



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101743313 A

(43) 申请公布日 2010.06.16

(21) 申请号 200880019032.9

代理人 谢顺星

(22) 申请日 2008.06.04

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C12N 15/82(2006.01)

07109621.8 2007.06.05 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.12.07

(86) PCT申请的申请数据

PCT/NL2008/050350 2008.06.04

(87) PCT申请的公布数据

W02008/150165 EN 2008.12.11

(71) 申请人 表现研究有限公司

地址 荷兰瓦赫宁根

(72) 发明人 阿德琳·阿芒迪娜·科莱特·波迪尔

戴安娜·安托瓦内特·玛丽亚·范德考伯

安妮·道维·狄波尔

保罗·亚历山大·帕萨里尼奥

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限

公司 11002

权利要求书 1 页 说明书 15 页 附图 3 页

(54) 发明名称

植物非生物胁迫的耐受性

(57) 摘要

本发明涉及一种使植物或植物细胞产生非生物胁迫耐受的方法。其是通过导入编码 RKS 蛋白的基因,特别是编码 RKS 亚群 II 蛋白的基因,更具体是 RKS1、RKS4 或截短型 RKS4,或编码 RKS 亚群 III 的蛋白的基因,优选 RKS12 实现的。RSK 基因过表达效果可通过添加油菜素类固醇化合物处理植物来增强。

1. 一种使植物产生非生物胁迫耐受的方法,其是通过将编码 RSK 基因的核苷酸序列或其同系物引入所述植物。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述 RKS 基因是截短型 RKS 基因。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述 RKS 基因选自 RKS 亚群 II (RKS1, RKS4, RKS5, RKS7, RKS11, 和 RKS14),更具体是 RKS1, RKS4 和截短型 RKS4。
4. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述 RKS 基因选自 RKS 亚群 III (RKS0, RKS8, RKS10, RKS12 和 RKS13),更具体是 RKS12。
5. 根据以上任一项权利要求所述的方法,其中所述核苷酸序列是过表达的。
6. 根据以上任一项权利要求所述的方法,其中所述植物还用油菜素类固醇进行处理。
7. 根据权利要求 6 所述的方法,其中所述油菜素类固醇选自油菜素内酯、表油菜素内酯、表高油菜素内酯及类似物。
8. 根据权利要求 1-7 任一项所述的方法,其中所述非生物胁迫是高盐度。
9. 根据权利要求 1-7 任一项所述的方法,其中所述非生物胁迫是渗透胁迫。
10. 根据权利要求 1-7 任一项所述的方法,其中所述非生物胁迫是冻害。
11. RKS 基因,更具体是来自 RKS 亚群 II 的基因,优选 RKS1, RKS4 或截短型 RKS4 在使植物或植物细胞产生非生物胁迫耐受中的应用。
12. RKS 基因,更具体是来自 RKS 亚群 III 的基因,优选 RKS12 在使植物或植物细胞产生非生物胁迫耐受中的应用。

植物非生物胁迫的耐受性

技术领域

[0001] 本发明涉及植物遗传领域,具体涉及增加植物对非生物胁迫的耐受性的基因工程领域。

背景技术

[0002] 植物属于高柔性的生物,使其具有效地和快速地适应(变化)它们的环境。由于不能移动,它们需要通过形态和生理进化策略以使其即使在恶劣的环境中生长。然而,其对环境的适应常常与农民或消费者期望的最佳经济性状不一致。对特定环境完全适应的植物常常表现出相对较低的产量或营养价值或者缺乏观赏性特点。相反地,设计用来满足农民和消费者需要的高育成品种,常常受环境情况和/或变化影响。

[0003] 非生物胁迫或环境胁迫是除整个活生物体外的其它方式对植物产生的胁迫。属于环境条件的非生物胁迫的例子诸如:高盐度,渗透胁迫,氧化应激,(极)热和(极)冷以及干旱。在许多发展中国家,这些胁迫引起的主要作物诸如水稻,玉米(玉米)和小麦作物的收获损失和作物产量损失代表重大的经济和政治因素,并引起粮食短缺。

[0004] 植物通常在其整个生命周期都暴露在环境水分含量减少的条件下。大部分植物具有保护其抵御干燥条件的进化策略。然而,如果干旱的非常严重和持续时间非常长,那么大多数农作物的发育,生长以及产量都会受到较大影响。此外,大部分作物对土壤中的高盐浓度特别敏感。持续暴露于干旱以及高盐环境引起植物代谢重大改变。长期暴露于极热或冷环境下可以观察到类似的改变。代谢的较大改变最终导致细胞死亡以及由此引发的产量损失。

[0005] 1979年,从油菜(*Brassica napus*)的花粉中分离得到一种新的被称为油菜素内酯的植物生长促进因子,其被鉴定为一种新型的类固醇内酯。研究发现在所有植物种类中含有油菜素内酯-类似类固醇化合物(称作油菜素类固醇),其浓度极低,并且具有使植物同时适应生物和非生物胁迫的功能(参见, Mandava, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39(1988), 23-52)。最初研究表明油菜素内酯这种特殊的因子的生理功能有(i)在较低温度时加速植物种子的发芽和生长,(ii)通过诱导细胞表面皮质微管和纤维素微丝纵向排列促进以细胞大小和伸长的增加,(iii)通过导管元的放大促进木质部的分化,(iv)导致植物及其果实干重显著增加,(v)促进叶子的开卷和增大,(vi)诱导H⁺的输出以及细胞膜超极化特性使生长素诱导细胞生长,(vii)抑制冠瘿瘤细胞的分裂以及茎的径向生长,(viii)抑制光-种植植物中花青素的产生,(ix)抑制去黄化诱导,例如,在黑暗环境中借助细胞分裂素,(x)促进黑暗中组织的衰老,但是在光照下延长植物的寿命以及(xi)诱导植物对多种细菌和真菌(列举于 Mandava(1988), *loc. cit.*)的病原体抗性。最近的研究进一步确定油菜素类固醇对大范围非生物胁迫(干旱,冷和盐, Kagale 等, *Planta* 225(2007), 353-364)的保护作用。

[0006] 继油菜素内酯最初的分离以及生理研究之后,在不同植物品种中鉴定了大量的,代表公认的生物合成中间体的油菜素类固醇化合物。由于这些化合物在体内浓度极低,

因此在发展这些化合物的化学合成方法上已经做出努力（参考，见：Adam 和 Marquardt, *Phytochem.* 25(1986), 1787-1799)。为了确定生理研究的结果，在田间试验中利用大豆、玉米、水稻和其它作物以及树来测试这些化合物。然而，田间试验显示由于植物表皮对类固醇吸收低，喷洒或施肥的类固醇数量相当大，从而利用油菜素类固醇提供植物对（非）生物胁迫的抵御几乎不可行。

[0007] 胁迫 - 耐受植物的培育是有可能解决或调解至少一些问题的一种策略。然而，培育对这些胁迫具有抗性（耐受性）的植物新品系的传统植物育种策略相对缓慢，并需要具体的抗性品系与理想品系杂交。有限的胁迫耐受种质资源以及远亲相关植物品种之间杂交的不兼容性在传统育种中遇到较大问题。此外，导致模式耐受植物干旱、热 / 冷、盐和和其它耐受性的细胞进程性质复杂，并涉及细胞适应的多种机制以及许多代谢途径。胁迫耐性的多组分性质不仅使耐受性的育种基本上不成功，而且也限制了利用生物技术方法获得基因工程胁迫耐受性植物的能力。

[0008] 因此，所需要的就是鉴定参与这些多成分过程导致胁迫耐受性的基因和蛋白。阐明在胁迫耐受性植物中表达的基因功能不仅可以推进我们对植物对环境胁迫适应性和耐受性的理解，而且还可以为作物改良新策略的设计提供重要信息。

[0009] 非生物胁迫诱导的基因的表达和功能已经从分子水平上进行了很好的研究。作为对胁迫作用的反应，基因表达和信号传导似乎涉及到复杂的机制。其包括非生物胁迫的感应机制，胁迫信号对细胞信号的调节，移位到核，参与胁迫信号传导的第二信使，胁迫诱导的基因转录调控以及胁迫诱导的基因的功能与合作。

[0010] 在动物细胞中，磷脂酰肌醇特异的磷酸脂酶 C (PI-PLC) 在不同的信号传导通路的早期起着关键作用。胞外刺激注入激素和生长因子激活 PI-PLC。PI-PLC 水解磷脂酰肌醇 -4,5- 二磷酸 (PIP₂) 并产生两种第二信使，肌醇,4,5- 三磷酸 (IP₃) 和 1,2- 甘油二酯 (DG)。IP₃ 诱导细胞内 Ca²⁺ 向胞质的释放，这又造成了其中的各种反应。DG 和 PIP₂ 也起着第二信使的作用并调控着不同的细胞反应。

