

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12N 15/82

[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/29 C07K 14/415

C12N 5/10 C12Q 1/68

A01H 5/00

[21] 申请号 99812532.6

[43]公开日 2002 年 1 月 30 日

[11]公开号 CN 1333833A

[22]申请日 1999.8.31 [21]申请号 99812532.6

[30]优先权

[32]1998.8.31 [33]US [31]60/098,402

[86]国际申请 PCT/US99/19899 1999.8.31

[87]国际公布 WO00/12736 英 2000.3.9

[85]进入国家阶段日期 2001.4.24

[71]申请人 孟山都公司

地址 美国密苏里州

[72]发明人 C·M·T·罗门斯

K·M·M·斯沃兹 H·彦

B·张

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 邵 红

权利要求书 4 页 说明书 77 页 附图页数 8 页

[54]发明名称 鉴定非寄主植物抗病基因的新方法

[57]摘要

本发明描述了一种分离植物抗病基因的新方法。该方法叙述了在感病植物中瞬时表达大量的从非寄主抗性植物中分离的 R 基因同系物或非寄主诱导型基因。可以根据或者抗病性或者以过敏反应应答病原体激卫素处理的能力来筛选这些植株。本发明也报道了采用所述方法成功分离出的几种 R 基因和非寄主诱导型基因。这些 R 基因在烟草中激发依赖于致病疫霉遍在性激卫素 INF1 存在的过敏反应。预期所述 R 基因既是首次分离出的赋予对致病疫霉抗性的 R 基因,又是首次报道的参与非寄主抗性的 R 基因。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 编码赋予抗植物病原体或激卫素抗性的蛋白的核酸序列的鉴定方法, 所述方法包括以下步骤:

5 选择抗目的病原体或激卫素的非寄主植株;

回收在所述抗性植株中存在的全长抗性基因同系物;

通过用所述同系物转化对病原体感病的植株的组织, 根据功能性筛选所述同系物;

用激卫素或病原体攻击所述转化的组织; 以及

10 观察对目的病原体的功能活性。

2. 按照权利要求1的方法, 其中所述抗目的病原体或激卫素的植物显示过敏反应型抗性。

3. 按照权利要求2的方法, 其中所述抗目的病原体或激卫素的植物是烟草。

15 4. 按照权利要求2的方法, 其中所述抗目的病原体或激卫素的植物是 *Solanum microdontum* accession 498124。

5. 按照权利要求1的方法, 其中所述目的病原体是致病疫霉。

6. 按照权利要求1的方法, 其中用 SEQ ID NO:37-48 的引物, 采用基因扩增回收所述全长抗性基因同系物。

20 7. 按照权利要求1的方法, 其中所述转化是农杆菌介导的转化。

8. 按照权利要求1的方法, 其中所述对病原体感病的植物是 *Nicotiana benthamiana*。

9. 按照权利要求1的方法, 其中所述用所述激卫素的攻击通过与所述激卫素的基因共转化进行。

25 10. 按照权利要求1的方法, 其中所述激卫素是 INF1。

11. 按照权利要求1的方法, 其中根据存在依赖于病原体或激卫素的过敏反应, 鉴定所述功能活性。

12. 核酸区段，其通过对植物病原体的无毒基因应答而赋予植物非寄主抗病性。

13. 按照权利要求12的核酸区段，它应答激卫素INF1。

5 14. 按照权利要求12的核酸区段，其包含SEQ ID NO:1-10或SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58或SEQ ID NO:60的核酸序列。

15. 按照权利要求12的核酸区段，其中所述核酸区段编码相当于SEQ ID NO:11-20的氨基酸序列。

16. 核酸区段，其包含SEQ ID NO:1-10的核酸序列或其互补序列，或包含在高严格条件下与SEQ ID NO:1-10杂交的序列。

10 17. 核酸区段，其包含SEQ ID NO:21-30的核酸序列或其互补序列，或包含在高严格条件下与SEQ ID NO:21-30杂交的序列。

18. 核酸区段，其包含SEQ ID NO:31-36的核酸序列或其互补序列，或包含在高严格条件下与SEQ ID NO:31-36杂交的序列。

15 19. 核酸区段，其包含SEQ ID NO:57的核酸序列或其互补序列，或包含在高严格条件下与SEQ ID NO:57杂交的序列。

20. 核酸区段，其包含SEQ ID NO:58的核酸序列或其互补序列，或包含在高严格条件下与SEQ ID NO:58杂交的序列。

21. 核酸区段，其包含SEQ ID NO:60的核酸序列或其互补序列，或包含在高严格条件下与SEQ ID NO:60杂交的序列。

20 22. 重组DNA表达系统，其包含一个其中插入一段异源DNA的表达载体，所述异源DNA通过对植物病原体的无毒基因应答而赋予植物非寄主抗病性。

23. 用异源DNA转化的细胞，所述异源DNA通过对植物病原体的无毒基因应答而赋予植物非寄主抗病性。

25 24. 按照权利要求23的细胞，其中所述异源DNA编码相当于SEQ ID NO:11-20的氨基酸序列。

25. 按照权利要求23的细胞，其中所述细胞选自植物细胞和细菌。

26. 按照权利要求25的细胞, 其中所述细胞是选自裸子植物、单子叶植物和双子叶植物的植物细胞。

27. 按照权利要求26的细胞, 其中所述细胞是选自以下的作物植物细胞: 金合欢属、苹果、香蕉、大麦、豆科植物、青花椰菜、甘蓝、canola、胡萝卜、柑桔、咖啡树、玉米、棉花、黄瓜、北美黄杉、桉树、大蒜、葡萄、火炬松、甜瓜、燕麦、油棕、洋葱、观赏植物、豌豆、花生、胡椒、杨树、马铃薯、Radiata pine、水稻、黑麦、高粱、南方松、大豆、草莓、甜菜、甘蔗、向日葵、枫香属(Sweetgum)、茶树、番茄、草坪、藤本植物和小麦。

28. 按照权利要求25的细胞, 其中所述细胞来自农杆菌属。

29. 按照权利要求23的细胞, 其中所述异源DNA插入包含表达载体的重组DNA表达系统中。

30. 按照权利要求23的细胞, 其中所述植物病原体是致病疫霉。

31. 用核酸区段转化的转基因植物, 所述核酸区段通过对植物病原体的无毒基因应答而赋予植物非寄主抗病性。

32. 按照权利要求31的转基因植物, 其中所述植物病原体是致病疫霉。

33. 按照权利要求31的转基因植物, 其中所述核酸区段编码相当于SQE ID NO:11-20的氨基酸序列。

34. 按照权利要求31的转基因植物, 其中所述植物选自裸子植物、单子叶植物和双子叶植物。

35. 按照权利要求34的转基因植物, 其中所述植物选自: 金合欢属、苹果、香蕉、大麦、豆科植物、青花椰菜、甘蓝、canola、胡萝卜、柑桔、咖啡树、玉米、棉花、黄瓜、北美黄杉、桉树、大蒜、葡萄、火炬松、甜瓜、燕麦、油棕、洋葱、观赏植物、豌豆、花生、胡椒、杨树、马铃薯、Radiata pine、水稻、黑麦、高粱、南方松、大豆、草莓、甜菜、甘蔗、向日葵、枫香属(Sweetgum)、茶树、番茄、草坪、藤本植物和小麦。

36. 用按照权利要求1分离的R基因转化的植物，所述R基因赋予所述植物对目的病原体的抗性。

37. 含有核酸区段SEQ ID NO:1-10或SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58或SEQ ID NO:60的诊断试剂盒。

说明书

鉴定非寄主植物抗病基因的新方法

5 本申请是1998年8月31日申请的美国临时专利申请第60/098,402号的部分继续申请，该临时申请的全部内容通过引用结合到本文中。

发明领域

10 本发明涉及快速鉴定在非寄主起抗性作用的基因的新方法。也涉及用该方法鉴定的、在感病植物中表达时提高抗病性水平的基因。

发明背景

15 在植物及其病原体之间的平衡进化中，遗传多样性是一个重要的因素。在天然系统中，杂交繁殖的植物群体与混合的病原体群体相互作用。这种相互作用通常依赖于植物中抗病(*R*)基因和病原体中无毒(*avr*)基因的存在。杂交繁殖的植物共享*R*基因库，而植物病原体则产生种类繁多的直接或间接由*avR*基因产生的激卫素(*elicitor*)。含有多少识别其中一种由侵染病原体产生的激卫素的*R*基因的单株抗所述病原体。

20 *R*基因介导的抗性通常导致过敏反应(HR)，即在侵染位点观察到的快速坏死。显然，活化的*R*基因触发导致程序性细胞死亡的信号转导事件，这可以防止侵入的病原体传播到侵染位点以外，并触发未受侵染的相邻细胞产生抗性。

25 在过去五年中，已经克隆了许多*R*基因。最普遍存在的一类*R*基因编码具有一个C末端富含亮氨酸的重复序列、一种N末端核苷酸结合位点和一段保守的具有共有序列GLPLAL的氨基酸序列的蛋白。该类*R*基因的实例是*Rps2* (Bent等, 1994)、*N* (Whitham等, 1994)、*L6* (Lawrence等, 1995)、*M* (Anderson等, 1997)和*Rpm1* (Grant等, 1995)。在鉴定参与*R*

基因介导的信号转导的蛋白方面也已经取得进展。最近的多篇论文报道了在R基因信号中涉及蛋白激酶、推定的转录因子和脂酶样蛋白(Innes综述, 1998)。最近, 已经表明对这些信号组分的工程改造也可以提高植物病害防治水平(Cao等, 1998)。

5 人们认为, R基因不提供抗所有基因型病原体的保护, 即一种物种内的病原体并不都产生相同的激生素。因此, 杂交繁殖群体的侵染可能将导致仅部分所述群体存活。现代农业可能破坏植物和病原体之间的平衡。现在暴发数十年前只影响相对有限数量植物的疾病可能引起毁灭性大流行。

10 为了防止病害引起的大的损失, 植物育种者尝试将抗最重要的病原体小种(race)的抗性渐渗到优良栽培品种中。在大多数情况下, 这是一场无止境的战斗, 因为抗一种病原体的一种或多种基因型的抗性选择导致出现其它基因型。例如, 相继将抗病型野生型马铃薯*Solanum demissum*的11个R基因渐渗到栽培的感病马铃薯栽培品种中, 在所有情
15 况下均导致出现毒性基因型的致病疫霉(*Phytophthora infestans*)病原体。经典的育种根据杂交程序定义, 因此, 仅可以在同一植物物种的不同accession或栽培品种之间、或在性亲和的植物物种之间转移抗性性状。这种抗性通常被称为“寄主”抗性。通过R基因的渐渗已经获得了对许多病原体的暂时防治, 所述病原体包括以下病原体: 致病疫霉、
20 大雄疫霉(*Phytophthora megasperma*)、禾柄锈菌(*Puccinia graminis*)、隐匿柄锈菌(*Puccinia recondita*)、高粱柄锈菌(*Puccinia sorghi*)、禾冠柄锈菌(*Puccinia coronata*)、向日葵柄锈菌(*Puccinia helianthi*)、鸭茅条形柄锈菌(*Puccinia striiformis*)、禾白粉菌(*Erysiphe graminis*)、大麦黑粉菌(*Ustilago hordei*)、燕麦散黑粉菌(*Ustilago avenae*)、豇豆单胞锈菌
25 (*Uromyces phaseoli*)、*Peronospora farinosa*、丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)、水稻黄单胞菌(*Xanthomonas oryzae*)、黄枝孢(*Cladosporium fulvum*)、稻褐飞虱、蚜虫、小麦瘿蚊和烟草花叶病毒。

已经鉴定了抗特定病原体大多数小种抗性的少数R基因。特别引

起关注的是水稻*Xa21*基因，它防治水稻黄单胞菌的大多数小种(Mazzola等, 1994; Song等, 1995); 小麦*Lr34*基因，参与对大多数叶锈病的抗性; 和大麦*Rpg1*基因，保护植物抵抗几乎所有秆锈病。然而，这些*R*基因是罕见的，并且可以被新的有侵袭力的小种打破。

5 一种提供广谱且持久的病害防治、但经典育种达不到的优越的抗性来源是所谓的“非寄主”抗性。如果一个植物种所有性亲和accession和栽培品种或非常近缘的物种抗特定的病原体的所有基因型，则该植物具有非宿主抗性。由于在那些植物种内缺乏感病材料，因此不能确定非寄主抗性的遗传基础。

10 迄今为止，尚未克隆到已知参与主动非寄主抗性的基因。然而，这种基因可能类似从显示寄主抗性的来源分离的*R*基因。该假说的支持来自对致病疫霉和非寄主植物种烟草(*Nicotiana tabacum*)之间相互作用的研究。烟草的抗性与其以HR响应侵染的能力相关，提示烟草对致病疫霉的抗性基于由*R*基因控制的主动防卫机制(kamoun等, 1997)。因此，烟草的非寄主抗性看来是“主动的”，并且不同于基于诸如存在
15 预先形成的病原体抑制剂或缺乏病原体生长必需的因子之类的因素的“被动”抗性(Ride, 1985)。

可以设想，某些克隆的非寄主抗性基因在感病作物中的表达可能提供现代农业需要的广谱而持久的抗病性水平。然而，还不能通过遗传学方法分离非宿主抗性基因。在此，本发明人已经开发出一种新的
20 技术，该技术基于分离和筛选大量的与主动非寄主抗性相关的基因。筛选在既对某些目标病原体感病又非常容易转化的植物中进行。通过施行该技术，已经鉴定出许多在感病植物中表达时提高、或预期提高抗病性水平的基因。

25 发明概述

本发明涉及在与非寄主抗性相关的基因中筛选在感病植物中表达时提高抗病性水平的基因的方法，即通过用这些基因转化病原体感

病植物的组织，用病原体或其激卫素攻击转化的组织，并观察增强的防卫反应和/或HR反应。在本发明的一个具体实施方案中，通过基因扩增、与致病疫霉的INF1激卫素共转化到*Nicotiana benthamiana*的叶片中，并根据指示功能性的过敏反应的存在进行筛选，鉴定出得自烟草的R基因的同系物。在另一实施方案中，通过首先选择由目标病原体在非寄主中诱导、而在感病寄主中不诱导(或不是同样程度诱导)的基因，其次根据它们在*N. benthamiana*植株的叶中瞬时过量表达时增强抗典型病原体(例如细菌病原体烟草假单胞菌(*Pseudomonas tabaci*))的抗性能力进行筛选，鉴定出与非寄主抗性相关的基因。

一方面，本发明提供可以赋予植物对致病疫霉的抗病性的新的核酸序列(SEQ ID NO:57和SEQ ID NO:1-10和SEQ ID NO:58、60、62)。本发明的再一实施方案提供参与植物对致病疫霉的抗病性的新蛋白序列(SEQ ID NO:11-20和SEQ ID NO:59)。

在本发明的再一实施方案中，提供包含赋予对致病疫霉的增强抗性的核酸序列的植物细胞或转基因植物、以及得自这种植物的种子或后代。与缺乏SEQ ID NO:57核酸序列、在其它方面相似的植物相比，包含所述核酸序列的转基因植物、其种子或后代表现出抗致病疫霉或其它真菌病原体引起的病害，或响应致病疫霉或其它真菌病原体表现出过敏反应。与缺乏SEQ ID NO:60的核酸序列、在其它方面相似的植物相比，包含所述核酸序列的转基因植物、其种子或后代表现出抗致病疫霉或其它真菌病原体引起的病害的抗性，或应答致病疫霉或其它真菌病原体的过敏反应。也提供了产生表现出对真菌病原体抗性增强的转基因植物的方法，包括将编码R蛋白的核酸序列引入植物细胞中，由此产生转化的细胞，并由所述转化细胞再生与缺乏所述核酸序列、在其它方面相似的植物相比表现出对一种或多种选定病原体抗性的转基因植物。

本发明也包括本文公开的DNA序列或其生物功能等同物的应用，即用于产生可用于鉴定赋予植物细胞对真菌病原体抗性的相关核

酸序列的重组质粒、转化的微生物、探针、分子标记和引物以及用于产生抗所述真菌病原体的转基因植物。

根据以下详述和附图，本发明的上述方面和其它方面将更显而易见。

5

附图简述

图1代表双元粘粒载体04541和04541M。LB的T-DNA结构。LB = 左侧边界; RB = 右侧边界; P-35S = 花椰菜花叶病毒的35S启动子; NPT = 新霉素磷酸转移酶基因; ocs3' = 章鱼碱合酶基因的终止序列; P-FMV = 玄参花叶病毒的35S启动子; sp = 编码PR1a的信号肽的序列; nos3' = 胭脂碱合酶基因的终止序列。该图未按比例画出。含INF1的 HindIII-XhoI DNA片段的方向可以相反。

10

图2图示pMON11770的质粒图谱。

15

图3显示涉及增强INF-1诱导的HR的10种R基因同系物的推定的部分氨基酸序列(SEQ ID NO:11-20)的序列对比。

图4图示pMON17227的质粒图谱。

图5图示pMON30656的质粒图谱。

图6图示pMON30620的质粒图谱。

图7图示pMON30621的质粒图谱。

20

序列表序列简述

SEQ ID NO:1-10显示了在*N. benthamiana*中增强INF-1依赖性HR的烟草R基因同系物的部分序列。

25

SEQ ID NO:11-20是涉及增强INF-1依赖性HR的R基因同系物(SEQ ID NO: 1-10)的推定的部分氨基酸序列。

SEQ ID NO:21-30是代表I类R基因同系物的10个不同亚类的序列。

SEQ ID NO:31-36是代表II类R基因同系物的6个不同亚类的序列。

SEQ ID NO:37-39是用于分离抗微生物肽同系物的引物。

SEQ ID NO:40-45是用于分离I类R基因同系物的引物。

5 SEQ ID NO:46-48是用于分离II类R基因同系物的引物。

SEQ ID NO:49-50是用于分离PR1a基因信号肽的引物。

SEQ ID NO:51-52是用来将INF1基因克隆入双元粘粒载体中的引物。

10 SEQ ID NO:53-54是用来将INF1基因克隆到pGEX载体中的引物。

SEQ ID NO:55-56是用来分离大豆叶斑疫霉(*P. sojae*)激卫素的引物。

SEQ ID NO:57是代表*Enh3*基因的基因组序列。

SEQ ID NO:58是TOB-F12的DNA序列。

15 SEQ ID NO:59是TOB-F12的蛋白序列。

SEQ ID NO:60是*Nhr1*基因的DNA序列。

SEQ ID NO:61-66是用来分离*Nhr1*基因的引物。

发明详述

20 定义

为了清楚且一致地理解本说明书和权利要求书，包括这些术语的给定范围，提供以下定义。

25 植物抗病(R)基因是这样一种核酸分离物：它编码的蛋白在植物与特定病原体或昆虫接触时，直接或间接参与诱导最终导致抗任何病原体或昆虫的植物防卫反应的信号转导途径。抗病基因产物应答称为激卫素的病原体信号分子时被活化。

非寄主诱导型基因(NHI)是由病原体在非寄主植物中被快速诱导的基因。

*R*蛋白是由*R*基因编码的产物。

植物抗病(*R*)基因座是遗传上确定的、参与昆虫抗性或抗病性的基因座，所述基因座已知或据信含有至少一种功能性*R*基因。

5 *R*基因同系物是其具有的推定氨基酸序列与一种或多种先前分离的*R*基因具有显著同源性的DNA序列。它应该既含有一个核苷酸结合位点，又含有一个GLPLAL区。

10 显著同源性定义为在常规杂交条件下与参比序列杂交的DNA序列。所述杂交条件最好是指6X SSC、5X Denhardt溶液、100 mg/ml 鱼精DNA、0.1% SDS中于55℃杂交足够时间，以允许杂交(例如数小时至过夜)，然后在2X SSC、0.1% SDS中于室温下洗涤2次，每次15分钟和在0.5-1X SSC、0.1% SDS中于55℃下洗涤2次，每次15分钟，然后进行放射自显影。通常，当杂交混合物在0.1X SSC中于55℃、优选60℃、更优选65℃下洗涤至少1次时，所述核酸分子能够杂交。

15 一个*R*基因亚类包括一组*R*基因同系物，它们在氨基酸水平上享有70%以上的同一性，或在植物基因组DNA印迹上交叉杂交。

功能性*R*基因是其编码的蛋白参与抗病原体或昆虫的植物抗病反应的基因。

20 *R*基因源是对一种或几种目的病原体表现出抗病性、并且可能含有介导该抗性的*R*基因的植物。存在主动*R*基因的指标是(1) 抗病性与过敏反应相关，和(2) 抗病性依赖于单一基因座的存在。

*R*基因信号转导途径是可以由特定的病原体激卫素通过直接或间接地与*R*基因产物相互作用而被活化、并且在活化时通常触发过敏反应、诱导致病相关基因表达和抗病性的途径。

25 过敏反应(HR)是一种针对病原体的植物防卫作用。它包括与各种活性氧产生有关的侵染位点附近的快速细胞坏死、产生抗微生物化合物和加强寄主细胞壁。在特定寄主激发HR的病原体对该寄主是无毒的，该寄主是抗性的，而所述植物-病原体相互作用是不亲和的。

寄主抗性是指为植物种一员的栽培品种、生态型或accession的任

何抗病性或昆虫抗性，所述植物种包括至少一种没有这种抗性的其它栽培品种、生态型或accession表现出。

非寄主抗性是指在特定植物种和性亲和的相关植物种的所有栽培品种、生态型或accession共有的任何抗病性或昆虫抗性。

5 主动非寄主抗性是已知或据信基于在侵染时激活防卫反应的非寄主抗性。主动非寄主抗性不是基于(1) 缺乏病原体分化或生长必需的因子，(2) 存在预先形成的病原体生长抑制剂，(3) 任何其它的“被动”原因。

10 非寄主抗性基因是R基因、NHI或从非寄主分离出的、编码激卫素结合蛋白并在感病寄主中增强植物HR和/或防卫反应的基因。

激卫素是由病原体产生的、在植物中激发反应的分子或肽。激卫素的产生由病原体无毒基因控制。

植物系统是指可以用来通过瞬时转化筛选多基因家族成员的植物种。

15 表达是指编码DNA分子(例如产生多肽的结构基因)经历的细胞内总过程，所述细胞内过程包括转录和翻译。

启动子是DNA序列或一组DNA序列上的识别位点，所述位点为结构基因提供表达控制元件，并且RNA聚合酶特异性地结合于所述位点并启动该基因的RNA合成(转录)。

20 再生是由植物细胞(例如植物原生质体或外植体)生长出植物的过程。

结构编码序列是指编码肽、多肽或蛋白质的DNA序列，所述肽、多肽或蛋白质是在细胞将所述结构编码序列转录出信使RNA (mRNA)后，将所述mRNA翻译为所需肽、多肽或蛋白产物而制备的。

25 稳定转化是将外源DNA序列(例如载体、重组DNA分子)引入细胞或原生质体中，然后所述外源DNA在所述细胞或原生质体中整合到染色体中或能够自主复制的过程。

瞬时转化是将携带由启动子驱动的一个或多个基因、后接终止信

号的外源DNA序列引入细胞或原生质体中、以在有限的时间内表达所引入的基因的过程。

转化细胞是其DNA通过将外源DNA分子引入该细胞中而改变的细胞。

5 转基因细胞是指得自转化细胞或由转化细胞再生、或得自转基因生物的任何细胞。典型的转基因细胞包括得自转化植物细胞的植物愈伤组织和得自转基因植物的特定细胞诸如体细胞(例如叶片、根、茎)或生殖细胞。

10 转基因植物是得自转化植物细胞或原生质体的植物或其后代，其中所述植物的DNA含有不是原始存在于同一品系的天然、非转基因植物中的所引入的外源DNA分子。术语“转基因植物”和“转化植物”本领域有时用作限定其DNA含有外源DNA分子的植物的同义词。然而，人们认为更科学正确的是，转基因植物是指由转化植物细胞或原生质体获得的再生植物或愈伤组织，在本文中采用该用法。

15 载体是能够在寄主细胞中复制的DNA分子，另一DNA区段可以与其有效连接，以便所连接区段复制。质粒是一种典型的载体。

植物在本文中在广义上使用，是指分化的植物以及在合适的条件下可以发育为成熟的植物的未分化植物材料(例如原生质体、植物细胞、种子、小植株等)以及这种植物的后代和其部分，例如插条(cuttings)和果实。

20 生物功能等同物是指在本发明的核酸和蛋白方面的等同物，它们含有的一段序列或部分与本发明的新序列具有序列相似性，并且其功能特性与本文所公开序列相同或相似。

25 本发明使得人们能够分离用于防治病毒、细菌、真菌或线虫病原体的非寄主抗性基因，所述病原体包括但不限于疫霉属(*Phytophthora*)、白粉菌属(*Erysiphe*)、柄锈菌属(*Puccinia*)、壳针孢属(*Septoria*)、黑粉菌属(*Ustilago*)、栅锈菌属(*Melampsora*)、盘梗霉属(*Bremia*)、黑星菌属(*Venturia*)、单胞锈菌属(*Uromyces*)、腥黑粉菌属

