



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102604964 B

(45) 授权公告日 2015. 08. 19

(21) 申请号 201210057248. 2

Gallie, D. R. et al. . 登录号 :AAR25569.

(22) 申请日 2008. 07. 18

《GenBank》. 2004,

(30) 优先权数据

审查员 王子晔

60/950, 853 2007. 07. 19 US

(62) 分案原申请数据

200880023173. 8 2008. 07. 18

(73) 专利权人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 丹尼尔·R·加利

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int. Cl.

C12N 15/29(2006. 01)

C12N 15/63(2006. 01)

C07K 14/415(2006. 01)

A01H 5/00(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1782076 A, 2006. 06. 07,

US 2005066389 A1, 2005. 03. 24,

权利要求书1页 说明书23页

序列表11页 附图1页

(54) 发明名称

通过靶向的乙烯信号传导的减少来增加谷物
产量

(57) 摘要

本发明涉及植物遗传工程。具体地, 本发明涉及通过抑制乙烯产生绿叶并增加产量。本发明的组合物与方法涉及干扰乙烯信号传导的显性负性乙烯受体。

1. 分离的多核苷酸,其编码不结合乙烯的乙烯受体多肽,其中:
 - (a) 所述不结合乙烯的乙烯受体多肽由 SEQ ID NO:6 的序列组成;并且
 - (b) 所述不结合乙烯的乙烯受体多肽的表达产生植物的滞绿表型。
2. 如权利要求 1 所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸由 SEQ ID NO:5 的序列组成。
3. 重组表达盒,其包含权利要求 1 所述的多核苷酸和可操作地连接至权利要求 1 所述的多核苷酸的启动子序列。
4. 产生具有滞绿表型的转基因植物的方法,其包含将权利要求 3 所述的表达盒导入植物。
5. 如权利要求 4 所述的方法,其中所述植物是谷物植物。
6. 如权利要求 4 所述的方法,其中所述植物是玉米。
7. 降低植物中乙烯敏感性的方法,其包括下述步骤:
 - (a) 导入表达盒,所述表达盒包含可操作地连接至启动子的权利要求 1 所述的分离的多核苷酸;以及
 - (b) 选择乙烯敏感性降低的植物。
8. 在植物中产生滞绿表型的方法,其包括下述步骤:
 - (a) 导入表达盒,所述表达盒包含可操作地连接至启动子的权利要求 1 所述的分离的多核苷酸;以及
 - (b) 选择具有滞绿特征的植物。
9. 如权利要求 8 所述的方法,其中基于增加的光合作用能力选择所述植物。
10. 如权利要求 8 所述的方法,其中基于一粒种子中有多个胚的表型选择所述植物。
11. 如权利要求 8 所述的方法,其中基于延迟的衰老选择所述植物。
12. 如权利要求 8 所述的方法,其中基于所述生物标志物的检测选择所述植物。
13. 如权利要求 8 所述的方法,其中所述植物是谷物植物。
14. 如权利要求 8 所述的方法,其中所述植物是玉米。

通过靶向的乙烯信号传导的减少来增加谷物产量

[0001] 发明背景

[0002] 已知乙烯为植物发育期间程序性细胞死亡 (PCD) 的调节物 (Campbell and Drew, *Planta* 157:350-357(1983); Drew et al., *Planta* 147:83-88(1979); He et al., *Plant Physiol.* 112:1679-1685(1996)) 并在发育中的谷物胚乳中用于协调 PCD: 外源乙烯能加速发育中的胚乳中的细胞死亡程序的发作, 而乙烯生物合成或感受的抑制剂延迟了该程序 (Young et al., *Plant Physiol.* 119:737-751(1997); Young and Gallie, *Plant Mol. Biol.* 39:915-926(1999); Young and Gallie, *Plant Mol. Biol.* 42:397-414(2000))。乙烯调控植物生长和发育的许多方面, 例如果实的发育、根和叶的生长以及种子的发芽。

[0003] 乙烯的感受与定位于膜的受体有关, 在拟南芥 (*Arabidopsis*) 中, 所述受体包括 ETR1、ERS1、ETR2、ERS2 以及 EIN4 (Chang et al., *Science* 262:539-544(1993); Hua et al., *Science* 269:1712-1714(1995), Hua et al., *Plant Cell* 10:1321-1332(1998), Sakai et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5812-5817(1998))。ETR1、ETR2 和 EIN4 包含 3 个结构域: N-末端跨膜乙烯结合结构域 (Schaller and Bleeker, *Science* 270:1809-1811(1995))、组氨酸蛋白激酶结构域和 C-末端接收结构域 ERS1 和 ERS2 没有接收结构域。基于同源性, 这些基因被分为两个亚家族, 其中 ETR1 和 ERS1 组成一个亚家族, 而 ETR2、ERS2 和 EIN4 组成另一个亚家族 (Hua et al., *Plant Cell* 10:1321-1332(1998))。ETR1 和 ERS1 都含有功能性组氨酸激酶结构域和自磷酸化组氨酸残基, 而另一家族成员没有组氨酸激酶活性所需的特殊残基。然而, 体外试验表明 ETR2、ERS2 和 EIN4 能在丝氨酸和苏氨酸残基上自磷酸化 (Moussatche and Klee (2004), *J. Biol. Chem.*, 279:48734)。

[0004] 与在拟南芥中鉴定了 5 种类型的基因相比, 在玉米中仅鉴定了两个乙烯受体基因 (即, ZmETR2 和 ZmERS1) (Gallie and Young (2004) *Mol Genet Genomics* 271:267-281)。ZmETR2 存在称为 ZmETR9 和 ZmETR40 的两个变体。与胚乳相比, 在发育中的胚中, 两个乙烯受体家族的成员的表达水平都显著提高。这解释了尽管胚乳和胚都有助于合成乙烯的事实, 为什么发育中的胚乳表现出对乙烯诱导的细胞死亡的低阈值而胚则受到保护。

[0005] 谷物的胚乳是谷粒的主要存储器官, 但在中期至晚期的种子发育期间经历细胞死亡。乙烯在发育中的胚乳中调节细胞死亡发作的时机。因为乙烯是能自由地通过膜的气体, 发育中的谷粒的所有器官都被认为暴露于乙烯, 所述乙烯由特定器官产生并且仅被它们距离产生源的距离所稀释。将细胞死亡局限于发育中的谷粒的特定器官的能力表明了对乙烯生物合成和感受机构的表达的严格控制。

[0006] 乙烯在光合作用中的作用还不清楚。光合作用在诸如干旱、臭氧暴露或寒冷的应激条件下经常被抑制 (Flexas and Medrano (2002), *Annals Bot.* 89:183-189; Chaves et al. (2002), *Annals Bot.* 89:907-916; Ramachandra et al. (2004), *J Plant Physiol.* 161:1189-1202)。光合作用的能力在展叶 (leaf expansion) 期升高并随着叶龄降低, 直至光合作用的能力达到叶衰老开始前的低水平 (Gay and Thomas (1995), *New Phytol.* 130:159-168)。衰老程序的起始速率和进行显著影响叶对植物的最终贡献。这与那些诸如谷物的农作物特别相关, 其中通过诱导过早叶衰老的不良环境条件降低了产量潜力。

[0007] 乙烯对光合作用的影响是有争议的,有的报道表明乙烯对光合作用没有影响,有的则表明有抑制作用 (Pallaghy and Raschke(1972), Plant Physiol. 49 :275-276 ;Kays and Pallas(1980), Nature 285 :51-52 ;Pallas and Kays(1982), Plant Physiol. 70 :598-601 ;Squier et al. (1985), Environ Sci Technol 19 :432-437 ;Taylor and Gunderson(1986), Merr. Plant Physiol. 86 :85-92 ;Woodrow et al. (1988), Mill. J Exp Bot. 39 :667-684)。物种、生长条件、完整相对切离的叶 (intact versus excised leaves) 以及所用的外源乙烯的浓度的差异可以是观察到的影响不同的原因。使用突变方法检测乙烯对玉米中光合作用活性和谷粒发育的影响 (Young et al. (2004), Plant J 40 :813-825)。在该研究中,作者发现乙烯产生缺陷的玉米突变体的叶绿素量和 CO₂ 同化作用速率相比野生型植物升高。

[0008] 由于乙烯在植物生长和发育中起到如此大的作用,鉴定与乙烯应答途径有关的基因可用于产生具有与改变的乙烯相关过程有关的表型的植物,诸如具有滞绿特性的植物与。因此,需要鉴定与谷物乙烯信号转导途径有关的基因。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明提供了影响植物中的乙烯信号转导途径的组合物和方法。

[0011] 本发明提供了能编码诸如显性负性 (dominant negative) ZmERS1、ZmETR9 或 ZmETR40 (分别用 SEQ ID NOs :2、4 和 6 表示) 的显性负性乙烯受体多肽的分离的核酸。另外,本发明包括编码这些多肽的每一个的多核苷酸序列 (例如,SEQ ID NOs :1、3 和 5)。本发明的多核苷酸包含与 SEQ ID NOs :1、3 和 5 具有至少 90%一致性的序列,并且更通常地,与 SEQ ID NOs :1、3 和 5 具有至少 95%、99%或 100%一致性的序列。在本发明的某些实施方案中,分离的核酸编码与 SEQ ID NO :2 具有至少 90%,更通常地,具有至少 95%、99%或 100%的一致性的多肽,其中氨基酸 65 不是半胱氨酸。在某些实施方案中,SEQ ID NO :2 的氨基酸 65 是酪氨酸。在某些实施方案中,分离的核酸编码与 SEQ ID NO :4 具有至少 90%,更通常地,具有至少 95%、99%或 100%一致性的多肽,其中氨基酸 102 不是半胱氨酸。在某些实施方案中,SEQ ID NO :4 的氨基酸 102 是酪氨酸。在某些实施方案中,分离的核酸编码与 SEQ ID NO :6 具有至少 90%,更通常地,具有至少 95%、99%或 100%一致性的多肽,其中氨基酸 102 不是半胱氨酸。在某些实施方案中,SEQ ID NO :6 的氨基酸 102 是酪氨酸。

[0012] 在某些实施方案中,所述核酸编码 ZmERS1 和 ZmETR2 的截断突变体 (例如,包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸 1-110 或 SEQ ID NOs :4 和 6 的氨基酸 1-147)。在这些实施方案中,所述截断突变体可以稍微更长,例如 SEQ ID NO :2 的 1-150、1-200、1-250、1-300、1-325 或 1-350 或者 SEQ ID NO :4 或 6 的氨基酸 1-200、1-250、1-300、1-350 或 1-375。

[0013] 在某些实施方案中,本发明提供了包含可操作地连接至核酸序列的启动子序列的重组表达盒,所述核酸序列编码显性负性乙烯受体多肽,例如显性负性 ZmERS1、ZmETR9 或 ZmETR40 (分别用 SEQ ID NOs :2、4 和 6 表示)。在某些实施方案中,所述核酸编码 ZmERS1 和 ZmETR2 的截断突变体 (例如,包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸 1-110 或 SEQ ID NO :4 或 6 的氨基酸 1-147)。另外,本发明包括 SEQ ID NOs :1、3 和 5 的多核苷酸序列,以及与 SEQ ID NOs :1、3 和 5 具有至少 90%,更通常地,具有至少 95%、99%或 100%一致性的核酸序列。

[0014] 在某些实施方案中,本发明提供了包含重组表达盒的转基因植物,所述重组表达盒包含可操作地连接至编码本发明的显性负性乙烯受体多肽的核酸序列的启动子序列。在

某些实施方案中,所述核酸编码 ZmERS1、ZmETR9 或 ZmETR40 (分别用 SEQ ID NOs :2、4 和 6 表示)。在其它实施方案中,显性负性乙烯受体多肽包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸 1-110 或 SEQ ID NO :4 或 6 的氨基酸 1-147。在某些实施方案中,所述核酸序列是 SEQ ID NO :1、3 或 5,以及与 SEQ ID NOs :1、3 和 5 至少 90%一致,并且更通常地,与 SEQ ID NOs :1、3 和 5 至少 95%、99%或 100%一致的核酸序列。在某些实施方案中,所述转基因植物是谷物植物,例如小麦、水稻、大麦、黑麦、小米、高粱或燕麦。在某些实施方案中,所述转基因植物是玉米。

[0015] 在另外的实施方案中,本发明提供了降低植物乙烯敏感性的方法,所述方法包括下述步骤:(a) 导入构建体 (construct),所述构建体包含可操作地连接至编码显性负性乙烯受体多肽的核酸序列的启动子,以及 (b) 选择具有降低的乙烯敏感性的植物。优选的显性负性乙烯受体多肽包括 ZmERS1、ZmETR9 或 ZmETR40 (分别用 SEQ ID NOs :2、4 和 6 表示)。在其它实施方案中,所述显性负性乙烯受体多肽包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸 1-110 或 SEQ ID NO :4 或 6 的氨基酸 1-147。在某些实施方案中,所述核酸序列是 SEQ ID NOs :1、3 或 5,以及与 SEQ ID NOs :1、3 或 5 至少 90%一致,并且更通常地,与 SEQ ID NOs :1、3 或 5 至少 95%、99%或 100%一致的核酸序列。

[0016] 在另一方面,本发明提供了产生植物中的滞绿表型的方法。所述方法包括下述步骤:(a) 导入构建体,所述构建体包含可操作地连接至编码显性负性乙烯受体多肽的核酸序列的启动子,以及 (b) 选择具有滞绿特征的植物。在某些实施方案中,所述乙烯受体多肽包括 ZmERS1、ZmETR9 或 ZmETR40 (分别用 SEQ ID NOs :2、4 和 6 表示)。在其它实施方案中,所述显性负性乙烯受体多肽包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸 1-110 或 SEQ ID NO :4 或 6 的氨基酸 1-147。在某些实施方案中,所述核酸序列是 SEQ ID NOs :1、3 或 5,以及与 SEQ ID NOs :1、3 或 5 至少 90%一致,并且更通常地,与 SEQ ID NOs :1、3 或 5 至少 95%、99%或 100%一致的核酸序列。在某些实施方案中,基于延迟的衰老、增加的光合作用能力或一粒种子中有多个胚来选择植物。

[0017] 通过下文的详细描述,本发明的其它目地、优势和实施方案将是显而易见的。

[0018] 附图简述

[0019] 图 1 :通过在拟南芥中表达突变的 ZmERS1 或 ZmETR2 而赋予的乙烯不敏感性随一系列 ACC 浓度的定量。使表达突变的 ZmERS1 (MS1-11) 或 ZmETR2 (MT2-9) 的种子在所示浓度的 ACC 上发芽并在黑暗中生长 5 天。将野生型种子 (WT) 包括在内作为对照。

[0020] 发明详述

[0021] A. 介绍

[0022] 本发明提供了通过抑制植物中的乙烯应答来延迟玉米植物中的衰老的新方法。可以通过乙烯受体蛋白的突变以及野生型或突变体乙烯受体蛋白的过表达实现衰老的延迟。本发明还提供了选择具有延迟的衰老模式或特征的谷物植物的方法。延迟的衰老模式会产生与野生型植物相比具有改变的表型的谷类植物。改变的表型包括但不限于滞绿特性,例如叶在生长季节的晚期保持绿色、增加的光合作用能力、改进的耐旱性、改进的青贮 (silage)、增加的谷物产量和增加的对较高密度种植的耐受性以及多胚的谷粒。因此,通过抑制乙烯应答,仅通过突变的乙烯受体蛋白的产生或结合其它方法,可以鉴定生物量和 / 或产量增加的植物。

[0023] B. 定义

[0024] 短语“核酸”或“多核苷酸序列”指的是从 5' 至 3' 末端阅读的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸碱基的单链或双链聚合物。核酸还可以包括修饰的核酸,其使多聚酶正确地连读而不改变所述核酸编码的多肽的表达。

[0025] 短语“编码... 的核酸序列”指的是指导特定蛋白或肽的表达的核酸。所述核酸序列包括转录成 RNA 的 DNA 链序列和翻译成蛋白质的 RNA 序列这两者。所述核酸序列包括全长核酸序列以及来自所述全长序列的非全长序列这两者。还应当理解,所述序列包括天然序列或可以被导入以在特定宿主细胞中提供密码子偏爱性的序列的简并密码子。

[0026] 术语“启动子”指的是位于转录起始上游或下游的区域或序列决定簇,并且所述启动子与起始转录的 RNA 多聚酶及其它蛋白的识别和结合有关。“植物启动子”是能在植物细胞中起始转录的启动子。这种启动子不需要是植物来源的,例如,能在本发明中使用诸如 CaMV35S 的来自植物病毒的启动子。

[0027] 术语“植物”包括完整植物、枝条营养器官 / 结构 (例如,叶、茎和块茎)、根、花和花器官 / 结构 (例如,苞、萼片、花瓣、雄蕊、心皮、花药和胚珠)、种子 (包含胚、胚乳和种皮) 和果实 (成熟子房)、植物组织 (例如,维管组织、基本组织等) 和细胞 (例如,保卫细胞、卵细胞、毛状体等) 及其后代。能用于本发明的方法中的植物种类一般与可用转化技术处理的高等和低等植物的种类一样多,其包括被子植物 (单子叶和双子叶植物)、裸子植物、蕨类植物、苔藓植物以及多细胞藻类。所述植物包括各种倍性水平,其包括非整倍体、多倍体、二倍体、单倍体以及半合子。

