(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1842593 B
(45)授权公告日 2013.03.13

(21)申请号 200480024557.3

(22)申请日 2004.06.25

(30)优先权数据
10/607,538 2003.06.27 US

(85)PCT申请进入国家阶段日
2006.02.27

(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2004/017424 2004.06.25

(87)PCT申请的公布数据
WO2005/004585 EN 2005.01.20

(73)专利权人 J.R. 西姆普罗特公司
地址 美国爱达荷州

(72)发明人 C·罗门斯 J·叶
J·梅嫩德斯-乌马拉 H·彦
K·斯沃尔兹

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 周慧敏 刘玥

(51)Int.Cl.
C12N 15/10(2006.01)
C12N 15/29(2006.01)
C12N 15/82(2006.01)
C12N 15/84(2006.01)
A01H 1/00(2006.01)

(56)对比文件
US 5482852 A,1996.01.09, 全文.
US 6103893 A,2000.08.15, 全文.
WO 9634968 A2,1996.11.07, 全文.

审查员 张小勇

权利要求书 2 页 说明书 90 页
序列表 68 页 附图 4 页

(54)发明名称

精确育种

(57)摘要

本发明涉及一种方法,用于鉴定和分离可起到T-DNA或T-DNA边界样序列作用的天然植物核酸序列,用于实现一种多核苷酸转移到另一种多核苷酸中。本发明还提供了一种修改的块茎,例如遗传修改的成熟块茎,其包含至少一种性状,所述性状不被相同物种的未修改的块茎展现。

CN 1842593 B

1. 一种产生植物的方法，包括

(1) 用载体通过土壤杆菌介导的转化来转化植物细胞，所述载体包含：(a) 插入 SEQ ID NO：1 或 98 所示的转移 DNA 中的表达盒，其中所述表达盒包含对于植物细胞的基因组是天然的多核苷酸，和 (b) 主干整合标记基因，其中所述主干整合标记基因位于载体主干中且不位于转移 DNA 中；

(2) 从所述转化的植物细胞培植植物，所述植物在其基因组中包含所述天然的多核苷酸的至少一个拷贝；

(3) 使所述转化的植物自交或杂交来产生子代植物；和

(4) 鉴定在其基因组中包含所述天然的多核苷酸但不包含所述主干整合标记基因的子代植物。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述植物细胞是单子叶或双子叶植物的细胞。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述天然的多核苷酸与对于植物来说是天然的调节元件可操作地连接。

4. 权利要求 1 的方法，还包括用包含选择性标记基因的载体转化所述植物细胞。

5. 权利要求 4 的方法，其中所述选择性标记基因是除草剂抗性基因或抗生素抗性基因。

6. 权利要求 4 的方法，其中所述包含选择性标记基因的载体进一步包含可在分离的 F1 子代植物中被选择的第二标记基因。

7. 权利要求 6 的方法，其中所述第二选择性标记基因编码细菌胞嘧啶脱氨酶。

8. 权利要求 4 的方法，其中所述选择性标记基因表达 1 到 10 天。

9. 权利要求 1 的方法，其中所述天然的多核苷酸包含序列，所述序列在植物中表达时，便于 R1、多酚氧化酶和磷酸化酶的至少一个的表达的下调。

10. 权利要求 4 的方法，其中所述天然的多核苷酸和所述选择性标记基因位于分离的土壤杆菌载体中。

11. 权利要求 10 的方法，其中每个载体位于与另一个载体不同的土壤杆菌菌株中。

12. 权利要求 10 的方法，其中所有载体都位于同一土壤杆菌菌株中。

13. 权利要求 10 的方法，其中所述包含所述选择性标记基因的载体进一步包含主干整合标记基因。

14. 权利要求 1 的方法，其中所述整合标记基因是：(i) 编码异戊基转移酶的基因，(ii) 细胞分裂素基因，或 (iii) 给予转化的植物不合需要的表型的基因。

15. 权利要求 1 的方法，其中所述天然的多核苷酸的表达修改选自由以下构成的组的性状：增强的健康和营养特性、增加的储藏、提高的产量、增强的耐盐性、增强的重金属耐受性、提高的干旱耐受性、提高的抗病性、提高的昆虫耐受性、提高的水胁迫耐受性、增强的寒冷和霜冻耐受性、增强的颜色、增加的甜味、提高的活力、改善的味道、改善的纹理、降低的磷酸盐含量、提高的发芽、提高的微量元素摄取、改善的淀粉组成、增加的花寿命、降低的冷诱导的糖化、更低的丙烯酰胺水平和降低的黑斑擦伤。

16. 权利要求 1 的方法，其中所述天然的多核苷酸的表达与不表达所述天然的多核苷酸的植物相比降低冷诱导的糖化程度。

17. 权利要求 1 的方法，其中所述天然的多核苷酸的表达修改如下性状：降低的淀粉磷

酸盐水平。

精确育种

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本国际申请要求2003年6月27日提交的美国申请系列号10/607,538的优先权，美国申请系列号10/607,538是2003年2月20日提交的美国申请系列号10/369,324的部分继续申请，其要求了美国临时申请系列号60/357,661和60/377,602的优选权，将这些申请以引用的方式全部并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及通过修改植物的基因组中特定的、良好表征的DNA来改进植物的营养、健康和农学特征的方法。与经典的植物育种相反，该发明性的过程不向植物的遗传构成中导入未知的或有潜在毒性的基因。此外，与常规的遗传工程策略不同，该发明性的方法不向植物基因组中掺入来自外源物种，即，与将通过遗传工程修改的植物不是互交可孕的物种的核酸。经由该发明性植物育种过程开发的植物展现出改进的农学特性。本发明的特别优选的植物包括显示出改进的健康和块茎贮藏特征的马铃薯，和显示出改进的疾病和干旱耐受性的草皮草。

[0004] 发明背景

[0005] 一般地已经通过经典的植物育种或遗传工程改进了植物的农学性能。经典的育种一般导致未知的核酸从一个植物转移到另一个植物。遗传工程技术将外源核酸导入植物基因组，即，不是来自植物的DNA、或不是来自与将通过遗传工程修改的植物天然互交可孕的植物的DNA。例如，遗传工程将非植物核酸导入植物基因组。经典的育种和遗传工程策略都产生含有不希望的和不需要的遗传物质的植物基因组，得到的杂交种或转基因植物可能显示出不利的性状。两种策略的不足之处可能是对转基因植物、以及对消费这种产品的动物和人是有害的。

[0006] 1. 常规的育种依靠未知DNA的转移

[0007] 植物育种一般依靠植物染色体的随机重组来产生具有新的和改进的特征的品种。因而，通过筛选植物杂交产生的大量子代群体，育种者可以鉴定那些展现了期望的性状的植物，所述性状例如提高的产量、改进的活力、增强的对疾病和昆虫的抗性、或在干旱条件下生存的更强的能力。然而，经典的育种方法是费力和耗时的，新品种一般仅显示出相对不多的改善。

[0008] 此外，经典的植物育种一般导致数百个未知基因转移到植物基因组中。有可能的是，某些转移的基因编码潜在有害的过敏原，例如马铃薯糖蛋白(patatin)、凝集素、几丁质酶、蛋白酶、奇异果甜蛋白样蛋白、脂质转移蛋白、淀粉酶、胰蛋白酶抑制剂和种子贮藏蛋白(Breiteneder et al.,J Allergy Clin Immunol 106:27-36)。

[0009] 类似地，种质渗入的基因(introgressed genes)可能涉及毒素的生物合成，所述毒素包括山黧豆素(lathyrogens)、胱、芥子油苷(glucosinolates)和甲状腺肿原、香豆素、皂角苷、生物碱、配糖生物碱、生物胺、酶抑制剂，例如凝集素(血细胞凝集素)、胰蛋白酶抑制剂，螯合物质例如植酸盐和草酸盐，核毒素、抗微生物肽、氨基酸，例如β-N-草酰氨

基-L-丙氨酸，苍术苷、夹竹桃苷、紫杉醇、和异喹啉(Pokorny，Cas Lek Cesk 136：267-70，1997)。由于“打开”用于食物消费前尚未使用过的野生作物亲缘植物的遗传多样性的工作，无意地将这些毒物引入到人和动物食物供应品中的风险进一步增加了(Hoisington et al.，Proc Natl Acad Sci U S A 96：5937-43，1999)。

[0010] 尽管经典的植物育种可以容易地将涉及不希望的抗营养化合物的基因导入到粮食作物和植物中，但不能容易地移除它们。举例来说，花费了约15年通过钝化Lpa基因来减少玉米和稻米中有害的植酸盐(phytate)水平(Raboy，J Nutr 132：503S-505S，2002)。用很长时间来获得积极的成果是不实际的，特别是因为急需更有效地和更高效地改进粮食作物的品质的方法。仅在近来发现与抗营养化合物的合成有关的基因的一个实例是多酚氧化酶(PPO)基因，其氧化某些酚类化合物生产致突变的、致癌的和细胞毒的试剂，如苯氧基基团和醌型衍生物(Kagan et al.，Biochemistry 33：9651-60，1994)。在植物，例如马铃薯的基因组中存在着这个基因的多个拷贝，使得特别难以通过育种来降低PPO活性。

[0011] 如果对它们的遗传基础了解很少或不了解，就需要更多的时间来除去抗营养化合物(anti-nutritional compounds)。举例来说，还没有基因与被加热到1600℃或更高温度的某些马铃薯中高浓度的丙烯酰胺累积联系起来，丙烯酰胺是一种强力的神经毒素和诱变剂(Tarekeet al.，J Agric Food Chem.50：4998-5006，2002)。因此很难在利用常规育种的过程期间有效地开发出产生更少的丙烯酰胺的新的马铃薯品种。因而，需要种植具有降低水平的这种危险化合物的马铃薯及其他富含碳水化合物的食物，例如小麦，但是不利用未知的或外源的核酸。

[0012] 其他可在加工期间积累的、并难以通过育种减少或消除的抗营养化合物包括Maillard反应产物N-亚硝基-N-(3-酮基-1，2-丁二醇)-3′-硝基酪胺(Wang et al.，Arch Toxicol 70：10-5，1995)，和5-羟基甲基-2-糠醛(Janzowski et al.，Food Chem Toxicol 38：801-9，2000)。还知道尚未被很好表征的其他的Maillard反应产物也展现了致突变的性质(Shibamoto，Prog Clin Biol Res 304：359-76，1989)。

[0013] 由于常规植物育种的固有不精确性，同样难以快速地增加粮食作物中积极营养化合物(positive nutritional compounds)的水平。举例来说，增加各种作物中“抗性淀粉”(Topping et al.，Physiol Rev81：1031-64，2001)的水平是所希望的。这种淀粉最终是促进免疫反应、抑制潜在的病原体和降低疾病包括结肠直肠癌症的发病率的原因(Bird et al.，Curr Issues Intest Microbiol 1：25-37，2000)。然而，具有升高的抗性淀粉水平的仅有的可用植物是低产量的品种，象玉米突变株“amylose extender”、“dull”和“sugary-2”。创造新的高抗性淀粉来源，例如马铃薯，将允许这种促进健康成分的更广泛的饮食加入。

[0014] 不能安全地操作植物的基因型常常导致使用外部的化学药品来诱导期望的表型。例如，尽管很多育种项目延迟块茎的发芽，但仍没有商业上可获得的马铃薯品种能够在不用发芽抑制剂处理的情况下保存数月。发芽抑制剂，例如异丙基-N-氯苯基-氨基甲酸酯(CIPC)与急性毒性和肿瘤发展有关，可以以1mg/kg到5mg/kg之间的浓度存在于加工的马铃薯食物中。

[0015] 2.遗传工程依靠外源DNA的转移

[0016] 遗传工程可用于修改、产生或从植物除去某些性状。虽然在增加植物的营养价值

和健康特征方面只有有限的进展，大多数改进的目标是提高作物栽培容易性的植物性状。因而，由于含有细菌基因 5- 烯醇丙酮酰莽草酸 -3- 磷酸酯合酶，某些植物对草甘膦除草剂有抗性 (Padgette et al.，Arch Biochem Biophys.258 :564-73,1987)。类似地，遗传工程已经生产出昆虫、病毒、和真菌抗性的植物品种 (Shah etal.，Trends in Biotechnology 13 :362-368,1995 ;Gao et al.，NatBiotechnol.18 :1307-10,2000 ;Osusky et al.，Nat Biotechnol.18 :1162-6,2000)，但很少有增强的营养或健康益处。

[0017] 根据标准的、公知的技术，将包含基因和调节元件的遗传“表达盒”插入到土壤杆菌 (Agrobacterium) 分离的转移 DNA(“T-DNA”) 的边界内，并整合到植物基因组中。因而，T-DNA 材料的土壤杆菌介导的转移一般包括以下标准步骤 :(1) 遗传元件的体外重组，其中至少一个是外源来源的，以产生用于转化选择的表达盒，(2) 通常与至少一个其他的含有外源 DNA 的表达盒一同，将这个表达盒插入到二元载体的 T-DNA 区中，其通常由侧翼是 T-DNA 边界序列的数百个土壤杆菌 DNA 碱基对组成 (3) 通常与某些或所有的来自土壤杆菌的其它二元载体序列一同，将位于 T-DNA 边界之间的序列转移给植物细胞，和 (4) 选择稳定转化的植物细胞。参见，例如，美国专利号

[0018] 4,658,082,6,051,757,6,258,999,5,453,367,5,767,368,6,403,865,5,629,183,5,464,763,6,201,169,5,990,387,4,693,976,5,886,244,5,221,623,5,736,369,4,940,838,6,153,812,6,100,447,6,140,553,6,051,757,5,731,179,5,149,645 和 EP 0 120,516，EP 0257,472，EP 0 561,082,1,009,842A1,0 853,675A1,0 486,233B1,0554,273A1,0 270,822A1,0 174,166A1，和 WO 01/25459。

[0019] 因而，遗传工程方法依靠将外源核酸导入到食物供应品中。那些技术将从病毒、细菌和植物分离的、对于被转化的植物物种是非天然的几个到超过 20 个遗传元件的复杂融合物转移。这种外源元件包括调节元件例如启动子和终止子，和涉及新性状的表达的、或起标记作用来鉴定或选择转化事件的基因。尽管在规章批准之前测试含有外源 DNA 的食物的安全性，许多消费者还是关心食用表达外源蛋白的食物的长期影响，所述外源蛋白是由从其他的、非植物物种获得的基因产生的。

[0020] 一个通常使用的调节元件是花椰菜花叶病毒 (CaMV) 的 35S “超级”启动子，其一般被用于植物工程来诱导与之直接连接的转基因的高水平表达。然而，35S 启动子也可以增强其附近的天然基因的表达 (Weigel et al.，Plant Physiol.，122 :1003-13,2000)。因而这种启动子可能诱导在内源基因表达方面的不可预见的改变，可能产生不希望的效果，例如生物碱产生的升高。优选的“强”启动子一般是那些从病毒分离的启动子，例如，大米 tungro 杆状病毒、玉米条纹病毒、木薯叶脉病毒、紫茉莉 (mirabilis) 病毒、花生褐绿条死病花叶病毒 (peanut chlorotic streak caulimovirus)、玄参花叶病毒和小球藻病毒。其他经常使用的启动子是从细菌物种克隆的，包括胭脂碱合酶和章鱼碱合酶基因的启动子。

[0021] 为了获得基因翻译的适当的终止，终止子序列被融合到转基因的 3′ - 端，包括来自土壤杆菌的胭脂碱合酶和章鱼碱合酶基因的遗传元件。其他遗传元件可被用于进一步增强基因表达，或将表达的蛋白靶向某些细胞区室。这些元件包括促进转基因表达的内含子，和将外源基因靶向某些细胞区室的信号肽序列，通常来源于外源植物物种。

[0022] 某些涉及新性状的表达的基因最经常地来源于外源的来源。如果使用天然的 (native) 基因，通常将它们反转以使转基因植物中该基因的表达沉默，并与外源 DNA 例如

选择性标记共转化。这种“反义”技术的主要缺陷是反转的DNA通常含有插入在启动子和终止子之间的、新的和未表征的开放阅读框。因而，用来源于淀粉相关基因R1(Kossmann et al.，美国专利6,207,880)、L和H型葡聚糖磷酸化酶基因(Kawchuk et al.，美国专利5,998,701,1999)、多酚氧化酶基因(Steffens，美国专利6,160,204,2000)，和淀粉分支酶I和II的基因(Schwall et al.，Nature Biotechnology 18:551-554,2000)的反义构建体遗传性修改的马铃薯植物，都潜在地表达由至少50个氨基酸组成的新肽(表1)。这些新肽可能干扰植物发育和/或降低马铃薯的营养价值，因此是不希望的。

[0023] 常规的标记基因被合并到遗传结构中，用于选择转化事件。它们为被转化植物赋予抗生素或除草剂抗性(美国专利No.6,174,724)、代谢优势(美国专利No.5,767,378)或形态学上异常的表型(美国专利No.5,965,791)。这种标记一般来源于细菌来源。

[0024] 此外，由于T-DNA转移的不精确性，在植物，例如番茄、烟草和马铃薯中约75％的转化事件除T-DNA之外还含有质粒“主干(backbone)”序列(Kononov et al.，Plant J.11:945-57,1997)。这种主干序列的存在是不合需要的，因为它们是外源的，并且一般含有复制起点和抗生素抗性基因标记。

[0025] 确实存在用于除去像外源标记基因的元件的各种方法，但是很少是容易适用于植物遗传工程的。根据一种此类方法，将标记基因和期望的基因或核苷酸序列置于不同的载体上。用携带两个载体的单个土壤杆菌菌株(美国专利No.6,265,638)、或用各携带一个载体的两个土壤杆菌菌株感染植物，可以偶尔地产生不联锁的整合事件，其可以通过远系繁殖遗传性地分离。这种方法的主要的缺点是基因座的遗传分离是非常费力和耗时的，特别是如果T-DNA整合事件是连锁的时。此外，在无性繁殖的单性生殖植物，例如肯塔基蓝草，或营养体繁殖的作物例如马铃薯中，由于近交抑制、高水平的异型接合性和低生育水平不能容易地育种，因而在这些植物中这种方法不是广泛适用的。

[0026] 用于除去外源遗传元件的另一个方法依靠将外源基因，如选择性标记插入到转座元件中。然后可以以低频率将修饰的转座元件从基因组中剪切出来。然后必需进行与未转化植物的传统杂交来从宿主中分离该转座的元件(美国专利No.5,482,852)。如对前述方法所描述的，这种替换性方法不能被用于营养体繁殖或单性生殖的的植物系统。

[0027] 第三种除去标记基因的方法使用了噬菌体P1的Cre/lox位点特异性重组系统(Dale & Ow，Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88:10558-62,1991)。与Cre重组酶基因和涉及Cre的诱导的嵌合基因(两个基因都带有它们自己的启动子和终止子)一同将标记基因插入到两个lox位点之间，引起再生过程期间由lox位点划定的区域的切除(Zuoet al.，Nat.Biotechnol.,19:157-61,2001)。这个复杂的过程是低效的和不可靠的，可能导致基因组的不稳定性。

[0028] 近来的研究报道说，一些植物基因本身可被用作转化标记。这种植物标记的实例包括Pga22(Zuo et al.，Curr Opin Biotechnol.13:173-80,2002)、Ckil(Kakimoto，Science 274:982-985,1996)和Esr1(Banno et al.，Plant Cell 13:2609-18,2001)。然而，所有这些基因都触发细胞分裂素反应，其给予转化的植物不合需要的表型。此外，这种植物标记仍需要通过上述的任何一种方法在转化时除去。

[0029] 转化植物的替换性的方法也基于外源遗传元件的体外重组，并依靠用于在E.coli中维持的细菌质粒序列，其部分序列在转化过程期间被共同整合了。这种用外源DNA转

化植物的方法的实例在美国专利Nos.5,591,616,6,051,757,4,945,050,6,143,949,4,743,548,5,302,523和5,284,253中有描述。

[0030] 通过在再生之前省略任何选择步骤，也可以获得无标记的转基因植物。这种方法的缺点是通过这种方法产生的大多数事件将代表未转化的或嵌合的植物，因为它们通常不是来源于单个转化的植物细胞的。使用无标记的步骤来鉴定在所有它们的细胞中含有相同DNA插入物的转基因植物是极为困难和费力的。

[0031] 因而，除了可通过经典的育种杂交和常规的遗传工程技术得到的，和不依靠将未知或外源核酸插入到植物基因组的之外，存在着非常重要的需求来改进植物。因此，本发明提供了用于精确地修改植物自己的遗传物质的方法和组合物。因而，发明性的“精确育种”策略不会诱导不合需要的表型，不会向植物基因组中导入未知的或外源的核酸。

[0032] 发明概述

[0033] 本发明提供了在不将未知的或外源的DNA永久地或稳定地结合到植物的基因组中的情况下、遗传性地增强植物的营养价值和农学性能的方法。根据本发明的方法，将特定的、良好表征的核酸、基因元件和基因从期望的植物物种或与期望的植物性上相容的植物物种中分离，进行修改，然后重新插入回该期望的植物物种的基因组中。所述修改可能要求对分离的核酸序列进行突变、删除部分分离的核酸、或简单地将该分离的核酸连接到另一个多核苷酸，例如将该分离的核酸亚克隆到质粒载体中。

[0034] 因此，通过该发明性的方法生产的转基因植物不具有包含任何外源物种的核酸的基因组。因而，本发明的方法生产一种转基因植物，其基因组不包含非植物物种启动子、不包含非植物物种终止子、不包含非植物物种5′-非翻译区、不包含非植物物种3′-非翻译区、不包含非植物物种标记基因，不包含非植物物种调节元件、不包含非植物物种基因、以及不包含其他任何从非植物物种基因组获得的多核苷酸。

[0035] 因而，本发明提供一种生产显示出出修改的表型的、稳定的转基因植物的方法，所述修改的表型不被未转化的植物展现，包括：(a)用期望的多核苷酸转化植物细胞；(b)从转化的细胞培植植物；和(c)挑选出展现新的表型、用所述期望的多核苷酸稳定地转化的植物，所述表型不被相应的未转化的植物细胞长成的植物展现。优选的，所述期望的多核苷酸基本上由以下组成：(i)对于植物细胞的基因组或相同物种的其它植物是天然的、和/或从中分离的，或者对于与分离出所述植物细胞的植物性上相容的植物物种的基因组是天然的、和/或从中分离的核酸序列；和(ii)至少一个DNA序列，所述DNA序列是具有一种序列的边界样序列，所述一种序列对于所述植物细胞的基因组是天然的，或对于相同物种的植物细胞的基因组是天然的，或对于与分离出所述植物细胞的植物性上相容的植物是天然的，其中所述边界样序列能够稳定地将期望的多核苷酸整合到所述植物细胞的基因组中。

[0036] 本发明的优选的方法要求生产展现出修改的表型的转基因植物，所述修改的表型不被未转化的植物展现，包括(a)用土壤杆菌感染外植体，所述土壤杆菌携带(i)“P-DNA”载体，其含有对于所述转基因植物是天然的、期望的多核苷酸，和(ii)“LifeSupport”载体，其含有包含选择性标记基因的表达盒；(b)选择选择性标记基因的短暂表达，优选的1-10天、3-7天、或4-5天；(c)将外植体转移到再生培养基以容许幼苗形成；(d)筛选幼苗群体，确定哪一些在它们的基因组中包含所述期望的多核苷酸的至少一个拷贝，在这些之中，确定哪些幼苗在它们的基因组中不含有任何外源核酸，例如选择性标记基因；和(e)容许在

它们的基因组中含有期望的多核苷酸但不含任何标记基因 DNA 的幼苗发育成完整植物，其中得到的完整植物展现出修改的表型，所述修改的表型不被相同物种的未转化植物细胞长成的植物展现。

[0037] 根据这种方法，期望的多核苷酸 (i) 基本上仅由对于植物细胞物种或其性上相容的物种的基因组是天然的、和 / 或从中分离的元件组成；(ii) 包含至少一个具有一种序列的边界元件，所述一种序列对于植物细胞物种或其性上相容的物种的基因组是天然的、或是从中分离的，并能够稳定地将所述期望的多核苷酸整合到暴露于载体的植物细胞的基因组中；和 (iii) 被稳定地整合到被转化植物的基因组中；其中所述方法不将非植物物种的或外源的 DNA 整合到被转化植物的基因组中。

[0038] 此外，可以使用任何选择性标记基因作为成功转化的指示物。举例来说，可以使用“新霉素磷酸转移酶”标记基因，或“hpt”标记基因来分别赋予对氨基糖苷类抗生素、卡那霉素和潮霉素的抗性。其他标记基因包括“bar”标记基因，其赋予对除草剂膦丝菌素的抗性；“DHFR”标记基因，其赋予对氨甲蝶呤的抗性；和“ESPS”标记基因，其赋予对 Round-up 除草剂的抗性。如何根据这些标记基因的表达来确定标记基因是否已经稳定地表达到转化的植物细胞的基因组中是本领域公知的。因此，熟练技术人员知道如何根据标记基因的表达来确定在被转化植物细胞中标记基因仅被短暂地表达。

[0039] 在本发明的另一个方面，提供一种制造稳定地转化的植物的方法，包括步骤：(1) 鉴别目标基因；(2) 分离与所述目标基因相关的前导区或尾随区 DNA 序列；(3) 任选地修改所述分离的前导区或尾随区 DNA；(4) 可操作地将所述前导区或尾随区 DNA 连接到天然调节元件以形成表达盒；(5) 将所述表达盒插入到位于二元载体上的 P-DNA 中，其中所述二元载体还携带可操作的细胞分裂素基因，从而外源来源的、其它二元载体序列的不经意插入可以通过细胞分裂素基因的表达来检测；(6) 将修改的二元载体导入到土壤杆菌中；(7) 利用 LifeSupport 介导的转化将重排的天然 DNA 稳定地整合到植物细胞的基因组中；(8) 再生含有重排的天然 DNA 的植物细胞；(9) 弃去显示出过度产生细胞分裂素表型和没有完全再生的植物；和 (10) 维持着不能与未转化的植物相区别的期望的植物用于进一步分析。

[0040] 在本发明的另一个方面，提供了修改选定的植物物种中性状表达的方法。在一个实施方式中，所述方法包括 (1) 鉴定待修改的性状；(2) 构建重组 DNA 分子，所述重组 DNA 分子基本上由对于选定的植物物种是天然的、或从中分离的遗传元件组成，其中当所述重组 DNA 分子被整合到所述选定植物物种的基因组中时，修改该转化的植物物种中性状的表达；(3) 利用 LifeSupport 介导的转化将所述重组 DNA 分子稳定地整合到所述选定植物物种的细胞中；和 (4) 鉴定展现出被修改的性状表达的转化的植物。

[0041] 在优选的实施方式中，通过用两种不同的土壤杆菌菌株感染外植体，将对于期望的植物是天然的多核苷酸插入到该期望的植物的基因组中。第一土壤杆菌菌株能够将天然 DNA 从 P-DNA 载体转移给植物细胞；第二菌株能将携带用于选择性标记基因的表达盒的 T-DNA 转移给植物细胞。后一种载体的实例包括在此描述的所谓的“LifeSupport”载体。通过优选地选择短暂表达标记基因 1-10 天、3-7 天或 4-5 天的植物，随后将外植体转移到再生培养基，获得事件 (events) 的群体，其中一部分是含有所述多核苷酸的至少一个拷贝、但缺少任何 T-DNA 或标记基因拷贝的植物。

[0042] 在另一个实施方式中，使用携带 P-DNA 载体以及 LifeSupport 载体的单个土壤杆

菌菌株，所述 P-DNA 载体在 P-DNA 边界样序列之间容纳了期望的、天然的目标基因或多核苷酸，所述 LifeSupport 载体含有标记基因。可以、或可以不将所述标记基因插入到 P-DNA 边界样序列、T-DNA 边界样序列或其它 T-DNA 样边界序列之间。

[0043] 因而，在另一个优选的实施方式中，P-DNA 载体含有至少两个表达盒，其中之一含有由天然启动子驱动、尾随着天然终止子的、天然的可筛选或可选择的标记基因。

[0044] 通过优选地选择至少 2 天、更优选的至少 5 天的天然标记基因表达，随后将外植体转移到再生培养基，获得事件的群体，其为含有被稳定地整合到它们的基因组中的、导入的 DNA 的至少一个拷贝的植物。在优选的实施方式中，植物衍生的标记基因编码突变的 5- 烯醇丙酮酰 -3- 磷酸莽草酸合酶或色氨酸脱羧酶。在更优选的实施方式中，选择性标记编码耐盐性。在最优选的实施方式中，耐盐性基因具有 SEQID 35 中所示的核苷酸序列，用于选择马铃薯中的转化事件。

[0045] 在又一个实施方式中，性状表达的修改的特征在于表达的增加、表达的下降、或不可检测的表达。

[0046] 在本发明的另一个方面，提供了由一种方法制造的植物，所述方法是 (1) 确定待修改的性状 ;(2) 构建重组 DNA 分子，所述重组 DNA 分子基本上由分离自选定的植物物种的遗传元件组成，其中当所述重组 DNA 分子被整合到所述选定植物物种的基因组中时，修改该转化的植物物种中性状的表达 ;(3) 经由 LifeSupport 介导的转化将所述重组 DNA 分子稳定地整合到所述选定植物物种的细胞中 ;和 (4) 鉴定展现出修改的性状表达的转化的植物。

[0047] 在进一步的方面，提供了修改选定的植物物种中性状表达的方法。这种方法包括 (1) 确定待修改的性状 ;(2) 构建重组 DNA 分子，所述重组 DNA 分子基本上由 (a) 从选定植物物种分离的遗传元件，其中当所述遗传元件被整合到所述选定植物物种的基因组中时，修改该转化的植物物种中性状的表达 ;和 (b) 从相同植物物种分离的选择性标记基因组成 ;(3) 经由 LifeSupport 介导的转化将所述重组 DNA 分子稳定地整合到所述选定植物物种的细胞中 ;(4) 检测所述选择性标记基因 ;和 (5) 鉴定展现出修改的性状表达的转化的植物。

[0048] 在又一个方面，提供了展现修改的性状表达的植物。在一个实施方式中，所述植物具有稳定地整合到其基因组中的重组 DNA 分子，所述重组 DNA 分子基本上由从相同物种的植物、或与该物种性上相容的植物分离的遗传元件组成，其中所述重组 DNA 分子修改所述性状的表达。

[0049] 在本发明的另一个方面，提供了被称为“植物 -DNA”(“P-DNA”) 的分离的核苷酸序列。在优选的实施方式中，P-DNA 本身缺乏任何基因或其部分，通过末端的 T-DNA “边界样”序列划定，所述“边界样”序列与任何强毒土壤杆菌菌株的 T-DNA 边界的核苷酸序列有至少 50％、至少 75％、至少 90％或至少 95％的序列同一性，其支持完整 P-DNA 有效地从土壤杆菌转移到植物细胞。

[0050] 在优选的实施方式中，“边界样”序列促进和便于与之连接的多核苷酸的整合。在另一个优选的实施方式中，修改的 P-DNA 的每个末端序列的长度在 5-100bp、10-80bp、15-75bp、15-60bp、15-50bp、15-40bp、15-30bp、16-30bp、20-30bp、21-30bp、22-30bp、23-30bp、24-30bp、25-30bp、或 26-30bp 之间。更优选的，边界样序列的长度在 20 个和 28 个核苷酸之间。

[0051] 在优选的实施方式中，本发明的 P-DNA 左侧和右侧边界序列对于待修改的植物的基因组是天然的和 / 或是从中分离的，并且在核苷酸序列上与任何已知的土壤杆菌衍生的 T-DNA 边界序列不相同。因而，在一个实施方式中，P-DNA 边界序列可具有与来自土壤杆菌物种，例如根癌土壤杆菌 (Agrobacterium tumefaciens) 或 Agrobacteriumrhizogenes 的 T-DNA 边界序列不同的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 个或更多个核苷酸。做为选择，在另一个实施方式中，本发明的 P-DNA 边界或边界样序列与来自土壤杆菌物种，例如根癌土壤杆菌或 Agrobacterium rhizogenes 的 T-DNA 边界序列具有至少 95％、至少 90％、至少 80％、至少 75％、至少 70％、至少 60％、或至少 50％的序列同一性。更优选的，是与土壤杆菌 T-DNA 边界序列有大于或等于 99％、98％、97％、96％、95％、94％、93％、92％、91％、90％、89％、88％、87％、86％、85％、84％、83％、82％、81％、80％、79％、78％、77％、76％、75％、74％、73％、72％、71％、70％、69％、68％、67％、66％、65％、64％、63％、62％、61％或 60％的核苷酸序列同一性的天然的植物 P-DNA 边界序列。

[0052] 在另一个优选的实施方式中，可以从植物基因组中分离边界样序列，然后进行修改或突变来改变它们能够将核苷酸序列整合到另一个核苷酸序列中的效率。在另一个实施方式中，可以将其他的多核苷酸序列添加到或掺合 (incorporate) 到本发明的边界样序列内部。因而，在又一个实施方式中，可以修改 P-DNA 左侧边界或 P-DNA 右侧边界以便具有 5′ -和 3′ -多克隆位点，或其他限制性位点。在进一步的实施方式中，可以修改 P-DNA 边界序列来增加来自伴随载体的主干 DNA 不整合到植物基因组中的可能性。

[0053] 在更优选的实施方式中，通过在聚合酶链式反应中利用简并引物将 P-DNA 从任何植物中分离。在一个优选的实施方式中，P-DNA 来自马铃薯，由与常规 T-DNA 边界分别具有 80％和 88％的同一性的 25-bp 末端划定，具有 SEQ ID NO.1 或 SEQ ID NO.98 所示的序列。在另一个最优选的实施方式中，P-DNA 来自小麦，由与常规 T-DNA 边界分别具有 72％和 92％的同一性的 25-bp 末端划定，含有 SEQ ID NO.34 所示的序列。

[0054] 可以修改这种 P-DNA 以便包含位于边界样序列之间的其他多核苷酸。在优选的实施方式中，修改的 P-DNA 在 5′ -到 3′ -方向上，基本上由促进 DNA 转移的第一边界样序列、启动子、可操作性连接到启动子的期望的多核苷酸、终止子和同样促进 DNA 转移的第二边界样序列组成。在一个其他的实施方式中，该期望的多核苷酸是在有义和 / 或反义方向上的前导区、尾随区或基因的一个或几个拷贝。在更优选的实施方式中，修改的 P-DNA 含有突变 PPO 基因和转化酶抑制物基因的表达盒。

[0055] 因而，在优选的实施方式中，期望的多核苷酸包含前导区序列的有义和反义序列。在更优选的实施方式中，前导区序列与对于选定植物物种的细胞是内源的基因相连。在再更优选的实施方式中，前导区与选自以下构成的组的基因相连 :PPO 基因、R1 基因、L 或 H 型 α 葡聚糖磷酸化酶基因、UDP 葡萄糖葡糖基转移酶基因、HOS1 基因、S- 腺苷高半胱氨酸水解酶基因、II 类肉桂酸 4- 羟化酶基因、肉桂酰基 - 辅酶 A 还原酶基因、肉桂酰基乙醇脱氢酶基因、咖啡酰基辅酶 A O- 甲基转移酶基因、肌动蛋白解聚因子基因、Nin88 基因、Lol p5 基因、过敏原基因、P450 羟化酶基因、ADP 葡萄糖焦磷酸化酶基因、脯氨酸脱氢酶基因、内切 -1,4-β- 葡聚糖酶基因、玉米黄质环氧酶基因、和 1- 氨基环丙烷 -1- 羧化物合酶基因。

[0056] 在又一个优选实施方式中，期望的多核苷酸序列包含尾随序列的有义和反义序列。在优选的实施方式中，尾随序列与选自以下构成的组的基因相连 :PPO 基因、R1 基因、L

或 H 型 α 葡聚糖磷酸化酶基因、UDP 葡萄糖葡糖基转移酶基因、HOS1 基因、S- 腺苷高半胱氨酸水解酶基因、II 类肉桂酸 4- 羟化酶基因、肉桂酰基 - 辅酶 A 还原酶基因、肉桂酰基乙醇脱氢酶基因、咖啡酰基辅酶 A O- 甲基转移酶基因、肌动蛋白解聚因子基因、Nin88 基因、Lol p5 基因、过敏原基因、P450 羟化酶基因、ADP 葡萄糖焦磷酸化酶基因、脯氨酸脱氢酶基因、内切 -1,4- β - 葡聚糖酶基因、玉米黄质环氧酶基因、和 1- 氨基环丙烷 -1- 羧化物合酶基因。

[0057] 在优选的实施方式中，期望的多核苷酸，例如基因，对于待转化的植物是天然的或是从中分离的。在另一个优选的实施方式中，修改或突变期望的多核苷酸。在一个实施方式中，对分离的多核苷酸的突变可以使得期望的核苷酸与其未突变的形式有大于或等于 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61% 或 60% 的不同。

[0058] 在本发明优选的实施方式中，位于 P-DNA 内部的表达盒的启动子是组成型启动子。在更优选的实施方式中，该组成型启动子是马铃薯的遍在蛋白 -3 基因的启动子。在更优选的实施方式中，该组成型启动子是马铃薯的遍在蛋白 -7 基因的启动子。

[0059] 在另一个实施方式中，位于 P-DNA 内部的表达盒的启动子是可调节启动子。在更优选的实施方式中，该可调节启动子对温度敏感。在更优选的实施方式中，该可调节启动子是 ci21A 启动子或 C17 启动子，都是从马铃薯分离的 (Schneider et al., Plant Physiol. 113 :335-45, 1997 ; Kirch et al., Plant Mol Biol 33 :897-909, 1997)。

[0060] 在另一个实施方式中，位于 P-DNA 内部的表达盒的启动子可以以时序方式调节。在优选的实施方式中，该启动子是 rbcS 启动子 (Ueda et al., Plant Cell 1 :217-27, 1989)。

[0061] 在又一个实施方式中，位于 P-DNA 内部的表达盒的启动子通过脱落酸、创伤、甲基茉莉酮酸酯 (methyl jasmonate) 或赤霉酸来调节。在进一步的实施方式中，这个启动子是选自 Rab 16A 基因启动子、β- 淀粉酶基因启动子或 pin2 基因启动子的启动子。

[0062] 在另一个实施方式中，位于 P-DNA 内部的表达盒的启动子是组织特异性启动子。在特别优选的实施方式中，这个启动子是从 S. tuberosum 分离的 GBSS 启动子。

[0063] 在一个实施方式中，本发明提供能够在 E. coli 和土壤杆菌中复制的、并含有 P-DNA 或修改的 P-DNA 的 P-DNA 载体。在优选的实施方式中，这个载体还在其主干中含有细胞分裂素表达盒，以允许针对主干整合事件的选择。

[0064] 在另一个优选的实施方式中，期望的核苷酸序列进一步包含间隔区元件。在更优选的实施方式中，间隔区元件是 Ubi 内含子序列或 GBSS 间隔区序列。

[0065] 在另一个优选的实施方式中，期望的核苷酸序列包含编码功能上无活性的蛋白的、突变的天然基因，如果在转基因植物中被表达，其可降低这个蛋白的整体活性。在又更优选的实施方式中，这个突变的基因编码功能上无活性的、缺少铜结合结构域的多酚氧化酶。

[0066] 在另一个优选的实施方式中，期望的核苷酸序列包含编码功能上有活性的蛋白的天然基因。在又更优选的实施方式中，这个基因编码与烟草液泡转化酶抑制物具有同源性的蛋白。

[0067] 在另一个实施方式中，位于 P-DNA 内部的表达盒的终止子是 Ubi3 终止子序列或选

定植物物种的基因的 3′ -非翻译区。

[0068] 在本发明的另一个方面，提供了修改目标植物细胞的方法。在一个实施方式中，所述方法包括：(1) 利用 LifeSupport 介导的转化将修改的 P-DNA 插入到目标植物细胞中的至少一个细胞的基因组中；和 (2) 观察在目标植物细胞中是否存在表型的变化；其中在修改的 P-DNA 中的启动子转录与天然基因相连的有义和 / 或反义非翻译序列来减少这个天然基因的表达，从而修改目标植物细胞。在另一个优选的实施方式中，在修改的 P-DNA 中的启动子转录基因来在目标植物细胞中过量表达这个基因。

[0069] 在又一个方面，提供一种制造含有修改的 P-DNA 的、选定植物物种的转基因植物细胞的方法。该方法包括用 P-DNA 载体和 LifeSupport 载体共转染选定植物物种的植物细胞，LifeSupport 载体包含侧翼是 T-DNA 左侧边界和 T-DNA 右侧边界的标记基因和插入到载体主干中的突变 virD2 基因，选择短暂地表达标记基因的植物细胞，分离含有整合到其基因组中的修改的 P-DNA、但不含有任何来自 LifeSupport 载体的核苷酸的植物细胞。在优选的实施方式中，标记基因赋予对卡那霉素的抗性。在最优选的实施方式中，在卡那霉素抗性基因之后是酵母 ADH 终止子。

[0070] 在优选的实施方式中，用于转化的选定植物物种的植物细胞位于培养基中。在另一个实施方式中，用于转化的选定植物物种的植物细胞在植物内。

[0071] 本发明还提供了包含至少一个细胞的选定物种的植物，所述细胞具有含修改的 P-DNA 的基因组。在优选的实施方式中，修改的 P-DNA 在 5′ -到 3′ -方向上，基本上由后面是 P-DNA 序列的、象 T-DNA 边界一样起作用的第一末端、启动子、与启动子可操作地连接的期望的核苷酸序列、终止子和由第二末端划定的其他 P-DNA 序列组成。在另一个实施方式中，期望的多核苷酸是在有义和 / 或反义方向上的前导区、尾随区和基因的一个或几个拷贝。

[0072] 在另一个实施方式中，预想了包含至少一个细胞的植物，所述细胞具有含修改的 P-DNA 的基因组。

[0073] 在本发明的另一个方面，提供了降低选定植物物种中基因表达的方法。该方法包括用 P-DNA 载体对来自选定植物物种的植物细胞进行 LifeSupport 介导的转化，其中这个载体的修改的 P-DNA 被稳定地整合到植物细胞的基因组中。在本发明的另一个方面，修改的 P-DNA 包含降低来自该选定植物物种的内源基因的表达的期望的多核苷酸。

[0074] 在本发明的另一个方面，可以利用发明性的方法，对对于选定植物物种是天然的基因进行突变并再导入到植物中。优选的，利用 P-DNA 载体将突变的基因，举例来说，突变的 PPO 基因整合到植物细胞基因组中。

[0075] 本发明还提供了降低选定植物物种中多酚氧化酶基因的不合需要的表达的方法。在优选的实施方式中，该方法包括将修改的 P-DNA 整合到选定植物物种的基因组中，所述 P-DNA 仅包含分离自选定植物物种或与该选定植物物种性上相容的植物的核苷酸序列，在 5′ -到 3′ -方向，基本上由后面是侧翼 P-DNA 序列的、象 T-DNA 边界一样起作用的第一 P-DNA 末端；启动子；期望的核苷酸，其是与特定 PPO 基因相连的有义方向的尾随区核苷酸序列；来自特定 PPO 基因的尾随区核苷酸序列的反义方向序列；终止序列，和由象 T-DNA 边界一样起作用的第二末端划定的其他 P-DNA 序列组成，其中启动子产生降低特定 PPO 基因表达的双链 RNA 分子，从而降低植物的特定组织中的黑斑擦伤。在另一个实施方式中，来自

前导区核苷酸序列的有义和反义方向的核苷酸序列是从特定 PPO 基因前面的 5′ -非翻译区获得的。在进一步的实施方式中，与 PPO 基因相连的有义和反义方向的前导区或尾随区序列可以由在此被称为内含子或“间隔区”的另一个多核苷酸序列分开。在优选的实施方式中，前导区或尾随区序列与马铃薯 PPO 基因相连。在更优选的实施方式中，前导区或尾随区序列与在马铃薯块茎中表达的马铃薯 PPO 基因相连。在最优选的实施方式中，前导区或尾随序列与在除表皮之外的马铃薯块茎所有部分中表达的马铃薯 PPO 基因相连。

[0076] 本发明还提供了用于在选定植物物种的块茎中降低丙烯酰胺产生、储藏期间的发芽诱导、磷酸盐累积、和 / 或冷诱导的糖化的方法。

[0077] 在优选的实施方式中，该方法包括用修改的 P-DNA 进行 LifeSupport 介导的选定植物物种的转化，所述 P-DNA 仅包含分离自选定植物物种或与该选定植物物种性上相容的植物的核苷酸序列，在 5′ -到 3′ -方向，基本上由具有左侧边界样序列的第一 P-DNA、启动子、期望的核苷酸序列，其是来自与 R1 基因相连的前导区序列的有义方向的核苷酸序列、来自这个前导区序列的反义方向序列、终止序列和右侧边界样序列组成。在表达时，产生降低 R1 基因表达的前导区 RNA 双链体，从而降低植物中冷诱导的糖化。在另一个实施方式中，期望的有义和反义方向的核苷酸序列是与 R1 基因相连的尾随区。在进一步的实施方式中，与 R1 相连的有义和反义方向的前导区或尾随区序列可以由在此被称为内含子或“间隔区”的另一个多核苷酸序列分开。

[0078] 在另一个优选的实施方式中，该方法包括用修改的 P-DNA 进行 LifeSupport 介导的选定植物物种的转化，所述 P-DNA 与上述的类似，但是含有与 α 葡聚糖磷酸化酶基因相连的前导区或尾随区序列。

[0079] 在又一个优选的实施方式中，该方法包括用修改的 P-DNA 进行 LifeSupport 介导的选定植物物种的转化，所述 P-DNA 含有转化酶抑制物基因。

[0080] 在另一个优选的实施方式中，使用在之前的段落中描述的修改的 P-DNA 来降低 Maillard 反应的其他不合需要的产物的累积，Maillard 反应在加热富含碳水化合物的食物例如马铃薯块茎时发生。这些不合需要的产物包括已经与各种病变相联系的高级糖基化终产物 (AGE)。

[0081] 本发明还提供了提高植物和粮食作物的储藏器官中抗性淀粉水平的方法。

[0082] 在优选的实施方式中，该方法包括用修改的 P-DNA 进行 LifeSupport 介导的选定植物物种的转化，所述 P-DNA 含有与淀粉分支酶 I 和 II 基因相连的尾随区序列的融合物的表达盒。

[0083] 本发明还提供了分离的核苷酸序列，其包含在块茎中优势表达的马铃薯 GBSS 基因和马铃薯蛋白酶抑制因子基因的启动子。该分离的启动子分别具有 SEQ ID NO. :6 和 SEQ ID NO. :40 中所示的核苷酸序列。

[0084] 在一方面，本发明提供了修改选定植物的性状的方法，包括 :

[0085] a. 用期望的多核苷酸稳定地转化来自选定植物的细胞，其中所述期望的多核苷酸基本上由对于所述选定植物是天然的、对于来自相同物种的植物是天然的、或对于与所述选定植物性上互交可孕的植物是天然的核酸序列组成，

[0086] b. 从转化的植物细胞中获得稳定地转化的植物，其中转化的植物含有稳定地整合到基因组中的多核苷酸，和其中所述期望的多核苷酸修改所述性状。

[0087] 在优选的实施方式中，该方法进一步包括用在植物细胞中短暂表达的选择性标记基因共转染植物细胞，鉴定转化的植物细胞，从转化的植物细胞获得转化的植物，其中选择性标记基因没有被稳定地整合，期望的多核苷酸被稳定地整合到基因组中。

[0088] 在优选的实施方式中，期望的多核苷酸包含 P-DNA、GBSS 启动子、Ubi7 启动子、Ubi3 启动子、PIP 启动子、修改的 PPO 基因、转化酶抑制物基因、耐盐性基因、R1 相连的前导区、磷酸化酶的相连前导区、R1 相连的尾随区、SBE 相连的尾随区、Ubi 内含子、GBSS 间隔区、UbiT。

[0089] 在另一个优选的实施方式中，本发明的“植物”是单子叶植物，选自由小麦、草皮(turf)、草皮草 (turfgrass)、谷类、玉米、稻米、燕麦、小麦、大麦、高粱、兰花、鸢尾、百合、洋葱、香蕉、甘蔗、高粱和棕榈构成的组。

[0090] 在又一个实施方式中，本发明的“植物”是双子叶植物，选自由 avacado、马铃薯、烟草、番茄、甜菜、椰菜、木薯、甘薯、胡椒、棉花、poinsetta、豆荚、苜蓿、大豆、胡萝卜、草莓、莴苣、橡树、枫树、胡桃、玫瑰、薄荷、南瓜、雏菊和仙人掌构成的组。

[0091] 在又一个实施方式中，当前发明性方法的植物和植物细胞是通过土壤杆菌介导的转化方法转化的。优选的，土壤杆菌介导的转化依靠使用至少一个二元载体。在又一个实施方式中，土壤杆菌介导的转化方法使用第一二元载体和第二二元载体。在优选的实施方式中，第一二元载体含有期望的多核苷酸，第二二元载体含有选择性标记基因，其中所述选择性标记基因可操作地连接到启动子和终止子。

[0092] 根据本方法，修改的性状选自由增强的健康和营养特性、增加的储藏、提高的产量、增强的耐盐性、增强的重金属耐受性、提高的干旱耐受性、提高的抗病性、提高的昆虫耐受性、提高的水胁迫耐受性、增强的寒冷和霜冻耐受性、增强的颜色、增加的甜味、提高的活力、改善的味道、改善的纹理、降低的磷酸盐含量、提高的发芽、提高的微量元素摄取、改善的淀粉组成、增加的花寿命构成的组。

[0093] 本发明还包括用当前方法制造的植物。

[0094] 在另一个方面，本发明提供了修改选定植物中的性状的方法，包括：

[0095] (a) 鉴定待修改的性状；

[0096] (b) 构建第一多核苷酸，所述第一多核苷酸基本上由从所述选定植物、来自相同物种的植物、或与所述选定植物性上互交可孕的植物分离的天然遗传元件组成，其中所述天然遗传元件能够修改控制性状的基因的表达

[0097] (c) 构建第二多核苷酸，所述第二多核苷酸包含与启动子和终止子可操作地连接的选择性标记基因；

[0098] (d) 用第一和第二多核苷酸共转染来自所述选定植物的植物细胞；

[0099] (e) 选择选择性标记基因的短暂表达；

[0100] (f) 筛选用第一多核苷酸稳定地转化的、但是不含有整合到基因组中的第二 DNA 分子的植物细胞；和

[0101] (g) 从展现出修改的性状表达的转化的植物细胞获得稳定地转化的植物。

[0102] 在一个实施方式中，遗传元件包含至少一个启动子、目标序列、终止子、增强子、内含子、间隔区或调节元件。在另一个实施方式中，权利要求 4 的方法，其中在第二多核苷酸之前用第一多核苷酸转染植物细胞，或反之。

[0103] 在一个实施方式中，目标序列是基因。在另一个实施方式中，所述基因是突变的或野生型多酚氧化酶基因或突变的或野生型 R1 基因。在一个其他的实施方式中，目标序列是前导区或尾随区序列，其中所述前导区或尾随区序列是位于对植物细胞是天然的基因的上游或下游的序列。在又一个实施方式中，目标序列包含可操作地与反义前导区序列连接的有义方向的前导区序列。在又一个实施方式中，目标序列包含可操作地与反义尾随区序列连接的有义方向的尾随区序列。在另一个实施方式中，启动子是可诱导的启动子。在另一个实施方式中，终止子是酵母 ADH 终止子序列。

[0104] 根据本发明，前导区构建体从 5′ －到 3′ －方向包含启动子、有义方向前导区序列、前导区的反义序列、和终止子，其中前导区构建体的表达生产双链 RNA 分子，所述双链 RNA 分子促进与之相关的基因的表达的下调。在一个其他的实施方式中，前导区序列与 PPO 基因、R1 基因、L 型磷酸化酶基因或 α 葡聚糖磷酸化酶基因的编码区相连 (associated with)，并位于它们的上游。

[0105] 在另一个实施方式中，尾随区构建体从 5′ －到 3′ －方向包含启动子、有义方向尾随区序列、尾随区的反义序列、和终止子，其中尾随区构建体的表达生产双链 RNA 分子，所述双链 RNA 分子促进与之相关的基因的表达的下调。在优选的实施方式中，尾随区序列与 PPO 基因、R1 基因、L 型磷酸化酶基因或 α 葡聚糖磷酸化酶基因的编码区相连，并位于它们的下游。

[0106] 该方法进一步包括使植物细胞暴露于第二载体，所述第二载体包含标记元件，其中所述标记在被转化植物中短暂地表达，不被稳定地整合到被转化植物的基因组中。在一个实施方式中，标记是除草剂抗性基因、抗生素抗性基因或 NPTII。

[0107] 优选的，通过土壤杆菌介导的转化来转化植物细胞。在一个实施方式中，土壤杆菌介导的转化依靠使用至少一个二元载体。在又一个实施方式中，土壤杆菌介导的转化方法使用第一二元载体和第二二元载体。在一个其他的实施方式中，第一二元载体携带第一多核苷酸，第二二元载体携带第二多核苷酸。

[0108] 本发明提供了修改选定植物中的基因表达的另一个方法，包括：

[0109] (a) 鉴定所述功能基因；

[0110] (b) 构建第一多核苷酸，所述第一多核苷酸基本上由从所述选定植物、与选定植物相同物种的植物、或与所述选定植物性上互交可孕的植物分离的天然遗传元件组成，其中所述天然遗传元件能够修改所述基因的表达；

