375
M/C	46.3 bc	297
M/C+H	42.3 bc	271
M/C-SD	40.0 cd	256
对照	15.6 e	100

¹ 可售产量包括所有 10cm × 0.5cm 或更大的菜豆豆荚。根据 Fisher 氏 LSD, 后面带有相同字母的平均值在 P=0.05 的水平上没有显著差异。

如表 28 所示, 用各种应用方法施用解淀粉欧文氏菌 harpin, 导致可售大小的食荚菜豆豆荚增产。单独用甲基纤维素处理也导致菜豆增产, 但当其与 harpin 组合用于种子处理(喷洒干粉)和叶处理时, 产量明显增加。

实施例 12 – 对黄瓜叶施用 HP-1000™得到的黄瓜增产

以 15、30 或 60μg/ml 活性成分(a.i.)的比率叶喷洒 HP-1000™ (EDEN Bioscience, Bothell, Washington)(解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂制剂), 处理黄瓜幼苗及移植体。在第一片真叶完全伸展时进行第一次喷洒。第一次喷洒后 10 天进行第二次应用。所有喷洒都应用一台背携式喷雾器进行, 试验还包括一个不处理的对照(UTC)。第二次施用 HP-1000™后 3 天, 将来自每种处理的十株植株移栽到随机化的田间小区中, 重复三次。这产生了每种处理总共 30 株植株。移栽后七天, 第三次叶喷洒 HP-1000™。虽然随后的严重干旱导致显著的用水胁迫, 但遵循标准工业化(commercial)收割模式进行了总共六次收割。从每种处理收获得的果实总重都显示在表 29 中。结果表明, 用比率为 15 和 30μg/ml 的 HP-1000™处理的植株产出了比 UTC 明显更多的果实。用 HP-1000™处理的植株产生了中度的增产。这些结果表明, HP-1000™处理的植株显著地比不处理的植株更耐受干旱的恶

劣条件。

表 29 - HP-1000™处理后得到的黄瓜增产

处理	比率 ¹	产量 ² , 磅/10 株	高于 UTC 的%
UTC	---	9.7 a	---
HP-1000™	15µg/ml	25.4 b	161.4
HP-1000™	30µg/ml	32.6 c	236.4
HP-1000™	60µg/ml	11.2 a	15.9

¹ 活性成分(a. i.)。 ² 根据 Duncan 氏 MRT, 后面带有不同字母的平均值在 P=0.05 的水平上有显著差异。

实施例 13 - 由 HP-1000™处理得到的棉花增产

在一个随机完全区组(RCB)大田试验中, 将棉花种植在四块一样的 12×20 英尺田间小区中。用 HP-1000™ (EDEN Bioscience) (解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂制剂)、HP-1000™+Pix® (Pix® (BASF Corp., Mount Olive, N. J.)是一种生长调节剂, 施用以保持棉花植株高度上的坚实(compact in height))或 Early Harvest® (Griffen Corp., Valdosta, Ga.) (一种竞争性生长增强剂)处理植株。试验还包括一个不处理的对照(UTC)。使用一台背携式喷雾器在作物的三个生长期(第一片真叶、开花前、花期早期)进行所有的叶施用处理。在所有处理中, 所有肥料和除草产品都根据常规的农业实践施用。收获前十周, HP-1000™处理的植株与其它处理的植株相比, 每株植株上棉桃的数目要显著更高。收获时, HP-1000™处理与 UTC 相比, 显示出皮棉产量显著增加(43%)(表 30)。当 HP-1000™与 Pix®组合使用时, 皮棉产量比 UTC 增加 20%。由于 Pix®普遍应用于大面积的棉花, 这个结果表明, HP-1000™可以与 Pix®成功地进行化学液体混合(tank mixed)。与 UTC 相比, 应用竞争性生长增强剂 Early Harvest®, 皮棉产量仅增加 9%。

表 30 - 用 HP-1000™、HP-1000™+ Pix® 或 Early Harvest®
处理后得到的皮棉产量增加

处理	比率 ¹	皮棉产量 (磅/英亩)	高于 UTC 的%
UTC	---	942.1	---
Early Harvest®	2 盎司/英亩	1,077.4*	14.3
HP-1000™+ Pix®	40µg/ml+8 盎司/英亩	1,133.1*	20.4
HP-1000™	40µg/ml	1,350.0*	43.3
(* 在 P=0.05 的水平上有显著差异)		lsd=122.4	

¹ HP-1000™的比率是指活性成分(a. i.)的比率; Early Harvest®和 Pix®的比率是指制成品的比率。

实施例 14 - 由 HP-1000™处理得到中国茄子(Chinese eggplant)的增产

向苗圃中培育的 Chinese egg 植株幼苗以 15、30 或 60µg/ml (a.i.) 喷洒一次 HP-1000™ (EDEN Bioscience) (解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂制剂), 然后移植到田间小区中, 每种处理重复三次。移栽后两周, 第二次施用 HP-1000™。第二次喷洒后约两周, 第三次即最后一次施用 HP-1000™。所有喷洒都使用一台背携式喷雾器进行; 试验还包括一个不处理的对照(UTC)。随着季节的变换, 每种处理共收获八次。从这些收成得到的数据表明, 用 HP-1000™处理导致单株果实产量更高。

表 31 - HP-1000™处理后中国茄子植株的增产:

处理	比率(活性成分)	产量(磅/株)	高于 UTC 的%
UTC	---	1.45	---
HP-1000™	15µg/ml	2.03	40.0
HP-1000™	30µg/ml	1.90	31.0
HP-1000™	60µg/ml	1.95	34.5

实施例 15 - 由用 HP-1000™处理得到的稻增产

将稻幼苗移栽进田间小区中, 重复三次, 然后用一台背携式喷

雾器以三种不同比率叶喷洒 HP-1000™ (EDEN Bioscience)(解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂制剂)进行处理。试验中还包括一个不处理的对照(UTC)。移栽后 1 周第一次施用 HP-1000™, 第一次施用三周后进行第二次施用。在稻粒刚好开始灌浆之前, 进行第三次即最后一次喷洒。收获的结果显示, 以 30 和 60μg/ml 叶施用 HP-1000™分别显著增产 47%和 56%(表 32)。

表 32 - 用 HP-1000™叶处理后得到的稻增产

处理	比率(活性成分)	产量 ¹ (磅/英亩)	高于 UTC 的%
UTC	---	3,853 a	---
HP-1000™	15μg/ml	5,265 ab	35.9
HP-1000™	30μg/ml	5,710 b	47.3
HP-1000™	60μg/ml	6,043 b	56.1

