

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/29



[12] 发明专利申请公开说明书

C12Q 1/68 C07K 14/415

C07K 16/16 C12N 15/63

C12N 15/82 C12N 5/10

A01H 5/00 A01H 4/00

[21] 申请号 02817065.2

[43] 公开日 2004 年 12 月 15 日

[11] 公开号 CN 1555414A

[22] 申请日 2002.8.30 [21] 申请号 02817065.2

[30] 优先权

[32] 2001. 8.31 [33] EP [31] 01120670.3

[86] 国际申请 PCT/EP2002/009738 2002.8.30

[87] 国际公布 WO2003/020013 英 2003.3.13

[85] 进入国家阶段日期 2004.3.1

[71] 申请人 马克思-普朗克科学促进协会公司

地址 德国柏林

共同申请人 KWS SAAT 公司

[72] 发明人 克里斯蒂安娜·格布哈特

阿吉姆·巴鲁沃拉

玛利亚·拉法埃莱·埃尔科拉诺

朱利亚·维斯

弗朗西斯科·萨拉米尼

[74] 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

代理人 丁香兰

权利要求书 4 页 说明书 55 页 序列表 21 页
附图 5 页

[54] 发明名称 来源于植物的抗性基因

[57] 摘要

本发明公开了编码能赋予抗植物病原体如真菌(例如致病疫霉菌和相关分离株)抗性或被其引发的多肽的核酸分子。优选的核酸分子编码马铃薯(*Solanum tuberosum*)的 R1 或其天然产生的多种同源物或其多种衍生物。本发明还公开了通过使用 R1 抗性基因激活抗性的特殊方法,其在某些情况下导致过敏反应。本发明的另一方面包括特异性引物、载体、宿主细胞、多肽、抗体、适体、转基因植物、制备和利用这些物质的方法以及在植物中影响抗性性状的方法。另外,本发明还提供了鉴定和获得植物保护性化合物的筛选方法。

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

1. 一种核酸分子，其编码在植物中表达并能赋予所述植物抵抗病原体抗性的多肽，该核酸分子包含或由选自以下组的核苷酸序列组成：

- 5 (a) 至少编码含有 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的蛋白 (R1) 的成熟形式的核苷酸序列；
- (b) 至少含有 SEQ ID NO: 1 所示 DNA 序列的一个或一个以上编码区域的核苷酸序列；
- (c) 在严格杂交条件下与 (a) 或 (b) 中定义的核苷酸序列的
- 10 互补链杂交的核苷酸序列；
- (d) 编码一种蛋白的核苷酸序列，所述蛋白通过在 (a) 或 (b) 的核苷酸序列编码的氨基酸序列中替换、缺失和/或添加一个或几个氨基酸，而由 (a) 或 (b) 的核苷酸序列编码的蛋白衍生获得；
- (e) 编码一种蛋白的核苷酸序列，所述蛋白具有与由 (a) 或 (b)
- 15 的核苷酸序列编码的氨基酸序列至少 60%一致性的氨基酸序列；
- (f) 一种核苷酸序列，该核苷酸序列至少编码相当于 SEQ ID NO: 2 中氨基酸 308-329 位置的亮氨酸拉链 (LZ) 结构域，相当于 SEQ ID NO: 2 中氨基酸 572-682 位置的核酸结合位点 (NBS) 结构域，和/或相当于 SEQ ID NO: 2 中氨基酸 780-1280 位置的富含亮氨酸重复序列 (LRR) 结
- 20 构域；
- (g) 编码由 (a) 或 (b) 的核苷酸序列编码的 R1 蛋白的携带抗原决定簇部分的核苷酸序列；
- (h) 包含 (a) 到 (g) 的任一核苷酸序列的至少 15 个连续核苷酸的核苷酸序列；
- 25 (i) 编码包含 SEQ ID NOs: 10 和 12 中所示一个或一个以上基序或氨基酸序列 LHD 的多肽的核苷酸序列；
- (j) 在严格条件下用探针筛选合适的文库而获得的 DNA 序列，所述探针具有 SEQ ID NOs: 1 或 5 到 8 的任一核苷酸序列的至少 17 个连续核苷酸；

(k) 编码由 (a) 或 (b) 的核苷酸序列编码的蛋白的至少 6 个连续氨基酸的片段的核苷酸序列;

(1) 由于对 (a) 到 (i) 任一核苷酸序列的遗传密码的简并, 而产生的核苷酸序列。

5 2. 如权利要求 1 所述的核酸分子, 其中所述的病原体是致病疫霉菌。

3. 一种至少 15 个核苷酸长的核酸分子, 该核酸分子与权利要求 1 或 2 所述的核酸分子或其互补链特异性地杂交。

4. 一种载体, 该载体包含权利要求 1 到 3 任一项所述的核酸分子。

10 5. 如权利要求 4 所述的载体, 该载体为一种表达载体, 其中所述的核酸分子可操作地与一个或一个以上的控制序列连接, 该控制序列允许在原核和/或真核宿主细胞中转录和选择地表达。

6. 一种宿主细胞, 该宿主细胞包含权利要求 4 或 5 所述的载体或权利要求 1 到 3 任一项所述的核酸分子。

15 7. 由权利要求 1 或 2 所述的核酸分子编码的 R1 蛋白或其具有免疫学活性或功能的片段。

8. 一种抗体或适体, 该抗体或适体特异性地识别权利要求 7 所述的蛋白或其片段或抗原决定簇。

20 9. 一种转基因植物细胞, 该转基因植物细胞包含权利要求 1 到 3 任一项所述的核酸分子, 该核酸分子可操作地与使 DNA 序列在植物细胞中转录和/或表达的调控元件连接。

10. 一种转基因植物或植物组织, 该转基因植物或植物组织包含权利要求 9 所述的植物细胞。

25 11. 一种启动子的调控序列, 其调控包含权利要求 1 或 2 所述的核酸分子的基因的表达, 该调控序列能在病原体侵染时赋予或调节异源 DNA 序列的表达。

12. 如权利要求 11 所述的调控序列, 该调控序列包含选自下列组的 DNA 序列:

(a) 包含 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸 1 到 2222 的核苷酸序列或其部分的 DNA 序列;

- (b) 包含 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸 1 到 2222 的核苷酸序列的至少 14 个连续核苷酸的 DNA 序列;
- (c) 在严格条件下与 (a) 或 (b) 中所定义的核苷酸序列杂交的 DNA 序列;
- 5 (d) 用具有权利要求 1 中所述核苷酸序列的探针筛选合适的基因组 DNA 文库而获得的片段的基因的 DNA 序列;
- (e) 包含 (a)、(b) 和 (c) 中保守的核苷酸序列的 DNA 序列。
13. 一种重组 DNA 分子, 该重组 DNA 分子包含权利要求 11 或 12 所述的调控序列。
- 10 14. 如权利要求 13 所述的重组 DNA 分子, 其中所述的调控序列可操作地与异源 DNA 序列连接。
15. 一种用权利要求 11 或 12 所述的调控序列或用权利要求 13 或 14 所述的重组 DNA 分子转化的宿主细胞。
16. 一种转基因植物、植物组织或植物细胞, 该转基因植物、植物组织或植物细胞包含权利要求 11 或 12 所述的调控序列或权利要求 13 或 14 所述的重组 DNA 分子。
17. 一种鉴定植物保护剂的方法, 该方法包括下列步骤:
- (a) 在化合物或含有多种化合物的样品存在下, 培养含有重组 DNA 分子的植物细胞或组织或维护含有重组 DNA 分子的植物, 所述重组 DNA 分子包含与权利要求 11 或 12 所述的调控序列可操作地连接的读出系统, 所述培养或维护是在允许所述读出系统表达的条件下进行的;
- 20 (b) 分别鉴定或证实样品和化合物, 该样品和化合物导致在所述植物、植物细胞或植物组织中, 所述读出系统的表达被抑制或激活和/或增强。
- 25 18. 一种鉴定和获得病原体的无毒或毒性因子的方法, 该方法包括下列步骤:
- (a) 在一个读出系统中以来源于病原体的肽或蛋白表达文库为背景筛选权利要求 7 所述的 R1 蛋白或其片段, 所述筛选是在允许所述读出系统中蛋白和肽相互作用的合适的条件下进行的;

(b) 鉴定或证实导致所述读出系统被抑制或激活的 cDNA。

19. 由权利要求 17 或 18 所述的方法获得或鉴定的 cDNA 或其编码的产物。

20. 一种组合物，该组合物包含权利要求 1 到 3 任一项所述的核酸
5 分子、权利要求 4 或 5 所述的载体、权利要求 7 所述的蛋白、权利要求 8 所述的抗体或适体、权利要求 11 或 12 所述的调控序列或权利要求 13 或 14 任一项所述的重组 DNA 分子以及选择性地用于检测的适合方法或用于植物细胞和组织培养的适合方法。

来源于植物的抗性基因

5 技术领域

本发明涉及来自马铃薯的 *RI* 抗性基因。本发明还涉及利用该基因的方法和材料，及鉴定或产生其他相关基因的方法。本发明还广泛涉及鉴定可以诱导 *RI* 基因或其编码的蛋白活性的植物保护剂的方法。另外，本发明涉及由于 *RI* 转基因的表达而对晚疫病产生抗性的转基因植物。

10

背景技术

本说明书中以姓名引用了多个文献。完整的文献目录引文可在紧接序列表或权利要求之前的说明书末尾找到。这里引用的每篇文献（包括任何制造商的说明、指导等等）在此引入作为参考；然而，并不承认引

15 用的任何文献确实是本发明的现有技术。

晚疫病是全球范围内对马铃薯种植最具破坏性的病害，每年造成十亿美元的损失（Kamoun 等，1999）。致病病原体是致病疫霉菌（*Phytophthora infestans*），其为一种卵菌纲真菌，也可侵染番茄（Judelson 1997）。晚疫病引起的马铃薯作物的彻底毁灭造成了 19 世纪

20 中期的“爱尔兰马铃薯饥荒”（Salaman 1985）并引发了对抗性植物的寻找。大约 100 年前在一种墨西哥本地的野生马铃薯品种（*S. demissum*）中发现了对晚疫病具有抗性的单基因（*R* 基因）。*R* 基因渐渗到马铃薯栽培品种赋予小种专化抗性，然而，因为新的小种迅速地克服了 *R* 基因介导的抗性，只能提供对晚疫病的短暂抗性（Wastie 1991, Fry 和 Goodwin

25 1997）。在野生马铃薯品种中还鉴定了针对晚疫病的数量抗性或田间抗性（Ross 1986）。这种抗性比由 *R* 基因介导的抗性更持久，但很难通过杂交和表型选择转移到栽培品种中。晚疫病仍主要通过频繁使用杀真菌剂来控制，该杀真菌剂通过杀真菌剂抗性分离种的选择来释放功效。

使用 DNA 标记已经将几个 *R* 基因定位于马铃薯染色体上

(Leonards-Schippers 等, 1992, EI-Kharbotly 等, 1994, 1996, Li 等, 1998, Ewing 等, 2000, Naess 等, 2000)。RI 被定位于染色体 V (Leonards-Schippers 等, 1992) 的一段区域上, 抗马铃薯 X 病毒 (*Potato virus X*) 的单基因也被定位于该区域 (Ritter 等, 1991, De Jong 1997)。同样的区域还包含抗寄生根胞囊线虫马铃薯白线虫 (*Globodera pallida*) (Kreike 等, 1994, Rouppe van der Voort 等, 1997, 2000) 和晚疫病 (Leonards-Schippers 等, 1994, Oberhagemann 等, 1999, Collins 1999) 的主要的数量性状座位 (QTL)。抗性基因热点的存在暗示它们从相同的祖先通过局部基因的复制及随后的功能分化进化而来。 (Leonards-Schippers 等, 1994, Leister 等, 1996, Oberhagemann 等, 1999, Gebhardt 和 Valkonen 2001)。如果确是如此, 那么 RI 基因的分子克隆将使在分子水平上研究定位到该区域和参与调控多种病原体的质量和数量抗性的多个因子成为可能。

15 发明内容

因此, 本发明的主要技术问题是为满足对植物病原体抗性基因和其调控序列的需要。

所述技术问题的解决方法通过在权利要求和下面进一步描述中提供的实施方式来获得。

20 根据本发明, 在分子水平上克隆并鉴定了抗晚疫病的第一个基因, 即 RI。通过位置克隆和候选基因方法相结合的特定方法鉴定该基因。该基因的分子结构使 RI 归类于含有保守的 NBS-LRR 和亮氨酸拉链基序的植物抗性基因中 (Ellis 等, 2000, Dangl 和 Jones, 2001)。

RI 是通过位置克隆策略并结合寻找具有与已知植物抗性基因相似的 DNA 序列的候选基因的方法克隆的 (Hammond-Kosack 和 Jones 1997, Ellis 等, 2000)。相似的方法也成功地用于克隆抗马铃薯 X 病毒的马铃薯基因 (Rx1, Bendahmane 等, 1999) 和抗根胞囊线虫马铃薯白线虫的马铃薯基因 (Gpa2, Van der Vossen 等, 2000)。向 RI 的染色体步查起始于两个位于 RI 侧翼短基因距离为 0.1 厘摩 (cM) 的标记座位 SPUD237 和 AFLP1。

然而，由于缺乏具有 *AFLP1* 标记的 BAC 和 YAC 克隆 (Leister 等, 1997)，从标记 *AFLP1* 的步查没有结果。通过 BAC 技术并结合使用 BAC 克隆的大矩阵促进了鉴定带有重叠插入物的马铃薯基因组克隆。在水稻 (Nakamura 等, 1997, Yang 等, 1997, Yang 等, 1998) 和番茄 (Folkertsma 等, 1998) 中已成功采用了上述方法。物理图谱 (图 1) 覆盖马铃薯基因组的至少 250 kb。根据与 BAC 末端标记连锁而不重组，约 200 kb 是含有 *RI* 基因的候选区域。因为在物理图谱中不包括分离 *RI* 和 *AFLP1* 的单重组事件，该候选区域对 *AFLP1* 座位是开放式的。从该候选区域的部分序列信息鉴定了一个 RGL 抗性基因类似基因片段，该基因片段检测到成员均存在于携带敏感等位基因 *r1* 或抗性等位基因 *RI* 的染色体上的基因家族。事实上，用于鉴定针对 *RI* 的 cDNA 和 BAC 克隆的 RGL 探针是 *r1* 敏感等位基因的一部分。根据从编码部分 *RI* 的 cDNA 克隆中进行的等位基因特异性 PCR 分析，显示候选基因家族的有功能的成员存在于具有 *RI* 抗性等位基因的植物中而不存在于敏感植物中。从 BAC BA87d17 中亚克隆该候选基因并稳定转化到敏感栽培品种 Desirée 中。在几个转基因植物中 *RI* 表型的互补表明该候选基因确实是 *RI* 基因。

因此，本发明涉及一种核酸分子，其编码在植物中表达并能赋予所述植物抵抗病原体抗性的多肽，该核酸分子包含或由选自以下组的核苷酸序列组成：

- (a) 至少编码含有 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的蛋白 (*R1*) 的成熟形式的核苷酸序列；
- (b) 至少含有 SEQ ID NO: 1 所示 DNA 序列的一个或一个以上编码区域的核苷酸序列；
- (c) 在严格杂交条件下与 (a) 或 (b) 中定义的核苷酸序列的互补链杂交的核苷酸序列；
- (d) 编码一种蛋白的核苷酸序列，所述蛋白通过在 (a) 或 (b) 的核苷酸序列编码的氨基酸序列中替换、缺失和/或添加一个或几个氨基酸，而由 (a) 或 (b) 的核苷酸序列编码的蛋白衍生获得；
- (e) 编码一种蛋白的核苷酸序列，所述蛋白具有与由 (a) 或 (b)

的核苷酸序列编码的氨基酸序列至少 60%一致性的氨基酸序列；

(f) 一种核苷酸序列，该核苷酸序列至少编码相当于 SEQ ID NO: 2 中氨基酸 308-329 位置的亮氨酸拉链 (LZ) 结构域，相当于 SEQ ID NO: 2 中氨基酸 572-682 位置的核酸结合位点 (NBS) 结构域，和/或相当于 SEQ ID NO: 2 中氨基酸 780-1280 位置的富含亮氨酸重复序列 (LRR) 结构域；

(g) 编码由 (a) 或 (b) 中核苷酸序列编码的 R1 蛋白的携带抗原决定簇部分的核苷酸序列；

(h) 包含 (a) 到 (g) 的任一核苷酸序列的至少 15 个连续核苷酸的核苷酸序列；

(i) 编码包含 SEQ ID NOs: 10 和 12、图 4 中所示的一个或一个以上基序或氨基酸序列 LHD 的多肽的核苷酸序列；

(j) 在严格条件下用探针筛选合适的文库而获得的 DNA 序列，所述探针具有 SEQ ID NOs: 1 或 5 到 8 的任一核苷酸序列的至少 17 个连续核苷酸；

(k) 编码由 (a) 或 (b) 的核苷酸序列编码的蛋白的至少 6 个连续氨基酸的片段的核苷酸序列；和

(l) 由于对 (a) 到 (i) 任一核苷酸序列的遗传密码的简并，而产生的核苷酸序列。

第一方面，本发明提供了一种核酸分子，其编码在植物中表达并能赋予所述植物抵抗病原体例如真菌抗性的多肽。

根据本发明，可采用感兴趣或原始种的核酸或基因的重组形式或游离或基本游离形式提供核酸分子而不是以编码具所需功能的多肽的序列形式。核酸分子（及它们编码的多肽产物）也可以为 (i) 从它们的天然环境中分离和/或纯化（虽然纯化形式本身并不是必需的），或 (ii) 基本纯化或均一形式。

根据本发明，核酸可包括 cDNA、RNA、基因组 DNA，优选完整的基因，可以是完全或部分合成的（构建）。当指定一个 DNA 序列，如根据一个图或 SEQ ID NO，除非上下文要求，否则包括用 U 替代 T 的 RNA 等价物。

也包括各种公开序列的互补序列，其可用于探测试验或序列的负调控中。

本发明的一个具体方面是具有 SEQ ID NO: 1 所示序列的所有或部分序列，包括（合适地）编码和/或非编码区的核酸分子。在 SEQ ID NO: 1 中显然有一个大的开放阅读框（ORF）。随后基因组 DNA 序列和 cDNA 序列的比较显示该基因含有三个外显子和三个内含子；参见实施例 5 和图 4。推测的 *R1* 多肽序列显示于图 4 中并指定为 SEQ ID NO: 2。 *R1* 含有 1293 个氨基酸残基，分子量为 149.4 千道尔顿（kDa）。本发明这一方面的具体的核酸分子包括编码 *R1* 蛋白产物的核酸分子和 cDNA，据信是除所示的内含子（包含 4878-4970 和 6130-6229）外的碱基 2223-6321。令人惊奇地， *R1* 与 *R* 蛋白的 L. Zip-NBS-LRR 类型（Hammond-Kosack 和 Jones 1997）的一级结构相似。根据推测的蛋白序列， *R1* 属于植物抗性基因的 L. Zip/NBS/LRR 类型（Hammond-Kosack 和 Jones 1997）。认为氨基端区域的亮氨酸拉链基序（L. Zip）在二聚作用或与其他蛋白相互作用中起重要作用。下游推测的核苷酸结合位点（NBS）结构域可能参与引起发生抗性反应的信号传导途径。C-末端的富含亮氨酸重复序列（LRR）结构域符合 Jones 和 Jones（1997）描述的细胞质 LRR 结构域的一致序列，并可能在蛋白-蛋白相互作用和配基结合上起作用。已显示亚麻锈病抗性基因 *L* 的等位基因的 LRR 结构域决定病原体特定小种的识别（Ellis 等，1999）。计算机预测 *R1* 序列中的四个十四烷基化和 43 个磷酸化位点暗示 *R1* 蛋白可能锚定在质膜上，其磷酸化/去磷酸化步骤，分别参与信号传导（Dangl 和 Jones 2001）。

R1 定位在染色体 V 的短臂上（Leonards-Schippers 等，1992，Dong 等，2000）是与抗丁香假单胞菌（*Pseudomonas syringae*）的番茄 *Prf* 基因相关的序列， *Prf* 基因定位于番茄染色体 5 上 *Pto/Fen* 抗性基因簇中（Salmeron 等，1996）。马铃薯和番茄的染色体 5 除了短臂上的臂内倒位外彼此是共线性的（ Tanksley 等，1992）。对应于 *Pto/Fen* 的马铃薯座位 *StPto* 与最邻近的 *R1* 定位超过 10 cM（Leister 等，1996），因此排除了 *R1* 和 *Prf* 定位于共线性基因组区域的可能性。然而当考虑赋予抗细菌病原体野油菜黄单胞菌（*Xanthomonas campestris*）抗性的番茄 *Bs4* 基

因时确是这种情况。对应于 *Bs4* 的马铃薯座位的位置可从 *Bs4* 和标记 *TG432*(Ballvora 等, 2001)的紧密连锁 (1 cM) 推断出, 所述标记 *TG432* 在番茄分子图谱上的定位与 *GP21* 距离 3.8 cM (Tanksley 等, 1992)。当考虑两基因组之间的臂内倒位时, 从 *GP21* 标记延伸的番茄染色体 5 的这
5 一区域应和马铃薯含有 *R1* 的 *GP21-GP179* 区间是共线性的。

抗马铃薯 X 病毒的两个马铃薯基因 *Rx2* 和 *Nb* 也和 *R1* 定位于相似位置(Ritter 等, 1991, Leonards-Schippers 等, 1992, De Jong 等, 1997)。*Rx2* 基因得到克隆, 并且像 *R1* 一样, 其是抗性基因 L. Zip/NBS/LRR 类型的成员(Bendahmane 等, 2000)。这两个抗性基因的序列一致性只有 32%,
10 因此是同一基因超家族中非常不同的成员。*Nb* 定位于不含 *R1* 的 *GP21-SPUD237* 区间(De Jong 等, 1997), 因此通常与 *R1* 分离。

另一方面, 本发明公开了有活性的同源的 *R1* 序列变异体, 例如该变异体可以是突变体或其他衍生物或天然产生的 *R1* 同源物如等位变异体、侧向同源物(来自相同的种但在不同的位置如连锁座位的拟等位基因)
15 或直向同源物(来自不同的种的相关基因)。下面显示了这些的例子。每种情况中, 变异体编码与 *R1* 同源(相似)的产物, 其可根据那个序列分离或制备, 并能赋予对一种或一种以上病原体的病原体抗性。

抗性基因的活性可用本领域已知的与待测抗性本质适合的常规方法检测。可在下列出版物中找到示例性方法: 细菌的(Grant, (1995)《科学(Science)》269, 843-846); 真菌的(Dixon, (1996)《细胞(Cell)》84, 451-459; Jones, (1994)《科学》266, 789-793; Thomas, (1997)《植物细胞(The Plant Cell)》9, 2209-2224); 线虫和病毒的(Whitham, (1994)《细胞》78, 1101-1115)。典型地, 通过植物性状互补检测活性; 参见实施例 4。这可用分离的基因完成或者例如将推测的活性变异体与用
25 于植物中表达的启动子和终止子耦合并将其转化到缺乏特定的抗性性状的敏感植物中。然后 *R1* 变异体的活性通过合适的病原体的攻击而被证实。作为选择, 也可使用类似于 Mindrinos 使用的(Mindrinos, (1994)《细胞》78, 1089-1099)瞬时表达分析检测 *R1* 变异体的活性。简要地, 推测的活性 *R1* 变异体和来源于病原体的基因及报告基因(如 GUS)从质粒

中共表达，其中所述来源于病原体的基因是推测的 *RI* 同源物特异性抗性的激发子。如果变异体被来源于病原体基因的持续表达激活，那么会导致过敏反应 (HR)，报告基因活性消失。如果没有活性产生，则可检测到报告基因。