[0111] (c) 构建含有功能性选择性标记基因的第二多核苷酸；

[0112] (d) 用第一和第二多核苷酸共转染来自所述选定植物的植物细胞；

[0113] (e) 选择选择性标记基因的短暂表达；

[0114] (f) 筛选用第一多核苷酸稳定地转化的、但是不含有整合到基因组中的第二多核苷酸的植物细胞；和

[0115] (g) 从展现出修改的基因表达的转化的植物细胞获得稳定地转化的植物。

[0116] 优选的，通过土壤杆菌介导的转化来转化植物细胞。在一个实施方式中，土壤杆菌介导转化依靠使用至少一个二元载体。在又一个实施方式中，土壤杆菌介导的转化方法使用第一二元载体和第二二元载体。在一个其他的实施方式中，第一二元载体携带第一多核苷酸，第二二元载体携带第二多核苷酸。

[0117] 在另一个实施方式中，第一多核苷酸包含 P-DNA、GBSS 启动子、Ubi7 启动子、Ubi3 启动子、PIP 启动子、修改的 PPO 基因、转化酶抑制物基因、耐盐性基因、R1 相连的前导区 (R1-associatedleader)、磷酸化酶相连的前导区、R1 相连的尾随区、SBE 相连的尾随区、Ubi 内含子、GBSS 间隔区、UbiT 中的至少一个。

[0118] 在另一个实施方式中，第二多核苷酸包含选择性标记基因、ω- 突变的 virD2 多核苷酸、codA 多核苷酸和 codA::upp 融合多核苷酸中的至少一个。

[0119] 本发明还包括通过这种方法制造的植物。

[0120] 在一个其他的实施方式中，提供了一种转基因植物，与非转基因植物相比其展现出修改的性状表达，所述转基因植物衍生自所述非转基因植物，其中所述转基因植物被期望的多核苷酸稳定地转化，所述期望的多核苷酸基本上由分离自所述植物、相同物种的植物、或与所述植物性上互交可孕的植物的天然遗传元件组成，其中所述多核苷酸修改所述性状的表达。

[0121] 在另一个优选的实施方式中，本发明的“植物”是单子叶植物，选自由小麦、草皮、草皮草、谷类、玉米、稻米、燕麦、小麦、大麦、高粱、兰花、鸢尾、百合、洋葱、香蕉、甘蔗、高粱和棕榈构成的组。

[0122] 在又一个实施方式中，本发明的“植物”是双子叶植物，选自由 avacado、马铃薯、烟草、番茄、甜菜、椰菜 (broccoli)、木薯、甘薯、胡椒、棉花、poinsetta、豆荚、苜蓿、大豆、胡萝卜、草莓、莴苣、橡树、枫树、胡桃、玫瑰、薄荷、南瓜、雏菊和仙人掌构成的组。

[0123] 在另一个实施方式中，该性状选自由增强的健康和营养特性、增加的储藏、提高的产量、增强的耐盐性、增强的重金属耐受性、提高的干旱耐受性、提高的抗病性、提高的昆虫耐受性、提高的水胁迫耐受性、增强的寒冷和霜冻耐受性、增强的颜色、增加的甜味、提高的活力、改善的味道、改善的纹理、降低的磷酸盐含量、提高的发芽、提高的微量元素摄取、改善的淀粉组成、增加的花寿命构成的组。

[0124] 在另一个实施方式中，期望的多核苷酸包含 P-DNA、GBSS 启动子、Ubi7 启动子、Ubi3 启动子、PIP 启动子、修改的 PPO 基因、转化酶抑制物基因、耐盐性基因、R1 相连的前导区、磷酸化酶相连的前导区、R1 相连的尾随区、SBE 相连的尾随区、Ubi 内含子、GBSS 间隔区、UbiT 中的至少一个。

[0125] 本发明还包括大小在 20 到 100bp 的范围内的、分离的边界样核苷酸序列，其与来自 Agrobacterium tumafaciens 的 T-DNA 边界序列具有 52％到 96％之间的序列同一性。在优选的实施方式中，分离的核苷酸序列分离自单子叶植物，所述单子叶植物选自由小麦、草皮、草皮草、谷类、玉米、稻米、燕麦、小麦、大麦、高粱、兰花、鸢尾、百合、洋葱、香蕉、甘蔗、高粱和棕榈构成的组。在另一个实施方式中，所述核苷酸序列分离自双子叶植物，所述双子叶植物选自由 avacado、马铃薯、烟草、番茄、甜菜、椰菜、木薯、甘薯、胡椒、棉花、poinsetta、豆荚、苜蓿、大豆、胡萝卜、草莓、莴苣、橡树、枫树、胡桃、玫瑰、薄荷、南瓜、雏菊和仙人掌构成的组。

[0126] 在又一个实施方式中，所述分离的核苷酸序列分离自马铃薯，具有 SEQ ID NO.94 或 95 所示的核苷酸序列。在优选的实施方式中，所述分离的核苷酸序列与来自 Agrobacterium tumafaciens 的 T-DNA 边界序列具有 52％的序列同一性。本发明包括包含这种核苷酸序列的载体。

[0127] 本发明还提供了制造用期望的多核苷酸稳定地转化的植物的方法，包括：

[0128] (a) 从所述植物中分离侧翼是边界样序列的 P-DNA，其中所述边界样序列与来自 Agrobacterium tumafaciens 的 T-DNA 边界序列具有 52％到 96％之间的序列同一性；

[0129] (b) 将所述期望的多核苷酸插入到 P-DNA 边界样序列之间，形成 P-DNA 构建体；和

[0130] (c) 用所述 P-DNA 构建体转化来自所述植物的植物细胞；和

[0131] (d) 从用所述 P-DNA 构建体稳定地转化的植物细胞中再生植物。

[0132] 在一个实施方式中，所述 P-DNA 构建体被携带在包含主干整合标记基因的载体上，选择不包含所述主干整合标记基因的转化的植物细胞。在另一个实施方式中，所述主干整合标记基因是细胞分裂素基因。在另一个实施方式中，不选择展现出过度产生细胞分裂素的表型的植物幼苗。在又一个实施方式中，所述主干整合标记基因是 IPT 基因，不选择展现出异常的表型或不能发育根系的植物幼苗。

[0133] 在一个其他的实施方式中，所述植物细胞来自单子叶植物，所述单子叶植物选自由小麦、草皮、草皮草、谷类、玉米、稻米、燕麦、小麦、大麦、高粱、兰花、鸢尾、百合、洋葱、香蕉、甘蔗、高粱和棕榈构成的组。

[0134] 在另一个实施方式中，所述植物细胞来自双子叶植物，所述双子叶植物选自由 avacado、马铃薯、烟草、番茄、甜菜、椰菜、木薯、甘薯、胡椒、棉花、poinsetta、豆荚、苜蓿、大豆、胡萝卜、草莓、莴苣、橡树、枫树、胡桃、玫瑰、薄荷、南瓜、雏菊和仙人掌构成的组。

[0135] 优选的，通过土壤杆菌介导的转化来转化植物细胞。在一个实施方式中，土壤杆菌介导转化依靠使用至少一个二元载体。在又一个实施方式中，土壤杆菌介导的转化方法使用第一二元载体和第二二元载体。在一个其他的实施方式中，第一二元载体携带第一多核苷酸，第二二元载体携带第二多核苷酸。在一个进一步的实施方式中，第二二元载体包含至少一个阴性选择性标记基因和 ω- 突变的 virD2 基因，其中所述阴性选择性标记基因位于右侧的 T-DNA 边界和左侧的 T-DNA 边界内，其中所述 ω- 突变的 virD2 基因位于第二二元载体的主干内。在优选的实施方式中，第二二元载体包含位于右侧的 T-DNA 边界和左侧的 T-DNA 边界内的阴性选择性标记基因，以及位于第二二元载体的主干内的 ω- 突变的 virD2 基因。

[0136] 本发明还提供了一种 P-DNA，在 5′ -到 3′ -方向上，其基本上由第一 T-DNA 边界样序列、启动子、与启动子可操作地连接的期望的多核苷酸序列、终止子、第二 T-DNA 边界样序列，其中所述边界样序列与 T-DNA 边界序列有低于 100％的序列同一性。

[0137] 在优选的实施方式中，所述 T-DNA 边界样序列、启动子、期望的多核苷酸和终止子都分离自相同植物、相同植物物种、或性上互交可孕的植物。

[0138] 在另一个实施方式中，所述 P-DNA 进一步的基本上由选择性标记基因组成。

[0139] 在又一个实施方式中，所述 T-DNA 边界样序列、启动子、期望的多核苷酸、终止子和选择性标记基因都分离自相同植物、相同植物物种、或性上互交可孕的植物。

[0140] 在又一个实施方式中，P-DNA 中的所述期望的多核苷酸序列是位于基因的编码区的上游或下游的序列，其中所述上游序列是前导区序列，其中所述下游的序列是尾随区序列。在这个实施方式中，所述 T-DNA 边界样序列、启动子、前导区序列、尾随区序列、终止子和选择性标记基因都分离自相同植物、相同植物物种、或性上互交可孕的植物。

[0141] 在另一个实施方式中，本发明提供了包含这种 P-DNA 构建体的载体。

[0142] 在另一个实施方式中，启动子是可调节启动子。在又一个实施方式中，所述可调节启动子是对温度敏感的。在优选的实施方式中，所述可调节启动子是小麦 wcs120 启动子。在另一个实施方式中，所述启动子处于时序调节之下。在又一个实施方式中，所述可调节启动子是羧化酶启动子。在进一步的实施方式中，所述羧化酶启动子是玉米羧化酶启动子。

[0143] 所述启动子可通过脱落酸、创伤、甲基茉莉酮酸酯或赤霉酸的任何一个来调节。在另一个实施方式中，所述启动子是选自 Rab 16A 基因启动子、D-淀粉酶基因启动子或 pin2 基因启动子的启动子。在又一个实施方式中，所述启动子是组织特异性启动子。

[0144] 在一个其他的实施方式中，前导区序列是基因的 5′ -非翻译区的一部分，所述基因对于选定植物物种的细胞是内源的。在另一个实施方式中，所述 5′ -非翻译区位于基因的起始密码子的上游，所述基因选自以下构成的组 :PPO 基因、R1 基因、HOS1 基因、S- 腺苷高半胱氨酸水解酶基因、II 类肉桂酸 4- 羟化酶基因、肉桂酰基 - 辅酶 A 还原酶基因、肉桂酰基乙醇脱氢酶基因、咖啡酰基辅酶 A O- 甲基转移酶基因、肌动蛋白解聚因子基因、Nin88 基因、Lol p5 基因、过敏原基因、P450 羟化酶基因、ADP 葡萄糖焦磷酸化酶基因、脯氨酸脱氢酶基因、内切 -1,4-β- 葡聚糖酶基因、玉米黄质环氧酶基因、和 1- 氨基环丙烷 -1- 羧化物合酶基因。

[0145] 在另一个实施方式中，所述尾随区序列是位于基因的终止密码子下游的基因的 3′ -非翻译区的一部分，所述基因选自以下构成的组 :PPO 基因、R1 基因、HOS1 基因、S- 腺苷高半胱氨酸水解酶基因、II 类肉桂酸 4- 羟化酶基因、肉桂酰基 - 辅酶 A 还原酶基因、肉桂酰基乙醇脱氢酶基因、咖啡酰基辅酶 A O- 甲基转移酶基因、肌动蛋白解聚因子基因、Nin88 基因、Lol p5 基因、过敏原基因、P450 羟化酶基因、ADP 葡萄糖焦磷酸化酶基因、脯氨酸脱氢酶基因、内切 -1,4-β- 葡聚糖酶基因、玉米黄质环氧酶基因、和 1- 氨基环丙烷 - 羧化物合酶基因。

[0146] 当前的载体可进一步包含间隔区元件，其是 Ubi 内含子序列或 GBSS 间隔区序列。在另一个实施方式中，所述载体包含终止子，其是 Ubi3 终止子序列或内源植物基因的 3′ -非翻译区。

[0147] 在另一个实施方式中，所述载体包含与组成型启动子可操作性连接的选择性标记基因和与可诱导启动子可操作性连接的 Cre 基因，其中所述选择性标记基因和所述 Cre 基因的侧翼是第一重组酶识别位点和第二重组酶识别位点。在另一个实施方式中，第一重组酶识别位点和第二重组酶识别位点是 lox 位点。

[0148] 在另一个实施方式中，所述可诱导启动子是温度敏感的启动子、化学诱导的启动子或时序启动子。在又一个实施方式中，所述可诱导启动子是 Ha hsp17.7G4 启动子、小麦 wcs120 启动子、Rab 16A 基因启动子、α- 淀粉酶基因启动子、pin2 基因启动子、羧化酶启动子。在又一个优选的实施方式中，进一步包含植物衍生的标记基因。在另一个优选的实施方式中，植物衍生的标记基因是烯醇丙酮酰 -3- 磷酸莽草酸合酶基因。

[0149] 在本发明的另一个方面，提供了一种修改植物细胞的方法，包括将 P-DNA 序列整合到植物细胞的基因组中，其中所述 P-DNA 在 5′ -到 3′ -方向上，基本上由第一 T-DNA 边界样序列、启动子、与所述启动子可操作性连接的期望的多核苷酸序列、终止子、第二 T-DNA 边界样序列组成，其中所述边界样序列与 T-DNA 边界序列具有低于 100％的序列同一性，和其中所述 T-DNA 边界样序列、启动子、期望的多核苷酸和终止子对于所述植物细胞的基因

组都是天然的或都是从中分离的，其中所述期望的多核苷酸包含与植物中基因的上游或下游非编码区相连的前导区序列或尾随区序列的有义和反义序列，和其中期望的多核苷酸的表达产生了靶向与所述期望的多核苷酸相连的基因的双链 RNA 转录产物，从而修改所述植物细胞。

[0150] 本发明还包括修改植物的方法，包括：

[0151] (i) 用本发明的载体转染所述植物中的至少一个细胞；

[0152] (ii) 选择表达功能性选择性标记的细胞；

[0153] (iii) 分离所述表达功能性选择性标记的细胞；

[0154] (iii) 在所述分离的细胞中诱导功能性 Cre 基因的表达；

[0155] (iv) 培养所述分离的细胞；和

[0156] (ii) 观察培养的细胞的表型；

[0157] 其中与未转化的植物细胞不同的表型表明目标植物细胞已经被修改。

[0158] 在优选的实施方式中，本发明的这个及其他方法的选择步骤通过鉴定对抗生素有抗性的细胞来进行。

[0159] 在另一个方面，用于识别其基因组含有 P-DNA 的目标植物细胞的方法，包括用本发明的载体和第二土壤杆菌衍生的载体共转染植物靶细胞，所述第二土壤杆菌衍生的载体包含侧翼是 T-DNA 左侧边界和 T-DNA 右侧边界的标记基因和 ω- 突变的 virD2 基因，其中将所述 P-DNA 整合到所述植物目标细胞的基因组中，和其中没有所述第二土壤杆菌衍生的载体的部分被整合到所述植物靶细胞的基因组中。在优选的实施方式中，在第二土壤杆菌衍生的载体中的标记是新霉素磷酸转移酶基因。

[0160] 在另一个方面，提供了用于识别其基因组含有整合盒的至少一部分的目标植物细胞的方法，进一步包括选择在含卡那霉素的培养基上暂时生长存活的细胞，其中所述选择的细胞的基因组仅含有所述整合盒。在一个实施方式中，所述目标植物细胞在植物内。本发明还包括包含至少一个细胞的植物，所述细胞的基因组包含这种 P-DNA。

[0161] 本发明还包括包含至少一个细胞的植物，所述细胞的基因组被人工地操作来仅含有植物衍生的核酸，其中没有所述植物的细胞含有整合到细胞基因组中的外源核酸。

[0162] 本发明还包括包含 SEQ ID NO.93 的多核苷酸序列的多核苷酸，其中所述多核苷酸的长度在 20 到 80 个核苷酸之间。在一个实施方式中，所述多核苷酸的长度在 21 到 70 个核苷酸、22 到 50 个核苷酸、23 到 40 个核苷酸或 24 到 30 个核苷酸之间。

[0163] 在另一个方面，本发明包括如 SEQ ID NO.40 所示的块茎特异性启动子。

[0164] 本发明还包括制造转基因植物细胞的基于土壤杆菌的方法，所述植物细胞不含有被稳定地整合到核 DNA 中的选择性标记基因，包括：

[0165] a. 构建包含多核苷酸的第一二元载体，所述多核苷酸基本上由期望的功能基因组成，在所述期望的功能基因的 5′ 和 3′ 末端可操作地连接 T-DNA 边界或 T-DNA 边界样序列；b. 构建包含功能性选择性标记基因的第二二元载体，在所述功能性选择性标记基因的 5′ 和 3′ 末端可操作地连接 T-DNA 边界或 T-DNA 边界样序列；c. 将植物细胞与 (i) 携带第一和第二二元载体的土壤杆菌菌株；或 (ii) 携带第一二元载体的第一土壤杆菌菌株和携带第二二元载体的第二土壤杆菌菌株孵化；d. 在孵化适当的时间后在含有合适的选择试剂的培养基上，选择植物细胞，其中在所述植物细胞中期望的功能基因被整合到植物的核

DNA 中，而没有所述选择性标记基因被整合到植物核 DNA 中。

[0166] 在优选的实施方式中，选择性标记基因是除草剂抗性基因或抗生素抗性基因。在另一个优选的实施方式中，所述抗生素抗性基因是 nNPTII 基因。在另一个实施方式中，所述抗生素抗性基因是与来自遍在蛋白 -7 基因的启动子和来自酵母乙醇脱氢酶 1(ADH1) 基因的终止子可操作地连接的 npt II 结构基因。依据这种方法，所述植物细胞首先与第一土壤杆菌菌株孵化，然后随后地与第二土壤杆菌菌株孵化，或反之。

[0167] 在优选的实施方式中，第一二元载体进一步的包含二元整合标记基因，所述二元整合标记基因可被用于检测用二元载体主干序列稳定地转化的植物细胞 . 在另一个实施方式中，所述二元载体整合标记基因选自由除草剂抗性基因、抗生素抗性基因或 NPTII 构成的组。在又一个实施方式中，第二二元载体进一步包含细菌胞嘧啶脱氨酶 (codA) 和尿嘧啶磷酸核糖基转移酶 (upp) 基因之间的基因融合物，其被插入到 T-DNA 或 T-DNA 边界样序列之间，在与第一和第二土壤杆菌菌株孵化后使植物暴露于 5- 氟胞嘧啶来选择用第二二元载体转化的那些植物细胞。

[0168] 在又一个实施方式中，所述第二二元载体进一步包含降低主干整合概率的基因。在一个实施方式中，这种基因是 ω- 突变的 virD2 基因，其中所述 ω- 突变的 virD2 基因降低选择性标记基因整合到植物核 DNA 中的频率。

[0169] 本发明还包括包含从 S. tuberosum 分离的 GBSS 启动子的分离的核苷酸序列。在优选的实施方式中，这个分离的核苷酸序列具有 SEQ ID NO.6 或 13 的核苷酸序列。

[0170] 本发明还预期用于分离包含 T-DNA 边界样序列的植物多核苷酸的方法，包括 (i) 片段化植物基因组 ；(ii) 将已知序列的多核苷酸连接到植物 DNA 片段来产生连接的 DNA ；(iii) 从所述连接的 DNA 产生 PCR 产物，其包含 (a) 与 T-DNA 边界序列的一部分同源的序列，(b) 来自所述植物基因组的 DNA 序列，和 (c) 来自已知序列的多核苷酸的序列，其中所述 (a) 和 (b) 的序列是连接的 ；(iv) 对 PCR 产物测序 ；(v) 根据来自所述植物基因组的 DNA 序列设计至少一个 PCR 引物 ；(vi) 在植物基因组 DNA 的反向 PCR 中使用至少一个 (v) 的 PCR 引物来鉴定来自植物基因组 DNA 的、是 T-DNA 边界样序列的序列。

[0171] 在一个实施方式中，步骤 (iii) 的 PCR 产物通过引物对产生，在引物对中，一个引物具有包含

[0172] 5′ -YGR CAG GAT ATA T-3 或 5′ -CAG GAT ATA TNN NNN KGT AAA C-3′ 的序列。

[0173] 本发明还预期用于产生不含有 T-DNA 的修改的植物的方法，包括 (1) 用 (i) 包含 P-DNA 内的期望的多核苷酸的土壤杆菌转化载体，和 (ii) 包含 T-DNA 内的选择性标记的土壤杆菌转化载体转化植物细胞 ；(2) 从所述转化的植物细胞获得转化的植物，所述植物在其基因组中包含所述 P-DNA 的至少一个拷贝和所述 T-DNA 的至少一个拷贝 ；(3) 使转化的植物自交或杂交来产生分离了 T-DNA 和 P-DNA 的子代植物 ；和 (4) 筛选子代植物来鉴定不包含所述 T-DNA 但包含所述 P-DNA 的修改的植物。

[0174] 在本发明的另一个方面，预期一种修改的块茎。在此描述的任何修改的块茎可以是成熟的块茎，例如至少 12 周龄的块茎。因而，在一个实施方式中，修改的块茎，其可以是成熟的块茎，与所述修改的块茎的物种相同物种的野生型块茎通常相关的丙烯酰胺水平相比，包含更低至少约 99％、98％、97％、96％、95％、94％、93％、92％、91％、90％、89％、88％、87％、86％、85％、84％、84％、83％、82％、81％、80％、79％、78％、77％、76％、75％、74％、

73％、72％、71％、70％、69％、68％、67％、66％、65％、64％、63％、62％、61％、60％、59％、58％、57％、56％、55％、54％、53％、52％、51％、50％、49％、48％、47％、46％、45％、44％、43％、42％、41％、40％、39％、38％、37％、36％、35％、34％、33％、32％、31％、30％、29％、28％、27％、26％、25％、24％、23％、22％、21％、20％、19％、18％、17％、16％、15％、14％、13％、12％、11％、10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％或 1％的丙烯酰胺水平。

[0175] 在另一个实施方式中，所述块茎选自由 ahipa、apio、秘鲁胡萝卜、慈茹、竹芋、baddo、苦树薯、巴西竹芋、木薯、中国薯蓣、荸荠、椰子、cocoyam、芋、芋根、象耳、菊芋、goo、日本薯蓣、日本马铃薯、耶路撒冷薯蓣、豆薯、百合根、ling gaw、mandioca、manioc、墨西哥马铃薯、墨西哥豆薯、old cocoyam、马铃薯、saa got、sato-imo、seegoo、sunchoke、sunroot、甜树薯、甘薯、tanier、tannia、tannier、木薯块根、topinambour、莲藕、豆薯、薯蓣、和 yautia 构成的组。

[0176] 在优选的实施方式中，所述马铃薯是 Russet 马铃薯、RoundWhite 马铃薯、Long White 马铃薯、Round Red 马铃薯、Yellow Flesh 马铃薯或 Blue 和 Purple 马铃薯。

[0177] 在另一个实施方式中，提供了一种修改的块茎，其与所述修改的块茎相同物种的野生型块茎的直链淀粉水平相比，包含更大至少约 99％、98％、97％、96％、95％、94％、93％、92％、91％、90％、89％、88％、87％、86％、85％、84％、84％、83％、82％、81％、80％、79％、78％、77％、76％、75％、74％、73％、72％、71％、70％、69％、68％、67％、66％、65％、64％、63％、62％、61％、60％、59％、58％、57％、56％、55％、54％、53％、52％、51％、50％、49％、48％、47％、46％、45％、44％、43％、42％、41％、40％、39％、38％、37％、36％、35％、34％、33％、32％、31％、30％、29％、28％、27％、26％、25％、24％、23％、22％、21％、20％、19％、18％、17％、16％、15％、14％、13％、12％、11％、10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％或 1％的直链淀粉水平。在另一个实施方式中，所述修改的块茎是成熟块茎。

[0178] 在另一个实施方式中，修改的、成熟的块茎包含与相同物种的野生型块茎的直链淀粉水平相比，约 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、或 10 倍的直链淀粉水平。

[0179] 在又一个实施方式中，所述修改的块茎是至少 12 周龄的。

[0180] 还预期一种修改的块茎，其与所述修改的块茎相同物种的野生型块茎中的葡萄糖水平相比，包含更低至少约 99％、98％、97％、96％、95％、94％、93％、92％、91％、90％、89％、88％、87％、86％、85％、84％、84％、83％、82％、81％、80％、79％、78％、77％、76％、75％、74％、73％、72％、71％、70％、69％、68％、67％、66％、65％、64％、63％、62％、61％、60％、59％、58％、57％、56％、55％、54％、53％、52％、51％、50％、49％、48％、47％、46％、45％、44％、43％、42％、41％、40％、39％、38％、37％、36％、35％、34％、33％、32％、31％、30％、29％、28％、27％、26％、25％、24％、23％、22％、21％、20％、19％、18％、17％、16％、15％、14％、13％、12％、11％、10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％或 1％的冷诱导的葡萄糖水平。在一个其他的实施方式中，所述修改的块茎是成熟块茎。

[0181] 在又一个实施方式中，在所述修改的块茎中的葡萄糖水平比相同物种的野生型块茎中的葡萄糖水平低约 40％。

[0182] 本发明还包括修改的、成熟的块茎，与相同物种的野生型块茎中的丙烯酰胺水平相比，其包含减少至 1/5 的丙烯酰胺水平。

[0183] 在另一个实施方式中，所述修改的块茎是成熟块茎。在又一个实施方式中，所述修

改的块茎是至少 12 周龄的。

[0184] 还包括一种修改的块茎，其与所述修改的块茎相同物种的野生型块茎中的磷酸盐水平相比，包含更低至少约 99％、98％、97％、96％、95％、94％、93％、92％、91％、90％、89％、88％、87％、86％、85％、84％、84％、83％、82％、81％、80％、79％、78％、77％、76％、75％、74％、73％、72％、71％、70％、69％、68％、67％、66％、65％、64％、63％、62％、61％、60％、59％、58％、57％、56％、55％、54％、53％、52％、51％、50％、49％、48％、47％、46％、45％、44％、43％、42％、41％、40％、39％、38％、37％、36％、35％、34％、33％、32％、31％、30％、29％、28％、27％、26％、25％、24％、23％、22％、21％、20％、19％、18％、17％、16％、15％、14％、13％、12％、11％、10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％或 1％的磷酸盐水平。在一个实施方式中，所述修改的块茎是成熟块茎。在另一个实施方式中，所述修改的块茎是至少 12 周龄的。

[0185] 本发明还提供了一种修改的块茎，其与所述修改的块茎的物种相同物种的野生型块茎相关的多酚氧化酶活性水平相比，包含更低至少约 99％、98％、97％、96％、95％、94％、93％、92％、91％、90％、89％、88％、87％、86％、85％、84％、84％、83％、82％、81％、80％、79％、78％、77％、76％、75％、74％、73％、72％、71％、70％、69％、68％、67％、66％、65％、64％、63％、62％、61％、60％、59％、58％、57％、56％、55％、54％、53％、52％、51％、50％、49％、48％、47％、46％、45％、44％、43％、42％、41％、40％、39％、38％、37％、36％、35％、34％、33％、32％、31％、30％、29％、28％、27％、26％、25％、24％、23％、22％、21％、20％、19％、18％、17％、16％、15％、14％、13％、12％、11％、10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％或 1％的多酚氧化酶活性水平。在一个其他的实施方式中，所述修改的块茎是成熟块茎。

[0186] 本发明还提供了一种包含至少一个细胞的修改的块茎，所述细胞过量表达无活性的多酚氧化酶基因，其中与所述修改的块茎相同物种的野生型块茎中的多酚氧化酶活性水平相比，在所述修改的块茎中多酚氧化酶活性水平减少了 99％、98％、98％、96％、95％、94％、93％、92％、91％、90％、89％、88％、87％、86％、85％、84％、84％、83％、82％、81％、80％、79％、78％、77％、76％、75％、74％、73％、72％、71％、70％、69％、68％、67％、66％、65％、64％、63％、62％、61％、60％、59％、58％、57％、56％、55％、54％、53％、52％、51％、50％、49％、48％、47％、46％、45％、44％、43％、42％、41％、40％、39％、38％、37％、36％、35％、34％、33％、32％、31％、30％、29％、28％、27％、26％、25％、24％、23％、22％、21％、20％、19％、18％、17％、16％、15％、14％、13％、12％、11％、10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％或 1％。在一个实施方式中，所述修改的块茎是成熟块茎。在另一个实施方式中，所述修改的块茎是至少 12 周龄的。在进一步的实施方式中，在所述修改的块茎或所述修改的成熟块茎中多酚氧化酶活性水平减少了 50％ -90％。

[0187] 在本发明的另一个方面，提供了一种生产不包含 T-DNA 的转基因植物的方法。该方法包括：

[0188] 用 P-DNA 载体和 T-DNA 载体共转化植物组织；

[0189] 通过在培养基上孵化所述植物组织从转化的植物组织培植植物苗，所述培养基含有破坏不含所述 P-DNA 载体或所述 T-DNA 载体的细胞的物质；

[0190] 选择含有所述 P-DNA 或所述 T-DNA 之一、或两者的植物苗；

[0191] 将所述植物苗培植到性成熟，使所述性成熟的植物与未转化的植物杂交；和

[0192] 将细胞仅含有 P-DNA 的子代植物与含有 T-DNA 的子代植物分离。

[0193] 在一个实施方式中，所述植物苗被培植到性成熟，然后自交来生产子代植物，在子代植物中的一些将含有仅含 P-DNA 的细胞。

[0194] 在一个实施方式中，所述 P-DNA 载体基本上与 pSIM340 类似。在另一个实施方式中，所述 T-DNA 载体实质上与 pSIM363 类似。

[0195] 在又一个实施方式中，所述培养基中的物质是 timentine。在另一个实施方式中，所述培养基中的物质是卡那霉素。在又一个实施方式中，timentine 和卡那霉素都是所述培养基中的物质。

[0196] 在这些方法任何一个之中，所述 T-DNA 含有选择性标记基因。

[0197] 在另一个方面，提供了一种生产不包含 T-DNA 的转基因植物的方法。该方法包括：

[0198] 用第一 P-DNA 载体和第二 P-DNA 载体共转化植物组织，其中所述第一 P-DNA 载体包含目标多核苷酸，和其中所述第二 P-DNA 载体包含选择性标记基因；

[0199] 通过在培养基上孵化所述植物组织从转化的植物组织培植植物苗，所述培养基含有破坏不含任何一个所述 P-DNA 载体的细胞的物质；

[0200] 选择含有所述 P-DNA 载体之一、或两者的植物苗；

[0201] 将所述植物苗培植到性成熟，使所述性成熟的植物与未转化的植物杂交、或使所述性成熟的植物自交；和

[0202] 将细胞仅包含来自所述第一 P-DNA 载体的 P-DNA 的子代植物，与在它们基因组中含有来自所述第二 P-DNA 载体的 P-DNA 的子代植物分离。

[0203] 本发明还提供了包含 SEQ ID NO.96 中描述的序列的核酸，其能将一种多核苷酸转移到另一种多核苷酸中。在一个其他的实施方式中，提供了一种含有与 SEQ ID NO.96 中描述的序列具有 90％的序列同一性的序列的核酸。

[0204] 还包括包含 SEQ ID NO.97 中描述的序列的核酸，其能将一种多核苷酸转移到另一种多核苷酸中。在一个实施方式中，提供了一种含有与 SEQ ID NO.97 中描述的序列具有 90％的序列同一性的序列的核酸。

[0205] 附图的简要说明

[0206] 附图 1. 用于本发明的某些 P-DNA 载体的示意图。P-DNA 区用灰色框表示。“ipt”＝ ipt 基因的表达盒；“npt”＝ nptII 基因的表达盒；“mPPO”＝修改的 PPO 基因的表达盒；“INH”＝转化酶抑制物基因的表达盒；“GUS”＝ GUS 基因的表达盒；“LPPO”＝与 PPO 基因相连的前导区的有义和反义拷贝的表达盒；“LPH”＝与磷酸化酶基因相连的前导区的有义和反义拷贝的表达盒；“Alf”＝马铃薯 Alfin 同源物的表达盒。详情参见正文。

[0207] 附图 2. 无基因的表达盒

[0208] 附图 3. 马铃薯和烟草转化酶抑制物蛋白的比对。“St”＝ Solanum tuberosum（马铃薯）；“Nt”＝ Nicotiana tabacum（烟草）

[0209] 附图 4. 与各种 PPO 基因相连的尾随区的对比。

[0210] 附图 5. 用于本发明的某些 LifeSupport 载体的示意图。“codA”是 codA 基因的表达盒；“codA::upp”是与 upp 融合的 codA 基因的表达盒；“ΩvirD2”是 ΩvirD2 基因的表达盒。

[0211] 优选实施方式的详细说明

[0212] 本发明的“精确育种”策略改进了植物和作物的农学性能、营养价值和健康特征，而不将未知的核酸、或来自外源物种的核酸导入到植物物种基因组中，不产生不合需要的表型或有害的副作用。

[0213] 因而，本发明提供了转基因植物，和制造这种植物的方法，所述方法不将来自非植物物种的核酸整合到该植物的基因组中。整合到选定植物基因组中的核酸、启动子、调节元件、其他非编码基因序列、标记、多核苷酸和基因优选的都是从待转化的植物、与待转化植物相同物种的植物、或与待转化植物在性上互交可孕的植物中分离的。可以根据在此描述的方法对这种“天然”核酸进行突变、修改或在表达盒中与其他天然的核酸共连接并重整合到选定植物基因组中。因此，仅利用选定植物自己的核酸、或利用来自与选定植物在性上相容的植物的核酸，改变了转基因植物的基因型和表型。

[0214] 为了便于产生这种转基因植物，本发明利用了这样的事实，不是所有在土壤杆菌介导的转化中使用的 T-DNA 载体都实际上整合到植物基因组中；即，虽然植物细胞可能接受了载体，可能不发生实际的整合事件。根据本发明，人们可以使用这种载体来将选择性标记基因运入植物细胞。然后可以筛选植物细胞，以通过测定标记基因表达多久来确定所述标记是否被稳定地整合到植物基因组中。因此，仅短暂地表达选择性标记基因的植物细胞是期望的，因为它们代表接受了选择性标记基因、但没有将选择性标记基因整合到它们的基因组中的细胞。

[0215] 因而，通过用这种“标记载体”和用另一个含有期望的天然基因或多核苷酸的载体共转化植物，人们可以选择接受了两个载体的植物细胞，从这些植物细胞中，确定哪些细胞具有仅含期望的基因或多核苷酸的基因组。可以修改“标记载体”来进一步降低标记整合到植物基因组中的可能性。本发明以“LifeSupport”载体的形式提供这种“标记载体”。

[0216] 如果没有另外定义，此处使用的所有技术和科学术语具有本发明所属技术领域的一个普通技术人员通常所理解的相同含义。一般地，在此使用的命名，细胞培养、分子遗传学和核酸化学中的实验方法，和在此描述的杂交是本领域公知和常用的。对于重组核酸方法、多核苷酸合成、微生物培养、细胞培养、组织培养、转化、转染、转导、分析化学、有机合成化学、化学合成、化学分析和药物制剂和递送，使用标准技术。一般地，根据厂家的说明进行酶促反应和纯化和 / 或分离步骤。一般根据公开的常规方法，例如，Molecular cloning alaboratory manual,2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, ColdSpring Harbor, NY(1989)，和 Current protocols in molecular biology, John Wiley & Sons, Baltimore, MD(1989) 中公开的，来进行这些技术和步骤。

[0217] 氨基酸序列：如在此使用的，包括低聚肽、肽、多肽或蛋白和其片段，是从植物分离的、对于植物是天然的、或在植物中天然存在的，或是合成制成的但包含内源对应物的核酸序列。

[0218] 人工操作的：如在此使用的，“人工操作的”是指通过手工或机械手段或重组手段，例如通过遗传工程技术，来移动、调整、操作或控制植物或植物细胞，以便产生与未操作的、天然发生的对应物相比具有不同的生物学的、生物化学的、形态学的或生理学上的表型和 / 或基因型的植物或植物细胞。

[0219] 无性繁殖：通过不涉及配子体融合的，从叶插 (leafcuttings)、枝插、根插、块茎

芽眼、匍匐枝、单个植物细胞原生质体、愈伤组织等等产生完整的植物，来生产子代。

[0220] 主干 (backbone)：除了用于转移的 T-DNA 或 P-DNA 序列之外的二元载体的核酸序列。

[0221] 边界和边界样序列："边界序列"是特定的土壤杆菌衍生的序列。一般地，左侧边界序列和右侧边界序列在 T-DNA 的两侧，它们都作为 virD2 催化的切割反应的识别位点起作用。这种活性释放了位于这样的边界之间的核酸。边界序列的例子参见下文的表 2。与 virD2 和 virE2 复合的、释放的核酸被靶向植物细胞核，在细胞核中所述核酸常被整合到植物细胞的基因组中。通常，两个边界序列，左侧边界和右侧边界，被用于将位于它们之间的核苷酸序列整合到另一个核苷酸序列中。也可能仅使用一个边界，或使用多于两个的边界，来以这种方式实现期望核酸的整合。

[0222] 根据本发明，"边界样"序列分离自待修改的 (to bemodified) 选定植物物种，或分离自与待修改的植物物种性上相容的植物，象土壤杆菌的边界序列一样起作用。也就是说，本发明的边界样序列促进和便于与之连接的多核苷酸的整合。本发明的植物 DNA，即 P-DNA 优选的含有边界样序列。

[0223] P-DNA 的边界样序列长度在 5-100bp、10-80bp、15-75bp、15-60bp、15-50bp、15-40bp、15-30bp、16-30bp、20-30bp、21-30bp、22-30bp、23-30bp、24-30bp、25-30bp、 或 26-30bp 之间。

[0224] 本发明的边界样序列可以分离自任何植物，例如分离自马铃薯和小麦。对于在两个末端含有分离自马铃薯和小麦的边界样序列的序列，参见 SEQ ID NOs. 1 和 98 和 SEQ ID NO. 34。因而，用于本发明的 P-DNA 左侧和右侧边界序列对于待修改的植物是天然的和 / 或是从中分离的。P-DNA 边界样序列在核苷酸序列上与任何已知的、土壤杆菌衍生的 T-DNA 边界序列是不相同的。因而，P-DNA 边界样序列可具有与来自土壤杆菌物种，例如根癌土壤杆菌 (Agrobacteriumtumefaciens) 或 Agrobacterium rhizogenes 的 T-DNA 边界序列不同的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 个或更多个核苷酸。也就是说，本发明的 P-DNA 边界或边界样序列与来自土壤杆菌物种，例如根癌土壤杆菌或 Agrobacteriumrhizogenes 的 T-DNA 边界序列具有至少 95％、至少 90％、至少 80％、至少 75％、至少 70％、至少 60％、或至少 50％的序列同一性，但不是 100％的序列同一性。如在此使用的，描述性术语"P-DNA 边界"和"P-DNA 边界样"是可互换的。

[0225] 天然 P-DNA 边界序列与土壤杆菌 T-DNA 边界序列在核苷酸序列上有大于或等于 99％、98％、97％、96％、95％、94％、93％、92％、91％、90％、89％、88％、87％、86％、85％、84％、83％、82％、81％、80％、79％、78％、77％、76％、75％、74％、73％、72％、71％、70％、69％、68％、67％、66％、65％、64％、63％、62％、61％、60％、59％、58％、57％、56％、55％、54％、53％、52％、51％或 50％的相似性。因此，可以从植物基因组中分离边界样序列，然后进行修改或突变来改变它们能够将核苷酸序列整合到另一个核苷酸序列中的效率。可以将其他的多核苷酸序列添加到或掺合到本发明的边界样序列内。因而，可以修改 P-DNA 左侧边界或 P-DNA 右侧边界以便具有 5′ -和 3′ -多克隆位点，或其他限制性位点。可以修改 P-DNA 边界序列来增加来自伴随载体的主干 DNA 不整合到植物基因组中的可能性。

[0226] 下文的表 2 描述了已知 T-DNA 边界序列的序列，和在此被鉴定为边界样序列的序列。在表 2 中的被鉴定为"边界样"的序列先前都未被鉴定为具有 T-DNA 边界样结构。马

铃薯边界样序列是通过当前的发明性方法，利用简并引物在聚合酶链式反应中从马铃薯基因组 DNA 分离的。本发明包括任何 P-DNA 边界样序列用于将连接的多核苷酸转移到植物细胞的基因组中的用途。

[0227] 实际上，本发明包括具有 SEQ ID NO. 93 :ANGATNTATN6GT(SEQ ID NO. 93) 的核酸序列结构的任何边界样序列，其中“N”是任何核苷酸，例如那些由“A”、“G”、“C”或“T”表示的核苷酸。这个序列代表由本发明鉴定出的边界样核酸的共有序列。

[0228] 表 2. “边界”和“边界样”序列

[0229]

土壤杆菌T-DNA边界	
TGACAGGATATATTGGCGGGTAAAC (SEQ ID NO.41)	土壤杆菌胭脂碱菌株（RB）
TGGCAGGATATATTGTGGTGTAAAC (SEQ ID NO.42)	土壤杆菌胭脂碱菌株（LB）
TGGCAGGATATATACCGTTGTAATT (SEQ ID NO.43)	土壤杆菌章鱼碱菌株（RB）
CGGCAGGATATATTCAATTGTAATT (SEQ ID NO.44)	土壤杆菌章鱼碱菌株（LB）
TGGTAGGATATATACCGTTGTAATT (SEQ ID NO.45)	LB 突变体
TGGCAGGATATATGGTACTGTAATT (SEQ ID NO.46)	LB 突变体
YGRYAGGATATATWSNVBKGTAAWY (SEQ ID NO.47)	边界基序
边界样序列	
CGGCAGGATATATCCTGATGTAAAT (SEQ ID NO.48)	*R. leguminosarum*
TGGCAGGAGTTATTCGAGGGTAAAC (SEQ ID NO.49)	*T. tengcongensis*
TGACAGGATATATCGTGATGTCAAC (SEQ ID NO.50)	*Arabidopsis thaliana*
GGGAAGTACATATTGGCGGGTAAAC (SEQ ID NO.51)	*A. thaliana* CHR1v07142002
TGGTAGGATACATTCTGATGTAGAT	Arab. NM114337 (位点 1404-1428)
TGACAGGATATATCGTGATGTCAAC	Arab. NM114337 (位点 2577-2601)
TGGTAGGATACATTCTGATGTAGTA	Arabidopsis
TTACAGGATATATTAATATGTATGA (SEQ ID NO.52)	*Oryza sativa* AC078894
TGGCAGGATATCTTGGCATTTAAAC	Rice AC037425 (28864-28888)
TGTCAGGATATATATCGATATGAAC	Rice AC097279 (60767-60791)
TGTCAGGATATATATCGATATGAAC	Rice AC097279 (58219-58195)
TAACATGATATATTCCCTTGTAAAT (SEQ ID NO.53)	Homo sapiens 克隆 HQ0089
TGACAGGATATATGGTAATGTAAAC (SEQ ID NO.54)	马铃薯（左边界序列）*
TGGCAGGATATATACCGATGTAAAC (SEQ ID NO.55)	马铃薯（右边界序列）*

[0230] Y = C 或 T ;R = A 或 G ;K = G 或 T ;M = A 或 C ;W = A 或 T ;S = C 或 G ;V = A,C, 或 G ;B = C,G, 或 T。

[0231] 边界样序列的登记号是 :Oryza sativa 染色体 10BAC0SJNBa0096G08 基因组序列 (AC078894.11) ;Arabidopsis thaliana 染色体 3(NM_114337.1) ;Arabidopsis thaliana 染色体 1(NM_105664.1) ;T.tengcongensis 菌株 MB4T，完整基因组的 244 的 118 节 (AE013091.1) ;Homo sapiens 克隆 HQ0089(AF090888.1) ;Rhizobium 克隆 :rhiz98e12.q1k. * 马铃薯左右边界序列是根据当前描述的发明性方法获得和分离的。

[0232] 载运体 (carrier)DNA :“载运体 DNA”是一种用于携带某些遗传元件并将它们递送到植物细胞中的 DNA 片段。在常规的外源 DNA 转移中，这种载运体 DNA 常常是土壤杆菌的 T-DNA，由边界序列划定。在此描述的载运体 DNA 是从待修改的选定植物物种获得的，含有末端，所述末端在结构和功能上可以不同于 T-DNA 边界，但与这种 T-DNA 一样具有支持将 DNA 从土壤杆菌转移到植物细胞或某些其他真核生物的核中，并且随后将这个 DNA 整合到这种真核生物的基因组中的能力。

[0233] 基本上由 ..... 组成 :组合物“基本上由”某些元素“组成”，限于包括那些元

素，以及实质上不影响所述发明性组合物的基本的和新的特征的那些元素。因而，只要组合物不影响当前发明的基本的和新的特征，也就是说，不含有不是来自选定植物物种或与所述选定植物物种性上相容的植物的外源 DNA，那么这样的组合物就可认为是以“实质上由 ..... 组成”的措辞表征的发明性组合物的一员。

[0234] 简并引物：“简并引物”是含有足够的核苷酸变异的寡核苷酸，从而使得它可以在与近似同源度、但不是完全同源的序列杂交时容许碱基错配。

[0235] 双子叶植物 (dicot)：其胚具有两个籽叶或子叶的有花植物。双子叶植物的实例包括，但不限于，烟草、番茄、马铃薯、甘薯、木薯、豆类包括苜蓿和大豆、胡萝卜、草莓、莴苣、橡树、枫树、胡桃、玫瑰、薄荷、南瓜、雏菊、和仙人掌。

[0236] 调节序列：是指对于本领域技术人员而言是标准的和已知的那些序列，可以被包括在表达载体中来在植物系统中增加和 / 或最大化目标基因的转录或产生的 RNA 的翻译。这些序列包括，但不限于，启动子、肽输出信号序列、内含子、聚腺苷酸和转录终止位点。修改核酸构建体来增加植物中的表达水平的方法也是本领域一般已知的 (参见，例如 Rogers et al.，260J.Biol.Chem.3731-38，1985；Cornejo et al.，23Plant Mol.Biol.567：81，1993)。在工程化植物系统来影响蛋白的转录速率时，各种因子是本领域已知的，包括调节序列，例如正或负作用序列、增强子、沉默子、以及可能具有嵌塞 (impact) 的染色质结构。本发明规定，在工程化植物表达目标蛋白时至少可以使用这些因子之一。本发明的调节序列是天然的遗传元件，即，是从待修改的选定植物物种中分离的。

[0237] 外源的：关于核酸“外源的”是指该核酸来源于非植物有机体、或来源于与待转化的植物不同物种的植物、或来源于与待转化植物不是互交可孕的植物，不属于目标植物的物种。根据本发明，外源的 DNA 或 RNA 代表天然地存在于真菌、细菌、病毒、哺乳动物、鱼或鸟类的遗传组成中，但不是天然地存在于待转化的植物中的核酸。因而，外源核酸是编码，例如，不由被转化植物天然地产生的多肽的核酸。外源核酸不必编码蛋白产物。根据本发明，期望的转基因植物是不含有整合到其基因组中的任何外源核酸的植物。

[0238] 另一方面，根据本发明，天然的遗传元件可以被掺合和整合到选定植物物种的基因组中。天然的遗传元件是从属于选定植物物种的植物、或从与选定植物物种性上相容的植物分离的。举例来说，掺合到培养的马铃薯 (Solanum tuberosum) 中的天然 DNA 可以来源于 S.tuberosum 的任何基因型、或与 S.tuberosum 性上相容的野生马铃薯物种的任何基因型。

[0239] 基因：“基因”指编码区，并且不包括该区的 5′ - 或 3′ - 的核苷酸序列。功能基因是与启动子或终止子可操作地连接的编码区。

[0240] 遗传重排：是指可能自发地在体内以及体外发生的、引入遗传物质的新结构的遗传元件的重新组合。举例来说，在不同的染色体座位上将多核苷酸拼接在一起，可以在植物发育和有性重组期间在体内自发地发生。因此，通过非天然遗传修改技术的体外遗传元件重组，与也可通过有性重组在体内发生的重组事件是同类的。

[0241] In frame：核苷酸三联体 (密码子) 在植物细胞中被翻译为期望的重组蛋白的初生氨基酸序列。特别地，本发明预期在阅读框中与第二核酸连接的第一核酸，其中，第一核苷酸序列是基因，第二核苷酸序列是启动子或类似的调节元件。

[0242] 整合：是指将来自选定植物物种、或来自与选定植物相同物种的植物、或来自与选

定植物物种性上相容的植物的核酸序列，插入到选定植物物种的细胞的基因组中。“整合”是指仅将天然的遗传元件掺合到植物细胞基因组中。为了整合天然的遗传元件，例如通过同源重组整合，本发明可以“使用”非天然 DNA 作为这种过程中的步骤。因而，本发明在“使用”特定 DNA 分子和“整合”特定 DNA 分子到植物细胞基因组中之间是有区分的。

[0243] 导入：如在此使用的，是指通过包括感染、转染、转化和转导的方法将核酸序列插入到细胞中。

[0244] 分离的：“分离的”是指物理上与其正常的、天然的环境分开的任何核酸或化合物。所述分离的材料可以维持在适合的溶液中，所述溶液含有，举例来说，溶剂、缓冲液、离子、或其他成分，可以是纯化的或未纯化的形式。

[0245] 前导区：在基因之前（或基因的 5′）的转录但不翻译的序列。

[0246] LifeSupport 载体 (vector)：LifeSupport 载体是含有可表达的选择性标记基因，例如位于 T-DNA 或 T-DNA 样边界之间的新霉素磷酸转移酶标记，的构建体。可以修改 LifeSupport 载体来限制这种标记以及位于所述边界或边界样序列之间的其他多核苷酸整合到植物基因组中。举例来说，LifeSupport 载体可包含突变的 virD2、codA::upp 融合物、或这些遗传元件的任何组合。因而，修改的 virD2 蛋白将仍然支持 T-DNA 转移到植物核中，但将限制随后的 T-DNA 的基因组整合的效率 (Shurvinton et al.，Proc Natl Acad Sci USA，89：11837-11841，1992；Mysore et al.，Mol Plant Microbe Interact，11：668-683，1998)。做为选择，codA::upp 基因融合物可在再生前被用作阴性选择性标记。在优选的构建体中，LifeSupport 载体包含与酵母 ADH 终止子元件可操作地连接的 npt 标记。

[0247] 单子叶植物 (monocot)：其胚具有一个籽叶或子叶的有花植物。单子叶植物的实例包括，但不限于草皮草、玉米、稻米、燕麦、小麦、大麦、高粱、兰花、鸢尾、百合、洋葱和棕榈。

[0248] 天然的 (native)：“天然的”遗传元件是指天然地存在于、或来源于、或属于待转化植物的基因组的核酸。因而，分离自待转化植物或植物物种的基因组的、或分离自与待转化植物物种性上相容或互交可孕的植物或物种的任何核酸、基因、多核苷酸、DNA、RNA、mRNA 或 cDNA 分子，对于所述植物物种是天然的，即，是天生的。换句话说，天然的遗传元件代表植物育种家通过经典植物育种来改进植物所可以使用的所有遗传物质。根据本发明，天然的核酸的任何变体也认为是“天然的”。在这点上，“天然的”核酸可以分离自植物或其性上相容 (sexually compatible) 的物种，并且可以被修改或突变，从而产生的变体在核苷酸序列上与从植物分离的未修改的、天然的核酸具有大于或等于 99％、98％、97％、96％、95％、94％、93％、92％、91％ 90％、89％、88％、87％、86％、85％、84％、83％、82％、81％、80％、79％、78％、77％、76％ 75％、74％、73％、72％、71％、70％、69％、68％、67％、66％、65％、64％、63％、62％、61％或 60％的相似性。天然的核酸变体也可在核苷酸序列上具有少于约 60％、少于约 55％，或少于约 50％的相似性。

[0249] 分离自植物的“天然的”核酸也可编码由该核酸转录和翻译的、天然发生的蛋白产物的变体。因而，“天然的”核酸可以编码蛋白质，所述蛋白质在氨基酸序列上与未修改的、在植物中表达的天然蛋白质相比，具有大于或等于 99％、98％、97％、96％、95％、94％、93％、92％、91％ 90％、89％、88％、87％、86％、85％、84％、83％、82％、81％、80％、79％、78％、77％、76％ 75％、74％、73％、72％、71％、70％、69％、68％、67％、66％、65％、64％、

63％、62％、61％或 60％的相似性，所述核酸分离自所述植物。

[0250] 天然发生的核酸：这个术语是指，所述核酸在选定植物物种的基因组中被发现，可以是 DNA 分子或 RNA 分子。通常存在于植物物种的基因组中的限制性位点序列可以被工程化到外源 DNA 分子，例如载体或寡核苷酸中，即使该限制性位点没有物理上地从所述基因组分离。因而，本发明允许核苷酸序列，例如限制性内切酶识别序列的合成性生成，只要该序列天然地存在于选定植物物种的基因组中或与待转化的选定植物物种性上相容的植物中。

[0251] 可操作地连接：以这样的方式组合两个或多个分子，从而它们在植物细胞中以组合方式适当地起作用。举例来说，当启动子控制结构基因的转录时，启动子可操作地连接到结构基因。

[0252] P-DNA：根据本发明，P-DNA（“植物 -DNA”）分离自植物基因组，在每个末端或仅在一个末端包含 T-DNA 边界样序列。边界样序列优选的与来自土壤杆菌物种，例如 Agrobacterium tumefaciens 或 Agrobacterium rhizogenes 的 T-DNA 边界序列具有至少 50％、至少 60％、至少 70％、至少 75％、至少 80％、至少 90％、或至少 95％，但少于 100％的序列同一性。因而，P-DNA 可被用来替代 T-DNA 来将核苷酸序列从土壤杆菌转移到另一个多核苷酸序列。可以修改 P-DNA 来促进克隆，并且应当优选的不天然地编码蛋白或蛋白的部分。P-DNA 的特征在于，其在每个末端含有至少一个边界序列，被称为“P-DNA 边界序列”或“P-DNA 边界样序列”，其是可互换的术语。参见上文“边界序列”和“边界样”的定义。P-DNA 也可被认为是“T-DNA 样”序列，参见下文的定义。

