



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0113792-1 B1



(22) Data do Depósito: 30/08/2001

(45) Data de Concessão: 17/11/2020

(54) Título: MÉTODO E VETOR PARA MANIPULAR O ENVELHECIMENTO DE UMA PLANTA

(51) Int.Cl.: C12N 15/11; C12N 15/63; A01H 1/00; A01H 3/00; A01H 5/00.

(30) Prioridade Unionista: 06/09/2000 AU PQ 9946.

(73) Titular(es): AGRICULTURE VICTORIA SERVICES PTY LTD; LA TROBE UNIVERSITY.

(72) Inventor(es): GERMAN SPANGENBERG; YIN HAN LIN; ROGER W. PARISH; SONG FENG LI; JOSHUA HEAZLEWOOD; CHARLES K. PALLAGHY.

(86) Pedido PCT: PCT AU2001001092 de 30/08/2001

(87) Publicação PCT: WO 2002/020772 de 14/03/2002

(85) Data do Início da Fase Nacional: 28/02/2003

(57) Resumo: MANIPULAÇÃO DO ENVELHECIMENTO DE PLANTAS USANDO UM PROMOTOR DO GENE MYB E GENES DA BIOSÍNTESE DE CITOQUININA". Refere-se o presente invento a métodos de manipulação do envelhecimento em plantas. O presente invento também se refere a vetores utilizáveis em tais métodos, a plantas transformadas com características de envelhecimento modificadas, e às células, sementes e outras partes de tais plantas.

MÉTODO E VETOR PARA MANIPULAR O ENVELHECIMENTO DE UMA PLANTA

[001] Refere-se o presente invento a métodos de manipulação do envelhecimento em plantas. O presente invento também se refere a vetores úteis em tais métodos, às plantas transformadas com características modificadas de envelhecimento e às células, sementes e outras partes de tais plantas.

[002] O envelhecimento das folhas envolve mudanças metabólicas e estruturais nas células antes da morte das mesmas. Também envolve a reciclagem de nutrientes para regiões de crescimento ativo.

[003] A regulação do envelhecimento da planta ou de seus órgãos por citoquininas tem conseqüências agrícolas importantes. Elevados níveis de citoquinina nas folhas tendem a retardar o envelhecimento. Vários promotores têm sido usados para regular a expressão do gene *ipt*, cujo produto (isopenteniltransferase) catalisa uma etapa chave na síntese da citoquinina. Entretanto, em geral, tem sido relatado que plantas transgênicas que expressam o gene *ipt* em maior quantidade apresentam um crescimento retardado de raízes e de brotos, nenhuma formação de raízes, domínio apical reduzido, e área de folhagem reduzida.

[004] Consiste um objetivo do presente invento superar, ou pelo menos aliviar, uma ou mais das dificuldades ou deficiências associadas com o estado da técnica.

[005] Em um aspecto, o presente invento provê um método de manipulação do envelhecimento numa planta, dito método incluindo introduzir em dita planta uma construção genética incluindo um promotor do gene *myb*, ou um fragmento funcionalmente ativo ou uma variante deste, operacionalmente ligado a um gene que codifica uma enzima envolvida na biossíntese de uma citoquinina, ou um fragmento funcionalmente ativo ou variante deste.

[006] A manipulação do envelhecimento refere-se à planta e/ou a órgãos específicos da planta. Pode ser manipulado o envelhecimento de órgãos diferentes da planta, tais como folhas, raízes, brotos, talos, tubérculos, flores, estolhos e frutos. A manipulação do envelhecimento da planta ou do envelhecimento de órgãos da planta pode ter conseqüências agrícolas importantes, tais como o maior tempo de prateleira de, p.ex., frutos, flores, folhas e tubérculos na produção horticultural e de flores, deteriorabilidade

reduzida da safra horticultural, fixação aumentada de carbono nas folhas com envelhecimento retardado levando a rendimentos melhorados, produção melhorada de biomassa em plantas de forragem, produção melhorada de sementes, etc.

[007] "Manipular o envelhecimento" geralmente se refere a retardar o envelhecimento na planta transformada com relação a uma planta de controle não transformada. Entretanto, para algumas aplicações pode ser desejável promover ou de outra forma modificar o envelhecimento na planta. O envelhecimento pode ser promovido, ou de outra forma modificado, por exemplo, pela utilização de um gene antisense.

[008] Uma quantidade efetiva de dita construção genética pode ser introduzida em dita planta, por qualquer técnica adequada, por exemplo por transdução, transfecção ou transformação. Por "quantidade efetiva" entende-se uma quantidade suficiente para resultar num traço fenotípico identificável em dita planta, ou numa planta, semente de planta ou outra parte de planta derivada dela. Tais quantidades podem ser prontamente determinadas por um técnico da área, levando-se em conta o tipo de planta, a rota de administração e outros fatores relevantes. Tal pessoa seria prontamente capaz de determinar uma quantidade adequada e o método de administração. Vide, p.ex., Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, cuja descrição completa é aqui incorporada por referência.

