



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105143455 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 09

(21) 申请号 201480018854. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 01. 30

C12N 15/82(2006. 01)

(30) 优先权数据

C07K 14/415(2006. 01)

61/758937 2013. 01. 31 US

C12Q 1/68(2006. 01)

A01H 5/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 09. 28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/013772 2014. 01. 30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/120884 EN 2014. 08. 07

(71) 申请人 纳慕尔杜邦公司

地址 美国特拉华州威尔明顿

申请人 普渡研究基金会

(72) 发明人 J. S. 贾奎斯 J. 季 G. 乔哈

A. 伦纳德 李柏林

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 邹雪梅 李炳爱

权利要求书4页 说明书28页

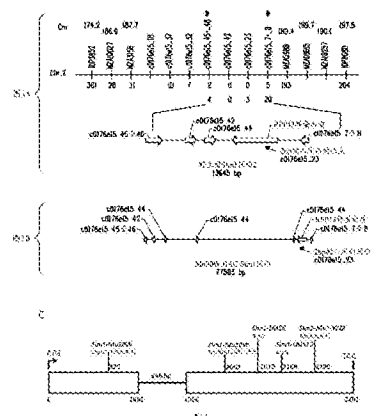
序列表40页 附图7页

(54) 发明名称

类病斑表型的抑制子 SLM1

(57) 摘要

本发明提供了用于调节 Slm1 的方法和组合物。本发明提供了用于调节 Slm1 在宿主植物或植物细胞中的表达以调节农学特性的方法。



1. 一种制备内源 Slm1 表达减少的转基因植物的方法,所述方法包括:
 - a. 将包含分离的多核苷酸的重组构建体引入到可再生的植物细胞中,所述分离的多核苷酸可操作地连接至启动子,其中所述多核苷酸序列的表达降低内源 Slm1 的表达;
 - b. 在步骤 (a) 之后,由所述可再生的植物细胞再生出转基因植物,其中所述转基因植物在其基因组中包含所述重组 DNA 构建体;以及
 - c. 选择 (b) 的转基因植物,其中所述转基因植物包含所述重组构建体且在包含与不包含所述重组 DNA 构建体的对照植物进行比较时表现出 Slm1 表达的减少。
2. 一种制备内源 Slm1 表达减少的转基因植物的方法,所述方法包括:
 - a. 将包含分离的多核苷酸的重组 DNA 构建体引入到可再生的植物细胞中,所述分离的多核苷酸以有义或反义取向可操作地连接至在植物中有功能的启动子,其中所述多核苷酸包含:
 - i. SEQ ID NO:47、48、50 或 51 的核苷酸序列;
 - ii. 基于 Clustal W 比对方法,在与 SEQ ID NO:47、48、50 或 51 进行比较时具有至少 90% 序列同一性的核苷酸序列;
 - iii. SEQ ID NO:47、48、50 或 51 的至少 100 个连续的核苷酸的核苷酸序列;
 - iv. 能够在严格条件下与 (i) 的核苷酸序列杂交的核苷酸序列;或
 - v. 经修饰的植物 miRNA 前体,其中所述前体已经经修饰以用设计用于产生指向 SEQ ID NO:47、48、50 或 51 的 miRNA 的序列替换所述 miRNA 编码区;
 - b. 在步骤 (a) 之后再再生转基因植物细胞,其中所述转基因植物在其基因组中包含所述重组 DNA 构建体;以及
 - c. 选择 (b) 的转基因植物,其中所述转基因植物包含所述重组 DNA 构建体且在包含与不包含所述重组 DNA 构建体的对照植物进行比较时表现出 Slm1 表达的减少。
3. 一种制备农学特性改变的转基因植物的方法,所述方法包括:
 - a. 将包含分离的多核苷酸的重组 DNA 构建体引入到可再生的植物细胞中,所述分离的多核苷酸可操作地连接至至少一种调控序列,其中所述多核苷酸编码多肽的片段或变体,基于 Clustal W 比对方法,在与 SEQ ID NO:49、52 或 73 进行比较时,所述多肽具有至少 80% 序列同一性的氨基酸序列,其中所述片段或所述变体赋予所述可再生的植物细胞中的显性负表型;
 - b. 在步骤 (a) 之后,由所述可再生的植物细胞再生出转基因植物,其中所述转基因植物在其基因组中包含所述重组 DNA 构建体;以及
 - c. 选择 (b) 的转基因植物,其中所述转基因植物包含所述重组 DNA 构建体且在包含与不包含所述重组 DNA 构建体的对照植物进行比较时表现出至少一种农学特性的改变,所述农学特性选自:非生物胁迫耐受性、早衰、绿度、生物量、产量、耐旱性、低氮耐受性、根倒伏、收获指数、茎倒伏、植物高度、穗高、穗长、耐盐性、早期幼苗活力和在低温胁迫下的出苗。
4. 一种鉴定 slm1 的等位基因的方法,所述方法包括以下步骤:
 - a. 对突变体玉米植物的群体进行遗传筛选;
 - b. 鉴定一种或多种表现出 slm1 表型的突变体玉米植物;以及
 - c. 从具有 slm1 表型的突变体玉米植物鉴定 slm1 等位基因。
5. 一种制备农学特性改变的转基因植物的方法,所述方法包括以下步骤:

a. 将包含 s1m1 等位基因的第一植物与包含重组 DNA 构建体的第二植物杂交,所述重组 DNA 构建体包含可操作地连接至启动子的分离的多核苷酸;

b. 筛选来自步骤 (a) 的植物群体;以及

c. 选择包含下列的植物:(i) 步骤 (a) 的重组 DNA 构建体;(ii) s1m1 表型;和 (iii) 在与包含所述重组 DNA 构建体但不包含 s1m1 表型的对照植物进行比较时,至少一种农学特性的改变,所述农学特性选自:非生物胁迫耐受性、早衰、绿度、生物量、产量、耐旱性、低氮耐受性、根倒伏、收获指数、茎倒伏、植物高度、穗高、穗长、耐盐性、早期幼苗活力和在低温胁迫下的出苗。

6. 一种植物,所述植物中内源 S1m1 基因的表达相对于对照植物是降低的。

7. 一种由权利要求 5 所述的方法制备的植物或种子。

8. 一种制备权利要求 6 所述的植物的方法,所述方法包括以下步骤:

a. 将突变引入到所述内源 S1m1 基因中;以及

b. 检测所述突变。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其中使用步骤 (a) 和 (b) 是使用定向诱导基因组局部突变 (TILLING) 方法来完成的,并且其中所述突变对于降低所述内源 S1m1 基因的表达或其活性或此二者是有效的。

10. 根据权利要求 8 或 9 所述的方法,其中所述突变是位点特异性突变。

11. 一种制备权利要求 6 所述的植物的方法,其中所述方法包括以下步骤:

a. 将转座子引入到包含内源 S1m1 基因的种质中;

b. 获取步骤 (a) 的种质的子代;以及

c. 鉴定步骤 (b) 的子代植物,所述子代植物中转座子已经插入到所述内源 S1m1 基因中并观察到 S1m1 表达的降低。

12. 根据权利要求 11 所述的方法,所述方法中步骤 (a) 还包括通过转化来将所述转座子引入到所述种质的可再生的植物细胞中以及由所述可再生的植物细胞再生出转基因植物,其中所述转基因植物在其基因组中包含所述转座子。

13. 根据权利要求 4 所述的方法,其中所述方法还包括以下步骤:

i. 将重组 DNA 构建体引入到可再生的植物细胞中,所述重组 DNA 构建体包含由权利要求 4 所述的方法鉴定的 s1m1 等位基因;

ii 在步骤 (i) 之后,由所述可再生的植物细胞再生出转基因植物,其中所述转基因植物在其基因组中包含所述重组 DNA 构建体;以及

iii. 选择 (ii) 的转基因植物,其中所述转基因植物包含所述重组 DNA 构建体且在与不包含所述重组 DNA 构建体的对照植物进行比较时表现出 s1m1 表型。

14. 根据权利要求 1、2 或 3 中任一项所述的方法,其中在具有 les23 突变基因型的植物品系中部分 (a) 的多核苷酸的表达能够部分或全部恢复野生型的表型。

15. 一种制备农学特性改变的转基因植物的方法,所述方法包括以下步骤:

a. 将包含分离的多核苷酸的重组 DNA 构建体引入到可再生的植物细胞中,所述分离的多核苷酸以有义或反义取向可操作地连接至在植物中有功能的启动子,其中所述多核苷酸包含:

i. SEQ ID NO:47、48、50 或 51 的核苷酸序列;

ii 基于 Clustal W 比对方法,在与 SEQ ID NO:47、48、50 或 51 进行比较时具有至少 90%序列同一性的核苷酸序列;

iii. SEQ ID NO:47、48、50 或 51 的至少 100 个连续的核苷酸的核苷酸序列;

iv. 能够在严格条件下与 (i) 的核苷酸序列杂交的核苷酸序列;或

v. 经修饰的植物 miRNA 前体,其中所述前体已经经修饰以用设计用于产生指向 SEQ ID NO:47、48、50 或 51 的 miRNA 的序列替换所述 miRNA 编码区;

b. 在步骤 (a) 之后,由所述可再生的植物细胞再生出转基因植物,其中所述转基因植物在其基因组中包含所述重组 DNA 构建体;以及

c. 选择 (b) 的转基因植物,其中所述转基因植物包含所述重组 DNA 构建体且在与不包含所述重组 DNA 构建体的对照植物进行比较时表现出至少一种农学特性的改变,所述农学特性选自:非生物胁迫耐受性、早衰、绿度、生物量、产量、耐旱性、低氮耐受性、根倒伏、收获指数、茎倒伏、植物高度、穗高、穗长、耐盐性、早期幼苗活力和在低温胁迫下的出苗。

16. 根据权利要求 1-5 或 8-15 中任一项所述的方法,其中所述植物选自:拟南芥、番茄、玉米、大豆、向日葵、高粱、卡诺拉、小麦、苜蓿、棉花、稻、大麦、粟、甘蔗和柳枝稷。

17. 一种植物,所述植物在其基因组中包含重组 DNA 构建体,所述重组 DNA 构建体包含以有义或反义取向或此两种取向可操作地连接至在植物中有功能的启动子的分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含:

a. SEQ ID NO:47、48、50 或 51 的核苷酸序列;

b. 基于 Clustal W 比对方法,在与 SEQ ID NO:47、48、50 或 51 进行比较时具有至少 90%序列同一性的核苷酸序列;

c. 能够在严格条件下与 (a) 的核苷酸序列杂交的核苷酸序列;或

d. 经修饰的植物 miRNA 前体,其中所述前体已经经修饰以用设计用于产生指向 SEQ ID NO:47、48、50 或 51 的 miRNA 的序列替换所述 miRNA 编码区;并且

其中所述植物在与不包含所述重组 DNA 构建体的对照植物进行比较时表现出至少一种农学特性的改变,所述农学特性选自:非生物胁迫耐受性、早衰、绿度、生物量、产量、耐旱性、低氮耐受性、根倒伏、收获指数、茎倒伏、植物高度、穗高、穗长、耐盐性、早期幼苗活力和在低温胁迫下的出苗。

18. 根据权利要求 17 所述的植物,其中所述植物选自:拟南芥、番茄、玉米、大豆、向日葵、高粱、卡诺拉、小麦、苜蓿、棉花、稻、大麦、粟、甘蔗和柳枝稷。

19. 权利要求 17 或权利要求 18 所述的植物的种子,其中所述种子在其基因组中包含重组 DNA 构建体,所述重组 DNA 构建体包含以有义或反义取向可操作地连接至在植物中有功能的启动子的分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含:

a. SEQ ID NO:47、48、50 或 51 的核苷酸序列;

b. 基于 Clustal W 比对方法,在与 SEQ ID NO:47、48、50 或 51 进行比较时具有至少 90%序列同一性的核苷酸序列;

c. SEQ ID NO:47、48、50 或 51 的至少 100 个连续的核苷酸的核苷酸序列;或

d. 经修饰的植物 miRNA 前体,其中所述前体已经经修饰以用设计用于产生指向 SEQ ID NO:47、48、50 或 51 的 miRNA 的序列替换所述 miRNA 编码区;并且

其中由所述种子产生的植物在与不包含所述重组 DNA 构建体的对照植物进行比较时

表现出至少一种农学特性的改变,所述农学特性选自:非生物胁迫耐受性、早衰、绿度、生物量、产量、耐旱性、低氮耐受性、根倒伏、收获指数、茎倒伏、植物高度、穗高、穗长、耐盐性、早期幼苗活力和在低温胁迫下的出苗。

20. 一种鉴定具有至少一种农学特性改变的第一玉米植物或第一玉米种质的方法,所述方法包括在所述第一玉米植物或所述第一玉米种质中检测至少一种与所述农学特性相关的标记基因座的多态性,其中所述标记基因座编码多肽,所述多肽包含与 SEQ ID NO:49 具有至少 90% 且小于 100% 序列同一性的氨基酸序列,其中在与对照植物进行比较时,所述多肽在植物或其植物部分中的表达引起至少一种农学特性的改变,所述农学特性选自:非生物胁迫耐受性、早衰、绿度、生物量、产量、耐旱性、低氮耐受性、根倒伏、收获指数、茎倒伏、植物高度、穗高、穗长、耐盐性、早期幼苗活力和在低温胁迫下的出苗,其中所述对照植物包含 SEQ ID NO:49。

21. 根据权利要求 20 所述的方法,其中所述多肽包含 SEQ ID NO:73 中所示的序列。

类病斑表型的抑制子 SLM1

技术领域

[0001] 本发明领域涉及植物育种和遗传学,并且具体地,涉及用于植物改良的重组 DNA 构建体。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求提交于 2013 年 1 月 31 日的美国临时申请 61/758937 的权益,其全部内容以引用方式并入本文。

背景技术

[0004] 玉米类病斑突变体 (Johal 等人 1995BioEssays 17(8):685-692) 为研究在很大程度上仍然难懂的植物细胞死亡的遗传机制提供了极佳的模型。在不同的遗传背景下许多类病斑的表型是不同的,表明天然变体可被用于遗传分析这一现象的过程以搜寻修饰物。先前的研究 (Penning 等人 2004Genome 47:961-969) 在玉米近交系 Mo20W 的 2 号染色体上鉴定了一个抑制隐性类病斑突变 les23 的主要数量性状座位 (被命名为 slm1,类病斑 -1 的抑制子)。

发明内容

[0005] 本公开包括了用于调节 Slm1 活性的方法和组合物。本发明提供了用于调节 Slm1 在宿主植物或植物细胞中的表达以调节农学特性的方法。

[0006] 附图说明和序列表

[0007] 根据以下的详细描述和附图以及序列表,可以更全面地理解本公开,以下的详细描述和附图以及序列表形成本申请的一部分。

[0008] 图 1A-图 1C 示出了在玉米中图位克隆 slm1 和在 slm1 处的四个突变等位基因。图 1A:F2 和 BC 群体的 slm1 遗传图谱。标记的上方显示了以厘摩为单位的遗传距离,并且标记的下方显示了重组体的数量。图 1B:对来自野生型和 Mo20W 的在 slm1 区间的 BAC 克隆进行测序和注释。图 1C:在玉米 slm1 中的四个突变等位基因的基因结构和分子表征。

[0009] 图 2:在玉米中 les23 的基因结构和突变等位基因。

[0010] 图 3 示出了在 SLM1 和 LES23 之间的物理相互作用。LES23 的全长蛋白质与来自 Va35 的 N 末端 (1-187 位氨基酸) 有物理相互作用,但与来自 Va35 的全长 SLM1 或来自 Mo20W 的预测截短产物没有物理相互作用。

[0011] 图 4 示出了 slm1 的精细作图步骤。

[0012] 图 5 示出了来自 BC8F2 种群包含 2、1、0 个 Slm1-Mo20W 拷贝的 les23-ref 纯合植物 (分别为从左至右)。

[0013] 图 6A-6B 示出了来自各种植物种类的 LES23 同源物的多重比对。所述比对使用 Clustal W 比对方法进行,多重比对的默认参数是:GAP PENALTY = 10,GAP LENGTH PENALTY = 0.2,Delay Divergent Sequences = 30%,DNA Transition Weight = 0.5,Protein Weight Matrix = Gonnet 系列,DNA Weight Matrix = IUB。在所有植物种类中在位置 19

处的脯氨酸是保守的,但在 les23-ref 突变体中变成了亮氨酸。

[0014] 图 7 示出了 slm1 和 les23 相互作用的工作模型。

[0015] 序列描述以及所附序列表遵循如 37C.F.R. § 1.821-1.825 所列出的关于专利申请中核苷酸和 / 或氨基酸序列公开的规定。

[0016] SEQ ID NO :1-SEQ ID NO :46 是本研究所用的引物。

[0017] SEQ ID NO :47 是来自 Va35 的野生型 Slm1 基因座的基因组核苷酸序列。

[0018] SEQ ID NO :48 是来自 Va35 的野生型 Slm1 基因座的编码蛋白质的核苷酸序列。

[0019] SEQ ID NO :49 是来自 Va35 的野生型 SLM1 蛋白质的氨基酸序列。

[0020] SEQ ID NO :50 是来自 Mo20W 的突变体 slm1 基因座的基因组核苷酸序列。

[0021] SEQ ID NO :51 来自 Mo20W 的突变体 slm1 基因座的核苷酸序列,其对应于 SEQ ID NO :48,蛋白质编码区。

[0022] SEQ ID NO :52 是 SEQ ID NO :51 的翻译产物,存在多个翻译终止密码子。突变体 slm1 基因座编码截短的蛋白质 (SEQ ID NO :73)。

[0023] SEQ ID NO :67 是野生型 Les23 基因座的基因组核苷酸序列。

[0024] SEQ ID NO :68 是野生型 Les23 基因座的编码蛋白质的核苷酸序列。

[0025] SEQ ID NO :69 是野生型 LES23 蛋白质的氨基酸序列。

[0026] SEQ ID NO :70 是突变体 les23-ref 基因座的基因组核苷酸序列。

[0027] SEQ ID NO :71 是突变体 les23-ref 基因座的编码蛋白质的核苷酸序列。

[0028] SEQ ID NO :72 是突变体 les23-ref 蛋白质的氨基酸序列。

[0029] SEQ ID NO :73 是由 SEQ ID NO :51 编码的截短的突变体 slm1 蛋白质的氨基酸序列。

[0030] SEQ ID NO :74 是来自玉米的硝酸诱导的 NOI 蛋白质 (NCBI GI No. 195622454) 的氨基酸序列,对应于玉米 LES23 横向同源物,被命名为 ZmLES23paralog。

[0031] SEQ ID NO :75 是 LES23 的稻同源物 (Os04g0379600 ;NCBI GI NO. 115457982) 的氨基酸序列,被命名为 RIN4-OsJ。

[0032] SEQ ID NO :76 是 LES23 的稻同源物 (假定蛋白质 OsI_15598 ;NCBI GI NO. 218194724) 的氨基酸序列,被命名为 RIN4-OsI。

[0033] SEQ ID NO :77 是拟南芥 RIN4 蛋白质 (AT-RIN4 ;针对 AT3G25070.1 的 TAIR 登录号 1009121715) 的氨基酸序列。

[0034] SEQ ID NO :78 是来自马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 的 RIN4 样蛋白质 (NCBI GI NO. 565345898) 的氨基酸序列,被命名为 StRIN4。

[0035] 此序列表中按照与 IUPAC-IUBMB 标准一致的定义,以单个字母表示核苷酸,并且以三字母表示氨基酸,如 *Nucleic Acids Res.* 13 :3021-3030(1985) 和 *Biochemical J.* 219 (No. 2) :345-373(1984) 中所述,这些文献以引用的方式并入本文。用于核苷酸和氨基酸序列数据的符号和格式遵循在 37C.F.R. § 1.822 中列出的规定。

具体实施方式

[0036] 本文中所列出的每篇参考文献的公开内容的全文均以引用的方式并入本文。

[0037] 如本文所用,以及在所附的权利要求书中,单数形式“一个”和“所述”包括复数涵

义,除非上下文中清楚地另有指明。因此,例如,“一株植物”的涵义包括多株此类植物,“一个细胞”的涵义包括一个或多个细胞及本领域的技术人员已知的等同物等等。

[0038] 如本文所用:

[0039] 术语“les”是指类病斑突变体。术语“les23”是指存在于2号染色体断臂上的玉米特定隐性类病斑(Penning等人2004Genome 47:961-969)。

[0040] 术语“slm1”表示“类病斑1型的抑制子”,是指对les23表型抑制的主要QTL(数量性状座位),其存在于玉米2号染色体上(Penning等人2004Genome 47:961-969)。

[0041] 术语“单子叶植物”和“单子叶的植物”在本文中互换使用。本公开的单子叶植物包括禾本科(Gramineae)。

[0042] 术语“双子叶植物”和“双子叶的植物”在本文中互换使用。本发明的双子叶植物包括以下科:十字花科(Brassicaceae)、豆科(Leguminosae)和茄科(Solanaceae)。

[0043] 术语“全长互补序列”和“全长的互补序列”本文互换使用,是指给定核苷酸序列的互补序列,其中所述互补序列和核苷酸序列由相同数目的核苷酸组成并且是100%互补的。

[0044] “表达序列标签”(“EST”)是得自cDNA文库的DNA序列,并且因此是已经被转录的序列。EST通常通过cDNA插入序列单程测序获得。将完整的cDNA插入序列称为“全长插入序列”(“FIS”)。“重叠群”序列是由选自但不限于由EST、FIS和PCR序列组成的群的两种或更多种序列装配成的序列。将编码完整或功能性蛋白质的序列称为“完全基因序列”(“CGS”),该序列可得自FIS或重叠群。

[0045] “性状”指植物或特定植物材料或细胞的生理学、形态学、生物化学、或物理学特性。在某些情况下,这种特征是人眼可见的,诸如种子或植物大小,或者能够通过生物化学技术测量,诸如检测种子或叶的蛋白质、淀粉、或油含量,或者通过观察代谢或生理过程,例如通过测量缺水耐受性或特定盐或糖浓度的耐受性,或者通过观察一个或多个基因的表达水平,或者通过农学观察诸如渗透胁迫耐受性或产量。

[0046] “农学特性”是可测量的参数,其包括但不限于非生物胁迫耐受性、早衰、绿度、产量、生长速率、生物量、成熟时的鲜重、成熟时的干重、果实产量、种子产量、总植物含氮量、果实含氮量、种子含氮量、营养组织含氮量、总植物游离氨基酸含量、果实游离氨基酸含量、种子游离氨基酸含量、营养组织游离氨基酸含量、总植物蛋白质含量、果实蛋白质含量、种子蛋白质含量、营养组织蛋白质含量、耐旱性、氮摄取、根倒伏、收获指数、茎倒伏、植物高度、穗高、穗长、耐盐性、早期幼苗活力和在低温胁迫下的出苗。

[0047] 非生物胁迫可为选自群的至少一种条件,所述群包括干旱、禁水、洪水、高光强、高温、低温、盐碱、黄化、落叶、重金属毒性、无氧生活、营养缺乏、营养过剩、紫外线照射、大气污染(例如臭氧)和暴露于诱导产生活性氧(ROS)的化学品(例如百草枯)。

[0048] 植物的“提高的胁迫耐受性”相对于参照植物或对照植物进行测量,它是相对在相似于胁迫条件下生长的参照或对照植物而言植物在胁迫条件下存活较长时间并且基本上不表现出相同程度的生理或物理退化的特性。

[0049] 具有“提高的胁迫耐受性”的植物可对一种或多种胁迫条件表现出提高的耐受性。

[0050] 多肽的“胁迫耐受活性”指在转基因植物中过表达所述多肽赋予转基因植物相对于参照植物或对照植物提高的胁迫耐受性。

[0051] 能够测量增加的生物量,例如测量植物高度、植物总叶片面积、植物鲜重、植物干

重或植物种子产量与对照植物相比的增加。

[0052] 提高植物生物量或植物尺寸的能力将具有若干个重要的商业应用。可生成产量较高的作物品种,产生较高的产量,例如在其中营养组织部分用作食物、生物燃料或以上两种用途的植物中。

[0053] 增大的叶片尺寸可受到特别的关注。增加的叶片生物量能够用于提高植物来源的制药或工业产品的产量。总植物光合作用的提高通常通过增加植物叶片面积来完成。附加的光合作用容量可用于提高特定植物组织来源的产量,包括叶片、根、果实或种子、或允许植物在较低光强度下或高光强度下生长。

[0054] 另一种组织(诸如根组织)的生物量的改变可用于改善植物在严酷环境条件下生长的能力,包括干旱或营养缺乏条件,因为较大的根系可较好的获取水或营养物质或吸收水或营养物质。

[0055] 就一些观赏植物而言,将高度期望提供较大品种的能力。就包括果树、产木材树木、或观赏或防风树木和灌木在内的多种植物而言,尺寸增加以产量提高或防护效果改善的形式提供改善的有益效果。

[0056] 玉米须的生长和出现在测定干旱下的产量中具有相当的重要意义(Fuad-Hassan 等人 2008 Plant Cell Environ. 31:1349-1360)。当在开花前发生土壤水分缺乏时,玉米须在玉米壳外的出现受到延迟,而开花基本上不受影响,这导致了开花-抽丝(anthesis-silking)间隔(ASI)的增加(Edmeades 等人 2000 Physiology and Modeling Kernel set in Maize(编辑 M.E. Westgate 和 K. Boote; CSSA(Crop Science Society of America) Special Publication No. 29, Madison, WI; CSSA, 43-73)。针对降低的 ASI 进行选择已经成功地用于提高玉米的耐旱性(Edmeades 等人, 1993 Crop Science 33:1029-1035; Bolanos&Edmeades 1996 Field Crops Research 48:65-80; Bruce 等人, 2002 J. Exp. Botany 53:13-25)。

[0057] 本文用于描述热时间(thermal time)的术语包括“生长度日”(GDD)、“生长度单位”(GDU)和“热单位”(HU)。

[0058] “转基因的”是指通过异源核酸(诸如重组 DNA 构建体)的存在而改变其基因组的任何细胞、细胞系、愈伤组织、组织、植物部分或植物,包括那些初始转基因事件以及从初始转基因事件通过有性杂交或无性繁殖而创制的那些。如本文所用的术语“转基因”不包括通过常规植物育种方法或通过诸如随机异花受精、非重组病毒感染、非重组细菌转化、非重组转座或自发突变之类的自然发生事件导致的基因组(染色体或染色体外)改变。

[0059] “基因组”在用于植物细胞时不仅涵盖存在于细胞核中的染色体 DNA,而且还包括存在于细胞的亚细胞组分(如线粒体、质粒)中的细胞器 DNA。

[0060] “植物”包括整个植物、植物器官、植物组织、植物繁殖体、种子和植物细胞以及相同的子代。植物细胞包括但不限于得自下列物质的细胞:种子、悬浮培养物、胚、分生区、愈伤组织、叶、根、芽、配子体、孢子体、花粉和小孢子。