[0253] 植物：包括被子植物和裸子植物例如马铃薯、番茄、烟草、苜蓿、莴苣、胡萝卜、草莓、甜菜、木薯、甘薯、大豆、玉米、草皮草、小麦、稻米、大麦、高粱、燕麦、橡树、桉树、胡桃和棕榈。因而，植物可以是单子叶植物或双子叶植物。在此使用的词语“植物”，还包括植物细胞、种子、植物子代、不管是有性地还是无性地产生的繁殖体、和这些的任何一种的派生物，例如插条或种子。植物细胞包括悬浮培养物、愈伤组织、胚、分生组织区、愈伤组织、叶、根、芽、配子体、孢子体、花粉、种子和小孢子。植物可以处于各种成熟阶段，可以在液体或固体培养基中，或在土壤中或在罐中的适合的培养基中、温室或田地中生长。导入的前导区、尾随区或基因序列在植物中的表达可以是短暂的或永久的。“选定的植物物种”可以是，但不限于，这些“植物”的任何一个的物种。

[0254] 精确的育种：是指通过将从选定植物物种、或从与选定植物相同物种的另一个植物、或从与选定植物物种性上相容的物种分离的核酸，例如天然的基因和调节元件，稳定地导入植物细胞个体中，随后将这些遗传修改的植物细胞再生成完整植物，来改进植物。由于没有未知的或外源的核酸被永久地掺合到植物基因组中，该发明性的技术利用了常规的植物育种也可使用的相同的遗传物质。

[0255] 植物物种：属于各种正式命名的植物物种的、至少展现了某些性相容性的植物的群体。

[0256] 植物转化和细胞培养：泛指通过它们来遗传地修改植物细胞，并转移到适合的植物培养基，用于维持、进一步生长、和 / 或进一步发育的过程。

[0257] 重组：如在此使用的，广泛地描述各种技术，通过这些技术可以克隆基因、对 DNA 测序、产生蛋白产物。如在此使用的，该术语还描述将基因转移到植物宿主系统的细胞中后

产生的蛋白质。

[0258] 选择性标记：“选择性标记”一般是基因，所述基因编码赋予对抗生素、除草剂或有毒化合物的某种抗性的蛋白质，被用来鉴定转化事件。选择性标记的实例包括编码链霉素抗性的链霉素磷酸转移酶（spt）基因，将甘露糖-6-磷酸转变成果糖-6磷酸的磷酸甘露糖异构酶（pmi）基因；编码卡那霉素和geneticin抗性的新霉素磷酸转移酶（nptII）基因，编码潮霉素抗性的潮霉素磷酸转移酶（hpt或aphiv）基因，编码对磺酰脲型除草剂的抗性的乙酰乳酸合酶（als）基因，编码对抑制谷氨酰胺合酶的作用的除草剂，例如膦丝菌素或basta的抗性的基因（例如bar基因），或其他本领域已知的类似基因。

[0259] 有义抑制：通过在转基因植物中表达基因的全部或部分的一个或多个额外的拷贝来减少内源基因的表达。

[0260] T-DNA样：“T-DNA样”序列是从选定植物物种或从与所述选定植物物种性上相容的植物分离的、与土壤杆菌物种T-DNA具有至少75％、80％、85％、90％、或95％，但不是100％的序列同一性的核酸。T-DNA样序列可含有每个都能将核苷酸序列整合到另一个多核苷酸中的一个或多个边界或边界样序列。如在此使用的“P-DNA”是T-DNA样序列的实例。

[0261] 尾随区（trailer）：在基因之后（或3′）转录但不翻译的序列。

[0262] 转录的DNA：包含基因以及与该基因相连的非翻译的前导区和尾随区序列的DNA，其在前方的启动子的作用下被转录为单个mRNA。

[0263] 转录和翻译终止子：本发明的表达载体一般在转录起始调节区的相反的末端具有转录终止区。可以选择转录终止区，用来稳定mRNA来增加表达和/或用于将聚腺苷酸尾部添加到基因转录产物（Alber & Kawasaki，Mol.& Appl.Genetics 4：19-34，1982）。说明性的转录终止区包括豌豆RBCS基因的E9序列（Mogen et al.，Mol.CellBiol.，12：5406-14，1992）和各种遍在蛋白基因的终止信号。

[0264] 植物细胞的转化：一种过程，通过它将DNA稳定地整合到植物细胞的基因组中。“稳定地”是指在细胞基因组中和通过细胞基因组，多核苷酸的永久的、或非短暂的保留和/或表达。因而，稳定地整合的多核苷酸是在转化的细胞基因组中的固定成分，可以通过所述细胞或产生的转化植物的连续子代来复制和繁殖。转化可以在天然的或人工的条件下利用本领域公知的各种方法来进行。转化可以依靠任何已知的方法来将核酸序列插入到原核的或真核的宿主细胞中，包括土壤杆菌介导的转化方案、病毒感染、颈须（whishkers）、电穿孔、热激、脂转染、聚乙二醇处理、显微注射和粒子轰击。

[0265] 转基因：将被插入到宿主基因组中的基因，包含蛋白编码区。在本发明的上下文中，包含转基因的元件是从宿主基因组分离的。

[0266] 转基因植物：含有至少一个转基因的遗传地修改的植物。

[0267] 块茎：块茎是加厚的、通常是地下的、食物贮藏器官，其缺乏基板（basal plate）和种皮样覆盖，而球茎和鳞茎具有。根和芽从块茎的表面上的生长芽，称作“芽眼”长出。某些块茎，例如杯芋caladiums，随着植物生长大小减小，在芽眼处形成新的块茎。其他的，例如有块茎的秋海棠，在生长季节中保存养分时大小增加，同时发育新的生长芽。块茎可以是皱缩的和坚硬的或稍微肉质的。它们可以是圆形、扁平的、奇形怪状的或粗糙的。块茎的实例包括，但不限于ahipa、apio、秘鲁胡萝卜、慈茹、竹芋、baddo、苦树薯、巴西竹芋、木薯、中国薯、荸荠、椰子、cocoyam、芋、芋根、象耳、菊芋、goo、日本薯、日本马铃薯、耶路撒冷

蓟、豆薯、百合根、ling gaw、mandioca、manioc、墨西哥马铃薯、墨西哥豆薯、old cocoyam、马铃薯、saa got、sato-imo、seegoo、sunchoke、sunroot、甜树薯、甘薯、tanier、tannia、tannier、木薯块根、topinambour、莲藕、豆薯、薯蓣、和 yautia。马铃薯的实例包括，但不限于 Russet 马铃薯、Round White 马铃薯、LongWhite 马铃薯、Round Red 马铃薯、Yellow Flesh 马铃薯和 Blue 和 Purple 马铃薯。

[0268] 块茎可以被分类为“微型块茎”、“迷你块茎”、“半成熟”块茎，和“成熟”块茎。微型块茎是在组织培养基中生长的，大小很小的块茎。“很小”是指约 0.1cm-1cm。“迷你块茎(minituber)”是比微型块茎大，在土壤中生长的块茎。“半成熟”块茎来自开始衰老的植物，如果在温室中生长是约 9 周龄。“成熟”的块茎是来自已经经历了衰老的植物。成熟的块茎是，例如，约 12 周龄或更多周龄的块茎。

[0269] 使用 / 利用 :本发明预想利用来自不是待转化的选定植物物种的物种的核酸，来促进天然的遗传元件整合到选定植物基因组中，只要这种外源核酸不被稳定地整合到同样的宿主植物基因组中。举例来说，天然遗传元件被克隆、置入或操纵到其中的质粒、载体或克隆构建体可以来源于与衍生所述天然遗传元件的物种不同的物种。

[0270] 变体 :在此使用的“变体”被理解为是指与标准的、或给定的特定基因或蛋白的核苷酸或氨基酸序列有区别的核苷酸或氨基酸序列。术语“同种异形”“同种型”和“类似物”也是指核苷酸或氨基酸序列的“变体”形式。通过添加、移除或替换一个或多个氨基酸而改变的氨基酸序列，或在核苷酸序列中的变化，可被认为是“变体”序列。变体可具有“保守性”变化，其中被取代的氨基酸具有类似的结构或化学性质，例如，用异亮氨酸替换亮氨酸。变体也可具有“非保守性”变化，例如用色氨酸替换甘氨酸。类似的较小的变异也可包括氨基酸删除或插入，或删除和插入。利用本领域公知的计算机程序，例如 Vector NTI Suite(InforMax，MD) 软件，可以获得在确定哪个氨基酸残基可以被取代、插入或删除方面的指导。

[0271] 应当理解的是，本发明不限于在此描述的特定方法、方案、载体和试剂等，这些都可以变化。还需要理解的是，在此使用的专有名词仅用于描述特定实施方式的目的，不意在限制本发明的范围。必须指出的是，在此使用的和在附随的权利要求中，单数形式“a”、“an”和“the”包括复数的引用，除非上下文中另有明显的指示。因而，例如，提及“a gene”是指一个或多个基因，包括本领域技术人员公知的其等同体等。实际上，本领域技术人员可以使用在此描述的方法来在植物宿主系统中表达任何天然的基因（目前或后来知道的）。

[0272] P-DNA 载体

[0273] 土壤杆菌介导的转化方法是将重组 NDA 掺合到植物细胞中的优选的方法。根据本发明，开发一种二元载体来生产仅含有天然的马铃薯核酸的、遗传地修改的马铃薯植物。这种载体在三个方面不同于常规的土壤杆菌介导的转化载体 :(1) 不同于由 T-DNA 边界划定的土壤杆菌衍生的 T-DNA 序列，当前的载体含有侧翼是边界样序列的天然植物 DNA(P-DNA) 片段，所述边界样序列尽管在结构和功能上不同于 T-DNA 边界，它们支持 P-DNA 从土壤杆菌转移到植物细胞，(2) 当前载体的主干可含有标记，从而，如果被整合到植物细胞的基因组中，可防止这些细胞发育成成熟植物，和 (3) 当前载体在 P-DNA 末端之间不含有外源的选择性标记基因。

[0274] 令人惊讶地，本发明表明，侧翼是边界样序列的 P-DNA 片段支持 DNA 从土壤杆菌转

移到植物细胞中。P-DNA可以利用引物从任何植物的基因组中分离，所述引物是根据马铃薯P-DNA的末端和常规T-DNA边界之间的同源性设计的。然后可以测试这种片段，如果是有效的，可专门地用于用天然DNA转化该植物。也可能通过利用如‘blastn’(Altschul et al.，J Mol Biol 215:403-10,1990)的程序来在植物基因组数据库中搜索带有显示了与T-DNA的同源性的区域的DNA片段。然后可以修改鉴定出的P-DNA来增加它们的实用性。举例来说，可以删除分离的P-DNA的内部片段，可以添加限制性位点来便于克隆。在末端序列导入点突变也可能是有效的，来使P-DNA在转移DNA方面更有效。

[0275] 本发明还包括用于分离对于植物基因组是天然的植物边界样序列的各种聚合酶链式反应策略。这种策略的目标是获得位于天然“边界样”序列的上游或下游的、植物基因组的一部分的核酸序列。然后这种序列可被用于设计两个或多个引物，用于随后对消化和环化的基因组植物DNA进行反向PCR，其产物含有天然植物边界样元件的真实序列。

[0276] 举例来说，本发明考虑了一种方法，通过这种方法，在第一步，用限制性内切酶消化总植物DNA，并连接到已知序列的多核苷酸上。这个连接产物用引物对通过PCR扩增，其中引物之一，“边界”引物，与植物边界样序列退火，其中另一个引物，“锚”引物，与已知序列退火。将这个反应的产物连接到已知序列的第二多核苷酸，产生的模板被用于用边界引物和第二锚引物进行PCR。将终产物克隆到质粒中并测序。

[0277] 这个产物的序列包含与边界引物退火的核酸序列、邻近的植物DNA序列、来自第一已知多核苷酸的序列和来自第二已知多核苷酸的序列。根据邻近的植物DNA的序列，设计至少两个引物来对用限制性内切酶消化的和自我环化的总植物DNA进行反向PCR。在将反向PCR产物克隆到载体中之后，进行分子的分析来测定所述植物边界样元件的真实序列。所有提及的方法都是标准的实验室做法。

[0278] 可以将任何基因表达盒插入到P-DNA边界样序列之间。对于马铃薯转化，这种表达盒可以由马铃薯启动子，其可操作地与马铃薯基因连接，和/或与该基因相连的前导区或尾随区序列，和随后的马铃薯终止子组成。表达盒可含有其他马铃薯遗传元件，例如框内与该基因的5′-末端融合的信号肽序列，和马铃薯内含子，例如可以置于启动子和目标基因之间来增加表达的内含子。为了用修改的P-DNA转化小麦，在小麦P-DNA上插入的所有遗传元件，包括P-DNA本身，可来源于小麦或与小麦性上相容的植物物种。

[0279] 分离P-DNA的另一个途径是产生土壤杆菌菌株的文库，其含有随机的植物DNA片段，而不是选择性标记侧翼的T-DNA。可以将用这个文库感染的外植体置于含有适合的选择试剂的增殖培养基上，来鉴定支持标记基因从土壤杆菌中的载体转移到植物细胞的P-DNA。

[0280] 有可能的是，不仅天然的修改的P-DNA，还有其他的质粒序列，在转化过程期间从土壤杆菌共转移到植物细胞。对于本发明的目的，这是不合需要的过程，因为这种质粒“主干”序列代表非植物的、外源的DNA，如细菌DNA。本发明防止含有主干序列的转化的植物细胞发育成成熟的植物。因而，本发明使得在再生的幼苗阶段区分含主干的和无主干的转化事件成为可能。

[0281] 选择或筛选主干整合事件的方法依靠载体主干中、P-DNA之外标记表达盒的存在，标记例如异戊烯磷酸转移酶(IPT)基因。在主干整合后，IPT诱导的细胞分裂素的累积将改变转化的幼苗的形状，防止这些幼苗发育根。除IPT基因之外，可以使用可改变转化植物的叶、根、茎的形状、纹理、或颜色，高度或某些其他形态特征的其他基因，来筛选和/或选择

主干整合事件。这种基因在此被称为“主干整合标记”。因而，可以知道展现出可归因于主干整合标记基因表达的改变的形态特征的被转化植物，在它的基因组中除期望的 P-DNA 外含有外源 DNA。因此，展现出与主干整合标记有关的表型的植物不是期望的。

[0282] 本发明不局限于仅使用 IPT 基因作为主干整合标记，可以按这种方式使用其他基因。例如，主干整合标记可以是土壤杆菌 transzeatine 合酶 (TZS) 基因 (Krall et al., FEBS Lett 527 :315-8,2002) 或隐性 Arabidopsis 基因 hoc1(Catterou et al., Plant J 30 :273-87,2002)。这个方法比在载体主干序列中插入有毒基因的某些方法能更容易地应用于本发明中。参见，例如，EP 1009,842。

[0283] 通过将主干整合标记基因，例如功能性细胞分裂素基因置于 P-DNA 的上游或下游，可以直接地区分转化事件。弃去展现出改变的形态特征的转化的植物，因为它们含有整合到基因组中的非天然 DNA 序列。

[0284] 用于鉴定仅用天然 DNA 稳定地转化的植物的另一个策略，是使用聚合酶链式反应。通过使用为检测主干序列特别设计的引物，可以鉴定植物并丢弃那些除 P-DNA 外含有外源主干序列的那些植物。可以随后使用其他引物组来证实 P-DNA 的完整转移。因而，通过使用基因的表达来改变植物的形态特征，或通过筛选转化的植物中稳定地整合的外源 DNA，可以鉴定和选择出仅用天然 DNA 序列稳定地转化的植物。

[0285] 可以将来自特定宿主植物的遗传元件插入到在 E.coli 和土壤杆菌中都能复制的二元载体的 P-DNA 序列中。将产生的载体导入到解毒的土壤杆菌菌株，例如 LBA4404，可以通过对化学上的感受态细胞进行电穿孔、三亲杂交或热休克处理来实现。然后新的菌株可被用于通过感染整个植物或外植体来转化单个植物细胞。

[0286] 可以将来自特定宿主植物的遗传元件插入到在 E.coli 和土壤杆菌中都能复制的二元载体的 P-DNA 序列中。将产生的载体导入到土壤杆菌菌株，例如 LBA4404，可以通过对化学上的感受态细胞进行电穿孔、三亲杂交或热休克处理来实现。然后新的菌株可被用于通过感染整个植物或外植体来转化单个植物细胞。LBA4404 含有解毒的 (disarmed)Ti 质粒 pAL4404，其带有致病功能和链霉素抗性基因。

[0287] LifeSupport 载体

[0288] 尽管细菌标记基因稳定地整合到植物细胞的基因组中便于鉴定转化事件，这种对植物基因组的修改是不合需要的，因为标记基因代表外源的 DNA。通过开发新的基于土壤杆菌的转化方法可以避免使用外源的标记基因。

[0289] 一个优选的实施方式是依靠使用两个土壤杆菌菌株的新方法 :一个菌株含有二元载体，所述二元载体带有要在植物核中短暂表达的选择性标记基因，另一个菌株携带 P-DNA，所述 P-DNA 带有要在植物基因组中稳定整合的目标真实序列 (见实施例 7)。

[0290] 在用土壤杆菌菌株共感染后，某些植物细胞将接受带有标记基因的 T-DNA 和带有目标序列的 P-DNA。作为随后通过使感染的外植体长期置于合适的抗生素中来选择标记基因的稳定整合的替代，外植体仅暂时地暴露于抗生素中。这样，短暂表达标记基因的所有植物细胞都将存活。因为，在大多数情况下 T-DNA 将由于内源核酸酶活性被降解而不是稳定地整合到它们宿主的基因组中，在短暂选择中存活的大多数植物细胞在此显示出将发育成缺乏标记基因的幼苗。此外，本发明表明，相当高比例的这些无标记幼苗含有稳定地整合的 P-DNA。

[0291] 有各种工具来增加无标记转化的效率。首先，本发明表明，可以通过顺序地用两个携带 T-DNA/ 标记和 P-DNA/ 目标序列的土壤杆菌菌株分别感染外植体，来增加这种频率。首先用 P-DNA 菌株感染外植体，在约 4 到 6 小时后用 T-DNA 菌株感染。

[0292] 第二，可以修改 T-DNA 菌株来表达 ω- 突变的 virD2 基因。修改的 virD2 蛋白将仍然支持 T-DNA 转移到植物核中，但将限制随后的 T-DNA 的基因组整合的效率 (Shurvinton et al., Proc Natl Acad SciUSA,89 :11837-11841,1992 ;Mysore et al., Mol Plant MicrobeInteract,11 :668-683,1998)。表达修改的 virD2 基因的最优选的方法是将由 virD 启动子驱动的 ω- 突变的 virD2 基因插入到 T-DNA 载体的主干中。

[0293] 第三，可以通过在靠近 T-DNA 的左侧和右侧边界序列的地方插入端粒序列来进一步削弱稳定的 T-DNA 整合 (Chiurazzi &Signer, Plant Mol.Biol., 26 :923-934,1994)。

[0294] 第四，可以增加携带标记基因的 T-DNA 区的大小来增加 T-DNA 和 P-DNA 一同移动到植物细胞核中的频率，和减少 T-DNA 的基因组整合的频率。

[0295] 第五，通过利用携带两个分别带有 T-DNA 和 P-DNA 的兼容的二元载体的单个土壤杆菌菌株，也可以增加 T-DNA 和 P-DNA 一同移动到植物细胞核中的频率。两个兼容二元载体的实例是 pSIM 1301 衍生的载体和 pBI121 衍生的载体。

[0296] 由于短暂表达的标记基因一般不整合到植物基因组中，这个基因和它的调节序列都为天然 DNA 是不必要的。实际上，使用外源的调节序列来促进被感染植物细胞中短暂基因表达的高水平是有利的。本发明的一个令人惊讶的发现是，含有 GUS 基因、之后是酵母醇脱氢酶 1(ADH1) 的终止子的表达盒在马铃薯细胞中以高水平短暂地表达。然而，带有酵母 CYC1 终止子的类似构建体没有充分地起作用。也有可能通过将标记基因可操作地连接到非天然启动子来增加短暂表达水平。这种启动子的实例是，例如，合成性启动子例如糖皮质激素可诱导的启动子 (Mori et al., Plant J., 27 :79-86,2001 ;Bohner et al., Mol.Gen. Genet., 264 :860-702001)，和非天然启动子，例如花椰菜花叶病毒和玄参花叶病毒的 35S 启动子，和真菌的启动子。

[0297] 作为对如上所述的两个菌株的土壤杆菌介导的转化方法的替代，也可以用含有带有天然标记基因和目标真实序列的 P-DNA 的单个菌株来转化植物。本发明表明，有可能使用耐盐性基因作为用于转化的天然标记。这种耐盐性基因包括 Arabidopsis 基因 SOS1(Shi et al., Nat Biotechnol.2002)、AtNHX1(Apse et al., Science.285 :1256-8,1999)、Avp1(Gaxiola et al.,Proc Natl Acad Sci U S A.98 :11444-9,2001) 和 CBF3(Kasuga et al., Nat Biotechnol.17 :287-91,1999) 的作物同源物。

[0298] 因而，本发明表明，可以通过用同时携带 LifeSupport 载体和 P-DNA 载体的土壤杆菌菌株感染外植体，然后短暂地或稳定地选择标记基因的表达来产生含有 P-DNA 的植物。

[0299] 通过这些步骤产生的其他植物的一部分是“共转化的”并同时含有 T-DNA 和 P-DNA 的。这些 T0 植物对商业生产是不合需要的，因为它们含有外源的 DNA，即，T-DNA 部分。然而，在很多情况下可以使这种植物自交或杂交，然后可以在它们的分离子代中筛选仅含 P-DNA 插入物的期望的 T1 植物。

[0300] 做为选择，有可能使用两个不同的 P-DNA 载体，一个含有期望的天然多核苷酸，另一个含有选择性标记基因。在短暂的或稳定的选择之后，可以通过筛选程序鉴定出同时含有至少一个带有期望的多核苷酸的 P-DNA 和至少一个带有选择性标记基因的 P-DNA 的 T0

植物。可以使这些植物自交或杂交来产生分离的T1子代。可以再次在这种子代中针对期望的多核苷酸的存在和标记基因的缺乏进行筛选。筛选程序可以包括ELISA、抗生素耐受性分析、PCR和Southern印迹分析。

[0301] 通过发明性的精确育种方法实现的遗传元件的重排，也可以自发地通过遗传重组过程发生。举例来说，所有植物都含有可以从一个染色体位置到另一个染色体位置转位的元件。通过插入到启动子或基因中，这种转位元件可以增强、改变和/或降低基因表达。举例来说，在转录调节基因P-wr的启动子中玉米Mutator元件的AMu4插入导致有条纹的红色果皮。在叶特异性MADS盒基因ZMM19的启动子中插入相同元件引起该基因在玉米花序中的表达，导致颖片的叶状伸长和在雄性和雌性花序中的其他变化，产生著名的有荚玉米表型。由于其奇异的须和穗，有荚玉米对于某些美洲土著部落具有宗教上的意义。许多基因还通过其他转位子诱导的修改，例如倒置、删除、添加和异位重组来重排(Bennetzen，Plant Mol Biol 42:251-69，2000)。此外，植物DNA重排经常通过基因内重组的过程发生。举例来说，通过对涉及针对特定病原体的抗性的基因进行重组，植物能够发展出具有新的特异性的抗性基因，从而与它们的病原体一同进化(Ellis.，Trends PlantSci 5:373-9，2000)。基因内重组的另一个实例涉及植物如何繁殖：通过重组涉及自交不亲和性的基因，植物从杂交(cross-fertilizing)转变为自交(self-fertilizing)(Kusaba et al.，Plant Cell 13:627-43，2001)。促进基因组进化的其他过程包括，举例来说，染色体断裂和染色体间的重组。

[0302] 增强植物和粮食作物的营养价值

[0303] 为了通过精确育种修改作物植物中的消极的性状，例如加工过程中的丙烯酰胺累积、配糖生物碱累积、不合需要的高级糖基化(glycation)产物的累积、CIPC累积、抗性淀粉的低水平、擦伤敏感性、冷诱导的糖化、疾病敏感、低产量和低质量，将至少一个特定的表达盒掺合(incorporated)到宿主基因组中。使用三种不同的方法来消除消极性状：(1)过量表达防止消极性状发生的基因，(2)过量表达与消极性状相关基因的突变型来用无功能的蛋白滴定掉(titrateout)野生型基因产物，和(3)通过按有义和/或反义方向表达与该基因相连的前导区或尾随区片段的至少一个拷贝，使与消极性状有关的特定基因沉默。

[0304] 在马铃薯中与消极性状有关的、并可以体外修改使之编码无功能蛋白的内源基因的一个实例是多酚氧化酶(PPO)基因。在碰撞伤时，PPO基因产物从质体释放到细胞质中(Koussevitzky et al.，J.Biol.Chem.，273:27064-9，1998)，在细胞质中它将介导苯酚的氧化来产生各种苯氧基基团和醌型衍生物，这些是有毒的和/或最终形成不合需要的、在作物中留下黑暗变色或“黑斑”的聚合物。

[0305] 过量表达含有无功能的铜结合结构域的突变PPO基因可以降低主要在块茎和相关器官例如芽中表达的所有PPO基因的活性。由于不能结合铜，突变使得多酚氧化酶蛋白没有活性。熟练技术人员可以了解在何处进行点突变，所述点突变在这种情况下将损害基因产物的功能。申请人通过将马铃薯PPO蛋白序列与甘薯PPO蛋白序列比对，鉴定了马铃薯PPO中的铜结合结构域(Klabunde et al.，Nat Struct.Biol.，5:1084-90，1998)。在铜结合位点中保守的区域，特别是那些含有保守的组氨酸残基的区域，是用于钝化转基因产物的靶点。由于在这种器官中PPO活性的几乎完全缺失可能负面地影响植物抵抗病原体的能力，本发明还描述了一种改进的方法，仅降低在成熟块茎除表皮之外的所有部分中优势

表达的特定 PPO 基因。利用与该基因相连的尾随区序列来沉默这个特定 PPO 基因，不会降低块茎表皮中的 PPO 表达，块茎的这个部分是最直接地暴露于试图进行感染的病原体的。

[0306] 由 PPO 基因诱导的酶性褐变不仅降低马铃薯块茎的品质，还负面地影响作物食物例如小麦、鳄梨、香蕉、莴苣、苹果和梨。

[0307] 与消极性状有关的、可以通过使用与那些基因相连的前导区或尾随区序列来沉默的其他基因包括马铃薯 R1 基因和 L 型磷酸化酶基因。两个基因都涉及淀粉降解为还原糖，例如葡萄糖和果糖，其在加热时参与 Maillard 反应产生有毒产物例如丙烯酰胺。本发明表明，通过降低 R1 或磷酸化酶活性来降低冷诱导的糖化，引起了在马铃薯的油炸加工期间非酶性褐变和丙烯酰胺累积的降低。

[0308] 本发明还表明了在遗传修改的作物中过量表达某些天然基因的实用性。通过在马铃薯中过量表达新近分离的液泡转化酶抑制物基因来降低蔗糖向还原糖的转化，显著地降低了 Maillard 反应产物例如丙烯酰胺的水平。

[0309] 本发明还预计，展现出升高的转化酶抑制物表达水平、或降低的 R1 或磷酸化酶表达水平的马铃薯块茎将不需要在储藏前用化学的发芽抑制剂例如 CIPC 进行强化处理，因为它们降低的还原糖水平将 (1) 延缓发芽，和 (2) 容许在更低的温度储藏，从而进一步延缓发芽。高度降低的 CIPC 残留水平、或它的完全缺失，进一步增加了加工的食物的营养价值，所述食物来源于含有在此描述的某些修改的 P-DNA 的植物。

[0310] 因而，来源于含有所述修改的 P-DNA 的块茎的炸薯条或薯片，将含有强烈降低的 CIPC 残留水平，进一步提升了它们的营养价值。

[0311] 在马铃薯块茎中同时地下调 PPO 以及 R1 或磷酸化酶基因的表达的效果是协同的，因为还原糖不仅是通过 Maillard 反应的非酶性褐变所需的，也是 PPO 酶介导的褐变所需的。在转基因马铃薯块茎中降低的还原糖水平，因此还将限制 PPO 活性和黑斑擦伤敏感性。因而，PPO、R1 和磷酸化酶基因，和 / 或与这些基因相连的前导区或尾随区序列，代表可以被分离、修改和再导入回植物中来下调这些基因的表达的目标 DNA 片段。

[0312] 除了开发擦伤抗性和降低的冷诱导的糖化之外，还有许多其他性状可以通过精确育种不使用外源的 DNA 来导入。举例来说，可以从野生马铃薯物种中分离疾病抗性基因，插入到疾病敏感品种的基因组中。

[0313] 因而，本发明预期一种遗传修改的块茎，其包含一定水平的某种物质，例如葡萄糖、直链淀粉或丙烯酰胺，不同于相同物种的野生型、未修改的块茎相关的正常水平。本发明的修改的块茎可以与相同物种的未修改的块茎进行比较，所述未修改的块茎在大小和形状方面与修改的块茎也是类似的。做为选择，修改的块茎的一部分可以与未修改的块茎的同一部分进行比较。例如，可以在修改的和未修改的块茎的相同大小的切片之间比较某一物质的水平，或在修改的和未修改的块茎的匀化制备物上进行生化分析，其中所述匀化制备物是相等的。

[0314] 类似地，本发明预期 (contemplate) 一种遗传修改的块茎，其包含一种基因，所述基因的表达水平不同于相同物种的野生型、未修改的块茎中的相同基因相关的正常表达水平。因而，天然基因的表达可以是过量表达的或被抑制的。

[0315] 还预期的是一种修改的块茎，其产生一种基因产物，所述基因产物在结构上和 / 或功能上不同于相同物种的野生型、未修改的块茎中产生的相同基因产物。因此，所述修改

的块茎可以表达无活性的或改变速率的蛋白，生物学途径以所述速率正常进展。例如，修改的块茎除天然的野生型对应物之外可以表达具有很少的、或没有酶活性的蛋白的突变型。用这种方式，可以产生具有某些性状的块茎，例如降低的冷诱导葡萄糖产生和降低的擦伤敏感性。

[0316] 因而，本发明预期一种修改的、成熟的块茎，其包含至少一种性状，所述性状被增加、降低或不同于与相同物种的成熟块茎正常相关的性状。

[0317] 修改的植物和作物的环境效益

[0318] 如上所述，降低的 R1 或者磷酸化酶水平引起降低的淀粉磷酸化作用。这种在淀粉磷酸化作用方面的降低引起马铃薯块茎的磷酸盐含量方面 90％的下降 (Vikso-Nielsen, Biomacromolecules,2 :836-43,2001)。这将引起来自马铃薯加工工厂的废水中磷酸盐水平的降低，当前该水平是约 25-40mg/L。因而，低磷酸盐块茎的使用将降低磷酸盐对环境的释放，帮助保护重要的生态系统。此外，低磷酸盐马铃薯可能需要更少的磷酸盐施肥来获得最优的生长和产量，这将通过延迟可用磷酸盐资源的消耗来支持更加可持续的农业。

[0319] 增强植物和粮食作物的农业性能

[0320] 除了降低的擦伤敏感性和降低的冷糖化之外，这是两个重要的加工性状，本发明还提供了耐盐性——一种日益重要的输入性状 (input trait)。在本发明中描述的某些修改的 P-DNA 构建体含有耐盐性基因作为天然标记用于转化。重要地，这个基因的实用性不限于转化过程中的筛选步骤。在马铃薯植物中耐盐性基因的过量表达减少了由高盐土壤水平诱导的应激症状，使得在含盐水平超过种植常规品种最佳的最大 2 毫姆 /cm 电导水平的、百分比不断增加的农业用地上，种植含有修改的 P-DNA 的新型品种成为可能。

[0321] 使用从选定植物物种、或从与所述选定植物物种性上相容的物种分离的调节元件

[0322] 一旦从目标植物物种中分离出、并任选地修改了前导区、基因或尾随区，其可以与植物启动子或类似的调节元件可操作地连接用于在植物中适当的表达。象这些一样的调节元件用来在特定组织中、或以某种水平、或在特定时间表达与目标基因相连的非翻译序列。

[0323] 取块于修改性状涉及的策略，限制对植物的特定区域的沉默可能是必需的。通常驱动内源基因的表达的启动子可能不适合于组织特异性的表达。如在上节中描述的，细菌或病毒调节元件，例如花椰菜花叶病毒 35S “超级”启动子的稳定整合可能引起不可预见的和不合需要的事件。因而，本发明的一个方面使用了从选定宿主植物物种中分离的启动子。

[0324] 在本发明的优选的实施方式中，为了在 S. tuberosum 中使用，与 R1、磷酸化酶和 PPO 基因相连的前导区或尾随区序列与微粒结合淀粉合酶基因启动子 (Rohde et al., J Gen & Breed,44311-315,1990) 可操作地连接。其他人已经经常地使用该启动子来驱动基因表达，该启动子在马铃薯块茎中是特别有活性的 (van der Steege et al., Plant Mol Biol,20 :19-30,1992 ;Beaujean et al.,Biotechnol.Bioeng,70 :9-16,2000 ;Oxenboll et al.,Proc Natl Acad Sci USA,9 :7639-44,2000)。在优选的实施方式中，该启动子也可用于表达 R1、磷酸化酶和 PPO 基因的修改的前导区或尾随区序列。

[0325] 做为选择，可以将其他马铃薯启动子与来自马铃薯的目标序列可操作地连接。这种启动子包括patatin基因启动子 (Bevan et al.,Nucleic Acids Res,14 :4625-38,1986) 或其片段，其促进马铃薯块茎中的表达，马铃薯 UDP- 葡萄糖焦磷酸化酶基因启动子 (美国专利 No.5,932,783) 和遍在蛋白基因的启动子 (Garbarino et al., Plant Physiol,109 :

1371-8,1995)。

[0326] 通过使用在构建体中与目标多核苷酸可操作地连接的可诱导启动子和调节区,也可以调节前导区和/或尾随区的转录。可诱导启动子的实例包括那些对温度敏感的启动子,例如热休克或冷休克启动子。举例来说,马铃薯 ci21A- 和 C17- 启动子是冷可诱导的(Kirch et al., Plant Mol.Biol,33 :897-909,1997 ;Schneider et al., Plant Physiol, 113 :335-45,1997)。

[0327] 可以使用对某些底物,象抗生素、其他化学物质、或 pH 起反应的其他可诱导启动子。举例来说,已知的是脱落酸和赤霉酸影响植物细胞的细胞内 pH,并且在这种情况下调节 Rab 16A 基因和 α-淀粉酶 1/6-4 启动子 (Heimovaara-Dijkstra et al., Plant Mol Biol,4815-20,1995)。脱落酸、创伤和甲基茉莉酮酸酯也已知是诱导马铃薯 pin2 启动子的(Lorberth et al., Plant J,2 :477-86,1992)。

[0328] 在另一个实施例中,某些核苷酸序列是受时序性 (temporal) 调节的,仅在植物的某些发育阶段期间,或在一天的某几小时期间被激活来表达下游序列。举例来说,核酮糖 -1,5- 二磷酸羧化酶 (rbcS) 基因的小亚基的马铃薯启动子可以指导细胞特异性的、光调节的表达 (Fritz et al.,Proc Natl Acad Sci USA,88 :4458-62,1991)。熟练技术人员将通晓可诱导启动子和调节序列的这些示范性的形式。

[0329] 通过改变 mRNA 转录物的稳定性,在调节表达时使用某些多腺苷酸化信号可能也是有用的。特别是,当与多核苷酸的 3′ 末端可操作地连接时,某些多腺苷酸化信号使得 mRNA 转录物成为可受降解影响的。

[0330] 因而,有可能通过使基因与一个或多个这种启动子、调节序列、3′ 多腺苷酸化信号、3′ 非翻译区、信号肽等等可操作地连接来调节基因的表达。根据本发明,最终将被整合到植物基因组中的 DNA 序列和调节元件,例如在此描述的那些,是从将要通过本发明的精确育种过程修改的选定植物物种的 DNA 获得的。也就是说,从其他物种,例如从细菌、病毒、微生物、哺乳动物、鸟类、爬行动物、和性上不相容的植物物种衍生、分离和克隆的 DNA 序列和调节元件不被整合到被转化植物的基因组中。对于选定植物物种的基因组是外源的 DNA,只要该外源 DNA 不被整合到植物基因组中,可以被用于本发明来产生转化构建体。

[0331] 本发明不仅提供了一种通过整合从选定植物物种、或从与所述选定植物物种性上相容的植物获得的 DNA 来转化植物物种的方法,还提供了一种方法,通过这种方法可以调节这种 DNA 的表达。因此,有可能通过如先前所描述的组织特异性的或某些其他策略来优化某种序列的表达。

[0332] 使用从选定植物物种分离的 3′ 终止子序列

[0333] 除了起始转录的调节元件之外,天然表达盒还需要位于转录起始调节区的 3′ 末端的、终止转录的元件。转录终止区和转录起始区可以从相同的基因或从不同的基因获得。可以选择转录终止区,特别地为了 mRNA 的稳定性来选择,以增强表达。

[0334] 这个特别的元件,所谓的“3′ 非翻译区”在转运、稳定、定位和终止基因转录产物方面是重要的。在这点上,对于本领域技术人员公知的是,3′ -非翻译区可以形成某种发夹环。因此,本发明预想将 3′ 非翻译区可操作地连接到克隆的多核苷酸的 3′ 末端的可能性,使得产生的 mRNA 转录产物可暴露于对由 3′ 非翻译区赋予的序列和结构起作用的因子。

[0335] 可以从植物物种亚克隆出遍在蛋白基因的 3′ 序列，并插入到转基因的下游来确保转录的适当终止，启动子和转基因是从所述植物物种分离的。两个示范性的转基因都可以被融合到马铃薯遍在蛋白基因 (Ubi3) 的终止子序列上，不论用哪个启动子来驱动它们的表达。

[0336] 实施例

[0337] 实施例 1

[0338] P-DNA 的克隆

[0339] 这个实施例表明了 T-DNA 边界是特异于土壤杆菌的。还显示了植物含有 T-DNA 边界样序列，提供了从马铃薯和小麦分离的、由这种边界样序列划定的 DNA 片段的序列。

[0340] 常规的转化系统使用土壤杆菌衍生的 T-DNA 作为载体将外源的 DNA 从土壤杆菌转移到植物细胞 (Schilperoort et al.，美国专利 4940838，1990)。尽管 T-DNA 通常包含由左侧边界 (LB) 和右侧边界 (RB) 重复来划定的数百个碱基对，它们也可以仅由这种边界组成。T-DNA 边界在 DNA 转移过程中起到了重要作用，因为它们起到了 virD2 催化的切割反应的特异性识别位点的作用。与土壤杆菌 virD2 和 virE2 复合的、释放的单链 DNA 被转移到植物细胞核，在植物细胞核中其常常成功地整合到植物基因组中。所有已经被用于外源 DNA 转移的 T-DNA 边界都来源于 Agrobacterium tumefaciens 和 A. rhizogenes 的胭脂碱和章鱼碱菌株 (表 2)。这些边界和通常某些侧翼土壤杆菌 DNA 存在于数千个二元载体中，包括，例如

[0341] pPAM(AY027531)，pJawoh1(AF408413)，

[0342] pYL156(AF406991)，pINDEX(AF294982)，pC1300(AF294978)，pB1121(AF485783)，pLH9000(AF458478)，pAC161(AJ315956)，BinHygTOp(Z37515)，pHELLSGATE(AJ311874)，pBAR-35S(AJ251014)，pGreen(AJ007829)，pBIN19(X77672)，pCAMBIA(AF354046)，pX6-GFP(AF330636)，pER8(AF309825)，pBI101(U12639)，pSKI074(AF218466)，pAJ1(AC138659)，pAC161(AJ315956)，pSLJ8313(Y18556)，和 pGV4939(AY147202)。近来，在 chrysopine 型 Ti 质粒 pTiChry5 中鉴定出两个 T-DNA 边界的同源物 (Palanichelvam et al.，Mol Plant Microbe Interact 13 :1081-91，2000)。左侧边界同源物与位于 pTi15955T-DNA 中间的非活性边界同源物相同。右侧边界同源物显著地不同于功能性 T-DNA 边界的序列。因此这些同源物不太可能在支持将 DNA 从 pTiChry5 转移到植物细胞方面是功能上有活性的。

[0343] 能使仅用天然 DNA 转化植物成为可能的新方法的开发，首先需要对包括 LB 和 RB 的 T-DNA 的替换。令人遗憾地，对公众数据库，包括由国家生物技术信息中心、基因组研究机构和 SANGER 维护的那些数据库的高级 BLAST 搜索未能在植物中鉴定出任何边界序列。因此必需考虑类似于 T-DNA 边界、但与 T-DNA 边界不同的植物 DNA 序列，在此被称为“边界样”(边界样)。在公众数据库中鉴定出的植物边界样序列的实例在表 2 中示出。在尝试用边界样序列替换 T-DNA 边界方面的挑战是，边界序列是高度保守的 (参见表 2)。在其他细菌 DNA 转移系统，例如 IncP、PC194 和 ΦX174 的切口区 (nickregion) 中，这些序列的大部分也是高度保守的，表明这些序列对于接合样 DNA 转移是必不可少的 (Waters et al.，Proc Natl Acad Sci 88 :1456-60，1991)。由于关于边界序列的必要条件没有可靠的的数据，因此在切割过程中完整的边界似乎是重要的。通过测试边界突变体在支持 DNA 转移方

面的效力尝试解块这个问题的单独研究是不可靠的，因为阴性对照似乎不能适当地起作用(van Haaren et al.，Plant Mol Biol13：523-531，1989)。此外，这个研究的结果都没有被分子上地证实。不考虑这些关切，在表 2 中还是显示了两个可能有效的边界突变体。

[0344] 根据边界序列之间的同源性，鉴定出 T-DNA 边界基序 (motif)(表 2)。尽管这个基序包含 13,824 种变体，其中许多可能不起作用或在转移 DNA 方面是不足够的，其仍然代表对 T-DNA 边界序列是什么或可能是什么的最广泛可能的定义。然后利用“基序比对和搜索工具 (Motif Alignment and Search Tool)”(Bailey andGribskov，Bioinformatics 14：48-54，1998) 和““advanced BLASTN”(“核苷酸错配的罚分”＝-1；“预期”＝10^5；Altschul et al.，Nucleic AcidsRes 25：3389-3402，1997) 用这个边界基序在公众可用的 DNA 数据库中搜索同源物。再一次地，这些搜索没有在除土壤杆菌外的生物中鉴定出任何同一的匹配。通过这种检索策略鉴定出的序列的实例在表 2 中举例说明，其列出了从，例如，Arabdopsis 和稻米核酸数据库条目鉴定出的各种边界样序列。

[0345] 为了尝试和提高分离含有相应于边界基序的边界样序列的马铃薯 DNA 片段的机会，从 100 个遗传上各异的登记（所谓的″核心保藏″，由美国马铃薯 Genebank，WI 提供）分离 DNA。将该 DNA 集中，用作利用各种被设计与边界或边界样序列退火的寡核苷酸进行聚合酶链式反应的模板。对扩增的片段进行序列分析，然后用嵌套引物使用反向 PCR 证实序列。特别感兴趣的马铃薯 DNA 片段之一含有由边界样序列划定的、没有任何主要开放阅读框的新序列（表 2)。这个片段的边界样序列之一含有与 T-DNA 边界的至少 5 个错配；另一个边界样序列含有至少 2 个错配。尽管两个序列都含有与边界基序的一个错配，还是测试它们支持 DNA 转移的能力。为此，首先通过进行内部删除将片段降低到 0.4k 碱基对的大小 (SEQ ID NO.：1)。产生的片段被命名为“P-DNA”(植物 DNA)，以与土壤杆菌衍生的 T-DNA 相区别。从马铃薯品种 Russet Ranger 的基因组中分离了类似的片段，但没有被用于任何进一步的实验。

[0346] 根据 P-DNA 和 T-DNA 边界之间的差异，用以下简并引物使用延长酶放大系统 (Life Technologies) 从小麦分离 P-DNA：5′ -GTTTACANHNBNATATATCCTGYCA-3′ (Bor-F)(SEQ ID NO.56)，和 5′ -TGRCAGGATATATNVNDNTGTAAAC-3′ (Bor-R)(SEQ ID NO.57)。产生的 825bp 片段在 SEQ ID NO.：2 中示出，被用于替换常规二元载体的 T-DNA。通过将 GUS 基因的表达盒插入到 P-DNA 末端之间，用携带产生的载体的土壤杆菌菌株感染小麦，可以测试这个构建体的效力。

[0347] 作为对 1 步 PCR 法来分离由边界样序列 (P-DNA) 划定的植物 DNA 片段的替代，开发出 2 步 PCR 法，根据以下的基本原理来在植物 DNA 中鉴定单个边界样序列：

[0348] 1. 用限制性酶部分地或完全地消化植物 DNA。可以使用常用的切割酶，例如 SauIIIA。

[0349] 2. 用具有已知序列的 DNA 片段连接消化的 DNA。这种已知 DNA 片段的实例是 pBR322 的 192-bp BamHI-EcoRV 片段。

[0350] 3. 用可以是简并的和与 T-DNA 边界样序列退火的“边界”引物、和与已知连接的 DNA 片段退火的“锚”引物进行 PCR。一般地，在凝胶电泳上观察到反应产物的弥散条带。边界引物的一个实例是 5′ -YGR CAG GAT ATA TNN NNN KGT AAA C-3′ ；锚引物的实例是 5′ -GAC CAC ACC CGT CCT GTG-′ 3。尽管在进行这个方法时可以改变 PCR 扩增反应的任

何参数，成功地使用这些引物的退火温度是 49℃ ；2.5 分钟的延伸时间被用于这个扩增反应。

[0351] 4. 用另一个已知序列连接 PCR 产物，例如连接到质粒样 pGEM-T。

[0352] 5. 用“边界”引物和与所述质粒，例如 SP6 或 T7 退火的引物进行 PCR。这个第二 PCR 的条件需要被优化，使得产生的 PCR 产物在凝胶上显示特定的条带，可能具有某些其它弥散条带。可以成功使用的退火温度是 52℃。

[0353] 6. 将产生的条带克隆到载体，例如 pGEM-T 中用于序列分析。

[0354] 7. 使用测序的 DNA 来设计 4 个引物，对用酶例如 SauIIA 完全消化然后自我连接的植物 DNA 进行反向 RCR。两个引物被用于第一 PCR，然后这个第一 PCR 的产物被用作利用嵌套引物进行第二 PCR 的模板。然后将扩增的 DNA 片段克隆到载体例如 PGEM-T 中，然后进行序列分析来测定实际的边界样序列。

[0355] 做为选择，在这个方法的步骤 3，用与边界样序列 5′ 部分退火的第一短引物，例如 5′ -YGR CAG GAT ATA T-3′ 和与具有已知序列的连接的 DNA 片段退火的第二短引物，例如 5′ -ATG GCG ACCACA-3′ ，使用限制错配数目的相对高的退火温度，例如 34℃，来进行扩增反应。将这个 DNA 稀释约 100 倍，使用 1μL 稀释的 DNA 作为模板，用与至少边界样序列的中部和 3′ 部分退火的一个引物，例如 5′ -CAGGAT ATA TNN NNN KGT AAA C-3′ ，和与具有已知序列的连接的 DNA 退火的、理想地与如上所述短“已知 DNA”引物嵌套 (nested) 的另一个引物，进行第二 PCR。可以成功使用的退火温度是 52℃。

[0356] 实施例 2

[0357] 用 P-DNA 载体转化烟草

[0358] 这个实例表明，尽管 P-DNA 末端和 T-DNA 边界之间具有结构的（序列差异）和功能的（转化频率）差异，P-DNA 可以以与 T-DNA 类似的方式用于将 DNA 从土壤杆菌转移到烟草细胞。

[0359] 在 E.coli 和 A.tumefaciens 中都能维持的无 T-DNA 载体，通过移除常规二元载体 pCAMBIA1301(Cambia，AU) 的完整 T-DNA 区获得。通过同时地将 pSIM1301 的 5.9kb SacII-SphI 片段与从 pCAMBIA1301 扩增的 2 个片段连接来实现，所述扩增分别使用寡核苷酸对 ：

[0360] 5′ -CCGCGGTGATCACAGGCAGCAAC-3′ (SEQ ID NO.58) 和 5′ -AAGCTTCCAGCCAGCCAACAGCTCCCCGAC-3′ (SEQ ID NO.59)，和 5′ -AAGCTTGGCTACTAGTGCGAGATCTCTAAGAGAAAAGAGCGTTTA-3′ (SEQ ID NO.60)，和 5′ -GCATGCTCGAGATAGGTGACCACATACAAATGGACGAACGG-3′ (SEQ IDNO.61)。

[0361] 为了使筛选主干整合事件成为可能，将包含由 Ubi3 启动子驱动的土壤杆菌异戊烯转移酶 (IPT) 基因，之后是 Ubi3 终止子 (SEQID NO. :3) 的表达盒作为 2.6kbp SacII 片段插入到如上所述无 T-DNA 载体的主干中，产生 pSIM100-OD-IPT。预期表达 IPT 基因的转化的植物细胞积累细胞分裂素，生长成不能发育根系的异常的幼苗。

[0362] 将实施例 1 中描述的 0.4kb P-DNA 片段插入到 pSIM100-OD-IPT 中来产生 pSIM111（附图 1 ;SEQ ID NO. :4)。

[0363] 为了测试 pSIM111 是否可被用于获得没有其他的载体主干、携带 P-DNA（包括位于 P-DNA 末端之间的任何序列）的转化的植物，将新霉素磷酸转移酶 (NPTII) 基因表达盒插入

到 pSIM111 的 P-DNA 中来产生 pSIM108（附图 1）。

[0364] 通过比较 pSIM108 和含有带有常规 T-DNA 边界的修改的 P-DNA 的对照载体之间的转化频率，测试 P-DNA 末端支持 DNA 转移的效力。这个对照载体，被命名为 pSIM109，通过用寡核苷酸对 :5′ -ACTAGTGTTTACCCGCCAATATATCCTGTCAGAG-3′ (SEQ ID NO.62)，和 5′ -AAGCTTTGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACGAAG-3′ (SEQ IDNO.63)。

[0365] 扩增含 NPTII 基因表达盒的完整 P-DNA 产生。用于这些实验的第二对照载体是常规的二元载体 pBI121(Genbank 登录号 AF485783)，其含有插入到常规 T-DNA 中的相同的 NPTII 表达盒。如下将二元载体导入 Agrobacterium tumefaciens LBA4404 细胞。感受态 LB4404 细胞 (50uL) 在 37℃在存在 1uL 载体 DNA 的情况下孵化 5 分钟，在液氮（约 -196℃）中冷冻约 15 秒，再次在 37℃孵化 5 分钟。在添加 1mL 的液体肉汤 (LB) 后，在 28℃使处理的细胞生长 3 小时，平铺到含链霉素 (100mg/L) 和卡那霉素 (100mg/L) 的 LB/ 琼脂上。然后从单个 LBA4404 菌落的过夜培养物分离载体 DNA，通过限制性分析检查证实完整质粒 DNA 的存在。

[0366] 通过使 10 倍稀释的过夜生长的 LBA4404::pSIM108 细胞生长 5-6 小时，在 2,800RPM 沉淀细胞 15 分钟，用补充有蔗糖 (3％，pH5.7) 的 MS 液体培养基 (Phytotechnology) 洗涤细胞，将细胞重悬浮在相同培养基中直到 OD_{600nm} 为 0.2，对模式植物烟草的转化进行测试。然后该悬浮液用于感染体外生长的 Nicotiana tabacum 植物的 4 周龄叶外植体。感染的烟草外植体在含 6g/L 琼脂的共培养培养基 (1/10MS 盐，3％蔗糖，pH 5.7) 上在 Percival 生长箱 (16 小时光照）中 25℃孵化 2 天，随后转移到含 timentine(150mg/L) 和卡那霉素 (100mg/L) 的 M401/ 琼脂培养基上。在接下来 4 周内每个外植体发育的愈伤组织数目在表 3 中示出。数据表明，由天然末端或常规的 T-DNA 边界划定的 P-DNA 在转化烟草方面，比 T-DNA 更有效约 50％。增加的 P-DNA 转移效率可能是由于其不同的 CG 含量或 P-DNA 的其他未知结构特征。

[0367] 此外，不仅用 pSIM108（含有插入到 P-DNA 中的 nptII 表达盒的载体，参见实施例 2)，还用 pSIM118（含有插入到衍生的 P-DNA 中的 nptII 表达盒的载体）感染烟草外植体。用 SEQ ID NO.1 或 SEQ IDNO.98 的 P-DNA 实施的实验具有相同的转化频率。SEQ ID NO 1 和 98 的不同仅在于左侧和右侧边界中单个碱基的变化。因而，有可能改变 P-DNA 的序列并且仍然获得可接受的转化频率。

[0368] 实施例 3

[0369] 用 P-DNA 载体转化马铃薯

[0370] 这个实施例表明，P-DNA 可以以与 T-DNA 类似的方式来将 DNA 从土壤杆菌转移到马铃薯细胞。

[0371] 根据以下步骤，通过用土壤杆菌菌株感染体外生长的 RussetRanger 植物苗的 4 周龄茎外植体，进行马铃薯转化。使 10 倍稀释的过夜生长的培养物生长 5-6 小时，在 2,800RPM 沉淀 15 分钟，用补充有蔗糖 (3％，pH 5.7) 的 MS 液体培养基 (Phytotechnology) 洗涤，重悬浮在相同培养基中直到 OD600nm 为 0.2。然后将重悬浮的细胞用于感染 0.4-0.6mm 节间马铃薯片段。感染的茎在含 6g/L 琼脂的共培养基 (1/10MS 盐，3％蔗糖，pH 5.7) 上在 Percival 生长箱 (16 小时光照）中 22℃孵化 2 天，随后转移到含 timentine(150mg/L) 和卡那霉素 (100mg/L) 的愈伤组织诱导培养基 (CIM，补充有 3％蔗糖 3、2.5mg/L 玉米素核糖甙、

