

尊敬的国家知识产权局及审查员：

您好！

白花虎眼万年青矮化多分蘖基因 **OtDWARF53** 具有转基因植株株型改变明显、表型显著突出、功能强大、创新性强等特点，对于科研和生产均具有较高的价值意义，只是由于该基因序列有点长，申请人在撰写申请书过程中采用格式上有所不同，所以产生了不必要的误解，现将相关的问题一一进行详细科学的回复，并将该基因序列用新的格式的序列表一一列出，然后举出该专利完成能够实现的实验数据及科研证据，以及阐明科学依据，恳请您给予指导和帮助：

**问题一：**关于“本申请说明书、说明书核苷酸和氨基酸序列表以及核苷酸和氨基酸序列计算机可读载体三份文件中都没有记载 SEQ ID NO.1 的核苷酸序列”的问题；

**回复一：**本说明书中有 SEQ ID NO.1 的核苷酸序列，在序列表第一到第五页，即“<213> 白花虎眼万年青(*Ornithogalum thyrsoides*)<400> 1”下面的序列就是 SEQ ID NO.1 的核苷酸序列

**问题二：**“上游引物 SEQ ID NO.3 翻译后的氨基酸序列为 MPTPVSSAR，SEQ ID NO.2 第 1-11 位所示的氨基酸序列为 METPTPVSSAR，两者并不匹配，由 SEQ ID NO.3 和 SEQ ID NO.4 所示的引物无法扩增获得 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列”，

**回复二：**(1) 因为“atgccgacaccgggtcagtagcgcgcggc”中的 ATG 是起始密码子，真核生物的起始密码子 AUG 翻译对应的是甲硫氨酸(Met)用三个字母表示 Met，用一个字母表示就是 M,所以实际上是一样的，完全匹配；

(2) 用 **Primer 5** 软件将 SEQ ID NO.3 的序列“atgccgacaccgggtcagtagcgcgcggc”与该基因的编码区进行比对，可以发现可以完全匹配上，将 SEQ ID NO.4 的序列“atccaaaataatcctggaaggaagaag”进行反向互补后，也用 **Primer 5** 软件进行比对，也可以与原序列完全重合，就说明用这两条引物能够从白花虎眼万年青的 cDNA 模板中扩增出该基因的，在实际实验中，申请人用这两条引物也扩增出了该基因的编码区，见图 1 和图 2；

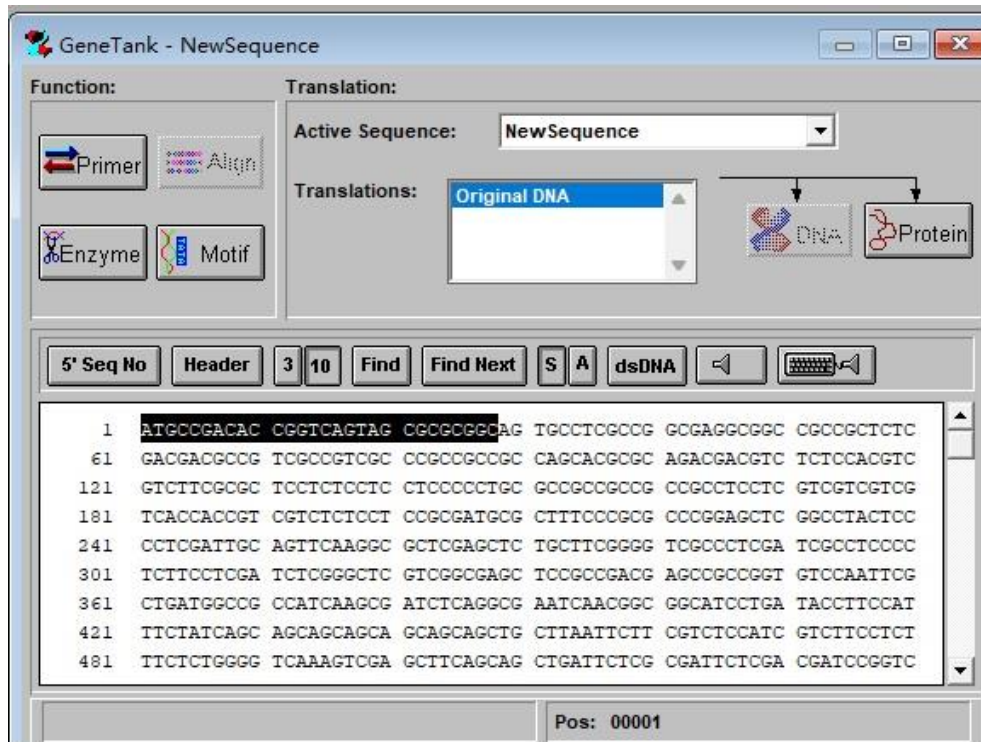


图 1 SEQ ID NO.3 正向引物与 DWARF53 编码区比对图

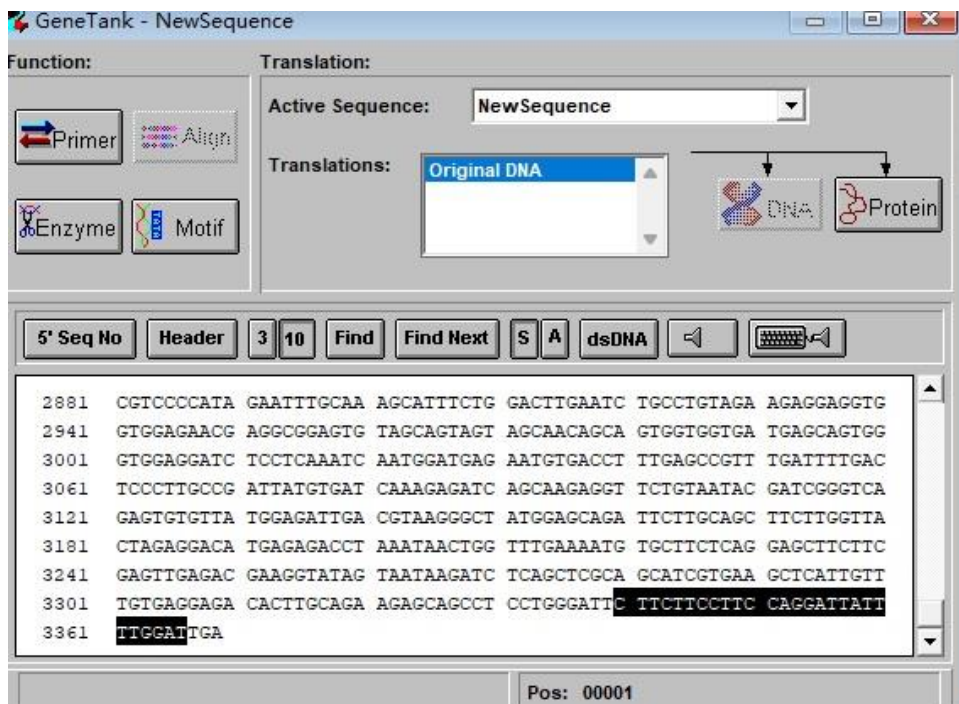


图 2 SEQ ID NO.4 反向引物与 DWARF53 编码区比对图

问题三：“将上述引物对与现有技术中的基因序列进行“primer-blast”，并不能获得现有技术中已经公开的任意与矮化多分蘖相关的编码基因，对 SEQ ID NO.2 进

行检索，也无法获得现有技术中已经公开的与矮化多分蘖相关基因编码区的所示的氨基酸序列”；

**回复三：**矮化多分蘖 **DWARF53** 一般都比较长，在 3000-4000 多，而所用的正向和反向引物仅有二十多个碱基，所占比例甚少，仅仅占编码区的约二十分之一，且不在该基因所编码的氨基酸的保守区域，所以一般无法比对出相关同源基因，而将其编码区的核苷酸 3369 个及对应的氨基酸 1123 个在 NCBI 上进行 Blast 比对，就完全可以比对出该基因的同源基因，且相似性较高，核苷酸 66%到 75%，见图 3-4；氨基酸也有 40%到 58%，见图 5-6，需要说明的是 **SMAX-LIKE** 为公认的分枝相关的基因，且研究已经表明，与水稻矮化多分蘖 **DWARF53** 基因非常相近；

并将其进行蛋白质保守序列分析表明，完全含有典型的保守序列，应含有的典型的保守区域，包括四个较大的保守区域：一个保守的 **N** 结构域（长细下划线表示）、一个 **D1 ATPase** 结构域（粗长矩圆形）、一个较长的 **M** 结构域（细长矩圆形）以及一个 **D2 ATPase** 结构域（粗长矩形），以及六个较小的保守位点：**WalkerA** 和 **WalkerB**（分别含有两个，矩形表示）、**GYVG loop**（矩圆形）和 **EAR motif**（矩圆形）等，见图 7；并在系统发育上，与油棕、野蕉、海枣及水稻等物种的 **DWARF53** 基因亲缘关系较近，可以证明其为 **DWARF53** 基因的同源基因；

