



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101442902 B

(45) 授权公告日 2013. 09. 18

(21) 申请号 200580048534. 0

(22) 申请日 2005. 12. 19

(30) 优先权数据

60/638, 099 2004. 12. 21 US

60/660, 320 2005. 03. 10 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 08. 21

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/046031 2005. 12. 19

(87) PCT申请的公布数据

W02007/044043 EN 2007. 04. 19

(73) 专利权人 孟山都技术有限公司

地址 美国密苏里州

(72) 发明人 M·阿巴德

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 权陆军 黄可峻

(51) Int. Cl.

C12N 5/04(2006. 01)

C12N 15/82(2006. 01)

A01H 1/00(2006. 01)

A01H 5/00(2006. 01)

(56) 对比文件

US 6294711 B1, 2001. 09. 25, 全文.

US 6653535 B1, 2003. 11. 25, 全文.

US 2004103457 A1, 2004. 05. 27, 全文.

审查员 王颖

权利要求书2页 说明书96页 附图11页

(54) 发明名称

具有增强的农艺性状的转基因植物的制备方法

(57) 摘要

本发明提供了具有重组 DNA 用于表达蛋白质的转基因植物细胞,所述蛋白质对于赋予转基因农作物植物增强的农艺性状有用。本发明还提供包括转基因植物细胞的转基因植物和后代种子,其中植物根据具有增强的性状进行选择,所述性状选自增强的水利用效率、增强的耐寒性、增加的产量、增强的氮利用效率、增强的种子蛋白质和增强的种子油。还公开了用于制备具有增强的性状的转基因种子和植物的方法。

1. 一种制备具有增加的产量或增强的氮利用效率的植物的方法,其包括

将重组 DNA 导入植物的细胞中,其中所述重组 DNA 包括在植物细胞中起作用并且与来自植物、细菌或酵母的 DNA 可操作地连接的启动子,所述 DNA 编码与具有转氨酶活性的 SEQ ID NO:130 的氨基酸序列具有至少 90% 的同一性且具有至少一个由 Pfam 名称 Aminotran12 鉴别的蛋白质结构域家族的 Pfam 结构域的蛋白质;和

通过筛选由具有所述重组 DNA 的植物群体中的植物细胞再生并表达所述蛋白质的植物与不具有所述重组 DNA 的对照植物相比增加的产量或增强的氮利用效率,从所述植物群体选择植物。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述蛋白质由 SEQ ID NO:130 的氨基酸序列组成。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述植物是玉米植物。

4. 权利要求 1 的方法,其中所述植物进一步包括编码蛋白质的 DNA,所述蛋白质提供来自暴露于除草剂的耐受性,所述除草剂以对野生型所述植物细胞致死的水平应用。

5. 权利要求 4 的方法,其中所述除草剂是草甘膦、麦草畏或草铵膦化合物。

6. 一种转基因花粉粒,其包括权利要求 1 的植物的单倍体配子,其中所述配子包含重组 DNA。

7. 一种用于制备非天然、转基因种子的方法,所述种子用于生产一批具有增强的性状的转基因植物,所述增强的性状由稳定整合的重组 DNA 表达产生,所述重组 DNA 包括 (a) 在植物细胞中起作用并且 (b) 与来自植物、细菌或酵母的 DNA 可操作地连接的启动子,所述 DNA 编码与具有转氨酶活性的 SEQ ID NO:130 的氨基酸序列具有至少 90% 的同一性且具有至少一个由 Pfam 名称 Aminotran12 鉴别的蛋白质结构域家族的 Pfam 结构域的蛋白质;并且其中所述增强的性状是增加的产量或增强的氮利用效率,用于制备所述种子的所述方法包括:

(a) 在植物群体中筛选所述增强的性状和所述重组 DNA,其中在所述群体中的个体植物显示的所述性状水平低于、基本上等于或高于所述性状在不表达所述重组 DNA 的对照植物中显示的水平,

(b) 从所述群体中选择一种或多种植物,它们显示的性状水平大于所述性状在对照植物中显示的水平,

(c) 证实所述重组 DNA 稳定整合在所述选择的植物中,

(d) 分析所选植物的组织以确定生产的蛋白质有具有 SEQ ID NO:130 的蛋白质的功能;和

(e) 收集来自所选植物的种子。

8. 权利要求 7 的方法,其中所述蛋白质由 SEQ ID NO:130 的氨基酸序列组成。

9. 权利要求 7 的方法,其中所述群体的植物进一步包括表达蛋白质的 DNA,所述蛋白质提供针对暴露于除草剂的耐受性,所述除草剂以对野生型植物细胞致死的水平应用,并且其中所述选择通过用所述除草剂处理所述群体来实现。

10. 权利要求 9 的方法,其中所述除草剂包括草甘膦、麦草畏或草铵膦化合物。

11. 权利要求 7 的方法,其中所述选择通过鉴别具有所述增强的性状的植物来实现。

12. 权利要求 7 的方法,其中所述种子是玉米、大豆、棉花、苜蓿、小麦或稻种子。

13. 一种生产杂交玉米种子的方法,其包括:

(a) 从除草剂耐受性玉米植物获得杂交玉米种子,所述玉米植物还具有稳定整合的重组 DNA,所述重组 DNA 包括 (a) 在植物细胞中起作用并且 (b) 与 DNA 可操作地连接的启动子,所述 DNA 编码与具有转氨酶活性的 SEQ ID NO:130 的氨基酸序列具有至少 90% 的同一性且具有至少一个由 Pfam 名称 Aminotran12 鉴别的蛋白质结构域家族的 Pfam 结构域的蛋白质;

(b) 由所述杂交玉米种子生产玉米植物,其中由所述杂交玉米种子产生的所述植物的一部分对于所述重组 DNA 是纯合的,由所述杂交玉米种子产生的所述植物的一部分对于所述重组 DNA 是半合子的,并且由所述杂交玉米种子产生的所述植物的一部分没有一种所述重组 DNA;

(c) 通过用除草剂处理选择对于所述重组 DNA 是纯合和半合子的玉米植物;

(d) 收集来自除草剂处理存活的玉米植物的种子并种植所述种子以产生进一步的后代玉米植物;

(e) 将步骤 (c) 和 (d) 重复至少一次以产生近交玉米系;

(f) 使所述近交玉米系与第二种玉米系杂交以生产杂交种子。

14. 选择由权利要求 1 的方法制备的植物的方法,其中使用免疫反应性抗体检测所述蛋白质在种子或植物组织中的存在。

15. 防伪的研磨种子,其具有作为来源指示的由权利要求 1 的方法制备的植物的细胞。

16. 一种无需灌溉水培育玉米、棉花或大豆农作物的方法,其包括种植具有由权利要求 1 的方法制备的植物的细胞的种子,所述种子根据增强的水利用效率进行选择。

17. 权利要求 16 的方法,其包括在所述农作物生产过程中提供最高达 300 毫米的地下水。

18. 一种无需添加氮肥料培育玉米、棉花或大豆农作物的方法,其包括种植具有由权利要求 1 的方法制备的植物的细胞的种子,所述种子根据增强的氮利用效率进行选择。

具有增强的农艺性状的转基因植物的制备方法

[0001] 与相关申请的交叉参考

[0002] 本申请根据 35USC § 119(e) 要求于 2004 年 12 月 21 日提交的美国临时申请序列号 60/638,099 和于 2005 年 3 月 10 日提交的美国临时申请序列号 60/660,320 的利益,所述 2 个临时申请引入本文作为参考。

[0003] 序列表的引入

[0004] 引入本文作为参考的序列表的 2 份拷贝(拷贝 1 和拷贝 2)和序列表的计算机可读形式(CRF)全都在 CD-ROMs 上,它们各自包含名称为 38-21(53720)B 的文件,所述文件是 33,897 千字节(在 MS-WINDOWS 中测量)并于 2005 年 12 月 13 日创建。

[0005] 计算机程序列表的引入

[0006] 计算机程序列表文件夹 hmmer-2.3.2 和 67pfamDir 包含在光盘中,并整体引入本文作为参考。文件夹 hmmer-2.3.2 包含用于执行 Pfam 分析的 HMMer 软件的源代码和其他相关文件。文件夹 67pfamDir 包含 67Pfam 隐马尔可夫模型。2 个文件夹于 2005 年 12 月 13 日在磁盘上创建,总大小为 7.7 兆字节(在 MS-WINDOWS 中测量)。

发明领域

[0007] 本文公开的是植物遗传学与发育生物学领域的发明。更具体而言,本发明提供了具有用于在转基因植物中提供增强的性状的重组 DNA 的植物细胞,包括此类细胞的植物,来源于此类植物的种子和花粉,制备及使用此类细胞、植物、种子和花粉的方法。

[0008] 发明背景

[0009] 具有改良的农艺性状例如产量、环境应激耐受性、害虫抗性、除草剂耐受性、改良的种子组成等的转基因植物是农民和消费者都需要的。尽管植物育种中的大量努力已提供了所需性状的显著收益,但将特定 DNA 导入植物基因组的能力为产生具有改良和/或独特性状的植物提供了进一步的机会。只将重组 DNA 导入植物基因组不总是产生具有增强的农艺性状的转基因植物。需要从群体中选择个别转基因事件的方法以鉴别其特征为增强的农艺特性的那些转基因事件。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明采用重组 DNA 用于表达对赋予转基因植物增强的农艺特性有用的蛋白质。本发明中的重组 DNA 在包括启动子的构建体中提供,所述启动子在植物细胞中起作用并且与 DNA 可操作地连接,所述 DNA 编码在序列中具有至少一个氨基酸结构域的蛋白质,所述氨基酸结构域对于与如表 28 鉴别的 Pfam 名称组中由 Pfam 名称鉴别的蛋白质结构域家族的氨基酸序列比对超过 Pfam 聚集截止值。在本发明更具体的实施方案中,在植物细胞中表达的蛋白质具有的氨基酸序列与共有氨基酸序列群中的共有氨基酸序列具有至少 90% 的同一性,所述共有氨基酸序列群由关于 SEQ ID NO:84 构建的共有氨基酸序列和表 2 中列举的其同源物,以及关于 SEQ ID NO:166 构建的共有氨基酸序列和表 2 中列举的其同源物组成。在本发明再更具体的实施方案中,植物细胞中表达的蛋白质是选自表 1 中鉴别的蛋白质群的蛋白质。

[0012] 本发明的其他方面具体涉及包括本发明的重组 DNA 的转基因植物细胞、包括多个此类植物细胞的转基因植物、来自此类植物的后代转基因种子和转基因花粉。通过在群体中筛选转基因植物与不具有所述重组 DNA 的对照植物相比增强的性状,从转基因植物群体中选择此类植物细胞,所述转基因植物群体从用重组 DNA 转化的植物细胞再生并表达蛋白,其中所述增强的性状选自增强的水利用效率、增强的耐寒性、增加的产量、增强的氮利用效率、增强的种子蛋白质和增强的种子油。

[0013] 在本发明的再一方面,植物细胞、植物、种子和花粉进一步包括表达蛋白质的 DNA,所述蛋白质提供来自暴露于除草剂的耐受性,所述除草剂以对野生型所述植物细胞致死的水平应用。此类耐受性不仅在此类植物中作为有利性状特别有用,还在本发明方法的选择步骤中 useful。在本发明的方面中此类除草剂的试剂是草甘膦、麦草畏或草铵 膦化合物。

[0014] 本发明的再其他方面提供对于重组 DNA 纯合的转基因植物,和来自玉米、大豆、棉花、低芥酸菜子、苜蓿、小麦或稻植物的本发明的转基因种子。在阿根廷用于实践本发明的各种方面的其他重要实施方案中,重组 DNA 在来源于玉米系的植物细胞中提供,所述玉米系是并维持对 Mal de Rio Cuarto 病毒或高粱柄锈菌 (*Puccinia sorghi*) 真菌或两者的抵抗力。

[0015] 本发明还提供了用于制备非天然的、转基因种子的方法,所述转基因种子可以用于生产一批具有增强的性状的转基因植物,所述增强的性状由稳定整合的重组 DNA 表达产生,所述重组 DNA 表达在序列中具有至少一个氨基酸结构域的蛋白质,所述氨基酸结构域对于与表 28 鉴别的 Pfam 名称组中由 Pfam 名称鉴别的蛋白质结构域家族的氨基酸比对超过 Pfam 聚集截止值。更具体而言,该方法包括 (a) 在植物群体中筛选增强的性状和重组 DNA,其中在群体中的个体植物可以显示的性状水平低于、基本上等于或高于所述性状在不表达所述重组 DNA 的对照植物中显示的水平, (b) 从群体中选出一种或多种植物,它们显示的性状水平大于所述性状在对照植物中显示的水平, (c) 证实重组 DNA 稳定整合在所述选择的植物中, (d) 分析所选植物的组织以确定生产的蛋白质具有由 SEQ ID NO:1-83 之一的序列中核苷酸编码的蛋白质的功能;和 (e) 收集来自所选植物的种子。在本发明的一个方面,群体中的植物进一步包括表达蛋白质的 DNA,所述蛋白质提供针对暴露于除草剂的耐受性,所述除草剂以对野生型植物细胞致死的水平应用,并且选择通过用除草剂例如草甘膦、麦草畏或草铵膦化合物处理群体来实现。在本发明的另一方面,通过鉴别具有增强的性状的植物来选择植物。该方法对于制备玉米、大豆、棉花、苜蓿、小麦或稻种子特别有用。

[0016] 本发明的另一方面提供了生产杂交玉米种子的方法,其包括从除草剂耐受性玉米植物中获得杂交玉米种子,所述玉米植物还具有稳定整合的重组 DNA,所述重组 DNA 包括 (a) 在植物细胞中起作用并且 (b) 与 DNA 可操作地连接的启动子,所述 DNA 编码在序列中具有至少一个氨基酸结构域的蛋白质,所述氨基酸结构域对于与表 28 鉴别的 Pfam 名称组中由 Pfam 名称鉴别的蛋白质结构域家族的氨基酸 比对超过 Pfam 聚集截止值。该方法进一步包括由所述杂交玉米种子生产玉米植物,其中由所述杂交玉米种子产生的植物的一部分对于所述重组 DNA 是纯合的,由所述杂交玉米种子产生的植物的一部分对于所述重组 DNA 是半合子的,并且由所述杂交玉米种子产生的所述植物的一部分没有一种所述重组 DNA;通过用除草剂处理选择对于所述重组 DNA 是纯合和半合子的玉米植物;收集来自除草剂处理存活的玉米植物的种子并种植所述种子以产生进一步的后代玉米植物;将选择和收集步骤

重复至少一次以产生近交玉米系；并使近交玉米系与第二种玉米系杂交以生产杂交种子。

[0017] 本发明的另一方面提供了选择包括本发明植物细胞的植物的方法，其通过使用免疫反应性抗体检测重组 DNA 表达的蛋白质在种子或植物组织中的存在来实现。本发明的再一方面提供防伪的研磨种子，其具有作为来源指示的本发明的植物细胞。

[0018] 本发明的再其他方面涉及具有增强的水利用效率或增强的氮利用效率的转基因植物。例如，本发明提供无需灌溉水培育玉米、棉花或大豆农作物的方法，其包括种植具有本发明的植物细胞的种子，所述种子根据增强的水利用效率进行选择。可替代的方法包括在玉米农作物生产过程中应用减少的灌溉水，例如提供最高达 300 毫米的地下水。本发明还提供了无需添加氮肥料培育玉米、棉花或大豆农作物的方法，其包括种植具有本发明的植物细胞的种子，所述种子根据增强的氮利用效率进行选择。

[0019] 发明详述

[0020] 如本文所使用的，“植物细胞”指用稳定整合、非天然的重组 DNA 转化的植物细胞，例如通过土壤杆菌属 (*Agrobacterium*) 介导的转化或通过使用重组 DNA 包被的微粒轰击或其他方法。本发明的植物细胞可以是作为微生物或作为后代植物细胞存在的最初转化的植物细胞，或来源于后代转基因植物的种子或花粉，所述后代植物细胞再生为分化的组织，例如再生为具有稳定整合、非天然重组 DNA 的转基因植物。

[0021] 如本文所使用的，“转基因植物”指其基因组已通过重组 DNA 的稳定整合而改变的植物。转基因植物包括由最初转化的植物细胞再生的植物，和来自转化植物的较后代或杂交的后代转基因植物。

[0022] 如本文所使用的，“重组 DNA”指已基因工程改造并在细胞外构建的 DNA，包括包含天然存在的 DNA 或 cDNA 的 DNA 或合成 DNA。

[0023] 如本文所使用的，“共有序列”指在同源蛋白质氨基酸序列比对的保守区域中的人工氨基酸序列，例如，如由同源蛋白质的氨基酸序列的 CLUSTALW 比对确定的。

[0024] 如本文所使用的，“同源物”指执行相同生物学功能的蛋白质群中的蛋白质，例如属于相同 Pfam 蛋白质家族并在本发明的转基因植物中提供共同的增强的性状的蛋白质。同源物由同源基因表达。同源基因包括天然存在的等位基因和人工生成的变体。遗传密码的简并提供下列可能性：不导致基因产生的多肽氨基酸序列的改变而用不同碱基置换该基因的蛋白质编码序列的至少一个碱基。因此，在本发明中有用的多核苷酸可以具有从 SEQ ID NO:1 到 SEQ ID NO:83 已根据遗传密码简并置换进行改变的任何碱基序列。同源物是在最佳比对时在全长蛋白质上具有至少 60% 同一性的蛋白质，更优选约 70% 或更高，更优选至少 80% 并且甚至更优选至少 90% 的同一性，所述全长蛋白质被鉴定为与在植物细胞中表达时赋予增强的性状相关联。同源物包括氨基酸序列与本文公开的蛋白质和同源物的共有氨基酸序列具有至少 90% 同一性的蛋白质。

[0025] 通过氨基酸序列比较鉴别同源物，例如人工或通过使用基于计算机的工具，所述工具使用基于同源性的已知搜索算法，例如通常已知并称为 BLAST、FASTA 和 Smith-Waterman 的那些。局部序列比对程序例如 BLAST，可以用于搜索序列数据库以找到相似序列，并且汇总的期望值 (E 值) 用于测量序列碱基相似性。因为具有特定生物的最佳 E 值的蛋白质命中不必是直向同源物或唯一的直向同源物，所以在本发明中使用交互查询以过滤对于直向同源物鉴别具有显著 E 值的命中序列。交互查询需要搜索针对来自基

础生物的氨基酸序列数据库的显著命中,它类似于查询蛋白质的序列。当交互查询的最佳命中是查询蛋白质自身或由物种形成后的重复基因编码的蛋白质时,命中的可能是直向同源物。本发明的进一步的方面包括功能性同源物蛋白质,作为保守氨基酸置换的结果它们在一个或多个氨基酸方面不同于公开的蛋白质的那些,例如在下列氨基酸中的置换:酸性(带负电荷的)氨基酸例如天冬氨酸和谷氨酸;碱性(带正电荷的)氨基酸例如精氨酸、组氨酸和赖氨酸;中性极性氨基酸例如甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺;中性非极性(疏水)氨基酸例如丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸;具有脂族侧链的氨基酸例如甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;具有脂族-羟基侧链的氨基酸例如丝氨酸和苏氨酸;具有包含酰胺的侧链的氨基酸例如天冬酰胺和谷氨酰胺;具有芳族侧链的氨基酸例如苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;具有碱性侧链的氨基酸例如赖氨酸、精氨酸和组氨酸;具有含硫侧链的氨基酸例如半胱氨酸和甲硫氨酸;天然保守的氨基酸例如缬氨酸-亮氨酸、缬氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、天冬氨酸-谷氨酸、和天冬酰胺-谷氨酰胺。在本发明转基因植物中有用的 DNA 编码的同源物的进一步方面是作为在天然序列中一个或多个氨基酸缺失或插入的结果与公开的蛋白质不同的那些蛋白质。

[0026] 如本文所使用的,“百分比同一性”指 2 个最佳比对的 DNA 或蛋白质区段在组分例如核苷酸序列或氨基酸序列比对窗口自始至终不变的程度。关于测试序列和参考序列的比对区段的“同一性分数”是通过比对窗口由 2 个比对区段序列共有的相同组分的数目除以参考区段中序列组分的总数目,所述总数目是完整的测试序列或完整的参考序列中的较小者。“百分比同一性”(“同一性%”)是同一性分数乘 100。

[0027] 如本文所使用的,“Pfam”指覆盖许多共同蛋白质家族的多重序列比对和隐马尔可夫模型的大集合,例如 Pfam 版本 18.0(2005 年 8 月)包含用于 7973 个蛋白质家族的比对和模型并且基于 Swissprot 47.0 和 SP-TrEMBL 30.0 蛋白质序列数据库。参见 S. R. Eddy, “Profile HiddenMarkov Models”, Bioinformatics 14:755-763, 1998。Pfam 目前由 PfamConsortium 维持和更新。比对代表对蛋白质功能有牵连的某些进化保守结构。由 Pfam 比对建立的分布型(Profile)隐马尔可夫模型(分布型 HMMs)对于自动识别属于现有蛋白质家族的新蛋白质有用,即使通过比对的同源性看起来低。一旦一种 DNA 鉴别为编码在转基因植物中表达时赋予增强的性状的蛋白质,就通过针对隐马尔可夫模型查询候选 DNA 编码的蛋白质氨基酸序列鉴别在相同蛋白质家族中的其他 DNA 编码蛋白质,所述模型使用 HMMER 软件表征 Pfam 结构域,其通用版本在附加的计算机列表中提供。满足特定 Pfam 比对的聚集截止值的候选蛋白质在蛋白质家族中,并且具有在构建用于本发明的植物细胞的重组 DNA 中有用的同源 DNA。附加的计算机列表中还包括了伴随 HMMER 软件使用的隐马尔可夫模型数据库,用于鉴别在关于本发明的植物细胞中的重组 DNA 的共同 Pfam 中表达蛋白质的 DNA。HMMER 软件和 Pfam 数据库是版本 18.0 并用于鉴别对应于 SEQ ID NO:84-SEQ ID NO:166 氨基酸序列的蛋白质中的已知结构域。编码通过本文公开的 Pfam 分析得分高于表 27 中公开的聚集截止值的蛋白质的所有 DNA 都可以在本发明植物细胞的重组 DNA 中使用,例如用于选择具有增强的农艺性状的转基因植物。如下文更具体地公开的,在本发明中使用的相关 Pfams 是 AAA、AP2、Aldo ket red、 α 淀粉酶、Aminotran 12、Ank、ArfGap、Asn 合酶、BR01、CBFD NFYBHMf、过氧化氢酶、CorA、Cpn60 TCP1、半胱氨酸蛋白酶抑制剂、DNA 光解

酶、DSPc、DUF1685、DUF296、Di19、E2F TDP、FAD 结合 7、FA 去饱和酶、FBPase、GAF、GATA、GATase 2、Glyco hydrol、乙二醛酶、Got1、HATPase c、HSF DNA- 结合、HSP20、HisKA、同源异型框、Hpt、异淀粉酶 N、K- 框、内酰胺酶 B、Metallophos、MtN3slv、NAF、NAM、NIF、Oxidored FMN、PAS、PDZ、PRA1、肽酶 C15、肽酶 S10、肽酶 S41、光敏色素、Peinase、Pkinase Tyr、吡哆醛 deC、RI01、RRM1、RTC、RTC 插入片段、Ras、应答 reg、SPC25、SPX、SRF-TF、小突触小泡蛋白、UPF0057、zf-C2H2、和 zf-C3HC4，其数据库包括在附加的计算机列表中。

[0028] 如本文所使用的“启动子”指用于起始转录的调节 DNA。“植物启动子”是无论其起源是否是植物细胞都能够在植物细胞中起始转录的启动子，例如众所周知的是土壤杆菌属启动子在植物细胞中起作用。因此，植物启动子包括从植物、植物病毒和细菌例如土壤杆菌属和慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 细菌获得的启动子 DNA。在发育控制下的启动子的实例包括优先起始在特定组织例如叶、根或种子中的转录的启动子。此类启动子称为“组织优选的”。只起始在特定组织中的转录的启动子称为“组织特异性的”。“细胞类型”特异性启动子主要驱动在一种或多种器官的特定细胞类型，例如根或叶中的血管细胞中的表达。“诱导型”或“阻抑型”启动子是在环境控制下的启动子。可以影响通过诱导型启动子的转录的环境条件的实例包括缺氧条件、或特定化学药品、或光的存在。组织特异性的、组织优选的、细胞类型特异性、和诱导型启动子构成“非组成型”启动子类别。“组成型”启动子是在大多数条件下有活性的启动子。

[0029] 如本文所使用的，“可操作地连接”指在 DNA 构建体中结合 2 个或更多个 DNA 片段，从而使得一种例如编码蛋白质的 DNA 的功能受另一种例如启动子的控制。

[0030] 如本文所使用的，“表达”指产生，例如当其同源 DNA 转录为 mRNA，mRNA 翻译成蛋白质时，蛋白质在植物细胞中表达。

[0031] 如本文所使用的，“对照植物”指不包含重组 DNA 的植物，所述重组 DNA 表达赋予增强的性状的蛋白质。对照植物用于鉴别并选择具有增强的性状的转基因植物。适当的对照植物可以是用于产生转基因植物的亲本系的非转基因植物，即缺乏重组 DNA。适当的对照植物在某些情况下是半合子转基因植物系的后代，它不包含重组 DNA，称为阴性分离子。

[0032] 如本文所使用的，“增强的性状”指转基因植物的特征，它包括但不限于，特征为增强的植物形态学、生理学、生长和发育、产量、营养增强、疾病或害虫抗性、或环境或化学药品耐受性的增强的农艺性状。在本发明的更具体的方面，增强的性状选自增强的水利用效率、增强的耐寒性、增加的产量、增强的氮利用效率、增强的种子蛋白质和增强的种子油。在本发明的重要方面，增强的性状是增强的产量，包括在非应激条件下增加的产量和在环境应激条件下增加的产量。应激条件可以包括例如干旱、阴凉、真菌病、病毒病、细菌病、昆虫侵扰、线虫侵扰、冷温度暴露、热暴露、渗透性应激、减少的氮营养物利用率、减少的磷营养物利用率和高植物密度。“产量”可以受许多性质影响，包括但不限于，植物高度、荚果数目、在植物上的结荚位置、节间数目、裂果 (pod shatter) 发生率、粒度、结瘤和固氮作用的效率、营养物同化作用的效率、针对生物和非生物应激的抗性、碳同化作用、植物结构、抗倒伏性、种子发芽百分数、幼苗活力、和幼年性状。产量还可受发芽效率 (包括在应激条件下的发芽)、生长速率 (包括在应激条件下的生长速率)、谷穗数目、每个谷穗的种子数目、种子大小、种子组成 (淀粉、油、蛋白质) 和种子充填的特征的影响。

[0033] 本发明转基因植物增加的产量可以以多种方法测量，包括测试重量、每株植物的

种子数目、种子重量、每单位面积的种子数目（即，每英亩的种子、或种子重量）、每英亩的蒲式耳、每英亩的公吨、每英亩的吨、每公顷的公斤。例如，玉蜀黍产量可以根据每单位生产面积生产的玉米粒测量，例如每英亩的蒲式耳或每公顷的公吨，通常在调整湿度的基础上报告，例如在 15.5 百分数湿度上。增加的产量还可由关键生物化学化合物的改善利用产生，所述化合物例如氮、亚磷和碳水化合物，或者由环境应激的改善应答产生，所述环境应激例如冷、热、干旱、盐、和害虫或病原体攻击。在本发明中使用的重组 DNA 还可用于提供具有改善的生长和发育以及最终增加的产量的植物，作为植物生长调节剂的修饰的表达、或细胞周期或光合作途径的修饰的结果。有意义的还有产生转基因植物，它就种子组分而言证实了增强的产量，所述种子组分可以对应或可以不对应总体植物产量的增加。此类性质包括种子油、种子分子例如生育酚、蛋白质和淀粉、或油特别是油组分的增强，如可以通过种子组分比率的改变证明的。

[0034] 本发明的核分子的子集包括公开的重组 DNA 的片段，其由至少 15 个、优选至少 16 或 17、更优选至少 18 或 19、并甚至更优选至少 20 个或多个邻接核苷酸的寡核苷酸组成。此类寡核苷酸是具有选自 SEQ ID NO :1-SEQ ID NO :83 的序列的较大分子的片段，并且可用作例如用于检测本发明多核苷酸的探针和引物。

[0035] 在本发明的某些实施方案中，产生天然基因的显性失活突变体以达到所需作用。如本文所使用的，“显性失活突变体”指其基因产物不利地影响相同细胞中正常、野生型基因产物的突变基因，通常通过与其二聚化（组合）。在聚合分子例如胶原的情况下，显性失活突变体通常比导致不产生基因产物的突变（无效突变或无效等位基因）更有害。SEQ ID NO :6 和 SEQ ID NO :7 被构建为分别编码缺失了 K- 框的 agl11 蛋白质和缺失了 MAD 框的 MADs 3 蛋白质。类似于 AGL11 的 MADS 框蛋白质可以视为具有 3 个功能结构域。存在 N 末端 DNA 结合结构域（MADS 框）、更远端的二聚化结构域（K- 框）和 C 末端结构域，它通常涉及与其他蛋白质的相互作用。在植物中，MADS 框和 K- 框之间的区域已显示在某些蛋白质中对于 DNA 结合是重要的并且通常称为 I- 框（Fan 等人，1997）。考虑了几种不同类别的显性失活 构建体。DNA 结合结构域的缺失或灭活可以产生蛋白质，它能够与其天然全长配对物以及其他天然二聚化配对物二聚化。同样地，C 末端结构域的去除可以允许与天然蛋白质及其天然二聚化配对物二聚化。在 2 种情况下，这些类型的构建体使得靶蛋白以及能够与 K- 框相互作用的任何其他蛋白质失去能力。

[0036] 在本发明的其他实施方案中，构建组成型活性突变以达到所需作用。SEQ ID NO :3 只编码来自依钙蛋白激酶（CDPK）的激酶结构域。CDPK1 具有的结构域结构类似于其他依钙蛋白激酶，其中蛋白激酶结构域通过 42 个氨基酸的“间隔区”区域与 4 个 EF 手型结构域分开。认为依钙蛋白激酶由钙诱导的构象变化激活，所述构象变化导致自身抑制性结构域从蛋白激酶活性位点移开（Yokokura 等人，1995）。因此组成型活性蛋白质可以通过只超表达蛋白质激酶结构域来制备。

[0037] DNA 构建体使用本领域普通技术人员众所周知的方法进行装配，并且一般包括与 DNA 可操作地连接的启动子，其表达提供增强的农艺性状。其他构建体组分可以包括另外的调节元件，例如用于增强转录的 5' 前导序列（leader）和内含子、3' 非翻译区（例如多腺苷酸化信号和位点）、用于转运的 DNA 或信号肽。

[0038] 在植物细胞中有活性的众多启动子已在文献中得到描述。这些包括在植物基

因组中存在的启动子以及来自其他来源的启动子,包括在根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 肿瘤诱导性质粒上携带的胭脂碱合酶 (NOS) 启动子和章鱼碱合酶 (OCS) 启动子、花椰菜花叶病毒启动子例如花椰菜花叶病毒。例如,参见美国专利号 5,858,742 和 5,322,938,它公开了来源于花椰菜花叶病毒的组成型启动子的版本 (CaMV35S),美国专利 5,641,876,它公开了稻肌动蛋白启动子,美国专利申请公开 2002/0192813A1,它公开了在有效的植物表达载体设计中有用的 5'、3' 和内含子元件,美国专利申请序列号 09/757,089,它公开了玉蜀黍叶绿体醛缩酶启动子,美国专利申请序列号 08/706,946,它公开了稻谷蛋白启动子;美国专利申请序列号 09/757,089,它公开了玉蜀黍醛缩酶 (FDA) 启动子,以及美国专利申请序列号 60/310,370,它公开了玉蜀黍 nicotianamine 合酶启动子,所述专利全部引入本文作为参考。在植物细胞中起作用的这些以及众多其他启动子是本领域技术人员已知的并且可在本发明的重组多核苷酸中用于提供在转基因植物细胞中表达所需基因。

[0039] 在本发明的某些方面,在植物种子组织中的充分表达是完成种子组成中的改良所需的。用于种子组成修饰的示例性启动子包括来自种子基因例如油菜籽蛋白 (美国专利 5,420,034)、玉米醇溶蛋白 Z27 和谷蛋白 1 (Russell 等人 (1997) *Transgenic Res.* 6(2) :157-166), 和过氧化物氧还蛋白抗氧化剂 (Per1) (Stacy 等人 (1996) *Plant Mol Biol.* 31(6) :1205-1216)、玉蜀黍 L3 油质蛋白 (U. S. 6,433,252)、球蛋白 1 (Belanger 等人 (1991) *Genetics* 129 :863-872) 的启动子。

[0040] 在本发明的其他方面,在植物绿色组织中的优先表达是所需的。用于此类用途的目的启动子包括来自基因的那些,例如鼠耳芥 (*Arabidopsis thaliana*) 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶 (Rubisco) 小亚基 (Fischhoff 等人 (1992) *Plant Mol Biol.* 20 :81-93)、醛缩酶和丙酮酸正磷酸二激酶 (PPDK) (Taniguchi 等人 (2000) *Plant Cell Physiol.* 41(1) :42-48)。

[0041] 此外,启动子可以被改变以包含多重“增强子序列”以帮助提高基因表达。此类增强子是本领域已知的。通过在此类构建体中包含增强子序列,可以增强所选蛋白质的表达。这些增强子通常在真核细胞中起作用的启动子的转录起始的 5' 发现,但通常可以插入编码序列的上游 (5') 或下游 (3')。在某些情况下,这些 5' 增强元件是内含子。作为增强子特别有用的是稻肌动蛋白 1 (参见美国专利 5,641,876) 和稻肌动蛋白 2 基因的 5' 内含子、玉蜀黍乙醇脱氢酶基因内含子、玉蜀黍热休克蛋白 70 基因内含子 (美国专利 5,593,874) 和玉蜀黍 *shrunkn1* 基因。

[0042] 在本发明的其他方面,需要在植物种子组织中的充分表达以完成种子组成的改良。用于种子组成修饰的示例性启动子包括来自种子基因的启动子,例如油菜籽蛋白 (U. S. 5,420,034)、玉蜀黍 L3 油质蛋白 (U. S. 6,433,252)、玉米醇溶蛋白 Z27 (Russell 等人 (1997) *Transgenic Res.* 6(2) :157-166)、球蛋白 1 (Belanger 等人 (1991) *Genetics* 129 :863-872)、谷蛋白 1 (Russell (1997) 同上)、和过氧化物氧还蛋白抗氧化剂 (Per1) (Stacy 等人 (1996) *Plant Mol Biol.* 31(6) :1205-1216)。

[0043] 根据本发明制备的重组 DNA 构建体通常还将包括 3' 元件,它一般包含多腺苷酸化信号和位点。众所周知的 3' 元件包括来自根癌土壤杆菌基因的那些,例如引入本文作为参考的 U. S. 6,090,627 中公开的 *nos* 3'、*tml* 3'、*tmr* 3'、*tms* 3'、*ocs* 3'、*tr* 73';来自植物基因例如小麦 (普通小麦 (*Triticum aestivum*)) 热休克蛋白 17 (Hsp173')、小麦遍在

蛋白基因、小麦果糖-1,6-二磷酸酶基因、稻谷蛋白基因、稻乳酸脱氢酶基因和稻 β 微管蛋白基因的 3' 元件,所有这些都在引入本文作为参考的美国公开专利申请 2002/0192813A1 中公开;和豌豆 (*Pisum sativum*) 核酮糖二磷酸羧化酶基因 (rbs 3'),和来自宿主植物中的基因的 3' 元件。

[0044] 构建体和载体还可包括用于将基因靶向植物细胞器,特别是叶绿体、白色体或其他质体细胞器的转运肽。关于叶绿体转运肽使用的描述参见引入本文作为参考的美国专利 5,188,642 和美国专利号 5,728,925。关于在本发明中有用的鼠耳芥 EPSPS 基因的转运肽区域的描述,参见 Klee, H. J. 等人 (MGG(1987)210:437-442)。

[0045] 包括或来源于用重组 DNA 转化的本发明植物细胞的转基因植物可以进一步用堆积性状增强,例如农作物植物具有的由本文公开的 DNA 表达产生的增强的性状,与除草剂和/或害虫抗性性状组合。例如,本发明的基因可以与其他农艺目的性状堆积,例如提供除草剂抗性或昆虫抗性的性状,例如使用来自苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 的基因以提供针对鳞翅昆虫、鞘翅昆虫 (coleopteran)、同翅昆虫、半翅昆虫 (hemipteran) 和其他昆虫的抗性。其转基因植物耐受性已证实以及可以应用本发明方法的除草剂包括,但不限于,草甘膦、麦草畏、草铵膦、磺酰脲类、溴苯腈和达草灭除草剂。编码涉及除草剂耐受性的蛋白质的多核苷酸分子是本领域众所周知的,并且包括,但不限于,美国专利 5,094,945;5,627,061;5,633,435 和 6,040,497 中公开的、赋予草甘膦耐受性的编码 5-烯醇式丙酮基莽草酸-3-磷酸合酶 (EPSPS) 的多核苷酸分子;美国专利 5,463,175 中公开的编码草甘膦氧化还原酶 (GOX) 的多核苷酸分子,和美国专利申请公开 2003/0083480A1 中公开的、同样赋予草甘膦耐受性的草甘膦-N-乙酰转移酶 (GAT);美国专利申请公开 2003/0135879A1 中公开的、赋予麦草畏耐受性的麦草畏单加氧酶;美国专利 4,810,648 中公开的、赋予溴苯腈耐受性的编码溴苯腈腈水解酶 (Bxn) 的多核苷酸分子;Misawa 等人, (1993) Plant J. 4:833-840 和 Misawa 等人, (1994) Plant J. 6:481-489 中描述的、关于达草灭耐受性的编码八氢番茄红素去饱和酶 (crt1) 的多核苷酸分子;Sathasivan 等人 (1990) Nucl. Acids Res. 18:2188-2193 中描述的、赋予对磺酰脲类除草剂耐受性的编码乙酰羟酸合酶 (AHAS, aka ALS) 的多核苷酸分子;DeBlock, 等人 (1987) EMBO J. 6:2513-2519 中公开的、赋予草铵膦和双丙氨酰膦耐受性的称为 bar 基因的多核苷酸分子;美国专利申请公开 2003/010609A1 中公开的、赋予 N 氨基甲基膦酸耐受性的多核苷酸分子;美国专利 6,107,549 中公开的、赋予吡啶除草剂抗性的多核苷酸分子;赋予多重除草剂例如草甘膦、莠去津、ALS 抑制剂、isoxoflutole 和草铵膦除草剂耐受性的分子和方法公开于美国专利 6,376,754 和美国专利申请公开 2002/0112260 中,所有所述美国专利和专利申请公开都引入本文作为参考。赋予昆虫/线虫/病毒抗性的分子和方法公开于美国专利 5,250,515;5,880,275;6,506,599;5,986,175 和美国专利申请公开 2003/0150017A1 中,所有所述专利引入本文作为参考。

[0046] 在具体实施方案中,本发明人预期了与本文公开的蛋白质结合的单克隆或多克隆抗体的用途。制备和表征抗体的方法是本领域众所周知的(参见,例如 Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988;引入本文作为参考)。产生单克隆抗体 (mAbs) 的方法一般根据与制备多克隆抗体的那些相同的路线开始。简言之,多克隆抗体通过用依照本发明的免疫原性组合物免疫动物并收集来自免疫动物的抗血清来制

备。广泛范围的动物物种可以用于生产抗血清。一般地,用于生产抗血清的动物是兔、小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠或山羊。因为兔的血量相对较大,所以兔是生产多克隆抗体的优选选择。

[0047] 如本领域众所周知的,给定组合物在其免疫原性方面可以不同。因此通常必须加强宿主的免疫系统,如可以通过将肽或多肽免疫原与载体偶联来完成。示例性和优选的载体是匙孔血蓝蛋白 (KLH) 和牛血清清蛋白 (BSA)。其他清蛋白例如卵清蛋白、小鼠血清清蛋白或兔血清清蛋白也可用作载体。使多肽与载体蛋白缀合的方法是本领域众所周知的并且包括使用戊二醛、间-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯、碳二亚胺和 bis-biazotized 联苯胺。

[0048] 如本领域众所周知的,特定免疫原组合物的免疫原性可以通过使用称为佐剂的非特异性免疫应答刺激物增强。示例性和优选的佐剂包括完全弗氏佐剂(包含杀死的结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 的非特异性免疫应答刺激物)、不完全弗氏佐剂和氢氧化铝佐剂。

[0049] 用于生产多克隆抗体的免疫原组合物的量依免疫原的性质以及用于免疫接种的动物而变。多种途径可以用于施用免疫原(皮下、肌肉、皮内、静脉内和腹膜内)。多克隆抗体的生产可以通过免疫动物在免疫接种后各个点上的抽样血液来监控。还可以给予第二次加强注射。重复加强和滴定过程直至达到合适滴度。当获得所需免疫原性水平时,可以对免疫的动物抽血并分离且贮存血清,和/或动物可以用于生产 mAbs。

[0050] 通过使用众所周知的技术可以容易地制备 mAbs,例如引入本文作为参考的美国专利号 4,196,265 中例示的那些。一般地,这项技术涉及用所选免疫原组合物,例如纯化或部分纯化的抗真菌蛋白、多肽或肽免疫合适的动物。免疫组合物以有效刺激抗体生产性细胞的方式施用。啮齿类动物例如小鼠和大鼠是优选的动物,然而,兔、羊或青蛙细胞的使用也是可能的。大鼠的使用可以提供一定的优点 (Goding, 1986, 第 60-61 页),但小鼠是优选的, BALB/c 小鼠是最优选的,因为这是最常规使用的并且一般给出更高百分比的稳定融合物。

[0051] 免疫接种后,选择具有生产抗体潜力的体细胞,特别是 B 淋巴细胞 (B 细胞) 在 mAb 生产方案中使用。这些细胞从活组织检查的脾、扁桃体或淋巴结,或从外周血样品中获得。优选脾细胞和外周血细胞,前者是因为它们是成浆细胞分裂阶段中的抗体生产性细胞的丰富来源,并且后者是因为外周血易于获得。通常,一组动物将是已免疫的并且将取出具有最高抗体滴度的动物脾,并通过用注射器使脾匀浆来获得脾淋巴细胞。一般地,来自免疫的小鼠的脾包含大约 5×10^7 - 2×10^8 的淋巴细胞。

[0052] 来自免疫的动物的抗体生产性 B 淋巴细胞随后与无限增殖骨髓瘤细胞的细胞融合,所述无限增殖骨髓瘤细胞一般是与被免疫的动物相同物种的。适合用于杂交瘤生产性融合操作的骨髓瘤细胞系优选是非抗体生产性的,具有高融合效率,并且具有致使它们不能在特定选择性培养基上生长的酶缺陷,所述选择性培养基只支持所需融合细胞(杂交瘤)生长。

[0053] 众多骨髓瘤细胞中的任何一种都可使用,如本领域技术人员已知的 (Goding, 1986, 第 65-66 页; Campbell, 1984, 第 75-83 页)。例如,当免疫的动物是小鼠时,人们可以使用 P3-X63/Ag8、X63-Ag8.653、NS1/1.Ag 41、Sp210-Ag14、F0、NS0/U、MPC-11、MPC11-X45-GTG1.7 和 S194/5XX0 Bu1;对于大鼠,人们可以使用 R210、RCY3、Y3-Ag1.2.3、IR983F 和 4B210;并且 U-266、GM1500-GRG2、LICR-LON-HMy2 和 UC729-6 均在人细胞融合方

面有用。

[0054] 一种优选的鼠类骨髓瘤细胞是 NS-1 骨髓瘤细胞系（也称为 P3-NS-1-Ag4-1），它通过要求细胞系保藏号 GM3573 从 NIGMS HumanGenetic Mutant Cell Repository 容易获得。可以使用的另一种小鼠骨髓瘤细胞系是 8- 氮鸟嘌呤抗性小鼠鼠类骨髓瘤 SP2/0 非生产者细胞系。

[0055] 用于产生抗体生产性脾或淋巴结细胞与骨髓瘤细胞的杂交体的方法通常包括使体细胞与骨髓瘤细胞以 2 : 1 的比率混合，尽管在促进细胞膜融合的一种或多种试剂（化学或电）的存在下，比率可以分别为约 20 : 1 到约 1 : 1。使用 Send 病毒的融合方法（Kohler 和 Milstein, 1975 ; 1976），以及使用聚乙二醇（PEG），例如 37%（v/v）PEG 的那些（Geftter 等人, 1977）已得到描述。使用电诱导的融合方法也是适当的（Goding, 1986, 第 71-74 页）。

[0056] 融合方法通常以低频率产生能存活的杂交体，约 1×10^{-6} - 1×10^{-8} 。然而，这不造成问题，因为通过在选择性培养基中培养可以将能存活的、融合的杂交体与亲本、未融合的细胞（特别是未融合的骨髓瘤细胞，它将通常继续无限地分裂）区分开。选择性培养基一般是包含阻断组织培养基中核苷酸从头合成的试剂。示例性和优选试剂是氨基蝶呤、氨甲蝶呤和重氮丝氨酸。氨基蝶呤和氨甲蝶呤阻断嘌呤和嘧啶的从头合成，而重氮丝氨酸只阻断嘌呤合成。当使用氨基蝶呤或氨甲蝶呤时，培养基补加了次黄嘌呤和胸苷作为核苷酸来源（HAT 培养基）。当使用重氮丝氨酸时，培养基补加了次黄嘌呤。

[0057] 优选的选择性培养基是 HAT。只有能够操作核苷酸补救途径的细胞能够在 HAT 培养基中存活。骨髓瘤细胞在补救途径的关键酶例如次黄嘌呤转磷酸核糖基酶（HPRT）上有缺陷，并且它们不能存活。B 细胞可以操作这个途径，但它们在培养中具有有限的寿命并且一般在约 2 周内死亡。因此可以在选择性培养基中存活的唯一细胞是由骨髓瘤和 B 细胞形成的那些杂交体。

[0058] 这种培养提供杂交瘤群体，从中可以选择特定的杂交瘤。一般地，杂交瘤的选择如下进行：通过在微量滴定板中单个克隆稀释培养细胞，随后测试个别克隆上清液（约 2-3 周后）的所需反应性。测定应该是灵敏、简单且快速的，例如放射免疫测定、酶免疫测定、细胞毒性测定、噬菌斑测定、免疫酶斑测定等。