[0011] 在植物中，类似的系统被认为具有对非生物胁迫反应的功能。这明确显示磷酸脂酶 A, C 或 D (PLA, PLC 或 PLD)，依据它们的裂解位置，在早期信号传导事件中具有促进细胞体积随植物渗透胁迫和渗透调节变化的作用，这对植物胁迫耐受性很重要 (Wang X. 等, 2000, *Biochemical Society Transactions.* 28 ;813-816 ;Chapman KD, 1998 *Tr. Plant Sci.* 3 : 419-426)。例如，PIP₂-PLC 快速激活介导保卫细胞中脱落酸 (ABA) - 诱导的气孔关闭。这导致 IP₃ 水平的增加，胞内钙升高，以及随后 K⁺ 通道的抑制。例如，在拟南芥中，磷酸脂酶 C 的基因，AtPLC 可受干旱或盐胁迫诱导快速产生 (Hirayama, T. 等, 1995 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92 :3903-3907)。

[0012] 如上所述，在植物中，Ca²⁺ 离子作为第二信使在不同信号传导中起着重要作用。受风，触摸，非生物胁迫（冷，干旱以及盐）或真菌诱导子的刺激可以观察到胞内 Ca²⁺ 浓度的显著增加。编码具有一个保守的 EF-hand 结构域的 Ca²⁺ 结合蛋白的几个基因已经被分离，并显示出非生物胁迫处理可以增加其表达量 (Frandsen G. 等, 1996 *J Biol. Chem.* 271 : 343-348 ;Takahashi S. 等, 2000 *Plant Cell Physiol.* 41 :898-903)。

[0013] 近年来不可思议地被称作 14-3-3 的蛋白，由于它们参与了包括从黏菌到高等植物的真核生物的不同生理过程的调控，因此同样引起了广泛的关注。在植物上，已经提出

14-3-3 蛋白的许多生物学作用。其中最有意义的作用包括核编码叶绿体蛋白的输入, 转录因子复合物的组装以及细胞内信号传导级联对应的酶活性调控 (Chung H J. 等, 1999 *Tr. Plant Sci.* 4 :367-371)。天然 14-3-3 蛋白是同源或异源二聚体以及, 每个单体都有一个结合位点, 一个二聚体可以潜在结合 2 个靶蛋白, 促进其联合。或者, 靶蛋白可以含有多于一个 14-3-3- 结合位点。

[0014] 现在已经提出 14-3-3 蛋白的几种参与植物胁迫耐受性的功能,。14-3-3 蛋白可以起着胁迫信号传导调节子的作用。例如, 在拟南芥中, RCI14A 和 RCI14B 基因受冷处理诱导表达, 并且与 14-3-3 蛋白高度同源。冷处理引起 RCI 转录水平的增加表明 RCI 蛋白在胁迫信号传导通路中发挥作用 (Jarillo J A 等, 1994 *Plant Mol. Biol.* 25 :693-704)。

[0015] 由于环境损坏对作物的商业后果, 人们对了解植物胁迫反应信号传导机制以及该如何操作以改善植物对环境损坏的反应产生了关注。因此, 有需要鉴定出那些在胁迫耐受植物中表达的基因, 它们具有将胁迫耐受性转移给其寄主植物以及其它植物品种的能力。新生成的胁迫耐受性植物将具有许多优点, 诸如增加农作物栽种的范围, 例如, 降低植物品种对水的需求。

[0016] 发明概述

[0017] 本发明包括一种通过向植物提供一段编码 RKS 基因的核苷酸序列使所述植物产生非生物胁迫耐受性方法。所述的 RKS 基因是一个截短型 RKS 基因, 编码受体的胞外域。RKS 基因最好是选自 RKS 亚群 II 成员 (RKS1, RKS4, RKS5, RKS7, RKS11, 和 RKS14), 更具体是 RKS1 或 RKS4 以及截短型 RKS4 或来自于 RKS 亚群 III 成员 (RKS0, RKS8, RKS10, RKS12 和 RKS13), 更具体是 RKS12。

[0018] 进一步优选的方法是用油菜素类固醇处理植物, 这里所述的油菜素类固醇最好是选自含有油菜素内酯、表油菜素内酯、表高油菜素内酯及类似物。

[0019] 本发明的另一部分是利用 RKS 基因, 更具体是选自 RSK 亚群 II 成员的基因, 更好是 RKS1 或 RKS4 以及截短型 RKS4 或选自 RKS 亚群 III 成员的基因 (RKS0, RKS8, RKS10, RKS12 和 RKS13), 更具体是 RKS12, 其使植物或植物细胞产生非生物胁迫耐受性。

附图说明

[0020] 图 1. 高盐胁迫对拟南芥种子发芽的影响

[0021] 在层积处理后 14 或 17 天统计发芽率 (分别是 A 和 C), 用百分数表示 3-5 次重复的平均数, 每组为 100 粒种子。误差棒表示标准误差。

[0022] A. 在培养基中添加 180mM NaCl 后, RKS4 过表达品系的发芽率。4 个 RKS4 过表达品系 (p35S::RKS4 ;RKS4-0X1 到 0X4) 同他们的野生型 (Ws-0) 一起表示。

[0023] B. 在高盐条件下, RKS4 基因的表达水平与发芽能力之间的相关性。利用定量 RT-PCR 确定过表达品系 RKS4-0X1-0X4 中 RKS4 基因的表达水平, 表示为与野生型 (WT) 表达水平相比, 呈倍数变化。在层积后 14 天, 作出相应品系的发芽率 (见图 A)。线性回归系数 ($R^2 = 0.972$) 和对应的方程如图表所示。

[0024] C. 培养基中添加 200mM NaCl, RKS1, RKS12 和 RKS14 过表达品系的发芽率。右图表示 Ws-0 生态型各品系获得的发芽率, 而左图表示 Col-0 生态型获得的发芽率。

[0025] 图 2. 渗透胁迫对拟南芥种子发芽的作用

[0026] 层积处理后的 14 天期间统计培养基中添加 450mM 甘露醇的 RKS4 过表达植株的发芽率,其表示为对应于 3-5 次重复平均数的百分数,每组 100 颗种子。误差棒代表标准误差。四种 RKS4 过表达植株 (p35S::RKS4 ;RKS4-0X1 至 0X4) 与它们的野生型 (Ws-0) 一起表示。RKS4-0X1 至 0X4 ;p35S::RKS4 ;RKS4m1-0X ;p35S::RKS4 Δ 531 ;RKS4m2-0X ;p35S::RKS4 Δ 618 ;Ws-0WT :野生型。

[0027] 图 3. 冻害对拟南芥生长 (花环大小) 的影响

[0028] A. 在 Col-0 原生态型 (左图) 或 Ws-0 原生态型 (右图) 中表达截短型 RSK4 基因的转基因系的花环大小。处理后 (0 天) 立即以及 14 天后测量花环的直径。在黑暗中于 -25°C (-25) 或室温 (对照) 处理 1 小时。每个柱对应于以 mm 为单位的 20 个独立测量的平均值,误差棒表示标准误差。柱上的不同字母表明组间差异显著。样品间同一个字母表示差异不显著,而对应于一组的每个字母表示其与其它差异显著。虚线箭头指示处理和非处理板之间的差异。Col-0 :rks4-1 野生型 :T-DNA 插入系 rks4-1 ;Ws-0 :RKS4m1-0X 野生型 :p35S::RKS4 Δ 531 和 RKS4m2-0X ;p35S::RKS4 Δ 618。

[0029] B. 冻害后的相对生长。处理和非处理植物 (-25°C vs 对照 = 第 14 天 (-25°C) 花环直径 / 第 14 天 (对照) 花环直径) 生长速度的差异代表冻害对植物生长的影响。相对生长也同样表示与对应的野生型相关 (vs WT = 转基因系的相对生长 (-25°C vs 对照) / 野生型的相对生长 (-25°C vs 对照))。Col-0 WT :rks4-1 野生型 :T-DNA 插入系 rks4-1 ;Ws-0 WT :RKS4m1-0X 野生型 :p35S::RKS4 Δ 531 和 RKS4m2-0X ;p35S::RKS4 Δ 618。

[0030] 图 4. GABA 旁路代谢途径示意图 (改自 Bouché 和 Fromm (2004) TIPS 9 :110-115)。与野生型相比,框内的化合物在 RKS4 转基因系中含量更丰富,而阴影的化合物相对较少。

[0031] 发明详述

[0032] 非生物胁迫具有多种形式并且具有多种影响。表 1 给出了非生物胁迫主要形式的简要概览,试验中如何实现以及其对植物的影响。可以看出,几乎所有的非生物胁迫形式都导致植物生长的受损,这是其呈现的主导影响。

[0033] 表 1

[0034]

胁迫	对应的处理	对植物的影响
盐	在 NaCl 上生长 (体外)	离子稳态和分布的去调节: - 破坏种子发芽 - 破坏植物的生长
渗透压	在甘露醇上生长 (体外)	离子稳态和分布的去调节: - 破坏种子发芽 - 破坏植物的生长
氧化	在甲基紫精上生长 (体外)	ROS 形成,蛋白质变性,叶绿素降解: - 脱色和死亡。

胁迫	对应的处理	对植物的影响
热	在高温下生长（体外）	蛋白质变性： - 破坏植物的生长
冷	在低温下生长（体外和体内）	ROS 形成,膜破坏： - 破坏植物的生长
干旱	控水（体内）	细胞生长和光合作用受阻： - 破坏植物的生长