[0061] “繁殖体”包括能够繁殖新的植物的减数分裂和有丝分裂的全部产物,包括但不限于种子、孢子以及作为营养生殖的途径的植物的部分,诸如球茎、块茎、侧枝、或纤匐枝。繁殖体也包括嫁接,其中植物的一部分被嫁接至不同植物(甚至不同种类的植物)的另外部分以创制活的生物体。繁殖体还包括通过克隆或集合减数分裂产物、或允许减数分裂产物

(天然地或在人工干预下)集合在一起以形成胚芽或受精卵,而产生的全部植物和种子。

[0062] “子代”包括植物的任何后续世代。

[0063] “转基因植物”包括在其基因组内包含异源多核苷酸的植物。例如,异源多核苷酸被稳定地整合进基因组中,使得该多核苷酸传递至连续的世代。异源多核苷酸可以单独地或作为重组 DNA 构建体的部分整合进基因组中。

[0064] 基因改良种质的商业开发也已经进展至向农作物引入多个性状的阶段,其通常称为基因堆叠法 (gene stacking approach)。在该方法中,可将赋予不同所关注特性的多种基因引入植物。基因堆叠可通过许多方法实现,包括但不限于共转化、再转化以及具有不同转基因的品系的杂交。

[0065] “转基因植物”还包括对在其基因组中包含超过一种异源多核苷酸的植物。每种异源多核苷酸均可赋予所述转基因植物不同的性状。

[0066] 相对序列而言的“异源”意指来自外来物种的序列,或者如果来自相同物种,则指通过蓄意的人为干预而从其天然形式发生了组成和 / 或基因座的显著改变的序列。

[0067] “多核苷酸”、“核酸序列”、“核苷酸序列”或“核酸片段”可互换使用并且是任选含有合成的、非天然的或改变的核苷酸碱基的单链 - 或双链 RNA 或 DNA 聚合物。核苷酸 (通常以它们的 5' - 单磷酸形式存在) 通过如下它们的单个字母名称来指代: “A”为腺苷酸或脱氧腺苷酸 (分别相应 RNA 或 DNA), “C”表示胞苷酸或脱氧胞苷酸, “G”表示鸟苷酸或脱氧鸟苷酸, “U”表示尿苷酸, “T”表示脱氧胸苷酸, “R”表示嘌呤 (A 或 G), “Y”表示嘧啶 (C 或 T), “K”表示 G 或 T, “H”表示 A 或 C 或 T, “I”表示肌苷, 并且 “N”表示任意核苷酸。

[0068] “多肽”、“肽”、“氨基酸序列”和“蛋白质”在本文中可互换使用,是指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然存在的氨基酸的人工化学类似物的氨基酸聚合物,以及适用于天然存在的氨基酸聚合物。术语“多肽”、“肽”、“氨基酸序列”和“蛋白质”还可包括修饰形式,包括但不限于糖基化、脂质连接、硫酸盐化、谷氨酸残基的 γ 羧化、羟化和 ADP- 核糖基化。

[0069] “信使 RNA (mRNA)”指无内含子并且可以通过细胞翻译成蛋白质的 RNA。

[0070] “cDNA”是指与 mRNA 模板互补并用逆转录酶从 mRNA 模板合成的 DNA。cDNA 可为单链的或者可用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段转化成双链形式。

[0071] “编码区”是指编码蛋白质或多肽的信使 RNA 的部分 (或另外的核酸分子如 DNA 分子的对应的部分)。“非编码区”是指信使 RNA 或其他核酸分子的不是编码区的全部部分,包括但不限于例如,启动子区、5' 非翻译区 (“UTR”)、3' UTR、内含子和终止子。术语“编码区”和“编码序列”在本文可互换使用。术语“非编码区”和“非编码序列”在本文可互换使用。

[0072] “成熟”蛋白质指经翻译后加工的多肽,即已经去除了存在于初始翻译产物中的任何前肽或肽原的多肽。

[0073] “前体”蛋白质指 mRNA 的初级翻译产物,即前肽和肽原仍然存在。前肽和原肽可为并且不限于细胞内定位信号。

[0074] “分离的”指物质,诸如核酸分子和 / 或蛋白质,该物质基本上不含在天然存在的环境中通常伴随该物质或与其反应的组分,或者说是该物质被从所述组分去除。分离的多核苷酸可从它们天然存在的宿主细胞中纯化。技术人员已知的常规核酸纯化方法可用于获取

分离的多核苷酸。该术语也涵盖重组多核苷酸和化学合成的多核苷酸。

[0075] “重组体”指例如通过化学合成或者通过用基因工程技术操纵分离的核酸片段来实现的两个原本分离的序列片段的人工组合。“重组体”也指已经通过引入异源核酸而进行了修饰的细胞或载体,或源于经这样修饰的细胞的细胞,但不涵盖由天然发生的事件(如自发突变、自然转化/转导/转座)对细胞或载体的改变,例如没有蓄意人为干扰而发生的那些。

[0076] “重组 DNA 构建体”是指在自然界中通常不会一起存在的核酸片段的组合。因此,重组 DNA 构建体可以包含源于不同来源的调控序列和编码序列,或源于相同来源但以不同于通常天然存在的方式排列的调控序列和编码序列。术语“重组 DNA 构建体”和“重组构建体”本文可互换使用。

[0077] 术语“入门克隆”和“入门载体”在本文中可互换使用。

[0078] “调控序列”指位于编码序列上游(5' 非编码序列)、中间或下游(3' 非编码序列)的核苷酸序列,并且该核苷酸序列影响相关编码序列的转录、RNA 加工或稳定性或翻译。调控序列可包括但不限于启动子、翻译前导序列、内含子和聚腺苷酸化识别序列。术语“调控序列”和“调控因子”在本文中可互换使用。

[0079] “启动子”是指能够控制另一核酸片段转录的核酸片段。

[0080] “在植物中有功能的启动子”是能够控制植物细胞中的转录的启动子,无论其是否来源于植物细胞。

[0081] “组织特异启动子”和“组织优选启动子”可互换使用,并且指主要但非必须专一地在一种组织或器官中表达,而是也可在一种特定细胞中表达的启动子。

[0082] “发育调控启动子”指其活性由发育事件决定的启动子。

[0083] 术语“可操作地连接”指核酸片段联合成单一片段,使得其中一个核酸片段的功能受到另一个核酸片段的调控。例如,在启动子能够调控核酸片段的转录时,该启动子与该核酸片段进行了操作地连接。

[0084] “表达”是指产生有功能的产物。例如,核酸片段的表达可以指核酸片段的转录(如生成 mRNA 或功能 RNA 的转录)和/或 mRNA 翻译成前体或成熟蛋白质。

[0085] “表型”是指细胞或生物体的可检测的特征。

[0086] 有关将核酸片段(例如重组 DNA 构建体)插入细胞内的“引入”是指“转染”或“转化”或“转导”,并且包括指将核酸片段整合进真核或原核细胞中,在该细胞中核酸片段可整合进细胞的基因组(如染色体、质粒、质体或线粒体 DNA)内,转变成自主的复制子或瞬时表达(如转染的 mRNA)。

[0087] “转化细胞”是将核酸片段(如重组 DNA 构建体)引入其中的任何细胞。

[0088] 本文所用的“转化”指稳定转化和瞬时转化两者。

[0089] “稳定转化”是指将核酸片段引入宿主生物体的基因组中,导致基因稳定遗传。一旦稳定转化,核酸片段稳定地整合进宿主生物体和任何后续世代的基因组中。

[0090] “瞬时转化”指将核酸片段引入宿主生物体的核中或包含 DNA 的细胞器中,引起基因表达而没有基因稳定遗传。

[0091] “等位基因”是占据染色体上给定位置的基因的几种供选择替代形式的其中一种。当二倍体植物中一对同源染色体上给定基因座上存在的等位基因相同时,该植物在该基因

座处是纯合的。如果二倍体植物中一对同源染色体上给定基因座上存在的等位基因不同,则该植物在该基因座处是杂合的。如果转基因存在于二倍体植物中一对同源染色体中的其中之一上,则该植物在该基因座处是半合子的。

[0092] “叶绿体转运肽”是与蛋白质协同翻译的氨基酸序列,将蛋白质导向在其中制备蛋白质的叶绿体或细胞中存在的其它质体类型 (Lee 等人 (2008) *Plant Cell* 20 : 1603-1622)。术语“叶绿体转运肽”和“质体转运肽”在本文可互换使用。“叶绿体转运序列”指编码叶绿体转运肽的核苷酸序列。“信号肽”是一种与蛋白质共同被翻译并将蛋白质导向分泌系统的氨基酸序列 (Chrispeels, (1991) *Ann. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* 42 : 21-53)。如果将所述蛋白质导向液泡,可另外加上液泡靶向信号 (同上),或如果将所述蛋白质导向内质网,可加上内质网驻留信号 (同上)。如果将蛋白质导向细胞核,将移除任何存在的信号肽并用核定位信号替代 (Raikhel (1992) *Plant Phys.* 100 : 1627-1632)。“线粒体信号肽”是指导前体蛋白质进入线粒体中的氨基酸序列 (Zhang 和 Glaser (2002) *Trends Plant Sci* 7 : 14-21)。

[0093] 序列比对和同一性百分比计算可用设计用于检测同源序列的多种比较方法来测定,这些方法包括但不限于 **LASERGENE**[®] 生物信息计算包 (**DNASTAR**[®] Inc., Madison, WI) 的 **Megalign**[®] 程序。除非另外说明,本文提供的序列的多重比对用 Clustal V 比对方法 (Higgins 和 Sharp (1989) *CABIOS* 5 : 151-153) 进行,采用默认参数 (GAP PENALTY = 10, GAP LENGTH PENALTY = 10)。使用 Clustal V 方法进行逐对比对和蛋白质序列的百分比同一性计算的默认参数为 KTUPLE = 1, GAP PENALTY = 3, WINDOW = 5, 以及 DIAGONALS SAVED = 5。对于核酸,这些参数为 KTUPLE = 2, GAP PENALTY = 5, WINDOW = 4, 以及 DIAGONALS SAVED = 4。在序列比对后,使用 Clustal V 程序,通过参阅相同程序上的“序列距离”表可能获得“百分比同一性”和“趋异度”值;除非另外说明,本文提供的和声明的同一性百分比和趋异度是以该方式计算。

[0094] 另选地,可采用 Clustal W 比对方法。Clustal W 比对方法 (描述于 Higgins 和 Sharp, *CABIOS* 5 : 151-153 (1989); Higgins, D. G. 等人, *Comput. Appl. Biosci.* 8 : 189-191 (1992)) 可见于 **LASERGENE**[®] 生物信息计算包 (**DNASTAR**[®] Inc., Madison, Wis.) 的 MegAlign[™] v6.1 程序。用于多重比对的默认参数对应于 GAP PENALTY = 10, GAP LENGTH PENALTY = 0.2, Delay Divergent Sequences = 30%, DNA Transition Weight = 0.5, Protein Weight Matrix = Gonnet 系列, DNA Weight Matrix = IUB。用于配对比对的默认参数是 Alignment = Slow-Accurate (缓慢-准确), Gap Penalty = 10.0, Gap Length = 0.10, Protein Weight Matrix = Gonnet 250, 以及 DNA Weight Matrix = IUB。在使用 Clustal W 程序比对序列后,可以通过查看同一程序中的“序列距离”表来获得“百分比同一性”和“趋异度”值。

[0095] 术语“在严格条件下”指两个序列在中或高严格条件下杂交。更具体地,中严格条件可由本领域的普通技术人员例如根据 DNA 长度来容易地确定。基本条件如 Sambrook 等人, *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, 第三版, 第 6 章和第 7 章, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 所示, 并且包括使用硝化纤维滤膜的预洗涤溶液 5×SSC, 0.5 % SDS, 1.0mM EDTA (pH8.0), 杂交条件为约 50 % 的甲酰胺, 2×SSC 至 6×SSC, 在约

40–50℃下进行（或其它类似的杂交溶液，例如 Stark 溶液，在约 50% 的甲酰胺中，在约 42℃下进行）并且洗涤条件为例如约 40–60℃，0.5–6×SSC，0.1% SDS。优选地，中严格条件包括在约 50℃和 6×SSC 条件下杂交（并洗涤）。高严格条件也可由本领域的技术人员例如根据 DNA 长度来容易地确定。

[0096] 一般来讲，此类条件包括在比中严格条件更高的温度和 / 或更低的盐浓度下杂交和 / 或洗涤（例如在约 65℃，6×SSC 至 0.2×SSC，优选地 6×SSC，更优选地 2×SSC，最优选地 0.2×SSC 条件下杂交）。例如，高严格条件可包括如上所述杂交并在大约 65–68℃，0.2×SSC，0.1% SDS 条件下洗涤。在杂交和洗涤缓冲液中可以用 SSC（1×SSC 为 0.15M NaCl 和 15mM 柠檬酸钠）取代 SSPE（1×SSPE 为 0.15M NaCl，10mM NaH₂PO₄ 和 1.25mM EDTA，pH7.4）；在完成杂交后洗涤 15 分钟。

[0097] 使用可商购获得的杂交试剂盒也是可能的，所述试剂盒无放射性的底物作为探针。特异性的样品包括与 ECL 直接标记和检测系统（Amersham）杂交。严格条件包括例如使用所述试剂盒包括的杂交缓冲液在 42℃杂交 4 小时，所述缓冲液补充有 5%（w/v）封闭液和 0.5M NaCl，并在 0.4% SDS，0.5×SSC 中，在 55℃下洗涤两次，每次 20 分钟，然后在 2×SSC 中，在室温下洗涤一次，时间 5 分钟。

[0098] 本文使用的标准重组 DNA 和分子克隆技术是本领域所熟知的并且在如下文献中有更全面的描述：Sambrook, J., Fritsch, E.F. 和 Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1989（下文称为“Sambrook”）。

[0099] S1m1 是在被称为“MAGIC”（突变体辅助的基因鉴定和表征）的天然增强子 / 抑制子筛选中发现的数量性状座位（QTL）。由 les23 提供了在该研究中所用的报告基因突变体表型，les23 为导致早熟叶死亡和果穗败育的隐性类病斑突变体。为了了解 S1m1 如何抑制 les23，通过涉及定位克隆、带有突变基因（Mu）的转座子标签和采用 EMS 的定点诱变的方法组合克隆并确认了负责 S1m1 的基因。结果发现了在 NBS-LRR R 基因的 5' 一侧的 2 碱基对插入序列（其导致产生移码和截短的蛋白质）产生了 S1m1 的 les23- 抑制表型。为了确定编码截短的蛋白质的缺陷的 R 基因如何能够作为 les23 的有效抑制子，克隆了 les23 基因。发现在拟南芥 RIN4 基因的同源物中导致单个氨基酸替换的一个错义突变导致了 les23 突变。最初识别为 R 蛋白质 RPM1 的相互作用因子，RIN4 已成为植物先天免疫反应的保护机制的关键组成部分。RIN4 的缺失或降解导致由 R 蛋白质 RPS2 介导的强大的过敏性细胞死亡反应。在这方面，在 SLM 1 基因似乎是拟南芥 RPS2 的功能等同物，在玉米 RIN4 突变时引发 les23 病变。然而，如果 slm1 功能失调，因为其位于 les23- 抑制性数量性状座位 S1m1 中，玉米 Rin4（ZmRin4）缺陷与否不会引发细胞死亡。根据这一模式，完整 SLM 1 蛋白质可以与野生型 ZmRIN4 蛋白质而非突变体 ZmRIN4 有物理的相互作用。因此，看起来是遗传功能获得的数量性状座位，实际上是玉米 R 基因卫士的失去功能的等位基因。

[0100] 在苏云金芽孢杆菌（*Bacillus thuringiensis*）中发现的杀虫蛋白质系统已在 W0 97/40162 中被公开。这个系统包含两种蛋白质：一种为大约 15kDa，另一种为约 45kDa。也参见美国专利 6,083,499 和 6,127,180。这些蛋白质已经分别分配了 Cry34 和 Cry35 的 Cry 命名。类型 Cry34 和 Cry35 作为二元毒素表现出对西部玉米根线虫，玉米根萤叶甲（*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte）的活性（Schnepf 等人 2005 *Applied and*

Environmental Microbiology 71:1765-1774)。

[0101] 在转基因玉米品系 HXRW 中,表达了两个独立的伴胞晶体蛋白质 Cry34 和 Cry35,分子量分别为 14kDa 和 44kDa。同时需要两种杀虫晶体蛋白质来提供针对西部玉米根线虫 (*Diabrotica virgifera virgifera*)、北部玉米根线虫 (*Diabrotica berberis*) 和墨西哥玉米根线虫 (*Diabrotica virgifera zea*, CRW) 幼虫的商业水平的活性。

[0102] HXRW 中存在的 Cry34/35 转基因与在某些近交背景下的明显早衰(叶片枯萎)表型有关。检查 slm1 等位基因作为在以 HXRW 转基因进行近交转化中近交降低早衰量的方法。通过将来自 Mo20W 的 slm1 供体等位基因与三个包含 HXRW 转基因的轮回亲本回交创建了近等基因系(NIL):InbredA-HXRW、InbredB-HXRW 和 InbredC-HXRW。将这些品系回交三代,然后自交两代以创建含有 Mo20W slm1 等位基因和不含 Mo20W slm1 等位基因的两种 BC3S2NIL。此前鉴定了 InbredA 的近交背景,在 HXRW 转基因的存在下表现为严重的叶片枯萎表型,而 InbredB 和 InbredC 近交系表现出不太严重的叶片枯萎。

[0103] 现在来看实施例:

[0104] 实施方案包括分离的多核苷酸和多肽、重组 DNA 构建体(包括抑制 DNA 构建体)、包含这些重组 DNA 构建体的组合物(诸如植物或种子),以及利用这些重组 DNA 构建体的方法。

[0105] 在另一个实施例中,重组 DNA 构建体包含可操作地连接至至少一种调控序列(例如,在植物中起作用的启动子)的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含 SEQ ID NO:47、48、50 或 51 的全部或一个片段,或编码 oSEQ ID NO:49、52 或 73 的全部或一个片段。

[0106] “抑制 DNA 构建体”是在转化或稳定整合进植物基因组时导致该植物中的靶基因“沉默”的重组 DNA 构建体。对该植物来说,该靶基因可为内源的或是转基因的。如本文针对靶基因所使用的,“沉默”通常指在由靶基因表达的 mRNA 或蛋白质/酶的水平上的抑制,和/或在酶活性或蛋白质至功能性的水平上的抑制。本文中可交换使用的术语“抑制”、“抑制性”以及“沉默”,包括降低、减少、减退、减小、抑制、消除或防止。“沉默”或“基因沉默”不确定机理并且包括而且不限于反义、共抑制、病毒抑制、发夹抑制、茎环抑制、基于 RNAi 的方法以及基于小 RNA 的方法。

[0107] 抑制 DNA 构建体可包含来源于受关注的靶基因的区域并且可包含受关注的靶基因的有义链(或反义链)的核酸序列的全部或部分。取决于所要利用的方法,该区域可与所关注基因的有义链(或反义链)的全部或部分 100%相同或小于 100%相同(例如,至少 50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99%相同)。

[0108] 抑制 DNA 构建体可包含感兴趣的基因的有义链(或反义链)的 100、200、300、400、500、600、700、800、900 或 1000 个连续核苷酸及其组合。

[0109] 抑制 DNA 构建体是本领域所熟知的,一旦选定受关注的靶基因就很容易构建,并且包括但不限于共抑制构建体、反义构建体、病毒抑制构建体、发夹抑制构建体、茎环抑制构建体、产生双链 RNA 的构建体,以及更通常的是, RNAi (RNA 干扰) 构建体和小 RNA 构建体,例如 siRNA (短干扰 RNA) 构建体和 miRNA (微 RNA) 构建体。

[0110] 还可通过使用人工 miRNA 前体、核酶构建体和基因中断实现基因表达的抑制。可使用经修饰的植物 miRNA 前体,其中所述前体已经经修饰以用设计用于产生针对感兴趣的核苷酸序列的 miRNA 的序列替换所述 miRNA 编码区。可通过使用转座元件或通过使用导致位点特异性突变的化学试剂实现基因中断。

[0111] “反义抑制”指产生能够抑制靶基因或基因产物表达的反义 RNA 转录物。“反义 RNA”指与靶初级转录物或 mRNA 的全部或部分互补,并阻断分离的靶核酸片段表达的 RNA 转录物(美国专利 5,107,065)。反义 RNA 可与特定基因转录物的任何部分,即 5' 非编码序列、3' 非编码序列、内含子或编码序列互补。

[0112] “共抑制”指产生能够抑制靶基因或基因产物表达的有义 RNA 转录物。“有义”RNA 是指包括 mRNA 并且在细胞内或体外可被翻译成蛋白质的 RNA 的 RNA 转录物。此前,已通过着眼于以有义方向过表达与内源 mRNA 具有同源性的核苷酸序列(其导致与过表达的序列具有同源性的所有 RNA 减少)设计出了植物中的共抑制构建体(参见 Vaucheret 等人,Plant J., 16 :651-659(1998);以及 Gura, Nature 404 :804-808(2000))。

[0113] 另一种变型描述了将植物病毒序列用于引导对近端 mRNA 编码序列的抑制(1998 年 8 月 20 日公开的 PCT 专利公布 WO 98/36083)。

[0114] RNA 干扰是指由短干扰性 RNA (siRNA) 介导的动物中序列特异性转录后基因沉默的过程(Fire 等人, Nature 391 :806(1998))。在植物中的相应过程通常称为转录后基因沉默 (PTGS) 或 RNA 沉默,并且在真菌中还称为镇压。据信转录后基因沉默过程是用于防止外来基因表达的进化保守的细胞防御机制,并且通常由不同植物区系和门所共享(Fire 等人, Trends Genet. 15 :358(1999))。

[0115] 小 RNA 在控制基因表达中起重要作用。包括开花在内的很多发育过程是由小 RNA 控制的。现在能够通过使用在植物中产生小 RNA 的转基因构建体来以工程手段改变植物基因的基因表达。

[0116] 小 RNA 似乎是通过与互补 RNA 或 DNA 靶序列碱基配对来行使功能的。当与 RNA 结合时,小 RNA 或者引发靶序列的 RNA 裂解或者引发翻译抑制。当与 DNA 靶序列结合时,小 RNA 被认为可介导靶序列的 DNA 甲基化。无论具体机制是什么,这些事件的后果是基因表达被抑制。

[0117] microRNA(miRNA) 是长度为约 19 至约 24 个核苷酸(nt)的已经在动物和植物中鉴定出的非编码 RNA(Lagos-Quintana 等人, Science 294 :853-858(2001);Lagos-Quintana 等人, Curr. Biol. 12 :735-739(2002);Lau 等人, Science 294 :858-862(2001);Lee 和 Ambros, Science 294 :862-864(2001);Llave 等人, Plant Cell 14 :1605-1619(2002);Mourelatos 等人, Genes Dev. 16 :720-728(2002);Park 等人, Curr. Biol. 12 :1484-1495(2002);Reinhart 等人, Genes. Dev. 16 :1616-1626(2002))。它们是由大小为约 70 至 200nt 的较长前体转录物加工生成的,并且这些前体转录物能够形成稳定的发夹结构。

[0118] 微 RNA(miRNA) 似乎通过与位于由这些基因产生的转录物中的互补序列结合来调控靶基因。miRNA 似乎可能进入至少两条靶基因调节途径:(1) 翻译抑制;和(2) RNA 裂解。进入 RNA 裂解途径的微 RNA 与在动物中 RNA 干扰(RNAi)期间以及在植物中转录后基因沉默(PTGS)期间产生的 21-25nt 短干扰性 RNA (siRNA) 类似,并且可能整合进与在 RNAi 情况

中观察到的复合物类似或相同的 RNA- 诱导的沉默复合物 (RISC) 中。

[0119] 术语“miRNA- 星号序列”和“miRNA* 序列”在本文互换使用,它们是指在 miRNA 前体中与 miRNA 序列高度互补的序列。所述 miRNA 和 miRNA* 序列形成了 miRNA 前体发夹结构的茎区的部分。

[0120] 在一个实施例中,提供了抑制靶序列的方法,其包括在细胞中引入编码与靶标基本上互补的 miRNA 的核酸构建体。在某些实施例中,所述 miRNA 包含约 19、20、21、22、23、24、或 25 个核苷酸。在某些实施例中,所述 miRNA 包含 21 个核苷酸。在某些实施例中,所述核酸构建体编码 miRNA。在某些实施例中,所述核酸构建体编码可形成双链 RNA,或包含所述 miRNA 的发夹结构的多核苷酸前体。

[0121] 在某些实施例中,所述核酸构建体包含经修饰的内源植物 miRNA 前体,其中所述前体经过修饰用设计以产生针对靶序列的 miRNA 的序列替换了内源 miRNA 编码区。植物 miRNA 前体可为全长前体的全长或一个片段。在某些实施例中,所述内源植物 miRNA 前体是来自双子叶植物或单子叶植物。在某些实施例中,所述内源植物 miRNA 前体是来自拟南芥、番茄、玉米、大豆、向日葵、高粱、卡诺拉、小麦、苜蓿、棉花、稻、大麦、粟、甘蔗和柳枝稷。

[0122] 在某些实施例中,所述 miRNA 模板,(即编码 miRNA 的多核苷酸)并且因此所述 miRNA 可包含相对于靶序列的一些错配。在某些实施方案中,与靶序列相比,miRNA 模板具有 > 1 个核苷酸错配,例如,与靶序列相比,miRNA 模板可具有 1、2、3、4、5 或更多个错配。错配程度还可通过确定 miRNA 模板与靶序列的互补序列的同一性百分比来描述。例如,与靶序列的互补序列相比,miRNA 模板可具有包括约至少 70%、75%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性百分比。

[0123] 在某些实施例中,所述 miRNA 模板,(即编码 miRNA 的多核苷酸)并且因此所述 miRNA 可包含相对于 miRNA- 星号序列的一些错配。在某些实施例中,与 miRNA- 星号序列相比,miRNA 模板具有 > 1 个核苷酸错配,例如,与 miRNA- 星号序列相比,miRNA 模板可具有 1、2、3、4、5 或更多个错配。错配程度还可通过确定 miRNA 模板与 miRNA- 星号序列的互补序列的同一性百分比来描述。例如,与 miRNA- 星号序列相比,miRNA 模板可具有包括约至少 70%、75%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性百分比。

[0124] 调控序列:

[0125] 本公开的重组 DNA 构建体(包括抑制 DNA 构建体)可包含至少一种调控序列。

[0126] 调控序列可为启动子。

[0127] 多种启动子可用于本公开的重组 DNA 构建体中。可根据所需结果来选择启动子,并且可包括用于在宿主生物体中表达的组成型启动子、组织特异启动子、诱导型启动子或其它启动子。

[0128] 在多数情况下引起基因在大多数细胞型中表达的启动子通常称为“组成型启动子”。

[0129] 虽然候选基因当通过组成型启动子驱动表达时可预测其效应,但候选基因在 35S 或 UBI 启动子控制下的高水平、组成型表达可具有多重效应。使用组织特异和 / 或胁迫特异启动子可消除不需要的效应但保留耐旱性的能力。在拟南芥中已经观察到了该效应