0.1mg/L 萘乙酸和 6g/L 琼脂的 MS 培养基）上。在 CIM 上培养一个月后，将外植体转移到含 timentine 和卡那霉素（分别为 150 和 100mg/L）的幼苗诱导培养基（SIM，补充有 3％蔗糖、2.5mg/L 玉米素核糖甙、0.3mg/L 赤霉酸 GA3 和 6g/L 琼脂的 MS 培养基）。3-4 周后，统计发育转基因的愈伤组织和 / 或幼苗的外植体数目。如在烟草中所示，用 pSIM108 感染的、显示了愈伤组织的茎外植体的数目，比用常规二元载体 pBI121 的对照实验中高（表 3）。随后由这些愈伤组织产生的幼苗可以分为两种不同的类型。第一类的幼苗是在表型上不能与用 LBA::pBI121 转化的对照幼苗相区别的。第二类幼苗展现了 IPT 表型。后一类的幼苗在生长中受到阻碍，仅有非常小的叶子、展现出浅绿到黄的颜色、在转移到无激素培养基时不能生根。为了证实具有 IPT 表型的幼苗含有稳定地整合到它们的基因组中的 IPT 基因，将所有幼苗转移到包含补充有 3％蔗糖和 timentine 150mg/L 的 MS 培养基的 Magenta 盒中，容许生长额外的 3 到 4 周，用于分离 DNA。这个植物 DNA 充当 PCR 反应的模板，其中使用被设计与 IPT 基因退火的寡核苷酸对 :5′ -GTC CAA CTT GCA CAG GAA AGA C-3′ 和 5′ -CATGGA TGA AAT ACT CCT GAG C-3′ 。如表 4 所示，PCR 实验证实了 IPT 表型与存在 IPT 基因之间的严格相关。还检查了在用 pBI121 转化获得的植物中主干 DNA 的存在。这通过用“pBI121 主干引物”:5′ -CGGTGTAAGTGAACTGCAGTTGCCATG-3′ (SEQ ID NO.64)，和 5′ -CATCGGCCTC ACTCATGAGCAGATTG-3′ (SEQ ID NO.65)。

[0372] 对从转化事件分离的 DNA 进行 PCR 反应来进行。0.7kbp 条带的扩增是主干整合的指示。通过比较表 4 中呈现的数据，可以断定主干整合频率对于 P-DNA 载体和 T-DNA 载体是类似的。

[0373] 进行第二 PCR 实验来测试无 IPT 的植物是否不含有任何其他主干序列。由于 IPT 表达盒的位置靠近左侧边界样序列，用于这个实验的寡核苷酸对被设计为与靠近右侧边界样序列的主干序列退火 :5′ -CACGCTAAGTGCCGGCCGTCCGAG-3′ (SEQ ID NO.66)，和 5′ -TC CTAATCGACGGCGCACCGGCTG-3′ (SEQ ID NO.67)。

[0374] 来自这个实验的数据证实对于 IPT 基因是阳性的植物对于主干的这个其他部分也是阳性的。

[0375] 对马铃薯品种 Russet Burbank 进行类似的实验。根据对 IPT 表型的评定，显示了 pSIM108 和 pSIM109 的主干整合频率，与在 RussetRanger 中的那些相当（参见表 4 和 5）。

[0376] 实施例 4

[0377] 马铃薯转化酶抑制物基因

[0378] 使用常规的转化方法，这个实施例表明，过量表达新的马铃薯转化酶抑制物基因 (potato invertase inhibitor gene) 增强了马铃薯块茎的加工和健康特征。

[0379] 设计以下引物来扩增烟草液泡转化酶抑制物 Nt-inhh1(Greiner et al., Nature Biotechnology,17,708-711,1999) 的新型马铃薯同源物 :5′ -AAAGTTGAATTCAAATGAGAAAT TTATTC-3′ (SEQ ID NO.68)，和 5′ -TTTTAAGCTTTCATAATAACATTCTAAT-3′ (SEQ ID NO.69)。

[0380] 通过混合以下成分进行扩增反应 :4μl 植物 DNA、2μl 正向引物 (10pM/ml)、2ul 反向引物，25ul Hot Start Master Mix(Qiagen CatalogNr.203443) 和 17μl 水。将这个反应混合物置于使用 PTC-100 热循环仪 (MJ Research) 的以下聚合酶链式反应 (PCR) 条件中 :(1)95℃ 5 分钟 (1 循环)，(2)94℃ 1 分钟，45℃ 1 分钟和 72℃ 4 分钟 (35 循环)，和 (3)72℃ 10 分钟 (1 循环）。将总产物加载到 0.8％琼脂糖凝胶上，利用 QIAquick Gel Extraction

试剂盒 (Qiagen，CA) 从凝胶中纯化出 540 碱基对的条带。然后将这个纯化的片段连接到 pGEM-T Easy(Promega,WI) 中，利用 Max Efficiency Competent Cells(GibcoBRL,MD) 转化到 E.coli DH5-α 中。对从转化的 DH5-α 分离的重组质粒 DNA 的序列分析显示，存在由 543 个碱基对组成的、编码推定的 181 氨基酸蛋白 (SEQ ID NO.5) 的单个开放阅读框；clustal 比对显示了与 Nt-inhh 的 70％同源性 (附图 2)。这种高水平的同源性延伸至 15 氨基酸的 N- 末端结构域，表明马铃薯同源物是靶向液泡的。有趣地，马铃薯转化酶抑制物同源物，命名为 St-inh1，与专利的命名为 Nt-inh1 的烟草细胞壁转化酶抑制物 (专利 WO98/04722；附图 2) 仅有 43％的同源性。

[0381] 尽管 St-inh1 基因存在于未修改的马铃薯块茎中，其表达水平对于完全抑制转化酶和降低冷诱导的糖化是不足够的。为了增强马铃薯的贮藏特性，将 St-inh1 基因与微粒结合淀粉合酶 (GBSS) 基因的新型块茎增强的启动子融合，已知该启动子能促进块茎中高水平的基因表达。通过利用正向引物 5′ -GAACCATGCATCTCAATC-3′ (SEQ ID NO.70) 和反向引物 5′ -GTCAGGATCCCTACCAAGCTACAGATGAAC-3′ (SEQ ID NO.71) 进行 PCR 反应从马铃薯栽培种 Russet Ranger 分离 GBSS 启动子。对克隆到 pGEM-T 中的该扩增产物的序列分析表明，这个新型启动子含有 658 个碱基对 (SEQ ID NO.:6)。然后将产生的启动子 / 基因融合物连接到马铃薯遍在蛋白基因的 3′ 调节序列 (UbiT；SEQ ID NO.:7)，因而确保转化酶抑制物基因的转录的转录的适当的终止。

[0382] 将这个表达盒插入到二元载体的 T-DNA 边界之间，产生的载体 pSIM320 被用于如上所述转化 Russet Ranger。将九个独立转基因系 (transgenic lines) 的三个插枝种植在土壤中，在生长箱中生长四周 (11 小时光照；20℃)。然后从每个株系 (line) 收获至少 3 个迷你块茎，转移到冷柜在 4℃诱导冷糖化 (cold sweetening)。4 周后，通过使用 Accu-Chek 计和测试条 (Roche Diagnostics，IN)，或葡萄糖氧化酶 / 过氧化物酶试剂 (Megazyme，Ireland) 测定冷藏的迷你块茎中的葡萄糖水平。将这些水平与 6 个未转化的株系和 6 个用缺乏转化酶抑制物基因的 pSIM110 衍生载体转化的“载体对照”株系中的平均葡萄糖水平进行比较。如表 6 中所示，三个转基因株系积累了比“载体对照”株系中少 40％的葡萄糖，表明马铃薯转化酶抑制物同源物是功能上有活性的。

[0383] 以下实验显示了在块茎中存在的还原糖数量与块茎加工期间丙烯酰胺产生有关。从田地里新鲜收获 Russet Ranger 马铃薯块茎，并保藏在 4℃来诱导冷糖化；对照块茎保藏在 18℃。4 周后，测定两组块茎中的葡萄糖水平。随后，洗涤块茎，在 165° F 白化 8 分钟或 12 分钟，切成 0.290×0.290 的鞋带状条，在 160° F 浸泡在 1％酸式焦磷酸钠溶液中，在 160° F 干燥直到达到 14±2％的干重损失，在 390° F 油炸 40 秒达到 64±2％的第一油炸湿度，在 -15° F 冷冻 20 分钟，在第一个 6 分钟内摇动托盘 2-3 次。然后产生的炸薯条由 Covance 实验室 (WI) 分析丙烯酰胺水平。如表 7 所示，保藏在 18℃的块茎中葡萄糖水平低于 0.1mg/g 的检测水平，而冷藏的块茎中含有平均 3.4mg/g 的葡萄糖。这个表格还显示了由后一种马铃薯生产的油炸食物含有比保存在 18℃的马铃薯生产的油炸食物高约 10 倍的丙烯酰胺水平。即使对 18℃保藏的马铃薯使用比 4℃保藏的马铃薯更短的漂白时间，来产生具有类似颜色 (颜色 ids 分别为 78 和 71) 的油炸食物，在丙烯酰胺累积方面仍得到了 5 倍的差异 (表 7)。因而，在块茎中的还原糖例如葡萄糖的数量和来源于这些块茎的油炸食物中丙烯酰胺的累积之间似乎存在直接的关联。

[0384] 为了测定在 pSIM320 株系中降低的葡萄糖水平是否限制加工诱导的丙烯酰胺累积，加工冷藏的 pSIM320 迷你块茎，切成楔形，白化 (blanching)8 分钟，在 0.5% SAPP 中浸泡 30 秒，在 160° F 干燥 4.5 分钟，在 380° F 油炸 40 秒，在 -15° F 冷冻 15 分钟，最后在 160° F 干燥 3 分钟和 10 秒。然后将加工的材料交给 Covance 实验室用于丙烯酰胺测定。如表 6 所示，从迷你块茎获得的炸薯条具有最低数量的葡萄糖积累和最低水平的丙烯酰胺。在株系“320-2”和“320-4”中葡萄糖水平方面 40％的降低，与丙烯酰胺水平的 5 倍降低相关。

[0385] 为了在成熟块茎中证实这些结果，将马铃薯植物苗种植在更大的 1 加仑罐中，容许在温室中生长。9 周后（衰老之前）从一组植物分离块茎，12 周后（衰老之后）从重复组植物分离块茎。收获的块茎在 4℃保藏 1 个月，如上所述分析葡萄糖水平。这个分析表明，在几个转基因的（半）成熟块茎中发现的冷诱导的葡萄糖水平甚至比相应的迷你块茎中更低。

[0386] 为了测定在 pSIM320 株系中降低的葡萄糖水平是否限制加工诱导的丙烯酰胺累积，加工冷藏的 pSIM320 迷你块茎，切成楔形，白化 8 分钟，在 0.5% SAPP 中浸泡 30 秒，在 160° F 干燥 4.5 分钟，在 380° F 油炸 40 秒，在 -15° F 冷冻 15 分钟，最后在 160° F 干燥 3 分钟和 10 秒。然后将加工的材料交给 Covance 实验室用于丙烯酰胺测定。如表 6 所示，从具有最低数量的葡萄糖的迷你块茎获得的炸薯条积累最低水平的丙烯酰胺。在株系“320-2”和“320-4”中葡萄糖水平方面 40％的降低，与丙烯酰胺水平的 5 倍降低相关。可以从成熟的 (12 周龄)、温室生长的块茎获得类似的结果。

[0387] 实施例 5

[0388] 与马铃薯 R1 基因相连的前导区和尾随区序列

[0389] 使用常规的转化方法，这个实施例表明，可以有效的使用与马铃薯 R1 基因相连的新型前导区序列来增强马铃薯块茎的加工和健康特征。还预计，可以同样地采用与同一基因相连的新型尾随区。

[0390] 作为对过量表达转化酶抑制物基因的替代，开发出限制丙烯酰胺产生而不使用任何实际的基因序列的方法。这种方法基于沉默块茎表达的 R1 基因。早先已经表明，可以通过来源于淀粉相关基因的 1.9kb 基因片段的反义表达来沉默淀粉相关基因 (Kossmann et al.，美国专利 6,207,880)。然而，大 DNA 片段的反义表达是不合需要的，因为这种片段含有新的开放阅读框（表 1)。作为比上述方法更安全的方法，从马铃薯中分离与 R1 基因相连的小的前导区序列。通过用 GIBCOBRL 提供的 5′ RACE 试剂盒，对来自 Russet Ranger 马铃薯植物的块茎的总 RNA 进行 cDNA 末端的快速扩增获得这个前导区 (leader)。序列分析表明，与 R1 相连的前导区由 179 个碱基对组成 (SEQ ID NO.:8)。由马铃薯遍在蛋白内含子 (SEQ ID NO.:9) 分隔的这个前导区序列的有义拷贝和反义拷贝，被置于 GBSS 启动子和 UbiT 之间。产生的与 R1 相连的前导区序列的表达盒在附图 3 中示出 (SEQ ID NO.:10)。含有来源于 GBSS 启动子的间隔区 (SEQ ID NO.:11) 的类似的盒在（附图 3;SEQ ID NOs.:12)）中示出，所述来源于 GBSS 启动子的间隔区代替 Ubi 内含子来分隔所述 R1 尾随区的有义拷贝和反义拷贝。具有 GBSS 启动子的更长版本 (SEQ ID NO.:13) 的其他变体在附图 3 中示出 (SEQ ID NO.:14-15)。

[0391] 为了测试 R1 相连的前导区在限制丙烯酰胺产生方面的效力，将附图 3 所示的表达

盒作为 KpnI-XbaI 片段插入到二元载体的 T-DNA 边界之间。携带产生的载体 pSIM332 的土壤杆菌 LBA4404 菌株被用于转化 Russet Ranger 马铃薯。为了诱导块茎形成，将代表独立转化事件的 25 个幼苗转移到土壤中，并置于生长箱（11 小时光照，25℃）中。三周后，将至少 3 个迷你块茎 / 株系在 4℃保藏 4 周来诱导淀粉活化。随后如实施例 4 中描述的测定这些冷藏的迷你块茎中的葡萄糖水平，与未转化植物和载体对照中的平均葡萄糖水平对比。如表 8 所示，来自所有 25 个株系的迷你块茎在冷藏后展现了降低的葡萄糖水平。在来自展现出降低的 R1 表达水平的迷你块茎的炸薯条中，与对照相比，丙烯酰胺水平被期待有约 2 倍的降低。在成熟块茎中，下调 R1 基因表达的更强烈的效应被预期。

[0392] 作为对基于前导区的方法的替代，产生含有与 R1 相连的尾随区序列的有义和反义拷贝的表达盒。通过对分离自马铃薯栽培种 Russet Ranger 的微型块茎的总 RNA 进行逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 获得这个尾随区 (trailer)。利用 Omniscript RT 试剂盒 (Qiagen,CA) 产生互补 DNA，然后用作 PCR 反应的模板，PCR 反应使用 Hot start DNA 聚合酶 (Qiagen, CA) 和基因特异性的反向引物 R1-1(5′ -GTTCAGACAAGACCACAGATGTGA-3′)。对克隆到 pGEM-T 中的扩增的 DNA 片段的序列分析表明，与 R1 相连的尾随区由 333 个碱基对组成 (SEQ ID NO. :16)。尾随区的有义拷贝和反义拷贝由 Ubi 内含子或 GBSS 间隔区分隔，并夹在 GBSS 启动子和 Ubi3 终止子之间（附图 3 ;SEQ ID NOs. :17-18)。使用更大的 GBSS 启动子的类似方案在附图 3 中示出 (SEQ ID NOs. :19-20)。

[0393] 如上所述测定葡萄糖和丙烯酰胺水平。在葡萄糖浓度方面展现出约 50％或更多的降低的块茎，预期在油炸加工过程中也积累更少约 50％的丙烯酰胺。修改的植物的改进的健康和贮藏特征可以在成熟的、田地生长的块茎中被证实。

[0394] 通过利用 AOAC Method 995.11 Phosphorus(Total)in Foods(45.1.33 Official Methods of Analysis of AOAC International,17thEdition) 测定马铃薯块茎中的磷酸盐水平。通过在马弗炉中干灰化之后酸解来制备样品。然后中和溶解的样品，用钼酸盐 - 抗坏血酸溶液处理，与磷标准的系列（类似地处理）比较。使用双波束分光光度计在 823 纳米进行比色分析。对环境有益的磷酸盐含量方面的显著下降是预期的。

[0395] 来自所有 25 个株系的迷你块茎在冷藏后展现了降低的葡萄糖水平。在半成熟的 (9 周龄）和成熟的 (12 周龄）温室生长的块茎中发现了下调 R1 基因表达对葡萄糖累积的更强的效应。在许多转基因株系的块茎中降低的葡萄糖水平与加工期间降低的丙烯酰胺累积相关。

[0396] 如上所述测定葡萄糖和丙烯酰胺水平。在葡萄糖浓度方面展现出约 50％或更多的降低的成熟的块茎，预期在油炸加工过程中也积累更少约 50％的丙烯酰胺。修改的植物的改进的健康和贮藏特征可以在成熟的、田地生长的块茎中被证实。

[0397] 通过利用 AOAC Method 995.11 Phosphorus(Total)in Foods(45.1.33 Official Methods of Analysis of AOAC International,17thEdition) 测定马铃薯块茎中的磷酸盐水平。通过在马弗炉中干灰化之后酸解来制备样品。然后中和溶解的样品，用钼酸盐 - 抗坏血酸溶液处理，与磷标准的系列（类似地处理）比较。使用双波束分光光度计在 823 纳米进行比色分析。对环境有益的磷酸盐含量方面的显著下降是预期的。

[0398] 实施例 6

[0399] 与 L-α 葡聚糖磷酸化酶基因相连的前导区序列

[0400] 使用常规的转化方法，这个实施例表明，可以使用与马铃薯 L-α 葡聚糖磷酸化酶基因相连的新型前导区序列来有效地增强马铃薯块茎的加工和健康特征。

[0401] 早先已经表明，可以通过来源于 α 葡聚糖磷酸化酶基因的 0.9-kb 片段的反义表达来降低冷诱导的糖化 (Kawchuk et al.，美国专利5,998,701,1999)。然而，这些相对大的 DNA 片段的反义表达是不合需要的，因为它们含有新的和未表征的开放阅读框，如果在转基因植物中表达，可能影响食物的营养品质（表 1)。

[0402] 作为比上述方法更安全的方法，从成熟块茎的 RNA 分离与 L 型葡聚糖磷酸化酶基因相连的小的前导区和尾随区序列。用于这个目的的引物对是：

[0403] 5′ -GGATCCGAGTGTGGGTAAGTAATTAAG-3′ (SEQ ID NO.72)，和 5′ -GAATTCTGTGCTCTCTATGCAAATCTAGC-3′ (SEQ ID NO.73)。扩增得到的 273bp 前导区序列，在 SEQ ID NO.：21 中示出。类似地，“直接”引物 5′ -GGAACATTGAAGCTGTGG-3′ (SEQ ID NO.74) 与寡 -dT 引物一起使用来扩增与 L 型磷酸化酶基因相连的 158bp “尾随区序列”(SEQID NO.:22)。

[0404] 然后利用这些尾随区或前导区序列设计表达盒来修改 L 型磷酸化酶基因的表达，在这种情况下，通过限制淀粉活化降低油炸产品中的丙烯酰胺水平。按与实施例 5 中描述的类似的方式构建这些盒，在附图 3 中示出 (SEQ ID NO.:23-26)。含有带这个表达盒的二元载体，命名为 pSIM216，的土壤杆菌，被用于感染马铃薯茎，产生 25 个转基因植物。将来源于这些植物的迷你块茎保藏在 4℃ 4 周来诱导冷糖化。然后分析冷藏的迷你块茎的葡萄糖水平。如表 9 所示，来自所有转基因株系的迷你块茎展现了降低的葡萄糖水平。

[0405] 四个展现出至少降低 50％的葡萄糖浓度的株系（株系 216-2、216-5、216-10 和 216-21) 被用于评定加工诱导的丙烯酰胺水平。尽管在来源于前三个株系的油炸块茎中丙烯酰胺水平与对照的类似，来源于株系 216-21 的炸薯条仅积累了野生型丙烯酰胺水平的 45％（十亿分之 136 比 305)。这些结果证实了实施例 4 中描述的关于过量表达马铃薯转化酶抑制物基因的块茎的实验，因为葡萄糖（和果糖）浓度方面相对大的降低是限制冷藏的迷你块茎中加热诱导的丙烯酰胺累积所需的。因为期望磷酸化酶基因的沉默在成熟的“216”块茎中更为有效，还预期在由这种块茎产生的炸薯条中丙烯酰胺水平的降低更为显著。修改的植物的改进的健康和贮藏特征可以在成熟块茎中被证实。

[0406] 四个展现出至少降低 50％的葡萄糖浓度的株系（株系 216-2、216-5、216-10 和 216-21) 被用于评定加工诱导的丙烯酰胺水平。尽管在来源于前三个株系的油炸块茎中丙烯酰胺水平与对照的类似，来源于株系 216-21 的炸薯条仅积累了野生型丙烯酰胺水平的 45％（十亿分之 136 比 305)。这些结果证实了实施例 4 中描述的关于过量表达马铃薯转化酶抑制物基因的块茎的实验，因为葡萄糖（和果糖）浓度方面相对大的降低是限制冷藏的迷你块茎中加热诱导的丙烯酰胺累积所需的。修改的植物的改进的健康和贮藏特征可以在成熟块茎中被证实。

[0407] 实施例 7

[0408] 修改的多酚氧化酶基因

[0409] 使用常规的转化方法，这个实施例表明了，能有效地使用缺少功能性铜结合位点的修改的多酚氧化酶基因来降低块茎中的擦伤敏感性 (bruise susceptibility)。

[0410] 早先已经表明了，通过 1.8kb PPO 基因的反义表达可以降低黑斑擦伤敏感性 (Steffens，美国专利6,160,204,2000)。然而，这个大基因的反向互补物的表达是不合需要

的，因为它含有编码由超过 100 个氨基酸组成的肽的、新的和未表征的开放阅读框，其可能潜在地影响食物的营养品质（表 1）. 作为比上述方法更安全的方法，修改 PPO 基因来编码无功能的蛋白。

[0411] 利用聚合酶链式反应 (PCR) 方法从 Russet Ranger 分离出野生型马铃薯 PPO 基因。首先，从 Russet Ranger 的芽中分离出基因组 DNA。然后从马铃薯基因组 DNA 使用 DNA 聚合酶和寡核苷酸引物 :5′ :CGAATTCATGGCAAGCTTGTGCAATAG-3′ (PPO-F)(SEQ ID NO.75)，和 5′ -CGAATTCTTAACAATCTGCAAGACTGATCG-3′ (PPO-R)(SEQ ID NO.76)。扩增马铃薯 PPO 基因。这些引物是被设计与马铃薯 PPO 基因的 5′ - 和 3′ - 末端互补的。将扩增的 1.6kb 片段克隆到 pGEM-T EASY 载体 (Promega) 中，通过序列分析证实是功能性 PPO 基因 (SEQ ID NO. :27)。

[0412] 通过将这个蛋白与甘薯 PPO 蛋白比对鉴定出马铃薯 PPO 中的铜结合结构域，甘薯 PPO 蛋白显示出含有保守的，在位置 92 的半胱氨酸 (Cys) 残基、在位置 236 的谷氨酰胺残基 (Glu)、和在位置 88、109、118、240、244 和 274 的组氨酸 (His) 残基，与两个活性位点的铜配位 (Klabunde et al., Nature Structural Biol., 5 :1084-1090, 1998)。这些 Cys、Glu 和 His 残基也存在于马铃薯 PPO 中。

[0413] 通过使用 PCR 突变置换方法创造无活性的 PPO 基因。通过 Proof Start Taq DNA 聚合酶 (Qiagen) 使用 3 对引物和野生型 RussetRanger PPO 作为模板扩增出三个片段。第一对、分别被命名为 P1-F 和 P2-R 的序列是 :5′ -GAGAGATCTTGATAAGACACAACC-3′ (SEQ ID NO.77)，和 5′ -CATTACC′ ATAAGCC^{2}CAC^{3}TGTATATTAGCTTGTTGC-3′ (SEQ ID NO.78)(1 :“A”到“C”突变，引起位置 186 的半胱氨酸到甘氨酸的替换 ;2 :“A”到“C”突变，引起位置 183 的半胱氨酸到色氨酸的替换 ;3 :“A”到“C”突变，引起位置 182 的组氨酸到谷氨酰胺的替换）。第二对、分别被命名为 P3-F 和 P4-R 的序列是 5′ -GTGCTTATAGAATTGGTGGC-3′ (SEQ ID NO.79)，和 5′ -TAGTTCCCGGGAGTTCAGTG-3′ (SEQ ID NO.80)。第三对、分别被命名为 P5-F 和 P6-R 的序列是 :5′ -CTCCCGGGAACTATAGG4AAACATTCCTCT^{5}CGGTCCTGTCCACATCTGGTC-3′ (SEQ ID NO.81) 和 5′ -GTGTGATATCTGTTCTTTTCC-3′ (SEQ ID NO.82)(4 :“A”到“G”突变，引起位置 326 的谷氨酰胺到甘氨酸的替换 ;5 :“A”到“T”突变，引起位置 330 的组氨酸到亮氨酸的替换）。

[0414] 使用引物 P1-F 和 P2-R 扩增出 80bp 片段，用 BglII 消化。这个片段含有一个粘性末端 (BglII) 和一个平端，带有铜结合位点 I 中的三个突变。使用引物 P3-F 和 P4-R 扩增出 0.4kb 片段，用 XmaI 消化，含有一个平端和一个粘性末端 (XmaI)。使用引物 P5-F 和 P6-R 扩增出 0.2Kb 片段，用 XmaI 和 EcoRV 消化。这个具有粘性末端 (XmaI) 和平端 (EcoRV) 的第三个片段具有在铜结合位点 II 中的两个突变。然后用上述三个连接的 PCR 扩增的片段替换克隆的野生型马铃薯 PPO 的 BglII 和 EcoRV 片段。通过序列分析证实在修改的 PPO 基因中存在总共 5 个点突变 (SEQ ID NO. :28)。为了产生修改的 PPO(mPPO) 的表达盒，同时地一起连接以下四个片段 :(1) 含有 GBSS 启动子的 BamHI-HindIII 片段，(2) 含有突变 PPO 的 HindIII-SacI 片段，(3) 含有 Ubi-3 终止子的 SacI-KpnI 片段，和 (4) 用 KpnI 和 BamHI 消化的质粒 pBluescript。然后将这个表达盒插入到二元载体的边界之间来产生 pSIM314。

[0415] 通过用 pSIM314 转化 Russet Ranger 茎外植体评定 mPPO 基因表达盒的效力。将含有这个表达盒的转基因植物的结节插枝置于补充有 7％蔗糖的 MS 培养基上。在 18℃在

黑暗中孵化 5 周之后，分离微型块茎，分析 PPO 活性。为此，在液氮中粉碎 1g 马铃薯块茎。然后将该粉未添加到 5ml 的含有 50mM 邻苯二酚的 50mM MOPS(3-(N-吗啉代）丙烷－磺酸）缓冲液 (pH 6.5) 中，在室温下旋转孵化约 1 小时。然后沉淀固体馏分，将上清液转移到另一个试管，通过测量随着时间过去的 OD-410 的变化来测定 PPO 活性。如表 10 所示，与未转化的对照或用不含突变 PPO 基因的构建体转化的对照相比，从某些转基因株系分离的微型块茎展现出显著降低的多酚氧化酶活性。在 PPO 活性方面最强烈的降低在株系“314-9”、“314-17”和“314-29”中观察到。为了测试突变 PPO 基因的表达是否还降低迷你块茎中的 PPO 活性，将转基因株系的生根的植物苗种植在土壤中，在生长箱中培育 4 周。对分离的迷你块茎的 PPO 分析表明，在微型块茎中降低的 PPO 活性大多数情况下与迷你块茎中降低的活性相关（表 10)。展现出降低的 PPO 活性的转基因株系可以在温室中和在田地中进行繁殖和测试，来证实成熟块茎中的“低擦伤”表型。因为微型和迷你块茎表达各种多酚氧化酶，其中一些仅与在成熟块茎中优势表达的目标多酚氧化酶有有限的序列同源性，在株系例如“314-9”和“314-17”的成熟块茎中可以预期更为剧烈的 PPO 活性降低。数据表明，功能上无活性的 PPO 基因的过量表达可以引起降低的擦伤敏感性。修改的植物的改进的健康和贮藏特征也可以在成熟的、田地生长的块茎中被证实。

[0416] 因为微型和迷你块茎表达各种多酚氧化酶，其中一些仅与在成熟块茎中优势表达的目标多酚氧化酶有有限的序列同源性，在成熟块茎中可以预期更为剧烈的 PPO 活性降低。为了测试这个假设，将 8 个转基因株系的植物苗种植在 1 加仑罐中，在温室中生长。9 周后（衰老之前）从一组植物分离块茎，12 周后（衰老之后）从重复组植物分离块茎。后一组植物的块茎可以认为是“成熟的”。如表 10 所示，如果与迷你块茎相比较，在株系 314-9 和 314-17 的“成熟”块茎中 PPO 活性实际上被进一步降低了。数据表明，功能上无活性的 PPO 基因的过量表达可以引起降低的擦伤敏感性。修改的植物的改进的健康和贮藏特征也可以在成熟的、田地生长的块茎中被证实。

[0417] 表 10. 在表达修改的 PPO 基因的马铃薯株系中的 PPO 活性

[0418]

株系	OD-410/克的改变			
	微型球茎（%-降低）	迷你球茎（%-降低）	9-周球茎（%-降低）	12-周球茎（%-降低）
未转化的对照	24.59 ± 2.22	20.07 ± 1.21	21.0 ± 3.3	21.0 ± 2.7
载体对照	22.59 ± 3.36	19.55 ± 1.43	20.6 ± 2.1	22.5 ± 2.2
314-1	2.36 (90%)	17.8 (11%)	19.2 (12%)	22.0 (-9%)
314-2	41.52 (-76%)	21.3 (-7%)		
314-4	18.40 (22%)	5.4 (73%)	19.0 (13%)	16.7 (17%)
314-5	8.49 (64%)	19.1 (4%)	24.2 (-11%)	26.8 (-33%)
314-7	16.04 (32%)	16 (20%)		
314-8	14.86 (37%)	17 (15%)		
314-9	5.43 (77%)	4.3 (78%)	3.7 (83%)	2.8 (86%)
314-12	19.35 (18%)	19.6 (2%)		
314-13	18.17 (23%)	15.4 (23%)		
314-14	18.64 (21%)	17.32 (13%)		
314-16	13.92 (41%)	18.2 (9%)		
314-17	5.19 (78%)	2.4 (88%)	4.8 (78%)	1.2 (94%)
314-20	26.66 (-13%)	13.2 (34%)	29.2 (-34%)	18.2 (10%)
314-21	11.32 (52%)	17.6 (12%)		
314-22	13.45 (43%)	18.8 (6%)		
314-23	5.19 (78%)	20.4 (-2%)	19.9 (8%)	15.8 (22%)
314-24	15.10 (36%)	19.6 (2%)		
314-25	23.12 (2%)	19 (5%)		
314-26	13.45 (43%)	17.8 (11%)		
314-27	26.42 (-12%)	19.4 (3%)		
314-28	31.85 (-35%)	19.4 (3%)		
314-29	3.77 (84%)	14.8 (26%)	22.1 (-2%)	18.3 (9%)
314-31	23.83 (-1%)	21.2 (-6%)		
314-32	28.78 (-22%)	20 (0%)		

[0419] 实施例 8

[0420] 特异于马铃薯块茎的非表皮组织的多酚氧化酶基因的尾随区序列

[0421] 使用常规的转化方法，这个实施例表明了，能有效地使用与马铃薯 PPO 基因相连的新型尾随区序列来降低块茎中的擦伤敏感性。

[0422] 使用逆转录 PCR 来还分离与在马铃薯块茎中表达的 PPO 基因相连的尾随区序列。用于第一 PCR 反应的引物是 PPO-1(5′ -GAATGAGCTTGACAAGGCGGAG-3′ ,(SEQ ID NO.83))和寡 -dT ;用于第二嵌套 PCR 反应的引物是 PPO-2(5′ -CTGGCGATAACGGAACTGTTG-3′ ,(SEQ ID NO.84)) 和寡 -dT。对克隆入 pGEM-T 中的扩增的 DNA 片段的序列分析显示了 154-bp 尾随区 (SEQ ID NO. :29) 的存在。然后将通过 Ubi 内含子分隔的这个尾随区的有义拷贝和反义拷贝,如前所述与 GBSS 启动子和 Ubi3 终止子融合,来产生表达盒,在附图 3 中示出 (SEQ ID NO. :30)。含有由 GBSS 间隔区分隔的尾随区片段的替换性构建体在附图 3 中示出 (SEQ ID NO. :31)。具有更大的 GBSS 启动子的类似方案在附图 3 中示出 (SEQ ID NOs. :32-33)。有趣地,在成熟的块茎中优势表达的 PPO 基因的尾随区 (在附图 4 中用 P-PPO3 表示),与在其他组织包括微型块茎中优势表达的 PPO 基因的尾随区 (在附图 4 中用 PPOM-41 和 PPOM-44 表示) 不同。由于与不同的 PPO 基因相连的尾随区之间的低同源性,使用 P-PPO3 尾随区将引起仅沉默成熟块茎特异性的 PPO 基因。用来源于 PPO 基因本身的序列将难以实现这种非常特异的基因沉默,因而表现了使用非编码序列进行基因沉默的优势。为了使 PPO 活性的扩展直观化,将 0.5mL 的 50mM 邻苯二酚滴到切开的遗传修改的迷你块茎的切面上。与对照相比,块茎区域的可见的褐色降低了约 5-10 倍。有趣地,然而,在马铃薯皮上没有观察到褐色的降低。似乎是,使用的尾随区序列特异性地沉默在皮层和木髓中优势地表达、但不在外皮中表达的 PPO 基因。这个意外的发现对于块茎保护自身免于某些病原体通过表皮的感染是有益的,因为 PPO 基因在某些防卫反应中可以起到一些作用。为了定量地测定 PPO 活性,如实施例 7 描述的进行分析。表 11 显示了与未转化的对照相比,在转化的迷你块茎中 PPO 活性的多达 80% 的降低。在成熟块茎中预期降低的水平会更大,因为这些块茎与迷你和微型块茎相比更优势地表达目标 PPO 基因。可以在成熟块茎中证实株系例如“217-7”和“217-26”的改进的特征。

[0423] 表 11 显示了与未转化的对照相比,在转化的迷你块茎中 PPO 活性的多达 80% 的降低。在温室生长的成熟块茎中降低的水平更大,因为这些块茎与迷你和微型块茎相比更优势地表达目标 PPO 基因 (表 11)。

[0424] 表 11. 在表达与 PPO 基因相连的修改的尾随区序列的马铃薯迷你块茎中的 PPO 活性

[0425]

株系	OD-410/克的改变（%-降低）		
	迷你球茎	9-周球茎	12-周球茎
未转化的对照	20.6 ± 1.3	21.0 ± 3.3	
载体对照	17.9 ± 2.1	20.6 ± 2.1	
217-1	12.5 (39.4%)		
217-4	12.6 (38.6%)		
217-5	11.3 (45.0%)		
217-6	6.1 (70.4%)	4.72 (78%)	2.44 (88%)
217-7	5.7 (72.5%)	3.68 (83%)	1.92 (90%)
217-9	10.4 (49.6%)		
217-10	15.2 (26.3%)		
217-11	15.2 (26.3%)		
217-12	6.6 (67.9%)	4.24 (80%)	2.84 (86%)
217-14	15.4 (25.4%)		
217-15	13.5 (34.6%)		
217-16	6.0 (71.0%)	2.12 (90%)	2.84 (86%)
217-17	9.7 (53.0%)		
217-19	8.6 (58.4%)	4.60 (79%)	3.2 (84%)
217-21	14.2 (31.1%)		
217-22	9.7 (53.0%)	2.56 (88%)	4.8 (76%)
217-23	15.2 (26.3%)		
217-24	8.2 (60.1%)		3.24 (84%)
217-25	11.9 (42.2%)		
217-26	3.1 (84.8%)	2.20 (90%)	2.32 (89%)
217-27	6.2 (69.9%)	10.28 (53%)	6.08 (70%)
217-29	7.2 (65.1%)	5.04 (77%)	3.92 (81%)

[0426] 实施例 9

[0427] 增加抗性淀粉水平的表达盒

[0428] 提高块茎中直链淀粉 / 支链淀粉的比例可以进一步增强马铃薯产品的营养价值。使得提高直链淀粉含量成为可能的一个方法基于编码淀粉分支酶 (SEB) I 和 II 的基因的反义表达 (Schwall et al.,NatureBiotechnology 18 :551-554,2000)。这个方法的缺点是，(1) 通过利用反义技术同时沉默两个不同基因的效率是非常低的，(2) 相对大的 SBE-I 和 SEB-II 基因序列的反义表达引起不合需要的开放阅读框的表达 (表 1)，(3) 携带两个反义表达盒的相应构建体不必要地大和复杂，因而增加了重组的机会和降低了转化频率。

[0429] 增加马铃薯中直链淀粉含量的这种方法基于与两个基因相连的尾随区序列的表达。用引物对 5′ -GTCCATGATGTCTTCAGGGTGGTA-3′ (SEQ ID NO.85),和 5′ -CTAATATTTGATATATGTGATTGT-3′ (SEQ ID NO.86),和 5′ -ACGAACTTGTGATCGCGTTGAAAG-3′ (SEQ ID NO.87),和 5′ -ACTAAGCAAAACCTGCTGAAGCCC-3′ (SEQ ID NO.88)。分离出这些尾随区 (SEQ ID No. :34 和 35)。单个启动子驱动两个尾随区的有义和反义融合物表达,有义和反义融合物由遍在蛋白 -7 内含子分隔,之后是遍在蛋白 -3 终止子。完整表达盒的大小仅为 2.5-kb。

[0430] 用于增加马铃薯中直链淀粉含量的这种方法基于与两个基因相连的尾随区序列的表达。用引物对 5′ -GTCCATGATGTCTTCAGGGTGGTA-3′ (SEQ ID NO.85),和 5′ -CTAATATTTGATATATGTGATTGT-3′ (SEQ ID NO.86),和 5′ -ACGAACTTGTGATCGCGTTGAAAG-3′ (SEQ ID NO.87),和 5′ -ACTAAGCAAAACCTGCTGAAGCCC-3′ (SEQ ID NO.88)。分离出这些尾随区 (SEQ ID No. :34 和 35)。从马铃薯品种 Russet ranger。0 分离了类似的尾随区 (SEQ ID NOs. :96 和 97,见下文)。

[0431] SEQ ID NO.96

[0432] GTCCATGATGTCTTCAGGGTGGTAGCATTGACTGATTGCATCATAGTTGTTTTTTTTTTTTAAAGTATT

[0433] TCCTCTATGCATATTATTAGCATCCAATAAATTTACTGGTTGTTGTACATAGAAAAAGTGCATTTGCAT

[0434] GTATGTGTTTCTCTGAAATTTTCCCCAGTTTTTGGTGCTTTGCCTTTGGAGCCAAGTCTCTATATGTAA

[0435] TAAGAAAACTAAGAACAATCACATATATCAAATATTA

[0436] SEQ ID NO.97

[0437] ACGAACTTGTGATCGCGTTGAAAGATTTGAACGCTACATAGAGCTTCTTGACGTATCTGGCAATATTGC

[0438] ATCAGTCTTGGCGGAATTTCATGTGACAAAAGGTTTGCAATTCTTTCCACTATTAGTAGTGCAACGATA

[0439] TACGCAGAGATGAAGTGCTGAACAAACATATGTAAAATCGATGAATTTATGTCGAATGCTGGGACGGGC

[0440] TTCAGCAGGTTTTGCTTAGT

[0441] 单个启动子驱动两个尾随区的的有义和反义融合物表达,有义和反义融合物由遍在蛋白 -7 内含子分隔,之后是遍在蛋白 -3 终止子。完整表达盒的大小仅为 2.5kb。

[0442] 实施例 10

[0443] 无标记转化方法的开发

[0444] 这个实施例表明,不需要选择性标记基因的稳定整合就可以有效地转化植物。

[0445] 这种方法首次利用了这样的现象,靶向植物细胞的核的 DNA 随后常常未能整合到植物细胞的基因组中。发明人作出了令人惊讶的发现,有可能通过将受感染外植体置于具有合适的选择性试剂的植物培养基上 5 天,来选择暂时地表达未整合的、含有选择性标记基因的 T-DNA 的细胞。用来开发当前方法的第二种现象是,来自不同二元载体的 T-DNA 常常靶向相同的植物细胞核。通过使用两个不同的二元载体,一个含有 T-DNA 上的选择性标记,另一个携带具有目标真实序列的 T-DNA 或 P-DNA,有可能应用一种短暂的选择系统,获得愈伤组织、幼苗或植物的群体,其中的很大部分代表无标记转化事件。

[0446] 命名为 pSIM011 的常规二元载体被用于代表具有“目标序列”的载体,在这个测试情况中,所述目标序列是位于常规 T-DNA 上的 β 葡糖醛酸酶 (GUS) 基因的表达盒。用于这些实验的第二二元载体含有表达盒,所述表达盒包含位于 pSIM011 衍生物的 T-DNA 边界之间的、由遍在蛋白 -7 基因的强启动子驱动的新霉素磷酸转移酶 (NPTII) 基因和随后的胭脂碱合酶 (nos) 基因的终止子序列。

[0447] 令人惊讶地，通过用酵母乙醇脱氢酶 1(ADH1) 基因的终止子 (Genbank 登录号 V01292，SEQ ID NO.56) 替换 nos 终止子，也可以获得短暂 NPTII 基因表达水平的很强水平。这个发现是使人感兴趣的，因为酵母 ADH1 终止子与任何植物终止子都不具有同源性。重要地，在此应当指出，许多酵母终止子不能在植物中充分地起作用。举例来说，使用 GUS 基因和随后的酵母异 -1- 细胞色素 C(CYC1) 终止子 (Genbank 登录号 SCCYT1) 在如上所述的类似实验中几乎没有观察到 GUS 基因表达。通过用酵母 ADH1 终止子替换 nos 终止子产生了携带选择性标记基因 NPTII 的改进的载体。含有选择性标记基因用于短暂转化的二元载体被命名为“LifeSupport”(附图 5)。

[0448] 同时用两个分别含有 pSIM011 和 LifeSupport 的 A.tumefaciens LBA4404 菌株感染马铃薯茎外植体。如实施例 3 描述的，在进行沉淀、洗涤和重悬浮至 OD_{600nm} 0.4 之前，使 1/10 稀释的每个菌株的过夜生长培养物生长 5-6 小时。然后将重悬浮的细胞以 0.2(OD_{600nm}) 的每个细菌的最终密度用于感染 0.4-0.6cm 节间马铃薯片段。感染的茎如实施例 3 中一样处理，主要区别是 :用卡那霉素选择被限于在愈伤组织诱导培养基上培养的第一个 5 天。然后，容许外植体在新鲜的 CIM 和仅含有 timentine 150mg/L、但不含选择性抗生素的 SIM 中进一步发育。幼苗来源于在 40-60％的受感染茎中发育的愈伤组织，从感染那天起约 3 个月内，来自所述幼苗的叶片都进行 GUS 表达测试和 PCR 分析，来鉴定含有目标序列但不含标记基因的事件。如表 12 所示，11％的幼苗代表无标记的转化事件。

[0449] 如上所述双菌株的方法也可以用来转化烟草。对约 2 个月内发育的幼苗进行 GUS 分析和 PCR 分析。鉴定出的高频率无标记转化事件 (18％) 意味着，开发出的该方法适合于除马铃薯以外的植物物种 (表 12)。

[0450] 重要地，用两个不同的土壤杆菌菌株次序地而不是同时地感染，引起无标记转化的效率方面的增加。通过用含 pSIM011 的土壤杆菌菌株感染马铃薯茎外植体，将被感染外植体置于共培养平板上 4 小时，然后用 LifeSupport 载体再感染它们，发现了次序感染的令人惊讶的效果。在这个实施例中，双重感染的外植体按先前描述的一样处理。如表 13 所示，在两次不同的感染之间的 4 小时延迟时间引起了马铃薯中 2 倍增加的无标记转化事件频率。

[0451] 实施例 11

[0452] 用 pSIM340 精确育种

[0453] 这个实施例说明了精确育种的效力。通过将马铃薯遗传元件插入到马铃薯中 (参见实施例 1、4 和 7)，使用无标记转化 (实施例 10)，增强了马铃薯的健康和农学特征。

[0454] 通过将突变 PPO 和转化酶抑制物的两个表达盒插入到二元载体 pSIM112′ 中，创造了含有插入在 P-DNA 末端之间的转化酶抑制物和突变多酚氧化酶基因的两个表达盒的、被命名为 pSIM340 的二元载体 (附图 1)。用 pSIM340 和进一步改进的 LifeSupport 载体同时地感染马铃薯茎外植体。然后如之前讨论的共培养感染的外植体，进行短暂选择，进行诱导来增殖和发育幼苗。3 个月后，将小幼苗转移到新的培养基，容许额外生长 3 周。然后如在实施例 2 和 3 中描述的，对幼苗进行表型分析，收集叶片材料用于分子分析来测定主干、标记基因和带有目标序列的 P-DNA 的存在。如表 14 所示，1.2％的事件代表含有 pSIM340 的修改的 P-DNA、不含 LifeSupport 的植物。这个无标记转化的频率比用 T-DNA 的更低，再次显示了 P-DNA 和 T-DNA 之间的功能差异。

[0455] 实施例 12

[0456] 选择 LifeSupport T-DNA 的稳定整合

[0457] 这个实施例表明，可以通过利用细菌胞嘧啶脱氨酶基因选择 LifeSupport T-DNA 的稳定整合来提高精确育种方法的效率。

[0458] 上述实施例表明，用修改的 P-DNA 的无标记转化的效率比使用常规的 T-DNA 低好几倍。为了提高产生仅含有修改的 P-DNA 的幼苗的效率，将包含细菌胞嘧啶脱氨酶 (codA) 和尿嘧啶磷酸核糖基转移酶 (upp) 基因 (InvivoGen，CA) 的自杀基因融合物的表达盒插入到 LifeSupport 载体的 T-DNA 边界之间，产生 pSIM346（附图 5）。用携带 pSIM340 的一个菌株和携带 pSIM346 的另一个菌株感染马铃薯茎外植体，随后置于以下培养基上：(1) 共培养培养基 2 天，(2)CIMTK 培养基 5 天，选择短暂的标记基因表达，(3)CIMT 培养基 30 天，容许短暂表达标记基因的植物细胞增殖，(4) 含有 500mg/L 的无毒的 5- 氟胞嘧啶 (5-FC) 的 SIMT 培养基，5- 氟胞嘧啶将由表达 codA::upp 的植物细胞转变为有毒的毒性 5- 氟尿嘧啶 (5-FU)，来选择 LifeSupport T-DNA 的稳定整合。在 4 周内愈伤组织在 SIMT 上生出幼苗。将这些幼苗转移到有 timentin 的 MS 培养基，容许生长，直到获得用于 PCR 分析的足够多的组织。然后从 100 个幼苗中提取 DNA，用于测定 P-DNA、LifeSupport 和主干的存在。如表 15 所示，被分析的幼苗都不含 LifeSupport T-DNA，首次表明，codA::upp 基因融合物可在再生前被用做阴性选择性标记。更重要地，这些结果表明，针对 LifeSupport T-DNA 整合的阴性选择增加了仅含有修改的 P-DNA 的幼苗的频率。通过将短暂标记基因表达的阳性选择与针对 codA::upp 基因融合物的稳定整合的阴性选择结合，仅含修改的 P-DNA 的幼苗的频率是仅应用短暂标记基因表达的阳性选择的约 5 倍高（表 15）。

[0459] 通过使用 LifeSupport 载体 pSIM350（附图 5），其类似于 pSIM346 但含有代替 codA::upp 基因融合物的 codA 基因，获得了在无标记转化效率方面甚至更大的增加。用 pSIM340 和 pSIM350 同时地感染的马铃薯茎外植体如上所述进行处理，对产生的 51 个幼苗进行分子检测，检测仅含来自 pSIM340 的 T-DNA 区的事件的发生。有趣地，这个 PCR 分析显示，某些幼苗含有 codA 基因（表 15）。这个发现表明，codA 在植物中作为阴性选择性标记不象 codA::upp 一样严密 (tight)。更重要地，大量的幼苗 (29％) 被显示代表无标记转化事件。

[0460] 通过不是同时地、而是次序地用 pSIM340 和 pSIM350 感染外植体，可以进一步增加效率。通过用 pSIM340 感染外植体，4 小时后用 pSIM350 再感染它们，预期无标记转化频率可达约 30-40％。

[0461] 实施例 13

[0462] 削弱 LifeSupport T-DNA 的整合

[0463] 这个实施例表明，可以通过使用 ω- 突变的 virD2 基因削弱 LifeSupport T-DNA 整合入植物基因组来提高精确育种方法的效率。

[0464] 已经显示了土壤杆菌蛋白 vird2 的 ω 结构域对于该蛋白支持将 T-DNA 整合到植物基因组中的能力是很重要的 (Mysore et al.，Mol Plant Microbe Interact 11：668-83，1998)。根据这个观察结果，创造含有 ω- 突变 virD2 蛋白的表达盒的修改的 LifeSupport 载体，所述 ω- 突变的 virD2 蛋白的表达盒被插入到载体的主干序列中的 SacII 位点中。通过从质粒 pCS45(Dr.Walt Ream-Oregon State University，OR，USA 的惠

赠,SEQ ID NO.:36)扩增2.2kb DNA片段获得所述表达盒。携带这个表达盒的LifeSupport衍生物,被命名为pSIM401Ω(附图5),用于支持用pSIM340的修改的P-DNA转化马铃薯植物。在短暂选择和幼苗诱导之后,对100个幼苗进行分子测试,测试转基因的存在。如表15所示,4.4%的幼苗仅含有修改的P-DNA,表明使用ω-virD2使无标记转化的效率增加了约4倍(表15)。

[0465] 通过将LifeSupport T-DNA的大小从3.7kb(在pSIM401Ω中)提高到8.1kb(在被命名为pSIM341Ω的pSIM401Ω衍生物中;附图5)进一步改进了效率。通过从同时用pSIM340和pSIM341Ω感染的马铃薯茎外植体再生幼苗,分析的81个事件中的7个(7%)被显示代表无标记转化事件(表15)。

[0466] 通过次序地而不是同时地用pSIM340和LifeSupport感染外植体,可以获得进一步的改进。按照与实施例10中的描述类似的方法,通过用pSIM340感染外植体、4小时后用LifeSupport再次感染它们,仅含修改的P-DNA的植物的频率可被近乎加倍。

[0467] 实施例14

[0468] 1-菌株法的开发

[0469] 这个实施例表明,通过使用同时含有P-DNA载体和LifeSupport的单个土壤杆菌菌株,也可以获得高频率的无标记转化。

[0470] 创造可以在土壤杆菌中同时维持的两个兼容的二元载体。作为对使用这个系统来稳定地整合分别携带目标DNA和标记基因的两个T-DNA的替代(Komari et al.美国专利5731179,1998),其计划用于仅整合修改的P-DNA。

[0471] 第一载体,被命名为pSIM356,含有插入到P-DNA末端之间的表达盒,所述表达盒包含由Ubi7启动子驱动的GUS基因和随后的UbiT。这个载体的主干部分含有来自pVS1和pBR322的细菌复制起点、用于细菌选择的奇霉素抗性基因,和IPT基因的表达盒,来允许在植物中选择主干整合(附图1)。第二载体,被命名为pSIM363,含有插入到常规T-DNA边界之间的表达盒,所述表达盒包含由Ubi7启动子驱动的NPTII基因和随后的酵母ADH1终止子(附图5)。这个载体的主干部分含有来自ColE1(Genbank号V00268)和ori V(Genbank号M20134)的细菌复制起点,和用于细菌选择的卡那霉素抗性基因。

[0472] 在100个烟草幼苗中测试使用pSIM356和pSIM363来提高无标记转化频率的构想。如表16所示,约19%的再生幼苗含有目标DNA,不含标记基因。通过对马铃薯应用这种1菌株法,也发现了无标记转化效率方面的增加。被测的60个独立幼苗中的9个(15%)含有pSIM340 T-DNA并缺乏LifeSupport T-DNA(表16)。

[0473] 可以将这种1-菌株法与实施例12中描述的方法组合,来将短暂标记基因表达的阳性选择与针对codA基因稳定整合的阴性选择结合。为此,开发了LifeSupport载体pSIM365(附图5)。携带这个载体和P-DNA载体的土壤杆菌菌株可被用于有效地开发植物,所述植物仅含有稳定地整合到它们的基因组中的、位于P-DNA内部的目标表达盒。

[0474] 实施例15

[0475] 依靠天然标记的精确育种方法

[0476] 除了用仅含有期望序列的P-DNA转化作物植物来导入有益性状之外,本发明还提供了用含有其他天然标记基因的P-DNA转化这种植物的方法。备选的新的和天然的标记基因是Arabidopsis液泡Na+/H+反向运转基因和苜蓿alfin-1基因的马铃薯同源物。这些

