



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102174541 A

(43) 申请公布日 2011. 09. 07

(21) 申请号 201110002021. 3

C12N 15/11 (2006. 01)

(22) 申请日 2001. 06. 18

C12N 15/63 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 1/15 (2006. 01)

00870132. 8 2000. 06. 16 EP

C12N 1/19 (2006. 01)

01870053. 4 2001. 03. 16 EP

C12N 1/21 (2006. 01)

60/258, 415 2000. 12. 27 US

C12N 5/10 (2006. 01)

C12N 9/02 (2006. 01)

(62) 分案原申请数据

C07K 16/40 (2006. 01)

01813216. 2 2001. 06. 18

C12Q 1/26 (2006. 01)

(71) 申请人 托马斯·施穆林

C12Q 1/68 (2006. 01)

地址 德国柏林

A01H 4/00 (2006. 01)

申请人 托马斯·维尔纳

A01H 5/00 (2006. 01)

A01N 61/00 (2006. 01)

(72) 发明人 托马斯·施穆林 托马斯·维尔纳

A01P 13/00 (2006. 01)

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

A01P 21/00 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

权利要求书 5 页 说明书 67 页

C12N 15/53 (2006. 01)

序列表 30 页 附图 11 页

(54) 发明名称

改变植物形态学、生物化学和生理学的方法

(57) 摘要

本发明涉及刺激根生长和 / 或增强侧根或不定根形成和 / 或改变根的向地性的方法, 其包在植物或植物部分中含表达植物细胞分裂素氧化酶或者表达可降低活性细胞分裂素水平的另一种蛋白质。本发明也涉及新的植物细胞分裂素氧化酶蛋白质、编码细胞分裂素氧化酶蛋白质的核酸序列、以及包含该序列的载体、宿主细胞、转基因细胞和植物。本发明还涉及所述序列在改善与根有关的特性 (包括提高产量和 / 或增强早期活力和 / 或改变根 / 枝条比率和 / 或提高抗倒伏和 / 或增强耐旱和 / 或促进外植体的体外繁殖和 / 或改变细胞命运和 / 或植物发育和 / 或植物形态学和 / 或植物生物化学和 / 或植物生理学) 上的用途。本发明还涉及所述序列在上述方法中的用途。本发明还涉及鉴定和获得与细胞分裂素氧化酶蛋白质相互作用的蛋白质和化合物的方法。本发明还涉及所述化合物作为植物生长调节剂或除草剂的用途。

1. 编码植物细胞分裂素氧化酶或者编码可降低活性细胞分裂素水平的蛋白质的核酸的用途,用于植物或植物部分中刺激根的生长或增强侧根或不定根形成或改变根的向地性。

2. 刺激根生长或增强侧根和不定根形成或改变根的向地性的方法,其包含表达编码植物细胞分裂素氧化酶的核酸,选自:

(a) 包含由任何 SEQ ID NO 27、1、3、5、7、9、11、25、26、28 至 31、33 或 34,或其互补序列所示的 DNA 序列的核酸,

(b) 包含相应于任何 SEQ ID NO 27、1、3、5、7、9、11、25、26、28 至 31、33 或 34,或其互补序列的 RNA 序列的核酸,

(c) 与任何 SEQ ID NO 27、1、3、5、7、9、11、25、26、28 至 31、33 或 34,或其互补序列特异性杂交的核酸,

(d) 编码包含任何 SEQ ID NO 2、4、6、8、10、12、32 或 35,或其互补序列所示的氨基酸序列的蛋白质的核酸,

(e) 任何 (a)-(d) 定义的核酸,其特征在于所述核酸是 DNA、基因组 DNA、cDNA、合成 DNA 或其中 T 替换为 U 的 RNA,

(f) 通过遗传密码可简并为任何 SEQ ID NO 27、1、3、5、7、9、11、25、26、28-31、33 或 34 中所示的核酸的核酸或者简并为任何 (a)-(e) 中定义的核酸的核酸,

(g) 由于生物之间密码子使用的差异不同于编码任何 SEQ ID NO 2、4、6、8、10、12、32 或 35 中所示的蛋白质的核酸的核酸,或者不同于任何 (a)-(e) 中定义的核酸的核酸,

(h) 编码 SEQ ID NO 2、4、6、8、10、12 或 35 中所示的蛋白质的核酸,或者 (a)-(e) 中定义的核酸,其由于等位基因之间的差异而不同,

(i) 编码任何 SEQ ID NO 2、4、6、8、10、12 或 35 中所示的蛋白质的核酸,

(j) 任何 (a)-(i) 中定义的核酸的、具有细胞分裂素氧化酶生物活性的功能性片段,以及

(k) 编码植物细胞分裂素氧化酶的核酸,

或者包含在植物或植物部分中、优选在根中表达编码可降低活性细胞分裂素水平的蛋白质的核酸。

3. 编码具有细胞分裂素氧化酶活性的新植物蛋白质的分离的核酸,选自:

(a) 包含任何 SEQ ID NO 29、3、5、9、26、27、31、33 或 34,或其互补序列所示的 DNA 序列的核酸,

(b) 包含相应于任何 SEQ ID NO 29、3、5、9、26、27、31、33 或 34,或其互补序列的 RNA 序列的核酸,

(c) 与任何 SEQ ID NO 29、3、5、9、26、27、31、33 或 34,或其互补序列所示的核酸特异性杂交的核酸,

(d) 编码具有包含 SEQ ID NO 32 所示的多肽的氨基酸序列、并且与 SEQ ID NO 4 所示的氨基酸序列至少 70%相似性的蛋白质的核酸,

(e) 编码具有与 SEQ ID NO 6 所示的氨基酸序列至少 47%相似性的氨基酸序列的蛋白质的核酸,

(f) 编号具有与 SEQ ID NO 10 或 35 所示的氨基酸序列至少 47%相似性的氨基酸序列

的蛋白质的核酸，

(g) 编码包含任何 SEQ ID NO 4、6、10、32 或 35 中所示的氨基酸序列的蛋白质的核酸，

(h) 通过遗传密码可简并为任何 SEQ ID NO 29、3、5、9、26、27、33 或 34 中所示核酸的核酸或者简并为任何 (a)–(g) 中定义的核酸的核酸，

(i) 由于生物之间密码子使用的差异而不同于编码任何 SEQ ID NO 4、6、10 或 35 中所示蛋白质的核酸的核酸，或者不同于任何 (a)–(g) 中定义的核酸的核酸，

(j) 编码 SEQ ID NO 4、6、10 或 35 中所示蛋白质的核酸，或者 (a)–(g) 中定义的核酸，其由于等位基因之间的差异而不同，

(k) 编码任何 SEQ ID NO 29、3、5、9、26、27、31、33 或 34 中所示核酸编码的细胞分裂素氧化酶的免疫活性片段的核酸，或者编码任何 (a)–(j) 中定义的核酸的免疫活性片段的核酸，

(l) 编码任何 SEQ ID NO 29、3、5、9、26、27、31、33 或 34 中所示核酸编码的细胞分裂素氧化酶的功能性片段的核酸，或者编码任何 (a)–(j) 中定义的核酸的功能性片段的核酸，其中所述片段具有细胞分裂素氧化酶的生物活性，以及

(m) 编码 SEQ ID NO 4、6、10 或 35 中定义的蛋白质的核酸，

只要所述核酸不是按下列 Genbank 登录号保存的核酸：AC005917、AB024035 和 AC023754。

4. 权利要求 3 的分离的核酸，它们是 DNA、cDNA、基因组 DNA 或合成的 DNA、或其中 T 替换为 U 的 RNA。

5. 至少 15 个核苷酸长度的核酸分子，其与权利要求 3 或 4 的核酸特异性杂交。

6. 至少 15 个核苷酸长度的核酸分子，其特异性扩增权利要求 3 或 4 的核酸。

7. 包含权利要求 3 或 4 的核酸的载体。

8. 权利要求 7 的载体，其为表达载体，其中该核酸与使所述核酸在原核和 / 或真核宿主细胞中表达的一个或多个控制序列有效连接。

9. 包含根据权利要求 3 或 4 的核酸或者权利要求 7 或 8 的载体的宿主细胞。

10. 权利要求 9 的宿主细胞，其中该宿主细胞是细菌、昆虫、真菌、植物或动物细胞。

11. 权利要求 3 或 4 的核酸编码的分离的多肽，或其同系物或衍生物或其免疫活性或功能性片段。

12. 权利要求 11 的多肽，其具有任何 SEQ ID NO 2、4、6、8、10、12、32 和 35、或其同系物或衍生物、或其免疫活性和 / 或功能性片段所示氨基酸序列。

13. 产生权利要求 11 或 12 的多肽的方法，其包含在使该多肽表达的条件下培养权利要求 9 或 10 的宿主细胞，并从培养物中回收生成的多肽。

14. 特异性识别权利要求 11 或 12 的多肽或其特异性表位的抗体。

15. 产生转基因植物、植物细胞或植物组织的方法，其包含在所述植物、植物细胞或植物组织中引入可表达形式的权利要求 3 或 4 的核酸或者权利要求 7 或 8 的载体。

16. 产生改变的植物、植物细胞或植物组织的方法，其包含将权利要求 11 或 12 的多肽直接引入所述植物的细胞、组织或器官中。

17. 实现权利要求 11 或 12 的多肽表达的方法，其包含在植物细胞的基因组中稳定引入与一个或多个控制序列有效连接的权利要求 3 或 4 的核酸或者权利要求 7 或 8 的载体。

18. 权利要求 16 或 17 的方法,其另外包含由所述植物细胞再生为植物。

19. 包含权利要求 3 或 4 的核酸的转基因植物细胞,该核酸与允许其在植物细胞中转录和 / 或表达的调控元件有效联接,或者利用权利要求 16 或 17 的方法获得的转基因植物细胞。

20. 权利要求 18 的转基因植物细胞,其中权利要求 3 或 4 所述核酸稳定整合到所述植物的基因组中。

21. 包含权利要求 19 或 20 的植物细胞的转基因植物或植物组织。

22. 权利要求 21 的植物的可收获部分。

23. 权利要求 22 的植物的可收获部分,其选自种子、叶子、果实、茎培养物、根茎、根、块茎和鳞茎。

24. 来源于权利要求 21-23 中任一项的任何植物或植物部分的后代。

25. 刺激根生长的方法,其包含在植物或植物部分中表达权利要求 3 或 4 的核酸或权利要求 2 中定义的核酸或者包含表达可降低活性细胞分裂素水平的另一蛋白质。

26. 增强侧根或不定根形成的方法,其包含在植物或植物部分中表达权利要求 3 或 4 的核酸或权利要求 2 中定义的核酸或者包含表达可降低活性细胞分裂素水平的另一蛋白质。

27. 改变根的向地性的方法,其包含在植物或植物部分中表达权利要求 3 或 4 的核酸或权利要求 2 中定义的核酸或者包含表达可降低活性细胞分裂素水平的另一蛋白质。

28. 权利要求 25-27 中任一项的方法,所述方法导致产量增加。

29. 权利要求 25-28 中任一项的方法,其中所述核酸的表达处于强的组成型启动子控制之下。

30. 权利要求 25-28 中任一项的方法,其中所述核酸的表达处于优选在根中表达的启动子控制之下。

31. 鉴定并获得与权利要求 11 或 12 的多肽相互作用的蛋白质的方法,其包含利用权利要求 11 或 12 的多肽的筛选试验。

32. 权利要求 31 的方法,其包含双杂交筛选试验,其中利用权利要求 11 或 12 的多肽为诱饵、cDNA 文库为捕获物。

33. 调节权利要求 11 或 12 的多肽与通过权利要求 31 或 32 的方法获得的相互作用蛋白质之间相互作用的方法。

34. 鉴定并获得与权利要求 11 或 12 的多肽相互作用的化合物的方法,其包含步骤:

a) 提供双杂交系统,其中表达权利要求 11 或 12 的多肽以及通过权利要求 31 或 32 方法获得的相互作用蛋白质配偶体,

b) 所述化合物与 (a) 中定义的表达的多肽形成的复合物相互作用,以及,

c) 对所述化合物与所述多肽或 (a) 中定义的表达多肽形成的复合物的相互作用进行测量。

35. 鉴定与权利要求 11 或 12 的多肽特异性结合的化合物或化合物的混合物的方法,包含:

a) 在适于使复合物形成的条件下将权利要求 11 或 12 的多肽与所述化合物或化合物的混合物结合,以及,

b) 检测复合物形成,其中复合物的存在可识别特异性结合所述多肽的化合物或混合

物。

36. 权利要求 31-35 中任一项的方法,其中所述化合物或混合物抑制权利要求 11 或 12 所述多肽的活性,并能用于合理设计化学剂。

37. 通过权利要求 31-35 中任一项的方法鉴定的化合物或混合物用作植物生长调节剂或除草剂的用途。

38. 生产植物生长调节剂或除草剂组合物的方法,其包含权利要求 31-35 中任一项方法的步骤,以及将所述步骤获得的化合物配制成适当形式以应用到农业或植物细胞或组织培养中。

39. 设计或筛选促生长化学剂或除草剂的方法,其包含利用权利要求 3 或 4 的核酸或权利要求 2 中定义的核酸或权利要求 7 或 8 的载体。

40. 权利要求 3 或 4 的核酸分子或权利要求 2 中定义的核酸、权利要求 7 或 8 的载体、权利要求 11 或 12 的多肽用于提高产量的用途。

41. 权利要求 3 或 4 的核酸分子或权利要求 2 中定义的核酸、权利要求 7 或 8 的载体、权利要求 11 或 12 的多肽用于刺激根生长的用途。

42. 权利要求 3 或 4 的核酸分子或权利要求 2 中定义的核酸、权利要求 7 或 8 的载体、权利要求 11 或 12 的多肽用于增强侧根和不定根形成的用途。

43. 权利要求 3 或 4 的核酸分子或权利要求 2 中定义的核酸、权利要求 7 或 8 的载体、权利要求 11 或 12 的多肽用于改变根的向地性的用途。

44. 诊断组合物,其至少包含权利要求 3-6 中任一项的核酸分子、权利要求 7 或 8 的载体、权利要求 11 或 12 的多肽或权利要求 14 的抗体。

45. 增加根分生组织大小的方法,其包含在植物或植物部分、优选根中表达权利要求 3 或 4 的核酸或权利要求 2 中定义的核酸,或者包含表达编码可降低活性细胞分裂素水平的蛋白质的核酸。

46. 增加根大小的方法,其包含在植物或植物部分、优选根中表达权利要求 3 或 4 的核酸或权利要求 2 中定义的核酸,或者包含表达编码可降低活性细胞分裂素水平的蛋白质的另一个核酸。

47. 增加枝条分生组织大小的方法,其包含优选在枝条中下调权利要求 3 或 4 的核酸、或者权利要求 2 中定义的核酸的表达。

48. 延迟叶子老化的方法,其包含在叶子中、优选在开始老化的叶子中下调权利要求 3 或 4 的核酸或者权利要求 2 中定义的核酸的表达。

49. 改变叶子老化的方法,其包含在开始老化叶子中表达权利要求 3 或 4 的核酸或者权利要求 2 中定义的核酸。

50. 提高叶子厚度的方法,其包含在植物或植物部分中表达权利要求 3 或 4 的核酸或权利要求 2 中定义的核酸,或者包含表达编码可降低活性细胞分裂素水平的蛋白质的核酸。

51. 减少导管大小的方法,其包含在植物或植物部分中表达权利要求 3 或 4 的核酸或权利要求 2 中定义的核酸,或者包含表达编码可降低活性细胞分裂素水平的蛋白质的核酸。

52. 增加导管大小的方法,其包含在植物或植物部分中下调权利要求 3 或 4 的核酸或者权利要求 2 中定义的核酸的表达。

53. 诱导单性结实的方法,其包含在植物或植物部分、优选胎座、胚珠及其衍生组织中

表达权利要求 3 或 4 的核酸或权利要求 2 中定义的核酸,或者包含表达编码可降低活性细胞分裂素水平的蛋白质的核酸。

54. 提高幼苗直立性的方法,其包含在幼苗、优选幼苗的根中表达权利要求 3 或 4 的核酸、或权利要求 2 中定义的核酸,或者包含表达编码可降低活性细胞分裂素水平的蛋白质的核酸。

55. 增加分枝的方法,其包含在植物或植物部分中表达权利要求 3 或 4 的核酸或者权利要求 2 中定义的核酸。

56. 提高抗倒伏性的方法,其包含在植物或植物部分、优选茎或腋芽中表达权利要求 3 或 4 的核酸或者权利要求 2 中定义的核酸。

57. 在与接穗嫁接过程中的转基因根状茎的用途,用于提高由于在所述根状茎中表达植物细胞分裂素氧化酶而致根生长增强的所得植物或树的根相关性特征。

58. 权利要求 57 的用途,其中所述植物细胞分裂素氧化酶由权利要求 3 或 4 的核酸或者权利要求 2 中定义的核酸编码。

59. 转基因植物,其包含表达权利要求 57 或 58 的植物细胞分裂素氧化酶的转基因根状茎,并另外包含接穗。

60. 权利要求 59 的植物的可收获部分。

61. 刺激根生长和发育的方法,其包含在转基因植物细胞或组织培养中表达编码植物细胞分裂素氧化酶的核酸。

62. 权利要求 61 的方法,其中所述核酸是至少权利要求 3 的或权利要求 2 中定义的核酸之一。

改变植物形态学、生物化学和生理学的方法

[0001] 本申请是申请日为 2001 年 6 月 18 日、申请号为 200610082474.0、发明名称为“改变植物形态学、生物化学和生理学的方法”的发明专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明一般涉及改变植物形态学、生物化学和生理学性质或特征的方法,例如一种或多种发育过程和 / 或环境适应过程,包括而不限于改变起始或刺激或增强根的生长、和 / 或不定根形成、和 / 或侧根形成、和 / 或根的向地性、和 / 或枝条生长、和 / 或顶端优势、和 / 或分枝、和 / 或衰老时间、和 / 或开花时间、和 / 或花朵形成、和 / 或种子发育、和 / 或种子产量,所述方法包含在植物中,在可调节的启动子序列(例如细胞特异性启动子、组织特异性启动子或器官特异性启动子序列)控制之下表达细胞分裂素降解控制蛋白质,特别是细胞分裂素氧化酶。本发明所改变的特征优选为细胞分裂素介导和 / 或生长素介导的特征。本发明延伸到用于施行本发明方法的遗传构建体,以及随之产生的转基因植物,与同基因相应物相比,该植物具有改变的形态学和 / 或生物化学和 / 或生理学性质。

[0003] 发明背景

[0004] 根是高等植物的重要器官。其主要功能是将植物固定在土壤中,并摄取水分和养分(N-营养、矿物质等)。因此,根的生长对地面上器官的生长和产量具有直接或间接的影响,特别是在养分受限的条件下。根也与产生植物次生产物有关,例如防御化合物和植物激素。

[0005] 在许多重要作物中,根也是储存器官。在欧洲,糖用甜菜是最重要的产糖植物(2 亿 6 千万吨 / 年;占世界产量的 38%)。树薯(木薯)、薯蓣和甘薯(batate)是重要的淀粉生产者(每种大约 1 亿 5 千万吨 / 年)。其淀粉含量可高达马铃薯的两倍。在许多植物(例如胡萝卜、萝卜)、草本植物(例如姜、kukuma)和药用植物(例如人参)中,根也是用于消耗的器官。此外,在根中发现的一些次生植物产物具有化学和制药工业的经济价值。例如薯蓣,其包含用于合成类固醇激素的基本分子。另一个例子是紫草素,由紫草(Lithospermum erythrorhizon)发根培养的根制备。紫草素用于抗炎症、抗肿瘤以及伤口愈合特性。

[0006] 此外,改善作物根的生长还会增强与杂草植物的竞争性,并提高水的可及性和摄取而改善在干旱地区的生长。

[0007] 改善根的生长也与生态目的有关,例如生物除污以及预防 / 阻止土壤侵蚀。

[0008] 根的构造是尚有大量利用传统繁殖未探索过的领域,因为难以在田间评价这种性状。由于生物技术不依赖于大规模的田间筛选,因而可对改善该性状具有重要影响。生物技术方法还需要对决定植物具体特征的分子元件的基本了解。如今,这些知识还只是零碎的,因此生物技术至今不能实现在此领域的突破。

[0009] 完善确定的根生长的调节剂是植物生长素。对生长的植物施加吲哚-3-乙酸(IAA)可促进侧根发育及侧根伸长(Torrey, Am J Bot 37:257-264,1950;Blakely 等人, Bot Gaz 143:341-352,1982;Muday 和 Haworth, Plant Physiol Biochem 32:193-203, 1994)。处于 IAA 浓度范围下的根开始增加许多侧根(Kerk 等人, Plant Physiol, 122:

925-932, 2000)。此外, 响应特定浓度的外源植物生长素而生成侧根的根随后置于较高浓度的 IAA 中, 在现有的根之间形成许多额外的侧根 (Kerk 等人, *Plant Physiol*, 122 :925-932, 2000)。相反, 在包含植物生长素转运抑制剂 (包括 NPA) 的琼脂上生长的根的侧根数目下降 (Muday 和 Haworth, *Plant Physiol Biochem* 32 :193-203, 1994)。

[0010] 已经分离了包含内源性 IAA 水平升高的鼠耳芥属 (*Arabidopsis*) 突变体 (Boerjan 等人, *Plant Cell* 7 :1405-141, 1995 ; Celenza 等人, *Gene Dev* 9 :2131-2142, 1995 ; King 等人, *Plant Cell* 7 :2023-2037, 1995 ; Lehman 等人, *Cell* 85 :183-194, 1996)。目前已知它们是位于染色体 2 上单座位的等位基因。这些突变体的幼苗具有过量的不定根和侧根, 与上述施加外源植物生长素的效果相一致。

[0011] 植物生长素对形成不定根和侧根的刺激效应提示在转基因植物中过量产生植物生长素是促进生根的有效策略。然而, 这样是否会产生具有改善特性的商用产品尚有疑问。除了对形成不定根和侧根的刺激效应以外, 植物生长素的过量生成引发其它效应, 例如叶子数目减少、叶子形态异常 (狭窄、卷曲的叶子)、花序发育不全、顶端优势增强、茎上形成不定根, 从农学观点来看, 其中大部分不合需要 (Klee 等人, *Genes Devel* 1 :86-96, 1987 ; Kares 等人, *Plant Mol Biol* 15 :225-236, 1990)。因此, 有赖提高植物生长素合成的方法的主要问题在于容留问题, 即将植物生长素的效应局限于根。不可能利用组织特异性启动子克服这种容留问题: 植物生长素在植物中转运, 因而其作用不局限于合成位点。另一问题在于, 植物生长素是否总是提高根的总生物量。对于琼脂中生长的植物, 已经注意到逐步提高浓度刺激侧根形成, 但同时抑制这些根的长出 (Kerk 等人, *Plant Physiol*, 122 :925-932, 2000)。通过本专利权利要求的实施方案, 可解决上述有关容留植物生长素效应以及维持根的长出的问题。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明涉及遗传构建体, 其包含编码鼠耳芥 (*Arbidopsis thaliana*) 的具有细胞分裂素氧化酶活性的蛋白质的基因。该基因在调节启动子的控制下表达。该启动子可由内源性组织特异性或环境特异性因子调节, 或者另外地, 可应用特定的化学制剂进行诱导。

[0014] 本发明还涉及包含该遗传构建体的细胞或者植物。

[0015] 本发明还涉及在根或根的某些组织或细胞类型特异性的启动子控制下表达细胞分裂素氧化酶基因来改变根的构造以及生物量的方法。

[0016] 发明详述

[0017] 为了绕过上述关于提高植物生长素生物合成的问题, 决定遵循另一方法。我们推论, 与提高植物生长素水平相比, 下调植物生长素的生物拮抗剂可能对根的生长引起类似以至更大的影响。激素的作用以及相互作用极其复杂, 但我们假定细胞分裂素能够对根的生长起到植物生长素拮抗剂的作用。植物组织培养的激素研究已经显示, 植物生长素与细胞分裂素的比值比其中每种激素的绝对水平对于器官发生更为重要, 这实际上表明这些激素起拮抗剂作用, 至少在某些生物进程中如此。此外, 外源施用细胞分裂素抑制侧根形成。有趣的是, 细胞分裂素处理对根的伸长还有负面影响, 这提示细胞分裂素控制根分支以及根的长出。

[0018] 总之, 目前的文献资料表明, 提高细胞分裂素的水平负面影响根的生长, 但对该过程的机制并不了解。植物中细胞分裂素合成的位置处于根尖以及枝条的幼稚组织。细胞分

裂素的内生浓度在 nM 范围内。然而,由于难于量化,需要提取的相当大的组织数量,以及并不知道实际的局部浓度。也不知道细胞分裂素的亚细胞区域化。一般认为自由的碱基和核糖核苷定位于细胞质和细胞核,而糖苷定位于液泡。还存在化学结构略微差异的不同细胞分裂素。因此,不知道外源细胞分裂素的效应是否应归于细胞分裂素的总浓度的提高,还是更应归于其它形式的植物产生的细胞分裂素(结构、细胞或亚细胞定位不同)竞争受体、转位分子、运输器、修饰酶.....

[0019] 为了检验根中细胞分裂素水平实际上超出最适于根生长水平的假设,从鼠耳芥中克隆了编码细胞分裂素氧化酶(即细胞分裂素代谢酶)的新基因(记为 AtCKX),然后在强的组成型启动子下于转基因烟草和鼠耳芥属中表达。显示 AtCKX mRNA 表达以及细胞分裂素氧化酶活性提高的转化子还显示根的形成和生长增强。也观察到对枝条生长的负效应。后者与这些植物中细胞分裂素氧化酶基因的组成型表达一致,说明细胞分裂素氧化酶基因的局限性表达对一般植物生长特性的重要性。利用细胞-、组织-或器官-特异性启动子能够实现细胞分裂素氧化酶活性的保留,因为如以上解释,细胞分裂素的降解过程限于表达 CKX 蛋白质的组织或细胞,这与依赖激素合成的过程不同。

[0020] 观察到的细胞分裂素氧化酶表达对枝条生长的负效应表明细胞分裂素氧化酶是设计或筛选生长促进化学剂的令人关注的靶标。这种化学剂应抑制细胞分裂素氧化酶活性,最好不被转运到根,并应在土壤中快速降解,以便施用这些化学剂不会抑制根的生长。细胞分裂素还延迟叶的衰老,这意味着正效应包括光合组织的生长和维持。另外,细胞分裂素延迟衰老、增强叶子的绿化(叶绿素含量)并减弱枝条的顶端优势的结果表明基于抑制植物地上部分中 CKX 活性的策略(例如反义、核糖酶以及共抑制技术)能够导致延迟衰老、增强叶子绿化并增加分枝。

[0021] 类似地,观察到的细胞分裂素氧化酶表达对根生长的正效应表明细胞分裂素氧化酶是设计或筛选除草剂的令人关注的靶标。这种除草剂应抑制细胞分裂素氧化酶活性,最好不被转运到枝条,以及应在能穿过土壤给予根的溶剂中可溶并相对稳定。

[0022] 细胞分裂素氧化酶过量表达对植物发育和构造的这些效应迄今未知,因而本发明及其实施方案是意想不到的。

[0023] 观察到的对枝条生长的负效应表明操纵细胞分裂素氧化酶还可用于获得矮化表型。矮化表型对经济作物例如谷类和果木特别有用。

[0024] 本发明的优选实施方案涉及细胞分裂素氧化酶表达对植物生长和构造(特别是根的生长和构造)的正效应。鼠耳芥属中细胞分裂素氧化酶基因家族包含至少六个成员(见如下实施例),本发明人已经表明,其中一些基因在转基因植物中实现的效应存在量的差异。鉴于有证据表明许多绿色植物(Hare 和 van Staden, *Physiol Plant* 91: 128-136, 1994; Jones 和 Schreiber, *Plant Growth Reg* 23: 123-134, 1997) 以及其它生物(Armstrong, in *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function*. Eds Mok and Mok, CRC Press, pp139-154, 1994) 中存在细胞分裂素氧化酶活性,可以预料,能够从其它生物中分离所述鼠耳芥属细胞分裂素氧化酶的功能性同系物。因此,在本发明中发挥功能的细胞分裂素氧化酶的序列不必与此处所述相同。通常本发明可特别用于谷类作物和单子叶作物,也可以利用来自诸如小麦或玉米的细胞分裂素氧化酶基因(Morris 等人, 1999; Rinaldi 和 Comandini, 1999)。可以想到具有细胞分裂素氧化酶活性或者任何其它细胞分裂素代谢活

性的其它基因(参见**Zažímalová**等人, *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*, Hooykaas, Hall and Libbenga (Eds.), Elsevier Science, pp141-160, 1997) 也可以用于本发明目的。类似地, 编码可增加内源性细胞分裂素代谢活性的蛋白质的基因也可以用于本发明目的。原则上, 还可以通过干扰在细胞分裂素下游行使功能的基因(例如参与细胞分裂素信号转导途径的受体或者蛋白质) 来获得类似表型。

[0025] 为了本发明目的, 应当理解术语“根的生长”包含单子叶和双子叶植物中组成根系的不同部分在其不同发育阶段中生长的所有方面。应当理解, 增强根的生长能够起因于增强其一个或多个部分的生长, 包括初生根、侧根、不定根等, 其均属于本发明范围之内。

[0026] 根据第一个实施方案, 本发明涉及刺激根生长和/或增强侧根和/或不定根形成和/或改变根的向地性的方法, 其包含在植物或植物部分中表达植物细胞分裂素氧化酶或者表达可降低活性细胞分裂素水平的另一蛋白质。

[0027] 在本发明上下文中, 应当理解术语“表达”和/或“过量表达”可互换使用, 两者均涉及“增强和/或异位表达”植物细胞分裂素氧化酶或者可减低植物中活性细胞分裂素水平的其它任何蛋白质。应当清楚, 此处意在增强植物细胞分裂素氧化酶表达, 以及“从头(de novo)”表达植物细胞分裂素氧化酶或者所述其它蛋白质。另外, 所述其它蛋白质增强植物细胞分裂素氧化酶的细胞分裂素代谢活性。

[0028] 还应理解在本发明上下文中, 表述“侧根和/或不定根”意味着“侧根和不定根”, 也意味着“侧根或不定根”。可以增强侧根形成或者不定根形成, 以及两种类型的非初生根形成, 但并不一定。

[0029] 根据另外的实施方案, 本发明涉及刺激根生长和/或增强侧根或不定根形成和/或改变根的向地性和/或增加产量和/或增强早期活力和/或改变根/枝比率和/或提高倒伏抗性和/或增加耐旱性和/或促进外植体体外繁殖的方法, 其包含在植物或植物部分中表达植物细胞分裂素氧化酶或者表达可降低活性细胞分裂素水平的另一蛋白质。

[0030] 根据优选实施方案, 本发明涉及通过在植物或植物部分(优选根部)过量表达细胞分裂素氧化酶(优选本发明的细胞分裂素氧化酶)或者可降低活性细胞分裂素水平的另一蛋白质来刺激根生长使根块(root mass)增大的方法。

[0031] 由过量表达促生长序列而提高根部生物量产生对产量具有直接效应, 对根细胞或转基因根细胞或所述转基因根细胞的细胞培养物所生成化合物的产生具有间接效应。根培养物中生成的一个引人注目的化合物的例子是紫草素, 能够利用所述方法方便地增加其产量。

[0032] 根据更具体的实施方案, 本发明涉及刺激根生长或增强侧根和不定根形成或改变根的向地性的方法, 其包含表达编码植物细胞分裂素氧化酶的核酸, 其选自:

[0033] (a) 包含任何 SEQ ID NO 27、1、3、5、7、9、11、25、26、28-31、33 或 34, 或其互补序列所示的 DNA 序列的核酸,

[0034] (b) 包含对应于任何 SEQ ID NO 27、1、3、5、7、9、11、25、26、28-31、33 或 34, 或其互补序列的 RNA 序列的核酸,

[0035] (c) 与任何 SEQ ID NO 27、1、3、5、7、9、11、25、26、28-31、33 或 34, 或其互补序列特异性杂交的核酸,

[0036] (d) 编码包含任何 SEQ ID NO 2、4、6、8、10、12、32 或 35, 或其互补序列所示的氨基

酸序列的蛋白质的核酸，

[0037] (e) 任何 (a)-(d) 定义的核酸，其特征在于所述核酸是 DNA、基因组 DNA、cDNA、合成 DNA 或 RNA (其中 T 替换为 U)，

[0038] (f) 通过遗传密码可简并为任何 SEQ ID NO 27、1、3、5、7、9、11、25、26、28-31、33 或 34 中所示的核酸的核酸，或者简并为任何 (a)-(e) 中定义的核酸的核酸，

[0039] (g) 由于生物之间密码子使用的差异，不同于编码任何 SEQ ID NO 2、4、6、8、10、12、32 或 35 中所示的蛋白质的核酸的核酸，或者不同于任何 (a)-(e) 中定义的核酸的核酸，

[0040] (h) 编码 SEQ ID NO 2、4、6、8、10、12 或 35 中所示蛋白质的核酸，或者 (a)-(e) 中定义的核酸，其由于等位基因之间的差异而不同，

[0041] (i) 编码任何 SEQ ID NO 2、4、6、8、10、12 或 35 中所示的蛋白质的核酸，

[0042] (j) 任何 (a)-(i) 中定义的核酸的、具有细胞分裂素氧化酶生物活性的功能性片段，以及

[0043] (k) 编码植物细胞分裂素氧化酶的核酸，

[0044] 或者包含在植物或植物部分中表达编码 (优选在根中) 可降低活性细胞分裂素水平的蛋白质的核酸。

[0045] 本发明中，已经分离了编码新的鼠耳芥细胞分裂素氧化酶的核酸，本发明人首次另人惊奇地表明，细胞分裂素氧化酶在转基因植物或转基因植物部分中的表达引起上述根相关性特征。细胞分裂素氧化酶的表达优选于根中进行，优选位于根特异性启动子的控制之下。SEQ ID NO 36 提供了这种根特异性启动子的一个例子。

[0046] 应当清楚，虽然本发明在实施例部分通过几种新的 AtCKX 基因和蛋白质得到支持，本发明构思还涉及利用从其它植物中 (优选在所述其它植物的根中) 分离并表达的其它细胞分裂素氧化酶，以在植物中获得与实施例部分所述类似的效应。

[0047] 因此，本发明更一般涉及利用编码植物细胞分裂素氧化酶的核酸或者编码可降低活性细胞分裂素水平的蛋白质的核酸在植物或植物部分中来刺激根的生长或增强侧根或不定根形成或改变根的向地性。优选使用的细胞分裂素氧化酶由以上定义的编码细胞分裂素氧化酶的核酸编码，以及由以下定义的本发明的新核酸编码。

[0048] 本发明涉及分离的编码具有细胞分裂素氧化酶活性的新植物蛋白质的核酸，其选自：

[0049] (a) 包含任何 SEQ ID NO 29、3、5、9、26、27、31、33 或 34、或其互补序列所示的 DNA 序列的核酸，

[0050] (b) 包含对应于任何 SEQ ID NO 29、3、5、9、26、27、31、33 或 34、或其互补序列的 RNA 序列的核酸，

[0051] (c) 与任何 SEQ ID NO 29、3、5、9、26、27、31、33 或 34、或其互补序列所示的核酸特异性杂交的核酸，

[0052] (d) 编码具有包含 SEQ ID NO 32 所示的多肽的氨基酸序列、并且与 SEQ ID NO 4 所示的氨基酸序列至少 70%、优选至少 75%、80% 或 85%、更优选至少 90% 或 95%、最优选至少 99% 相似性的蛋白质的核酸，

[0053] (e) 编码具有与 SEQ ID NO 6 所示的氨基酸序列至少 35%、优选 37%、40%、45%、47% 或 50%、更优选 55%、60%、65%、70%、75% 或 80%、最优选 85%、90% 或 95% 相似性

的氨基酸序列的蛋白质的核酸,

[0054] (f) 编码具有与 SEQ ID NO 10 或 35 所示的氨基酸序列至少 35%、优选 37%、40%、45%、47% 或 50%、更优选 55%、60%、65%、70%、75% 或 80%、最优选 85%、90% 或 95% 相似性的氨基酸序列的蛋白质的核酸,

[0055] (g) 编码包含任何 SEQ ID NO 4、6、10、32 或 35 中所示的氨基酸序列的蛋白质的核酸,

[0056] (h) 通过遗传密码可简并为任何 SEQ ID NO 29、3、5、9、26、27、33 或 34 中所示核酸的核酸,或者简并为任何 (a)-(g) 中定义的核酸的核酸,

[0057] (i) 由于生物之间密码子使用的差异,不同于编码任何 SEQ ID NO 4、6、10 或 35 中所示蛋白质的核酸的核酸,或者不同于任何 (a)-(g) 中定义的核酸的核酸,

[0058] (j) 编码 SEQ ID NO 4、6、10 或 35 中所示的蛋白质的核酸,或者 (a)-(g) 中定义的核酸,其由于等位基因之间的差异而不同,

[0059] (k) 编码任何 SEQ ID NO 29、3、5、9、26、27、31、33 或 34 中所示的核酸编码的细胞分裂素氧化酶的免疫活性片段的核酸,或者任何 (a)-(j) 中定义的核酸的免疫活性片段的编码核酸,

[0060] (l) 编码任何 SEQ ID NO 29、3、5、9、26、27、31、33 或 34 中所示核酸编码的细胞分裂素氧化酶的功能性片段的核酸,或者任何 (a)-(j) 中定义的核酸的功能性片段的编码核酸,其中所述片段具有细胞分裂素氧化酶的生物活性,以及

[0061] (m) 编码 SEQ ID NO 4、6、10 或 35 中定义的蛋白质的核酸,

[0062] 只要所述核酸不是按下列 Genbank 登录号保藏的核酸:AC005917、AB024035 和 AC023754

[0063] 本发明还涉及本发明分离的核酸,它们是 DNA、cDNA、基因组 DNA 或合成的 DNA、或 RNA (其中 T 替换为 U)。

[0064] 本发明还涉及与本发明的核酸特异性杂交或特异性扩增的至少 15 个核苷酸长度的核酸分子。

[0065] 根据另一实施方案,本发明还涉及包含本发明核酸的载体。在优选实施方案中,所述载体是表达载体,其中该核酸与使该序列在原核和 / 或真核宿主细胞中表达的一种或多种控制序列有效连接。

[0066] 应当理解,为了在单子叶植物中表达本发明的细胞分裂素氧化酶基因,应该使用对应于 cDNA 序列的核酸序列以避免单子叶植物中内含子的错误剪接。在单子叶植物中表达的优选 cDNA 序列具有 SEQ ID NO 25-30 和 34 所示的核酸序列。

[0067] 本发明还涉及包含本发明的任何核酸分子或载体的宿主细胞。所述宿主细胞选自细菌、昆虫、真菌、植物或动物细胞。

[0068] 本发明的另一实施方案涉及由本发明核酸编码的分离的多肽、或其同系物或衍生物、或其免疫活性或功能性片段。本发明优选的多肽包含任何 SEQ ID NO 2、4、6、8、10、12、32 和 35 所示氨基酸序列、或其同系物或衍生物、或其免疫活性和 / 或功能性片段。在另一更优选实施方案中,本发明涉及具有 SEQ ID NO 2、4、6、8、10、12 或 35 所示的氨基酸序列的多肽、或其同系物或衍生物、或其免疫活性和 / 或功能性片段。其优选的功能性片段是缺乏其信号肽的片段。

[0069] 根据另一实施方案,本发明涉及产生本发明多肽的方法,其包含在使该多肽表达的条件下培养本发明的宿主细胞,并从培养物中回收生成的多肽。

[0070] 本发明还涉及特异性识别本发明多肽或其特异性表位的抗体。

[0071] 本发明进一步涉及产生转基因植物、植物细胞或植物组织的方法,其包含在所述植物、植物细胞或植物组织中引入可表达形式的本发明的核酸分子或者本发明的载体。

[0072] 本发明还涉及产生改变的植物、植物细胞或植物组织的方法,其包含将本发明的多肽直接引入所述植物的细胞、组织或器官中。

[0073] 根据另一实施方案,本发明涉及实现本发明多肽表达的方法,其包含在植物细胞的基因组中稳定引入与一个或多个控制序列有效连接的本发明的核酸分子或者本发明的载体。本发明进一步涉及上述方法,其另外包含由所述植物细胞再生为植物。本发明还涉及包含本发明核酸序列的转基因植物细胞,该序列与使其在植物细胞中转录和 / 或表达的调控成分有效联接,或可利用以上阐述的方法获得。

[0074] 根据另一优选实施方案,本发明涉及此处上述的转基因植物细胞,其中本发明的核酸稳定整合到该植物细胞的基因组中。

[0075] 本发明另外涉及包含此处所述植物细胞的转基因植物或植物组织,也涉及所述转基因植物可收获的部分,优选地选自种子、叶子、果实、茎培养物、根、块茎、根茎和鳞茎。本发明还涉及来源于任何所述转基因植物或植物部分的后代。