(Kasuga 等人 (1999) *Nature Biotechnol.* 17 :287-91)。

[0130] 适用于植物宿主细胞的组成型启动子包括 (例如) Rsyn7 启动子的核心启动子和在 WO 99/43838 和美国专利 6,072,050 中公开的其他组成型启动子; CaMV 35S 核心启动子 (Odell 等人, *Nature* 313 :810-812 (1985)); 稻肌动蛋白 (McElroy 等人, *Plant Cell* 2 :163-171 (1990)); 泛素 (Christensen 等人, *Plant Mol. Biol.* 12 :619-632 (1989) 和 Christensen 等人, *Plant Mol. Biol.* 18 :675-689 (1992)); pEMU (Last 等人, *Theor. Appl. Genet.* 81 :581-588 (1991)); MAS (Velten 等人, *EMBO J.* 3 :2723-2730 (1984)); ALS 启动子 (美国专利 5,659,026), 组成型合成核心启动子 SCP1 (国际公布 03/033651) 等。其他组成型启动子包括例如在美国专利 5,608,149、5,608,144、5,604,121、5,569,597、5,466,785、5,399,680、5,268,463、5,608,142 和 6,177,611 中公开的那些启动子。

[0131] 在选择用于本公开的方法的启动子时,可能需要使用组织特异启动子或发育调控启动子。

[0132] 组织特异性启动子或发育调节启动子是这样的 DNA 序列:该序列调节 DNA 序列选择性地在对雄穗发育、结籽或二者重要的植物细胞/组织中表达,并限制这种 DNA 序列只在植物的雄穗发育或种子成熟期间表达。任何引起所需时空表达的可鉴定启动子都可用于本公开的方法中。

[0133] 可用于本公开的种子或胚芽特异性启动子包括大豆 Kunitz 胰蛋白酶抑制剂启动子 (Kti3, Jofuku 和 Goldberg, *Plant Cell* 1 :1079-1093 (1989))、马铃薯块茎储藏蛋白启动子 (马铃薯块茎) (Rocha-Sosa, M. 等人 (1989) *EMBO J.* 8 :23-29)、convicilin 启动子、豌豆球蛋白启动子和蚕豆豆球蛋白启动子 (豌豆子叶) (Rerie, W.G. 等人 (1991) *Mol. Gen. Genet.* 259 :149-157; Newbigin, E.J. 等人 (1990) *Planta* 180 :461-470; Higgins, T.J.V. 等人 (1988) *Plant. Mol. Biol.* 11 :683-695)、玉米蛋白启动子 (玉米胚乳) (Schemthaner, J.P. 等人 (1988) *EMBO J.* 7 :1249-1255)、菜豆素启动子 (菜豆子叶) (Segupta-Gopalan, C. 等人 (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82 :3320-3324)、植物血球凝集素启动子 (菜豆子叶) (Voelker, T. 等人 (1987) *EMBO J.* 6 :3571-3577)、B-伴球蛋白启动子和大豆球蛋白启动子 (大豆子叶) (Chen, Z-L 等人 (1988) *EMBO J.* 7 :297-302)、谷蛋白启动子 (大米胚乳)、大麦醇溶蛋白启动子 (大麦胚乳) (Marriis, C. 等人 (1988) *Plant Mol. Biol.* 10 :359-366)、麦谷蛋白启动子和麦醇溶蛋白启动子 (小麦胚乳) (Colot, V. 等人 (1987) *EMBO J.* 6 :3559-3564) 和甘薯贮藏蛋白启动子 (甘薯块根) (Hattori, T. 等人 (1990) *Plant Mol. Biol.* 14 :595-604)。可操作地连接至嵌合基因构建体中的异源编码区的种子特异性基因的启动子在转基因植物中保持它们的时空表达模式。此类例子包括在拟南芥和甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) 种子中表达脑啡肽的拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 2S 种子储藏蛋白基因启动子 (Vanderkerckhove 等人, *Bio/Technology* 7 :L929-932 (1989))、表达荧光素酶的菜豆凝集素和 β -菜豆蛋白启动子 (Riggs 等人, *Plant Sci.* 63 :47-57 (1989)) 和表达氯霉素乙酰转移酶的小麦谷蛋白启动子 (Colot 等人, *EMBO J.* 6 :3559-3564 (1987))。

[0134] 可诱导启动子响应内源或外源刺激的存在,例如通过化合物 (化学诱导剂),或响应环境、激素、化学信号和/或发育信号而选择性表达可操作地连接的 DNA 序列。可诱导的或受调控的启动子包括例如受光、热、胁迫、水涝或干旱、植物激素、创伤或诸如乙醇、茉莉

酮酸酯、水杨酸或安全剂之类的化学品调控的启动子。

[0135] 用于本公开的启动子包括以下启动子:1) 胁迫诱导型 RD29A 启动子 (Kasuga 等人 (1999) *Nature Biotechnol.* 17:287-91); 2) 大麦启动子 B22E; B22E 的表达是发育中的玉米籽粒中的柄所特异性的 (“Primary Structure of a Novel Barley Gene Differentially Expressed in Immature Aleurone Layers”, Klemsdal, S.S. 等人, *Mol. Gen. Genet.* 228(1/2):9-16(1991)); 以及 3) 玉米启动子 Zag2 (“Identification and molecular characterization of ZAG1, the maize homolog of the Arabidopsis floral homeotic gene AGAMOUS”, Schmidt, R.J. 等人, *Plant Cell* 5(7):729-737(1993); “Structural characterization, chromosomal localization and phylogenetic evaluation of two pairs of AGAMOUS-like MADS-box genes from maize”, Theissen 等人, *Gene* 156(2):155-166(1995); NCBI GenBank 登录号 X80206)。Zag2 转录物可在授粉前 5 天至授粉后 (DAP) 7 至 8 天被检测到, 并且引导 Cim1 在发育中的雌花序的心皮中表达, Cim1 对发育中的玉米籽粒的籽仁而言是特异性的。Cim1 转录物在授粉前 4 天至 5 天至授粉后 6 至 8 天被检测到。其他可用的启动子包括可来源于其表达与发育中的雌小花母系相关的基因的任何启动子。

[0136] 用于调控本公开的核苷酸序列在植物中表达的其它启动子是茎特异性启动子。此类茎特异性启动子包括苜蓿 S2A 启动子 (GenBank 登录号 EF030816; Abrahams 等人, *Plant Mol. Biol.* 27:513-528(1995)) 和 S2B 启动子 (GenBank 登录号 EF030817) 等等, 这些文献以引用的方式并入本文。

[0137] 启动子可整个源于原生基因, 或者由源于天然存在的不同启动子的不同元件构成, 或者甚至包含合成的 DNA 片段。

[0138] 用于本公开的启动子可包括: RIP2、mLIP15、ZmCOR1、Rab17、CaMV 35S、RD29A、B22E、Zag2、SAM 合成酶、泛素、CaMV 19S、nos、Adh、蔗糖合成酶、R- 等位基因、维管组织优选启动子 S2A (GenBank 登录号 EF030816) 和 S2B (GenBank 登录号 EF030817) 及来自玉米 (*Zea mays*) 的组成型启动子 GOS2。其它启动子包括根优选的启动子, 例如玉米 NAS2 启动子、玉米 Cyclo 启动子 (US 2006/0156439, 公开于 2006 年 7 月 13 日)、玉米 ROOTMET2 启动子 (W005063998, 公开于 2005 年 7 月 14 日)、CR1BIO 启动子 (W006055487, 公开于 2006 年 5 月 26 日)、CRWAQ81 (W005035770, 公开于 2005 年 4 月 21 日) 和玉米 ZRP2.47 启动子 (NCBI 登录号: U38790; GI No. 1063664)。

[0139] 本公开的重组 DNA 构建体也可包括其它调控序列, 包括但不限于翻译前导序列、内含子和多腺苷酸化识别序列。在本公开的另一个实施例中, 本公开的重组 DNA 构建体还包括增强子或沉默子。

[0140] 内含子序列可以加至 5' 非翻译区、蛋白质编码区或 3' 非翻译区以增加积聚在胞浆中的成熟信使的量。已经显示, 在植物和动物二者的表达构建体的转录单位中包含可剪接内含子可使基因表达在 mRNA 和蛋白质水平上都增强高达 1000 倍。Buchman 和 Berg, *Mol. Cell Biol.* 8:4395-4405(1988); Callis 等人, *Genes Dev.* 1:1183-1200(1987)。

[0141] 适用于分离基因和调控序列和适用于本公开的组合物和方法的植物的例子应该包括但不限于苜蓿、苹果、杏、拟南芥植物、洋蓟、芝麻菜、芦笋、鳄梨、香蕉、大麦、豆类、甜菜、黑莓、蓝莓、西兰花、抱子甘蓝、卷心菜、卡诺拉、香瓜、胡萝卜、木薯、蓖麻、菜花、芹菜、樱

桃、菊苣、芜荑、柑桔类、克莱门氏小柑橘类、三叶草、椰子、咖啡、玉米、棉、蔓越莓、黄瓜、花旗松、茄子、菊苣、茅菜、桉树、茴香、无花果、大蒜、葫芦、葡萄、柚子树、白兰瓜、豆薯、猕猴桃、生菜、韭葱、柠檬、酸橙、火炬松、亚麻子、芒果、甜瓜、蘑菇、油桃、坚果、燕麦、油棕、油菜、秋葵、橄榄树、洋葱、橙、观赏植物、棕榈、木瓜树、欧芹、欧洲防风草、豌豆、桃树、花生、梨树、胡椒、柿树、松树、菠萝、大蕉、李树、石榴树、白杨、马铃薯、南瓜、温柏、辐射松、红菊苣、萝卜、油菜、树莓、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、枫香树、柳枝稷、柑橘、茶、烟草、蕃茄、黑小麦、草皮草、芜菁、葡萄树、西瓜、小麦、薯蓣和西葫芦。

[0142] 本公开的组合物包括包含所述重组 DNA 构建体的转基因的微生物、细胞、植物和种子。所述细胞可以是真核细胞，例如酵母、昆虫或植物细胞，或是原核细胞，例如细菌细胞。

[0143] 本公开的组合物是其基因组中包含本发明的任何重组 DNA 构建体（包括任何抑制 DNA 构建体）（例如上面所讨论的任何一种构建体）的植物。组合物也包括任何植物的子代，以及获得自植物或其子代的任何种子，其中所述子代或种子在其基因组中包含重组 DNA 构建体（或抑制 DNA 构建体）。子代包括通过植物的自花授粉或异型杂交而获得的连续世代。子代也包括杂交系和近交系。

[0144] 在杂交种子繁殖的农作物中，成熟的转基因植物可自花授粉而产生纯合的近交系植物。该近交系植物产生含有新引入的重组 DNA 构建体（或抑制 DNA 构建体）的种子。这些种子可生长而产生将会表现出改变的农学特性（例如，任选地在水限制条件下农学特性增加）的植物，或可用于育种程序以产生杂交种子，这些杂交种子可生长而产生将会表现出此类农学特性改变的植物。所述种子可为玉米种子。

[0145] 所述植物可为单子叶或双子叶植物，例如玉米或大豆植物。所述植物还可以是向日葵、高粱、卡诺拉、小麦、苜蓿、棉花、稻、大麦、粟、甘蔗或柳枝稷。所述植物可为杂交植物或近交植物。

[0146] 重组 DNA 构建体可稳定地整合进植物的基因组中。

[0147] 在本文所述实施例的任一项中，所述重组 DNA 构建体（或抑制 DNA 构建体）可以包含至少一种在植物中有功能的启动子作为调控序列。

[0148] 在本文所述实施例的任一项或本公开的任何其它实施例中，所述至少一种农学特性的改变是增加或减少。

[0149] 在本文所述实施例的任一项中，所述至少一种农学特性可以选自：非生物胁迫耐受性、早衰、绿度、产量、生长速率、生物量、成熟时的鲜重、成熟时的干重、果实产量、种子产量、总植物含氮量、果实含氮量、种子含氮量、营养组织含氮量、总植物氨基酸含量、果实游离氨基酸含量、种子游离氨基酸含量、营养组织游离氨基酸含量、总植物蛋白质含量、果实蛋白质含量、种子蛋白质含量、营养组织蛋白质含量、耐旱性、氮摄取、根倒伏、收获指数、茎倒伏、植物高度、穗高、穗长、盐耐受性、早期幼苗活力和在低温胁迫下的出苗。例如，至少一种农学特性的改变可为产量、绿度或生物量的增加，或早衰的减少。

[0150] 在本文所述实施例的任一项中，在水限制条件下，所述植物在与不包含所述重组 DNA 构建体（或所述抑制 DNA 构建体）的对照植物进行比较时可以表现出至少一种农学特性的改变。

[0151] 在本文所述实施例的任一项中,所述植物在水限制条件下可以表现出相对于对照植物较少的产量损失,例如,至少 25%、至少 20%、至少 15%、至少 10%或至少 5%的产量损失,或在水非限制性条件下相对于对照植物将具有提高的产量,例如,至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%或至少 25%的提高了的产量。

[0152] “干旱”指植物可利用的水不足,尤其是当时间延长时,能够引起植物损伤或阻止其正常发育(例如限制植物生长或种子产量)。“水限制条件”是指在其中的水量不足以维持最优的植物生长和发育的植物生长环境。术语“干旱”和“水限制性条件”在本文可互换使用。

[0153] “耐旱性”指植物在干旱条件下存活较长时间并且基本上不表现出生理或物理退化的特性。

[0154] 多肽的“耐旱活性”指在转基因植物中过表达所述多肽赋予转基因植物相对于参照植物或对照植物增强的耐旱性。

[0155] 植物的“耐旱性提高”相对于参照植物或对照植物进行测量,它是植物在干旱条件下存活较长时间,并且相对于在相似干旱条件下生长的参照或对照植物基本上不表现出相同程度的生理或物理退化的特性。通常当转基因植物在其基因组中包含重组 DNA 构建体或抑制 DNA 构建体时,它相对于参比或对照植物表现出增强的耐旱性,所述参比或对照植物在其基因组中不包含重组 DNA 构建体或抑制 DNA 构建体。

[0156] 如本文使用,“三重胁迫”是指由于干旱胁迫、高温胁迫和高光照胁迫施加于植物的非生物胁迫。

[0157] 术语“热胁迫”和“温度胁迫”可互换使用,并且定义为环境温度以充分的时间热到足够使这些温度导致植物功能或发育的损害的情况,其在损害上是可逆或不可逆的。“高温”可以是“高空气温度”或“高土壤温度”、“高日间温度”或“高夜间温度”、或超过一种的这样的组合。

[0158] 在本公开的一个实施例中,所述环境温度可在 30℃至 36℃的范围内。在本公开的一个实施例中,所述高温胁迫的时长可在 1-16 小时的范围内。

[0159] “高光照强度”和“高照射”以及“光照胁迫”可互换使用,并且是指通过对植物实施充分时间高得足以使其对该植物导致光抑制损害的光照强度而施加的胁迫。

[0160] 在本公开的一个实施例中,所述光密度可在 250 μ E 至 450 μ E 的范围内。在本公开的一个实施例中,所述高光密度胁迫的时长可在 12-16 小时的范围内。

[0161] “三重胁迫耐受性”是植物在干旱、高温和高光照强度的组合胁迫条件下存活长时间而不表现出实质性生理或物理退化的性状。

[0162] “百草枯”是对植物实施氧化胁迫的除草剂。联吡啶类除草剂百草枯通过拦截来自 PSI 中的电子传递链的电子而发挥作用。这一反应导致联吡啶自由基的产生,其易于与分子氧进行反应而产生过氧化物。植物中的百草枯耐受性已被关联于氧自由基的清理能力(Lannelli, M. A. 等人 (1999) J Exp Botany, 第 50 卷, 第 333 期, 第 523-532 页)。据报道百草枯抗性植物对于其它氧化胁迫也具有较高的耐受性。

[0163] “百草枯胁迫”被定义为通过对植物给以 0.03 至 0.3 μ M 的百草枯浓度而对它们施加的胁迫。

[0164] 大量的不良环境条件(诸如干旱、盐胁迫以及除草剂的使用)促进了反应性氧化物

质 (ROS) 在植物细胞中的过量产生。ROS (诸如单线态氧、过氧化物自由基、过氧化氢 (H_2O_2) 和羟自由基) 据认为是导致急性细胞损害的主要因素,这是由于它们与膜脂、蛋白质和 DNA 的高反应性导致的 (Mittler, R. (2002) Trends Plant Sci 第 7 卷,第 9 期)。

[0165] 具有“三重胁迫耐受活性”的多肽指在转基因植物中过表达所述多肽赋予转基因植物相对于参照植物或对照植物提高的三重胁迫耐受性。具有“百草枯胁迫耐受活性”的多肽指在转基因植物中过表达所述多肽赋予转基因植物相对于参照植物或对照植物提高的百草枯胁迫耐受性。

[0166] 通常当转基因植物在其基因组中包含重组 DNA 构建体或抑制 DNA 构建体时,它相对于参照或对照植物表现出提高的胁迫耐受性,所述参照或对照植物在其基因组中不包含所述重组 DNA 构建体或抑制 DNA 构建体。

[0167] 本领域的普通技术人员熟悉模拟干旱条件以及对已经受了模拟的或天然存在的干旱条件的植物的耐旱性进行评价的方案。例如,技术人员可通过向植物提供比正常需求较少的水或在一定时期内不提供水来模拟干旱条件,并且技术人员可通过寻找在生理和/或物理条件上的差异来评价耐旱性,包括但不限于活力、生长、大小、或根长、或具体地叶片颜色或叶片面积大小。用于评价耐旱性的其它技术包括测量叶绿素荧光、光合作用速率和换气速率。

[0168] 干旱胁迫实验可以包括慢性胁迫 (即缓慢干燥) 和/或可以包括两次急性胁迫 (即突然排水),这两次急性胁迫由一天或两天的恢复隔开。慢性胁迫可持续 8-10 天。急性胁迫可持续 3-5 天。在对转基因植物和相应对照植物进行干旱胁迫以及良好灌溉处理期间可测量以下变量:

[0169] 变量“%面积 chg_慢性开始-急性 2”是介于慢性胁迫第一天和第二次急性胁迫那一天之间的、通过远可见光谱成像测定的总面积百分比变化的量度。

[0170] 变量“%面积 chg_慢性开始-慢性结束”是介于慢性胁迫第一天和慢性胁迫最后一天之间的、通过远可见光谱成像测定的总面积百分比变化的量度。

[0171] 变量“%面积 chg_慢性开始-收获”是介于慢性胁迫第一天和收获那一天之间的、通过远可见光谱成像测定的总面积百分比变化的量度。

[0172] 变量“%面积 chg_慢性开始-恢复 24 小时”是介于慢性胁迫第一天和恢复 24 小时 (急性胁迫 2 之后 24 小时) 之间的、通过远可见光谱成像测定的总面积百分比变化的量度。

[0173] 变量“psii_急性 1”是在第一次急性胁迫末期的光系统 II (PSII) 效率的量度。它提供对 PSII 天线吸光效率的评价,并且直接涉及叶片内部的二氧化碳同化。

[0174] 变量“psii_急性 2”是在第二次急性胁迫末期的光系统 II (PSII) 效率的量度。它提供对 PSII 天线吸光效率的评价,并且直接涉及叶片内部的二氧化碳同化。

[0175] 变量“fv/fm_急性 1”是在第一次急性胁迫末期的最佳量子产率 (F_v/F_m) 的量度 - (最大和最小荧光之间的可变荧光差值 / 最大荧光)。

[0176] 变量“fv/fm_急性 2”是在第二次急性胁迫末期的最佳量子产率 (F_v/F_m) 的量度 - (最大和最小荧光之间的可变荧光差值 / 最大荧光)。

[0177] 变量“叶片卷曲_收获”是在收获日的顶部图像对侧面图像的比率的量度。

[0178] 变量“叶片卷曲_恢复 24 小时”是恢复 24 小时顶部图像对侧面图像的比率的量

度。

[0179] 变量“比生长速率 (SGR)”指植物总表面积经过单独一天的变化 (通过 Lemna Tec Instrument 测量) ($Y(t) = Y_0 * e^{r*t}$)。 $Y(t) = Y_0 * e^{r*t}$ 等同于在 $Y/\Delta t$ 中的 % 变化, 其中的单个术语如下所述: $Y(t)$ = 在 t 天的总表面积; Y_0 = 起始总表面积 (估计的); r = 比生长速率天⁻¹, 并且 t = 种植后的天数 (“DAP”)。

[0180] 变量“苗干重”是将苗置于 104°C 烘箱 96 小时后的苗重量的量度。

[0181] 变量“苗鲜重”是从植物切除后立即称重的苗重量的量度。

[0182] 下文例子描述一些用于模拟干旱条件和 / 或评价耐旱性的代表性规程和技术。

[0183] 也可通过在田间测试中比较植物在模拟的或天然存在的干旱条件下 (例如通过测量与非干旱条件下相比, 在干旱条件下基本等等的产量, 或测量与对照或参照植物相比, 在干旱条件下更少的产量损失) 保持足够产量 (至少 75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 产量) 的能力来评价耐旱性。

[0184] 在评价或测量其中利用了对照植物的本公开的任何实施例 (例如, 如本文描述的组合物或方法) 中的转基因植物的农学特性或表型时, 本领域的普通技术人员将很容易认识到要利用的合适对照植物。例如, 通过如下非限制性例子来说明:

[0185] 1. 经转化的植物的子代, 该经转化的植物对于重组 DNA 构建体 (或抑制 DNA 构建体) 来说是半合子的, 使得该子代分离成包含或不包含该重组 DNA 构建体 (或抑制 DNA 构建体) 的植物: 包含该重组 DNA 构建体 (或抑制 DNA 构建体) 的子代将通常相对于不包含该重组 DNA 构建体 (或抑制 DNA 构建体) 的子代来进行测量 (即, 不包含该重组 DNA 构建体 (或抑制 DNA 构建体) 的子代是对照或参照植物)。

[0186] 2. 重组 DNA 构建体 (或抑制 DNA 构建体) 基因渗入近交系中, 诸如在玉米中, 或基因渗入变种中, 诸如在大豆中: 基因渗入品系将通常相对于亲本近交系或变种品系进行测量 (即, 亲本近交系或变种品系是对照或参照植物)。

[0187] 3. 双杂交系, 其中第一杂交系由两个亲本近交系产生, 而第二杂交系由相同的两个亲本近交系产生, 不同的是其中一个亲本近交系含有重组 DNA 构建体 (或抑制 DNA 构建体): 第二杂交系通常将相对于第一杂交系进行测量 (即第一杂交系为对照植物或参照植物)。

[0188] 4. 包含重组 DNA 构建体 (或抑制 DNA 构建体) 的植物: “该植物可以相对于这样的对照植物进行评估或测量, 该对照植物不包含重组 DNA 构建体 (或抑制 DNA 构建体), 但具有与该植物相当的遗传背景 (例如, 与包含重组 DNA 构建体 (或抑制 DNA 构建体) 的植物相比较, 核遗传物质具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性)。存在许多可用于分析、比较和表征植物遗传背景的基于实验室的技术; 其中这些技术是同工酶电泳、限制性片段长度多态性 (RFLP)、随机扩增多态性 DNA (RAPD)、任何引物聚合酶链反应 (AP-PCR)、DNA 扩增指纹 (DAF)、序列特异扩增区域 (SCAR)、扩增片段长度多态性 (AFLP[®]) 和也称为微卫星的简单序列重复 (SSR)。

[0189] 此外, 本领域的普通技术人员将容易认识到, 评价或测量转基因植物的农学特性或表型时合适的对照或参照植物将不包括先前已经针对所需的农学特性或表型, 通过诱变或转化而选择的植物。

[0190] 方法:

[0191] 方法包括但不限于:提高植物耐旱性的方法、评价植物耐旱性的方法、改变植物农学特性的方法、测定植物农学特性改变的方法、以及制备种子的方法。所述植物可为单子叶或双子叶植物,例如玉米或大豆植物。植物还可以是向日葵、高粱、卡诺拉、小麦、苜蓿、棉、稻、大麦、粟、甘蔗或高粱。所述种子可为玉米或大豆种子,例如玉米杂交种子或玉米近交系种子。

[0192] 方法包括但不限于如下方法:

[0193] 转化细胞(或微生物)的方法包括用本公开的任何分离的多核苷酸或重组 DNA 构建体转化细胞(或微生物)。(本发明)也包括用这个方法转化的细胞(或微生物)。在特定实施例中,所述细胞是真核细胞,例如酵母、昆虫或植物细胞,或原核细胞,例如细菌细胞。所述微生物可为农杆菌属(*Agrobacterium*),例如根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)或毛根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)。

[0194] 制备转基因植物的方法,所述方法包括用本公开的任何分离的多核苷酸或重组 DNA 构建体(包括抑制 DNA 构建体)来转化植物细胞并由转化的植物细胞中再生转基因植物。本公开也涉及由该方法制备的转基因植物,以及从该转基因植物中获得的转基因种子。通过该方法获取的转基因植物可被用于本公开的其他方法中。

[0195] 改变本公开的多肽在宿主细胞中的表达水平的方法,所述方法包括:(a) 用本公开的重组 DNA 构建体转化宿主细胞;以及(b) 在适于表达所述重组 DNA 构建体的条件下使转化的细胞生长,其中所述重组 DNA 构建体的表达导致转化的宿主细胞中的本公开的多肽的水平改变。

[0196] 提高植物耐旱性的方法,所述方法包括:(a) 将抑制 DNA 构建体引入到可再生的植物细胞中,所述抑制 DNA 构建体包含至少一种调控序列(例如在植物中有功能的启动子),其可操作地连接至以下序列的全部或部分:(i) 编码多肽的核酸序列,基于 Clustal V 或 Clustal W 比对方法,在与 SEQ ID NO:47、48、50 或 51 进行比较时,所述多肽具有至少 50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性的氨基酸序列;或(ii) (a) (i) 的核酸序列的全长互补序列;以及(b) 在步骤(a)之后,由所述可再生的植物细胞再生出转基因植物,其中所述转基因植物在其基因组中包含抑制 DNA 构建体且在与不包含所述抑制 DNA 构建体的对照植物进行比较时表现出增强的耐旱性。所述方法还可包括(c) 获得来源于所述转基因植物的子代植物,其中所述子代植物在其基因组中包含抑制 DNA 构建体且在与不包含所述抑制 DNA 构建体的对照植物进行比较时表现出提高的耐旱性。

[0197] 提高植物耐旱性的方法,所述方法包括:(a) 将抑制 DNA 构建体引入到可再生的植物细胞中,所述抑制 DNA 构建体包含至少一种调控序列(例如植物中有功能的启动子),其可操作地连接至来源于所关注的靶基因的有义链或反义链的全部或部分的区域,当基于 Clustal V 或 Clustal W 比对方法与来源于所述区域的所述有义链或反义链的全部或部分进行比较时,所述区域的核酸序列具有至少 50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、