基因的表达不仅容许鉴定转化事件，还为转化的植物提供了耐盐性。因而，在不断扩大的农业用地中的高含盐水平将更少地影响含有耐盐性标记的马铃薯植物。

[0477] 液泡 Na+/H+ 反向运转同源物的两个版本，被命名为 Pst（马铃薯耐盐性），是从获自美国马铃薯 Genbank(WI) 的、被命名为“LBR4”的晚疫病抗性品种的 cDNA 扩增的，使用的寡核苷酸对是 5′ -CCCGGGATGGCTTCTGTGCTGGCT-3′ (SEQ ID NO.89) 和 5′ -GGTACCTCATGGACCCTGTTCCGT-3′ (SEQ ID NO.90)。它们的序列在 SEQ ID NO.:37 和 38 中示出。与 alfin-1 同源的第三个基因 (SEQ ID NO.:39) 是使用引物 5′ -CCCGGGTATGGAAAATTCGGTACCCAGGACTG-3′ (SEQ ID NO.91) 和 5′ -ACTAGTTAAACTCTAGCTCTCTTGC-3′ (SEQ ID NO.92)。

[0478] 从 LBR4 马铃薯 DNA 扩增的。通过将与 Ubi7 启动子的融合物插入到修改的 pSIM341 载体的常规 T-DNA 边界之间，评估了 Pst 基因发挥转化标记功能的效力。在短暂选择阶段之后，容许卡那霉素抗性细胞增殖和发育幼苗。然后将这些幼苗转移到含 100-150mM 氯化钠的培养基中。耐盐性的幼苗代表含有修改的 pSIM341 的 T-DNA 的转化事件。

[0479] 实施例 16

[0480] 块茎特异性启动子

[0481] 新近分离的块茎特异性启动子可以替换使用的 GBSS 启动子来开发上述实施例中描述的表达盒。通过用特异于马铃薯蛋白酶抑制因子基因 (Genbank 登记号 D17332)(SEQ ID NO.39) 的引物使用反向聚合酶链式反应，从 Russet Burbank 马铃薯植物的基因组分离出这个启动子。通过创造含有由该启动子驱动的 GUS 基因和 NPTII 标记基因的表达盒的二元载体来测试这种 PIP 启动子的效力。用 GBSS 启动子来代替 PIP 启动子的类似构建体被用作对照。通过用携带所述二元载体的土壤杆菌菌株感染茎外植体获得转化的幼苗，共培养 2 天，在 CIMTK 培养基上选择 2 个月。将这些幼苗转移到新鲜培养基来诱导根系形成，然后种植到土壤中。在温室中 3 个月的生长期后，可以分析块茎的 GUS 表达。

[0482] 实施例 17

[0483] 用于精确育种的优选的构建体和转化方法

[0484] 除 pSIM340 之外，许多其他载体可被用于用修改的 P-DNA 进行转化来改进马铃薯植物。两个这种载体含有与 PPO 基因相连的尾随区的有义和反义拷贝的表达盒，所述 PPO 基因在除表皮之外的所有块茎组织中表达（参见实施例 8）。载体 pSIM370 含有与磷酸化酶基因相连的前导区的有义和反义拷贝的其他表达盒（参见实施例 6）。载体 pSIM371 含有马铃薯 alfin-1 同源物的第三个表达盒（附图 1）。

[0485] 第三个替换性的载体，被命名为 pSIM372，含有马铃薯 alfin-1 同源物的表达盒，以及 PPO 相连的尾随区、R1 相连的前导区和磷酸化酶相连的前导区的融合物的有义和反义拷贝的表达盒。

[0486] 1- 菌株法的优选的 LifeSupport 载体是 pSIM365。对于 2- 菌株法，优选的载体是 pSIM367，其含有在 T-DNA 边界之间的 NPTII 和 codA 的表达盒，和在质粒主干中的额外的 ωvirD2 表达盒（附图 5）。

[0487] 用携带 pSIM365 和载体 pSIM370、371 和 372 之一的 1 个菌株感染马铃薯茎外植体，或次序地用分别携带 pSIM366 和优选的目标载体之一的 2 个菌株感染。2 天的共培养和 5 天的短暂选择期之后，将外植体转移到培养基中用于增殖 / 再生和消除土壤杆菌。三十天后，将外植体再次转移到相同的、但现在还含有 5-FU 的培养基，来消除含有 LifeSupport

T-DNA 的事件。将随后在愈伤组织上产生的幼苗转移到可含有 100-200mM 盐的再生培养基，来筛选耐盐性的事件。容许 IPT 阴性的幼苗生根并发育为成熟植物。预期这些植物的一大部分（10％ -100％）代表无标记和无主干的、含有被稳定整合到它们基因组中的带有目标核苷酸序列的 P-DNA 的植物。

[0488] 实施例 18

[0489] 产生 P-DNA 转化事件的替换性方法 :共转化之后分离

[0490] 可以用同时携带 P-DNA 载体（例如 pSIM340）和 T-DNA 载体（例如 pSIM363）的土壤杆菌感染植物组织，例如外植体。2 天的共培养期之后，将感染的外植体转移到含 timentine 和卡那霉素的 CIM 培养基。然后可以将外植体转移到含 timentine 和卡那霉素的 SIM 培养基，在 25℃孵化以容许幼苗形成。可以使产生的幼苗生根并转移到土壤中（转化过程的详情参见实施例 3）。这种方法产生的转化的植物苗可以进行 PCR 筛选，筛选 P-DNA 和 T-DNA 的至少一个拷贝的存在。可以将这种植物转移到温室中并容许成熟。然后可以用性成熟植物与未转化的植物杂交。做为选择，可以容许转基因植物自交。对马铃薯来说，举例来说，彻底地洗涤从 T0 植物的浆果分离的 T1 种子（不干燥），与 2000ppm GA3 孵化约 16 小时，种植到含有 Promix 或另一种适合的混合物的 3 英寸罐中。然后用例如 3mm 蛭石覆盖罐，来保持湿度，直到幼苗开始发芽。这种子代植物可被用于育种计划中来开发仅含天然 DNA 的转基因品种。

[0491] 作为对同时使用 P-DNA 和 T-DNA 的替换，也有可能使用两个 P-DNA，一个含有期望的多核苷酸（例如 pSIM340），另一个含有选择性标记基因（例如 pSIM108）。按与如上所述类似的方法，可以产生含有每种 P-DNA 的至少一个拷贝的植物。可以使这些植物自交和杂交来获得仅携带含期望的多核苷酸的 P-DNA 的子代植物。

[0492] 表 1. 在反义马铃薯株系中潜在地表达的未表征的肽

[0493]

基因（使用的片段的大小）	由反向互补DNA中ORF编码的预测的肽
R1 (1.9-kb)	MSSTSNVGQD CLAEVTISYQ WVGRVINYNF FLLIHWYTVV EASTGITFQI FPIGIRSEDD RSFYEKADRF AWVT
	MSSESTFSKT PNGRATDVGI PTEEGTFPFR YAILRDLAPT ISLVNSSADI A
	MSEGVGFKSK ILPSFAWRSA NILGSKHVAK QTFPFLARTE TCERTSGMSG VIRATAPSGI SSSPLTDFAT KIVGFS
GLTP (1-kb)	VCSPALKADK SKSADGTCVD HSRRLIVVLV LYPGMGTSYA TAFISSPPIQ YLFPSDPVET FP
	MLGSLVLPKS PENRKQAVPN PHFQEQHLVP EKPHFLDCGQ GFSKLPQMHQ
	MVNFLTQGIV DMETAFGSPK MGGFGKEQFG ACVSRSEMDE SGIGAVMVEQ VCSICSRHFV LSMQI
GHTP (0.9-kb)	MLEGSMWPWN QESMKRAFLN HHFLMLHLFP AQRPPQAADP VCLKHQHMHC GCLSFQLHLS KLAPGDTPLI SSMFALD
	MKLCSSIILS IIKQKQVEIL RACFGFPETK TISVFSSVSW NWHIICKSL
	MTKKPDRKDN IMPYNFPGTK FLQPIFRNFF LPSLCDKLLK KSISVPQAIT PCWKVQCGHG IKKA
PPO (1.8-kb)	TILKLDLHTF NGHFFTASFW NQSHRNSIFI FQSNILQQFS YRQLESNTGN MISITSMNM RQASITPCKL RLIKLICIHS LVHVQRHIEP YIVPIIIRYF IECQYLLLLI FLLCCP
	MKGKEKPREM NLQFFTTNFV STVAISTMNI SLLFKAKRVK GVFIKFPHST RSQLILGYVL LIRRMSRGAD AEFSHRRELV VRNTIDLIGY RRATTVYYIN TFFYMGSTTR LEIRRWYRCS SR
	MEWALARNRI PFFYCPNSLR TSHGKGYDFH RRKRIQSSTN LYLLNPFFSR QLISIHSTSC PHWHGGSKKS DLNRVSRNYP CLHRFFDEVC HRSRCEPEYE GCFQ
SBE A (1.2-kb)	MNNITHSPIL IPFLEQLNPF ISNCHMQPIV KANTPILNGN TKCRHSANIF TNGNCIWEKP MNKIVDQHQI HNSIHISCES KVFLVVPSES HR
	MKFRYPSPPN PIVTSLIILC NAIPRSINDV DGLSRAIKSY ISLSISQNAI VLSPTRA
SBE B (2.6-kb)	MVNIMTSSSM ATKFPSITVQ CNSVLPWQVT SNFIPFVCVL WVEVEYKYQV TTFKHNNLII IIHAAYYLFS
	MAKLVTHEIE VPLSSQGHCE KMDHLVKRNS SINNRRSICQ ARHARIHLFV H
	MFETKLNSGV VWNDWLTVNI RNSNTPNTKL VLLHHVVRTV PSIEIANNFV FLSSRSPFTI DYATIFPVES KF
	MLYTSLYISY LSNSMLLPSW TNLHHSYSLN NLSTYLGLPL PGGNQNQFLP QKQAGQGPAY QKHLRQ

[0494] 表 3. 转化效率

[0495]

二元载体	愈伤组织 / 烟草叶外植体 ±SE	愈伤组织 / 马铃薯茎外植体 ±SE
pBI121	7.8±0.6	0.31±0.10
pSIM108	10.2±0.6	0.59±0.07
pSIM109	12.8±0.6	0.47±0.05

[0496] 表 4. Russet Rsnger 转化产生的主干整合

[0497]

二元载体	总数	IPT 表型	IPT 的 PCR^+	0.6kb 主干片段的 PCR^+
pBI121	98	NA	NA	54(55%)

pSIM108	193	138(71%)	137(71%)	NA
pSIM109	133	82(62%)	80(60%)	NA

[0498] NA:不适用

[0499] 表 5. Russet Burbank 转化产生的主干整合

[0500]

二元载体	总数	IPT 表型
PSIM108	79	49(60%)
PSIM109	72	60(84%)

[0501] 表 6. 来源于冷藏的 pSIM320 迷你块茎的炸薯条中的丙烯酰胺水平

[0502]

株系	葡萄糖 mg/g(降低的%)	丙烯酰胺 (PPB)
未转化的	10.2	469
载体对照	10.2	NA
320-2	5.4(47%)	95
320-4	5.8(43%)	107
320-7	8.7(14%)	353
320-9	7.4(27%)	137
320-17	6.0(41%)	506
320-21	8.5(16%)	428
320-33	6.6(35%)	516

[0503] NA:未获得

[0504] 表 7. 来源于未转化的成熟块茎的炸薯条中的丙烯酰胺水平

[0505]

	保藏在 18℃(颜色 id.*)	保藏在 4℃(颜色 id.*)
葡萄糖水平	< 0.1mg/g	3.4mg/g
8 分钟白化	53PPB(78)	603PPB(56)
12 分钟白化	28PPB(84)	244PPB(71)

[0506] *:更高的数值表明最终的油炸产品的更浅的颜色

[0507] 表 8. 冷藏的 pSIM332 迷你块茎中的葡萄糖水平

[0508]

株系	葡萄糖 mg/g(降低的%)
未转化的对照	11.6±0.5
载体对照	11.5±0.5
332-1	5.4(53%)
332-2	4.8(58%)
332-4	7.0(39%)
332-5	5.8(50%)
332-6	6.9(40%)
332-7	6.0(48%)
332-8	6.8(41%)
332-9	6.6(43%)
332-10	5.4(53%)
332-11	6.1(47%)
332-12	6.4(44%)
332-13	6.4(44%)
332-15	7.7(33%)
332-16	6.5(43%)
332-17	5.3(54%)
332-18	7.1(38%)
332-21	6.3(46%)
332-22	5.4(53%)
332-23	4.2(63%)

332-31	6.0(48%)
332-34	6.2(48%)
332-35	6.4(44%)
332-39	6.7(41%)
332-40	7.5(35%)
332-41	5.7(50%)

[0509] 表 9. 冷藏的 pSIM216 迷你块茎中的葡萄糖水平

[0510]

株系	葡萄糖 mg/g(降低的%)
未转化的对照	11.6±0.5
载体对照	11.5±0.5
216-2	5.5(52%)
216-3	8.8(23%)
216-4	7.4(36%)
216-5	5.8(50%)
216-8	8.4(27%)
216-10	5.1(56%)
216-11	10.1(19%)
216-12	9.3(19%)
216-13	6.4(44%)
216-15	8.8(23%)
216-16	9.7(16%)
216-17	6.4(44%)
216-19	8.7(24%)

216-21	3.2(72%)
216-24	9.4(18%)
216-26	9.3(19%)
216-29	7.1(38%)
216-30	8.2(29%)
216-32	9.3(19%)
216-34	7.1(38%)
216-35	7.8(32%)
216-38	7.1(38%)
216-42	8.1(30%)
216-44	9.4(18%)
216-45	10.2(11%)

[0511] 表 10. 在表达修改的 PPO 基因的马铃薯株系中的 PPO 活性

[0512]

株系	OD-410/克	
	微型块茎（降低的%）	迷你块茎（降低的%）
未转化的对照	24.59 ± 2.22	20.07 ± 1.21
载体对照	22.59 ± 3.36	19.55 ± 1.43
314-1	2.36 (90%)	17.8 (11%)
314-2	41.52 (-76%)	21.3 (-7%)
314-4	18.40 (22%)	**5.4 (73%)**
314-5	8.49 (64%)	19.1 (4%)
314-7	16.04 (32%)	16 (20%)
314-8	14.86 (37%)	17 (15%)
314-9	**5.43 (77%)**	**4.3 (78%)**
314-12	19.35 (18%)	19.6 (2%)
314-13	18.17 (23%)	15.4 (23%)
314-14	18.64 (21%)	17.32 (13%)
314-16	13.92 (41%)	18.2 (9%)
314-17	**5.19 (78%)**	**2.4 (88%)**
314-20	26.66 (-13%)	13.2 (34%)
314-21	11.32 (52%)	17.6 (12%)
314-22	13.45 (43%)	18.8 (6%)
314-23	5.19 (78%)	20.4 (-2%)
314-24	15.10 (36%)	19.6 (2%)
314-25	23.12 (2%)	19 (5%)
314-26	13.45 (43%)	17.8 (11%)
314-27	26.42 (-12%)	19.4 (3%)
314-28	31.85 (-35%)	19.4 (3%)
314-29	3.77 (84%)	14.8 (26%)
314-31	23.83 (-1%)	21.2 (-6%)
314-32	28.78 (-22%)	20 (0%)

[0513] 表 11. 在表达与 PPO 基因相连的修改的尾随区序列的马铃薯迷你块茎中的 PPO 活性

[0514]

株系	OD-410/ 克（降低的％）

未转化的对照	20.6±1.3
载体对照	17.9±2.1
217-1	12.5(39.4%)
217-4	12.6(38.6%)
217-5	11.3(45.0%)
217-6	6.1(70.4%)
217-7	5.7(72.5%)
217-9	10.4(49.6%)
217-10	15.2(26.3%)
217-11	15.2(26.3%)
217-12	6.6(67.9%)
217-14	15.4(25.4%)
217-15	13.5(34.6%)
217-16	6.0(71.0%)
217-17	9.7(53.0%)
217-19	8.6(58.4%)
217-21	14.2(31.1%)
217-22	9.7(53.0%)
217-23	15.2(26.3%)
217-24	8.2(60.1%)
217-25	11.9(42.2%)
217-26	3.1(84.8%)
217-27	6.2(69.9%)
217-29	7.2(65.1%)

[0515] 表 12. 用 LifeSupport 载体 +pSIM011 的无标记转化

[0516]

植物	共转化的	仅标记的	仅目标基因的	未转化的
马铃薯	0%	33%	11%	56%
烟草	20%	26%	18%	36%

[0517] 共转化的 :GUS 和 NPT 都是 PCR 阳性

[0518] 仅目标基因的 :GUS PCR 阳性

[0519] 未转化的 :对于 GUS 和 NPT,植物都是 PCR 阴性的

[0520] 表 13. 用 LifeSupport 载体和 pSIM011 次序转化马铃薯

[0521]

时间窗口	共转化的	仅标记的	仅目标基因的	未转化的
0 小时	9%	36%	9%	46%
4 小时	20%	30%	20%	30%

[0522] 未转化的 :对于标记和目标基因,植物是 PCR 阴性的

[0523] 表 14. 用 P-DNA 载体 pSIM340+LifeSupport 无标记转化

[0524]

植物	共转化的	仅标记的	仅目标基因的	未转化的
马铃薯	17%	52.8%	1.2%	29%

[0525] 共转化的 :对于 pSIM340 的 PPO 基因和来自 LifeSupport 的 NPT 基因都是 PCR 阳性

[0526] 未转化的 :对于 PPO 和 NPTII,植物是 PCR 阴性的

[0527] 表 15. 用 pSIM340+ 改进的 LifeSupport 载体无标记转化马铃薯

[0528]

LifeSupport 载体	共转化的	仅标记的	仅目标基因的	未转化的
PSIM346	0%	0%	4%	96%
PSIM350	10%	10%	29%	51%
PSIM401 Ω	6%	34%	5%	55%
pSIM341 Ω	16%	23%	7%	54%

[0529] 共转化的：对于 pSIM340 的 PPO 基因和来自 LifeSupport 的 NPT 基因都是 PCR 阳性

[0530] 未转化的：对于 PPO 和 NPTII，植物是 PCR 阴性的

[0531] 表 16. 用同时携带 pSIM356 和 pSIM363 的单个土壤杆菌菌株无标记转化马铃薯

[0532]

植物	共转化的	仅标记的	仅目标基因的	未转化的
烟草	50%	15%	19%	16%
马铃薯	22%	5%	15%	58%

[0533] 共转化的：对于 pSIM356 的 GUS 基因和来自 LifeSupport 的 NPT 基因都是 PCR 阳性

[0534] 未转化的：对于 PPO 和 NPTII，植物是 PCR 阴性的

[0535] SEQ ID NO. 标识

[0536] SEQ ID NO.：1：马铃薯 P-DNA。SEQ ID NO. 1 的加粗下划线的部分分别代表 P-DNA 的左侧 (5′ -) 和右侧 (3′ -) 边界样序列。

[0537] SEQ ID NO.：2：小麦 P-DNA

[0538] SEQ ID NO.：3：IPT 基因的表达盒

[0539] SEQ ID NO.：4：二元载体 pSIM111

[0540] SEQ ID NO.：5：马铃薯转化酶抑制物基因

[0541] SEQ ID NO.：6：马铃薯 GBSS 启动子

[0542] SEQ ID NO.：7：马铃薯遍在蛋白 -3 基因终止子

[0543] SEQ ID NO.：8：与 R1 基因相连的马铃薯前导区

[0544] SEQ ID NO.：9：马铃薯遍在蛋白内含子

[0545] SEQ ID NO.：10：与 R1 基因相连的前导区的有义和反义拷贝的表达盒

[0546] SEQ ID NO.：11：间隔区

[0547] SEQ ID NO.：12：与 R1 基因相连的前导区的有义和反义拷贝的替换性表达盒

[0548] SEQ ID NO.：13：更长的马铃薯 GBSS 启动子

[0549] SEQ ID NO.：14：与 R1 基因相连的前导区的有义和反义拷贝的替换性表达盒

[0550] SEQ ID NO.：15：与 R1 基因相连的前导区的有义和反义拷贝的替换性表达盒

[0551] SEQ ID NO.：16：与 R1 基因相连的马铃薯尾随区

[0552] SEQ ID NO.：17：与 R1 基因相连的尾随区的有义和反义拷贝的表达盒

[0553] SEQ ID NO.：18：与 R1 基因相连的尾随区的有义和反义拷贝的表达盒

[0554] SEQ ID NO.：19：与 R1 基因相连的尾随区的有义和反义拷贝的表达盒

[0555] SEQ ID NO.：20：与 R1 基因相连的尾随区的有义和反义拷贝的表达盒

[0556] SEQ ID NO.：21：与 L 葡聚糖磷酸化酶基因相连的马铃薯前导区

[0557] SEQ ID NO.：22：与 L 葡聚糖磷酸化酶基因相连的马铃薯尾随区

[0558] SEQ ID NO.：23：与 L 葡聚糖磷酸化酶基因相连的前导区的有义和反义拷贝的表达盒

[0559] SEQ ID NO.:24:与L葡聚糖磷酸化酶基因相连的前导区的有义和反义拷贝的替换性表达盒

[0560] SEQ ID NO.:25:与L葡聚糖磷酸化酶基因相连的前导区的有义和反义拷贝的替换性表达盒

[0561] SEQ ID NO.:26:与L葡聚糖磷酸化酶基因相连的前导区的有义和反义拷贝的替换性表达盒

[0562] SEQ ID NO.:27:马铃薯PPO基因

[0563] SEQ ID NO.:28:修改的无活性的马铃薯PPO基因

[0564] SEQ ID NO.:29:与PPO基因相连的马铃薯尾随区

[0565] SEQ ID NO.:30:与PPO基因相连的尾随区的有义和反义拷贝的表达盒

[0566] SEQ ID NO.:31:与PPO基因相连的尾随区的有义和反义拷贝的替换性表达盒

[0567] SEQ ID NO.:32:与PPO基因相连的尾随区的有义和反义拷贝的替换性表达盒

[0568] SEQ ID NO.:33:与PPO基因相连的尾随区的有义和反义拷贝的替换性表达盒

[0569] SEQ ID NO.:34:与淀粉分支酶基因相连的马铃薯尾随区

[0570] SEQ ID NO.:35:与淀粉分支酶基因相连的马铃薯尾随区

[0571] SEQ ID NO.:36:ω-突变的virD2基因的表达盒

[0572] SEQ ID NO.:37:马铃薯耐盐性基因Pst1

[0573] SEQ ID NO.:38:马铃薯耐盐性基因Pst2

[0574] SEQ ID NO.:39:马铃薯耐盐性基因Pst3

[0575] SEQ ID NO.:40:马铃薯块茎特异性启动子

[0576] SEQ ID NOs.41-55:参见表2

[0577] SEQ ID NO.:56:酵母ADH终止子

[0578] SEQ ID NO.94:小麦左侧边界样序列

[0579] SEQ ID NO.95:小麦右侧边界样序列

[0580] SEQ ID NO.96:来自Ranger的SBE尾随区

[0581] SEQ ID NO.97:来自Ranger的SBE尾随区

[0582] SEQ ID NO.:98:马铃薯P-DNA。SEQ ID NO.98的加粗下划线的部分分别代表P-DNA的左侧(5′-)和右侧(3′-)边界样序列。

[0583] SEQID NO.1

[0584] **GTTTACA**[redacted]**TACCATATATCCTGTCA** GAGGTATAGAGGCATGACTGGCATGATCACTAAATTGATGCCCA

[0585] CAGAGGAGACTTATAACCTACAGGGGCACGTAGTTCTAGGACTTGAAAGTGACTGACCGTAGTCCAACT

[0586] CGGTATAAAGCCTACTCCCAACTAAATATATGAAATTTATAGCATAACTGCAGATGAGCTCGATTCTAG

[0587] AGTAGGTACCGAGCTCGAATTCCTTACTCCTCCACAAAGCCGTAACTGAAGCGACTTCTATTTTTCTCA

[0588] ACCTTCGGACCTGACGATCAAGAATCTCAATAGGTAGTTCTTCATAAGTGAGACTATCCTTCATAGCTA

[0589] CACTTTCTAAAGGTACGATAGATTTTGGATCAACCACACACACTTCG **TTTACA**[redacted]**CGGTATATATCCTGC**

[0590]

