[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 99812790.6

[51] Int. Cl.
C12N 15/29 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 2 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 1240837C

[22] 申请日 1999.8.18 [21] 申请号 99812790.6

[30] 优先权

[32] 1998.8.29 [33] GB [31] 9818808.9

[86] 国际申请 PCT/GB1999/002746 1999.8.18

[87] 国际公布 WO2000/012715 英 2000.3.9

[85] 进入国家阶段日期 2001.4.28

[71] 专利权人 先进技术(剑桥)有限公司

地址 英国伦敦

[72] 发明人 M·M·布雷尔 A·坎布里吉

M·J·毛恩德尔斯

S·麦奎恩-马森

审查员 郝建欣

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 杨九昌

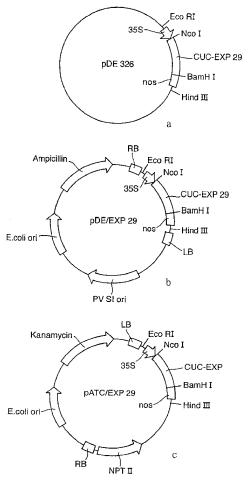
权利要求书 1 页 说明书 26 页 附图 2 页

[54] 发明名称

植物纤维的修饰

[57] 摘要

本发明涉及来源于异源和同源树种的新的棒曲霉素基因序列的分离和鉴定，以及将这些新的基因重新导入树内以改变棒曲霉素的水平。已经鉴定出六种新的基因。也已经采用黄瓜 EX29 序列(基因库，登记编号 U30382 - 即 Cs - EXP1)转化桉树。与对照植株相比，观察到植株的高度和节间长度发生了变化。



1. 一种转化树木以修饰树高和/或节间长度的方法，该方法包括将一种含有一个启动子和一段以正常的阅读框方向排列的编码棒曲霉素基因的核酸编码序列的嵌合基因稳定地插入到植物基因组内，所述转化的树木是桉树，并且所述核酸序列是称作黄瓜 Ex29 的棒曲霉素序列，或者是与其具有足够同源性从而在中度严格条件下杂交，并且编码具有棒曲霉素活性的蛋白质的序列，并再生具有被改变的基因组的植物，所述杂交条件为在 65℃下在 2 x SSC 中洗涤。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述核酸序列来源于桉属或黄瓜。

3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述核酸序列是 mRNA、cDNA 序列或基因组 DNA。

4. 权利要求 1、2 或 3 的方法，其中所述核酸是以正常的阅读框方向排列，并且达到了节间长度和/或植株高度的减小。

5. 根据权利要求 1－4 的任意一项的方法转化的植物细胞。

6. 一种嵌合基因在修饰树高和/或节间长度中的用途，所述嵌合基因含有一个启动子和一段以正常的阅读框方向排列的编码棒曲霉素基因的核酸编码序列，所述树木是桉树，并且所述核酸序列是称作黄瓜 Ex29 的棒曲霉素序列，或者是与其具有足够同源性从而在中度严格条件下杂交，并且编码具有棒曲霉素活性的蛋白质的序列，所述杂交条件为在 65℃下在 2 x SSC 中洗涤。

植物纤维的修饰

本发明涉及植物纤维细胞形态的修饰。本发明的例证通过，例如，采用遗传构建体以修饰，尤其是，但非唯一的，桉树（Eucalyprus）纤维的方法。

人们认为林业的初级产物是木材，虽然更基本地，其应该定义为纤维。该行业为生产多种产品的固木和纸浆/造纸行业提供了广泛的给料。因此林业人员必须力求满足这些行业的需要，而且即使在特定的行业内部，也存在一定范围的不同需求。例如，不同纸张等级对原材料品质的需求就有所不同。

以林业为基础的工作依赖于林业人员为加工者提供具有特定性质的纤维的能力、和加工者修改其工艺以适应现有原材料的能力之间的平衡。加工树木的设计和操作受原料的木材（纤维）性质的影响。

虽然存在这些特定的需求，纤维的均一性和强度是大多数行业使用的普遍要求，因此由林务人员提供的纤维必须能够将这些性质提供给加工者。

例如，在纸浆加工业，强度特性部分是由纤维的长度决定的。纤维长度的提高使所生产纸张的强度增加。结合强度归因于纤维之间的连接和表面的粘连能力，其依赖于纤维的长度、周长和糙度。另外，在加工过程中，纤维长度的增加提高了湿网的强度，使操作更简便（Seth, 1995）。

然而，长纤维并非对所有的应用都是理想的。在一些情况下，较短的纤维是优选的，例如在光面纸张的生产中。

物种之间的纤维性质不同，因此特定的物种对于特定的应用在组织学上具有局限性。来源于硬木质种属的纤维通常比来自软木种属的纤维短得多。这使得所生产的纸浆和纸张具有理想的表面特征，如光滑和光亮、但具有低强度的特点。在实践中，当没有一种单一的物种能够提供具有这些特征的适当组合的纤维时，所采用的是来自不同物种的长和短纤维的组合。如果存在一种单一的来源，其拥有这些理想的特征及最佳的纤维长度，这将为加工者带来很大的利益。一些普通的物种及它们的纤维长度如以下表 1 中举例列出。

表 1

不同树种的纤维长度

物种	纤维长度（毫米）
火炬松 (Loblolly Pine)	3.5 – 4.5
美国西部铁杉，美国西加云杉 (Western Hemlock, Western Spruce)	2.5 – 4.2
南部硬木 (Southern Hardwood)	1.2 – 1.4
北部硬木 (Northern Hardwood)	1.0 – 1.2
桉树属 (Eucalyptus)	0.8 – 1.0
白栎木 (White Oak)	0.59
枫香属 (Sweetgum)	0.48
白杨 (Aspen)	0.35

桉属(Eucalyptus)树代表全球造纸工业中采用的最大的纤维来源（Bamber 1985; Ranatunga, 1964），在世界上，估计有一千至一千五百万公顷的土地种植桉属树（Verhaegen 和 Plomion, 1996）。桉树的主要优点是它们十分高的生长速度和在广范围的条件、热带及温带中生长的能力。

然而，桉属(Eucalyptus)的纤维明显短于其它，一度较流行的来源的纤维，如松树。因此，由桉属(Eucalyptus)纸浆制造的纸张常常不牢固，通常需要其它来源的较长纤维的加固，提高了生产成本。如果树木能够生长较长的纤维，这将是造纸行业的一个十分可观的优点，提高了用于纸浆和纸张合成的原材料的品质。

通过树木培育，有可能使纤维特性得到一些改进。例如，白杨的种间三倍体杂交品种已经形成，其具有的纤维比亲本种属的长 。

纤维特性上的遗传变异在物种内也是明显的。纤维特征受一套复

杂的遗传因子的控制，不容易遵循经典繁殖方法。因此，现有的遗传变异在树木繁殖工程中没有被显著地开发出来。同时，目前人们的认识集中在木材特性的遗传可能性上，在以前，这些通常没有被认为是与生长特征同等重要的，而且其有时在追求后者的同时被埋没。在一些情况下，生长速度与纤维特征负相关，虽然这不总是确切的（如对于桉树），目前正在进行育种的努力以争取包揽二者的优点。

在许多情况下，纤维特性对于终产品是足够的，改进被认为没有必要。例如，提高纤维的长度超过 2 毫米在撕拉强度或张力强度上仅引起很小的提高，并且许多软木纤维的长度通常为 3 毫米左右，也就是高于理想长度的最小值。然而，幼龄木材中的纤维趋向较短，并且幼龄材料随着循环的次数降低而具有较高的使用价值。因此，即使在通常产生长纤维的树种中仍然存在改善的余地。