¹ 根据 Duncan 氏 MRT, 后面带有不同字母的平均值在 P=0.05 的水平上有显著差异。

实施例 16 - 由 HP-1000™处理得到的大豆增产

将大豆种植进随机化的田间小区中, 每种处理重复三次。使用一台背携式喷雾器叶喷洒 HP-1000™(EDEN Bioscience)(解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂制剂), 试验中还包括一个不处理的对照(UTC)。在四片真叶期, 植株约八英寸高时, 开始以三个比率施用 HP-1000™。第一次喷洒后 10 天第二次喷洒 HP-1000™, 第二次喷洒 10 天后进行第三次喷洒。第一次喷洒处理 10 天后测量到的株高表明, HP-1000™应用导致生长显著增强(表 33)。此外, 用 60μg/ml 比率的 HP-1000™处理的植株比其它处理的植株早 5 天开始开花。第三次喷洒后约十天, 计数每次重复的十株随机选出的植株上单株大豆豆荚的数目。这些结果表明, 由 HP-1000™处理得到的生长增强导致显著更高的产量(表 34)。

表 33 – 用 HP-1000™叶处理后大豆株高的增加

处理	比率(活性成分)	株高 ¹ (英寸)	高于 UTC 的%
UTC	---	12.2 a	---
HP-1000™	15µg/ml	13.2 b	8.3
HP-1000™	30µg/ml	14.1 c	16.2
HP-1000™	60µg/ml	14.3 c	17.3

¹ 根据 Duncan 氏 MRT, 后面带有不同字母的平均值在 P=0.05 的水平上有显著差异。

表 34 – 用 HP-1000™叶处理后大豆结荚(pod set)增加

处理	比率(活性成分)	豆荚数/株 ¹ (英寸)	高于 UTC 的%
UTC	---	41.1 a	---
HP-1000™	15µg/ml	45.4 ab	10.4
HP-1000™	30µg/ml	47.4 b	15.4
HP-1000™	60µg/ml	48.4 b	17.7

¹ 根据 Duncan 氏 MRT, 后面带有不同字母的平均值在 P=0.05 的水平上有显著差异。

实施例 17 - 由 HP-1000™处理得到的草莓增产

用 HP-1000™(EDEN Bioscience) (解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂制剂)对两个草莓变种 *Camarosa* 和 *Selva* 进行两个大田试验。在一块工业化生产草莓的田中, 为每个变种的每种处理建立一个具有四个重复小区(5.33 × 10 英尺)的随机完全区组(RCB)设计。每个小区中双行布置种植草莓植株。试验还包括一个不处理的对照。在施用开始前, 所有植株都摘净花和浆果。使用一台背携式喷雾器每六周喷洒 40µg/ml 比率的 HP-1000™。在每次喷洒应用之前, 收获每种处理得到的所有成熟果实、称重并根据商业标准评级。对 *Selva* 草莓植株第一次施用 HP-1000™后三周内, 生长增强可目视辨别为更大的地上生物量以及更茁壮、更绿和更健康的外观。六次收获之后(即这些植株的计划寿命), 合计所有产量的数据并进行分析。对于 *Camarosa* 变种, 平均最后四次采摘量时, HP-1000™处理的植株得到可售果实的产量比 UTC 显著增加(27%)(表 35)。该变种各处理的头两次采摘量

之间并不表现显著差异。*Selva* 变种更易受到 HP-1000™处理的生长增强作用的影响；平均六次采摘量后，*Selva* 草莓变种与 UTC 相比，产生了具统计学显著性的多 64%的可售果实。

表 35 - 用 HP-1000™叶处理后得到的草莓增产

处理	比率(活性成分)	产量 ¹ (磅/重复)	高于 UTC 的%
变种: <i>Camarosa</i>			
UTC	---	1.71 a	---
HP-1000™	40µg/ml	2.17 b	27
变种: <i>Selva</i>			
UTC	---	0.88 a	---
HP-1000™	40µg/ml	1.44 b	64

¹ 根据 Duncan 氏 MRT，后面带有不同字母的平均值在 P=0.05 的水平上有显著差异。

实施例 18 - 由 HP-1000™处理得到的番茄更早成熟和增产

在一块工业化番茄生产田中，在一个随机完全区组(RCB)大田试验中将新鲜市售番茄(*Solar Set* 变种)种植在小区(2×30 英尺)中，重复 5 次。处理包括 HP-1000™ (EDEN Bioscience)(解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂制剂)、一种试验性的竞争性产品(Actigard™ (Novartis, Greensboro, N. C.))以及用于病害防治的化学标准品(Kocide® (Griffen Corp., Valdosta, GA)) + Maneb® (DuPont Agricultural Products, Wilmington, D.E.))。HP-1000™的首次施用是在移栽后立即将 50ml 浸液(drench)(30µg/ml 活性成分)直接浇在幼苗上。此后，使用一台便携式喷雾器每 11 周应用叶喷洒。移栽后约六周对所有处理进行第一次收获，并且每种处理只收获完全红的、成熟的番茄。结果表明，HP-1000™处理的植株有显著更大量的番茄可供第一次收获(表 36)。由 HP-1000™处理的植株收获到的番茄估计比其它处理的早 10-14 天。

表 36 – 用 HP-1000™叶处理后第一次收获时番茄产量的增加

处理	比率(活性成分) ¹	产量 ² (磅/重复)	高于 UTC 的%
UTC	---	0.61 a	---
HP-1000™	30µg/ml	2.87 b	375
Actigard™	14g/英亩	0.45 a	-25.1
Kocide® + Maneb®	2 磅/英亩 1 磅/英亩	0.31 a	-49.1

¹ Kocide®和 Maneb®的比率是针对制成品而言的。² 根据 Duncan 氏 MRT, 后面带有不同字母的平均值在 P=0.05 的水平上有显著差异。

实施例 19 – 用 HP-1000™处理的草莓种植在未熏蒸土壤中时早开花和生长增强

在一个随机完全区组大田试验中, 将草莓植株(“plugs”和“裸根”)栽培品种 *Commander* 移栽到小区(2×30 英尺)中, 重复 5 次。在每块重复小区中移栽约六十株植株。这次大田试验进行如下处理:

处理	应用方法
HP-1000™ (plug 植株)	将植株移栽进未烟熏蒸的土壤 ¹ 后, 立即将 40µg/ml (活性成分)的 50- ml HP-1000™ (EDEN Bioscience) (解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂制剂)浸液直接浇到各植株上, 然后每 14 天叶应用 40µg/ml 的 HP-1000™。
HP-1000™ 40 (裸根植株)	在就要将植株移栽进未熏蒸的土壤 ¹ 之前用 µg/ml 的 HP-1000™溶液浸泡根 1 小时, 然后每 14 天叶应用 40µg/ml 的 HP-1000™。
溴代甲烷/氯化苦 75/25	在移栽前通过注入法以 300 磅/英亩的比率进行土壤熏蒸, 不应用 HP-1000™处理
Telone/氯化苦 70/30	在移栽前通过注入法以 45 加仑/英亩的比率进行土壤熏蒸, 不应用 HP-1000™处理
不处理的对照(UTC)	不熏蒸, 不应用 HP-1000™处理