(*Tilletia*)、喙孢属(*Rhynchosporium*)、核腔菌属、*Fulvia*、尖镰孢(*Fusarium oxysporum*)、霜霉属(*Peronospora*)、丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)、黄单胞菌属(*Xanthomonas*)、枝孢属(*Cladosporium*)、(*Colletotrichum*)、烟草花叶病毒、马铃薯Y病毒、马铃薯X病毒、瓶霉属(*Phialophora*)、异皮线虫属(*Heterodera*)、刺盘孢属(*Colletotrichum*)、*Magnaporthe*、稻褐飞虱、green rice leafhopper、蚜虫、*Pseudocercosporella*和小麦瘿蚊。也提供功能性R基因、NHI和编码激卫素结合蛋白的基因的DNA序列,并且提供将这种DNA序列插入寄主细胞的基因构成物和方法,用于产生由此编码的用于防治致病疫霉和可能的疫霉属其它菌种的多肽。

本发明叙述了在感病植物中表达R基因、NHI和编码激卫素结合蛋白的基因,以鉴定增强HR和/或防卫反应的基因。能够快速分离这种“功能性”基因以及随后将这些非寄主抗性基因转移到感病作物中,将大大促进抗病栽培品种的开发。这里,本发明人描述了一种采用不是基于传统遗传学的方法分离非寄主抗性基因的一种全新的方法。相反,它依赖于在植物试验系统中根据功能活性筛选R基因、NHI和激卫素结合蛋白。这种新方法的最重要的结果之一是抗性源是预期使得可以分离参与广谱而持久防治病害的基因的主动非寄主的抗性源。

与主动非寄主抗性相关的基因的筛选

本领域技术人员可以分析非寄主中功能性R基因的存在,并因此允许通过各种各样的方法选择有用的抗性源(R基因供体),所述方法包括但不限于感染非寄主和检查过敏反应(HR)枯斑(lesion)的存在。有时可能用肉眼观察到作为局部枯斑的这种HR。通常仍需要显微镜分析侵染的叶片组织。目测HR细胞的一种方法是用乳酸酚蓝染色。本领域熟知的其它方法也可以用来检测植物枯斑,所述方法包括但不限于通过自身荧光检查HR细胞的存在。虽然缺乏时不是无资格作为R基因供体,但增加作为R基因供体的非寄主有用性的其它因子包括来自目的病

原体的已知激卫素。

在本发明的一个实施方案中，烟草显示对马铃薯晚疫病病原体致病疫霉的持久且广谱的非寄主抗性。这种抗性与侵染时过敏反应的诱导有关(Kamoun等, 1997)，提示烟草对致病疫霉的抗性基于由*R*基因控制的主动防卫机制。已经克隆了诱导烟草HR的致病疫霉的激卫素INF1的事实，促进了具有抗致病疫霉功能活性的烟草*R*基因的克隆。将少量INF1肽注射到烟草叶片的胞间隙中，导致诱导HR(Kamoun等, 1997)。

在一个实施方案中，鉴定了DNA片段，并用来检查提供与HR相关的或据信与HR相关的抗病性的许多或所有亚类的潜在*R*基因。本领域技术人员可以利用本领域众所周知的方法，分离可以用作“亚类特异性探针”的这些片段，所述方法包括但不限于例如(1) 设计对*R*基因中保守的结构域特异性的简并或非简并*R*基因引物，以扩增种类繁多的*R*基因的同系物片段(保守结构域的实例是核苷酸结合位点和GLPLAL基序)；(2) 对得自抗性源基因组的*R*基因片段测序，并将其分为亚类，在同一亚类成员中优选的推导氨基酸序列的同一性大于约70%；和(3) 使每个亚类的代表性DNA片段与植物总基因组DNA消化物杂交，以估计每个亚类成员的总数。随后，用亚类特异性探针筛选所述抗性源的双元粘粒文库。通过部分消化总基因组DNA，并优选亚克隆双元粘粒载体T-DNA边界之间能够在大肠杆菌和根癌农杆菌(*A. tumefaciens*)两者中复制的约15-20 kb的片段，更优选约21-25 kb的片段(Jones等, 1992)，构建这些文库。

最好是构建并筛选非cDNA文库的双元粘粒文库，因为(1) 双元粘粒允许不用进一步的克隆步骤而筛选*R*基因，并且(2) 在某些情况下(例如*Rps2*和*N*) *R*基因的cDNA克隆表达已经表明不提供对具有相应无毒基因的病原体的抗病性。

设计了由本发明提供的DNA序列信息可供用于制备有能力特异性地与选定多核苷酸的基因序列杂交的DNA (或RNA)序列。基于对*R*基因同系物的选定序列的研究，所述选定序列例如最优选为与SEQ ID

NO:1-10相同的序列，或优选所提及的任何亚类特异性探针，可以制备合适长度的核酸探针。这种DNA和核酸探针特异性地显示烟草属(*Nicotiana*)、茄科(*Solanaceous*)和其它植物种的亚类R基因的能力，使得它们在各种实施方案中特别有用。最重要的是，所述探针可以用于各种各样的用于分离功能性R基因的分析中。R基因同系物也可以用来在植物分离群体中研究抗性分离。这样，有可能在DNA印迹上鉴定与抗性共分离的条带。这些条带可以用作抗性的紧密分子标记，并且本身可以用于育种程序中。另外，这些条带可以显示分离R基因本身。因此，与实施例中提出的R基因同源的序列既可用于R基因的作图，又可用于R基因的分离。例如，我们已经在含有抗US-8基因型致病疫霉抗性分离的马铃薯植株DNA的DNA印迹上，测试了作为探针的与R基因同源的DNA片段(SEQ ID NO:21-36)。具有SEQ ID NO:29的放射性标记的DNA片段可以用来在许多抗性植物中鉴定在感病植株中总是缺乏的一个条带。

在某些实施方案中，最好使用寡核苷酸引物。采用在用PCR技术检测、扩增R基因限定区段或使所述区段突变中使用多核苷酸，设计这种引物的序列。长度至少14个核苷酸的大小有助于确保该片段具有足够的长度，以形成既稳定又具有选择性的双链体分子。但是一般优选在大于14个碱基的序列段内具有互补序列的分子，以提高杂交体的稳定性和选择性，并由此改进所获得的特异性杂交分子的质量和程度。人们一般优选设计具有约14-20个核苷酸或需要时甚至更长的基因互补序列段的核酸分子。例如通过用化学方法直接合成该片段；通过应用和核酸复制技术，例如美国专利4,683,195和4,683,202(所述专利通过引用结合到本文中)的PCR技术；通过从含有合适插入片段和合适的限制位点的重组质粒上切下选定的DNA片段，可以容易地制备这种片段。

二元粘粒文库的筛选产生带有至少部分R基因的粘粒。采用本领域众所周知的方法，包括但不限于用简并R基因引物进行PCR扩增，可

以证实R基因同源序列的存在。本领域技术人员可以使用一种简单的方法，来获得关于在T-DNA边界之间存在由其自身启动子驱动的、后接其自身终止信号全长的R基因同系物的指示。该方法基于我们的发现，即将高浓度的带有R基因同系物的农杆菌属菌株(约 10^9 菌落形成单位/ml)注射到例如*Nicotiana benthamiana*的植物的胞间隙中，通常在注射后3-6天导致不是与病原体攻击无关就是与激卫素处理无关的HR的诱导。因此，在植物中诱导“自发”HR的R基因同系物的结构序列和功能序列最可能是全长的。

在另一实施方案中，可以鉴定不是R基因但是在或者R基因激活途径或者导致病原体抗性的任何其它诱导途径中起作用的基因。采用例如PCR选择扣除(PCR select subtraction)的技术，可以分离出这些“非寄主诱导型基因”(NHI)，PCR选择扣除允许鉴定出在病原体攻击时在非寄主植物中表达的、但在感病植物中表达程度较低的基因。为了快速选择最感兴趣的线索(lead)，可以将这些候选基因在例如*N. benthamiana*的植物中瞬时表达，并测试它们限制由典型病原体(例如烟草假单胞菌)引起的病症的能力。可以用于此目的的替代的病原体包括侵染*N. benthamiana*的所有其它病原体，包括烟草花叶病毒、马铃薯X病毒和致病疫霉。

在另一实施方案中，可以采用酵母双杂交法鉴定在抗性信号活动中起作用的激卫素结合蛋白。酵母双杂交系统已经广泛用来研究蛋白-蛋白相互作用(Fields和Sternglanz, 1994)。可以将病原体激卫素亚克隆到“饵”载体中，用来分离与激卫素相互作用的植物蛋白。然后可以使阳性候选物在植物中瞬时表达，并测试其诱导HR和/或防卫反应的能力。原则上，可以在植物中诱导防卫反应的所有病原体激卫素和/或无毒因子均可以通过该方法使用，以分离其植物结合因子/互作因子。

为了在模型系统中鉴定非寄主抗性基因，这种模型必须具有(1)瞬时转化的可及性，(2)对目标病原体和/或典型病原体的感病性，和(3)对该病原体的某些激卫素的不敏感性。一种非常令人关注的候选

植物系统是*N. benthamiana*, 因为该植物系统是稳定的农杆菌介导的转化高度可及的(Rubino等, 1993)、是普查农杆菌介导的瞬时转化可及的并且对在烟草中完全受控制的许多病原体感病, 所述病原体包括大豆花叶病毒、甘薯羽斑纹病毒、李坏死等轴不稳环斑病毒(ilarvirus)、菜豆普通花叶马铃薯Y病毒(poyvirus)和携带无毒基因*avrPto* (Rommens等, 1995)的细菌丁香假单胞菌病原体。预期*N. benthamiana*也将对农学上其它重要的病毒、真菌、细菌和线虫病原体具有感病性, 所述病原体包括但不限于致病疫霉、大豆叶斑疫霉(*Phytophthora soja*)、*Phialophora gregata*、茄假单胞菌(*Pseudomonas solanacearum*)和尖镰孢。该说明(list)还包括侵染马铃薯、番茄或大豆的线虫以及某些昆虫。*N. benthamiana*对许多病原体的感病性使得*N. benthamiana*成为根据功能活性筛选R基因同系物的良好植物系统。其它植物系统包括*N. clevelandii*、烟草、*Lotus japonicus*、大豆(*Glycine max*)和稻(*Oryza sativa*)。

本领域技术人员可以通过各种各样的方法, 包括但不限于用携带这些基因的农杆菌菌株转化植物, 根据功能活性筛选所述分离的非寄主基因。所述植物既为瞬时转化(最好是农杆菌介导的瞬时转化)高度可及的, 又对目标病原体感病。

用大量基因有效地稳定转化植物的一种方法是将各携带一种特有基因的农杆菌菌株按组合并, 每组10种菌株。这样, 仅需要约50个转化体。然后每种转化可以合并40株植株的种子。为了筛选抗病性, 可以用一种病原体侵染每批种子约160株植株, 即总共8,000株植株。

如果目标病原体产生已知的激卫素, 则通过使所述转基因植株经所述激卫素处理可以有助于筛选工作。表达功能性非寄主抗性基因的转基因植物将对该激卫素应答, 建立可清楚观察到的HR。已知激卫素的实例是从大雄疫霉细胞壁释放的 β -葡聚糖激卫素(Sharp等, 1984)、致病疫霉产生的花生四烯酸(Bostock等, 1981)、大豆叶斑疫霉(*P. sojae*)的胞外42 kDa糖蛋白(Parker等, 1991)和疫霉(*Phytophthora* spp.)产生的10 kDa elicitors (Yu, 1995)。

或者显示对病原体侵染的抗病性或者经所述激卫素处理时以HR
应答的转基因植物可以用来以各种各样的方式鉴定功能性非寄主抗性
基因。例如，T-DNA特异性引物可以用来扩增所引入的DNA的部分。
该扩增片段随后可以用作探针，以筛选大肠杆菌原始文库基因。许多
5 所述阳性克隆将含有所述功能基因，然而可以对所述基因进行进一步
分析，并按照标准方案进行亚克隆。

如Kapila等(1997)所述，农杆菌介导的瞬时基因表达是稳定转化以
根据抗目标病原体的功能活性筛选非寄主基因(R基因、NHI或推定的
激卫素结合蛋白)的一种替代方法。如果克隆了编码目标病原体激卫素
10 的基因，则优选该系统。已经提出该测定为一种快速可靠的方法，用
以测试R基因Cf4和Cf9在其它植物种中的功能(PCT申请WO 96/35790)
以及测试特定突变的影响，而无需产生稳定的转基因植物，但从未建
议将其作为根据功能活性筛选大量基因(最优选R基因)的方法。

本文描述的方法并限于筛选功能性R基因的同系物。在最广义
15 上，可以根据功能活性筛选任何基因大家族的成员。可以根据抗微生物
功能活性筛选的非R基因的基因的一个实例是编码致病相关(PR)蛋
白的一大类基因。仅测试了小部分这些基因防治微生物的能力，本文
所述的方法可以使得能够快速测试更多的PR基因和PR基因同系物。另
一实例是筛选编码抗微生物小肽的基因，所述基因存在于大多数或所
20 有植物种中的大基因家族中。大多数所述抗微生物肽(AMP)含有偶数
半胱氨酸，所述半胱氨酸均通过二硫桥成对地连接。根据一级结构水
平上的同源性，可以将植物AMP分类不同的家族，包括硫堇、植物防
卫素、脂质转移蛋白以及橡胶蛋白型和knottin型AMP (Broekaert等，
1997)。AMP之间的同源性可以允许通过基因扩增或DNA印迹分析来分
25 离AMP同系物。例如，示于SEQ ID NO:37-39的引物可以用来从分离自
一种或几种植物的基因组DNA中扩增大量的AMP同系物。采用约100
ng模板DNA，并加入建议量的核苷酸、缓冲液和Taq聚合酶以及1 μ M
引物SEQ ID NO:37以及或者0.5 μ M引物SEQ ID NO:38或者0.5 μ M引

物SEQ ID NO:39, 可以进行基因扩增反应。可以将扩增的同系物克隆到双元载体中, 所述双元载体在植物中可表达AMP, 并且可以被接合到农杆菌中。随后可以将所述农杆菌菌株独立地或与2种或3种不同菌株结合, 注射到植物系统例如*N. benthamiana*的胞间隙中, 并可以同时测试多次注射的叶片组织的抗病性。

所述基因表达系统可以用来测试任何其它基因对线虫或病原体的功能活性。这包括涉及抗性信号活动和/或防卫反应的基因和编码以下蛋白的基因: 蛋白激酶, 例如Pto和Pti 1; 参与防卫作用的转录因子; 脂质转运蛋白; 参与细胞壁加强或木质素生物合成的蛋白质; 参与早期信号活动的蛋白质; ω -6-脂肪酸去饱和酶; 参与抗性的GTP结合蛋白; SAR/HR会聚蛋白(converging protein), 例如Cpr5、Acd2和Lsd1; HR/SAR分支点下游的R基因级联汇集途径(convergence pathway)中蛋白, 例如Cpr1、Cpr6, Cim2、Cim3; 参与水杨酸和茉莉酮酸生物合成的蛋白; 参与植物抗毒素产生的蛋白; 参与抗细胞凋亡的保护的蛋白; 参与广谱抗性的膜结合蛋白, 例如ml-O; 参与植物胁迫的蛋白, 例如陪伴分子; 参与微生物毒素解毒的蛋白; 抗真菌蛋白基因; 推定的脂酶, 例如Pad4; 和由非上述激卫素诱导的蛋白, 例如细胞色素P450、ACC合酶和DGP解离抑制剂。

赋予感病寄主抗病性的功能性非寄主基因的克隆

本领域技术人员可以通过各种各样的方法, 将鉴定的功能基因引入所需的但为感病的植物栽培品种中, 所述方法包括但不限于农杆菌介导的转化。功能基因可以用来赋予种类繁多的植物细胞抗病性, 所述植物例如裸子植物、单子叶植物和双子叶植物。虽然可以将这些基因插入属于以下各种类别的任何植物细胞中, 但它们尤其可用于目的农作物, 包括但不限于金合欢属(*Acacia*)、苜蓿、aneth、苹果、杏、菊芋、arugula、芦笋、鳄梨、香蕉、大麦、豆科植物、甜菜、黑刺莓、越桔、青花椰菜、抱子甘蓝、甘蓝、canola、网纹甜瓜、胡萝卜、木薯、

花椰菜、芹菜、樱桃、茺荑叶、柑桔、clementines、咖啡树、玉米、棉花、黄瓜、北美黄杉、茄子、苜蓿菜、宽叶苦苣、桉树、茴香、无花果、大蒜、葫芦、葡萄、葡萄柚、白兰瓜、豆薯、猕猴桃、莴苣、韭葱、柠檬、酸橙、火炬松、芒果、甜瓜、蘑菇、坚果、燕麦、油棕、油料种子油菜、秋葵、洋葱、橙、观赏植物、番木瓜、欧芹、豌豆、桃子、花生、梨、胡椒、柿子、松、凤梨、车前草、李子、石榴、杨树、马铃薯、西葫芦、quince、radiata pine、radicchio、萝卜、悬钩子、水稻、黑麦、高粱、南方松、大豆、菠菜、南瓜、草莓、甜菜、甘蔗、向日葵、甘薯、枫香、柑桔、茶树、烟草、番茄、小黑麦、草坪、藤本植物、西瓜、小麦、薯蓣和西葫芦。

制备表达载体的方法是本领域众所周知的。在美国专利第4,971,908、4,940,835、4,769,061和4,757,011中描述了用来转化植物的表达(转化)载体和制备那些载体的方法,所述专利公开内容通过引用结合到本文中。可以修饰那些载体,以包括按照本发明的编码序列。

可以开发各种各样的方法来通过互补粘性末端或平端将DNA与载体有效连接。例如,可以将互补同聚物序列加入待插入的DNA区段中以及插入载体DNA中。然后所述载体和所述DNA区段则在互补同聚尾序之间通过氢键连接,形成重组DNA分子。

编码有能力赋予细胞抗病性的多肽的编码区最好含有与SEQ ID NO:1-10或SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58、60、62、64、66、68、70所示序列相同的序列或生物功能等同的序列。

可用于在高等植物中表达基因的典型载体是本领域众所周知的,包括衍生自根癌农杆菌肿瘤诱导(Ti)质粒(Rogers等,1987)的载体。然而,已知几种其它植物整合型载体系统在植物中起作用,包括pCaMVCN转移控制载体(Fromm等,1985)。质粒pCaMVCN(可得自Pharmacia, Piscataway, NJ)包括花椰菜花叶病毒(CaMV) 35S启动子。

在某些实施方案中,用来表达所述多肽的载体包括在植物细胞中有效的选择标记。用作选择标记的核酸序列用来在细胞中产生有助于

相对于不含所述标记的细胞鉴别所述细胞的表型。有用的选择标记包括GUS、绿荧光蛋白(GFP)、新霉素磷酸转移酶II (*nptII*)、荧光素酶(LUX)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、抗生素抗性序列和耐除草剂(例如草甘膦)序列。选择标记最好是卡那霉素、潮霉素或除草剂抗性标记。一种抗药性标记是其表达导致卡那霉素抗性的基因，即含有胭脂碱合酶启动子、Tn5新霉素磷酸转移酶II (*NptII*)和胭脂碱合酶3'非翻译区的嵌合基因(Togers等, 1987)。

本发明构成物的3'非翻译区应该含有一种转录终止子或具有同等功能的元件和一个在植物中起作用的聚腺苷酸化信号，以使得腺苷酸核苷酸添加到所述mRNA的3'端。这种3'区的实例包括含有农杆菌肿瘤诱导(Ti)质粒基因和植物基因的聚腺苷酸化信号的3'转录、非翻译区，所述Ti质粒基因例如胭脂碱合酶(*nos*)基因，所述植物基因例如大豆7s储存蛋白基因和豌豆ssRUBISCO E9基因(欧洲专利申请0 385 962)。可以将这些元件组合，例如以提供重组双链DNA分子，包含以5'至3'方向有效连接的：一个在植物细胞中起作用的启动子，以使得产生RNA序列；一个编码R基因的DNA编码序列；和一个在植物细胞中起作用的3'非翻译区，以引起转录终止并将聚腺苷酸核苷酸添加到所述RNA序列的3'端。

与抗性有关的基因序列可以包含完整的核苷酸序列或其可能具有等同功能的任何部分，例如截短形式。或者，可能最好表达植物抗病性多肽的表位区，以便利用这些肽产生抗所述多肽的抗体。

翻译增强子也可以作为载体DNA的部分加入。因此，本发明的DNA构成物也应该含有一个或多个可以用来增强由所产生的mRNA转录物表达基因产物的5'非翻译前导序列。这种序列可以衍生自选择以表达所述基因的启动子，或可以对其特异性地修饰，以增加mRNA的翻译。这种区域也可以得自病毒RNA、合适的真核基因或合成基因序列。

最好这种增强子序列增加或改变所产生的mRNA的翻译效率。本

发明不限于所述增强子衍生自天然5'非翻译启动子序列的构成物，而且它还可包括衍生自其它非相关启动子的非翻译前导序列，例如其它增强子转录激活蛋白或基因。例如，矮牵牛热激蛋白70 (Hsp70)含有这种前导序列(Winter等, 1988)。

5 本发明设计了产生包含本文所述核酸序列的表达载体。因此，在一个实施方案中，表达载体包含分离并纯化的DNA分子，所述DNA分子包含有效连接编码本发明多肽的编码区的启动子，因此所述启动子驱动所述编码区的转录。所述编码区有效连接于转录终止区。本文所用的术语“有效连接”是指启动子与编码区连接的方式，使得由该启动子控制并调节所述编码区的转录。将启动子与编码区有效连接的方法是本领域众所周知的。因为本发明的表达载体将用来转化植物，所以选择有能力在植物中驱动表达的启动子。在植物中起作用的启动子也是本领域熟知的。可用于在植物中表达所述多肽的启动子有诱导型启动子、病毒启动子、合成启动子或组成型启动子(Poszkowski等, 1989; 10 Odell等, 1985)以及时间调节型、空间调节型或时空调节型启动子(Chau等, 1989)。根据在转化植物细胞或转基因植物中对所述编码区转录活性的控制能力选择启动子。在植物组织中可以由种类繁多的启动子驱动结构基因。启动子可以是影响双子叶植物或单子叶植物的近组成型启动子，例如CaMV 35S启动子，或是组织特异性或发育特异性的启动子。 15 20

如上所述，可以将与抗性相关的非寄主基因置于或者天然存在的同源启动子或者种类繁多的异源启动子的控制之下。文献中已经描述了在植物细胞中有活性的许多启动子。这些启动子包括例如胭脂碱合酶(nos)、甘露碱合酶(mas)和章鱼碱合酶(ocs)启动子，它们携带于根癌农杆菌肿瘤诱导质粒上；花椰菜花叶病毒(CaMV) 19S和35S启动子； 25 增强的CaMV 35S启动子；玄参花叶病毒(FMV) 35S启动子；核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶小亚基(ssRUBISCO)的光诱导型启动子；烟草的EIF-4A启动子(Mandel等, 1995)；拟南芥属(*Arabidopsis*)的壳多糖酶启动子

(Samac等, 1991); 嫩茎花椰菜的LTP (脂质转移蛋白)启动子(Pyee等, 1995); 玉米的遍在蛋白启动子(Christensen等, 1992); 甘蔗badnavirus启动子; 和水稻的肌动蛋白启动子(McElroy等, 1990)。所有这些启动子已经用来产生在植物中表达的各种类型的DNA构成物。在这方面请参见例如PCT国际说明书WO 84/02915。与由其天然启动子驱动的表达水平相比, 这些启动子中的许多启动子可以提高基因表达水平。在某些情况下, 基因表达的增加使得抗性水平提高。

在适用于本发明方法的DNA构成物中有用的启动子可以根据其赋予对病原体侵染应答特异性表达编码序列的能力来选择。病原体对植物的侵染触发了称为防卫相关基因或致病相关(PR)蛋白的多种蛋白的诱导(Bowles, 1990; Bol等, 1990; Linthorst, 1991)。这种防卫相关或PR基因可以编码参与苯丙类(phenylpropanoid)代谢的酶(例如苯丙氨酸脱氨酶、查尔酮合酶)、修饰植物细胞壁的酶(例如富羟脯氨酸糖蛋白、富甘氨酸蛋白、过氧化物酶)、降解真菌细胞壁的酶(例如壳多糖酶、葡聚糖酶)、奇异果甜蛋白样蛋白或尚未知功能的蛋白。已经从许多植物物种中分离并鉴定了防卫相关或PR基因。这些基因的启动子可以用来在用相应病原体攻击转基因植物时驱动非寄主抗性基因及其生物功能等同物的表达。例如, 这种启动子已经得自从马铃薯植株(Fritzemeier等, 1987; Cuypers等, 1988; Logemann等, 1989; Matton等, 1989; Schroder等, 1992)或从芦笋(Warner等, 1993)中分离的防卫相关或PR基因。或者, 可以使用病原体诱导型启动子, 例如可得自烟草的PRP1启动子(Martini等, 1993)。

也可以根据在所述植物抗病蛋白最有效的组织中赋予特异性表达的能力来选择启动子, 所述组织例如对于根专性病原体(例如大豆cyst nematode)为根组织, 对叶专一性病原体(例如锈病和霉病)为叶组织或对于主要在头状花序致病的病原体(例如禾本科镰孢(*Fusarium graminearum*))为花组织。

不论怎样, 选择以驱动R基因在转基因植物中表达的具体启动子

均应该能够在植物组织中启动生物有效量的所述蛋白的表达。能够驱动这种表达的组成型启动子的实例是e35S启动子、FMV35S启动子、水稻肌动蛋白启动子、玉米遍在蛋白启动子、甘蔗badnavirus启动子和eIF-4A启动子。