[0035]

[0036] 正如介绍中所详述的那样,油菜素类固醇对植物生长相关的特性具有有益影响。

[0037] 油菜素类固醇受体 BRI1 (BRassinosteroid Insensitive 1) 是一种 LRP (富含亮氨酸重复序列) 跨膜受体激酶 (Cell, 1997, 90, 929-938)。其属于包括下述成员的拟南芥中的一个小家族成员: BRI1 (At4g39400); BRL1 (At1g55610), BRL2 (At2g01950) 和 BRL3 (At3g13380) (Development, 2004, 131, 5341-5351)。BRI1 和同系物不仅直接参与类固醇识别 (Nature 2005, 433, 167-171), 而且还与系统素 (来源于拟南芥的系统素前体同系物: At2g22940) 以高亲和力结合, 系统素是一种肽类激素, 参与病原抗性反应的系统信号 (PNAS, 2002, 99, 9090-9092)。有报道描述了植物类固醇信号的下游胞内通路 (Bioassays, 2001, 23, 1028-1036; Trends in Plant Science, 2004, 9, 91-95)。

[0038] 参与油菜素类固醇识别的另一个受体家族由 RKS (Receptor Kinase-like SERK; Development, 1997, 124, 2049-2062) 基因产物 (WO 04/007712) 所定义。这些 RSK 基因产物同样也参与植物油菜素类固醇信号通路, 并可以与 BRI1 类似受体形成复合物 (The Plant Cell, 2004, 16, 3216-3229; Cell, 2002, 110, 213-222; Cell, 2002, 110, 203-212)。它们也参与胞外肽配体的结合, 它们也同样由候选肽配体如拟南芥 14 GASA (Gibberelic Acid Stimulated Arabidopsis; Plant Mol Biol., 1995, 27, 743-752) 基因产物代表, 这些基因产物被认为是与拟南芥 14 RKS 基因产物直接结合 (WO 04/007712)。GASA 蛋白结构上含有一个袋, 其被认为是以高亲和力参与油菜素类固醇的结合。因此 GASA 肽配体可以作为 RKS/BRI- 二聚体和油菜素类固醇分子的中间体。RKS 和其它受体如 BRI1 之间的二聚复合物是一种动态质膜复合物, 其中不同家族成员都可以作为二聚体化成员参与。

[0039] 此类受体激酶的活力同时受肽配体和类固醇激素调节。不同形式的植物油菜素类固醇都是可用的 (描述于 J. Exp. Botany, 1999, 50, 275-282; The Plant Cell, 2002, S97-S110; Plant Physiol., 2003, 131, 287-297)。除此之外, 一些合成激动剂或拮抗剂 (Trends in Plant Science, 1999, 4, 348-353) 可被用于调节这些受体的活力。

[0040] 上述蛋白受体复合物, ELS 蛋白 (WO 04/007712) 也参与了油菜素类固醇的识别和信号传输, 进而介导整个植物的抗性反应。LRP, 拟南芥 ELS 基因产物在西红柿中的同系物, 在发病时, 被特异地诱导以及蛋白水解处理 (Mol. Gen. Genet., 1994, 243, 47-53; Plant J., 1996, 10, 315-330)。ELS 蛋白产物明确参与病原抗性反应, 以及可能在油菜素类固醇调节抗

性的调节中发挥作用。

[0041] 越来越多的证据表明植物受到环境威胁时的反应就是将几条通路进行合流。复杂机制感知生物和非生物胁迫导致大规模的基因调控,这些基因大部分都是对给定胁迫所特有的,但是一些常见基因同时受几种独立胁迫调控 (Fujita, M. 等, 2006, *Curr. Opin. Plant Biol.* 9(4) :436-442)。

[0042] 此处所用的术语“核酸”,包括参考脱氧核糖核酸或核苷酸聚合物,例如,单链或双链形式的多核苷酸,以及除非其它限制,其包含已知类似物,具有天然核苷酸的基本性质,也就是可以与天然核苷酸(例如,肽核苷酸)一样的方式与单链核酸杂交。多核苷酸可以是自身或外源结构或调控基因的全长或子序列。除非另有说明,该术语包括参考特异序列以及它的互补序列。因此,作为术语“多核苷酸”这里还预期为为了稳定性或其它原因主干经修饰的 DNA 或 RNA。此外,含有稀有碱基,诸如次黄嘌呤,或经修饰的碱基,诸如三苯甲基碱基的 DNA 或 RNA,以此处所用的术语多核苷酸命名刚才例举的两种例子。可以发现对 DNA 和 RNA 所做的大量不同修饰所起的许多有用目的对熟知本领域技术人员是众所周知的。此处所用的术语多核苷酸包含诸如多核苷酸化学的、酶的或代谢的修饰形式,以及病毒和细胞的 DNA 和 RNA 特性的化学形式,包括其它的,简单和复杂细胞。

[0043] 这里可互换使用的术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”是指一种氨基酸残基的聚合物。所述术语应用于天然氨基酸聚合物以及一种或多种氨基酸残基对应天然氨基酸的人工化学类似物氨基酸聚合物。天然氨基酸的这些类似物的本质特性是,当纳入一种蛋白质,该蛋白可以与由整个天然氨基酸组成的相同蛋白的抗体特异反应。术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”也包含修饰,其包括但不限于,糖基化、脂质附着、硫酸化、谷氨酸残基的 γ 羧基化、羟基化和 ADP 核糖基化。

[0044] 编码序列是指编码蛋白氨基酸序列的基因部分,或功能 RNA 诸如 tRNA 或 rRNA,是特指真正含有可翻译成特定蛋白信息的核苷酸序列。编码蛋白的核酸在其翻译区域内可以含有非翻译序列(例如,内含子),或可以缺乏此类间插非翻译序列(例如,在 cDNA 中)。编码蛋白的信息是用密码子指定的。一般地,核苷酸利用“通用”遗传密码编码氨基酸序列。然而,诸如在一些植物,动物,和真菌线粒体,山羊支原体细菌,或纤毛虫大核中表达的核苷酸所用的通用密码不同。当综合制备或改变核苷酸,可以根据核苷酸将要在其中表达的宿主的已知密码子的偏好进行密码子优化。例如,尽管本发明的核苷酸序列可以同时单子叶和双子叶植物中表达,考虑到特异的密码子偏好性,需要将序列进行修改,并且单子叶或双子叶植物对 GC 含量的偏好性表现不同。

[0045] “表达”是指一个基因转录成结构 RNA (rRNA, tRNA) 或信使 RNA,信使 RNA 随后可以翻译成蛋白质。

[0046] 本文所用的术语“序列同一性”是指两条或多条多核苷酸序列之间或两条或多条多肽序列之间出现一致性。具有“相同”序列的多核苷酸或多肽,如果在它们的序列中的核苷酸或氨基酸序列在比对时最大程度相应,则相同。两条或多条多核苷酸或多肽的序列比对通常是在一个比对窗口比较两条序列的部分,目的是鉴定和比对序列相似性的局部区域。对比窗口一般是从约 20 至 200 个连续的核苷酸或从约 7 至 70 个连续的氨基酸。多核苷酸或多肽的“序列同一性百分比”,诸如 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 或 100% 是由在比对窗口通过比较两条最佳比对序列决定的,其中对于两条序列的最佳比对,比对窗口中的

多核苷酸或多肽序列的部分与参考序列（其不含有插入或缺失）比对可以包括插入或缺失（例如缺口）。百分比的计算是通过：(a) 由两条序列同时有的相同核苷酸碱基或氨基酸残基位置产生的匹配位置数目确定的；(b) 从比对窗口中的所有位置总数目中分出匹配位置的数目；以及 (c) 将结果乘以 100 产生序列同源性的百分比。用于比对序列的最佳对齐可以通过已知算法计算机实现，或通过检查进行。适合于序列比对和序列同源性或一致性的算法和软件是本领域技术人员所熟知的。这些工具的明显例子有基于 FASTA 和 BLAST 程序的 Pearson 和 Lipman 搜索，详细请参见 Altschul 等 (1997), *Nucleic Acid Res.* 25 : 3389-3402 ; Altschul 等 (1990), *J. Mol. Biol.* 215 :403-10 ; Pearson 和 Lipman (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 :2444-8 ; Lipman 和 Pearson (1985), *Science* 227 :1435-41)。其它合适的程序包括 PILEUP, LINEUP, GAP, BESTFIT 和 FASTA 程序其在美国威斯康星州麦迪逊威斯康星大学遗传学计算机集团的 GCG® Wisconsin Package® 中，现在由 Accelrys 公司提供。上述程序的详细情况在 internet 上可通过以下站点了解 ' <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> ' 或镜像站点和 http://www.accelrys.com/products/gcg_wisconsin_package。因此这些同源性和同一性百分比可以通过利用公开的或商业的现成软件包或网上的计算机服务器确定。术语“同一性”意思是所要求的氨基酸序列或核苷酸序列的百分比是在参考序列的相同相对位置找到的，当序列是最佳比对时，尽管事实上序列在一定位置上可能有缺失或插入，需要导入缺口以便获得氨基酸或碱基的最高比对百分数。最佳的序列比对用 10 个或更少的缺口，例如导入两条序列的缺口总数相加是 10 或低于 10。这些缺口的长度不是特别重要，但是一般不要超过 10，最好是不超过 5 个氨基酸，或 30 个碱基且最好不超过 15 个碱基。