5 可定义变异体和 *RI* 的相似性或同源性并可通过本领域标准使用的 TBLASTN 程序测定，(Altschul, (1990) 《分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.)》，215, 403-10)，或者优选标准程序 BestFit，其是 1999 年 1 月第 10 版威斯康星程序包 (Wisconsin Package) 的一部分 (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, 麦迪逊, 威斯康星, 美国, 威斯康星 53711)，在本申请中被用于计算序列同源性。也可采用具有 PAM250 残基量表 (缺口处罚 (gap penalty) 10, 缺口长度 (gap length) 10) 的 CLUSTAL 方法的 DNASTAR 软件。同源性 (或相似性, 或一致性) 可以在核苷酸序列水平和/或表达的氨基酸序列水平。优选地, 核酸序列和/或氨基酸序列与 SEQ ID NO: 1 的编码序列或核苷酸序列编码的序列或在此提到的其他序列具有同源性, 优选同源性至少约 50%、或 60%、或 70%、或 80%，最优选同源性至少约 90%、95%、96%、97%、98%或 99%。同源性可以覆盖在此显示的相关序列的全长, 或视具体情况, 与相关的氨基酸序列或核苷酸序列相比, 可更优选覆盖大约或超过约例如 20、100、200、300、500、600 个或更多氨基酸或密码子的连续序列。

15 20 据信在马铃薯基因组中有两个以上的 *RI* 同源物。一种或一种以上的这些同源物可能是抗病毒、真菌、细菌或线虫的 R 基因。

根据本发明, 天然存在的 *RI* 变异体可以毫不费力地从任何适合的植物中分离到。天然存在的 *RI* 变异体可以从, 如基因组或 cDNA 中分离。如在图 4 中指定, 推测的抗性基因可使用基于 *RI* 独有区域的材料 (如引物或探针) 获得。正如在所附的实施例中讨论的, 根据本发明在马铃薯中鉴定的 *RI* 基因被认为是植物抗性基因的一种新类型。因此编码显示相似特性的蛋白的对应基因应该也存在于其他植物中。本发明的核酸分子可以通过, 如将上述核酸分子与任何来源的核酸分子 (样品) 杂交获得。与上述核酸分子杂交的核酸分子通常可从任何具有该分子的植物中得

到，优选双子叶植物，特别是农业、园艺或木材培育中感兴趣的植物，如农作物，茄科植物如马铃薯和番茄，还有植物如木薯植物，豆科植物，产油植物如油菜、亚麻籽 (linenseed) 等等，用多肽作为储藏物质的植物如大豆，用蔗糖作为储藏物质的植物如甜菜或甘蔗，树，观赏植物和用于制造生物燃料、再生能源或建筑材料的植物如苧麻等。

因此，本发明的另一方面提供从植物中鉴定和/或克隆同源的 *R1* 基因的方法，此方法利用全部或部分上述核苷酸序列。因此在一个实施方式中，本文提供的核苷酸序列信息可用于数据库（如 ESTs、或 STSs、或其他基因组序列信息）检索以找到同源序列，可检测所述同源序列的表达产物的病原体抗性活性，例如使用基于本发明的瞬时分析方法或常规的转基因植物表型分析方法。

作为选择，基于该序列的探针可用于，如 DNA 印迹中。例如，从显示合适的抗性性状的植物上取得的细胞中提取 DNA，用不同的限制性酶消化。然后在变性前将限制性片段分开（如用琼脂糖凝胶电泳法）并转移到硝酸纤维素滤膜上。标记好的探针可在滤膜上与 DNA 片段杂交然后判断结合。

预备实验可以在低严格条件下通过杂交进行。对于探针，优选条件是足够严格的以使其成为具有少量杂交反应被鉴定为阳性的单一模式，并可进一步检测所述阳性杂交。例如，杂交反应可以用含有下列组分的杂交液进行：5×SSC（其中 SSC=0.15 M 氯化钠；0.15 M 柠檬酸钠；pH=7），5× Denhardt 试剂，0.5%-1.0% SDS，100 μg/ml 变性的断裂的鲑鱼精 DNA，0.05% 焦磷酸钠和可达 50% 的甲酰胺。在 37-42°C 进行杂交至少六小时。杂交后，依下列步骤洗滤膜：(1) 在 2×SSC 和 1% SDS 中于室温洗滤膜 5 分钟；(2) 在 2×SSC 和 0.1% SDS 中于室温洗滤膜 15 分钟；(3) 在 1×SSC 和 1% SDS 中于 37°C 洗滤膜 30 分钟到 1 小时；(4) 在 1×SSC 和 1% SDS 中于 42-65°C 洗滤膜 2 小时，每 30 分钟更换溶液。

用于计算获得特定序列同源性的核酸分子间的杂交所需的严格条件的一个通用公式 (Sambrook 等, 1989) 是： $T_m = 81.5^{\circ}\text{C} + 16.6 \log [\text{Na}^+] + 0.41 (\% \text{G+C}) - 0.63 (\% \text{甲酰胺}) - 600 / \# \text{bp}$ 双链体中。作为上述公式的例证，

使用 $[Na^+] = [0.368]$ 和 50%甲酰胺, GC 含量为 42%, 探针平均大小为 200 碱基, T_m 是 57°C。同源性每减少 1%, DNA 双链体的 T_m 降低 1-1.5 °C。因此, 序列一致性大于约 75%的靶标可以用 42°C 的杂交温度观察到。这样的序列可认为与本发明的核酸序列基本同源。本领域中熟知增加杂交的严格性直到只剩下几个阳性克隆。其他适合的条件包括, 如为了检测大约 80%-90%一致性的序列, 在 0.25M 磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4), pH=7.2, 6.5% SDS, 10%硫酸右旋糖酐中于 42°C 杂交过夜, 最后在 0.1×SSC, 0.1% SDS 中于 55°C 洗滤膜。为了检测超过约 90%一致性的序列, 合适的条件包括在 0.25M Na_2HPO_4 , pH=7.2, 6.5% SDS, 10%硫酸右旋糖酐中于 65°C 杂交过夜, 最后在 0.1×SSC, 0.1% SDS 中于 60°C 洗滤膜。

本领域技术人员可任意使用各种的技术检测探针与靶核酸 (如 DNA) 的结合。例如, 探针可以用放射性、荧光、或酶标记。不采用探针标记的其他方法包括用 PCR 扩增 (包括, 当合适时, RACE PCR), 核糖核酸酶保护和等位基因特异性寡核苷酸探针。

15 鉴定成功杂交后分离已杂交的核酸, 其可包括通过在适当宿主中复制的载体中克隆, 进行一个或一个以上 PCR 或扩增步骤。

在每种情况下, 如果需要, 在检索中鉴定的克隆 (如 λ 、粘粒、质粒、BACs、biBACS) 或片段都能被延伸或补充。例如, 如果怀疑它们不完整, 可再次访问原始的 DNA 来源 (如克隆文库、mRNA 制备物等) 以分离缺失的部分, 如使用基于已获得的序列、探针或引物来鉴定含有重叠序列的其他克隆 (参见如 S B Primrose 的“基因组分析原理 (Principles of Genome Analysis)” (1995) Pub. Blackwell Science Ltd, 牛津, 英国)。

25 随后, 例如, 如在实施例中所描述的那样, 检测核酸分子或相应的基因的功能。用于分离 R1 同源物的一个方案如下所示:

I) 产生一个群体, 其中抗性性状是分离的。

II) 用基于 R1 序列 (但不是 R 基因保守基序) 的引物对群体中的个体成员进行 PCR 扩增 DNA。

III) 检测 PCR 产物 (直接测序分析或限制性酶消化), 寻找和 R 性

状共分离的序列多态性。鉴定合适的多态性标记序列。

IV) 分离多态性基因的完整编码序列。这可从合适的克隆文库实现或用 R1 的 5' 端和 3' 端引物扩增实现。在每种情况下, 被鉴定的多态性 PCR 产物或由其提供的序列信息可用来鉴定基因。

5 然后, 可如上述或实施例中的方法检测抗性基因编码活性。

更特定的途径是基于已知同源 *RI* 基因可能连锁成簇。已报道马铃薯中成簇的 R 基因(Leister 等, 1996; De Jong 等, 1997)。大的 R 基因簇之一在马铃薯染色体 V 的短臂上。

含有 *RI* 的马铃薯染色体 V 的抗性热点还包含抗致病疫霉菌
10 (Leonards-Schippers 等, 1994, Oberhagemann 等, 1999, Collins 等, 1999)和根胞囊线虫马铃薯白线虫 (Kreike 等, 1994, Rouppe van der Voort 等, 1997, 2000)的主要的 QTL (数量性状座位)。连锁不平衡作图显示在 0.8 cM 的含有 *RI* 的 *SPUD237-GP179* 区间中的标记与叶片和块茎对晚疫病的抗性有强烈的联系, 证明 *RI* 和控制晚疫病数量抗性的因子间
15 紧密连锁。已指出, 基于观察到的遗传连锁, *RI* 和控制晚疫病数量抗性的因子可能是同一基因的等位基因或成簇基因家族的成员 (Leonards-Schippers 等, 1994, Oberhagemann 等, 1999)。现在 *RI* 座位的首次分子分析显示更赞成后一观点, 因为 *RI* 是一个基因家族的成员, 其在携带有 *RI* 的染色体的 DNA 插入中作为额外的拷贝而存在。相似的发
20 现在拟南芥 (*Arabidopsis*) 的 *Rpm1* 座位报道过(Stahl 等, 1999)。 *RI* 基因应该已经通过异源染色体交换从野生品种 *S. demissum* 渐渗到马铃薯基因组中。在野生和栽培的茄科植物 (*Solanum*) 品种之间交换中经常发生异源染色体成对(Singh 等, 1989)。 *RI* 基因家族的第二个高度同源的成员 (其有两个等位基因 *r1.1* 和 *r1.2*) 物理定位于 *RI* 附近。需要对
25 该基因的功能作进一步的研究。因为可获得 *RI* 序列, 现在可以鉴定 *RI* 家族的其他成员, 它们可能存在于 *GP21-Gap179* 区间中还未被物理图谱所覆盖的那些部分中和/或马铃薯基因组的其他部分中。可分离涉及对致病疫霉菌的数量抗性的马铃薯中的等位基因变异体和其他茄科物种中的同源物。

因此，在本发明的一个优选的实施方式中表达本发明的核酸分子的植物所抵抗的病原体是致病疫霉菌。

R1 和晚疫病病原体间的相互作用是与基因对基因假说一致的 (Person 等, 1962, Flor 1971)。单个基因的转化足以使敏感宿主植物
5 在用携带有无毒基因 *Avr1* 的致病疫霉菌小种 (除了具有小种 1 专化性的
之外的所有小种) 侵染时引起过敏性反应。在 *Avr1* 杂合的致病疫霉菌
菌株的后代中 *Avr1* 作为单显性因子分离并定位于致病疫霉菌分子图谱的
连锁群 IV (Van der Lee 等, 2001)。至今还没克隆到致病疫霉菌的无毒
因子。在分子水平对 *R1* 作进一步特性描述以及 *Avr1* 基因的克隆应该有
10 助于阐明抗性蛋白是怎样识别无毒效应器分子的。克隆识别不同于 *Avr1*
的无毒因子的晚疫病抗性基因可能使鉴定决定效应器识别特异性的分子
基序成为可能, 并且可能有助于设计出具有更广泛和更持久的抗晚疫病的
R 蛋白。其他, 连锁的 *R1* 变异体 (提供不同的 R 性状) 可以基本根据
上述方法分离, 但其中用于最初扩增步骤的 DNA 从群体成员中获得, 该
15 群体中所需的 R 性状与 *R1* 本身 (或 *R1* 变异体) 共分离。

本发明者指出, *R1* 序列与番茄中赋予抗细菌病原体即抗丁香假单胞
菌抗性的另一不相关的 *Prf* 基因的序列相似 (Salmeron 等, 1996)。根据
这一信息看来, *R1* 的序列可通过如位点定向或随机突变被修饰, 以产生
可赋予抗完全不同于致病疫霉菌的其他病原体抗性 (即被完全不同于致
20 病疫霉菌的其他病原体开启) 的 *R1* 突变体或其他衍生物。这可使用下述
方法获得, 并用上述的瞬时表达实验分析方法检测 *R1* 突变体。

优选地, 从与 SEQ ID NO: 1 或在此公开的其他序列中显示的全部或
部分序列对应的原始核酸直接或间接 (如通过一个或一个以上扩增或复
制步骤) 产生突变的或其他衍生的核酸分子。

25 因此, 本发明的另一个方面是产生编码 *R1* 衍生物的核酸的方法, 该
方法包括修饰编码 *R1* 的核酸分子的步骤。该衍生物可以包括核酸分子的
改变, 其不改变所编码的氨基酸序列 (即简并性等价改变)。为产生突
变体或衍生物, 对序列的改变可以通过对核酸中一个或一个以上核苷酸进
行一个或一个以上增加、插入、缺失或替代, 从而导致编码的多肽中一

个或一个以上氨基酸的增加、插入、缺失或替代。除了在 *R1* 序列中的一个或一个以上变化外，变异体核苷酸可编码 C-末端和/或 N-末端含有增加的氨基酸的氨基酸序列。

5 特别包括与所提供的序列部分对应的部分或片段（无论什么方式产生），其编码具有生物活性的多肽，所述生物活性是如病原体抗性或者具有提高或结合 *R1* 结合抗体的能力。

一般来说，因为许多理由而值得改变，包括引入或除去下列特征：限制性内切酶序列；密码子选择；翻译后修饰必需的其他位点；编码的多肽中的剪切位点；编码的多肽中用于糖基化、硫辛酰化等的基序。可以在表达的蛋白上加上前导序列或其他靶向序列以决定表达后它的位置。所有这些可以有助于以重组形式有效地克隆和表达活性多肽（参见下
10 述）。优选的修饰包括在 QLPL、CFLY 或 LHD 基序中或附近减少该区域的净负电荷。如何修饰抗性基因的手段和方法是本领域技术人员已知的，并在如 WO 01/29239 中对马铃薯 Rx 基因描述过。其他可取的突变可以是
15 为改变所编码的多肽的活性（如特异性）或稳定性而进行的随机或定点诱变。

众所周知，氨基酸水平的同源性可根据氨基酸的相似性或一致性测定。相似性允许保守性变异，即一个疏水性残基如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或蛋氨酸替代另一个疏水性残基，或者一个极性残基替代另一个
20 极性残基，如精氨酸替代赖氨酸、谷氨酸替代天冬氨酸、或谷氨酰胺替代天冬酰胺。如本领域技术人员所熟知的，通过保守性替代来改变多肽的一级结构可能不会显著改变该肽的活性，因为插入到序列中的氨基酸的侧链可能形成与被替换出的氨基酸侧链相似的联接和接触。甚至当替代发生在决定肽链构象的关键区域，也是如此。

25 本发明也包括具有非保守性替代的同源物。如本领域技术人员所熟知的，在对决定肽链构象并不关键的肽链区域的替代可能对它的活性不会有很大影响，因为它们不会极大地改变肽链的三维结构。在决定肽链构象或活性的关键区域，这样的变化可能会改变多肽的性质。实际上，上述的变化可能赋予肽链稍微有利的性质如稳定性或特异性改变，尤其

是有更广泛的特异性。

然后具有这些性质的突变体可用上述方法选出。

5 其他方法可包括将来自相关抗性基因的序列混合或整合到 *RI* 序列中。例如，*RI* 的限制性酶片段可以与 *RI* 同源物或者与甚至不相关基因的片段连接起来形成 *RI* 的重组形式。修饰 *RI* 的可选择的策略可采用上述的 PCR (Ho 等, 1989 《基因 (Gene)》 77, 51-59) 或 DNA 改组 (DNA shuffling) (Cramer 等, 1998 《自然 (Nature)》 391)。

10 因此，本发明的方法，如上所述，可包括基于 *RI* 序列的一个或一个以上（如两个）探针或引物的杂交，来筛选 *RI* 同源物或产生 *RI* 衍生物。这样的寡核苷酸、探针或引物构成了本发明的另一个部分。用于探测或 PCR 的寡核苷酸可具有约 30 或低于 30 个核苷酸长（如 18、21 或 24 个）。一般来说，特异性引物超过 14 或 15 个核苷酸长。对于最佳的特异性和成本效率，优选长度为 16-24 个核苷酸的引物。本领域技术人员精通如何设计用于如 PCR 过程的引物。如果需要，可使用在此公开的基因的全部限制性酶片段进行探测，所述限制性酶片段可为 100 个核苷酸或甚至
15 1000 个核苷酸长。

在本发明的一个方面，上述的核酸分子是重组的形式，优选是可复制的载体。

20 “载体”被定义为包括，尤其是，任何双链或单链的线性或环状的质粒、粘粒、噬菌体或农杆菌二元载体，该载体能或不能自我转移或移动，可通过整合到细胞基因组中或存在于染色体外的形式（如带有复制起始位点的自主复制质粒）转化原核或真核宿主。特别包括穿梭载体，穿梭载体被看作是天然地或通过设计可以在两种不同的宿主生物体中复制的 DNA 媒介物，可以从放线菌类 (actinomycetes) 和相关物种、细菌
25 和真核细胞（如高等植物、哺乳动物、酵母或真菌细胞）中挑选出。

含有本发明的核酸的载体不需要含有启动子或其他调控序列，尤其是如果当该载体用于将核酸引入细胞以重组到基因组中时。

优选地，载体中的核酸受控于或可操作地连接于合适的启动子或其他调控序列，以在宿主细胞如微生物（如细菌）或植物细胞中转录。该

载体可以是在多种宿主中起作用的双功能表达载体。在基因组 DNA 情况下，它可包含它自身的启动子或其他调控序列。在 cDNA 情况下，它可以受控于合适的启动子或其他调控元件，以在宿主细胞中表达。

“启动子”是指一段核苷酸序列，其可操作地连接于其下游的 DNA
5 （即，在双链 DNA 的有义链的 3' 方向中）使转录从这里开始。

“可操作地连接”是指作为相同的核酸分子的一部分被连接、正确定位和定向而使转录从启动子起始。DNA 可操作地连接于启动子是指在启动子的“转录起始调控下”。

因此本发明的这一方面提供了一种基因构建体，优选可复制的载体，
10 所述基因构建体包含与本发明提供的核苷酸序列可操作地连接的启动子，所述核苷酸序列如 *R1* 基因或其变异体（如突变体、衍生物或等位基因）的编码区域。一般来说，本领域技术人员都能很好地构建用于重组基因表达的载体并设计流程。可选择或构建合适的含有适当调控序列的载体，所述适当调控序列包括启动子序列、终止子片段、多聚腺苷酸化
15 序列、增强子序列、标记基因和其他适用的序列。更多细节可参见，如，《分子克隆：实验室手册（Molecular Cloning: a Laboratory Manual）》：第二版，Sambrook 等，1989，冷泉港实验室出版（Cold Spring Harbor Laboratory Press）。在 Ausubel 等编辑，John Wiley 和 Sons，1992 年的《分子生物学当前技术（Current Protocols in Molecular Biology）》
20 第二版中详细描述了用于核酸操作和蛋白分析的许多已知的技术和流程如核酸构建体的制备、诱变（参见上述）、测序、将 DNA 引入细胞和基因表达。Sambrook 等和 Ausubel 等的公开内容引入本文作为参考。

本发明的这一方面的一个实施方式提供一种基因构建体，优选可复制的载体，该基因构建体包含与本发明提供的核苷酸序列可操作地连接
25 的诱导型启动子。

本领域技术人员熟知用于启动子的术语“诱导型”。本质上，受诱导型启动子控制的表达可以响应施加的刺激物而“开启”或增加。启动子的刺激物的性质多种多样。一些诱导型启动子在合适的刺激物不存在的情况下几乎不产生或产生检测不到水平的表达（或不表达）。其他诱导型

启动子在刺激物不存在的情况下产生可检测的组成型表达。无论在刺激物不存在的情况下表达的水平如何，在正确的刺激物存在的情况下任何诱导型启动子的表达都会增加。优选的条件是通过施用有效改变表型特性的数量的相关刺激物时，表达的水平增加。因此诱导型（或“可开关型”）启动子可用于在刺激物不存在的情况下产生本底表达水平，该表达水平太低以至于不能产生所需表型（可能实际上为零）。在施用刺激物后，表达增加（或开启）到可引起所需表型的水平。

允许在原核宿主细胞中表达的可能的调控元件包括，如，大肠杆菌中的 P_L 、*lac*、*trp* 或 *tac* 启动子。可允许在真核宿主细胞中表达的调控元件的例子为酵母中的 *AOX1* 或 *GAL1* 启动子或者哺乳动物和其他动物细胞中的 CMV-、SV40-、RSV-启动子（劳氏肉瘤病毒）、CMV-增强子、SV40-增强子或球蛋白内含子。在上下文中，本领域已知适合的表达载体，例如 Okayama-Berg cDNA 表达载体 pcDV1 (Pharmacia)、pCDM8、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3(In-vitro gene)、pSPORT1(GIBCO BRL)。

上下文中特别感兴趣的是植物载体。Bevan（《核酸研究 (Nucl. Acids Res.)》12, 8711-8721 (1984)）以及 Guerineau 和 Mullineaux (1993)（“植物转化和表达载体 (Plant transformation and expression vectors)”，在《植物分子生物学实验室传真 (Plant Molecular Biology Labfax)》中 (Croy RRD 编辑)，牛津，BIOS Scientific Publishers, 121-148 页) 描述了以前已广泛成功用于植物的特异性方法和载体。适合在植物中操作的启动子包括实际上在所有的植物组织中以高水平表达的花椰菜花叶病毒 35S 基因启动子 (CaMV 35S) (Benfey 等, 1990a 和 1990b)；可在植物体中顶端分生组织和几个局部位置如内生韧皮部、花原基、根和茎的分支点表达的花椰菜 *meri 5* 启动子, (Medford, 1992; Medford 等, 1991) 以及在花发育中表达非常早的拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) *LEAFY* 启动子 (Weigel 等, 1992)。其他启动子包括水稻肌动蛋白启动子。

启动子可包括赋予发育和/或组织特异性表达调控的一个或一个以上的序列基序或元件。

因此,本发明的载体除了要求给其提供复制性、整合性和/或表达功能的多种序列以外,可包含 *R1* 基因或其变异体。这样的载体可用于,例如,使引入其的植物对致病疫霉菌或其他真菌具有抗性。

如果想要诱导广谱抗性,根据本公开的内容可获得多种其他选择:

5 (a) 修饰 *R1* 序列,以产生上述的突变体或其它衍生物,这样它的功效可被除马铃薯晚疫病病菌外的激发子或病原体或在此讨论的其他天然激发子所激发。

(b) 直接与合适的激发子一起共表达 *R1* (如无毒菌株中的 *Avr 1*)。

10 (c) 共表达 *R1* 和激发子基因,该激发子基因的转录或翻译由于 *R1* 的激活而抑制。

这将使 *R1* 重新偶联到它的激发子上,更好地模拟了对致病疫霉菌的自然响应从而导致广泛的特异性沉默。

(d) 与激发子基因一起共表达 *R1*,该激发子基因的翻译只在病原体存在情况下开启。

15 (e) 与激发子基因一起共表达 *R1*,藉此该一种或两种基因失活,并用多种方式再激活基因,这样 *HR* 只被限制在植物的特定部位(如体细胞上定义的部分)而防御反应可以延伸出这些部位。这可以用类似于 W095/31564 中公开的方法获得,其中在将带有转座子标记的抗性基因(那种情况下是 *cf-9*)加上完整的激发子(*Avr-9*)的植物与带有激活子转座酶的植物回交后,其后代显示 *cf-9* 的体细胞再激活,导致局部的坏死斑反应和整体的抗性。