特别说明的是将白花虎眼万年青 **OtDWARF53** 转烟草出现了植株严重矮化、多分蘖及叶片边缘波浪状表型（图 1-2），而水稻、玉米、豌豆和小麦等植物的 **DWARF53** 也出现了植株矮化、多分蘖及叶片变形等相似的表型，也可以说明其为同源基因，及有相似的作用机理！

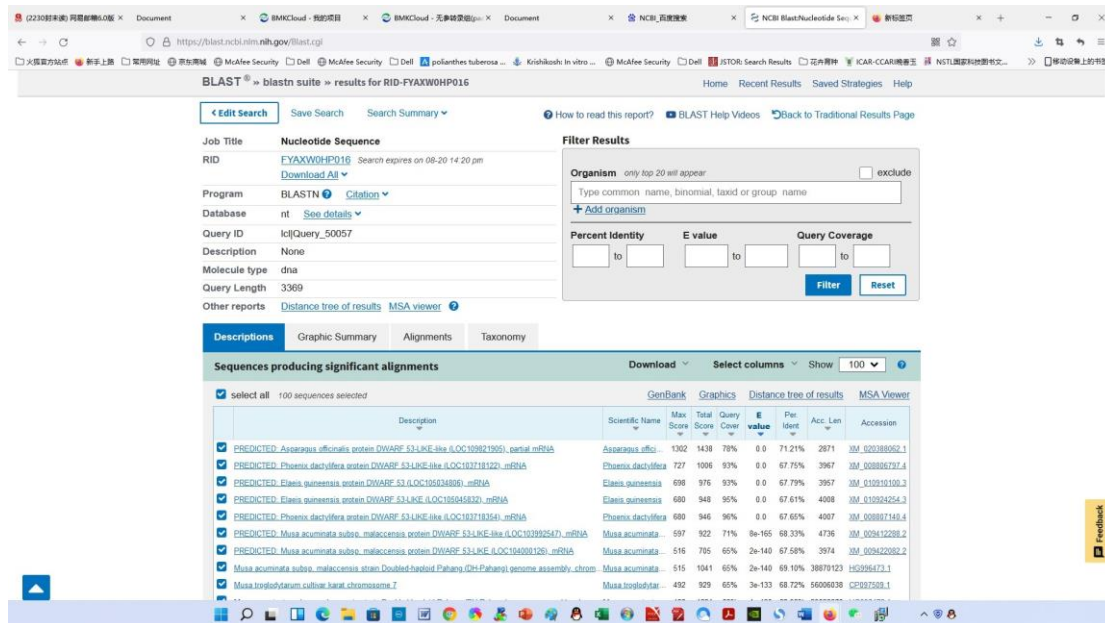


图 3 白花虎眼万年青编码的核苷酸序列 3369 在 NCBI 上 BLAST 比对结果一

|  |                     |     |     |     |        |        |          |                |
|--|---------------------|-----|-----|-----|--------|--------|----------|----------------|
| <div><div></div><div>PREDICTED: Musa acuminata subsp. malaccensis protein DWARF 53-LIKE-like (LOC103969547). mRNA</div></div>          | Musa acuminata ...  | 405 | 881 | 57% | 3e-107 | 69.56% | 4286     | XM_009383108.2 |
| <div><div></div><div>Ananas comosus var. bracteatus genome assembly chromosome 1</div></div>   | Ananas comosu ...   | 389 | 475 | 24% | 2e-102 | 70.52% | 17006997 | LR862129.1     |
| <div><div></div><div>PREDICTED: Zingiber officinale protein DWARF 53-LIKE-like (LOC121988978). mRNA</div></div>                        | Zingiber officinale | 389 | 467 | 46% | 2e-102 | 67.01% | 4213     | XM_042542732.1 |
| <div><div></div><div>PREDICTED: Zingiber officinale protein DWARF 53-LIKE-like (LOC121997924). mRNA</div></div>                        | Zingiber officinale | 384 | 467 | 53% | 9e-101 | 66.93% | 4234     | XM_042562597.1 |
| <div><div></div><div>PREDICTED: Zingiber officinale protein DWARF 53-LIKE-like (LOC122019665). mRNA</div></div>                        | Zingiber officinale | 379 | 379 | 38% | 4e-99  | 66.86% | 3923     | XM_042677120.1 |
| <div><div></div><div>PREDICTED: Zingiber officinale protein DWARF 53-LIKE-like (LOC1220222764). mRNA</div></div>                       | Zingiber officinale | 371 | 525 | 38% | 6e-97  | 69.47% | 3934     | XM_042580871.1 |
| <div><div></div><div>PREDICTED: Zingiber officinale protein DWARF 53-LIKE-like (LOC121967804). mRNA</div></div>                        | Zingiber officinale | 352 | 556 | 55% | 2e-91  | 66.57% | 4050     | XM_042518256.1 |
| <div><div></div><div>PREDICTED: Zingiber officinale protein DWARF 53-LIKE-like (LOC122053022). mRNA</div></div>                        | Zingiber officinale | 340 | 548 | 55% | 1e-87  | 66.47% | 4299     | XM_042614845.1 |
| <div><div></div><div>PREDICTED: Zingiber officinale protein DWARF 53-LIKE-like (LOC121969231). transcript variant X2. mRNA</div></div> | Zingiber officinale | 310 | 467 | 45% | 2e-78  | 67.78% | 3680     | XM_042519197.1 |
| <div><div></div><div>PREDICTED: Zingiber officinale protein DWARF 53-LIKE-like (LOC121969231). transcript variant X1. mRNA</div></div> | Zingiber officinale | 310 | 467 | 45% | 2e-78  | 67.78% | 3689     | XM_042519196.1 |
| <div><div></div><div>PREDICTED: Zingiber officinale protein DWARF 53-LIKE-like (LOC122055344). transcript variant X2. mRNA</div></div> | Zingiber officinale | 305 | 531 | 44% | 7e-77  | 70.39% | 3824     | XM_042616728.1 |
| <div><div></div><div>PREDICTED: Zingiber officinale protein DWARF 53-LIKE-like (LOC122055344). transcript variant X1. mRNA</div></div> | Zingiber officinale | 305 | 533 | 44% | 7e-77  | 70.39% | 3827     | XM_042616727.1 |
| <div><div></div><div>Ananas comosus genome assembly chromosome 13</div></div>  | Ananas comosus      | 291 | 374 | 24% | 5e-73  | 68.81% | 11759267 | LR828293.1     |
| <div><div></div><div>PREDICTED: Brachypodium distachyon protein DWARF 53 (LOC100846733). mRNA</div></div>                              | Brachypodium di...  | 279 | 342 | 22% | 3e-69  | 69.59% | 3944     | XM_003577849.4 |
| <div><div></div><div>PREDICTED: Ananas comosus protein DWARF 53-LIKE-like (LOC109719676). mRNA</div></div>                             | Ananas comosus      | 269 | 392 | 26% | 5e-66  | 68.39% | 3712     | XM_020246457.1 |
| <div><div></div><div>Ananas comosus var. bracteatus genome assembly chromosome 7</div></div>   | Ananas comosu ...   | 240 | 240 | 10% | 3e-57  | 75.00% | 25559796 | LR862135.1     |
| <div><div></div><div>Ananas comosus var. bracteatus genome assembly chromosome 17</div></div>  | Ananas comosu ...   | 235 | 354 | 14% | 3e-56  | 74.93% | 22565093 | LR862145.1     |
| <div><div></div><div>Ananas comosus var. bracteatus genome assembly chromosome 5</div></div>   | Ananas comosu ...   | 235 | 509 | 10% | 3e-56  | 74.73% | 18411140 | LR862133.1     |
| <div><div></div><div>PREDICTED: Dioscorea cayenensis subsp. rotundata protein DWARF 53-LIKE-like (LOC120268903). mRNA</div></div>      | Dioscorea cayen...  | 232 | 632 | 58% | 4e-55  | 67.01% | 3418     | XM_039276164.1 |
| <div><div></div><div>Ananas comosus var. bracteatus genome assembly chromosome 12</div></div>  | Ananas comosu ...   | 232 | 290 | 14% | 4e-55  | 74.73% | 12166499 | LR862140.1     |
| <div><div></div><div>PREDICTED: Asparagus officinalis uncharacterized LOC109844163 (LOC109844163). ncRNA</div></div>                   | Asparagus offici... | 215 | 215 | 7%  | 3e-50  | 78.74% | 951      | XR_002247884.1 |
| <div><div></div><div>PREDICTED: Triticum aestivum protein DWARF 53-LIKE-like (LOC123111423). mRNA</div></div>                          | Triticum aestivum   | 213 | 280 | 20% | 4e-49  | 66.89% | 4207     | XM_044532218.1 |
| <div><div></div><div>PREDICTED: Triticum dicoccoides protein DWARF 53-LIKE-like (LOC119308535). mRNA</div></div>                       | Triticum dicocco... | 213 | 280 | 20% | 4e-49  | 66.89% | 4342     | XM_037584663.1 |
| <div><div></div><div>PREDICTED: Setaria italica protein DWARF 53 (LOC101776824). mRNA</div></div>                                      | Setaria italica     | 211 | 211 | 19% | 1e-48  | 67.16% | 3946     | XM_014805549.2 |

