



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106386474 A

(43)申请公布日 2017.02.15

(21)申请号 201610822031.4

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2011.10.13

A01H 1/04(2006.01)

(30)优先权数据

A01H 1/06(2006.01)

10187751.2 2010.10.15 EP

A01H 5/06(2006.01)

61/394,463 2010.10.19 US

A01H 5/12(2006.01)

C12P 7/10(2006.01)

(62)分案原申请数据

C12P 19/00(2006.01)

201180049766.3 2011.10.13

C12P 5/02(2006.01)

(71)申请人 拜耳知识产权有限责任公司

C12P 19/38(2006.01)

地址 德国蒙海姆

C12N 15/82(2006.01)

申请人 KWS种子欧洲股份公司

A01H 5/00(2006.01)

(72)发明人 R·海恩 J·本特宁 G·唐

C12N 5/10(2006.01)

N·尼特尔-奥特里本

C12N 15/60(2006.01)

B·霍尔兹卓特 A·路克

C·施普林曼 R·詹森

(74)专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司

公司 11285

权利要求书3页 说明书25页

代理人 张广育 姜建成

序列表16页

(54)发明名称

可耐受ALS抑制剂除草剂的甜菜突变体

(57)摘要

本发明涉及一种可耐受ALS抑制剂除草剂的甜菜植物及其部分,其包含内源性乙酰乳酸合酶(ALS)基因的突变,其中所述ALS基因编码在其位置569处含有不同于色氨酸的氨基酸的ALS多肽。

1. 一种可耐受ALS抑制剂除草剂的甜菜植物、其部分、其可收获部分或其繁殖材料用于甜菜植物的制备/育种、糖生产、生物燃料生产、乙醇生产、甜菜碱生产或尿苷生产的用途，所述甜菜植物、其部分、其可收获部分或其繁殖材料包含内源性乙酰乳酸合酶 (ALS) 基因的突变，其中所述ALS基因编码在其位置569处含有不同于色氨酸的氨基酸的ALS多肽。

2. 根据权利要求1的用途，其中所述ALS多肽在位置569处用氨基酸丙氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸或精氨酸替代了天然编码的氨基酸色氨酸。

3. 根据权利要求1的用途，其中所述ALS基因编码ALS多肽，所述ALS多肽在如SEQ ID NO:2所示的ALS多肽序列的位置569处含有不同于色氨酸的氨基酸。

4. 根据权利要求1的用途，其中所述氨基酸为亮氨酸，并且其中所述内源ALS基因与SEQ ID NO:3所确定的核苷酸序列是相同的。

5. 根据权利要求1的用途，其可耐受一种或多种ALS抑制剂除草剂，所述ALS抑制剂除草剂选自磺酰脲除草剂、磺酰氨基羰基三唑啉酮除草剂、咪唑啉酮除草剂、三唑并嘧啶除草剂和嘧啶基(硫)苯甲酸盐(酯)除草剂。

6. 根据权利要求1的用途，其就所述内源性乙酰乳酸合酶 (ALS) 基因的突变而言是纯合的。

7. 根据权利要求1的用途，其中所述部分为植物的器官、组织和细胞，并且优选种子。

8. 制备权利要求1的甜菜植物及其部分的方法，包括如下步骤：

(a) 将来自甜菜的愈伤组织暴露于约 10^{-7} M- 10^{-9} M的ALS抑制剂除草剂，优选甲酰胺磺隆；

(b) 选择可在最高达 3×10^{-6} M的ALS抑制剂除草剂存在的情况下生长的细胞克隆，所述ALS抑制剂除草剂优选甲酰胺磺隆；

(c) 在ALS抑制剂除草剂存在的情况下再生茎尖，所述ALS抑制剂除草剂优选甲酰胺磺隆；

(d) 用ALS抑制剂除草剂选择再生的小植株，其中所述ALS抑制剂除草剂优选甲酰胺磺隆、碘甲磺隆钠盐和/或这两者的混合物，并且其中甲酰胺磺隆的剂量优选地等价于7-70g a.i./ha，并且碘甲磺隆钠盐的剂量优选地等价于1-10g a.i./ha，

其中所述小植株包含内源性乙酰乳酸合酶 (ALS) 基因的突变，其中所述ALS基因编码在其位置569处含有不同于色氨酸的氨基酸的ALS多肽。

9. 一种可耐受ALS抑制剂除草剂的甜菜植物的部分或可收获部分，其包含内源性乙酰乳酸合酶 (ALS) 基因的突变，其中所述ALS基因编码在其位置569处含有不同于色氨酸的氨基酸的ALS多肽，其中所述甜菜植物的部分或可收获部分是非繁殖性的。

10. 权利要求9的甜菜植物的部分或可收获部分，其中所述ALS多肽在位置569处用氨基酸丙氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸或精氨酸替代了天然编码的氨基酸色氨酸。

11. 权利要求9的甜菜植物的部分或可收获部分，其中所述ALS基因编码ALS多肽，所述ALS多肽在如SEQ ID NO:2所示的ALS多肽序列的位置569处含有不同于色氨酸的氨基酸。

12. 权利要求9的甜菜植物的部分或可收获部分，其中所述氨基酸为亮氨酸，并且其中所述内源ALS基因与SEQ ID NO:3所确定的核苷酸序列是相同的。

13. 权利要求9的甜菜植物的部分或可收获部分，其可耐受一种或多种ALS抑制剂除草

剂,所述ALS抑制剂除草剂选自磺酰脲除草剂、磺酰氨基羰基三唑啉酮除草剂、咪唑啉酮除草剂、三唑并嘧啶除草剂和嘧啶基(硫)苯甲酸盐(酯)除草剂。

14. 权利要求9的甜菜植物的部分或可收获部分,其就所述内源性乙酰乳酸合酶(ALS)基因的突变而言是纯合的。

15. 产生可耐受除草剂的甜菜植物和其部分的方法,所述甜菜植物和其部分包含(i)内源性乙酰乳酸合酶(ALS)基因的突变,其中所述ALS基因编码在其位置569处含有不同于色氨酸的氨基酸的ALS多肽,和(ii)所述内源性ALS基因中的额外突变,所述方法包括以下步骤:

(a) 产生包含内源性乙酰乳酸合酶(ALS)基因突变的可耐受ALS抑制剂除草剂的甜菜植物,其中所述ALS基因编码在其位置569处含有不同于色氨酸的氨基酸的ALS多肽(亲本A);

(b) 将亲本A与在内源ALS基因中不同于氨基酸位置569的位置处含有一个或多个另外突变的甜菜植物(亲本B)杂交;

(c) 获得对氨基酸位置569处的ALS基因突变以及由亲本B编码的一个或多个任何的另外ALS基因突变来说是杂合子的甜菜子代;

(d) 其中所述育种过程由以下两者控制

(i) 应用标记辅助育种和/或微序列测定技术,和/或

(ii) 应用农艺学上相关剂量的一种或多种ALS抑制剂除草剂,所述ALS抑制剂除草剂可被步骤(c)所产生的子代所耐受。

16. 一种来自可耐受ALS抑制剂除草剂的甜菜植物和其部分的细胞提取物或叶提取物,所述甜菜植物和其部分包含内源性乙酰乳酸合酶(ALS)基因的突变,其中所述ALS基因编码在其位置569处含有不同于色氨酸的氨基酸的ALS多肽。

17. 权利要求16的细胞提取物或叶提取物,其中所述ALS多肽在位置569处用氨基酸丙氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸或精氨酸替代了天然编码的氨基酸色氨酸。

18. 权利要求16的细胞提取物或叶提取物,其中所述ALS基因编码ALS多肽,所述ALS多肽在如SEQ ID NO:2所示的ALS多肽序列的位置569处含有不同于色氨酸的氨基酸。

19. 权利要求16的细胞提取物或叶提取物,其中所述氨基酸为亮氨酸,并且其中所述内源ALS基因与SEQ ID NO:3所确定的核苷酸序列是相同的。

20. 可耐受ALS抑制剂除草剂的甜菜植物或其可收获部分用在选择ALS抑制剂除草剂的筛选方法中的用途,所述甜菜植物或其可收获部分包含内源性乙酰乳酸合酶(ALS)基因的突变,其中所述ALS基因编码在其位置569处含有不同于色氨酸的氨基酸的ALS多肽。

21. 一种来自可耐受ALS抑制剂除草剂的甜菜植物和其部分的植物细胞,所述甜菜植物和其部分包含内源性乙酰乳酸合酶(ALS)基因的突变,其中所述ALS基因编码在其位置569处含有不同于色氨酸的氨基酸的ALS多肽,并且其中所述植物细胞被用作非繁殖材料。

22. 权利要求21的植物细胞,其中所述ALS多肽在位置569处用氨基酸丙氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸或精氨酸替代了天然编码的氨基酸色氨酸。

23. 权利要求21的植物细胞,其中所述ALS基因编码ALS多肽,所述ALS多肽在如SEQ ID NO:2所示的ALS多肽序列的位置569处含有不同于色氨酸的氨基酸。

24. 权利要求21的植物细胞,其中所述氨基酸为亮氨酸,并且其中所述内源ALS基因与SEQ ID NO:3所确定的核苷酸序列是相同的。

25. 一种甜菜,其包含权利要求21-24中任一项的植物细胞,其中所述甜菜被用作非繁殖材料。

可耐受ALS抑制剂除草剂的甜菜突变体

[0001] 本申请是申请日为2011年10月13日,申请号为201180049766.3,发明名称为“可耐受ALS抑制剂除草剂的甜菜突变体”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及可耐受ALS抑制剂除草剂的甜菜 (*Beta vulgaris*) 植物及其部分,以及用于它们制备的方法。

背景技术

[0003] 栽培类型的甜菜(如Ford-Lloyd(2005) Sources of genetic variation, Genus Beta. In: Biancardi E, Campbell LG, Skaracis GN, De Biaggi M (eds) Genetics and Breeding of Sugar Beet. Science Publishers, Enfield (NH), USA, pp25-33中所定义的)是温带和亚热带地区的重要农作物。例如,约20%的全世界糖类生产是基于糖甜菜(sugar beet)。因为甜菜幼苗和新生植物在其生命的最初6-8周期间易受到由快速生长的杂草导致的强力竞争,所述杂草可竞争超过幼小的作物植物,所以在这些作物区域中可靠的杂草防治措施是必要的。

[0004] 40多年以来,除草剂是用于在栽培的甜菜中防治杂草的优选工具。用于此目的的产品,例如苯敌草(phenmedipham)、异苯敌草(desmediphan)和苯嗪草酮(metamitron),可抑制甜菜田地中的杂草生长而不损害所述作物。然而在不利环境条件下,这些产品的效力还有提高的空间,尤其是当有害杂草,例如藜(*Chenopodium album*)、反枝苋(*Amaranthus retroflexus*)和/或三肋果(*Tripleurospermum inodorata*),在一段较长的时间内萌发时。

[0005] 非常需要创新的除草剂活性成分以改善甜菜中的杂草控制选择。这种化合物应该对广泛的杂草谱(优选从杂草萌发直到所述杂草植物的全面发育)起作用而不影响甜菜作物(不论其处于哪个发育阶段)。通过经典的除草剂筛选途径,在过去的几十年中没有发现可用于甜菜的可以农艺学上优先的方式满足全部这些严格性质的选择性除草剂活性成分。

[0006] 某些化学药品可抑制所述酶“乙酰羟酸合酶”(AHAS),该酶还被称为“乙酰乳酸合酶”(ALS [EC 4.1.3.18])。ALS是属于ALS抑制剂除草剂类的五种结构上不同的除草剂家族的作用位点,所述除草剂家族例如(a)磺酰脲除草剂(sulfonylurea herbicide) (Beyer E.M et al. (1988), Sulfonylureas in Herbicides: Chemistry, Degradation, and Mode of Action; Marcel Dekker, New York, 1988, 117-189), (b)磺酰氨基羰基三唑啉酮除草剂(sulfonylaminocarbonyltriazolinone herbicide) (Pontzen, R., Pflanz.-Nachrichten Bayer, 2002, 55, 37-52), (c)咪唑啉酮除草剂(Shaner, D.L., et al., Plant Physiol., 1984, 76, 545-546; Shaner, D.L., and O'Connor, S.L. (Eds.) The Imidazolinone Herbicides, CRC Press, Boca Raton, FL, 1991), (d)三唑并嘧啶除草剂(triazolopyrimidine herbicide) (Kleschick, W.A. et al., Agric. Food Chem., 1992, 40, 1083-1085), 和(e)嘧啶基(硫)苯甲酸盐(酯)除草剂(pyrimidinyl (thio) benzoate herbicide) (Shimizu, T.J., Pestic. Sci., 1997, 22, 245-256; Shimizu, T. et al.,

Acetolactate Synthase Inhibitors in Herbicide Classes in Development, Boger, P., Wakabayashi, K., Hirai, K., (Eds.), Springer Verlag, Berlin, 2002, 1-41)。

[0007] ALS参与两个丙酮酸分子到一个乙酰乳酸分子和二氧化碳的转变。所述反应使用焦磷酸硫胺素以连接所述两个丙酮酸分子。该反应产生的产物乙酰乳酸最终转变为缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸(Singh(1999) "Biosynthesis of valine, leucine and isoleucine", in Plant Amino Acids, Singh, B.K., ed., Marcel Dekker Inc. New York, New York, pp. 227-247)。

[0008] ALS的抑制剂可阻断植物中缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成。结果是所述各个氨基酸库被迅速耗尽,引起蛋白生物合成的停止,这导致植物生长停止并最终导致所述植物死亡或至少被损害。

[0009] ALS抑制剂除草剂由于其在适度施用率下的有效性及在动物中的相对无毒性而广泛地用于现代农业。通过抑制ALS活性,这些除草剂家族可防止包括很多杂草种类在内的易感植物的进一步生长和发育。为了提供具有对实现充分杂草防治所需要的甚至高浓度的ALS抑制剂除草剂的高耐受度的植物,需要额外的可抗ALS抑制型除草剂的作物植物的育种品系和品种,以及用于产生和使用可抗ALS抑制型除草剂的育种品系和品种的方法和组合物。

[0010] 多种多样的ALS抑制剂除草剂使得农民可控制许多杂草种类(无论其处于何种生长阶段),但这些高度有效的除草剂不能用于甜菜,因为常规的甜菜植物/商业化甜菜品种对这些ALS抑制剂除草剂是高度敏感的。

[0011] 然而,这些ALS抑制剂除草剂对阔叶和禾本科杂草种类显示出优秀的除草剂活性。早在30年以前,具有抑制ALS的作用方式的第一批除草剂已被开发用于农业。现在,这类除草剂的活性成分展示出强力的杂草控制,并被广泛用于玉米和谷类以及双子叶作物,甜菜除外。

[0012] 当今已知的用于甜菜出苗后施用方案的唯一ALS抑制剂除草剂是**Debut®**。这种除草剂(含有氟胺磺隆(triflurosulfuron-methyl)作为活性成分加上特定的制剂化合物)可在其抑制甜菜内源性ALS酶之前被甜菜分解,但是其在甜菜生长区域的杂草控制中有严重的不足(gap)。