[009] O promotor do gene myb pode ser de qualquer tipo adequado. Preferencialmente, o promotor do gene myb é um promotor do gene myb32. Preferencialmente, o promotor do gene myb é proveniente de *Arabidopsis*, mais preferencialmente *Arabidopsis thaliana*. Mais preferencialmente, o promotor do gene myb inclui uma sequência de nucleotídeos escolhida dentre o grupo que consiste da sequência mostrada na Figura 1 (*Sequence ID No: 1*) e fragmentos funcionalmente ativos e variantes desta.

[010] Um promotor adequado é descrito em Li et al., Cloning of three MYB-like genes from *Arabidopsis* (PGR99-138), *Plant Physiology* 121:313 (1999), cuja descrição completa é aqui incorporada por referência.

[011] Por "funcionalmente ativo" entende-se que o fragmento ou variante (tais como um análogo, derivado ou mutante) é capaz de manipular o envelhecimento em uma planta

pelo método de acordo com o presente invento. Tais variantes incluem os variantes alélicos de ocorrência natural e os variantes de ocorrência não natural. Adições, remoções, substituições e derivações de um ou mais dos nucleotídeos estão contempladas enquanto as modificações não resultarem em perda de atividade funcional do fragmento ou variante. Preferencialmente, o fragmento ou variante funcionalmente ativo tem pelo menos aproximadamente 80% de identidade com a parte relevante da seqüência mencionada acima, mais preferencialmente pelo menos aproximadamente 90% de identidade, mais preferencialmente pelo menos 95% de identidade. Preferencialmente, o fragmento tem um tamanho de pelo menos 10 nucleotídeos, mais preferencialmente de 15 nucleotídeos, mais preferencialmente de pelo menos 20 nucleotídeos.

[012] O gene que codifica uma enzima envolvida na biossíntese de uma citoquinina pode ser de qualquer tipo adequado. Preferencialmente, o gene é um gene isopentenil transferase (ipt). Preferencialmente, o gene é de *Agrobacterium*, mais preferencialmente de *Agrobacterium tumefaciens*. Mais preferencialmente, o gene inclui uma seqüência de nucleotídeos escolhida dentre o grupo que consiste da seqüência mostrada na Figura 2 (*Sequence ID No: 2*) e fragmentos funcionalmente ativos e variantes desta.

[013] Por "funcionalmente ativo" entende-se que o fragmento ou variante (tais como um análogo, derivado ou mutante) é capaz de manipular o envelhecimento em uma planta pelo método de acordo com o presente invento. Tais variantes incluem os variantes alélicos de ocorrência natural e os variantes de ocorrência não natural. Adições, remoções, substituições e derivações de um ou mais dos nucleotídeos estão contempladas enquanto as modificações não resultarem em perda de atividade funcional do fragmento ou variante. Preferencialmente, o fragmento ou variante funcionalmente ativo tem pelo menos aproximadamente 80% de identidade com a parte relevante da seqüência mencionada acima, mais preferencialmente pelo menos aproximadamente 90% de identidade, mais preferencialmente pelo menos 95% de identidade. Tais variantes e fragmentos funcionalmente ativos incluem, por exemplo, aqueles que têm mudanças no ácido nucléico que resultam em substituições conservativas de aminoácidos de um ou mais resíduos na correspondente seqüência de aminoácidos. Preferencialmente, o fragmento tem o tamanho de pelo menos 10 nucleotídeos, mais preferencialmente de pelo

menos 15 nucleotídeos, mais preferencialmente de pelo menos 20 nucleotídeos.

[014] A construção genética pode ser introduzida na planta por meio de qualquer técnica adequada. As técnicas para incorporar as construções genéticas do presente invento nas células das plantas (por exemplo por transdução, transfecção ou transformação) são bem conhecidas dos técnicos da área. Tais técnicas incluem a introdução mediada por *Agrobacterium*, eletroporação em tecidos, células e protoplastos, fusão de protoplasto, injeção em órgãos reprodutivos, injeção em embriões imaturos e introdução de projéteis de alta velocidade em células, tecidos, calos, embriões maduros e imaturos, e combinações destes. A escolha da técnica dependerá em grande parte do tipo de planta a ser transformada, e pode ser prontamente determinada por um técnico da área.

[015] As células que incorporam a construção genética do presente invento podem ser escolhidas, como descrito abaixo, e então cultivadas num meio apropriado para regenerar plantas transformadas, usando-se as técnicas bem conhecidas do estado da técnica. As condições de cultura, tais como temperatura, pH e similares ficarão claras para um técnico da área. As plantas resultantes podem ser reproduzidas, seja sexualmente ou assexualmente, usando métodos bem conhecidos do estado da técnica, para produzir gerações sucessivas de plantas transformadas.