[0028] 短语“宿主细胞”指的是来自任何生物的细胞。优选的宿主细胞来自植物、细菌、酵母、真菌、昆虫或其它动物。将多核苷酸序列导入不同类型的宿主细胞的方法在本领域是熟知的。

[0029] 如果多核苷酸序列来自外源物种或者如果来自相同物种,但被人为地修饰其原始形式,所述多核苷酸序列与第二多核苷酸序列是“异源的”。例如,可操作地连接至启动子的异源编码序列指的是来自与启动子来源的物种不同的物种的编码序列,可选择地,如果来自相同的物种,与任何天然存在的等位基因变体不同的编码序列。

[0030] 对个体植物而言的“外源”的多核苷酸是通过除有性杂交之外的方式被导入所述植物或所述植物的上一代的多核苷酸。下文将描述能实现该结果的方法的实例,并且所述方法的实例包括农杆菌介导 (agrobacterium-mediated) 的转化、生物导弹法 (biolistic methods)、电穿孔、植物原位 (in planta) 技术等。

[0031] 本发明的具体多肽或核酸的“增加或增强的表达或活性”指的是多肽的活性的增大变化。这种增加的活性或表达的实例包括下述内容:多肽的活性或编码所述多肽的基因的表达增加 (或存在更长的时间段) 至高于野生型、非转基因对照植物的水平的水平。多肽的活性或基因的表达存在于器官、组织或细胞中,其中所述多肽的活性或基因的表达在野生型、非转基因对照植物中通常检测不到 (即,多肽或编码多肽的基因的表达的空间分布发生改变)。

[0032] 本发明的多肽或核酸的“降低的表达或活性”指的是多肽的活性降低。这种降低的活性或表达的实例包括下述内容:多肽的活性或基因的表达降低至低于野生型、非转基因对照植物的水平。

[0033] 本文所用的术语“生殖结构”或“生殖组织”包括果实、胚珠、种子、花粉、花或诸如

雌蕊、雄蕊、花药、萼片、花瓣、心皮的花部分或任何胚性组织。

[0034] 本文所用的术语“营养结构”或“营养组织”包括叶、茎、块茎、根、维管组织或根和枝条分生组织。

[0035] “表达盒”指的是核酸构建体,当被导入宿主细胞时,所述核酸构建体分别引起 RNA 或多肽的转录和 / 或翻译。不或不能被翻译的反义或正义结构特别地包括在本定义中。

[0036] 在转基因的表达和内源基因的抑制(例如,通过反义或正义抑制)这两者的情况下,技术人员会认识到,插入的多核苷酸序列不需要与其来源的基因的序列完全相同,而是可以“基本相同”。如下文解释的,该术语特别地包含这些变体。

[0037] 在插入的多核苷酸序列被转录和翻译以产生功能化多肽的情况下,技术人员会认识到,由于密码子简并性,许多多核苷酸序列将编码相同的多肽。术语“本发明的基因的多核苷酸序列”特别地包括这些变体。另外,该术语特别地包括与编码本发明的多肽的基因序列基本相同(如下文所述测定)的序列(例如,全长序列)和编码保留本发明多肽的功能的蛋白的序列。

[0038] 在多核苷酸被用于抑制内源基因的表达的情况下,导入的序列不需要与靶内源基因的序列完全相同。导入的多核苷酸序列通常至少与靶内源序列基本相同(如下文所述测定)。

[0039] 如果当如下文所述进行最大对应性的比对时,两个核酸序列或多肽序列中的核苷酸或氨基酸残基序列分别是相同的,则这两个核酸序列或多肽被认为是“一致”的。本文所用的术语“互补”表示序列与全部或部分参考多核苷酸序列互补。

[0040] 可通过下述进行用于比较的序列的最佳比对:Smith 和 Waterman, *Add. APL. Math.* 2:482(1981) 的局部同源算法、Needleman 和 Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443(1970) 的同源比对算法、Pearson 和 Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444(1988) 的寻找相似性方法、这些算法的计算机实现(Wisconsin遗传学软件包(Wisconsin Genetics Software Package)中的 GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA 和 TFASTA, Genetics Computer Group(GCG), 575Science Dr., Madison, WI) 或目测(inspection)。

[0041] 通过在比较窗口上比较两个最佳比对的序列测定“序列一致性百分比”,其中为了两个序列的最佳比对,与参考序列相比(其不包含增加或缺失),比较窗口中的多核苷酸序列部分可以包含添加或缺失(即,空位)。百分比通过下述方法计算:确定两个序列中存在相同核酸碱基或氨基酸残基的位置的数目,从而获得匹配的位置的数目,将匹配的位置的数目除以比较窗口中位置的总数并将结果乘以 100,从而获得序列一致性的百分比。

[0042] 术语多核苷酸序列“基本一致”表示多核苷酸包含具有与显性负性乙烯受体多核苷酸(例如,SEQ ID NO:1、3 或 5)至少 85%一致性的序列。可选择地,一致性百分比(percent identity)可以是 85%至 100%的任何整数。利用本文所述的程序,大部分实施方案包括相比于参照序列的至少 85%、90%、95%或 99%的一致性;如下文所述,优选使用标准参数的 BLAST。因此,本发明的方法所用的编码多肽的序列包括与本文公开的序列基本相同的核酸序列。技术人员会理解,通过考虑密码子简并性、氨基酸相似性、阅读框定位等,能合适地调整这些值以确定对应的两个核苷酸序列编码的蛋白质的一致性。

[0043] 用于这些目的的氨基酸序列的基本一致表示与显性负性乙烯受体多肽(例如,SEQ ID NO:2、4 或 6)的序列一致性至少为 90%。多肽的一致性百分比可以是 90%至 100%

的任何整数,例如 90%、95%或 99%。“基本相似”的多肽共享如上所指出的序列,除了不一致的残基位置可以由于保守氨基酸的变化而不同。保守氨基酸取代指的是具有相似侧链的氨基酸的可互换性。例如,一组具有脂肪族侧链的氨基酸是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;一组具有脂肪族羟基侧链的氨基酸是丝氨酸和苏氨酸;一组具有含酰胺侧链的氨基酸是天冬酰胺和谷氨酰胺;一组具有芳香族侧链的氨基酸是苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;一组具有碱性侧链的氨基酸是赖氨酸、精氨酸和组氨酸;以及一组具有含硫侧链的氨基酸是半胱氨酸和甲硫氨酸。保守氨基酸取代组合包括:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、天冬氨酸-谷氨酸以及天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0044] 核苷酸序列基本一致的另一指示是两个分子在严紧条件下是否互相杂交,或与第三个核酸杂交。严紧条件是序列依赖性的并在不同的情况下不同。一般地,严紧条件被选择在确定离子强度和 pH 的条件下,比特定序列的热熔点 (T_m) 低约 5°C。 T_m 是 50%的靶序列与完全匹配的探针杂交的温度(在确定的离子强度和 pH 的条件下)。通常,严紧条件是 pH 为 7 时,盐浓度为约 0.02 摩尔并且温度至少为约 60°C 或 65°C。

[0045] 出于本发明公开的目的,杂交的严紧条件是包括于 63°C 下进行 20 分钟、在 0.2X SSC 中、至少洗涤一次在内的那些条件,或等同条件。中等严紧条件包括于至少约 50°C,通常约 55°C 的温度下进行 20 分钟、在 0.2X SSC 中、至少洗涤一次(通常 2 次),或等同条件。

[0046] 短语“与乙烯相关过程有关的表型”指的是由乙烯调节的表型。示例性的表型包括但不限于,滞绿特性,诸如改进的耐旱性、改进的青贮、叶在生长季节的晚期保持绿色和增加的对更高密度种植的耐受性。乙烯相关过程的调节能来自,例如,乙烯的过量产生、乙烯的产生不足、对细胞中乙烯的敏感性增加或对细胞中乙烯的敏感性降低。

[0047] 术语“乙烯受体”或“乙烯受体蛋白”指的是来自存在于植物中的任何乙烯受体家族的乙烯受体。作为示例,在拟南芥中,乙烯受体蛋白包括 ETR1、ERS1、ETR2、ERS2 和 EIN4。玉米 (*Zea mays*) 乙烯受体蛋白包括 ZmERS1 和 ZmETR2(包括 ZmETR2 变体 ZmETR9 和 ZmETR40)。如本文所用的,能同义地使用“ETR2”、“ZmETR2”、“ZmETR9”和“ZmETR40”。类似地,能同义地使用“ERS1”和“ZmERS1”。

[0048] 可以从任何物种的植物中分离本发明的乙烯受体,所述乙烯受体包括示例性乙烯受体的物种同系物。乙烯受体还包括天然存在和具有诱导突变的蛋白质,所述突变包括插入、缺失和点突变。

[0049] “显性负性”指的是基因产物,所述基因产物在相同的细胞内,甚至在该细胞是杂合子(野生型和显性负性)时,对正常、野生型基因产物的功能有不利影响。所述显性负性突变体的表达通常导致正常功能的下降。可以通过保留二聚体化结构域,但破坏或截断蛋白的其它功能结构域形成“显性负性乙烯受体”。例如,不结合乙烯的乙烯受体突变体(在本文中称为“不结合乙烯的乙烯受体”)以显性负性方式起作用。本发明的不结合乙烯的乙烯受体包括 SEQ ID NOs :2、4 和 6 的多肽及其基本上相同的变体,只要 SEQ ID NO :2 的氨基酸残基 65 或 SEQ ID NOs :4 或 6 的氨基酸残基 102 不是半胱氨酸。

[0050] 乙烯受体多肽通过位于多肽的 N 末端的二硫键成为二聚物(参见,例如, Schaller et al. (1995) J. Biol. Chem. 270 :12526-30)。为了乙烯受体的目的,所述“二聚体化结构域”指的是介导这种二聚作用的 N 末端半胱氨酸中的至少一个。与二聚作用有关的半胱氨酸与

介导乙烯结合的半胱氨酸残基明显不同。ZmERS1 的二聚体化结构域被发现位于 SEQ ID NO : 2 的氨基酸 4 和 6。ZmETR9 和 ZmETR40 的二聚体化结构域分别位于 SEQ ID NO :4 的氨基酸 37 和 40 和 SEQ ID NO :6 的氨基酸 38 和 40。

[0051] 术语“乙烯结合结构域”大体上对应存在乙烯受体多肽的 N 末端的跨膜结构域。与 ZmERS1 中的乙烯结合有关的残基跨越 SEQ ID NO :2 的氨基酸 20-119。与 ZmETR2 的乙烯结合有关的残基跨越 SEQ ID NOs :4 和 6 的氨基酸 53-156。能利用本文所述的方法测试所述受体的乙烯结合能力。

[0052] 术语乙烯受体的“跨膜结构域”或“膜内区域”指的是跨越乙烯受体多肽的 3 或 4 个跨膜螺旋的区域。像大部分跨膜结构域一样,所述乙烯受体跨膜结构域主要是疏水的。在大部分乙烯受体多肽中,所述跨膜结构域大体上对应“乙烯结合结构域”。作为示例,所述 ZmERS1 的跨膜结构域大约跨越 SEQ ID NO :2 的氨基酸 20-107。所述 ZmETR2 的跨膜结构域大约跨越 SEQ ID NOs :4 和 6 的氨基酸 5-144。

[0053] 乙烯受体的“组氨酸激酶结构域”或“激酶结构域”指的是与信号转导途径有关的区域。ETR1 和 ERS1 受体在该区域中的保守组氨酸残基自磷酸化以应答乙烯。其它乙烯受体家族蛋白 (ETR2、ERS2 和 EIN4) 缺乏组氨酸激酶活性所需的残基。然而,这些蛋白仍然能赋予植物细胞乙烯应答性。

[0054] 仅在 ETR1、ETR2 和 EIN4 乙烯受体中发现“C 末端接收结构域”。所述接收结构域联合所述激酶结构域在调节应答中起作用。所述激酶结构域和接收结构域与 CTR1 相互作用以调节乙烯应答性。作为示例,所述 ETR2 的 C 末端接收结构域大约跨越 SEQ ID NOs :4 和 6 的氨基酸 612-767。

[0055] 术语“滞绿”指的是与野生型植物相比,杂交植物在进入生长季节后期保持植物健康的能力。滞绿特性涉及增加的谷物产量、增加的光合作用能力、改进的耐旱性、改进的青贮和增加的对更高密度种植的耐受性。利用标准分析可以方便地测定滞绿表型。例如,能使用黑暗诱导的衰老分析。这种分析通常包括覆盖仍然连接在植物上的叶达 1 周。光的缺乏诱导叶的衰老,与对照相比,本发明的植物的叶的衰老能被延迟。

[0056] 术语“光合作用能力”指的是植物将光能转变为化学能的能力。例如,通过测量植物结构中的叶绿素的量或 CO₂ 同化作用的量可以确定光合作用的能力。这些技术在本领域是已知的。

[0057] “生物标志物”是指示感兴趣的特性或基因的存在任何可检测标志物。在某些情况下,生物标志物是容易检测的表型,所述表型与感兴趣的特性或基因连锁或共分离 (cosegregates)。例如,某些生物标志物提供对化学或营养应激的抗性。在某些实施方案中,所述生物标志物是容易检测的蛋白,例如荧光团或类似的报道构建体。在某些实施方案中,所述生物标志物是核苷酸序列,例如单一限制位点或容易扩增的序列。生物标志物能用于指示转基因或内源基因的存在,例如特定的等位基因。生物标志物的用途在本领域是已知的并且可以改变所述技术以适应具体的情况。

[0058] C. 本发明的多肽的抑制活性

[0059] 本发明提供了通过抑制植物中乙烯受体蛋白的活性,调节乙烯相关过程的方法。在某些实施方案中,本发明提供了抑制植物中乙烯受体活性的方法,所述方法包括导入包含可操作地连接至编码乙烯受体的核酸序列的启动子的构建体,构建体所述核酸序列例如

SEQ ID NO :1、3 或 5、其变体或截断突变体。

[0060] 在某些实施方案中,能通过表达编码突变的显性负性多肽的转基因来制备本发明的多肽的无功能或显性负性突变。如上文所解释的,显性负性突变体多肽在相同的细胞中,甚至当该细胞是杂合子(野生型和显性负性)时,对正常、野生型基因产物的功能有不利影响。不希望被理论所约束,所述显性负性基因产物被认为起作用并与至少某些与野生型基因产物相同的成分相互作用,但阻断野生型功能的某些方面。

[0061] 显性负性突变的实例是作为二聚体起作用的蛋白质。除去功能性结构但是保留二聚体化结构域的突变导致显性负性表型,因为野生型蛋白的某些部分被无功能的蛋白结合,从而产生无功能的二聚体。乙烯受体蛋白符合这一模式,因为其作为同型二聚体在细胞膜中起作用。因此,作为实例,通过保留所述二聚体化结构域但破坏或截断蛋白的其它功能结构域可以形成显性负性乙烯受体。

[0062] 不结合乙烯的乙烯受体以显性负性方式起作用。因此,破坏 ZmERS1 或 ZmETR2 的乙烯结合结构域的至少一个残基能导致乙烯的不敏感性。例如,我们发现破坏 ZmERS1 中的 Cys65 和 ZmETR2 中的 Cys102 导致植物中的乙烯不敏感性。破坏乙烯结合结构域的其它残基也能干扰乙烯的结合,例如 ZmERS1 的残基 20-119、25-36 或 61-91 的任意残基或者 ZmETR2 的残基 53-156、58-67 或 90-120 的任意残基。

[0063] Mizukami et al., Plant Cell 8 :831-845(1996) 中描述了使用显性负性突变体以在转基因植物中产生失活的靶基因。如上文指出的,通过向植物中导入乙烯受体的显性负性突变体,该方法能用于降低植物中的乙烯敏感性。例如,改变的拟南芥 ERS 基因能用于提供显性乙烯不敏感性(Hua et al., Science 269 :1712-4(1995))。也使用了拟南芥 ETR1 突变体(Wilkinson et al., Nat Biotechnol., 15AU-I(1997) 和 Chang et al., Science, 262 :539-44(1993))。

[0064] 其它策略是抑制本发明的多肽与自身或其它分子相互作用的能力。例如,利用特异性抗体能实现这种策略。例如,抗体的细胞特异性表达能通过抗体:抗原识别使功能性结构域失活(参见, Hupp et al., Cell 83 :237-245(1995))。

[0065] 在某些实施方案中,本发明包括乙烯应答性降低的乙烯受体。在没有乙烯的条件下,乙烯受体负向调节乙烯应答途径。CTR1 介导乙烯受体蛋白的信号传导下游, CTR1 是涉及哺乳动物 RAF 型丝氨酸/苏氨酸激酶的乙烯应答的负向调节子(Kieber et al., Cell, 72 :427-441(1993))。乙烯的结合导致 CTR-1 的活性降低,并因此导致 EIN2(其作为 CTR-1 的下游)活性的增加,这最终导致乙烯应答性的升高(Bleeker and Schaller, Plant Physiol., 111 :653-660(1996); Hua and Meyerowitz, Cell, 72 :427-441(1998))。因此,乙烯的结合抑制负性受体信号传导。

