



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101292037 B

(45) 授权公告日 2013.07.10

(21) 申请号 200680019552.0
 (22) 申请日 2006.06.02
 (30) 优先权数据
 102005026045.4 2005.06.03 DE
 (85) PCT申请进入国家阶段日
 2007.12.03
 (86) PCT申请的申请数据
 PCT/DE2006/000950 2006.06.02
 (87) PCT申请的公布数据
 W02006/128444 DE 2006.12.07
 (73) 专利权人 KWS 萨特股份公司
 地址 德国艾恩贝克
 (72) 发明人 D·J·斯塔尔
 (74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
 72001
 代理人 郭文洁 梁谋

列的研究发展.《南京农业大学学报》.1999,第22卷(第3期),102-107.

Motoaki Seki.AV827853 RAFL9 Arabidopsis thaliana cDNA clone RAFL09-20-M08 5-, mRNA sequence.《NCBI》.2002,

Abdelhafid Bendahmane et al.Constitutive gain-of-function mutants in a nucleotide binding site-leucine rich repeat protein encoded at the Rx locus of potato.《The Plant Journal》.2002,第32卷(第2期),195-204.

审查员 杨佳倩

(51) Int. Cl.
 C12N 15/82(2006.01)
 C07K 14/415(2006.01)
 (56) 对比文件
 CN 1555414 A, 2004.12.15,
 秦跟基.植物抗病基因结构特征及其类似序

权利要求书2页 说明书16页
序列表12页 附图23页

(54) 发明名称
 自激活抗性蛋白
 (57) 摘要

本发明涉及在植物中编码对病原体产生抗性的自激活抗性蛋白的核酸,其特征在于核酸具有NBS-LRR抗性基因的有限部分,从NBS-LRR抗性基因编码区的5'端向下延伸到NBS-LRR抗性基因NBS结构域的起始处,该NBS-LRR抗性基因不是TIR-NBS-LRR抗性基因。

```

1
(1) -----MSEKSDVVTKTTIAHDTTFAGDETCASYATQGIILAAQGVNRDDE
Bv12069 (1) -----MEFESTTNSISEKLNIALQWEPFKDKLFSNFS-----YETDEE
Bv13033 #159 (1) -----MVDAGQPRVFEKELNVAIQEAGVVLG-----FKDRFEE
BvKWS3_135 #147 (1) -----MVIIGGIIIFSEAEIQVLEKLSGGLSIFLKREKQ-----IGPKVTEC
BvKWS3_165 #175 (1) MEIGLAWGGIFSEELNVAIDRAPHEDLNMPQRKHK-----DHVKLRE
R3a-#1-155 (1) M EAVLSA L LF LA G L LK
Consensus 51 100
(45) EENKKEIARAFVQAESQVDSKAKIWLKQKVAQSIPIHMAQVHTD
Bv12069 (39) ELQRTSSSTRAIHWVETILELSDIECRQEEIADDTFEADSEIIEVLL
Bv13033 #159 (33) ELNDKYNQOQPFKQAFRLKRDDEKCTLAHAEIAPAESEIACQLL
BvKWS3_135 #147 (42) EWEKKRLIEEAFNSAQQQEFNNAKILWREKQEPADLSEIIEVDFD
BvKWS3_165 #175 (45) EEDILGLGQIYSSANRNASNRHSCQPNKQIADDCQKQVLEKQVY
R3a-#1-155 (51) KIQ L I AVL DAE KQ ENVK WL DLKE VYDAEDLLDEV TD
Consensus 101 150
(95) LLRKRREKSHLLRQIRVYLS-----SSNPELSNHWSS-----DK
Bv12069 (89) RHQQNMYVDGSLKLVKRRHFS-----SSNPECVSNHSS-----RG
Bv13033 #159 (83) S-----SSCKLLEDEYSPTK-----YPAKYQHG-----KQ
BvKWS3_135 #147 (92) ARLKEIWDCEPQPOPEHQPKSSCSPFNKQVQSCISCGEPTLNKTKTKYSTS
BvKWS3_165 #175 (95) ALRLKRYGCHONIAATSNQC-----VSDLNLCSSDDPEEN-----IKDSE
R3a-#1-155 (101) A RVN S L D I FEM K
Consensus 151 190
(129) ERSIVQRFSIIEAANRRDQCDGHDPTEVYNIENRNLDA--
Bv12069 (125) SKQEKKKLQDIEANNOFSHELLDEPIRNRKRETCSS--
Bv13033 #159 (108) ECGTNEKLNISKNSAATGELQPVHGNVEEAGPWRWSSP
BvKWS3_135 #147 (142) EEPHSTRLAEELDQSRSESTQIHSRVQHEPR--
BvKWS3_165 #175 (134) EEPHSTRLAEELDQSRSESTQIHSRVQHEPR--
R3a-#1-155 (134) EEPHSTRLAEELDQSRSESTQIHSRVQHEPR--
Consensus (151) I EI KLDDI NI LLL E

```

1. 在植物中产生针对病原体的抗性的自激活抗性蛋白,其特征在于所述抗性蛋白是由含有 NBS-LRR 抗性基因的有限部分的核酸编码的,其中所述 NBS-LRR 抗性基因的有限部分从 NBS-LRR 抗性基因编码区的 5' 端向下延伸到 NBS-LRR 抗性基因 NBS 结构域的起始处,但不包括 P 环,其中所述 NBS-LRR 抗性基因不是 TIR-NBS-LRR 抗性基因,并且其中所述核酸选自下列组的核苷酸序列:

a) 如 SEQ ID NO :1 所述的核苷酸序列或与如 SEQ ID NO :1 所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列;

b) 如 SEQ ID NO :2 所述的核苷酸序列或与如 SEQ ID NO :2 所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列;

c) 如 SEQ ID NO :3 所述的核苷酸序列或与如 SEQ ID NO :3 所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列;

d) 如 SEQ ID NO :4 所述的核苷酸序列或与如 SEQ ID NO :4 所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列。

2. 如权利要求 1 所述的自激活抗性蛋白,其特征在于 NBS-LRR 抗性基因是来自甜菜的抗性基因。

3. 一种使用核酸生产针对病原体具有提高的抗性的转基因植物、以及所述植物的转基因种子或转基因种子材料的方法,其中所述核酸含有 NBS-LRR 抗性基因的有限部分并编码自激活抗性蛋白,其中所述 NBS-LRR 抗性基因的有限部分从 NBS-LRR 抗性基因编码区的 5' 端向下延伸到 NBS-LRR 抗性基因 NBS 结构域的起始处,但不包括 P 环,其中所述的 NBS-LRR 抗性基因不是 TIR-NBS-LRR 抗性基因,并且其中所述核酸选自下列组的核苷酸序列:

a) 如 SEQ ID NO :1 所述的核苷酸序列或与如 SEQ ID NO :1 所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列;

b) 如 SEQ ID NO :2 所述的核苷酸序列或与如 SEQ ID NO :2 所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列;

c) 如 SEQ ID NO :3 所述的核苷酸序列或与如 SEQ ID NO :3 所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列;

d) 如 SEQ ID NO :4 所述的核苷酸序列或与如 SEQ ID NO :4 所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列。

4. 如权利要求 3 所述的方法,其特征在于 NBS-LRR 抗性基因是来自甜菜的抗性基因。

5. 如权利要求 3 所述的方法,其特征在于所述核酸的转录受病原体诱导型启动子控制。

6. 如权利要求 5 所述的方法,其特征在于所述的病原体诱导型启动子是合成的启动子。

7. 如权利要求 6 所述的方法,其特征在于所述的合成的启动子包括以下的顺式元件组合中的一个:

a) SEQ ID NO :10

b) SEQ ID NO :11

c) SEQ ID NO :12

d) 4x SEQ ID NO :6-2x SEQ ID NO :8

e) 2x SEQ ID NO :6-4x SEQ ID NO :8

f) 4x SEQ ID NO :6-4x SEQ ID NO :8。

自激活抗性蛋白

[0001] 本发明涉及编码可在植物中产生针对病原体的抗性的自激活抗性蛋白的核酸,该核酸在产生转基因植物的用途以及转基因植物。

[0002] 由于植物中抵御或延迟及抑制主要的潜在病原体散播的天然防御机制不充分,因此由真菌、病毒、线虫和细菌引起的植物病害在世界范围造成极大损失,可影响收获产品的质量并需要更多更大量使用化学杀虫剂。这些防御机制包括超敏反应、感染部位宿主组织的可控死亡、通过木质化和愈合组织的形成而增强植物细胞壁、形成植物抗毒素及产生 PR(致病相关的)蛋白。植物抗性基因(R基因)是激活诱导型防御机制的关键分子。根据 Flor 的基因对基因假说, R 基因的蛋白与微生物无毒基因(Avr 基因)的对应蛋白相互作用,从而启动诱导型防御反应。

[0003] 根据其编码的 R 蛋白的结构可将主要的 R 基因分为 5 类(Martin et al., 2003)。1 类仅包括编码丝氨酸/苏氨酸激酶的番茄 Pto 基因。而主要的植物 R 基因属于 NBS-LRR 基因超家族,它编码“核苷酸结合位点”(NBS)和“富含亮氨酸的重复”(LRR)。在其 N 末端具有诸如例如“亮氨酸拉链”这样的“卷曲螺旋”结构(CC)的 NBS-LRR 基因可归为 2 类 CC-NBS-LRR 基因。CC-NBS-LRR 型 R 基因在所有被子植物中均有发现。3 类包括 TIR-NBS-LRR 型 R 基因,它在 N 末端具有取代 C 结构域的、与动物 TIR 区(“toll-interleukin-1 受体”)同源的序列。虽然在拟南芥中,TIR-NBS-LRR 基因构成了约 75% R 基因,但未在草和甜菜中发现(Tian et al., 2004)。

[0004] 第四类 R 基因包括番茄的 Cf 基因。CF 蛋白没有 NBS 结构域,但具有跨膜结构域(TM)和胞外 LRR。第五类包括水稻的 Xa21 蛋白,它由胞外 LRR 结构域、跨膜结构域和胞内激酶结构域构成。

[0005] 尽管 R 基因由 R 基因启动子进行弱表达,但 1、2 和 3 类 R 基因的强组成型表达甚至在没有相应的无毒基因产物时仍可激活植物的病原体防御系统,由此导致 R 蛋白的自激活(Tang et al., 1999; Oldroyd and Staskawicz, 1998; Bendahmane et al., 2002)。

[0006] 但通常 R 基因在转基因植物中的组成型过表达与诸如植株的微坏死(Tang et al., 1999)或矮小(Frost et al., 2004)这样的农事上不良特征相关。

[0007] 2 类和 3 类 R 蛋白的自激活的另一个可能原因是在全长 CC-NBS-LRR, 或 TIR-NBS-LRR 蛋白中特定的、保守的氨基酸元件发生了突变。在 NBS 或马铃薯 Rx 基因的 LRR 结构域(Bendahmane et al., 2002)及亚麻 L6 基因的 NBS 结构域(Howles et al., 2005)中序列的突变可产生突变株,在不存在相应无毒基因的情况下,该突变株在瞬时表达后可启动细胞死亡。

[0008] 用 Rx 基因的缺失实验表明包含 CC 结构域和部分 NBS 结构域的缺失产物可在其瞬时过表达后启动细胞死亡,其发生比使用全长 R 基因的情况更快。这些缺失产物除了 CC 结构域外,还需要 NBS 结构域中的 P 环、激酶 2 以及完整的激酶 3a。相反,与全长 R 基因相比较,NBS 的进一步缩短可导致更慢的 HR 引发或启动(Bendahmane et al. 2002)。

[0009] 亚麻 L10 基因,它也是一种 3 类 R 基因,其自激活可通过形成缩短的、含有 TIR 结构域以及包括 P 环在内的限制性 NBS 结构域的 34 个氨基酸的 TIR-NBS-LRR 蛋白来实现(Frost

et al., 2004)。

[0010] 虽然已知有多种 R 基因的自激活方法,但目前仍未报道过其中 R 蛋白自激活在导致真菌抗性增强的同时可降低农事上不良特征的转基因植物。在亚麻中,尝试在天然 L6 抗性基因启动子或真菌诱导型启动子控制下分别稳定转化两个 L6 基因的自激活全长变异体,产生的是正常生长的真菌敏感型植株,或者是矮小的真菌抗性植株 (Howels et al., 2005)。

[0011] 因此,本发明的目的是改变植物抗病原体的防御能力,从而使植物的防御反应确实在病原体攻击时可被激活,但不会对植物的农事特征产生负面影响。

[0012] 根据本发明,可通过核酸来实现上述目的,该核酸包括 NBS-LRR 抗性基因的有限部分,它从 NBS-LRR 抗性基因编码区的 5' 端向下延伸到 NBS-LRR 抗性基因 NBS 结构域的起始处,其中 NBS-LRR 抗性基因不是 TIR-NBS-LRR 抗性基因。这种核酸可从植物中分离或人工合成。

[0013] NBS-LRR 抗性基因的有限部分起始于翻译起始密码子 (ATG 密码子),并延伸到其基本特征是含有 P 环 (激酶 -1a 元件) 的 NBS 结构域。对于发明中 NBS-LRR 抗性基因部分的功能而言, P 环不应包括在内。同样,也不应存在 NBS-LRR 抗性基因中 NBS-LRR 结构域的其它部分。但可保留包括 P 环在内的 NBS 结构域中的个别核苷酸,只要它们不干扰 HR 的引发即可。

[0014] 术语“自激活抗性蛋白”是指在不存在相应的无毒基因产物时可激活植物病原体防御机制的蛋白。因此,本发明的优势在于不需要抗性蛋白和无毒蛋白间的相互作用即可形成对病原体的抗性,从而在实质上更直接地、最终更可靠地进行植物的防御反应。

[0015] 例如,自激活可通过抗性基因的瞬时过表达而产生。过表达是指在没有相应的微生物无毒基因产物时,天然 R 基因启动子的表达强度在一定程度上超过 R 蛋白调控的信号传导的级联反应。因此,病原体的防御机制被激活,表现出部分或完全的病害抗性。

[0016] 但抗性蛋白的自激活也可通过将甜菜的全长 R 基因 BvKWS3_165、BvKWS3_135、Bv13033 和 Bv12069 以及马铃薯的 StR3a 基因缩短到仅编码含有可能的 CC 结构域的蛋白的 NBS 和 LRR 结构域的自由 N 末端的 5' 区来实现。NBS 结构域自由 N 末端在这种情况下是指 NBS-LRR 抗性基因编码区的 5' 端仅向 3' 端延伸到以下程度:在其有效或可操作的结构中不包括 NBS-LRR 抗性基因的 P 环。最简单的情况是将 P 环完全删除。但 P 环的个别核苷酸可保留在缩短的抗性基因中,只要它们不降低或阻碍 HR 的引发即可。对缩短到 N 末端的 NBS-LRR 抗性基因而言,也删除了根据数据库 Prosite (Bairoch et al., 1996) 和 Pfam (Sonnhammer et al., 1997),并在 Bendahmane et al. (2002) 中提供描述的激酶 2、激酶 3、GLPC 和 MHD 元件。

[0017] 与全长 R 基因相比较而言,缩短的 R 基因 165_#176、135_#147、13033_#159 和 Bv12069 及 StR3a-#1-155 的用途是在植物组织中更快地引发细胞死亡。联合使用病原体诱导型启动子,可诱导改善的诱导型病原体防御机制。该也可用于那些不被表达 135_#147 和 BvKWS3_135-D480V 基因的 MHD 或 VHD 结构域中的已知突变所自激活的 R 蛋白。

[0018] 与全长 R 基因相比较而言,由于缩短的 R 基因可更早地引发细胞死亡,因此缩短的 R 基因比 R 基因 135_#147 只需要更少的表达即可足以达到植物防御机制中的临界蛋白浓度。

[0019] P环或激酶1a元件与激酶2和激酶3元件均为ATP或GPT水解蛋白(Traut,1994),并位于NBS-LRR-基因的NBS结构域中。P环是NBS结构域N末端区的特征(Bendahmane et al.,2002)。R基因Prf、Rx、Rpm1、BvKWS3_135、BvKWS3_133和BvKWS3_165的P环的共有序列是:(I/V)VG(M/I)GG(L/I/S)GKTT(L/V)。

[0020] 令人惊讶的是,用编码序列元件DAE的氨基酸序列的核酸可获得非常好的自激活。特别是编码序列元件AVLXDAE的核酸。例如,序列元件DAE和AVLXDAE位于SEQ ID NOS:13和15中。

[0021] 优选的核酸序列选自以下组:

[0022] a) 如SEQ ID NO:1所述的核苷酸序列或与如SEQ ID NO:1所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列,或与如SEQ ID NO:1所述的核苷酸序列或与如SEQ ID NO:1所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列杂交的核苷酸序列;

[0023] b) 如SEQ ID NO:2所述的核苷酸序列或与如SEQ ID NO:2所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列,或与如SEQ ID NO:2所述的核苷酸序列或与如SEQ ID NO:2所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列杂交的核苷酸序列;

[0024] c) 如SEQ ID NO:3所述的核苷酸序列或与如SEQ ID NO:3所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列,或与如SEQ ID NO:3所述的核苷酸序列或与如SEQ ID NO:3所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列杂交的核苷酸序列;

[0025] d) 如SEQ ID NO:4所述的核苷酸序列或与如SEQ ID NO:4所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列,或与如SEQ ID NO:4所述的核苷酸序列或与如SEQ ID NO:4所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列杂交的核苷酸序列;及

[0026] e) 如SEQ ID NO:16所述的核苷酸序列或与如SEQ ID NO:16所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列,或与如SEQ ID NO:16所述的核苷酸序列或与如SEQ ID NO:16所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。

[0027] NBS-LRR抗性基因的有限部分(limited part)在优选的核苷酸基因序列中的延伸程度如下所示:

[0028] SEQ ID NO:1的124-654

[0029] SEQ ID NO:2的155-598

[0030] SEQ ID NO:3的94-573

[0031] SEQ ID NO:4的194-694

[0032] 此处所用术语“杂交”是指在如Sambrook et al.(1989)中所述的传统条件下,优选地在严谨条件下的杂交。例如,严谨杂交条件是:在4×SSC中,于65℃杂交,然后在0.1×SSC中,于65℃多次洗涤约1小时。例如,较弱的严谨杂交条件是:在4×SSC中,于37℃杂交,然后在1×SSC中,室温下多次洗涤。“严谨的杂交条件”也指:在0.25M磷酸钠,pH7.2、7% SDS、1mM EDTA和1% BSA中,于68℃杂交16小时,然后在2×SSC和0.1% SDS中,于68℃洗涤两次。

[0033] 优选的编码自激活抗性蛋白的抗性基因来源于甜菜或马铃薯。

[0034] 在另一个优选的方案中,发明的核酸编码具有SEQ ID NOS:13到15中共有序列的氨基酸序列。在共有序列中,功能上等价的氨基酸可相互替代,例如Asp可替换为Glu,Leu可替换为Ile、Ala或Val,Arg可替换为Lys,Phe可替换为Trp。

[0035] 如 SEQ ID NOS :13 和 14 所述的两个共有序列代表两个功能区,其间隔距离是不固定的。两个区优选的间隔可参见如 SEQ ID NO :15 所述的共有序列和如图 10 所示的共有序列。

[0036] 发明的核酸优选地与病原体诱导型启动子连接。病原体诱导型启动子在病原体,例如有害真菌、细菌、病毒或线虫感染宿主组织的反应中被激活。病原体诱导型启动子在试图或成功感染的植物组织中的活性比未感染的植物组织更强。

[0037] 本领域技术人员已知病原体诱导型启动子。病原体诱导型启动子的实施例包括几丁质酶启动子 (Samac and Shah 1991)、葡聚糖酶启动子 (Henning et al.,1993) 和 prp-1 启动子 (Martini et al.,1993)。