73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性，并且其中所述所关注的靶基因编码 Slm1 多肽；以及 (b) 在步骤 (a) 之后，由所述可再生的植物细胞再生出转基因植物，其中所述转基因植物在其基因组中包含抑制 DNA 构建体且在与不包含所述抑制 DNA 构建体的对照植物进行比较时表现出增强的耐旱性。所述方法还可包括 (c) 获得来源于所述转基因植物的子代植物，其中所述子代植物在其基因组中包含抑制 DNA 构建体且在与不包含所述抑制 DNA 构建体的对照植物进行比较时表现出提高的耐旱性。

[0198] 选择（或鉴定）植物干旱胁迫耐受性的方法，所述方法包括：(a) 获取转基因植物，其中所述转基因植物在其基因组中包含抑制 DNA 构建体，所述抑制 DNA 构建体包含至少一种调控序列（例如在植物中有功能的启动子），其可操作地连接以下序列的全部或部分：(i) 编码多肽的核酸序列，基于 Clustal V 或 Clustal W 比对方法，在与 SEQ ID NO:47、48、50、或 51 进行比较时，所述多肽具有至少 50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列；或(ii) (a) (i) 的核酸序列的全长互补序列；(b) 获取来源于所述转基因植物的子代植物，其中所述子代植物在其基因组中包含所述抑制 DNA 构建体；以及 (c) 选择（或鉴定）在与不包含所述抑制 DNA 构建体的对照植物进行比较时表现出干旱耐受性的所述子代植物。

[0199] 选择（或鉴定）植物氮胁迫耐受性的方法，所述方法包括：(a) 获取转基因植物，其中所述转基因植物在其基因组中包含抑制 DNA 构建体，所述抑制 DNA 构建体包含至少一种调控序列（例如在植物中有功能的启动子），其可操作地连接至源自受关注靶基因的有义链或反义链的全部或部分的区域，基于 Clustal V 或 Clustal W 比对方法，在与来源于所述区域的所述有义链或反义链的全部或部分进行比较时，所述区域具有至少 50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%序列同一性的核酸序列，并且其中所述受关注的靶基因编码 Slm1 多肽；(b) 获取来源于所述转基因植物的子代植物，其中所述子代植物在其基因组中包含所述抑制 DNA 构建体；以及 (c) 选择（或鉴定）在与不包含所述抑制 DNA 构建体的对照植物进行比较时表现出干旱耐受性的所述子代植物。

[0200] 选择（或鉴定）植物农学特性改变的方法，所述方法包括：(a) 获取转基因植物，其中所述转基因植物在其基因组中包含抑制 DNA 构建体，所述抑制 DNA 构建体包含至少一种调控序列（例如在植物中有功能的启动子），其可操作地连接以下序列的全部或部分：(i) 编码多肽的核酸序列，基于 Clustal V 或 Clustal W 比对方法，在与 SEQ ID NO:47、48、50、或 51 进行比较时，所述多肽具有至少 50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、

88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列；或(ii)(i)的核酸序列的全长互补序列；(b)获取来源于所述转基因植物的子代植物，其中所述子代植物在其基因组中包含所述抑制DNA构建体；以及(c)选择（或鉴定）在与不包含所述抑制DNA构建体的对照植物进行比较时（优选地在水限制条件下）表现出至少一种农学特性改变的所述子代植物。

[0201] 选择（或鉴定）植物农学特性改变的方法，所述方法包括：(a)获取转基因植物，其中所述转基因植物在其基因组中包含抑制DNA构建体，所述抑制DNA构建体包含至少一种调控序列（例如在植物中有功能的启动子），其可操作地连接至源自受关注靶基因的有义链或反义链的全部或部分的区域，基于Clustal V或Clustal W比对方法，在与来源于所述区域的所述有义链或反义链的全部或部分进行比较时，所述区域具有至少50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%序列同一性的核酸序列，并且其中所述受关注的靶基因编码S1m1多肽；(b)获取来源于所述转基因植物的子代植物，其中所述子代植物在其基因组中包含所述抑制DNA构建体；以及(c)选择（或鉴定）在与不包含所述抑制DNA构建体的对照植物进行比较时（优选地在水限制条件下）表现出至少一种农学特性改变的所述子代植物。

[0202] 选择（或鉴定）早衰减少的玉米植物的方法，所述方法包括：(a)获取转基因玉米植物，其与非转基因玉米植物相比表现早衰；(b)获取第二种转基因玉米植物，其包含步骤(a)的玉米植物的转基因并且附加包含突变的s1m1等位基因；以及(c)选择（或鉴定）步骤(b)的表现出早衰减少的第二种转基因玉米植物。所述步骤(a)的转基因植物可包含Tcry34和cry35转基因。所述步骤(b)的突变体s1m1等位基因可包含SEQ ID NO:73。通过上述方法制备玉米植物或玉米种子。

[0203] 选择（或鉴定）干旱耐受性增加的玉米植物的方法，所述方法包括：(a)获取转基因玉米植物；(b)获取第二种转基因玉米植物，其包含步骤(a)的玉米植物的转基因并且附加包含突变体s1m1等位基因；以及(c)选择（或鉴定）步骤(b)的表现出干旱耐受性增加的第二种转基因玉米植物。所述步骤(a)的转基因植物可包含Tcry34和cry35转基因。所述步骤(b)的突变体s1m1等位基因可包含SEQ ID NO:73。通过上述方法制备玉米植物或玉米种子。

[0204] 选择（或鉴定）百草枯耐受性增加的玉米植物的方法，所述方法包括：(a)获取转基因玉米植物；(b)获取第二种转基因玉米植物，其包含步骤(a)的玉米植物的转基因并且附加包含突变体s1m1等位基因；以及(c)选择（或鉴定）步骤(b)的表现出百草枯耐受性增加的第二种转基因玉米植物。所述步骤(b)的突变体s1m1等位基因可包含SEQ ID NO:73。通过上述方法制备玉米植物或玉米种子。

[0205] 选择（或鉴定）百草枯耐受性增加的玉米植物的方法，所述方法包括：(a)获取转基因玉米植物；(b)获取第二种转基因玉米植物，其包含步骤(a)的玉米植物的转基因并且附加包含突变体s1m1等位基因；以及(c)选择（或鉴定）步骤(b)的表现出百草枯耐受性增加的第二种转基因玉米植物。所述步骤(b)的突变体s1m1等位基因可包含SEQ ID NO:

73. 通过上述方法制备玉米植物或玉米种子。

[0206] 产生种子（例如可作为提供耐旱性的产品销售的种子）的方法，该方法包括任一上述的方法，并且还包括从所述子代植物获得种子，其中所述种子在其基因组中包含所述重组 DNA 构建体（或抑制 DNA 构建体）。

[0207] 在任何前述方法或本公开的方法的任何其他实施方案中，在所述引入步骤中所述可再生的植物细胞可包括愈伤组织细胞、胚胎愈伤组织细胞、配子细胞、分生细胞或未成熟胚芽细胞。可再生的植物细胞可来自近交玉米植物。

[0208] 在前述方法中任一项或本公开方法的任何其它实施例中，所述再生步骤可包括以下步骤：(i) 在包含促胚发生激素的培养基中培养所述转化的植物细胞，直至观察到愈伤组织；(ii) 将步骤 (i) 的所述转化植物细胞转移到第一培养基中，所述培养基包括促组织形成激素；以及 (iii) 在第二培养基上传代培养步骤 (ii) 后的所述转化的植物细胞，以允许嫩芽伸长、根发育或这两者同时发生。

[0209] 在前述方法中任一项或本公开方法的任何其它实施例中，所述至少一种农学特性可选自：非生物胁迫耐受性、早衰、绿度、产量、生长速率、生物量、成熟时的鲜重、成熟时的干重、果实产量、种子产量、总植物含氮量、果实含氮量、种子含氮量、营养组织含氮量、总植物游离氨基酸含量、果实游离氨基酸含量、种子游离氨基酸含量、营养组织氨基酸含量、总植物蛋白质含量、果实蛋白质含量、种子蛋白质含量、营养组织蛋白质含量、耐旱性、氮摄取、根倒伏、收获指数、茎倒伏、植物高度、穗高、穗长、耐盐性、早期幼苗活力和在低温胁迫下的出苗。至少一种农学特性的改变可为产量、绿度或生物量的增加，或早衰的减少。

[0210] 在任一上述方法或本公开的任一其他方法中，在水限制条件下，所述植物在与不包含所述重组 DNA 构建体（或所述抑制 DNA 构建体）的对照植物进行比较时可表现出至少一种农学特性的改变。

[0211] 在任一前述方法或本公开方法的任何其他实施例中，存在供选择的替代方案用于将包含可操作地连接至少一种调控序列的多核苷酸的重组 DNA 构建体引入到可再生的植物细胞中。例如，可将调控序列（例如一种或多种增强子、任选地作为转位因子的部件）引入到可再生的植物细胞，然后筛选其中将所述调控序列可操作地连接至编码本公开多肽的内源基因的事件。

[0212] 将本公开的重组 DNA 构建体引入植物可通过任何合适的技术来进行，这些技术包括但不限于引导 DNA 摄取、化学处理、电穿孔、微注射、细胞融合、感染、载体介导的 DNA 转移、轰击或农杆菌介导的转化。植物转化和再生技术已经在国际专利公布 WO 2009/006276 中进行了描述，其内容以引用方式并入本文。

[0213] 含有编码受关注蛋白质的外来的外源分离核酸片段的植物的发育或再生是本领域所熟知的。可将再生的植物进行自花授粉以产生纯合的转基因植物。或者，将得自再生植物的花粉与农学上重要的品系的产生种子的植物进行杂交。相反，将来自这些重要品系植物的花粉用于给再生植物授粉。利用本领域的技术人员所熟知的方法培育含有所需多肽的本公开的转基因植物。

[0214] **实例：**

[0215] 本公开将在下面的实例中进一步说明，其中份数和百分比是以重量计并且度数是摄氏度，除非另外说明。应该理解，尽管这些实例说明了本公开的实施例，但仅是以例证的

方式给出的。根据上面的论述和这些实例,本领域的技术人员能够确定本公开的基本特征,并且在不脱离其实质和范围的情况下,能够对本公开做出各种变化和修改以使其适用于各种用法和条件。因此,除了本文所示和描述的那些之外,根据前文所述,本公开的各种修改形式对本领域的技术人员来说将是显而易见的。此类修改形式也旨在涵盖于所附权利要求书的范围内。

[0216] 实例 1

[0217] 用于 slm1 基因座精细作图的群体

[0218] 为了精细作图和分离 slm1 基因座,从 Mo20W 和 les23::Va35 的初始杂交经过与轮回亲本 les23::Va35 七至八轮回交开发了针对 slm1 基因座杂合的等基因系。将这些 BC7F1 和 BC8F1 自交以生成两个 F2 群体,并且将 BC8F1 与 les23::Va35 回交以建立回交群体。用基于 PCR 的标记对这些分离群体进行表型分析和基因型分析,将 slm1 定位在 c0176e15_42b 和 c0176e15_7_8 之间。

[0219] 实例 2

[0220] slm1 基因座的精细作图

[0221] 针对 Slm1,使用了 8 盘来自 BC₇F₂作图群体的叶片组织以提取 DNA 用于精细作图。用了总共 567 个个体。两盘包含野生型个体的样品(没有形成病斑),两盘是突变体个体(形成重度病斑),以及四盘包含杂合的个体(形成中等程度病斑)。对替代了 SSR 标记、大体对应于先前经鉴定的 bnlg1045 和 bnlg1316 的侧翼标记的插入-缺失多态性(IDP)标记进行了测试,并用于界定 Slm1 区间序列的外部边界。发现 IDP3952(174.2cM)是左侧标记,对应于 bnlg1045, IDP8680(197.8)是右侧标记,对应于 bnlg1316。

[0222] 使用引物 IDP3952_For(SEQ ID NO:1)和 IDP3952_Rev(SEQ ID NO:2)扩增 IDP3952 基因座。将 PCR 产物凝胶电泳,分析条带模式以确定该基因座的基因型。

[0223] 使用引物 IDP8680_For(SEQ ID NO:3)和 IDP8680_Rev(SEQ ID NO:4)扩增 IDP8680 基因座。将 PCR 产物凝胶电泳,分析条带模式以确定该基因座的基因型。

[0224] 在鉴定侧翼标记 IDP3952 和 IDP8680 后,开发附加的标记以进一步缩小 Slm1 区间序列。用 MZA 引物序列扩增,对 Va35 和 Mo20W 中对应区域进行测序。分析测序结果中加入或去除限制酶位点的多态性的存在。用 MZA3156(187.7cM)和 MZA5988(189.4cM)来缩小 Slm1 区间序列至刚过 1 个 BAC 的长度。

[0225] 使用引物 MZA3156_For(SEQ ID NO:5)和 MZA3156_Rev(SEQ ID NO:6)扩增 MZA3156 基因座。用 DdeI 消化 PCR(产物),分析条带模式以确定该基因座的基因型。

[0226] 使用引物 MZA5988_For(SEQ ID NO:7)和 MZA5988_Rev(SEQ ID NO:8)扩增 MZA5988 基因座。将该反应的 PCR 产物用作第二轮反应的模板,所用引物为 MZA5988_ForNest(SEQ ID NO:9)和 MZA5988_RevNest(SEQ ID NO:10)。用 BsiHKAI 消化 PCR 产物,分析条带模式以确定该基因座的基因型。

[0227] 在这个~1BAC 区间序列内,存在相对小数量的基因。一个基因,注释为假定的 R 基因,被认为是 slm1 的一个可能的候选者。

[0228] 实例 3

[0229] slm1 基因座的序列分析

[0230] R 基因参与了导致病斑形成的超敏反应,是该群体中可见病斑表型的遗迹。因此,

决定对 Va35 和 Mo20W 中的假定的 R 基因测序以寻找任何明显的差异。设计了九套覆盖整个基因的巢式引物 (SEQ ID NO:11-46) 用于测序。这些引物是基于现有的 B73 序列设计的。测序结果显示在 Va35 中,假定的 R 基因是完整的和完全的基因 (基因组序列:SEQ ID NO:47;CDS:SEQ ID NO:48;蛋白质序列:SEQ ID NO:49),而在 Mo20W 中,除其它差异,在编码序列中有 2bp 的插入序列,其导致移码和蛋白质序列中提前的终止密码子 (基因组序列:SEQ ID NO:50;CDS:SEQ ID NO:51;蛋白质序列:SEQ ID NO:52)。因此,所述假定的 R 基因被鉴定为主要候选基因。

[0231] 使用引物对 c0176e15_21For (SEQ ID NO:11) 和 c0176e15_21Rev (SEQ ID NO:12), c0176e15_22For (SEQ ID NO:15) 和 c0176e15_22Rev (SEQ ID NO:16), c0176e15_23For (SEQ ID NO:19) 和 c0176e15_23Rev (SEQ ID NO:20), c0176e15_24For (SEQ ID NO:23) 和 c0176e15_24Rev (SEQ ID NO:24), c0176e15_25For (SEQ ID NO:27) 和 c0176e15_25Rev (SEQ ID NO:28), c0176e15_26For (SEQ ID NO:31) 和 c0176e15_26Rev (SEQ ID NO:32), c0176e15_27For (SEQ ID NO:35) 和 c0176e15_27Rev (SEQ ID NO:36), c0176e15_28For (SEQ ID NO:39) 和 c0176e15_28Rev (SEQ ID NO:40), 以及 c0176e15_29For (SEQ ID NO:43) 和 c0176e15_29Rev (SEQ ID NO:44) 扩增覆盖所述假定的 R 基因的基因组区。将这些反应的 PCR 产物用作第二轮反应的模板,所用的对应的引物对为: c0176e15_21ForNest (SEQ ID NO:13) 和 c0176e15_21RevNest (SEQ ID NO:14), c0176e15_22ForNest (SEQ ID NO:17) 和 c0176e15_22RevNest (SEQ ID NO:18), c0176e15_23ForNest (SEQ ID NO:21) 和 c0176e15_23RevNest (SEQ ID NO:22), c0176e15_24ForNest (SEQ ID NO:25) 和 c0176e15_24RevNest (SEQ ID NO:26), c0176e15_25ForNest (SEQ ID NO:29) 和 c0176e15_25RevNest (SEQ ID NO:30), c0176e15_26ForNest (SEQ ID NO:33) 和 c0176e15_26RevNest (SEQ ID NO:34), c0176e15_27ForNest (SEQ ID NO:37) 和 c0176e15_27RevNest (SEQ ID NO:38), c0176e15_28ForNest (SEQ ID NO:41) 和 c0176e15_28RevNest (SEQ ID NO:42), 以及 c0176e15_29ForNest (SEQ ID NO:45) 和 c0176e15_29RevNest (SEQ ID NO:46)。

[0232] 为了进一步支持所述假定的 R 基因就是引起 S1m1 的基因,在 ~1BAC 区间内进行附加的作图。基于现成的 B73 序列从低拷贝区设计 PCR 引物。如果在从 Va35 和 Mo20W 的产物中观察到大小差异,用该标记作为 IDP。如果大小差异不容易辨认,将 PCR 产物测序并对存在的导致限制酶位点变化的多态性进行分析。使用标记 c0176e15_45/46 和 c0176e15_8/7,将所述 S1m1 区间序列缩小至 ~12kb 的区域,该区域内只存在假定的 R 基因一个基因。

[0233] 使用引物 c0176e15_45For (SEQ ID NO:53) 和 c0176e15_46Rev (SEQ ID NO:54) 来扩增 BAC 上的 c0176e15 区。将该反应的 PCR 产物用作第二轮反应的模板,所用引物为 c0176e15_45ForNest (SEQ ID NO:55) 和 c0176e15_46RevNest (SEQ ID NO:56)。用 BsaJI 消化 PCR 产物,分析条带模式以确定该基因座的基因型。

[0234] 使用引物 c0176e15_8For (SEQ ID NO:57) 和 c0176e15_7RevNest (SEQ ID NO:58) 来扩增 BAC 上的 c0176e15 区。将 PCR 产物凝胶电泳,分析条带大小差异以确定该基因座的基因型。

[0235] 实例 4

[0236] s1m1 基因座的确认

[0237] 通过使用独立的 EMS 和 Mu- 插入等位基因来确认假定的 R 基因候选者。

[0238] 为了确认 slm1 的特性,搜索了 UniFormMu 储存品系,发现一个品系在距 slm1 的起始密码子 2289bp 处带有 Mu 插入(命名为 Slm1-Mu*-W22)。然后将该品系与 les23::Va35 杂交建立了 F2 群体,其中基于 94 个 F2 个体的分析 les23 表型与 slm1 基因座的表型共分离。此外,对从直接 EMS 诱变试验中的约 15,000 个后代回收的两个独立的 slm1 等位基因的序列分析揭示了存在错义点突变:即,在突变体 Slm1-EMS8 中的 G2018A(Gly673Glu)和在突变体 Slm1-EMS15 中的 A2180G(Asp727Gly)。我们的数据表明 slm1 编码了典型的 NBS-LRR R 基因,并且有功能的 R 基因是引发 les23 突变的细胞死亡表型所必需的。

[0239] 实例 5

[0240] les23 基因座的精细作图

[0241] 采用了在 Va35 背景下得自 B73 与 les23 杂交的 F2 群体的~575 个种子。在 Wilmington, DE 的杜邦实验站的温室中培养这些植物并进行表型分析。开发了许多标记使我们能够将 les23 区间序列缩小至~10cM。重组子的缺乏阻碍了更多进展。虽然不是最近的侧翼标记,由于它们是最清晰和最易使用的标记, IDP200(119.5cM)和 MZA6815(132.7cM)被用于筛选更多个体。

[0242] 使用引物 MZA6815_For(SEQ ID NO:59)和 MZA6815_Rev(SEQ ID NO:60)扩增 MZA6815 基因座。将 PCR 产物凝胶电泳,分析条带大小差异以确定该基因座的基因型。

[0243] 使用引物 IDP200_For(SEQ ID NO:61)和 IDP200_Rev(SEQ ID NO:62)扩增 IDP200 基因座。将 PCR 产物凝胶电泳,分析条带大小差异以确定该基因座的基因型。

[0244] 为了进一步对 les23 作图,我们采用了 Va35 背景的作图群体中得自 B73 与 les23 杂交的另外~1500 个种子。这些植物也生长在 Wilmington, DE 的杜邦实验站的温室中。对这些植物取样,采用 IDP 标记 MZA6815 和 IDP200 进行基因型分析。对重组子进行表型分析并用于附加的作图。界定了一大块物理区间,由于 les23 靠近着丝粒, MZA760(127.2cM)和 MZA15537(127.7)是能够设计的最近的侧翼标记。

[0245] 使用引物 MZA760_For(SEQ ID NO:63)和 MZA760_Rev(SEQ ID NO:64)扩增 MZA760 基因座。用 BsrDI 消化 PCR(产物),分析条带模式以确定该基因座的基因型。

[0246] 使用引物 MZA15537_For(SEQ ID NO:65)和 MZA15537_Rev(SEQ ID NO:66)扩增 MZA15537 基因座。用 BsrDI 消化 PCR(产物),分析条带模式以确定该基因座的基因型。

[0247] 与试图继续缩小 les23 区间序列相反,考虑到引起 Slm1 的基因是假定的 R 基因,决定检查在该区域的基因列表,确定是否存在明显的候选基因。

[0248] 实例 6

[0249] les23 基因座的序列分析和验证

[0250] 精细作图将 les23 基因座定位于约有 64 个假定的基因的区间中,其中之一被注释为 RPM1 相互作用(RIN)。在拟南芥中, RIN4 与属于 CC-NBS-LRR R 类蛋白质的 RPM1 和 RPS2 有遗传上和物理上的相互作用。由于 Slm1 编码相同类的 R 蛋白质,假定 LES23 可能是 AtRIN4 的玉米同源物。为了测试这个想法,我们首先从玉米 les23 突变体和野生型中克隆了 RIN4CDS 同源物,我们发现在来自 les23::Va35(C55T)的 rin4 中的一个错义点突变导致一个氨基酸的改变(P19L),该氨基酸在来自真双子叶植物和单子叶植物的 rin4 同源物中是保守的(图 6A-6B)。对独立等位基因形式 Mu 标签试验的进一步分子鉴定表明在三种

突变体中的 rin4 的启动子区中（全部在距离翻译起始密码子 1kb 的范围内）和在两种其它突变体中 rin4 的外显子 2 中 Mu 元件的差异性插入（图 2）。所有五种突变体表现出与 les23 : Va35 相同的病斑表型。我们的数据有力地支持了 les23 编码了 Atrn4 的玉米同源物并且 les23 基因的正常功能负调控细胞死亡过程。

[0251] 相关序列如下：野生型基因组序列：SEQ ID NO :67；野生型 CDS：SEQ ID NO :68；野生型蛋白质序列：SEQ ID NO :69；les23-ref 突变体基因组序列：SEQ ID NO :70；les23-ref 突变体 CDS：SEQ ID NO :71；les23-ref 突变体蛋白质序列：SEQ ID NO :72。所述 les23-ref 是在 opaque : Va35 背景下的经 EMS 诱变的突变体，是通过纯合突变体和杂合野生型植物之间的重复同胞杂交而繁殖的（Penning 等人 2004 Genome 47 :961-969）

[0252] 实例 7

[0253] SLM1 和 LES23 蛋白质的相互作用

[0254] 遗传分析阐明了 slm1 野生型基因是在 Va35 背景下 les23-ref 的表型表达所必需的。由于已知 Rpm1 直接与 RIN4 蛋白质相互作用，一种可能性是 SLM1 直接与 RIN4 相互作用并影响其活性。为了测试这种可能性进行了酵母双杂交（Y2H）分析。

[0255] 按照来自制造商（Stratagene）说明书用 GAL4 系统进行 Y2H 分析。将来自 Mo20W 的 Slm1 的全长或部分（距 5' 端 561bp）截短的 cDNA 克隆进 pAD-GAL4-2.1 以生成 DNA- 结合域诱饵蛋白质融合物。将来自 Va35 的全长 les23 cDNA 克隆进 pBD-GAL4 以生成激活域猎物蛋白质融合物。相互作用的测试是在不含组氨酸、亮氨酸和色氨酸的选择性培养基上通过组氨酸营养缺陷型的互补作用、以及将合适的质粒共转化进 YRG-2 菌株与阳性和阴性对照的 LacZ 报告基因活性（ β -半乳糖苷酶测定）进行的。

[0256] 如图 3 中所示，发现 LES23 的全长蛋白质与来自 Va35 的 SLM1 的 N 末端（1-187 位氨基酸）有物理相互作用，这与先前来自拟南芥的 Mo20W 的预测截短产物结果一致。

[0257] 实例 8

[0258] 拟南芥中的 RPM1/RSP2 和非生物胁迫的耐受性

[0259] 如先前 PCT 国际专利申请 PCT/US12/62374A 中所述，在拟南芥 RPM1 和 RSP2 基因敲除突变体中进行测定。在正常条件下，在 rpm1 和 rps2 突变体和野生型植物之间没有观察到生长速率的差异。在百草枯测定中，rps2 是阳性反应；然而 rpm1 没有任何效果。在三重胁迫测定中，rpm1 是阳性反应；然而 rps2 没有任何效果。将生成 rps2/rpm1 双突变体并进行测试。

[0260] 实例 9

[0261] S1m1 延迟了与 HXRW 转基因相关的叶片枯萎

[0262] 在某些背景下（例如，HXRW-LF），HXRW 转基因（Cry34/35）与明显的早衰（叶片枯萎）表型有关。表 1 中展示的数据表明 S1m1 能减轻叶片枯萎表型。

[0263] 表 1

[0264] 在来自 (HXRW-LF) X Mo20W 的 BC3F2 个体中的叶片枯萎分数 (1-9)

[0265]

	N	Fire2	Fire3	Fire4
HXRW-LF slm1	154	6.32	5.44	3.95

HXRW-LF WT	156	5.74	4.92	3.03
差值		0.58	0.52	0.93

[0266] 实例 10

[0267] 测试近等基因系 (NIL) 的叶片枯萎反应

[0268] 通过将来自 Mo20W 的 *slm1* 供体等位基因与三个包含 HXRW 转基因的轮回亲本回交创建了近等基因系 (NIL) :InbredA-HXRW、InbredB-HXRW 和 InbredC-HXRW。将这些品系回交三代,然后自交两代以创建含有 Mo20W *slm1* 等位基因和不含 Mo20W *slm1* 等位基因的两种 BC3S2NIL。此前鉴定了 InbredA 的近交背景,在 HXRW 转基因的存在下表现为严重的叶片枯萎表型,而 InbredB 和 InbredC 近交系表现出不太严重的叶片枯萎。