[016] O método de acordo com o presente invento pode ser aplicado a uma variedade de plantas, incluindo monocotiledôneas [tais como gramas (pasto e gramado), milho, aveia, trigo e cevada], dicotiledôneas [tais como *Arabidopsis*, tabaco, trevos (p.ex. trevo branco, trevo vermelho, trevo subterrâneo), alfafa, canola, brassicáceas, alface, espinafre] e gimnospermas.

[017] Num segundo aspecto do presente invento é provido um vetor capaz de manipular o envelhecimento numa planta, dito vetor incluindo um promotor do gene myb, ou um fragmento funcionalmente ativo ou variante deste, ligado operacionalmente a um gene que codifica uma enzima envolvida na biossíntese de uma citoquinina, ou um fragmento funcionalmente ativo ou uma variante deste.

[018] Numa forma preferida de realização deste aspecto do presente invento, o vetor pode adicionalmente incluir um terminador: ditos promotor, gene e terminador estando

operacionalmente ligados.

[019] Por "operacionalmente ligados" entende-se que dito promotor é capaz de causar a expressão de dito gene numa célula da planta e dito terminador é capaz de terminar a expressão de dito gene numa célula da planta. Preferencialmente, dito promotor está a montante de dito gene e dito terminador está a jusante de dito gene.

[020] O vetor pode ser de qualquer tipo adequado e pode ser viral ou não-viral. O vetor pode ser um vetor de expressão. Tais vetores incluem seqüências de ácidos nucleicos cromossomais, não cromossomais e sintéticas, p.ex. derivadas de vírus de plantas; plasmídeos bacteriais; derivados do plasmídeo Ti da *Agrobacterium tumefaciens*; derivados do plasmídeo Ri da *Agrobacterium rhizogenes*; fagos de DNA; cromossomos artificiais de levedura; cromossomos bacteriais artificiais; cromossomos bacteriais artificiais binários; vetores derivados de combinações de plasmídeos e fagos de DNA. Entretanto, qualquer outro vetor pode ser usado enquanto for replicável ou integrativo ou viável na célula da planta.

[021] O promotor, o gene e o terminador podem ser de qualquer tipo adequado e podem ser endógenos à célula da planta alvo ou podem ser exógenos, desde que sejam funcionais na célula da planta alvo.

[022] Uma variedade de terminadores que podem ser empregados nos vetores do presente invento é também conhecida dos técnicos da área. O terminador pode ser do mesmo gene da seqüência do promotor ou um gene diferente. São terminadores particularmente adequados os sinais de poliadenilação, tais como o CaMV 35S polyA e outros terminadores dos genes nopalina sintase (nos) e octopina sintase (ocs).

[023] O vetor, em adição ao promotor, o gene e o terminador, podem incluir elementos adicionais necessários para a expressão do gene, em combinações diferentes, por exemplo a dorsal, origem ou replicação (ori) do vetor, múltiplos sítios de clonagem, seqüências espaçadoras, intensificadores, introns (tais como o intron de milho Ubiquitin Ubi), genes de resistência a antibióticos e outros genes marcadores [tais como o gene neomicina fosfotransferase (nptII), o gene higromicina fosfotransferase (hph), o gene fosfinotricina acetiltransferase (bar ou pat)] e os genes "reporter" [tais como o gene (gusA) beta-glucuronidase (GUS)]. O vetor também pode conter um sítio de ligação a

ribossomo para o início da translação. O vetor também pode incluir seqüências apropriadas para amplificar a expressão.

[024] Como uma alternativa ao uso de um gene marcador para prover um traço fenotípico para seleção de células de hospedeiro transformadas, a presença do vetor nas células transformadas pode ser determinada por meio de outras técnicas bem conhecidas do estado da técnica, tais como PCR (reação em cadeia de polimerase), análise de hibridização "Southern blot", ensaios histoquímicos (p.ex. ensaios GUS), cromatografia de camada delgada (TLC), análises de hibridização "northern blot" e "western blot".

[025] Os técnicos da área notarão que os vários componentes do vetor estão operacionalmente ligados, para resultar na expressão de dito gene. Também são bem conhecidas dos técnicos da área as técnicas para ligar operacionalmente os componentes do vetor do presente invento.

[026] Num outro aspecto do presente invento, é provida uma célula de planta, planta, semente de planta ou outra parte de planta, transgênica, com características de envelhecimento modificadas. Preferencialmente, célula de planta, planta, semente de planta ou outra parte de planta, transgênica é produzida por um método de acordo com o presente invento.

[027] O presente invento também prove uma planta, semente de planta ou outra parte de planta, derivada de uma célula de planta de acordo com o presente invento.

