



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102725402 B

(45) 授权公告日 2016. 02. 03

(21) 申请号 201080005141. 2

(22) 申请日 2010. 07. 16

(30) 优先权数据

12/692, 552 2010. 01. 22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 07. 22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/042357 2010. 07. 16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/068567 EN 2011. 06. 09

(73) 专利权人 先正达参股股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 T. R. 霍克斯 M. P. 朗福德

R. C. 维纳 B. T. M. 弗努伊杰

R. 达尔 S. 辛格 V. 克拉默

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 傅宇昌

(51) Int. Cl.

C12N 9/02(2006. 01)

C12N 15/82(2006. 01)

(56) 对比文件

US 6245968 B1, 2001. 06. 12,

CN 101586108 A, 2009. 11. 25,

WO 0246387 A2, 2002. 06. 13,

审查员 王子晔

权利要求书1页 说明书47页

序列表110页 附图4页

(54) 发明名称

新颖的羟基苯丙酮酸双加氧酶多肽及其使用方法

(57) 摘要

提供了新颖的羟基苯丙酮酸双加氧酶 (HPPD) 多肽、变体及其片段, 连同编码能够向植物赋予商业水平的赋予 HPPD 除草剂抗性或耐受性的多肽、变体及其片段的多核苷酸。提供了包括对于 HPPD 多肽的氨基酸序列、以及它们的变体和片段, 连同编码它们的多核苷酸。还提供了用于生产和使用表达这些新颖的 HPPD 多肽的 HPPD 除草剂抗性植物的方法、用于在作物场所的大田中选择性地控制杂草的方法、以及用于测定、表征、鉴定和选择这些新颖的 HPPD 的方法。

1. 由 SEQ ID NO :1 所示但在下列位置处被取代的氨基酸序列组成的多肽 :在 339 位, I 被 E、D 或 C 取代 ;或, 在 358 位 L 被 M 取代, 在 326 位 A 被 R 取代, 在 217 位 V 被 I 取代且在 339 位 I 被 E 取代 ;或, 在 358 位 L 被 M 取代, 在 326 位 A 被 R 取代, 在 217 位 V 被 L 取代且在 339 位 I 被 E 取代。

2. 编码如权利要求 1 所述的多肽的多核苷酸。

3. 如权利要求 2 所述的多核苷酸, 其中该核苷酸序列被优化用于在植物中进行表达。

4. 表达盒, 该表达盒包括可操作地连接于启动子的如权利要求 3 所述的多核苷酸, 该启动子在植物或植物细胞中驱动表达。

5. 如权利要求 4 所述的表达盒, 进一步包括可操作地连接的编码多肽的多核苷酸序列, 该多肽赋予希望的性状。

6. 如权利要求 5 所述的表达盒, 其中所述希望的性状是对除草剂的抗性 or 耐受性。

7. 如权利要求 6 所述的表达盒, 其中所述希望的性状是对 HPPD 抑制剂、草甘膦、或草铵膦的抗性 or 耐受性。

8. 如权利要求 7 所述的表达盒, 其中赋予希望的性状的所述多肽是细胞色素 P450。

9. 如权利要求 7 所述的表达盒, 其中赋予希望的性状的所述多肽是 EPSPS (5-烯醇丙酮莽草酸 -3-磷酸合成酶) (5-enol-pyrovyl-shikimate-3-phosphate-synthase)。

10. 如权利要求 7 所述的表达盒, 其中赋予希望的性状的所述多肽是草胺膦乙酰转移酶。

11. 包括如权利要求 4-10 任一项所述的表达盒的载体。

12. 用于在植物中赋予对 HPPD 抑制剂的抗性 or 耐受性的方法, 该方法包括将如权利要求 4-10 任一项所述的至少一个表达盒引入到该植物中。

13. 制备来自转化的植物细胞的植物的方法, 其中所述转化的植物细胞包括如权利要求 4-10 所述的至少一个表达盒。

14. 如权利要求 13 所述的方法, 其中所述植物细胞是水稻、大麦、马铃薯、甘薯、低芥酸菜籽、向日葵、黑麦、燕麦、小麦、玉米、大豆、甜菜 (sugar beet)、烟草、芒草、柳枝稷、红花、树类、棉花、木薯、番茄、高粱、苜蓿、甜菜、以及甘蔗植物细胞。

15. 如权利要求 14 所述的方法, 其中所述植物细胞是大豆植物细胞。

16. 在场所控制杂草的方法, 该方法包括对该场所施用杂草控制量的一种或多种 HPPD 抑制剂, 其中该场所包括权利要求 13 所述的转化植物细胞的植物, 和其中一种或多种 HPPD 抑制剂是甲基磺草酮 (mesotrione), sulcitrione, 异噁唑草酮 (isoxaflutole), tembotrione, 和 bicyclopyrone。

新颖的羟基苯丙酮酸双加氧酶多肽及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 在此要求对于 2010 年 1 月 22 日提交的美国专利申请号 12/692, 552、2009 年 7 月 10 号提交的美国临时申请号 61/224, 661、以及对于 2009 年 1 月 22 号提交的美国临时申请号 61/146, 513 的优先权, 将它们每一个通过引用以其全文结合在此。

[0003] 发明的技术领域

[0004] 本发明涉及向植物赋予除草剂抗性或耐受性的新颖的羟基苯丙酮酸双加氧酶 (HPPD) 多肽以及编码它们的核酸序列。本发明的方法涉及表达这些突变体 HPPD 多肽并且对于 HPPD 除草剂具有抗性的植物的产生和用途。

[0005] 发明背景

[0006] 羟基苯丙酮酸双加氧酶 (HPPD) 是催化对羟基苯丙酮酸 (HPP) 被转化成尿黑酸盐的反应的酶。这个反应在酶结合的铁 (Fe^{2+}) 和氧的存在下发生。通过抑制 HPPD 而起作用的除草剂是熟知的, 并且包括异噁唑类、二酮腈类、三酮类、以及吡唑啉盐类 (pyrazolinate) (Hawkes "Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase (HPPD)-The Herbicide Target." In Modern Crop Protection Compounds. Eds. Krämer and Schirmer. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2007. Ch. 4. 2, pp. 211-220)。HPPD 的抑制作用阻断了从酪氨酸生物合成质体醌 (PQ)。PQ 在类胡萝卜素色素的生物合成中是一种必需的辅因子, 这些类胡萝卜素色素对于光合中心的光防护是必需的。抑制 HPPD 的除草剂是韧皮部可移动的漂白剂, 它们引起暴露于光的新的分生组织和叶子显现出白色。在缺乏类胡萝卜素下, 叶绿素是光破坏性的并且通过单线态氧的光生作用而自身变成一种光化裂解剂。

[0007] 用于提供耐受 HPPD 除草剂的植物的方法同样是已知的。这些方法包括: 1) 将 HPPD 酶过量表达从而在植物中产生大量的 HPPD 酶, 这些 HPPD 酶与一种给定的除草剂是充分有关的从而具有足够的可供使用的用于植物茁壮成长的功能性酶 (尽管存在该除草剂); 并且 2) 将一种特定的 HPPD 酶突变成一种对于通过除草剂的抑制是较不敏感的酶。已经描述了为了改进 HPPD 除草剂耐受性的用于突变 HPPD 酶的方法 (参见, 例如, PCT 申请号 WO 99/24585 和 WO 2009/144079), 并且植物 HPPD 酶的一些特定的突变 (例如, 拟南芥属 HPPD 序列中的 G422 的突变) 据称能够提供对于甲基磺草酮和其他三酮除草剂的一定量度的耐受性。然而, 迄今所报道的酶动力学的和完整的植物数据不足以推定所报道的突变是否向相应的野生型酶赋予了商业上重要的益处。

[0008] 此外, 虽然一种特定的突变体 HPPD 酶可以提供一個有用水平的对于一些 HPPD 抑制剂除草剂的耐受性, 相同的 HPPD 可能相当不足以提供商业水平的对于一种不同的、更希望的 HPPD 抑制剂除草剂的耐受性 (参见, 例如, 美国专利申请公开号 20040058427; PCT 公开号 WO 98/20144 和 WO 02/46387; 还参见美国专利申请公开号 20050246800, 它涉及作为相对耐受 HPPD 的大豆品种的鉴定和标记)。而且, 还有待报道来自具有改进的对三酮类型除草剂的抗性的冷气候禾本科植物 (cool-climate grass) 的 HPPD 的突变形式。此类突变体将是非常令人希望的, 这是由于来自冷气候禾本科植物的 HPPD 优于其他类型 (参见, 例如, PCT 申请号 WO 02/46387 和 Hawkes et al. 2001 in Proc. Brit. Crop Prot. Conf. Weeds

2,563)。因此,需要用于向不同的作物和作物品种赋予商业水平的 HPPD 除草剂耐受性的新的方法和组合物。

[0009] 发明概述

[0010] 在此提供了用于向植物赋予羟基苯丙酮酸双加氧酶 (HPPD) 除草剂抗性或耐受性的组合物和方法。这些组合物包括对于 HPPD 多肽的核苷酸和氨基酸序列。在某些实施方案中,本发明的这些多肽是新颖的 HPPD,这些新颖 HPPD 来自于植物并且当在其他植物中异源表达时赋予对于某些类别的抑制 HPPD 的除草剂的抗性或耐受性。在具体的实施方案中,这些 HPPD 多肽包括在 SEQ ID NOs :2-12 中列出的、特别是在 SEQ ID NOs :2-8 中列出的氨基酸序列,以及具有与展示 HPPD 酶活性的 SEQ ID NOs :2-12 至少大约 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91% 或 90% 的序列同一性的多肽。

[0011] 优选的新颖的 HPPD 同样是与现有技术的 HPPD 酶相比展示出对于一种或多种类型的 HPPD 除草剂的优越的耐受性并且其中耐受性是在体外由参数 ($k_{\text{off}} \times k_{\text{cat}}/K_{\text{m HPPD}}$) 的数值来表征的那些,其中 k_{off} 是决定 HPPD 酶与除草剂的复合体的解离速率的速率常数并且 $k_{\text{cat}}/K_{\text{m HPPD}}$ 是催化转化数除以对于底物 HPP (4-羟基苯基丙酮酸) 的 K_{m} 值。

[0012] 在本发明的一个另外的实施方案中,因此还提供了一种用于表征和选择赋予优越水平的对于 HPPD 除草剂的耐受性的 HPPD 的体外方法,这种方法是基于测量并且比较 $k_{\text{cat}}/K_{\text{m HPPD}}$ 和 k_{off} 值或这些参数的功能性等同物。

[0013] 在另外的实施方案中,本发明的这些多肽是从植物得到的催化上具有活性的突变体 HPPD,并且这些多肽相对于相似的未突变酶赋予了优越水平的对某些类别的抑制 HPPD 的除草剂的抗性或耐受性。在具体的实施方案中,这些突变体 HPPD 多肽包括选自 SEQ ID NOs :15-19 的一种或多种氨基酸序列,其中 SEQ ID NOs :15-19 具有如以下所述的一个或多个氨基酸置换:

[0014] 关于序列 (L, I, R) (V, A) (G, A) DVL (S, T) (SEQ ID NO :15), 第一个 L、I、或 R 被任何其它的氨基酸、特别是被 E、D、G、C、N、Q、S、以及 A 并且更特别是被 E、C、A 以及 D 替换。

[0015] 关于序列 G (I, V) LVD (R, K) (SEQ ID NO :16), 其中 L 被任何其它的氨基酸、特别是被 M、F、Y、I、A、W、以及 V 并且更特别是被 M 所代替。

[0016] 关于序列 DH (V, I, M) VGN (SEQ ID NO :17), 第一个 V、I 或 M 被任何其它的氨基酸、特别是被 L、A 以及 I 并且更特别是被 L 和 I 所代替。

[0017] 关于序列 GGF (E, D) F (M, L) (A, P) (SEQ ID NO :18), A 或 P 被任何其它的氨基酸、特别是被 R、K、H、N、I、L、T、S 以及 Q、并且更特别是被 R、I、L、H 以及 K 代替。

[0018] 关于序列 CGFGKGN (SEQ ID NO :19), 第二个 G 或 K 被任何其它的氨基酸所代替。在某些实施方案中,第二个 G 被 R、K、H、E、D、N、Q、A、S、T 并且更具体地被 R、S、T、H 以及 K 所代替。在其它的实施方案中, K 被 S 和 T、并且更具体地被 T 所代替。

[0019] 在一些实施方案中,这些多肽是单个的、双重的、三重的、四重的、五重的或六重的突变体 HPPD,它们以不同的排列组合了多于一个以上的突变体 (例如,2+3、2+4、2+1 ;3+4、3+1 ;4+1 ;3+4+1、2+3+4、2+4+1、2+3+1 ;2+3+4+1 ;1+2+3+4+5 等)。

[0020] 在另外的实施方案中,该突变体 HPPD 是来自一种单子叶植物并且特别是来自一种冷气候禾本科植物种类如小麦、大麦、燕麦或黑麦。在具体的实施方案中,该突变体 HPPD 是来自黑麦草属 (*Lolium*)、燕麦属 (*Avena*)、早熟禾属 (*Poa*)、看麦娘属 (*Alopecurus*) 或高

粱属种类 (Sorghum), 并且更具体地, 是来自 SEQ ID NOs :1-8 的 HPPD 多肽中的一种或多种。

[0021] 根据本发明的示例性 HPPD 多肽和突变体 HPPD 多肽相应于在 SEQ ID NOs :2-8、20-41、49 以及 50 中所列出的氨基酸序列, 及其变体和片段。进一步提供了包括编码本发明的这些特定的突变体 HPPD 多肽的多核苷酸序列的核酸分子, 例如 SEQ ID NOs :53-82、84 以及 85。组合物还包括表达盒, 该表达盒包括可操作地连接到编码本发明的 HPPD 多肽的一个核苷酸序列上的启动子, 该表达盒是单独的或与一种或多种另外的编码赋予所希望的性状的核酸分子进行组合。进一步提供了包括本发明的一种表达盒的转化的植物、植物细胞、以及种子。

[0022] 在针对向植物赋予除草剂抗性或耐受性、特别是对某些类别的抑制 HPPD 的除草剂的抗性或耐受性的方法中, 本发明的这些组合物是有用的。在具体的实施方案中, 这些方法包括向植物中引入至少一种表达盒, 该表达盒包括可操作地连接到编码本发明的 HPPD 多肽的核苷酸序列上的启动子。其结果是, 该 HPPD 多肽被表达于该植物中, 并且由于该 HPPD 是基于这个基础选择的, 即对于抑制 HPPD 的除草剂是较不敏感的, 这导致了该植物展示出对于抑制 HPPD 的除草剂的基本上基本上改进的抗性或耐受性。

[0023] 本发明的方法还包括选择性地控制在一个作物场所的大田中的杂草。在一个实施方案中, 此类方法涉及在一个作物场所的大田中过多的苗前或苗后施用杂草控制量的 HPPD 除草剂, 该作物场所含有表达本发明的 HPPD 多肽的植物。在其他实施方案中, 还提供了用于测定、表征、鉴定、以及选择本发明的突变体 HPPD 的方法。

[0024] 附图的若干视图的简要概述

[0025] 图 1 描述了来自燕麦属的 HPPD 多肽 (对应于在 SEQ ID NO :1 中列出的氨基酸序列) 的 K_m 和 V_{max} 测定的数据。

[0026] 图 2 描述了在冰温下来自抑制剂交换实验的数据以确定解离速率 (k_{off}) 值, 该解离速率 (k_{off}) 值决定了结构 B (甲基磺草酮) 与 HPPD 多肽的复合体的解离, 该 HPPD 多肽相应于 A) SEQ ID NO :1 中列出的氨基酸序列以及 B) SEQ ID NO :41 中列出的氨基酸序列。

[0027] 图 3 显示了用于大豆转化的二元载体 17900 的图示, 用编码 SEQ ID NO :49 的一种双子叶植物密码子优化的燕麦 HPPD 基因赋予了 HPPD 抗性。对于草丁膦选择, 这种二元载体还包含双重 PAT 选择标记。

[0028] 图 4 显示了用于大豆转化的二元载体 17901 的图示, 用编码 SEQ ID NO :50 的一种双子叶植物密码子优化的燕麦 HPPD 基因赋予了 HPPD 抗性并且还赋予了对草甘膦的耐受性 (选择标记)。

[0029] 发明详细说明

[0030] 本发明提供了针对向植物赋予羟基苯丙酮酸双加氧酶 (HPPD) 除草剂抗性或耐受性的组合物和方法。组合物包括对于具有 HPPD 酶活性的天然和突变体 HPPD 多肽的氨基酸序列, 及其变体和片段。还提供了编码本发明的突变体 HPPD 多肽的核酸。进一步提供了用于向植物赋予除草剂抗性或耐受性、特别是对某些类别的抑制 HPPD 的除草剂的抗性或耐受性的方法。还提供了用于在一个作物场所的大田中选择性地控制杂草以及用于测定、表征、鉴定和选择提供了除草剂耐受性的本发明的突变体 HPPD 的方法。

[0031] 在本发明的上下文中, 术语羟基苯丙酮酸双加氧酶 (HPPD)、4-羟基苯丙酮酸双加氧酶 (4-HPPD) 以及对羟基苯丙酮酸双加氧酶 (p-HPPD) 是同义的。

[0032] “HPPD 除草剂”是漂白剂的除草剂,并且它们的主要作用位点是 HPPD。许多是熟知的并且在此别处被描述并且在文献 (Hawkes “Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase (HPPD)-The Herbicide Target.” In Modern Crop Protection Compounds. Eds. **Krämer** and Schirmer. Weinheim, Germany :Wiley-VCH, 2007. Ch. 4. 2, pp. 211-220 ; Edmunds “Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) Inhibitors :Triketones.” In Modern Crop Protection Compounds. Eds. **Krämer** and Schirmer. Weinheim, Germany : Wiley-VCH, 2007. Ch. 4. 2, pp. 221-242) 中。如在此所使用的,术语“HPPD 除草剂”是指直接或间接地抑制 HPPD 的除草剂,其中这些除草剂 是漂白剂,并且其中 HPPD 的抑制是除草剂的对于植物的作用模式的至少一部分。

[0033] 如在此所使用的,当与由类似经受的非耐受样植物所展示的进行比较时,基本上基本上“耐受”一种除草剂的植物当用所述除草剂进行处理时展示出一个移到右边的剂量 / 反应曲线。此类剂量 / 反应曲线具有标绘在 x 轴上的“剂量”以及标绘在 y 轴上的“杀死或破坏百分比”、“除草效果”等。为了产生一种给定的除草效果,耐受性植物典型地需要非耐受样植物的差不多至少两倍的除草剂。当经受典型地被农业社会采用的为了杀死大田中的杂草的浓度和速率的除草剂时,基本上“低抗”除草剂的植物展示出很少的(如果有的话)坏死、溶解、萎黄病或其他损伤或至少没有一个在产量上有显著影响。

[0034] 如在此所使用的,“非转基因样植物”是与转基因植物类似或相同的但是不包含赋予除草剂抗性的转基因的植物。

[0035] 如在此所使用的,术语“赋予”是指向植物提供一种特征或性状,如除草剂耐受性或抗性和 / 或其他所希望的性状。

[0036] 如在此别处所使用的,术语“异源的”是指来自另一个来源。在 DNA 的背景下,“异源的”是指任何外来的“非自身”DNA,包括来自相同种类的另一个植物的 DNA。例如,在本申请中,转基因地表达回到大豆植物中的大豆 HPPD 基因将仍被描述为“异源的”DNA。

[0037] 在此使用的冠词“一种”和“一个”是指一个或多于一个(即,至少一个)的该冠词的合乎语法的对象。作为举例,“要素”,“要素”(“元件”)表示一种或多种要素。贯穿本说明书,单词“包括”或其变体例如“包括了”或“包括”应被理解是指包括一种所述要素、整体或步骤,或一组要素、整体或步骤,但是不排除任何其他要素、整体或步骤,或一组要素、整体或步骤。

[0038] 在此定义了或另外表征了许多种额外的术语。

[0039] HPPD 序列

[0040] 本发明的这些组合物包括分离的或基本上纯化的天然的和突变体 HPPD 多核苷酸以及多肽连同包括 HPPD 多核苷酸的宿主细胞。确切地,本发明提供了 HPPD 多肽,这些突变体 HPPD 多肽具有 HPPD 酶活性并且在植物中赋予对于某些类别的抑制 HPPD 的除草剂的抗性 or 耐受性,以及它们变体和片段。还提供了编码本发明的天然的和突变体 HPPD 多肽的核酸。

[0041] 本发明的突变体 HPPD 多肽相对于它们从其衍生的初始野生型序列在一个或多个位置处具有氨基酸变化,并且展示出对于一种或多种 HPPD 抑制剂除草剂的增强的耐受性。相对于同样的未突变的初始酶,展示出对于一种 HPPD 除草剂的增强的耐受性的 HPPD 酶可以如此实行,因为这些 HPPD 酶展示出:

[0042] a) 对于自然底物 (4- 羟基苯丙酮酸) 较低的 K_m 值 ;
[0043] b) 对于将 4- 羟基苯丙酮酸转化成尿黑酸盐的较高的 k_{cat} 值 ;
[0044] c) 较低的表现速率常数值 k_{on} , 它管理形成一种酶 :HPPD 抑制剂除草剂复合体 ;
[0045] d) 增加的速率常数值 k_{off} , 它管理解离一种酶 :HPPD 抑制剂除草剂复合体 ;和 / 或
[0046] e) 由于 c) 和 d) 中的一个或两者的变化, 增加的平衡常数值 K_i (也称为 K_d), 它管理解离酶 :HPPD 抑制剂除草剂复合体。编码此类改进的突变的 HPPD 的 DNA 序列用于提供本发明的 HPPD 植物、作物、植物细胞以及种子, 它们相比于同样表达未突变的初始酶的同样的植物提供了对于一种或多种 HPPD 除草剂的增强的耐受性或抗性。

[0047] 在此发现, 在 k_{off} 值方面的增加是在改进一种 HPPD 的赋予 HPPD 除草剂抗性的能力方面的特定值, 然而, 在 25°C 下至少在高于 $5000s^{-1}M^{-1}$ 的范围内在 k_{on} 方面的改变具有相对小的影响。所以, 例如, 化合物 B 和 C 展示出类似的关于 SEQ ID NO :1 的 HPPD 的 K_d 值, 但是关于 B 和 C, k_{off} 值大约 10 倍差别。因此, 表达 SEQ ID NO :1 的 HPPD 的转基因植物对化合物 B 展示出比对化合物 C 更优越的抗性。

[0048] 因此优选的 HPPD 是如选择的与其他 HPPD 酶相比展示出对于一种或多种类型的 HPPD 除草剂的优越的耐受性并且其中耐受性使在体外由参数 ($k_{off} \times k_{cat} / K_m$ HPPD) 的数值来表征的那些, 并且其中 k_{off} 是决定 HPPD 酶与除草剂的复合体的解离速率的速率常数, 并且 k_{cat} / K_m HPPD 是催化转化数除以对于底物 HPP (4- 羟基苯基丙酮酸) 的 K_m 值。

[0049] 因此, 在本发明的一个实施方案中, 提供了一种用于表征并且选择赋予优越水平的对 HPPD 除草剂的耐受性的 HPPD 的体外方法, 这种方法是基于测量并且比较这些 k_{cat} / K_m HPPD 和 k_{off} 值或这些参数的功能性等同物。

[0050] 选择编码 HPPD 的基因的定点突变从而编码选自那些在此列出的氨基酸变化 (单独地或优选组合地)。编码此类突变形式的 HPPD 的基因对于制造抵抗抑制 HPPD 的除草剂的作物植物是有用的。如此修饰的 HPPD 基因特别适合用在转基因植物中, 以便向作物植物赋予除草剂耐受性或抗性。在一个优选的实施方案中, 这些 HPPD 从植物中得到。

[0051] 许多 HPPD 序列在本领域中是已知的并且通过进行相应于那些在此所述的氨基酸置换可以用来产生突变体 HPPD 序列。例如, 可以检查一种已知的或怀疑的 HPPD 序列的氨基酸基序 SEQ ID NOs :15-19 的存在以及所进行的在此描述的相应变化。可替代地, 在不从植物得到 HPPD 的情况下, 可以基于序列排队以及对于在此指定的基序的相似性来进行对于在此所指示的等效变化。可替代地, 有待通过突变而改进的序列可以使用标准的序列比对工具与例如 SEQ ID NO :1 进行比对, 并且可以在参比序列中在相应的位置处进行在此所述的关于 SEQ ID NO :1 的相应的氨基酸置换。

[0052] 在具体的实施方案中, 本发明的这些组合物包括一种突变体 HPPD 多肽, 该突变体 HPPD 多肽与 SEQ ID NO :1 (燕麦的 HPPD 氨基酸序列) 或与 SEQ ID NO :2、或与 SEQ ID NO :3 或与 SEQ ID NO :4 或与 SEQ ID NO :5 或与 SEQ ID NO :6 或与 SEQ ID NO :7 或与 SEQ ID NO :8 具有至少大约 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多的序列同一性, 其中该多肽具有 HPPD 酶活性, 并且其中该多肽包含相应于在表 1 的第 1 栏中列出的氨基酸位置的一个或多个置换。

[0053] 表 1. 示例性的 HPPD 突变

[0054]

关于 SEQ ID NO :1 的易突变氨基酸位置	置换或添加
217	A、I、L
326	R、K、H、N、I、L、T、S、Q
339	E、D、G、C、N、Q、S、A、L
358	M、F、Y、I、A、W、V
408	R、K、H、E、D、N、Q、A、S、T
411	S、T

[0055] 在不同的实施方案中,在第 1 栏中列出的一个或多个位置处的一个氨基酸被任何其它的氨基酸所代替。在另一个实施方案中,该多肽包括一个或多个氨基酸置换、添加、或缺失,相应于在表 1 的第 2 栏中列出的一个或多个氨基酸置换或添加。在又一个实施方案中,该多肽包括一个或多个置换,相应于在表 2 的第 1 栏中列出的氨基酸的保守性变体。

[0056] 例如,该多肽可以包括相应于 SEQ ID NO :1 的氨基酸位置 339 的一种突变,其中该氨基酸被谷氨酸或谷氨酸的保守置换所代替。

[0057] 在具体的实施方案中,本发明的突变体 HPPD 多肽的氨基酸序列是选自下组,该组由以下各项组成:SEQ ID NOs :20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、31、33、34、35、36、37、38、39、40、41、49 以及 50。

[0058] 术语“多肽”、“肽”、以及“蛋白”在此可互换地使用,指的是氨基酸残基的聚合物。这些术语应用于氨基酸聚合物,其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然发生的氨基酸以及天然发生的氨基酸聚合物的一种人工化学类似物。本发明的多肽可以从一种在此披露的核酸或通过使用标准分子生物学技术来产生。例如,本发明的一种截短的蛋白可以通过在一种适当的宿主细胞中表达本发明的一种重组核酸或可替代地通过组合体外步骤(如蛋白酶消化和纯化)来产生。

[0059] 因此,本发明还提供了包括编码突变体 HPPD 多肽的多核苷酸序列的核酸分子,这些突变体 HPPD 多肽具有 HPPD 酶活性并且在植物中赋予对于某些类别的抑制 HPPD 的除草剂的抗性或耐受性,以及它们的变体和片段。总体上,本发明包括编码在此所述的任何突变体 HPPD 多肽的任何多核苷酸序列,连同编码相对于在此所述的突变体 HPPD 多肽具有一个或多个保守性氨基酸置换的 HPPD 多肽的任何多核苷酸序列。提供功能上相似的氨基酸的保守性置换表在本领域中是所熟知的。以下五组各自包含彼此保守性置换的氨基酸:脂肪族的:甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I);芳香族的:苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);含硫的:甲硫氨酸(M)、半胱氨酸(C);碱性的:精氨酸 I、赖氨酸(K)、组氨酸(H);酸性的:天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)、天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)。

[0060] 在一个实施方案中,本发明提供了一种多核苷酸序列,该多核苷酸序列编码一种与 SEQ ID NOs :1、2、3、4、5、6、7 或 8 具有至少大约 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多的序列同一性的氨基酸序列,其中该 HPPD 氨基酸序列来自一种植物,其中该多肽具有 HPPD 酶活性,并且其中该多肽包含如以下所讨论的一个或多个置换、添加、或缺失。

[0061] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种选自下组的多核苷酸序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NOs :50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、84 以及 85。

[0062] 如在此所使用的,“核酸”包括引用一种处于单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或

核糖核苷酸聚合物,并且除非被另外限制,包括已知的具有天然核苷酸的重要性质的类似物(例如肽核酸),因为它们以一种类似于天然发生的核苷酸的方式杂交到单链核酸上。

[0063] 如在此所述的,术语“编码”或“编码的”当用在一种指定的核酸的背景下时是指该核酸包括必需的信息从而将该核苷酸序列直接翻译成一种特定的蛋白质。用来编码一种蛋白质的信息通过密码子的使用而详细说明。一种编码蛋白质的核酸在该核酸的翻译区域之内可以包括非翻译序列(例如,内含子)或可以缺乏此类插入的非翻译序列(例如,在cDNA中)。

[0064] 本发明包括分离的或纯化的多核苷酸或蛋白质组合物。一种“分离的”或“纯化的”多核苷酸或蛋白质、或它的生物学活性部分是基本上或基本上不含通常与该多核苷酸或蛋白质相伴随的或相互作用的组分(如在它的天然发生环境中所发现的)。因此,一种分离或纯化的多核苷酸或蛋白质当通过重组技术产生时是基本上不含其他细胞物质或培养基的,或当用化学方法合成时是基本上不含化学前体或其他化学品的。最佳地,一种“分离的”多核苷酸不含天然地在多核苷酸从其衍生的生物的基因组DNA中的多核苷酸的侧翼(即位于多核苷酸的5'和3'端)的序列(最佳地蛋白质编码序列)。例如,在不同的实施方案中,分离的多核苷酸可以包含小于约5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kb、或0.1kb的天然地在多核苷酸从其衍生的细胞的基因组DNA中的多核苷酸的侧翼的核苷酸序列。基本上不含干扰酶活性的并且能够关于其催化、动力学的和分子特性进行表征的一种蛋白质包括:具有小于大约98%、95%、90%、80%、70%、60%或50%(按干重计)的污染蛋白的相当粗制的蛋白制品(例如重组地产生在细胞提取物中)以及通过本领域中已知的方法进一步进行纯化以具有40%、30%、20%、10%、5%、或1%(按干重计)的污染蛋白的制品。

[0065] 本发明的这些蛋白质能够以不同的方式进行改变,包括氨基酸置换、缺失、截短、以及插入。用于这样的操作的方法在本领域中是通常是已知的。例如,突变体HPPD蛋白的氨基酸序列变体和片段可以通过在DNA中的突变来制备。用于诱变和多核苷酸修改的方法在本领域中是熟知的。参见,例如,Kunkel(1985)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492; Kunkel et al. (1987)Methods in Enzymol. 154:367-382;美国专利号4,873,192;Walker and Gastra, eds. (1983)Techniques in Molecular Biology(MacMillan 出版公司,纽约)以及其中引用的参考文献。关于通常不影响感兴趣的蛋白质的生物活性的适当的氨基酸置换的指导可以发现于Dayhoff et al. (1978)Atlas of Protein Sequence and Structure(Natl. Biomed. Res. Found., 华盛顿)的模型中。保守置换(如将一个氨基酸用具有相似特性的另一个氨基酸进行代换)可能是最佳的。

[0066] 本发明的这些多核苷酸还可以用来从其他生物特别是其他植物中分离出相应的序列。以这种方式,如PCR、杂交等方法可以用来鉴定此类序列(基于它们与在此列出的序列的序列同源性)。

[0067] 在一种PCR方法中,可以设计寡核苷酸引物用于在PCR反应中从感兴趣的任何植物提取出的cDNA或基因组DNA扩增相应的DNA序列。用于设计PCR引物和PCR克隆的方法在本领域中通常是已知的。参见,例如,Sambrook et al. (1989)Molecular Cloning: A Laboratory Manual(2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York)。还参见Innis et al., eds. (1990)PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications(Academic Press, New York);Innis and Gelfand, eds. (1995)PCR

Strategies(Academic Press, New York); 以及 Innis and Gelfand, eds. (1999)PCR Methods Manual(Academic Press, New York)。

[0068] 在杂交技术中,一种已知的多核苷酸的全部或部分被用作一种探针,该探针选择性地杂交到存在于来自一种选择的生物的一组克隆的基因组 DNA 片段或 cDNA 片段(即基因组文库或 cDNA 文库)中的其他相应的多核苷酸上。这些杂交探针可以是基因组 DNA 片段、cDNA 片段、RNA 片段、或其他寡核苷酸,并且可以被标记有一种可检出的基团如 ^{32}P 或任何其他可检出的标记。用于制备用于杂交作用的探针以及用于构建 cDNA 和基因组文库的方法在本领域中通常是已知的并且披露于 Sambrook et al. (1989)Molecular Cloning: A Laboratory Manual(2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York)。

[0069] 对于“杂交到”或“特异性杂交到”是指一种分子在严谨条件下仅可与一种特定的核苷酸序列结合、双链化(duplexing)或杂交,这是在该序列存在于一种复合混合物(例如,总细胞的)DNA 或 RNA 中时进行的。“基本上基本上结合”是指在一种探针核酸与一种靶标核酸之间的互补性杂交,并且包含了少量错配,这些错配可以通过降低该杂交介质的严谨性来调节,从而实现所希望的目标核酸序列的检测。

[0070] 在核酸杂交实验的背景下(例如, Southern 及 Northern 杂交)的“严谨杂交条件”和“严谨杂交洗涤条件”是序列依赖性的,并且在不同的环境参数下是不同的。较长的序列在较高的温度下特异地杂交。对核酸杂交的一种广泛指导发现于 Tijssen(1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes part I chapter 2" Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays" Elsevier, New York。通常,对于在一个限定的离子强度和 pH 下的特异序列,高严谨杂交和洗涤条件被选择为比热融点(T_m)大约低 5°C。典型地,在“严谨条件”下,一种探针将会与它的目标子序列进行杂交,但不会与其他序列杂交。

[0071] T_m 是 50% 的目标序列与一种完全匹配的探针进行杂交所处的温度(在限定的离子强度及 pH 下)。极度严谨条件被选择为等于对于一种特定探针的 T_m 。对于互补核酸(它们在 Southern 或 Northern 印迹中在过滤器上具有超过 100 个互补的残基)的杂交的严谨杂交条件的一个实例是在 42°C 下、具有 1mg 肝素的 50% 甲酰胺、将杂交进行过夜。高严谨性洗涤条件的一个实例是 0.15M NaCl, 在 72°C 下持续约 15 分钟。严谨洗涤条件的一个实例是在 65°C 下, 0.2X SSC 洗涤持续 15 分钟(参见, Sambrook, 以下, 对于 SSC 缓冲剂的说明)。通常,一种高严谨洗涤之前会先进行一种低严谨洗涤,以便去除背景探针信号。对于一个例如多于 100 个核苷酸的双链体的实例性中等严谨性洗涤是 1X SSC, 在 45°C 持续 15 分钟。对于一种例如超过 100 个核苷酸的双链体(duplex)的低严谨洗涤的一个实例是在 40°C 下的 4-6X SSC 持续 15 分钟。对于短探针(例如,大约 10 至 50 个核苷酸),严谨条件典型地涉及小于约 1.0M 的 Na 离子的盐浓度,典型地在 pH 7.0 至 8.3 下,大约 0.01 至 1.0M 的 Na 离子浓度(或其他盐类),并且该温度典型地是至少约 30°C。通过加入去稳定剂例如甲酰胺也可以实现严谨条件。通常,在特定的杂交测定中对于不相关探针观察到高 2 倍(或更高)的信噪比,表明检测到特异杂交。如果它们所编码的蛋白是基本上完全相同的,这些在严谨条件下彼此不杂交的核酸仍然是基本上完全相同的。例如,当使用该遗传密码允许的

最大程度的密码简并而生成核酸的拷贝时,则发生这种情况。

[0072] 以下是可以用来克隆核苷酸序列(这些序列与本发明的参比核苷酸序列是同源物)的杂交/洗涤条件的设置的例子:一种参比核苷酸序列优选地与在以下条件下的参比核苷酸序列杂交:在7%十二烷基硫酸钠(SDS)、0.5MNaPO₄、1mM EDTA 中在50℃下,并且在2X SSC、0.1% SDS 中在50℃下洗涤,更令人希望的是在7%十二烷基硫酸钠(SDS)、0.5M NaPO₄、1mM EDTA 中在50℃下,并且在1X SSC、0.1% SDS 中在50℃下洗涤,仍然更令人希望的是在7%十二烷基硫酸钠(SDS)、0.5M NaPO₄、1mM EDTA 中在50℃下,并且在0.5X SSC、0.1% SDS 中在50℃下洗涤,优选在7%十二烷基硫酸钠(SDS)、0.5M NaPO₄、1mM EDTA 中在50℃下,并且在0.1X SSC、0.1% SDS 中在50℃下洗涤,更优选在7%十二烷基硫酸钠(SDS)、0.5M NaPO₄、1mM EDTA 中在50℃下,并且在0.1X SSC、0.1% SDS 中在65℃下洗涤。

[0073] 所披露的核苷酸序列的片段和变体以及由此所编码的蛋白质也被涵盖在本发明中。“片段”意指一部分的核苷酸序列或一部分的氨基酸序列以及因此由此编码的蛋白。一种核苷酸序列的片段可以编码保留了突变体HPPD蛋白的生物活性并且因此具有HPPD酶活性的蛋白片段。可替代地,作为杂交探针或在诱变以及改组反应(为了产生仍进一步的HPPD变体)中有一种核苷酸序列的片段通常并不编码保留了生物活性的片段蛋白。因此,核苷酸序列的片段可以在从编码本发明的多肽的至少大约20个核苷酸、大约50个核苷酸、大约100个核苷酸、以及高达全长核苷酸序列的范围内变化。

[0074] 编码本发明的突变体HPPD蛋白的生物活性部分的核苷酸序列的片段将编码至少15、25、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、150、180、200、250、300、350个连续的氨基酸,或高达存在于本发明的全长突变体HPPD多肽中的总数目的氨基酸。作为杂交探针或PCR引物有用的核苷酸序列的片段通常不需要编码HPPD蛋白的生物活性部分。

[0075] 如在此所使用的,在引用一种特定的多核苷酸时,“全长序列”是指具有一种天然或突变的HPPD序列的整个核酸序列。“天然序列”意指一种内源序列,即,在生物体的基因组中发现的一种非工程化的序列。

[0076] 因此,本发明的核苷酸序列的片段可以编码突变体HPPD的生物活性部分,或它可以是片段,该片段可以用作杂交探针等或PCR引物(使用以下披露的方法)。突变体HPPD多肽的生物活性部分可以通过分离本发明的这些核苷酸序列之一的部分、表达所编码的突变体HPPD蛋白的部分(例如,通过体外重组表达)、并且评价所编码的突变体HPPD蛋白的部分的活性来制备。是本发明的一种核苷酸序列的片段的核酸分子包括至少15、20、50、75、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、或1300个连续的核苷酸,或高达存在于在此披露的全长核苷酸序列中的数目的核苷酸。

[0077] “变体”意指基本上基本上类似的序列。对于多核苷酸,一种变体包括在参比多核苷酸之内或或多个内部位点处的一个或多个核苷酸的缺失和/或添加和/或在突变体HPPD多核苷酸中的一个或多个位点处的一个或多个核苷酸的置换。如在此所使用的,“参比”多核苷酸或多肽对应地包括突变体HPPD核苷酸序列或氨基酸序列。如在此所使用的,“天然”多核苷酸或多肽对应地包括天然发生的核苷酸序列或氨基酸序列。本领域的普通技术人员将认识到本发明的这些核酸的变体将被如此构建从而使得开放阅读框得以维持。对于多核苷酸,保守性变体包括编码本发明的这些突变体HPPD多肽之一的氨基酸序列的那些序列(由于遗传密码的简并性)。如这些天然发生的等位基因变体可以使用熟知的分子生物

学技术、例如使用以下概述的聚合酶链式反应 (PCR) 以及杂交技术来鉴定。变体多核苷酸还包括合成衍生的多核苷酸, 像例如通过使用定点诱变产生的但是仍然编码本发明的一种突变体 HPPD 蛋白的那些。通常, 本发明的一种特定的多核苷酸的变体将具有与该特定的多核苷酸至少大约 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多的序列同一性, 如通过在此别处所述的序列比对程序和参数所确定的。

[0078] 本发明的特定多核苷酸 (即参比多核苷酸) 的变体还可以通过比较由一个变体多核苷酸编码的多肽与由该参比多核苷酸编码的多肽之间的百分比序列同一性来评价。因此, 例如, 披露了编码了一种多肽的多核苷酸, 该多肽与 SEQ ID NOs :1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、49 以及 50 的多肽具有一个给定百分比的序列同一性。在任何两个多肽之间的百分比序列同一性可以使用在此别处描述的序列比对程序和参数来计算。其中本发明的任何给定的多核苷酸对是通过比较它们编码的两个多肽共有的百分比序列同一性来评价的, 在两个被编码的多肽之间的百分比序列同一性是跨过在此所述的 HPPD 序列的全部的至少大约 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多的序列同一性。

[0079] “变体”蛋白意指从一种参比蛋白通过在该突变体 HPPD 蛋白中的一个或多个内部位点处的一个或多个氨基酸的缺失或添加和 / 或在该突变体 HPPD 蛋白中的一个或多个位点处的一个或多个氨基酸的置换而衍生的一种蛋白质。由本发明涵盖的变体蛋白是生物学活性的, 即它们继续具有突变体 HPPD 蛋白的所希望的生物活性, 即, 如在此所述的 HPPD 酶活性和 / 或除草剂耐受性。此类变体可以产生于例如遗传多态性或产生于人的操作。本发明的一种突变体 HPPD 蛋白的生物活性变体将具有与该突变体 HPPD 蛋白跨过该突变体 HPPD 蛋白的氨基酸序列的全部的至少大约 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多的序列同一性, 如通过在此别处所述的序列比对程序和参数所确定的。本发明的一种蛋白质的一种生物活性变体可能不同于以少至 1-15 个氨基酸残基、少至 1-10 个 (如 6-10 个)、少至 5 个 (如 4、3、2 个、或甚至 1 个) 氨基酸残基的蛋白质。

[0080] 用于比较的序列比对方法在本领域中是所熟知的并且可以使用数学算法来完成, 这些数学算法如 Myers and Miller (1988) CABIOS 4 :11-17 的算法; Smith et al. (1981) Adv. Appl. Math. 2 :482 的局部比对算法; Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48 : 443-453 的全局比对算法; 以及 Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264 的算法, 如在 Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :5873-5877 中的修改。对于序列比较可以利用这些数学算法的电脑实现方式以确定序列同一性。此类实现方式包括但不限于: PC/Gene 程序中的 CLUSTAL (从 Intelligent, Mountain View, California 可获得); ALIGN 程序 (版本 2.0) 以及 GCG Wisconsin Genetics Software Package 版本 10 中的 GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、以及 TFASTA (从 Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, California, USA 可获得)。

[0081] 基因叠加

[0082] 在某些实施方案中, 本发明的编码天然或突变体 HPPD 多肽或它们的保留了 HPPD

酶活性的变体的这些多核苷酸（例如编码了选自下组的一个氨基酸序列的核苷酸序列，该组由以下各项组成：SEQ ID NOs：1、2、3、4、5、6、7、8、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、49 以及 50）可以与任何感兴趣的多核苷酸序列的组合进行叠加从而产生具有一种所希望的性状的植物。如在此所使用的一种性状是指从一个特定的序列或序列组得到的表型。例如，编码突变体 HPPD 多肽或它们的保留了 HPPD 酶活性的变体的多核苷酸可以与任何其它的编码赋予一种所希望的性状的多肽的多核苷酸进行叠加，这些性状包括但不限于：对于疾病、昆虫、以及除草剂的抗性，对于热和干旱的耐受性，缩短的作物成熟时间，改进的工业加工（例如，用于将淀粉或生物质转化为可发酵的糖类）、以及改进的农艺学品质（例如，高油含量和高蛋白含量）。

[0083] 在本发明的一个具体的实施方案中，多核苷酸可以被叠加（或可替代地，表达盒可以被叠加在一个单个的多核苷酸上）从而在一种植物内表达多于一种类型的 HPPD 多肽。当例如一种 HPPD 特别适合用于提供对一种类别的 HPPD 除草剂的抗性而另外一种提供对不同类别的 HPPD 除草剂的更好的耐受性时，这是特别有利的。当一种多肽表达固有的除草剂抗性但是稍微不稳定时，叠加 HPPD 多肽同样是一种优点。通过形成混合的的酶二聚体，这种抵抗除草剂的 HPPD 然后可以在与例如相似的但是较不温度稳定的 HPPD 的混合的表达中进行稳定。