[0013] 自从ALS抑制剂除草剂被引进到农业中以来,观察到敏感的植物种类(包括天然存在的杂草)偶尔显现出对这类除草剂的自发耐受性。在ALS基因的特定位置点处的单碱基对取代通常导致或多或少的抗性ALS酶变体,所述变体显示出不同水平地被ALS抑制剂除草剂的抑制。

[0014] 因此,具有突变的ALS等位基因的植物显示出对ALS抑制剂除草剂的不同水平的耐受性,这依赖于所述ALS抑制剂除草剂的化学结构和ALS基因的点突变位点。

[0015] 例如,Hattori et al. (1995), Mol. Gen. Genet. 246:419-425记载了甘蓝型油菜(*Brassica napus*)细胞系中Trp 557密码子中的单突变(根据用于文献中以比较全部ALS/AHAS突变体的拟南芥序列的编号,所述位置是指位置"574"),所述位置等同于甜菜ALS序列的位置569。这些作者观察到了对ALS抑制剂除草剂亚类的几个成员(例如磺酰脲、咪唑啉酮和三唑并嘧啶)的抗性。

[0016] 描述了在Ala 122密码子中具有点突变的甜菜突变体,所述点突变导致对ALS抑制

剂除草剂咪唑啉酮亚类的某种耐受性(WO 98/02526),但这对于农业施用方案中的杂草控制来说是不足够的。使用这种突变体时,没有记载对其他ALS抑制剂除草剂类别的交叉耐受性。此外,在Pro 197密码子中具有第二点突变的甜菜植物显示出对属于磺酰脲除草剂亚类成员的ALS抑制剂除草剂的中度耐受性。还描述了具有这两种突变的双重突变体(WO 98/02527)。但是,这些突变体都没有被用于甜菜品种的市场引入,因为在这些突变体中对ALS抑制剂除草剂的除草剂耐受性水平未高至足以被开发用在农艺学上。

[0017] Stougaard et al. (1990), J. Cell Biochem., Suppl. 14E, 310描述了在四倍体糖甜菜细胞培养物中ALS突变体的分离。两种不同的ALS基因(ALS I和ALS II)被分离,其仅在氨基酸位置37处不同。突变体1在其ALS I基因中含有2处突变,突变体2在其ALS II基因中含有3处突变。在所述突变被分离以分辨哪个突变会赋予对ALS抑制剂的抗性后,发现如果在重组大肠杆菌中合成的ALS的Trp 574密码子处(根据用于文献中以比较全部ALS/AHAS突变体的拟南芥序列的编号,其等同于甜菜ALS序列的位置569)含有点突变(其导致氨基酸“Trp”被氨基酸“Leu”替换),则所述ALS具有除草剂抗性。Stougaard等人没有证明在糖甜菜中任何糖甜菜ALS基因在位置569的突变均可足以获得对ALS抑制剂除草剂的可接受水平的耐受性。此外,Stougaard等人没有再生或处理包含突变(包括糖甜菜ALS位置569处的Trp→Leu突变)的糖甜菜植物。

[0018] 知晓这点后,Stougaard等人构建了用于植物转化的含有不同ALS基因的植物转化载体。但是,从那以后20多年以来,到目前为止,这些或其他作者没有公开在基因工程或突变体植株中的进一步的数据——尤其没有涉及将ALS抑制剂除草剂施用到在甜菜植物包括该突变的植物和/或农业区域的效果的数据。

[0019] WO 99/57965广义上描述了磺酰脲抗性的糖甜菜植物和通过EMS(甲基磺酸乙酯)诱变来获得它们的方法。但是,除了获得这种突变体所需的研究之外,该出版物既没有提供这种植物,也没有描述在ALS基因中可能与获得ALS抑制剂除草剂耐受性突变体相关的任何具体位置,也没有公开其任何相关的农艺学用途。此外,有很大可能性是,通过使用这类强的诱变化合物(例如EMS)可在基因组中别处产生多种另外的突变,这可能导致这样获得的植物有缺陷以致无生育力和/或生长迟缓。另外,由于其与DNA的化学相互作用,EMS的施用可能具有诱导特定突变(例如将三联体TGG转变为TTG)的不足,因为EMS总是将鸟苷转变为腺苷。

[0020] 在某些杂草种类例如苋属(Amaranthus)中,可在重复暴露于ALS抑制剂除草剂的植物种群中检测到Trp 574 Leu突变。这些Trp 574 Leu突变体显示出对几种化学类别的ALS抑制剂除草剂(例如选自磺酰脲和磺酰氨基羰基三唑啉酮的那些)的高水平耐受性。

[0021] WO 2008/124495公开了ALS的双重和三重突变体。根据WO 2009/046334,提供了ALS基因中的具体突变。但是,到目前为止还没有获得含有WO 2009/046334的这类突变的农艺学上可用的可耐受除草剂的甜菜突变体。

[0022] 另外,考虑到例如糖甜菜占世界糖生产的约20%的事实,还非常需要获得相对于强生命力的杂草具有生长优势的糖甜菜植物。因此,相对于ALS基因,非常需要获得可耐受ALS抑制剂除草剂的非转基因甜菜植物(包括糖甜菜植物)。因此,需要这种非转基因的甜菜植物,尤其是可耐受在农艺学上开用的ALS抑制剂除草剂水平的ALS抑制剂除草剂的糖甜菜植物。

[0023] 因此,所述技术问题是为了满足这种需要。

发明内容

[0024] 本发明解决了这种需要,并因此作为所述技术问题的一个解决方案,提供了包含内源性乙酰乳酸合酶(ALS)基因的突变的可耐受ALS抑制剂除草剂的甜菜植物及其部分,其中所述ALS基因编码的ALS多肽在其位置569处含有不同于色氨酸的氨基酸。

[0025] 本发明的种子已经在2010年3月12日以保藏号NCIMB 41705保藏在英国阿伯丁的食品工业与海洋细菌菌种保藏中心(NCIMB,Aberdeen,UK)。

具体实施方式

[0026] 通过应用多种育种方法,随后可利用最初获得的突变体植物开发在所有特定市场具有高度竞争力的附带有强ALS抑制剂除草剂耐受性的高产商业品种。

[0027] 必须要注意,除非上下文另有明确指示,否则本文所用的单数形式“一”、“一个”和“所述”包括复数的指代对象。因此,例如,提及“试剂”时包括一种或多种这样的不同试剂,提及“所述方法”时包括提及本领域普通技术人员已知的可被修改或取代以用于本文所述方法的等价的步骤和方法。

[0028] 本公开内容中引用的所有出版物和专利以引用的方式全文纳入本文。如果以引用方式纳入本文的内容与本说明书矛盾或不一致,则本说明书将代替任何这样的内容。

[0029] 除非另有说明,用在一系列要素之前的术语“至少”应理解为是指该系列中每个要素。仅仅使用常规的实验,本领域技术人员就会认识到或能够确定本文所述的本发明具体实施方案的许多等价方案。本发明意欲包括这样的等价方案。

[0030] 除非上下文另有需要,否则在本说明书和其后的权利要求中,术语“包括(comprise)”和变化形式例如“包含(comprises)”和“含有(comprising)”应被理解为是指包含所陈述的整体或步骤或者整体组或步骤组,而不排除任何其他整体或步骤或者整体组或步骤组。一方面,术语“包括(comprise)”及其变化形式以及另一方面“含有(contain)”及其类似变化形式可被互换使用,而不优先选择其中任何一个。

[0031] 本发明中,获得了甜菜植物,其包括改变的内源ALS基因(也称为“AHAS”基因),在Trp 569密码子处(相对于SEQ ID NO:2中示出的甜菜ALS氨基酸参照序列;这等同于SEQ ID NO:6中示出的参照拟南芥序列的位置574)带有点突变,所述点突变是通过对于特异性选择的ALS抑制剂除草剂的几轮选择而获得的。

[0032] 由于本发明的甜菜植物是通过分离自发的突变体植物细胞而获得的,所述自发的突变体植物细胞可直接再生为完全能育的具有本文中详细描述的点突变的甜菜植物。就所涉及的ALS基因而言,这些植株是非转基因的。

[0033] 另外,本发明的植物本身及其子代是能育的,因此可用于育种目的,而无需可能导致胁迫诱导的对遗传背景的其他改变的任何其他操作。根据本文应用的所述选择步骤而获得的植物可被直接使用,以产生具有农艺学上可用水平的ALS抑制剂除草剂耐受性的甜菜品种和/或杂种,因此允许在甜菜生长区域中新的杂草防治措施。

[0034] 当用于本文时,术语“转基因”意指通过适当的生物载体(例如根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*))或通过任何其他的物理方式(例如原生质体转化或离子轰

击)将基因(可以是相同或不同的种类)引入到植物中,并且所述基因能够在新的宿主环境(即遗传修饰的生物(GMO))中表达。

[0035] 根据前述定义,术语“非转基因”的意义正好相反,即没有通过适当的生物载体或通过任何其他物理方式引入各个基因。但是,突变的基因可通过授粉(自然地或通过育种方法)被传递,以产生另一种含有该特定基因的非转基因植物。

[0036] “内源”基因意指植物中不是通过基因工程技术引入到所述植物中的基因。

[0037] 当用于本文时,根据使用术语“序列”的上下文,术语“序列”涉及核苷酸序列、多核苷酸、核酸序列、核酸、核酸分子、肽、多肽和蛋白质。

[0038] 术语“核苷酸序列”、“多核苷酸”、“核酸序列”、“核酸”、“核酸分子”在本文中可互换使用,其是指任意长度的聚合无支链形式的核苷酸,核糖核苷酸或者脱氧核糖核苷酸或其二者组合。核酸序列包括DNA、cDNA、基因组DNA、RNA,包括合成形式以及混合的聚合物,包括正义链和反义链,或可以含有非天然的或衍生的核苷酸碱基,本领域技术人员可容易地理解这点。

[0039] 当用于本文时,术语“多肽”或“蛋白质”(本文中这两个术语可互换地使用)意指包含给定长度的氨基酸链的肽、蛋白质或多肽,其中所述氨基酸残基通过共价的肽键连接。但是,本发明也包括所述蛋白质/多肽的肽模拟物(其中氨基酸和/或肽键已经被功能性类似物替换),以及除了所述20种基因编码的氨基酸之外的氨基酸例如硒代半胱氨酸。肽、寡肽和蛋白质可被称为多肽。所述术语多肽还指(不排除)多肽的修饰,例如糖基化、乙酰化、磷酸化等。这种修饰很好地记载于基础文献中,并更详细地记载于专著以及研究文献中。在本文中优选的多肽(或蛋白质)是指甜菜ALS多肽(或ALS蛋白质)[SEQ ID NO:2]。

[0040] 氨基酸取代包括氨基酸改变,其中氨基酸被不同的天然存在的氨基酸残基代替。这种取代可被分类为“保守的”,其中野生型ALS蛋白质中含有的氨基酸残基被另外的天然存在且特性相似的氨基酸替换,例如Gly↔Ala、Val↔Ile↔Leu、Asp↔Glu、Lys↔Arg、Asn↔Gln或Phe↔Trp↔Tyr。本发明中包括的取代还可能是“非保守的”,其中存在于野生型ALS蛋白质中的氨基酸残基被具有不同性质的氨基酸取代,例如来自于不同组的天然存在的氨基酸(例如用丙氨酸取代带电荷的或疏水的氨基酸)。本文使用的“相似的氨基酸”是指具有相似的氨基酸侧链的氨基酸,即具有极性、非极性或接近中性的侧链的氨基酸。本文使用的“不相似氨基酸”是指具有不同氨基酸侧链的氨基酸,例如具有极性侧链的氨基酸与具有非极性侧链的氨基酸是不相似的。极性侧链通常趋向存在于蛋白质的表面,在此它们可以与细胞中存在的水环境相互作用(“亲水性”氨基酸)。另一方面,“非极性”氨基酸趋向于位于蛋白质内的中心,在此它们可以与相似的非极性相邻分子相互作用(“疏水性”氨基酸)。具有极性侧链的氨基酸的实例为精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、组氨酸、赖氨酸、丝氨酸和苏氨酸(全部为亲水性氨基酸,除了半胱氨酸为疏水性的)。具有非极性侧链的氨基酸的实例为丙氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸和色氨酸(全部为疏水性的,除了甘氨酸为中性的)。

[0041] 通常,本领域技术人员根据其通常的常识和使用术语ALS、ALSL、AHAS或AHASL的上下文即可知晓分别是指所述核苷酸序列或核酸,或者是指所述氨基酸序列或多肽。

[0042] 当用于本文时,术语“基因”是指任何长度的核苷酸(核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸)的聚合形式。该术语包括双链和单链的DNA和RNA。其还包括已知类型的修饰,例如甲基

化、“加帽”、用类似物取代一个或多个天然存在的核苷酸。优选地，基因包括编码本文所定义的多肽的编码序列。“编码序列”是当被置于或在适当调节序列的控制下可被转录为mRNA和/或被翻译为多肽的核苷酸序列。所述编码序列的界限是由5'末端的翻译起始密码子和3'末端的翻译终止密码子确定的。编码序列可以包括但不限于mRNA、cDNA、重组核酸序列或基因组DNA，但是某些情况下也可能存在内含子。

[0043] 当用于本文时，术语“甜菜 (*Beta vulgaris*)”可缩写为“甜菜 (*B.vulgaris*)”。此外，本文中使用了术语“甜菜 (beet)”。所述三个术语可互换使用并且应被理解为完全包括栽培形式的甜菜，所述栽培形式的甜菜如Ford-Lloyd (2005) *Sources of genetic variation, Genus Beta*. In: Biancardi E, Campbell LG, Skaracis GN, De Biaggi M (eds) *Genetics and Breeding of Sugar Beet*. Science Publishers, Enfield (NH), USA, pp 25-33中所定义的。相似地，例如术语“拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)”可缩写为“拟南芥 (*A.thaliana*)”。在本文中这两个术语可互换地使用。

[0044] 当用于本发明时，术语“位置”意指氨基酸在本文描述的氨基酸序列中的位置或核苷酸在本文描述的核苷酸序列中的位置。本文使用的术语“对应的”还包括不仅由前述核苷酸/氨基酸的编号所确定的位置。

[0045] 由于在ALS 5'非翻译区 (UTR) (包括启动子和/或任何其他调节序列) 或基因 (包括外显子和内含子) 中其他位置处核苷酸的缺失或插入，本发明中可被取代的给定核苷酸的位置可以不同。相似地，由于在ALS多肽中其他位置氨基酸的缺失或插入，本发明中可被替换的给定氨基酸的位置可以不同。

[0046] 因此，本发明中“对应位置”应被理解为在所指示编号处的核苷酸/氨基酸可以不同，但仍然可具有相似的相邻核苷酸/氨基酸。所述可被交换、缺失或插入的核苷酸/氨基酸也被术语“对应位置”所包括。