图 4 白花虎眼万年青编码的核苷酸序列 3369 在 NCBI 上 BLAST 比对结果二



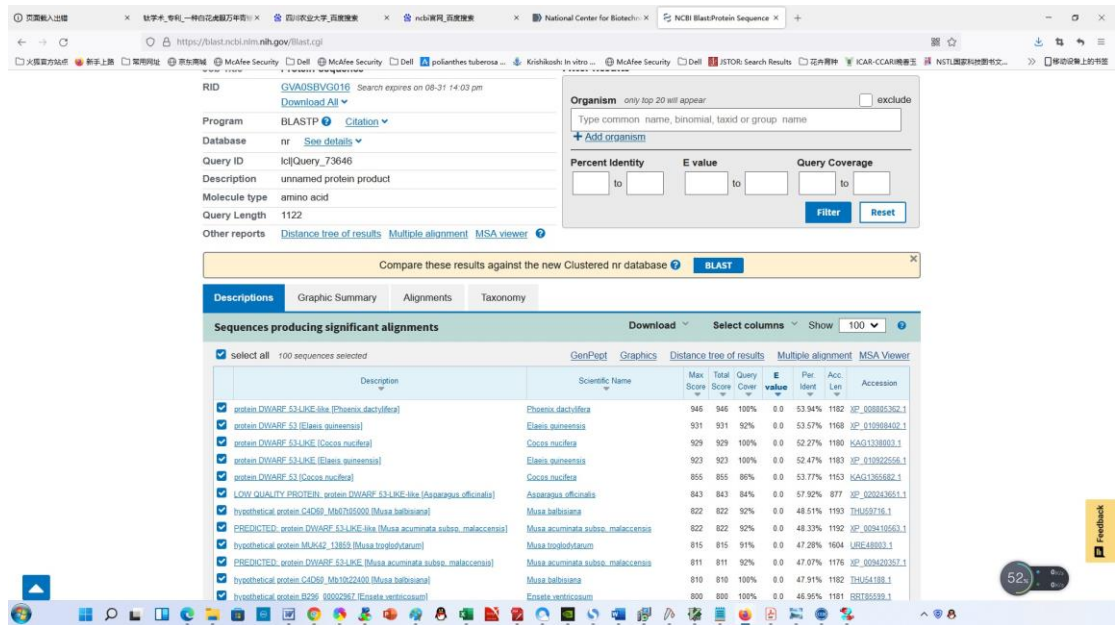


图 5 白花虎眼万年青编码的氨基酸序列 1123 在 NCBI 上 BLAST 比对结果一

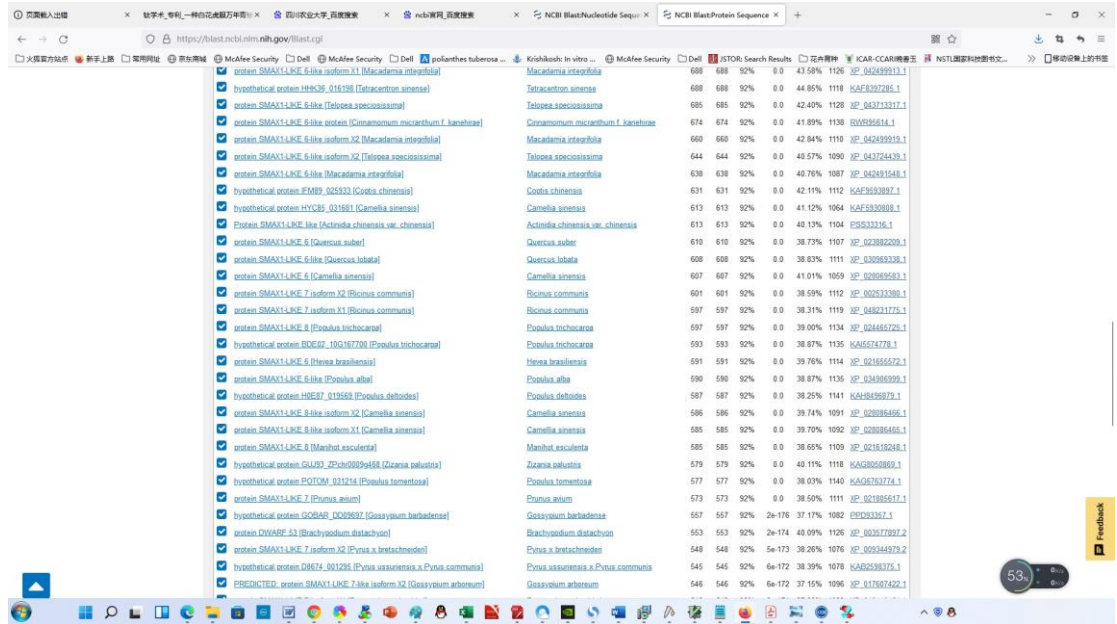


图 6 白花虎眼万年青编码的氨基酸序列 1123 在 NCBI 上 BLAST 比对结果二

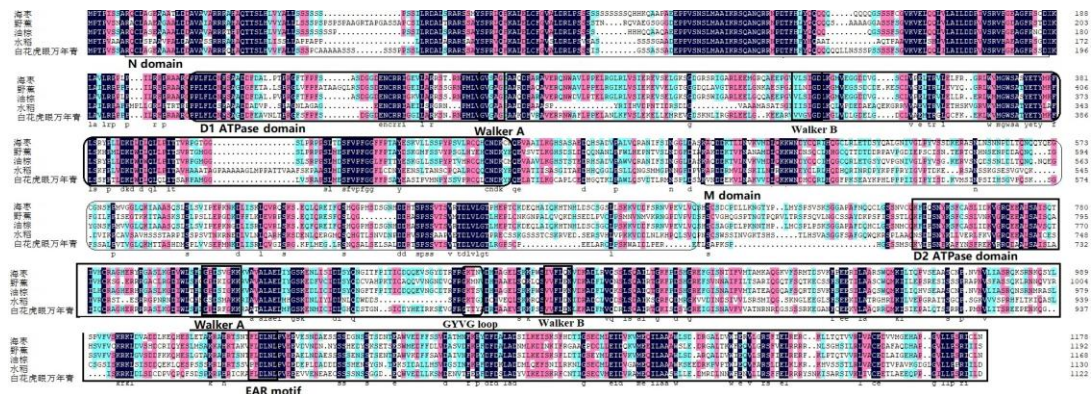


图 6 白花虎眼万年青 *OtDWARF53* 氨基酸序列与水稻、玉米的同源基因比对，完全含有典型的保守序列，应含有的典型的保守区域，包括四个较大的保守区域：一个保守的 N 结构域（长细下划线表示）、一个 D1 ATPase 结构域（粗长矩圆形）、一个较长的 M 结构域（细长矩圆形）以及一个 D2 ATPase 结构域（粗长矩形），以及六个较小的保守位点：WalkerA 和 WalkerB（分别含有两个，矩形表示）、GYVG loop（矩圆形）和 EAR motif（矩圆形）等；可以证明其为 *DWARF53* 基因的同源基因（同源基因种类及登录号分别为：水稻:KF623088.1；野蕉:XM\_009412288；海棠:XM\_008806797；油棕:XM\_010910100）

**问题四：**“本申请说明书记载了 OtDWARF53 基因编码区长度为 3369bp，序列为 SEQ ID NO.1 所示，所编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示，包括 1123 个氨基酸的开放阅读框 ORF。然而，说明书核苷酸和氨基酸表以及核苷酸和氨基酸列表计算机可读载体中，SEQ ID NO.2 序列的实际长度为 1172，也与说明书记载的不一致，SEQ ID NO.4-6 记载的引物序列与说明书中记载的引物序列也不匹配”

回复四：本说明书的第五页到第九页“<210>2 和 <400> 2 中所编码的氨基酸的长度是为 1123 个的，可见第九页末尾中的

“1096 Val Lys Leu Ile Val Cys Glu Glu Thr Leu Ala Glu Glu Gln Pro  
1100 1105 1110

1111 Pro Gly Ile Leu Leu Pro Ser Arg Ile Ile Leu Asp \*\*\*”确为1123个,

并且 SEQ ID NO.4-6 记载的引物序列与说明书中记载的引物序列也吻合的，  
如<400> 5

accactctctgtctcAAGCTTATGCCGACACCGGTCAGTAGC 42  
<400> 6

ggtcaggatactagtGGATCCATCCAAAATAATCCTGGAAG 42

即 SEQ ID NO.5-6 中构建植物载体的无缝融合的引物与扩增编码区的引物 SEQ ID NO.3-4 (<400> 3 “ atgccgacaccggtcagtagcgcgcggc”和<400> 4

“atccaaaataatcctggaagaagaag”，分别是根据目的基因的起始密码子和终止密码子来设计)，在目的基因特有的序列上是相同的，吻合一致的，也是根据目的基因的起始密码子和终止密码子来设计，只是在此用了大写字母，而在其 5'端添加了植物表达载体的序列（用小写字母表示）和酶切位点（用大写斜体表示），是为了构建表达载体的需要！