[0038] 例如,通过 R 基因的病原体诱导型过表达,可避免组成型表达造成的诸如植株的矮小或畸形这样的负面结果。

[0039] 已表明合成的启动子本身即是特别合适的启动子。这些通过分子生物学技术产生的启动子在设计上是自然界没有发现的。一种这样的合成启动子是最低限启动子 (minimalistic promoter),它除了基本启动子 (minimal promoter) 外仅含有一个或多个选择的确定的顺式元件。这些顺式元件是诸如转录因子这样的 DNA 结合蛋白的结合位点,它们是从天然启动子分离获得的,来源于已分离的顺式元件或通过随机重组技术产生并通过合适的或适当的过程筛选。与天然启动子相比较,由于合成启动子没有复杂的结构,所以仅被几个外源或内源因素所激活,因此可进行更特异的调控。

[0040] 最小启动子或“核心”启动子是含基本转录因子复合物结合位点、并能精确起始 RNA 聚合酶 II 的转录的核酸序列。最小启动子的特征序列元件是 TATA 盒、起始子元件 (Inr)、“TFBII 识别元件” (BRE) 和“下游核心启动子元件” (DPE)。这些元件可单独存在或在最小启动子中联合存在。最小启动子或其序列元件可从遗传的植物或病毒基因中获得。

[0041] 在本发明框架中,已开发了新合成的启动子,它与实质上并不编码自激活抗性蛋白的已知抗性基因连接,可用于产生病原体抗性植物。这些启动子的类型有 nxS-mxD 最小启动子、nxW2-mxD 最小启动子和 nxGst1-mxD 最小启动子,这样合成的启动子包括一个或多个以下顺式元件组合:

[0042] a) nxS-mxD- 盒

[0043] b) nxW2-mxD- 盒

[0044] c) nxGst1-mxD- 盒

[0045] (其中 n 和 m 是指 1 到 10 的自然数)

[0046] 在 Rushton et al.,2002 中描述了包括其功能必需的核心序列的核酸序列为 SEQ ID NO :6 的 S 盒 (CAGCCACCAAAGAGGACCCAGAAT),核酸序列为 SEQ ID NO :7 的 W2 盒 (TTATTCAGCCATCAAAAGTTGACCAATAAT),核酸序列为 SEQ ID NO :8 的 D 盒 (TACAATTCAAACATTGTTCAAA CAAGGAACC) 及核酸序列为 SEQ ID NO :9 的 Gst 盒 (TTCTAGCCACCAGATTTGACCAAAC)。

[0047] 启动子可根据元件的选择性 (nxS-mxD、nxW2-mxD 或 nxGst1-mxD) 而与其自身的基础活性、病原体诱导性、激活动力学及启动子强度有所差异,例如如具有以下顺式元件组合的启动子所示:

[0048] 核酸序列为 SEQ ID NO :10 的 2xS-2xD,

[0049] 核酸序列为 SEQ ID NO :11 的 2xW2-2xD,及

[0050] 核酸序列为 SEQ ID NO :12 的 2xGst1-2xD。

[0051] 合成启动子的特征可根据基因表达的需要,通过改变顺式元件的数目 ($n, m = 1 \dots 10$) 来改变。通过对启动子 2xS-2xD 与变异体 2xS-4xD、4xS-2xD 和 4xS-4xD 的比较表明,与二聚体构建的启动子相比较,可使用四聚体来增强平均启动子强度。另外,在所有的测定间隔点上,病原体诱导性从二聚体-二聚体启动子 (2xS-2xD)、四聚体-二聚体及二聚体-四聚体启动子 (4xS-2xD、4xS-2xD),到四聚体-四聚体启动子 (4xS-4xD) 依次增强。与启动子强度和病原体诱导性的增强相平行,含四聚体的启动子的基础活性在所述实施例的情况下也增强了。该实施例表明重要的启动子特征也可通过顺式元件的数目来调控,并且可产生并鉴定最适启动子变异体用于不同技术中的翻译或转变。

[0052] 但也可用顺式元件组合来获得合适的结果,这些组合表示核酸序列 SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11 或 SEQ ID NO :12 的衍生物,并具有与顺式元件组合 SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11 或 SEQ ID NO :12 可比较的特征。

[0053] 例如,启动子 2xS-2xD 最小启动子和 2xW2-2xD 最小启动子与四个全长 R 基因 BvKWS3_133、BvKWS3_123、BvKWS3_135 和 BvKWS3_165 连接,并转化到甜菜中。用具有对甜菜而言最重要的有害真菌、可造成叶斑点病的甜菜褐斑病菌的转基因植物进行的真菌抗性实验,获得了每种可改善真菌抗性、但转基因植物在其生长或其它农事特征方面与非转基因植物没有差别的构建体。这些结果表明基本上可以用病原体诱导型启动子来实现细胞死亡引发的 R 基因的过表达,并由此具有改善的病害抗性,而且不对植株发育产生负面影响。选取具有最佳数目的顺式元件重复的最适启动子,使用它可进一步提高病害抗性。

[0054] 本发明进一步涉及用新核酸构建体转化的转基因植物,特别是甜菜植株、该植株的一部分以及种子或遗传材料,及新核酸构建体在产生转基因植物方面的用途。

[0055] 本发明将在下面通过附图和实施例进行更详尽的描述。

[0056] 本发明使用甜菜通过实施例方式来进行描述,可容易将其应用到其它分离到抗性基因的农事植物中。

[0057] 附图

[0058] 图 1 所示的是二元载体 pER-35Sluci 的图谱,它可用于甜菜叶中根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 诱导的 R 基因的瞬时表达。载体携来自北美萤火虫 (*Photinus pyralis*) 的、被内含子打断的、不能在根癌土壤杆菌中表达的荧光素酶基因。

[0059] 图 2 所示的是通过根癌土壤杆菌,R 基因 BvKWS3_133 的瞬时表达可在甜菜叶中引发细胞死亡。而瞬时表达构建体 pER-35Sluci 可在甜菜叶中产生强的报告基因活性,表达构建体 pER133-35Sluci 可引发细胞死亡,因此无法检测到报告基因活性。

[0060] 图 3 所示的是用于瞬时生物弹射击法转化甜菜叶的载体 pCaMV-2。全长的和缩短的 R 基因位于所述载体的双 35S 启动子控制下。

[0061] 图 4 所示的是通过生物弹射击法转化的 R 基因 BvKWS3_123、BvKWS3_133 和 BvKWS3_165 瞬时表达后在甜菜叶中引发细胞死亡。基因 BvKWS3_123、BvKWS3_133 和 BvKWS3_165 在双 35S 启动子 (d35S) 控制下,并与报告基因构建体 p70S-luc 共转化。在转化 20 小时后测定报告基因活性。与对照 (空载体 pCaMV-2 和 p70S-luc) 相比较,由于引发了超敏反应,因此报告基因活性是降低的。所示的是用每个构建体各自 9 个实验的 3 次独立实验重复的平均值。误差为标准偏差。

[0062] 图 5 所示的是与表达全长 R 基因 BvKWS3_165 相比较,表达 R 基因 BvKWS3_165 的 5' 末端区可引发增强的细胞死亡。在 d35S 启动子控制下的 N 末端区和全长 R 基因 (p70S-165_#175 和 p70S-BvKWS3_165) 与构建体 p70S-luc 通过生物弹射击法共转化到甜菜叶中。所示的是每个构建体各自 9-12 个实验的 3 次独立实验重复的平均值。

[0063] 图 6 所示的是与表达全长 R 基因 BvKWS3_135 相比较,表达 R 基因 BvKWS3_135 的 5' 末端区 135_#147 可引发增强的细胞死亡。在 d35S 启动子控制下的全长 R 基因和 N 末端区 135_#147 (p70S-BvKWS3_135 和 p70S-135_#147) 与构建体 p70S-luc 通过生物弹射击法共转化到甜菜叶中。所示的是每个构建体各自 9-12 个实验的 2 次独立实验重复的平均值。

[0064] 图 7 所示的是与表达全长 R 基因 Bv13033 相比较,表达 R 基因 Bv13033 的 5' 末端区 13033_#159 可引发增强的细胞死亡。在 d35S 启动子控制下的全长 R 基因和 N 末端区 13033_#159 (p70S-13033 和 p70S-13033_#159) 与构建体 p70S-luc 通过生物弹射击法共转化到甜菜叶中。所示的是每个构建体各自 9-12 个实验的 2 次独立实验重复的平均值。

[0065] 图 8 所示的是 R 基因 Bv12069 的表达启动细胞死亡。

[0066] 图 9 所示的是与 NBS 结构域 VHD 元件突变相比较,通过缩短 cDNA 克隆 135_#1475' 区的蛋白 BvKWS3_135 的自激活。

[0067] 图 10a)-c) 所示的是缩短的自激活蛋白 Bv12069、Bv13033_#159、BvKWS135_#147、BvKWS3_165_#175 和 StR3a-#1-155 彼此之间的氨基酸序列比较,及来自马铃薯 (RX-160) 和 StR1 (355-540) 的非自激活缩短的抗性蛋白的序列比较,以及与来自拟南芥 (AtAB028617)、豆 (PvulgarisJ71)、水稻 (OsativaAP003073)、大豆 (GmaxKR4) 和番茄 (番茄-12) 的 NBS-LRR 类的完整 R 蛋白的序列比较。高亮标出了共有序列。

[0068] 图 11 所示的是氨基酸 147-175 的缺失可显著降低 165_#175 蛋白的自激活活性。

[0069] 图 12 所示的是合成启动子 2xS-2xD 在甜菜褐斑病菌感染后在转基因甜菜中的激活。

[0070] 图 13 所示的是合成启动子 2xW₂-2xD 在甜菜褐斑病菌感染后在转基因甜菜中的激活。

[0071] 图 14 所示的是启动子 2xS-2xD、4xS-2xD、2xS-4xD 和 4xS-4xD 在甜菜褐斑病菌 (*Cercospora beticola*) 感染后在转基因甜菜中的报告基因活性的比较。

[0072] 图 15 和 16 所示的是具有合成启动子 2xS-2xD 的全长 R 基因 123、133、135、165 的组合。

[0073] 图 17 和 18 所示的是具有合成启动子 2xW₂-2xD 的全长 R 基因 123、133、135、165 的组合。

[0074] 图 19 所示的是与非转基因对照 3DC4156 相比较,转基因甜菜系 PR68-6 对有害真菌——甜菜褐斑病菌的抗性增加。

[0075] 图 20 所示的是与非转基因对照 3DC4156 相比较,转基因甜菜系 PR70-32 对有害真菌——甜菜褐斑病菌的抗性增加。

[0076] 图 21 和 22 所示的是具有合成启动子 2xS-2xD 和 2xW₂-2xD 的 R 基因 N 末端区 165_#176 和 12069 的组合。

[0077] 实施例

[0078] 对 BvKWS3 133 基因的过表达在甜菜叶中引发快速抗性反应的验证。

[0079] 通过根癌农杆菌的 BvKWS3_133 基因全长 cDNA 克隆的瞬时过表达可在甜菜叶中引发快速细胞死亡,但不形成可见的坏死。将 cDNA 克隆 BvKWS3_133 与 d35S 启动子连接,并插入到二元载体 pER-34Sluci (图 1) 中。得到的载体命名为 pER133-34Sluci。将 pER-34Sluci 和 pER133-34Sluci 转化到农杆菌 C58C1 (An1987) 中。在 50ml 含 100mg/ml 壮观霉素和 20 μ M 乙酰丁香酮的 LB 培养基将阳性农杆菌培养 4-5 小时使其瞬时表达。然后,离心细菌,将沉淀悬浮在含 10mM $MgCl_2$ 、10mM MES、100 μ M 乙酰丁香酮的溶液中,调整细菌浓度为 $OD_{600} = 0.1$ 。将细菌悬浮液放置 2-3 小时,然后用 2.5ml 皮下注射器通过 10 周龄甜菜叶的内侧将其注射到老甜菜的叶中。在 25°C 温箱中温育,温育后 1、2 和 3 天测定转化的叶中北美萤火虫荧光素酶报告基因的活性。另外,用荧光素酶检测系统 (Promega, Mannheim, Germany) 在 Sirius Luminometer (Berthold Detection System GmbH, Pforzheim, Germany) 上根据说明书测定荧光素酶的活。为了获得适于测量的酶,在每次测量间隔对两个叶片进行标注。对每个构建体在每个测量日收集 8 个测量点。将叶样品在加入海沙和 10 倍体积 (v/w) Passive Lysis Buffer (PBL) 的研钵中进行匀浆。提取液体上清,并分别用 10 μ l 未加工的提取液进行 Photinus 荧光素酶活性的测定。用对照构建体 pER-35Sluci 转化的甜菜叶在第 1 天的活性较小,在第 2 和 3 天的荧光素酶活性为 124,000、或 116,000 RLU/mg 叶组织。用构建体 pER-34Sluci 转化的甜菜叶的活性在 3 个测量点均大于接种 $MgCl_2$ 的叶 (图 2)。因此,cDNA 克隆 BvKWS3_133 的瞬时表达可在接种的甜菜叶中启动快速细胞死亡。

[0080] R 基因 BvKW3_123、BvKWS3_133 和 BvKWS3_165 的组成型表达可在甜菜叶中启动细胞死亡。

[0081] R 基因 BvKWS3_133 和具有如 SEQ ID No. 5 所述的核苷酸序列的 R 基因 BvKWS3_165 及 R 基因 BvKWS3_123 与载体 pCaMV-2 的双 35S 启动子连接 (图 3)。得到的载体命名为 p70S-BvKWS3_133、p70S-bvKWS3_165 和 p70S-BvKWS3-123。为了验证 R 基因的功能性,根据 Schmidt et al. (2004) 所述,通过生物弹射击法将报告基因载体 p70S-luc 与构建体 p70S-BvKWS3_133、p70S-bvKWS3_165 和 p70S-BvKWS3-123 在甜菜中瞬时表达。使用空载体 pCaMV-2 联合报告基因载体 P70S-luc 作为阳性对照。与 Schmidt, et al. (2004) 相反,摒弃了归一化载体的使用。用荧光素酶检测系统 (Promega, Mannheim, Germany) 在转化 20 小时后测定荧光素酶活性。转化实验重复 3 次,其中每次实验的每个构建体包括 9 个实验重复。3 次实验的平均值表明,与设为 100% 的阳性对照 (空载体) 的荧光素酶活性相比较,p70S-BvKWS3-133 的报告基因活性仅为 37.7%,p70S-BvKWS3_165 仅为 66%,p70S-BvKWS3-123 仅为 68.7% (图 4)。因此 d35S 启动子控制的 R 基因 BvKWS3_133、BvKWS3_165 和 BvKWS3_123 的强表达可启动细胞死亡,或在抑制共表达同时转化的报告基因载体的一部分转化细胞中启动超敏反。因此表明这 3 个 R 基因的强表达可导致细胞死亡,或在没有相应的无毒基因产物的情况下产生 HR。

[0082] 基因 BvKWS3_165 的 5' 区可比全长 cDNA 克隆 BvKWS3_165 启动更快的细胞死亡。

[0083] 从构建体 p70S-BvKWS3_165 中其核苷酸序列如 SEQ ID No. 5 所述的全长 cDNA 克隆 BvKWS3_165 开始,用 Pfu 聚合酶 (Stratagene) 和引物 S316 (CTCGAGAATTCGAGCTCCACCGCGG) 及 S318 (CTGGATCCTCACCTCCGTTCTTCATGTTGCTCTACC) 扩增基因 5' 区,同时在编码区引入终止密码子。扩增区对应于如 SEQ ID No. 1 所述的核苷酸序列,它编码 BvKWS3_165 1-175 的氨基酸序列 (图 10)。氨基酸序列仅含 BvKWS3_165 的 N 末端区,不含 NBS 和 LRR 结构域 (图

10)。用限制性酶 SacII 和 BamHI 切割 PCR 产物,并克隆到载体 pCaMV-2 中。得到的载体命名为 p70S-BvKWS3_#175。通过瞬时生物弹射击转化来定量检测构建体 P70S-BvKWS3_165 和 p70S-165_#175 在甜菜叶中启动细胞死亡的能力。为了该目的,将每个载体分别与报告基因载体 p70S-luc 共转化。空载体 pCaMV-2 与报告基因载体 p-70S-luc 共同使用作为阳性对照。与空载体 (pCaMV-2) 的转化相比较, p70S-BvKWS3_165 的转化可产生 65% 可测的报告基因活性,而 p70S-165_#175 的转化仅产生 38% 可测的报告基因活性 (图 5)。该结果表明 165_#175N 末端 175 个氨基酸的排他表达可在转化的甜菜叶中启动比使用 1066 个氨基酸长的全长蛋白 BvKWS3_165 更强烈的细胞死亡。165_#175 的表达比 BvKWS3_165 的表达可使更多的转化叶细胞死亡。该差异的原因是 R 蛋白通过缩短 (缩减) N 末端产生了新的、更强烈的自激活方式。

[0084] 基因 BvKWS3 135 5' 区比全长 cDNA 克隆 BvKWS3 135 启动更快的细胞死亡

[0085] 从构建体 p70S-BvKWS3_135 中全长 cDNA 克隆 BvKWS3_135 开始,用 Pfu 聚合酶 (Stratagene) 和引物 S316 (CTCGAGAATTCGAGCTCCACCGCGG) 及 S330 (CTGGATCCTCAGGGAGAACTCCATCTGGGTGGTCC) 扩增基因 5' 区,同时在编码区引入终止密码子。扩增区对应于如 SEQ ID No. 2 所述的核苷酸序列,它编码 BvKWS3_135 1-147 的氨基酸序列 (图 10)。氨基酸序列仅含 BvKWS3_135 的 N 末端区,不含 NBS 和 LRR 结构域,或来自这些结构域的元素。用限制性酶 SacII 和 BamHI 切割 PCR 产物,并克隆到载体 pCaMV-2 中。得到的载体命名为 p70S-135_#147。通过瞬时生物弹射击转化来定量检测构建体 p70S-BvKWS3_135 和 p70S-135_#147 在甜菜叶中启动细胞死亡的能力。为了该目的,将每个载体分别与报告基因载体 p70S-luc 共转化。空载体 pCaMV-2 与报告基因载体 p-70S-luc 共同使用作为阳性对照。与空载体 (pCaMV-2) 的转化相比较, p70S-BvKWS3_135 的转化可产生 74.5% 可测的报告基因活性,而 p70S-135_#147 的转化仅产生 58% 可测的报告基因活性 (图 6)。该结果表明全长克隆 BvKWS3_135 的表达可在转化的组织中启动细胞死亡。但 135_#147N 末端 147 个氨基酸的排他表达可在转化的甜菜叶中启动比使用 844 个氨基酸长的蛋白 BvKWS3_135 更强烈的细胞死亡。135_#147 的表达比 BvKWS3_135 的表达可使更多的转化叶细胞死亡。该差异的原因是 R 蛋白通过缩减或缩短 N 末端产生自了新的、更强烈的激活方式。

[0086] 基因 Bv13033 5' 区比全长 cDNA 克隆 Bv13033 启动更快的细胞死亡

[0087] 从构建体 p70S-Bv13033 中全长 cDNA 克隆 Bv13033 开始,用 Pfu 聚合酶 (Stratagene) 和引物 S316 (CTCGAGAATTCGAGCTCCACCGCGG) 及 S333 (CTGGATCCTCAAGAACAAGTCTCAGGCCTTCTGTT) 扩增基因 5' 区,同时在编码区引入终止密码子。扩增区对应于如 SEQ ID No. 3 所述的核苷酸序列,它编码 Bv13033 1-159 的氨基酸序列 (图 10)。氨基酸序列仅含 Bv13033 的 N 末端区,不含 NBS 和 LRR 结构域,或来自这些结构域的元素。用限制性酶 SacII 和 BamHI 切割 PCR 产物,并克隆到载体 pCaMV-2 中。得到的载体命名为 p70S-13033_#159。通过瞬时生物弹射击转化来定量检测构建体 p70S-13033 和 p70S-13033_#159 在甜菜叶中启动细胞死亡的能力。为了该目的,将每个载体分别与报告基因载体 p70S-luc 共转化。空载体 pCaMV-2 作为阳性对照。与空载体 (pCaMV-2) 的转化相比较, p70S-13033 的转化可产生 95% 可测的报告基因活性,而 p70S-165_#175 的转化仅产生 68% 可测的报告基因活性 (图 7)。该结果表明全长克隆 BV13033 的表达仅可在转化的组织中启动较弱的细胞死亡。另一方面,13033_#159N 末端 159 个氨基酸的排他表达可在转化的甜菜叶中引发强烈的细