从纸浆造纸行业的观点来看，纤维是已经经过一系列处理以除去所有内容物和大多数非纤维质的细胞壁成分的特殊类型的植物细胞壁（Stewart 等，1994）。在木本植物中，纤维是由死亡的细胞壁材料构成的。为了生产较长的纤维，在纤维形成之前，在生长过程中必须具有较长的活细胞。

可以将细胞壁想象为一个通过非共价相互作用与基质聚合体连接在一起的纤维质微纤维构成的复杂网络(Carpita 和 Gibeaut, 1993)。微纤维被半纤维的混合物包裹，其与微纤维的表面形成广泛的氢键相互作用。与其共同延伸的是由各种胶质形成的另一个网络，其主要通过离子键结合在一起（McQueen-Mason, 1995）。

为了使细胞生长和扩大，必须松弛细胞壁组分以使基质内的多聚糖和蛋白能够滑动(Cosgrove, 1993)。然后通过细胞的内部膨胀压使细胞扩张，这是值得注意的。细胞生长过程中的扩张程度是由细胞壁的机械特性控制的，这些特性决定于细胞壁的构成及细胞壁小纤维和结构多聚体的取向。

细胞壁扩张的调控受植物的紧密调节，以利于生长控制和形态发生。调控的最终因子是位于细胞壁自身上的酶。如果植物在其细胞壁上表达细胞壁“松弛”酶，则这些酶有可能能够调节细胞生长。因此表达水平的改变能够引起细胞生长和纤维长度的升高或降低。也可以在细胞壁的结构上产生变化。

一类细胞壁蛋白是棒曲霉素。棒曲霉素引起植物细胞壁扩张，在目前是所报道的唯一具有被证实的细胞壁松弛活性的蛋白。棒曲霉素最先是由 McQueen-Mason 等（1992）从黄瓜胚轴细胞壁中分离出来的，并且通过它们在一项体外流变学试验中催化细胞壁松弛的能力被鉴性。

棒曲霉素的作用方式被认为是通过削弱纤维素和半纤维素之间的非共价键，结果引起聚合体在细胞壁内彼此相对滑动(Cosgrove 1996)。棒曲霉素精确的生化行为尚不清楚，虽然已知它们的作用不是由于外聚糖酶(exoglycanase)或木胍内转移糖基化酶 (xylogucan endotransglycosylase) 的活性（McQueen-Mason 等，1992，McQueen-Mason&Cosgrove,1993）。棒曲霉素似乎能够阻断纤维素微纤维和半纤维素之间的氢键结合。该过程使细胞壁能够在聚合体没有任何降解的情况下松弛,或在扩张过程中细胞壁结构全面削弱。与该机制一致的是，棒曲霉素已经表现出能够削弱纤维质纸张，该纸张的机械强度是来源于纤维素纤维之间的氢键结合（McQueen-Mason 和 Cosgrove，1994）。

棒曲霉素能够以 pH 值依赖的方式恢复所分离的细胞壁的扩张能力（McQueen-Mason 和 Cosgrove，1995），并且可能是植株内部“酸性生长”现象的原因（Shcherban 等，1995）。棒曲霉素蛋白已经在黄瓜胚轴（McQueen-Mason 等，1992）、燕麦胚芽鞘（Li 等，1993）、伸展的西红柿叶片（Keller 和 Cosgrove，1995）和稻节间（Cho 和 Kende，1997）中被鉴性。

已经从多种植物中分离且鉴性出棒曲霉素 cDNA,目前很明显棒曲霉素是以在物种之间表现出高度保守性的多基因家族存在的。已经从拟南芥属（Arabidopsis）和水稻的无名表达序列标记（Expression Sequence Tag，EST）的汇集中鉴定出具有高度同源性的 cDNA。这些 EST cDNA 在蛋白序列的水平上表现出高度的同源性（60-87%），暗示着棒曲霉素的结构是高度保守的（Shcherban 等，1995）。棒曲霉素没有表现出与其它已知酶的序列具有相似性，虽然它们的确与一些花粉变应原具有序列相似性(Shcherban 等，1995)。最近，Cosgrove 等（1997）已经证明来自玉米的花粉变应原也具有相当高的棒曲霉素活性。

如果能够在植物的细胞壁上进行修饰以使其过量表达棒曲霉素，则这些植物有希望在细胞扩张或生长上表现出显著的提高。相反，棒曲霉素表达的降低将引起细胞生长的下降。因此很奇怪棒曲霉素在桉树内的组成性表达会导致株高和节间长度的降低。

一种修饰棒曲霉素表达的方法是通过将重组DNA序列引入到植物基因组内部。可以采用几种方法将异源DNA导入到植物细胞内（见综述Weising等，1988; Miki和Iyer, 1990和Walden 1994）。根癌土壤杆菌（Agrobacterium tumefaciens）介导的基因转移可能是这些方法中最广泛被采用和通用的（Walden, 1994）。

其它工作人员已经研究过针对改变树木的木材和纸张特性的遗传修饰实验，尤其是集中于细胞内的木质素途径和最终纸张产物中的木质素含量(Hawkins和Boudet, 1994; Grima-Pettenati, 等,1993; Poeydomenge等，1993; Boudet等，1995和Hibino等，1994）。本发明目的的不同之处在于其试图提供一种控制纤维生长和细胞壁形态的方法。

本发明的一个目标是提供一种方法，籍此可以对树木进行修饰以生产出具有理想长度的纤维以适应特定用途。这将使林业人员可以控制其产品的品质。另外，这将使林业人员能够从单一或少数的物种中生产出广范围的纤维类型，可以对这些物种进行选择以使其在特定位点尤其适合培养。这样既带来采用单一的统一造林体系的经济，又具有生产在特定时期所需要的任何类型的纤维的灵活性。

本发明也提供了一种在树木生长周期的特定时期，从其中生产出特定类型的纤维的方法。例如，可以达到从幼材中生产长纤维，以此加速了作物收获的时间。

这种方法首先是通过从异源和同源物种中分离和鉴定出棒曲霉素基因序列，然后采用熟知的过表达、共抑制（如DNAP在其欧洲专利号0465572和0647715中所描述）和反义敲除策略，将这些基因重新导入到树木内以改变转基因树中的棒曲霉素水平。这将使树木的培育更适于纸张的生产。

本发明提供了一段编码一种能够修饰纤维细胞壁的扩张的基因的核酸编码序列，该核酸编码序列为本说明书中的序列编号1－6中的一种或多种。

本发明也提供了一种转化树木以修饰树木内的纤维特性的方法，该方法包括将一个嵌合基因稳定地插入到植物基因组内，该嵌合基因含有一个启动子和一段编码能够修饰纤维细胞壁扩张的基因的核酸编码序列，并再生一种具有被改变的基因组的植物。

本发明也提供了含有上述嵌合基因的树木，该嵌合基因含有一个启动子和一段能够修饰纤维细胞壁扩张的核酸编码序列。

本发明也提供了一种能够修饰细胞壁扩张的嵌合基因，上述嵌合基因包括一个启动子和一段编码一种能够修饰纤维细胞壁扩张的基因的核酸编码序列，上述核酸编码序列为序列编号 1 - 6 中的一种或几种或黄瓜 Ex 29 编码序列，或者是一段与序列编号 1 - 6 或黄瓜 Ex 29 中的任何一种具有足够的同源性，以至在介质严格的条件下能够与其杂交的序列。

该嵌合基因优选地是进一步含有一个终止子。

以上所描述的具有该 DNA 结构特征的构建体和插入了上述依据本发明的构建体/或嵌合基因的树木也是本发明的内容。

含有包括一段能够修饰纤维细胞壁扩张的核酸编码序列的嵌合基因的植物细胞也是本发明的一个方面，以及含有依据本发明的嵌合基因的被转化的植物的种子也是。

当该嵌合基因存在于基因组内时，其可能包括核酸编码序列，以及内源性启动子、终止子、内含子和其它调控序列，或者是该核酸编码序列，有或没有内含子，与一段异源性启动子、终止子和/或其它调控序列结合。