5 如有需要，可以对用于所述DNA构成物的启动子进行修饰，以影响其控制特性。例如，CaMV35S启动子可以连接于ssRUBISCO基因中在无光情况下阻抑ssRUBISCO表达的部分，由此产生在叶片中而不在根中有活性的启动子。为了本发明的目的，术语“CaMV35S”启动子包括CaMV35S启动子的变体，例如通过与操作基因区连接、随机诱变
10 或控制诱变等衍生的启动子。此外，可以改变可用于本发明的启动子，以使其含有多个增强子序列，以有助于提高基因表达水平。这种增强子序列的实例已经由Kay等(1987)报道。

 当所述启动子为近组成型启动子例如CaMV35S时，在多种转化植物组织(例如愈伤组织、叶片、种子和根)中发现多肽表达增加。或者，
15 通过采用含有组织特异性启动子的植物整合型载体，可以将转化效应导向特定的植物组织。

 一个典型的组织特异性启动子是凝集素启动子，它是种子组织特异性的。大豆种子中的凝集素蛋白由单基因(*Lel*)编码，它仅在种子成熟时表达，占种子总mRNA的约2%至约5%。已经对凝集素基因和种子
20 特异性启动子进行了全面的表征，并已经用来在转基因烟草植株中控制种子特异性表达(Vodkin等, 1983; Lindstrom等, 1990)。

 本发明不仅设计了全长的R基因序列，而且设计了生物功能等同的核苷酸序列。术语“生物功能等同的核苷酸序列”是指如果将它们
25 以使其表达的功能有效的方式引入寄主细胞中，其编码的肽、多肽和蛋白与SEQ ID NO:11-20或SEQ ID NO: 59所示的部分序列具有相同或相似生物活性的DNA或RNA，包括基因组DNA、质粒DNA、cDNA、合成DNA和mRNA核苷酸序列，而且它们产生参与在植物中诱导有效抗性反应的肽、多肽或蛋白。

生物功能等同的核苷酸序列包括编码基础氨基酸序列中保守氨基酸改变的核苷酸序列，其中产生沉默改变。与编码野生型基因的核苷酸序列相比，这种核苷酸序列含有相应的碱基置换。

5 除编码在基础多肽序列中的保守氨基酸改变的核苷酸序列外，生物功能等同的核苷酸序列还包括含有其它碱基置换、添加或缺失的核苷酸序列。这些核苷酸序列包括含有的遗传信息与所述cDNA中含有的信息相同的核酸。这种核苷酸序列可以称为所述cDNA的“遗传等同修饰形式”，并且可以用本文所述的方法鉴定。

10 在所述cDNA、质粒DNA、基因组DNA、合成DNA或编码所述非寄主抗性基因的其它核酸中制造的突变，最好保持所述编码序列的读框。此外，这些突变最好不产生可以杂交产生mRNA二级结构(例如回折或发夹)的互补区，因为这可能不利地影响mRNA的翻译。

15 虽然可以预定突变位点，但不必预定突变本身的性质。例如，为了选择给定位点上诱变的最佳特性，可以在靶密码子上进行随机诱变。

或者，通过合成含有突变序列、侧翼为能够连接天然cDNA序列片段的限制位点的寡核苷酸，可以在特定位置上引入突变。在连接后，所产生的重新构建的核苷酸序列编码具有所需氨基酸插入、置换或缺失的衍生形式。

20 在任一种情况下，都可以通过例如实施例5和6中所述的方法，根据所需病原体活性来筛选所表达的突变体。

所述DNA有用的遗传等同修饰形式的具体实例包括其核苷酸序列与所述DNA具有高水平同源性(即序列同一性)的DNA。与所述DNA或其相应部分的序列同一性可以为约70%或更高、更优选约80%或更高、最优选约90%或更高。

25 采用常规DNA-DNA或DNA-RNA杂交技术(Sambrook等, 1989)或通过用PCR法扩增，可以容易地分离出这种遗传等同修饰形式。这些形式当通过常规转化技术引入通常对真菌病原体敏感的植物细胞中

时，应该有能力赋予对这种真菌病原体的抗性。

所述非寄主抗性基因的片段和变体可以由cDNA、质粒DNA、基因组DNA、合成DNA或mRNA编码。这些核酸与核苷酸序列编码所述植物R基因的DNA的相应区域或部分、或其相应的mRNA的序列相似性应该为约70%或更高，优选约80%或更高，最优选约90%或更高。

在本发明中，与所述非寄主抗性基因或其片段生物功能等同的核酸包括：

(1) DNA，该DNA已经通过天然突变或人工突变例如部分核苷酸缺失、插入、添加等改变其长度，使得当以全长的所述序列为100%时，所述生物功能等同序列的长度为该序列的约60%至约120%，最好是约80%至约110%；或

(2) 核苷酸序列，其含有部分(通常为所述全长的约20%或更低，优选约10%或更低，更优选约5%或更低)、天然或人工突变，使得这种序列编码不同的氨基酸，但其中所产生的多肽保留所述基因的植物抗病活性。以该方式产生的突变DNA通常编码与所述核苷酸序列编码的植物抗病蛋白的氨基酸序列的序列同一性约70%或更高的多肽，优选序列同一性约80%或更高，更优选约90%或更高。

在本发明中，用来产生人工突变的方法不特别受限制，并且这种突变可以用任何本领域常规方法产生。

例如，可以用合适的限制酶处理所述cDNA，以便插入或缺失合适的DNA片段，使得保留正确的氨基酸读框。在限制性内切核酸酶处理后，可以处理消化的DNA以补平任何突出端，并再连接所述DNA。

也可以通过合成寡核苷酸，所述寡核苷酸含有邻接能够连接所述天然cDNA或基因组序列片段的限制位点的突变体序列，也可以在特定的位置引入突变。连接后，所产生的重新构建的序列编码具有所需氨基酸插入、置换或缺失的衍生物。

或者，可以采用寡核苷酸指导的定点诱变或区段特异性诱变法，产生具有根据所需置换、缺失或插入而改变的特定密码子的改变的

cDNA或基因组DNA序列。

Ausubel等(1995); Bauer等(1985); Craik (1985); Frits Eckstein等(1982); Osuna等(1994); Sambrook等(1989); Smith等(1981); 和Walder等(1986)公开了制备上述改变的典型方法。采用这些方法中的任一种产生的本文公开的DNA序列的生物功能等同物, 可以通过采用本领域熟知的技术分析由此编码的肽、多肽或蛋白来选择。

编码R基因的所述DNA的生物功能等同形式包括与针对非寄主抗性基因产生的抗体反应即与其特异性结合而且与所述多肽的生物活性相同或相似的肽、多肽和蛋白的编码核苷酸序列。这种抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。

由于遗传密码的简并性, 即在蛋白质中天然存在的大多数氨基酸存在一个以上的密码子, 因此含有的遗传信息与本发明DNA基本相同、且所编码的氨基酸序列与所述非寄主抗性基因的核苷酸序列编码的氨基酸序列基本相同的其它DNA (和RNA)序列, 可以用于实施本发明。这种方法也适用于本文讨论的其它核苷酸序列。

本发明设计的DNA的生物功能等同形式也包括用来在特定寄主细胞中增强表达的合成DNA。寄主细胞通常具有优选型式的密码子选择(Campbell等, 1990)。用来在特定寄主中增强表达的合成DNA因此应该反映该寄主细胞中的密码子选择型式。

在本发明中, 可以采用“BestFit”或“Gap”程序, 采用序列分析软件包(Genetics Computer Group, Inc., University of Wisconsin Biotechnology Center, Madison, WI 53711)的默认值, 测定序列相似性或同一性。优选的计分矩阵(scoring matrix)是PAM250。

当然本发明也设计了与分离的非寄主抗性基因的序列及其互补序列杂交、且表达时编码的肽、多肽或蛋白具有的生物活性与天然蛋白相同或相似的核苷酸序列。这种核苷酸序列最好在中等严格条件至高严格条件(参见Sambrook等, 1989)下与所述非寄主抗性基因或其互补序列杂交。典型的条件包括开始在6X SSC、5X Denhardt溶液、100

mg/ml鱼精DNA、0.1% SDS中于55℃下杂交足够时间，以允许杂交(例如数小时至过夜)，然后在2X SSC、0.1% SDS中于室温下洗涤2次，每次15分钟，然后在0.5-1X SSC、0.1% SDS中于55℃下洗涤2次，每次15分钟，然后进行放射自显影。通常，当杂交混合物在0.1X SSC中于55℃、优选于60℃、更优选于65℃下至少洗涤1次时，所述核酸分子能够杂交。

如果上述核苷酸序列编码的肽、多肽或蛋白所具有的抗病原体效应与本文鉴定的核苷酸序列编码的肽、多肽或蛋白的效应相似，则认为上述核苷酸序列具有与所述抗性编码基因基本等同的生物功能。

用包含非寄主抗性基因的一种或多种表达载体转化细菌、酵母细胞、植物细胞或整株植株的方法和组合物构成本说明书的进一步方面。衍生自这种转化方法的转基因细菌、酵母细胞、植物细胞或植物或得自这种转基因植物的后代和种子也构成本发明的进一步实施方案。

转化细菌和酵母细胞的方法是本领域众所周知的。植物细胞的DNA转化方法包括农杆菌介导的植物转化、原生质体转化、基因转移到花粉中、注射到生殖器官中、注射到未成熟胚中和粒子轰击。这些方法中的每种方法均具有不同的优点和缺点。因此，将基因引入特定植物品系中的一种具体方法对于另一植物品种可能不一定是最有效的，但众所周知哪种方法可用于特定的植物品种。

主要利用根癌农杆菌转化双子叶植物、并获得转基因植物的方法是本领域熟知的，并且已经推广用于棉花(美国专利第5,004,863号；美国专利第5,159,135号；美国专利第5,518,908号)、大豆(美国专利第5,569,834号；美国专利第5,416,011号；McCabe等, 1988；Christou等, 1988)、芸苔属(*Brassica*) (美国专利第5,463,174)、花生(Cheng等, 1996；McKentley等, 1995)、番木瓜(Yang等, 1996)和豌豆(Grant等, 1995；Schroeder等, 1993；De Kathen和Jacobsen, 1990)。Gasser和Fraley (1989)对该领域进行了综述。

也已经报道了采用电穿孔、粒子轰击和农杆菌的单子叶植物转化。在芦笋(Bytebier等, 1987)、大麦(Wan和Lemaux, 1994)、玉米(Rhodes等, 1988; Gordon-Kamm等, 1990; Fromm等, 1990; Koziel等, 1993; Armstrong等, 1995)、燕麦(Somers等, 1992)、鸡脚草(Horn等, 1988)、水稻(Toriyama等, 1988; Zhang和Wu, 1988; Zhang等, 1988; Batraw和Hall, 1990; Christou等, 1991; Park等, 1996)、黑麦(De la Pena等, 1987)、甘蔗(Bower和Birch, 1992)、苇状羊茅(Wang等, 1992)和小麦(Vasil等, 1992; Weeds等, 1993)中已经达到了转化和植株再生。Davey等(1986)和Davey等(1989)也综述了单子叶植物转化和植株再生的技术。

本文所述的研究可以用来分离功能性*R*基因、NHI和/或激卫素结合蛋白, 以及用来将这些基因转移到目的作物中, 以产生昆虫抗性或抗病性。

实施例

以下实施例进一步阐明本发明。它们不能解释为限制权利要求书的范围和含义。

实施例1: 用于马铃薯晚疫病防治的烟草*R*基因的鉴定

从烟草基因组中分离出*R*基因, 随后将这些基因转移到马铃薯中, 可以使得产生抗致病疫霉的转基因马铃薯植株。已经克隆了诱导烟草HR的致病疫霉激卫素INF1的事实(Kamoun等, 1997), 促进了具有抗致病疫霉的功能活性的烟草*R*基因的克隆。为了有助于显现HR细胞, 一个优选的方法是将受侵染叶片组织在含有1份乳酸酚蓝(0.5 mg/ml锥虫蓝、0.25 g/ml苯酚、25%甘油、25%乳酸)和2份96%乙醇的溶液中煮沸, 然后在2.5 g/L水合氯醛中脱色过夜(Shipton和Brown, 1962)。

为了分离*R*基因同系物的多个部分, 设计退火至*R*基因中保守区的引物。I类*R*基因编码具有一个核苷酸结合位点和一段保守的具有共有

序列“GLPLAL”的氨基酸序列的蛋白。

用于I类基因的引物组1由示于SEQ ID NO:40-41的引物组成。用于I类基因的引物组2由示于SEQ ID NO:42-43的引物组成。SEQ ID NO:42可以用SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45中所示引物中任一种取代。

5 II类R基因编码具有一个保守的推定膜锚着点的蛋白。示于SEQ ID NO:46-47的引物被成功地用来分离该类R基因同系物。SEQ ID NO:47中的引物可以用SEQ ID NO:48中所示引物取代。

10 采用与上述一种引物相似或相同的引物和Gibco BRL试剂系统(产品目录号10198-018; Lige Technologies, Gaithersburg, MD), 在厂商建议的标准条件下进行PCR反应(于94℃变性1分钟, 于48-52℃退火1分钟, 于72℃延伸2分钟, 总共进行35个循环), 获得所述R基因同系物片段。将PCR产物在琼脂糖凝胶上电泳, 通常显示为一条0.5 kb的主带。然而, 将凝胶纯化的条带在载体PCRscript (Stratageng, La Jolla, CA)中亚克隆; 并按照厂商的程序(ABI PRISM™染料终止循环测序, Perkin Elmer, Foster City, CA)进行各个扩增产物的序列分析, 证明出现的每个条带均含有几十种不同的R基因同系物片段。为了保证鉴定尽可能多的亚类, 可以在相同条件下使用上述引物, 以不仅从烟草中分离R基因同系物, 而且从近缘植物种*Solanum microdontum*中分离R基因同系物。将从这些植物种中分离的200多种R基因同系物片段进行序列对比, 并根据氨基酸水平的同源性将其分为不同的亚类。根据成员间同一性至少约70%或成员能够在DNA印迹上杂交的能力来定义每个亚类。

20 鉴定出许多不同亚类后, 下一步是使用这些亚类的代表性成员对DNA印迹进行探测, 以确定R基因同系物的总数。采用标准引物T3和T7 (Life Technologies, Gaithersburg, MD), 从相应的质粒扩增了I类10个不同的亚类代表(SEQ ID NO:21-30)和II类的6个不同的亚类代表(SEQ ID NO:31-36)。扩增的片段随后用Prime-It II (Stratagene, La Jolla, CA)标记, 并将一等份 5×10^7 cpm加入15 ml Rapid-hyb缓冲液(Amersham, Arlington Heights, IL), 以用含有植物DNA消化物的Hybond-N⁺滤膜

(Amersham, Arlington Heights, IL)进行DNA印迹实验。16个不同的杂交实验显现在烟草中总共约350种R基因同系物，其中200种I类同系物和150种II类同系物。从*S. microdontum*中分离的探针看来在含有烟草DNA的滤膜上显现R基因同系物中与烟草探针同样有效，证明R基因同系物在近缘植物种间是保守的，并且表明采用内源和异源探针的适用性。采用选择的16种探针显现这种大量的R基因同系物的能力暗示这些探针以及因此相应的DNA序列在分离烟草功能性R基因方面的重要性，预期烟草功能性R基因中的许多基因与这些DNA片段中任一种具有高度同源性。生物功能性R基因应该含有与选定的16种DNA片段(SEQ ID NO:21-36)中任一序列的序列相似性约70%或更高的约180个氨基酸的区域，所述序列相似性优选约80%或更高，最优选约90%或更高。也将滤膜与Pam Ronald (University of California, Davis)提供的番茄*Pto*基因以及两种番茄*Xa21*同系物杂交，显示约40多个条带。

15 全长文库的构建:

产生衍生自SLJ44024 (Jones等, 1992)的改进双元粘粒载体04541，命名为04541M，它除含有新霉素磷酸转移酶(*NptII*)基因外，还在T-DNA的两个边界之间含有由玄参花叶病毒35S启动子驱动的*INF1*基因(图1)。通过首先用SEQ ID NO:49-50中所示引物扩增编码*PR1a*基因(Hammond-Kosack等, 1994)的信号肽的DNA序列，也用SEQ ID NO:51-52中所示引物扩增*INF1*基因(294 bp; 从US-8基因型致病疫霉的基因组DNA中分离)，构建04541M载体。用XbaI-KpnI和KpnI-BglII分别消化扩增的信号肽序列，并将其亚克隆到用XbaI和BamHI消化的质粒载体pMON11770 (图2)中，。所产生的质粒含有一个盒，该盒按序列包含玄参花叶病毒35S启动子、*PR1a*信号肽序列、*INF1*基因和胭脂碱合酶(*nos*)基因的转录终止序列。将含该盒的HindIII-SmaI DNA片段亚克隆到pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA)，并用HindIII和HincII线性化。最后，用HindIII和XhoI从该载体中释放该盒，并克隆到用相

同酶消化的双元粘粒载体04541中。

采用Gigapack III Gold系统(Stratagene, La Jolla, CA), 将原始04541载体和新的04541M载体转导到大肠杆菌MR细胞中, 并通过三亲本交配接合到农杆菌ABI中(Ditta等, 1980)。ABI是一种A208根癌农杆菌菌株, 携带解除武装的(disarmed)的pTiC58质粒pMP90RK (Koncz等, 1986)。让农杆菌于30℃在含25 µg/ml氯霉素和50 µg/ml卡那霉素的LB培养基(每升10 g胰胨、5 g酵母和5 g NaCl)中生长。让含有辅助质粒pRK2013的大肠杆菌在含有50 µg/ml卡那霉素的LB培养基中生长过夜。带有所述双元粘粒载体的大肠杆菌在含10 µg/ml四环素的LB培养基中生长。在所有培养物生长后, 将4 ml LB加入含ABI、大肠杆菌(pRK2013)和大肠杆菌(双元粘粒载体)各100 ml的试管中。将该混合物用微量离心机(microfuge)离心1分钟, 并倾出上清液部分。将沉淀部分再悬浮于剩余的液体中, 将一等份吸移到LB琼脂平板的中心。于30℃生长过夜后, 将一等份取自该平板的细胞在补充2 µg/ml四环素、50 µg/ml卡那霉素和25 µg/ml氯霉素的LB平板上划线接种。于30℃生长24-48小时后, 由于“三亲本”交配而在选择平板上出现菌落。从该平板选择4个单菌落, 将每个菌落分别接种到补充2 µg/ml四环素、50 µg/ml卡那霉素和25 µg/ml氯霉素的LB液体培养基中, 并于30℃生长。通过对分离自农杆菌菌株的质粒DNA进行限制分析, 证实存在完整的T-DNA。

将携带04541的农杆菌菌株注射到烟草和*N. Benthamiana*的胞间隙中, 正如所预料, 没有产生任何表型, 并且注射的组织看来与注射缺乏粘粒载体的农杆菌菌株的组织相同。然而, 在将04541M注射到烟草叶片中后产生严重的坏死反应, 表明INF1的瞬时表达的确在烟草中激发HR。在*N. benthamiana*中, 在对注射组织的死细胞进行锥虫蓝染色后, 仅能观察到有限量的坏死。在*N. benthamiana*中INF1诱导的坏死量低于在烟草中诱导的坏死量的5%。这些结果表明: (1) 烟草含有合适的基因以识别疫霉激卫素INF1, 并且这种识别激发快速强烈的HR,

而(2) *N. benthamiana* 不含有与烟草一样强的识别INF1的合适基因，或在识别INF1时不能激发快速强烈的HR。因此，这些看来是识别INF1的能力和致病疫霉抗病性之间存在明确关系。

假定R基因在识别INF1中起作用，我们计划根据在*N. benthamiana* 中激发依赖于INF1的HR的能力来筛选R基因同系物。为此，从烟草幼叶中分离基因组DNA，用SauIIIA部分消化，用小牛碱性磷酸酶(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)处理以除去3'-OH基团，与用BamHI消化的04541M连接，并用Gigapack III Gold系统(Stratagene, La Jolla, CA)转导到大肠杆菌MR细胞中，以产生平均插入片段大小为20千碱基对的 2×10^6 个克隆的双元粘粒文库。

用先前用于初始DNA印迹分析的所有亚类特异性探针，筛选所述烟草双元粘粒文库。我们按常规同时使用5种不同的探针筛选该文库。与所述亚类特异性探针(DRQ ID NO:21-36)杂交的所有双元粘粒载体均用R基因引物(SEQ ID NO:40-41)进行PCR分析，以确证存在至少R基因同系物的部分。随后将这些“阳性”粘粒接合到根癌农杆菌中，以产生用于瞬时转化植株或稳定转化植物的菌株。

实施例2：非寄主诱导型基因的分离

在非寄主防卫信号活动中起作用的基因的超量表达可以增强感病植物的抗病性。为了鉴定这种非寄主诱导型基因(NHI)，进行以下实验。

提取RNA

用TRIzol™试剂，按照厂商的方案(Life Technologies, Gaithersburg, MD)从以下植物叶片中提取RNA：

烟草叶片，用致病疫霉攻击侵染后4小时

烟草叶片，经喷水模拟处理后4小时

烟草叶片，用致病疫霉攻击侵染后18小时

烟草叶片，经喷水模拟处理后18小时

扣除

按照厂商的方案(Clontech, Palo Alto, CA)进行以下PCR选择的cDNA扣除(PCR-select cDNA subtractions), 以选择在抗性植物中由致病疫霉主要诱导的基因:

- 5 从“1”中的cDNA中扣除“2”中的所有cDNA, 产生库I
 从“3”中的cDNA中扣除“4”中的所有cDNA, 产生库II

候选基因的选择

10 将扣除的cDNA库克隆到pGEMT载体(Promega, Madison, WI). 采用标准T7和M13反向引物(Life Technologies, Gaithersburg, MD), 经PCR从该载体扩增扣除的克隆, 并一式两份点样到尼龙膜(Amersham, Arlington, Heights, IL)上. 一式两份的膜与用TRIzol™试剂(Life Technologies, Gaithersburg, MD)从抗性植株或感病植株中分离的信使RNA衍生的cDNA探针杂交. 选择与抗性探针的杂交强于与感病探针杂交的斑点, 用于进一步的RNA印迹分析以证实其表达.