除了上述的载体和构建体外,本发明还提供了包括将上述 *R1* 构建体(如载体)引入宿主细胞的方法和/或通过施用适合的刺激物(一种有效的外源诱导物)在植物细胞中诱导构建体表达的方法。上述载体可用任何适用的方法引入宿主中,如下面进一步详述的接合、转移、转化、转染、转导或电穿孔。

另一个方面,本发明公开一种含有本发明的核酸或载体的宿主细胞,尤其是植物或微生物细胞。所述宿主细胞可以是任何原核或真核细胞,如细菌、昆虫、真菌、植物或动物细胞。优选的真菌细胞如酵母属

(*Saccharomyces*) 成员, 尤其是啤酒酵母 (*S. cerevisiae*) 种的成员。

为了在植物细胞中正义方向或反义方向表达根据本发明的核酸分子, 将这些分子置于确保在植物细胞中表达的调控元件控制下。这些调控元件可以与要表达的核酸分子及要转化的植物物种异源或同源。一般
5 来说, 这样的调控元件包括在植物细胞中有活性的启动子。为了在转基因植物所有组织中都获得表达, 优选使用组成型启动子, 如 CaMV 的 35 S 启动子 (Odell, 《自然》313 (1985), 810-812) 或玉米的多聚泛蛋白基因启动子 (Christensen, 《植物分子生物学》18 (1982), 675-689)。为了在转基因植物的特定组织中表达, 可以使用组织特异性启动子 (参见,
10 如 Stockhaus, 《欧洲分子生物学组织杂志 (EMBO J.)》8 (1989), 2245-2251)。已知在马铃薯块茎中或在其他植物物种的种子如玉米、蚕豆、小麦、大麦等中有特异性活性的启动子。为了能够精确控制表达, 可使用诱导型启动子。诱导型启动子的一个例子是编码热激蛋白的基因的启动子。同样, 在 W096/16182 中描述了小孢子特异性调控元件和它们的用途。另外, 可以使用化学诱导型的 Tet-系统 (Gatz, 《分子基因与遗传学 (Mol. Gen. Genet.)》227 (1991); 229-237)。在如 Ward (《植物分子生物学 (Plant Mol. Biol.)》22 (1993), 361-366) 中描述了本领域熟知的其他适合的启动子。调控元件可进一步包括植物细胞中有功能的转录和/或翻译增强子。另外, 调控元件可包括转录终止信号, 如多
20 聚腺苷酸信号, 其使转录本上添加一个多聚腺苷酸尾巴, 可能提高转录本的稳定性; 可参见前述的文献。

在本发明的核酸分子以正义方向表达的情况下, 原则上可以修饰编码序列, 以这种方式使蛋白定位于植物细胞任何所需的区室中。它们包括内质网、液泡、线粒体、质体、质外体、细胞质等等。本领域技术人员熟知如何进行这类修饰和确保定位于所需区室的信号序列。
25

本领域还熟知用于将外源 DNA 引入植物的方法。它们包括, 如用根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 或毛根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 的 T-DNA 转化植物细胞或组织, 原生质体融合, 直接基因转化 (参见, 如 EP-A 164 575), 注射, 电穿孔, 基因枪法如粒子轰击和

本领域其他已知的方法。本发明的方法中使用的载体还可包括功能性元件，如农杆菌 T-DNA 的“左边界”和“右边界”序列，其有利于稳定地整合到植物基因组中。另外本领域技术人员已知可产生无标记的转基因植物的方法和载体，即在植物发育或植物育种的某个时期丢失了可选择或可计数的标记基因。这可以通过如共转化 (Lyznik, 《植物分子生物学》 13 (1989), 151-161; Peng, 《植物分子生物学》 27 (1995), 91-104) 和/或利用能使用启动植物中同源重组的酶的系统获得 (参见, 如 W097/08331; Bayley, 《植物分子生物学》 18 (1992), 353-361); Lloyd, 《分子基因与遗传学》 242 (1994), 653-657; Maeser, 《分子基因与遗传学》 230 (1991), 170-176; Onouchi, 《核酸研究》 19 (1991), 6373-6378)。在如 Sambrook (《分子克隆: 实验室手册》第二版(1989), 冷泉港实验室出版, 冷泉港, 纽约) 中描述了用于制备合适载体的方法。

本领域技术人员熟知适合的根癌农杆菌菌株和载体, 农杆菌的转化及合适的生长和选择培养基, 它们已在现有技术中描述 (GV3101 (pMK90RK), Koncz, 《分子基因与遗传学》 204 (1986), 383-396; C58C1 (pGV 3850kan), Deblaere, 《核酸研究》 13 (1985), 4777; Bevan, 《核酸研究》 12 (1984), 8711; Koncz, 《美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)》 86 (1989), 8467-8471; Koncz, 《植物分子生物学》 20 (1992), 963-976; Koncz, 用于基因标记和表达研究的特异性载体 (Specialized vectors for gene tagging and expression studies), 在《植物分子学手册 (Plant Molecular Biology Manual)》中, 卷 2, Gelvin 和 Schilperoort (编辑), Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publ. (1994), 1-22; EP-A-120 516; Hoekema: 二元植物载体系统 (The Binary Plant Vector System), Offsetdrukkerij Kanters B. V., Alblasserdarn (1985), 第五章, Fraley, Crit. Rev. Plant. Sci., 4, 1-46; 《欧洲分子生物学组织杂志》 4 (1985), 277-287)。虽然在本发明的方法中优选使用根癌农杆菌, 但例如如果想要该菌株赋予的表型, 也可使用其他农杆菌菌株, 如毛根农杆菌。

用基因枪法进行转化的方法是本领域技术人员所熟知的; 参见, 如

Wan, 《植物生理 (Plant Physiol.)》 104 (1994), 37-48; Vasil, 《生物技术 (Bio/Technology)》 11 (1993), 1553-1558 和 Christou (1996) 《植物科学进展 (Trends in Plant Science)》 1, 423-431。显微注射可参照 Potrykus 和 Spangenberg (编辑), 《将基因转移到植物 (Gene Transfer To Plants)》, Springer Verlag, Berlin, NY (1995) 进行。

大多数双子叶植物的转化可以用上述方法。但对于单子叶植物的转化, 也开发了几个成功的转化技术。它们包括用如上述的基因枪法的转化和原生质体转化、部分渗透性的细胞的电穿孔、用玻璃纤维引入 DNA 等等。然后用技术人员已知的方法可使得到的转化植物细胞用于再生转化植物。这可以在如 Hood, 《分子育种 (Molecular Breeding)》 3 (1997), 291-306; Coleman, 《美国国家科学院院刊》 94 (1997), 7094-7097; Shilito, 《生物技术 (Biotechnology)》 7 (1989), 581-587 找到。

一般来说, 根据本发明被修饰的植物和表现为本发明的蛋白过量表达或这样的蛋白合成减少的植物可以从任何想要的植物物种中获得。它们可以是单子叶植物或双子叶植物, 优选地它们属于在农业、木材培育或园艺中感兴趣的植物物种, 如农作物 (如玉米、水稻、大麦、小麦、黑麦、燕麦等)、马铃薯、产油植物 (如油菜、向日葵、花生、大豆等)、棉花、甜菜、甘蔗、豆科植物 (如菜豆、豌豆等)、生产木材的植物, 优选树, 等等。

转化技术的特定选择将根据其转化某种植物物种的有效性和有特定选择方法论的具体操作试验人员的经历和偏好决定。对技术人员来说显然将核酸引入植物细胞的转化系统的特定选择并不是本发明的本质或受其限制, 对植物再生的技术的选择也不是。如果想要, 可使用由嵌合基因构成的选择性遗传标记, 其可赋予选择性表型如对抗生素的抗性, 所述抗生素如卡那霉素、潮霉素、草丁膦 (phosphinotricin)、绿磺隆 (chlorsulfuron)、氨甲喋呤、庆大霉素、壮观霉素、咪唑啉酮和草甘磷。

因此, 另一个方面本发明提供了一种转化植物细胞的方法, 该方法包括将含有本发明的核酸 (如 *R1* 或 *R1* 变异体) 的载体引入植物细胞,

并引起或允许在载体和植物细胞基因组间发生重组以使核苷酸序列引入基因组。

本发明还包括一种用本发明的核酸分子或载体转化的宿主细胞，尤其是植物或微生物细胞。在转基因植物细胞中（即对所讨论的核酸的转基因），转基因可以在基因组外的载体上或整合、优选稳定地整合到基因组中。每个单倍体基因组可以有一个以上的异源的核苷酸序列。

在本方面广泛使用的术语“异源的”，是指使用基因工程即通过人类干预，将所讨论的核苷酸的基因/序列引入所述的植物或其祖先的细胞中。异源基因对相应的内源基因而言，可以是附加的。对植物细胞来说异源或外源或外来的核酸可以是在该类型、变种、或物种的细胞中非天然发生的。因此所述异源核酸可包含特定类型的植物细胞或植物物种或变种的编码序列或衍生序列，并将其放置在不同类型的植物细胞或植物物种或变种中。

转化后，植物可从如单细胞、愈伤组织或叶盘再生，如本领域常规技术一样。几乎任何植物都能从植物细胞、组织和器官中再生。可获得的技术的综述见 Vasil 等，《植物细胞培养和体细胞遗传 (Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants)》，卷 I, II 和 III, 《实验室工作程序和它们的应用 (Laboratory Procedures and Their Applications)》，Academic 出版社，1984；Weissbach 和 Weissbach, 《植物分子生物学方法 (Methods for Plant Molecular Biology)》，Academic 出版社，1989。

已经在谷类如水稻、玉米、小麦、燕麦和大麦中获得可育的转基因植物（综述参见 Shimamoto, K. (1994) 《生物技术最新进展》5, 158-162；Vasil, 等, (1992) 《生物技术 (Bio/Technology)》10, 667-674；Vain 等, 1995, 《生物技术进展 (Biotechnology Advances)》13 (4): 653-671；Vasil, 1996, 《自然生物技术 (Nature Biotechnology)》14, 702 页)。

本发明还提供含有本发明植物细胞的植物，连同其任何的部分或繁殖体、种子、自交或杂交子代和后代。根据本发明的植物可能在一个或一个以上性质上不是纯育的。可能不包括植物变种，尤其是根据植物育

种者的权利 (Plant Breeders' Rights) 登记的植物变种。需要指出的是, 不必仅仅因为一种植物的基因组中稳定地含有引入该植物或其祖先的细胞中的转基因, 就认为这种植物是“植物变种”。

在本发明的一个优选的实施方式中, 由于存在本发明的 *RI* 基因, 本
5 发明的转基因植物获得或改善了抗相应野生型植物敏感的病原体的抗性。

术语“抗性”涵盖从延缓到完全抑制病症发展的保护范围。重要的病原体的例子包括致病疫霉菌, 即马铃薯晚疫病病因; 大豆疫霉菌 (*Phytophthora sojae*), 即大豆根腐病的病原体; 寄生霜霉菌
10 (*Peronospora parasitica*) (霜霉病); 稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*), 稻瘟病的病因; 白粉菌 (*Erysiphe* spp) (白粉病); 丁香假单胞菌, (细菌疫病的病因); 解淀粉欧文氏菌 (*Erwinia amylovora*) (火疫病); 胡萝卜软腐欧文氏菌 (*Erwinia carotovora*) (软腐病); 灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*) (葡萄霜霉病); 棉花立枯丝核病菌 (*Rhizoctonia solani*) 和
15 德巴利腐霉 (*Pythium debaryanum*), (苗疫病或猝倒病的病因)。优选地, 本发明的转基因植物获得抗致病疫霉菌抗性。

除了再生植物, 本发明包括所有下列: 这样的植物、种子、自交或杂交子代或后代 (如 F1 和 F2 代) 的无性系及上述的任何部分, 如插条、种子。本发明也提供了来自这样的植物的植物繁殖体, 即任何可用于再
20 生或繁殖、有性或无性的部分, 包括插条、种子等等。

作为将 *RI* (或其变异体) 引入植物的分子生物学方法的替换, 在此公开的序列也可用于促进植物的选择, 其中在上述植物中期望用常规植物育种方法引入抗性性状。带有该基因的杂交后代可通过基于 *RI* 序列, 尤其是 *RI* 特征性序列的筛选, 而很容易地鉴定出。

25 在此公开的用于鉴定 *RI* 座位最近标记的方法一般来说也可应用于基因簇中发现的其他基因 (如来源于植物的抗性基因)。这样的方法的特征在于用不含保守序列基序的非简并性引物采用低严格性 PCR 的步骤。一般程序可概括如下: (a) 准备一个群体, 其中感兴趣的基因正在分离, (b) 根据高度保守的 (抗性基因) 基序和高度简并性引物, 鉴定与感兴

趣座位连锁的抗性基因同源物 (Leister 等, 1996)《自然遗传学(Nature Genet.)》14, 421-428, (c) 用不含保守序列基序的非简并性引物采用低严格性 PCR, 进一步鉴定与同源基因对应的标记, 该标记在(抗性)座位内并非非常接近该基因, (d) 用所述进一步得到的标记, 从抗性植物的
5 感兴趣的基因组文库中鉴定带有(抗性)基因的克隆, 可选地, 结合对活性的瞬时分析 (Mindrinis 等 (1994) 或如本文所述), (e) 可选地, 根据转基因植物中的表型证实克隆到的基因的特性。

本发明还包括任何 *RI* 或上述的变异体核酸序列的表达产物及因此在适合条件下通过编码核酸分子的表达制备表达产物的方法, 所述编码
10 核酸分子可在体外适合的宿主细胞中或化学合成, 尤其是当想获得用于产生抗体的抗原时。

可使用本领域已知的任何方法将抗体制成纯化的 *RI*/变异体多肽或肽 (综述参见如 Roitt, Brostoff, Male 的“免疫学-第五版 (Immunology-5th Edition)”: Pub 1998-Mosby 出版社, 伦敦)。这样的
15 抗体或其片段或衍生物可用于结合 *RI* 或用于鉴定和/或分离与 *RI* 同源的蛋白 (即带有相同抗原决定簇), 从而可提供上述方法的一种替代方法以分离它们的编码基因。

同样地, 可使用与本发明的 *RI* 多肽结合的适体 (aptamers)。本领域技术人员已知适体的制备 (参见, 如 Thomas, 和 Dinshaw (2000) 通过核酸适体的适应性识别 (Adaptive recognition by nucleic
20 aptamers), 《科学 (Science)》287: 820-825)。

本发明进一步提供影响或改变植物中抗性性状的方法, 该方法包括在植物细胞中引起或允许上述异源核酸序列 (如 *RI* 或 *RI* 变异体, 所有情况下都加有可选择的激发子) 表达的步骤。

25 作为选择, 可期望负调控 *RI* 活性。这可通过如反义技术获得 (参见 Bourque, (1995), 《植物科学(Plant Science)》105, 125-149, 和 Flavell, (1994), 《美国国家科学院院刊》91, 3490-3496)。除了反义, 另一选择是以正义 (与靶基因同样方向) 插入完整或部分靶基因的拷贝, 以获得由共抑制引起的靶基因的表达降低; 例如, 参见 van der Krol 等, (1990)

《植物细胞》2, 291-299; Napoli 等, (1990) 《植物细胞》 2, 279-289; Zhang 等, (1992) 《植物细胞》4, 1575-1588, 和 US-A-5, 231, 020。

这样, 本发明也涉及一种转基因植物细胞、含有这样的植物细胞的转基因植物, 所述转基因植物细胞包含优选稳定地整合到所述基因组中的本发明的核酸分子或其部分, 其中所述核酸分子或其部分的转录和/或表达导致 *RI* 蛋白的合成降低。在一个优选的实施方式中, 这种降低通过 *RI* 基因的反义、正义、核酶、共抑制、显性突变效应或敲除突变获得。

然而, 优选地, 本发明提供了一种方法, 该方法包括在将核酸引入植物或其祖先的细胞的初步步骤后, 在植物细胞中表达 SEQ ID NO: 1 或其变异体 (由此产生编码的多肽)。一般来说, 可使用所述的方法将真菌抗性引入到植物中, 藉此 *RI* 介导的抗性通过与适当的真菌激发子或其他起始物或诱导物接触而引发。广泛地说, 激发子或其他引发子可由侵入的真菌直接编码 (如: 致病疫霉菌或某种其他真菌的毒性蛋白)。可选择地, 可由其本身受真菌侵染而引发或正调控的分离的构建体或转基因表达。另外, 在这两种情况下, 如果优选, 允许非天然激发子激发 *RI* (变异体) 序列的修饰。

针对一个推测或已知的激发子来评价 *RI* 或 *RI* 衍生物的功能, 上述这种形式本身构成了本发明的另一方面, 特别是用于确定激发子和抗性基因之间的基因对基因的相容性的方法, 其特征在于包括下列步骤: (a) 导致或允许 *RI* 或 *RI* 衍生物和激发子在细胞内共表达, (b) 观察上述细胞的 HR 现象, (c) 将 (b) 中得到的观察结果与 *RI* 或 *RI* 衍生物对激发子的特异性联系起来。

如上所示, 本发明还涉及与相应的野生型植物相比, 对晚疫病侵染更敏感的转基因植物。同样地, 本发明涉及这样植物的可收获部分和繁殖材料。

如实施例所述, 已分离了 *RI* 基因, 将其转化到敏感马铃薯种植品种 Desirée 后可赋予抗致病疫霉菌的抗性。因为相应 DNA 序列为 SEQ ID NO : 1 的基因组克隆能够产生这种效果, 显然在分离的 DNA 序列中含有在病原体侵染中介导 *RI* 多肽表达所必需和充分的 *RI* 基因调控序列。对于本领域

域技术人员来说很显然这样的调控序列本身具有重要的应用性，例如，在病原体侵染中用于特异性表达异源 DNA 序列，如诱导针对特定病原体的过敏反应。

因此，本发明也涉及启动子的调控序列，其天然地调控上述本发明的核酸分子的表达或与本发明核酸分子同源的核酸分子的表达，所述调控序列在病原体侵染时能赋予或调节异源 DNA 序列的表达。

在本发明的上下文中，术语“调控序列”是指影响表达特异性和/或表达水平的序列，例如在此意义上，它们赋予细胞和/或组织特异性。这样的区域可定位于转录起始位点的上游，也可定位在它的下游，如在转录但不翻译的前导序列中或在内含子中。

术语“启动子”在本发明中的含义是指转录起始（即 RNA 聚合酶结合和进行性转录本形成的成功起始）所必需的核苷酸序列，也可能含有，如 TATA 框。

如本文使用的术语“与本发明核酸分子同源的核酸分子”，包括如来自其他物种如番茄的其他 *RI* 基因的启动子区域和调控序列，这些 *RI* 基因与马铃薯 *RI* 基因同源并基本表现相同的表达模式。这样的启动子的特性在于它们在病原体侵染时能赋予在植物中表达，优选专有表达异源 DNA 序列的能力。

如本文使用的术语“可在病原体侵染时赋予或调节异源 DNA 序列的表达”，意思是上述启动子能在侵染位点控制异源 DNA 序列在植物中的表达，与在多数不相容性寄主/病原体相互作用的天然抗性中涉及的病原体相关基因的控制表达类似或非常相关，如在植物一部分的侵染位点的过敏性细胞死亡。因此，本发明的调控序列的特性在于其能响应病原体攻击或响应模拟病原体攻击的刺激如从病原体如真菌或细菌或其衍生物制得的激发子，选择性地介导局部转录活性。由于细胞-细胞相互作用，本发明调控序列的转录活性也可在实际侵染位点周围的细胞中出现。有利地，其他刺激如非生物胁迫可不诱导或只很小程度地诱导本发明的调控序列和含有这样序列的嵌合启动子。优选地，在病原体攻击或激发子处理下，嵌合启动子的诱导比其在非生物胁迫下的激活，如果有的话，至

少约高 10 倍，优选高 20 倍，更优选高 30 倍。

然而，本发明的调控序列所赋予的表达特异性，并不限制于由于病原体的局部基因表达，例如，它们可以进一步和提供组织特异性基因表达的其他的调控序列联合。特定的表达模式也可以依赖于所采用的植物/载体系统。然而，除非本领域技术人员使用和设计本发明的某种元件以调控特定细胞类型异源 DNA 序列的表达，由本发明的调控序列驱动的异源 DNA 序列的表达主要发生在病原体侵染或用相应的激发子处理时。

因此，根据本发明，也可使用来自其他物种的调控序列，该调控序列与上述的 *RI* 特异性核酸分子的启动子、或显示相同或相似表达模式的基因启动子的调控序列在功能上是同源的。特定的表达模式也可以依赖于所采用的植物/载体系统。然而，除非本领域技术人员使用和设计本发明的调控序列的某种元件以调控异源 DNA 序列在特定组织中表达或其他调控方式，由本发明的调控序列驱动的异源 DNA 序列的表达主要发生在被特定的病原体侵染的任何细胞中。

根据本发明，可分离 *RI* 基因新的调控序列并且将其作为马铃薯 *RI* 基因的调控序列的例证。例如，可用合适的限制性酶消化基因组 DNA，变性并使其退火到来源于本发明的 cDNA 序列的反向引物上。在引物延伸后，可连上平端接头并使用来源于上述 cDNA 序列的套式反向引物和来源于接头序列的正向引物进行 PCR。在另一个克隆本发明调控序列的策略中，编码区上游的基因组序列的物理图谱可以用基因组印迹分析方法构建。具有了这一信息，基因组 DNA 可以用选出的限制性酶消化，含有上游序列和编码序列的基因组片段可用凝胶纯化并大量自连以有利于形成环状分子，其随后可通过用来源于该基因的编码序列的正向和反向引物进行 PCR 扩增。在克隆的基因组序列中，转录起始位点可用每一个本领域技术人员熟知的常规方法来确定，如 5' -RACE、引物延伸或 S1 作图。为了确定转录起始位点上游的顺式调控元件（即在推测的启动子区域中），将各区域与标记基因如编码 GUS 或 GFP 的基因融合，并产生这些构建体的 5' 缺失的衍生物。将它们转化到合适的植物材料中，测定依赖于剩余的上游序列（推测的启动子）的标记基因的表达。这些技术是本领域技术人

员所熟知的。

在一个实施方式中，本发明的调控序列包含选自如下的 DNA 序列：

- (a) 包含 SEQ ID NO: 1 中所示核苷酸 1 到 2222 的核苷酸序列或其部分的 DNA 序列；
- 5 (b) 包含 SEQ ID NO: 1 中所示核苷酸 1 到 2222 的核苷酸序列的至少 14 个连续核苷酸的 DNA 序列；
- (c) 在严格条件下与 (a) 或 (b) 中所述核苷酸序列杂交的 DNA 序列；
- (d) 具有权利要求 1 中所述核苷酸序列的探针筛选合适的基因组 DNA 文库而获得的片段的基因的 DNA 序列；
- 10 (e) 包含 (a)、(b) 和 (c) 中保守的核苷酸序列的 DNA 序列。

同源的调控序列与 (a) 或 (b) 中的调控序列在一个或一个以上位点不同，但仍然有同样的特异性，即它们包含相同或相似的负责上述表达模式的序列基序，优选 6 到 10 个核苷酸长。优选地，该调控序列与一个上述的调控序列的杂交，最优选地，在严格条件下杂交。特别优选地，
15 调控序列与上述的调控序列之一的序列一致性至少为 85%，更优选为 90%-95%，最优选为 96%-99%，并具有相同或基本相同的特异性。该调控序列还包含那些被改变的调控序列，例如与上述核苷酸序列相比，通过单独或联合对一个或一个以上核苷酸进行的缺失、插入、替代、添加和/或重组和/或任何本领域已知的修饰而获得的改变。本领域技术人员熟知
20 将这样的修饰引入本发明调控序列的核苷酸序列中的方法。对本领域技术人员来说很显然其他的调控元件也可添加到本发明的调控序列中。例如，可以采用本发明调控序列的转录增强子和/或涉及诱导表达的序列。例如，适合的诱导性系统为如 Gatz（见上）的受四环素调控的基因表达。