[0047] 术语“遗传密码简并性”是指大量的功能一致的核苷酸编码任何特定蛋白的事实。例如，密码子 GCA, GCC, GCG 和 GCU 全部编码丙氨酸。因此，在一个密码子特异编码丙氨酸的每个位置，密码子可以改变成其任何一个对应的所述密码子，而不改变编码的多肽。此类核苷酸变异是“沉默变异”。通过参考遗传密码这里编码多肽的每个核苷酸序列也描述每种核算可能的沉默变异。

[0048] “互补链”里的术语“互补”意思是指核酸链的核苷酸序列按照 Watson-Crick 碱基配对原则同另一条核苷酸序列形成氢键双链。例如，5' -AAGGCT-3' 的互补碱基序列是 3' -TTCCGA-5'。

[0049] 关于氨基酸所用的“保守性替换”的表示是指利用具有相同理化特性的同一族氨基酸替换给定氨基酸。因此，当 RKS 序列的一个氨基酸具有疏水基，另一个氨基酸保守性替换它时需要同样具有疏水基；其它此类的基团特性有亲水的，阳离子，阴离子或包含有巯基或硫醚。此类替换是本领域普通技术人员公知的，例如参见 US5, 380, 712。可以在如下氨基酸中进行保守性替换，例如脂肪族非极性氨基酸 (Gly, Ala, Pro, Ile, Leu, Val)，极性不带电荷氨基酸 (Cys, Ser, Thr, Met, Asn, Gln)，极性带电荷氨基酸 (Asp, Glu, Lys, Arg) 或芳香族氨基酸 (His, Phe, Tyr, Trp)。

[0050] 术语“选择标记”是指编码代谢特征的多核苷酸序列，用于转基因和非转基因生物的分选，主要是提供抗生素抗性的多核苷酸序列。可选的标记，例如编码卡那霉素抗性标记的 NPTII 基因，编码潮霉素抗性的 HPT 基因。其它的选择标记，例如报告基因诸如氯霉素乙酰转移酶， β -半乳糖苷酶，荧光素酶以及绿色荧光蛋白。报告基因产物的鉴定方法包

括但不仅限于,酶法测定和荧光法测定。报告基因以及检测其产物的测定方法为本领域所熟知,并被描述,例如现代分子生物学实验技术, eds. Ausubel 等, Greene Publishing and Wiley-Interscience :New York(1987) 以及定期更新。

[0051] 这里所用的,包括术语“载体”是指用于转化或转染宿主细胞的核酸,并且其中间可以插入一段多核苷酸。载体常常是复制子。表达载体允许插入其中的核苷酸转录。

[0052] 这里所用的术语“有效连接”是指功能性连接或并列连接,其中如此描述的组件关系是允许它们以它们预期的方式发挥功能。相对于另一个对照序列和 / 或一条编码序列的“有效连接”对照序列是通过这样一个方式连接的,其编码区的转录和 / 或表达是在与对照序列相兼容的条件下完成。一般来说,有效连接是指连接的核酸序列是邻近的,这需要将两种蛋白编码区相接,使其相邻并在相同的读码框架中。

[0053] “宿主细胞”是指一种细胞,其含有载体并支持载体的复制和 / 或表达。宿主细胞可以是原核细胞诸如大肠杆菌,或真核细胞诸如植物,酵母,昆虫,两栖动物,或哺乳动物细胞。优选地,宿主细胞是细菌细胞或植物细胞,更优选为植物细胞。

[0054] 这里所用的针对于核苷酸的“异源”是指来源于外来种的核苷酸,或如果来源于同一物种,也是将其自然形式的组成和 / 或基因位点进行蓄意人为干预方式而重大修改的。例如,有效连接到一个异源结构基因的启动子来源的物种与结果基因来源的物种不同,或来源于同一个物种,一个或两同时将原有形式进行重大修改。异源蛋白可以来自另一个物种或,如果来源于同一物种,也是将其自然形式的通过蓄意人为干预方式而重大修改的。

[0055] 本文所定义的术语“调控序列”包括任何组件,其是编码区序列表达必需或有利的。调控序列对于编码区序列可以是原生的或外源的。此类调控序列包括,但是不仅限于,前导序列,聚腺苷酸序列,启动子,信号序列,或转录终止子。至少,调控序列包括一个启动子,以及转录和翻译起始和终止信号。调控序列可以提供一个接头,目的是导入特异的限制性酶切位点,这样有利于调控序列与编码多肽的核苷酸的编码区域连接。

[0056] 这里所用的术语“启动子”,本领域公认的意思是指含 DNA 序列的基因的一部分,其提供 RNA 聚合酶的结合以及转录起始。启动子序列一般地,但是并不总是,位于基因的 5' 非翻译区。“植物启动子”是指无论其来源是否是植物细胞,能够启动植物细胞转录的启动子。植物启动子的范例包括,但是不仅限于,那些从植物、植物病毒和细菌中获得的,其含有在植物细胞诸如农杆菌或根瘤菌中表达的基因。适宜的启动子的例子有花椰菜花叶病毒 35S 启动子及其衍生物、铁氧还蛋白启动子、胭脂碱合成酶 (nos),甘露碱合成酶 (mas) 和章鱼碱合成酶 (ocs) 启动子 (EP 0 122 791, EP 0 126 546, EP 0 145 338)、泛素启动子 (EP 0 342 926),木薯叶脉花叶病毒启动子以及用于核酮糖二磷酸缩化酶短亚基的菊花启动子。

[0057] 术语“转基因植物或植物细胞”包括涉及一种植物或植物细胞,其基因组内含有一条异源的多核苷酸。一般地,外源核苷酸稳定整合到其基因组上,因此该多核苷酸可以传递给后代。外源核苷酸可以独自整合到基因组或作为重组表达框的一部分。同时还可能是外源核苷酸并没有或不稳定地整合到转化植物的基因组上。在这种情况下,基因是“瞬时”表达的,这意味着表达发生在给定的时间内,之后导入的多核苷酸从细胞中丢失。对于本发明的目的而言,一种转基因植物或植物细胞同样包括瞬时表达异源多肽的植物或植物细胞。这里所述的“转基因”包括任何细胞、细胞系、愈伤组织、组织、植物部分或植物,其基因

型由于出现外源核苷酸已经改变,包含最初转基因的改变以及最初转基因杂交或无性繁殖产生的。术语“转基因”不包含通过传统植物育种方法或自然发生事件诸如随机异花受精,非重组病毒感染,非重组细菌转化,非重组移位,或自发突变引起的基因组(染色体或染色体外)改变。

[0058] 上下文中将核苷酸导入到细胞内的术语“插入”,意思是“转染”或“转化”或“转导”,包括涉及将一核苷酸纳入到真核或原核细胞,在此核苷酸可以纳入到细胞的基因组(例如,染色体,质粒,质体或线粒体 DNA),转换到一个自主复制子或瞬时表达(例如, mRNA 转染)。

[0059] 这里所使用的术语“植物”包括涉及整株植物,植物器官(例如,叶,茎,根,等等),种子和植物细胞和所述植物或植物细胞的后代。这例所用的植物细胞包括,但不限于,叶、根、芽、配子体、孢子体、花粉和小孢子。可以用于本发明的方法中的此类植物,通常在经得起转化技术的高等植物中尽可能的广泛,包括单子叶和双子叶两种植物。

[0060] 此时本发明涉及导入含有 RKS 基因的一段核苷酸结构,优选是来自 RKS 亚群家族,更具体是 RKS1 或 RKS 或来自 RKS 亚群 III,更具体是 RKS12,目的是使植物产生非生物胁迫耐受性。整个说明书所用的术语耐受性意思是植物承受或变得对非生物胁迫不响应的能力。术语对非生物胁迫耐受性和抗性可以互换使用。

[0061] RKS 基因产物或 RKS 蛋白(也参见 WO 2004/007712)的不同结构域本质上含有如下功能:N-末端预测蛋白结构的第一个结构域含有一段信号序列,其参与将蛋白靶向到质膜。蛋白裂解从最终成熟蛋白产物中删除了此段序列(Jain 等,1994, J. Biol. Chemistry 269:16306-16310)。第二个结构域包括不同数目的亮氨酸拉链基序,并且可能参与蛋白-蛋白二聚化。另一个结构域含有保守的半胱氨酸残基对,参与硫酸氢盐桥的形成。下一个结构域含有 5 个(或在 RKS3 中是 4)富含亮氨酸重复序列(LRRs),可能参与配基结合(Kobe 和 Deisenhofer 1994, TIBS 19:415-420)。该结构域边上还有一个含有保守半胱氨酸残基对的结构域,其参与硫酸氢盐桥的形成,富含丝氨酸/脯氨酸的区域常常紧随其后。下一个结构域表现出单次跨膜结构域的所有特性。在蛋白预测的胞质位点,一个具有未知功能的结构域位于此,紧随其后的是丝氨酸/苏氨酸激酶活性区域(Schmidt 等 1997, Development 124:2049-2062, WO 01/29240)。激酶结构域后是一个未知功能的结构域,而在蛋白的 C-末端是一个富含亮氨酸重复序列,很可能参与蛋白-蛋白互作。