[0059] 选择的杂交瘤随后可以系列稀释并克隆到个别的抗体生产性细胞系中，其克隆可以随后无限地繁殖以提供 mAbs。可以采用细胞系以 2 种基本方式生产 mAb。杂交瘤的样品可以注射（通常注射到腹膜腔内）到组织相容性动物类型中，所述动物用于提供最初融合的体细胞和骨髓瘤细胞。注射的动物发展出分泌特定单克隆抗体的肿瘤，所述抗体由融合的细胞杂交体产生。随后可以抽取动物的体液，例如血清或腹水，以提供高浓度的 mAbs。个别细胞系还可在体外培养，其中 mAbs 天然分泌到培养基中，从中它们可以容易地以高浓度获得。如果需要，通过任一方法产生的 mAbs 可以使用过滤、离心和各种色谱法例如 HPLC 或亲和色谱进一步纯化。

[0060] 植物细胞转化方法

[0061] 用重组 DNA 转化植物细胞的众多方法是本领域已知的并且可以在本发明中使用。用于植物转化的 2 种常用方法是土壤杆菌属介导的转化和微粒轰击。微粒轰击方法在美国专利 5,015,580（大豆）；5,550,318（玉米）；5,538,880（玉米）；5,914,451（大

豆);6,160,208(玉米);6,399,861(玉米)和6,153,812(小麦)中说明,并且土壤杆菌属介导的转化在美国专利5,159,135(棉花);5,824,877(大豆);5,591,616(玉米);和6,384,301(大豆)中描述,所有专利都引入本文作为参考。对于基于根癌土壤杆菌的植物转化系统,在转化构建体上存在的另外元件将包括T-DNA左和右边界序列以促进重组多核苷酸整合到植物基因组中。

[0062] 一般而言,在靶植物系的基因组中随机即在非特异性位置导入重组DNA是有用的。在特殊情况下,靶向重组DNA插入片段可以是有用的,以实现位点特异性整合,例如代替基因组中的现有基因,使用植物基因组中现有的启动子,或在已知对于基因表达有活性的预定位点插入重组多核苷酸。现有的已知对植入物起作用的几种位点特异性重组系统包括如美国专利4,959,317中公开的cre-lox,以及如美国专利5,527,695中公开的FLP-FRT,两个所述专利都引入本文作为参考。

[0063] 本发明的转化方法优选在培养基上和控制环境中的组织培养中实践。“培养基”指众多营养物混合物,它们用于体外培养细胞,即在完整活生物之外。受体细胞靶包括,但不限于,分生组织细胞,愈伤组织,未成熟胚和配子细胞例如小孢子、花粉、精子和卵细胞。预期的是由其可以再生能育植物的任何细胞用作受体细胞。愈伤组织可以从组织来源开始,包括,但不限于,未成熟胚、幼苗顶端分生组织、小孢子等。能够作为愈伤组织增殖的细胞也是用于遗传转化的受体细胞。用于制备本发明转基因植物的实际转化方法和材料,例如各种培养基和受体靶细胞,未成熟胚细胞的转化和后续能育的转基因植物的再生公开于美国专利6,194,636和6,232,526中,它们引入本文作为参考。

[0064] 可以从能育的转基因植物收获转基因植物的种子并且可以用于培育本发明的转化植物的后代,包括用于选择具有增强的性状的植物的杂交植物系。除了用重组DNA直接转化植物外,通过使具有重组DNA的第一种植物与缺乏DNA的第二种植物杂交可以制备转基因植物。例如,重组DNA可以导入顺应转化以生产转基因植物的第一种植物系中,所述第一种植物系可以与第二种植物系杂交以使重组DNA基因渐渗到第二种植物系中。具有提供增强的性状例如增强的产量的重组DNA的转基因植物可以与具有赋予另一种性状例如除草剂抗性 or 害虫抗性的其他重组DNA的转基因植物系杂交,以生产具有赋予2种性状的重组DNA的后代植物。一般地,在关于组合性状的此类育种中,供给另外性状的转基因植物是雄性系,并且携带基础性状的转基因植物是雌性系。将分离这种杂交的后代,从而使得某些植物将携带关于2种亲本性状的DNA,并且某些将携带关于一种亲本性状的DNA;此类植物可以通过与亲本重组DNA结合的标记鉴别,例如通过分析重组DNA的标记鉴别,或在其中选择标记连接至重组体的情况下,通过应用选择试剂,例如与除草剂耐受性标记一起使用的除草剂,或通过选择增强的性状。携带2种亲本性状的DNA的后代植物可以与雌性亲本系多次回交,例如通常为6-8代,以产生具有与一种最初转基因亲本系基本上相同的基因型但具有另一种转基因亲本系的重组DNA的后代植物。

[0065] 在转化实践中,在任何一个转化实验中DNA一般只导入小百分比的靶植物细胞。标记基因用于提供鉴别那些细胞的有效系统,所述细胞通过在其基因组中接受和整合转基因DNA构建体稳定转化。优选的标记基因提供选择标记,所述选择标记赋予针对选择试剂,例如抗生素或除草剂的抗性。本发明植物对其可以是抗性的任何除草剂是选择标记的有用试剂。潜在转化的细胞暴露于选择剂。在存活细胞群体中的将是其中抗性赋予基因一般

以足够水平整合并表达以允许细胞存活的那些细胞。可以测试细胞以进一步证实外源 DNA 的稳定整合。通常使用的选择标记基因包括赋予对抗生素抗性的那些,所述抗生素例如卡那霉素和巴龙霉素 (nptII)、潮霉素 B(aph IV) 和庆大霉素 (aac3 和 aacCA),或针对除草剂例如草铵膦 (bar 或 pat) 和草甘膦 (aroA 或 EPSPS) 的抗性。此类选择的实例在美国专利 5,550,318 ;5,633,435 ;5,780,708 和 6,118,047 中说明,所有专利引入本文作为参考。提供视觉鉴别转化体的能力的选择标记也可以采用,例如表达有色或荧光蛋白质例如萤光素酶或绿色荧光蛋白 (GFP) 的基因,或表达 β 葡糖醛酸糖苷酶的基因或其各种显色底物是已知的 uidA 基因 (GUS)。

[0066] 暴露于选择剂存活的植物细胞或在筛选测定法中已评分为阳性的植物细胞,可以在再生培养基中培养并允许成熟为植物。由转化的植物细胞再生的发展中的小植物可以转移至植物生长混合物,并在转移至用于成熟的温室或生长室之前使其受冷而变得耐寒,例如在约 85% 相对湿度、600ppm CO₂ 和 25-250 微爱因斯坦 (microeinsteins)m⁻²s⁻¹ 光的环境控制的室中。取决于最初组织,在鉴别出转化体后约 6 周-10 个月再生出植物。可以使用本领域技术人员已知的常规植物育种方法给植物授粉并且产生种子,例如自花传粉通常对转基因玉米使用。可以测试再生的转化植物或其后代种子或植物的重组 DNA 表达并选择增强的农艺性状的存在。

[0067] 转基因植物和种子

[0068] 将来源于本发明植物细胞的转基因植物培育至产生与对照植物相比具有增强的性状的转基因植物,并产生本发明的转基因种子和单倍体花粉。通过在转化的植物或后代种子中选择增强的性状来鉴别具有增强的性状的此类植物。关于效率,设计选择方法以评估包括重组 DNA 的多重转基因植物 (事件),例如来自 2-20 个或更多转基因事件的多重植物。从本文提供的转基因种子培育的转基因植物证实有助于增加产量的改良的农艺性状,或提供增加的植物价值,包括例如改良的种子质量的其他性状。特别感兴趣的是具有增强的水利用效率、增强的耐寒性、增加的产量、增强的氮利用效率、增强的种子蛋白质和增强的种子油的植物。

[0069] 表 1 提供了编码蛋白质的 DNA (“基因”) 列表,它用作生产具有增强的农艺性状的转基因植物的重组 DNA,表 1 的元件通过参考下列来描述:

[0070] “PEP SEQ”鉴别 SEQ ID NO:84-166 的氨基酸序列。

[0071] “NUC SEQ”鉴别 SEQ ID NO:1-83 的 DNA 序列。

[0072] “基础载体”鉴别用于转化重组 DNA 的基础质粒。

[0073] “蛋白质名称”是由重组 DNA 编码的蛋白质的俗名。

[0074] “增强的性状”鉴别由蛋白质在转基因农作物植物中表达赋予的增强的性状。

[0075] “质粒 ID”鉴别关于植物转化质粒的任意名称,包括用于在植物细胞中表达重组 DNA 的重组 DNA。

[0076] 表 1

[0077]

PEP SE Q ID NO	NU C SEQ ID NO	基础载体	蛋白质名称	增强的性状	质粒 ID
84	1	pMON65154	乳酰谷胱甘肽裂合酶	增强的种子蛋白质	pMON69462
85	2	pMON72472	rab7c	增强的耐寒性	pMON69456
86	3	pMON65154	CDPK 激酶结构域	增强的水利用效率	pMON67754

[0078] [0078]

87	4	pMON72472	SCOF-1	增强的水利用效率和 增强的耐寒性	pMON72494
88	5	pMON72472	聚球蓝细菌属物种 (Synechococcus sp.) PCC 6301 δ 9 去饱和酶	增加的产量、增强的耐寒性和增强的水利用效率	pMON68399
89	6	pMON72472	鼠耳芥 ag111 δ K- 框	改善的耐寒性	pMON73765
90	7	pMON72472	稻 MADS3 δ MADS- 框 -L37528	增强的耐寒性	pMON73829
91	8	pMON72472	玉米 MADS 框蛋白质 110	增强的氮利用效率和 增强的耐寒性	pMON73816
92	9	pMON72472	鼠耳芥同源结构域转 录因子 -	增强的耐寒性	pMON75305
93	10	pMON72472	鼠耳芥 AP2 结构域转 录因子	增强的耐寒性	pMON75306
94	11	pMON72472	鼠耳芥 GATA 结构域 转录因子	增强的耐寒性	pMON75309
95	12	pMON72472	鼠耳芥 AT- 钩状结构 域转录因子 -	增强的耐寒性	pMON75312
96	13	pMON72472	稻 DET1- 样 - BAB16336	增强的氮利用效率和 增强的耐寒性	pMON80270
97	14	pMON72472	大豆 G482- 样 1	增强的水利用效率	pMON76342
98	15	pMON72472	鼠耳芥假设蛋白 [NM_114802]	增强的耐寒性	pMON79174
99	16	pMON72472	玉米假设蛋白	增强的耐寒性	pMON79413
100	17	pMON72472	大豆 Pra2- 样蛋白质 2	增强的氮利用效率	pMON75511
101	18	pMON72472	土壤杆菌属隐花色素 - 样蛋白质 -AE008050	增强的耐寒性	pMON75515
102	19	pMON72472	稻 SNF1- 样蛋白质 9 [OsPK4]-AB011967	增强的氮利用效率、增 强的水利用效率、增加 的产量	pMON80542
103	20	pMON72472	玉米 SNF1- 样蛋白质 3	增强的水利用效率和 增强的氮利用效率	pMON78949

[0079] [0079]

104	21	pMON72472	玉米 SNF1- 样蛋白质 8	增强的耐寒性和增强 的水利用效率	pMON78936
105	22	pMON72472	玉米 Rubisco 激活酶 2	增加的产量、增强的耐 寒性和增强的氮利用 效率	pMON75524
106	23	pMON72472	NLI 相互作用同工型 T1-	增强的耐寒性和增加 的产量	pMON79163
107	24	pMON72472	玉蜀黍小突触小泡蛋 白相关序列 1-	增强的耐寒性条件和 增加的产量	pMON75533
108	25	pMON72472	玉蜀黍镁转运蛋白 mrs2-1- 样 1 序列	增强的氮利用效率和 增加的产量	pMON79709
109	26	pMON72472	类似于结瘤蛋白 MtN3 蛋白质的玉米蛋白质	增强的水利用效率	pMON79422
110	27	pMON72472	玉米乙醛酶 II 同工 酶	增强的耐寒性	pMON79425
111	28	pMON72472	玉米 RNA 3'-末端磷 酸环化酶 - 样蛋白质	增强的耐寒性	pMON79718
112	29	pMON72472	稻 Di19 样序列	增强的耐寒性	pMON79447
113	30	pMON72472	大豆 MAP 激酶 6 样 2 序列	增强的耐寒性	pMON78232
114	31	pMON72472	Ralstonia metallidurans 谷氨酸脱羧酶	增强的耐寒性和增强 的氮利用效率	pMON75980
115	32	pMON72472	稻 HSF5 样序列	增强的水利用效率	pMON80489
116	33	pMON72472	大豆 hsp17.4 样 1 序列	增强的耐寒性和增强 的水利用效率	pMON79697
117	34	pMON72472	玉米的推定吡咯烷酮 羧肽酶	增强的水利用效率	pMON78237
118	35	pMON72472	鼠耳芥 E2F	增强的耐寒性、增强 的氮利用效率	pMON80461
119	36	pMON72472	鼠耳芥蛋白质磷酸酶 1A	增强的耐寒性	pMON78235

[0080] [0080]

120	37	pMON72472	鼠耳芥 CtpA	增强的耐寒性和增强 的水利用效率	pMON80452
121	38	pMON74532	鼠耳芥 CtpA	增加的产量	
122	39	pMON72472	类似于鼠耳芥可能的 微粒体信号肽酶的玉 米蛋白质	增强的耐寒性	pMON80500
123	40	pMON72472	[稻 (Oryza sativa)] 的 推定醛糖还原酶	增强的氮利用效率	pMON80850
124	41	pMON72472	玉蜀黍 (Zea Mays) 激酶 II (类似于酵母 IKS1 和 At MRK1)	增加的种子蛋白质	pMON78949
125	42	pMON72472	果糖 -1-6- 二磷酸酶	增加的产量	pMON81853
126	43	pMON72472	大豆 G1928 样 1	增加的种子蛋白质	pMON83769
127	44	pMON74532	集胞蓝细菌属物种 (Synechocystis sp.) 6803Hik19	增加的产量	pMON78911
128	45	pMON72472	集胞蓝细菌属物种 6803Hik19	增加的产量	
129	46	pMON72472	鼠耳芥 NAC 结构域转 录因子	增加的产量	pMON73787
130	47	pMON72472	酵母丙氨酸转氨酶 1- AAB67593	增加的产量和增强的 氮利用效率	pMON77895
131	48	pMON72472	大豆过氧化氢酶 - 样 1	增加的产量	pMON79152
132	49	pMON72472	玉米 ALG-2 相互作 用蛋白质	增加的产量	pMON80921
133	50	pMON72472	推定的丝氨酸羧肽酶	增加的产量	pMON75505
134	51	pMON72472	推定的锚蛋白样蛋白 质 -	增加的产量	pMON80925
135	52	pMON72472	推定的激酶样蛋白质 -	增加的产量	pMON78942
136	53	pMON72472	推定的蛋白质 -	增加的产量	pMON79164
137	54	pMON72472	酵母 YPR45W/asn1- U40829	增加的产量	pMON79653

[0081] [0081]

138	55	pMON72472	稻 AtHSP17.6A 样 1 序列	增加的产量	pMON81228
139	56	pMON72472	酵母 YDL123w	增加的产量	pMON79430
140	57	pMON72472	稻 12-oxophytodienoate 还原酶样 1 序列	增加的产量	pMON79731
141	58	pMON72472	大豆 MAP 激酶 6 样 3 序列	增加的产量	pMON78229
142	59	pMON72472	鼠耳芥 GAD1	增加的产量	pMON79696
143	60	pMON74532	鼠耳芥 GAD1		
144	61	pMON72472	大豆 hsp17.4 样 4 序列	增加的产量	pMON78240
145	62	pMON72472	玉蜀黍 hsp60 样 4 序 列	增加的产量	pMON80283
146	63	pMON72472	大豆 dsPTP1	增加的产量	pMON80866
147	64	pMON72472	酵母 GLC3 糖原分支 酶	增加的产量	pMON80292
148	65	pMON72472	鼠耳芥未知蛋白质	增加的产量	pMON82223
149	66	pMON72472	β -D- 葡萄糖苷酶	增加的产量	pMON83553

150	67	pMON72472	未知蛋白质 1	增加的产量	pMON81857
151	68	pMON72472	醛氧化酶	增加的产量	pMON82218
152	69	pMON72472	玉米假设蛋白	在冷应激下改善的生长	pMON78227
153	70	pMON72472	玉米假设蛋白	在冷应激下改善的生长	pMON78904
154	71	pMON72472	鼠耳芥半胱氨酸蛋白 酶抑制剂	增加的产量	pMON78920
155	72	pMON82053	鼠耳芥半胱氨酸蛋白 酶抑制剂	增加的产量	pMON92646
156	73	pMON72472	鼠耳芥假设蛋白	在冷应激下改善的生长	pMON78922
157	74	pMON72472	酵母 SNF1-A26030	在低氮、干旱和 / 或冷 应激下改善的生长	pMON78948
158	75	pMON72472	大豆 SNF1- 样蛋白质 1	增加的产量	pMON79660

[0082] [0082]

159	76	pMON72472	大豆 SNF1- 样蛋白质 2	增强的氮利用效率、增 强的水利用效率、增加 的产量	pMON78931
160	77	pMON72472	大豆 G1760	增加的产量和增强的 水利用效率	pMON82645
160	77		大豆 G1760	增加的产量	pMON74470
161	78	pMON72472	稻乙二醛酶 II	增加的产量	pMON79665
162	79	pMON72472	玉米 OsPK7- 样	增强的氮利用效率、增 强的水利用效率、增加 的产量	pMON82629
163	80	pMON75432	含有鼠耳芥 phyC 内含 子 1 的稻 phyA	增加的产量	pMON81344
164	81	pMON82060	稻 G975 样 1	在冷应激下改善的生 长	
165	82		玉米光敏色素 A	增加的产量	pMON74916
166	83		鼠耳芥 G1760	增加的产量	pMON73957

[0083] 具有增强的农艺性状的转基因植物的选择方法

[0084] 在用重组 DNA 转化的植物细胞再生的转基因植物群体中,比产生种子和后代植物的能育的转基因植物活得长的许多植物将不显示增强的农艺特性。从群体选择必需鉴别一种或多种转基因植物细胞,它们可以提供具有增强的性状的植物。具有增强的性状的转基因植物选自再生或来源于如本文所述转化的植物细胞的植物群体,这通过在多种测定中评估植物以检测增强的性状,例如增强的水利用效率、增强的耐寒性、增加的产量、增强的氮利用效率、增强的种子蛋白质和增强的种子油。这些测定还可以采取多种形式,包括,但不限于,在温室或田间试验中直接筛选性状或通过筛选替代性状。此类分析可以涉及检测植物化学组成、生物量、生理性质、形态学中的改变。化学组成中例如谷粒的营养组成的改变可以通过分析种子组成和蛋白质含量、游离氨基酸、油、游离脂肪酸、淀粉或生育酚来检测。生物量特征中的改变可以对温室或田间生长植物进行,并且可以包括植物高度、茎直径、根和枝条干重 ;和,对于玉米植物,谷穗长度和直径。 生理性质中的改变可以通过评估针对应激条件的应答来鉴定,例如使用施加的应激条件例如水分亏缺、缺氮、寒冷生长条件、病原体或昆虫攻击或光缺乏、或增加的植物密度的测定。形态学中的改变可以通过目视观察具有增强的农艺性状的转化植物看起来也是正常植物,与朝向丛状分枝、更高、更厚、更狭窄的叶、有条纹的叶、具节的性状、缺绿症、白化、花色素苷产生、或改变的雄花穗、谷穗或根的改变比较的趋势。其他选择性质包括花粉释放的天数、抽丝的天数、叶伸展速率、叶绿素含量、叶温度、直立、幼苗活力、节间长度、植物高度、叶数目、叶面积、分蘖、支柱根、保持绿色 (stay green)、茎倒伏、根倒伏、植物健康状况、不育 / 多育、绿色植物突然折断 (green snap) 和害虫抗性。另外,可以评估收获的谷粒的表型特征,包括谷穗上每行的谷粒数目、谷穗上谷粒的行数、谷粒败育、谷粒重量、谷粒大小、谷粒密度和物理谷粒质量。尽管本发明的植物细胞和方法可以应用于任何植物细胞、植物、种子或花粉,例如任何果实、蔬菜、草、树或观赏植物,但本发明的各个方面优选应用于玉米、大豆、棉花、低芥酸菜子、苜蓿、小麦和稻植物。在许多情况下,本发明应用于对来自 Mal de Rio Cuarto 病毒或高粱柄锈菌真菌或两者的疾病有固有抗性的玉米植物。

[0085] 包括下列实施例以证实本发明的方面,根据本公开内容,本领域技术人员应当理解,在不背离本发明的精神和范围的情况下,可在公开的具体方面进行许多改变并且仍获

得相同或相似结果。

[0086] 实施例 1. 植物表达构建体

[0087] A. 用于玉米转化的植物表达构建体

[0088] 这个实施例说明了用于将重组 DNA 转化到植物细胞中的质粒的构建, 所述植物细胞能够再生为本发明的转基因植物。在编码序列的起始和终止密码子处或附近设计用于 PCR 扩增重组 DNA 的蛋白质编码核苷酸的引物, 以消除大部分 5' 和 3' 非翻译区。编码表 1 中鉴别的蛋白质的每种重组 DNA 在插入如表 1 中参考的基础载体之一的插入位点中之前通过 PCR 进行扩增。

[0089] 使用 GATEWAY™ Destination 植物表达载体系统 (从 InvitrogenLife Technologies, Carlsbad, CA 获得) 建造基础植物转化载体 pMON65154 用于制备转化到玉米组织中的重组 DNA。参考下表 3 中描述的元件和 SEQ ID NO:10024, pMON65154 包括选择标记表达盒和模板重组 DNA 表达盒。标记表达盒包括与编码新霉素磷酸转移酶 II 的基因 (nptII) 可操作地连接的 CaMV 35S 启动子, 随后为根癌土壤杆菌胭脂碱合酶基因 (nos) 的 3' 区。模板重组 DNA 表达盒定位与标记表达盒尾部对尾部。模板重组 DNA 表达盒包括 5' 调节 DNA, 其包括稻肌动蛋白 1 启动子、外显子和内含子, 随后为重组 DNA 的 GATEWAY™ 插入位点, 随后为马铃薯蛋白酶抑制剂 II (pinII) 基因的 3' 区。一旦重组 DNA 已插入到插入位点中, 质粒就对于植物转化有用, 例如通过微粒轰击。

[0090] 表 3

[0091]

功能	元件	参考文献
植物目的基因表达盒	稻肌动蛋白 1 启动子	美国专利 5,641,876
	稻肌动蛋白 1 外显子 1, 内含子 1 增强子	美国专利 5,641,876
目的基因插入位点	<i>AttR1</i>	GATEWAY™ Cloning Technology Instruction Manual
	CmR 基因	GATEWAY™ Cloning Technology Instruction Manual
	<i>ccdA</i> 、 <i>ccdB</i> 基因	GATEWAY™ Cloning Technology Instruction Manual
	<i>attR2</i>	GATEWAY™ Cloning Technology Instruction Manual
植物目的基因表达盒	马铃薯 <i>pinII</i> 3'区	An 等人 (1989) Plant Cell 1:115-122
植物选择标记表达盒	CaMV 35S 启动子	美国专利 5,858,742
	<i>nptII</i> 选择标记	美国专利 5,858,742
	<i>nos</i> 3'区	美国专利 5,858,742
在大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) 中的维持	<i>ColE1</i> 复制起点	
	F1 复制起点	
	<i>Bla</i> 氨苄青霉素抗性	

[0092] 构建类似的基础载体质粒 pMON72472 (SEQ ID NO:10025) 在土壤杆菌属介导的植物转化方法中使用,所述载体质粒类似于 pMON65154,只是除了 (a) 在模板重组 DNA 表达盒中的 5'调节 DNA 是稻肌动蛋白启动子和稻肌动蛋白内含子, (b) 加入来自土壤杆菌属的左和右 T-DNA 边界序列,右边界序列位于稻肌动蛋白 1 启动子的 5',并且左边界序列位于 35S 启动子的 3',和 (c) 加入 DNA 以促进质粒在大肠杆菌和根癌土壤杆菌中的复制。在 T-DNA 边界序列外加入质粒的 DNA 包括在土壤杆菌属中起作用的 *oriV* 广泛宿主范围的 DNA 复制起点,在大肠杆菌中起作用的 pBR322 复制起点,和在大肠杆菌和土壤杆菌属中用于选择的壮观霉素 / 链霉素抗性基因。

[0093] 使用本领域已知的技术装配表 4 中举例说明的另一基础载体 pMON82060 (SEQ ID NO:10026)。

[0094] 表 4

[0095]

功能	名称	注释	SEQ ID NO: 10026 的坐标
Agro 转化	B-AGRtu.右边界	T-DNA 转移必需的 Agro 右边界序列	5235-5591
目的基因植物表达盒	P-Os.Act1	来自稻肌动蛋白基因 act1 的启动子	5609-7009
	L-Os.Act1	来自稻肌动蛋白 1 基因的前导序列 (第一个外显子)	
	I-Os.Act1	来自稻肌动蛋白 1 基因的第一个内含子和侧翼 UTR 外显子序列	
	T-St.Pis4	马铃薯蛋白酶抑制剂 II 基因的 3' 非翻译区, 它对指导 mRNA 的多腺苷酸化起作用	7084-8026
植物选择标记表达盒	P-CaMV.35S	CaMV35S 启动子	8075-8398
	L-CaMV.35S	来自 CaMV35S RNA 的 5' UTR	
	CR-Ec.nptII-Tn5	赋予对新霉素和卡那霉素抗性的 nptII 选择标记	8432-9226
	T-AGRtu.nos	对指导 mRNA 的多腺苷酸化起作用的根癌土壤杆菌 Ti 质粒胭脂碱合酶基因的 3' 非翻译区	9255-9507
Agro 转化	B-AGRtu.左边界	T-DNA 转移必需的 Agro 左边界序列	39-480

[0096]

在大肠杆菌 中的维持	OR-Ec.oriV-RK2	来自质粒 RK2 的植物复制起点	567-963
	CR-Ec.rop	来自 ColE1 质粒的引物的阻抑物的编码区。这种基因产物的表达干扰复制起点处的引物结合，从而维持低质粒拷贝数目。	2472-2663
	OR-Ec.ori-ColE1	来自大肠杆菌质粒 ColE1 的最小复制起点	3091-3679
	P-Ec.aadA- SPC/STR	Tn7 腺苷酰基转移酶 (AAD(3')) 启动子	4210-4251
	CR-Ec.aadA- SPC/STR	赋予壮观霉素和链霉素抗性的 Tn7 腺苷酰基转移酶 (AAD(3')) 的编码区	4252-5040
	T-Ec.aadA- SPC/STR	来自大肠杆菌 Tn7 腺苷酰基转移酶 (AAD(3')) 基因的 3'UTR	5041-5098

[0097] B. 用于大豆转化的植物表达载体

[0098] 还制备了在大豆转化中使用的质粒。下表 5 中显示了示例性共同表达载体质粒 pMON74532 (SEQ ID NO:10027) 的元件。

[0099] 表 5

[0100]

功能	元件	参考文献
Agro 转化	B-ARGtu.右边界	Depicker, A.等人 (1982) Mol Appl Genet 1:561-573
抗生素抗性	CR-Ec.aadA-SPC/STR	
来自 ColE1 质粒的引物的阻抑物	CR-Ec.rop	
复制起点	OR-Ec.oriV-RK2	
Agro 转化	B-ARGtu.左边界	Barker, R.F.等人 (1983) Plant Mol Biol 2:335-350
植物选择标记表达盒	具有鼠耳芥 act7 基因 (AtAct7) 的内含子和 5'UTR 的启动子	McDowell 等人 (1996) Plant Physiol. 111:699-711.
	鼠耳芥 act7 基因的 5'UTR	
	AtAct7 的 5'UTR 中的内含子	
	鼠耳芥 EPSPS 的转运肽区域	Klee, H.J.等人 (1987) MGG 210:437-442
	具有双子叶植物优选的密码子选择的合成 CP4 编码区	
	根癌土壤杆菌 Ti 质粒胭脂碱合酶基因的 3'UTR	美国专利 5,858,742
植物目的基因表达盒	包含-90 - -350 区域重复的来自 CaMV 35S RNA 的启动子	美国专利 5,322,938
	目的基因插入位点	
	棉花 E6 3'末端	GenBank 登记 U30508

[0101] 使用本领域已知的技术装配表 6 中举例说明的另一基础载体 pMON82053 (SEQ ID NO :10028)。

[0102] 表 6

[0103]

功能	名称	注释	SEQ ID NO: 10028 的坐标
Agro 转化	B-AGRtu.左边界	T-DNA 转移必需的 Agro 左边界序列	6144-6585
植物选择 标记表达 盒	P-At.Act7	来自鼠耳芥肌动蛋白 7 基因的启动子	6624-7861
	L- At.Act7	鼠耳芥 Act7 基因的 5'UTR	
	I- At.Act7	来自鼠耳芥肌动蛋白 7 基因的内含子	
	T-At.ShkG-CTP2	鼠耳芥 EPSPS 的转运肽区域	7864-8091
	CR-AGRtu.aroA- CP4.nno_At	具有双子叶植物优选的密码子选择的 合成 CP4 编码区	8092-9459
	T-AGRtu.nos	对指导 mRNA 的多腺苷酸化起作用的 根癌土壤杆菌 Ti 质粒胭脂碱合酶基因的 3'非翻译区	9466-9718
目的基因 表达盒	P-CaMV.35S-enh	包含-90 - -350 区域重复的来自 CaMV 35S RNA 的启动子	1-613
	T-Gb.E6-3b	来自海岛棉花纤维蛋白 E6 基因的 3'非 翻译区	688-1002
Agro 转化	B-AGRtu.右边界	T-DNA 转移必需的 Agro 右边界序列	1033-1389
在大肠杆 菌中的维 持	OR-Ec.oriV-RK2	来自质粒 RK2 的植物复制起点	5661-6057
	CR-Ec.rop	来自 ColE1 质粒的引物的阻抑制的编码 区。这种基因产物的表达干扰复制起点 处的引物结合，从而维持低质粒拷贝数 目。	3961-4152
	OR-Ec.ori-ColE1	来自大肠杆菌质粒 ColE1 的最小复制起 点	2945-3533
	P-Ec.aadA- SPC/STR	Tn7 腺苷酰基转移酶 (AAD (3')) 启 动子	2373-2414
	CR-Ec.aadA- SPC/STR	赋予壮观霉素和链霉素抗性的 Tn7 腺苷 酰基转移酶 (AAD (3')) 的编码区	1584-2372
	T-Ec.aadA- SPC/STR	来自大肠杆菌 Tn7 腺苷酰基转移酶 (AAD (3')) 基因的 3'UTR	1526-1583

[0104] 在插入位点插入载体之前通过 PCR 扩增重组 DNA 的蛋白质编码 区段。在编码序
列的起始和终止密码子处或附近设计用于 PCR 扩增的引物，以消除大部分 5' 和 3' 非翻译

区。

[0105] 实施例 2. 玉米转化

[0106] 这个实施例说明了在生产本发明的转基因玉米植物细胞、植物、种子和花粉中有用的植物细胞转化方法,以及具有增强的性状的转基因玉米植物和种子的生产和鉴别,所述增强的性状即增强的水利用效率、增强的耐寒性、增加的产量、增强的氮利用效率、增强的种子蛋白质和增强的种子油。通过将表 1 中鉴别的 DNA 克隆到鉴别的基础载体中制备质粒载体,以用于玉米植物细胞的玉米转化中以生产转基因玉米植物和后代植物、种子和花粉。

[0107] 对于土壤杆菌属介导的玉米胚细胞转化,将容易转化的玉米植物系(命名为 LH59)在温室中培育,并且当胚长度为 1.5-2.0mm 时收获谷穗。通过喷雾或将谷穗浸泡在 80%乙醇中,随后风干来表面灭菌谷穗。从表面灭菌的谷穗上的个别谷粒分离出未成熟胚。在接种玉蜀黍细胞前,土壤杆菌属细胞在室温下生长过夜。未成熟的玉蜀黍胚细胞在切割后很快用土壤杆菌属接种,并在室温下与土壤杆菌属一起温育 5-20 分钟。未成熟胚植物细胞随后与土壤杆菌属在 23°C 在黑暗中共培养 1-3 天。将共培养的胚转移至选择培养基并培养大约 2 周,以允许胚发生愈伤组织发育。胚发生愈伤组织转移至包含 100mg/L 巴龙霉素的培养基中并在约 2 周的时间间隔进行传代培养。在选择开始后 6-8 周回收转化的植物细胞。

[0108] 对于土壤杆菌属介导的玉蜀黍愈伤组织的转化,未成熟胚在切割后培养大约 8-21 天以允许愈伤组织发育。愈伤组织随后在室温下与土壤杆菌属悬浮液一起温育约 30 分钟,随后通过抽吸去除液体。愈伤组织和土壤杆菌属不加选择地共培养 3-6 天,随后通过对巴龙霉素选择大约 6 周,每两周一次转移至新鲜培养基,并且巴龙霉素抗性愈伤组织鉴别为在表达盒中包含重组 DNA。

[0109] 对于通过微粒轰击的转化,在轰击前 3-4 天分离并培养未成熟的玉蜀黍胚。在微粒轰击前,制备金颗粒悬浮液,在其上沉淀所需重组 DNA 表达盒。如美国专利 5,550,318 和 6,399,861 中所述,使用放电粒子加速基因递送装置将 DNA 导入玉蜀黍细胞中。在微粒轰击后,组织在黑暗中以 27°C 培养。用于制备本发明转基因植物的另外的转化方法和材料,例如,各种培养基和受体靶细胞、未成熟胚的转化和后续能育的转基因植物的再生公开于美国专利 6,194,636 和 6,232,526 以及美国专利申请序列号 09/757,089 中,其引入本文作为参考。

[0110] 为了再生转基因玉米植物,由转化产生的转基因植物细胞的愈伤组织置于培养基上以起始小植物的枝条发育,所述小植物转移至盆栽土壤以在生长室中以 26°C 起始生长,随后为喷雾苗床,之后移植至 5 英寸罐中,在其中植物生长至成熟。再生的植物自体受精并收获种子以用于在一种或多种方法中选择种子、幼苗或后代第二代转基因植物(R2 植物)或杂交体,例如通过与对照植物比较选择显示增强的性状的转基因植物。

[0111] 转基因玉米植物细胞用来自表 1 中鉴别的每种基因的重组 DNA 转化。如实施例 5 中报告的,筛选后代转基因植物和转化的植物细胞的种子的增强的水利用效率、增强的耐寒性、增加的产量、增强的氮利用效率、增强的种子蛋白质和增强的种子油。

[0112] 实施例 3. 大豆转化

[0113] 这个实施例说明了在生产本发明的转基因大豆植物中有用的植物转化,以及具有

下列特性的转基因大豆的转基因种子的生产和鉴别：增强的水利用效率、增强的耐寒性、增加的产量、增强的氮利用效率、增强的种子蛋白质和增强的种子油。

[0114] 对于土壤杆菌属介导的转化，大豆种子发芽过夜并切下分生组织外植体。分生组织和外植体置于创伤容器中。大豆外植体和诱导的土壤杆菌属细胞在种子发芽开始后不迟于 14 小时混合，并且使用超声处理进行创伤，所述土壤杆菌属细胞来自包含具有目的基因盒和植物选择标记盒的质粒 DNA 的菌株。创伤后，外植体置于共培养中 2-5 天，在这个点上它们转移至选择培养基 6-8 周，以允许选择和培育转基因枝条。大约 6-8 周收获性状阳性枝条并置于选择性生根培养基中 2-3 周。生根的枝条转移至温室并在土壤中进行盆栽。对选择保持健康但不生根的枝条转移至非选择性生根培养基另外 2 周。对来自中止选择产生根的任何枝条的根测试植物选择标记的表达，之后将它们转移至温室并土壤中进行盆栽。另外，如引入本文作为参考的美国专利 5,015,580 中所述，DNA 构建体可以通过粒子轰击转移至大豆细胞基因组中，并且细胞再生为能育的大豆植物。

[0115] 用来自表 1 中鉴别的每种基因的重组 DNA 转化转基因大豆植物细胞。如实施例 5 中报告的，筛选后代转基因植物和转化的植物细胞种子的增强的水利用效率、增强的耐寒性、增加的产量、增强的氮利用效率、增强的种子蛋白质和增强的种子油。

[0116] 实施例 4. 同源物鉴别

[0117] 这个实施例说明了表 1 中鉴别的 DNA 编码的蛋白质同源物的鉴别，它用于提供具有增强的农艺性状的转基因种子和植物。从来自同源物的序列中，可以鉴别同源 DNA 序列以用于制备本发明的具有增强的农艺性状的另外的转基因种子和植物。

[0118] 使用有所有权的序列数据库和国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information) (NCBI) 非冗余氨基酸数据库 (nr. aa) 构建已知蛋白质序列的“所有蛋白质数据库”。对于从中获得本文提供的多核苷酸序列的每种生物，构建生物的已知蛋白质序列的“生物蛋白质数据库”；它是基于生物的 NCBI 分类学 ID 的所有蛋白质数据库的子集。

[0119] 使用 NCBI “blastp”程序，E 值截止值 $1e-8$ ，使用本文提供的氨基酸序列如 SEQ ID NO:84-SEQ ID NO:166 查询所有蛋白质数据库。记录最高达 1000 的最高命中并通过生物名称分开。对于除查询序列的生物以外的每种生物，记录来自查询生物自身的命中列表，其具有比生物的最佳命中更显著的 E 值。列表包含本文提供的多核苷酸的可能的重复基因，并称为核心列表。另一列表记录来自每种生物的所有命中，通过 E 值分选，并称为命中列表。

[0120] 使用 NCBI “blastp”程序，E 值截止值 $1e-4$ ，使用本文提供的多肽序列如 SEQ ID NO:84-SEQ ID NO:166 查询生物蛋白质数据库。记录最高达 1000 的最高命中。基于这些命中构建 BLAST 可检索数据库，并称为“SubDB”。使用 NCBI “blastp”程序，E 值截止值 $1e-8$ ，使用命中列表中的每种序列查询 SubDB。具有最佳 E 值的命中与来自相应生物的核心列表比较。如果命中属于核心列表，则认为它是可能的直向同源物，否则就认为它不是可能的直向同源物，并且不在相同生物的命中列表中进一步检索序列。通过 SEQ ID NO:167-SEQ ID NO:10023 的氨基酸序列鉴别并报告来自大量不同生物的同源物。在表 2 中鉴别了 SEQ ID NO:84-166 的蛋白质以及 SEQ ID NO:167-10023 的同源物之间的这些关系。对于每种同源物的来源生物见序列列表。

[0121] 表 2

[0122]	PEP SEQ ID NO :同源物 SEQ ID NOs										
[0123]	84 :4274	4007	7537	1472	2465	1788	1873	8538	2486	2101	20903705
[0124]	513	7264	6280	4902	2624	8820	1614	5907	8247	2717	41475559
[0125]	1631	7278	6566	6687	2116	9018	192	2002	5150	322	63146458
[0126]	6281	1285	7292	4226	4543	2496	9903	1478	554	5383	77512484
[0127]	4954	7695	5821	6271	3339	443	8542	1561	2321	5876	68773452
[0128]	2879	3497	2097	4257	7449	7281	3708	4513	2001	4425	93194133
[0129]	6686	2146	9698	1036	2026	1292	5566	181	6951	9794	24392621
[0130]	5202	878	8081	1392	1950	9999	4392	2121	7824	2367	51026717
[0131]	1541	9444	7051	529	4096	602	8266				
[0132]	85 :1163	3954	9565	5913	8096	1310	3871	3019	2926	1456	27704461
[0133]	2570	5099	7946	3700	9665	1600	7270	7312	6531	9978	88038920
[0134]	4917	6067	6352	6902	2025	2516	4213	9446	8483	5404	22134311
[0135]	3724	9926	9599	3835	727	8396	190	3701	7478	706	40387149
[0136]	5413	1538	8094	9467	7385	7520	7275	3299	3658		
[0137]	86 :2511	2513	7067	7055	5647	9608	9399	4420	9867	4564	25277769
[0138]	2323	347	6509	2052	5258	4504	5363	3847	329	7133	17513243
[0139]	8135	4767	5558	2719	6177	6161	6180	1606	3066	514	77254747
[0140]	2868	3953	3995	9218	8245	1471	1050	4602	9788	5705	1043
[0141]	87 :7338	2565	1372	619	8819	7803	7216	9263	8478	7286	20518010
[0142]	4629	2569	8521	7659	6081	6080	2727	1944	5731	7616	81988166
[0143]	6312	9586	2010	7801	4694	4265	3928	9925	1675	6099	57251040
[0144]	5933	270	4135	6356	8593	7015	3351	9045	5105	9655	38745951
[0145]	2184	7921	9476	3408	7095	1214	9077	3211	7050	7106	47883534
[0146]	3093	7715									
[0147]	88 :9004	8450	3918	3721	516	8506	8664	3458	6365	2464	15644322
[0148]	7760	3673	7547	2603	8146	1755	7919	4542	436	2278	49132453
[0149]	9651	2319	3659	678	4640	3600	4171	1156	1807	5765	66192992
[0150]	354	8233	2386	9454	9453	8837	1238	6971	7874	6538	82581371
[0151]	1609	3120	3437	8825	7158	5623	1313	7335	6137	3691	8239415
[0152]	7580	5147	8818	6282	4612	543	6639	9686	7662	7683	76827664
[0153]	5278	5260	8016	2558	2566	2530	9515	5921	8962	3892	71746793
[0154]	表 2(续)										
[0155]	6936	6938	8284	5225	9323	2932	4932	5328	6697	6602	51099625
[0156]	1876	7435	7758	1719	662	6913	4095	5563	4919	8188	6804360
[0157]	9790	7742	7745	2584	8776	8004	862	6690	8757	5193	66189595
[0158]	225	4815	5192	1055	4061	4017	9781	9955	8231	1254	59444087
[0159]	8234	319	1180	4631	9258	6546	699	3498	866	588	1894577
[0160]	1244	5332	3952	9818	2700	9827	6958	7167	3762	9259	35044434

[0161]	4968	3204	8580	1077	5275	9915	1474	9160	1653	2701	16375350
[0162]	5299	1843	4178	10018	7040	2894	2821	5624	680	9370	75604573
[0163]	2144	6813	6722	3689	6721	3373	8902	6656	8928	8462	13369106
[0164]	6956	220	3196	221	6118	4162	7171	9683	3870	4094	83438342
[0165]	213	904	6335	8822	2482	3806	1766	2692	9038	384	90089007
[0166]	3843	2040	7982	9001	9002	4781	606	4807	4852	5595	15091018
[0167]	8100	8751	6816	9347	8346						
[0168]	89 : 9376	7987	7994	8028	8008	9732	7256	7258	6605	6606	72803139
[0169]	9607	7439	6711	9237	9236	6585	1956	1982	1979	7291	72901200
[0170]	8901	7293	7295	7315	7297	7279	6624	6601	6622	6584	65836387
[0171]	7341	9612	264	284	3163	7321	7324	3947	6330	6620	66006598
[0172]	6675	9922	4296	3753	4899	6243	4253	4128	8555	2069	98313105
[0173]	6073	6074	6075	7571	9157	3157	7568	8071	7565	5977	44677244
[0174]	1849	7820	7235	3250	6000	1058	6372	9381	7369	4775	4109609
[0175]	9998	9373	6579	6559	6561	206	8729	1166	4317	1863	5710381
[0176]	2162	4270	6680	6925	752	2268	4086	394	378	3059	62629338
[0177]	2659	8145	6646	9005	4294	6457	6451	8075	8093	3747	35587476
[0178]	7475	7317	1709	6558	3764	3280	6580	1845			
[0179]	90 : 446	4338	4342	9732	4169	7256	7258	7260	6605	6606	72809607
[0180]	3131	3148	6585	4388	3940	177	7243	7291	7290	1200	12311207
[0181]	6265	7295	7293	7315	7297	7279	7792	7788	6624	6601	66226583
[0182]	6584	6891	7253	7277	7262	7272	7271	7324	7321	6598	66206600
[0183]	9922	7623	6675	9831	2069	3105	6073	6075	6074	7571	91577107
[0184]	7110	7108	7109	7244	1849	7235	3250	176	179	3357	10586798
[0185]	表 2(续)										
[0186]	5204	9410	1816	5206	6794	1553	6056	6795	6372	9585	95877819
[0187]	383	510	175	2068	2865	2823	450	9643	1555	1636	34182608
[0188]	701	6147	6165	1470	6578	9307	4775	3206	4245	7525	82552331
[0189]	9277	9305	9278	9274	6559	6579	6561	8729	7851	2561	78502208
[0190]	1166	9701	670	6640	8134	5364	3904	6039	1320	6481	59933541
[0191]	207	8345	8326	4696	7508	1266	2160	2162	1270	3958	42506887
[0192]	3932	4270	5104	6680	8202	6925	1088	8251	1466	8249	96773579
[0193]	7756	2119	4273	1011	245	3713	9490	5245	4735	2153	8544214
[0194]	5025	6660	5001	4086	4099	4077	7241	7237	3059	6262	2659820
[0195]	6646	9005	4294	6457	6451	2869	2767	7746	1732	1738	17341740
[0196]	1617	6714	8105	7317	7318	1709	1731	6558	7716	7971	79681210
[0197]	1248	925	6580	1247	1273	1274	3369	2586	3664		
[0198]	91 : 7402	7398	3583	3592	4729	6500	6496	2752	215	7280	31393136
[0199]	7439	7440	7424	9236	9237	3124	3128	3938	177	1956	19821979