[028] O presente invento também prove uma planta, semente de planta ou outra parte de planta, derivada de uma planta de acordo com o presente invento.

[029] O presente invento será agora mais completamente descrito com referência aos exemplos e desenhos anexos. Deve ser entendido, entretanto, que a seguinte descrição é apenas ilustrativa e não deve ser tomada de forma alguma como uma restrição da generalidade do invento descrito acima.

[030] Nas figuras:

- a fig. 1 mostra a seqüência de nucleotídeos do promotor a partir do gene myb32 (atmyb32) da *Arabidopsis thaliana* (ID no. 1) ;
- a fig. 2 mostra a seqüência de nucleotídeos do gene isopentenil transferase (ipt) do *Agrobacterium tumefaciens* (ID no. 2)

- a fig. 3 mostra a análise PCR e "Southern" de plantas transgênicas atmyb32::ipt trevo branco (*Trifolium repens*).

a) a região T-DNA de patmyb32::ipt mostrando sítios de restrição de enzima e a localização das sondas usadas para a análise de hibridização "Southern".

b) gel de agarose 1% marcado por brometo de etídio dos produtos amplificados por PCR 599 bp nptII e 583 bp ipt.

c) hibridização "Southern blot" com DNA genômico total digerido por *HindIII* isolado de plantas trevo branco PCR positivas hibridizadas com a sonda ipt.

d) hibridização "Southern blot" com DNA genômico total digerido por *HindIII* isolado de plantas trevo branco PCR positivas hibridizadas com a sonda nptII.

Raias 1-2: dois regenerantes independentes cultivados em Haifa resistentes a canamicina, código: Hmi01, Hmi08, respectivamente;

Raias 3-12: doze regenerantes independentes cultivados em irrigação resistentes a canamicina, código: Imi06, Imi07, Imi08, Imi09, Imi10, Imi11, Imi12, Imi14, Imi16, Imi18, respectivamente;

Raia C: trevo branco não transformado;

Raia P: plasmídeo de controle positivo patmyb32ipt.

- a fig. 4 mostra a análise RT-PCR da expressão de ipt mRNA em plantas transgênicas trevo branco (*T. repens*) atmyb32::ipt.

As raias 1-11 são amostras de 11 linhas transgênicas independentes com códigos de planta correspondentes como na fig. 4.8;

Raia C: planta não transformada de controle;

Raia P: plasmídeo como controle positivo.

O RNA total foi isolado dos tecidos das folhas. O RNA total (13 µg) foi usado para cada reação de transcrição reversa e 1/5 do produto da RT foi amplificado por PCR. Os produtos de DNA no gel à direita foram amplificados por 2 x 30 ciclos de PCR intensiva. Nenhuma transcriptase reversa foi adicionada à reação RT-PCR correspondente carregada nas raias alternadas.

- a fig. 5 mostra um bioensaio de envelhecimento de folhas excisadas de plantas transgênicas trevo branco (*T. repens*) atmvb32::int. Pelo menos 30 folhas foram

recolhidas de cada linhagem a partir de posições similares no estolho das linhagens de plantas.

A. o número de folhas amarelando como uma fração do número de folhas excisadas.

B. aparência típica de folhas mantidas em água sob luz por duas semanas. Chave para as linhagens das plantas: HC, IC e Hmb, Img, não-trasformada e plantas transgênicas atmyb32::gusA (cultivadas em Haifa e Irrigação), respectivamente; 01 e 08, linhas transgênicas atmyb32::ipt Haifa Hmi01 e Hmi08, respectivamente; 11, 12, 16 e 18, linhas transgênicas atmyb32::ipt Irrigação Imi11, Imi12, Imi16 e Imi18, respectivamente.

- a fig. 6 mostra A) morfologia geral da planta, B) desenvolvimento normal dos brotos, e C) desenvolvimento normal da raiz em plantas transgênicas atmyb32::ipt trevo branco (*T. repens*) (direita) comparado com plantas de controle (esquerda).

Exemplos

Exemplo 1

Produção de plantas transgênicas atmyb32::ipt

[031] Plantas transgênicas trevo branco (*Trifolium repens* cultivada em haifa e irrigação) foram produzida por transformação mediada por *Agrobacterium* usando um vetor binário carregando o gene quimérico atmyb32::ipt (fig. 3a). As plantas transgênicas foram analisadas por PCR usando sondas ipt e nptII (fig. 3b) Amostras de DNA genômico digeridas por *HindIII*, submetidas à análise de hibridização de DNA "Southern" mostraram que foram detectados fragmentos de DNA maiores que 4,4 kb em todas as raias por ambas as sondas ipt e nptII, demonstrando a presença e integração do T-DNA no genoma do trevo branco (fig. 3). As linhas transgênicas Hmi01, Imi06, Imi11 e Imi18 (raias 1, 3, 5, 8 e 12, respectivamente) pareciam ter uma única cópia do T-DNA integrado no genoma. Outras linhas tinham múltiplas cópias do transgene atmyb32::ipt.