##### 五：白花虎眼万年青 OtDWARF53 基因的功能说明：

将白花虎眼万年青 OtDWARF53 转烟草出现了植株严重矮化、多分蘖及叶片边缘波浪状表型（图 1-2），而水稻、玉米、豌豆和小麦等植物的 DWARF53 也出现了植株矮化、多分蘖及叶片变形等相似的表型，也可以说明其为同源基因，及有相似的作用机理！

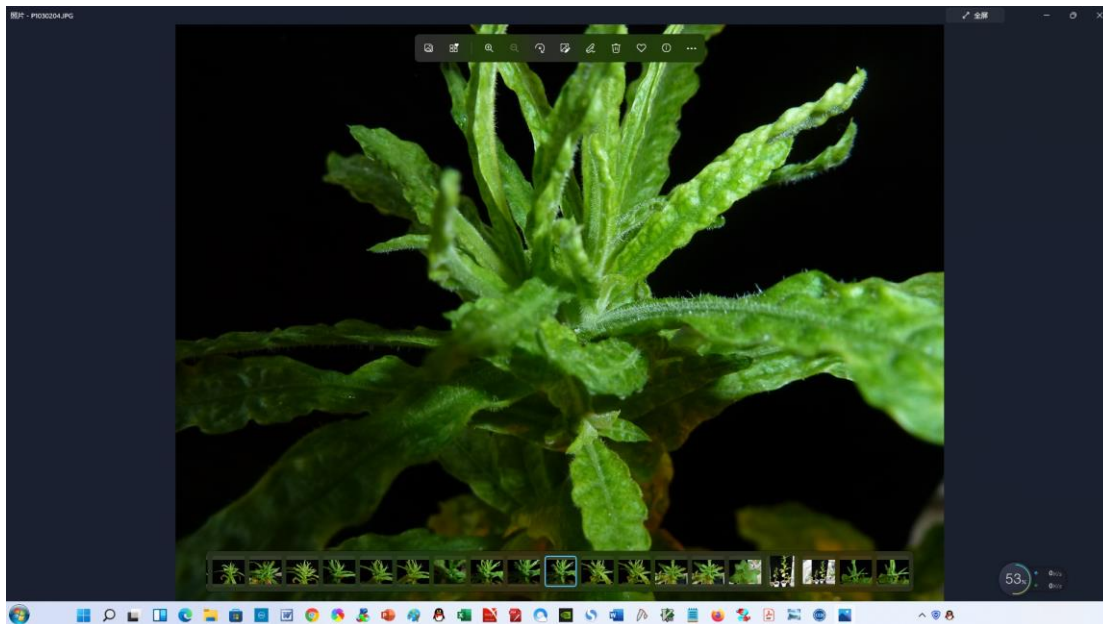


图 1 白花虎眼万年青 OtDWARF53 转基因烟草多分蘖且叶片边缘波浪状





图 2 白花虎眼万年青 OtDWARF53 转基因烟草植物严重矮化且多分蘖

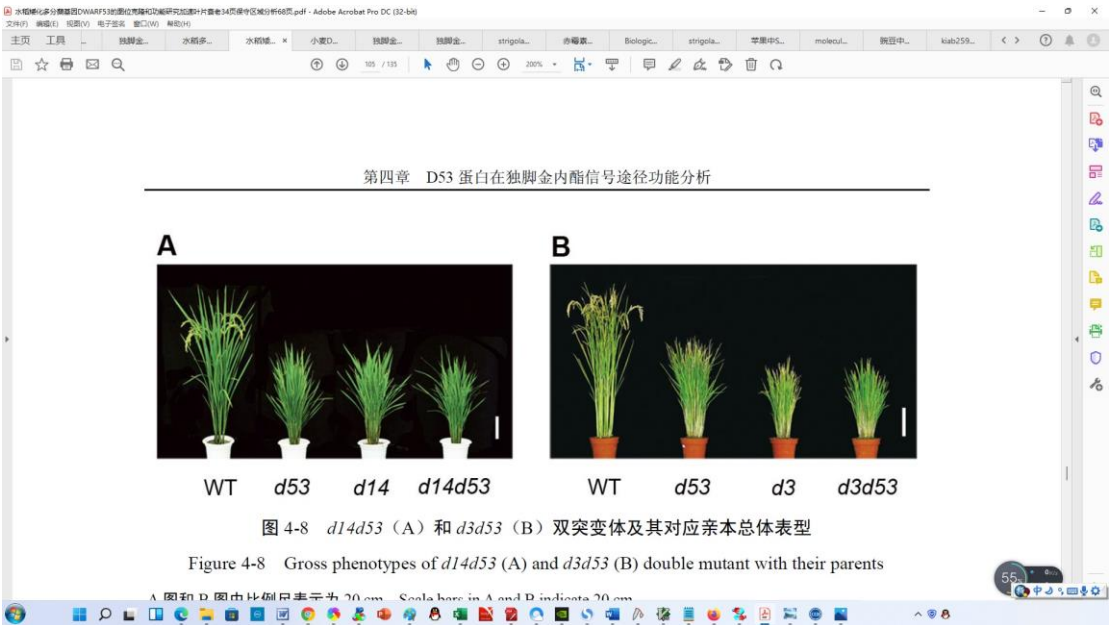


图 3 水稻 DWARF53 基因同源转化表型

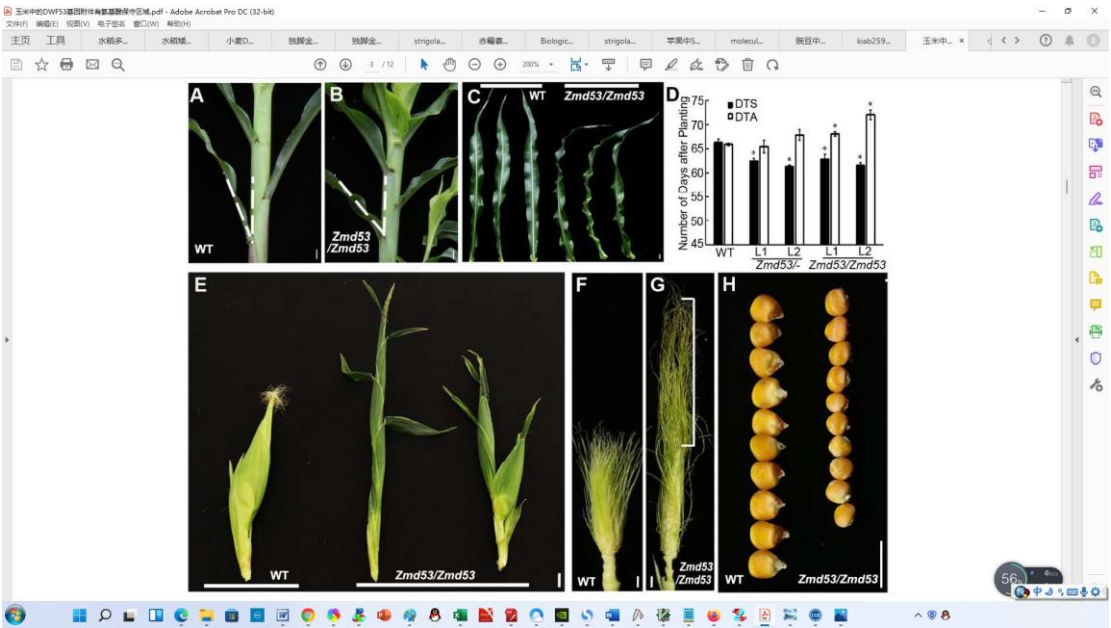


图 4 玉米 DWARF53 基因同源转化表型



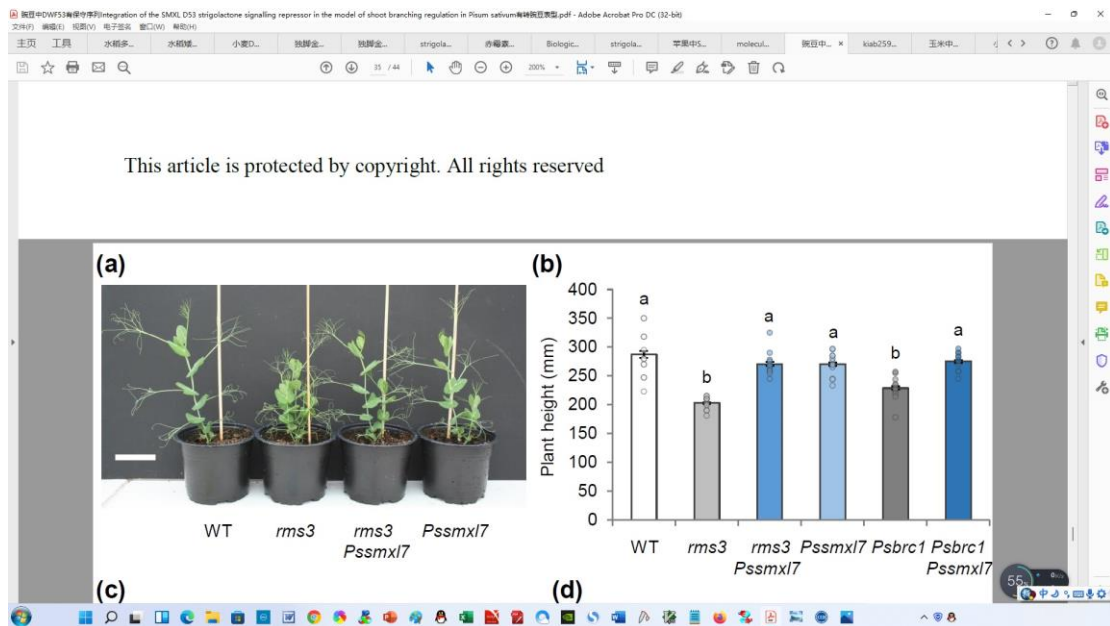


图 5 豌豆 DWARF53 基因同源转化表型

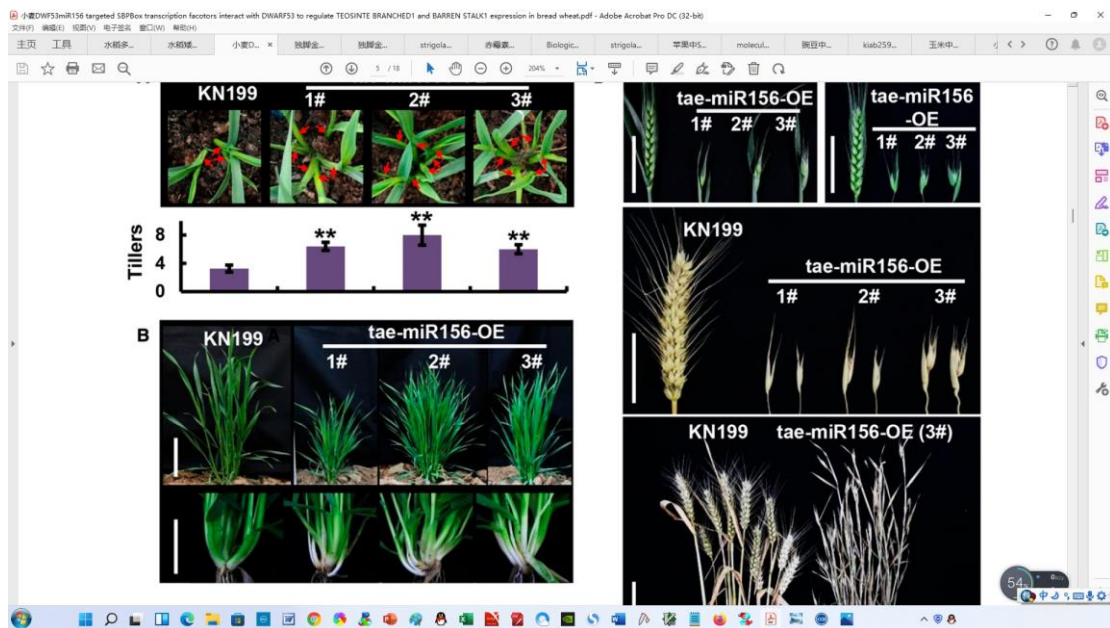


图 6 小麦 DWARF53 及其相关基因同源转化表型

白花虎眼万年青矮化多分蘖基因 *OtDWARF53* 实现发明专利的实验证据和科学依据：

#### (1) DWARF53 基因的生物信息学研究证据：

首先，申请人将白花虎眼万年青 *OtDWARF53* 的完整编码区序列，在美国生物信息中心 NCB 上进行 Blast 同源序列比对，可以显示其出水稻、油棕、野蕉、海枣、小米、菠萝等多个物种 DWARF53 基因同源性均较高；

然后, 申请人进行白花虎眼万年青 OtDWARF53 的氨基酸保守序列分析及系统发育树构建等生物信息学研究结果表明, 其与与水稻等植物的 DWARF53 基因相似性和同源性很高, 并含有该基因所编码的蛋白质所应含有的典型的保守区域, 如一个保守的 N 结构域、一个 D1 ATPase 结构域、一个较长的 M 结构域以及一个 D2 ATPase 结构域; 并在系统发育上, 与油棕、野蕉、海枣及水稻等物种的 DWARF53 基因亲缘关键较近, 可以证明其为 DWARF53 基因的同源基因;

**(2) 转基因烟草表现分析的实验证据: 植株株型叶形改变明显、表型显著突出、功能强大:**

首先, 转基因烟草株型改变明显 (与野生型相比): 出现了节间长度和植株高度显著缩短、植株严重矮化、叶腋分蘖增多、植株顶端优势明显丧失、茎尖多分叉、茎尖从仅有一个单一顶芽到出现多个顶芽等特别突出的表型; 水稻和玉米的 DWARF53 基因各自同源转化所获得的水稻和玉米均产生了植株矮小和侧枝分蘖增多等表型, 证明上述基因有相似的功能及作用机制;

其次, 转基因烟草叶片的形状也发生了明显的变化, 从阔卵形转变为长条形, 叶缘从全缘变成了波浪状, 更容易衰老;

以上实验表明, 白花虎眼万年青 DWARF53 基因是调控植物株型的关键基因, 可能处于株型调控的基因网络的核心地位, 并且与水稻和玉米中的 DWARF53 基因所产生的表现很类似, 可能具有相似的调控机制和作用机理;

**(3) 转基因烟草激素测定的实验数据: 内源基因改变明显, 调控激素和株型的关键开关;**

转基因烟草的独脚金内酯、生长素和细胞分裂素等内源基因的浓度和比例也发生了明显变化, 说明其是独脚金内酯信号途径的抑制因子和关键开关, 也影响了其他激素的变化;