[0200]	7291	7290	4868	6436	7355	7315	7297	7279	794	7341	72727262
[0201]	290	304	289	291	288	7324	7321	3947	6330	6661	66584296
[0202]	3753	8555	1943	8457	3157	7565	7568	7088	5977	4467	39983185
[0203]	3181	3152	3155	7534	7516	7244	1847	7442	7468	6000	8494375
[0204]	1057	9773	6372	7369	957	2685	3508	3586	3087	8866	57491377
[0205]	2317	723	4586	2111	4703	4413	3687	8541	9052	1793	60372164
[0206]	2626	6824	5207	3238	7618	9974	9973	1815	1813	206	45402230
[0207]	6716	5597	2206	2232	2200	5599	1187	3435	9672	9040	90392881
[0208]	7223	2377	2292	7024	6395	4348	4880	744	8064	5301	84928447
[0209]	4312	4317	8472	1863	7956	6694	8324	7358	381	5710	30282182
[0210]	7020	3016	531	5699	9003	7798	7421	2299	787	1905	36411934
[0211]	1893	1889	7496	5036	7100	3584	3055	2018	2043	2042	73451084
[0212]	1086	8473	8350	4908	4934	8469	8477	8098	8215	6937	84964319
[0213]	8499	8500	1741	5722	1844	1930	2265	2272	605	4099	40865667
[0214]	7379	7378	6262	9338	4236	9976	9969	9972	819	9011	90124937
[0215]	4956	2236	6461	5469	8073	6550	3501	2047	2133	7747	63041321
[0216]	表 2(续)										
[0217]	7230	5154	5153	7376	7373	7476	7490	6862	7512	7475	75627538
[0218]	7536	7559	212	200	2238	3159	8122	1753	435	442	23373280
[0219]	3274	8476	5502	6810	2934	4335	3380	8421	1125	1368	
[0220]	92 :	4117	4611	3810	2575	6435	3730	689	8501	7519	5065 78401174
[0221]	8079	3550	8678	8411	9895	1790	4481	2401	2373	1224	
[0222]	93 :	3314	5148	1284	2180	7766	9728	8528	6328	7621	9726 11347569
[0223]	7567	5040	7727	8537	7497	8041	1784	8956	8953	3029	50877642
[0224]	2764	1736	6023	8126	164	8296	4997	6279	3822	9989	63395750
[0225]	4196	2427	7030	8232	2440	5671	7115	6494	3608		
[0226]	94 :	370	4530	5496	2209	8764	5878	2102	3133	4500	
[0227]	95 :	7835	7905	4016	3657	6757	2948	2947	3710	3091	4869 83096256
[0228]	3302	1832	7091	9509	2972	4439	667	3396	7147		
[0229]	96 :	7080	6259	8950	8331	6582	1510	8054	801	3389	4111 26144255
[0230]	5795	2476	10023	6565	3866	1300	6088	7775	6346	9576	80296701
[0231]	1803	4281	816	2806	396	2594	3089				
[0232]	97 :	6736	292	4996	5983	8898	6886	8845	1312	9032	1586 99649971
[0233]	6476	455	357	6653	3756	4574	3311	920	3295	3443	96016906
[0234]	5214	5215	5216	5217	7960	7945	7009	8847	4936	6359	52966571
[0235]	2233	3288	8736	5420	4531	9662	4891	7545	7948	7980	22019853
[0236]	8153	4861	8591	1746	7233	8693	3252	8690	709	5069	9505
[0237]	98 :	9658	9420	3779	6609	3006	2471	3567	4983	434	3565 100088348
[0238]	5728	8033	8302	5426	8854	6705	4160	4243	9780	9744	824444469

[0239]	317	152	522	6171	3571	3894	8512	2442	9642	6255	39803725
[0240]	99:	9060	9635	3511	3575	1890	1852	7041	4217	2648	156 28338456
[0241]	7232	8503	5709	8742	6107	9824	9121	1142	886	9105	82102910
[0242]	100:	9526	1911	5622	9279	2726	1935	4608	7672	9536	4429 2604235
[0243]	356	5588	4995	2426	5771	4203	1942	6086	3697	2322	93591534
[0244]	9550	1034	8012	7732	7017	1448					
[0245]	101:	4840	6812	777	7939	1059	6995	5721	4881	5741	9047 5663050
[0246]	8123	2590	8060	4040	6354	2078	2081	3304	2079	3305	27341841
[0247]	9901	9621	1060	6385	3676	2300	1773	9674	4263	7267	99207962
[0248]	1042	6416	8813	2382	4599	5670	3931	4207	2985	400	56782687
[0249]	7693	5971	2534	4262	9246	1286	9506	3796	9450	271	68805182
[0250]	表 2(续)										
[0251]	6830	3290	2631	572	3716	9890	9594	9073	7979	8835	7060503
[0252]	4838	6333	2562	8179	3698	4825	8783	2604	673	2632	58223084
[0253]	9095	9913	3912	9850	7102	7121	4583	5132	3859	3618	49791024
[0254]	4655	9239	1027	3466	8177	1137	6704	1902	3898	6320	39908921
[0255]	9789	7780	1867	720	7797	8984	8792	6677	2787	6486	49747096
[0256]	6414	1120	4261	4688	9633	7118	1304	7906	4639	8137	63176512
[0257]	5194	7524	3719	8879	5892	6719	10015	2432	5524	5347	46207838
[0258]	2349	3742	3336	8156	4407	751	9048	1574	8745	9064	59823677
[0259]	3335	8828	2296	6016	2954	2083	7531	750	6967	8907	47547306
[0260]	9325	8831	8687	6604	8124	953	5357	6150	4106	7305	4487370
[0261]	2848	4299	6468	9430	4333	9395	6953	5311	6493	5514	18832876
[0262]	4693	645	4187	4174	955	2372	7506	9290	4134	4176	29869835
[0263]	4353	3004	4350	4916	2653	9517	5416	2953	2619	8038	84435903
[0264]	8092	4082	5327	1767	1761	1781	1763	9578	9787	3277	47197767
[0265]	4559	3285	7164	1444	6028	2320	6608	1684	1706	1687	17107111
[0266]	7099	5737	6814	6811	386	1976	9411	7973	2663	5521	97348257
[0267]	5695	2667	1484	5781	1479	2298	9281	9280	9689	502	69094165
[0268]	426	2941	8935	9201	1089	5055	7239	831	1203	9814	9688385
[0269]	7326	6723	7768	5838	2982	242	2577	3232	9055	8305	57947974
[0270]	6114	3340	1764	5723	5940	5567	5093	9792	1635	7645	49586863
[0271]	2987	9330	3245	9438	4298	534	3316	5125	6755	4873	10656730
[0272]	6904	3603	5948	6903	9042	2384	3197	1325	9053	5820	9713970
[0273]	7014	4645	2517	5757	7712	3115	3116	3113	6008	3494	90969270
[0274]	8942	5369	3727	5382	6563	7718	4888	3393	9383	834	
[0275]	102:	4624	1430	1961	1964	5156	999	3374	6267	4084	9627 43831556
[0276]	1098	783	6842	7112	7177	7189	4841	9547	456	3255	28508504
[0277]	1846	9224	7752	1367	8373	3039	6783	3653	4153	6429	94578323

[0278]	4252	6669	202	162	8940	1117	956	5660	7829	5669	48935253
[0279]	9367	6594	4400	6788							
[0280]	103	:4624	9456	5156	999	6267	3374	4084	5394	6413	7397 81696610
[0281]	表 2(续)										
[0282]	9718	7876	4383	1098	1556	783	7112	3279	6197	9663	62527970
[0283]	7356	4596	1390	5051	5754	7566	980	5947	6353	2721	23653317
[0284]	2005	5483	8362	7498	6681	1616	4872	1367	6742	1167	86057077
[0285]	3202	8267	3674	8623	7344	6893	869	8068	1122	1124	36534153
[0286]	6429	9457	8101	8228	1091	8323	5427	3242	9678	7829	56696594
[0287]	4893	157	2141	2249	205	7148	4801	1348	5789	371	99573281
[0288]	2933	6102	9219	4400	7744						
[0289]	104	:4624	9456	5156	999	6267	4084	5394	6413	7397	8169 97186610
[0290]	7876	1098	4383	1556	783	5129	3279	6197	7970	4596	73561390
[0291]	5051	5754	7566	5947	980	6353	2721	2365	3317	7189	7177456
[0292]	1367	6742	1167	3202	7077	8605	8623	8267	3368	7344	68933674
[0293]	6783	8068	9341	3935	4153	6429	9457	8101	3987	9140	3035238
[0294]	8323	5427	3242	7829	5669	6594	4893	157	2141	205	22497148
[0295]	4801	4054	1348	5789	9493	8525	371	9957	3281	2933	61029219
[0296]	4400	6788	9027								
[0297]	105	:7812	882	3025	2739	5708	3306	1560	7612	5164	8369 46569015
[0298]	2778	2824	4488	9482	4490	7160	1576	8990	3445	9496	10818581
[0299]	8589	9860	6511	559	8419	7407	6212	6227	9129	4498	72698072
[0300]	9605	1531	7089	1967	8562	9391	1385	7893	1070	3042	83708206
[0301]	1811	5662	5196	4406	4389	5144	4681	4683	4661	7698	38006641
[0302]	7414	4547	9756	5711	5714	4033	4037	4039	4035	948	
[0303]	106	:9402	8595	2366	8382	1968	3420	6998	1544	1165	8998 11935810
[0304]	8051	1252	8171								
[0305]	107	:1291	7911	2740	6326	1417	8943	7052	3303	9661	5223 75115891
[0306]	5111	6321	4259	4424	4358	9191	2891	8424	8353	2521	64271960
[0307]	355	5300	5739	2460	3831	6920	9695	6754	4501	2964	43997640
[0308]	8431	7924	3977	1557	2027	3409	1651	8086	9083	8265	3131774
[0309]	2339	1155	8549	234	6176	5862	3417	4736	6612	2434	
[0310]	108	:3765	171	1106	382	6195	8056	5268	5113	472	8844 4982666
[0311]	8778	6706	7739	2918	9074	3017	4218	9363	9914	5967	77969712
[0312]	5449	5635	9520								
[0313]	109	:1826	2705	9393	2425	1213	7660	9089	9054	4327	3778 3034458
[0314]	表 2(续)										
[0315]	9486	6741	5431	6169	3381	1431	930	1853	2573	4821	84545435
[0316]	1573										

[0317]	110 ;5969	7138	7828	3577	4895	5219	6737	9681	6534	1722	88814557
[0318]	8810	4325	7209	9670	5063	2588	3570	2468	3921	9958	93015466
[0319]	3869	3523	1591	5729	9783	2404	7123	10012	1898	2921	13612199
[0320]	6079	4823	6562	3582	4198	2988	1673	9091	6045	745	72544887
[0321]	977	564	9761	790	3944	608	1196	5222	966	8036	3261477
[0322]	2535	9234	1206	4824	2506	5853	1778	6765	919	8702	48125353
[0323]	1322	3733	5817	3053	4591	5238	4483	786	852	3201	15887489
[0324]	5700	2914	5503	2660	2500	2582	8351	2766	9436	4685	99404443
[0325]	8414	1785	1349	417	5680	3107	1447	4089	3425	2643	82917197
[0326]	5541	6047	4613	2239	7734	4497	881	7549	2390	7637	64185266
[0327]	5855	5325	7607	3119	859	3220	1382	4268	240	5654	37398059
[0328]	4397	806	301	2748	4529	838	9166	769	7471	8997	20991829
[0329]	3560	8685	3440	4648	6234	642	8422	3978	1239	3217	7553790
[0330]	2682	1051	5269	8390	6076	676	6647	1805	8971	7955	7882675
[0331]	161	8217	9631	9610	2898	569	3240	6155	3722	2713	97465523
[0332]	6768	5103	4879	6805	6194	5775	7593	7966	1217	1068	5925777
[0333]	2301	9364	7176	1747	7810						
[0334]	111 ;1848	7581	8716	1381	3763	9600	464	830	1454	2697	19463371
[0335]	3331	5569	5388	8095	1812	8144	5798	9118	4416	2526	67916506
[0336]	2295	1757	521	807	6077	9190	8758	1157	2605	5928	4987256
[0337]	8104	3453	5802	9866	374	6761					
[0338]	112 ;3041	1135	1343	4097	5330	4575	1412	1253			
[0339]	113 ;7726	7410	8023	8039	8037	3318	7855	3370	1661	7688	56274943
[0340]	8955	8914	4862	1500	344	3426	5227	3502	293	9110	30832887
[0341]	9766	1619	6856	2546	6874	6190	6923	5100	4621	9470	87549389
[0342]	6376	6441	4422	9154	345	457	6292	571	1061	3909	47512793
[0343]	5101	4673	4878	3491	6065	7011	7632	5390	4909	8328	53916022
[0344]	9063	1804	3189	3803	880	2123	2931	6650	7789	2392	34782204
[0345]	1188	1993	6419	5463	1704	1718	4102	6349	4776	8793	19197221
[0346]	表 2(续)										
[0347]	1154	8756	3192	1603	8648	1347	1692	9684	3073	3212	81251563
[0348]	5012	2143	2731	10006	5240	4915	7389	1729	7639	6319	8442263
[0349]	6343	891	3352	590	593	578	591	8035	6049	6731	75921145
[0350]	7686	9079	4699	5323	4303	1000	579	340	9696	539	78177814
[0351]	352	6724	1917	3594	8858	8853	8855	1866	2559	5673	
[0352]	114 ;9538	6322	7202	4360	8216	2187	2190	2706	8864	7631	4191753
[0353]	4188	3875	4002	8728	5819	8780	4946	5823	5429	9409	47971914
[0354]	9292	4470	1705	8384	2457	7603	5603	8655	376	7135	32493241
[0355]	5239	1064	1066	7518	6038	6924	3213	3207	5845	2936	66835372

[0356]	10011	9763	9153	4074	4666	7043	8312	4569	1296	3499	38465324
[0357]	5997	7365	3321	2810	4489	5162	9846	1282	8791	5848	56966367
[0358]	5854	3923	6828	9284	2736	6767	4015	4001	7119	7128	68196637
[0359]	6746	5893	8436	3198	954	9398	4215	6750	1094	429	61577446
[0360]	5377	6108	7283	2695	597	5092	227	5082	143	142	43454731
[0361]	5584	4024	1933	9022	1446	8586	6315	9886	8896	1441	33222485
[0362]	9887	1859	4473	4598	1725	1723	1711	1727	4684	1789	33752128
[0363]	1830	7859	7156	4538	461	5632	4722	4804	449	7646	42275060
[0364]	4568	5604	6193	2360	3728	5736	1183	4672	3037	9327	688466
[0365]	1275	1707	2012	6397	463	3789	2075	6517	6083	2533	2036726
[0366]	6533	899	8318	6219	508	312	5191	1874	4144	704	7621810
[0367]	4409	6251	5115	4914	526	3447	1665	9116	2732	5462	79971995
[0368]	8681	1540	3384	9404	2304	4761	3200	9823	622	1354	51459265
[0369]	1685	8769	8873	8475	1862	5428	3807	1585	1457	9535	70237207
[0370]	8840	3150	7215	4107	3879	4554	1912	9215	1955	2217	43146198
[0371]	6851	7248	3714	1842	6726	3068	1234	1314	8417	5801	69527120
[0372]	2118	643	7187	7053	7671	9298	4633	4795	2872	634	62753390
[0373]	5246										
[0374]	115 :6527	5534	7630	1822	3812	8830	7349	8173	8230	6454	8235742
[0375]	7635	2370	6734	3441	7401	1825	7723	1776	8502	43769	8498505
[0376]	9918	1246	5086	9880	5477	1168	6035	263	6347	7450	47838460
[0377]	表 2(续)										
[0378]	3576	1626	1550	6648	3860	6467	9774	1264	5066	3347	98694031
[0379]	1128	9691	6162	7227	3529	3184	3182	6301	6712		
[0380]	116 :6340	2512	9223	8511	1411	9838	4614	2313	8017	3726	78534136
[0381]	7242	5908	4839	3629	2463	8002	685	2572	5679	9641	50496231
[0382]	3777	9346	570	2598	5766	4493	1856	3171	633	3079	35196914
[0383]	6119	4782	9549	944	6394	1818	3916	7353	2995	5902	2095747
[0384]	9917	9933	4752	4734	4779	493	3829	5900	7925	2928	21571988
[0385]	7313	4921	4689	9543	1857	4528	407	9514	9214	3665	35062973
[0386]	3045	4875	6374	6390	4895	6392	6393	8200	4551	6433	57902532
[0387]	6707	8937	4894	7719	7722	6196	4546	7019	6334	5718	26938868
[0388]	8337	7624	8084	5368	1792	1809	5308	5291	3604	2470	47201363
[0389]	2244	6555	1691	5954	5228	5208	5224	3448	5362	9613	52307162
[0390]	8616	2935	5756	4391	4390	4378	9775	1461	914	4939	66682178
[0391]	4494	4491	4492	4447	4446	4398	4401	4423	3968	4462	68377793
[0392]	8451	922	9304	4070	7852	1526	1527	2223	387	246	15548977
[0393]	6547	3865	1386	684	8322	252	248	249	4690	2214	70846873
[0394]	328	9533	8682	4926	4698	7268	2344	9907	6963	6033	7577297

[0395]	5424	3515	8897	9306	2854	9203	7342	949	6487	8468	23899019
[0396]	6360	377	9321	7871	1683	1290	4183	3397	3219	4855	48537564
[0397]	8066	2391	2364	2341	2308	2336	2359	2312	2355	2291	86748676
[0398]	2309	2334	2338	2293	6361	5880	4164	2896	8031	6630	54257499
[0399]	1442										
[0400]	117	:3877	5727	4241	1513	5672	903	2629	7240	1570	3522 62096399
[0401]	7453	4618	848	9822	1978	8047	7126	9241	3754	6401	68388863
[0402]	8632	7454	5580	8522	7895						
[0403]	118	:3495	5400	9889	6676	3537	2811	5961	7327	7081	3672 1803487
[0404]	729	9474	1384	3951	5271	717	7942	6235	5455	4990	93721754
[0405]	1073	6133	7304	7521							
[0406]	119	:9634	7978	4066	4065	2009	5886	5171	8727	7846	9806 28154941
[0407]	1225	8445	4436	2407	3775	5616	4453	5778	6515	6090	49254646
[0408]	5370	6739	7765	4381	8172	1108	1839	7443	330	7806	78041251
[0409]	表 2(续)										
[0410]	7085	1192	1195	8607	6203	9771	698	8705	5590	5598	55925596
[0411]	3601	9117	2765	3559	343	7898	8931	3693	3692	1611	1610365
[0412]	5981	1171	764	5611	5444	5881	8797	7530	2017	8983	29972930
[0413]	6738	5270	1786	9245	3759	1888	4980	6122	5354	3372	92975120
[0414]	120	:9228	4471	4904	8878	2071	9785	822	6100	8130	8957 69611787
[0415]	9828	6974	5058	6048	2058	1334	8704	4992	625	3328	42222494
[0416]	8453	5397	4969	4450	4318	2859	1370	1074	323	8974	44266663
[0417]	5231	4130	5715	6857	4963	5687	5392	8795	5871	8912	62991801
[0418]	2634	2636	1802	3896	9268	8278	3174	7026	7220	8074	86509102
[0419]	9287	7583	7097	8408	7371	7667	195	5536	2730	3535	21154088
[0420]	1078	5734	6232	6400	5785	9041	5946	5806	533	6762	51673509
[0421]	7720	6425	1775	5393	9808	2671	5316	1712	9504	4010	58184041
[0422]	4667	2542	3854	9371	235	4204	6216	4774	1599	2661	39758489
[0423]	1947	6860	3465	9213	3323	6144	9350	1311	6868	1029	55437654
[0424]	5689	9138	4901	3646	4370	5447	3568	9049	191	9432	75003216
[0425]	1937	1287	2215	3057	4331	2431	3662	2335	4680	9924	94649069
[0426]	2446	1136	9899	6634	3821	7491	5743	3818	5952	7694	50087044
[0427]	427	2844	993	3332	3542	9555	7509	2655	9733	5930	99352885
[0428]	3456	4859	5366	9953	703	1152	8430	4437	7699	8295	1423695
[0429]	8683	1317	3715	6834	613	3411	1147	6674	3578	9109	29997881
[0430]	8241	6528	3430	2831	9772	7685	4897	7480	601	7250	93922656
[0431]	8567	4984	3736	9512	9647	5430	4593	748	6576	8827	33469892
[0432]	4300	3364	7086	6670	4459	7543	3063	3463	5232	5575	96241514
[0433]	1882	4732	5860	3475	5168	6684	6581	6437	8357	2423	48762589

[0434]	4866	4870	2803	6735	8307	4675	4142	798	2816	5545	8672253
[0435]	5522	3595	2944	1158	840	7251	6225	8152	6818	7384	84408966
[0436]	5155	6030	7494	5408	8341	7914	7909	1602	8527	9112	28282829
[0437]	5360	4922	4427	459	9254	1278	7587	10010	5614	5712	66991041
[0438]	6085	1953	5422	1038	1533	8211	5116	4737	7492	9123	12373782
[0439]	表 2(续)										
[0440]	5218	8775	8058	7078	9592	1095	9142	325	368	4520	65535378
[0441]	6134	8299	1309	2520	7542	9412	7800	6452	5355	3976	97257636
[0442]	7309	525	9834	4503	5283	870	5203				
[0443]	121	:9228	4471	4904	8878	2071	9785	822	6100	8130	8957 69611787
[0444]	9828	6974	5058	6048	2058	1334	8704	4992	625	3328	42222494
[0445]	8453	5397	4969	4450	4318	2859	1370	1074	323	8974	44266663
[0446]	5231	4130	5715	6857	4963	5687	5392	8795	5871	8912	62991801
[0447]	2634	2636	1802	3896	9268	8278	3174	7026	7220	8074	86509102
[0448]	9287	7583	7097	8408	7371	7667	195	5536	2730	3535	21154088
[0449]	1078	5734	6232	6400	5785	9041	5946	5806	533	6762	51673509
[0450]	7720	6425	1775	5393	9808	2671	5316	1712	9504	4010	58184041
[0451]	4667	2542	3854	9371	235	4204	6216	4774	1599	2661	39758489
[0452]	1947	6860	3465	9213	3323	6144	9350	1311	6868	1029	55437654
[0453]	5689	9138	4901	3646	4370	5447	3568	9049	191	9432	75003216
[0454]	1937	1287	2215	3057	4331	2431	3662	2335	4680	9924	94649069
[0455]	2446	1136	9899	6634	3821	7491	5743	3818	5952	7694	50087044
[0456]	427	2844	993	3332	3542	9555	7509	2655	9733	5930	99352885
[0457]	3456	4859	5366	9953	703	1152	8430	4437	7699	8295	1423695
[0458]	8683	1317	3715	6834	613	3411	1147	6674	3578	9109	29997881
[0459]	8241	6528	3430	2831	9772	7685	4897	7480	601	7250	93922656
[0460]	8567	4984	3736	9512	9647	5430	4593	748	6576	8827	33469892
[0461]	4300	3364	7086	6670	4459	7543	3063	3463	5232	5575	96241514
[0462]	1882	4732	5860	3475	5168	6684	6581	6437	8357	2423	48762589
[0463]	4866	4870	2803	6735	8307	4675	4142	798	2816	5545	8672253
[0464]	5522	3595	2944	1158	840	7251	6225	8152	6818	7384	84408966
[0465]	5155	6030	7494	5408	8341	7914	7909	1602	8527	9112	28282829
[0466]	5360	4922	4427	459	9254	1278	7587	10010	5614	5712	66991041
[0467]	6085	1953	5422	1038	1533	8211	5116	4737	7492	9123	12373782
[0468]	5218	8775	8058	7078	9592	1095	9142	325	368	4520	65535378
[0469]	表 2(续)										
[0470]	6134	8299	1309	2520	7542	9412	7800	6452	5355	3976	97257636
[0471]	7309	525	9834	4503	5283	870	5203				
[0472]	122	:5149	8274	1269	5690	5410	6173	3556	3468	4438	1208 5663545

[0473]	7791	167	8526	3554	3890	5517	2633	5799	7332	3855	
[0474]	123	:6613	2955	6069	4371	9778	2358	6094	6089	6526	8516 55476071
[0475]	3313	6112	4034	2957	2978	5525	5509	5531	5528	5561	56075578
[0476]	5565	5581	5579	5526	5533	8275	9649	3706	6832	6350	50881150
[0477]	1439	5916	5281	2689	4704	6036	7641	3679	9051	6455	6836861
[0478]	3525	9267	551	1047	9231	6871	6525	6523	3862	6179	72062549
[0479]	3992	178	3349	2003	9082	2354	3011	3013	6910	9731	5551033
[0480]	8344	6990	7131	5177	8976	9092	1601	1598	1608	8048	84183451
[0481]	7002	4523	8340	5474	2917	7702	4505	7759	6992	6991	41459590
[0482]	9714	3423	9656	7573	3644	350	6892	6889	403	423	959710004
[0483]	8938	1952	9076	2084	3308	849	8160	1899	2114	8649	37024565
[0484]	6473	4071	5833	2038	3309	9303	3587	3472	9061	6685	194646
[0485]	6121	5506	2376	9559	2417	3376	3360	1834	9759	2899	29016629
[0486]	5631	7670	8613	2962	9803	2743	2363	6848	9146	8108	88821697
[0487]	9779	3960	9830	4022	7740	4346	4615	3012	2583	803	58888151
[0488]	1450	8428	6588	5909	3963	6185	5814	1539	274	3076	1000310005
[0489]	1221	1737	4288	6470	8686	2601	6469	5276	2937	6200	5380172
[0490]	7523	9242	1590	266	973	7743	1032	9357	5552	9716	32596628
[0491]	3263	4120	3258	2581	3260	4555	5197	1295	7028	5131	93438641
[0492]	5953	2790	4533	3684	6756	8425	7620	9044	4484	4442	65897205
[0493]	2544	5999	5110	7690	3707	6257	8989	5519	4451	9747	41998386
[0494]	3597	3792	4276	797	2990	3048	5601	359	7576	1657	37408176
[0495]	9455	612	694	7192	9414	7194	254	581	2378	2380	12357600
[0496]	1272	3830	6792	5403	3464	3261	6428	8573	8600	9589	55055333
[0497]	2150	9945	536	8952	6290	8741	9349	7929	6110	6101	65546551
[0498]	7005	6556	2195	2194	9934	6053	5550	6091	6097	1294	43046796
[0499]	5401	3015	3974	9921	2789	8083	8082	6710	8905	7514	5763319
[0500]	表 2(续)										
[0501]	5564	4590	9666	515	6745	5138	5139	2130	2645	6228	35628634
[0502]	9178	6536	4361	3337	9699	8491	7757	4905	3257	7611	67439014
[0503]	3439	6120	1783	1850	8136	4851	661	800	6654	2866	17597551
[0504]	2690	4141	6430	654	527	7495	5412	8061	2455	8022	44354155
[0505]	1201	7714	5423	7689	7485	7469	7473	7463	7348	5512	5755548
[0506]	7021	6070	5585	9708	3749						
[0507]	124	:7858	8376	2905	7510	6066	7834	594	9979	7103	3214 28924020
[0508]	125	:1965	1299	9851	8509	7263	1130	8178	2737	8180	3769 87599805
[0509]	1981	9059	8530	1473	9765	4269	4292	1925	7809	4290	9845314
[0510]	7374	231	4410	7211	4323	7033	6382	6485	4356	7873	93425560
[0511]	5071	3031	305	8559	247	1595	5021	4580	1249	8659	38726504

[0512]	5803	5906	8242	4525	8657	8070	598	5089	283	2903	27207170
[0513]	2274	8111	2729	7063	1409	2646	5774	5385	2760	5834	88767082
[0514]	3856	4842	5034	1645	7857	1744	9722	3900	2635	3326	6930444
[0515]	5800	4668	3489	3366	3363	6548	1067	6568	3580	9755	4621517
[0516]	3282	5254	7231	5879	5640	9730	8264	6866	8271	8219	89828518
[0517]	7330	5152	6006	362	6587	3857	8189	1021	4928	6146	73661017
[0518]	4985	6287	269	9285	8103	6140	8900	8461	8042	7513	15308908
[0519]	9187	7436	5320	7656	1494	1750	9428	8182	5863	1567	49449088
[0520]	4138	3394	3493	2812	5989	8558	2028	7289	1771	1452	99325027
[0521]	5309	2398	5097	8009	201	2519	8192	5965	8374	8356	67997965
[0522]	6539	3530	4701	563	8194	7382	410	5432	2428	265	56976229
[0523]	331	2681	8269	4012	7866	7729	1913	2904	4157	3917	
[0524]	126	:5740	333	3685	6489	6369	4339	7931	3455	392	7908 56021268
[0525]	5664	6024	5557	2057	1003	8161	4098	8684	6875	9916	6781936
[0526]	9710	7735	5417	7273	887	5812					
[0527]	127	:5856	1578	7377	3621	5827	3671	2110	9481	4233	1104 81639262
[0528]	4971	2839	3787	5613	3078	2259	8139	5793	3459	5929	28012151
[0529]	8722	3469	2286	3100	5637	6002	1085	7774	3391	1250	58041639
[0530]	512	660	4885	7730	3038	9471	9992	825	7282	9937	20802108
[0531]	8747	7188	1529	5986	8046	6381	1331	2403	209	1777	85571506
[0532]	表 2(续)										
[0533]	2579	8482	3343	2553	565	3342	3401	6464	5117	8449	35287042
[0534]	1092	4056	4605	3546	5074	4182	6213	3686	8439	7265	98942923
[0535]	4307	3005	7934	287	3138	6664	6013	4832	4468	3283	62369800
[0536]	7555	7668	2445	8349	8224	8032	6172	7963	7938	7860	79107940
[0537]	7907	7451	8523	7548	8917	4291	4210	5628	7633	8801	26585498
[0538]	6844	9034	992	6878	638	5185	3614	3001	2430	5371	22973099
[0539]	3329	2769	5307	818	5470	1002	3141	1414	9309	8679	86565433
[0540]	8459	4544	7977	2596	4036	6311	8615	7375	4284	7400	21591895
[0541]	6521	4711	1896	2666	9809	1537	3569	6829	6890	8347	52442023
[0542]	9596	210	8696	3632	3636	7413	7411	3341	5996	9252	65706106
[0543]	2550	827	9397	7998	5434	6501	421	6820	4792	8862	25871686
[0544]	5844	8143	2650	9719	2952	7764	7310	7350	4419	7343	49532281
[0545]	6922	998	732	4907	3656	3861	7773	1362	540	9872	48894717
[0546]	5358	4967	3442	9026	1186	1545	3768	3848	397	1733	77783230
[0547]	3231	2907	5201	4679	4662	2132	7944	9893	9351	9176	76974264
[0548]	4814	2142	7990	9856	9426	9361	4582	1406	2310	8164	86018738
[0549]	3162	3793	5143	9494	8400	2046	2045	4978	5677	7136	24745014
[0550]	5007	5017	5011	5639	3867	5691	5713	4168	4184	2860	15439881

[0551]	2070	8772	9552	6943	577	8594	2433	2435	6495	9544	41371833
[0552]	9946	6276	6143	6141	5825	6671	5735	8848	7146	7144	46235738
[0553]	184	9876	7225	9462	9460	9465	5910	2383	4800	5870	5869273
[0554]	9875	9873	222	9840	4786	981	3797	1770	4201	7394	31439906
[0555]	1220	6221	4682	4697	6465	7159	6643	3631	3660	3640	36393638
[0556]	3635	3154	3650	3082	9499	1198	8043	8063	9598	7101	18711197
[0557]	4535	6057	7181	5995	6202	934	5123	5106	5576	5128	66886678
[0558]	4536	952	3461	5374	6774	9942	1230	6306	3483	5047	54504652
[0559]	9013	4964	7678	5914	3945	5931	5883	3330	584	7843	78427848
[0560]	7868	7847	4173	8628	8577	8303	8804	4589			
[0561]	128	5856	1578	7377	3621	5827	3671	6513	2110	9481	4233 11048163
[0562]	9262	4971	2839	3787	5613	3078	2259	8139	5793	3459	59292801
[0563]	表 2(续)										
[0564]	2151	8722	3469	2286	3100	5637	6002	1085	7774	3391	12505804
[0565]	1639	512	660	4885	7730	3038	9471	9992	825	7282	99372080
[0566]	2108	8747	7188	1529	5986	8046	6381	1331	2403	209	17778557
[0567]	1506	2579	8482	3343	2553	565	3342	3401	3108	8272	37844267
[0568]	6464	5117	8449	3528	7042	1092	4056	4605	3546	5074	41826213
[0569]	3686	8439	7265	9894	2923	4307	3005	7934	287	3138	66646013
[0570]	4832	4468	3283	6236	9800	7555	7668	2445	8349	8224	80326172
[0571]	2670	7963	7938	7860	7910	7940	7907	7451	8523	7548	89174291
[0572]	4210	5628	7633	8801	2658	5498	6844	9034	992	6878	6385185
[0573]	3614	3001	2430	5371	2297	3099	3329	2769	5307	8420	8185470
[0574]	1002	3141	1414	9309	8679	8656	5433	8459	4544	7977	25964036
[0575]	6311	8615	7375	4284	7400	2159	1895	6521	4711	1896	26669809
[0576]	1537	3569	6829	6890	8347	5244	2023	9596	210	8696	36323636
[0577]	7413	7411	3341	5996	9252	6570	6106	2550	827	9397	79985434
[0578]	6501	421	6820	4792	8862	2587	1686	5844	8143	2650	97192952
[0579]	7764	7310	7350	4419	7343	4953	2281	6922	998	732	75634907
[0580]	3656	3861	7773	1362	540	9872	4889	4717	5358	4967	34429026
[0581]	1186	1545	3768	3848	397	1733	7778	3230	3231	2907	52014679
[0582]	4662	2132	7944	9893	9351	9176	7697	4264	4814	2142	79909856
[0583]	9426	9361	4582	1406	2310	8164	8601	8738	3162	3793	51439494
[0584]	8400	2046	2045	4978	5677	7136	2474	5014	5007	5017	50115639
[0585]	3867	5691	5713	4168	4184	2860	1543	9881	2070	8772	95526943
[0586]	577	8594	2433	2435	6495	9544	4137	1833	9946	6276	61436141
[0587]	251	5336	5825	6671	5735	8848	7146	7144	4623	5738	1849876
[0588]	7225	9462	9460	9465	5910	2383	4800	5870	5869	273	98759873
[0589]	222	9840	4786	981	3797	1770	4201	7394	3143	9906	12206221

[0590]	4682	4697	6465	5600	7159	6643	3631	3660	3640	3639	36383635
[0591]	3154	3650	3082	9499	1198	8043	8063	9598	7101	1871	11974535
[0592]	6057	7181	5995	6202	934	5123	5106	5576	5128	4166	66886678
[0593]	表 2(续)										
[0594]	4536	952	9386	3367	3461	5374	6774	9942	1230	6306	34835047
[0595]	5450	4652	9013	4964	7678	5924	3945	5931	5883	3330	5847843
[0596]	7842	7848	7868	7847	4173	8628	8577	8303	8804	4589	
[0597]	129	:6283	2094	3062	2271	6254	9056	4151	3773	1819	5768 16747328
[0598]	5634	9770	3114	9282	6309	9704	845	5395	7738	5398	17965098
[0599]	1232	5972									
[0600]	130	:7784	5453	9584	6859	9085	5136	9525	2342	2327	2326 82273072
[0601]	6540	5884	9046	3774	9221	8368	4647	6152	6616	4140	5610267
[0602]	1654	9864	3834	9194	5858	3771	2074	3054	970	1835	16777614
[0603]	6954	3403	6800	1641	7395	5591	3386	9950	8611	856	18581520
[0604]	473	8885	6011	9711	9825	9859	3111	5119	1429	1523	35611945
[0605]	9938	5482	3348	2385	6226	3194	3839	9243	3008	4170	66621892
[0606]	2971	766	6573	409	5075	4890	9646	5026	9188	942	9407917
[0607]	938	7915	6978	1566	4359	5107	6149	1921	9205	558	25939767
[0608]	3663	3485	4395	5451	1327	3271	725	793	4006	2369	4653590
[0609]	858	4660	8466	5760	453	2677	3069	3964	3914	4301	30643301
[0610]	7884	2946	9593	1301	1216	9620	2994	2405	3203	6375	21474373
[0611]	9796	8212	4251	5659	3187	9170	2662	2694	5304	4050	40694047
[0612]	6861	9115	2858	481	4119	7615	7762	10016	6239	337	3388599
[0613]	8597	929	927	924	363	7717	204	5991	3852	6318	11761179
[0614]	2056	2441	8533	628	2053	8174	5619	1515	5080	7386	62507883
[0615]	2826	5083	1164	9070	1162	1160	1438	1436	913	3235	5963680
[0616]	4588	4570	6183	6184	8547	367	1416	380	1891	3924	52625013
[0617]	4687	5467	8364	7479	6919	5452	6845	2870	2993	3956	41751153
[0618]	7594	1878	2488	9668	3669	9251	5263	7422	8183	5174	67648181
[0619]	404	2913	6297	604	812	8190	9618	3480	3278	2591	59601324
[0620]	7168	7056	8115	5520	9207	8128	218	1127	3477	3670	31258175
[0621]	7877	1752	2733	1141	4208	4347	1178	1655	4864	9388	71951831
[0622]	7319	2809	9983	8576	8209	6211	5985	7193	7172	3476	69468553
[0623]	8127	336	9078	7210	7452	842	6296	7259	8099	262	72085730
[0624]	表 2(续)										
[0625]	3224	5151	9273	3752	2509	4744	9275	8065	3772	8089	1647761
[0626]	393	9365	3811	2436	2699	9248	2055	5846	4705	4287	15942863
[0627]	4479	6327	416	3939	1110	8556	8259	1688	3628	1083	97416541
[0628]	4025	4046	4026	815	2691	8354	2970	2976	8363	5782	65326520

[0629]	7608	3545	6249	10017	8969	170	7412	2402	1726	2886	67602893
[0630]	8941	8926	1099	8899	5043	8842	9093	9097	9094	3237	9975732
[0631]	6302	4820	483	599	3492	485	9120	4799	5221	6286	34969084
[0632]	5010	8262	3704	5443	4626	583	9310	4048	8575	3981	39797967
[0633]	9931	8221	203	193	9874	470	4105	864	6260	2222	7912909
[0634]	2949	8495	479	5872	216	3623	3236	9418	3607	4308	74553010
[0635]	9192	1583	9348	5873	796	9882	8903	2724	9328	3934	35147540
[0636]	6894	8289	10013	8967	7832	9868	5251	8336	6242	6691	67852443
[0637]	1097	7889	7093	6508	4232	2438	2247	9065	6246	6168	6186621
[0638]	1149	9707	2641	3609	2735	7025	420	1824	7038	9975	51378767
[0639]	7252	6126	3695	478	4249	9959	6269	8608	5706	951	3884316
[0640]	6858	4028	4644	7046	1823	1357	6802	7127	9616	4121	30477634
[0641]	1870	302	4118	2842	652	6907	9815	9812	3365	9764	48444849
[0642]	4847	4846	2929	6567	8044	7445	2818	8838	8841	7861	89865665
[0643]	8545	9143	6751	6789	9944						
[0644]	131	5504	7201	9080	4524	6201	3840	4320	2523	2135	7287 72999617
[0645]	6355	4519	632	4321	7887	8869	366	8507	2280	8201	3170697
[0646]	696	7153	6491	8338	8389	8397	8381	8377	8380	8358	83938391
[0647]	8394	8313	8352	8415	8317	8334	8333	8361	8314	8315	83328335
[0648]	8375	5831	5829	7224	1326	8514	946	7226	2939	327	6491493
[0649]	3809	4297	4080	2845	1795	5346	6667	309	1854	1140	78372545
[0650]	7199	1133	1129	1151	1115	1146	1985	1959	1957	1983	33078045
[0651]	3741	3761	3758	6087	9379	4826	6544	675	538	8707	58579832
[0652]	8154	8796	1629	5286	8321	7217	824	2711	9035	9036	3030975
[0653]	7674	6483	7661	8936	1875	5973	4043	1380	1475	4930	29587261
[0654]	1499	3014	1118	4597	9776	4045	9394	1075	5052	3239	69004517
[0655]	表 2(续)										
[0656]	7736	1105	9534	2745	1713	8191	6041	1894	9169	2207	90589057
[0657]	7606	9010	6901	6139	8120	7458	1100	8906	6027	419	45161121
[0658]	1840	5685	742	3398	4315	7584	5975	7854	6034	580	6723555
[0659]	7613	5650	1836	8040	3428	8666	2077	1708	437	4402	31697183
[0660]	6217	6054	7882	665	3473	2638	2784	674	8719	5127	70875042
[0661]	9757	8027	395	2919	511	6695	7456	560	3549	8964	2863470
[0662]	9697	8561	2708	6753	9472	2611	7750	7001	342	3233	32345990
[0663]	4867	5918	321	9956	2156	5769	6864	320	662	77213	71849216
[0664]	544	4092	5302	6529	1682	1907	4691	5608	1063	7337	28089500
[0665]	1975	9163	2361	4923	6408	6445	7405	1974	5389	9491	39696957
[0666]	8378	3026	3751	5198	8427	8438	8584	8587	5030	5340	90315970
[0667]	3246	5935	5841	7679	391	4480	451	4813	6214	3457	81558236

[0668]	9366	710	8960	3718	4721	7862	3936	8627	1552	3825	16336948
[0669]	4863	7763	8131	5038	335	6404	1109	253	5375	991	18271503
[0670]	2479	2503	6313	4724	4816	6673	9553	2085	9222	9687	26863888
[0671]	5409	2127	5964	9572	681	3989	6809	9602	5922	9591	27562758
[0672]	6689	8560	1663	5987	4502	5912	8708	8737	8713	1575	65074057
[0673]	2862	469	1869	7285	8781	7390	1437	3602	9071	9713	24122922
[0674]	1209	5744	5692	1026	9522	5688	3097	9739	9900	7071	73597822
[0675]	4049	8760	349	690	2499	2502	2505	2498	1337	2791	58975606
[0676]	4991	3385	3598	9168	5609	9723	9452	5114	1422	542	95131289
[0677]	3327	6439	1584	8412	4773	1330	5478	8055	9066	3902	85101970
[0678]	3043	422	425	4014	7799	6230	2105	6258	6010	9413	86602628
[0679]	6270	6876	4757	1582	1581	5586	9313	2411	3471	2774	95754886
[0680]	4883	4884	1215	785	4052	9911	8024	9256	3819	2592	41224055
[0681]	2104	8273	8711	3776	4609	5894	5414	5418	5415	5642	9965943
[0682]	6109	4051	4053	8715	8689	8709	8717	8692	8688	5287	28179609
[0683]	7733	9086	6128	4075	7772	6277	6273	4787	3051	8442	87124124
[0684]	2000	4725	1483	9000	9477	2674	278	7578	3218	1900	13506241
[0685]	表 2(续)										
[0686]	1920	6638	5305	6621	9702	4686	7782	6159	7362	5339	16238116
[0687]	1283	7783	3123	3850	5188	8534	6749	6062	7680	4280	64715968
[0688]	5335	9529	7785	6059	4403	9104	1212	9615	6740	3591	20502501
[0689]	802	9315	8981	1486	9161	2203	821	6989	8360	5767	5015220
[0690]	5243	5219	1306	2318	1308	1569	3903	7296	1023	5411	792210000
[0691]	8193	5033	7826	8112	1031	480	9434	8638	2548	6644	6659926
[0692]	1281	3863	6885	5018	4324	8240	5645	1451	1428	9255	50204604
[0693]	4477	2089	4986	5016	4449	4981	4472	4466	7926	3449	79305796
[0694]	7352	8479	4487	8945	8107	3619	1039	5716	943	5762	46366158
[0695]	553	6272	3897	8815	1257	974	2294	2276	804	846	28077643
[0696]	2248	9745	506	6040	557	2227	6288	6293	4240	257	85986115
[0697]	7125	4527	7301	5367	5048	2504	3901	5615	6160	7427	9645
[0698]	132	7833	5889	3007	8109	5915	2022	6345	3652	3805	4242 69595248
[0699]	6384	1580	8887	6294	1739	9842	6700	3666	2480	3620	74729016
[0700]	9795	276	1758	5135	1256	3574	7061	4918	7154	1916	20769159
[0701]	3416	4625	1865	1670	9896	6240	8603	8205	6782	8883	8777470
[0702]	7190										
[0703]	133	3767	1936	390	6879	5949	8320	4341	1797	9923	5720 76265638
[0704]	8294	5250	5783	4649	3513	3058	519	7034	4635	7649	76844411
[0705]	7300	4860	7598	9786	3415	4337	4344	7610	3729	4393	76271303
[0706]	9821	5057	520	6928	3675	494	8993	2837	7701	2841	80116082

[0707]	6341	495	7302	7878	8508	7303	9857	4723	3748	5707	67737432
[0708]	918	3886	8446	2456	7372	1768	3467	6125	5805	4521	21632258
[0709]	9581	4275	4278	4277	6407	5172	4628	2564	4139	2574	
[0710]	134 :9820	3178	3325	9629	4845	7949	7988	6657	1236	4592	3104063
[0711]	1123	2925	2783	7441	3361	4193	7477	4906	2980	4000	
[0712]	135 :4310	4445	1549	1551	3520	6747	1048	9936	8536	4394	31738330
[0713]	2117	6095	9293	4238	4200	4617	3566	9898	2444		
[0714]	136 :7669	3429	8564	5459	5927	2547	8365	5562	7856		
[0715]	137 :7203	1791	7073	4234	972	3070	439	9332	8118	4541	3482648
[0716]	537	5289	5540	490	702	664	1008	6187	7074	6233	61634384
[0717]	8150	5035	1644	4408	6682	3350	8610	3596	230	3531	3948898
[0718]	表 2(续)										
[0719]	219	1056	4256	8367	3221	4110	4671	5460	2049	9396	29002969
[0720]	9748	389	9212	1864	5652	2316	3193	8423	7844	243	78901403
[0721]	2437	6939	332	5108	1139	3836	4791	3688	3868	5811	98041305
[0722]	7891	2082	8288	5255	7561	8519	5295	7387	5694	5274	98636912
[0723]	8622	3682	5241	8843	9768	4465	5859	1838	5905	1199	5242161
[0724]	2578	9604	1383	9340	2346	616	1159	7597	8811	4810	945968
[0725]	5461	5898	1202	5573	8859	3581	6206	6103	4456	3135	17722420
[0726]	1542	9260	6174	562	1605	1656	6955	6926	6358	441	92492800
[0727]	8387	3191	334	2847	6264	872	687	8724	8761	549	567582
[0728]	507	5130	8455	3399	4068	2609	6331	5656	4441	2510	23323481
[0729]	4081	9524	6696	6218	4369	4945	4309	4977	405	6983	68707927
[0730]	4526	2262	7867	4653	2920	5839	2357	3696	2951	3527	34621263
[0731]	1881	5247	9669	6111	9269	6592	4622	5763	8052	4584	53039133
[0732]	9742	1799	5298	5348	2353	408	6603	1498	4948	1468	65694552
[0733]	4474	6215	9167	8635	3889	3190	6852	6001	2924	6593	17699650
[0734]	8304	5072	3090	6124	6966	6156	5792	7585	9548	4237	41906153
[0735]	7245	9753	4877	3298	3746	1328	6557	8823	8653	2152	353424
[0736]	5626	9311	7214	4534	4537	8243	2229	1536	1559	3540	35392772
[0737]	294	1511	1204	9644	1227	1332	6205	8680	6524	9632	28751173
[0738]	7336	9927	8110	3755	9682	7367	8630	2454	3973	5134	30408782
[0739]	8372	199	1015	2599	6284	2131	9652	9977	4718	2747	23151977
[0740]	4229	5568	2490	4404	3624	3794	1205	6459	5436	5438	30002998
[0741]	223	1445	2176	3648	3647	614	9919	3503	1333	4230	2856261
[0742]	2409	4607	8222	3883	8049	9508	7003	3315	8218	5212	19547696
[0743]	7141	6117	3021	5587	3606	7591	1054	3882	9819	548	20964432
[0744]	2507	2406	4146	3563	603	7104	9676	3832	5518	4567	19947175
[0745]	3096	6776	7786	6338	186	8520	5752	630	8740	5658	56742763