[0076] 根据另一实施方案,本发明涉及刺激根生长的方法,其包含在植物或植物部分中表达本发明的核酸或者表达可降低活性细胞分裂素水平的另一蛋白质。

[0077] 植物细胞或组织培养即人工产生的植物细胞或植物组织培养物,其在特定的培养基(液体或固体)中生长,以提供这些植物细胞或组织生长和 / 或产生某些化合物所必需的各种条件。植物细胞和 / 或组织培养能用于快速繁殖植物以及产生转基因植物,仅举几个例子。某些外植体或者在所述的某些培养条件下难以形成根,在所述培养的植物细胞或组织中表达细胞分裂素氧化酶基因能够用于增强根形成。植物细胞和 / 或组织培养还能用于工业生产有价值的化合物。可能生产的化合物有药物、杀虫剂、颜料、化妆品、香料、食品添加剂等。该产品的一个例子是紫草素,由植物紫草(*Lithospermum erythrorhizon*)的根产生。植物组织培养的例子有毛根培养物,其是人工制备的毛根块。紫草的根难以大量收集,通过制备毛根培养物,能够比常规速度更快地工业上制备终产品紫草素。如此处所公开,表达细胞分裂素氧化酶增强了根的生长和发育,因此能够方便地用于所述植物细胞以及组织培养过程中。因此,本发明的另一实施方案提供了刺激根的生长和发育的方法,其包含在转基因植物细胞或包含该转基因植物细胞的组织培养中表达植物细胞分裂素氧化酶、优选本发明的细胞分裂素氧化酶的编码核酸。

[0078] 本发明另外涉及增强侧根或不定根形成的方法,其包含在植物或植物部分中表达本发明的核酸或者表达可降低活性细胞分裂素水平的另一蛋白质。

[0079] 本发明还涉及改变根向地性的方法,其包含在植物或植物部分中改变本发明核酸的表达或者表达可降低活性细胞分裂素水平的另一蛋白质。

[0080] 本发明还涉及增强早期活力和 / 或改变根 / 枝条比率和 / 或提高倒伏抗性和 / 或增加耐旱性和 / 或促进外植体体外繁殖的方法,其包含在植物或植物部分中表达本发明的核酸或者表达可降低活性细胞分裂素水平的另一蛋白质。

[0081] 本发明进一步涉及增加根的大小或者根分生组织大小的方法,其包含在植物或植物部分、优选根中表达本发明的核酸或者表达可降低活性细胞分裂素水平的另一蛋白质。

[0082] 根据另一实施方案,本发明涉及增加枝条分生组织大小的方法,其包含优选在枝条中下调本发明核酸的表达。

[0083] 根据优选的实施方案,本发明涉及延迟叶片老化的方法,其包含在叶片中、优选开始老化的叶片中下调本发明的任何细胞分裂素氧化酶的表达。本发明还涉及改变叶片老化的方法,其包含在开始老化的叶片中表达一种细胞分裂素氧化酶。

[0084] 本发明还涉及增加叶片厚度的方法,其包含在植物或植物部分、优选叶片中表达本发明的核酸或者表达可降低活性细胞分裂素水平的另一蛋白质。

[0085] 本发明还涉及降低导管大小的方法,其包含在植物或植物部分、优选导管中表达本发明的核酸或者表达可降低活性细胞分裂素水平的另一蛋白质。

[0086] 本发明另外涉及增加导管大小的方法,其包含下调本发明核酸在植物或植物部分中的表达。

[0087] 根据另一实施方案,本发明涉及提高幼苗直立性(standability)的方法,其包含表达本发明的核酸,或者包含表达可降低幼苗中活性细胞分裂素水平的另一蛋白质。

[0088] 此外,本发明涉及上述任何方法,所述方法导致产量增加。

[0089] 本发明另外涉及本发明的任何方法,其中所述核酸的表达处于强的组成型启动子控制之下。在优选的实施方案中,本发明涉及本发明的任何方法,其中所述核酸的表达处于优选在根中表达的启动子控制之下。表 5 包括了根特异性启动子的不完全清单。用于本发明方法的优选启动子为根 *clavata* 同源性(root *clavata* homolog) 启动子,具有 SEQ ID NO 36 所示的序列。

[0090] 根据另一实施方案,本发明涉及改变细胞命运和/或改变植物发育和/或改变植物形态学和/或改变植物生物化学和/或改变植物生理学和/或改变细胞周期前进速度的方法,其包含改变本发明核酸在植物特定的细胞、组织或器官中的表达。

[0091] 本发明还涉及获得增强生长、和/或提高产量和/或改变植物细胞、组织和/或器官老化、和/或增加植物侧生器官形成频率的方法,其包含异位表达本发明的核酸。

[0092] 本发明还涉及在不利的生长条件和/或压力下促进和延长细胞中细胞分裂活性的方法,其包含异位表达本发明的核酸序列。

[0093] 根据另一实施方案,本发明涉及识别并获得与本发明多肽相互作用的蛋白质的方法,其包含利用本发明多肽的筛选试验。

[0094] 在更优选实施方案中,本发明涉及识别并获得与本发明多肽相互作用的蛋白质的方法,其包含双杂交筛选试验,其中利用本发明多肽为诱饵(bait)及 cDNA 文库为捕获物(preying)。

[0095] 本发明进一步涉及调节本发明多肽与通过上述方法获得的互相作用蛋白质之间互相作用的方法。

[0096] 在另外的实施方案中,本发明涉及识别并获得与本发明多肽相互作用的化合物的方法,其包含步骤:

[0097] a) 提供双杂交系统,其中本发明多肽以及通过上述方法获得的互相作用蛋白质,

[0098] b) 所述化合物与 a) 中定义的表达的多肽形成的复合物相互作用,以及,

[0099] c) 对所述化合物与所述多肽或 a) 中定义的表达多肽形成的复合物的相互作用进行(实时)测量。

[0100] 本发明进一步涉及识别与本发明多肽特异性结合的化合物、或化合物的混合物的方法,包含:

[0101] a) 在适于复合物形成的条件下,将本发明多肽与所述化合物或化合物的混合物结合,以及,

[0102] b) 检测复合物形成,其中复合物存在可识别特异性结合所述多肽的化合物或混合物。

[0103] 本发明还涉及上述方法,其中所述化合物或混合物抑制本发明所述多肽的活性,并能用于合理设计化学剂。

[0104] 根据另一实施方案,本发明涉及上述方法识别的化合物或混合物作为植物生长调节剂或除草剂的用途。

[0105] 本发明还涉及植物生长调节剂或除草剂组合物的生产方法,其包含上述化合物筛选步骤,以及将该步骤获得的化合物配制成适当形式以应用到农业或植物细胞或组织培养中。

[0106] 本发明还涉及增加分枝的方法,其包含在植物或植物部分中、优选茎或腋芽中表达本发明的核酸。

[0107] 本发明还涉及提高倒伏抗性的方法,其包含在植物或植物部分中、优选茎或腋芽中表达本发明的核酸。

[0108] 本发明还涉及设计或筛选促生长的化学剂或除草剂的方法,其包含利用本发明的核酸或本发明的载体。

[0109] 根据另一实施方案,本发明涉及将本发明的核酸分子、本发明的载体、或本发明的多肽用于提高产量。

[0110] 本发明还涉及将本发明的核酸分子、本发明的载体、或本发明的多肽用于刺激根生长。

[0111] 本发明还涉及将本发明的核酸分子、本发明的载体、或本发明的多肽用于增强侧根或不定根形成。

[0112] 本发明还涉及将本发明的核酸分子、本发明的载体、或本发明的多肽用于改变根的向地性。

[0113] 本发明另外涉及将本发明的核酸分子、本发明的载体、或本发明的多肽用于增强早期活力和/或改变根/枝条比率和/或提高倒伏抗性和/或增强耐旱性和/或促进外植体的体外繁殖。

[0114] 本发明还涉及将本发明的核酸分子、本发明的重组载体或本发明的多肽用于改变植物发育和/或改变植物形态学和/或改变植物生物化学和/或改变植物生理学。

[0115] 根据另一实施方案,本发明涉及诊断组合物,其至少包含本发明的核酸分子、本发明的载体、本发明的多肽或本发明的抗体。

[0116] 本发明另一实施方案涉及在与接穗嫁接过程中利用转基因根状茎(其根的生长和发育由于表达细胞分裂素氧化酶而增强)来产生农业或园艺特性得到改善的植物或树。接穗可能是转基因或非转基因的。此实施方案的具体特征是由根系赋予的特定性状,包括

增强植物 / 树木在土壤中的固定和 / 或提高水的摄取而导致例如耐旱性增强、和 / 或提高从土壤中摄取养分和 / 或增强植物的有机物转运、和 / 或增加物质分泌到土壤中（例如植物含铁细胞）、和 / 或改善呼吸作用和 / 或提高抗病性和 / 或增加产量。利用 AtCKX 转化的根状茎进行嫁接的好处，除增强根系之外，还如此处所公开，在于延迟接枝上叶片的老化（参见图 12A）。此特定实施方案优选的植物或树木包括利用自身根生长不良、且嫁接栽培的植物或树木，例如具有商业利益的各种葡萄、柑橘、杏、扁桃、李子、桃、苹果、梨、樱桃、胡桃、无花果、榛子和枇杷。

[0117] 如上所述，在某些生物过程中植物生长素和细胞分裂素作为拮抗剂。例如，细胞分裂素 / 植物生长素的比率调节根和枝条的产生，高浓度的植物生长素引起生根，高浓度的细胞分裂素引起枝条生长。如本发明所公开，在烟草和鼠耳芥属中表达细胞分裂素氧化酶引起根的发育增强，与植物生长素效应增强相一致。果实发育中也涉及植物生长素。植物生长素处理雌花部导致某些植物品种发育单性果实。通过增强雌性生殖器官中植物生长素的生物合成，几种园艺作物植物已经遗传工程改造为单性果实发育 (W00105985)。因此，根据另一实施方案，本发明涉及诱导植物单性性状的方法，该方法包含在植物或植物部分中、优选在雌性生殖器官例如胎座、胚珠及其衍生组织中下调一种或多种细胞分裂素氧化酶、或者可降低活性细胞分裂素水平的另一蛋白质的表达。金鱼草 (*Antirrhinum majus*) DefH9 启动子区或其同系物之一（其在胎座和胚珠提供特异性高效表达）能够用于此目的。

[0118] 定义及实施方案详述

[0119] 本领域技术人员应当明白，除明确描述以外，此处所述本发明可能变更和修改。应当理解此处所述本发明包括所有这些变更和修改。本发明还包括本说明书中涉及或表明的所有这类步骤、特征、组合物和化合物，单个或全体，以及任一或更多所述步骤或特征的任意或所有组合。本发明适用于任何植物，特别是单子叶植物和双子叶植物，包括饲料或豆科饲料、观赏植物、粮食作物、树木、或灌木，选自：金合欢属 (*Acacia* spp.)，槭树属 (*Acer* spp.)，猕猴桃属 (*Actinidia* spp.)，七叶树属 (*Aesculus* spp.)，新西兰贝壳杉 (*Agathis australis*)，*Albizia amara*，*Alsophila tricolor*，须芒草属 (*Andropogon* spp.)，落花生属 (*Arachis* spp.)，槟榔 (*Areca catechu*)，*Astelia fragrans*，*Astragalus cider*，*Baikiaea plurijuga*，桦木属 (*Betula* spp.)，芸苔属 (*Brassica* spp.)，木榄 (*Bruguiera gymnorhiza*)，*Burkea africana*，紫柳 (*Butea frondosa*)，*Cadaba farinosa*，朱缨花属 (*Calliandra* spp.)，大叶茶 (*Camellia sinensis*)，美人蕉 (*Canna indica*)，辣椒属 (*Capsicum* spp.)，决明属 (*Cassia* spp.)，*Centroema pubescens*，木瓜属 (*Chaenomeles* spp.)，肉桂 (*Cinnamomum cassia*)，小果咖啡 (*Coffea arabica*)，*Colophospermum mopane*，变异小冠花 (*Coronillia varia*)，*Cotoneaster serotina*，山楂属 (*Crataegus* spp.)，香瓜属 (*Cucumis* spp.)，柏木属 (*Cupressus* spp.)，*Cyathea dealbata*，榲桲 (*Cydonia oblonga*)，日本柳杉 (*Cryptomeria japonica*)，香茅属 (*Cymbopogon* spp.)，*Cynthea dealbata*，榲桲 (*Cydonia oblonga*)，*Dalbergia monetaria*，大叶骨碎补 (*Davallia divaricata*)，角丝鼓藻属 (*Desmodium* spp.)，粗糙蚌壳蕨 (*Dicksonia squarosa*)，*Diheteropogon amplexans*，*Dioclea* spp.，镰扁豆属 (*Dolichos* spp.)，*Dorycnium rectum*，*Echinochloa pyramidalis*，*Ehrartia* spp.，稗子 (*Eleusine coracana*)，*Eragrostis* spp.，刺桐属 (*Erythrina* spp.)，桉属 (*Eucalyptus* spp.)，*Euclea*

schimperii, Eulaliavillosa, 荞麦属 (*Fagopyrum* spp.), 费约果 (*Feijoa sellowiana*), 草莓属 (*Fragaria* spp.), 千斤拔属 (*Flemingia* spp.), *Freycinetia banksii*, *Geranium thunbergii*, 银杏 (*Ginkgo biloba*), *Glycine javanica*, *Gliricidia* spp, 陆地棉 (*Gossypium hirsutum*), 银桦属 (*Grevillea* spp.), *Guibourtia coleosperma*, 岩黄芪属 (*Hedysarum* spp.), 牛鞭草 (*Hemarthia altissima*), 扭黄茅 (*Heteropogon contortus*), 大麦 (*Hordeum vulgare*), *Hyparrhenia rufa*, 小连翘 (*Hypericum erectum*), *Hyperthelia dissoluta*, *Indigo incarnata*, 鸢尾属 (*Iris* spp.), *Leptarrhena pyrolifolia*, 胡枝子属 (*Lespedeza* spp.), *Lettuca* spp., *Leucaena leucocephala*, *Loudetia simplex*, *Lotonus bainesii*, 百脉根属 (*Lotus* spp.), *Macrotyloma axillare*, 苹果属 (*Malus* spp.), *Manihot esculenta*, 紫苜蓿 (*Medicago sativa*), 水杉 (*Metasequoia glyptostroboides*), 大蕉 (*Musa sapientum*), 烟草属 (*Nicotiana* spp.), 驴食豆属 (*Onobrychis* spp.), *Ornithopus* spp., 稻属 (*Oryza* spp.), *Peltophorum africanum*, 狼尾草属 (*Pennisetum* spp.), *Persea gratissima*, 碧冬茄属 (*Petunia* spp.), 菜豆属 (*Phaseolus* spp.), 槟榔竹 (*Phoenix canariensis*), *Phormium cookianum*, 石楠属 (*Photinia* spp.), 白云杉 (*Picea glauca*), 松属 (*Pinus* spp.), 豌豆 (*Pisum sativum*), 新西兰罗汉松 (*Podocarpus totara*), *Pogonarthria fleckii*, *Pogonarthria squarrosa*, 杨属 (*Populus* spp.), 牧豆树 (*Prosopis cineraria*), 花旗松 (*Pseudotsuga menziesii*), *Pterolobium stellatum*, 西洋梨 (*Pyrus communis*), 栎属 (*Quercus* spp.), *Rhaphiolepis umbellata*, 美味棒花棕 (*Rhopalostylis sapida*), *Rhus natalensis*, 欧洲醋栗 (*Ribes grossularia*), 茶藨子属 (*Ribes* spp.), 洋槐 (*Robinia pseudoacacia*), 蔷薇属 (*Rosa* spp.), 悬钩子属 (*Rubus* spp.), 柳属 (*Salix* spp.), *Schyzachyrium sanguineum*, 金松 (*Sciadopitys verticillata*), 北美红杉 (*Sequoia sempervirens*), 巨杉 (*Sequoiadendron giganteum*), 两色蜀黍 (*Sorghum bicolor*), 菠菜属 (*Spinacia* spp.), *Sporobolus fimbriatus*, *Stiburus alopecuroides*, *Stylosanthos humilis*, 葫芦茶属 (*Tadehagi* spp), 落羽杉 (*Taxodium distichum*), 阿拉伯黄背草 (*Themeda triandra*), 车轴草属 (*Trifolium* spp.), 小麦属 (*Triticum* spp.), 异叶铁杉 (*Tsuga heterophylla*), 越桔属 (*Vaccinium* spp.), 野豌豆属 (*Vicia* spp.), 葡萄 (*Vitis vinifera*), 锥穗沃森花 (*Watsonia pyramidata*), 马蹄莲 (*Zantedeschia aethiopica*), 玉蜀黍 (*Zea mays*), 苋属 (*amaranth*), 朝鲜蓟、芦笋、茎椰菜、抱子甘蓝、甘蓝、油菜、胡萝卜、花椰菜、芹菜、羽衣甘蓝、绿叶菜、亚麻、散叶甘蓝、小扁豆、含油种子油菜、秋葵、洋葱、马铃薯、稻、大豆、稻草、糖用甜菜、糖甘蔗、向日葵、番茄、南瓜和茶等, 或上述任何特定名称植物的种子, 或任何上述物种的组织、细胞或器官培养物。

[0120] 贯穿本说明书, 除非上下文需要, 否则单词“包含”应当理解为表示包含所述整体或步骤、或整体或步骤群, 而不排除任何其它的整体或步骤、或整体或步骤群。

[0121] 此处所用术语“来源于”应当用来表明来源于指定种类的特定整体或整体群, 但并不一定直接从该指定来源获得。

[0122] 此处所用术语“蛋白质”、“肽”或“寡肽”是指任意长度的多聚体形式的氨基酸。所述术语还包括已知的氨基酸修饰, 例如二硫键形成、半胱氨酰化、氧化、谷胱甘肽酰化、甲基化、乙酰化、法尼基化、生物素化、硬脂酰化、甲酰化、硫辛酸加成、磷酸化、硫酸化、泛素化、肉豆蔻酰化、棕榈酰化、香叶基香叶基化 (geranylgeranylation)、环化 (例如形成

焦谷氨酸)、氧化、脱酰胺化、脱水化、糖基化(例如戊糖、氨基己糖、N-乙酰氨基己糖、脱氧己糖、己糖、唾液酸等.)和酰基化,以及非天然存在的氨基酸残基,L-氨基酸残基和D-氨基酸残基。

[0123] 本发明蛋白质的“同系物”是肽、寡肽、多肽、蛋白质和酶,就其是同系物而言,其包含相对于所述蛋白质的氨基酸替换、缺失和/或添加,而不改变其一种或多种功能特性,特别是不降低其产物的活性。例如,所述蛋白质的同系物会包含所述蛋白质的生物活性的氨基酸序列变体。所述蛋白质中的氨基酸能够替换为其它具有类似特性(例如疏水性、亲水性、疏水性矩(hydrophobic moment)、抗原性、倾向性形成或破坏 α -螺旋结构或 β -片层结构等)的氨基酸,以产生上述同系物。表1给出氨基酸的物理和化学性质概述。本发明蛋白质的替换变体为其中所述蛋白质氨基酸序列中至少一个残基已经去除,并在其位置插入一个不同的残基。氨基酸替换一般为单个残基,但可能取决于该多肽处的功能限制而成簇;插入通常为大约1-10个氨基酸残基数目,而缺失介于大约1-20个残基。优选地,氨基酸替换将包含保守氨基酸的替换,例如上文所述。

[0124] 表1. 天然存在的氨基酸的特性

带电性 / 疏水性	侧链基团	氨基酸
非极性 疏水	脂肪族 脂肪族, 含硫 芳香族 亚氨基	ala, ile, leu, val met phe, trp pro
极性 不带电	脂肪族 酰胺 芳香族 羟基 巯基	gly asn, gln Tyr ser, thr cys
正电	碱性	arg, his, lys
负电	酸性	asp, glu

[0126] 本发明蛋白质插入的氨基酸序列变体为其中在所述蛋白质的预定位点引入一个或多个氨基酸残基。插入可包含氨基端和/或羧基端融合,以及单个或多个氨基酸的内部序列插入。氨基酸序列内部插入通常小于氨基端或羧基端融合,其数目大约为1-10个残基。氨基端或羧基端融合蛋白质或肽的例子包括双杂交系统、噬菌体外壳蛋白、(组氨酸)6-标签、谷胱甘肽S-转移酶、蛋白质A、麦芽糖-结合蛋白质、二氢叶酸还原酶、Tag 100表位(EETARFQPGYRS)、c-myc表位(EQKLISEEDL)、**FLAG**[®]-表位(DYKDDDK)、lacZ、

CMP(钙调蛋白-结合肽)、HA 表位 (YPYDVPDYA)、蛋白质 C 表位 (EDQVDPRLIDGK) 以及 VSV 表位 (YTDIEMNRLGK) 中使用的转录活化子的结合结构域或活化结构域。

[0127] 本发明蛋白质的缺失变体特征在于从所述蛋白质的氨基酸序列中去除一个或多个氨基酸。

[0128] 本发明蛋白质的氨基酸变体可以容易地利用本领域公知的肽合成方法(例如固相肽合成等)、或者通过重组 DNA 操作进行制造。产生变体蛋白质(表示为替换、插入或缺失变体)的 DNA 序列操作为本领域所公知。例如,在已知序列 DNA 的预定位点产生替换突变的方法为本领域技术人员所公知,诸如利用 M13 诱变、T7-Gen 体外诱变试剂盒(USB, Cleveland, OH)、QuickChange Site Directed 诱变试剂盒(Stratagene, San Diego, CA)、PCR-介导的定点诱变或者其它定点诱变方法。

[0129] 在本发明中,利用本领域已知的计算机程序(诸如 DNASTAR/MegAlign 程序)结合 Clustal 方法,计算 DNA 序列和/或蛋白质之间的“同一性”和/或“相似性”百分率。本发明蛋白质的“衍生物”为肽、寡肽、多肽、蛋白质以及酶,其包含所述多肽至少大约 5 个连续的氨基酸残基,但保持所述蛋白质的生物活性。“衍生物”可以进一步包含另外的天然存在的、改变的糖基化、酰化或者与天然存在形式的所述多肽的氨基酸序列相比为非天然存在的氨基酸残基。另外或者再有,与所述多肽的天然存在形式的氨基酸序列相比,衍生物可以包含一个或多个非氨基酸取代,例如报告分子或者其它配基,与氨基酸序列共价或非共价结合,例如其结合一个报告分子以便于检测。

[0130] 具有“免疫活性”意味着分子或其特定片段(例如特异性表位或半抗原)通过结合抗体而被识别。利用例如 Geysen 等人(1996)描述的肽扫描技术可确定特异性表位(Geysen, H. M., Rodda, S. J. 和 Mason, T. J. (1986). A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. Mol. Immunol. 23, 709-715.)。

[0131] 术语“序列的片段”或“序列的一部分”意思是所涉及的原始序列的截短序列。截短序列(核酸或蛋白质序列)长度可以变化很大;最小长度序列为足以提供至少与所涉及的原始序列具有类似的功能和/或活性的序列(例如“功能片段”),而最大长度并不关键。在某些应用中,最大长度通常基本上不大于提供所期望的原始序列的活性和/或功能所需要的长度。典型地,截短的氨基酸序列介于大约 5-60 个氨基酸长度。然而更典型地,序列最大为大约 50 个氨基酸长度,优选最大为大约 60 个氨基酸。通常希望选择至少约 10、12 或 15 个氨基酸、直至最大约 20 或 25 个氨基酸的序列。

[0132] 功能片段还可以包括那些包含对本发明蛋白质特异性的表位的片段。优选的功能片段长度至少为,例如 5、10、25、100、150 或 200 个氨基酸。

[0133] 因而应当理解,功能片段也可以是、或者不是免疫活性片段。

[0134] 在本发明上下文中包含上文明确的细胞分裂素氧化酶的同系物、衍生物、和/或免疫活性和/或功能片段。本发明预期使用的、特别优选的细胞分裂素氧化酶蛋白质的同系物、衍生物和/或免疫活性和/或功能片段来源于植物,更具体而言来源于鼠耳芥,再具体而言,所述细胞分裂素氧化酶是鼠耳芥 (At)CKX、或者能够任其中被表达。本发明显然包括 AtCKX 蛋白质的功能同系物或衍生物和/或免疫活性片段的应用,并不受限于利用编码所述 AtCKX 蛋白质的核苷酸序列的应用。

[0135] 可以在生物系统例如细胞培养中产生任何所述蛋白质、多肽、肽及其片段。另外,

可以化学方法制备任何所述蛋白质、多肽、肽及其片段,例如通过固相肽合成。所述蛋白质或其片段可以是融合蛋白质的一部分,例如双杂交试验中就是这样,其能够鉴定与本发明细胞分裂素氧化酶相互作用的蛋白质。

[0136] 该蛋白质或其片段另外用于例如调节本发明细胞分裂素氧化酶与利用本发明方法获得的蛋白质配偶体之间的相互作用。化学合成肽特别用于例如作为抗原来源以生产抗血清和/或抗体。“抗体”包括单克隆、多克隆、合成或重链 camel 抗体以及抗体片段,例如 Fab、Fv 或 scFv 片段。可以利用例如 Liddle 和 Cryer (1991) 所述技术制备单克隆抗体,其包含小鼠骨髓瘤细胞与来源于免疫动物的脾细胞融合。此外,可以利用例如 Harlow 和 Lane (1988) 所述方法获得分子或其片段的抗体或其片段。至于针对小肽(例如本发明蛋白质的片段)的抗体,通常在免疫动物以前,将该肽与载体蛋白质偶联。这样的蛋白质载体包括匙孔血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白以及破伤风类毒素。载体蛋白质增强动物的免疫反应,并为 T 细胞受体结合部位提供表位。术语“抗体”进一步包括其衍生物,例如标记的抗体。抗体标记物包括碱性磷酸酶、PKH2、PKH26、PKH67、荧光素(FITC)、Hoechst 33258、R-藻红蛋白(PE)、罗丹明(TRITC)、Quantum Red、Texas Red、Cy3、生物素、琼脂糖、过氧化物酶以及金球(gold spheres)。依赖蛋白质抗体的分子生物学工具包括蛋白质凝胶印迹分析、筛选表达文库进行基因鉴定、蛋白质定量方法(包括 ELISA 和 RIA)、蛋白质的免疫亲和纯化、蛋白质的免疫沉淀(例如参见实施例 6)以及免疫定位。抗体、特别是肽抗体的其它用途包括研究蛋白水解加工(Löffler 等人,1994, Woulfe 等人,1994)、确定蛋白质活性部位(Lerner 1982)、研究前体和翻译后加工(Baron 和 Baltimore 1982, Lerner 等人,1981, Semier 等人,1982)、鉴定蛋白质-蛋白质相互作用涉及的蛋白质结构域(Murakami 等人,1992)以及研究基因表达中外显子的使用(Tamura 等人,1991)。

[0137] 本发明包括特异性识别上文明确的细胞分裂素氧化酶或同系物、衍生物或其片段的抗体。该细胞分裂素氧化酶优选植物细胞分裂素氧化酶,更具体而言,是鼠耳芥细胞分裂素氧化酶(AtCKX)之一。

[0138] 此处所用术语“基因”、“多核苷酸”、“核酸”、“核酸序列”、“核苷酸序列”或“核酸分子”是指多聚体形式的任意长度核苷酸,或为核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或两者的组合。所述术语另外包括双链及单链 DNA 和 RNA。所述术语还包括已知的核苷酸修饰,例如甲基化、环化和‘戴帽’以及一个或多个天然存在的核苷酸替换为类似物,例如次黄苷。核苷酸修饰包括加成吡啶、胺、生物素、瀑布蓝(cascade blue)、胆固醇、**Cy3[®]**、**Cy5[®]**、**Cy5.5[®]** Dabcyl、地高辛配基、二硝基苯基、Edans、6-FAM、荧光素、3'-甘油基、HEX、IRD-700、IRD-800、JOE、磷酸补骨脂素、罗丹明、ROX、硫醇(SH)、隔离物、TAMRA、TET、**AMCA-S[®]**、SE、**BODIPY[®]**、Marina **Blue[®]**、Pacific **Blue[®]**、Oregon **Green[®]**、Rhodamine **Green[®]**、Rhodamine **Red[®]**、Rhodol **Green[®]** 和 Texas **Red[®]**。多核苷酸主链修饰包括磷酸甲酯、2'-OMe-磷酸甲酯 RNA、硫代磷酸酯、RNA、2'-OMeRNA。碱基修饰包括 2-氨基-dA、2-氨基嘌呤、3'-(ddA)、3'-dA(蛹虫草菌素)、7-脱氮-dA、8-Br-dA、8-oxo-dA、N⁶-Me-dA、无碱基位点(dSpacer)、生物素 dT、2'-OMe-SMe-C、2'-OMe-丙炔基-C、3'-(5-Me-dC)、3'-(ddC)、5-Br-dC、5-I-dC、5-Me-dC、5-F-dC、羧基-dT、可转换 dA、可转换 dC、可转换 dG、可转换 dT、可转换 dU、7-脱氮-dG、8-Br-dG、8-oxo-dG、O⁶-Me-dG、

S6-DNP-dG、4-甲基-吡啶、5-硝基吡啶、2'-OMe-次黄苷、2'-dI、0⁶-苯基-dI、4-甲基-吡啶、2'-脱氧水粉草素、5-硝基吡啶、2-氨基嘌呤、dP(嘌呤类似物)、dK(嘧啶类似物)、3-硝基吡咯、2-硫代-dT、4-硫代-dT、生物素-dT、羧基-dT、0⁴-Me-dT、0⁴-三唑 dT、2'-OMe-丙炔基-U、5-Br-dU、2'-dU、5-F-dU、5-I-dU、0⁴-三唑 dU。所述术语还包含肽核酸(PNA),一种DNA类似物,其中主链是假肽(pseudopeptide),其由N-(2-氨基乙基)-甘氨酸单元而非糖组成。PNA类似DNA的特性,结合核酸互补链。PNA的中性主链导致比通常获得的结合更牢、特异性更强。此外,PNA独特的化学、物理和生物学特性已经用于产生强大的生物分子工具、反义和反基因因子、分子探针以及生物传感器。本发明还方便地提供了至少约15个本发明核酸的连续核苷酸的核酸序列,并优选15-50个核苷酸。这些序列可以方便地用作探针,特异性与上文定义的本发明序列杂交,或者用作引物,特异性扩增或复制上文定义的本发明序列,等等。可按照本领域公知的技术(例如重组或合成方法)产生这样的核酸序列。它们也可用于诊断试剂盒等以检测本发明核酸的存在。该检测一般包括探针在杂交条件下与样品接触,检测探针与样品中任意核酸之间形成的任何双链或三链。

[0139] 可利用重组或合成方法方便地产生本发明的核酸序列,例如利用PCR克隆原理,其中一般包括制备一对引物,其可能为欲克隆基因区域的约15-50个核苷酸,将引物与细胞的mRNA、cDNA或基因组DNA接触,在使所要求区域扩增的条件下进行聚合酶链反应,分离扩增区域或片段,并回收扩增的DNA。此处所述的这种技术一般为本领域所公知,例如Sambrook等人所述(Molecular Cloning:a Laboratory Manual,1989)。

[0140] "编码序列"或"开放阅读框架"或"ORF"定义为在适当的控制序列或调节序列的控制下,即所述编码序列或ORF以表达形式存在时,能够转录为mRNA和/或翻译为多肽的核苷酸序列。所述ORF编码序列以5'翻译起始密码子和3'翻译终止密码子为界。编码序列或ORF可包括但不限于RNA、mRNA、cDNA、重组核苷酸序列、合成制备的核苷酸序列或基因组DNA。所述编码序列或ORF可被插入的核酸序列破坏。

[0141] 基本上编码相同蛋白质但分离自不同来源的基因和编码序列可以由基本上不同的核酸序列组成。相反,基本不同的核酸序列可以用来表达基本相同的蛋白质。所述核酸序列是由,例如给定基因存在不同的等位基因、遗传密码的简并性或密码子使用上的差异而造成。因而,如表2所示,氨基酸例如甲硫氨酸和色氨酸由单个密码子编码,而其它氨基酸例如精氨酸、亮氨酸和丝氨酸,各由多达6个不同的密码子翻译而成。根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)(一种细菌)、鼠耳芥(*A. thaliana*)、紫苜蓿(*M. sativa*)(两种双子叶植物)和稻(*Oryza sativa*)(一种单子叶植物)偏性密码子使用的差异如表3所示。选一个例子,密码子GGC(甘氨酸)在根癌土壤杆菌中为最常用密码子(36.2%),在稻中为第二常用密码子,而在鼠耳芥和紫苜蓿中的使用频率则低得多(分别为9%和8.4%)。编码甘氨酸的四种可能的密码子中(参见表2),根癌土壤杆菌和稻最偏性使用所述GGC密码子。然而,鼠耳芥使用GGA(和GGU)密码子,而紫苜蓿为GGU(和GGA)密码子。

[0142] 本发明确定的DNA序列可被插入序列破坏。"插入序列"是指破坏包含所述发明DNA序列的编码序列、或者破坏包含所述发明DNA序列的DNA序列的可表达形式的任何核酸序列。去除插入序列可恢复所述编码序列或所述可表达形式。插入序列的例子包括内含子以及可移动的DNA序列,例如转座子。"可移动的DNA序列"是指能够由于重组事件而移动的任何DNA序列。

[0143] 表 2. 遗传密码的简并性

[0144]

氨基酸	三字母 代码	单字母 代码	可能的密码子					
丙氨酸	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
精氨酸	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
天门冬酰胺	Asn	N	AAC	AAU				
天冬氨酸	Asp	D	GAC	GAU				
半胱氨酸	Cys	C	UGC	UGU				
谷氨酸	Glu	E	GAA	GAG				
谷氨酰胺	Gln	Q	CAA	CAG				
甘氨酸	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU		
组氨酸	His	H	CAC	CAU				
异亮氨酸	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
亮氨酸	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
赖氨酸	Lys	K	AAA	AAG				
甲硫氨酸	Met	M	AUG					
苯丙氨酸	Phe	F	UUC	UUU				
脯氨酸	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
丝氨酸	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
苏氨酸	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
色氨酸	Trp	W	UGG					
酪氨酸	Tyr	Y	UAC	UAU				
缬氨酸	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
			可能的"终止"密码子					
			UAA	UAG	UGA			

[0145] 表 3. 不同生物中指定密码子的使用

[0146] 按每千个密码子的频率给出 (<http://www.kazusa.or.jp/codon>)

[0147]

密码子	根癌土壤杆菌	鼠耳芥	紫苜蓿	稻
UUU	13.9	22.5	24.1	11.3
UUC	24.3	20.7	16.9	26.3
UUA	3.5	12.9	10.4	4.7
UUG	13.2	21.0	22.4	11.8
UCU	7.0	24.6	19.8	10.1
UCC	14.8	10.8	7.7	16.9
UCA	7.4	17.8	17.2	9.7
UCG	18.2	8.9	3.2	10.8
UAU	12.3	15.2	16.6	9.2
UAC	10.3	13.7	14.0	20.6
UAA	0.9	0.9	1.2	0.9
UAG	0.6	0.5	0.8	0.8
UGU	3.0	10.8	10.6	5.0
UGC	7.4	7.2	5.8	14.3
UGA	1.8	1.0	0.8	1.3
UGG	12.2	12.7	10.0	12.8
CUU	19.1	24.3	28.3	14.6
CUC	25.7	15.9	12.0	28.0
CUA	5.2	10.0	8.8	5.7
CUG	31.6	9.9	8.5	22.1
CCU	7.7	18.3	23.2	11.8
CCC	10.6	5.3	5.3	12.5
CCA	8.9	16.1	22.6	12.2

CCG	20.7	8.3	3.6	16.7
CAU	10.6	14.0	14.6	9.2
CAC	9.1	8.7	9.1	14.6
CAA	11.2	19.7	23.2	11.9
CAG	24.9	15.2	12.3	24.6
CGU	12.2	8.9	10.1	6.8
CGC	25.5	3.7	4.2	15.9
CGA	8.2	6.2	4.2	4.2
CGG	13.2	4.8	1.8	9.7
AUU	15.4	22.0	29.4	13.8
AUC	36.9	18.5	14.7	25.5
AUA	6.2	12.9	11.7	7.2
AUG	24.7	24.5	21.7	24.4
ACU	6.4	17.8	20.8	10.3
ACC	20.9	10.3	11.7	18.6
ACA	9.1	15.9	18.9	10.0
ACG	18.8	7.6	2.8	10.8
AAU	13.5	22.7	25.0	12.9
AAC	18.7	20.9	18.7	25.1
AAA	13.6	31.0	32.2	12.0
AAG	24.4	32.6	35.1	39.4
AGU	5.7	14.0	12.6	7.3
AGC	15.8	11.1	8.8	16.9
AGA	5.3	18.7	13.6	7.7

AGG	6.5	10.9	11.7	14.9
GUU	16.6	27.3	34.7	15.0
GUC	29.3	12.7	9.9	22.8
GUA	6.1	10.1	10.0	5.7
GUG	19.7	17.5	16.5	25.0
GCU	17.4	28.0	34.6	19.8
GCC	35.8	10.3	11.4	33.2
GCA	19.5	17.6	25.9	15.6
GCG	31.7	8.8	3.4	25.3
GAU	25.8	36.8	40.0	21.5
GAC	28.0	17.3	15.5	31.6
GAA	29.9	34.4	35.9	17.1
GAG	26.3	32.2	27.4	41.1
GGU	16.5	22.2	28.7	16.3
GGC	36.2	9.0	8.4	34.7
GGA	12.5	23.9	27.3	15.0
GGG	11.3	10.2	7.4	16.6

[0148]

[0149]

[0150] “杂交”是基本上同源的互补核苷酸序列互相退火的过程。杂交过程能够完全在溶液中进行,即互补核酸双方都处于溶液中。依赖此过程的分子生物学方法包括 PCR、消减杂交以及 DNA 序列测定。将一条互补核酸固定到基质(例如磁珠、Sepharose 珠或其它任何树脂)上,也能发生杂交过程。依赖此过程的分子生物学方法包括分离 poly(A⁺)mRNA。此外,将一条互补核酸固定到固相支持物,例如硝化纤维或尼龙膜、或通过例如光蚀刻技术(photolithography)固定到硅质玻璃支持物(后者即核酸阵列或微阵列或核酸芯片),能够发生杂交过程。依赖此过程的分子生物学方法包括 RNA 和 DNA 凝胶印迹分析、集落杂交、噬斑杂交以及微阵列杂交。为了使杂交发生,一般核酸分子通过热或化学(例如用 NaOH)变性,双链解链为两条单链和/或去除单链核酸的发夹或其它二级结构。杂交的严谨性受例

如温度、盐浓度和杂交缓冲液成分等条件的影响。高严谨性杂交条件包括高温、和 / 或低盐浓度（盐包括 NaCl 和 Na₃- 柠檬酸）、和 / 或杂交缓冲液中包含甲酰胺、和 / 或降低杂交缓冲液中化合物例如 SDS（去污剂）的浓度、和 / 或排除杂交缓冲液中化合物例如硫酸葡聚糖或聚乙二醇（促进分子聚集）。常规杂交条件为 Sambrook 等人所述（1989），但技术人员应当理解，根据已知的或预期的同源性功能性和 / 或核酸序列的长度可以设计许多不同的杂交条件。特别优选严谨性足够低的杂交条件，以分离与上述本发明 DNA 序列异源的核酸。促成所述异源性的因素包括等位性、遗传密码简并性以及上述偏性密码子使用的差异。

[0151] 显然，本发明包含前述本发明编码细胞分裂素氧化酶、其同系物、衍生物或免疫活性和 / 或功能片段的 DNA 序列在任何杂交方法中的应用。此外，本发明也涉及与所述发明的 DNA 序列杂交的 DNA 序列。该细胞分裂素氧化酶优选植物细胞分裂素氧化酶，更具体而言，是鼠耳芥（At）CKX。

[0152] 为在（优选植物来源的）细胞、组织或器官中实现蛋白质表达，该蛋白质可以通过例如显微注射或冲击方法直接引入所述细胞中，或者另外地，可以将编码该蛋白质的分离的核酸分子以可表达形式引入所述细胞、组织或器官中。

[0153] 本发明 DNA 序列优选包含编码上述细胞分裂素氧化酶蛋白质、或其同系物或衍生物、或其免疫活性和 / 或功能片段的编码序列或开放阅读框架（ORF）。本发明优选的蛋白质包含所述细胞分裂素氧化酶的氨基酸序列。所述细胞分裂素氧化酶优选植物细胞分裂素氧化酶，更具体而言，是鼠耳芥（At）CKX。

[0154] “载体”或“载体序列”是指可以通过转化引入生物体并可在该生物体中稳定维持的 DNA 序列。例如，有可能在大肠杆菌（*Escherichia coli*）、根瘤土壤杆菌（*A. tumefaciens*）、酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）或裂殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）的培养物中维持载体。其它载体，例如噬菌粒（phagemid）和粘粒载体可以在细菌和 / 或病毒中维持并繁殖。载体序列一般包含一套限制酶识别的唯一位点、多克隆位点（MCS），其中可以插入一个或多个非载体序列。

[0155] 因此，“非载体序列”是指整合到载体所含 MCS 的一个或多个位点中的 DNA 序列。

[0156] “表达载体”构成载体的亚类，其由于包含适当的调节或控制序列，将插入的非载体序列形成可表达形式，从而使所述非载体序列编码的蛋白质表达。表达载体为本领域已知，可使蛋白质在包括细菌（例如大肠杆菌）、真菌（例如啤酒酵母、裂殖酵母、巴斯德毕赤氏酵母）、昆虫细胞（例如杆状病毒表达载体）、动物细胞（例如 COS 或 CHO 细胞）以及植物细胞（例如基于马铃薯 X 病毒的表达载体）的生物体中表达。在本发明显然包含上述任何细胞分裂素氧化酶、同系物、衍生物、和 / 或免疫活性和 / 或功能片段。所述细胞分裂素氧化酶优选植物细胞分裂素氧化酶，更具体而言，是鼠耳芥（At）CKX。