[0084] 可以与本发明的编码突变体 HPPD 多肽或它们的保留了 HPPD 酶活性的变体的多核苷酸进行叠加的示例性多核苷酸包括编码了赋予对于害虫 / 病原体如病毒、线虫、昆虫或真菌等等的抗性的多肽的多核苷酸。可以与本发明的多核苷酸进行叠加的示例性多核苷酸包括编码以下多肽的多核苷酸，这些多肽是：具有杀虫和 / 或杀昆虫活性的多肽，如其他苏芸金芽胞杆菌毒性蛋白（描述于美国专利号 5,366,892；5,747,450；5,737,514；5,723,756；5,593,881；以及 Geiser et al. (1986) Gene 48:109 中）、凝集素 (Van Damme et al. (1994) Plant Mol. Biol. 24:825)、五邻体 (pentin)（描述于美国专利号 5,981,722），等等；用于疾病或除草剂耐受性所希望的性状（例如，伏马菌素解毒基因（美国专利号 5,792,931）的多核苷酸；无毒力以及疾病抗性基因 (Jones et al. (1994) Science 266:789；Martin et al. (1993) Science 262:1432；Mindrinos et al. (1994) Cell 78:1089)；编码了赋予对于某些类别的茁长素和乙酰辅酶 A 羧化酶除草剂的抗性的一种芳氧基链烷酸酯双加氧酶的一种基因（例如，在 PCT 公开号 WO 2008/141154、WO 2007/053482 或在美国专利号 6,153,401 中的一种给出了对于 2,4D 的抗性的 tfdA 基因）；编码了赋予麦草畏抗性的麦草畏单加氧酶的一种基因 (Behrens et al. (2007) Science, 316,1185)；编码了赋予对于抑制 HST 的除草剂的抗性的一种尿黑酸茄呢基转移酶 (HST) 的一种基因 (PCT 公开号 WO 2010/029311)；编码了赋予对于一种包含腈的除草剂的抗性的一种腈水解酶（例如，bxnA 溴草腈腈水解酶）的一种基因；导致除草剂耐受性的乙酰乳酸合成酶 (ALS) 突变体，如 S4 和 / 或 Hra 突变；草甘磷抗性（例如，5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合成酶 (EPSPS) 基因，描述于美国专利号 4,940,935 和 5,188,642 中；或草甘磷 N-乙酰转移酶 (GAT) 基因，描述于 Castle et al. (2004) Science, 304:1151-1154；并且于美国专利申请公开号 20070004912、20050246798、以及 20050060767)；草丁膦抗性（例如，草丁膦乙酰转移酶基因 PAT 和 BAR，描述于美国专利号 5,561,236 和 5,276,268 中）；一种细胞色素 P450 或它的赋予对于尤其 HPPD 除草剂的除草剂抗性或耐受性的变体（美国专

利申请公开号 20090011936 ;美国专利号 6, 380, 465 ;6, 121, 512 ;5, 349, 127 ;6, 649, 814 ;以及 6, 300, 544 ;以及 PCT 公开号 W02007/000077) ;以及对于以下的加工或过程产物所希望的性状 :如高油 (例如, 美国专利号 6, 232, 529) ;改性的油 (例如, 脂肪酸去饱和酶基因 (美国专利号 5, 952, 544 ;PCT 公开号 W0 94/11516)) ;改性淀粉 (例如, ADPG 焦磷酸化酶 (AGPase)、淀粉合成酶 (SS)、淀粉分支酶 (SBE)、以及淀粉脱支酶 (SDBE)) ;以及聚合物或生物塑料 (例如, 美国专利号 5. 602, 321 ; β -酮硫解酶、聚羟基丁酯合成酶、以及乙酰乙酰辅酶 A 还原酶 (Schubert et al. (1988) J. Bacteriol. 170 :5837-5847), 有助于聚羟基烷酸酯 (PHA) 的表达)。

[0085] 因此, 在一个实施方案中, 将编码一种天然的或突变体 HPPD 多肽或它的保留了 HPPD 酶活性的变体的多核苷酸与一个或多个编码赋予对于一种除草剂的抗性或耐受性的多肽的多核苷酸进行叠加。在一个实施方案中, 所希望的性状是对于一种 HPPD 抑制剂的抗性或耐受性。在另一个实施方案中, 所希望的性状是对于草甘磷的抗性或耐受性。在另一个实施方案中, 所希望的性状是对于草丁膦的抗性或耐受性。在进一步的实施方案中, 所希望的性状是对于一种 HST 抑制剂除草剂、一种茁长素除草剂或一种 PSII 除草剂的抗性或耐受性。

[0086] 这些叠加的组合可以通过任何方法来产生, 这些方法包括但不限于 :通过常规的或顶交方法的杂交育种植物、或遗传转化。如果这些序列是通过遗传转化这些植物来进行叠加的, 所感兴趣的多核苷酸序列可以在任何时间并且以任何次序进行组合。例如, 包括一个或多个所希望的性状的转基因植物可以用作通过后续转化而引入另外的性状的靶标。这些性状可以在一个共转化方案中与由转化盒的任何组合提供的感兴趣的多核苷酸同时引入。例如, 如果将引入两个序列, 这两个序列可以包含在分开的转化盒 (反式) 中或包含在相同的转化盒 (顺式) 中。这些序列的表达可以通过相同的启动子或通过不同的启动子来驱动。在某些情况下, 可能希望的是引入一个抑制所感兴趣的多核苷酸的表达的转化盒。这可以与其它的抑制盒或过量表达盒的任何组合进行组合以在该植物中产生所希望的性状组合。进一步认识到的是, 多核苷酸序列可以在一个所希望的基因组位置处使用位点特异性重组系统进行叠加。参见, 例如, PCT 公开号 W0 99/25821、W0 99/25854、W0 99/25840、W0 99/25855、以及 W0 99/25853。

[0087] 植物表达盒

[0088] 本发明的组合物可以额外地包含用于在一个感兴趣的植物中转化和表达的核酸序列。这些核酸序列可能存在于 DNA 构建体或表达盒中。如此处使用的“表达盒”是指能够在适当的宿主细胞中指引一种特定核苷酸序列的表达的一种核酸分子, 包含可操作连接到感兴趣的核苷酸序列 (即, 一种单独地或与一种或多种编码赋予所希望的性状的多肽的额外的核酸分子相组合而编码一种突变体 HPPD 多肽或它的保留了 HPPD 酶活性的变体的多核苷酸) 的一个启动子, 该感兴趣的核苷酸序列可操作地连接到终止信号。它还典型地包含正确翻译该核苷酸序列所需要的序列。该编码区通常对一种感兴趣的蛋白质进行编码, 但是还可以对一种感兴趣的功能性 RNA 进行编码, 例如在正义或反义方向上的反义 RNA 或一种非翻译 RNA。包含该感兴趣的核苷酸序列的表达盒可以是嵌合的, 意味着至少一个它的组分相对于至少一个它的其他组分是异源的。该表达盒还可以是一种天然发生的表达盒, 但已经是在对异源表达有用的一个重组体形式而获得的。然而, 典型地, 该表达盒对于宿

主是异源的,即,该表达盒的特定 DNA 序列并不天然发生于该宿主细胞中,并且必须已通过一个转化事件而被引入该宿主细胞或该宿主细胞的祖先中。在该表达盒中核苷酸序列的表达可以是在组成型启动子或诱导型启动子的控制之下,该启动子只有当该宿主细胞暴露于一些特殊的外界刺激时才引发转录。另外,该启动子对于一种特定的组织或器官或发育阶段也可以是特异性的。

[0089] 本发明涵盖了用能够表达一种感兴趣的多核苷酸(即一种单独地或与一种或多种编码赋予所希望的性状的多肽的额外的核酸分子相组合而编码一种突变体 HPPD 多肽或它的保留了 HPPD 酶活性的变体的多核苷酸)的表达盒来转化植物。该表达盒在 5' -3' 的转录方向上包括一个转录和翻译的起始区(即,一个启动子)和一个多核苷酸开放阅读框。该表达盒可以任选地包括在植物中起作用的一个转录和翻译终止区(即,终止区)。在一些实施方案中,该表达盒包括一种选择标记基因从而允许选择稳定的转化体。本发明的表达构建体还可以包括一个前导序列和/或一个允许感兴趣的多核苷酸的诱导型表达的序列。对于允许诱导型表达的序列的实例参见 Guo et al. (2003) Plant J. 34 :383-92 和 Chen et al. (2003) Plant J. 36 :731-40。

[0090] 该表达构建体的调节序列可操作地连接到感兴趣的多核苷酸。对于“可操作地连接”意指在启动子与第二序列之间的功能性连接,其中该启动子序列引发和介导了对应于该第二序列的 DNA 序列的转录。通常,可操作地连接表示被连接的核苷酸序列是邻近的。

[0091] 在本发明的实践中可以使用任何能够在感兴趣的植物中驱动表达的启动子。该启动子可以是天然的或模拟的或外来的或与该宿主植物是异源的。当在此用来提及一个核酸序列(例如, DNA 或 RNA 序列)或基因时,术语“异源的”和“外源的”是指源自对于特定的宿主细胞是外来的来源的、或者如果源自相同的来源则是自其原始形式进行修饰的一种序列。因此,宿主细胞中的异源基因包括对于该特定宿主细胞是内源性的但是已经通过例如使用 DNA 改组而修饰的一种基因。这些术语还包括一种天然发生的 DNA 序列的非天然发生的多份拷贝。因此,这些术语是指一种 DNA 片段,它对于该细胞是外来的或异源的或与该细胞是同源的但是处于在其中通常找不到该元件的该宿主细胞核酸之内的一个位置。表达了外源 DNA 片段以产生外源性多肽。

[0092] “同源的”核酸(例如, DNA) 序列是与它被引入其中的宿主细胞天然相关联的一种核酸(例如, DNA 或 RNA) 序列。

[0093] 有待包括的启动子的选择取决于几个因素,包括但不限于:效率、可选择性、诱导性、所希望的表达水平、以及细胞优先表达或组织优先表达。对于本领域的技术人员而言,通过相对于序列来适当地选择并且定位启动子以及其它的调节区而调整该序列的表达是一种惯例。用于表达一个或多个转基因的启动子可以是强的植物启动子、病毒启动子、或嵌合启动子,组成这些启动子的元件如:来自任何基因的(或合成的,基于植物基因 TATA 盒的分析) TATA 盒,其任选地融合到对于植物启动子的 TATA 盒的 5' 上(这指向组织以及暂时适当的基因表达),任选地融合到 1 个或多个增强子上(如 35S 增强子、FMV 增强子、CMP 增强子、RUBISCO SMALL SUBUNIT 增强子、PLASTOCYANIN 增强子)。

[0094] 示例性的组成型启动子包括例如:Rsyn7 启动子的核心启动子以及其它的披露于 WO 99/43838 和美国专利号 6,072,050 中的组成型启动子;核心 CaMV 35S 启动子(Odell et al. (1985) Nature 313 :810-812);水稻肌动蛋白(McElroy et al. (1990) Plant Cell 2:

163-171);泛素(Christensen et al.(1989)Plant Mol.Biol.12:619-632和Christensen et al.(1992)Plant Mol.Biol.18:675-689);pEMU(Last et al.(1991)Theor.Appl.Genet.81:581-588);MAS(Velten et al.(1984)EMBO J.3:2723-2730);ALS启动子(美国专利号5,659,026),等等。其他组成型启动子包括在例如美国专利号5,608,149;5,608,144;5,604,121;5,569,597;5,466,785;5,399,680;5,268,463;5,608,142;以及6,177,611中。

[0095] 适当的植物或嵌合启动子对于如在某些组织中的转基因的表达的应用是有用的,同时将其其他组织如种子或生殖组织中的表达最小化。示例性的细胞类型启动子或组织优先启动子优选在靶组织中驱动表达、但也可以在其他细胞类型或组织中导致某种表达。用于在植物基因组DNA中鉴定并表征启动子区的方法包括例如在以下参考文献中所说明的那些:Jordano, et al., Plant Cell, 1:855-866(1989);Bustos, et al., Plant Cell, 1:839-854(1989);Green, et al., EMBO J. 7, 4035-4044(1988);Meier, et al., Plant Cell, 3, 309-316(1991);以及Zhang, et al., Plant Physiology 110:1069-1079(1996)。

[0096] 在本发明的其他实施方案中,诱导型启动子可能是所希望的。诱导型启动子驱动响应于外部刺激(如化学试剂或环境刺激)的转录。例如,诱导型启动子可以响应于激素(如赤霉素或乙烯)、或响应于光或干旱而赋予转录。

[0097] 许多种用于表达盒中的转录终止子是可获得的。这些转录终止子负责超过该转基因的转录终止以及正确的mRNA多聚腺苷酸化。该终止区可以是与该转录引发区天然在一起的、可以是与感兴趣的可操作地连接的DNA序列天然在一起的、可以是与该宿主植物天然在一起的、或者可以是源自另一种来源(即,对于该启动子、该感兴趣的DNA序列、该宿主植物、或它们的任何组合是外来的或异源的)。适当的转录终止子是已知在植物中发挥作用的那些,并且包括CAMV 35S终止子、tm1终止子、胭脂碱合成酶终止子以及豌豆rbcS E9终止子。这些终止子可以在单子叶植物和双子叶植物中使用。此外,可以使用一种基因的天然转录终止子。

[0098] 一般地,该表达盒将包括一种选择标记基因用于选择转化的细胞。利用选择标记基因来选择转化的细胞或组织。

[0099] 已经发现众多序列增强了来自转录单位之内的基因表达并且这些序列可以与本发明的基因结合使用以增加它们在转基因植物中的表达。

[0100] 已经显示不同的内含子序列增强了特别是在单子叶植物的细胞中的表达。例如,已经发现玉米Adh1基因的内含子当引入玉米细胞中时显著增强了在其同源启动子下野生型基因的表达。已经发现内含子1是特别有效的并且增强了在具有氯霉素乙酰转移酶基因的融合构建体中的表达(Callis et al., Genes Develop. 1:1183-1200(1987))。在同一个实验体系中,来自玉米青铜色1基因(maize bronze 1 gene)的内含子在增强表达方面具有相似的效果。常规地已经将内含子序列结合到植物转化载体中,典型地在非翻译前导序列中。

[0101] 也已知许多源自病毒的未翻译的前导序列增强了表达,并且这些在双子叶植物的细胞中是特别有效的。确切地说,已经显示来自烟草花叶病毒(TMV,“W-序列”)、玉米褪绿斑驳病毒(MCMV)、以及苜蓿花叶病毒(AMV)的前导序列在增强表达方面是有效的(例如,Gallie et al. Nucl. Acids Res. 15:8693-8711(1987);Skuzeski et al. Plant Molec.

Biol. 15 :65-79(1990))。本领域中已知的其他前导序列包括但不限于:细小核糖核酸病毒前导序列,例如,EMCV 前导序列(脑心肌炎 5' 非编码区)(Elroy-Stein, O., Fuerst, T. R., and Moss, B. PNAS USA 86 :6126-6130(1989));马铃薯 Y 病毒属前导序列,例如,烟草蚀纹病毒(TEV)前导序列(Allison et al., 1986);玉米矮花叶病毒(MDMV)前导序列;病毒学 154 :9-20;人免疫球蛋白重链结合蛋白(BiP)前导序列(Macejak, D. G., and Samow, P., Nature 353 :90-94(1991));来自苜蓿花叶病毒的外壳蛋白 mRNA 的未翻译的前导序列(AMV RNA 4)(Jobling, S. A., and Gehrke, L., Nature 325 :622-625(1987));烟草花叶病毒前导序列(TMV)(Gallie, D. R. et al., Molecular Biology of RNA, pages 237-256(1989));以及玉米褪绿斑驳病毒前导序列(MCMV)(Lommel, S. A. et al., Virology 81 :382-385(1991)。还参见, Della-Cioppa et al., Plant Physiology 84 :965-968(1987)。

[0102] 本发明还涉及包括一个或多个以上所述的表达盒的核酸构建体。该构建体可以是载体,如一种植物转化载体。在一个实施方案中,该载体是包括多核苷酸的植物转化载体,该多核苷酸包括在 SEQ ID NO :51 或 SEQ ID NO :52 中列出的序列。

[0103] 植物

[0104] 如在此使用的,术语“植物部分”或“植物组织”包括植物细胞、植物原生质体、植物可以由之再生的植物细胞组织培养物、植物愈伤组织、植物簇(plant clumps)、以及在植物或以下植物的部分中完整的植物细胞,这些植物的部分是如胚、花粉、胚珠、种子、叶、花、枝、果实、核、穗、穗轴、外壳、茎、根、根尖、花药,等等。上述术语还包括植物产品,例如谷物、果实、以及坚果。

[0105] 在本发明中有用的植物包括对于至少一种多核苷酸是转基因的植物,该多核苷酸单独地或与一种或多种编码赋予所希望的性状的多肽的额外的核酸分子进行组合而编码一种突变体 HPPD 多肽或它的保留了 HPPD 酶活性的变体。所选择的植物的类型取决于多种因素,包括例如:收获的植物原料的下游使用、植物物种对转化的适应性、以及植物将要生长、收割、和/或加工的所处条件。普通技术人员将进一步认识到用于选择用于本发明适当的植物种类的另外的因素包括:高产量潜力、良好的茎强度、对特殊病的抵抗力、耐旱性、快速干燥以及足以允许储存和输送至市场而具有最小损失的谷物质量。

[0106] 根据本发明的植物包括出于生产人类或动物所寻求的、用作口服消费的、或者是在一个工业、药学、或商业过程中加以利用的植物材料的目的是而种植的任何植物。本发明可以应用于多种植物的任何品种,包括但不限于:玉米、小麦、水稻、大麦、大豆、棉花、高粱、一般的豆类、油菜(rape)/低芥酸菜籽、苜蓿、亚麻、向日葵、红花、粟、黑麦、甘蔗、甜菜、可可、茶树、芸苔属、棉花、咖啡、甘薯、亚麻、花生、以及三叶草;蔬菜(例如,莴苣、番茄、葫芦、木薯、马铃薯、胡萝卜、萝卜、豌豆、扁豆、甘蓝、花椰菜、西兰花、孢子甘蓝(tea, Brassica, cotton, coffee, sweet potato, flax, peanut, clover; vegetables such as lettuce, tomato, cucurbits, cassava, potato, carrot, radish, pea, lentils, cabbage, cauliflower, broccoli, Brussels sprouts)、胡椒(pepper)、以及菠萝);果树(例如,柑橘属的树、苹果树、梨树、桃树、杏树、胡桃树、鳄梨树、香蕉树、以及椰子树);以及花卉(例如,兰花、康乃馨、以及玫瑰)(tree fruits such as citrus, apples, pears, peaches, apricots, walnuts, avocado, banana, and coconut; and flowers such as orchids, carnations and roses)。在本发明的实践中有用的其他植物包括多年生的禾本科植物,如

柳枝稷 (switchgrass)、草原草 (prairie grasses)、印度草 (Indiangrass)、大须芒草 (Big bluestem grass) 等等。认识到可以使用多种植物的混合物。

[0107] 此外,术语“作物”应当理解为还包括由于常规育种方法或遗传工程方法而赋予了对多种除草剂或多种除草剂类别(例如像 ALS 抑制剂,如氟嘧磺隆、氟丙磺隆和三氟啶磺隆、EPSPS(5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸酯合成酶)抑制剂、GS(谷氨酰胺合成酶)抑制剂)(primisulfuron, prosulfuron and trifloxysulfuron, EPSPS(5-enol-pyrovoyl-shikimate-3-phosphate-synthase)inhibitors,GS(glutamine synthetase)inhibitors)的耐受性的作物。由于常规育种方法或遗传工程方法而被赋予了对多种除草剂或多种除草剂类别的耐受性的作物的实例包括草甘膦和草丁膦耐受性作物品种,它在 RoundupReady[®] 知 LibertyLink[®] 商标名下是可商购的。根据本发明的方法对于保护大豆作物是特别适合的,这些大豆植物被赋予了对草甘膦和/或草丁膦的耐受性,并且其中 HPPD 除草剂与其他此类除草剂(草丁膦和/或草甘膦)一起被用在除草程序中用于除草。

[0108] 进一步考虑到本发明的构建体可以被引入具有改进的对于具体的下游使用是适合的或最佳的特性的植物品种中。例如,在植物中天然发生的遗传变异性导致了植物具有对于 HPPD 抑制剂或其他除草剂的抗性或耐受性,并且此类植物在本发明的方法中同样是有用的。根据本发明的方法可以通过将提供了一个水平的耐受性的转基因与大豆栽培品种进行杂交来进一步优化,其中大豆栽培品种展示了增强水平的发现于小百分比的大豆系中的对于 HPPD 抑制剂的耐受性。

[0109] 植物转化

[0110] 一旦已经将一种抗或耐受除草剂突变体 HPPD 多核苷酸单独地或与编码赋予所希望的性状的多肽的一种或多种额外的核酸分子结合而克隆到一个表达系统中,它就被转化到了一种植物细胞中。本发明的这些表达盒可以以多种领域公认的方式被引入到植物细胞中。在多核苷酸的背景下,术语“引入”(例如,一个感兴趣的核苷酸构建体)旨在表示以这样一种方式将该多核苷酸提供给该植物,使得该多核苷酸获得对一种植物细胞的内部的接近。其中有待引入一个以上的多核苷酸,这些多核苷酸可以作为单个核苷酸构建体的部分而进行组装,或者作为分开的核苷酸构建体,并且可以位于相同的或不同的转化载体上。因此,或作为育种方案的一部分,例如在植物中的在一个单一的转化事件中、在分开的转化事件中可以将这些多核苷酸引入到感兴趣的宿主细胞中。本发明的这些方法并不取决于一种用于引入一个或多个多核苷酸到植物中的具体方法,仅仅是获得这个或这些多核苷酸对于植物的至少一个细胞的内部的接近。在本领域中已知的用于将多个多核苷酸引入到植物中的方法包括但不限于瞬时转化方法、稳定转化方法、以及病毒介导的方法。

[0111] 在一个多核苷酸的背景下的“瞬时转化”旨在表示多核苷酸被引入到植物中,并且并没有整合到该植物的基因组中。

[0112] 在被引入到植物中的一个多核苷酸的背景下,对于“稳定地引入”或“被稳定地引入”旨在表示该引入的多核苷酸被稳定地结合到植物基因组中,并且因此该植物被该多核苷酸稳定地转化。

[0113] “稳定转化”或“被稳定地转化”旨在表示一种多核苷酸,例如一种这里描述的被引入到植物中的核苷酸构建体整合到该植物的基因组中并且能够被它的后代更具体地多个连续世代的后代继承。

[0114] 对于那些在植物转化领域的普通技术人员而言,用于植物转化的可获得的众多转化载体是已知的,并且与本发明有关的基因可以与任何这样的载体结合使用。载体的选择将取决于优选的转化技术以及用于转化的目标种类。对于某些目标种类,可以优选不同的抗生素或除草剂选择标记。在转化中常规使用的选择标记包括赋予对卡那霉素以及相关抗生素的抗性的 nptII 基因 (Messing & Vierra Gene 19 :259-268(1982) ; Bevan et al., Nature 304 :184-187(1983))、赋予对除草剂草丁膦 (还被称作草胺膦; 参见 White et al., Nucl. Acids Res 18 :1062(1990), Spencer et al. Theor. Appl. Genet 79 :625-631(1990) 以及美国专利号 5, 561, 236 以及 5, 276, 268) 的抗性的 pat 和 bar 基因、赋予对抗生素潮霉素的抗性的 hph 基因 (Blochinger & Diggelmann, Mol. Cell Biol. 4 :2929-2931)、以及赋予对甲氨蝶呤的抗性的 dhfr 基因 (Bourouis et al., EMBO J. 2(7) :1099-1104(1983))、赋予对草甘膦的抗性的 EPSPS 基因 (美国专利号 4, 940, 935 和 5, 188, 642)、也赋予对草甘膦的抗性的草甘膦 N- 乙酰基转移酶 (GAT) 基因 (Castle et al. (2004) Science, 304 :1151-1154 ;美国专利申请公开号 20070004912, 20050246798 和 20050060767)、以及提供代谢甘露糖的能力的 6- 磷酸甘露糖异构酶基因 (美国专利号 5, 767, 378 和 5, 994, 629)。可替代地,以及在一个优选的实施方案中,本发明的 HPPD 基因与作为选择剂的一种 HPPD 除草剂的使用结合,它自身被用作选择标记。

[0115] 用于再生植物的方法在本领域也是熟知的。例如,已经利用 Ti 质粒载体用于递送外源 DNA, 以及直接 DNA 摄入、脂质体、电穿孔、显微注射、以及微弹。此外,可以利用来自农杆菌属的细菌来转化植物细胞。以下是用于转化双子叶和单子叶植物二者的代表性技术连同代表性质体转化技术的说明。

[0116] 对于使用根癌农杆菌的转化而言,很多载体是可获得的。这些载体典型地携带至少一个 T-DNA 边界序列并且包括例如 pBIN19 (Bevan, Nucl. Acids Res. (1984)) 的载体。对于在农杆菌转化中有用的载体的构建,参见,例如,美国专利申请公开号 2006/0260011。

[0117] 没有使用根癌农杆菌的转化避免了在选择的转化载体中对于 T-DNA 序列的需要,并且因此除了例如以上描述的包含 T-DNA 序列的那些载体以外,可以利用缺乏这些序列的载体。不依赖农杆菌的转化技术包括经由基因枪法、原生质体摄入 (例如 PEG 和电穿孔) 和显微注射的转化。载体的选择很大程度上取决于对于被转化的种类的优先选择。对于此类载体的构建,参见,例如,美国专利申请公开号 20060260011。

[0118] 为了在植物质体中表达本发明的核苷酸序列,使用了质体转化载体 pPH143 (参见 PCT 公开号 WO 97/32011, 实例 36)。该核苷酸序列被插入到 pPH143 中,由此取代 PROTOX 编码序列。这种载体接下来用于质体转化以及对于大观霉素抗性的转化体的选择。可替代地,该核苷酸序列被插入到 pPH143 中,这样它取代了 aadH 基因。在这种情况下,对 PROTOX 抑制剂具有抗性的转化体进行了选择。

[0119] 用于双子叶植物的转化技术在本领域也是熟知的,并且包括基于农杆菌的技术以及不需要农杆菌的技术。非农杆菌技术涉及直接通过原生质体或细胞的外源基因材料的摄入。这可以通过 PEG 或电穿孔介导的摄入、基因枪介导的递送、或显微注射来完成。由 Paszkowski et al., EMBO J. 3 :2717-2722(1984), Potrykus et al., Mol. Gen. Genet. 199 :169-177(1985), Reich et al., Biotechnology 4 :1001-1004(1986), 以及 Klein et al., Nature 327 :70-73(1987) 描述了这些技术的实例。在每一情况下,使用本领域已知的标准

技术将这些转化的细胞再生为完整的植物。

[0120] 对于双子叶植物的转化,农杆菌介导的转化是一种优选的技术,因为它的高转化效率以及它的对于许多不同的种类的广泛实用。农杆菌转化典型地涉及将携带感兴趣的外源 DNA 的二元载体(例如,pCIB200 或 pCIB2001)转移到一个适当的农杆菌菌株中,该二元载体可以依赖于由该宿主农杆菌菌株(例如用于 pCIB200 以及 pCIB2001 的 CIB542 菌株(Uknes et al.Plant Cell 5:159-169(1993)))或者在一个共驻留 Ti 质粒上亦或在染色体上携带的 vir 基因的互补物。通过使用携带重组二元载体的大肠杆菌以及携带一种质粒(例如 pRK2013)并且能够将该重组二元载体移动到目标农杆菌菌株中的辅助大肠杆菌菌株的三亲本杂交方法来实现该重组二元载体到农杆菌的转移。可替代地,可以通过 DNA 转化将该重组二元载体转移到农杆菌中(Hofgen & Willmitzer, Nucl. Acids Res. 16: 9877(1988))。

[0121] 通过重组农杆菌转化目标植物物种通常涉及该农杆菌与来自该植物的外植体的共培养,并且遵循本领域中熟知的科学试验计划。将转化的组织在存在于二元质粒 T-DNA 边界之间的携带有抗生素或除草剂抗性标记的选择培养基上再生。

[0122] 另一种用基因转化植物细胞的方法涉及在植物组织和细胞上注入惰性的或生物学活性的粒子。美国专利号 4,945,050、5,036,006、以及 5,100,792(都是授予 Sanford 等人)中披露了这种技术。通常,这种方法涉及在细胞上在有效穿透该细胞的外表面并提供掺入在其内部中的条件下注入惰性的或生物学活性的粒子。当使用惰性粒子时,可以通过用含有所希望的基因的载体包被这些粒子以将该载体引入细胞中。可替代地,可以用载体围绕目标细胞使得该载体通过该粒子的激发而被带入该细胞中。也可以将生物学活性的粒子(例如,干酵母细胞、干细菌或噬菌体,各自包含被试图引入的 DNA)注入到植物细胞组织中。

[0123] 多数单子叶植物种类的转化现在也已经变成了常规操作。优选的技术包括使用 PEG 或电穿孔技术的直接基因转移进入原生质体、以及粒子轰击进入愈伤组织。可以用单一 DNA 种类或多种 DNA 种类(即,共转化)进行转化,并且这两种技术都适合于本发明中。共转化可能具有避免完全型载体构建以及生成对于感兴趣的基因与选择标记具有非伴性基因座的转基因植物的优点,使得能够在随后的世代中去除该选择标记(如果这被认为是所希望的话)。然而,使用共转化的一个缺点是小于 100%的频率,分离的 DNA 种类以该频率被整合到基因组中(Schocher 等人 Biotechnology 4:1093-1096(1986))。

[0124] 欧洲专利 EP 0 292 435 和 EP 0 392 225、以及 PCT 公开号 W0 93/07278 描述了用于从良种近交系玉米制备愈伤组织和原生质体、使用 PEG 或电穿孔转化原生质体、以及从转化的原生质体再生玉米植物的技术。Gordon-Kamm 等人(Plant Cell 2:603-618(1990))和 Fromm 等人(Biotechnology 8:833-839(1990))已经公开了使用粒子轰击用于转化源于 A188 的玉米系的技术。此外,PCT 公开号 W0 93/07278 和 Koziel 等人(Biotechnology 11:194-200(1993))描述了通过粒子轰击用于转化良种近交系玉米的技术。这种技术利用了从授粉之后 14-15 天的玉米穗切除的 1.5-2.5mm 长的未成熟玉米胚以及用于轰击的一台 PDS-1000He Biolistics 装置。

[0125] 水稻的转化也可以通过利用原生质体或粒子轰击的直接基因转移技术来进行。原生质体介导的转化已经对 Japonica 型和 Indica 型进行了描述(Zhang et al.Plant

Cell Rep 7 :379-384(1988) ;Shimamoto et al.Nature 338 :274-277(1989) ;Datta et al.Biotechnology 8 :736-740(1990)。使用粒子轰击也可常规地转化两种类型(Christou et al.Biotechnology 9 :957-962(1991))。此外,PCT 公开号 W0 93/21335 描述了通过电穿孔用于转化水稻的技术。

[0126] 欧洲专利 EP 0 332 581 描述了用于产生、转化以及再生早熟禾亚科原生质体的技术。这些技术允许转化鸭茅属和小麦。此外,已经由 Vasil 等人 (Biotechnology 10 :667-674(1992)) 使用粒子轰击进入 C 型长期可再生愈伤组织的细胞,以及还有 Vasil 等人 (Biotechnology 11 :1553-1558(1993)) 和 Weeks 等人 (Plant Physiol.102 :1077-1084(1993)) 使用离子轰击未成熟胚和未成熟胚来源的愈伤组织描述了小麦的转化。然而,用于小麦转化的一种优选的技术涉及通过离子轰击未成熟胚的小麦转化并且在基因递送之前包括高蔗糖步骤或高麦芽糖步骤。在轰击之前,将任意数目的胚(长度为 0.75-1mm)在具有 3% 蔗糖 (Murashiga & Skoog, Physiologia Plantarum 15 :473-497(1962)) 以及 3mg/l 2,4-D 的 MS 培养基上进行铺板用于诱导体细胞胚,这允许在黑暗中进行。在选择进行轰击的那天,将胚从诱导培养基中取出并且放置在渗透剂上(即以希望的浓度(典型地是 15%)添加有蔗糖或麦芽糖的诱导培养基)。允许这些胚质壁分离 2-3 小时,然后进行轰击。每个目标板二十个胚是典型的,尽管不是关键性的。使用标准方法使一种适当的携带基因的质粒(如 pCIB3064 或 pSOG35)沉淀在微米大小的金颗粒上。使用约 1000psi 的爆破压力,使用标准的 80 目网筛,用 DuPont BIOLISTICS[®] 氩装置射击每个板的胚。在轰击之后,将这些胚放回到黑暗中恢复约 24 小时(仍在渗透剂上)。24 小时后,从渗透剂上取出这些胚并将其放回到诱导培养基上,在这里在再生之前它们停留约 1 个月。约 1 个月之后,将具有发育中的胚性愈伤组织的胚外植体转移到再生培养基中 (MS+1mg/升 NAA、5mg/l GA),该再生培养基进一步包含适当的选择剂(在 pCIB3064 的情况下是 10mg/l 的 basta 而在 pSOG35 的情况下是 2mg/l 的甲氨蝶呤)。约 1 个月之后,将发育的嫩枝转移到更大的被称为“GA7”的灭菌容器中,这些容器包含半浓度的 MS、2% 的蔗糖、以及相同浓度的选择剂。

[0127] 还已经描述了使用农杆菌转化单子叶植物。参见,PCT 公开号 W0 94/00977、美国专利号 5,591,616、以及 Negrotto et al., Plant Cell Reports 19 :798-803(2000)。例如,水稻(亚洲栽培稻)可以用于产生转基因植物。可以使用不同的水稻培养品种(Hiei et al.,1994, Plant Journal 6 :271-282 ;Dong et al.,1996, Molecular Breeding 2 :267-276 ;Hiei et al.,1997,Plant Molecular Biology,35 :205-218)。还有,以下描述的各种培养基组分可以在量上变化或者被替换。通过在 MS-CIM 培养基 (MS 基础盐,4.3g/l ;维生素 B5(200X),5ml/升 ;蔗糖,30g/l ;脯氨酸,500mg/l ;谷氨酰胺,500mg/l ;酪蛋白水解物,300mg/l ;2,4-D(1mg/ml),2ml/升 ;用 1N KOH 调节 pH 到 5.8 ;植物凝胶,3g/l) 上进行培养而开始胚胎发生的响应和/或从成熟的胚建立培养物。将或者在培养物响应的初始阶段的成熟胚或已建立的培养系进行接种并且与含有所希望的载体构建的根癌农杆菌菌株 LBA4404(农杆菌属)进行共培养。将农杆菌(来自甘油母液)在固体 YPC 培养基(100mg/l 大观霉素或任何其他适当的抗生素)上在 28℃ 培养大约 2 天。将农杆菌重新悬浮于液态 MS-CIM 培养基中。将该农杆菌培养物稀释至 OD⁶⁰⁰为 0.2-0.3,并且添加乙酰丁香酮直到最终浓度为 200 μM。在将该溶液与这些水稻培养物混合之前添加乙酰丁香酮以诱导农杆菌

以将 DNA 转移到植物细胞中。为了接种,将这些植物培养物浸入细菌悬浮液中。去除该液体的细菌悬浮液并将接种的培养物放在共培养培养基上,然后在 22℃ 下孵育 2 天。然后将这些培养物转移到具有替卡西林 (400mg/l) 的 MS-CIM 培养基中以抑制农杆菌的生长。对于使用 PMI 选择标记基因的构建体 (Reed et al., *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 37: 127-132),在 7 天后将培养物转移到含有甘露糖作为碳水化合物来源的选择培养基 (具有 2% 的甘露糖、300mg/l 的替卡西林的 MS) 中,并且在黑暗中培养 3-4 周。然后将抗性菌落转移到再生诱导培养基 (不具有 2,4-D、0.5mg/l 的 IAA、1mg/l 的玉米素、200mg/l 的特美汀、2% 的甘露糖 以及 3% 的山梨糖醇的 MS) 中并且在黑暗中生长 14 天。然后将增殖中的菌落转移到另一轮的再生诱导培养基中并且移到光照生长室中。将再生的嫩枝转移到带有 GA7-1 培养基 (不含激素以及含 2% 的山梨糖醇的 MS) 的 GA7 容器中持续 2 周,然后在它们足够大并具有足够的根时将其移到温室中。将植物移栽到温室的土壤中 (T_0 代) 生长至成熟,并且收获 T_1 代种子。

[0128] 通过用本发明中的感兴趣的核酸序列的转化获得的植物可以是各种各样的植物种类的任何一种,包括单子叶植物和双子叶植物的那些;然而,在本发明的方法中所使用的植物在此优先选自在别处列出的农学上重要的目标作物的列表。与对于产量和质量重要的其他特征相结合到本发明的一种基因的表达可以通过育种结合到植物系中。育种的方法和技术在本领域中是已知的。参见,例如, Welsh J. R., *Fundamentals of Plant Genetics and Breeding*, John Wiley & Sons, NY(1981); *Crop Breeding*, Wood D. R. (Ed.) American Society of Agronomy Madison, Wis. (1983); Mayo O., *The Theory of Plant Breeding*, Second Edition, Clarendon Press, Oxford(1987); Singh, D. P., *Breeding for Resistance to Diseases and Insect Pests*, Springer-Verlag, NY(1986); 以及 Wricke and Weber, *Quantitative Genetics and Selection Plant Breeding*, Walter de Gruyter and Co., Berlin(1986)。

[0129] 对于质体的转化,将烟草“Xanthienc”的种子是在 T 琼脂培养基上在 1" 圆形排列中每个板发芽 7 个,并且在播种 12-14 天后用 1 μ m 钨粒子进行轰击 (M10, Biorad, Hercules, Calif.), 这些粒子包被有基本上如所描述的来自质粒 pPH143 和 pPH145 的 DNA (Svab, Z. and Maliga, P. (1993) *PNAS* 90, 913-917)。将轰击的种苗在 T 培养基上孵育 2 天,在这之后将它的叶子剪去并且在光亮中 (350-500 μ mol 光子 / m^2 /s) 将轴外面向上放置于含有 500 μ g/ml 二盐酸大观霉素 (Sigma, St. Louis, Mo.) 的 RMOP 培养基板上 (Svab, Z., Hajdukiewicz, P. and Maliga, P. (1990) *PNAS* 87, 8526-8530)。将轰击后三至八周出现在褪色的叶子下面出现的抗性嫩枝亚克隆到相同的选择培养基上,允许其形成愈伤组织,并且将次级嫩枝分离并进行亚克隆。在独立的亚克隆中的转化质体基因组拷贝 (同质体性 (homoplasmicity)) 的完整分离是由 Southern 印迹的标准技术进行评定的 (Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor)。将 BamHI/EcoRI-消化的总细胞 DNA (Mettler, I. J. (1987) *Plant Mol Biol Reporter* 5, 346349) 在 1% 的三羟甲基氨基甲烷-硼酸 (TBE) 琼脂糖凝胶上分开、转移到尼龙膜 (Amersham) 上、并且用 32 P- 标记的随机引物 DNA 序列进行探测,这些 DNA 序列对应于一个 0.7kb BamHI/HindIII DNA 片段,该片段来自包含 rps 7/12 质体靶向序列的一部分的 pC8。使同质的嫩枝在含大观霉素的 MS/IBA 培养基上无菌地生根 (McBride, K. E. et

a1. (1994)PNAS 91,7301-7305) 并转移到温室中。

[0130] 工程化进入以上描述的转基因的种子以及植物中的遗传特性通过有性生殖或营养生长被传递,并且可以因此在子代植物中被维持和繁殖。一般而言,维持和繁殖利用了已知的农业方法,开发这些方法以适合特定的目的(如耕种、播种或收获)。

[0131] 可以进一步在植物育种中利用根据本发明的转基因植物和种子的有利的遗传特性。取决于所希望的特性,可以采取不同的育种措施。相关的技术是在本领域内是熟知的,并且包括不仅限于:杂交、近亲繁殖、回交育种、多系育种、变种混合、种间杂交、非整倍体技术、等等。因此,根据本发明的转基因种子和植物可以用于改良植物系的育种,这些植物系例如增加常规方法(例如除草剂或杀虫剂处理)的效力或由于它们的修饰的遗传特性而允许免除所述的方法。

[0132] 使用适合的选择标记(如卡那霉素)、二元载体(如来自农杆菌)以及植物再生(如从烟草叶盘)的许多合适的转化方法在本领域是熟知的。任选地,一个对照种群的植物同样用表达对照 HPPD 的多核苷酸进行了转化。可替代地,既然如此,一种未转化的双子叶植物(如拟南芥或烟草)可以被用作对照(在任何情况下,表达它自己的内源性 HPPD)。

[0133] 除草剂抗性

[0134] 本发明提供了已经用编码赋予对除草剂的抗性或耐受性的一个突变体 HPPD 或它的变体的核酸分子(单独地或与一个或多个编码赋予所希望的性状的多肽的额外的核酸分子相结合)转化的转基因植物、植物细胞、组织、和种子。

[0135] 在一个实施方案中,本发明的转基因植物表现出对以一个从约 5 至约 2000 克每公顷(g/ha)的量施用的除草剂的抗性或耐受性,该除草剂的量包括,例如约 5g/ha、约 10g/ha、约 15g/ha、约 20g/ha、约 25g/ha、约 30 g/ha、约 35g/ha、约 40g/ha、约 45g/ha、约 50g/ha、约 55g/ha、约 60g/ha、约 65g/ha、约 70g/ha、约 75g/ha、约 80g/ha、约 85g/ha、约 90g/ha、约 95g/ha、约 100g/ha、约 110g/ha、约 120g/ha、约 130g/ha、约 140g/ha、约 150g/ha、约 160g/ha、约 170g/ha、约 180g/ha、约 190g/ha、约 200g/ha、约 210g/ha、约 220g/ha、约 230g/ha、约 240g/ha、约 250g/ha、约 260g/ha、约 270g/ha、约 280g/ha、约 290g/ha、约 300g/ha、约 310g/ha、约 320g/ha、约 330g/ha、约 340g/ha、约 350g/ha、约 360g/ha、约 370g/ha、约 380g/ha、约 390g/ha、约 400g/ha、约 410g/ha、约 420g/ha、约 430g/ha、约 440g/ha、约 450g/ha、约 460g/ha、约 470g/ha、约 480g/ha、约 490g/ha、约 500g/ha、约 510g/ha、约 520g/ha、约 530g/ha、约 540g/ha、约 550g/ha、约 560g/ha、约 570g/ha、约 580g/ha、约 590g/ha、约 600g/ha、约 610g/ha、约 620g/ha、约 630g/ha、约 640g/ha、约 650g/ha、约 660g/ha、约 670g/ha、约 680g/ha、约 690g/ha、约 700g/ha、约 710g/ha、约 720g/ha、约 730g/ha、约 740g/ha、约 750g/ha、约 760g/ha、约 770g/ha、约 780g/ha、约 790g/ha、约 800g/ha、约 810g/ha、约 820g/ha、约 830g/ha、约 840g/ha、约 850g/ha、约 860g/ha、约 870g/ha、约 880g/ha、约 890g/ha、约 900g/ha、约 910g/ha、约 920g/ha、约 930g/ha、约 940g/ha、约 950g/ha、约 960g/ha、约 970g/ha、约 980g/ha、约 990g/ha、约 1,000g/ha、约 1,010g/ha、约 1,020g/ha、约 1,030g/ha、约 1,040g/ha、约 1,050g/ha、约 1,060g/ha、约 1,070g/ha、约 1,080g/ha、约 1,090g/ha、约 1,100g/ha、约 1,110g/ha、约 1,120g/ha、约 1,130g/ha、约 1,140g/ha、约 1,150g/ha、约 1,160g/ha、约 1,170g/ha、约 1,180g/ha、约 1,190g/ha、约 1,200g/ha、约 1,210g/ha、约 1,220g/ha、约 1,230g/ha、约 1,240g/ha、约 1,250g/ha、约 1,260g/ha、约 1,270g/ha、约 1,280g/ha、

约 1,290g/ha、约 1,300g/ha、约 1,310g/ha、约 1,320g/ha、约 1,330g/ha、约 1,340g/ha、约 1,350g/ha、约 1,360g/ha、约 1,370g/ha、约 1,380g/ha、约 1,390g/ha、约 1,400g/ha、约 1,410g/ha、约 1,420g/ha、约 1,430g/ha、约 1,440g/ha、约 1,450g/ha、约 1,460g/ha、约 1,470g/ha、约 1,480g/ha、约 1,490g/ha、约 1,500g/ha、约 1,510g/ha、约 1,520g/ha、约 1,530g/ha、约 1,540g/ha、约 1,550g/ha、约 1,560g/ha、约 1,570g/ha、约 1,580g/ha、约 1,590g/ha、约 1,600g/ha、约 1,610g/ha、约 1,620g/ha、约 1,630g/ha、约 1,640g/ha、约 1,650g/ha、约 1,660g/ha、约 1,670g/ha、约 1,680g/ha、约 1,690g/ha、约 1,700g/ha、约 1,710g/ha、约 1,720g/ha、约 1,730g/ha、约 1,740g/ha、约 1,750g/ha、约 1,760g/ha、约 1,770g/ha、约 1,780g/ha、约 1,790g/ha、约 1,800g/ha、约 1,810g/ha、约 1,820g/ha、约 1,830g/ha、约 1,840g/ha、约 1,850g/ha、约 1,860g/ha、约 1,870g/ha、约 1,880g/ha、约 1,890g/ha、约 1,900g/ha、约 1,910g/ha、约 1,920g/ha、约 1,930g/ha、约 1,940g/ha、约 1,950g/ha、约 1,960g/ha、约 1,970g/ha、约 1,980g/ha、约 1,990g/ha、或约 2,000g/ha。

[0136] 在一个不同浓度的除草剂的范围内,以基于植物损伤、分生组织的漂白症状等的常规方式评估了主要植物转化事件的范围的除草剂耐受性或抗性水平的平均值和分布。这些数据可以以如下方式来表达,例如源自剂量/反应曲线(具有标绘在 x 轴上的“剂量”以及标绘在 y 轴上的“杀伤百分比”、“除草效果”、“出现绿色植物的数量”等)的 GR50 值,其中增加的 GR50 值对应于增加的固有抑制剂耐受性水平(例如增加的 k_{off}/K_{mHPP} 值)和/或表达的 HPPD 多肽的表达水平。