[0066] 因此,可以通过防止乙烯与受体结合的突变或通过 CTR-1 引起组成型信号传导的突变提供显性负性乙烯不敏感性。显性负性乙烯不敏感性突变体的具体实例是拟南芥 ETR1 基因的 etr1-1 突变体。其在第二跨膜区域具有防止乙烯结合至受体的 Cys 至 Tyr 的突变。甚至在存在乙烯的条件下干扰乙烯结合或允许 CTR-1 信号传导的其它乙烯受体突变体在本领域是已知的(参见,例如, Wang et al., (2006), Plant Cell, 18 :3429-3442)。

[0067] 在某些实施方案中,乙烯受体蛋白的截断突变体用于提供乙烯不敏感性。所述截断可以位于乙烯受体的 N-末端或 C-末端或这两者。一个实例是缺乏组氨酸蛋白激酶和

C-末端接收结构域的乙烯受体。另一实例是缺乏跨膜区域后的细胞内结构域的截断突变体,例如,大约 SEQ ID NO:2 的残基 110 后或 SEQ ID NO:4 或 6 的残基 147 后。这些截断突变体能单独或结合其它突变用于降低乙烯的应答性。在某些实施方案中,所述截断突变体能稍微更长,例如,SEQ ID NO:2 的 1-150、1-200、1-250、1-300、1-325 或 1-350 或者 SEQ ID NO:4 或 6 的氨基酸 1-200、1-250、1-300、1-350 或 1-375。

[0068] 定点诱变技术可以用于本发明的核苷酸序列。例如,如 Sambrook 等人 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. (分子克隆: 实验室手册, 第二版), 1989 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, N. Y.) 的第 15.3 节所述, DNA 的限制性内切酶消化然后连接可以用于产生乙烯受体的缺失变体。如上文的 Sambrook 等人的第 15.3 节所述, 类似的策略可用于构建插入变体。最近, Zhu et al., (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:8768-73 发明了利用嵌合 RNA/DNA 寡核苷酸在体内将突变靶向植物基因的方法。

[0069] 寡核苷酸定向诱变也可用于制备本发明的取代变体。其还可以用于方便地制备本发明的缺失和插入变体。如 Adelman et al. (1983) DNA 2:183、上文的 Sambrook 等人 “Current Protocols in Molecular Biology (最新分子生物学方法)”, 1991, Wiley (NY), F. T. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. D. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl, eds 所述, 这种技术在本领域是熟知的。

[0070] PCR 技术也可以用于向靶核苷酸序列导入突变。例如, PCR 引物可以设计为将插入、缺失或点突变导入靶序列中。这些技术在本领域是被广泛了解的。

[0071] 上文的技术可以与其它方法组合以降低植物中的乙烯应答性。例如, 利用指定的启动子, 技术人员能指导外源乙烯受体 (例如, ERS1、ERS2、ETR1、ETR2 或 EIN4) 的表达并产生具有诸如滞绿特性的期望表型特征的植物。技术人员能从多种已知启动子中选择启动子, 不论组成型、诱导型、组织特异性启动子。在优选的实施方案中, 利用增加功能性乙烯受体的表达的方法降低乙烯敏感性。在另一优选实施方案中, 利用降低内源乙烯受体表达的方法降低乙烯敏感性。在第 10/876,086 号美国专利申请中详细地描述了这些方法, 该申请通过引用的方式全文并入本文。

[0072] D. 本发明所用的核酸的分离

[0073] 在某些实施方案中, 本发明提供了编码乙烯受体蛋白或其突变形式的分离的核酸。所述分离的核酸与乙烯受体基因的野生型多核苷酸序列至少 90% 一致。在一实施方案中, 所述分离的核酸包含来自玉米乙烯受体的序列。在示例性的实施方案中, 所述多核苷酸序列与 SEQ ID NO:1、3 或 5 至少 90% 一致, 并且更通常地, 95%、99% 或 100% 一致。在其它实施方案中, 能使用包含小于全长乙烯受体蛋白的截断突变体。在某些实施方案中, 所述截断突变体包含 N 末端跨膜结构域。在优选的实施方案中, 所述截断突变体包含 SEQ ID NO:1 的大约核苷酸 1-330 (编码 SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-110)。在另一优选实施方案中, 所述截断突变体包含 SEQ ID NO:3 或 5 的核苷酸 1-441 (分别编码 SEQ ID NOs:4 和 6 的氨基酸 1-147)。

[0074] 可以通过许多技术分离本发明所用的核酸。例如, 基于其它植物物种的乙烯受体基因的已知序列的寡核苷酸探针能用于从期望植物物种的 cDNA 或基因组 DNA 文库中鉴定期望的基因。为了构建基因组文库, 通过诸如使用限制性内切酶的随机断裂产生大片段的基因组 DNA, 并用载体 DNA 连接所述大片段的基因组 DNA 以形成能被包装入合适载体的串联

体(concatemers)。为了制备胚特异性 cDNA 文库,从胚中分离 mRNA 并且从所述 mRNA 制备含有基因转录本的 cDNA 文库。

[0075] 然后能利用基于克隆的乙烯受体基因的序列的探针筛选所述 cDNA 或基因组文库。探针可用于与基因组 DNA 或 cDNA 序列杂交以分离相同或不同植物物种中的同源基因。

[0076] 可选择地,能使用扩增技术从核酸样品中扩增感兴趣的核酸。例如,能使用聚合酶链式反应(PCR)技术直接从 mRNA、从 cDNA、从基因组文库或 cDNA 文库扩增所述基因的序列。例如,PCR 和其它体外扩增方法还能用于克隆编码待被表达的蛋白的核酸序列,制备作为用于检测样品中期望 mRNA 的存在、用于核酸测序或用于其它目的的探针的核酸。

[0077] 通过比较已知乙烯受体蛋白的序列得到合适的引物和探针,所述引物和探针用于鉴定植物组织中编码本发明的多肽的基因。对于 PCR 的一般概述,参见 PCR Protocols :A Guide to Methods and Applications(PCR 操作:方法和应用指南)。(Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. and White, T., eds.), Academic Press, San Diego(1990)。扩增条件取决于许多因素,所述因素包括引物长度、引物与靶序列之间的相同程度以及待扩增的靶序列的长度。通常的反应条件如下文所述。反应组分:10mM pH 为 8.3 的 Tris HCl、50mM 的氯化钾、1.5mM 的氯化镁、0.001% 的明胶、200 μ M 的 dATP、200 μ M 的 dCTP、200 μ M 的 dGTP、200 μ M 的 dTTP、0.4 μ M 的引物以及每 mL 100 单位的 Taq 聚合酶。程序:96 $^{\circ}$ C、3min., 96 $^{\circ}$ C、45sec 进行 30 个循环,50 $^{\circ}$ C、60sec, 72 $^{\circ}$ C、60sec, 然后 72 $^{\circ}$ C、5min.。

[0078] 可以通过如技术文献所述的熟知技术合成多核苷酸。参见,例如, Carruthers et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47:411-418(1982) 和 Adams et al., J. Am. Chem. Soc. 105:661(1983)。然后可以通过合成互补链并在合适条件下使这两条链一起退火,或者通过使用 DNA 聚合酶和合适的引物序列添加互补链获得双链 DNA 片段。

[0079] 本发明的序列的种类包括利用核酸序列和蛋白序列分析鉴定和表征的基因和基因产物,所述核酸序列包括 SEQ ID NOs :1、3 和 5,所述蛋白序列包括 SEQ ID NOs :2、4 和 6。编码本发明所用多肽的序列包括与 SEQ ID NOs :1、3 和 5 基本相同的核酸序列。编码本发明所用的多肽的序列包括那些编码与 SEQ ID NOs :2、4 和 6 基本相同的多肽序列的序列。

[0080] 一旦利用上文所述的方法分离了核酸,能使用标准方法确定所述核酸是否编码乙烯受体蛋白。编码本发明的多肽的核酸可以用于产生具有滞绿特性的转基因植物。例如,乙烯受体多肽的表达增强或增加的转基因植物会表现出与植物中改变的乙烯过程有关的表型,例如延迟的衰老,所述乙烯受体多肽与 SEQ ID NOs :2、4 或 6 或其截断突变体相同或基本相同。

[0081] 使用标准方法,技术人员可以将被认为编码,例如,乙烯受体多肽的推定核酸序列的序列与编码乙烯受体多肽的核酸序列进行比较以确定所述推定核酸序列是否编码真实的乙烯受体多肽。编码乙烯受体多肽的核酸,例如包含与 SEQ ID NOs :1、3 或 5 或其截断突变体相同或基本相同的序列的核酸,能用于本发明的方法中。

[0082] E. 重组载体的制备

[0083] 本发明提供了重组表达盒,所述重组表达盒包含可操作地连接至编码乙烯受体多肽序列的核酸序列的启动子序列。在某些实施方案中,所述乙烯受体是 ERS,例如, SEQ ID NO :1 或者 SEQ ID NO :1 的截断突变体所表示的 ERS1 核苷酸。在某些实施方案中,所述乙烯受体是 ETR,例如, SEQ ID NO :3 或 5 或者 SEQ ID NO :3 或 5 的截断突变体所表示的核苷

酸。

[0084] 为了使用上文的技术中分离的序列,制备了适合植物细胞转化的重组 DNA 载体。用于转化大量高等植物物种的技术是公知的,并且技术和科学文献,例如,Weising et al., Ann. Rev. Genet. 22 :421-477 (1988) 中描述了所述技术。编码期望的多肽的 DNA 序列,例如,编码全长蛋白的 cDNA 序列,优选地与转录和翻译起始调节序列组合,这将指导来自转化植物目的组织中的基因的序列的转录。

[0085] 例如,为了过表达,可以使用植物启动子片段,所述植物启动子片段指导再生植物的所有组织中的基因的表达。这种启动子在本文中称为“组成型”启动子并且在大多数环境条件下和发育或细胞分化状态下是有活性的。

[0086] 可选择地,植物启动子可以指导本发明的多核苷酸在特定组织(组织特异性启动子、器官特异性启动子)或特定环境条件(诱导型启动子)中的表达。

[0087] 如果期望合适的多肽表达,应包含位于编码区 3' - 末端的多聚腺苷酸化区域。所述多聚腺苷酸化区域可以源自天然基因、多种其它植物基因或 T-DNA。

[0088] 包含来自本发明的基因的序列(例如,启动子或编码区)的载体通常包含赋予植物细胞可选择的表型的标志物基因。例如,所述标志物可以编码生物杀伤剂抗性,具体地,抗生素抗性,例如对卡那霉素、G418、博来霉素、潮霉素的抗性,或者除草剂抗性,例如对草甘膦(glyphosate)、氯磺隆(chlorosulfuron)或草丁膦(glufosinate)的抗性。

[0089] 在植物细胞中重组表达诸如编码乙烯受体蛋白的核酸序列的本发明的核酸序列以增强和升高内源性植物转录因子的水平。例如,在植物细胞中重组表达本发明的乙烯受体核酸序列以增强和升高内源性乙烯受体多肽的水平。能制备多种不同的表达构建体,例如表达盒和适合植物细胞转化的载体。转化许多高等植物物种的技术是公知的,并且技术和科学文献中,例如,Weising et al., Ann. Rev. Genet. 22 :421-477 (1988) 中描述了所述技术。能将编码本发明所述多肽的 DNA 序列,例如编码全长乙烯受体蛋白的 cDNA 序列,与顺式作用(启动子和增强子)转录调节序列组合以指导在转化的植物的目的组织中转录的时机、组织类型和水平。也可以使用翻译调控元件。

[0090] 本发明提供了可操作地连接至启动子的编码乙烯受体多肽的核酸,所述启动子在某些实施方案中,能驱动植物中的编码序列的转录。例如,所述启动子可以源自植物或病毒来源。所述启动子可以是,例如,有组成型活性的、诱导的或组织特异性的。在本发明的重组表达盒、载体、转基因的构建中,可以选择和使用不同的启动子以差异地指导基因表达,例如在植物或动物的某些或全部组织中。通常,如上文所讨论的,通过分析对应本文所述的胚特异性基因的基因组克隆的 5' 序列鉴定期望的启动子。

[0091] 1. 组成型启动子

[0092] 可以使用在所有转化的细胞或组织中,例如,再生植物(regenerated plant)的细胞或组织中指导编码乙烯受体蛋白的核酸表达的启动子片段。这种启动子在本文中称为“组成型”启动子并且其在大多数环境条件和发育或细胞分化状态下是有活性的。组成型启动子的实例包括来自感染植物的病毒的组成型启动子,例如花椰菜花叶病毒(CaMV) 35S 转录起始区(参见,例如, Dagless, Arch. Viro. 142 :183-191 (1997))、源自根癌农杆菌(Agrobacterium tumefaciens)的 T-DNA 的 1' - 或 2' - 启动子(参见,例如,上文的 Mengiste (1997) ; 0' Grady, Plant Mol. Biol. 29 :99-108 (1995))、烟草花叶病毒的启

动子、玄参花叶病毒的启动子（参见，例如，Maiti, Transgenic Res. 6 :143-156(1997)）、诸如拟南芥肌动蛋白基因启动子的肌动蛋白启动子（参见，例如，Huang, Plant Mol. Biol. 33 :125-139(1997)）、醇脱氢酶 (Adh) 基因启动子（参见，例如，Millar, Plant Mol. Biol. 31 :897-904(1996)）、来自拟南芥的 ACT11(Huang et al., Plant Mol. Biol. 33 :125-139(1996)）、来自拟南芥的 Cat3(GenBank No. U43147, Zhong et al., Mol. Genet. 251 :196-203(1996)）、来自甘蓝型油菜 (Brassica napus) 的编码硬脂酰 - 酰基载体蛋白脱饱和酶的基因 (Genbank No. X74782, Solocombe et al., Plant Physiol. 104 :1167-1176(1994)）、来自玉米的 GPC1(GenBank No. X15596, Martinez et al., J. Mol. Biol. 208 :551-565(1989)）、来自玉米的 Gpc2(GenBank No. U45855, Manjunath et al., Plant Mol. Biol. 33 :97-112(1997)）、来自技术人员已知的不同植物基因的其它转录起始区。还参见，Holtorf et al., Plant Mol. Biol. 29 :637-646(1995)。

[0093] 2. 诱导型启动子

[0094] 可选择地，植物启动子可以指导诸如编码乙烯受体蛋白的核酸的本发明所述的核酸在变化的环境条件或发育条件影响下的表达。可以通过诱导型启动子影响转录的环境条件的实例包括厌氧条件、升高的温度、干旱或光的存在。可以通过诱导型启动子影响转录的发育条件的实例包括衰老。这种启动子在本文中称为“诱导型”启动子。例如，本发明包括玉米的干旱诱导型启动子（上文的 Busk(1997)）、来自马铃薯的寒冷、干旱、高盐诱导型启动子 (Kirch et al., Plant Mol. Biol. 33 :897909(1997))。发育条件的实例包括细胞老化和胚发生。例如，本发明包括拟南芥的衰老诱导型启动子 SAG 12(Gan and Amasino, Science 270 :1986-1988(1995)) 以及 LEC1(Lotan et al., Cell, 93 :1195-1205(1998))、LEC2(Stone et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 :11806-11811(2001))、FUS3(Luerssen, Plant J. 15 :755-764(1998))、AtSERK1(Hecht et al., Plant Physiol. 127 :803-816(2001)) 和 AGL15(Heck et al., Plant Cell 7 :1271-1282(1995)) 的胚发生相关启动子。

[0095] 可选择地，使用暴露于诸如茁长素或细胞分裂素的植物激素而诱导的植物启动子以表达本发明的核酸。例如，本发明能使用大豆 (Glycine max L.) 中的茁长素应答元件 E1 启动子片段 (AuxRE) (Liu, Plant Physiol. 115 :397-407(1997))、茁长素应答的拟南芥 GST6 启动子（也应答水杨酸和过氧化氢）(Chen, Plant J. 10 :955-966(1996))、来自烟草的茁长素诱导型 parC 启动子 (Sakai, Plant Cell Physiol. 37 :906-913(1996))、植物生物素应答元件 (Streit, Mol. Plant Microbe Interact. 10 :933-937(1997)) 以及对应激激素脱落酸应答的启动子 (Sheen, Science 274 :1900-1902(1996))。本发明也能够使用 ARR5(Brandstatter and Kieber, Plant Cell 10 :1009-1019(1998))、ARR6(Brandstatter and Kieber, Plant Cell 10 :1009-1019(1998))、ARR2(Hwang and Sheen, Nature 413 :383-389(2001)) 的细胞分裂素诱导型启动子、ERF1 的乙烯应答启动子 (Solano et al., Genes Dev. 12 :3703-3714(1998)) 以及 XVE 的 β -雌二醇诱导型启动子 (Zuo et al., Plant J 24 :265-273(2000))。

[0096] 暴露于诸如除草剂或抗生素的能应用于植物的化学试剂而诱导的植物启动子也能用于表达本发明的核酸。例如，能使用苯磺酰胺除草剂安全剂激活的玉米 In2 2 启动子 (De Veylder, Plant Cell Physiol. 38 :568-577(1997)) 以及地塞米松应用诱导的糖