¹ 此前未熏蒸的土壤已经种植野豌豆两年。

在晚秋，当寒冷天气可能减缓植物生长时，进行移栽。移栽后两周，用一台背携式喷雾器以 40µg/ml(活性成分)第一次叶施用 HP-1000™。移栽后三周，计数每次重复中所有草莓“塞子”植株上花的数目，将 HP-1000™处理与溴代甲烷处理和 UTC 作比较，收集初步结果。由于“裸根”植株上还未出现开花，因此通过测量 3-叶丛中间一片叶子从叶尖到茎的距离，评价每次重复该处理中每株植株的早期叶生长。结果(表 37 和 38)表明，用 HP-1000™处理分别为“塞子”和“裸根”草莓植株提供了早期增强的花生长和叶大小。

表 37 - HP-1000™叶处理后得到的 “plug” 草莓移植体的早开花

处理	比率(活性成分)	花数/重复 ¹	高于 UTC 的%
UTC	---	2.0 a	---
HP-1000™	40µg/ml	7.5 b	275
溴代甲烷/氯化苦	300 磅/英亩	5.3 b	163

¹ 根据 Duncan 氏 MRT，后面带有不同字母的平均值在 P=0.05 的水平上有显著差异。

表 38 - HP-1000™叶处理后得到的 “裸根” 草莓移植体的叶生长增强

处理	比率(活性成分)	叶长度 ¹ (英寸)	高于 UTC 的%
UTC	---	1.26 a	---
HP-1000™	40µg/ml	1.81 b	44

¹ 根据 Duncan 氏 MRT，后面带有不同字母的平均值在 P=0.05 的水平上有显著差异。

实施例 20 - 施用 HP-1000™得到的 Jalapeno 胡椒的早期生长增强

将 Jalapeno 胡椒(栽培品种 *Mittlya*)的移植体用 HP-1000™(EDEN Bioscience)(解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂制剂)(30 µg/ml a.i.)的根浸液处理 1 小时，然后移栽进随机化的田间小区中，重复四次。试验还包括一个不处理的对照(UTC)。从移栽后 14 天开始，用一台背

携式喷雾器以 14 天的间隔对受处理的植株三次叶喷洒 HP-1000™。第三次施用 HP-1000™后一周(移栽后 54 天), 测量每个重复的四株随机选出的植株的株高。这些测量的结果表明, HP-1000™处理过的植株约比 UTC 植株高约 26%(表 39)。此外还计数了每株植株的芽数、花数或果实数。这些结果表明, HP-1000™处理过的植株比 UTC 植株多 61%以上的花、果实或芽(表 40)。

表 39 - HP-1000™处理后得到的 Jalapeno 胡椒株高的增加

处理	比率(活性成分)	株高 ¹ (英寸)	高于 UTC 的%
UTC	---	7.0 a	---
HP-1000™	30µg/ml	8.6 b	23.6

¹ 根据 Duncan 氏 MRT, 后面带有不同字母的平均值在 P=0.05 的水平上有显著差异。

表 40 - HP-1000™处理后 Jalapeno 胡椒的花数、果实数或芽数的增加

处理	比率(活性成分)	花数、果实数或芽数/株 ¹	高于 UTC 的%
UTC	---	20.6 a	---
HP-1000™	30µg/ml	12.8 b	61.3

¹ 根据 Duncan 氏 MRT, 后面带有不同字母的平均值在 P=0.05 的水平上有显著差异。

实施例 21 - 应用 HP-1000™得到的烟草生长增强

将烟草幼苗移栽进随机化的田间小区, 重复三次。移栽后, 以三个比率之一(15、30 或 60µg/ml 活性成分)叶喷洒 HP-1000™(EDEN Bioscience)(解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂制剂)。六十天之后, 第二次叶施用 HP-1000。第二次施用后两天, 对每种处理的 10 株随机选出的植株测量株高、计数单株叶数并测量叶大小(面积)。这些测量的结果表明, 用 HP-1000™进行处理显著增强了烟草植物的生长(表 41、42 和 43)。株高增加了 6-13%, 同时用 HP-1000™以 30 和 60µg/ml 处理的植株平均单株叶数比 UTC 多 1 片以上。然而, 最显著的是, 用 HP-1000™以 15、30 和 60µg/ml 处理导致叶面积的相应增加。单

株叶数多 1 片和平均叶大小(面积)增加的烟草植株表现出商业性的显著反应。

表 41 - HP-1000™处理后烟草株高的增加

处理	比率(活性成分)	株高(cm)	高于 UTC 的%
UTC	---	72.0	---
HP-1000™	15µg/ml	76.4	5.3
HP-1000™	30µg/ml	79.2	9.0
HP-1000™	60µg/ml	81.3	6.9

表 42 - HP-1000™处理后烟草单株叶数的增加

处理	比率(活性成分)	叶数/株 ¹	高于 UTC 的%
UTC	---	16.8	---
HP-1000™	15µg/ml	17.4	3.6
HP-1000™	30µg/ml	18.1	7.7
HP-1000™	60µg/ml	17.9	6.5

表 43 - HP-1000™处理后烟草叶面积的增加

处理	比率(活性成分)	叶面积(cm ²)	高于 UTC 的%
UTC	---	1,246	---
HP-1000™	15µg/ml	1,441	16
HP-1000™	30µg/ml	1,543	24
HP-1000™	60µg/ml	1,649	32

实施例 22 - 应用 HP-1000™得到的冬小麦生长增强

以每 100 磅种子 3 盎司制成品(3%活性成分)的比率,将 HP-1000™ (EDEN Bioscience)(解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂制剂)干粉“撒粉”在冬小麦种子上。然后用常规播种设备将这些种子播种进 100 英尺长、11.7 英尺宽的随机化试验小区中。其它处理包括:以每 100

磅种子 1 盎司制成品向种子“撒粉” HP-1000™干粉(3%活性成分); 用浓度为 20µg/ml 活性成分的 HP-1000™溶液浸泡种子四小时、风干并种植; 用标准化学品(Dividend®)杀真菌剂“撒粉”; 以及一个不处理的对照(UTC)。种植后 8 天, HP-1000™处理的种子开始出苗, 而 UTC 和化学标准品处理的种子直到预期的正常时间, 即种植后约 14 天才出苗。种植后 41 天, 从田中取出幼苗并进行评估。目测并判断以 3 盎司/100 磅“撒粉” HP-1000™处理的小麦的根重量是其它任何一种处理的约两倍。