[0047] 为了确定在给定的ALS核苷酸/氨基酸序列中核苷酸残基或氨基酸残基是否对应于核苷酸序列SEQ ID NO:1或氨基酸序列SEQ ID NO:2中的某些位置，本领域技术人员可使用本领域中公知的工具和方法，例如人工地或通过使用计算机程序的比对，例如BLAST (Altschul et al. (1990), *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410) (其代表基本局部比对搜索工具) 或ClustalW (Thompson et al. (1994), *Nucleic Acid Res.*, 22, 4673-4680) 或任何其他适合于产生序列比对的适合程序。

[0048] SEQ ID NO:1为编码甜菜野生型ALS的核苷酸序列。SEQ ID NO:2为源于SEQ ID NO:1的甜菜氨基酸序列。因此，核苷酸序列SEQ ID NO:1的位置1705-1707处的密码子编码SEQ ID NO:2的位置569处的氨基酸，即，三字母编码中的氨基酸“Trp”或单字母编码中的“W”。

[0049] 在确定给定的ALS核苷酸/氨基酸序列中核苷酸残基或氨基酸残基是否对应于核苷酸序列SEQ ID NO:1中某些位置的备选方案中，可以使用编码SEQ ID NO:5示出的拟南芥野生型ALS的核苷酸序列。SEQ ID NO:6是源于SEQ ID NO:5的拟南芥氨基酸序列。

[0050] 因此，核苷酸序列SEQ ID NO:5的位置1720-1722处的密码子编码SEQ ID NO:6的位置574处的氨基酸 (即，三字母编码中的氨基酸“Trp”或单字母编码中的“W”)。

[0051] 如果SEQ ID NO:5示出的拟南芥野生型ALS核苷酸序列被用作参照序列 (因为大多数相关文献是这么做的，所以使用该序列以使得与这类已知序列的比较更容易)，那么编码

不同于色氨酸的氨基酸的密码子是在对应于SEQ ID NO:5示出的拟南芥ALS基因核苷酸序列的位置1720-1722的位置。

[0052] 但是,在所有随后的公开内容中SEQ ID NO:1优选作为参照核苷酸序列,SEQ ID NO:2优选作为参照氨基酸序列。

[0053] 下表提供了对本文使用的参照序列的概述,这时核苷酸序列中点突变的位置或氨基酸序列中取代的位置已被确定:

[0054]

SEQ ID NO:	序列类型	物种
1	核苷酸序列	甜菜
2	氨基酸序列	甜菜
3	核苷酸序列 (突变的)	甜菜
4	氨基酸序列 (突变的)	甜菜
5	核苷酸序列	拟南芥
6	氨基酸序列	拟南芥

[0055] 因此,无论如何,通过与参照序列例如SEQ ID NO:1或5 (核苷酸序列) 或者SEQ ID NO:2或6 (氨基酸序列) 的比对仍然能够确定等价的位置。

[0056] 考虑到甜菜野生型ALS基因和本发明的甜菜植物所包含的ALS基因之间的差异,本发明的甜菜植物所包含的ALS基因 (或多核苷酸或核苷酸序列) 还可被称为是“突变的ALS基因”、“突变的ALS等位基因”、“突变的ALS多核苷酸”等。因此,在整个本说明书中,术语“突变的等位基因”、“突变的ALS等位基因”、“突变的ALS基因”或“突变的ALS多核苷酸”可被互换使用。

[0057] 除非本文另有说明,这些术语是指在对应于SEQ ID NO:1中示出的甜菜ALS基因核苷酸序列的位置1705-1707的位置处包含编码不同于色氨酸的氨基酸的密码子的核苷酸序列。当依据SEQ ID NO:5示出的拟南芥参照序列设定时,所述密码子的位置为1720-1722。

[0058] 同样地,这些术语是指编码在对应于SEQ ID NO:2示出的甜菜ALS蛋白氨基酸序列的位置569的位置处具有不同于色氨酸的氨基酸的ALS蛋白的核苷酸序列。当依据SEQ ID NO:6示出的拟南芥参照序列设定时,所述位置为574。

[0059] “不同于色氨酸的氨基酸” (三字母编码中表示为“Trp”或者等价使用单字母编码“W”表示) 包括不同于色氨酸的任何天然存在的氨基酸。这些天然存在的氨基酸包括丙氨酸 (A)、精氨酸 (R)、天冬酰胺 (N)、天冬氨酸 (D)、半胱氨酸 (C)、谷氨酰胺 (Q)、谷氨酸 (E)、甘氨酸 (G)、组氨酸 (H)、异亮氨酸 (I)、亮氨酸 (L)、赖氨酸 (K)、甲硫氨酸 (M)、苯丙氨酸 (F)、脯氨酸 (P)、丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T)、酪氨酸 (Y) 或缬氨酸 (V)。

[0060] 但是,优选地,不同于色氨酸 (属于中性-极性氨基酸组) 的氨基酸是具有不同于色氨酸的物理化学性质的氨基酸,即属于任何的显示中性-非极性、酸性或碱性性质的氨基酸。更优选地,所述不同于色氨酸的氨基酸选自丙氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸和精氨酸。甚至更优选地,所述氨基酸为中性-非极性氨基酸,例如丙氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸或缬氨酸。尤其优选地,所述氨基酸为丙氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸。甚至更优选地为甘氨酸和亮氨酸。更优选地,其为亮氨酸。

[0061] 相比之下,除非另有说明,术语“野生型等位基因”、“野生型ALS等位基因”、“野生型ALS基因”或“野生型ALS多核苷酸”是指编码没有SEQ ID NO:2的W569替换(或SEQ ID NO:6的W574替换)的ALS蛋白的核苷酸序列。这些术语还是指在对应于SEQ ID NO:1中示出的甜菜ALS基因核苷酸序列的位置1705-1707的位置包含编码不同于色氨酸的氨基酸的密码子的核苷酸序列。

[0062] 这样的“野生型等位基因”、“野生型ALS等位基因”、“野生型ALS基因”或“野生型ALS多核苷酸”可包含或不包含除可导致所述W569取代的突变之外的突变。

[0063] 实质上,关于所述ALS基因,野生型甜菜植物和本发明的甜菜植物之间的唯一差异优选地(并且明确地)为在本文具体说明的位置处(具体地在对应于SEQ ID NO:1中示出的甜菜ALS基因核苷酸序列的位置1705-1707的位置处),本发明的甜菜植物包含编码不同于色氨酸的氨基酸的密码子,优选地所述密码子编码本文别处所列出的氨基酸。但是,如上所述,在本文所列出的突变的ALS等位基因和野生型ALS等位基因之间可存在另外的差异,例如额外的突变。然而,只要存在此前所解释的差异,这些另外的差异是无关紧要的。

[0064] 因此,所述W569替换(或者,当使用SEQ ID NO:6的拟南芥ALS氨基酸序列作为参照时的W574替换)是由于在对应于SEQ ID NO:1中示出的核苷酸序列位置1705-1707的位置处(或在对应于SEQ ID NO:5中示出的核苷酸序列位置1720-1722的位置处)的密码子改变。

[0065] 优选地,在位置569处的取代为W→L取代,其中“L”由密码子“CTT”、“CTC”、“CTA”、“CTG”、“TTA”或“TTG”中的任一个编码。

[0066] 更优选地,在位置569处的取代为W→L取代,这是由于在对应于SEQ ID NO:1中示出的核苷酸序列位置1706的位置处(或在对应于SEQ ID NO:5中示出的核苷酸序列位置1721的位置处)“G”核苷酸颠换为“T”核苷酸。因此,在对应于SEQ ID NO:1中示出的核苷酸序列位置1705-1707的位置处(或在对应于SEQ ID NO:5中示出的核苷酸序列位置1720-1722的位置处)的密码子由“TGG”改变为“TTG”。然而密码子“TGG”编码色氨酸,密码子“TTG”编码亮氨酸。

[0067] 因此,在最优选的实施方案中,本发明提供了一种甜菜植物,在所述甜菜植物的内源ALS基因的核苷酸序列中,在对应于SEQ ID NO:1中示出的甜菜ALS突变体基因核苷酸序列位置1705-1707的位置处包含密码子TTG(编码亮氨酸),所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:3(或次优地由其组成)。

[0068] 所述编码ALS多肽(在对应于SEQ ID NO:2中示出的甜菜ALS蛋白氨基酸序列的位置569的位置处具有不同于色氨酸的氨基酸)的甜菜植物,优选地在其内源ALS基因的核苷酸序列中,在对应于SEQ ID NO:1中示出的甜菜ALS基因核苷酸序列位置1705-1707的位置处包含编码不同于色氨酸的氨基酸的密码子。

[0069] 术语甜菜“ALS”或“AHAS”基因还包括与SEQ ID NO:1或3的甜菜ALS核苷酸序列具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的甜菜核苷酸序列,其中这些具有60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%或99%同一性的核苷酸序列在对应于SEQ ID NO:1的核苷酸序列位置1705-1707的位置处包含编码不同于色氨酸的氨基酸的密码子。

[0070] 同样地,这些具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的核苷酸序列编码ALS多肽,所述ALS多肽在对应于SEQ ID NO:2的位置569的位置处包含不同于色氨酸的氨基酸。所述具有同一性的核苷酸序列编码可保持本文所述活性的ALS蛋白质,更优选地其所编码

的ALS多肽可耐受一种或多种本文所述的ALS抑制剂除草剂。该术语还包括编码ALS多肽的等位基因变体和同系物,所述ALS多肽优选地可耐受一种或多种本文所述的ALS抑制剂除草剂。

[0071] 为了确定某个核酸序列是否与本发明的核苷酸序列具有某种程度的同一性,本领域技术人员可使用本领域中公知的工具和方法例如比对(人工地或者通过使用计算机程序),例如如下提到的与术语“杂交”的定义和同源性程度有关的那些。

[0072] 例如,BLAST,其代表基本局部比对搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool,Altschul,Nucl.Acids Res.25(1997),3389-3402;Altschul,J.Mol.Evol.36(1993),290-300;Altschul,J.Mol.Biol.215(1990),403-410),可被用于搜索进行局部序列比对。BLAST产生核苷酸和氨基酸序列的比对以确定序列相似性。由于所述比对的局部特性,BLAST在确定精确匹配或鉴定相似序列时尤其有用。BLAST算法输出的基本单元为高分值片段对(High-scoring Segment Pair,HSP)。HSP由两条任意但长度相等的序列片段组成,其比对是局部最大的,并且其比对分值达到或超过由用户设定的阈值或临界分值。BLAST方法是寻找查询序列和数据库序列之间HSP,来评估所找到的任何匹配的统计学显著性,并且仅报告满足用户选择的显著性阈值的那些匹配。参数E确立了用于报告数据库序列匹配的统计学显著性的阈值。E被诠释为在整个数据库搜索范围内HSP(或HSP组)出现几率的期望频率的上限。其匹配满足E的任何数据库序列被报告在程序输出中。

[0073] 使用BLAST的类似计算机技术(Altschul(1997),loc.cit.;Altschul(1993),loc.cit.;Altschul(1990),loc.cit.)被用于在核苷酸数据库(例如GenBank或EMBL)中搜索相同或相关的分子。这种分析比多重基于膜的杂交要快得多。另外,所述计算机搜索的灵敏度可被修改以确定任何具体匹配被归类为精确还是相似。所述搜索的基础是乘积分值,其被定义为:

$$\text{[0074] } \frac{\% \text{序列同一性} \times \% \text{最大 BLAST 分值}}{100}$$

[0075] 其考虑了两条序列之间的相似性程度和序列匹配的长度。例如,乘积分值为40时,则所述匹配在1-2%误差内是精确的;乘积分值为70时,所述匹配为精确的。通常通过选择那些显示出15-40的乘积分值的分子来鉴定相似分子,但是更低的分值可能会鉴定相关分子。

[0076] 术语甜菜“ALS”或“AHAS”多肽还包括与SEQ ID NO:2或4的ALS氨基酸序列具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,其中这些具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列在对应于SEQ ID NO:2的位置569的位置处包含不同于色氨酸的氨基酸。所述具有同一性的氨基酸序列可保持本文所述ALS的活性,更优选地所述ALS多肽可耐受本文所述的ALS抑制剂除草剂。

[0077] 如果需要,可根据Singh(1991),Proc.Natl.Acad.Sci.88:4572-4576中描述的测定法来测量ALS活性。

[0078] 但是,本文提到的编码ALS多肽的ALS核苷酸序列优选地可赋予对本文所述的一种或多种ALS抑制剂除草剂的耐受性(或者,反之亦然,对ALS抑制剂除草剂更低的敏感度)。这是由于本文所述的导致氨基酸取代的点突变。

[0079] 因此,对ALS抑制剂除草剂的耐受性(或者,反之亦然,对ALS抑制剂除草剂更低的

敏感度)可通过在存在ALS抑制剂除草剂的情况下,从来自含有突变ALS序列的植物和没有突变ALS序列的植物的细胞提取物中获得ALS并比较其活性来测量,例如Singh et al (1988) [J.Chromatogr., 444, 251-261]中描述的方法。

[0080] 但是,用于由在对应于SEQ ID NO:1中示出的甜菜ALS基因核苷酸序列位置1705-1707的位置处包含编码不同于色氨酸的氨基酸的密码子的核苷酸序列所编码的ALS多肽的较优选活性测定法可按如下所示进行:

[0081] 根据制造商的说明书,将甜菜野生型和突变体甜菜植物的编码序列克隆进例如Novagen pET-32a(+)载体,用所述载体转化例如大肠杆菌AD494。优选地将细菌培养在37℃下,在处于选择压力下的培养基(例如含有100mg/l羧苄西林和25mg/l卡那霉素的LB培养基)中,在OD₆₀₀优选地为约0.6时用例如1mM异丙基-β-D-硫代半乳糖吡喃糖苷诱导,优选地在18℃下培养约16小时,然后通过离心收获。将细菌沉淀以1克湿重/25ml缓冲液的浓度重悬在100mM pH7.0的磷酸钠缓冲液(含有0.1mM焦磷酸硫胺素、1mM MgCl₂和1μM FAD)中并通过超声使细菌破裂。离心后获得的粗品蛋白质提取物被用于ALS活性测量。

[0082] 然后在例如96孔微量滴定板中使用Ray (1984), Plant Physiol., 75, 827-831描述的步骤的修改方案进行ALS测定。反应混合物优选地含有20mM pH7.0的磷酸钾缓冲液、20mM 丙酮酸钠、0.45mM焦磷酸硫胺素、0.45mM MgCl₂、9μM FAD、ALS酶和多种浓度的ALS抑制剂,最终体积为约90μl。

[0083] 通过加入酶开始测定,优选地在30℃下孵育75min后,通过加入40μl 0.5M的H₂SO₄来终止测定。在室温下约60min后,加入1.4%α-萘酚和0.14%肌酸在0.7M NaOH中的溶液约80μl,室温下再孵育约45min后,在540nm处测定吸光度。按照Ray (1984), Plant Physiol., 75, 827-831所述,使用英国吉尔福德(Guildford) ID Business Solutions Limited公司的XLFit Excel插件版本4.3.1曲线拟合程序测定了ALS抑制的pI50值。