皮质激素受体蛋白融合的启动子 (Aoyama, Plant J. 11 :605-612(1997)) ;不同的除草剂安全剂的应用诱导不同的基因表达模式,包括在根、排水器和枝条顶端分生组织中的表达。所述核酸的编码序列还能受例如,诸如含有 *Avenasativa* L. (燕麦) 精氨酸脱羧酶基因的转基因烟草植物所述的四环素诱导型启动子或水杨酸应答元件 (Stange, Plant J. 11 :1315-1324(1997)) 的调控。

[0097] 3. 组织特异性启动子

[0098] 可选择地,植物启动子可以指导本发明的多核苷酸在特定组织中的表达 (组织特异性启动子)。组织特异性启动子是转录调控元件,其仅在植物发育的特定时间在特定细胞或组织中有活性,例如在营养组织或生殖组织中。

[0099] 受发育调控的组织特异性启动子的实例包括仅在 (或仅主要在) 某些组织中起始转录的启动子,例如诸如在根、叶或茎的营养组织或诸如果实、胚珠、种子、花粉、雌蕊、花、花药的生殖组织或任何胚性组织。生殖组织特异性启动子可以是,例如,胚珠特异性、胚特异性、胚乳特异性、珠被特异性、种子和种皮特异性、花粉特异性、花瓣特异性、萼片特异性、花药特异性或其某些组合的。

[0100] 合适的种子特异性启动子源自下述基因:来自玉米的 *MAC1* (Sheridan, Genetics 142 :1009-1020(1996))、来自玉米的 *Cat3* (GenBank No. L05934, Abler Plant Mol. Biol. 22 :10131-10138(1993))、来自拟南芥的胎萌基因 *-1* (*viviparous-1*) (Genbank No. U93215)、来自拟南芥的 *atmyc1* (Urao, Plant Mol. Biol. 32 :571-576(1996) ;*Conceicao Plant5* :493-505(1994))、来自甘蓝型油菜的 *napA* 和 *BnCysPl* (GenBank No. J02798, Josefsson, JBL 26 :12196-12201(1987), Wan et al., Plant J 30 :1-10(2002)) 以及来自甘蓝型油菜的 *napin* 基因家族 (Sjodahl, Planta 197 :264-271(1995))。果实特异性启动子包括来自 *CYP78A9* 基因的启动子 (Ito and Meyerowitz, Plant Cell 12 :1541-1550(2000))。

[0101] 还能使用 Reiser, Cell 83 :735-742(1995), GenBank No. U39944 所述的胚珠特异性 *BEL1* 基因。还参见 Ray, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :5761-5765(1994)。卵细胞和中央细胞特异性 *FIE1* 启动子也是有用的生殖组织特异性启动子。

[0102] 萼片和花瓣特异性启动子也用于以生殖组织特异性的方式表达本发明的核酸。例如,拟南芥花同源异型基因 *APETALA1* (*API*) 编码推定的转录因子,其表达于幼花原基,并随后局限于萼片和花瓣 (参见,例如, Gustafson Brown, Cell 76 :131-143(1994) ;Mandel, Nature 360 :273-277(1992))。对于 *AP2*, 其是花轮中的萼片和花瓣的正常发育所必需的花同源异型基因,相关的启动子也是有用的 (参见,例如 Drews, Cell 65 :991-1002(1991) ;Bowman, Plant Cell 3 :749-758(1991))。其它有用的启动子是调控拟南芥的非寻常的花器官 (*ufo*) 基因的启动子,所述基因的表达被限制在萼片与花瓣原基之间的结合处 (Bossinger, Development 122 :1093-1102(1996))。

[0103] 在玉米中鉴定了花粉特异性启动子 (Guerrero, Mol. Gen. Genet. 224 :161-168(1990))。例如, Wakeley, Plant Mol. Biol. 37 :187-192(1998) ;Ficker, Mol. Gen. Genet. 257 :132-142(1998) ;Kulikauskas, Plant Mol. Biol. 34 :809-814(1997) ;Treacy, Plant Mol. Biol. 34 :603-611(1997) 描述了特定地表达于花粉中的其它基因。

[0104] 雌蕊和长角果瓣、花序分生组织、茎生叶以及茎和花梗的维管系统特异性的启动

子包括来自 FUL 基因的启动子 (Mandel and Yanofsky, Plant Cell, 7 :1763-1771(1995))。发育中的心皮、胎座、隔膜和胚珠的特异性的启动子也用于以组织特异性方式表达 LEC2 核酸。所述启动子包括来自 SHP1 和 SHP2 基因的启动子 (Flanagan et al., Plant J 10 :343-353(1996), Savidge et al., Plant Cell 7(6) :721-733(1995))。花药绒毡层特异性启动子可以来自 TA29 基因 (Goldberg et al., Philos Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 350 :5-17(1995))。

[0105] 其它合适的启动子包括来自编码胚贮藏蛋白的基因的启动子。例如,能使用来自甘蓝型油菜的编码 2S 贮藏蛋白的基因 (Dasgupta, Gene 133 :301-302(1993))、来自拟南芥的 2s 种子贮藏蛋白基因家族、来自甘蓝型油菜的编码油质蛋白 20kD 的基因 (GenBank No. M63985)、来自大豆的编码油质蛋白 A 的基因 (Genbank No. U09118) 和编码油质蛋白 B 的基因 (Genbank No. U09119)、来自拟南芥的编码油质蛋白的基因 (Genbank No. Z17657)、来自玉米的编码油质蛋白 18kD 的基因 (GenBank No. J05212, Lee, Plant Mol. Biol. 26 :1981-1987(1994)) 以及来自大豆的编码低分子量富硫蛋白的基因 (Choi, Mol. Gen. Genet. 246 :266-268(1995))。来自马铃薯的组织特异性 E8 启动子具体地用于指导基因表达,从而使期望的基因产物位于果实中。合适的启动子还可以包括那些来自在维管组织中表达的基因的启动子,所述基因例如,ATHB-8、AtPINK AtP5K1 或 TED3 基因 (Baima et al., Plant Physiol. 126 :643-655(2001), Galweiler et al., Science 282 :2226-2230(1998), Elge et al., Plant J. 26 :561-571(2001), Igarashi et al., Plant Mol. Biol. 36 :917-927(1998))。

[0106] 能使用在果实成熟、衰老和叶脱落以及较轻程度的花脱落期有活性的马铃薯启动子 (Blume, Plant J. 12 :731-746(1997))。其它示例性的启动子包括编码雌蕊特异性碱性内切几丁质酶 (Ficker, Plant Mol. Biol. 35 :425-431(1997)) 的马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) SK2 基因的雌蕊特异性启动子、在转基因苜蓿的营养性和花枝条顶端的表皮组织中有活性的来自豌豆 (*Pisum sativum* cv. Alaska) 的 Blec4 基因的启动子。这使所述启动子成为将外源基因的表达靶向生长活跃的枝条的表皮层的有用工具。

[0107] 各种特定地在诸如叶、茎、根和块茎的营养组织中有活性的启动子能用于表达本发明的方法所用的核酸。例如,能使用调控块茎蛋白 (patatin) 的启动子,所述块茎蛋白是马铃薯块茎的主要贮藏蛋白,例如, Kim, Plant Mol. Biol. 26 :603-615(1994); Martin, Plant J. 11 :53-62(1997)。还能使用在根中表现出高活性的毛根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 的 ORF 13 启动子 (Hansen, Mol. Gen. Genet. 254 :337-343(1997))。其他有用的营养组织特异性启动子包括:编码来自大芋头 (major taro, *Colocasia esculenta* L. Schott) 球茎蛋白家族的球蛋白的基因 tarin (Bezerra, Plant Mol. Biol. 28 :137-144(1995)) 的 tarin 启动子、在芋头球茎发育期间有活性的仙茅甜蛋白启动子 (de Castro, Plant Cell 14 :1549-1559(1992)) 以及表达局限于根分生组织和未成熟的中柱区域的烟草根特异性基因 TobRB7 的启动子 (Yamamoto, Plant Cell 13 :371-382(1991))。

[0108] 能使用诸如二磷酸核酮糖羧化酶 (RBCS) 启动子的叶特异性启动子。例如,番茄 RBCS1、RBCS2 和 RBCS3A 基因表达于叶和光下生长的幼苗中,只有 RBCS1 和 RBCS2 表达于发育中的番茄果实中 (Meier, FEBS Lett. 415 :91-95(1997))。能使用如 Matsuoka, Plant J. 6 :311-319(1994) 所述的几乎只高水平地表达于叶片和叶鞘的叶肉细胞中的二

磷酸核酮糖羧化酶启动子。另一叶特异性启动子是捕光叶绿素 a/b 结合蛋白基因启动子, 参见, 例如, Shiina, *Plant Physiol.* 115 :477-483(1997) ;Casal, *Plant Physiol.* 116 :1533-1538(1998)。Li, *FEBS Lett.* 379 :117-121(1996) 所述的拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) myb 相关基因启动子 (Atmyb5) 是叶特异性的。所述 Atmyb5 启动子表达于发育中的叶毛状体、托叶、以及幼莲座叶和茎生叶边缘的表皮细胞以及未成熟的种子中。Atmyb5mRNA 出现在受精和胚发育的 16 细胞期之间, 并且持续超过心形期 (heart stage)。还能使用 Busk, *Plant J.* 11 :1285-1295(1997) 在玉米中鉴定的叶启动子。

[0109] 另一类有用的营养组织特异性启动子是分生组织 (根尖和枝条尖) 启动子。例如, 能使用 Di Laurenzio, *Cell* 86 :423-433(1996) 和 Long, *Nature* 379 :66-69(1996) 所述的“SHOOTMERISTEMLESS”和“SCARECROW”启动子, 其在发育中的枝条或根尖分生组织中是有活性的。另一有用的启动子是调控 3 羟基 3 甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 HMG2 基因的表达的启动子, 所述基因的表达限于分生和花 (柱头的分泌区、成熟花粉粒、雌蕊群维管组织和受精胚珠) 组织 (参见, 例如, Enjuto, *Plant Cell.* 7 :517-527(1995))。来自玉米和表现出分生组织特异性表达的其它物种的 kn1 相关基因也是有用的, 参见, 例如, Granger, *Plant Mol. Biol.* 31 :373-378(1996) ;Kerstetter, *Plant Cell* 6 :1877-1887(1994) ;Hake, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 350 :45-51(1995)。例如, 拟南芥 KNAT1 或 KNAT2 启动子。在枝条尖中, KNAT1 转录子主要局限于枝条顶端分生组织 ;KNAT1 在枝条分生组织的表达在花转换期降低并限于花序茎的皮层 (参见, 例如, Lincoln, *Plant Cell* 6 :1859-1876(1994))。

[0110] 技术人员会理解, 组织特异性启动子可以驱动可操作地连接的序列在除靶组织外的组织中的表达。因此, 如本文所用的, 组织特异性启动子是优先驱动在靶组织中的表达、但也可以导致在其它组织中的某些表达的启动子。

[0111] 在另一实施方案中, 本发明所述的核酸通过转座元件表达。这允许组成型活性多肽的组成性但定期和罕见的表达。本发明还提供了来自病毒的组织特异性启动子的用途, 所述启动子可以包括, 例如, 烟草花叶病毒亚基因组启动子 (Kumagai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 :1679-1683(1995)) ;仅在被感染的水稻植物的韧皮部细胞中复制的水稻东格鲁杆状病毒 (rice tungro bacilliform virus) (RTBV), 其启动子驱动强烈的韧皮部特异性报道基因的表达 ;木薯叶脉花叶病毒 (CVMV) 启动子, 其在维管元件、叶肉细胞以及根尖中具有最高的活性 (Verdaguer, *Plant Mol. Biol.* 31 :1129-1139(1996))。

[0112] F. 转基因植物的制备

[0113] 在另一方面, 本发明提供了包含重组表达盒的转基因植物, 所述表达盒包含可操作地连接至诸如 ERS (例如, SEQ ID NO :1 所示) 或 ETR (例如, SEQ ID NO :3 或 5 所示) 的编码乙烯受体的核酸序列的启动子序列, 其中所述分离的核酸与所述多核苷酸序列至少 90% 相同。可选择地, 分离的核酸是 SEQ ID NO :1、3 或 5 的截断突变体。

[0114] 可以通过各种常规技术将本发明的 DNA 构建体导入期望的植物宿主的基因组中。例如, 可以利用诸如植物细胞原生质体的电穿孔和微注射的技术将 DNA 构建体直接导入植物细胞的基因组 DNA 中, 或者利用诸如 DNA 粒子轰击的生物导弹法将 DNA 构建体直接导入植物组织中。

[0115] 微注射技术在本领域是已知的, 并且在科学和专利文献中被详细地描述。Paszkowski et al. *Embo J.* 3 :2717-2722(1984) 中描述了利用聚乙二醇沉淀法导入 DNA 构

建体。Fromm et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 :5824(1985) 中描述了电穿孔技术。Klein et al. Nature 327 :70-73(1987) 中描述了生物导弹转化技术。

[0116] 可选择地, 可以将 DNA 构建体与合适的 T-DNA 侧翼区组合并导入常规根癌农杆菌宿主载体中。当细胞被根癌农杆菌感染时, 根癌农杆菌宿主的毒力功能将指导所述构建体及邻近的标志物插入植物细胞的 DNA 中。科学文献中详细描述了根癌农杆菌介导的转化技术, 其包括双元载体 (binary vector) 的消除和使用。参见, 例如, Horsch et al. Science 233 :496-498(1984) 和 Fraley et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 :4803(1983) 以及 Gene Transfer to Plants(向植物的基因转移), Potrykus, ed. (Springer-Verlag, Berlin 1995)。

[0117] 可以培养源自任何上文的转化技术的转化的植物细胞以再生完整的植物, 所述植物具有转化的基因型并且因此具有期望的表型, 例如降低的法尼酰基转移酶活性。这种再生技术依赖于对组织培养生长培养基中的某些植物激素的调控, 通常依赖于与期望的核苷酸序列共同导入的生物杀伤剂和 / 或除草剂标志物。Evans et al., Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture(原生质体分离和培养, 植物细胞培养手册), pp. 124-176, MacMillan Publishing Company, New York, 1983 和 Binding, Regeneration of Plants, Plant Protoplasts(植物、植物原生质体的结合和再生), pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985 中描述了来自培养的原生质体的植物再生。还能从植物胼胝体、外植体、器官或其部分获得再生。Klee et al., Ann. Rev. of Plant Phys. 38 : 467-486(1987) 中全面地描述了这种再生技术。

[0118] 本发明的核酸可以用于赋予包含玉米在内的基本上任何植物期望的特性。因此, 本发明能用于包括来自以下属的物种在内的多种植物: 腰果属 (Anacardium)、花生属 (Arachis)、天门冬属 (Asparagus)、颠茄属 (Atropa)、燕麦属 (Avena)、芸苔属 (Brassica)、衣藻属 (Chlamydomonas)、小球藻属 (Chlorella)、柑桔属 (Citrus)、西瓜属 (Citrullus)、辣椒属 (Capsicum)、红蓝菊属 (Carthamus)、椰子属 (Cocos)、咖啡属 (Coffea)、香瓜属 (Cucumis)、南瓜属 (Cucurbita)、贯众属 (Cyrtomium)、胡萝卜属 (Daucus)、油棕属 (Elaeis)、草莓属 (Fragaria)、甘吻沙蚕属 (Glycine)、棉属 (Gossypium)、向日葵属 (Helianthus)、萱草属 (Heterocallis)、大麦属 (Hordeum)、莨菪属 (Hyoscyamus)、莴苣属 (Lactuca)、昆布属 (Laminaria)、亚麻属 (Linum)、毒麦属 (Lolium)、羽扇豆属 (Lupinus)、番茄属 (Lycopersicon)、大囊伞属 (Macrocytis)、苹果属 (Malus)、木薯属 (Manihot)、墨角兰属 (Majorana)、苜蓿属 (Medicago)、海囊藻属 (Nereocystis)、烟草属 (Nicotiana)、木犀榄属 (Olea)、稻属 (Oryza)、紫萁属 (Osmunda)、黍属 (Paniceum)、皇竹草属 (Pennisetum)、鳄梨属 (Persea)、菜豆属 (Phaseolus)、黄连木属 (Pistachia)、豌豆属 (Pisum)、梨属 (Pyrus)、水龙骨属 (Polypodium)、樱桃属 (Prunus)、蕨属 (Pteridium)、萝卜属 (Raphanus)、蓖麻属 (Ricinus)、黑麦属 (Secale)、千里光属 (Senecio)、欧白芥属 (Sinapis)、茄属 (Solanum)、高粱属 (Sorghum)、可可属 (Theobroma)、葫芦巴属 (Trigonella)、小麦属 (Triticum)、野豌豆属 (Vicia)、葡萄属 (Vitis)、豇豆属 (Vigna) 以及玉米属 (Zea)。

[0119] G. 本发明的转基因植物的检测

[0120] 本发明提供了调节植物中乙烯受体活性的方法。在某些实施方案中, 所述方法还包括选择在其生殖植物结构中具有延迟的衰老表型的植物。在某些实施方案中, 所述生殖