胞死亡。该差异的原因是 R 蛋白通过缩短 N 末端产生了新的更强烈的自激活方式。

[0088] 通过 Bv12069 5' 区在甜菜叶中启动细胞死亡

[0089] 具有如 SEQ ID No. 4 所述的核苷酸序列的 R 基因 Bv12069 编码 R 蛋白 166 个氨基酸长的 N 末端。蛋白 Bv12069 不含 NBS 和 LRR 结构域, 但与自激活 R 蛋白 165_#175、135_#147、13033_#159 的 175、147 和 159 个氨基酸长的 N 末端基因表现出不同的同源性 (图 10)。cDNA 克隆与载体 pCaMV-2 的双 35S 启动子连接 (图 3), 形成载体 p70S-12069。为了检测基因 Bv12069 的功能性, 将构建体 p70S-12069 与报告基因载体 p70S-luc 通过生物弹射击转化, 在甜菜叶中瞬时表达。3 次独立实验中测定的用 p70S-12069 和 p70S-luc 转化的叶中的报告基因活性是阳性对照的活性的 51% (空载体 pCaMV-2 和 p70S-luc) (图 8)。因此 166 个氨基酸长的蛋白 Bv12069 的表达可在甜菜细胞中启动细胞死亡。

[0090] 缩短基因 BvKWS3 135 但不突变 MHD 结构域可产生自激活 R 蛋白

[0091] 将通过把 NBS-LRR 类型的 R 蛋白缩减为无 NBS 和 LRR 的 N 末端的自激活的发明机制, 与 MHD 元件突变的自激活方法进行比较。马铃薯 Rx 基因和亚麻 L5 基因的 MHD 元件的突变可导致所用基因的自激活 (Bendahmane et al., 2002; Howes et al., 2005)。cDNA 克隆 BvKWS3_135 对于 MHD 元件等价于 VHD 元件, 后者是常见的除 MHD 元件之外也是 R 基因的元件 (Howles et al., 2005)。如 Bendahmane et al. (2002) 所述, 将相应的突变引入到全长克隆 BvKWS3_135。为了该目的, 将基因 BvKWS3_135 的 VHD 元件中的氨基酸天冬氨酸用氨基酸缬氨酸来替代。得到的基因命名为 BVKW3_135_D480V。通过根癌土壤杆菌起始的瞬时过表达来检测甜菜叶中基因 135_#147、BvKWS3_135_D480V 和未修饰的基因 BvKWS3_135 的有效性。为此将 cDNA 克隆 BvKWS3_135 与 d35S 启动子连在一起并插入到二元载体 pER-34Sluci 中。得到的载体命名为 pER135-34Sluci。同样地, 对缩短的具有如 SEQID No. 2 所述的核苷酸序列的 eDNA 克隆 135_#147 以及突变的 cDNA 克隆 BvKWS3_135_D480V 进行加工。得到的载体命名为 pER135_#147-35Sluci 和 pER135_D480V-35Sluci。将载体转化到土壤杆菌菌株或所述的 C58C1 细胞系中, 并与对照 pER-35Sluci 同时注射到甜菜叶中。接种后的 1、2 和 3 天在转化叶片中测定北美萤火虫荧光素酶报告基因的活性。用对照构建体 pER-35Sluci 转化的甜菜叶在第 1 天的活性较小, 在第 2 和 3 天的荧光素酶活性为 299, 000 和 433, 000RLU/mg 叶组织。用构建体 pER135-35Sluci 转化的甜菜叶的荧光素酶活性在第 2 天和第 3 天为 190, 000 和 245, 000RLU/mg 叶组织, 因此与阳性对照 pER-35Sluci 相比较, 表现出可测定的细胞死亡。构建体 pER_135_D480V-35Sluci 的报告基因活性在第 2 天和第 3 天测定为 188, 000 和 206, 000RLU/mg (图 9)。因此, 在基因 BvKWS3_135 中引入 MHD 突变不产生或产生很少可测定的自激活。根据本过程缩短的 R 基因 135_#147 在第 2 天和第 3 天的报告基因活性为 90, 000 和 63, 000RLU/mg (图 9), 因此比构建体 pER135-35Sluci 和 pER_135_D480V-35Sluci 引发更强的细胞死亡和自激活。

[0092] 在 BvKWS3 165、BvKWS3 135、Bv13033 和 Bv12069 及 StR3a R 蛋白的 N 末端中通用氨基酸元件的鉴定

[0093] 将 175、147、159 和 166 个氨基酸长的 R 蛋白 BvKWS3_165、BvKWS3_135、Bv13033 和 Bv12069 的 N 末端与 155 个氨基酸长的马铃薯 R3a 基因 (Huang et al., 2005) 的 N 末端进行同源性比较, 以鉴定通用序列元件。通过比较在自激活 R 蛋白的 N 末端鉴定出多个共有序列。在图 10a) 中高亮标出通用序列元件的共有序列。

[0094] 一个共有序列对应于如 SEQ ID NO :13 :AVLXDAEXKQXXXXLXXWLXD LKDXVYDXDD ILDE 所述的氨基酸序列。另一个共有序列对应于如 SEQ ID NO :14 :IXEIXXKLDD L 所述的氨基酸序列。

[0095] 此处字母 X 表示任何氨基酸。

[0096] 这两个所述形式的共有序列仅包含在这种其表达会导致自激活的 CC-NBS-LRR R 蛋白的 N 末端中。因此, RX 基因的 160 个氨基酸长的 CC 结构域不能引发细胞死亡或过敏反应 (Bendahmane et al., 2002)。与全长 R 基因 BvKWS3_133_e08 相比较, 甜菜 R 基因 BvKWS3_133_e08177 个氨基酸长的 N 末端和马铃薯 R1 基因 540 个氨基酸长的 N 末端 (Ballvora et al., 2002) 的瞬时表达没有引发扩增, 对 R1 基因而言, 没有细胞死亡 (数据未显示)。自激活蛋白 BvKWS3_165_#176、BvKWS3_135_#147、Bv13033_#159、Bv12069 和 StR3a-#1-155 N 末端与 Rx-、StR1- 和 BvKWS3_133_#177 蛋白 CC 结构域氨基酸序列的氨基酸比较表明, 在非激活 N 末端不含上述共有序列 (图 10b)。特别是序列元件 DAE 对鉴定其 N 末端是自激活的 R 蛋白是非常重要的。在共有序列中的序列元件 DAE 的协助下, 可在多个植物物种中找到合适的自激活 R 基因, 如图 10c 所示, 例如拟南芥 (AtAB028617)、豆 (PvulgarisJ71)、水稻 (osativaAp003073)、大豆 (GmaxKR4) 和番茄 (Tomato-I2)。

[0097] 氨基酸序列 147-175 对 R 蛋白 165_#175 的自激活是重要的

[0098] 为了鉴定 165_#175 蛋白中对 NBS-LRR 蛋白 N 末端自激活重要的氨基酸部分, 将 cDNA 克隆 165_#175 的编码区缩短。cDNA 克隆 165_#93 和 165_#146 编码 165_#175 蛋白的 1-93 或 1-146 氨基酸。构建体 p70S_165_#93、p70S_165_#146 和 p70S_165_#175 的瞬时生物弹射击实验表明只有 165_#175 蛋白可启动强烈的细胞死亡, 而 165_#93 和 165_#146 不能 (图 11)。因此, 146-175 序列区域对 NBS-LRR 蛋白自激活是必需的。在该区域含有所有被检测蛋白中都保守的序列元件 (图 10a)。

[0099] 合成的病原体诱导型启动子 2xS-2xD 和 2xW2-2xD 通过真菌侵染而产生的快速激活

[0100] 对完整或部分抗性基因的病原体诱导的过表达而言, 特别合适的是 nxS-mxD、nxW2-mxD 和 nxGst1-mxD 类的合成启动子, 其中 $n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$, $m = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ 。例如, 将如 SEQ ID NO. 10 所述的 2xS-2xD 类启动子、如 SEQ ID NO. 11 所述的 2xW2-2xD 类启动子及如 SEQ ID NO. 12 所述的 2xGst1-2xD 类启动子与来自北美萤火虫的荧光素酶基因连接, 转化到甜菜中, 然后分析对真菌侵染的反应。

[0101] 对植物转化而言, 可使用二元载体 2xS-2xD-luc-kan、2xW2-2xD-luc-kan 和 2xGst1-2xD-luc-kan。将二元载体通过直接 DNA 转化过程用定居质粒 pGV2260 转化到根癌土壤杆菌 C58C1 中 (An, 1987)。用抗生素卡那霉素 (50mg/l) 筛选重组根癌土壤杆菌克隆。

[0102] 根据 Lindsey et al. (1991) 用抗生素卡那霉素进行甜菜的转化。通过 PCR 检测植物的转基因性。使用引物 GTGGAGAGGCTATTCGGTA 和 CCACCATGATATTCGGCAAG 可从 nptII 基因扩增 533 个碱基对长的 DNA 片段。用 10ng 基因组 DNA 进行 PCR, 引物浓度为 0.2 μ M, 退火温度为 55 $^{\circ}$ C, 在 Mutli-Cycler PTC-200 (MJ Reasearch, Watertown, USA) 进行扩增。

[0103] 为了分析启动子的病原体诱导性, 将转基因甜菜在体外条件下用甜菜叶斑点诱导者甜菜褐斑病菌进行感染。分别将 4 个转基因系的植株浸泡在甜菜褐斑病菌菌丝体片段的悬浮液 (400,000 片段/ml) 中, 另外 4 个植株浸泡在稀释的营养液中作为对照。然后将感

染植株和对照植株在培养箱中 25℃光照温育 16 小时。在接种后 1、2、3、4 和 6-7 天除去感染的和未感染的叶材料,用荧光素酶检测系统 (Promega, Mannheim, Germany) 如上述测定荧光素酶报告基因的活性。

[0104] 2xS-2xD 和 2xW2-2xD 启动子在感染早期均具有快速强烈的病原体诱导性,但在基础活性和启动子强度上有所不同 (图 12-13)。与未感染植株相比较,2xS-2xD 启动子可在转基因系 PR39/11、PR39/48 和 PR39/49 中被快速诱导,在接种后第 1 天已达到 11-59 倍,在第 2 天达到 21-384 倍 (图 12)。而第 1 天以真菌菌丝在表皮的生长为特征,在第 2 天,真菌菌丝通过气孔穿入叶片,进入叶组织。在第 7 天感染的后期,可通过可见坏死的发展测定启动子被诱导了 113-792 倍。未感染植株以报告基因活性测定的 2xS-2xD 启动子的基础活性很低,仅为非转基因植株的荧光素酶活性的 1-10 倍。

[0105] 2xW2-2xD 启动子的激活有时比 2xS-2xD 启动子慢。在感染第 1 天,2xW2-2xD 启动子仅具有 2-11 倍病原体诱导活性,在感染第 2 天为 5-56 倍。在第 7 天产生坏死,达到最大的 318-672 倍病原体诱导性 (13)。与非转基因植物相比较具有 10-50 倍报告基因活性的 2xW2-2-D 启动子的基础活性比 2xS-2xD 启动子高。2xW2-2xD 启动子显著超过了 2xS-2xD 启动子约 10 倍以上的启动子强度。

[0106] 通过改变顺式元件数目来优化启动子特性

[0107] 根据基因表达的需要,可通过改变顺式元件的数目来调控和优化具有 $n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ 及 $m = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ 的 $nxS-mxD$ 、 $nxW2-mxD$ 和 $nxGst1-mxD$ 类型合成启动子的特性。以 $nxS-mxD$ 型启动子为例进行说明。除了二元载体 2xS-2xD-luc-kan 外,构建二元载体 4xS-2xD-luc-kan、2xS-4xD-luc-kan 和 4xS-4xD-luc-kan,并转化到甜菜中。用甜菜褐斑病菌如上所述感染植物,并在真菌接种后每日测定报告基因的活性。测定来自 13 个独立的 2xS-2xD-luc 系、14 个独立的 4xS-2xD-luc 系、15 个独立的 2xS-4xD-luc 系及 15 个独立的 4xS-4xD-luc 系的实验结果,并比较其启动子强度、病原体诱导性和基础活性的测定值。

[0108] 将 2xS-2xD 启动子与变异体 2xS-4xD、4xS-2xD 和 4xS-4xD 进行比较,结果表明,与二聚体启动子构建体相比较,使用四聚体可增加平均启动子的强度 (图 14)。另外,在所有测量的时间间隔,二聚体-二聚体启动子 (2xS-2xD) 的病原体诱导性随着四聚体-二聚体和二聚体-四聚体启动子 (4xS-2xD、4xS-2xD) 升高至四聚体-四聚体启动子 (4xS-4xD) (表 1)。

[0109]

启动子 (独立转化子的数目)	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
2xS-2xD (13 系)	1.9	3.6	27	59
4xS-2xD (14 系)	3.1	4.8	52	135

2xS-4xD (15 系)	1.4	9.2	54	87
4xS-4xD (15 系)	2.9	9.8	90	93

[0110] 表 1:启动子 2xS-2xD、4xS-2xD、2xS-4xD 和 4xS-4xD 在感染甜菜褐斑病菌后的转基因甜菜中的病原体诱导性。

[0111] 所示的是每个启动子构建体在接种 1-4 天 13-15 个独立转化子(系)的病原体诱导性的平均值。

[0112] 随着启动子强度和病原体诱导性的增加,可导致含四聚体的启动子的基础活性也增加(表 2)。

[0113]

启动子 (独立转化子的数目)	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
2xS-2xD (13 系)	4.7	5.5	5.2	2.6
4xS-2xD (14 系)	14.2	21	7.8	11
2xS-4xD (15 系)	24.6	13.3	7	22.3
4xS4xD (15 系)	35.5	20.3	6.3	20

[0114] 表 2:启动子 2xS-2xD、4xS-2xD、2xS-4xD 和 4xS-4xD 在转基因甜菜叶中的基础活性。

[0115] 所示的是每个启动子构建体 13-15 个独立转化子(系)的基础活性的平均值,是在 4 天感染实验中作为未感染对照来测定的。基础活性提供了与非转基因植物的非特异背景活性相比较而言的转基因植物的报告基因活性的行为或关系。

[0116] 该实施例表明,对诸如启动子强度、诱导性和基础活性等概念重要的启动子特征可通过顺式元件的数目来调控,因此可构建合适的启动子病原体用于各种技术转换。在实验性实施例中,与病原体的诱导性相关的病原体诱导性启动子的顺式元件的最佳数目大于如 Rushton et al., 2002 所述的二聚体溶液。

[0117] 通过病原体诱导的抗性基因的转化来产生真菌抗性

[0118] 为了增加甜菜的真菌抗性,将启动子 2xS-2xD 或 2xW₂-2xD 分别与四个 R 基因 BvKWS3_123、BvKWS3_133、BvKWS3_135 和 BvKWS3_165 连接,并转化到甜菜中。然后用 SacI 切割 13,959 或 13,969kb 长的二元载体 2xS-2xD-luc-kan 和 2xW₂-2xD-luc-kan,并用 T4-DNA 聚合酶处理来填充切割位点。然后将载体用 XhoI 重新切割,电泳分离,使 12,284 或

12, 294kb 长的载体与 1, 675kb 长的荧光素酶基因分开并分离。

[0119] 从载体 p70S-BvKWS3_123、p70S-BvKWS3_133、p70S-BvKWS3_135 和 p70S-BvKWS3_165 中分离 ZR 抗性基因。为此, 首先用 NotI 使载体线性化, 切割位点用 Klenow 处理而填充。然后用 XhoI 切割载体, 并分离 R 基因。得到的载体命名为 2xS-2xD-BvKWS3_123、2xS-2xD-BvKWS3_133、2xS-2xD-BvKWS3_135 和 2xS-2xD-BvKWS3_165, 或 2xW₂-2xD-BvKWS3_123、2xW₂-2xD-BvKWS3_133、2xW₂-2xD-BvKWS3_135 和 2xW₂-2xD-BvKWS3_165 (图 15-18)。用二元载体如上所述产生转基因甜菜。

[0120] 通过对植物病原体真菌——甜菜褐斑病菌的抗性实验来鉴定抗真菌的甜菜。

[0121] 在真菌抗性实验中可观察到增强的真菌抗性, 该实验如下进行描述, 作为甜菜对甜菜褐斑病菌的抗性检测的示例。

[0122] 对用叶斑点诱导物甜菜褐斑病菌所感染甜菜而言, 除了转基因植株外, 也使用基因型为 3DC4156 的甜菜在温室中进行转化。在接种蔬菜汁前 2 周, 用侵染性甜菜褐斑病菌分离株 Ahlburg 涂布平板 (40% Albani 蔬菜汁), 并在 25°C 温育。在接种前, 将长有真菌的琼脂用刮铲 (objectcarrier) 和水刮下来。通过细胞计数器测定菌丝体片段的浓度。用水稀释调整接种密度为 20, 000 片段 /ml。将 10-12 周龄的植株反向浸泡在 5L 含接种物的玻璃烧杯中进行感染。对每个待测的系, 将 30 个植株进行接种, 并将植株在温室中随机排列。

[0123] 接种后将植株在 28°C, 95% 湿度的温室中温育 4 天。第 4 天后, 将湿度降低为 60-70%。接种 2、3 和 4 周后, 用 Kleinwanzlebener Saatucht (KWS) 等级方案 (1970) (1 = 健康叶, 9 = 100% 损坏的叶) 目测叶落。与对照相比较, 用构建体 2xS-2xD-BvKWS3_123、2xS-2xD-BvKWS3_133、2xS-2xD-BvKWS3_165、2xW₂-2xD-BvKWS3_123、2xW₂-2xD-BvKWS3_133、2xW₂-2xD-BvKWS3_135 或 2xW₂-2xD-BvKWS3_165 转化的转基因系具有增强的真菌抗性 (表 3)。

[0124]

对照 (非转基因) T3 ¹ AUDPC ²	转基因系 谱系名称	T3 ¹	AUDPC ²	构建体
6.0 220	PR68-6	4.6	169	2xS-2xD-BvKWS3-133
6.8 193	PR74-73	6.1	157	2xS-2xD-BvKWS3-123
4.1 167	PR75-8	2.8	132	2xS-2xD-BvKWS3-165
6.0 220	PR69-15	5.3	177	2xW ₂ -2xD-BvKWS3-133
7.0 226	PR70-32	5.5	182	2xW ₂ -2xD-BvKWS3-123
6.8 193	PR7742	5.6	155	2xW ₂ -2xD-BvKWS3-135
6.8 229	PR7141	5.6	182	2xW ₂ -2xD-BvKWS3-165

[0125] 表 3:对植物病原体真菌——甜菜褐斑病菌抗性增强的转基因甜菜。

[0126] ¹ 抗性实验中第 3 个和最后一个等级的值 (1 = 健康, 9 = 100% 损坏的叶表面)。

[0127] ² 在 3 个等级时间段 (T1-T3) 测定的 AUDPC (疾病进程曲线下的面积) 值。AUDPC 将多个等级时间点的侵染强度的进程包括在单个值中。

[0128] 转化子 PR68-6 和 PR70-32 的 3 个等级时间段的侵染时间进程分析表明, 在实验持续时间内, 对照和转基因系的侵染进程的差异增加 (图 19 和 20)。这些结果表明在病原体特异启动子的协助下, 甜菜的不同 R 基因的诱导型表达可导致对真菌抗性增加。

[0129] 通过转化在病原体应答启动子控制下的 R 基因 N 末端区来产生真菌抗性植株。

[0130] 为了产生真菌抗性植株, 使用 R 基因 N 末端区, 将缩减或缩短的 R 基因 13033_#159、135_#147、165_#175 和 Bv12069 与启动子 2xS2xD 和 2xW2-2xD 连接, 并转化到甜菜中。

[0131] 为此, 用 SacI 切割 13, 959 或 13, 969kb 长的二元载体 2xS2xD-luc-kan 和 2xW2-2xD-luc-kan, 并用 T4 DNA 聚合酶填充切割位点。然后, 用 XhoI 进一步切割载体, 凝胶电泳分离, 使 12, 284 或 12, 294kb 长的载体与 1, 675 长的荧光素酶基因分开。

[0132] 从载体 p70S-12069、p70S-13033_#159、p70S-135_#147 和 p70S-165_#175 中分离缩短的 R 基因。首先将载体用 XbaI 线性化, DNA 末端用 Klenow 处理填充, 用 XhoI 进一步切割载体。然后将分离的 R 基因片段克隆到制备的二元载体中。得到的载体命名为 2xS-2xD12069、2xS-2xD-13033_#159、2xS-2xD-135_#147、2xS-2xD165_#175 或 2xW2-2xD12069、2xW2-2xD-13033_#159、2xW2-2xD135_#147、2xW2-2xD-165_#175 (图 21-22)。将二元载体如上所述转化到甜菜中, 并通过甜菜褐斑病菌抗性实验鉴定真菌抗性植株。

[0133] 参考文献

[0134] Altschul, S.F. et al. (1990). Basic Local Alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215 :403-410

[0135] An, G. (1987). Binary Ti vectors for plant transformation and promoter analysis. *Methods Enzymol.* 153, 292-305.