[0084] 当使用植物时,优选地在存在多种浓度的ALS抑制剂除草剂(优选磺酰脲除草剂或磺酰氨基-羰基三唑啉酮除草剂)的情况下,更优选在存在多种浓度的ALS抑制剂除草剂“甲酰胺磺隆”(foramsulfuron)的情况下,在野生型的细胞提取物或叶提取物以及在所获得突变体的甜菜细胞提取物或叶提取物中测定ALS活性。因此,优选地,按照Ray (1984) in Plant Physiol 75:827-831所述从糖甜菜叶片或糖甜菜组织培养物中提取ALS。

[0085] 优选地,本发明的甜菜植物对ALS抑制剂敏感度更低,更优选地其敏感度至少低100倍,更优选地500倍,甚至更优选地1000倍,最优选低2000倍。当用于本文时,敏感度更低,反之亦然,可被看作是“耐受性更高”或“抗性更高”。相似地,“耐受性更高”或“抗性更高”,反之亦然,可被看作是“敏感度更低”。

[0086] 例如,本发明的甜菜植物(尤其是随附实施例中描述的甜菜植物)对ALS抑制剂除草剂甲酰胺磺隆(ALS抑制剂亚类“磺酰脲除草剂”的一个成员)的敏感度比野生型酶低至少2000倍。

[0087] 优选地,本发明的甜菜植物对多种ALS抑制剂除草剂的成员(例如磺酰脲除草剂、磺酰氨基-羰基三唑啉酮除草剂和咪唑啉酮除草剂)的敏感度更低。优选地,选择所述植物对其敏感度更低的磺酰脲除草剂和磺酰氨基羰基三唑啉酮除草剂。在一个尤其优选的实施方案中,本发明的甜菜植物对单独的ALS抑制剂除草剂甲酰胺磺隆(formamsulfuron)(磺酰脲类除草剂)或者其与一种或多种另外的ALS抑制剂除草剂(来自磺酰脲除草剂亚类或任何

其他亚类的ALS抑制剂除草剂)的组合的敏感度更低。

[0088] 因此,本发明的优选地对ALS抑制剂除草剂敏感度更低的甜菜植物还可同样地被表征为对ALS抑制剂“耐受性更高”(即可耐受ALS抑制剂的植物)。

[0089] 因此,“可耐受ALS”的植物是指植物,尤其是对处于通常可抑制正常或野生型植物生长的水平的至少一种ALS抑制剂除草剂具有更高耐受性的甜菜植物,优选地所述ALS抑制剂除草剂可防治正常或野生型植物。所述正常或野生型植物在内源ALS基因的任何等位基因的核苷酸序列中,在对应于SEQ ID NO:1中示出的甜菜ALS基因核苷酸序列的位置1705-1707的位置处不包含编码不同于色氨酸的氨基酸的密码子。

[0090] 所述核苷酸序列通常还可被表征为“可耐受ALS抑制剂除草剂”的核苷酸序列。“可耐受ALS抑制剂除草剂的核苷酸序列”意指这样的核酸分子,所述核酸分子与在对应于SEQ ID NO:2中示出的甜菜ALS蛋白氨基酸序列位置569的位置处不含不同于色氨酸的氨基酸的ALS蛋白相比,至少包含可产生编码不同于色氨酸的氨基酸的密码子的突变的核苷酸序列,其中所述至少一个突变导致对ALS抑制剂除草剂敏感度更低的ALS蛋白的表达。

[0091] “可耐受除草剂的ALS蛋白”意指在存在至少一种已知可干扰ALS活性的ALS抑制剂除草剂并且所述除草剂处于已知可抑制野生型ALS蛋白ALS活性的浓度或水平的情况下,与野生型ALS蛋白的ALS活性相比,展示出更高ALS活性的ALS蛋白。

[0092] 相似地,术语“ALS抑制剂除草剂”或简化的“ALS抑制剂”可互换地使用。用于本文时,“ALS抑制剂除草剂”或“ALS抑制剂”不意图受限于可干扰ALS酶活性的单一除草剂。因此,除非另有说明或可从上下文中明显看出,否则“ALS抑制剂除草剂”或“ALS抑制剂”可以是本领域中已知的一种除草剂或者两种、三种、四种或多种除草剂的混合物,所述除草剂优选为本文所列出的那些,其均可干扰ALS酶的活性。

[0093] 令人意外地,发现甚至本发明的单个点突变可赋予甜菜植物及其子代农艺学上有用且稳定水平的对ALS抑制剂除草剂的耐受性,尤其当建立纯合子(homozygosity)时。与具有同样遗传背景(其中这类突变仅以杂合子形式存在)的可耐受除草剂的甜菜植物相比,具有所述突变为纯合子形式的可耐受除草剂的甜菜植物显示出更高农艺学水平的对ALS抑制剂除草剂的耐受性。

[0094] 因此,本发明涉及具有内源性乙酰乳酸合酶(ALS)基因突变的可耐受ALS抑制剂除草剂的甜菜植物,其中所述ALS基因编码在其位置569处含有不同于色氨酸的氨基酸的ALS多肽。所述各个突变可以杂合子形式存在,并可优选地是所述ALS基因的唯一突变。更优选地,所述各个突变可以纯合子形式存在;最优选地,所述突变作为内源性ALS基因的唯一突变以纯合子形式存在。

[0095] 也不能期望甜菜中ALS基因的仅一个单一突变会是足够的,因为,例如WO 2010/037061中教导ALS基因中两个或三个突变是赋予农艺学上有用的ALS抑制剂除草剂耐受性所必需的。

[0096] 因此,对所述突变来说是杂合子的甜菜植物及其部分是次优选的,但仍然被本发明所涵盖,并且对某些应用方案和/或某些环境条件来说其可能是足够的。本发明还涵盖这样的植物,所述植物在所述内源ALS基因的至少一个等位基因中,在对应于SEQ ID NO:1中示出的甜菜ALS基因核苷酸序列位置1705-1707的位置处含有编码不同于色氨酸的氨基酸(优选亮氨酸)的密码子,并且在所述内源ALS基因中含有一个(当为二倍体时)或多个(当为

多倍体时)具有一个或多个其他突变的其他等位基因。

[0097] 因此,当用于本文时,术语“杂合的”或“杂合地”意指在具体的基因座尤其是在ALS基因的基因座有不等位基因的本发明的植物。

[0098] “纯合的”或“纯合地”是指在不同的DNA链尤其是在ALS基因的基因座有两个拷贝的相等等位基因的本发明的植物。

[0099] 用于本文时,除非另有明确说明,否则术语“植物”意指处在任何发育阶段的植物。

[0100] 优选地,本发明的甜菜植物是正倍体或奇倍体。正倍体植物可优选地为单倍体、二倍体、四倍体、六倍体、八倍体、十倍体或十二倍体,奇倍体植物可优选地为三倍体或五倍体。

[0101] 植物的部分可被连接到整个完整植物或者可从整个完整植物分离。这样的植物的部分包括但不限于植物的器官、组织和细胞,优选种子。

[0102] 因此,本发明的甜菜植物在内源ALS基因方面是非转基因的。当然,可通过基因工程或通过常规方法例如杂交来将外源基因转移到所述植物中。所述基因可以是可赋予除草剂耐受性的基因(优选可赋予不同于ALS抑制剂除草剂耐受性的除草剂耐受性的基因)、提高产量的基因、改进对生物体的抗性的基因和/或涉及内容物改变的基因。

[0103] 在另一方面,本发明涉及制备甜菜植物及其部分的方法,包括如下步骤:

[0104] (a) 将愈伤组织(优选来自糖甜菜的愈伤组织)暴露于约 10^{-7} M- 10^{-9} M的ALS抑制剂除草剂(优选甲酰胺磺隆);

[0105] (b) 选择可在存在高达 3×10^{-6} M的ALS抑制剂除草剂(优选甲酰胺磺隆,[CAS RN 173159-57-4])的情况下生长的细胞克隆;

[0106] (c) 在存在ALS抑制剂除草剂(优选甲酰胺磺隆)的情况下再生茎尖(shoot);

[0107] (d) 用ALS抑制剂除草剂(优选甲酰胺磺隆、碘甲磺隆钠盐(iodosulfuron-methyl-sodium) [CAS RN 144550-36-7] 和/或两者的混合物)选择再生的小植株(plantlet),其中甲酰胺磺隆的剂量优选地等价于7-70g a.i./ha,碘甲磺隆钠盐的剂量优选地等价于1-10g a.i./ha。

[0108] 在另一方面,根据上述过程(a)至(d)获得的再生的小植株,可通过应用下述步骤(e)至(m)而被用于进一步制备甜菜植物:

[0109] (e) 通过建立每个可耐受ALS抑制剂除草剂的小植株的细胞系(克隆)对步骤(d)的个体小植株进行营养体微体繁殖以获得不同的阳性变体;

[0110] (f) 对每个所建立的处于营养体状态的克隆进行长期储存;

[0111] (g) 将长期储存的每个克隆的克隆植物转移到温室;

[0112] (h) 在春化室中春化并适应以诱导开花;

[0113] (i) 将春化的植物转移到生长室(受控的温度和光照);

[0114] (j) 选择最佳开花克隆的最佳花粉散发植株用于与良种但对ALS抑制剂除草剂敏感的去雄植物株杂交,以克服体细胞无性系变异对步骤(d)小植株的生育能力(雄性和雌性)的负面影响;

[0115] (k) 回交到良种株系直到恢复生育力,最后使杂合植物自交以达到纯合状态;

[0116] (l) 与ALS抑制剂除草剂敏感的配体进行测交,并产生每个回交株系的自交种子以用于田间评估;

[0117] (m) 应用农艺学上相关剂量率的不同ALS抑制剂除草剂以选择表现最佳的株系,优选为纯合子状态。

[0118] 根据上述步骤(a)至(m)获得的株系形成了按照育种协会已知的步骤开发商业品种的基础,所述已知的步骤由分子育种技术(例如标记辅助育种或标记辅助选择)支持以加速所述过程并确保正确选择植物,以便获得纯合子形式的突变,或者以便在编码ALS的内源基因的多个位置含有一个或多个突变时正确地选择至少在一个等位基因中确实含有本发明W569突变的杂合子植物(关于综述,参见Bertrand C.Y.et al.(2008), Phil.Trans.R.Soc,B.,363,557-572)。

[0119] 通过本领域中众所周知的工具和方法(例如随附实施例中所述的工具和方法)可以获得愈伤组织。

[0120] 从上述步骤(m)获得的种子已经以保藏号NCIMB 41705保藏在英国阿伯丁的食品工业与海洋细菌菌种保藏中心(NCIMB,Aberdeen,UK)。

[0121] 在另一方面,本发明涉及产生可耐受除草剂的甜菜植物及其部分的方法,所述甜菜植物机器部分包括(i)内源性乙酰乳酸合酶(ALS)基因的突变,其中所述ALS基因编码在其位置569处含有不同于色氨酸的氨基酸的ALS多肽,和(ii)所述内源ALS基因的额外突变,所述方法包括以下步骤:

[0122] (a)产生包含内源性乙酰乳酸合酶(ALS)基因突变的可耐受ALS抑制剂除草剂的甜菜植物,其中所述ALS基因编码在其位置569处含有不同于色氨酸的氨基酸的ALS多肽(亲本A);

[0123] (b)将亲本A与在内源ALS基因中不同于氨基酸位置569的位置处含有一个或多个另外突变的甜菜植物(亲本B)杂交;

[0124] (c)获得对氨基酸位置569处的ALS基因突变以及由亲本B编码的一个或多个任何的另外ALS基因突变来说是杂合子的甜菜子代;

[0125] (d)其中所述育种过程由以下两者控制

[0126] (i)应用标记辅助育种和/或微序列测定技术,和/或

[0127] (ii)应用农艺学上相关剂量的一种或多种ALS抑制剂除草剂,所

[0128] 述ALS抑制剂除草剂可被步骤(c)所产生的子代所耐受。

[0129] 因此,可以想到,本发明还涉及通过前述的制备方法可获得的甜菜植物。

[0130] 在一个非限制性实例中,本发明的糖甜菜植物是通过执行以下的非限制性方案而获得的。不受限于理论,同样的方案可被用于获得除糖甜菜外的甜菜植物。

[0131] 糖甜菜细胞培养物起始于基因型7T9044的二倍体糖甜菜幼苗(例如由Alexander Dovzhenko, PhD Thesis, Title: "Towards plastid transformation in rapeseed (*Brassica napus* L.) and sugarbeet (*Beta vulgaris* L.)", Ludwig-Maximilians-Universitat Munchen, Germany, 2001所描述的)。将糖甜菜种子浸入70%乙醇60秒,然后在有0.01%清洁剂的无菌水中清洗两次,然后在1%NaOCl漂白液中孵育1-4小时。然后将种子用无菌H₂O洗涤3次,并将种子在4℃储存在无菌水中过夜。然后使用镊子和解剖刀分离胚芽。

[0132] 将新制备的胚芽浸入0.5%NaOCl并持续30分钟,然后用无菌水洗涤3次。最后一次洗涤步骤后,将其置于无激素的MS琼脂培养基(Murashige and Skoog(1962),

Physiol.Plantarum,15,473-497)。那些发育为无菌幼苗的胚芽被用于可再生的糖甜菜细胞培养物的起始。

[0133] 子叶以及下胚轴被切成2-5mm长的片段,然后在含有1mg/1苯甲酸嘌呤(BAP)或0.25mg/1苯基噻二唑脲(TDZ)的琼脂(0.8%)固化的MS培养基上培养。4周后,将正在发育的茎尖培养物转移到同样组成的新鲜琼脂培养基上,然后以每月的间隔进行继代培养(sub-culture)。将所述培养物保持在25℃、12h/12h光照/黑暗周期的暗光下。

[0134] 7-10(天)的继代培养后,在含有苯基噻二唑脲的培养基上生长的继代培养物茎尖培养物形成了清晰的愈伤组织类型,其生长快速、柔软且松脆。这种愈伤组织类型的颜色为浅黄色至浅绿色。这些松脆愈伤组织中的某些始终如一地从胚状结构中产生含有叶绿素的茎尖原基。这些快速生长的可再生的愈伤组织被用于选择可耐受ALS抑制剂除草剂的糖甜菜突变体。

[0135] 当将这种愈伤组织类型暴露于 10^{-9} M的磺酰脲甲酰胺磺隆(CAS RN 173159-57-4)时,所述细胞存活,但是其产生的生物量少于其同系细胞在不含所述抑制剂的培养基上产生的生物量的50%。在含有 3×10^{-8} M甲酰胺磺隆的培养基上没有检测到生长。对于大规模的突变体选择实验,选择了 10^{-7} M的甲酰胺磺隆。计数正在存活并生长的细胞克隆,并在4-6周后将其转移到含有 3×10^{-7} M所述抑制剂的新鲜培养基上。这些细胞克隆之一不仅能够在该浓度的所述抑制剂下生长,甚至能够在 3×10^{-6} M甲酰胺磺隆的存在下生长。从该克隆(SB574TL)中,在ALS抑制剂除草剂存在的情况下再生茎尖,然后将所述茎尖转移到含有0.05mg/1萘乙酸(NAA)的MS培养基。