[0269] 测试含有或不含 Mo20W 的 NIL 的叶片枯萎反应。在 InbredA-HXRW 背景下,测试了 24 个含有 Mo20W *slm1* 的 NIL 和 24 个不含 Mo20W *slm1* 的 NIL。在 InbredB-HXRW 和 InbredC-HXRW 两者的背景下,测试了 15 个含有 Mo20W *slm1* 的 NIL 和 15 个不含 Mo20W *slm1* 的 NIL。叶片枯萎表型的分数尺度为 1 至 9,1 为最严重的叶片枯萎,9 为无叶片枯萎。比较 NIL 的平均值,用双样本 T 检验确定统计显著性。在 InbredA-HXRW 背景下 (这是在 HXRW 转基因的存在下具有最严重的叶片枯萎反应的遗传背景),Mo20W *slm1* 等位基因导致增加 3.1 分。在具有不太严重的叶片枯萎反应的遗传背景下,InbredB-HXRW 和 InbredC-HXRW 分别增加了 1.1 分和 0.9 分,但都不是统计显著性的差异。

[0270] 表 2

[0271]

	InbredA-HXRW		InbredB-HXRW		InbredC-HXRW	
	叶片枯萎	SE 平均值	叶片枯萎	SE 平均值	叶片枯萎	SE 平均值
含有 Mo20W <i>slm1</i> 的 NIL	5.0	0.3	7.1	0.3	5.2	0.5
不含 Mo20W	2.0	0.3	6.0	0.8	4.3	0.5

[0272]

<i>slm1</i> 的 NIL						
差值	3.1		1.1		0.9	
P 值	0.000		0.196		0.194	

[0273] 实例 11

[0274] 测试近等基因系 (NIL) 的产量

[0275] 将 InbredA-HXRW NIL 与两个测试对象 Tester1 和 Tester2 顶交,然后测试产量以确定在杂交植物中 Mo20W *slm1* 等位基因的效应。对于每个测试对象有 24 个含 Mo20W *slm1* 的两排曲线图和 24 个不含 Mo20W *slm1* 的两排曲线图。按照标准规程收集产量相关性状。与 Tester2 顶交的含 Mo20W *slm1* 的 NIL 的产量增加了 11.4bu/a(P 值 0.001),但是与 Tester1 顶交的 NIL 的 (产量) 增加不显著,表明测试对象的效应有差异。

[0276] 表 3

[0277]

	TSTWT	MST	HRVWT	产量
含 Mo20W 的 NIL-Tester1	56.6	23.1	27.4	221.0
不含 Mo20W 的 NIL-Tester1	57.0	22.6	27.0	219.4
差值	-0.4	0.5	0.4	1.6
P 值	0.208	0.012	0.32	0.574
含 Mo20W 的 NIL-Tester2	54.9	24.2	29.0	230.9
不含 Mo20W 的 NIL-Tester2	55.3	23.8	27.4	219.5
差值	-0.5	0.3	1.6	11.4
P 值	0.024	0.195	0.000	0.001

[0278] 实例 12

[0279] 测试近等基因系 (NIL) 的干旱耐受性

[0280] 采用水培检测法测试含 Mo20W 和不含 Mo20W 的 NIL 对中度 and 重度干旱条件的反应。对于中度干旱条件检测,将 14 株含有 Mo20W s1m1 等位基因的植物与 14 株不含 Mo20W s1m1 等位基因的植物同时在对照条件和中度干旱条件下生长。所有植物生长在管道中,所述管道填有蒙脱石并置于带有计时器控制的修改过的 Hoaglands 营养培养基循环的水槽中。人工气候室保持在 26 度 /16 小时 (日) 和 22 度 /8 小时 (夜),培养基保持在 65℃ 的恒温。在对照水槽中的植物 (每两小时循环培养基) 生长 38 天,然后测量每株植物新鲜生物量的克数。在干旱水槽中的植物在正常条件下生长七天,然后停用培养基三天。在三天干旱期后,所述植物回到正常培养基条件下生长三天。这这种干旱循环总共重复四次。在最后一个循环后,所述植物在正常培养基中生长三天,测量每株植物新鲜生物量的克数。

[0281] 对于重度干旱条件检测,将 8 株含有 Mo20W s1m1 等位基因的植物与 8 株不含 Mo20W s1m1 等位基因的植物同时在对照条件和重度干旱条件下生长。在对照水槽中的植物生长 33 天,然后测量每株植物新鲜生物量的克数。在干旱水槽中 on 个的植物在正常条件下生长六天,然后停用培养基七天。在七天干旱期后,所述植物回到正常培养基条件下生长三天。这这种干旱循环总共重复三次。在最后一个循环后,所述植物在正常培养基中生长三天,测量每株植物新鲜生物量的克数。

[0282] 计算在干旱条件下的植物与对照条件下的植物的生物量比率。在中度干旱 (条件) 下,含 Mo20W-s1m1 等位基因的 InbredA-HXRW 植物大小是对照植物的 41%,但不含 Mo20W-s1m1 的情况下,干旱植物大小是对照植物的 21%。

[0283] 表 4

[0284]

		干旱与对照植物的生物量比率	
		中度干旱	重度干旱
InbredA-HXRW	不含 Mo20W-slm1	0.21	0.14
	含 Mo20W-slm1	0.41	0.18
InbredB-HXRW	不含 Mo20W-slm1	0.22	0.16
	含 Mo20W-slm1	0.21	0.20
InbredC-HXRW	不含 Mo20W-slm1	0.32	0.19
	含 Mo20W-slm1	0.25	0.19

[0001]

序列表

<110> E. I. du Pont de Nemours and Company
Purdue Research Foundation
Jaqueth, Jennifer
Ji, Jiabing
Johal, Gurnukh S
Leonard, April
Li, Bailin

<120> 类病斑表型的抑制子 SLMI

<130> BB1930PCT

<150> US 61/758937

<151> 2013-01-31

<160> 78

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> IDP3952 正向引物

<400> 1

gtgtcgagga gatcgtcagg

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> IDP3952 反向引物

<400> 2

ctcccagctc aaggtagtgc

20

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> IDP8680 正向引物

<400> 3

[0002]

ggtcccttga tgtecatgc	19
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> IDP8680 反向引物	
<400> 4	
gaagcaggtc gtgatgttcc	20
<210> 5	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> MZA3156 正向引物	
<400> 5	
egaacagcaa gacttctga a	21
<210> 6	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> MZA3156 反向引物	
<400> 6	
gtgcattggc tattattcta gg	22
<210> 7	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> MZA5988 正向引物	
<400> 7	
cacctcattc ataaaggaag g	21
<210> 8	
<211> 19	

[0003]

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	MZA5988 反向引物	
<220>		
<221>	尚未归类的特性	
<222>	(8)..(8)	
<223>	n 为 a、c、g 或 t	
<400>	8	
	etecctenta ggetccgtc	19
<210>	9	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	MZA5988 正向巢式引物	
<400>	9	
	agaaagacat atcccacact tg	22
<210>	10	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	MZA5988 反向巢式引物	
<400>	10	
	ctctctttcc ttatcccgc	19
<210>	11	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_21 正向引物	
<400>	11	
	cttcttcgat ccttcgacgg ag	22
<210>	12	
<211>	20	

[0004]

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_21 反向引物	
<400>	12	
	tattggcgag ggtggtcttc	20
<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_21 正向巢式引物	
<400>	13	
	aaggcgctcg agaagattca	20
<210>	14	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_21 反向巢式引物	
<400>	14	
	gttgacgaag cgaacatgg	20
<210>	15	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_22 正向引物	
<400>	15	
	agagcacact ggaggacctc gt	22
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_22 反向引物	

[0005]

<400> 16	
tgtgcacggc cttcatctgc	20
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> c0176e15_22 正向巢式引物	
<400> 17	
gccgagatga agcgcateac	20
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> c0176e15_22 反向巢式引物	
<400> 18	
cagcaggacc ttctttcccg	20
<210> 19	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> c0176e15_23 正向引物	
<400> 19	
gaagaccacc ctgcgaaga	20
<210> 20	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> c0176e15_23 反向引物	
<400> 20	
cctgcccaag actacctgtt caa	23

[0006]

<210>	21	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_23 正向巢式引物	
<400>	21	
	gacgagttcg acctcagggt gt	22
<210>	22	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_23 反向巢式引物	
<400>	22	
	tttggaacgt acgatgccca	20
<210>	23	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_24 正向引物	
<400>	23	
	gatgcttctt ttccgtgtct tca	23
<210>	24	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_24 反向引物	
<400>	24	
	ggttgcgcac gactagttct ctg	23
<210>	25	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

[0007]

<220>		
<223>	c0176e15_24 正向巢式引物	
<400>	25	
	atggcaacaa cattactgtg gttt	24
<210>	26	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_24 反向巢式引物	
<400>	26	
	cactgtttca aatgaggcgg ta	22
<210>	27	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_25 正向引物	
<400>	27	
	tatgtttgaa caggtagtct tgggc	25
<210>	28	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_25 反向引物	
<400>	28	
	tatgcagtct cactatgctc cca	23
<210>	29	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_25 正向巢式引物	
<400>	29	

[0008]

gacattggta tggagatcgt caca	24
<210> 30	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> c0176e15_25 反向巢式引物	
<400> 30	
atcacacaga gaaggcgga	20
<210> 31	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> c0176e15_26 正向引物	
<400> 31	
attacgatca gtcaggatgc acg	23
<210> 32	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> c0176e15_26 反向引物	
<400> 32	
tgtgtccgaa gaagccgatt	20
<210> 33	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> c0176e15_26 正向巢式引物	
<400> 33	
atgcatgacc ttcttcgate gt	22
<210> 34	
<211> 20	

[0009]

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_26 反向巢式引物	
<400>	34	
	ggctctgcttt ctgggecaca	20
<210>	35	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_27 正向引物	
<400>	35	
	gaactcgattg gagacttgag gtatc	25
<210>	36	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_27 反向引物	
<400>	36	
	cacaagccct gtggggaaat	20
<210>	37	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_27 正向巢式引物	
<400>	37	
	cagtacattg gtctgcataaa ctgca	25
<210>	38	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_27 反向巢式引物	

[0010]

<400>	38	
	gaacagcattc cgagggtcta ttt	23
<210>	39	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_28 正向引物	
<400>	39	
	taataacaca cagcaggaga aacgt	25
<210>	40	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_28 反向引物	
<400>	40	
	tcgcaccctc ttgtgtttgt	20
<210>	41	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_28 正向巢式引物	
<400>	41	
	ttgaggatgt ctttgatgag ctctg	25
<210>	42	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_28 反向巢式引物	
<400>	42	
	tggaaacagt tctgcggcat	20

[0011]

<210>	43	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_29 正向引物	
<400>	43	
	acaaggaact tgagcaggca at	22
<210>	44	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_29 反向引物	
<400>	44	
	ctgcttttca taaataccgt gtcaa	25
<210>	45	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_29 正向巢式引物	
<400>	45	
	caaagtcaca aaatgcaage tcaa	24
<210>	46	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_29 反向巢式引物	
<400>	46	
	tggagtaggc ttattgcaga aaga	24
<210>	47	
<211>	3747	
<212>	DNA	
<213>	玉米 (<i>Zea mays</i>)	

[0012]

<400> 47

```

atggctatga tccatagacgc cttcgtgccc atgctggggc gaatggtegc tgggtccgtg      60
aaggagagge tegacacgct cctcggcggtg cccggggaga tggaaaggct ggagagcaca      120
ctggaggacc tcgtgaatgt cctcggcgac gccgagatga agcgcacac ggacacggcc      180
gtcgaagcct gggttcggga gcttaaggac gtcattgacg acgcgcacga cgtcctcgac      240
cgggtggcaga tggaggccca ggcccgcagc agcagcgacg cgcaccaagc ctcgttccct      300
ggcgctggct gctgcgcgcc cctcctcagc tgcctccggg acccggcgct cgtcaccgcc      360
atggcggcgc agatcaagga gctgaaccgg aggetggaga gcgtgtgcgc tcggagctcc      420
atgtttcgtc tcgtcagcgc ctcgtcgtcc gtcccccctc ggcagcaact accaccgcca      480
tcacagcgga acggtaagac gagctcgggtg atcgtccacg ccgattctat cgggggagaag      540
atcgaggagg acgggaacag gctgggtggag gcgtgatcg ccgacgacct gcgcgagaac      600
gtcctcgcgc tgggcacac aggcgcgggc gggatcggga agaccacct cgcgaagg      660
gtcttcgtg accagcgct gcgcgacgag ttccacctca ggggtgtgggt gtgcgtgtcg      720
caggacgtga acgaggctga cctgctgtgg tcctctctcg ttggcgcgg aggcggccac      780
cagctccagc agcagcagca cgcacgcgc gacaggctgt cgttggagcc cgcctccag      840
cgggcgctct cgggaaagaa ggtcctgctg gtcttggaag acgtgtggag cgaactggcc      900
tggaaaggagg tctacagaa cgcgttcagg gccggcgctc gtggtggcag cagggtgctc      960
gtcacgacga ggaaagagac ggttgcagg cagatgaagg ccgtgcacat ccaccgctg      1020
gagaagctgc agcctgaaga tgggtggcgc ttactcaaga accaggttag ggactggaat      1080
ggatgcttct tttcgtgtc ttcaaatata ctatggcaac aacattactg tggtttgatg      1140
atgcgtaaaa gcaccagta aattacactt gcactctaaa ggcattcaac cacttgattg      1200
atgtcatgtc agccaaatga actttatct cctctaaatt cagaaggaga tgtccacct      1260
cctcaccagc acgattaaac atagggcact tggatgaacaa tctcaccccc cttcttttca      1320
gtttcactct caaggctaaa ctataataca caattegcca aagaaaatgt ttaactttgt      1380
ttgggcacgc taegtccaa atcccacgcc gaaattctta taacaaaaca cactaattt      1440
tacctgacaa aagaatactc ttttgagaga gaaaaactg gacactggt actactgatg      1500
catccagaga ggacttgaa catctagtac atggtctgat ggcagacata caagattaat      1560
ttgagcacag ttgttataca aattcttaac cattctttta tgtttgaaca ggtagtcttg      1620
ggcagggaatc caaccgacat tgaaaattc aaagacattg gtafggagat cgtcacaaga      1680
tgcgattgcc tgcgcttgc catcaagaca gtgggtgggc tactgtgcac aaaagagaga      1740
acgttcagag actgggagga agtctcaagg agcgcgcgat ggtccgtggc aggaactacct      1800
gaagaggttc acaacgcgat ctacctgagc tatgcggatc taccgcctca ttgaaacag      1860
tgtttcctgc actgctccct tttcccaaaa gacgaagtca tcaaacgggt ggatgtcgtt      1920
cagatgttga tcgcggaggg gtttgtacaa gaggatgggt cctcagcgct gctcgaagat      1980
gtagggaaca tgtattacag agaactagtc atgcgcaacc tactcgaacc tgaaggccag      2040
tattacgate agtcaggatg cagcatgcac gacctctctc gatcgtttgc caattatctg      2100
gcaaaagatg aagcgttgc tcttacgcag ggccaaaget tatgcgacat gaagacaaaa      2160
gccaaagetg gtccgtgtc cgtagcaacc gaaaatgtgc tccaaagtae cttcagaaat      2220
cagaagcagc tgaggcgct aatgatactc cgaagcacca cggttcagct ggaagagttc      2280
ctgcattgac tgcctaaget gcgactgtg catctcgggg gtgtaaacct cacaaccttg      2340
ccgccttctc tgtgtgatct gaagcatctc agatacttgg agctgtcttg tactatgata      2400
gatgcaatcc cagactcgat tggagacttg aggtatctac agtacatttg tctgetaaac      2460
tgcataaate tgttcagtct tctgggagc atagtggagc tgcattaggt gagagctctc      2520

```

[0013]

```

cacatcaagg gggccagtgt gaatgacatc cccaggggga tagggagatt acaaaacett 2580
gtcgagctga ctggtttttt aacacagaat gatgetctg caggttggaa cagectggag 2640
gagetaggec acctgcccca gctcagcctc ttgtatctaa gcaacctaga gaaagcacac 2700
accggctctg tggccaagaa agcaggcctc caaggeaage gccaccttag atacttaago 2760
ttggagtgc caccaagage cgttggigga aatcagatca aagataataa cacacagcag 2820
gagaaacgtc agattgagga tgtctttgat gagetctgtc caccggtttg cctcgaaaaa 2880
ctctcactaa tgggtctctt cggacacaag ctctctaat ggatgagctc aggegagatg 2940
gatcttaagt acctaaagtc aataaaaac cgaagattgca cctactgcga gcagctcccc 3000
gcattgggccc atctctctgag ttttagatttc ctgtctatca aacatgcgcc atctattatg 3060
agaattggac acgaattctt ttgcagcagc aatgctacac aaatagaccc tggatgctg 3120
ttcccaagge tggagaaaact tggattgat aggttggatg gatgggaaga atggatatgg 3180
gacaaggaac ttgagcagge aatgccaaac atctttctc tcaaagtcac aaaatgcaag 3240
ctcaagtatt tccccacagg gcttctgcat caaaccagga ccttgagaga attgataata 3300
tetgaagett gcaacttgac atcatttgc aactttctc tctcagcga tctgcatttc 3360
catgccaccc caaatctcga gatgctgcc aatctctca aactacgaag gcttctgggt 3420
atccaatgcc ccaagttaga tgcatttgc gggttaacag aactgcaag cattacattg 3480
caggactatg ccgcagaact gtttcacag taatttgaag aaactagtc tgcagaacta 3540
gaggtttct gtaatgaaga actcttcaaa ctataaccc tgcagaagg ttcatagtg 3600
tgcaagatca agaataacca aaatgtttaa gcatatgctc ccaaggagg cgaccgtaa 3660
ggatggtacg cattatacac taaggaccg tttagctga ccacaaaca caagggtgc 3720
gaaatatttg aagtgcaca gtcctaa 3740

```

<210> 48

<211> 3201

<212> DNA

<213> 玉米 (Zea mays)

<400> 48

```

atggetatga tctagaagc ctctgtgcc atgttgggga gaattgtctc tggctccgtg 60
aaggagagge tgacacgct cctcggcgtg ccgggggaga tggaaaggct ggagagcaca 120
ctggaggacc tctgaatgt cctcggcga gccagatga agcgcacac ggacacggcc 180
gtcgacgct gggctcggga gcttaaggac gtcattgac acgcgcagca cgtctctgac 240
cggctggaaga tggaggccca ggccgcagc agcagcagc cgcacaagcg cctgttccct 300
ggcgttggct gctgcgcgc cctctcagc tcttccggg acccggcgt cgtcagccc 360
atggcggcgc agatcaagga gctgaaccgg aggttgaga gctgtgccc tggagctcc 420
atgttctgct tctcagcgc cctctctgc gtcctctcc ggcagcaact accacggcca 480
tccagggcca acggttaagc gactcgggt atctctcag ccgattctat cggggagaag 540
atcagaggag acgggaacag gctgttgag gctgtgag ccagcacct gcgcagaa 600
gtctctgccc tgggcacac aggcgcggc gggatcgga agaccacct cgcgaagg 660
gtctctgct accagcgcg gcgcagcag ttgacctca ggtgtgggt gtgctgtc 720
caggacgtga acgaggtga cctgtgttg tctctctc ttggcgccg aggcggccac 780
cagctccagc agcagcagc cgcacgcgc gacaggctc cgttgagcc cgcgtccag 840
cgggcgtct cgggaaagaa ggtctgctg gtgttgag acgtgtggc cagctggcc 900
tggaggagg tctacagaa cgcgtcagg gcggcgtc gtgttgccg cagggtctc 960

```

[0014]

```

gtcaacgacga ggaaagagac ggttgccagg cagatgaagg cegtgcacat ccaccgcgtg 1020
gagaagctgc agcctgaaga tgggtggcgc ttactcaaga accaggtagt cttgggcagg 1080
aatccaaccg acattgaaaa tttcaaagac atttggtatg agatcgtaac aagatgcgat 1140
tgccctgcgc ttgccatcaa gacagtgggt gggctactgt gcacaaaaga gagaacgttc 1200
agagactggg aggaagtctc aaggagcgcc gcctggctcg tggcaggact acctgaagag 1260
gttcaacaac ccattctacc gagctatgcc gatctaccgc ctcatittga acagtgtttc 1320
ctgcaetget cccitttccc aaaagacgaa gtcatcaaac ggggtggatg cgttcagatg 1380
tggatcgccg aggggtttgt acaagaggat gggctctcag cgtctctcga agatgtaggg 1440
aacatgtatt acagagaact agtcatgcgc aacctactcg aacctgatgg ccagtattac 1500
gateagtcag gatgcacgat gcatgacctt cttegatcgt ttgccatta tetggcaaaa 1560
gaigaagcgt tgcctcttac gcagggccaa agcttatgcg acatgaagac aaaagccaag 1620
ctgcgtcggc tgtccgtagc aaccgaaaat gtgtccaaa gtaccttcag aaatcagaag 1680
cagctgaggg cgctaatgat actccgaagc accacggttc agctggaaga gtctctgcct 1740
gacctgccta agctgcgact gctgcctctc ggggggtgta acctcacaac cttgcgcct 1800
tctctgtgtg atctgaagca tctaaagata ttggagctgt ctgggtacct gatagatgca 1860
atcccagaet cgattggaga cttgaggtat ctacagtaca ttggtctgct aaactgcata 1920
aatctgttca gtcttctctg gagcatagtg agactgcata ggtctgagagc tctccacatc 1980
aagggggcca gtgtgaatga catccccagg gggataggga gattacaaaa ccttgtcgag 2040
ctgactgggt ttttaacaca gaatgatgct gctgcagggt ggaacagcct ggaggagcta 2100
ggccaccctc ccagctcag cctcttgat cttaagcaacc tagagaaagc acacaccggc 2160
tctgtggcca agaaagcagg cctccaaggc aagcgccacc ttagatactt aagcttgag 2220
tgcacacca gacccgttg tggaaatcag atcaaagata ataacacaca gcaggagaaa 2280
cgtcagattg aggatglett tgatgagctc tgtccaccgg tttgcctcga aaacctctca 2340
ctaategget tcttcggaca caagcttctt aaatggatga gctcaggcga gatggattct 2400
aagtaacctaa gatcaataaa actcgaagat tgcacctact gcgagcagct ccccgcatig 2460
ggccatctcc tgagtctaga tttctgtctg atcaaacatg cggcatctat tatgagaatt 2520
ggacaagaat tcttttgag cagcaatgct acacaaatag accctcgat gctgttccca 2580
aggctggaga aacttggatt tgatagggtg gatggatggg aagaatggat atgggacaag 2640
gaacttgagc aggcattgcc aaacatcttt tctctcaaag tcacaaaatg caagctcaag 2700
tatttcccca cagggttgt gcatcaaac aggacctga gagaattgat catatctgaa 2760
gcttgcaact tgacatcagt tgcaaacitt ctctctctca gcgatctgca tctccatgcc 2820
aaccacaaatc tcgagatgat cgccaatctc cctaaactac gaaggettct gggttatccaa 2880
tgccccaaat tgaatgcact tgtgggttta acagaaactgc aaagcattac attgcaggac 2940
tatgcgcgag aactgtttcc acagtacttg gaagaaacta gtgtgcaaa gctagagggt 3000
ttctgtaatg aagaactctt caaacctata accctgcaag aaggctcaga gttgtgcaag 3060
atcaagaata tccaaaatgt taaagcatat gctcccaaag gagcgaccg taaaggatgg 3120
tacgcattat acactaagga accgtttagc ctgaccacaa acaacaaggg gtgcgaata 3180
tttgaagttg caaagtccta a 3201

```

<210> 49

<211> 1066

<212> PRT

<213> 玉米 (Zea mays)

[0015]

<400> 49
 Met Ala Met Ile Leu Asp Ala Phe Val Pro Met Leu Gly Arg Met Val
 1 5 10 15
 Ala Gly Ala Val Lys Glu Arg Leu Asp Thr Leu Leu Gly Val Pro Gly
 20 25 30
 Glu Met Glu Arg Leu Glu Ser Thr Leu Glu Asp Leu Val Asn Val Leu
 35 40 45
 Gly Asp Ala Glu Met Lys Arg Ile Thr Asp Thr Ala Val Asp Ala Trp
 50 55 60
 Val Arg Glu Leu Lys Asp Val Met Tyr Asp Ala Asp Asp Val Leu Asp
 65 70 75 80
 Arg Trp Gln Met Glu Ala Gln Ala Arg Ser Ser Ser Asp Ala Pro Lys
 85 90 95
 Arg Ser Phe Pro Gly Ala Gly Cys Cys Ala Pro Leu Leu Thr Cys Phe
 100 105 110
 Arg Asp Pro Ala Leu Ala His Ala Met Ala Ala Gln Ile Lys Glu Leu
 115 120 125
 Asn Arg Arg Leu Glu Ser Val Cys Arg Arg Ser Ser Met Phe Arg Phe
 130 135 140
 Val Ser Ala Ser Ser Ser Val Pro Leu Arg Gln Gln Leu Pro Pro Ala
 145 150 155 160
 Ser Ser Gly Asn Gly Lys Thr Ser Ser Val Ile Val His Ala Asp Leu
 165 170 175
 Ile Gly Glu Lys Ile Glu Glu Asp Gly Asn Arg Leu Val Glu Ala Leu
 180 185 190
 Ile Ala Asp Asp Leu Arg Glu Asn Val Leu Ala Val Gly Ile Thr Gly
 195 200 205
 Ala Gly Gly Ile Gly Lys Thr Thr Leu Ala Lys Arg Val Phe Ala Asp
 210 215 220
 Gln Arg Val Arg Asp Glu Phe Asp Leu Arg Val Trp Val Cys Val Ser
 225 230 235 240
 Gln Asp Val Asn Glu Ala Asp Leu Leu Trp Ser Val Leu Val Gly Ala
 245 250 255
 Gly Gly Gly His Gln Leu Gln Gln Gln His Asp Ala Thr Pro Asp Arg
 260 265 270
 Ser Ser Leu Glu Pro Ala Leu Gln Arg Ala Val Ser Gly Lys Lys Val
 275 280 285
 Leu Leu Val Leu Asp Asp Val Trp Ser Asp Val Ala Trp Lys Glu Val
 290 295 300
 Leu Gln Asn Ala Phe Arg Ala Gly Ala Arg Gly Gly Ser Arg Val Leu
 305 310 315 320
 Val Thr Thr Arg Lys Glu Thr Val Ala Arg Gln Met Lys Ala Val His
 325 330 335
 Ile His Arg Val Glu Lys Leu Gln Pro Glu Asp Gly Trp Arg Leu Leu

[0016]