- 15 用于RNA印迹分析的滤膜含有分离自以下的10微克RNA:
 烟草叶片, 在用致病疫霉攻击侵染后0、4、8和18小时
 烟草叶片, 在经喷水模拟处理后0、4、8和18小时

按优先序排列先后位置(lead)

根据RNA印迹资料, 采用以下标准对候选物按优先序排列:

- 20 1. 在受侵染烟草植株中的诱导强于模拟处理的烟草植株
 2. 在侵染后4小时的诱导强于侵染后18小时
 3. 在受侵染烟草中的诱导强于受侵染的感病马铃薯和/或benthamiana中的诱导
 4. 或者明确参与上游信号活动的编码蛋白(例如受体、激酶和
25 转录因子)或具有酶功能的编码蛋白

全长cDNA的分离

为了分离全长cDNA, 用SMART™ cDNA文库构建试剂盒(Clontech, Palo Alto, CA)按照厂商的建议制备烟草cDNA文库. 该文库

产生的总共 2×10^6 个独立的克隆，并在40-50个平板(150 × 15 mm)中扩增。对于每个完整的文库，收集每个平板的裂解液，并作为亚库单独贮存。

对于每个候选基因，根据得自扣除克隆的序列设计特异性引物。基因特异性引物用来对所有亚库筛选含有至少一个阳性cDNA的亚库。

用双元质粒载体亚克隆全长序列

构建双元载体pMON30656 (图5)，以有助于克隆并随后分析抗性相关基因。该载体允许以一个步骤亚克隆分离自SMART文库的全长基因，因为它在玄参花叶病毒的35S启动子和具有根癌农杆菌pTiT37胭脂碱合酶基因终止信号的非翻译尾随序列之间含有一个独特的SfiI位点。该载体也含有Lox-P位点，该位点允许从植物基因组中拯救目的基因。或者，可以通过用PacI将DNA片段化来拯救目的基因。片段化的DNA需要随后自身连接，以产生除含有目的基因外还含有赋予细菌对卡那霉素和新霉素抗性的kan基因和细菌质粒pACYC184的复制起点的质粒结构。

实施例3：从烟草中分离激卫素结合蛋白

为了分离可以激活基于识别致病疫霉激卫素导致诱导HR的信号转导途径的非R基因的植物因子或受体，使用酵母MATCHMARKER双杂种 (Clontech, Palo Alto, CA)。按照厂商的方案构建烟草MATCHMARKER cDNA文库，并用来根据与致病疫霉激卫素INF1相互作用的能力来进行筛选。筛选了总共 3×10^6 个克隆，已经鉴定出6个阳性克隆。其中一个名为*Nhr1* (SEQ ID NO:60)的阳性克隆含有两个锌指样结构域和一个bromo结构域，提示*Nhr1*可能是一种转录调节物或信号蛋白。

为了分离*Nhr1*的全长基因，构建了含有所述FMV启动子控制之下的INF1基因和平均大小为20千碱基对的烟草DNA片段的双元粘粒文

库，并用*Nhr1*筛选。将阳性克隆接合到农杆菌中，将所产生的菌株的过夜培养物重悬浮于 $0.1 \times \text{MS}$ 培养基(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)中，并稀释至 $\text{OD}_{600} = 1.0$ ，并如下所述将该培养物注射到*Nicotiana benthamiana*胞间隙中。

5

实施例4: 筛选功能基因的植物系统的鉴定

为了获得基因活性的初步证据，需要允许根据功能活性筛选烟草R基因、NHI和推定激卫素受体的模型植物系统。该植物系统应该(1) 高度容易瞬时转化，(2) 对目标病原体致病疫霉和典型病原体例如丁香假单胞菌易感，和(3) 对于INF1肽不敏感。*Nicotiana benthamiana*符合所有这些标准。为了确定瞬时转化效率，将 $\text{OD}_{600} = 0.1$ 的携带编码在T-DNA两个边界之间的绿色荧光蛋白(GFP)的基因的农杆菌菌株注射到*N. benthamiana*叶片的胞间隙中。注射后3天，用以下方案分离原生质体：将叶片切成小块，并用含2%纤维素酶、0.5%离析酶R-10、0.5 M蔗糖和5 mM CaCl_2 的溶液消化2.5小时。使消化的产物流过40微米筛，并以80-100 x g离心4分钟。然后将飘浮的原生质体转移到新试管中，并通过光学显微镜计数。随后，通过UV辐射测定发荧光的原生质体数。通过将原生质体总数与发荧光原生质体之比乘以100，确定转化细胞的百分比。如表1所示，该实验和采用GUS基因代替GFP基因作为报道基因的相似实验证明了转化率约为90%。

10

20

表1. 在从农杆菌感染的叶片中分离的原生质体中的基因表达

报道基因	表达报道基因的原生质体的百分比
FMV:GFP	87.9 + 1.9
CaMV:GUS	91.1 + 0.4

用分别在T-DNA边界之间携带编码绿荧光蛋白(GFP)和 β -葡萄糖醛糖苷酶(GUS)的农杆菌菌株注射叶片。GUS基因被一个内含子间断，以防止细菌基因表达。GFP基因由玄参花叶病毒的35S启动子驱

25

动; GUS基因由花椰菜花叶病毒的35S启动子驱动。所用的农杆菌菌株分别是ABI和GV2260。浸润后2天, 监测原生质体的自身荧光, 以确定GFP表达细胞的频率。通过用X-葡萄糖苷酸将原生质体染色, 测定GUS表达细胞的频率。数据是GFP的7个独立实验的平均值, 是GUS的3个独立实验的平均值。

人们对于*N. benthamiana*对在其它近缘植物(例如烟草)无毒的真菌病原体的反应知之甚少。为了确定*N. benthamiana*对致病疫霉的感病性, 用8000个孢子/ml的基因型US-1和US-8侵染6周龄的植株。同时侵染烟草和马铃薯植株分别用作抗性对照和感病性对照。将受侵染的植株置于潮湿的17℃生长室中, 在黑暗中放置约40小时, 以保证侵染, 然后将其转移至18℃生长室, 光周期为16 h光/8 h黑暗, 以产生晚疫病症状。侵染后5天, *N. benthamiana*植株大范围枯萎。用锥虫蓝染色并用水合氯醛脱色(Keogh等, 1980)的受侵染叶片的显微镜分析证明在病灶中存在严重的真菌生长。正如所预期, 在烟草上没有观察到病症, 而马铃薯植株在所有地上组织中均表现出严重的病症。

用包含谷胱甘肽-S-转移酶和INF1的纯化融合蛋白证明了*N. benthamiana*对INF1肽的敏感性低。这种融合蛋白通过以下步骤产生: (1) 用SEQ ID NO:53-54所示引物扩增INF1基因, (2) 将扩增的DNA片段亚克隆到pCRscript (Stratagene, La Jolla, CA)中, (3) 用BamHI和NotI从该载体中释放INF1基因, (4) 将含INF1的BamHI-NotI DNA片段亚克隆到pGEX-5X-3 (Pharmacia, Piscataway, NY)中, (5) 在大肠杆菌中表达GST-INF1融合物, 和(6) 如先前所述(Zhang等, 1995)纯化该融合蛋白。使用8叶期的植株, 用所述纯化蛋白注射第3片叶。注射后2天, 不足10%的接种区产生过敏性坏死反应。因为在烟草中相似的实验在整个接种区产生坏死, 所以可以推断出*N. benthamiana*对于INF1的敏感性至少比烟草低10倍。

在两组实验中证明了用*N. benthamiana*来筛选功能性抗病R基因的原理。首先, 表明用番茄R基因Pto稳定转化*N. benthamiana*产生有效

的抗病性(Rommens等, 1995)。其次, *N. benthamiana*的叶片用烟草抗病R基因N (具有新霉素磷酸转移酶作为植株选择标记和壮观霉素抗性作为细菌标记的质粒SPDK167, 由Barbara Baker博士提供, USDA, Albany) 瞬时转化, 并在3天后用病毒病原体烟草花叶病毒(TMV)攻击。攻击感染后5天, 转化组织产生过敏反应(HR), 表明N基因在*N. benthamiana*中发挥有效活性。在用GFP基因瞬时转化并用TMV感染的对照植株中没有观察到HR反应。

实施例5: 通过筛选R基因同系物和NHI鉴定功能基因

筛选R基因同系物:

在含有适当抗生素的液体肉汤中将农杆菌菌株培养约2天, 以根据同时存在农杆菌和粘粒载体进行选择。沉淀农杆菌细胞并将其在TT培养基(含有Gamborg维生素[Sigma MS B5盐]、3.9 g/L MES pH 5.4、20 g/L蔗糖和10 g/L葡萄糖的0.1 X Murashige和Skoog基础培养基)再悬浮至 $OD_{600} = 0.05$ 。用1 ml注射器将细胞悬浮液注射到*N. benthamiana*叶片的胞间隙中。预期识别疫霉属激卫素INF1的R基因在*N. benthamiana*瞬时表达系统中在INF1蛋白存在下将诱导HR。注射了总共181种带有I类R基因的菌株。在7例中, 注射导致在注射后3天内产生快速HR。相应的R基因命名为R1-R7。对前6种R基因的P回折和GLPLAL区之间的0.5 kb片段的序列分析表明, 这些基因最类似烟草R基因N。第7种R基因同系物仅诱导弱HR。该同系物看来与番茄R基因Prf的同源性最高。为了证实由R1-R7诱导的HR是依赖于INF1的, 用插入无INF1基因的双元粘粒载体04541中的烟草基因组DNA片段构建了第二文库。用来与这种第二文库杂交的探针通过以下步骤产生: (1) 用引物SEQ ID NO:40-41扩增R1-R7的P回折-GLPLAL区, 和(2) 合并并放射性标记这些扩增的片段。将杂交阳性克隆接合到农杆菌中, 并将所产生的菌株的细胞悬浮液($OD_{600} = 0.05$)与等量的农杆菌菌株细胞混合, 所述农杆菌菌株或者含有携带GFP基因的双元粘粒, 或者含有携带INF1基因的双元粘

粒。然后将混合菌株注射到*N. benthamiana*的胞间隙中。如表2所示，R1-R7基因的10种同系物能够强有力地增强由INF1诱导的HR反应。激发依赖于INF1的HR的R1-R7基因的10种烟草同系物命名为*Enh1-Enh10* (INF1诱导的HR的增强子(enhancer of INF1-induced HR)). *Enh1-Enh10*的部分序列分别示于SEQ ID NO:1-10。图3显示氨基酸序列SEQ ID NO:11-20的序列对比，证明这些R基因共有高水平的同源性。

表2. *N. benthamiana*对一个亚组的R基因与或者INF1或者GFP瞬时共表达的反应。

为了根据在INF1存在下激发HR的能力筛选R基因同系物，用以下农杆菌菌株共注射植物：一种菌株含有R基因同系物，而另一种菌株含有INF1基因。作为对照，用携带GFP基因的农杆菌菌株共注射携带R基因同系物的农杆菌菌株。注射后4天和7天(DAI)，确定HR程度。“-”：<10%注射组织发生HR反应；“+”：10-20% HR；“++”：20-50% HR；“+++”：50-100 HR。

R基因#		4 DAI		7 DAI		同系物
		+ GFP	+ INF1	+ GFP	+ INF1	
<i>Enh1</i>	SEQ ID NO:18	-	+	-	+++	N基因
<i>Enh2</i>	SEQ ID NO:13	-	-	-	+	Prf基因
<i>Enh3</i>	SEQ ID NO:17	-	++	-	+++	N基因
<i>Enh4</i>	SEQ ID NO:11	-	-	-	++	Prf基因
<i>Enh5</i>	SEQ ID NO:16	-	-	-	++	N基因
<i>Enh6</i>	SEQ ID NO:15	-	+	-	++	N基因
<i>Enh7</i>	SEQ ID NO:20	-	++	-	+++	N基因
<i>Enh8</i>	SEQ ID NO:12	-	-	-	+	Prf基因
<i>Enh9</i>	SEQ ID NO:14	-	++	-	+++	N基因
<i>Enh10</i>	SEQ ID NO:19	-	+	-	++	N基因

可以通过农杆菌介导的转化，将携带功能未知的烟草R基因同系物的双元粘粒载体稳定引入*N. benthamiana*中。以这种方式可以产生转

基因*N. benthamiana*植物的文库，每一不同植株表达至少一种烟草R基因。为了限制需要进行的独立转化数目，我们将约180种含有具I类R基因同系物的双元载体的农杆菌菌株分为18个库，每个库10种菌株。每个库产生25个转基因*N. benthamiana*系。由不同库分离的种子可用来根据对在烟草中无毒而在*N. benthamiana*中有毒性的任何病原体的抗病性进行筛选。表达对这种病原体抗性的转基因*N. benthamiana*可能含有功能性烟草R基因。用对邻接所述烟草DNA插入片段的T-DNA序列特异性的引物，通过PCR反应(例如大尺度(long range) PCR或反向PCR)测定这种R基因的序列。然后可以通过用合适的载体克隆和转化，将这种R基因引入任何目的作物中，以在该作物中产生抗目标病原体的抗病性。

在本申请中已经描述了与R基因具有同源性的许多序列。这些基因中的任一种均可以用作探针，以研究抗性在植物分离群体中的分离。这样，有可能在DNA印迹上鉴定出与抗性共分离的条带。这些条带是抗性的良好标记，并且因此可以用于育种程序中。另外，这些条带可以显现分离的R基因本身。因此，本文所述的R基因同源序列可用于R基因的作图和分离。例如，我们已经在含有抗US-8基因型致病疫霉抗性分离的马铃薯植株DNA的DNA印迹上，测试了作为探针的上述所有亚类代表性DNA片段。我们在标准条件下用引物SEQ ID NO:40-41从烟草DNA扩增的DNA片段，在许多抗性植株中鉴定出一个在感病植株中总是缺乏的条带。

将活性R基因同系物稳定转化到*N. benthamiana*中：

为了检查*Enh*基因增强INF1诱导的HR的能力是否增强转基因*N. benthamiana*植株抗致病疫霉的抗病性，通过农杆菌介导的转化将10种不同的*Enh*基因(SEQ ID NO:1-10)引入这种植物种中。如下进行这些转化。用无菌种苗繁殖的小植株产生叶圆盘，将其置于固体MS104预培养平板上，所述平板中已经加入2 ml液体TXD培养基(4.3 g/L MS盐、2

ml/L Gamborg B-5 500x、4 mg/L对氯苯氧乙酸、0.005 mg/L激动素、30 mg/L蔗糖, pH 5.8)和无菌Whatman圆滤纸。叶圆盘在温室(23℃, 连续光照)下预培养1-2天后, 将过夜生长培养物在补充四环素(2 mg/L)、氯霉素(35 mg/L)和卡那霉素(50 mg/mL)的LB培养基中稀释10倍获得的7 ml农杆菌悬浮液, 加入所述预培养平板中。15分钟后, 吸出过量的农杆菌, 将外植体与其余的农杆菌细胞共培养2-3天。然后将外植体转移至含有羧苄青霉素(500 mg/L)、头孢噻肟(100 mg/L)和万古霉素(150 mg/L)的MS104 (4.4 g/L MS碱性盐 + B5维生素、30 g/L蔗糖、1.0 mg/L 6-苄氨基嘌呤、0.1 mg/L α -萘乙酸、9 g/L琼脂)平板上。3天后, 将外植体转移至含有羧苄青霉素(500 mg/L)、头孢噻肟(100 mg/L)、万古霉素(150 mg/L)和卡那霉素(300 mg/L)的MS104平板上, 以进行转基因细胞的选择和再生。从愈伤组织切下伸长并含有顶端分生组织的嫩枝(shoot), 将其在含有羧苄青霉素(500 mg/L)的MSO培养基(4.4 g/L MS碱性盐 + B5维生素、30 g/L蔗糖、9 g/L琼脂)上培养。随后将生根的嫩枝转移至4"盆中, 以产生转基因小植株。这些小植株和未转化的对照在18℃生长室中生长, 光周期为16 h光/8 h黑暗。3周后, 用每毫升约 10^4 US-8基因型致病疫霉的孢子囊侵染植株。将接种的植株在潮湿、黑暗的17℃生长室中放置约40小时以确保侵染, 随后将其转移至18℃生长室中, 以产生晚疫病症状。在接种后3、4和5天, 通过估计病变叶片组织的百分比评价病害严重程度。

大多数转基因植株以与对照植株相似的方式对致病疫霉侵染反应, 并在注射后5天显示出严重的病症, 45%-50%的叶片组织枯萎。然而, 31株*Enh3* (SEQ ID NO:3)中的2株没有表现出任何病症并显示出抗性。观察到在含有*Enh6* (SEQ ID NO:6)的40株植株中的1株(致病疫霉损害5%的叶片组织)和携带*Enh9* (SEQ ID NO:9)的30株植株中的1株(致病疫霉损害15%的叶片组织)的抗性水平几乎相同。为了确定抗性是否由于存在所述转基因, 使抗性转基因植株自交。将得自*Enh6*和*Enh9*植株的转基因种子种植于土壤中, 以产生两个所述转基因分离的群体。第

三个群体得自未转化对照植株的种子。抗性*Enh3*系看来无菌，不能用于进一步分析。萌发后6周，用每毫升约 10^4 US-8基因型致病疫霉的孢子囊感染植株。病原体感染后5天，*Enh6*和*Enh9*分离的群体中枯萎叶片组织的平均百分比均是33%。在对照植株中致病疫霉诱发的损害高得多，平均为55%。

因此，*Enh6*和*Enh9* (和可能*Enh3*)在*N. benthamiana*中赋予对致病疫霉的部分防治。因为这三种基因共享高水平的序列同源性，它们最可能具有相似的作用方式。这种作用方式可能基于INF1诱导的HR的增强。有可能*Enh*基因的超量表达将导致抗病性的进一步增强。此外，有可能*Enh*基因或这些基因的同系物参与对其它疫霉菌种的抗性，所述其它疫霉菌种包括大雄疫霉、德雷疫霉(*P. drechsleri*)、辣椒疫霉(*P. capsici*)、恶疫霉(*P. cactorum*)、隐地疫霉(*P. cryptogea*)和樟疫霉(*P. cinnamomi*)，因为它们均编码在结构上与INF1非常相似、并且在烟草中均诱导HR的激卫素(Yu, 1995)。甚至可能这些基因提供对产生INF1样激卫素的其它病原体(例如钟器腐霉(*Pythium vexans*))的抗性。对致病疫霉的烟草非寄主抗性的可持久特性可能部分缘于这样一个事实：烟草含有至少4个参与识别激卫素INF1的功能性*R*基因。

为了证明识别INF1的*R*基因在防治非致病疫霉的疫霉方面的适用性，我们分离了大豆疫霉腐烂病的病原体大豆叶斑疫霉的激卫素编码基因。通过用SEQ ID NO:55-56所示的两种引物，对大豆叶斑疫霉的总DNA进行PCR，可以分离出该基因。可以将PCR产物亚克隆到PCRscript载体(Stratagene, La Jolla, CA)中，并对其测序以证明所扩增DNA的完整性。可以将用KpnI和BglII消化的含有INF1同源基因的300 bp片段与用XbaI和KpnI消化的*PR1*基因(Hammond-Kosack等, 1994)的100 bp信号肽序列连接，并将其亚克隆到pMON11770载体(图2)中。然后可以纯化含有FMV启动子、信号肽、大豆叶斑疫霉激卫素和nos终止子的NotI消化片段，并将其亚克隆到pMON17227 (图4) T-DNA双元载体中。可以选择成功的克隆，并将其接合到农杆菌中用于进一步测试。

*Enh*基因增强HR活性可能不限于疫霉激卫素。有可能*Enh*基因的表达或超量表达导致对病毒、细菌或真菌病原体的广谱防治。这可能由于参与抗病性的信号途径的自发诱导。

5 筛选NHI:

通过用毒性细菌病原体烟草假单胞菌(“野火病”的病原体)处理瞬时表达这些基因的*N. benthamiana*叶片,可以获得抗性相关基因活性的指示。为此,用携带含目的基因的pMON30656 (图3)衍生物的农杆菌菌株注射叶片的右侧半。作为对照,用含有双元载体pMON30656的农杆菌菌株注射叶片的左侧半。注射后2天,用细菌悬浮液注射叶片的左侧半和右侧半。该悬浮液通过用10 mM $MgCl_2$ 洗涤烟草假单胞菌的过夜培养物,并将该悬浮液稀释至 OD_{600} 为0.001 (相当于 10^6 菌落形成单位)而获得(Rommens等, 1995)。病原体攻击后4天,将叶片右侧半的病害进展与对照左侧半的病害进展比较。

15 至今以该方式分析的两个基因中,表明一个基因的表达部分防治野火病。TOB-F12 (SEQ ID NO:58)编码胡萝卜(*Daucus carota*)的21 kDa蛋白的同系物,并在N末端区与Xa21共享某些保守的氨基酸,Xa21是一种参与抗水稻细菌病原体黄单胞菌属抗性的受体激酶(Song等, 1995)。

20

测试Nhr1:

为了证明HR的诱导是依赖于INF1,产生了不含INF1的第二个粘粒文库。将与*Nhr1*杂交的克隆接合到农杆菌中,并与在T-DNA边界之间携带或者INF1基因或者编码绿荧光蛋白(GFP)基因的农杆菌菌株混合。将混合菌株以 $OD_{600} = 0.3$ 注射到*N. benthamiana*叶片中。测试的5种菌株中的3种在存在INF1时在注射后3天内诱导HR。全部5种株均在5天后产生HR,而且这5种菌株中的一种甚至可以在 $OD_{600} = 0.1$ 时可诱导HR。这种粘粒*Nhr1*克隆用来进一步分析在INF1存在下其HR诱导力(表

25

3). 在GFP存在下没有诱导HR, 证明诱导HR的能力是依赖于INF1的。

表3: 粘粒*Nhr1*在INF1存在下显著增强HR

	坏死百分比 (31片叶片的平均值)				
	78 hai	94 hai	102 hai	120 hai	140 hai
<i>Nhr1</i> + INF1	10.97%	19.84%	25.97%	28.87%	30.97
INF1 + GFP	0.32%	0.55%	3.23%	3.87%	4.19%
<i>Nhr1</i> + GFP	0	0	0	0	0

(hai: 接种后的小时数)

5

用Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN)的5'/3' RACE试剂盒, 按照厂商的方案, 分离*Nhr1*全长的cDNA形式。用于5' RACE的引物是:

SEQ ID NO: 61: TAA GCC TCT CGA CAC ATG GC

SEQ ID NO: 62: TCG GTT GCA CAA TTA GTG GC

10

SEQ ID NO: 63: CGA TTC GTG GCA CAA CAT TC

用于3' RACE的引物是:

SEQ ID NO: 64: TGG TCA AAG TAT TGC CAC C

SEQ ID NO: 65: GGG GGA GAA CTG ATT TGC TG

SEQ ID NO: 66: TTA GGT GTA CAG TGT ACC CC.

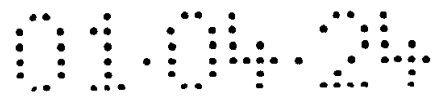
15

实施例6: 将活性基因克隆到马铃薯中以赋予晚疫病抗病性

在模型系统中增强HR和/或防卫反应的所有鉴定的非寄主基因是增强作物病害防治的良好候选物。在前一节中描述的研究鉴定出含有在*N. benthamiana*中瞬时稳定表达时能够增强INF1诱导型HR的*Enh*和*Nhr1*基因的双元粘粒载体。同样的双元载体用来转化马铃薯。

20

在含有2 µg/ml四环素、50 µg/ml卡那霉素和25 µg/ml氯霉素的2 ml LB培养基中, 将携带具有*Enh3*基因的双元粘粒载体(pMON30621; 图7)的农杆菌菌株培养过夜。第二天, 用在1升体积中含有4.4 g MS盐(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)、30 g蔗糖和2 ml维生素B5, pH 5.7的MSO



培养基稀释细菌10倍，或直至于600 nm下获得0.1的光密度读数。

从已经在每升含有4.4 g MS盐、30 g蔗糖、0.17 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.4 mg盐酸硫胺素、25 g抗坏血酸和0.1 g肌醇，pH 6.0和0.2% Gelrite琼脂的PM培养基上，在以下条件下由含多个节(nodes)的枝插(stem cuttings)生长的马铃薯植株(*Solanum tuberosum*)的茎上取下叶片，所述
5 条件为无菌条件，温度为19℃，光周期为16小时光/8 小时黑暗，光强为100 $\mu\text{E}/\text{sec}/\text{m}^2$ 。将茎切成3-5 mm的节段。

在接种之前，将30个茎段置于共培养平板上，用作非接种对照。共培养平板含有0.9%琼脂固化的愈伤组织诱导培养基，所述培养基含
10 有1X MS盐、5.0 mg/L玉米素核糖核苷、10 mg/L AgNO_3 、3%蔗糖、500 mg/L羧苄青霉素、0.3 mg/L GA_3 和0.025 mM草甘膦。8周后开始出现嫩枝。在12周内每4周将外植体转移到至新鲜的嫩枝诱导培养基中。从愈伤组织切下嫩枝，置于用0.2% Gelrite琼脂固化的PM培养基上约2周。用所产生的植株产生每次转化至少包含4个插条的转基因系。当插条足
15 够大并且产生根后，立即将每个系的3个插条置于土壤中。

转基因小植株和得自未转化对照的小植株在生长室中于18℃在4”盆中生长。约3周后，用约 10^4 孢子囊/ml的US-8基因型致病疫霉接种植株。将接种的植株置于17℃、潮湿、黑暗的生长室中约40小时以确保侵染，随后将其转移至18℃的生长室，以产生晚疫病症状。在接种后3、
20 4和5天，通过估计病害叶片组织的百分比评价病害严重程度。对照植株被致病疫霉严重侵染，在第3天25%的组织被该病原体损害。侵染后5天，快速的病害发展已经导致83%的叶片组织枯萎。平均“病害发展曲线下的面积”(AUDPC)是感病性水平的一个可靠指示，所有对照植株的AUDPC均为107。某些转基因系对致病疫霉的感病性与对植株相同，表明在这些系中的所述转基因或者缺乏或者表达不足。有趣的是，
25 4个转基因系一致地表现出显著的抗性增强，在第5天仅有50-60%的病症。这些系的AUPDC值为60-70。该结果表明，*Enh3*在马铃薯中的表达可以增强对致病疫霉的抗病性。

如上所述将粘粒克隆*Nhr1* (pMON30620; 图6)稳定转化到马铃薯栽培品种Russet Burbank中。已经产生了总共50个推定的转基因系。病害试验表明, 6个转基因系对致病疫霉小种US8的抗性增强。所述6个系中的一个系56433含有全长的*Nhr1*基因, 选择它来证实其抗性增强。56433和三个载体对照系各6个插条用致病疫霉攻击, 表4总结了病害发展数据。56433系抗性显著增强, 在致病疫霉接种后5天(dai)病害防治率约为37%。56433系的RNA印迹分析表明, *Nhr1*基因的表达在该植物中非常低, 低于烟草中表达水平的1/10。我们提出, *Nhr1*基因在马铃薯中的增强表达可以显著提高抗性。

表4: 对系56433和载体对照系的病害试验

系	5 dai病害 (%)
56433 (C45-2)	17.15%
38585 (VC)	30.3%
38588 (VC)	24.4%
38599 (VC)	28.8%

实施例7: *Enh3*的全长序列

初步数据表明, 转基因马铃薯植株中*Enh3*基因表达水平非常低。有可能在转基因马铃薯植株中高水平的*Enh3*基因表达将导致*Enh3*介导的对致病疫霉的抗病性进一步增强。通过超量表达*Enh3*基因, 应该可能进一步提高转移马铃薯植株的抗病性。为了将*Enh3*基因与启动子例如胭脂碱合酶基因的启动子融合, 通过ABI PRISM染料终止循环测序(Perkin Elmer, Foster City, CA)测定*Enh3*的全长基因组序列(SEQ ID NO:57)。由于尚不能得到cDNA克隆, 因此尚不能预测*Enh3*与其最密切的同系物-烟草抗病基因*N* (它具有抗烟草花叶病毒的功能活性)的同源性水平。然而, 目前的估计表明, 在DNA水平上的总同源性为约65%。

在本说明书中提及的所有出版物和专利申请代表本发明所属技

术领域的技术人员的技术水平。所有出版物和专利申请均通过引用结合到本文中，其引用程度与具体单独指明每个单独的出版物或专利申请引用结合程度一样。

5 虽然为了阐明本发明已经进行了详细描述，但是应该指出，这种具体描述仅用于阐明本发明，在不偏离以下权利要求书限定的本发明的精神和范围的情况下本领域技术人员可对其进行各种改变。

参考文献

- Anderson et al., *Plant Cell* 9: 641-51, 1997.
- Armstrong et al., *Crop Science*, 35:550-557, 1995.
- Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., 1995.
- Battraw and Hall, *Plant Mol. Biol.*, 15(4):527-538, 1990.
- Bauer et al., *Gene*, 37: 73, 1985.
- Bent et al., *Science* 265: 1856-60, 1994.
- Bol et al., *Ann. Rev. Phytopathol*, 28:13-138, 1990
- Bostock et al., *Science* 212:67-69, 1981.
- Bower and Birch, *Plant J.*, 2:409, 1992.
- Bowles, *Ann. Rev. Biochem*, 59: 873-907, 1990.
- Broekaert et al., *Critical Rev Plant Sci* 16: 297-323, 1997.
- Bytebier et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:5345, 1987.
- Campbell et al., *Plant Physiol.*, 92: 1-11, 1990.
- Cao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:6531-6, 1998.
- Chau et al., *Science*, 244:174-181. 1989.
- Cheng et al., *Plant Cell Rep.* 15(9): 653-7, 1996.
- Christensen et al., *Plant Mol. Biol.*, 18: 675,689, 1992.
- Christou et al., *Plant Physiol.*, 87: 671-674, 1988.
- Christou et al., *Bio/Technology*, 9:957, 1991.
- Craik, *BioTechniques*, 3: 12-19, 1985.
- Cuypers et al., *Mol. Plant-Microbe Interact*, 1: 157-160, 1988.
- Davey et al., *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 40: 85-120, 1986.
- Davey et al., *Plant Mol. Biol.*, 13(3): 273-285, 1989.
- De Kathen and Jacobsen, *Plant Cell Rep.*, 9(5): 276-9, 1990.
- De la Pena et al., *Nature*, 325:274, 1987.
- Ditta et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 7347, 1980.
- Fields and Sternglanz, *Trends Genet.*, 10:286-292, 1994.
- Frits Eckstein et al., *Nucleic Acids Research*, 10: 6487-6497, 1982.
- Fritzemeier et al., *Plant Physiol.*, 85: 34-41, 1987.