大田试验之后, 设计一个温室试验对这些结果获得确证。处理包括种植前以每 100 磅种子 3 盎司的比率向小麦种子撒 HP-1000™(10%活性成分)干粉; 以溶液浓度为 20mg/ml 的 HP-1000™浸泡种子、然后种植; 以及一个不处理的对照(UTC)。将从每种处理得到的小麦种子以每盆 25 粒种子的比率种植, 每种处理用 5 盆作为重复。种植后十五天, 从每个处理盆中取出十株随机选择的幼苗, 仔细地弄干净, 并测量根长度。由于单株幼苗的地上部分并不表现任何处理效果, 因此用 HP-1000™处理导致的根生长增强并不影响样本选择。由两种 HP-1000™处理得到的根生长增强都显著强于 UTC (表 49); 然而撒粉处理的种子看起来表现出略好的结果。

表 44 - HP-1000™处理后小麦幼苗的根生长的增强

处理	比率	根长度(cm) ¹	高于 UTC 的%
UTC	---	35.6 a	---
HP-1000™ (撒粉)	3 盎司/100 磅	41.0 b	17.4
HP-1000™ (浸泡)	20µg/ml	40.8 b	14.6

¹ 根据 Duncan 氏 MRT, 后面带有不同字母的平均值在 P=0.05 的水平上有显著差异。

实施例 23 - 施用 HP-1000™得到的黄瓜生长增强

对工业化生产的黄瓜的大田试验包括四种处理: 两种比率(20 或

40 μ g/ml)的 HP-1000TM(EDEN Bioscience) (解淀粉欧文氏菌过敏反应诱发剂制剂), 一种用于病害防治的化学标准品(Bravo®(Zeneca Ag Products, Wilmington, Del.) + Maneb®)和一个不处理的对照(UTC)。每种处理在 3×75 英尺的小区中重复四次, 每种处理的植株间隔约 2 英尺。从长出第一片真叶开始叶喷洒 HP-1000TM, 并以 14 天的间隔重复直到最后收获, 总共进行六次施用。如果条件允许, 每七天或更短时间间隔施用标准杀真菌剂混合物。第一次施用 HP-1000TM约两个月后(五次喷洒 HP-1000TM之后)开始工业化收获, 第一次收获约 14 天之后进行最后的收获。

由第一次收获得到的结果表明, 用 HP-1000TM处理通过增加收获黄瓜的总数而不是单个黄瓜的平均重量而增加了黄瓜平均产量(表 45-47)。在最后一次收获中也注意到有相同的趋势(表 48-49)。在商业上很重要的是, 由 HP-1000TM处理得到的增产并非通过显著增加黄瓜的平均大小获得。

表 45 - HP-1000TM处理后第一次收获时黄瓜产量的增加

处理	比率(活性成分)	产量/trt ¹ (kg.)	高于 UTC 的%
UTC	---	10.0 a	---
Bravo+Maneb	按标签(label)	10.8 a	8.4
HP-1000 TM	20 μ g/ml	12.3 ab	22.8
HP-1000 TM	40 μ g/ml	13.8 b	38.0

¹ 根据 Duncan 氏 MRT, 后面带有不同字母的平均值在 P=0.05 的水平上有显著差异。

表 46 - HP-1000TM处理后第一次收获时黄瓜果实数目的增加

处理	比率(活性成分)	果实数/trt ¹	高于 UTC 的%
UTC	---	24.5 a	---
Bravo+Maneb	按标签	27.6 ab	12.8
HP-1000 TM	20 μ g/ml	31.2 b	27.0
HP-1000 TM	40 μ g/ml	34.3 b	39.8

¹ 根据 Duncan 氏 MRT, 后面带有不同字母的平均值在 P=0.05 的水平上有显著差异。

表 47 - HP-1000™处理后第一次收获时黄瓜的平均重量

处理	比率(活性成分)	重量/果实(g)	与 UTC 相比的 变化%
UTC	---	406	---
Bravo+Maneb	按标签	390	-4
HP-1000™	20µg/ml	395	-3
HP-1000™	40µg/ml	403	-1

表 48 - HP-1000™处理后第三次收获时黄瓜产量的增加

处理	比率(活性成分)	产量/trt ¹ (kg.)	高于 UTC 的%
UTC	---	17.5 a	---
Bravo+Maneb	按标签	14.0 b	-20.1
HP-1000™	20µg/ml	20.1 a	15.3
HP-1000™	40µg/ml	20.2 a	15.6

¹ 根据 Duncan 氏 MRT, 后面带有不同字母的平均值在 P=0.05 的水平上有显著差异。

表 49 - HP-1000™处理后第三次收获时黄瓜果实数目的增加

处理	比率(活性成分)	果实数/trt ¹	与 UTC 相比 的变化%
UTC	---	68.8 ab	---
Bravo+Maneb	按标签	60.0 a	-12.7
HP-1000™	20µg/ml	82.3 b	19.6
HP-1000™	40µg/ml	85.3 b	24.0

¹ 根据 Duncan 氏 MRT, 后面带有不同字母的平均值在 P=0.05 的水平上有显著差异。

表 50 - HP-1000™处理后第三次收获时黄瓜的平均重量

处理	比率(活性成分)	重量/果实(g)	与 UTC 相比的变化%
UTC	---	255	---
Bravo+Maneb	按标签	232	-9
HP-1000™	20µg/ml	247	-3
HP-1000™	40µg/ml	237	-7

¹ 根据 Duncan 氏 MRT, 后面带有不同字母的平均值在 P=0.05 的水平上有显著差异。

实施例 24 - 得自丁香假单胞菌丁香致病变种的 harpin_{pss} 诱导番茄的生长增强

为测试 harpin_{pss} (即得自丁香假单胞菌丁香致病变种的过敏反应诱发剂)(He, S. Y., 等人, “丁香假单胞菌丁香致病变种的 harpin_{pss} 通过 Hrp 途径分泌、并在植物中诱发过敏反应的一种蛋白,” Cell 73: 1255-66 (1993), 特此通过引用结合到本文中)是否也刺激植物生长, 将番茄种子(Marglobe 变种)播种在装有人工土壤的 8 英寸盆中。播种后 10 天, 将幼苗移栽到单独的盆中。试验的整个过程中, 植株间的肥料、水灌溉、温度和土壤湿度维持一致。移栽后 16 天, 测量起始株高并第一次施用 harpin_{pss}, 这一天被称为第 0 天。第二次施用在第 15 天进行。在第 10 天和第 30 天收集另外的生长数据。在第 30 天收集的最后一次数据包括株高和鲜重。