该启动子可以是一种组成型启动子，如花椰菜花叶病毒 35S 启动子（CaMV35S）、花椰菜花叶病毒 19S 启动子（CaMV19S）、或胭脂碱合成酶启动子，一种组织特异性启动子，如 rolC、patatin 或 petE 启动子，或一种可诱导的启动子，如 AlcR/AlcS。其它合适的启动子，如纤维特异的启动子，将是本领域的技术人员已知的。

该核酸序列，或其部分，可能以正常阅读框的方向排列，即有义方向，或者以相反的阅读框方向排列，即反义方向。可以采用有义、反义或共抑制技术以上调或下调棒曲霉素蛋白活性或其编码基因，来达到纤维细胞壁长度的改变。

该核酸序列优选的是编码称为棒曲霉素家族中的一种或多种蛋

白。更优选地是该核酸序列来自桉属（Eucalyptus）或黄瓜。

该核酸序列有利地是本说明书中的序列编码 1 - 6 中的一种或多种。可选地，该核酸序列可以是黄瓜棒曲霉素序列黄瓜 Ex29（基因库登记编号 U30382 - 即 Cs-EXP1）。该序列也由 Shcheraban 等（1995）描述。

可选地，该核酸序列可以是一段与序列编号 1 - 6 或黄瓜 Ex29 中的任何一种具有足够的同源性，以至在介质严格的条件下（65℃下在 2 x SSC 中洗涤）与其杂交的序列。

该核酸序列优选地是一段 mRNA 或 cDNA 序列，虽然它可能是基因组 DNA。

可能适合于采用所发明的方法转化的树木包括桉树、白杨、松树、落叶松。

该核酸序列可以通过任何已知的遗传转化技术被导入，例如，根癌土壤杆菌（Agrobacterium tumefaciens）介导的转化、发根病土壤杆菌（Agrobacterium rhizogenes）介导的转化、生物导弹、电穿孔、化学穿孔、微量注射或硅-纤维转化。

为了使本发明易于理解并易于实施，现通过举例的方式，在以下附图中给出参考，其中:

图 1a 是克隆到载体 pDE326 内的花椰菜花叶病毒 35S 启动子和 nos 终止子之间的黄瓜 Ex29 的编码序列的示意图。

图 1b 是来源于图 1a 的 EcoR I 和 Hind III 限制性酶切位点之间、被引入到经过修饰的 Ti 质粒 pDE 1001 内以形成 pDE/EXP29 的插入片段的示意图，以及

图 1c 是来源于图 1a 的 EcoR I 和 Hind III 限制性酶切位点之间、被引入到经过修饰的 Ti 质粒 p35GUSINT 内以形成 pATC/EXP29 的插入片段的示意图；以及

图 2 是一段在 EcoR I 和 Hind III 限制性酶切位点之间含有序列编号 1、被引入到经过修饰的 Ti 质粒 p35GUSINT 内以形成 pATC/序列编号 1 的插入片段的示意图。

实施例 1

来自桉树（E. grandis）茎组织的新棒曲霉素序列的分离

从黄瓜胚轴中提取 RNA。在塑料培养盘（35 厘米 x 25 厘米 x 6 厘米）内，将黄瓜（Cucumis sativus L., cv Burpee pickler, 来自 A.W. Burpee,Westminster, 宾夕法尼亚州, 美国）的种子播种在水浸润的毛状席垫（capillary matting）（Fordingbridge Growers Supplies, Arundel, W. Sussex, 英国）上，并在 27 ℃下使其在暗处发育。4 天以后在绿光下收集白化的幼苗，通过切下胚轴顶端 20 毫米置于液氮中，并用预冷到-80 ℃的杵和研钵将其碾成细粉末。依据 Verwoerd 等（1989）的操作程序在一种热的苯酚/氯化锂缓冲液中抽提总 RNA。

从桉树（Eucalyptus grandis）中提取 RNA。将桉树（E. grandis）的种子播种到装有 Levington's F2 混合肥料（Levington Horticulture 公司, Ipswich, Suffolk, 英国）的培养盘（35 厘米 x 25 厘米 x 6 厘米）内，并使其在温室（18-24℃，光线强度约为 10,000 勒克司，日照为 16 小时）内发芽。8 周以后将幼苗转移到各自盆内，然后依需要进行移植（大约每 6-7 周）。从分枝顶端的最末 40-50 毫米处收集生长的茎组织，置于液氮中。未成熟的叶片，通常是生长的分枝顶端的最嫩两片，也被直接收集到液氮内；根部在自来水中清洗几遍，蒸馏水漂洗，然后切下生长的顶端置于液氮中。如 Pawlowski 等（1994）所描述的提取 RNA，采用经特殊改进以适用于从含有高水平的酚类化合物的植物中提取 RNA 的操作程序。

从桉树（E. grandis）茎组织提取的总 RNA 中分离多聚(A^+) mRNA。采用推式（Stratagene, 剑桥, 英国）或旋转式寡聚(dt)层析柱（Clontech Laboratories, 公司 CA.,美国）、并依据供应商的指导和建议从总 RNA 中分离多聚(A^+) mRNA。

RT-PCR 和序列测定。棒曲霉素的核酸序列表现出高度的变异。然而已经鉴定出两个具有相当保守程度的区域，并将其用于合成两段低复杂性的寡核苷酸引物（见表 2）。

如以上所描述的，从幼茎组织中提取总 RNA 并采用寡聚（dt）层析柱分离多聚(A^+) mRNA。在一项 PCR 实验（退火温度为 50℃, 30 个循环，热启动）中采用 1 微克 mRNA，及两段棒曲霉素共有引物和 Taq DNA 聚合酶（Promege 英国公司）。

表 2

共有的棒曲霉素引物的序列

	序列（5'-3'）
P.1 (序列编号 7)	ATGGIGGIGCNTGYGGNTA
P.2 (序列编号 8)	TGCCARTTYTGNCCCCARTT

注解: Y=C 或 T, N=A 或 G 或 C 或 T, R=A 或 G, I=次黄苷

构建 cDNA 文库。对于第一条 cDNA 链的合成，在一个反应中采用 1 微克 mRNA 及 0.15 微克 OG1 寡聚 dt 引物和 AMV 反转录酶（9 单位/微升，Promega 英国公司，Southampton,英国）。

依照供应商的指导，将文库构建在λ ZAP II 载体上（Stratagene，剑桥，英国）。

采用所描述的方法，依照供应商（R&D 系统）所描述的方法，在琼脂平板上通过蓝-白克隆筛选来分离被转化的克隆。挑选出二十个白（“阳性”）克隆并测序。在这些当中，采用由 NCBI 提供的基础 BLAST 检索，鉴定出六个克隆含有与其它已知的棒曲霉素序列具有相似性的序列。所推定的转录产物的大小约为 450 个核苷酸（通过 PCR 和凝胶电泳测定）。采用一种正向引物对 PCR 产物进行测序，得到鉴定为序列编号 1-6 的序列。

实施例 2

核酸印迹分析

如以上所描述的从桉树（E. grandis）的茎、叶和根部分离总 RNA。将 20 微升 DEPC 水中的 6 微克 RNA 在等体积的变性溶液（50% 甲酰胺，2x TBE）中变性，并在标准的 1.5%琼脂糖凝胶上以 75 伏电泳 200 分钟。通过毛细管转移，将 RNA 从凝胶转移到“Zeta-Probe” GT 基因测试印迹膜（Biorad Laboratories, 加利福尼亚,美国）上。将通过 RT-PCR 从茎 mRNA（如以上所描述的）中产生的部分桉树（E. grandis）棒曲霉素序列用作 32P-随机引物标记，并依照膜供应商（Biorad Laboratories）建议的方法与被转移的 RNA 杂交。