CA

[0591] SEQ ID NO. 2

[0592] TGGCAGGATATATGAGTGTGTAAACAACCATAATCAGGCTGTAATTATCAAGAGAACTAATGACAAGAA

[0593] GCAGAGCTTATCAAGTGTTTCGTCCAGCTGTAACATGGGCACAAAAGCTTGCTTGATGCATGTCTGGCT

[0594] TTTCAAAGAGCAATGTATTCTCAGGTACCTGCACGTTTGATCCCCTACCACGTACAAGACGAGCAGAAA

[0595] GGACATGTCTGCAGAAACTTAGACACATCCATTGCAGACTCGTTCCGAAGCATCAGGAGAGTAGTCAGC

[0596] AATGGTCATCTGCTGATGTAAATTAATTGATTGTTGGTAATCAAATTTTAACAGCAATATATATAATAT

[0597] ATCAATAGTATATTGAACTATGAAAGACTGTAATCATATATAACAGCATACAAATTGTCGTGGAAACAA

[0598] GAGGAGCTCATCAAGTGTTTAGTTCAGAAATAGCTAACCAAGAATGCAATATAATAGGGGTACTGAGCT

[0599] CCCTTCAAAATTACTAACTTCAGAAATAGCTAACCAAGAATGCAATGGCATTGCATAATTTAAACAACT

[0600] GTCAGCACCAATCTCTGACTGAAGGCAGTTTACCCATTCAGAAGAGCACACATTTTCTGAACGACAACT

[0601] CTGAGCGGGGATTGTTGACAGCAGCAATTAATCTGGCCTCAAGATGGTTTCCAACAACATAGATCAGAT

[0602] ACAGCACTCAAGCACCCAATAATCAGCCAGTACTGATCTGGTTACCACTGCAATTGATTAACAGATGAA

[0603] CTGTGAAATTAAGATTTAACTGACAGTAATATATACCAGTTGGCAGGATATATCCCTCTGTAAAC

[0604] SEQ ID NO. 3

[0605] CTGCAGCCAAAGCACATACTTATCGATTTAAATTTCATCGAAGAGATTAATATCGAATAATCATATACA

[0606] TACTTTAAATACATAACAAATTTTAAATACATATATCTGGTATATAATTAATTTTTTAAAGTCATGAAG

[0607] TATGTATCAAATACACATATGGAAAAAATTAACTATTCATAATTTAAAAAATAGAAAAGATACATCTAG

[0608] TGAAATTAGGTGCATGTATCAAATACATTAGGAAAAGGGCATATATCTTGATCTAGATAATTAACGATT

[0609] TTGATTTATGTATAATTTCCAAATGAAGGTTTATATCTACTTCAGAAATAACAATATACTTTTATCAGA

[0610] ACATTCAACAAAGTAACAACCAACTAGAGTGAAAAATACACATTGTTCTCTAAACATACAAAATTGAGA

[0611] AAAGAATCTCAAAATTTAGAGAAACAAATCTGAATTTCTAGAAGAAAAAAATAATTATGCACTTTGCTA

[0612] TTGCTCGAAAAATAAATGAAAGAAATTAGACTTTTTTAAAAGATGTTAGACTAGATATACTCAAAAGCT

[0613] ATCAAAGGAGTAATATTCTTCTTACATTAAGTATTTTAGTTACAGTCCTGTAATTAAAGACACATTTTA

[0614] GATTGTATCTAAACTTAAATGTATCTAGAATACATATATTTGAATGCATCATATACATGTATCCGACAC

[0615] ACCAATTCTCATAAAAAGCGTAATATCCTAAACTAATTTATCCTTCAAGTCAACTTAAGCCCAATATAC

[0616] ATTTTCATCTCTAAAGGCCCAAGTGGCACAAAATGTCAGGCCCAATTACGAAGAAAAGGGCTTGTAAAA

[0617] CCCTAATAAAGTGGCACTGGCAGAGCTTACACTCTCATTCCATCAACAAAGAAACCCTAAAAGCCGCAG

[0618] CGCCACTGATTTCTCTCCTCCAGGCGAAGATGCAGATCTTCGTGAAGACCCTAACGGGGAAGACGATCA

[0619] CCCTAGAGGTTGAGTCTTCCGACACCATCGACAATGTCAAAGCCAAGATCCAGGACAAGGAAGGGATTC

[0620] CCCCAGACCAGCAGCGTTTGATTTTCGCCGGAAAGCAGCTTGAGGATGGTCGTACTCTTGCCGACTACA

[0621] ACATCCAGAAGGAGTCAACTCTCCATCTCGTGCTCCGTCTCCGTGGTGGTGGATCCATGGACCTGCATC

[0622] TAATTTTCGGTCCAACTTGCACAGGAAAGACGACGACCGCGATAGCTCTTGCCCAGCAGACAGGGCTTC

[0623] CAGTCCTTTCGCTTGATCGGGTCCAATGCTGTCCTCAACTATCAACCGGAAGCGGACGACCAACAGTGG

[0624] AAGAACTGAAAGGAACGACGCGTCTCTACCTTGATGATCGGCCTCTGGTGGAGGGTATCATCGCAGCCA

[0625] AGCAAGCTCATCATAGGCTGATCGAGGAGGTGTATAATCATGAGGCCAACGGCGGGCTTATTCTTGAGG

[0626] GAGGATCCACCTCGTTGCTCAACTGCATGGCGCGAAACAGCTATTGGAGTGCAGATTTTCGTTGGCATA

[0627] TTATTCGCCACAAGTTACCCGACCAAGAGACCTTCATGAAAGCGGCCAAGGCCAGAGTTAAGCAGATGT

[0628] TGCACCCCGCTGCAGGCCATTCTATTATTCAAGAGTTGGTTTATCTTTGGAATGAACCTCGGCTGAGGC

[0629] CCATTCTGAAAGAGATCGATGGATATCGATATGCCATGTTGTTTGCTAGCCAGAACCAGATCACGGCAG

[0630] ATATGCTATTGCAGCTTGACGCAAATATGGAAGGTAAGTTGATTAATGGGATCGCTCAGGAGTATTTCA

[0631] TCCATGCGCGCCAACAGGAACAGAAATTCCCCCAAGTTAACGCAGCCGCTTTCGACGGATTCGAAGGTC

[0632] ATCCGTTCGGAATGTATTAGGTTACGCCAGCCCTGCGTCGCACCTGTCTTCATCTGGATAAGATGTTCG

[0633] TAATTGTTTTTGGCTTTGTCCTGTTGTGGCAGGGCGGCAAATACTTCCGACAATCCATCGTGTCTTCAA

[0634] ACTTTATGCTGGTGAACAAGTCTTAGTTTCCACGAAAGTATTATGTTAAATTTTAAAATTTCGATGTAT

[0635] AATGTGGCTATAATTGTAAAAATAAACTATCGTAAGTGTGCGTGTTATGTATAATTTGTCTAAATGTTT

[0636] AATATATATCATAGAACGCAATAAATATTAAATATAGCGCTTTTATGAAATATAAATACATCATTACAA

[0637] GTTGTTTATATTTCGGGTGGACTAGTTTTTAATGTTTAGCAAATGTCCTATCAGTTTTCTCTTTTTGTC

[0638] GAACGGTAATTTAGAGTTTTTTTTGCTATATGGATTTTCGTTTTTGATGTATGTGACAACCCTCGGGAT

[0639] TGTTGATTTATTTCAAAACTAAGAGTTTTTGCTTATTGTTCTCGTCTATTTTGGATATCAATCTTAGTT

[0640] TTATATCTTTTCTAGTTCTCTACGTGTTAAATGTTCAACACACTAGCAATTTGGCTGCAGCGTATGGAT

[0641] TATGGAACTATCAAGTCTGTGGGATCGATAAATATGCTTCTCAGGAATTTGAGATTTTACAGTCTTTAT

[0642] GCTCATTGGGTTGAGTATAATATAGTAAAAAAATAGGAATTC

[0643] SEQ ID NO.4

[0644] AGCTTTGGCAGGATATATACCGGTGTAAACGAAGTGTGTGTGGTTGATCCAAAATCTATCGTACCTTTA

[0645] GAAAGTGTAGCTATGAAGGATAGTCTCACTTATGAAGAACTACCTATTGAGATTCTTGATCGTCAGGTC

[0646] CGAAGGTTGAGAAAAATAGAAGTCGCTTCAGTTACGGCTTTGTGGAGGAGTAAGGGTACCTACTCTAGA

[0647] ATCGAGCTCATCGTTATGCTATAAATTTCATATATTTAGTTGGGAGTAGGCTTTATACCGAGTTGGACT

[0648] ACGGTCAGTCACTTTCAAGTCCTAGAACTACGTGCCCCTGTAGGTTATAAGTCTCCTCTGTGGGCATCA

[0649] ATTTAGTGATCATGCCAGTCATGCCTCTATACCTCTGACAGGATATATGGTACTGTAAACACTAGTTGT

[0650] GAATAAGTCGCTGTGTATGTTTGTTTGAGATCTCTAAGAGAAAAGAGCGTTTATTAGAATAACGGATAT

[0651] TTAAAAGGGCGTGAAAAGGTTTATCCGTTCGTCCATTTGTATGTGGTCACCTATCTCGAGCATGCCAAC

[0652] CACAGGGTTCCCCTCGGGATCAAAGTACTTTGATCCAACCCCTCCGCTGCTATAGTGCAGTCGGCTTCT

[0653] GACGTTCAGTGCAGCCGTCTTCTGAAAACGACATGTCGCACAAGTCCTAAGTTACGCGACAGGCTGCCG

[0654] CCCTGCCCTTTTCCTGGCGTTTTCTTGTCGCGTGTTTTAGTCGCATAAAGTAGAATACTTGCGACTAGA

[0655] ACCGGAGACATTACGCCATGAACAAGAGCGCCGCCGCTGGCCTGCTGGGCTATGCCCGCGTCAGCACCG

[0656] ACGACCAGGACTTGACCAACCAACGGGCCGAACTGCACGCGGCCGGCTGCACCAAGCTGTTTTCCGAGA

[0657] AGATCACCGGCACCAGGCGCGACCGCCCGGAGCTGGCCAGGATGCTTGACCACCTACGCCCTGGCGACG

[0658] TTGTGACAGTGACCAGGCTAGACCGCCTGGCCCGCAGCACCCGCGACCTACTGGACATTGCCGAGCGCA

[0659] TCCAGGAGGCCGGCGCGGGCCTGCGTAGCCTGGCAGAGCCGTGGGCCGACACCACCACGCCGGCCGGCC

[0660] GCATGGTGTTGACCGTGTTCGCCGGCATTGCCGAGTTCGAGCGTTCCCTAATCATCGACCGCACCCGGA

[0661] GCGGGCGCGAGGCCGCCAAGGCCCGAGGCGTGAAGTTTGGCCCCCGCCCTACCCTCACCCCGGCACAGA

[0662] TCGCGCACGCCCGCGAGCTGATCGACCAGGAAGGCCGCACCGTGAAAGAGGCGGCTGCACTGCTTGGCG

[0663] TGCATCGCTCGACCCTGTACCGCGCACTTGAGCGCAGCGAGGAAGTGACGCCCACCGAGGCCAGGCGGC

[0664] GCGGTGCCTTCCGTGAGGACGCATTGACCGAGGCCGACGCCCTGGCGGCCGCCGAGAATGAACGCCAAG

[0665] AGGAACAAGCATGAAACCGCACCAGGACGGCCAGGACGAACCGTTTTTCATTACCGAAGAGATCGAGGC

[0666] GGAGATGATCGCGGCCGGGTACGTGTTCGAGCCGCCCGCGCACGTCTCAACCGTGCGGCTGCATGAAAT

[0667] CCTGGCCGGTTTGTCTGATGCCAAGCTGGCGGCCTGGCCGGCCAGCTTGGCCGCTGAAGAAACCGAGCG

[0668] CCGCCGTCTAAAAAGGTGATGTGTATTTGAGTAAAACAGCTTGCGTCATGCGGTCGCTGCGTATATGAT

[0669] GCGATGAGTAAATAAACAAATACGCAAGGGGAACGCATGAAGGTTATCGCTGTACTTAACCAGAAAGGC

[0670] GGGTCAGGCAAGACGACCATCGCAACCCATCTAGCCCGCGCCCTGCAACTCGCCGGGGCCGATGTTCTG

[0671] TTAGTCGATTCCGATCCCCAGGGCAGTGCCCGCGATTGGGCGGCCGTGCGGGAAGATCAACCGCTAACC

[0672] GTTGTCGGCATCGACCGCCCGACGATTGACCGCGACGTGAAGGCCATCGGCCGGCGCGACTTCGTAGTG

[0673] ATCGACGGAGCGCCCCAGGCGGCGGACTTGGCTGTGTCCGCGATCAAGGCAGCCGACTTCGTGCTGATT

[0674] CCGGTGCAGCCAAGCCCTTACGACATATGGGCCACCGCCGACCTGGTGGAGCTGGTTAAGCAGCGCATT

[0675] GAGGTCACGGATGGAAGGCTACAAGCGGCCTTTGTCGTGTCGCGGGCGATCAAAGGCACGCGCATCGGC

[0676] GGTGAGGTTGCCGAGGCGCTGGCCGGGTACGAGCTGCCCATTCTTGAGTCCCGTATCACGCAGCGCGTG

[0677] AGCTACCCAGGCACTGCCGCCGCCGGCACAACCGTTCTTGAATCAGAACCCGAGGGCGACGCTGCCCGC

[0678] GAGGTCCAGGCGCTGGCCGCTGAAATTAAATCAAAACTCATTTGAGTTAATGAGGTAAAGAGAAAATGA

[0679] GCAAAAGCACAAACACGCTAAGTGCCGGCCGTCCGAGCGCACGCAGCAGCAAGGCTGCAACGTTGGCCA

[0680] GCCTGGCAGACACGCCAGCCATGAAGCGGGTCAACTTTCAGTTGCCGGCGGAGGATCACACCAAGCTGA

[0681] AGATGTACGCGGTACGCCAAGGCAAGACCATTACCGAGCTGCTATCTGAATACATCGCGCAGCTACCAG

[0682] AGTAAATGAGCAAATGAATAAATGAGTAGATGAATTTTAGCGGCTAAAGGAGGCGGCATGGAAAATCAA

[0683] GAACAACCAGGCACCGACGCCGTGGAATGCCCCATGTGTGGAGGAACGGGCGGTTGGCCAGGCGTAAGC

[0684] GGCTGGGTTGTCTGCCGGCCCTGCAATGGCACTGGAACCCCCAAGCCCGAGGAATCGGCGTGACGGTCG

[0685] CAAACCATCCGGCCCGGTACAAATCGGCGCGGCGCTGGGTGATGACCTGGTGGAGAAGTTGAAGGCCGC

[0686] GCAGGCCGCCCAGCGGCAACGCATCGAGGCAGAAGCACGCCCCGGTGAATCGTGGCAAGCGGCCGCTGA

[0687] TCGAATCCGCAAAGAATCCCGGCAACCGCCGGCAGCCGGTGCGCCGTCGATTAGGAAGCCGCCCAAGGG

[0688] CGACGAGCAACCAGATTTTTTCGTTCCGATGCTCTATGACGTGGGCACCCGCGATAGTCGCAGCATCAT

[0689] GGACGTGGCCGTTTTCCGTCTGTCGAAGCGTGACCGACGAGCTGGCGAGGTGATCCGCTACGAGCTTCC

[0690] AGACGGGCACGTAGAGGTTTCCGCAGGGCCGGCCGGCATGGCCAGTGTGTGGGATTACGACCTGGTACT

[0691] GATGGCGGTTTCCCATCTAACCGAATCCATGAACCGATACCGGGAAGGGAAGGGAGACAAGCCCGGCCG

[0692] CGTGTTCCGTCCACACGTTGCGGACGTACTCAAGTTCTGCCGGCGAGCCGATGGCGGAAAGCAGAAAGA

[0693] CGACCTGGTAGAAACCTGCATTCGGTTAAACACCACGCACGTTGCCATGCAGCGTACGAAGAAGGCCAA

[0694] GAACGGCCGCCTGGTGACGGTATCCGAGGGTGAAGCCTTGATTAGCCGCTACAAGATCGTAAAGAGCGA

[0695] AACCGGGCGGCCGGAGTACATCGAGATCGAGCTAGCTGATTGGATGTACCGCGAGATCACAGAAGGCAA

[0696] GAACCCGGACGTGCTGACGGTTCACCCCGATTACTTTTTGATCGATCCCGGCATCGGCCGTTTTCTCTA

[0697] CCGCCTGGCACGCCGCGCCGCAGGCAAGGCAGAAGCCAGATGGTTGTTCAAGACGATCTACGAACGCAG

[0698] TGGCAGCGCCGGAGAGTTCAAGAAGTTCTGTTTCACCGTGCGCAAGCTGATCGGGTCAAATGACCTGCC

[0699] GGAGTACGATTTGAAGGAGGAGGCGGGGCAGGCTGGCCCGATCCTAGTCATGCGCTACCGCAACCTGAT

[0700] CGAGGGCGAAGCATCCGCCGGTTCCTAATGTACGGAGCAGATGCTAGGGCAAATTGCCCTAGCAGGGGA

[0701] AAAAGGTCGAAAAGGTCTCTTTCCTGTGGATAGCACGTACATTGGGAACCCAAAGCCGTACATTGGGAA

[0702] CCGGAACCCGTACATTGGGAACCCAAAGCCGTACATTGGGAACCGGTCACACATGTAAGTGACTGATAT

[0703] AAAAGAGAAAAAAGGCGATTTTTCCGCCTAAAACTCTTTAAAACTTATTAAAACTCTTAAAACCCGCCT

[0704] GGCCTGTGCATAACTGTCTGGCCAGCGCACAGCCGAAGAGCTGCAAAAAGCGCCTACCCTTCGGTCGCT

[0705] GCGCTCCCTACGCCCCGCCGCTTCGCGTCGGCCTATCGCGGCCGCTGGCCGCTCAAAAATGGCTGGCCT

[0706] ACGGCCAGGCAATCTACCAGGGCGCGGACAAGCCGCGCCGTCGCCACTCGACCGCCGGCGCCCACATCA

[0707] AGGCACCCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGG

[0708] TCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCG

[0709] GGTGTCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGC

[0710] ATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAA

[0711] ATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCG

[0712] AGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAA

[0713] CATGTGAGCAAAGGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAG

[0714] GCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACT

[0715] ATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTAC

[0716] CGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCT

[0717] CAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTG

[0718] CGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGC

[0719] CACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAA

[0720] CTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAG

[0721] AGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCA

[0722] GATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTG

[0723] GAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGCATTCTAGGTACTAAAACAATTCATCCAGTAAAAT

[0724] ATAATATTTTATTTTCTCCCAATCAGGCTTGATCCCCAGTAAGTCAAAAAATAGCTCGACATACTGTTC

[0725] TTCCCCGATATCCTCCCTGATCGACCGGACGCAGAAGGCAATGTCATACCACTTGTCCGCCCTGCCGCT

[0726] TCTCCCAAGATCAATAAAGCCACTTACTTTGCCATCTTTCACAAAGATGTTGCTGTCTCCCAGGTCGCC

[0727] GTGGGAAAAGACAAGTTCCTCTTCGGGCTTTTCCGTCTTTAAAAAATCATACAGCTCGCGCGGATCTTT

[0728] AAATGGAGTGTCTTCTTCCCAGTTTTCGCAATCCACATCGGCCAGATCGTTATTCAGTAAGTAATCCAA

[0729] TTCGGCTAAGCGGCTGTCTAAGCTATTCGTATAGGGACAATCCGATATGTCGATGGAGTGAAAGAGCCT

[0730] GATGCACTCCGCATACAGCTCGATAATCTTTTCAGGGCTTTGTTCATCTTCATACTCTTCCGAGCAAAG

[0731] GACGCCATCGGCCTCACTCATGAGCAGATTGCTCCAGCCATCATGCCGTTCAAAGTGCAGGACCTTTGG

[0732] AACAGGCAGCTTTCCTTCCAGCCATAGCATCATGTCCTTTTCCCGTTCCACATCATAGGTGGTCCCTTT

[0733] ATACCGGCTGTCCGTCATTTTTAAATATAGGTTTTCATTTTCTCCCACCAGCTTATATACCTTAGCAGG

[0734] AGACATTCCTTCCGTATCTTTTACGCAGCGGTATTTTTCGATCAGTTTTTTCAATTCCGGTGATATTCT

[0735] CATTTTAGCCATTTATTATTTCCTTCCTCTTTTCTACAGTATTTAAAGATACCCCAAGAAGCTAATTAT

[0736] AACAAGACGAACTCCAATTCACTGTTCCTTGCATTCTAAAACCTTAAATACCAGAAAACAGCTTTTTCA

[0737] AAGTTGTTTTCAAAGTTGGCGTATAACATAGTATCGACGGAGCCGATTTTGAAACCGCGGATCCTGCAG

[0738] CCAAAGCACATACTTATCGATTTAAATTTCATCGAAGAGATTAATATCGAATAATCATATACATACTTT

[0739] AAATACATAACAAATTTTAAATACATATATCTGGTATATAATTAATTTTTTAAAGTCATGAAGTATGTA

[0740] TCAAATACACATATGGAAAAAATTAACTATTCATAATTTAAAAAATAGAAAAGATACATCTAGTGAAAT

[0741] TAGGTGCATGTATCAAATACATTAGGAAAAGGGCATATATCTTGATCTAGATAATTAACGATTTTGATT

[0742] TATGTATAATTTCCAAATGAAGGTTTATATCTACTTCAGAAATAACAATATACTTTTATCAGAACATTC

[0743] AACAAAGTAACAACCAACTAGAGTGAAAAATACACATTGTTCTCTAAACATACAAAATTGAGAAAAGAA

[0744] TCTCAAAATTTAGAGAAACAAATCTGAATTTCTAGAAGAAAAAAATAATTATGCACTTTGCTATTGCTC

[0745] GAAAAATAAATGAAAGAAATTAGACTTTTTTAAAAGATGTTAGACTAGATATACTCAAAAGCTATCAAA

[0746] GGAGTAATATTCTTCTTACATTAAGTATTTTAGTTACAGTCCTGTAATTAAAGACACATTTTAGATTGT

[0747] ATCTAAACTTAAATGTATCTAGAATACATATATTTGAATGCATCATATACATGTATCCGACACACCAAT

[0748] TCTCATAAAAAGCGTAATATCCTAAACTAATTTATCCTTCAAGTCAACTTAAGCCCAATATACATTTTC

[0749] ATCTCTAAAGGCCCAAGTGGCACAAAATGTCAGGCCCAATTACGAAGAAAAGGGCTTGTAAAACCCTAA

[0750] TAAAGTGGCACTGGCAGAGCTTACACTCTCATTCCATCAACAAAGAAACCCTAAAAGCCGCAGCGCCAC

[0751] TGATTTCTCTCCTCCAGGCGAAGATGCAGATCTTCGTGAAGACCCTAACGGGGAAGACGATCACCCTAG

[0752] AGGTTGAGTCTTCCGACACCATCGACAATGTCAAAGCCAAGATCCAGGACAAGGAAGGGATTCCCCCAG

[0753] ACCAGCAGCGTTTGATTTTCGCCGGAAAGCAGCTTGAGGATGGTCGTACTCTTGCCGACTACAACATCC

[0754] AGAAGGAGTCAACTCTCCATCTCGTGCTCCGTCTCCGTGGTGGTGGATCCATGGACCTGCATCTAATTT

[0755] TCGGTCCAACTTGCACAGGAAAGACGACGACCGCGATAGCTCTTGCCCAGCAGACAGGGCTTCCAGTCC

[0756] TTTCGCTTGATCGGGTCCAATGCTGTCCTCAACTATCAACCGGAAGCGGACGACCAACAGTGGAAGAAC

[0757] TGAAAGGAACGACGCGTCTCTACCTTGATGATCGGCCTCTGGTGGAGGGTATCATCGCAGCCAAGCAAG

[0758] CTCATCATAGGCTGATCGAGGAGGTGTATAATCATGAGGCCAACGGCGGGCTTATTCTTGAGGGAGGAT

[0759] CCACCTCGTTGCTCAACTGCATGGCGCGAAACAGCTATTGGAGTGCAGATTTTCGTTGGCATATTATTC

[0760] GCCACAAGTTACCCGACCAAGAGACCTTCATGAAAGCGGCCAAGGCCAGAGTTAAGCAGATGTTGCACC

[0761] CCGCTGCAGGCCATTCTATTATTCAAGAGTTGGTTTATCTTTGGAATGAACCTCGGCTGAGGCCCATTC

[0762] TGAAAGAGATCGATGGATATCGATATGCCATGTTGTTTGCTAGCCAGAACCAGATCACGGCAGATATGC

[0763] TATTGCAGCTTGACGCAAATATGGAAGGTAAGTTGATTAATGGGATCGCTCAGGAGTATTTCATCCATG

[0764] CGCGCCAACAGGAACAGAAATTCCCCCAAGTTAACGCAGCCGCTTTCGACGGATTCGAAGGTCATCCGT

[0765] TCGGAATGTATTAGGTTACGCCAGCCCTGCGTCGCACCTGTCTTCATCTGGATAAGATGTTCGTAATTG

[0766] TTTTTGGCTTTGTCCTGTTGTGGCAGGGCGGCAAATACTTCCGACAATCCATCGTGTCTTCAAACTTTA

[0767] TGCTGGTGAACAAGTCTTAGTTTCCACGAAAGTATTATGTTAAATTTTAAAATTTCGATGTATAATGTG

[0768] GCTATAATTGTAAAAATAAACTATCGTAAGTGTGCGTGTTATGTATAATTTGTCTAAATGTTTAATATA

[0769] TATCATAGAACGCAATAAATATTAAATATAGCGCTTTTATGAAATATAAATACATCATTACAAGTTGTT

[0770] TATATTTCGGGTGGACTAGTTTTTAATGTTTAGCAAATGTCCTATCAGTTTTCTCTTTTTGTCGAACGG

[0771] TAATTTAGAGTTTTTTTTGCTATATGGATTTTCGTTTTTGATGTATGTGACAACCCTCGGGATTGTTGA

[0772] TTTATTTCAAAACTAAGAGTTTTTGCTTATTGTTCTCGTCTATTTTGGATATCAATCTTAGTTTTATAT

[0773] CTTTTCTAGTTCTCTACGTGTTAAATGTTCAACACACTAGCAATTTGGCTGCAGCGTATGGATTATGGA

[0774] ACTATCAAGTCTGTGGGATCGATAAATATGCTTCTCAGGAATTTGAGATTTTACAGTCTTTATGCTCAT

[0775] TGGGTTGAGTATAATATAGTAAAAAAAATAGGAATTCTATCCGCGGTGATCACAGGCAGCAACGCTCTGT

[0776] CATCGTTACAATCAACATGCTACCCTCCGCGAGATCATCCGTGTTTCAAACCCGGCAGCTTAGTTGCCG

[0777] TTCTTCCGAATAGCATCGGTAACATGAGCAAAGTCTGCCGCCTTACAACGGCTCTCCCGCTGACGCCGT

[0778] CCCGGACTGATGGGCTGCCTGTATCGAGTGGTGATTTTGTGCCGAGCTGCCGGTCGGGGAGCTGTTGGC

[0779] TGGCTGGA

[0780] SEQ ID NO.5

[0781] ATGAGAAATTTATTCCCCATATTGATGCTAATCACCAATTTGGCACTCAACAACGATAACAACAACAAC

[0782] AACAACAACAACAATAATTATAATCTCATACACGCAACGTGTAGGGAGACCCCATATTACTCCCTATGT

[0783] CTCACCACCCTACAATCCGGTCCACGTAGTAACGAGGTTGAGGGTGGTGATGCCATCACCACCCTAGGC

[0784] CTCATCATGGTGGACGCGGTGAAATCAAAGTCCATAGAAATAATGGAAAAAATAAAAGAGCTAGAGAAA

[0785] TCGAACCCTGAGTGGCGGGCCCCACTTAGCCAGTGTTACGTGGCGTATAATGCCGTCCTACGAGCCGAT

[0786] GTAACGGTAGCCGTTGAAGCCTTAAAGAAGGGTGCCCCCAAATTTGCTGAAGATGGTATGGATGATGTT

[0787] GTTGCTGAAGCACAAACTTGTGAGTATAGTTTTAATTATTATAATAAATTGGATTTTCCAATTTCTAAT

[0788] TTGAGTAGGGAAATAATTGAACTATCAAAAGTTGCTAAATCCATAATTAGAATGTTATTATGA

[0789] SEQ ID NO.6

[0790] GAACCATGCATCTCAATCTTAATACTAAAAAATGCAACAAAATTCTAGTGGAGGGACCAGTACCAGTAC

[0791] ATTAGATATTATCTTTTATTACTATAATAATATTTTAATTAACACGAGACATAGGAATGTCAAGTGGTA

[0792] GCGGTAGGAGGGAGTTGGTTCAGTTTTTTAGATACTAGGAGACAGAACCGGAGGGGCCCATTGCAAGGC

[0793] CCAAGTTGAAGTCCAGCCGTGAATCAACAAAGAGAGGGCCCATAATACTGTCGATGAGCATTTCCCTAT

[0794] AATACAGTGTCCACAGTTGCCTTCCGCTAAGGGATAGCCACCCGCTATTCTCTTGACACGTGTCACTGA

[0795] AACCTGCTACAAATAAGGCAGGCACCTCCTCATTCTCACACTCACTCACTCACACAGCTCAACAAGTGG

[0796] TAACTTTTACTCATCTCCTCCAATTATTTCTGATTTCATGCATGTTTCCCTACATTCTATTATGAATCG

[0797] TGTTATGGTGTATAAACGTTGTTTCATATCTCATCTCATCTATTCTGATTTTGATTCTCTTGCCTACTG

[0798] AATTTGACCCTACTGTAATCGGTGATAAATGTGAATGCTTCCTCTTCTTCTTCTTCTTCTCAGAAATCA

[0799] ATTTCTGTTTTGTTTTTGTTCATCTGTAGCTTGGTAG

[0800] SEQ ID NO.7

[0801] TTTTAATGTTTAGCAAATGTCCTATCAGTTTTCTCTTTTTGTCGAACGGTAATTTAGAGTTTTTTTTGC

[0802] TATATGGATTTTCGTTTTTGATGTATGTGACAACCCTCGGGATTGTTGATTTATTTCAAAACTAAGAGT

[0803] TTTTGCTTATTGTTCTCGTCTATTTTGGATATCAATCTTAGTTTTATATCTTTTCTAGTTCTCTACGTG

[0804] TTAAATGTTCAACACACTAGCAATTTGGCTGCAGCGTATGGATTATGGAACTATCAAGTCTGTGGGATC

[0805] GATAAATATGCTTCTCAGGAATTTGAGATTTTACAGTCTTTATGCTCATTGGGTTGAGTATAATATAGT

[0806] AAAAAAATAG

[0807] SEQ ID NO.8

[0808] ACCTTATTTCACTACCACTTTCCACTCTCCAATCCCCATACTCTCTGCTCCAATCTTCATTTTGCTTCG

[0809] TGAATTCATCTTCATCGAATTTCTCGACGCTTCTTCGCTAATTTCCTCGTTACTTCACTAAAAATCGAC

[0810] GTTTCTAGCTGAACTTGAGTGAATTAAGCCAGTGGGAGGAT

[0811] SEQ ID NO.9

[0812] GTTAGAAATCTTCTCTATTTTTGGTTTTTGTCTGTTTAGATTCTCGAATTAGCTAATCAGGTGCTGTTA

[0813] TAGCCCTTAATTTTGAGTTTTTTTTCGGTTGTTTTGATGGAAAAGGCCTAAAATTTGAGTTTTTTTACG

[0814] TTGGTTTGATGGAAAAGGCCTACAATTGGAGTTTTCCCCGTTGTTTTGATGAAAAAGCCCCTAGTTTGA

[0815] GATTTTTTTTCTGTCGATTCGATTCTAAAGGTTTAAAATTAGAGTTTTTACATTTGTTTGATGAAAAAG

[0816] GCCTTAAATTTGAGTTTTTCCGGTTGATTTGATGAAAAAGCCCTAGAATTTGTGTTTTTTCGTCGGTTT

[0817] GATTCTGAAGGCCTAAAATTTGAGTTTCTCCGGCTGTTTTGATGAAAAAGCCCTAAATTTGAGTTTCTC

[0818] CGGCTGTTTTGATGAAAAAGCCCTAAATTTGAGTTTTTTCCCCGTGTTTTAGATTGTTTGGTTTTAATT

[0819] CTCGAATCAGCTAATCAGGGAGTGTGAAAAGCCCTAAAATTTGAGTTTTTTTCGTTGTTCTGATTGTTG

[0820] TTTTTATGAATTTGCAG

[0821] SEQ ID NO.10

[0822] GGTACCGAACCATGCATCTCAATCTTAATACTAAAAAATGCAACAAAATTCTAGTGGAGGGACCAGTAC

[0823] CAGTACATTAGATATTATCTTTTATTACTATAATAATATTTTAATTAACACGAGACATAGGAATGTCAA

[0824] GTGGTAGCGGTAGGAGGGAGTTGGTTCAGTTTTTTAGATACTAGGAGACAGAACCGGAGGGGCCCATTG

[0825] CAAGGCCCAAGTTGAAGTCCAGCCGTGAATCAACAAAGAGAGGGCCCATAATACTGTCGATGAGCATTT

[0826] CCCTATAATACAGTGTCCACAGTTGCCTTCCGCTAAGGGATAGCCACCCGCTATTCTCTTGACACGTGT

[0827] CACTGAAACCTGCTACAAATAAGGCAGGCACCTCCTCATTCTCACACTCACTCACTCACACAGCTCAAG

[0828] AAGGATCCACCTTATTTCACTACCACTTTCCACTCTCCAATCCCCATACTCTCTGCTCCAATCTTCATT

[0829] TTGCTTCGTGAATTCATCTTCATCGAATTTCTCGACGCTTCTTCGCTAATTTCCTCGTTACTTCACTAG

[0830] AAATCGACGTTTCTAGCTGAACTTGAGTGAATTAAGCCAGTGGGAGGATGAATTCAAGGTTAGAAATCT

[0831] TCTCTATTTTTGGTTTTTGTCTGTTTAGATTCTCGAATTAGCTAATCAGGTGCTGTTATAGCCCTTAAT

[0832] TTTGAGTTTTTTTTCGGTTGTTTTGATGGAAAAGGCCTAAAATTTGAGTTTTTTTACGTTGGTTTGATG

[0833] GAAAAGGCCTACAATTGGAGTTTTCCCCGTTGTTTTGATGAAAAAGCCCCTAGTTTGAGATTTTTTTTC

[0834] TGTCGATTCGATTCTAAAGGTTTAAAATTAGAGTTTTTACATTTGTTTGATGAAAAAGGCCTTAAATTT

[0835] GAGTTTTTCCGGTTGATTTGATGAAAAAGCCCTAGAATTTGTGTTTTTTCGTCGGTTTGATTCTGAAGG

[0836] CCTAAAATTTGAGTTTCTCCGGCTGTTTTGATGAAAAAGCCCTAAATTTGAGTTTCTCCGGCTGTTTTG

[0837] ATGAAAAAGCCCTAAATTTGAGTTTTTTCCCCGTGTTTTAGATTGTTTGGTTTTAATTCTCGAATCAGC

[0838] TAATCAGGGAGTGTGAAAAGCCCTAAAATTTGAGTTTTTTTCGTTGTTCTGATTGTTGTTTTTATGAAT

[0839] TTGCAGATGGATATCATCCTCCCACTGGCTTAATTCACTCAAGTTCAGCTAGAAACGTCGATTTCTAGT

[0840] GAAGTAACGAGGAAATTAGCGAAGAAGCGTCGAGAAATTCGATGAAGATGAATTCACGAAGCAAAATGA

[0841] AGATTGGAGCAGAGAGTATGGGGATTGGAGAGTGGAAAGTGGTAGTGAAATAAGGTAAGCTTTTGATTT

[0842] TAATGTTTAGCAAATGTCCTATCAGTTTTCTCTTTTTGTCGAACGGTAATTTAGAGTTTTTTTTGCTAT

[0843] ATGGATTTTCGTTTTTGATGTATGTGACAACCCTCGGGATTGTTGATTTATTTCAAAACTAAGAGTTTT

[0844] TGCTTATTGTTCTCGTCTATTTTGGATATCAATCTTAGTTTTATATCTTTTCTAGTTCTCTACGTGTTA

[0845] AATGTTCAACACACTAGCAATTTGGCTGCAGCGTATGGATTATGGAACTATCAAGTCTGTGGGATCGAT

[0846] AAATATGCTTCTCAGGAATTTGAGATTTTACAGTCTTTATGCTCATTGGGTTGAGTATAATATAGTAAA

[0847] AAAATAGTCTAGA

[0848] SEQ ID NO.11

[0849] GTAACTTTTACTCATCTCCTCCAATTATTTCTGATTTCATGCATGTTTCCCTACATTCTATTATGAATC

[0850] GTGTTATGGTGTATAAACGTTGTTTCATATCTCATCTCATCTATTCTGATTTTGATTCTCTTGCCTACT

[0851] GAATTTGACCCTACTGTAATCGGTGATAAATGTGAATGCTTCCTCTTCTTCTTCTTCTTCTCAGAAATC

[0852] AATTTCTGTTTTGTTTTTGTTCATCTGTAG

[0853] SEQ ID NO.12

[0854] GGTACCGAACCATGCATCTCAATCTTAATACTAAAAAATGCAACAAAATTCTAGTGGAGGGACCAGTAC

[0855] CAGTACATTAGATATTATCTTTTATTACTATAATAATATTTTAATTAACACGAGACATAGGAATGTCAA

[0856] GTGGTAGCGGTAGGAGGGAGTTGGTTCAGTTTTTTAGATACTAGGAGACAGAACCGGAGGGGCCCATTG

[0857] CAAGGCCCAAGTTGAAGTCCAGCCGTGAATCAACAAAGAGAGGGCCCATAATACTGTCGATGAGCATTT

[0858] CCCTATAATACAGTGTCCACAGTTGCCTTCCGCTAAGGGATAGCCACCCGCTATTCTCTTGACACGTGT

[0859] CACTGAAACCTGCTACAAATAAGGCAGGCACCTCCTCATTCTCACACTCACTCACTCACACAGCTCAAG

[0860] AAGGATCCACCTTATTTCACTACCACTTTCCACTCTCCAATCCCCATACTCTCTGCTCCAATCTTCATT

[0861] TTGCTTCGTGAATTCATCTTCATCGAATTTCTCGACGCTTCTTCGCTAATTTCCTCGTTACTTCACTAG

[0862] AAATCGACGTTTCTAGCTGAACTTGAGTGAATTAAGCCAGTGGGAGGATGAATTCGTGGTAACTTTTAC

[0863] TCATCTCCTCCAATTATTTCTGATTTCATGCATGTTTCCCTACATTCTATTATGAATCGTGTTATGGTG

[0864] TATAAACGTTGTTTCATATCTCATCTCATCTATTCTGATTTTGATTCTCTTGCCTACTGAATTTGACCC

[0865] TACTGTAATCGGTGATAAATGTGAATGCTTCCTCTTCTTCTTCTTCTTCTCAGAAATCAATTTCTGTTT

[0866] TGTTTTTGTTCATCTGTAGCTTGATATCATCCTCCCACTGGCTTAATTCACTCAAGTTCAGCTAGAAAC

[0867] GTCGATTTCTAGTGAAGTAACGAGGAAATTAGCGAAGAAGCGTCGAGAAATTCGATGAAGATGAATTCA

[0868] CGAAGCAAAATGAAGATTGGAGCAGAGAGTATGGGGATTGGAGAGTGGAAAGTGGTAGTGAAATAAGGT

[0869] AAGCTTTTGATTTTAATGTTTAGCAAATGTCCTATCAGTTTTCTCTTTTTGTCGAACGGTAATTTAGAG

[0870] TTTTTTTTGCTATATGGATTTTCGTTTTTGATGTATGTGACAACCCTCGGGATTGTTGATTTATTTCAA

[0871] AACTAAGAGTTTTTGCTTATTGTTCTCGTCTATTTTGGATATCAATCTTAGTTTTATATCTTTTCTAGT

[0872] TCTCTACGTGTTAAATGTTCAACACACTAGCAATTTGGCTGCAGCGTATGGATTATGGAACTATCAAGT

[0873] CTGTGGGATCGATAAATATGCTTCTCAGGAATTTGAGATTTTACAGTCTTTATGCTCATTGGGTTGAGT

[0874] ATAATATAGTAAAAAAATAGTCTAGA

[0875] SEQ ID NO.13

[0876] GAACCATGCATCTCAATCTTAATACTAAAAAATGCAACAAAATTCTAGTGGAGGGACCAGTACCAGTAC

[0877] ATTAGATATTATCTTTTATTACTATAATAATATTTTAATTAACACGAGACATAGGAATGTCAAGTGGTA

[0878] GCGGTAGGAGGGAGTTGGTTCAGTTTTTTAGATACTAGGAGACAGAACCGGAGGGGCCCATTGCAAGGC

[0879] CCAAGTTGAAGTCCAGCCGTGAATCAACAAAGAGAGGGCCCATAATACTGTCGATGAGCATTTCCCTAT

[0880] AATACAGTGTCCACAGTTGCCTTCCGCTAAGGGATAGCCACCCGCTATTCTCTTGACACGTGTCACTGA

[0881] AACCTGCTACAAATAAGGCAGGCACCTCCTCATTCTCACACTCACTCACTCACACAGCTCAACAAGTGG

[0882] TAACTTTTACTCATCTCCTCCAATTATTTCTGATTTCATGCATGTTTCCCTACATTCTATTATGAATCG

[0883] TGTTATGGTGTATAAACGTTGTTTCATATCTCATCTCATCTATTCTGATTTTGATTCTCTTGCCTACTG

[0884] AATTTGACCCTACTGTAATCGGTGATAAATGTGAATGCTTCCTCTTCTTCTTCTTCTTCTCAGAAATCA

[0885] ATTTCTGTTTTGTTTTTGTTCATCTGTAGCTTGGTAGATTCCCCTTTTTGTAGACCACACATCAC

[0886] SEQ ID NO.14

[0887] GGTACCGAACCATGCATCTCAATCTTAATACTAAAAAATGCAACAAAATTCTAGTGGAGGGACCAGTAC

[0888] CAGTACATTAGATATTATCTTTTATTACTATAATAATATTTTAATTAACACGAGACATAGGAATGTCAA

[0889] GTGGTAGCGGTAGGAGGGAGTTGGTTCAGTTTTTTAGATACTAGGAGACAGAACCGGAGGGGCCCATTG

[0890] CAAGGCCCAAGTTGAAGTCCAGCCGTGAATCAACAAAGAGAGGGCCCATAATACTGTCGATGAGCATTT

[0891] CCCTATAATACAGTGTCCACAGTTGCCTTCCGCTAAGGGATAGCCACCCGCTATTCTCTTGACACGTGT

[0892] CACTGAAACCTGCTACAAATAAGGCAGGCACCTCCTCATTCTCACACTCACTCACTCACACAGCTCAAG

[0893] AAGGATCCTCATATTCTAGTTGTATGTTGTTCAGAGAAGACCACAGATGTGATCATATTCTCATTGTAT

[0894] CAGATCTGTGACCACTTACCTGATACCTCCCATGAAGTTACCTGTATGATTATACGTGATCCAAAGCCA

[0895] TCACATCATGTTCACCTTCAGCTATTGGAGGAGAAGTGAGAAGTAGGAATTGCAATATGAGGAATAATA

[0896] AGAAAAACTTTGTAAAAGCTAAATTAGCTGGGTATGATATAGGGAGAAATGTGTAAACATTGTACTATA

[0897] TATAGTATATACACACGCATTATGTATTGCATTATGCACTGAATAATACCGCAGCATCAAAGAAGGAAT

[0898] TCAAGGTTAGAAATCTTCTCTATTTTTGGTTTTTGTCTGTTTAGATTCTCGAATTAGCTAATCAGGTGC

[0899] TGTTATAGCCCTTAATTTTGAGTTTTTTTTCGGTTGTTTTGATGGAAAAGGCCTAAAATTTGAGTTTTT

[0900] TTACGTTGGTTTGATGGAAAAGGCCTACAATTGGAGTTTTCCCCGTTGTTTTGATGAAAAAGCCCCTAG

[0901] TTTGAGATTTTTTTTCTGTCGATTCGATTCTAAAGGTTTAAAATTAGAGTTTTTACATTTGTTTGATGA

[0902] AAAAGGCCTTAAATTTGAGTTTTTCCGGTTGATTTGATGAAAAAGCCCTAGAATTTGTGTTTTTTCGTC

[0903] GGTTTGATTCTGAAGGCCTAAAATTTGAGTTTCTCCGGCTGTTTTGATGAAAAAGCCCTAAATTTGAGT

[0904] TTCTCCGGCTGTTTTGATGAAAAAGCCCTAAATTTGAGTTTTTTCCCCGTGTTTTAGATTGTTTGGTTT

[0905] TAATTCTCGAATCAGCTAATCAGGGAGTGTGAAAAGCCCTAAAATTTGAGTTTTTTTCGTTGTTCTGAT

[0906] TGTTGTTTTTATGAATTTGCAGATGGATATCCTTCTTTGATGCTGCGGTATTATTCAGTGCATAATGCA

[0907] ATACATAATGCGTGTGTATATACTATATATAGTACAATGTTTACACATTTCTCCCTATATCATACCCAG

[0908] CTAATTTAGCTTTTACAAAGTTTTTCTTATTATTCCTCATATTGCAATTCCTACTTCTCACTTCTCCTC

[0909] CAATAGCTGAAGGTGAACATGATGTGATGGCTTTGGATCACGTATAATCATACAGGTAACTTCATGGGA

[0910] GGTATCAGGTAAGTGGTCACAGATCTGATACAATGAGAATATGATCACATCTGTGGTCTTCTCTGAACA

[0911] ACATACAACTAGAATATGAAAGCTTTTGATTTTAATGTTTAGCAAATGTCCTATCAGTTTTCTCTTTTT

[0912] GTCGAACGGTAATTTAGAGTTTTTTTTGCTATATGGATTTTCGTTTTTGATGTATGTGACAACCCTCGG

[0913] GATTGTTGATTTATTTCAAAACTAAGAGTTTTTGCTTATTGTTCTCGTCTATTTTGGATATCAATCTTA

[0914] GTTTTATATCTTTTCTAGTTCTCTACGTGTTAAATGTTCAACACACTAGCAATTTGGCTGCAGCGTATG

[0915] GATTATGGAACTATCAAGTCTGTGGGATCGATAAATATGCTTCTCAGGAATTTGAGATTTTACAGTCTT

[0916] TATGCTCATTGGGTTGAG TATAATATAGTAAAAAAATAGTCTAGA

[0917] SEQ ID NO.15

[0918] GGTACCGAACCATGCATCTCAATCTTAATACTAAAAAATGCAACAAAATTCTAGTGGAGGGACCAGTAC

[0919] CAGTACATTAGATATTATCTTTTATTACTATAATAATATTTTAATTAACACGAGACATAGGAATGTCAA

[0920] GTGGTAGCGGTAGGAGGGAGTTGGTTCAGTTTTTTAGATACTAGGAGACAGAACCGGAGGGGCCCATTG

[0921] CAAGGCCCAAGTTGAAGTCCAGCCGTGAATCAACAAAGAGAGGGCCCATAATACTGTCGATGAGCATTT

[0922] CCCTATAATACAGTGTCCACAGTTGCCTTCCGCTAAGGGATAGCCACCCGCTATTCTCTTGACACGTGT

[0923] CACTGAAACCTGCTACAAATAAGGCAGGCACCTCCTCATTCTCACACTCACTCACTCACACAGCTCAAG

[0924] AAGGATCCTCATATTCTAGTTGTATGTTGTTCAGAGAAGACCACAGATGTGATCATATTCTCATTGTAT

[0925] CAGATCTGTGACCACTTACCTGATACCTCCCATGAAGTTACCTGTATGATTATACGTGATCCAAAGCCA

[0926] TCACATCATGTTCACCTTCAGCTATTGGAGGAGAAGTGAGAAGTAGGAATTGCAATATGAGGAATAATA

[0927] AGAAAAACTTTGTAAAAGCTAAATTAGCTGGGTATGATATAGGGAGAAATGTGTAAACATTGTACTATA

[0928] TATAGTATATACACACGCATTATGTATTGCATTATGCACTGAATAATACCGCAGCATCAAAGAAGGAAT

[0929] TCGTGGTAACTTTTACTCATCTCCTCCAATTATTTCTGATTTCATGCATGTTTCCCTACATTCTATTAT

[0930] GAATCGTGTTATGGTGTATAAACGTTGTTTCATATCTCATCTCATCTATTCTGATTTTGATTCTCTTGC

[0931] CTACTGAATTTGACCCTACTGTAATCGGTGATAAATGTGAATGCTTCCTCTTCTTCTTCTTCTTCTCAG

[0932] AAATCAATTTCTGTTTTGTTTTTGTTCATCTGTAGCTTGATATCCTTCTTTGATGCTGCGGTATTATTC

[0933] AGTGCATAATGCAATACATAATGCGTGTGTATATACTATATATAGTACAATGTTTACACATTTCTCCCT

[0934] ATATCATACCCAGCTAATTTAGCTTTTACAAAGTTTTTCTTATTATTCCTCATATTGCAATTCCTACTT

[0935] CTCACTTCTCCTCCAATAGCTGAGGTGAACATGATGTGATGGCTTTGGATCACGTATAATCATACAGG

[0936] TAACTTCATGGGAGGTATCAGGTAAGTGGTCACAGATCTGATACAATGAGAATATGATCACATCTGTGG

[0937] TCTTCTCTGAACAACATACAACTAGAATATGAAAGCTTTTGATTTTAATGTTTAGCAAATGTCCTATCA

[0938] GTTTTCTCTTTTTGTCGAACGGTAATTTAGAGTTTTTTTTGCTATATGGATTTTCGTTTTTGATGTATG

[0939] TGACAACCCTCGGGATTGTTGATTTATTTCAAAACTAAGAGTTTTTGCTTATTGTTCTCGTCTATTTTG

[0940] GATATCAATCTTAGTTTTATATCTTTTCTAGTTCTCTACGTGTTAAATGTTCAACACACTAGCAATTTG

[0941] GCTGCAGCGTATGGATTATGGAACTATCAAGTCTGTGGGATCGATAAATATGCTTCTCAGGAATTTGAG

[0942] ATTTTACAGTCTTTATGCTCATTGGGTTGAGTATAATATAGTAAAAAAATAGTCTAGA

[0943] SEQ ID NO. 16

[0944] TCATATTCTAGTTGTATGTTGTTCAGAGAAGACCACAGATGTGATCATATTCTCATTGTATCAGATCTG

[0945] TGACCACTTACCTGATACCTCCCATGAAGTTACCTGTATGATTATACGTGATCCAAAGCCATCACATCA

[0946] TGTTCACCTTCAGCTATTGGAGGAGAAGTGAGAAGTAGGAATTGCAATATGAGGAATAATAAGAAAAAC

[0947] TTTGTAAAAGCTAAATTAGCTGGGTATGATATAGGGAGAAATGTGTAAACATTGTACTATATATAGTAT

[0948] ATACACACGCATTATGTATTGCATTATGCACTGAATAATACCGCAGCATCAAAGAAG

[0949] SEQ ID NO. 17

[0950] GGTACCGAACCATGCATCTCAATCTTAATACTAAAAAATGCAACAAAATTCTAGTGGAGGGACCAGTAC

[0951] CAGTACATTAGATATTATCTTTTATTACTATAATAATATTTTAATTAACACGAGACATAGGAATGTCAA

[0952] GTGGTAGCGGTAGGAGGGAGTTGGTTCAGTTTTTTAGATACTAGGAGACAGAACCGGAGGGGCCCATTG

[0953] CAAGGCCCAAGTTGAAGTCCAGCCGTGAATCAACAAAGAGAGGGCCCATAATACTGTCGATGAGCATTT

[0954] CCCTATAATACAGTGTCCACAGTTGCCTTCCGCTAAGGGATAGCCACCCGCTATTCTCTTGACACGTGT

[0955] CACTGAAACCTGCTACAAATAAGGCAGGCACCTCCTCATTCTCACACTCACTCACTCACACAGCTCAAG

[0956] AAGGATCCTCATATTCTAGTTGTATGTTGTTCAGAGAAGACCACAGATGTGATCATATTCTCATTGTAT

[0957] CAGATCTGTGACCACTTACCTGATACCTCCCATGAAGTTACCTGTATGATTATACGTGATCCAAAGCCA

[0958] TCACATCATGTTCACCTTCAGCTATTGGAGGAGAAGTGAGAAGTAGGAATTGCAATATGAGGAATAATA

[0959] AGAAAAACTTTGTAAAAGCTAAATTAGCTGGGTATGATATAGGGAGAAATGTGTAAACATTGTACTATA

[0960] TATAGTATATACACACGCATTATGTATTGCATTATGCACTGAATAATACCGCAGCATCAAAGAAGGAAT

[0961] TCAAGGTTAGAAATCTTCTCTATTTTTGGTTTTTGTCTGTTTAGATTCTCGAATTAGCTAATCAGGTGC

[0962] TGTTATAGCCCTTAATTTTGAGTTTTTTTTCGGTTGTTTTGATGGAAAAGGCCTAAAATTTGAGTTTTT

[0963] TTACGTTGGTTTGATGGAAAAGGCCTACAATTGGAGTTTTCCCCGTTGTTTTGATGAAAAAGCCCCTAG

[0964] TTTGAGATTTTTTTTCTGTCGATTCGATTCTAAAGGTTTAAAATTAGAGTTTTTACATTTGTTTGATGA

[0965] AAAAGGCCTTAAATTTGAGTTTTTCCGGTTGATTTGATGAAAAAGCCCTAGAATTTGTGTTTTTTCGTC

[0966] GGTTTGATTCTGAAGGCCTAAAATTTGAGTTTCTCCGGCTGTTTTGATGAAAAAGCCCTAAATTTGAGT

[0967] TTCTCCGGCTGTTTTGATGAAAAAGCCCTAAATTTGAGTTTTTTCCCCGTGTTTTAGATTGTTTGGTTT

[0968] TAATTCTCGAATCAGCTAATCAGGGAGTGTGAAAAGCCCTAAAATTTGAGTTTTTTTCGTTGTTCTGAT

[0969] TGTTGTTTTTATGAATTTGCAGATGGATATCCTTCTTTGATGCTGCGGTATTATTCAGTGCATAATGCA

[0970] ATACATAATGCGTGTGTATATACTATATATAGTACAATGTTTACACATTTCTCCCTATATCATACCCAG

[0971] CTAATTTAGCTTTTACAAAGTTTTTCTTATTATTCCTCATATTGCAATTCCTACTTCTCACTTCTCCTC

[0972] CAATAGCTGAAGGTGAACATGATGTGATGGCTTTGGATCACGTATAATCATACAGGTAACTTCATGGGA

[0973] GGTATCAGGTAAGTGGTCACAGATCTGATACAATGAGAATATGATCACATCTGTGGTCTTCTCTGAACA

[0974] ACATACAACTAGAATATGAAAGCTTTTGATTTTAATGTTTAGCAAATGTCCTATCAGTTTTCTCTTTTT

[0975] GTCGAACGGTAATTTAGAGTTTTTTTTGCTATATGGATTTTCGTTTTTGATGTATGTGACAACCCTCGG

[0976] GATTGTTGATTTATTTCAAAACTAAGAGTTTTTGCTTATTGTTCTCGTCTATTTTGGATATCAATCTTA

[0977] GTTTTATATCTTTTCTAGTTCTCTACGTGTTAAATGTTCAACACACTAGCAATTTGGCTGCAGCGTATG

[0978] GATTATGGAACTATCAAGTCTGTGGGATCGATAAATATGCTTCTCAGGAATTTGAGATTTTACAGTCTT

[0979] TATGCTCATTGGGTTGAGTATAATATAGTAAAAAAATAGTCTAGA

[0980] SEQ ID NO. 18

[0981] GGTACCGAACCATGCATCTCAATCTTAATACTAAAAAATGCAACAAAATTCTAGTGGAGGGACCAGTAC

[0982] CAGTACATTAGATATTATCTTTTATTACTATAATAATATTTTAATTAACACGAGACATAGGAATGTCAA

[0983] GTGGTAGCGGTAGGAGGGAGTTGGTTCAGTTTTTTAGATACTAGGAGACAGAACCGGAGGGGCCCATTG

[0984] CAAGGCCCAAGTTGAAGTCCAGCCGTGAATCAACAAAGAGAGGGCCCATAATACTGTCGATGAGCATTT

[0985] CCCTATAATACAGTGTCCACAGTTGCCTTCCGCTAAGGGATAGCCACCCGCTATTCTCTTGACACGTGT

[0986] CACTGAAACCTGCTACAAATAAGGCAGGCACCTCCTCATTCTCACACTCACTCACTCACACAGCTCAAG

[0987] AAGGATCCTCATATTCTAGTTGTATGTTGTTCAGAGAAGACCACAGATGTGATCATATTCTCATTGTAT

[0988] CAGATCTGTGACCACTTACCTGATACCTCCCATGAAGTTACCTGTATGATTATACGTGATCCAAAGCCA

[0989] TCACATCATGTTCACCTTCAGCTATTGGAGGAGAAGTGAGAAGTAGGAATTGCAATATGAGGAATAATA

[0990] AGAAAAACTTTGTAAAAGCTAAATTAGCTGGGTATGATATAGGGAGAAATGTGTAAACATTGTACTATA

[0991] TATAGTATATACACACGCATTATGTATTGCATTATGCACTGAATAATACCGCAGCATCAAAGAAGGAAT

[0992] TCGTGGTAACTTTTACTCATCTCCTCCAATTATTTCTGATTTCATGCATGTTTCCCTACATTCTATTAT

[0993] GAATCGTGTTATGGTGTATAAACGTTGTTTCATATCTCATCTCATCTATTCTGATTTTGATTCTCTTGC

[0994] CTACTGAATTTGACCCTACTGTAATCGGTGATAAATGTGAATGCTTCCTCTTCTTCTTCTTCTTCTCAG

[0995] AAATCAATTTCTGTTTTGTTTTTGTTCATCTGTAGCTTGATATCCTTCTTTGATGCTGCGGTATTATTC

[0996] AGTGCATAATGCAATACATAATGCGTGTGTATATACTATATATAGTACAATGTTTACACATTTCTCCCT

[0997] ATATCATACCCAGCTAATTTAGCTTTTACAAAGTTTTTCTTATTATTCCTCATATTGCAATTCCTACTT

[0998] CTCACTTCTCCTCCAATAGCTGAAGGTGAACATGATGTGATGGCTTTGGATCACGTATAATCATACAGG

[0999] TAACTTCATGGGAGGTATCAGGTAAGTGGTCACAGATCTGATACAATGAGAATATGATCACATCTGTGG

[1000] TCTTCTCTGAACAACATACAACTAGAATATGAAAGCTTTTGATTTTAATGTTTAGCAAATGTCCTATCA

[1001] GTTTTCTCTTTTTGTCGAACGGTAATTTAGAGTTTTTTTTGCTATATGGATTTTCGTTTTTGATGTATG

[1002] TGACAACCCTCGGGATTGTTGATTTATTTCAAAACTAAGAGTTTTTGCTTATTGTTCTCGTCTATTTTG

[1003] GATATCAATCTTAGTTTTATATCTTTTCTAGTTCTCTACGTGTTAAATGTTCAACACACTAGCAATTTG

[1004] GCTGCAGCGTATGGATTATGGAACTATCAAGTCTGTGGGATCGATAAATATGCTTCTCAGGAATTTGAG

[1005] ATTTTACAGTCTTTATGCTCATTGGGTTGAGTATAATATAGTAAAAAAATAGTCTAGA

[1006] SEQ ID NO.19

[1007] GGTACCGAACCATGCATCTCAATCTTAATACTAAAAAATGCAACAAAATTCTAGTGGAGGGACCAGTAC

[1008] CAGTACATTAGATATTATCTTTTATTACTATAATAATATTTTAATTAACACGAGACATAGGAATGTCAA

[1009] GTGGTAGCGGTAGGAGGGAGTTGGTTCAGTTTTTTAGATACTAGGAGACAGAACCGGAGGGGCCCATTG

[1010] CAAGGCCCAAGTTGAAGTCCAGCCGTGAATCAACAAAGAGAGGGCCCATAATACTGTCGATGAGCATTT

[1011] CCCTATAATACAGTGTCCACAGTTGCCTTCCGCTAAGGGATAGCCACCCGCTATTCTCTTGACACGTGT

[1012] CACTGAAACCTGCTACAAATAAGGCAGGCACCTCCTCATTCTCACACTCACTCACTCACACAGCTCAAC

[1013] AAGTGGTAACTTTTACTCATCTCCTCCAATTATTTCTGATTTCATGCATGTTTCCCTACATTCTATTAT

[1014] GAATCGTGTTATGGTGTATAAACGTTGTTTCATATCTCATCTCATCTATTCTGATTTTGATTCTCTTGC

[1015] CTACTGAATTTGACCCTACTGTAATCGGTGATAAATGTGAATGCTTCCTCTTCTTCTTCTTCTTCTCAG

[1016] AAATCAATTTCTGTTTTGTTTTTGTTCATCTGTAGCTTGGTAGATTCCCCTTTTTGTAGACCACACATC

[1017] ACGGATCCTCATATTCTAGTTGTATGTTGTTCAGAGAAGACCACAGATGTGATCATATTCTCATTGTAT

[1018] CAGATCTGTGACCACTTACCTGATACCTCCCATGAAGTTACCTGTATGATTATACGTGATCCAAAGCCA

[1019] TCACATCATGTTCACCTTCAGCTATTGGAGGAGAAGTGAGAAGTAGGAATTGCAATATGAGGAATAATA

[1020] AGAAAAACTTTGTAAAAGCTAAATTAGCTGGGTATGATATAGGGAGAAATGTGTAAACATTGTACTATA

[1021] TATAGTATATACACACGCATTATGTATTGCATTATGCACTGAATAATACCGCAGCATCAAAGAAGGAAT

[1022] TCAAGGTTAGAAATCTTCTCTATTTTTGGTTTTTGTCTGTTTAGATTCTCGAATTAGCTAATCAGGTGC

[1023] TGTTATAGCCCTTAATTTTGAGTTTTTTTTCGGTTGTTTTGATGGAAAAGGCCTAAAATTTGAGTTTTT

[1024] TTACGTTGGTTTGATGGAAAAGGCCTACAATTGGAGTTTTCCCCGTTGTTTTGATGAAAAAGCCCCTAG

[1025] TTTGAGATTTTTTTTCTGTCGATTCGATTCTAAAGGTTTAAAATTAGAGTTTTTACATTTGTTTGATGA

[1026] AAAAGGCCTTAAATTTGAGTTTTTCCGGTTGATTTGATGAAAAAGCCCTAGAATTTGTGTTTTTTCGTC

[1027] GGTTTGATTCTGAAGGCCTAAAATTTGAGTTTCTCCGGCTGTTTTGATGAAAAAGCCCTAAATTTGAGT

[1028] TTCTCCGGCTGTTTTGATGAAAAAGCCCTAAATTTGAGTTTTTTCCCCGTGTTTTAGATTGTTTGGTTT

[1029] TAATTCTCGAATCAGCTAATCAGGGAGTGTGAAAAGCCCTAAAATTTGAGTTTTTTTCGTTGTTCTGAT

[1030] TGTTGTTTTTATGAATTTGCAGATGGATATCCTTCTTTGATGCTGCGGTATTATTCAGTGCATAATGCA

[1031] ATACATAATGCGTGTGTATATACTATATATAGTACAATGTTTACACATTTCTCCCTATATCATACCCAG

[1032] CTAATTTAGCTTTTACAAAGTTTTTCTTATTATTCCTCATATTGCAATTCCTACTTCTCACTTCTCCTC

[1033] CAATAGCTGAAGGTGAACATGATGTGATGGCTTTGGATCACGTATAATCATACAGGTAACTTCATGGGA

[1034] GGTATCAGGTAAGTGGTCACAGATCTGATACAATGAGAATATGATCACATCTGTGGTCTTCTCTGAACA

[1035] ACATACAACTAGAATATGAAAGCTTTTGATTTTAATGTTTAGCAAATGTCCTATCAGTTTTCTCTTTTT

[1036] GTCGAACGGTAATTTAGAGTTTTTTTTGCTATATGGATTTTCGTTTTTGATGTATGTGACAACCCTCGG

[1037] GATTGTTGATTTATTTCAAAACTAAGAGTTTTTGCTTATTGTTCTCGTCTATTTTGGATATCAATCTTA

[1038] GTTTTATATCTTTTCTAGTTCTCTACGTGTTAAATGTTCAACACACTAGCAATTTGGCTGCAGCGTATG

[1039] GATTATGGAACTATCAAGTCTGTGGGATCGATAAATATGCTTCTCAGGAATTTGAGATTTTACAGTCTT

[1040] TATGCTCATTGGGTTGAGTATAATATAGTAAAAAAATAGTCTAGA

[1041] SEQ ID NO.20

[1042] GGTACCGAACCATGCATCTCAATCTTAATACTAAAAAATGCAACAAAATTCTAGTGGAGGGACCAGTAC

[1043] CAGTACATTAGATATTATCTTTTATTACTATAATAATATTTTAATTAACACGAGACATAGGAATGTCAA

[1044] GTGGTAGCGGTAGGAGGGAGTTGGTTCAGTTTTTTAGATACTAGGAGACAGAACCGGAGGGGCCCATTG

[1045] CAAGGCCCAAGTTGAAGTCCAGCCGTGAATCAACAAAGAGAGGGCCCATAATACTGTCGATGAGCATTT