[0136] 在4-12周内所述茎尖形成根,然后将它们转移到装有湿的灭菌珍珠岩的无菌植物容器,用半浓度(half strength)的MS无机组分浇灌。或者,将所述小植株直接从琼脂固化的培养基转移到温室中含有珍珠岩的土壤混合物中。在转移到含有土壤的基质后的最初10-15天内,将所述植物保持在高空气湿度的环境中。在将它们逐渐改变为正常的温室空气湿度方案期间及以后,将所述植物在人工光照(12h)和 $20 \pm 3^{\circ}\text{C}/15 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 昼/夜温度下保持在温室中。

[0137] 3-5周后,将来自上述获得的可耐受甲酰胺磺隆的细胞培养物(SB574TL)以及来自野生型细胞培养物的再生植物用甲酰胺磺隆、碘甲磺隆钠盐(CAS RN 144550-3-7)和这两种活性成分的混合物处理。所测试的除草剂剂量等价于7-70g a.i./ha甲酰胺磺隆,并且等价于1-10g a.i./ha碘甲磺隆钠盐。来源自这个耐受性细胞系的再生植物甚至可耐受最高除草剂剂量(甲酰胺磺隆、碘甲磺隆钠盐及其比例为7:1的混合物),然而甚至最低的剂量杀死了野生型植物。

[0138] 将子代按如下测试(以非限制性方式):

[0139] 基于SB574TL,将含有杂合子状态抗性位基因的实验杂交种的F2和F3种子以及含有纯合子状态突变体等位基因的F4-F6种子播种在田间,当所述植物发育出3-5片莲座叶时,将其用甲酰胺磺隆、碘甲磺隆钠盐以及这两种ALS抑制剂除草剂的混合物处理。所述纯合子幼苗可耐受35g甲酰胺磺隆/ha+7g碘甲磺隆钠盐/ha的混合物而没有生长迟缓或任何可见损伤的迹象。在几种情况中,在这些比率下杂合子株系显示出生长迟缓和某些叶失绿症的迹象,但是它们在3-5周内恢复,然而常规的糖甜菜幼苗被所述ALS抑制剂除草剂杀死。

[0140] 所述ALS突变体按如下表征:

[0141] 对所获得的突变体的提取和核酸序列分析是由德国柏林LGC Genomics GmbH公司根据改进的标准方案来进行的。

[0142] 从糖甜菜突变体SB574TL获得的核酸序列如SEQ ID NO:3所示。SEQ ID NO:4表示对应的氨基酸序列,然而SEQ ID NO:1是将野生型糖甜菜作为原材料并测序后获得的。SEQ ID NO:2表示所述野生型糖甜菜的对应氨基酸序列。

[0143] 对所有这些序列的比较显示,仅在所述内源ALS基因的位置574处有突变,而在其他任何部分都没有发生其他改变。

[0144] SEQ ID No1

[0145] (1)

[0146] ATGGCGGCTACCTTCACAAACCCAACATTTTCCCCTTCCTCAACTCCATTAACCAAAACC

[0147] SEQ ID No 3

[0148] (1)

[0149] ATGGCGGCTACCTTCACAAACCCAACATTTTCCCCTTCCTCAACTCCATTAACCAAAACC

[0150] SEQ ID No1

[0151] (61)

[0152] CTAAAATCCCAATCTTCCATCTCTTCAACCCCTCCCCTTTTCCACCCCTCCCAAAACCCCA

[0153] SEQ ID No 3

[0154] (61)

[0155] CTAAAATCCCAATCTTCCATCTCTTCAACCCCTCCCCTTTTCCACCCCTCCCAAAACCCCA

[0156] SEQ ID No1

[0157] (121)

[0158] ACTCCACTCTTTCACCGTCCCCTCCAAATCTCATCCTCCCAATCCCACAAATCATCCGCC

[0159] SEQ ID No 3

[0160] (121)

[0161] ACTCCACTCTTTCACCGTCCCCTCCAAATCTCATCCTCCCAATCCCACAAATCATCCGCC

[0162] SEQ ID No1

[0163] (181)

[0164] ATTAAAACACAAACTCAAGCACCTTCTTCTCCAGCTATTGAAGATTCATCTTTCGTTTCT

[0165] SEQ ID No 3

[0166] (181)

[0167] ATTAAAACACAAACTCAAGCACCTTCTTCTCCAGCTATTGAAGATTCATCTTTCGTTTCT

[0168] SEQ ID No1

[0169] (241)

[0170] CGATTTGGCCCTGATGAACCCAGAAAAGGGTCCGATGTCCTCGTTGAAGCTCTTGAGCGT

[0171] SEQ ID No 3

[0172] (241)

[0173] CGATTTGGCCCTGATGAACCCAGAAAAGGGTCCGATGTCCTCGTTGAAGCTCTTGAGCGT

[0174] SEQ ID No1

[0175] (301)

[0176] GAAGGTGTTACCAATGTGTTTGCTTACCCTGGTGGTGCATCTATGGAAATCCACCAAGCT
[0177] SEQ ID No 3
[0178] (301)
[0179] GAAGGTGTTACCAATGTGTTTGCTTACCCTGGTGGTGCATCTATGGAAATCCACCAAGCT
[0180] SEQ ID No1
[0181] (361)
[0182] CTCACACGCTCTAAAACCATCCGCAATGTCTCCCTCGCCATGAACAAGGCGGGGTTTTC
[0183] SEQ ID No 3
[0184] (361)
[0185] CTCACACGCTCTAAAACCATCCGCAATGTCTCCCTCGCCATGAACAAGGCGGGGTTTTC
[0186] SEQ ID No1
[0187] (421)
[0188] GCCGCCGAGGGATATGCTAGAGCTACTGGAAAGGTTGGTGTCTGCATTGCGACTTCTGGT
[0189] SEQ ID No 3
[0190] (421)
[0191] GCCGCCGAGGGATATGCTAGAGCTACTGGAAAGGTTGGTGTCTGCATTGCGACTTCTGGT
[0192] SEQ ID No1
[0193] (481)
[0194] CCTGGTGCTACCAACCTCGTATCAGGTCTTGCTGACGCTCTCCTTGATTCTGTCCCTCTT
[0195] SEQ ID No 3
[0196] (481)
[0197] CCTGGTGCTACCAACCTCGTATCAGGTCTTGCTGACGCTCTCCTTGATTCTGTCCCTCTT
[0198] SEQ ID No1
[0199] (541)
[0200] GTTGCCATCACTGGCCAAGTTCCACGCCGTATGATTGGCACTGATGCTTTTCAGGAGACT
[0201] SEQ ID No 3
[0202] (541)
[0203] GTTGCCATCACTGGCCAAGTTCCACGCCGTATGATTGGCACTGATGCTTTTCAGGAGACT
[0204] SEQ ID No1
[0205] (601)
[0206] CCAATTGTTGAGGTGACAAGGTCTATTACTAAGCATAATTATTTAGTTTTGGATGTAGAG
[0207] SEQ ID No 3
[0208] (601)
[0209] CCAATTGTTGAGGTGACAAGGTCTATTACTAAGCATAATTATTTAGTTTTGGATGTAGAG
[0210] SEQ ID No1
[0211] (661)
[0212] GATATTCCTAGAATTGTTAAGGAAGCCTTTTTTTTAGCTAATTCTGGTAGGCCTGGACCT
[0213] SEQ ID No 3
[0214] (661)

[0215] GATATTCCTAGAATTGTTAAGGAAGCCTTTTTTTTAGCTAATTCTGGTAGGCCTGGACCT
[0216] SEQ ID No1
[0217] (721)
[0218] GTTTTGATTGATCTTCCTAAAGATATTCAGCAGCAATTGGTTGTTCTGATTGGGATAGG
[0219] SEQ ID No 3
[0220] (721)
[0221] GTTTTGATTGATCTTCCTAAAGATATTCAGCAGCAATTGGTTGTTCTGATTGGGATAGG
[0222] SEQ ID No1
[0223] (781)
[0224] CCTTTTAAGTTGGGTGGGTATATGTCTAGGCTGCCAAAGTCCAAGTTTTCGACGAATGAG
[0225] SEQ ID No 3
[0226] (781)
[0227] CCTTTTAAGTTGGGTGGGTATATGTCTAGGCTGCCAAAGTCCAAGTTTTCGACGAATGAG
[0228] SEQ ID No1
[0229] (841)
[0230] GTTGGACTTCTTGAGCAGATTGTGAGGTTGATGAGTGAGTCGAAGAAGCCTGTCTTGTAT
[0231] SEQ ID No 3
[0232] (841)
[0233] GTTGGACTTCTTGAGCAGATTGTGAGGTTGATGAGTGAGTCGAAGAAGCCTGTCTTGTAT
[0234] SEQ ID No1
[0235] (901)
[0236] GTGGGAGGTGGGTGTTTGAATTCTAGTGAGGAGTTGAGGAGATTTGTTGAGTTGACAGGG
[0237] SEQ ID No 3
[0238] (901)
[0239] GTGGGAGGTGGGTGTTTGAATTCTAGTGAGGAGTTGAGGAGATTTGTTGAGTTGACAGGG
[0240] SEQ ID No1
[0241] (961)
[0242] ATCCGGTGGCTAGTACTTTGATGGGGTTGGGGTCTTACCCTTGTAATGATGAACTGTCT
[0243] SEQ ID No 3
[0244] (961)
[0245] ATCCGGTGGCTAGTACTTTGATGGGGTTGGGGTCTTACCCTTGTAATGATGAACTGTCT
[0246] SEQ ID No1
[0247] (1021)
[0248] CTTCATATGTTGGGGATGCACGGGACTGTTTATGCCAATTATGCGGTGGATAAGGCGGAT
[0249] SEQ ID No 3
[0250] (1021)
[0251] CTTCATATGTTGGGGATGCACGGGACTGTTTATGCCAATTATGCGGTGGATAAGGCGGAT
[0252] SEQ ID No1
[0253] (1081)

[0254] TTGTTGCTTGCTTTCGGGGTTAGGTTTGATGATCGTGTGACCGGGAAGCTCGAGGCGTTT
[0255] SEQ ID No 3
[0256] (1081)
[0257] TTGTTGCTTGCTTTCGGGGTTAGGTTTGATGATCGTGTGACCGGGAAGCTCGAGGCGTTT
[0258] SEQ ID No1
[0259] (1141)
[0260] GCTAGCCGTGCTAAGATTGTGCATATTGATATTGACTCTGCTGAGATTGGGAAGAACAAG
[0261] SEQ ID No 3
[0262] (1141)
[0263] GCTAGCCGTGCTAAGATTGTGCATATTGATATTGACTCTGCTGAGATTGGGAAGAACAAG
[0264] SEQ ID No1 (1201)
[0265] CAGCCCCATGTGTCCATTTGTGCTGATGTTAAATTGGCATTGCGGGGTATGAATAAGATT
[0266] SEQ ID No 3 (1201)
[0267] CAGCCCCATGTGTCCATTTGTGCTGATGTTAAATTGGCATTGCGGGGTATGAATAAGATT
[0268] SEQ ID No1
[0269] (1261)
[0270] CTGGAGTCTAGAATAGGGAAGCTGAATTTGGATTTCTCCAAGTGGAGAGAAGAATTAGGT
[0271] SEQ ID No 3
[0272] (1261)
[0273] CTGGAGTCTAGAATAGGGAAGCTGAATTTGGATTTCTCCAAGTGGAGAGAAGAATTAGGT
[0274] SEQ ID No1
[0275] (1321)
[0276] GAGCAGAAGAAGGAATTCCCACTGAGTTTTAAGACATTTGGGGATGCAATTCCTCCACAA
[0277] SEQ ID No 3
[0278] (1321)
[0279] GAGCAGAAGAAGGAATTCCCACTGAGTTTTAAGACATTTGGGGATGCAATTCCTCCACAA
[0280] SEQ ID No1 (1381)
[0281] TATGCCATT CAGGTGCTTGATGAGTTGACCAATGGTAATGCTATTATAAGTACTGGTGTT
[0282] SEQ ID No 3 (1381)
[0283] TATGCCATT CAGGTGCTTGATGAGTTGACCAATGGTAATGCTATTATAAGTACTGGTGTT
[0284] SEQ ID No1
[0285] (1441)
[0286] GGGCAGCACCAAATGTGGGCTGCGCAGCATTACAAGTACAGAAACCTCGCCAATGGCTG
[0287] SEQ ID No 3
[0288] (1441)
[0289] GGGCAGCACCAAATGTGGGCTGCGCAGCATTACAAGTACAGAAACCTCGCCAATGGCTG
[0290] SEQ ID No1
[0291] (1501)
[0292] ACCTCTGGTGGGTTGGGGGCTATGGGGTTTGGGCTACCAGCCGCCATTGGAGCTGCAGTT

[0293] SEQ ID No 3
[0294] (1501)
[0295] ACCTCTGGTGGGTGGGGGCTATGGGGTTTGGGCTACCAGCCGCCATTGGAGCTGCAGTT
[0296] SEQ ID No1
[0297] (1561)
[0298] GCTCGACCAGATGCAGTGGTTGTCGATATTGATGGGGATGGCAGTTTTATTATGAATGTT
[0299] SEQ ID No 3
[0300] (1561)
[0301] GCTCGACCAGATGCAGTGGTTGTCGATATTGATGGGGATGGCAGTTTTATTATGAATGTT
[0302] SEQ ID No1
[0303] (1621)
[0304] CAAGAGTTGGCTACAATTAGGGTGGAAAATCTCCCAGTTAAGATAATGCTGCTAAACAAT
[0305] SEQ ID No 3
[0306] (1621)
[0307] CAAGAGTTGGCTACAATTAGGGTGGAAAATCTCCCAGTTAAGATAATGCTGCTAAACAAT
[0308] SEQ ID No1
[0309] (1681)
[0310] CAACATTTAGGTATGGTTGTCCAATGGGAAGATAGGTTCTATAAAGCTAACCGGGCACAT
[0311] SEQ ID No 3
[0312] (1681)
[0313] CAACATTTAGGTATGGTTGTCCAATGGGAAGATAGGTTCTATAAAGCTAACCGGGCACAT
[0314] SEQ ID No1
[0315] (1741)
[0316] ACATACCTTGAAACCCTTCCAAATCTGCTGATATCTTCCCTGATATGCTCAAATTCGCT
[0317] SEQ ID No 3
[0318] (1741)
[0319] ACATACCTTGAAACCCTTCCAAATCTGCTGATATCTTCCCTGATATGCTCAAATTCGCT
[0320] SEQ ID No1
[0321] (1801)
[0322] GAGGCATGTGATATTCCTTCTGCCCGTGTTAGCAACGTGGCTGATTTGAGGGCCGCCATT
[0323] SEQ ID No 3
[0324] (1801)
[0325] GAGGCATGTGATATTCCTTCTGCCCGTGTTAGCAACGTGGCTGATTTGAGGGCCGCCATT
[0326] SEQ ID No1
[0327] (1861)
[0328] CAAACAATGTTGGATACTCCAGGGCCGTACCTGCTCGATGTGATTGTACCGCATCAAGAG
[0329] SEQ ID No 3
[0330] (1861)
[0331] CAAACAATGTTGGATACTCCAGGGCCGTACCTGCTCGATGTGATTGTACCGCATCAAGAG