结构是种子。在某些实施方案中,所述表型是一粒种子中有多个胚。在某些实施方案中,通过有性杂交导入构建体。

[0121] 在某些实施方案中,筛选还包括检测具有期望的表型的植物。例如,可以检测叶的颜色以确定植物的光合作用寿命是否已经被影响。具有延长的光合作用生命周期的植物的特征是与野生型植物相比,叶在更长的时间段内保持绿色。另外,能利用已熟知的技术测量叶绿素水平和 CO_2 同化作用。可以检测植物的营养和生殖结构的大小以确定这些结构是否大于或小于野生型植物营养和生殖结构。本发明的转基因植物可以具有更大的果实、胚珠、种子、花粉、胚芽组织、花、诸如雌蕊、雄蕊、萼片、花瓣、心皮的花的部分、叶、茎、块茎、根、维管组织、原维管组织或者根或茎分生组织。可以检测得到的转基因植物的增加的耐旱性。检测增加的耐旱性的方法是已知的,所述方法包括测量转基因植物的蒸腾速率、气孔通导率、分离的叶检测中的失水速率或检查叶的膨胀。例如,蒸腾速率降低的植物具有增加的耐旱性。

[0122] 还能通过测试植物在更高的密度下生长的能力来选择乙烯敏感性降低的植物。不论何种选择方法,具有这种乙烯抗性表型的植物有利地高密度下种植。类似地,不论何种选择方法,具有乙烯抗性表型的植物有利于在干旱条件下种植。

[0123] 还能通过检测存在的例如标志物基因的生物标志物来选择乙烯敏感性降低的植物。标志物基因通常提供容易检测到的与滞绿表型共分离的表型,其可以不是直接检测到的表型。

[0124] 还能通过“三重反应”表型观察乙烯敏感性,所述“三重反应”包含下胚轴的径向膨胀、根和下胚轴延长的抑制以及顶端倒刺的扩大 (exaggeration) (Neljubow (1901), *Pflanzen Beih. Bot. Zentralbl.*, 10 :128-139)。引起组成型乙烯信号传导的突变体的特征在于与野生型植物相比,高度降低 (Guzman and Ecker (1990), *Plant Cell*, 2 :513-523 ; Kieber et al. (1993) *Cell* 72 :427-441)。

[0125] 相反地,可以通过延迟的黑暗诱导的叶绿素损失和 / 或植物体积的增加来观察乙烯的不敏感性。即便与生长于最佳条件,即没有可能在封闭的生长设施中累积的痕量水平乙烯的条件下的野生型植物相比,乙烯不敏感性植物可以更大。然而,本领域的技术人员应当了解,乙烯应答根据植物物种和环境条件变化。利用标准分析可以方便地检测滞绿表型。例如,能使用黑暗诱导的衰老分析。这些分析通常包括覆盖仍然连接在植物上的叶片达一周。光的缺乏诱导叶的衰老,在本发明的植物中,与对照相比,所述叶的衰老能被延迟。

[0126] 检测转基因植物的生化方法也是熟知的,例如,检测诸如插入到转基因构建体的报道基因的生物标志物的表达,或转基因核酸序列或蛋白序列在植物中的表达。本领域技术人员熟知检测和定量 mRNA 和蛋白质的方法,例如, RNA 印迹法 (Northern Blot)、PCR、蛋白印迹法 (Western Blot) 以及活性检测。例如,向植物中导入表达盒后,基于转基因的存在筛选植物并使所述植物与近交或杂交系杂交。然后基于转基因的存在筛选后代植物并使所述后代植物自花传粉。栽培自花传粉植物的后代。检测产生的转基因植物的任何与改变的乙烯相关过程有关的表型特征,例如,与滞绿特性或延迟的衰老有关的特征。例如,使用本发明的方法,抑制本发明所述的核酸或蛋白可以延迟营养或生殖植物结构细胞中的衰老。

[0127] 应当理解,本文所述的实施例和实施方案仅用于示例的目的,并且本领域的技术人员会想到所述实施例和实施方案的各种变型或变化,所述变型或变化包括于本申请的精

神和范畴内并在所附的权利要求书的范围之内。本文引用的所有出版物、专利和专利申请都在此通过引用的方式整体并入本文用于所有目的。

实施例

[0128] 在下文简述的方法中使用了标准方法。

[0129] 实施例 1:拟南芥 etrl-1 在玉米中的表达导致延迟的乙烯应答构建体设计和植物转化

[0130] 上文已经描述了拟南芥 etrl-1 突变体。所述突变体是导致乙烯不敏感性的显性负性突变体乙烯受体。通过胚发生的 A 188 X B73(HiII) 胼胝体的粒子轰击 (Gordon-Kamm et al. (1990), Plant Cell, 2:603-618) 产生转基因玉米, 所述转基因玉米含有受 pACH18 中的玉米泛素 (Ub) 启动子调控的小麦拟南芥 etrl-1 (Christensen and Quail (1996), Transgenic Res., 5:213-218)。与 bar 基因的共转化提供了转化的胼胝体的双丙氨磷选择 (De Block et al. (1987) EMBO J. 6:2513-2518)。利用 PCR 鉴定含有 Ub-etrl-1 构建体的再生物。

[0131] 结果

[0132] 为了确定引入乙烯不敏感性状态是否能改变玉米中乙烯介导的事件, 在温室条件下栽培表达受玉米泛素 (Ub) 启动子调控的拟南芥 etrl-1 的转基因玉米株系。通过 PCR 证实含有 etrl-1 转基因的 T₀ 子代的叶表现出改变的生长表型。为了检测 etrl-1 转基因的表达是否导致叶衰老或滞绿表型的改变, 覆盖仍然连接在植物上的来自成体 T₀ 代植物的叶 6 和叶 7 以避免光到达叶子达一周。光的缺乏通常诱导称为黑暗诱导的衰老的叶衰老, 并且通常用作滞绿潜力的量度。

[0133] 表达 etrl-1 的转基因叶表现出延迟的叶衰老, 这表明玉米的乙烯不敏感性状态导致滞绿表型。这些结果证明通过表达显性负性突变乙烯受体, 例如, 实施第二跨膜中的 Cys 至 Tyr 的突变或有类似效果的其它突变构建玉米的乙烯不敏感性状态能改变诸如叶老化和衰老的乙烯介导的过程。

[0134] 实施例 2:拟南芥中显性负性 ZmERS1 和 ZmETR2 的表达导致乙烯不敏感性

[0135] 然后, 我们着手确定突变的玉米乙烯受体的表达是否以相同的方式在拟南芥中导致乙烯不敏感性。

[0136] 构建体设计和植物转化

[0137] 根据实施例 1 中所述的方法, 使用 pBI121 构建体转化拟南芥。所述构建体包含可操作地连接至下述编码序列中的一个的 35S 启动子: ein2-5 (Alonso et. al. (1999) Science 284:2148-52 中描述的乙烯不敏感性拟南芥突变)、突变体 ZmERS1 或突变体 ZmETR2 (ZmETR40)。ZmERS1 和 ZmETR2 突变体是显性负性乙烯受体 (不结合乙烯), 并且本文描述了其序列。使用野生型植物作为乙烯敏感性对照 (表示为 WT)。在乙烯的前体 ACC 上的发芽抑制了幼苗的生长。通过使转化株避光在含有 20 μ M ACC 的培养基上发芽来筛选乙烯不敏感性转化株。选择 ZmERS1 转化株的三种独立株系 (指定为 MS1-11、MS2-12 和 MS1-15) 和 ZmETR2 转化株的三种独立株系 (指定为 MT2-4、MT2-5 或 MT2-9) 用于另外的试验。

[0138] 结果

[0139] 为了表示突变的 ZmETR2 和 ZmERS1 乙烯受体提供了乙烯不敏感性状态,使所述突变体株系在含有 20 μ M ACC 的培养基或含有 20 μ M Ag 的培养基上发芽,这以化学方法在拟南芥中提供了乙烯不敏感性状态。数据显示,表达突变体 ZmERS1 或 ZmETR2 的种子是乙烯不敏感性的,因为它们没有对乙烯表现出典型的“三重应答”,而是表现出长、薄的下胚轴并且没有顶端倒刺。对于乙烯不敏感性突变体 *ein2-5* 观察到了类似的结果。相比之下,野生型幼苗表现出对乙烯的典型应答。在存在 Ag 的条件下,WT 幼苗也是乙烯不敏感性的。5 天大的幼苗的定量测量示于表 1 中(除非另外说明,否则 $p < 0.001$)。这些数据表明突变的 ZmERS1 和 ZmETR2 乙烯受体能在拟南芥中提供乙烯不敏感性。

[0140] 表 1 突变的 ZmERS1 和 ZmETR2 受体的表达在拟南芥中提供乙烯不敏感性

	20mM ACC		5mM Ag	
	下胚轴长度 (mm)	根长度 (mm)	下胚轴长度 (mm)	根长度 (mm)
WT	5.0 $\pm$ 0.71	3.00 $\pm$ 1.03	14.7 $\pm$ 1.12	6.69 $\pm$ 1.41
<i>ein2-5</i>	13.9 $\pm$ 1.71	7.43 $\pm$ 2.63	11.0 $\pm$ 3.13	6.27 $\pm$ 1.93 $p = 0.371$
MT2-4	14.2 $\pm$ 1.61	6.05 $\pm$ 1.36	13.0 $\pm$ 3.20	7.33 $\pm$ 1.81 $p = 0.122$
MT2-5	14.4 $\pm$ 1.97	4.87 $\pm$ 1.16	11.5 $\pm$ 2.87	5.39 $\pm$ 1.27
MT2-9	13.8 $\pm$ 2.36	6.27 $\pm$ 1.76	12.1 $\pm$ 2.40	7.07 $\pm$ 1.58 $p = 0.354$
WT	6.6 $\pm$ 1.33	3.10 $\pm$ 0.92	16.9 $\pm$ 2.41	5.48 $\pm$ 0.94
<i>ein2-5</i>	17.0 $\pm$ 2.98	6.51 $\pm$ 1.56	14.7 $\pm$ 3.78	5.97 $\pm$ 1.56 $p = 0.349$
MS1-11	17.6 $\pm$ 3.10	4.60 $\pm$ 0.88	10.9 $\pm$ 3.68	6.35 $\pm$ 1.87 $p = 0.086$
MS1-15	18.0 $\pm$ 1.38	5.88 $\pm$ 1.40	11.7 $\pm$ 5.01	5.51 $\pm$ 1.45 $p = 0.921$
MS1-12	8.8 $\pm$ 1.37	3.33 $\pm$ 0.97 $p = 0.406$	17.3 $\pm$ 1.95 $p = 0.561$	7.14 $\pm$ 1.97

[0142] 为了检测提供的乙烯不敏感性随一系列 ACC 浓度变化的水平,使来自一个 ZmERS1 株系 (MS1-11) 和一个 ZmETR2 株系 (MT2-9) 的种子在含有不同水平 ACC(从 1.0 μ M 至 20 μ M) 的培养基上发芽。突变的乙烯受体的表达在 ACC 浓度范围内提供了乙烯不敏感性。在更高的 ACC 浓度下,达到的乙烯不敏感性水平出现些许下降,但仍显著高于 WT 幼苗中的乙烯不敏感性水平。定量测量示于图 1 中。

[0143] 当使幼苗于光下在 20 μ M ACC 上发芽时,也能表现出乙烯不敏感性。WT 幼苗表现出不膨胀的子叶,而表达突变 ZmERS1 或 ZmETR2 的株系与乙烯不敏感性突变体 *ein2-5* 类似。随后于光下在 10 μ M ACC 上的生长显示,WT 幼苗显著小于生长于 Ag 上的 WT 幼苗,而表达突变 ZmERS1 或 ZmETR2 的株系与生长于 Ag 上的 WT 幼苗或 *ein2-5* 乙烯不敏感性突变体类似。

[0144] 表达突变 ZmERS1 或 ZmETR2 的植物还具有更大的叶子面积,这与 *ein2-5* 和 *etrl-1* 乙烯不敏感性突变体类似。在 7 周龄时,表达突变 ZmERS1 或 ZmETR2 的植物表现出延迟的叶衰老和滞绿表型,这与 *ein2-5* 观察到的情况类似。当在第 4 周进行检测时,观察到的叶绿体含量的差别很小(表 2)。然而,表达突变 ZmERS1 或 ZmETR2 的植物表现出开花的某种

延迟,以及由此叶数目的增加。

[0145] 表 2:表达突变玉米乙烯受体的拟南芥的表型

[0146]

	开花期 (天)	叶数目	叶绿素a (ng/mg FW)	叶绿素b (ng/mg FW)	a/b比
WT	22.0	11.1 ± 1.7	960 ± 92	281 ± 21	3.42
<i>ein2-5</i>	22.5	12.1 ± 2.0	923 ± 67	296 ± 21	3.11
MT2-4	22.5	12.9 ± 1.9	988 ± 86	298 ± 27	3.32
MT2-5	22.5	13.8 ± 2.0	903 ± 93	271 ± 16	3.33
MT2-9	28.0	16.2 ± 1.2	965 ± 104	304 ± 39	3.18
MS1-11	24.0	12.5 ± 1.7	1016 ± 144	312 ± 33	3.25

[0147] 然后,我们试图确定在以半合状态相对于纯合状态存在时,突变 ZmERS1 的表达在提供乙烯不敏感状态中是否是完全显性的。进行 ZmERS1 突变体 (MS1-11) 纯合子与野生型种子之间的杂交以获得 ZmERS1 突变体半合的种子。相对于突变 ZmERS1 纯合的种子检测这些半合的种子。使所述植物在 20 μM ACC 中避光生长 5 天。如表 3 所示,在三重应答分析 (triple response assay) 中,半合的幼苗和纯合的幼苗对乙烯一样不敏感 ($p < 0.001$)。于光下在 20 μM ACC 上生长时,半合的和纯合的突变体也是同样地不敏感。

[0148] 表 3:根据 ZmERS1 突变体半合子在拟南芥中的表达, ZmERS1 突变体是显性的

	下胚轴长度 (mm)	根长度 (mm)
[0149] WT	8.52 ± 0.65	2.78 ± 0.83
半合的 MS1-11	16.5 ± 4.78	4.78 ± 1.60
纯合的 MS1-11	17.3 ± 4.77	4.77 ± 0.92

[0150] 序列表

[0151] SEQ ID NO :1

[0152] 玉米 ERS1 样编码序列 (Cys → Tyr65)

[0153] ATGGACGGATGCGATTGCATAGAGCCACTATGGCCTACCGA TGATCTTCTCGTCAAGTATCAGTACAT
CTCAGACTTCTTCATAGCCCTTGCGTACTTCTCGATTCCATTGGAGGTCATATATTTTGTGAAGAAGTCGTCCTTCT
TCCCATACAGATGGGTCTGATCCAGTTTGGTGCGTTTATAGTTCTTTATGGGGCAACCCATCTGATAAACCTGTGG
ACGTTCAACACACATACAAAAGACCGTTGCGATGGTCATGACCATAGCGAAGATTTCTACAGCAGTCGTGTCCTGTG
CAACTGCTTTGATGCTCGTTCATATCATTCCCGACTTGTTGAGCGTGAAAAGTAGGGAGTTGTTCTTGAAGAATAAA
GCTGAGGAGCTTGATAGAGAGATGGGACTTATAAGGACGCAAGAGGAGACTGGTAGACATGTTAGGATGCTTACACA
TGAAATCAGAAGTACTCTTGATAGACATACAATTTTGAAGACTACTCTCGTTGAGCTAGGAAGGACCTTGGGTCTGG
AAGAATGTGCATTGTGGATGCCATCTCGAAGTGGCTCAAGCCTTCAGCTTCTCATACTTTGCGCCACCAGATTACT
GTTGGATCATCGGTGCCAATGAATCTTCCTGTCGTCAATCAAGGTTTCAGTAGCAACCGGGCAATCATAATACCCCA
CACATCTTCTTTGGCGCGGGTTCGACCTCTTGACGGCGATATGTTCCACCAGAAGTGCCGCGAGTCCGTGTACCTC
TTCTACATCTTTCAAACCTTTCAAATA AATGATTGGCCTGAGCTCTCAGCA AAA AGCTTTGCAATCATGGTTTGT
ATGCTTCCATCTGATAGTGCTAGAAAAATTGCATGTGCATGAATTGGAGCTGGTTGAGGTCGTTGCTGATCAGGTAGC
AGTTGCACTATCTCATGCAGCTATTCTCGAAGAGTCCATGCGGGCACGTGATTTACTAATGGAGCAGAATGTTGCCC
TGGATTTAGCTCGA AGAGAGGCTGAGATGGCTATCCGTGCTCGCAATGATTTCCCTAGCTGTTATGAATCACGAAAT
GAGAACACCCATGAATGCAATAATAGCCCTTTCCCTCCTTGCTTTTGAAAGTACTGCTTACTCCTGAGCAGCGTCTAA