**(4) 把握前沿、创新性强、科研价值高:**

#### **4.1 植物株型调控对科研生产的重要价值意义**

高等植物株型形成是指在植物整个生长发育过程中植株形态相关器官的发生, 尤其是指分枝、叶片和花器官的形成、形状与着生位置等。植物株型的形成过程主要受遗传与植物激素等内在因素的调控, 同时还受光周期、温度、水肥等外界环境因素的影响。高等植物株型形成的分子机理是植物生长发育研究的基本科学问题, 具有重要的理论意义和生产实际应用价值<sup>[1-4]</sup>。

在作物中, 株型直接影响有效穗数和穗粒数, 是控制产量的核心要素, 作物株型的改良具有重要的生产应用价值。而在花卉中, 观赏植物的分蘖分枝和株型是决定观赏价值、经

济效益和生态效益的重要因素；

白花虎眼万年青植株低矮，多个近基生叶片形成簇生覆盖地面，花葶在开花时从叶丛中央抽生，“拔地而起”，好花也需绿叶扶，其基生叶分蘖的角度和数量，对于植物的形态建成、光能的利用、花的产量和品质有重要影响，丰满而紧凑的基生叶片也可以提高整株植物的观赏价值及经济效益，同时能更多地覆盖地面从而更好地发挥其生态防护作用。

但是对于其基生叶片分蘖、茎秆分枝和株型及形态建成等方面的研究尚未见到报道，在鳞茎球根植物以及其他花卉中也鲜见相关研究，亟需深入研究。

#### 4.2 独脚金内酯在植物分蘖和株型中的作用

以前的研究中，人们一直认为只有细胞分裂素和生长素是影响植物的分枝两大激素，自 2008 年以来发现独脚金内酯(Strigolactones, SLs)是一类来源于类胡萝卜素的萜内酯，作为一种新型的植物激素也参与了对植物分枝的调控，其在植物根部产生并向上运输，从而抑制腋芽的发育和植物的分枝，能够抑制植物的分枝和侧芽的生长，并与生长素和细胞分裂素一起调控植物的分枝（蘖）数量，并从独脚金内酯的合成和传导过程中分离出来 MAX3/MAX4/D27/D14/MAX2/TB/FC1/DWF53/SMAX1 等系列的重要功能基因；独脚金内酯在植物与真菌共生、不定根（根毛和根系）的生长发育、次生生长、光形态建成以及杂草的寄生等方面也发挥重要作用；

#### 4.3 DWF53 作为独脚金内酯信号的抑制因子来调控分蘖和株型

DWF53 是从水稻的矮化多分蘖突变体中分离出来的，是一类新发现的高等植物所特有的蛋白家族，作为独脚金内酯信号途径的抑制因子和关键开关，通过泛素化介导降解特定的靶蛋白来发挥作用，通过影响其下游目标基因的转录水平来调控独脚金内酯的信号传递，参与调控植物分枝分蘖，促进水稻分蘖生长发育，通过调节 DWF53 基因在植物体内的表达水平来实现对水稻分蘖数量和株型的定向调控，从而适当增加分蘖以显著提高水稻产量，是实际生产中可用于调控植物分蘖分枝和株型的重要功能基因，而且 DWF53 蛋白可以为深入研究在独脚金内酯信号传递中的调控机制，以及独脚金内酯参与的分枝、次生生长、根系发育和光形态建成等发育途径的分子机制提供了突破口和奠定了基础；对于科研和生产均具有重要的价值与意义

#### 4.4 DWF53 基因研究创新型强、学术价值高

虽然已经从水稻、玉米、麦类、豆类和苹果等植物中分离了 DWF53 基因，但是在观赏植物中研究甚少，鳞茎球根植物中更是尚未报道！而鳞茎球根植物由于具有较高的观赏、药用、经济和生态等价值，以及独有的抗逆性强、生态适应能力强等优点，其价值和用途越来越引起人们的重视和开发！