- [0332] SEQ ID No1
[0333] (1921)
[0334] CATGTGTTGCCTATGATTCCAAGTGGTGCCGGTTTCAAGGATACCATTACAGAGGGTGAT
[0335] SEQ ID No 3
[0336] (1921)
[0337] CATGTGTTGCCTATGATTCCAAGTGGTGCCGGTTTCAAGGATACCATTACAGAGGGTGAT
[0338] SEQ ID No1
[0339] (1981) GGAAGAACCTCTTATTGA
[0340] SEQ ID No 3
[0341] (1981) GGAAGAACCTCTTATTGA
[0342] SEQ ID No.2
[0343] (1)
[0344] MAATFTNPTFSPSSTPLTKTLKSQSSISSTLPFSTPPKTPTPLFHRPLQISSSQSHKSSA
[0345] SEQ ID No.4
[0346] (1)
[0347] MAATFTNPTFSPSSTPLTKTLKSQSSISSTLPFSTPPKTPTPLFHRPLQISSSQSHKSSA
[0348] SEQ ID No.2
[0349] (61)
[0350] IKTQTQAPSSPAIEDSSFVSRFGPDEPRKGSVDLVEALEREGVTNVFAYPGGASMEIHQA
[0351] SEQ ID No.4
[0352] (61)
[0353] IKTQTQAPSSPAIEDSSFVSRFGPDEPRKGSVDLVEALEREGVTNVFAYPGGASMEIHQA
[0354] SEQ ID No.2
[0355] (121)
[0356] LTRSKTIRNVLP RHEQGGVFAAEGYARATGKVGVC IATSGPGATNLVSG LADALLDSVPL
[0357] SEQ ID No.4
[0358] (121)
[0359] LTRSKTIRNVLP RHEQGGVFAAEGYARATGKVGVC IATSGPGATNLVSG LADALLDSVPL
[0360] SEQ ID No.2
[0361] (181)
[0362] VAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRIVKEAFFLANSGRPGP
[0363] SEQ ID No.4
[0364] (181)
[0365] VAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRIVKEAFFLANSGRPGP
[0366] SEQ ID No.2
[0367] (241)
[0368] VLIDLPKDIQQQLVVPDWD RPFKLGGYMSRLPKSKFSTNEVGLLEQIVRLMSESKKPVLY
[0369] SEQ ID No.4
[0370] (241)

- [0371] VLIDLPKDIQQQLVVPDWRPFKLGGYMSRLPKSKFSTNEVGLLEQIVRLMSESKKPVLY
[0372] SEQ ID No.2
[0373] (301)
[0374] VGGGCLNSSEELRRFVELTGIPVASTLMGLGSYPCNDELSLHMLGMHGT VYANYAVDKAD
[0375] SEQ ID No.4
[0376] (301)
[0377] VGGGCLNSSEELRRFVELTGIPVASTLMGLGSYPCNDELSLHMLGMHGT VYANYAVDKAD
[0378] SEQ ID No.2
[0379] (361)
[0380] LLLAFGVRFD DRTVGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQPHVSICADV KLALRGMNKI
[0381] SEQ ID No.4
[0382] (361)
[0383] LLLAFGVRFD DRTVGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQPHVSICADV KLALRGMNKI
[0384] SEQ ID No.2
[0385] (421)
[0386] LESRIGKLNLD FSKWREELGEQKKEFPLSFKTFGDAIPPQYAIQVLDEL TNGNAIISTGV
[0387] SEQ ID No.4
[0388] (421)
[0389] LESRIGKLNLD FSKWREELGEQKKEFPLSFKTFGDAIPPQYAIQVLDEL TNGNAIISTGV
[0390] SEQ ID No.2
[0391] (481)
[0392] GQHQMWA AQHYKYRNPRQWLTSGGLGAMGFGLPAAIGA AVARPD AVVVDIDGDG SFIMNV
[0393] SEQ ID No.4
[0394] (481)
[0395] GQHQMWA AQHYKYRNPRQWLTSGGLGAMGFGLPAAIGA AVARPD AVVVDIDGDG SFIMNV
[0396] SEQ ID No.2
[0397] (541)
[0398] QELATIRVENLPVKIMLLNNQH LGMVVQWEDRFYKANRAHTY LGNPSKSADIFPDMLKFA
[0399] SEQ ID No.4
[0400] (541)
[0401] QELATIRVENLPVKIMLLNNQH LGMVVQLED RFYKANRAHTY LGNPSKSADIFPDMLKFA
[0402] SEQ ID No.2
[0403] (601)
[0404] EACDIPSARVSNVADLR AAIQTMLDTPGPYLLDVIVPHQE HVLP MIPSGAGFKDTITEGD
[0405] SEQ ID No.4
[0406] (601)
[0407] EACDIPSARVSNVADLR AAIQTMLDTPGPYLLDVIVPHQE HVLP MIPSGAGFKDTITEGD
[0408] SEQ ID No.2
[0409] (661) GRTSY-

[0410] SEQ ID No.4

[0411] (661)GRTSY-

[0412] 然而,通常优选地,本发明的甜菜植物及其部分是农艺学上可利用的。“农艺学上可利用的”意指所述甜菜植物及其部分可用于农艺学目的。例如,所述甜菜植物应可用于糖生产、生物燃料生产(例如沼气、生物丁醇)、乙醇生产、甜菜碱和/或尿苷生产的目的。术语“农艺学上可利用的”在用于本文时还包括:本发明的甜菜植物优选地对ALS抑制剂除草剂的敏感度更低,更优选地其敏感度至少低100倍,更优选地500倍,甚至更优选地1000倍,最优选地低于2000倍。所述ALS抑制剂除草剂是本文所描述的一种或多种,优选地其为单独的甲酰胺磺隆或者甲酰胺磺隆与来自磺酰脲除草剂亚类或ALS抑制剂除草剂的任何其他亚类的一种或多种其他ALS抑制剂除草剂的组合,最优选地其为甲酰胺磺隆与其他磺酰脲除草剂和/或磺酰氨基羰基三唑啉酮除草剂亚类的ALS抑制剂的组合。

[0413] 优选地,本发明的农艺学上可利用的甜菜植物(最优选地,糖甜菜植物)是完全能育的,更优选地其具有野生型的生育力。为了成为农艺学可利用的,生育力对本发明的甜菜植物来说是最重要的。

[0414] 农艺学上可利用的甜菜植物的一个实例是糖甜菜。当栽培在1公顷田地的区域中时,本发明的糖甜菜植物(约80,000至90,000株糖甜菜)应优选地可用于产生至少4吨糖。

[0415] 或者,本发明的糖甜菜植物应优选含有15-20%(优选地至少17%)的糖含量,以便是农艺学上可利用的。因此,具有15-20%(优选至少17%)的糖含量的糖甜菜植物是本发明的优选实施方案。

[0416] 可使用任何基因型分析方法鉴定本发明的植物。植物的基因型评价包括使用技术,例如同工酶电泳、限制性片段长度多态性(RFLP)、随机扩增多态性DNA(RAPD)、随机引发的聚合酶链式反应(AP-PCR)、等位基因特异性PCR(AS-PCR)、DNA扩增指纹印迹(DAF)、序列特征性扩增区域(SCAR)、扩增片段长度多态性(AFLP)、简单重复序列(SSR)(还被称为“微卫星”)。用于分析本文提供的植物的基因型的额外组合物和方法包括在美国公开No.2004/0171027、美国公开No.2005/02080506和美国公开No.2005/0283858中公开的那些方法。

[0417] 本发明的另一方面是本文所述甜菜植物和/或本文所述可收获部分或繁殖材料用于制备/育种甜菜植物的用途。用于制备/育种甜菜植物的方法描述于本文中别处。这种制备/育种方法可被用于产生还包括新的植物性状的本发明甜菜植物,所述新的植物性状例如胁迫抗性(stress resistance),例如但不限于干旱胁迫、热胁迫、冷胁迫或盐胁迫等。

[0418] 在另一方面中,本发明涵盖了本文所述的可耐受除草剂的甜菜植物和/或源于其的可收获部分或繁殖材料用在选择ALS抑制剂除草剂的筛选方法中的用途。

[0419] 从如下实施例可更好地理解本发明及其众多优势,提供所述实施例仅出于示例性目的并且不意图以任何方式限制本发明的范围。

[0420] 实施例1:突变体分离

[0421] 糖甜菜细胞培养物起始于基因型7T9044的二倍体糖甜菜(例如由Alexander Dovzhenko, PhD Thesis, Title: “Towards plastid transformation in rapeseed (*Brassica napus* L.) and sugarbeet (*Beta vulgaris* L.)”, Ludwig-Maximilians-Universitat Munchen, Germany, 2001所描述的)。

[0422] 将糖甜菜种子浸入70%乙醇中60秒,然后在含0.01%洗涤剂的无菌水中清洗两

次,然后在1%NaOCl漂白液中孵育1-4小时。然后,将种子用无菌H₂O洗涤3次,并将所述种子于4℃下在无菌H₂O中储存过夜。然后使用镊子和解剖刀分离胚芽。

[0423] 将新制备的胚芽浸入0.5%NaOCl并持续30分钟,然后用无菌H₂O洗涤3次。最后一次洗涤步骤后,将其置于无激素的MS琼脂培养基(Murashige and Skoog(1962), *Physiol.Plantarum*,15,473-497)上。那些发育为无菌幼苗的胚芽被用于起始可再生的糖甜菜细胞培养物。

[0424] 子叶以及下胚轴被切成2-5mm长的片段,然后在含有1mg/l苯甲酸嘌呤(BAP)或0.25mg/l苯基噻二唑脲(TDZ)的琼脂(0.8%)固化的MS琼脂培养基上培养。4周后将正在发育的茎尖培养物转移到具有同样组成的新鲜MS琼脂培养基上,然后以每月的间隔进行继代培养。将所述培养物保持在25℃、12h/12h光照/黑暗周期的暗光下。

[0425] 7-10天后,在含有苯基噻二唑脲的培养基上生长的继代培养物茎尖培养物形成了清晰的愈伤组织类型,其生长快速、柔软且松脆。这种愈伤组织类型的颜色为浅黄色至浅绿色。这些松脆愈伤组织中的某些始终如一地从胚状结构中产生含有叶绿素的茎尖原基。这些快速生长的可再生的愈伤组织被用于选择可耐受ALS抑制剂除草剂的糖甜菜突变体。

[0426] 当将这种愈伤组织类型暴露于10⁻⁹M的ALS抑制剂除草剂甲酰胺磺隆(属于磺酰脲亚类,见上文)时,所述细胞存活,但是其产生的生物量少于其同系细胞在不含所述抑制剂的培养基上产生的生物量的50%。在含有3×10⁻⁸M甲酰胺磺隆的培养基上没有检测到生长。对于大规模的突变体选择实验,选择了10⁻⁷M的甲酰胺磺隆。计数正在存活并生长的细胞克隆,并在4-6周后将其转移到含有3×10⁻⁷M所述抑制剂的新鲜培养基上。这些细胞克隆之一不仅能够在该浓度的所述抑制剂下生长,而且甚至能够在3×10⁻⁶M甲酰胺磺隆的存在下生长。

[0427] 从该克隆(SB574TL)中,在ALS抑制剂除草剂存在的情况下再生茎尖,然后将所述茎尖转移到含有0.05mg/l萘乙酸(NAA)的MS培养基。

[0428] 在4-12周内所述茎尖形成根,然后将它们转移到装有湿的灭菌珍珠岩的无菌植物容器,用半浓度的MS无机组分浇灌。或者,将所述小植株直接从琼脂固化的培养基转移到温室中含有珍珠岩的土壤混合物中。在转移到含有土壤的基质后的最初10-15天内,将所述植物保持在高空气湿度的环境中。在将它们逐渐改变为正常的温室空气湿度方案期间及以后,将所述植物在人工光照(12h)和20+/-3℃/15+/-2℃昼/夜温度下保持在温室中。

[0429] 3-5周后,将来自上述获得的可耐受甲酰胺磺隆的细胞培养物(SB574TL)以及来自野生型细胞培养物的再生植物用甲酰胺磺隆、碘甲磺隆钠盐(CAS RN 144550-3-7)和这两种活性成分的混合物处理。所测试的除草剂剂量等价于7-70g a.i./ha甲酰胺磺隆,并且等价于1-10g a.i./ha碘甲磺隆钠盐。来源自这个耐受性细胞系的再生植物甚至可耐受最高除草剂剂量(甲酰胺磺隆、碘甲磺隆钠盐及其比例为7:1的混合物),然而甚至最低的剂量杀死了野生型植物。

[0430] 实施例2:子代的测试

[0431] 基于SB574TL,将含有杂合子状态抗性位基因的实验杂交种的F₂和F₃种子以及含有纯合子状态突变体等位基因的F₄-F₆种子播种在田间,当所述植物发育出3-5片莲座叶时,将其用甲酰胺磺隆、碘甲磺隆钠盐以及这两种ALS抑制剂除草剂的混合物处理。所述纯合子幼苗可耐受35g甲酰胺磺隆/ha+7g碘甲磺隆钠盐/ha的混合物而没有生长迟缓或任何

可见损伤的迹象。在这些比率下,杂合子株系显示出生长迟缓和某些叶失绿症的迹象,但是它们在3-5周内恢复,然而常规的糖甜菜幼苗被所述ALS抑制剂除草剂杀死。

[0432] 实施例3:所获得的糖甜菜突变体(SB574TL)的分子表征

[0433] 对所获得的突变体的提取和核酸序列分析是由德国柏林LGC Genomics GmbH公司根据改进的标准方案来进行的。

[0434] 从所述糖甜菜突变体SB574TL获得的核酸序列如SEQ ID NO:3所示,SEQ ID NO:4表示对应的氨基酸序列,而SEQ ID NO:1是将野生型糖甜菜作为原材料并测序后获得的。SEQ ID NO:2表示所述野生型糖甜菜的对应的氨基酸序列。