[0137] 本发明的这些方法对于保护农作物免受 HPPD 抑制剂除草剂的除草损伤是特别有用的。例如, HPPD 抑制除草剂是适当地选自下组,该组由以下各项组成:二环吡喃酮(bicyclopiron) (CAS RN 352010-68-5)、苯并双环酮(benzobicyclon) (CAS RN 156963-66-5)、吡草酮(benzofenap) (CAS RN 82692-44-2)、螺旋多司酮(ketospiradox) (CAS RN 192708-91-1)或其游离酸(CAS RN 187270-87-7)、异恶氯草酮(isoxachlortole) (CAS RN 141112-06-3)、异恶唑草酮(isoxaflutole) (CAS RN 141112-29-0)、甲基磺草酮(mesotrione) (CAS RN 104206-82-8)、磺酰草吡脱(pyrasulfotole) (CAS RN 365400-11-9)、苄草唑(pyrazolynate) (CAS RN 58011-68-0)、匹唑芬(pyrazoxyfen) (CAS RN 71561-11-0)、磺草酮(sulcotrione) (CAS RN 99105-77-8)、特呋三酮(tefuryltrione) (CAS RN 473278-76-1)、tembo 三酮(tembotrione) (CAS RN 335104-84-2)、以及苯吡唑草酮(topramezone) (CAS RN 210631-68-8);包括在可应用时,它们的农业上可接受的盐。

[0138] 使用的方法

[0139] 本发明进一步提供了在一种包括作物植物和杂草的场所选择性地控制杂草的方法,其中这些植物是通过上述本发明的任何方法获得的,其中该方法包括对该场所施用杂草控制量的一种或多种除草剂。在此描述的任何转基因植物可以在本发明的这些方法内使用。术语“场所”可以包括土壤、种子、和苗、连同已经长成的植物。可以合适地在作物或杂草的苗前或苗后使用除草剂。

[0140] 术语“杂草控制量”表示机能上包括除草剂的量,该除草剂的量能够影响给定的杂草的生长或发育。因此,该量可以小到足以简单地阻止或抑制给定的杂草的生长或发育,或者该量可以大到足以不可逆地破坏一种给定的杂草。

[0141] 因此,本发明提供了一种在场所控制杂草的方法,包括对该场所施用杂草控制量

的一种或多种除草剂,其中该场所包括已经用编码赋予 HPPD 除草剂的抗性或耐受性的突变体 HPPD 多肽或它的变体的核酸分子进行转化的转基因植物(单独地或与一种或多种编码赋予所希望的性状的多肽的额外的核酸分子相组合)。在一个实施方案中,该希望的性状是对一种除草剂的抗性或耐受性,该除草剂包括例如选自下组的除草剂,该组由以下各项组成:一种 HPPD 抑制剂、草甘膦、以及草铵膦(glyphosate, and glufosinate)。在另一个实施方案中,该场所包括一种已经用上述核酸分子的任何组合进行转化的转基因植物,这些核酸分子包括编码一种赋予对一种除草剂的抗性或耐受性的突变体 HPPD 多肽或它的变体的一种或多种核酸分子,这些核酸分子与至少一种、至少两种、至少三种、或至少四种编码赋予所希望的性状的多肽的额外的核酸分子相组合。

[0142] 在一个实施方案中,本发明提供了对于控制在作物大田中不想要的植物种类有用的转基因植物和方法,其中这些作物植物通过转化来表达编码突变体 HPPD 多肽的基因而被赋予对 HPPD 化学性质的抗性,其中以能够杀死不想要的植物种类(杂草种类、或例如在所希望的作物植物的大田中的残留或“劣种”或“自生”植物作物)或损害其生长的量而应用了作为过多施用的的一种 HPPD 除草剂。该施用可以是在这些作物植物或这些不想要的种类的苗前或苗后,并且可以与作物对其天然耐受或通过表达一种或多种其他除草剂抗性转基因而对其具有抗性的其他除草剂的施用相结合。参见,例如,美国专利申请公开号 No. 2004/0058427 和 PCT 公开号 WO 98/20144。

[0143] 在另一个实施方案中,本发明还涉及一种保护作物植物免受除草剂损伤的方法。在作物植物的培养中,特别是在一个商业规模上,正确的作物轮作对于产量稳定性(实现经过一个长时期的具有良好质量的高产量)以及对于农艺学商业的经济成功是极其重要的。例如,穿过大面积的美国主要玉米生长区(“中央玉米带”),在超过 75%的情况下,大豆是作为玉米的后茬作物而生长。使用 HPPD 抑制剂除草剂来进行在玉米作物中的选择性杂草控制正在逐渐实现。虽然这个类别的除草剂对于这个目的具有优良的适宜性,但是它可以在后茬作物中导致对这些作物植物的农艺学上不可接受的植物毒性损害(“残余”损害)。例如,某些大豆品种对此类 HPPD 抑制剂除草剂的甚至非常少的残余是敏感的。因此,本发明的除草剂抗性或耐受性植物对于在来自先前施用的除草剂的任何短期残留的一个场所进行种植也是有用的(例如,通过在施用一种除草剂后的下一年种植一种本发明的转基因植物,以降低来自该除草剂的土壤残余的损害的风险)。

[0144] 实例

[0145] 现在本发明参照以下实例进行描述。提供这些实例仅用于说明性目的,并且本发明不限于这些实例,但是更确切地说涵盖了所有的由于在此提供的传授的内容而明显的变体。

[0146] 实例 1

[0147] 燕麦属衍生的 HPPD SEQ ID NO:1 的克隆、表达和测定以及对于不同的 HPPD 除草剂的 k_{cat} 、 K_{mHPP} 以及 k_{off} 的值的确定。

[0148] 由 GeneArt(德国雷根斯堡)合成了一种 DNA 序列(对于在大肠杆菌中的表达是密码子优化的),该序列编码了来自燕麦的 HPPD(SEQ ID NO:1),将其克隆到 pET24a 中并且在大肠杆菌 BL21(DE3)中进行表达,用 50 μ g/ml 卡那霉素进行选择(如 PCT 公开号 WO 02/46387 中所描述)。使用在 30°C 下生长的过夜培养物,以 1:100 的比率接种在摇瓶中

的 3×1 升 LB。使培养物在 37℃、220rpm 下生长直至达到 A^{1cm}600nm 为 0.6-0.8。将温度降到 15℃并且用 0.1mM IPTG 进行诱导。将培养物生长过夜,并且在 10,000 g 下在 15 分钟的离心之后收集这些细胞。将这些细胞保存在 -20℃下直至提取。将来自 3 升摇瓶培养物(约 12g)的细胞沉淀物以 1ml 缓冲剂: 1g 细胞糊 (cell paste) 的比率融化在提取缓冲液 (50mM Tris、10mM 抗坏血酸钠、2mM DTT、2mM AEBSF、10 μM 胰蛋白酶抑制剂、1mM EDTA、pH7.66) 中。

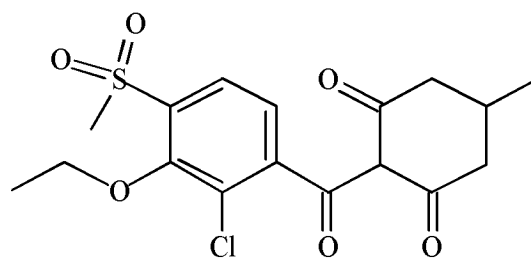
[0149] 在 30,000psi 下使提取物通过细胞破碎仪,并且在 4℃在 50,000g 下离心 25 分钟。可以该提取物任选地向下流过 Sephadex® G25 与缓冲液进行交换。上清液在液氮中形成珠粒并且在 -80℃下储存。通过蛋白印迹分析并且使用纯的燕麦属 (1-10ng) 作为标准对 HPPD 表达的水平进行估计。将提取物以 1 : 6000 进行稀释并且将 1-10 μl 加载到 12% SDS PAGE 上。此外,通过用 Coomassie® (英国伦敦帝国化学工业公司) 染色来比较诱导的和未诱导的 SDS PAGE 从而对表达进行定量。将凝胶印迹到 PVDF 膜上并且使用兔抗小麦 HPPD (1 : 6600) 血清作为第一抗体以及羊抗兔 FITC- 连接的抗体 (1 : 600) 作为第二抗体进行蛋白质印迹。通过在 Fluorimager™ 595 (英国白金汉郡 GE Healthcare 公司) 上进行扫描来进行条带的检测并且通过使用 ImageQuant™ (英国白金汉郡 GE Healthcare 公司) 来进行峰值定量。从所有转化的菌株中再分离出质粒 DNA 并且对跨编码区的 DNA 序列进行确认。

[0150] 从蛋白质印迹,在大肠杆菌提取物中表达的 SEQ ID NO :1 多肽的表达水平被估计为在 33.5mg/ml 的总的可溶性蛋白浓度之外约 10-14mg/ml。

[0151] 通过活性位点滴定还更精确地估计了提取物中活性 HPPD 的浓度。例如,将一定体积范围的提取物 (典型地 0-20 μl) 加入到 pH 7.0 并且在 25℃的包含 25mM 抗坏血酸钠、4 μg/ml 牛过氧化氢酶以及 3nmoles 的 ¹⁴C- 标记的化合物 A (1.81GBq/mmol) 的 50mM 双三羟基氨基丙烷 (BisTrisPropane) 缓冲液中,总最终测定体积为 425 μl。

[0152] 化合物 A

[0153]



[0154] 3 分钟之后通过加入 100 μl 1mM ‘冷的’结构 A 将放射性标记蛋白结合反应淬灭。通过快速层析向下流入一个 NAP5 G25 Sephadex ® 柱子 (英国白金汉郡 GE Healthcare 公司) 将蛋白质交换进入 pH 7.0 的包含 0.1M KCl 的 50mM 双三羟基氨基丙烷缓冲剂中并且使用一台 Tri-Carb 2900TR 闪烁计数器 (Perkin Elmer, Wellesley, MA) 对结合到蛋白质部分上的 ¹⁴C 以 Optiphase 闪烁体进行测量。从如在 PCT 申请公开号 W0 02/46387 中所述的滴定来计算提取物中 HPPD 结合位点浓度,并且在一种提取物中被估计为 94.9、78.3、以及 82.3 (平均值 85.2) μM 并且在另一个实例中为 47.2 μM。

[0155] 表达的 HPPD 的 K_{mHPP} 和 k_{cat} 值是基于在 25℃在 pH 7.0 的包含 25mM 抗坏血酸盐钠、4 μg/ml 牛过氧化氢酶 (Sigma, St. Louis, MO)、以及一定浓度范围 (典型地 0.5x-10x K_m)

的 4-羟基苯丙酮酸的 50mM 双三羟基氨基丙烷缓冲剂的溶液中进行的测定来估计的。典型地在最终体积为 110 μ l 中的这些测定是通过加入酶开始的并且在 20 秒或优选 10 或 15 秒钟之后随着涡旋混合加入 20 μ l 25%高氯酸而精确地终止。将测定溶液转移到 Chromacol 03-CVG HPLC 小瓶中,密封并且通过注射到反向 Aqua C185 μ 75x 4.6mm HPLC 柱子上以 1.5ml/min 流动 5.5%乙腈 0.1% TFA(缓冲剂 A) 来确定在 40 μ l 等分部分中形成的尿黑酸盐的量。在 1.5ml/分钟下通过以下各步骤来洗脱该柱子:使用缓冲液 A 洗涤 2 分钟、然后在缓冲液 A 和 100%乙腈的 30/70 混合物中洗涤 2 分钟,并且进一步在缓冲液 A 中洗涤 3.5 分钟。尿黑酸盐的洗脱是通过在 292nm 处的 UV 来监测的并且通过与标准校准曲线进行比较来对各反应中形成的量进行定量。

[0156] 使用一个非线性最小二乘法拟合使用 Grafit 4™软件(英国米德塞克斯 Erithacus 软件公司)确定了 K_m 和 V_{max} 值(例如图 1)。通过将最大速率、 V_{max} (以 nmol/秒来表示)除以 HPPD 酶的纳摩尔的数量(基于通过活性位点滴定而确定的浓度)确定了 K_{cat} 值。

[0157] 根据与图 1 中所示数据所产生的那些类似的一组分开的实验,就 HPPD SEQ ID NO:1 的一个提取物而言, K_m 值被估计为 6.17、4.51、6.09、6.13、4.37、4.62、5.41、5.13 以及 6 μ M(K_m 平均值 = 5.38 μ M)。相应的 k_{cat} 值是 4.92、6.25、7.08、6.26、5.5、6.77、6.89、7.12 以及 7.39 s^{-1} (k_{cat} 平均值 = 6.46 s^{-1})。注意对于这个计算,并且在此标准地是,Mr 被取为约 94kD 并且假设每个二聚体一个活性位点(即,半位点活性以及抑制剂结合;参见 Garcia et al. (2000) *Biochemistry*, 39:7501-7507; Hawkes "Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase(HPPD)-The Herbicide Target." In *Modern Crop Protection Compounds*. Eds. Krämer and Schirmer. Weinheim, Germany:Wiley-VCH, 2007. Ch. 4. 2, pp. 211-220)。对于该替代的假设是每个单体一个活性位点,则计算的 k_{cat} 值应当只需相应地并且系统地减半。

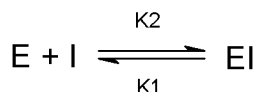
[0158] 对于酶:抑制剂复合体的形成的结合速率(由结合速率常数 (k_{on}) 决定)、EI 以及解离速率(由解离速率常数 (k_{off}) 决定)是通过本领域已知的方法并且基本上如 Hawkes et al. (2001) *Proc. Bright. Crop. Prot. Conf. Weeds*, 2:563-568 以及 PCT 公开号 WO 02/46387 中所述来确定的。

[0159] 例如,通过在零时间并且在不同时间点处(0-180s)将约 60 皮摩尔 HPPD 加入在 pH 7.0 并且在 25°C 的包含 25mM 抗坏血酸钠、4 μ g/ml 牛过氧化氢酶(Sigma, St. Louis, MO) 以及过量的(约 300 皮摩尔) ^{14}C 抑制剂的处于 425 μ l 的总测定体积的 50mM 双三羟基氨基丙烷缓冲液中,然后加入并且快速混合 100 μ l '冷的' 1mM 结构 A 淬灭放射性标记的结合反应来测量结合速率。然后通过快速层析向下进入一个 NAP5 G25 Sephadex® 柱子(英国白金汉郡 GE Healthcare 公司)将在不同时间淬灭的蛋白质样品交换进入 pH 7.0 的包含 0.1M KCl 的 50mM 双三羟基氨基丙烷缓冲剂中并且使用一台 Tri-Carb® 2900TR 闪烁计数器(Perkin Elmer, Wellesley, MA)对结合到蛋白部分上的 ^{14}C 的量以 Optiphase 闪烁体进行定量。按照下面的方案来拟合数据从而取得表观二级速率常数 (k_2) 的值,该值决定酶和放射性标记的抑制剂的结合速率。使用了一定范围的酶和抑制剂浓度。任选地,可以从类似实验得到该速率常数,其中在这种情况下酶(处于约 0.05-0.2 μ M 结合位点)和未标记的抑制剂(处于约 0.5 至 2 μ M) 在 pH 7.0 并且在 25°C 的包含 25mM 抗坏血酸钠、4 μ g/ml

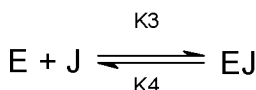
牛过氧化氢酶 (Sigma, St. Louis, MO) 的 50mM 双三羟基氨基丙烷缓冲剂中反应一个短时间 (0-60s) 的范围, 并且然后通过快速稀释到包含 100-200 μ M HPP 的测定溶液中进行淬灭用于通过对 30-40s (即在该测定的时间尺度上抑制剂分离和结合不会显著发生的一个足够短的时间) 之后尿黑酸盐形成的 HPLC/UV 定量进行立即测定 (如上所述)。另外的实例的方法描述于 PCT 公开号 WO 02/46387 中。

[0160] 从交换速率研究得到多个解离速率 (以下方案中的 k_1), 其中测试抑制剂 (I) 或它的交换配偶体 (J) 被放射性标记并且根据以下方案进行数据拟合。如在 Hawkes et al. (2001) Proc. Bright. Crop. Prot. Conf. Weeds, 2 :563-568 中注释的, HPPD 制品典型地显示出 (至少关于某些抑制剂的解离) 包含抑制剂结合位点的 5% -40% 的更快的交换 (较弱的结合) 部分。少量的这种效应是由于非特异性结合引起的, 它可以容易地减去或考虑到。对于多数抑制剂, 这种效应是小的; 关于像化合物 A 的结构, 这样一种效应可能是由于前手性引起的。当快速和缓慢交换部分是通过抑制剂完全区别时, 在此所测量的解离速率通常仅仅是指主要的较慢的交换部分, 它代表了存在于所测试的提取物中的 60% -95% 的大部分 HPPD 抑制剂结合位点。

[0161]



[0162]



[0163] 例如通过将约 200 皮摩尔的 HPPD 结合位点 (如上所述在一个用结构 A 进行的 3 分钟反应中通过活性位点滴定来确定) 预孵育在 pH 7.0 并且在 25°C 的包含 25mM 抗坏血酸钠、4 μ g/ml 牛过氧化氢酶 (Sigma, St. Louis, MO) 的包含 25°C 的约 1.0 纳摩尔 14 C 抑制剂的 50mM 双三羟基氨基丙烷缓冲剂 (总测定体积为 1.3ml) 中来确定解离速率。30 分钟之后, 通过在充分混合下加入 100 μ l 1mM ‘冷的’ 结构 A 来起始交换反应, 并且立即抽取 150 μ l 并且加载到一个 NAP5 柱上, 通过快速 (< 2 分钟) 色谱向下进入一个 NAP5 G25 Sephadex [®] 柱子 (英国白金汉郡 GE Healthcare 公司) 将该蛋白交换进入 pH 7.0 的包含 0.1M KCl 的 50mM 双三羟基氨基丙烷缓冲剂中, 并且使用一台 Tri-Carb [®] 2900TR 闪烁计数器 (Perkin Elmer, Wellesley, MA) 对结合到蛋白质上的 14 C 的量以 Optiphase 闪烁体进行测量。在经过根据需要的数分钟或数小时的不同时间处以相同方式移开并且测量另外的等分部分从而确定交换动力学。

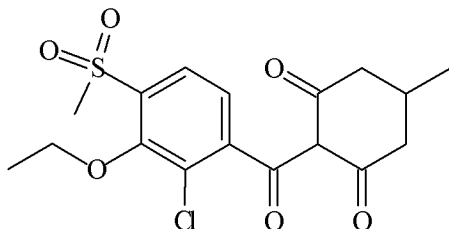
[0164] 在有用于更好地区别相对快的 (例如, 当在 25°C 下 $t_{1/2} < 15$ 分钟时) 这些解离速率的方法的一个变体中, 该实验的温度从 25°C 降低到冰温。在这种情况下, 通过将约 200 皮摩尔的 HPPD 预孵育在 25°C 的总测定体积为 1.3ml 的包含约 1.0 纳摩尔 14 C 抑制剂的反应缓冲液中 (50mM BTP pH 7, 25mM 抗坏血酸钠、4 μ g/ml 牛过氧化氢酶、以及 10% 甘油) 来确定解离速率。30 分钟之后, 将反应器转移到冰上。在冰温下持续另外的 10 分钟之后, 通过在充分混合下加入 100 μ l 1mM 结构 A 来启动该交换反应, 并且抽出 150 μ l 并且在冷室中在约 5°C 至 8°C 下加载到并且快速向下交换到一个 NAP5 柱子上, 从而在冰温下在从交换开始的不同时间对保持结合在该蛋白质上的放射性标记的量进行定量。

[0165] 可以间接地测量 HPPD 抑制剂的解离速率 (k_1), 这些抑制剂不是放射性标记可容易获得的或存在其他测量问题 (例如高水平的背景非特异性蛋白结合, 这可能被测量为放射性标记结合, 这种结合保持高浓度的‘冷’抑制剂的存在)。在这种情况下, 首先与未标记的抑制剂一起形成酶复合物 (约 0.1 至 0.2 μM), 然后通过用一种高浓度的 ^{14}C - 标记的结构 A (或放射性标记的 D) 赶走 (chase off) 它并且监测在该标记结合到蛋白质时的速率而得到交换动力学。结构 A 是一种具有已知动力学特性的特别有效的抑制剂。在 20 倍或更高的过量结构 A 下在 > 90% 的平衡时将占据与在此所测试的其他抑制剂以及实际上的大多数其他抑制剂处于交换竞争的结合位点, (本领域普通技术人员当然可以设计该实验 / 相对浓度并且因此拟合这些数据)。示例性的方法还描述于 PCT 公开号 WO 02/46387 中。

[0166] 针对以下化合物, 对于燕麦属衍生的 HPPD SEQ ID NO :1 得到了示例性的结合和解离速率数据 (以及衍生的 K_i 值)。

[0167] 化合物 A (^{14}C 1.81GBq/mmol)

[0168]



[0169] 如使用直接放射化学法在 25°C 下所确定的解离速率 $k_1 = 1.67\text{E}-05\text{s}^{-1}$ 。

[0170] 如使用直接放射化学法在 25°C 下所确定的结合速率 $k_2 = 8.50\text{E}+04\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。

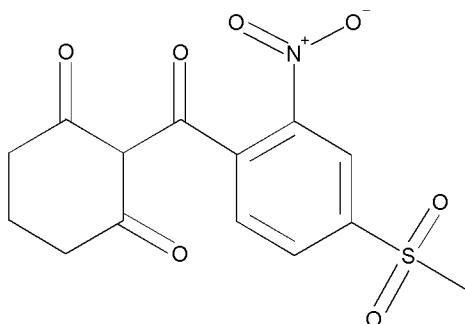
[0171] $K_d = 1.96\text{E}-10\text{M}$ 。

[0172] K_d/K_m 比率 = 0.000036。

[0173] 因此, k_{off} 被评估为 = $1.67\text{E}-05\text{s}^{-1}$

[0174] 化合物 B (^{14}C 1.81GBq/mmol)

[0175]



[0176] 在 25°C 下解离速率 $k_1(\text{av}) = 8.1\text{E}-04\text{s}^{-1}$ (单独的实验产生 $k_1 = 8.00\text{E}-04$ 、 $8.88\text{E}-04$ 、 $7.50\text{E}-04$ 以及 $8.00\text{E}-04\text{s}^{-1}$, 如通过直接放射化学法所确定的)。

[0177] 在冰温下测量的 $k_1 = 1.58\text{E}-05\text{s}^{-1}$ (初始的单独的实验产生 $1.16\text{E}-05\text{s}^{-1}$ 、 $1.0\text{E}-05\text{s}^{-1}$ 、 $1.2\text{E}-05\text{s}^{-1}$ 、 $1.5\text{E}-05\text{s}^{-1}$)。随后, 更好地考虑到非特异性结合值的更广泛的实验连贯地出现在接近并且平均大约 $1.58\text{E}-05\text{s}^{-1}$ ($1.58\text{E}-05\text{s}^{-1}$ 、 $1.5\text{E}-05\text{s}^{-1}$ 、 $1.67\text{E}-05\text{s}^{-1}$ 、 $1.5\text{E}-05\text{s}^{-1}$ 、 $1.58\text{E}-05\text{s}^{-1}$ 、 $1.5\text{E}-05\text{s}^{-1}$)。

[0178] 在 25°C 下结合速率 $k_2(\text{av}) = 6.7\text{E}+04\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$ (单独的实验产生 $k_2 = 6.35\text{E}+04$ 、

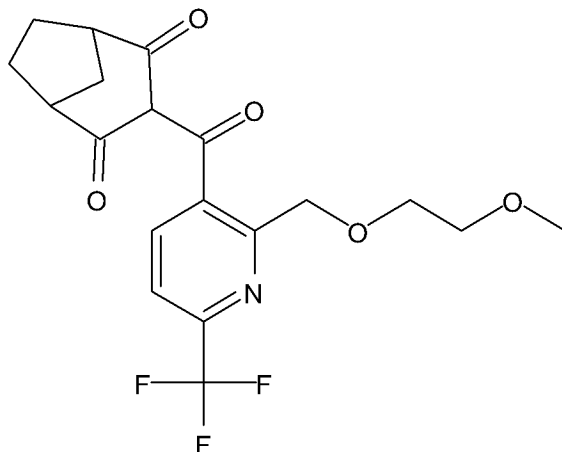
7.50E+04、6.2E+04,如通过直接放射化学法确定的)。对于甲基磺草酮而言(它具有相对快速的解离速率),基于以活性为基础的方法对于结合速率的估计是更加可变的,在25℃下其范围从4.2E+04s⁻¹M⁻¹、4.9E+04s⁻¹M⁻¹至7.5E+04s⁻¹M⁻¹。

[0179] 因此从这些放射化学数据中估计K_d为1.16E-08M⁻¹,相应于K_d/K_m比率为0.00217。

[0180] 因此k_{off}被估计为在25℃下8.1E-04s⁻¹并且在0℃下1.58E-05s⁻¹。

[0181] 化合物C(¹⁴C 0.774GBq/mmol)

[0182]



[0183] 在25℃下解离速率k₁(av) = 5.3E-05s⁻¹(初始实验产生了k₁ = 7.80E-05s⁻¹、9.17E-05s⁻¹、4.5E-05s⁻¹、6E-05s⁻¹、7E-05s⁻¹以及7.80E-05s⁻¹;然而更准确地考虑到非特异性结合效应的一个后续组的实验使得可能前面的高值是离群值)。基于之后的更连贯的值,解离速率k₁(av) = 5.3E-05s⁻¹,基于单独的实验值6.5-05s⁻¹、5.0-05s⁻¹、5.67-05s⁻¹、4.67-05s⁻¹、5.17-05s⁻¹、4.67-05s⁻¹、4.67-05s⁻¹、以及6.0-05s⁻¹。

[0184] 结合速率k₂(在25℃下如通过直接放射化学法估计是7.50E+03s⁻¹M⁻¹)与在25℃下来自基于酶活性的方法的估计值7.50E+03s⁻¹M⁻¹、7.80E+03s⁻¹M⁻¹、7.60E+03s⁻¹M⁻¹、7.20E+03s⁻¹M⁻¹以及1.0E+04s⁻¹M⁻¹是良好一致的。

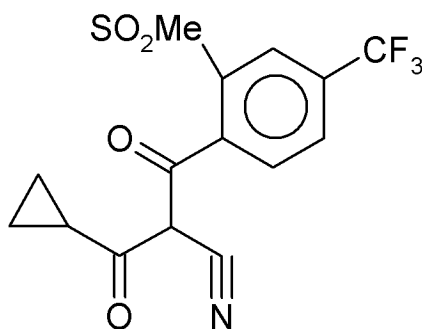
[0185] 基于放射化学法K_d的估计值 = 7.1E-09M。

[0186] 因此,K_d/K_m比率的估计值 = 0.0013。

[0187] 因此,k_{off}被估计为5.3E-05s⁻¹

[0188] 化合物D(¹⁴C 1.036GBq/mmol)

[0189]



[0190] 如使用直接放射化学法所确定的在25℃下解离速率k₁ = 3.96E-05s⁻¹(单独的测量为4.17E-05s⁻¹以及3.75E-05s⁻¹)。如在一系列间接解离速率实验中测定的解离速率是4.25-05s⁻¹、4.66-05s⁻¹、4.5-05s⁻¹、4.83-05s⁻¹、3.83-05s⁻¹、4.5-05s⁻¹、4.5-05s⁻¹、

4.33-05s⁻¹、5.0-05s⁻¹。从所有数据中取得的对于解离速率的平均值是 4.39E-05s⁻¹。

[0191] 如通过直接放射化学法所确定的在 25°C 下结合速率 $k_2 = 3.20E+04M^{-1}s^{-1}$ 。这与来自基于活性的方法的估计值（对于结合速率为 $3.20E+04M^{-1}s^{-1}$ 以及 $5.7E+04M^{-1}s^{-1}$ ）很好地一致。

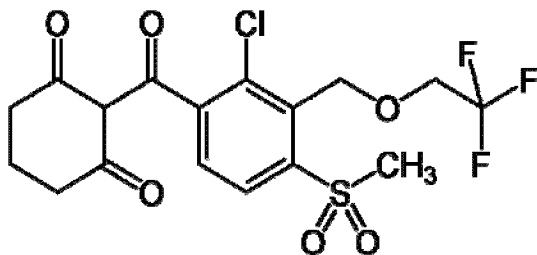
[0192] 基于放射化学法 K_d 的估计值 = 1.36E-9M。

[0193] K_d/K_m 比率的估计值 = 0.00025。

[0194] 因此, k_{off} 被估计为 4.39E-05s⁻¹。

[0195] 化合物 E

[0196]



[0197] 如使用间接放射化学法所初始确定的在 25°C 下解离速率 $k_1 = 4.17E-05s^{-1}$ (基于单独的测量为 $5.50E-05s^{-1}$ 以及 $2.85E-05s^{-1}$)。根据一系列进一步的测量, 初始较高的值将显得是一种离群值, 其中获得的值是 $3.67E-05s^{-1}$ 、 $3.17E-05s^{-1}$ 、 $2.67E-05s^{-1}$ 、 $3.17E-05s^{-1}$ 、 $2.67E-05s^{-1}$ 、 $3.33E-05s^{-1}$ 、 $3.08E-05s^{-1}$ 、 $2.02E-05s^{-1}$ 、 $3.00E-05s^{-1}$, 以及一个新的平均 k_{off} 值被估计为 $2.96E-05s^{-1}$ 。

[0198] 如通过直接非放射化学法所确定的在 25°C 下结合速率 $k_2 = 1.30E+05M^{-1}s^{-1}$ 。

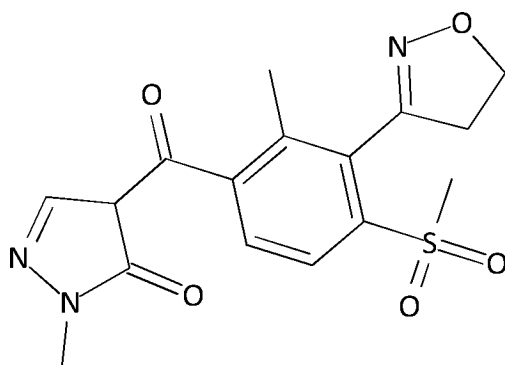
[0199] K_d 的估计值 = 2.28E-10M。

[0200] K_d/K_m 比率的估计值 = 0.000042。

[0201] 因此, k_{off} 被估计为 $2.96E-05s^{-1}$

[0202] 化合物 F

[0203]



[0204] 根据一系列间接解离速率测量结果 ($7.08E-05s^{-1}$ 、 $6.00E-05s^{-1}$ 、 $7.00E-05s^{-1}$ 以及 $6.83E-05s^{-1}$), 平均的 k_{off} 值被估计为 $6.72E-05s^{-1}$ 。

[0205] 实例 2

[0206] 来自不同植物的 HPPD SEQ ID NOs :1-14 的克隆、表达和测定以及对于不同的 HPPD 除草剂的 k_{cat} 、 K_{mHP} 以及 k_{off} 的值的确定

[0207] 将由 GeneArt (德国雷根斯堡) 合成的编码来自不同植物的相应于 SEQ ID NOs :

1-14 的 HPPD 多肽的对于大肠杆菌密码子使用优化的 DNA 序列克隆到 pET24a 中并且在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行表达, 用 50 μ g/ml 卡那霉素进行选择 (如在 PCT 申请公开号 WO 02/46387 中所描述)。使细胞生长, 制备蛋白提取物, 并且如实例 1 中所描述进行 HPPD 活性位点滴定以及 (对多种不同的除草剂的 k_{cat} 、 K_{mHPPD} 、以及 k_{off} 值的) 动力学测量。

[0208] 包含了相应于 SEQ ID NO:1 的 HPPD 作为实验中的一个内部对照。对于 SEQ ID NO:1 的不同的动力学参数的平均绝对值详细列于以上实例 1 中。在以下表 2 中的数据提供了来自对于 SEQ ID NOs:2-14 的这些测量结果的数据, 表达为对于相应的 SEQ ID NO:1 的对照值的一个比例。因此, 对于 SEQ ID NO:1 的所有的参数值被给定为 1.0 并且该表中的所有值与对于 SEQ ID NO:1 的那些是相当的。

[0209] 表 2 SEQ ID NOs:2-14 的 HPPD 的动力学参数

[0210]

SEQ ID NO:	K_{cat}/K_{cat} SEQ ID NO: 1	K_{mHPPD}/K_m SEQ ID NO: 1	$(K_{cat}/K_m)/$ (K_{cat}/K_m) SEQ ID NO: 1	K_{offB}/K_{offB} SEQ ID NO: 1	K_{offC}/K_{offC} SEQ ID NO: 1	K_{offD}/K_{offD} SEQ ID NO: 1	K_{offE}/K_{offE} SEQ ID NO: 1	K_{offF}/K_{offF} SEQ ID NO: 1
1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
2				2.0				
3	1.1	1.1	0.9	2.1	1.3	1.3	1.5	1.6
	1.3	1.2	1.1	2.2	1.1	1.2	1.5	
4	1.3	1.6	0.8	0.5		0.6	1.6	
	1.3	1.6	0.8					
5	1.5	1.4	1.1	0.5		0.7	1.5	
	1.7	1.8	0.9					
6	1.0	1.1	0.9	1.0		1.8	1.0	
7	1.1	0.9	1.2	1.1		2.1	1.7	1.3
	0.9	0.8	1.1	1.3		1.7	1.7	
8	1.1	0.8	1.3	1.3		1.4	1.1	
	1.2	0.8	1.4					
9	1.2	1.1	1.1	0.1		0.2	0.5	
10	1.4			< 0.05		0.2	0.1	
11				< 0.1		0.3	0.3	0.3
12				0.1		0.1	0.2	0.2
13	0.7	0.7	1.0	< 0.05		0.2		
14	0.8	6.0	0.2	< 0.05		4.0		

[0211] ‘ k_{offB} ’、‘ k_{offC} ’等, 是指通过与实例 1 中所述的 HPPD 抑制剂除草剂 B-F 的放射性标记交换而测量的解离速率。

[0212] 从表 2 中的数据清楚的是, 相对于 SEQ ID NO:1, 一些 HPPD 是内在地较多抵抗不同的除草剂 B-F 的而其他是内在地较少抵抗不同的除草剂 B-F 的, 并且因此或多或少地适合于在转基因植物中赋予抗性。此外, 一些展示出相对于 SEQ ID NO:1 的 HPPD 较大的或较小的 k_{cat}/K_m 值。对于每种除草剂, 确定适合性或另外给定的 HPPD 序列的有关比较参数是 k_{cat}/K_m (相对于对于 SEQ ID NO:1) 值与相应的对于除草剂的 k_{off} 速率 (相对于对于 SEQ ID NO:1) 的倍数。

[0213] 因此,例如,从看麦娘属 (*Alopecurus*) 得到的 SEQ ID NO :3 的 HPPD 对于甲基磺草酮 (B) 给定了对于这个倍数的一个大约 2.3 的值,意味着它比 SEQ ID NO :1 有效大约 2.3 倍更抵抗于甲基磺草酮,如果所有条件是相等的,当同样在转基因植物中表达时,将赋予更高(可能大约两倍)水平的对于甲基磺草酮的耐受性。

[0214] 类似地,相同的序列还提供了胜过 SEQ ID NO :1 的对于测试的其他除草剂(苯吡唑草酮、tembo 三酮以及衍生自异恶唑草酮的二酮腈等)的增强的(尽管在较小程度上)耐受性。同样,可以看出 SEQ ID NOs :6、7 以及 8 的 HPPD 也赋予了优点。在另一方面,一些测试的其他范围的 HPPD 显得比 SEQ ID NO :1 的 HPPD 对于提供对任何除草剂的耐受性显著地更不有效。因此,例如,来自野黍属 (*Eriochola*)、拟南芥属以及鬼针草属 (*Bidens*) 的 HPPD 显得是具有与 SEQ ID NO :1 的 HPPD 类似的催化活性,但是对于甲基磺草酮更敏感 > 20 倍,同时假单胞菌属酶两者都是较不催化有效的(对于 SEQ ID NO :1 k_{cat}/K_m 约 0.2) 并且对于甲基磺草酮是更敏感的。因此,在此所述的许多新的 HPPD 序列(例如 SEQ ID NOs :2-8) 提供了胜过现有技术的显著改进(关于用于提供对于 HPPD 除草剂并且特别是关于所例证的化学类别的耐受性提供更好的选项)。

[0215] 实例 3

[0216] HPPD 的突变体变种的克隆、表达和测定以及对于不同的 HPPD 除草剂的 k_{cat} 、 K_{mHPP} 以及 k_{off} 的值的确定。

[0217] 使细胞生长,制备蛋白提取物,并且如实例 1 中所描述进行 HPPD 活性位点滴定以及 k_{cat} 、 K_{mHPP} 、以及 k_{off} 值的动力学测量。

[0218] 在本实例中,使用衍生自 SEQ ID NO :1 的以下 HPPD 序列:

[0219] 通过在位置 358 处将 L 取代为 M,将 SEQ ID NO :1 改变为 HPPD SEQ ID NO :20。

[0220] 通过在位置 217 处将 V 取代为 I,将 SEQ ID NO :1 改变为 HPPD SEQ ID NO :21。

[0221] 通过在位置 217 处将 V 取代为 L,将 SEQ ID NO :1 改变为 HPPD SEQ ID NO :22。

[0222] 通过在位置 326 处将 A 取代为 R,将 SEQ ID NO :1 改变为 HPPD SEQ ID NO :23。

[0223] 通过在位置 326 处将 A 取代为 K,将 SEQ ID NO :1 改变为 HPPD SEQ ID NO :24。

[0224] 通过在位置 326 处将 A 取代为 I,将 SEQ ID NO :1 改变为 HPPD SEQ ID NO :25。

[0225] 通过在位置 339 处将 I 取代为 E,将 SEQ ID NO :1 改变为 HPPD SEQ ID NO :26。

[0226] 通过在位置 339 处将 I 取代为 D,将 SEQ ID NO :1 改变为 HPPD SEQ ID NO :27。

[0227] 通过在位置 339 处将 I 取代为 C,将 SEQ ID NO :1 改变为 HPPD SEQ ID NO :28。

[0228] 通过在位置 408 处将 G 取代为 R,将 SEQ ID NO :1 改变为 HPPD SEQ ID NO :29。

[0229] 通过在位置 358 处将 L 取代为 M 并且在位置 326 处将 A 取代为 R,将 SEQ ID NO :1 改变为 HPPD SEQ ID NO :30。

[0230] 通过在位置 358 处将 L 取代为 M、通过在位置 326 处将 A 取代为 R、并且通过在位置 217 处将 V 取代为 I,将 SEQ ID NO :1 改变为 HPPD SEQ ID NO :31。

[0231] 通过在位置 358 处将 L 取代为 M 并且在位置 217 处将 V 取代为 I,将 SEQ ID NO :1 改变为 HPPD SEQ ID NO :32。

[0232] 通过在位置 326 处将 A 取代为 R 并且在位置 217 处将 V 取代为 I,将 SEQ ID NO :1 改变为 HPPD SEQ ID NO :33。

[0233] 通过在位置 358 处将 L 取代为 M、通过在位置 326 处将 A 取代为 K、并且通过在位

置 217 处将 V 取代为 I, 将 SEQ ID NO :1 改变为 HPPD SEQ ID NO :34。

[0234] 通过在位置 358 处将 L 取代为 M、通过在位置 326 处将 A 取代为 R、并且通过在位置 217 处将 V 取代为 L, 将 SEQ ID NO :1 改变为 HPPD SEQ ID NO :35。

[0235] 通过在位置 358 处将 L 取代为 M、通过在位置 326 处将 A 取代为 R、通过在位置 217 处将 V 取代为 I、并且通过在位置 339 处将 I 取代为 E, 将 SEQ ID NO :1 改变为 HPPD SEQ ID NO :36。

[0236] 通过在位置 358 处将 L 取代为 M、通过在位置 326 处将 A 取代为 R、通过在位置 217 处将 V 取代为 L、并且通过在位置 339 处将 I 取代为 E, 将 SEQ ID NO :1 改变为 HPPD SEQ ID NO :37。

[0237] 通过在位置 412 处将 G 取代为 H, 将 SEQ ID NO :1 改变为 HPPD SEQ ID NO :42。

[0238] 通过在位置 412 处将 G 取代为 C, 将 SEQ ID NO :1 改变为 HPPD SEQ ID NO :43。

[0239] 通过在位置 297 处将 Q 取代为 A, 将 SEQ ID NO :1 改变为 HPPD SEQ ID NO :44。

[0240] 通过在位置 283 处将 Q 取代为 N, 将 SEQ ID NO :1 改变为 HPPD SEQ ID NO :45。

[0241] 通过在位置 297 处将 Q 取代为 G, 将 SEQ ID NO :1 改变为 HPPD SEQ ID NO :46。

[0242] 通过在位置 358 处将 L 取代为 A, 将 SEQ ID NO :1 改变为 HPPD SEQ ID NO :47。

[0243] 在本实例中, 使用了衍生自 SEQ ID NO :3 的以下 HPPD 序列:

[0244] 通过在位置 359 处将 L 取代为 M 并且在位置 327 处将 A 取代为 R, 将 SEQ ID NO :3 改变为 HPPD SEQ ID NO :40。

[0245] 通过在位置 359 处将 L 取代为 M、通过在位置 327 处将 A 取代为 R、并且通过在位置 218 处将 V 取代为 I, 将 SEQ ID NO :3 改变为 HPPD SEQ ID NO :41。

[0246] 在本实例中, 使用了衍生自 SEQ ID NO :7 的以下 HPPD 序列:

[0247] 通过在位置 353 处将 L 取代为 M 并且在位置 321 处将 A 取代为 R, 将 SEQ ID NO :7 改变为 HPPD SEQ ID NO :38。

[0248] 通过在位置 353 处将 L 取代为 M、通过在位置 321 处将 A 取代为 R、并且通过在位置 213 处将第一个 V 取代为 I, 将 SEQ ID NO :7 改变为 HPPD SEQ ID NO :39。

[0249] 包含了相应于 SEQ ID NO :1 的 HPPD 作为实验中的一个内部对照。对于 SEQ ID NO :1 的 HPPD 的不同的动力学参数的平均绝对值详细列于以上实例 1 中。在以下表 3-5 中的数据提供了来自对于 SEQ ID NOs :20-47 和 50 的这些测量结果的数据, 表达为相应的对于 SEQ ID NO :1 的对照值的一个比例。因此, 对于 SEQ ID NO :1 的所有参数值被给定为 1.0。

[0250] 表 3 SEQ ID NOs :20-29 的 HPPD 的动力学参数

[0251]

SEQ ID NO:	K_{cat}/K_{cat} SEQ ID NO: 1	K_{mHPP}/K_m SEQ ID NO: 1	$(K_{cat}/K_m)/$ (K_{cat}/K_m) SEQ ID NO: 1	K_{offB}/K_{offB} SEQ ID NO: 1	K_{offC}/K_{offC} SEQ ID NO: 1	K_{offD}/K_{offD} SEQ ID NO: 1	K_{offE}/K_{offE} SEQ ID NO: 1	K_{offF}/K_{offF} SEQ ID NO: 1
1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
20	0.7	0.9	0.8	2.0	1.1	2.3	1.2	2.1
	0.8	0.9	0.8	1.9		1.9		
21	1.1	1.4	0.8	1.5	1.1	1.0	1.0	1.1
	0.9	0.9	1.0	1.5				
22	0.8	0.8	1.0	2.0	1.0	1.2	1.0	1.0
	0.7	0.7	1.1					
23	1.5	1.0	1.6	1.7		1.4	1.2	1.3
	1.3	0.6	2.2	1.7	0.9	1.4	1.3	
24	0.8	1.0	0.8	1.4	1.1	1.5	1.2	1.3
	0.7	0.6	1.2					
25	0.9			1.6		1.1	1.3	
26	0.6	0.5	1.2	1.5	1.0	1.4	1.6	1.5
	0.6	0.6	1.0					
27	0.8	0.9	0.9	1.7		1.1	1.5	
	0.7	0.7	1.1					
28				1.2		1.0	1.6	
29	0.1	0.6	0.2	8.1		1.7	11.3	
	0.1	0.3	0.4					

[0252] 表 4 SEQ ID NOs :30-36 的 HPPD 的动力学参数

[0253]

SEQ ID NO:	K_{cat}/K_{cat} SEQ ID NO: 1	K_{mHPP}/K_m SEQ ID NO: 1	$(K_{cat}/K_m)/$ (K_{cat}/K_m) SEQ ID NO: 1	$K_{off} B/K_{off} B$ SEQ ID NO: 1	$K_{off} C/K_{off} C$ SEQ ID NO: 1	$K_{off} D/K_{off} D$ SEQ ID NO: 1	$K_{off} E/K_{off} E$ SEQ ID NO: 1	$K_{off} F/K_{off} F$ SEQ ID NO: 1
1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
30	0.6	0.6	1.1	3.4		2.8	1.6	3.2
	0.6	0.5	1.1	3.3		2.7	1.6	3.1
	0.8	0.8	1.1	3.5	1.1	3.1	1.9	
	0.8	0.7	1.1	3.6	0.9	2.8	2.2	
	0.8	0.7	1.0					
31	0.6	0.5	1.1	5.3	1.1	3.2	2.4	3.8
	0.6	0.5	1.1	5.3		2.6	2.3	
	0.8	0.7	1.2					
32	1.0	1.1	0.8	3.1	1.0	2.1	1.6	2.7
	0.9	0.9	0.9	3.2		2.3		
33	0.6	0.5	0.8	2.5	1.3	1.4	1.5	1.3
	0.6	0.7	0.7					
34	0.7	0.8	0.9	5.0		3.2	2.9	
	0.7	0.9	0.8					
35	0.8	1.2	0.7	6.3		3.0	2.5	
	0.7	0.8	0.9					
36	0.7	0.7	1.0	8.5		3.6	5.1	
	0.7	0.5	1.3					

[0254] 表 5 SEQ ID NOs :37-47 和 50 的 HPPD 的动力学参数

[0255]