本研究在虎眼万年青和百合等鳞茎球根植物中首次克隆出 **DWARF53 基因**，并研究证明具有能够使得植物植株高度严重矮化、茎尖多分叉、叶腋多分蘖、叶片狭长且边缘波浪化等株型的显著改变，并且引发内源基因明显变化等可靠确凿的数据结果；

**并且与水稻和玉米中的 DWARF53 基因所产生的表现很类似，可能具有相似的调控机制和作用机理；**

把握了独脚金内酯与株型研究的植物科学和学科发展的前沿，又紧密联系实际生产，“顶天立地”，为鳞茎球根植物新品种的选育和株型调控提供了有价值的重要功能基因，也为独角金内酯的合成、信号传导和代谢及株型发育机制的研究提供了很好的切入点和窗口，对科研和生产均具有较高的价值和意义，创新型强、学术价值高、应用前景广阔！

所以，白花虎眼万年青矮化多分蘖基因 DWARF53 的发明专利的申请是有充足的证据、充分的理由、足够的科学依据，并且完全能够实现的！

恳请审查员在此陈述的基础上继续审查，如有问题，申请人愿意继续配合修改。再次对您的辛苦工作表示诚挚感谢！

## 序列表

### 一、白花虎眼万年青 OtDWARF53 的编码区序列 SEQ ID NO.1

SEQ ID

```
ATGCCGACACCGGTCAGTAGCGCGCGGCAGTGCCTCGCCGGCGAGGCGGCCGCCGCTCTC
60
GACGACGCCGTCGCCGTCGCCCCGCCGCCAGCACGCGCAGACGACGTCTCTCCACGTC12
0
GTCTTCGCGCTCCTCTCCTCCTCCCCCTGCGCCGCCGCCGCCGCTCCTCGTCGTCGTCG 180
TCACCACCGTCGTCTCTCCTCCGCGATGCGCTTTCGCCGCCGCCGAGCTCGGCCTACTCC 240
CCTCGATTGCAGTTCAAGGCGCTCGAGCTCTGCTTCGGGGTCGCCCTCGATCGCCTCCCC 300
TCTTCCTCGATCTCGGGCTCGTCGGCGAGCTCCGCCGACGAGCCGCCGGTGTCCAATTG
360
CTGATGGCCGCCATCAAGCGATCTCAGGCGAATCAACGGCGGCATCCTGATACCTTCCAT 420
TTCTATCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCTGCTTAATTCTTCGTCTCCATCGTCTTCTCT 480
TTCTCTGGGGTCAAAGTCGAGCTTCAGCAGCTGATTCTCGCGATTCTCGACGATCCGGTC 540
GTCAGTAGGGTTTTCGGCGAGGCCGGATTAGGAGCTCCGACATAAAGCTCGCGGTTTTG
600
CGGCCGCCGCCCTCCGATCCTCCGGTTCCCTCGCGCCGCCGCCGCTGCCGCCGCTGTTCTTG 660
TGTAATTTCTCGGCCGGGGATGATTTTGAGGCGGTCAATTTGACTCCAGAGGGTTTAGC
720
TTCCATTCTCGGATGGCGGGGATGAGAATTGCCGGCGGATTGGGGGGATTTTGCGGAGG
780
```



AAGAGCAATCGGAATCCGATGCTGGTCGGCGTTGGGGCCGGAGACGCTGCTAAAGATTTT  
840  
GTTCTGGGCGGTGAGAGGCGTAACTGGGCGTTCTTGCCGCCGGAGCTGGCCAACTGAAG9  
00  
TTTGTTAGCTTGAAAAAGGAGCTTCTTGAGATGAGAGAGGTTGGAGATTCGAAGAATTTG  
960  
ATTAGGGGGAGGCTGGAGGAATTGGGGAAGGAGGAGGCTAGGGTTGTGGTTGGGGTTGG  
A1020  
GATTTGAAGGGGTTGGTGGATTTAGGGGATGAGTTGGGGGATTGCTTGGTGGCCGAGATG  
1080  
ACGAGAGGATTGCAGTGTTTTAAGGAGAAGTTGTGGGTGATGGGGTGGTCTGCTACTTAT  
1140  
GAGACTTACATGAAGTTCCTGTCGAGTTTTCCGACACTCGACAAGGATTGGGATCTGCAG  
1200  
CTGCAGCTCATTACTTCGGCCAGGCCAGCAATGGGGGGACTTGTCAGCCGAGCTCCCAGC  
1260  
TTGATGGAGTCTTTTGTTCATTCCGGTGGTTTCTTCCCTTCTGCATATGAGGCCAGTATT 1320  
CCAGTAATGAACCCATATTCCTCAGTTCCTCGTTGCCAGCTCTGTAATGACAAATACGAG 1380  
CAAGAAGCTCGCTACAATATTGAAGGGATGTGCACCGTTATGTGAAGATCACGGACAGACA  
1440  
AAATTGCCTGCATGGCTCCAAAGTGTAAGTACTCTCAGAATGAACAGTCCATTGGATTCC 1500  
TTAAAGGTTAATGACGATGAGAAAGTACTAAATGCTAAAGTTGTAGATTGCAAAAGAAA  
1560  
TGGAATGATCATTGCCAGCGACTTCATCAGGGCTTCCCAAAGTCTGAGGCATACAAGCCC  
1620  
CACTTGCCCCCGCCATTATTGGCATTCCGTATATTTAGATAAAGTTATGTCCATTAAT 1680  
CCGAGCATCATACATTGGGGTGTACCCCAAAGCAAAAGCGGGTTCAGCAGTGCACTCCCC  
1740  
GTGACAGTTGGATTGCAGAAAATGACCACAGCTAGCCACGACATGTCACCACTTGTGGTA  
1800  
TCTGAACCTATGAACAAAGATTTGATATCTAGACTCCAAGTTGGGATTTCTAGAGGTAAA 1860  
CCGCTGATGGAGGGCTTGAGGTCTAATCAAAGTGCCTTGTGAGAATTGAGCGCGCTTGAC  
1920  
GACCGCACTTCACCTTCATCTGTAACCTCCGTGACAACTGATTTAGTTTTGGGGACTCTT 1980  
CGTGGACCTTCGTGCCCTGAGGAGTTGGCTCGTTGCCTTCCATCCAAGTGGGCCATCGAT  
2040  
CTCCCTGAGCGTGAGACTCTTTCAGCTCCAAAGTCTCCTCACGGTTCATCTAGCATGTCT 2100  
GGGAAGGTTGATCCAAGTAATTTCAAAGCATTTTATAATAGTTTCCGAGAAAAGGTCCGC  
2160  
AGACAGGATGCAGCATTAAGTGCTATAAGTCTAGCCATCATTAGTGCCGAGCTGGGCAT  
2220  
GAAAGGCGACGAAGGGCAAGCCTTAAAGGTGACATATGGCTTAGTTTTCTAGGTCCAGAT  
2280  
AGGTTTCGGGAAGAAAAGGGCAGCTACAGCTCTGGCTGAGTTGATGTTTGGTAGCAAAGAG

2340  
 AACATGATCTGCATTGACCTAGGTCATCAGGATAGCACTGGAAATTCTATCTGTGACTAT 2400  
 CATGAGATCAGGAAATCTGAAGTTGGTTTCAGAGGGACAACATATGCTGACCGCATTGCT  
 2460  
 GCAGAGGTTAGCAGGAAACCATCATCTGTAGTATTTCTGGAGAATTTGGAGAAAGCTGAC  
 2520  
 TTCATGGTGCAAGACAGGTTATCACAGGCAATTCGCACAGGCAAAATTTCAGACTCTTAT  
 2580  
 GGACGGGAGATTGGGATCAGCAATGCCGTATTTGTGGTGGCCACAAATAGAAACCGGGAT  
 2640  
 GGAAGTTCTTCCTCGAGGAAAGAGGGTGCTAATTTTTGTGAGGAGAAGGTCCTGGCAGCT  
 2700  
 CAGAGACGTCAAATGAAGATCTCAATCGAGCCGGCTTTGCAGACCAGCAGCCGGCGTCCC  
 2760  
 CCCATGAATGTCTTAATCACTTCCAGAGAAGAGCCTGAGAACAAACAGGGCATCAGTAAA  
 2820  
 CGGAAGCTGGACCTCTCTGATTGCGATCCAGTCCAGCCGCAGTTTTCTGATTCACCGAAA  
 2880  
 CGTCCCCATAGAATTTGCAAAGCATTTCTGGACTTGAATCTGCCTGTAGAAGAGGAGGTG  
 2940  
 GTGGAGAACGAGGCGGAGTGTAGCAGTAGTAGCAACAGCAGTGGTGGTGATGAGCAGTGG  
 3000  
 GTGGAGGATCTCCTCAAATCAATGGATGAGAATGTGACCTTTGAGCCGTTTGATTTTGAC  
 3060  
 TCCCTTGCCGATTATGTGATCAAAGAGATCAGCAAGAGGTTCTGTAATACGATCGGGTCA  
 3120  
 GAGTGTGTTATGGAGATTGACGTAAGGGCTATGGAGCAGATTCTTGCAGCTTCTTGGTTA  
 3180  
 CTAGAGGACATGAGAGACCTAAATAACTGGTTTGAAAATGTGCTTCTCAGGAGCTTCTTC  
 3240  
 GAGTTGAGACGAAGGTATAGTAATAAGATCTCAGCTCGCAGCATCGTGAAGCTCATTGTT  
 3300  
 TGTGAGGAGACACTTGCAGAAGAGCAGCCTCCTGGGATTCTTCTTCCTTCCAGGATTATT  
 3360  
 TTGGATTGA\*