[0746]	8877	5701	6518	1260	8398	8918	7622	8077	2861	9735	86435686
[0747]	6827	5648	4664	950	1885	9164	668	528	656	6068	90438808
[0748]	表 2(续)										
[0749]	4152	8817	4150	5780	5776	9902	5830	5073	324	5617	56257408
[0750]	5329	6642	318	7647	4115						
[0751]	138	:8968	2512	9223	8511	3726	6931	2463	9346	570	2598 23742120
[0752]	6914	6119	944	6394	1818	7353	9429	747	3887	9917	99334752
[0753]	2216	1923	9626	493	2928	3665	4875	4912	6403	6405	64338937
[0754]	4874	9507	1293	1302	4892	6196	7019	2623	2620	9448	99293532
[0755]	198	7447	1262	9816	2942	214	5895	8132	6833	2470	60441360
[0756]	3864	3354	5078	3712	3622	2243	7841	7704	7058	8513	42485756
[0757]	1329	1650	915	3098	4511	4507	6837	7793	8451	8617	40707852
[0758]	4387	2840	9705	7098	9546	9283	7821	9334	1355	8515	45153849
[0759]	1103	4638	7596	1101	6492	7805	4585	2129	3813	3165	60122459
[0760]	4855	3219	4853	7564	4163	2896	6630				
[0761]	139	:3997	2703	1918	5761	6918	6142	9908	5187	2508	
[0762]	140	:9075	587	5843	3210	5471	8034	8884	3547	8432	5657 4333460
[0763]	5473	789	471	3122	7813	7075	3837	3743	8256	348	30775593
[0764]	5832	987	3146	9721	5493	5966	5508	2938	8924	7628	24626274
[0765]	719	8951	9226	7284	2916	4116	8624	4496	2668	9288	18145032
[0766]	893	5334	3572	6043	1404	6379	5861	9837	8946	1512	27962246
[0767]	1405	9622	7329	4715	1148	4231	4695	5190	4903	7517	14403444
[0768]	9782	8850	2260	9801	3324	6632	2884	9126	3044	2991	37868888
[0769]	7132	3383	9017	8248	1660	7652	3827	8250	7599	5788	27988406
[0770]	3056	2529	8973	1049	1082	6220	6984	9090	4858	8488	4846596
[0771]	1558	7383	8535	6808	9568	6266	168	406	1425	5748	69696702
[0772]	9912	3294	9324	3291	6801	9081	1476	5724	8405	372	43305141
[0773]	3067	7461	6014	3410	4643	4606	2961	6780	414	3074	46326130
[0774]	1316	1319	2004	3438	2134	9758	1126	3244	3215	7234	7221394
[0775]	2679	7238	7007	4659	1903	7605	5015	9769	9693	6982	26306050
[0776]	1465	244	4085	1276	4159	5963	9264	2927	6093	8298	33598697
[0777]	8399	1481	4594	5950	5882	5282	6872	2524	9738	9706	61514349
[0778]	498	4669	9149	5901	9185	7875	169	183	6175	4512	8771174
[0779]	6208	768	8720	1460	770	4495	4692	724	901	6744	66517901
[0780]	表 2(续)										
[0781]	1649	7047	5090	8755	5784	5815	9826	5681	1076	7590	11857406
[0782]	3024	8988	7169	4476	2458	561	241	259	1191	7004	12196720
[0783]	5056	7916	5849	2343	2984	6652	2915	261	4127	1948	63108213
[0784]	7655	6289	6015	5992	713	737	9023	1906	3484	3994	41806042

[0785]	4627	4179	6063	1342	4478	1760	735	7308	1211	211	20163413
[0786]	2761	8403	9671	3223	2610	6373	2912	3345	6189	373	3613430
[0787]	7399	7985	4778	509	3557	3379	5229	629	3927	7993	80307991
[0788]	505	9441	8091	635	8392	3382	9291	9299	2607	712	41927064
[0789]	4220	5454	5175	8836	7428	1630	2531	4634	7795	3052	1659532
[0790]	8922	6060	8806	1643	1046	6432	530	5257	6181	5009	1144173
[0791]	2348	7322	7083	9654	255	2956	7522	9545	9523	3395	3709236
[0792]	4405	187	4154	2983	3573	5555	9760	7294	9331	2109	21671280
[0793]	4396	1044	3149	4750	4896	2106	3020	6679	6549	7288	80139862
[0794]	3450	1045	6386	9884	896	7380	3022	5932	492	3526	98477879
[0795]	5847	2718	9458	4283	4104	5361	8282	6752	1668	9638	78853930
[0796]	863	7550	4244	5787	2543	2906	4959	4952	418	4994	69275582
[0797]	4076	9962	2092	8524	3145	4431	2557	5249	8225	6443	96674131
[0798]	2416	8413	3643	4181	7952	9690	5499	2154	2155	2177	20618834
[0799]	2175	2749	523	1716	8963	3110	3009	5753	4947	9619	36947995
[0800]	9473	9431	1492	7403	4539	623	9195	2989	8057	1634	55303661
[0801]	4674	8260	6635	4058	3824	6199	5809	3436	2191	9530	95011972
[0802]	2813	6148	8444	1808	6021	7831	5292	3950	6999	6997	51336170
[0803]	5636	3521	2788	9752	9527	1910	6847	7134	4013	1102	45067666
[0804]	3334	5267	2644	3985	651	5046	4819	6263	9628	3518	35162113
[0805]	2098	7129	3412	3092	5544	6537	4415	841	1037	836	65459865
[0806]	9685	1632	9736	9510	6775	6136	3176	721	5911	3424	72465062
[0807]	3402	7541	4475	7969	8925	307	8929	8910	8913	8915	5176440
[0808]	399	4558	1132	5824	8138	5406	8078	847	4706	2943	27229939
[0809]	8129	6474	9988	9994	6797	4455	4457	4454	1607	916	95745091
[0810]	表 2(续)										
[0811]	9573	9416	6129	2974	9630	9904	8114	1131	1742	7897	51865618
[0812]	2362	2379	468	7173	6703	2170	9387	9362	9562	1646	58073814
[0813]	9186	6763	6268	2429	902	5140	4247	885	2652	6247	31613723
[0814]	6096	7818	6599	2688	7827	1622	6633	8485	6498	4882	51635076
[0815]	4563	5733	9810								
[0816]	141	7726	7410	8023	8039	8037	6113	3318	7855	3370	7688 16614943
[0817]	5627	8955	8914	4862	1500	344	3426	5227	3502	293	91103083
[0818]	2887	9766	6856	1619	2546	6874	6190	5100	6923	4621	94708754
[0819]	9389	6441	6376	4422	9154	345	457	6292	571	1061	39094751
[0820]	2793	5101	4673	4878	8732	3491	6065	7011	7632	5390	83286022
[0821]	880	2123	2931	4044	6650	7789	2392	3478	2204	1188	44401993
[0822]	6419	5463	1704	1718	4102	6349	398	4776	8793	1919	72218756
[0823]	1154	3192	1603	8648	2048	1692	1347	3073	9684	3212	81251563

[0824]	5012	2143	2731	10006	5240	4915	7389	1729	7639	6319	8442263
[0825]	6343	891	3352	590	593	578	591	8035	6049	6731	75921145
[0826]	7686	9079	4699	5323	4303	1000	579	340	9696	539	78177814
[0827]	352	6724	1917	8987	3594	8858	8853	8855	1866	2559	56737130
[0828]	142 :9538	6322	8216	2187	2190	2706	2702	8864	7631	5819	49465429
[0829]	1914	9292	4470	1705	2457	8384	7603	8655	376	1064	75185845
[0830]	2936	6683	9763	9153	7043	3846	5324	5162	4489	5848	63675696
[0831]	5854	2736	9284	6767	4015	4001	7119	7128	6819	6746	66378436
[0832]	3198	7283	2695	597	5092	4684	1789	8417	7187	643	70537671
[0833]	4633	4795	6275	3390	5246	4731					
[0834]	143 :9538	6322	7202	114	8216	2187	2190	2706	2702	8864	76314188
[0835]	753	4191	8728	4002	3875	5819	8780	4946	5429	1914	92924470
[0836]	1705	2457	8384	7603	8655	376	7135	1064	1066	7518	60386924
[0837]	5845	3207	2936	6683	10011	9763	9153	7043	4569	1296	38465324
[0838]	5997	3321	5162	4489	9846	1282	8791	5848	6367	5696	58546828
[0839]	2736	9284	6767	4015	4001	7119	7128	6819	6746	6637	84363198
[0840]	9398	1094	7283	2695	597	5092	227	5082	4684	1789	33756456
[0841]	表 2(续)										
[0842]	8602	2128	5736	1183	4672	6560	688	466	3789	2075	6517726
[0843]	6083	2036	2533	4914	762	5115	4409	6251	704	1810	5261665
[0844]	7997	2732	5462	7207	8475	8840	7215	1585	1862	3807	54281234
[0845]	8417	5801	6952	7120	7187	643	7053	7671	9298	4633	47956275
[0846]	3390	5246	4731								
[0847]	144 :7151	6340	8968	2512	9223	8511	6831	1411	8429	640	98388939
[0848]	4614	2313	8017	7853	3726	4136	7242	5908	4839	3629	55532463
[0849]	8002	685	2572	5679	5651	9641	5049	2397	6231	3777	9346570
[0850]	2598	5766	4493	4464	1856	3171	4078	2374	633	615	30793519
[0851]	6914	6119	4782	8753	9483	1625	9549	944	6394	1818	7353491
[0852]	9429	2995	10019	8167	5902	2890	636	9917	9933	4734	4779493
[0853]	6410	3829	1821	2762	5900	7925	2780	627	6949	2928	99952157
[0854]	1988	7313	4921	9729	2461	4689	9543	3358	1857	4528	95149214
[0855]	3665	3506	2973	4875	3045	6374	6390	4895	6393	6392	82004665
[0856]	3446	4551	1111	6433	5790	2532	6707	8937	4894	7719	77227644
[0857]	6196	4546	7019	6334	4112	2693	5718	8868	8337	7105	84013479
[0858]	9883	5297	5826	5195	1694	1052	7624	8084	5368	1792	18095308
[0859]	5291	3604	6611	2470	4720	1363	1360	1366	2541	2540	22447448
[0860]	7845	5208	5228	5224	5362	5230	3448	7779	7781	9870	77764248
[0861]	2935	5756	4391	4378	9775	4390	1461	914	4939	6837	77938451
[0862]	9304	9302	922	718	4070	7852	1527	1526	8977	246	6843865

[0863]	6547	1386	387	2223	1554	8322	252	249	248	2214	70844690
[0864]	328	6873	7325	2968	9025	8682	9533	6729	9375	1072	68974926
[0865]	7268	2344	6963	9907	4698	7342	949	5424	6033	1290	7577297
[0866]	3515	8897	9306	2854	9019	6360	6487	2389	9203	7871	9321377
[0867]	1683	8468	3397	4855	3219	4853	7825	8066	2391	2312	23642341
[0868]	2308	2336	2359	2355	2291	2309	8676	2334	8674	2338	22936361
[0869]	5880	4164	2896	6929	5179	4595	8031	1887	6630	5425	74991442
[0870]	7539	5770									
[0871]	145	585	3920	765	759	2616	8355	4161	2637	7094	9183 44339037
[0872]	表 2(续)										
[0873]	5612	7711	708	9981	1449	535	369	3735	3293	3266	32698463
[0874]	8467	8543	8464	3289	3286	3297	3287	3262	5702	5683	56987139
[0875]	1676	9405	9107	8749	779	4302	6597	6771	5571	7748	67905122
[0876]	8975	8959	6766	8978	8958	9114	7307	6807	8875	5118	89806787
[0877]	7247	6769	6530	5704	6823	5121	6786	8954	873	8636	38083804
[0878]	2021	8654	3510	3490	6003	413	2715	3140	589	7741	37177864
[0879]	4809	1615	1297	3474	2657	8486	1090	4379	3610	1681	72763538
[0880]	9250	5439	9541	6420	6446	6448	6453	1779	2759	4209	88395759
[0881]	6316	5079	9067	7346	965	5537	4924	932	4239	5440	45504553
[0882]	9891	728	6411	3757	1365	749	8359	4212	5384	5887	58857619
[0883]	5344	8695	4266	8762	895	5170	9300	4177	3407	3406	16584158
[0884]	3996	5386	9435	3353	2967	7334	1571	9189	1662	9905	7848069
[0885]	1679	4032	8480	1420	8470	2469	6970	3941	10007	1233	75951223
[0886]	3392	9479	5643	4657	5675	2843	6552	8891	733	1929	64094271
[0887]	1806	8106	906	5484	7989	1861	5345	3310	2776	6368	28388416
[0888]	5284	3760	9836	7972	7638	6223	760	8339	639	626	45767072
[0889]	6595	3817	5644	3801	500	8184	9664	182	3226	3544	26785693
[0890]	8861	428	9165	4156	8484	9539	275	279	280	730	736739
[0891]	741	758	763	767	778	781	3505	5684	3264	2966	74741093
[0892]	7069	8585	5272	2654	2683	624	5465	5356	7266	5797	35361828
[0893]	547	1597	8870	6843	10022	8087	8540	2613	3377	9407	19804818
[0894]	5874	7036	1298	1335	2836	7790	3404	1182	3845	3785	82903075
[0895]	7048	6182	3791	4149	2282	6718	5538	679	9878	2857	86455464
[0896]	7964	1621	5456	477	476	475	2742	8088	8670	6713	93083421
[0897]	5326	5668	4641	9333	1369	1749	6883	4532	961	7152	60325703
[0898]	8658	774	9119	7953	3512	9537	3823	4365	8395	1780	4882388
[0899]	3356	6398	7648	3878	3906	7124	7182	5189	746	2122	6448448
[0900]	9888	8140	6672	217	4167	8812	6029	3543	4023	7409	81422473
[0901]	5200	772	546	1868	7354	6135	3651	9257	8149	1604	99283589

[0902] 表 2(续)

[0903]	1820	6020	4900	8814	963	2723	5479	5280	7755	1762	7757059
[0904]	776	5842	6839	3690	6921	8787	4186	8301	3732	1119	11141715
[0905]	7142	7143	714	3780	9326	6442	5485	1407	6888	4871	30026383
[0906]	1161	7161	7157	7065	3783	8739	2979	4246	2649	3844	26472325
[0907]	2642	743	740	734	731	738	6590	6591	4561	8433	75358157
[0908]	346	499	9813	773	7165	780	8640	2945	2556	438	72197179
[0909]	4482	2856	2709	3962	5211	3292	3296	3300	3802	8102	9987995
[0910]	4700	1720	8404	5786	3433	8639	454	7777	1004	1491	14905199
[0911]	969	982	2555	3984	1007	990	5359	9982	306	8565	85748570
[0912]	8551	7460	6248	8548	868	8546	8994	6342	6224	6145	67481028
[0913]	8067	7339	7140	1005	2536	2771	1006	7381	6324	4286	1013985
[0914]	983	986	988	1012	1014	5904	6917	9390	8571	3799	99411435
[0915]	1184	1700	7836	6450	6415	3826	460	4702	1613	989	36277006
[0916]	3820	2775	2019	6031	3109	9844	1190	8286	2676	7249	80538050
[0917]	8021	5583	1288	9211	1388	9566	9567	8578	1194	5183	54415476
[0918]	9139	1941	7180	2347	7137	7145	3046	3434	2250	659	46545998
[0919]	4123	2044	7609	3431	4126	7018	9353	2424	8631	5621	7163265
[0920]	1927	4113	5029	2741	3179	1255	1258	1259	4029	1699	16804579
[0921]	1701	4581	1678	4578	6472	5994	5755	5840	9542	620	9678297
[0922]	8661	2254	2618	3734	388	1999	6815	6462	3737	3738	5682
[0923]	146	:7116	5816	2975	2710	7572	5242	8569			
[0924]	147	:9980	8517	5865	3276	1782	5877	3378	2835	6460	7031 6377150
[0925]	5976	5053	8379	6853	5054	6835	2396	2400	10014	8794	27773049
[0926]	3065	4260	1323	1393	3229	4514	518	6979	2478	4572	78158710
[0927]	8714	2447	1880	1877	9531	6131	2371	9692	4518	7212	70708383
[0928]	2539	447	4509	2757	8254	4486	1886	8886	647	3605	13404340
[0929]	4352	2450	9960	9961	9984	5974	3654	2277	3683	4258	76257629
[0930]	7807	1667	5942	4108	4951	7663	4817	9558	1497	9335	19222552
[0931]	315	5475	1702	8621	1181	4759	6019	412	3885	6535	96598860
[0932]	1138	3205	3227	3507	7092	2746	7090	8214	8238	1170	79961169
[0933]	表 2(续)										
[0934]	2580	4143	700	2066	5653	6377	9985	8119	8133	3999	88469385
[0935]	1080	9220	7323	8985	611	9087	4272	4289	9437	9871	77311640
[0936]	6396	5112	6732	308	6772	2651	6072	6882	6884	6840	12434194
[0937]	8085	6138	5719	7574	9528	7823	6291	5169	6865	3858	98397673
[0938]	5764	8979	3419	9556	4316	5574	9235	7604	6645	7218	7992923
[0939]	7314	7316	5655	2602	2600	1222	1226	9024	1998	8625	21079020
[0940]	9749	9033	9750	9030	8706	8220	3106	3838	2032	5349	45666025

[0941] 37885620	4658	4677	9841	8773	6626	8774	5666	5661	5458	6693
[0942] 40309848	5178	6017	6018	2528	2525	226	888	799	2054	4027
[0943] 98976666	4545	1071	5285	6911	1565	1568	3943	4377	5487	2125
[0944] 33883387	9709	771	7870	5851	3208	8090	810	1624	8292	9433
[0945] 74194009	467	2381	5050	1693	5019	1695	1698	1001	2950	1016
[0946] 74444898	8816	941	3750	7912	5077	196	2275	5837	5836	311
[0947] 19974708	9271	7544	7546	7570	4976	3166	5924	4603	3955	2015
[0948] 83087888	8402	7880	3273	905	7113	6305	683	8306	839	272
[0949] 66652669	4510	9798	2895	2832	2996	9727	6188	250	228	9569
[0950] 29112908	3905	3967	3983	7320	7999	8000	6004	5158	6444	5159
[0951] 36349484	4616	5890	9068	2210	3841	8458	3611	517	3630	3617
[0952] 64217737	3248	2410	9577	3637	3616	3612	296	6502	232	3745
[0953] 60926417	1535	1728	4293	6636	4642	2481	295	8618	7665	5500
[0954] 57171618	9793	1756	1107	8880	7849	4355	2551	6728	6727	6725
[0955] 43645925	6869	1735	2189	8582	431	6104	2137	4753	300	7068
[0956] 63486344	7582	5337	8409	3270	7438	2020	5293	6300	6132	6898
[0957] 68957039	6915	6364	6988	6944	6962	6402	6389	6896	6935	6431
[0958] 70622625	6164	6960	6933	7037	6424	6363	7012	2698	7035	7054
[0959] 86948718	8662	8725	2242	8550	2240	2235	8721	2622	2306	8620
[0960]	2211	2185	2181	1669	2328	2288	8665	8698	8544	8691

21862307

[0961]	2302	6323	2283	2261	8612	2269	2329	8588	8614	2303	85728592
[0962]	2273	8668	2375	8563	8619	8566	2266	7707	7198	2415	86637016
[0963]	表 2(续)										
[0964]	7651	8590	7653	2413	2352	8644	7010	2981	6940	7029	69086370
[0965]	6303	2330	2408	2350	6406	6964	6758	8583	6307	6899	75866942
[0966]	5539	5516	5556	5542	5472	5535	8947	5497	7057	6987	70087617
[0967]	7553	7032	6985	541	6058	6084	8637	6965	9469	7236	66981730
[0968]	9006	3880	5551	1508	6825	595	3061	3766	1241	4738	33389162
[0969]	2738	2754	2792	2755	8261	9240	8014	3333	3160	2615	61547902
[0970]	1851	1638	6482	5095	2179	4637	7811	7808	9636	7191	76502537
[0971]	5006										
[0972]	148	:9807	9021	3422	2554	9217	1648	8121	7920	3711	4189 4458186
[0973]	9777	5773	5629	8481	7331	9861	358	5468	2202	5988	32476055
[0974]	4619	474	4670								
[0975]	149	:5381	9028	2279	884	4610	8904	4254	5875	6779	4755 89115791
[0976]	5808	8596	5957	6105	7423	9570	6777	3703	6770	9316	96946778
[0977]	1800	3633	2725	1518	2728	8293	197	7515	6222	817	59343432
[0978]	4228	497	9852	9532	9797	2585	9286	4549	2707	6026	78167886
[0979]	9885	8531	7941	6505	5939	8407	7918	9261	5926	4508	59802753
[0980]	4600	6329	4072	482	3320	1189	6715	6733	4651	4185	62074328
[0981]	4305	7347	7753	3966	7961	4768	6708	6614	809	8319	81651612
[0982]	4463	2522	6308	9784	3982	7865	1315	9193	4380	5448	97171962
[0983]	2714	2820	3593	6916	5746	1143	6972	8371	5751	5306	16966855
[0984]	1022	2422	8196	6854	1087	7228	4448	5899	2617	2888	8141229
[0985]	2851	1359	6649	7079	9751	9877	8961	8311	6617	556	19513744
[0986]	1307	9445	6692	2039	188	4412	6543	2640	4522	1318	85398579
[0987]	5589	6447	3908	5896	6572	9171	7178	9244	1271	9817	92667196
[0988]	7122	7937	2744	9623	3164	1855	3222	5747	3731	8388	6311245
[0989]	4663	3199	8554	9111	2314	2031	6332	1664	1672	8062	92724562
[0990]	1229	1443	850	5294	1908	2034	3937	1627	9459	2172	36992324
[0991]	2220	9564	1596	6052	7728	3284	4062	4060	4351	3833	37955442
[0992]	5446	8168	9551	2627	9679	6542	2567	8609	9122	6380	76573272
[0993]	8965	4079	5096	9540	5633	4911	5173	3094	1532	1748	21456278
[0994]	表 2(续)										
[0995]	3256	4148	7431	3922	3919	5419	5331	5059	1467	921	72294285
[0996]	2140	2571	573	994	3993	6950	1469	3500	2877	5376	74046849
[0997]	8018	5094	1374	4042	4962	1459	1463	4601	9948	610	4064379
[0998]	2475	2960	6166	8246	7298	5379	9417	7830	9137	5938	59234827

[0999]	5937	4780	9811	7357	5234	8731	7904	258	4100	7487	2331079
[1000]	8789	8798	607	2673	2477	9419	3588	2672	6167	6245	79755342
[1001]	5322	1030	9660	917	2188	3645	2878	3625	6803	653	40212136
[1002]	6522	2665	1990	6623	452	5945	9639	1516	7426	8934	68675941
[1003]	339	1901	2174	1572	6009	586					
[1004]	150	:6947	9930	8552	4707	600	458	9423	3655	2834	5726 36679648
[1005]	650	9611	5396	7913	8923	5649	3615	4630	7483	9614	77001010
[1006]	1924	6440	9247	7839	4961	6973	7163	7602	4129	574	38516285
[1007]	618	5577	8277								
[1008]	151	:2606	2063	2060	496	3946	10020	7076	2024	5495	6475 9700
[1009]	152	:9658	9420	3779	6609	3006	2471	3567	4983	98	979 34865549
[1010]	3725	6098	7872	2112	434	3565	10008	5728	8348	8033	54268854
[1011]	9642	6255	3980								
[1012]	153	:9658	9420	3779	6609	3006	2471	3567	4983	3486	98 9795549
[1013]	434	3565	10008	8348	5728	8302	8033	6705	8244	9642	6255
[1014]	154	:9424	4676	2340	5445	8252	8604	8158	6499	3027	1765 100092963
[1015]	4716	5352	5351	5277	6850	7155	4678	8208	8329	6993	21009833
[1016]	2421	9791	7936	7900	9072	9799	4367	6826	6514	4091	40902751
[1017]	4093	3033	9312	9554	6607	4421	1703	4418	1817	7022	43574059
[1018]	9296	9910	3071	2940	1860	7771	402	2073	9498	928	19099653
[1019]	9497	2696	8498	3036	2414	4777	3899	6192	9909	3770	44852467
[1020]	2419	9451	2712	837	8434	2138	6351	9108	4836	5481	21242418
[1021]	6981	7274	5184	5081	1671	9295	3599	1020	4224	5554	55725570
[1022]	6391	3961									
[1023]	155	:9424	4676	2340	5445	8252	8604	8158	6499	3027	1765 65103427
[1024]	10009	2963	4716	5352	5351	5277	6850	7155	4678	8208	83296993
[1025]	2100	9833	6994	9657	6996	9854	3668	8199	5365	7802	90292421
[1026]	9791	7936	7900	9072	9799	4367	6826	6514	4091	4090	27514093
[1027]	表 2(续)										
[1028]	3033	9312	9554	6607	4421	1703	4418	1817	7022	4357	40599296
[1029]	9910	3071	2940	1860	2684	7829	2767	4259	991	2492	18842794
[1030]	8529	5265	8007	7771	402	3842	2073	9498	928	1909	96539497
[1031]	2696	8498	3036	2414	4777	3899	6192	9909	3770	4485	24672419
[1032]	9451	2712	837	8434	2138	6351	9108	4836	5481	2124	24186981
[1033]	7274	5184	5081	1714	3228	2139	6846	7947	2977	5641	16719295
[1034]	3599	1020	4224	5554	5572	5570	6391	3961			
[1035]	156	:9060	9635	3511	1890	1852	7041	8456	8503	5709	7232 98249121
[1036]	1142	9105	3524	886	99	2910	9802	8893	9050	6116	82102648
[1037]	157	:4624	1430	1961	1964	9456	5156	5394	7397	8169	7589 32794306

[1038]	7970	5051	6353	5373	7529	7189	7177	9720	9724	9737	83259743
[1039]	8310	9762	5483	4841	9547	456	7027	4073	865	3681	41252487
[1040]	9754	9715	5852	7311	8287	9858	4556	4386	5237	4843	82836968
[1041]	3988	5146	2030	3167	10021	7754	401	6336	1019	9986	73519843
[1042]	1519	5919	6463	2568	4326	3251	7257	411	8280	2612	4172677
[1043]	5236	6337	6941	1939	1846	3268	5264	2126	2850	1413	25954865
[1044]	5338	8606	8629	3585	9954	2395	3255	1592	8504	2091	34548148
[1045]	2103	6516	7601	9113	5955	8362	7498	6681	8435	682	16164872
[1046]	3003	3881	9673	5402	10002	9368	1367	5310	4499	5630	4811486
[1047]	6466	4114	6893	1167	504	159	7344	2897	9561	6709	38288373
[1048]	5779	5405	8890	3368	7467	1794	5605	3202	7077	3414	86058267
[1049]	8441	6977	6210	3177	3674	9141	1069	1345	8623	3926	78925387
[1050]	663	1904	869	6784	3039	6783	5341	9603	7943	1496	14958633
[1051]	7703	6564	8195	4295	754	7579	7687	9829	1122	3935	93418268
[1052]	4211	3564	2805	8263	792	1124	756	2716	7333	7222	20142356
[1053]	3127	3653	7950	4153	8867	6429	9457	6434	8734	6905	21654571
[1054]	2072	6064	4650	5252	3798	3915	1666	7185	7706	3720	8833254
[1055]	4920	8452	5962	7186	1091	8162	8228	843	9140	2345	39877200
[1056]	2814	6078	9492	3816	4354	6881	7705	1724	2597	102	4828238
[1057]	552	5676	1642	4417	5646	3678	6325	4282	2664	3035	95037204
[1058]	表 2(续)										
[1059]	6422	6586	1652	3175	8323	2399	2394	5427	4430	6378	80972704
[1060]	4444	9173	9557	8568	6575	1240	268	5166	550	2093	58358235
[1061]	3242	9062	7503	1242	6669	202	4252	3942	1837	5772	70133949
[1062]	2387	1872	4132	239	6362	3853	5399	5290	361	1690	68171339
[1063]	1096	1489	224	351	1620	7863	9449	6123	8366	6051	21831721
[1064]	9238	2680	3626	3344	1116	2750	6932	7588	7744	103	32675492
[1065]	104	9588	6655	8671	8426	5594	1218	7709	9637	2882	3986162
[1066]	8940	7045	1364	3112	2088	6478	9289	3965	1117	5979	93292311
[1067]	956	6806	9680	5660	8285	1398	5343	6127	7466	4784	30325850
[1068]	5920	9197	3649	8744	8970	8852	1984	5669	7829	6594	82371348
[1069]	5789	371	9957	3281	2933	6102	9219	4400	6788	4414	
[1070]	158	:2959	3815	4004	3362	3533	6295	3034	6178	1228	1025 5085
[1071]	159	:4624	1430	1961	1964	9456	5156	999	3374	6267	1053 40849627
[1072]	5394	6413	7397	8169	9718	6610	7876	4383	1098	1556	7836842
[1073]	7112	9675	3279	6197	9663	4306	7970	4596	7356	1390	50517566
[1074]	5754	6353	2721	2365	7177	7189	4841	9547	3255	2850	85041846
[1075]	9224	7752	6742	3039	8268	3564	4153	6429	9457	102	48287200
[1076]	4354	6881	8323	5427	6669	4252	162	8940	1117	5660	9567829

[1077]	5669	6594	4893	5253	9367	5124	9369	5546	157	2141	2052249
[1078]	7148	8237	1348	5789	9493	371	9957	3281	2933	6102	92194400
[1079]	6788	9027	8373								
[1080]	160	:7398	4338	6484	6449	9732	6500	6496	6480	6477	4169 72606605
[1081]	6606	7280	8487	9607	7439	9236	9237	3131	6585	177	72917290
[1082]	4868	7293	7295	7297	7315	7279	8159	6601	6624	6622	65846583
[1083]	6388	6387	7341	6891	7253	7321	7324	3947	4452	6330	66206598
[1084]	6600	3753	4899	6243	9355	3157	7108	7107	5977	4467	39983181
[1085]	3185	3152	3155	7534	1849	7442	7235	3250	8494	176	33577369
[1086]	8673	9585	9587	8866	6046	9103	4775	9951	9949	9943	99476579
[1087]	6559	6561	6574	1261	8729	1166	9701	8492	8447	8472	43171863
[1088]	7956	8326	3400	1267	4696	7761	1266	1270	5036	7100	63666519
[1089]	6371	3055	3488	6680	1088	8473	8469	3126	8098	5813	84964319
[1090]	表 2(续)										
[1091]	8499	8500	1717	1741	4313	9009	854	6660	5001	4099	40864077
[1092]	7241	8185	3059	3060	8187	2158	8207	5667	8147	7379	62629338
[1093]	8145	820	6646	9005	2236	5469	8075	8093	3501	7746	13216007
[1094]	3747	1915	5153	7373	3558	7476	212	200	2238	1617	67148105
[1095]	7317	7318	6558	7716	3764	7971	7968	3275	6580	8476	3023
[1096]	161	:7166	6423	5969	7138	7828	3577	489	5529	6737	9681 65341722
[1097]	8881	8779	4557	8810	4325	7209	9670	5063	2588	3570	24683921
[1098]	9958	9301	5466	911	3869	3523	1591	9783	2404	237	71236479
[1099]	10012	1898	2921	1361	341	8532	2199	6079	2205	4823	65623582
[1100]	4198	5437	2988	1673	7066	5126	9091	6045	745	4216	72545161
[1101]	4887	977	5407	564	9761	790	1009	3944	8437	608	11965222
[1102]	966	8036	1477	2535	9234	4824	5288	2506	5853	2880	17783225
[1103]	6765	919	4375	8702	3209	4812	1562	833	5353	1322	37335817
[1104]	6945	3053	7049	900	4591	5238	5868	4483	786	3201	15887489
[1105]	5700	2914	5503	2660	2500	6191	2902	2582	8948	8351	1852766
[1106]	6841	9436	9478	4685	9940	658	4443	1344	8414	1785	13498856
[1107]	417	5680	984	3107	1447	4089	3425	2643	3781	3118	45487197
[1108]	5541	6047	4613	7933	2239	7734	4497	9378	4202	881	89997549
[1109]	2390	7637	795	6418	6577	5266	3253	5855	6759	5325	76073119
[1110]	859	2333	3220	1382	4560	4268	240	5654	3739	8059	4397806
[1111]	686	8170	301	2748	9480	4529	838	9166	769	1265	11128997
[1112]	2099	1408	1829	3560	8685	3440	4648	6234	8422	642	39783217
[1113]	755	1239	3790	2682	1051	5269	8390	6253	6076	676	66471805
[1114]	8971	7955	788	9502	2675	9610	2898	569	3240	110	7810487
[1115]	9253	6155	3722	2713	9746	5523	8080	6768	5103	4879	68059475

[1116]	7593	364	7966	1217	1068	592	5777	568	2301	3933	1747
[1117]	162 :4624	9456	5156	999	3374	1053	4084	9627	5394	6413	26397397
[1118]	8169	6610	9718	4383	1556	1098	783	6842	7112	9675	32796197
[1119]	4306	7970	4596	7356	5051	7566	5754	6353	2721	2365	71777189
[1120]	9724	9547	456	3255	7752	3039	6783	8268	3564	4153	64299457
[1121]	表 2(续)										
[1122]	102	4828	7200	6881	4354	8323	4252	6669	202	7829	56695253
[1123]	9367	4893	6594	157	2141	205	2249	7148	1348	5789	9493371
[1124]	9957	3281	2933	6102	9219	4400	6788	1117	5660	956	
[1125]	163 :3151	8646	4019	4005	282	299	4018	4831	2576	4850	31349124
[1126]	9125	9174	9175	9209	9210	9127	9128	9134	7493	2483	41019518
[1127]	9521	907	7896	937	1505	8471	8474	8465	5165	5181	51807708
[1128]	7710	5235	5233	4103	8785	8786	8790	8788	8723	8703	87338735
[1129]	8748	3085	8752	8765	8763	8770	8784	1378	1402	8799	88008805
[1130]	8802	8824	8821	8826	9314	9317	9320	9322	9318	9345	93449352
[1131]	9354	9384	9400	9358	9356	9374	9380	9377	9382	9406	94089421
[1132]	9425	9422	9427	9439	9440	9442	9447	9443	9461	9466	94639485
[1133]	9468	9487	9488	9489	9495	9511	9963	9965	9970	9990	99689966
[1134]	9996	10001	9997	8766	8768	8647	8651	8652	8667	8699	14321504
[1135]	1455	1502	805	7528	5864	5866	2489	9147	9148	281	92069208
[1136]	9225	9227	2563	9229	9230	715	2008	2011	1387	1389	91009101
[1137]	9130	9131	7770	7787	9150	9151	4834	9179	9180	4837	31532065
[1138]	2067	2086	2087	4460	3913	3911	3103	1391	1395	2491	19281926
[1139]	1973	4008	4003	8746	8743	8833	8829	9993	1940	1963	19922006
[1140]	1932	1938	5044	933	939	7558	4219	808	908	811	8137526
[1141]	7481	828	4221	826	814	931	829	910	851	832	7505853
[1142]	835	7429	7486	7391	7388	7364	7527	7417	7433	7465	964875
[1143]	7363	874	876	7361	7360	909	4223	7457	7462	879	74594206
[1144]	7482	4733	7464	7507	7557	889	7392	935	7504	7393	75327488
[1145]	4205	7554	7437	7533	960	7415	894	892	897	5532	959890
[1146]	7552	4942	3959	3972	3957	3991	3971	5758	5070	2448	24492452
[1147]	2466	2493	2495	2497	2560	7368	7501	7556	4726	4728	19669177
[1148]	1397	2514	2538	711	958	1035	7575	7434	855	871	7484857
[1149]	860	962	7502	7420	7416	5068	4938	1433	7986	8001	14808005
[1150]	1501	1528	1373	3095	4225	4730	7396	1277	1279	947	79327935
[1151]	2285	2287	4374	4910	4927	4929	4931	4933	4935	9181	91821485
[1152]	表 2(续)										
[1153]	6986	3088	1522	1338	1356	1353	1427	1426	1487	1525	13511399
[1154]	1521	1524	1507	1488	2472	1358	1376	1401	1464	3104	49494950

[1155]	4955	4957	4960	4988	4989	4993	4998	4999	5022	5023	50245028
[1156]	5031	5486	5488	5489	5490	5494	5507	5510	5513	5515	55115527
[1157]	3101	7954	7958	7957	7899	7903	4372	4385	7928	7959	79767951
[1158]	7981	7984	8019	8006	8025	8020	4368	4366	4343	4363	43827894
[1159]	8026	4334	4332	4822	8003	7923	7983	4336	3180	3158	31292245
[1160]	3086	3137	2290	3183	3186	3188	8700	8701	2393	2368	31174739
[1161]	4972	4763	4766	4772	4806	2241	2289	2305	2270	2264	22672284
[1162]	2212	2237	6357	4975	4756	9294	8327	5259	5256	5867	47948493
[1163]	8497	1931	3144	3142	3121	1113	5209	7676	7658	7675	35483551
[1164]	4329	8490	9196	9198	4848	9152	9155	9145	9144	9135	91369204
[1165]	8385	2228	2226	2231	2234	3552	3553	1589	7721	9640	25152518
[1166]	277	3910	3018	6615	3355	6975	6980	6976	7713	7000	35174790
[1167]	4802	4830	3405	2451	4011	4833	5828	4712	4805	4771	47465318
[1168]	4713	4793	4835	5319	5317	4742	4764	1421	1424	9606	66251969
[1169]	1971	1434	8672	8669	3130	2013	2029	9516	8726	8730	93369339
[1170]	9337	4829	6934	1743	5745	1958	7869	6426	1986	1987	73405037
[1171]	4785	4789	912	3876	3873	3891	3102	8807	8626	8642	31324854
[1172]	9232	9233	9202	9132	1418	1419	9199	9200	9184	1628	11721175
[1173]	1177	9360	4765	5061	671	657	669	655	5314	5067	81138117
[1174]	978	8270	165	7255	8809	298	1989	1991	4796	4808	62446488
[1175]	6490	6503	4743	3312	6822	4067	5279	9156	9158	5205	31473168
[1176]	3172	4856	3156	1548	1798	1546	208	8944	8933	8949	82768279
[1177]	8281	8203	8204	6005	8253	8992	8995	8996	8972	8991	95198197
[1178]	5917	5978	8223	5984	5936	8316	5956	5958	8226	8229	83009098
[1179]	9099	9560	9580	9579	9582	9583	8919	7418	7794	1587	15797692
[1180]	5273	1593	5261	4710	4279	1547	6497	3895	3893	3907	30814195
[1181]	5210	4758	4197	8832	8916	8851	8857	8894	8892	8871	88658849
[1182]	表 2(续)										
[1183]	8872	8889	8874	8927	8932	8930	8895	8909	4770	7681	76915226
[1184]	5213	5157	5160	1375	1400	1458	1462	1482	2037	2041	91725321
[1185]	1396	1415	4714	4741	4966	4970	5000	5002	4745	5003	47604762
[1186]	5005	4769	4798	5064	1379	1352	1341	1453	3929	3925	30808750
[1187]	7430	9401	9403	2007	2062	2059	2064	4857	8675	8677	49404965
[1188]	4973	5004	5039	5041	5045	705	707	691	693	692	20332035
[1189]	4740	4709	4749	4748	4803	5312	5313	5315	1745	9855	6821
[1190]	164	:6237	6238	7766	2180	5501	6061	617	1996	7115	6328 76219726
[1191]	1897	1879	6204	5480	6298	8537	6412	5959	1784	7642	80151736
[1192]	9952	8126	432	3822	4362	5750	5671	7677			
[1193]	165	:3151	1577	8646	4019	4005	282	299	4018	4831	2576 48503134

[1194]	9124	9125	9174	9175	9209	9210	9127	9128	9134	7493	24839518
[1195]	9521	907	7896	937	1505	2252	2804	2782	2779	2822	22242251
[1196]	2149	2256	2846	2781	2257	2255	2855	2852	2797	2785	22212802
[1197]	2873	2849	2786	2819	2795	2799	2148	2198	2192	2168	22252218
[1198]	2197	2867	2864	2825	2196	2193	2171	2169	2830	2219	21732166
[1199]	2853	2827	2889	2871	2874	8471	8474	8465	5165	5181	51807708
[1200]	7710	5235	5233	4103	8785	8786	8790	8788	8723	8703	87338735
[1201]	8748	3085	8752	8765	8763	8770	8784	1378	1402	8799	88008805
[1202]	8802	8824	8821	8826	9314	9317	9320	9322	9318	9345	93449352
[1203]	9354	9384	9400	9358	9356	9374	9380	9377	9382	9406	94089421
[1204]	9425	9422	9427	9439	9440	9442	9447	9443	9461	9466	94639485
[1205]	9468	9487	9488	9489	9495	9511	9963	9965	9970	9990	99689966
[1206]	9996	10001	9997	8766	8768	8647	8651	8652	8667	8699	14321504
[1207]	1455	1502	805	7528	5864	5866	2489	9147	9148	281	31952773
[1208]	9206	9208	9225	9227	2563	9229	9230	715	2008	2011	13871389
[1209]	9100	9101	9130	9131	7770	7787	9150	9151	4834	9179	91804837
[1210]	3153	2065	2067	2086	2087	4460	3913	3911	3103	1391	13952491
[1211]	1928	1926	1973	4008	4003	8746	8743	8833	8829	9993	19401963
[1212]	1992	2006	1932	1938	5044	933	939	7558	4219	808	908811
[1213]	表 2(续)										
[1214]	813	7526	7481	828	4221	826	814	931	829	910	851832
[1215]	7505	853	835	7429	7486	7391	7388	7364	7527	7417	74337465
[1216]	964	875	7363	874	876	7361	7360	909	4223	7457	7462879
[1217]	7459	4206	7482	4733	7464	7507	7557	889	7392	935	75047393
[1218]	7532	7488	4205	7554	7437	7533	960	7415	894	892	8975532
[1219]	959	890	7552	4942	3959	3972	3957	3991	3971	5758	50702448
[1220]	2449	2452	2466	2493	2495	2497	2560	7368	7501	7556	47264728
[1221]	1966	9177	1397	2514	2538	711	958	1035	7575	7434	855871
[1222]	7484	860	857	962	7502	7420	7416	5068	4938	1433	79868001
[1223]	1480	8005	1501	1528	1373	3095	4225	4730	7396	1277	1279947
[1224]	7932	7935	2285	2287	4374	4910	4927	4929	4931	4933	49359181
[1225]	9182	1485	6986	976	3088	1522	1338	1356	1353	1427	14261487
[1226]	1525	1351	1399	1521	1524	1507	1488	2472	1358	1376	14011464
[1227]	3104	4949	4950	4955	4957	4960	4988	4989	4993	4998	49995022
[1228]	5023	5024	5028	5031	5486	5488	5489	5490	5494	5507	55105513
[1229]	5515	5511	5527	3101	7954	7958	7957	7899	7903	4372	43857928
[1230]	7959	7976	7951	7981	7984	8019	8006	8025	8020	4368	43664343
[1231]	4363	4382	7894	8026	4334	4332	4822	7117	8003	7923	79834336
[1232]	3180	3158	3129	2245	3086	3137	2290	3183	3186	3188	87008701

[1233]	2393	2368	3117	4739	4972	4763	4766	4772	4806	2241	22892305
[1234]	2270	2264	2267	2284	2212	2237	6357	4975	4756	9294	83275259
[1235]	5256	5867	4794	8493	8497	3144	3142	1113	7676	7658	76753548
[1236]	3551	4329	8490	9196	9198	4848	9152	9155	9145	9144	91359136
[1237]	9204	8385	2226	2228	2231	2234	3552	3553	7721	9640	25152518
[1238]	277	3910	3018	6615	3355	6975	6980	6976	7713	7000	35174790
[1239]	4802	4830	3405	2451	4011	4833	5828	4712	4805	4771	47465318
[1240]	4713	4793	4835	5319	5317	4742	4764	1421	1424	9606	66251969
[1241]	1971	1434	8672	8669	3130	2013	2029	9516	8726	8730	93369339
[1242]	9337	6631	4829	6934	1743	5745	1958	7869	6426	1986	19877340
[1243]	表 2(续)										
[1244]	5037	4785	4789	912	3876	3873	3891	3102	8807	8626	86423132
[1245]	4854	9232	9233	9202	9132	1418	1419	9199	9200	9184	16281172
[1246]	1175	1177	9360	4765	9855	163	5084	6821	5061	671	657669
[1247]	655	5314	5067	8113	8117	298	1989	1991	4796	4808	62446488
[1248]	6490	6503	4743	3312	6822	4067	5279	9156	9158	5205	31473168
[1249]	4856	3156	1548	1798	1546	208	8944	8933	8949	8276	82798281
[1250]	8203	6005	8253	8992	8995	8996	8972	8991	9519	8197	59175978
[1251]	8223	5984	5936	8316	5956	5958	8226	8229	8300	9098	90999560
[1252]	9563	9580	9579	9582	9583	8919	7418	7794	1587	1579	76925273
[1253]	1593	5261	4710	4279	1547	3895	3893	3907	3081	4195	52104758
[1254]	4197	4727	8832	8916	8851	8857	8894	8892	8871	8865	88498872
[1255]	8889	8874	8927	8932	8930	8895	8909	4770	1062	7681	76915213
[1256]	5226	5157	5160	1375	1400	1458	1462	1482	2037	2041	91725321
[1257]	1396	1415	4714	4741	4966	4970	5000	5002	4745	5003	47604762
[1258]	5005	4769	4798	5064	7114	1379	1352	1341	1453	3929	39253080
[1259]	8750	7430	9401	9403	2007	2059	2062	2064	4857	8675	86774940
[1260]	4965	4973	5004	5039	5041	5045	705	707	691	693	6922033
[1261]	2035	4740	4709	4749	4748	4803	5312	5313	5315	1745	8270
[1262]	166	7398	6484	6449	4729	6500	6496	6480	6477	4169	7256 72582351
[1263]	6605	6606	7280	9607	7439	9571	9415	6711	9236	9237	6585177
[1264]	1949	7291	7290	4868	6438	6265	7293	7295	7297	7315	72797792
[1265]	7788	8159	6601	6622	6624	6584	6583	6388	7341	7253	72777321
[1266]	7324	3947	6620	6598	6600	4296	3753	4899	6243	4253	41289355
[1267]	8071	7568	7534	7244	7442	7468	7820	7235	3250	8494	1766372
[1268]	7369	4428	8866	4775	7525	8255	5421	9967	6579	6559	65612768
[1269]	1166	9701	4083	9703	8447	4312	8472	4317	1863	7956	3400757
[1270]	3642	5036	7100	3055	3488	6680	4587	8473	8469	3126	84778098
[1271]	5813	9879	2965	9740	5142	8499	4319	8500	1717	8410	28831410