[0136] Bairoch et al., (1996) The PROSITE database, its status in 1995. *Nucleic Acids Res* 24 :189-96

[0137] Ballavora A., Ercolana M R., Weiss J., Meksem K., Bormann C. A. I., Oberhagemann P., Salamini F., Gebhardt C. (2002). The R1 gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. *Plant J.* 30 (3) :361-71.

[0138] Bendahmane A., Farnham G., Moffett P., and Baulcombe D. C. (2002). Constitutive gain-of-function mutants in a nucleotide binding site-leucine rich repeat protein encoded at the Rx locus of potato. *Plant J.* Oct ;32 (2) :195-204.

[0139] Frost D., Way H., Howles P., Luck J., Manners J., Hardham A., Finnegan J., and Ellis J. (2004). Tobacco transgenic for the flax rust resistance gene L expresses allele-specific activation of defense responses. *Mol Plant Microbe Interact.* 17 (2) :224-32.

- [0140] Hennig, J., Dewey, R. E., Cutt, J. R., and Klessig, D. F. (1993), Pathogen, salicylic acid and developmental dependent expression of a beta-1,3-glucanase/GUS gene fusion in transgenic tobacco plants. *Plant J.* 4(3) :481-93.
- [0141] Howles P., Lawrence G., Finnegan J., McFadden H., Ayliffe M., Dodds D., and Ellis J. (2005). Autoactive Alleles of the Flax L6 Rust Resistance Gene Induce Non-Race-Specific Rust Resistance Associated with the Hypersensitive Response. *Mol Plant Microbe Interact.* 18(6) :570-582.
- [0142] Huang S., van der Vossen E. A., Kuang H., Vlesshouwers V. G., Zhang N., Borm, T. J., van Eck H. J., Baker B., Jacobsen E., and Visser R. G. (2005). Comparative genomics enabled the isolation of the R3a late blight resistance gene in potato. *Plant J.* 42(2) :251-61.
- [0143] Lindsey, K., Gallois, P., and Eady, C. (1991). Regeneration and transformation of sugarbeet by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Tissue Culture Manual B7* :1-13; Kluwer Academic Publishers.
- [0144] Lupas, A., Van Dyke M., and Stock J. (1991) Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* 252 :1162-4.
- [0145] Martir, G. B., Bogdanove, A. J., and Sessa, G. (2003). Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54 :23-61.
- [0146] Martini, N., Egen, M., Rüntz, I., and Strittmatter, G. (1993). Promoter sequences of a potato pathogenesis-related gene mediate transcriptional activation selectively upon fungal infection. *Mol Gen Genet* 236 :179-186.
- [0147] Oldroyd, G. E. D., and Staskawicz, B. J. (1998). Genetically engineered broad-spectrum disease resistance in tomato, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(17) : 10300-10305
- Rushton P. J., Reinstadler A., Lipka V., Lippok B., Somssich I. E. (2002). Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. *Plant Cell* 14(4) :749-62.
- [0148] Samac, D. A. and Shah, D. M. (1991). Developmental and Pathogen-Induced Activation of the Arabidopsis Acidic Chitinase Promoter. *Plant Cell.* 3(10) : 1063-1072.
- [0149] Schmidt K., Heberle B., Kurrasch J., Nehls R., and Stahl D. J. (2004). Suppression of phenylalanine ammonia lyase expression in sugar beet by the fungal pathogen *Cercospora beticola* is mediated at the core promoter of the gene. *Plant Mol. Biol.* , 55 :835-852.
- [0150] Sonnhammer, E. L., Eddy, S. R., and Durbin, R. D. (1997) Pfam : A comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins* 28 :405-20.
- [0151] Tang X., Xie M., Kim Y. J., Zhou J., Klessig D. F., Martin G. B. (1999). Overexpression of Pto activates defense responses and confers broad resistance. *Plant Cell* 11(1) :15-29.

[0152] Tian Y., Fan L., Thureau T., Jung C., and Cai D. (2004). The absence of TIR-typoresistance gene analogues in the sugar beet (*Beta vulgaris* L.) genome. *J. Mol. Evol.* 58(1) :40-53.

[0153] Traut, T.W. (1994). The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide binding sites. *Eur. J. Biochem.* 222 :9-19.

[0001]

序列表

- <110> KWS SAAT AG
- <120> 自激活抗性蛋白
- <130> KWS SAAT AG
- <160> 16
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 660
- <212> DNA
- <213> Beta vulgaris (甜菜)
- <400> 1
- gaattcgagc tccaccgegg gattctaata cgactcacta tagggcaage agtggatca 60
- acgcagagta cgcggrgatt catactctac ttccatactt tgtaaaaaca aaaaagata 120
- aaaatggtga taggcggaga gatttttcta tcagcgttcc tccaagtgc ctttgaaaag 180
- cttgcacag gagggataag tctattccta aaaagagaaa aaggaatagg acctaaagtt 240
- attcaaagat ggaacaaaaa attgagatta atagaggcgg ttttaagtga cgccgagcaa 300
- aagcagtttc acaacaatgc cgtcaaattg tggettogag atettcaaga gttcgcgtac 360
- gatttagagg acatcttaga cgaatttgat acagatgctc gacttaagga gttcaatgat 420
- cagcctcage cacagccaca ggaacatcaa cccaaatctt cttgttctcc tttcaataag 480
- gtacaaagct gtctttcttg tggtttccca actttaaata agaaaactac aaagtattca 540
- actagcattg aagagatgag cactcgcttg gaagatcttc tggaccaagt aaggtctttg 600
- gctctctcaa cgcagataca ctcaagggtg gagcaacatg aagaacggag gtgaggatcc 660
- <210> 2
- <211> 604
- <212> DNA

[0002]

<213> Beta vulgaris (甜菜)	
<400> 2	
gaattcgagc tccaccgegg gattctaata cgaactacta tagggcaagc agtggtatca	60
acgcagagta cgcggggaat ttgaagtcac catcaacctc ttatcatcat ccaactccaa	120
gattctctca tcaactgacag ttctggagta gaatatggcg gacgcagtg tcaactgtgt	180
tttgaaaaa cttttcaatg tecttgttca ggagggtggt gttttacttg gtttcaaaga	240
tcggtttaag aagctacaaa atgatctcaa atacatgcaa agcttcttta aagacgcoga	300
gaggetcaaa aggaaagatg agtctctaaa atgcaactctg gcgcacatgc gtgagctggt	360
atatgaagct gaagacatac ttgcagattg ccagcttttg tcaaatagtt ctggaaaact	420
tcttgaagac tattctecta caaaggttcc agccaaatat caaatgggga aaagaattgg	480
tgaaatcaat gaaaagatca atagcattaa aaataacatc tcagcttttc ttgggcctct	540
tcaacctgtc catggtaatg tagaagaaga gggaccaccc agatggagtt ctccctgagg	600
atcc	604
<210> 3	
<211> 580	
<212> DNA	
<213> Beta vulgaris (甜菜)	
<400> 3	
gaattcgagc tccaccgegg acgcgtgggc agcagccaaa cacacacttt ctctctgat	60
catcaatcat cattatcacc tccaaaacca aaaatggaat tcataagcac aacagtctct	120
atcgctgaaa aactgaatac tgcaactgcag ttatgggagt tcaaagacaa gctctttagt	180
aacttcagct acgaaaccga acttgaggat ctccaacgca ccgtcagttc cataactgag	240
gcgctacatg tagcagagac caagctggag ctctccgatg aactacaacg tcaaatcgag	300
gagetcaagg ataccatctt tgaagcggat gatctactgg atgagcttgt cactctttct	360

[0003]

caccagcagc gggttgtaga tgccgatggt agtctcctag ataaagtaag acacttcttc	420
tctagttcca acccaatctg tgtttcttac tggatgtctc gggggagtaa ggatatcaag	480
aagaaattag atgatattgc taacaataat cagtttagct tagagcttga tcatgagcct	540
atcaggaaca gaaggcctga gactigtctt tgaggatcct	580
<210> 4	
<211> 2047	
<212> DNA	
<213> Beta vulgaris (甜菜)	
<400> 4	
agtttgtaga aaaaagcagg ctggtaccgg tccggaattc ccgggatata gtcgaccac	60
gcgtccgctt caacaacca tctcttcaat aatttgtaa aaccacaaat catgattaag	120
taatttctgc accacttttg cctctcage cccttctaaa tcttccccc tgaagtgate	180
aataatcatt agaatgtctg aagcactact gtgggetgtc acaaaaacaa cactgcaca	240
cattgctact ttigtctggtg atcttacctg cagttatgct acacaaggca ttttagcage	300
tcaagggtgc cgaaacgacc tcaaaaagat cgagaacaag ctgattgcta ttccgctgt	360
tctgcaagat gcagaaagta agcaatatga tagcaggct gtcaagattt ggcgaaaga	420
tgtcaaaaat gttgtgtatg atatagatga cctcttggat gaagttcaca ctgatctgtt	480
acgaaagaga atcaacaaaa gccatctgct tcgacaaatc aggtactatc tttcctctc	540
gaatccaatt ctgagtaatt tttattggag tgataagatt agagacctg ttcaaagatt	600
tgatgacatt gctgctaata gacgagatct tggattggat ggtcatgac caattgaagt	660
atacaacatt gagaggaatc ctttagatgc ataatcatat gtaagaaat cagaaattat	720
tggtagagat gaagctaggt ccgaaataat tagacgctta actagtagta ctagtgttg	780
agatgctagt aggttgggtg tgcctccgat agttgggttt ggcgggattg ggaaaacagc	840
attggcaaag ctgtttttta atgatgagt gggttctagt aactttgata ttaagttgtg	900

[0004]

ggcatgtgtc tctgaaaaat ttgatctgca gaagactaca gaagaaattt tgaattctgt	960
aagtaatgaa accactgcaa acctcaacat gagacagttg catgaaaaac tccgtgagat	1020
attggatgat cggaagcatt tccttgtgct ggacaatgtg tggatcgagg acatcaaagt	1080
gcactccaca ggaagcattt ccttgtactg gcatttagag agggatgaaga aacaagatac	1140
ccaaagcttg ctacaatcgg gaaaagcatt gttgaaaatt gtggcgggggt tcctctggtt	1200
gttaaggttc ttgcaagcct gttacacagt gaaaggaacg agaaagaatg gaggcgaatt	1260
tctgaaacaa acaacataat gatatcaaac aagctttgag agtgagctac aataaactcc	1320
catctcaatt aaaagcatgt ttttctatt gttcattatt tgtgaaggat agcaagctta	1380
atcctccgat tttgtcatgc ctgtggagtg cacttggaat cttgcaacga ggtaacgaca	1440
atgaagagtt ataatccatt ggatacaagt attgtgaaga cctatagtca agatgtcttc	1500
ttcaggatgc atttctgtg ttcaccgaaa ttataagtga atgtagaatg caogacttat	1560
tccatgattt agcaactgac ctgtttggtg aagagatagc tgtgtgacc agtaatcctc	1620
ttaatgttcc agatatgtgc aggcatttag tatggggata tgaaggaggt gaaggtttat	1680
cagataagaa tttcccaaaa gagctactta gagcaaagaa ggctcgaact ttcagatttg	1740
gctatgcaat gggctatatt agcaagtcat ttattgaaag tattatacac aacttcaggt	1800
gcttacgtgt gttggatttg cattagagta gcttcgagga gttgtogatg tcaattggga	1860
agttagaaca tctaagatat cttgacctgt cctacaaccc aatcatcaaa tttcttccaa	1920
gtacactatg caagttgttg aatctacaat cgttgtatgt tccaaaaaaaa aaaaaaaaaagg	1980
ggggccgctc tagagtatcc ctcgaggggc ccaagcttac gcgtaccag ctttcttgta	2040
caaagtg	2047

<210> 5

<211> 3463

[0005]

<212> DNA
 <213> Beta vulgaris (甜菜)

<400> 5

gattcactact ctacttccat accttgtaaa aacaaaaaaaa gataaaaatg gtgataggcg	60
gagagatfff tctatcagcg tttcttcaag tgctctttga aaagcttgca tcaggaggga	120
taagtctatt cctaaaaaga gaaaaaggaa taggacctaa agttattcaa agatggaaca	180
aaaaattgag attaatagag gcggttttaa gtgacgcoga gcaaaagcag tttcacaaca	240
atgccgtcaa attgtggctt cgagatcttc aagagtctgc gtacgattta gaggacatct	300
tagacgaatt tgatacagat gctcgaactta aggagttaaa tgatcagcct cagccacagc	360
cacaggaaca tcaacccaaa tcttcttggt ctctcttcaa taaggtacaa agctgtcttt	420
cttgtggttt cccaacttta aataagaaaa ctacaaagta ttcaactagc attgaagaga	480
tgagcactcg cttggaagat ctcttgacc aagtaaggtc tttggctctc tcaacgcaga	540
tacaactcaag ggtagagcaa catgaagaac ggagggaaac atcatctatg atacgggagc	600
cagttgtata tgggagggac gatgagaaaa atcagataat ccaaagatta ttaaagacag	660
atgagccatt ttgtgaaaat tacaatgtaa ttctattgt tggaacagga ggcattggga	720
agacgacct cgcacaggt gtatacaatg atgagcaggt gaaggctcac tttgatgtaa	780
aagcatgggt gtgcatctcc gatgagtttg atgfcaaca agtgacaaca agcattatca	840
cttcagccac tcgtgatata tgaattctcg gtgttctaga tgaggcacia gataaattaa	900
agaacttgct tgtagacaaa agattcttga tcgttcttga tgatatatgg agtgatgaat	960
atgatccttg ggaccaactt caaacccctt tttcatcagc gaagaaggga agtagagttc	1020
taatcacgac cagaatggag acggtggcaa agaacatggt taaaagacca gatcaaagcc	1080
ccatcatcaa gttaaaggtt ttatctgatg atgattgttg gcttctcttt caaaagcatg	1140
cagtcgtaga tgaagacctc attgtgatgc agaaggactt ggttgggttg ttcaaaggat	1200

[0006]

tgccctttggc tgcaaaagct ctaggaggtc tccaaaggag agagcgtaag agtaattggg	1260
caaggatatt aaagagcaat atttggagtg aagaagggtg tgttctgcca gtcttgagge	1320
ttagttatca tcactccca caaacctca aacgtgcctt tgcttattgt tctatattcc	1380
cgaaagatta taaattcacg gagatgaatg ttatattaat gtggatagca gaaggcttgc	1440
tgccagagca cgacaaggag tgcaaggaag acattggctg tgactatfff cttgatctag	1500
tatcaagatc attgtttgaa ccaaacagtc caatgtatat ggatggatct ttcattatgc	1560
atgacctaat ccattgaccta gctcaatggg ctgctgggtg agtttgttgc acattgaata	1620
tccaaaaact ttcttctaga acacgttatt ggtctttctc tgaagaaata ctgatagatc	1680
aaacatggac tccaagaaa cttgtccagg tacgatcatt tgcttctttt ggtgcattag	1740
atgttcgaat tcctatgcaa ctactagatt ccattttccg tcagtttcaa tacttacgct	1800
tgttgcgtat gcataaggcg ggaataattg agttaccaa tagtatgggt aatctgaaac	1860
acttgagact tcttgacctc tcattggaata caaaactaac tagattgcca aagtcacta	1920
gcaagctttg caacctccag acgtctgtgt taagaggatg taagtctctt gtggagatag	1980
tcctctaat cgaacttcaa caccttgatg ttagtagtag gtatgtgtct tcaccgttg	2040
ggattggaaa attaacaaac ttgcagacat tgaagggtt tactttgaga agatacteta	2100
agacaagtat aagtgaattg aagaacttga aatgcctccg tggtcactg gacatccatg	2160
gcctagagaa tgtgtttagt agtgaagaag cacaagcagc aaggttgcac gaaaagacag	2220
gccttgataa gttggaatg tattggggag ataatgcca tgatgttgat gacaacatta	2280
aaaaagatgt agttgatcga ttacagctc cggaatccat caaagaatta acgttgaatg	2340
ggtaagcagg cttaacattc cctgcttggg tgggaaatcc ctcttacct aatatggttt	2400
tcatagaatt aaggagatgt aggagatgtg aattcttacc agcactaggg cagctgcct	2460
cattaagaa catcataata gaaggatgg atgatattaa gactgtaggc cctgaatfff	2520

[0007]

acggcaatga tgatggttgt tcaaacctgt ttccctgcatt gaaaagteta cgattctatg	2580
gaatgggggg ttgggaggag tggttggccc catcagttga caatagcaat gcatttccct	2640
gccttgaata tattagcata tatgaatgic cattgttgog ggctaaacta ccttcccac	2700
tcccacccct aaaagacttg tccattggca aatgcaaaga gttgagattg tcacttccaa	2760
gctgcccttt gctccaaaaa ttgactatta taacatatga gacgccattt agtattgctg	2820
attgtttgcc ctcaactctt gagaccctgg aaatcttga ctcgaaata gagcagccaa	2880
ttcaagagtg gaaacttgac ctcttactt ctcttaaate tcttgatctc caaaacatag	2940
gcagagccgc agatacaata gagcatattc cccaaccaga tttcatctt cctcttctct	3000
tgtcttctct atatatctcg gatttcaaga atttgaate cttgtcatgc tctaccctc	3060
ccaacctcac tgaattaaa atctggaatt gtaagaagct ggaatcattg ggtgtcgatt	3120
tcccaccac gaagcttcag gaagcgtatt ttagtgattg ccctttgatt tatcaacgat	3180
gcaaaccgga tcccacatga ctattgttt ttaattatat tgataaatac aaatattcgt	3240
acattgaag attccagttt tcattccctg aagattgagt tggagggtga gttttgggt	3300
tttttcaga ttttgtttt gtttttttc atttcttta gtttattgt atgaaactag	3360
aatatattca aggaatttg ataaaaaaaa aaaaaaagg gggccgctc tagagtatcc	3420
ctcgaggggc ccaagcttac gcgaccacg tttcttaca agg	3463