二、(1) 白花虎眼万年青 OtDWARF53 编码的氨基酸 SEQ ID NO.2 (一个氨基酸三个字母表示)

|    |   |
|----|---|
| 1  | MET Pro Thr Pro Val Ser Ser Ala Arg Gln Cys Leu Ala Gly Glu |
|    | 1 5 10 15   |
| 16 | Ala Ala Ala Ala Leu Asp Asp Ala Val Ala Val Ala Arg Arg Arg |
|    | 20 25 30  |
| 31 | Gln His Ala Gln Thr Thr Ser Leu His Val Val Phe Ala Leu Leu |

|     |   |     |     |     |
|-----|---|-----|-----|-----|
|     |   | 35  | 40  | 45  |
| 46  | Ser Ser Ser Pro Cys Ala Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ser Ser Ser |     |     |     |
|     |   | 50  | 55  | 60  |
| 61  | Ser Pro Pro Ser Ser Leu Leu Arg Asp Ala Leu Ser Arg Ala Arg |     |     |     |
|     |   | 65  | 70  | 75  |
| 76  | Ser Ser Ala Tyr Ser Pro Arg Leu Gln Phe Lys Ala Leu Glu Leu |     |     |     |
|     |   | 80  | 85  | 90  |
| 91  | Cys Phe Gly Val Ala Leu Asp Arg Leu Pro Ser Ser Ser Ile Ser |     |     |     |
|     |   | 95  | 100 | 105 |
| 106 | Gly Ser Ser Ala Ser Ser Ala Asp Glu Pro Pro Val Ser Asn Ser |     |     |     |
|     |   | 110 | 115 | 120 |
| 121 | Leu MET Ala Ala Ile Lys Arg Ser Gln Ala Asn Gln Arg Arg His |     |     |     |
|     |   | 125 | 130 | 135 |
| 136 | Pro Asp Thr Phe His Phe Tyr Gln Gln Gln Gln Gln Gln Leu     |     |     |     |
|     |   | 140 | 145 | 150 |
| 151 | Leu Asn Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Ser Phe Ser Gly Val Lys |     |     |     |
|     |   | 155 | 160 | 165 |
| 166 | Val Glu Leu Gln Gln Leu Ile Leu Ala Ile Leu Asp Asp Pro Val |     |     |     |
|     |   | 170 | 175 | 180 |
| 181 | Val Ser Arg Val Phe Gly Glu Ala Gly Phe Arg Ser Ser Asp Ile |     |     |     |
|     |   | 185 | 190 | 195 |
| 196 | Lys Leu Ala Val Leu Arg Pro Pro Pro Pro Ile Leu Arg Phe Pro |     |     |     |
|     |   | 200 | 205 | 210 |
| 211 | Arg Ala Ala Arg Cys Pro Pro Leu Phe Leu Cys Asn Phe Ser Ala |     |     |     |
|     |   | 215 | 220 | 225 |
| 226 | Gly Asp Asp Phe Glu Ala Val Asn Leu Thr Pro Arg Gly Phe Ser |     |     |     |
|     |   | 230 | 235 | 240 |
| 241 | Phe Pro Phe Ser Asp Gly Gly Asp Glu Asn Cys Arg Arg Ile Gly |     |     |     |
|     |   | 245 | 250 | 255 |
| 256 | Gly Ile Leu Ala Arg Lys Ser Asn Arg Asn Pro MET Leu Val Gly |     |     |     |
|     |   | 260 | 265 | 270 |
| 271 | Val Gly Ala Gly Asp Ala Ala Lys Asp Phe Val Arg Ala Val Glu |     |     |     |
|     |   | 275 | 280 | 285 |
| 286 | Arg Arg Asn Trp Ala Phe Leu Pro Pro Glu Leu Ala Asn Leu Lys |     |     |     |
|     |   | 290 | 295 | 300 |
| 301 | Phe Val Ser Leu Glu Lys Glu Leu Leu Glu MET Arg Glu Val Gly |     |     |     |
|     |   | 305 | 310 | 315 |
| 316 | Asp Ser Lys Asn Leu Ile Arg Gly Arg Leu Glu Glu Leu Gly Lys |     |     |     |
|     |   | 320 | 325 | 330 |
| 331 | Glu Glu Ala Arg Val Val Val Gly Val Gly Asp Leu Lys Gly Leu |     |     |     |
|     |   | 335 | 340 | 345 |
| 346 | Val Asp Leu Gly Asp Glu Leu Gly Asp Cys Leu Val Ala Glu MET |     |     |     |
|     |   | 350 | 355 | 360 |
| 361 | Thr Arg Gly Leu Gln Cys Phe Lys Glu Lys Leu Trp Val MET Gly |     |     |     |

|     |   |     |     |     |
|-----|---|-----|-----|-----|
|     |   | 365 | 370 | 375 |
| 376 | Trp Ser Ala Thr Tyr Glu Thr Tyr MET Lys Phe Leu Ser Ser Phe |     |     |     |
|     |   | 380 | 385 | 390 |
| 391 | Pro Thr Leu Asp Lys Asp Trp Asp Leu Gln Leu Gln Leu Ile Thr |     |     |     |
|     |   | 395 | 400 | 405 |
| 406 | Ser Ala Arg Pro Ala MET Gly Gly Leu Val Ser Arg Ala Pro Ser |     |     |     |
|     |   | 410 | 415 | 420 |
| 421 | Leu MET Glu Ser Phe Val Pro Phe Gly Gly Phe Phe Pro Ser Ala |     |     |     |
|     |   | 425 | 430 | 435 |
| 436 | Tyr Glu Ala Ser Ile Pro Val MET Asn Pro Tyr Ser Ser Val Pro |     |     |     |
|     |   | 440 | 445 | 450 |
| 451 | Arg Cys Gln Leu Cys Asn Asp Lys Tyr Glu Gln Glu Leu Ala Thr |     |     |     |
|     |   | 455 | 460 | 465 |
| 466 | Ile Leu Lys Gly Cys Ala Pro Leu Cys Glu Asp His Gly Gln Thr |     |     |     |
|     |   | 470 | 475 | 480 |
| 481 | Lys Leu Pro Ala Trp Leu Gln Ser Val Asp Thr Leu Arg MET Asn |     |     |     |
|     |   | 485 | 490 | 495 |
| 496 | Ser Pro Leu Asp Ser Leu Lys Val Asn Asp Asp Glu Lys Val Leu |     |     |     |
|     |   | 500 | 505 | 510 |
| 511 | Asn Ala Lys Val Val Asp Leu Gln Lys Lys Trp Asn Asp His Cys |     |     |     |
|     |   | 515 | 520 | 525 |
| 526 | Gln Arg Leu His Gln Gly Phe Pro Lys Ser Glu Ala Tyr Lys Pro |     |     |     |
|     |   | 530 | 535 | 540 |
| 541 | His Leu Pro Pro Pro Ile Ile Gly Ile Pro Tyr Ile Ser Asp Lys |     |     |     |
|     |   | 545 | 550 | 555 |
| 556 | Val MET Ser Ile Asn Pro Ser Ile Ile His Ser Gly Val Pro Gln |     |     |     |
|     |   | 560 | 565 | 570 |
| 571 | Ser Lys Ser Gly Phe Ser Ser Ala Leu Pro Val Thr Val Gly Leu |     |     |     |
|     |   | 575 | 580 | 585 |
| 586 | Gln Lys MET Thr Thr Ala Ser His Asp MET Ser Pro Leu Val Val |     |     |     |
|     |   | 590 | 595 | 600 |
| 601 | Ser Glu Pro MET Asn Lys Asp Leu Ile Ser Arg Leu Gln Val Gly |     |     |     |
|     |   | 605 | 610 | 615 |
| 616 | Ile Ser Arg Gly Lys Pro Leu MET Glu Gly Leu Arg Ser Asn Gln |     |     |     |
|     |   | 620 | 625 | 630 |
| 631 | Ser Ala Leu Ser Glu Leu Ser Ala Leu Asp Asp Arg Thr Ser Pro |     |     |     |
|     |   | 635 | 640 | 645 |
| 646 | Ser Ser Val Thr Ser Val Thr Thr Asp Leu Val Leu Gly Thr Leu |     |     |     |
|     |   | 650 | 655 | 660 |
| 661 | Arg Gly Pro Ser Cys Pro Glu Glu Leu Ala Arg Cys Leu Pro Ser |     |     |     |
|     |   | 665 | 670 | 675 |
| 676 | Lys Trp Ala Ile Asp Leu Pro Glu Arg Glu Thr Leu Ser Ala Pro |     |     |     |
|     |   | 680 | 685 | 690 |