实施例 3

Exp29 转化载体的制备

从黄瓜胚轴中提取 RNA。在塑料培养盘（35 厘米 x 25 厘米 x 6 厘米）内，将黄瓜（Cucumis sativus L.，cv Burpee pickler，来自 A.W. Burpee,Westminster，宾夕法尼亚州，美国）的种子播种在水浸润的毛状席垫（Fordingbridge Growers Supplies, Arundel, W. Sussex，英国）上，并在 27 ℃下使其在暗处发芽。4 天以后在绿光下收集白化的幼苗，通过切下胚轴顶端 20 毫米置于液氮中，并用预冷到-80 ℃的杵和研钵将其碾成细粉末。依据 Verwoerd 等（1989）的操作程序在一种热的苯酚/氯化锂缓冲液中抽提总 RNA。

载体构建。通过 RT-PCR 产生黄瓜 Ex29（基因库登记编号为 U30382；即 Cs-EXP1，Shcherban 等，1995）的编码序列，并将其克隆到 pDE326（由约克大学 Jürgen Denecke 博士友情提供的载体）的花椰菜花叶病毒 35S 启动子和 nos 终止子之间（见图 1a）。在 Ex29 棒曲霉素序列的插入之后，将该插入片段进行测序以检测阅读框插入的正确性，测序采用的引物位于 35S 启动子区域内。

在 EcoRI 和 HindIII 限制性内切位点之间切下含有 35S 启动子、Ex29 序列和 nos 终止子的插入片段，并将其插入到经过修饰的 Ti 质粒内以形成转化构建体。采用了两种被修饰的 Ti 质粒：由 Jürgen Denecke 博士提供的 pDE1001（Denecke 等，1992 或 Shcherban 等，1995）和 p35GUSINT（Vancanneyt 等，1990）。所构建的含有插入片段的质粒被称为 pDE/EXP29（pDE1001+EXP29）（见图 1b）和 pATC/EXP29（p35GUSINT+Ex29）（见图 1c），确认质粒的来源。

通过常规的方法将质粒转入大肠杆菌内；大肠杆菌菌株在含有适当抗生素以进行阳性选择的 LB 平板（37℃孵育，然后在 4℃保存）或 LB 培养基上生长。

通过直接的 DNA 转化或通过采用大肠杆菌转移功能菌株 HB101（pRK2013）进行三亲株杂交，将构建体引入土壤杆菌属（Agrobacterium）内（Figurski 和 Helinske，1979）。

两种根癌土壤杆菌（Agrobacterium tumefacien）被采用。一种 C58 菌株（C58C1（pGV2260）Deblacere，R 等，1985）由 Jürgen Denecke 博士友情提供，和 EHA105（Hood 等，1993）。土壤杆菌属（Agrobacterium）在 LB 平板（27℃培养，然后在 4℃保存）或含有适当抗生素以进行阳性筛选的 LB 培养基上生长。

根癌土壤杆菌（Agrobacterium tumefaciens）EHA105 pATC/EXP29 由 210 剑桥科学园、剑桥 CB4 4WA 高新技术（剑桥）有限公司按用于专利程序的微生物的国际保藏和认可的布达佩斯条约保藏在工业和海洋细菌国家保藏中心（the National Collection of Industrial and Marine Bacteria, NCIMB），23 St. Marchar 街道，阿泊丁郡，苏格兰，保藏日为 1998 年 10 月 25 日，保藏号为 NCIMB 40968。该微生物为根癌土壤杆菌（Agrobacterium tumefaciens）：EHB105 菌株，含有 pATC/EXP29。将黄瓜 EX29 的 cDNA 与 35S 花椰菜花叶病毒启动子和 nos 终止子一起插入到失活的 pBIN19 (Bevan, 1984) 内。然后将该质粒转入土壤杆菌属（Agrobacterium）菌株 EHA105 内。该构建体对于改变纤维细胞壁的扩张是有效的。

实施例 4

植物转化

在无菌条件下剪下幼年叶片，该叶片取自 25 ℃下在我们的组织培养实验室的生长室内、在装有 LS 培养基的 Magenta 盒子（7 厘米 x 7 厘米 x 13 厘米）内生长的、大约为 4 周龄的桉树（E. grandis）培养物，并将其用于土壤杆菌属(Agrobacterium)介导的感染(Horsch, Fry, Hoffman, Eichholtz, Rogers, 和 Fraley 1985)。在一间生长室的漫射光下，将接种过的组织留下在 LS 培养基（加上 20 克/升葡萄糖，0.7%琼脂糖，0.01 毫摩尔玉米素和 1 微摩尔 NAA）中共培养 4 天，条件同前。在 50 毫克/升卡那霉素和 250 毫克/升头孢氨噻肟中筛选转化株。

制备了两种用于植物转化的构建体，并将它们引入到两种土壤杆菌属(Agrobacterium)菌株，C58 和 EHA105 内，以产生含有 pDE+Ex29 的 C58、含有 pATC+Ex29 的 C58 和含有 pATC+Ex29 的 EHA105。将每种含有构建体的菌株接种 400 片从桉树（E.grandis）组织上剪切下来的叶片（在两种独立的场合下，每次接种 200 片叶片）。

进一步用 240 片叶片重复转化实验，用含有 pATC+Ex29 的的 EHA105 一起接种以提高可获得的可能转化子的数量。

从用 EHA105 接种的组织的原始组群中，将 25 株植物在温室内生长并确定根部的特性。

从对照植物的平均对照值为603毫米到被转化植株的546毫米可以看出，与35SCAmV启动子连接的棒曲霉素编码序列的引入可能已经引起了植物总体高度的降低。除了25株植物之外，4株对照和13株转基因植株也包括在本分析中。如以下表格中所分析的，这种高度的降低与节间长度的变化相关。表3中数据的卡方分析显示两群植株的显著性差异值为P< 0.01。

表3

节间长度的分类（毫米）	节间数目的分类		节间百分比的分类	
	对照	棒曲霉素	对照	棒曲霉素
10	1	7	3	6
20	10	28	28	24
30	9	28	28	24
40	4	21	11	18
50	1	9	3	8
60	6	12	17	10
70	2	7	6	6
80	3	4	8	3
>80	01			

从数据可以明显看出，在树木内对棒曲霉素活性水平的修饰可以被用于产生所需要的影响。为了提高生长，也许有必要采用下调技术，如棒曲霉素序列的反向或互补链的表达，或一部分有义棒曲霉素序列的表达，目的是提高纤维长度。

实施例5

以两种取向，即反义和有义取向分别引入序列编号1-6，并采用如实施例3和4中所描述的相同的方法，将它们转化桉树和烟草。图2表示了有义取向的质粒pATC/序列编号1，作为一种在转化中使用的质粒的代表。任何合适的转化载体均可以被采用。

据发现，新棒曲霉素序列的引入使被转化的植株同对照植株不同。

参考文献

Bamber RK (1985) 桉树的木质解剖和造纸。Appita 38:210-216

Bevan MW (1984) 植物转化的双重土壤杆菌载体。核酸研究 12, 871-8721

Boudet AM, Lapierre C + Grima-Pettenati J(1995) 木质化的生化和分子生物学。New Phytol. Tansley rev. 80, 129 203-236

Carpita NC, Gibeaut DM (1993)开花植物中初级细胞壁的结构模型: 生长过程中细胞壁物理特性的分子结构坚固性。植物杂志 3 (1): 1-30。