- <210> 6
- <211> 24
- <212> DNA
- <213> Petroselinum crispum (欧芹)

<400> 6
cagccaccaa agaggacca gaat 24

- <210> 7
- <211> 29

[0008]

<212> DNA	
<213> <i>Petroselinum crispum</i> (欧芹)	
<400> 7	
ttattcagcc atcaaagttg accaataat	29
<210> 8	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> <i>Petroselinum crispum</i> (欧芹)	
<400> 8	
tacaattcaa acattgttca aacaaggaac c	31
<210> 9	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> <i>Solanum tuberosum</i> (马铃薯)	
<400> 9	
ttctagccac cagatttgac caaac	25
<210> 10	
<211> 141	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 欧芹顺式元件 2xS 和 2xD 的组合, 侧翼是限制性酶识别位点	
<400> 10	
actagtcagc caccaaagag gaccagaat tctagtcagc caccaaagag gaccagaat	60
tctagttaca attcaaacat tgttcaaaca aggaacctct agttacaatt caaacattgt	120
tcaaacaagg acctctaga g	141
<210> 11	
<211> 150	
<212> DNA	

[0009]

- <213> 人工
- <220>
- <223> 欧芹顺式元件 2xW2 和 2xD 的组合, 侧翼是限制性酶识别位点
- <400> 11
- actagtttat tcagccatca aagttgacca ataattctag ttattcagc catcaaagtt 60
- gaccaataat tctagttaca attcaaacat tgttcaaaca aggaacctct agttacaatt 120
- caaacattgt tcaaacaagg aacctctaga 150
- <210> 12
- <211> 142
- <212> DNA
- <213> 人工
- <220>
- <223> 马铃薯和欧芹顺式元件 2xGst1 和 2xD 的组合, 侧翼是限制性酶识别位点
- <400> 12
- actagtttct agccaccaga ttgacaaaa ctctagtttc tagccaccag atttgaccaa 60
- actctagtta caattcaaac attgttcaaa caaggaacct ctagttacaa ttcaaacatt 120
- gttcaaacaa ggaacctcta ga 142
- <210> 13
- <211> 36
- <212> PRT
- <213> 两种生物体的共有序列 (Beta vulgaris 和 Solanum tuberosum)
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (4).. (4)
- <223> xaa = 20 种氨基酸之任一种
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (8).. (8)
- <223> xaa = 20 种氨基酸之任一种

[0010]

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11).. (15)
 <223> xaa = 20 种氨基酸之任一种

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17).. (18)
 <223> xaa = 20 种氨基酸之任一种

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21).. (21)
 <223> xaa = 20 种氨基酸之任一种

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26).. (26)
 <223> xaa = 20 种氨基酸之任一种

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30).. (30)
 <223> xaa = 20 种氨基酸之任一种

<400> 13

Ala Val Leu Xaa Asp Ala Glu Xaa Lys Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu
 1 5 10 15

Xaa Xaa Trp Leu Xaa Asp Leu Lys Asp Xaa Val Tyr Asp Xaa Asp Asp
 20 25 30

Ile Leu Asp Glu
 35

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 两种生物体的共有序列 (Beta vulgaris 和 Solanum tuberosum)

[0011]

50	55	60	
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa			
65	70	75	80
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Glu Ile Xaa Xaa Lys Leu			
	85	90	95
Asp Asp Ile			
<210> 16			
<211> 468			
<212> DNA			
<213> Beta vulgaris (甜菜)			
<400> 16			
atggagattg gcttagcagt tgggtggtgca tttctctctt cagctttgaa tgttctcttt			60
gataggcttg ctctcaccg tgcctcgcgc aacatgtttc agaagcataa ggatcatggt			120
aagctcttaa agaagctgga ggacattttg ctcggtcttc agattgtgct aagtgatgca			180
gagaataaac aagcatcaaa togacatgtg agccagtggg tcaataagct tcagaatgct			240
gtggacgggtg ctgagaactt gatagaacaa gtcaattatg aagctttgag gcttaagggtg			300
gaaggccagc atcaaaatct tgcagaaaca agcaaccagc aagtaagtga ccttaacctg			360
tgettccagtg atgatttctt tcttaacata aaggataagt tggaagaaac cattgaaaca			420
ttggaggtgt tggaagaaagca aattgggtgc cttgtaatca ctagctag			468