TGGTGGAAACAGTACTGAAAAGCAGCAATTTGTTAGCAACACTCATCAATGATGTTCTGGATCTTTCCAAACTCGAG
GATGGAAGCCTTGAAGTGGAGATTAAAGCATTCAATCTTCATGCTGTTTTCAAAGAAGTAATGGGTTTCATTAAACC
AATTGCATCTATCAAGAGGCTATCTGTATCGGTTATGTTGGCACCAGATCTGCCGTTATGTGCAATTGGTGATGAAA
AGAGACTCATGCAAACTATTCTGAACATCTCTGGCAATGCTGTAAAGTTTACCAAGGAGGGACACATCACGCTTGTA
GCTTCCATTGTGAAGGCTGACTCTTTGAGAGAGTTCAGAACCCCAAGATTTTCATCCAAGTGAAGTGAACATTT
CTATTTGAAAGTTCAGGTAAAAGATACAGGCTGTGGAGTTAGTCCTCAGGATCTACCTCATGTATTCACAAAGTTTG
CTCATCCTCAAAGTGGAGGAAACCGAGGGTTAATGGTAGTGGTCTTGGCCTTGCCATATGCAAGAGGTTTGTTAGT
CTTATGGGAGGGCACATCTGGATCGACAGCGAAGGAACCGGAAGAGGTTGCACCGCAACATTCGTCATCAAGCTCGG
CGTGTGTGACAACACAAACACCTACCAAAAGCAGCTGGTTCCTCTAATCTGGCCAAGCAGTGCAGACTCCAATTTGT
CTGCTCCGAAAGTGTGCCCCGACGGGAGAGGATCTGTTTCCCTGAAATCTCGGTACCAAAGAAGCGTA

[0154] SEQ ID NO :2

[0155] 玉米 ERS1 样蛋白序列 (Cys → Tyr65)

[0156] MDGCDIEPLWPTDDLVLKYQYISDFFIALAYFSIPLLELIYFVKKSSFFPYRWVLIQFGAFIVLYGATH
LINLWTFTHTKTVAMVMTIAKVSTAVVSCATALMLVHIIPDLLSVKTRELFLKNKAEELDREMGLIRTQEETGRHV
RMLTHEIRSTLDRHMLKTTTLVELGRTLGLEECALWMPSSRSGSSLQLSHTLHHQITVGSSVPINLPVINQVFSSNRA
IIIPHTSPLARIRPLTGRYVPPEVA AVRVPPLHLHSNFQINDWPELSAKSFAIMVLMPLSDSARKWHVHELELVEVVA
DQVAVALSHAAILEESMRARDLLMEQNVALDLARREAEMAIRARNDFLAVMNHMRTPMNAIIALSSLLLETELTP
QRLMVETVLKSSNLLATLINDVLDLSKLEDGSLELEIKAFNLHAVFKEVMGFIKPIASIKRLSVSVMLAPDLPLCAI
GDEKRLMQTILNISGNAVKFTKEGHITLVASIVKADSLREFRTPEFHPTASDDHFYLVKQVKDTGCGIGPQDLPHVF
TKFAHPQSGGNRGNFNGSGLGLAICKRFVSLMGGHIWIDSEGTGRGCTATFVVKLGVCNDNTNTYQQQLIPLVWPSSAD
SDLRAPKPLPDGRGSTPLKSRYQRSVSEQ ID NO :3

[0157] 玉米 ETR2 样 (ZmETR9) 编码序列 (Cys → Tyr102)

[0158] ATGGTGGTGGGAACGGCACTGCTGCGCGGGGTTTCCTCCGCGTGGATCCTCCTGTTCTCCTCCCTG
CTCCTCTCGCCGTCAGCGGCGTCTGTGATTTTCGGCCACTGCGGCGGCTGCGACGACGCCGACGCGGCGCCCTCTC
CAGCACCTATAACATCCTGCAATGCCAGAAGGTCAGCGACTTCCTCATCGCCGCGGCCTACTTCTCCATCCCGCTCG
AGCTGCTCTACTTCGCCACCTGCTCCGACCTCTTCCCCCTCAAATGGATCGTGCTGCAGTTTCGGCGCCTTCATCGTG
CTCTACGGCCTCACGCACCTCATCACTGTGTTACCTACGAGCCGCACTCCTTCCACCTCGTACTCGCCCTTACCGT
CGCCAAGTTCCTGACGGCACTGGTCTCCTTCGCGACGGCCATCACCTGCTGACGCTGATACCACAGCTCCTGAGGG
TGAAGGTCAGGGAAAACCTCCTGATGAACAAGGCGCGTGAGCTGGACCGGGAGGTGGGGAGGATGAAAAGGAAAGAA
GAGGCGAGCTGGCATGTGCGCATGCTCACACAGGAGATCCGCAAGTCGCTCGACAGACATACCATCTTGTAACCCAC
CATGGTTGAGCTCTCGAAGGCACTGGAATGCAGAATTGTGCTGTCTGGATgCCTGATGAGACCAGGAGCACGATGA
TCTTAACACATCAGCTGAGGGAAAGGGATATAATGGACCCACAGAAACACTCGATTCCCTATTGATGATCCGGATGTT
CAAGAAATAAAGGCAACCAAGGATGCAAAAGTTCTTGGCCCAGATTTCGGCGCTAGGGGTTTCTAGCCGAAGCAAGCA
TGAAGCAGGGCCTGTGGCTGCAATAAGGATGCCGATGTTAAGGGTGTCAAATTTCAAAGGAGGGACTCCGGAAGTGA
TGCAGACGAGCTATGCTATCTTGGTTCTGGTTTTGCCTAATGATGGTTCATTAGGGTGGGGTGAAGAGAGTTGGAG
ATTGTTGAGGTAGTTGCTGACCAAGTTGCAGTCGCTCTGTACATGCTGCACTCCTAGAGGAGTCTCAGCTGATGCG
AGAGAAGCTTGCCGAGCAGCATAGGGACTTGCTGCAGGCAAAGGATGAAGCCATGAGGGCAGGGGACGCTAGGAATT
CCTTCCAGACTGCAATGTACGATGGAATGCGAAGGCCAATGCACTCAATCCTTGGTCTCGTCTCAATGATGCAACAG
GAGAGCATGAATCCAGAGCAAAGGCTTGTGATGGATGCCATTGCCAAGACAAGCAGTGTTCATCCCACTGATGAA

CGATGTGATGCAAAACATCGACAATGAACTGTGAGCACTTGTCTTTGGTCAGGAGGCCGTTCAACCTTCATTCCTTCA
TTAAAGAAGTTGTTGGAGTGGTCAGATGTCTAACTGGTTGCAAGGGTGTGGAGTTTGAAGTTTCAAGTGGAGAATTCT
TTGCCAGAAAGGATCATTGGTGTGAGAAGAGAGTCTTCCATATTGTCCTGCACATGGTAGGCACTCTAACAGACCG
ATGTAATGCTGGCTGTATCTCATTATATGTAAATGTCCATAATGAGGTTGAAGATAGGCATAATCATGACTGGATGC
TGCGAAGAGCAAACCTTCTCTGGGGGCTATGTATGTGTGAAATTTGAGATTAGGATTAGAAAATCAAAGGGCTATCTG
TTGAGTTCATCAAGCAGTCAGATAAGTCAGGGATCCAAACCCAACAATTCTGAGATGGGGCTTAGCTTCAATATGTG
CAAGAAGATTGTGCAGATGATGAATGGCAATATTTGGTCAGTATCAGATTCTAAAAGCATCGAGAAACTATCATGC
TAGTCCTCCAGTTCAGTTGGAACCTGTGACTCCGGTCTCTGGAGCGTCCCTCAGATTTGTACAGATCATCCGCAATT
CCCAACTTTAATGGGCTCAGAGTCCTCCTTGCAGACAGCGACTGCACCAACCGAGCTGTAACCTCACAGGCTCCTAGA
GAAGCTTGGTTGCCGAGTCCTTTCGGTCGCTTCTGGCGTCCAAATGCATCAGCTCCTTCGCTGCGGAGTCGTCCTTCC
AGCTGGTGGTTCTTGATCTTGACATGCAGACGATGGATGGATTCTGAAGTAGCCCGCGGATCAGGAAGTTCAGTAGC
AATAGTTGGCTGCCGTTGATTATTGCCCTAGCAGCAAGAATCGACGACAACATCCGGGATCGTTGCCAGAGGTCAGG
AGTAAATGGCCTGATCCAGAAACCGGTCACATTAGCCGCGCTGGGAGATGAACTGTATAGAGTCCTTCAGAACAAT

[0159] SEQ ID NO :4

[0160] 玉米 ETR2 样 (ZmETR9) 蛋白序列 (Cys → Tyr102)

[0161] MVVGTALLRGVSSAWILLFLSSLLSPSAASVDFGHCGGCCDDADDGALSSTYNILQCQKVSDFLIAA
AYFSIPLELLYFATCSDLFPLKWIVLQFGAFIVLYGLTHLITVFTYEPHSFHLVLALTVAKFLTALVSFATAITL
LTLIPQLLRVKVRENFLMNKARELDREVGRMKRKEEASWHVRMLTQEIRKSLDRHTILYTTMVELSKALELQNC
VWMPDETRSTMILTHQLRERDIMPQKHSIPIDDPDVQEI KATKDAKVLGPDSALGVSSRSKHEAGPVAAIRMPM
LRVSNFKGGTPEVMQTSYAILVLVLPNDGSLGWGRRELEIVEVVADQVAVALSHAALLEESQLMREKLAEQHRDL
LQAKDEAMRAGDARNSTFYAMYDGMRRPMHSILGLVSMQQESMNPEQRLVMDAIAKTSSVASTLMNDVMQTSTM
NCEHLSLVRRPFLNHSFIKEVVGVRCLTGCKGVEFEFQVENS LPERIIGDEKRVFHVILHVMGTLTDRCNAGCI
SLYVNVHNEVEDRHNHDWMLRRANFSGGYVCVKFEIRIRKSKGYLLSSSSSQISQGSKPNNSEMGLSFMCKKIV
QMMNGNIWSVSDSKSIGETIMLVLFQLEPVTPVSGASSDLYRSSAIPNFNGLRVLLADSDCTNRAVTHRLLEKL
GCRVLSVASGVQCISSFAAESSFQLVVL DLDMQTMDGFEVARAIRKFSSNSWLPLI IALAARIDDNIRDR CQRSG
VNGLIQKPVTLAALGDELYRVLQNN

[0162] SEQ ID NO :5

[0163] 玉米 ETR2 样 (ZmETR40) 编码序列 (Cys → Tyr102)

[0164] ATGGTGGTGGGAACGGCGCCGTGCGGGGTCTCCGTCTCCTCCGTGTGGATCCTCCTGCTCCTTTCTCC
CTGCTCCTCTCGCCGTGCGGCGGTCCGTGATTTGCGCCACTGCGGCTGCGACGACGCCGACGCGGCCCTCTC
GAGCACCTACAACATCCTGCAATGCCAGAAGGTCAGCGACTTCCTCATCGCCGCGGCCTACTTCTCCATCCCGCTCG
AGCTGCTCTACTTCGCC ACCTGCTCCGACCTTTTCCCCCTCAAATGGATCGTGCTGCAGTTCGGCGCCTTCATCGT
GCTCTACGGCCTCACGCACCTCATCACCGTGTTCACCTACGACCCGCACTCCTTCCACCTCGTGCTCGCCCTCACCG
TCGCCAAGTTCATGACGGCACTAGTCTCCTTCGCCACAGCCATCACGCTGCTGACACTGATACCGCAGCTCCTGAGG
GTGAAGGTCAGGGAAAACCTTCTGGTGAACAAGGCACGTGAGCTGGACCGGGAGGTGGGGATGATGAAAATGAAAGA
AGAGGCGAGCTGGCATGTGCGTATGCTCACACAGGAGATCCGCAAGTCGCTCGACAGGCACACCATCTTGACACCA
CCATGGTTGAGCTCTCGAAAGCGCTGGAAGTGCAGAATTGTGCTGTCTGGATGCCCGATGAAACCAGGAGCGAGAT
GATCTTAACTCATCAGCCAAGGGAAAGGGATATAATGGACCAGCAGAACTGCTCGATTCTTATTGATGATCCAGATG
TTCAAGAAATAAAGGCTACCAAGGACGCAAAAGTTCTTGGGCCAGATTCCGGCACTAGGGGTTGCTACCCGCAAGCTT

GACGTGGGGCTGTGGCTGCAATAAGGATGCCGATGTTAAGGGTGTCAAATTTCAAAGGAGGGACTCCAGAAGTGAT
GCAGACGAGCTATGCTATCTTGTTCTGGTTTTGCCTAATGATGGTTCATTGGGGTGGGGTAGAAGAGAGTTGGAGA
TTGTTGAAGTAGTTGCTGACCAAGTTGCGGTCGCTTTGTACATGCTGCACTCCTAGAGGAGTCTCAGCTGATGCGA
GAGAACTTGCTGAGCAGTATAGGGACTTGCTGCAGGCAAAGCATGAAGCCATGAGGGCAGGGGAAGCTCGGAATTC
CTTCCAGACTGCAATGTACGACGGAATGCGAAGGCCAATGCACTCAATCCTTGGTCTTGTCTCAATGATGCAACAGG
AGAGCATGAATCCAGAGCAAAGGGTTGTGATGGATGCCATTGCCAAGACAAGCAGTGTGGGTCCACACTGATGAAT
GATGTGATGCAAACATCGACAATGAACTGTGAGCACTTGTCTTTGGTGAGGAGGCCGTTCAATCTTCATTCTTTTAT
TAAAGAAGCTGTTGGAGTGGTCAGATGTCTAACTGGTTGCAAGGGTGTAGAGTTTGAGTTTCAAGTGGATAATTCTT
TGCCAGAAAGGATCATTGGTGATGAGAAGAGAGTCTTCCACATTGTCCTGCACATGGTAGGCACCCTAATAAACCGA
TGTAATGTCGGCTGTATCTCGTTATATGTCAATGGTCATAATGAGGTTGAAGAGAGGCATAATCATGACTGGATGCT
GCGGAGAACAACTTCTCTGGGGCTATGTTTGTGTGAAATTTGAGATTAGGATTAGAAAATCCAAGGACTATCTTT
TGAGTTCAAACGGTCAGATAAGTCATGGGTCCAAACCAAACAATTCTGAGATGGGGCTTAGCTTCAATATGTGCAAG
AAGATTGTGCAGATGATGAACGGCAACATTTGGTCAGTATCAGATTCTAAAAGCGTTGGAGAAACCATCATGCTGGT
CCTCCAGTTCCAGCTGCAGCCTCTGGACTGCGGTCTCCTCCGCGGCGTCTTCAGACTTGAGCCGATCGTCCGCAATC
CCCAACTTCAACGGGCTCAGAGTCCTCCTGGCGGACAGCGACGACACCAACAGAGCAGTAACACACAGGCTCCTGGA
GAAGCTCGGCTGCCGGGTCTTTCGGTCGCTCCGGTGTCCAATGCACGAGCTCCTTCGCCGCCGAGCCGTCCTTCC
AGCTGGTGGTCCTGGACCTCGCTTGCAGAGGACGGACGGGCTCGAAGTGGCCCCGCGCATCAGGAAGTTCAGTAGC
AATAGCTGGCTGCCGCTGATCGTCGCCCTAGCTGCGAGGATCGATGACAAGGTCCGAGACGGATGCCAGAGGTGGG
GATAAGCGGCCTGATCCAGAAACCGGCCACGTTAGCTGCGCTGGGAGATGAGCTGTATAGGGTCCTTCAGAACAGT

[0165] SEQ ID NO :6

[0166] 玉米 ETR2 样 (ZmETR40) 蛋白序列 (Cys → Tyr102)

[0167] MVVGTAPCGVS SVSWILLLLSSLLSPSAASVDFGHCGDDADDGALSSTYNILQCQKVSDFLIAAAY
FSIPLELLYFATCSDLFPLKWIVLQFGAFIVLYGLTHLITVFTYDPHSFHLVLALTVAKFMTALVSFATAITLLTLI
PQLLRVKVRENFLVNKARELDREVGMMKMKEEASWHVRMLTQEIRKSLDRHTILYTTMVELSKALELQNCVWMPDE
TRSEMILTHQPRERDIMDQQNCSIPIDDPDVQEIKATKDAKVLGPDSALGVATRKL DVGPVAAIRMPMLRVSNFKGG
TPEVMQTSYAILVLVLPNDGSLGWGRRELEIVEVVADQVAVALSHAALLEESQLMREKLAEQYRDLLQAKHEAMRAG
EARN SFQTAMYDGMRRPMSILGLVSMMQQESMNPEQRVMDIAKTSSVASTLMNDVMQTSTMNCEHLSLVRPFPN
LHSFIKEAVGVVRCLTGCKGVEFEFQVDNSLPERIIGDEKRVFHIVLHVMGT LINRCNVGCI SLYVNGHNEVEERH
NHDWMLRRTNFSGGYVCVKFEIRIRKSKDYLLSSNGQLSHGSKPNNSEMGLSFNMCKKIVQMMNGNIWSVSDSKSVG
ETIMLVLQFQLQPLTAVSSAASSDLRSSAIPNFNGLRVLLADSDDTNRAVTHRLLLEKLGCRVLSVASGVQCTSSFA
AEPSFQLVVL DLALQRTDGLEVARAIRKFSSNSWLPLIVALAARIDDKVRDGCQRSGISGLIQKPATLAALGDELYR
VLQNS

[0001]