Cho H-T, Kende H (1997) 深水水稻节间内的棒曲霉素。植物生理 113 1137-1143

Cho H-T, Kende H (1997) 深水水稻的棒曲霉素和节间生长。植物生理 113 1145-1151

Cosgrove DJ (1993) 细胞壁延展性-其本质、测定及与植物细胞生长的关系。新植物学 124 (1): 1-23

Cosgrove DJ (1996) 植物细胞的增大及棒曲霉素的作用。生物测定 18 (7): 533-540

Cosgrove DJ, Bedinger P, Durachro(1997)作为细胞壁松弛剂的禾本科花粉 I 型变应原。美国国家科学院院刊 94 6559-6564

Deblaere, R. Bytebier, B. De Greve, H., Deboaeck, F., Schell, J., Van Montagu, M. Leemans, J. (1985) 用于土壤杆菌调节的基因转移到植物内的有效章鱼碱 T-质粒载体。核酸研究, 13, 4777-4788

Denecke J. Rycke RD, Botterman J (1992)植物和哺乳动物分类信号—滞留在内质网内的蛋白含有一段保守的抗原决定簇。欧洲生物化学杂志 11 (6): 2345-2355

Figurski D, Helinske DR(1979)包含来源的质粒 RK2 的衍生物的复制依赖于一种反向提供的质粒功能。美国国家科学院院刊, 75, 1648-1652

Grima-Pettenati J, Feullet C, Goffner D, Borderies G, Boudet AM(1993) 编码苯丙烯盐基乙醇脱氢酶的一种桉树

（Eucalyptus gunnii）克隆的分子克隆和表达。植物分子生物学 21: 1085-1095

Hawkins SW, Boudet AM (1994) 来自桉树（Eucalyptus gunnii Hook）周皮的苯丙烯盐基乙醇脱氢酶对碘氧基苯甲醚的纯化和定性。植物生理 104: 75-84

Herrera-Estrella I, De Block M, Messens E, Hernalsteens JP, Van Montagu M, Schell J (1983) 植物细胞中作为显性选择标记的嵌合基因。欧洲生物化学杂志 2: 987-995

Hibino T, Chen J-Q, Shibata D +Miguchi T(1994)编码苯丙烯盐基乙醇脱氢酶的一种桉树总状花序基因的核苷序列。植物生理 104 305-306

Hood EE, Gelvin SB, Melcheri LS, Hoekma A(1993)用于基因导入植物内的新土壤杆菌协助质粒。转基因研究 2, 208-218

Horsch RB, Fry JE, Hoffman NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT (1985) 一种将基因转入植物内的简单通用的方法。科学 227: 1229-2123

Keller E, Cosgrove DJ (1995)生长旺盛的西红柿叶片内的棒曲霉素。植物杂志 8: 795-802

Li Z-C, Durachko DM, Cosgrove DM (1993)在体外诱导细胞壁扩张、并且与来自黄瓜胚轴的类似蛋白具有抗原相关的一种燕麦胚芽鞘细胞壁蛋白。植物 191: 349-356

McQueen-Mason S (1995)棒曲霉素与细胞壁的扩张。J. Exp. Bot. B46(292):1639-1650

McQueen-Mason S, Cosgrove DJ (1993)黄瓜棒曲霉素在体外破坏细胞纤维素之间的氢键。植物生理 102（1）: 122

McQueen-Mason S, Cosgrove DJ (1994)诱导细胞壁扩张的蛋白破坏了植物细胞壁多聚体之间的氢键结合。美国国家科学院院刊 91: 6574-6578

McQueen-Mason S, Cosgrove DJ (1995)对细胞壁作用的棒曲霉素模型；细胞壁水解、应力松弛和结合的分析。植物生理 107: 87-100

McQueen-Mason S, Durachko DM, Cosgrove DJ (1992)在植物内诱导细胞壁扩张的两种内源性蛋白。植物细胞 4: 1425-1433

Mike BLA, Iyer VN (1990) 基因转入植物内的基本原理。在: Dennis DT, Turpin DH (编辑) 植物生理、生化和分子生物学，第一版，朗文科学与技术出版社，英国

Pawlowski K, Kunze R, De Vries S, Bisseling T (1994)从植物组织中分离总、多聚（A）和多核糖体 RNA。Kluwer 学院出版社，Belgium

Poeydomenge O, Boudet AM, Grima-Pettenati J(1994)来自桉树（Eucalyptus）的一种 cDNA 编码 S-辅酶-L-甲硫氨酸: 咖啡酸 3-O-转甲基酶。植物生理 105: 749-750

Ranatunga MS (1964)生长在锡兰（Ceylon）的桉树（Eucalyptus grandis）纤维长度的研究。锡兰森林 6: 101-112

Shcherban TY, Shi J, Durachko DM, Guiltinan MJ, McQueen-Mason S, Shieh M, Cosgrove DJ (1995)棒曲霉素 —— 一种在植物内部调节细胞壁扩张的高度保守和多基因家族的蛋白 —— 的分子克隆和序列分析。美国国家科学院院刊 92: 9245-9249

Seth RS(1995)纤维长度和糙度对湿网张力强度的影响: 一种统计几何学的诠释。Tappi J 78(3) 99-102

Stewart 等（1994）

Vanncanneyt, G, Schmide, R., O'Connor-Sanchez A, Willmitzer L, Rocha-Sosa M (1990)含有内含子的标记基因的构建: 内含子在转基因植物内的拼接及其在监控土壤杆菌调节的植物转化早期事件中的作用。分子基因遗传学 220, 245-250

Verhaegen, D, Plomion C (1996)采用 RAPD 标记对桉树（Eucalyptus urophylla）绘制的遗传图谱。基因组 39: 1051-1061

Verwoerd TC, Dekker VMM, Hoekema A (1989)快速分离植物 RNA 的小量方法。核酸研究 17（6）: 2362

Walden R (1994)细胞培养，转化和基因技术。在: Les PJ, Leegood RC(编辑)植物生化和分子生物学，第一版，John Wiley & Sons 有限公司，伦敦

Weising K, Schell, J, Kahl G. (1988)植物内的异源基因: 转移、结构、表达和应用。遗传年鉴 22: 421-477

序列清单

（1）一般信息

(i) 申请者:

（A）姓名: 高新技术（剑桥）有限公司

（Advanced Technologies(Cambridge)Limited）

（B)街道: Globe House, 1 Water Street

（C）城市: 伦敦

（E）国家: 英国

（F）邮编: WC2R3LA

（ii）发明题目: 植物纤维的修饰

（iii）序列数目: 8

(iv)联系地址:

（A）地址: 英国美国烟草（投资）有限公司

British American Tobacco(Investments) Limited

（B）街道: Regents Park Road

（C）城市: 南安普敦（Southampton）

（D）郡: 汉普郡（Hampshire）

（E）国家: 英国

（F）邮编: SO15 8TL

(v)计算机可读形式:

(A) 介质类型: 3.50英寸磁盘

(B) 计算机: Viglen P5/75

(C) 操作系统: MS-DOS Windows95

(D)软件: Microsoft Word 97

(vi) 本次申请数据:

(A) 申请号: 目前未知

(C) 分类: 目前未知

(viii)代理人/代理商信息:

(A)姓名: M.R. Walford女士 / K.J.H. MacLean先生

(C)索引: RD-ATC-19

(ix)通讯信息:

(A)电话: 01703 777155
(B)电传: 01703 779856

(2)序列编号: 1的信息

(i)序列特征:

(A)长度: 488个碱基对
(B)类型: 核酸
(C)链的性质: 双链
(D)拓扑学: 线性

(ii)分子类型: cDNA

(vi)原始来源:

(A)生物: 桉树(Eucalyptus grandis)