Exemplo 2

Expressão do gene atmyb32::ipt em plantas transgênicas

[032] A expressão do transgene atmyb32::ipt em plantas transgênicas trevo branco (*T. repens*) foi avaliada por RT-PCR. O mRNA ipt foi detectado nos tecidos das folhas de todas as plantas transgênicas atmyb32::ipt trevo branco examinadas com níveis variantes

de produtos PCR detectados (fig. 4).

Exemplo 3

Envelhecimento retardado de folhas destacadas de plantas transgênicas atmyb32::ipt

[033] Foram realizados experimentos para avaliar o envelhecimento retardado de folhas destacadas de plantas transgênicas atmyb32::ipt. Foi observado um rápido amarelamento nas folhas de plantas trevo branco não transformadas e transgênica atmyb32::gusA em ambos os cultivares dentro de uma semana. As linhagens transgênicas Hmi01, Hmi08, Imi16 e Imi18 mostraram envelhecimento retardado, enquanto que as linhagens Imi11 e Imi12 não mostraram sinal de amarelamento ao fim dos 7 dias. Após duas semanas, as folhas de todas as plantas transgênicas atmyb32::ipt estavam muito mais verdes que aquelas das plantas não transformadas e das plantas transgênicas de controle atmyb32::gusA (fig. 5). O grau de envelhecimento nas folhas cortadas foi, na ordem, HC, Hmg > Hmi01 > Hmi08 para o cultivo em haifa, e IC e Img > Imi16 > Imi18 > Imi11 e Imi12, para cultivo em irrigação. HC é controle não transformado cultivado em haifa, Hmg é controle atmyb32::gusA cultivado em haifa, IC é controle não transformado cultivado em irrigação, Img é controle atmyb32::gusA cultivado em irrigação. Hmi01, Hmi08, Imi16, Imi18, Imi11 e Imi12 são plantas transgênicas atmyb32::ipt trevo branco independentes a partir dos cultivares haifa (H) e irrigação (I), respectivamente.

Exemplo 4

Morfologia normal da planta e desenvolvimento normal da raiz em plantas transgênicas atmyb32::ipt

[034] A morfologia normal das plantas, bem como o desenvolvimento normal dos brotos e raízes foram observados nas plantas transgênicas trevo branco atmyb32::ipt (fig. 6), indicando assim que a expressão regulada do gene ipt sob controle do promotor atmyb32 não afeta negativamente nem a raiz nem a dominância apical das plantas transgênicas trevo branco (Tabela 1).

Tabela 1

Transformante	Cultivar	Construção	Cópia ipt No.	Fenótipo
----------------------	-----------------	-------------------	----------------------	-----------------

Hmi01	Haifa	atmyb32::ipt	1	Normal
Hmi08	Haifa	atmyb32::ipt	>3	Normal
Imi06	Irrigação	atmyb32::ipt	1	Normal
Imi07	Irrigação	atmyb32::ipt	3	Normal
Imi09	Irrigação	atmyb32::ipt	>3	Normal
Imi10	Irrigação	atmyb32::ipt	>3	Normal
Imi11	Irrigação	atmyb32::ipt	1	Normal
Imi12	Irrigação	atmyb32::ipt	2	Normal
Imi16	Irrigação	atmyb32::ipt	2	Normal
Imi18	Irrigação	atmyb32::ipt	1	Normal

[035] Foi observada uma morfologia normal de planta e raízes normais em 10 linhagens de plantas transgênicas trevo branco atmyb32::ipt independentes analisadas. É mostrado o número de cópias estimado do gene ipt nas 10 linhagens de plantas transgênicas trevo branco atmyb32::ipt independentes.

[036] Deve ser entendido que o invento descrito e definido na presente especificação se estende a todas as combinações alternativas de duas ou mais das características individuais mencionadas ou evidentes a partir do texto ou dos desenhos. Todas essas combinações diferentes constituem vários aspectos alternativos do presente invento.

[037] Finalmente, deve ser entendido que podem ser feitas várias alterações, modificações e/ou adições sem com isso fugir ao espírito do presente invento como foi descrito aqui.

[038] Também deve ser entendido que o termo "compreende" (ou suas variações gramaticais), como usado nesta especificação, é equivalente ao termo "inclui" e não deve ser tomado como excludente da presença de outros elementos ou características.

[039] Os documentos citados nesta especificação são apenas para fins de referência e sua inclusão não é um reconhecimento de que eles formam parte do conhecimento geral comum na técnica relevante.