SEQ ID NO:	K_{cat}/K_m SEQ ID NO: 1	K_{mHPPD}/K_m SEQ ID NO: 1	$(K_{cat}/K_m)/$ (K_{cat}/K_m) SEQ ID NO: 1	K_{offB}/K_{offB} SEQ ID NO: 1	K_{offC}/K_{offC} SEQ ID NO: 1	K_{offD}/K_{offD} SEQ ID NO: 1	K_{offE}/K_{offE} SEQ ID NO: 1	K_{offF}/K_{offF} SEQ ID NO: 1
1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
37	0.7	0.5	1.3	8.6		3.4	3.7	
	0.7	0.4	1.6					
38	0.5	0.8	0.7	3.9		3.1	2.8	
	0.6	0.5	1.2					
39	0.8	0.7	1.2	6.4		4.3	4.8	
	0.9	0.8	1.0					
40	0.6	0.5	1.0	8.4		2.1	2.5	
	0.8	0.6	1.3					
41	0.9	0.7	1.2	12.5		3.6	5.3	
	0.9	1.0	1.0					
42	2.0	8.1	0.2	1.4	0.7	0.6	1.0	1.9
	1.1	4.6	0.2					
43	0.7	10.5	<0.1	2.0	1.4	1.0	2.7	0.7
	0.5	8.5	<0.1					
44	0.4	22	<0.1		1.6	0.6		
45	<0.05	>2	<<0.1			2.0		
46	0.1	49	<<0.1	2.7	1.8			

[0256]

47	0.2	2	0.1	1.0	1.7			
50	1.1	2	1.1	15.3		3.2	4.7	
						3.4	3.7	4.1

[0257] 从表 3-5 中所描述的数据清楚的是,相对于 SEQ ID NO:1,一些 HPPD 是内在地较多抵抗不同的除草剂 B-F 的而其他是内在地较少抵抗不同的除草剂 B-F 的,并且因此或多或少地适合用于在转基因植物中赋予抗性。再次,对于每种除草剂,确定适合性或另外给定的 HPPD 序列的有关比较参数是 k_{cat}/K_m (相对于对于 SEQ ID NO:1) 值与相应的对于除草剂的 k_{off} 速率 (相对于对于 SEQ ID NO:1) 的倍数。因此,具有在 SEQ ID NO:1 的位置 L358、V217、I339 以及 A326 处相对于 SEQ ID NO:1 的单个氨基酸改变的那些序列 (例如 SEQ ID NOs:20-29) 不仅在对于一种或多种测试除草剂 (B-F) 的解离速率 (k_{off}) 方面显示出显著的增加而且保持催化有效 (即 k_{cat}/K_m 保持大约相同或比 SEQ ID NO:1 改进)。因此,例如,SEQ ID NO:26 的 HPPD (它具有相对于 SEQ ID NO:1 的一种 I339E 氨基酸置换) 在对于除草剂 B、D、E 和 F 的固有耐受性方面相对于 SEQ ID NO:1 展示出显著 (约 1.5 倍) 的改进。类似地,不同的其他单个氨基酸置换 (SEQ ID NOs:20-29 的 L358M、V217I、V217L、G408R、I339D、I339C、A326R、A326I 以及 A326K) 还提供了在对于一种或多种除草剂的固有耐受性方面的改进。

[0258] SEQ ID NO:29 (具有相对于 SEQ ID NO:1 的一种 G408R 变化) 展示出 SEQ ID NO:1 的 HPPD 的仅大约四分之一至三分之一的催化活性。然而,在催化活性方面的这种不足更多地是通过在 k_{off} 值 (决定化合物 B 和 E 从该酶上的解离速率) 方面的 8X 或更多的增加

来补足的。另外的证据证明突变 G408 对于突变体酶赋予了有利的特性。例如,一种 G408A 置换具有与 SEQ ID NO :1 (k_{cat}/K_m) 的 HPPD 类似的催化活性,并且与 SEQ ID NO :1 相比在与甲基磺草酮的酶:抑制剂复合体的解离速率 (k_{off}) 方面展示出 1.45 倍的增加。相对于 SEQ ID NO :1, G408A 突变体 HPPD 还展示出在关于抑制剂 D 的 k_{off} 值方面大于 1.5X 的增加以及在关于抑制剂 E 的 k_{off} 值方面大于 3.5X 的增加。这样,通过这些披露的突变赋予的额外的改进,对于 HPPD 除草剂(并且特别是对于在此所例证的结构类别)的商业水平的耐受性是更容易获得的。

[0259] 为了提供任何程度的有用的耐受性,一种突变必须提供一种在除草剂结合方面在数字大小上的降低(在此被测量为在除草剂从酶上的解离速率方面的增加),这比任何催化不足(在此测量为 k_{cat}/K_m) 更为重要。甚至更有价值的是可以与彼此组合在一起并且结合到多种 HPPD 序列(例如在表 2 中列出的 HPPD) 中的那些突变,从而组合起作用并且相对于天然 HPPD 提供附加的、或更优选地协同水平的除草剂耐受性。

[0260] 因此,例如,从燕麦属得到的 SEQ ID NO :30 的变体 HPPD (SEQ ID NO :23 的 A326R 置换与 SEQ ID NO :20 的 L358M 置换组合) 提供了超过两个单个的突变中的任何一个的水平 HPPD 除草剂抗性并且确实提供了几乎倍增的增加。所以,例如 SEQ ID NO :30 的 HPPD 比 SEQ ID NO :1 大约 3.5 倍更抵抗于甲基磺草酮,并且因此,如果所有条件是相等的,当同样在转基因植物中表达时将赋予更高水平(优选大约三倍或更大的倍数)的对于甲基磺草酮的耐受性。相同的 HPPD 序列(即 SEQ ID NO :30) 还提供了比 SEQ ID NO :1 增强的耐受性(关于所测试的其他除草剂)并且值得注意地例如是比 SEQ ID NO :1 大约 3 倍更耐受于苯吡唑草酮和异恶唑草酮(二酮腈)。SEQ ID NO :31 的 HPPD (将 SEQ ID NO :21 的 V217I 置换与 SEQ ID NO :20 的 L358M 置换以及 SEQ ID NO :23 的 A326R 置换进行组合) 相应地显示出胜过 SEQ ID NO :1 的 HPPD 的甚至仍进一步的(约 5.8 倍)在对于甲基磺草酮以及其他除草剂的抗性方面的增强。类似地,SEQ ID NO :36 的 HPPD (仍进一步将 SEQ ID NO :26 的 I339E 变化加入到 SEQ ID NO :31 的那些上) 比 SEQ ID NO :1 的 HPPD 是仍然甚至更耐受于(大约 9.8 倍)甲基磺草酮的。这证明了可以将所有这些氨基酸位置处的变化进行组合从而提供增强水平的固有的酶除草剂耐受性。

[0261] 此外,这些相同的突变改变还起作用并且有利地改变了 HPPD 的特征,除了来自燕麦属的 SEQ ID NO :1 以外。因此,例如,SEQ ID NO :40 组合了与在 SEQ ID NO :30 中等效的氨基酸变化,但是这次在 SEQ ID NO :3 的看麦娘属 HPPD 中。这两种突变改变以及看麦娘属 HPPD 酶的胜过燕麦属的益处大约倍增地起作用,从而考虑到 k_{cat}/K_m 和 k_{off} 值,SEQ ID NO :40 的 HPPD 相对于 SEQ ID NO :1 在对于甲基磺草酮的固有耐受性方面展示出大于 10 倍的改进。类似地,SEQ ID NO :39 组合了与在 SEQ ID NO :31 中等效的氨基酸变化,但是这次在 SEQ ID NO :7 的早熟禾属 HPPD 中。因此,相比于 SEQ ID NO :31 的 HPPD (比 SEQ ID NO :1 的 HPPD 大约好 3.2 倍),SEQ ID NO :39 对于化合物 D 展示出显著更好的耐受性(比 SEQ ID NO :1 的 HPPD 大约好 4.7 倍)。SEQ ID NO :41 也组合了与在 SEQ ID NO :31 中等效的氨基酸变化,但是这次在 SEQ ID NO :3 的看麦娘属 HPPD 中。SEQ ID NO :41 的 HPPD 展示出高水平的对化合物 E (比 SEQ ID NO :1 的 HPPD 大约高 5.8 倍) 以及还对甲基磺草酮(比 SEQ ID NO :1 的 HPPD 大约高 13.8 倍) 两者的固有耐受性。

[0262] 实例 4

[0263] 由烟草中表达的异源 HPPD 酶赋予的除草剂耐受性的制备和评价

[0264] 在本实例中,天然的和突变体 HPPD 是,例如,SEQ ID NOs :1-14 和 20-47。编码了这些 HPPD 的 DNA 序列(对于烟草是优化的,或任选地根据一种目标作物如大豆进行密码子优化的)是合成地制备的并且从 GeneArt(德国雷根斯堡)商业地获得的。每个序列被设计成具有 5' NdeI 和 3' BamHI 位点以有助于直接克隆并且然后克隆到一个合适的二元载体中用于基于农杆菌属的植物转化。

[0265] 在一个具体的实施方案中,将编码碧冬茄属 (petunia)EPSPS 叶绿体转运肽 (SEQ ID NO :48) 至 HPPD SEQ ID NOs :13 和 14 以及小麦 HPPD (SEQ ID NO :5, 在 PCT 公开号 WO 02/46387 中 ;UNIPROT :A7WK82) 的 N 端融合的烟草优化的基因克隆到表达构建体中并且转化到烟草中。编码 CTP/HPPD 的核苷酸序列被 PCR 进行编辑(或初始地合成)以包括 5' XhoI 位点、TMV Ω 增强子 (SEQ ID NO :86) 以及 3' KpnI 位点(并且为了除去任何此类内部位点)。

[0266] 使用 XhoI/KpnI 切断该表达盒(包括 TMV Ω 5' 前导序列、CTP 和 4-HPPD 基因)并且克隆到类似地消化的 pBIN 19 (Bevan, Nucl. Acids Res. (1984)) 中(在双重增强的 35S 启动子 (SEQ ID NO :87) 之后并且在 NOS 3' 转录终止子 (SEQ ID NO :88) 之前)并且然后转化到大肠杆菌 TOP 10 感受态细胞中。使用从该大肠杆菌中回收的 DNA 来转化根癌农杆菌 LBA4404, 并且在包含利福平和卡那霉素的培养基上选择转化的细菌。使用本领域中已知的方法或如在此所述使烟草组织经受农杆菌介导的转化。例如,使用包含表达 HPPD 的二元载体的根癌农杆菌的母板来接种包含 100mg/1 利福平加上 50mg/1 卡那霉素的 10ml LB (L 肉汤)(使用单一的菌落)。在 28°C 下在 200rpm 摇动下将这种培养物孵育过夜。使用这种整个的过夜培养物来接种 50ml 体积的包含相同抗生素的 LB。再一次,在 28°C 下在 200rpm 摇动下将这种培养物培养过夜。通过在 3000rpm 下离心 15 分钟使这些农杆菌细胞沉淀,然后再悬浮于包含 30g/1 蔗糖、pH 5.9 的 MS (Murashige and Skoog) 的培养基中至 OD (600nm) = 0.6。将这种悬浮液以 25ml 等分部分分配到皮氏培养皿中。

[0267] 克隆地微繁殖的烟草嫩枝培养物被用来切除嫩叶(还没有完全展开)。将中脉和外叶缘移开并且弃去,并且将剩余的叶片切成 1 平方 cm。将这些叶片转移到农杆菌悬浮液中持续 20 分钟。然后将外植体移开,在无菌滤纸上轻拍以移除过量的悬浮液,然后转移到固体 NBM 培养基(在 pH 5.9 下的包含 30g/1 蔗糖、1mg/1 BAP (苯甲酸嘌呤) 以及 0.1mg/1 NAA (萘乙酸) 并且用 8g/1 植物琼脂进行固化的 MS 培养基)上,使各外植体的背轴面与该培养基相接触。每个皿转化约 7 个外植体,然后将该皿密封并且在光照培养箱中在 25°C 下保持 16 小时光周期持续 3 天。

[0268] 然后将这些外植体转移到包含 100mg/1 卡那霉素加上抗生素的 NBM 培养基上以进一步阻止农杆菌的生长(具有 250mg/1 羧苄青霉素的 200mg/1 特美汀)。然后每 2 周在这种相同的培养基上进行进一步的传代培养。

[0269] 当嫩枝开始从愈伤组织叶外植体再生时,将这些移到嫩枝伸长培养基中 (MS 培养基, 30g/1 蔗糖、8g/1 植物琼脂、100mg/1 卡那霉素、200mg/1 特美汀、250mg/1 羧苄西林、pH 5.9)。在 2 周内这些稳定的转基因植物容易地生根。为了对每个事件提供多种植物,以最终允许对每种转基因植物的一种以上的除草剂测试,将所有生根的嫩枝进行微繁殖从而产生 3 个或更多个生根的克隆。

[0270] 使用引物（这些引物扩增了该 HPPD 转基因内的 500bp 片段）通过 PCR 对在结合卡那霉素的培养基上正在生根并且显示出旺盛的枝生长的推定的转基因植物进行分析。在未转化的烟草上的这种相同的引物集的评估结论性地显示出这些引物不会扩增来自天然烟草 HPPD 基因的序列。

[0271] 将转化的嫩枝分成 2 或 3 个克隆并且从卡那霉素抗性愈伤组织进行再生。这些嫩枝在包含卡那霉素的 MS 琼脂上生根。使存活的外植体再 生根从而提供了来自各事件的事件的约 40-50 个卡那霉素抗性的并且 PCR 阳性的事件。

[0272] 一旦生根, 将这些小植株从琼脂转移并且盆栽到具有 50% 泥炭、具有缓释肥料的 50% John Innes Soil No.3 的 3 英寸圆形盆中, 有规律地浇水从而在温室中建立 8 至 12 天。温室条件被调节到白天约 24℃ 至 27℃ ; 夜间 18℃ 至 21℃ 并且大致 14 小时的光周期。将湿度调节到大约 65% 并且光水平是在台式水平 (bench level) 下高达 2000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ 。

[0273] 因此产生了三个转基因群体, 这些群体各自具有约 40 个烟草植株并且可替代地包含一种编码小麦 HPPD (A7WK82)、HPPD SEQ ID NO:12 或 HPPD SEQ ID NO:13 的 HPPD 基因。然后基于相同的大小从每个群体中选择大约 30 个植物的亚群用于喷雾试验。然后将所有的植物用 600g/ha 的甲基磺草酮进行喷雾。将 Callisto® 与 0.2% -0.25% X-77® 表面活性剂混合在水中并且从适当的轨道喷雾器上的喷杆进行喷雾, 该喷雾器以 2mph 移动, 其中喷嘴距离植物顶部约 2 英寸。喷雾量是 200l/ha。针对损害对这些植物进行评定并且在处理后 14 天进行评分 (DAT)。在表 6 中描述了这些结果。

[0274] 在表 6 中的黑框表示在那个特定的事件中的植物是绿色的, 而灰框表明这些植物是部分漂白的。剩余的白框表示这些植物是完全漂白的。根据表 6 中描述的数据可以清楚的是, 对于同样表达的 HPPD, 仅仅小麦 HPPD (A7WK82) 赋予了有用水平的对甲基磺草酮的耐受性 (即, 直到至少 2-4X 的一个正规大田施用率而仍正常健康)。相比之下, SEQ ID NO:13 (来自拟南芥属) 以及 SEQ ID NO:14 (来自荧光假单胞菌) 的 HPPD 没有提供在该喷雾率的有效耐受性。33 个小麦 HPPD 事件中的五个显示出 < 或等于 10% 的损害 (零至轻度矮化)。根据所表达的 HPPD 的这种在甲基磺草酮耐受性方面的差异是与表 2 中描述的体外数据 (表明拟南芥属和假单胞菌属 HPPD 都没有很好的对甲基磺草酮的固有耐受性) 并且还描述了小麦 HPPD (在体外和在植物体内两者) 对于这些之一的相对显著优越性的公开数据 (Hawkes et al (2001) in Proc. Brit Crop Prot. Conf. (Weeds), p 563. British Crop Protection Council 以及 PCT 公开号 WO 02/46387) 两者是完全一致的。

[0275] 表 6

[0276]

拟南芥属		小麦		假单胞菌属	
事件	得分	事件	得分	事件	得分

[0277]

987	90	1605	90	1897	85
1988	90	1607	0	1898	80
1990	80	1608	15	1899	80
1993	85	1609	30	1905	85
1995	85	1610	80	1908	85
1996	90	1612	75	1909	90
1997	85	1613	80	1918	85
1999	90	1616	50	1920	100
2009	85	1617	65	1927	85
2011	90	1618	70	1928	90
2012	90	1620	0	1929	85
2013	95	1622	20	1930	85
2015	90	1623	30	1931	85
2016	90	1626	75	1934	85
2021	90	1636	85	1936	80
2022	90	1701	70	1937	80
2029	90	1704	75	1938	75
2031	85	1705	75	1939	90
2033	85	1706	10	1940	85
2035	85	1708	15	1943	85
2036	90	1709	90	1944	80
2038	85	1710	5	1945	80
2039	90	1711	85	1951	90
2040	90	1713	70	1952	90
2044	90	1717	75	1953	90
2049	85	1718	80	1954	95
2051	90	1719	5	1955	95
2052	85	1720	70	1956	95
2053	90	1721	15	1957	95
2059	0	1722	90	1958	95

[0278]

2061	90	1723	15	1965	85
2062	90	1727	35	1966	95
		1728	40		

[0279] 表 7 描述了用 600g/ha 异恶唑草酮的克隆植物的损伤 14DAT 的评定,具有如表 6 中所述的相同的事件,来自相同时间平行进行的一个实验。

[0280] 表 7

[0281]

拟南芥属		小麦		假单胞菌属	
事件	得分	事件	得分	事件	得分
987	65	1605	85	1897	70
1988	75	1607	60	1898	50
1990	80	1608	15	1899	50
1993	10	1609	70	1905	65
1995	80	1610	80	1908	90
1996	65	1612	85	1909	95
1997	70	1613	30	1918	70
1999	85	1616	70	1920	
2009	70	1617	80	1927	70
2011	70	1618	10	1928	75
2012	70	1620	65	1929	60
2013	90	1622	80	1930	75
2015	80	1623	65	1931	60
2016	70	1626	90	1934	70
2021	70	1636	35	1936	60
2022	65	1701	65	1937	65
2029	70	1704	90	1938	30
2031	80	1705	65	1939	80
2033	70	1706	25	1940	70
2035	80	1708	25	1943	75
2036	80	1709	90	1944	75

[0282]

2038	80	1710	40	1945	50
2039		1711	95	1951	68
2040	85	1713	65	1952	75
2044	90	1717	85	1953	68
2049	75	1718	75	1954	68
2051	75	1719	25	1955	55
2052	68	1720	80	1956	55
2053	68	1721	65	1957	70
2059	70	1722	95	1958	68
2061	75	1723	15	1965	80
2062	90	1727	50	1966	75
		1728	68		

[0283] 喷雾了异恶唑草酮的所有植物被损伤,其中仅仅 3/33 的表达小麦 HPPD 的事件表现出小于 20% 的损伤。再次,表达了拟南芥属 HPPD 的植物中没有一个可观地显出抗性,而假单胞菌属 HPPD 确实赋予了某种程度的耐受性,其中 4/32 的植物显示出 50% 的损伤或更少。再次,这与体外动力学数据(表 2 和 PCT 公开号 W0 02/46387) 广泛一致,显示出虽然展示出对于 HPP 的高 K_m 值并且因此展示出相对差的 k_{cat}/K_m 值,假单胞菌属 HPPD 并没有展示出相对高的对异恶唑草酮的二酮腈(即化合物 D) 的 k_{off} 值。

[0284] 上述数据广泛建立了确定体外酶动力学的预测力,如通过相对值 $(k_{cat}/K_m) \times k_{off}$ 所确定的,从而预见一种给定的 HPPD 当在一个作物植物中表达时能赋予多少的对一种给定的 HPPD 除草剂的耐受性。

[0285] 在另外的实例中,将编码 HPPD SEQ ID NOs. 1 至 14 以及 HPPD SEQ NOs: 20-47 的烟草优化的基因克隆(这次没有任何 CTP) 到表达构建体中(如以下所述) 并且转化到烟草中。编码 HPPD 的核苷酸序列被 PCR 进行编辑(或初始地合成) 以包括 5' XhoI 位点、TMV Ω 增强子以及 3' KpnI 位点(并且为了除去任何此类内部位点)。使用 XhoI/KpnI 切断该表达盒(包括 TMV Ω 前导序列和 4-HPPD 基因) 并且克隆到类似地消化的 pBIN 19(Bevan, Nucl. Acids Res. (1984)) 中(在双重 35S 启动子之后并且在 Nos 基因转录终止子之前) 并且然后转化到大肠杆菌 TOP 10 感受态细胞中。再次,再生了烟草植物的转基因群体并且在温室中进行评定,如以上所述。

[0286] 实例 5

[0287] 大豆转化载体的构建

[0288] 用以下各项来构建用于双子叶植物(大豆) 转化的二元载体:启动子(例如包含 CaMV 35S 的合成启动子) 以及驱动 HPPD 编码序列(例如 SEQ ID NOs: 1-8 和 20-41) 的表达的 FMV 转录增强子,紧接着 Nos 基因 3' 终止子。基于 HPPD 基因编码区的预测的氨基酸

序列, HPPD 基因被密码子优化以用于大豆表达。在这种情况下, HPPD 本身并不被用作选择标记, 通过加入转化选择标记基因来构建包含 HPPD 表达盒的农杆菌二元转化载体。例如, 二元转化载体 17900 (SEQ ID NO :51) 包含编码 HPPD 变体 (SEQ ID NO :49) 的表达盒, 该表达盒连接有两个 PAT 基因盒 (具有 35S 启动子并且具有 CMP 启动子, 并且其中两个 PAT 基因都紧接着 nos 终止子) 用于在转化过程期间进行基于草铵膦的选择。另一种二元转化载体 (17901 ;SEQ ID NO :52) 包含编码 HPPD 变体 (SEQ ID NO :24) 的表达盒并且还有 EPSPS 选择标记盒。将载体 17901 转化到大豆中, 并且使用不成熟种子目标物的农杆菌介导的转化使用草甘膦选择得到转基因植物。这些编码 HPPD 基因的 DNA 序列被密码子优化的以用于在双子叶植物中表达。

[0289] 使用本领域的普通技术人员所熟知的方法 (如重叠 PCR、DNA 合成、限制性片段亚克隆以及连接) 的组合来构建上述实例的二元载体。它们的独特结构在图 3(载体 17900) 以及图 4(载体 17901) 中并且在序列表 SEQ ID NOs :51 和 52 中变得清楚。关于这些载体的另外的信息提供如下。

[0290] 在图 3(载体 17900) 中所使用的缩写被定义如下:

[0291] cAvHPPD-04

[0292] 起点 :1024 终点 :2343

[0293] 编码 SEQ ID NO :49 的大豆密码子优化的燕麦 HPPD 基因

[0294] cPAT-03-01

[0295] 起点 :3209 终点 :3760

[0296] PAT Hoescht A02774 合成的产绿色链霉菌, 植物密码子 ;与 Q57146 草铵膦乙酰转移酶蛋白相同

[0297] cPAT-03-02

[0298] 起点 :5062 终点 :5613

[0299] PAT Q57146 产绿色链霉菌草铵膦乙酰转移酶蛋白, cPAT-03-01DNA, 具有突变的 BamH1、Bgl2 位点

[0300] cSpec-03

[0301] 起点 :6346 终点 :7134

[0302] 也被称为 aadA ;编码酶氨基糖甙 3' 腺苷酰转移酶的基因, 赋予了对大观霉素和链霉素的抗性用来将载体保持在大肠杆菌和农杆菌中。

[0303] cVirG-01

[0304] 起点 :7434 终点 :8159

[0305] 来自 pAD1289 的 virG(推定的)(具有 TTG 起始密码子)。virGN54D 来自 Hansen et al. 1994, PNAS 91 :7603-7607 中所描述的 pAD1289

[0306] cRepA-01

[0307] 起点 :8189 终点 :9262

[0308] RepA, pVS1 复制蛋白

[0309] eNOS-01

[0310] 起点 :168 终点 :259

[0311] 来自 15235 的推定的 NOS 增强子序列 (如在某些二元载体的右边缘中所发现的)。

- [0312] eFMV-03
- [0313] 起点 :396 终点 :589
- [0314] 来自玄参花叶病毒 (FMV) 的增强子区
- [0315] e35S-05
- [0316] 起点 :596 终点 :888
- [0317] 在 CMV 35S 增强子区中 C 至 T 以及 C 至 A 的碱基对变化。
- [0318] eTMV-02
- [0319] 起点 :953 终点 :1020
- [0320] 被考虑用来增强表达的 TMV Ω 5' UTR 引导序列。EMBL :TOTMV6
- [0321] eFMV-03
- [0322] 起点 :4054 终点 :4247
- [0323] 来自玄参花叶病毒 (FMV) 的增强子区
- [0324] e35S-05
- [0325] 起点 :4254 终点 :4546
- [0326] 在 CMV 35S 增强子区中 C 至 T 以及 C 至 A 的碱基对变化
- [0327] eNOS-01
- [0328] 起点 :4557 终点 :4648
- [0329] 来自 15235 的推定的 NOS 增强子序列 (如在某些二元载体的右边缘中所发现的)。
- [0330] bNRB-05
- [0331] 起点 :4 终点 :259 (互补序列)
- [0332] 右边缘 /NOST-DNA 区 ; 可以影响多个启动子。EMBL Nos :J01826、V00087、AF485783。
- [0333] bNRB-01-01
- [0334] 起点 :101 终点 :125 (互补序列)
- [0335] 根癌农杆菌胭脂碱 ti 质粒的 T-DNA 的右边缘重复序列
- [0336] bNLB-03
- [0337] 起点 :5937 终点 :6066 (互补序列)
- [0338] 根癌农杆菌胭脂碱 ti 质粒的 T-DNA 的左边缘区
- [0339] 起点 :5972 终点 :5996 (互补序列)
- [0340] 根癌农杆菌胭脂碱 ti 质粒的 T-DNA 的 25bp 左边缘重复序列区
- [0341] prCMP-04
- [0342] 起点 :4655 终点 :5051
- [0343] 夜香树黄叶卷曲病毒启动子以及引导序列。Genbank [®] 登录号 AF364175。还参见美国专利申请公开号 20040086447。prCMP-01 在 5' 端上具有 1 个碱基对平截并且在 3' 端上具有 2 个碱基对平截
- [0344] pr35S-04-01
- [0345] 起点 :2664 终点 :3184
- [0346] 来自 CMV 的 35S 启动子。EMBL :CAMVG2
- [0347] oVS1-02

- [0348] 起点 :9305 终点 :9709
- [0349] 来自假单胞菌的质粒 pVS1 的复制起始区和分隔区 (Itoh 等人,1984,Plasmid 11 : 206-220) ;类似于 GenBank ® 登录号 U10487 ;在根癌农杆菌宿主中用作复制起始区。
- [0350] oCOLE-06
- [0351] 起点 :10387 终点 :11193(互补序列)
- [0352] 从 pUC19 得到的在大肠杆菌中起作用的 ColE1 复制起始区
- [0353] tNOS-05-01
- [0354] 起点 :2360 终点 :2612
- [0355] 合成胭脂碱合成酶终止子
- [0356] tNOS-05-01
- [0357] 起点 :3794 终点 :4046
- [0358] 合成胭脂碱合成酶终止子
- [0359] tNOS-05-01
- [0360] 起点 :5642 终点 :5894
- [0361] 合成胭脂碱合成酶终止子
- [0362] 在图 4(载体 17901) 中所使用的缩写被定义如下:
- [0363] cAmHPPD-01
- [0364] 起点 :1024 终点 :2346
- [0365] 编码 SEQ ID NO :50 的烟草密码子优化的大穗看麦娘 HPPD 基因
- [0366] cGmEPSPS-01
- [0367] 起点 :3675 终点 :5252
- [0368] 双重突变型大豆 EPSPS cDNA 的大豆密码子优化形式
- [0369] cSpec-03
- [0370] 起点 :6346 终点 :7134
- [0371] 也被称为 aadA ;编码酶氨基糖甙 3' 腺苷酰转移酶的基因,赋予了对大观霉素和链霉素的抗性用于将载体保持在大肠杆菌和农杆菌中。
- [0372] cVirG-01
- [0373] 起点 :7434 终点 :8159
- [0374] 来自 pAD1289 的 virG(推定的)(具有 TTG 起始密码子)。virGN54D 来自 Hansen et al. 1994,PNAS 91 :7603-7607 中所描述的 pAD1289
- [0375] cRepA-01
- [0376] 起点 :8189 终点 :9262
- [0377] RepA, pVS1 复制蛋白
- [0378] eNOS-01
- [0379] 起点 :168 终点 :259
- [0380] 来自 15235 的推定的 NOS 增强子序列 (如在某些二元载体的右边缘中所发现的)。
- [0381] eFMV-03
- [0382] 起点 :396 终点 :589
- [0383] 来自玄参花叶病毒 (FMV) 的增强子区

- [0384] e35S-05
- [0385] 起点 :596 终点 :888
- [0386] 在 CMV 35S 增强子区中 C 至 T 以及 C 至 A 的碱基对变化
- [0387] eTMV-02
- [0388] 起点 :953 终点 :1020
- [0389] 被考虑用来增强表达的 TMV Ω 5' UTR 引导序列。EMBL :TOTMV6
- [0390] eFMV-03
- [0391] 起点 :4054 终点 :4247
- [0392] 来自玄参花叶病毒 (FMV) 的增强子区
- [0393] e35S-05
- [0394] 起点 :4254 终点 :4546
- [0395] 在 CMV 35S 增强子区中 C 至 T 以及 C 至 A 的碱基对变化
- [0396] eNOS-01
- [0397] 起点 :4557 终点 :4648
- [0398] 来自 15235 的推定的 NOS 增强子序列 (如在某些二元载体的右边缘中所发现的)。
- [0399] bNRB-05
- [0400] 起点 :4 终点 :259 (互补序列)
- [0401] 右边缘 /NOST-DNA 区 ; 可以影响多个启动子。EMBL Nos :J01826、V00087、AF485783。
- [0402] bNRB-01-01
- [0403] 起点 :101 终点 :125 (互补序列)
- [0404] 根癌农杆菌胭脂碱 ti 质粒的 T-DNA 的右边缘重复序列 bNLB-03
- [0405] 起点 :5937 终点 :6066 (互补序列)
- [0406] 根癌农杆菌胭脂碱 ti 质粒的 T-DNA 的左边缘区
- [0407] 起点 :5972 终点 :5996 (互补序列)
- [0408] 根癌农杆菌胭脂碱 ti 质粒的 T-DNA 的 25bp 左边缘重复序列区 prCMP-04
- [0409] 起点 :4655 终点 :5051
- [0410] 夜香树黄叶卷曲病毒启动子以及引导序列。Genbank ® 登录号 AF364175。还参见美国专利申请公开号 20040086447。prCMP-01 在 5' 端上具有 1 个碱基对平截并且在 3' 端上具有 2 个碱基对平截
- [0411] oVS1-02
- [0412] 起点 :9305 终点 :9709
- [0413] 来自假单胞菌的质粒 pVS1 的复制起始区和分隔区 (Itoh 等人, 1984, Plasmid 11 : 206-220) ; 类似于 GenBank ® 登录号 U10487 ; 在根癌农杆菌宿主中用作复制起始区
- [0414] oCOLE-06
- [0415] 起点 :10387 终点 :11193 (互补序列)
- [0416] 从 pUC19 得到的在大肠杆菌中起作用的 Co1E1 复制起始区
- [0417] tNOS-05-01
- [0418] 起点 :2360 终点 :2612

[0419] 合成胭脂碱合成酶终止子

[0420] tNOS-05-01

[0421] 起点 :3794 终点 :4046

[0422] 合成胭脂碱合成酶终止子

[0423] 实例 6

[0424] 大豆的转化以及除草剂抗性植物的选择

[0425] 可以将大豆植物材料适当地转化并且通过本领域的普通技术人员熟知的多种方法再生育性植物。例如,可以通过以下各项得到育性的形态学正常的转基因大豆植物: 1) 从例如不成熟的子叶、下胚轴或其他适合的组织生产体细胞胚性组织; 2) 通过粒子轰击或用农杆菌感染来进行转化; 以及 3) 再生出植株。在一个实例中,如在美国专利号 5,024,944 中所描述的,从大豆的不成熟胚中切除子叶组织,优选地将胚轴移出,并且在包含激素的培养基中进行培养从而形成体细胞胚性植物材料。使用例如直接 DNA 方法、DNA 包被的微弹轰击或用农杆菌感染来将该材料转化,在一种适合的选择培养基上进行培养并且任选地还在选择剂的连续存在下再生成育性转基因大豆植物。选择剂可以是抗生素如卡那霉素、潮霉素或除草剂(如草胺磷或草甘磷),或可替代地,选择可以是基于可见标记基因(如 GUS)的表达。可替代地,用于转化的靶组织包括分生组织而不是体细胞克隆胚性组织或任选地是花或形成花的组织。可以找到大豆转化的其他实例,例如通过物理的 DNA 递送方法,如粒子轰击(Finer and McMullen(1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P: 175-182; McCabe et al. (1988) *Bio/technology* 6:923-926)、噬菌体颈须法(Khalafalla et al. (2006) *African J. of Biotechnology* 5:1594-1599)、气溶胶束注射(美国专利号 7,001,754)、或通过农杆菌介导的递送方法(Hinchee et al., (1988) *Bio/Technology* 6: 915-922、美国专利号 7,002,058、美国专利申请公开号 20040034889、美国专利申请公开号 20080229447、Paz et al. (2006) *Plant Cell Report* 25:206-213)。还可以将 HPPD 基因递送到细胞器中,例如用来赋予增加的除草剂抗性的质体(参见美国专利申请公开号 20070039075)。

[0426] 可以用不同的转化方法用上述的包含 HPPD 基因变体的二元载体来产生大豆转基因植物。任选地,该 HPPD 基因可以提供选择和鉴定转基因组织的手段。例如,如所述(参见例如美国专利申请公开号 20080229447)使用一种载体来转化不成熟的种子目标物从而直接使用 HPPD 抑制剂(例如甲基磺草酮)作为选择剂来产生转基因 HPPD 大豆植物。任选地, HPPD 基因可以在其他序列的旁边存在于多核苷酸中,这些其他序列提供选择/鉴定转化的组织的另外的手段,包括例如提供对卡那霉素、潮霉素、草胺磷、氟丙嘧草酯、或草甘磷具有抗性的已知基因。例如,将包含如在实例 4 中所述的 PAT 或 EPSPS 选择标记基因的二元载体转化到不成熟大豆种子目标物中,从而使用如所述的农杆菌介导的转化以及草胺磷或草甘磷选择而产生 HPPD 除草剂耐受性植物(参见,例如,美国专利申请公开号 20080229447)。

[0427] 可替代地,选择标记序列可以存在于分开的多核苷酸上并且使用例如一种共转化或共选择的方法。可替代地,除了选择标记基因之外,可以使用一种可评分的标记基因(例如 GUS)来鉴定转化的组织。

[0428] 如所述可以使用一种用于大豆转化的基于农杆菌的方法使用草胺磷、草甘磷或

HPPD 抑制剂甲基磺草酮作为选择剂使用不成熟的大豆种子来产生转基因植物（美国专利申请公开号 20080229447）。

[0429] 实例 7

[0430] 大豆 T₀转基因植物的生长、分析以及除草剂耐受性的评估

[0431] 将来自组织培养物的 T₀植物放到温室中，在温室中将它们移植到在 2” 方形盆中的混合有 1% 颗粒性 Marathon ®（宾夕法尼亚州 Mainland 市奥林匹克园艺制品公司）(5-10g/gal Redi-Earth ® Mix) 的水饱和的土壤（华盛顿州贝尔维尤市 Sun Gro Horticulture 公司 Redi-Earth ® Plug and Seedling Mix）中。将这些植物用潮湿拱顶进行覆盖并且置于具有以下环境条件的一个 Conviron 室（北达科他州彭比纳）中：白天 24℃；夜间 18℃；16 小时光照以及 8 小时黑暗光周期；并且 80% 相对湿度。

[0432] 在植物已经被建立在土壤中并且出现新的生长（约 1 至 2 周）之后，将植物取样并且使用适当的用于 HPPD 基因的探针、或启动子（例如 prCMP 和 prUBq3）通过 Taqman™ 分析对所希望的转基因的存在进行测试。所有的阳性植物和一些阴性植物被移植到含有 MetroMix ® 380 土壤的 4” 方形盆中（华盛顿州贝尔维尤市 Sun Gro Horticulture 公司）。以推荐的比率将 Sierra 17-6-12 缓释肥料掺入土壤中。阴性植物充当对于喷雾实验的对照。然后将这些植物重新安置在一个标准温室中以与适应环境（约 1 周）。这些环境条件典型地是：白天 27℃；夜间 21℃；16 小时光周期（具有环境光照）；环境湿度。在适应环境（大约 1 周）后，这些植物准备用所希望的除草剂进行喷雾。将这些除草剂耐受性转基因大豆植物生长至成熟用于种子生产。使用转基因种子和子代植物来进一步对它们的除草剂耐受性性能以及分子特征进行评估。

[0433] 因此，使载体 17900（图 3）和载体 17901（图 4）（来自相同的表达盒，可替代地表达 SEQ ID NO:49 和 SEQ ID NO:50）的 T1 大豆植物生长并且对一定范围的 HPPD 除草剂的耐受性进行测试，与同样表达 HPPD SEQ ID NO:1 的相似植物进行比较。

[0434] 本说明书中提到的所有专利、专利申请以及公开文献都指示了本发明涉及的本领域的普通技术人员的水平。所有专利、专利申请以及公开文献均通过引用结合在此，其程度如同每个单独的公开文献或专利申请被确切地并单独地指明通过引用而结合。

[0435] 虽然本发明参照具体实施方案进行披露，所清楚的是在不偏离本发明的真实精神和范围下本发明的其他实施方案和变更可以由其它的本领域的普通技术人员来设计。所附的权利要求包括所有这些实施方案以及等同变体。

[0001]

序列表

<110> 先正达参股股份有限公司 (Syngenta Participations AG)
 Hawkes, Timothy R
 Langford, Michael P
 Viner, Russell C
 Vernooij, Bernard TM
 Dale, Richard
 Singh, Shradha
 Kramer, Vance

<120> 新颖的羟基苯丙酮酸双加氧酶多肽及其使用方法

<130> S305 1021PCT 63367.0139.1

<150> 61/224,661
 <151> 2009-07-10

<150> 12/692,552
 <151> 2010-01-22

<150> 61/146,513
 <151> 2009-01-22

<160> 88

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> 燕麦 (Avena sativa)

<400> 1

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val
 1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
 20 25 30

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu
 35 40 45

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
 50 55 60

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala
 65 70 75 80

His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr
 85 90 95

Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala
 100 105 110

Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala
 115 120 125

His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala
 130 135 140

[0002]

Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala
 145 150 155 160

Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr
 165 170 175

Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu
 180 185 190

Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp
 195 200 205

Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met
 210 215 220

Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe
 225 230 235 240

Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn
 245 250 255

Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn
 260 265 270

Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu
 275 280 285

Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn
 290 295 300

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly
 305 310 315 320

Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val
 325 330 335

Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys
 340 345 350

Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu
 355 360 365

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu
 370 375 380

Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu
 385 390 395 400

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu
 405 410 415

Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln
 420 425 430

[0003]

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
 435

<210> 2
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> *Alopecurus myosuroides*

<400> 2

Met Pro Pro Thr Thr Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val
 1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Arg Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
 20 25 30

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ala Phe His His Val Glu Phe
 35 40 45

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
 50 55 60

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ser
 65 70 75 80

His Ala Ser His Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr
 85 90 95

Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Asp Ala Ala Asp Ala Ala Thr
 100 105 110

Ala Ser Ile Pro Ser Phe Ser Thr Glu Ala Ala Arg Thr Phe Ser Ser
 115 120 125

Ala His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Ala Ile Arg Val Ala Asp Ala
 130 135 140

Ala Glu Ala Phe His Thr Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe
 145 150 155 160

Ala Pro Ala Asp Leu Gly Ser Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu
 165 170 175

Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser His Pro Asp Gly Asp Asp
 180 185 190

Val Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Gly Val Ser Arg Pro Gly Ala Met
 195 200 205

Asp Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu
 210 215 220

Met Ala Pro Val Ala Ala Tyr Met Lys Gly Phe Thr Gly Phe His Glu
 225 230 235 240

Phe Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Ala Glu Ser Gly Leu

[0004]

	245		250		255
Asn Ser Val	Val Leu Ala	Asn Asn Ser	Glu Ala Val	Leu Leu Pro	Leu
	260	265		270	
Asn Glu Pro	Val His Gly	Thr Lys Arg	Arg Ser Gln	Ile Gln Thr	Tyr
	275	280		285	
Leu Asp Tyr	His Gly Gly	Pro Gly Val	Gln His Ile	Ala Leu Ala	Ser
	290	295		300	
Ser Asp Val	Leu Arg Thr	Lcu Arg Glu	Mct Arg Ala	Arg Ser Ala	Mct
	305	310		315	320
Gly Gly Phe	Glu Phe Met	Ala Pro Pro	Gln Ala Lys	Tyr Tyr Glu	Gly
	325		330		335
Val Arg Arg	Leu Ala Gly	Asp Val Leu	Ser Glu Ala	Gln Ile Lys	Glu
	340		345		350
Cys Gln Glu	Leu Gly Val	Leu Val Asp	Arg Asp Asp	Gln Gly Val	Leu
	355		360		365
Leu Gln Ile	Phe Thr Lys	Pro Val Gly	Asp Arg Arg	Pro Thr Phe	Phe
	370		375		380
Leu Glu Met	Ile Gln Arg	Ile Gly Cys	Met Glu Lys	Asp Glu Ile	Gly
	385		390		395
Gln Glu Tyr	Gln Lys Gly	Gly Cys Gly	Gly Phe Gly	Lys Gly Asn	Phe
	405		410		415
Ser Glu Leu	Phe Lys Ser	Ile Glu Asp	Tyr Glu Lys	Ser Leu Glu	Ala
	420		425		430
Lys Gln Ser	Ala Val Ala	Gln Gln Ser			
	435		440		
<210>	3				
<211>	440				
<212>	PRT				
<213>	Alopecurus myosuroides				
<400>	3				
Mct Pro Pro	Thr Thr Ala	Thr Ala Thr	Gly Ala Ala	Ala Ala Ala	Val
1	5		10		15
Thr Pro Glu	His Ala Ala	Arg Arg Phe	Pro Arg Val	Val Arg Val	Asn
	20		25		30
Pro Arg Ser	Asp Arg Phe	Pro Val Leu	Ala Phe His	His Val Glu	Phe
	35		40		45
Trp Cys Ala	Asp Ala Ala	Ser Ala Ala	Gly Arg Phe	Ser Phe Ala	Leu
	50		55		60

[0005]

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ser
 65 70 75 80
 His Ala Ser His Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr
 85 90 95
 Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Asp Ala Ala Asp Ala Ala Ala Thr
 100 105 110
 Ala Ser Ile Pro Ser Phe Ser Thr Glu Ala Ala Arg Thr Phe Ser Ser
 115 120 125
 Ala His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Ala Ile Arg Val Ala Asp Ala
 130 135 140
 Ala Glu Ala Phe His Thr Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe
 145 150 155 160
 Ala Pro Ala Asp Leu Gly Ser Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu
 165 170 175
 Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser His Pro Asp Gly Asp Asp
 180 185 190
 Val Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Gly Val Ser Arg Pro Gly Ala Met
 195 200 205
 Asp Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu
 210 215 220
 Met Ala Pro Val Ala Ala Tyr Met Lys Gly Phe Thr Gly Phe His Glu
 225 230 235 240
 Phe Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Ala Glu Ser Gly Leu
 245 250 255
 Asn Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu
 260 265 270
 Asn Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr
 275 280 285
 Leu Asp Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser
 290 295 300
 Ser Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Ser Ala Met
 305 310 315 320
 Gly Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly
 325 330 335
 Val Arg Arg Leu Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Ala Gln Ile Lys Glu
 340 345 350

[0006]

Cys Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu
 355 360 365
 Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu
 370 375 380
 Glu Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Ile Gly Gln
 385 390 395 400
 Glu Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser
 405 410 415
 Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys
 420 425 430
 Gln Ser Ala Val Ala Gln Gln Ser
 435 440
 <210> 4
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> 假高粱 (Sorghum halepense)
 <400> 4
 Met Pro Pro Thr Pro Thr Thr Ala Ala Ala Thr Gly Ala Ala Val Ala
 1 5 10 15
 Ala Ala Ser Ala Glu Gln Ala Ala Phe Arg Leu Val Gly His Arg Asn
 20 25 30
 Phe Val Arg Val Asn Pro Arg Ser Asp Arg Phe His Thr Leu Ala Phe
 35 40 45
 His His Val Glu Leu Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg
 50 55 60
 Phe Ser Phe Gly Leu Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser
 65 70 75 80
 Thr Gly Asn Thr Ala His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu
 85 90 95
 Ala Phe Leu Phe Thr Ala Pro Tyr Ala His Gly Ala Asp Ala Ala Thr
 100 105 110
 Ala Ser Leu Pro Ser Phe Ser Ala Ala Glu Ala Arg Arg Phe Ala Ala
 115 120 125
 Asp His Gly Leu Ala Val Arg Ala Val Ala Leu Arg Val Ala Asp Ala
 130 135 140
 Glu Asp Ala Phe Arg Ala Ser Val Ala Ala Gly Ala Arg Pro Ala Phe
 145 150 155 160

[0007]

Glu Pro Val Glu Leu Gly Leu Gly Phe Arg Leu Ala Glu Val Glu Leu
 165 170 175

Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Tyr Val Ser Tyr Pro Asp Asp Ala Asp
 180 185 190