[1046] CCCTATAATACAGTGTCCACAGTTGCCTTCCGCTAAGGGATAGCCACCCGCTATTCTCTTGACACGTGT

[1047] CACTGAAACCTGCTACAAATAAGGCAGGCACCTCCTCATTCTCACACTCACTCACTCACACAGCTCAAG

[1048] AAGGATCCTCATATTCTAGTTGTATGTTGTTCAGAGAAGACCACAGATGTGATCATATTCTCATTGTAT

[1049] CAGATCTGTGACCACTTACCTGATACCTCCCATGAAGTTACCTGTATGATTATACGTGATCCAAAGCCA

[1050] TCACATCATGTTCACCTTCAGCTATTGGAGGAGAAGTGAGAAGTAGGAATTGCAATATGAGGAATAATA

[1051] AGAAAAACTTTGTAAAAGCTAAATTAGCTGGGTATGATATAGGGAGAAATGTGTAAACATTGTACTATA

[1052] TATAGTATATACACACGCATTATGTATTGCATTATGCACTGAATAATACCGCAGCATCAAAGAAGGAAT

[1053] TCGTGGTAACTTTTACTCATCTCCTCCAATTATTTCTGATTTCATGCATGTTTCCCTACATTCTATTAT

[1054] GAATCGTGTTATGGTGTATAAACGTTGTTTCATATCTCATCTCATCTATTCTGATTTTGATTCTCTTGC

[1055] CTACTGAATTTGACCCTACTGTAATCGGTGATAAATGTGAATGCTTCCTCTTCTTCTTCTTCTTCTCAG

[1056] AAATCAATTTCTGTTTTGTTTTTGTTCATCTGTAGCTTGATATCCTTCTTTGATGCTGCGGTATTATTC

[1057] AGTGCATAATGCAATACATAATGCGTGTGTATATACTATATATAGTACAATGTTTACACATTTCTCCCT

[1058] ATATCATACCCAGCTAATTTAGCTTTTACAAAGTTTTTCTTATTATTCCTCATATTGCAATTCCTACTT

[1059] CTCACTTCTCCTCCAATAGCTGAAGGTGAACATGATGTGATGGCTTTGGATCACGTATAATCATACAGG

[1060] TAACTTCATGGGAGGTATCAGGTAAGTGGTCACAGATCTGATACAATGAGAATATGATCACATCTGTGG

[1061] TCTTCTCTGAACAACATACAACTAGAATATGAAAGCTTTTGATTTTAATGTTTAGCAAATGTCCTATCA

[1062] GTTTTCTCTTTTTGTCGAACGGTAATTTAGAGTTTTTTTTGCTATATGGATTTTCGTTTTTGATGTATG

[1063] TGACAACCCTCGGGATTGTTGATTTATTTCAAAACTAAGAGTTTTTGCTTATTGTTCTCGTCTATTTTG

[1064] GATATCAATCTTAGTTTTATATCTTTTCTAGTTCTCTACGTGTTAAATGTTCAACACACTAGCAATTTG

[1065] GCTGCAGCGTATGGATTATGGAACTATCAAGTCTGTGGGATCGATAAATATGCTTCTCAGGAATTTGAG

[1066] ATTTTACAGTCTTTATGCTCATTGGGTTGAGTATAATATAGTAAAAAAATAGTCTAGA

[1067] SEQ ID NO.21

[1068] TTAGAGTGTGGGTAAGTAATTAAGTTAGGGATTTGTGGGAAATGGACAAATATAAGAGAGTGCAGGGGA

[1069] GTAGTGCAGGAGATTTTCGTGCTTTTATTGATAAATAAAAAAAGGGTGACATTTAATTTCCACAAGAGG

[1070] ACGCAACACAACACACTTAATTCCTGTGTGTGAATCAATAATTGACTTCTCCAATCTTCATCAATAAAA

[1071] TAATTCACAATCCTCACTCTCTTATCACTCTCATTCGAAAAGCTAGATTTGCATAGAGAGCACAAA

[1072] SEQ ID NO:22

[1073] GAGGGGGAAGTGAATGAAAAATAACAAAGGCACAGTAAGTAGTTTCTCTTTTTATCATGTGATGAAGGT

[1074] ATATAATGTATGTGTAAGAGGATGATGTTATTACCACATAATAAGAGATGAAGAGTCTCATTTTCTGCT

[1075] TAAAAAAACAATTCACTGGC

[1076] SEQ ID NO.23

[1077] GGTACCGAACCATGCATCTCAATCTTAATACTAAAAAATGCAACAAAATTCTAGTGGAGGGACCAGTAC

[1078] CAGTACATTAGATATTATCTTTTATTACTATAATAATATTTTAATTAACACGAGACATAGGAATGTCAA

[1079] GTGGTAGCGGTAGGAGGGAGTTGGTTCAGTTTTTTAGATACTAGGAGACAGAACCGGAGGGGCCCATTG

[1080] CAAGGCCCAAGTTGAAGTCCAGCCGTGAATCAACAAAGAGAGGGCCCATAATACTGTCGATGAGCATTT

[1081] CCCTATAATACAGTGTCCACAGTTGCCTTCCGCTAAGGGATAGCCACCCGCTATTCTCTTGACACGTGT

[1082] CACTGAAACCTGCTACAAATAAGGCAGGCACCTCCTCATTCTCACACTCACTCACTCACACAGCTCAAG

[1083] AAGGATCCGAGTGTGGGTAAGTAATTAAGTTAGGGATTTGTGGGAAATGGACAAATATAAGAGAGTGCA

[1084] GGGGAGTAGTGCAGGAGATTTTCGTGCTTTTATTGATAAATAAAAAAAGGGTGACATTTAATTTCCACA

[1085] AGAGGACGCAACACAACACACTTAATTCCTGTGTGTGAATCAATAATTGACTTCTCCAATCTTCATCAA

[1086] TAAAATAATTCACAATCCTCACTCTCTTATCACTCTCATTCGAAAAGCTAGATTTGCATAGAGAGCACA

[1087] GAATTCAAGGTTAGAAATCTTCTCTATTTTTGGTTTTTGTCTGTTTAGATTCTCGAATTAGCTAATCAG

[1088] GTGCTGTTATAGCCCTTAATTTTGAGTTTTTTTTCGGTTGTTTTGATGGAAAAGGCCTAAAATTTGAGT

[1089] TTTTTTACGTTGGTTTGATGGAAAAGGCCTACAATTGGAGTTTTCCCCGTTGTTTTGATGAAAAAGCCC

[1090] CTAGTTTGAGATTTTTTTTCTGTCGATTCGATTCTAAAGGTTTAAAATTAGAGTTTTTACATTTGTTTG

[1091] ATGAAAAAGGCCTTAAATTTGAGTTTTTCCGGTTGATTTGATGAAAAAGCCCTAGAATTTGTGTTTTTT

[1092] CGTCGGTTTGATTCTGAAGGCCTAAAATTTGAGTTTCTCCGGCTGTTTTGATGAAAAAGCCCTAAATTT

[1093] GAGTTTCTCCGGCTGTTTTGATGAAAAAGCCCTAAATTTGAGTTTTTTCCCCGTGTTTTAGATTGTTTG

[1094] GTTTTAATTCTCGAATCAGCTAATCAGGGAGTGTGAAAAGCCCTAAAATTTGAGTTTTTTTCGTTGTTC

[1095] TGATTGTTGTTTTTATGAATTTGCAGATGGATATCTGTGCTCTCTATGCAAATCTAGCTTTTCGAATGA

[1096] GAGTGATAAGAGAGTGAGGATTGTGAATTATTTTATTGATGAAGATTGGAGAAGTCAATTATTGATTCA

[1097] CACACAGGAATTAAGTGTGTTGTGTTGCGTCCTCTTGTGGAAATTAAATGTCACCCTTTTTTTATTTAT

[1098] CAATAAAAGCACGAAAATCTCCTGCACTACTCCCCTGCACTCTCTTATATTTGTCCATTTCCCACAAAT

[1099] CCCTAACTTAATTACTTACCCACACTCTAAGCTTTTGATTTTAATGTTTAGCAAATGTCCTATCAGTTT

[1100] TCTCTTTTTGTCGAACGGTAATTTAGAGTTTTTTTTGCTATATGGATTTTCGTTTTTGATGTATGTGAC

[1101] AACCCTCGGGATTGTTGATTTATTTCAAAACTAAGAGTTTTTGCTTATTGTTCTCGTCTATTTTGGATA

[1102] TCAATCTTAGTTTTATATCTTTTCTAGTTCTCTACGTGTTAAATGTTCAACACACTAGCAATTTGGCTG

[1103] CAGCGTATGGATTATGGAACTATCAAGTCTGTGGGATCGATAAATATGCTTCTCAGGAATTTGAGATTT

[1104] TACAGTCTTTATGCTCATTGGGTTGAGTATAATATAGTAAAAAAATAGTCTAGA

[1105] SEQ ID NO.24

[1106] GGTACCGAACCATGCATCTCAATCTTAATACTAAAAAATGCAACAAAATTCTAGTGGAGGGACCAGTAC

[1107] CAGTACATTAGATATTATCTTTTATTACTATAATAATATTTTAATTAACACGAGACATAGGAATGTCAA

[1108] GTGGTAGCGGTAGGAGGGAGTTGGTTCAGTTTTTTAGATACTAGGAGACAGAACCGGAGGGGCCCATTG

[1109] CAAGGCCCAAGTTGAAGTCCAGCCGTGAATCAACAAAGAGAGGGCCCATAATACTGTCGATGAGCATTT

[1110] CCCTATAATACAGTGTCCACAGTTGCCTTCCGCTAAGGGATAGCCACCCGCTATTCTCTTGACACGTGT

[1111] CACTGAAACCTGCTACAAATAAGGCAGGCACCTCCTCATTCTCACACTCACTCACTCACACAGCTCAAG

[1112] AAGGATCCGAGTGTGGGTAAGTAATTAAGTTAGGGATTTGTGGGAAATGGACAAATATAAGAGAGTGCA

[1113] GGGGAGTAGTGCAGGAGATTTTCGTGCTTTTATTGATAAATAAAAAAAGGGTGACATTTAATTTCCACA

[1114] AGAGGACGCAACACAACACACTTAATTCCTGTGTGTGAATCAATAATTGACTTCTCCAATCTTCATCAA

[1115] TAAAATAATTCACAATCCTCACTCTCTTATCACTCTCATTCGAAAAGCTAGATTTGCATAGAGAGCACA

[1116] GAATTCGTGGTAACTTTTACTCATCTCCTCCAATTATTTCTGATTTCATGCATGTTTCCCTACATTCTA

[1117] TTATGAATCGTGTTATGGTGTATAAACGTTGTTTCATATCTCATCTCATCTATTCTGATTTTGATTCTC

[1118] TTGCCTACTGAATTTGACCCTACTGTAATCGGTGATAAATGTGAATGCTTCCTCTTCTTCTTCTTCTTC

[1119] TCAGAAATCAATTTCTGTTTTGTTTTTGTTCATCTGTAGCTTGATATCTGTGCTCTCTATGCAAATCTA

[1120] GCTTTTCGAATGAGAGTGATAAGAGAGTGAGGATTGTGAATTATTTTATTGATGAAGATTGGAGAAGTC

[1121] AATTATTGATTCACACACAGGAATTAAGTGTGTTGTGTTGCGTCCTCTTGTGGAAATTAAATGTCACCC

[1122] TTTTTTTATTTATCAATAAAAGCACGAAAATCTCCTGCACTACTCCCCTGCACTCTCTTATATTTGTCC

[1123] ATTTCCCACAAATCCCTAACTTAATTACTTACCCACACTCTAAGCTTTTGATTTTAATGTTTAGCAAAT

[1124] GTCCTATCAGTTTTCTCTTTTTGTCGAACGGTAATTTAGAGTTTTTTTTGCTATATGGATTTTCGTTTT

[1125] TGATGTATGTGACAACCCTCGGGATTGTTGATTTATTTCAAAACTAAGAGTTTTTGCTTATTGTTCTCG

[1126] TCTATTTTGGATATCAATCTTAGTTTTATATCTTTTCTAGTTCTCTACGTGTTAAATGTTCAACACACT

[1127] AGCAATTTGGCTGCAGCGTATGGATTATGGAACTATCAAGTCTGTGGGATCGATAAATATGCTTCTCAG

[1128] GAATTTGAGATTTTACAGTCTTTATGCTCATTGGGTTGAGTATAATATAGTAAAAAAATAGTCTAGA

[1129] SEQ ID NO.25

[1130] GGTACCGAACCATGCATCTCAATCTTAATACTAAAAAATGCAACAAAATTCTAGTGGAGGGACCAGTAC

[1131] CAGTACATTAGATATTATCTTTTATTACTATAATAATATTTTAATTAACACGAGACATAGGAATGTCAA

[1132] GTGGTAGCGGTAGGAGGGAGTTGGTTCAGTTTTTTAGATACTAGGAGACAGAACCGGAGGGGCCCATTG

[1133] CAAGGCCCAAGTTGAAGTCCAGCCGTGAATCAACAAAGAGAGGGCCCATAATACTGTCGATGAGCATTT

[1134] CCCTATAATACAGTGTCCACAGTTGCCTTCCGCTAAGGGATAGCCACCCGCTATTCTCTTGACACGTGT

[1135] CACTGAAACCTGCTACAAATAAGGCAGGCACCTCCTCATTCTCACACTCACTCACTCACACAGCTCAAC

[1136] AAGTGGTAACTTTTACTCATCTCCTCCAATTATTTCTGATTTCATGCATGTTTCCCTACATTCTATTAT

[1137] GAATCGTGTTATGGTGTATAAACGTTGTTTCATATCTCATCTCATCTATTCTGATTTTGATTCTCTTGC

[1138] CTACTGAATTTGACCCTACTGTAATCGGTGATAAATGTGAATGCTTCCTCTTCTTCTTCTTCTTCTCAG

[1139] AAATCAATTTCTGTTTTGTTTTTGTTCATCTGTAGCTTGGTAGATTCCCCTTTTTGTAGACCACACATC

[1140] ACGGATCCGAGTGTGGGTAAGTAATTAAGTTAGGGATTTGTGGGAAATGGACAAATATAAGAGAGTGCA

[1141] GGGGAGTAGTGCAGGAGATTTTCGTGCTTTTATTGATAAATAAAAAAAGGGTGACATTTAATTTCCACA

[1142] AGAGGACGCAACACAACACACTTAATTCCTGTGTGTGAATCAATAATTGACTTCTCCAATCTTCATCAA

[1143] TAAAATAATTCACAATCCTCACTCTCTTATCACTCTCATTCGAAAAGCTAGATTTGCATAGAGAGCACA

[1144] GAATTCAAGGTTAGAAATCTTCTCTATTTTTGGTTTTTGTCTGTTTAGATTCTCGAATTAGCTAATCAG

[1145] GTGCTGTTATAGCCCTTAATTTTGAGTTTTTTTTCGGTTGTTTTGATGGAAAAGGCCTAAAATTTGAGT

[1146] TTTTTTACGTTGGTTTGATGGAAAAGGCCTACAATTGGAGTTTTCCCCGTTGTTTTGATGAAAAAGCCC

[1147] CTAGTTTGAGATTTTTTTTCTGTCGATTCGATTCTAAAGGTTTAAAATTAGAGTTTTTACATTTGTTTG

[1148] ATGAAAAAGGCCTTAAATTTGAGTTTTTCCGGTTGATTTGATGAAAAAGCCCTAGAATTTGTGTTTTTT

[1149] CGTCGGTTTGATTCTGAAGGCCTAAAATTTGAGTTTCTCCGGCTGTTTTGATGAAAAAGCCCTAAATTT

[1150] GAGTTTCTCCGGCTGTTTTGATGAAAAAGCCCTAAATTTGAGTTTTTTCCCCGTGTTTTAGATTGTTTG

[1151] GTTTTAATTCTCGAATCAGCTAATCAGGGAGTGTGAAAAGCCCTAAAATTTGAGTTTTTTTCGTTGTTC

[1152] TGATTGTTGTTTTTATGAATTTGCAGATGGATATCTGTGCTCTCTATGCAAATCTAGCTTTTCGAATGA

[1153] GAGTGATAAGAGAGTGAGGATTGTGAATTATTTTATTGATGAAGATTGGAGAAGTCAATTATTGATTCA

[1154] CACACAGGAATTAAGTGTGTTGTGTTGCGTCCTCTTGTGGAAATTAAATGTCACCCTTTTTTTATTTAT

[1155] CAATAAAAGCACGAAAATCTCCTGCACTACTCCCCTGCACTCTCTTATATTTGTCCATTTCCCACAAAT

[1156] CCCTAACTTAATTACTTACCCACACTCTAAGCTTTTGATTTTAATGTTTAGCAAATGTCCTATCAGTTT

[1157] TCTCTTTTTGTCGAACGGTAATTTAGAGTTTTTTTTGCTATATGGATTTTCGTTTTTGATGTATGTGAC

[1158] AACCCTCGGGATTGTTGATTTATTTCAAAACTAAGAGTTTTTGCTTATTGTTCTCGTCTATTTTGGATA

[1159] TCAATCTTAGTTTTATATCTTTTCTAGTTCTCTACGTGTTAAATGTTCAACACACTAGCAATTTGGCTG

[1160] CAGCGTATGGATTATGGAACTATCAAGTCTGTGGGATCGATAAATATGCTTCTCAGGAATTTGAGATTT

[1161] TACAGTCTTTATGCTCATTGGGTTGAGTATAATATAGTAAAAAAATAGTCTAGA

[1162] SEQ ID NO.26

[1163] GGTACCGAACCATGCATCTCAATCTTAATACTAAAAAATGCAACAAAATTCTAGTGGAGGGACCAGTAC

[1164] CAGTACATTAGATATTATCTTTTATTACTATAATAATATTTTAATTAACACGAGACATAGGAATGTCAA

[1165] GTGGTAGCGGTAGGAGGGAGTTGGTTCAGTTTTTTAGATACTAGGAGACAGAACCGGAGGGGCCCATTG

[1166] CAAGGCCCAAGTTGAAGTCCAGCCGTGAATCAACAAAGAGAGGGCCCATAATACTGTCGATGAGCATTT

[1167] CCCTATAATACAGTGTCCACAGTTGCCTTCCGCTAAGGGATAGCCACCCGCTATTCTCTTGACACGTGT

[1168] CACTGAAACCTGCTACAAATAAGGCAGGCACCTCCTCATTCTCACACTCACTCACTCACACAGCTCAAC

[1169] AAGTGGTAACTTTTACTCATCTCCTCCAATTATTTCTGATTTCATGCATGTTTCCCTACATTCTATTAT

[1170] GAATCGTGTTATGGTGTATAAACGTTGTTTCATATCTCATCTCATCTATTCTGATTTTGATTCTCTTGC

[1171] CTACTGAATTTGACCCTACTGTAATCGGTGATAAATGTGAATGCTTCCTCTTCTTCTTCTTCTTCTCAG

[1172] AAATCAATTTCTGTTTTGTTTTTGTTCATCTGTAGCTTGGTAGATTCCCCTTTTTGTAGACCACACATC

[1173] ACGGATCCGAGTGTGGGTAAGTAATTAAGTTAGGGATTTGTGGGAAATGGACAAATATAAGAGAGTGCA

[1174] GGGGAGTAGTGCAGGAGATTTTCGTGCTTTTATTGATAAATAAAAAAAGGGTGACATTTAATTTCCACA

[1175] AGAGGACGCAACACAACACACTTAATTCCTGTGTGTGAATCAATAATTGACTTCTCCAATCTTCATCAA

[1176] TAAAATAATTCACAATCCTCACTCTCTTATCACTCTCATTCGAAAAGCTAGATTTGCATAGAGAGCACA

[1177] GAATTCGTGGTAACTTTTACTCATCTCCTCCAATTATTTCTGATTTCATGCATGTTTCCCTACATTCTA

[1178] TTATGAATCGTGTTATGGTGTATAAACGTTGTTTCATATCTCATCTCATCTATTCTGATTTTGATTCTC

[1179] TTGCCTACTGAATTTGACCCTACTGTAATCGGTGATAAATGTGAATGCTTCCTCTTCTTCTTCTTCTTC

[1180] TCAGAAATCAATTTCTGTTTTGTTTTTGTTCATCTGTAGCTTGATATCTGTGCTCTCTATGCAAATCTA

[1181] GCTTTTCGAATGAGAGTGATAAGAGAGTGAGGATTGTGAATTATTTTATTGATGAAGATTGGAGAAGTC

[1182] AATTATTGATTCACACACAGGAATTAAGTGTGTTGTGTTGCGTCCTCTTGTGGAAATTAAATGTCACCC

[1183] TTTTTTTATTTATCAATAAAAGCACGAAAATCTCCTGCACTACTCCCCTGCACTCTCTTATATTTGTCC

[1184] ATTTCCCACAAATCCCTAACTTAATTACTTACCCACACTCTAAGCTTTTGATTTTAATGTTTAGCAAAT

[1185] GTCCTATCAGTTTTCTCTTTTTGTCGAACGGTAATTTAGAGTTTTTTTTGCTATATGGATTTTCGTTTT

[1186] TGATGTATGTGACAACCCTCGGGATTGTTGATTTATTTCAAAACTAAGAGTTTTTGCTTATTGTTCTCG

[1187] TCTATTTTGGATATCAATCTTAGTTTTATATCTTTTCTAGTTCTCTACGTGTTAAATGTTCAACACACT

[1188] AGCAATTTGGCTGCAGCGTATGGATTATGGAACTATCAAGTCTGTGGGATCGATAAATATGCTTCTCAG

[1189] GAATTTGAGATTTTACAGTCTTTATGCTCATTGGGTTGAGTATAATATAGTAAAAAAATAGTCTAGA

[1190] SEQ ID NO.27

[1191] ATGGCAAGCTTGTGCAATAGTAGTAGTACATCTCTCAAAACTCCTTTTACTTCTTCCTCCACTTCTTTA

[1192] TCTTCCACTCCTAAGCCCTCTCAACTTTTCATCCATGGAAAACGTAACCAAATGTTCAAAGTTTCATGC

[1193] AAGGTTATCAATAATAACGGTGACCAAAACGTTGAAACGAATTCTGTTGATCGAAGAAATGTTCTTCTT

[1194] GGCTTAGGTGGTCTTTATGGTGTTGCTAATGCTATACCATTAGCTGCATCCGCTGCTCCAACTCCACCT

[1195] CCTGATCTCTCGTCTTGTAGTATAGCCAGGATTAACGAAAATCAGGTGGTGCCGTACAGTTGTTGCGCG

[1196] CCTAAGCCTGATGATATGGAGAAAGTTCCGTATTACAAGTTCCCTTCTATGACTAAGCTCCGTGTCCGT

[1197] CAGCCTGCTCATGAAGCTAATGAGGAGTATATTGCCAAGTACAATCTGGCGATTAGTCGAATGAGAGAT

[1198] CTTGATAAGACACAACCTTTAAACCCTATTGGTTTTAAGCAACAAGCTAATATACATTGTGCTTATTGT

[1199] AATGGTGCTTATAGAATTGGTGGCAAAGAGTTACAAGTTCATAATTCTTGGCTTTTCTTCCCGTTCCAT

[1200] AGATGGTACTTGTACTTCCACGAGAGAATCGTGGGAAAATTCATTGATGATCCAACTTTCGCTTTGCCA

[1201] TATTGGAATTGGGACCATCCAAAGGGTATGCGTTTTCCTGCCATGTATGATCGTGAAGGGACTTCCCTT

[1202] TTCGATGTAACACGTGACCAAAGTCACCGAAATGGAGCAGTAATCGATCTTGGTTTTTTCGGCAATGAA

[1203] GTCGAAACAACTCAACTCCAGTTGATGAGCAATAATTTAACACTAATGTACCGTCAAATGGTAACTAAT

[1204] GCTCCATGTCCTCGGATGTTCTTTGGTGGGCCTTATGATCTCGGGATTAACACTGAACTCCCGGGAACT

[1205] ATAGAAAACATTCCTCACGGTCCTGTCCACATCTGGTCTGGTACAGTGAGAGGTTCAACTTTGCCCAAT

[1206] GGTGCAATATCAAACGGTGAGAATATGGGTCATTTTTACTCAGCTGCTTTGGACCCGGTTTTCTTTTGC

[1207] CATCACAGCAATGTGGATCGGATGTGGAGCGAATGGAAAGCGACAGGAGGGAAAAGAACAGATATCACA

[1208] CATAAAGGTTGGTTGAACTCCGAGTTCTTTTTCTATGATGAAAATGAAAACCCTTACCGTGTGAAAGTC

[1209] CGAGACTGTTTGGACACGAAGAAGATGGGGTATGATTATGCACCAATGGCCACCCCGTGGCGTAACTTC

[1210] AAGCCAATAACAAAAACTACAGCTGGGAAAGTGAATACAGCTTCTCTTCCGCCAGCTAGCAATGTATTC

[1211] CCAGTGGCTAAACTCGACAAAGCAATTTCGTTTTCCATCAATAGGCCGACTTCGTCAAGGACTCAACAA

[1212] GAGAAAAATGCACAAGAGGAGATGTTGACATTCAGTAGCATAAGATATGATAACAGAGGGTACATAAGG

[1213] TTCGATGTGTTCCTGAACGTGGACAATAATGTGAATGCGAATGAGCTTGACAAGGCGGAGTTTGCGGGG

[1214] AGTTATACTAGTTTGCCACATGTTCATAGAGCTGGTGAGACTAATCATATCGCGACTGTTGATTTCCAG

[1215] CTGGCGATAACGGAACTGTTGGAGGATATTGGTTTGGAAGATGAAGATACTATTGCGGTGACTCTGGTG

[1216] CCAAAGAGAGGTGGTGAAGGTATCTCCATTGAAAGTGCGACGATCAGTCTTGCAGATTGTTAA

[1217] SEQID NO.28

[1218] ATGGCAAGCTTGTGCAATAGTAGTAGTACATCTCTCAAAACTCCTTTTACTTCTTCCTCCACTTCTTTA

[1219] TCTTCCACTCCTAAGCCCTCTCAACTTTTCATCCATGGAAAACGTAACCAAATGTTCAAAGTTTCATGC

[1220] AAGGTTATCAATAATAACGGTGACCAAAACGTTGAAACGAATTCTGTTGATCGAAGAAATGTTCTTCTT

[1221] GGCTTAGGTGGTCTTTATGGTGTTGCTAATGCTATACCATTAGCTGCATCCGCTGCTCCAACTCCACCT

[1222] CCTGATCTCTCGTCTTGTAGTATAGCCAGGATTAACGAAAATCAGGTGGTGCCGTACAGTTGTTGCGCG

[1223] CCTAAGCCTGATGATATGGAGAAAGTTCCGTATTACAAGTTCCCTTCTATGACTAAGCTCCGTGTCCGT

[1224] CAGCCTGCTCATGAAGCTAATGAGGAGTATATTGCCAAGTACAATCTGGCGATTAGTCGAATGAGAGAT

[1225] CTTGATAAGACACAACCTTTAAACCCTATTGGTTTTAAGCAACAAGCTAATATACAGTGGGCTTATGGT

[1226] AATGGTGCTTATAGAATTGGTGGCAAAGAGTTACAAGTTCATAATTCTTGGCTTTTCTTCCCGTTCCAT

[1227] AGATGGTACTTGTACTTCCACGAGAGAATCGTGGGAAAATTCATTGATGATCCAACTTTCGCTTTGCCA

[1228] TATTGGAATTGGGACCATCCAAAGGGTATGCGTTTTCCTGCCATGTATGATCGTGAAGGGACTTCCCTT

[1229] TTCGATGTAACACGTGACCAAAGTCACCGAAATGGAGCAGTAATCGATCTTGGTTTTTTCGGCAATGAA

[1230] GTCGAAACAACTCAACTCCAGTTGATGAGCAATAATTTAACACTAATGTACCGTCAAATGGTAACTAAT

[1231] GCTCCATGTCCTCGGATGTTCTTTGGTGGGCCTTATGATCTCGGGATTAACACTGAACTCCCGGGAACT

[1232] ATAGGAAACATTCCTCTCGGTCCTGTCCACATCTGGTCTGGTACAGTGAGAGGTTCAACTTTGCCCAAT

[1233] GGTGCAATATCAAACGGTGAGAATATGGGTCATTTTTACTCAGCTGCTTTGGACCCGGTTTTCTTTTGC

[1234] CATCACAGCAATGTGGATCGGATGTGGAGCGAATGGAAAGCGACAGGAGGGAAAAGAACAGATATCACA

[1235] CATAAAGGTTGGTTGAACTCCGAGTTCTTTTTCTATGATGAAAATGAAAACCCTTACCGTGTGAAAGTC

[1236] CGAGACTGTTTGGACACGAAGAAGATGGGGTATGATTATGCACCAATGGCCACCCCGTGGCGTAACTTC

[1237] AAGCCAATAACAAAAACTACAGCTGGGAAAGTGAATACAGCTTCTCTTCCGCCAGCTAGCAATGTATTC

[1238] CCAGTGGCTAAACTCGACAAAGCAATTTCGTTTTCCATCAATAGGCCGACTTCGTCAAGGACTCAACAA

[1239] GAGAAAAATGCACAAGAGGAGATGTTGACATTCAGTAGCATAAGATATGATAACAGAGGGTACATAAGG

[1240] TTCGATGTGTTCCTGAACGTGGACAATAATGTGAATGCGAATGAGCTTGACAAGGCGGAGTTTGCGGGG

[1241] AGTTATAC TAGTTTGCCACATGTTCATAGAGCTGGTGAGACTAATCATATCGCGACTGTTGATTTCCA
G

[1242] CTGGCGATAACGGAACTGTTGGAGGATATTGGTTTGGAAGATGAAGATACTATTGCGGTGACTCTGGTG

[1243] CCAAAGAGAGGTGGTGAAGGTATCTCCATTGAAAGTGCGACGATCAGTCTTGCAGATTGTTAA

[1244] SEQ ID NO.29

[1245] TTAGTCTCTATTGAATCTGCTGAGATTACACTTTGATGGATGATGCTCTGTTTTTGTTTTCTTGTTCTG

[1246] TTTTTTCCTCTGTTGAAATCAGCTTTGTTGCTTGATTTCATTGAAGTTGTTATTCAAGAATAAATCAGT

[1247] TACAATTATGTTTGGG

[1248] SEQ ID NO.30

[1249] GGTACCGAACCATGCATCTCAATCTTAATACTAAAAAATGCAACAAAATTCTAGTGGAGGGACCAGTAC

[1250] CAGTACATTAGATATTATCTTTTATTACTATAATAATATTTTAATTAACACGAGACATAGGAATGTCAA

[1251] GTGGTAGCGGTAGGAGGGAGTTGGTTCAGTTTTTTAGATACTAGGAGACAGAACCGGAGGGGCCCATTG

[1252] CAAGGCCCAAGTTGAAGTCCAGCCGTGAATCAACAAAGAGAGGGCCCATAATACTGTCGATGAGCATTT

[1253] CCCTATAATACAGTGTCCACAGTTGCCTTCCGCTAAGGGATAGCCACCCGCTATTCTCTTGACACGTGT

[1254] CACTGAAACCTGCTACAAATAAGGCAGGCACCTCCTCATTCTCACACTCACTCACTCACACAGCTCAAG

[1255] AAGGATCCTTAGTCTCTATTGAATCTGCTGAGATTACACTTTGATGGATGATGCTCTGTTTTTGTTTTC

[1256] TTGTTCTGTTTTTTCCTCTGTTGAAATCAGCTTTGTTGCTTGATTTCATTGAAGTTGTTATTCAAGAAT

[1257] AAATCAGTTACAATTATGGAATTCAAGGTTAGAAATCTTCTCTATTTTTGGTTTTTGTCTGTTTAGATT

[1258] CTCGAATTAGCTAATCAGGTGCTGTTATAGCCCTTAATTTTGAGTTTTTTTTCGGTTGTTTTGATGGAA

[1259] AAGGCCTAAAATTTGAGTTTTTTTACGTTGGTTTGATGGAAAAGGCCTACAATTGGAGTTTTCCCCGTT

[1260] GTTTTGATGAAAAAGCCCCTAGTTTGAGATTTTTTTTCTGTCGATTCGATTCTAAAGGTTTAAAATTAG

[1261] AGTTTTTACATTTGTTTGATGAAAAAGGCCTTAAATTTGAGTTTTTCCGGTTGATTTGATGAAAAAGCC

[1262] CTAGAATTTGTGTTTTTTCGTCGGTTTGATTCTGAAGGCCTAAAATTTGAGTTTCTCCGGCTGTTTTGA

[1263] TGAAAAAGCCCTAAATTTGAGTTTCTCCGGCTGTTTTGATGAAAAAGCCCTAAATTTGAGTTTTTTCCC

[1264] CGTGTTTTAGATTGTTTGGTTTTAATTCTCGAATCAGCTAATCAGGGAGTGTGAAAAGCCCTAAAATTT

[1265] GAGTTTTTTTCGTTGTTCTGATTGTTGTTTTTATGAATTTGCAGATGGATATCCTTCTTTGATGCTGAT

[1266] CCATAATTGTAACTGATTTATTCTTGAATAACAACTTCAATGAAATCAAGCAACAAAGCTGATTTCAAC

[1267] AGAGGAAAAAACAGAACAAGAAAACAAAAACAGAGCATCATCCATCAAAGTGTAATCTCAGCAGATTCA

[1268] ATAGAGACTAAGCTTTTGATTTTAATGTTTAGCAAATGTCCTATCAGTTTTCTCTTTTTGTCGAACGGT

[1269] AATTTAGAGTTTTTTTTGCTATATGGATTTTCGTTTTTGATGTATGTGACAACCCTCGGGATTGTTGAT

[1270] TTATTTCAAAACTAAGAGTTTTTGCTTATTGTTCTCGTCTATTTTGGATATCAATCTTAGTTTTATATC

[1271] TTTTCTAGTTCTCTACGTGTTAAATGTTCAACACACTAGCAATTTGGCTGCAGCGTATGGATTATGGAA

[1272] CTATCAAGTCTGTGGGATCGATAAATATGCTTCTCAGGAATTTGAGATTTTACAGTCTTTATGCTCATT

[1273] GGGTTGAGTATAATATAGTAAAAAAATAGTCTAGA

[1274] SEQ ID NO.31

[1275] GGTACCGAACCATGCATCTCAATCTTAATACTAAAAAATGCAACAAAATTCTAGTGGAGGGACCAGTAC

[1276] CAGTACATTAGATATTATCTTTTATTACTATAATAATATTTTAATTAACACGAGACATAGGAATGTCAA

[1277] GTGGTAGCGGTAGGAGGGAGTTGGTTCAGTTTTTTAGATACTAGGAGACAGAACCGGAGGGGCCCATTG

[1278] CAAGGCCCAAGTTGAAGTCCAGCCGTGAATCAACAAAGAGAGGGCCCATAATACTGTCGATGAGCATTT

[1279] CCCTATAATACAGTGTCCACAGTTGCCTTCCGCTAAGGGATAGCCACCCGCTATTCTCTTGACACGTGT

[1280] CACTGAAACCTGCTACAAATAAGGCAGGCACCTCCTCATTCTCACACTCACTCACTCACACAGCTCAAG

[1281] AAGGATCCTTAGTCTCTATTGAATCTGCTGAGATTACACTTTGATGGATGATGCTCTGTTTTTGTTTTC

[1282] TTGTTCTGTTTTTTCCTCTGTTGAAATCAGCTTTGTTGCTTGATTTCATTGAAGTTGTTATTCAAGAAT

[1283] AAATCAGTTACAATTATGGAATTCGTGGTAACTTTTACTCATCTCCTCCAATTATTTCTGATTTCATGC

[1284] ATGTTTCCCTACATTCTATTATGAATCGTGTTATGGTGTATAAACGTTGTTTCATATCTCATCTCATCT

[1285] ATTCTGATTTTGATTCTCTTGCCTACTGAATTTGACCCTACTGTAATCGGTGATAAATGTGAATGCTTC

[1286] CTCTTCTTCTTCTTCTTCTCAGAAATCAATTTCTGTTTTGTTTTTGTTCATCTGTAGCTTGATATCCTT

[1287] CTTTGATGCTGATCCATAATTGTAACTGATTTATTCTTGAATAACAACTTCAATGAAATCAAGCAACAA

[1288] AGCTGATTTCAACAGAGCAAAAAACAGAACAAGAAAACAAAAACAGAGCATCATCCATCAAAGTGTAAT

[1289] CTCAGCAGATTCAATAGAGACTAAGCTTTTGATTTTAATGTTTAGCAAATGTCCTATCAGTTTTCTCTT

[1290] TTTGTCGAACGGTAATTTAGAGTTTTTTTTGCTATATGGATTTTCGTTTTTGATGTATGTGACAACCCT

[1291] CGGGATTGTTGATTTATTTCAAAACTAAGAGTTTTTGCTTATTGTTCTCGTCTATTTTGGATATCAATC

[1292] TTAGTTTTATATCTTTTCTAGTTCTCTACGTGTTAAATGTTCAACACACTAGCAATTTGGCTGCAGCGT

[1293] ATGGATTATGGAACTATCAAGTCTGTGGGATCGATAAATATGCTTCTCAGGAATTTGAGATTTTACAGT

[1294] CTTTATGCTCATTGGGTTGAGTATAATATAGTAAAAAAATAGTCTAGA

[1295] SEQID NO.32

[1296] GGTACCGAACCATGCATCTCAATCTTAATACTAAAAAATGCAACAAAATTCTAGTGGAGGGACCAGTAC

[1297] CAGTACATTAGATATTATCTTTTATTACTATAATAATATTTTAATTAACACGAGACATAGGAATGTCAA

[1298] GTGGTAGCGGTAGGAGGGAGTTGGTTCAGTTTTTTAGATACTAGGAGACAGAACCGGAGGGGCCCATTG

[1299] CAAGGCCCAAGTTGAAGTCCAGCCGTGAATCAACAAAGAGAGGGCCCATAATACTGTCGATGAGCATTT

[1300] CCCTATAATACAGTGTCCACAGTTGCCTTCCGCTAAGGGATAGCCACCCGCTATTCTCTTGACACGTGT

[1301] CACTGAAACCTGCTACAAATAAGGCAGGCACCTCCTCATTCTCACACTCACTCACTCACACAGCTCAAC

[1302] AAGTGGTAACTTTTACTCATCTCCTCCAATTATTTCTGATTTCATGCATGTTTCCCTACATTCTATTAT

[1303] GAATCGTGTTATGGTGTATAAACGTTGTTTCATATCTCATCTCATCTATTCTGATTTTGATTCTCTTGC

[1304] CTACTGAATTTGACCCTACTGTAATCGGTGATAAATGTGAATGCTTCCTCTTCTTCTTCTTCTTCTCAG

[1305] AAATCAATTTCTGTTTTGTTTTTGTTCATCTGTAGCTTGGTAGATTCCCCTTTTTGTAGACCACACATC

[1306] ACGGATCCTTAGTCTCTATTGAATCTGCTGAGATTACACTTTGATGGATGATGCTCTGTTTTTGTTTTC

[1307] TTGTTCTGTTTTTTCCTCTGTTGAAATCAGCTTTGTTGCTTGATTTCATTGAAGTTGTTATTCAAGAAT

[1308] AAATCAGTTACAATTATGGAATTCAAGGTTAGAAATCTTCTCTATTTTTGGTTTTTGTCTGTTTAGATT

[1309] CTCGAATTAGCTAATCAGGTGCTGTTATAGCCCTTAATTTTGAGTTTTTTTTCGGTTGTTTTGATGGAA

[1310] AAGGCCTAAAATTTGAGTTTTTTTACGTTGGTTTGATGGAAAAGGCCTACAATTGGAGTTTTCCCCGTT

[1311] GTTTTGATGAAAAAGCCCCTAGTTTGAGATTTTTTTTCTGTCGATTCGATTCTAAAGGTTTAAAATTAG

[1312] AGTTTTTACATTTGTTTGATGAAAAAGGCCTTAAATTTGAGTTTTTCCGGTTGATTTGATGAAAAAGCC

[1313] CTAGAATTTGTGTTTTTTCGTCGGTTTGATTCTGAAGGCCTAAAATTTGAGTTTCTCCGGCTGTTTTGA

[1314] TGAAAAAGCCCTAAATTTGAGTTTCTCCGGCTGTTTTGATGAAAAAGCCCTAAATTTGAGTTTTTTCCC

[1315] CGTGTTTTAGATTGTTTGGTTTTAATTCTCGAATCAGCTAATCAGGGAGTGTGAAAAGCCCTAAAATTT

[1316] GAGTTTTTTTCGTTGTTCTGATTGTTGTTTTTATGAATTTGCAGATGGATATCCTTCTTTGATGCTGAT

[1317] CCATAATTGTAACTGATTTATTCTTGAATAACAACTTCAATGAAATCAAGCAACAAAGCTCATTTCAAC

[1318] AGAGGAAAAAACAGAACAAGAAAACAAAAACAGAGCATCATCCATCAAAGTGTAATCTCAGCAGATTCA

[1319] ATAGAGACTAAGCTTTTGATTTTAATGTTTAGCAAATGTCCTATCAGTTTTCTCTTTTTGTCGAACGGT

[1320] AATTTAGAGTTTTTTTTGCTATATGGATTTTCGTTTTTGATGTATGTGACAACCCTCGGGATTGTTGAT

[1321] TTATTTCAAAACTAAGAGTTTTTGCTTATTGTTCTCGTCTATTTTGGATATCAATCTTAGTTTTATATC

[1322] TTTTCTAGTTCTCTACGTGTTAAATGTTCAACACACTAGCAATTTGGCTGCAGCGTATGGATTATGGAA

[1323] CTATCAAGTCTGTGGGATCGATAAATATGCTTCTCAGGAATTTGAGATTTTACAGTCTTTATGCTCATT

[1324] GGGTTGAGTATAATATAGTAAAAAAATAGTCTAGA

[1325] SEQ ID NO.33

[1326] GGTACCGAACCATGCATCTCAATCTTAATACTAAAAAATGCAACAAAATTCTAGTGGAGGGACCAGTAC

[1327] CAGTACATTAGATATTATCTTTTATTACTATAATAATATTTTAATTAACACGAGACATAGGAATGTCAA

[1328] GTGGTAGCGGTAGGAGGGAGTTGGTTCAGTTTTTTAGATACTAGGAGACAGAACCGGAGGGGCCCATTG

[1329] CAAGGCCCAAGTTGAAGTCCAGCCGTGAATCAACAAACAGAGGGCCCATAATACTGTCGATGAGCATTT

[1330] CCCTATAATACAGTGTCCACAGTTGCCTTCCGCTAAGGGATAGCCACCCGCTATTCTCTTGACACGTGT

[1331] CACTGAAACCTGCTACAAATAAGGCAGGCACCTCCTCATTCTCACACTCACTCACTCACACAGCTCAAC

[1332] AAGTGGTAACTTTTACTCATCTCCTCCAATTATTTCTGATTTCATGCATGTTTCCCTACATTCTATTAT

[1333] GAATCGTGTTATGGTGTATAAACGTTGTTTCATATCTCATCTCATCTATTCTGATTTTGATTCTCTTGC

[1334] CTACTGAATTTGACCCTACTGTAATCGGTGATAAATGTGAATGCTTCCTCTTCTTCTTCTTCTTCTCAG

[1335] AAATCAATTTCTGTTTTGTTTTTGTTCATCTGTAGCTTGGTAGATTCCCCTTTTTGTAGACCACACATC

[1336] ACGGATCCTTAGTCTCTATTGAATCTGCTGAGATTACACTTTGATGGATGATGCTCTGTTTTTGTTTTC

[1337] TTGTTCTGTTTTTTCCTCTGTTGAAATCAGCTTTGTTGCTTGATTTCATTGAAGTTGTTATTCAAGAAT

[1338] AAATCAGTTACAATTATGGAATTCGTGGTAACTTTTACTCATCTCCTCCAATTATTTCTGATTTCATGC

[1339] ATGTTTCCCTACATTCTATTATGAATCGTGTTATGGTGTATAAACGTTGTTTCATATCTCATCTCATCT

[1340] ATTCTGATTTTGATTCTCTTGCCTACTGAATTTGACCCTACTGTAATCGGTGATAAATGTGAATGCTTC

[1341] CTCTTCTTCTTCTTCTTCTCAGAAATCAATTTCTGTTTTGTTTTTGTTCATCTGTAGCTTGATATCCTT

[1342] CTTTGATGCTGATCCATAATTGTAACTGATTTATTCTTGAATAACAACTTCAATGAAATCAAGCAAACA
A

[1343] AGCTGATTTCAACA GAGGAAAAAACAGAACAAGAAAACAAAAACAGAGCATCATCCATCAAAGTGTAA
T

[1344] CTCAGCAGATTCAATAGAGACTAAGCTTTTGATTTTAATGTTTAGCAAATGTCCTATCAGTTTTCTCTT

[1345] TTTGTCGAACGGTAATTTAGAGTTTTTTTTGCTATATGGATTTTCGTTTTTGATGTATGTGACAACCCT

[1346] CGGGATTGTTGATTTATTTCAAAACTAAGAGTTTTTGCTTATTGTTCTCGTCTATTTTGGATATCAATC

[1347] TTAGTTTTATATCTTTTCTAGTTCTCTACGTGTTAAATGTTCAACACACTAGCAATTTGGCTGCAGCGT

[1348] ATGGATTATGGAACTATCAAGTCTGTGGGATCGATAAATATGCTTCTCAGGAATTTGAGATTTTACAGT

[1349] CTTTATGCTCATTGGGTTGAGTATAATATAGTAAAAAAATAGTCTAGA

[1350] SEQ ID NO.34

[1351] GTCCATGATGTCTTCAGGGTGGTAGCATTGACTGATGGCATCATAGTTTTTTTTTTAAAAGTATTTCCT

[1352] CTATGCATATTATTAGTATCCAATAAATTTACTGGTTGTTGTACATAGAAAAAGTGCATTTGCATGTAT

[1353] GTGTTTCTCTGAAATTTTCCCCAGTTTTTGGTGCTTTGCCTTTGGAGCCAAGTCTCTATATGTATAAGA

[1354] AAACTAAGAACAATCACATATATCAAATATTAG

[1355] SEQ ID NO.35

[1356] ACGAACTTGTGATCGCGTTGAAAGATTTGAACGCTACATAGAGCTTCTTGACGTATCTGGCAATATTGC

[1357] ATCAGTCTTGGCGGAATTTCATGTGACAACAAGGTTTGCAATTCTTTCCACTATTAGTAGTGCAACGAT

[1358] ATACGCAGAGATGAAGTGCTGAACAAACATATGTAAAATCGATGAATTTATGTCGAATGCTGGGACGGG

[1359] CTTCAGCAGGTTTTGCTTAGT

[1360] SEQ ID NO.36

[1361] CCGCGGTTTTCTCTCCATCGCGTCAGAGGCCGGTTTTCGTCGGCATCGAAGAGGGCCACTCGTTTACCG

[1362] TCATTTGCCAAAGCAGCGCAAAGGCCCATGAGTGCGGTGGTTTTGCCAGCACCCCCTTTGAAAGAGCAA

[1363] AACGTCAAAAGTTGCATATTCTGATCCCGCCTGTCCTGTGAAACGGAGTGCATTTGTATTTTTGTTCGT

[1364] ATAAATGTTTTTGTGATTATCGATGAGTAAAAGCGTTGTTACACTATTTTTTATTTCAAATTCGTTATA

[1365] ATTAAATTGCAATTGTAGCAATTATATTCGGTTTTTCCTGTAAATATACTGTTGATTTCATATCGAGTA

[1366] GGGCTAGACTTTAATCTGTCTACCCGGGCACATTTCGTGCTGGAGTATTCAGACCTTCCGCTTTTTTTG

[1367] GAGGAAGCTATGTCAAAACACACCAGAGTCACGTCGAGTGAGACTGCCATCAACCAGCATCGATCCCTG

[1368] AACGTTGAAGGGTTTAAGGTCGTGAGTGCCCGTCTGCGATCGGCCGAGTATGAAACCTTTTCCTATCAA

[1369] GCGCGCCTGCTGGGACTTTCGGATAGTATGGCAATTCGCGTTGCGGTGCGTCGCATCGGGGGCTTTCTC

[1370] GAAATAGATGCACACACCCGAGAAAAGATGGAAGCCATACTTCAGTCCATCGGAATACTCTCAAGTAAT

[1371] GTATCCATGCTTCTATCTGCCTACGCCGAAGACCCTCGATCGGATCTGGAGGCTGTGCGAGATGAACGT

[1372] ATTGCTTTTGGTGAGGCTTTCGCCGCCCTCGATGGCCTACTCCGCTCCATTTTGTCCGTATCCCGGCGA

[1373] CGGATCGACGGTTGCTCGCTATTGAAAGGTGCCTTGTAGCACTTGACCACGCACCTGACGGGAGAAAAT

[1374] TGGATGCCCGATCGCGCTCAAGTAATCATTCGCATTGTGCCAGGAGGTGGAACCAAGACCCTTCAGCAG

[1375] ATAATCAATCAGTTGGAGTACCTGTCCCGTAAGGGAAAGCTGGAACTGCAGCGTTCAGCCCGGCATCTC

[1376] GATATTCCCGTTCCGCCGGATCAAATCCGTGAGCTTGCCCAAAGCTGGGTTACGGAGGCCGGGATTTAT

[1377] GACGAAAGTCAGTCAGACGATGATAGGCAACAAGACTTAACAACACACATTATTGTAAGCTTCCCCGCA

[1378] GGTACCGACCAAACCGCAGCTTATGAAGCCAGCCGGGAATGGGCAGCCGAGATGTTTGGGTCAGGATAC

[1379] GGGGGTGGCCGCTATAACTATCTGACAGCCTACCACGTCGACCGCGATCATCCACATTTACATGTCGTG

[1380] GTCAATCGTCGGGAACTTCTGGGGCACGGGTGGCTGAAAATATCCAGGCGCCATCCCCAGCTGAATTAT

[1381] GACGGCTTACGGAAAAAGATGGCAGAGATTTCACTTCGTCACGGCATAGTCCTGGATGCGACTTCGCGA

[1382] GCAGAAAGGGGAATAGCAGAGCGACCAATCACATATGCTGAACATCGCCGCCTTGAGCGGATGCAGGCT

[1383] CAAAAGATTCAATTCGAAGATACAGATTTTGATGAGACCTCGCCTGAGGAAGATCGTCGGGACCTCAGT

[1384] CAATCGTTCGATCCATTTCGATCGGACCCATCTACCGGCGAACCGGACCGTGCAACCCGACATGACAAA

[1385] CAACCGCTTGAACAGCACGCCCGTTTCCAGGAGTCCGCCGGCTCCAGCATCAAAGCCGACGCACGGATC

[1386] CGCGTATCATTGGAGAGCGAGCGGAGTGCCCAACCATCCGCGTCCAAAATCCCTGTAATTGGGCATTTC

[1387] GGGATTGAGACTTCCTATGTCGCTGAAGCCAGCGTGCGCAAACGAAGCGGCATTTTCGGTACTTCTCGC

[1388] CCGGTGACTGACGTTGCCATGCACACAGTCAAGCGCCAGCAGCGATCAAAACGACGTAATGACGAGGAG

[1389] GCAGGTCCGAGCGGAGCAAACCGTAAAGGATTGAAGGCTGCGCAAGTTGATTCCGAGGCAAATGTCGGT

[1390] GAGCAAGACACTCGCGATGACAGCAACAAGGCGGCTGATCCGGTGTCTGCTTCCATCGGTACCGAGCAA

[1391] CCGGAAGCTTCTCCAAAGCGTCCGCGTGACCGTCACGATGGAGAATTGGGTGGACGCAAACGTGCAAGA

[1392] GGTAATCGTCGCTCGAGCTCGAGCGGGGGGACCTAGAGACAGGAAGGACCGAATAATGGCCGCGG

[1393] SEQ ID NO.37

[1394] ATGGCTTCTGTGCTGGCTTCTCTGTTTCCAAAACTGGGCTCTTTGGGTACTTCAGATCATGCTTCTGTT

[1395] GTATCCATCAACCTCTTTGTGGCACTCCTTTGTGCTTGCATCATCATTGGTCATCTCTTGGAGGAGAAC

[1396] CGCTGGGTTAATGAGTCCATTACTGCCCTCATAATTGGTTTGTGTACAGGAGTGGTTATCTTGCTCGTA

[1397] AGTGGTGGAAAGAGCTCACACCTTCTGGTTTTCAGTGAAGATCTCTTTTTCATATATGTACTTCCTCCA

[1398] ATCATATTTAATGCAGGGTTTCAGGTAAAAAAGAAGCAATTTTTCGTAAACTTCATTACTATAATGATG

[1399] TTCGGAGCCATTGGTACCCTGGTCTCATGTGCCATTATATCATTAGGTGCCATTCAAACTTTCAAGAAG

[1400] TTGGACATTGAATTTCTAGATATTGGGGATTATCTTGCAATTGGAGCAATATTTGCTGCCACAGATTCC

[1401] GTCTGCACATTGCAGGTCCTACATCAGGATGAGACACCCCTCCTTTACAGTCTTGTATTTGGAGAAGGA

[1402] GTTGTAAATGATGCTACATCGGTGGTGCTTTTCAATGCTATTCAAAACTTCGACCTTACGAGCATGAAT

[1403] CCCAGTATAGCCCTCAGTTTCCTTGGCAACTTCTTCTATCTGTTCCTTGCTAGCACTTTACTGGGAGCA

[1404] GGAACTGGTCTTCTTAGTGCTTACATTATCAAGAAGCTATATTTTGGCAGGCACTCCACAGATCGTGAG

[1405] GTTGCCCTTATGATGCTCATGGCTTACTTATCATACTTGCTGGCCGAATTATTCTATTTGAGTGGGATT

[1406] CTCACCGTCTTTTTCTGTGGTATTGTAATGTCTCACTACACTTGGCACAATGTGACCGAGAGTTCAAGA

[1407] GTCACTACAAGGCACACTTTTGCAACTTTGTCATTTCTTGCAGAGACTTTCCTCTTCCTCTATGTCGGC

[1408] ATGGATGCTTTGGATATCGAGAAGTGGAAATTTGTTGGTGACAGGCCTGGATTATCAATTTCCGTGAGT

[1409] TCAATACTGATGGGACTAATCTTGCTTGGGAGAGCTGCCTTTGTTTTTCCATTATCATTCTTATCCAAC

[1410] TTAATGAAGAAATCCTCGGAGCAAAAAATTACCTTTAGGCAGCAAGTGATAATATGGTGGGCAGGTTTG

[1411] ATGAGAGGCGCAGTGTCCATGGCACTGGCATATAATAAGTTCACTCGTGGGGGACACACTCAACTGCAG

[1412] GACAATGCAATAATGATTACCAGCACGATAACCATTGTTCTATTCAGCACAATGGTATTCGGTTTAATG

[1413] ACAAAACCCCTTATAAGTCTCCTGCTGCCACCACAGAGGCAATTGAGTACAGTGTCATCAGGCGCAAAT

[1414] ACTCCAAAGTCTCTAACAGCCCCACTCCTAGGCAGTCGAGAGGACTCTGAAGTTGATTTAAATGTTCCA

[1415] GATCTTCCTCACCCACCAAGTTTGAGGATGCTACTTACCGCACCAAGTCATAAAGTGCATCGGTACTGG

[1416] CGCAAGTTTGACGATGCATTCATGCGCCCTATGTTTGGTGGTCGGGGATTTGCTCCTCCTGCCCCTGGT

[1417] TCTCCAACGGAACAGGGTCCATGAGGTACCAATC

[1418] SEQ ID NO.38

[1419] ATGGCTTCTGTGCTGGCTTCTCTGTTTCCAAAACTGGGCTCTTTGGGTACTTCAGATCATGCTTCTGTT

[1420] GTATCCATCAACCTCTTTGTGGCACTCCTTTGTGCTTGCATCATCATTGGTCATCTCTTGGAGGAGAAC

[1421] CGCTGGGTTAATGAGTCCATTACTGCCCTCATAATTGGTTTGTGTACAGGAGTGGTTATCTTGCTCGTA

[1422] AGTGGTGGAAAGAACTCACACCTTCTGGTTTTCAGTGAAGATCTCTTTTTCATATATGTACTTCCTCCA

[1423] ATCATATTTAATGCAGGGTTTCAGGTAAAAAAGAAGCAATTTTTCGTGAACTTCATTACTATAATGATG

[1424] TTCGGAGCCATTGGTACCCTGGTCTCATGTGCCATTATATCATTAGGTGCAATTCAAACTTTCAAGAAG

[1425] TTGGACATTGAATTTCTAGATATTGGGGATTATCTTGCAATTGGAGCAATATTTGCTGCCACAGATTCC

[1426] GTCTGCACATTGCAGGTCCTACATCAGGATGAGACACCCCTCCTTTACAGTCTTGTATTTGGAGAAGGA

[1427] GTTGTAAATGATGCTACATCGGTGGTGCTTTTCAATGCTATTCAAAACTTTGACCTTACGAGCGTGAAT

[1428] CCCAGTATAGCCCTCAGTTTCCTTGGCAACTTCTTCTATCTGTTCCTTGCTAGCACTTTACTGGGAGCA

[1429] GGAACTGGTCTTCTTAGTGCTTACATTATCAAGAAGCTGTATTTTGGCAGGCACTCCACAGATCGTGAG

[1430] GTTGCCCTTATGATGCTCATGGCTTACTTATCATACATGCTGGCTGAACTATTCTATTTGAGTGGGATT

[1431] CTCACTGTATTTTTCTGTGGTATTGTAATGTCTCATTACACTTGGCACAATGTGACCGAGAGTTCAAGA

[1432] GTCACTACAAGGCACGCTTTTGCAACTTTGTCATTTCTTGCAGAGACTTTCCTCTTCCTCTATGTCGGC

[1433] ATGGATGCTTTGGATATCGAGAAGTGGAAATTTGTTGGTGACAGGCCTGGATTATCAATTTCCGTGAGT

[1434] TCAATACTGATGGGATTAATCTTGCTGGGGAGAGCTGCCTTTGTTTTTCCATTATCATTCTTCTCCAAC

[1435] TTAATGAAGAAATCCTCGGAGCAAAAAATTACCTTTAGGCAGCAAGTGATAATATGGTGGGCAGGTTTG

[1436] ATGAGAGGCGCAGTGTCCATGGCACTGGCATATAATAAGTTCACTCGTGGGGGACACACTCAACTGCAG

[1437] GACAATGCAATAATGATTACCAGCACGATAACCATTGTTCTATTCAGCACAATGGTATTCGGTTTAATG

[1438] ACAAAACCCCTTATAAGTCTCCTGCTGCCACCACAGAGGCAATTGAGTACAGTGTCATCAGGTGCAAAT

[1439] ACTCCAAAGTCTCTAACAGCCCCACTCCTAGGCAGTCGAGAGGACTCTGAAGTTGATTTAAATGTTCCA

[1440] GATCTTCCTCACCCACCAAGTTTGAGGATGCTACTTACCGCACCAAGTCATAAAGTGCATCGGTACTGG

[1441] CGCAAGTTTGACGATGCATTCATGCGCCCTATGTTTGGTGGTCGGGGATTTGCTCCTCCTGCCCCTGGT

[1442] TCTCCAACGGAACAGGGTCCATGAGGTACAATC

[1443] SEQ ID NO.39

[1444] ATGGAAAATTCGGTACCCAGGACTGTAGAAGAAGTATTCAACGATTTCAAAGGTCGTAGAGCTGGTTTA

[1445] ATCAAAGCACTAACTACAGATGTCGAGAAGTTTTATCAATCGTGTGATCCTGAAAAGGAGAACTTGTGT

[1446] CTCTATGGGCTTCCTAATGAAACATGGGAAGTAAACCTCCCTGTAGAGGAGGTGCCTCCAGAACTTCCG

[1447] GAGCCAGCATTGGGCATAAACTTCGCACGTGATGGAATGCAAGAGAAAGACTGGTTATCACTTGTTGCT

[1448] GTTCACAGTGATTCATGGCTGCTTTCTGTTGCATTTTACTTTGGTGCAAGGTTTGGGTTCGGCAAGAGT

[1449] GAAAGGAAGAGGCTTTTCCAAATGATAAATGATCTCCCAACAGTGTTTGAAGTTGTTACCGGAGCTGCT

[1450] AAACAGACACGTGATCCCCCTCACAACAATAGCAACAAAAGCAAATCAAGTGGAAAGCCTCGACAGCCA

[1451] GAGTCCCAACTCAAGGCAGTAAAGGTGTCTCCACCTAAAATGGAGAACGACAGTGGGGAGGAGGAAGAA

[1452] GAAGAAGAGGATGAACAAGGAGCAACTCTCTGTGGAGCTTGTGGTGATAATTATGCCACTGATGAATTC

[1453] TGGATTTGCTGTGATATTTGTGAGAGATGGTTCCATGGCAAATGTGTGAAGATTACCCCAGCAAAAGCT

[1454] GAGCATATCAAGCAGTACAAGTGTCCTAGTTGCAGTAGCAAGAGAGCTAGAGTTTAA

[1455] SEQ ID NO.40

[1456] TGACATCTGCCAATAAAGCCAAGAATAATTGGCATTAACATGACCAAAAAAATGGTTTGGCAGCATTAA

[1457] GTCAAATAAAAAAGCTACTTTAATATAAAATAATATTAAAATGCTTAATAACCAACAGTTTATAAGAAG

[1458] GTTAATGTTAACATGGATGAGGAATGACCAAAAGGGGAATTATATATTAACCTTTAAATCAATCTAATT

[1459] CTCTCTTTTTGTTTCTAGCTATATTTACTCGATAGATAAACTCTCTTACTTGACGAATTTTTTGATACA

[1460] AGAAGACATATTTCATCATGATTTTAATTCGTCGTGTCAAATTTATTAAATAGTTTAATTTTAATCGTA

[1461] AATTTAGATATGAAATTTAAAAAAAAATAAATATATACATATTTGAAGAATACATAAAAAGTACATATA

[1462] AATCACAAATATTTAATAATTCAAGATATTAAAACACATAGAAAAATAATTACTTACAAAGAAATTCTT

[1463] ATTTGAATCCTCTAAATTCGAGAAGTGCAACACAAACTGAGACGAAGAAAATGAATAATATTTGATAAG

[1464] AAATTTATTATAATTGAATGACCATTTAAGTAATTACGGGTAATAACAACACAATAAGGAACTGTAGTC

[1465] ATTTTTAATACATGGCAAGGAATATGAGAGTGTGATGAGTCTATAAATAGAAGGCTTCATTAGTGTAGA

[1466] GGAGTCACAAACAAGCAATACACAAATAAAATTAGTAGCTTAAACAAGATG

[1467] SEQ ID NO.56

[1468] TTCTTCGCCAGAGGTTTGGTCAAGTCTCCAATCAAGGTTGTCGGCTTGTCTACCTTGCCAGAAATTTAC

[1469] GAAAAGATGGAAAAGGGTCAAATCGTTGGTAGATACGTTGTTGACACTTCTAAATAAGCGAATTTCTTA

[1470] TGATTTATGATTTTTATTATTAAATAAGTTATAAAAAAAATAAGTGTATACAAATTTTAAAGTGACTCT

[1471] TAGGTTTTAAAACGAAAATTCTTATTCTTGAGTAACTCTTTCCTGTAGGTCAGGTTGCTTTCTCAGGTA

[1472] TAGCATGAGGTCGCTC

[1473] SEQ ID NO.94

[1474] TGGCAGGATATATGAGTGTGTAAAC

[1475] SEQ ID NO.95

[1476] TTGGCAGGATATATCCCTCTGTAAAC

[1477] SEQ ID NO.96

[1478] GTCCATGATGTCTTCAGGGTGGTAGCATTGACTGATTGCATCATAGTTTTTTTTTTTTTTTAAGTATT

[1479] TCCTCTATGCATATTATTAGTATCCAATAAATTTACTGGTTGTTGTACATAGAAAAAGTGCATTTGCAT

[1480] GTATGTGTTTCTCTGAAATTTTCCCCAGTTTTTGGTGCTTTGCCTTTGGAGCCAAGTCTCTATATGTAA

[1481] TAAGAAAACTAAGAACAATCACATATATCAAATATTA

[1482] SEQ ID NO.97

[1483] ACGAACTTGTGATCGCGTTGAAAGATTTGAACGCTACTTGGTCATCCACATAGAGCTTCTTGACGTATC

[1484] TGGCAATATTGCATCAGTCTTGGCGGAATTTCATGTGACAAAAGGTTTGCAATTCTTTCCACTATTAGT

[1485] AGTGCAACGATATACGCAGAGATGAAGTGCTGAACAAACATATGTAAAATCGATGAATTTATGTCGAAT

[1486] GCTGGGACGGGCTTCAGCAGGTTTTGCTTAGT

[1487] SEQID NO.98

[1488] GTTTACA[redacted]TACCATATATCCTGTCA GAGGTATAGAGGCATGACTGGCATGATCACTAAATTGATGCCCA

[1489] CAGAGGAGACTTATAACCTACAGGGGCACGTAGTTCTAGGACTTGAAAGTGACTGACCGTAGTCCAACT

[1490] CGGTATAAAGCCTACTCCCAACTAAATATATGAAATTTATAGCATAACTGCAGATGAGCTCGATTCTAG

[1491] AGTAGGTACCGAGCTCGAATTCCTTACTCCTCCACAAAGCCGTAACTGAAGCGACTTCTATTTTTCTCA

[1492] ACCTTCGGACCTGACGATCAAGAATCTCAATAGGTAGTTCTTCATAAGTGAGACTATCCTTCATAGCTA

[1493] CACTTTCTAAAGGTACGATAGATTTTGGATCAACCACACACACTTCG TTTACA[redacted]CGGTATATATCCTGC

[1494]

CA

序列表

<110>ROMMENS, CAIUS
YE, JINGSONG
HUMARA, JAIME M.
YAN, HUA
SWORDS, KATHY

<120> 精确育种

<130>058951/0167

<140>10/607,538
<141>2003-06-27

<150>10/369,324
<151>2003-02-20

<150>60/357,661
<151>2002-02-20

<150>60/377,602
<151>2002-05-06

<160>139

<170>PatentIn Ver. 3.2

<210>1
<211>416
<212>DNA
<213>Solanum tuberosum

<400>1
gtttacagta ccatatatcc tgtcagaggt atagaggcat gactggcatg atcactaaat 60
tgatgcccac agaggagact tataacctac aggggcacgt agttctagga cttgaaagtg 120
actgaccgta gtccaactcg gtataaagcc tactcccaac taaatatatg aaatttatag 180
cataactgca gatgagctcg attctagagt aggtaccgag ctcgaattcc ttactcctcc 240
acaaagccgt aactgaagcg acttctattt ttctcaacct tcggacctga cgatcaagaa 300

tctcaatagg tagttcttca taagtgagac tatccttcat agctacactt tctaaaggta 360
cgatagattt tggatcaacc acacacactt cgtttacacc ggtatatatc ctgcca 416

<210>2
<211>824
<212>DNA
<213>Triticum sp.