通过如不影响调控序列整体结构或结合基序的核苷酸代替的方法修
25 饰上述的调控序列或其序列基序是可能的，因此在病原体侵染时其仍可赋予基因表达。本发明的调控序列可来源于马铃薯 *R1* 基因（见实施例），但是其他植物也可以是这样调控序列的合适的来源。另外本发明的核苷酸序列可用本领域已知的适用的计算机程序进行比较，如代表局部比对基本查询工具（Basic Local Alignment Search Tool）的 BLAST，其可

用于局部序列比对 (Altschul, 1997; Altschul, J. Mol. Evol. 36 (1993), 290-390; Altschul, J. Mol. Biol. 215 (1990); 403-410)。BLAST 产生核苷酸序列的比对以确定序列相似性。因为比对的局部特性, BLAST 在确定精确配对或鉴定同源物中特别有用。用这些方法, 可能鉴定
5 在病原体特异性表达中起作用的保守的核苷酸序列。

通常, 所述的调控序列是重组 DNA 分子的一部分。在本发明的一个优选的实施方式中, 将重组 DNA 分子中的调控序列可操作地与异源 DNA 序列连接。术语“与本发明调控序列可操作地连接的 DNA 序列的异源”是指所述 DNA 序列不是天然地与本发明调控序列连接。所述异源的 DNA
10 序列的表达包括 DNA 序列的转录, 优选转录成可翻译的 mRNA。确保在真核细胞, 优选在植物细胞中表达的调控元件, 是本领域技术人员所熟知的。它们通常包含可确保转录终止和转录本稳定的多聚腺苷酸信号, 也参见前述。另外的调控元件可包含转录和翻译的增强子; 见前述。

在一个优选的实施方式中, 上述重组 DNA 分子的异源 DNA 序列编码
15 肽、蛋白、反义 RNA、正义 RNA 和/或核酶。可单独使用或作为表达异源 DNA 序列的载体的一部分使用本发明的重组 DNA 分子, 其中例如所述异源 DNA 序列编码蛋白如种子贮藏蛋白、毒素、抗体(“植物抗体”)或用于诊断 R1 相关基因的表达。将含有编码感兴趣蛋白的 DNA 序列的重组 DNA 分子或载体引入细胞中从而产生感兴趣的蛋白。例如, 可将本发明的调控
20 序列可操作地与分别编码芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂和芽孢杆菌 RNA 酶的序列连接, 用于在植物中产生 HR 反应。对本领域技术人员来说本发明的调控序列的应用性是显然的, 可以从文献如 Strittmatter 和 Wegener, Zeitschrift für Naturforschung 48c (1993), 673-688; Kahl, 《微生物生物技术杂志 (J. Microbiol. Biotechnol.)》 11 (1995), 449-460
25 和在此引用的参考文献获得。

另一方面, 上述蛋白可以是可计数的标记, 如, 荧光素酶、绿色荧光蛋白或 β -半乳糖苷酶。这一实施方式特别有利于简便和快速地筛选下述的能调节 R1 基因表达的化合物和物质。例如, 可以在存在或不存在候选化合物的情况下种植转基因植物, 以确定该化合物是否影响受控于本

发明调控序列的基因的表达，其可以用如监控上述标记的表达来测定。对本领域技术人员来说很显然也可利用其他标记基因，如编码对诱导或抑制上述标记表达的化合物进行直接选择的选择性标记。

本发明的调控序列也可用于反义方法中。反义 RNA 可以是一段短的核苷酸序列（一般至少 10 个核苷酸，优选地至少 14 个，任选地长达 100 个或 100 个以上核苷酸），将该核苷酸序列设计为与感兴趣基因的特异性 mRNA 序列和/或 DNA 序列的一部分互补。涉及反义技术的常规方法已有描述；参见，如 Klann, 《植物生理》112 (1996), 1321-1330 和前述。在将 DNA 序列转录为反义 RNA 后，反义 RNA 在细胞中与其靶序列结合，从而抑制 mRNA 转录并负调控 mRNA 编码的蛋白的表达。

在另一个实施方式中，本发明涉及至少 15 个核苷酸长的核酸分子，该核酸分子与上述的调控序列或其互补链特异性地杂交。特异性杂交优选发生在严格条件下，并意味着与不具有或具有基本不同的调控特性的核酸分子之间没有或很少有交叉杂交现象。该核酸分子可用作探针和或用于基因表达控制。核酸探针技术是本领域技术人员熟知的并且很容易理解这样的探针在长度上可变化。优选 17 到 35 个核苷酸长的核酸探针。当然，使用长达 100 个或 100 个以上核苷酸的核酸也是合适的。本发明的核酸探针具有多种应用。另一方面，它们可以用作扩增本发明调控序列的 PCR 引物。另一个应用是作为杂交探针通过基因组 DNA 文库的同源筛选来鉴定可与本发明调控序列杂交的调控序列。根据本发明的这一优选的实施方式，与上述的调控序列互补的核酸分子也可用于抑制含有该调控序列的基因的表达，例如，由于反义、共抑制或三链螺旋效应，或用于构建适用的核酶（参见，如 EP-B1 0 291 533, EP-A1 0321 201, EP-A2 0 360 257），该核酶可特异性剪切含有本发明调控序列的基因的（前体）mRNA。适用的靶位点和对应的核酶的选择可用已述的方法进行，如 Steinecke, 核酶 (Ribozymes), 《细胞生物学方法 (Methods in Cell Biology)》50, Galbraith 等编辑, Academic Press, Inc. (1995), 449-460。另外，本领域技术人员会意识到也可能使用有特殊应用的适合的标记来标记这样的核酸探针，如用于在来源于生物体的样本中检测本

发明核酸分子的存在。

上述核酸分子可以是 DNA 或 RNA 或其杂合体。另外上述核酸分子可含有在寡核苷酸反义方法中常用的，例如，硫酯键和/或核苷酸类似物；参见前述。

5 本发明也涉及载体，尤其是在基因工程中常用的质粒、粘粒、病毒和噬菌体，所述载体包含本发明的调控序列或相应的重组 DNA 分子。

优选地，所述载体是表达载体和/或进一步包含植物的选择标记的载体。适合的选择标记的例子参见前述。可使用本领域技术人员熟知的方法构建重组载体；参见，如在 Sambrook, 《分子克隆，实验室手册》冷泉
10 港实验室 (1989) 纽约，和 Ausubel, 《分子生物学当前技术》，Green Publishing Associates 和 Wiley Interscience, 纽约 (1989) 中描述的技术。可选择地，本发明的重组 DNA 分子和载体可被重新构建于脂质体中以便运送到靶细胞中。

另外，本发明还涉及用本发明的调控序列、DNA 分子或载体转化的
15 宿主细胞。所述宿主细胞可以是原核或真核细胞。存在于宿主细胞中的本发明的调控序列、载体或重组 DNA 分子可整合到宿主细胞的基因组中或保持在染色体外。宿主细胞可以是任何原核或真核细胞，如细菌、昆虫、真菌、植物、动物或人类细胞。优选的细胞是植物细胞。

在另一个优选的实施方式中，本发明提供制备转基因植物、植物细
20 胞或植物组织的方法，该方法包括将本发明的核酸分子、重组 DNA 分子或载体引入所述植物、植物细胞或植物组织的基因组中。为了在植物细胞中表达受控于根据本发明的调控序列的异源 DNA 序列，可融合其他调控序列如聚腺苷酸尾巴，优选融合到异源 DNA 序列 3' 末端，参见前述。另外也有可能加入可增强基因表达的转录或翻译增强子或增加 mRNA 稳定
25 性的序列。用于在植物、植物细胞和植物组织中引入外源 DNA 的方法参见上述。

因此，本发明也涉及含有，优选稳定地整合到基因组中的本发明的调控序列、重组 DNA 分子或载体的转基因植物细胞。另外，本发明也涉及包含上述转基因植物细胞的转基因植物和植物组织。

另外，本发明涉及用于鉴定植物防护剂的方法，该方法包括下列步骤：

(a) 在化合物或含有多种化合物的样品存在下，培养含有重组 DNA 分子的植物细胞或组织或维护含有重组 DNA 分子的植物，所述重组 DNA 分子包含与本发明的调控序列可操作地连接的读出系统，所述培养或维护是在允许所述读出系统表达的条件下进行的；

(b) 分别鉴定或证实样品和化合物，该样品和化合物导致在所述植物、植物细胞和植物组织中，所述读出系统的表达抑制、激活和/或增强。

在本发明上下文中术语“读出系统”是指在细胞、组织或生物体中转录和/或表达后的 DNA 序列提供可计数的和/或可选择的表型。所述读出系统是本领域技术人员所熟知的，包括，例如，上述的重组 DNA 分子和标记基因。

在本发明的方法中的术语“多种化合物”可理解为可相同或不不同的多种化合物。

所述化合物或多种化合物可以是无机或有机的、天然存在的或人造的化合物，可以包含在，例如，样品中，如从植物、动物或微生物的细胞提取物中。另外，上述化合物可以是本领域已知的但至今对其抑制、激活和/或增强 R1 基因转录的能力未知。可将多种化合物，例如，加到培养基，或注射到植物、植物细胞或组织中，或喷到植物上，或由土壤中提供。

如果用本发明的方法鉴定含有化合物或多元化合物的样品，那么从已鉴定含有能抑制、激活和/或增强 R1 基因转录的化合物的原始样品中有可能分离到该化合物，或者如果它由多种不同的化合物组成的话，可以进一步地细分原始样品，以致于减少每个样品中不同物质的数目并用原始样品的一部分重复该方法。根据样品的复杂性，可多次进行上述步骤，优选直到根据本发明方法鉴定的样品只包括有限数目的物质或只有一种物质。优选地，所述样品包含具有相似的化学和/或物理特性的物质，更优选地，所述样品是相同的。优选地，根据上述方法鉴定的化合物进一步地设计为适合应用于植物育种或植物细胞和组织培养的形式。

根据本发明方法检测和鉴定的化合物可以是表达文库，如，cDNA 表达文库、肽、蛋白、核酸、抗体、有机小化合物、激素、肽模拟物、PNAs 或类似物 (Milner, 《自然医学 (Nature Medicine)》1 (1995), 879-880; Hupp, 《细胞 (Cell)》83 (1995), 237-245; Gibbs, 《细胞》79 (1994), 5 193-198 和前述的文献)。另外，编码 R1 基因推测的调控子的基因可用下列方法鉴定，例如，用本领域已知的基因靶向载体进行的插入诱变 (参见，如，Hayashi, 《科学》258 (1992), 1350-1353; Fritze 和 Walden, 通过 T-DNA 标签的基因激活 (Gene activation by T-DNA tagging), 在《分子生物学方法 (Methods in Molecular biology)》中，44 (Gartland, 10 K. M. A. 和 Davey, M. R. 编辑), Totowa: Human Press (1995), 281-294) 或转座子标签 (Chandlee, *Physiologia Plantarum* 78 (1990), 105-115)。所述化合物也可以是已知的抑制剂或激活剂的功能性衍生物或类似物。用于制备化学衍生物和类似物的方法是本领域技术人员熟知的，并在如 Beilstein, 《有机化学手册 (Handbook of Organic 15 Chemistry)》, Springer edition New York Inc., 175 Fifth Avenue, 纽约, N. Y. 10010 美国和《有机合成 (Organic Synthesis)》, Wiley, 纽约, 美国) 中描述。另外，所述的衍生物和类似物可根据本领域已知的方法检测它们的功效。另外，例如，根据上述方法，也可使用肽模拟物和/或适用的衍生物和类似物的计算机辅助设计。

20 确定一种化合物是否能抑制、激活和/或增强 R1 基因转录可以通过，如在植物中监控报告基因来进行。还可监控接触该化合物的本发明的转基因植物的表型特征，并将其与野生型植物的表型特征进行比较。在另一个实施方式中，所述特征可与接触化合物 (已知该化合物能或不能抑制、激活和/或增强 R1 基因转录或该蛋白的活性) 的转基因植物的特征 25 进行比较。认为根据本发明的方法鉴定的化合物是非常有益的，因为到目前为止已知的启动子只有有限的用途，这是由于它们的调控序列没有或没有紧密调控的病原体特异性。

由上述方法鉴定的抑制剂或激活剂可证明作为除草剂、杀虫剂和/或作为植物生长调控剂是有用的。因此，在另一个实施方式中，本发明

涉及根据本发明的方法获得或鉴定的化合物。该有用的化合物可以是，例如，结合到本发明的调控序列的反式作用因子。可以用本领域常规方法进行反式作用因子的鉴定（参见，如，Sambrook，如前述，和 Ausubel，如前述）。为了确定蛋白是否结合到本发明的调控序列上，可使用常规的 DNA 足迹法和/或非变性凝胶转移分析。为了鉴定与本发明的调控序列结合的反式作用因子，可以将所述调控序列用作常规蛋白纯化方法中的亲和试剂，或作为筛选表达文库的探针。一旦鉴定了反式作用因子，就可以继续对其与本发明的调控序列的结合进行调节，这种调节是以，例如，筛选用于抵制反式作用因子与本发明的调控序列结合的抑制剂而开始的。然后 *RI* 基因在植物中的激活或抑制可通过例如在用于转基因植物的载体中应用该反式作用因子（或抑制剂）或其编码基因获得。另外，如果反式作用因子的活性形式是一个二聚体，可使该反式作用因子显性失活突变以抑制其活性。另外，基于对反式作用因子的鉴定，可鉴定该途径中导致受控于本发明调控序列的基因的激活（如，信号传导）或抑制的其他化合物。然后可继续对这些化合物活性进行调节，以开发出用于调节受控于本发明调控序列的基因的表达的其他药物和方法。

优选地，将根据上述方法鉴定的化合物或其类似物或衍生物，进一步设计为适合应用于植物育种或植物细胞和组织培养的形式。例如，它可以与本领域已知的农业上可接受的载体联合。可通过采用本发明上述方法以及以满足农业使用的剂量合成被鉴定为抑制剂或激活剂的化合物制备植物防护性组合物。因此，本发明也涉及用于制备农业植物防护性组合物的方法，该方法包括本发明方法的上述步骤以及合成这样鉴定的化合物或其类似物或衍生物。

在本发明的植物防护性组合物中，由上述方法鉴定的化合物可以用常规方法优选地设计为常用的如除草剂和杀虫剂或能诱导系统获得性抗性(SAR)的制剂。例如，可以使用本领域技术人员已知的某种添加剂，例如金刚砂或 0.01% SDS（十二烷基硫酸钠）溶液，所述添加剂包含稳定剂或易于植物细胞、植物组织或植物吸收的物质。

在另一个实施方式中，本发明涉及鉴定和获得病原体的无毒或毒性

因子的方法，该方法包括下列步骤：

(a) 在一个读出系统中以来源于病原体的肽或蛋白表达文库为背景筛选本发明的 R1 蛋白或其片段，所述筛选是在允许所述读出系统中蛋白和肽相互作用的合适的条件下进行的；

5 (b) 鉴定或证实导致读出系统抑制或激活的 cDNA。

除了在具修饰特性的植物的基因工程中使用根据本发明的核酸分子的上述可能性以及它们在鉴定同源分子中的作用之外，还可以将上述核酸分子用于几个其他用途，例如，用于鉴定编码与上述 R1 蛋白相互作用的蛋白的核酸分子。这可以用本领域熟知的实验来实现，例如，如
10 Scofield (《科学》274 (1996), 2063-2065) 中所述，通过使用通常所说的酵母“双杂交系统”。在这一系统中，本发明的核酸分子编码的蛋白或其较小部分被连接到 GAL4 转录因子的 DNA 结合结构域。表达该融合蛋白并包含有合适的启动子驱动的 lacZ 报告基因的酵母菌株，用 cDNA 文库进行转化，其中所述启动子被 GAL4 转录因子识别，所述 cDNA 文库可
15 表达融合到激活结构域的植物蛋白或肽。因此，如果由一个 cDNA 编码的肽能够与包含本发明蛋白的肽的融合肽相互作用，该复合体能够指导报告基因的表达。用这种方法，可根据本发明的核酸分子和编码的肽用于鉴定与 R1 蛋白相互作用的肽和蛋白。也可将该方法用于鉴定上述的抑制剂和激活剂。

20 用于鉴定与根据本发明的蛋白或编码该分子的核酸分子相互作用的化合物的其它方法有，例如，用噬菌体展示系统和滤膜结合试验进行体外筛选或者使用如 BIAcore 仪器(Pharmacia)进行相互作用的“实时”监测；参见前述的文献。

也可用通常所说的三杂交系统进行相似的策略。

25 酵母双杂交系统最初由 Fields 和 Song 描述(《自然》340 (1989), 245-246；也可参见综述 Vidal, M, 在 Bartel, P.L. 和 Fields, S. (编辑), 《酵母双杂交系统 (The yeast two-hybrid system)》中，牛津大学出版社 (Oxford University Press), 纽约, NY, (1997), 109-147)。酵母双杂交系统的一个优化版本已描述于 (Gyuris, 《细胞》75 (1993),

223-232; Zervos, 《细胞》72 (1993), 223-232。) 简短地说, 使用多肽的一个结构域作为结合化合物的饵。通过它们可在缺少亮氨酸的平板上生长的能力选出阳性克隆, 然后进一步地检测在含 X-gal 平板上变蓝的能力, 如以前详述; 也可参见 W0 95/31544。一个优化版本是“反式酵母双杂交系统”, 其使用负性选择策略用于选择相互作用缺乏的等位基因, 例如在 Vidal, 《美国国家科学院院刊》93 (1996), 10321-10326; Vidal, 《美国国家科学院院刊》93 (1996), 10315-10320 中描述的。该系统使用反选择性报告基因 *URA3*。表达 Ura3p 的酵母细胞将化合物 5-氟乳清酸 (FOA) 转化为毒性衍生物 5-氟尿嘧啶。因此在 FOA 存在的情况下可反选择导致 *URA3* 报告基因激活的双杂交相互作用, 而且失去功能的突变体可从大的野生型等位基因池中特异地选出。

例如, 另一个方便的方法可为如 SenGupta, 《美国国家科学院院刊》93 (1996), 8496-8501 所述的酵母三杂交系统。开发酵母三杂交选择系统是为了分离与 RNA 相互作用的蛋白的基因, 并研究 RNA-蛋白的相互作用。基于酵母双杂交系统的这一系统, 包含与已知的 RNA 结合蛋白融合的 DNA 结合结构域、与预期的 RNA 结合蛋白融合的激活结构域以及杂合的 RNA。只有当两杂合蛋白均和杂合的 RNA 相互作用时才会发生报告基因的转录。在反式三杂交系统中, 蛋白和杂合的 RNA 的相互作用导致其产物对酵母细胞有害的报告基因的表达。根据上述本发明的方法可采用所有这些方法, 其中将 R1 蛋白或其肽片段作为饵, 用于鉴定和获得无毒或毒性因子和它们的编码 cDNA 或其部分。用于获得在筛选分析中检测为阳性的那些克隆的 DNA 序列的方法是本领域技术人员所熟知的, 并在上述参考的文献中描述。

本发明还涉及用上述方法获得或鉴定的 cDNA 及它们编码的产物。

本发明还涉及组合物, 该组合物包含至少一个上述的核酸分子和/或包含与这样的核酸分子互补的核酸分子、本发明的载体、本发明的 R1 蛋白或其具免疫学或生物学活性的片段或者特异性识别这样的蛋白或片段的抗体或适体; 调控序列或重组 DNA、或本发明的相应的载体、根据本发明的蛋白定向设计的化合物和/或根据上述方法鉴定的化合物和/或特

异性识别这样的化合物或调控序列的抗体，以及任选地，涉及用于检测的适合的方法或植物细胞和组织培养检测的适合的方法。

可将诊断组合物用于通过检测相应 mRNA 的存在来检测 *RI* 基因的表达的方法中，该方法包括从细胞中分离的 mRNA 并在杂交条件下将所获得的 mRNA 与包含上述核酸探针的探针接触，检测与探针杂交的 mRNA 的存在，并由此检测细胞中的基因表达。检测根据本发明的蛋白存在的其他方法包括本领域熟知的免疫技术，如酶联免疫吸附分析。

另外，本发明涉及一种试剂盒，该试剂盒包含至少一个本发明的上述的核酸分子、载体、蛋白、化合物、抗体或适体。本发明的试剂盒还可进一步含有下列成分，如适用于产生转基因植物细胞、植物组织或植物的选择性培养基的选择标记和组分。另外，试剂盒可包含可在本发明的重组基因或载体中存在的报告基因的缓冲液和底物。本发明的试剂盒可以方便地用于进行本发明的方法，尤其是能用于在此提及的多种应用，如在诊断领域或作为研究工具。本发明的试剂盒的各部分可独立包装于小瓶中或合并于容器或多容器单元中。试剂盒的制造优选地依照本领域技术人员已知的标准程序进行。可根据本发明的试剂盒或其成分用于植物细胞和植物组织培养中，例如，用于上述的检测 *RI* 基因抑制剂和激活剂的任何方法中。本发明的试剂盒和其成分在培育新品种上非常有用，例如，呈现改善的特性如营养价值或病害抗性的植物新品种。

对本领域技术人员来说显然，可以将本发明的调控序列、重组 DNA 分子、载体和化合物用于产生具有想要的性状的转基因植物；参见综述 *TIPTEC Plant Product & Crop Biotechnology* 13 (1995), 312-397。

另外，可以根据本发明核酸分子作为在植物育种中的分子标记使用。此外，可以根据本发明核酸分子的过量表达用于改变或修饰植物/病原体相互作用。术语“病原体”包括，例如，细菌、病毒和真菌及原生动物。优选地，上述病原体是致病疫霉菌。

另外，本发明涉及本发明的核酸分子、载体、宿主细胞、蛋白、调控序列、适体重组 DNA 分子、载体、化合物、适体和/或抗体的用途，其中将上述物质用于鉴定病原体毒性和无毒基因的筛选方法、筛选植物保

护性化合物、在植物中诱导病原体抗性、作为在标记辅助的植物育种中的标记。优选将本发明的调控序列或重组 DNA 分子用于异源 DNA 序列的表达。

5 本发明的描述和实施例公开和涵盖了这些和其他的实施方式。涉及本发明的任何一种方法、用途和化合物的其他文献可以用如电子设备从公共图书馆中获得。例如可利用因特网上提供的“Medline”公共数据库，如在地址 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>。另外的数据库和地址，如 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>，<http://www.infobiogen.fr/>，[http://www.fmi.ch/biology/research](http://www.fmi.ch/biology/research_tools.html)
10 [_tools.html](http://www.fmi.ch/biology/research_tools.html)，<http://www.tigr.org/>，都是本领域技术人员熟知的并可以用如 <http://www.lycos.com> 获得。Berks 的 TIBTECH
12(1994), 352-364 中提供了用于回溯检索和目前关注的生物技术中专利信息信息的总评和专利信息相关来源的纵览。