Ala Ser Phe Leu Pro Gly Phe Val Gly Val Ser Ser Pro Gly Ala Ala
 195 200 205

Asp Tyr Gly Leu Arg Arg Phe Asp His Ile Val Gly Asn Val Pro Glu
 210 215 220

Leu Ala Pro Ala Ala Ala Tyr Phe Ala Gly Phe Thr Gly Phe His Glu
 225 230 235 240

Phe Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu
 245 250 255

Asn Ser Met Val Leu Ala Asn Asn Ala Glu Asn Val Leu Leu Pro Leu
 260 265 270

Asn Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Phe
 275 280 285

Leu Asp His His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Met Ala Leu Ala Ser
 290 295 300

Asp Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Gln Ala Cys Ser Ala Met
 305 310 315 320

Gly Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Ala Pro Glu Tyr Tyr Asp Gly
 325 330 335

Val Arg Arg Arg Ala Gly Asp Val Leu Thr Glu Ala Gln Ile Lys Glu
 340 345 350

Cys Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu
 355 360 365

Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu
 370 375 380

Glu Ile Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Lys Gly Gln
 385 390 395 400

Glu Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser
 405 410 415

Gln Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys
 420 425 430

Gln Ala Ala Ala Ala Gln Gly Pro
 435 440

[0008]

<210> 5
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 假高粱 (Sorghum halepense)
 <400> 5
 Met Pro Pro Thr Pro Thr Thr Ala Ala Ala Thr Gly Ala Ala Val Ala
 1 5 10 15
 Ala Ala Ser Ala Glu Gln Ala Ala Phe Arg Leu Val Gly His Arg Asn
 20 25 30
 Phe Val Arg Val Asn Pro Arg Ser Asp Arg Phe His Thr Leu Ala Phe
 35 40 45
 His His Val Glu Leu Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg
 50 55 60
 Phe Ser Phe Gly Leu Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser
 65 70 75 80
 Thr Gly Asn Thr Ala His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu
 85 90 95
 Ala Phe Leu Phe Thr Ala Pro Tyr Ala His Gly Ala Asp Ala Ala Thr
 100 105 110
 Ala Ser Leu Pro Ser Phe Ser Ala Ala Glu Ala Arg Arg Phe Ala Ala
 115 120 125
 Asp His Gly Leu Ala Val Arg Ala Val Ala Leu Arg Val Ala Asp Ala
 130 135 140
 Glu Asp Ala Phe Arg Ala Ser Val Ala Ala Gly Ala Arg Pro Ala Phe
 145 150 155 160
 Glu Pro Val Glu Leu Gly Leu Gly Phe Arg Leu Ala Glu Val Glu Leu
 165 170 175
 Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Tyr Val Ser Tyr Pro Thr Thr Arg Thr
 180 185 190
 Arg Pro Ser Cys Arg Gly Ser Trp Ala Asp Asp Ala Asp Ala Ser Phe
 195 200 205
 Leu Pro Gly Phe Val Gly Val Thr Ser Pro Gly Ala Ala Asp Tyr Gly
 210 215 220
 Leu Lys Arg Phe Asp His Ile Val Gly Asn Val Pro Glu Leu Ala Pro
 225 230 235 240
 Ala Ala Ala Tyr Phe Ala Gly Phe Thr Gly Phe His Glu Phe Ala Glu
 245 250 255

[0009]

Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn Ser Met
 260 265 270

Val Leu Ala Asn Asn Ala Glu Asn Val Leu Leu Pro Leu Asn Glu Pro
 275 280 285

Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Phe Leu Asp His
 290 295 300

His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Met Ala Leu Ala Ser Asp Asp Val
 305 310 315 320

Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Gln Ala Arg Ser Ala Met Gly Gly Phe
 325 330 335

Glu Phe Met Ala Pro Pro Ala Pro Glu Tyr Tyr Asp Gly Val Arg Arg
 340 345 350

Arg Ala Gly Asp Val Leu Thr Glu Ala Gln Ile Lys Glu Cys Gln Glu
 355 360 365

Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu Gln Ile
 370 375 380

Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu Ile Ile
 385 390 395 400

Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Lys Gly Gln Glu Tyr Gln
 405 410 415

Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Gln Leu Phe
 420 425 430

Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys Gln Ala Ala
 435 440 445

Ala Ala Gln Gly Pro
 450

<210> 6
 <211> 436
 <212> PRT
 <213> 早熟禾(Poa annua)

<400> 6

Met Pro Pro Thr Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Ala Thr Val Thr Pro
 1 5 10 15

Glu His Ala Ala Arg Arg Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn Pro Arg
 20 25 30

Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Phe Trp Cys
 35 40 45

Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu Gly Ala

[0010]

50	55	60
Pro Leu Ala Ala Arg Ser 65	Asp Leu Ser Thr Gly 70	Asn Ser Ala His Ala 75 80
Ser Leu Leu Leu Arg Ser 85	Gly Ala Leu Ala Phe 90	Leu Phe Thr Ala Pro 95
Tyr Ala Pro Gln Pro Gln 100	Asp Ala Asp Thr Ala 105	Ser Ile Pro Ser Phe 110
Ser Ala Asp Ala Ala Arg 115	Ala Phe Ser Ala Ala 120	His Gly Leu Ala Val 125
Arg Ser Val Ala Val Arg 130	Val Ala Asp Ala Ala 135	Asp Ala Phe Arg Ala 140
Ser Ile Ala Ala Gly Ala 145	Arg Pro Ala Phe Ala 150 155	Pro Ala Asp Leu Gly 160
Arg Gly Phe Gly Leu Ala 165	Glu Val Glu Leu Tyr 170	Gly Asp Val Val Leu 175
Arg Phe Val Ser His Pro 180	Asp Ala Asp Asp Ala 185	Pro Pro Phe Leu Pro 190
Gly Phe Glu Ala Val Ser 195	Arg Arg Pro Gly Ala 200	Val Asp Tyr Gly Leu 205
Thr Arg Phe Asp His Val 210	Val Gly Asn Val Pro 215	Glu Met Gly Pro Val 220
Ile Asp Tyr Ile Lys Gly 225	Phe Met Gly Phe His 230 235	Glu Phe Ala Glu Phe 240
Thr Ala Glu Asp Val Gly 245	Thr Thr Glu Ser Gly 250	Leu Asn Ser Val Val 255
Leu Ala Asn Asn Ser Glu 260	Ala Val Leu Leu Pro 265	Leu Asn Glu Pro Val 270
His Gly Thr Lys Arg Arg 275	Ser Gln Ile Gln Thr 280	Tyr Leu Glu Tyr His 285
Gly Gly Pro Gly Val Gln 290	His Ile Ala Leu Ala 295	Ser Ser Asp Val Leu 300
Arg Thr Leu Arg Glu Met 305	Gln Ala Arg Ser Ala 310 315	Met Gly Gly Phe Glu 320
Phe Met Ala Pro Pro Gln 325	Pro Lys Tyr Tyr Glu 330	Gly Val Arg Arg Ile 335
Ala Gly Asp Val Leu Ser 340	Glu Ala Gln Ile Lys 345	Glu Cys Gln Glu Leu 350

[0011]

340	345	350
Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu Gln Ile Phe 355	360	365
Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu Met Ile Gln 370	375	380
Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Arg Gly Gln Glu Tyr Gln Lys 385	390	395
Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys 405	410	415
Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys Gln Ser Ala Val 420	425	430
Ala Gln Gln Ser 435		
<210> 7		
<211> 434		
<212> PRT		
<213> 早熟禾(Poa annua)		
<400> 7		
Met Pro Pro Thr Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Ala Thr Val Thr Pro 1	5	10
Glu His Ala Ala Arg Arg Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn Pro Arg 20	25	30
Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Phe Trp Cys 35	40	45
Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu Gly Ala 50	55	60
Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala His Ala 65	70	75
Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr Ala Pro 85	90	95
Tyr Ala Pro Gln Pro Gln Asp Ala Asp Thr Ala Ser Ile Pro Ser Phe 100	105	110
Ser Ala Asp Ala Ala Arg Ala Phe Ser Ala Ala His Gly Leu Ala Val 115	120	125
Arg Ser Val Ala Val Arg Val Ala Asp Ala Ala Asp Ala Phe Arg Ala 130	135	140
Ser Ile Ala Ala Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala Pro Ala Asp Leu Gly 145	150	155
		160

[0012]

Arg Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu
 165 170 175

Arg Phe Val Ser His Pro Asp Ala Asp Asp Ala Pro Phe Leu Pro Gly
 180 185 190

Phe Glu Ala Val Ser Arg Pro Gly Ala Val Asp Tyr Gly Leu Thr Arg
 195 200 205

Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met Gly Pro Val Ile Asp
 210 215 220

Tyr Ile Lys Gly Phe Met Gly Phe His Glu Phe Ala Glu Phe Thr Ala
 225 230 235 240

Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn Ser Val Val Leu Ala
 245 250 255

Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn Glu Pro Val His Gly
 260 265 270

Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Glu Tyr His Gly Gly
 275 280 285

Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Ser Asp Val Leu Arg Thr
 290 295 300

Leu Arg Glu Met Gln Ala Arg Ser Ala Met Gly Gly Phe Glu Phe Met
 305 310 315 320

Ala Pro Pro Gln Pro Lys Tyr Tyr Glu Gly Val Arg Arg Ile Ala Gly
 325 330 335

Asp Val Leu Ser Glu Ala Gln Ile Lys Glu Cys Gln Glu Leu Gly Val
 340 345 350

Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys
 355 360 365

Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu Met Ile Gln Arg Ile
 370 375 380

Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Arg Gly Gln Glu Tyr Gln Lys Gly Gly
 385 390 395 400

Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser Ile
 405 410 415

Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys Gln Ser Ala Val Ala Gln
 420 425 430

Gln Ser

[0013]

<210> 8
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> 何首乌 (*Lolium multiflorum*)
 <400> 8
 Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val
 1 5 10 15
 Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
 20 25 30
 Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu
 35 40 45
 Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
 50 55 60
 Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala
 65 70 75 80
 His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr
 85 90 95
 Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr
 100 105 110
 Ala Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala
 115 120 125
 Ala His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala
 130 135 140
 Ala Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe
 145 150 155 160
 Ala Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu
 165 170 175
 Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp
 180 185 190
 Leu Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val
 195 200 205
 Asp Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu
 210 215 220
 Met Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu
 225 230 235 240
 Phe Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu
 245 250 255

[0014]

Asn Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Asn Val Leu Leu Pro Leu
 260 265 270

Asn Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr
 275 280 285

Leu Asp Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser
 290 295 300

Thr Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met
 305 310 315 320

Gly Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly
 325 330 335

Val Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu
 340 345 350

Cys Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu
 355 360 365

Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu
 370 375 380

Glu Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln
 385 390 395 400

Glu Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser
 405 410 415

Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Thr Leu Glu Ala Lys
 420 425 430

Gln Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
 435 440

<210> 9
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> *Erichola villosa*
 <400> 9

Met Pro Pro Thr Pro Thr Pro Ala Ala Ala Ala Pro Gly Ala Ala Ala
 1 5 10 15

Ala Pro Pro Ala Ala Ala Glu Gln Ala Ala Phe Arg Leu Val Gly His
 20 25 30

Arg Ser Phe Val Arg Val Asn Pro Arg Ser Asp Arg Phe His Thr Leu
 35 40 45

Ala Phe His His Val Glu Leu Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala
 50 55 60

[0015]

Gly Arg Phe Ser Phe Gly Leu Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp
 65 70 75 80
 Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala His Thr Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly
 85 90 95
 Ser Leu Ala Phe Leu Phe Thr Ala Pro Tyr Ala Glu His Ala Gly Ala
 100 105 110
 Asp Ala Ala Thr Ala Ser Leu Pro Ser Phe Ser Ala Pro Thr Ala Arg
 115 120 125
 Arg Phe Ala Ala Asp His Gly Leu Ala Val Arg Ala Ile Ala Leu Arg
 130 135 140
 Val Ala Asp Ala Glu Asp Ala Phe Arg Ala Ser Val Ala Ala Gly Ala
 145 150 155 160
 Arg Pro Ala Phe Glu Pro Ala Glu Leu Gly Leu Gly Phe Arg Leu Ala
 165 170 175
 Glu Val Glu Leu Tyr Gly Glu Val Val Leu Arg Tyr Val Ser Tyr Pro
 180 185 190
 Asp Ala Ala Gly Ser Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Glu Val Arg Asn
 195 200 205
 Pro Arg Ala Val Asp Tyr Gly Leu Lys Arg Phe Asp His Ile Val Gly
 210 215 220
 Asn Val Pro Glu Leu Ala Pro Val Ala Ala Tyr Val Ala Gly Phe Thr
 225 230 235 240
 Gly Phe His Glu Phe Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Ala
 245 250 255
 Glu Ser Gly Leu Asn Ser Met Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Thr Val
 260 265 270
 Leu Ile Pro Leu Asn Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln
 275 280 285
 Ile Gln Thr Phe Leu Glu His His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile
 290 295 300
 Ala Leu Ala Ser Asp Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Gln Ala
 305 310 315 320
 Arg Ser Ala Met Gly Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Pro Pro Asp
 325 330 335
 Tyr Tyr Asp Gly Val Arg Arg Arg Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Ala
 340 345 350

[0016]

Gln Ile Lys Glu Cys Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp
 355 360 365

Gln Gly Val Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro
 370 375 380

Thr Phe Phe Leu Glu Ile Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp
 385 390 395 400

Glu Gln Gly Gln Glu Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys
 405 410 415

Gly Asn Phe Ser Gln Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser
 420 425 430

Leu Glu Val Lys Gln Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
 435 440

<210> 10
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Bidens subalternans

<400> 10

Met Gly Thr Glu Ala Asn Thr Thr Phe Thr Gly Glu Gln Gln Ser Thr
 1 5 10 15

Gln Ala Phe Lys Leu Val Gly Phe Arg Asn Phe Ile Arg Thr Asn Pro
 20 25 30

Lys Ser Asp Lys Phe Thr Val Lys Arg Phe His His Val Glu Phe Trp
 35 40 45

Cys Ser Asp Ala Thr Asn Thr Ser Arg Arg Phe Ser Trp Gly Leu Gly
 50 55 60

Met Pro Ile Leu Leu Lys Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Thr Val His
 65 70 75 80

Ala Ser Tyr Leu Ile Arg Ser Gly His Leu Asn Phe Leu Phe Thr Ala
 85 90 95

Pro Tyr Ser Pro Ser Ile Thr Thr Thr Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser
 100 105 110

Ser Ile Pro Ser Phe Ser His Thr Val Cys Arg Asp Phe Thr Gly Lys
 115 120 125

His Gly Leu Ala Val Arg Ala Ile Ala Val Glu Val Glu Asp Ala Glu
 130 135 140

Thr Ala Phe Ala Val Ser Val Ala Asn Gly Ala Lys Pro Ser Cys Thr
 145 150 155 160

Pro Val Thr Ile Ser Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Gln Asn Asp Val

[0017]

165					170					175					
Val	Val	Val	Leu	Ser	Glu	Val	Lys	Leu	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Leu	Arg
			180					185					190		
Tyr	Val	Ser	Tyr	Lys	Asn	Pro	Asn	Leu	Glu	Thr	Asn	Leu	Lys	Phe	Leu
		195					200					205			
Pro	Gly	Phe	Glu	Pro	Val	Glu	Ala	Thr	Ser	Ser	Phe	Pro	Asp	Leu	Asp
	210					215					220				
Tyr	Gly	Ile	Arg	Arg	Leu	Asp	His	Ala	Val	Gly	Asn	Val	Pro	Glu	Leu
225					230					235					240
Ala	Pro	Ala	Val	Glu	Tyr	Val	Lys	Ser	Phe	Thr	Gly	Phe	His	Glu	Phe
			245						250					255	
Ala	Glu	Phe	Thr	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Gly	Leu	Asn
			260					265					270		
Ser	Val	Val	Leu	Ala	Cys	Asn	Ser	Glu	Glu	Val	Leu	Leu	Pro	Met	Asn
		275					280						285		
Glu	Pro	Val	Tyr	Gly	Thr	Lys	Arg	Lys	Ser	Gln	Ile	Gln	Thr	Tyr	Leu
	290					295					300				
Glu	His	Asn	Glu	Gly	Ala	Gly	Val	Gln	His	Leu	Ala	Leu	Ala	Ser	Glu
305					310					315					320
Asp	Ile	Phe	Arg	Thr	Leu	Arg	Glu	Met	Arg	Lys	Arg	Ser	Gly	Val	Gly
			325						330					335	
Gly	Phe	Glu	Phe	Met	Pro	Ser	Pro	Pro	Pro	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Asn	Leu
			340						345					350	
Lys	Asn	Arg	Ala	Gly	Asp	Val	Leu	Ser	Asp	Glu	Gln	Ile	Lys	Glu	Cys
		355					360						365		
Glu	Glu	Leu	Gly	Ile	Leu	Val	Asp	Arg	Asp	Asp	Gln	Gly	Thr	Leu	Leu
	370					375					380				
Gln	Ile	Phe	Thr	Lys	Pro	Val	Gly	Asp	Arg	Pro	Thr	Ile	Phe	Ile	Glu
385					390					395					400
Ile	Ile	Gln	Arg	Val	Gly	Cys	Met	Val	Lys	Asp	Asp	Glu	Gly	Asn	Val
			405						410					415	
Gln	Gln	Lys	Ala	Gly	Cys	Gly	Gly	Phe	Gly	Lys	Gly	Asn	Phe	Ser	Glu
			420					425					430		
Leu	Phe	Lys	Ser	Ile	Glu	Glu	Tyr	Glu	Lys	Thr	Leu	Glu	Ala	Arg	Val
		435					440					445			
Ala	Thr	Ala	Thr	Ala											

[0018]

450

<210> 11
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> *Bidens pilosa*
 <400> 11
 Met Gly Thr Glu Ala Asn Thr Thr Phe Thr Gly Glu Gln Gln Gln Gln
 1 5 10 15
 Gln Ser Thr Gln Pro Phe Lys Leu Val Gly Phe Lys Asn Phe Ile Arg
 20 25 30
 Thr Asn Pro Lys Ser Asp Lys Phe Thr Val Lys Arg Phe His His Val
 35 40 45
 Glu Phe Trp Cys Ser Asp Ala Thr Asn Thr Ser Arg Arg Phe Ser Trp
 50 55 60
 Gly Leu Gly Met Pro Ile Val Leu Lys Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn
 65 70 75 80
 Ser Val His Ala Ser Tyr Leu Leu Arg Ser Gly Ser Leu Asn Phe Leu
 85 90 95
 Phe Thr Ala Pro Tyr Ser Pro Ser Ile Thr Thr Thr Gly Ser Thr Ser
 100 105 110
 Ser Ser Ile Pro Ser Phe Ser His Thr Val Cys Arg Asp Phe Thr Gly
 115 120 125
 Lys His Gly Leu Ala Val Arg Ala Ile Ala Val Glu Val Glu Asp Ala
 130 135 140
 Glu Thr Ala Phe Ala Val Ser Val Ala Asn Gly Ala Lys Pro Ser Cys
 145 150 155 160
 Ala Pro Val Thr Ile Ser Asn Asn Asn Asn Asn Asp Asn Gln Asn Asp
 165 170 175
 Val Val Val Leu Ser Glu Val Lys Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg
 180 185 190
 Tyr Val Ser Tyr Lys Asn Pro Asn Leu Glu Thr Asn Leu Asn Asn Leu
 195 200 205
 Lys Ile Leu Pro Gly Phe Glu Pro Val Glu Thr Thr Ser Ser Phe Pro
 210 215 220
 Asp Leu Asp Tyr Gly Ile Arg Arg Leu Asp His Ala Val Gly Asn Val
 225 230 235 240
 Pro Glu Leu Ala Lys Ala Val Asp Tyr Val Lys Ser Phe Thr Gly Phe
 245 250 255

[0019]

His Glu Phe Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Ser Glu Ser
 260 265 270

Gly Leu Asn Ser Val Val Leu Ala Cys Asn Ser Glu Glu Val Leu Ile
 275 280 285

Pro Met Asn Glu Pro Val Tyr Gly Thr Lys Arg Lys Ser Gln Ile Gln
 290 295 300

Thr Tyr Leu Glu His Asn Glu Gly Ala Gly Val Gln His Leu Ala Leu
 305 310 315 320

Ala Ser Glu Asp Ile Phe Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Lys Arg Ser
 325 330 335

Gly Val Gly Gly Phe Glu Phe Met Pro Ser Pro Pro Pro Thr Tyr Tyr
 340 345 350

Arg Asn Leu Lys Asn Arg Ala Gly Asp Val Leu Ser Asp Glu Gln Ile
 355 360 365

Lys Glu Cys Glu Glu Leu Gly Ile Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly
 370 375 380

Thr Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Ile
 385 390 395 400

Phe Ile Glu Ile Ile Gln Arg Val Gly Cys Met Met Lys Asp Asp Glu
 405 410 415

Gly Lys Val Gln Gln Lys Ala Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn
 420 425 430

Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu Glu Tyr Glu Lys Thr Leu Glu
 435 440 445

Ala Arg Ala Thr Thr Ala Thr Ala
 450 455

<210> 12
 <211> 436
 <212> PRT
 <213> 短柄草 (Brachypodium arbuscula)

<400> 12

Met Pro Pro Pro Ala Thr Thr Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ala Val Thr
 1 5 10 15

Pro Glu His Ala Arg Pro Pro Arg Arg Val Ala Arg Val Asn Pro Arg
 20 25 30

Ser Asp Arg Phe Ser Ala Leu Ser Phe His His Val Glu Leu Trp Cys
 35 40 45

[0020]

Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu Gly Ala
50 55 60

Pro Pro Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala His Ala
65 70 75 80

Ser Ile Leu Leu Arg Ser Gly Ser Leu Ala Phe Leu Phe Thr Ala Pro
85 90 95

Tyr Ala Pro Ser Pro Ala Ser Asp Ser Ala Ala Ser Ile Pro Ser Phe
100 105 110

Ser Ala Ser Ala Ala Arg Gln Phe Thr Ala Asp His Gly Gly Leu Ala
115 120 125

Val Arg Ala Val Ala Leu Arg Val Ser Ser Ala Ser Asp Ala Phe His
130 135 140

Ala Ser Val Ser Ala Gly Ala Arg Pro Ser Phe Pro Pro Ala Asp Leu
145 150 155 160

Gly Gln Gly Phe Ala Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr Gly Asp Val Val
165 170 175

Leu Arg Phe Ile Ser His Pro Asp Glu Asn Thr Glu Ile Pro Phe Leu
180 185 190

Pro Gly Phe Glu Ser Val Ser Asn Pro Gly Ala Ser Thr Tyr Gly Leu
195 200 205

Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Ser Leu Ala Pro Val
210 215 220

Ala Ala Tyr Ile Ala Gly Phe Thr Gly Phe His Glu Phe Ala Glu Phe
225 230 235 240

Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Ala Asp Ser Gly Leu Asn Ser Val Val
245 250 255

Leu Ala Asn Asn Ser Glu Arg Val Leu Leu Pro Leu Asn Glu Pro Val
260 265 270

His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Asp His His
275 280 285

Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asp Asp Val Leu
290 295 300

Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Ser Ala Met Gly Gly Phe Glu
305 310 315 320

Phe Leu Ala Pro Pro Pro Pro Asn Tyr Tyr Asp Gly Val Arg Arg Arg
325 330 335

[0021]

Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Ala Gln Ile Lys Glu Cys Gln Glu Leu
340 345 350

Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu Gln Ile Phe
355 360 365

Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Leu Phe Leu Glu Met Ile Gln
370 375 380

Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Ile Gly Gln Glu Gln Gln Lys
385 390 395 400

Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Arg
405 410 415

Ser Ile Glu Glu Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys Gln Ser Ala Val
420 425 430

Val Gln Glu Ser
435

<210> 13
<211> 445
<212> PRT
<213> 拟南芥(Arabidopsis thaliana)

<400> 13

Met Gly His Gln Asn Ala Ala Val Ser Glu Asn Gln Asn His Asp Asp
1 5 10 15

Gly Ala Ala Ser Ser Pro Gly Phe Lys Leu Val Gly Phe Ser Lys Phe
20 25 30

Val Arg Lys Asn Pro Lys Ser Asp Lys Phe Lys Val Lys Arg Phe His
35 40 45

His Ile Glu Phe Trp Cys Gly Asp Ala Thr Asn Val Ala Arg Arg Phe
50 55 60

Ser Trp Gly Leu Gly Met Arg Phe Ser Ala Lys Ser Asp Leu Ser Thr
65 70 75 80

Gly Asn Met Val His Ala Ser Tyr Leu Leu Thr Ser Gly Asp Leu Arg
85 90 95

Phe Leu Phe Thr Ala Pro Tyr Ser Pro Ser Leu Ser Ala Gly Glu Ile
100 105 110

Lys Pro Thr Thr Thr Ala Ser Ile Pro Ser Phe Asp His Gly Ser Cys
115 120 125

Arg Ser Phe Phe Ser Ser His Gly Leu Gly Val Arg Ala Val Ala Ile
130 135 140

[0022]

Glu Val Glu Asp Ala Glu Ser Ala Phe Ser Ile Ser Val Ala Asn Gly
 145 150 155 160

Ala Ile Pro Ser Ser Pro Pro Ile Val Leu Asn Glu Ala Val Thr Ile
 165 170 175

Ala Glu Val Lys Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Tyr Val Ser Tyr
 180 185 190

Lys Ala Glu Asp Thr Glu Lys Ser Glu Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg
 195 200 205

Val Glu Asp Ala Ser Ser Phe Pro Leu Asp Tyr Gly Ile Arg Arg Leu
 210 215 220

Asp His Ala Val Gly Asn Val Pro Glu Leu Gly Pro Ala Leu Thr Tyr
 225 230 235 240

Val Ala Gly Phe Thr Gly Phe His Gln Phe Ala Glu Phe Thr Ala Asp
 245 250 255

Asp Val Gly Thr Ala Glu Ser Gly Leu Asn Ser Ala Val Leu Ala Ser
 260 265 270

Asn Asp Glu Met Val Leu Leu Pro Ile Asn Glu Pro Val His Gly Thr
 275 280 285

Lys Arg Lys Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Glu His Asn Glu Gly Ala
 290 295 300

Gly Leu Gln His Leu Ala Leu Met Ser Glu Asp Ile Phe Arg Thr Leu
 305 310 315 320

Arg Glu Met Arg Lys Arg Ser Ser Ile Gly Gly Phe Asp Phe Met Pro
 325 330 335

Ser Pro Pro Pro Thr Tyr Tyr Gln Asn Leu Lys Lys Arg Val Gly Asp
 340 345 350

Val Leu Ser Asp Asp Gln Ile Lys Glu Cys Glu Glu Leu Gly Ile Leu
 355 360 365

Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Thr Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro
 370 375 380

Leu Gly Asp Arg Pro Thr Ile Phe Ile Glu Ile Ile Gln Arg Val Gly
 385 390 395 400

Cys Met Met Lys Asp Glu Glu Gly Lys Ala Tyr Gln Ser Gly Gly Cys
 405 410 415

Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu
 420 425 430

[0023]

Glu Tyr Glu Lys Thr Leu Glu Ala Lys Gln Leu Val Gly
 435 440 445

<210> 14
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> 绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)

<400> 14

Met Ala Asp Gln Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
 1 5 10 15

Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu
 20 25 30

Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His
 35 40 45

Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Gln Pro Asp
 50 55 60

Ser Leu Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly
 65 70 75 80

Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Gln Ala Tyr Asn Arg Ala Leu
 85 90 95

Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Glu Thr Gly Pro Met Glu Leu
 100 105 110

Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile
 115 120 125

Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr
 130 135 140

Leu Glu Gly Val Asp Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Val Ile
 145 150 155 160

Asp His Leu Thr His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Ala Tyr Trp Ala
 165 170 175

Asn Phe Tyr Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Ala Arg Tyr Phe Asp
 180 185 190

Ile Lys Gly Glu Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Ser Ala Pro
 195 200 205

Asp Gly Met Ile Arg Ile Pro Leu Asn Glu Glu Ser Ser Lys Gly Ala
 210 215 220

Gly Gln Ile Glu Glu Phe Leu Met Gln Phe Asn Gly Glu Gly Ile Gln
 225 230 235 240

His Val Ala Phe Leu Thr Glu Asp Leu Val Lys Thr Trp Asp Ala Leu

[0024]

- <223> 源自燕麦衍生的 HPPD 的序列基序 (Sequence motif from Avena sativa derived HPPD)
- <220>
 <221> 变体 (VARIANT)
 <222> (2).. (2)
 <223> Xaa = I 或 V
- <220>
 <221> 变体 (VARIANT)
 <222> (3).. (3)
 <223> Xaa = 除了 L 的任何氨基酸
- <220>
 <221> 变体 (VARIANT)
 <222> (6).. (6)
 <223> Xaa = R 或 K
- <400> 16
- Gly Xaa Xaa Val Asp Xaa
 1 5
- <210> 17
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 源自燕麦衍生的 HPPD 的序列基序 (Sequence motif from Avena sativa derived HPPD)
- <220>
 <221> 变体 (VARIANT)
 <222> (3).. (3)
 <223> Xaa = 除了 V, I 或 M 的任何氨基酸 (any amino acid other than V, I or M)
- <400> 17
- Asp His Xaa Val Gly Asn
 1 5
- <210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 源自燕麦衍生的 HPPD 的序列基序 (Sequence motif from Avena sativa derived HPPD)
- <220>
 <221> 变体 (VARIANT)
 <222> (4).. (4)
 <223> Xaa = E or D
- <220>
 <221> 变体 (VARIANT)
 <222> (6).. (6)
 <223> Xaa = M or L
- <220>
 <221> 变体 (VARIANT)
 <222> (7).. (7)
 <223> Xaa = 除了 A 或 P 的任何氨基酸
- <400> 18
- Gly Gly Phe Xaa Phe Xaa Xaa
 1 5

[0026]

<210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 源自燕麦衍生的 HPPD 的序列基序 (Sequence motif from Avena sativa derived HPPD)

<220>
 <221> 变体 (VARIANT)
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa =除了 K 的任何氨基酸

<400> 19

Cys Gly Gly Phe Gly Xaa Gly Asn
 1 5

<210> 20
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> 燕麦 (Avena sativa)

<400> 20

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val
 1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
 20 25 30

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu
 35 40 45

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
 50 55 60

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala
 65 70 75 80

His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr
 85 90 95

Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala
 100 105 110

Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala
 115 120 125

His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala
 130 135 140

Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala
 145 150 155 160

Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr
 165 170 175

[0027]

Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu
 180 185 190
 Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp
 195 200 205
 Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met
 210 215 220
 Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn
 245 250 255
 Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn
 260 265 270
 Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu
 275 280 285
 Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn
 290 295 300
 Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly
 305 310 315 320
 Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val
 325 330 335
 Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys
 340 345 350
 Gln Glu Leu Gly Val Met Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu
 355 360 365
 Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu
 370 375 380
 Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu
 385 390 395 400
 Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu
 405 410 415
 Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln
 420 425 430
 Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
 435
 <210> 21
 <211> 439
 <212> PRT

[0028]

<213> 燕麦 (*Avena sativa*)

<400> 21

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val
 1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
 20 25 30

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu
 35 40 45

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
 50 55 60

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala
 65 70 75 80

His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr
 85 90 95

Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala
 100 105 110

Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala
 115 120 125

His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala
 130 135 140

Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala
 145 150 155 160

Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr
 165 170 175

Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu
 180 185 190

Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp
 195 200 205

Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Ile Val Gly Asn Val Pro Glu Met
 210 215 220

Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe
 225 230 235 240

Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn
 245 250 255

Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn
 260 265 270

[0029]

Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu
 275 280 285

Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn
 290 295 300

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly
 305 310 315 320

Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val
 325 330 335

Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys
 340 345 350

Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu
 355 360 365

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu
 370 375 380

Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu
 385 390 395 400

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu
 405 410 415

Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln
 420 425 430

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
 435

<210> 22
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> 燕麦(Avena sativa)

<400> 22

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val
 1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
 20 25 30

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu
 35 40 45

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
 50 55 60

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala
 65 70 75 80

His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr

[0030]

				85					90					95	
Ala	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro	Pro	Gln	Glu	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	Thr	Ala
			100						105					110	
Ser	Ile	Pro	Ser	Phe	Ser	Ala	Asp	Ala	Ala	Arg	Thr	Phe	Ala	Ala	Ala
		115					120					125			
His	Gly	Leu	Ala	Val	Arg	Ser	Val	Gly	Val	Arg	Val	Ala	Asp	Ala	Ala
		130				135					140				
Glu	Ala	Phe	Arg	Val	Ser	Val	Ala	Gly	Gly	Ala	Arg	Pro	Ala	Phe	Ala
					150						155				160
Pro	Ala	Asp	Leu	Gly	His	Gly	Phe	Gly	Leu	Ala	Glu	Val	Glu	Leu	Tyr
					165					170				175	
Gly	Asp	Val	Val	Leu	Arg	Phe	Val	Ser	Tyr	Pro	Asp	Glu	Thr	Asp	Leu
			180						185					190	
Pro	Phe	Leu	Pro	Gly	Phe	Glu	Arg	Val	Ser	Ser	Pro	Gly	Ala	Val	Asp
		195					200						205		
Tyr	Gly	Leu	Thr	Arg	Phe	Asp	His	Leu	Val	Gly	Asn	Val	Pro	Glu	Met
		210				215					220				
Ala	Pro	Val	Ile	Asp	Tyr	Met	Lys	Gly	Phe	Leu	Gly	Phe	His	Glu	Phe
					230					235				240	
Ala	Glu	Phe	Thr	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Thr	Thr	Glu	Ser	Gly	Leu	Asn
					245					250				255	
Ser	Val	Val	Leu	Ala	Asn	Asn	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Asn
			260						265					270	
Glu	Pro	Val	His	Gly	Thr	Lys	Arg	Arg	Ser	Gln	Ile	Gln	Thr	Tyr	Leu
		275					280						285		
Glu	Tyr	His	Gly	Gly	Pro	Gly	Val	Gln	His	Ile	Ala	Leu	Ala	Ser	Asn
		290				295					300				
Asp	Val	Leu	Arg	Thr	Leu	Arg	Glu	Met	Arg	Ala	Arg	Thr	Pro	Met	Gly
		305				310					315				320
Gly	Phe	Glu	Phe	Met	Ala	Pro	Pro	Gln	Ala	Lys	Tyr	Tyr	Glu	Gly	Val
					325						330				335
Arg	Arg	Ile	Ala	Gly	Asp	Val	Leu	Ser	Glu	Glu	Gln	Ile	Lys	Glu	Cys
			340								345				350
Gln	Glu	Leu	Gly	Val	Leu	Val	Asp	Arg	Asp	Asp	Gln	Gly	Val	Leu	Leu
		355					360						365		
Gln	Ile	Phe	Thr	Lys	Pro	Val	Gly	Asp	Arg	Pro	Thr	Phe	Phe	Leu	Glu

[0031]

Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp
 195 200 205

Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met
 210 215 220

Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe
 225 230 235 240

Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn
 245 250 255

Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn
 260 265 270

Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu
 275 280 285

Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn
 290 295 300

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly
 305 310 315 320

Gly Phe Glu Phe Met Arg Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val
 325 330 335

Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys
 340 345 350

Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu
 355 360 365

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu
 370 375 380

Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu
 385 390 395 400

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu
 405 410 415

Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln
 420 425 430

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
 435

<210> 24
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> 燕麦(Avena sativa)
 <400> 24

[0033]

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val
 1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
 20 25 30

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu
 35 40 45

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
 50 55 60

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala
 65 70 75 80

His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr
 85 90 95

Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala
 100 105 110

Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala
 115 120 125

His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala
 130 135 140

Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala
 145 150 155 160

Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr
 165 170 175

Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu
 180 185 190

Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp
 195 200 205

Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met
 210 215 220

Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe
 225 230 235 240

Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn
 245 250 255

Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn
 260 265 270

Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu
 275 280 285

[0034]

Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn
 290 295 300

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly
 305 310 315 320

Gly Phe Glu Phe Met Lys Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val
 325 330 335

Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys
 340 345 350

Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu
 355 360 365

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu
 370 375 380

Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu
 385 390 395 400

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu
 405 410 415

Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln
 420 425 430

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
 435

<210> 25
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> 燕麦(Avena sativa)

<400> 25

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val
 1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
 20 25 30

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu
 35 40 45

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
 50 55 60

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala
 65 70 75 80

His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr
 85 90 95

[0035]

Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala
 100 105 110

Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala
 115 120 125

His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala
 130 135 140

Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala
 145 150 155 160

Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr
 165 170 175

Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu
 180 185 190

Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp
 195 200 205

Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met
 210 215 220

Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe
 225 230 235 240

Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn
 245 250 255

Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn
 260 265 270

Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu
 275 280 285

Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn
 290 295 300

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly
 305 310 315 320

Gly Phe Glu Phe Met Ile Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val
 325 330 335

Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys
 340 345 350

Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu
 355 360 365

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu
 370 375 380

[0036]

Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu
385 390 395 400

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu
405 410 415

Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln
420 425 430

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
435

<210> 26
<211> 439
<212> PRT
<213> 燕麦(Avena sativa)

<400> 26

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val
1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
20 25 30

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu
35 40 45

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
50 55 60

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala
65 70 75 80

His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr
85 90 95

Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala
100 105 110

Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala
115 120 125

His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala
130 135 140

Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala
145 150 155 160

Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr
165 170 175

Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu
180 185 190

Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp

[0037]

195	200	205
Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met 210 215 220		
Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe 225 230 235 240		
Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn 245 250 255		
Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn 260 265 270		
Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu 275 280 285		
Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn 290 295 300		
Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly 305 310 315 320		
Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val 325 330 335		
Arg Arg Glu Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys 340 345 350		
Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu 355 360 365		
Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu 370 375 380		
Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu 385 390 395 400		
Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu 405 410 415		
Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln 420 425 430		
Ser Val Val Ala Gln Lys Ser 435		
<210> 27		
<211> 439		
<212> PRT		
<213> 燕麦(Avena sativa)		
<400> 27		
Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val 1 5 10 15		

[0038]

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

[0039]

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly
 305 310 315 320
 Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val
 325 330 335
 Arg Arg Asp Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys
 340 345 350
 Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu
 355 360 365
 Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu
 370 375 380
 Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu
 385 390 395 400
 Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu
 405 410 415
 Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln
 420 425 430
 Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
 435
 <210> 28
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> 燕麦(Avena sativa)
 <400> 28
 Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val
 1 5 10 15
 Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
 20 25 30
 Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu
 35 40 45
 Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
 50 55 60
 Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala
 65 70 75 80
 His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr
 85 90 95
 Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala
 100 105 110

[0040]

Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala
 115 120 125

His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala
 130 135 140

Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala
 145 150 155 160

Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr
 165 170 175

Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu
 180 185 190

Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp
 195 200 205

Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met
 210 215 220

Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe
 225 230 235 240

Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn
 245 250 255

Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn
 260 265 270

Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu
 275 280 285

Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn
 290 295 300

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly
 305 310 315 320

Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val
 325 330 335

Arg Arg Cys Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys
 340 345 350

Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu
 355 360 365

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu
 370 375 380

Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu
 385 390 395 400

[0041]

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu
 405 410 415

Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln
 420 425 430

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
 435

<210> 29
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> 燕麦(Avena sativa)

<400> 29

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val
 1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
 20 25 30

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu
 35 40 45

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
 50 55 60

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala
 65 70 75 80

His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr
 85 90 95

Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala
 100 105 110

Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala
 115 120 125

His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala
 130 135 140

Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala
 145 150 155 160

Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr
 165 170 175

Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu
 180 185 190

Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp
 195 200 205

[0042]

Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met
 210 215 220

Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe
 225 230 235 240

Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn
 245 250 255

Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn
 260 265 270

Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu
 275 280 285

Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn
 290 295 300

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly
 305 310 315 320

Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val
 325 330 335

Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys
 340 345 350

Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu
 355 360 365

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu
 370 375 380

Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu
 385 390 395 400

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Arg Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu
 405 410 415

Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln
 420 425 430

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
 435

<210> 30
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> 燕麦(Avena sativa)

<400> 30

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val
 1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn

[0043]

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

[0044]

His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala
 130 135 140

Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala
 145 150 155 160

Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr
 165 170 175

Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu
 180 185 190

Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp
 195 200 205

Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Ile Val Gly Asn Val Pro Glu Met
 210 215 220

Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe
 225 230 235 240

Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn
 245 250 255

Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn
 260 265 270

Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu
 275 280 285

Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn
 290 295 300

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly
 305 310 315 320

Gly Phe Glu Phe Met Arg Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val
 325 330 335

Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys
 340 345 350

Gln Glu Leu Gly Val Met Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu
 355 360 365

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu
 370 375 380

Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu
 385 390 395 400

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu
 405 410 415

[0046]

Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln
 420 425 430

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
 435

<210> 32
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> 燕麦(Avcna sativa)

<400> 32

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val
 1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
 20 25 30

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu
 35 40 45

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
 50 55 60

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala
 65 70 75 80

His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr
 85 90 95

Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala
 100 105 110

Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala
 115 120 125

His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala
 130 135 140

Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala
 145 150 155 160

Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr
 165 170 175

Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu
 180 185 190

Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp
 195 200 205

Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Ile Val Gly Asn Val Pro Glu Met
 210 215 220

[0047]

Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe
225 230 235 240

Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn
245 250 255

Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn
260 265 270

Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu
275 280 285

Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn
290 295 300

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly
305 310 315 320

Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val
325 330 335

Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys
340 345 350

Gln Glu Leu Gly Val Met Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu
355 360 365

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu
370 375 380

Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu
385 390 395 400

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu
405 410 415

Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln
420 425 430

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
435

<210> 33
<211> 439
<212> PRT
<213> 燕麦(Avena sativa)

<400> 33

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val
1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
20 25 30

[0048]

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu
 35 40 45

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
 50 55 60

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala
 65 70 75 80

His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr
 85 90 95

Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala
 100 105 110

Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala
 115 120 125

His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala
 130 135 140

Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala
 145 150 155 160

Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr
 165 170 175

Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu
 180 185 190

Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp
 195 200 205

Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Ile Val Gly Asn Val Pro Glu Met
 210 215 220

Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe
 225 230 235 240

Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn
 245 250 255

Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn
 260 265 270

Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu
 275 280 285

Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn
 290 295 300

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly
 305 310 315 320

[0049]

Gly Phe Glu Phe Met Arg Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val
 325 330 335

Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys
 340 345 350

Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu
 355 360 365

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu
 370 375 380

Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu
 385 390 395 400

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu
 405 410 415

Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln
 420 425 430

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
 435

<210> 34
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> 燕麦(Avena sativa)

<400> 34

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val
 1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
 20 25 30

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu
 35 40 45

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
 50 55 60

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala
 65 70 75 80

His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr
 85 90 95

Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala
 100 105 110

Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala
 115 120 125

His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala

[0050]

130	135	140
Glu Ala Phe Arg Val Scr	Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala	
145	150	155
Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr		
	165	170
Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu		
	180	185
Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp		
	195	200
Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Ile Val Gly Asn Val Pro Glu Met		
	210	215
Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe		
	225	230
Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn		
	245	250
Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn		
	260	265
Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu		
	275	280
Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn		
	290	295
Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly		
	305	310
Gly Phe Glu Phe Met Lys Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val		
	325	330
Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys		
	340	345
Gln Glu Leu Gly Val Met Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu		
	355	360
Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu		
	370	375
Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu		
	385	390
Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu		
	405	410
Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln		

[0051]

	420	425	430
Scr Val Val Ala Gln Lys Ser			
	435		
<210> 35			
<211> 439			
<212> PRT			
<213> 燕麦(Avena sativa)			
<400> 35			
Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val			
1	5	10	15
Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn			
	20	25	30
Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu			
	35	40	45
Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu			
	50	55	60
Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala			
65	70	75	80
His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr			
	85	90	95
Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala			
	100	105	110
Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala			
	115	120	125
His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala			
	130	135	140
Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala			
145	150	155	160
Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr			
	165	170	175
Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu			
	180	185	190
Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp			
	195	200	205
Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Leu Val Gly Asn Val Pro Glu Met			
	210	215	220
Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe			
225	230	235	240

[0052]

Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn
245 250 255

Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn
260 265 270

Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu
275 280 285

Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn
290 295 300

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly
305 310 315 320

Gly Phe Glu Phe Met Arg Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val
325 330 335

Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys
340 345 350

Gln Glu Leu Gly Val Met Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu
355 360 365

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu
370 375 380

Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu
385 390 395 400

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu
405 410 415

Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln
420 425 430

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
435

<210> 36
<211> 439
<212> PRT
<213> 燕麦(Avena sativa)

<400> 36

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val
1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
20 25 30

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu
35 40 45

[0053]

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
 50 55 60

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala
 65 70 75 80

His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr
 85 90 95

Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala
 100 105 110

Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala
 115 120 125

His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala
 130 135 140

Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala
 145 150 155 160

Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr
 165 170 175

Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu
 180 185 190

Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp
 195 200 205

Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Ile Val Gly Asn Val Pro Glu Met
 210 215 220

Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe
 225 230 235 240

Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn
 245 250 255

Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn
 260 265 270

Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu
 275 280 285

Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn
 290 295 300

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly
 305 310 315 320

Gly Phe Glu Phe Met Arg Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val
 325 330 335

[0054]

Arg Arg Glu Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys
 340 345 350

Gln Glu Leu Gly Val Met Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu
 355 360 365

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu
 370 375 380

Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu
 385 390 395 400

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu
 405 410 415

Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln
 420 425 430

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
 435

<210> 37
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> 燕麦(Avena sativa)

<400> 37

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val
 1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
 20 25 30

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu
 35 40 45

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
 50 55 60

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala
 65 70 75 80

His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr
 85 90 95

Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala
 100 105 110

Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala
 115 120 125

His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala
 130 135 140

[0055]

Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala
 145 150 155 160

Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr
 165 170 175

Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu
 180 185 190

Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp
 195 200 205

Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Leu Val Gly Asn Val Pro Glu Met
 210 215 220

Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe
 225 230 235 240

Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn
 245 250 255

Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn
 260 265 270

Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu
 275 280 285

Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn
 290 295 300

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly
 305 310 315 320

Gly Phe Glu Phe Met Arg Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val
 325 330 335