[1272] 641 854 6660 5001 4099 4086 7241 4077 7237 8777 30598185
[1273] 5491 3060 5667 7379 6262 9338 4236 6646 2236 8075 80938076
[1274] 表 2(续)
[1275] 2767 7746 7749 1321 6007 7724 7373 7376 3558 7476 17321734
[1276] 1740 1738 212 200 6714 7317 7318 1689 1709 6558 77163764
[1277] 435 7971 7968 6580 8476 5457 1346

[1278] 实施例 5. 具有增强的农艺性状的转基因植物的选择

[1279] 这个实施例说明了通过筛选衍生的植物和种子的增强的性状鉴别本发明的植物细胞。具有表 1 中鉴别的重组 DNA 的转基因玉米种子和植物通过用 DNA 转化的植物细胞制备,所述 DNA 稳定整合到玉米细胞的基因组中。使用测量方法选择转基因种子、小植物和后代植物。转基因玉米植物细胞用来自表 1 中鉴别的每种基因的重组 DNA 转化。与对照植物比较筛选转化的植物细胞的后代转基因植物和种子的增强的水利用效率、增强的耐寒性、增加的产量、增强的氮利用效率、增强的种子蛋白质和增强的种子油。

[1280] A. 增强的氮利用效率的选择

[1281] 可以在高通量氮 (N) 选择方法中测试转基因玉米植物 (作为杂交体测试) 的生理效率的氮利用效率 (NUE) 性状。使用统计学模型比较收集的数据与来自野生型对照的测量结果,以确定改变是否归因于转基因。使用 SAS 软件分析原始数据。本文显示的结果是转基因植物相对于野生型对照的比较。

[1282] (1) 用于设置 NUE 方案的培养基制备

[1283] 使用的种植培养基是: Metro Mix 200 (厂商: Hummert) Cat. #10-0325, Scotts Micro Max Nutrients (厂商: Hummert) Cat. #07-6330, OS 41/3" x 37/8" 罐 (厂商: Hummert) Cat. #16-1415, OS 盘 (厂商: Hummert) Cat. #16-1515, Hoagland 氏大量营养物溶液, Plastic 5" 桩 (厂商: Hummert) 黄色 Cat. #49-1569, 白色 Cat. #49-1505, 具有说明材料的编号的标签包含在罐中。用 Metro Mix 200 装填 500 个罐至边缘, 重量为 ~140g/罐。通过使用平衡器均一地装填罐。向每个罐中加入 0.4g Micro Max 营养物。用刮铲搅拌成分至 3 英寸深, 同时防止材料损失。

[1284] (2) 在温室中设置 NUE 选择

[1285] (a) 种子发芽 - 使用逆向渗透的纯化水给每个罐轻微地浇水 2 次。安排第一次浇水紧在种植之前发生; 并且第二次浇水在种子已种植到罐中之后。种植每次入组的 10 粒种子 (每罐 1 粒种子) 以选择 8 个健康状态均一的幼苗。种植另外的野生型对照用作边界行。可替代地, 种植每次入组的 15 粒种子 (每罐 1 粒种子) 以选择 12 个健康状态均一的幼苗 (这个较大的种植数目用于第二次或证实种植)。将罐在 Conviron 生长室中的 12 个架子的每一个上放置 7 天。这样做是为了允许更均一的发芽和早期的幼苗生长。随后的生长室设定为 25°C / 日和 22°C / 夜, 14 小时光照和 10 小时黑暗, 湿度 ~80%, 以及光强度 ~350 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (在罐的水平上)。经由类似于温室工作台的毛细管垫子在每天 3 次 10 分钟的持续时间内进行浇水。

[1286] (b) 幼苗转移 -7 天后, 分别选择第一次或证实途径运行的最佳的 8 或 12 个幼苗, 并转移至温室工作台。使用毛细管垫子上印刷的间隔图案使罐相隔 8 英寸 (中心与中心) 并置于工作台上。Vattex 垫子产生 384 位网格, 其中所有列、行组合随机化。另外的对照罐

沿着实验区组外放置以减少边界作用。

[1287] 允许植物在低 N 运行下生长 28 天或在高 N 运行下生长 23 天。大量营养物以大量营养物溶液（参见下文的组合物）的形式分配，所述溶液包含精确量的添加的 N（对于限制性 N 选择为 2mM NH_4NO_3 并且对于高 N 选择运行 20mM NH_4NO_3 ）。每个罐分别在高 N 和低 N 运行种植后 8 和 10 天时开始隔日人工分配 100ml 营养物溶液，一周 3 次。在营养物应用的当天，跳过 05:00 和 13:00 时的 2 次 20 分钟浇水。每第 3 次运行应当更换 Vatter 垫子以避免 N 积聚和根物质的累积。表 7 显示对于低或高氮选择的营养物溶液中营养物的量。

[1288] 表 7

[1289]

营养物原液	2mM NH_4NO_3 (低氮 生长条件, 低 N)	20mM NH_4NO_3 (高 氮生长条件, 高 N)
	mL/L	mL/L
1 M NH_4NO_3	2	20
1 M KH_2PO_4	0.5	0.5
1 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2	2
1 M CaCl_2	2.5	2.5
1 M K_2SO_4	1	1

[1290] 注：用 HCl 或 KOH 将 pH 调整至 5.6

[1291] (c) 收获测量结果和数据收集 - 植物在低 N 运行下生长 28 天和植物在高 N 运行下生长 23 天后，进行下列测量（括号中为 phenocodes）：通过 Sartorius 电子天平测量的总枝条新鲜质量 (g) (SFM)，通过 Minolta SPAD 计测量的 V6 叶叶绿素（相对单位）(LC)，通过 Li-Cor 叶面积计测量的 V6 叶面积 (cm^2) (LA)，通过 Sartorius 电子天平测量的 V6 叶新鲜质量 (g) (LFM)，以及通过 Sartorius 电子天平测量的 V6 叶干质量 (g) (LDM)。通过 SAS 软件分析原始数据。显示的结果是转基因植物相对于野生型对照的比较。

[1292] 为了进行叶读取，从 V6 叶上切下样品。因为玉米叶的叶绿素计阅读受到叶的部分和叶在取样的植物上的位置影响，所以 SPAD 计阅读在植物的第 6 片叶上进行。每片叶进行 3 次测量，其中第一次阅读取自在叶尖和环之间一半距离，以及从叶缘到中脉的一半的点，而 2 次向叶尖获取。测量限制在叶总长度的 1/2-3/4（从底部）的区域，它们之间的间隔大约相等。从 SPAD 机器获取 3 次测量结果的平均值。

[1293] 记录切下的 V6 叶的叶新鲜质量，将叶置于纸袋中。包含叶的纸袋随后置于强制空气烘箱中在 80°C 进行 3 天。3 天后，从烘箱中取出纸袋并进行叶干质量测量。

[1294] 由收集的数据进行 2 次衍生测量：(1) 叶叶绿素面积 (LCA)，这是 V6 相对叶绿素含量与其叶面积（相对单位）的乘积。叶叶绿素面积 = 叶叶绿素 × 叶面积。这个参数给出了叶绿素在整个叶面积上的展开的指示；(2) 比叶面积 (LSA) 计算为 V6 叶面积与其干质量的比 (cm^2/g 干质量)，这个参数还识别为 NUE 的测量。数据显示于表 8 中。

[1295]

表 8

PEP SEQ ID	构建体 ID	事件ID	叶绿素面积			叶绿素			枝条新鲜质量		
			百分比 改变	平均值	对照 平均值	P 值	百分比 改变	平均值	对照 平均值	P 值	百分比 改变
91	PMON73816	ZM M37183	4	3688.43	3558.85	0.221	3	24.54	23.73	0.0722	5
	PMON73816	ZM M37183	15	5963.14	5180.33	0	12	31.72	28.41	0	16
	PMON73816	ZM M37183	8	4796	4439.2	0.0438	3	27.1	26.2	0.2569	23
	PMON73816	ZM M37188	12	4002.73	3558.85	0	13	26.86	23.73	0	4
	PMON73816	ZM M37188	13	5832.79	5180.33	3.00E-04	12	31.73	28.41	0	11
	PMON73816	ZM M37188	-9	4037.7	4439.2	0.0234	-1	26	26.2	0.7492	-10
	PMON73816	ZM M37197	4	5375.2	5180.33	0.2694	1	28.81	28.41	0.5194	17
	PMON73816	ZM M37197	21	5374.8	4439.2	0	14	29.9	26.2	0	30
100	PMON73816	ZM M37197	5	3733.33	3558.85	0.0996	1	24.02	23.73	0.522	5
	PMON75511	ZM M44958	18.1	5065.43	4287.52	1.00E-04	13.9	29.44	25.86	0	12
	PMON75511	ZM M44958	7.3	8006.21	7460.91	0.0071	5.5	40.63	38.5	0.0072	0
	PMON75511	ZM M44961	8.2	4639.06	4287.52	0.0583	5.8	27.36	25.86	0.0449	6.7
	PMON75511	ZM M44961	4.7	7810.27	7460.91	0.0947	4.9	40.41	38.5	0.0195	4.9
	PMON75511	ZM M46591	5.1	4504.72	4287.52	0.2951	5.5	27.27	25.86	0.0734	-4.5
	PMON75511	ZM M46591	-4.3	7142.88	7460.91	0.1149	-1.4	37.98	38.5	0.4997	8
	PMON75511	ZM M46601	12.3	4813.03	4287.52	0.0117	4.7	27.07	25.86	0.1494	22.4
114	PMON75511	ZM M46601	7.7	8036.73	7460.91	0.0045	5	40.44	38.5	0.014	0.3
	PMON75980	ZM M53387	-8	3998.29	4368.22	0.0065	2	24.35	23.8	0.3237	-18
	PMON75980	ZM M53389	-10	3323.6	3691.69	0.0189	-3	23.05	23.65	0.3551	-8
	PMON75980	ZM M53389	-5	4139.75	4368.22	0.1038	-2	23.42	23.8	0.4834	-10
	PMON75980	ZM M53390	8	4728.73	4368.22	0.0188	5	25.07	23.8	0.0272	-3
	PMON75980	ZM M53390	10	4044.06	3691.69	0.0245	2	24.24	23.65	0.3703	9
	PMON75980	ZM M53392	27	4679.18	3691.69	0	10	26.06	23.65	3.00E-04	27
	PMON75980	ZM M53392	2	4446.67	4368.22	0.5757	4	24.88	23.8	0.0534	3
	PMON75980	ZM M53396	13	4948.67	4368.22	0	7	25.37	23.8	0.0068	8
	PMON75980	ZM M53396	16	4271.59	3691.69	2.00E-04	4	24.7	23.65	0.109	13
	PMON75980	ZM M53397	1	4411.5	4368.22	0.7574	1	24.06	23.8	0.6707	-6
	PMON75980	ZM M53398	2	4476.43	4368.22	0.4235	7	25.36	23.8	0.0052	-6

[1296]

表 8 (续)

103	PMON78949	ZM_M63936	-2.1	4587.66	4686.12	0.4835	3.3	30.35	29.37	0.1605	-6.1	32.65	34.77	0.0457
	PMON78949	ZM_M63936	-2.1	3863.18	3946.32	0.4391	-0.6	28.37	28.55	0.7352	8.7	45.14	41.55	0.0077
	PMON78949	ZM_M63941	7.5	5037.73	4686.12	0.0128	3.9	30.51	29.37	0.1021	7.4	37.33	34.77	0.0158
	PMON78949	ZM_M63941	-1.9	3871.03	3946.32	0.4835	-2.5	27.83	28.55	0.1742	9.8	45.63	41.55	0.0036
	PMON78949	ZM_M63942	7.5	5036.21	4686.12	0.0132	6.4	31.26	29.37	0.007	9.2	37.98	34.77	0.0025
	PMON78949	ZM_M63942	13	4459.25	3946.32	0	7.6	30.73	28.55	0	9.2	45.37	41.55	0.0047
	PMON78949	ZM_M63944	4.3	4887.29	4686.12	0.1528	4.9	30.81	29.37	0.0393	-6.6	32.48	34.77	0.0306
	PMON78949	ZM_M63944	0.8	3979.53	3946.32	0.7571	0.4	28.66	28.55	0.8318	-0.9	41.17	41.55	0.7776
	PMON79709	ZM_M51983	3	5110.49	4947.82	0.1855	6	28.18	26.59	0.0012	4	46.1	44.36	0.076
	PMON79709	ZM_M51983	2	6011.13	5906.6	0.6174	3	28.75	27.9	0.2078	16	62.26	53.53	2.00E-04
	PMON79709	ZM_M51985	0.9	5829.16	5776.02	0.7681	-0.7	30.24	30.45	0.7671	-3.1	45.46	46.92	0.4097
	PMON79709	ZM_M51985	0	5773.16	5776.02	0.988	-0.2	30.38	30.45	0.9183	-1.6	46.16	46.92	0.682
	PMON79709	ZM_M51985	7	6301.05	5906.6	0.0602	3	28.81	27.9	0.1763	16	62.11	53.53	2.00E-04
108	PMON79709	ZM_M51985	6	5263.87	4947.82	0.0079	6	28.07	26.59	0.0026	3	45.48	44.36	0.2555
	PMON79709	ZM_M52025	3	5075.34	4947.82	0.2817	4	27.58	26.59	0.0415	4	46.33	44.36	0.052
	PMON79709	ZM_M52025	3.2	5959.63	5776.02	0.3087	-1.7	29.93	30.45	0.4617	1	47.38	46.92	0.7983
	PMON79709	ZM_M52025	21	7124.16	5906.6	0	14	31.74	27.9	0	20	64.48	53.53	0
	PMON79709	ZM_M52710	6	6240.85	5906.6	0.1109	10	30.6	27.9	1.00E-04	9	58.5	53.53	0.0321
	PMON79709	ZM_M52710	8	5339.8	4947.82	0.001	7	28.46	26.59	1.00E-04	3	45.82	44.36	0.1373
	PMON79709	ZM_M52710	3.8	5995.36	5776.02	0.2241	3.6	31.55	30.45	0.1214	-4.1	45	46.92	0.2779
	PMON79709	ZM_M52720	7.4	6201.46	5776.02	0.0188	5.2	32.04	30.45	0.0258	6.1	49.8	46.92	0.1242
	PMON79709	ZM_M52720	7	5280.25	4947.82	0.0053	7	28.39	26.59	2.00E-04	-5	42.31	44.36	0.0357
	PMON79709	ZM_M52720	12	6617.79	5906.6	8.00E-04	9	30.28	27.9	9.00E-04	3	55.01	53.53	0.5222

[1297]

表 8 (续)

PMON80270	ZM M55967	5.2	6306.34	5993.37	0.0376	4.3	30.64	29.39	0.028	7.3	54.7	50.98	0.0017
PMON80270	ZM M55967	6.6	5.33	5	0.0666	6.7	33.48	31.38	0.0075	6	44.75	42.21	0.0627
PMON80270	ZM M55968	16.6	5.83	5	0	5.7	33.17	31.38	0.0421	17.5	49.6	42.21	0
PMON80270	ZM M55968	-1	5930.77	5993.37	0.6873	-0.5	29.25	29.39	0.8058	7.7	54.89	50.98	0.001
PMON80270	ZM M55969	-4.1	5749.51	5993.37	0.1048	0.3	29.47	29.39	0.892	4.7	53.36	50.98	0.0427
PMON80270	ZM M55969	5	5.25	5	0.1118	4.1	32.66	31.38	0.1464	8	45.58	42.21	0.0139
PMON80270	ZM M55970	-2.3	5855.83	5993.37	0.3595	1.3	29.76	29.39	0.5246	4.4	53.2	50.98	0.0504
PMON80270	ZM M55970	2.6	5.13	5	0.4257	-2.5	30.58	31.38	0.3062	2.9	43.45	42.21	0.3616
PMON80270	ZM M55971	-4	5754.31	5993.37	0.1118	0.7	29.61	29.39	0.7	1.8	51.92	50.98	0.4075
PMON80270	ZM M55971	6	5.3	5	0.0728	4.8	32.89	31.38	0.0536	6	44.74	42.21	0.064
PMON80270	ZM M55972	-1	5933.48	5993.37	0.6897	-0.3	29.29	29.39	0.8631	3.6	52.81	50.98	0.1193
PMON80270	ZM M55972	13.8	5.69	5	0	5.1	32.99	31.38	0.0397	9.4	46.19	42.21	0.0037
PMON80270	ZM M56524	8	5.4	5	0.0364	5.1	32.98	31.38	0.0413	15.5	48.74	42.21	0
PMON80270	ZM M56524	-1.4	5908.18	5993.37	0.5702	1	29.67	29.39	0.6255	6.3	54.18	50.98	0.0067
PMON80270	ZM M56526	-2.7	5829.79	5993.37	0.276	-1.4	28.98	29.39	0.4744	2.5	52.23	50.98	0.2681
PMON80270	ZM M56526	20	6	5	0	0.5	31.54	31.38	0.8352	13.8	48.05	42.21	0
PMON80270	ZM M56527	1.2	6063.11	5993.37	0.6421	-0.2	29.32	29.39	0.8978	5.6	53.82	50.98	0.0126
PMON80270	ZM M56527	2.2	5.11	5	0.489	2.4	32.14	31.38	0.3294	4.1	43.95	42.21	0.2012
PMON80461	ZM M52932	24.5	8417.13	6759.85	0	13.4	34.66	30.57	0	25.7	76.5	60.88	0
PMON80461	ZM M52932	6	7095.13	6713.17	0.0553	3	30.63	29.82	0.294	-1	54.05	54.73	0.653
PMON80461	ZM M52932	1	4877.13	4816.31	0.5834	2	29.24	28.65	0.2351	-2	30.75	31.34	0.4187
PMON80461	ZM M52932	-4.5	5830.38	6107.25	0.1599	-1.1	29.45	29.77	0.6468	-2.7	37.58	38.63	0.5145
PMON80461	ZM M52932	-9	4808.1	5269.64	0.0084	1	30.86	30.68	0.7905	2	35.8	35.13	0.4119
PMON80461	ZM M52932	8.2	5088.24	4886.12	0.0069	10	32.31	29.37	0	-6	32.68	34.77	0.0483
PMON80461	ZM M52932	14.3	4511.99	3946.32	0	6.5	30.42	28.55	5.00E-04	11	46.12	41.55	7.00E-04
PMON80461	ZM M53218	-14.6	5773.62	6759.85	1.00E-04	-5.6	28.87	30.57	0.0168	-16.4	50.92	60.88	1.00E-04
PMON80461	ZM M53218	7	7166.44	6713.17	0.0231	5	31.33	29.82	0.0501	9	59.48	54.73	0.002
PMON80461	ZM M53218	2	4908.21	4816.31	0.4075	3	29.55	28.65	0.072	3	32.25	31.34	0.1908
PMON80461	ZM M53218	-9	4808.4	5269.64	0.0085	-2	30.04	30.68	0.3563	-2	34.52	35.13	0.4641
PMON80461	ZM M53218	8.2	5071.81	4886.12	0.0064	6.2	31.19	29.37	0.0096	0.4	34.91	34.77	0.8893
PMON80461	ZM M53218	1.7	6211.2	6107.25	0.6164	-1.5	29.33	29.77	0.5225	0.9	38.97	38.63	0.8332
PMON80461	ZM M53218	1.1	3987.88	3946.32	0.6988	1.3	28.92	28.55	0.484	1.3	42.07	41.55	0.6981
PMON80461	ZM M53235	3	4955.98	4816.31	0.2084	1	28.93	28.65	0.5828	0	31.45	31.34	0.8709
PMON80461	ZM M53235	20.2	8122.46	6759.85	0	13.8	34.79	30.57	0	17.3	71.4	60.88	0
PMON80461	ZM M53235	3	6907.56	6713.17	0.3282	5	31.36	29.82	0.0447	1	55.05	54.73	0.8357

96

118

表 8 (续)

PMON80461	ZM M53503	2	4921.37	4816.31	0.3438	8	30.95	28.65	0	3	32.32	31.34	0.1605
PMON80461	ZM M53503	14.9	7763.72	6759.85	1.00E-04	10.4	33.77	30.57	0	25.9	76.63	60.88	0
PMON80461	ZM M53503	7	7197.24	6713.17	0.0154	6	31.54	29.82	0.0255	12	61.48	54.73	0
PMON80461	ZM M53504	-1	6666.94	6713.17	0.816	1	29.98	29.82	0.8413	10	60.29	54.73	6.00E-04
PMON80461	ZM M53504	-1	4748.6	4816.31	0.5416	-1	28.4	28.65	0.9231	-2	30.82	31.34	0.4559
PMON80461	ZM M53504	-15.3	5724.41	6759.85	0	-8.6	27.93	30.57	2.00E-04	-21	48.11	60.88	0
PMON80461	ZM M53848	2	4897.29	4816.31	0.4654	4	29.87	28.65	0.0153	-2	30.63	31.34	0.3077
PMON80461	ZM M53848	-15.3	5722.73	6759.85	0	-5.6	28.87	30.57	0.0168	-24.1	46.19	60.88	0
PMON80461	ZM M54282	3	6882.64	6713.17	0.394	7	31.86	29.82	0.008	2	56	54.73	0.4059
PMON80461	ZM M54282	0	4800.09	4816.31	0.8878	2	29.31	28.65	0.2011	-1	30.98	31.34	0.6261
PMON80461	ZM M54282	-2	6592.76	6713.17	0.5446	-2	29.35	29.82	0.5372	3	56.57	54.73	0.2552
PMON80461	ZM M54282	-12.7	5900.82	6759.85	7.00E-04	-4.9	29.07	30.57	0.0346	-19.8	48.83	60.88	0
PMON80461	ZM M54284	7	7155.9	6713.17	0.0265	5	31.2	29.82	0.0723	1	55.01	54.73	0.855
PMON80461	ZM M54284	19.2	8060.14	6759.85	0	9.7	33.55	30.57	0	16.4	70.88	60.88	1.00E-04
PMON80461	ZM M54284	5	5052.8	4816.31	0.0404	1	28.94	28.65	0.5692	3	32.14	31.34	0.2488
PMON80461	ZM M55266	-2.4	5962.4	6107.25	0.4616	0.2	29.81	29.77	0.9457	-6.7	36.04	38.63	0.1098
PMON80461	ZM M55957	5	6414.71	6107.25	0.1187	2.9	30.63	29.77	0.2128	-3.7	37.21	38.63	0.3528
PMON80461	ZM M56233	2.7	6270.89	6107.25	0.4056	5	31.25	29.77	0.0426	-0.7	38.38	38.63	0.8653
PMON80461	ZM M56728	3.8	6338.35	6107.25	0.2405	4	30.96	29.77	0.0831	-0.5	38.43	38.63	0.8911
PMON80542	ZM M57107	-3.8	5766.93	5993.37	0.1461	-0.2	29.34	29.39	0.9327	6.1	54.07	50.98	0.0089
PMON80542	ZM M57107	14.2	571	5	0	1.2	31.75	31.38	0.6312	12.3	47.4	42.21	2.00E-04
PMON80542	ZM M57119	-8	5512.76	5993.37	0.0015	-1.1	29.08	29.39	0.5896	4.6	53.34	50.98	0.0375
PMON80542	ZM M57119	11.6	558	5	5.00E-04	5.1	32.96	31.38	0.0429	16.2	49.03	42.21	0
PMON80542	ZM M57120	2.6	513	5	0.4257	2.5	32.16	31.38	0.3138	-1.1	41.75	42.21	0.7377
PMON80542	ZM M57120	-3.1	5807.66	5993.37	0.2163	0.2	29.46	29.39	0.9036	0.1	51.04	50.98	0.9595
PMON80542	ZM M57121	-2.7	5829.33	5993.37	0.2746	1.9	29.94	29.39	0.3311	8.4	55.24	50.98	2.00E-04
PMON80542	ZM M57121	4.4	522	5	0.2467	-1.4	30.95	31.38	0.5865	9	45.99	42.21	0.0058
PMON80542	ZM M57122	-3.5	5785.68	5993.37	0.1669	0.4	29.5	29.39	0.8458	8.9	55.51	50.98	1.00E-04
PMON80542	ZM M57122	0	5	5	1	2.3	32.1	31.38	0.3537	6.8	45.07	42.21	0.0474
PMON80542	ZM M57124	-3	5815.15	5993.37	0.2353	-2.7	28.61	29.39	0.1694	6.6	54.33	50.98	0.0032
PMON80542	ZM M57124	13.4	567	5	2.00E-04	0.3	31.48	31.38	0.8981	13.1	47.74	42.21	1.00E-04
PMON80542	ZM M57131	13.3	7776.21	6866.4	0	6.5	33.54	31.48	0.0099	27.9	68.11	53.23	0
PMON80542	ZM M57132	-2.3	5853.25	5993.37	0.3506	-2.3	28.71	29.39	0.2306	13.2	57.73	50.98	0
PMON80542	ZM M57132	7.6	538	5	0.0174	-1.9	30.79	31.38	0.4522	7.4	45.34	42.21	0.0221
PMON80542	ZM M57146	0.6	6031.47	5993.37	0.7995	4.9	30.82	29.39	0.0124	-2.6	49.63	50.98	0.2347
PMON80542	ZM M57146	0.4	5.02	5	0.9047	7	33.58	31.38	0.0052	0.7	42.51	42.21	0.8221

102

表 8 (续)

PMON80850	ZM M56061	-3.7	4.94	5.13	0.1027	2.8	30.43	29.6	0.2912	-1.8	44.81	45.62	0.6326
PMON80850	ZM M56061	-1.1	5272.7	5331.51	0.7088	0.7	28.56	28.35	0.7113	-6.3	42.33	45.16	0.0465
PMON80850	ZM M56062	3.5	5.31	5.13	0.1181	0.1	29.63	29.6	0.9654	6.2	48.44	45.62	0.0972
PMON80850	ZM M56062	4.4	5566.18	5331.51	0.1369	1.6	28.8	28.35	0.4251	9.3	49.37	45.16	0.0032
PMON80850	ZM M56071	-3.3	4.96	5.13	0.141	2.5	30.33	29.6	0.379	7.6	49.1	45.62	0.0407
PMON80850	ZM M56071	-0.5	5302.33	5331.51	0.853	-0.8	28.11	28.35	0.6697	10.7	50.01	45.16	7.00E-04
PMON80850	ZM M56222	-0.8	5.09	5.13	0.719	6.1	31.41	29.6	0.0211	0.9	46.01	45.62	0.8177
PMON80850	ZM M56222	4	5545.23	5331.51	0.1754	4.2	29.53	28.35	0.0367	-0.8	44.78	45.16	0.7867
PMON80850	ZM M56722	-1.8	5.05	5.13	0.4557	0.1	29.61	29.6	0.9841	-5.6	43.05	45.62	0.1295
PMON80850	ZM M56722	0.9	5379.37	5331.51	0.7693	2.1	28.94	28.35	0.3101	2.8	46.42	45.16	0.3906
PMON80850	ZM M56723	-4.1	4.92	5.13	0.0711	-1.2	29.25	29.6	0.6582	-2.9	44.28	45.62	0.4536
PMON80850	ZM M56723	8.3	5774.12	5331.51	0.0052	2.1	28.94	28.35	0.2947	2.6	46.33	45.16	0.4113
PMON80850	ZM M57056	7.2	5.51	5.13	0.0014	5	31.06	29.6	0.0623	11.5	50.85	45.62	0.0022
PMON80850	ZM M57056	2.6	5472.58	5331.51	0.3707	1.4	28.75	28.35	0.4782	2.1	46.11	45.16	0.5035

123

[1300] 氮使用田间效率测定

[1301] 水平 I. 将本发明提供的转基因植物种植在田间而不应用任何氮源。转基因植物

和对照植物通过基因型和构建体分群,其中对照随机安排在基因型区组中。每种类型的转基因植物通过 3 次重复并横过 5 个位置进行测试。通过收集来自 0-24" 和 24-48" 土壤层的 30 个样品土壤核心在 4 月初的预先种植中分析田间的氮水平。分析土壤样品的硝酸盐-氮、磷 (P)、钾 (K)、有机物质和 pH 以提供基线值。基于土壤测试建议应用 P、K 和微量营养物。

[1302] 水平 II. 将本发明提供的转基因植物种植在应用 3 种氮 (N) 肥料水平的田间,即低水平 (0N)、中等水平 (80 磅 / 英亩 (lb/ac)) 和高水平 (180 磅 / 英亩)。液体 28% 或 32% UAN(尿素, 铵态氮) 用作 N 源并通过散播吊杆应用,且合并在与预期的农作物行相同的方向具有后翻滚篮 (rear rolling basket) 的田地中耕地。尽管对于 0N 处理没有应用 N,但土壤仍应当以与处理的区域相同的方式扰动。转基因植物和对照植物通过基因型和构建体分群,其中对照随机安排在基因型区组中。每种类型的转基因植物通过 3 次重复并横过 4 个位置进行测试。通过收集来自 0-24" 和 24-48" 土壤层的 30 个样品土壤核心在 4 月初的预先种植中分析田间的氮水平。分析土壤样品的硝酸盐-氮、磷 (P)、钾 (K)、有机物质和 pH 以提供基线值。基于土壤测试建议应用 P、K 和微量营养物。

[1303]

表9. 基因在不同氮水平的转基因植物中增加种子产量。

PEP SEQ ID NO	Phe ID	基因	构建体	事件	转基因 平均值	对照 平均值	百分比 改变	P值
I	108	玉蜀黍转运输蛋白, mrs2-1-样1	PMON79709	ZM M51983	137.5	124.76521	10.207	0.0908
	105	玉米 激活酶2	PMON75524	ZM M47998	140.2	124.76521	12.3711	0.0407
	130	酵母丙氨酸转氨酶	PMON77895	ZM M61017	140.3	124.76521	12.4512	0.0394
PEP SEQ ID NO	Phe ID	基因	构建体	处理	事件	转基因产量	对照产量	P值
II	114	Ralstonia metallidurans 谷氨酸脱羧酶	pMON75980	高	ZM M53398	159.7	142.45	0.0521
		Ralstonia metallidurans 谷氨酸脱羧酶		低	ZM M53398	137.125	125.14298	0.0263
		Ralstonia metallidurans 谷氨酸脱羧酶		高	ZM M53392	202.575	190.5333333	0.0833
118		鼠耳芥E2F	pMON80461	高	ZM M53218	160.6	142.45	0.0498
		鼠耳芥E2F		高	ZM M53848	158.675	142.45	0.0792
		鼠耳芥E2F		低	ZM M53848	141.175	125.14298	0.0031
		鼠耳芥E2F		中	ZM M53218	159.15	145.075	0.0883
91	PHE0001017 1108	MADS 框 110	pMON73816	低	ZM M37188	134.575	125.14298	0.0798

[1304] B. 对于增加的产量的选择

[1305] 本发明的多种转基因植物与对照植物比较显示出改善的产量。改善的产量可以由增强的种子库潜力 (sink potential), 即胚乳细胞或谷粒的数目和大小和 / 或增强的库强 (sink strength), 即淀粉生物合成的速率引起。库潜力可以在谷粒发展过程的非常早期确

定,因为胚乳细胞数目和大小在授粉后最初几天内测定。

[1306] 在过去几十年中玉米产量的许多增加由种植密度的增加产生。在那个时期,玉米产量以 2.1 蒲式耳 / 英亩 / 年的速率增加,而种植密度已以 250 株植物 / 英亩 / 年的速率增加。现代杂交玉米的特征是这些变种以高密度种植的能力。许多研究已显示高于目前的种植密度应当导致更多生物量产生,但目前的种质在这些更高的密度上执行得不好。在高密度种植中增加产量的一个方法是增加收获指数 (HI),这是与总生物量比较分配给谷粒的生物量的比例。

[1307] 增强的所得转基因玉米事件的有效产量选择使用在多个位置的转基因事件的杂交后代,其中植物在最佳生产管理实践和最大害虫控制下生长。对于改善的产量有用的靶是,与来自对照植物种子培育的植物产生的产量比较,产量增加 5% -10%。选择方法可以在多个和不同的地理位置中应用,例如最高达 16 或更多个位置,经过一个或多个种植季节,例如至少 2 个种植季节,以统计学区分产量改进与天然环境作用。在标准地块中种植多重转基因植物、阳性和阴性对照植物、以及授粉者植物,例如 2 排地块,20 英尺长 5 英尺宽,排间距为 30 英寸,并且行之间有 3 英尺小径。转基因事件可以通过重组 DNA 构建体分群,群随机置于田间。当使用雄性不育转基因事件时,每 2 块地块种植高质量玉米系的授粉者地块以允许自由传粉。有用的种植密度是约 30,000 株植物 / 英亩。高种植密度大于 30,000 株植物 / 英亩,优选约 40,000 株植物 / 英亩,更优选约 42,000 株植物 / 英亩,最优选约 45,000 株植物 / 英亩。关于产量改善的替代指示包括源容量 (生物量)、源输出 (蔗糖和光合作用)、库组分 (谷粒大小、谷穗大小、种子中的淀粉)、发育 (光应答、高度、密度耐受性)、成熟度、早期开花性状和对高密度种植的生理学应答,例如 45,000 株植物 / 英亩,例如如表 10 和 11 中说明的。

[1308] 表 10

[1309]

时间选择	评价	描述	评论
V2-3	早期直立	可以在发芽后和取出任何植物前的任何时候获 取。	
花粉释放	GDU至50%释放	GDU至50%植物释放50 %雄花穗。	
抽丝	GDU至50%抽丝	GDU至50%植物显示 丝。	
成熟度	植物高度	从土壤表面到旗叶附着 的高度（英寸）。	每地块 10 株植物 - 产量团队帮助
成熟度	谷穗高度	从土壤表面到第一个谷 穗附着节的高度。	每地块 10 株植物 - 产量团队帮助
成熟度	谷穗上方的叶	视觉得分, 茎直、大小、 翻转	
成熟度	雄花穗大小	视觉得分 +/- 对 WT	
收获前	最终直立	收获前的最后直立计 数, 分蘖除外	
收获前	茎倒伏	第一个耳穗附着下方的 茎折断的数目。倾斜的分 蘖除外	
收获前	根倒伏	与垂线倾斜> 45° 角的茎 的数目。	
收获前	保持绿色	生理成熟后并且当基因 型中的差异明显时, 等级 1 (90-100%的组织绿 色)-9 (0-19%的组织 绿色)。	
收获	谷粒产量	谷粒产量 / 地块 (壳重量)	

[1310] [1310] 表 11

[1311]

时间选择	评价	描述
V8-V12	叶绿素	
V12-VT	谷穗叶面积	
V15-15DAP	Chl 荧光	
V15-15DAP	CER	
15-25DAP	碳水化合物	蔗糖、淀粉
收获前	第一个节间的直径	
收获前	底部第三个节间的直 径	
收获前	谷穗节间的直径	
成熟	谷穗性状	直径、长度、谷粒数 目、谷粒重量

[1312] 电子传递速率 (ETR) 和 CO₂ 交换速率 (CER): 使用 Li6400LCF (Licor, Lincoln, NE) 在约 V9-R1 阶段测量 ETR 和 CER。叶叶绿素荧光是监控来源活性的快速方法并且报告与在各种条件下的 CO₂ 同化作用高度关联 (Photosyn Research, 37:89-102)。用光化性光 1500 (具有 10% 的蓝光) 微摩尔 m⁻²s⁻¹, 28°C, CO₂ 水平 450ppm 测量最年幼的完全伸展的叶或耳穗叶上方的 2 片叶。在每个事件中测量 10 株植物。对于每株植物进行 2 次阅读。

[1313] 手提式叶绿素计 SPAD-502 (Minolta- 日本) 用于测量在活转基因植物和野生型配对物上的总叶绿素水平。分析来自每株植物的 3 个三小叶, 并且每个三小叶分析 3 次。随后将 9 个数据点平均以获得叶绿素水平。每种基因型分析的植物数目为 5-8。

[1314]

表 12

pep SEQ ID	构建体	Wichita, KS			Carrollton, IL			
		平均SPAD值	% 改变	P值	平均SPAD值	% 改变	P值	
88	pMON68399	ZM_M31143	64.8	2	0.5215	58.87	4	0.0507
		ZM_M31143	64.8	2	0.5828			
		ZM_M31146	64	1	0.7624	54	-1.14	0.0337
		ZM_M31146	64	1	0.8319			
		ZM_M31147	67.3	6	0.0858	59.84	6	0.0665
		ZM_M31147	67.3	6	0.105			
		ZM_M31152	66.6	5	0.1564	58.9	1	0.7965
		ZM_M31152	66.6	5	0.1862			
		ZM_M31524	60.4	-5	0.2009	57.44	2	0.5839
		ZM_M31524	60.4	-5	0.1734			
		ZM_M32356	61.9	-2	0.5386	59.36	-2	0.4308
		ZM_M32356	61.9	-3	0.4836			
		ZM_M34171	62.7	-1	0.7919	60.18	0	0.9203
		ZM_M34171	62.7	-1	0.7255			
		ZM_M38646	64.5	2	0.6164	59.89	3	0.3042
		ZM_M38646	64.5	1	0.6819			
		ZM_M38660	67.3	6	0.0836	62.35	7	0.004

[1315]

表 13

PEP SEQ ID	构建体	事件	n- trt	n- ctr	ETR- ctr	% 改变	P 值	CER- ctr	% 改变	P 值	ETR- ctr	% 改变	P 值	CER- ctr	% 改变	P 值
105	PMON75524	ZM M47998	20	40	141.3	3	0.001	45.7	7	0.000	10	42	153.7	45.8	-2	0.067
	PMON75524	ZM M48003	20	40	141.3	8	0.000	45.7	6	0.000	10	42	153.7	45.8	4	0.001
	PMON75524	ZM M48004	20	40	141.3	-4	0.000	45.7	-8	0.000	11	42	153.7	45.8	9	0.000
	PMON75524	ZM M48005	20	40	141.3	2	0.008	45.7	4	0.012	12	42	153.7	45.8	5	0.000
	PMON75524	ZM M48007	20	40	141.3	4	0.000	45.7	-3	0.052	11	42	153.7	45.8	-2	0.072
	PMON75524	ZM M48010	20	40	141.3	6	0.000	45.7	8	0.000	10	42	153.7	45.8	9	0.000
	PMON81853	ZM M70887	18	64	136.3	-3	0.298	43.7	-5	0.097	19	51	151.5	34.8	9	0.012
	PMON81853	ZM M70888	22	64	136.3	15	0.000	43.7	15	0.000	10	51	151.5	34.8	22	0.000
125	PMON81853	ZM M70889	22	64	136.3	-23	0.000	43.7	-18	0.000	16	51	151.5	34.8	13	0.000
	PMON81853	ZM M70900	22	64	136.3	-14	0.000	43.7	-14	0.000	21	51	151.5	34.8	-0	0.944
	PMON81853	ZM M71630	16	64	136.3	9	0.005	43.7	5	0.119	10	51	151.5	34.8	22	0.000
	PMON80542	ZM M57107	20	101	154.1	0	0.863	40.5	5	0.084	9	40	131.7	28.9	18	0.000
102	PMON80542	ZM M57119	20	101	154.1	3	0.002	40.5	5	0.099	10	40	131.7	28.9	-3	0.304
	PMON80542	ZM M57120	20	101	154.1	-6	0.000	40.5	-4	0.112	10	40	131.7	28.9	15	0.000
	PMON80542	ZM M57121	20	101	154.1	-5	0.000	40.5	-8	0.003	12	40	131.7	28.9	-12	0.000
	PMON80542	ZM M57122	20	101	154.1	10	0.000	40.5	19	0.000	9	40	131.7	28.9	-5	0.080
	PMON80542	ZM M57124	20	101	154.1	1	0.514	40.5	3	0.204	11	40	131.7	28.9	27	0.000
	PMON80542	ZM M57131	20	101	154.1	6	0.000	40.5	7	0.017	10	40	131.7	28.9	-3	0.276
	PMON80542	ZM M57132	20	101	154.1	9	0.000	40.5	11	0.000	11	40	131.7	28.9	-3	0.191
	PMON80542	ZM M57146	20	101	154.1	9	0.000	40.5	13	0.000	10	40	131.7	28.9	5	0.062

[1316] 当选择产量改善时,有用的统计学测量方法包括 3 个组分,即模拟对于每个位置分开的测试田间的空间自相关,调整对于每个位置的空间依赖性的重组 DNA 事件的性状,

和进行交叉位置分析。模拟空间自相关的第一个步骤是估计半变异函数 (semivariogram) 的协方差参数。假定球形协方差模型以模拟空间自相关。由于试验的大小和性质, 空间自相关可能可以改变。因此, 连同球形协方差结构一起也假定各向异性。下列方程式组描述了各向异性球形协方差模型的统计学形式。

$$[1317] \quad C(h; \theta) = \nu I(h=0) + \sigma^2 \left(1 - \frac{3}{2}h + \frac{1}{2}h^3 \right) I(h < 1),$$

[1318] 其中 $I(\cdot)$ 是指示物函数, $h = \sqrt{\dot{x}^2 + \dot{y}^2}$, 且

$$[1319] \quad \dot{x} = [\cos(\rho\pi/180)(x_1 - x_2) - \sin(\rho\pi/180)(y_1 - y_2)]/\omega_x$$

$$[1320] \quad \dot{y} = [\sin(\rho\pi/180)(x_1 - x_2) + \cos(\rho\pi/180)(y_1 - y_2)]/\omega_y$$

[1321] 其中 $s_1 = (x_1, y_1)$ 是一个位置的空间坐标并且 $s_2 = (x_2, y_2)$ 是第二个位置的空间坐标。共有 5 个相等协方差各向异性椭圆的协方差参数, $\theta = (\nu, \sigma^2, \rho, \omega_n, \omega_j)$, 其中 ν 是块金效应, σ^2 是偏基台值, ρ 是由北顺时针方向旋转的度数, ω_n 是对于短轴的定标参数并且 ω_j 是对于长轴的定标参数。限定空间趋势的 5 个协方差参数随后将通过使用来自大量重复授粉者地块的数据经由限制的最大似然方法估计。在多位置田间试验中, 对于每个位置分开模拟空间趋势。

[1322] 在获得模型的方差参数后, 产生方差 - 协方差结构用于要分析的数据集。这个方差 - 协方差结构包含调整空间依赖性的产量数据所需的空間信息。在这种情况下, 最佳代表本研究的处理和实验设计的嵌套模型连同方差 - 协方差结构一起使用以调整产量数据。在这个过程中, 还可模拟并估计苗圃或种子批次作用, 以关于由种子批次差异引起的任何产量相等调整产量。来自不同位置的空间调整的数据产生后, 组合并分析所有调整的数据, 其中假定位置作为复制。在这次分析中, 组合位置内和位置间的方差以估计来自转基因植物和对照植物的产量标准误。相对平均数比较用于指示统计学显著的产量改善。

[1323] 表 14

[1324]

PEP SEQ ID NO	构建体id	转基因事件	对照	转基因平均值	对照平均值	百分比差异	P值
105	pMON75524	ZM_M47998	阴性分离子	173.3	176.1	-1.6	0.392
		ZM_M48003	阴性分离子	167.2	176.1	-5.1	0.007
		ZM_M48004	阴性分离子	176.2	176.1	0.0	0.990
		ZM_M48005	阴性分离子	186.0	176.1	5.6	0.003
		ZM_M48007	阴性分离子	177.9	176.1	1.0	0.631
		ZM_M48010	阴性分离子	176.8	176.1	0.4	0.841
88	pMON68399	ZM_M31146	阴性分离子	179.1	179.9	-0.4	0.778
		ZM_M31147	阴性分离子	181.7	179.9	1.0	0.497
		ZM_M31524	阴性分离子	179.3	179.9	-0.3	0.829
		ZM_M32356	阴性分离子	181.3	179.9	0.8	0.601
		ZM_M38646	阴性分离子	180.3	179.9	0.2	0.880
		ZM_M38681	阴性分离子	180.2	179.9	0.2	0.894
		ZM_M39295	阴性分离子	176.6	179.9	-1.8	0.259
		ZM_M39297	阴性分离子	175.6	179.9	-2.3	0.125
		ZM_M39298	阴性分离子	184.6	179.9	2.7	0.082
		ZM_M39302	阴性分离子	182.0	179.9	1.2	0.440
PEP SEQ.ID NO	构建体id	转基因事件	对照	转基因平均值	对照平均值	百分比差异	P值
105	pMON75524	ZM_M47998	阴性分离子	173.3	176.1	-1.6	0.392
		ZM_M48003	阴性分离子	167.2	176.1	-5.1	0.007
		ZM_M48004	阴性分离子	176.2	176.1	0.0	0.990
		ZM_M48005	阴性分离子	186.0	176.1	5.6	0.003
		ZM_M48007	阴性分离子	177.9	176.1	1.0	0.631
		ZM_M48010	阴性分离子	176.8	176.1	0.4	0.841
88	pMON68399	ZM_M31146	阴性分离子	179.1	179.9	-0.4	0.778
		ZM_M31147	阴性分离子	181.7	179.9	1.0	0.497
		ZM_M31524	阴性分离子	179.3	179.9	-0.3	0.829
		ZM_M32356	阴性分离子	181.3	179.9	0.8	0.601
		ZM_M38646	阴性分离子	180.3	179.9	0.2	0.880
		ZM_M38681	阴性分离子	180.2	179.9	0.2	0.894
		ZM_M39295	阴性分离子	176.6	179.9	-1.8	0.259
		ZM_M39297	阴性分离子	175.6	179.9	-2.3	0.125
		ZM_M39298	阴性分离子	184.6	179.9	2.7	0.082
		ZM_M39302	阴性分离子	182.0	179.9	1.2	0.440

[1325] 表 15

[1326]