- Fromm et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82(17): 5824-5828, 1985.
- Fromm et al., Bio/Technology 8: 833, 1990.
- Gasser and Fraley, Science, 244:1293, 1989.
- Gordon-Kamm et al., Plant Cell, 2:603, 1990.
- Grant et al., Science 269: 843-46, 1995.
- Hammond-Kosack et al., Proc Natl Acad Sci USA, 91:10445, 1994.
- Horn et al., Plant Cell Rep., 7:469, 1988.
- Innes, Curr. Opin. Plant Biol. 1:299-304, 1998.
- Jones et al., Transgen. Res., 1: 285-297, 1992.
- Karnoun et al., Mol Plant Microbe Interact, 10:13-20, 1997.
- Kapila et al., Plant Science, 122:101-108, 1997.
- Kay et al., Science, 236:1299, 1987.
- Keogh et al., Trans Br Mycol Soc, 74:329-333, 1980.
- Koncz et al., Mol Gen Genet, 204:383-396, 1986.
- Koziel et al., Bio/Technology, 11:194, 1993.
- Lawrence et al., Plant Cell, 7:1195-206, 1995.
- Lindstrom et al., Developmental Genetics, 11: 160, 1990.
- Linthorst, Crit. Rev. Plant Sci., 10: 123-150, 1991.
- Logemann et al., Plant Cell, 1: 151-158, 1989.
- Mandel et al., Plant Mol. Biol, 29: 995-1004, 1995.
- Martini et al., Mol. Gen. Genet., 263:179, 1993.
- Matton et al., Mol. Plant-Microbe Interact., 2:325-331, 1989.
- Mazolla et al., Phytopathol, 84:392-397, 1994.
- McCabe et al., Biotechnology, 6: 923, 1988.
- McElroy et al., Plant Cell, 2:163-171, 1990.
- McKently et al., Plant Cell Rep., 14(11): 699-703, 1995.
- Odell et al., Nature, 313: 810, 1985.
- Osuna et al., Critical Reviews In Microbiology, 20: 107-116, 1994.
- Park et al., Plant Mol. Biol., 32(6): 1135-1148, 1996.
- Parker et al., Mol Plant-Microbe Interact, 4:19, 1991.
- Poszkowski et al., EMBO J., 3: 2719, 1989.

- Pyee et al., *Plant J.*, 7: 49-59, 1995.
- Rhodes et al., *Science*, 240:204, 1988.
- Ride, in: *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases* (ed. R. Fraser; Kluwer Academic Publishers, Boston) pp. 29-61, 1985.
- Rogers et al., *Meth. in Enzymol.*, 153: 253-277, 1987.
- Rommens et al., *Plant Cell*, 7:1537-1544, 1995.
- Rubino et al., *Mol Plant-Microbe Interact.*, 6:729-734, 1993.
- Sarnac et al., *Plant Cell*, 3:1063-1072, 1991.
- Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.
- Schroder et al., *Plant J.*, 2: 161-172, 1992.
- Schroeder et al., *Plant Physiol.*, 101(3): 751-757, 1993.
- Sharp et al., *J Biol Chem*, 259:11312-11320, 1984.
- Shipton and Brown, *Phytopathological Notes*, pp. 1313, 1962.
- Smith et al., In: *Genetic Engineering: Principles and Methods*, Setlow et al., Eds., Plenum Press, N.Y., 1-32, 1981.
- Somers et al., *Bio/Technology*, 10:1589, 1992.
- Song et al., *Science*, 270:1804-1806, 1995.
- Toriyama et al., *Bio/Technology*, 6:10, 1988.
- Vasil et al., *Bio/Technology*, 10: 667, 1992.
- Vodkin et al., *Cell*, 34: 1023, 1983.
- Walder et al., *Gene*, 42: 133, 1986.
- Wan and Lemaux, *Plant Physiol.*, 104:37, 1994.
- Wang et al., *Bio/Technology*, 10:691, 1992.
- Warner et al., *Plant J.*, 31:191-201, 1993.
- Weeks et al., *Plant Physiol.* 102(4):1077-1084, 1993.
- Winter et al. *Mol. Biol. Genet.* 211(2): 315-319, 1988.
- Whitham et al., *Cell*, 78:1011-15, 1994.
- Yang et al., *Plant Cell Rep.*, 15(7):459-464, 1996.
- Yu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:4088-4094, 1995.
- Zhang and Wu, *Theor. Appl. Genet.*, 76:835, 1988.

序列表

	<110> Rommens, Caius M T Zhang, Bei Swords, Kathy M M Yan, Hua
5	
	<120> 鉴定非寄主植物抗病基因的新方法
10	<130> r基因专利
	<140> <141>
15	<150> 60/098,402 <151> 1998-08-31
	<160> 66
20	<170> PatentIn Ver. 2.0
	<210> 1 <211> 489 <212> DNA
25	<213> 烟草
	<400> 1 tcaggcatgg ggggagtggg caaaacgaca atagcaagag ccatttttga tacactctcg 60 tatcaatttg aagttacttg cttcctggcg gatgttaaag aaaacaaatg tggaatgcat 120 30 totttgcaaa atatecttct ctcagaactg ttaagggaaa acgctaatta cgtgaataat 180 aaggaggacg gaaagcacct gatggctcgt agacttcgct ctaagaaggt ttagttgtg 240 cttgatgaca tagatcacag agaccatttg gactacctag caggggatct tggttggttc 300 ggcaatggca gtagaattat tgcaacaaca agagacaagc atttgattgg gaagaaggat 360 gcattatatg aagtgactac actagctgac catgaagcta ttcgattgtt caatcgatac 420 35 gcttttaagg aagatgttcc agatgagggt tttgagaagc taacgctgga ggtagtaagt 480 catgcgaaa 489
	<210> 2 <211> 489 <212> DNA
40	<213> 烟草
	<400> 2 atgggggggag tgggcaagac tacacttgca aagaagattt acagtgaccc aatagtcacc 60 45 tcttactttg atgtccgtgc tcagtgtgtg gtgactcaag tatattcatg gcgagaattg 120 ttgottacca ttttgaatga tgtgtttgag cctactgac gcaatttaaa agaagatggc 180 gaattagctg atgagctgcg tcgattcttg ttgaccaaga gattottaat tctcgttgat 240 gacgtgtggg acactaaagt gtgggactat ttacatatgt gctgtagagg ttctcgcaac 300 gggagtagaa ttatttctaac gacacggctg agtgacgttg ccagttatgc tcaatgttat 360 50 agtaaaccce atcatcttcg tttattcaga gatgatgaga gttggacatt attacagaaa 420

gaggtgttcc aaggagagat ctgtccacct gaactttctg atgtgggttt cgaatagcaa 480
aaacttgtg 489

<210> 3
<211> 488
<212> DNA
<213> 烟草

<400> 3

10 gaattcaggc atgggggggag tgggcaaaac gacaatagca agagccattt ttgatacact 60
ctcgtatcaa ttgaagtta cttgcttctt tgcggatgtt aaagaaaaca aatgtggaat 120
gcattctttg caaaatatcc ttctctcaga actgttaagg gaaaacgcta attacgtgaa 180
taataaggat gacggaaage atctgatggo ttgtagactt cgttctaaga aggttttagt 240
tgtgcttgat gacatagatc actgagaaca ttggagtagc ctacgagggg atcttggttg 300
15 gttcggcaat ggcagtagaa ttattgcaac aacaagagac aagcatttga ttgggaagaa 360
ggatacatta tatgaagtga ctacactago tgaccatgaa gctattcgat tgttcaatcg 420
atacactttt aaggaagatg ttccagatga gttttttgag aagctaacgc tggaggtagt 480
aagtcatg 488

20 <210> 4
<211> 472
<212> DNA
<213> 烟草

<400> 4

25 actacaattg caaagaagat ttacaatgat ccaacagtca cctctcactt tgatgcccat 60
gctcaatgtc ttgtgactca aatatattca tggaggaggat tgttgctgac catcttgaat 120
gatgttcttg agcctgctga tctcaatgta aaagaagatg gtgaattage tgatgagcta 180
cgccgatttt tgttgactaa gagattcttg attctcattg atgatgtgtg ggacaacaaa 240
30 gtgtgggaca atttacatct gtgcttcaga gatgttcgga gtgggagtag aattattcta 300
acaaccoggt tgagtacat tgccaattat gttaaatgtg aaagtgatec ccatcatctt 360
catttggtca gagatgatga gagttggaca ttgttacaga aagaggtatt tcaaggggag 420
acctgtccac cggaacttgc agatgtggga tctcggatag caaggcgttg ta 472

35 <210> 5
<211> 508
<212> DNA
<213> 烟草

<400> 5

40 aattcaggea tgggggggagt gggcaaaaac acaatagcta gagctatgtt cgatactctt 60
ttaggaagaa gggatagtcc ctatcaattt gatgggtgctt gtttccttaa ggatattaaa 120
gaaaacaaac gtggaatgca ttctcttcaa aatacccttc tctttgaact ttttaaggga 180
aatgctaatt acaataatga ggacgatgga aagcaccaaa tggctagtag acttcgttct 240
45 aagaaggtec taattgtgct tgatgacata gatgataaag atcattattt ggagtattta 300
gcaggatgac ttgattggtt tggtaatggc agtagaatta ttgtaacaac tagagacaag 360
catttgattg ggaagaatga tataatatat gaagtgactg cactacctga tcatgaagcc 420
attcaattgt tctatcaaca tgetttcaaa aaagagggtc cagatgagtg ttttaaggag 480
ctttcattgg aggtagtaaa tcatgcta 508

<210> 6
 <211> 509
 <212> DNA
 <213> 烟草

5

<400> 6
 gaattcaggc atgggggggag tgggcaaaac gacaatagca agagctatgt ttgataccct 60
 tttgggaaga agagaaagt cctatcaatt tgatggtgct tgtttcctta aggatattaa 120
 10 agataacaaa catggaatgc attctctgca aaatatcatt ctctttaatc ttttaaagga 180
 aaaagccaat tacaataatg aggaggacgg aaagcaccac atggctagta gactgcgttc 240
 taagaaggtc ctaattgtgc ttgatgacat agataataaa gatcattatt tggagtattt 300
 agcaggtgat cttgattggt ttggtaatgg tagtagaatt attttaacaa ctagagacaa 360
 gcatttaatt gagaagaatg ttgtagtata tgaagtgaact gcactacctg atcatgaatc 420
 15 cattcaattg ttcaatcagc atgctttcag aaaacaagat ccagatgagt gttttaagga 480
 actctcattg gaggtagtaa attatgcta 509

<210> 7
 <211> 477
 <212> DNA
 <213> 烟草

20

<400> 7
 aggcattgggg ggagtgggca aaacgacaat agcaagagtc atttttgata ctctcatatc 60
 25 aatttgaagt tgcttgttcc cttgcggatg tcaaagagaa caaatgtgga atgcactctt 120
 tgcaaaatat ccttctctct gaactgttaa gagaaaacgc taattgcgtt aataatgagg 180
 atggaaagca gttgatggct cgtagacttc gttttaaaaa ggtattaatt gtgcttgacg 240
 tcatagatca tttggattac ctagctgggg atcctggttg gtttggcaat ggcagtagaa 300
 ttattgcaac aattagagac aaacatgtga caggaagaa tgatatagta tatgaagtga 360
 30 ctacactact tgaacatgat gctattcaat tgttcaatca atatgccttc aaagaagaag 420
 ttccagatga gtgttttgag aagctaactt tggaggtagt aagttatgct aatggcc 477

<210> 8
 <211> 477
 <212> DNA
 <213> 烟草

35

<400> 8
 gctatccgag atcccacatc tgcaagttcc ggtggacagg tctccccttg aaatacctct 60
 40 ttctgtaaca atgtccaact ctcatcatct ctgaacaaat gaagatgatg gggatcactt 120
 tcacatttaa cataattggc aatgtcactc aaccgggttg ttagaataat tctactccca 180
 ctcgaacat ctctgaagca cagatgtaaa ttgtcccaca ctttgttgtc ccacacatca 240
 tcaatgagaa tcaagaatct cttagtcaac aaaaatcggc gtagctcatc agctaattca 300
 ccattctctt ttacattgag atcagcaggc tcaagaacat cattcaagat ggtagcaac 360
 45 aactccctcc atgaatatat ttgagtcaca agacattgag catgggcac aaagtgaagag 420
 gtgactgttg gatcattgta aatcttcttt gcaattgtag tcttgcacac tcccccc 477

<210> 9
 <211> 459

<212> DNA

<213> 烟草

<400> 9

5 ttagcataat ttactacctc caatgagagt tccttaaaac actcatotgg atcttggttt 60
 ctgaaagcat gctgattgaa caattgaatg gattcatgat caggtagtgc agtcacttca 120
 tatactacaa cattctcttc aattaaatgc ttgtctctag ttgttaaaat aattctacta 180
 ccattaccaa accaatcaag atcacctgct aaatactcca aataatgac tttattatct 240
 atgtcatcaa gcacaattag gaccttotta gaacgcagtc tactagccat ttggtgcttt 300
 10 ccgtctctct cattattgta attggtttt tcctttaaaa gattagagag aatgatattt 360
 tgcagagaat gcattccatg tttgttatct ttaatatcct taaggaaaca agcaccatca 420
 aattgatagg aactttccct tcttcccaaa aggtatca 459

<210> 10

15 <211> 470

<212> DNA

<213> 烟草

<400> 10

20 aaaacgacaa tagcaagggc tatttttgat actctctcat atcaatttga aggtacttgt 60
 ttcttgcga atgttaaaga aaacaaatgt ggaatgcatt ctttgcaaaa tatectctc 120
 tcagaactgt caagggaana cgctaattac gtgaataata aggaggacgg aaagcagctg 180
 atggctcgta gacttcgttc taagaaggtt ttagttgtgc ttgatgacat agatcacaga 240
 gaccatttgg agtacctagc aggggatctt ggttggttcg gcaatggcag tagaattatt 300
 25 gcaacaacaa gagacaagca ttgatgtgg aagaaggacg cattatatga aatgactaca 360
 ctagctgacc atgaagctat tcaattgttc aatcgatacg cttttaagga agatgttcca 420
 gatgagttct ttgagaagct aacgtggag gtagtaagtc atgctaaagg 470

<210> 11

30 <211> 157

<212> PRT

<213> 烟草

<400> 11

35 Thr Thr Ile Ala Lys Lys Ile Tyr Asn Asp Pro Thr Val Thr Ser His
 1 5 10 15

Phe Asp Ala His Ala Gln Cys Leu Val Thr Gln Ile Tyr Ser Trp Arg
 20 25 30

40 Glu Leu Leu Leu Thr Ile Leu Asn Asp Val Leu Glu Pro Ala Asp Leu
 35 40 45

Asn Val Lys Glu Asp Gly Glu Leu Ala Asp Glu Leu Arg Arg Phe Leu
 50 55 60

Leu Thr Lys Arg Phe Leu Ile Leu Ile Asp Asp Val Trp Asp Asn Lys
 65 70 75 80

Val Trp Asp Asn Leu His Leu Cys Phe Arg Asp Val Arg Ser Gly Ser
 85 90 95

5 Arg Ile Ile Leu Thr Thr Arg Leu Ser Asp Ile Ala Asn Tyr Val Lys
 100 105 110

Cys Glu Ser Asp Pro His His Leu His Leu Phe Arg Asp Asp Glu Ser
 115 120 125

10 Trp Thr Leu Leu Gln Lys Glu Val Phe Gln Gly Glu Thr Cys Pro Pro
 130 135 140

Glu Leu Ala Asp Val Gly Ser Arg Ile Ala Arg Arg Cys
 145 150 155

15

<210> 12
 <211> 158
 <212> PRT
 20 <213> 烟草

<400> 12
 Gly Gly Val Gly Lys Thr Thr Ile Ala Lys Lys Ile Tyr Asn Asp Pro
 1 5 10 15

25 Thr Val Thr Ser His Phe Asp Ala His Ala Gln Cys Leu Val Thr Gln
 20 25 30

Ile Tyr Ser Trp Arg Glu Leu Leu Leu Thr Ile Leu Asn Asp Val Leu
 30 35 40 45

Glu Pro Ala Asp Leu Asn Val Lys Glu Asp Gly Glu Leu Ala Asp Glu
 50 55 60

35 Leu Arg Arg Phe Leu Leu Thr Lys Arg Phe Leu Ile Leu Ile Asp Asp
 65 70 75 80

Val Trp Asp Asn Lys Val Trp Asp Asn Leu His Leu Cys Phe Arg Asp
 85 90 95

40 Val Arg Ser Gly Ser Arg Ile Ile Leu Thr Thr Arg Leu Ser Asp Ile
 100 105 110

Ala Asn Tyr Val Lys Cys Glu Ser Asp Pro His His Leu His Leu Phe
 45 115 120 125

Arg Asp Asp Glu Ser Trp Thr Leu Leu Gln Lys Glu Val Phe Gln Gly
 130 135 140

Glu Thr Cys Pro Pro Glu Leu Ala Asp Val Gly Ser Arg Ile
 145 150 155

5

<210> 13
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 烟草

10

<400> 13
 Met Gly Gly Val Gly Lys Thr Thr Leu Ala Lys Lys Ile Tyr Ser Asp
 1 5 10 15

15

Pro Ile Val Thr Ser Tyr Phe Asp Val Arg Ala Gln Cys Cys Val Thr
 20 25 30

Gln Val Tyr Ser Trp Arg Glu Leu Leu Thr Ile Leu Asn Asp Val
 35 40 45

20

Leu Glu Pro Thr Asp Arg Asn Leu Lys Glu Asp Gly Glu Leu Ala Asp
 50 55 60

25

Glu Leu Arg Arg Phe Leu Leu Thr Lys Arg Phe Leu Ile Leu Val Asp
 65 70 75 80

Asp Val Trp Asp Thr Lys Val Trp Asp Tyr Leu His Met Cys Cys Arg
 85 90 95

30

Gly Ser Arg Asn Gly Ser Arg Ile Ile Leu Thr Thr Arg Leu Ser Asp
 100 105 110

Val Ala Ser Tyr Ala Gln Cys Tyr Ser Lys Pro His His Leu Arg Leu
 115 120 125

35

Phe Arg Asp Asp Glu Ser Trp Thr Leu Leu Gln Lys Glu Val Phe Gln
 130 135 140

40

Gly Glu Ile Cys Pro Pro Glu Leu Leu Asp Val Gly Phe Glu Glx Gln
 145 150 155 160

Lys Leu Val

45

<210> 14
 <211> 152
 <212> PRT
 <213> 烟草

<400> 14

Asp Thr Leu Leu Gly Arg Arg Glu Ser Ser Tyr Gln Phe Asp Gly Ala
 1 5 10 15

5

Cys Phe Leu Lys Asp Ile Lys Asp Asn Lys His Gly Met His Ser Leu
 20 25 30

Gln Asn Ile Ile Leu Ser Asn Leu Leu Lys Glu Lys Ala Asn Tyr Asn
 35 40 45

10

Asn Glu Glu Asp Gly Lys His Gln Met Ala Ser Arg Leu Arg Ser Lys
 50 55 60

Lys Val Leu Ile Val Leu Asp Asp Ile Asp Asn Lys Asp His Tyr Leu
 65 70 75 80

Glu Tyr Leu Ala Gly Asp Leu Asp Trp Phe Gly Asn Gly Ser Arg Ile
 85 90 95

20

Ile Leu Thr Thr Arg Asp Lys His Leu Ile Glu Lys Asn Val Val Val
 100 105 110

Tyr Glu Val Thr Ala Leu Pro Asp His Glu Ser Ile Gln Leu Phe Asn
 115 120 125

25

Gln His Ala Phe Arg Lys Gln Asp Pro Asp Glu Cys Phe Lys Glu Leu
 130 135 140

Ser Leu Glu Val Val Asn Tyr Ala
 145 150

30

<210> 15

<211> 167

<212> PRT

<213> 烟草

35

<400> 15

Gly Met Gly Gly Val Gly Lys Thr Thr Ile Ala Arg Ala Met Phe Asp
 1 5 10 15

Thr Leu Leu Gly Arg Arg Glu Ser Ser Tyr Gln Phe Asp Gly Ala Cys
 20 25 30

45

Phe Leu Lys Asp Ile Lys Asp Asn Lys His Gly Met His Ser Leu Gln
 35 40 45

Asn Ile Ile Leu Phe Asn Leu Leu Lys Glu Lys Ala Asn Tyr Asn Asn
 50 55 60

5 Glu Glu Asp Gly Lys His Gln Met Ala Ser Arg Leu Arg Ser Lys Lys
 65 70 75 80

Val Leu Ile Val Leu Asp Asp Ile Asp Asn Lys Asp His Tyr Leu Glu
 85 90 95

10 Tyr Leu Ala Gly Asp Leu Asp Trp Phe Gly Asn Gly Ser Arg Ile Ile
 100 105 110

Leu Thr Thr Arg Asp Lys His Leu Ile Glu Lys Asn Val Val Val Tyr
 115 120 125

15 Glu Val Thr Ala Leu Pro Asp His Glu Ser Ile Gln Leu Phe Asn Gln
 130 135 140

20 His Ala Phe Arg Lys Gln Asp Pro Asp Glu Cys Phe Lys Glu Leu Ser
 145 150 155 160

Leu Glu Val Val Asn Tyr Ala
 165

25 <210> 16
 <211> 167
 <212> PRT
 <213> 烟草

30 <400> 16
 Gly Met Gly Gly Val Gly Lys Thr Thr Ile Ala Arg Ala Met Phe Asp
 1 5 10 15

35 Thr Leu Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Tyr Gln Phe Asp Gly Ala Cys
 20 25 30

Phe Leu Lys Asp Ile Lys Glu Asn Lys Arg Gly Met His Ser Leu Gln
 35 40 45

40 Asn Thr Leu Leu Phe Glu Leu Leu Arg Glu Asn Ala Asn Tyr Asn Asn
 50 55 60

45 Glu Asp Asp Gly Lys His Gln Met Ala Ser Arg Leu Arg Ser Lys Lys
 65 70 75 80

Val Leu Ile Val Leu Asp Asp Ile Asp Asp Lys Asp His Tyr Leu Glu
 85 90 95

Tyr Leu Ala Gly Asp Leu Asp Trp Phe Gly Asn Gly Ser Arg Ile Ile
 100 105 110
 5 Val Thr Thr Arg Asp Lys His Leu Ile Gly Lys Asn Asp Ile Ile Tyr
 115 120 125
 Glu Val Thr Ala Leu Pro Asp His Glu Ala Ile Gln Leu Phe Tyr Gln
 130 135 140
 10 His Ala Phe Lys Lys Glu Val Pro Asp Glu Cys Phe Lys Glu Leu Ser
 145 150 155 160
 Leu Glu Val Val Asn His Ala
 15 165
 <210> 17
 <211> 160
 20 <212> PRT
 <213> 烟草
 <400> 17
 Gly Met Gly Gly Val Gly Lys Thr Thr Ile Ala Arg Ala Ile Phe Asp
 25 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Tyr Gln Phe Glu Val Thr Cys Phe Leu Ala Asp Val Lys
 20 25 30
 30 Glu Asn Lys Cys Gly Met His Ser Leu Gln Asn Ile Leu Leu Ser Glu
 35 40 45
 Leu Leu Arg Glu Asn Ala Asn Tyr Val Asn Asn Lys Asp Asp Gly Lys
 50 55 60
 35 His Leu Met Ala Cys Arg Leu Arg Ser Lys Lys Val Leu Val Val Leu
 65 70 75 80
 Asp Asp Ile Asp His Glx Glu His Leu Glu Tyr Leu Ala Gly Asp Leu
 40 85 90 95
 Gly Trp Phe Gly Asn Gly Ser Arg Ile Ile Ala Thr Thr Arg Asp Lys
 100 105 110
 45 His Leu Ile Gly Lys Lys Asp Thr Leu Tyr Glu Val Thr Thr Leu Ala
 115 120 125
 Asp His Glu Ala Ile Arg Leu Phe Asn Arg Tyr Thr Phe Lys Glu Asp