[0157] 作为生物系统中以表达载体介导蛋白质生产的替代方案，可以应用蛋白质的化学合成。可以在液相或固相中制造合成肽。然而肽固相合成（Merrifield 1963）是最常见的方式，包括连续加成氨基酸以形成线性肽链。固相肽合成包括由三个步骤组成的循环：(i) 将生长中肽链的羧基端氨基酸固定到固相支持物或树脂上；(ii) 链装配过程，由将要加成到生长中肽链上的氨基酸的活化、偶联以及去保护组成；以及 (iii) 断裂，包括从树脂上去除完成的肽链，并从氨基酸侧链上去除保护基团。常见的肽固相合成方法包括，将 Fmoc/tBu（9- 芴甲氧羰基 / t- 叔丁基）和 Boc（t- 叔丁氧羰基）用作氨基酸的氨基端保护

基团。氨基酸侧链保护基团包括甲基 (Me)、甲酰基 (CHO)、乙基 (Et)、乙酰基 (Ac)、*t*-叔丁基 (*t*-Bu)、甲氧苯基、苄基 (Bzl)、三氟乙酰基 (Tfa)、*N*-羟基丁二酰亚胺 (ONSu, OSu)、苯甲酰基 (Bz)、4-甲苄基 (Meb)、硫茴香基 (thioanizyl)、硫甲苯基 (thiocresyl)、苄氧甲基 (Bom)、4-硝基苯基 (ONp)、苄氧羰基 (Z)、2-硝基苯甲酰基 (NBz)、2-硝基苯硫苯基 (Nps)、4-甲苄磺酰基 (Tosyl, Tos)、五氟苯基 (Pfp)、二苯甲基 (Dpm)、2-氯苄氧基羰基 (CI-Z)、2,4,5-三氯苯基、2-溴苄氧基羰基 (Br-Z)、三苯甲基 (Trityl, Trt) 以及 2,5,7,8-五甲基-苯并二氢吡喃-6-磺酰 (Pmc)。链装配过程中, 去除 Fmoc 或 Boc 引起结合生长中链的氨基酸残基的氨基端活化。新进氨基酸的羧基端通过转变为高反应性的酯 (例如通过 HBTU) 而活化。利用现有技术 (例如 PerSeptive Biosystems 9050 合成仪, Applied Biosystems Model 431A Peptide Synthesizer), 可以制备多达 50 个残基的线性肽。许多指导原则可以用来生产适于生物系统使用的肽, 包括 (i) 限制使用不利的氨基酸, 例如 cys、met、trp (在肽合成期间容易氧化和 / 或降解) 或 arg; (ii) 最少使用疏水氨基酸 (可降低肽的可溶性); 以及 (iii) 防止氨基端的谷氨酸 (可环化为焦谷氨酸)。

[0158] “可表达形式”是指分离的核酸分子或者组成型、或者经胞内或胞外信号 (例如环境刺激或压力 (有丝分裂原、缺氧、低氧、温度、盐、光、脱水等)、或者化合物例如 IPTG (异丙基- β -D-硫代半乳糖苷)、或者例如抗生素 (四环素、氨基青霉素、利福平、卡那霉素)、激素 (例如赤霉素、植物生长素、细胞分裂素、糖皮质激素、brassinosteroid、乙烯、脱落酸等)、激素类似物 (吲哚乙酸 (IAA)、2,4-D 等)、金属 (锌、铜、铁等)、或者地塞米松等) 诱导后, 处于适合转录为 mRNA 和 / 或翻译以产生蛋白质的形式。如本领域技术人员所知, 表达功能蛋白质可能还需要一种或多种翻译后修饰, 例如糖基化、磷酸化、去磷酸化、或者一种或多种蛋白质-蛋白质的相互作用等。所有这类过程都包括在术语“可表达形式”的范畴之内。

[0159] 在优选植物来源的特定细胞、组织或器官中实现一种蛋白质的表达, 优选地通过在所述细胞、组织或器官中引入并表达编码所述蛋白质的分离的核酸分子, 例如 cDNA 分子、基因组基因、合成的寡核苷酸分子、mRNA 分子或者开放阅读框架, 其中所述核酸分子有效地连接适当的调节或控制序列, 包括启动子 (优选植物可表达的启动子) 以及终止子序列。

[0160] 此处涉及的“启动子”将利用其广义, 包括来源于传统真核基因组基因的转录调节序列, 包括准确起始转录所需的 TATA 盒、有或没有 CCAAT 盒以及响应发育和 / 或外界刺激、或者以组织特异性方式改变基因表达的另外的调节或控制成分 (即上游活化序列、增强子和沉默子)。

[0161] 术语“启动子”还包括传统原核基因的转录调节序列, 在这种情况下可能包括 -35 盒序列和 / 或 -10 盒转录调节序列。

[0162] 术语“启动子”还用于描述引起细胞、组织或器官中核酸分子表达活化或增强的合成的或者融合分子、或衍生物。

[0163] 启动子可以包含另外的一种或多种特异性调节成分的拷贝, 以进一步增强与其有效相连的核酸分子的表达和 / 或改变其空间上和 / 或时间上的表达。这种调节成分可置于异源启动子序列邻近以应答例如铜、糖皮质激素、地塞米松、四环素、赤霉素、cAMP、脱落酸、植物生长素、创伤、乙烯、茉莉酮酸酯或水杨酸而驱动核酸分子的表达, 或者使核酸分子在

特定细胞、组织或器官例如分生组织、叶、根、胚、花、种子或果实中表达。

[0164] 在本发明范围内,启动子优选植物可表达的启动子序列。本发明并不排除也在或仅在非植物细胞中(例如细菌、酵母细胞、昆虫细胞和动物细胞)有功能的启动子。“植物可表达”是指至少能够诱导、赋予、活化或者增强植物细胞、组织或器官优选单子叶或双子叶植物细胞、组织或器官中表达的启动子序列,包括其中加入或包含的任何另外的调节成分。

[0165] 此处所用关于启动子序列的术语“植物可操作”以及“可在植物中操作”,应当认为等同于植物可表达的启动子序列。

[0166] 作为双病毒植物表达系统的一部分,可调节启动子也为技术人员所知(Yadav 1999-W09922003 ;Yadav 2000-W00017365)。

[0167] 在目前范围内,“可调节启动子序列”是能够使结构基因于特定条件下在植物特定细胞、组织或器官、或者细胞、组织或器官群中表达、但在所有条件下一般不使其表达遍及整个植物的启动子。因此,可调节启动子序列可能是使与其有效连接的基因在植物内特定位点、或者于特定条件组合下(例如通过化合物或其它激发子(elicitor)诱导基因表达)使其在整个植物中表达的启动子序列。

[0168] 用于实现本发明的可调节启动子,优选或组成型或诱导以后在植物内特定位点引起表达、但无论如何不在整个植物中引起表达。在此种启动子的范畴内,包括细胞特异性启动子序列、组织特异性启动子序列、器官特异性启动子序列、细胞周期特异性基因启动子序列、可诱导启动子序列以及已经改造为可在任一时刻于植物特定部分引起表达的组成型启动子序列,例如将所述组成型启动子整合入可转座的遗传因子(Ac, Ds, Spm, En 或其它转座子)内部。

[0169] 类似地,应当认为术语“组织特异性”表示主要在(优选植物来源的)特定组织或组织类型中表达,虽然不一定仅仅位于所述组织或组织类型。

[0170] 类似地,应当认为术语“器官特异性”表示主要在(优选植物来源的)特定器官中表达,虽然不一定仅仅位于所述器官。

[0171] 类似地,应当认为术语“细胞周期特异性”表示主要周期性表达于(优选植物来源的)细胞周期一个或多个不一定连续的阶段,虽然不一定仅仅位于周期细胞中。

[0172] 本领域技术人员应当知道,“可诱导型启动子”是应答发育、化学、环境或物理刺激而增强或诱导转录活性的启动子。类似地,技术人员应当理解,“组成型启动子”是在生物体(优选植物)的大部分、而不一定所有部分中,于其生长和发育的大部分、而不一定所有阶段中具有转录活性的启动子。

[0173] 本领域技术人员能轻易地从公开或易于利用的资源中选择适当的启动子序列用于调节细胞分裂素氧化酶蛋白质的适度表达,无需过分实验。

[0174] 将核酸分子置于启动子序列的调节控制之下或者与启动子序列有效连接,是指放置所述核酸分子使其表达受启动子序列控制。启动子通常、但不一定位于所调节核酸分子的上游、或5'端,并在转录开始位点的2kb之内。在异源启动子/结构基因组合的构建中,一般优选将启动子置于与基因转录开始位点隔一段距离,大约等同于天然状态中启动子与其控制的基因(即,该启动子来源于的基因)之间的距离。如本领域已知,可以适应距离上的一些变化,而不损失启动子的功能。类似地,调节序列成分相对于处于其控制下的异源基

因的优选位置由天然状态中该成分的位置确定（即，其来源于的基因）。此外，如本领域已知，还可以存在一些距离上的变化。

[0175] 适于本发明基因构建体使用的启动子的例子包括表 4 所列等。仅为例证目的提供表 4 所列启动子，本发明不受其提供的列表限制。本领域技术人员应容易提供另外的可用于实现本发明的启动子。

[0176] 至于组成型启动子或者在整个植物中诱导表达的启动子，其优选通过加入来源于一个或多个表 4 所列组织特异性启动子的核苷酸序列、或者来源于一个或多个上述组织特异性可诱导启动子的核苷酸序列，从而改变该序列，以赋予了组织特异性。例如，如先前所述，通过加入玉米 Adh1 启动子序列可改变 CaMV 35S 启动子带来厌氧调节的根特异性表达 (Ellis 等人, 1987)。另一个例子描述了通过将 CaMV35S 启动子与玉米富含甘氨酸蛋白质 GRP3 基因的成分融合，带来根特异性或根丰富性的基因表达 (Feix 和 Wulff 2000-W00015662)。本领域技术人员可以通过常规实验获得这种修饰。

[0177] 术语“终止子”是指转录单位末端的 DNA 序列，提供转录终止信号。终止子是包含多聚腺苷酸信号的 3' 非翻译 DNA 序列，其促进在原始转录物的 3' 端添加多聚腺苷酸序列。在来自病毒、酵母、霉菌、细菌、昆虫、鸟类、哺乳动物和植物的细胞中的活性终止子已知并在文献中进行了描述。它们可分离自细菌、真菌、病毒、动物和 / 或植物。

[0178] 表 4. 用于实现本发明的代表性的植物可表达启动子

[0179]

I: 细胞特异性、组织特异性和器官特异性启动子		
基因来源	表达模式	参考文献
α -淀粉酶 (<i>Amy32b</i>)	糊粉	Lanahan, M.B. 等人, <i>Plant Cell</i> 4: 203-211, 1992; Skriver, K 等人, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)</i> 88: 7266-7270, 1991
组织蛋白酶 β -样基因	糊粉	Cejudo, F.J. 等人, <i>Plant Molecular Biology</i> 20:849-856, 1992.
发根农杆菌(<i>Agrobacterium rhizogenes</i>) <i>rolB</i>	形成层	Nilsson 等人, <i>Physiol. Plant.</i> 100:456-462, 1997
AtPRP4	花	http://salus.medium.edu/mmgtierney/html
苯基苯乙烯酮合成酶 (<i>chsA</i>)	花	Van der Meer 等人, <i>Plant Mot. Biol.</i> 15,95-109,1990.
LAT52	花药	Twel 等人, <i>Mol. Gen Genet.</i> 217:240-245(1989)

[0180]

<i>apetala-3</i>	花	
几丁质酶	果实(浆果、葡萄等)	Thomas等人, <i>CSIRO Plant Industry</i> , Urrbrae, South Australia, Australia; http://winetitles.com.au/gwrde/csh95-1.html
<i>rbcs-3A</i>	绿色组织(例如叶子)	Lam, E.等人, <i>The Plant Cell</i> 2:857- 866, 1990.; Tucker等人, <i>Plant Physiol.</i> 113:1303-1308,1992.
叶特异性基因	叶子	Baszczynski等人, <i>Nucl. Acid Res.</i> 16:4732,1988.
<i>AtPRP4</i>	叶子	http://salus.med.umd.edu/mmg/tierney/html
小球藻病毒腺嘌呤甲基转移酶基因启动子	叶子	Mitra和Higgins, 1994, <i>Plant Molecular Biology</i> 26: 85-93
<i>aldP</i> 稻基因启动子	叶子	Kagaya等人, 1995, <i>Molecular and General Genetics</i> 248: 668-674
<i>rbcs</i> 稻或番茄启动子	叶子	Kyozuka等人, 1993, <i>Plant Physiology</i> 102: 991-1000
松 <i>cab-6</i>	叶子	Yamamoto等人, <i>Plant Cell Physiol.</i> 35: 773-778,1994.
核酮糖二磷酸羧化酶-加氧酶启动子	叶子	
<i>cab</i> (叶绿素a/b/结合蛋白质)	叶子	
<i>SAM22</i>	衰老叶子	Crowell等人, <i>Plant Mol. Biol.</i> 18: 459-466, 1992.
<i>Itp</i> 基因(脂质转移基因)		Fleming等人, <i>Plant J.</i> 2, 855-862.
<i>R. japonicum nif</i> 基因	根瘤	美国专利号 4,803,165
<i>B. japonicum nifH</i> 基因	根瘤	美国专利号5,008,194
<i>GmENOD40</i>	根瘤	Yang等人, <i>The Plant J.</i> 3: 573-585.
PEP羧化酶(PEPC)	根瘤	Pathirana等人, <i>Plant Mol. Biol.</i> 20: 437-450,1992.
豆血红蛋白(Lb)	根瘤	Gordon等人, <i>J. Exp. Bot.</i> 44:1453- 1465,1993.
Tungro杆状病毒基因	韧皮部	Bhattacharyya-Pakrasi等人, <i>The Plant J.</i> 4: 71-79, 1992.
花粉特异性基因	花粉; 小孢子	Albani等人, <i>Plant Mol. Biol.</i> 15: 605, 1990; Albani等人, <i>Plant Mol. Biol.</i> 16: 501, 1991)
<i>Zm13</i>	花粉	Guerrero等人, <i>Mol. Gen. Genet.</i> 224:161-168 (1993)

[0181]

apg基因	小孢子	Twel等人, Sex. Plant Reprod. 6:217- 224(1993)
玉米花粉特异性基因	花粉	Hamilton等人, Plant Mol. Biol. 18: 211-218,1992.
向日葵花粉表达基因	花粉	Baltz等人, The Plant J. 2: 713-721, 1992.
B. napus花粉特异性基因	花粉; 花药; 绒毡层	Arnoldo等人, J. Cell. Biochem, Abstract No. Y101, 204, 1992.
根可表达基因	根	Tingey等人, EMBO J. 6: 1, 1987.
烟草植物生长素可诱导基因	根尖	Van der Zaal等人, Plant Mol. Biol. 16, 983, 1991.
β -微管蛋白	根	Oppenheimer等人, Gene 63: 87, 1988.
烟草根特异性基因	根	Conkling等人, Plant Physiol. 93: 1203, 1990.
B. napus G1-3b基因	根	美国专利号5, 401, 836
SbPRP1	根	Suzuki等人, Plant Mol. Biol. 21: 109- 119,1993.
AtPRP1; AtPRP3	根; 根毛	http://salus.medium.edu/mmg/tierney/ html
RD2 gene	根皮层	http://www2.cnsu.edu/ncsu/research
TobRB7基因	根脉管系统	http://www2.cnsu.edu/ncsu/research
AtPRP4	叶子; 花; 侧根原基	http://salus.medium.edu/mmg/tierney/ html
种子特异性基因	种子	Simon等人, Plant Mol. Biol. 5: 191, 1985; Scofield等人, J. Biol. Chem. 262: 12202, 1987.; Baszczynski等人, Plant Mol. Biol. 14:633,1990.
巴西果白蛋白	种子	Pearson等人, Plant Mol. Biol. 18: 235-245,1992.
豆球蛋白	种子	Ellis等人, Plant Mol. Biol. 10: 203- 214,1988.
谷蛋白(稻)	种子	Takaiwa等人, Mol. Gen. Genet. 208: 15-22, 1986; Takaiwa等人, FEBS Letts. 221: 43-47, 1987.
玉米醇溶蛋白	种子	Matzke等人, Plant Mol Biol, 14(3):323-32 1990
NapA	种子	Stalberg等人, Planta 199: 515-519, 1996.
小麦LMW和HMW麦谷蛋白-1	内胚乳	Mol Gen Genet 216:81-90,1989; NAR 17:461-2,1989
小麦SPA	种子	Albani等人, Plant Cell, 9: 171-184, 1997
小麦 α β -麦醇溶蛋白	内胚乳	EMBO 3:1409-15,1984

[0182]

大麦ltri启动子	内胚乳	
大麦B1, C, D,大麦醇溶蛋白	内胚乳	Theor Appl Gen 98:1253-62,1999; Plant J 4:343-55,1993; Moll Gen Genet 250:750-60, 1996
大麦DOF	内胚乳	Mena等人, The Plant Journal, 116(1): 53-62,1998
<i>Blz2</i>	内胚乳	EP99106056.7
合成启动子	内胚乳	Vicente-Carbajosa等人, <i>Plant J. 13</i> : 629-640,1998.
稻谷醇溶蛋白NRP33	内胚乳	Wu等人, <i>Plant Cell Physiology</i> 39(8) 885-889,1998
稻 α -球蛋白Glb-1	内胚乳	Wu等人, <i>Plant Cell Physiology</i> 39(8) 885-889,1998
稻OSHI	胚	Sato 等人, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 93: 8117-8122,1996
稻 α -球蛋白REB/OHP-1	内胚乳	Nakase等人, <i>Plant Mol. Biol.</i> 33: 513-522, 1997
稻ADP-葡萄糖PP	内胚乳	<i>Trans Res</i> 6:157-68,1997
玉米ESR基因家族	内胚乳	<i>Plant J</i> 12:235-46, 1997
高粱 γ -高粱醇溶蛋白	内胚乳	<i>PMB</i> 32:1029-35,1996
KNOX	胚	Postma-Haarsma 等人, <i>Plant Mol. Biol.</i> 39:257-71, 1999
稻油膜蛋白(oleosin)	胚和糊粉	Wu等人, <i>J. Biochem.</i> , 123:386, 1998
向日葵油膜蛋白oleosin	种子(胚和干种子)	Cummins等人, <i>Plant Mol. Biol.</i> 19: 873-876,1992
<i>LEAFY</i>	枝条分生组织	Weigel等人, <i>Cell</i> 69:843-859, 1992.
鼠耳芥 <i>knati</i>	枝条分生组织	登录号AJ131822
苹果(<i>Malus domestica</i>) <i>kn1</i>	枝条分生组织	登录号Z71981
<i>CLAVATA1</i>	枝条分生组织	登录号AF049870
柱头特异性基因	柱头	Nasrallah等人, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 85: 5551, 1988; Trick等人, <i>Plant Mol. Biol.</i> 15:203,1990.
I型马铃薯块茎蛋白(patatin)基因	块茎	Liu等人, <i>Plant Mol. Biol.</i> 153:386-395,1991.
PCNA稻	分生组织	Kosugi 等人, <i>Nucleic Acids Research</i> 19:1571-1576, 1991; Kosugi S.和Ohashi Y, <i>Plant Cell</i> 9:1607-1619,

[0183]

		1997.
豌豆TubAl微管蛋白	分裂细胞	Stotz和Long, <i>Plant Mol.Biol.</i> 41, 601-614.1999
鼠耳芥属cdc2a	周期细胞	Chung和Parish, <i>FEBS Lett</i> , 3;362(2):215-9,1995
鼠耳芥属Rop1 A	花药; 成熟花粉+ 花粉管	Li等人, 1998 <i>Plant Physiol</i> 118, 407-417.
鼠耳芥属AtDMC1	减数分裂相关的	Klimyuk和Jones 1997 <i>Plant J.</i> 11, 1-14.
豌豆PS-IAA4/5和PS-IAA6	植物生长素可诱 导的	Wong等人, 1996 <i>Plant J.</i> 9, 587-599.
豌豆法呢基转移酶	分生组织; 韧皮 部邻近生长组 织; 光和糖抑制	Zhou等人, 1997 <i>Plant J.</i> 12, 921-930
烟草(<i>N. sylvestris</i>)细胞周期蛋白B1;1	分裂细胞/分生组 织	Trehin等人, 1997 <i>Plant Mot Biol.</i> 35, 667-672.
长春花(<i>Catharanthus roseus</i>)有丝分 裂细胞周期蛋白CYS(A型)和 CYM(B型)	分裂细胞/分生组 织	Ito等人, 1997 <i>Plant J.</i> 11, 983-992
鼠耳芥属cyc1At(=cyc B1;1)和 cyc3aAt(A型)	分裂细胞/分生组 织	Shaul 等 人 , 1996 <i>Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A</i> 93, 4868-4872.
鼠耳芥属tefl启动子盒	分裂细胞/分生组 织	Regad等人, 1995 <i>Mol.Gen.Genet.</i> 248, 703-711.
长春花cyc07	分裂细胞/分生组 织	Ito等人, 1994 <i>Plant Mol.Biol.</i> 24, 863-878.

[0184] 表 4(续)。用于实现本发明的代表性的植物可表达启动子

[0185]

II: 代表性组成型启动子		
基因来源	表达模式	参考文献
肌动蛋白	组成型	McElroy 等人, Plant Cell, 2: 163-171,1990
CAMV 35S	组成型	Odell 等人, Nature, 313: 810-812, 1985
CaMV 19S	组成型	Nilsson 等人, Physiol. Plant. 100:456-462,1997
GOS2	组成型	de Pater 等人, Plant J. 2:837-844, 1992
泛素	组成型	Christensen 等人, Plant Mol. Biol. 18: 675-689,1992
稻亲环蛋白 (cyclophilin)	组成型	Buchholz 等人, Plant Mol Biol. 25: 837-843,1994
玉米组蛋白 H3	组成型	Lepetit 等人, Mol. Gen. Genet. 231:276-285,1992
紫花苜蓿(alfalfa) 组蛋白 H3	组成型	Wu 等人, Nucleic Acids Res. 17: 3057-3063, 1989; Wu 等人, Plant Mol. Biol. 11:641-649,1988
肌动蛋白 2	组成型	An 等人, Plant J. 10(1); 107-121, 1996

[0186] 表 4(续)。用于实现本发明的代表性的植物可表达启动子

[0187]

III: 代表性压力诱导型启动子		
名称	压力	参考文献
P5CS (δ(1)-吡咯啉-5-羧酸酯合酶)	盐、水	Zhang 等人, Plant Science. 129: 81-89, 1997
cor15a	寒冷	Hajela 等人, Plant Physiol. 93: 1246-1252, 1990
Cor 5b	寒冷	Wlilhelm 等人, Plant Mol Biol. 23:1073-1077, 1993
cor15a (-305 to +78nt nt)	寒冷、干旱	Baker 等人, Plant Mol Biol. 24: 701-713, 1994
rd29	盐、干旱、寒冷	Kasuga 等人, Nature Biotechnology 18:287-291, 1999
热休克蛋白质, 包括含有热休克成分(HSE)的人工启动子	热	Barros 等人, Plant Mol Biol 19: 665-75, 1992. Marrs 等人, Dev Genet.14: 27-41, 1993. Schoffl 等人, Mol Gen Gent, 217:246-53, 1989.
smHSP (小热休克蛋白质)	热	Waters 等人, J Experimental Botany 47:325-338, 1996
Wcs120	寒冷	Ouellet 等人, FEBS Lett. 423: 324-328, 1998
ci7	寒冷	Kirch 等人, Plant Mol Biol 33: 897-909, 1997
Adh	寒冷、干旱、低氧	Dolferus 等人, Plant Physiol 105: 1075-87, 1994
pwsil 8	寒冷、盐和干旱	Joshee 等人, Plant Cell Physiol 39: 64-72, 1998
ci21A	寒冷	Schneider 等人, Plant Physiol 113: 335-45, 1997
Trg-31	干旱	Chaudhary 等人, Plant Mol Biol 30: 1247-57, 1996
渗透蛋白	渗透	Raghothama 等人, Plant Mol Biol 23:1117-28, 1993
Rab17	渗透、ABA	Vilardell 等人, Plant Mol Biol 17: 985-93, 1991
lapA	创伤、环境	W099/03977 University of California/INRA

[0188] 表 4(续)。用于实现本发明的代表性的植物可表达启动子

[0189]

IV: 代表性病原体诱导型启动子		
名称	病原体	参考文献
RB7	根癌线虫 (<i>Meloidogyne</i> spp.)	US5760386 - North Carolina State University; Opperman 等人, (1994) <i>Science</i> 263: 221-23.
PR-1, 2, 3, 4, 5, 8, 11	真菌、病毒、细菌	Ward 等人(1991) <i>Plant Cell</i> 3: 1085-1094; Reiss 等人, 1996; Lebel 等人, (1998), <i>Plant J</i> , 16(2):223-33; Melchers 等人, (1994), <i>Plant J</i> , 5(4):469-80; Lawton 等人, (1992), <i>Plant Mol Biol</i> , 19(5):735-43.
HMG2	线虫	W09503690 - Virginia Tech Intellectual Properties Inc .
Abi3	包囊线虫 (<i>Heterodera</i> spp.) (<i>Heterodera</i> spp.)	未发表
ARM1	线虫	Barthels 等人, (1997) <i>The Plant Cell</i> 9, 2119-2134. WO 98/31822 - Plant Genetic Systems
Att0728	线虫	Barthels 等人, (1997) <i>The Plant Cell</i> 9, 2119-2134. <i>PCT/EP98/07761</i>
Att1712	线虫	Barthels 等人, (1997) <i>The Plant Cell</i> 9, 2119-2134. <i>PCT/EP98/07761</i>
GstI	不同种类病原体	Strittmatter 等人, (1996) <i>Mol. Plant-Microbe Interact.</i> 9, 68-73.
LEMMI	线虫	WO 92/21757- <i>Plant Genetic Systems</i>
CLE	双生病毒	<i>PCT/EP99/03445 - CINESTAV</i>
PDF1.2	真菌, 包括甘蓝链格孢 (<i>Alternaria brassicicola</i>) 和灰色葡萄孢 (<i>Botrytis cinerea</i>)	Manners 等人, (1998), <i>Plant Mol Biol</i> , 38(6):1071-80.

[0190]

Thi2.1	真菌 - <i>Fusarium oxysporum f sp.matthiolar matthiolar</i>	Vignutelli 等人, (1998) Plant J;14(3):285-95
DB#226	线虫	Bird 和 Wilson (1994) Mol. Plant-Microbe Interact., 7, 419-42 WO 95.322888
DB#280	线虫	Bird 和 Wilson (1994) Mol. Plant-Microbe Interact., 7, 419-42 WO 95.322888
Cat2	线虫	Niebel 等人, (1995) Mol Plant Microbe Interact 1995 May-Jun;8(3):371-8
DTub	线虫	Aristizabal 等人, (1996), 8 th International Congress on Plant-Microbe Interaction, Knoxville US B-29
SHSP	线虫	Fenoll 等人, (1997) In: Cellular and molecular aspects of plant-nematode interactions. Kluwer Academic, C. Fenoll, F.M.W. Grundler and S.A. Ohl (Eds.),
Tsw12	线虫	Fenoll 等人, (1997) In: Cellular and molecular aspects of plant-nematode interactions. Kluwer Academic, C. Fenoll, F.M.W. Grundler and S.A. Ohl (Eds.)
Hs1(proi)	线虫	WO 98/122335 - Jung
NsLTP	病毒、真菌、细菌	Molina & Garc'ia-Olmedo (1993) FEBS Lett, 316(2):119-22
RIP	病毒、真菌	Turner 等人, (1997) Proc Natl Acad Sci U S A, 94(8):3866-71

[0191] 特别适用于本发明基因构建体的终止子的例子包括根癌土壤杆菌胭脂碱合酶 (NOS) 基因终止子、根癌土壤杆菌章鱼碱合酶 (OCS) 基因终止子序列、花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 基因终止子序列、稻 (*Oryza sativa*) ADP- 葡萄糖焦磷酸化酶终止子序列 (t3' Bt2)、玉蜀黍 (*Zea mays*) 玉米醇溶蛋白基因终止子序列、rbcS-1A 基因终止子以及

rbcs-3A 基因终止子序列等。

[0192] 优选的本发明启动子序列包括根特异性启动子,例如而但不限于表 5 所列以及实施例中所述。

[0193] 表 5. 用于实现本发明的代表性的根特异性启动子

[0194]

名称	来源	参考文献
SbPRP1	大豆	Suzuki等人, Plant Mol Biol, 21: 109-119,1993
TobRB7的636bp片段	烟草	Yamamoto等人, Plant Cell 3:371-382,1991
GGPS3	鼠耳芥属	Okada等人, Plant Physiol 122: 1045-1056, 2000
prxEa的580bp片段	鼠耳芥属	Wanapu和Shinmyo, Ann N Y Acad Sci 782: 107-114, 1996
Ids2启动子	大麦	Okumura等人, Plant Mol Biol 25: 705-719,1994
AtPRP3	鼠耳芥属	Fowler等人, Plant Physiol 121: 1081-1092,1999

[0195] 本领域技术人员应当知晓可能适用于实现本发明的另外的启动子序列和终止子序列。这种序列可以轻易使用,无需任何过分的实验。

[0196] 在本发明范围内,基因或蛋白质的“异位表达”或“异位过量表达”赋予所述基因或蛋白质在自然条件下一般不存在的表达模式和/或表达水平,更具体而言,是指增强表达和/或增强表达水平。能够以许多方式获得异位表达,包括编码所述蛋白质的编码序列与分离的同源或异源启动子有效连接以形成嵌合基因和/或所述编码序列与其自身的分离的启动子(即天然驱动所述蛋白质表达的未分离启动子)有效连接以产生重组基因重复或基因倍增效应。“异位共表达”是指异位表达或异位过表达两个或多个基因或蛋白质。相同的或更优选不同的启动子用于引起所述基因或蛋白质的异位表达。

[0197] 本发明范围内使用的启动子序列优选地与编码上述细胞分裂素氧化酶蛋白质或同系物、衍生物、或其免疫活性和/或功能片段的编码序列或开放阅读框架(ORF)有效连接。

[0198] 此处所用“下调表达”是指降低基因表达的水平 and / 或活性基因产物的水平和/或基因产物活性的水平。通过例如在相对启动子序列的正义方向(如果引起共抑制)或者在反义方向添加编码序列或其部分,并进一步通过例如插入诱变(例如 T-DNA 插入或转座子插入)或者通过例如 Angel1 和 Baulcombe (1998-W09836083)、Lowe 等人

(1989-W09853083)、Lederer 等人 (1999-W09915682) 或 Wang 等人 (1999-W09953050) 所述基因沉默策略来降低表达。针对沉默基因表达的遗传构建体在其相对于启动子序列的正义和 / 或反义方向上可包含所述基因 (或其一个或多个部分) 的核苷酸序列。下调基因表达的另一方法包含利用核酶。

[0199] 通过将所述基因产物、同系物、衍生物和 / 或其免疫活性片段给予或接触细胞、组织、器官或生物体,可以实现调节、包括降低活性基因产物或者基因产物活性的水平。能够下调活性基因产物水平和 / 或基因产物活性的技术的另一个例子是免疫调节,其包含将所述基因产物的抗体给予或接触细胞、组织、器官或生物体、或在其中表达,将调节其中所述基因产物和 / 或基因产物活性的水平。这种抗体包含 " plantibodies "、单链抗体、IgG 抗体和重链 camel 抗体及其片段。

[0200] 通过将所述基因产物或其活性的激动剂给予或接触细胞、组织、器官或生物体可以进一步实现调节、包括降低活性基因产物或者基因产物活性的水平。这种激动剂包括上述本发明鉴定的蛋白质 (例如包含激酶和蛋白酶类) 和化合物。

[0201] 在本发明范围内关注下调上述细胞分裂素氧化酶基因的表达。所述细胞分裂素氧化酶基因优选植物细胞分裂素氧化酶基因,更具体而言是 AtCKX。本发明进一步包含下调细胞分裂素氧化酶蛋白质或细胞分裂素氧化酶活性的水平,所述细胞分裂素氧化酶蛋白质上文已经明确。所述细胞分裂素氧化酶蛋白质优选植物细胞分裂素氧化酶,更具体而言是 AtCKX。

[0202] " 改变细胞命运和 / 或植物发育和 / 或植物形态学和 / 或生物化学和 / 或生理学 " 是指通过实行此处所述本发明的一个或多个步骤改变植物的一种或多种发育和 / 或形态学和 / 或生物化学和 / 或生理学特性。

[0203] " 细胞命运 " 是指在植物发育或细胞过程中、特别是在细胞周期中或因细胞周期过程而产生的特定细胞的细胞类型或细胞特性。

[0204] 应当认为此处所用 " 植物发育 " 或术语 " 植物发育特性 " 或类似术语是在决定祖细胞将发育成的植物细胞、特别是特异性组织或器官类型的发育命运中所涉及的植物的任何细胞过程。与植物发育有关的细胞过程应为本领域技术人员所知。该过程涉及,例如形态发生、光形态发生、枝条发育、根发育、营养体发育、生殖发育、茎伸长、开花以及决定细胞命运中涉及的调节机制、特别是涉及细胞周期的过程或调节过程。

[0205] 本领域技术人员应当理解,此处所用 " 植物形态学 " 或术语 " 植物形态特性 " 或类似术语是指植物的外观,包括任何一个或多个结构特性或其结构特性的组合。这种结构特性包括植物的任何细胞、组织或器官、或者细胞、组织或器官群 (包括根、茎、叶、枝、叶柄、毛状体、花、花瓣、柱头、花柱、雄蕊、花粉、胚珠、种子、胚、胚乳、种皮、糊粉、纤维、果实、形成层、木材、心材、薄壁组织、通气组织、筛管分子、韧皮部或维管组织等) 的形状大小、数目、位置、颜色、质地、排列及成型。

[0206] 本领域技术人员应当理解,此处所用 " 植物生物化学 " 或术语 " 植物生物化学特性 " 或类似术语是指植物的代谢和催化过程,包括初级和次级代谢及其产物,包括任何小分子、大分子或化合物,例如而限于植物产生的淀粉、糖、蛋白质、肽、酶、激素、生长因子、核酸分子、纤维素、半纤维素、愈创葡聚糖、植物凝集素、纤维、色素如花青苷、维生素、矿物、微量营养物或常量营养物。

[0207] 应当理解此处所用“植物生理学”或术语“植物生理学特性”或类似术语是指植物的功能性过程,包括发育过程例如生长、增殖和分化、性发育、有性繁殖、结种(seed set)、种子发育、灌浆、无性繁殖、细胞分裂、休眠、萌芽、光适应、光合作用、展叶、纤维产生、次生生长或木材生产等;植物对外界施加因素例如金属、化学物、激素、生长因子、环境和环境压力因素(例如缺氧、低氧、高温、低温、脱水、光、昼长(daylength)、水淹、盐、重金属等)的反应,包括植物对所述外界施加因素的适应性反应。

[0208] 将重组 DNA 引入植物组织或细胞的方法包括但不限于,利用 CaCl_2 及其变体转化,特别是 Hanahan(1983)所述方法,原生质体直接摄取 DNA(Krens 等人,1982;Paszkowski 等人,1984),PEG 介导原生质体摄取(Armstrong 等人,1990)微粒轰击,电穿孔(Fromm 等人,1985),DNA 显微注射(Crossway 等人,1986),微粒轰击组织外植体或细胞(Christou 等人,1988;Sanford,1988),核酸真空渗入组织,或者对植物而言,An 等人(1985)、Dodds 等人(1985)、Herrera-Estrella 等人(1983a,1983b,1985)所述的 T-DNA 介导从土壤杆菌转移到植物组织。本领域公知单子叶植物的转化方法,其包括土壤杆菌介导的转化(Cheng 等人,1997-W09748814;Hansen 1998-W09854961;Hiei 等人,1994-W09400977;Hiei 等人,1998-W09817813;Rikiishi 等人,1999-W09904618;Saito 等人,1995-W09506722)、微粒轰击(Adams 等人,1999-US5969213;Bowen 等人,1998-US5736369;Chang 等人,1994-W09413822;Lundquist 等人,1999-US5874265/US5990390;Vasil 和 Vasil,1995-US5405765;Walker 等人,1999-US5955362)、DNA 摄取(Eyal 等人,1993-W09318168)、土壤杆菌细胞的显微注射(von Holt,1994-DE4309203)以及超声处理(Finer 等人,1997-US5693512)。

[0209] 细胞的微粒轰击是将微粒推进到细胞中产生转化细胞。任何适当的弹性细胞转化方法和仪器可用于实现本发明。代表性的仪器和方法由 Stomp 等人(U. S. Patent No. 5, 122, 466)以及 Sanford 和 Wolf(U. S. Patent No. 4, 945, 050)公开。利用弹性转化过程时,基因构建体可掺入能在被转化细胞中复制的质粒。该系统适用的微粒的例子包括 1-5 μm 的金球。通过任何适用技术例如沉淀可将 DNA 构建体沉积在微粒上面。

[0210] 按照本领域公知的方法,全植物可从转化或转染细胞再生。无论通过器官发生或胚胎发生能够随后进行克隆繁殖的植物组织可用本发明的基因构建体转化并从中再生全植物。特定组织的选择变化取决于所转化的特定物种可用的并且是最适合的克隆繁殖体系。代表性的组织对象包括叶片、花粉、胚、子叶、下胚轴、大配子体、愈伤组织、原生分生组织(例如顶端分生组织、腋芽和根分生组织)以及诱生分生组织(例如子叶分生组织和胚轴分生组织)。

[0211] 此处所用术语“器官发生”是指由分生组织中心顺序发育为枝条和根的过程。

[0212] 此处所用术语“胚胎发生”是指由体细胞或配子按协同方式(而非顺序地)共同发育为枝条和根的过程。

[0213] 优选地,按本发明方法产生的植物通过任何公认的技术方法例如微粒轰击、显微注射、土壤杆菌介导转化(包括植物内 in planta)转化)、原生质体融合或电穿孔等进行遗传序列转染或转化、或者引入蛋白质。所述植物最优选通过土壤杆菌介导的转化产生。

[0214] 植物、酵母、霉菌或丝状真菌的土壤杆菌介导转化或“agroclistic”转是基于将转化载体序列的一部分(称为 T-DNA)转移到细胞核并整合所述 T-DNA 到所述真核生物的

基因组中。

[0215] “土壤杆菌属”是指 *Agrobacteriaceae* 的一个成员,更优选土壤杆菌或根瘤菌属 (*Rhizobacterium*),最优选根瘤土壤杆菌。

[0216] “T-DNA”或转移 DNA 是指侧翼为 T-DNA 边界的转化载体的一部分,土壤杆菌 *vir* 基因活化后,于 T-DNA 边界处切断,以单链 DNA 转移到真核细胞的细胞核中。

[0217] 此处所用“T-DNA 边界”、“T-DNA 边界区”或“边界区”是指或右侧的 T-DNA 边界 (RB) 或左侧的 T-DNA 边界 (LB)。这种边界包含核心序列,其侧翼为边界内区域(为边界侧翼的 T-DNA 的一部分)和/或边界外区域(为边界侧翼的载体主链的一部分)。章鱼肉碱型载体和胭脂碱型载体的核心序列分别包含 22bp、25bp。在右边界区和左边界区中,核心序列形成不完全的重复。边界核心序列为至少由 *VirD1* 和 *VirD2* 组成的土壤杆菌切割复合物的识别和加工所必需。T-DNA 侧翼的核心序列足以促进所述 T-DNA 的转移。然而,利用携带侧翼只有该核心序列的所述 T-DNA 的转化载体的转化效率低。已知边界内和外区域调节 T-DNA 的转移效率 (Wang 等人,1987)。已经鉴定一种增强 T-DNA 转移的成分,其位于右边界外区域,称为 *overdrive* (超趋动) (Peralta 等人,1986, van Haaren 等人,1987)。

[0218] “T-DNA 转化载体”或“T-DNA 载体”是指包含侧翼为右和左 T-DNA 边界(至少分别由右和左边界核心序列组成)的 T-DNA 序列的任何载体,其用来转化任何真核细胞。

[0219] “T-DNA 载体主链序列”是指含 T-DNA 载体位于 T-DNA 边界以外、更具体而言位于边界核心不完全重复的切割位点以外的全部 DNA。

[0220] 本发明包括优化的 T-DNA 载体,以使真核细胞基因组中整合的载体主链最少或没有。“优化 T-DNA 载体”是指 T-DNA 载体设计为减少或消除转移到真核细胞基因组的载体主链序列。这种 T-DNA 载体为熟悉技术人员所知,包括 Hanson 等人 (1999) 和 Stuiver 等人 (1999-W09901563) 所述。

[0221] 本发明显然包括在任何 T-DNA 载体包括双转化载体、超级双转化载体、共整合转化载体、*Ri* 来源的转化载体以及用于 *agroclistic* 转化的携带 T-DNA 的载体中的上述编码细胞分裂素氧化酶、同系物、衍生物或其免疫活性和/或功能片段的 DNA 序列。所述细胞分裂素氧化酶优选植物细胞分裂素氧化酶,更具体而言,是鼠耳芥 (*At*) CKX。