PEP SEQ ID	构建体	事件	转基因 平均值	对照 平均值	百分比 差异	P值
127	PMON78911	ZM M45101	167.9	178.1	-4.7	0.016
127	PMON78911	ZM M59413	175.4	178.1	-0.4	0.832
127	PMON78911	ZM M59778	161.2	178.1	-8.5	0.000
127	PMON78911	ZM M59783	181.0	178.1	8.4	0.000
127	PMON78911	ZM M59784	182.6	178.1	3.7	0.053
127	PMON78911	ZM M62810	180.2	178.1	2.3	0.212
130	PMON77895	ZM M81018	171.5	178.1	-2.8	0.163
139	PMON77896	ZM M61017	173.4	178.1	-1.8	0.397
130	PMON77895	ZM M81033	184.1	178.1	4.6	0.015
131	PMON79152	ZM M64367	162.9	178.1	-7.5	0.000
131	PMON79152	ZM M65978	184.5	178.1	4.7	0.012
131	PMON79152	ZM M65982	175.0	178.1	-0.8	0.733
131	PMON79152	ZM M65986	139.7	178.1	-20.7	0.000
131	PMON79152	ZM M65992	171.8	178.1	-2.5	0.182
132	PMON80921	ZM M63833	184.2	178.1	4.6	0.015
133	PMON75505	ZM M49384	183.6	178.1	4.2	0.023
134	PMON80925	ZM M60505	183.4	178.1	4.1	0.039
134	PMON80925	ZM M62005	179.8	178.1	2.1	0.288
134	PMON80925	ZM M62007	178.5	178.1	1.3	0.489
134	PMON80925	ZM M63594	180.1	178.1	2.3	0.229
108	PMON79163	ZM M45011	177.0	178.1	0.6	0.782
108	PMON79163	ZM M48217	179.8	178.1	2.1	0.289
108	PMON79163	ZM M61818	183.5	178.1	4.2	0.033
108	PMON79163	ZM M61822	188.1	178.1	4.6	0.023
136	PMON79164	ZM M44045	172.1	178.1	-2.3	0.217
136	PMON79164	ZM M59749	180.6	178.1	2.5	0.175
136	PMON79164	ZM M59750	181.8	178.1	3.2	0.087
136	PMON79164	ZM M61348	169.5	178.1	-3.8	0.042
136	PMON79164	ZM M61889	175.0	178.1	-0.6	0.738
136	PMON79164	ZM M61890	145.4	178.1	-17.4	0.000
136	PMON79164	ZM M62988	175.7	178.1	-0.3	0.881
136	PMON79164	ZM M63003	185.0	178.1	5.0	0.007
107	PMON75533	ZM M47453	183.4	178.1	4.1	0.027
107	PMON75533	ZM M47460	178.4	178.1	1.3	0.491
107	PMON75533	ZM M49275	183.9	178.1	4.4	0.018
107	PMON75533	ZM M49278	177.0	178.1	0.5	0.790
137	PMON79653	ZM M49883	174.6	178.1	-0.9	0.633
137	PMON79653	ZM M65281	183.4	178.1	4.1	0.030
138	PMON81228	ZM M59931	169.3	178.1	-3.9	0.066
138	PMON81228	ZM M60825	185.8	178.1	5.5	0.003
148	PMON82223	ZM M70571	185.8	178.1	5.5	0.007
161	PMON79665	ZM M61224	171.9	178.1	-2.4	0.198
161	PMON79665	ZM M63787	172.2	178.1	-2.2	0.233
161	PMON79665	ZM M65078	184.2	178.1	4.6	0.019
139	PMON79430	ZM M50221	181.1	178.1	2.8	0.137
139	PMON79430	ZM M50222	178.6	178.1	1.4	0.477
139	PMON79430	ZM M50223	180.8	178.1	2.7	0.153
139	PMON79430	ZM M50727	177.7	178.1	0.8	0.637
139	PMON79430	ZM M50729	179.0	178.1	1.8	0.377
139	PMON79430	ZM M51479	171.7	178.1	-2.5	0.188
139	PMON79430	ZM M51481	185.4	178.1	5.2	0.006
139	PMON79430	ZM M51490	178.5	178.1	1.3	0.492
140	PMON79731	ZM M52239	187.5	178.1	6.5	0.001
140	PMON79731	ZM M52245	172.2	178.1	-2.2	0.230
140	PMON79731	ZM M52252	174.6	178.1	-0.9	0.638
140	PMON79731	ZM M52255	172.4	178.1	-2.1	0.248
140	PMON79731	ZM M52375	173.3	178.1	-1.6	0.396
140	PMON79731	ZM M62802	173.6	178.1	-1.6	0.447
140	PMON79731	ZM M52812	166.6	178.1	-5.4	0.004
141	PMON78229	ZM M65981	176.0	178.1	-0.1	0.963
141	PMON78229	ZM M65982	182.3	178.1	3.5	0.065
141	PMON78229	ZM M65984	175.1	178.1	-0.6	0.743
141	PMON78229	ZM M66184	187.2	178.1	6.3	0.001
141	PMON78229	ZM M66185	181.8	178.1	3.2	0.083
141	PMON78229	ZM M69082	176.1	178.1	0.0	0.984

[1327] 表 15 续

[1328]

SEQ ID NO	构建体	事件	转基因 平均值	对照 平均值	百分比 差异	P值
116	PMON79697	ZM_M53938	171.6	176.1	-2.6	0.171
116	PMON79697	ZM_M53939	180.2	176.1	2.3	0.236
116	PMON79697	ZM_M54371	175.0	176.1	-0.6	0.733
116	PMON79697	ZM_M54372	185.1	176.1	5.1	0.009
116	PMON79697	ZM_M54374	181.2	176.1	2.8	0.127
144	PMON78240	ZM_M53484	184.1	176.1	4.5	0.015
144	PMON78240	ZM_M53485	175.2	176.1	-0.5	0.785
144	PMON78240	ZM_M53470	174.4	176.1	-1.0	0.811
144	PMON78240	ZM_M53471	166.7	176.1	-5.4	0.005
144	PMON78240	ZM_M53478	173.6	176.1	-1.4	0.456
144	PMON78240	ZM_M53673	175.8	176.1	-0.2	0.917
144	PMON78240	ZM_M53674	172.5	176.1	-2.1	0.269
144	PMON78240	ZM_M53684	179.4	176.1	1.8	0.342
122	PMON80500	ZM_M56549	173.4	176.1	-1.6	0.408
122	PMON80500	ZM_M56560	173.4	176.1	-1.6	0.394
122	PMON80500	ZM_M56565	175.4	176.1	-0.4	0.811
122	PMON80500	ZM_M56567	177.9	176.1	1.0	0.599
122	PMON80500	ZM_M56568	185.9	176.1	5.6	0.003
122	PMON80500	ZM_M58003	169.4	176.1	-3.8	0.047
145	PMON80283	ZM_M58140	174.6	176.1	-0.9	0.641
145	PMON80283	ZM_M58141	179.7	176.1	2.0	0.294
145	PMON80283	ZM_M58143	183.8	176.1	4.4	0.024
146	PMON80866	ZM_M58256	177.6	176.1	0.8	0.651
146	PMON80866	ZM_M59441	183.3	176.1	4.1	0.028
146	PMON80866	ZM_M60646	174.8	176.1	-0.7	0.692
147	PMON80292	ZM_M57487	180.8	176.1	2.6	0.159
147	PMON80292	ZM_M58571	184.2	176.1	4.6	0.021
147	PMON80292	ZM_M58578	177.5	176.1	0.8	0.717
142	PMON79696	ZM_M53849	177.6	179.1	-1.2	0.431
142	PMON79696	ZM_M53849	190.3	179.1	5.8	0.0003
142	PMON79696	ZM_M53849	178.5	179.1	-0.7	0.0635
150	PMON81857	ZM_M67504	178.8	176.1	1.5	0.415
150	PMON81857	ZM_M70000	182.7	176.1	3.7	0.047
150	PMON81857	ZM_M71064	172.1	176.1	-2.3	0.229
150	PMON81857	ZM_M71065	184.6	176.1	4.8	0.011
150	PMON81857	ZM_M72550	174.3	176.1	-1.0	0.589
149	PMON83553	ZM_M71131	150.7	176.1	-14.5	0.000
149	PMON83553	ZM_M71140	187.4	176.1	6.4	0.001
149	PMON83553	ZM_M71156	150.3	176.1	-14.7	0.000
149	PMON83553	ZM_M71161	172.7	176.1	-1.9	0.298
150	PMON81857	ZM_M67504	178.8	176.1	1.5	0.415
150	PMON81857	ZM_M70000	182.7	176.1	3.7	0.047
150	PMON81857	ZM_M71064	172.1	176.1	-2.3	0.229
150	PMON81857	ZM_M71065	184.6	176.1	4.8	0.011
150	PMON81857	ZM_M72550	174.3	176.1	-1.0	0.589
151	PMON82212	ZM_M67581	171.1	176.1	-2.8	0.126
151	PMON82212	ZM_M67583	186.1	176.1	5.6	0.002
151	PMON82212	ZM_M69111	173.2	176.1	-1.7	0.368

[1329] 表 15 续

[1330]

PEP SEQ ID NO	构建体	事件	转基因 平均值	对照 平均值	百分比 差异	P 值
108	PMON79709	ZM_M51983	184.3	176.1	4.7	0.037
108	PMON79709	ZM_M51985	180.1	176.1	2.3	0.231
108	PMON79709	ZM_M52052	185.6	176.1	5.3	0.013
108	PMON79709	ZM_M52710	175.5	176.1	-0.4	0.862
108	PMON79709	ZM_M6272	175.2	176.1	-0.6	0.765
129	PMON73787	ZM_M55089	162.6	176.1	-7.7	0.000
129	PMON73787	ZM_M61950	186.4	176.1	5.8	0.002
129	PMON73787	ZM_M61953	164.7	176.1	-6.5	0.001
129	PMON73787	ZM_M61958	165.9	176.1	-5.8	0.003
129	PMON73787	ZM_M61965	134.3	176.1	-23.8	0.000
129	PMON73787	ZM_M61966	172.6	176.1	-2.0	0.280
135	PMON78942	ZM_M66312	176.2	176.1	0.0	0.997
135	PMON78942	ZM_M66316	173.1	176.1	-1.7	0.362
135	PMON78942	ZM_M66318	164.1	176.1	-6.9	0.000
135	PMON78942	ZM_M66331	183.3	176.1	4.1	0.029

[1331] C. 对于增强的水利用效率 (WUE) 的选择

[1332] 在这个实施例中描述的是用于温室选择转基因玉米植物与野生型玉米植物（作为近交系或杂合体测试）的水利用效率的高通量方法。这个选择方法在最初 11 天无应激生长时间段后，经过总共 15 天的时间段对植物施加 3 次干旱 / 再浇水循环。每次循环由 5 天组成，在最初的 4 天不应用水并且在循环的第 5 天应用水淬火。如在植物干旱处理过程中通过高度和生物量测定的，通过选择方法分析的最初表现型是植物生长速率的改变。还测量了干旱后枝条组织的水合状态。在 3 个时间点上测量植物高度。第一次紧在植物为 11 天龄时干旱开始前进行，这是枝条初始高度 (SIH)。还在种植后第 18 天贯穿干旱 / 再浇水方案中途测量植物高度，以产生枝条干旱中期高度 (SMH)。在种植后第 26 天最终干旱循环完成后，收获植物的枝条部分并测量最终高度，这是枝条枯萎高度 (SWH) 并且还测量了枝条枯萎生物量 (SWM)。将枝条在 40°C 在黑暗中置于水中。3 天后，将枝条称重以产生枝条膨胀重量 (STM)。在烘箱中干燥 4 天后，将枝条称重得到枝条干生物量 (SDM)。枝条平均高度 (SAH) 是经过 3 次高度测量的平均植物高度。已知情形时，上文描述的程序对于每个步骤可以调整 ± 1 天。

[1333] 为了校正植物间的轻微差异，由 SIH 和 SWH 获得大小校正的生长值。这是相对生长速率 (RGR)。对于每个枝条使用式 $[RGR\% = (SWH - SIH) / ((SWH + SIH) / 2) * 100]$ 计算相对生长速率 (RGR)。相对含水量 (RWC) 是植物在收获时有多少水 (%) 的测量结果。对于每个枝条使用式 $[RWC\% = (SWM - SDM) / (STM - SDM) * 100]$ 计算含水量 (RWC)。这个年龄的充分浇水的玉米植物为约 98% RWC。

[1334] 通过根据上述标准方法的选择方法选择本发明提供的转基因植物，并且这些转基因植物的性能显示于下表 16 中。

[1335] 表 16

[1336]

PEP SEQ ID NO	构建体	N事件	Perc, SAH	P值, SAH	Perc, RGR	P值, RGR	Perc, SDM	P值, SDM	Perc, RWC	P值, RWC
88	PMON68399	18	-2.9129	0	4.6104	0	-1.2282	0.0534	2.0799	0
87	PMON72494	2	-2.6854	0	3.3347	0.0034	-3.178	0.0258	2.8177	0.0001
	PMON72494	2	-1.4189	0	4.5389	0	1.0503	0.2808	1.8075	0.0272
	PMON72494	6	-2.8912	0	5.0217	0	-3.0056	0.0032	3.0684	0
	PMON72494	1	-3.2736	0	1.4026	0.2741	0.0968	0.9545	-2.3654	0.0194
97	PMON76342	1	-3.6096	0.0003	8.9657	0	-2.9332	0.2317	2.1037	0.1252
	PMON76342	2	-0.9997	0.0384	4.9006	0	-1.7424	0.1472	-0.8155	0.2552
117	PMON78237	4	-2.0513	0	2.1335	0.0011	3.2477	0.0002	0.5998	0.2456
104	PMON78936	2	0.2781	0.3727	1.3631	0.0165	2.1849	0.023	1.4237	0.0744
	PMON78936	4	-2.3342	0	6.1784	0	-2.5964	0.0336	2.5358	0.0003
103	PMON78949	4	-1.6398	0	4.5323	0	2.2077	0.0112	0.9068	0.08
109	PMON79422	4	-2.0016	0	2.8698	0	-1.3511	0.0488	1.8883	0.0009
116	PMON79697	2	-1.0829	0.1252	2.9806	0.0225	-0.0495	0.9771	0.0115	0.9907
	PMON79697	3	-1.5704	0	2.1663	0	-0.4949	0.5582	1.7787	0.0073
120	PMON80452	1	-1.7626	0.0032	2.1476	0.2778	2.1702	0.3832	-1.914	0.1164
	PMON80452	8	-0.2756	0.0645	-1.0206	0.0002	0.4707	0.3101	-0.072	0.8521
	PMON80452	11	-0.7077	0.0258	2.1403	0.0003	1.4477	0.0623	-0.0405	0.9267
115	PMON80489	6	-0.895	0.0001	3.7262	0	-1.5941	0.0442	1.4212	0.0038
102	PMON80542	8	-2.5925	0	1.1234	0.0254	2.1829	0.0013	3.2415	0
	PMON80542	1	-5.5931	0	2.5902	0.0486	-2.1444	0.2158	9.5238	0

[1337] 在 Satanta, IL 和 Dixon CA 使用中等干旱条件在田间测试用 pMON67754 转化的转基因植物, 所述 pMON67754 包括如 SEQ ID NO :3 中列出的重组 DNA。与对照植物比较, 在中等干旱应激下叶上的 SPAD 读数显示转基因植物中的叶绿素水平显著增加。2 个事件显示叶绿素水平的 SPAD 读数显著增加, 从而表明干旱耐受性的改善。在重复的田间试验中, 6 个测试的事件中的 2 个事件 (ZM_M16396 和 ZM_M16401) 显示 2 个不同位置中显著 ($p < 0.1$) 改善的叶 SPAD 读数, 从而表明干旱耐受性的改善。

[1338] D. 在冷应激下生长的选择

[1339] (1) 冷发芽测定 - 对于本测定使用 3 组种子。第一组由阳性转基因事件 (F1 杂交) 组成, 其中本发明的基因在种子中表达。第二个种子组是非转基因的、野生型阴性对照, 由与转基因事件相同的基因型制备而成。第三组由 2 个耐寒性和 1 个冷敏感性玉米商业对照系组成。所有种子都用杀真菌剂“克菌丹” (MAESTRO[®] 80DF Fungicide, Arvesta Corporation, San Francisco, CA, USA) 处理。通过将其充分混合并在实验前干燥杀真菌剂, 对每 45g 玉米种子应用 0.43mL 克菌丹。

[1340] 玉米谷粒胚侧向下置于发芽盘 (54x36cm) 的个别单元 (8.9x8.9cm) 中的吸墨纸上。来自一个事件的 10 粒种子置于发芽盘的一个单元中。每个盘可以容纳 21 个转基因事件和 3 份重复的野生型 (LH244SDms+LH59), 这在完全区组设计中随机化。对于每个事件, 有 5 次重复 (5 个盘)。将盘置于 Convrion 生长室 (Convion ModelPGV36, Controlled Environments, Winnipeg, 加拿大) 内在 9.7°C 下 24 天 (无光)。将 250 毫升去离子水加入每个发芽盘。发芽计数在实验开始日后的第 10 天、第 11 天、第 12 天、第 13 天、第 14 天、第 17 天、第 19 天、第 21 天和第 24 天进行。如果出现的胚根大小为 1cm, 那么种子视为发芽的。从发芽计数计算发芽指数。

[1341] 发芽指数根据下式计算:

[1342] 发芽指数 = ($\sum ([T+1-n_i] * [P_i - P_{i-1}])$) / T

[1343] 其中 T 为其中进行发芽测定的总天数。n 定义种植后的天数。“i”表明已计数发芽的次数,包括当天。P 是在任何给定等级中发芽种子的百分比。计算转基因事件和野生型对照之间的统计学差异。统计学分析后,显示相对于野生型对照统计学显著性为 p 水平小于 0.1 的事件将进行第二次冷选择。第二次冷筛选以第一次选择相同的方式进行,只将重复数目增至 10。进行来自第二次选择数据的统计学分析以鉴别显示相对于野生型对照统计学显著性为 p 水平小于 0.05 的事件。

[1344] 表 17

[1345]

	构建体ID	事件ID	发芽指数			
PEP SEQ ID			百分比 改变	平均值	对照 平均值	P值
85	PMON69456	ZM M15392	-27	23.4	32.07	0.0718
	PMON69456	ZM M15392	12	47.88	42.93	9.00E-04
	PMON69456	ZM M15392	13	48	42.44	0.0756
	PMON69456	ZM M17042	-9	29.2	32.07	0.4
	PMON69456	ZM M17042	17	49.5	42.44	0.0248
	PMON69456	ZM M17042	16	49.89	42.93	0
	PMON69456	ZM M17042	-6	28.14	30.07	0.6526
	PMON69456	ZM M17044	-38	19.25	30.88	0.019
	PMON69456	ZM M17044	9	46.17	42.44	0.2317
	PMON69456	ZM M17044	7	46.88	43.86	0.0297
107	PMON75533	ZM M17044	14	34.14	30.07	0.3445
	PMON75533	ZM M47453	3	46.88	45.38	0.3782
	PMON75533	ZM M47453	25	49.75	39.69	0.002
	PMON75533	ZM M47460	23	48.83	39.69	0.0047
	PMON75533	ZM M47460	3	46.88	45.38	0.3782
	PMON75533	ZM M49275	14	45.08	39.69	0.0914
	PMON75533	ZM M49275	11	50.46	45.38	0.0031
	PMON75533	ZM M49278	15	45.83	39.69	0.055
119	PMON75533	ZM M49278	14	51.75	45.38	2.00E-04
	PMON78235	ZM M53641	16	48.25	41.72	4.00E-04
	PMON78235	ZM M53641	23	45	36.5	0.0508
	PMON78235	ZM M53641	1	48.42	48.08	0.9116
	PMON78235	ZM M53641	5	42.17	40.24	0.5629
	PMON78235	ZM M53994	26	48	36.5	0.0294
	PMON78235	ZM M53994	15	47.92	41.72	7.00E-04
	PMON78235	ZM M53994	1	48.67	48.08	0.8459
	PMON78235	ZM M53994	-4	38.58	40.24	0.6196
	PMON78235	ZM M53997	16	48.21	41.72	4.00E-04
104	PMON78235	ZM M53997	15	42	36.5	0.2036
	PMON78936	ZM M45248	25	48.25	38.69	0.0221
	PMON78936	ZM M45248	14	48.29	42.21	0.0013
	PMON78936	ZM M45274	15	48.33	42.21	0.0012
	PMON78936	ZM M45274	24	48.08	38.69	0.0245
	PMON78936	ZM M45275	5	40.5	38.69	0.6613
	PMON78936	ZM M46485	11	42.92	38.69	0.3066
	PMON78936	ZM M46516	-1	38.33	38.69	0.9301
	PMON78936	ZM M46516	-4	40.38	42.21	0.3274
110	PMON78936	ZM M47276	11	43.08	38.69	0.288
	PMON79425	ZM M50823	4	42.79	41.31	0.3848
	PMON79425	ZM M50823	18	42.83	36.25	0.0378
	PMON79425	ZM M50856	4	42.88	41.31	0.3589
	PMON79425	ZM M50856	13	40.83	36.25	0.1462
	PMON79425	ZM M51300	7	44.25	41.31	0.087
	PMON79425	ZM M51300	-3	35.16	36.25	0.7282
	PMON79425	ZM M51302	23	44.54	36.25	0.0093
	PMON79425	ZM M51302	17	48.17	41.31	1.00E-04
	PMON79425	ZM M51313	12	46.33	41.31	0.004
	PMON79425	ZM M51313	23	44.7	36.25	0.008
	PMON79425	ZM M51608	24	45.08	36.25	0.0057
	PMON79425	ZM M51608	11	45.88	41.31	0.0086
	PMON79425	ZM M51623	21	43.7	36.25	0.0189

[1346]

	PMON79425	ZM M51623	14	47.21	41.31	8.00E-04
	PMON79425	ZM M52067	-5	39.13	41.31	0.2033
	PMON79425	ZM M52067	8	39.08	36.25	0.368
116	PMON79697	ZM M53938	7	47.04	43.93	0.0587
	PMON79697	ZM M53938	5	42	40.17	0.6198
	PMON79697	ZM M53939	18	47.25	40.17	0.0575
	PMON79697	ZM M53939	11	48.58	43.93	0.0049
	PMON79697	ZM M54371	11	48.88	43.93	0.0028
	PMON79697	ZM M54371	15	46.25	40.17	0.1019
	PMON79697	ZM M54372	1	40.75	40.17	0.8745
	PMON79697	ZM M54374	12	49.21	43.93	0.0022
	PMON79697	ZM M54374	18	47.25	40.17	0.0575
	PMON79718	ZM M50838	6	45.25	42.78	0.331
	PMON79718	ZM M51591	-3	42.67	43.93	0.4409
	PMON79718	ZM M51591	-18	35.08	42.78	0.0031
111	PMON79718	ZM M51592	-3	41.42	42.78	0.5919
	PMON79718	ZM M51594	6	46.46	43.93	0.1241
	PMON79718	ZM M51594	13	48.15	42.78	0.0545
	PMON79718	ZM M51598	11	48.96	43.93	0.0024
	PMON79718	ZM M51598	11	47.58	42.78	0.0606
	PMON79718	ZM M51815	6	46.46	43.93	0.1241
	PMON79718	ZM M51815	11	47.33	42.78	0.075
	PMON79718	ZM M51818	2	43.5	42.78	0.7769
	PMON79718	ZM M52797	-6	40.17	42.78	0.3047
	PMON79718	ZM M52937	16	49.67	42.78	0.0077
	PMON79718	ZM M52937	12	49.04	43.93	0.0021
96	PMON80270	ZM M55967	10.19	50.63	45.94	6.00E-04
	PMON80270	ZM M55968	7.38	49.33	45.94	0.0129
	PMON80270	ZM M55969	3.27	47.44	45.94	0.2678
	PMON80270	ZM M55970	10.56	50.79	45.94	4.00E-04
	PMON80270	ZM M55971	7.38	49.33	45.94	0.0129
	PMON80270	ZM M55972	2.66	47.17	45.94	0.3663
	PMON80270	ZM M56524	3.81	47.7	45.94	0.1952
	PMON80270	ZM M56526	-7.6	42.46	45.94	0.0105
	PMON80270	ZM M56527	-19.87	36.82	45.94	0
120	PMON80452	ZM M53452	13	41.83	37.08	0.1902
	PMON80452	ZM M53452	19	49.63	41.56	0
	PMON80452	ZM M53452	7	51.42	48.08	0.2683
	PMON80452	ZM M53452	0	40.25	40.24	0.9971
	PMON80452	ZM M53455	-3	36	37.08	0.7642
	PMON80452	ZM M53455	17	48.67	41.56	0
	PMON80452	ZM M53455	-9	43.67	48.08	0.1434
	PMON80452	ZM M53455	-1	39.92	40.24	0.9231
	PMON80452	ZM M53456	18	49.17	41.56	0
	PMON80452	ZM M53456	18	43.83	37.08	0.0639
	PMON80452	ZM M53469	14	47.54	41.56	1.00E-04
	PMON80452	ZM M53469	18	43.75	37.08	0.0672
	PMON80452	ZM M53694	14	42.42	37.08	0.1418
	PMON80452	ZM M53694	13	46.92	41.56	4.00E-04
	PMON80452	ZM M53695	21	50.08	41.56	0
	PMON80452	ZM M53695	22	45.25	37.08	0.0256
	PMON80452	ZM M53696	21	50.42	41.56	0
	PMON80452	ZM M53696	31	48.5	37.08	0.002
	PMON80452	ZM M54104	13	41.75	37.08	0.198
	PMON80452	ZM M54104	13	47.17	41.56	2.00E-04
	PMON80452	ZM M54106	8	39.92	37.08	0.4332

[1347]

118	PMON80452	ZM M54106	12	46.38	41.56	0.0015
	PMON80461	ZM M52932	17	48.67	41.56	0
	PMON80461	ZM M52932	32	48.17	36.5	0.0079
	PMON80461	ZM M52932	-8	43.25	46.86	0.1944
	PMON80461	ZM M52932	9	43.92	40.24	0.271
	PMON80461	ZM M53218	16	42.42	36.5	0.1717
	PMON80461	ZM M53218	7	44.58	41.56	0.0448
	PMON80461	ZM M53218	-6	44.08	46.86	0.3172
	PMON80461	ZM M53218	4	41.92	40.24	0.6145
	PMON80461	ZM M53235	22	50.71	41.56	0
	PMON80461	ZM M53235	24	45.25	36.5	0.0445
	PMON80461	ZM M53503	13	46.79	41.56	6.00E-04
	PMON80461	ZM M53503	28	46.83	36.5	0.0181
	PMON80461	ZM M53504	12	41	36.5	0.2975
	PMON80461	ZM M53504	14	47.5	41.56	1.00E-04
	PMON80461	ZM M53848	24	51.57	41.56	0
	PMON80461	ZM M53848	15	41.92	36.5	0.2104
	PMON80461	ZM M54282	22	50.75	41.56	0
	PMON80461	ZM M54282	29	47	36.5	0.0164
	PMON80461	ZM M54284	21	44.33	36.5	0.0714
	PMON80461	ZM M54284	22	50.71	41.56	0
	PMON80461	ZM M55266	7	50.22	46.86	0.2268
	PMON80461	ZM M55957	10	51.53	46.86	0.0945
	PMON80461	ZM M56233	9	51.18	46.86	0.1217
	PMON80461	ZM M56728	2	47.92	46.86	0.7033
122	PMON80500	ZM M56549	-0.52	45.71	45.94	0.8613
	PMON80500	ZM M56560	8.29	49.75	45.94	0.0053
	PMON80500	ZM M56565	2.2	46.96	45.94	0.4535
	PMON80500	ZM M56567	9.19	50.17	45.94	0.002
	PMON80500	ZM M56568	10.82	50.92	45.94	3.00E-04
	PMON80500	ZM M58003	4.2	47.88	45.94	0.1542

[1348] (2) 冷休克测定 - 对于冷休克测定的实验组织与上文冷发芽测定描述的相同,除了对于冷休克测定种子在盆栽培养基中生长外。

[1349] 所需数目的 2.5" 正方形塑料罐置于浅苗床 (flat) 上 ($n = 32, 4 \times 8$)。罐装满 Metro Mix 200 土壤较少的培养基,其包含 19 : 6 : 12 肥料 (6 磅 / 立方码) (Metro Mix, 罐和浅苗床从 Hummert International, Earth City, MO 获得)。种植种子后,将罐置于设定为 23°C,相对湿度 65%,12 小时日和夜光周期 (300uE/m²- 分钟) 的生长室中。种植的种子每隔一日通过地下灌溉浇水 20 分钟,并且对于生长中的玉米幼苗浅苗床每隔一天在生长室中旋转。

[1350] 在种植后第 10 天,转基因阳性和野生型阴性 (WT) 植物以交替的模式置于浅苗床中。在生长黑暗时间段期间的第 10 天通过使用 PAM-2000 手提式荧光计根据制造商的说明 (Walz, 德国) 测量植物的叶绿素荧光。叶绿素测量后,收集来自每个事件的叶样品以用于证实本发明基因的表达。对于表达分析,随机收获来自每次选择的 6 个 V1 叶尖。浅苗床移至设定为 5°C 的生长室。所有其他条件例如湿度、日 / 夜周期和光强度在生长室中保持不变。在移至冷温度后浅苗床每天进行地下灌溉。在第 4 天测量叶绿素荧光。在冷休克处理 6 天后将植物转移至正常生长条件并允许其在接下来的 3 天恢复。在这个恢复时间段期间,在第 1 天和第 3 天测量 V3 叶的长度。在恢复 2 天后,通过估计绿色 V2 叶的百分数视觉测定 V2 叶损害。

[1351] 在休克前和冷休克过程中 V3 叶生长、V2 叶坏死和荧光的统计学差异可以用于估计冷休克对玉米植物的损害。

[1352] (3) 早期幼苗生长测定 - 对于本实验使用 3 组种子。第一组由阳性转基因事件 (F1 杂交) 组成, 其中本发明的基因在种子中表达。第二个种子组是非转基因的、野生型阴性对照, 由与转基因事件相同的基因型制备而成。第三个种子组由 2 个耐寒性和 2 个冷敏感性玉米商业对照系组成。所有种子用杀真菌剂“克菌丹” (3a, 4, 7, a- 四氢 -2-[(三氯甲基) 硫代]-1H- 异吡唑 -1,3(2H)- 二酮, Drex Chemical Co. Memphis, TN) 处理。通过将其充分混合并在实验前干燥杀真菌剂, 对每 45g 玉米种子应用克菌丹 (0.43mL)。

[1353] 种子在发芽纸中生长以用于早期幼苗生长测定。对于测试中的每次入组使用 3 张 12" x 18" 发芽纸 (Anchor Paper#SD7606) (每个转基因事件重复 3 次)。纸在 0.5% KNO_3 和 0.1% Thyram 的溶液中湿润。

[1354] 对于每张纸, 在沿着纸长度均匀隔开的线上放置 15 粒种子。将 15 粒种子定位在纸上, 从而使得胚根 (radical) 将向下生长, 例如与纸的边缘更长的距离。湿纸从短末端之一开始卷起来。纸均匀且足够紧地卷起以使种子维持在一定位置。纸卷用 2 个大纸夹固定在一定位置, 一个纸夹在顶端并且一个在底部。在适当容器中的随机化的完全区组设计中纸卷在生长室于 23°C 温育 3 天。室设定为 65% 的湿度, 没有光周期。对于冷应激处理, 纸卷随后在生长室中于 12°C 温育 12 天。室设定为 65% 的湿度, 没有光周期。

[1355] 冷处理后, 将发芽纸打开并丢弃不发芽的种子。通过自动化成像程序测量每个种子的胚根和胚芽鞘的长度, 所述程序自动收集并处理图像。成像程序自动测量每一个单独幼苗的枝条长度、根长度和整个幼苗长度并随后计算每个纸卷的平均数。

[1356] 统计学分析后, 显示相对于野生型对照统计学显著性为 p 水平小于 0.1 的事件将进行第二次冷选择。第二次冷筛选以与第一次选择相同的方式进行, 只将重复数目增至 5。进行来自第二次选择数据的统计学分析以鉴别显示相对于野生型对照统计学显著性为 p 水平小于 0.05 的事件。

[1357]

表 18.

PEP SEQ ID	构建体ID	事件ID	根长度				枝条长度				幼苗长度			
			百分比 改变	平均值	对照 平均值	P值	百分比 改变	平均值	对照 平均值	P值	百分比 改变	平均值	对照 平均值	P值
88	PMON68399	ZM M31143	-4	9.5	9.85	0.5479	-1	7.94	8.04	0.7666	-3	17.45	17.9	0.6024
	PMON68399	ZM M31143	7	11.15	10.41	0.1158	8	9.42	8.69	0.0536	8	20.57	19.1	0.0607
	PMON68399	ZM M31146	11	11.52	10.41	0.0186	0	8.67	8.69	0.9668	6	20.2	19.1	0.1593
	PMON68399	ZM M31146	14	9.9	8.66	0.011	6	7.37	6.99	0.2969	10	17.27	15.65	0.0396
	PMON68399	ZM M31147	13	11.75	10.41	0.0051	12	9.69	8.69	0.0088	12	21.43	19.1	0.0034
	PMON68399	ZM M31147	14	11.25	9.85	0.0185	4	8.33	8.04	0.3961	9	19.58	17.9	0.0513
	PMON68399	ZM M31152	-20	8.4	10.45	2.00E-04	-7	7.44	7.96	0.3265	-14	15.84	18.41	0.0087
	PMON68399	ZM M31152	1	10.48	10.41	0.8793	6	9.17	8.69	0.1965	3	19.66	19.1	0.4697
	PMON68399	ZM M31524	15	12.01	10.41	9.00E-04	10	9.54	8.69	0.0242	13	21.55	19.1	0.0021
	PMON68399	ZM M31524	12	11.08	9.85	0.0385	8	8.69	8.04	0.0569	11	19.77	17.9	0.0306
	PMON68399	ZM M32356	12	10.99	9.85	0.0533	-1	7.99	8.04	0.8731	6	18.98	17.9	0.2052
	PMON68399	ZM M32356	12	11.7	10.41	0.0068	7	9.32	8.69	0.096	10	21.01	19.1	0.0153
	PMON68399	ZM M34171	-24	8.6	11.39	4.00E-04	-13	7.35	8.48	0.0331	-20	15.95	19.87	0.0016
	PMON68399	ZM M34171	13	11.72	10.41	0.006	6	9.23	8.69	0.1486	10	20.95	19.1	0.0187
	PMON68399	ZM M38646	10	12.63	11.52	0.032	3	10.38	10.05	0.4864	7	23.01	21.57	0.106
	PMON68399	ZM M38660	10	12.68	11.52	0.0249	3	10.37	10.05	0.4953	7	23.06	21.57	0.0947
	PMON68399	ZM M38681	6	12.2	11.52	0.1829	3	10.31	10.05	0.5738	4	22.52	21.57	0.2835
	PMON68399	ZM M38697	7	12.35	11.52	0.1053	0	10.03	10.05	0.9751	4	22.38	21.57	0.3563
	PMON68399	ZM M39295	11	12.84	11.52	0.0115	11	11.12	10.05	0.0264	11	23.97	21.57	0.0084
	PMON68399	ZM M39297	20	13.84	11.52	0	7	10.79	10.05	0.1203	14	24.63	21.57	0.001
87	PMON68399	ZM M39298	7	12.29	11.52	0.1342	-1	9.91	10.05	0.7669	3	22.19	21.57	0.4785
	PMON68399	ZM M39299	6	12.17	11.52	0.2051	1	10.13	10.05	0.8674	3	22.29	21.57	0.4118
	PMON68399	ZM M39302	-44	6.44	11.52	0	-31	6.98	10.05	0	-38	13.42	21.57	0
	PMON72494	ZM M26428	22	17.55	14.42	0	4	12.4	11.87	0.21	14	29.95	26.29	1.00E-04
	PMON72494	ZM M26428	46	15.57	10.67	0	12	11.3	10.11	0.0033	29	26.86	20.78	0
	PMON72494	ZM M26428	23	14.1	11.43	0	13	9	7.98	0.0704	19	23.1	19.4	8.00E-04
	PMON72494	ZM M26428	-6	10.7	11.43	0.2402	9	8.71	7.98	0.1938	0	19.41	19.4	0.9925
	PMON72494	ZM M26428	3	11.02	10.67	0.5208	9	11.07	10.11	0.0163	6	22.09	20.78	0.1209
	PMON72494	ZM M49327	8	12.13	11.23	0.2163	5	10.44	9.93	0.271	7	22.57	21.16	0.2103
	PMON72494	ZM M49327	17	11.22	9.61	0.0189	4	8.28	7.93	0.5332	11	19.51	17.53	0.0853
	PMON72494	ZM M49327	22	14.04	11.54	4.00E-04	21	9.73	8.06	0.0039	21	23.77	19.59	1.00E-04

[1358]

	PMON72494	ZM M49328	4	11.7	11.23	0.5112	11	11.03	9.93	0.0196	7	22.74	21.16	0.1618
	PMON72494	ZM M49328	28	12.31	9.61	1.00E-04	17	9.27	7.93	0.0206	23	21.58	17.53	6.00E-04
	PMON72494	ZM M49328	27	14.61	11.54	0	37	11.07	8.06	0	31	25.68	19.59	0
	PMON72494	ZM M60546	-2	12.67	12.95	0.7032	6	9.48	8.95	0.4795	1	22.15	21.91	0.8478
89	PMON73765	ZM M35084	10	10.56	9.61	0.1621	-2	7.8	7.93	0.8286	5	18.36	17.53	0.4667
	PMON73765	ZM M35084	30	14.51	11.2	1.00E-04	27	9.25	7.27	0.0015	29	23.76	18.46	0
	PMON73765	ZM M54013	42	13.61	9.61	0	13	8.96	7.93	0.0717	29	22.57	17.53	0
	PMON73765	ZM M54013	32	14.78	11.2	0	49	10.82	7.27	0	39	25.6	18.46	0
	PMON73765	ZM M54016	33	12.82	9.61	0	7	8.51	7.93	0.3051	22	21.33	17.53	0.0013
	PMON73765	ZM M54016	34	14.98	11.2	0	39	10.09	7.27	0	36	25.07	18.46	0
	PMON73816	ZM M37183	21	12.1	9.96	0.0378	14	10.65	9.35	0.0587	18	22.75	19.31	0.0348
	PMON73816	ZM M37183	33	11.5	8.66	0	21	9.82	8.09	0	27	21.32	16.75	0
91	PMON73816	ZM M37188	18	11.78	9.96	0.076	21	11.3	9.35	0.0051	20	23.08	19.31	0.021
	PMON73816	ZM M37188	24	10.71	8.66	0	16	9.41	8.09	3.00E-04	20	20.11	16.75	0
	PMON73816	ZM M37197	30	12.93	9.96	0.0044	6	9.88	9.35	0.4306	18	22.82	19.31	0.0313
	PMON73816	ZM M37197	30	11.26	8.66	0	13	9.11	8.09	0.0047	22	20.37	16.75	0
	PMON73829	ZM M37805	29	9.46	7.32	1.00E-04	13	6.58	5.8	0.0171	22	16.04	13.12	1.00E-04
	PMON73829	ZM M37805	18	11.78	9.96	0.076	15	10.74	9.35	0.0436	17	22.52	19.31	0.0484
	PMON73829	ZM M37815	30	12.92	9.96	0.0046	13	10.57	9.35	0.0756	22	23.49	19.31	0.0109
	PMON73829	ZM M37815	11	8.14	7.32	0.1117	13	6.54	5.8	0.0225	12	14.68	13.12	0.0241
90	PMON73829	ZM M38768	13	11.26	9.96	0.201	-1	9.25	9.35	0.8842	6	20.51	19.31	0.4543
	PMON73829	ZM M38768	-2	7.2	7.32	0.8084	2	5.93	5.8	0.6854	0	13.13	13.12	0.9914
	PMON73829	ZM M38797	-39	4.49	7.32	0	-19	4.68	5.8	8.00E-04	-30	9.16	13.12	0
	PMON73829	ZM M38797	-11	8.83	9.96	0.2685	0	9.36	9.35	0.9827	-6	18.2	19.31	0.4895
	PMON73829	ZM M38798	-62	3.75	9.96	0	-35	6.07	9.35	0	-49	9.82	19.31	0
	PMON73829	ZM M38798	-50	3.67	7.32	0	-41	3.41	5.8	0	-46	7.08	13.12	0
	PMON73829	ZM M39692	3	7.54	7.32	0.6671	-3	5.62	5.8	0.5857	0	13.16	13.12	0.9475
	PMON73829	ZM M39692	17	11.69	9.96	0.0919	3	9.59	9.35	0.7181	10	21.28	19.31	0.2211
92	PMON75305	ZM M35696	26	14.78	11.77	0	18	11.74	9.97	3.00E-04	22	26.52	21.74	0
	PMON75305	ZM M35696	33	11.51	8.66	0	15	9.33	8.09	7.00E-04	24	20.84	16.75	0
	PMON75305	ZM M36703	27	14.94	11.77	0	13	11.25	9.97	0.007	20	26.19	21.74	0
	PMON75305	ZM M36703	40	12.15	8.66	0	22	9.84	8.09	0	31	21.99	16.75	0
	PMON75305	ZM M36711	26	14.88	11.77	0	9	10.91	9.97	0.0455	19	25.78	21.74	2.00E-04
	PMON75305	ZM M36711	35	11.68	8.66	0	16	9.38	8.09	4.00E-04	26	21.06	16.75	0
	PMON75306	ZM M35601	29	11.19	8.66	0	33	10.76	8.09	0	31	21.94	16.75	0
	PMON75306	ZM M35601	11	13.05	11.77	0.0507	12	11.2	9.97	0.0097	11	24.24	21.74	0.0159
93	PMON75306	ZM M35604	24	14.64	11.77	0	16	11.57	9.97	9.00E-04	21	26.21	21.74	0
	PMON75306	ZM M35604	42	12.29	8.66	0	35	10.92	8.09	0	39	23.21	16.75	0

[1359]

	PMON75306	ZM M35605	47	12.72	8.66	0	30	10.49	8.09	0	39	23.2	16.75	0
	PMON75306	ZM M35605	18	13.92	11.77	0.0013	22	12.12	9.97	0	20	26.04	21.74	1.00E-04
	PMON75309	ZM M35865	21	10.45	8.66	0	3	8.3	8.09	0.5545	12	18.75	16.75	0.0017
	PMON75309	ZM M35865	22	11.75	9.66	0.0038	17	10.68	9.1	0.0064	20	22.43	18.76	0.0031
	PMON75309	ZM M35878	23	10.6	8.66	0	26	10.17	8.09	0	24	20.78	16.75	0
94	PMON75309	ZM M35878	18	11.38	9.66	0.0163	13	10.3	9.1	0.0362	16	21.68	18.76	0.017
	PMON75309	ZM M36160	19	11.51	9.66	0.0099	19	10.79	9.1	0.0037	19	22.31	18.76	0.0041
	PMON75309	ZM M36160	32	11.41	8.66	0	19	9.6	8.09	0	25	21.01	16.75	0
	PMON75312	ZM M35649	22	14.37	11.77	1.00E-04	12	11.18	9.97	0.0107	18	25.55	21.74	3.00E-04
	PMON75312	ZM M35649	28	11.06	8.66	0	13	9.15	8.09	0.0034	21	20.21	16.75	0
95	PMON75312	ZM M37099	9	9.46	8.66	0.0458	13	9.11	8.09	0.0049	11	18.57	16.75	0.0042
	PMON75312	ZM M37099	23	14.42	11.77	1.00E-04	10	10.97	9.97	0.0343	17	25.39	21.74	6.00E-04
	PMON75312	ZM M37100	37	11.9	8.66	0	22	9.83	8.09	0	30	21.73	16.75	0
	PMON75312	ZM M37100	9	12.85	11.77	0.0979	5	10.45	9.97	0.3064	7	23.29	21.74	0.1298
	PMON75515	ZM M43539	26	12.88	10.19	0	13	10.12	8.98	0.0097	20	23	19.17	0
101	PMON75515	ZM M43546	-3	9.87	10.19	0.5762	-5	8.55	8.98	0.3141	-4	18.43	19.17	0.3786
	PMON75515	ZM M50136	16	10.41	8.98	0.0441	14	7.42	6.51	0.2064	15	17.84	15.48	0.085
	PMON75515	ZM M50136	24	13.2	10.68	0.0015	25	9.27	7.42	0.0053	24	22.47	18.1	4.00E-04
	PMON75515	ZM M50142	25	11.25	8.98	0.0018	17	7.61	6.51	0.1294	22	18.87	15.48	0.0145
	PMON75515	ZM M50142	31	13.94	10.68	1.00E-04	35	10	7.42	1.00E-04	32	23.94	18.1	0
	PMON75524	ZM M47998	17	11.23	9.61	0.0452	35	9.69	7.17	0.0012	25	20.91	16.79	0.0043
	PMON75524	ZM M47998	15	13.3	11.54	0.0101	38	11.15	8.06	0	25	24.45	19.59	0
	PMON75524	ZM M48003	4	9.99	9.61	0.6366	9	7.78	7.17	0.4187	6	17.77	16.79	0.4837
	PMON75524	ZM M48003	28	14.77	11.54	0	15	9.22	8.06	0.0414	22	24	19.59	1.00E-04
	PMON75524	ZM M48004	19	11.44	9.61	0.0245	29	9.24	7.17	0.007	23	20.68	16.79	0.0069
	PMON75524	ZM M48004	5	12.11	11.54	0.3919	1	8.17	8.06	0.8374	4	20.28	19.59	0.5062
	PMON75524	ZM M48005	18	11.37	9.61	0.0303	19	8.57	7.17	0.0654	19	19.93	16.79	0.0276
	PMON75524	ZM M48005	33	15.38	11.54	0	29	10.4	8.06	1.00E-04	32	25.78	19.59	0
	PMON75524	ZM M48007	20	11.51	9.61	0.0195	7	7.66	7.17	0.5152	14	19.17	16.79	0.0927
	PMON75524	ZM M48007	28	14.78	11.54	0	46	11.78	8.06	0	36	26.55	19.59	0
	PMON75524	ZM M48010	22	11.77	9.61	0.0083	12	8.05	7.17	0.2443	18	19.81	16.79	0.0339
	PMON75524	ZM M48010	18	13.62	11.54	0.0026	25	10.08	8.06	6.00E-04	21	23.7	19.59	2.00E-04
107	PMON75533	ZM M47453	55	14.93	9.61	0	54	11.03	7.17	0	55	25.96	16.79	0
	PMON75533	ZM M47453	39	14.99	10.8	0	44	10.24	7.12	0	41	25.23	17.92	0
	PMON75533	ZM M47460	15	11.03	9.61	0.0782	5	7.53	7.17	0.63	11	18.56	16.79	0.208
	PMON75533	ZM M47460	36	14.65	10.8	0	21	8.6	7.12	0.0037	30	23.25	17.92	0
	PMON75533	ZM M49275	23	11.82	9.61	0.0069	20	8.58	7.17	0.0636	22	20.4	16.79	0.0119
	PMON75533	ZM M49275	30	14.09	10.8	0	21	8.65	7.12	0.0028	27	22.74	17.92	0

[1360]

	PMON75533	ZM M49278	14	10.96	9.61	0.093	7	7.68	7.17	0.4982	11	18.64	16.79	0.1885
	PMON75533	ZM M49278	18	12.79	10.8	0.0014	13	8.01	7.12	0.0757	16	20.8	17.92	0.0023
	PMON75980	ZM M53387	17	13.08	11.23	0.0122	11	10.99	9.93	0.0247	14	24.08	21.16	0.0109
	PMON75980	ZM M53389	13	12.69	11.23	0.0463	9	10.85	9.93	0.0503	11	23.54	21.16	0.0363
	PMON75980	ZM M53390	5	11.8	11.23	0.4269	4	10.33	9.93	0.3908	5	22.13	21.16	0.3859
114	PMON75980	ZM M53392	20	13.42	11.23	0.0033	13	11.19	9.93	0.0079	16	24.62	21.16	0.0028
	PMON75980	ZM M53396	14	12.75	11.23	0.0383	4	10.38	9.93	0.338	9	23.12	21.16	0.0831
	PMON75980	ZM M53397	6	11.92	11.23	0.3398	-4	9.59	9.93	0.455	2	21.51	21.16	0.7576
	PMON75980	ZM M53398	4	11.66	11.23	0.5533	3	10.27	9.93	0.4659	4	21.93	21.16	0.4944
	PMON78232	ZM M55911	-3	12.1	12.44	0.652	12	9.85	8.82	0.1004	3	21.94	21.27	0.5616
	PMON78232	ZM M55911	-5	13.18	13.83	0.3591	2	9.43	9.27	0.8057	-2	22.61	23.09	0.6774
	PMON78232	ZM M56069	14	14.13	12.44	0.031	7	9.44	8.82	0.3213	11	23.56	21.27	0.0511
113	PMON78232	ZM M56069	11	15.39	13.83	0.0296	12	10.38	9.27	0.0932	12	25.77	23.09	0.0237
	PMON78232	ZM M56206	-14	10.75	12.44	0.0307	-9	8	8.82	0.1837	-12	18.75	21.27	0.0333
	PMON78232	ZM M56206	1	14.03	13.83	0.7776	5	9.73	9.27	0.4808	3	23.76	23.09	0.5663
	PMON78232	ZM M56428	12	13.9	12.44	0.0606	11	9.83	8.82	0.1065	12	23.73	21.27	0.0367
	PMON78232	ZM M56428	13	15.55	13.83	0.0164	18	10.91	9.27	0.0143	15	26.46	23.09	-0.0048
	PMON79163	ZM M45011	16	11.88	10.25	0.0215	7	8.54	8	0.4508	12	20.42	18.26	0.0941
106	PMON79163	ZM M45011	20	12.98	10.8	0.0017	23	8.74	7.12	0.0046	21	21.71	17.92	4.00E-04
	PMON79163	ZM M48217	16	11.89	10.25	0.0213	18	9.42	8	0.0487	17	21.3	18.26	0.0197
	PMON79163	ZM M48217	28	13.81	10.8	0	20	8.51	7.12	0.0062	24	22.32	17.92	0
	PMON79174	ZM M47171	13	11.58	10.25	0.0602	20	9.61	8	0.0259	16	21.18	18.26	0.0247
98	PMON79174	ZM M47171	28	13.84	10.8	0	24	8.82	7.12	0.001	26	22.65	17.92	0
	PMON79174	ZM M47941	18	12.09	10.25	0.0101	6	8.48	8	0.4971	13	20.57	18.26	0.0734
	PMON79174	ZM M47941	25	13.53	10.8	0	16	8.24	7.12	0.026	21	21.77	17.92	1.00E-04
	PMON79413	ZM M48525	44	13.83	9.61	0	30	9.34	7.17	0.0049	38	23.17	16.79	0
	PMON79413	ZM M48525	26	13.66	10.8	0	32	9.41	7.12	0	29	23.07	17.92	0
99	PMON79413	ZM M50333	25	12.05	9.61	0.0031	25	8.95	7.17	0.0197	25	21	16.79	0.0036
	PMON79413	ZM M50333	27	13.75	10.8	0	34	9.55	7.12	0	30	23.3	17.92	0
	PMON79413	ZM M53171	18	11.34	9.61	0.0331	27	9.13	7.17	0.0107	22	20.46	16.79	0.0106
	PMON79413	ZM M53171	21	13.04	10.8	3.00E-04	37	9.78	7.12	0	27	22.82	17.92	0
	PMON79447	ZM M53825	16	12.45	10.71	0.0079	17	9.12	7.83	0.0281	16	21.57	18.53	0.0077
	PMON79447	ZM M53825	30	14.57	11.2	1.00E-04	34	9.75	7.27	1.00E-04	32	24.32	18.46	0
112	PMON79447	ZM M53826	11	11.87	10.71	0.0705	0	7.84	7.83	0.9839	6	19.71	18.53	0.2903
	PMON79447	ZM M53826	34	15	11.2	0	42	10.31	7.27	0	37	25.32	18.46	0
	PMON79447	ZM M53835	6	11.31	10.71	0.342	-5	7.42	7.83	0.4779	1	18.73	18.53	0.8568
	PMON79447	ZM M53835	32	14.83	11.2	0	47	10.66	7.27	0	38	25.49	18.46	0

[1361] 4. 冷田间效力试验

[1362] 这个实施例阐述了冷田间效力试验以鉴别基因构建体,在常规耕种和模拟的无耕

种环境中在早春田间种植条件下所述构建体给予发芽时增强的冷活力和早期幼苗生长。在当地农民开始种植玉米前大约 2 周将种子种植到地里,从而使得对农作物施加显著的冷应激,命名为冷处理。种子还在当地最佳种植条件下种植,从而使得农作物只有很少或没有暴露于冷条件,命名为正常处理。冷田间效力试验在 5 个地点进行,包括 Glyndon MN、Mason MI、Monmouth IL、Dayton IA、Mystic CT。在每个地点,种子在冷和正常条件下种植,每个处理重复 3 次,每行 20 个谷粒,并且每地块单行。种子种植到土壤中 1.5-2 英寸深,以避免多泥条件。在每个地点安置 2 个温度监视器以每天监控空气和土壤温度。

[1363] 种子突出(emergence)定义为生长中的枝条刺破土壤表面时的时刻。从最早的地块开始突出那天开始每天计数每地块中突出的幼苗数目直至突出发生没有显著变化。此外,对于每个种植日期,还记录所有地块中突出为 0 时的最迟日期。还在玉米植物平均高度达到 10 英寸前的 V3-V4 阶段评价幼苗活力,其中 1 = 极佳的早期生长,5 = 平均生长和 9 = 生长差。使用 SAS 软件对于每个地点中或跨越所有地点的数据计算 50%突出的天数、最大百分比突出和幼苗活力。

[1364] 下列表列出了基于上文说明的方法收集并分析的数据。跨越所有地点分析的数据只包括来自 Glyndon MN、Mason MI 和 Mystic CT 的那些。

[1365]

表 19.