	130	135	140
	Val Pro Asp Glu Phe Phe Glu Lys Leu Thr Leu Glu Val Val Ser His		
	145	150	155 160
5			
10	<210> 18		
	<211> 162		
	<212> PRT		
	<213> 烟草		
15	<400> 18		
	Gly Met Gly Gly Val Gly Lys Thr Thr Ile Ala Arg Ala Ile Phe Asp		
	1 5 10 15		
20	Thr Leu Ser Tyr Gln Phe Glu Val Thr Cys Phe Leu Ala Asp Val Lys		
	20 25 30		
	Glu Asn Lys Cys Gly Met His Ser Leu Gln Asn Ile Leu Leu Ser Glu		
	35 40 45		
25	Leu Leu Arg Glu Asn Ala Asn Tyr Val Asn Asn Lys Glu Asp Gly Lys		
	50 55 60		
	His Leu Met Ala Arg Arg Leu Arg Ser Lys Lys Val Leu Val Val Leu		
	65 70 75 80		
30	Asp Asp Ile Asp His Arg Asp His Leu Glu Tyr Leu Ala Gly Asp Leu		
	85 90 95		
35	Gly Trp Phe Gly Asn Gly Ser Arg Ile Ile Ala Thr Thr Arg Asp Lys		
	100 105 110		
	His Leu Ile Gly Lys Lys Asp Ala Leu Tyr Glu Val Thr Thr Leu Ala		
	115 120 125		
40	Asp His Glu Ala Ile Arg Leu Phe Asn Arg Tyr Ala Phe Lys Glu Asp		
	130 135 140		
	Val Pro Asp Glu Val Phe Glu Lys Leu Thr Leu Glu Val Val Ser His		
	145 150 155 160		
45	Ala Lys		

<210> 19
 <211> 156
 <212> PRT
 5 <213> 烟草

 <400> 19
 Lys Thr Thr Ile Ala Arg Ala Ile Phe Asp Thr Leu Ser Tyr Gln Phe
 1 5 10 15
 10 Glu Gly Thr Cys Phe Leu Ala Asn Val Lys Glu Asn Lys Cys Gly Met
 20 25 30
 15 His Ser Leu Gln Asn Ile Leu Leu Ser Glu Leu Ser Arg Glu Asn Ala
 35 40 45
 Asn Tyr Val Asn Asn Lys Glu Asp Gly Lys Gln Leu Met Ala Arg Arg
 50 55 60
 20 Leu Arg Ser Lys Lys Val Leu Val Val Leu Asp Asp Ile Asp His Arg
 65 70 75 80
 Asp His Leu Glu Tyr Leu Ala Gly Asp Leu Gly Trp Phe Gly Asn Gly
 85 90 95
 25 Ser Arg Ile Ile Ala Thr Thr Arg Asp Lys His Leu Ile Gly Lys Lys
 100 105 110
 Asp Ala Leu Tyr Glu Met Thr Thr Leu Ala Asp His Glu Ala Ile Gln
 30 115 120 125
 Leu Phe Asn Arg Tyr Ala Phe Lys Glu Asp Val Pro Asp Glu Phe Phe
 130 135 140
 35 Glu Lys Leu Thr Leu Glu Val Val Ser His Ala Lys
 145 150 155

 <210> 20
 40 <211> 159
 <212> PRT
 <213> 烟草

 <400> 20
 45 Gln Ala Trp Gly Glu Trp Ala Lys Arg Gln Glx Gln Glu Ser Phe Leu
 1 5 10 15
 Ile Leu Ser Tyr Gln Phe Glu Val Ala Cys Phe Leu Ala Asp Val Lys
 20 25 30

Glu Asn Lys Cys Gly Met His Ser Leu Gln Asn Ile Leu Leu Ser Glu
 35 40 45

5 Leu Leu Arg Glu Asn Ala Asn Cys Val Asn Asn Glu Asp Gly Lys Gln
 50 55 60

Leu Met Ala Arg Arg Leu Arg Phe Lys Lys Val Leu Ile Val Leu Asp
 65 70 75 80

10 Val Ile Asp His Leu Asp Tyr Leu Ala Gly Asp Pro Gly Trp Phe Gly
 85 90 95

Asn Gly Ser Arg Ile Ile Ala Thr Ile Arg Asp Lys His Val Thr Gly
 15 100 105 110

Lys Asn Asp Ile Val Tyr Glu Val Thr Thr Leu Leu Glu His Asp Ala
 115 120 125

20 Ile Gln Leu Phe Asn Gln Tyr Ala Phe Lys Glu Glu Val Pro Asp Glu
 130 135 140

Cys Phe Glu Lys Leu Thr Leu Glu Val Val Ser Tyr Ala Asn Gly
 25 145 150 155

<210> 21
 <211> 504
 <212> DNA
 30 <213> 烟草

<400> 21
 gggggagtgg gtaaaacgac aatagcaaaa gccatttttg atacaactctc gtatcagttt 60
 gaagctgctt gtttccttgc ggatgttaaa gaaaatgaaa aaagatatca actgcattct 120
 35 ttacaaaaca ctcttctctc taaattgita agaagcaaag atgattgtgt caataataag 180
 cttgaaggga agcagatgat tccggacaga ctttgttcta agaaggctct aattgtgctt 240
 gatgacatag atgatggaga acaattggag tatttagcag gtgatcttag ttggtttggt 300
 aagggcacta gagttatcgt aacaactaga gacaagcatt tgatagggaa gaatgatgta 360
 atatatgaag tgactacact acctgatcat gaagctacgc agttgttcaa gcaatatgct 420
 40 tttaaagaag aagatccaga tgtgtgtttt gagaagctaa tattggacgt agtaagtcac 480
 gctaaaggcc tgccctctagc actt 504

<210> 22
 <211> 517
 45 <212> DNA
 <213> 烟草

<400> 22
 gggggattgg gtaagactac actagcgaag aagatttaca atgatccaac agtcacctct 60

cactttgatg tccatgctca atgtcttgtg actcaaatat attcatggag ggagttgttg 120
 ctgaccatct tgaatgatgt tcttgagcct gctgaccgca atgaaaaaga agacgggtgaa 180
 ttagctgatg agctacgccg atttttgttg actaagagat tcttgattct cattgatgat 240
 gtgtgggaca acaaagtgtg ggacaattta catatgtgct tcagagatgt tcggaatggg 300
 5 agtagaatta ttctaacaac ccggetgagt gacattgccca attatgttaa atgtgaaagt 360
 gatccccatc atcttcgttt gtteagagat gatgagagtt ggacattgtt acagaaaagag 420
 gtatttcaag gggagacctg tccacctgaa cttgcagatg tgggatctcg gatagcaagg 480
 cgttgtagag gccttccttt ctccctcgac togagaa 517

10 <210> 23
 <211> 513
 <212> DNA
 <213> 烟草

15 <400> 23
 tggcgggatt gggtaagacg acattggctg agaaaaaag agcaagggcg aaaaaagaaa 60
 ggttctttga tgaggttgtc atggtaactg tcagtcaaca accagacttg aaacaattc 120
 aagctgagat agctggagga atcggcttaa cattacaagg cgacaatttt tggaatcgtg 180
 gagatcagtt gcgttcaagg ttaatgggtc aggacagcat ccttgtaate ttggatgatg 240
 20 tctgggagge tcttgatotg aacaagcttg gaattcctag tggtagcaat cacaaccatc 300
 ggtgcaaagt aacattgaca acgcgactcc gagatgtttg tgaacaatg gaggetcgaa 360
 agatcataga agttggaate ttacctgaaa aggaagcatg ggtccttttc agacagaaaag 420
 ccgtaattc ggtagctgat cttctcttc atcacacagc aaaagatgtt gtgaaagaat 480
 gcaaggggct tcctttcgcc gttgactoga gaa 513

25 <210> 24
 <211> 644
 <212> DNA
 <213> 烟草

30 <400> 24
 cgggcccccc tcgaggctga cggatatgat aagcttgata togaattcct gcagccccggg 60
 ggatccgccc attcagcoat ggggggagtg ggcaagacaa cacttgctaa agccgtttac 120
 aatgatgaga gggtaagaa acatttttgt ttgaaagctt ggttttgtgt ttctgaggca 180
 35 tatgatgctt tcagaataac aaaagggata ctccaagaaa ttggaaaatt tgactcaaaag 240
 gatgtccaca acaatcttaa tcagcttcaa gtcaaattga aggaaagctt gaagggaaaag 300
 aagttcctta ttgttttga tgatgtgtgg aatgacaact acaatgagtg ggatgacttg 360
 agaaatgctt ttgtacaagg agatatagga agtaagatca ttatgacgac acgtaaagat 420
 agtgttgctt tgatgatggg ttgtggggca atctacgtgg gaattctgtc tagtgaagac 480
 40 tcttgggctt tattcaaacg acattcacta gaaaataggg atcctgagga acatccagaa 540
 tttgaagagg ttggaaaaca aattgcagac aagtgcaaag gtctgccttt ctccctcgac 600
 tcgagaaggg ctagagcgcc gccacccgag gtggagctcc actt 644

45 <210> 25
 <211> 637
 <212> DNA
 <213> 烟草

<400> 25

5 gggtacgggc cccctcgag gtcgacggta tcgataagct tgatatcgaa ttctgcage 60
 cggggggatc cgccttgaa ttcaggcatg gggggagtgg gcaaaacgac tatagcaaaa 120
 gctgtttttg atacactctc acctcaattt caaggtgcaa gtttcettgc ggatgtcaaa 180
 gaaactaaca caaatgaaat gcattctctg caaaatatcc ttctctctga attgttaagg 240
 10 gaagataaaa gatattgtgaa taataaggag gaagggaagc gtctgatggc tcatagactt 300
 cgttttatga aggttttagt tgccttgat gacatcaatc atcatgatca tttggagtat 360
 ttagcagggg atcttcgttg gtttggcagt ggaagtagaa ttatcgcaac aactagaaac 420
 aagcaaatta tagggaagaa taatgtagta tatgaagtga ctacactgcc cgaacatgat 480
 gctattcagt tgttcaatca ttatgctttt aaggacgaag ctctctgatga gcatattaa 540
 10 aagttggctc tagaggtagt aagtcatgct aaaggcctgc ctctcgact cgactcgaga 600
 agggctagag cggccgcac ccgcgtggag ctccagt 637

<210> 26

<211> 534

15 <212> DNA

<213> 烟草

<400> 26

20 ttgaattcag gaatgggagg agtgggtaag acaactctag ctaacaaact atttcttgat 60
 ctgttagttg tttctcattt tgatgtcgt gcacaatgtt gtgtatctca agcatataca 120
 cgtaaagact tgttactaac cattcttcgg ggtgtgaaga aggatacagt tatcagtgat 180
 aaactaccag agaatgaatt ggcagataag ttgcgtaaac ttctatttgg tcagagggtat 240
 ottatcctta ttgatgatgt ctgggaaact actgcatgtg atgatotaat gccttgcttc 300
 tatgaagcca ataatggaag tagacttate ctgacaactc gccatgatca tgttgcttac 360
 25 catgctaaac tcgttagtga tctcatttt ctgcgaaagt ttactottga agaaagttgg 420
 atgctattga cgaataaggt gttcaacaaa aaaagttgcc ctgttgctt agaagatgtt 480
 ggccaaaaga tagcacaanaa gtgtggaggt ctgcctctct cctcgcactc gaga 534

<210> 27

30 <211> 532

<212> DNA

<213> 烟草

<400> 27

35 ttgaattcag gcatgccggg agtgggtaag actacactag caaagaagat ttacaatgat 60
 ccagaagtca actctcgtt cgatgtccat gtcfaatgtg ttgtgactca attatattca 120
 tggagagagt tgttgctcac cattttgaat gacgtgcttg agccttctga tcgcaatgaa 180
 aaagaagatg gtgaaatagc tgatgagcta cgcgcatttt tgttgaccaa gagattcttg 240
 attttcattg atgatgtgtg ggactataaa gtgtgggaca atctacgtat gtgcttcagt 300
 40 gatgtttcaa aaaggagtag aattattcta acaacccgct tgaatgatgt tgccgaatat 360
 gtcaaagtgt aaagtgatcc ccatcatctt cgtttattca gagatgatga gagttggaca 420
 ttattacaga gagaagctt tcaaggagag agctgtccac ctaaaactta agatgtggga 480
 tttgaaatat caaaaagttg tagaggcctg cctctcgccc tcgactcgag aa 532

45 <210> 28

<211> 519

<212> DNA

<213> 烟草

<400> 28

ntgaattcag gcattgccggg agtggggcaaa acgacaatag taagagcaat ttttgatatg 60
 ctctcacctc aatttgatgg tgcttggttc tttgcggata tcaaagaaac taaagaaatg 120
 cactctctgc aaaatatcct tctctctgaa ctgctaagga aaaaagaaga atacgtgaat 180
 5 aataaggtgg atgggaagca cttgatggct cgtagaactc gttttaagaa ggtcttagtt 240
 gtgcttgatg acataaatca cggagacccat ttggataacc tagcagggga ccttgattgg 300
 tttggcaagg gcagtaggat tattgcaact acaagaggca aacatttgat agggagaagt 360
 gatgtagtat atgaagtgc cactactagt gatcatcaag ctatccaatt gttcaatcaa 420
 cttgctttca aggacgaagt tccagataag tcatttgaga agctaactg ggaggtggta 480
 10 ggtcatgcga atggcctgcc tttctcactc gactcgaga 519

<210> 29

<211> 540

<212> DNA

15 <213> 烟草

<400> 29

ttgaattcag gcattggggg attgggtaaa ctactttggc ttacagagtg tataatgata 60
 agtccattgt tgatcatttc gatgtttgtg cttgggtgcac agtcgaccag gaaagtaatg 120
 20 agaaaaagtt gttgcagaaa attttcaatc aagttatagg tttgaaagaa cgattcaatg 180
 aggatcatga catagatgat gatgttgctg ataagctgcg gagacaacta tttggaaaac 240
 ggtacettat tgtcttgatg gacatgtggg atactgcaac attgatgag ctaacaagac 300
 cttttcctga attacagaaa ggaagcagag tgattttaac aagtcggaaa aaggaagttg 360
 ctttgcattg aaaatgccac agtgatcctc tttatcttcg attgctaaga tcagaagaaa 420
 25 gttgggagtt attagagaaa agggatttcg gagaagaacg ttgccctgat gaactaaagg 480
 atgtcggaaa aaagatatct cgaaagtgtg atggccttcc tctagccctt gactcgagaa 540

<210> 30

<211> 499

30 <212> DNA

<213> 烟草

<400> 30

gggggagtg gcaagacgac aatagcaaga gctatttttg atatacactc atctaaattt 60
 35 gatggtgctt gtttccttcc ggtcagtaaa gaaaacaagc atgaaataca ttctcttcaa 120
 agtattcttc tctctaaact ggtaggggaa aaagaaaatt gtgtgcttga taaggaggac 180
 gggaggtacc tgatggctcg tagacttcgt ttcaagaagg ttctagttgt gctagataac 240
 atagatcatg tagaccaatt ggattaccta gcaggggac ttagtttggt tggcaatggc 300
 agcagaataa ttgcaacaac taggaacagg catttcaaaa ggaaaaatga tgccatatat 360
 40 cctgtgacca cactacttga acatgatgct gttcagttgt tcaaccaata cgccttcaaa 420
 gatgaagttc cagataaagt tttcaggag atgacgttgg aggtagtacg tcattgctcaa 480
 ggccttctc tcgccctcg 499

<210> 31

45 <211> 455

<212> DNA

<213> 烟草

<400> 31

tcaaataaat tgcattggacc cattagagct tcaaggaata aaaacttctt tgcaaaaactt 60
 caaattatgg atcttttcac caatgcattt agtgggaatt taccagcagg cctttttgag 120
 aaattccaat cgaatgaaact aattgataag agcatgagta cactttggta ttggagtgea 180
 aatgtacaaa ttgcattctaa ttgatattt acaacaaagg gattgacact tgaatttctt 240
 5 cgagttttga atactagtaa catgggttacc gatctctcaa ggaatagatt tgaagggtgt 300
 attccaagta ctattggagg tctcattgga ctctgtacgc tgaacttacc tcacaatggc 360
 ttggagtgtc acataccacc atcactgcaa catctatctg ttcttgaacc attggatctc 420
 tcatttaaca aaattggttg agaaatacca caaca 455

10 <210> 32
 <211> 401
 <212> DNA
 <213> 烟草

15 <400> 32
 tcaaataaat tgcattggacc tattccaaag tcaactcctaa accagcataa tctattagca 60
 cttctctctt ctcaaaataa tctcagtggc cagattgctt caaccatctg caatcttaaa 120
 acagtgcagt tgcattggtc gggaagtaat aatttacagg gaacaatccc agaattgttg 180
 ggtgagatgg atagaactta tgttttggat ttaagcaata ataattttag tgggacaatt 240
 20 caagcaaatt ttagtattgg aaaccgattc agatgcatta aattgcattg gaataagtta 300
 gagggaaaag tccaagacc ttgatcaat tgcaagtatt tggaaactact tgatttaggt 360
 aacaatgagt tggacgacac ttttcaaaa tggttgggaa t 401

25 <210> 33
 <211> 320
 <212> DNA
 <213> 烟草

<400> 33
 30 tcaaataagt tgcattggtc cattccagt tcaataggaa acatgacgtc tctattgat 60
 cttgaattaa gggaaatcg cctagtgttg aagataccaa gagagttggg acagctaaag 120
 aatttgaaac tcttgaact ttattacaac caactegaag gtcaaatccc cgaggagctt 180
 ggaaatttaa ctgaacttat agacttggat atgtctgtta acaatttaac aggcaaagt 240
 ccggagtcta taagccgcct tctaagcta gaagttttgc agctttacca taattctctt 300
 35 tcaggagaga taccacaaca 320

40 <210> 34
 <211> 556
 <212> DNA
 <213> 烟草

<400> 34
 45 tctattaaa acttcaagga ctggaaactt gtttgcacag ctttaagtta tggatctatc 60
 atccaatgga tttagtggca atttacctgt aagtcttttt gtgaatttgc aagccatgaa 120
 gaaaattgat gagaacatga tagggaaaga gattttagat tatgatgatt ctttgacaat 180
 tacaacaaag ggattggatc ttacttttgc tagagttttg tggagaaata acatagttat 240
 agatctctca agaaatagat ttgaaggctc tttctaac attataggac atctcattgg 300
 actctgtgtg ttaaagttat ctcataatgt cttggatggt catataccag catcattgca 360
 aaatctattt gtactcgaat cattggatct ctcatctaac aaaatcaacg gagaaatttc 420

cgcggaact tccatccctc acattttcttg aagtctttaa tctctctcac aatcatcttg 480
 ttggatgcat tcccaaagga aaacaatttg atacatttga gaacagttca taccaaggga 540
 atgatggatt acgagg 556

5 <210> 35
 <211> 458
 <212> DNA
 <213> 烟草

10 <400> 35
 tcgaataagt tgcattgtcc tataaatgat tcaaggactg agaacttggt tgctaaaatt 60
 ctagtaatag atctctcacc caatggattc agtggagatt tacctgtgag cctttttgag 120
 aattttcaag ccatgaaaat gattgggtgag aatagtggaa cccagagta tgtagcagaa 180
 acatattcta ctttatacac aaattctttg atagtgaaca caaaggggtt ggatcttgaa 240
 15 ctctctcaag ttttgactac aaacataatt atcgatctct caatgaatag atttgaaagt 300
 tctatcccaa gtattattgg agatctaatt ggacttcgta tgttgaactt gtctcataat 360
 aacttgaaag gtcataacc agcatcaatg caacatttat ctgtacttga atcattggat 420
 ctctcatcca acaaaatcgg cggagaaatt ccacagca 458

20 <210> 36
 <211> 449
 <212> DNA
 <213> 烟草

25 <400> 36
 tcgaataagt tgcattggacc tatcagaaca tcaaggattg agaacatggt tccagagctt 60
 cgaatcatag atctctcctc caatggcttc tcggaaaact taccacagaa tttgtttcta 120
 catctgaaag ccatgaggac aattgatcca tcaatggaag caccaagtta taaacgagat 180
 agatattacc aagattctat tacagttgca actaaggat gtgatcgtga aattgtgaga 240
 30 atcttgtatt tgtacaccgt tatcgatcct tcaagtaata aatttagagg gaaaattcca 300
 agtatcgtgg gggatctcat tgcagttcgc atcttgaatt tatctcataa tggattgcaa 360
 ggtcatatac cgcaatcatt cggagattta tcttcagttg aatcattgga cctatcagga 420
 aaccaacttt cgggagagat accacagca 449

35 <210> 37
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> 人工序列

40 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成引物

<400> 37
 45 aarytntgyg ararr 15

<210> 38
 <211> 15
 <212> DNA
 50 <213> 人工序列

	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成引物	
5		
	<400> 38	
	rcanggraar tarca	15
	<210> 39	
10	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
15	<223> 人工序列的描述: 合成引物	
	<400> 39	
	rcarttraar tarca	15
20	<210> 40	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
25	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成引物	
30	<400> 40	
	ttgaattcag gmatgssrgg aktsggyaa	29
	<210> 41	
	<211> 28	
35	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
40	<223> 人工序列的描述: 合成引物	
	<400> 41	
	ttctcgagtc raskgmkara ggmarnc	28
45	<210> 42	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
50	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成引物	

5	<400> 42 ggrggaktsg gyaarackac w	21
10	<210> 43 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
15	<220> <223> 人工序列的描述: 合成引物	
20	<400> 43 raskgmkara ggmarncc	18
25	<210> 44 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
30	<220> <223> 人工序列的描述: 合成引物	
35	<400> 44 carrgcyaad ggaagtcc	18
40	<210> 45 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
45	<220> <223> 人工序列的描述: 合成引物	
50	<400> 45 gatagctaata ggcacacc	18
	<210> 46 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的描述: 合成引物	
	<400> 46	

	tcrataart tgcattggcc yat	23
	<210> 47	
	<211> 17	
5	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
10	<223> 人工序列的描述: 合成引物	
	<400> 47	
	tgytgyggwa tytctcc	17
15	<210> 48	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
20	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成引物	
	<400> 48	
25	ccrcgtaayc catcattmcc	20
	<210> 49	
	<211> 26	
	<212> DNA	
30	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成引物	
35	<400> 49	
	tctagaatgg gatttgttct cttttc	26
	<210> 50	
40	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
45	<223> 人工序列的描述: 合成引物	
	<400> 50	
	ggtaccggca cggcaagagt gggata	26
50	<210> 51	

	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
5	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成引物	
	<400> 51	
10	ggtaccacgt gcaccacctc gcagcag	27
	<210> 52	
	<211> 26	
	<212> DNA	
15	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成引物	
20	<400> 52	
	agatcttcat agcgacgcac acgtag	26
	<210> 53	
25	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
30	<223> 人工序列的描述: 合成引物	
	<400> 53	
35	ggatcccat gaactttcgt gctctgttcg ctg	33
	<210> 54	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
40	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成引物	
45	<400> 54	
	tagcgacgca cacgtagacg agaacc	26
	<210> 55	
	<211> 27	
50	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成引物