通过发酵包含带有编码 harpin_{pss} 的基因(即 *hrpZ*)的质粒的大肠杆菌 DH5, 产生试验中所用的 harpin_{pss}。收获细胞, 重悬浮于 5mM 磷酸钾缓冲液, 超声处理进行破碎。将超声处理的材料煮沸 5 分钟, 然后 10,000rpm 离心 10 分钟。上清液可被认为是无细胞诱发剂制备物(CFEP)。使用与用来制备细胞悬浮缓冲液的相同缓冲液制备 20 和 50µg/ml harpin_{pss} 溶液。由包含相同质粒但不包含 *hrpZ* 基因的相同菌株制备的 CFEP 用作对照处理的材料。

将润湿剂 Pinene II (Drexel Chemical Co., Memphis, Tenn.)加入

harpin_{pss} 溶液中，达到 0.1% 的浓度，然后将 harpin_{pss} 喷洒到番茄植株上直到形成溢流。

表 51 显示在 harpin_{pss} 处理组和对照组间有显著差异。harpin_{pss} 处理的番茄高度增加超过 10%。这个数据支持 harpin_{pss} 与得自解淀粉欧文氏菌的过敏反应诱发剂相似地起作用的说法，因为当其应用于番茄和许多其它植物物种时，具有生长增强的作用。除番茄高度显著增加外，harpin_{pss} 处理的番茄的生物量更多、叶子大、花成果(flower seteing)早以及总体上外观更健康。

表 51 – Harpin_{pss} 增强番茄植株的生长

处理	株高(cm ¹)		
	第 0 天	第 10 天	第 30 天
CFEP 对照	8.5 ² (0.87) a ³	23.9 (1.90) a	68.2 (8.60) a
Harpinpss 20μg/ml	8.8 (0.98) a	27.3 (1.75) b	74.2 (6.38) b
Harpinpss 50μg/ml	8.8 (1.13) a	26.8 (2.31) b	75.4 (6.30) b

¹ 株高测量精确至 0.5cm。第 0 天是指记录初始株高并进行第一次施用的那一天。

² 给出平均值的同时在圆括号中给出了 SD(所有处理组的 n=20)。

³ 不同字母(a 和 b)表明平均值间有显著差别(P=0.05)。首先用 ANOVA，然后用 Fisher LSD 评估差异。

虽然本发明已经为例证目的详细描述，但应当理解，这些细节仅仅是为此目的，在那些方面，本领域的技术人员可以做出变更，而不会偏离由下面的权利要求书所确定的本发明的精神和范围。

序列表

(1) 一般资料

- (i) 申请人: Cornell Research Foundation, Inc.
- (ii) 发明名称: 植物生长的增强
- (iii) 序列数: 10
- (iv) 通信地址:
 - (A) 收信人: Nixon, Hargrave, Devans & Doyle LLP
 - (B) 街道: Clinton Square, P. O. Box 1051
 - (C) 城市: Rochester
 - (D) 州: 纽约州
 - (E) 国家: 美国
 - (F) 邮政编码: 14603
- (v) 计算机可读形式
 - (A) 媒体类型: 软盘
 - (B) 计算机: IBM PC 兼容机
 - (C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) 软件: PatentIn Release #1.0, 版本 1.30
- (vi) 当前申请数据
 - (A) 申请号:
 - (B) 提交日期: a
 - (C) 分类:
- (vii) 在先申请数据
 - (A) 申请号: US 60/036,048
 - (B) 提交日期: 1997 年 1 月 27 日
- (viii) 代理律师/代理人资料
 - (A) 姓名: Goldman, Michael L.
 - (B) 注册号: 30,727
 - (C) 参考/档案号: 19603/1502
- (ix) 电讯资料
 - (A) 电话: (716) 263-1304
 - (B) 传真: (716) 263-1600

(2) SEQ ID NO:1 的信息:

- (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 338 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链型:
 - (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型：蛋白质

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:1:

```

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

```

Asn Leu Asn Leu Arg Gly Ala Gly Gly Ala Ser Leu Gly Ile Asp Ala
 305 310 315 320
 Ala Val Val Gly Asp Lys Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Lys Leu Ala
 325 330 335
 Asn Ala

(2) SEQ ID NO:2 的信息:

- (i) 序列特征:
- (A)长度: 2141 个碱基对
 - (B)类型: 核酸
 - (C)链型: 单链
 - (D)拓扑学: 线性

- (ii) 分子类型: DNA (基因组)

- (xi) 序列描述: SEQ ID NO:2:

CGATTTTACC	CGGGTGAACG	TGCTATGACC	GACAGCATCA	CGGTATTCTGA	CACCGTTACG	60
GCGTTTATGG	CCGCGATGAA	CCGGCATCAG	GCGGCGCGCT	GGTCGCCGCA	ATCCGGCGTC	120
GATCTGGTAT	TTCAGTTTGG	GGACACCGGG	CGTGAACCTCA	TGATGCAGAT	TCAGCCGGGG	180
CAGCAATATC	CCGGCATGTT	GCGCACGCTG	CTCGCTCGTC	GTTATCAGCA	GGCGGCAGAG	240
TGCGATGGCT	GCCATCTGTG	CCTGAACGGC	AGCGATGTAT	TGATCCTCTG	GTGGCCGCTG	300
CCGTCCGATC	CCGGCAGTTA	TCCGCAGGTG	ATCGAACGTT	TGTTTGAACT	GGCGGGAATG	360
ACGTTGCCGT	CGCTATCCAT	AGCACCGACG	GCGCGTCCGC	AGACAGGGAA	CGGACGCGCC	420
CGATCATTA	GATAAAGGCG	GCTTTTTTTA	TTGCAAAACG	GTAACGGTGA	GGAACCGTTT	480
CACCGTCGGC	GTCACTCAGT	AACAAGTATC	CATCATGATG	CCTAATATCGG	GATCGGCGTG	540
GGCATCCGTT	GCAGATACTT	TTGCGAACAC	CTGACATGAA	TGAGGAAACG	AAATTATGCA	600
AATTACGATC	AAAGCGCACA	TCGGCGGTGA	TTTGGGCGTC	TCCGGTCTGG	GGCTGGGTGC	660
TCAGGGACTG	AAAGGACTGA	ATTCCGCGGC	TTCATCGCTG	GGTTCCAGCG	TGGATAAACT	720
GAGCAGCACC	ATCGATAAGT	TGACCTCCGC	GCTGACTTCG	ATGATGTTTG	GCGGCGCGCT	780
GGCGCAGGGG	CTGGGCGCCA	GCTCGAAGGG	GCTGGGGATG	AGCAATCAAC	TGGGCCAGTC	840
TTTCGGCAAT	GGCGCGCAGG	GTGCGAGCAA	CCTGCTATCC	GTACCGAAAT	CCGGCGGCGA	900
TGCGTTGTCA	AAAATGTTTG	ATAAAGCGCT	GGACGATCTG	CTGGGTCATG	ACACCGTGAC	960
CAAGCTGACT	AACCAGAGCA	ACCAACTGGC	TAATTCAATG	CTGAACGCCA	GCCAGATGAC	1020
CCAGGGTAAT	ATGAATGCGT	TCGGCAGCGG	TGTGAACAAC	GCACTGTCGT	CCATTCTCGG	1080
CAACGGTCTC	GGCCAGTCGA	TGAGTGCGCT	CTCTCAGCCT	TCTCTGGGGG	CAGGCGGCTT	1140

```

GCAGGGCCTG AGCGGCGCGG GTGCATTCAA CCAGTTGGGT AATGCCATCG GCATGGGCGT      1200
GGGGCAGAAT GCTGCGCTGA GTGCGTTGAG TAACGTCAGC ACCCACGTAG ACGGTAACAA      1260
CCGCCACTTT GTAGATAAAG AAGATCGCGG CATGGCGAAA GAGATCGGCC AGTTTATGGA      1320
TCAGTATCCG GAAATATTCG GTAAACCGGA ATACCAGAAA GATGGCTGGA GTTCGCCGAA      1380
GACGGACGAC AAATCCTGGG CTAAAGCGCT GAGTAAACCG GATGATGACG STATGACCGG      1440
CGCCAGCATG GACAAATTCC GTCAGGCGAT GGGTATGATC AAAAGCGCGG TGGCGGGTGA      1500
TACCGGCAAT ACCAACCTGA ACCTGCGTGG CGCGGGCGGT GCATCGCTGG GTATCGATGC      1560
GGCTGTCGTC GGCATAAAAA TAGCCAACAT GTCGCTGGGT AAGCTGGCCA ACGCCTGATA      1620
ATCTGTGCTG GCCTGATAAA GCGGAAACGA AAAAAGAGAC GGGGAAGCCT GTCTCTTTTC      1680
TTATTATGCG GTTTATGCGG TTACCTGGAC CGGTTAATCA TCGTCATCGA TCTGGTACAA      1740
ACGCACATTT TCCCGTTTCAT TCGCGTCGTT ACGCGCCACA ATCGCGATGG CATCTTCCTC      1800
GTCGCTCAGA TTGCGCGGCT GATGGGGAAC GCCGGGTGGA ATATAGAGAA ACTCGCCGGC      1860
CAGATGGAGA CACGTCTGCG ATAAATCTGT GCCGTAACGT GTTTCTATCC GCCCCTTTAG      1920
CAGATAGATT GCGGTTTCGT AATCAACATG GTAATGCGGT TCCGCCTGTG CGCCGGCCGG      1980
GATCACCACA ATATTCATAG AAAGCTGTCT TGCACCTACC GTATCGCGGG AGATACCGAC      2040
AAAATAGGGC AGTTTTTGCG TGGTATCCGT GGGGTGTTCC GGCCTGACAA TCTTGAGTTG      2100
GTTCGTCATC ATCTTTCTCC ATCTGGGCGA CCTGATCGGT T      2141

```

(2) SEQ ID NO:3 的信息:

- (i) 序列特征:
 (A)长度: 403 个氨基酸
 (B)类型: 氨基酸
 (C)链型:
 (D)拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 蛋白质
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO:3:

```

Met Ser Leu Asn Thr Ser Gly Leu Gly Ala Ser Thr Met Gln Ile Ser
1           5           10           15
Ile Gly Gly Ala Gly Gly Asn Asn Gly Leu Leu Gly Thr Ser Arg Gln
20           25           30
Asn Ala Gly Leu Gly Gly Asn Ser Ala Leu Gly Leu Gly Gly Gly Asn
35           40           45
Gln Asn Asp Thr Val Asn Gln Leu Ala Gly Leu Leu Thr Gly Met Met
50           55           60

```

Met Met Met Ser Met Met Gly Gly Gly Gly Leu Met Gly Gly Gly Leu
 65 70 75 80
 Gly Gly Gly Leu Gly Asn Gly Leu Gly Gly Ser Gly Gly Leu Gly Glu
 85 90 95
 Gly Leu Ser Asn Ala Leu Asn Asp Met Leu Gly Gly Ser Leu Asn Thr
 100 105 110
 Leu Gly Ser Lys Gly Gly Asn Asn Thr Thr Ser Thr Thr Asn Ser Pro
 115 120 125
 Leu Asp Gln Ala Leu Gly Ile Asn Ser Thr Ser Gln Asn Asp Asp Ser
 130 135 140
 Thr Ser Gly Thr Asp Ser Thr Ser Asp Ser Ser Asp Pro Met Gln Gln
 145 150 155 160
 Leu Leu Lys Met Phe Ser Glu Ile Met Gln Ser Leu Phe Gly Asp Gly
 165 170 175
 Gln Asp Gly Thr Gln Gly Ser Ser Ser Gly Gly Lys Gln Pro Thr Glu
 180 185 190
 Gly Glu Gln Asn Ala Tyr Lys Lys Gly Val Thr Asp Ala Leu Ser Gly
 195 200 205
 Leu Met Gly Asn Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gly Asn Gly Gly Leu Gly
 210 215 220
 Gly Gly Gln Gly Gly Asn Ala Gly Thr Gly Leu Asp Gly Ser Ser Leu
 225 230 235 240
 Gly Gly Lys Gly Leu Gln Asn Leu Ser Gly Pro Val Asp Tyr Gln Gln
 245 250 255
 Leu Gly Asn Ala Val Gly Thr Gly Ile Gly Met Lys Ala Gly Ile Gln
 260 265 270
 Ala Leu Asn Asp Ile Gly Thr His Arg His Ser Ser Thr Arg Ser Phe
 275 280 285
 Val Asn Lys Gly Asp Arg Ala Met Ala Lys Glu Ile Gly Gln Phe Met
 290 295 300
 Asp Gln Tyr Pro Glu Val Phe Gly Lys Pro Gln Tyr Gln Lys Gly Pro
 305 310 315 320
 Gly Gln Glu Val Lys Thr Asp Asp Lys Ser Trp Ala Lys Ala Leu Ser
 325 330 335
 Lys Pro Asp Asp Asp Gly Met Thr Pro Ala Ser Met Glu Gln Phe Asn
 340 345 350
 Lys Ala Lys Gly Met Ile Lys Arg Pro Met Ala Gly Asp Thr Gly Asn
 355 360 365
 Gly Asn Leu Gln Ala Arg Gly Ala Gly Gly Ser Ser Leu Gly Ile Asp
 370 375 380
 Ala Met Met Ala Gly Asp Ala Ile Asn Asn Met Ala Leu Gly Lys Leu
 385 390 395 400
 Gly Ala Ala

(2) SEQ ID NO:4 的信息:

- (i) 序列特征:
 (A)长度: 1288 个碱基对
 (B)类型: 核酸
 (C)链型: 单链
 (D)拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: DNA(基因组)
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO:4:

```

AAGCTTCGGC ATGGCACGTT TGACCGTTGG GTCGGCAGGG TACGTTTGAA TTATTCATAA      60
GAGGAATACG TTATGAGTCT GAATACAAGT GGGCTGGGAG CGTCAACGAT GCAAATTTCT      120
ATCGGCGGTG CGGGCGGAAA TAACGGGTTG CTGGGTACCA GTCGCCAGAA TGCTGGGTTG      180
GGTGGCAATT CTGCACTGGG GCTGGGCGGC GGTAATCAAA ATGATACCGT CAATCAGCTG      240
GCTGGCTTAC TCACCGGCAT GATGATGATG ATGAGCATGA TGGGCGGTGG TGGGCTGATG      300
GGCGGTGGCT TAGGCGGTGG CTTAGGTAAT GGCTTGGGTG GCTCAGGTGG CCTGGGCGAA      360
GGACTGTCGA ACGCGCTGAA CGATATGTTA GGCGGTTCGC TGAACACGCT GGGCTCGAAA      420
GGCGGCAACA ATACCACTTC AACAAACAAT TCCCCGCTGG ACCAGGCGCT GGGTATTAAC      480
TCAACGTCCC AAAACGACGA TTCCACCTCC GGCACAGATT CCACCTCAGA CTCCAGCGAC      540
CCGATGCAGC AGCTGCTGAA GATGTTTCAGC GAGATAATGC AAAGCCTGTT TGGTGATGGG      600
CAAGATGGCA CCCAGGGCAG TTCCTCTGGG GGCAAGCAGC CGACCGAAGG CGAGCAGAAC      660
GCCTATAAAA AAGGAGTCAC TGATGCGCTG TCGGCCTGA TGGGTAATGG TCTGAGCCAG      720
CTCCTTGGCA ACGGGGGACT GGGAGGTGGT CAGGGCGGTA ATGCTGGCAC GGGTCTTGAC      780
GGTTCGTCGC TGGGCGGCAA AGGGCTGCAA AACCTGAGCG GGCCGGTGGA CTACCAGCAG      840
TTAGGTAACG CCGTGGGTAC CGGTATCGGT ATGAAAGCGG GCATTTCAGGC GCTGAATGAT      900
ATCGGTACGC ACAGGCACAG TTCAACCCGT TCTTTCGTCA ATAAAGGCGA TCGGGCGATG      960
GCGAAGGAAA TCGGTCAGTT CATGGACCAG TATCCTGAGG TGTTTGGCAA GCCGCAGTAC     1020
CAGAAAGGCC CGGGTCAGGA GGTGAAAACC GATGACAAAT CATGGGCAAA AGCACTGAGC     1080
AAGCCAGATG ACGACGGAAT GACACCAGCC AGTATGGAGC AGTTCAACAA AGCCAAGGGC     1140
ATGATCAAAA GGCCCATGGC GGGTGATACC GGCAACGGCA ACCTGCAGGC ACGCGGTGCC     1200
GGTGGTTCTT CGCTGGGTAT TGATGCCATG ATGGCCGGTG ATGCCATTAA CAATATGGCA     1260
CTTGGCAAGC TGGGCGCGGC TTAAGCTT                                     1288

```

(2) SEQ ID NO:5 的信息:

- (i) 序列特征:
 (A)长度: 341 个氨基酸
 (B)类型: 氨基酸
 (C)链型:
 (D)拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:5:

```

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

```

Arg Gly Leu Gln Ser Val Leu Ala Gly Gly Gly Leu Gly Thr Pro Val
 260 265 270
 Asn Thr Pro Gln Thr Gly Thr Ser Ala Asn Gly Gly Gln Ser Ala Gln
 275 280 285
 Asp Leu Asp Gln Leu Leu Gly Gly Leu Leu Leu Lys Gly Leu Glu Ala
 290 295 300
 Thr Leu Lys Asp Ala Gly Gln Thr Gly Thr Asp Val Gln Ser Ser Ala
 305 310 315 320
 Ala Gln Ile Ala Thr Leu Leu Val Ser Thr Leu Leu Gln Gly Thr Arg
 325 330 335
 Asn Gln Ala Ala Ala
 340

(2) SEQ ID NO:6 的信息:

- (i) 序列特征:
- (A)长度: 1026 个碱基对
 - (B)类型: 核酸
 - (C)链型: 单链
 - (D)拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: DNA (基因组)
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO:6:

ATGCAGAGTC TCAGTCTTAA CAGCAGCTCG CTGCAAACCC CGGCAATGGC CCTTGTCTCTG	60
GTACGTCCTG AAGCCGAGAC GACTGGCAGT ACGTCGAGCA AGGCGCTTCA GGAAGTTGTC	120
GTGAAGCTGG CCGAGGAACT GATGCGCAAT GGTCAACTCG ACGACAGCTC GCCATTGGGA	180
AAACTGTTGG CCAAGTCGAT GGCCGCAGAT GGCAAGGCGG GCGGCGGTAT TGAGGATGTC	240
ATCGCTGCGC TGGACAAGCT GATCCATGAA AAGCTCGGTG ACAACTTCGG CGCGTCTGCG	300
GACAGCGCCT CGGGTACCGG ACAGCAGGAC CTGATGACTC AGGTGCTCAA TGGCCTGGCC	360
AAGTCGATGC TCGATGATCT TCTGACCAAG CAGGATGGCG GGACAAGCTT CTCCGAAGAC	420
GATATGCCGA TGCTGAACAA GATCGCGCAG TTCATGGATG ACAATCCCGC ACAGTTTCCC	480
AAGCCGGACT CGGGCTCCTG GGTGAACGAA CTCAAGGAAG ACAACTTCCT TGATGGCGAC	540
GAAACGGCTG CGTTCCGTTC GGCACCTCGAC ATCATTGGCC AGCAACTGGG TAATCAGCAG	600
AGTGACGCTG GCAGTCTGGC AGGGACGGGT GGAGGTCTGG GCACTCCGAG CAGTTTTTCC	660
AACAACTCGT CCGTGATGGG TGATCCGCTG ATCGACGCCA ATACCGGTCC CGGTGACAGC	720
GGCAATACCC GTGGTGAAGC GGGGCAACTG ATCGGCGAGC TTATCGACCG TGGCCTGCAA	780
TCGGTATTGG CCGGTGGTGG ACTGGGCACA CCCGTAAACA CCGCGCAGAC CGGTACGTCG	840

```

GCGAATGGCG GACAGTCCGC TCAGGATCTT GATCAGTTGC TGGGCGGCTT GCTGCTCAAG      900
GGCCTGGAGG CAACGCTCAA GGATGCCGGG CAAACAGGCA CCGACGTGCA GTCGAGCGCT      960
GCGCAAATCG CCACCTTGCT GGTCAGTACG CTGCTGCAAG GCACCCGCAA TCAGGCTGCA      1020
GCCTGA                                           1026