(xi)序列描述: 序列编号: 1:

```
ATGGGGGGGG CTTGTGGGTA TGGCAACCTG TACAGCCAAG GCTATGGCAC      50

CAACACTGCA GCTTTGAGCA CTGCCCTGTT CAACAATGGC CTGAGCTGCG     100

GGGCATGTTA CGAGATGCGG TGCAACGACG ACCCCAGGTG GTGCCTCCCG     150

GGGACCATCA TGGTCACGGC AACCAACTTT TGCCCTCCCA ACTTGGCCCT     200

CTCCAACGAC AATTGCGGCT GGTGCAACCC CCCTCTCCAG CACTTCGATA     250

TGGCCGAGCC TGCTTTCTTG CAGATTGCCC AGTACAAAGC TGGGATTGTC     300

CAGGTTTCCT TCAGAAGGGT TCCGTGTGTG AAGAAAGGAG GGGTAAGGTT     350

CACCATCAAT GGGCACTCCT ACTTCAACTT GGTGCTGATC ACCAACGTGG     400

GAGGTGCTGG TGATGTCCAT TCCGTTTCCA TCAAGGGCTC GAGGACTGGT     450

TGGCAAGCCA TGTCAAGGAA CTGGGGCAAA AACTGGCA                  488
```

(2)序列编号: 2的信息

(i)序列特征:

(A)长度: 475个碱基对
(B)类型: 核酸
(C)链的性质: 双链
(D)拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(vi) 原始来源:

(A) 生物: 桉树(Eucalyptus grandis)

(xi) 序列描述: 序列编号: 2:

ATGGGGGGGG CATGCGGGTA TGGCAACCTG TACAGCCAAG GCTATGGCAC 50

CAACACTGCA GCTTTGAGCA CTGCCCTGTT CAACAATGGC CTGAGCTGCG 100

GGGCATGTTA CGAGATGCGG TGCAACGACG ACCCCAGGTG GTGCCTCCCG 150

GGGACCATCA TGGTCACGGC AACCAACTTT TGCCCTCCCA ACTTGGCCCT 200

CTCCAACGAC AATGGCGGCT GGTGCAACCC CCCTCTCCAG CACTTCGATA 250

TGGCCGAGCC TGCTTTCTTG CAGATTGCCC AGTACAAAGC TGGGATTGTC 300

CCGGTTTCCT TCAGAAGGGT TCCGTGTGTG AAGAAAGGAG GGGTAAGGTT 350

CACCATCAAT GGGCACTCCT ACTTCAGCTG TGGTGCTGAT CACCAACGTG 400

GGAGGTGCTG GTGATGTCCA TTCCGTTTCC ATCAAGAGCT CGAGGACTGG 450

TTGGCAAGCC ATGTCAAGGA ATTGA 475

(2) 序列编号: 3 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 494 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链的性质: 双链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(vi) 原始来源:

(A) 生物: 桉树(Eucalyptus grandis)

(xi) 序列描述: 序列编号: 3:

```
ATGGGGGGGG CATGTGGTTA CGGGGACCTT CACAGGGCCA CCTATGGCAA   50

GTACAGTGCC GGCTTGAGCT CGATGCTGTT CAACAGAGGG AGTACCTGCG  100

GGGCTTGCTT CGAGCTCCGG TGCGTCGACC ACATTTTGTG GTGCCTCCCT  150

GGTAGCCCGT CGGTGATCCT CACCGCCACC GACTTCTGCC CTCCGAACTA  200

CGGGCTCGCG GCAGATTACG GCGGGTGGTG CAACTTCCCG CAGGAGCACT  250

TCGAGATGTC GGAGGCGGCC TTCGCCGAGA TTGCGGTGCG AAGGGCTGAT  300

GTGGTGCCTA TCCAGTACAG GAGGGTGAAC TGTCTGAGAA GCGGTGGTCT  350

GAGATTCACA TTGAGCGGAA ACTCTCACTT CTTTCAGGTC TTGGTGACGA  400

ATGTAGGCCT AGATGGGGAG GTGATTGCCA TGAAAATGAA GGGATCGAAA  450

ACAGGGTGGA TACCGATGGC AAGAAACTGG GGCAAAAACT GGCA        494
```

（2）序列编号：4的信息

（i）序列特征：

（A）长度：437个碱基对

（B）类型：核酸

（C）链的性质：双链

（D）拓扑学：线性

（ii）分子类型：cDNA

（vi）原始来源：

（A）生物：桉树（Eucalyptus grandis）

（xi）序列描述：序列编号：4：

ATGGGTTGCC ACCGGGTCCT TGATCCTTTG ATGGCCACGG AGTGCACATC 50

CCCTGCTCCG CCGACATTGG TTATGAGCAC GAGGTTGAAA TAAGAATGGC 100

CGTTGACGGT GAACCGGATC CCTCCGCTTC TCCTGCACCT CACTCTTCGG 150

TAGGCCACCG GGACGATCCC GGCCCTGTAC TGCGCAATGT GCTGGAAGAC 200

CGGCTGGGAG AGGTCGAAAT GGAGTTGAGG AGGGTCGCAC CACCCTCCTG 250

GAGGGCAGAA GTTGGTCGCC GTGACCACAA TGGCGCCCGG GAGGCACCAC 300

TGCGGGTCGT TCACGCACCG GAGCTCAAAG CACGCGCCGC AGCTCAGCCC 350

ATTGTTGAAC AATGCAGTGC TCAGTGCAGC TGTGTTTGTG CCGTACCCTT 400

GGCTGTATAG ATTCCCATAA CCACACGCCC CCCCCAT 437

(2) 序列编号: 5 的信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 437 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链的性质: 双链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(vi) 原始来源:

(A) 生物: 桉树(Eucalyptus grandis)

(xi) 序列描述: 序列编号: 5:

```
ATGGGTTGCC ACCGGGTCCT TGATCCTTTG ATGGCCACGG AGTGCACATC      50

CCCTGCTCCG CCGACATTGG TTATGAGCAC GAGGTTGAAA TAAGAATGGC     100

CGTTGACGGT GAACCGGATC CCTCCGCTTC TCCTGCACCT CACTCTTCGG     150

TAGGCCACAG GGACGATCCC GGCCCTGTAC TGCGCAATGT GCTGGAAGAC     200

AGGCTGGGAG AGGTCGAAAT GGAGTTGAGG AGGGTCGCAC CACCCTCCTG     250

GAGGGCAGAA GTTGGTCGCC GTGACAACAA TGGCGCCCGG GAGGCACCAC     300

TGCGGGTCGT TCACGCACCG GAGCTCAAAG CACGCGCCGC AGCTCAGCCC     350

ATTGTTGAAC AATGCAGTGC TCAGTGCAGC TGTGTTTGTG CCGTACCCTT     400

GGCTGTATAG ATTCCCATAA CCACACGCCC CCCCCAT                   437
```