参考下列非限制性的附图和实施例进一步描述本发明。

15

附图说明：

图 1. *R1* 区域的遗传和物理图谱。*GP21* 和 *GP179* 是用于构建 *R1* 区域的高分辨率图谱的标记。*SPUD237* 和 *AFLP1* 是改造过的在 *R1* 侧翼的 AFLP 标记 (Meksem 等, 1995, De Jong 等, 1997)。遗传距离以厘摩 (cM)
20 表示。CosS 是用 *SPUD237* 选择的粘粒克隆。物理图谱中的其余克隆是长度为 70 到 90 kb 的 BACs 克隆。黑色实心棒：来自携带 *R1* 的染色体的 BACs 克隆。灰色棒：来自携带 *r1* 的染色体的 BACs 克隆。白色棒：未确定 BAC 来源。用将 BAC 末端与 *R1* 分离的重组子的数目表示定位的 BAC 末端。用于染色体步查的粘粒和 BAC 末端用垂直箭头表示。RGL：抗性基因
25 类似片段。

图 2. 用等位基因特异性引物 76-2sf2 和 76-2SR 和 DNA 模板 PCR 扩增 *R1* 基因的 1.4 kb 片段，其中 DNA 模板来自 (A) Desirée; (B) 抗性亲本 P41; (C) 敏感亲本 P40; (D) 转基因 Desirée 植物 10-2_5; (E) 携带 *R1* 等位基因的 BAC 克隆 BA87d17; (F)、(G)、(H)、(I)、(J) 分别是 BAC

克隆 BA122p13, BA12101, BA76011, BA47F2 和 BA27c1; (K) 阴性对照。

图 3. *RI* 互补试验。接种 9 天后 (A) 敏感的 Desirée; (B) 用 g10-2 克隆转化的转基因 Desirée 系 No: 10-2_5 和 (C) 抗性亲本 P41 (*R1r1*) 的叶片上呈现病害症状。

5 图 4. *RI* 基因。(A) 结构构成。框型表示外显子, 折线表示内含子。(B) 推测的氨基酸序列。双下划线表示亮氨酸拉链基序。斜体字表示 LRR 区域。在框中表示预测的激酶基序, 粗体字表示 N-糖基化位点。植物抗性蛋白的特异性保守基序 QLPL、CFLY 和 LHD 加下划线。氨基酸为标准的单字母密码子。

10 图 5. 染色体 5 的 *R1* 座位附近区域的图示。填充垂直线的框代表携带 *RI* 和 *r1* 等位基因的染色体间的同源区域。用开放框表示功能性等位基因 *RI. 1* 和 *RI. 2/r1. 2*。折线表示与 *RI* 染色体相比在 *r1* 染色体上存在的缺失。

15 具体实施方式

实施例

材料和方法:

植物材料:

将杂合二倍体克隆 H79. 1506/1 (*RI r1*) 和 H80. 696/4 (*r1 r1*) 间杂交
20 的 F1 后代, 分别称为 P41 和 P40 (Gebhardt 等, 1989, Leonards-Schippers
等, 1992), 并用于 *RI* 的高分辨率遗传图谱作图。如所述 (Meksem 等, 1995)
选出来源于 P41 亲本 (*RI r1*) 的标记 *GP21* 到 *GPI79* 区间的重组子。将
从 P41 × P40 杂交而来的携带有杂合状态的 *RI* 的杂种克隆 P6/210
(Leister 等, 1997) 用于构建基因组粘粒和 BAC 文库。将亲本 P41 (*R1r1*)
25 用于构建 cDNA 文库。

检测对致病疫霉菌的抗性:

除了用整个叶片代替叶盘进行接种, 如 (Leonards-Schippers 等,
1992) 所述确定对具有相应无毒因子 *Avr1* 的致病疫霉菌菌株 (小种 4)
的抗性。接种后 8-10 天评定过敏反应 (HR) 存在与否。

马铃薯基因组文库:

由 LION Bioscience AG (海德尔堡, 德国) 提供 BAC 文库。如 (Meksem 等, 2000) 所述, 在双元载体 pCLD04541 (Jones 等, 1992) 中用 *Hind*III 部分消化 P6/210 克隆的高分子量基因组 DNA 构建所述 BAC 文库。该 BAC 文库由 101,376 个克隆组成, 平均插入长度为 70 kb。在含有冷冻缓冲液 (5.5 w/v% 甘氨酸、7 mM (NH₄)₂SO₄, 1.5 mM 柠檬酸钠, 0.3 mM MgSO₄, 13 mM KH₂PO₄, 27 mM K₂HPO₄) 的 2YT 培养基 (Sambrook 等, 1989) 中将克隆贮存在 264 个 384 孔微量滴定板 (Genetix, 牛津, 英国) 中。

用常规方法 (Sambrook 等, 1989) 从 *Sau*3AI 部分消化的 P6/210 的基因组 DNA (17-23 kb 的片段) 和在与 BAC 文库相同的载体 (*Bam*HI 克隆位点) 中构建大约 150 000 个克隆的粘粒文库。用 Gigapack II Gold Packaging extract (Stratagene, 加利福尼亚, 美国) 包装粘粒并将其转染到大肠杆菌 (*E. coli*) 菌株 SURE™ (Stratagene, 加利福尼亚, 美国) 中。从含大约 1500 个细菌菌落的池中提取质粒 DNA (Sambrook 等, 1989)。用 *SPUD237* 特异性引物产生和筛选了一百零三个粘粒池 (De Jong 等, 1997)。用常规程序铺板并通过菌落杂交筛选阳性池 (Sambrook 等, 1989)。

BAC 文库的筛选和重叠群的构建:

用 BioGRID 自动装置 (牛津, 英国) 制备用于以杂交为基础筛选 BAC 文库的高密度菌落滤膜。使用 5×5 阵列将克隆在双位点点样, 每个 22.5 × 22.5 厘米尼龙膜 (PALL, Biodyne, Portsmouth, 英国) 上具有 6×384 阵列的 5×5 阵列。每 5×5 阵列包括 2×12 个菌落并使 pSW1 克隆 (PE Biosystems, Foster City, 加利福尼亚, 美国) 占据阵列的对照位置。该点阵模式使 27,648 个克隆在每张膜上被显示两次。用一组四张带有 101,376 个克隆的滤膜进行文库筛选。在 LB 培养基上于 37°C 培养菌落滤膜 15 小时, 然后用标准方法进行菌落杂交 (Sambrook 等, 1989), 如 (Gebhardt 等, 1989) 所述进行滤膜杂交, 不同之处是将 300 pg pSW1 对照插入和探针一起标记和杂交, 以便于鉴定阳性克隆的位置。从阳性克隆中纯化质粒 DNA, 并用 T3 和 T7 寡核苷酸作为测序引物从两端对插入片段进行测序。将 BAC 插入末端的 DNA 序列信息用于设计特异性 PCR 引

物对。将用这些引物扩增的 PCR 产物和作为模板的各自的 BAC 克隆用作新的膜杂交的探针以鉴定重叠的 BAC 克隆，用于重叠的 BAC 克隆相对于彼此间的定位和在重组植物中的作图。通过对 PCR 产物测序来证实重叠。通过用重组植物和 RFLP 或基于 PCR 的标记分析进行的遗传作图来证实重叠群延伸的方向。为了测定 BAC 插入的大小，用 *NotI* 消化 BAC DNA，并使用 CHEF DRIII (BioRad, Hercules, 加利福尼亚, 美国) 上的脉冲场凝胶电泳在 11°C 电泳 12 小时来分离片段，起始脉冲间隔为 5 秒，最终脉冲间隔为 10 秒，120° 角，6 伏特/厘米 (V/cm)。

BAC DNA 的分离:

10 根据稍微改进的生产商说明，用 QIAfilter 质粒纯化试剂盒 100 (Qiagen, Hilden, 德国) 提取 BAC DNA。将单菌落在液体 LB 培养基中于 37°C 预培养 8 小时，将 75 μ l 预培养物加到 75 ml LB 培养基中并于 37°C 继续培养 15 小时。将上清通过 QIAfilter 滤膜之前加入一个离心步骤，以除去细菌细胞碎片。

15 制备来自 BAC 插入的探针:

用 *HindIII* 和 *EcoRI* 彻底消化 1.5 μ g 的 BAC DNA，并在 0.8% 低熔点琼脂糖凝胶 (Sea Plaque GTG 琼脂糖, Bioproducts, Rockland, Maine, 美国) 上与载体分离开。使用 GELase 体系 (Epicentre Technologies or Biozym) 根据供应商的说明，从凝胶中溶解插入的 DNA。使用乙醇沉淀 DNA，使其溶解于水中并用随机引物标记法标记上 32 P-dCTP (Feinberg 和 Vogelstein 1984)。

BAC BA87d17 的亚克隆:

25 于 65°C 将 10 μ g 的 BAC DNA 用 1 个单位的 *Tsp509I* 部分消化 15 分钟并在 0.8% 低熔点琼脂糖凝胶 (Sea Plaque GTG 琼脂糖, Bioproducts, Rockland, Maine, 美国) 上分离片段。使用 GELase 体系 (Epicentre Technologies, 麦迪逊, 美国) 根据供应商的说明，洗脱大小约 10 kb 的片段。将纯化的片段克隆入用 *EcoRI* 线性化并用 SHRIMP 磷酸酶 (Roche, 德国) 去磷酸化的 pCLD04541 双元载体中，并转化到大肠杆菌菌株 DH10B (Life Technologies, 美国) 中。将两百个重组菌落挑选到微量滴

定板中。

cDNA 文库的构建和筛选:

用致病疫霉菌小种 4 侵染约 8 周大的亲本植物 P41 (*Rlrl*) 和敏感品种 Desirée 的切枝, 并将其在玻璃缸下 (为增加湿度) 在 17°C 于生长箱中的水中光照 16 小时。在这些条件下, 敏感对照的叶子在 8 天后长满了致病疫霉菌菌丝体。在接种 2 小时、19 小时、3 天、7 天和 9 天后采集相同量的未感病的亲本 P41 的叶片和感病的叶片。用 RNeasy 植物小量提取试剂盒 (RNeasy Plant Mini Kit) 或 Oligotex mRNA 小量提取试剂盒 (Oligotex mRNA Mini Kit) (Qiagen, Hilden, 德国) 根据供应商的说明, 分离 Poly A⁺ RNA。根据生产商的说明, 用该 Poly A⁺ RNA 构建 λ ZAP II cDNA 文库 (Stratagene, 加利福尼亚, 美国)。在连到 λ ZAP 载体之前收集不同的 cDNA 制备物。将 5×10^5 pfu's 置于板上并通过噬菌斑杂交方法用 BAC 克隆 BA121o1 和 BA76o11 的插入片段作为探针进行筛选。

5' 端的 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 分析:

使用 RNeasy 植物小量提取试剂盒 (Qiagen, Hilden, 德国) 根据供应商的说明, 从未感病的 P41 叶片 (*Rlrl*) 组织中分离完整的 RNA。使用 SMART[™] Race cDNA 扩增试剂盒 (SMART[™] Race cDNA Amplification Kit, Clontech, 加利福尼亚, 美国) 根据生产商的说明, 用 1 μ g 完整 RNA 进行 RACE 分析。用于 PCR 扩增的套式基因特异性引物是: 第一条 RT1-1: 5'-AAACCCGGTGTTCCAAATCTAACACT-3' (SEQ ID NO: 3), 第二条 RT2-1: 5'-CATGTAGTGAGGATATGTCACGAGTG-3' (SEQ ID NO: 4)。将 RACE 反应的最终 PCR 产物克隆到 pGEM-T 载体 (Promega, 加利福尼亚, 美国) 中。已将两个独立克隆测序。

DNA 序列分析:

使用 Max Planck 育种研究所的 (Max Planck Institute for Breeding Research) ADIS 设备进行常规的 DNA 测序。使用 ABI PRISM 染色终止循环测序迅速反应试剂盒 (ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit) 和 AB1377 自动 DNA 测序仪 (PE Biosystems, Foster City, 加利福尼亚, 美国) 进行双脱氧链终止测序

法。

使用威斯康星程序包 10.0 版本 (Wisconsin Package Version 10.0, 遗传学计算机组 (Genetics Computer Group (GCG)), 麦迪逊, 威斯康星, 美国) 进行 DNA 序列分析。用国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, 美国) 和 ExPASy www server (Appel 等, 1994) 提供的 BlastX 和其它运算法则检索序列数据库。

根瘤农杆菌的转化:

根据 Wen-jun 和 Forde (1989), 将 BAC 克隆 BA87d17 的亚克隆 g10 电转移到根瘤农杆菌菌株 LBA4404 中。将三个农杆菌菌株 LBAg10-2、
10 LBAg10-5 和 LBAg10-23 用于转化马铃薯。

根瘤农杆菌介导的马铃薯转化和转基因植物的分析:

在所有转化实验中使用敏感的马铃薯栽培品种 Desirée。根瘤农杆菌介导的转化如 Rocha-Sosa 等 (1989) 所述进行, 不同之处是 MS 培养基含有 250 mg/l 凯福隆 (Claforan)。通过聚合酶链式反应 (PCR), 用针对
15 插入的特异性引物 87e (5'-ATTACAATGGGTTGAACTCAG-3' (SEQ ID NO: 5)) 和 87s (5'-ACCTCTTTCAATTGTTCTGGTG-3' (SEQ ID NO: 6)) 检测卡那霉素抗性转基因植物中 g10 插入的存在。PCR 条件是: 于 55°C 保温 (Ta) 45 秒, 于 72°C 聚合 60 秒。用来源于 cDNA c76-2 的 R1 特异性引物
20 76-2sf2 (5'-CACTCGTGACATATCCTCACTA-3' (SEQ ID NO: 7)) 和 76-2SR (5'-CAACCCTGGCATGCCACG-3' (SEQ ID NO: 8)) 筛选转基因植物。PCR 条件是: 于 55°C 保温 45 秒, 于 72°C 聚合 90 秒。在每个实验中使用每种植物的三个叶片进行对致病疫霉菌小种 4 的抗性的检测。

实施例 1: R1 座位的高分辨率遗传作图

为方便 R1 座位的物理作图, 从 588 个植物中选出了 16 个位于 R1 侧
25 翼的标记 GP21 和 GP179 之间 (Leonards-Schippers 等, 1992) 的重组子, 并检测了其对带有相应的无毒因子 *Avr1* 的致病疫霉菌的抗性。和在同样区间先前选出的 15 个重组子一起 (Meksem 等, 1995), 1049 个植物中总共有 31 个在 GP21-GP179 区间的重组子, 与 3.0% 的重组率 (3 厘摩) 相对应。GP21 和 R1 间的重组率与 R1 和 Gp179 间的重组率分别是 2.2 % 和

0.8 % (表 1)。

表 1. 从分离的 F1 群体的 1049 个植物中选出在 *GP21-R1*, *GP179-R1* 和 *GP21-GP179* 区间的重组个体的数目

	<i>GP21-R1</i>	<i>GP179-R1</i>	<i>GP21-GP179</i>
重组子数目	23	8	31
基因型 <i>R1r1</i> 的重组子	12	4	16
基因型 <i>r1r1</i> 的重组子	11	4	15
重组率 (%)	2.2	0.8	3.0

5 定位于 *GP21-GP179* 区间的标记 *SPUD237* 和 *AFLP1*, (De Jong 等, 1997, Meksem 等, 1995) 位于 *R1* 座位的侧翼。在 1049 个植物中这两个标记都通过一个重组事件与 *R1* 分离 (0.1 厘摩, 图 1)。

实施例 2: 向 *R1* 座位的染色体步查和 *R1* 候选基因的鉴定

10 将标记 *SPUD237* 用于筛选粘粒文库的探针。鉴定了一个阳性克隆 CosS (图 1)。对 CosS 插入进行末端测序产生了一个新的标记, 其通过一个重组事件 (0.1 厘摩) 与 *R1* 座位分离。用这个标记筛选 BAC 文库鉴定了 BAC 克隆 BA100e13。三个重组事件将 BA100e13 的远端与 *R1* 分离。用接近 *R1* 的 BA100e13 末端鉴定了 BA47f2。远离 *R1* 的 BA47f2 末端与 BA100e13 重叠并通过一个重组事件与 *R1* 分离。其近端与 *R1* 共分离, 类似所有后续分析的 BAC 末端(图 1 的右边部分)。用与 *R1* 共分离的 BA47f2 末端鉴定了 BA27c1 克隆。与 BA47f2 不重叠的 BA27c1 末端鉴定了 BA122p13 和 BA121o1 克隆。与 BA27c1 不重叠的 BA121o1 末端显示与抗丁香假单胞菌的番茄基因 *Prf*(Salmeron 等, 1996) 具有非常高的序列相似性(翻译的氨基酸序列具有 37%一致性、56%相似性)。将该抗性基因类似(RGL)片段

15 用作探针再次筛选 BAC 文库。除了 BA122p13, 该 RGL 探针鉴定了几个新的阳性克隆, 对其中的两个: BA87d17 和 BA76o11 进一步进行分析。它们含有被设想为可能是 *R1* 候选者的 RGL 基因的全长拷贝。BA76o11 和 BA87d17 的非重叠端与 *R1* 共分离。

也可使用便于物理图谱构建的 BAC 末端标记将 BAC 克隆定位到携带

有 *r1* 或 *R1* 等位基因的 P6/210(*R1r1*) 染色体上。BA100e13、BA47f2 和 BA87d17 克隆(图 1)与 *R1* 等位基因顺式, 而 BA121o1、BA122p13 和 BA76o11 从携带有 *r1* 的同源物而来(图 1)。基于使用的标记, 不能将 BA27c1 克隆定位到 *r1* 或 *R1* 染色体。

5 实施例 3: *R1* 候选 cDNA 克隆

用 BAC 克隆 BA121o1 和 BA76o11 的完整插入片段作为探针, 从由基因型 P41(*R1r1*) 被侵染的叶片制备的 cDNA 文库中, 分别分离了六个和八个 cDNA 克隆。这 14 个 cDNA 克隆中的八个与已知的植物抗性基因相似。与抗丁香假单胞菌的番茄基因 *Prf* 可获得最高的相似性(Salmeron
10 等, 1996)。这八个候选 cDNA 的序列彼此间有大约 80%–90% 的一致性。2292 个核苷酸长的 cDNA 克隆 c76-2 与 g10 克隆(一个代表部分 BA87d17 的亚克隆)的基因组序列, 除内含子外, 是一致的(见后)。在数据库中与已知抗性基因的序列比较显示不是全长 c76-2。用 RACE 分析, 该 cDNA 向 5' 端延伸 1943 个核苷酸, 得到 4235 个核苷酸的全长 cDNA 序列, 该全长
15 cDNA 序列包含 59 个核苷酸的 5' -非翻译区和在终止密码子和多聚腺苷酸尾巴之间的 297 个核苷酸的 3' -非翻译区。该 cDNA 在基因组序列的 2223 位点包含一个起始密码子, 其与 g10 克隆推测的氨基酸序列的第一个甲硫氨酸相对应(图 4B)。在-3 和+4 位点(ATG 的 a 是+1 位点)的两个腺嘌呤相当于植物、昆虫、酵母和哺乳动物中的核糖体识别序列(Kozak
20 1991)。

基于与其他七个候选 cDNA 的序列比对分析, 设计 cDNA c76-2 的特异性 PCR 引物。引物 76-2sf2 和 76-2SR(参见材料和方法)只有在亲本 P41(*R1r1*) 中产生 1.4 kb 的 PCR 产物, 而在亲本 P40(*r1r1*) 中没有产生(图 2)。这一多态性表明即使图谱数据显示 BAC BA87d17 克隆(来源于含有
25 *R1* 的染色体)的远端和 *R1* 没有发生重组, 但该 BAC 克隆仍然可能含有 *R1* 基因。

实施例 4: *R1* 表型的互补

从 BA87d17(76 kb) 构建了在携带有平均 10 kb 插入片段的双元载体 pCLD04541(参见材料和方法)中的基因组亚文库。用 BA121o1 的 RGL 探

针进行菌落杂交来筛选该文库。通过用从载体边界而来的正向引物(T3和T7)和从RGL而来的反向引物进行PCR而获得的扩增产物的大小来判断存在候选的RGL基因完整拷贝的阳性克隆。也可以用c76-2 cDNA特异性引物76-2sf2和76-2SR检测克隆。选出亚克隆g10-2并使其转化入根瘤农杆菌。使用三个不同的细菌克隆转化敏感栽培品种Desirée。从三个转化实验中,再生出15个独立的转基因系,并在四个独立实验中检测其表现的对致病疫霉菌小种4的抗性(表2)。

表2. 检测用g10克隆转化的转基因马铃薯系对致病疫霉菌小种4的抗性。在四个独立实验中通过每个系的三个叶片表现的对致病疫霉菌小种4的过敏抗性,检测转基因系。

转基因系号	抗性 ^c
10-2 ^a 1 ^b	敏感
10-2 2	抗性
10-2 3	抗性
10-2 4	抗性
10-5 1	抗性
10-5 2	敏感
10-5 3	未检测到(n.d.)
10-5 4	未检测到
10-5 5	抗性
10-23 1	未检测到
10-23 2	抗性
10-23 3	抗性
10-23 4	抗性
10-23 5	抗性
10-23 6	敏感

九个转基因系持续地显出典型的HR反应,与含有R1的抗性系P41

相似(图3);三个给出了不持续的结果而其余三个是敏感性的,类似未转化的 *Desirée* 对照。基于这些结果,得出的结论为 g10 亚克隆包含了有功能的 *R1* 基因。

所有具有 *R1* 表型的转基因系都包含与 cDNA 76-2 相应的基因,原因在于用引物 76-2sf2 和 76-2SR 扩增,产生 1.4 kb 的 PCR 产物。该产物不存在于未转化的 *Desirée* (对照)和图1中报道的作为 *R1* 附近的重叠群成员中除了 BA87d17 之外的所有 BAC 克隆中(图2)。

实施例5: *R1* 基因的结构

将含有 *R1* 基因的亚克隆 g10 测序,参见 SEQ ID NO: 1。该序列为 10,388 个核苷酸长,并含有一个与其他植物抗性基因序列相似的基因。在 GenEMBL 数据库中没有鉴定出其他开放阅读框或序列同源性。与 cDNA c76-2 和 5' RACE 产物的序列相似性比对显示存在三个外显子和三个内含子。92 bp(4878 到 4970 位点)和 126 bp(6103 到 6229 位点)的这两个内含子打断了编码区。81 bp(6323 到 6404 位点)的第三个内含子定位于紧接着终止密码子下游的 3' 非翻译区(图4A)。对推测的氨基酸序列进行预测,其为一个分子量为 149.4 kDa 的 1293 个氨基酸的多肽(图4B)。*R1* 基因的推测氨基酸序列与番茄的抗丁香假单胞菌的 *Prf* 基因(Salmeron 等,1996)最相似(40%一致性)。预测的 R1 蛋白具有由 P-环构成的推定的核糖体结合位点(NBS)结构域(氨基酸 572-578)、激酶 2(氨基酸 649-653)和激酶 3a(氨基酸 677-682)基序(图4B)。激酶基序下游是与在抗性基因中功能未知的保守结构域相似的其它序列:GLPL(在 *R1* 中为 QLPL (SEQ ID NO: 10)), CKLY(在 *R1* 中为 CFLY (SEQ ID NO: 12)) 和 MHD(在 *R1* 中为 LHD)。用 ExPASy 运算法则检索保守的基序,在推测的 R1 氨基酸序列中找到了推定的 4 个十四烷基化、9 个糖基化、43 个磷酸化和 1 个酰胺化位点。在该基因的羧基端部分,R1 的推定的富含亮氨酸重复序列(LRR)结构域具有 15-16 个不完全的重复。像具有细胞质富含亮氨酸重复序列的其他植物的 R 蛋白一样,R1 蛋白含有从氨基酸位置 308 到 329 的亮氨酸拉链(Hammond-Kosack 和 Jones, 1997)。