```

(2) SEQ ID NO:7 的信息:

- (i) 序列特征:
 (A)长度: 344 个氨基酸
 (B)类型: 氨基酸
 (C)链型:
 (D)拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:7:

```

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

```

Ala Asp Gly Gly Ser Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Asn Gly Ala
 195 200 205

Asp Gly Gly Asn Gly Val Asn Gly Asn Gln Ala Asn Gly Pro Gln Asn
 210 215 220

Ala Gly Asp Val Asn Gly Ala Asn Gly Ala Asp Asp Gly Ser Glu Asp
 225 230 235 240

Gln Gly Gly Leu Thr Gly Val Leu Gln Lys Leu Met Lys Ile Leu Asn
 245 250 255

Ala Leu Val Gln Met Met Gln Gln Gly Gly Leu Gly Gly Gly Asn Gln
 260 265 270

Ala Gln Gly Gly Ser Lys Gly Ala Gly Asn Ala Ser Pro Ala Ser Gly
 275 280 285

Ala Asn Pro Gly Ala Asn Gln Pro Gly Ser Ala Asp Asp Gln Ser Ser
 290 295 300

Gly Gln Asn Asn Leu Gln Ser Gln Ile Met Asp Val Val Lys Glu Val
 305 310 315 320

Val Gln Ile Leu Gln Gln Met Leu Ala Ala Gln Asn Gly Gly Ser Gln
 325 330 335

Gln Ser Thr Ser Thr Gln Pro Met
 340

(2) SEQ ID NO:8 的信息:

- (i) 序列特征:
 (A)长度: 1035 个碱基对
 (B)类型: 核酸
 (C)链型: 单链
 (D)拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: DNA(基因组)
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO:8:

ATGTCAGTCG GAAACATCCA GAGCCCGTCG AACCTCCCGG GTCTGCAGAA CCTGAACCTC 60

AACACCAACA CCAACAGCCA GCAATCGGGC CAGTCCGTGC AAGACCTGAT CAAGCAGGTC 120

GAGAAGGACA TCCTCAACAT CATCGCAGCC CTCGTGCAGA AGGCCGCACA GTCGGCGGGC 180

GGCAACACCG GTAACACCGG CAACGCGCCG GCGAAGGACG GCAATGCCAA CGCGGGCGCC 240

AACGACCCGA GCAAGAACGA CCCGAGCAAG AGCCAGGCTC CGCAGTCGGC CAACAAGACC 300

GGCAACGTCG ACGACGCCAA CAACCAGGAT CCGATGCAAG CGCTGATGCA GCTGCTGGAA 360

GACCTGGTGA AGCTGCTGAA GCGGGCCCTG CACATGCAGC AGCCCGGCGG CAATGACAAG 420

GGCAACGGCG TGGGCGGTGC CAACGGCGCC AAGGGTGCCG GCGGCCAGGG CGGCCTGGCC 480

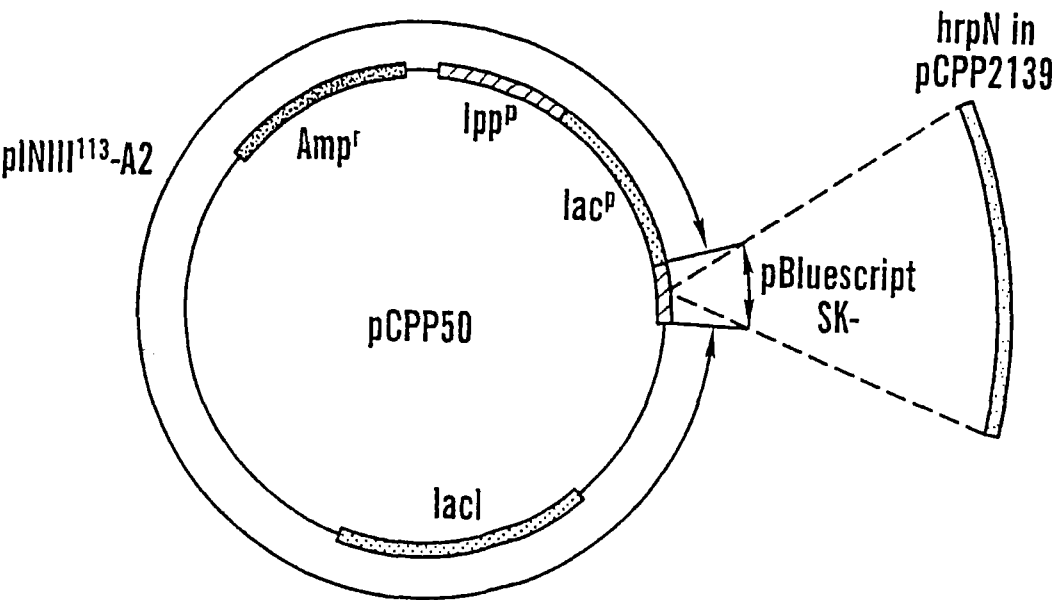


图 1

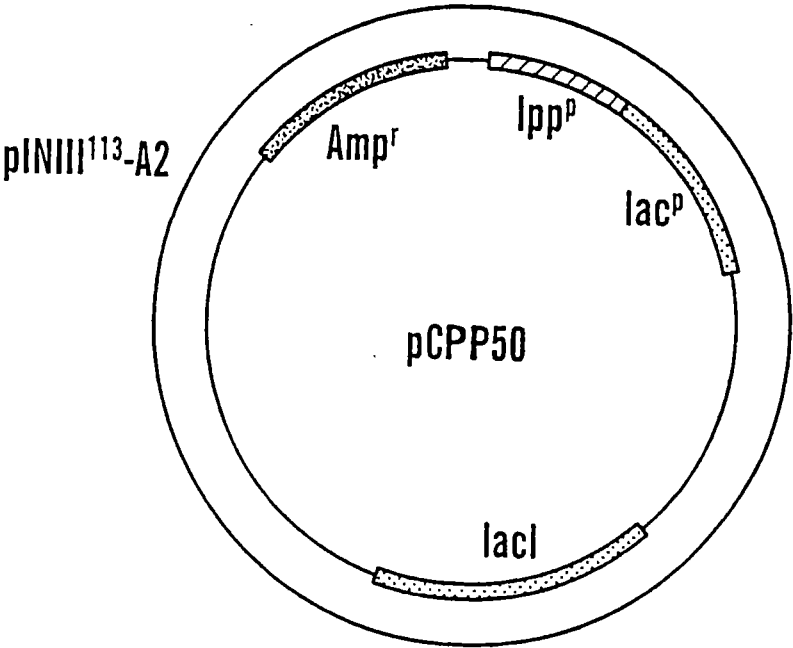


图 2