Arg Arg Glu Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys
 340 345 350

Gln Glu Leu Gly Val Met Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu
 355 360 365

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu
 370 375 380

Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu
 385 390 395 400

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu
 405 410 415

Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln
 420 425 430

[0056]

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
 435

<210> 38
 <211> 434
 <212> PRT
 <213> 早熟禾 (*Poa annua*)

<400> 38

Met Pro Pro Thr Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Ala Thr Val Thr Pro
 1 5 10 15

Glu His Ala Ala Arg Arg Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn Pro Arg
 20 25 30

Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Phe Trp Cys
 35 40 45

Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu Gly Ala
 50 55 60

Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala His Ala
 65 70 75 80

Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr Ala Pro
 85 90 95

Tyr Ala Pro Gln Pro Gln Asp Ala Asp Thr Ala Ser Ile Pro Ser Phe
 100 105 110

Ser Ala Asp Ala Ala Arg Ala Phe Ser Ala Ala His Gly Leu Ala Val
 115 120 125

Arg Ser Val Ala Val Arg Val Ala Asp Ala Ala Asp Ala Phe Arg Ala
 130 135 140

Ser Ile Ala Ala Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala Pro Ala Asp Leu Gly
 145 150 155 160

Arg Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu
 165 170 175

Arg Phe Val Ser His Pro Asp Ala Asp Asp Ala Pro Phe Leu Pro Gly
 180 185 190

Phe Glu Ala Val Ser Arg Pro Gly Ala Val Asp Tyr Gly Leu Thr Arg
 195 200 205

Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met Gly Pro Val Ile Asp
 210 215 220

Tyr Ile Lys Gly Phe Met Gly Phe His Glu Phe Ala Glu Phe Thr Ala
 225 230 235 240

Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn Ser Val Val Leu Ala

[0057]

	245		250		255
Asn Asn Ser	Glu Ala Val	Leu Leu Pro	Leu Asn Glu Pro	Val His Gly	
	260		265	270	
Thr Lys Arg	Arg Ser Gln	Ile Gln Thr	Tyr Leu Glu Tyr	His Gly Gly	
	275		280	285	
Pro Gly Val	Gln His Ile	Ala Leu Ala	Ser Ser Asp	Val Leu Arg Thr	
	290		295	300	
Leu Arg Glu	Met Gln Ala	Arg Ser Ala	Met Gly Gly	Phe Glu Phe Met	
305		310		315	320
Arg Pro Pro	Gln Pro Lys	Tyr Tyr Glu	Gly Val Arg	Arg Ile Ala Gly	
	325		330	335	
Asp Val Leu	Ser Glu Ala	Gln Ile Lys	Glu Cys Gln	Glu Leu Gly Val	
	340		345	350	
Met Val Asp	Arg Asp Asp	Gln Gly Val	Leu Leu Gln	Ile Phe Thr Lys	
	355		360	365	
Pro Val Gly	Asp Arg Pro	Thr Phe Phe	Leu Glu Met	Ile Gln Arg Ile	
	370		375	380	
Gly Cys Met	Glu Lys Asp	Glu Arg Gly	Gln Glu Tyr	Gln Lys Gly Gly	
385		390		395	400
Cys Gly Gly	Phe Gly Lys	Gly Asn Phe	Ser Glu Leu	Phe Lys Ser Ile	
	405		410	415	
Glu Asp Tyr	Glu Lys Ser	Leu Glu Ala	Lys Gln Ser	Ala Val Ala Gln	
	420		425	430	
Gln Ser					
<210>	39				
<211>	434				
<212>	PRT				
<213>	早熟禾(Poa annua)				
<400>	39				
Met Pro Pro	Thr Thr Ala	Thr Ala Thr	Ala Ala Ala	Thr Val Thr Pro	
1		5		10	15
Glu His Ala	Ala Arg Arg	Phe Pro Arg	Val Val Arg	Val Asn Pro Arg	
	20		25	30	
Ser Asp Arg	Phe Pro Val	Leu Ser Phe	His His Val	Glu Phe Trp Cys	
	35		40	45	
Ala Asp Ala	Ala Ser Ala	Ala Gly Arg	Phe Ser Phe	Ala Leu Gly Ala	
	50		55	60	

[0058]

Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala His Ala
 65 70 75 80

Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr Ala Pro
 85 90 95

Tyr Ala Pro Gln Pro Gln Asp Ala Asp Thr Ala Ser Ile Pro Ser Phe
 100 105 110

Ser Ala Asp Ala Ala Arg Ala Phe Ser Ala Ala His Gly Leu Ala Val
 115 120 125

Arg Ser Val Ala Val Arg Val Ala Asp Ala Ala Asp Ala Phe Arg Ala
 130 135 140

Ser Ile Ala Ala Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala Pro Ala Asp Leu Gly
 145 150 155 160

Arg Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu
 165 170 175

Arg Phe Val Ser His Pro Asp Ala Asp Asp Ala Pro Phe Leu Pro Gly
 180 185 190

Phe Glu Ala Val Ser Arg Pro Gly Ala Val Asp Tyr Gly Leu Thr Arg
 195 200 205

Phe Asp His Ile Val Gly Asn Val Pro Glu Met Gly Pro Val Ile Asp
 210 215 220

Tyr Ile Lys Gly Phe Met Gly Phe His Glu Phe Ala Glu Phe Thr Ala
 225 230 235 240

Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn Ser Val Val Leu Ala
 245 250 255

Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn Glu Pro Val His Gly
 260 265 270

Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Glu Tyr His Gly Gly
 275 280 285

Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Ser Asp Val Leu Arg Thr
 290 295 300

Leu Arg Glu Met Gln Ala Arg Ser Ala Met Gly Gly Phe Glu Phe Met
 305 310 315 320

Arg Pro Pro Gln Pro Lys Tyr Tyr Glu Gly Val Arg Arg Ile Ala Gly
 325 330 335

Asp Val Leu Ser Glu Ala Gln Ile Lys Glu Cys Gln Glu Leu Gly Val
 340 345 350

[0059]

Met Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys
 355 360 365

Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu Met Ile Gln Arg Ile
 370 375 380

Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Arg Gly Gln Glu Tyr Gln Lys Gly Gly
 385 390 395 400

Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser Ile
 405 410 415

Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys Gln Ser Ala Val Ala Gln
 420 425 430

Gln Ser

<210> 40
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> *Alopecurus myosuroides*

<400> 40

Met Pro Pro Thr Thr Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val
 1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Arg Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
 20 25 30

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ala Phe His His Val Glu Phe
 35 40 45

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
 50 55 60

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ser
 65 70 75 80

His Ala Ser His Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr
 85 90 95

Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Asp Ala Ala Asp Ala Ala Ala Thr
 100 105 110

Ala Ser Ile Pro Ser Phe Ser Thr Glu Ala Ala Arg Thr Phe Ser Ser
 115 120 125

Ala His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Ala Ile Arg Val Ala Asp Ala
 130 135 140

Ala Glu Ala Phe His Thr Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe
 145 150 155 160

[0060]

Ala Pro Ala Asp Leu Gly Ser Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu
165 170 175

Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser His Pro Asp Gly Asp Asp
180 185 190

Val Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Gly Val Ser Arg Pro Gly Ala Met
195 200 205

Asp Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu
210 215 220

Met Ala Pro Val Ala Ala Tyr Met Lys Gly Phe Thr Gly Phe His Glu
225 230 235 240

Phe Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Ala Glu Ser Gly Leu
245 250 255

Asn Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu
260 265 270

Asn Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr
275 280 285

Leu Asp Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser
290 295 300

Ser Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Ser Ala Met
305 310 315 320

Gly Gly Phe Glu Phe Met Arg Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly
325 330 335

Val Arg Arg Leu Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Ala Gln Ile Lys Glu
340 345 350

Cys Gln Glu Leu Gly Val Met Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu
355 360 365

Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu
370 375 380

Glu Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Ile Gly Gln
385 390 395 400

Glu Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser
405 410 415

Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys
420 425 430

Gln Ser Ala Val Ala Gln Gln Ser
435 440

[0061]

<210> 41
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> *Alopecurus myosuroides*
 <400> 41
 Met Pro Pro Thr Thr Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val
 1 5 10 15
 Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Arg Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
 20 25 30
 Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ala Phe His His Val Glu Phe
 35 40 45
 Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
 50 55 60
 Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ser
 65 70 75 80
 His Ala Ser His Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr
 85 90 95
 Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Asp Ala Ala Asp Ala Ala Thr
 100 105 110
 Ala Ser Ile Pro Ser Phe Ser Thr Glu Ala Ala Arg Thr Phe Ser Ser
 115 120 125
 Ala His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Ala Ile Arg Val Ala Asp Ala
 130 135 140
 Ala Glu Ala Phe His Thr Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe
 145 150 155 160
 Ala Pro Ala Asp Leu Gly Ser Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu
 165 170 175
 Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser His Pro Asp Gly Asp Asp
 180 185 190
 Val Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Gly Val Ser Arg Pro Gly Ala Met
 195 200 205
 Asp Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Ile Val Gly Asn Val Pro Glu
 210 215 220
 Met Ala Pro Val Ala Ala Tyr Met Lys Gly Phe Thr Gly Phe His Glu
 225 230 235 240
 Phe Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Ala Glu Ser Gly Leu
 245 250 255

[0062]

Asn Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu
 260 265 270

Asn Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr
 275 280 285

Leu Asp Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser
 290 295 300

Ser Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Ser Ala Met
 305 310 315 320

Gly Gly Phe Glu Phe Met Arg Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly
 325 330 335

Val Arg Arg Leu Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Ala Gln Ile Lys Glu
 340 345 350

Cys Gln Glu Leu Gly Val Met Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu
 355 360 365

Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu
 370 375 380

Glu Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Ile Gly Gln
 385 390 395 400

Glu Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser
 405 410 415

Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys
 420 425 430

Gln Ser Ala Val Ala Gln Gln Ser
 435 440

<210> 42
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> 燕麦(Avena sativa)

<400> 42

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val
 1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
 20 25 30

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu
 35 40 45

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
 50 55 60

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala

[0063]

65	70	75	80
His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr	85	90	95
Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala	100	105	110
Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala	115	120	125
His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala	130	135	140
Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala	145	150	155
Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr	165	170	175
Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu	180	185	190
Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp	195	200	205
Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met	210	215	220
Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe	225	230	235
Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn	245	250	255
Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn	260	265	270
Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu	275	280	285
Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn	290	295	300
Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly	305	310	315
Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val	325	330	335
Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys	340	345	350
Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu			

[0064]

Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu
 180 185 190

Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp
 195 200 205

Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met
 210 215 220

Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe
 225 230 235 240

Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn
 245 250 255

Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn
 260 265 270

Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu
 275 280 285

Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn
 290 295 300

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly
 305 310 315 320

Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val
 325 330 335

Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys
 340 345 350

Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu
 355 360 365

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu
 370 375 380

Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu
 385 390 395 400

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Cys Asn Phe Ser Glu
 405 410 415

Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln
 420 425 430

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
 435

<210> 44

<211> 439

[0066]

<212> PRT
 <213> 燕麦(Avena sativa)
 <400> 44
 Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val
 1 5 10 15
 Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
 20 25 30
 Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu
 35 40 45
 Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
 50 55 60
 Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala
 65 70 75 80
 His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr
 85 90 95
 Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala
 100 105 110
 Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala
 115 120 125
 His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala
 130 135 140
 Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala
 145 150 155 160
 Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr
 165 170 175
 Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu
 180 185 190
 Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp
 195 200 205
 Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met
 210 215 220
 Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn
 245 250 255
 Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn
 260 265 270

[0067]

Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu
 275 280 285

Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Ala His Ile Ala Leu Ala Ser Asn
 290 295 300

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly
 305 310 315 320

Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val
 325 330 335

Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys
 340 345 350

Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu
 355 360 365

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu
 370 375 380

Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu
 385 390 395 400

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu
 405 410 415

Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln
 420 425 430

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
 435

<210> 45
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> 燕麦(Avena sativa)

<400> 45

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val
 1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
 20 25 30

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu
 35 40 45

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
 50 55 60

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala
 65 70 75 80

[0068]

His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr
 85 90 95

Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala
 100 105 110

Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala
 115 120 125

His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala
 130 135 140

Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala
 145 150 155 160

Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr
 165 170 175

Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu
 180 185 190

Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp
 195 200 205

Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met
 210 215 220

Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe
 225 230 235 240

Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn
 245 250 255

Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn
 260 265 270

Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Asn Ile Gln Thr Tyr Leu
 275 280 285

Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn
 290 295 300

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly
 305 310 315 320

Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val
 325 330 335

Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys
 340 345 350

Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu
 355 360 365

[0069]

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu
 370 375 380

Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu
 385 390 395 400

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu
 405 410 415

Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln
 420 425 430

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
 435

<210> 46
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> 燕麦(Avena sativa)

<400> 46

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val
 1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
 20 25 30

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu
 35 40 45

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
 50 55 60

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala
 65 70 75 80

His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr
 85 90 95

Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala
 100 105 110

Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala
 115 120 125

His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala
 130 135 140

Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala
 145 150 155 160

Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr
 165 170 175

Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu

[0070]

180	185	190
Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp 195 200 205		
Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met 210 215 220		
Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe 225 230 235 240		
Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn 245 250 255		
Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn 260 265 270		
Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu 275 280 285		
Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gly His Ile Ala Leu Ala Ser Asn 290 295 300		
Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly 305 310 315 320		
Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val 325 330 335		
Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys 340 345 350		
Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu 355 360 365		
Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu 370 375 380		
Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu 385 390 395 400		
Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu 405 410 415		
Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln 420 425 430		
Ser Val Val Ala Gln Lys Ser 435		
<210> 47		
<211> 439		
<212> PRT		
<213> 燕麦(Avena sativa)		

[0071]

<400> 47

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val
1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
20 25 30

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu
35 40 45

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
50 55 60

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala
65 70 75 80

His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr
85 90 95

Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala
100 105 110

Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala
115 120 125

His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala
130 135 140

Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala
145 150 155 160

Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr
165 170 175

Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu
180 185 190

Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp
195 200 205

Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met
210 215 220

Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe
225 230 235 240

Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn
245 250 255

Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn
260 265 270

Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu
275 280 285

[0072]

Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn
 290 295 300

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly
 305 310 315 320

Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val
 325 330 335

Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys
 340 345 350

Gln Glu Leu Gly Val Ala Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu
 355 360 365

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu
 370 375 380

Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu
 385 390 395 400

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu
 405 410 415

Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln
 420 425 430

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
 435

<210> 48
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> 矮牵牛(Petunia x hybrida)

<400> 48

Met Ala Gln Ile Asn Asn Met Ala Gln Gly Ile Gln Thr Leu Asn Pro
 1 5 10 15

Asn Ser Asn Phe His Lys Pro Gln Val Pro Lys Ser Ser Ser Phe Leu
 20 25 30

Val Phe Gly Ser Lys Lys Leu Lys Asn Ser Ala Asn Ser Met Leu Val
 35 40 45

Leu Lys Lys Asp Ser Ile Phe Met Gln Lys Phe Cys Ser Phe Arg Ile
 50 55 60

Ser Ala Ser Val Ala Thr Ala Cys
 65 70

<210> 49
 <211> 440
 <212> PRT

[0073]

<213> 燕麦 (*Avena sativa*)

<400> 49

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val
 1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
 20 25 30

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu
 35 40 45

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
 50 55 60

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala
 65 70 75 80

His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr
 85 90 95

Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr
 100 105 110

Ala Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala
 115 120 125

Ala His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala
 130 135 140

Ala Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe
 145 150 155 160

Ala Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu
 165 170 175

Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp
 180 185 190

Leu Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val
 195 200 205

Asp Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Ile Val Gly Asn Val Pro Glu
 210 215 220

Met Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu
 225 230 235 240

Phe Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu
 245 250 255

Asn Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu
 260 265 270

[0074]

Asn Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr
 275 280 285
 Leu Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser
 290 295 300
 Asn Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met
 305 310 315 320
 Gly Gly Phe Glu Phe Met Arg Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly
 325 330 335
 Val Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu
 340 345 350
 Cys Gln Glu Leu Gly Val Met Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu
 355 360 365
 Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu
 370 375 380
 Glu Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln
 385 390 395 400
 Glu Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser
 405 410 415
 Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys
 420 425 430
 Gln Ser Val Val Ala Gln Lys Ser
 435 440
 <210> 50
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> *Alopecurus myosuroides*
 <400> 50
 Pro Pro Thr Thr Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val Thr
 1 5 10 15
 Pro Glu His Ala Ala Arg Arg Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn Pro
 20 25 30
 Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ala Phe His His Val Glu Phe Trp
 35 40 45
 Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu Gly
 50 55 60
 Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ser His
 65 70 75 80
 Ala Ser His Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr Ala

[0075]

370 375 380

Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Ile Gly Gln Glu
385 390 395 400

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu
405 410 415

Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys Gln
420 425 430

Ser Ala Val Ala Gln Gln Ser
435

<210> 51
<211> 11208
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 表达盒(Expression cassette)

<400> 51
atccctgtgg ttggcatgca catacaaatg gacgaacgga taaacctttt cacgcccitt 60
taaataatecg attattetaa taaacgctct ttctctttag gtttacecgc caatataatec 120
tgcaaacac tgalagllia aactgaaggc gggaaacgac aatctgalca tgagcggaga 180
attaaggagag tcacgttatg acccccgcgg atgacgcggg acaagccggt ttacgtttgg 240
aactgacaga accgcaacgc tgcaggaatt ggccgcagcg gccattttaa tcaattgggc 300
gcgtacgtag cactagttaa ttccggaccc aagcttgcac gcctgcagga attggccgca 360
ggggccattt aatcaattg ggcgcgtgcg gccgcagcig cttgtgggga ccagacaaaa 420
aaggaaatgg tgcagaatgt taggcgcacc taccaaaagc atctttgctt ttattgcaaa 480
gataaagcag atccctctag tacaagtggg gaacaaaata acgtggaaaa gagctgtcct 540
gacagcccac tcactaatgc gtatgacgaa cgcagtgacg accacaaaac tcgagacttt 600
tcaacaagg gtaatatccg gaaacctctt cggattccat tgcccagcta tctgtcactt 660
tattgtgaag atagtggaaa aggaaggtag ctctacaaa tgccatcatt gcgataaagg 720
aaaggctatc gtgaagatg cctctgccga cagtggtecc aaagatggac ccccaccac 780
gaggagcacc gtggaaaaag aagacgttcc aaccaegtct tcaaagcaag tggattgatg 840
tgatactctc actgacgtaa gggatgacga acaatcccac tatccttctg caggtegact 900
ctagaggatc ctataaatag gaagttcatt tcatttggag aggaaacctc gactattttt 960
acaacaatta ccaacaacia caaacaacia acaacattac aattactatt tacaattaca 1020
catatgccac caactactgc tactgctaca ggtgctgctg ctgcagctgt tactccagaa 1080
catgctgcta gaaggttccc aagagttgtt agagttaacc caaggtctga taggttccca 1140
gttcttgcct tccatcatgt tgagttttgg tgtgctgatg ctgcttctgc tgcctggaaga 1200
ttttcttttg ctcttgggtc tccacttgcg gctagatctg atttctctac tggaaactct 1260
ctcacgctt ctacaccttt gagatctggt gctcttgcct tccitttcac tgetccttat 1320

[0077]

gctccaccac cacaagaigc tgcagatgca gcagctactg cttctattcc atctttttca	1380
actgaggcig ctaggacitt ctctctgcti catggattgg ctgtagatc tgggctiatt	1440
agagttgcag atgctgcaga ggctttccat acttctgttg ctgggtgtgc tagaccagct	1500
tttgctccag ctgatcttgg atctggatti ggacttgctg aggttgagct ttacggtgat	1560
gttgcttcta gattcgtgic tcaccagat ggtgatgat ttccatttct tccaggattc	1620
gagggtgtta gtagaccagg tgcctatgat tatggactca ctaggttcga tcaccttgtg	1680
ggaaatgttc cagaaatggc tccagttgct gcttacctga agggattcac tggatttcat	1740
gagttcctg agttcactgc tggagatgtt ggaactgctg agtctggact taactctgtt	1800
gtgcttgcta acaactctga ggcgttctt ttgccactta atgagccagt tcacggcact	1860
aagagaagat ctgagattca gacttacctc gattaccatg gtggaccagg tgttcaacat	1920
attgctcttg ctccatctga tgtgcttagg actcttagag agatgagagc tagatctgct	1980
atggagggat ttgagtttat gagaccacca caagctaagt attacgaagg tgttagaagg	2040
gaggctgttg atgttctttc tggagctcaa atcaaagagt gccaaagact tggagttatg	2100
gtggatagag atgatcaggg tgtgcttctc cagattttca ctaagccagt tggagatagg	2160
ccaacattct tcttggagat gattcagagg atcggctgca tggaaaagga tgagattgga	2220
caagagtacc aaaaggcgg atgtgttga ttggaaagg gaaatttctc cgagcttttc	2280
aagtcacac aggallacga gaagctctt gaggctaac aatctgctgt tgcctcaacg	2340
tcttgagagc tcttcataat acgatcttcc aaacatttgg caataaagtt tcttaagatt	2400
gaatctctgt gccggtcttg cgaigattat cataaattt ctgttgaatt acgttaagca	2460
tglataaatt aacatgtaat gcaigacgtt atttatgaga tgggttttta tgattagagt	2520
cccgcaatta tacatttaat acgcgataga aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa	2580
allatcgcgc gcgggtgcat ctatgttact agatcgcgga ccgaagcttg catgccigca	2640
ggctgactct agaggatctg ggaaccagtc aaagattcaa atagaggacc taacagaact	2700
cgccgtaaag actggcgaac agttcataca gactctctta cgactcaatg acaagaagaa	2760
aatctctgct aacatggttg agcacgacac gcttgtctac tccaaaaata tcaaagatac	2820
agtctcagaa gaccaaagg caattgagac tttcaacaa agggtaatat ccggaaacct	2880
cctcgattc cattgcccag ctatctgca ctttattgtg aagatagtgg aaaaggaagg	2940
tggctcttac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggcc atcgttgaag atgctctgct	3000
cgacagtggc cccaaagatg gacccccacc caccaggagc atcgttgaag aagaagact	3060
tccaaccacg tcttcaaagc aagtgattg atgtgatat tccactgacg taagggatga	3120
cgcaaatcc cactatectt cgcaagacc ttctctata taaggagtt catttcattt	3180
ggagaggaca cgctgaaatc actagtcac catgtctccg gagaggagac cagttgagat	3240
taggccagct acagcagctg atatggccgc ggttgtgat atcgttgaac attacattga	3300
gacgtctaca gtgaacttta ggacagagcc acaaacacca caagagtga ttgatgatct	3360
agagaggttg caagatagat acccttgggt ggttctgag gttgaggtg ttgtggctgg	3420
tattgcttac cctgggacct ggaaggctag gaacgcttac gattggacag ttgagagtc	3480

[0078]

tgtttacgtg tcacataggc atcaaaaggtt gggccclagga tccacattgt acacacattt	3540
gcttaagtct atggaggcgc aaggttttaa gtcctgtggtt gctgttatag gccttccaaa	3600
cgatccatct gttaggttgc atgaggcttt gggatacaca gcccggggtt cattgcgcgc	3660
agctggatac aagcatggtg gatggcatga tgttggtttt tggcaaaggg attttagatt	3720
gccagctcct ccaaggccag ttaggccagi taccagatc tgaactagtg atatcggcgc	3780
catgggtcga cctgcagatc gttcaancat ttggcaataa agtttcttaa gattgaatcc	3840
tgttgcgggt cttgcgatga ttaicatata atttctgttg aattacgtta agcatgtaat	3900
aattaacatg laatgcatga cgttatttat gagatgggtt tttatgatta gagtcccgca	3960
attatcatt taatcgcga tagaaaacaa aatatagcgc gcaactagg ataaattatc	4020
gcgcgcggtg tcatctatgt tactagatcc ggaccagct gcttgtgggg accagacaaa	4080
aaaggaatgg tgcagaattg ttaggcgcac ctaccaaag catctttgcc tttattgcaa	4140
agataaagca gattcctcta gtacaagtgg ggaacaaaat aacgtggaaa agagctgtcc	4200
tgacagccca ctactaatg cgtatgacga acgcagtgc gaccacaaaa ctcgagactt	4260
ttcaacaaag ggtaataacc ggaaccctcc tcggattcca ttgccagct atctgtcact	4320
ttattgtgaa gatagtggaa aaggaaagtg gctcctacaa atgccatcat tgcgataaag	4380
gaaaggctat cgttgaagat gccctgccc acagtgtcc caaagatgga cccccacca	4440
cgaggagcat cgttgaaaaa gaagacgttc caaccacgic ttcaaaagcaa gtggattgal	4500
gtgatatctc cactgacgta agggatgacg aacaatccca ctatccttct gccggaccct	4560
catgagcggg gaattaaggg agtcacgtta tgacccccgc cgatgacgcg ggacaagccg	4620
ttttacgttt ggaactgaca gaaccgcaac gaagctttgg cagacaaagt ggagacata	4680
ctgtcccaca aatgaagatg gaaictgtaa aagaaaacgc gtgaaataat gcgtctgaca	4740
aaggllaggl cggcctgctt laalcaatc caaagtggtc cctaccacga tggaaaaact	4800
gtgcagtcgg tttggctttt tctgacgaac aaataagatt cgtggccgac aggtgggggt	4860
ccaccatgtg aaggcatctt cagactccaa taatggagca atgacgtaag ggcttacgaa	4920
ataagtaagg gtatgttggg aaatgtccac tcaccgctca gtctataaat acttagcccc	4980
tcctcattg ttaagggagc aaaatctcag agagatagtc ctagagagag aaagagagca	5040
agtagcctag aagtggatcc caccatgtct ccggagagga gaccagttga gattaggcca	5100
gctacagcag ctgatatggc cgcggtttgt gatategtta accattacat tgagacgtct	5160
acagtgaact ttaggacaga gccacaaaca ccacaagagt ggattgatga tctagagagg	5220
ttgcaagata gatacccttg gttggttgct gaggttgagg gtgttgtggc tggatttgc	5280
tacgctgggc cctggaaggc taggaacgtt tacgattgga cagttgagag tactgtttac	5340
gtgtcacata ggcatcaaag gttgggccta ggatctacat tgtacacaca tttgcttaag	5400
tctatggagg cgcaaggttt taagtctgtg gttgctgta taggccttcc aaacgatcca	5460
tctgttaggt tgcatgaggc tttgggatac acagccccgg gtacattgcg cgcagctgga	5520
tacaagcatg gtggatggca tgaigtgtgt ttttggcaaa gggattttga gttgccagct	5580
cttccaaggc cagttaggcc agttaccag atatgagtcg agctctagat ccccgaaattt	5640

[0079]

ccccgategt tcaaacattt ggcaataaag ttctttaaga ttgaatcctg ttgccggctc	5700
tgcgatgatt atcatataat ttctgtttaa ttacgttaag catgtaataa ttaacaigtg	5760
atgcatgacg ttattttatga gatgggtttt tatgattaga gtcccccaat tatacattta	5820
atacgcgata gaaaacaaaa tafagcgcgc aaactaggat aaattatcgc gcgcggigtc	5880
atctatgtta ctagatcggg aatlgggtaac catgccccgg cgccagcat ggccgtatcc	5940
gcaatgtgtt attaagtigt ctaagcgtca attigtttac accacaatat atcctgccac	6000
cagccagcca acagctcccc gaccggcagc tcggcacaaa atcaccactc gatacaggca	6060
gcccacaga attaattctc atgittgaca gcttatcctc gactgcacgg tgcaccaatg	6120
cttctggcgt caggcagcca tcggaagctg tggatggct gtgcaggtcg taaatcactg	6180
cataatctgt gtgcctcaag gcgcactccc gtcttgata atgttttttg cgcgcacatc	6240
ataacggttc tggcaaatat tctgaaatga gctgttgaca attaatcctc cggctcgtat	6300
aatgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagacat gagggaaagc	6360
ttgatgcgag aagtatcgac tcaactatca gaggtagtgt gcgtcatcga gcgccatctc	6420
gaaccgacgt tgcctggcgt acattgttac ggctccgcag tggatggcgg cctgaagcca	6480
cacagtata ttgatttctt ggttacgggt accgtaaggc ttgatgaaac aacgcggcga	6540
gctttgatca acgacctttt gaaacttctg gcttccccgt gagagagcga gattctccgc	6600
gctglagaag tcaccattgt tglgcacgac gacalcalic cgtggcglia tccagctaac	6660
cgcgaactgc aatttggaga atggcagcgc aatgacattc ttgcaggtat ctccagacca	6720
gccacgatcg acattgatct ggctatcttg ctgacaaaag caagagaaca tagcgttggc	6780
ttggtaggtc cagcggcgga ggaactcttt gatccggttc ctgaacagga tctattttag	6840
gcgctaaatg aaacctaac gctatggaac tcgcccccc actgggcttg cgtatgagcga	6900
aatglagltc ttacgttctc ccgcatlttg tacagcgcag taaccggcaa aatcgcgccg	6960
aaggatgtcg ctgccgactg ggcaatggag cgcctgccgg cccagtatca gccctcata	7020
cttgaagcta ggcaggctta tcttggacaa gaagatcgtt tggcctcgcg cgcagatcag	7080
ttggaagaat ttgttacta cgtgaaagcg gagatcacca aagtagtcgg caaataaagc	7140
tctagtggat ctccgtacct ggggatctgg ctccggcggc acgcacgacg cggggcgag	7200
acctagggcg atctcctaaa tcaatagtag ctgtaacctc gaagcgttct acttctaaca	7260
acgattgaga atttttgtca taaaattgaa atacttgggt cgcatttttg tcatccggg	7320
tcagccgcaa ttctgacgaa ctgccattt agctggagat gattgtacat ccttcacgtg	7380
aaaattctc aagcgtgtg aacaagggtt cagattttag attgaaagggt gagccgttga	7440
aacacgttct tcttctgat gacgacgtcg ctatcggca tcttattatt gaatacctta	7500
cgatccacgc ctccaagtg accgcggtag ccgacagcac ccagttcaca agagtactct	7560
cttccgcgac ggtcgtatgc gtggttgttg atctagattt aggtcgtgaa gatgggctcg	7620
agatcgttct taatctggcg gcaaagctct atattccaat cataattatc agtggcgacc	7680
gccttgagga gacggataaa gtgttgcac tcgagctagg agcaagtgat ttatcgccta	7740
agccgttcag tatcagagag ttcttagcac gcattcgggt tgccttgcgc gtgcgcccc	7800

[0080]

acgtttgctcg	ctccaaagac	cgacggctctt	tttgttttac	tgactggaca	cttaatctca	7860
ggcaacgtcg	cttgatgtcc	gaagctggcg	gtgaggtgaa	acttacggca	ggtgagttca	7920
atctttctcct	cgcgttttta	gagaaacccc	gcgacgttct	atcgcgcgag	caactttctca	7980
ttgccagtcg	agtacgcgac	gaggagggtt	atgacaggag	tatagatggt	ctcattttga	8040
ggctgcgccc	caaacttgag	gcagatccgt	caagccctca	actgataaaa	acagcaagag	8100
gtgccggtta	tttctttgac	gcggacgtgc	aggtttcgca	cggggggacg	atggcagcct	8160
gagccaattc	ccagatcccc	gaggaatcgg	cgtagcgggt	cgaaacccat	ccggcccgggt	8220
acaaatcgcc	gcggcgcctg	gtgatgacct	ggtggagaag	ttgaaggccg	cgcaggccgc	8280
ccagcggcaa	cgcatcgagg	cagaagcacg	ccccggtgaa	tcgtggcaag	cggccgctga	8340
tcgaatccgc	aaagaatccc	ggcaaccgcc	ggcagccgggt	gcgccgtcga	ttaggaagcc	8400
gccccagggc	gacgagcaac	cagatTTTT	cgttccgatg	ctctatgacg	tgggcacccc	8460
cgatagtcgc	agcatcatgg	acgtggccgt	tttccgtctg	tcgaagcgtg	accgacgagc	8520
tggcgagggtg	atccgctacg	agcttcaga	cgggcacgta	gaggtttccg	cagggccggc	8580
cggcatggcc	agtgtgtggg	attacgacct	ggtactgatg	gcggtttccc	atctaaccga	8640
atccatgaac	cgataccggg	aagggaaagg	agacaagccc	ggcccgcgtg	tccgtccaca	8700
cgttcgggac	gtactcaagt	ctgcccggcg	agccgatggc	ggaaagcaga	aagacgacct	8760
gglagaaacc	tgcatlccgt	laaacaccac	gcacgttgcc	atgcagccta	cgaagaaggc	8820
caagaacggc	cgccctggta	cggtatccga	gggtgaagcc	ttgattagcc	gctacaagat	8880
cglaaagagc	gaaaccgggc	ggccggagta	catcgagatc	gagctagctg	attggatgta	8940
ccgcgagatc	acagaaggca	agaaccggga	cgltctgacg	gltcaccctg	attacttttt	9000
gatcgatccc	ggcatcggcc	gtttctctca	ccgctggca	cgccgcgccc	caggcaaggc	9060
agaagccaga	tggtlgtlca	agacgactca	cgaacgcagl	ggcagcgcgg	gagagtlcaa	9120
gaagttctgt	ttaccctgic	gcaagctgat	cgggtcaaat	gacctgccgg	agtlacattt	9180
gaaggaggag	gcggggcagg	ctggcccgat	cctagtcatg	cgctaccgca	acctgatcga	9240
ggcggaagca	tcccccgttt	cctaatgtac	ggagcagatg	ctagggcaaa	ttgccctagc	9300
aggggaaaaa	ggtcgaaaag	gtctctttcc	tgtggatagc	acgtacattg	ggaacccaaa	9360
gccgtacatt	gggaaccgga	accgctacat	tgggaaccca	aagccgtaca	ttgggaaccg	9420
gtcacacatg	taagtactg	ataaaaaaga	gaaaaaaggc	gatttttccg	cctaaaaactc	9480
tttaaaactt	attaaaactc	ttaaaaccgg	cctggcctgt	gcataactgt	ctggccagcg	9540
cacagccgaa	gagctgcaaa	aagcgcctac	ccttcggctg	ctgcgctccc	tacgccccgc	9600
cgttctcggt	cgccctatcg	cgcccgctgg	ccgctcaaaa	atggctggcc	tacggccagg	9660
caatctacca	gggcgcccga	aagccgcgcc	gtcgcaccctc	gaccgcccgc	gctgaggctct	9720
gcctcgtgaa	gaagggtgtg	ctgactcata	ccaggcctga	atgccccat	catccagcca	9780
gaaagtgagg	gagccacgggt	tgaigagagc	ttgtttgtag	gtggaccagt	tgggtatttt	9840
gaacttttgc	tttgccacgg	aacggctctgc	gttgtcggga	agatgcgcta	ctgatcctt	9900
caactcagca	aaagttcgat	ttattcaaca	aagccgccgt	cccgtcaagt	cagcgtaatg	9960

[0081]

ctctgccagt gttacaacca attaaccaat tctgattaga aaaactcacc gagcatcaaa 10020
 tgaaactgca atttattcat atcaggatta tcaataccat atttttgaaa aagccgtttc 10080
 tglaatgaag gagaaaactc accgaggcag ticcatagga tggcaagatc ctggtatcgg 10140
 tctgcgattc cgactcgtcc aacatcaata caacctatta atttcccctc gtcaaaaaata 10200
 aggttatcaa gtgagaaatc accatgagtg acgactgaat ccggtgagaa tggcaaaagc 10260
 tctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg ggcgctcttc 10320
 cgcttctctg ctactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc 10380
 tcactcaaag cgggtaatac ggttatccac agaactcagg gataacgcag gaaagaacat 10440
 gtgagcaaaa gcccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt 10500
 ccatagctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg 10560
 aaaccgaca ggactataaa gataccagc gtttcccctt ggaagctccc tegtgcgctc 10620
 tctgttccg acctgcccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt 10680
 ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa 10740
 gctggcctgt gtgcacgaac cccccctca gcccgaccgc tgcgccttat ccgtaacta 10800
 tcgtcttgag tccaaccggg taagacacga ctatcgcga ctggcagcag ccactggtaa 10860
 caggattagc agagcagagt atglaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa 10920
 ctaccgclac actagaagaa caglatltag talctgcgcl ctgctgaagc cagtlacctt 10980
 cggaaaaaga gttgtagct ctgatccgg caaacaacc accgctggta gcgggtggtt 11040
 ttttgtttg aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag atcctttgat 11100
 cttttctacg gggctctgac ctcagtggaa cgaaaactca cgttaaggga ttttggctat 11160
 gagattatca aaaaggatct tcacctagat ccttttgatc cggaaatta 11208

<210> 52
 <211> 11208
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 表达盒(Expression cassette)

<400> 52
 attcctgtgg ttggcatgca catacaaatg gacgaacgga taaacctttt cagcccttt 60
 taaatatccg attattctaa taaacgctct tttctcttag gtttaccgcg caatatatcc 120
 tgtcaaacac tgatagtita aactgaaggc gggaaacgac aatctgatca tgagcggaga 180
 attaaggag tcacgttatg acccccgcg atgacgcggg acaagccgtt ttacgtttgg 240
 aactgacaga accgcaacgc tgcaggaatt ggccgcagcg gccatttaaa tcaattgggc 300
 gcgtacgtag cactagttaa ttccggacc aagcttgcat gcctgcagga attggccgca 360
 gcggccattt aaatcaattg ggcgcgtgcg gccgcagctg cttgtgggga ccagacaaaa 420
 aaggaatggt gcagaattgt taggcgcacc taccaaaagc atctttgect ttattgcaaa 480
 gataaagcag attcctctag tacaagtggg gaacaaaata acgtggaaaa gagctgtcct 540
 gagagcccac tcactaatgc gtaigacgaa cgcagtgacg accacaaaac tcgagacttt 600

[0082]

tcaacaaagg gtaatatccg gaaacctcct cggattccat tgcccageta tctgtcactt	660
tattgtgaag atagtggaaa aggaagggtg ctcctacaaa tgccatcatt gcgataaagg	720
aaaggctatc gttgaagatg cctctgccga cagtggctcc aaagatggac ccccaccac	780
gaggagcatic gttgaaaaag aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg	840
tgatatctcc actgacglia gggatgacga acaatcccac tatccttctg caggctcact	900
ctagaggatc ctataaatag gaagttcatt tcatttggag aggaaacctc gagtatTTTT	960
acaacaatta ccaacaacaa caaacaacaa acaacattac aattactatt tacaattaca	1020
catatgccac caactactgc tactgctaca ggtgctgctg ctgcagctgt tactccagaa	1080
catgctgcta gaaggttccc aagagtgtt agagttaacc caaggtctga taggttccca	1140
gttcttgett tccatcatgt tgagtttgg tgtgctgatg ctgcttctgc tcttggaaaga	1200
ttttcttttg ctcttggctg tccacttget gctagatctg atttgtctac tggaaactct	1260
tctcacgett ctcacctttt gagatctggt gctcttgett tcttttccac tgetccttat	1320
gctccaccac cacaagatgc tgcagatgca gcagctactg ctctctatcc atcttttca	1380
actgaggctg ctaggacttt ctctctgcti catggattgg ctgttagatc tgtggctatt	1440
agagttgcag atgctgcaga ggccttccat acttctgttg ctgggtggctg tagaccagct	1500
tttgcctcag ctgactttgg atctggattt ggacttgcct aggttgagct ttaccggtgat	1560
gltgttctta galtcgtgic taccacagal ggtgatgalt tccallcti tccaggattc	1620
gagggtgtta gtagaccagg tgcctatggat tatggactca ctaggttcga tcccttctg	1680
ggaaatgttc cagaatggc tccagttgct gcttacaiga agggattcac tggatttcat	1740
gagttcctg agttcacctg tggagatgtt ggaactgctg agtctggact taactctgtt	1800
gtgcttctca acaactctga ggcgttctt ttgccactta atgagccagt tccagccact	1860
aagagaagat ctacagatca gacttacctc gallaccalg gtagaccagg tglccaacat	1920
attgctcttg ctctcatctg tgtgcttagg actcttagag agatgagagc tagatctgct	1980
atgggaggat ttgagtttat gagaccacca caagctaagt attacgaagg tgttagaagg	2040
gaggctggtg atgttcttct tggagctcaa atcaaagagt gccaaagact tggagttatg	2100
gtggatagag atgatcaggg tgtgcttctc cagattttca ctaagccagt tggagatagg	2160
ccaacattct tcttggagat gattcagagg atcggctgca tggaaaagga tgagattgga	2220
caagagtacc aaaagggcgg atgtgggtga ttggaaaagg gaaatttctc cgagcttttc	2280
aagtccatcg aggattacga gaagtctctt gaggttaagc aatctgctgt tgetcaacag	2340
tcttgagagc tcttcatatg acgatcgttc aaacatttgg caataaagtt tcttaagatt	2400
gaatcctgtt gccggctctg cgaigattat catataattt ctggtgaatt acgttaagca	2460
tgtataaatt aacatgtaat gcatgacgtt atttatgaga tgggttttta tgattagagt	2520
cccgaatta tacatttaat acgcgataga aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa	2580
attatcgcgc gcgggtctat ctaigtact agatcgcgga ccgaagcttg catgcctgca	2640
ggtcactctt agaggatctg ggaccacgtc aaagattcaa atagaggacc taacagaact	2700
gcgcgtaaag actggcgaac agttcataca gacttcttta cgactcaatg acaagaagaa	2760

[0083]

aatcttcgtc aacatgggtg agcaccgacac gcttgtctac tccaaaaata tcaaaagatac	2820
agcttcagaa gaccaaaggc caattgagac ttttcaacaa agggtaatat ccggaaacct	2880
cctcggattc cattgccagc ctaictgtca ctttattgtg aagatagtgg aaaagggaagg	2940
tggctcctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggcc atcgttgaag atgcctctgc	3000
cgacagtggc cccaaagatg gacccccacc caccaggagc atcgtggaaa aagaagacgt	3060
tccaaccacg tcttcaangc aagtgattg atgtgatatc tccactgacg taagggatga	3120
cgcacaatcc cactatcctt cgcaagacc ctcctctata taaggaagt catttcattt	3180
ggagaggaca cgctgaaatc actagtccac catgtctccg gagaggagac cagttgagat	3240
taggccagct acagcagctg atatggccgc ggtttgtgat atcgttaacc attacattga	3300
gacgtctaca gigaacttta ggacagagcc acaaacacca caagatgga ttgatgatct	3360
agagaggttg caagatagat acccttgggt ggttgcctgag gttgagggtg ttgtggctgg	3420
tattgcttac gctgggacct ggaaggctag gaacgcttac gattggacag ttgagagtac	3480
tgtttacgtg tcacatagge atcaaaaggt gggcctagga tccacattgt acacacattt	3540
gcttaagtct atggaggcgc aaggttttaa gtctgtggtt gctgttatag gccttccaaa	3600
cgatccatct gttaggttgc atgaggcttt gggatcacaca gcccgggta cattgcgcgc	3660
agctggatac aagcatggtg gatggcatga tgttggtttt tggcaaaggg attttgagtt	3720
gccagctcct ccaaggccag ttaggccagl taccagalc tgaactagtg atatcggcgc	3780
catgggtcga cctgcagatc gtccaacat ttggcaataa agtttcttaa gattgaaatc	3840
tgttgcgggt cttgcgatga ttaicatata atttctgttg aattacgta agcatgtaat	3900
aattaacatg taatgatga cgttatttat gagatgggtt tttatgatta gagtcccgca	3960
attatacatc taatacgcga tagaaaacaa aatatagcgc gcaactagg ataaattatc	4020
gcgcgcggig tcalclalgl taciagatcc ggaccagct gcttggggg accagacaaa	4080
aaaggaatgg tgcagaattg ttaggcgcac ctacaaaag catctttgcc tttattgcaa	4140
agataaagca gattcctcta gtacaagtgg ggaacaaaat aacgtggaaa agagctgtcc	4200
tgcagacca ctcactaatg cgtatgacga acgcagtgc gaccacaaa ctcgagactt	4260
ttcaacaaag ggtaatatcc ggaacctcc tcggattcca ttgccagct atctgtcact	4320
ttattgtgaa gatagtggaa aaggaaaggt gctcctacaa atgccatcat tgcgataaag	4380
gaaaggctat cgttgaagat gccctgcgc acagtggtec caaagatgga cccccacca	4440
cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccagtc tcaaaagcaa gtggattgat	4500
gtgatatct cactgacgta agggatgacg aacaatccca ctatccttct gccggacct	4560
catgagcggg gaattaaggg agtcacgta tgacccccgc cgtgacgcg ggacaagccg	4620
ttttacgttt ggaactgaca gaaccgcaac gaagcittgg cagacaaagt ggcagacata	4680
ctgtcccaca aatgaagatg gaaictgtaa aagaaaacgc gtgaaataat gcgtctgaca	4740
aaggttaggt cggctgcctt taatcaatac caaagtggtc cctaccacga tggaaaaact	4800
gtgcagtcgg tttggctttt tctgacgaac aaataagatt cgtggccgac aggtgggggt	4860
ccaccatgtg aaggcatctt cagactccaa taatggagca atgacgtaag ggcttacgaa	4920