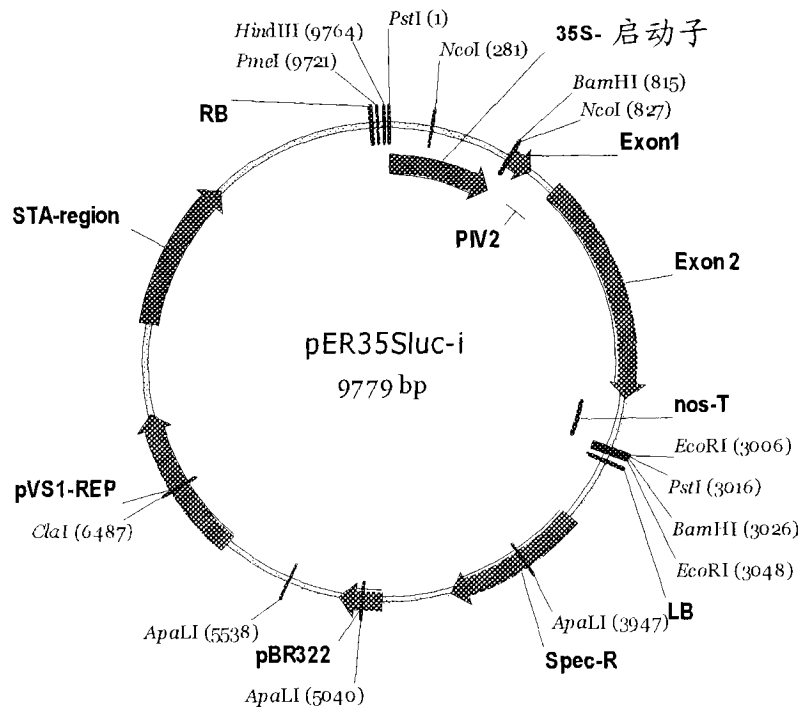


图 1

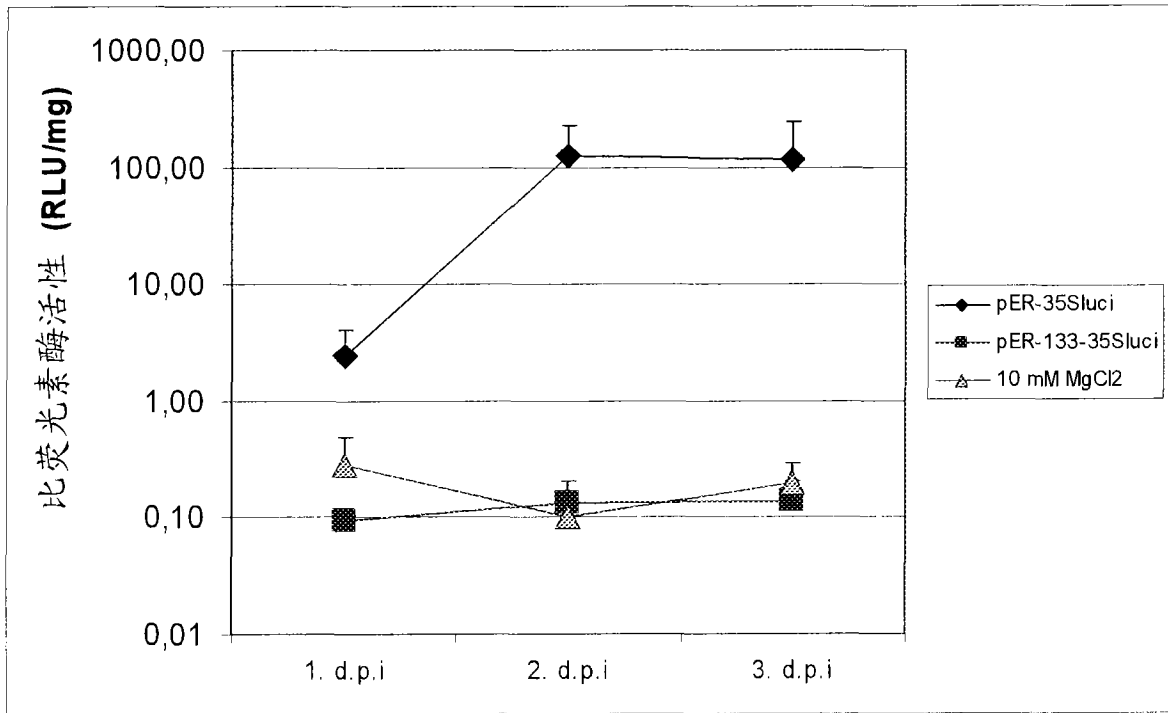


图 2

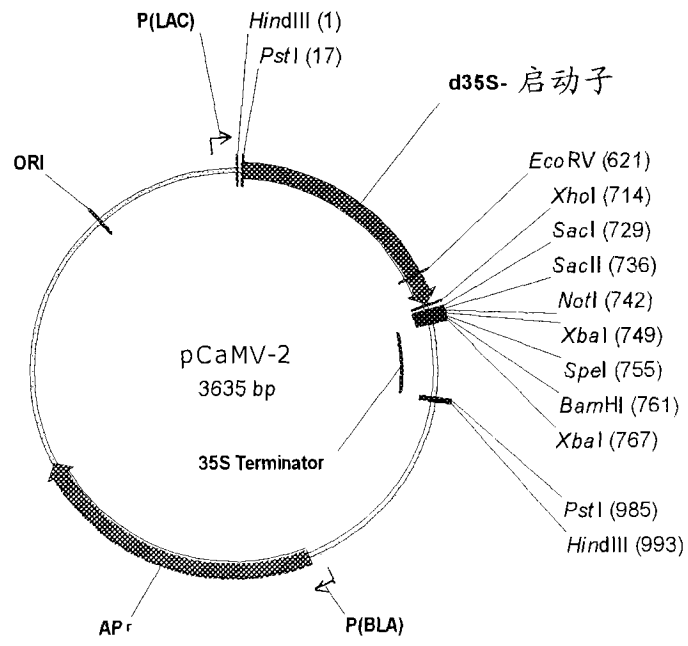


图 3

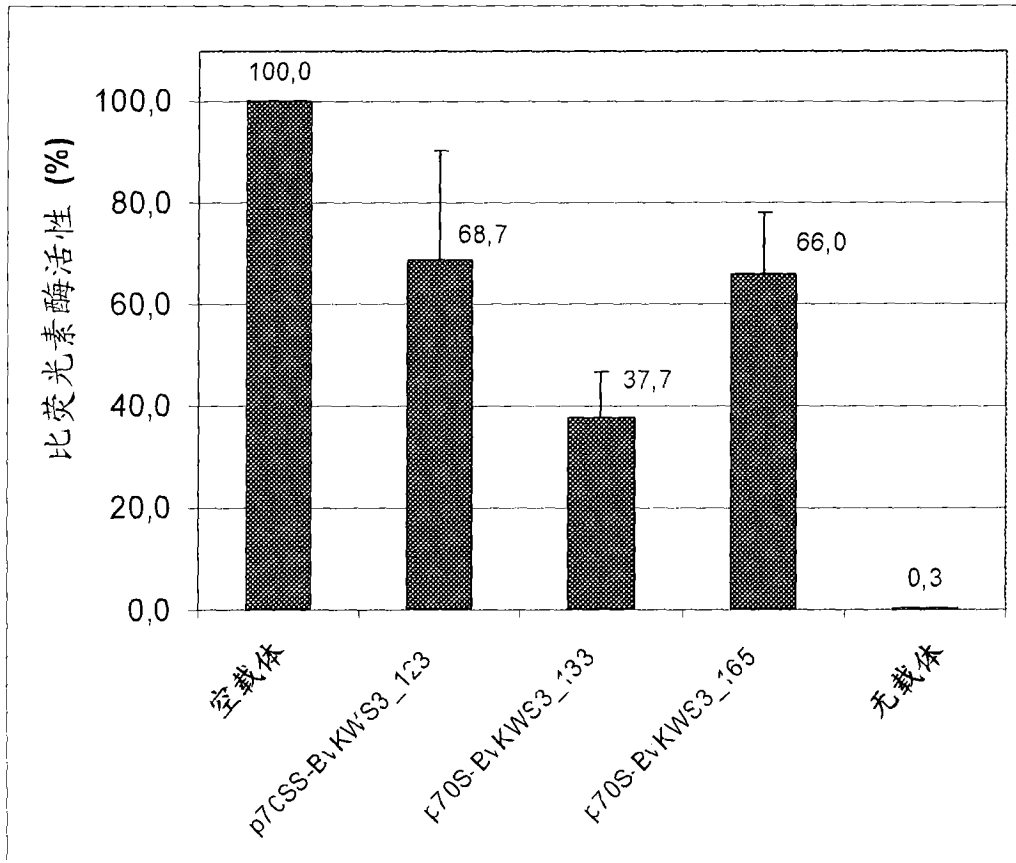


图 4

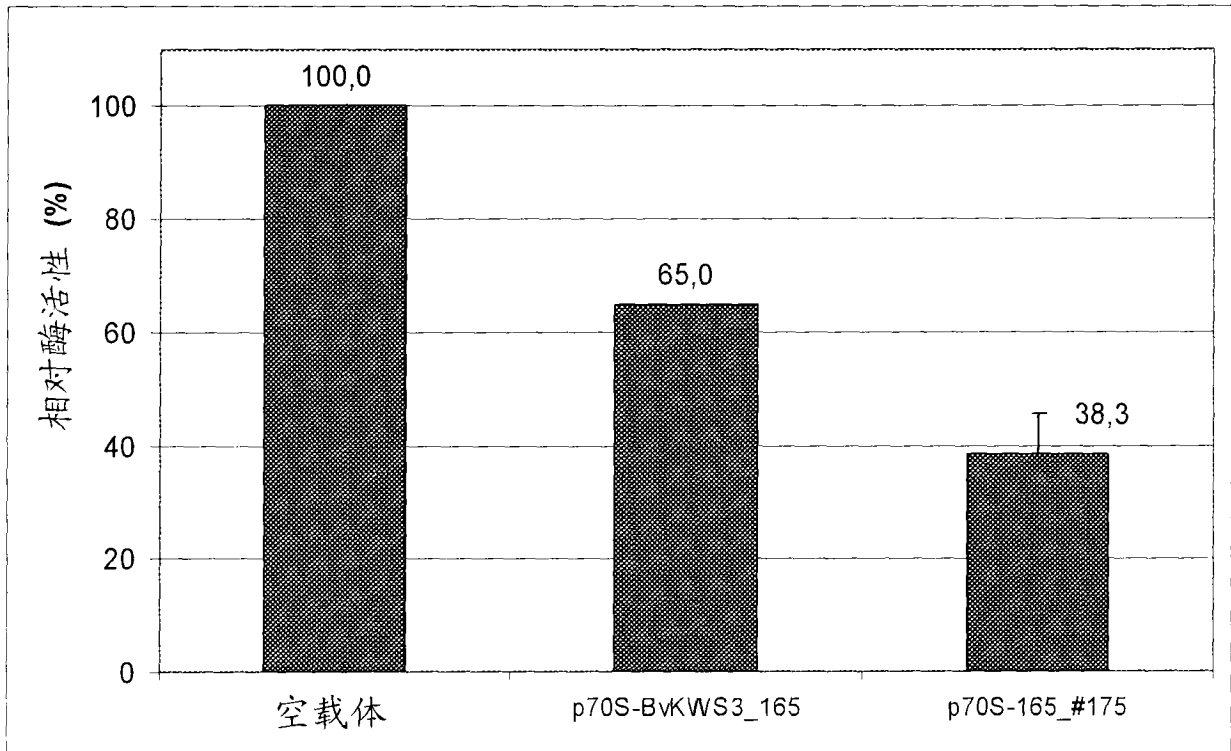


图 5

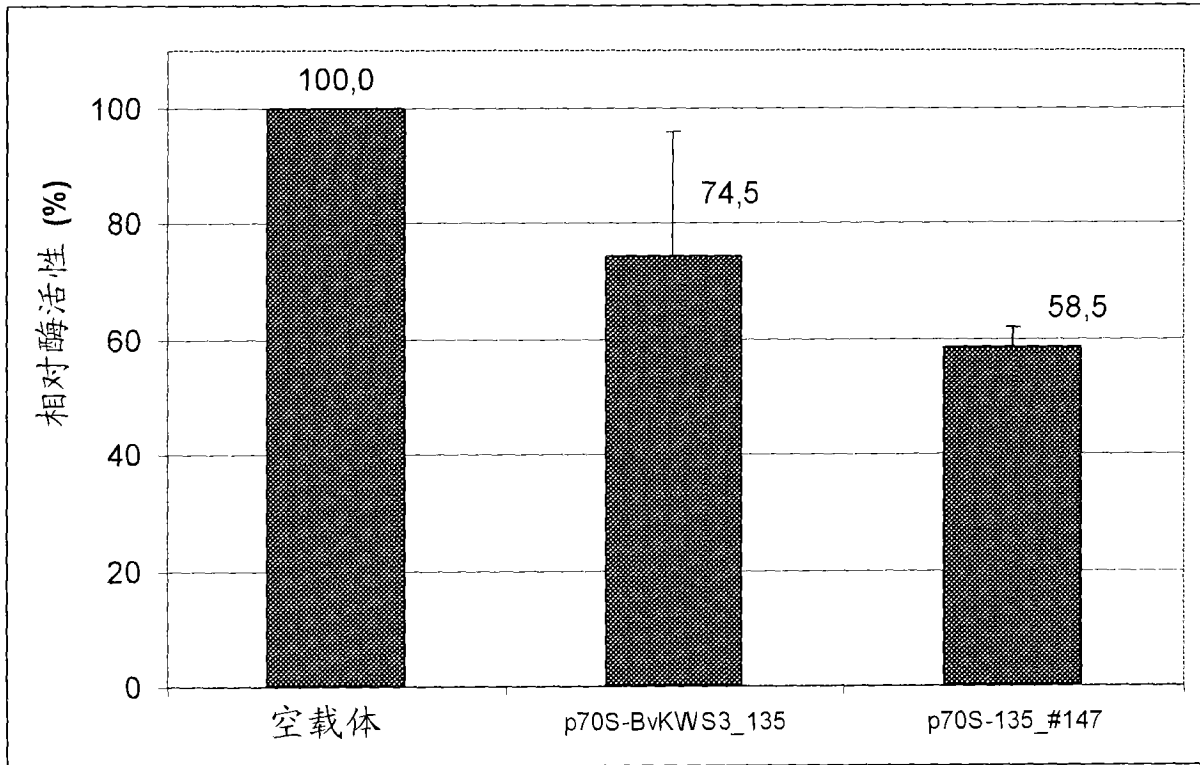


图 6

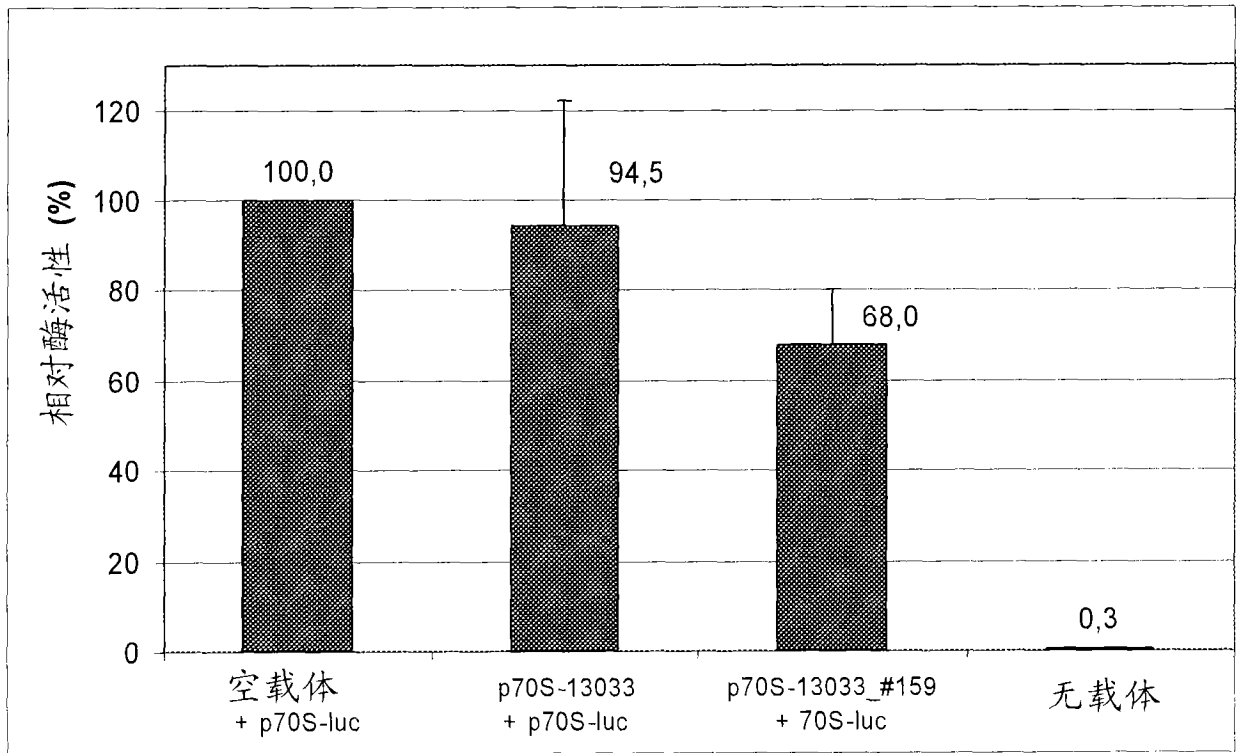


图 7

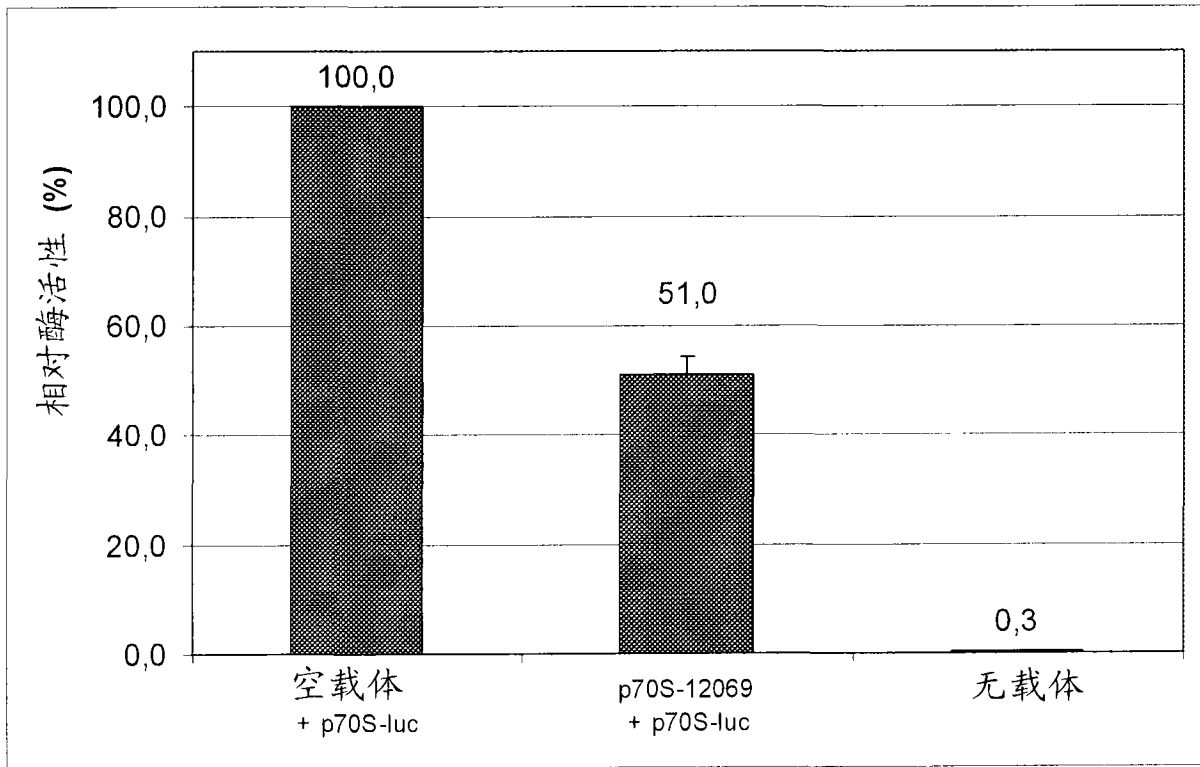


图 8

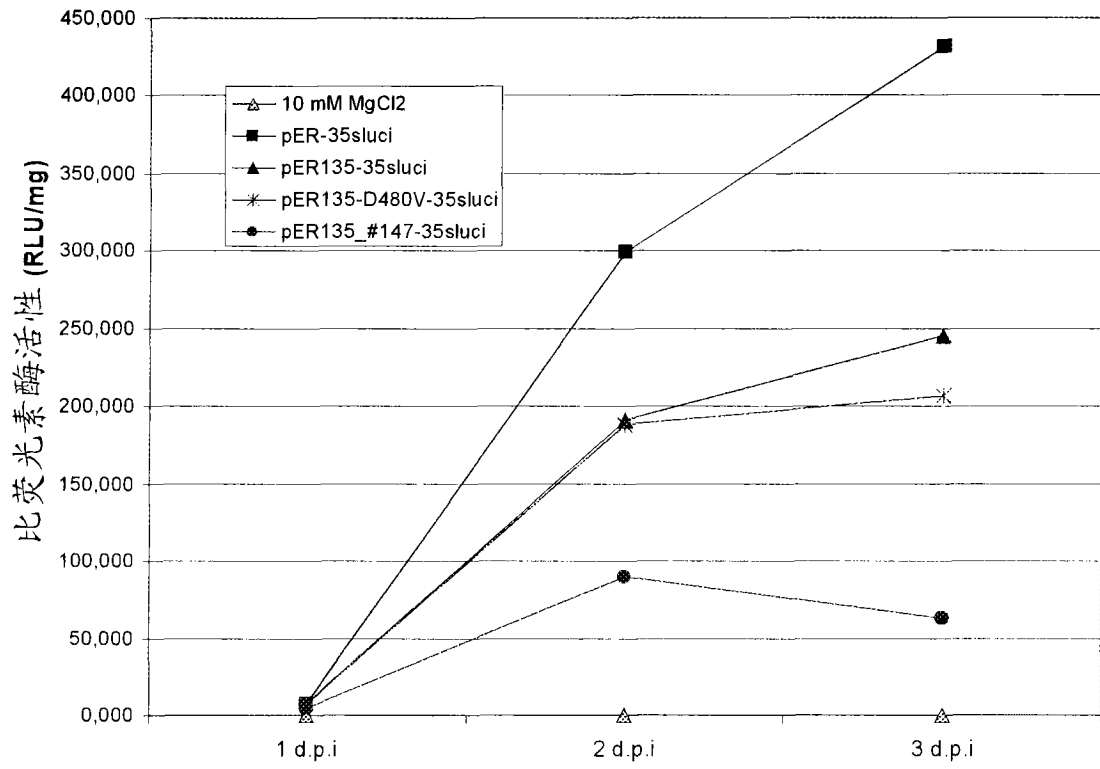


图 9

		1		50
Bv12069	(1)	-----MSEALWAVTKTTAHIATFAGDTC	SYATQGILAAQ	GVRNDL
Bv13033_#159	(1)	---MEFISTVSIAEKLNLTALQWEFKDK	FSNFS-----	YETE
BvKWS3_135_#147	(1)	-----MVDVVTFLKLNVAQEGVVLG	-----	FKDR
BvKWS3_165_#175	(1)	---MVIGGEIISAFLOVLEKLAGGIS	FLKREKG-----	IGPKVI
R3a-#1-155	(1)	MEIGLAVGAAISSALNVLDRLAPHDL	NMFQKHK-----	DHVKLL
Consensus	(1)	M EAVLSA L LF LA G L		LK
		51		100
Bv12069	(45)	NIENKLIATRAVTOAESKQYDSEAVKI	WTKVKNVYDIDU	IDEVHT
Bv13033_#159	(39)	DIQRTVSSITAVLHVATLELSDEL	LRQTEEI	KDTIFEADLDELVTL
BvKWS3_135_#147	(33)	KLQNDLKYMOSFQKQERLRKDES	LKCTLAMREL	YEAEIILADCQLL
BvKWS3_165_#175	(42)	RWNKKLRLEAVLSDAQKQFHNAVKL	ERLKEFADLEI	ILDEIDTD
R3a-#1-155	(45)	KLIDILLGQIVLSDAFNQASNRHV	QWPNKLDVA	DAEELIEVNYE
Consensus	(51)	KLQ L I AVL DAE KQ EAVK	WL DLKE	VYDAEDLLDEV TD
		101		150
Bv12069	(95)	LLRKRIKSHLLRQIRYYLS-----	SSNPILSN	YWS-----DK
Bv13033_#159	(89)	SHQQRVVDADGSLLDKVRHFFS	-----SSNPICVSYWMS	-----RG
BvKWS3_135_#147	(83)	S-----SSGKLEEDYSPTK	-----	VPAKYQMG-----KR
BvKWS3_165_#175	(92)	ARLKEDDQPPQPEHQPKSSCSPFN	KVQSC	SCGPTLNKKTTKYST
R3a-#1-155	(95)	ALRLKVGGHQNIAETSNOQ-----	VSDLNLC	SDDFLN-----IKDK
Consensus	(101)	A RVN S L D		I FFM K
		151		190
Bv12069	(129)	IRDEVQRDIIAANRRDGLDGHDP	IEVYNI	ERNPLDA--
Bv13033_#159	(125)	SKDIKKLDDIANNQFSELDHEPI	RNRREP	TCS-----
BvKWS3_135_#147	(108)	TGEINEKISTKNMISALGPLQ	PVHGNVEE	GPPRWSSP
BvKWS3_165_#175	(142)	LEEMSTRLEILLDQVRS	LISTQIHSR	VEQHEER-----
R3a-#1-155	(134)	LEETIELEVVLEKQIGR	VITS-----	-----
Consensus	(151)	I EI KLDDI NI LLL		E

图 10a

	1	50
Rx_160	(1)	-----MAYAVTSLMRTLHOSMELTQCDLQP-----
BvKWS3-133_#177	(1)	-----MAVTDLFVTEATELTKQIAIARKSTLCRAS-----ADQLI
Str1 (355-540)	(1)	LYDIKQKQEDTEGAINQAGFDLPRNIEPEKAMINLVMQKAFQCNLFRI
Bv12069	(1)	-----MSEALWAVTKTTLAHLATFAGDETCASYATQGILAAQGVNRDL
Bv13033_#159	(1)	-----MSTSTTVSIAEKLATAQLWFEFKDKLFSNFSYETEL
BvKWS3_135_#147	(1)	-----MVDAVVTLEEKLFNVVQEGGVVLG-----FKDR
BvKWS3_165-#175	(1)	----MVGGEIFLQAEQVLEFKLASGGISLFLKREKG-----IGPKVT
Str3a-#1-155	(1)	-MEIGLAVGAFILSEINVLFDRLAPHGDLNMFQKHK-----DHVKLL
Consensus	(1)	M DA LSAIL L L G L L I
	51	100
Rx_160	(27)	FYEK--LKSRLRAILEASCNIMGDHEGLILEVEIVEVYTEDMVDRES
BvKWS3-133_#177	(38)	HIRELEPIIQEVKYQGVLELPFRQQLQISETLRGMELSLVLANR
Str1 (355-540)	(51)	HGGYVDFLLKNEKDFQGRY--DSLDFLNOQLVITETEELPPLVVV
Bv12069	(44)	KKIENKLIATRAVTOAFSKDYDSEAVKIWKDKVYVYDIDDLLEVH
Bv13033_#159	(38)	EELQRTVSSYTAHVAATKLELSDELRQIEEKDTIFEADLLLELV
BvKWS3_135_#147	(32)	KKLQNDLKYMQSFKKAEKRLSRKDESACTLAQMPRELVAEELIADCO
BvKWS3_165-#175	(41)	QRWNKKEKRLTEAVSEAEQKQFHNAAVILWLRDEEFYDLEDLDEED
Str3a-#1-155	(44)	KKLEDILLGLQIVLSDAENKQASNPHVQWNLQAVDAEELIEVN
Consensus	(51)	KL L I AVL DAE K Q E LK L DLKE VYDAEDLLDEV
	101	150
Rx_160	(74)	RFLAQNLEER---SRANWEIIFVLEQALECIDSTVKQWATS-----
BvKWS3-133_#177	(88)	WVYRNQLQARKMEKLEKIVAREVQGPMAHVADVHHLRFDSAER----
Str1 (355-540)	(100)	EEVHNKLLKLNEDCATQILRKAYEVEYVVDACINKEVPOWCIER----
Bv12069	(93)	TLLLRKRINKSH--LLRQIRYYLS-----S--SNPILSNFYWS-----
Bv13033_#159	(87)	TLSHQQRVVDADGSLLDKVRHFES-----S--SNPICVSYWMS-----
BvKWS3_135_#147	(81)	LLSNSSGKLELYSPTKVPKAYQMG-----
BvKWS3_165-#175	(90)	TBARLKEFNDQP--QPQPQEHQPKSSCSPPFKVQSCLSCGPPTLNKKTTK
Str3a-#1-155	(93)	YEALRLKVEGQH-QNLAETSNQQ-----VSDENLCSDDFLV-----
Consensus	(101)	DA L L I F S I I F S
	151	198
Rx_160	(115)	--LMMKQKPKPTSLVSLPEHDVEQPENIMVGRENFEMMLDQLARGG
BvKWS3-133_#177	(134)	-FERMDASTRRELAQLGDRIGGGDGGWLEEKRVSEIDGVFDCT---
Str1 (355-540)	(144)	---WLLQIEITCEKATQEKNTVEDTMKTVIARTSSKLARTPRM---
Bv12069	(127)	--EKIRLVQFDDAANRRDLGLDGHDPFVYNIERNPLDA-----
Bv13033_#159	(123)	---GSKIKKHLDDIANNQFSELDHEPIRNRPETCS-----
BvKWS3_135_#147	(106)	---RIGEINEKTSKNNISAFGLPLQPVHGNVEETGPPRWSSP----
BvKWS3_165-#175	(138)	YSTTEEMSTRLEDELDDVRSLLSTQIHSRYEQHEER-----
Str3a-#1-155	(130)	IKKKEETIELEVLEKQIGRLVITS-----
Consensus	(151)	DKI DI RIE I NI L I V E

图 10b

	1	50
AtAB028617	(1) ----MTGIEMFLAFLQALFQTEVSEPFRSFFKRR--LINENLLRRESTA	
Bv12069	(1) MSEALLWAVTKTTLAIIATFAGMLFC SYATQGI LAAQGVNRNDLKKIEN--	
Bv13033_#159	(1) -----MEIISTTVIAEKLNTALQLWEFKDKLFCNFSYETOLEDLQ	
BvKWS3_135_#147	(1) -----MVDVMTFTEKLENVEMOE-----GGV--ELGFKDRFKKLQ	
OsativaAp003073	(1) -----MAEAELIAFMQLFQKISEA--TIDHFIISWRGIHGKLSSTSSST	
BvKWS3_165-#175	(1) ----MVIQGEIIFSAFLQVLFQKIASGGISLFLKREKGIQPKVIRWN--	
GmaxKR4	(1) --MALECVCVGAFLSSFLQALFQKIASP-QVLDFFRGTIKIDQLRRDLLEFT	
PvulgarisJ71	(1) --MAAELVGGALSAFLQVAEDRLASP-QIVDFEIKGRKLDKLPRLKFT	
StR3a-#1-155	(1) -MEIGLAVGGAFSSALNVLEDRLAFHGDLLNMFQKHKHDHVKLLKLE--E	
Tomato-I2	(1) -MEIGLAVGGAFSSALNVLEDRLAFNGDLLNMFQKHKHDHVKLLKLETLK	
Consensus	(1) VG AFLSAFLQVLF KLAS L FR KL LLK L	
	51	100
AtAB028617	(46) FTLLIETAVLIBAEKQITPVMVEKVVNELRDVVMIAEDALDDIATEALR	
Bv12069	(49) K-LIIEFVAVLQDAESKCYDSEAVKINLKDVKVIVYDIDLLDEVHTDLR	
Bv13033_#159	(42) RTVSSYTAQIHHVATKLELSDLELQRIEELKDTIFEADQILDELVTLSHQ	
BvKWS3_135_#147	(36) NDLKYMOSFVKDAERLRKDESLKCTIADMRELVEAETIADQCILLSNS	
OsativaAp003073	(43) LSQFLQAFIDDAEKQLTASVVRGMLAKLKDIAVLDLDDLLDYSASMP	
BvKWS3_165-#175	(45) KKRLRFAVLSDAEQKQFHNAVKLWRDLQEFAYLELDLDEDTDARL	
GmaxKR4	(48) NKLSIQAVEDDAEQKQFNMVVRDWLIELKVAMLDVEVLDSEIQHRLQ	
PvulgarisJ71	(48) IMLRSICALADDAELRQFTNPHIKAWLFVVKAEVFAEDLLCEIDYELTF	
StR3a-#1-155	(48) DIHLQIIVESDAENKQASRHVQWENKIQNAVDYAFILIEVNYEAR	
Tomato-I2	(50) MTERSTQIVESDAENKQASRPSVRDWLNEIRDAVDSAEMLIEVNYEAR	
Consensus	(51) L SIQAVL DAE KQ TN SVK WL DLKD VYDAEDLLDEI EALR	
	101	150
AtAB028617	(96) LIGAESSSS-----NFTRLRQLRGRMSLGDFLDGNSEHLETRLEK	
Bv12069	(98) KRINKSHLLR-----QIRYYLSS-SNPILSNFYWSDKIRD	
Bv13033_#159	(92) QRMVDADGS-----LLDKVRHESS-SNPICVSYWMSRGSKD	
BvKWS3_135_#147	(86) SGKLLDYSP-----TKVPAKYQNGKRIGEINEKINSTKNISA	
OsativaAp003073	(93) MKQRQVIFPT-----KASFFTLSSSELSR----NLQHRLEKHKINI	
BvKWS3_165-#175	(95) KFNNDQPPQPQEHQPKSSCSFNKVQSCISCGFPTLNKKTTPKYSTIEE	
GmaxKR4	(98) VVPOSESQ-----TFTCTCKVPNEFKS-SPVSSSENKEINSMKK	
PvulgarisJ71	(98) CQVEAQSEPF-----TQFTSKVSNFLN--FTFSSENKKTESMKE	
StR3a-#1-155	(98) LKVEGQHQN-----LAETSNOQVSDIENL-CFSDDEFLNFKDKLEE	
Tomato-I2	(100) LKVEGQHFT-----QNFSETS-----NQ-QVSDDEFLNFKDKLEE	
Consensus	(101) LKV T V FL F I K I D	
	151	200
AtAB028617	(137) VVIRLERIASORNIIGIKELTAMIPKQRLP-----TFTTSLVDESEVFC	
Bv12069	(132) LVLRDDIANNRRDLGIDGHDPTEVYNIERNPLDA-----	
Bv13033_#159	(128) IKKIKDDIANNNQFSLELDHEPIRNRREPETCS-----	
BvKWS3_135_#147	(125) YLGPLOPVHGNVEEECPWRWSSP-----	
OsativaAp003073	(130) TLERLDKIAQRDTIGLQMICEMRRYDTSE---RPOSSSLVFTDSSAVFC	
BvKWS3_165-#175	(145) MSTRLEDLLDQVRSALSTQIHSRVEQHEER-----	
GmaxKR4	(136) VLDLIDGLASRMDSLGLKASDLVAGSGS-GGNFTKLOSTSLVVESDICG	
PvulgarisJ71	(137) VLEKLEYLANQKGCALCKEGETSSGDASGGKVFTPPQKLPSTSLVVEVLYG	
StR3a-#1-155	(137) TIEFLEVLEKQIGRLVITS-----	
Tomato-I2	(134) TIEFLKDLQEQIGLLGLKEYFDSTKLETR-----RPSTSEFTVDDESDIFG	
Consensus	(151) VLERLD LA QI LGL I S S I G	