序列表

- <110> 丹尼尔. R. 加利
加利福尼亚大学董事会
- <120> 通过靶向的乙烯信号传导的减少来增加谷物产量
- <130> D12C10181CN
- <140> WO PCT/US08/70507
- <141> 2008-07-18
- <150> US 60/950, 853
- <151> 2007-07-19
- <160> 6
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 1902
- <212> DNA
- <213> 玉米
- <220>
- <223> ERS-1样显性负性不结合乙烯的乙烯受体突变体(Cys65 → Tyr65) 编码序列
- <400> 1
- | | | | | | | |
|-------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------|
| atggacggat | gcgattgcat | agagccacta | tggectaccg | atgatcttct | cgteaagtat | 60 |
| cagtacatct | cagacttctt | catageccct | gcgtacttct | cgattccatt | ggagctcata | 120 |
| tattttgtga | agaagtcgtc | cttcttccca | tacagatggg | tcctgatcca | gtttgggtgcg | 180 |
| tttatagttc | tttatggggc | aaccatctg | ataaacctgt | ggacgttcac | cacacataca | 240 |
| aagaccgttg | cgatggtcac | gaccatagcg | aagatttcta | cagcagtcgt | gtcctgtgca | 300 |
| actgctttga | tgctcgttca | tatcattccc | gacttggtga | gcgtgaaaac | tagggagttg | 360 |
| ttcttgaaga | ataaagctga | ggagcttgat | agagagatgg | gacttataag | gacgcaagag | 420 |
| gagactggta | gacatgttag | gatgcttaca | catgaaatca | gaagtactct | tgatagacat | 480 |
| acaattttga | agactactct | cgttgagcta | ggaaggacct | tgggtctgga | agaatgtgca | 540 |
| ttgtggatgc | catctcgaag | tggtcgaagc | cttcagcttt | ctcatacttt | gcgccaccag | 600 |
| attactgttg | gateatcggt | gccaatgaat | cttctgtctg | tcaatcaagt | gttcagtagc | 660 |
| aaccgggcaa | tcataatacc | ccacacatct | tctttgcegc | gggttcgacc | tcttgccagg | 720 |
| cgatatgttc | caccagaagt | ggccgcagtc | cgtgtacctc | ttctacatct | ttcaaaacttt | 780 |
| caaataaatg | attggcctga | gctctcagca | aaaagctttg | caatcatggg | tttgatgctt | 840 |
| ccatctgata | gtgctagaaa | attgcatgtg | catgaattgg | agctgggtga | ggctcgttgc | 900 |
| gatcaggtag | cagttgcact | atctcatgca | gctattctcg | aagagtccat | gcgggcacgt | 960 |
| gatttactaa | tggagcagaa | tggtgccctg | gatttagctc | gaagagaggc | tgagatggct | 1020 |
| atccgtgctc | gcaatgattt | cctagctgtt | atgaatcacg | aaatgagaac | acctatgaat | 1080 |
| gcaataatag | ccctttcctc | cttgcttttg | gaaactgagc | ttactcctga | gcagcgtcta | 1140 |
| atgggtgaaa | cagtactgaa | aagcagcaat | ttgttagcaa | cactcatcaa | tgatgttctg | 1200 |
| gatctttcca | aactcgagga | tggaagcctt | gaactggaga | ttaaagcatt | caatcttcat | 1260 |
| gctgttttca | aagaagtaat | gggtttcatt | aaaccaattg | catctatcaa | gaggctatct | 1320 |
| gtatcggtta | tgttgccacc | agatctgccg | ttatgtgcaa | ttggtgatga | aaagagactc | 1380 |
| atgcaaaacta | ttctgaacat | ctctggcaat | gctgtaaaag | ttaccaagga | gggacacatc | 1440 |
| acgctttag | cttccattgt | gaaggctgac | tctttgagag | agttcagaac | cccagaattt | 1500 |
| catecaactg | caagtgatga | acatttctat | ttgaaagtgc | aggtaaaaga | tacaggctgt | 1560 |
| ggagttagtc | ctcaggatct | acctcatgta | ttcacaaggt | ttgctcatcc | tcaaagtgga | 1620 |
| ggaaaccgag | ggtttaattg | tagtgggtct | ggccttgcca | tatgcaagag | gtttgttagt | 1680 |
| cttatgggag | ggcacatctg | gatcgacagc | gaaggaaccg | gaagaggttg | caccgcaaca | 1740 |

[0002]

```

ttcgtcatca agctcggcgt gtgtgacaac acaaacacct accaaaagca gctggttcct 1800
ctaattctggc caagcagtgc agactccaat ttgtctgctc cgaaagtgtc gcccgcacggg 1860
agaggatctg tttccctgaa atctcggtac caaagaagcg ta 1902

```

<210> 2

<211> 634

<212> PRT

<213> 玉米

<220>

<223> ERS-1样显性负性不结合乙烯的乙烯受体突变体(Cys65 -> Tyr65)蛋白

<400> 2

```

Met Asp Gly Cys Asp Cys Ile Glu Pro Leu Trp Pro Thr Asp Asp Leu
  1              5              10              15

```

```

Leu Val Lys Tyr Gln Tyr Ile Ser Asp Phe Phe Ile Ala Leu Ala Tyr
              20              25              30

```

```

Phe Ser Ile Pro Leu Glu Leu Ile Tyr Phe Val Lys Lys Ser Ser Phe
              35              40              45

```

```

Phe Pro Tyr Arg Trp Val Leu Ile Gln Phe Gly Ala Phe Ile Val Leu
              50              55              60

```

```

Tyr Gly Ala Thr His Leu Ile Asn Leu Trp Thr Phe Thr Thr His Thr
              65              70              75              80

```

```

Lys Thr Val Ala Met Val Met Thr Ile Ala Lys Val Ser Thr Ala Val
              85              90              95

```

```

Val Ser Cys Ala Thr Ala Leu Met Leu Val His Ile Ile Pro Asp Leu
              100              105              110

```

```

Leu Ser Val Lys Thr Arg Glu Leu Phe Leu Lys Asn Lys Ala Glu Glu
              115              120              125

```

```

Leu Asp Arg Glu Met Gly Leu Ile Arg Thr Gln Glu Glu Thr Gly Arg
              130              135              140

```

```

His Val Arg Met Leu Thr His Glu Ile Arg Ser Thr Leu Asp Arg His
              145              150              155              160

```

```

Met Ile Leu Lys Thr Thr Leu Val Glu Leu Gly Arg Thr Leu Gly Leu
              165              170              175

```

```

Glu Glu Cys Ala Leu Trp Met Pro Ser Arg Ser Gly Ser Ser Leu Gln
              180              185              190

```

```

Leu Ser His Thr Leu His His Gln Ile Thr Val Gly Ser Ser Val Pro
              195              200              205

```

```

Ile Asn Leu Pro Val Ile Asn Gln Val Phe Ser Ser Asn Arg Ala Ile
              210              215              220

```

```

Ile Ile Pro His Thr Ser Pro Leu Ala Arg Ile Arg Pro Leu Thr Gly

```

[0003]

225					230					235					240
Arg	Tyr	Val	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Ala	Val	Arg	Val	Pro	Leu	Leu	His
				245					250					255	
Leu	Ser	Asn	Phe	Gln	Ile	Asn	Asp	Trp	Pro	Glu	Leu	Ser	Ala	Lys	Ser
			260					265					270		
Phe	Ala	Ile	Met	Val	Leu	Met	Leu	Pro	Ser	Asp	Ser	Ala	Arg	Lys	Trp
		275					280					285			
His	Val	His	Glu	Leu	Glu	Leu	Val	Glu	Val	Val	Ala	Asp	Gln	Val	Ala
	290					295					300				
Val	Ala	Leu	Ser	His	Ala	Ala	Ile	Leu	Glu	Glu	Ser	Met	Arg	Ala	Arg
305					310					315					320
Asp	Leu	Leu	Met	Glu	Gln	Asn	Val	Ala	Leu	Asp	Leu	Ala	Arg	Arg	Glu
				325					330					335	
Ala	Glu	Met	Ala	Ile	Arg	Ala	Arg	Asn	Asp	Phe	Leu	Ala	Val	Met	Asn
			340					345					350		
His	Glu	Met	Arg	Thr	Pro	Met	Asn	Ala	Ile	Ile	Ala	Leu	Ser	Ser	Leu
		355					360					365			
Leu	Leu	Glu	Thr	Glu	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Arg	Leu	Met	Val	Glu	Thr
	370					375					380				
Val	Leu	Lys	Ser	Ser	Asn	Leu	Leu	Ala	Thr	Leu	Ile	Asn	Asp	Val	Leu
385					390					395					400
Asp	Leu	Ser	Lys	Leu	Glu	Asp	Gly	Ser	Leu	Glu	Leu	Glu	Ile	Lys	Ala
				405					410					415	
Phe	Asn	Leu	His	Ala	Val	Phe	Lys	Glu	Val	Met	Gly	Phe	Ile	Lys	Pro
			420					425					430		
Ile	Ala	Ser	Ile	Lys	Arg	Leu	Ser	Val	Ser	Val	Met	Leu	Ala	Pro	Asp
		435					440					445			
Leu	Pro	Leu	Cys	Ala	Ile	Gly	Asp	Glu	Lys	Arg	Leu	Met	Gln	Thr	Ile
	450					455					460				
Leu	Asn	Ile	Ser	Gly	Asn	Ala	Val	Lys	Phe	Thr	Lys	Glu	Gly	His	Ile
465					470					475					480
Thr	Leu	Val	Ala	Ser	Ile	Val	Lys	Ala	Asp	Ser	Leu	Arg	Glu	Phe	Arg
				485					490					495	
Thr	Pro	Glu	Phe	His	Pro	Thr	Ala	Ser	Asp	Asp	His	Phe	Tyr	Leu	Lys
			500					505					510		
Val	Gln	Val	Lys	Asp	Thr	Gly	Cys	Gly	Ile	Gly	Pro	Gln	Asp	Leu	Pro
		515					520					525			
His	Val	Phe	Thr	Lys	Phe	Ala	His	Pro	Gln	Ser	Gly	Gly	Asn	Arg	Gly

[0004]

530	535	540
Phe Asn Gly Ser Gly Leu Gly Leu Ala Ile Cys Lys Arg Phe Val Ser 545	550	555
Leu Met Gly Gly His Ile Trp Ile Asp Ser Glu Gly Thr Gly Arg Gly 565	570	575
Cys Thr Ala Thr Phe Val Val Lys Leu Gly Val Cys Asp Asn Thr Asn 580	585	590
Thr Tyr Gln Gln Gln Leu Ile Pro Leu Val Trp Pro Ser Ser Ala Asp 595	600	605
Ser Asp Leu Arg Ala Pro Lys Pro Leu Pro Asp Gly Arg Gly Ser Thr 610	615	620
Pro Leu Lys Ser Arg Tyr Gln Arg Ser Val 625	630	

<210> 3

<211> 2301

<212> DNA

<213> 玉米

<220>

<223> ETR2样(ZmETR9) 显性负性不结合乙烯的乙烯受体突变体(Cys102 -> Tyr102)
编码序列

<400> 3

```

atggtggtgg gaacggcact gctgcgcggg gtttctctcg cgtggatcct cctgttcttc 60
tcttcctgc tctctcgcg gtcagcggcg tctgtcgatt tcggccactg cggcggtgc 120
gacgacgcg acgacggcg cctctccagc acctataaca tctgcaatg ccagaaggtc 180
agcgacttc tcatcgccg gccctacttc tccatcccgc tcgagctgct ctacttcgcc 240
acctgctccg acctcttccc cctcaaattg atcgtgctgc agttcggcgc cttcatcgtg 300
ctctacggcc tcacgcacct calcactlg ltcacctacg agccgcactc ctccacctc 360
gtactcgccc ttaccgtcgc caagtctctg acggcaactg tctccttcgc gacggccatc 420
acctgctga cgctgatacc acagctcctg aggggtgaagg tcagggaaga cttcctgatg 480
aacaaggcgc gtgagctgga cggggagggt gggaggatga aaaggaaaga agagcgagc 540
tgcatgtgc gcatgtcac acaggagatc cgcaagtcgc tcgacagaca taccatcttg 600
tacaccacca tggttgagct ctggaaggca ctggaactgc agaattgtgc tgtctggatg 660
cctgatgaga ccaggagcac gatgatctta acacatcagc tgagggaag ggatataatg 720
gaccacaga aacactcgat tctattgat gatccggatg ttcaagaaat aaaggcaacc 780
aaggatgcaa aagttcttgg ccagatttcg gcgctagggg tttctagccg aagcaagcat 840
gaagcagggc ctgtggctgc aataaggatg ccgatgttaa ggggtgtcaa tttcaaagga 900
gggactccgg aagtgatgca gacgagctat gctatcttgg ttctggtttt gcctaattgat 960
ggttcattag ggtggggtcg aagagagttg gagattgttg aggtagttgc tgaccaagtt 1020
gcagtcgctc tgtcacatgc tgcactccta gaggagtctc agctgatgcg agagaagctt 1080
gccgagcagc atagggactt gctgcaggca aaggatgaag ccatgagggc aggggacgct 1140
aggaattcct tccagactgc aatgtacgat ggaatgcgaa ggccaatgca ctcaatcctt 1200
ggtctcgtct caatgatgca acaggagagc atgaatccag agcaaaggct tgtgatggat 1260
gccattgcc aagacaagcag tgttgcatcc aactgatga acgatgtgat gcaaacatcg 1320
acaatgaact gtgagcactt gtctttggtc aggagccgt tcaaccttca ttccttcatt 1380
aaagaagttg ttggagtggc cagatgtcta actggttgca aggggtgtgga gtttgagttt 1440
caagtggaga attctttgcc agaaaggatc attggtgatg agaagagagt cttccatatt 1500
gtcctgcaca tggtaggcac tctaacagac cgatgtaatg ctggctgtat ctcatatat 1560

```

[0005]

```

gtaaagtgtcc ataatgaggt tgaagatagg cataatcatg actggatgct gcgaagagca 1620
aactttctctg ggggctatgt atgtgtgaaa tttgagatta ggattagaaa atcaaagggc 1680
tatctgttga gticcatcaag cagtcagata agtcagggat ccaaacccaa caattctgag 1740
atggggctta gcttcaatat gtgcaagaag attgtgcaga tgatgaatgg caatatttgg 1800
tcagtatcag attctaaaag catcggagaa actatcatgc tagtcctcca gttccagttg 1860
gaacctgtga ctccggtctc tggagcgtcc tcagatttgt acagatcacc cgcaattccc 1920
aactttaatg ggctcagagt cctccttgcg gacagcgact gcaccaaccg agctgtaact 1980
cacaggtccc tagagaagct tggttgccga gtcctttcgg tcgcttctgg cgtccaatgc 2040
atcagctcct tcgctgcgga gtcgtccttc cagctggtgg ttcttgatct tgacatgcag 2100
acgatggatg gattcgaagt agcccgcgcg atcaggaagt tcagtagcaa tagttggctg 2160
ccgttgatta ttgccctagc agcaagaatc gacgacaaca tccgggatcg ttgccagagg 2220
tcaggagtaa atggcctgat ccagaaaccg gtcacattag ccgcgctggg agatgaactg 2280
tatagagtcc ttcagaacaa t 2301

```

<210> 4

<211> 767

<212> PRT

<213> 玉米

<220>

<223> ETR2样(ZmETR9) 显性负性不结合乙烯的乙烯受体突变体(Cys102 -> Tyr102) 蛋白

<400> 4

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

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

Asp Phe Gly His Cys Gly Gly Cys Asp Asp Ala Asp Asp Gly Ala Leu
35 40 45

Ser Ser Thr Tyr Asn Ile Leu Gln Cys Gln Lys Val Ser Asp Phe Leu
50 55 60

Ile Ala Ala Ala Tyr Phe Ser Ile Pro Leu Glu Leu Leu Tyr Phe Ala
65 70 75 80

Thr Cys Ser Asp Leu Phe Pro Leu Lys Trp Ile Val Leu Gln Phe Gly
85 90 95

Ala Phe Ile Val Leu Tyr Gly Leu Thr His Leu Ile Thr Val Phe Thr
100 105 110

Tyr Glu Pro His Ser Phe His Leu Val Leu Ala Leu Thr Val Ala Lys
115 120 125

Phe Leu Thr Ala Leu Val Ser Phe Ala Thr Ala Ile Thr Leu Leu Thr
130 135 140

Leu Ile Pro Gln Leu Leu Arg Val Lys Val Arg Glu Asn Phe Leu Met
145 150 155 160

Asn Lys Ala Arg Glu Leu Asp Arg Glu Val Gly Arg Met Lys Arg Lys
165 170 175

[0006]