[0084]

ataagtaagg gtagtttggg aaaigtccac tcaccctca gtcataaat acttagcccc	4980
tccctcattg ttaagggagc aaaatctcag agagatagtc ctagagagag aaagagagca	5040
agtagcctag aagtggatcc caccatgtct ccggagagga gaccagtga gattaggcca	5100
gctacagcag ctgatatggc cgcggttgi gatatcgta accattacat tgagacgtct	5160
acagtgaact ttaggcaga gccacaaaca ccacaagagt ggattgatga tctagagagg	5220
ttgcaagata gatacccttg gttggttgct gaggttgagg gtgttggc tggatttgc	5280
tacgctgggc cctggaaggc taggaacgct tacgattgga cagttgagag tactgtttac	5340
ggttcacata ggcatcaaag gttggccta ggatctacat tgtacacaca tttgcttaag	5400
tctatggagg cgcaaggttt taagtctgtg gttgctgta taggccttcc aaacgatcca	5460
tctgttaggt tgcattaggc ttgggatac acagcccggtg gtacattgct cgcagctgga	5520
tacaagcatg gtggatggca tgaigtgtgt ttttgcaaa gggattttga gttgccagct	5580
cctccaaggc cagttaggcc agtiaccagc atatgagtcg agctctagat ccccgaaatt	5640
ccccgatcgt tcaaacattt ggcaataaag tttcttaaga ttgaatcctg ttgccggtct	5700
tgcgatgatt atcatataat tctgttgaa ttacgitaag catgtaataa ttaacatgta	5760
atgcatgacg ttattttaag gatgggtttt tatgattaga gtcccgcaat talacattta	5820
atacgcgata gaaaacaaaa tatagcgcgc aaactaggat aaattatcgc gcgcggtgtc	5880
alcctatgta ctagalcggg aalgggiac calgccccgg cggccagcat ggcctgacc	5940
gcaatgtgtt attaagttgt ctaagcgtca atttgtttac accacaatat atcctgccac	6000
cagccagcca acagctcccc gaccggcagc tcggcacaaa atcaccactc gatacaggca	6060
gccccacaga attaatctc atgtttgaca gcttatcctc gactgcacgg tgcaccaatg	6120
cttctggcgt caggcagcca tcggaagctg tggatggct gtgcaggtcg taaatcactg	6180
calaalcgt gtcgclcaag gcgcaccccc gttctggala atgtttttg cgcgcacatc	6240
ataacggttc tggcaaatat tctgaaatga gctgttgaca attaatcctc cggctcgtat	6300
aatgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagaccat gagggaagcg	6360
ttgatgcctg aagatcgcac tcaactatca gaggtagttg cgtcatcga gcgccatctc	6420
gaaccgactg tgcctggcgt acatttgtac ggctccgcag tggatggcgg cctgaagcca	6480
cacagtgata ttgatttgcg ggttacggtg accgtaaggc ttgatgaaac aacggcgcca	6540
gctttgatea acgacctttt ggaaccttcg gcttccccg gagagagega gattctccgc	6600
gctgtagaag tcaccattgt tgtgcacgac gacatcattc cgtggcgtta tccagctaa	6660
cgcgaactgc aatttggaga atggcagcgc aatgacattc ttgcaggtat cttcgagcca	6720
gccacgatcg acattgatct ggctatcttg ctgacaaaag caagagaaca tagcgttggc	6780
ttggtaggct cagcggcgga ggaactctt gatccggttc ctgaacagga tctatttgg	6840
gcgctaaatg aaaccttaac gctatggaac tcgcccccc actgggctgg cgatgagcga	6900
aatgtagtgc ttacgttgc ccgatttgg tacagcgcag taaccggcaa aatcgcccg	6960
aaggatgtcg ctgcgactg ggcaatggag cgcctgccgg cccagatca gccgctcata	7020
cttgaagcta ggcaggctta tcttggcaaa gaagatcgtc tggcctcgcg cgcagatcag	7080

[0085]

ttggaagaat ttgttcaacta cgtgaaagcc gagatcacca aagtagtcgg caaataaagc	7140
tctagtggat ctccgtaccc ggggatctgg ctccggcggc acgcacgacg ccggggcgag	7200
accataggcg atctcctaaa tcaatagtag ctgtaacctc gaagcgtttc acttgtaaca	7260
acgattgaga atttttgca taaaattgaa atacttgggt cgcatTTTTg tcatccgcgg	7320
tcagccgcaa ttctgacgaa ctgcccattt agctggagat gattgtacat ccttcacgtg	7380
aaaatttctc aagcgtgtg aacaagggtt cagattttag attgaaaggc gagccgttga	7440
aacacgttct tcttgtcgat gacgacgtcg ctatgcggca tcttattatt gaatacctta	7500
cgatccacgc ctccaagtg accgcgtag ccgacgac ccagttcaca agagtactct	7560
cttccgcgac ggtcgtgtc gtggttgtg atctagattt aggtcgtgaa gatgggctcg	7620
agatcgttcg taacttggcg gcaaagtctg atattccaat cataattatc agtggcgacc	7680
gccttgagga gacggataaa gtgtttgac tcgagctagg agcaagtgat tttatcgcta	7740
agccgttcag taccagagag ttctagcac gcattcgggt tgccttgcgc gtgcgcccc	7800
acgttgtccg ctccaaagac cgaaggcttt ttgttttac tgactggaca cttaatctca	7860
ggcaacgtcg ctgatgtcc gaagctggcg gtgagtgaa acttacggca ggtgagtca	7920
atcttctect cgcgttttta gagaaacccc gcgacgttct atcgcgcgag caacttctca	7980
ttgccagtcg agtacgcgac gaggagggtt atgacaggag tatagatgtt ctcatTTTga	8040
ggctgcgccc caaacctgag gcagatccgl caagccccca actgataaaa acagcaagag	8100
gtgccggtta tttctttgac gcggacgtgc aggtttcgca cggggggacg atggcagcct	8160
gagccaattc ccagatcccc gaggaatcgg cgtgagcggc cgcaaacctt ccggcccggc	8220
acaaatcggc gcggcgcctg gtgatgacct ggtggagaag ttgaaggccg cgcaggccgc	8280
ccagcggcaa cgcacgagg cagaagcac ccccggtgaa tcgtggcaag cggccgctga	8340
tcgaalccgc aaagaalccc ggcaaccgcc ggcagccggt gcgcccgcga ttaggaagcc	8400
gccccaggcc gacgagcaac cagattttt cgttccgatg ctctatgacg tgggcacccc	8460
cgatagtcgc agcatcatgg acgiggccgt tttccgtctg tcgaagcgtg accgacgagc	8520
tggcgaggtg atccgctacg agcttcaga cgggcacgta gaggtttccg caggccggc	8580
cggcatggcc agtgtgtggg attacgacct ggtactgatg gcggtttccc atctaaccga	8640
atccatgaac cgataccggg aagggaaggg agacaagccc ggcccgctgt tccgtccaca	8700
cgttgcggac gtactcaagt tctgccggcg agccgatggc ggaaagcaga aagacgacct	8760
ggtagaacc tgcatcgggt taaacaccac gcacgttgc atgcagcgtc cgaagaaggc	8820
caagaacggc cgcctgggtg cgglatccga ggggtgaagcc ttgattagcc gctacaagat	8880
cgtaaagagc gaaaccgggc ggccggagta catcgagatc gagctagctg attggatgta	8940
ccgcgagatc acagaaggca agaaccggga cgtgctgacg gttcaccgcg attactttt	9000
gatcgatccc ggcatcggcc gttttctcta ccgctggca cggcgcgccc caggcaaggc	9060
agaagccaga tggttgttca agacgatcta cgaacgcagt ggacgcgccc gagagtcaa	9120
gaagtctgt ttcaccgtgc gcaagctgat cgggtcaaat gacctgccgg agtacgattt	9180
gaaggaggag gcggggcagg ctggcccgat cctagtcatg cgctaccgca acctgatcga	9240

[0086]

```

gggcgaagca tccgccggtt cctaatgtac ggagcagatg ctagggcaaa ttgccctagc 9300
aggggaaaaa ggtcgaaaaa gtctctttcc tgtggatagc acgtacattg ggaacccaaa 9360
gccgtacatt gggaaccgga acccgtacat tgggaaccca aagccgtaca ttgggaaccg 9420
gtcacacatg taagtgactg atataaaga gaaaaaaggc gatTTTTccg cctaaaactc 9480
TTTTAAactt attaaaactc ttaaaaccg cctggcctgt gcataactgt ctggccagcg 9540
cacagccgaa gagctgcaaa aagcgcctac ccttcggctg ctgcgctccc tacgccccgc 9600
cgcttcgctg cggcctatcg cggccgctgg ccgctcaaaa atggctggcc tacggccagg 9660
caatctacca gggcgccgac aagccgcgcc gtgccactc gaccgcccgc gctgaggtct 9720
gcctctgtaa gaagtggtg ctgactcata ccaggcctga atcggcccat catccagcca 9780
gaaagtgagg gagccacggt tgaigagagc tttgtttag gttgaccagt ttgtgatttt 9840
gaacttttgc ttgccacgg aacggctcgc gttgtcggga agatgcgtga tctgatcctt 9900
caactcagaa aaagtccgat ttatcaaca aagccgcctt cccgtcaagt cagcgtaatg 9960
ctctgccagt gttacaacca attaaccaat tctgattaga aaaactcacc gagcatcaaa 10020
tgaaactgca atttattcat atcaggatta tcaataccat atttttgaaa aagccgtttc 10080
tgtaatgaag gagaaaaact accgaggcag tccatagga tggcaagatc ctggtatcgg 10140
tctgcgattc cgactcgtcc aacatcaata caacctatta atttcccctc gtcaaaaaata 10200
aggllalcaa glgagaaac accatgagtg acgactgaat ccggtgagaa tggcaaaaagc 10260
tctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg ggcgctcttc 10320
cgcttccctc ctactgact cgcctgcctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc 10380
tcactcaaag gcggtlaaac ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat 10440
gtgagcaaaa gcccagcaaa agccagga ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt 10500
ccataggctc cggccccctg acgagcatca caaaaatcga cgcctcaagtc agagggtggcg 10560
aaaccggaca ggactataaa gataccaggc gtttcccctt ggaagctccc tegtgcctc 10620
tcctgttccg accctgcgcg ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt 10680
ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gttgaggtcg ttcgctccaa 10740
gctgggctgt gtgcacgaac cccccgtta gcccgaccgc tgcgccttat ccgtaacta 10800
tcgtcttgag tccaaccgg taagacacga ctatcgcca ctggcagcag ccactggtaa 10860
caggattagc agagcagagt atgtagcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa 10920
ctacggctac actagaagaa cagtatttg tatctgcct ctgctgaagc cagtaccctt 10980
cggaaaaaga gttgtagct ctgatccgg caaacaacc accgctgta gcggtggttt 11040
TTTTgttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag atcctttgat 11100
cttttctac gggctcagc ctcagtggaa cgaaaactca cgttaaggga ttttggctat 11160
gagattatca aaaaggatct tcacctagat ccttttgatc cggaatta 11208

```

```

<210> 53
<211> 1320
<212> DNA
<213> 燕麦(Avena sativa)

```

[0087]

<400> 53
 atgccaccaa ctccagctac tgciactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat 60
 gctgctagat cttllccaag gglilgaga gllaaccaa ggctlgatag gllcccagtl 120
 cttttttcc accacgttga actttgggt gctgatgcag cttctgctgc tggaaagatt 180
 tcttttgcct ttggctgctc acttgcctgt aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct 240
 caagcttctt tgcctttgag gtciggtgct ctgctttcc tttttactgc tctttatgct 300
 ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta tccatcttt ttcagctgat 360
 gctgcaagga cttttgcctc tgcicattga ctgctgtta gatctgttgg agtttagatt 420
 gctgatgcag ctgaggtctt cagagtttct gttgctggig gctgtagacc agcttttgc 480
 ccagctgata ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgaattgttt 540
 ctctgttctg tgtcttacc agaagagact gatcttccat tcttccagg attttagagg 600
 gtttcatctc caggtgctgt tgattatgga ctactaggt tcatcacgt tgtgggaaat 660
 gtccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaaggat tctttggatt ccatgagttc 720
 gctgagttta ctgctgagga tgttggaaat actgagctc gacttaactc tgttgtgctt 780
 gctaacaact ctgaggtctt tctttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga 840
 agatctcaga ttcagactta cctttagtac catggtggac caggtgttca acatattgct 900
 ctgcttcta acgatgtgct taggactctt agagagatga gagctagaac tccaatggga 960
 ggattttagt ttatggctcc accacaagct aagtattacg aggtgtttag aaggattgct 1020
 ggtgatgttc tttccgagga acagatcaaa gagtgcgaag agcttggagt tctctggtat 1080
 agagatgata aggtgtgct tctccagat ttcactaac cagltggaga taggccaaca 1140
 tttttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcattgaaa aggatgaagt tggacaagag 1200
 taccaaaagg gcggatgttg tggatttga aagggaatt tctccgagct tttcaagtc 1260
 atcgaggatt acgagaagtc tctttaggtt aagcagctc tttgtgctca gaagtcttga 1320

<210> 54
 <211> 1326
 <212> DNA
 <213> *Alopecurus myosuroides*

<400> 54
 atgcctccga ccaccgcaac cgcaaccggt gctgcagcag cagccgttac accggaacat 60
 gcagcacgtc gttttccgct tgttgttctt gtaatccgc gttagcgtcg ttttccggtt 120
 ctggcatttc atcatgttga attttgggt gccgatgcag caagcgcagc aggtcgtttt 180
 agctttgcac tgggtgcacc gctggcagca cgttagcgtc tgagcaccgg taatagcagc 240
 catgcaagcc atctgctgct tagtgggtca ctggcatttc tgtttaccgc accgatgca 300
 ccgctccgc aggatgcagc agatgcagcc gctaccgcca gcattccgag ctttagcacc 360
 gaagcagcac gtacctttag cagcgcacat ggtctggcag ttcgttagct tgcaattcgt 420
 gttgcagatg ccgcagaagc atticatacc agcgttgcgg gttgtgcag tccggcattt 480
 gcaccggcag atctgggttag cggttttgtt ctggccgaag ttgaactgta tggatgatt 540
 gttctgctt ttgttagtca tccggatgtt gatgatgttc cgtttctgcc ggtttttgaa 600

[0088]

gggttagcc gtcgggtgc aatggattat ggctgaccc gttttgatca tgttgttgg	660
aatgttcccg aaatggcacc ggttgcagca tataatgaaag gttttaccgg ctttcatgaa	720
tttgcgaat ttaccgcaga agatgttggc accgcagaaa gcggctgaa tagcgttgtt	780
ctggcaata atagcgaagc agttctgctg ccgctgaatg aaccggigca tggcaccaaa	840
cgctgagcc agattcagac ctatctggat talcatggig gtcgggtgt tcagcatall	900
gcactggcaa gcagtgatgt tctgcgtacc ctgcgtgaaa tgcgtgcacg tagcgcgatg	960
gggtgtttt aatttatggc accgccgag gcaaaatatt atgaagggtg tgcgtctctg	1020
gctggtagt tctgagcga agcacagall aaagaatgic aggaactggg cgttctggll	1080
gatcgtgatg atcagggtgt tctgctgagc atttttacca aaccggittg tgatcgtctg	1140
ccgaccttt tctggaat gattcagcgt attggctgca tggaaaaaga tgaattggc	1200
caggaaatc agaaaggcgg ctgtggggg tllgglaaag glaalltag cgaactgtll	1260
aaaagcattg aagattatga aaaagcctg gaagccaac agagcgcagt tgcacagcag	1320
agctaa	1326
<210> 55	
<211> 1323	
<212> DNA	
<213> Alopecurus myosuroides	
<400> 55	
atgccaccaa ctactgctac tgcctacaggc gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60
gctgctagaa ggttcccaag agttgttaga gttaacccaa ggtctgatag gttccagtt	120
cttgccttcc atcaatgga gttttgggtg gctgatgctg cttctgctgc tggaaagattt	180
tcctttgctc ttggctccc acttgcctct agatctgatt tgcctactgg aaactcttct	240
cacgcttctc accttttgag atctggctct cttgccttcc ttctactgct tccattatgt	300
ccaccaccac aagatgctgc agatgcagca gctactgctt ctattccatc tttttcaact	360
gaggctgcta ggactttctc ttctgctcat ggattggctg ttgatctgtt ggcattatga	420
gttgcagatg ctgcagagcc ttccatact tctgttgcct gttgtgctag accagctttt	480
gctccagctg atcttggatc tggatttggc cttgctgagg ttgagcttta cggctgatgtt	540
gttcttagat tctgtctca cccagatggt gatgatgttc catttcttcc aggattcgag	600
gggttagta gaccaggctc tatggattat ggactcacta ggttcgatca cgttgtggga	660
aatgttccag aaatggctcc agttgctgct tacatgaagg gattcactgg atttcatgag	720
ttcgtgagt tcactgctga ggaatgttga actgctgagt ctggacttaa cctgttgtg	780
cttgcataca actctgagcc tgttcttttg ccacttaatg agccagttca cggcactaag	840
agaagatctc agattcagac ttacctgat taccatggig gaccaggigt tcaacatatt	900
gctcttgcct catctgatgt gcttaggact cttagagaga tgagagctag atctgctatg	960
ggaggatttg agtttatggc tccaccacaa gctaaagtatt acgaaggigt tagaaggctt	1020
gctggtagat tcttttctga ggtcaaatc aaagatgccc aagagcttgg agttcttctg	1080
gatagagatg atcagggtgt gcttctccag attttcaact agccagttgg agataggcca	1140
acattcttct tggagatgat tcaagagatc ggctgcatgg aaaaggatga gattggacaa	1200

[0089]

gagtacccaaa agggcggatg tggtaggatt ggaaaaggaa atttctccga gcttttcaag	1260
tccatcgagg attacgagaa gtctcttgag gctaagcaat ctgctgttgc tcaacagtct	1320
tga	1323
<210> 56	
<211> 1323	
<212> DNA	
<213> 假高粱 (Sorghum halepense)	
<400> 56	
atgccctccga ccccgaccac cgcagcagca acaggtagcc cagttgcagc agcaagcgc	60
gaacagcagc catttcgtct ggttaggcat cgtaatcttg ttcgtgttaa tcccgctagc	120
gatcgttttc ataccctggc atttcatcat gttgaactgt ggtgtgccga tgcagccagc	180
gcagcaggic gttttagctt tggctcgggt gcaccctggc cagcacglag cgalctgagc	240
accggtaata ccgcacatgc aagcctgctg ctgcgttcag gtgcactggc atttctgttt	300
accgcaccgt atgcccattg tgcctgatga gcaaccgcaa gcctgccgag ctttagcgc	360
gcagaagcac gtcgttttgc agcagatcat ggtctggcag ttcgtgccgt tgcactgcgt	420
gttgcatatg ccgaagatgc atttcgtgca agcgttgca cgggtgcaag tccggcattt	480
gaaccggttg aactgggtct gggtttctgt ctggccgaag ttgaactgta tggtagtatt	540
gttctgcgtt atgllagcta tccgtagat gcagatgcaa gcttctgcc ggglltltt	600
ggtgttagca gtccgggtgc ggcagattat ggcttgcgtc gttttgatca tattgtgggt	660
aatgttccgg aactggcacc ggcagcggca tattttgcag gttttaccgg ctttcatgaa	720
tttgagaat ttaccgcaga agatgttggc accaccgaaa gcggtctgaa tagcatggtt	780
ctggcaata atgccgaaa tgttctgctg ccgctgaatg aaccggtgca tggcaccaaa	840
ctccttagcc agattcagac ctttctggat catcatggig gtccgggtgt tcagcacatg	900
gcactggcaa gtgatgatgt gctgcgtacc ctgcgtgaaa tgcaggcatg tagtgcaatg	960
ggtggttttg aatttatggc acccccgca ccggaatatt atgatggigt tctctctcgt	1020
gccggtagat ttctgaccga agcacagatt aaagaatgic aggaactggg cgttctggtt	1080
gatcgtgatg atcagggtgt tctgctgcag atttttacca aaccggttgg tgatcgcacc	1140
accttttttc tggaaattat tcagcgtatt gtttgcatgg aaaaagatga aaaaggccag	1200
gaatatcaga aaggcgggtg tggtaggttt ggtaaaggta attttagcca gctgtttaa	1260
agcaligaag attatgaaaa aagcctggaa gcaaacagg cagctgcagc acagggtccg	1320
taa	1323
<210> 57	
<211> 1323	
<212> DNA	
<213> 假高粱 (Sorghum halepense)	
<400> 57	
atgccctccga ccccgaccac cgcagcagca acaggtagcc cagttgcagc agcaagcgc	60
gaacagcagc catttcgtct ggttaggcat cgtaatcttg ttcgtgttaa tcccgctagc	120
gatcgttttc ataccctggc atttcatcat gttgaactgt ggtgtgccga tgcagccagc	180

[0090]

gcagcaggtc gttttagctt tggctcgggt gcaccgctgg cagcacgtag cgaictgagc 240
accggttaata ccgcacatgc aagcctcgtg ctgcgttcag gtgcactggc atttctgttt 300
accgcaccgt atgcccattg tgcctgatca gcaaccgcaa gcctgccgag ctttagcgca 360
gcagaagcac gtcgttttgc agcagatcat ggtctggcag ttcgtgccgt tgcactgcgt 420
gttgcatatg ccgaagatgc atttctgca agcgttgca cgggtgcacg tccggcattt 480
gaaccggtg aactgggtct gggttttcgt ctggccgaag ttgaactgta tggtagatgt 540
gttctgcttt atgttagcta tccggatgat gcagatgcaa gctttctgcc gggttttgtt 600
gggtttacca gtcgggtgc ggcagattat ggctgaaac gttttgatca tatttggtgt 660
aatgttccgg aactggcacc ggcagcggca tattttgcag gttttaccgg ctttcatgaa 720
tttgcagaal ttaccgcaga agaigtggc accaccgaaa gcggtctgaa tagcatggtt 780
ctggcaata atgcccgaaa tttctcgtg ccgctgaaig aaccggtgca tggcaccaaa 840
cgtcgtagcc agattcagac ctttctggat catcatggig ttcgggtgt tcagcacatg 900
gcactggcaa gtgatgatgt gctgcgtacc ctgcgtgaaa tgcaggcacg tagtgaatg 960
gggtgtttg aatttaaggc accgccggca ccggaataat atgatgggt tgcctcgtct 1020
gccggtgatg ttctgaccga agcacagatt aaagaatgic aggaactggg cgttctggtt 1080
gatcgtgatg atcagggtgt tctgctgcag atttttacca aaccggttgg tgatgcccc 1140
acctttttc tggaaattat tcagcgtatt ggttgcatgg aaaaagatga aaaaggccag 1200
gaatatacga aaggcgggtg tgggtgtttt ggtaaaggta attttagcca gctgittaaa 1260
agcattgaag attatgaaaa aagcctggaa gcaaacagg cagctgcagc acagggtccg 1320
taa 1323

<210> 58
<211> 1311
<212> DNA
<213> 早熟禾 (*Poa annua*)

<400> 58
atgcctccga ccaccgcaac cgccaccgca gcagcaaccg ttacaccgga acatgcagca 60
cgtcgttttc cgcgtgtgt tctgtttaat ccgcgtagcg atcgttttcc ggttctgagc 120
tttcatcatg ttgaattttg gigtgccgat gcagcaagcg cagcaggtcg ttttagcttt 180
gcactgggtg caccgctggc agcacgtagc gatctgagca ccgtaatag cgcacatgca 240
agcctgtctg tgcgttcagg tgcactggca tttctgttta ccgcaccgta tgcaccgcag 300
ccgcaggatg cagataccgc aagcattccg agcttttagc cagatgcagc acgtgcattt 360
agccagcac atggtctggc agttcgtagc gtgcagttc gtgttgaga tgcgccagat 420
gcatttcgtg caagcattgc agccgggtgca cgtccggcat ttgcaccggc agatctgggt 480
cgtggttttg gctcggccga agttgaactg tatggtgatg ttgttctgct tttgtttagc 540
catccggatg cagatgatgc accgccgttt ctgccgggt ttgaagcagt tagccgtcgt 600
ccgggtgccg ttgattatgg tctgaccctt ttgatcatg ttgttggtaa tgttccggaa 660
atgggtccgg tgattgatta tattaaaggc tttatgggct ttcattgaatt tgcgaattt 720

[0091]

accgcagaag atgttggcac caccgaaagc ggictgaata gcgttgttct ggcaataat	780
agcgaagcag ttctgtgcc gctgaatgaa ccggtgcatg gcacaaaacg tcgtagccag	840
attcagacct atctggaata tcatggigtg ccgggtgttc agcatattgc actggcaagc	900
agtgatgttc tgcgtaccct gcgtgaaatg caggcacggt cagcaatggg tggttttgaa	960
lllalggcac cggcgcagcc gaaalalial gaagggtgtc glcglaligc cggigtatgt	1020
ctgagcgaag cacagaltaa agaatgtcag gaactgggag ttcgtgttga tcgtgatgat	1080
cagggtgttc tgetgcagat tttaccaaa ccggttggig atcgtccgac cttttttctg	1140
gaaatgattc agcgtattgg ctgcatgaa aaagatgaac gtggtcagga atatcagaaa	1200
ggcggttgtg gcggttttgg taaaggtaat tttagcgaac tgtttaaaag cattgaagat	1260
lalgaaaaa gccctggaagc caaacagagc gcagltgcac agcagagcta a	1311
<210> 59	
<211> 1305	
<212> DNA	
<213> 早熟禾(Poa annua)	
<400> 59	
atgccaccaa ctactgtcac tgetacagct gctgtctacg ttaactcaga acatgtctgt	60
agaaggttcc caagagttgt tagagttaac ccaaggctcg ataggttccc agttctttct	120
ttccaccacg ttgaattttg gtgtgtctgat gctgtcttcg ctgctggaag attttctttt	180
gctcttgggt cttccactgc tgettagatc gatttgtcta ctggaattc tgetcagct	240
tctttgcttt tgaggcttgg tgetcttget ttccttttta ctgetctta tgetccaca	300
ccacaggatg ctgatactgc atcaattcca tctttctcag ctgatgttgc aagggtttt	360
tctgtctctc atggattggc ttttagatc gtgtctgtta gatttctga tgcagctgat	420
gctttcagag cttctattgc tgcagggtct agaccagctt ttgctccagc tgaacttga	480
agaggatttg gacttctga ggttagctt tacggtagt ttgttcttag attcgtgtct	540
caccagatg ctgatgatc tccatttctt ccaggatttg aggtgtttc tagaccaggt	600
gctgttgatt atggactcac taggttcgat cacgttgttg gaaatgttcc agaaatggga	660
ccagtgatcg attacatcaa gggattcatg ggattccaag agttcgtga gtttactgct	720
gaggatgttg gaactactga gtctggactt aactctgttg tctttgctaa caactctgag	780
gctgttcttt tgcacttaa tgagccagtt cacggcacta agagaagatc tcagattcag	840
acttaccttg agtaccatgg tggaccaggt gttaacata ttgetcttgc ttcattctgat	900
gtgcttagga ctcttagaga gatgcaagct agatctgcta tgggaggatt tgagittatg	960
gctccaccac aacctaaagta ttacgagggt gttagaagga ttgctgttga tgttctttcc	1020
gaggctcaaa tcaagagtg tcaagagctt ggagtgcttg tggatagaga tgaicagggt	1080
gtgcttctcc agattttcac taagccagtt ggagatagc caacattctt cttggagatg	1140
attcagagga tccgctgcat ggaaaaggat gagagaggic aagagtatca aaaggcggga	1200
tgtgggtgat ttggaaggg aaatttctcc gagcttttca agtccatcga ggattacgag	1260
aagtctcttg aggctaagca atctgctgtt gctcaacagt ctgga	1305

[0092]

<210> 60
 <211> 1323
 <212> DNA
 <213> 何首乌 (*Lolium multiflorum*)

<400> 60
 atgcctccga caccggcaac cgcaaccggt gctgcagcag cagcagttac accggaacat 60
 gcagcacgla gcttcccgcg tgttgllcgt gllaalccgc glagcgalcg ttttccggll 120
 ctgagcttcc atcatgttga actgtgggtg gccgatgcag caagcgcagc aggtcgtttt 180
 agctttgcac tgggtgctcc gctggcagcc cgtagcagtc ttagcaccgg taatagcgca 240
 catgcaagcc tctctctcgc tagcggcgca ctggcatttc tgltlaccgc accglatgca 300
 ccgctccgc aggaagcagc aaccgcagct gcaaccgcaa gcatlccgag ctttagcgca 360
 gatgcagccc gtacctttgc agcagcacat ggctggcag ttcgtagcgt tgggtgtcgt 420
 gttgccgatg cagcggaaag atttcgllgt agcglggccg glgglgcacg lccggcattl 480
 gcaccggcag atctgggtca tggttttggt ctggccgaag tgaactgta tggtagatgt 540
 gttctcgttt ttgttagcta tccggatgaa accgatctgc cgtttctgcc gggttttgaa 600
 cgtgttagca gtccgggtgc cgttgattat ggctgaccc gttttgatca tgttgttgg 660
 aatgttccgg aaatggcacc ggttatgat tatatgaaag gctttctggg ctttcatgaa 720
 ttgcagaat ttaccgcaga agatgttggc accaccgaaa gcggtctgaa tagcgttgtt 780
 ctggcaata atagcgaata tttctctcgc ccgctgaaag aaccggcgca tggcaccaaa 840
 cgtcgtagcc agattcagac ctatctggat tatcatggcg gtcgggtgt tcagcatatt 900
 gcactggcaa gcaccgatgt tctgcgtacc ctgcgtgaaa tgcgtgcacg taccccgatg 960
 ggtggttttg aatttatggc acccccgag gcaaaatatt atgaagggtg tctcgtatt 1020
 gccggtgatg tctgagcga agaacaatt aaagaatgac aggaactggg cgttctggtt 1080
 gatcgtgatg atcagggtgt tctgctcag atttttacca aaccggttgg tgatcgtccg 1140
 acctttttc tggaaatgat tcagcgtatt ggctgcatgg aaaaagatga agttggtcag 1200
 gaatacaga aaggcgttg tgggtgtttt ggtaaaggtt attttagcga actgtttaaa 1260
 agcattgaag attatgaaaa aacctggaa gccaaacaga gcgttgttgc acagaaaagc 1320
 taa 1323

<210> 61
 <211> 1320
 <212> DNA
 <213> 燕麦 (*Avena sativa*)

<400> 61
 atgccaccaa ctccagctac tgetactggt gctgctgcig cagctgttac tccagaacat 60
 gctgctagat cttttccaag ggttgggaga gttacccaa ggtctgatag gttccagtt 120
 ctttcttcc accacgttga actttgggtg gctgatgcag cttctgctgc tggaaagattt 180
 tcttttgcct tgggtgctcc acttgcctgt aggtctgatt tctctactgg aaattctgct 240
 cacgcttctt tctttttag gctgggtgct ctgtctttcc ttttactgct tctttatgct 300
 ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta tccatcttt ttagctgat 360
 gctgcaagga cttttgctgc tgetcatgga ctgtctgtta gatctgttgg agtttagatti 420

[0093]

gctgatgcag ctgaggcttt cagagtttct gttgctggig gtgctagacc agcttttgc	480
ccagctgac ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgatgttgtt	540
cttcgtttcg tgtcttacc agatgagact gatcttccat tccttccagg atttgagagg	600
gtttcatctc caggtgctgt tgattatgga ctactaggt tcatcacgt tgtgggaaat	660
gttccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaagggat tccttggatt ccatgagttc	720
gctgagttta ctgctgagga tgttggaaact actgagtctg gacttaactc tgttgtgctt	780
gctaacaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga	840
agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catgggtggac caggtgttca acatattgct	900
cttgccttcta acgatgtgct taggactctt agagagatga gagctagaac tccaatggga	960
ggatttgagt ttatggctcc accacaagct aagtattacg aggggtttag aaggattgct	1020
ggatgatgtc tttccgagga acagatcaaa gagtgtcaag agcttggagt tatggtggat	1080
agagatgac aggggtgtgt tctccagatt ttaactaagc cagttggaga taggccaaca	1140
ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcattgaaa aggatgaagt tggacaagag	1200
tacaaaagg gcgatgtgg tggatttga aagggaaat tctccgagct tttcaagtcc	1260
atcgaggatt acgagaagtc tcttgaggtt aagcagtctg ttgtggctca gaagcttga	1320
<210> 62	
<211> 1320	
<212> DNA	
<213> 燕麦 (<i>Avena sativa</i>)	
<400> 62	
atgccaccaa ctcagctac tgetactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60
gctgctagat cttttccaag gttgtgaga gttaaccaa ggtctgatag gttccagtt	120
ctttctttcc accacgttga actttgggtg gctgatgcag ctctctgctc tggaaagatt	180
tcttttgcct ttgggtctcc acttgcctgt aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct	240
cacgcttctt tgcctttgag gctcgggtgt ctgtctttcc tttttactgc tccttatgct	300
ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta ttccatcttt ttcagctgat	360
gctgcaagga cttttgctgc tgcctatgga ctgctgtta gatctgttgg agttagagtt	420
gctgatgcag ctgaggcttt cagagtttct gttgctggig gtgctagacc agcttttgc	480
ccagctgac ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgatgttgtt	540
cttcgtttcg tgtcttacc agatgagact gatcttccat tccttccagg atttgagagg	600
gtttcatctc caggtgctgt tgattatgga ctactaggt tcatcacat tgtgggaaat	660
gttccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaagggat tccttggatt ccatgagttc	720
gctgagttta ctgctgagga tgttggaaact actgagtctg gacttaactc tgttgtgctt	780
gctaacaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga	840
agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catgggtggac caggtgttca acatattgct	900
cttgccttcta acgatgtgct taggactctt agagagatga gagctagaac tccaatggga	960
ggatttgagt ttatggctcc accacaagct aagtattacg aggggtttag aaggattgct	1020

[0094]

ggigatgttc ttccgagga acagatcaaa gagtgcaag agcttggagt tctcgtggat 1080
 agagatgatic aggggtgtgct tctccagatt ttactaagc cagttggaga taggccaaca 1140
 ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcattgaaa aggatgaagt tggacaagag 1200
 taccaaaagg gcggatgtgg tggatttga aagggaatt tctccagct tttcaagtc 1260
 atcaggatt acgagaagtc tctttaggtt aagcagtcg ttgtggctca gaagtctga 1320

<210> 63
 <211> 1320
 <212> DNA
 <213> 燕麦(Avena sativa)

<400> 63
 atgccaccaa ctccagctac tgcactggg gctgctgctg cagctgttac tccagaacat 60
 gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gtaacccaa ggtctgatag gttccagtt 120
 ctttctttcc accacgttga acttgggtg gctgatgcag cttctgctgc tggaaagatt 180
 tcttttgcct ttggctgctc acttgcctg aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct 240
 caogettttt tgcctttgag gctgggtgct ctgctttcc ttttactgc tcttatgct 300
 ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta tccatcttt ttcagctgat 360
 gctgcaagga cttttgctgc tgcicattga ctgctgtta gatctgttgg agttagagtt 420
 gctgatgcag ctgaggcttt cagagttct gttgctgggt gtcctagacc agcttttgc 480
 ccagctgac ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgatgttgtt 540
 ctctgttctg tctcttacc agatgagact gatcttccat tcttccagg atttgagagg 600
 glltcaatc cagggtctgt tgallatgga ctactaggt legatcact tglgggaaal 660
 gttccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaaggat tcttggatt ccatgagttc 720
 gctgagttta ctgctgagga tgttggaaact actgagtcg gacttaactc tgttgtgctt 780
 gctaaact ctgaggctgt tcttttcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga 840
 agatctcaga ttcagactta cctttagtac catgtggac caggtgttca acatattgct 900
 ctgcttcta acgatgtgct taggactctt agagagatga gagctagaac tccaatggga 960
 ggatttgagt ttatggctcc accacaagct aagtattac aggggtttag aaggattgct 1020
 ggigatgttc ttccgagga acagatcaaa gagtgcaag agcttggagt tctcgtggat 1080
 agagatgatic aggggtgtgct tctccagatt ttactaagc cagttggaga taggccaaca 1140
 ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcattgaaa aggatgaagt tggacaagag 1200
 taccaaaagg gcggatgtgg tggatttga aagggaatt tctccagct tttcaagtc 1260
 atcaggatt acgagaagtc tctttaggtt aagcagtcg ttgtggctca gaagtctga 1320

<210> 64
 <211> 1320
 <212> DNA
 <213> 燕麦(Avena sativa)

<400> 64
 atgccaccaa ctccagctac tgcactggg gctgctgctg cagctgttac tccagaacat 60
 gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gtaacccaa ggtctgatag gttccagtt 120

[0095]

ctttcttcc accacgttga actttgggtg gctgatgcag cttctgctgc tggaaagatt	180
tcttttgctc tgggtgctcc acttgcctgc aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct	240
cacgcttctt tgcctttgag gcttgggtct cttgctttcc tttttactgc tctttatgct	300
ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta tccatcttt ttcagctgat	360
gctgcaagga cttttgctgc tgcctatgga cttgctgtta gatctgttgg agtttagatt	420
gctgatgcag ctgaggcttt cagagtttct gttgctgggt gtcctagacc agcttttgc	480
ccagctgac tggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgaatgtgtt	540
cttcgttctg tgccttacc agatgagact gatcttccat tcttccagg attttagagg	600
gtttcatctc cagggtctgt tgattatgga ctcaactaggt tcatcacgt tgtgggaaat	660
gttccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaagggat tctttggatt ccatgagttc	720
gctgagttta ctgctgagga tgttggaaat actgagctgc gacttaactc tgttgtctt	780
gctaacaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga	840
agatctcaga ttcagactta cctttagtac catggtggac cagggttca acatattgct	900
cttgcctcta acgatgtgct taggactctt agagagatga gagctagaac tccaatggga	960
ggatttgagt ttatgagacc accacaagct aagtattacg aggggttag aaggattgct	1020
gggatgttc tttccgagga acagatcaaa gagtgcaag agcttggagt tctcgtggat	1080
agagatgac aggggtgtct tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca	1140
ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcctgaaa aggatgaagt tggacaagag	1200
tacaaaagg gcggatgtgg tggatttga aagggaatt tctccagct tttcaagctc	1260
atcgaggatt acgagaagtc tctttaggtt aagcagctgc ttgtggctca gaagcttga	1320
<210> 65	
<211> 1320	
<212> DNA	
<213> 燕麦(Avena sativa)	
<400> 65	
atgccaccaa ctccagctac tgcctactgt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60
gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gtttaaccaa ggtctgatag gttccagtt	120
ctttcttcc accacgttga actttgggtg gctgatgcag cttctgctgc tggaaagatt	180
tcttttgctc tgggtgctcc acttgcctgc aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct	240
cacgcttctt tgcctttgag gcttgggtct cttgctttcc tttttactgc tctttatgct	300
ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta tccatcttt ttcagctgat	360
gctgcaagga cttttgctgc tgcctatgga cttgctgtta gatctgttgg agtttagatt	420
gctgatgcag ctgaggcttt cagagtttct gttgctgggt gtcctagacc agcttttgc	480
ccagctgac tggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgaatgtgtt	540
cttcgttctg tgccttacc agatgagact gatcttccat tcttccagg attttagagg	600
gtttcatctc cagggtctgt tgattatgga ctcaactaggt tcatcacgt tgtgggaaat	660
gttccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaagggat tctttggatt ccatgagttc	720
gctgagttta ctgctgagga tgttggaaat actgagctgc gacttaactc tgttgtctt	780

[0096]

gctaacaact ctgaggcigt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga	840
agatctcaga ttcagacitta ccttgagtac catggggac caggtgttca acatattgct	900
cttgcttcta acgatgtgct taggactcct agagagatga gagctagaac tccaatggga	960
ggatttgagt ttaigaagcc accacaagct aagtattacg aggggtttag aaggattgct	1020
gglgatgllc lltccgagga acagatcaaa gagtgcgaag agcctggagt tctcgtggat	1080
agagatgac aggggtgtgct tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca	1140
ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcattgaaa aggatgaagt tggacaagag	1200
tacaaaagg gcggatgtgg tggatttga aagggaatt tctccagct tttcaagtc	1260
atcaggatt acgagaagtc tcttgaggtt aagcagtcg ttgtggctca gaagtcttga	1320
<210> 66	
<211> 1320	
<212> DNA	
<213> 燕麦(Avena sativa)	
<400> 66	
atgccaccaa ctccagctac tgcctacggg gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60
gctgctagat cttttcaag ggttgtgaga gttaaccaa ggtctgatag gttccagtt	120
ctttcttcc accacgttga actttgggtg gctgatgcag cttctgctgc tggaaagatt	180
tctlltgcct lttgtctcc acttgcctgc aggtctgatt tgcctacgg aattctgct	240
cacgcttctt tgcctttgag gctgggtgct cttgctttcc tttttactgc tccctatgct	300
ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta tccatcttt ttcagctgat	360
gctgcaagga cttttgctgc tgcctatgga cttgctgtta gatctgttgg agtttagatt	420
gctgatgcag ctgaggcitt cagagtttct gttgctggig gtgctagacc agcttttgc	480
ccagctgac ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgatgttgtt	540
cttctttctg tgtcttacc agatgagact gatcttccat tcttccagg atttgagagg	600
gittcatctc cagggtctgt tgattatgga ctacttaggt tcatcacgt tgtgggaaat	660
gttccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaagggat tcttggatt ccatgagttc	720
gctgagttta ctgctgagga tgttggaaact actgagctcg gacttaactc tgttgtgctt	780
gctaacaact ctgaggcigt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga	840
agatctcaga ttcagacitta ccttgagtac catggggac caggtgttca acatattgct	900
cttgcttcta acgatgtgct taggactcct agagagatga gagctagaac tccaatggga	960
ggatttgagt ttaigtattcc accacaagct aagtattacg aggggtttag aaggattgct	1020
ggatgatgtc tttccgagga acagatcaaa gagtgcgaag agcctggagt tctcgtggat	1080
agagatgac aggggtgtgct tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca	1140
ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcattgaaa aggatgaagt tggacaagag	1200
tacaaaagg gcggatgtgg tggatttga aagggaatt tctccagct tttcaagtc	1260
atcaggatt acgagaagtc tcttgaggtt aagcagtcg ttgtggctca gaagtcttga	1320
<210> 67	

[0097]

<211> 1320
 <212> DNA
 <213> 燕麦(Avena sativa)

<400> 67
 atgccaccaa ctccagctac tgciactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat 60
 gctgctagat cttttccaag ggtigtgaga gttaacccaa ggtctgatag gttccagtt 120
 cttttcttcc accacgttga actttgggtg gctgatgcag cttctgctgc tggaaagatt 180
 tcttttgcct ttggtgctcc acttgcctct aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct 240
 cacgctctct tgcctttgag gtciggtgct ctgctcttcc tttttactgc tctttatgct 300
 ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta tccatcttt ttcagctgat 360
 gctgcaagga cttttgctgc tgcicatgga ctgctgtta gatctgttgg agtttagatt 420
 gctgatgcag ctgaggtctt cagagttctt gttgctggtg gtgctagacc agcttttgc 480
 ccagctgctc ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgatgttgtt 540
 cttcgttctg tgtcttacc agaagagact gatcttccat tcttccagg atttgagagg 600
 gtttcatctc caggtgctgt tgattatgga ctactaggt tcatcacgt tgtgggaaat 660
 gttccagaaa ttgctccagt gatcgattac atgaagggat tctttggatt ccatgagttc 720
 gctgagttta ctgctgagga tgttggaaat actgagctc gacttaactc tgttgtgctt 780
 gctaacaact ctgaggtctt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga 840
 agatctcaga ttcagactta cctttagtac catggaggac caggtgttca acatattgct 900
 ctgcttcta acgatgtgct taggactctt agagagatga gagctagaac tccaatggga 960
 ggattttagt llatggctcc accacaagct aaglatlac aggtgtttag aaggaggtc 1020
 ggtgatgttc tttccgagga acagatcaaa gagtgtcaag agcttggagt tctctggat 1080
 agagatgctc aggtgtgctt tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca 1140
 tttctcttgg agatgattca gaggatcggc tgcattgaaa aggatgaagt tggacaagag 1200
 taccaaaagg gcggatgttg tggatttga aagggaatt tctccgagct tttcaagctc 1260
 atcagagatt acgagaagtc tctttaggtt aagcagctct ttgtggctca gaagtcttga 1320

<210> 68
 <211> 1320
 <212> DNA
 <213> 燕麦(Avena sativa)

<400> 68
 atgccaccaa ctccagctac tgciactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat 60
 gctgctagat cttttccaag ggtigtgaga gttaacccaa ggtctgatag gttccagtt 120
 cttttcttcc accacgttga actttgggtg gctgatgcag cttctgctgc tggaaagatt 180
 tcttttgcct ttggtgctcc acttgcctct aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct 240
 cacgctctct tgcctttgag gtciggtgct ctgctcttcc tttttactgc tctttatgct 300
 ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta tccatcttt ttcagctgat 360
 gctgcaagga cttttgctgc tgcicatgga ctgctgtta gatctgttgg agtttagatt 420
 gctgatgcag ctgaggtctt cagagttctt gttgctggtg gtgctagacc agcttttgc 480

[0098]

ccagctgac tggacatgg atttggactt gctgaggttg agcittacgg tgaigtgtt 540
 cttegttctg tgccttacc agatgagact gatcttccat tccctccagg atttgagagg 600
 gtttcactc cagggtctgt tgattatgga ctcaactaggt tcatcacgt tgtgggaaat 660
 gtccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaagggat tccctggatt ccatgagttc 720
 gctgagltta ctgctgagga tgttggaaact actgagtcig gacttaactc tgttgtgtt 780
 gctaacaaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga 840
 agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catgggtggac cagggttca acatattgct 900
 ctgtcttcta acgaigtgt tggactctt agagagatga gagctagaac tccaatggga 960
 ggatttgagt ttatggctcc accacaagct aagtattacg aggggttag aagggtgct 1020
 ggtgatgttc tttccgagga acagatcaaa gagtgcaag agcttggagt tctcgtggt 1080
 agagatgac aggggtgtct tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca 1140
 ttctcttgg agatgattca gaggatcggc tgcattgaaa aggatgaagt tggacaagag 1200
 taccaaaagg gcggatgttg tggatttggg aagggaatt tctccagct tttcaagtcc 1260
 atcgaggatt acgagaagtc tcttgggtt aagcagtcig ttgtggctca gaagtcttga 1320