实施例6: *R1* 座位的基因组结构

DNA 凝胶印迹分析表明 *RI* 是一个基因家族的成员。

RI 特异性引物 76-2sf2 和 76-2SR 在 BA87d17 (*RI*) 中扩增了 1.4 kb 片段但在重叠克隆 BA121o1、BA122p13 和 BA76o11 (*rI*) 中则不能 (图 2)。对 BAC 克隆 BA87d17 (*RI*) 和 BA122p13 (*rI*) 的 DNA 序列分析显示 BA87d17
5 含有 *RI* 基因家族的两个高度同源的成员: 与有功能的 *RI* 基因相对应的 *RI*, 和与 BA122p13 中的 *rI. 2* 等位基因直向同源的 *rI. 1*。有功能的 *RI* 基因是在携带 *RI* 的染色体中由 BA87d17 表示的区域中的 15 kb 插入的一部分, 但在携带 *rI* 的染色体中不存在 (图 5)。

显然除了如在前面的描述和实施例中特别描述的之外, 也可实施本
10 发明。根据上述教导, 可以对本发明进行无数的修改和改变, 因此, 这些修改和改变也在所附的权利要求的范围内。

在本发明的背景技术、描述、实施例和序列表中引用的每篇文献的全部内容 (包括专利、专利申请、杂志文章、摘要、实验室手册、书、序列或其他内容) 都引入本文作为参考。

15

参考文献

Appel, R-D., Bairoch, A. 和 Hochstrasser, D.F. (1994), 适合生物学家使用的新一代信息检索工具: ExPASy www 服务器的实例 (A new generation of information retrieval tools for biologists: the
20 example of the ExPASy www server), 《生物化学科学进展 (Trends Biochem. Sci.)》19: 258-260;

Ballvora, A., Schornack, S., Baker, B. J., Ganai, M., Bonas, U. 和 Lahaye, T. (2001), 在番茄 *Bs4* 基因座位上的染色体登陆 (Chromosome landing at the tomato *Bs4* focus), 《分子基因与遗传
25 学 (Mol Gen Genet)》, 待出版;

Bendahmane, A., Kanyuka, K. 和 Baulcombe, D.C. (1999), 马铃薯的 *Rx* 基因控制独立的病毒抗性和细胞死亡反应 (The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses), 《植物细胞 (The Plant Cell)》11: 781-791;

- Bendahmane, A., Querci, M., Kanyuka, K. 和 Baulcombe, D.C. (2000), 农杆菌瞬时表达系统作为一种分离抗病基因的工具: 对马铃薯中 *Rx2* 座位的应用 (*Agrobacterium* transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the *Rx2* locus in potato), 《植物杂志 (The Plant Journal)》21: 73-81;
- Dangl, J.L. 和 Jones, J.D.G. (2001), 植物病原体和植物对感染的整体防御反应 (Plant pathogens and integrated defence responses to infection), 《自然 (Nature)》411: 826-833;
- 10 De Jong, W., Forsyth, A., Leister, D, Gebhardt, C. 和 Baulcombe, D.C. (1997), 一个抗马铃薯 X 病毒的马铃薯过敏性抗性基因定位在染色体 V 的一个抗性基因簇中 (A potato hypersensitive resistance gene against potato virus X maps to a resistance gene cluster on chromosome V), 《理论与应用遗传学 (Theor Appl Genet)》95: 153-62;
- 15 Dong F, Song J, Naess SK, Helgeson JP, Gebhardt C, Jiang J (2000), 马铃薯中的一套染色体特异性的细胞遗传学 DNA 标记的开发与应用 (Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato), 《理论与应用遗传学 (Theor Appl Genet)》101: 1001-07;
- 20 El-Kharbotly. A., Leonards-Schippers, C., Huigen, D.J., Jacobsen, E., Pereira, A., Stiekema, W.J., Salamini, F. 和 Gebhardt, C. (1994), 对二倍体马铃薯亲本的后代中赋予抗致病疫霉菌的小种专化抗性的 *R1* 和 *R3* 等位基因的分离分析和 RFLP 作图 (Segregation analysis and RFLP mapping of the *R1* and *R3* alleles conferring race specific resistance to *Phytophthora infestans* in progenies of dihaploid potato parents), 《分子基因与遗传学 (Mol. Gen. Genet.)》242: 749-754;
- El-Kharbotly, A., Palomino-Sanchez, C., Salamini, F., Jacobsen, E. 和 Gebhardt, C. (1996), 以赋予抗致病疫霉菌小种专化

抗性的马铃薯 *R6* 和 *R7* 等位基因鉴定了与 *R3* 基因座位集簇于染色体 XI 的基因座位 (*R6* and *R7* alleles of potato conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary identified genetic loci clustering with the *R3* locus on chromosome XI), 《理论与应用遗传学》92: 880-884;

Ellis, J.G., Lawrence, G.J., Luck, J.E. 和 Dodds, P.N. (1999), 鉴定决定基因对基因特异性不同的亚麻抗锈病基因 L 的等位基因的区域 (Identification of regions in alleles of the flax rust resistance gene L that determine differences in gene-for-gene specificity), 《植物细胞 (Plant Cell)》11: 495-506;

Ellis, J.G., Dodds, P.N. 和 Pryor, T. (2000), 植物抗病基因的结构、功能和进化 (Structure, function and evolution of plant disease resistance genes), 《植物生物学最新观点 (Curr Opin Plant Biol)》3: 278-284;

Ewing, E.E., Simko, I., Smart, C.D., Bonierbale, M.W., Mizubuti, E.S.G., May, G.D., 和 Fry, W.E. (2000), 在由马铃薯和 *Solanum berthaultii* 而来的种群中从抗致病疫霉菌的数量和质量抗性的田间试验得到的遗传作图 (Genetic mapping from field tests of quantitative and qualitative resistance to *phytophthora infestans* in a population derived from *Solanum tuberosum* and *Solanum berthaultii*), 《分子育种 (Mol Breeding)》6: 25-36;

Feinberg, A.P. 和 Vogelstein, B. (1984), 一种使放射性标记的 DNA 限制性内切酶片段具有高特异活性的技术 (A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity), (附录), 《分析生物化学 (Anal Biochem)》137: 266-267;

Flor, H.H (1971) 基因对基因假说的现状 (Current status of the gene-for-gene concept), 《植物病理学年鉴 (Annu Rev Phytopathol)》9: 275-296;

Folkertsma, R. T., Spassova, M. I., Prins, M., Stevens, M. R., Hille, J. 和 Goldbach R. W. (1999), 番茄栽培品种 Stevens 的细菌人工染色体文库(BAC)的构建及其在 *Sw-5* 基因座位物理作图中的应用 (Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library of *Lycopersicon esculentum* cv. Stevens and its application to physically map the *Sw-5* locus), 《分子育种》5: 197-207;

Fry, W. E. 和 Goodwin, S. B. (1997), 爱尔兰马铃薯饥荒的真菌的复苏 (Resurgence of the Irish potato famine fungus), 《生物科学 (Bioscience)》47: 363-371;

10 Gebhardt, C., Ritter, E., Debener, T., Schachtschabel, U., Walkemeier, B., Uhrig, U. 和 Salamini, F. (1989), 在马铃薯中的 RFLP 分析和连锁作图 (RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*), 《理论与应用遗传学》78: 65-75;

Gebhardt, C. 和 Valkonen, J. P. T. (2001), 马铃薯基因组中控制抗病性的基因的结构构成 (Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome), 《植物病理学年鉴 (Annu Rev. Phytopathol)》39: 79-102;

Hammond_Kosack, K. 和 Jones, J. D. (1997), 植物的抗病性基因 (Plant disease resistance genes), 《植物生理学与植物分子生物学年鉴 (Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol)》48: 575-607;

20 Jones, D. A., Thomas, C. M., Hammond-Kosack. K. E., Balint-Kurti, P. J. 和 Jones, D. J. G. (1992), 用于转基因植物中外源基因的转化、表达并分析检测转座子切除的高效载体 (Effective vectors for transformation, expression of heterologous genes, and assaying transposon excision in transgenic plants), 《转基因研究 (Transgenic Res.)》1: 285-297;

Jones, D. A. 和 Jones, D. J. G. (1997), 富含亮氨酸的重复在植物防御中的作用 (The roles of leucine rich repeats in plant defences), 《高等植物研究与高等植物病理学 (Adv Bot Res Adv Plant Pathol)》

24: 90-167;

Judelson, H. S. (1997), 致病疫霉菌的遗传学和生物学: 一个历史难题的最新进展 (The genetics and biology of *Phytophthora infestans*: Modern approaches to a historical challenge), 《真菌遗传学与生物学 (Fungal Genet and Biol)》22: 65-76;

Kamoun, S. (2001), 对疫霉菌的非宿主抗性: 一个经典问题的新前景 (Nonhost resistance to *Phytophthora*: Novel prospects for a classical problem), 《植物生物学最新观点 (Curr Opin Plant Biol)》4: 295-300;

10 Kreike, C.M., De Koning, J.R.A., Vinke, J.H., Van Ooijen, J.W., 和 Stiekema, W.J. (1994), 在 *Solanum spegazzinii*. 中数量遗传的抗马铃薯白线虫抗性是由一个主要基因座位决定的 (Quantitatively-inherited resistance to *Globodera pallida* is dominated by one major locus in *Solanum spegazzinii*), 《理论与应用遗传学》88: 764-69;

15 Kozak, M. (1991), 调节翻译起始的真核 mRNA 的结构特征 (Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation), 《生物化学杂志 (J Biol Chem)》266: 19867-19870;

20 Leister, D., Ballvora, A., Salamini., F, 和 Gebhardt, C. (1996), 一种用于从马铃薯中分离抗病基因并在植物中具有广泛的应用潜力的基于 PCR 的方法 (A PCR based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants), 《自然遗传学 (Nature Genetics)》14: 421-429;

25 Leister, D., Berger, A., Thelen, H., Lehmann, W., Salamini, F. 和 Gebhardt, C. (1997), 马铃薯酵母人工染色体文库的构建以及与抗病基因座位 *RI* 和 *Gro1* 相关克隆的鉴定 (construction of a potato YAC library and identification of clones linked to the disease resistance loci *RI* and *Gro1*), 《理论与应用遗传学》95: 954-960;

Leonards-Schippers, C., Gieffers, W., Gebhardt, C. 和 Salamini, F. (1992), 马铃薯中提供抗致病疫霉菌的小种专化抗性的 *R1* 基因被定位于马铃薯染色体 V 上 (The *R1* gene conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* in potato is located on potato chromosome V), 《分子基因与遗传学 (Mol Gen Genet)》233: 278-283;

Leonards-Schippers, C., Gieffers, W., Schäfer-Pregl, R., Ritter, E., Knapp, S. J., Salamini, F. 和 Gebhardt, C. (1994), 马铃薯中对致病疫霉菌的数量抗性: 一个在异花授粉的植物物种进行 QTL 作图的范例研究 (Quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in potato: a case study for QTL mapping in an allogamous plant species), 《遗传学 (Genetics)》137: 67-77;

Li, X., van Eck, H. J., Rouppe van der Voort, J., Huigem, D-J., Stam, P., 和 Jacobsen, E. (1998), 同源四倍体和使用常用的 AFLP 标记进行的遗传作图: 赋予抗致病疫霉菌抗性的 *R2* 等位基因被定位在第 4 号马铃薯染色体上 (Autotetraploids and genetic mapping using common AFLP markers: The *R2* allele conferring resistance to *Phytophthora infestans* mapped on potato chromosome 4), 《理论与应用遗传学》96: 1121-28;

Meksem, K. Leister, D. Peleman, J., Zabeau, M., Salamini, F. 和 Gebhardt, C. (1995), 基于 RFLP 和 AFLP 标记的位于马铃薯第 5 号染色体 *R1* 基因座位附近的高分辨率图谱 (A high-resolution map of the vicinity of the *R1* locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers), 《分子基因与遗传学》249: 74-81;

Meksem, K., Zobrist, K., Ruben, E. Hyten, D., Quanzhou, T., Zhang, H-B. 和 Lightfoot, D. A. (2000), 在双元载体中构建的两个大插入片段的大豆基因组文库: 在染色体步查和基因组宽度物理作图中的应用 (Two large-insert soybean genomic libraries constructed in a binary vector: applications in chromosome walking and genome wide physical mapping), 《理论与应用遗传学》101: 747-755;

Naess, S.K., Bradeen, J.M., Wielgus, S.M., Haberlach, G.T., McGrath, J.M., 和 Helgeson, J.P. (2000). *Solanum bulbocastanum* 中抗晚疫病抗性被定位于第 8 号染色体上 (Resistance to late blight in *Solanum bulbocastanum* is mapped to chromosome 8), 《理论与应用遗传学》101: 697-704;

Nakamura, S., Asakawa, S., Ohmido, N., Fukui, K., Shimizu, N. 和 Kawasaki, S. (1997), 使用极具代表性的水稻细菌人工染色体文库在稻瘟病抗性基因 $Pi-ta^2$ 的靠近着丝粒的区域构建了一个 800-kb 的重叠群 (Construction of an 800-kb contig near-centromeric region of the rice blast resistance gene $Pi-ta^2$ using a highly representative rice BAC library), 《分子基因与遗传学》254: 611-620;

Oberhagemann, P., Chatot-Balandras, C., Bonnel, E., Schäfer-Pregl, R., Wegener, D., Palomino, C., Salamini, F. 和 Gebhardt, C. (1999), 马铃薯中抗晚疫病数量抗性的遗传分析: 朝向标记辅助的选择 (A genetic analysis of quantitative resistance to late blight in potato: Towards marker assisted selection), 《分子育种 (Mol Breed)》5: 399-415;

Person, C., Samborski, D.J. 和 Rohringer, R. (1962), 基因对基因假说 (The gene-for-gene concept), 《自然》194: 561-562;

Rocha-Sosa, M., Sonnewald, U., Frommer, W., Stratmann, M., Schell, J. 和 Willmitzer, L. (1989), 发育和代谢信号都激活了 I 类马铃薯块茎蛋白的基因的启动子 (Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene), 《欧洲分子生物学组织杂志 (EMBO Journal)》8 (1): 23-29;

Ross, H. (1986), 马铃薯育种: 问题与展望 (Potato breeding. Problems and perspectives), 《高等植物育种 (Adv Plant Breed)》增刊 13;

Reiser, L., Modrusan, Z., Margossian, L., Samach, A., Ohad, N., Haughn, G.W. 和 Fischer, R. (1995), BELL1 基因编码了参与拟南

芥胚珠原基的模式形成的同源域蛋白 (The BELL1 Gene Encodes a Homeodomain Protein Involved in Pattern Formation in the Arabidopsis Ovule Primordium), 《细胞 (Cell)》83: 735-742;

Ritter, E., Debener, T., Barone, A., Salamini, F. 和 Gebhardt, C. (1991), 马铃薯染色体上两个控制对马铃薯 X 病毒 (PVX) 的极端抗性的基因的 RFLP 作图 (RFLP mapping on potato chromosomes of two genes controlling extreme resistance to potato virus X (PVX)), 《分子基因与遗传学 (Mol Gen Genet)》227: 81-85;

Roupe van der Voort, J., Wolters, P., Folkertsma, R., Hutten, R., van Zandvoort, P., Vinke, H., Kanyuka, K., Bendahmane, A., Jacobsen, E., Janssen, R. 和 Bakker, J. (1997), 使用基于共迁移的 AFLP 标记的策略对马铃薯中抗包囊线虫抗性基因座位 *Gpa2* 进行作图 (Mapping of the cyst nematode resistance locus *Gpa2* in potato using a strategy based on comigrating AFLP markers), 《理论与应用遗传学》95: 874-80;

Roupe van der Voort, J., van der Vossen, E., Bakker, E., Overmars, H., van Zandvoort, P., Hutten, R., Klein-Lankhorst, R. 和 Bakker, J. (2000), 另外两个赋予马铃薯抗马铃薯白线虫广谱抗性的 QTLs 被定位于抗性基因簇中 (Two additive QTLs conferring broad-spectrum resistance in potato to *Globodera pallida* are localized on resistance gene clusters), 《理论与应用遗传学》101: 1122-30;

Salaman, R.N. (1985), 马铃薯饥荒: 其原因与后果 (The potato famine: its causes and consequences), 《马铃薯的历史与社会影响 (The History and Social Influence of the Potato)》, 修订版, 编辑 JG Hawkes, 页码: 289-316, Cambridge/New York/New Rochelle/Melbourne/Sydney: 剑桥大学出版社;

Salmeron J.M., Oldroyd, G.E., Rommens C.M., Scofield, S.R., Kim, H-S., Lavelle, D.T., Dahlbeck, D. 和 Staskawicz, B.J. (1996),

马铃薯 *Prf* 是植物的富含亮氨酸重复序列的类型的抗病基因的成员并且存在于 *Pto* 激酶基因簇中 (Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene cluster), 《细胞》卷 86: 123-133;

5 Sambrook, J., Fritsch, E.F. 和 Maniatis, T. (1989), 《分子克隆: 实验室手册 (Molecular Cloning: A laboratory Manual)》, 冷泉港, 纽约: 冷泉港实验室出版社;

Singh, A.K., Salamini, F. 和 Uhrig, H. (1989), 在 11 个二倍体马铃薯种中 14 个 F1 代杂种的染色体配对 (Chromosome pairing in 14 F1
10 hybrids among 11 diploid potato species), 《遗传育种杂志 (J Genet Breed)》43: 1-5;

Stahl, E. A., Dwyer, G., Mauricio, R., Kreitman, M. 和 Bergelson, J. (1999), 拟南芥中的 *Rpml* 基因座位的抗病多态性的动力学 (Dynamics of disease resistance polymorphism at the *Rpml* locus in
15 *Arabidopsis*), 《自然》400: 667-671;

Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, de Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB, Messeguer R, Miller JC, Miller L, Paterson AH, Pineda O, Röder MS, Wing RA, Wu W, Young ND. 1992, 番茄和马铃薯基因组的高密度分子连锁图谱 (High density molecular linkage maps of the tomato and potato
20 genomes), 《遗传学 (Genetics)》132: 1141-60;

Van der Lee, T., Robold, A., Testa, A., van't Klooster, J.W. 和 Govers, F. (2001), 使用群分法 (BSA) 选择的扩增片段长度多态性标记对致病疫霉菌的无毒基因作图 (Mapping of Avirulence Genes in
25 *Phytophthora infestans* With Amplified Fragment Length Polymorphism Markers Selected by Bulk Segregant Analysis), 《遗传学》157: 949-956;

Van der Vossen, E. A. G., Rouppe van der Voort, J. N. A. M., Kanyuka, K., Bendahmane, A., Sandbrink, H., Baulcombe, D. C.,

- Bakker, J., Stiekema, W. J. 和 Klein-Lankhorst, R. M. (2000), 马铃薯中一个单抗性基因簇的同源物赋予针对不同病原体: 病毒和线虫的抗性 (Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode), 《植物杂志 (The Plant Journal)》23: 567-576;
- Wastie, R. L. (1991), 抗性育种 (Breeding for resistance), 《高等植物病理学 (Adv Plant Pathol)》7: 193-223;
- Wen-jun, S. 和 Forde, B. G. (1989), 使用高压电穿孔高效地转化农杆菌 (Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. By high voltage electroporation), 《核酸研究 (Nuc Acids Res)》17: 8385;
- Yang, D., Parco, A., Nandi, S., Subudhi, P., Zhu, Y., Wang, G. 和 Huang, N. (1997), 细菌人工染色体文库的构建及使用第4号染色体特异性 RFLP 标记对重叠的细菌人工染色体文库克隆的鉴定 (Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library and identification of overlapping BAC clones with chromosome 4-specific RFLP markers);
- Yang, D., Sanzhes, A., Khush, G. S., Zhu, Y., 和 Huang, N. (1998), 构建一个含有水稻中 *xa5* 基因座位的细菌人工染色体的重叠群 (Construction of a BAC contig containing the *xa5* locus in rice), 《理论与应用遗传学》97: 1120-1124。

<110> 马克思-普朗克科学促进协会公司
KWS SAAT公司

<120> 来源于植物的抗性基因

<130> P04DE023002

<150> EP 01120670.3

<151> 2001-08-31

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 10388

<212> DNA

<213> 马铃薯

<220>

<221> 内含子

<222> (4878).. (4970)

<223>

<220>

<221> 内含子

<222> (6103).. (6229)

<223>

<220>

<221> 内含子

<222> (6323).. (6404)

<223>

<220>

<221> CDS

<222> (2223).. (4877)

<223>

<220>

<221> CDS

<222> (4971).. (6102)

<223>

<220>

<221> CDS

<222> (6230).. (6321)

<223>

<220>

<221> 5' UTR

<222> (2164).. (2222)

<223>

<220>

<221> 启动子

<222> (1).. (2164)

<223>

<220>

<221> 3' UTR

<222> (6405).. (6702)

<223>

<400> 1

ttaatatata gatggaatcg gtgttttaaa aggcagggcg cgaggcgaga cgttttactt	60
agtatagagc gaggcgtaag cctaattgatt catttttcta agaacgatat taattcatta	120
aattacttaa ttataataaa tttatacact tcaaatacac ttggatatga ataagtaatt	180
atccttcacg agattcaaat gaaaaataag tggagttaat tagagtaaag tagagtaatt	240
taaacacttt agtctgaatc tttatacatt atacaaaaaa agtaattata tttcaccaaa	300
ttcaaatgga aattaaaat atatgaagat aattacaaca caagtgttat gtgtcagttg	360
gaaagctcaa gcgtgggtcc taccatactc catgacattt cacttttagg gtatgattcg	420
taatttaatg aaaatgatga cttttttttt tggagttagt aatgaggtct aaataactaa	480
acatagagga caacctctt aagcaagcaa atcttgcaat aacatttcaa agacatgat	540
atcctcaaat tttttattaa tgactaaaa ctaacatggt aaactctcct gtgtattatt	600
cattgtaata ttttttttgg ttaaatcatt cattgtaaaa taaattcatt atacataatg	660
ttaatttttt ctttaataatc aaatattatt catcgtatat ttactaaaaa tattcaatgt	720
atgatgatga gagaataaac tatataagaa atataagaaa tttaatgaaa ccatattcaa	780
aaatggcttc tcaatgtgtc aaaaaatcaa caatgacaga tcaaatacat tatcttattt	840
ctttaaattg tgttagatat atttgtactt ttagaggatt attaatttat aatatcaatg	900

aagccatata tttatataag agtcttctga aaatatatta tcttattatc ttatcaaaat	960
ggatgatttt ttccattgat ccaagtcggg accaaaaaag aatattatct caaagagatt	1020
attaatttac caaatattaa tttagtgagg ttttactgta atttgggtgt ggtccatgac	1080
catatatatt ttgaaaaaaa actgctttgt aaattccaag ttggaacgac atttctacag	1140
ccaatgttga aatactattc ttgtcctgat taggagactt attatttcat ttcatatata	1200
gataggtccc ttgagaacta gaaagattaa attaaagatt gagatccaat aatgcatatg	1260
aacacagaac atttgtcttt tttccaaagg ggacatata tatataagat gtcattgtgc	1320
tttatgtatg gaagagagaa taacgatctc atatatatat ctcatatata tatatatcat	1380
ctaaaaaag atgttttaa ccatctggta ttcgggtatac aatttacact aaaaagacca	1440
aacaggtggg aaggacacaa acattagatc aaaaattaag gttaagtgat tcagatatca	1500
agaggaacaa tatactaatt ggaacaaatt aaagtatcct cacttacaat ggtcatatat	1560
agaagctact taggtaatac tctcactatc cctaattatt tgtccacttt taaattagca	1620
cacctattaa taaaacaatt attggcatag tgagtttacc attttacctt ttttaattatg	1680
aagcgaatga attaaaaact taagatatta aaaaaattct gcctttaaca aagtaattat	1740
ttgaggtat aataggtaaa aagaaattgt ccttttttta tttgtcaaaa tgaacaagta	1800
gttagggaca actaaaaaag gaaaaatgga tgagtaatta ggaacggagg gagtataaaa	1860
cactgtcatc actcaaaaaa tatgagtatc ttgacttgca caacataggt acttaatcaa	1920
agactcaata tacaatctc taaagtaaat ttgtatttgt atatacagtc tctttgaaag	1980
cccaattigt ataaaatatt taaatgcagc tagatataca aacggaaatt agcatagcaa	2040
ctgaaactat agatataгаа cataattagg caatgacttt gttttttggt tgtctgcctc	2100
acactttatt tgactgcctt ccttgaatac tttgaatatt ctaagtacgc cagctataag	2160
gtgaagaaag aattaaacta taatactctg tattgctctt cttccataat agtgaacaa	2220
gg atg aat ttc aac aat gaa ttg tct gat ctg aaa aat cgc ttc cta	2267
Met Asn Phe Asn Asn Glu Leu Ser Asp Leu Lys Asn Arg Phe Leu	
1 5 10 15	
ttt agg acg ctg aga gcc cag aaa tgc tcg gat gtt gca aga gat cga	2315