[0062] RKS 家族(受体激酶如 SERK)基于富含亮氨酸重复序列(LRRs)的拷贝数和结构安排形成由 Shiu 和 Bleeker L(2001, PNAS, 98:10763-10768)定义的 RR11 RLK 亚群。在拟南芥中其含有 14 个成员,其对应的基因第一次描述于 WO 01/29240(也参见 WO2004/007712)并在下面列出:

[0063] RKS0 At1g71830

[0064] RKS1 At1g60800

[0065] RKS2 At5g65240

[0066] RKS3 At5g63710

[0067] RKS4 At2g23950

[0068] RKS5 At5g45780

[0069] RKS6 At5g10290

- [0070] RKS7 At5g16000
 [0071] RKS8 At1g34210
 [0072] RKS10 At4g33430
 [0073] RKS11 At4g30520
 [0074] RKS12 At2g13800
 [0075] RKS13 At2g13790
 [0076] RKS14 At3g25560

[0077] RKS 受体全部含有该亚群的 3 个特征结构域：一个由 5 个串联排列的位于同一连续块的 LRRs 组成的胞外域，一个跨膜结构域以及胞外激酶结构域。胞外域的前四个 LRRs 是全长（24 个氨基酸）的，而 LRR5 是截短型的并仅含有 16 个残基。在 RKS3 中不存在 LRR4。除 RKS3 的胞外域以及 RKS2 和 RKS6 的激酶结构域外内含子的位置和数目是保守的。

[0078] 当看激酶结构时，基于氨基酸序列，该家族可以进一步细分为 3 组（参见 WO 01/29240 和 WO 2004/007712），最近也被 Zhang 等 (J. Mol. Evol. (2006) 63 :612-621) 描述。这些亚群是组 I :RKS 2,3 和 6 ;组 II :1,4,5,7,11 和 14 ;组 III :RKS 0,8,10,12 和 13。此外，亚群 III 在跨膜蛋白结构域前具有一个普通的 SPP 盒 (Schmidt 等 (1997) Dev. 124 : 2049-2062)，而在其它亚群中不具有。另一方面，亚群 II 区别于其它，例如 LRR1 中出现 ‘PSQ’ 基序或 LRR2 中出现 ‘LQNNxI’，这些在种间是保守的。

[0079] 同样地，在 RKS 所定义之内包含一段由不同 RKS 基因的结构域组成的核苷酸序列，或甚至是与上述 RKS 基因结构域同源的人工合成结构域。以这种方式，例如，编码亚群 II 的一个 RKS 基因的跨膜结构域的核苷酸片段可以被编码亚群 III 的一跨膜结构域的核苷酸片段，包括 SPP 盒所替换。也有可能 RKS 基因的密码子使用的是调节成那些可以适于植物的转化的密码子使用的。

[0080] 拟南芥 RKS 基因的植物同系物可以通过不同的植物数据库比对发现以及此外包括：

- [0081] [Y14600](#) | [SBRLK1](#) | *Sorghum bicolor*
 [0082] [BF004020](#) | [BF004020](#) | [EST432518KV1](#) *Medicago truncatata*
 [0083] [AW934655](#) | [AW934655](#) | [EST353547](#) *tomato*
 [0084] [AW617954](#) | [AW617954](#) | [EST314028L](#) *pennellii*
 [0085] [AA738544](#) | [AA738544](#) | [SbRLK2](#) *Sorghum bicolor*
 [0086] [AA738545](#) | [AA738545](#) | [SbRLK3](#) *Sorghum bicolor*
 [0087] [BG595415](#) | [BG595415](#) | [EST494093](#) *cSTS Solanum tuberosa*
 [0088] [AI896277](#) | [AI896277](#) | [EST265720](#) *tomato*
 [0089] [BF643238](#) | [BF643238](#) | [NF002H05EC1F1045](#)
 [0090] [AA738546](#) | [AA738546](#) | [SbRLK 4](#) *Sorghum bicolor*
 [0091] [BE658174](#) | [BE658174](#) | [GM700005A20D5](#) *Gm-r1070 Glycine max*
 [0092] [BF520845](#) | [BF520845](#) | [EST458318](#) *DSIL Medicago truncata*
 [0093] [AC069324](#) | [AC069324](#) | *Oryza sativa*
 [0094] [AW761055](#) | [AW761055](#) | [s170d06.y1](#) *Gm-c1027 Glycine max*
 [0095] [BE352622](#) | [BE352622](#) | [WHE0425_G11_M21ZS](#) *Wheat*

- [0096] [BG647340](#)|BG647340|EST508959 HOGA *Medicago truncata*
- [0097] [AY028699](#)|AY028699|*Brassica napus*
- [0098] [AW666082](#)|AW666082|sk31h04.y1 Gm-c1028 *Glycine max*
- [0099] [AA738547](#)|AA738547|SbRLK5 *Sorghum bicolor*
- [0100] [BG127658](#)|BG127658|EST473220 tomato
- [0101] [L27821](#)|RICPRKI|*Oryza sativa*
- [0102] [BG238468](#)|BG238468|sab51a09.y1Gm-c1043Glycine max
- [0103] [BG441204](#)|BG441204|GA_Ea0012C 15f *Gossypium arbo.*
- [0104] [AW667985](#)|AW667985|GA_Ea0012C15 *Gossypium arbore.*
- [0105] [AW233982](#)|AW233982|sf32g05.y1 Gm-c1028Glycine max
- [0106] [AP003235](#)|AP003235|*Oryza sativa*
- [0107] [BF460294](#)|BF460294|074A05Mature tuber
- [0108] [AY007545](#)|AY007545|*Brassica napus*
- [0109] [AC087544](#)|AC087544|*Oryza sativa*
- [0110] [AB041503](#)|AB041503|*Populus nigra*

[0111] 在 RKS4 过表达植株中, At2g14560 基因产物是上调表达的, 其作为油菜素类固醇诱导而不是生长素诱导的标记 (参见 W02004/007712 图 9 和 10)。为了详细研究 RKS4 的功能, 获得功能和失去功能的方法如下。在 CaMV 35S 启动子调控下, RKS4 全长 cDNA 在拟南芥 Ws-0 植株中是异位表达的, 并且我们在 SALK 收集中寻找 T-DNA 插入品系 (Alonso 等, 2003 可从欧洲拟南芥种子存储中心 NASC 获得)。插入系 SALK_066568 又名 rks4-1 是与过表达系 (RKS4-0X) 一起研究的。RKS4 稳态 mRNA 水平的变化利用 12 天幼苗 RT-PCR 验证, 结果表明在 RKS4-0X 植株中 RKS4 确实是过表达的, 并且其全长信使在 rks4-1 植株中检测不到 (数据未显示)。然而, RKS4 mRNA 的 5' 末端 (T-DNA 插入的上游序列) 在 rks4-1 品系中仍然转录了, 并且产生的截短型信使的水平比所有其它的样本都要高。该片段对应于 RKS4 受体部分胞外结构域 (编码区序列的前 531 个碱基对)。由于突变系与 RKS4-0X 植株同时在形态水平以及疾病抗性上的表型相似, 所以构建了对应于截短型 RKS4 受体 (RKS4m1-0X (前 531bp, 与 rks4-1 一样) 以及 RKS4m2-0X (前 618bp, 包含所有的 LRR 结构域)) 的过表达结构, 并转化到拟南芥内, 目的是尝试模仿这种情况并更详细地研究其作用。在本申请中, 截短型 RKS 基因被定义为至少含有全长 RKS 基因前 531 碱基对的 RKS 基因。同样地, 截短型 RKS 蛋白被定义为至少含有全长 RKS 基因前 531 碱基对所编码的蛋白。

[0112] RKS4 的过表达似乎给予非生物胁迫耐受性, 更确切是在高盐胁迫条件下 (图 1) 和在较小程度的渗透胁迫条件下, 而截短型 RKS4 形式的过表达与 rks4-1 植株观察到的一样, 可以抵抗冻害 (图 3)。RKS 受体在非生物胁迫中的作用进一步通过亚群 II 的另一个成员 RKS1 以及亚群 III 的成员 RKS12 过表达确定。两者都显示出对高盐胁迫耐受性的增加 (图 1C)。

[0113] 基于 RKS4 转基因拟南芥植株的转录组学和代谢组学分析, 我们假定 RKS- 介导的非生物胁迫耐受性的增加是通过以下完成的:

[0114] 1) 已知的几种非生物胁迫快速激活 GABA 代谢旁路的调节引起活性氧的产生 (ROS, Bouché 和 Fromm (2004) TIPS 9:110-115)。越来越多的证据显示 γ -氨基丁酸