[0222] “双转化载体”是指 T-DNA 转化载体,其包含:

[0223] (a) 包含至少一个目的基因和/或至少一个在待转化真核细胞中有活性的选择标志的 T-DNA 区域;以及

[0224] (b) 包含至少在大肠杆菌 (*E. coli*) 和土壤杆菌中有活性的复制起点、以及在大肠杆菌和土壤杆菌中供选择的标志的载体主链区域。

[0225] 双转化载体的 T-DNA 边界可来源于章鱼肉碱型或胭脂碱型 Ti 质粒或双方。双载体的 T-DNA 和辅助质粒一起只能转移到真核细胞中。

[0226] “辅助质粒”是指在土壤杆菌中稳定维持、并至少携带为使 T-DNA 转移所必需的一套 *vir* 基因的质粒。该套 *vir* 基因可来源于章鱼肉碱型或胭脂碱型 Ti 质粒或双方。

[0227] “超级双转化载体”是指在载体主链区域内另外带有根瘤土壤杆菌超级毒性株 A281 的 Ti 质粒 pTiBo542 的 *vir* 区的双转化载体 (EP0604662, EP0687730)。超级双转化载体与辅助质粒一起使用。

[0228] “共整合转化载体”是指 T-DNA 转化载体,其至少包含:

[0229] (a) 包含至少一个目的基因和 / 或至少一个在植物中有活性的选择标志的 T-DNA 区域 ; 以及

[0230] (b) 包含至少在大肠杆菌和土壤杆菌中有活性的复制起点、在大肠杆菌和土壤杆菌中供选择的标志、以及为使 T-DNA 转移所必需的一套 vir 基因的载体主链区域。

[0231] 所述 T-DNA 载体的 T-DNA 边界和该套 vir 基因可来源于章鱼肉碱型或胭脂碱型 Ti 质粒或双方。

[0232] " Ri 来源的植物转化载体 " 是指其中 T-DNA 边界来源于 Ti 质粒的双转化载体, 所述双转化载体与携带一套必要的 vir 基因的 " 辅助 " Ri 质粒一起使用。

[0233] 此处所用术语 " 选择标志基因 " 或 " 选择标志 " 或 " 供选择的标志 " 包括赋予细胞表型的任何基因, 其中其表达以促进鉴定和 / 或选择经本发明基因构建体或其衍生物转染或转化的细胞。此处合适的选择标志基因包括氨苄青霉素抗性 (Amp^r)、四环素抗性基因 (Tc^r)、细菌卡那霉素抗性基因 (Kan^r)、磷丝菌素抗性基因、新霉素磷酸转移酶基因 (nptII)、潮霉素抗性基因、 β - 葡糖醛酸酶 (GUS) 基因、氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 基因、绿色荧光蛋白质 (gfp) 基因 (Haseloff 等人, 1997) 以及萤光素酶基因等。

[0234] 此处 " agrolistics "、" agrolistic 转化 " 或 " agrolistic 转移 " 是指联合土壤杆菌介导的转化以及 biolistic DNA 转运的特性的转化方法。同样, 含 T-DNA 的目的质粒与可使植物中产生 VirD1 和 VirD2、有或无 VirE2 的 DNA/RNA 共转运 (Hansen 和 Chilton 1996 ; Hansen 等人, 1997 ; Hansen 和 Chilton 1997-W09712046)。

[0235] " 外源 DNA " 是指通过重组技术引入宿主基因组的任何 DNA 序列。所述外源 DNA 包括例如 T-DNA 序列或其一部分, 诸如包含选择标志的可表达形式的 T-DNA 序列。外源 DNA 另外包括上述插入 DNA 序列。" 重组事件 " 是指位点特异性重组事件、或由转座子 " 跳跃 " 引起的重组事件。

[0236] " 重组酶 " 是指位点特异性重组酶或转座酶。

[0237] " 重组位点 " 是指位点特异性重组位点或转座子边界序列。

[0238] " 位点特异性重组事件 " 是指通过一般由三个成分组成的系统催化的事件 : 一对 DNA 序列 (位点特异性重组序列或位点) 以及一个特异性酶 (位点特异性重组酶)。位点特异性重组酶仅仅在两个位点特异性重组序列之间、取决该位点特异性重组序列的方向催化重组反应。如果位点特异性重组序列彼此反方向定位 (即反向重复), 在位点特异性重组酶存在下, 两个位点特异性重组位点之间的插入序列将倒转。如果位点特异性重组序列彼此相同方向定位 (即同向重复), 那么在位点特异性重组酶作用下, 将删除任何插入序列。因此, 如果位点特异性重组序列以同向重复存在于整合真核基因组中的外源 DNA 序列的两端, 通过该位点特异性重组序列与相应的位点特异性重组酶的相互作用, 所述序列的这种整合可随后倒转。可以利用许多不同的位点特异性重组酶系统, 包括而不限于噬菌体 P1 的 Cre/lox 系统、酵母的 FLP/FRT 系统、噬菌体 Mu 的 Gin 重组酶、大肠杆菌的 Pin 重组酶、志贺菌 (Shigella) 的 PinB、PinD 和 PinF 以及 pSR1 质粒的 R/RS 系统。重组酶一般为整合酶、解离酶或反转酶 (flippase)。双特异性重组酶还可与对应于该双特异性重组酶的直接或间接重复的两个不同的位点特异性重组位点联合使用 (W0 99/25840)。两个优选的位点特异性重组酶系统是噬菌体 P1Cre/lox 以及酵母 FLP/FRT 系统。在这些系统中, 重组酶 (Cre 或 FLP) 特异性地与其各自的位点特异性重组序列 (分别为 lox 或 FRT) 相互作用以倒转或切

除插入序列。这两个系统的位点特异性重组序列相对较短 (lox 为 34bp, FRT 为 47bp)。这些系统中某些已经高效用于植物例如烟草 (Dale 等人, 1990) 以及鼠耳芥属 (Osborne 等人, 1995)。位点特异性重组系统在植物分子生物学中具有许多应用, 包括控制同源重组 (例如 US5527695)、定点插入、基因叠加等 (W099/25821) 以及分解复杂的 T-DNA 整合模式或切除选择标志 (W099/23202) 的方法。

[0239] 虽然位点特异性重组序列必须连接所切除或倒转的 DNA 末端, 但编码位点特异性重组酶的基因可位于别处。例如, 重组酶基因可以已经存在于真核生物 DNA 中, 或者可以通过其后引入的 DNA 片段 (或通过杂交、或通过异花授粉直接引入细胞) 提供。另外, 基本纯化的重组酶蛋白质可以通过例如显微注射或粒子轰击直接引入真核细胞。位点特异性重组酶编码区一般应有效连接调节序列, 使能够在真核细胞中表达位点特异性重组酶。

[0240] “转座子跳跃引起的重组事件” 或 “转座酶介导的重组” 是指通过由三个成分组成的系统催化的重组事件: 一对 DNA 序列 (转座子边界序列) 以及一个特异性酶 (转座酶)。转座酶只在倒转重复排列的两个转座子边界序列之间催化重组反应。可以使用许多不同的转座子 / 转座酶系统, 包括而不限于 Ds/Ac 系统、Spm 系统以及 Mu 系统。这些系统起源于玉米, 但已经表明至少 Ds/Ac 和 Spm 系统也在其它植物中起作用 (Fedoroff 等人, 1993, Schlappi 等人, 1993, Van Sluys 等人, 1987)。优选 Ds- 和 Spm- 型转座子, 其分别有 11bp- 和 13bp- 边界序列。

[0241] 虽然转座子边界序列必须连接所切除 DNA 的末端, 但编码转座酶的基因可位于别处。例如, 重组酶基因可以已经存在于真核生物 DNA 中, 或者可以通过其后引入 DNA 片段 (或通过杂交、或通过异花授粉直接引入细胞) 提供。另外, 基本纯化的转座酶蛋白质可以通过例如显微注射或粒子轰击直接引入真核细胞。

[0242] 作为本发明的一部分, 转座子边界序列归入外源 DNA 序列, 其位于所述 DNA 序列外, 并将所述 DNA 序列转变为能够在转座酶作用下移动的转座子样成分。

[0243] 由于转座子经常重整合到宿主基因组的另一座位, 可能必须隔离允许转座酶起作用的宿主子代以分离例如只包含转座子足印 (footprint) 的转化宿主以及仍包含外源 DNA 的转化宿主。

[0244] 在实施本发明中, 优选地诱导遗传成分动员, 例如通过在细胞中表达重组酶蛋白质, 接触该遗传成分的整合位点并促进其中的重组事件, 完全切除该遗传成分或在原始整合位点留下 “足印” (一般为约 20 个核苷酸长度或更大)。可以通过标准的核酸杂交和 / 或扩增技术检测可移动遗传成分或包含该成分的基因构建体的存在来鉴定按照本发明方法产生的宿主和宿主部分。另外, 对于已经切除其中可移动遗传成分的转化宿主细胞、组织和宿主, 利用这种技术有可能检测切除事件后在宿主基因组中留下的足印。此处所用术语 “足印” 应当认为是指此处所述可移动遗传成分或包含该成分的基因构建体的任何衍生物, 其通过从先前经所述基因构建体转化的细胞的基因组中切除、缺失或其它方法去除可移动遗传成分而产生。足印一般包含重组座位或用于促进切除的转座子的至少一个拷贝。然而, 足印可包含另外的来源于基因构建体的序列, 例如来源于左边界序列、右边界序列、复制起点、重组酶或转座酶编码序列 (如果使用过) 的核苷酸序列, 或者其它来自载体的核苷酸序列。因此, 根据重组座位或者所用基因构建体的转座子的核苷酸序列 (例如与 lox 位点或 frt 位点对应或互补的核苷酸序列) 可以识别足印。

[0245] 术语“细胞周期”是指与细胞生长和分裂相关、特别是与调节 DNA 复制和有丝分裂相关的周期性的生化和结构事件。细胞周期包括称为 G0、Gap1 (G1)、DNA 合成 (S)、Gap2 (G2) 和有丝分裂 (M) 的阶段。通常这四个阶段顺序发生,然而细胞周期也包括变化的周期,其中缺少一个或多个阶段,引起细胞周期改变,例如核内有丝分裂、多核化 (acytokinesis)、多倍性、多线性和核内再复制。

[0246] 术语“细胞周期进展”是指通过细胞周期不同阶段的过程。因此术语“细胞周期进展速度”是指通过所述细胞周期阶段的速度或者完成所述细胞周期阶段所需的时间跨度。

[0247] “双杂交试验”是指以下述观察为基础的试验,即许多真核转录因子包含两个结构域,一个 DNA 结合结构域 (DB) 和一个活化结构域 (AD),其如果物理上分离 (即共价键破裂) 则不能实现目的基因表达。能够物理上相互作用的两个蛋白质 (其一与 DB 融合,另一与 AD 融合) 将重新联合转录因子的 DB 和 AD 结构域,导致目的基因表达。在酵母双杂交试验中,目的基因通常是报告基因,例如 β -半乳糖苷酶基因。因而可通过测量报告基因产物的活性来定量酵母双杂交试验中蛋白质配偶体之间的相互作用 (Bartel 和 Fields 1997)。另外,可以使用哺乳动物双杂交系统,其包括例如编码嵌合绿色荧光蛋白质的报告基因 (Shioda 等人,2000)。

[0248] 此外,利用适当的计算机程序可以进行本发明蛋白质结构基序的折叠模拟和计算机重新设计 (Olszewski, Proteins 25(1996),286-299;Hoffman, Comput. Appl. Biosci. 1(1995),675679)。蛋白质折叠的计算机建模可用于肽和蛋白质详细模型的构象和能量分析 (Monge, J. Mol. Biol. 247(1995),995-1012;Renouf, Adv. Exp. Med. Biol. 376(1995),37-45)。特别地,适当的程序通过计算机辅助搜索互补肽序列可用于鉴定细胞分裂素氧化酶、其配基或其它相互作用蛋白质的相互作用的位点 (Fassina, Immunomethods 5(1994),114-120)。现有技术例如 Berry, Biochem. Soc. Trans. 22(1994), 1033-1036;Wodak, Ann. N. Y. Acad. Sci. 501(1987),1-13;Pabo, Biochemistry 25(1986), 5987-5991 中描述了更多供设计蛋白质和肽的合适计算机系统。从上述计算机分析获得的结果可用于例如制备本发明蛋白质或其片段的拟肽 (peptidomimetics)。蛋白质天然氨基酸序列的这种拟肽类似物可非常有效地摹拟亲代蛋白质 (Benkirane, J. Biol. Chem. 271(1996),33218-33224)。例如,将易于获得的非手性 Ω -氨基酸残基掺入本发明蛋白质或其片段导致氨基键替换为脂肪链的聚亚甲基单元,从而提供了构建拟肽的方便策略 (Banerjee, Biopolymers 39(1996),769-777)。现有技术描述了其它系统中小型肽类激素超级活性的拟肽类似物 (Zhang, Biochem. Biophys. Res. Commun. 224(1996),327-331)。通过连续的胺的烷基化合成拟肽组合文库并测试产生的化合物 (例如其结合、激酶抑制和/或免疫特性) 也可以鉴别本发明蛋白质合适的拟肽。现有技术描述了产生和使用拟肽组合文库的方法,例如 Ostresh, Methods in Enzymology 267(1996),220-234 以及 Dorner, Bioorg. Med. Chem. 4(1996),709-715。

[0249] 此外,本发明蛋白质的三维和/或晶体结构可用于设计本发明蛋白质生物活性的拟肽抑制剂 (Rose, Biochemistry 35(1996),12933-12944;Ruterber, Bioorg. Med. Chem. 4(1996),1545-1558)。

[0250] 本发明方法将要获得或鉴别的化合物可以是能够结合本发明任何核酸、肽或蛋白

质的化合物。将要鉴别的其它感兴趣的化合物是以通过该化合物的作用增强或减低所述基因或蛋白质表达的方式调节本发明基因或蛋白质表达的化合物。另外,化合物可以通过增强或减低本发明任何蛋白质的活性而发挥作用。此处优选蛋白质为新的细胞分裂素氧化酶。

[0251] 所述化合物或许多化合物可能包含于样本中,例如植物、动物或微生物的细胞提取物。此外,所述化合物可能为本领域已知,但至今不知道其能够抑制或活化细胞分裂素氧化酶相互作用蛋白质。反应混合物可能是细胞或组织培养物的无细胞提取物,或者包含细胞或组织培养物。适于本发明方法的安排为本领域技术人员所知,并例如一般在 Alberts 等人, *Molecular Biology of the Cell*, 第三版 (1994), 特别是第 17 章中所述。例如,许多化合物可添加到反应混合物、培养基或注入细胞中。

[0252] 如果本发明方法鉴定出样本包含一种或许多化合物,那么有可能从鉴定为包含能够作为激动剂的化合物的原始样本中分离该化合物,或者例如,如果它由许多不同的化合物组成,则可以进一步细分原始样本,以便降低每种样本中各种物质的数目,并重复细分原始样本的方法。取决于样品的复杂性,上述步骤可以执行若干次,优选地,直至根据本发明方法鉴定的样品只包含少数或仅仅一种物质。所述样品优选包含具有类似化学和 / 或物理特性的物质,最优选所述物质是相同的。优选地,根据上述方法鉴定的化合物或其衍生物进一步配制成适合植物育种、或植物细胞和组织培养应用的形式。

[0253] 术语“早期活力”是指植物在早期发育期间快速生长的能力,并涉及在萌芽后成功建立发育良好的根系以及发育良好的光合作用器官。

[0254] 术语“倒伏抗性”或“直立性”是指植物将自身固定到土壤中的能力。对于具有直立或半直立生长习性的植物,该术语也指在不利的(环境)条件下维持直立位的能力。该性状与根系的大小、深度和形态学有关。

[0255] 此处所用术语“嫁接”是指将两个不同植物的部分接在一起,以便其结合在一起,而且汁液可以流动,从而形成单一的可以生长和发育的新植物。因此嫁接由两部分组成:(i) 下部为此处所述根状茎,基本上由根系和一部分茎组成,以及(ii) 上部为接穗或移植物,其产生植物的地上部分。

[0256] 此处所用 tblastn 是指对比工具,其是 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) 程序家族的一部分 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)。BLAST 目标在于鉴定最佳局部对比区域,即对比两个核酸或蛋白质序列的某些部分,检测仅共享孤立的相似性区域的序列间关系(Altschul 等人,1990)。本发明中,BLAST 2.0 程序套件的 tblastn 用于比较玉米细胞分裂素氧化酶蛋白质序列与按全部阅读框架动态翻译的核苷酸序列数据库(Altschul 等人, *Nucleic Acids Res.* 25 :3389-3402(1997))。

[0257] 提供下列实施例和附图用于阐明本发明而决非限制。本申请中包括的所有参考文献的内容引入以供参考。

[0258] 附图简述

[0259] 图 1. 植物细胞分裂素氧化酶基因的示意图

[0260] 显示从玉米(ZmCKX1, 登录号 AF044603, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 255 : 328-333, 1999) 和鼠耳芥属(AtCKX1-AtCKX4) 中分离的不同细胞分裂素氧化酶基因的结构。外显子命名为‘E’,由阴影框表示。内含子由空白框表示。还标明了基因大小(kb,于

各结构上方)、基因登录号(名称下方)以及表示 0.5kb 的标尺。

[0261] 图 2. 植物细胞分裂素氧化酶氨基酸序列的比对。

[0262] 比对了分别来自玉米(ZmCKX1)和鼠耳芥属(AtCKX1-AtCKX4)细胞分裂素氧化酶的氨基酸序列。相同的氨基酸残基由黑色框标记,相似氨基酸残基为灰色框。氨基酸相似群:(M, I, L, V), (F, W, Y), (G, A), (S, T), (R, K, H), (E, D), (N, Q),

[0263] 图 3. 表达 ALCKX1 的烟草和鼠耳芥属植物的 Northern 印迹分析。

[0264] (A) 组成型表达的烟草植物(泳道 1-8)较之野生型 SNN 烟草(泳道 9)的 Northern 印迹分析

[0265] (B) 组成型表达的克隆诱导 12h 后,比较叶子中四环素诱导的基因表达。泳道 2-9, 四个不同 AtCKX1-W38TetR 克隆的叶子(+、- 为有或没有四环素处理);泳道 1, 组成型表达的 35S::AtCKX1 克隆。

[0266] (C) 鼠耳芥属植物组成型表达的 AtCKX1 基因的 Northern 印迹分析。泳道 2-4 为三个不同的组成型表达的 35S::AtCKX1 克隆,与野生型鼠耳芥属植物(泳道 1)比较。

[0267] 图 4:35S::AtCKX1 转基因的鼠耳芥属植物的生长特性。

[0268] (A) 两个野生型幼苗(左)与两个 35S::AtCKX1 表达幼苗(右)比较。注意转基因幼苗中不定根形成增强以及根分支增强。于萌芽 14 天后照相。植物体外在培养皿中 MS 培养基上垂直生长。

[0269] (B) 类似 A,但是根用甲苯胺蓝染色。

[0270] (C) 萌芽三周后,35S::AtCKX1 转基因幼苗的培养皿的平面图。

[0271] (D) 液体培养中生长的 35S::AtCKX1 转基因植物。野生型幼苗的根在此条件下生长不良(未显示)。

[0272] (E) 表达 35S::AtCKX1 基因的转化子(T0)(右方三个植物),左边所示野生型植物。

[0273] (F) 土壤中生长的 T1 植物的表型。野生型植物(左)与两个 35S::AtCKX1 转基因植物比较。

[0274] 图 5:AtCKX2 过表达的鼠耳芥属植物的表型。

[0275] 表达 35S::AtCKX2 的 T1 代鼠耳芥属植物(右方两个植物)与野生型(左方植物)比较。

[0276] 图 6. 表达 AtCKX2 的烟草和鼠耳芥属植物的 Northern 印迹分析。

[0277] (A) 组成型表达的烟草植物(泳道 1-7)较之野生型 SNN 烟草(泳道 8)的 Northern 印迹分析。

[0278] (B) 鼠耳芥属植物组成型表达的 AtCKX2 基因的 Northern 印迹分析。泳道 2-8 为七个不同的 35S::AtCKX2 组成型表达克隆与野生型鼠耳芥属植物(泳道 1)比较。

[0279] 图 7. 表达 AtCKX1 和 AtCKX2 烟草植物的枝条表型。

[0280] (A) 六周龄植物的平面图。

[0281] (B) 开花期的烟草植物。

[0282] (C) 茎伸长的动力学。箭头标记花的开始。此阶段植物龄期(萌芽后天数)和叶片数如箭头上部所示。短线表示标准差(SD);n = 12。

[0283] (D) 萌芽后第 68 天和 100 天之间形成叶片数(n = 12)以及这些叶片的最终表面积

(野生型 100% 为 $3646 \pm 144 \text{ cm}^2$; $n = 3$)。

[0284] (E) 比较叶子大小和老化。叶子来自于从上数节点号 4、9、12、16 和 20 (从左至右)。

[0285] 图 8. 表达 AtCKX 转基因烟草植物的根的表型。

[0286] (A) 萌芽 17 天后幼苗。

[0287] (B) 土壤中生长植物在开花期的根系。

[0288] (C) 萌芽后第 10 天的根长、侧根 (LR) 和不定根 (AR) 数目。

[0289] (D) 外源细胞分裂素抑制根生长抑制的剂量 - 反应曲线。短线表示 $\pm \text{SD}$; $n = 30$ 。

[0290] 图 9 : 表达 35S::AtCKX1 烟草植物中腋生枝分生组织的生长。

[0291] 图 10 : 过表达 AtCKX1 的烟草植物与野生型 (WT) 烟草的枝条分生组织、叶和根分生组织的组织学。

[0292] (A) 营养枝顶端分生组织纵向正中切面。P, 叶原基。

[0293] (B) 次级叶脉的维管组织。X, 木质部; PH, 韧皮束。

[0294] (C) 充分发育的叶子的横向切面。

[0295] (D) 上叶表皮的扫描电子显微术。

[0296] (E) 根尖用 DAPI 染色。RM, 根分生组织。

[0297] (F) 萌芽 10 天后, 根分生组织的纵向正中切面。RC, 根冠; PM, 原分生组织。

[0298] (G) 尖端 10mm 处的横向根部切面。E, 表皮; C1-C4, 皮层细胞层; X, 木质部; PH, 韧皮部。短线为 100 μm 。

[0299] 图 11 : 表达 AtCKX3 和 AtCKX4 的烟草植物的 Northern 印迹分析。

[0300] (A) 组成型表达 AtCKX3 的烟草植物的 Northern 印迹分析。泳道名称表示各转基因植物的编号, WT 为野生型 SNN 烟草。上部印迹用 AtCKX3 特异性探针检测, 下部印迹用 25S rRNA 特异性探针, 并作为 RNA 载样量的对照。

[0301] (B) 组成型表达 AtCKX4 的烟草植物的 Northern 印迹分析。泳道名称表示各转基因植物的编号, WT 为野生型 SNN 烟草。上部印迹用 AtCKX4 特异性探针检测, 下部印迹用 25S rRNA 特异性探针, 并作为 RNA 载样量的对照。

[0302] 图 12 : AtCKX2 转基因烟草植物和野生型植物的交互嫁接。

[0303] (A) 左方两个植物 : 对照 (嫁接在 WT 根状茎上的 WT 接穗)。

[0304] 右方两个植物 : 嫁接在 AtCKX2-38 转基因根状茎上的 WT 接穗。

[0305] (B) 左侧 : 对照 (嫁接在 WT 根状茎上的 WT 接穗)。

[0306] 右侧 : 嫁接在 WT 根状茎上的 AtCKX2-38 植物的接穗。

[0307] (C) 根区放大。

[0308] 左侧 : 对照 (嫁接在 WT 根状茎上的 WT 接穗)。

[0309] 右侧 : 嫁接在 AtCKX2-38 转基因根状茎上的 WT 接穗。

[0310] (D) 不定根形成。

[0311] 左侧 : 对照 (嫁接在 WT 根状茎上的 WT 接穗)。

[0312] 右侧 : 嫁接在 AtCKX2-36 转基因根状茎上的 WT 接穗。

实施例

[0313] 实施例 1. 本发明序列简述

[0314]

Seq ID No	描述
1	AtCKX1 基因组
2	AtCKX1 蛋白质
3	AtCKX2 基因组
4	AtCKX2 蛋白质
5	AtCKX3 基因组
6	AtCKX3 蛋白质
7	AtCKX4 基因组
8	AtCKX4 蛋白质
9	AtCKX5 基因组（短形式）
10	AtCKX5 蛋白质（短形式）
11	AtCKX6 基因组
12	AtCKX6 蛋白质
13	5' 引物 AtCKX1
14	3' 引物 AtCKX1
15	5' 引物 AtCKX2
16	3' 引物 AtCKX2
17	5' 引物 AtCKX3
18	3' 引物 AtCKX3
19	5' 引物 AtCKX4
20	3' 引物 AtCKX4
21	5' 引物 AtCKX5

22	3' 引物 AtCKX5
23	5' 引物 AtCKX6
24	3' 引物 AtCKX6
25	AtCKX1cDNA
26	AtCKX2cDNA
27	AtCKX3cDNA
28	AtCKX4cDNA
29	AtCKX5cDNA(短形式)
30	AtCKX6cDNA
31	AtCKX2cDNA 片段
32	AtCKX2 肽片段
33	AtCKX5 基因组(长形式)
34	AtCKX5cDNA(长形式)
35	AtCKX5 蛋白质(长形式)
36	根 <i>clavata</i> 同源性启动子

[0315]

[0316] 实施例 2. 鉴定候选的鼠耳芥细胞分裂素氧化酶编码基因

[0317] 从鼠耳芥中鉴定了与玉米细胞分裂素氧化酶基因具有序列相似性的 6 个不同基因 (Morris 等人, Biochem Biophys Res Comm 255 :328-333, 1999 ;Houda-Herlin 等人, Plant J 17 :615-626 ;WO 99/06571)。利用玉米蛋白质序列,使用 tblastn 程序从基因组公共数据库中筛选 6 个翻译框架的核苷酸序列发现这些基因。这些序列命名为鼠耳芥细胞分裂素氧化酶样基因或 AtCKX。其任意编号为 AtCKX1-AtCKX6。如下列表概述了这些基因的有关信息。预测的 ORF 边界和蛋白质序列是指示性的,以大致说明鼠耳芥属和玉米细胞分裂素氧化酶之间、以及不同的鼠耳芥属细胞分裂素氧化酶之间蛋白质序列的差异。所示 ORF 边界和蛋白质序列不应视为这些 AtCKX 基因作用方式的结论性证据。DNASTAR 的 MegAlign 程序用于 DNA 和蛋白质序列比较。该程序使用 Clustal 比对方法。对于蛋白质和 cDNA 序列的多重比对,空位罚分和空位长度罚分均设为 10。蛋白质的成对比对参数如下 :Ktuple 为 1 ;空位罚分为 3 ;窗口为 5 ;对角线存为 5。cDNA 的成对比对参数如下 :Ktuple 为 2 ;空位罚分为 5 ;窗口为 4 ;对角线存为 4。蛋白质比对的相似群为 : (M, I, L, V), (F, W, Y), (G, A), (S, T), (R, K, H), (E, D), (N, Q)。鼠耳芥属 cDNA 和蛋白质序列中标明的值代表各种组合发现

的最低和最高值。

[0318] A. 基因名称 :AtCKX1(鼠耳芥细胞分裂素氧化酶样蛋白质 1, SEQ ID NO1)

[0319] 数据库定位(登录号、bac 定位):AC002510, 255 个完整序列的鼠耳芥染色体 II 225 区。序列来自克隆 T32G6。

[0320] 在数据库中预测的 ORF:

[0321] 15517..16183, 16415..16542, 16631..16891, 16995..17257, 17344..17752

[0322] AtCKX1 cDNA 序列如 SEQ ID NO 25 所列

[0323] 预测的蛋白质序列:SEQ ID NO 2

[0324] 同源性

[0325] 与玉蜀黍(Z. mays) cDNA 的同一性%:

[0326] 31, 5% (Dn astar/MegAlign-Clustal 方法)

[0327] 与玉蜀黍蛋白质的相似性%:

[0328] 32, 2% (Dnastar/MegAlign-Clustal 方法)

[0329] 与其它鼠耳芥属 cDNA 的同一性%(范围):

[0330] 38, 2% (AtCKX2)-54, 1% (AtCKX6) (Dnastar/MegAlign-Clustal 方法)

[0331] 与其它鼠耳芥属蛋白质的相似性%(范围):

[0332] 37, 1% (AtCKX2)-58, 1% (AtCKX6) (Dnastar/MegAlign-Clustal 方法)

[0333] B. 基因名称 :AtCKX2(鼠耳芥细胞分裂素氧化酶样蛋白质 2, SEQ ID NO3)

[0334] 数据库定位(登录号、bac 定位):AC005917, 255 个完整序列的鼠耳芥染色体 II 113 区。序列来自克隆 F27F23、F3P11。

[0335] 在数据库中预测的 ORF:

[0336] 互补, 40721..41012, 41054..41364, 41513..41770, 42535..42662, 43153..43711

[0337] 请注意:本发明人利用基因预测程序 NetPlantGene(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>) 鉴定的 cDNA 序列不同于数据库中注释的序列。根据新的 cDNA 序列, 修正了在数据库中预测的 ORF: 互补, 40721..41012, 41095..41364, 41513..41770, 42535..42662, 43153..43711

[0338] 该 cDNA 序列编码的蛋白质序列如 SEQ ID NO 4 所列。利用一步 RT-PCR 试剂盒(Qiagen, Hilden, Germany), 从 AtCKX2 转基因植物组织的总 RNA 中 RT-PCR 克隆 AtCKX2 的 cDNA, 并利用 ABI PRISM Big Dye Terminator 循环测序反应试剂盒(Perkin Elmer Applied Biosystems Division) 测序。这证实本发明人鉴定和预测的 cDNA 序列是正确的。新的 AtCKX2 cDNA 序列如 SEQ ID NO 26 所列。对应于 AtCKX2 cDNA 1171-1254 核苷酸的 84-bp 片段列于 SEQ ID NO 31。该 84-bp cDNA 序列对应的肽序列如 SEQ ID NO 32 所列。

[0339] 同源性

[0340] 与玉蜀黍 cDNA 的同一性%:

[0341] 38, 4% (Dnastar/MegAlign-Clustal 方法)

[0342] 与玉蜀黍蛋白质的相似性%:

[0343] 37, 5% (Dnastar/MegAlign-Clustal 方法)

[0344] 与其它鼠耳芥属 cDNA 的同一性%(范围):

[0345] 34, 9% (AtCKX6)-64, 5% (AtCKX4) (Dnastar/MegAlign-Clustal 方法)

- [0346] 与其它鼠耳芥属蛋白质的相似性% (范围) :
- [0347] 36,5% (AtCKX6)-66,1% (AtCKX4) (Dnastar/MegAlign-Clustal 方法)
- [0348] C. 基因名称 :AtCKX3 (鼠耳芥细胞分裂素氧化酶样蛋白质 3, SEQ ID NO 5)
- [0349] 数据库定位 (登录号、bac 定位) :AB024035, 鼠耳芥基因组 DNA、染色体 5、P1 克隆 :MHM17, 全序列。
- [0350] 数据库中预测到 ORF。
- [0351] 本发明人利用若干基因预测程序鉴定该基因, 包括 GRAIL(<ftp://arthur.epm.ornl.gov/pub/xgrail>), Genscan(<http://CCR-081.mit.edu/GENSCAN.html>) 和 NetPlantGene(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>) :
- [0352] 互补, 29415..29718, 29813..30081, 30183..30443, 30529..30656, 32107..32716
- [0353] 本发明人鉴定的新的 AtCKX3 cDNA 序列如 SEQ ID NO 27 所列
- [0354] 根据自身 ORF 预测的蛋白质序列 :SEQ ID NO 6
- [0355] 同源性
- [0356] 与玉蜀黍 cDNA 的同一性% :
- [0357] 38,7% (Dnastar/MegAlign-Clustal 方法)
- [0358] 与玉蜀黍蛋白质的相似性% :
- [0359] 39,2% (Dnastar/MegAlign-Clustal 方法)
- [0360] 与其它鼠耳芥属 cDNA 的同一性% (范围) :
- [0361] 38,8% (AtCKX6)-51,0% (AtCKX2) (Dnastar/MegAlign-Clustal 方法)
- [0362] 与其它鼠耳芥属蛋白质的相似性% (范围) :
- [0363] 39,9% (AtCKX6)-46,7% (AtCKX2) (Dnastar/MegAlign-Clustal 方法)
- [0364] D. 基因名称 :AtCKX4 (鼠耳芥细胞分裂素氧化酶样蛋白质 4, SEQ ID NO 7)
- [0365] 数据库定位 (登录号、bac 定位) :
- [0366] 1) AL079344, 鼠耳芥 DNA 染色体 4, BAC 克隆 T16L4 (ESSA 计划)
- [0367] 2) AL161575, 鼠耳芥 DNA 染色体 4, 重叠群 (contig) 片段号 71。
- [0368] 在数据库中预测的 ORF :
- [0369] 1) 76187..76814, 77189..77316, 77823..78080, 78318..78586, 78677..78968
- [0370] 2) 101002..101629, 102004..102131, 102638..102895, 103133..103401, 103492..103783
- [0371] AtCKX4 cDNA 序列如 SEQ ID NO 28 所列
- [0372] 预测的蛋白质序列 :SEQ ID NO 8
- [0373] 同源性
- [0374] 与玉蜀黍 cDNA 的同一性% :
- [0375] 41,0% (Dnastar/MegAlign-Clustal 方法)
- [0376] 与玉蜀黍蛋白质的相似性% :
- [0377] 41,0% (Dnastar/MegAlign-Clustal 方法)
- [0378] 与其它鼠耳芥属 cDNA 的同一性% (范围) :
- [0379] 35,2% (AtCKX6)-64,5% (AtCKX2) (Dnastar/MegAlign-Clustal 方法)
- [0380] 与其它鼠耳芥属蛋白质的相似性% (范围) :

- [0381] 35,1% (AtCKX6)-66,1% (AtCKX2) (Dnastar/MegAlign-Clustal 方法)
- [0382] E. 基因名称 :AtCKX5 (鼠耳芥细胞分裂素氧化酶样蛋白质 5, SEQ ID NO 9)
- [0383] 数据库定位 (登录号、bac 定位) :AC023754, F1B16, 全序列, 染色体 1
- [0384] 数据库中预测到 ORF。
- [0385] 本发明人利用若干基因预测程序鉴定该基因, 包括 GRAIL(<ftp://arthur.epm.ornl.gov/Pub/xgrail>), Genscan(<http://CCR-081.mit.edu/GENSCAN.html>) 和 NetPlantGene(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>)。
- [0386] 43756..44347, 44435..44562, 44700..44966, 45493..45755, 46200..46560
- [0387] 本发明人鉴定并预测的新的 AtCKX5cDNA 序列如 SEQ ID NO 29 所列。该 cDNA 预测的蛋白质序列如 SEQ ID NO 10 所列。第二个可能的 ATG 起始密码子位于基因组序列更上游的 9 个核苷酸。尚不清楚这两个起始密码子中, 哪个编码该蛋白质的第一个氨基酸。因此, 起始于该上游起始密码子的第二个可能的 AtCKX5 cDNA 也列于本发明的 SEQ ID NO 34。相应的基因组序列如 SEQ ID NO 33 所列, 编码的蛋白质为 SEQ ID NO 35。
- [0388] 同源性
- [0389] 与玉蜀黍 cDNA 的同一性% :
- [0390] 39,1% (Dnastar/MegAlign-Clustal 方法)
- [0391] 与玉蜀黍蛋白质的相似性% :
- [0392] 36,6% (Dnastar/MegAlign-Clustal 方法)
- [0393] 与其它鼠耳芥属 cDNA 的同一性% (范围) :
- [0394] 40,1% (AtCKX2)-44,0% (AtCKX3) (Dnastar/MegAlign-Clustal 方法)
- [0395] 与其它鼠耳芥属蛋白质的相似性% (范围) : :
- [0396] 41,6% (AtCKX4)-46,4% (AtCKX6) (Dnastar/MegAlign-Clustal 方法)
- [0397] F. 基因名称 :AtCKX6 (鼠耳芥细胞分裂素氧化酶样蛋白质 6, SEQ ID NO 11)
- [0398] 数据库定位 (登录号、bac 定位) :AL163818, 鼠耳芥 DNA 染色体 3, P1 克隆 MAA21 (ESSA 计划)。
- [0399] 在数据库中预测的 ORF :
- [0400] 46630..47215, 47343..47470, 47591..47806, 47899..48161, 48244..48565
- [0401] AtCKX6cDNA 序列如 SEQ ID NO 30 所列
- [0402] 预测的蛋白质序列 :SEQ ID NO 12
- [0403] 同源性
- [0404] 与玉蜀黍 cDNA 的同一性% : :
- [0405] 37,3% (Dnastar/MegAlign-Clustal 方法)
- [0406] 与玉蜀黍蛋白质的相似性% : :
- [0407] 36,1% (Dnastar/MegAlign-Clustal 方法)
- [0408] 与其它鼠耳芥属 cDNA 的同一性% (范围) :
- [0409] 34,9% (AtCKX2)-54,1% (AtCKX1) (Dnastar/MegAlign-Clustal 方法)
- [0410] 与其它鼠耳芥属蛋白质的相似性% (范围) :
- [0411] 35,1% (AtCKX4)-58,1% (AtCKX1) (Dnastar/MegAlign-Clustal 方法)
- [0412] 基因 AtCKX3 和 AtCKX5 在数据库中注释为推定的细胞分裂素氧化酶, 并且未

给出这些基因的 ORF。此外,预测的 AtCKX2 ORF (以及随之的蛋白质结构) 不同于我们自己的预测,我们的预测由 AtCKX2cDNA 测序证实。

[0413] 鼠耳芥属 AtCKX 基因 1-4 与玉米 CKX 基因的基因结构比较如图 1 所示。

[0414] 预测的鼠耳芥属 AtCKX 基因编码的蛋白质与玉米蛋白质之间显示 32% 和 41% 的序列相似性,而它们彼此之间显示 35% 和 66% 的序列相似性。由于序列保守性降低,事先并不清楚鼠耳芥属 AtCKX 基因是否编码具有细胞分裂素氧化酶活性的蛋白质。鼠耳芥属 AtCKX 预测蛋白质 1-4 与玉米 CKX 基因的比对如图 2 所示。

[0415] 实施例 3. 过量表达 AtCKX1 的转基因植物显示增强的细胞分裂素氧化酶活性以及植物形态学改变

[0416] 1. 克隆过程描述

[0417] 下列引物用于从鼠耳芥 (*Arabidopsis thaliana*, accession Columbia) 中 PCR 扩增 AtCKX1 基因 (小写字母为用于克隆的非同源序列):

[0418] 5' 引物序列:cggtcgacATGGGATTGACCTCATCCTTACG (SEQ ID NO:13)

[0419] 3' 引物序列:gcgtcgacTTATACAGTTCTAGGTTTCGGCAGTAT (SEQ ID NO:14)

[0420] 这些引物扩增的 2235-bp PCR 片段插入 pUC19 的 Sal I 位点。插入序列测序并证实 PCR 扩增产物不含任何突变。该载体的 SalI/SalI 片段亚克隆到双载体 pBinHyg-Tx 的改变的 CaMV 35S 启动子 (携带三个四环素操纵子序列) 下游的 SalI 位点 (Gatz 等人, 1992)。利用标准转化规程,通过土壤杆菌介导的转化将产生的构建体引入烟草和鼠耳芥。

[0421] 2. 转基因系的分子分析

[0422] 鉴定了高水平合成 AtCKX1 转录物的若干转基因系 (图 3)。表达 AtCKX1 转录物的转基因系也显示增强的细胞分裂素氧化酶活性 (由所述的基于 $[2-^3\text{H}] \text{iP}$ 转变为腺嘌呤的细胞分裂素氧化酶活性标准试验测定 (Motyka 等, 1996))。

[0423] 这由表 6 中 2 个烟草系和 2 个鼠耳芥属系举例说明。此结果证明,AtCKX1 基因编码具有细胞分裂素氧化酶活性的蛋白质。

[0424] 表 6. AtCKX1 转基因植物组织的细胞分裂素氧化酶活性

叶子样品		
植物品种	植物系	细胞分裂素氧化酶活性 (nmol Ade/mg 蛋白质.h)
鼠耳芥属	Col-0 野生型	0.009
	CKX1 -11	0.024
	CKX1-22	0.026
	CKX1 -22	0.027
烟草	SNN 野生型	0.004
	CKX1-SNN-8	0.016
	CKX1-SNN-28	0.021

[0425]

[0426] 3. 转基因系的表型描述

[0427] 3.1 在烟草中:

[0428] 该植物具有矮化表型,顶端优势下降(图 7A、B 和 C)以及根产生增强(图 8)。

[0429] 五种表型:

[0430] 1) 强 -2 个克隆

[0431] 2) 中 -3 个克隆

[0432] 3) 弱 -4 个克隆

[0433] 4) 高大植物(同 WT)、大花序 -5 个克隆

[0434] 5) 类似于 WT, 9 个克隆

[0435] 高度(见图 7B 和 C)