Reivindicações

1. Método para manipular o envelhecimento de uma planta, **caracterizado por** dito método compreender introduzir em dita planta uma construção genética que compreende o promotor do gene myb da *Arabidopsis* de SEQ ID NO:1, operacionalmente ligado a um gene isopentenil transferase (ipt) de SEQ ID NO: 2.
2. Método, conforme reivindicação 1, **caracterizado por** dita construção genética ser introduzida em dita planta por transdução, transfecção ou transformação de células da planta.
3. Método, conforme reivindicação 1, **caracterizado por** as células da planta que incorporam a construção genética serem escolhidas e então cultivadas para regenerar plantas transformadas.
4. Vetor capaz de manipular o envelhecimento de uma planta, **caracterizado por** o promotor do gene myb da *Arabidopsis* de SEQ ID NO:1, operacionalmente ligado ao gene isopentenil transferase (ipt) de SEQ ID NO:2.
5. Vetor, conforme reivindicação 4, **caracterizado por** incluir adicionalmente um terminador; dito promotor, gene e terminador sendo operacionalmente ligados.

1 gtttggtgtct tctagattaa tcctccaaac ttttgattaa ccaaaaaaat tatcaaacta
61 acatgttctc cttttttctt tagaaattct aacgaattta tctttatact gatttgaata
121 tacttaattt ggtcatttgg atgcccttta caacctcctt accaaactca ctatggcaaa
181 tatatactat tttccattgt aacataaatg tccataattt gaattaaatt cgttgtagta
241 cgaaaccatc caactttgtc caaaaacaaa atccttataa ctatttactt taatgtaaatt
301 atatcctcta cttttgtttt tacaacccta gctcaaacaa atttattatt tgcgataaaa
361 aatcatatcg aacaaactcg atgatttttt ttttcttacg ttattaatga aactaaaata
421 tagaaaaaaa caagatgaac caaattttca cctatctaac tacttaaata taatatgatt
481 aaatttggtg aagtttgaaa agtttcttta gaaatgtgaa atattgatca cagtttctat
541 tgctaaaatc accaacaaaa cgcattgtgc cattcataat tatgggttca cacctacaac
601 taggctaata agtaaataag tagacaacta gactcagggt tgaaaaaacc ataaaagcca
661 tatagcgttt tctcattgaa actgcgaaca cgatcggtg aatggtgcag tttctagttt
721 tgatacaaac aaacaaaaac acaatttaatt cttagattaa aaagaaaaaa gagaacggag
781 cccactagcc actccttcaa acgtgtctta ccaactctct tctagaaaca aattaggctt
841 caccttctct ttccaacctc tctctctctc tctctctctt tttctcaaac catctctcca
901 taaagcccta atttcttcat cacaagaatc agaagaaga a

Fig. 1

```

1  ggatcctggtt acaagtattg caagttttat aaattgcata ttaatgcaat cttgattttt
61  aacaacgaac gtaatggcgt aaaaaatgta tggtatatta tttatattta attatattgg
121 agtgcgccat aatatgatga tttataatta aaaaatattt actgtcacat tgactgagat
181 ggcaactgtta tttcaaccat gaaattttgt tgattttttt acaataacaa taattgcagg
241 aagtaaataa tagacgccgt tgttaaaaaa ttgcaatcat atgtgcctaa ctataggggac
301 aattaagtca attgtaatag tctcccttat tttaacgact cacctaataca agtattacaa
361 aatatctcac ttttcgtcag taatgatgta atcagaactg aatagtacaa gtaaaacgtg
421 gaaaaacgtc atagagtggc atgattatat tcctctgcat tgccaattta ttcagcttta
481 tttgacttag gtgtgccttc gttagcgaca aattgctttc aaggagacag ccatgcccca
541 cactttgttg aaaaacaagt tgccttttgg gatacggtaa agccagttgc acttcaataa
601 tgaatttcaa ggagacaata taaccgcctc tgataacaca attctctaata ataaaaatca
661 gtttgtattc aatatactgc aaaaaactta tggacctgca tctaattttc ggtccaactt
721 gcacaggaaa gacgacgacc gcgatagctc ttgccagca gacagggctt ccagtccttt
781 cgcttgatcg ggtccaatgc tgtcctcaac tatcaaccgg aagcggacga ccaacagtgg
841 aagaactgaa aggaacgacg cgtctctacc ttgatgatcg gcctctggtg gagggtatca
901 tcgcagccaa gcaagctcat cataggctga tcgaggaggt gtataatcat gaggccaacg
961 gcgggcttat tcttgagga ggatccacct cgttgctcaa ctgcatggcg cgaacagct
1021 attggagtgc agattttcgt tggcatatta ttcgccacaa gttaccgcac caagagacct
1081 tcatgaaagc ggccaaggcc agagttaagc agatgttgca ccccgctgca ggccattcta
1141 ttattcaaga gttggtttat ctttggaatg aacctcggct gaggccatt ctgaaagaga
1201 tcgatggata tcgatatgcc atgttgtttg ctagccagaa ccagatcacg gcagatatgc
1261 tattgcagct tgacgcaaat atggaaggta agttgattaa tgggatcgct caggagtatt
1321 tcatccatgc gcgccaacag gaacagaaat tcccccaagt taacgcagcc gctttcgacg
1381 gattcgaagg tcatccgttc ggaatgtatt aggttacgcc agccctgcgt cgcacctgct
1441 ttcactctgga taagatgttc gtaattgttt ttggctttgt cctgttggtg cagggcgga
1501 aatacttccg acaatccatc gtgtcttcaa actttatgct ggtgaacaag tcttagtttc
1561 cacgaaagta ttatgttaaa ttttaaaatt tcgatgtata atgtggctat aattgtaaaa
1621 ataaactatc gtaagtgtgc gtgttatgta taatttgtct aaatgtttaa tatatatcat
1681 agaacgcaat aaatattaaa tatagcgctt ttatgaaata taaatacatc attacaagtt
1741 gtttatattt cgggtacctt ttccattatt ttgcgcaaca agtcacggat attcgtgaaa
1801 acgacaaaaa ctgcgaaatt tgccggcagt gccttcagtt ttcctattaa tatttagttt
1861 gacaccagtt gctatcattg cggccaagct cagctgtttc ttttcttgaa acgatggatc
1921 gaatgagcat ggctcggcaa gggttggttg taccatgtct ttctcatggc aaagatgatc
1981 aactgcag