(GABA) 在胁迫耐受性上发挥作用 (Kinnersley 和 Turano (2000) *Crit. Rev. Plant Sci.* 19 : 479-509), 其水平和例如谷氨酸, 富马酸, 丙氨酸和脯氨酸一起在 RKS4 植株中是增加的。这些化合物的增加伴随没食子酸的降低, 抑制谷氨酸脱羧酶 (GAD) 将谷氨酸转化为 GABA, 随着甲酸的降低抑制 TCA 循环中琥珀酸向富马酸的转化。有趣的是当暴露于胁迫时, 在 *E. coli* 中 GAD 被积极诱导, 被假设是通过 GABA 产物调节胞内 pH 的原因 (Bouché 和 Fromm (2004) *TIPS* 9 : 110-115)。反过来, GABA 也是丙氨酸的前体, 丙氨酸水平在 RKS4 植株中更高, 并且谷氨酸是脯氨酸的前体, 在相同植株中, 其水平也升高了。脯氨酸水平的增加常常与渗透以及盐胁迫相关 (分别是 Roosen 等, (1998) *Plant Phys.* 117 : 263-271 和 Armengaud 等, (2004) *Plant Phys.* 120 : 442-450)。

[0115] 2) 黄酮醇合成通路, 更具体地说的对槲皮素和山萘酚生物合成水平的调节。除参与预防癌症和心血管疾病 (Graf 等, (2005) *J. Med. Food* 8 : 281-290) 外, 一般包含黄酮醇的黄酮类化合物在植物上也具有功能诸如紫外线保护, 对生物或非生物试剂的抵御以及抗药性以及同植物激素互作 (Winkel-Shirley (2002) *Curr. Opin. Plant Biol.* 5 : 218-223)。在 RKS4 转基因植株中不同形式的山萘与槲皮素葡萄糖苷一起被发现其水平升高。黄酮醇的两种衍生物都具有强的抗氧化潜能, 给予它们作为解毒剂的能力 (orres 等, (2006) *J. Exp. Bot.* 57 : 1933-1947) 以及对于 GABA 其作用是保护对抗 ROS 产物。另外, GABA 和胁迫诱导的苯丙素产生的联系是通过 TCA 循环, 其中 GABA 提供一个替代的碳源, 目的是一旦胁迫则允许黄酮类化合物产生 (Kinnersley 和 Turano (2000) *Crit. Rev. Plant Sci.* 19 : 479-509)。

[0116] 3) 胆碱生物合成的调节, 其水平在 RKS4 植株中升高, 用作例如甘氨酸甜菜碱生物合成的前体, 而甘氨酸甜菜碱是一种渗透保护剂, 其给予盐、干旱或其它环境胁迫的耐受性 (McNeil et al. (2001) *PNAS* 98 : 10001-10005)。有趣的是, 甘氨酸也在 RKS4 植株中含量丰富, 而甜菜碱的类似物的水平是降低的。观察到胆碱水平的升高也可能是由于芥子酯生物合成途径的调节, 该途径通过增加芥子碱的水解而导致芥子酸 (在 RKS4 中更丰富) 和胆碱的产生 (Strack (1981) *Z. Naturforsch.* 36c : 215-221)。

[0117] 基因表达的多核苷酸构建诸如位于植物核内的 RKS 基因优选含有适当的 3' 序列, 诸如 3' 调控序列或转录终止子, 紧邻连接在异源核苷酸的下游。多种这样的终止子是可用的并为本领域所知 (例如来源于花椰菜花叶病毒的 tm1, 马铃薯的 PotPI II, rbcS 的 E9)。植物中任何可用的已知功能的终止子可以用于本发明。许多其他序列可以纳入用于表达本发明所描述的 DNA 分子表达的多核苷酸构建。这些序列包括那些具有增强表达, 诸如内含子序列 (例如, 来自 Adh1 和 bronzel) 以及病毒前导序列 (例如来自 TMV, MCMV 和 AMV)。

[0118] 多核苷酸构建包含用于表达 RKS 基因的重组多核苷酸, 优选亚群 II 的 RKS 基因, 更优选是 RKS4 基因。所述基因优选含有编码 RKS 蛋白、RKS 蛋白的同源序列或其功能片段的一段核苷酸。所述蛋白的功能片段是指蛋白, 其与野生型的 RKS 蛋白同源, 并且当在植物中表达时仍保持功能, 而所述的功能性意思是其能够给予非生物胁迫抗性。在此意义上截短型 RKS4 蛋白也可被认为是功能性片段。

[0119] 同源其意思是指氨基酸序列与上述所提及的序列的序列一致性大于 50%, 优选大于 70%, 更优选大于 80% 以及最优选大于 90%。或者, 同源性是在核苷酸水平上判断的, 其同源是指一段核苷酸序列与野生型的 RKS 基因或其片段的序列一致性多于 50%, 优选大于

70%，更优选大于 80% 以及最优选大于 90%。

[0120] 本发明的多核苷酸构建是较好构建的，使得其含有至少或紧邻连接在植物上有功能的第一启动子，编码 RKS 基因的核苷酸序列，优选是 RKS4，以及一个终止子。多核苷酸可选地含有编码可选择的或可筛选的标记紧邻在表达调控序列后。

[0121] 优选使用的是病毒启动子，诸如来源于木薯叶脉花叶病毒 (CVMV) 的启动子或花椰菜花叶病毒 (CMV)。然而，任何提供组成性表达（诸如 35S 或增强型 35S 启动子）的启动子都可以使用。

[0122] 重组基因表达构建可以插入到载体上，其可以是商用的，并且适合转化植物并适合转化细胞的基因产物的表达。优选使用的是二元载体（诸如 pMOG22，已知来自 Goddijn, O. J. M. 等, 1993, Plant J, 4 :863-873），其在利用拟南芥的植物转化中是有用的。

[0123] 原则上，任何一种转化方法可以用于按照本发明将嵌合体 DNA 导入到适当的祖细胞。适当的方法可以选自用于原生质体的钙 / 聚乙二醇方法，原生质体的电穿孔方法，植物材料的显微注射法，不同植物材料的（DNA 或 RNA 包被）粒子轰击法，病毒（非整合的）感染，农杆菌通过浸透成株或转化成熟花粉或孢子介导的基因转移 (EP 0301 316)，等等。本发明优选的方法包含农杆菌介导的 DNA 转移。特别优选的是如 EP 0 120 516 和美国专利 4,940,838 所介绍的使用所谓的二元载体技术。

[0124] 根据本发明的生产转基因植物或植物部分的方法可以包含选择转化植物或植物部分的步骤。通常转化之后，选择已转化多核苷酸的植物细胞或细胞群，多核苷酸结构包括根据本发明多核苷酸构建含有编码不同酶或阻断机制的基因的 DNA 序列，随后的步骤是本领域技术人员所知的技术，转化材料再生入整个植株，以及对过量 RKS 蛋白的转基因植物的评价。

[0125] 可选标记，其可被包含于产生的重组 DNA 的一部分，用于在未转化细胞之外选择转化细胞（含有重组 DNA）。合适的标记的例子包括那些提供抗生素或除草剂抗性的基因。含有重组 DNA 的细胞能够在能杀死未转化细胞的抗生素或除草剂浓度下存活。可选择的标记基因的例子包括对除草剂 Basta 具有抗性的 bar 基因；具有卡那霉素抗性的 nptII 基因；具有潮霉素抗性的 hpt 基因；以及产生氰胺抗性的 cah 基因。整个植株可以由单个转化的植物细胞通过本领域技术人员所知的细胞培养技术产生。

[0126] 根据本发明一个可选实施方案中获得转基因植物的步骤可包含将载体按照本发明导入到一个祖植物，接着从所述的祖植物产生所述的转基因植物。

[0127] 依据本发明获得转基因植物的另一个实施方案，可包括将依据本发明的核苷酸构建导入到适合的载体，用于植物部分的转化，目的是产生一种转化的植物部分，接着从所述的转化植物部分再生出所述的转基因植物。

[0128] 在 DNA 转化以及再生之后，将对假定存在的转化植物进行鉴定，例如利用 Southern 分析本发明的重组 DNA 的出现，拷贝数和 / 或基因组结构。此外，或者可选性地，利用 Northern 和 / 或 Western 分析开展新导入 DNA 的表达水平，这些技术是本领域普通技术人员所熟知的。此外，在非生物胁迫条件下的表型分析可以揭示植物由于转入 RKS 基因变得有抗性。

[0129] 这还提出插入 RKS 基因优选 RKS4 编码序列的转基因植物，通过向所述植物提供油菜素类固醇化合物，例如可以激活油菜素类固醇受体的化合物，可以获得对非生物胁迫更

多抗性。此类化合物优选选自油菜素内酯、表油菜素内酯、表高油菜素内酯及其类似物。纵观油菜素类固醇在对非生物胁迫的保护作用以及 RKS 基因在油菜素类固醇信号中的作用,通过 RKS 受体的调控表达结合油菜素内固醇对非生物胁迫耐受性的应用,与这两种方法单独使用相比会进一步增强。

[0130] 油菜素类固醇化合物对植物的应用是通过传统的应用方法完成的,例如通过喷洒或通过浇灌。

具体实施方式

[0131] 实施例 1. 非生物胁迫对种子发芽的影响 (高盐和渗透胁迫)