340	345	350
Lys Asn Gln Val Val Leu Gly Arg Asn Pro Thr Asp Ile Glu Asn Phe		
355	360	365
Lys Asp Ile Gly Met Glu Ile Val Thr Arg Cys Asp Cys Leu Pro Leu		
370	375	380
Ala Ile Lys Thr Val Gly Gly Leu Leu Cys Thr Lys Glu Arg Thr Phe		
385	390	395
Arg Asp Trp Glu Glu Val Ser Arg Ser Ala Ala Trp Ser Val Ala Gly		
405	410	415
Leu Pro Glu Glu Val His Asn Ala Ile Tyr Leu Ser Tyr Ala Asp Leu		
420	425	430
Pro Pro His Leu Lys Gln Cys Phe Leu His Cys Ser Leu Phe Pro Lys		
435	440	445
Asp Glu Val Ile Lys Arg Val Asp Val Val Gln Met Trp Ile Ala Glu		
450	455	460
Gly Phe Val Gln Glu Asp Gly Ser Ser Ala Leu Leu Glu Asp Val Gly		
465	470	475
Asn Met Tyr Tyr Arg Glu Leu Val Met Arg Asn Leu Leu Glu Pro Asp		
485	490	495
Gly Gln Tyr Tyr Asp Gln Ser Gly Cys Thr Met His Asp Leu Leu Arg		
500	505	510
Ser Phe Ala Asn Tyr Leu Ala Lys Asp Glu Ala Leu Leu Thr Gln		
515	520	525
Gly Gln Ser Leu Cys Asp Met Lys Thr Lys Ala Lys Leu Arg Arg Leu		
530	535	540
Ser Val Ala Thr Glu Asn Val Leu Gln Ser Thr Phe Arg Asn Gln Lys		
545	550	555
Gln Leu Arg Ala Leu Met Ile Leu Arg Ser Thr Thr Val Gln Leu Glu		
565	570	575
Glu Phe Leu His Asp Leu Pro Lys Leu Arg Leu Leu His Leu Gly Gly		
580	585	590
Val Asn Leu Thr Thr Leu Pro Pro Ser Leu Cys Asp Leu Lys His Leu		
595	600	605
Arg Tyr Leu Glu Leu Ser Gly Thr Met Ile Asp Ala Ile Pro Asp Ser		
610	615	620
Ile Gly Asp Leu Arg Tyr Leu Gln Tyr Ile Gly Leu Leu Asn Cys Ile		
625	630	635
Asn Leu Phe Ser Leu Pro Gly Ser Ile Val Arg Leu His Arg Leu Arg		
645	650	655
Ala Leu His Ile Lys Gly Ala Ser Val Asn Asp Ile Pro Arg Gly Ile		
660	665	670
Gly Arg Leu Gln Asn Leu Val Glu Leu Thr Gly Phe Leu Thr Gln Asn		
675	680	685
Asp Ala Ala Ala Gly Trp Asn Ser Leu Glu Glu Leu Gly His Leu Pro		

[0017]

690	695	700
Gln Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Ser Asn Leu Glu Lys Ala His Thr Gly		
705	710	715
Ser Val Ala Lys Lys Ala Gly Leu Gln Gly Lys Arg His Leu Arg Tyr		
725	730	735
Leu Ser Leu Glu Cys Thr Pro Arg Ala Ala Gly Gly Asn Gln Ile Lys		
740	745	750
Asp Asn Asn Thr Gln Gln Glu Lys Arg Gln Ile Glu Asp Val Phe Asp		
755	760	765
Glu Leu Cys Pro Pro Val Cys Leu Glu Asn Leu Ser Leu Ile Gly Phe		
770	775	780
Phe Gly His Lys Leu Pro Lys Trp Met Ser Ser Gly Glu Met Asp Leu		
785	790	795
Lys Tyr Leu Arg Ser Ile Lys Leu Glu Asp Cys Thr Tyr Cys Glu Gln		
805	810	815
Leu Pro Ala Leu Gly His Leu Leu Ser Leu Asp Phe Leu Leu Ile Lys		
820	825	830
His Ala Pro Ser Ile Met Arg Ile Gly His Glu Phe Phe Cys Ser Ser		
835	840	845
Asn Ala Thr Gln Ile Asp Pro Arg Met Leu Phe Pro Arg Leu Glu Lys		
850	855	860
Leu Gly Phe Asp Arg Leu Asp Gly Trp Glu Glu Trp Ile Trp Asp Lys		
865	870	875
Glu Leu Glu Gln Ala Met Pro Asn Ile Phe Ser Leu Lys Val Thr Lys		
885	890	895
Cys Lys Leu Lys Tyr Phe Pro Thr Gly Leu Val His Gln Thr Arg Thr		
900	905	910
Leu Arg Glu Leu Ile Ile Ser Glu Ala Cys Asn Leu Thr Ser Val Ala		
915	920	925
Asn Phe Leu Leu Leu Ser Asp Leu His Leu His Ala Asn Pro Asn Leu		
930	935	940
Glu Met Ile Ala Asn Leu Pro Lys Leu Arg Arg Leu Ser Val Ile Gln		
945	950	955
Cys Pro Lys Leu Asn Ala Leu Val Gly Leu Thr Glu Leu Gln Ser Ile		
965	970	975
Thr Leu Gln Asp Tyr Ala Ala Glu Leu Phe Pro Gln Tyr Leu Glu Glu		
980	985	990
Thr Ser Ala Ala Lys Leu Glu Val Phe Cys Asn Glu Glu Leu Phe Lys		
995	1000	1005
Leu Ile Thr Leu Gln Glu Gly Ser Glu Trp Cys Lys Ile Lys Asn		
1010	1015	1020
Ile Gln Asn Val Lys Ala Tyr Ala Pro Lys Gly Gly Asp Arg Lys		
1025	1030	1035
Gly Trp Tyr Ala Leu Tyr Thr Lys Glu Pro Phe Ser Leu Thr Thr		

[0018]

1040	1045	1050	
Asn Asn Lys Gly Cys Glu Ile	Phe Glu Val Ala Lys	Ser	
1055	1060	1065	
<210> 50			
<211> 3794			
<212> DNA			
<213> 玉米 (Zea mays)			
<400> 50			
atggetatga tccatagacgc cttcgtgccc atgetggggc gaatggtegc tggtgccgtg		60	
aaggagagge tgcacacgt ccteggcgtg cccggggaga tggaaaggct ggagagcaca		120	
ctggaggacc tctgaatgt ccteggcgac gcagagatga agcgcacac ggacacggcc		180	
gtcagcgcct gggttcggga gcttaaggac gtcattgacg acgcgcacga cgtcctcgac		240	
cgggtggcaga tggaggecca ggcccgcagc agcagcgacg cgcaccaagc ctcgttcct		300	
ggcgttggt getgcgcgc cctcctcagc tcttcgggg acceggcgt cgtcagcgc		360	
atggcggcgc agatcaagga gctgaaccgg aggetggaga gcgtgtgcgc teggagctcc		420	
atgtttcgt tctcagcgc ctcgtctcc gtcctctcc ggcagcaact accaccggca		480	
tccagcggca accgtaagac gagctcggtg atcgtccacg ccgattctat cggggagaag		540	
atcgaggagg accggaacag gctggtggag gtgtgatcg ctgacgacct gcgcgagaac		600	
gtcctcgccg tgggcatcac aggcgcggc gggatcggga agaccacct cgcgaagg		660	
gtcttcgtg accagcgcgt gcgcgacgag ttgcacctca ggggtgggt gtgcgtgtcg		720	
caggacgtga accaggtga cctgctgtgg tccgtctcg ttggcgcgg aggcggccac		780	
cagctccagc agcagcagc cgcacgcgc gacaggctgt cgtctggag cccgcctcc		840	
agcgggcgt ctcgggaaag aaggtctgc tgggtgtga cgcgtgtgg agcagctgg		900	
cctggaagga ggtgtctcag accgcgtca ggcgcggcgc tctgggcgc agcagggtgc		960	
tctcagcagc gaggaaagag tccgttgcca ggcagatgaa ggcctgcac atccaccgcg		1020	
tggagaagct gcagcctgaa gatgggtgga gcttactcaa gaaccaggtt agggactgga		1080	
atgaatgct ctttcctgtg tcttcaaatt aactatggcg acaacattac tgcggttga		1140	
tgatgctaa aagcaccagt taaattacac ttgcacteta aagtcattca accattta		1200	
tgatgtcagc caactgaact ttatctctct cttaaattcag tttctgact tgcattttt		1260	
tttttaaaaa aaaaggagat gtccattgtc caccatctc accagcaca ttaacaaat		1320	
taaacatagg gcacttgggt aacaatctca cccctctct ttcagcttca ctctcaaggc		1380	
taaaactataa tacacaattc gccaaagaaa atgtttaact ttgtttggac atcgtacgtt		1440	
ccaaatccca cgcacaaatt cttaataaca aacacagcta atttlaacatg acaaaagaag		1500	
gtcttttga gagagagaaa actggacact ggetactgac tgatgcaccc agagaggact		1560	
tgaaccatct agtacatggt ctgatggcag acatacaaga ttaatttgag cacagttgtt		1620	
atacaaatat ttaaccatac tttatgtttg aacaggtagt cttgggcagg aatccaaccg		1680	
acatagaaaa ttccaagac attggtatgg agatcgtcac aagatgcgat tgcctgcgc		1740	
ttgccatcaa gacagtgggt gggtactgt gcacaaaaga gagaacgttc agagactggg		1800	
aggaagctc aaggagcgc gcattgtccg tggcaggact acctgaagag gttcacaacg		1860	
ccatctacct gagctatgcc gatctaccgc ctcatittga acagtgttct ctgcactgct		1920	
cccttttccc aaaagacgaa gtcatacaac ggggtgatgt cgttcagatg tggatgcgcg		1980	
aggggtttgt acaagaggat gggctctcag cgtgtctcga agatgtaggg aacatgtatt		2040	

[0019]

```

acagagaact agtcatgcgc aacctactcg aacctgatgg ccagtattac gatcagtcag 2100
gatgcacgat gcatgacctt cttegatcgt ttgccaatat tctggcaaaa gatgaagcgt 2160
tgctttttac gcagggccaa agtttatgcg acatgaagac aaaagccaag ctgcgtcgge 2220
tgtccgtagc caccgaaaat gtgtcccaaa gtaccttcag aaatcagaag cagctgaggg 2280
cgctaatgat actccgaage accacgggtc agctggaaga gtctctgcat gacctgccta 2340
agetgcgaact gctgcattct ggggggtgaa acctcacaac ctgcgcctct tctctgtgtg 2400
atctgaagea tctaagatac tiggagctgt ctggtacctat gatagatgca atcccagact 2460
cgattggaga cttgagggtat ctacagtaca ttggtctgct aaactgcata aatctgttca 2520
gtcttctctg gagcatagtg aggetgcata agctgagage tctccacatc aagggggcca 2580
gtgtgaatga cgacatcccc agggggatag ggagattaca aaaccttggt gagctgaactg 2640
gttttttaac acagaatgat gctgctgcag gttggaacag cctggaggag ctaggccacc 2700
ttccccagct cagcctcttg tatetaagca acctagagaa agcacacacc ggctctgttg 2760
ccaagaaage agacctccaa ggcaagcgcc accttagata cttaaagctt gagtgacac 2820
caagagccgc tggtggaat cagatcaaaag ataataaac acagcaggag aaacgtcaga 2880
ttgaggatgt ctttgatgag ctctgtccac cggtttgcct cgaaaacctc tcaataatcg 2940
gcttctctgg acacaagctt cctaaatgga tgagctcagg cgagatggat ctttaagtacc 3000
taagateaat aaaactcgaa gattgcacct actgcagaca gctccccgca ttgggccatc 3060
tcttgagttt agatttctg ctgatecaaac atgcgccatc tattatgaga attggacacg 3120
aattcttttg cagcagcaat gctacacaaa tagacctcg gatgctgttc ccaaggcttg 3180
agaaaacttg atttgatagg ttggatggat gggaagaatg gatatgggac aaggaaactg 3240
agcaggeaat gccaaacatc tttctctca aagtcacaaa atgcaagctc aagtatttcc 3300
ccccagggct tgtgcatcaa accagggcct tgaaagaatt gatcatatct gaagcttgca 3360
acttgacatc agttgcacac ttctctctcc tcagcgatct gcattctcat gccaacccaa 3420
atctcgagat gatcgctaat ctccctaaac taagaagctt ttgggttate caatgcccc 3480
agttgaatgc acttgtaggt ttaacagaa cgcacagcat cacattgcag gactatgcg 3540
cagaactgtt tccacgtac ttggaagaaa ctagtgtctc aaagetagag gttttctgta 3600
atgaagaact ctccaaactt ataacctgc aagaaggctc agagtgggtc aagatcaaga 3660
atatccaaaa tgttaaagca tatgtctcca aaggaggcga ccgtaaagga tggatgcat 3720
tataactaa ggaacctgtt agcctgacca caaacacaaa ggggtgcgaa atatttgaag 3780
ttgcaaagtc ctaa 3794

```

<210> 51

<211> 3205

<212> DNA

<213> 玉米 (Zea mays)

<400> 51

```

atggetatga tcttagacgc ctctgtgccc atgetggggc gaatggctgc tggtgccgtg 60
aaggagagge tgcacacgct cctcgccgtg cccggggaga tggaaaggct ggagagcaca 120
ctggaggacc tegtgaatgt cctcgccgac gcagagatga agcgcacac ggacacggcc 180
gtcgacgcct ggggttcggga gcttaaggac gtcattgacg acgccgacga cgtctcgac 240
cgggtggcaga tggaggccca ggcgcgcgc agcagcgacg cgcaccaagg cctgttccct 300
ggcgtggct getgcgcgc cctctcagc tgettcggg acccgcgct cgtcagcgc 360
atggcggcgc agatcaagga gctgaacgg aggetggaga gctgtgcgc tcggagctcc 420

```

[0020]

atgttttcegt	tegtcagegc	ctegtctgtcc	gtccccctcc	ggcagcaact	accaccggca	480
tcacagggca	acggtaagac	gagctcgggtg	atcgtccacg	cagatctcat	cggggagaag	540
atcgaggagg	acgggaacag	gttggtggag	gtgtgatcg	ctgacgacct	gcgcgagAAC	600
gtctctgcgc	tgggcaicac	agggccgggc	gggatcggga	agaccacct	cgcgaagagg	660
gtcttctgtg	accagcgcgt	gcgcgacgag	tctgacctca	gggtgtgggt	gtgcgigtgc	720
caggacgtga	acgaggetga	cctgtctgtg	tccgtctctg	ttggcgccgg	aggcgggccac	780
cagctccagc	agcagcaaga	cgcacgcgcg	gacaggctgt	cgtctctggag	cccgctctcc	840
agcgggcgcgt	ctcgggaaag	aaggctctgc	tgggtctgga	cgcgtgtgtg	agcgcgtgtg	900
cctggaagga	ggctctccag	aaagcgttca	gggcgggcgc	tctgtggcgc	agcagggtgc	960
tctctcagac	gaggaaagag	tccgttgcga	ggcagatgaa	ggccgtgcac	atccaccgcg	1020
tggagaagct	gcagcctgaa	gatgggtggc	gcttactcaa	gaaccagtag	tcttgggcag	1080
gaatccaaac	gacatagaaa	atttcaaaga	catttggtatg	gagatcttca	caagatgcga	1140
ttgcctgcgc	cttgccatca	agacagtggg	tgggtctactg	tgcacaaaag	agagaacgtt	1200
cagagactgg	gaggaaagct	caaggagcgc	cgcctgtctc	gtggcaggac	tacctgaaga	1260
ggctccaaac	gccatctaac	tgcctctatg	cgtctctcgc	cctcatttga	aacagtgttt	1320
cctgcactgc	tcccttttcc	caaaagacga	agtcataaaa	cgggtggatg	tcttccagat	1380
gttgatctgc	gaggggtttg	tacaagagga	tgggtctctca	gcgcctctcg	aagatgtagg	1440
gaacatgtat	tacagagAAC	tagtcatgag	caacctactc	gaacctgatg	gccagtatta	1500
cgatcagtca	ggatgcacga	tgcctgacct	tcttctgctg	tttgcacatt	atctggcaaa	1560
agatgaagcg	ttgtctctta	cgcaggggcc	aagtttatgc	gacatgaaga	caaaagccaa	1620
gtctgcctgg	ctgtccgtag	ccaccgaaaa	tgtgtctcaa	agtaccttca	gaaatcagaa	1680
gcagctgagg	gcctaatga	tactccgaag	caccacgggt	cagctggaag	agttctctga	1740
tgcctctcct	aagctgcgac	tgtctctctc	cgggggtgtg	aaacctcaaa	ccttgcgcgc	1800
ttctctgtgt	gactcgaage	atctaaagata	cttggagctg	tctgttacea	tgalagatgc	1860
aatcccagac	tgcattggag	acttgaggta	tctacagtac	attggtctgc	taaacctgcat	1920
aaatctgttc	agtcttctctg	ggagcatagt	gaggtctcat	aagctgagag	ctctccacat	1980
caagggggcc	agtgtgaatg	acgacatccc	caggggggata	gggagattac	aaaaccttgt	2040
tgcctcgaact	ggtttttttaa	cacagaatga	tgtctctgca	ggttggaaaca	gcctggagga	2100
gttagggccac	cttccccage	tcagctctct	gtatctaaag	aaactagaga	aagcacacac	2160
cggctctgtg	gccaagaaag	cagacctcca	aggcaagcgc	caccttagat	acttaagctt	2220
ggagtgcaca	ccaagagcgc	ctgggtggaaa	tcagatcaaa	gataataaca	cacagcagga	2280
gaaacgtcag	attgaggatg	tctttgatga	gcctctgcca	cgggtttgce	tgcaaaacct	2340
ctcactaatc	ggcttctctg	gacacaagct	tccaaatgg	atgagctcag	gcgagatgga	2400
tcttaagtae	ctaagatcaa	taaaactcga	agattgcacc	tactgcgagc	agctccccgc	2460
attgggccat	ctctctgatt	tagatttctc	gtgatcaaaa	catgcgccat	ctattatgag	2520
aattggacac	gaattctttt	gcagcagcaa	tgtctacaaa	atagaccctc	ggatgtctgt	2580
cccaaggetg	gagaaaactg	gatttgatag	gttggatgga	tgggaagaat	ggatatggga	2640
caaggaaactg	gagcaggcaa	tgcacaaact	ctttctctct	aaagtcacaa	aatgcaagct	2700
caagtatttc	ccccagggc	ttgtctatca	aaccagggcc	ttgaaagaat	tgatcatatc	2760
tgaagcttgc	aacttgacat	cagttgcaaa	ctttctctct	ctcagcgatc	tgcactctca	2820
tgcacaccca	aatctcgaga	tgategetaa	tctccctaaa	ctacgaagge	tttcggttat	2880
ccaatgcccc	aagtgtgaatg	cacttgtggg	tttaacagaa	ctgcaaagca	tcacattgca	2940
ggaetatgcc	gcagaaactgt	tccacagta	cttgggaagaa	actagtgtctg	caaagctaga	3000
ggttttctgt	aatgaagaac	tcttcaaaact	tataacctgt	caagaagggt	cagagtggtg	3060

[0021]

caagatcaag aatatccaaa atgttaaage atatgtccc aaaggaggcg accgtaaagg	3120
atggtatgca ttatacacta aggaaccgtt tagcctgacc acaaacaaca aggggtgcga	3180
aatatttgaa gttgcaaagt cctaa	3205

<210> 52
<211> 1068
<212> PRT
<213> 玉米 (Zea mays)
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (333).. (333)
<223> Xaa 为翻译终止
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (419).. (419)
<223> Xaa 为翻译终止
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (496).. (496)
<223> Xaa 为翻译终止
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (509).. (509)
<223> Xaa 为翻译终止
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (522).. (522)
<223> Xaa 为翻译终止
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (581).. (581)
<223> Xaa 为翻译终止
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (584).. (584)
<223> Xaa 为翻译终止
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (604).. (604)
<223> Xaa 为翻译终止
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (654).. (654)
<223> Xaa 为翻译终止

[0022]

<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (667).. (667)
<223> Xaa 为翻译终止
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (681).. (681)
<223> Xaa 为翻译终止
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (690).. (690)
<223> Xaa 为翻译终止
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (736).. (736)
<223> Xaa 为翻译终止
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (755).. (756)
<223> Xaa 为翻译终止
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (765).. (765)
<223> Xaa 为翻译终止
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (769).. (770)
<223> Xaa 为翻译终止
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (792).. (792)
<223> Xaa 为翻译终止
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (802).. (802)
<223> Xaa 为翻译终止
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (869).. (870)
<223> Xaa 为翻译终止
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (921).. (921)
<223> Xaa 为翻译终止

[0023]

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <222> (950).. (950)
 <223> Xaa 为翻译终止
 <220>
 <221> 尚未归类的特性
 <222> (953).. (953)
 <223> Xaa 为翻译终止
 <220>
 <221> 尚未归类的特性
 <222> (995).. (995)
 <223> Xaa 为翻译终止
 <220>
 <221> 尚未归类的特性
 <222> (1004).. (1005)
 <223> Xaa 为翻译终止
 <220>
 <221> 尚未归类的特性
 <222> (1029).. (1029)
 <223> Xaa 为翻译终止
 <220>
 <221> 尚未归类的特性
 <222> (1039).. (1039)
 <223> Xaa 为翻译终止
 <220>
 <221> 尚未归类的特性
 <222> (1047).. (1047)
 <223> Xaa 为翻译终止
 <220>
 <221> 尚未归类的特性
 <222> (1051).. (1051)
 <223> Xaa 为翻译终止
 <220>
 <221> 尚未归类的特性
 <222> (1063).. (1063)
 <223> Xaa 为翻译终止

<400> 52

Met	Ala	Met	Ile	Leu	Asp	Ala	Phe	Val	Pro	Met	Leu	Gly	Arg	Met	Val
1				5					10					15	
Ala	Gly	Ala	Val	Lys	Glu	Arg	Leu	Asp	Thr	Leu	Leu	Gly	Val	Pro	Gly
			20				25					30			
Glu	Met	Glu	Arg	Leu	Glu	Ser	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	Val	Asn	Val	Leu
			35				40					45			

[0024]

Gly Asp Ala Glu Met Lys Arg Ile Thr Asp Thr Ala Val Asp Ala Trp		
50	55	60
Val Arg Glu Leu Lys Asp Val Met Tyr Asp Ala Asp Asp Val Leu Asp		
65	70	80
Arg Trp Gln Met Glu Ala Gln Ala Arg Ser Ser Ser Asp Ala Pro Lys		
85	90	95
Arg Ser Phe Pro Gly Ala Gly Cys Cys Ala Pro Leu Leu Thr Cys Phe		
100	105	110
Arg Asp Pro Ala Leu Ala His Ala Met Ala Ala Gln Ile Lys Glu Leu		
115	120	125
Asn Arg Arg Leu Glu Ser Val Cys Arg Arg Ser Ser Met Phe Arg Phe		
130	135	140
Val Ser Ala Ser Ser Ser Val Pro Leu Arg Gln Gln Leu Pro Pro Ala		
145	150	160
Ser Ser Gly Asn Gly Lys Thr Ser Ser Val Ile Val His Ala Asp Leu		
165	170	175
Ile Gly Glu Lys Ile Glu Glu Asp Gly Asn Arg Leu Val Glu Val Leu		
180	185	190
Ile Ala Asp Asp Leu Arg Glu Asn Val Leu Ala Val Gly Ile Thr Gly		
195	200	205
Ala Gly Gly Ile Gly Lys Thr Thr Leu Ala Lys Arg Val Phe Ala Asp		
210	215	220
Gln Arg Val Arg Asp Glu Phe Asp Leu Arg Val Trp Val Cys Val Ser		
225	230	240
Gln Asp Val Asn Glu Ala Asp Leu Leu Trp Ser Val Leu Val Gly Ala		
245	250	255
Gly Gly Gly His Gln Leu Gln Gln Gln His Asp Ala Thr Pro Asp Arg		
260	265	270
Ser Ser Leu Trp Ser Pro Arg Ser Ser Gly Pro Ser Arg Glu Arg Arg		
275	280	285
Ser Cys Trp Cys Trp Thr Thr Cys Gly Ala Thr Trp Pro Gly Arg Arg		
290	295	300
Cys Ser Arg Thr Arg Ser Gly Pro Ala Leu Val Ala Ala Ala Gly Cys		
305	310	320
Ser Ser Arg Arg Gly Lys Ser Arg Leu Pro Gly Arg Xaa Arg Pro Cys		
325	330	335
Thr Ser Thr Ala Trp Arg Ser Cys Ser Leu Lys Met Gly Gly Ala Tyr		
340	345	350
Ser Arg Thr Ser Ser Leu Gly Gln Glu Ser Asn Arg His Arg Lys Phe		
355	360	365
Gln Arg His Trp Tyr Gly Asp Arg His Lys Met Arg Leu Pro Ala Ala		
370	375	380
Cys His Gln Asp Ser Gly Trp Ala Thr Val His Lys Arg Glu Asn Val		
385	390	400

[0025]

Gln Arg Leu Gly Gly Ser Leu Lys Glu Arg Arg Met Val Arg Gly Arg		
405	410	415
Thr Thr Xaa Arg Gly Ser Gln Arg His Leu Pro Glu Leu Cys Arg Ser		
420	425	430
Thr Ala Ser Phe Glu Thr Val Phe Pro Ala Leu Leu Pro Phe Pro Lys		
435	440	445
Arg Arg Ser His Gln Thr Gly Gly Cys Arg Ser Asp Val Asp Arg Arg		
450	455	460
Gly Val Cys Thr Arg Gly Trp Val Leu Ser Ala Ala Arg Arg Cys Arg		
465	470	475
Glu His Val Leu Gln Arg Thr Ser His Ala Gln Pro Thr Arg Thr Xaa		
485	490	495
Trp Pro Val Leu Arg Ser Val Arg Met His Asp Ala Xaa Pro Ser Ser		
500	505	510
Ile Val Cys Gln Leu Ser Gly Lys Arg Xaa Ser Val Ala Ser Tyr Ala		
515	520	525
Gly Pro Lys Phe Met Arg His Glu Asp Lys Ser Gln Ala Ala Ser Ala		
530	535	540
Val Arg Ser His Arg Lys Cys Ala Pro Lys Tyr Leu Gln Lys Ser Glu		
545	550	555
Ala Ala Glu Gly Ala Asn Asp Thr Pro Lys His His Gly Ser Ala Gly		
565	570	575
Arg Val Pro Ala Xaa Pro Ala Xaa Ala Ala Thr Ala Ala Ser Arg Gly		
580	585	590
Cys Lys Pro His Asn Leu Ala Ala Phe Ser Val Xaa Ser Glu Ala Ser		
595	600	605
Lys Ile Leu Gly Ala Val Trp Tyr His Asp Arg Cys Asn Pro Arg Leu		
610	615	620
Asp Trp Arg Leu Glu Val Ser Thr Val His Trp Ser Ala Lys Leu His		
625	630	635
Lys Ser Val Gln Ser Ser Trp Glu His Ser Glu Ala Ala Xaa Ala Glu		
645	650	655
Ser Ser Pro His Gln Gly Gly Gln Cys Glu Xaa Arg His Pro Gln Gly		
660	665	670
Asp Arg Glu Ile Thr Lys Pro Cys Xaa Ala Asp Trp Phe Phe Asn Thr		
675	680	685
Glu Xaa Cys Cys Cys Arg Leu Glu Gln Pro Gly Gly Ala Arg Pro Pro		
690	695	700
Ser Pro Ala Gln Pro Leu Val Ser Lys Gln Pro Arg Glu Ser Thr His		
705	710	715
Arg Leu Cys Gly Gln Glu Ser Arg Pro Pro Arg Gln Ala Pro Pro Xaa		
725	730	735
Ile Leu Lys Leu Gly Val His Thr Lys Ser Arg Trp Trp Lys Ser Asp		
740	745	750