|      |   |      |      |
|------|---|------|------|
| 691  | Lys Ser Pro His Gly Ser Ser Ser MET Ser Gly Lys Val Asp Pro |      |      |
|      | 695   | 700  | 705  |
| 706  | Ser Asn Phe Lys Ala Phe Tyr Asn Ser Phe Arg Glu Lys Val Arg |      |      |
|      | 710   | 715  | 720  |
| 721  | Arg Gln Asp Ala Ala Leu Ser Ala Ile Ser Leu Ala Ile Ile Gln |      |      |
|      | 725   | 730  | 735  |
| 736  | Cys Arg Ala Gly His Glu Arg Arg Arg Arg Ala Ser Leu Lys Gly |      |      |
|      | 740   | 745  | 750  |
| 751  | Asp Ile Trp Leu Ser Phe Leu Gly Pro Asp Arg Phe Gly Lys Lys |      |      |
|      | 755   | 760  | 765  |
| 766  | Arg Ala Ala Thr Ala Leu Ala Glu Leu MET Phe Gly Ser Lys Glu |      |      |
|      | 770   | 775  | 780  |
| 781  | Asn MET Ile Cys Ile Asp Leu Gly His Gln Asp Ser Thr Gly Asn |      |      |
|      | 785   | 790  | 795  |
| 796  | Ser Ile Cys Asp Tyr His Glu Ile Arg Lys Ser Glu Val Gly Phe |      |      |
|      | 800   | 805  | 810  |
| 811  | Arg Gly Thr Thr Tyr Ala Asp Arg Ile Ala Ala Glu Val Ser Arg |      |      |
|      | 815   | 820  | 825  |
| 826  | Lys Pro Ser Ser Val Val Phe Leu Glu Asn Leu Glu Lys Ala Asp |      |      |
|      | 830   | 835  | 840  |
| 841  | Phe MET Val Gln Asp Arg Leu Ser Gln Ala Ile Arg Thr Gly Lys |      |      |
|      | 845   | 850  | 855  |
| 856  | Ile Ser Asp Ser Tyr Gly Arg Glu Ile Gly Ile Ser Asn Ala Val |      |      |
|      | 860   | 865  | 870  |
| 871  | Phe Val Val Ala Thr Asn Arg Asn Arg Asp Gly Ser Ser Ser Ser |      |      |
|      | 875   | 880  | 885  |
| 886  | Arg Lys Glu Gly Ala Asn Phe Cys Glu Glu Lys Val Leu Ala Ala |      |      |
|      | 890   | 895  | 900  |
| 901  | Gln Arg Arg Gln MET Lys Ile Ser Ile Glu Pro Ala Leu Gln Thr |      |      |
|      | 905   | 910  | 915  |
| 916  | Ser Ser Arg Arg Pro Pro MET Asn Val Leu Ile Thr Ser Arg Glu |      |      |
|      | 920   | 925  | 930  |
| 931  | Glu Pro Glu Asn Lys Gln Gly Ile Ser Lys Arg Lys Leu Asp Leu |      |      |
|      | 935   | 940  | 945  |
| 946  | Ser Asp Cys Asp Pro Val Gln Pro Gln Phe Ser Asp Ser Pro Lys |      |      |
|      | 950   | 955  | 960  |
| 961  | Arg Pro His Arg Ile Cys Lys Ala Phe Leu Asp Leu Asn Leu Pro |      |      |
|      | 965   | 970  | 975  |
| 976  | Val Glu Glu Glu Val Val Glu Asn Glu Ala Glu Cys Ser Ser Ser |      |      |
|      | 980   | 985  | 990  |
| 991  | Ser Asn Ser Ser Gly Gly Asp Glu Gln Trp Val Glu Asp Leu Leu |      |      |
|      | 995   | 1000 | 1005 |
| 1006 | Lys Ser Met Asp Glu Asn Val Thr Phe Glu Pro Phe Asp Phe Asp |      |      |
|      | 1010  | 1015 | 1020 |

|      |   |
|------|---|
| 1021 | Ser Leu Ala Asp Tyr Val Ile Lys Glu Ile Ser Lys Arg Phe Cys |
|      | 1025 1030 1035  |
| 1036 | Asn Thr Ile Gly Ser Glu Cys Val MET Glu Ile Asp Val Arg Ala |
|      | 1040 1045 1050  |
| 1051 | MET Glu Gln Ile Leu Ala Ala Ser Trp Leu Leu Glu Asp MET Arg |
|      | 1055 1060 1065  |
| 1066 | Asp Leu Asn Asn Trp Phe Glu Asn Val Leu Leu Arg Ser Phe Phe |
|      | 1070 1075 1080  |
| 1081 | Glu Leu Arg Arg Arg Tyr Ser Asn Lys Ile Ser Ala Arg Ser Ile |
|      | 1085 1090 1095  |
| 1096 | Val Lys Leu Ile Val Cys Glu Glu Thr Leu Ala Glu Glu Gln Pro |
|      | 1100 1105 1110  |
| 1111 | Pro Gly Ile Leu Leu Pro Ser Arg Ile Ile Leu Asp ***         |
|      | 1115 1120   |

(2) 白花虎眼万年青 OtDWARF53 编码的氨基酸 SEQ ID NO.2 (一个氨基酸一个字母表示)

MPTPVSSARQCLAGEAAAAALDDAVAVARRRQHAQTTSLHVVFALLSSSPCAAAAASSSSSPSS  
 LLRDALSRRARSSAYSRLQFKALELCFGVALDRLPSSSISGSSASSADEPPVNSLMAAIKRQANQ  
 RRRPDTFHFYQQQQQQQLLNSSSPSSSFSGVKVELQQLILAILDDPVVSRVFGAAGFRSSDIKLA  
 VLRPPPPILRFPRARCPPLFLCNFSAGDDFEAVNLTPRGFSFPFSDGGDENCRRIGGILARKSNR  
 NPMLVGVGAGDAAKDFVRAVERRNWAFLPPELANLKFVSLEKELLEMREVGD SKNLIRGRLEEL  
 GKEEARVVVGVDLGLVDLGDELGDCLVAEMTRGLQCFKEKLWVMGWSATYETMYMKFLSSFP  
 TLDKDWDLQLQLITSARPAMGGLVSRAPSLMESFVPFGGFFPSAYEASIPVMNPYSSVPRCQLC  
 NDKYEQELATILKGCAPLCEDHGQTKLPAWLQSVDTLRMNSPLDSLKVNDDEKVLNAKVVDLQK  
 KWNDHQCRLHQGFQPKSEAYKPHLPPIIGIPYISDKVMSINPSIIHSGVPQSKSGFSSALPVTVGLQ  
 KMTTASHDMSPLVSEPMNKDLISRLQVGISRGKPLMEGLRSNQSALSALDDRTSPSSVTSV  
 TTDLVLGTLRGPSCEELARCLPSKWIDLPERETLSAPKSPHGSSMSGKVDPSNFKAFYNSFRE  
 KVRQRDAALSAISLAIQCRAGHERRRRASLKGDIWLSFLGPDRFGKKRAATALAELMFGSKENM  
 ICIDLGHQDSTGNSICDYHEIRKSEVGFRGTTYADRIAAEVSRKPSSVVFLENLEKADFMVQDRLS  
 QAIRTGKISDSYGREIGISNAVFVATNRNRDGSSSSRKEGANFCEEKVLAQRRQMKISIEPALQ  
 TSSRRPPMNVLITSREEPENKQGISKRLDLSDCDPVQPQFSDSPKRPHRICKAFLDLNLPVEEEV  
 VENEAECSSSNSSGGDEQWVEDLLKSMDENVTFEPDFDSLADYVIKEISKRFNTIGSECVMEI  
 DVRAMEQILAASWLLEDMRDLNNWFENVLLRSFFELRRRYSNKISARSIVKLIVCEETLAEEQPP  
 GILLPSRIILD-

### 三、白花虎眼万年青 OtDWARF53 基因扩增编码区的引物序列表

表 1 白花虎眼万年青 OtDWARF53 基因扩增编码区的引物序列表

| 名称          | 序列                            | 编号         | 用途      |
|-------------|-------------------------------|------------|---------|
| SEQ ID NO.3 | atgccgacaccggctcagtagcgcgcggc | OtDWARF53F | 扩增的正向引物 |
| SEQ ID NO.4 | atccaaaataatcctggaaggaagaag   | OtDWARF53R | 扩增的反向引物 |

四、白花虎眼万年青 OtDWARF53 基因植物表达载体的引物序列表

表 1 白花虎眼万年青 OtDWARF53 基因植物表达载体构建的引物序列表

| 名称          | 序列   | 编号                | 用途                    |
|-------------|--|-------------------|-----------------------|
| SEQ ID NO.5 | accactctctgtctcAAGCTTATGCCGACACCGGTCAGTAGC | HindIII OtDWARF53 | 扩增的正向引物，带有载体序列和酶切位点序列 |
| SEQ ID NO.6 | ggtcaggatactagtGGATCCATCCAAAATAATCCTGGAAG  | BamHIOtDWARF53R   | 扩增的反向引物，带有载体序列和酶切位点序列 |