[0132] 对于所有试验采用的 Wassilewskija (Ws-0) 或 Columbia (Col-0) 生态型拟南芥种子 (野生型和同系物转基因系) 都用 2% 漂白剂 +0.01% 吐温 20 进行表面消毒,用无菌水冲洗 5 次,然后置于 MS+ 维生素 (0.8% 琼脂 w/v) 板上,添加或不添加 180 或 200mM NaCl 或 400 和 450mM 甘露醇。将平板置于 4°C 的黑暗中 24 小时层积催芽,然后将平板转移到 20°C, 16 小时光照 ($100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 的生长室。

[0133] 从层积催芽 3 天后开始每 2 天测定一次发芽百分率,直到各组处理后 14-17 天。

[0134] 结果

[0135] 为了提前转基因可能的微妙作用,立即用高盐作用于种子发芽,并用不同浓度的 NaCl 进行监控。根据不同的转基因系所对应的野生型储备种子对照的反应进行 NaCl 浓度的调整。例如,即使在 180mMNaCl 条件下,野生型 RKS1 和 RKS12 过表达系发芽非常好,并且在 200mM 时,仅能见到差异。相反地,180mM 对 RKS4 系以及它们的野生型是足够的。在 RKS4-0X 系中观察到了较高的发芽率 (图 1A),虽然不是所有的系都这样,这最有可能是由于表达水平差异,这种表达水平差异与在高盐浓度下与发芽能力存在相关 (见图 1B)。例如,0X2 系同样显示转基因最高的表达水平,在发芽过程中其表现出对高盐更高的耐受性。为了验证盐耐受性的增加是否仅限于 RKS4,还检测了属于同一亚群 (II) 的其它 RKS 基因 RKS1 和 RKS14 的过表达系以及属于 RKS 家族亚群 III 的 RKS12 过表达系。在这些品系中同样观察到了盐耐受性的增加 (图 1C),这表明除 RKS4 外的其它 RKS 基因的过表达也同样能改善对盐的耐受性。这些结果在 RKS1 两种生态型中全部更令人信服,其可并行测试。RSK14-0X 的发芽并不显著高于野生型对照。然而我们不能排除 RSK14 的表达水平太低以至于不能使盐耐受性增加,因为只检测了一种品系。

[0136] 渗透胁迫对种子发芽的影响同样及时监控,并使用不同浓度的渗透调节物甘露醇。其与 NaCl 情况一样,高浓度 (450mM) 给出了最明显的结果 (图 2)。与盐中发现的相同,在 450mM 甘露醇中表现出最高百分比的种子发芽率说明 RKS4 过表达系 0X2 对渗透调节物质表现出最高水平的耐受性,而过表达截短型的 RKS4 表现出更敏感。

[0137] 实施例 2- 低温对植物生长的影响

[0138] 对于所有试验采用的 Wassilewskija (Ws-0) 或 Columbia (Col-0) 生态型拟南芥种子 (野生型和同系物转基因系) 都用 2% 漂白剂 +0.01% 吐温 20 进行表面消毒,用无菌水冲洗 5 次,然后置于 MS+ 维生素 (0.8% 琼脂 w/v) 板上,添加或不添加 10g/l 蔗糖 (= MS10)。将平板置于 4°C 的黑暗中 24 小时层积催芽,然后将平板转移到 21°C, 16 小时光照 ($100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 的生长室。10 天后,每个样本 20 株幼苗转移到含有相同培养基的新鲜

平板上。让幼苗在相同温度以及光条件下进一步生长 10 天以上,之后将所有的平板用铝箔包好置于 -25°C 或室温 (对照平板) 1 小时。接着按照随机原则将幼苗转移到土壤中,其目的是校正位置效应,并测量每个植株的花环直径。接着将植株在土壤上于 21°C 、16h 光照 ($100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 条件下生长,处理后 7 天和 14 天再次测定其花环直径。以处理结果的生长下降的差异作为冻害耐受性改变的标准。利用学生 t - 检验确定统计显著性 (p 值 < 0.05)。

[0139] 结果

[0140] 我们试验中的霜冻处理导致严重的生长抑制,其是通过花环直径来衡量的。耐受性高的植物在该处理中影响更少,在处理后的花环直径比敏感性植物更接近未经处理的植物。我们的测量清晰显示由于处理后 14 天的花环直径与对照植株没有什么不同,所以 *rks4-1* 植株比野生型 (Co1-0) 对冻害具有更高的耐受性 (图 3A, 左面)。然而,与未处理的对照植株相比处理后 Co1-0 植株生长更缓慢。有趣的是,过表达 RKS4 基因截短型的品系同 *rks4-1* 产生的部分转录相当,对冻害也表现出耐受性提高 (图 3A, 右面)。该结果也揭示了所用两种生态型对处理敏感性的差异。对 Ws-0 的影响比对 Co1-0 的影响更严重的多,而且 RKS4-m1-0X 和 RKS4-m2-0X 耐受性的增加似乎不如 *rks4-1* 重要。然而,如果其中一个翻译,与生长相关的花环直径在处理和非处理植物中呈现差异,所有转基因品系显示出耐受性的大幅增加是明显的。当差异与野生型的相对生长相关时则更明显。RKS4-m1-0X 和 RKS4-m2-0X 对冻害的影响表现出甚至不如 *rks4-1* 重要。它们确实分别生长 1.6 和 2.3 倍,比野生型更好,然而对于 *rks4-1* 是 1.4 倍。因此,通过 RKS4 基因 (胞外 LRRs) 截短型过表达可以获得冻害耐受性的增加。基于截短型 RKS4 受体的作用,可以合理地假设可以通过胞外 LRRs 下游编码序列的突变获得相同的结果。

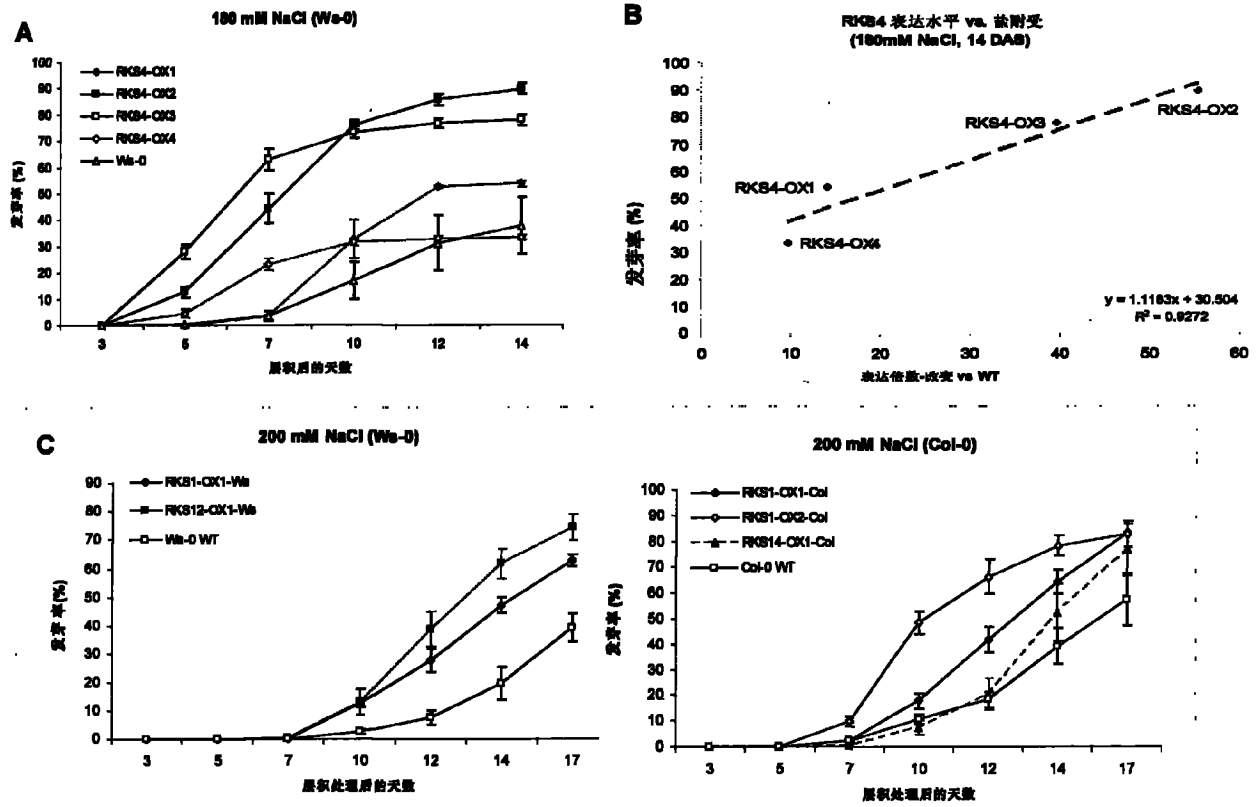


图 1

450 mM 甘露醇 (WS-0)