[0436] -WT: 介于 100-150cm

[0437] -弱: 大约 75cm

[0438] -中: 大约 40-45cm(主茎大约 25cm, 但侧枝生长过度。

[0439] -强: 大约 10cm

[0440] 转基因的 AtCKX1-48 和 AtCKX1-50 显示强的表型。以下为同 WT 植物相比测量茎的伸长:

[0441]

系	野生型	AtCKX1-48	AtCKX1-50
萌芽后天数	高度 (cm)	高度 (cm)	高度 (cm)
47	9, 5 $\pm$ 0, 5	1, 3 $\pm$ 0, 3	1, 2 $\pm$ 0, 2
58	22, 4 $\pm$ 2, 3	2, 2 $\pm$ 0, 3	2, 3 $\pm$ 0, 3
68	35, 3 $\pm$ 2, 6	3, 1 $\pm$ 0, 5	2, 6 $\pm$ 0, 5
100	113, 3 $\pm$ 9, 8	7, 1 $\pm$ 0, 8	4, 8 $\pm$ 0, 9
117	138, 6 $\pm$ 8, 1	8, 7 $\pm$ 0, 7	6, 6 $\pm$ 0, 9
131	139, 0 $\pm$ 9, 3	9, 3 $\pm$ 0, 7	8, 6 $\pm$ 1, 0
152	136, 6 $\pm$ 10, 4	10, 9 $\pm$ 1, 1	10, 0 $\pm$ 1, 0
165		11, 8 $\pm$ 1, 9	11, 4 $\pm$ 1, 4
181		16, 5 $\pm$ 1, 7	14, 9 $\pm$ 1, 2
198		19, 5 $\pm$ 1, 5	18, 1 $\pm$ 1, 3

[0442] 实验: 植物在温室土壤中生长。数据采自每系至少十株植物。

[0443] 叶子(参见图 7D 和 E)

[0444] AtCKX1 转基因表达子的叶子形状为披针形(长而窄): 成熟叶的宽-长比值从野

生型植物 1 : 2 减少到 AtCKX1 转基因的 1 : 3 (图 7E)。叶数和叶面比 WT 减少 (参见图 7D)。也注意到叶老化进展的显著差异。在 WT 烟草中, 叶老化开始于最基部的叶子, 引起叶色素的均匀减少 (图 7E)。相反, 强表达 AtCKX1 植物的老化叶子的叶脉保持绿色, 而脉间区域变黄, 表明叶的衰老变化。老叶的质地更坚硬。

[0445] 根

[0446] 该基因高表达的体外生长植物能够形成更多较粗 (较强壮) 的根, 并沿着茎形成气生根, 因而容易与 WT 区分,

[0447] 如图 8C 所示, AtCKX1-50 过量表达幼苗的初生根较长, 侧根和不定根的数目较多 (参见实施例 9)。

[0448] 外源细胞分裂素抑制根生长的剂量 - 反应曲线表明转基因幼苗的根对细胞分裂素的抗性高于 WT 的根 (图 8D)。AtCKX1 转基因植物对 iPR 的抗性较之 AtCKX2 不明显, 这与后者中 iP 型细胞分裂素的变化较小相一致 (见表 10)。

[0449] 土壤中生长的成熟植物尽管地上部分的生长大大减少, 但观察到根生物量大量增加 (土壤中生长 4-5 个月的植物参见图 8B)。

[0450] 节间距离

[0451] ● 中间表型: 花序下方第五节间约为 2.5cm 长, 第九节间约为 0.5cm 长, 而 WT 植物的第五和第九节间分别为 5cm 和 2cm 长。

[0452] ● 强表型: 植物 AtCKX1-50 于萌芽后 131 天测量下数第二十一节间长度为 $1.3 \pm 0.4\text{mm}$, WT 为 $39.2 \pm 3.8\text{mm}$

[0453] 顶端优势和分枝

[0454] 在营养生长期形成更多侧枝表明与 WT 植物相比顶端优势降低 (参见图 9)。中间型 AtCKX1 表达子主茎侧枝过度生长, 高度达到 40-45cm。甚至出现次生枝。然而, 芽并没有完全从顶端优势脱落, 即侧枝没有真正继续发育。顶端优势降低可能归因于枝条顶端分生组织较小而导致植物生长素产生减少 (参见实施例 10)。

[0455] 繁殖发育

[0456] AtCKX1 转基因植物的开花起始延迟, 花的数目和每粒蒴果的种子产量减少。转基因植物花的大小没有变化, 各粒种子的重量与野生型植物种子的重量相当。以下概述了两个典型的 AtCKX1 转基因植物的数据:

[0457] A. 开花起始

[0458]

系	野生型	AtCKX1 -48	AtCKX1 -50
开花时间 (DAG)	$106,2 \pm 3,3$	$193,3 \pm 4,3$	$191,8 \pm 3,8$

[0459] 实验: 数据采自每系至少十株植物。第一朵花完全伸展定义为开花起始。DAG = 萌芽后天数。

[0460] B. 每株植物的种子蒴果数目

[0461]

系	野生型	AtCKX1-48	AtCKX1-50
蒴果数目	83, 33±5, 13	2, 00±1, 00	2, 60±1, 67

[0462] 实验 :至少从 5 株不同植物确定种子蒴果数目。请注意这些植物冬季在温室条件下生长。这对花形成的数目有负面影响,特别是在转基因克隆中。然而,其花形成数目减少的概况是正确的。n. d., 未确定

[0463] C. 种子产量 / 蒴果 (mg)

[0464]

系	野生型	AtCKX1-48	AtCKX1-50
种子 / 蒴果 (mg)	87, 41±28, 75	23, 83±13, 36	61, 8±40, 66

[0465] 实验 :种子产量至少由 12 个种子蒴果确定。种子蒴果的大小变化很大,因此标准偏差大。n. d., 未确定

[0466] D. 100 粒种子的重量 (mg)

[0467]

系	野生型	AtCKX1-48	AtCKX1-50
种子重 (mg)	9, 73±0, 44	10, 70±1, 60	9, 54±0, 94

[0468] 实验 :种子生物量由来自至少 5 个不同种子蒴果的 100 粒种子的重量确定。n. d., 未确定

[0469] 3.2 鼠耳芥属中

[0470] - 萌芽起始与 WT 相同

[0471] - 总根系增大,旁根和不定根数目增加 (参见图 4A-D)

[0472] - 地面器官的生长减弱,产生矮化表型 (参见图 4E 和 F),叶生物量减少。叶和花的形成推迟。

[0473] - 与 WT 相比,生命周期较长,种子产量下降

[0474] 下列形态学数据说明这些表型 :

[0475] 根发育

[0476] A. 根系总长度

[0477]

系	野生型	AtCKX1-11	AtCKX1-15
长度 (mm)	32, 5	76, 5	68, 4

[0478] B. 初生根长度

[0479]

系	野生型	AtCKX1-11	AtCKX1-15
---	-----	-----------	-----------

长度 (mm)	32, 3±3, 8	52, 3±4, 8	39, 9±4, 2
---------	------------	------------	------------

[0480] C. 侧根 (LR) 长度

[0481]

系	野生型	AtCKX1-11	AtCKX1-15
长度 (mm)	0, 2±0, 4	15, 6±11, 0	10, 4±7, 6

[0482] D. 不定根长度

[0483]

系	野生型	AtCKX1-11	AtCKX1-15
长度 (mm)	0, 03±0, 18	8, 6±8, 5	19, 1±11, 0

[0484] E. 侧根 (LR) 数目

[0485]

系	野生型	AtCKX1-11	AtCKX1-15
LR 数目	0, 3±0, 5	10, 4±5, 4	2, 6±1, 1

[0486] F. 不定根 (AR) 数目

[0487]

系	Wild-type	AtCKX1-11	AtCKX1-15
AR 数目	0, 03±0, 18	1, 6±1, 1	2, 6±1, 1

[0488]

[0489] 实验:植物于 MS 培养基中体外萌芽 8 天后进行测量。每系至少计数 17 株植物。

[0490] 枝条发育

[0491] A. 叶面

[0492]

系	野生型	AtCKX1-11-7 T3 纯合植物	AtCKX1-11-12 T3 纯合植物	AtCKX1-15-1 T3 纯合植物
叶面(cm ²)	21,16±1,73	2,28±0,58	2,62±0,28	1,66 ± 0,22

[0493] 实验:测量在萌芽 30 天后形成的主要莲座叶的叶面面积。每个克隆分析 3 株植物。

[0494] 繁殖发育

[0495] 开花起始

[0496]

系	野生型	AtCKX1 -11 T3杂合植物	AtCKX2-2 T2杂合植物	AtCKX2-5 T2杂合植物
开花时间(DAG)	43,6 ± 5,8	69,7 ± 9,4	51,2 ± 4,1	45,1 ± 6,9

[0497] 实验:植物在温室条件下生长。每个克隆分析至少 13 株植物。DAG = 萌芽后天数

[0498] 结论:AtCKX1 转基因的鼠耳芥属植物的分析很大程度上证实了从烟草中获得的
结果,表明减少细胞分裂素含量所致后果的普遍特性。总根系增大(AtCKX1 转基因植物的
总根长增加大约 110-140%),枝条发育更慢(开花延迟)以及叶生物量减少。转基因植物的
种子产量也降低(数据未显示)。

[0499] 实施例 4. 过量表达 AtCKX2 的转基因植物显示增强的细胞分裂素氧化酶活性以及
植物形态学改变

[0500] 1. 克隆过程描述

[0501] 下列引物用于从鼠耳芥 (*Arabidopsis thaliana*, accession Columbia) 中 PCR 扩
增 AtCKX2 基因(小写字母为用于克隆的非同源序列):

[0502] 5' 引物序列:gcggtaccAGAGAGAGAAAACATAAAACAAATGGC(SEQ ID NO:15)

[0503] 3' 引物序列:gcggtaccCAATTTTACTTCCACCAAAATGC(SEQ ID NO:16)

[0504] 这些引物扩增的 3104-bp PCR 片段插入 pUC19 的 KpnI 位点。插入序列测序以检查
PCR 方法未引入与发表序列的差异。该载体的 KpnI/KpnI 片段亚克隆到双载体 pBinHyg-Tx
的改变的 CaMV 35S 启动子(携带三个四环素操纵子序列)下游的 KpnI 位点(Gatz 等人,
1992)。利用标准转化规程,通过土壤杆菌介导的转化将产生的构建体引入烟草和鼠耳芥。

[0505] 2. 转基因系的分子分析

[0506] 鉴定了高水平合成 AtCKX2 转录物的若干转基因系(图 6)。表达 AtCKX2 转录物的
转基因系也显示增强的细胞分裂素氧化酶活性。这由表 7 中 2 个烟草系和 3 个鼠耳芥属系
举例说明。此结果证明 AtCKX2 基因编码具有细胞分裂素氧化酶活性的蛋白质。

[0507] 表 7. AtCKX2 转基因植物组织的细胞分裂素氧化酶活性

[0508]

样品		
植物品种和组织	植物系	细胞分裂素氧化酶活性(nmol Ade/mg 蛋白质.h)
鼠耳芥属愈伤组织	Col-0野生型	0.037
	CKX2-15	0.351
	CKX2-17	0.380
	CKX2-55	0.265
烟草叶子	SNN野生型	0.009
	CKX2-SNN-18	0.091
	CKX2-SNN-19	0.091

[0509] 3. 转基因系的表型描述

[0510] 3.1 在烟草中 (参见图 7-10):

[0511] 三种表型:

[0512] 1) 强 -15 个克隆 (类似于 AtCKX1 的中间表型)

[0513] 2) 弱 -6 个克隆

[0514] 3) 其它 - 类似于 WT 植物, 7 个克隆

[0515] 植物地上部分

[0516] 有关植株高度、节间距离、分枝、叶子形成及变黄的观察结果类似于 AtCKX1 转基因植物, 一般具有某些微小的数量差异, AtCKX1 转基因植物比 AtCKX2 转基因的矮化特性更严重 (图 7A 和 B 比较了 AtCKX1 植物与 AtCKX2 植物)。以下强表型克隆 AtCKX2-38 和 AtCKX2-40 的茎伸长和节间距离的测量说明了这一点:

[0517] 茎伸长

[0518]

系	野生型	AtCKX2-38	AtCKX2-40
萌芽后天数	高度 (cm)	高度 (cm)	高度 (cm)
47	9, 5 $\pm$ 0, 5	2, 4 $\pm$ 0, 1	2, 6 $\pm$ 0, 2
58	22, 4 $\pm$ 2, 3	5, 5 $\pm$ 0, 7	5, 3 $\pm$ 0, 5
68	35, 3 $\pm$ 2, 6	7, 1 $\pm$ 0, 8	7, 0 $\pm$ 0, 7
100	113, 3 $\pm$ 9, 8	15, 5 $\pm$ 2, 5	20, 3 $\pm$ 6, 4
117	138, 6 $\pm$ 8, 1	19, 8 $\pm$ 3, 8	29, 5 $\pm$ 6, 0
131	139, 0 $\pm$ 9, 3	26, 5 $\pm$ 7, 0	33, 4 $\pm$ 5, 8
152	136, 6 $\pm$ 10, 4	33, 7 $\pm$ 6, 3	33, 9 $\pm$ 6, 4
165		36, 2 $\pm$ 4, 3	

[0519] 实验: 植物在温室土壤中生长。数据采自每系至少十株植物。

[0520] 节间距离

[0521]

系	野生型	AtCKX2-38
节间距离 (mm)	39, 2 $\pm$ 3, 8	7, 2 $\pm$ 1, 6

[0522] 实验: 萌芽 131 天后测量从下数第二十一节间的长度。

[0523] 根

[0524] 基因高表达的体外生长植物能够形成更多较粗 (较强壮) 的根, 并沿着茎形成气生根, 因而容易与 WT 植物区分。

[0525] 如图 8C 所示, AtCKX2-38 过量表达幼苗的初生根较长, 侧根和不定根的数目较多 (参见实施例 9)。

[0526] 外源细胞分裂素抑制根生长的剂量-反应曲线表明转基因幼苗的根对细胞分裂素的抗性高于 WT 的根 (图 8D)。AtCKX1-28 转基因植物对 iPR 的抗性比 AtCKX2-38 不明显, 这与后者中 iP 型细胞分裂素的变化较小相一致 (参见表 10)。

[0527] 对于土壤中生长的植物, 观察到 AtCKX2 转基因植物 T0 系的根生物量的鲜重和干重比 WT 增加, 如下表所示:

[0528]

系	野生型	AtCKX2 (T0)
鲜重 (g)	45, 2. $\pm$ 15, 4	77, 1 $\pm$ 21, 3
干重 (g)	6, 3 $\pm$ 1, 9	8, 6 $\pm$ 2, 2

[0529] 实验: 六个 WT 植物和六个独立的 T0 系 35S::AtCKX2 克隆在土壤中生长。开花后, 用水洗涤根系, 尽可能除去土壤, 测量鲜重和干重。

[0530] 对于水培生长的植物, 也观察到 AtCKX2 转基因植物 F1 代的根生物量的鲜重和干重比 WT 增加, 如下表所示:

[0531]

系	野生型	AtCKX2-38	AtCKX2-40
根鲜重 (g)	19, 76 $\pm$ 6, 79	33, 38 $\pm$ 7, 76	50, 04 $\pm$ 15, 59
根干重 (g)	2, 36 $\pm$ 0, 43	2, 61 $\pm$ 0, 39	3, 52 $\pm$ 1, 06
枝条鲜重 (g)	159, 8 $\pm$ 44, 53	33, 66 $\pm$ 2, 67	48, 84 $\pm$ 11, 83
枝条 / 根的鲜重比值	8, 24 $\pm$ 0, 63	1, 04 $\pm$ 0, 18	1, 08 $\pm$ 0, 51

[0532] 实验: 萌芽 60 天后, 土壤生长的植物转移到水培体系 (Hoagland's 溶液), 再生长 60 天。水培溶液连续通气, 每 3 天更换新鲜溶液。

[0533] 总之, 水培溶液中生长的转基因植物比野生型植物形成的根生物量多大约 65-150% (鲜重)。干重增加 10-50%。这种差异可能部分由于转基因植物的细胞体积大。这使细胞壁相应成分减少, 其形成大部分的干物质。枝条生物量减少为野生型枝条的 20%-70%。鲜重的差异导致枝条 / 根比值变动, 野生型约为 8, 而转基因克隆约为 1。

[0534] 结论:

[0535] 不同条件下生长的 AtCKX2 转基因幼苗和成熟植物与 WT 对照相比, 观察到根的生长和生物量增加, 尽管其地上植物部分的生长下降。在不同转基因植物之间观察到数量差异: 最强表达克隆观察到根生物量的增加较大。

[0536] 繁殖发育

[0537] AtCKX2 转基因植物的开花起始延迟, 花的数目和每粒蒴果的种子产量减少。这些效应非常类似于 AtCKX1 转基因植物的观察结果, 但在 AtCKX2 转基因植物中并不显著, 如下

表所示。转基因植物花的大小没有变化,各粒种子的重量与野生型植物种子的重量相当。

[0538] A. 开花起始

[0539]

系	野生型	AtCKX1-48	AtCKX1-50	AtCKX2-38	AtCKX2-40
开花时间 (DAG)	106, 2 ± 3, 3	193, 3 ± 4, 3	191, 8 ± 3, 8	140, 6 ± 6, 5	121, 9 ± 9, 8

[0540] 实验 :数据采自每系至少十株植物。第一花完全伸展定义为开花起始。DAG = 萌芽后天数。

[0541] B. 每株植物的种子蒴果数目

[0542]

系	野生型	AtCKX1-48	AtCKX1-50	AtCKX2-38	AtCKX2-40
蒴果数目	83, 33 ± 5, 13	2, 00 ± 1, 00	2, 60 ± 1, 67	4, 30 ± 2, 58	n. d.

[0543] 实验 :至少从 5 株不同植物确定种子蒴果数目。请注意这些植物冬季在温室条件下生长。这对花形成的数目有负面影响,特别是在转基因克隆中。然而,其花形成数目减少的概况是正确的。n. d., 未确定

[0544] C. 种子产量 / 蒴果 (mg)

[0545]

系	野生型	AtCKX1 -48	AtCKX1 -50	AtCKX2-38	AtCKX2-40
种子/蒴果 (mg)	87,41 ± 28,75	23,83 ± 13,36	61,8 ± 40,66	46,98 ± 29,30	n.d.

[0546] 实验 :种子产量至少由 12 个种子蒴果确定。种子蒴果的大小变化很大,因此标准偏差大。n. d., 未确定

[0547] D. 100 粒种子的重量 (mg)

[0548]

系	野生型	AtCKX1 -48	AtCKX1 -50	AtCKX2-38	AtCKX2-40
种子重 (mg)	9,73 ± 0,44	10,70 ± 1,60	9,54 ± 0,94	10,16 ± 0,47	n.d.

[0549] 实验 :种子生物量由来自至少 5 个不同种子蒴果的 100 粒种子的重量确定。n. d., 未确定

[0550] 3.2 鼠耳芥属中:

[0551] 由 AtCKX2 转基因植物获得下列形态学数据:

[0552] 根发育

[0553] A. 根系总长度

[0554]

系	野生型	AtCKX2-2	AtCKX2-5
长度 (mm)	32, 5	50, 6	48, 5

[0555] B. 初生根长度

[0556]

系	野生型	AtCKX2-2	AtCKX2-5
长度 (mm)	32, 3±3, 8	30, 7±4, 8	31, 6±6, 8

[0557] C. 侧根长度

[0558]

系	野生型	AtCKX2-2	AtCKX2-5
长度 (mm)	0, 2±0, 4	5, 5±9, 0	1, 9±2, 5

[0559] D. 不定根长度

[0560]

系	野生型	AtCKX2-2	AtCKX2-5
长度 (mm)	0, 03±0, 18	14, 4±10, 2	14, 9±9, 1

[0561] E. 侧根 (LR) 数目

[0562]

系	野生型	AtCKX2-2	AtCKX2-5
LR 数目	0, 3±0, 5	2, 9±2, 3	1, 9±1, 0

[0563] F. 不定根 (AR) 数目

[0564]

系	野生型	AtCKX2-2	AtCKX2-5
AR 数目	0, 03±0, 18	1, 8±0, 9	1, 8±1, 0

[0565] 实验 : 植物于体外 MS 培养基中 8d. a. g 后进行测量。每系至少计数 17 株植物。

[0566] 枝条发育[0567] 叶面

[0568]

系	野生型	AtCKX2-2 T2 杂合植物	AtCKX2-5 T2 杂合植物	AtCKX2-9 T2 杂合植物
叶面 (cm ²)	21,16 ± 1,73	8,20 ± 2,35	8,22 ± 0,55	7,72 ± 0,85

[0569] 实验:测量在萌芽 30 天后形成的主要莲座叶的叶面面积。每个克隆分析 3 株植物。

[0570] 繁殖发育

[0571] 开花起始

[0572]

系	野生型	AtCKX1-11 T3 杂合植物	AtCKX2-2 T2 杂合植物	AtCKX2-5 T2 杂合植物
开花时间 (DAG)	43,6 ± 5,8	69,7 ± 9,4	51,2 ± 4,1	45,1 ± 6,9

[0573] 实验:植物在温室条件下生长。每个克隆分析至少 13 株植物。DAG = 萌芽后天数

[0574] 结论:鼠耳芥属 AtCKX2 转基因植物叶生物量减少以及类似于 AtCKX1 转基因植物的矮化表型(比较图 5 和图 4F)。AtCKX2 转基因鼠耳芥属的总根系也增大。AtCKX2 转基因植物的总根长增加约 50%。AtCKX1 转基因植物的初生根较长,旁根较多,并形成较多不定根。AtCKX2 转基因植物的初生根没有增强生长,但比 WT 形成更多的旁根和侧根。

[0575] 小结:

[0576] 观察到 AtCKX2 转基因植物的表型与 AtCKX1 转基因植物非常类似但并不相同,与烟草转基因植物获得的结果也非常类似但并不相同。这证实在这两个植物品种中减少细胞分裂素含量所致后果的普遍特性,因此类似表型在其它植物品种中也可能发生。烟草和鼠耳芥属之间的主要区别在于 AtCKX2 过量表达植物没有增强初生根的生长(数据未显示)。

[0577] 实施例 5. 过量表达 AtCKX3 转基因植物显示增强的细胞分裂素氧化酶活性以及植物形态学改变

[0578] 1. 克隆过程描述

[0579] 下列引物用于从鼠耳芥 (*Arabidopsis thaliana*, accession Columbia) 中 PCR 扩增 AtCKX3 基因(小写字母为用于克隆的非同源序列):

[0580] 5' 引物序列:gcggtaccTTCATTGATAAGAATCAAGCTATTCA (SEQ ID NO:17)

[0581] 3' 引物序列:gcggtaccCAAAGTGGTGAGAACGACTAACA (SEQ ID NO:18)

[0582] PCR 扩增产生的 3397-bp PCR 片段插入 pBluescript 的 KpnI 位点。插入序列测序以证实 PCR 扩增产物与基因比较没有序列变化。该载体的 KpnI/KpnI 片段亚克隆到双载体 pBinHyg-Tx 的改变的 CaMV 35S 启动子(携带三个四环素操纵子序列)下游的 KpnI 位点(Gatz 等人,1992)。利用标准转化规程,通过土壤杆菌介导的转化将产生的构建体引入烟草和鼠耳芥。

[0583] 2. 转基因系的分子分析

[0584] 鉴定了高水平合成 AtCKX3 转录物的若干转基因烟草系(图 11A)。表达 AtCKX3 转录物的转基因烟草系也显示增强的细胞分裂素氧化酶活性。这由表 8 中的 3 个植物举例说明。此结果证明 AtCKX3 基因编码具有细胞分裂素氧化酶活性的蛋白质。

[0585] 表 8. AtCKX4 转基因植物组织的细胞分裂素氧化酶活性

叶子样品		
植物品种和组织	植物系	细胞分裂素氧化酶活性 (nmol Ade/mg 蛋白质.h)
[0586]	烟草叶子	SNN 野生型
		0.011
		CKX3-SNN-3
		0.049
		CKX3-SNN-6
		0.053
		CKX3-SNN-21
		0.05

[0587] 3. 植物表型分析

[0588] 在烟草和鼠耳芥属中过量表达 AtCKX3 基因所产生的表型基本上类似于表达 AtCKX1 和 AtCKX2 的植物,即增强生根及矮化。然而,在烟草中过量表达 AtCKX3 基因比 AtCKX2 产生更强的表型。在这种意义上讲,过量表达 AtCKX3 与过表达 AtCKX1 更为相似。

[0589] 实施例 6. 过量表达 AtCKX4 的转基因植物显示增强的细胞分裂素氧化酶活性以及植物形态学改变

[0590] 1. 克隆过程描述

[0591] 下列引物用于从鼠耳芥 (*Arabidopsis thaliana*, accession Columbia) 中 PCR 扩增 AtCKX4 基因 (小写字母为用于克隆的非同源序列) :

[0592] 5' 引物序列 :gcggtaccCCCATTAACTACCCGTTTG (SEQ ID NO :19)

[0593] 3' 引物序列 :gcggtaccAGACGATGAACGTACTTGTCTGTA (SEQ ID NO :20)

[0594] PCR 扩增产生的 2890-bp PCR 片段插入 pBluescript 的 KpnI 位点。插入序列测序以证实 PCR 扩增产物与基因比较没有序列变化。该载体的 KpnI/KpnI 片段亚克隆到双载体 pBinHyg-Tx 的改变的 CaMV 35S 启动子 (携带三个四环素操纵子序列) 下游的 KpnI 位点 (Gatz 等人,1992)。利用标准转化规程,通过土壤杆菌介导的转化将产生的构建体引入烟草和鼠耳芥。

[0595] 2. 转基因系的分子分析

[0596] 高水平合成 AtCKX4 转录的若干转基因烟草系 (图 11B)。表达 AtCKX4 转录物的转基因系也显示增强的细胞分裂素氧化酶活性。这由表 9 中 3 个鼠耳芥属系和 3 个烟草系举例说明。此结果证明 AtCKX4 基因编码具有细胞分裂素氧化酶活性的蛋白质。

[0597] 表 9. AtCKX4 转基因植物组织的细胞分裂素氧化酶活性

[0598]

样品		
植物品种和组织	植物系	细胞分裂素氧化酶活性 (nmol Ade/mg 蛋白质.h)
鼠耳芥属愈伤组织	Col-0 野生型	0.037
	CKX4-37	0.244
	CKX4-40	0.258
	CKX4-41	0.320
烟草叶子	SNN 野生型	0.011
	CKX4-SNN-3	0.089
	CKX4-SNN-18	0.085
	CKX4-SNN-27	0.096

[0599] 总之,数据表明四个细胞分裂素氧化酶以 iP 为底物的表观 K_m 值介于 0.2-9.5 μ M 范围内,这进一步表明 AtCKX1-4 编码的蛋白质确实是如此处公开的细胞分裂素氧化酶。

[0600] 3. 植物表型分析

[0601] 在烟草和鼠耳芥属中过量表达 AtCKX4 基因所产生的表型基本上类似于表达 AtCKX1 和 AtCKX2 的植物,即生根增强、顶端优势降低、矮化以及烟草老叶的脉间区域变黄。烟草中另外的表型为披针形叶(改变长-宽比例)。

[0602] 过量表达 AtCKX 烟草植物的一般观察结果

[0603] 总之,表型分析表明在烟草中过量表达 AtCKX 基因引起植物枝条和根系发育的剧烈变化,包括根系发育增强以及植物地上部分矮化。如此处公开,也观察到其它效应,例如改变叶老化、在茎上形成不定根等。不同的基因,其变化非常相似,但并不相同。在烟草中,AtCKX1 和 AtCKX3 过量表达子及 AtCKX2 和 AtCKX4 的相似。前两者一般显示较高表达的性状,特别是在枝条中。因此,可优选特定的细胞分裂素氧化酶基因以获得本发明实施方案中所述表型。

[0604] 实施例 7. AtCKX5 基因的克隆

[0605] 下列引物用于从鼠耳芥 (*Arabidopsis thaliana*, accession Columbia) 中 PCR 扩增 AtCKX5 基因(小写字母为用于克隆的非同源序列):

[0606] 5' 引物序列:gggtaccTTGATGAATCGTGAAATGAC(SEQ ID NO:21)

[0607] 3' 引物序列:gggtaccCTTTCCTCTTGGTTTTGTCCTGT(SEQ ID NO:22)

[0608] 5' 引物序列包括 AtCKX5 蛋白质两个潜在的起始密码子,下划线为最 5' 的起始密码子,斜体表示第二个 ATG。PCR 扩增产生的 2843-bpPCR 片段,以平端产物插入 pCR-Blunt II-TOPO 克隆载体 (Invitrogen)。

[0609] 实施例 8. AtCKX6 基因克隆

[0610] 下列引物用于从鼠耳芥 (*Arabidopsis thaliana*, accession Columbia) 中 PCR 扩

增 AtCKX6 基因（小写字母为用于克隆的非同源序列）：

[0611] 5' 引物序列：gctctagaTCAGGAAAAGAACCATGCTTATAG (SEQ ID NO :23)

[0612] 3' 引物序列：gctctagaTCATGAGTATGAGACTGCCTTTTG (SEQ ID NO :24)

[0613] PCR 扩增产生的 1949-bp PCR 片段，以平端产物插入 pCR-Blunt II-TOPO 克隆载体 (Invitrogen)。

[0614] 实施例 9. 烟草幼苗生长测试表明 AtCKX 转基因植物的早期活力

[0615] 过量表达 AtCKX1-50 和 AtCKX2-38 转基因植物和 WT 烟草的种子体外播种在 MS 培养基中，低温处理后 4 天带到培养间，6 天后萌芽。萌芽 10 天后观察幼苗生长（参见图 8C），总结如下。每个克隆至少计数 20 株个体。两次不同实验获得相似数据。

[0616] A. 根系总长度

[0617]

系	野生型	AtCKX1-50	AtCKX2-38
长度 (mm)	61, 1	122, 0	106, 5

[0618] B. 初生根长度

[0619]

系	野生型	AtCKX1-50	AtCKX2-38
长度 (mm)	32, 3±2, 6	50, 8±4, 5	52, 4±4, 8

[0620] C. 侧根长度

[0621]

系	野生型	AtCKX1-50	AtCKX2-38
长度 (mm)	9, 8±5, 5	18, 0±8, 1	13, 0±6, 0

[0622] D. 不定根长度

[0623]

系	野生型	AtCKX1-50	AtCKX2-38
长度 (mm)	19, 0±5, 0	53, 0±12, 0	42, 0±9, 8

[0624] E. 侧根 (LR) 数目

[0625]

系	野生型	AtCKX1-50	AtCKX2-38
LR 数目	1, 9±0, 9	6, 5±2, 2	5, 6±2, 0

[0626] F. 不定根 (AR) 数目

[0627]

系	野生型	AtCKX1-50	AtCKX2-38
---	-----	-----------	-----------

AR 数目	2, 2±0, 6	3, 5±0, 9	3, 6±1, 3
-------	-----------	-----------	-----------

[0628] AtCKX1 和 AtCKX2 植物的一般观察结果:

[0629] 萌芽 10 天以后,与未转化的对照植物相比,AtCKX1 和 AtCKX2 过量表达烟草植物的幼苗的不定根多出 60%,侧根多出 3 倍。初生根的长度增加约 70%。加之更多、更长的旁根和次生根,使总根长增加 70-100%。这些结果表明过量表达细胞分裂素氧化酶增强了主根和不定根的生长和发育,引起早期活力。

[0630] 实施例 10. AtCKX1 过量表达烟草植物形态学变化的组织学分析

[0631] 显微镜分析不同组织揭示 AtCKX 转基因植物的形态变化是细胞数目和细胞形成速度方面显著变化的反映(参见图 10)。AtCKX1 转基因植物的枝条顶端分生组织(SAM)比野生型小,位于侧器形成的中央带和边缘带之间的细胞较少,但细胞大小相同(图 10A)。细胞分裂素含量减少导致 SAM 的细胞数目和大小减少,表明细胞分裂素具有控制 SAM 增殖的作用。分化样式没有发生明显变化,提示 SAM 分化带的空间定向很大程度上与细胞数目以及局部细胞分裂素浓度无关。细胞分裂素氧化酶过量表达子叶子的整体组织样式没有变化。但韧皮部和木质部的大小显著减少(图 10B)。相反,叶薄壁组织和表皮细胞的平均细胞大小增加 4-5 倍(图 10C、D)。AtCKX1 转基因植物以野生型叶 3-4%的速度形成新细胞,估计叶子的最终细胞数目介于野生型的 5-6%。这表明为了维持细胞分裂周期,叶中绝对需要细胞分裂素。花器的细胞大小和细胞类型均未改变,每粒蒴果的种子产量在野生型及 AtCKX 转基因植物中相似。AtCKX1 转基因植物根分生组织的细胞群体大约增大 4 倍,中囊轴(columnella)和侧囊轴中细胞数目均增多(图 10E、F)。由于各类根细胞的直径增大,最终根部直径增加 60%。野生型和转基因植物根的径向样式相同,不同之处在于经常注意到转基因根皮层细胞存在第四层(图 10G)。细胞数目增加而细胞长度略微减少表明根生长增强是由于周期细胞数目增加,而非细胞生长增强。细胞分裂素含量降低的情况下,根分生组织细胞必须经历另轮有丝分裂,才能脱离分生组织并开始伸长。因此,脱离分生组织由对细胞分裂素敏感的机制来调节。显然,细胞分裂素对根分生组织具有负调节作用,野生型细胞分裂素浓度受抑制以发育出最大的根系。因此,利用过量表达细胞分裂素氧化酶减少活性细胞分裂素的水平刺激根发育,其导致与 WT 植物相比,根的大小增加,具有更多的侧根和不定根。

[0632] 实施例 11. AtCKX1 和 AtCKX2 过量表达的烟草植物细胞分裂素含量减少。

[0633] 在测量的 16 个不同的细胞分裂素代谢物中,AtCKX2 过量表达子中 iP 型细胞分裂素的变化最大(表 10):表达 AtCKX2 植物中 iP 型细胞分裂素含量全面下降比 AtCKX1 转基因植物更为显著。AtCKX1 转基因植物的枝条显示更强的表型。尚未了解与所分析的不同性状相对应的细胞分裂素代谢物。不同形式的细胞分裂素可能在不同的发育过程中发挥不同的作用。注意到 Z 型细胞分裂素的变化较小,这可能是由于底物的可及性不同,或者蛋白质的底物特异性下降。各个转基因克隆的 iP 和 Z 代谢物的总含量介于野生型的 31%-63%之间。转基因植物中 O-葡萄糖苷的细胞分裂素储备库也降低(表 10)。N-葡萄糖苷和 DHZ 型细胞分裂素的浓度很低,在转基因幼苗中没有或者只略微改变(数据未显示)。

[0634] 表 10. AtCKX 转基因植物的细胞分裂素含量。按 Faiss 等人,1997 所述进行细胞分裂素的提取、免疫纯化、HPLC 分离以及 ELISA 方法定量。每个克隆分析大约 100 株两周

龄幼苗的三个独立混合样本（每样本 2.5g）。浓度为 $\text{pmol} \times \text{g 鲜重}^{-1}$ 。缩写：iP, $\text{N}^6(\Delta^2 \text{ 异戊烯基})$ 腺嘌呤；PR, $\text{N}^6-(\Delta^2 \text{ 异戊烯基})$ 腺嘌呤核苷；iPRP, $\text{N}^6(\Delta^2 \text{ 异戊烯基})$ 腺嘌呤核苷 5' - 一磷酸；Z, 反式 - 玉米素；ZR, 玉米素核苷；ZRP, 玉米素核苷 5' - 一磷酸；ZOG, 玉米素 O- 葡萄糖苷；ZROG, 玉米素核苷 O- 葡萄糖苷。

[0635]

系	WT		AtCKX1-2		AtCKX1-28		AtCKX2-38		AtCKX2-40	
细胞分裂素	浓度	浓度	WT%	浓度	WT%	浓度	WT%	浓度	WT%	
素代谢物										
iP	5,90±1,80	4,76±0,82	81	4,94±2,62	84	1,82±0,44	31	2,85±0,62	48	
ipR	2,36±0,74	1,53±0,14	65	0,75±0,27	32	0,55±0,39	23	0,89±0,07	38	
iPRP	3,32±0,73	0,87±0,26	26	1,12±0,13	34	0,80±0,48	24	1,68±0,45	51	
Z	0,24±0,06	0,17±0,02	71	0,22±0,03	92	0,21±0,06	88	0,22±0,02	92	
ZR	0,60±0,13	0,32±0,12	53	0,34±0,03	57	0,34±0,15	57	0,32±0,05	53	
ZRP	0,39±0,17	0,42±0,11	107	0,28±0,15	72	0,06±0,01	15	0,17±0,06	44	
ZOG	0,46±0,20	0,32±0,09	70	0,26±0,13	57	0,20±0,07	43	0,12±0,02	26	
ZROG	0,48±0,17	0,30±0,06	63	0,47±0,02	98	0,23±0,05	48	0,30±0,13	63	
合计	13,75	8,69	63	8,38	61	4,21	31	6,55	48	

[0636] 实施例 12. 嫁接实验表明 AtCKX 过量表达所致矮化和根发育增强限于转基因组织

[0637] 为研究细胞分裂素氧化酶过量表达的哪些表型效应限于表达的组织（即为细胞或器官自主性状）进行嫁接实验。在 AtCKX2 转基因烟草植物和 WT 烟草之间进行交互嫁接。该实验使用的转基因植物是显示强表型的 AtCKX2-38, 其特征在于根生长增强以及植物地上部分发育减少。如实施例 3-6 所述, 这是烟草和鼠耳芥属中由细胞分裂素氧化酶过量表达所致的两个重要表型。

[0638] 嫁接并且嫁接接点位于土壤以上约 10cm 的时植物大约 15cm 高。图 12 所示为嫁接 15 周后的植物。主要结果是：(i) 嫁接在转基因根状茎上的 WT 接穗的地上表型类似于 WT 嫁接对照（= WT 根状茎上的 WT 接穗）。重要的是, 这表明在根状茎中过量表达 AtCKX2 转基因不诱导该植物非转基因的地上部分的矮化（参见图 12A）。转基因根状茎维持其根生长增强, 表明 AtCKX 转基因植物的根生长增强是自主性的, 并不依赖于 AtCKX 转基因枝条（图 12C）。有趣的是, 嫁接在转基因根状茎上的 WT 接穗看上去健康, 并且发育良好。值得注意的是, 这些植物的基生叶延迟老化（参见图 12A）；(ii) 嫁接在 WT 根状茎上的转基因接穗看上去类似于所来源的转基因植物的地上部分, 即枝条矮化表型也是自主性的, 并不依赖于根生长的增强（参见图 12B）。

[0639] 嫁接在转基因根状茎上的 WT 枝条除上述优良表现之外, 注意到在 WT 枝条的基部形成不定根（图 12D, 右侧植物）。在 AtCKX 转基因植物茎上也形成不定根, 但 WT 对照嫁

接物的茎上没有(图 12D,左侧植物),因而似乎是非自主性性状。

[0640] 总之,本发明公开了 AtCKX 过量表达烟草的根形成增强以及枝条矮化是自主性性状,并可以通过嫁接方法而分离。令人吃惊的是,在 AtCKX 转基因根状茎上嫁接 WT 接穗引起的植物生长更具活力,并延迟叶子老化。

[0641] 除嫁接之外,可以使用组织特异性启动子分离细胞分裂素过表达的自主性表型效应。因此,本发明公开了以组织特异性方式过量表达细胞分裂素氧化酶可用于改变植物例如枝条或根的形态学。

[0642] 实施例 13. 转基因植物中在根特异性启动子控制下 AtCKX 基因的表达导致根产量增加

[0643] 将 AtCKX 基因(参见实施例 4)克隆于可驱动根特异性表达的鼠耳芥属根 *clavata* 同源性启动子(SEQ ID NO 36)控制之下。其它根特异性启动子也可用于本发明目的。代表性的根特异性启动子参见表 5。

[0644] 在根中特异性表达 AtCKX 基因的转基因植物显示根产生提高,而对该植物地上部分的生长和发育没有负面影响。观察到对叶子老化和植物地上部分生长的正效应。

[0645] 实施例 14. 转基因植物中在衰老诱导型启动子控制之下 AtCKX 基因的抑制导致叶老化延迟以及种子产量增加。

[0646] 将设计为抑制内源细胞分裂素氧化酶基因表达的、来源于 AtCKX 基因的嵌合基因构建体克隆于衰老诱导型启动子控制之下。例如,可以使用来源于衰老相关基因(SAG)的启动子,例如 SAG 12 启动子(Quirino 等人,2000)。在老化叶子中特异性抑制内源细胞分裂素氧化酶基因的转基因植物显示叶老化延迟以及种子产量较高,而对该植物的形态学以及生长和发育没有负面影响。

[0647] 实施例 15. 在雌性繁殖器官中过量表达 AtCKX 基因导致单性果实发育

[0648] 将 AtCKX 基因的开放阅读框架克隆于使其在雌性繁殖器官中过表达的启动子控制之下,例如金鱼草(*Antirrhinum majus*)DefH9 启动子或其同系物,其在胎座和胚珠中具有高表达特异性。在这些组织中细胞分裂素氧化酶活性提高的转基因植物显示单性果实发育。

[0649] 参考文献

[0650] W00105985.Method to modulate the expression of genes inducing the parthenocarpic trait in plants.