5

<400> 55

ggtaccacca cgtgcacetc gtcgcag

27

<210> 56

10

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

15

<223> 人工序列的描述: 合成引物

<400> 56

agatctcagc gacgcgcacg tggac

25

20

<210> 57

<211> 11789

<212> DNA

<213> 烟草

25

<400> 57

gaattctaatt gaaagtaagt tggaagtttg gaagtgttgg gtttttaagc attaataagc 60
 ttaaaacagg gtgaatgaga aattgaggga aaaattaggt tccctcttga ttgtcccata 120
 tgggaagagg aaaacgtttt tgatgggtat ataagcaatt gctcttcttt tagctcttaa 180
 30 agagttgaga agaaggcaag tctcgcgtg tcgtcgtcgt tgctcgcgtg acttcggctt 240
 cggatttgat caaatttatt tgtaaatatt aaatattaac agaaatgta ttaaatattt 300
 tgttattaat gttattaaat atttgtttaa taacaaaata ttaatatata atccattcaa 360
 ttttcagttt tctgttgttg taatagaaaa ttaactactc ttcaattttc cctctttatt 420
 gttgagtaaa tagccaatta tgatcatggca tttattctat aggcgttttg aaaaaacagc 480
 35 ctcttcaaatt ttcaactcaa acatgcattg ttcttaggga agctctccaa aacttcaaaa 540
 accttgcaac aaagaactat atgctttctt tacttgcaatt tatgctattc tttctgact 600
 aaatcgatgt atatgaaggt gttgagatac gttggagtca tggatgggtg caatggaaaa 660
 ggggtgtg agctgcaaag atacaataat gaacgtccat ttgcacaatt ctcaggatcg 720
 gataacataa ttgcattcac aactgaaaga catgogaaga atctctcgta gtgtgtggtc 780
 40 cgattgctgg agctgaattg tcttctgtg gagtatatat taactgcatt tcagaccttt 840
 gttacagtca acagtcaaca gctgcctct actgatactg tagtctcata tgctttacat 900
 ggtgttgcatt ggctcactct gtggcttgtc tcttctcttc ttctgtagga cttttttgta 960
 gctgcttat ttgttaaat gcaactctga tattgattaa gttgtatttt ggttgaaatc 1020
 agttagtga gcaagattgg tgatgtatgt tgatgcata tcaacgactc tatagtgttc 1080
 45 atatggtcga ctcaagtct gtaactctct tgagattgag gcataatgtt gttattttta 1140
 cgtaaaaaata aggtgtacat ttggttcttt ttatttagtt gtttgatttt taattttgaa 1200
 agaaaaataa tccatttcga agtaaaatag atttggtttg attcaatttt ctttttttaa 1260
 tttctctcga attgattttt tgggttttcc attatcaage aaatgatgta gotggtaagg 1320
 ctgagtacaa tataccgggc tgcctttttt ttatatgaag gtgttgagat acgtcggagt 1380

cgtggatgtt gtcaatggaa aagcgactgt ccagctgcaa agagacaata acgaacgcc 1440
 atttgcacaa ctgtcaggat cggataacat aattgcattc ataactgaaa gacatgtgaa 1500
 gaacctctag tagtgtgtgg totggttgct agggcttaag taatagcttg tggagtattt 1560
 tgtgacatct tgogacttgc atcatatatt ggtgctccat cttaatattc atttagtgca 1620
 5 aggcagtcgg atgcactaag ctccagctat gtgctgggtc cgaagaacgg tcgaaccaca 1680
 aggatctata atactcagtc ttaccctgca tttctgcaat ttgtttccac tgcctgaact 1740
 cgtgacctct tggtcacatg gcatcaactt taccggtcac gccaaaggctc cccttcaatt 1800
 actgcaagcc agtattttgc ttcttttttt ttagtaccac gttctaaact ttgttgtatg 1860
 attttcatgt ggaaagatgt atttgggtgt aagggttgtaa ttcaattatt aacttcattt 1920
 10 ttcatcacc agtttcagac ctttgatag ccacactgta gtctctatgc ttacatgggt 1980
 gttgcggtt aagcaacaac atgcatgtc actctgtggo ttgtctcttc tcttctctta 2040
 taattttttt tttttttgt tagctttctt atttaatttg taaattgcaa ctctgatatt 2100
 gattcaagcc tgcctccagg gtcagcagcg aggttaagct catctccttt ttctttgtc 2160
 ttttctact gttcactctt gacctcttt ctgaactcgt taacaccgga acaccgccca 2220
 15 tgaaggttac tcaaagtaac ctactcgagc ttccgcccttt gtatataagt tgtattttgg 2280
 ttgaaatcag ttagtagagc agattagtga tgtatgttga tgcagcatcc aatggactgt 2340
 atagtgttcc tataaccgac tgtaagtctg taagactgta actctcttga gattgaggcg 2400
 taattattgt tatttgtaac taaaaataag gtgtacattt ggtctttat gattttaatt 2460
 ttgaaagaaa ataaatccaa cctgaagtaa aatagatttg gtttggttca attttctttt 2520
 20 ttgatttttt tcgaattgat ttattgggtt ttctattatc aagcaaaata atatctatag 2580
 caaaaccata aaaagagttc ataaaaaaa acacacacat gggagaaaaa actgttcaaa 2640
 atccgtaaaa tattccagta taatatattg gtccaacata atatgctgga agttcaagt 2700
 atccaatctc tagtatacta tgcctggaact ttccgtgttg aagcaaaata gtagtctttt 2760
 ttcaatatac tagaacttct cgtgttgagc caaaatagta gtaattattt ttcaatgact 2820
 25 ttgcaaacgc ttcatatttt tcaattacca gtcttaaaac tagtaattac aaggtaatat 2880
 acttaattag ttgattcttc tattgccatt ttgcatagaa ttaagtagac atagtatttg 2940
 gaotttggag caataattct attcaacttg gcattttatt ttctttattt attcatcagc 3000
 ttgtactttt agctgcccat tgtgtacatc ttacagtgga cctttggtgc aggggaattt 3060
 gtgggggggtg ggggtggggg gtggggagga atttctaat acattctatt aaatacagtt 3120
 30 caaagaaaaa ccacaataaa caatagttct aatcaacggg agtagagatt aagaatcttc 3180
 acagaaattt catactactt ctattaataa ttcaaaaaa aatgtaccac atataatgct 3240
 atataaatat atttcagttg actagatcca atagcaataa tttatttcaa ctggagtaga 3300
 gcccatcgcc ttagaagctt tcatatttga agtgtatttg cttattcttc tgaagtacag 3360
 acactctata atagtatccc tatataaac cacttacta taaaatccaa gatttttcca 3420
 35 aaccaatttt tatgttacgt tataatatat gtgctctata acagcacttc gctataacat 3480
 ccaaaaatat ttggaacaaa cgaggtgtt atatagaggt ttgactgtat caataagctg 3540
 atctcttacc acgactacaa tatatccaca cagttttttt ttgttttcat atcaaccaat 3600
 taattgaate catggcatct tcttctctt tcgcgagtaa ttcacaatac tatectcgat 3660
 ggaagtacga tgttttcag aggtgaagat actcgcaaaa cgtttacagg gcacttatat 3720
 40 gaaggcttga gaaatagagg aatatttacc ttcaagatg acaaaaggat agagaatggc 3780
 gaatccatct cagaaaaact ttgtaaagct atagaagagt ctcaagttgc cgtcatcatt 3840
 ttctcaaaaga attatgctac atcgaggtgg tgccttgatg aactagtga gatcatggaa 3900
 tgcaagactc aatttgaaca aactgtcata ccggtcttct atgatgtgga tccatcaaca 3960
 attcgatacc aaaagcaag ctttgcgtgaa gccttttaca aacatgaatc aaagtttaag 4020
 45 gatgatgttg agggaatgca gaaggtacaa agatggagga gtgctttaac tgaagcggca 4080
 aatctcaaag gctgtgatat tcgtgacagg tgagttaaaa acacattage tggaacagag 4140
 agaatacttt gcattcaaat ttggatgctt ctatgaagac tagctacaca tattctatac 4200
 ctcaaaaatg agttacacag aatccttaaa taaattttt atattttcta aaagaagatt 4260

gatggttgat tatatatgat tctataagta agaagacata acttatcagt ttaattactc 4320
 aattatattg ttatgtatgat actattttga ttggttcttc aagagtttga tttctgtgtc 4380
 ctttttatca taattatgca ctatatggtt gactttctta cctgtatata tcaacaatgt 4440
 aatttttgta ggattgaatc agactgtgtt cagcagatcg ttgaccaaatt tccaagtta 4500
 5 tgcaagtttt ctttatcata ttgcaagat attgtgggaa taaatccata tttagagaaa 4560
 gtaaaatcct actacagata gaaatcaatg atgttcatat tgtggggatt tggggcatgg 4620
 gaggagttgg taaaacgaca atagcaagag ccatttttga tacactctcg tatcaatttg 4680
 aagttacttg cttccttgcg gatgttaaag aaaacaaatg tggaatgcat tctttgcaaa 4740
 atatecttct ctcagaactg ttaagggaaa acgctaatta cgtgaataat aaggatgacg 4800
 10 gaaagcatct gatggcttgt agacttcggt ctaagaagg tttagtgttg cttgatgaca 4860
 tagatcactg agaacatttg gactacctag caggggatct tggttgggtc ggcaatggca 4920
 gtagaattat tgcaacaaca agagacaagc atttgattgg gaagaaggat acatttatatg 4980
 aagtgaactac actagctgac catgaageta ttgattgtt caatcgatac acttttaagg 5040
 aagatgttcc agatgagttt ttgagaagc taacgctgga ggtagtaagt catgctaaag 5100
 15 gccttccctt agcgcgtgaa gtgtgggggt ctttctttca taagaggaat ataactgagt 5160
 ggagaagtgc tatactgcaa atgaaaaaac actctaattc agaaattgtt gacaagctca 5220
 aaattagcat gcttcttacg agggagagaa aaggatgaga tcatacagat tcttgagagc 5280
 tgtgattttg gggtaatat cggattgogt gtccataattg acaaatctct tgtgtttatc 5340
 tccgaaaaag atacgattga aatgcatgac ttaataaaag atatgggtaa atatgtagta 5400
 20 aacatacaaaa agaatccggg agaacgtagc agactatggc tcgccgaaga tttcgaagaa 5460
 gtgatgatca acaatacagt aagtaggctt tactgcagta atattcaatt tctatttttc 5520
 atattccaaa gacatagagg ctcagttaat caatttatatg ttcttcttgc ttcttattct 5580
 cgcacgtaag tcattttaat tgttgtttt aataagagaa aaaaaagtaa cattaattgc 5640
 cgtcaagtag gcactttaca tagtgttgcc taatccgttg tacttattaa gccatgaatt 5700
 25 agtctagtag ccacttaate ttttaatec atcattcttc tgattaactt gaaatttgtt 5760
 accattgaat atttttcaag ttaaaaaact gtacaattt attggtattt tttcaattaa 5820
 ttgttctatc attgcatgaa aaactttact cgactctaaa gaagtctca gaaaatata 5880
 tattactgac atttgaagct atactttgta agetaatgat ctttttacca ggggactaag 5940
 gcaatggaag caatttggtt tctttattta aaaggactat gtttttagcag agagggcatg 6000
 30 aaaaatatga aaagacttag aatattatat atacgtgatg ggtcacaaag gatccagget 6060
 ggctccattt gccataatgg ctccattgag tatttgccca acagettgtg ttggtttgtc 6120
 tggttttgct atccttgga gtcattacca tctacattg aacccaaaaa gctcgttcat 6180
 cttaaactcc aatccagttc actgcgtcat ttatggacgg aaataacagt ataatacctg 6240
 aattctactt tatttttatt tttctctcta actatcttta tcttttatta atgagcgaat 6300
 35 aatattgctt tcacctgttt tatgtttgtc ctagaattat gatgcacgtc tttacataaa 6360
 aatggttatt aatttcataa gctggagcaa tggtaaagtt atcttaggtt caaacctggg 6420
 aatcagtcac tgatgcttgc atcagggtag actatataca tcacatcctt aggggtgogg 6480
 gccttccccg ccacctgtgt gaatgcagga tgcttcgtga tcttggttgc cccttaattc 6540
 cataaactca aatttatgta ttttatttta ttttgggttg ttctcagagt attactctgg 6600
 40 catctttatg tcttggtttt ctaaattctc tcacatcat tttactaaa aagetcaata 6660
 aactcattca aacattttct gaacagcatt tgcgtctct aaaaaagcta attctcagtt 6720
 gctgtgtaag cctgatgca acaccagatt tcacggggat gccaaatttg gagtatttg 6780
 atttgagctt ttgcagtaat ttgaagagc ttactactc cctgggatgt tgcagaaaaa 6840
 tegtgcagtt aaatttgact tgggtgtgaa gccttaagag gggtccatgt gttacgtgg 6900
 45 aatctcttga acatttgga ctacatggtt gctctagttt acagaaattt ccagaaatga 6960
 aaaacctttt atctattcag taccaaactc atattaccaa tctagacttg agcttttttag 7020
 aaaaccttgt aactcttgta aaacggcact gtgttaaaac aaaaaatctg aaaacgaaaa 7080
 gaaatattcc gagtcacaaa tttccttggt tgccttaag aattttaacc cctcacaag 7140

ttgccaaggt aatggattaa atcctcccag gatgaaacgg aataaacctt cctgcaacag 7200
 tggcaatata agctgcagga taccgacgaa ctcaaagaac ggagaaaaat cacacttaag 7260
 aatttgagag agagggagag actgcgaaga agaatgcagt attcagaagt tgattttcag 7320
 5 tgaatgaaat ggaaggcatg cctcagaatc tataggcaat tattggaaga ggtgtgtctg 7380
 ttcaggaaga tgtgtctgtt cagaagggaa aggtctgttc agaagggaaa ggtctgttca 7440
 gaagggaag gtgtgtctgt tcaggaagat gtgtctcttc agaagggaaa gcaaacgttc 7500
 agctggattc caggattcca gttaatttcg ttaatgaact gactgacatt taattaatta 7560
 ttaaataatt aactaaataa attttgtcca aaaaataato ttatogatcg atcatttgac 7620
 aaatccaaat ccgaattcat tctcttcaac tctttttaag agctctaaga agtgatctta 7680
 10 tatttataca cataagtga gtttgtcttt caccaatatg gtacaaagtt catgacaaaa 7740
 gottacttga ttcaaatttt catttctctc tattttattt cccaccattt cccaattcac 7800
 actcttagtc tttaaagccc aatgctctta aaatccaaca acttttccaa gcagcatctg 7860
 taggttgaaa aatttggtta gtctagatgt gtcgttttgc tacagactta aaagettacc 7920
 taaagagata ggagatttag aaaacttga gaaacttgat gccagcaata cctaataatc 7980
 15 acggcctcca acttccatcg tccgcttgaa caaacttaac tcttgactt ttgcaaaaata 8040
 agaatcagat aatggtcaag ttgcagctta ctttgtgttc cctcccgtag ctgaagggtt 8100
 acagtcattg gaatttctga aactcagtta ctgcaatcta ataggtggag gacttcacga 8160
 agacattggc tgcttatatt ctttgaaaga gttgtatctc aggggaaatt attttgagca 8220
 tttgctcaa agcatggctc aactcgggtc tcttcgatcc ttggacttat cgtattgtta 8280
 20 taggcttaaa gagttgccag atttcatggg gatgcaaac ttggaaactt tgaatctatt 8340
 atattgtatg aatcttgaag agattcctca ttccacggga gtttttaaaa agctcaccca 8400
 attaaatttg actgattgtg aacgccttaa gagggttcca actctgtgga togattccct 8460
 taaatgtctg cagctacaga aatgctctag tttagaatat ttctctgata tcttcggag 8520
 catgaaattg gagttagaga ttctcatgct agacagtgtg ataagggatc ttaattcgtc 8580
 25 ctataattcg tttcaactta cctgttatca gaatgacatc tctatttcag attccttctc 8640
 acaaagagtg tttaccattt tgcataaagg gaagaggatt ccaagttggt tccacattca 8700
 gggaatggat agtagtgtat cagtcaattt gcttgaaaat tggtaggta acttcttggg 8760
 atttgtgtg tgtaactctg gctgcttaac cgacaccaca gccacttgg ttccattttg 8820
 taacgatgga atgctgtgga ttaccctgga actatatttt ttccaccatt cagaatgtga 8880
 30 tgaagaatct actgttcatt tttctttgt accttttct agtttatggg atccatctaa 8940
 ggcaaatgga aaaacaccaa atgactatgg tcttattacg ttatcttttt ctggagcaat 9000
 gattgagttt ggacttcgtt tgttgtataa agatgaacct gagattgagg ccttggtaca 9060
 aatgagggaa aataatgaag agtcaacaga aaattgcact aggataagga ggagcagaca 9120
 tgacaacgog accaatgaag ccagttgctc ctctggtaag aaacaaaggt cacattctat 9180
 35 tattcagggc agctctgtct ttgagaatct gcagcagcaa gtagagtgc cagtctcttc 9240
 agaaattttg aggttaatc gttcattccc ataatttttc ctagttaggc gtgaaattgt 9300
 gttctctctt tttatgtaat tctctcttc tatatattag ctactgtctt ctccaaatc 9360
 aataaacatt ttatttctca ttctttctta tttttccct tttgttggtt ttctttccc 9420
 tattgacagg agctcatcaa tgggtgatgt acatatcaac aaggagtgtt gtctattgtt 9480
 40 tctccacctt gtctccgttt gtctgaccc atgctttacc atggtgagtt aaaggatgtg 9540
 aacaagtatt aattttccat gctcaaatca gattcttgaa tgtagctta aagtcactag 9600
 taaactctaa aatgaaaaca taattctaca aactaaaggt gataatgctc gattgtgctg 9660
 cattagttat ggacttcgtt tctctccatg aagtaaaatt ttggtgagtt ttcaggaga 9720
 atgcatctgc tgaggagttt atgcgacagt tggctaacca aaggcaagag actgaagctg 9780
 45 ttgacgaagt gagatataga ataaacttaa acgttacaga tacatactat tgtgatggcc 9840
 atcttatccg aaagaacctc ctctcgata ctctccgttt gaaactgatg ttcaccttca 9900
 cttgcaaaat aatttgcatt ttggaagaac cagaagtctc ttacacatta cataacttta 9960
 agacgactca atttaacgct tctttttgag atggaagaga gaagcggtta attgagtcgt 10020

5 ottaaagtcg tcaatttaac gcttctgcat ccaaatactt tcttgtcaaa aggtaaatgat 10080
 catgtttctaa cegtagcaat acacttttgt agagaccatt ttcataattta tacciaagtta 10140
 aaggagggttc aattcaggat agagggagta caagaacatt ttataaaaata aacaactgta 10200
 gtaaagaaaa ccataaaata tatgtatttt tctcattage agttcctgca tagggaaatt 10260
 gctcttttatt ttagaatttt aatagcagaa gtaccagata agtcatagta tgtagtgccg 10320
 tgccttcatca ttgactactg atttgatcca atctttgagg gagaaagtga gatgagaggg 10380
 aaagaagtca caagaattat ctttgtgtga ttcaatctag ttcagttgca gccattgcat 10440
 gacaaaatat tttcttgtca caaggttgag taggtcataa gcatgtatta gatgttttgt 10500
 10 tttcttgtat ttgtgctatt ttaccttctt ttaccatttg gcggttgaaa acaaaagtga 10560
 ttccagtaca cgactgttag gctcatccaa ggcgatatcta cgaaagtaat aggggaacttg 10620
 acogttaagt ttgaaaaaag ttggccaagc ctgtgtcact ttcttacgtc aggagaaacg 10680
 gogatcaaaag gagtatggga ccgatacgcg aaggatcaaa tcatagggat accgatctt 10740
 aagagacgga agaaaacctc ggcgacccaa agattgcgga gccgcgcccg tgccgaaagt 10800
 gaagaacctt tctccttctc agtcgagcat acccgogctt tagcaacttc cttcccgag 10860
 15 taggagtagg agaaaggaaa gcgcactcga tcatctacca tgccgtatcg taagacaaaa 10920
 agtcacttgc aggagcttaa aaccaatctc ttggtgaaag gcctctactc tacgaaccac 10980
 agctttcttt ttgatccct cggtagcatt tcttttact gaggaatggg cggatgaata 11040
 gattcagggt ctcctaattg atgtatatga aggtcttgag atacgttgga gtcgtggatg 11100
 ttgtcaatag aaaaggagcc gtcgagctgt ggagatacag tagaaacaca gttttgcaca 11160
 20 actctcaoga taggataaca taattgcatt cacaattgaa agatatgca agcaacctct 11220
 attagtgtgt ggtttcgtgt cctggggctg aagtgcagc ccgtggagta ttctgtgact 11280
 tgttgctact tgagtcattg gttgatgctt catcataatt catttactga aagctagttt 11340
 tctgcttttc tgagtaccaa gtttcagatt ttgtctttgt tgtactgatt tcatgtgga 11400
 aagacatatt tgggtgtaag gttgtagtgc aattattaac tgtatctgtt tccctgatcg 11460
 25 tttcgtgtct ttctgcagac gtatactcta cggataaaaa tttactgtg gtactagatg 11520
 aagatgcctt tgaggttctt ctcaacaagc cacacagaaa attggcaaaag gttgttatt 11580
 cccaaaggta gctactgatc catgagtta aaacttttta atttatcgtt ttgatgctct 11640
 ctttgaggag tatattggag gaaactctgc tttaaattca gatctctctc ttgttgtggc 11700
 aggaaggttg ggaaaatgat gaaaaagtcg acgatgcagc acaacatgag acagtggagg 11760
 30 aagctggagc gcaaggtgaa gttgaatto 11789

<210> 58

<211> 932

<212> DNA

35 <213> 烟草

<400> 58

40 ggccattatg gccggggatc ataactcgaa ctagctaact ttagttattg agagacaaac 60
 aaattacaga agcttaatta attattagag aaagagagat ggaagggtgct tatatcggtt 120
 gccatattct caccgttttt cttattatag ctgtcttcac atcttcttca ttcacggagt 180
 cagtttcagc ggcaaggcca gcagccggag atacaaatac ggagtttata agaacatcat 240
 gcaaatcaac tacatatcca aacctctgtt tcagttcatt atcaggccgt gcaactgcta 300
 ttgggggttc ccctcaactt ctagcccatg aatccctcac cgtcagcctc gaaacagcgc 360
 agtetacatc tgtcacgatg gtggagttgg cacacggcca aggcattgac ccgagagaga 420
 45 tcgggtgcat gcatgactgt gtggaggaac taagcgacct gtcgttgaat tgagaaagtc 480
 tttgggcgaa atgaagcagc taaggggcaa agatttgacc ttaaaatgag tgatattcaa 540
 acgtgggtaa gtgctgcttt gactgacgag gacacctgca ccgaggggtt tgccggaaaa 600
 gttatgaacg ggaaagttaa gacagtagta aggggaagga ttctggacgt tgcacatttg 660

acaagtaatg ccttggttt gatcaacagc cttgcgctt ttcacggcta gagcaagaag 720
 tcaattacac gtacactcct atatagtgtt atttctcgtt tttctcaaag tgtacttagt 780
 tcttcctttg ctgatocttg aagtagcagg gtcgtcagct ttgggtaatt ttcttatata 840
 agtctgttcc atatgcattt atagaaaagg taatttttgt gcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 900
 5 aaaaaaaaaa acatgtcggc cgcctcggcc ca 932

<210> 59

<211> 124

<212> PRT

10 <213> 烟草

<400> 59

Met Glu Gly Ala Tyr Ile Gly Cys His Ile Leu Thr Val Phe Leu Ile
 1 5 10 15

15

Ile Ala Val Phe Thr Ser Ser Ser Phe Thr Glu Ser Val Ser Ala Ala
 20 25 30

Arg Pro Ala Ala Gly Asp Thr Asn Thr Glu Phe Ile Arg Thr Ser Cys
 20 35 40 45

Lys Ser Thr Thr Tyr Pro Asn Leu Cys Phe Ser Ser Leu Ser Gly Arg
 50 55 60

Ala Thr Ala Ile Gly Val Ser Pro Gln Leu Leu Ala His Glu Ser Leu
 65 70 75 80

Thr Val Ser Leu Glu Thr Ala Gln Ser Thr Ser Val Thr Met Val Glu
 85 90 95

30

Leu Ala His Gly Gln Gly Met Thr Pro Arg Glu Ile Gly Ala Met His
 100 105 110

Asp Cys Val Glu Glu Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asn
 35 115 120