Phe	Arg	Thr	Leu	Arg	Ala	Gln	Lys	Cys	Ser	Asp	Val	Ala	Arg	Asp	Arg		
				20					25					30			
ata	gat	ttc	ttt	ata	tgg	gag	tta	aaa	ttc	ctt	aat	tgt	ttt	ctc	cat		2363
Ile	Asp	Phe	Phe	Ile	Trp	Glu	Leu	Lys	Phe	Leu	Asn	Cys	Phe	Leu	His		
			35					40					45				
ttg	cag	agc	ttc	gct	ttt	gca	agt	gaa	tgt	ggt	atg	cta	gat	atc	tca		2411
Leu	Gln	Ser	Phe	Ala	Phe	Ala	Ser	Glu	Cys	Gly	Met	Leu	Asp	Ile	Ser		
		50					55					60					
cag	aaa	atg	ata	gaa	att	tgc	aag	agg	ttt	aat	aca	cca	cct	cca	cat		2459
Gln	Lys	Met	Ile	Glu	Ile	Cys	Lys	Arg	Phe	Asn	Thr	Pro	Pro	Pro	His		
	65					70				75							
aat	tca	ttt	gca	tac	tgg	aag	gag	gta	att	tgc	aag	agg	ctg	tgc	gct		2507
Asn	Ser	Phe	Ala	Tyr	Trp	Lys	Glu	Val	Ile	Cys	Lys	Arg	Leu	Cys	Ala		
80					85					90					95		
att	agc	atc	cag	ccg	gat	gct	agt	tca	gat	gat	gga	ttt	gca	tgc	tgg		2555
Ile	Ser	Ile	Gln	Pro	Asp	Ala	Ser	Ser	Asp	Asp	Gly	Phe	Ala	Cys	Trp		
				100					105					110			
aag	aaa	gta	att	tgg	aag	act	aag	caa	gaa	ttc	aga	gct	aaa	tac	tcc		2603
Lys	Lys	Val	Ile	Trp	Lys	Thr	Lys	Gln	Glu	Phe	Arg	Ala	Lys	Tyr	Ser		
			115					120						125			
ttt	cca	aaa	aca	cta	ctt	gca	gac	aac	aag	gta	tat	gat	gat	gat	gat		2651
Phe	Pro	Lys	Thr	Leu	Leu	Ala	Asp	Asn	Lys	Val	Tyr	Asp	Asp	Asp	Asp		
		130					135					140					
act	aat	ccc	aaa	ttt	gtg	atg	gaa	ttc	atc	gat	gct	gtt	gtg	ggg	aat		2699
Thr	Asn	Pro	Lys	Phe	Val	Met	Glu	Phe	Ile	Asp	Ala	Val	Val	Gly	Asn		
	145					150					155						
ctc	aat	gtt	cta	gtc	aag	atc	aat	gat	cca	tct	tca	ttg	ctt	ttt	gtt		2747
Leu	Asn	Val	Leu	Val	Lys	Ile	Asn	Asp	Pro	Ser	Ser	Leu	Leu	Phe	Val		
160					165					170					175		
cca	gga	ccc	aag	gaa	caa	ata	gaa	caa	gtg	tta	aag	gag	ttg	aag	tta		2795
Pro	Gly	Pro	Lys	Glu	Gln	Ile	Glu	Gln	Val	Leu	Lys	Glu	Leu	Lys	Leu		
				180					185					190			
ttg	aga	ttt	ttt	gtc	tgc	ttt	gtt	tca	aac	aaa	tgt	ata	gag	cct	caa		2843
Leu	Arg	Phe	Phe	Val	Cys	Phe	Val	Ser	Asn	Lys	Cys	Ile	Glu	Pro	Gln		
			195					200					205				
tac	caa	cat	act	act	ttt	tat	act	cac	gct	tta	att	gag	gct	agc	cac		2891
Tyr	Gln	His	Thr	Thr	Phe	Tyr	Thr	His	Ala	Leu	Ile	Glu	Ala	Ser	His		

210	215	220	
atc gca atg gtt gtg tgg ttg aat ttg cca atc tat gga aac aga aat Ile Ala Met Val Val Trp Leu Asn Leu Pro Ile Tyr Gly Asn Arg Asn 225 230 235			2939
caa gac ttg gct tca agt gaa gtt agt tgt ttg ctt tct gat ttc atg Gln Asp Leu Ala Ser Ser Glu Val Ser Cys Leu Leu Ser Asp Phe Met 240 245 250 255			2987
gaa atg aag att aag tcc att cag cca gac atc agc cgc aac aat att Glu Met Lys Ile Lys Ser Ile Gln Pro Asp Ile Ser Arg Asn Asn Ile 260 265 270			3035
tat att gat gtc ttg agg gcg ttg aag tca acc ata cca caa gct caa Tyr Ile Asp Val Leu Arg Ala Leu Lys Ser Thr Ile Pro Gln Ala Gln 275 280 285			3083
gat aag cat gct gct gag agt ggc att gtg gag act cca aca cac aat Asp Lys His Ala Ala Glu Ser Gly Ile Val Glu Thr Pro Thr His Asn 290 295 300			3131
ctg atg gtt ggt ttg agt gat caa atg gcc aac ctt cag gag atg ctc Leu Met Val Gly Leu Ser Asp Gln Met Ala Asn Leu Gln Glu Met Leu 305 310 315			3179
tgc ctt cta aga gac aat ctc att cat ctg cca ata cta gat ctg gaa Cys Leu Leu Arg Asp Asn Leu Ile His Leu Pro Ile Leu Asp Leu Glu 320 325 330 335			3227
ttt cat ctt caa gat atg gat tct gtt att gtt gat gcc gga ctt ctt Phe His Leu Gln Asp Met Asp Ser Val Ile Val Asp Ala Gly Leu Leu 340 345 350			3275
att tac tca tta tat gat atc aag ggg cag aag gaa gac aca aca ttg Ile Tyr Ser Leu Tyr Asp Ile Lys Gly Gln Lys Glu Asp Thr Thr Leu 355 360 365			3323
gag gat atc aac cag gca ctt ggt ttt gat ctt ccc aga aac att gag Glu Asp Ile Asn Gln Ala Leu Gly Phe Asp Leu Pro Arg Asn Ile Glu 370 375 380			3371
cct atc aag gca atg atc aac ctt gtc atg caa aag gca ttt caa tgt Pro Ile Lys Ala Met Ile Asn Leu Val Met Gln Lys Ala Phe Gln Cys 385 390 395			3419
aac ttg cca agg att cat gga cta ggt tat gtc gat ttt cta ttg aaa Asn Leu Pro Arg Ile His Gly Leu Gly Tyr Val Asp Phe Leu Leu Lys 400 405 410 415			3467

aac ctg aag gat ttc caa ggc cgt tat tca gat tca ctc gat ttc ctc Asn Leu Lys Asp Phe Gln Gly Arg Tyr Ser Asp Ser Leu Asp Phe Leu 420 425 430	3515
aag aat caa ctt caa gtt att caa act gaa ttt gag agc ttg caa cct Lys Asn Gln Leu Gln Val Ile Gln Thr Glu Phe Glu Ser Leu Gln Pro 435 440 445	3563
ttc ttg aag gtt gtc gta gaa gag cca cac aat aag ctc aag aca ctg Phe Leu Lys Val Val Val Glu Glu Pro His Asn Lys Leu Lys Thr Leu 450 455 460	3611
aat gaa gat tgt gct aca cag ata att agg aaa gca tat gag gtg gaa Asn Glu Asp Cys Ala Thr Gln Ile Ile Arg Lys Ala Tyr Glu Val Glu 465 470 475	3659
tat gta gtt gat gct tgt ata aac aaa gag gtt cct cag tgg tgc atc Tyr Val Val Asp Ala Cys Ile Asn Lys Glu Val Pro Gln Trp Cys Ile 480 485 490 495	3707
gag cgt tgg ctc ctg gat atc ata gag gag att act tgt atc aaa gca Glu Arg Trp Leu Leu Asp Ile Ile Glu Glu Ile Thr Cys Ile Lys Ala 500 505 510	3755
aag att cag gaa aag aac acg gtt gag gat aca atg aag act gtc att Lys Ile Gln Glu Lys Asn Thr Val Glu Asp Thr Met Lys Thr Val Ile 515 520 525	3803
gct cgt aca tca tca aaa ctg gca agg act cca agg atg aat gaa gag Ala Arg Thr Ser Ser Lys Leu Ala Arg Thr Pro Arg Met Asn Glu Glu 530 535 540	3851
att gtt ggg ttt gag gat gtc ata gaa aat tta aga aaa aaa cta ctg Ile Val Gly Phe Glu Asp Val Ile Glu Asn Leu Arg Lys Lys Leu Leu 545 550 555	3899
aat gga acc aaa ggg caa gat gtc att tca att cac ggc atg cca ggt Asn Gly Thr Lys Gly Gln Asp Val Ile Ser Ile His Gly Met Pro Gly 560 565 570 575	3947
tta ggt aag acg act tta gcc aac agt ctc tat tct gac agg tca gtt Leu Gly Lys Thr Thr Leu Ala Asn Ser Leu Tyr Ser Asp Arg Ser Val 580 585 590	3995
ttt tct caa ttt gat att tgt gca caa tgt tgt gtg tct caa gta tat Phe Ser Gln Phe Asp Ile Cys Ala Gln Cys Cys Val Ser Gln Val Tyr 595 600 605	4043

tct tat aag gac tta ata ttg gcc ttg cta cgt gat gct att ggt gag Ser Tyr Lys Asp Leu Ile Leu Ala Leu Leu Arg Asp Ala Ile Gly Glu 610 615 620	4091
ggg tct gtg cgt aga gaa ctt cat gcc aat gaa tta gct gat atg ctt Gly Ser Val Arg Arg Glu Leu His Ala Asn Glu Leu Ala Asp Met Leu 625 630 635	4139
cgc aaa act cta ttg ccc cga agg tac ctt atc ctt gtt gat gac gtg Arg Lys Thr Leu Leu Pro Arg Arg Tyr Leu Ile Leu Val Asp Asp Val 640 645 650 655	4187
tgg gaa aat agt gtt tgg gat gat tta aga ggt tgt ttt cca gat gtc Trp Glu Asn Ser Val Trp Asp Asp Leu Arg Gly Cys Phe Pro Asp Val 660 665 670	4235
aat aac aga agc aga atc att cta aca aca aga cat cat gaa gtt gcc Asn Asn Arg Ser Arg Ile Ile Leu Thr Thr Arg His His Glu Val Ala 675 680 685	4283
aaa tat gct agt gtt cat agt gat ccc ctt cat ctt cgt atg ttt gac Lys Tyr Ala Ser Val His Ser Asp Pro Leu His Leu Arg Met Phe Asp 690 695 700	4331
gaa gtt gaa agt tgg aag ttg ctt gaa aag aaa gtg ttt ggt gaa gaa Glu Val Glu Ser Trp Lys Leu Leu Glu Lys Lys Val Phe Gly Glu Glu 705 710 715	4379
agc tgt tcc cct ctc cta aaa aat gtt ggg cta aga ata gca aaa atg Ser Cys Ser Pro Leu Leu Lys Asn Val Gly Leu Arg Ile Ala Lys Met 720 725 730 735	4427
tgt gga caa cta cct ctt tca att gtt ctg gtg gct ggt att ctg tca Cys Gly Gln Leu Pro Leu Ser Ile Val Leu Val Ala Gly Ile Leu Ser 740 745 750	4475
gag atg gaa aag gaa gta gaa tgt tgg gaa caa gtg gcc aac aat ttg Glu Met Glu Lys Glu Val Glu Cys Trp Glu Gln Val Ala Asn Asn Leu 755 760 765	4523
ggg tcc tac att cac aat gac tca aga gcc att gta gac aaa agt tat Gly Ser Tyr Ile His Asn Asp Ser Arg Ala Ile Val Asp Lys Ser Tyr 770 775 780	4571
cat gtt tta cct tgt cat ctt aag tct tgc ttc ctt tat ttt gga gca His Val Leu Pro Cys His Leu Lys Ser Cys Phe Leu Tyr Phe Gly Ala 785 790 795	4619
ttt tta gaa gat aga gtg att gac att tca agg tta ata agg cta tgg	4667

Phe Leu Glu Asp Arg Val Ile Asp Ile Ser Arg Leu Ile Arg Leu Trp 800	805	810	815	
ata tca gaa gca ttt ata aaa agt agt gaa ggc agg agg ttg gag gat Ile Ser Glu Ala Phe Ile Lys Ser Ser Glu Gly Arg Arg Leu Glu Asp 820	825	830	4715	
ata gca gaa ggt tac ttg gag aat ctt att gga aga aat cta gta atg Ile Ala Glu Gly Tyr Leu Glu Asn Leu Ile Gly Arg Asn Leu Val Met 835	840	845	4763	
gtt act cag agg tcc att tca gat ggt aag gcg aaa gaa tgt cgc ctt Val Thr Gln Arg Ser Ile Ser Asp Gly Lys Ala Lys Glu Cys Arg Leu 850	855	860	4811	
cat gat gta tta ctc gac ttc tgc aag gaa aga gca gct gag gag aat His Asp Val Leu Leu Asp Phe Cys Lys Glu Arg Ala Ala Glu Glu Asn 865	870	875	4859	
ttt cta cta tgg ata aat aggtaatatg ataagtaact gtactttcaa Phe Leu Leu Trp Ile Asn 880	885		4907	
tcaatcaagt atttcaagtt atatctgaaa attaatagata tgattttgct aattgatata			4967	
ttc agg gat cag att acc aaa cct tct tcc tgt gtt tac tct cac aag Arg Asp Gln Ile Thr Lys Pro Ser Ser Cys Val Tyr Ser His Lys 890	895	900	5015	
cag cat gct cac ttg gcc ttc act gaa atg cat aat ctt gta gaa tgg Gln His Ala His Leu Ala Phe Thr Glu Met His Asn Leu Val Glu Trp 905	910	915	5063	
agt gcg tct tgc tca ttt gtt ggc tcg gta gta ctt tcc aat aaa tat Ser Ala Ser Cys Ser Phe Val Gly Ser Val Val Leu Ser Asn Lys Tyr 920	925	930	5111	
gac tca tac ttt tcc act cgt gac ata tcc tca cta cat gat ttt tca Asp Ser Tyr Phe Ser Thr Arg Asp Ile Ser Ser Leu His Asp Phe Ser 935	940	945	5159	
att tca cgc att tta cca aat ttc aag ttt cta aaa gtg tta gat ttg Ile Ser Arg Ile Leu Pro Asn Phe Lys Phe Leu Lys Val Leu Asp Leu 950	955	960	5207	
gaa cac cgg gtt ttt att gat ttt att cca act gag ctt gtt tac ttg Glu His Arg Val Phe Ile Asp Phe Ile Pro Thr Glu Leu Val Tyr Leu 965	970	975	5255	980

aag tat ttt tct gca cac att gaa cag aat tca att cct tca agc ata	5303
Lys Tyr Phe Ser Ala His Ile Glu Gln Asn Ser Ile Pro Ser Ser Ile	
985 990 995	
tcc aat ctt tgg aac ctt gaa act ctt ata tta aaa agt cca ata	5348
Ser Asn Leu Trp Asn Leu Glu Thr Leu Ile Leu Lys Ser Pro Ile	
1000 1005 1010	
tat gcg tta cgt tgc acg cta cta cta cct agt aca gtt tgg gat	5393
Tyr Ala Leu Arg Cys Thr Leu Leu Leu Pro Ser Thr Val Trp Asp	
1015 1020 1025	
atg gtt aaa ttg aga cat ctg tat att cct gac ttc agc aca agg	5438
Met Val Lys Leu Arg His Leu Tyr Ile Pro Asp Phe Ser Thr Arg	
1030 1035 1040	
att gaa gca gca tta ctt gag aac tct gca aaa ctt tat aat ttg	5483
Ile Glu Ala Ala Leu Leu Glu Asn Ser Ala Lys Leu Tyr Asn Leu	
1045 1050 1055	
gaa acc ctt tcc act cta tat ttc tct cgt gtt gag gat gca gaa	5528
Glu Thr Leu Ser Thr Leu Tyr Phe Ser Arg Val Glu Asp Ala Glu	
1060 1065 1070	
ttg atg ctg aga aaa aca cct aat ctt cga aaa ctg ata tgt gaa	5573
Leu Met Leu Arg Lys Thr Pro Asn Leu Arg Lys Leu Ile Cys Glu	
1075 1080 1085	
gtt gaa tgt tta gaa tac ccc cct cag tac cat gtg ttg aat ttt	5618
Val Glu Cys Leu Glu Tyr Pro Pro Gln Tyr His Val Leu Asn Phe	
1090 1095 1100	
cca ata cgg ctt gaa ata cta aag ctt tat cga tca aaa ttt aaa	5663
Pro Ile Arg Leu Glu Ile Leu Lys Leu Tyr Arg Ser Lys Phe Lys	
1105 1110 1115	
acc atc ccc ttt tgc atc tct gca cca aat ctc aaa tac ttg aaa	5708
Thr Ile Pro Phe Cys Ile Ser Ala Pro Asn Leu Lys Tyr Leu Lys	
1120 1125 1130	
ctc tgt ggc ttt tcc ctg gat tct cag tac tta tca gaa act gct	5753
Leu Cys Gly Phe Ser Leu Asp Ser Gln Tyr Leu Ser Glu Thr Ala	
1135 1140 1145	
gat cat ctc aag cac ctt gag gta ctc ata ctg tac aag gtt gaa	5798
Asp His Leu Lys His Leu Glu Val Leu Ile Leu Tyr Lys Val Glu	
1150 1155 1160	
ttt ggt gat cat agg gaa tgg aaa gtg agc aat ggc aag ttc cct	5843

Phe Gly Asp His Arg Glu Trp Lys Val Ser Asn Gly Lys Phe Pro	
1165	1170 1175
caa ctc aaa atc ttg aaa cta gaa tat ttg tcc ttg gtg aaa tgg	5888
Gln Leu Lys Ile Leu Lys Leu Glu Tyr Leu Ser Leu Val Lys Trp	
1180	1185 1190
att gta gct gat gat gcc ttt cct aac ctt gaa caa ttg gtt ttg	5933
Ile Val Ala Asp Asp Ala Phe Pro Asn Leu Glu Gln Leu Val Leu	
1195	1200 1205
cgt gga tgt caa gat ctt atg gag atc cct tct tgt ttc atg gac	5978
Arg Gly Cys Gln Asp Leu Met Glu Ile Pro Ser Cys Phe Met Asp	
1210	1215 1220
atc ctt tct ctc aag tac atc ggg gta gaa tac tgc aat gag tcg	6023
Ile Leu Ser Leu Lys Tyr Ile Gly Val Glu Tyr Cys Asn Glu Ser	
1225	1230 1235
gtt gtc aag tca gcc ttg aat ata caa gaa aca caa gtc gaa gat	6068
Val Val Lys Ser Ala Leu Asn Ile Gln Glu Thr Gln Val Glu Asp	
1240	1245 1250
tat caa aat act aat ttc aag ctc gtt ctc atc g aggtacacta	6112
Tyr Gln Asn Thr Asn Phe Lys Leu Val Leu Ile	
1255	1260
ctgaaaaaag ctttattctg catgattttg atgaatcaga aatcgcctaa atttacaaa	6172
ctgttttctc agttatcttt acctcgtggc ctcgttttac atttgggttc ttctctt	6229
ag ttt tct ttg cag aaa aag gcg tgg aaa tta aat tta act gat	6273
Glu Phe Ser Leu Gln Lys Lys Ala Trp Lys Leu Asn Leu Thr Asp	
1265	1270 1275
gcg gaa gat atg cac aat gca gta aaa aat att ctt gca gaa ata	6318
Ala Glu Asp Met His Asn Ala Val Lys Asn Ile Leu Ala Glu Ile	
1280	1285 1290
aga taggtactac ttttttttt ttctttcctt tttttaata caccaaatag	6371
Arg	
atagattcat ctttttgtc ttttcgatat gaaaggata gaatcagttt catctgatga	6431
gaaagagaag aaacttactg tgaccggaga tgtggatgct gatgaagttc aattagttgt	6491
ggagaaactg agaaagcgtg gcatgccagg gttgtagtcc caacttgtca acacaaatgt	6551

gctatactca ttttgcttac tgtaatacca tttcatgaca cacacacaca aacattaact	6611
gtagtaaagt tttgatggat cagtaaactct gagttcaacc cattgtaatc cgttcaaatt	6671
caactcaaaa aattcccatt gagttattct ttaacagggt atccagagtt tgtagctgga	6731
gcaatttgga atatcacatg taatttcttt atgagttaat tcgtttaata aaagattctg	6791
taaaacgtcc aacggctgtt gcattcattg taaactaaat atatctcagt atgtaactat	6851
tgaacaaatt tttcatttta gtccctgagg tttgatgtaa gtcattagat tttacggatc	6911
ctgaagtgaa tggtttttagc cttttctatt ttcttatgag ttacacaaaa tgttgtgatg	6971
ccactctgct acatgttaga gaaatgagaa tgttagcacc cgagagtatg gcctagcgggt	7031
caatcaatga agcaggtgaa aacaacaaaa gcaaaaaata ctaagagatt tcttcacatc	7091
tatctaagta ccgctaagca aagatactgt aatgaccctc ctggtcattt atgtgtcttg	7151
ccttctgtgt gtcgtttaga gtgttccat agcgaccca agtcatttat gacttgctgg	7211
gactaacggt tcggtcacat ggctgttctg ttggttttgg tgcgagtttt tgtgttttgg	7271
agcttatgaa tcttgaacga tgattttcga tcaaaaattc aagaagatga catcggaatc	7331
catttctaac gattccatca gctccggaag ggtcatttta ggctagtagc ttggtcggca	7391
tgactcccgg tgcgattagg ctttttaact ttaagtttaa gcctaagttt gactttggtc	7451
aacattctga gtaaacgcgc tcggatgaga attccgtcag tgcggtttagc tccggaatgt	7511
caagtttggg ttagattgac ctttcttttg tgtctcgagg tttttgatat ttttcggagc	7571
tcttttggg gttttgactt aaaatggcat ttgggtgtgg aatccacttt ttgtcaagat	7631
gacctcgtat agaaattttg gctgtgccat tgagtccgaa atatcgaatt tgatatgatt	7691
gcatactcgc tttgtgtgca cggggttccg aacgagttcg gagaaccttg tcgcagtttt	7751
taaattttgg ggtaagtgca gaaaaatctg cacttttggg aaaccttaa aacctcatcc	7811
ctctctcacc cctctctcat ctctcaatca tttaggcgat tcgaagtgtg ggaactttgt	7871
atttttgatg gcttcgctgt agagtattca gaagctgttg ggtgcgcgta gttcgaggta	7931
aatctcgtaa aatacctgct gccacgatcc ctttttggg cttgattttg gaattttga	7991
gatttgtttt cttagccatt tttgggtccg tttcagtgat tcttgaggct atcttgagtg	8051