PEP SEQ ID 构建体	50%突出的天数										最大百分比									
	Across Black Dirt Trts		热 Trts		Mason_Trt 2		Glyndon_Trt 2		Mystic_Trt 2		Across Black Dirt Trts		热 Trts		Mason_Trt 2		Glyndon_Trt 2		Mystic_Trt 2	
	Δ	P值	Δ	P值	Δ	P值	Δ	P值	Δ	P值	Δ	P值	Δ	P值	Δ	P值	Δ	P值	Δ	P值
事件 1																				
ZM M31146	1.46	0.106	0.04	0.979	0.51	0.755	2.17	0.079	0.99	0.551	-2.7	0.428	1.42	0.501	0.19	0.97	-7.53	0.125	4.07	0.503
ZM M31147	1.29	0.153	0.34	0.81	0.59	0.721	1.47	0.234	1.64	0.322	-6.31	0.064	-5.8	0.033	-6.48	0.184	-9.75	0.047	0.74	0.903
ZM M31524	-0.41	0.649	0.23	0.873	-2.09	0.205	-0.13	0.919	0.69	0.676	-2.7	0.428	-1.91	0.481	5.19	0.288	-4.2	0.393	-7.59	0.212
ZM M32356	-0.21	0.814	0.33	0.815	-1.18	0.472	-1.59	0.197	3.52	0.034	3.55	0.297	-1.91	0.481	8.52	0.081	5.8	0.237	-5.93	0.33
构建体	0.53	0.302	0.24	0.772	-0.54	0.563	0.48	0.495	1.71	0.071	-2.04	0.293	-2.05	0.185	1.85	0.505	-3.92	0.161	-2.18	0.53
ZM M37805	0.95	0.293	-0.04	0.977	-0.4	0.808	2.28	0.065	-0.35	0.831	-4.18	0.22	5.83	0.032	1.67	0.733	-9.01	0.067	-0.37	0.951
ZM M37815	-1.24	0.169	0.06	0.965	-0.84	0.611	-1.4	0.258	-1.35	0.417	4.71	0.167	-3.62	0.183	8.33	0.088	2.1	0.669	6.3	0.301
ZM M38768	2.79	0.002	0.7	0.621	0.64	0.696	2.11	0.087	6.3	0	-6.27	0.066	-2.51	0.356	-1.67	0.733	-5.68	0.247	12.04	0.048
构建体	0.83	0.145	0.24	0.788	-0.2	0.849	1	0.2	1.53	0.144	-1.91	0.374	-0.1	0.954	2.78	0.368	-4.2	0.177	-2.04	0.596
ZM M35696	1.75	0.053	0.14	0.922	-1.93	0.24	4.17	0.001	0.61	0.715	-5.02	0.141	2.49	0.359	10	0.041	12.35	0.012	-5.37	0.377
ZM M36703	-0.47	0.603	0.4	0.777	-2.34	0.155	-0.83	0.502	2.12	0.202	0.4	0.906	-1.95	0.473	6.67	0.172	0.99	0.841	-7.04	0.248
ZM M36711	-0.92	0.31	0.32	0.823	-1.23	0.454	-1.5	0.223	0.57	0.731	3.6	0.291	1.38	0.611	1.67	0.733	6.54	0.183	-0.37	0.951
构建体	0.12	0.832	0.29	0.749	-1.84	0.078	0.61	0.432	1.1	0.295	-0.34	0.875	0.64	0.709	6.11	0.048	-1.6	0.605	-4.26	0.268
ZM M35601	-0.53	0.56	-0.36	0.803	-0.25	0.877	-0.22	0.861	-1.42	0.392	-2.52	0.46	3.6	0.185	1.67	0.733	-5.68	0.247	-0.37	0.951
ZM M35604	-0.92	0.309	0.45	0.752	0.1	0.951	-1.89	0.125	-0	1	3.04	0.372	-3.06	0.26	5	0.305	5.43	0.269	-3.7	0.543
ZM M35605	1.46	0.105	-0.08	0.958	-0.74	0.654	2.89	0.019	0.82	0.623	-3.49	0.306	-1.4	0.607	8.33	0.088	10.12	0.039	-2.04	0.738
构建体	0.01	0.992	0.01	0.994	-0.3	0.776	0.26	0.738	-0.2	0.847	-0.99	0.647	-0.28	0.869	5	0.105	-3.46	0.266	-2.04	0.596
ZM M35865	-0.31	0.735	-0.27	0.849	-2.91	0.078	0.25	0.84	1.18	0.475	-2.1	0.538	-3.06	0.315	1.67	0.733	-2.35	0.633	-5.37	0.377
ZM M35878	-0.1	0.916	0.33	0.817	0.3	0.858	-0.48	0.698	0.28	0.867	-0.99	0.772	1.38	0.611	-0	1	-0.12	0.98	-3.7	0.543
ZM M36160	-0.58	0.519	-0.46	0.748	-1.84	0.264	-0.65	0.597	0.81	0.625	0.82	0.81	1.38	0.611	8.33	0.088	0.99	0.841	-7.04	0.248
构建体	-0.33	0.566	-0.13	0.882	-1.48	0.155	-0.29	0.707	0.76	0.47	-0.76	0.726	-0.1	0.955	3.33	0.28	-0.49	0.874	-5.37	0.163
ZM M49275	-3.72	0.001	2.39	0.343	-5.47	0.004	-5.14	0	X	X	10.25	0.019	5.28	0.274	17.5	0.002	15	0.009	X	X
ZM M49278	-2.37	0.042	2.08	0.409	-7.87	0	-1.9	0.185	X	X	4.88	0.265	-1.39	0.773	19.17	0.001	6.11	0.284	X	X
构建体	-3.04	0.001	2.24	0.241	-6.67	0	-3.52	0.003	X	X	7.56	0.03	1.94	0.594	18.33	0	10.56	0.024	X	X
ZM M53641	1.25	0.166	0.04	0.978	2.88	0.081	-0.31	0.804	2.74	0.099	-1.27	0.71	1.38	0.611	5	0.305	0.99	0.841	12.04	0.048
ZM M53994	-0.56	0.536	-0.13	0.926	-1.04	0.526	0.06	0.962	-1.31	0.429	1.65	0.626	-1.4	0.607	3.33	0.494	0.99	0.841	1.3	0.831
ZM M53997	-0.8	0.376	0.11	0.937	0.38	0.816	-1.82	0.139	0.07	0.968	5.26	0.122	3.05	0.262	1.67	0.733	9.88	0.044	-0.37	0.951
构建体	-0.04	0.95	0.01	0.994	0.74	0.478	-0.69	0.376	0.5	0.635	1.88	0.382	1.01	0.557	3.33	0.28	3.95	0.203	-3.7	0.336
ZM M45248	-1.52	0.211	2.65	0.294	-4.77	0.013	-2.01	0.188	X	X	-3.09	0.481	1.94	0.687	10.83	0.056	-1.67	0.77	X	X

[1366]

pMON78936	ZM M45274	-3.87	0.001	2.58	0.307	-5	0.009	-5.59	0	X	X	9.88	0.024	6.94	0.15	14.17	0.013	16.11	0.005	X	X	X
	构建体	-2.69	0.004	2.61	0.171	-4.89	0.002	-3.8	0.002	X	X	3.39	0.331	4.44	0.223	12.5	0.007	7.22	0.121	X	X	X
	ZM M50823	-2	0.057	-0.17	0.921	-5.85	0.002	-2.51	0.08	2.87	0.136	4.85	0.24	-0.83	0.792	10.83	0.056	7.22	0.206	-6.67	0.346	
	ZM M50856	-0.01	0.993	-0.6	0.714	-5.19	0.007	-0.31	0.839	6.23	0.001	-6.88	0.082	-0.83	0.792	5.83	0.304	-8.33	0.144	16.67	0.019	
110 pMON79425	ZM M51300	-1.91	0.068	-0.02	0.989	-4.43	0.021	-2.42	0.091	1.61	0.402	3.54	0.371	-0.83	0.792	4.17	0.462	8.33	0.144	-6.67	0.346	
	ZM M51302	-3.5	0.001	-0.21	0.899	-6.08	0.002	-5.38	0	2.85	0.139	12.85	0.001	0.83	0.792	14.17	0.013	19.44	0.001	-1.67	0.814	
	ZM M51313	-4.06	0	-0.12	0.94	-4.16	0.03	-5.38	0	-1.31	0.496	9.51	0.016	-0.83	0.792	15.83	0.005	12.78	0.025	-3.33	0.637	
	ZM M51608	-2.84	0.007	-0.27	0.87	-3.74	0.051	-4.88	0.001	2.15	0.265	5.49	0.166	0.83	0.792	10.83	0.056	7.22	0.206	-3.33	0.637	
116 pMON79697	ZM M51623	-2.09	0.047	-0.15	0.926	-5.14	0.007	-3.15	0.028	3.09	0.11	1.6	0.687	3.06	0.333	17.5	0.002	2.78	0.626	16.67	0.019	
	构建体	-2.34	0.001	-0.22	0.838	-4.94	0	-3.43	0	2.5	0.048	4.39	0.09	0.2	0.923	11.31	0.002	7.06	0.059	-7.86	0.08	
	ZM M53939	-2.66	0.022	2.55	0.313	-3.3	0.085	-4.63	0.001	X	X	6.36	0.147	1.94	0.687	12.5	0.028	11.67	0.041	X	X	
	ZM M54371	-1.02	0.378	2.71	0.282	-3.56	0.063	-2.04	0.154	X	X	0.06	0.989	3.61	0.454	2.5	0.659	7.22	0.206	X	X	
111 pMON79718	ZM M54374	-2.79	0.016	2.67	0.29	-4.36	0.023	-4.3	0.003	X	X	10.06	0.022	-1.39	0.773	12.5	0.028	17.22	0.003	X	X	
	构建体	-2.16	0.01	2.64	0.11	-3.74	0.009	-3.66	0.001	X	X	5.49	0.081	1.39	0.66	9.17	0.03	12.04	0.005	X	X	
	ZM M51598	-2.19	0.071	2.23	0.376	-4.51	0.019	-3.25	0.033	X	X	4.13	0.345	-1.39	0.773	19.17	0.001	5	0.381	X	X	
	ZM M52937	-1.8	0.138	3.07	0.224	-5.32	0.006	-2.14	0.162	X	X	-1.42	0.745	6.94	0.15	15.83	0.005	-1.67	0.77	X	X	
120 pMON80452	构建体	-2	0.037	2.65	0.165	-4.92	0.002	-2.89	0.028	X	X	1.36	0.698	2.78	0.446	17.5	0	1.67	0.72	X	X	
	ZM M53455	0.14	0.873	0.29	0.838	3.04	0.065	-1.71	0.166	0.95	0.565	1.65	0.628	-1.95	0.473	-3.33	0.494	7.65	0.119	-5.37	0.377	
	ZM M53456	-0.56	0.532	-0.51	0.719	0.97	0.555	-1.18	0.337	-0.86	0.802	3.04	0.372	0.27	0.921	-5	0.305	8.77	0.074	-0.37	0.951	
	ZM M53694	0.88	0.332	0.25	0.859	2.06	0.211	1.04	0.401	-0.62	0.706	-0.15	0.964	0.83	0.761	-1.67	0.733	-0.12	0.98	1.3	0.831	
118 pMON80461	ZM M53695	1.47	0.104	0	0.998	3.07	0.062	0.22	0.857	2.37	0.154	-3.9	0.252	1.38	0.611	1.67	0.733	-3.46	0.481	10.37	0.089	
	ZM M53696	0.95	0.295	-0.2	0.888	0.46	0.78	0.74	0.55	1.85	0.265	0.96	0.779	2.49	0.359	6.67	0.172	2.1	0.669	-7.04	0.248	
	构建体	0.57	0.23	-0.03	0.965	1.92	0.028	-0.18	0.783	0.74	0.402	0.32	0.86	0.6	0.675	-0.33	0.897	2.99	0.25	-4.37	0.175	
	ZM M53218	-1.55	0.087	-0.02	0.988	-3.54	0.032	-2.09	0.09	1.55	0.351	3.46	0.31	-0.84	0.757	8.33	0.088	8.77	0.074	12.04	0.048	
118 pMON80461	ZM M53235	-1.42	0.117	0.34	0.808	-0.5	0.761	-1.86	0.131	-1.44	0.386	3.6	0.291	0.83	0.761	-3.33	0.494	9.88	0.044	-2.04	0.738	
	ZM M53848	-0.36	0.69	-0.02	0.988	-1.11	0.5	-0.6	0.624	0.88	0.595	4.98	0.143	3.05	0.262	6.67	0.172	7.65	0.119	-2.04	0.738	
	ZM M54282	-0.98	0.279	0.16	0.909	-3.97	0.016	0.32	0.796	-0.58	0.727	-0.57	0.867	-3.62	0.183	6.67	0.172	-3.46	0.481	-2.04	0.738	
	ZM M54284	-1.06	0.24	0.05	0.972	-0.35	0.832	-1.21	0.328	-1.49	0.37	4.98	0.143	-1.19	0.679	10	0.041	0.99	0.841	7.96	0.191	
118 pMON80461	构建体	-1.07	0.025	0.1	0.891	-1.89	0.03	-1.09	0.095	-0.21	0.806	3.29	0.068	-0.35	0.807	5.67	0.028	4.77	0.067	-2.04	0.527	

[1367] E. 具有增加的蛋白质和 / 或油水平的转基因植物种子的筛选

[1368] 这个实施例阐述了使用 Infratec 1200 系列谷粒分析仪鉴别在种子组成中具有

改善的植物种子的高通量选择,所述谷粒分析仪是近红外透射率分光计,用于测定大批种子样品的组成。近红外分析是无破坏性、高通量的方法,它可以分析单一样品扫描中的多重性状。目的分析物的 NIR 校准用于预测未知样品的值。使用复合化学计量软件包获得样品的 NIR 光谱并与校准值比较,所述软件包提供预测值以及关于样品在校准中拟合得如何好的信息。

[1369] Foss North America 具有转运模块的 Infratec Model 1221、1225 或 1227 与比色杯,条目 #1000-4033, Foss North America 一起使用,或对于小样品与小单元比色杯,由 Leon Girard Co. 修改的 Foss 标准比色杯,一起使用。维持在对照单元比色杯中各种组成的玉米和大豆对照样品由 Leon Girard Co. 供应。NIT 收集软件由 Maximum Consulting Inc. Software 提供。通过软件自动进行计算。种子样品在具有来自消费者的条形码标签的包装或容器中收到。在收到时将种子倾倒入比色杯中并进行分析。

[1370] 表 20

[1371]

一般样品：	全谷粒玉米和大豆种子
运行方法的分析时间：	每个样品少于 0.75 分钟
每次运行经过的总时间：	每个样品 1.5 分钟
一般和最小样品大小：	玉米一般为 :50cc ;最小值 30cc 大豆一般为 :50cc ;最小值 5cc
一般分析范围：	通过特别校准部分测定。 玉米 - 湿度 5-15%,油 5-20%, 蛋白质 5-30%,淀粉 50-75%,和 密度 1.0-1.3%。 大豆 - 湿度 5-15%,油 15-25%和蛋白质 35-50%。

[1372] [1372]

表 21.

在2003、2004和2005年中西部杂交体试验中转基因植物种子的谷粒蛋白质含量。																	
PEP SE QID	构建体	事件	杂交体2003					杂交体2004					杂交体2005				
			转基因 平均值	对照 平均值 ^a	改变 %	P值	转基因 平均值	对照 平均值 ^a	改变 %	P值	转基因 平均值	对照 平均值 ^b	改变 %	P值			
84	PMON69462	ZM M17475	9.2	8.7	6.9	0.00	8.8	8.1	8.8	0.00	9.5	9.0	6.4	0.00			
	PMON69462	ZM M17512	9.4	8.7	8.0	0.00	8.9	8.1	10.3	0.00	9.6	9.0	6.8	0.00			
	PMON69462	ZM M19779	8.6	8.7	-1.1	0.37	8.0	8.1	-1.8	0.20	-	-	-	-			
	PMON69462	ZM M19792	8.9	8.7	2.3	0.17	8.1	8.1	-0.1	0.92	-	-	-	-			
	PMON69462	ZM M19775	8.5	8.7	-2.3	0.17	8.0	8.1	-1.4	0.32	-	-	-	-			
	PMON69462	ZM M19755	-	-	-	-	8.1	8.1	0.3	0.83	8.7	9.0	-2.5	0.09			
	PMON69462	ZM M19263	-	-	-	-	7.9	8.1	-2.1	0.12	-	-	-	-			
	PMON69462	ZM M19752	-	-	-	-	8.1	8.1	0.0	0.97	-	-	-	-			
126	PMON83769	ZM M75771	-	-	-	-	-	-	-	-	9.6	9.1	5.9	0.00			
	PMON83769	ZM M73623	-	-	-	-	-	-	-	-	9.1	9.1	0.2	0.92			
	PMON83769	ZM M73624	-	-	-	-	-	-	-	-	9.8	9.1	7.7	0.00			
	PMON83769	ZM M74392	-	-	-	-	-	-	-	-	9.6	9.1	5.0	0.00			
	PMON83769	ZM M74394	-	-	-	-	-	-	-	-	9.9	9.1	8.8	0.00			
	PMON83769	ZM M74395	-	-	-	-	-	-	-	-	9.5	9.1	4.5	0.01			
	PMON83769	ZM M75255	-	-	-	-	-	-	-	-	9.8	9.1	8.0	0.00			
	PMON83769	ZM M75260	-	-	-	-	-	-	-	-	9.5	9.1	4.1	0.01			
124	PMON80868	ZM M59335	-	-	-	-	-	-	-	-	9.2	9.0	2.1	0.24			
	PMON80868	ZM M59391	-	-	-	-	-	-	-	-	9.3	9.0	3.0	0.10			
	PMON80868	ZM M59764	-	-	-	-	-	-	-	-	9.0	9.0	0.0	0.98			
在100 % 干物质基础上报告的谷粒蛋白质																	
^a 关于2003和2004的对照是轮回亲本																	
^b 关于2005年实验的对照是PMON69462的授粉者以及PMON83769和PMON80868的轮回亲本																	

[1373] 表 22

[1374]

PEP SEQ ID	在夏威夷近交试验中转基因植物种子的谷粒蛋白质含量 ^a						
	构建体	事件	年	转基因平均值	对照平均值 ^b	改变%	P值
84	PMON69462	ZM M17475	2002	14.2	10.7	32.7	0.02
	PMON69462	ZM M17512	2002	12.6	11.8	6.8	0.10
	PMON69462	ZM M19779	2002	11.4	10.7	6.5	0.10
	PMON69462	ZM M19792	2002	12.5	11.6	7.8	0.10
	PMON69462	ZM M19775	2002	12.9	11.9	8.4	0.10
	PMON69462	ZM M19755	2003	12.0	11.3	6.4	0.44
	PMON69462	ZM M19263	2003	10.8	11.0	-2.2	0.77
	PMON69462	ZM M19752	2003	11.1	11.9	-7.0	0.23
	PMON69462	ZM M19270	2002	13.0	10.5	23.8	0.02
	PMON69462	ZM M19781	2002	12.4	10.3	20.4	0.02
	PMON69462	ZM M19257	2003	12.7	11.4	11.4	0.30
126	PMON83769	ZM M73624	2004	13.4	9.4	42.9	0.00
	PMON83769	ZM M74380	2004	11.9	11.7	1.4	0.88
	PMON83769	ZM M74392	2004	10.7	12.0	-10.5	0.21
	PMON83769	ZM M74394	2004	11.8	10.7	10.5	0.05
	PMON83769	ZM M74395	2004	13.6	11.8	14.8	0.00
	PMON83769	ZM M75255	2004	12.5	11.0	13.2	0.27
	PMON83769	ZM M75771	2004	12.3	12.5	-2.2	0.83
124	PMON80868	ZM M59335	2004	13.3	12.1	10.4	0.07
	PMON80868	ZM M59764	2004	12.8	11.5	10.8	0.27
	PMON80868	ZM M59765	2004	13.7	11.8	15.5	0.00
^a 在100%干物质基础上报告的谷粒蛋白质							
^b 对于每个事件对照都是阴性等值线(isoline)							

[1375] 实施例 6

[1376] 这个实施例说明了转基因植物细胞的制备,所述细胞包含表达玉蜀黍光敏色素 A 蛋白(PHYA)的重组 DNA(SEQ ID NO:82)。编码玉米 PHYA 蛋白质的全长 cDNA 从玉米中克隆。cDNA 克隆包含 3396bp 核苷酸,其编码分子量为 125.2kD 的 1131 个氨基酸 PHYA 蛋白质。基于 cDNA 序列,设计引物以从玉蜀黍近交 LH 172 基因组文库中克隆图 1 中说明的基因组 DNA。将重组 DNA 插入如 SEQ ID NO:10030 中列出的 pMON74916 转化载体中,所述重组 DNA 包括与编码玉米 PHYA 蛋白质的基因组 DNA 可操作地连接的稻肌动蛋白启动子,随后为 Hsp17 终止子。使用 pMON74916 用表达 PHA 的重组 DNA 转化玉米植物细胞,并将其用于再生转基因植物群体。由约 100 个转化的植物细胞事件再生转基因植物;选择来自 90 个事件具有各种表达水平的植物用于授粉以生产 R1 和 F1 种子;并且选择来自 31 个事件的植物用于增强的性状的筛选。

[1377] 种子发芽和幼苗发育

[1378] 选择 5 个事件连同其他转基因材料一起分析在黑暗条件下对种子发芽和幼苗发育的表型作用。每个野生型和转基因玉蜀黍事件的 12 粒近交种子在湿润且卷起的发芽纸中在完全黑暗的生长室中发芽 10 天。测量每个幼苗的中胚轴、胚芽鞘和根的长度。与非转基因对照比较,鉴别显示中胚轴和展开的胚芽鞘极大延长生长的转基因玉蜀黍幼苗,所述生长由表达 PHYA 蛋白质的重组 DNA 赋予。

[1379] 密度研究

[1380] 转基因植物以 3 个密度在田间生长：高密度为 42,000 株植物 / 英亩；中等密度为 35,000 株植物 / 英亩；和低密度为 28,000 株植物 / 英亩。选择来自表达 PHVA 的 3 个植物细胞事件的植物用于研究针对不同密度的生理学和产量应答。来自密度试验 YI130 的生理学数据概括于下文显示的表 23 中。在高种植密度下事件 ZM_S83483 显示植物高度、谷穗高度和节间长度显著减少并且叶绿素含量具有显著增加。

[1381] 表 23

[1382]

低密度 YI130 JV 2004					高密度 YI130 JV 2004				
事件 ID	植物高度	谷穗高度	茎直径	节间长度	植物高度	谷穗高度	节间长度	SPAD	拍照速率
ZM_S83483	不显著 P=0.727	显著减少 P=0.085	不显著 P=0.9436	显著减少 P=0.0370	不显著 P=0.5866	显著减少 P=0.0185	增加不显著 P=0.2412	显著增加 P=0.0762	NA
ZM_S83897	不显著 P=0.8778	减少不显著 P=0.1937	不显著 P=0.2517	显著增加 P=0.0421	显著减少 P=0.0306	不显著 P=0.6542	不显著 P=0.5206	显著减少 P=0.0153	显著减少
ZM_S83907	高度显著增加 P=0.0021	增加不显著 P=0.2426	显著增加 P=0.0633	高度显著增加 P=0.001	显著增加 P=0.0016	显著增加 P=0.015	不显著 P=0.898	增加不显著 P=0.3208	不显著

[1383] 谷粒性状分析

[1384] 如表 24 中所示，事件 ZM_S83444、ZM_S83446、ZM_S83473、ZM_S83480、ZM_S83483 和 ZM_S83907 显示单谷粒重量显著增加。事件 ZM_S83452 显示单谷粒重量和总谷粒重量显著增加。筛选数据显示具有稳定整合、非天然、表达光敏色素 A 蛋白的重组 DNA 的植物细胞可以再生为与对照植物比较显示增加的产量的植物。

[1385] 表 24

[1386]

事件	性状	平均值 _TRAN	平均值 _CON	TRAN_C ON	改变 %	P 值	结果
ZM-S83416	总谷粒重量, g	151.3	140.21	11.09	8	0.1452	不显著
	总谷粒数目	876	830.22	45.78	6	0.3118	不显著
	单谷粒重量, g	0.17	0.17	0.01	6	0.3551	不显著
ZM-S83444	总谷粒重量, g	147.14	144.65	2.49	2	0.753	不显著
	总谷粒数目	664.38	930.47	-266.1	-29	0	高度显著
	单谷粒重量, g	0.25	0.16	0.09	56	0	高度显著
ZM-S83446	总谷粒重量, g	152.12	158.27	-6.15	-4	0.3931	不显著
	总谷粒数目	718.88	918.94	-200.07	-22	0	高度显著
	单谷粒重量, g	0.2	0.17	0.03	18	0.0008	高度显著
ZM-S83452	总谷粒重量, g	166.94	140.21	26.72	19	0.0014	高度显著
	总谷粒数目	888.89	830.22	58.67	7	0.2123	不显著
	单谷粒重量, g	0.19	0.17	0.02	12	0.0045	高度显著
ZM-S83473	总谷粒重量, g	145.87	146.47	-0.6	-0	0.9451	不显著
	总谷粒数目	784.71	885.21	-100.5	-11	0.0099	高度显著
	单谷粒重量, g	0.18	0.16	0.02	13	0.0618	在 10% 时显著
ZM-S83480	总谷粒重量, g	157.23	149.44	7.79	5	0.3769	不显著
	总谷粒数目	856.67	924.28	-67.61	-7	0.0982	在 10% 时显著
	单谷粒重量, g	0.18	0.16	0.02	13	0.0018	高度显著
ZM-S83483	总谷粒重量, g	164.86	158.27	6.6	4	0.3599	不显著
	总谷粒数目	820.4	918.94	-98.54	-11	0.0165	显著
	单谷粒重量, g	0.19	0.17	0.02	12	0.0317	显著
ZM-S83897	总谷粒重量, g	132.62	149.44	-16.83	-11	0.0617	在 10% 时显著
	总谷粒数目	743.5	924.28	-180.78	-20	0.0001	高度显著
	单谷粒重量, g	0.18	0.16	0.02	13	0.0125	显著
ZM-S83907	总谷粒重量, g	146.23	146.47	-0.24	-0	0.9807	不显著
	总谷粒数目	733.44	833.41	-99.97	-12	0.0703	在 10% 时显著
	单谷粒重量, g	0.19	0.17	0.02	12	0.0792	在 10% 时显著
ZM-S83416	总谷粒重量, g	157.3	146.47	10.83	7	0.2666	不显著
	总谷粒数目	881.8	833.41	48.39	6	0.3558	不显著
	单谷粒重量, g	0.18	0.17	0	0	0.6827	不显著

[1387] 实施例 7

[1388] 这个实施例说明了转基因植物细胞的制备,其包含表达大豆 MADS 框转录因子蛋白质的重组 DNA (SEQ ID NO :77),并鉴别为 G1760。

[1389] 编码大豆 MADS 框转录因子的 DNA 从大豆文库中克隆,并插入重组 DNA 构建体中,所述构建体包括与编码转录因子的 DNA 可操作地连接的 CaMV 35S 启动子,随后为终止子。重组 DNA 构建体插入转化载体质粒中,以产生如 SEQ ID NO:10029 中所列出的质粒 pMON74470,它用于土壤杆菌属介导的大豆植物细胞转化。

[1390] 使用 MON74470 用表达 MADS 框转录因子的重组 DNA 转化大豆植物细胞并用于再生转基因植物群体。将转基因大豆植物再生并选择用于筛选增强的性状。

[1391] 转基因大豆植物显示具有高度扩大的萼片和缠绕茎的花。主茎显示减少的侧出分枝和增加的总状花序形成。与对照植物比较,在短白昼(10 小时)和长白昼(14 小时)条件下,开花时间减少约 2-4 天。当置于非诱导的 20 小时光时,转基因植物还开花 5 周;野生型对照植物在此类条件下不开花。在转基因植物中花和荚果的脱离极大地减少,从而导致每株植物的荚果数目增加。野生型对照植物产生 100 个荚果左右,特定的转基因植物产生至少 125 个荚果/植物,并且由一个转基因事件的植物细胞再生的植物产生大于 200 个荚果/植物。成熟期也有所延迟,来自单一拷贝事件 A29204 的植物显示的 1 周到来自多拷贝事件 A28877 的植物显示的 1 个月。来自事件 A29204 的转基因植物上超过 95%的荚果在一个时间段内成熟;但来自事件 A28877 的转基因植物上只有 50%的荚果在相同时间段内成熟。来自转基因植物的种子小于来自对照植物的种子,并且在数目上大于来自对照植物的种子,例如约多 1800 粒种子/磅。转基因植物还显示具有增强的水利用效率。

[1392] 在测试大豆的干旱耐受性时,将 4.5" 罐用 Metromix 200 制备并将罐调整至相同重量。罐用水饱和。R2 或 R3 纯合种子置于罐的土壤中,每个事件 15 个罐,每个构建体 3-6 个事件。植物在 $600 \mu \text{EM}^{-2}\text{S}^{-1}$ 的光强度;温度:28°C;相对湿度(RH):60%下生长。使用基因检查条(Trait RUR Lateral Flow 50 测试,来自 Strategic Diagnostics, Inc.) 对选择的植物进行关于 CP4 基因存在的基因检查。丢弃不需要的阴性植物。当植物达到 V1 阶段时,通过彻底灌溉用水饱和罐。拍摄在水饱和罐中的植物的照片。排出过量的水并停止进一步的浇水直至对于良好浇水的对照和干旱处理的植物分别为 50%的罐含水量和 10%的持水量(通过每 3-5 天测量土壤湿度或罐重量监控含水量)。在大约 10%的饱和水重量时,植物开始显示萎蔫表型的起始。每 1-2 天继续限制浇水以将罐含水量维持在 50 或 10%。接下来的 14 天测定干旱伤害表型(参见测量结果表)。在干旱处理开始后 14 天的每一天进行植物的拍照和生理学测定。这些包括,但不限于,植物高度、叶相对含水量、叶水势、叶绿素含量和叶绿素荧光。在 14 天后罐用营养物溶液饱和并重新开始规律浇水时间表。

[1393] 表 25

[1394]

测量结果	方案
农艺学测量结果	突出,旱季节活力,高度(cm)
视觉干旱得分	分数为 1-4:1. 健康植物,与对照植物没有差异;2. 看见萎蔫,叶变得萎蔫;3. 植物萎蔫,仍为绿色并可恢复;4. 严重萎蔫,萎黄病并且不可恢复

[1395] 如表 25 中描述对转基因大豆植物进行的干旱测定法测量结果显示,来自事件 GM 29204 的转基因植物细胞的转基因大豆植物呈现增强的水利用效率。

[1396] 与 150 粒种子/植物的平均数比较,来自 41 个转基因植物细胞事件中的一个转基因植物细胞事件(28877)再生的 R0 植物产生大数目的荚果/节和种子/植物-531R1 种子/植物,即产量增加。

[1397] 实施例 6. 共有序列

[1398] 这个实施例说明了对于 DNA 编码的蛋白质和同源物的共有氨基酸序列的鉴别,所述 DNA 用于制备本发明的具有增强的农艺性状的转基因种子和植物。

[1399] 选择 ClustalW 程序用于 SEQ ID NO:136 的氨基酸序列及其 9 个同源物,以及 SEQ ID NO:151 及其 11 个同源物的多重序列比对。显著影响序列比对的 3 个主要因素是 (1) 蛋白质权重矩阵;(2) 缺口 开放罚分;(3) 缺口延伸罚分。对于 ClustalW 程序可用的蛋白质权重矩阵包括 Blosum、Pam 和 Gonnet 系列。广泛地测试具有缺口开放罚分和缺口延伸罚分的那些参数。在测试结果的基础上,对于多重序列比对选择 Blosum 权重矩阵、缺口开放罚分 10 和缺口延伸罚分 1。图 2 显示 SEQ ID NO:136、其同源物和结尾的共有序列 (SEQ ID NO:10031) 的序列。图 3 显示 SEQ ID NO:151、其同源物和结尾的共有序列 (SEQ ID NO:10032) 的序列。关于共有序列的符号是 (1) 大写字母为多重序列比对输出的所有位置中 100% 的同一性;(2) 小写字母为 $\geq 70\%$ 的同一性;符号;(3) “X”指示 $< 70\%$ 的同一性;(4) 破折号“-”指缺口在 $\geq 70\%$ 的序列中。

[1400] 共有氨基酸序列可以用于鉴别对应本发明完全范围的 DNA,所述 DNA 在提供转基因植物例如具有增强的农艺性状的玉米和大豆植物中 useful,所述增强的农艺性状例如改善的氮利用效率、增加的产量、改善的水利用效率和 / 或在冷应激下改善的生长,这是由于编码的氨基酸序列等同于共有氨基酸序列的蛋白质的 DNA 在植物中的表达。

[1401] 实施例 7. 通过 Pfam 分析鉴别氨基酸结构域

[1402] 使用附加的计算机列表中的 HMMER 软件,针对多重序列比对的目前 Pfam 集合和隐马尔可夫模型分析 Pfam 蛋白质家族中显示与增强的性状结合的表达蛋白质的氨基酸序列。表 26 中显示了 SEQ ID NO:84-166 的蛋白质的 Pfam 蛋白质家族。附加的计算机列表中还有关于鉴别的专利家族的隐马尔可夫模型数据库,其允许鉴别其他同源蛋白质及其同源编码 DNA,以使得本领域普通技术人员能够充分外延本发明。通过单个 Pfam 结构域鉴别特定蛋白质,并且通过多个 Pfam 结构域鉴别其他的蛋白质。例如,具有 SEQ ID NO:91 的氨基酸的蛋白质的特征为 2 个 Pfam 结构域,即 SRF-TF 和 K-框;并且具有 SEQ ID NO:165 的氨基酸的蛋白质的特征为 6 个 Pfam 结构域,即 GAF、光敏色素、PAS、重复的 PAS、HisKA 和 HATPase。

[1403] 表 26

[1404]

NUC SEQ ID	PEP SEQ ID	Pfam结构域名称	开始	终止	得分	E值
3	86	Pkinase	79	337	343	4.30E-100
5	88	FA-去饱和酶	99	319	206.2	6.60E-59
2	85	Ras	10	178	297.9	1.60E-86
1	84	乙二醛酶	27	171	130.1	5.40E-36
8	91	SRF-TF	9	59	121.4	2.30E-33
8	91	K-框	75	176	151.7	1.70E-42
7	90	K-框	4	104	145.6	1.20E-40
83	166	SRF-TF	9	59	99.2	1.10E-26
83	166	K-框	75	172	92.4	1.20E-24
82	165	GAF	219	404	105.6	1.30E-28
82	165	光敏色素	415	595	407.6	1.60E-119
82	165	PAS	622	738	88.9	1.40E-23
82	165	PAS	753	878	101.1	2.80E-27
82	165	HisKA	898	957	27.6	4.00E-05
82	165	HATPase c	1012	1124	66.9	5.80E-17
9	92	同源异型框	97	158	68	2.80E-17
10	93	AP2	5	68	127.5	3.30E-35
11	94	GATA	196	231	71.3	2.70E-18
12	95	AT 钩	57	69	7.4	1.1
12	95	DUF296	84	208	183.6	4.30E-52
24	107	小突触小泡蛋白	128	215	137.6	2.90E-38
31	114	吡哆醛-deC	28	381	194.6	2.10E-55
36	119	Metallophos	63	258	161	2.80E-45
21	104	Pkinase	12	267	346	5.40E-101
21	104	Pkinase Tyr	12	265	88.5	1.80E-23
21	104	NAF	310	369	98.6	1.60E-26
26	109	MtN3 slv	9	98	96.7	6.10E-26
26	109	MtN3 slv	132	218	116.8	5.70E-32
27	110	内酰胺酶-B	94	252	125.1	1.80E-34
33	116	HSP20	53	157	159.9	5.80E-45

[1405]

28	111	RTC	3	353	275.2	1.10E-79
28	111	RTC_插入片段	184	300	120.8	3.40E-33
37	120	PDZ	200	284	37.6	3.80E-08
37	120	肽酶_S41	320	483	244.5	1.90E-70
35	118	E2F_TDP	167	232	131	2.90E-36
41	124	Pkinase	63	341	199.5	7.00E-57
41	124	Pkinase_Tyr	63	341	243	5.60E-70
43	126	zf-C2H2	72	94	25.6	0.00016
43	126	zf-C2H2	149	171	20.5	0.0054
4	87	zf-C2H2	85	107	22.1	0.0018
17	100	PRA1	10	161	181.8	1.50E-51
22	105	AAA	154	352	85	2.10E-22
14	97	CBFD_NFYB_HMF	31	96	134.4	2.80E-37
34	117	肽酶_C15	11	219	-72.2	3.50E-07
						7.80E-101
20	103	Pkinase	13	267	345.5	
20	103	Pkinase_Tyr	13	265	75.2	1.80E-19
20	103	NAF	312	371	104.7	2.50E-28
32	115	HSF_DNA-结合	49	225	212.2	1.00E-60
						2.30E-103
19	102	Pkinase	37	291	353.9	
19	102	RIO1	50	208	-88.1	0.0038
19	102	NAF	375	432	101.8	1.80E-27
						1.00E-131
40	123	Aldo_ket_red	7	284	448.1	
						5.30E-205
42	125	FBPase	13	337	691.6	
6	89	SRF-TF	9	59	119.7	7.20E-33
18	101	DNA_光解酶	6	173	163.3	5.70E-46
						5.50E-125
18	101	FAD_结合_7	205	476	425.8	
30	113	Pkinase	41	327	326.6	3.80E-95
23	106	NIF	95	291	90.6	4.10E-24
15	98	Got1	30	130	237	3.60E-68
16	99	RRM_1	21	89	67.1	5.00E-17
						8.00E-107
29	112	Di19	13	206	365.4	
						1.00E-119
25	108	CorA	90	467	408.2	
39	122	SPC25	12	190	252.3	9.00E-73
44	127	应答-reg	18	139	151.1	2.60E-42
44	127	HisKA	320	385	101.5	2.30E-27
44	127	HATPase_c	432	565	138.4	1.70E-38
44	127	应答-reg	740	862	128	2.40E-35
44	127	Hpt	922	1013	63.4	6.60E-16
45	128	应答-reg	18	139	151.1	2.60E-42
45	128	HisKA	320	385	101.5	2.30E-27
45	128	HATPase_c	432	565	138.4	1.70E-38
45	128	应答-reg	740	862	128	2.40E-35

[1406]

45	128	Hpt	922	1013	63.4	6.60E-16
46	129	NAM	9	135	313.7	2.90E-91
47	130	Aminotran 1 2	183	576	55.7	1.40E-13
48	131	过氧化氢酶	18	401	960.1	7.80E-286
49	132	BRO1	10	172	177.8	2.40E-50
69	152	Got1	30	130	211.8	1.40E-60
70	153	Got1	30	130	174.9	1.80E-49
71	154	半胱氨酸蛋白酶抑制剂	36	124	87.6	3.40E-23
72	155	半胱氨酸蛋白酶抑制剂	36	124	87.6	3.40E-23
73	156	RRM 1	22	87	32.4	1.40E-06
74	157	Pkinase Tyr	55	304	86.2	9.10E-23
74	157	Pkinase	55	306	362	8.40E-106
75	158	SPX	1	167	88.9	1.30E-23
75	158	zf-C3HC4	238	286	17	0.0024
76	159	Pkinase Tyr	19	271	70.8	4.00E-18
76	159	Pkinase	19	273	359.7	4.10E-105
76	159	NAF	324	381	105.6	1.30E-28
77	160	SRF-TF	9	59	100.8	3.60E-27
77	160	K-框	73	173	95.3	1.60E-25
50	133	肽酶-S10	1	227	-42.7	6.00E-11
51	134	Ank	44	76	47.3	4.70E-11
51	134	Ank	77	109	33.5	6.40E-07
51	134	Ank	111	144	15.7	0.14
51	134	Ank	185	217	39.7	9.00E-09
51	134	Ank	228	260	30.7	4.50E-06
52	135	Pkinase Tyr	51	341	158.7	1.40E-44
52	135	Pkinase	63	341	104.4	3.00E-28
54	137	GATase 2	2	162	11.8	6.10E-12
54	137	Asn-合酶	211	479	334.3	1.80E-97
55	138	HSP20	56	164	168.2	1.90E-47
78	161	内酰胺酶-B	93	251	129	1.20E-35
56	139	UPF0057	11	62	102.9	8.40E-28
57	140	Oxidored FMN	6	341	302.1	9.10E-88
58	141	Pkinase	39	325	309.2	6.40E-90
59	142	吡哆醛-deC	33	381	546	3.40E-161
60	143	吡哆醛-deC	33	381	546	3.40E-161
61	144	HSP20	57	160	178.8	1.20E-50
38	121	PDZ	200	284	37.6	3.80E-08
38	121	肽酶-S41	320	483	244.5	1.90E-70
62	145	Cpn60 TCP1	59	562	578.6	5.40E-171
63	146	DSPc	50	188	142.9	7.70E-40
64	147	异淀粉酶-N	61	149	94.9	2.10E-25
64	147	α 淀粉酶	209	589	-36.4	1.30E-07