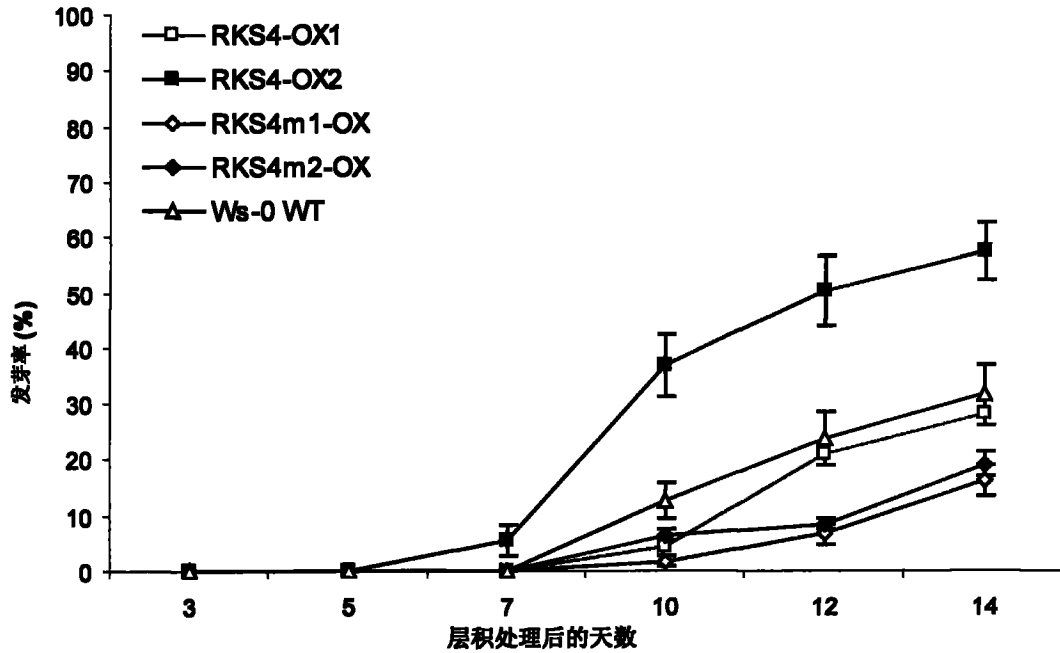


图 2

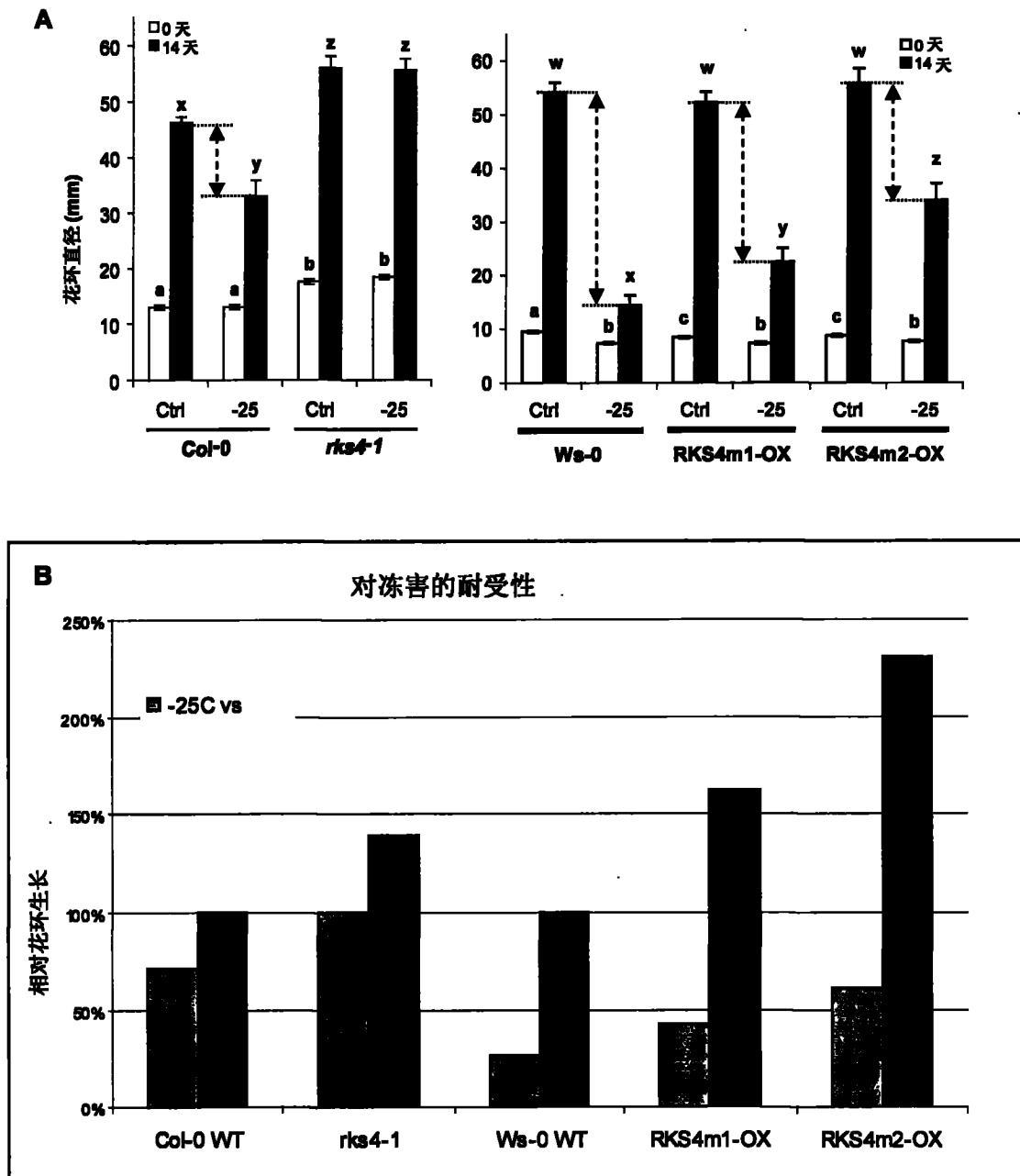


图 3

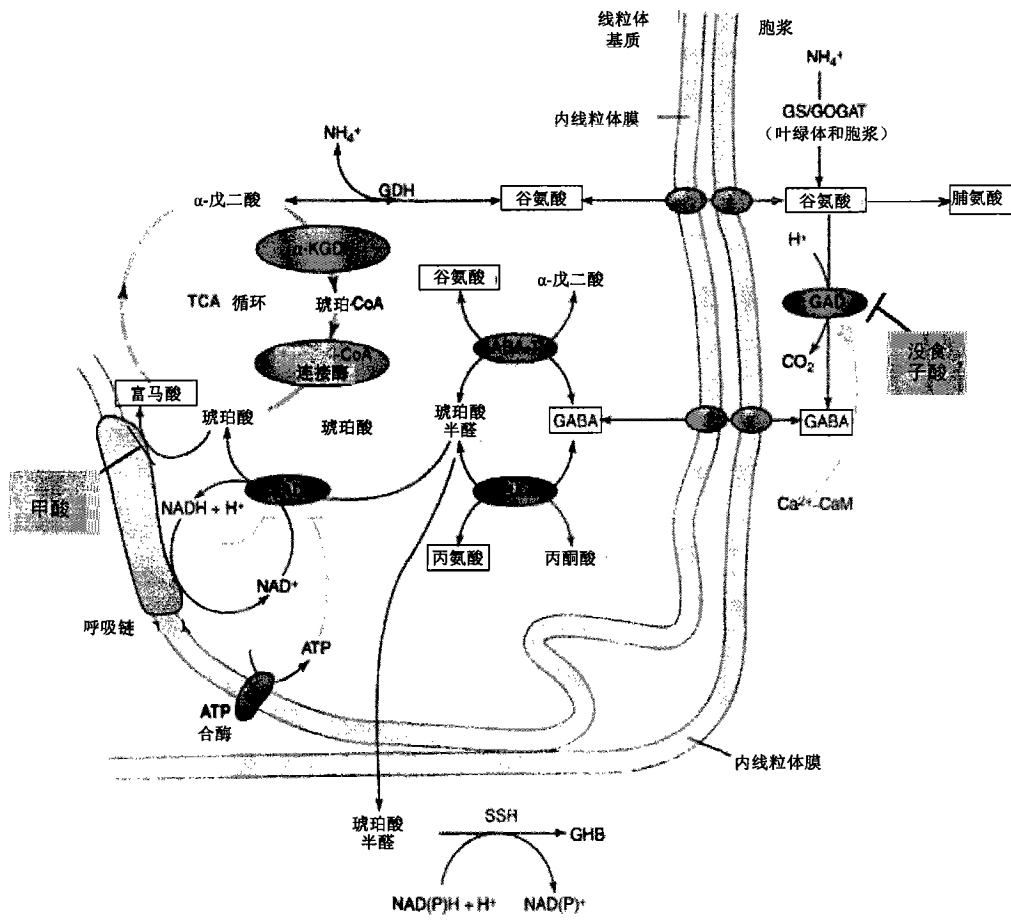


图 4