<210> 69
 <211> 1320
 <212> DNA
 <213> 燕麦(Avena sativa)

<400> 69
 atgccaccaa ctccagctac tgcctactgt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat 60
 gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gttaacccaa ggtctgatag gttccagtt 120
 ctctcttcc accacgttga actttgggtg gctgatgcag ctctctgctc tggaaagatt 180
 tcttttgctc ttgggtctcc acttgcctgt aggtctgatt tgcctactgg aaattctgct 240
 cacgcttctt tgcctttgag gtctgggtct ctgtcttcc ttttactgc tctttatgct 300
 ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta tccatcttt ttcagctgat 360
 gctgcaagga cttttgctgc tgcctatgga ctgtctgtta gatctgttgg agttagagtt 420
 gctgatgcag ctgaggcttt cagagtctt gttgctggtg gtgctagacc agcttttgc 480
 ccagctgac tggacatgg atttggactt gctgaggttg agcittacgg tgaigtgtt 540
 cttegttctg tgccttacc agatgagact gatcttccat tccctccagg atttgagagg 600
 gtttcactc cagggtctgt tgattatgga ctcaactaggt tcatcacgt tgtgggaaat 660
 gtccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaagggat tccctggatt ccatgagttc 720
 gctgagltta ctgctgagga tgttggaaact actgagtcig gacttaactc tgttgtgtt 780
 gctaacaaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga 840
 agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catgggtggac cagggttca acatattgct 900
 ctgtcttcta acgaigtgt tggactctt agagagatga gagctagaac tccaatggga 960
 ggatttgagt ttatggctcc accacaagct aagtattacg aggggttag aagggtgct 1020
 ggtgatgttc tttccgagga acagatcaaa gagtgcaag agcttggagt tctcgtggt 1080
 agagatgac aggggtgtct tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca 1140

[0099]

ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcattgaaa aggatgaagt tggacaagag 1200
 taccaaaagg gcggatgtgg tggatttggg aagggaatt tctccgagct ttccaagtcc 1260
 atcagaggatt acgagaagtc tctttaggtt aagcagctctg ttgtggctca gaagtcttga 1320

<210> 70
 <211> 1320
 <212> DNA
 <213> 燕麦(Avena sativa)

<400> 70
 atgccaccaa ctccagctac tgcctactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat 60
 gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gttaacccaa ggtctgatag gttcccagtt 120
 ctttctttcc accacgttga actttgggtg gctgatgcag cttctgctgc tggaaagatt 180
 tcttttgcct ttgggtgctc acttgcctgt aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct 240
 caagcttctt tgcctttgag gtcctggtct ctgtcttcc ttttactgc tcttatgct 300
 ccaccaccac aagaagctgc tacagctgtc actgcttcta tccatcttt ttcagctgat 360
 gctgcaagga cttttgctgc tgcctatgga ctgtctgta gatctgttgg agtttagatt 420
 gctgatgcag ctgaggcttt cagagttcti gttgtgggtg gtgctagacc agcttttgc 480
 ccagctgata ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgatgttgtt 540
 cttctttctg tctcttacc agatgagact gatcttccat tcttccagg attttagagg 600
 gtttcatctc cagggtctgt tgattatgga ctacttaggt tcatcacgt tgtgggaaat 660
 gttccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaaggat tcttggatt ccatgagttc 720
 gctgagllta ctgctgagga tglggaacl actgagctc gacttaactc tglgtgctt 780
 gctaacaaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga 840
 agatctcaga ttcagactta cctttagtac catggtggac caggtgttca acatattgct 900
 cttgcttcta acgatgtgct taggactctt agagagatga gagctagaac tccaatggga 960
 ggatttgagt ttatggctcc accacaagct aagtattacg aggggtttag aaggattgct 1020
 ggtgatgllc lttccgagga acagalcaaa gagtctcaag agcttggagt tctcgtggat 1080
 agagatgata aggggtgctc tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca 1140
 ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcattgaaa aggatgaagt tggacaagag 1200
 taccaaaagg gcggatgtgg tagatttggg aagggaatt tctccgagct ttccaagtcc 1260
 atcagaggatt acgagaagtc tctttaggtt aagcagctctg ttgtggctca gaagtcttga 1320

<210> 71
 <211> 1320
 <212> DNA
 <213> 燕麦(Avena sativa)

<400> 71
 atgccaccaa ctccagctac tgcctactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat 60
 gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gttaacccaa ggtctgatag gttcccagtt 120
 ctttctttcc accacgttga actttgggtg gctgatgcag cttctgctgc tggaaagatt 180
 tcttttgcct ttgggtgctc acttgcctgt aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct 240

[0100]

cacgcttctt tgcctttgag gctcggctgt cttgctttcc tttttactgc tccctatgct 300
 ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta ttccatcttt ttcagctgat 360
 gctgcaagga cttttgctgc tgctcatgga cttgctgtta gatctgttgg agttagagtt 420
 gctgatgcag ctgaggcttt cagagtttct gttgctggig gtgctagacc agcttttgc 480
 ccagctgata ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgaigtgtt 540
 ctctgtttcg tgccttacc agatgagact gatcttccat tccctccagg attttagagg 600
 gtttcatctc caggtgctgt tgattatgga ctactaggt tcgatcacgt tgtgggaaat 660
 gttccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaaggat tccctggatt ccatgagttc 720
 gctgagttta ctgctgagga tgttggaaact actgagctcg gacttaactc tgttctgctt 780
 gctaacaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga 840
 agatctcaga ttcagactta cctttagtac catggtggac caggtgttca acatattgct 900
 cttgcttcta acgatgtgct taggactctt agagagatga gagctagaac tccaatggga 960
 ggatttgagt ttatgagacc accacaagct aagtattacg aggggtttag aaggattgct 1020
 ggtgatgttc tttccgagga acagatcaa gagtgtcaag agcttggagt tatggtgat 1080
 agagatgata aggggtgtct tctccagatt ttcactaage cagttggaga taggccaaca 1140
 ttcttcttgg agatgatca gaggatcggc tgcattgaaa aggatgaagt tggacaagag 1200
 taccaaaagg gcgatgtgg tggatttga aagggaat tctccagct tttcaagtc 1260
 atcgaggatt acgagaagtc tctttaggtt aagcagctcg ttgtggctca gaagcttga 1320

<210> 72
 <211> 1320
 <212> DNA
 <213> 燕麦(Avena sativa)

<400> 72
 atgccacca ctccagctac tgcctactgt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat 60
 gctgctatag cttttccaag gggtgtgaga gtaacccaa ggctgatag gttccagtt 120
 ctttcttcc accacgtga actttgggtg gctgatgcag cttctgctgc tggaaagatt 180
 tcttttctc ttggtgctcc acttgcctgt aggtctgatt tgcctactgg aaattctgct 240
 cacgcttctt tgcctttgag gctcggctgt cttgctttcc tttttactgc tccctatgct 300
 ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta ttccatcttt ttcagctgat 360
 gctgcaagga cttttgctgc tgctcatgga cttgctgtta gatctgttgg agttagagtt 420
 gctgatgcag ctgaggcttt cagagtttct gttgctggig gtgctagacc agcttttgc 480
 ccagctgata ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgaigtgtt 540
 ctctgtttcg tgccttacc agatgagact gatcttccat tccctccagg attttagagg 600
 gtttcatctc caggtgctgt tgattatgga ctactaggt tcgatcacat tgtgggaaat 660
 gttccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaaggat tccctggatt ccatgagttc 720
 gctgagttta ctgctgagga tgttggaaact actgagctcg gacttaactc tgttctgctt 780
 gctaacaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga 840

[0101]

agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catggggac cagggttca acatattgct 900
 ctgtcttcta acgatgtgct taggactctt agagagatga gagctagaac tccaatggga 960
 ggatttgagt ttatgagacc accacaagct aagtattacg aggggtttag aaggattgct 1020
 ggtgatgttc tttccgagga acagatcaaa gagtgtaag agcttggagt tatggtggat 1080
 agagatgac aggggtgtct tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca 1140
 ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcattgaaa aggatgaagt tggacaagag 1200
 taccaaaagg gcggatgtgg tggatttga aagggaaatt tctccgagct tttcaagtcc 1260
 atcgaggatt acgagaagtc tcttgaggtt aagcagtcig ttgtggctca gaagcttga 1320

<210> 73
 <211> 1320
 <212> DNA
 <213> 燕麦(Avena sativa)

<400> 73
 atgccaccaa ctccagctac tgcctacggg gctgctgctg cagctgttac tccagaacat 60
 gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gtttaaccaa ggtctgatag gttcccagtt 120
 ctttctttcc accacgttga actttgggtg gctgatgcag cttctgctgc tggaaagattt 180
 tcttttgcct ttgggtctcc acttgcctgt aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct 240
 cacgcttctt tgcctttgag gctctggctc ctgtcttcc tttttactgc tctttatgct 300
 ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta tccatcttt ttcagctgat 360
 gctgcaagga cttttgctgc tgcctcagga ctgtctgta gatctgttgg agttagagtt 420
 gctgatgcag ctgaggcttt cagagtctct gttgctggig gtcctagacc agcttttggct 480
 ccagctgac ttggacaagg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgaatgtgtt 540
 cttegtttcg tgtcttacc agatgagact gatcttccat tccctccagg atttgagagg 600
 gtttcacttc cagggtcgtg tgattatga ctactaggt tccatccat tgtgggaaat 660
 gttccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaagggat tccctggatt ccatgagttc 720
 gctgagtta ctgctgagga tgttggaaact actgagtcig gacttaactc tgttgtgctt 780
 gtaacaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga 840
 agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catggggac cagggttca acatattgct 900
 ctgtcttcta acgatgtgct taggactctt agagagatga gagctagaac tccaatggga 960
 ggatttgagt ttatggctcc accacaagct aagtattacg aggggtttag aaggattgct 1020
 ggtgatgttc tttccgagga acagatcaaa gagtgtaag agcttggagt tatggtggat 1080
 agagatgac aggggtgtct tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca 1140
 ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcattgaaa aggatgaagt tggacaagag 1200
 taccaaaagg gcggatgtgg tggatttga aagggaaatt tctccgagct tttcaagtcc 1260
 atcgaggatt acgagaagtc tcttgaggtt aagcagtcig ttgtggctca gaagcttga 1320

<210> 74
 <211> 1320
 <212> DNA
 <213> 燕麦(Avena sativa)

[0102]

<400> 74
 atgccaccaa ctccagctac tgciactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat 60
 gctgctagat cttttccaag ggttgtaga gtaacccaa ggtctgatag gttcccagtt 120
 cttttttcc accacgttga actttgggtg gctgatgcag cttctgctgc tggaaagatt 180
 tcttttgcct ttggtgctcc acttgcctgc aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct 240
 cacgcttctt tgcctttgag gtciggtgct cttgctttcc tttttactgc tctttatgct 300
 ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta tccatcttt ttcagctgat 360
 gctgcaagga cttttgctgc tgcicatgga cttgctgta gatctgttgg agtttagatt 420
 gctgatgcag ctgagcttt cagagttct gttgctggg gtcctagacc agcttttgc 480
 ccagctgac ttggacatgg atttggactt gctgaggtt agctttacgg tcatgttgtt 540
 ctctgttctg tgtcttacc agatgagact gatcttccat tcttccagg atttgagagg 600
 gtttcatctc caggtgctgt tgattatgga ctactaggt tcatcactat tctgggaaat 660
 gttccagaaa tggctccagt gatcattac atgaaggat tctttggatt ccatgagttc 720
 gctgagttta ctgctgagga tgttgaact actgagctc gacttaactc tgttctgctt 780
 gctaacaact ctgagctgt tctttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga 840
 agatctcaga ttcagactta cctttagtac catggtggac caggtgttca acatattgct 900
 cttgcttcta acgatgtgct taggactctt agagagatga gagctagaac tccaatggga 960
 ggatttgagt ttatgagacc accacaagct aagtattac aggggtttag aaggattgct 1020
 ggtgatgttc tttccgagga acagatcaa gactgtcaag agcttggagt tctctggat 1080
 agagatgac aggggtgct tctccagat tccactaac cagttggaga taggccaaca 1140
 tttttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcattgaaa aggatgaagt tggacaagag 1200
 taccaaaagg gcgcatgttg tggatttga aagggaatt tctccgagct tttcaagctc 1260
 atcgaggatt acgagaagtc tctttaggtt aagcagctc ttttggctca gaagtcttga 1320

<210> 75
 <211> 1320
 <212> DNA
 <213> 燕麦(Avena sativa)

<400> 75
 atgccaccaa ctccagctac tgciactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat 60
 gctgctagat cttttccaag ggttgtaga gtaacccaa ggtctgatag gttcccagtt 120
 cttttttcc accacgttga actttgggtg gctgatgcag cttctgctgc tggaaagatt 180
 tcttttgcct ttggtgctcc acttgcctgc aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct 240
 cacgcttctt tgcctttgag gtciggtgct cttgctttcc tttttactgc tctttatgct 300
 ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta tccatcttt ttcagctgat 360
 gctgcaagga cttttgctgc tgcicatgga cttgctgta gatctgttgg agtttagatt 420
 gctgatgcag ctgagcttt cagagttct gttgctggg gtcctagacc agcttttgc 480
 ccagctgac ttggacatgg atttggactt gctgaggtt agctttacgg tcatgttgtt 540
 ctctgttctg tgtcttacc agatgagact gatcttccat tcttccagg atttgagagg 600

[0103]

gtttcatctc caggtgctgt tgattatgga ctactaggt tcgacacat tggggaaat 660
gttccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaaggat tccttgatt ccatgagttc 720
gctgagtta ctgctgagga tgttgaact actgagtcig gacttaactc tgttgtgctt 780
gctaacaact ctgaggctgt tcttttgcca citaatgagc cagttcacgg cactaagaga 840
agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catgggtggac caggtgttca acatattgct 900
cttgcttcta acgatgtgct taggactctt agagagatga gagctagaac tccaatggga 960
ggatttgagt ttatgaagcc accacaagct aagtattacg aggggtgtag aaggattgct 1020
ggatgatgtc tttccgagga acagatcaaa gagtgtcaag agcttgaggt tatggtggat 1080
agagatgatc aggggtgtgct tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca 1140
ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcattgaaa aggatgaagt tggacaagag 1200
taccaaaagg gcggtgtgg tggatttggg aagggaatt tctccgagct tttcaagtcc 1260
atcgaggatt acgagaagtc tcttgaggtt aagcagtcig ttgtggctca gaagcttga 1320

<210> 76
<211> 1320
<212> DNA
<213> 燕麦(Avena sativa)

<400> 76
atgccaccaa ctccagctac tgctactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat 60
gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gtaaccaa ggtctgatag gttccagtt 120
ctttctttcc accacgttga actttgggtg gctgatgcag cttctgtgctc tggaaagatt 180
tcttttctgc ttggtgctcc acttgtctgt aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct 240
caagcttctt tgetttttag gctggtgctc ctgtctttcc tttttactgc tcttatgct 300
ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta ttccatctt ttcagctgat 360
gctgcaagga cttttgctgc tgcctatgga ctgtctgta gatctgttgg agtttagatt 420
gctgatgcag ctgaggcttt cagagtttct gttgctggig gtgctagacc agcttttct 480
ccagctgatc ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgaigtgtt 540
cttcgtttcg tgtcttacc agatgagact gatcttccat tccttccagg attttagagg 600
gtttcatctc caggtgctgt tgattatgga ctactaggt tcgacacct tggggaaat 660
gttccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaaggat tccttgatt ccatgagttc 720
gctgagtta ctgctgagga tgttgaact actgagtcig gacttaactc tgttgtgctt 780
gctaacaact ctgaggctgt tcttttgcca citaatgagc cagttcacgg cactaagaga 840
agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catgggtggac caggtgttca acatattgct 900
cttgcttcta acgatgtgct taggactctt agagagatga gagctagaac tccaatggga 960
ggatttgagt ttatgagacc accacaagct aagtattacg aggggtgtag aaggattgct 1020
ggatgatgtc tttccgagga acagatcaaa gagtgtcaag agcttgaggt tatggtggat 1080
agagatgatc aggggtgtgct tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca 1140
ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcattgaaa aggatgaagt tggacaagag 1200

[0104]


```

taccaaaagg gcggatgigg tggatttga aagggaaatt tctccgagct tttcaagtc 1260
atcgaggatt acgagaagtc tctttaggtt aagcagtcig ttgtggctca gaagtcitga 1320

<210> 77
<211> 1320
<212> DNA
<213> 燕麦(Avena sativa)

<400> 77
atgccaccaa ctccagctac tgcctactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat 60
gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gtaacccaa ggtctgatag gttccagtt 120
ctttctttcc accacgttga actttggtgt gctgatgcag cttctgctgc tggaaagatt 180
tcttttgcct ttggtgctcc acttgcctgt aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct 240
caogcttctt tgcctttgag gtcctggtgt cttgctttcc tttttactgc tctttatgct 300
ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta tccatcttt ttcagctgat 360
gctgcaagga cttttgctgc tgcctatgga cttgctgtta gatctgttgg agtttagatt 420
gctgatgcag ctgaggtctt cagagttcti gttgctggig gtgctagacc agcttttgc 480
ccagctgata ttggacatgg atttggacti gctgaggttg agctttacgg tgatgttgtt 540
cttctttctg tctcttacc agatgagact gatcttccat tctttccagg attttagagg 600
gtttcatctc cagggtctgt tgattatgga ctacttaggt tcatcacat tgtgggaaat 660
gttccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaagggat tctttggatt ccatgagttc 720
gctgagttta ctgctgagga tgttggaaact actgagctctg gacttaactc tgttgtgctt 780
gctaacaaat ctgaggtctg tcttttgcct ctlaatgagc cagttcacgg cactaagaga 840
agatctcaga ttcagactta cctttagtac catggtggac caggtgttca acatattgct 900
cttgcctcta acgatgtgct taggactctt agagatgta gagctagaac tccaatggga 960
ggattttagt ttatgagacc accacaagct aagtattacg aggggtgttag aagggaggct 1020
ggigtatgtc tttccgagga acagatcaaa gagtgtcaag agcttggagt tatggtggat 1080
agagatgata aggtgtgtgt tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca 1140
ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcattgaaa aggatgaagt tggacaagag 1200
taccaaaagg gcggatgigg tggatttga aagggaaatt tctccgagct tttcaagtc 1260
atcgaggatt acgagaagtc tctttaggtt aagcagtcig ttgtggctca gaagtcitga 1320

<210> 78
<211> 1320
<212> DNA
<213> 燕麦(Avena sativa)

<400> 78
atgccaccaa ctccagctac tgcctactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat 60
gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gtaacccaa ggtctgatag gttccagtt 120
ctttctttcc accacgttga actttggtgt gctgatgcag cttctgctgc tggaaagatt 180
tcttttgcct ttggtgctcc acttgcctgt aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct 240
caogcttctt tgcctttgag gtcctggtgt cttgctttcc tttttactgc tctttatgct 300

```

[0105]

ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta ttecatcttt ttcagctgat	360
gctgcaagga cttttgctgc tgcicatgga ctgctgtta gatctgttgg agttagagtt	420
gctgatgcag ctgaggcttt cagagtttct gtgctgggtg gtgctagacc agcttttgc	480
ccagctgate tggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgaigtgtt	540
cttcglltcg tgccltacc agatgagact galcllccat lccclccagg atllgagagg	600
gtttcatctc cagggtctgt tgattatgga ctcaclaggt tcatcacct tgtgggaaat	660
gttccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaagggat tccittggatt ccatgagttc	720
gctgagllla ctgctgagga tglttggaact actgagctcg gacllaacct tglgtgctt	780
gctaacaaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga	840
agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catggggac cagggttca acatattgct	900
cttgccllca acgalgtgct laggaccll agagagalga gagctagaac lccaatggga	960
ggatttgagt ttatgagacc accacaagct aagtattacg aggggttag aaggaggct	1020
ggigtgttc tttccgagga acagatcaaa gagtgtcaag agcttggagt tatgggtgat	1080
agagatgatc aggggtgtct tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca	1140
ttcttcttg agatgattca gaggatcggc tcatggaaa aggatgaagt tggacaagag	1200
taccaaaagg gcggatgtgg tggatttga aagggaatt tctccgact tttcaagtcc	1260
atcgaggatt acgagaagtc tcttgaggtt aagcagctcg ttgtggctca gaagtctga	1320

<210> 79
 <211> 1305
 <212> DNA
 <213> 早熟禾 (Poa annua)

<400> 79	
atgccaccaa ctactgctac tgcctacgct gctgctactg ttactccaga acatgctgct	60
agaaggttcc caagagttgt tagagttaac ccaaggctcg ataggttccc agttctttct	120
ttccaccacg ttgaattttg gtgtgctgat gctgctctg ctgctggaag attttcttt	180
gctcttgggt ctccacttgc tgcctagatct gatttgccta ctggaaattc tgcctacgct	240
tctttgcttt tgaggctcgg tgccttctgt ttccttttta ctgctcetta tgcctccaaa	300
ccacaggatg ctgatactgc atcaattcca tctttctcag ctgatgctgc aagggtttt	360
tctgctgctc atggattggc tgttagatct gtgctgtta gagttgctga tgcagctgat	420
gctttcagag ctctatttgc tgcaggctct agaccagctt ttgctccagc tgatcttga	480
agaggatttg gacttgcctg ggttagctt tacggctgat ttgttcttag attcgtgtct	540
caccagatg ctgatgatc tccatctctt ccaggatttg aggcgtttc tagaccaggi	600
gctgttgatt atgactcac taggttcgat cacgttctgg gaaatgtcc agaaatggga	660
ccagtgatcg attacatcaa gggattcatg ggattccatg agttcgtga gtttactgct	720
gaggatgttg gaactactga gtcggactt aactctgttg tgccttctaa caactctgag	780
gctgttcttt tgcacttaa tgagccagtt cacggcacta agagaagatc tcagattcag	840
acttaccttg agtaccatgg tggaccaggt gttaacata ttgctcttgc tcatctgat	900
gtgcttagga ctcttagaga gatgcaagct agatctgcta tgggaggatt tgagtttatg	960

[0106]

aggccaccac aacctaagta ttacgagggt gttagaagga ttgctggiga tgttctttcc 1020
gaggctcaaa tcaaagagtg tcaagagctt ggagtgatgg tggatagaga tgatcagggt 1080
gtgcttctec agattttcac taagccagtt ggagataggc caacattctt cttggagatg 1140
attcagagga tggctgcat ggaaaaggat gagagaggtc aagagtatca aaagggcgga 1200
tgggtggat ttgaaaagg aaatttctec gagcttttca agtccatcga ggattacgag 1260
aagtctcttg aggctaagca atctgctgtt gctcaacagt cttga 1305

<210> 80
<211> 1305
<212> DNA
<213> 早熟禾 (*Poa annua*)

<400> 80
atgccaccaa ctactgctac tgctacagct gctgctactg ttactccaga acatgctgct 60
agaaggttcc caagagtgtg tagagttaac ccaaggtctg ataggttccc agttctttct 120
ttccaccacg ttgaattttg gtgigtgat gctgcttctg ctgctggaag attttctttt 180
gctcttggig ctccacttgc tgetagatct gatttgtcta ctggaattc tgetcacgct 240
tctttgcttt ttgaggtctg tgccttctg ttccttttta ctgctcetta tgetccacaa 300
ccacaggatg ctgatactgc atcaattcca tctttctcag ctgatgctgc aagggtttt 360
tctgctgctc atgattggc tttagatct gttgctgta gatttctga tgcagctgat 420
gctttcagag ctctctattgc tgcaggctct agaccagctt ttgctccagc tgatcttggg 480
agaggatttg gacttctga ggttagctt tacggtagt ttgttcttag attcgtgctt 540
caccagatg ctgatgatgc tccattctt ccaggallg aggtcttctc tagaccaggt 600
gctgttgatt atggactcac taggttcgat cacattgttg gaaatgttcc agaatggga 660
ccagtgatcg attacatcaa gggattcatg ggattccatg agttcctga gtttactgct 720
gaggatgttg gaactactga gtciggactt aactctgttg tgccttctaa caactctgag 780
gctgttcttt tgcacttaa tgagccagtt cacggcaact agagaagatc tcagattcag 840
acttaccctg agtaccatgg tggaccaggt gttcaacata ttgctcttgc ttcaactgat 900
gtgcttagga ctcttagaga gatgcaagct agatctgcta tgggaggatt tgagtttatg 960
aggccaccac aacctaagta ttacgagggt gttagaagga ttgctggiga tgttctttcc 1020
gaggctcaaa tcaaagagtg tcaagagctt ggagtgatgg tggatagaga tgatcagggt 1080
gtgcttctec agattttcac taagccagtt ggagataggc caacattctt cttggagatg 1140
attcagagga tggctgcat ggaaaaggat gagagaggtc aagagtatca aaagggcgga 1200
tgggtggat ttgaaaagg aaatttctec gagcttttca agtccatcga ggattacgag 1260
aagtctcttg aggctaagca atctgctgtt gctcaacagt cttga 1305

<210> 81
<211> 1323
<212> DNA
<213> *Alopecurus myosuroides*

<400> 81
atgccaccaa ctactgctac tgctacaggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat 60

[0107]

gctgctagaa ggttccaag agttgttaga gttaaccaa ggtctgatag gttcccagtt	120
cttgccttcc atcatgttga gttttgggt gctgatgctg cttctgctgc tggagattt	180
tcttttgcct ttggtgctcc acctgctgct agatctgatt tgtctactgg aaactcttct	240
cacgcttctc acctttttag atctgggtct ctgctttcc ttttactgc tccctatgct	300
ccaccaccac aagatgctgc agatgcagca gctactgctt ctattccatc ttttcaact	360
gaggctgcta ggactttctc tctgctcat ggattggctg ttagatctgt ggctattaga	420
gttgcagatg ctgcagaggc tttccatact tctgttgcig gtggctgtag accagctttt	480
gctccagctg atcttggatc tggatttga ctgctgagg ttgagcttta cggctgatgt	540
gttcttagat tctgtctca cccagatggt gatgatgttc ctttcttcc aggattcgag	600
gggtttagta gaccaggctc tctggattat ggactcacia ggctcgalca cgttctggga	660
aatgttccag aaatggctcc agttgctgct tacatgaagg gattcactgg attcatgag	720
tctgctgagt tcactgctga ggatgttga actgctgagt ctggacttaa ctctgttctg	780
cttgcctaac actctgagc tcttctttt ccacttaat agccagttca cggcactaag	840
agaagatctc agattcagac ttacctgat taccatggig gaccaggtgt tcaacatatt	900
gctcttctt catctgatgt gcttaggact cttagagaga tgagagctag atctgctatg	960
ggaggatttg agtttatgag accaccacaa gctaagtatt acgaagggtg tagaaggctt	1020
gctggctgat tctttctga ggtcacaatc aaagagtgcc aagagcttgg agttatggig	1080
gatagagatg atcaggggtg gcttctccag attttcaact agccagttgg agataggcca	1140
acattcttct tggagatgat tcaagagatc ggctgcatgg aaaaggatga gattggacaa	1200
gagttacaaa agggcggatg tgggtgattt ggaaaggaa atttctccga gcttttcaag	1260
tccatcgagg attacgagaa gtctctttag gctaagcaat ctgctgttgc tcaacagtct	1320
tga	1323

<210> 82
 <211> 1323
 <212> DNA
 <213> Alopecurus myosuroides

<400> 82	
atgccaccaa ctactgctac tgctacaggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60
gctgctagaa ggttccaag agttgttaga gttaaccaa ggtctgatag gttcccagtt	120
cttgccttcc atcatgttga gttttgggt gctgatgctg cttctgctgc tggagattt	180
tcttttgcct ttggtgctcc acctgctgct agatctgatt tgtctactgg aaactcttct	240
cacgcttctc acctttttag atctgggtct ctgctttcc ttttactgc tccctatgct	300
ccaccaccac aagatgctgc agatgcagca gctactgctt ctattccatc ttttcaact	360
gaggctgcta ggactttctc tctgctcat ggattggctg ttagatctgt ggctattaga	420
gttgcagatg ctgcagaggc tttccatact tctgttgcig gtggctgtag accagctttt	480
gctccagctg atcttggatc tggatttga ctgctgagg ttgagcttta cggctgatgt	540
gttcttagat tctgtctca cccagatggt gatgatgttc ctttcttcc aggattcgag	600

[0108]

ggigttagta gaccaggigc taigattat ggactcacta ggttcgatca cattgtggga	660
aatgttccag aaatggctcc agttagctcti tacatgaagg gattcactgg atttcaigag	720
ttagctgagt tcaactgctga ggaigtgga actgctgagt ctggacttaa ctctgtttgtg	780
cttgctaaca actctgagge tgttcttttg ccacttaatg agccagtcca eggcactaag	840
agaagatcic agattcagac ttacctgat taccatggig gaccaggigt tcaacatatt	900
gctcttgett catctgatgt gcttaggact cttagagaga tgagagctag atctgctatg	960
ggaggattig agtttatgag accaccacaa gctaagtatt acgaaggigt tagaaggctt	1020
gctggigtatg ttctttctga ggcicaaatc aaagagtgcc aagagcttgg agttatggig	1080
gatagagatg atcagggtgt gcttctccag attttcacta agccagttag agataggcca	1140
acattcttct tggagatgat tcagaggatc ggctgcatgg aaaaggatga gattggacaa	1200
gagtacaaa agggcggatg tggiggattt ggaaaggaa atttctccga gcttttcaag	1260
tccatcgagg attacgagaa gtccttgag gctaagcaat ctgctgttgc tcaacagtct	1320
tga	1323
<210> 83	
<211> 217	
<212> DNA	
<213> 矮牵牛(Petunia x hybrida)	
<400> 83	
atggcacaaa ttaacaacat ggcacaaggg atacaaacc ttaatcccaa ttccaatttc	60
cataaacecc aagtccetaa atctcaagt tttctgttt ttggatctaa aaaactgaaa	120
aattcagcaa attctatgtt ggttttgaaa aaagattcaa tttttatgca aaagtttgt	180
tccttttagga tttcagcate agtggctaca gcctgcc	217
<210> 84	
<211> 1323	
<212> DNA	
<213> 燕麦(Avena sativa)	
<400> 84	
atgccaccaa ctccagctac tgctactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60
gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gtaacccaa ggtctgatag gttccagtt	120
ctttctttcc accacgttga actttgggtg gctgatgcag ctctgctgc tggagattt	180
tcctttgctc ttggtgctcc actgctgctt aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct	240
cacgtttctt tgcctttgag gctgggtgct ctgctttcc tttttactgc tctttatgct	300
ccaccaccac aagaagctgc tacagctgca gctactgctt ctattccate tttttcagct	360
gatgctgcaa ggacttttgc tgcgctcat ggacttgcg ttagatctgt tggagttaga	420
gttgcctgat cagctgagge tttcagattt tctgttgcg gttgtgctag accagctttt	480
gctccagctg atcttggaca tggatttga cttagctgagg ttgagcttta cggtgatgtt	540
gttcttctgt tctgtcttta cccagatgag actgatcttc cattcttcc aggattttag	600
agggtttcat ctccaggigc tgttgattat ggactcacta ggttcgatca cattgtggga	660
aatgttccag aaatggctcc agttagctat tacatgaagg gattccttgg atttcaigag	720

[0109]

ttcgctgagt ttactgctga ggaigtigga actactgagt ctggacttaa ctctgtgtg	780
cttgctaaca actctgagge tgtcttttg ccacttaatg agccagttca cggcactaag	840
agaagatctc agattcagac ttacctgag taccatggig gaccagggtg tcaacatatt	900
gctcttgctt ctaacgatgt gcttaggact cttagagaga tgagagctag aactccaatg	960
ggaggatttg agtttatgag accaccacaa gctaagtatt acgagggtgt tagaaggall	1020
gctggtagatg ttctttccga ggaacagatc aaagagtgc aagagcttgg agttatggig	1080
gatagagatg atcagggtgt gcttctccag attttcacta agccagttgg agataggcca	1140
acattcttct tggagatgat tcagaggatc ggctgcatgg aaaaggatga agltggacaa	1200
gaglacaaa agggcggatg tggiggattt ggaaagggaa atttctccga gctttcaag	1260
tccatcgagg attacgagaa gtctcttgag gtttaagcagt ctgtgtgtgc tcagaagtct	1320
lga	1323
<210> 85	
<211> 1323	
<212> DNA	
<213> Alopecurus myosuroides	
<400> 85	
atgccaccaa ctactgctac tgcctacagg tctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60
gctgctagaa ggttcccaag agttgttaga gtttaaccaa ggtctgtag gttccagtt	120
cttgctttcc atcaigtga gttttgggtg gctgatgctg cttctgctgc tggaaagattt	180
tcttttgcct tgggtgctcc acttgcctct agatctgatt tgtctactgg aaactcttct	240
cacgcttctc accttttgag atctgggtct ctgtctttcc tttcactgc tctttatgct	300
ccaccaccac aagatgctgc agatgcagca gctactgctt ctattccatc tttttcaact	360
gaggctgcta ggactttctc ttctgctcat ggattggctg ttagatctgt ggctattaga	420
gttgcatgatg ctgcagagge ttccatact tctgttgcct gttgtgctag accagctttt	480
gctccagctg atcttggatc tggatttga ctgtctgagg ttgagcttta cggigtatgt	540
gttcttagat tctgtctca cccagatggt gatgatgttc cattcttcc aggattcgag	600
gggttagta gaccagggtc tatggattat ggactcacta ggttcgatca ccttgggga	660
aatgttccag aaatggctcc agttgctgct tacatgaagg gattcactgg atttcatgag	720
ttcgctgagt ttactgctga ggaigtigga actgctgagt ctggacttaa ctctgtgtg	780
cttgctaaca actctgagge tgtcttttg ccacttaatg agccagttca cggcactaag	840
agaagatctc agattcagac ttacctgat taccatggig gaccagggtg tcaacatatt	900
gctcttgctt catctgatgt gcttaggact cttagagaga tgagagctag atctgctatg	960
ggaggatttg agtttatgag accaccacaa gctaagtatt acgaagggtg tagaaggag	1020
gctggtagatg ttctttctga ggtcaaatc aaagagtgc aagagcttgg agttatggig	1080
gatagagatg atcagggtgt gcttctccag attttcacta agccagttgg agataggcca	1140
acattcttct tggagatgat tcagaggatc ggctgcatgg aaaaggatga gattggacaa	1200
gaglacaaa agggcggatg tggiggattt ggaaagggaa atttctccga gctttcaag	1260
tccatcgagg attacgagaa gtctcttgag gctaagcaat ctgtgtgtgc tcaacagtct	1320

[0110]

tga	1323
<210> 86	
<211> 70	
<212> DNA	
<213> 烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus)	
<400> 86	
tatitttaca acaattacca acaacaaca acaacaaaca acattacaat tactatttac	60
aattacacat	70
<210> 87	
<211> 744	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Double 35S promoter DNA sequence	
<400> 87	
aacatgggtgg agcacgacac acttgtctac tccaaaaata tcaaagatac agtctcagaa	60
gaccaaaggg caattgagac ttttcaaca aggtaatat cggaaacct cctcggattc	120
cattgccag ctatctgtca ctttattgtg aagatagtg aaaaggaagg tggctcctac	180
aaatgccalc attgcgataa aggaaaggcc atcgttgaag atgcctctgc cgacagtggt	240
cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc atcgttgaaa aagaagacgt tccaaccacg	300
tcttcaaagc aagtggattg atgtgataac atgggtggagc acgacacact tgtctactcc	360
aaaaatatca aagatacagt ctacagaagc caaagggcaa ttgagacttt tcaacaaagg	420
gtaatatccg gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt tatttgaag	480
atagtggaaa aggaagggtg ctcttcaaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc	540
gttgaagatg cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac ccccaccac gaggagcacc	600
gtggaaaaag aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatactcc	660
actgacgtaa gggatgacgc acaatcccac tatccttcgc aagacccttc ctctatataa	720
ggaagttcat ttcatttga gagg	744
<210> 88	
<211> 255	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Nos-终止子 DNA 序列	
<400> 88	
cgatcgttca aacatttggc aataaagttt cttaagattg aatcctgttg cgggtcttgc	60
gatgattatc atataatttc tgttgaatta cgtaagcat gtaataatta acatgtaatg	120
catgacgtta tttatgagat gggtttttat gattagagtc cgcgaattat acatttaata	180
cgcgatagaa aacaaaatat agcgcgcaaa ctaggataaa ttatcgcgcg cgggtgcatc	240
tatgttacta gatcg	255

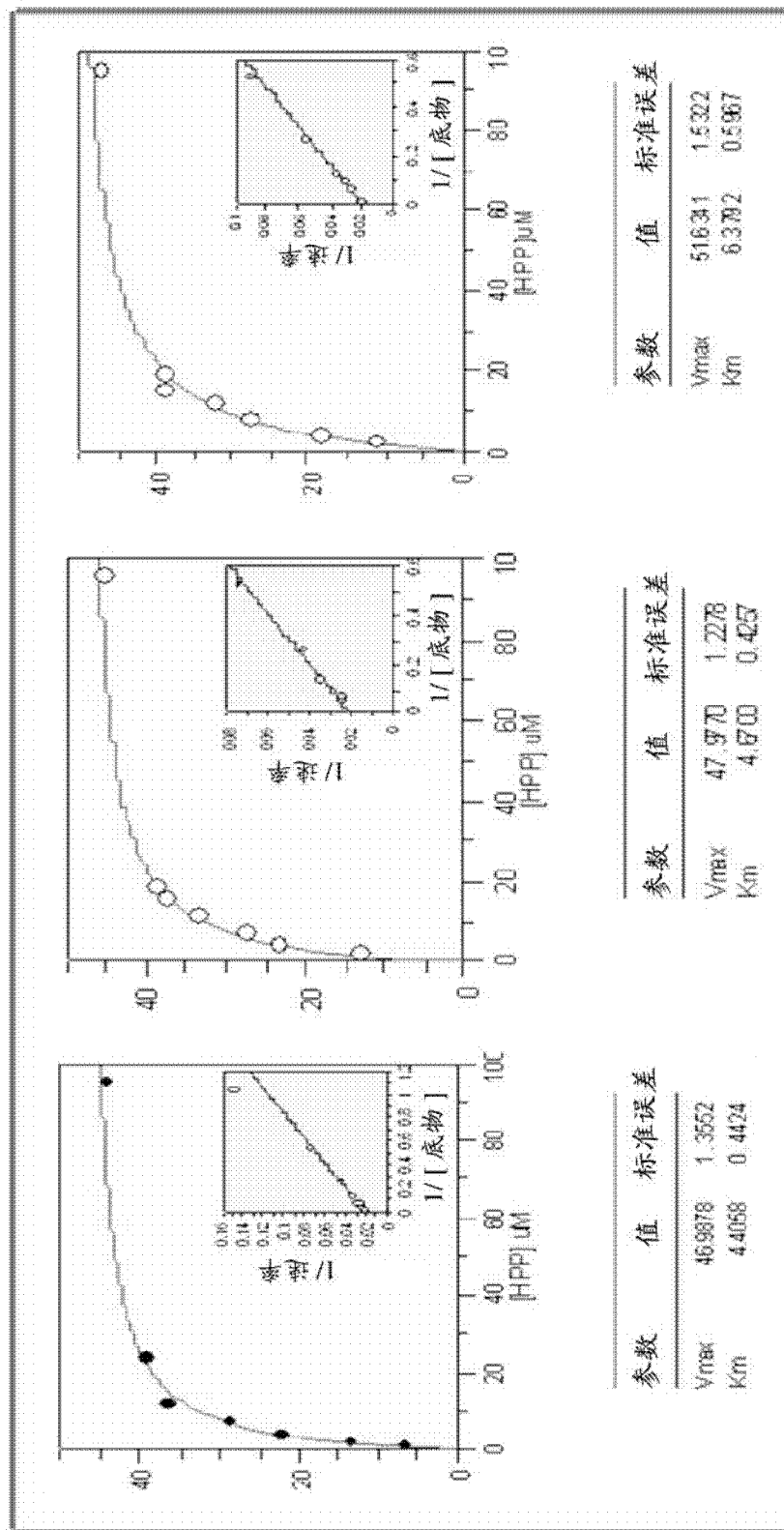


图 1

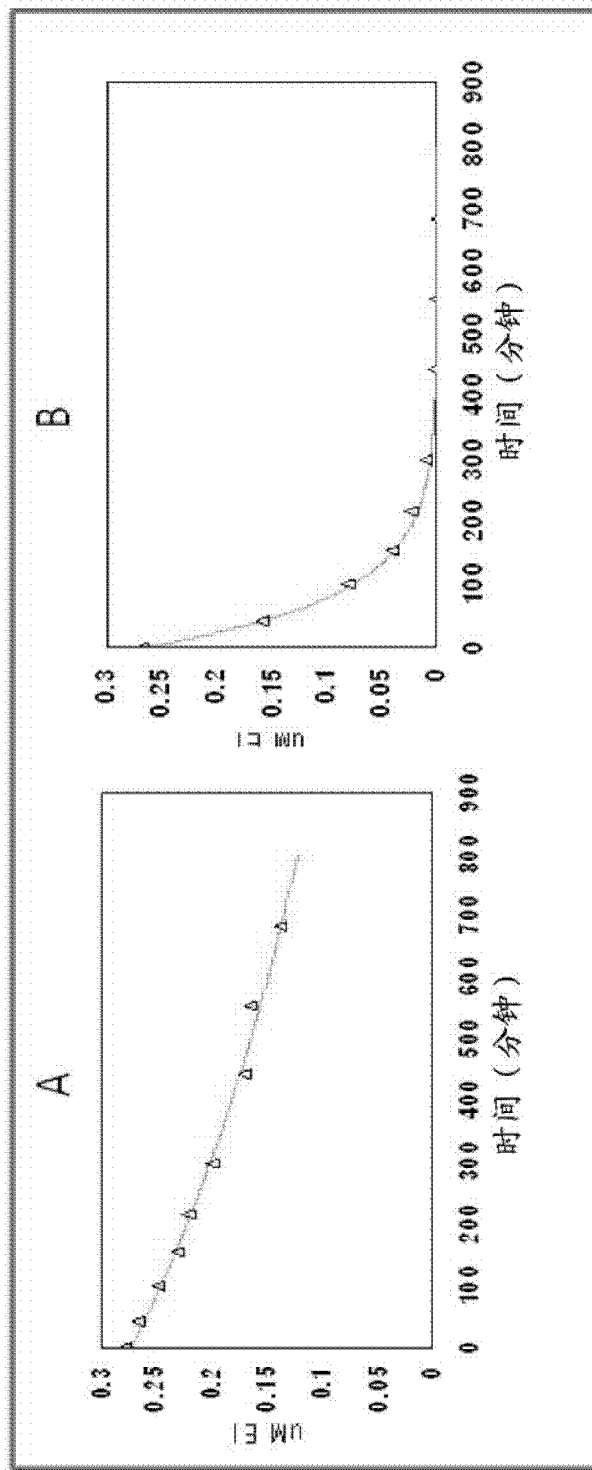


图 2



图 3

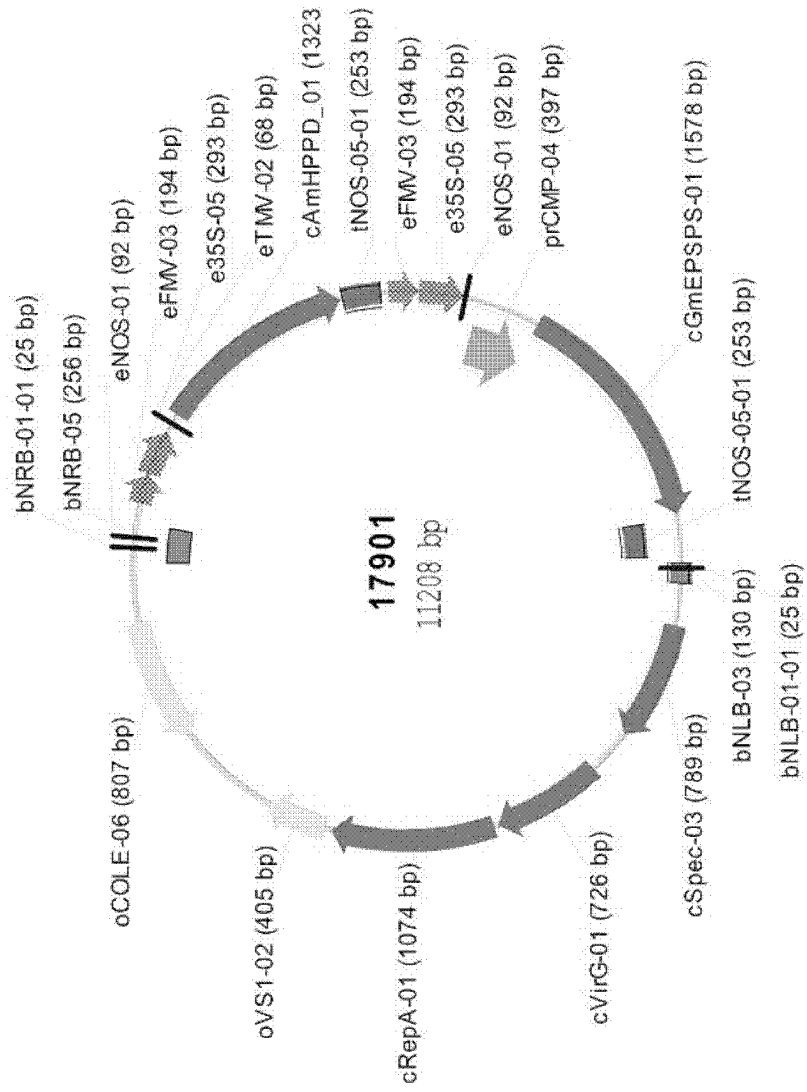


图 4