[0435] 对所有这些序列的比较清楚地显示,仅在该糖甜菜植物材料的该内源ALS基因的位置569处有一个突变,其他任何部分都没有发生其他改变。

[0436] 实施例4:酶活性测量

[0437] 根据制造商的说明书,将甜菜野生型和W574L-突变体(SB574TL) ALS基因的编码序列克隆进Novagen pET-32a(+)载体,用所述载体转化大肠杆菌AD494。将细菌在37℃下,在含有100mg/l羧苄西林和25mg/l卡那霉素的LB培养基(Luria-Broth培养基)中培养,在OD₆₀₀为0.6时用1mM异丙基-β-D-硫代半乳糖吡喃糖苷诱导,在18℃下培养16小时,然后通过离心收获。将细菌沉淀以1克湿重/25ml缓冲液的浓度重悬在100mM pH7.0的磷酸钠缓冲液(含有0.1mM焦磷酸硫胺素、1mM MgCl₂和1μM FAD)中并通过超声使细菌破裂。离心后获得的粗品蛋白质提取物被用于ALS活性测量。

[0438] 在96孔微量滴定板中使用Ray(1984)描述的步骤的修改方案进行ALS测定。反应混合物含有20mM pH7.0的磷酸钾缓冲液、20mM丙酮酸钠、0.45mM焦磷酸硫胺素、0.45mM MgCl₂、9μM FAD、ALS酶和多种浓度的ALS抑制剂,最终体积为90μl。通过加入酶开始测定,并在30℃下孵育75min后通过加入40μl 0.5M的H₂SO₄来终止测定。在室温下60min后,加入1.4%α-萘酚和0.14%肌酸在0.7M NaOH中的溶液80μl,室温下再孵育45min后,在540nm处测定吸光度。按照Ray(1984)所述,使用ID Business Solutions Limited公司的XLFit Excel插件版本4.3.1曲线拟合程序测定了抑制ALS的pI50值。

[0439] 总共,与野生型酶相比,所述突变体酶对ALS抑制剂甲酰胺磺隆的敏感度低至少2000倍。

[0440] 实施例5:酶活性测量(来自植物)

[0441] 按照Ray(1984),Plant Physiol 75:827-831所述,从糖甜菜叶或糖甜菜组织培养物中提取ALS。

[0442] 按实施例4所述,在存在多种浓度的甲酰胺磺隆的情况下,测定了野生型和糖甜菜的叶提取物中以及所获得的SB574TL叶提取物中的ALS活性。

[0443] 总共,与野生型酶相比,所述突变体酶对ALS抑制剂甲酰胺磺隆的敏感度低至少2000倍。

[0444] 实施例6使用纯合的可耐受ALS抑制剂除草剂的糖甜菜植物进行的田间试验

[0445] 基于SB574TL,含有纯合子状态的所述内源ALS基因的突变体等位基因的F4-F6种子用于进一步的测试。

[0446] 将纯合的SB574TL突变体植物的植物种子以及传统变种KLARINA(通常市售的ALS抑制剂敏感性参照糖甜菜品种,在其ALS蛋白中位置569处没有相应突变)的植物种子播种

在田地中并根据BBCH标准(如monographie,,Entwicklungsstadien mono-und dikotylar Pflanzen",2nd edition,2001,ed.Uwe Meier,Biologische Bundesanstalt fur Land und Forstwirtschaft所定义)培育至多种生长阶段。

[0447] 然后将所述植物用下表1列举的各个ALS抑制剂除草剂处理,所述除草剂与在选择步骤中使用的那些相同。

[0448] 在各种应用中使用的水量等于200l/ha。

[0449] 在应用各个ALS抑制剂除草剂后(DAA)第8、14和28天(如表1所示),根据0%至100%的范围对不同糖甜菜植物上的损害(植物毒性/植物)评分。在该上下文中,"0%"意指"没有植物毒性/植物","100%"意指植物被完全杀死。

[0450] 表1

[0451]

品种特征		KLARINA	基于 S8574TL 的糖甜菜	KLARINA	基于 S8574TL 的糖甜菜	KLARINA	基于 S8574TL 的糖甜菜
应用阶段		BBCH 14	BBCH 14	BBCH 14	BBCH 14	BBCH 14	BBCH 14
比例		%植物	%植物	%植物	%植物	%植物	%植物
应用 - 评估间隔		8 天	8 天	14 天	14 天	28 天	28 天
活性物质	g/ha						
甲酰胺磺隆	25 g/ha	85	0	83	0	86	0
甲酰胺磺隆	50 g/ha	90	0	92	0	94	0
磺甲磺隆钠盐	7 g/ha	90	0	97	0	100	0

序列表

<110> 拜尔农作物科学股份公司和KWS种子股份有限公司

<120> 可耐受ALS抑制剂除草剂的甜菜突变体

<130> BCS 09-1021 / KWS 0172 EP

<160> 6

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1998

<212> DNA

<213> 甜菜(Beta vulgaris)

<400> 1

atggcggcta ccttcacaaa cccaacattt tccccttctt caactccatt aacaaaaacc	60
ctaaaatccc aatcttccat ctcttcaacc ctcccctttt ccacccctcc caaaacccca	120
actccactct ttcaccgtcc cctccaaate tcatectccc aatcccacaa atcatccgcc	180
[0001] attaaaacac aaactcaagc acctctctct ccagctattg aagattcatc ttctgtttct	240
cgatttgccc ctgatgaacc cagaaaaggg tccgatgtcc tcgttgaage tcttgagcgt	300
gaaggtgtta ccaatgtgtt tgettaccct ggtgggtgcat ctatggaaat ccaccaagct	360
ctcacacgct ctaaaacat cgcgaatgtc ctccctcgcc atgaacaagg cggggtttct	420
gccgccgagg gatatgctag agctactgga aaggttggtg tctgcattgc gacttctggt	480
cctggtgcta ccaacctegt atcaggctct gctgaagctc tccctgattc tgteccctct	540
gttgccatca ctggccaagt tccacgccgt atgattggca ctgatgcttt tcaggagact	600
ccaattgttg aggtgacaag gtctattact aagcataatt atttagtttt ggatgtagag	660
gatattccta gaattgttaa ggaagccttt tttttagcta attctggtag gcctggacct	720
gttttgattg atcttcttaa agatattcag cagcaattgg ttgttctga ttgggatagg	780
ccttttaagt tgggtgggta tatgtctagg ctgccaaagt ccaagtttct gacgaatgag	840
gttggaattc ttgagcagat tgtgaggttg atgagtgagt cgaagaagcc tgtcttgtat	900
gtgggagggt ggtgtttgaa ttctagttag gagttgagga gatttgttga gttgacaggg	960

	attccgggtgg ctagtacttt gatgggggttg gggctcttacc cttgtaatga tgaactgtct	1020
	cttcatatgt tggggatgca cgggactgtt tatgccaatt atgcgggtgga taaggcggat	1080
	ttgttgcttg ctttcgggggt taggtttgat gatcgtgtga ccgggaagct cgaggcgttt	1140
	gctagccgtg ctaagattgt gcatattgat attgactctg ctgagattgg gaagaacaag	1200
	cagcccatg tgtccatttg tgctgatgtt aaattggcat tgcgggggtat gaataagatt	1260
	ctggagteta gaatagggaa gctgaatttg gatttctcca agtggagaga agaattaggt	1320
	gagcagaaga aggaattccc actgagtttt aagacatttg gggatgcaat tcctccacaa	1380
	tatgccattc aggtgcttga tgagttgacc aatggtaatg ctattataag tactgggtgtt	1440
	gggcagcacc aaatgtgggc tgcgcagcat tacaagtaca gaaacctcg ccaatggetg	1500
	acctctggtg ggttgggggc tatggggttt gggctaccag ccgccattgg agctgcagtt	1560
	getcgaccag atgcagtggg tgcgatatt gatggggatg gcagttttat tatgaatgtt	1620
	caagagttag ctacaattag ggtggaaaat ctcccagtta agataatgct gctaaacaat	1680
[0002]	caacatttag gtatggttgt ccaatgggaa gataggttct ataaagctaa ccgggcacat	1740
	acatacettg gaaaccttc caaatctget gatattctcc ctgatatgct caaatcget	1800
	gaggcatgtg atattcette tgcctgtgtt agcaacgtgg ctgatttgag ggccgccatt	1860
	caaacaatgt tggatactcc agggccgtac ctgctcgatg tgattgtacc gcatcaagag	1920
	catgtgttgc ctatgattcc aagtgggtgcc ggtttcaagg ataccattac agagggtgat	1980
	ggaagaacct cttattga	1998

<210> 2
 <211> 665
 <212> PRT
 <213> 甜菜

<400> 2

Met Ala Ala Thr Phe Thr Asn Pro Thr Phe Ser Pro Ser Ser Thr Pro
 1 5 10 15

Leu Thr Lys Thr Leu Lys Ser Gln Ser Ser Ile Ser Ser Thr Leu Pro
 20 25 30

Phe Ser Thr Pro Pro Lys Thr Pro Thr Pro Leu Phe His Arg Pro Leu
35 40 45

Gln Ile Ser Ser Ser Gln Ser His Lys Ser Ser Ala Ile Lys Thr Gln
50 55 60

Thr Gln Ala Pro Ser Ser Pro Ala Ile Glu Asp Ser Ser Phe Val Ser
65 70 75 80

Arg Phe Gly Pro Asp Glu Pro Arg Lys Gly Ser Asp Val Leu Val Glu
85 90 95

Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val Thr Asn Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly
100 105 110

Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Lys Thr Ile Arg
115 120 125

[0003]

Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly
130 135 140

Tyr Ala Arg Ala Thr Gly Lys Val Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly
145 150 155 160

Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp
165 170 175

Ser Val Pro Leu Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile
180 185 190

Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser
195 200 205

Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg
210 215 220

	Ile	Val	Lys	Glu	Ala	Phe	Phe	Leu	Ala	Asn	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro
	225					230					235					240
	Val	Leu	Ile	Asp	Leu	Pro	Lys	Asp	Ile	Gln	Gln	Gln	Leu	Val	Val	Pro
					245					250						255
	Asp	Trp	Asp	Arg	Pro	Phe	Lys	Leu	Gly	Gly	Tyr	Met	Ser	Arg	Leu	Pro
				260					265					270		
	Lys	Ser	Lys	Phe	Ser	Thr	Asn	Glu	Val	Gly	Leu	Leu	Glu	Gln	Ile	Val
			275					280						285		
	Arg	Leu	Met	Ser	Glu	Ser	Lys	Lys	Pro	Val	Leu	Tyr	Val	Gly	Gly	Gly
	290						295					300				
	Cys	Leu	Asn	Ser	Ser	Glu	Glu	Leu	Arg	Arg	Phe	Val	Glu	Leu	Thr	Gly
	305					310					315					320
[0004]	Ile	Pro	Val	Ala	Ser	Thr	Leu	Met	Gly	Leu	Gly	Ser	Tyr	Pro	Cys	Asn
					325					330					335	
	Asp	Glu	Leu	Ser	Leu	His	Met	Leu	Gly	Met	His	Gly	Thr	Val	Tyr	Ala
				340					345					350		
	Asn	Tyr	Ala	Val	Asp	Lys	Ala	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Phe	Gly	Val	Arg
			355					360					365			
	Phe	Asp	Asp	Arg	Val	Thr	Gly	Lys	Leu	Glu	Ala	Phe	Ala	Ser	Arg	Ala
	370						375					380				
	Lys	Ile	Val	His	Ile	Asp	Ile	Asp	Ser	Ala	Glu	Ile	Gly	Lys	Asn	Lys
	385					390					395					400
	Gln	Pro	His	Val	Ser	Ile	Cys	Ala	Asp	Val	Lys	Leu	Ala	Leu	Arg	Gly
					405					410					415	
	Met	Asn	Lys	Ile	Leu	Glu	Ser	Arg	Ile	Gly	Lys	Leu	Asn	Leu	Asp	Phe
				420					425					430		

Ser Lys Trp Arg Glu Glu Leu Gly Glu Gln Lys Lys Glu Phe Pro Leu
435 440 445

Ser Phe Lys Thr Phe Gly Asp Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln
450 455 460

Val Leu Asp Glu Leu Thr Asn Gly Asn Ala Ile Ile Ser Thr Gly Val
465 470 475 480

Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln His Tyr Lys Tyr Arg Asn Pro
485 490 495

Arg Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu
500 505 510

Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Ala Arg Pro Asp Ala Val Val Val
515 520 525

[0005]

Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn Val Gln Glu Leu Ala
530 535 540

Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile Met Leu Leu Asn Asn
545 550 555 560

Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala
565 570 575

Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Ser Lys Ser Ala Asp Ile
580 585 590

Phe Pro Asp Met Leu Lys Phe Ala Glu Ala Cys Asp Ile Pro Ser Ala
595 600 605

Arg Val Ser Asn Val Ala Asp Leu Arg Ala Ala Ile Gln Thr Met Leu
610 615 620

Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile Val Pro His Gln Glu
625 630 635 640

His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Ala Gly Phe Lys Asp Thr Ile
645 650 655

Thr Glu Gly Asp Gly Arg Thr Ser Tyr
660 665

<210> 3
<211> 1998
<212> DNA
<213> 甜菜

<220>
<221> 突变
<222> (1706).. (1706)
<223> 用胸腺嘧啶核苷取代鸟嘌呤核苷

<400> 3
[0006] atggcggtc ccttcacaaa cccaacattt tccccttcct caactccatt aaccaaaaacc 60
ctaaaatccc aatcttccat ctcttcaace ctcccccttt ccaccctccc caaaacccca 120
actccactct ttcaccgtcc cctccaaate tcctcctccc aatcccacaa atcatecgcc 180
attaaaaaac aaactcaage accctcttct ccagctattg aagattcatt ttctgtttct 240
cgatttggcc ctgatgaacc cagaaaaggg tccgatgtcc tcgttgaagc tcttgagcgt 300
gaaggtgtta ccaatgtgtt tgcttaccct ggtggtgcat ctatggaaat ccaccaagct 360
ctcacacgct ctaaaaccat cegcaatgtc ctccctegcc atgaacaagg cgggggtttc 420
gccgccgagg gatatgctag agctactgga aaggttggtg tctgcattgc gacttctggt 480
cctggtgcta ccaacctegt atcaggtctt gctgacgctc tccttgatc tgctccctct 540
gttgccatca ctggccaagt tccacgcct atgattggca ctgatgctt tcaggagact 600
ccaattgttg aggtgacaag gtctattact aagcataatt atttagtttt ggatgtagag 660
gatattccta gaattgttaa ggaagccttt ttttagcta attctggtag gcctggacct 720
gttttgattg atcttcttaa agatattcag cagcaattgg ttgttctga ttgggatagg 780

	ccttttaagt tgggtgggta tatgtctagg ctgccaaagt ccaagttttc gacgaatgag	840
	gttggacttc ttgagcagat tgtgagggtg atgagtgagt cgaagaagcc tgtcttgtat	900
	gtgggaggtg ggtgtttgaa ttctagttag gagttgagga gatttgttga gttgacaggg	960
	attccggtgg ctagtacttt gatgggggtg gggctcttacc ctgtaatga tgaactgtct	1020
	cttcatatgt tggggatgca cgggactgtt tatgccaatt atgcggtgga taaggcggat	1080
	ttgttgett gcttccgggt taggtttgat gatcgtgtga ccgggaagct cgaggcggtt	1140
	gctagccgtg ctaagattgt gcatattgat attgactctg ctgagattgg gaagaacaag	1200
	cagcccatg tgtccatttg tgctgatgtt aaattggcat tgcgggggtat gaataagatt	1260
	ctggagtcta gaatagggaa gctgaatttg gatttctcca agtggagaga agaattaggt	1320
	gagcagaaga aggaattccc actgagtttt aagacatttg gggatgcaat tcctccacaa	1380
	tatgccattc aggtgcttga tgagttgacc aatggtaatg ctattataag tactgggtgt	1440
	gggcagcacc aaatgtgggc tgcgcagcat tacaagtaca gaaaccctcg ccaatggctg	1500
[0007]	acctctggtg gggtgggggc tatgggggtt ggctaccag ccgccattgg agctgcagtt	1560
	gctcgaccag atgcagtggg tgcgatatt gatggggatg gcagttttat tatgaatgtt	1620
	caagagttag ctacaattag ggtggaaaat ctcccagtta agataatgct gctaaacaat	1680
	caacatttag gtatggttgt ccaattggaa gataggttct ataaagctaa ccgggcacat	1740
	acataccttg gaaacccttc caaatctgct gatatcttcc ctgatatgct caaatteget	1800
	gaggcatgtg atattccttc tgcctgtgtt agcaacgtgg ctgatttgag ggccgccatt	1860
	caaacaatgt tggatactcc agggccgtac ctgctcgatg tgattgtacc gcatcaagag	1920
	catgtgttgc ctatgattcc aagtgtgccc ggtttcaagg ataccattac agagggtgat	1980
	ggaagaacct cttattga	1998