Glu	Glu	Ala	Ser	Trp	His	Val	Arg	Met	Leu	Thr	Gln	Glu	Ile	Arg	Lys	180	185	190	
Ser	Leu	Asp	Arg	His	Thr	Ile	Leu	Tyr	Thr	Thr	Met	Val	Glu	Leu	Ser	195	200	205	
Lys	Ala	Leu	Glu	Leu	Gln	Asn	Cys	Ala	Val	Trp	Met	Pro	Asp	Glu	Thr	210	215	220	
Arg	Ser	Thr	Met	Ile	Leu	Thr	His	Gln	Leu	Arg	Glu	Arg	Asp	Ile	Met	225	230	235	240
Asp	Pro	Gln	Lys	His	Ser	Ile	Pro	Ile	Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Glu	245	250	255	
Ile	Lys	Ala	Thr	Lys	Asp	Ala	Lys	Val	Leu	Gly	Pro	Asp	Ser	Ala	Leu	260	265	270	
Gly	Val	Ser	Ser	Arg	Ser	Lys	His	Glu	Ala	Gly	Pro	Val	Ala	Ala	Ile	275	280	285	
Arg	Met	Pro	Met	Leu	Arg	Val	Ser	Asn	Phe	Lys	Gly	Gly	Thr	Pro	Glu	290	295	300	
Val	Met	Gln	Thr	Ser	Tyr	Ala	Ile	Leu	Val	Leu	Val	Leu	Pro	Asn	Asp	305	310	315	320
Gly	Ser	Leu	Gly	Trp	Gly	Arg	Arg	Glu	Leu	Glu	Ile	Val	Glu	Val	Val	325	330	335	
Ala	Asp	Gln	Val	Ala	Val	Ala	Leu	Ser	His	Ala	Ala	Leu	Leu	Glu	Glu	340	345	350	
Ser	Gln	Leu	Met	Arg	Glu	Lys	Leu	Ala	Glu	Gln	His	Arg	Asp	Leu	Leu	355	360	365	
Gln	Ala	Lys	Asp	Glu	Ala	Met	Arg	Ala	Gly	Asp	Ala	Arg	Asn	Ser	Phe	370	375	380	
Gln	Thr	Ala	Met	Tyr	Asp	Gly	Met	Arg	Arg	Pro	Met	His	Ser	Ile	Leu	385	390	395	400
Gly	Leu	Val	Ser	Met	Met	Gln	Gln	Glu	Ser	Met	Asn	Pro	Glu	Gln	Arg	405	410	415	
Leu	Val	Met	Asp	Ala	Ile	Ala	Lys	Thr	Ser	Ser	Val	Ala	Ser	Thr	Leu	420	425	430	
Met	Asn	Asp	Val	Met	Gln	Thr	Ser	Thr	Met	Asn	Cys	Glu	His	Leu	Ser	435	440	445	
Leu	Val	Arg	Arg	Pro	Phe	Asn	Leu	His	Ser	Phe	Ile	Lys	Glu	Val	Val	450	455	460	
Gly	Val	Val	Arg	Cys	Leu	Thr	Gly	Cys	Lys	Gly	Val	Glu	Phe	Glu	Phe	465	470	475	480

[0007]

Gln	Val	Glu	Asn	Ser	Leu	Pro	Glu	Arg	Ile	Ile	Gly	Asp	Glu	Lys	Arg	
				485					490					495		
Val	Phe	His	Ile	Val	Leu	His	Met	Val	Gly	Thr	Leu	Thr	Asp	Arg	Cys	
			500					505					510			
Asn	Ala	Gly	Cys	Ile	Ser	Leu	Tyr	Val	Asn	Val	His	Asn	Glu	Val	Glu	
		515					520					525				
Asp	Arg	His	Asn	His	Asp	Trp	Met	Leu	Arg	Arg	Ala	Asn	Phe	Ser	Gly	
	530					535					540					
Gly	Tyr	Val	Cys	Val	Lys	Phe	Glu	Ile	Arg	Ile	Arg	Lys	Ser	Lys	Gly	
545					550					555					560	
Tyr	Leu	Leu	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Gln	Ile	Ser	Gln	Gly	Ser	Lys	Pro	
			565					570						575		
Asn	Asn	Ser	Glu	Met	Gly	Leu	Ser	Phe	Asn	Met	Cys	Lys	Lys	Ile	Val	
			580					585					590			
Gln	Met	Met	Asn	Gly	Asn	Ile	Trp	Ser	Val	Ser	Asp	Ser	Lys	Ser	Ile	
		595					600					605				
Gly	Glu	Thr	Ile	Met	Leu	Val	Leu	Gln	Phe	Gln	Leu	Glu	Pro	Val	Thr	
	610					615					620					
Pro	Val	Ser	Gly	Ala	Ser	Ser	Asp	Leu	Tyr	Arg	Ser	Ser	Ala	Ile	Pro	
625					630					635					640	
Asn	Phe	Asn	Gly	Leu	Arg	Val	Leu	Leu	Ala	Asp	Ser	Asp	Cys	Thr	Asn	
			645						650					655		
Arg	Ala	Val	Thr	His	Arg	Leu	Leu	Glu	Lys	Leu	Gly	Cys	Arg	Val	Leu	
			660					665					670			
Ser	Val	Ala	Ser	Gly	Val	Gln	Cys	Ile	Ser	Ser	Phe	Ala	Ala	Glu	Ser	
		675				680						685				
Ser	Phe	Gln	Leu	Val	Val	Leu	Asp	Leu	Asp	Met	Gln	Thr	Met	Asp	Gly	
	690					695					700					
Phe	Glu	Val	Ala	Arg	Ala	Ile	Arg	Lys	Phe	Ser	Ser	Asn	Ser	Trp	Leu	
705					710					715					720	
Pro	Leu	Ile	Ile	Ala	Leu	Ala	Ala	Arg	Ile	Asp	Asp	Asn	Ile	Arg	Asp	
				725					730					735		
Arg	Cys	Gln	Arg	Ser	Gly	Val	Asn	Gly	Leu	Ile	Gln	Lys	Pro	Val	Thr	
			740					745					750			
Leu	Ala	Ala	Leu	Gly	Asp	Glu	Leu	Tyr	Arg	Val	Leu	Gln	Asn	Asn		
		755					760					765				

<210> 5

[0008]

<211> 2298

<212> DNA

<213> 玉米

<220>

<223> ETR2样(ZmETR40) 显性负性不结合乙烯的乙烯受体突变体(Cys102 -> Tyr102)
编码序列

<400> 5

```

atggtggtgg gaacggcgcc gtgcgggggtc tccgtctcct ccgtgtggat cctcctgctc 60
ctttctctcc tgctcctctc gccgtcggcg gcgtccgtcg atttcggcca ctgcggctgc 120
gacgacgccg acgacggcgc cctctcgagc acctacaaca tcctgcaatg ccagaaggte 180
agcgacttcc tcatcgccgc ggctacttc tccatcccgc tcgagctgct ctacttcgcc 240
acctgtcccg accttttccc cttcaaatgg atcgtgctgc agttcggcgc cttcatcgctg 300
ctctacggcc tcacgcacct catcacctgt ttcacctacg acccgcactc cttccacctc 360
gtgctcgccc tcaccgtcgc caagttcatg acggcactag tctccttcgc cacagccatc 420
acgtgtctga cactgatacc gcagctcctg aggggtgaagg tcagggaanaa cttcctgggtg 480
aacaaggcac gtgagctgga cggggagggtg gggatgatga aatgaaaga agaggcgagc 540
tgcatgtgct gtatgctcac acaggagatc cgcaagtcgc tcgacaggca caccatcttg 600
tacaccacca tggttgagct ctcgaaagcg ctggaactgc agaattgtgc tgtctggatg 660
cccgatgaaa ccaggagcga gatgatctta actcatcagc caagggaag ggatataatg 720
gaccagcaga acgtctcgal lclalilgal galccagalg llcaagaaal aaaggclacc 780
aaggacgcaa aagttcttgg gccagattcg gcactagggg ttgctaccgg caagcttgac 840
gtggggcctg tggctgcaat aaggatgccg atgttaaggg tgtcaaattt caaaggaggg 900
actccagaag tgatgcagac gagctatgct atcttggttc tggttttgcc taatgatggt 960
tcattggggt ggggtagaag agagtggag attgttgaag tagttgctga ccaagttgcg 1020
gtcgttttgt cacatgctgc actcctagag gactctcagc tgatgcgaga gaaacttgct 1080
gagcagtata gggacttgct gcaggcaaaag catgaagcca tgagggcagg ggaagctcgg 1140
aatctcttcc agactgcaat gtacgacgga atgcgaagc caatgcactc aatccttggt 1200
cttgtctcaa tgatgcaaca ggagagcatg aatccagagc aaagggttgt gatggatgcc 1260
attgccaaga caagcagtgt tgcgtccaca ctgatgaatg atgtgatgca aacatcgaca 1320
atgaactgtg agcacttgct tttggtgagg aggccgttca atcttcattc ttttattaaa 1380
gaagctgttg gagtggctcag atgtctaact ggttgcaagg gtgtagagtt tgagtttcaa 1440
gtggataatt ctttgccaga aaggatcatt ggtgatgaga agagagtctt ccacattgtc 1500
ctgcacatgg taggcacct aataaaccga tgtaatgtcg gctgtatctc gttatatgtc 1560
aatggtcata atgaggttga agagaggcat aatcatgact ggatgctgcg gagaacaaac 1620
llclclgggg gclalglilg lglgaaalll gagallagga llagaaaalc caaggactat 1680
cttttgagtt caaacggtca gataagtcac ggggtccaaac caaacaattc tgagatgggg 1740
cttagcttca atatgtgcaa gaagattgtg cagatgatga acggcaacat ttggctcagta 1800
tcagattcta aaagcgttgg agaaaccatc atgctggtec tccagtcca gctgcagcct 1860
ctgactcggg tctctccgc ggctcttca gacttgagcc gatcgtccgc aatccccaac 1920
ttcaacgggc tcagagtcct cctggcgagc agcgacgaca ccaacagagc agtaacacac 1980
aggctcctgg agaagtcgg ctgccgggtc ctttcggteg cctccggtgt ccaatgcacg 2040
agctccttcg ccgccgagcc gtccctccag ctggtggtec tggacctcgc cttgcagagg 2100
acggacgggc tcgaagtggc ccgcccagtc aggaagttca gtagcaatag ctggctgccg 2160
ctgategtcg ccctagctgc gaggatcgat gacaaggtec gagacggatg ccagaggteg 2220
gggataagcg gcctgateca gaaaccggcc acgttagctg cgctgggaga tgagctgtat 2280
agggtccttc agaacagt

```

<210> 6

<211> 766

<212> PRT

<213> 玉米

<220>

<223> ETR2样(ZmETR40) 显性负性不结合乙烯的乙烯受体突变体(Cys102 -> Tyr102)

[0009]

蛋白

<400> 6

Met Val Val Gly Thr Ala Pro Cys Gly Val Ser Val Ser Ser Val Trp
 1 5 10 15

Ile Leu Leu Leu Leu Ser Ser Leu Leu Leu Ser Pro Ser Ala Ala Ser
 20 25 30

Val Asp Phe Gly His Cys Gly Cys Asp Asp Ala Asp Asp Gly Ala Leu
 35 40 45

Ser Ser Thr Tyr Asn Ile Leu Gln Cys Gln Lys Val Ser Asp Phe Leu
 50 55 60

Ile Ala Ala Ala Tyr Phe Ser Ile Pro Leu Glu Leu Leu Tyr Phe Ala
 65 70 75 80

Thr Cys Ser Asp Leu Phe Pro Leu Lys Trp Ile Val Leu Gln Phe Gly
 85 90 95

Ala Phe Ile Val Leu Tyr Gly Leu Thr His Leu Ile Thr Val Phe Thr
 100 105 110

Tyr Asp Pro His Ser Phe His Leu Val Leu Ala Leu Thr Val Ala Lys
 115 120 125

Phe Met Thr Ala Leu Val Ser Phe Ala Thr Ala Ile Thr Leu Leu Thr
 130 135 140

Leu Ile Pro Gln Leu Leu Arg Val Lys Val Arg Glu Asn Phe Leu Val
 145 150 155 160

Asn Lys Ala Arg Glu Leu Asp Arg Glu Val Gly Met Met Lys Met Lys
 165 170 175

Glu Glu Ala Ser Trp His Val Arg Met Leu Thr Gln Glu Ile Arg Lys
 180 185 190

Ser Leu Asp Arg His Thr Ile Leu Tyr Thr Thr Met Val Glu Leu Ser
 195 200 205

Lys Ala Leu Glu Leu Gln Asn Cys Ala Val Trp Met Pro Asp Glu Thr
 210 215 220

Arg Ser Glu Met Ile Leu Thr His Gln Pro Arg Glu Arg Asp Ile Met
 225 230 235 240

Asp Gln Gln Asn Cys Ser Ile Pro Ile Asp Asp Pro Asp Val Gln Glu
 245 250 255

Ile Lys Ala Thr Lys Asp Ala Lys Val Leu Gly Pro Asp Ser Ala Leu
 260 265 270

Gly Val Ala Thr Arg Lys Leu Asp Val Gly Pro Val Ala Ala Ile Arg
 275 280 285

[0010]

Met	Pro	Met	Leu	Arg	Val	Ser	Asn	Phe	Lys	Gly	Gly	Thr	Pro	Glu	Val	290	295	300	
Met	Gln	Thr	Ser	Tyr	Ala	Ile	Leu	Val	Leu	Val	Leu	Pro	Asn	Asp	Gly	305	310	315	320
Ser	Leu	Gly	Trp	Gly	Arg	Arg	Glu	Leu	Glu	Ile	Val	Glu	Val	Val	Ala	325	330	335	
Asp	Gln	Val	Ala	Val	Ala	Leu	Ser	His	Ala	Ala	Leu	Leu	Glu	Glu	Ser	340	345	350	
Gln	Leu	Met	Arg	Glu	Lys	Leu	Ala	Glu	Gln	Tyr	Arg	Asp	Leu	Leu	Gln	355	360	365	
Ala	Lys	His	Glu	Ala	Met	Arg	Ala	Gly	Glu	Ala	Arg	Asn	Ser	Phe	Gln	370	375	380	
Thr	Ala	Met	Tyr	Asp	Gly	Met	Arg	Arg	Pro	Met	His	Ser	Ile	Leu	Gly	385	390	395	400
Leu	Val	Ser	Met	Met	Gln	Gln	Glu	Ser	Met	Asn	Pro	Glu	Gln	Arg	Val	405	410	415	
Val	Met	Asp	Ala	Ile	Ala	Lys	Thr	Ser	Ser	Val	Ala	Ser	Thr	Leu	Met	420	425	430	
Asn	Asp	Val	Met	Gln	Thr	Ser	Thr	Met	Asn	Cys	Glu	His	Leu	Ser	Leu	435	440	445	
Val	Arg	Arg	Pro	Phe	Asn	Leu	His	Ser	Phe	Ile	Lys	Glu	Ala	Val	Gly	450	455	460	
Val	Val	Arg	Cys	Leu	Thr	Gly	Cys	Lys	Gly	Val	Glu	Phe	Glu	Phe	Gln	465	470	475	480
Val	Asp	Asn	Ser	Leu	Pro	Glu	Arg	Ile	Ile	Gly	Asp	Glu	Lys	Arg	Val	485	490	495	
Phe	His	Ile	Val	Leu	His	Met	Val	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Arg	Cys	Asn	500	505	510	
Val	Gly	Cys	Ile	Ser	Leu	Tyr	Val	Asn	Gly	His	Asn	Glu	Val	Glu	Glu	515	520	525	
Arg	His	Asn	His	Asp	Trp	Met	Leu	Arg	Arg	Thr	Asn	Phe	Ser	Gly	Gly	530	535	540	
Tyr	Val	Cys	Val	Lys	Phe	Glu	Ile	Arg	Ile	Arg	Lys	Ser	Lys	Asp	Tyr	545	550	555	560
Leu	Leu	Ser	Ser	Asn	Gly	Gln	Ile	Ser	His	Gly	Ser	Lys	Pro	Asn	Asn	565	570	575	
Ser	Glu	Met	Gly	Leu	Ser	Phe	Asn	Met	Cys	Lys	Lys	Ile	Val	Gln	Met	580	585	590	

[0011]

Met	Asn	Gly	Asn	Ile	Trp	Ser	Val	Ser	Asp	Ser	Lys	Ser	Val	Gly	Glu
		595					600					605			
Thr	Ile	Met	Leu	Val	Leu	Gln	Phe	Gln	Leu	Gln	Pro	Leu	Thr	Ala	Val
	610					615					620				
Ser	Ser	Ala	Ala	Ser	Ser	Asp	Leu	Ser	Arg	Ser	Ser	Ala	Ile	Pro	Asn
625					630					635					640
Phe	Asn	Gly	Leu	Arg	Val	Leu	Leu	Ala	Asp	Ser	Asp	Asp	Thr	Asn	Arg
				645					650					655	
Ala	Val	Thr	His	Arg	Leu	Leu	Glu	Lys	Leu	Gly	Cys	Arg	Val	Leu	Ser
			660					665					670		
Val	Ala	Ser	Gly	Val	Gln	Cys	Thr	Ser	Ser	Phe	Ala	Ala	Glu	Pro	Ser
		675					680					685			
Phe	Gln	Leu	Val	Val	Leu	Asp	Leu	Ala	Leu	Gln	Arg	Thr	Asp	Gly	Leu
	690					695					700				
Glu	Val	Ala	Arg	Ala	Ile	Arg	Lys	Phe	Ser	Ser	Asn	Ser	Trp	Leu	Pro
705					710					715					720
Leu	Ile	Val	Ala	Leu	Ala	Ala	Arg	Ile	Asp	Asp	Lys	Val	Arg	Asp	Gly
				725					730					735	
Cys	Gln	Arg	Ser	Gly	Ile	Ser	Gly	Leu	Ile	Gln	Lys	Pro	Ala	Thr	Leu
			740					745					750		
Ala	Ala	Leu	Gly	Asp	Glu	Leu	Tyr	Arg	Val	Leu	Gln	Asn	Ser		
		755					760					765			