```

Fig. 2

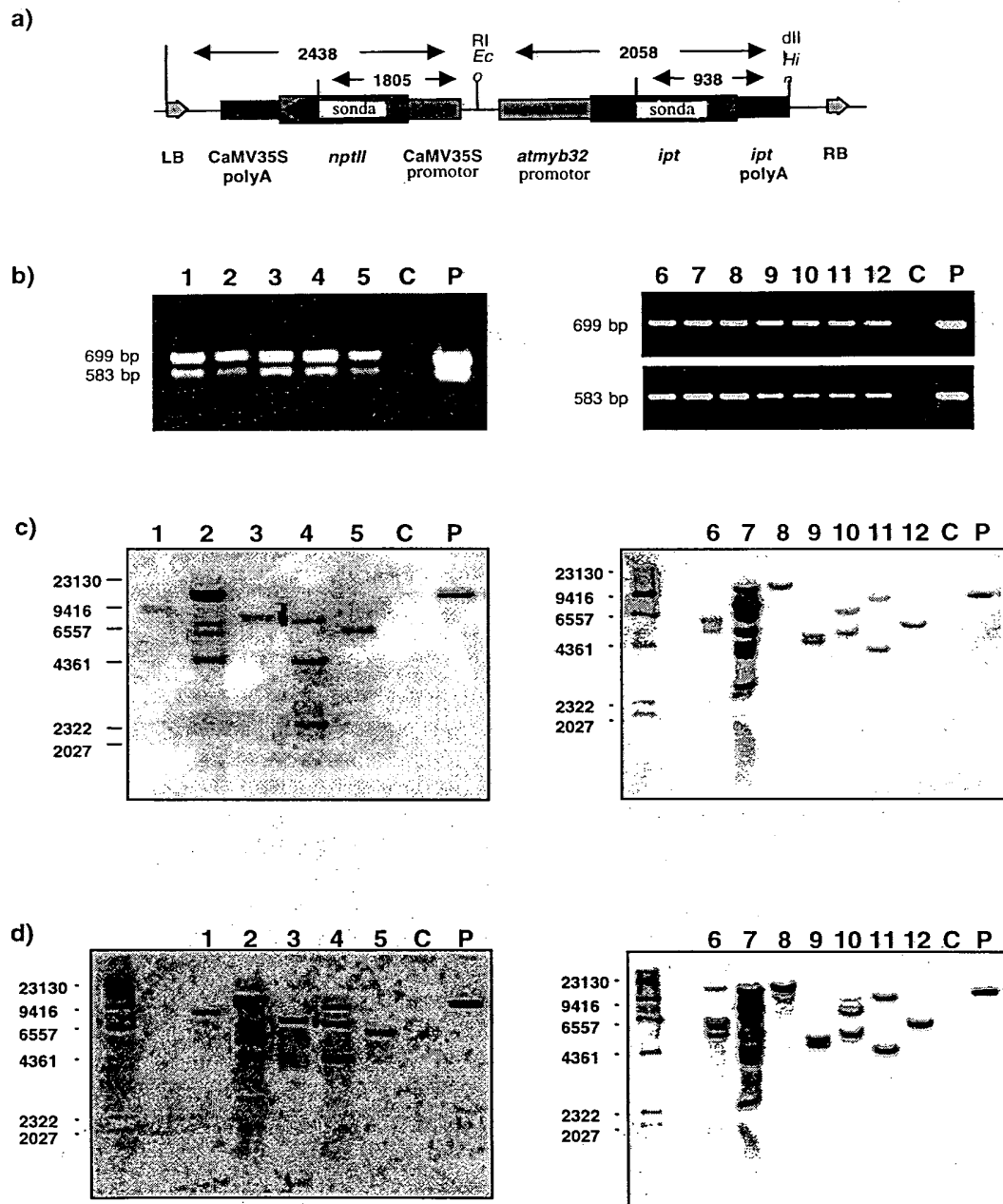
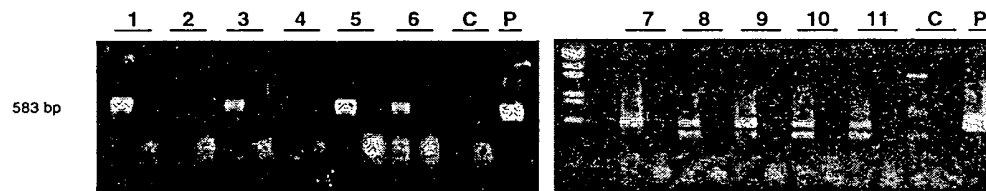