[1407]

79	162	Pkinase	45	299	360.3	2.80E-105
79	162	NAF	384	441	105.2	1.70E-28
65	148	DUF1685	38	146	184.5	2.40E-52
80	163	GAF	219	404	108.4	1.90E-29
80	163	光敏色素	415	595	409.1	5.70E-120
80	163	PAS	622	737	96.6	6.50E-26
80	163	PAS	752	877	107.4	3.80E-29
80	163	HisKA	897	956	26.7	7.10E-05
80	163	HATPase c	1011	1123	64.4	3.30E-16
66	149	Glyco hydro 1	74	558	1024.9	0
67	150	ArfGap	17	133	174.4	2.50E-49
81	164	AP2	6	69	132	1.50E-36

[1408] 表 27

[1409]

pfam结构域名称	登记号	聚集截止值	结构域描述
AAA	PF00004.17	10	与各种细胞活性相关的ATPase家族 (AAA)
AP2	PF00847.9	0	AP2结构域
Aldo ket red	PF00248.10	-97	醛/酮还原酶家族
α 淀粉酶	PF00128.11	-93	α 淀粉酶, 催化结构域
Aminotran 1 2	PF00155.9	-57.5	I和II类转氨酶
Ank	PF00023.17	21.6	锚蛋白重复序列
ArfGap	PF01412.8	-17	对于Arf推定的GTP酶激活蛋白质
Asn-合酶	PF00733.10	-52.8	天冬酰胺合酶
BRO1	PF03097.6	25	BRO1样结构域
CBFD NFYB HMF	PF00808.12	18.4	组蛋白样转录因子 (CBF/NFY) 和 archaeal组蛋白
过氧化氢酶	PF00199.8	-229	过氧化氢酶
CorA	PF01544.8	-61.3	CorA样Mg ²⁺ 转运蛋白
Cpn60 TCP1	PF00118.13	-223.4	TCP-1/cpn60陪伴蛋白家族
半胱氨酸蛋白酶抑制剂	PF00031.10	17.5	半胱氨酸蛋白酶抑制剂结构域
DNA-光解酶	PF00875.7	-10	DNA光解酶
DSPc	PF00782.9	-21.8	双重特异性磷酸酶, 催化结构域
DUF1685	PF07939.1	25	未知功能的蛋白质 (DUF1685)
DUF296	PF03479.4	-11	未知功能的结构域 (DUF296)
Di19	PF05605.2	25	干旱诱导的19蛋白质 (Di19)
E2F TDP	PF02319.9	17	E2F/TDP家族翼状螺旋DNA结合结构域
FAD-结合-7	PF03441.3	25	DNA光解酶的FAD结合结构域
FA-去饱和酶	PF00487.13	-46	脂肪酸去饱和酶
FBPase	PF00316.9	-170.3	果糖-1,6-二磷酸酶
GAF	PF01590.14	23	GAF结构域
GATA	PF00320.15	28.5	GATA锌指

[1410]

GATase_2	PF00310.10	-106.2	II类谷氨酰胺转氨酶
Glyco_hydro_1	PF00232.8	-301.8	糖基水解酶家族1
乙二醛酶	PF00903.14	12.1	乙二醛酶/博来霉素抗性蛋白质/加双氧酶超家族
Got1	PF04178.2	25	Got1样家族
HATPase_c	PF02518.13	22.4	组氨酸激酶, DNA促旋酶B, 和HSP90样ATPase
HSF-DNA结合	PF00447.7	-70	HSF类型DNA结合
HSP20	PF00011.9	13	HSP20/ α 晶体蛋白家族
HisKA	PF00512.13	10.2	His激酶A(磷受体(phosphoacceptor))结构域
同源异型框	PF00046.17	-4.1	同源异型框结构域
Hpt	PF01627.11	25	Hpt结构域
异淀粉酶N	PF02922.7	-6.5	异淀粉酶N末端结构域
K-框	PF01486.7	0	K-框区域
内酰胺酶_B	PF00753.15	22.3	金属 β 内酰胺酶超家族
Metallophos	PF00149.16	22	钙依赖磷酸酶样磷酸酯酶
MtN3_slv	PF03083.5	-0.8	MtN3/唾液家族
NAF	PF03822.4	25	NAF结构域
NAM	PF02365.5	-19	无顶端分生组织(NAM)蛋白质
NIF	PF03031.7	-81	NLI相互作用因子样磷酸酶
Oxidored FMN	PF00724.8	-147.7	NADH: 黄素氧化还原酶/NADH氧化酶家族
PAS	PF00989.12	20	PAS折叠
PDZ	PF00595.11	12.1	PDA结构域(还称为DHR或GLGF)
PRA1	PF03208.8	25	PRA1家族蛋白质
肽酶_C15	PF01470.7	-100	焦谷氨酰胺酶
肽酶_S10	PF00450.11	-198	丝氨酸羧肽酶
肽酶_S41	PF03572.7	-25.8	肽酶家族S41
光敏色素	PF00360.9	11	光敏色素区域
Pkinase	PF00069.14	-70.8	蛋白质激酶结构域
Pkinase Tyr	PF07714.4	65	蛋白质酪氨酸激酶
吡哆醛-deC	PF00282.8	-158.6	吡哆醛依赖性脱羧酶保守结构域
RIO1	PF01163.11	-89.1	RIO1家族
RRM_1	PF00076.10	15.2	RNA识别基序(也称为RRM、RBD或RNP结构域)
RTC	PF01137.11	-36.9	RNA3'末端磷酸环化酶
RTC-插入片段	PF05189.3	25	RNA3'末端磷酸环化酶(RTC), 插入结构域
Ras	PF00071.11	18	Ras家族
应答-reg	PF00072.11	-14.4	应答调节物接受结构域
SPC25	PF06703.1	25	微粒体信号肽酶25kDa亚基(SPC25)
SPX	PF03105.9	-20	SPX结构域
SRF-TF	PF00319.8	11	SPF类型转录因子(DNA结合和二聚化结构域)
小突触小泡蛋白	PF00957.9	25	小突触小泡蛋白
UPF0057	PF01679.7	25	未表征的蛋白质家族UPF0057

[1411]

zf-C2H2	PF00096.14	19	锌指, C2H2类型
zf-C3HC4	PF00097.12	16.9	锌指, C3HC4类型 (RING指)

[1412] 实施例 8. 具有增强的农艺性状的转基因植物的选择

[1413] 这个实施例说明了通过选择来源于本发明转基因植物细胞的转基因种子和植物的制备和鉴别,其中通过筛选由蛋白质表达赋予的增强的农艺性状来鉴别植物和种子,所述蛋白质选自实施例 4 中鉴别的同源蛋白质,SEQ ID NO:121、128、152-160、162 和 164。用重组 DNA 转化玉米、大豆、棉花、低芥酸菜子、小麦和稻的转基因植物细胞,以表达实施例 4 中鉴别的每种同源物。由转化的植物细胞再生植物并将其用于生产后代植物和种子,筛选所述后代植物和种子的增强的水利用效率、增强的耐寒性、增加的产量、增强的氮利用效率、增强的种子蛋白质和增强的种子油。通过同源蛋白质的表达鉴别显示赋予的增强的性状的植物。

用于转化载体中的ZmPHYA间断编码序列(基因组序列)

ACC**ATG**TCTTCCTCGAGGCGCTGCCACTCTTCAAGTTCATCCAGCAGGACTCGCCAGAGCTCCCGGGCAAGGATATTAG
CACAAACAACCCTTGATGCTGAAGTCAATGCAGAGTACGAAGAATCTGGTGATTCTTTGATTACTCCAAGTTGGTTGAAG
CACAGCGGAGCACTCCACCTGAGCAGCAAGGGCGATCGGGAAAGGTCATAGCCTACTTGACGATATTCAAAGAGGAAA
GCTTATCCAACCAATTTGGTTGCCTGTTGGCCCTTGACGAGAAAGAGCTTCAGGGTCATTGCATTAGTGAGAATGCACCTGA
AATGCTTACAACGGTCAGCCATGCTGTGCCAAACGTTGATGATCCCCGAAAGCTAGGAATTGGTACCAATGTGCGCTCCCT
TTTCACTGACCTGGTGCTACAGCACTGCAGAAGGCACTTGGATTTGCTGATGTTTCTTTGCTGAATCCTATCCTGGTTGAG
TGCAAGACCTCAGGCAAGCCATTCTATGCCATTCTTCACAGGGCAACTGGTTGCTGGTGGTAGATTTTGAGCCTGTGAAG
CCTACAGAATTTCTGCCACTGCTGCTGGGGCTTTGCAGTCTACAAGCTTGCTGCCAAGGCAATCTCCAAGATCCAGTCA
CTACTAGTGGAAGCATGGAGGCTTATGCAATACCGTGGTTAAGGAAGTCTTTGACCTGACAGGTTATGACAGGGTTATG
GCTTACAAGTTCCATGAAGATGAGCATGGGGAGGCTTTTCTGAGATCACCAAACCTGGTATTGAGCCCTATATAGGCGCTG
CACTATCCAGCCACTGATATCCCTCAAGCTGCCAGGTTCTCTTCATGAAGAACAAAGTCAGAATGATCTGTGATTGCCGT
GCAAGATCCGTGAAGATTATTGAAGATGAGGCACTCTCCATTGATATTAGCTTGTGTGGTTCAACTCTTAGAGCACCAT
AGCTGTCACCTTAAGTATATGGAGAACATGAAGTTCGATTGCATCTCTTGTGCTGCTGTTGTGGTCAATGAAATGAAGAG
GATGATGAACCCGAGCCTGAACAACACCACAACAGCAGAAGAAGAAGAGGCTGTGGGGTCTCATTGTTGCCACCATGA
GAGCCCCAGATATGTCCCGTTCCACTGCGGTATGCCGTGTAATTCTTGGCCCAAGTGTTTGTGCTGTCATGTAACAAGGA
GTTTGAATTGGAGAAGCAGATACGAGAGAAAAACATTCTGCGAATGCAAAACATGCTCTGACATGCTGTTCAAGGAAT
CATCTCCCTTGAGTATCGTGCTGGGAGTCCAAATATCATGGACCTAGTTAAGTGTGATGGCGCTGCTCTTTTGTATGGGA
CAAAGTATGGCGGCTTCAAACGGCTCCAACCGAGTCTCAGATTCGTGATATTGCCCTTCTGGCTTTCAGAAAGTTCATGGGA
TTCCACTGGCTTGAGTACTGATAGCCTCCAGGATGCTGGATATCCAGGAGCTGCTTCCCTTGGTGACATGATTGTGGAATG
GCAGTGGCCAAGATCAGTCCAAGGACATTCTTTTCTGGTTCAAGTCAATACAGCTGCTGAAATCAAATGGGGAGGTGCA
AAGCATGATCCATCTGATAAGGATGACAACAGAAGGATGCACCCTAGGTTATCCTTTAAGGCTTTCCTTGAGGTTGTCAAG
ACGAAGAGTTTGGCATGGAGTGACTACGAGATGGATGCTATTCACTCATTGCAGCTTATTCTTAGAGGTACACTGAATGAT
GCCTCGAAGCCAGCCAGGCATCTGGTTAGATAACCAGATCGGTGATCTAAAACCTGATGGGCTTGTGTAATTGCAAGCA
GTGACAAGTGAAATGGTCCGCCTGATGGAACAGCAACTGTCCGATCTTGGCAGTAGATGGCAATGGATTGGTCAATGG
ATGGAACCAAAAGGTAGCGAGTTGTGAGGCTGAGAGTTGATGAGGCTATAGGAAGACACATACTTACACTTGTGGAGG
ATTCTTCTGTATCACTTGTTCAGAGGATGCTATATTTAGCTCTGCAAGGTGAGTGGAAGTAAAGGTTTTAAGCACCTTTACTGT
CTGCACCAATTAATTAATACTTCTTACTGTTAATAGTCAACCCCTCAGAAAAAATGAATAAATTTATGTATTACGATTGGTTTCTGAATA
TTTCATCAATTGAGCAGGCAGAGAAGAGAAGGAAGTTGATTTGAGCTGAAAACACATGGCTCCAAGAGGGATGATGGCCC
TGTTATCTTGGTCGTAATGCTTGTGCCAGTGGTGATCTTCATGACCATGTTGTTGGGGTGTGCTTTGTAGCCAGGACATG
ACTGTTCAACAAGTTGGTCATGGACAAATTTACTCGGGTCGAGGGGGACTACAAGGCAATCATCCACAACCCGAACCCACT
CATTCTCCTATATTTGGTGCTGACCAGTTTGGATGGTGCTCTGAGTGGAATGCAGCCATGACCAAGCTTACCGGGTGGCA
CAGAGATGAAGTGGTTGATAAGATGCTCCTTGCCGAGGTTTTTAACAGCAGCAATGCTTCCTGCCTTCTGAAGAGCAAAGA
TGCTTTGTACGCTTTGCATTGTCATCAACAGTGCAATTAGCTGGTGGAAGGCGAGAAAAAGGCTTCATTCCGCTTCTTTGAC
CGCAATGAGAAATATGTCGAATGCCTTCTGTCCGTGAACAGGAAAGTAAATGCAGATGGTGTGTCACTGGAGTGTTCTGT
TTTCATCCATGTTCTAGTGATGACCTGCAGCATGCGCTACATGTGCAGCAAGCCTCTGAGCAGACAGCACAAGAAAGTTG
AAGGCTTTCTCGTACATGCGACATGCCATCAACAAACCTCTCTCAGGTATGCTTTATTCTAGGGAAACACTCAAGAGCACA
GGTCTGAATGAAGAGCAGATGAGGCAGGTTCCGCTCGGAGACAATTGCCATCGCCAGCTAAACAAGATACTTGGCGACTT
GGATCAAGATAACATCACTGACAAGTAACCTTCTTGCCAAAGTCTTTAAACCTGTTCTATTAGGTTCTGTATTATTTCGGTCTTC
TCGTAATTGACAATTTTCTGAACAGTAGGTTGATGGTATCACTTAATTTTACTTCACIAGCTACGAAGCTTATAGCCATATTCTGTTAC
AACCAACTTAATATTTCTGTATCATTATGTTACAGGTTCAAGCTGCTTGGATTGGATATGGCTGAATTTGTGTGCAAGATGTG
GTGGTGTCTGCTGTAAGTCAAGTGCTGATAGGTTGCCAGGCTAAAGGTATCAGAGTTGCTTGCAACCTGCCAGAGAGATCC
ATGAAGCAAAAGGTTTACGGGGATGGTATCCGACTCCAGCAGATCGTCTCCGACTTCTATTTGTTTCGGTGAAGTTCTCTC
CTGCTGGTGGCTCTGTTGACATCTCTTCCAAGCTGACTAAGAACAGCATGGGGAAAACCTTCACCTCATAGACTTCGAAC
TTAGGTATGCTGGGCATGCTAGTTTGCAAGCATACATTCATTTCTGAACCTGGAAAGCATGAGGTGTGAAGGCTTAAGTTAC
TCTTGTGTTATGCTTTATGATTTTCAGGATCAAGCACCGAGGAGCAGGAGTCCCAACCGAAATATTGTCGCAAAATGTAT
GAGGAGGACAATAAAGAGCAGTCAGAGGAGGGCTTCAGCCTTGCTGTTTCTAGAAACCTTCTGAGGCTCATGAATGGTGA

图 1

CATCCGTCACCTCAGGGAAGCTGGCATGTCAACCTTCATTCTCACTGCTGAACTTGCTGCTGCTCCTTCAGCAGTTGGACGA
TGATGAATCGATGAC

注：在ZmPHYA序列中非编码序列（内含子）以斜体突出。用于
ZmPHYA蛋白质翻译的起始密码子（ATG）和终止密码子（TGA）被放大。

图 1(续)

SEQ ID NO: 136及其同源物的共有序列

SEQ ID NO

```

7669 -----
3429  MPGMEY-----GNKSHTRATIRRGEMKIYPEHNAGDAEDNGDESGVVNGKIL
8564 -----
136 -----
7856 -----
5562 -----
8365 -----
5927 -----
2547 -----
5459 -----

```

共有序列

```

-----MSISQFPPPPASPPASSSRSLASSSPSPGFSFSSMRLW
RRYRPWNVRLCRRRLPWIVHRRSVPTFPPPPASPPASSSRSLASSSPSPGFSFSSMRLW
-----MSISQFPPPPASPPASSSRSLASSSPSPGFSFSSMRLW
-----METSATPTRPPHQAATSPSPSPSSSLRLW
-----METSATPTRPPHQAATSPSPSPSSSLRLW
-----METSATPTRPPHQAATSPSPSPSSSLRLW
-----METSATPTRPPHQAATSPSPSPSSSLRLW
-----MEATPTRPPHQAATSPSPSPSSSLRLW
-----MEATPTRPPHQAATSPSPSPSSSLRLW
-----GLQEFGTSPTPSPLSLRQW
-----
-----XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXSSSSXRLW

```

```

RPAAQRNLRNQWSNLSNCRQQWIVACSAGRSHATLLVNSYLSQKYMPPMELGVLSDMFDI
RPAAQRNLRNQWSNLSNCRQQWIVACSAGRSHATLLVNSYLSQKYMPPMELGVLSDMFDI
RPAAQRNLRNQWSNLSNCRQQWIVACSAGRSHATLLVNSYLSQKYMPPMELGVLSDMFDI
RPAAQRNMRNQWSHLAAKEQWLAADVADGRAHASALVNVHLSCRNMPTMDLGVLKDMPGI
RPAAQRNMRNQWSHLAAKEQWLAADVADGRAHASALVNVHLSCRNMPTMDLGVLKDMPGI
RPAAQRNMRNQWSHLAAKEQWLAADVADGRAHASALVNVHLSCRNMPTMDLGVLKDMPGI
RPAAQRNMRNQWSHLAAKEQWLAADVADGRAHASALVNVHLSCRNMPTMDLGVLKDMXGI
RPAAQRNLRNQWSRLAAAKAR-----YMPGMDLGVLKDMPGI
RPAAQRNLRNQWSRLAAKTQWLDAAASGRSHAAXLVNAYLSRSYMPGMDLGVLKDIPRI
-----
rpaaqrnxrnqwsx1sxxxxqwxaxxxgrxhaxxlvnxx1sxxxmpxmxlgv1xdmxxi

```

```

DKKALKKLFTQSSYRIKLLSSYKEMVAVVVEMVNASRSLRCYTKLSTG-SLIQFSGTKE
DKKALKKLFTQSSYRIKLLSSYKEMVAVVVEMVNASRSLRCYTKLSTG-SLIQFSGTKE
DKKALKKLFTQSSYRIKLLSSYKEMVAVVVEMVNASRSLRCYTKLSTG-SLIQFSGTKE
RDKANSKLALREEQYSGMLLSAYKEMVRQLSYLVEASHSMRRFSKAAPNCPITQFSDRQD
RDKANSKLALREEQYSGMLLSAYKEMVRQLSYLVEASHSMRRFSKAAPNCPITQFSDRQD
RDKANSKLALREEQYSGMLLSAYKEMVRQLSYLVEASHSMRCFSKAAPNCSITQFSDRQD
RDKANSKLALREEQYSGMLLSAYKEMVRQLSYLVEASHSMRRFSKAAPNCPITQFSDRQD
REKASGKLARREEQCQSMLLSAYREMVLTAEVLVRAASHMRCFSKVAANSPLIRFETERQD
RDRASAKLXTRRCNAREMLLSAYKEMVCAMSDLVKASHAMRCFSKVSSGSPLVRFTDRQD
-----LQVGIVSDMINVSRSMKCFKGSNNSSLLHFSYNSA
xxkaxxklxxxxxyxxx11sxykemVxxxxxxvxaSxsmrcfxKxxxxxxxqFxxxx

```

图 2

DSNdagDCGGIPVFNFWNVSAFEKMAEELVEMFKREVMLK---RLLIMELISLSTEVPPQ
 DSNdagDCGGIPVFNFWNVSAFEKMAEELVEMFKREVMLK---RLLIMELISLSTEVPPQ
 DSNdagDCGGIPFGTCHVEMIPKMAEELVEMFKREVMLK---RLLIMELISLSTEVPPQ
 NLNDsgDGGGAPVFKWFSVLEFESLAQELVQMFVSEQKLK-RLLLLLEFLSIALKEGVELQ
 NLNDsgDGGGAPVFKWFSVLEFESLAQELVQMFVSEQKLK-RLLLLLEFLSIALXEGVELQ
 NLNDsgDGGGAPVFKWFSVLEFESLAQELVQMFVSEQKLKXRLLLLEFLSIALKEGVELQ
 NLNDsgDGGGAPVFKWFSVLEFESLAQELVQMFVSEQKLK-RLLLLLEFLSIALKEGVELQ
 DMNDsgDGGGSPVFKWFSVLEFENLAQELVDMF-ISELQLKRLLVLELLSVTFKEGVQHD
 DLNDLGDGGGAPVHRWVSMLEFENLAKELVEMFXVSELRLKRLIVLDLLSINLKEG--AD
 DQSDsgDGGGIPAFFYFYSITSHEKFAX-----FSMELCLK---RLLVLEFMSISYDTSAV
 xxnDxGDgGgPvfxxxxsvxxfExxAxelvxmFxxexx1k-xxxlLxxxxixlxxxxvxxx

INNSWSDELYHGEFDHLTKCSLYSMEVAKPVLPRVKDYNIGSSSISHTNQPTAEILQIYL
 INNSWSDELYHGEFDHLTKCSLYSMEVAKPVLPRVKDYNIGSSSISHTNQPTAEILQIYL
 INNSWSDELYHGEFDHLTKCSLYSMEVAKPVLPRVKDYNIGSSSISHTNQPTAEILQIYL
 TSLNWGDELYDGESNKLQSIGLQSGDAYSPPENWCAERLGSQR---PGNPLHEVLQVYL
 TSLNWGDELYD-----ERLGSQR---PGNPLHEVLQVYL
 TSLNWGDELYDGESNKLQSIGLQSGDAYSPPENWCAERLGSQR---PGNPLHEVLQVYL
 TSLNWGDELYDGESNKLQSIGLQSGDAYSPPENWCAERLGSQR---PGNPLHEVLQVYL
 ASLEWSNELFDGEFNEFQSIGLLSGDSYALPKNWSAGVSKAWQ---PDQTPSHEVLQVYL
 PSLEWSDELYDGEFNEFQRIGLSGDSFPLPENWKADVLQARR---PGHTPSHEVLQVYL
 KQLHWSTQLYDDEFKDLRDCNLYCVVTHGPVPPRLRDGKSGIDALRFDNQPNPEVLQVYL
 xx1xWxdeLydgexxlxxxxlxsxmxxxxpxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxPxxEvLQvYL

TTWLAEVNIDTHRVDAILALVGEEIRVTF-
 TTWLAEVNIDTHRVDAILALVGEEIRVTF-
 TTWLAEVNIDTHRVDAILALVGEEIRVTF-
 TTWHANMNINRSRIDEIFELVEEEMKIKLS*
 TTWHANMNINX-EIDEIFELVEEEMKIKLS*
 TTWHANMNINRSRIGEIFELVEEEMKIKLS*
 TTWHANMNINRSRIDEIFELVEEEMKIKLS*
 TSWLANVNIKTSRIDEIFELVGEEMQIKLS*
 TSWLANVNIKTSRIDEIFELVEEEMQIKLR*
 TTWLAEVNMSLPSMIAMKFIL-----*
 TtWxAxxNixxxrxdeiixlvxeexxxxxx*

图 2(续)

SEQ ID NO: 151及其同源物的共有序列

```

SEQ ID NO
151 -----
5495 -----
6475 -----
9700 -----
2063 -----MGSEAAAARPVVTVNGERYEAVGVDPSTTLLEFLRTRT
10020 -----MGSEAAAARPVVTVNGERYEAVGVDPSTTLLEFLRTRT
2024 -----
2060 -----MGSEAAAAARVVAVNGERYEAVGVDPSTTLLEFLRTRT
7076 -----MGEAAAVVAVNGERYEAVGVDPSTTLLEFLRTRT
2606 -----
3946 MDSPPPPREEVVVFAVNSERFELRRDGGDPGESLLEFLRSRTRFTGAKLGC GEGKATPQP
496 -----MSDCNSGGGERRPNARATDAPP
共有序列 -----XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

```

```

-----
-----
-----
PVRGPKLGC GEGGCGACVVVSKYDAVADEVTEFSASSCLTLLGSLHHCAVTTSEIGNS
PVRGPKLGC GEGGCGACVVVSKYDAVADEVTEFSASSCLTLLGSLHHCAVTTSEIGNS
-----
PVRGPKLGC GEGGCGACVVVSKYDAVADEVTEFSASSCLTLLGSLHHCAVTTSEIGNS
PVRGPKLGC GEGGCGACVVVSKYDAVADEVTEFSASSCLTLLGSLHHCAVTTSEIGNS
-----
TALPPPRLLCFRGCGACVVVVSAYDAEAEDEVAAVSSCLTLARGLHHRAVTTTEGLGSS
VRAPSGGAFRRCRGCGACVILIAYNPKTDEVTEFNASSCLTLLYSIHFCSIITTEGLGNT
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

```

```

-----
-----
-----
RDGFHAVQRRLSGFHASQCGFCTPGMCMSIYSALAKADRCSSRPSPPP----GFSKLTAA
RDGFHAVQRRLSGFHASQCGFCTPGMCMSIYSALAKADRCSSRPSPPP----GFSKLTAA
-----
RDGFHAVQRRLSGFHASQCGFCTPGMCMSIYSALAKADKASGRPAPT----GFSKITAA
RDGFHPVQRRLAGFHASQCGFCTPGMCVSIYSALANADRAASAAPPPPTPPGFSRLTAA
-----
RRGLHALHERLAGFHASQCGFCTPGVCMSLAGALAAE---GNGKKAASAAEGFSRLTAA
KDGFHAIQKRMSGFHASQCGFCTPGMCMSIFSSLVNAD---KSKKPD--PKGFSKLSVS
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX--XXXXXXX

```

图 3

EAEKAVSGNLCRCTGYRPIVDACKSFAADVDLEDLGLNAFWKKGADDERADVGLPAYSG
EAEKAVSGNLCRCTGYRPIVDACKSFAADVDLEDLGLNAFWKKGADDERADVGLPAYSG

EAEKAVSGNLCRCTGYRPIVDACKSFAADVDLEDLGLNAFWKKGVDDHADINKLPAYSG
DAERAVSGNLCRCTGYRPILDACKSFAADVDLEDLGLNSFWKK---GERADITKLPAYSC

EAERAVAGNLCRCTGYRPIADACKSFAADVDLEDLGLNCFWNKGDATAVS SKLPYKERS
EAERSFSGNMCRCCTGYRPIVDACKSFASDVLEDLGLNIFWKKGDKHPDPTKLP---SYT
XX

GAAVCTFPEFLKSEIRSSMGQANGGAPAVAVTGDGWFHPKSVVEEFHRLFDSNLFDEERSVK
GAAVCTFPEFLKSEIRSSMGQANGGAPAVAVTGDGWFHPKSVVEEFHRLFDSNLFDEERSVK

GAAVCTFPEFLKSEIRSSMGQANGDTSAVVVTGDGWFHPKSVVEEFHRLFDSNLFDEERSVK
TADVATFPEFLKSEIRSSG---GAPAVAVTGDGWFHPRSIIEEFHRLFECNLFDEMSVK

IAAFPEFLKDEIRSSLGIDHSISSASMVGSVSSWYQPKNVEEYKYLIGSLSSSSDKSRTK
LGGGICTFPDFLKSEIKSSIDFNDAISSPREGWYCPKNIKQYYKLVN--SGLFSESSVK
XX

IVASNTGSGVYKDQDLHDKYINISQILELSAINRSSKGVEIGAVVSIS-----KAIEIL
IVASNTGSGVYKDQDLHDKYINISQILELSAINRSSKGVEIGAVVSIS-----KAIEIL

IVASNTGSGVYKDQDLHDKYINISQIPELSAINRSSKGVEIGAVVSIS-----QAIDIL
IVASNTGSGVYKDQDLHDKYINISQIPELSAINRSSNGIEIGA AVSIS-----KAIEIL

VVVGNTSSGVYRDAELYDRYIDLRAIPELNSVSKDVKGVGIGAAMSISQVIEILRGEGNS
VVVGNTSTGVYKDQDLYDKYIDIAGIPELSAIVRKDKGIEIGAATSISRTIEILNQESSES
XX--XXXXXX

SDGG---AVFRKIADHLSKVASSFVQNTATIGGNIIMAQRLSFPSDIATVLLAAGSTVTI
SDGG---AVFRKIADHLSKVASSFVQNTAAIGGNIIMAQRLSFPSDIATVLLAAGSTVTI

SDGG---AVFRKIADHLSKVASPFVRNTATIGGNIIMAQRLSFSSDIATVLLAAGSTVTI
RSDGGDAVFRKIAYHLGKVASPFVRNTATIGGNIIMAQRMSPPSDIATVLLAAGSTVTI

YKD---VVFCKIADHMEKVASQFVRNMA SLGGNLIMAQRDEFASDIATVLLAAGSSLCI
TSSPNGSVVFRKLAEHMSKVASPFVRNTASIGGNIILAHKYPFRSDIATILLGAATVNL
XXXX--XX

图 3(续)

QVAAKR-MCITLEEFLKQPPCDSRTLLVSIS-----IPDWGSDDGITFE
QVAAKR-MCITLEEFLKQPPCDSRTLLVSIS-----IPDWGSDDGITFE

QVAAKR-MCITLEEFLKQPPCDSRTLLVSIS-----IPDWGSDDGITFQ
QQVASKRMCLTLEEFLKQPPCDSRTLLISIS-----IPDWCSYDGITFE

QVSSERMNVTLERFLDMAPCDCKTLLRIYIPHCTPSGISSSSESVNKTGDKPASSVLFE
QVSSKTLHVTLEQFLEQPPPLGHNTLLSIFIPHWAS-----DCKKEHTLVFE
xxxxxx-xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx-----xxxxxxxxxxxxxx

SFRAAPRPLGNAVSYVNSAFLARSSVDGSSGSHLIEDVCLAFGAFGAEHAIRAREVEEFL
SFRAAPRPLGNAVSYVNSAFLARSSVDGSSGSHLIEDVCLAFGAFGAEHAIRAREVEEFL

TFRAAPRPLGNAVSYVNSAFLARSSVDGSSGSHLIEDVCLAFGPFPAKHAIRAREVEKFL
TFRAAPRPLGNAVSYVNSAFLARSSLDAAAGSHLIEDVRLAFGAFGSEHAIRASKVEEFL

TYRASPRPIGNAVSYLNSAFLAKLSSDETSGNCILEKLCLAFGAYGTQHAVRATNVESLL
TYRAAPRPLGNAVSYVNSAFLGHVSLDKSSGDNILSNLHLAFGAYGTEHAIRARKVEEYL
xx

KGKLVSA PVILEAVRLLKGVVSPAEGTTHPEYRVSLAVSYLFRFLTSLAN-----
KGKLVSA PVILEAVRLLKGVVSPAEGTTHPEYRVSLAVSYLFRFLTSLAN-----

KGKLVSA PVILEAVRLLKGVVSPAEGTTHPEYRVSLAVSYLFRFLTSLTN-----
KGKLVSA PVILEAVRLLKGVVSPAEGTTHPEYRVSLAVSYLFRFLTSLAN-----

VGKPITASLLLEACTVLKKTIVPGEGRHAAYRSSLAFLFSFLYPITKGTFKPVEAVH
TGKILSASVVLEAIRLLRETIVPEGTTHPEYRVSVAVGFLFSFLSPLCKGVIEPGKTL
xx

--GLDEPENANVPNGSCTNGTANGSANSSPEKHSNVDSSDLPIKSRQEMVFSDEYKPVGK
--GLDEPENANVPNGSCTNGTANGSANSSPEKHSNVDSSDLPIKSRQEMVFSDEYKPVGK

--GLDEPENANVPNGSFTNGTANGIVDSSPEKHSNVDSSYLPIKSRQEMVFSDEYRPIGK
--GLDDKPEN--ANNVPNGSCTTNGTTNGSAESTVDSFDLPIKSRQEMVFSDEYKPVGK

LNHGIISDNNGNMNRGPDTHVDVSPKEINNVSDDLHGNDRILESSKQVIEISEDYLPVGL
ISEDLVHTDNVHN-----MPLSSRRETLSGDEYKPVGD
--xx

图 3(续)

PIEKTGAELQASGEAVYVDDIPAPKDCLYGAFIYSTHPHAHIKDINFRSSLASQKVITVI
PIEKTGAELQASGEAVYVDDIPAPKDCLYGAFIYSTHPHAHIKDINFRSSLASQKVITVI

PIEKTGAELQASGEAVYVDDISAPKDCLYGAFIYSTHPHAHIKGVNFRSSLASQKVITVI
PIKKVGAELOASGEAVYVDDIPAPKDCLYGAFIYSTHPHAHIKGVNFRSSLASQKVITVI

PAKKVGAELOASGEAIYVDDIPSPKDCLHGAFVYSTKPLAHVKSIELNPSLEQLKTVAIV
PIKKYKVELQASGEAIYVDDIPAPKNCLYGEFIYSTQPLANVKSIFKPSLASKKILTUV
XX

TAKDIPTGGENIGSCFPMLGDEALFVHPVSEFAGQNIQGVVIAETQKYAYMAAKQAVIEYS
TAKDIPTGGENIGSCFPMLGDEALFVHPVSEFAGQNIQGVVIAETQKYAYMAAKQAVIEYS

TLKDIPTNGKNIGSCSPMLGDEALFVDPVSEFAGQNIQGVVIAETQKYAYMAAKQSVIEYS
TAKDIPTGGENIGSCFPMLGDEALFADPVAEFAGQNIQGVVIAETQKYAYMAAKQAVIEYN

TAKDIPKGGSNVGANTIIFGPE-PLFGDPLTQWAGEPLGIVVIAETQKTANIAASRALVDYS
SAKDIPGGRNIGSTFLFGDEEPLFGDPIAEFAGQALGVVIAETQRYADMAAKQAVVEYT
XX

TENLQPPILTIEDAVQHNSYFPVPPFLAPTPIGDFNQAMSEADHKIIDGEVKLESQYYFY
TENLQPPILTIEDAVQHNSYFPVPPFLAPTPIGDFNQAMSEADHKIIDGEVKLESQYYFY

TENLQPPILTIEDAVQHNSYFQVPPFLAPTPIGEFNQAMSEADHKIIDGEVKLESQYYFY
TENLQPPILTIEDAVQHNSYFQVPPFLQPKPIGDFNQAMSEADHKIIDGEVKLSQYYFY

MENLDAPILSIEEAVRSSSYFEILPFLLPQKIGDFSKGMEEADQKIYSTEVNLSQYYFY
TDGLKAPILTVEQAVQNNSYFQVPPERAPKQVGDFSKGMAEADHKIMSEEVKLASQYYFY
XX

METQTALAIPEEDNCITLYVSAQLPEITQNTVARCLGIPYHNVRIITRRVGGGFGGKAMK
METQTALAIPEEDNCITLYVSAQLPEITQNTVARCLGIPYHNVRIITRRVGGGFGGKAMK

METQTALAIPEEDNCITLYVSAQLPEITQNTVARCLGIPYHNVRIITRRVGGGFGGKAMK
METQTALAIPEEDNCITLYVSAQMPEVTQDIVARCLGVPFHNVRRIITRRVGGGFGGKAMK

METQTALAIPEEDNCMVVYSSSQCEVAQETIAKCLGLPCHNVRIITRRVGGGFGGKAVR
METQTALAIPEEDNTMTVYSSSQFPELAQNVISKCLGIPFNNVRRIITRRVGGGFGGKAVR
XX

图 3(续)

AIHVAAACAVAAFKLRRPVRMYLDRKTDIMAGGRHPMKVKYSVGFKSDGKITGLHFDLG
AIHVAAACAVAAFKLRRPVRMYLDRKTDIMAGGRHPMKVKYSVGFKSDGKITGLHFDLG

AIHVATACAVAAFKLRRPVRMYLDRKTDIMAGGRHPMKVKYSVGFKSDGKITGLHVDLR
ATHVATACAVAAFKLRRPVRMYLDRKTDIMAGGRHPMKAKYSVGFKSDGKITALHLDLK

SLPVATACALSAFKLQRPVRIYLDKTDIMTGGRRHPMKIRYSVGFKSDGNITALHIELL
SLHIATAAALCAHTLRRPVRMYLNRNTDMMVGGRRHPMKARYSVGFKSDGKITALHLDLL
XX

-----VTILNKFVQKSRLVPVRNSRDIVDPR
MNGGISPD CSPVLPVAIVGALKKYNWGALSFDIKVCKTNVSSKSAMRAPGDAQGSFIAEA
MNGGISPD CSPVLPVAIVGALKKYNWGALSFDIKVCKTNVSSKSAMRAPGDAQGSFIAEA

INCGISPD CSPALPVAIVGALKKYNWGALSFDIKLCKTNVSSKSAMRAPGDAQGSFIAEA
INAGISPEFSPAIPYAIVGALKKYSWGALAFDIKVCKTNVSSKSAMRAPGDAQGSFIAEA

VNAGITQDVSPVIPHNFIEALKKYNWGAFSYDARICKTNIATRSAMRGPGEVQGSYVAEA
INAGISADASPVIPGTIISGLKKYNWGALSFDVKLCKTNNTSKSVMRAPGDTQGSFIAEA
XX

IREHVASALGADTNAVRRKNLHVESLTKFYGDAAG---DAPTYSLIDIFDKLASSPEYR
IVEHIASTLSVDTNAIRRKNLHDFESLKVFGNSAG---DPSTYSLVTIFDKLASSPEYQ
IVEHIASTLSVDTNAIRRKNLHDFESLKVFGNSAG---DPSTYSLVTIFDKLASSPEYQ

IVEHIASTLSVDTNAIRRKNLHDFESLKVFGNSAG---DPSTYSLVTIFDKLASSPEYQ
IVEHVASTLSVATNTIRRKNLHDFESLKVFFGDSAAGEASTSSYSLVIIFDRLASTPEYQ

IIEHVAAVLSTDVNLVRQRLHTVESLSLYHS---ECMEDALGYTLPSICNQLITSANYQ
IIEHVAAILSLDANTVRQKNFHTYDSLVLFP---DSAGESSTYTLHSIFDRLASTRYL
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX--XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

SRAEAVRFNGGSRWKKRGISCVPIITYEVALRPTPGKVSILNDGSI AVEVGGVELGQGLY
QRAAMVEHFNAGNRWKKRGISCVPIITYDVRLRPTPGKVSIMNDGSI AVEVGGVEIGQGLW
QRAAMVEHFNAGNRWKKRGISCVPIITYDVRLRPTPGKVSIMNDGSI AVEVGGVEIGQGLW

QRAAVVEHFNAGSRWKKRGISCVPIITYDVRLRPSPGKVSIMNDGSI AVEVGGVEIGQGLW
RRAAMVEQFNGSSRWKKRGISCVPIITYSVTLRPSPGKVSILNDGSI AVEVGGVEIGQGLW

HQLEMIRSFNKS NRWKKRGLSVVPIVHKFASRPTPGKVSILNDGSI AVEVGGIELGQGLW
QRVESIKKFNSTNKWRKRGISSVPLIFKVEPRPAPGRVSVLNDGSI VVEVGGVELGQGLW
XX

图 3(续)

```

-----
-----
-----
TKVKQMTAFGLRELCPDADG-LLDKVRVIQADTLSLIQGSFTGGSTTSESSCEAVRQSCT
TKVKQMTAFALGQLCDDGGEGGLIDKVRVIQADTLSMIQQGFTGGSTTSETSCAVRKSCA
TKVKQMTAFALGQLCDDGGEGGLIDKVRVIQADTLSMIQQGFTGGSTTSETSCAVRKSCA
-----
TKVKQMTAFALGQLCDDGGEGGLLDKVRVIQADTLSMIQQGFTGGSTTSETSCAVRKSCA
TKVKQMTAFALGQLCDDGGEGGLDNVRVIQADTLSMIQQGWTAGSTTSETSCAVRKSCA
-----
TKVKQMAAFGLGQLWTDRRQELLERVRIIQADTLSVIQQGWTGSTTSESSCEAVHRACN
TKVQMTAFALGQLWPKGCEGLLDRIQSDTLNLIQGGTAGSTTSESSCAATLQACN
xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

```

```

-----
-----
-----
VLFERLKPIKDSLEAGPGAAAPWSALIAQAKMASVNLASAHAYWKPGPAFRKIHPTGAAY
ALVERLKPIKEKAGTPPWKSLIAQASMASVKLTEHAYWTPDPTFTSYLN-----YGAAI
ALVERLKPIKEKAGTPPWKSLIAQASMASVKLTEHAYWTPDPTFTSYLN-----YGAAI
-----
ALVERLKPIKEKAGTLPWKSLIAQASMASVKLTEHAYWTPDPTFTSYLN-----YGAAI
ALVERLKPIKEKAGTLPWKSFIAQASMASVKLTEHAYWTPDPTFTSYMN-----YGAAT
-----
ILVDRLKPLKEQLQEK--QGTVSWDELISQAKMVGVDLSAKELYVPG-ASGSYLNLYGAAA
MLIERLKPVMERLQLQ--SDTVSWDTLISQASQENINLSASAYWVPEQDSNFYLNLYGAGT
xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

```

```

-----
-----
-----
-----SAFIQGVXFFTNEYATNSDGLV
-----TGATTIMRSDLVYDCGQSLNPAVDLGQVEGAFVQGVGFFTNEYATNADGLV
SEVEIDVLTGATTIMRSDLVYDCGQSLNPAVDLGQVEGAFVQGVGFFTNEYATNADGLV
SEVEVDVLTGETTILRSDLVYDCGQSLNPAVDLGQVEGAFVQGVGFFTNEYATTNSDGLV
SEVEVDVLTGETTILRSDLVYDCGQSLNPAVDLGQVEGAFVQGVGFFTNEYATTNSDGLV
-----
SEVEVDVLTGETTILRSDLVYDCGQSLNPAVDLGQVEGAFVQGVGFFTNEYATTNSDGLV
SEVEVDVLTGATTILRSDLVYDCGQSLNPAVDLGQVEGAFVQGVGFFTNEYATNADGLV
-----QTDILYDSGKSLNPAVDLGQIEGAFVQGLGFFMLEEYITDSEGLR
SEVEIDLLTGATTILRSDLIYDCGRSLNPAVDLGQVEGAFVQGVGFFTNEYVTNSDGLL
SEVEVDLLTGAITIIIRSDLIYDCGKSLNPAVDLGQIEGSFIQIGFFIYEEHQTNDSGLV
xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxdxxydxgxslnpavdlgqxeqafxqgxfxxexytnxdglx

```

```

-----
-----
-----
-----MREAIR
IHDGTWYKIPTVDTI PKQFNVELINSAHDQKRVLSSKASGEPPLLLASSVHCAMREAIR
VHDGTWYKIPTVDTI PKQFNVELISSARENKRVLSSKASGEPPLLLAASVHCAMREAIR
VNDGTWYKIPTVDTI PKQFNVELISSARDKKRVLSSKASGEPPLLLAASVHCAMREAIR
INDGTWYKIPTVDTI PKQFNVELINSARDHKRVLSSKASGEPPLLLASSVHCAMREAIR
INDGTWYKIPTVDTI PKQFNVELINSARDHKRVLSSKASGEPPLLLASSVHCAMREAIR
-----ARDHKGVLSSKSGKFPPLLLGLSVHCPIREAIR
INDGTWYKIPTVDTI PKQFNVELINSARDHKRVLSSKASGEPPLLLASSVHCAMREAIR
IHDGTWYKIPTVDTI PKQFNVELINTARHHSRVLSSKASGEPPLLLASSVHCAMREAIR
LTDSTWYKIPTVDTI PRQFNVEILNSGRHEKRVLSSKASGEPPLLLAASVHCATREAVK
VSDGTWYKIPTVDTI PKQFNKLLNSGFHKKRVLSSKASGEPPLLLAASVHCATREAIR
ISNSTWDYKIPSVDTI PKQFNAEVLNTGYHKKRVLSSKASGEPAVVLGASVHCAREAIR
xxdxtwttykiptvdtipkqfnvexxxxxxxxxkrvlsskasgepplllaxsvhcaxREAIR

```

图 3(续)

AARKEFSVCTGP---ANSAITFQMDVPATMPVVKELCGLDVVERYLESVSAASPTNTAKA
AARKEFSVCTGP---ANSTITFQMDVPATMPIIKELCGLDVVERYLESMSAASPTATAQA
AARTDFSVNS-----PLTFQMDVPATMADVKELCGLDVVERHLQSLSSAAEVPTPVA
AARTDFSVNS-----PLTFQMDVPATMADVKELCGLDVVERHLQSLSSAAEVPTPVA
AARKEFAGAGG-----SPLTFQMDVPATMPIVKELCGLDVVERYLESFAAKA-----
AARKEFAGAGG-----SPLTFQMDVPATMPIVKELCGLDVVERYLESFAAKA-----
AARKEFPGAGG-----FPLTFQMDVPATMPIVKELCGLDVVEKYFESFAAKA-----
AARKEFAGAGG-----SSLTFQMDVPATMPIVKELCGLDVVERDLESFAAKA-----
AARREFAAVGGGTGGSDQVTSFQMDVPATMPAVKELCGLDVVERYLESFSATTA-----
EARKQLRMWKG---VNDELMTFQLPVPATMPVVKELCGLDIVESYLEWPPSVN-----
AAREEYHCSR----SGSSPPFFDLEVPAIMPTVKELCGLDNVEKYLESIKSK-----
AARIEFAGNNG---SGSSLLTFQLDVPAPMTVVVKELCGLDIVEKYLEDLNIRGAASGN--
aARxefxxxxg---xxxxxxtFqmdVPAtMpxvKELCGLDvVExylesxxxxxxxxxxxxx

图 3(续)