[0651] Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D. (1994). "Molecular Biology of the Cell." Garland Publishing Inc.

[0652] Altschul, S. F., Madden, T. L., **Schäffer**, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucl. Acids Res. 25, 3389-3402.

[0653] An, G., Watson, B. D., Stachel, S., Gordon, M. P., and Nester, E. W. (1985). New cloning vehicles for transformation of higher plants. EMBO J. 4, 277-284.

[0654] Armstrong, C. L., Petersen, W. P., Buchholz, W. G., Bowen, B. A., and Sulc, S. L. (1990). Factors affecting PEG-mediated stable transformation of maize protoplasts. Plant Cell Reports 9, 335-339.

- [0655] Banerjee, A., Pramanik, A., Bhattacharjya, S., and Balaram, P. (1996). Omega amino acids in peptide design:incorporation into helices. *Biopolymers* 39, 769-777.
- [0656] Baron, M.H. and Baltimore, D. (1982). Antibodies against the chemically synthesized genome-linked protein of poliovirus react with native virus-specific proteins. *Cell* 28,395-404.
- [0657] Bartel, P.L. and Fields, S. (1997). "The Yeast Two-Hybrid System." Oxford University Press.
- [0658] Benkirane, N., Guichard, G., Briand, J.P., and Muller, S. (1996). Exploration of requirements for peptidomimetic immune recognition. Antigenic and immunogenic properties of reduced peptide bond pseudopeptide analogues of a histone hexapeptide. *J. Biol. Chem.* 271,33218-33224.
- [0659] Berry, A. and Brenner, S.E. (1994). A prototype computer system for de novo protein design. *Biochem. Soc. Trans.* 22,1033-1036.
- [0660] Christou, P., McCabe, D.E., and Swain, W.F. (1988). Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles. *Plant Physiol.* 87,671-674.
- [0661] Crossway, A., Oakes, J.V., Irvine, J.M., Ward, B., Knauf, V.C., and Shewmaker, C.K. (1986). Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* 202,179-185.
- [0662] Dale, E.C. and Ow, D.W. (1990). Intra- and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. *Gene* 91, 79-85.
- [0663] Dodds, J.H. (1985). "Plant genetic engineering." Cambridge University Press.
- [0664] Doerner, P., Jorgensen, J.E., You, R., Steppuhn, J., and Lamb, C. (1996). Control of root growth and development by cyclin expression. *Nature* 380,520-523.
- [0665] Dorner, B., Husar, G.M., Ostresh, J.M., and Houghten, R.A. (1996). The synthesis of peptidomimetic combinatorial libraries through successive amide alkylations. *Bioorg. Med. Chem.* 4,709-715.
- [0666] Ellis, J.G., Llewellyn, D.J., Dennis, E.S., and Peacock, W.J. (1987). Maize Adh-1 promoter sequences control anaerobic regulation: addition of upstream promoter elements from constitutive genes is necessary for expression in tobacco. *EMBO J.* 6,11-16.
- [0667] Faiss, M., Zalubilová, J., Strnad, M., Schmölling, T. (1997). Conditional transgenic expression of the ipt gene indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants. *Plant J.* 12,401-415.
- [0668] Fassina, G. and Melli, M. (1994). Identification of interactive sites of proteins and protein receptors by computer-assisted searches for complementary

peptide sequences.

[0670] Immunomethods. 5,114-120.

[0671] Fedoroff, N. V. and Smith, D. L. (1993). A versatile system for detecting transposition in Arabidopsis. Plant J. 3,273-289.

[0672] Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.

[0673] J. Mol. Biol 166,557-580.

[0674] Hansen, G. and Chilton, M. D. (1996). "Agrolistic" transformation of plant cells: integration of T-strands generated in planta. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 93,14978-14983.

[0675] Hansen, G., Shillito, R. D., and Chilton, M. D. (1997). T-strand integration in maize protoplasts after codelivery of a T-DNA substrate and virulence genes.

[0676] Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 94,11726-11730.

[0677] Hanson, B., Engler, D., Moy, Y., Newman, B., Ralston, E., and Gutterson, N. (199g). A simple method to enrich an Agrobacterium-transformed population for plants containing only T-DNA sequences. Plant J. 19,727-734.

[0678] Harlow, E. and Lane, D. (1988). "Antibodies :A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[0679] Herrera-Estrella, L., De Block, M., Messens, E. H. J. P., Van Montagu, M., and Schell, J. (1983). Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. EMBO J. 2,987-995.

[0680] Hoffman, D. L., Laiter, S., Singh, R. K., Vaisman, I. I., and Tropsha, A. (1995). Rapid protein structure classification using one-dimensional structure profiles on the bioSCANparallel computer. Comput. Appl. Biosci. 11,675-679.

[0681] Krens, F. A., Molendijk, L., Wullems, G. J., and Schilperoort, R. A. (1982). In vitro transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. Nature 296, 72-74.

[0682] Lerner, R. A. (1982). Tapping the immunological repertoire to produce antibodies of predetermined specificity. Nature 299,593-596.

[0683] Lerner, R. A., Green, N., Alexander, H., Liu, F. T., Sutcliffe, J. G., and Shinnick, T. M. (1981). Chemically synthesized peptides predicted from the nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome elicit antibodies reactive with the native envelope protein of Dane particles. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 78, 3403-3407.

[0684] Liddle, J. E. and Cryer, A. (1991). "A Practical Guide to Monoclonal Antibodies." Wiley New York.

[0685] Loffler, J., Langui, D., Probst, A., and Huber, G. (1994). Accumulation of a 50kDa N-terminal fragment of beta-APP695 in Alzheimer's disease hippocampus and neocortex.

- [0686] Neurochem. Int. 24, 281-288.
- [0687] Monge, A., Lathrop, E. J., Gunn, J. R., Shenkin, P. S., and Friesner, R. A. (1995). Computer modeling of protein folding: conformational and energetic analysis of reduced and detailed protein models. *J. Mol. Biol.* 247, 995-1012.
- [0688] Morris, R. O. et al. (1999). Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 328-333.
- [0689] Motyka, V., Faiss, M., Strnad, M., Kaminek, M. and Schmuelling, T. (1996). Changes in cytokinin content and cytokinin oxidase activity in response to derepression of ipt gene transcription in transgenic tobacco calli and plants. *Plant Physiol.* 112, 1035-1043.
- [0690] Murakami, T., Simonds, W. F., and Spiegel, A. M. (1992). Site-specific antibodies directed against G protein beta and gamma subunits: effects on alpha and beta gamma subunit interaction. *Biochemistry* 31, 2905-2911.
- [0691] Olszewski, K. A., Kolinski, A., and Skolnick, J. (1996). Folding simulations and computer redesign of protein A three-helix bundle motifs. *Proteins* 25, 286-299.
- [0692] Osborne, B. I., Wirtz, U., and Baker, B. (1995). A system for insertional mutagenesis and chromosomal rearrangement using the Ds transposon and Cre-lox. *Plant J.* 7, 687-701.
- [0693] Ostresh, J. M., Blondelle, S. E., Dorner, B., and Houghten, R. A. (1996). Generation and use of nonsupport-bound peptide and peptidomimetic combinatorial libraries. *Methods Enzymol.* 267, 220-234.
- [0694] Pabo, C. O. and Suchanek, E. G. (1986). Computer-aided model-building strategies for protein design. *Biochemistry* 25, 5987-5991.
- [0695] Paszkowski, J., Shillito, R. D., Saul, M., Mandak, V., and Hohn, T. H. B. P. I. (1984). Direct gene transfer to plants. *EMBO J.* 3, 2717-2722.
- [0696] Peralta, E. G., Hellmiss, R., and Ream, W. (1986). Overdrive, a T-DNA transmission enhancer on the *A. tumefaciens* tumour-inducing plasmid. *EMBO J.* 5, 1137-1142.
- [0697] Quirino, B. F., Noh, Y.-S., Himelbau, E., and Amasino, R. M. (2000). Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant Science* 5, 278-282.
- [0698] Renouf, D. V. and Hounsell, E. F. (1995). Molecular modelling of glycoproteins by homology with non-glycosylated protein domains, computer simulated glycosylation and molecular dynamics. *Adv. Exp. Med. Biol.* 376, 37-45.
- [0699] Rinaldi, A. C. and Comandini, O. (1999). Cytokinin oxidase strikes again. *Trends in Plant Sc.* 4, 300.
- [0700] Rose, R. B., Craik, C. S., Douglas, N. L., and Stroud, R. M. (1996). Three-dimensional structures of HIV-1 and SIV protease product complexes. *Biochemistry* 35, 12933-12944.

- [0701] Rutenber, E. E. , McPhee, F. , Kaplan, A. P. , Gallion, S. L. , Hogan, J. C. , Jr. , Craik, C. S. , and Stroud, R. M. (1996). A new class of HIV-1 protease inhibitor :the crystallographic structure, inhibition and chemical synthesis of an aminimide peptide isostere.
- [0702] Bioorg. Med. Chem. 4,1545-1558.
- [0703] Sambrook, J. , Fritsch, E. F. , and Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning :A Laboratory Manual. " Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [0704] Schlappi, M. , Smith, D. , and Fedoroff, N. (1993). TnpA trans-activates methylated maize Suppressor-mutator transposable elements in transgenic tobacco. Genetics 133,1009-1021.
- [0705] Shioda, T. , Andriole, S. , Yahata, T. , and Isselbacher, K. J. (2000). A green fluorescent protein-reporter mammalian two-hybrid system with extrachromosomal maintenance of a prey expression plasmid :Application to interaction screening. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 97,5220-5224.
- [0706] Tamura, R. N. , Cooper, H. M. , Collo, G. , and Quaranta, V. (1991). Cell type-specific integrin variants with alternative alpha chain cytoplasmic domains. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 88,10183-10187.
- [0707] Van Haaren, M. J. , Sedee, N. J. , Schilperoort, R. A. , and Hooykaas, P. J. (1987). Overdrive is a T-region transfer enhancer which stimulates T-strand production in Agrobacterium tumefaciens. Nucleic Acids Res. 15,8983-8997.
- [0708] Van Sluys, M. A. , Tempe, J. , and Fedoroff, N. (1987). Studies on the introduction and mobility of the maize Activator element in Arabidopsis thaliana and Daucus carota. EMBO J. 6,3881-3889.
- [0709] Wang, K. , Genetello, C. , Van Montagu, M. , and Zambryski, P. C. (1987). Sequence context of the T-DNA border repeat element determines its relative activity during T-DNA transfer to plant cells. Mol. Gen. Genet. 210,338-346.
- [0710] Woulfe, J. , Lafortune, L. , de Nadai, F. , Kitabgi, P. , and Beaudet, A. (1994). Post-translational processing of the neurotensin/neuromedin N precursor in the central nervous system of the rat-II. Immunohistochemical localization of maturation products. Neuroscience 60,167-181.
- [0711] Zhang, Y. L. , Dawe, A. L. , Jiang, Y. , Becker, J. M. , and Naider, F. (1996). A superactive peptidomimetic analog of a farnesylated dodecapeptide yeast pheromone. Biochem. Biophys. Res. Commun. 224,327-331.

[0001]

序列表

<110> Schmülling, Thomas
Werner, Tomás

<120> 改变植物形态学、生物化学和生理学的方法

<130> CROP-005-PCT

<140>

<141>

<150> EP 00870132.8

<151> 2000-06-16

<150> US 60/258,415

<151> 2000-12-27

<150> EP 01870053.4

<151> 2001-03-16

<160> 36

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2236

<212> DNA

<213> 鼠耳芥 (*Arabidopsis thaliana*)

<400> 1

```
atgggattga cctcatcctt acggttccat agacaaaaca acaagacttt cctcgggaatc 60
ttcatgatct tagttctaag ctgtatacca ggtagaacca atctttgttc caatcattct 120
gttagtaccc caaaagaatt accttcttca aatccttcag atattcggtc ctcattagtt 180
tactagatt tggagggtta tataagcttc gacgatgtcc acaatgtggc caaggacttt 240
ggcaacagat accagttacc acctttggca attctacatc caaggtcagt ttttgatatt 300
tcatcgatga tgaagcatat agtacatctg ggctccacct caaatcttac agtagcagct 360
agaggccatg gtcactcgct tcaaggacaa gctctagctc atcaagggtg tgtcatcaaa 420
atggagtcac ttcgaagtcc tgatatcagg atttataagg ggaagcaacc atatgttgat 480
gtctcagggtg gtgaaatatg gataaacatt ctacgcgaga ctctaaaata cggctcttca 540
ccaaagtcc tggacagacta ccttcatttg accgttggag gtacactatc taatgctgga 600
atcagcgggtc aagcattcaa gcatggacct caaatcaaca acgtctacca gctagagatt 660
gttacaggta tttcattcat gctttatctc tgcggtagtc tcaaaaaaat atgcacctgt 720
aaagaatatc catctcttca tgagcaaaaa catgacgac tttaaataat ttttgactat 780
aaaacaagag tgcattaggca caaatgtgaa attgcaaca cacaattgta acttgcacca 840
agaaaaaagt tataaaaaa aacaactgat aagcaatata tttccaatat ttaatcaggg 900
aaaggagaag tcgtaacctg ttctgagaag cggaattctg aacttttctt cagtgttctt 960
ggcgggcttg gacagtttgg cataatcacc cgggcacgga tctctcttga accagaccg 1020
catatggtaa agttctatct tgaacaaagt tcaacaata tacgctatga ttctaagaac 1080
cactttcctg acacagtcaa ataactttta ataggttaaa tggatcaggg tactctactc 1140
tgacttttct gcattttcaa gggaccaaga atatctgatt tccaaggaga aaacttttga 1200
ttacgttgaa ggatttgtga taatcaatag aacagacctt ctcaataatt ggcgatcgct 1260
attcagtcct aacgattcca cacaggcaag cagattcaag tcagatggga aaactcttta 1320
ttgcctagaa gtggtcaaat atttcaacct agaagaagct agctctatgg atcaggtaag 1380
```

[0002]

```

atgtgaaagc aatatataac tagacttagt ttccacagag agctccaaat caaccgttgg 1440
ctactagcct actaacataa tgaatgggtg ccgtgcagga aactggcaag ttacttttcag 1500
agttaaatta tattccatcc actttgtttt catctgaagt gccatatatc gagtttctgg 1560
atcgcgtagc tatcgtagag agaaaactaa gagcaaaggg tttatgggag gttccacatc 1620
cctggctgaa tctcctgatt cctaagagca gcatatacca atttgctaca gaagttttca 1680
acaacattct cacaagcaac aacaacgggtc ctatccttat ttatccagtc aatcaatcca 1740
agtaagttag caaaatgcc aagcaaatg cgtccagtga ttctgaaaca taaattacta 1800
accatatcca acattttgtg gtttcagggtg gaagaaacat acatctttga taactccaaa 1860
tgaagatata ttctatctcg tagcctttct cccctctgca gtgccaaatt cctcagggaa 1920
aaacgatcta gtagctttt tgaaacaaaa ccaaagagtt atgaacttct gcgcagcagc 1980
aaacctcaac gtgaagcagt atttgcccca ttatgaaact caaaaagagt ggaaatcaca 2040
ctttggcaaa agatgggaaa catttgccca gaggaacaa gcctacgacc ctctagcgat 2100
tctagcacct ggccaaagaa tattccaaaa gacaacagga aaattatctc ccatccaact 2160
cgcaaagtca aaggcaacag gaagtcctca aaggtaccat tacgcatcaa tactgccgaa 2220
acctagaact gtataa 2236

```

<210> 2

<211> 575

<212> PRT

<213> 鼠耳芥

<400> 2

```

Met Gly Leu Thr Ser Ser Leu Arg Phe His Arg Gln Asn Asn Lys Thr
  1              5              10              15

Phe Leu Gly Ile Phe Met Ile Leu Val Leu Ser Cys Ile Pro Gly Arg
  20              25              30

Thr Asn Leu Cys Ser Asn His Ser Val Ser Thr Pro Lys Glu Leu Pro
  35              40              45

Ser Ser Asn Pro Ser Asp Ile Arg Ser Ser Leu Val Ser Leu Asp Leu
  50              55              60

Glu Gly Tyr Ile Ser Phe Asp Asp Val His Asn Val Ala Lys Asp Phe
  65              70              75              80

Gly Asn Arg Tyr Gln Leu Pro Pro Leu Ala Ile Leu His Pro Arg Ser
  85              90              95

Val Phe Asp Ile Ser Ser Met Met Lys His Ile Val His Leu Gly Ser
 100              105              110

Thr Ser Asn Leu Thr Val Ala Ala Arg Gly His Gly His Ser Leu Gln
 115              120              125

Gly Gln Ala Leu Ala His Gln Gly Val Val Ile Lys Met Glu Ser Leu
 130              135              140

Arg Ser Pro Asp Ile Arg Ile Tyr Lys Gly Lys Gln Pro Tyr Val Asp
 145              150              155              160

Val Ser Gly Gly Glu Ile Trp Ile Asn Ile Leu Arg Glu Thr Leu Lys
 165              170              175

```

[0003]

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

[0004]

Val Pro Asn Ser Ser Gly Lys Asn Asp Leu Glu Tyr Leu Leu Lys Gln
 465 470 475 480

Asn Gln Arg Val Met Asn Phe Cys Ala Ala Ala Asn Leu Asn Val Lys
 485 490 495

Gln Tyr Leu Pro His Tyr Glu Thr Gln Lys Glu Trp Lys Ser His Phe
 500 505 510

Gly Lys Arg Trp Glu Thr Phe Ala Gln Arg Lys Gln Ala Tyr Asp Pro
 515 520 525

Leu Ala Ile Leu Ala Pro Gly Gln Arg Ile Phe Gln Lys Thr Thr Gly
 530 535 540

Lys Leu Ser Pro Ile Gln Leu Ala Lys Ser Lys Ala Thr Gly Ser Pro
 545 550 555 560

Gln Arg Tyr His Tyr Ala Ser Ile Leu Pro Lys Pro Arg Thr Val
 565 570 575

<210> 3
 <211> 2991
 <212> DNA
 <213> 鼠耳芥

<400> 3
 atggctaata ttcgtttaat gatcacttta atcacggttt taatgatcac caaatcatca 60
 aacgggtatta aaattgattt acctaaatcc cttaacctca cctctcttac cgatccttcc 120
 atcatctccg cagcctctca tgacttcgga aacataacca ccgtgacccc cggcggcgta 180
 atctgccccct cctccaccgc tgatatctct cgtctcctcc aatacgccgc aaacggaaaa 240
 agtacattcc aagtagcggc tcgtggccaa ggccactcct taaacggcca agcctcggtc 300
 tccggcgag taatcgtaaa catgacgtgt atcactgacg tgggtggtttc aaaagacaag 360
 aagtagcgtg acgtggcggc cgggacgtta tgggtggatg tgcttaagaa gacggcgag 420
 aaaggggtgt cgccggtttc ttggacggat tatttgcata taaccgtcgg aggaacgttg 480
 tcgaatggtg gaattggtgg tcaagtgttt cgaaacggtc ctcttgtag taacgtcctt 540
 gaattggacg ttattactgg tacgcactct ctaaactttg atgtacatac aacaacaaaa 600
 actgtttttg ttttatagta ttttcathtt tttgtaccat aggttttatg ttttatagtt 660
 gtgctaaact tcttgacca cacgtaagtc ttcgaaacac aaaatgcgta acgcatctat 720
 atgttttttg tacatattga atgttggtca tgagaaataa agtaattaca tatacacaca 780
 tttattgtcg tacatatata aataattaaa gacaaathtt cacaattggt agcgtgttaa 840
 tttgggattt ttgtaatgta catgcatgac gcatgcatat ggagcttttc ggttttctta 900
 gatttgtgta gtatttcaaa tatatcathtt attttctttc gaataaagag gtggtatatt 960
 tttaaaatag caacatttca gaatttttct ttgaatttac actttttaaa ttgttattgt 1020
 taatatggat tttgaataaa taatttcagg gaaaggtgaa atgttgacat gctcgcgaca 1080
 gctaaaccca gaattgttct atggagtgtt aggaggtttg ggtcaatttg gaattataac 1140
 gagagccaga attgttttgg accatgcacc taaacgggta cgtatcatca tattttacca 1200
 tttgttttag tcagcattca tttttcatta gtaattccgt ttcaatttct aaattttttt 1260
 agtcaataga aaatgattct tatgtcagag cttgattatt tagtgatttt tattgagata 1320
 aaataaaata taacctaacg gaaataatta ttttactaat cggataatgt ctgattaaaa 1380
 cattttatga tattacacta agagagttag agacgtatgg atcacaaaac atgaagcttt 1440
 cttagatggt atcctaaaac taaagttagg tacaagtttg gaatttaggt caaatgctta 1500
 agttgcatta atttgaacaa aatctatgca ttgaataaaa aaaagatatg gattatttta 1560

[0005]

```

taaagtatag tccttgtaat cctaggactt gttgtctaata cttgtcttat gcgtgcaaata 1620
ctttttgatg tcaatatata atccttggtt attagagtca agctctttca ttagtcaact 1680
actcaaata actccaaagt ttagaatata gtcttctgac taattagaat cttacaaccg 1740
ataaacgtta caatttggtt atcattttta aaaacagatt tggtcataat atacgatgac 1800
gttctgtttt agtttcatct attcacaat tttatataat tattttcaag aaaatattga 1860
aatactatac tgtaatatgg tttctttata tatgtgtgta taaattaaat gggattgttt 1920
tctctaaatg aaattgtgta ggccaaatgg tttcggatgc tctacagtga tttcacaact 1980
tttacaagg accaagaacg tttgatatca atggcaaacg atattggagt cgactattta 2040
gaaggccaat tatttctatc aaacggtgtc gttgacacct cttttttccc accttcagat 2100
caatctaaag tcgctgatct agtcaagcaa cacggtatca tctatgttct tgaagtagcc 2160
aagtattatg atgatcccaa tctcccatc atcagcaagg tactacacat ttacattttc 2220
atcatcgttt ttatcatacc ataagatatt taaatgattc atcattgcac cacattaaga 2280
tattcatcat catcatcggt acattttttt ttgcatctta tgcttctcat aatctactat 2340
tgtgtagggt attgacacat taacgaaaac attaatgtac ttgccgggt tcatatcaat 2400
gcacgacgtg gcctacttcg atttcttgaa ccgtgtacat gtcgaagaaa ataaactcag 2460
atctttggga ttatgggaac ttctcatcc ttggcttaac ctctacgttc ctaaactctg 2520
gattctcgat tttcataacg gtgtgtgcaa agacattctt cttagcaaa aatcagcttc 2580
gggactcgct cttctctatc caacaaaccg gaataagtac atacttctct tcattcatat 2640
ttatcttcaa gaaccaaagt aaataaattt ctatgaactg attatgctgt tattgttaga 2700
tgggacaatc gtatgtcggc gatgatacca gagatcgatg aagatgttat atatattatc 2760
ggactactac aatccgctac cccaaaggat cttccagaag tggagagcgt taacgagaag 2820
ataattaggt tttgcaagga ttcagggtatt aagattaagc aatatctaata gcattatact 2880
agtaaagaag attggattga gcattttgga tcaaaatggg atgatttttc gaagaggaaa 2940
gatctatttg atcccaagaa actgttatct ccagggaag acatcttttg a 2991

```

<210> 4

<211> 501

<212> PRT

<213> 鼠耳芥

<400> 4

```

Met Ala Asn Leu Arg Leu Met Ile Thr Leu Ile Thr Val Leu Met Ile
  1                      5                      10                      15

```

```

Thr Lys Ser Ser Asn Gly Ile Lys Ile Asp Leu Pro Lys Ser Leu Asn
      20                      25                      30

```

```

Leu Thr Leu Ser Thr Asp Pro Ser Ile Ile Ser Ala Ala Ser His Asp
      35                      40                      45

```

```

Phe Gly Asn Ile Thr Thr Val Thr Pro Gly Gly Val Ile Cys Pro Ser
      50                      55                      60

```

```

Ser Thr Ala Asp Ile Ser Arg Leu Leu Gln Tyr Ala Ala Asn Gly Lys
      65                      70                      75                      80

```

```

Ser Thr Phe Gln Val Ala Ala Arg Gly Gln Gly His Ser Leu Asn Gly
      85                      90                      95

```

```

Gln Ala Ser Val Ser Gly Gly Val Ile Val Asn Met Thr Cys Ile Thr
      100                      105                      110

```

```

Asp Val Val Val Ser Lys Asp Lys Lys Tyr Ala Asp Val Ala Ala Gly
      115                      120                      125

```

[0006]

Thr	Leu	Trp	Val	Asp	Val	Leu	Lys	Lys	Thr	Ala	Glu	Lys	Gly	Val	Ser	130	135	140
Pro	Val	Ser	Trp	Thr	Asp	Tyr	Leu	His	Ile	Thr	Val	Gly	Gly	Thr	Leu	145	150	155 160
Ser	Asn	Gly	Gly	Ile	Gly	Gly	Gln	Val	Phe	Arg	Asn	Gly	Pro	Leu	Val	165	170	175
Ser	Asn	Val	Leu	Glu	Leu	Asp	Val	Ile	Thr	Gly	Lys	Gly	Glu	Met	Leu	180	185	190
Thr	Cys	Ser	Arg	Gln	Leu	Asn	Pro	Glu	Leu	Phe	Tyr	Gly	Val	Leu	Gly	195	200	205
Gly	Leu	Gly	Gln	Phe	Gly	Ile	Ile	Thr	Arg	Ala	Arg	Ile	Val	Leu	Asp	210	215	220
His	Ala	Pro	Lys	Arg	Ala	Lys	Trp	Phe	Arg	Met	Leu	Tyr	Ser	Asp	Phe	225	230	235 240
Thr	Thr	Phe	Thr	Lys	Asp	Gln	Glu	Arg	Leu	Ile	Ser	Met	Ala	Asn	Asp	245	250	255
Ile	Gly	Val	Asp	Tyr	Leu	Glu	Gly	Gln	Ile	Phe	Leu	Ser	Asn	Gly	Val	260	265	270
Val	Asp	Thr	Ser	Phe	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Gln	Ser	Lys	Val	Ala	Asp	275	280	285
Leu	Val	Lys	Gln	His	Gly	Ile	Ile	Tyr	Val	Leu	Glu	Val	Ala	Lys	Tyr	290	295	300
Tyr	Asp	Asp	Pro	Asn	Leu	Pro	Ile	Ile	Ser	Lys	Val	Ile	Asp	Thr	Leu	305	310	315 320
Thr	Lys	Thr	Leu	Ser	Tyr	Leu	Pro	Gly	Phe	Ile	Ser	Met	His	Asp	Val	325	330	335
Ala	Tyr	Phe	Asp	Phe	Leu	Asn	Arg	Val	His	Val	Glu	Glu	Asn	Lys	Leu	340	345	350
Arg	Ser	Leu	Gly	Leu	Trp	Glu	Leu	Pro	His	Pro	Trp	Leu	Asn	Leu	Tyr	355	360	365
Val	Pro	Lys	Ser	Arg	Ile	Leu	Asp	Phe	His	Asn	Gly	Val	Val	Lys	Asp	370	375	380
Ile	Leu	Leu	Lys	Gln	Lys	Ser	Ala	Ser	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Tyr	Pro	385	390	395 400
Thr	Asn	Arg	Asn	Lys	Trp	Asp	Asn	Arg	Met	Ser	Ala	Met	Ile	Pro	Glu	405	410	415

[0007]

Ile Asp Glu Asp Val Ile Tyr Ile Ile Gly Leu Leu Gln Ser Ala Thr
420 425 430

Pro Lys Asp Leu Pro Glu Val Glu Ser Val Asn Glu Lys Ile Ile Arg
435 440 445

Phe Cys Lys Asp Ser Gly Ile Lys Ile Lys Gln Tyr Leu Met His Tyr
450 455 460

Thr Ser Lys Glu Asp Trp Ile Glu His Phe Gly Ser Lys Trp Asp Asp
465 470 475 480

Phe Ser Lys Arg Lys Asp Leu Phe Asp Pro Lys Lys Leu Leu Ser Pro
485 490 495

Gly Gln Asp Ile Phe
500

<210> 5

<211> 3302

<212> DNA

<213> 鼠耳芥

<400> 5

```

atggcgagtt ataatcttcg ttcacaagtt cgtcttatag caataacaat agtaatcatt 60
attactctct caactccgat cacaaccaac acatcaccac aaccatggaa tatcctttca 120
cacaacgaat tcgcgcgaaa actcacctcc tcctcctcct ccgtcgaatc agccgccaca 180
gatttcggcc acgtcaccaa aatcttccct tccgccgtct taatcccttc ctccgttgaa 240
gacatcacag atctcataaa actctctttt gactctcaac tgtcttttcc tttagccgct 300
cgtgggtcac gacacagcca ccgtggccaa gcctcggcta aagacggagt tgtggtcaac 360
atgcggtcca tggtaaaccg ggatcgaggt atcaagggtg ctaggacctg tttatatgtt 420
gacgtggacg ctgcgtggct atggattgag gtgttgaata aaactttgga gttagggtta 480
acgcccgttt cttggacgga ttatttgtat ttaacagtcg gtgggacgtt atcaaaccgc 540
ggaattagtg gacaaacggt tcgggtacgtt ccacagatca ctaatgttct agagatggat 600
gttattactg gtacgtacca cgatcttttt cacacagaga ttaaaaaaaaa cagtaatagt 660
gattttaact tcgtacgttt ctgatagaca acaagaact tcgtacgttt ttcgaagttt 720
tttcgtcttt ttcatttttag atctgcgcgg ccatttttgg ttatgctatt gtttgtttgt 780
attgtttgtc tctgtttatt tatttctcga acttgttgat agcttttctt cttttcacac 840
atcaatctaa tcaccttttt tggctttaag attagaaaga agatacggac taggtaaaaa 900
taggtggttg taaacgtaga cgcattaaaa aaatattggt ttttttattt tttgataagc 960
aaaattggtg gttggtctaa gattataaac ttgatattaa tgcaaagggt gatctagcaa 1020
tagaagatta atcaatatc ttggtgtttt aacaacagat tatttcatca ttaaaatcgt 1080
gaaacaaaga aattttggta gtatacatta cgtgtagttt tgtagttta ttaaaaaaaa 1140
tagtatatag ttttgttaaa acgcgattta tttagtaaca cattagtata ttacacgttt 1200
aaccaactaa actttttttt ttgaataatt atgttctata tttcttactc aaattatgca 1260
aatttcgtgg attcgaagtc aaatttctgc gaaatttaca tgggtcatata ttataaaact 1320
gttcatataa cccggtgaac aaacagacaa ttaagggttt gaatggttac ggcggttggg 1380
gcggacacaa ccgtcaatag atcagaccgt tttttattta ccattcatca attatattcc 1440
gcagtgtttt ggggtaaaaa aaatagaaga aaaccgcagc ggaccaattc cataccgttt 1500
ttacatacaa ataaacatgg tgcgcaacgg tttattgtcc gcctcaaaaa tgaaatggac 1560
taaaccgcag ataaattaga ccgtttgttc cgctgcctcc attcatagac taaaaaaaaa 1620
caacaaaaaa aaaaatggtc ccacgcccat gattttacac gaggtttctt gtggcgtaag 1680
gacaaaactc aaaagttcat aacgtttggt cctaaccagg tgtaatggat taagtaacag 1740

```

[0008]


```

tcaattttct tattatagct gtatccatta tgtccacata tgcattccata tacattacac 1800
tggttggtctc aagtgtagtt agattacgaa gactttcaag ttccattttt tggttaggag 1860
ataaacataa tttaatgata ccgacttttag cactctaggc tcaaaacaag tacagaagag 1920
aatagtttta tttcaaaactc gttgcattgt tgtatcaatt aatttgtgta gtctttgtat 1980
attctttacat aacgggtccaa gtttggtgaa atagtttact tactaaactt ttcctaattg 2040
gggtcaaattt tatttttatag gaaaaggaga gattgcaact tgttccaagg acatgaactc 2100
ggatcttttc ttccgcggtgt taggagggtt ggggtcaattc ggcattataa caagagccag 2160
aattaaactt gaagtagctc cgaaaagggt atgttaaatt tgtaaattat gcaactacag 2220
aaaattctat gaaatttatg aatgaacata tatgcatttt tggatttttg taggcccaagt 2280
ggttaagggt tctatacata gatttctccg aattcacaag agatcaagaa cgagtgatat 2340
cgaaaacgga cgggtgtagat ttcttagaag gttccattat ggtggaccat ggcccaccgg 2400
ataactggag atccacgtat tatccaccgt ccgatcactt gaggatcgcc tcaatggtca 2460
aacgacatcg tgatcatctac tgccttgaag tcgtcaagta ttacgacgaa acttctcaat 2520
acacagtcaa cgagggtccgt acatacatatc aatcataaat catacatgta taattgggag 2580
atctttatgc attattcaat tatattaatt tacttttagt atttaactta tgcaggaaat 2640
ggaggagtta agcgatagtt taaaccatgt aagaggggtt atgtacgaga aagatgtgac 2700
gtatatggat ttcttaaacc gagttcgaac cggagagcta aacctgaaat ccaaaggcca 2760
atgggatggt ccacatccat ggcttaatct ctctcgtaaca aaaactcaaa tctccaaatt 2820
tgatgatggt gtttttaagg gtattatcct aagaaataac atcactagcg gtctgttct 2880
tgtttatcct atgaatcgca acaagtaagt ttaactcgat attgcaaaat ttactatcta 2940
cattttcggt ttggaatccg aaatattctt acaagctaatt tttatgcggc gtttttaggt 3000
ggaatgatcg gatgtctgcc gctatacccg aggaagatgt attttatgcg gtagggtttt 3060
taagatccgc gggttttgac aattgggagg cttttgatca agaaaacatg gaaatactga 3120
agttttgtga ggatgctaatt atgggggtta tacaatatct tccttatcat tcatcacaag 3180
aaggatgggt tagacatttt ggtccgaggt ggaatatatt cgtagagaga aaatataaat 3240
atgatcccaa aatgatatta tcaccgggac aaaatatatt tcaaaaaata aactcgagtt 3300
ag 3302

```

<210> 6

<211> 523

<212> PRT

<213> 鼠耳芥

<400> 6

```

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

```

[0009]

Ala Lys Asp Gly Val Val Val	Asn Met Arg Ser Met Val Asn Arg Asp
115	120 125
Arg Gly Ile Lys Val Ser Arg Thr Cys Leu Tyr Val Asp Val Asp Ala	
130	135 140
Ala Trp Leu Trp Ile Glu Val Leu Asn Lys Thr Leu Glu Leu Gly Leu	
145	150 155 160
Thr Pro Val Ser Trp Thr Asp Tyr Leu Tyr Leu Thr Val Gly Gly Thr	
	165 170 175
Leu Ser Asn Gly Gly Ile Ser Gly Gln Thr Phe Arg Tyr Gly Pro Gln	
	180 185 190
Ile Thr Asn Val Leu Glu Met Asp Val Ile Thr Gly Lys Gly Glu Ile	
	195 200 205
Ala Thr Cys Ser Lys Asp Met Asn Ser Asp Leu Phe Phe Ala Val Leu	
	210 215 220
Gly Gly Leu Gly Gln Phe Gly Ile Ile Thr Arg Ala Arg Ile Lys Leu	
	225 230 235 240
Glu Val Ala Pro Lys Arg Ala Lys Trp Leu Arg Phe Leu Tyr Ile Asp	
	245 250 255
Phe Ser Glu Phe Thr Arg Asp Gln Glu Arg Val Ile Ser Lys Thr Asp	
	260 265 270
Gly Val Asp Phe Leu Glu Gly Ser Ile Met Val Asp His Gly Pro Pro	
	275 280 285
Asp Asn Trp Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Pro Ser Asp His Leu Arg Ile	
	290 295 300
Ala Ser Met Val Lys Arg His Arg Val Ile Tyr Cys Leu Glu Val Val	
	305 310 315 320
Lys Tyr Tyr Asp Glu Thr Ser Gln Tyr Thr Val Asn Glu Glu Met Glu	
	325 330 335
Glu Leu Ser Asp Ser Leu Asn His Val Arg Gly Phe Met Tyr Glu Lys	
	340 345 350
Asp Val Thr Tyr Met Asp Phe Leu Asn Arg Val Arg Thr Gly Glu Leu	
	355 360 365
Asn Leu Lys Ser Lys Gly Gln Trp Asp Val Pro His Pro Trp Leu Asn	
	370 375 380
Leu Phe Val Pro Lys Thr Gln Ile Ser Lys Phe Asp Asp Gly Val Phe	
	385 390 395 400

[0010]

Lys Gly Ile Ile Leu Arg Asn Asn Ile Thr Ser Gly Pro Val Leu Val
 405 410 415
 Tyr Pro Met Asn Arg Asn Lys Trp Asn Asp Arg Met Ser Ala Ala Ile
 420 425 430
 Pro Glu Glu Asp Val Phe Tyr Ala Val Gly Phe Leu Arg Ser Ala Gly
 435 440 445
 Phe Asp Asn Trp Glu Ala Phe Asp Gln Glu Asn Met Glu Ile Leu Lys
 450 455 460
 Phe Cys Glu Asp Ala Asn Met Gly Val Ile Gln Tyr Leu Pro Tyr His
 465 470 475 480
 Ser Ser Gln Glu Gly Trp Val Arg His Phe Gly Pro Arg Trp Asn Ile
 485 490 495
 Phe Val Glu Arg Lys Tyr Lys Tyr Asp Pro Lys Met Ile Leu Ser Pro
 500 505 510
 Gly Gln Asn Ile Phe Gln Lys Ile Asn Ser Ser
 515 520

<210> 7
 <211> 2782
 <212> DNA
 <213> 鼠耳芥

<400> 7
 atgactaata ctctctgttt aagcctcatc accctaataa cgctttttat aagtttaacc 60
 ccaaccttaa tcaaatcaga tgagggcatt gatgttttct taccatatac actcaacctt 120
 acggctctaa ccgatccctt ctccatctct gccgcttctc acgacttogg taacataaac 180
 gacgaaaatc ccggcgccgt cctctgcctt tcctccacca cggagggtggc tcgtctcctc 240
 cgtttcgcta acggaggatt ctcttacaat aaaggctcaa ccagccccgc gtctactttc 300
 aaagtggctg ctcgaggcca aggccactcc ctccgtggcc aagcctctgc acccgagggt 360
 gtcgtcgtga acatgacgtg tctcgccatg gcggctaaac cagcggcggt tggtatctcg 420
 gcagacggga cttacgctga cgtggctgcc gggacgatgt ggggtggatgt tctgaaggcg 480
 gcgggtggata gaggcgtctc gccggttaca tggacggatt atttgtatct cagcgtcggc 540
 gggacgttgt cgaacgctgg aatcggtggt cagacgttta gacacggccc tcagattagt 600
 aacgttcatg agcttgacgt tattaccggt acgtaaatac caaaacttca ctaatctcgt 660
 tacaattttt taattttttg gtaatatataa ttttgtacgg ctcaactctt aattaagaat 720
 gaaacagtat ctatgatctt ctagatgctc tttttttgtc tgcaagcttt aattgtagta 780
 acatcagcga tatatatatc acatgcatgt gtattattga tgataatata taatgtttta 840
 gttacaaatt tgattctcaa ggtaaaactc acacgccata accagtataa aactccaaaa 900
 atcacgtttt ggtcagaaat acatatcctt cattaacagt agttatgcta taatttgtga 960
 ttataaataa ctccggagtt tgttcacaat actaaatttc aggaaaagggt gaaatgatga 1020
 cttgctctcc aaagttaaac cctgaattgt tctatggagt tttaggagggt ttgggtcaat 1080
 tcggtattat aacgagggcc aggattgcgt tggatcatgc acccacaagg gtatgtatca 1140
 tgcacttata gtgtaatcaa tttataattt taatgtagtg gtcctaaatc caaattttga 1200
 tttgatttgg ttggaacgta cgtatatata ataagtcaaa aggctgattt tgaagacgaa 1260
 tttatatact tttgttgaat taaatctgat tttgcttacg ttttattaga ttctgcgtaa 1320
 taaatcctag gacttgctcg agtgaatct tgtcttatgc ttgcaaatct tgttgatgtc 1380