<210> 4
 <211> 665
 <212> PRT
 <213> 甜菜

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (569)..(569)
<223> 用亮氨酸取代色氨酸

<400> 4

Met Ala Ala Thr Phe Thr Asn Pro Thr Phe Ser Pro Ser Ser Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Lys Thr Leu Lys Ser Gln Ser Ser Ile Ser Ser Thr Leu Pro
20 25 30

Phe Ser Thr Pro Pro Lys Thr Pro Thr Pro Leu Phe His Arg Pro Leu
35 40 45

Gln Ile Ser Ser Ser Gln Ser His Lys Ser Ser Ala Ile Lys Thr Gln
50 55 60

[0008]

Thr Gln Ala Pro Ser Ser Pro Ala Ile Glu Asp Ser Ser Phe Val Ser
65 70 75 80

Arg Phe Gly Pro Asp Glu Pro Arg Lys Gly Ser Asp Val Leu Val Glu
85 90 95

Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val Thr Asn Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly
100 105 110

Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Lys Thr Ile Arg
115 120 125

Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly
130 135 140

Tyr Ala Arg Ala Thr Gly Lys Val Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly
145 150 155 160

Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp
165 170 175

	Ser	Val	Pro	Leu	Val	Ala	Ile	Thr	Gly	Gln	Val	Pro	Arg	Arg	Met	Ile	
				180					185					190			
	Gly	Thr	Asp	Ala	Phe	Gln	Glu	Thr	Pro	Ile	Val	Glu	Val	Thr	Arg	Ser	
			195					200					205				
	Ile	Thr	Lys	His	Asn	Tyr	Leu	Val	Leu	Asp	Val	Glu	Asp	Ile	Pro	Arg	
		210					215					220					
	Ile	Val	Lys	Glu	Ala	Phe	Phe	Leu	Ala	Asn	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro	
	225					230					235					240	
	Val	Leu	Ile	Asp	Leu	Pro	Lys	Asp	Ile	Gln	Gln	Gln	Leu	Val	Val	Pro	
					245					250					255		
	Asp	Trp	Asp	Arg	Pro	Phe	Lys	Leu	Gly	Gly	Tyr	Met	Ser	Arg	Leu	Pro	
				260					265					270			
[0009]	Lys	Ser	Lys	Phe	Ser	Thr	Asn	Glu	Val	Gly	Leu	Leu	Glu	Gln	Ile	Val	
			275					280					285				
	Arg	Leu	Met	Ser	Glu	Ser	Lys	Lys	Pro	Val	Leu	Tyr	Val	Gly	Gly	Gly	
		290						295				300					
	Cys	Leu	Asn	Ser	Ser	Glu	Glu	Leu	Arg	Arg	Phe	Val	Glu	Leu	Thr	Gly	
	305					310					315					320	
	Ile	Pro	Val	Ala	Ser	Thr	Leu	Met	Gly	Leu	Gly	Ser	Tyr	Pro	Cys	Asn	
					325					330					335		
	Asp	Glu	Leu	Ser	Leu	His	Met	Leu	Gly	Met	His	Gly	Thr	Val	Tyr	Ala	
				340					345					350			
	Asn	Tyr	Ala	Val	Asp	Lys	Ala	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Phe	Gly	Val	Arg	
			355					360					365				
	Phe	Asp	Asp	Arg	Val	Thr	Gly	Lys	Leu	Glu	Ala	Phe	Ala	Ser	Arg	Ala	
		370					375					380					

Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys
385 390 395 400

Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Arg Gly
405 410 415

Met Asn Lys Ile Leu Glu Ser Arg Ile Gly Lys Leu Asn Leu Asp Phe
420 425 430

Ser Lys Trp Arg Glu Glu Leu Gly Glu Gln Lys Lys Glu Phe Pro Leu
435 440 445

Ser Phe Lys Thr Phe Gly Asp Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln
450 455 460

Val Leu Asp Glu Leu Thr Asn Gly Asn Ala Ile Ile Ser Thr Gly Val
465 470 475 480

[0010]

Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln His Tyr Lys Tyr Arg Asn Pro
485 490 495

Arg Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu
500 505 510

Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Ala Arg Pro Asp Ala Val Val Val
515 520 525

Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn Val Gln Glu Leu Ala
530 535 540

Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile Met Leu Leu Asn Asn
545 550 555 560

Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Leu Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala
565 570 575

Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Ser Lys Ser Ala Asp Ile
580 585 590

Phe Pro Asp Met Leu Lys Phe Ala Glu Ala Cys Asp Ile Pro Ser Ala
595 600 605

Arg Val Ser Asn Val Ala Asp Leu Arg Ala Ala Ile Gln Thr Met Leu
610 615 620

Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile Val Pro His Gln Glu
625 630 635 640

His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Ala Gly Phe Lys Asp Thr Ile
645 650 655

Thr Glu Gly Asp Gly Arg Thr Ser Tyr
660 665

[0011] <210> 5
<211> 2013
<212> DNA
<213> 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)

<400> 5
atggcggcgg caacaacaac aacaacaaca tcttcttctga tctcttctct caccaaacca 60
tctcttctct cctccaaatc accattacca atctccagat tctccctccc attctcccta 120
aaceccaaca aatcatcctc ctctctccgc cgccggcgta tcaaattccag ctctccctcc 180
tccatctcgg cegtgtcaa cacaaccacc aatgtcaca ccactccctc tccaaccaa 240
cctaccaaac ccgaacatt catctccga ttctgtccag atcaaccccg caaaggcgt 300
gatatcctcg tcgaagcttt agaacgtcaa ggcgtagaaa ccgtattcgc ttaccctgga 360
ggtgcatcaa tggagattca ccaagcctta acccgtctt cctcaatccg taacgtcctt 420
cctcgtcacg aacaaggagg tgtattcgca gcagaaggat acgtcgate ctcaggtaaa 480
ccaggtatct gtatagccac ttcaggctcc ggagctacaa atctcgtag cggtattgcc 540
gatgcgttgt tagatagtgt tctcttctga gcaatcacag gacaagtcct cgtcgtatg 600

	attggtacag atgcgtttca agagactccg attgttgagg taacgcgttc gattacgaag	660
	cataactatc ttgtgatgga tgttgaagat atccctagga ttattgagga agctttcttt	720
	ttagctactt ctggtagacc tggacctgtt ttggttgatg ttccctaaaga tattcaacaa	780
	cagcttgcga ttccctaattg ggaacaggct atgagattac ctggttatat gtctaggatg	840
	cctaaacctc cggaagattc tcatttggag cagattgta ggttgatttc tgagtctaag	900
	aagcctgtgt tgtatgttgg tgggtgtgtt ttgaattcta gcgatgaatt gggtaggttt	960
	gttgagctta cggggatccc tgttgcgagt acgttgatgg ggetgggac ttatccttgt	1020
	gatgatgagt tgtcgttaca tatgcttggg atgcatggga cgggtgatgc gaattacgct	1080
	gtggagcata gtgatttgtt gttggcgttt ggggtgaggt ttgatgatcg cgtcacgggt	1140
	aagcttgagg cttttgctag tagggctaag attgttcata ttgatattga ctctgctgag	1200
	attgggaaga ataagaetcc tcatgtgtct gtgtgtgttg atgtcaagct ggctttgcaa	1260
	gggatgaata aggttcttga gaaccgagct gaggagctta agcttgattt tggagtittg	1320
[0012]	aggaatgagt tgaacgtaca gaaacagaag ttcccggtga gctttaagac gtttggggaa	1380
	gctattcctc cacagtatgc gattaaggct cttgatgagt tgaetgatgg aaaagccata	1440
	ataagtaetg gtgtcgggca acatcaaattg tgggcggcgc agttctacaa ttacaagaag	1500
	ccaaggeagt ggctatcate aggaggcctt ggagctatgg gttttggact tctgtgtgcc	1560
	attggagcgt ctgttgetaa cctgatgca atagtgttg atattgacgg agatggaage	1620
	tttataatga atgtgcaaga gctggccaca atccgtgtag agcaacttcc agtgaagata	1680
	ctcttattaa acaaccagca tcttggcatg gttatgcaat gggaagatcg gttctacaag	1740
	gctaaccgag ctacacacatt tctcggggat ccggetcagg aggacgagat attcccgaac	1800
	atgttgetgt ttgcagcagc ttgcgggatt ccagcggcga gggtgacaaa gaaagcagat	1860
	ctccgagaag ctattcagac aatgctggat acaccaggac cttacctgtt ggatgtgatt	1920
	tgtccgcacc aagaacatgt gttgccgatg atcccagtg gtggcacttt caacgatgtc	1980
	ataacggaag gagatggccg gattaaatac tga	2013

<210> 6

<211> 670
 <212> PRT
 <213> 拟南芥

<400> 6

Met Ala Ala Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ser Ser Ser Ile Ser Phe
 1 5 10 15

Ser Thr Lys Pro Ser Pro Ser Ser Ser Lys Ser Pro Leu Pro Ile Ser
 20 25 30

Arg Phe Ser Leu Pro Phe Ser Leu Asn Pro Asn Lys Ser Ser Ser Ser
 35 40 45

Ser Arg Arg Arg Gly Ile Lys Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ile Ser Ala
 50 55 60

[0013]

Val Leu Asn Thr Thr Thr Asn Val Thr Thr Thr Pro Ser Pro Thr Lys
 65 70 75 80

Pro Thr Lys Pro Glu Thr Phe Ile Ser Arg Phe Ala Pro Asp Gln Pro
 85 90 95

Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Gln Gly Val
 100 105 110

Glu Thr Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln
 115 120 125

Ala Leu Thr Arg Ser Ser Ser Ile Arg Asn Val Leu Pro Arg His Glu
 130 135 140

Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Ser Ser Gly Lys
 145 150 155 160

Pro Gly Ile Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val
 165 170 175

	Ser	Gly	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Leu	Asp	Ser	Val	Pro	Leu	Val	Ala	Ile	
				180					185						190		
	Thr	Gly	Gln	Val	Pro	Arg	Arg	Met	Ile	Gly	Thr	Asp	Ala	Phe	Gln	Glu	
			195					200					205				
	Thr	Pro	Ile	Val	Glu	Val	Thr	Arg	Ser	Ile	Thr	Lys	His	Asn	Tyr	Leu	
		210					215					220					
	Val	Met	Asp	Val	Glu	Asp	Ile	Pro	Arg	Ile	Ile	Glu	Glu	Ala	Phe	Phe	
	225					230					235					240	
	Leu	Ala	Thr	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro	Val	Leu	Val	Asp	Val	Pro	Lys	
					245					250						255	
	Asp	Ile	Gln	Gln	Gln	Leu	Ala	Ile	Pro	Asn	Trp	Glu	Gln	Ala	Met	Arg	
			260						265					270			
[0014]	Leu	Pro	Gly	Tyr	Met	Ser	Arg	Met	Pro	Lys	Pro	Pro	Glu	Asp	Ser	His	
			275					280						285			
	Leu	Glu	Gln	Ile	Val	Arg	Leu	Ile	Ser	Glu	Ser	Lys	Lys	Pro	Val	Leu	
		290					295					300					
	Tyr	Val	Gly	Gly	Gly	Cys	Leu	Asn	Ser	Ser	Asp	Glu	Leu	Gly	Arg	Phe	
	305					310					315					320	
	Val	Glu	Leu	Thr	Gly	Ile	Pro	Val	Ala	Ser	Thr	Leu	Met	Gly	Leu	Gly	
				325						330					335		
	Ser	Tyr	Pro	Cys	Asp	Asp	Glu	Leu	Ser	Leu	His	Met	Leu	Gly	Met	His	
				340					345					350			
	Gly	Thr	Val	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Val	Glu	His	Ser	Asp	Leu	Leu	Leu	
			355					360					365				
	Ala	Phe	Gly	Val	Arg	Phe	Asp	Asp	Arg	Val	Thr	Gly	Lys	Leu	Glu	Ala	
		370					375					380					

Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu
385 390 395 400

Ile Gly Lys Asn Lys Thr Pro His Val Ser Val Cys Gly Asp Val Lys
405 410 415

Leu Ala Leu Gln Gly Met Asn Lys Val Leu Glu Asn Arg Ala Glu Glu
420 425 430

Leu Lys Leu Asp Phe Gly Val Trp Arg Asn Glu Leu Asn Val Gln Lys
435 440 445

Gln Lys Phe Pro Leu Ser Phe Lys Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro Pro
450 455 460

Gln Tyr Ala Ile Lys Val Leu Asp Glu Leu Thr Asp Gly Lys Ala Ile
465 470 475 480

[0015]

Ile Ser Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Tyr
485 490 495

Asn Tyr Lys Lys Pro Arg Gln Trp Leu Ser Ser Gly Gly Leu Gly Ala
500 505 510

Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Pro
515 520 525

Asp Ala Ile Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn
530 535 540

Val Gln Glu Leu Ala Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Val
545 550 555 560

Leu Leu Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Met Gln Trp Glu Asp
565 570 575

Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Phe Leu Gly Asp Pro Ala
580 585 590

Gln Glu Asp Glu Ile Phe Pro Asn Met Leu Leu Phe Ala Ala Ala Cys
595 600 605

Gly Ile Pro Ala Ala Arg Val Thr Lys Lys Ala Asp Leu Arg Glu Ala
610 615 620

[0016]

Ile Gln Thr Met Leu Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile
625 630 635 640

Cys Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Asn Gly Gly Thr
645 650 655

Phe Asn Asp Val Ile Thr Glu Gly Asp Gly Arg Ile Lys Tyr
660 665 670