（2）序列编号：6的信息

（i）序列特征

（A）长度：448个碱基对

（B）类型：核酸

（C）链的性质：双链

（D）拓扑学：线性

（ii）分子类型：cDNA

（vi）原始来源：

（A）生物：桉树（Eucalyptus grandis）

（xi）序列描述：序列编号：6

CCTTGACATG GTCTGCCACC TTGTCCGCGA ACCCTTCACG GCGACCGAGT 50

TGACGTTGCC TGCGCCGCCG ACGTTTGTGA CGAGGACGAG CTTGAAGTAT 100

GAGTTGCCGT TGATGGTGAA CCGGATGCCT CCTCTCCTCC TGCACGTCAC 150

CCTCCTGTAC GCAACGTGGA CGATGCCGGC TCGGTACTTG GCAATGTGCT 200

GGAAGACGGG CTGGGAGATG TCGAAGTGGT GTTGGGGCCG GTTGCACCAT 250

CCGCCGGCGT TGTTTGGGAG GGCGTTGTTT GGCGGGCAGA AGTTTGTGGC 300

GGTGACGACG ATGGAGCCGC CCAGGCACCA CTTTCCGTCG TTCACGCACC 350

GGATCTCGAA GCACGACCCC CAGCTCAGCC CGTTTTTTAA CAGCGCCGTG 400

CTCAGCGCCG CCGTGTTCGT ACCGTAGCCC TGGCTGTACA GGTTGCCG 448

（2）序列编号：7的信息

（i）序列特征：

（A）长度： 19个核碱基

（B）类型： 核酸

（C）链的性质： 单链

（D）拓扑学： 线性

（ii）分子类型： 合成的DNA

（xi）序列描述： 序列编号：7

ATGGIGGIGC NTGTGGNTA 19

注解 I = 次黄苷

N = A、G、T、或C

（2）序列编号：8的信息

（i）序列特征：

（A）长度： 20个核碱基

（B）类型： 核酸

（C）链的性质： 单链

（D）拓扑学： 线性

（ii）分子类型： 合成的DNA

（xi）序列描述： 序列编号：8

TGCCARTTYT GNCCCCARTT 20

注解 R = A 或 G

Y = T 或 C

N=A、G、T 或 C

序列清单

<110>高新技术（剑桥）有限公司）

<120>植物纤维的修饰

<130>RD－ARC－19

<140>PCT/GB99/02746

<141>1999-08-18

<160>8

<170>专利版本 2.1

<210>1

<211>488

<212>DNA

<213>桉树

<400>1

atgggggggg cttgtgggta tggcaacctg tacagccaag gctatggcac caacactgca 60
gctttgagca ctgccctgtt caacaatggc ctgagctgcg gggcatgtta cgagatgcgg 120
tgcaacgacg accccaggtg gtgcctcccg gggaccatca tggtcacggc aaccaacttt 180
tgccctccca acttggccct ctccaacgac aattgcggct ggtgcaaccc ccctctccag 240
cacttcgata tggccgagcc tgctttcttg cagattgccc agtacaaagc tgggattgtc 300
caggtttcct tcagaagggt tccgtgtgtg aagaaaggag gggtaaggtt caccatcaat 360
gggcactcct acttcaactt ggtgctgatc accaacgtgg gaggtgctgg tgatgtccat 420
tccgtttcca tcaagggctc gaggactggt tggcaagcca tgtcaaggaa ctggggcaaa 480
aactggca 488

<210>2

<211>475

<212>DNA

<213>桉树

<400>2

atgggggggg catgcgggta tggcaacctg tacagccaag gctatggcac caacactgca 60
gctttgagca ctgccctgtt caacaatggc ctgagctgcg gggcatgtta cgagatgcgg 120
tgcaacgacg accccaggtg gtgcctcccg gggaccatca tggtcacggc aaccaacttt 180
tgccctccca acttggccct ctccaacgac aatggcggct ggtgcaaccc ccctctccag 240
cacttcgata tggccgagcc tgctttcttg cagattgccc agtacaaagc tgggattgtc 300
ccggtttcct tcagaagggt tccgtgtgtg aagaaaggag gggtaaggtt caccatcaat 360
gggcactcct acttcagctg tggtgctgat caccaacgtg ggaggtgctg gtgatgtcca 420
ttccgtttcc atcaagagct cgaggactgg ttggcaagcc atgtcaagga attga 475

<210>3
<211>494
<212>DNA
<213>桉树

<400>3

atgggggggg catgtggtta cggggacctt cacagggcca cctatggcaa gtacagtgcc 60
ggcttgagct cgatgctgtt caacagaggg agtacctgcg gggcttgctt cgagctccgg 120
tgcgtcgacc acattttgtg gtgcctccct ggtagcccgt cggtgatcct caccgccacc 180
gacttctgcc ctccgaacta cgggctcgcg gcagattacg gcgggtggtg caacttcccg 240
caggagcact tcgagatgtc ggaggcggcc ttcgccgaga ttgcggtgcg aagggctgat 300
gtggtgccta tccagtacag gagggtgaac tgtctgagaa gcggtggtct gagattcaca 360
ttgagcggaa actctcactt ctttcaggtc ttggtgacga atgtaggcct agatggggag 420
gtgattgcca tgaaaatgaa gggatcgaaa acagggtgga taccgatggc aagaaactgg 480
ggcaaaaact ggca 494

<210>4
<211>437
<212>DNA
<213>桉树

<400>4

atgggttgcc accgggtcct tgatcctttg atggccacgg agtgcacatc ccctgctccg 60
ccgacattgg ttatgagcac gaggttgaaa taagaatggc cgttgacggt gaaccggatc 120
cctccgcttc tcctgcacct cactcttcgg taggccaccg ggacgatccc ggccctgtac 180
tgcgcaatgt gctggaagac cggctgggag aggtcgaaat ggagttgagg agggtcgcac 240
caccctcctg gagggcagaa gttggtcgcc gtgaccacaa tggcgcccgg gaggcaccac 300
tgcgggtcgt tcacgcaccg gagctcaaag cacgcgccgc agctcagccc attgttgaac 360
aatgcagtgc tcagtgcagc tgtgtttgtg ccgtaccctt ggctgtatag attcccataa 420
ccacacgccc cccccat 437

<210>5
<211>437
<212>DNA

<213>桉树

<400>5

atgggttgcc accgggtcct tgatcctttg atggccacgg agtgcacatc ccctgctccg 60
ccgacattgg ttatgagcac gaggttgaaa taagaatggc cgttgacggt gaaccggatc 120
cctccgcttc tcctgcacct cactcttcgg taggccacag ggacgatccc ggccctgtac 180
tgcgcaatgt gctggaagac aggctgggag aggtcgaaat ggagttgagg agggtcgcac 240
caccctcctg gagggcagaa gttggtcgcc gtgacaacaa tggcgcccgg gaggcaccac 300
tgcgggtcgt tcacgcaccg gagctcaaag cacgcgccgc agctcagccc attgttgaac 360
aatgcagtgc tcagtgcagc tgtgtttgtg ccgtaccctt ggctgtatag attcccataa 420
ccacacgccc cccccat 437

<210>6
<211>448
<212>DNA
<213>桉树

<400>6

ccttgacatg gtctgccacc ttgtccgcga acccttcacg gcgaccgagt tgacgttgcc 60
tgcgccgccg acgtttgtga cgaggacgag cttgaagtat gagttgccgt tgatggtgaa 120
ccggatgcct cctctcctcc tgcacgtcac cctcctgtac gcaacgtgga cgatgccggc 180
tcggtacttg gcaatgtgct ggaagacggg ctgggagatg tcgaagtggt gttggggcgg 240
gttgcaccat ccgccggcgt tgtttgggag ggcgttgttt ggcgggcaga agtttgtggc 300
ggtgacgacg atggagccgc ccaggcacca ctttccgtcg ttcacgcacc ggatctcgaa 360
gcacgacccc cagctcagcc cgtttttaa cagcgccgtg ctcagcgccg ccgtgttcgt 420
accgtagccc tggctgtaca ggttgccg 448