[0011]

```

aatatctaatt ctttttttatt atattttccct acgtaagttt tagatatagt tatttttaaac 1440
tgctataaat tgtgtacgta tagacttttag ataaaaagtt gtggtcgctt gcacctattt 1500
gtttatcgct atagtgatc aaaggtctat atatgattct tgggttttct ttttgaaaaa 1560
aatagaccat acaatccaag gaagatgac ttaaatggac taatttatgg atataaattg 1620
atatacaaat ctgcaggtga aatgggtctcg catactctac agtgacttct cggcctttta 1680
aagagaccaa gagcggtttta tatcaatgac caatgatctc ggagttgact ttttggaagg 1740
tcaacttatg atgtcaaag gcttcgtaga cacctctttc tccccactct ccgatcaaac 1800
aagagtcgca tctcttgtga atgaccaccg gatcatctat gttctcgaag tagccaagta 1860
ttatgacaga accacccttc ccattattga ccaggtaact aaatccatta ttcattgatga 1920
ttatcttcac acaatcagta tcatcaccaa ttaccatcat cacttgatcat atatgatcca 1980
aagtaaatat atcacatgat ataaataaat cgttcaaatac ttttttttta aagaataaaa 2040
gaatcatttt caagcattac tcatacacat ctacgaatca ccgtgaccat atataaccat 2100
acgcttatta aataatcatt tttgtttgta ggtgattgac acgttaagta gaactctagg 2160
tttcgctoca ggggtttatgt tcgtacaaga tgttcctgat ttcgatttct tgaaccgtgt 2220
ccgaaacgaa gaagataaac tcagatcttt aggactatgg gaagttcctc atccatggct 2280
taacatcttt gtcccggggg ctcgaatcca agattttcat gatggtggtta ttaatggcct 2340
tcttctaaac caaacctcaa cttctggtgt tactctcttc tatcccacaa accgaaacaa 2400
gtaaatattt actttttgat tttgttttat ttgaaagtat atcccaataa tgtatgttaa 2460
attgttaaca agaatttatt ttattaatag atggaacaac cgcattgtcaa cgatgacacc 2520
ggacgaagat gttttttatg tgatcggatt actgcaatca gctggtggat ctcaaaattg 2580
gcaagaactt gaaaatctca acgacaaggt tattcagttt tgtgaaaact cgggaattaa 2640
gattaaggaa tattttgatc actatacaag aaaagaagat tgggttaaac attttggacc 2700
aaaatgggat gattttttta gaaagaaaat tatgtttgat cccaaaagac tattgtctcc 2760
aggacaagac atattttaatt aa 2782

```

<210> 8

<211> 524

<212> PRT

<213> 鼠耳芥

<400> 8

```

Met Thr Asn Thr Leu Cys Leu Ser Leu Ile Thr Leu Ile Thr Leu Phe
  1              5              10              15

Ile Ser Leu Thr Pro Thr Leu Ile Lys Ser Asp Glu Gly Ile Asp Val
      20              25              30

Phe Leu Pro Ile Ser Leu Asn Leu Thr Val Leu Thr Asp Pro Phe Ser
      35              40              45

Ile Ser Ala Ala Ser His Asp Phe Gly Asn Ile Thr Asp Glu Asn Pro
      50              55              60

Gly Ala Val Leu Cys Pro Ser Ser Thr Thr Glu Val Ala Arg Leu Leu
      65              70              75              80

Arg Phe Ala Asn Gly Gly Phe Ser Tyr Asn Lys Gly Ser Thr Ser Pro
      85              90              95

Ala Ser Thr Phe Lys Val Ala Ala Arg Gly Gln Gly His Ser Leu Arg
      100              105              110

Gly Gln Ala Ser Ala Pro Gly Gly Val Val Val Asn Met Thr Cys Leu
      115              120              125

```

[0012]

Ala Met Ala Ala Lys Pro Ala Ala Val Val Ile Ser Ala Asp Gly Thr 130	135	140
Tyr Ala Asp Val Ala Ala Gly Thr Met Trp Val Asp Val Leu Lys Ala 145	150	155 160
Ala Val Asp Arg Gly Val Ser Pro Val Thr Trp Thr Asp Tyr Leu Tyr 165	170	175
Leu Ser Val Gly Gly Thr Leu Ser Asn Ala Gly Ile Gly Gly Gln Thr 180	185	190
Phe Arg His Gly Pro Gln Ile Ser Asn Val His Glu Leu Asp Val Ile 195	200	205
Thr Gly Lys Gly Glu Met Met Thr Cys Ser Pro Lys Leu Asn Pro Glu 210	215	220
Leu Phe Tyr Gly Val Leu Gly Gly Leu Gly Gln Phe Gly Ile Ile Thr 225	230	235 240
Arg Ala Arg Ile Ala Leu Asp His Ala Pro Thr Arg Val Lys Trp Ser 245	250	255
Arg Ile Leu Tyr Ser Asp Phe Ser Ala Phe Lys Arg Asp Gln Glu Arg 260	265	270
Leu Ile Ser Met Thr Asn Asp Leu Gly Val Asp Phe Leu Glu Gly Gln 275	280	285
Leu Met Met Ser Asn Gly Phe Val Asp Thr Ser Phe Phe Pro Leu Ser 290	295	300
Asp Gln Thr Arg Val Ala Ser Leu Val Asn Asp His Arg Ile Ile Tyr 305	310	315 320
Val Leu Glu Val Ala Lys Tyr Tyr Asp Arg Thr Thr Leu Pro Ile Ile 325	330	335
Asp Gln Val Ile Asp Thr Leu Ser Arg Thr Leu Gly Phe Ala Pro Gly 340	345	350
Phe Met Phe Val Gln Asp Val Pro Tyr Phe Asp Phe Leu Asn Arg Val 355	360	365
Arg Asn Glu Glu Asp Lys Leu Arg Ser Leu Gly Leu Trp Glu Val Pro 370	375	380
His Pro Trp Leu Asn Ile Phe Val Pro Gly Ser Arg Ile Gln Asp Phe 385	390	395 400
His Asp Gly Val Ile Asn Gly Leu Leu Leu Asn Gln Thr Ser Thr Ser 405	410	415

[0013]

Gly Val Thr Leu Phe Tyr Pro Thr Asn Arg Asn Lys Trp Asn Asn Arg
 420 425 430
 Met Ser Thr Met Thr Pro Asp Glu Asp Val Phe Tyr Val Ile Gly Leu
 435 440 445
 Leu Gln Ser Ala Gly Gly Ser Gln Asn Trp Gln Glu Leu Glu Asn Leu
 450 455 460
 Asn Asp Lys Val Ile Gln Phe Cys Glu Asn Ser Gly Ile Lys Ile Lys
 465 470 475 480
 Glu Tyr Leu Met His Tyr Thr Arg Lys Glu Asp Trp Val Lys His Phe
 485 490 495
 Gly Pro Lys Trp Asp Asp Phe Leu Arg Lys Lys Ile Met Phe Asp Pro
 500 505 510
 Lys Arg Leu Leu Ser Pro Gly Gln Asp Ile Phe Asn
 515 520

<210> 9

<211> 2805

<212> DNA

<213> 鼠耳芥

<400> 9

atgacgtcaa gctttcttct cctgacgttc gccatatgta aactgatcat agccgtgggt 60
 ctaaacgtgg gccccagtga gctcctccgc atcggagcca tagatgtcga cggccacttc 120
 accgtccacc ctcccgactt agcctccgct tcctcagact tcggtatgct gaagtcacct 180
 gaagagccat tggccgtgct tcatccatca tcggccgaag acgtggcacg actcgtcaga 240
 acagcttacg gttcagccac ggcgtttccg gtctcagccc gaggccacgg ccattccata 300
 aacggacaag ccgcgggcggg gaggaacggg gtggtggttg aaatgaacca cggcgtaacc 360
 gggacgcccc agccactcgt ccgaccggat gaaatgtatg tggatgtatg ggggtggagag 420
 ttatgggtcg atgtgttgaa gaaaacgttg gagcatggct tagcaccaaa atcatggacg 480
 gattacttgt atctaaccgt tggaggtaca ctctccaatg caggaatcag tgggtcaagct 540
 tttcaccatg gtcctcaaat tagtaacgtc cttgagctcg acgttgtaac tggttagtat 600
 taaaacattc aagttcatat attttaaatg cttttgtctg aagttttact aataacaaga 660
 aattgatacc aaaaagtagg gaaaggagag gtgatgagat gctcagaaga agagaacaca 720
 aggctattcc atggagttct tgggtgatta ggtcaatttg ggatcatcac tcgagcacga 780
 atctctctcg aaccagctcc ccaaagggtg atattttttt aatgactagc tatcaaaaat 840
 ccctggcggg tccatacgtt gtaatctttt tagttttttac tgttgatggg attttttata 900
 tattttggat aataaaaccc taaaatggta tattgtgatg acaggtgaga tggatacggg 960
 tattgtattc gagcttcaaa gtgttttacg aggaccaaga gtacttaatc tcaatgcatg 1020
 gtcaattaaa gtttgattac gtggaagggt ttgtgattgt ggacgaagga ctctgtaaca 1080
 attggagatc ttctttcttc tctccacgta accccgtcaa gatctcctct gttagttcca 1140
 acggtctctg tttgtattgc cttgagatca ccaagaacta ccacgactcc gactccgaaa 1200
 tcgttgatca ggtcactttc attattcact tagaaaaaag cgatattttc attttttata 1260
 ttgatgaata tctggaagga tttaacgcta tgcgactatt gggaaatcat tatgaaaaaa 1320
 tatttagttt atatgattga aagtgggtct catagtattt ttgttgtgtc gactttatta 1380
 taacttaaat ttggaagagg acatgaagaa gaagccagag aggatctaca gagatctagc 1440
 ttttccacct gaacttaata atgcacattt atataattat ttttcttctt ctaaagttta 1500
 gtttatcact agcgaattaa tcatggttac taattaagta gtggacaggg tcatggacca 1560

[0014]

```

ctcactcacc aaataatgat tcctcttttac tcttaagttt aattttaata aaaccaactc 1620
tactggaatc ttaacttata cttggttttg gtaggctttt atagcaacac gggtttttta 1680
attttcctat tccagatttt gtatattaaa tgcgattttt ttttcttttt gtttcaggaa 1740
gttgagattc tgatgaagaa attgaatttc ataccgacat cgggtctttac aacggattta 1800
caatatgtgg actttctcga cgggttacac aaggccgaat tgaagctccg gtccaagaat 1860
ttatgggagg ttccacaccc atggctcaac ctcttcgtgc caaatcaag aatctctgac 1920
ttcgataaag gcgtttttcaa gggcattttg ggaaataaaa caagtggccc tattcttata 1980
taccocatga acaaagacaa gtaagtcttg acattaccat tgattactac ttctaaattt 2040
cttctctaga aaaaagaata aaacgagttt tgcattgcat gcatgcaaag ttacacttgt 2100
ggggattaat tagtgggtcca agaaaaaag tttgtcaaaa ttgaaaaaaa ctagacacgt 2160
ggtacatggg attgtccgaa aaacgttgtc cacatgtgca tcgaaccagc taagattgac 2220
aacaacactt cgtcggctcg tatttctctt tttgttttgt gaccaaacc gatggtccag 2280
attgggttta tttgttttta agttcctaga actcatggtg ggtgggtccc aatcagattc 2340
tctagacca aaccgatctc aacgaaccct ccgcacatca ttgattatta cattaatata 2400
gatattgtcg ttgctgacgt gtcgtaattt gatgttattg tcagatggga cgagaggagc 2460
tcagccgtga cgccggatga ggaagttttc tatctggttg ctctattgag atcagcttta 2520
acggacggtg aagagacaca gaagctagag tatctgaaag atcagaaccg tcggatcttg 2580
gagttctgtg aacaagccaa gatcaatgtg aagcagtatc ttctcacca cgcaacacag 2640
gaagagtggg tggctcattt tggggacaag tgggatcggg tcagaagctt aaaggctgag 2700
tttgatccgc gacacatact cgctactggt cagagaatct ttcaaaaccc atctttgtct 2760
ttgtttcttc cgtcgtcgtc ttcttcgtca gcggttcat ggtga 2805

```

<210> 10

<211> 536

<212> PRT

<213> 鼠耳芥

<400> 10

```

Met Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ile Cys Lys Leu Ile
  1              5              10              15

```

```

Ile Ala Val Gly Leu Asn Val Gly Pro Ser Glu Leu Leu Arg Ile Gly
      20              25              30

```

```

Ala Ile Asp Val Asp Gly His Phe Thr Val His Pro Ser Asp Leu Ala
      35              40              45

```

```

Ser Val Ser Ser Asp Phe Gly Met Leu Lys Ser Pro Glu Glu Pro Leu
      50              55              60

```

```

Ala Val Leu His Pro Ser Ser Ala Glu Asp Val Ala Arg Leu Val Arg
      65              70              75              80

```

```

Thr Ala Tyr Gly Ser Ala Thr Ala Phe Pro Val Ser Ala Arg Gly His
      85              90              95

```

```

Gly His Ser Ile Asn Gly Gln Ala Ala Ala Gly Arg Asn Gly Val Val
      100              105              110

```

```

Val Glu Met Asn His Gly Val Thr Gly Thr Pro Lys Pro Leu Val Arg
      115              120              125

```

```

Pro Asp Glu Met Tyr Val Asp Val Trp Gly Gly Glu Leu Trp Val Asp
      130              135              140

```

[0015]

```

Val Leu Lys Lys Thr Leu Glu His Gly Leu Ala Pro Lys Ser Trp Thr
145                      150                      155                      160

Asp Tyr Leu Tyr Leu Thr Val Gly Gly Thr Leu Ser Asn Ala Gly Ile
                      165                      170                      175

Ser Gly Gln Ala Phe His His Gly Pro Gln Ile Ser Asn Val Leu Glu
                      180                      185                      190

Leu Asp Val Val Thr Gly Lys Gly Glu Val Met Arg Cys Ser Glu Glu
                      195                      200                      205

Glu Asn Thr Arg Leu Phe His Gly Val Leu Gly Gly Leu Gly Gln Phe
210                      215                      220

Gly Ile Ile Thr Arg Ala Arg Ile Ser Leu Glu Pro Ala Pro Gln Arg
225                      230                      235                      240

Val Arg Trp Ile Arg Val Leu Tyr Ser Ser Phe Lys Val Phe Thr Glu
                      245                      250                      255

Asp Gln Glu Tyr Leu Ile Ser Met His Gly Gln Leu Lys Phe Asp Tyr
                      260                      265                      270

Val Glu Gly Phe Val Ile Val Asp Glu Gly Leu Val Asn Asn Trp Arg
275                      280                      285

Ser Ser Phe Phe Ser Pro Arg Asn Pro Val Lys Ile Ser Ser Val Ser
290                      295                      300

Ser Asn Gly Ser Val Leu Tyr Cys Leu Glu Ile Thr Lys Asn Tyr His
305                      310                      315                      320

Asp Ser Asp Ser Glu Ile Val Asp Gln Glu Val Glu Ile Leu Met Lys
                      325                      330                      335

Lys Leu Asn Phe Ile Pro Thr Ser Val Phe Thr Thr Asp Leu Gln Tyr
                      340                      345                      350

Val Asp Phe Leu Asp Arg Val His Lys Ala Glu Leu Lys Leu Arg Ser
355                      360                      365

Lys Asn Leu Trp Glu Val Pro His Pro Trp Leu Asn Leu Phe Val Pro
370                      375                      380

Lys Ser Arg Ile Ser Asp Phe Asp Lys Gly Val Phe Lys Gly Ile Leu
385                      390                      395                      400

Gly Asn Lys Thr Ser Gly Pro Ile Leu Ile Tyr Pro Met Asn Lys Asp
                      405                      410                      415

Lys Trp Asp Glu Arg Ser Ser Ala Val Thr Pro Asp Glu Glu Val Phe
420                      425                      430

```

[0016]

Tyr Leu Val Ala Leu Leu Arg Ser Ala Leu Thr Asp Gly Glu Glu Thr
 435 440 445
 Gln Lys Leu Glu Tyr Leu Lys Asp Gln Asn Arg Arg Ile Leu Glu Phe
 450 455 460
 Cys Glu Gln Ala Lys Ile Asn Val Lys Gln Tyr Leu Pro His His Ala
 465 470 475 480
 Thr Gln Glu Glu Trp Val Ala His Phe Gly Asp Lys Trp Asp Arg Phe
 485 490 495
 Arg Ser Leu Lys Ala Glu Phe Asp Pro Arg His Ile Leu Ala Thr Gly
 500 505 510
 Gln Arg Ile Phe Gln Asn Pro Ser Leu Ser Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 515 520 525
 Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ser Trp
 530 535

<210> 11

<211> 1936

<212> DNA

<213> 鼠耳芥

<400> 11

```

atgcttatag taagaagttt caccatcttg cttctcagct gcatagcctt taagttggct 60
tgctgcttct ctagcagcat ttcttctttg aaggcgcttc ccctagtagg ccatttggag 120
tttgaacatg tccatcacgc ctccaaagat tttggaaatc gataccagtt gatccctttg 180
gcggtcttac atcccaaadc ggtaagcgac atcgctcaa cgatacgaca catctggatg 240
atgggcactc attcacagct tacagtggga gcgagaggtc gtggacattc actccaaggc 300
caagctcaaa caagacatgg aattgttata cacatggaat cactccatcc ccagaagctg 360
caggtctaca gtgtggattc ccctgctcca tatgttgatg tgtctgggtg tgagctgtgg 420
ataaacattt tgcattgagac cctcaagtac gggcttgac caaaatcatg gacggattac 480
ctgcatttaa ctgtagggtg tactctgtcc aatgctggaa taagcggcca ggcattccga 540
catggaccac agatcagcaa tgttcatcaa ctggagattg tcacagggtta gttcagagtt 600
gcagtattcg tgttttgaaa gcatagactc tatatgggtg gtgactatta acaacatgaa 660
gagattcccg agaatagcta ccactaatg tcatgcctat ttattgactg caggaaaagg 720
cgagatccca aactgtacaa agaggcagaa cagcgactta ttaaatggtg ttcttgggtg 780
tttaggtcag tttggcatca taacgcgggc aagaatagca ttggaaccag caccaaccat 840
ggtaaacat aaataaataa aaaacttaaa aactgaacac gcgtgtgtcc tcctaactct 900
gtataatgga caggtaaaat ggataagagt gttatacctg gattttgcag cttttgcaa 960
ggaccaagag caactaatat ctgcccaggg ccacaaattc gattacatag aagggtttgt 1020
gataataaac aggacaggcc tcctgaacag ctggagggtg tctttcaccg cagaagagcc 1080
tttagaagca agccaattca agtttgatgg aaggactctg tattgtctgg agctagccaa 1140
gtatttgaag caagataaca aagacgtaat caaccagggt agaaaacaga gtagaagcaa 1200
tcggtagaat cttcttttgt agatgacatt cattggaact gaaaatata atatatattgt 1260
ccaatccagg aagtgaagaa aacattatca gagctaagct acgtgacgtc gacactgttt 1320
acaacggagg tagcatatga agcattcttg gacagggtac atgtgtctga ggtaaaactc 1380
cgatcgaaag ggcagtggga ggtgccacat ccatggctga acctcctggt accaagaagc 1440
aaaatcaatg aatttgcaag aggtgtattt ggaaacatac taacggatac aagcaacggc 1500
ccagtcacgt tctaccaggt gaacaaatca aagtaagaaa gaaagaaaga aagagctagt 1560

```

[0017]

```

catgattttg tttcttttca cttgttgaca aaacaaaagc atgttggtga gcaggtggga 1620
caatcaaaca tcagcagtaa caccggagga agaggtattc tacctggtgg cgatcctaac 1680
atcggcatct ccagggtcgg caggaaagga tggagtagaa gagatcttga ggcggaacag 1740
aagaatactg gaattcagtg aagaagcagg gatagggttg aagcagtatc tgccacatta 1800
cacgacaaga gaagagtgga gatcccattt cggggacaag tggggagaat ttgtgaggag 1860
gaaatccaga tatgatccat tggcaattct tgcgcctggc caccgaattt ttcaaaaggc 1920
agtctcatatc tcatga 1936

```

<210> 12

<211> 504

<212> PRT

<213> 鼠耳芥

<400> 12

```

Met Leu Ile Val Arg Ser Phe Thr Ile Leu Leu Leu Ser Cys Ile Ala
  1                      5                      10                      15

Phe Lys Leu Ala Cys Cys Phe Ser Ser Ser Ile Ser Ser Leu Lys Ala
                20                      25                      30

Leu Pro Leu Val Gly His Leu Glu Phe Glu His Val His His Ala Ser
  35                      40                      45

Lys Asp Phe Gly Asn Arg Tyr Gln Leu Ile Pro Leu Ala Val Leu His
  50                      55                      60

Pro Lys Ser Val Ser Asp Ile Ala Ser Thr Ile Arg His Ile Trp Met
  65                      70                      75                      80

Met Gly Thr His Ser Gln Leu Thr Val Ala Ala Arg Gly Arg Gly His
                85                      90                      95

Ser Leu Gln Gly Gln Ala Gln Thr Arg His Gly Ile Val Ile His Met
  100                      105                      110

Glu Ser Leu His Pro Gln Lys Leu Gln Val Tyr Ser Val Asp Ser Pro
  115                      120                      125

Ala Pro Tyr Val Asp Val Ser Gly Gly Glu Leu Trp Ile Asn Ile Leu
  130                      135                      140

His Glu Thr Leu Lys Tyr Gly Leu Ala Pro Lys Ser Trp Thr Asp Tyr
  145                      150                      155                      160

Leu His Leu Thr Val Gly Gly Thr Leu Ser Asn Ala Gly Ile Ser Gly
                165                      170                      175

Gln Ala Phe Arg His Gly Pro Gln Ile Ser Asn Val His Gln Leu Glu
  180                      185                      190

Ile Val Thr Gly Lys Gly Glu Ile Leu Asn Cys Thr Lys Arg Gln Asn
  195                      200                      205

Ser Asp Leu Phe Asn Gly Val Leu Gly Gly Leu Gly Gln Phe Gly Ile

```

[0018]

210	215	220
Ile Thr Arg Ala Arg	Ile Ala Leu Glu Pro	Ala Pro Thr Met Asp Gln
225	230	235 240
Glu Gln Leu Ile Ser	Ala Gln Gly His Lys Phe	Asp Tyr Ile Glu Gly
245	250	255
Phe Val Ile Ile Asn	Arg Thr Gly Leu Leu	Asn Ser Trp Arg Leu Ser
260	265	270
Phe Thr Ala Glu Glu	Pro Leu Glu Ala Ser	Gln Phe Lys Phe Asp Gly
275	280	285
Arg Thr Leu Tyr Cys	Leu Glu Leu Ala Lys	Tyr Leu Lys Gln Asp Asn
290	295	300
Lys Asp Val Ile Asn	Gln Glu Val Lys Glu	Thr Leu Ser Glu Leu Ser
305	310	315 320
Tyr Val Thr Ser Thr	Leu Phe Thr Thr Glu	Val Ala Tyr Glu Ala Phe
325	330	335
Leu Asp Arg Val His	Val Ser Glu Val Lys	Leu Arg Ser Lys Gly Gln
340	345	350
Trp Glu Val Pro His	Pro Trp Leu Asn Leu	Leu Val Pro Arg Ser Lys
355	360	365
Ile Asn Glu Phe Ala	Arg Gly Val Phe Gly	Asn Ile Leu Thr Asp Thr
370	375	380
Ser Asn Gly Pro Val	Ile Val Tyr Pro Val	Asn Lys Ser Lys Trp Asp
385	390	395 400
Asn Gln Thr Ser Ala	Val Thr Pro Glu Glu	Glu Val Phe Tyr Leu Val
405	410	415
Ala Ile Leu Thr Ser	Ala Ser Pro Gly Ser	Ala Gly Lys Asp Gly Val
420	425	430
Glu Glu Ile Leu Arg	Arg Asn Arg Arg Ile	Leu Glu Phe Ser Glu Glu
435	440	445
Ala Gly Ile Gly Leu	Lys Gln Tyr Leu Pro	His Tyr Thr Thr Arg Glu
450	455	460
Glu Trp Arg Ser His	Phe Gly Asp Lys Trp	Gly Glu Phe Val Arg Arg
465	470	475 480
Lys Ser Arg Tyr Asp	Pro Leu Ala Ile Leu	Ala Pro Gly His Arg Ile
485	490	495
Phe Gln Lys Ala Val	Ser Tyr Ser	
500		

[0019]

<210> 13
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸: 引物或探针

<400> 13
cggtcgacat gggattgacc tcattccttac g 31

<210> 14
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸: 引物或探针

<400> 14
gcgtcgactt atacagttct aggtttcggc agtat 35

<210> 15
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸: 引物或探针

<400> 15
gcggtaccag agagagaaac ataaacaaat ggc 33

<210> 16
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸: 引物或探针

<400> 16
gcggtaccca attttacttc caccaaaatg c 31

[0020]

<210> 17
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸: 引物或探针

<400> 17
gcgggtacctt cattgataag aatcaagcta ttca

34

<210> 18
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸: 引物或探针

<400> 18
gcgggtaccca aagtgggtgag aacgactaac a

31

<210> 19
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸: 引物或探针

<400> 19
gcgggtacccc cattaaccta cccgttttg

28

<210> 20
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸: 引物或探针

<400> 20
gcgggtaccag acgatgaacg tacttgtctg ta

32

<210> 21
<211> 28
<212> DNA

[0021]

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸: 引物或探针

<400> 21

ggggtacctt gatgaatcgt gaaatgac

28

<210> 22

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸: 引物或探针

<400> 22

ggggtaccct ttctctcttg ttttgtcctg t

31

<210> 23

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸: 引物或探针

<400> 23

gctctagatc aggaaaagaa ccatgccttat ag

32

<210> 24

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸: 引物或探针

<400> 24

gctctagatc atgagtatga gactgccttt tg

32

<210> 25

<211> 1728

<212> DNA

<213> 鼠耳芥

<400> 25

[0022]

```

atgggattga cctcatcctt acggttccat agacaaaaca acaagacttt cctcggaatc 60
ttcatgatct tagttctaag ctgtatacca ggtagaacca atctttgttc caatcattct 120
gttagtacct caaaagaatt accttcttca aatccttcag atattcggtc ctcattagtt 180
tcactagatt tggagggtta tataagcttc gacgatgtcc acaatgtggc caaggacttt 240
ggcaacagat accagttacc acctttggca attctacatc caaggtcagt ttttgatatt 300
tcacgatga tgaagcatat agtacatctg ggctccacct caaatcttac agtagcagct 360
agaggccatg gtcactcgct tcaaggacaa gctctagctc atcaagggtg tgtcatcaaa 420
atggagtcac ttcggaagtc tgatatcagg atttataagg ggaagcaacc atatgttgat 480
gtctcagggtg gtgaaatatg gataaacatt ctacgcgaga ctctaaaata cgggtctttca 540
ccaaagtcct ggacagacta ccttcatttg accgttggag gtacactatc taatgctgga 600
atcagcgggc aagcattcaa gcatggaccc caaatcaaca acgtctacca gctagagatt 660
gttacaggga aaggagaagt cgtaacctgt tctgagaagc ggaattctga acttttcttc 720
agtgttcttg gcgggcttgg acagtttggc ataaccacc gggcacggat ctctcttgaa 780
ccagcacccg atatggttaa atggatcagg gtactctact ctgacttttc tgcattttca 840
agggaccaag aatatctgat ttcgaaggag aaaacttttg attacgttga aggatttgtg 900
ataatcaata gaacagacct tctcaataat tggcgatcgt cattcagtc caacgattcc 960
acacaggcaa gcagattcaa gtcagatggg aaaactcttt attgcctaga agtgggtcaaa 1020
tatttcaacc cagaagaagc tagctctatg gatcaggaaa ctggcaagtt actttcagag 1080
ttaaattata ttccatccac tttgttttca tctgaagtgc catatatcga gtttctggat 1140
cgcggtgcata tcgcagagag aaaactaaga gcaaagggtt tatgggaggt tccacatccc 1200
tggctgaatc tcctgattcc taagagcagc atataccaat ttgctacaga agttttcaac 1260
aacattctca caagcaacaa caacggtcct atccttattt atccagtc aaatccaag 1320
tggaagaaac atacatcttt gataactcca aatgaagata tattctatct cgtagccttt 1380
ctcccctctg cagtgcctaa ttcctcaggg aaaaacgatc tagagtacct tttgaaacaa 1440
aaccaaagag ttatgaactt ctgcgcagca gcaaacctca acgtgaagca gtatttgccc 1500
cattatgaaa ctcaaaaaga gtggaatatc cactttggca aaagatggga aacatttgca 1560
cagaggaaac aagcctacga cctctagcg attctagcac ctggccaaag aatattccaa 1620
aagacaacag gaaaattatc tcccatccaa ctcgcaaaag caaaggcaac aggaagtctt 1680
caaaggtagc attacgcac aatactgccc aaacctagaa ctgtataa 1720

```

<210> 26

<211> 1506

<212> DNA

<213> 鼠耳芥

<400> 26

```

atggcctaattc ttcgtttaatt gatcacttta atcacggttt taatgatcac caaatcatca 60
aacggtatta aaattgattt acctaaatcc cttaacctca cctctcttac cgatccttcc 120
atcatctccg cagcctctca tgacttcgga aacataacca ccgtgacccc cggcggcgta 180
atctgcccct cctccaccgc tgatatctct cgtctctctc aatagccgc aaacggaaaa 240
agtacattcc aagtagcggc tcgtggccaa ggcactcct taaacggcca agcctcggtc 300
tccggcggag taatcgtcaa catgacgtgt atcactgacg tgggtggttc aaaagacaag 360
aagtagcgtg acgtggcggc cgggacgtta tgggtggatg tgetttaagaa gacggcggag 420
aaaggggtgt cgccggtttc ttggacggat tatttgcata taaccgtcgg aggaacgttg 480
tcgaatggtg gaattggtgg tcaagtgttt cgaaacggtc ctcttgtag taacgtcctt 540
gaattggacg ttattactgg gaaaggtgaa atgttgacat gctcgcgaca gctaaacca 600
gaattgttct atggagtgtt aggaggttg ggtcaatttg gaattataac gagagccaga 660
attgttttgg accatgcacc taaacgggac aaatggttcc ggatgctcta cagtatttc 720
acaactttta caaaggacca agaacgtttg atatcaatgg caaacgatat tggagtcgac 780
tatttagaag gtcaaatatt tctatcaaac ggtgtcgttg acacctctt tttccacct 840
tcagatcaat ctaaagtgcg tgatctagtc aagcaacacg gtatcatcta tgttcttgaa 900
gtagccaagt attatgatga tcccaatctc cccatcatca gcaaggttat tgacacatta 960
acgaaaacat taagttactt gcccggttcc atatcaatgc acgacgtggc ctacttcgat 1020
ttcttgaacc gtgtacatgt cgaagaaaat aaactcagat ctttgggatt atgggaactt 1080

```

[0023]

```

cctcatcctt ggcttaacct ctacgttccct aaatctcggg ttctcgattt tcataacggg 1140
gttgtcaaag acattcttct taagcaaaaa tcagcttcgg gactcgctct tctctatcca 1200
acaaaccgga ataatggga caatcgtatg tcggcgatga taccagagat cgatgaagat 1260
gttatatata ttatcggact actacaatcc gctaccccaa aggatcttcc agaagtggag 1320
agcgttaacg agaagataat taggttttgc aaggattcag gtattaagat taagcaatat 1380
ctaattgcatt atactagtaa agaagattgg attgagcatt ttggatcaaa atgggatgat 1440
ttttcgaaga ggaaagatct atttgatccc aagaaactgt tatctccagg gcaagacatc 1500
ttttga 1506

```

<210> 27

<211> 1572

<212> DNA

<213> 鼠耳芥

<400> 27

```

atggcgagtt ataattcttgg ttccacaagtt cgtcttatag caataacaat agtaatcatc 60
attactctct caactccgat cacaaccaac acatcaccac aacctgggaa tatcctttca 120
cacaacgaat tcgccggaaa actcacctcc tcctcctcct ccgtcgaatc agccgccaca 180
gatttcggcc acgtcaccaa aatcttccct tcgcgcgtct taatcccttc ctccgttgaa 240
gacatcacag atctcataaa actctctttt gactctcaac tgtcttttcc tttagccgct 300
cgtggtcacg gacacagcca ccgtggccaa gcctcggcta aagacggagt tgtggtcaac 360
atgcggtcca tggtaaaccc ggatcgaggt atcaagggtg ctaggacctg tttatatgtt 420
gacgttgacg ctgcgtggct atggattgag gtgttgaata aaactttgga gttagggtta 480
acgccggttt cttggacgga ttatttgtat ttaacagtcg gtgggacgtt atcaaacggc 540
ggaattagtg gacaaacgtt tcgggtacgtt ccacagatca ctaatgttct agagatggat 600
gttattactg gaaaaggaga gattgcaact tgttccaagg acatgaactc ggatcttttc 660
ttcgcggtgt taggaggttt gggatcaattc ggcattataa caagagccag aattaaactt 720
gaagtagctc cgaaaagggc caagtgggta aggtttctat acatagattt ctccgaattc 780
acaagagatc aagaacgagt gatatcgaaa acggacggtg tagatttctt agaaggttcc 840
attatggtgg accatggccc accggataac tggagatcca cgtattatcc accgtccgat 900
cacttgagga tcgcctcaat ggtcaaacga catcgtgtca tctactgcct tgaagtcgtc 960
aagtattacg acgaaacttc tcaatacaca gtcaacgagg aaatggagga gttaagcgat 1020
agtttaaacc atgtaagagg gtttatgtac gagaaagatg tgacgtatat ggatttccta 1080
aaccgagttc gaaccggaga gctaaacctg aaatccaaag gccaatggga tgttccacat 1140
ccatggctta atctcttcgt accaaaaact caaatctcca aatttgatga tgggtgtttt 1200
aagggtatta tcttaagaaa taacatcact agcggctctg ttcttgttta tcttatgaat 1260
cgcaacaagt ggaatgatcg gatgtctgcc gctatacccg aggaagatgt attttatgct 1320
gtagggtttt taagatccgc gggttttgac aattgggagg cttttgatca agaaaacatg 1380
gaaatactga agttttgtga ggatgcta atgggggtta tacaatatct tcttatcat 1440
tcatcacaag aaggatgggt tagacatttt ggtccgaggt ggaatatatt cgtagagaga 1500
aaatataaat atgatccaa aatgatatta tcaccgggac aaaatatatt tcaaaaaata 1560
aactcgagtt ag 1572

```

<210> 28

<211> 1575

<212> DNA

<213> 鼠耳芥

<400> 28

```

atgactaata ctctctgttt aagcctcatc accctaataa cgctttttat aagtttaacc 60
ccaaccttaa tcaaatcaga tgagggcatt gatgttttct taccatatac actcaacctt 120
acggctcctaa ccgatccctt ctccatctct gccgttctc acgacttcgg taacataacc 180
gacgaaaatc ccggcgccgt cctctgcctt tctccacca cggaggtggc tcgtctcctc 240

```

[0024]


```

cgtttcgcta acggaggatt ctcttacaat aaaggctcaa ccagccccgc gtctactttc 300
aaagtggctg ctcgaggcca aggccactcc ctccgtggcc aagcctctgc acccgagggt 360
gtcgtcgtga acatgacgtg tctcgccatg gcggctaaac cagcggcggg tgttatctcg 420
gcagacggga cttacgctga cgtggctgcc gggacgatgt ggggtggatgt tctgaaggcg 480
gcgggtggata gaggcgctct gccggttaca tggacggatt atttgtatct cagcgtcggc 540
gggacgttgt cgaacgctgg aatcggtggt cagacgttta gacacggccc tcagattagt 600
aacggtcatg agcttgacgt tattaccgga aaagggtgaa tgatgacttg ctctccaaag 660
ttaaaccttg aattgttcta tggagtttta ggaggtttgg gtcaattcgg tattataacg 720
agggccagga ttgcgttgga tcatgcaccc acaagggtga aatggtctcg catactctac 780
agtgacttct cggcttttaa aagagacca gaggctttaa tatcaatgac caatgatctc 840
ggagttgact ttttggaagg tcaacttatg atgtcaaag gcttcgtaga cactctttc 900
tcccactct ccatcaaac aagagtcgca tctcttgta atgaccaccg gatcatctat 960
gttctcgaag tagccaagta ttatgacaga accacccttc ccattattga ccagggtgatt 1020
gacacgttaa gtagaactct aggtttcgct ccagggttta tgttcgtaca agatgttccg 1080
tatttcgatt tcttgaaccg tgtccgaaac gaagaagata aactcagatc tttaggacta 1140
tggaagttc ctcacccatg gcttaacatc tttgtcccgg ggtctcgaat ccaagatttt 1200
catgatgggt ttattaatgg ccttcttcta aaccaaacct caacttctgg tgttactctc 1260
ttctatccca caaacgaaa caaatggaac aaccgcatgt caacgatgac accggacgaa 1320
gatgtttttt atgtgatcgg attactgcaa tcagctgggt gatctcaaaa ttggcaagaa 1380
cttgaataac tcaacgacaa ggttattcag ttttgtgaaa actcgggaat taagattaag 1440
gaatatttga tgcactatac aagaaaagaa gattgggtta aacattttgg accaaaatgg 1500
gatgattttt taagaaagaa aattatgttt gatcccaaaa gactattgtc tccaggacaa 1560
gacatattta attaa 1575

```

<210> 29

<211> 1611

<212> DNA

<213> 鼠耳芥

<400> 29

```

atgacgtcaa gctttcttct cctgacgttc gccatatgta aactgatcat agcgtgggt 60
ctaaacgtgg gcccagtgta gctcctccgc atcggagcca tagatgtcga cggccacttc 120
accgtccacc cttccgactt agcctccgtc tcctcagact tcggtatgct gaagtcacct 180
gaagagccat tggcgtgct tcacccatca tcggccgaag acgtggcacg actcgtcaga 240
acagettacg gttcagccac ggcgtttccg gtctcagccc gaggccacgg ccattccata 300
aacggacaag ccgcggcggg gaggaacggg gtggtggttg aaatgaacca cggcgtaacc 360
gggacgcca agccactcgt ccgaccggat gaaatgtatg tggatgtatg ggggtggag 420
ttatgggtcg atgtgttgaa gaaaacgttg gagcatggct tagcacaaa atcatggacg 480
gattacttgt atctaaccgt tggaggtaca ctctccaatg caggaatcag tggtaagct 540
tttcaccatg gtctcaaat tagtaacgtc cttgagctcg acgttgtaac tgggaaagga 600
gaggtgatga gatgtcaga agaagagaac acaaggctat tccatggagt tcttggtgga 660
ttaggtcaat ttgggatcat cactcgagca cgaatctctc tcgaaccagc tcccaaagg 720
gtgagatgga tacgggtatt gtattcgagc ttcaaagtgt ttacggagga ccaagagtac 780
ttaatctcaa tgcattgtca attaaagttt gattacgtgg aaggttttgt gattgtggac 840
gaaggactcg tcaacaattg gagatcttct ttcttctctc cagtaacct cgtcaagatc 900
tcctctgtta gttccaacgg ctctgttttg tattgccttg agatcacaa gaactaccac 960
gactccgact ccgaaatcgt tgatcaggaa gttgagattc tgatgaagaa attgaatttc 1020
ataccgacat cgggtctttac aacggattta caatatgttg actttctcga ccgggtacac 1080
aaggccgaat tgaagctccg gtccaagaat ttatgggagg ttccacacct atggtcaac 1140
ctcttcgtgc caaaatcaag aatctctgac ttcgataaag gcgttttcaa gggcattttg 1200
ggaaataaaa caagtggccc tattcttata taccatga acaaagacaa atgggacgag 1260
aggagctcag ccgtgacgcc ggatgaggaa gttttctatc tgggtggctc attgagatca 1320
gctttaacgg acggtgaaga gacacagaag ctagagtatc tgaaagatca gaaccgtcgg 1380
atcttgaggt tctgtgaaca agccaagatc aatgtgaagc agtatcttc tcaccacgca 1440

```

[0025]

```

acacaggaag agtgggtggc tcattttggg gacaagtggg atcgggttcag aagcttaaaag 1500
gctgagtttg atccgcgaca catactcgct actggtcaga gaatctttca aaacccatct 1560
ttgtctttgt ttctctcgtc gtcgtcttct tcgtcagcgg cttcatgggtg a 1611

```

<210> 30
 <211> 1515
 <212> DNA
 <213> 鼠耳芥

```

<400> 30
atgcttatag taagaagttt caccatcttg cttctcagct gcatagcctt taagttggct 60
tgctgcttct ctagcagcat ttcttctttg aaggcgcttc ccctagtagg ccatttggag 120
tttgaacatg tccatcacgc ctccaaagat tttggaaatc gataccagtt gatccctttg 180
gcggtcttac atcccaaato ggtaagcgac atcgctcaa cgatacgaca catctggatg 240
atgggcactc attcacagct tacagtggca gcgagaggtc gtggacattc actccaaggc 300
caagctcaaa caagacatgg aattgttata cacatggaat cactccatcc ccagaagctg 360
caggtctaca gtgtggattc cctgctcca tatgttgatg tgtctgggtg tgagctgtgg 420
ataaacattt tgcattgagc cctcaagtac gggcttgac caaaatcatg gacggattac 480
ctgcatttaa ctgtaggtgg tactctgtcc aatgctggaa taagcggcca ggcattccga 540
catggaccac agatcagcaa tgttcatcaa ctggagattg tcacaggaaa aggcgagatc 600
ctaaactgta caaagaggca gaacagcgac ttatttaatg gtgttcttgg tggtttaggt 660
cagtttggca tcataacgcg ggcaagaata gcattggaac cagcaccaac catggacca 720
gagcaactaa tatctgcccc gggccacaaa ttcgattaca tagaagggtt tgtgataata 780
aacaggacag gcctcctgaa cagctggagg ttgtctttca ccgcagaaga gcctttagaa 840
gcaagccaat tcaagtttga tgggaaggact ctgtattgtc tggagctagc caagtatttg 900
aagcaagata acaaagacgt aatcaaccag gaagtgaag aaacattatc agagctaagc 960
tacgtgacgt cgacactggt tacaacggag gtagcatatg aagcattctt ggacagggta 1020
catgtgtctg aggtaaaact ccgacgaaa gggcagtggt aggtgccaca tccatggctg 1080
aacctcctgg taccaagaag caaaatcaat gaatttgcaa gaggtgtatt tggaaacata 1140
ctaacggata caagcaacgg ccagtcacg gtctaccag tgaacaaatc aaagtgggac 1200
aatcaaacat cagcagtaac accggaggaa gaggtattct acctggtggc gatcctaaca 1260
tcggcatctc cagggtcggc aggaaggat ggagtagaag agatcttgag gcggaacaga 1320
agaatactgg aattcagtga agaagcaggg atagggttga agcagtatct gccacattac 1380
acgacaagag aagagtggag atcccatttc ggggacaagt ggggagaatt tgtgaggagg 1440
aatccagat atgatccatt ggcaattctt gcgcctggcc accgaatttt tcaaaaggca 1500
gtctcactat catga 1515