<210> 60

<211> 3612

40 <212> DNA

<213> 烟草

<400> 60

tgtgaagttt ccaattcagt gctgttcttg gagttgtgac aagttcttgt tagtgttgga 60
 45 ttggattgct gttgtgggta acttgaaatt tccaatttct tataaatttt gcggtaatga 120
 gtgatggaat gatggaaata gagaagcccg taaatgttga ttcaaagtgt gacaaacaat 180
 ggtttgtaga tgccagtact gaacaggagg agccatgtgt cgagaggctt aattttaaaa 240
 ctttagatgg tgtagaatta gattgttgtg ccacgaatca tgccactaat tgtgcaaccg 300
 aagctgtaga tgggttagga gtagaatgtt gtgccacgaa tcgtgcaccc gaaactgtag 360

atggtatagg agtagaaggt tgtgccacga atogtgcacc tgaaactgaa gatgatgtag 420
 aattagaagg ttgtgcgcg tttcgtgcac ctggaacttt aaacacggag gaatcagagt 480
 taggtgagaa gcaggcaaac aaattgaata attgtgatgt ccagccctat gtaaggattg 540
 atgtgaagga agcttcgaat gatgagatgc tttctgaagt ttcaaataca aatttgcctc 600
 5 caagagagaa cacgtcaagt ttccagacta tcagtaatca agggatggat ttattgagta 660
 ataatacaagg ttgttctgga gagattacat ctttttcac aggggaattca agtgcggatg 720
 agagtgtcgg tgaagaagag cataatcaaa ttgatgtatc cgaggcagtt gcgaaatcct 780
 ctgtgggtact tgaattcca aaggaattta gcacaactgg tgtcaggaag attacattta 840
 agtttagcaa aagaaaggag gattatggta atgcatatgc ttcagctgct ctgcctgtga 900
 10 ctgatcgggt tgatgatgga tttgggtgaag cacatgcacg gtatccttct gatgatatga 960
 ctccacctat ttcaagcaca aatggagcat tttatcaaca tggagatcct ttttatgtc 1020
 ctccaaacat ggaattaaaa atgtctaaga aggtcatttc tgatgcttac ccgacaaatg 1080
 tcaagaagct tctatcgacg ggtatttttg aaggagcaag ggtgaactac atttcaactt 1140
 ctgggaagat ggagcttctt ggaatcataa aggattacgg atacttgtgt ggttgttcat 1200
 15 tctgcaattt ctctaaagt ctcatgtctt acgaatttga agtgcacgct gggggcaaga 1260
 ctagacaccc aaacaatcat atttatttgg agaattgaaa acctatttac aggataattc 1320
 aagagttgaa gactgcacca cttagcagac tagaagaagt tgtaagagac gtgctgtgtt 1380
 cttctattaa tgagcaatat tttaggctt ggaaagcaaa actcctgcag tgctatgagg 1440
 tggttagtgc tgaccaatat tcttatggaa aggttcagg aatttatcac tctaagctaa 1500
 20 gttcgggtgat ggaagatggc cttatttctg ctctactc ctatattgac aacttccctc 1560
 caaatccatt tagctatatg gagacagcag aggcattgaa gcatgtggct aaaaagccaa 1620
 ggtgcaattt ttccagctca acagtagagc caaaaagacc tgctgaaggt tgcacaagaa 1680
 aaagggataa tgacttgac cgatcattat tcatgcaaaa tggacttcca gatggaactg 1740
 atttggcata ttattctaag gggaagaaag ttctgggggg ctacaagctg ggaaatggca 1800
 25 tagtctgcag ctgctgtgat actgagataa gtccgtccca gtttgaggct catgctggat 1860
 gtgcagctaa acgtcagcct taccgtcaca tctacaactc caatggactt acctacacg 1920
 atatagcatt aatgctggca aatggtcaaa gtattgccac caataacagt gatgatattg 1980
 gtacaatatg cggcgatggg ggagaactga tttgctgtga aggggtgtct cgggctttcc 2040
 atgcagcttg tttaggtgta cagtgtaccc caaccagtgg ttgctctgt tcatattgta 2100
 30 gagacaattt tgtacctggg agggaaactg caggagatgc aggaccaatt atgatacggg 2160
 tgacaagagt ggttaaagct ccggagtctg aagggtgggtg gtgcgttgtt tgcaggaccc 2220
 cggactttag cgttgcaaaa tttgacgac ggacagttat gctctgtgac cagtgtgaga 2280
 aagaatacca tgttgggtgt ctgcgggaaa gtgggctgtg tgatctgaaa gaactcccaa 2340
 aagataaatg gttttgttgc aatgactgca ataaagtta tgcggtactt cagaattgtg 2400
 35 ttctgaaggg agctgaggtc attccagcac ctgcagcaac tgcagtaact aagaagcatg 2460
 tccagaaatg tttaatggat acagctacaa atgacattca gtggogaatc ttaagtggga 2520
 agagtgccta ccggagcat ctacctctc tttccagagc agcaacaatc tttagggagt 2580
 gctttgatcc tattgttgcc aaatctggac gagatcttat acctgttatg gtttatgggc 2640
 gaaacatctc gggtcaggaa tttgggggaa tgtattgcat cgttttgact gtaaagtctg 2700
 40 tagtctatc agctggtctt ctccagattt tggggcaaga ggttctgaa ctacctttgg 2760
 tggtacaaag tagagaaaac caagggaag gttatttcca ggogttattt gcatgtattg 2820
 agatgctatt atcttccatg catgttaaaa acctggttct gctgctgct gaggaggcgg 2880
 aatccatctg gacaaataaa ctggggttca aaaagatgac tgatgaacga tatctgaagt 2940
 attcaaggga ctccagttg acggtattca aggggacatc aatgttgag aaggaggtgc 3000
 45 agcagacagc ttatgaattg taattcatct ttgtggagaa tgtgcaacaa ggagctagaa 3060
 ttgctacata tcttgacgc actctattc aggagggaga cctctgttct actcaatgat 3120
 ctgaaatgga agtgaaaata gagaaaggag tgcttctcat tgcagatoga tcttttctt 3180
 aatatctaga acatgcaaaa tgcacctatg ctgatgagtt ttgagtttca aggcattaa 3240

atagtagaca atgcaagggtg tttggaggca catcaagttg ctggcggacc ttgtagcat 3300
 cactcttaga tgcaaggaca agtgcatttc ttattcgta tttaccacta tgttttcata 3360
 aagtagtcat tgcttttata gattagtttt cagctgatgt ataaagagca gctgaggaac 3420
 5 tgcctggtga aagtcctcga ggcattgctga cttttatca tgcgtgogtg gggcaaacgt 3480
 tgtttttacc cttttctttt tgcagtggta gtttcctttt gtacatttcc agtgcataaa 3540
 aaaaaaagaa aaaaaaaaaa agtcgacatc gagacgcgtg gtogggctag agcggccgcc 3600
 accgcggtgg ag 3612

10 <210> 61
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

15 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成引物

20 <400> 61
 taagcctctc gacacatggc 20

25 <210> 62
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成引物

30 <400> 62
 tcggttgac aattagtggc 20

35 <210> 63
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

40 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成引物

<400> 63
 cgattcgtgg cacaacattc 20

45 <210> 64
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列

50 <220>

<223> 人工序列的描述: 合成引物

<400> 64

5 tgg tcaa agt att gcc acc

19

<210> 65

<211> 20

<212> DNA

10 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成引物

15

<400> 65

ggggg aga ac tgatttgctg

20

<210> 66

20 <211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

25 <223> 人工序列的描述: 合成引物

<400> 66

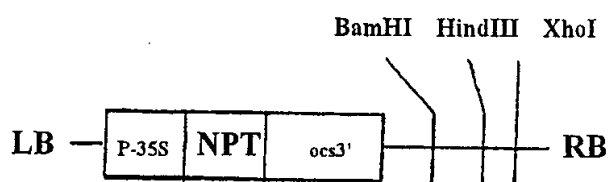
30 ttaggtgtac agtgtacccc

20

35

说明书附图

04541:



04541M:

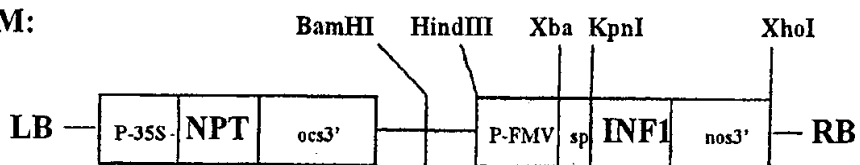


图 1

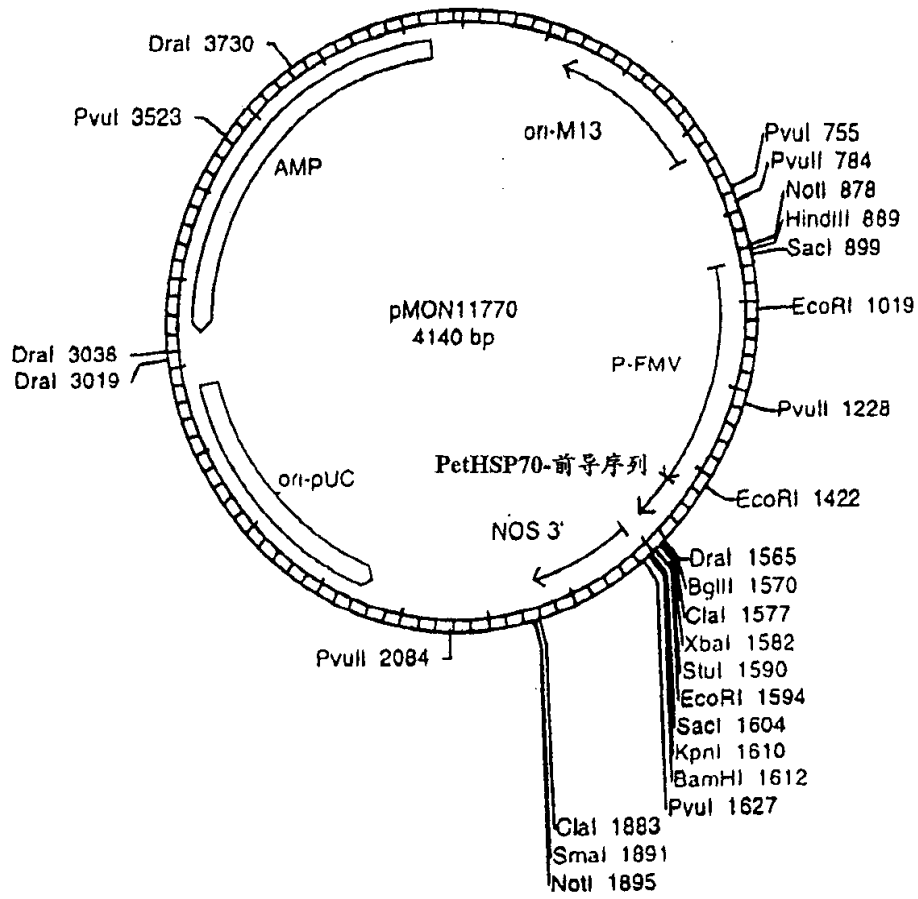


图2 pMON11770质粒图谱

1 50
 Enh4 -----TTIA KKIYNDPTVT SHFDAHAQCL VTQIYSWREL LLTILNDVLE
 Enh8 -GGVGKTITIA KKIYNDPTVT SHFDAHAQCL VTQIYSWREL LLTILNDVLE
 Enh2 MGGVGKTTLA KKIYSDPIVT SYFDVRAQCC VTQVYSWREL LLTILNDVLE
 Enh9 -----
 Enh6 -----
 Enh5 -----
 Enh3 -----
 Enh1 -----
 Enh10 -----
 Enh7 -----

51 100
 Enh4 PADLNVKEDG ELADELRRFL LTKRFLILID DVWDNKVWDN LHLCFRDVRS
 Enh8 PADLNVKEDG ELADELRRFL LTKRFLILID DVWDNKVWDN LHLCFRDVRS
 Enh2 PTORNKEDG ELADELRRFL LTKRFLILVD DVWDTKVWDY LHMCCRGSRN
 Enh9 -----
 Enh6 -----
 Enh5 -----
 Enh3 -----
 Enh1 -----
 Enh10 -----
 Enh7 -----

101 150
 Enh4 GSRIILTTRL SDIANYVKCE SDPHHLHLFR DDESWTLLQK EVFQGETCPP
 Enh8 GSRIILTTRL SDIANYVKCE SDPHHLHLFR DDESWTLLQK EVFQGETCPP
 Enh2 GSRIILTTRL SDVASYAQCY SKPHHLRLFR DDESWTLLQK EVFQGEICPP
 Enh9 -----
 Enh6 -----
 Enh5 -----
 Enh3 -----
 Enh1 -----
 Enh10 -----
 Enh7 -----I

151 200
 Enh4 ELADVGSRIA RRC-----
 Enh8 ELADVGSRI-----
 Enh2 ELLDVGFZQ KLV-----
 Enh9 -----DTLLG RRESSYQFDG ACFLKDIKDN KHGMHSLQNI
 Enh6 GMGGVGKTTI ARAMFDTLLG RRESSYQFDG ACFLKDIKDN KHGMHSLQNI
 Enh5 GMGGVGKTTI ARAMFDTLLG RRDSSYQFDG ACFLKDIKEN KRGMHSLQNT
 Enh3 GMGGVGKTTI ARAIFDTL... SYQFEV TCFLADVKEN KCGMHSLQNI
 Enh1 GMGGVGKTTI ARAIFDTL... SYQFEV TCFLADVKEN KCGMHSLQNI
 Enh10 -----KTTI ARAIFDTL... SYQFEG TCFLANVKEN KCGMHSLQNI
 Enh7 QAWGEWAKRQ ZQESFLIL... SYQFEV ACFLADVKEN KCGMHSLQNI

201 250
 Enh4 -----
 Enh8 -----
 Enh2 -----
 Enh9 ILSNLLKEKA NY.NNEEDGK HQMASRLRSK KVLIVLDDID NKDHYLEYLA
 Enh6 ILFNLLKEKA NY.NNEEDGK HQMASRLRSK KVLIVLDDID NKDHYLEYLA
 Enh5 LLFELLRENA NY.NNEEDGK HQMASRLRSK KVLIVLDDID DKDHYLEYLA
 Enh3 LSELLRENA NYVNNKODGK HLMACRLRSK KVLVVLDDID HZEH.LEYLA
 Enh1 LSELLRENA NYVNNKEDGK HLMARRLSK KVLVVLDDID HRDH.LEYLA
 Enh10 LSELLSRENA NYVNNKEDGK QLMARRLSK KVLVVLDDID HRDH.LEYLA
 Enh7 LSELLRENA NCVNN.EDGK QLMARRLRFK KVLIVLDDID ...H.LDYLEA

	251		300
Enh4	-----	-----	-----
Enh8	-----	-----	-----
Enh2	-----	-----	-----
Enh9	GDLDWFGNGS	RIILTTRDKH	LIEKNVVVYE VTALPDHESI QLFNQHAFRK
Enh6	GDLDWFGNGS	RIILTTRDKH	LIEKNVVVYE VTALPDHESI QLFNQHAFRK
Enh5	GDLDWFGNGS	RIIVTTRDKH	LIGKNDIIE VTALPDHEAI QLFYQHAFKK
Enh3	GDLGWFGNGS	RIIATTRDKH	LIGKKDTLYE VTTLADHEAI RLFNRYTFKE
Enh1	GDLGWFGNGS	RIIATTRDKH	LIGKKDALYE VTTLADHEAI RLFNRYAFKE
Enh10	GDLGWFGNGS	RIIATTRDKH	LIGKKDALYE MTTLADHEAI QLFNRYAFKE
Enh7	GDPGWFGNGS	RIIATIRDKH	VTGKNDIVYE VTTLEHDAI QLFNQYAFKE

	301		325
Enh4	-----	-----	-----
Enh8	-----	-----	-----
Enh2	-----	-----	-----
Enh9	QDPDECFAKL	SLEVNYA--	-----
Enh6	QDPDECFAKL	SLEVNYA--	-----
Enh5	EVPDECFAKL	SLEVNHAA--	-----
Enh3	DVPDEFFFAKL	TLEVVS---	-----
Enh1	DVPDEVFAKL	TLEVVSFAK-	-----
Enh10	DVPDEFFFAKL	TLEVVSFAK-	-----
Enh7	EVPDECFAKL	TLEVVSFAK-	-----

图 3

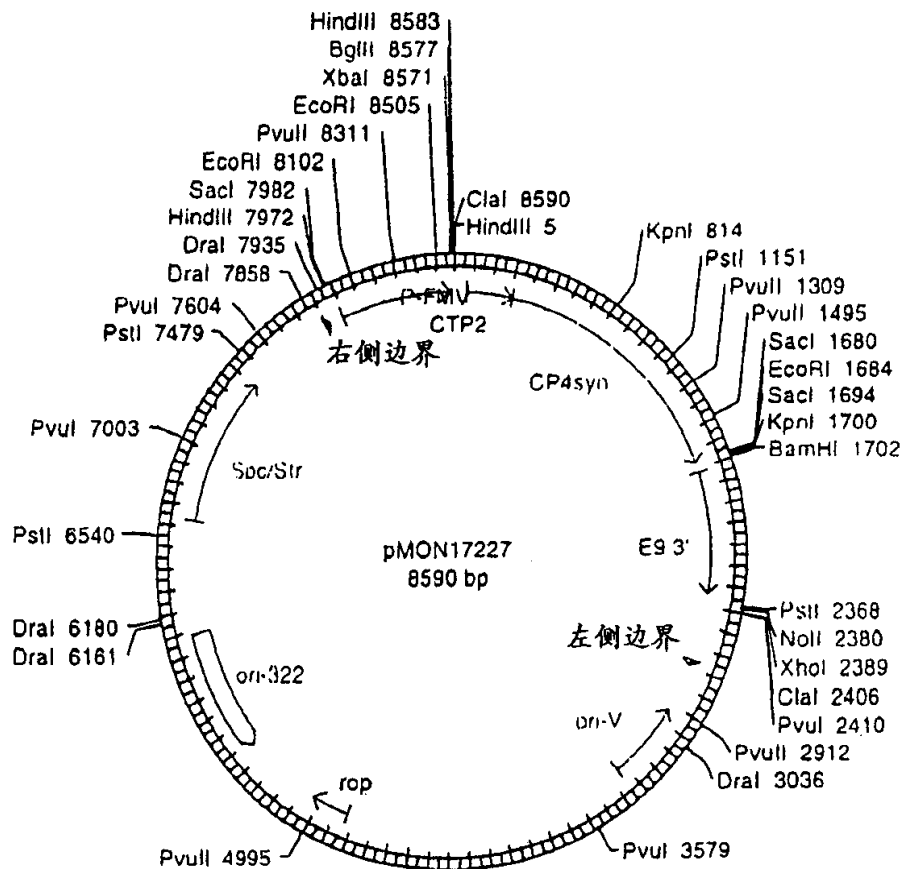


图4 pMON17227质粒图谱

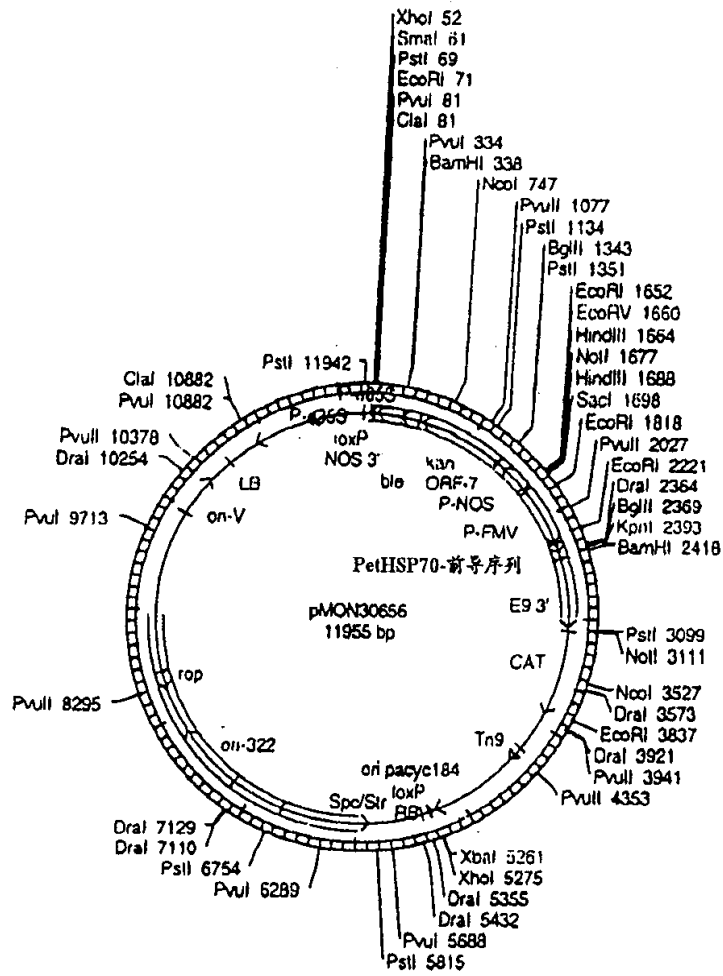


图 5

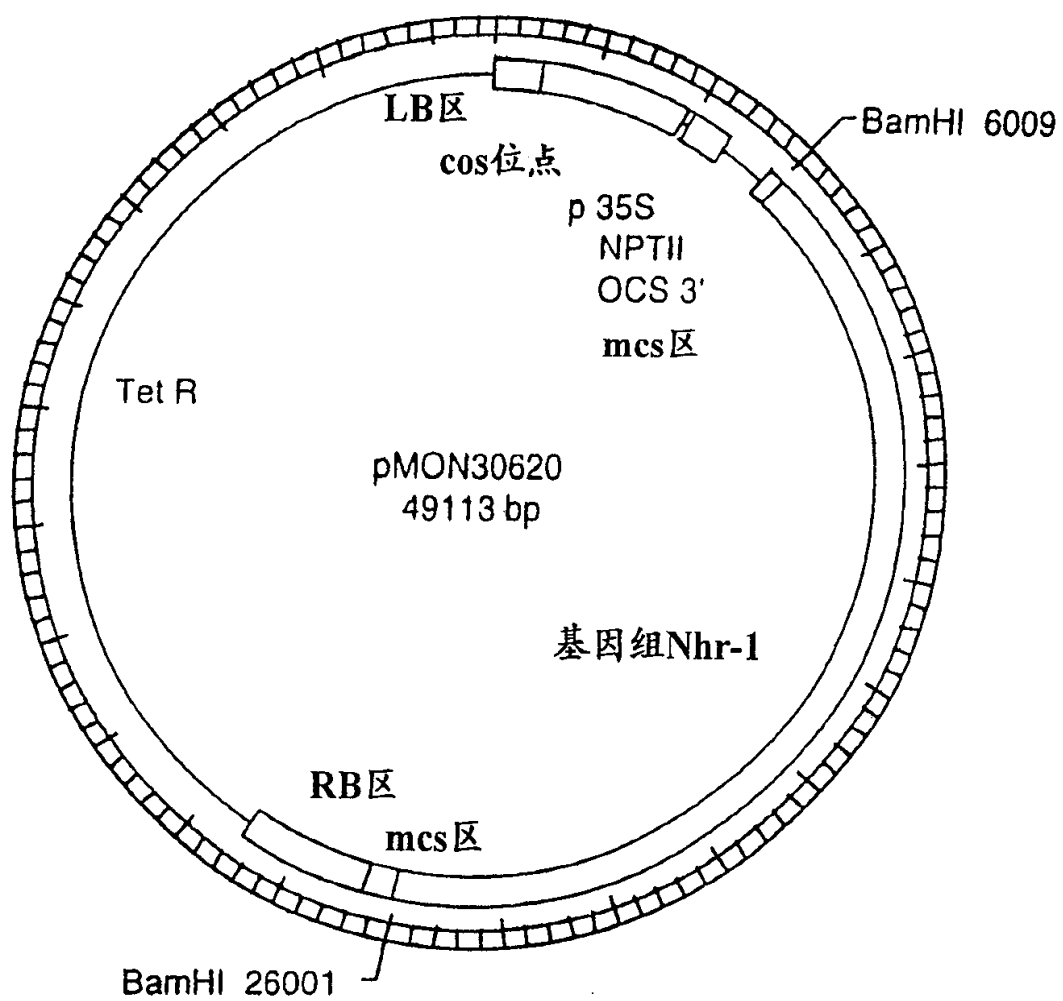


图 6

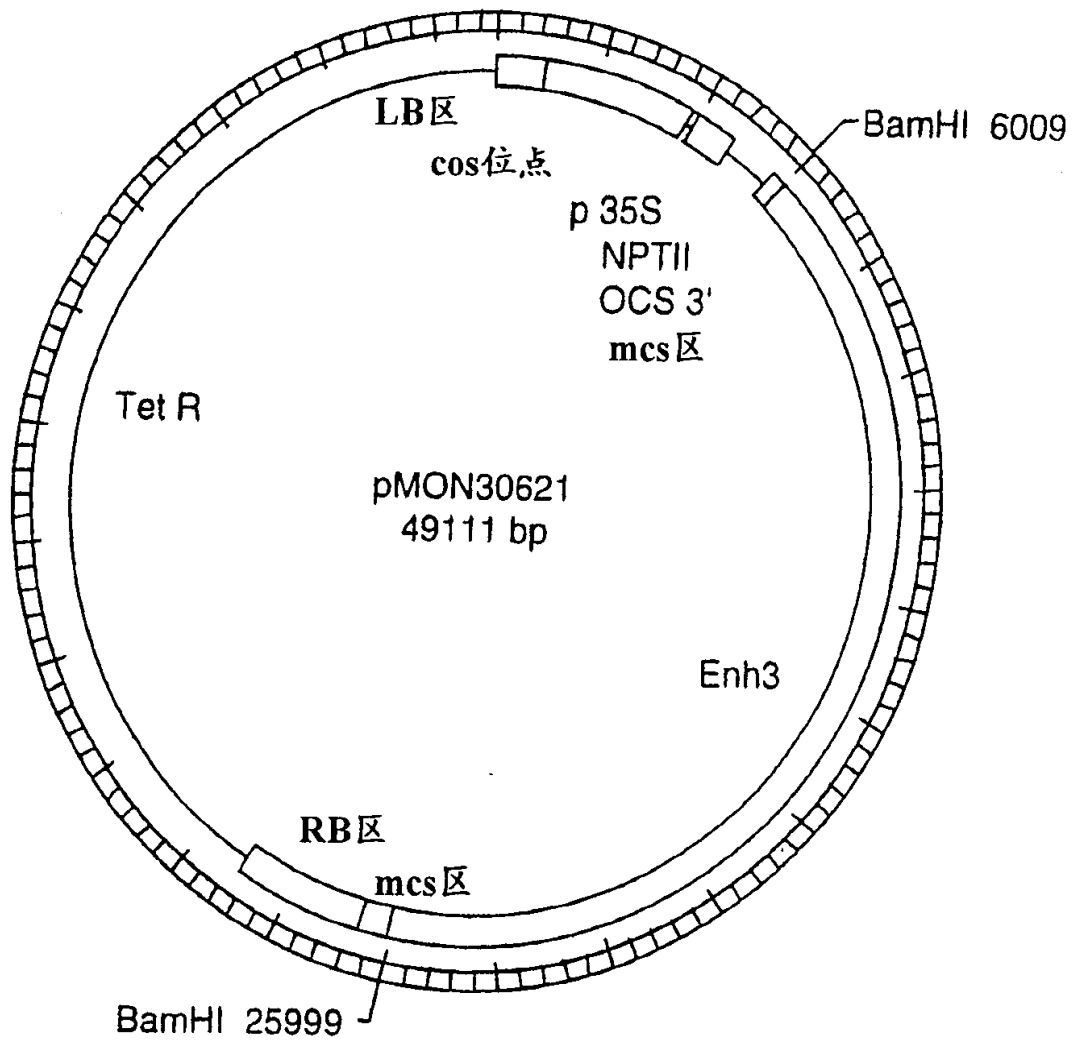


图 7