<210>7
<211>19
<212>DNA
<213>合成序列

<220>
<223>合成序列的描述: PCR 引物

<220>
<221>被修饰的碱基
<222>5
<223>i

<220>
<221>被修饰的碱基
<222>8

<223>i

<400>7
atggaggagc ntgtggnta

<210>8
<211>20
<212>DNA
<213>合成序列

<220>
<223>合成序列的描述: PCR 引物

<400>8
tgccarttyt gnccccartt

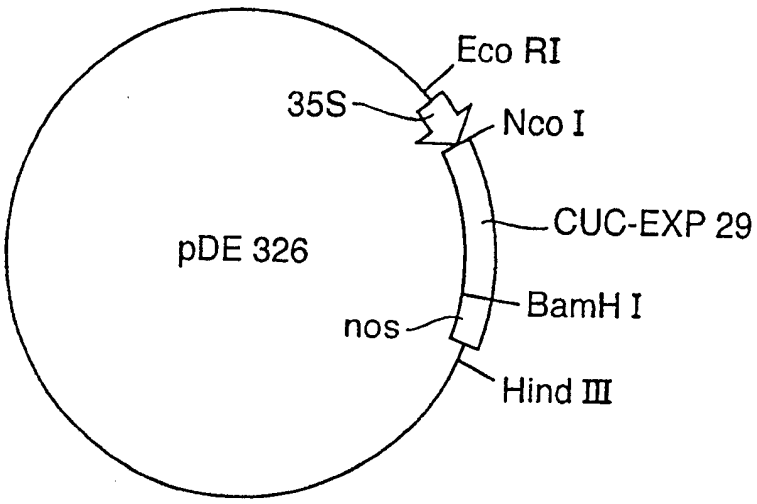

Eco RI
35S
Nco I
CUC-EXP 29
pDE 326
BamH I
nos
Hind Ⅲ

图 1a

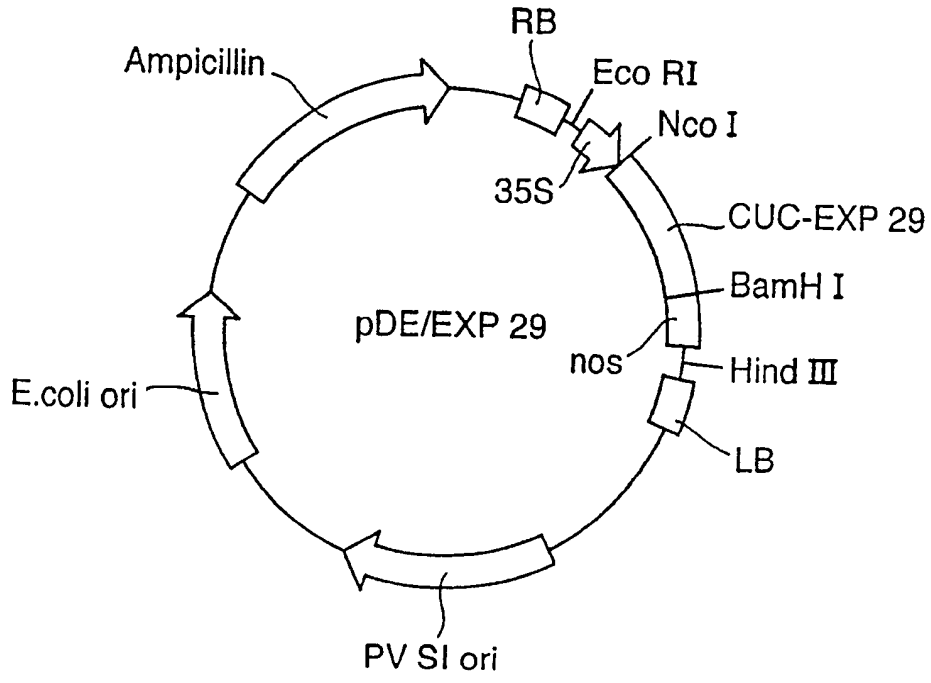

RB
Ampicillin
Eco RI
Nco I
35S
CUC-EXP 29
BamH I
pDE/EXP 29
nos
Hind Ⅲ
E.coli ori
LB
PV SI ori

图 1b

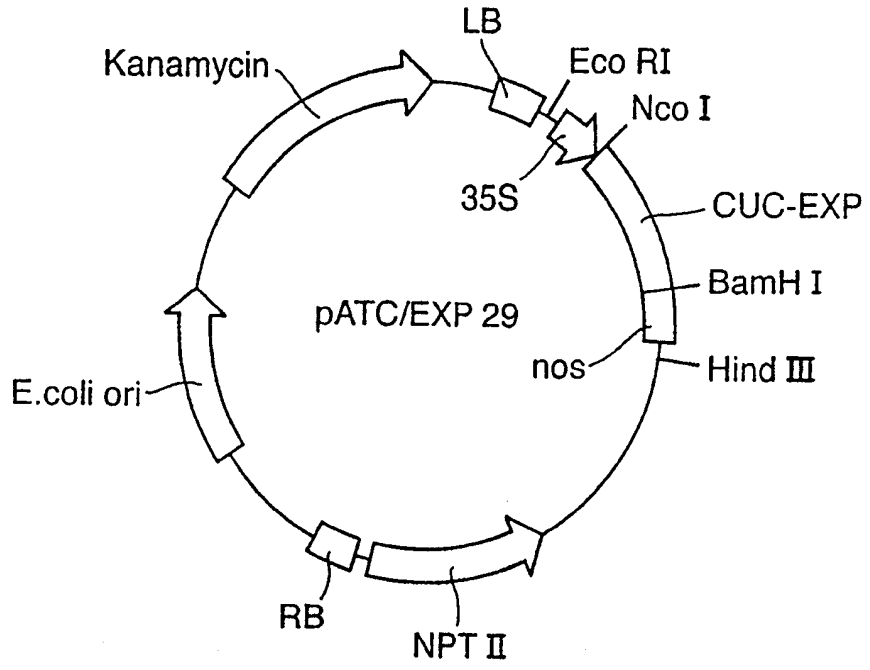

LB
Kanamycin
Eco RI
Nco I
35S
CUC-EXP
BamH I
pATC/EXP 29
nos
Hind Ⅲ
E.coli ori
RB
NPT Ⅱ

图 1c

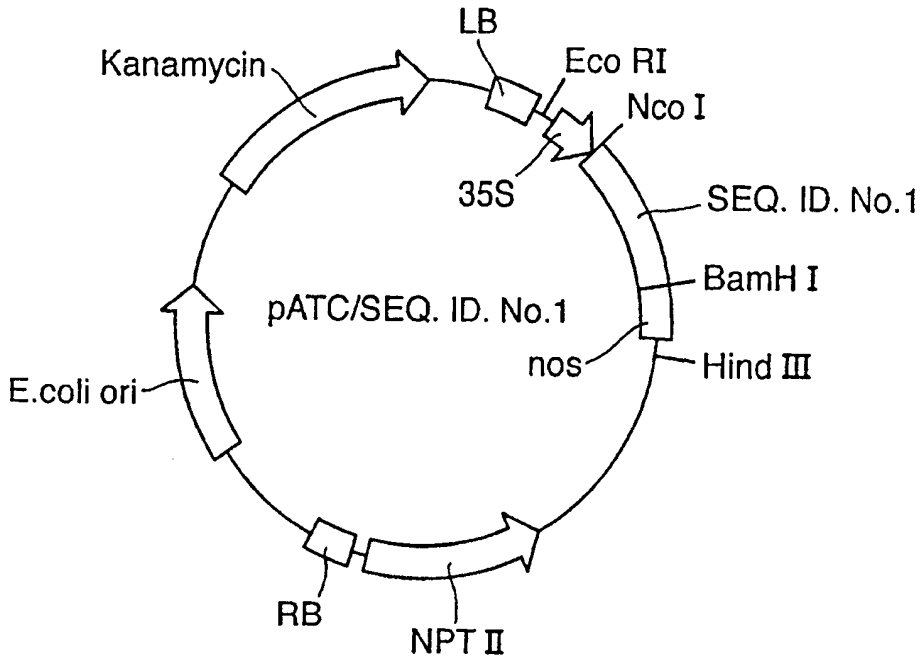

LB
Kanamycin
Eco RI
Nco I
35S
SEQ. ID. No.1
BamH I
pATC/SEQ. ID. No.1
nos
Hind Ⅲ
E.coli ori
RB
NPT Ⅱ

图 2