```

<210> 31
 <211> 84
 <212> DNA
 <213> 鼠耳芥

```

<400> 31
tcagcttcgg gactcgctct tctctatcca acaaaccgga ataaatggga caatcgatat 60
tcggcgatga taccagagat cgat 84

```

<210> 32
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> 鼠耳芥

<400> 32

[0026]

Ser Ala Ser Gly Leu Ala Leu Leu Tyr Pro Thr Asn Arg Asn Lys Trp
 1 5 10 15
 Asp Asn,Arg Met Ser Ala Met Ile Pro Glu Ile Asp
 20 25

<210> 33
 <211> 2814
 <212> DNA
 <213> 鼠耳芥

<400> 33
 atgaatcgta tgacgtcaag ctttcttctc ctgacgttcg ccatatgtaa actgatcata 60
 gccgtgggtc taaacgtggg cccagtgag ctcctccgca tcggagccat agatgtcgac 120
 ggccacttca ccgtccacc ttccgactta gcctccgtct cctcagactt cggatatgctg 180
 aagtcacctg aagagccatt ggccgtgctt catccatcat cggccgaaga cgtggcacga 240
 ctgctcagaa cagcttacgg ttccagccacg gcgtttccgg tctcagcccg aggccacggc 300
 cattccataa acggacaagc cgcggcgggg aggaacggtg tgggtggttga aatgaaccac 360
 ggcgtaaccg ggacgcccac gccactcgtc cgaccggatg aaatgtatgt ggatgtatgg 420
 ggtggagagt tatgggtcga tgtgttgaag aaaacgttgg agcatggctt agcaccacaaa 480
 tcatggacgg attacttgta tctaaccgtt ggaggtacac tctccaatgc aggaatcagt 540
 ggtcaagctt ttcaccatgg tectcaaatt agtaacgtcc ttgagctcga cgttgtaact 600
 ggttagtatt aaaacattca agttcatata ttttaaattgc ttttgtctga agttttacta 660
 ataacaagaa attgatacca aaaagtaggg aaaggagagg tgatgagatg ctcagaagaa 720
 gagaacacaa ggttattcca tggagtctct ggtggattag gtcaatttgg gatcatcact 780
 cgagcacgaa tctctctcga accagctccc taaatctttt agtttttact gttgatggta 840
 atcaaaaatc cctggcgggt ccatcagttg taaatctttt agtttttact gttgatggta 900
 ttttttatat attttggata ataaaacctt aaaatgggtat attgtgatga cagggtgagat 960
 ggatacgggt attgtattcg agcttcaaag tgtttacgga ggaccaagag tacttaattc 1020
 caatgcatgg tcaattaaag tttgattacg tgggaagggtt tgtgatttgt gacgaaggac 1080
 tcgtcaacaa ttggagatct tctttcttct ctccacgtaa ccccgtaag atctcctctg 1140
 ttagttccaa cggctctggt ttgtattgcc ttgagatcac caagaactac cactgactccg 1200
 actccgaaat cgttgatcag gtcaacttca ttattcactt agaaaaaagc gatattttca 1260
 ttttttatat tgatgaatat ctggaaggat ttaacgctat gcgactattg ggaaatcatt 1320
 atgaaaaaat atttagttta tatgattgaa agtggctctc atagtatttt tgttgtgtcg 1380
 actttattat aacttaaatt tgggaaggga catgaagaag aagccagaga ggaactacag 1440
 agatctagct tttccacctg aacttaataa tgcacattta tataattatt tttcttcttc 1500
 taaagtttag tttatcacta gcgaattaat catggttact aattaagtag tggacagggt 1560
 catggaccac tcaactacca aataatgatt cctctttact cttaagttta attttaataa 1620
 aaccaactct actggaatct taacttatcc ttggttttgg taggctttta tagcaacacg 1680
 gtttttttaa ttttcctatt ccagattttg tatattaaat gtcgattttt tttctttttg 1740
 tttcaggaag ttgagattct gatgaagaaa ttgaatttca taccgacatc ggtctttaca 1800
 acggatttac aatatgtgga ctttctcgac cgggtacaca aggccgaatt gaagctccgg 1860
 tccaagaatt tatgggaggt tccacaccca tggctcaacc tcttcgtgcc aaaatcaaga 1920
 atctctgact tcgataaagg cgttttcaag ggcatttttg gaaataaaac aagtggcct 1980
 attcttatct accccatgaa caaagacaag taagtcttga cattaccatt gattactact 2040
 tctaaatttc ttctctagaa aaaagaataa aacgagtttt gcattgcatg catgcaaagt 2100
 tacacttggt gggatttaatt agtgggtccaa gaaaaaaagt ttgtcaaaat tgaaaaaac 2160
 tagacacgtg gtacatggga ttgtccgaaa aacgttgtcc acatgtgcat cgaaccagct 2220
 aagattgaca acaacacttc gtcggctcgt atttctcttt ttgttttgg accaaatccg 2280
 atgggtccaga ttgggtttat ttgtttttta gttcctagaa ctcaggtgg gtgggtccca 2340
 atcagattct cctagaccaa accgatctca acgaacctc cgcacatcat tgattattac 2400
 attaatatag atattgtcgt tgctgacgtg tcgtaatttg atgttattgt cagatgggac 2460

[0027]

```

gagaggagct cagccgtgac gccggatgag gaagttttct atctggtggc tctattgaga 2520
tcagcttttaa cggacggtga agagacacag aagctagagt atctgaaaga tcagaaccgt 2580
cggatcttgg agttctgtga acaagccaag atcaatgtga agcagtatct tcctcaccac 2640
gcaacacagg aagagtgggt ggctcatttt ggggacaagt gggatcgggt cagaagctta 2700
aaggctgagt ttgatccgag acacatactc gctactgggt agagaatctt tcaaaaccca 2760
tctttgtctt tgtttcctcc gtcgtcgtct tcttcgtcag cggcttcatg gtga 2814

```

<210> 34
 <211> 1620
 <212> DNA
 <213> 鼠耳芥

```

<400> 34
atgaatcgta tgacgtcaag ctttcttctc ctgacgttcg ccatatgtaa actgatcata 60
gccgtgggtc taaacgtggg ccccgatgag ctccctccga tcggagccat agatgtcgac 120
ggccacttca cgtccaccc ttccgactta gcctccgtct cctcagactt cggtatgctg 180
aagtcacctg aagagccatt ggccgtgctt catccatcat cggccgaaga cgtggcacga 240
ctcgtcagaa cagcttacgg ttccagccacg gcgtttccgg tctcagcccg aggccacggc 300
cattccataa acggacaagc cgcggcgggg aggaacgggtg tgggtggttg aatgaaccac 360
ggcgtaaccg ggacgcccac gccactcgtc cgaccggatg aaatgtatgt ggatgtatgg 420
ggtggagagt tatgggtcga tgtgttgaag aaaacgttgg agcatggctt agcaccaaaa 480
tcatggacgg attacttcta tctaaccgtt ggaggtacac tctccaatgc aggaatcagt 540
ggtcaagctt ttccaccatgg tcctcaaatt agtaacgtcc ttgagctcga cgttgtaact 600
gggaaaggag aggtgatgag atgctcagaa gaagagaaca caaggctatt ccatggagtt 660
cttgggtggat taggtcaatt tgggatcatc actcgagcac gaatctctct cgaaccagct 720
ccccaaaggg tgagatggat acgggtattg tattcgagct tcaaagtgtt tacggaggac 780
caagagtact taatctcaat gcatggtcaa ttaaagtttg attacgtgga aggttttgtg 840
attgtggacg aaggactcgt caacaattgg agatcttctt tcttctctcc acgtaacccc 900
gtcaagatct cctctgttag ttccaacggc tctgttttgt attgccttga gatcaccaag 960
aactaccacg actccgactc cgaaatcggt gatcaggaag ttgagattct gatgaagaaa 1020
ttgaatttca taccgacatc ggtctttaca acggatttac aatatgtgga ctttctcgac 1080
cgggtacaca aggcggaatt gaagctccgg tccaagaatt tatgggaggt tccacacca 1140
tggtctcaacc tcttcgtgcc aaaatcaaga atctctgact tcgataaagg cgttttcaag 1200
ggcatttttg gaaataaaac aagtggccct attcttatct accccatgaa caaagacaaa 1260
tgggacgaga ggagctcagc cgtgacgccg gatgaggaag ttttctatct ggtggctcta 1320
ttgagatcag ctttaacgga cggatgaagag acacagaagc tagagtatct gaaagatcag 1380
aaccgtcgga tcttgaggtt ctgtgaacaa gccaatgata atgtgaagca gtatcttctt 1440
caccacgcaa cacaggaaga gtgggtgggt cattttgggg acaagtggga tcggttcaga 1500
agcttaaagg ctgagtttga tccgcgacac atactcgcta ctggtcagag aatctttcaa 1560
aaccatctt tgtctttgtt tcctccgtcg tcgtcttctt cgtcagcggc ttcattggtga 1620

```

<210> 35
 <211> 539
 <212> PRT
 <213> 鼠耳芥

```

<400> 35
Met Asn Arg Met Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ile Cys
 1             5             10             15

Lys Leu Ile Ile Ala Val Gly Leu Asn Val Gly Pro Ser Glu Leu Leu
                20             25             30

```

[0028]

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

[0029]

325	330	335
Leu Met Lys Lys Leu Asn Phe Ile Pro Thr Ser Val Phe Thr Thr Asp 340	345	350
Leu Gln Tyr Val Asp Phe Leu Asp Arg Val His Lys Ala Glu Leu Lys 355	360	365
Leu Arg Ser Lys Asn Leu Trp Glu Val Pro His Pro Trp Leu Asn Leu 370	375	380
Phe Val Pro Lys Ser Arg Ile Ser Asp Phe Asp Lys Gly Val Phe Lys 385	390	395 400
Gly Ile Leu Gly Asn Lys Thr Ser Gly Pro Ile Leu Ile Tyr Pro Met 405	410	415
Asn Lys Asp Lys Trp Asp Glu Arg Ser Ser Ala Val Thr Pro Asp Glu 420	425	430
Glu Val Phe Tyr Leu Val Ala Leu Leu Arg Ser Ala Leu Thr Asp Gly 435	440	445
Glu Glu Thr Gln Lys Leu Glu Tyr Leu Lys Asp Gln Asn Arg Arg Ile 450	455	460
Leu Glu Phe Cys Glu Gln Ala Lys Ile Asn Val Lys Gln Tyr Leu Pro 465	470	475 480
His His Ala Thr Gln Glu Glu Trp Val Ala His Phe Gly Asp Lys Trp 485	490	495
Asp Arg Phe Arg Ser Leu Lys Ala Glu Phe Asp Pro Arg His Ile Leu 500	505	510
Ala Thr Gly Gln Arg Ile Phe Gln Asn Pro Ser Leu Ser Leu Phe Pro 515	520	525
Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ser Trp 530	535	

<210> 36

<211> 842

<212> DNA

<213> 鼠耳芥

<400> 36

aagcttaaat gacaatttag taccttgggt tggatcatgat ttagagcgga acaaataac 60
catacatcaa acgaggatat acagagaaaa ttcattggaag tatggaattt agaggacaat 120
ttctcttctg ggctacaacg gaccggccca ttctgtcatt taccagagg tatcgagttt 180
gtggactttt gatgccgcta gagactattg gcatcggatt gaaaaaatg ttacttctgt 240
tggttaacaat ttcttgaatg caatattttc cttgtcatga atatttaaac ttgttattac 300
tttcttttag cttaggtgtg gacaattatg gagtttactt caaacgagga agaattctaa 360

[0030]

acgctcggtt	caggtctcga	aaacaaacca	actcacaatc	ctgacttaat	tgaggaaaac	420
aatgcaaaac	cacatgcatg	cttccatatt	tctatcataa	tcttataaga	aaaaacacta	480
ctaagtgaac	tgattctgta	tatatataac	caatgccttt	tgttttgtga	tattttatgt	540
atatataact	attgactttt	gtcatctatg	gatagtgtct	cgggctcttg	gcaaacatat	600
ttcaaagaaa	agttaatgac	tgtaattaat	taatctgaag	ctagaaacag	aaccccgagg	660
taaaagaaaa	agacagagca	catgaagttt	agtactttta	tatatttaat	atatcattct	720
ttcttattgc	ttatctctaa	agcaaaaact	tccctaaacc	ctaagccaaa	ggactcagat	780
cgatgcagaa	ccaagaaggc	ttgtttttgga	tttgagagcc	aaatgcaaag	aaaaaaactc	840
tt						842

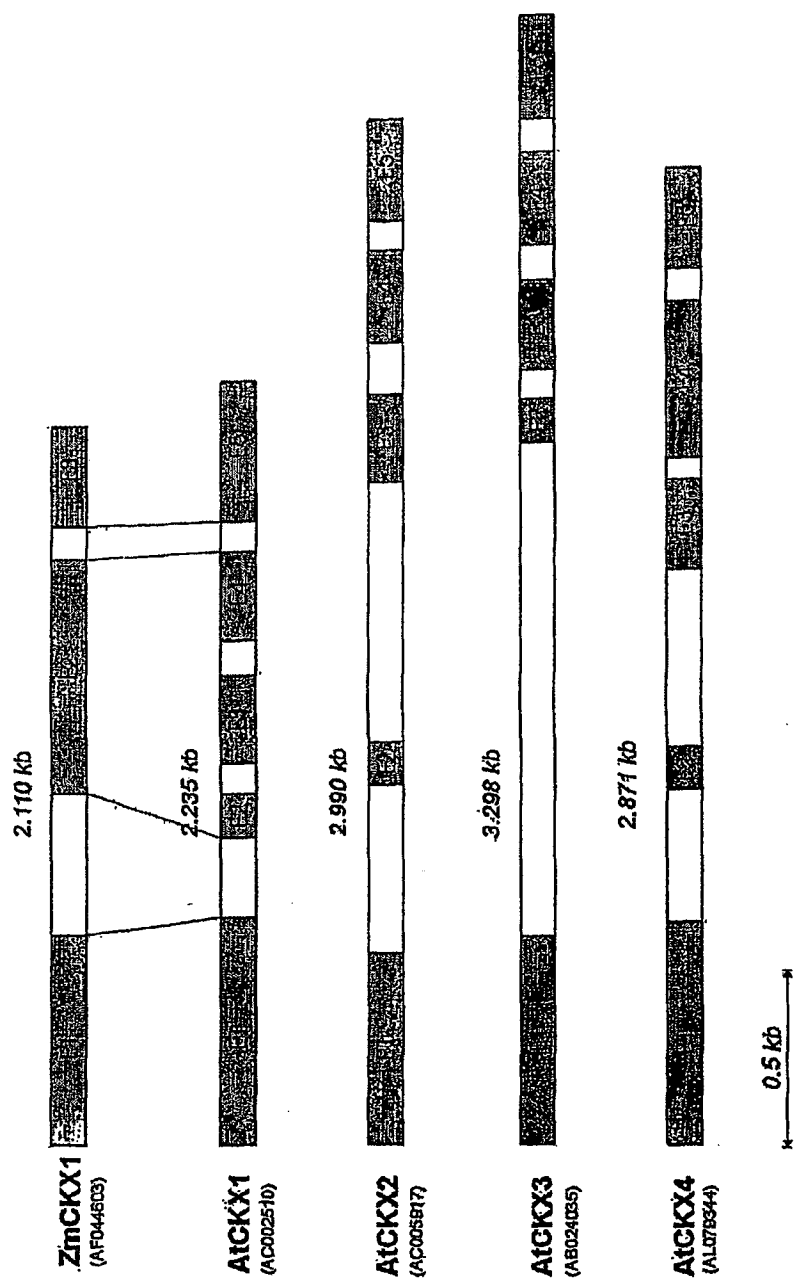


图 1

ZmCCKX1	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
AtCCKX1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AtCCKX2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AtCCKX3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AtCCKX4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ZmCCKX1	82	101	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200									
AtCCKX1	101	101	101	101	101	101	101	101	101	101	101	101									
AtCCKX2	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70									
AtCCKX3	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83									
AtCCKX4	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77									
ZmCCKX1	173	201	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300									
AtCCKX1	190	190	190	190	190	190	190	190	190	190	190	190									
AtCCKX2	154	154	154	154	154	154	154	154	154	154	154	154									
AtCCKX3	171	171	171	171	171	171	171	171	171	171	171	171									
AtCCKX4	177	177	177	177	177	177	177	177	177	177	177	177									
ZmCCKX1	273	301	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400									
AtCCKX1	290	290	290	290	290	290	290	290	290	290	290	290									
AtCCKX2	254	254	254	254	254	254	254	254	254	254	254	254									
AtCCKX3	271	271	271	271	271	271	271	271	271	271	271	271									
AtCCKX4	277	277	277	277	277	277	277	277	277	277	277	277									
ZmCCKX1	373	401	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500									
AtCCKX1	377	377	377	377	377	377	377	377	377	377	377	377									
AtCCKX2	340	340	340	340	340	340	340	340	340	340	340	340									
AtCCKX3	358	358	358	358	358	358	358	358	358	358	358	358									
AtCCKX4	363	363	363	363	363	363	363	363	363	363	363	363									
ZmCCKX1	466	501	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600									
AtCCKX1	473	473	473	473	473	473	473	473	473	473	473	473									
AtCCKX2	435	435	435	435	435	435	435	435	435	435	435	435									
AtCCKX3	451	451	451	451	451	451	451	451	451	451	451	451									
AtCCKX4	457	457	457	457	457	457	457	457	457	457	457	457									

图 2

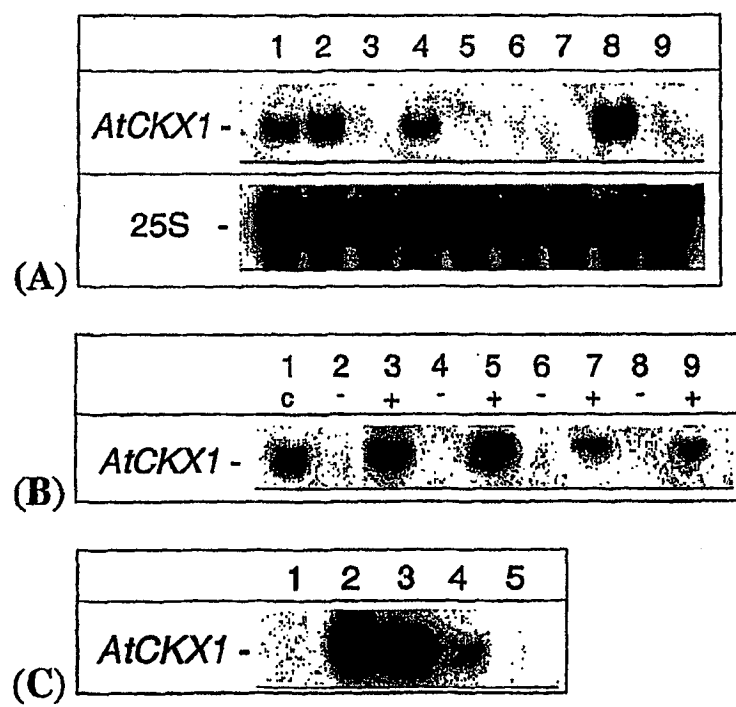


图 3

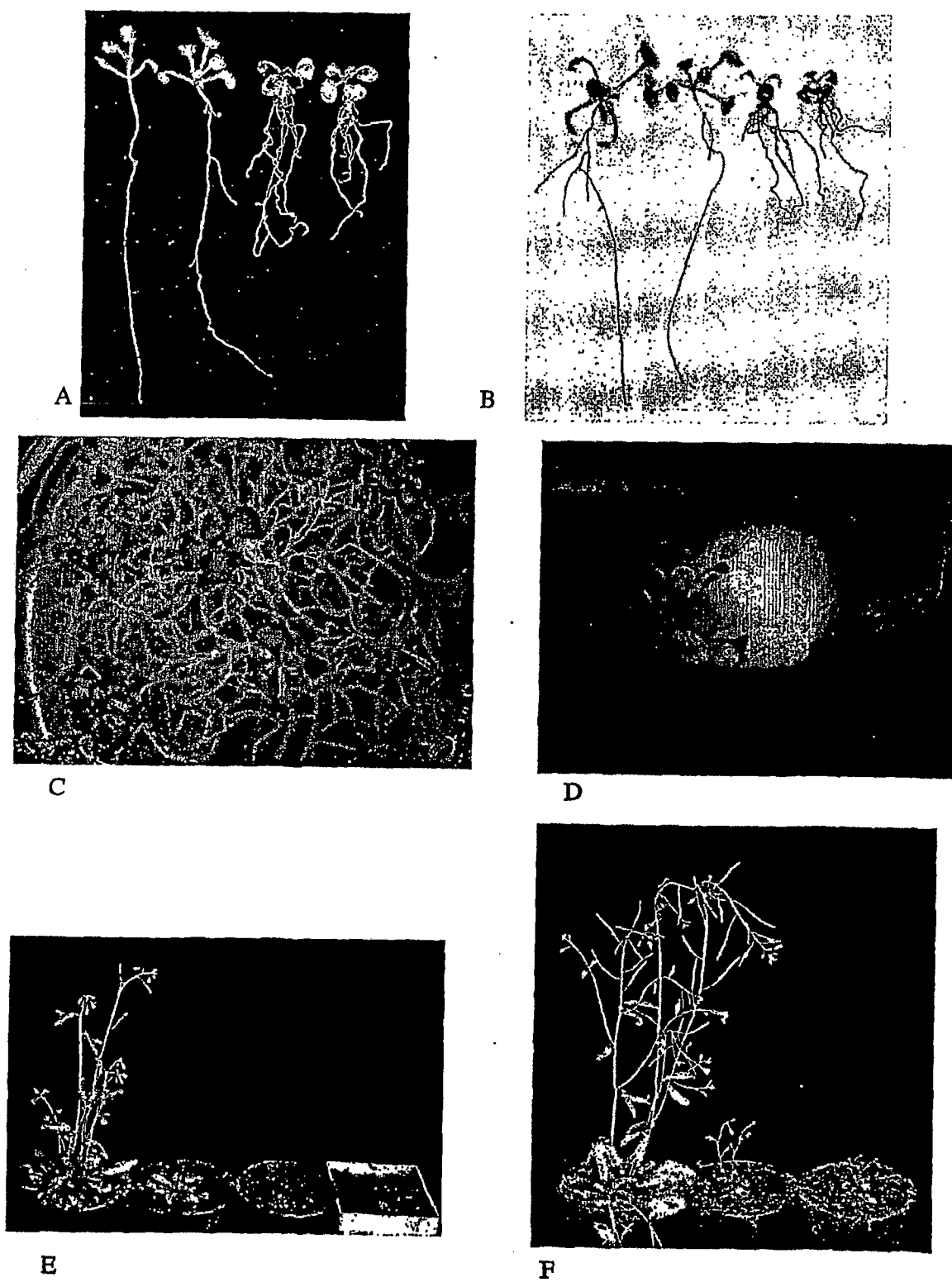


图 4



图 5

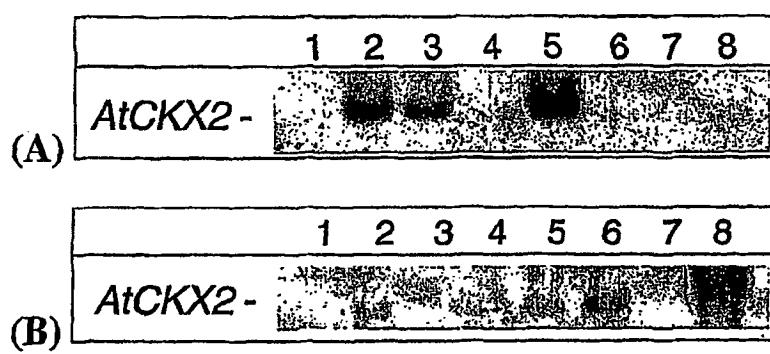


图 6

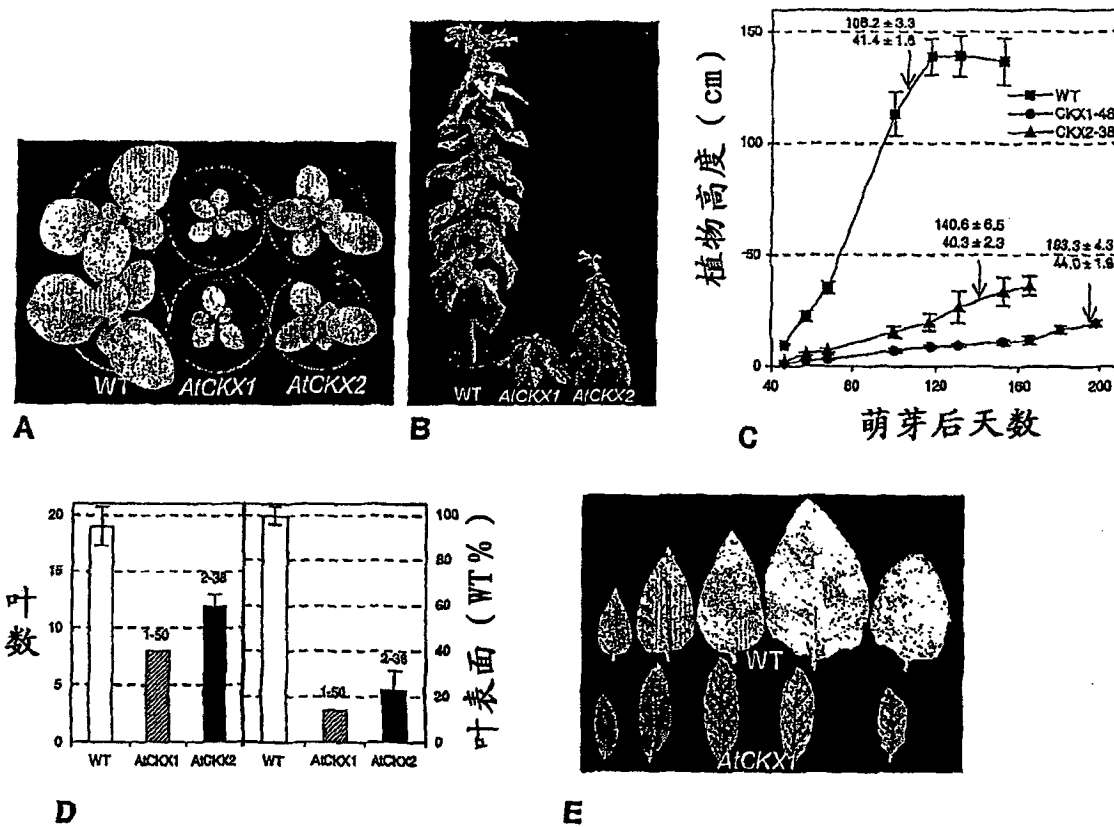


图 7

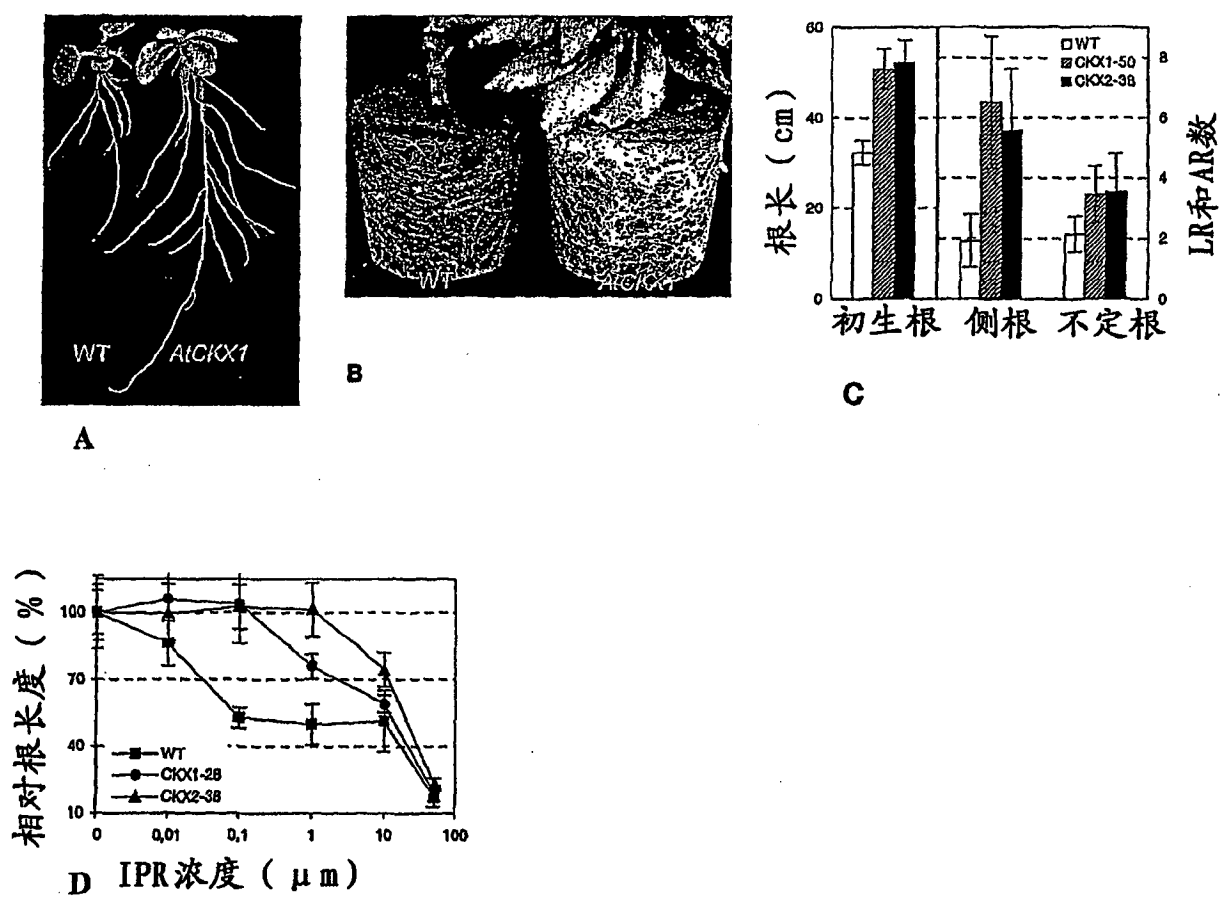


图 8



图 9

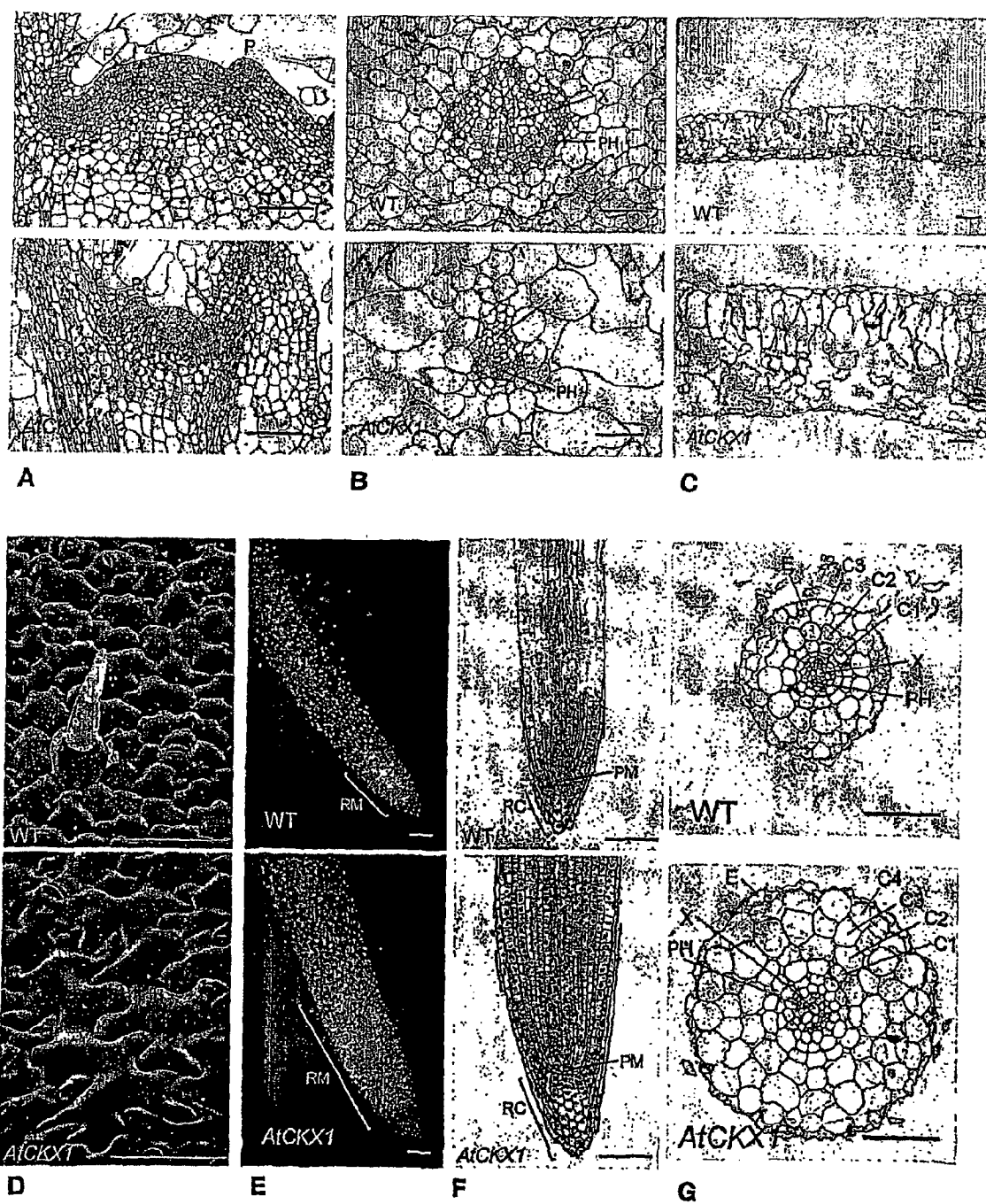


图 10

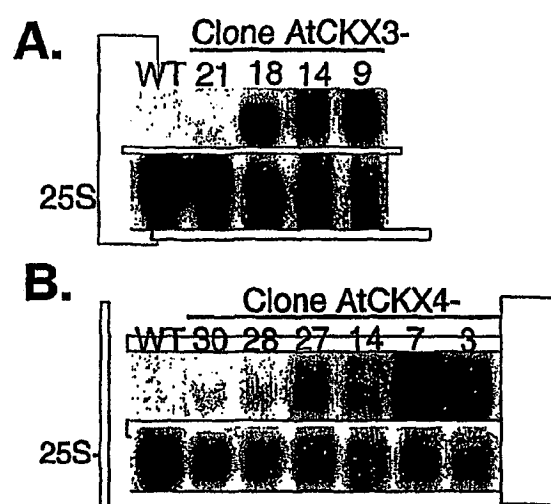


图 11

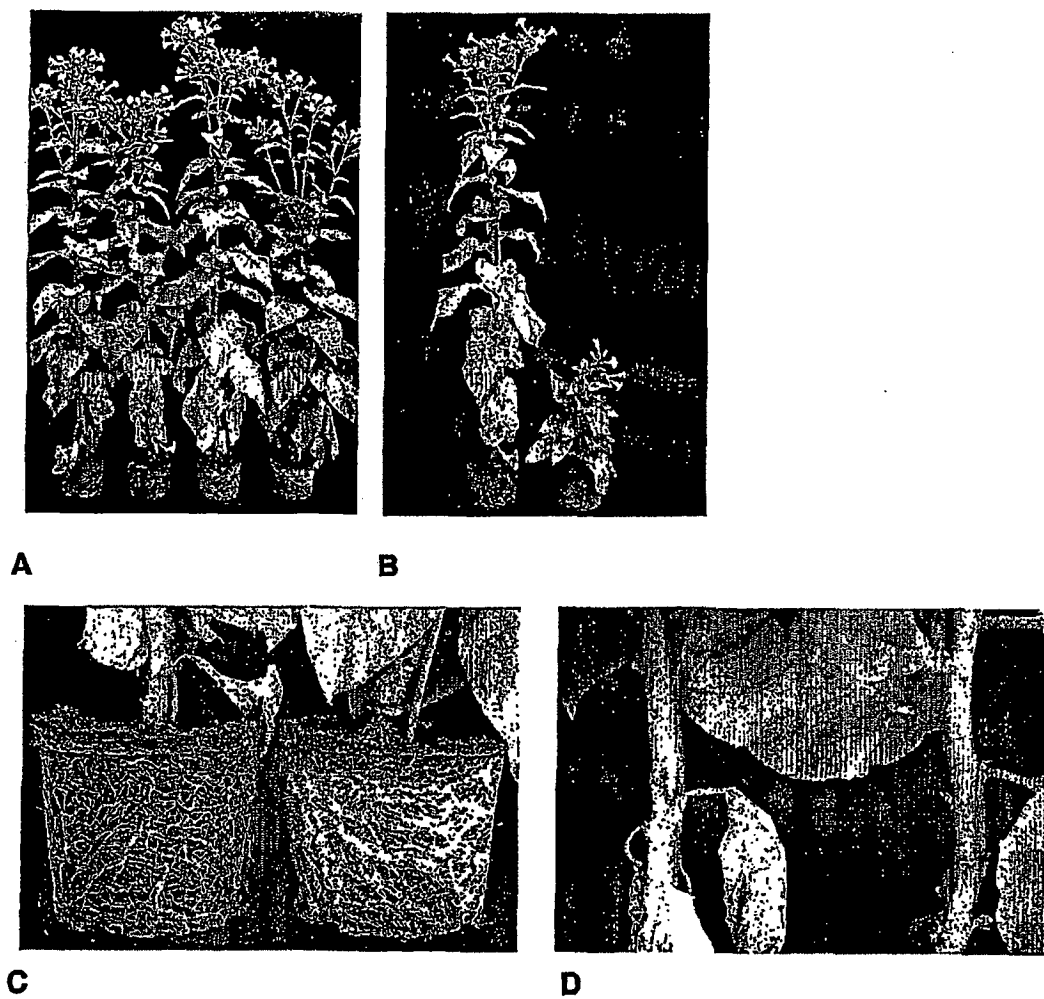


图 12

专利名称(译)	改变植物形态学、生物化学和生理学的方法		
公开(公告)号	CN102174541A	公开(公告)日	2011-09-07
申请号	CN201110002021.3	申请日	2001-06-18
[标]申请(专利权)人(译)	托马斯·施穆林 托马斯·维尔纳		
申请(专利权)人(译)	托马斯·施穆林 托马斯·维尔纳		
当前申请(专利权)人(译)	托马斯·施穆林 托马斯·维尔纳		
[标]发明人	托马斯施穆林 托马斯维尔纳		
发明人	托马斯·施穆林 托马斯·维尔纳		
IPC分类号	C12N15/53 C12N15/11 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/02 C07K16/40 C12Q1/26 C12Q1/68 A01H4/00 A01H5/00 A01N61/00 A01P13/00 A01P21/00 G01N33/53 C12N9/06 C12N15/09 C12N15/82		
CPC分类号	C12N15/8271 C12N15/8295 C12N15/8287 C12N9/0032 C12N15/8261 Y02A40/146		
优先权	2000870132 2000-06-16 EP 2001870053 2001-03-16 EP 60/258415 2000-12-27 US		
其他公开文献	CN102174541B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及刺激根生长和/或增强侧根或不定根形成和/或改变根的向地性的方法，其包在植物或植物部分中含表达植物细胞分裂素氧化酶或者表达可降低活性细胞分裂素水平的另一种蛋白质。本发明也涉及新的植物细胞分裂素氧化酶蛋白质、编码细胞分裂素氧化酶蛋白质的核酸序列、以及包含该序列的载体、宿主细胞、转基因细胞和植物。本发明还涉及所述序列在改善与根有关的特性(包括提高产量和/或增强早期活力和/或改变根/枝条比率和/或提高抗倒伏和/或增强耐旱和/或促进外植体的体外繁殖和/或改变细胞命运和/或植物发育和/或植物形态学和/或植物生物化学和/或植物生理学)上的用途。本发明还涉及所述序列在上述方法中的用途。本发明还涉及鉴定和获得与细胞分裂素氧化酶蛋白质相互作用的蛋白质和化合物的方法。本发明还涉及所述化合物作为植物生长调节剂或除草剂的用途。

带电性 / 疏水性	侧链基团	氨基酸
非极性 疏水	脂肪族 脂肪族, 含硫 芳香族 亚氨基	ala, ile, leu, val met phe, trp pro
极性 不带电	脂肪族 酰胺 芳香族 羟基 巯基	gly asn, gln Tyr ser, thr cys
正电	碱性	arg, his, lys
负电	酸性	asp, glu