[0026]

Gln Arg Xaa Xaa His Thr Ala Gly Glu Thr Ser Asp Xaa Gly Cys Leu
 755 760 765
 Xaa Xaa Ala Leu Ser Thr Gly Leu Pro Arg Lys Pro Leu Thr Asn Arg
 770 775 780
 Leu Leu Arg Thr Gln Ala Ser Xaa Met Asp Glu Leu Arg Arg Asp Gly
 785 790 795 800
 Ser Xaa Val Pro Lys Ile Asn Lys Thr Arg Arg Leu His Leu Leu Arg
 805 810 815
 Ala Ala Pro Arg Ile Gly Pro Ser Pro Glu Phe Arg Phe Pro Ala Asp
 820 825 830
 Gln Thr Cys Ala Ile Tyr Tyr Glu Asn Trp Thr Arg Ile Leu Leu Gln
 835 840 845
 Gln Gln Cys Tyr Thr Asn Arg Pro Ser Asp Ala Val Pro Lys Ala Gly
 850 855 860
 Glu Thr Trp Ile Xaa Xaa Val Gly Trp Met Gly Arg Met Asp Met Gly
 865 870 875 880
 Gln Gly Thr Gly Ala Gly Asn Ala Lys His Leu Phe Ser Gln Ser His
 885 890 895
 Lys Met Gln Ala Gln Val Phe Pro Pro Arg Ala Cys Ala Ser Asn Gln
 900 905 910
 Gly Leu Glu Arg Ile Asp His Ile Xaa Ser Leu Gln Leu Asp Ile Ser
 915 920 925
 Cys Lys Leu Ser Pro Pro Gln Arg Ser Ala Ser Pro Cys Gln Pro Lys
 930 935 940
 Ser Arg Asp Asp Arg Xaa Ser Pro Xaa Thr Thr Lys Ala Phe Gly Tyr
 945 950 955 960
 Pro Met Pro Gln Val Glu Cys Thr Cys Gly Phe Asn Arg Thr Ala Lys
 965 970 975
 His His Ile Ala Gly Leu Cys Arg Arg Thr Val Ser Thr Val Leu Gly
 980 985 990
 Arg Asn Xaa Cys Cys Lys Ala Arg Gly Phe Leu Xaa Xaa Arg Thr Leu
 995 1000 1005
 Gln Thr Tyr Asn Pro Ala Arg Arg Phe Arg Val Val Gln Asp Gln
 1010 1015 1020
 Glu Tyr Pro Lys Cys Xaa Ser Ile Cys Ser Gln Arg Arg Arg Pro
 1025 1030 1035
 Xaa Arg Met Val Cys Ile Ile His Xaa Gly Thr Val Xaa Pro Asp
 1040 1045 1050
 His Lys Gln Gln Gly Val Arg Asn Ile Xaa Ser Cys Lys Val Leu
 1055 1060 1065

<210> 53

<211> 25

<212> DNA

[0027]

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_45 正向引物	
<400>	53	
	ctgcatgtgg actttattca gaaga	25
<210>	54	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_46 反向引物	
<400>	54	
	tectttitgca ttggatgget	20
<210>	55	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_45 正向巢式引物	
<400>	55	
	catcaagttt taggtggact gaagc	25
<210>	56	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_46 反向巢式引物	
<400>	56	
	aaatggcctg attcttttgg taga	24
<210>	57	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_8 正向引物	

[0028]

<400>	57	
	gatgcagtgt attctcgacg aact	24
<210>	58	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c0176e15_7 反向巢式引物	
<400>	58	
	tcgatgtaat ccggtgcgga	20
<210>	59	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	MZA6815_正向引物	
<400>	59	
	aaatgtgaac cttgaggaa ac	22
<210>	60	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	MZA6815_反向引物	
<400>	60	
	ctgaaaacca agatagttca tg	22
<210>	61	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	IDP200_正向引物	
<400>	61	
	gcacgccga ctgtatcc	18
<210>	62	

[0029]

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	IDP200 反向引物	
<400>	62	
cctcgteage cagagtaacc		20
<210>	63	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	MZA760 正向引物	
<400>	63	
atgetgttct gtcactcggc		20
<210>	64	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	MZA760 反向引物	
<400>	64	
gatagacacc ctccaagcaa at		22
<210>	65	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	MZA15537 正向引物	
<400>	65	
gagcagtaac agttcatga		20
<210>	66	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

[0030]

<223> MZA15537 反向引物

<400> 66

ctcgaccacc taattaaaca gt

22

<210> 67

<211> 3201

<212> DNA

<213> 玉米 (*Zea mays*)

<400> 67

atggcggfga gtaaategtt tetgatitc gcatatttat catgtctttg acctcttgat	60
gtctgttagta aaaagtecaa attactccat ccaagtttgc ctatccetta aactaacatt	120
tagttcaatt tactacctet aactatttca gttggcteta tttaacactt aaaaagattt	180
ttcgttttgt ttctctgtgt ataaatgtg tgattataga ggcatcata gtttgtgtta	240
gaaaaatata tcatgaacgt tcatcacta tattttgtat gatattatat ctctagtgtc	300
atttactatt aaatttecta agetatcaaa aatagtggca gaaaagaata tatatgtttt	360
tcetaatata actcataatg tcctctatca catcacaaaa ttgatatta gtacttaact	420
tatacgtgat gaaacagaaa ataacaaatc ttgttaaggg gtaaacctgga ctaactcaaa	480
tagttgggtg agtaaatega accaaataac atettagggt taattagacc aatgccaaaa	540
ttgagggggag taatttggac ttttttaata aaactagagc gaaaacacgt ccaacttgtaa	600
aatgtaaaaa aattctccag cctgaacaag tcaaggcaga atcgaagtat catttacact	660
agttcttatt taaccagaca attagtcatc acaggacaga ccaattccag atttcttaca	720
gttgactcaa aatgtaatac aatatgtatg tatccgtatg gaagacagag ggagacataa	780
tgggacctat aagtactgtc gaatgagtag tgtactttagc tggtttggta gttataaacc	840
cacctttgtc tgttcatgtg gtgaitgggt tgcgtgttat getaggecta ttcatgtgt	900
gagtgtggca gataatttcc cagaataaat ccttgttgaa actagtaaac tgc aaatgce	960
acaattctag acctgtgtgc acitgateca gtatatgeat tatactcttc ttttgcattg	1020
tagcatgtat catagacatc ccaaatattt aggggggttca gtcttagttt tctcagaaat	1080
gataatctcc tgaatcttgc tgcagggtat tcagcatact ttgggatgtt tgagaatett	1140
tttgtctttg ctaattcttc tcccacaaaa tgataactat cctagcaaca gatggttgct	1200
ttiacatttt tatatacat aactcatagc cctccagaaa gttgactaaa gctaccgatt	1260
actctgtctc gtacagcaac ctgaaattcc tgcatttggg gatttgggaaa ccaactggaaa	1320
cacaccttac acacaaaagt tgcaggatgc acggaagaac aagaaaacag gaattcttgc	1380
acaaccaaat gatccaagga gggatctgga acctctctgc aagtcgctt tgcacccaac	1440
ggctacaaa actaatctc aagaccaagg tccaaggaa ccaaccatc gaccaagacc	1500
tgaacttgac aaccaacgac actctgaccg gcctactcac cgtgagtcct caccacgaag	1560
acattcaaat ctccagagag aacaagggag taatgtctgg acaccaagaa gccctacag	1620
aacagctgct gggctctgct caccaatgca gccaaacaac caateaaagc caaagcacag	1680
gtcaactgga atgcagactc cagagaggag ggcattctca gaggggcttg gccagcatac	1740
acctggaagg agcaggatga agccgggtgg ctatgaggta ataatacctt actatacttc	1800
attttttcaa taatatttca atgaatgttg getagaaatc ccttttagat aattactctt	1860
gtttctgcat tggtaaatcc agcctgaaga agtggctgta ccacctttg gegaatggga	1920
tgatgcaaat gcagcatcag gtgaaaagta caetggtatc ttaacaggg tgagggatga	1980

[0031]

```

taggttgtea cctacctett ctgctaggca accgtctact actcgtagtg aagagaataa 2040
ggtagcaacag gtagtcaaaa gcttgteccag agtaaagttg aaaattcagt ttatatgttc 2100
aattetteat tgtatattat tgcacaccac atatgcaaat gcaattatgc aaaaaagtat 2160
cataatetet atgatgttga tgctaactia atattaagta ttgtatctga tagatcatat 2220
ataacaaaaa tatatttatg ctatttgcct ttagaactet ttggcattta atcttcecta 2280
tgttctecaa tagaacatat cctgaactata ttattgcaet agcateagaa atgtccaaagg 2340
ttcatcttet atttttattt tctctaacac gcaagtgagt tacatatcat tttattatca 2400
agaaagaaaa gagtagcga gagggacaaa gtccccgaaa cacacccaaa actcacagcc 2460
acactgcaac tggaaacaaa ttgccctttt caacagcaag tgatcaacaa gctaccagta 2520
aaaattaatt gtctggtaat caactgtgac atccagctat ccgaccttga atcttggctc 2580
gattactaaa caataaatgt tttctatata gticattcta tatgttccct aaatatttaa 2640
ttttgtgacc ttaagtttat ttaaaglate aatagcaata ttgtatgce atacagctgg 2700
tggattggta gcttagagaa caggttattt ttatggaaac cacacacaa tatatgtatt 2760
ctgcaagtaa aaaatattgg caagtggcat ctcccttta aaaaaaaact gccaacttca 2820
ttgtcaaat ctacatgat agatagtat faagataig ttacataaat acateagctg 2880
catgatttgc taattaagta attatcttca ttgtttgtt ttgattcage tagcaactca 2940
atactgagac atattccttg ttgctctatc aacagtagta aactagtaat cgtggcattg 3000
ttttggtata gaatgttgaa ctgttgtaa gatgagttat ttgacctga atttatecag 3060
ataaataaac atggaaattt taaaacaca aatatgttct ttatttaaag ttcctaaaa 3120
ctctgcattg catacaggga tatcttatcg actgacctt gtctctttaa tctacagaaa 3180
tgttcttget gcatactttg a 3201

```

<210> 68

<211> 699

<212> DNA

<213> 玉米 (Zea mays)

<400> 68

```

atggcgcaac ctgaaattcc tgcatttggg gattgggaaa ccactggaaa cacaccttac 60
acacaaaagt tcgaggatgc acggaagaac aagaaaaacag gaattcttgc acaaccaaat 120
gatccaagga gggatcttga acctctctgc aagtcgctt tgcacccaac ggtctacaaa 180
actaatcttc aagaccaagg tccaaggaac ccaccacatc gaccaagacc tgaacttgac 240
aaccaacgac actctgaccg gctactcac cgtgagcttg caccacgaag acattcaaat 300
cttcagagag aacaaggag taatgetggg acaccaagaa gccctacag aacagctget 360
gggtctgctt caccaatgca gccaaacaac caatcaaage caaagcacag gtcaactgga 420
atgcagactc cagagaggag ggcattctca gaggggcttg gccagcatac acctggaagg 480
agcaggatga agccgggttg ctatgagcct gaagaagtgg ctgtaccacc ctttggcgaa 540
tgggatgatg caaatgcage atcaggtgaa aagtacactg gtattctcaa cagggtgagg 600
gatgataggt tgtcacctac ctctctctgt aggcaaccgt ctactactcg tagtgaagag 660
aataaggtgc aacagaaatg ttcttgetge atactttga 699

```

<210> 69

<211> 232

<212> PRT

[0032]

<213> 玉米 (Zea mays)

<400> 69

```

Met Ala Gln Pro Glu Ile Pro Ala Phe Gly Asp Trp Glu Thr Thr Gly
1           5           10           15
Asn Thr Pro Tyr Thr Gln Lys Phe Glu Asp Ala Arg Lys Asn Lys Lys
           20           25           30
Thr Gly Ile Leu Ala Gln Pro Asn Asp Pro Arg Arg Asp Leu Glu Pro
           35           40           45
Pro Arg Lys Ser Pro Leu His Pro Thr Val Tyr Lys Thr Asn Pro Gln
           50           55           60
Asp Gln Gly Pro Arg Asn Pro Pro His Arg Pro Arg Pro Glu Leu Asp
65           70           75           80
Asn Gln Arg His Ser Asp Arg Pro Thr His Arg Glu Ser Ala Pro Arg
           85           90           95
Arg His Ser Asn Leu Gln Arg Glu Gln Gly Ser Asn Ala Gly Thr Pro
           100          105          110
Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Ala Ala Gly Ser Ala Ser Pro Met Gln Pro
           115          120          125
Asn Asn Gln Ser Lys Pro Lys His Arg Ser Thr Gly Met Gln Thr Pro
           130          135          140
Glu Arg Arg Ala Ser Ser Glu Gly Leu Gly Gln His Thr Pro Gly Arg
145          150          155          160
Ser Arg Met Lys Pro Gly Gly Tyr Glu Pro Glu Glu Val Ala Val Pro
           165          170          175
Pro Phe Gly Glu Trp Asp Asp Ala Asn Ala Ala Ser Gly Glu Lys Tyr
           180          185          190
Thr Gly Ile Phe Asn Arg Val Arg Asp Asp Arg Leu Ser Pro Thr Ser
           195          200          205
Ser Ala Arg Gln Pro Ser Thr Thr Arg Ser Glu Glu Asn Lys Val Gln
           210          215          220
Gln Lys Cys Ser Cys Cys Ile Leu
225          230

```

<210> 70

<211> 3201

<212> DNA

<213> 玉米 (Zea mays)

<400> 70

```

atggcgggtga gtaaactggt tetgatttgc gcatatttat catgtetttg acctettgat      60
gtctgtagta aaaagtccaa attacccat ccaagtttgc ctatccctta aactaacatt      120
tagttcaatt tactacctet aactatttca gttggctctaa ttacacett aaaaagattt      180
ttcgttttgt ttctctgtgt ataaattgtg tgattataga ggctcctata gtttgtgita      240

```

[0033]

gaaaaatata	tcatgaacgt	ttcatcacta	tattttgtat	gatattatat	ctctagtgtc	300
atttactatt	aaatttceta	agctatcaaa	aatagtggca	gaaaagaata	tatattgttt	360
tcetaatata	actcataatg	tcctetatca	catcacaaaa	tttgatatfa	gtacttaact	420
tatacgtgat	gaaacagaaa	atacaaaatc	ttgttaaggg	gtaaaactgga	ctaaactcaaa	480
tagttgggtg	agtaaatcga	accaaaatcc	atcttagggf	taattagacc	aatgccaaaa	540
ttgaggggag	taatttggac	ttttttaata	aaactagage	gaaaacacgt	ccacttgtaa	600
aatgtaaaaa	aattctccag	cttgaacaag	teaaggcaga	atcgaagtat	catttacact	660
agttcttatt	taaccagaca	attagtcata	acaggacaga	ccaattccag	atttcttaca	720
gttgactcaa	aatgtaatac	aatatgtatg	tatccgtatg	gaagacagag	ggagacataa	780
tgggacctat	aagtactget	gaatgagtag	tgtactttagc	tggtttggta	gttataaaac	840
cacctttgtc	tgttcattgt	gtgattgggtg	tgetgtgtat	getaggecta	ttcatgctgt	900
gagtggtgga	gataatttcc	cagaataaat	cttgtttgaa	actagtaaac	tgcaaatgcc	960
acaattctag	acctgtgtgc	acttgatcca	gtatatgcat	tatactcttc	ttttgcatgt	1020
tagcatgtat	catagacata	ccaaatattt	aggggggttca	gtcttagttt	tctcagaaat	1080
gataatctcc	tgaatcttgc	tgcagggtat	tcagcatact	ttgggatgtt	tgagaatctt	1140
tttgtctttg	ctaattcttc	ccccacaaaa	tgataactat	cttagcaaca	gatggttget	1200
tttaccattt	tatatatcat	aaactatagc	ctccagaaaa	gttgactaaa	gtaccgattt	1260
actctgctct	gtacagcaac	ctgaaattcc	tgcatttggg	gatttgggaaa	ccacttgaaa	1320
cacactttac	acacaaaagt	tcgaggatgc	acggaagaac	aagaaaacag	gaattcttgc	1380
acaaccaaat	gatccaagga	gggatcttga	acctctctgc	aagtcgctt	tgcacccaac	1440
ggctacaaaa	actaatcttc	aagaccaagg	tccaaggaaac	ccaccacata	gaccaagacc	1500
tgaacttgac	aaccaacgac	actctgaccg	gectactcac	cgtgagtctg	caccaacgaag	1560
acattcaaat	cttcagagag	aacaagggag	taatgtctgg	acaccaagaa	gcccctacag	1620
aacagctget	gggtctgtct	caccaatgca	gccaaacaa	caatcaaaagc	caaagcacag	1680
gtcaactgga	atgcagactc	cagagaggag	ggcatcttca	gaggggcttg	gccagcatac	1740
acctggaagg	agcaggatga	agccgggtgg	ctatgaggta	ataatacctt	actatacttc	1800
attttttcaa	taatatattc	atgaatgtgg	getagaaate	cttttagagt	aattactctt	1860
gettctgcat	tgttaaatcc	agcctgaaga	agtggctgta	ccaccttttg	gcgaatggga	1920
tgatgcaaat	gcagcatcag	gtgaaaagta	cacttggtatc	ttcaacaggg	tgagggatga	1980
taggttgtca	cttaectctt	ctgctaggca	accgtctact	actcgtagt	aagagaataa	2040
gggtgcaacag	gtatgcacaa	gcttgtccag	agtaaagttg	aaaattcagt	ttatatgttc	2100
aattcttcat	tgtatattat	tgcacaccac	atatgcacaa	gcaattatgc	aaaaaagtat	2160
cataatctct	atgatgttga	tgttaactta	atattaagta	ttgtatctga	tagatcatat	2220
ataacaaaaa	tatatattat	ctatttgcct	ttagaactct	ttggcattta	atcttcceta	2280
tgttctccaa	tagaacatat	cttgaatata	ttattgcaat	agcatcagaa	atgtccaagg	2340
ttcatcttct	atttttattt	tctctaacac	geaagtgaat	tacatatcat	tttattatca	2400
agaaagaaaa	gagtagcga	gagggacaaa	gtccccgaaa	cacacccaaa	actcacagcc	2460
acactgcaac	tggaaacaaa	ttgccccttt	caacagcaag	tgatcaacaa	gctaccagta	2520
aaaatttaatt	gtctggtaat	caactgtgac	atccagctat	ccgaccttga	atcttggctt	2580
gattactaaa	caataaatgt	ttctctatata	gttcattctc	tatgttctct	aaatatttta	2640
ttttgtgacc	ttaagtttat	ttaaagtata	aatagcaata	tttgtatgcc	atacagctgg	2700
tggattggta	gcgtagagaa	caggttatit	ttatggaaac	cacacacaa	tatatgtatt	2760
ctgcaagtaa	aaaatattgg	caagtggcat	cttcttttta	aaaaaaaaact	gccaaactta	2820
ttgtcaaat	cttaccatgat	agatatgtat	taaagatatg	ttacataaat	acatacagctg	2880

[0034]

```

catgatttgc taattaagta attatcttca ttgtttgtt ttgattcage tagcaactcaa 2940
atactgagac atattccttg ttgctctatc aacagtagta aactagtaat cgtggcattg 3000
ttttggtata gaattgttaa ctgttgtaa gatgagttat ttgccttga atttatccag 3060
ataaataaac atggaaattt taaaaacaca aatatgttct ttatttaaag ttccctaaaa 3120
ctctgcatgt catacaggga tatcttatcg actgatecct gtctctttta tctacagaaa 3180
tgttcttget geatactttg a 3201

```

<210> 71

<211> 699

<212> DNA

<213> 玉米 (Zea mays)

<400> 71

```

atggcgcaac ctgaaattec tgcatttggg gattgggaaa ccactggaaa cacactttac 60
acacaaaagt tcgaggatgc acggaagaac aagaaaacag gaattcttgc acaaccaaatt 120
gatecaagga gggatctgga acctctctgc aagtcgctt tgcacccaac ggtctacaaa 180
actaatcttc aagaccaagg tccaaggaa ccaaccacatc gaccaagacc tgaacttgac 240
aaccaacgac actctgaccg gctactcac cgtgagtctg caccacgaag acattcaaat 300
cttcagagag aacaagggag taatgctggg acaccaagaa gccctacag aacagctgct 360
gggtctgctt caccaatgca gccaaacaac caatcaaaag caaagcacag gtcaactgga 420
atgcagacte cagagaggag ggcacttca gaggggcttg gccagcatac acctggaagg 480
agcaggatga agcgggtgg ctatgagcct gaagaagtgg ctgtaccacc ctttggcgaa 540
tgggatgatg caaatgcagc atcaggtgaa aagtacactg gtatcttcaa cagggtgagg 600
gatgataggt tgtcaacctac ctctcttctg aggeaacctg ctactactcg tagtgaagag 660
aataaggtgc aacagaaatg ttcttctctg atactttga 699

```

<210> 72

<211> 232

<212> PRT

<213> 玉米 (Zea mays)

<400> 72

```

Met Ala Gln Pro Glu Ile Pro Ala Phe Gly Asp Trp Glu Thr Thr Gly
1           5           10          15
Asn Thr Leu Tyr Thr Gln Lys Phe Glu Asp Ala Arg Lys Asn Lys Lys
20          25          30
Thr Gly Ile Leu Ala Gln Pro Asn Asp Pro Arg Arg Asp Leu Glu Pro
35          40          45
Pro Arg Lys Ser Pro Leu His Pro Thr Val Tyr Lys Thr Asn Pro Gln
50          55          60
Asp Gln Gly Pro Arg Asn Pro Pro His Arg Pro Arg Pro Glu Leu Asp
65          70          75          80
Asn Gln Arg His Ser Asp Arg Pro Thr His Arg Glu Ser Ala Pro Arg
85          90          95

```

[0035]

Arg His Ser Asn Leu Gln Arg Glu Gln Gly Ser Asn Ala Gly Thr Pro
 100 105 110
 Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Ala Ala Gly Ser Ala Ser Pro Met Gln Pro
 115 120 125
 Asn Asn Gln Ser Lys Pro Lys His Arg Ser Thr Gly Met Gln Thr Pro
 130 135 140
 Glu Arg Arg Ala Ser Ser Glu Gly Leu Gly Gln His Thr Pro Gly Arg
 145 150 155 160
 Ser Arg Met Lys Pro Gly Gly Tyr Glu Pro Glu Glu Val Ala Val Pro
 165 170 175
 Pro Phe Gly Glu Trp Asp Asp Ala Asn Ala Ala Ser Gly Glu Lys Tyr
 180 185 190
 Thr Gly Ile Phe Asn Arg Val Arg Asp Asp Arg Leu Ser Pro Thr Ser
 195 200 205
 Ser Ala Arg Gln Pro Ser Thr Thr Arg Ser Glu Glu Asn Lys Val Gln
 210 215 220
 Gln Lys Cys Ser Cys Cys Ile Leu
 225 230

<210> 73

<211> 332

<212> PRT

<213> 玉米 (Zea mays)

<400> 73

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

[0036]

145	150	155	160
Ser Ser Gly Asn Gly Lys Thr Ser Ser Val Ile Val His Ala Asp Leu			
	165	170	175
Ile Gly Glu Lys Ile Glu Glu Asp Gly Asn Arg Leu Val Glu Val Leu			
	180	185	190
Ile Ala Asp Asp Leu Arg Glu Asn Val Leu Ala Val Gly Ile Thr Gly			
	195	200	205
Ala Gly Gly Ile Gly Lys Thr Thr Leu Ala Lys Arg Val Phe Ala Asp			
	210	215	220
Gln Arg Val Arg Asp Glu Phe Asp Leu Arg Val Trp Val Cys Val Ser			
225	230	235	240
Glu Asp Val Asn Glu Ala Asp Leu Leu Trp Ser Val Leu Val Gly Ala			
	245	250	255
Gly Gly Gly His Gln Leu Gln Gln Gln His Asp Ala Thr Pro Asp Arg			
	260	265	270
Ser Ser Leu Trp Ser Pro Arg Ser Ser Gly Pro Ser Arg Glu Arg Arg			
	275	280	285
Ser Cys Trp Cys Trp Thr Thr Cys Gly Ala Thr Trp Pro Gly Arg Arg			
	290	295	300
Cys Ser Arg Thr Arg Ser Gly Pro Ala Leu Val Ala Ala Ala Gly Cys			
305	310	315	320
Ser Ser Arg Arg Gly Lys Ser Arg Leu Pro Gly Arg			
	325	330	

<210> 74

<211> 232

<212> PRT

<213> 玉米 (Zea mays)

<400> 74

Met Ala Gln Pro Glu Ile Pro Ala Phe Glu Asp Trp Glu Thr Thr Gly			
1	5	10	15
Asn Thr Pro Tyr Thr Gln Lys Phe Glu Asp Val Arg Lys Asn Lys Lys			
	20	25	30
Thr Gly Ile Pro Ala Gln Thr Asn Asp Pro Arg Arg Asn Pro Glu His			
	35	40	45
Pro Arg Lys Ser Pro Leu His Pro Thr Ala Tyr Lys Thr Asp Pro Gln			
	50	55	60
Asp Gln Gly Pro Arg Asn Pro Pro His Arg Pro Arg Pro Glu Thr Asp			
65	70	75	80
Gln Gln Arg His Ser Asp Arg Pro Thr His Arg Glu Pro Ala Pro Arg			
	85	90	95
Arg His Ala Asn Pro His Arg Glu Gln Gly Ser Asn Ala Val Ala Pro			
	100	105	110

[0037]

Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Ala Ala Gly Ser Ala Ser Pro Met Gln Ser
 115 120 125
 Asn Asn Gln Ser Lys Pro Asn His Arg Ser Thr Ala Thr Gln Ala Pro
 130 135 140
 Glu Arg Arg His Ser Ser Glu Gly His Ser Gln His Thr Pro Gly Arg
 145 150 155 160
 Ser Arg Met Lys Pro Gly Ser Tyr Glu Pro Glu Glu Val Ala Val Pro
 165 170 175
 Pro Phe Gly Glu Trp Asp Asp Ala Asn Ala Ala Ser Gly Glu Lys Tyr
 180 185 190
 Thr Gly Ile Phe Asn Arg Val Arg Asp Asp Arg Leu Ser Pro Thr Ser
 195 200 205
 Ser Ala Arg Gln Pro Ser Thr Ala Arg Arg Glu Glu Asn Lys Val Gln
 210 215 220
 Gln Lys Cys Ser Cys Cys Ile Leu
 225 230

<210> 75
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> 水稻 (Oryza sativa)

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

[0038]