图 10c

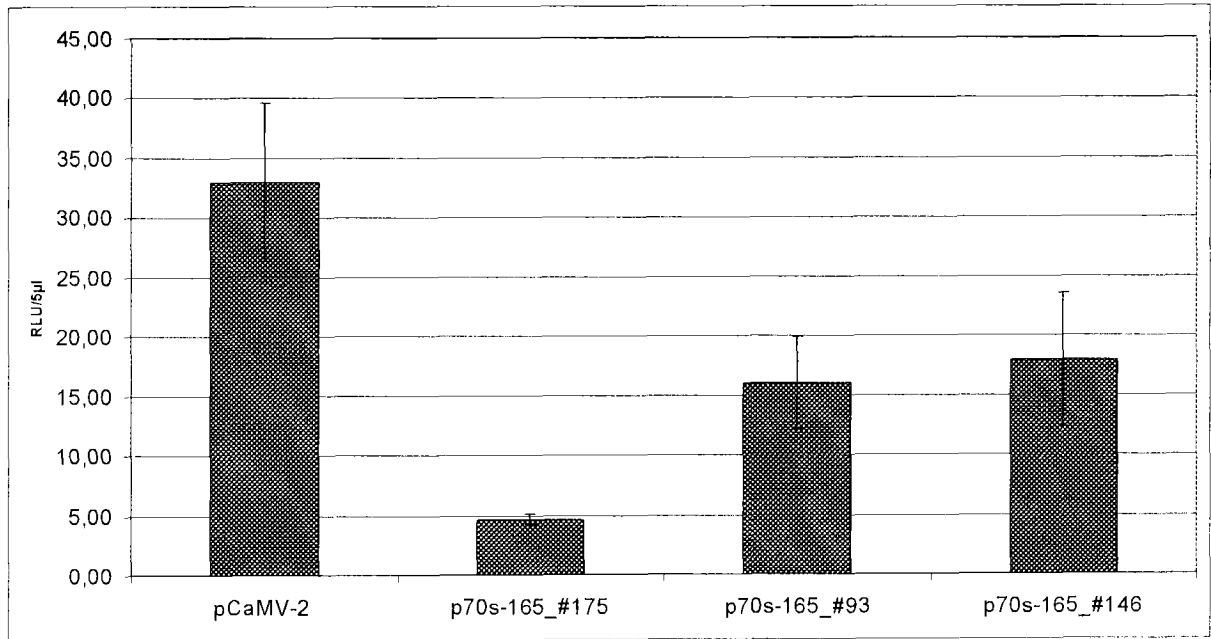


图 11

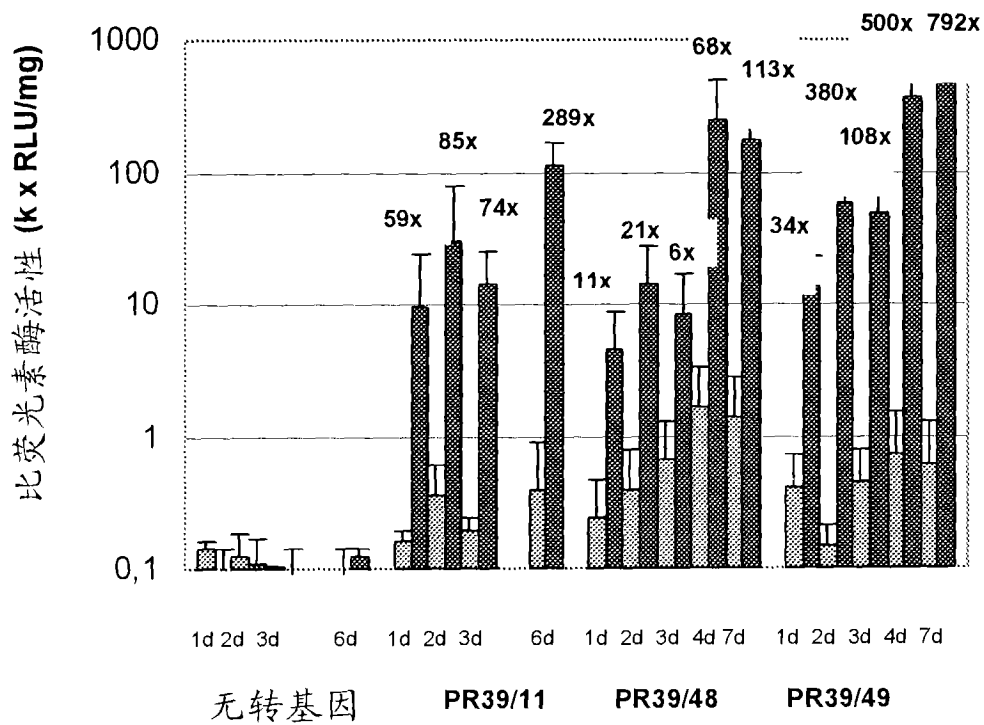


图 12

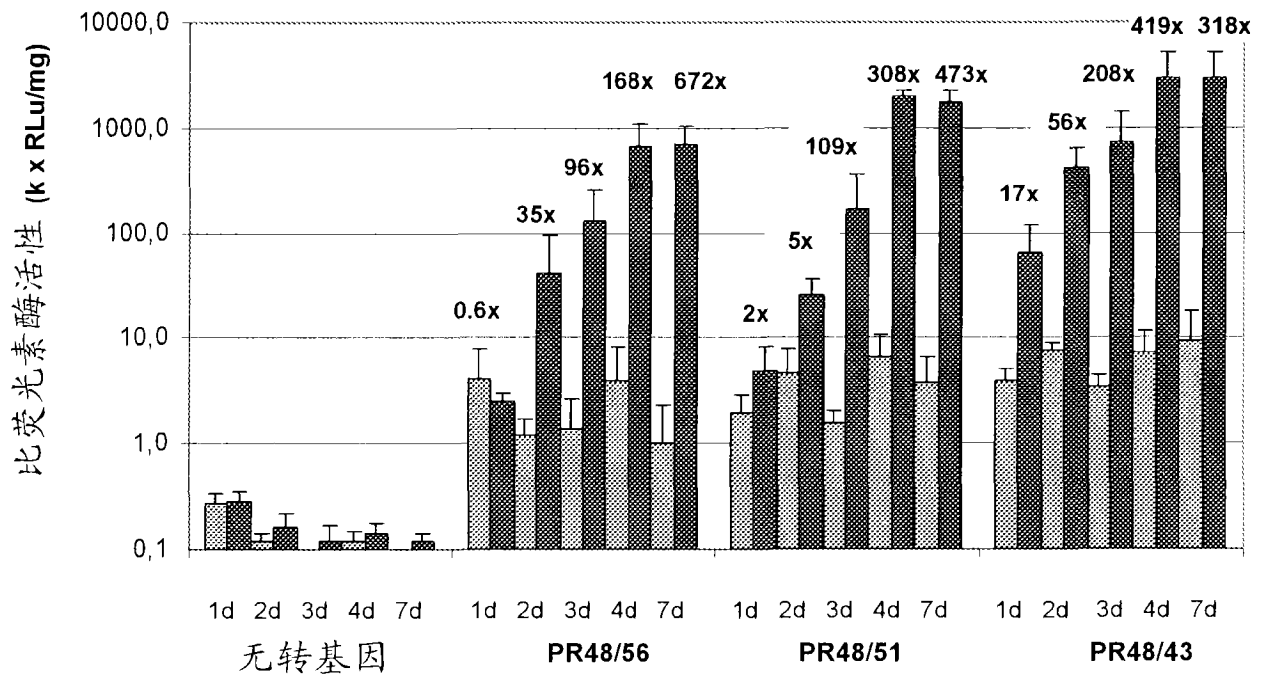


图 13

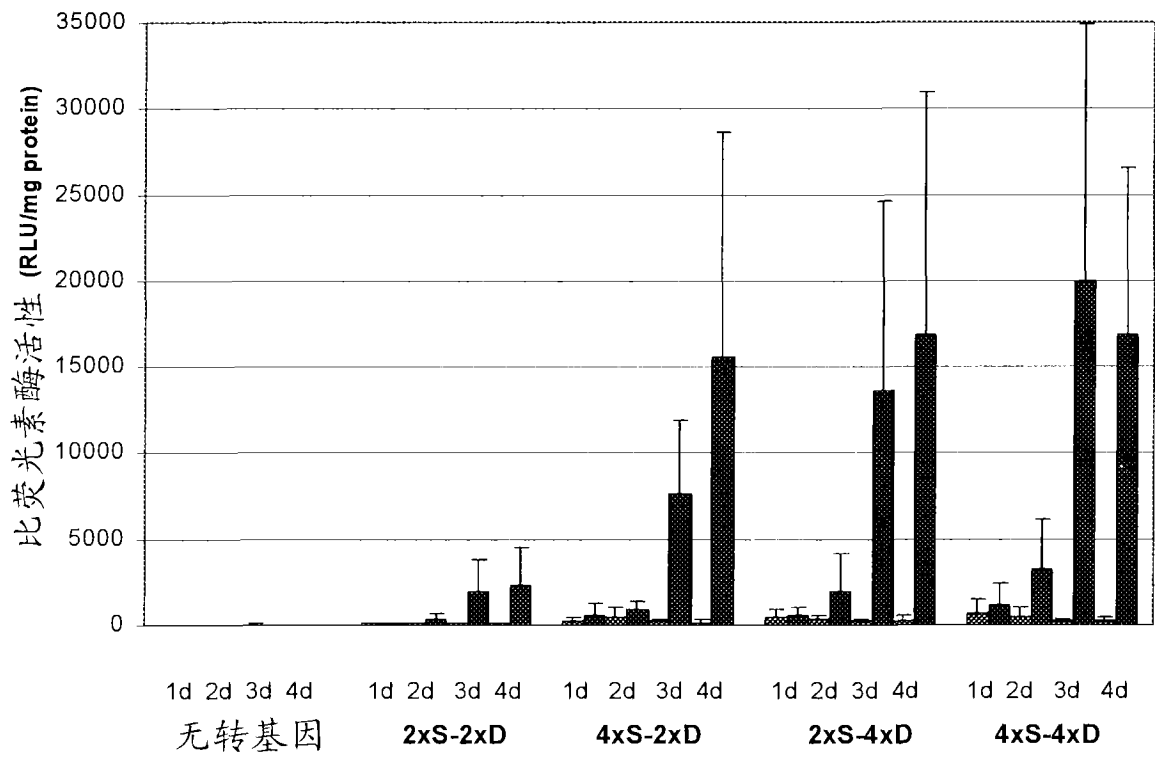


图 14

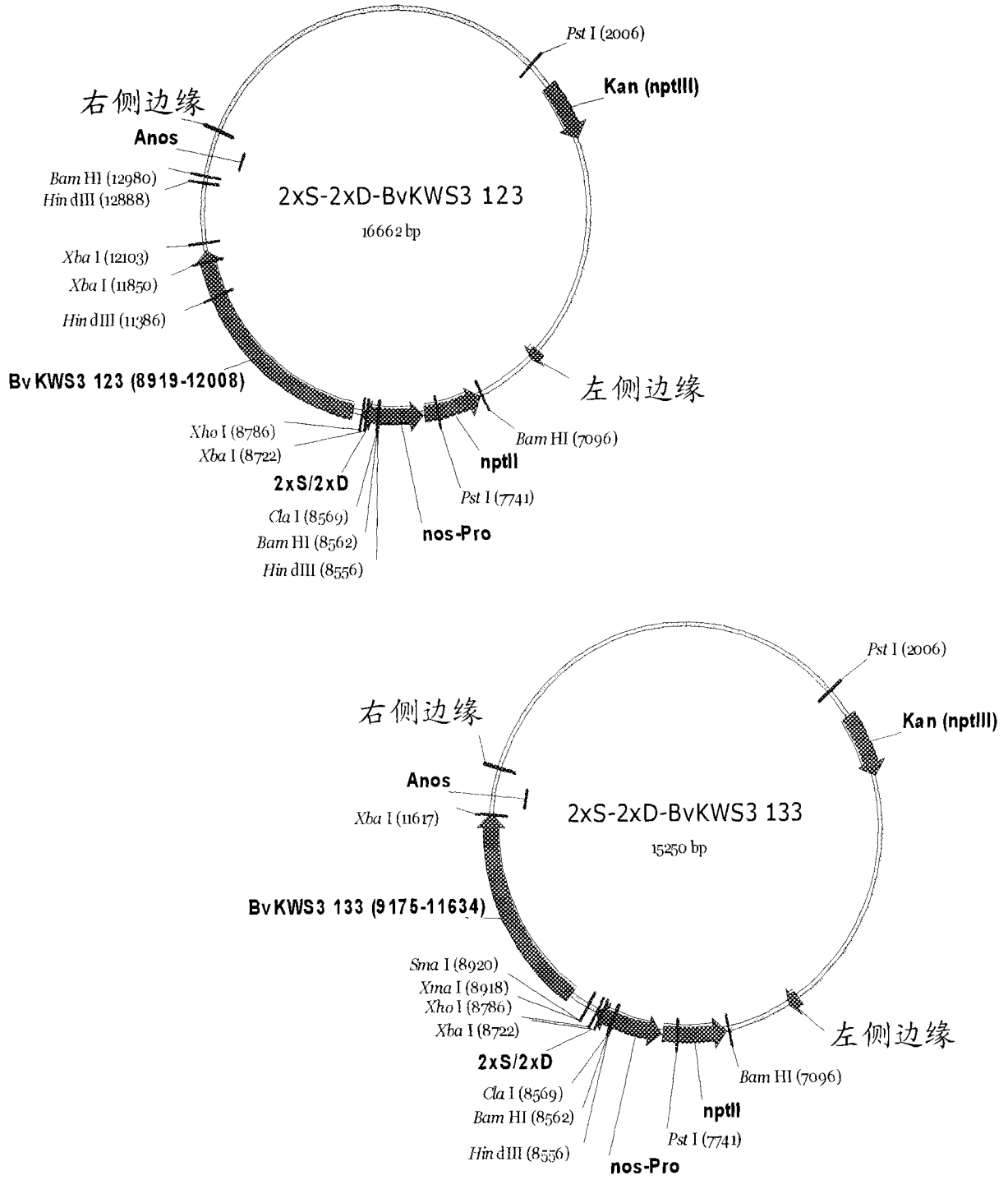


图 15

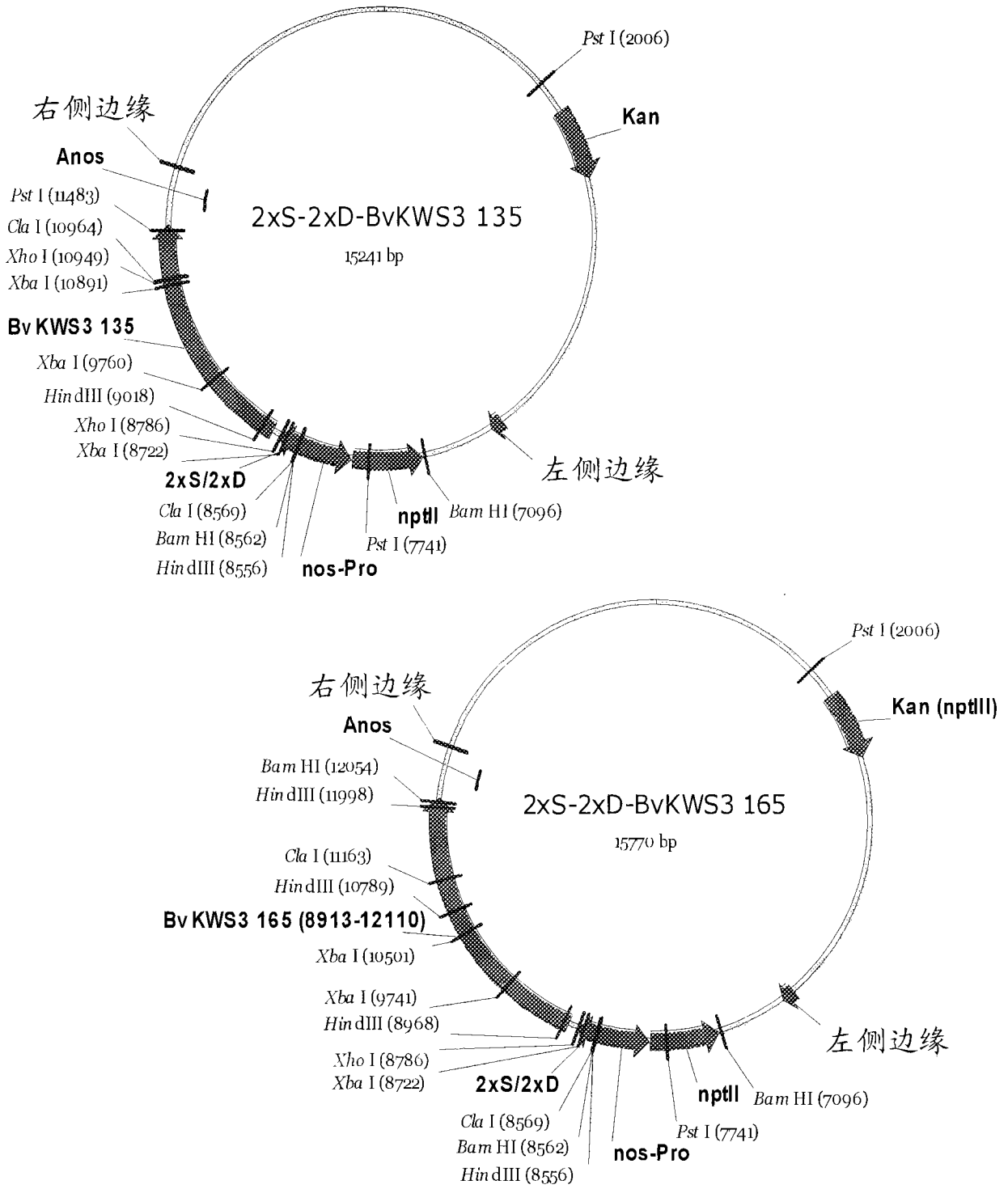