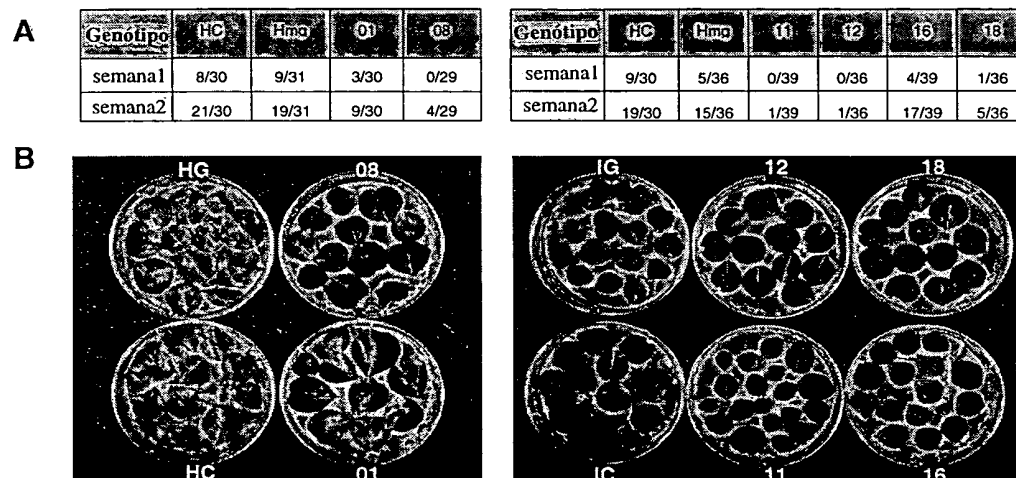
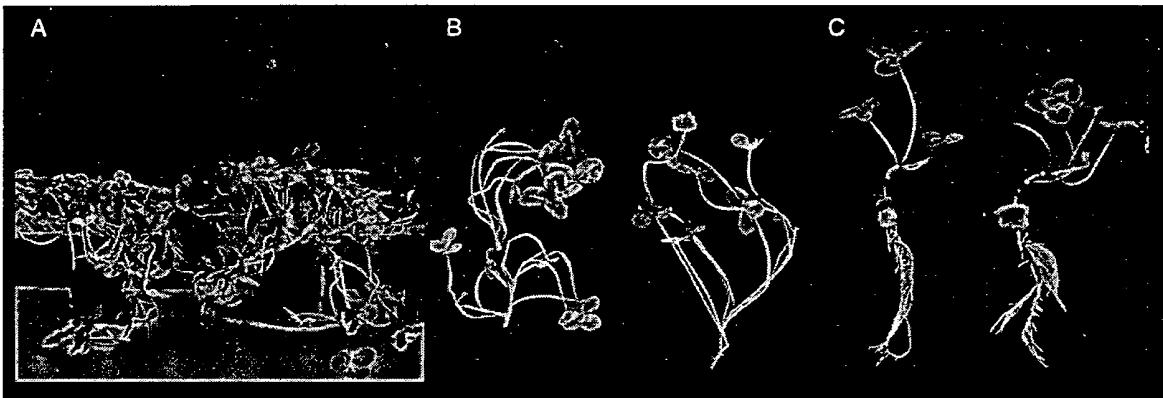


Fig. 3

**Fig. 4**

**Fig. 5**

**Fig. 6**