	165	170	175
Asn Ala Ala Ser Gly Glu Lys Phe Thr Gly Ile Phe Asn Arg Val Arg			
	180	185	190
Asp Asp Lys Leu Ser Pro Asn Thr Ser Thr Arg Gln Pro Asp Thr Asn			
	195	200	205
Arg Ser Gln Glu Asn Lys Val Lys Gln Thr Cys Pro Cys Cys Ile Leu			
210	215	220	

<210> 76
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> 水稻 (Oryza sativa)

<400> 76

Met Ala Gln Pro Asp Ile Pro Ala Phe Gly Asn Trp Asp Thr Thr Gly			
1	5	10	15
Asn Thr Pro Tyr Lys Gln Lys Phe Glu Asn Ala Arg Lys Asn Lys Lys			
	20	25	30
Ala Gly Ile Ser Ser His Pro Asn Asp Pro Arg Arg His Pro Glu Pro			
	35	40	45
Pro Thr Lys Ser Pro Leu His Pro Ala Tyr Thr Pro Asp Ala Gln Gly			
	50	55	60
Gln Ser Pro Met Asn Pro Gln His Gly Arg Arg Gln Glu Ala Asp Pro			
65	70	75	80
His Arg Arg His Ser Leu Ser Gln Gln Arg Glu Val Gly Gly Gly Thr			
	85	90	95
Gly Ser Ala Pro Arg Ser Pro Tyr Arg Met Val His Gly Ser Ala Ser			
	100	105	110
Pro Ala Gln Pro Asn Asn Pro Ser Lys Pro Lys His Lys Ser Ser Gly			
	115	120	125
Met Gln Thr Pro Glu Arg Arg Ala Ser Ser Glu Gly His Gly Glu His			
	130	135	140
Thr Pro Arg Arg Ser Arg Gly Lys Gln Gly Gly Arg Gly Tyr Asp Ala			
145	150	155	160
Pro Glu Asp Asp Val Ala Val Pro Pro Phe Gly Glu Trp Asp Glu Gly			
	165	170	175
Asn Ala Ala Ser Gly Glu Lys Phe Thr Gly Ile Phe Asn Arg Val Arg			
	180	185	190
Asp Asp Lys Leu Ser Pro Asn Thr Ser Thr Arg Gln Pro Asp Thr Asn			
	195	200	205
Arg Ser Gln Glu Asn Lys Val Lys Gln Ala Ala Ala			
210	215	220	

<210> 77

[0039]

<211> 211
 <212> PRT
 <213> 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)

<400> 77

```
Met Ala Arg Ser Asn Val Pro Lys Phe Gly Asn Trp Glu Ala Glu Glu
1           5           10           15
Asn Val Pro Tyr Thr Ala Tyr Phe Asp Lys Ala Arg Lys Thr Arg Ala
           20           25           30
Pro Gly Ser Lys Ile Met Asn Pro Asn Asp Pro Glu Tyr Asn Ser Asp
           35           40           45
Ser Gln Ser Gln Ala Pro Pro His Pro Pro Ser Ser Arg Thr Lys Pro
           50           55           60
Glu Glu Val Asp Thr Val Arg Arg Ser Arg Glu His Met Arg Ser Arg
65           70           75           80
Glu Glu Ser Glu Leu Lys Gln Phe Gly Asp Ala Gly Gly Ser Ser Asn
           85           90           95
Glu Ala Ala Asn Lys Arg Gln Gly Arg Ala Ser Gln Asn Asn Ser Tyr
           100          105          110
Asp Asn Lys Ser Pro Leu His Lys Asn Ser Tyr Asp Gly Thr Gly Lys
           115          120          125
Ser Arg Pro Lys Pro Thr Asn Leu Arg Ala Asp Glu Ser Pro Glu Lys
           130          135          140
Val Thr Val Val Pro Lys Phe Gly Asp Trp Asp Glu Asn Asn Pro Ser
145          150          155          160
Ser Ala Asp Gly Tyr Thr His Ile Phe Asn Lys Val Arg Glu Glu Arg
           165          170          175
Ser Ser Gly Ala Asn Val Ser Gly Ser Ser Arg Thr Pro Thr His Gln
           180          185          190
Ser Ser Arg Asn Pro Asn Asn Thr Ser Ser Cys Cys Cys Phe Gly Phe
           195          200          205
Gly Gly Lys
           210
```

<210> 78
 <211> 256
 <212> PRT
 <213> 马铃薯 (*Solanum tuberosum*)

<400> 78

```
Met Ala Arg Pro Asn Val Pro Lys Phe Gly Asn Trp Glu Asn Asp Asp
1           5           10           15
Asn Thr Pro Tyr Thr Val Tyr Phe Glu Lys Ala Arg Gln Thr Arg Gly
           20           25           30
```

[0040]

Thr Gly Lys Ile Met Asn Pro Asn Asp Pro Glu Glu Asn Pro Asp Met		
35	40	45
Phe Pro Asn Leu Ala Pro Pro Pro Glu Val Ala Pro Gln Ser Lys Pro		
50	55	60
Lys Lys Gln Thr Glu Glu Pro Pro Ile Gly Arg Gly Gly Pro Ala Arg		
65	70	75
Gln Thr Arg Glu His Arg Leu Ser Lys Glu Asp Gly Glu Phe Arg Gln		
85	90	95
Tyr Ala Asn Ser Pro Ala Arg Asn Glu Asn Met Gly Arg Lys Gly Ala		
100	105	110
Asn Glu Pro Ser His Gln Arg Gly Arg Gly Ser Asn Ser Gly Arg Thr		
115	120	125
Gly Arg Gln Ser Ile Gly Ser Glu His Ser Phe Asp Lys Ser Pro Leu		
130	135	140
His Pro His Tyr Gln Ala Lys Val Asn Asn Ala Gly Arg Gly Val Ala		
145	150	155
Ser Pro Ala Trp Glu Gly Lys Asn Asn Asn Ser Tyr Asp Ser Ser His		
165	170	175
Gly Thr Pro Gly Arg Ser Lys Val Lys Gln Glu Asn Gln Ser Asp Arg		
180	185	190
Gly Ala Ala Val Pro Arg Phe Gly Glu Trp Asp Glu Asn Asp Pro Gln		
195	200	205
Ser Ala Asp Asn Tyr Thr His Ile Phe Asn Lys Val Arg Glu Glu Lys		
210	215	220
Gln Gly Asn Pro Ser Gly Thr Pro Ser Arg Ala Ser Asn Asn Thr Gln		
225	230	235
Lys His Asn Ser Glu Glu Lys Gln Met Lys Trp Cys Cys Cys Pro Trp		
245	250	255

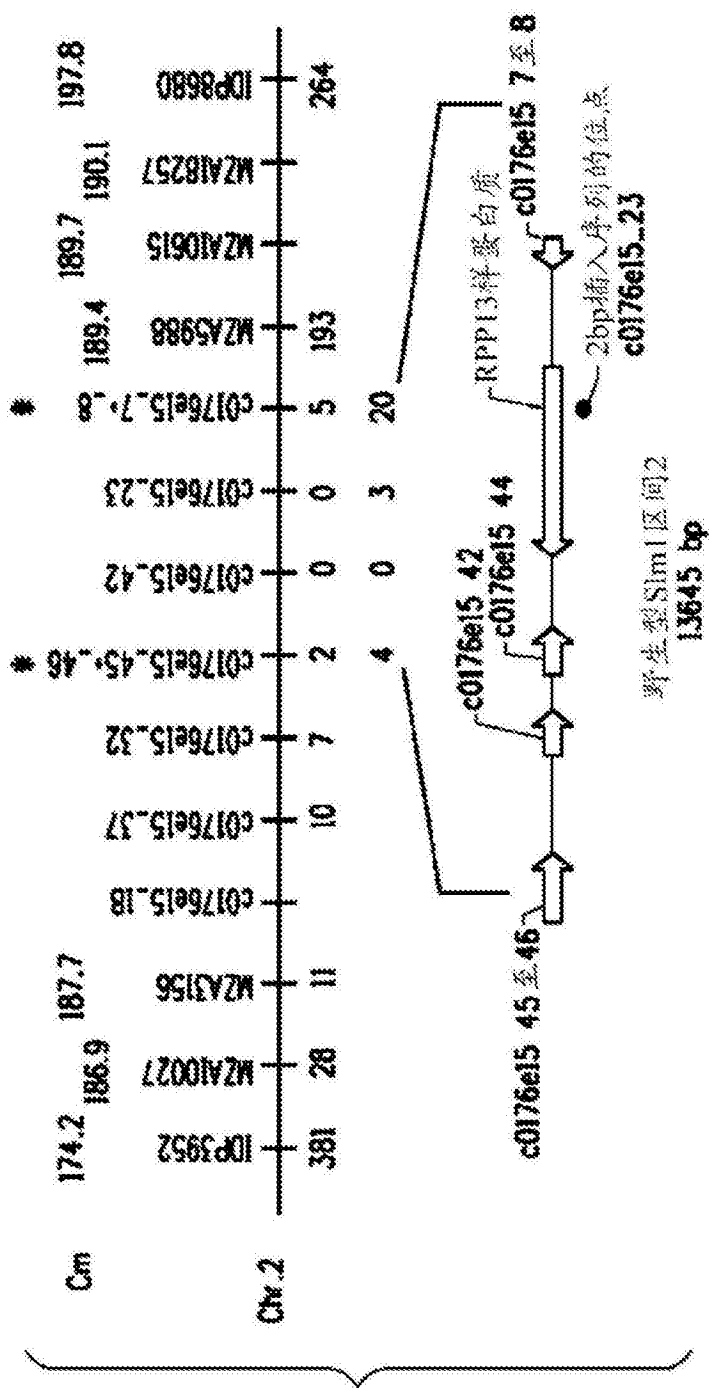


图 1A

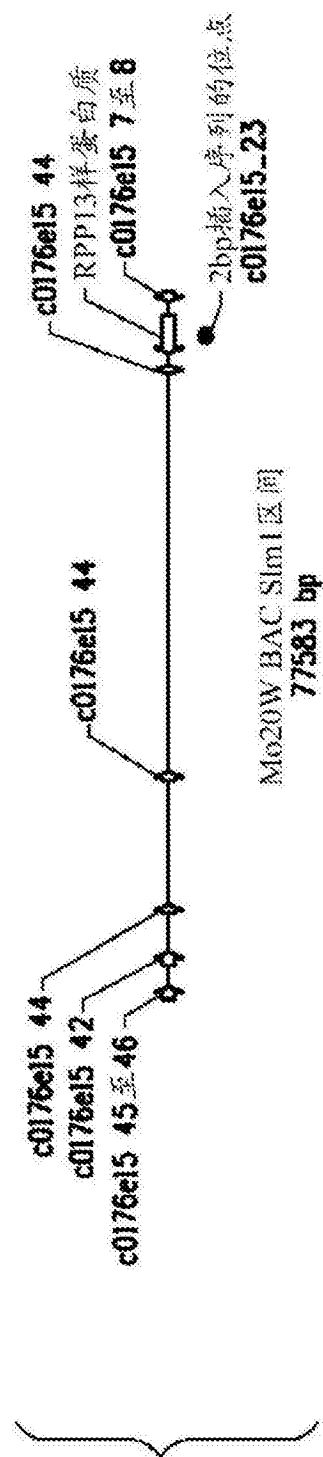


图 1B

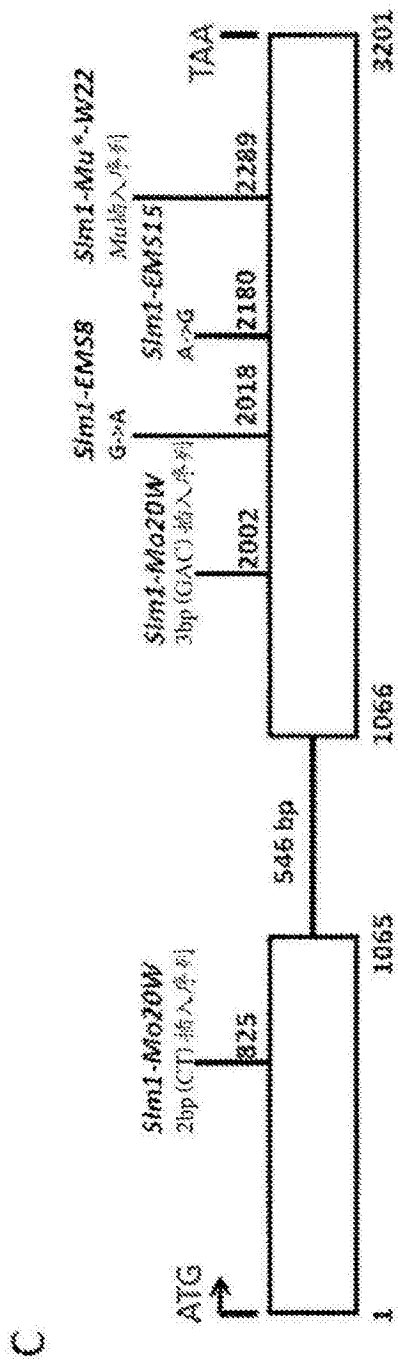


图 1C

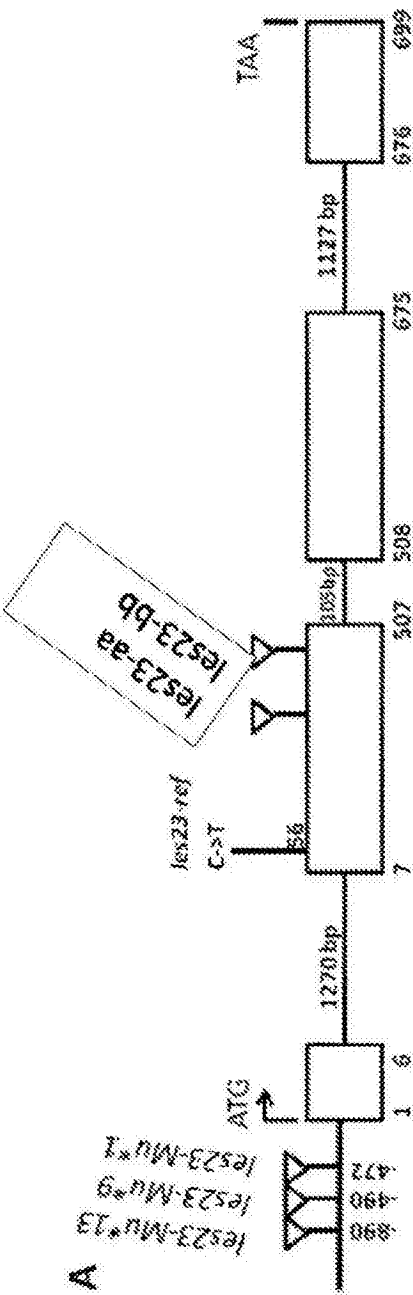


图 2

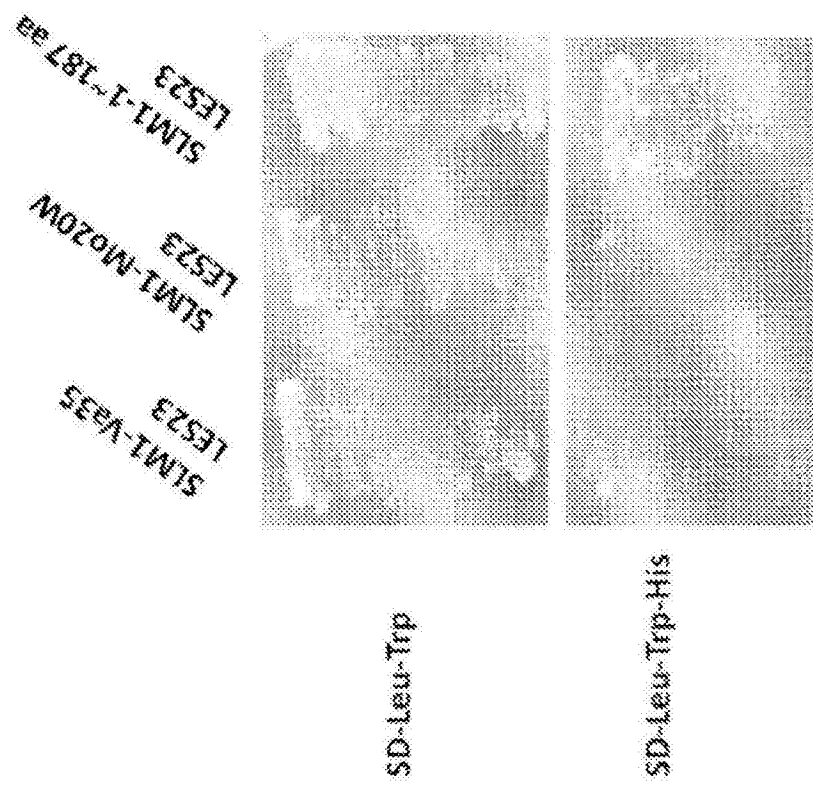


图 3

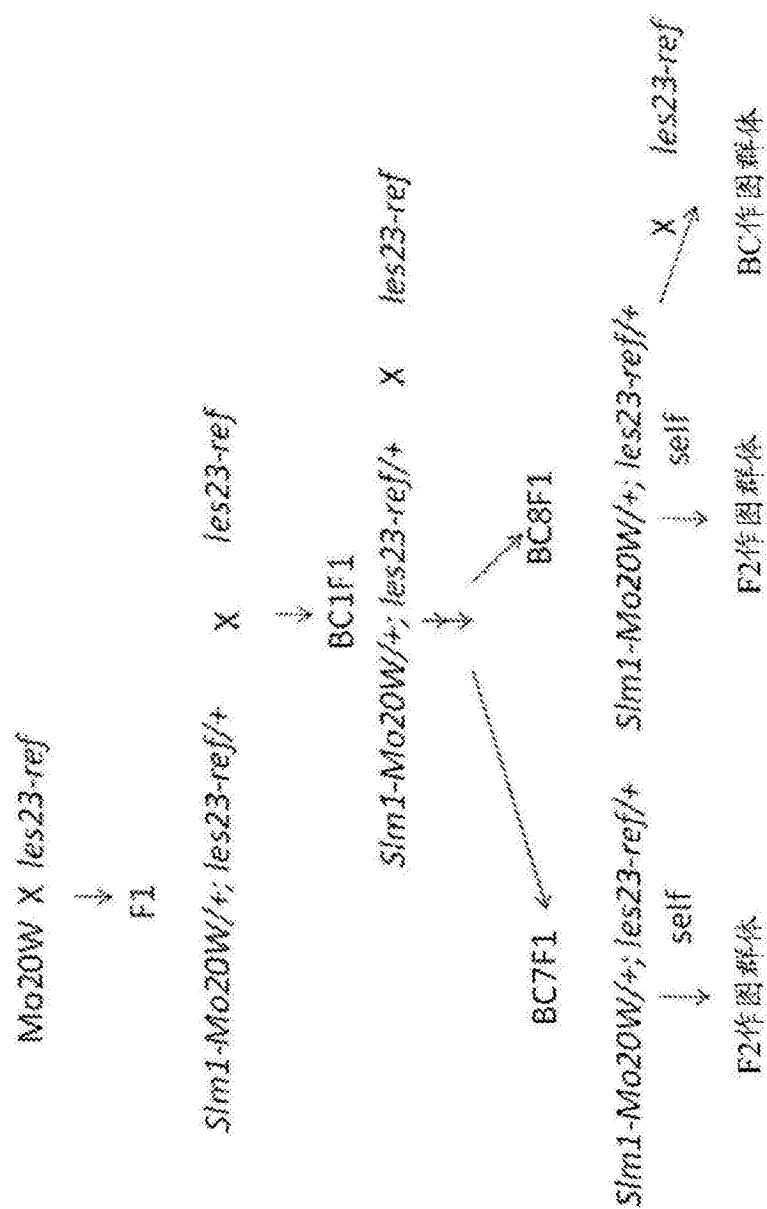


图 4

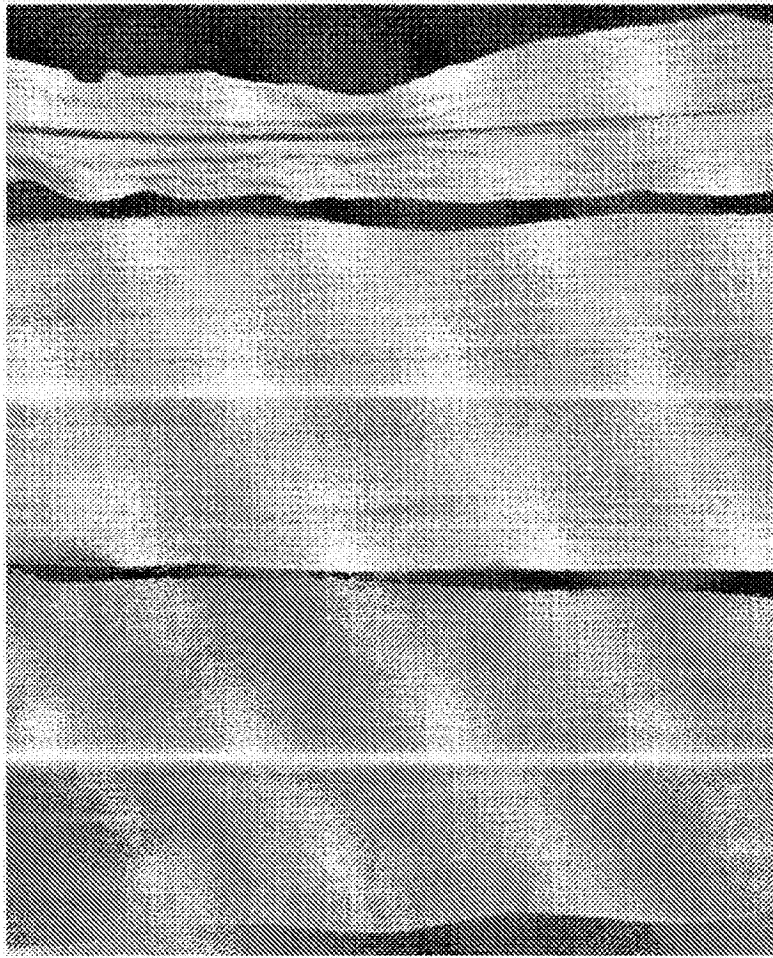


图 5

[illegible]

图 6A

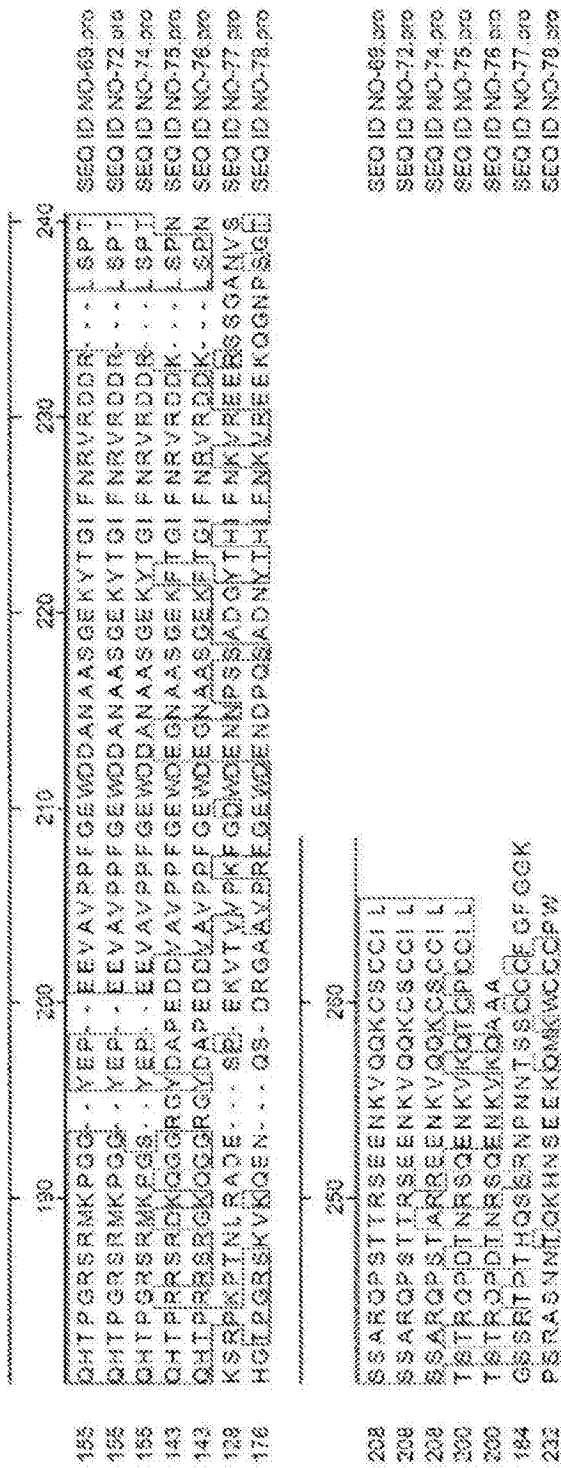


图 6B

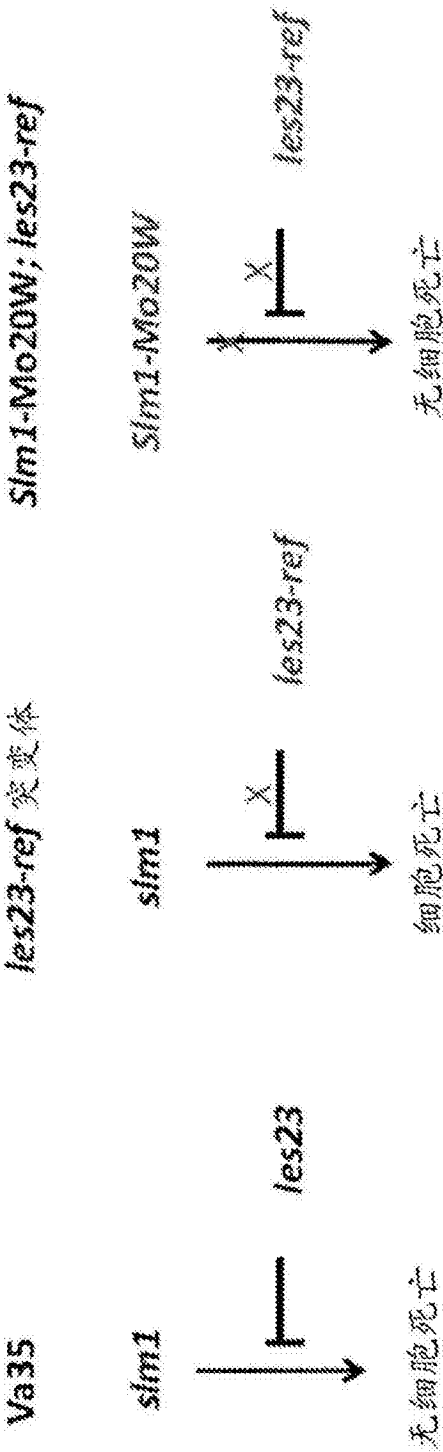


图 7