gttttcgag gagagcatcg tgggtgtgtc ggaatttact gtagaccacc catttttgg	8111
aaatatgctg aattaacttc tgtcccattt ctttagtttt tgagaaaaat ttgggttttg	8171
gttgcatggt ggttatgtgt tgtttttgat ccccgaatgg tgtcccatca tggaacacaa	8231
tttggggagc tgtaagaac ctatttttgg ggtaattcc ggagtttcca gcgcgggtcc	8291
cacttctccc gttttgacc cgaaattgat atgtctccgt ttcttgcgat tttagtgtct	8351
aaacgaccgt aataacattg tgactctatt tttgatagcg gggcagcgtt tcgaggccgt	8411
tcggaaaggg aaagctccgg agaagtgatt tttggagcgt gcgtgatctg cccacaagta	8471
gggtatggtt tccctctctt agattgagct tgagagtgtg aatgcatggt gattagtgtg	8531
gatttgggtt ggtagttatt gaatcatgca taggtgttta gaaatcatgt tttggccttt	8591
tcgggaatta tcgggtaact gtgagcatgc tatgtgttac taattgacc tccttgcctat	8651
gtggagtgct tgaatgcttg attactattt atctgaagca tgttgggcct tagtttaggt	8711
ttgactaggg cttgccttag agatgcatga ttccgatttg ataggcctta gttttgccc	8771
cgacgtcgct cggtcgactt agatccatgt agactgggtg agcaacttga gtctgatagt	8831
ttgggcctta gctaggcgat acgcttgctc cgatgataat tatcttcttc ttctttttt	8891
cgttgttacg gcttcacgag ttacgttggc gacattgatt ctgcttcgcg atttgaagtt	8951
gattttttat tcggttccaa ggacttacat tgattggcta agtgtggacg gcgttccacg	9011
gaaatttata agcatggatc gattgagacc ctttcagcag ctacattggc acttatatag	9071
agcatccgat ttaagggtccg gcctctatcg cccaaatact tatatagagc aaccggttta	9131
aggtccggcc tctatcgccc agatacttgt atagagcatc cggttagagg tctggcctca	9191
gttacttgat acttgtgatt ggttacttgg gtacttttgg tgagcatccg gttcgaggtc	9251
cggcctccgt actgtcagat tctactaatt ggggttgaga ttctggttcg atgtttccg	9311
ttcttgggtt cttatatgca attttcttta gttatagtta ttttgtgtac tcatcgggct	9371
tatggggatc cgtttaggtt tttatttaac ttgcgcacga gtgtaccttc tgggcttatg	9431
ggggcccagt taggtgtagt tagcttatag attactttag ttagttcttt ttacacttgt	9491

gtgctttcca tggtttactt agattgtcat tcttgacctc tgtttgtgtt attccttctt 9551
 ttcatattgc ctttactttt caagttcagt cggcctataa tgcatactgg gtacctgttg 9611
 ttttggtact catgctacgc tctgcatctg tttcgtgatg caggtctgag caccagtggc 9671
 cagcgttgat ccagtttggg gtagtctgat cgggagacgg gggtagacac atggcgtttt 9731
 gtactatttc agtctccatc tigtgtatata gacttgtctt ttacctttcg agacagtcca 9791
 atctctgtgg tccacttttg ggacttgtac tcgttttggt agtagctctg tactgggtgac 9851
 ttcttggttc taggagggat ctttatttgt atatatgttt tggttcgctt ccgcctgttt 9911
 atattgttat cataaaattt tgcctactct tgttagtttc taccctcaga cccattactt 9971
 gttattccgg gttacgggtt ggcttaccta ctgggtgggt atagtatgtg ccaccatgac 10031
 tcgagaaatc gggtcgtgac agatacatga tgcctctttg gttggaagaa gcgggtactc 10091
 agtcaaattg tcgaggtgag ctcgacacca tcaataacat cccaaaaaag gaacaatgag 10151
 aaagttacaa atcacaatac atgtccatat gctttggaac taaagaattc aaagcacaca 10211
 atgtatttca ataatctttt atctctgcct gcagttgaat ataccagata tcagatctga 10271
 gacgatgttt aaaaaggaaa ctattattcg accctattcc tttctcaaac ctcgaaacca 10331
 acaccagtta tacaacaata tatgcagaac cctttaacta tatactatat acaaatt 10388

<210> 2

<211> 1293

<212> PRT

<213> 马铃薯

<400> 2

Met Asn Phe Asn Asn Glu Leu Ser Asp Leu Lys Asn Arg Phe Leu Phe
 1 5 10 15

Arg Thr Leu Arg Ala Gln Lys Cys Ser Asp Val Ala Arg Asp Arg Ile
 20 25 30

Asp Phe Phe Ile Trp Glu Leu Lys Phe Leu Asn Cys Phe Leu His Leu
 35 40 45

Gln Ser Phe Ala Phe Ala Ser Glu Cys Gly Met Leu Asp Ile Ser Gln
 50 55 60

Lys Met Ile Glu Ile Cys Lys Arg Phe Asn Thr Pro Pro Pro His Asn
 65 70 75 80
 Ser Phe Ala Tyr Trp Lys Glu Val Ile Cys Lys Arg Leu Cys Ala Ile
 85 90 95
 Ser Ile Gln Pro Asp Ala Ser Ser Asp Asp Gly Phe Ala Cys Trp Lys
 100 105 110
 Lys Val Ile Trp Lys Thr Lys Gln Glu Phe Arg Ala Lys Tyr Ser Phe
 115 120 125
 Pro Lys Thr Leu Leu Ala Asp Asn Lys Val Tyr Asp Asp Asp Asp Thr
 130 135 140
 Asn Pro Lys Phe Val Met Glu Phe Ile Asp Ala Val Val Gly Asn Leu
 145 150 155 160
 Asn Val Leu Val Lys Ile Asn Asp Pro Ser Ser Leu Leu Phe Val Pro
 165 170 175
 Gly Pro Lys Glu Gln Ile Glu Gln Val Leu Lys Glu Leu Lys Leu Leu
 180 185 190
 Arg Phe Phe Val Cys Phe Val Ser Asn Lys Cys Ile Glu Pro Gln Tyr
 195 200 205
 Gln His Thr Thr Phe Tyr Thr His Ala Leu Ile Glu Ala Ser His Ile
 210 215 220
 Ala Met Val Val Trp Leu Asn Leu Pro Ile Tyr Gly Asn Arg Asn Gln
 225 230 235 240
 Asp Leu Ala Ser Ser Glu Val Ser Cys Leu Leu Ser Asp Phe Met Glu
 245 250 255
 Met Lys Ile Lys Ser Ile Gln Pro Asp Ile Ser Arg Asn Asn Ile Tyr
 260 265 270
 Ile Asp Val Leu Arg Ala Leu Lys Ser Thr Ile Pro Gln Ala Gln Asp
 275 280 285
 Lys His Ala Ala Glu Ser Gly Ile Val Glu Thr Pro Thr His Asn Leu
 290 295 300
 Met Val Gly Leu Ser Asp Gln Met Ala Asn Leu Gln Glu Met Leu Cys
 305 310 315 320

Thr Gln Arg Ser Ile Ser Asp Gly Lys Ala Lys Glu Cys Arg Leu His
 850 855 860
 Asp Val Leu Leu Asp Phe Cys Lys Glu Arg Ala Ala Glu Glu Asn Phe
 865 870 875 880
 Leu Leu Trp Ile Asn Arg Asp Gln Ile Thr Lys Pro Ser Ser Cys Val
 885 890 895
 Tyr Ser His Lys Gln His Ala His Leu Ala Phe Thr Glu Met His Asn
 900 905 910
 Leu Val Glu Trp Ser Ala Ser Cys Ser Phe Val Gly Ser Val Val Leu
 915 920 925
 Ser Asn Lys Tyr Asp Ser Tyr Phe Ser Thr Arg Asp Ile Ser Ser Leu
 930 935 940
 His Asp Phe Ser Ile Ser Arg Ile Leu Pro Asn Phe Lys Phe Leu Lys
 945 950 955 960
 Val Leu Asp Leu Glu His Arg Val Phe Ile Asp Phe Ile Pro Thr Glu
 965 970 975
 Leu Val Tyr Leu Lys Tyr Phe Ser Ala His Ile Glu Gln Asn Ser Ile
 980 985 990
 Pro Ser Ser Ile Ser Asn Leu Trp Asn Leu Glu Thr Leu Ile Leu Lys
 995 1000 1005
 Ser Pro Ile Tyr Ala Leu Arg Cys Thr Leu Leu Leu Pro Ser Thr
 1010 1015 1020
 Val Trp Asp Met Val Lys Leu Arg His Leu Tyr Ile Pro Asp Phe
 1025 1030 1035
 Ser Thr Arg Ile Glu Ala Ala Leu Leu Glu Asn Ser Ala Lys Leu
 1040 1045 1050
 Tyr Asn Leu Glu Thr Leu Ser Thr Leu Tyr Phe Ser Arg Val Glu
 1055 1060 1065
 Asp Ala Glu Leu Met Leu Arg Lys Thr Pro Asn Leu Arg Lys Leu
 1070 1075 1080
 Ile Cys Glu Val Glu Cys Leu Glu Tyr Pro Pro Gln Tyr His Val
 1085 1090 1095

Leu Asn Phe Pro Ile Arg Leu Glu Ile Leu Lys Leu Tyr Arg Ser
 1100 1105 1110
 Lys Phe Lys Thr Ile Pro Phe Cys Ile Ser Ala Pro Asn Leu Lys
 1115 1120 1125
 Tyr Leu Lys Leu Cys Gly Phe Ser Leu Asp Ser Gln Tyr Leu Ser
 1130 1135 1140
 Glu Thr Ala Asp His Leu Lys His Leu Glu Val Leu Ile Leu Tyr
 1145 1150 1155
 Lys Val Glu Phe Gly Asp His Arg Glu Trp Lys Val Ser Asn Gly
 1160 1165 1170
 Lys Phe Pro Gln Leu Lys Ile Leu Lys Leu Glu Tyr Leu Ser Leu
 1175 1180 1185
 Val Lys Trp Ile Val Ala Asp Asp Ala Phe Pro Asn Leu Glu Gln
 1190 1195 1200
 Leu Val Leu Arg Gly Cys Gln Asp Leu Met Glu Ile Pro Ser Cys
 1205 1210 1215
 Phe Met Asp Ile Leu Ser Leu Lys Tyr Ile Gly Val Glu Tyr Cys
 1220 1225 1230
 Asn Glu Ser Val Val Lys Ser Ala Leu Asn Ile Gln Glu Thr Gln
 1235 1240 1245
 Val Glu Asp Tyr Gln Asn Thr Asn Phe Lys Leu Val Leu Ile Glu
 1250 1255 1260
 Phe Ser Leu Gln Lys Lys Ala Trp Lys Leu Asn Leu Thr Asp Ala
 1265 1270 1275
 Glu Asp Met His Asn Ala Val Lys Asn Ile Leu Ala Glu Ile Arg
 1280 1285 1290

<210> 3
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 寡核苷酸

 <400> 3

aaacccggtg ttccaaatct aacact	26
<210> 4	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 4	
catgtagtga ggatatgtca cgagtg	26
<210> 5	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 5	
attacaatgg gttgaactca g	21
<210> 6	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 6	
acctctttca attgttctgg tg	22
<210> 7	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 7	
cactcgtgac atatcctcac ta	22

<210> 8
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸

<400> 8
caaccctggc atgccacg

18

<210> 9
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 保守结构域

<400> 9

Gly Leu Pro Leu
1

<210> 10
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 保守结构域

<400> 10

Gln Leu Pro Leu
1

<210> 11
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 保守结构域

<400> 11

Cys Lys Leu Tyr
1

<210> 12

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 保守结构域

<400> 12

Cys Phe Leu Tyr
1

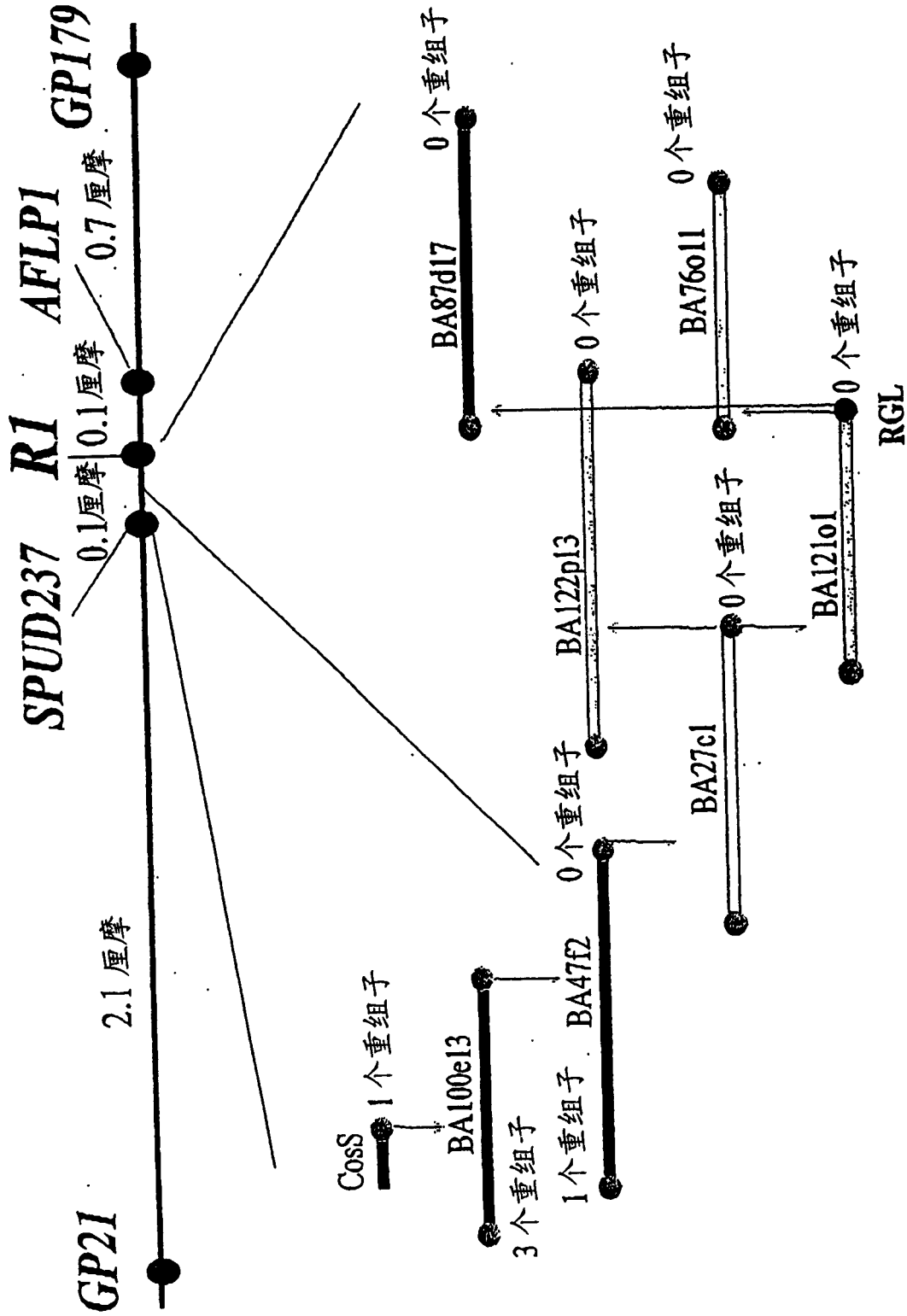


图 1

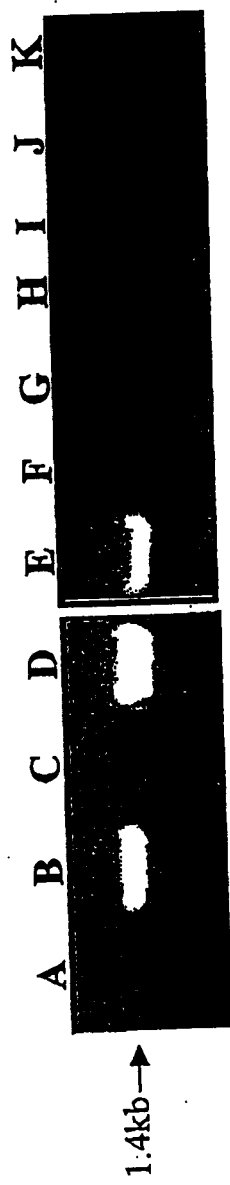


图 2

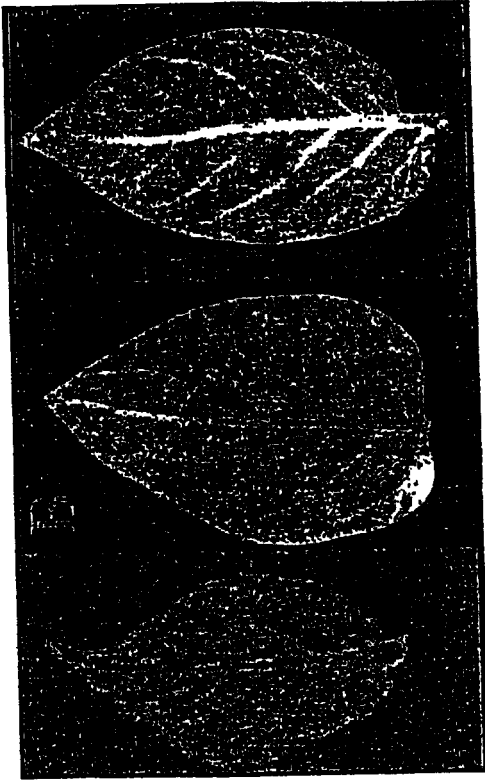


图 3



1 MNFNNELSDL KNRFLFRTLRAQKCSVDYARDRIDFFWELKFLNCFHLQSQ
 51 FAFASECGMLDISQKMEICKRFNTPPHNSFAYWKEVICKRLCAISIQP
 101 DASSDDGFACWKKYWKTKQEFRAKYSFKLLADNKVYD DDDTNPKFVVM
 151 EFIDAVVGNL NVLVKINDPS SLLFVPGPKEQIEQVLKELKLLRFFVCFVYS
 201 NKCFYQYQH TIFYTHALIEASHLAVVWLNLPIYGNRNQDLASSEVSCL
 251 LSDFMEMKIKSIQPDISRNNIYDVLRALKSTIQAQDKHAAESGIVEIP
 301 THNLMVGLSDOMANLQEMLC LLRDNLHLP LDLEFHLQD MDSVIVDAGL
 351 LIYSLYDIKG QKEDTILEDI NQALGFDLPRNBIPIKAMINLVMQKAFQCN
 401 LPRIHGLGYVDFLLKNLKDFQCRYSDSLDFLKNQLQVIQTEFESLQFFLK
 451 VVVEPHNKLKTLNEDCATQIIRKAYEVEYVVDACINKEVPOWCIERWLL
 501 DIEBITCIKAKIQEKNTVE DTKTYIARTSSKLARTPRMNEEIVGFEDV
 551 IENLRKLLN GTKGQDVISI HGMFGLGKITT LANSLYSDRS VFSQFDICAQ
 601 CCYSQVYSYKDLILALLRDAIGESVREELHANELADMRLKTLPRRYLI
 651 LVDDVWENSVDWDDLRCCEPDVNNRSYDLTTRHHEBVAKYASVHSDPLHLR
 701 MPDBVESWKLLEKKVFGESCSPLKKNVGLRIAKMCGOLPLSIVLVAGIL
 751 SEMEKVBECEQVANNLGSYIHNSRAIVDKSYHVLPCHLKSCFLYFGAF
 801 LEDRVIDISR LIRLWTEAFIKSEGRRLDIAEGYLENLIGRNLVMTIQ
 851 RSISDGKAKECRLLHDVLLDFCKERAEEENFLWNRDQITKPSSCYTSHK
 901 QHAHLAFTEMHNLVEWSASC SFYGSYVLSNKDYSYFSTRD ISSLHDFSS
 951 RILPNFKFLK VLDLEHRVFI DFPTELYLKYFAHIEQN SIPSSISMLW
 1001 NLETILAKSP IYALRCTLLL PSTVWDMVKL RHLIYDFST RIEAALLENS
 1051 AKLYNLSTLS TLYFSRVEDA ELMLRKTPLN RKLICEVECL EYPPQYHVLN
 1101 FPIRLKILKLYRSKFKTIPFCISAPNLKYLKLCGFSLDSQYLSETADHLK
 1151 HLEVLLLYKVEFGDHRHWKY SNGKFPQLKILKLEYLSLVK WYVADDAFPN
 1201 LEQVLRGCQDLMEIPSCFM DILSLKYIGV EYCNESVTKS ALNIQETQYE
 1251 DYQNTNFKLYLIEFSLQKKA WKLNLTDAEDMHNNAVKNILA EIR*

图 4

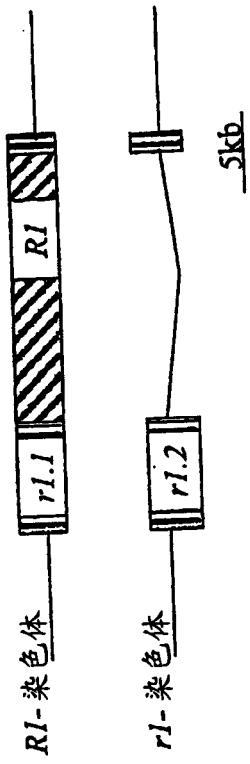


图 5

专利名称(译)	来源于植物的抗性基因		
公开(公告)号	CN1555414A	公开(公告)日	2004-12-15
申请号	CN02817065.2	申请日	2002-08-30
[标]申请(专利权)人(译)	马克思-普朗克科学促进协会		
[标]发明人	克里斯蒂安娜格布哈特 阿吉姆巴鲁沃拉 玛利亚拉法埃莱埃尔科拉诺 朱利亚维斯 弗朗西斯科萨拉米尼		
发明人	克里斯蒂安娜·格布哈特 阿吉姆·巴鲁沃拉 玛利亚·拉法埃莱·埃尔科拉诺 朱利亚·维斯 弗朗西斯科·萨拉米尼		
IPC分类号	A01H A01H1/00 A01H4/00 A01H5/00 C07H21/04 C07K14/415 C07K16/16 C12N5/04 C12N5/10 C12N9/24 C12N15/29 C12N15/63 C12N15/82 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/415 C12N15/8282		
优先权	2001120670 2001-08-31 EP		
其他公开文献	CN1555414B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了编码能赋予抗植物病原体如真菌(例如致病疫霉菌和相关分离株)抗性或被其引发的多肽的核酸分子。优选的核酸分子编码马铃薯(*Solanum tuberosum*)的R1或其天然产生的多种同源物或其多种衍生物。本发明还公开了通过使用R1抗性基因激活抗性的特殊方法,其在某些情况下导致过敏反应。本发明的另一方面包括特异性引物、载体、宿主细胞、多肽、抗体、适体、转基因植物、制备和利用这些物质的方法以及在植物中影响抗性性状的方法。另外,本发明还提供了鉴定和获得植物保护性化合物的筛选方法。