图 16

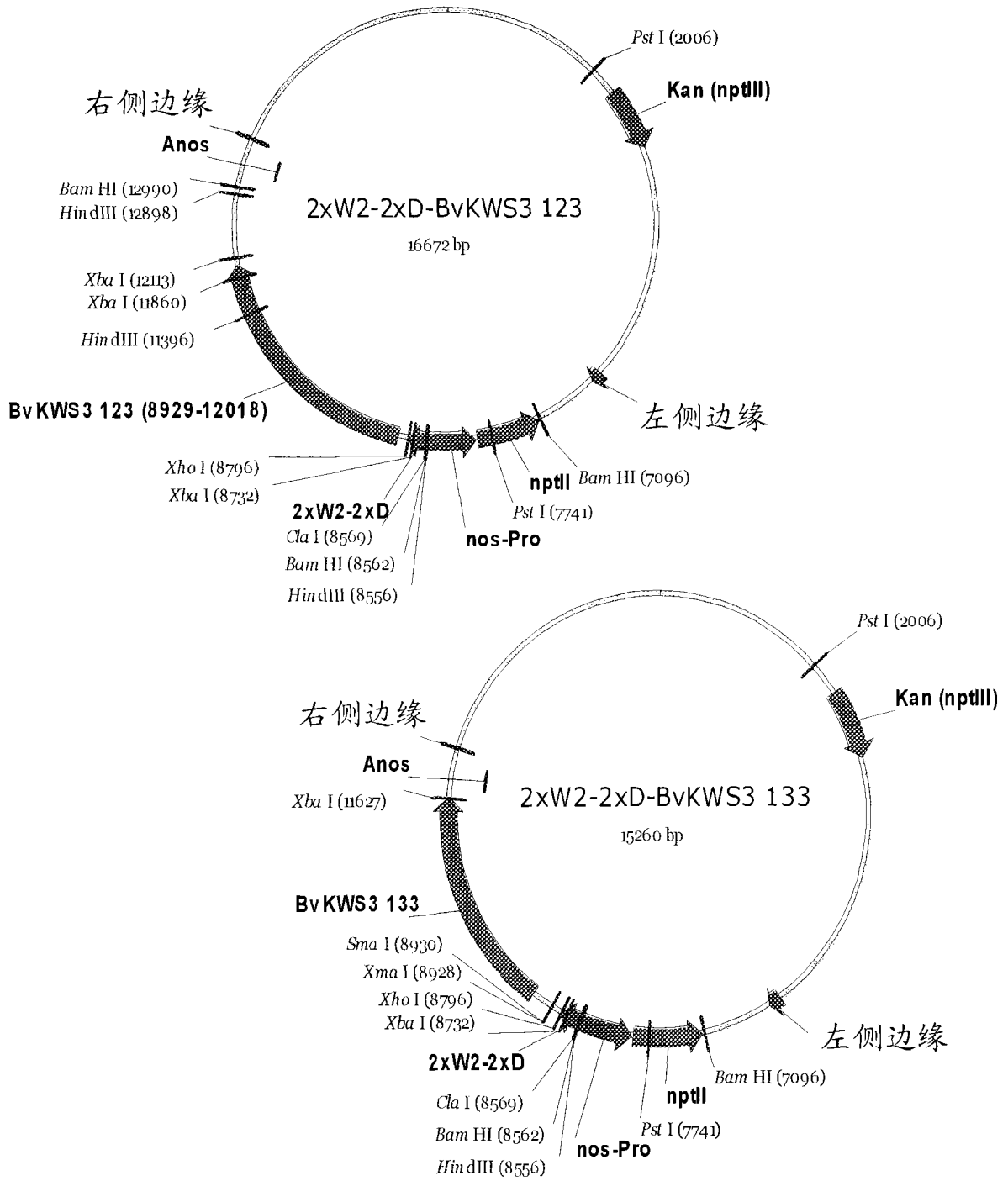


图 17

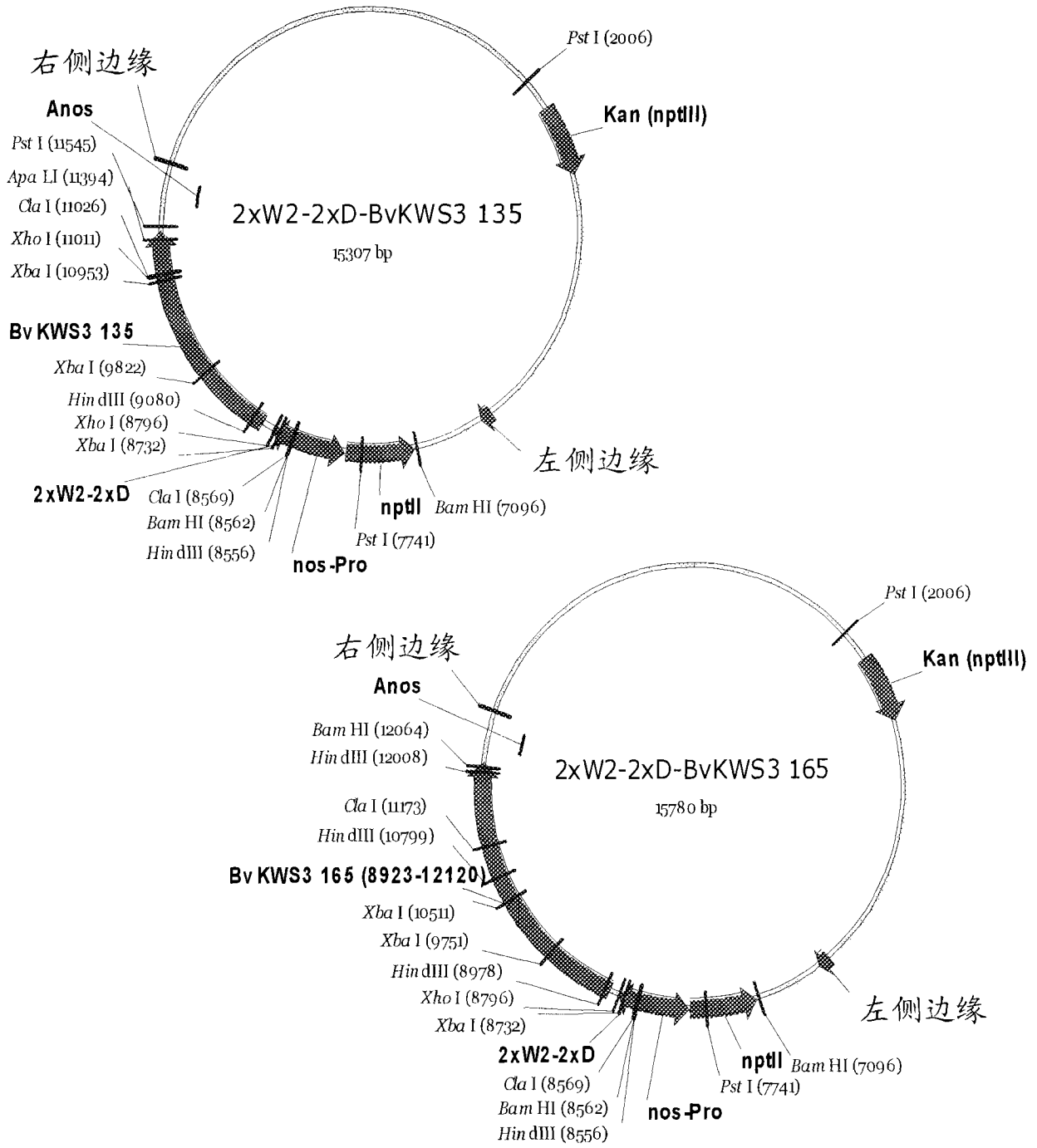


图 18

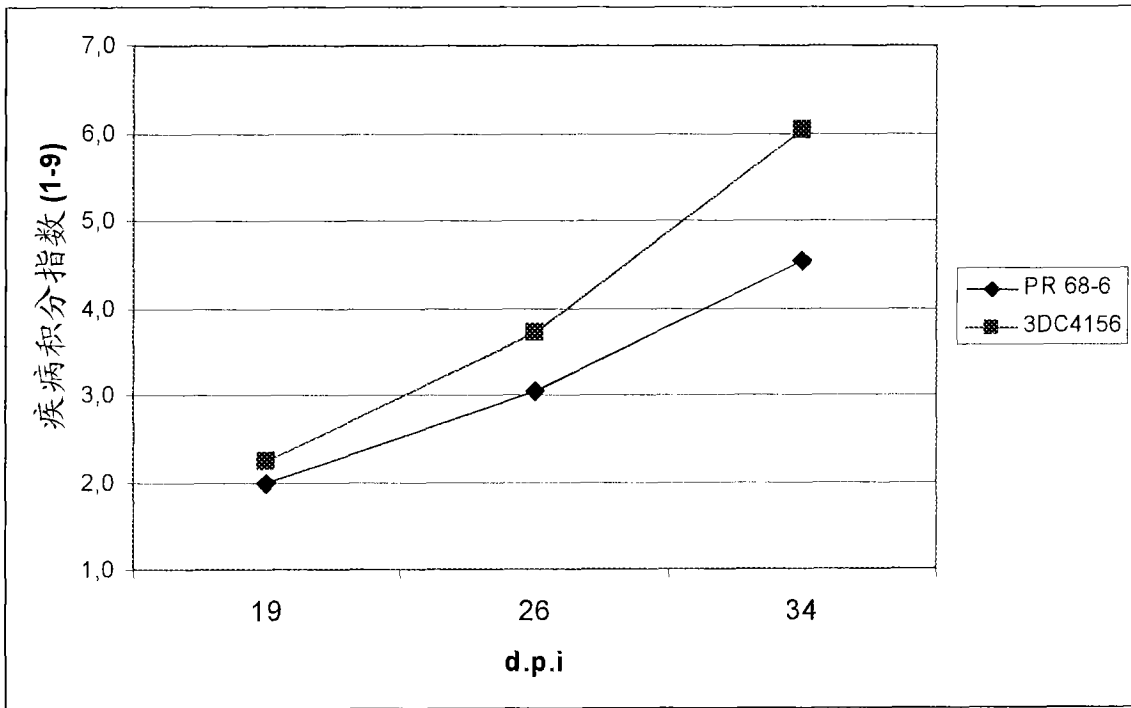


图 19

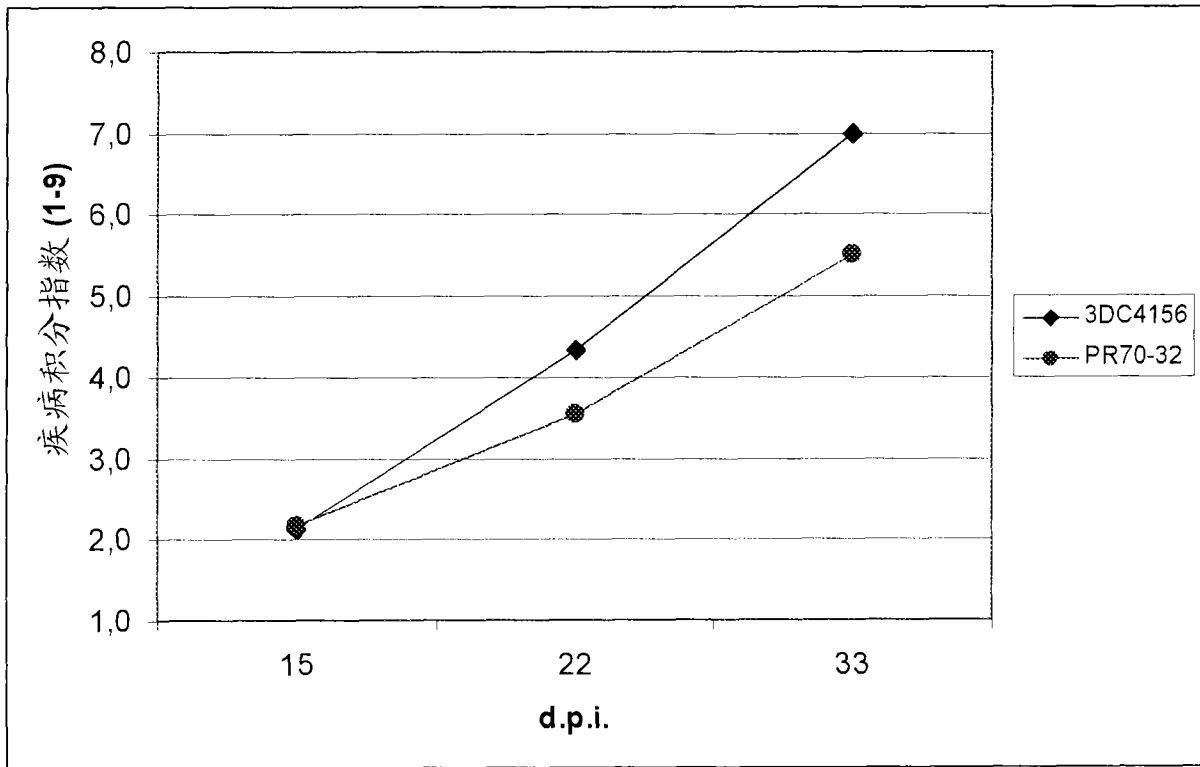


图 20

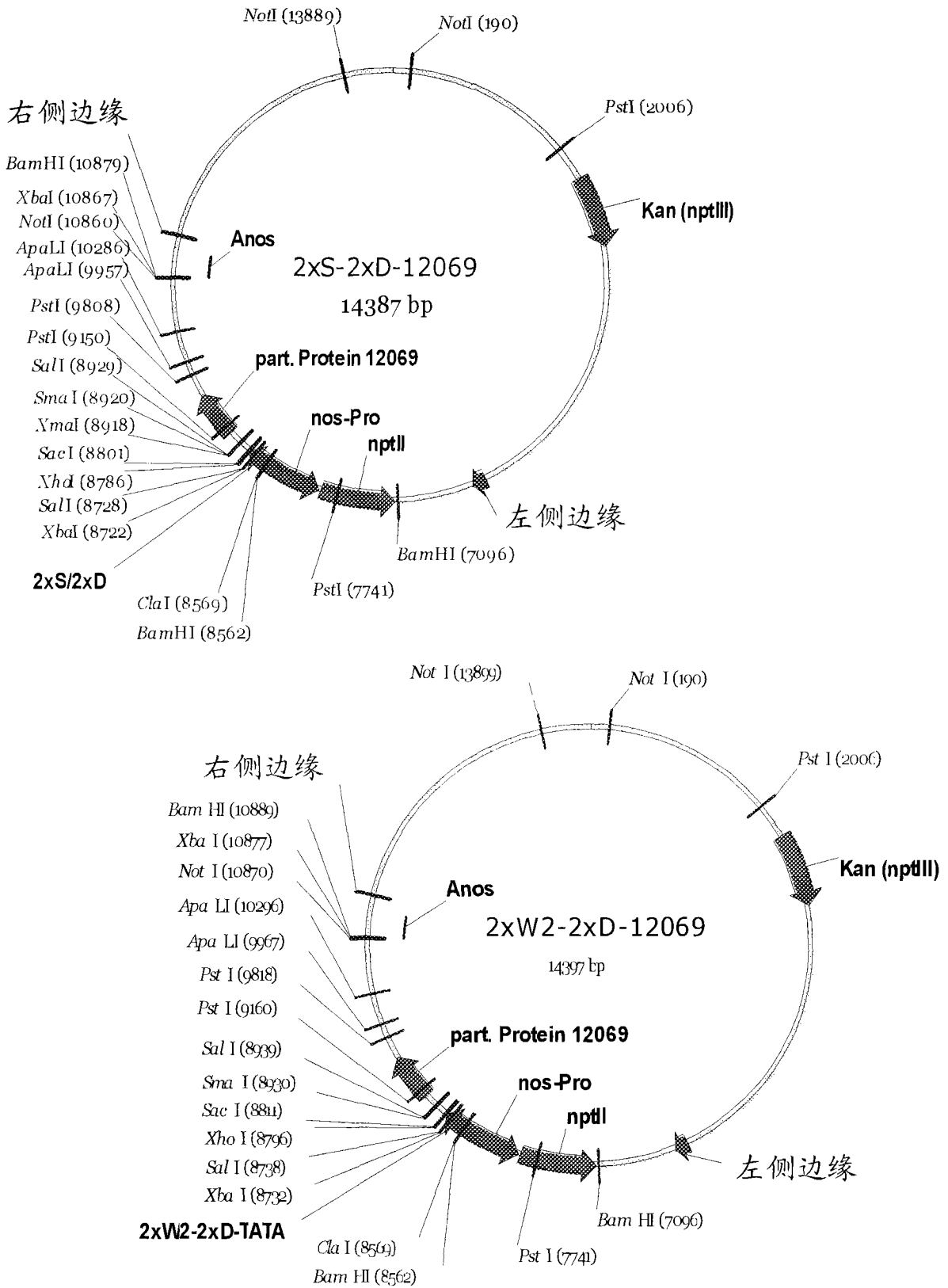


图 21

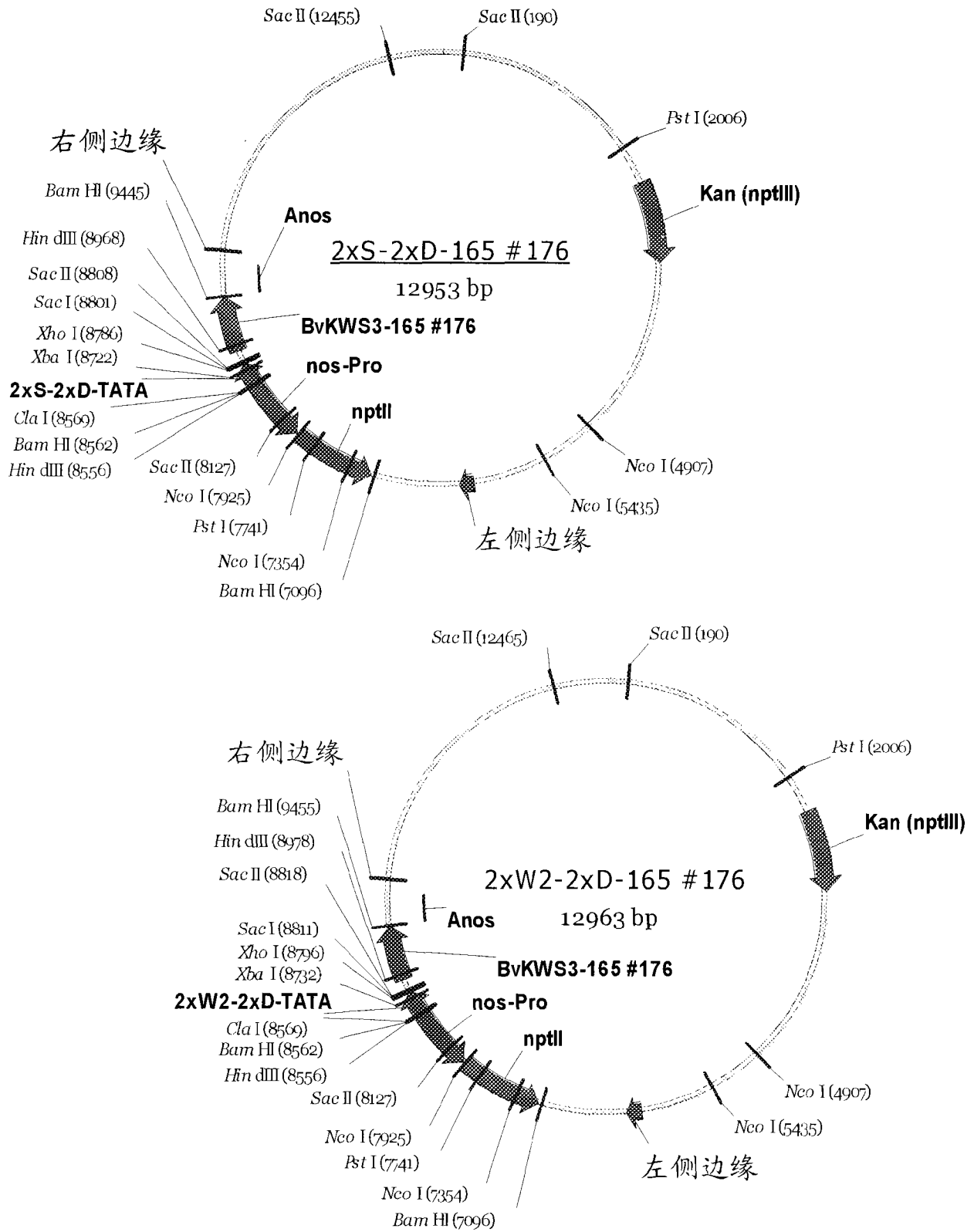


图 22