<400>2
tggcaggata tatgagtgtg taaacaacca taatcaggct gtaattatca agagaactaa 60
tgacaagaag cagagcttat caagtgtttc gtccagctgt aacatgggca caaaagcttg 120
cttgatgcat gtctggcttt tcaaagagca atgtattctc aggtacctgc acgtttgatc 180
ccctaccacg tacaagacga gcagaaagga catgtctgca gaaacttaga cacatccatt 240
gcagactcgt tccgaagcat caggagagta gtcagcaatg gtcatctgct gatgtaaatt 300
aattgattgt tggtaatcaa attttaacag caatatatat aatatatcaa tagtatattg 360
aactatgaaa gactgtaatc atatataaca gcatacaaat tgtcgtggaa acaagaggag 420
ctcatcaagt gtttagttca gaaatagcta accaagaatg caatataata ggggtactga 480
gctcccttca aaattactaa cttcagaaat agctaaccaa gaatgcaatg gcattgcata 540
atttaaacaa ctgtcagcac caatctctga ctgaaggcag tttacccatt cagaagagca 600
cacattttct gaacgacaac tctgagcggg gattgttgac agcagcaatt aatctggcct 660
caagatggtt tccaacaaca tagatcagat acagcactca agcacccaat aatcagccag 720
tactgatctg gttaccactg caattgatta acagatgaac tgtgaaatta agatttaact 780
gacagtaata tataccagtt ggcaggatat atccctctgt aaac 824

<210>3
<211>2595
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :IPT 基因的表达盒

<400>3
ctgcagccaa agcacatact tatcgattta aatttcatcg aagagattaa tatcgaataa 60
tcatatacat actttaaata cataacaaat tttaaataca tatatctggt atataattaa 120
ttttttaaag tcatgaagta tgtatcaaat acacatatgg aaaaaattaa ctattcataa 180
tttaaaaaat agaaa gata catctagtga aattaggtgc atgtatcaaa tacattagga 240
aaagggcata tatcttgatc tagataatta acgattttga tttatgtata atttccaaat 300
gaaggtttat atctacttca gaaataacaa tatactttta tcagaacatt caacaaagta 360

acaaccaact agagtgaaaa atacacattg ttctctaaac atacaaaatt gag aaagaa 420
tctcaaaatt tagagaaaca aatctgaatt tctagaagaa aaaaataatt atgcactttg 480
ctattgctcg aaaaataaat gaaagaaatt agacttttt aaaagatgtt agactagata 540
tactcaaaag ctatcaaagg agtaatattc ttcttacatt aagtatttta gttacagtcc 600
tgtaattaaa gacacatttt agattgtatc taaacttaaa tgtatctaga atacatatat 660
ttgaatgcat catatacatg tatccgacac accaattctc ataaaaagcg taatatccta 720
aactaattta tccttcaagt caacttaagc ccaatataca ttttcatctc taaaggccca 780
agtggcacaa aatgtcaggc ccaattacga agaaaagggc ttgtaaaacc ctaataaagt 840
ggcactggca gagcttacac tctcattcca tcaacaaaga aaccctaaaa gccgcagcgc 900
cactgatttc tctcctccag gcgaagatgc agatcttcgt gaagacccta acggggaaga 960
cgatcaccct agaggttgag tcttccgaca ccatcgacaa tgtcaaagcc aagatccagg 1020
acaaggaagg gattccccca gaccagcagc gtttgatttt cgccggaaag cagcttgagg 1080
atggtcgtac tcttgccgac tacaacatcc agaaggagtc aactctccat ctcgtgctcc 1140
gtctccgtgg tggtggatcc atggacctgc atctaatttt cggtccaact tgcacaggaa 1200
agacgacgac cgcgatagct cttgcccagc agacagggct tccagtcctt tcgcttgatc 1260
gggtccaatg ctgtcctcaa ctatcaaccg gaagcggacg accaacagtg gaagaactga 1320
aaggaacgac gcgtctctac cttgatgatc ggcctctggt ggagggtatc atcgcagcca 1380
agcaagctca tcataggctg atcgaggagg tgtataatca tgaggccaac ggcgggctta 1440
ttcttgaggg aggatccacc tcgttgctca actgcatggc gcgaaacagc tattggagtg 1500
cagattttcg ttggcatatt attcgccaca agttacccga ccaagagacc ttcatgaaag 1560
cggccaaggc cagagttaag cagatgttgc accccgctgc aggccattct attattcaag 1620
agttggttta tctttggaat gaacctcggc tgaggcccat tctgaaagag atcgatggat 1680
atcgatatgc catgttgttt gctagccaga accagatcac ggcagatatg ctattgcagc 1740
ttgacgcaaa tatggaaggt aagttgatta atgggatcgc tcaggagtat ttcatccatg 1800
cgcgccaaca ggaacagaaa ttccccccaag ttaacgcagc cgctttcgac ggattcgaag 1860
gtcatccgtt cggaatgtat taggttacgc cagccctgcg tcgcacctgt cttcatctgg 1920
ataagatgtt cgtaattgtt tttggctttg tcctgttgtg gcagggcggc aaatacttcc 1980
gacaatccat cgtgtcttca aactttatgc tggtgaacaa gtcttagttt ccacgaaagt 2040
attatgttaa attttaaaat ttcgatgtat aatgtggcta taattgtaaa aataaactat 2100
cgtaagtgtg cgtgttatgt ataatttgtc taaatgttta atatatatca tagaacgcaa 2160
taaatattaa atatagcgct tttatgaaat ataaatacat cattacaagt tgtttatatt 2220
tcgggtggac tagttttaa tgtttagcaa atgtcctatc agttttctct ttttgtcgaa 2280
cggtaattta gagttttttt tgctatatgg attttcgttt ttgatgtatg tgacaaccct 2340
cgggattgtt gatttatttc aaaactaaga gtttttgctt attgttctcg tctattttgg 2400
atatcaatct tagttttata tcttttctag ttctctacgt gttaaatgtt caacacacta 2460
gcaatttggc tgcagcgtat ggattatgga actatcaagt ctgtgggatc gataaatatg 2520
cttctcagga atttgagatt ttacagtctt tatgctcatt gggttgagta taatatagta 2580
aaaaaatagg aattc 2595

<210>4
<211>9323
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :pSIM111 核苷酸序列

<400>4
agctttggca ggatatatac cggtgtaaac gaagtgtgtg tggttgatcc aaaatctatc 60
gtacctttag aaagtgtagc tatgaaggat agtctcactt atgaagaact acctattgag 120
attcttgatc gtcaggtccg aaggttgaga aaaatagaag tcgcttcagt tacggctttg 180
tggaggagta agggtaccta ctctagaatc gagctcatcg ttatgctata aatttcatat 240
atttagttgg gagtaggctt tataccgagt tggactacgg tcagtcactt tcaagtccta 300
gaactacgtg cccctgtagg ttataagtct cctctgtggg catcaattta gtgatcatgc 360
cagtcatgcc tctatacctc tgacaggata tatggtactg taaacactag ttgtgaataa 420
gtcgctgtgt atgtttgttt gagatctcta agagaaaaga gcgtttatta gaataacgga 480
tatttaaaag ggcgtgaaaa ggtttatccg ttcgtccatt tgtatgtggt cacctatctc 540
gagcatgcca accacagggt tcccctcggg atcaaagtac tttgatccaa cccctccgct 600
gctatagtgc agtcggcttc tgacgttcag tgcagccgtc ttctgaaaac gacatgtcgc 660
acaagtccta agttacgcga caggctgccg ccctgccctt ttcctggcgt tttcttgtcg 720
cgtgttttag tcgcataaag tagaatactt gcgactagaa ccggagacat tacgccatga 780
acaagagcgc cgccgctggc ctgctgggct atgcccgcgt cagcaccgac gaccaggact 840
tgaccaacca acgggccgaa ctgcacgcgg ccggctgcac caagctgttt tccgagaaga 900
tcaccggcac caggcgcgac cgcccggagc tggccaggat gcttgaccac ctacgccctg 960
gcgacgttgt gacagtgacc aggctagacc gcctggcccg cagcacccgc gacctactgg 1020
acattgccga gcgcatccag gaggccggcg cgggcctgcg tagcctggca gagccgtggg 1080
ccgacaccac cacgccggcc ggccgcatgg tgttgaccgt gttcgccggc attgccgagt 1140
tcgagcgttc cctaatcatc gaccgcaccc ggagcgggcg cgaggccgcc aaggcccgag 1200
gcgtgaagtt tggcccccgc cctaccctca ccccggcaca gatcgcgcac gcccgcgagc 1260
tgatcgacca ggaaggccgc accgtgaaag aggcggctgc actgcttggc gtgcatcgct 1320
cgaccctgta ccgcgcactt gagcgcagcg aggaagtgac gcccaccgag gccaggcggc 1380
gcggtgcctt ccgtgaggac gcattgaccg aggccgacgc cctggcggcc gccgagaatg 1440
aacgccaaga ggaacaagca tgaaaccgca ccaggacggc caggacgaac cgtttttcat 1500
taccgaagag atcgaggcgg agatgatcgc ggccgggtac gtgttcgagc cgcccgcgca 1560
cgtctcaacc gtgcggctgc atgaaatcct ggccggtttg tctgatgcca agctggcggc 1620
ctggccggcc agcttggccg ctgaagaaac cgagcgccgc cgtctaaaaa ggtgatgtgt 1680
atttgagtaa aacagcttgc gtcatgcggt cgctgcgtat atgatgcgat gagtaaataa 1740
acaaatacgc aaggggaacg catgaaggtt atcgctgtac ttaaccagaa aggcgggtca 1800

ggcaagacga ccatcgcaac ccatctagcc cgcgccctgc aactcgccgg ggccgatgtt 1860
ctgttagtcg attccgatcc ccagggcagt gcccgcgatt gggcggccgt gcgggaagat 1920
caaccgctaa ccgttgtcgg catcgaccgc ccgacgattg accgcgacgt gaaggccatc 1980
ggccggcgcg acttcgtagt gatcgacgga gcgccccagg cggcggactt ggctgtgtcc 2040
gcgatcaagg cagccgactt cgtgctgatt ccggtgcagc caagccctta cgacatatgg 2100
gccaccgccg acctggtgga gctggttaag cagcgcattg aggtcacgga tggaaggcta 2160
caagcggcct ttgtcgtgtc gcgggcgatc aaaggcacgc gcatcggcgg tgaggttgcc 2220
gaggcgctgg ccgggtacga gctgcccatt cttgagtccc gtatcacgca gcgcgtgagc 2280
tacccaggca ctgccgccgc cggcacaacc gttcttgaat cagaacccga gggcgacgct 2340
gcccgcgagg tccaggcgct ggccgctgaa attaaatcaa aactcatttg agttaatgag 2400
gtaaagagaa aatgagcaaa agcacaaaca cgctaagtgc cggccgtccg agcgcacgca 2460
gcagcaaggc tgcaacgttg gccagcctgg cagacacgcc agccatgaag cgggtcaact 2520
ttcagttgcc ggcggaggat cacaccaagc tgaagatgta cgcggtacgc caaggcaaga 2580
ccattaccga gctgctatct gaatacatcg cgcagctacc agagtaaatg agcaaatgaa 2640
taaatgagta gatgaatttt agcggctaaa ggaggcggca tggaaaatca agaacaacca 2700
ggcaccgacg ccgtggaatg ccccatgtgt ggaggaacgg gcggttggcc aggcgtaagc 2760
ggctgggttg tctgccggcc ctgcaatggc actggaaccc ccaagcccga ggaatcggcg 2820
tgacggtcgc aaaccatccg gcccggtaca aatcggcgcg gcgctgggtg atgacctggt 2880
ggagaagttg aaggccgcgc aggccgccca gcggcaacgc atcgaggcag aagcacgccc 2940
cggtgaatcg tggcaagcgg ccgctgatcg aatccgcaaa gaatcccggc aaccgccggc 3000
agccggtgcg ccgtcgatta ggaagccgcc caagggcgac gagcaaccag atttttтcgt 3060
tccgatgctc tatgacgtgg gcacccgcga tagtcgcagc atcatggacg tggccgtttt 3120
ccgtctgtcg aagcgtgacc gacgagctgg cgaggtgatc cgctacgagc ttccagacgg 3180
gcacgtagag gtttccgcag ggccggccgg catggccagt gtgtgggatt acgacctggt 3240
actgatggcg gtttcccatc taaccgaatc catgaaccga taccgggaag ggaagggaga 3300
caagcccggc cgcgtgttcc gtccacacgt tgcggacgta ctcaagttct gccggcgagc 3360
cgatggcgga aagcagaaag acgacctggt agaaacctgc attcggttaa acaccacgca 3420
cgttgccatg cagcgtacga agaaggccaa gaacggccgc ctggtgacgg tatccgaggg 3480
tgaagccttg attagccgct acaagatcgt aaagagcgaa accgggcggc cggagtacat 3540
cgagatcgag ctagctgatt ggatgtaccg cgagatcaca gaaggcaaga acccggacgt 3600
gctgacggtt caccccgatt actttttgat cgatcccggc atcggccgtt ttctctaccg 3660
cctggcacgc cgcgccgcag gcaaggcaga agccagatgg ttgttcaaga cgatctacga 3720
acgcagtggc agcgccggag agttcaagaa gttctgtttc accgtgcgca agctgatcgg 3780
gtcaaatgac ctgccggagt acgatttgaa ggaggaggcg gggcaggctg gcccgatcct 3840
agtcatgcgc taccgcaacc tgatcgaggg cgaagcatcc gccggttcct aatgtacgga 3900
gcagatgcta gggcaaattg ccctagcagg ggaaaaaggt cgaaaaggtc tctttcctgt 3960
ggatagcacg tacattggga acccaaagcc gtacattggg aaccggaacc cgtacattgg 4020
gaacccaaag ccgtacattg ggaaccggtc acacatgtaa gtgactgata taaaagagaa 4080
aaaaggcgat ttttccgcct aaaactcttt aaaacttatt aaaactctta aaacccgcct 4140

ggcctgtgca taactgtctg gccagcgcac agccgaagag ctgcaaaaag cgcctaccct 4200
tcggtcgctg cgctccctac gccccgccgc ttcgcgtcgg cctatcgcgg ccgctggccg 4260
ctcaaaaatg gctggcctac ggccaggcaa tctaccaggg cgcggacaag ccgcgccgtc 4320
gccactcgac cgccggcgcc cacatcaagg caccctgcct cgcgcgtttc ggtgatgacg 4380
gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac agcttgtctg taagcggatg 4440
ccgggagcag acaagcccgt cagggcgcgt cagcgggtgt tggcgggtgt cggggcgcag 4500
ccatgaccca gtcacgtagc gatagcggag tgtatactgg cttaactatg cggcatcaga 4560
gcagattgta ctgagagtgc accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag 4620
aaaataccgc atcaggcgct cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt 4680
tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc 4740
aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa 4800
aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa 4860
tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc 4920
ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc 4980
cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag 5040
ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccccg ttcagcccga 5100
ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtaagac acgacttatc 5160
gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac 5220
agagttcttg aagtggtggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg 5280
cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca 5340
aaccaccgct ggtagcggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa 5400
aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa 5460
ctcacgttaa gggattttgg tcatgcattc taggtactaa aacaattcat ccagtaaaat 5520
ataatatttt attttctccc aatcaggctt gatccccagt aagtcaaaaa atagctcgac 5580
atactgttct tccccgatat cctccctgat cgaccggacg cagaaggcaa tgtcatacca 5640
cttgtccgcc ctgccgcttc tcccaagatc aataaagcca cttactttgc catctttcac 5700
aaagatgttg ctgtctccca ggtcgccgtg ggaaaagaca agttcctctt cgggcttttc 5760
cgtctttaaa aaatcataca gctcgcgcgg atctttaaat ggagtgtctt cttcccagtt 5820
ttcgcaatcc acatcggcca gatcgttatt cagtaagtaa tccaattcgg ctaagcggct 5880
gtctaagcta ttcgtatagg gacaatccga tatgtcgatg gagtgaaaga gcctgatgca 5940
ctccgcatac agctcgataa tcttttcagg gctttgttca tcttcatact cttccgagca 6000
aaggacgcca tcggcctcac tcatgagcag attgctccag ccatcatgcc gttcaaagtg 6060
caggaccttt ggaacaggca gctttccttc cagccatagc atcatgtcct tttcccgttc 6120
cacatcatag gtggtccctt tataccggct gtccgtcatt tttaaatata ggttttcatt 6180
ttctcccacc agcttatata ccttagcagg agacattcct tccgtatctt ttacgcagcg 6240
gtatttttcg atcagttttt tcaattccgg tgatattctc attttagcca tttattattt 6300
ccttcctctt ttctacagta tttaaagata ccccaagaag ctaattataa caagacgaac 6360
tccaattcac tgttccttgc attctaaaac cttaaatacc agaaaacagc tttttcaaag 6420
ttgttttcaa agttggcgta taacatagta tcgacggagc cgattttgaa accgcggatc 6480

ctgcagccaa agcacatact tatcgattta aatttcatcg aagagattaa tatcgaataa 6540
tcatatacat actttaaata cataacaaat tttaaataca tatatctggt atataattaa 6600
ttttttaaag tcatgaagta tgtatcaaat acacatatgg aaaaaattaa ctattcataa 6660
tttaaaaaat agaaaagata catctagtga aattaggtgc atgtatcaaa tacattagga 6720
aaagggcata tatcttgatc tagataatta acgattttga tttatgtata atttccaaat 6780
gaaggtttat atctacttca gaaataacaa tatactttta tcagaacatt caacaaagta 6840
acaaccaact agagtgaaaa atacacattg ttctctaaac atacaaaatt gagaaaagaa 6900
tctcaaaatt tagagaaaca aatctgaatt tctagaagaa aaaaataatt atgcactttg 6960
ctattgctcg aaaaataaat gaaagaaatt agacttttt aaaagatgtt agactagata 7020
tactcaaaag ctatcaaagg agtaatattc ttcttacatt aagtatttta gttacagtcc 7080
tgtaattaaa gacacatttt agattgtatc taaacttaaa tgtatctaga atacatatat 7140
ttgaatgcat catatacatg tatccgacac accaattctc ataaaaagcg taatatccta 7200
aactaattta tccttcaagt caacttaagc ccaatataca ttttcatctc taaaggccca 7260
agtggcacaa aatgtcaggc ccaattacga agaaaagggc ttgtaaaacc ctaataaagt 7320
ggcactggca gagcttacac tctcattcca tcaacaaaga aaccctaaaa gccgcagcgc 7380
cactgatttc tctcctccag gcgaagatgc agatcttcgt gaagacccta acggggaaga 7440
cgatcaccct agaggttgag tcttccgaca ccatcgacaa tgtcaaagcc aagatccagg 7500
acaaggaagg gattccccca gaccagcagc gtttgatttt cgccggaaag cagcttgagg 7560
atggtcgtac tcttgccgac tacaacatcc agaaggagtc aactctccat ctcgtgctcc 7620
gtctccgtgg tggtggatcc atggacctgc atctaatttt cggtccaact tgcacaggaa 7680
agacgacgac cgcgatagct cttgcccagc agacagggct tccagtcctt tcgcttgatc 7740
gggtccaatg ctgtcctcaa ctatcaaccg gaagcggacg accaacagtg gaagaactga 7800
aaggaacgac gcgtctctac cttgatgatc ggcctctggt ggagggtatc atcgcagcca 7860
agcaagctca tcataggctg atcgaggagg tgtataatca tgaggccaac ggcgggctta 7920
ttcttgaggg aggatccacc tcgttgctca actgcatggc gcgaaacagc tattggagtg 7980
cagattttcg ttggcatatt attcgccaca agttacccga ccaagagacc ttcatgaaag 8040
cggccaaggc cagagttaag cagatgttgc accccgctgc aggccattct attattcaag 8100
agttggttta tctttggaat gaacctcggc tgaggcccat tctgaaagag atcgatggat 8160
atcgatatgc catgttgttt gctagccaga accagatcac ggcagatatg ctattgcagc 8220
ttgacgcaaa tatggaaggt aagttgatta atgggatcgc tcaggagtat ttcatccatg 8280
cgcgccaaca ggaacagaaa ttcccccaag ttaacgcagc cgctttcgac ggattcgaag 8340
gtcatccgtt cggaatgtat taggttacgc cagccctgcg tcgcacctgt cttcatctgg 8400
ataagatgtt cgtaattgtt tttggctttg tcctgttgtg gcagggcggc aaatacttcc 8460
gacaatccat cgtgtcttca aactttatgc tggtgaacaa gtcttagttt ccacgaaagt 8520
attatgttaa attttaaaat ttcgatgtat aatgtggcta taattgtaaa aataaactat 8580
cgtaagtgtg cgtgttatgt ataatttgtc taaatgttta atatatatca tagaacgcaa 8640
taaatattaa atatagcgct tttatgaaat ataaatacat cattacaagt tgtttatatt 8700
tcgggtggac tagtttttaa tgtttagcaa atgtcctatc agttttctct ttttgtcgaa 8760
cggtaattta gagtttttt tgctatatgg attttcgttt ttgatgtatg tgacaaccct 8820

cgggattgtt gatttatttc aaaactaaga gtttttgctt attgttctcg tctattttgg 8880
atatcaatct tagttttata tcttttctag ttctctacgt gttaaatgtt caacacacta 8940
gcaatttggc tgcagcgtat ggattatgga actatcaagt ctgtgggatc gataaatatg 9000
cttctcagga atttgagatt ttacagtctt tatgctcatt gggttgagta taatatagta 9060
aaaaaatagg aattctatcc gcggtgatca caggcagcaa cgctctgtca tcgttacaat 9120
caacatgcta ccctccgcga gatcatccgt gtttcaaacc cggcagctta gttgccgttc 9180
ttccgaatag catcggtaac atgagcaaag tctgccgcct tacaacggct ctcccgctga 9240
cgccgtcccg gactgatggg ctgcctgtat cgagtggtga ttttgtgccg agctgccggt 9300
cggggagctg ttggctggct gga 9323

<210>5
<211>546
<212>DNA
<213>Solanum tuberosum

<400>5
atgagaaatt tattccccat attgatgcta atcaccaatt tggcactcaa caacgataac 60
aacaacaaca acaacaacaa caataattat aatctcatac acgcaacgtg tagggagacc 120
ccatattact ccctatgtct caccacccta caatccggtc cacgtagtaa cgaggttgag 180
ggtggtgatg ccatcaccac cctaggcctc atcatggtgg acgcggtgaa atcaaagtcc 240
atagaaataa tggaaaaaat aaaagagcta gagaaatcga accctgagtg gcgggcccca 300
cttagccagt gttacgtggc gtataatgcc gtcctacgag ccgatgtaac ggtagccgtt 360
gaagccttaa agaagggtgc ccccaaattt gctgaagatg gtatggatga tgttgttgct 420
gaagcacaaa cttgtgagta tagttttaat tattataata aattggattt tccaatttct 480
aatttgagta gggaaataat tgaactatca aaagttgcta aatccataat tagaatgtta 540
ttatga 546

<210>6
<211>658
<212>DNA
<213>Solanum tuberosum

<400>6
gaaccatgca tctcaatctt aatactaaaa aatgcaacaa aattctagtg gagggaccag 60
taccagtaca ttagatatta tcttttatta ctataataat attttaatta acacgagaca 120
taggaatgtc aagtggtagc ggtaggaggg agttggttca gtttttaga tactaggaga 180
cagaaccgga ggggcccatt gcaaggccca agttgaagtc cagccgtgaa tcaacaaaga 240
gagggcccat aatactgtcg atgagcattt ccctataata cagtgtccac agttgccttc 300
cgctaaggga tagccacccg ctattctctt gacacgtgtc actgaaacct gctacaaata 360

aggcaggcac ctcctcattc tcacactcac tcactcacac agctcaacaa gtggtaactt 420
ttactcatct cctccaatta tttctgattt catgcatgtt tccctacatt ctattatgaa 480
tcgtgttatg gtgtataaac gttgtttcat atctcatctc atctattctg attttgattc 540
tcttgcctac tgaatttgac cctactgtaa tcggtgataa atgtgaatgc ttcctcttct 600
tcttcttctt ctcagaaatc aatttctgtt ttgtttttgt tcatctgtag cttggtag 658

<210>7
<211>355
<212>DNA
<213>Solanum tuberosum

<400>7
ttttaatgtt tagcaaatgt cctatcagtt ttctcttttt gtcgaacggt aatttagagt 60
ttttttgct atatggattt tcgtttttga tgtatgtgac aaccctcggg attgttgatt 120
tatttcaaaa ctaagagttt ttgcttattg ttctcgtcta ttttggatat caatcttagt 180
tttatatctt ttctagttct ctacgtgtta aatgttcaac acactagcaa tttggctgca 240
gcgtatggat tatggaacta tcaagtctgt gggatcgata aatatgcttc tcaggaattt 300
gagattttac agtctttatg ctcattgggt tgagtataat atagtaaaaa aatag 355

<210>8
<211>179
<212>DNA
<213>Solanum tuberosum

<400>8
accttatttc actaccactt tccactctcc aatccccata ctctctgctc caatcttcat 60
tttgcttcgt gaattcatct tcatcgaatt tctcgacgct tcttcgctaa tttcctcgtt 120
acttcactaa aaatcgacgt ttctagctga acttgagtga attaagccag tgggaggat 179

<210>9
<211>569
<212>DNA
<213>Solanum tuberosum

<400>9
gttagaaatc ttctctattt ttggtttttg tctgtttaga ttctcgaatt agctaatcag 60
gtgctgttat agcccttaat tttgagtttt ttttcggttg ttttgatgga aaaggcctaa 120
aatttgagtt tttttacgtt ggtttgatgg aaa ggccta caattggagt tttccccgtt 180
gttttgatga aaaagcccct agtttgagat tttttttctg tcgattcgat tctaaaggtt 240

t aaattaga gtttttacat ttgtttgatg aaaaaggcct taaatttgag tttttccggt 300
tgatttgatg aaaaagccct agaatttgtg ttttttcgtc ggtttgattc tgaaggccta 360
aaatttgagt ttctccggct gttttgatga aaaagcccta aatttgagtt tctccggctg 420
ttttgatgaa aaagccctaa atttgagttt tttccccgtg ttttagattg tttggtttta 480
attctcgaat cagctaatca gggagtgtga aaagccctaa aatttgagtt tttttcgttg 540
ttctgattgt tgtttttatg aatttgcag 569

<210>10
<211>1738
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：与 R1 基因相连的前导区的有义和反义拷贝的表达盒

<400>10
ggtaccgaac catgcatctc aatcttaata ctaaaaaatg caacaaaatt ctagtggagg 60
gaccagtacc agtacattag atattatctt ttattactat aataatattt taattaacac 120
gagacatagg aatgtcaagt ggtagcggta ggagggagtt ggttcagttt tttagatact 180
aggagacaga accggagggg cccattgcaa ggcccaagtt gaagtccagc cgtgaatcaa 240
caaagagagg gcccataata ctgtcgatga gcatttccct ataatacagt gtccacagtt 300
gccttccgct aagggatagc cacccgctat tctcttgaca cgtgtcactg aaacctgcta 360
caaataaggc aggcacctcc tcattctcac actcactcac tcacacagct caagaaggat 420
ccaccttatt tcactaccac tttccactct ccaatcccca tactctctgc tccaatcttc 480
attttgcttc gtgaattcat cttcatcgaa tttctcgacg cttcttcgct aatttcctcg 540
ttacttcact agaaatcgac gtttctagct gaacttgagt gaattaagcc agtgggagga 600
tgaattcaag gttagaaatc ttctctattt ttggtttttg tctgtttaga ttctcgaatt 660
agctaatcag gtgctgttat agcccttaat tttgagtttt ttttcggttg ttttgatgga 720
aaaggcctaa aatttgagtt tttttacgtt ggtttgatgg aaaaggccta caattggagt 780
tttccccgtt gttttgatga aaaagcccct agtttgagat tttttttctg tcgattcgat 840
tctaaaggtt taaaattaga gtttttacat ttgtttgatg aaaaaggcct taaatttgag 900
tttttccggt tgatttgatg aaaaagccct agaatttgtg ttttttcgtc ggtttgattc 960
tgaaggccta aaatttgagt ttctccggct gttttgatga aaaagcccta aatttgagtt 1020
tctccggctg ttttgatgaa aaagccctaa atttgagttt tttccccgtg ttttagattg 1080
tttggtttta attctcgaat cagctaatca gggagtgtga aaagccctaa aatttgagtt 1140
tttttcgttg ttctgattgt tgtttttatg aatttgcaga tggatatcat cctcccactg 1200
gcttaattca ctcaagttca gctagaaacg tcgatttcta gtgaagtaac gaggaaatta 1260
gcgaagaagc gtcgagaaat tcgatgaaga tgaattcacg aagcaaaatg aagattggag 1320
cagagagtat ggggattgga gagtggaaag tggtagtgaa ataaggtaag cttttgattt 1380

taatgtttag caaatgtcct atcagttttc tcttttttgtc gaacggtaat ttagagtttt 1440
ttttgctata tggattttcg tttttgatgt atgtgacaac cctcgggatt gttgatttat 1500
ttcaaaacta agagtttttg cttattgttc tcgtctattt tggatatcaa tcttagtttt 1560
atatcttttc tagttctcta cgtgttaaat gttcaacaca ctagcaattt ggctgcagcg 1620
tatggattat ggaactatca agtctgtggg atcgataaat atgcttctca ggaatttgag 1680
attttacagt ctttatgctc attgggttga gtataatata gtaaaaaaat agtctaga 1738

<210>11
<211>237
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :合成的间隔区序列

<400>11
gtaactttta ctcatctcct ccaattattt ctgatttcat gcatgtttcc ctacattcta 60
ttatgaatcg tgttatggtg tataaacgtt gtttcatatc tcatctcatc tattctgatt 120
ttgattctct tgcctactga atttgaccct actgtaatcg gtgataaatg tgaatgcttc 180
ctcttcttct tcttcttctc agaaatcaat ttctgttttg tttttgttca tctgtag 237

<210>12
<211>1406
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :与 R1 基因相连的前导区的有义和反义拷贝的替换性表达盒

<400>12
ggtaccgaac catgcatctc aatcttaata ctaaaaaatg caacaaaatt ctagtggagg 60
gaccagtacc agtacattag atattatctt ttattactat aataatattt taattaacac 120
gagacatagg aatgtcaagt ggtagcggta ggagggagtt ggttcagttt tttagatact 180
aggagacaga accggagggg cccattgcaa ggcccaagtt gaagtccagc cgtgaatcaa 240
caaagagagg gcccataata ctgtcgatga gcatttccct ataatacagt gtccacagtt 300
gccttccgct aagggatagc cacccgctat tctcttgaca cgtgtcactg aaacctgcta 360
caaataaggc aggcacctcc tcattctcac actcactcac tcacacagct caagaaggat 420
ccaccttatt tcactaccac tttccactct ccaatcccca tactctctgc tccaatcttc 480
attttgcttc gtgaattcat cttcatcgaa tttctcgacg cttcttcgct aatttcctcg 540

ttacttcact agaaatcgac gtttctagct gaacttgagt gaattaagcc agtgggagga 600
tgaattcgtg gtaactttta ctcatctcct ccaattattt ctgatttcat gcatgtttcc 660
ctacattcta ttatgaatcg tgttatggtg tataaacgtt gtttcatatc tcatctcatc 720
tattctgatt ttgattctct tgcctactga atttgaccct actgtaatcg gtgataaatg 780
tgaatgcttc ctcttcttct tcttcttctc agaaatcaat ttctgttttg tttttgttca 840
tctgtagctt gatatcatcc tcccactggc ttaattcact caagttcagc tagaaacgtc 900
gatttctagt gaagtaacga ggaaattagc gaagaagcgt cgagaaattc gatgaagatg 960
aattcacgaa gcaaaatgaa gattggagca gagagtatgg ggattggaga gtggaaagtg 1020
gtagtgaaat aaggtaagct tttgatttta atgtttagca aatgtcctat cagttttctc 1080
tttttgtcga acggtaattt agagtttttt ttgctatatg gattttcgtt tttgatgtat 1140
gtgacaaccc tcgggattgt tgatttattt caaaactaag agtttttgct tattgttctc 1200
gtctattttg gatatcaatc ttagttttat atcttttcta gttctctacg tgttaaatgt 1260
tcaacacact agcaatttgg ctgcagcgta tggattatgg aactatcaag tctgtgggat 1320
cgataaatat gcttctcagg aatttgagat tttacagtct ttatgctcat tgggttgagt 1380
ataatatagt aaaaaaatag tctaga 1406

<210>13
<211>686
<212>DNA
<213>Solanum tuberosum

<400>13
gaaccatgca tctcaatctt aatactaaaa aatgcaacaa aattctagtg gagggaccag 60
taccagtaca ttagatatta tcttttatta ctataataat attttaatta acacgagaca 120
taggaatgtc aagtggtagc ggtaggaggg agttggttca gttttttaga tactaggaga 180
cagaaccgga ggggcccatt gcaaggccca agttgaagtc cagccgtgaa tcaacaaaga 240
gagggcccat aatactgtcg atgagcattt ccctataata cagtgtccac agttgccttc 300
cgctaaggga tagccacccg ctattctctt gacacgtgtc actgaaacct gctacaaata 360
aggcaggcac ctcctcattc tcacactcac tcactcacac agctcaacaa gtggtaactt 420
ttactcatct cctccaatta tttctgattt catgcatgtt tccctacatt ctattatgaa 480
tcgtgttatg gtgtataaac gttgtttcat atctcatctc atctattctg attttgattc 540
tcttgcctac tgaatttgac cctactgtaa tcggtgataa atgtgaatgc ttcctcttct 600
tcttcttctt ctcagaaatc aatttctgtt ttgtttttgt tcatctgtag cttggtagat 660
tccccttttt gtagaccaca catcac 686

<210>14
<211>2046
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：与 R1 基因相连的前导区的有义和反义拷贝的替换性表达盒

<400>14

ggtaccgaac catgcatctc aatcttaata ctaaaaaatg caacaaaatt ctagtggagg 60
gaccagtacc agtacattag atattatctt ttattactat aataatattt taattaacac 120
gagacatagg aatgtcaagt ggtagcggta ggagggagtt ggttcagttt tttagatact 180
aggagacaga accggagggg cccattgcaa ggcccaagtt gaagtccagc cgtgaatcaa 240
caaagagagg gcccataata ctgtcgatga gcatttccct ataatacagt gtccacagtt 300
gccttccgct aagggatagc cacccgctat tctcttgaca cgtgtcactg aaacctgcta 360
caaataaggc aggcacctcc tcattctcac actcactcac tcacacagct caagaaggat 420
cctcatattc tagttgtatg ttgttcagag aagaccacag atgtgatcat attctcattg 480
tatcagatct gtgaccactt acctgatacc tcccatgaag ttacctgtat gattatacgt 540
gatccaaagc catcacatca tgttcacctt cagctattgg aggagaagtg agaagtagga 600
attgcaatat gaggaataat aagaaaaact ttgtaaa gc taaattagct gggtatgata 660
tagggagaaa tgtgtaaaca ttgtactata tatagtatat acacacgcat tatgtattgc 720
attatgcact gaataatacc gcagcatcaa agaaggaatt caaggttaga aatcttctct 780
atttttggtt tttgtctgtt tagattctcg aattagctaa tcaggtgctg ttatagccct 840
taattttgag ttttttttcg gttgttttga tggaaaaggc ctaaaatttg agtttttta 900
cgttggtttg atggaaaagg cctacaattg gagtttcccc cgttgttttg atgaaaaagc 960
ccctagtttg agatttttt tctgtcgatt cgattctaaa ggtttaaaat tagagttttt 1020
acatttgttt gatgaaaaag gccttaaatt tgagtttttc cggttgattt gatgaaaaag 1080
ccctagaatt tgtgtttttt cgtcggtttg attctgaagg cctaaaattt gagtttctcc 1140
ggctgttttg atgaaaaagc cctaaatttg agtttctccg gctgttttga tgaaaaagcc 1200
ctaaatttga gttttttccc cgtgttttag attgtttggt tttaattctc gaatcagcta 1260
atcagggagt gtgaaaagcc ctaaaatttg agtttttttc gttgttctga ttgttgtttt 1320
tatgaatttg cagatggata tccttctttg atgctgcggt attattcagt gcataatgca 1380
atacataatg cgtgtgtata tactatatat agtacaatgt ttacacattt ctccctatat 1440
catacccagc taatttagct tttacaaagt ttttcttatt attcctcata ttgcaattcc 1500
tacttctcac ttctcctcca atagctgaag gtgaacatga tgtgatggct ttggatcacg 1560
tataatcata caggtaactt catgggaggt atcaggtaag tggtcacaga tctgatacaa 1620
tgagaatatg atcacatctg tggtcttctc tgaacaacat acaactagaa tatgaaagct 1680
tttgatttta atgtttagca aatgtcctat cagttttctc tttttgtcga acggtaattt 1740
agagtttttt ttgctatatg gattttcgtt tttgatgtat gtgacaaccc tcgggattgt 1800
tgatttattt caaaactaag agtttttgct tattgttctc gtctattttg gatatcaatc 1860
ttagttttat atcttttcta gttctctacg tgttaaatgt tcaacacact agcaatttgg 1920
ctgcagcgta tggattatgg aactatcaag tctgtgggat cgataaatat gcttctcagg 1980
aatttgagat tttacagtct ttatgctcat tgggttgagt ataatatagt aaaaaaatag 2040
tctaga 2046

<210>15
<211>1714
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：与 R1 基因相连的前导区的有义和反义拷贝的替换性表达盒

<400>15
ggtaccgaac catgcatctc aatcttaata ctaaaaaatg caacaaaatt ctagtggagg 60
gaccagtacc agtacattag atattatctt ttattactat aataatattt taattaacac 120
gagacatagg aatgtcaagt ggtagcggta ggagggagtt ggttcagttt tttagatact 180
aggagacaga accggagggg cccattgcaa ggcccaagtt gaagtccagc cgtgaatcaa 240
caaagagagg gcccataata ctgtcgatga gcatttccct ataatacagt gtccacagtt 300
gccttccgct aagggatagc cacccgctat tctcttgaca cgtgtcactg aaacctgcta 360
caaataaggc aggcacctcc tcattctcac actcactcac tcacacagct caagaaggat 420
cctcatattc tagttgtatg ttgttcagag aagaccacag atgtgatcat attctcattg 480
tatcagatct gtgaccactt acctgatacc tcccatgaag ttacctgtat gattatacgt 540
gatccaaagc catcacatca tgttcacctt cagctattgg aggagaagtg agaagtagga 600
attgcaatat gaggaataat aagaaaaact ttgtaaaagc taaattagct gggtatgata 660
tagggagaaa tgtgtaaaca ttgtactata tatagtatat acacacgcat tatgtattgc 720
attatgcact gaataatacc gcagcatcaa agaaggaatt cgtggtaact tttactcatc 780
tcctccaatt atttctgatt tcatgcatgt ttccctacat tctattatga atcgtgttat 840
ggtgtataaa cgttgtttca tatctcatct catctattct gattttgatt ctcttgccta 900
ctgaatttga ccctactgta atcggtgata aatgtgaatg cttcctcttc ttcttcttct 960
tctcagaaat caatttctgt tttgtttttg ttcatctgta gcttgatatc cttctttgat 1020
gctgcggtat tattcagtgc ataatgcaat acataatgcg tgtgtatata ctatatatag 1080
tacaatgttt acacatttct ccctatatca tacccagcta atttagcttt tacaaagttt 1140
ttcttattat tcctcatatt gcaattccta cttctcactt ctcctccaat agctgaaggt 1200
gaacatgatg tgatggcttt ggatcacgta taatcataca ggtaacttca tgggaggtat 1260
caggtaagtg gtcacagatc tgatacaatg agaatatgat cacatctgtg gtcttctctg 1320
aacaacatac aactagaata tgaaagcttt tgattttaat gtttagcaaa tgtcctatca 1380
gttttctctt tttgtcgaac ggtaatttag agtttttttt gctatatgga ttttcgtttt 1440
tgatgtatgt gacaaccctc gggattgttg atttatttca aaactaagag tttttgctta 1500
ttgttctcgt ctattttgga tatcaatctt agttttatat cttttctagt tctctacgtg 1560
ttaaatgttc aacacactag caatttggct gcagcgtatg gattatggaa ctatcaagtc 1620
tgtgggatcg ataaatatgc ttctcaggaa tttgagattt tacagtcttt atgctcattg 1680
ggttgagtat aatatagtaa aaaaatagtc taga 1714

<210>16
<211>333
<212>DNA
<213>Solanum tuberosum

<400>16
tcatattcta gttgtatgtt gttcagagaa gaccacagat gtgatcatat tctcattgta 60
tcagatctgt gaccacttac ctgatacctc ccatgaagtt acctgtatga ttatacgtga 120
tccaaagcca tcacatcatg ttcaccttca gctattggag gagaagtgag aagtaggaat 180
tgcaatatga ggaataataa gaaaaacttt gtaaaagcta aattagctgg gtatgatata 240
gggagaaatg tgtaaacatt gtactatata tagtatatac acacgcatta tgtattgcat 300
tatgcactga ataataccgc agcatcaaag aag 333

<210>17
<211>2046
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：与 R1 基因相连的尾随区的有义和反义拷贝的替换性表达盒

<400>17
ggtaccgaac catgcatctc aatcttaata ctaaaaaatg caacaaaatt ctagtggagg 60
gaccagtacc agtacattag atattatctt ttattactat aataatattt taattaacac 120
gagacatagg aatgtcaagt ggtagcggta ggagggagtt ggttcagttt tttagatact 180
aggagacaga accggagggg cccattgcaa ggcccaagtt gaagtccagc cgtgaatcaa 240
caaagagagg gcccataata ctgtcgatga gcatttccct ataatacagt gtccacagtt 300
gccttccgct aagggatagc cacccgctat tctcttgaca cgtgtcactg aaacctgcta 360
caaataaggc aggcacctcc tcattctcac actcactcac tcacacagct caagaaggat 420
cctcatattc tagttgtatg ttgttcagag aagaccacag atgtgatcat attctcattg 480
tatcagatct gtgaccactt acctgatacc tcccatgaag ttacctgtat gattatacgt 540
gatccaaagc catcacatca tgttcacctt cagctattgg aggagaagtg agaagtagga 600
attgcaatat gaggaataat aagaaaaact ttgtaaaagc taaattagct gggtatgata 660
tagggagaaa tgtgtaaaca ttgtactata tatagtatat acacacgcat tatgtattgc 720
attatgcact gaataatacc gcagcatcaa agaaggaatt caaggttaga aatcttctct 780
atttttggtt tttgtctgtt tagattctcg aattagctaa tcaggtgctg ttatagccct 840
taattttgag tttttttttcg gttgttttga tggaaaaggc ctaaaatttg agtttttttta 900
cgttggtttg atggaaaagg cctacaattg gagtttttccc cgttgttttg atgaaaaagc 960
ccctagtttg agatttttttt tctgtcgatt cgattctaaa ggtttaaaat tagagttttt 1020

acatttgttt gatgaaaaag gccttaaatt tgagtttttc cggttgattt gatgaaaaag 1080
ccctagaatt tgtgtttttt cgtcggtttg attctgaagg cctaaaattt gagtttctcc 1140
ggctgttttg atgaaaaagc cctaaatttg agtttctccg gctgttttga tgaaaaagcc 1200
ctaaatttga gttttttccc cgtgttttag attgtttggt tttaattctc gaatcagcta 1260
atcagggagt gtgaaaagcc ctaaaatttg agtttttttc gttgttctga ttgttgtttt 1320
tatgaatttg cagatggata tccttctttg atgctgcggt attattcagt gcataatgca 1380
atacataatg cgtgtgtata tactatatat agtacaatgt ttacacattt ctccctatat 1440
catacccagc taatttagct tttacaaagt ttttcttatt attcctcata ttgcaattcc 1500
tacttctcac ttctcctcca atagctgaag gtgaacatga tgtgatggct ttggatcacg 1560
tataatcata caggtaactt catgggaggt atcaggtaag tggtcacaga tctgatacaa 1620
tgagaatatg atcacatctg tggtcttctc tgaacaacat acaactagaa tatgaaagct 1680
tttgatttta atgtttagca aatgtcctat cagttttctc tttttgtcga acggtaattt 1740
agagtttttt ttgctatatg gattttcgtt tttgatgtat gtgacaaccc tcgggattgt 1800
tgatttattt caaaactaag agtttttgct tattgttctc gtctattttg gatatcaatc 1860
ttagttttat atcttttcta gttctctacg tgttaaatgt tcaacacact agcaatttgg 1920
ctgcagcgta tggattatgg aactatcaag tctgtgggat cgataaatat gcttctcagg 1980
aatttgagat tttacagtct ttatgctcat tgggttgagt ataatatagt aaaaaaatag 2040
tctaga 2046

<210>18
<211>1714
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :与 R1 基因相连的尾随区的有义和反义拷贝的替换性表达盒

<400>18
ggtaccgaac catgcatctc aatcttaata ctaaaaaatg caacaaaatt ctagtggagg 60
gaccagtacc agtacattag atattatctt ttattactat aataatattt taattaacac 120
gagacatagg aatgtcaagt ggtagcggta ggagggagtt ggttcagttt tttagatact 180
aggagacaga accggagggg cccattgcaa ggcccaagtt gaagtccagc cgtgaatcaa 240
caaagagagg gcccataata ctgtcgatga gcatttccct ataatacagt gtccacagtt 300
gccttccgct aagggatagc cacccgctat tctcttgaca cgtgtcactg aaacctgcta 360
caaataaggc aggcacctcc tcattctcac actcactcac tcacacagct caagaaggat 420
cctcatattc tagttgtatg ttgttcagag aagaccacag atgtgatcat attctcattg 480
tatcagatct gtgaccactt acctgatacc tcccatgaag ttacctgtat gattatacgt 540
gatccaaagc catcacatca tgttcacctt cagctattgg aggagaagtg agaagtagga 600
attgcaatat gaggaataat aagaaaaact ttgtaaaagc taaattagct gggtatgata 660

tagggagaaa tgtgtaaaca ttgtactata tatagtatat acacacgcat tatgtattgc 720
attatgcact gaataatacc gcagcatcaa agaaggaatt cgtggtaact tttactcatc 780
tcctccaatt atttctgatt tcatgcatgt ttccctacat tctattatga atcgtgttat 840
ggtgtataaa cgttgtttca tatctcatct catctattct gattttgatt ctcttgccta 900
ctgaatttga ccctactgta atcggtgata aatgtgaatg cttcctcttc ttcttcttct 960
tctcagaaat caatttctgt tttgtttttg ttcatctgta gcttgatatc cttctttgat 1020
gctgcggtat tattcagtgc ataatgcaat acataatgcg tgtgtatata ctatatatag 1080
tacaatgttt acacatttct ccctatatca tacccagcta atttagcttt tacaaagttt 1140
ttcttattat tcctcatatt gcaattccta cttctcactt ctcctccaat agctgaaggt 1200
gaacatgatg tgatggcttt ggatcacgta taatcataca ggtaacttca tgggaggtat 1260
caggtaagtg gtcacagatc tgatacaatg agaatatgat cacatctgtg gtcttctctg 1320
aacaacatac aactagaata tgaaagcttt tgattttaat gtttagcaaa tgtcctatca 1380
gttttctctt tttgtcgaac ggtaatttag agtttttttt gctatatgga ttttcgtttt 1440
tgatgtatgt gacaaccctc gggattgttg atttatttca aaactaagag tttttgctta 1500
ttgttctcgt ctattttgga tatcaatctt agttttatat cttttctagt tctctacgtg 1560
ttaaatgttc aacacactag caatttggct gcagcgtatg gattatggaa ctatcaagtc 1620
tgtgggatcg ataaatatgc ttctcaggaa tttgagattt tacagtcttt atgctcattg 1680
ggttgagtat aatatagtaa aaaaatagtc taga 1714

<210>19
<211>2322
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :与 R1 基因相连的尾随区的有义和反义拷贝的替换性表达盒

<400>19
ggtaccgaac catgcatctc aatcttaata ctaaaaaatg caacaaaatt ctagtggagg 60
gaccagtacc agtacattag atattatctt ttattactat aataatattt taattaacac 120
gagacatagg aatgtcaagt ggtagcggta ggagggagtt ggttcagttt tttagatact 180
aggagacaga accggagggg cccattgcaa ggcccaagtt gaagtccagc cgtgaatcaa 240
caaagagagg gcccataata ctgtcgatga gcatttccct ataatacagt gtccacagtt 300
gccttccgct aagggatagc cacccgctat tctcttgaca cgtgtcactg aaacctgcta 360
caaataaggc aggcacctcc tcattctcac actcactcac tcacacagct caacaagtgg 420
taacttttac tcatctcctc caattatttc tgatttcatg catgtttccc tacattctat 480
tatgaatcgt gttatggtgt ataaacgttg tttcatatct catctcatct attctgattt 540
tgattctctt gcctactgaa tttgacccta ctgtaatcgg tgataaatgt gaatgcttcc 600
tcttcttctt cttcttctca gaaatcaatt tctgttttgt ttttgttcat ctgtagcttg 660

gtagattccc ctttttgtag accacacatc acggatcctc atattctagt tgtatgttgt 720
tcagagaaga ccacagatgt gatcatattc tcattgtatc agatctgtga ccacttacct 780
gatacctccc atgaagttac ctgtatgatt atacgtgatc caaagccatc acatcatgtt 840
caccttcagc tattggagga gaagtgagaa gtaggaattg caatatgagg aataataaga 900
aaaactttgt aaaagctaaa ttagctgggt atgatatagg gagaaatgtg taaacattgt 960
actatatata gtatatacac acgcattatg tattgcatta tgcactgaat aataccgcag 1020
catcaaagaa ggaattcaag gttagaaatc ttctctattt ttggtttttg tctgtttaga 1080
ttctcgaatt agctaatcag gtgctgttat agcccttaat tttgagtttt ttttcggttg 1140
ttttgatgga aaaggcctaa aatttgagtt tttttacgtt ggtttgatgg aaaaggccta 1200
caattggagt tttccccgtt gttttgatga aaaagcccct agtttgagat tttttttctg 1260
tcgattcgat tctaaaggtt taaaattaga gtttttacat ttgtttgatg aaaaaggcct 1320
taaatttgag tttttccggt tgatttgatg aaaaagccct agaatttgtg ttttttcgtc 1380
ggtttgattc tgaaggccta aaatttgagt ttctccggct gttttgatga aaaagcccta 1440
aatttgagtt tctccggctg ttttgatgaa aaagccctaa atttgagttt tttccccgtg 1500
ttttagattg tttggtttta attctcgaat cagctaatca gggagtgtga aaagccctaa 1560
aatttgagtt tttttcgttg ttctgattgt tgtttttatg aatttgcaga tggatatcct 1620
tctttgatgc tgcggtatta ttcagtgcat aatgcaatac ataatgcgtg tgtatatact 1680
atatatagta caatgtttac acatttctcc ctatatcata cccagctaat ttagctttta 1740
caaagttttt cttattattc ctcatattgc aattcctact tctcacttct cctccaatag 1800
ctgaaggtga acatgatgtg atggctttgg atcacgtata atcatacagg taacttcatg 1860
ggaggtatca ggtaagtggt cacagatctg atacaatgag aatatgatca catctgtggt 1920
cttctctgaa caacatacaa ctagaatatg aaagcttttg attttaatgt ttagcaaatg 1980
tcctatcagt tttctctttt tgtcgaacgg taatttagag tttttttttgc tatatggatt 2040
ttcgtttttg atgtatgtga caaccctcgg gattgttgat ttatttcaaa actaagagtt 2100
tttgcttatt gttctcgtct attttggata tcaatcttag ttttatatct tttctagttc 2160
tctacgtgtt aaatgttcaa cacactagca atttggctgc agcgtatgga ttatggaact 2220
atcaagtctg tgggatcgat aaatatgctt ctcaggaatt tgagatttta cagtctttat 2280
gctcattggg ttgagtataa tatagtaaaa aaatagtcta ga 2322

<210>20
<211>1714
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：与 R1 基因相连的尾随区的有义和反义拷贝的替换性表达盒

<400>20
ggtaccgaac catgcatctc aatcttaata ctaaaaaatg caacaaaatt ctagtggagg 60

gaccagtacc agtacattag atattatctt ttattactat aataatattt taattaacac 120
gagacatagg aatgtcaagt ggtagcggta ggagggagtt ggttcagttt tttagatact 180
aggagacaga accggagggg cccattgcaa ggcccaagtt gaagtccagc cgtgaatcaa 240
caaagagagg gcccataata ctgtcgatga gcatttccct ataatacagt gtccacagtt 300
gccttccgct aagggatagc cacccgctat tctcttgaca cgtgtcactg aaacctgcta 360
caaataaggc aggcacctcc tcattctcac actcactcac tcacacagct caagaaggat 420
cctcatattc tagttgtatg ttgttcagag aagaccacag atgtgatcat attctcattg 480
tatcagatct gtgaccactt acctgatacc tcccatgaag ttacctgtat gattatacgt 540
gatccaaagc catcacatca tgttcacctt cagctattgg aggagaagtg agaagtagga 600
attgcaatat gaggaataat aagaaaaact ttgtaaaagc taaattagct gggtatgata 660
tagggagaaa tgtgtaaaca ttgtactata tatagtatat acacacgcat tatgtattgc 720
attatgcact gaataatacc gcagcatcaa agaaggaatt cgtggtaact tttactcatc 780
tcctccaatt atttctgatt tcatgcatgt ttccctacat tctattatga atcgtgttat 840
ggtgtataaa cgttgtttca tatctcatct catctattct gattttgatt ctcttgccta 900
ctgaatttga ccctactgta atcggtgata aatgtgaatg cttcctcttc ttcttcttct 960
tctcagaaat caatttctgt tttgtttttg ttcatctgta gcttgatatc cttctttgat 1020
gctgcggtat tattcagtgc ataatgcaat acataatgcg tgtgtatata ctatatatag 1080
tacaatgttt acacatttct ccctatatca tacccagcta atttagcttt tacaaagttt 1140
ttcttattat tcctcatatt gcaattccta cttctcactt ctcctccaat agctgaaggt 1200
gaacatgatg tgatggcttt ggatcacgta taatcataca ggtaacttca tgggaggtat 1260
caggtaagtg gtcacagatc tgatacaatg agaatatgat cacatctgtg gtcttctctg 1320
aacaacatac aactagaata tgaaagcttt tgattttaat gtttagcaaa tgtcctatca 1380
gttttctctt tttgtcgaac ggtaatttag agttttttt gctatatgga ttttcgtttt 1440
tgatgtatgt gacaaccctc gggattgttg atttatttca aaactaagag tttttgctta 1500
ttgttctcgt ctattttgga tatcaatctt agttttatat cttttctagt tctctacgtg 1560
ttaaatgttc aacacactag caatttggct gcagcgtatg gattatggaa ctatcaagtc 1620
tgtgggatcg ataaatatgc ttctcaggaa tttgagattt tacagtcttt atgctcattg 1680
ggttgagtat aatatagtaa aaaaatagtc taga 1714

<210>21
<211>273
<212>DNA
<213>Solanum tuberosum

<400>21
ttagagtgtg ggtaagtaat taagttaggg atttgtggga aatggacaaa tataagagag 60
tgcaggggag tagtgcagga gattttcgtg cttttattga taaataaaaa aagggtgaca 120
tttaatttcc acaagaggac gcaacacaac acacttaatt cctgtgtgtg aatcaataat 180
tgacttctcc aatcttcatc aataaaataa ttcacaatcc tcactctctt atcactctca 240

ttcgaaaagc tagatttgca tagagagcac aaa 273

<210>22
<211>158
<212>DNA
<213>Solanum tuberosum

<400>22
gaggggaag tgaatgaaaa ataacaaagg cacagtaagt agtttctctt tttatcatgt 60
gatgaaggta tataatgtat gtgtaagagg atgatgttat taccacataa taagagatga 120
agagtctcat tttctgctta aaaaaacaat tcactggc 158

<210>23
<211>1917
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :与 L 葡聚糖磷酸化酶基因相连的前导区的有义和反义拷贝的表达盒

<400>23
ggtaccgaac catgcatctc aatcttaata ctaaaaaatg caacaaaatt ctagtggagg 60
gaccagtacc agtacattag atattatctt ttattactat aataatattt taattaacac 120
gagacatagg aatgtcaagt ggtagcggta ggagggagtt ggttcagttt tttagatact 180
aggagacaga accggagggg cccattgcaa ggcccaagtt gaagtccagc cgtgaatcaa 240
caaagagagg gcccataata ctgtcgatga gcatttccct ataatacagt gtccacagtt 300
gccttccgct aagggatagc cacccgctat tctcttgaca cgtgtcactg aaacctgcta 360
caaataaggc aggcacctcc tcattctcac actcactcac tcacacagct caagaaggat 420
ccgagtgtgg gtaagtaatt aagttaggga tttgtgggaa atggacaaat ataagagagt 480
gcaggggagt agtgcaggag attttcgtgc ttttattgat aaataaaaaa agggtgacat 540
ttaatttcca caagaggacg caacacaaca cacttaattc ctgtgtgtga atcaataatt 600
gacttctcca atcttcatca ataaaataat tcacaatcct cactctctta tcactctcat 660
tcgaaaagct agatttgcat agagagcaca gaattcaagg ttagaaatct tctctatttt 720
tggtttttgt ctgtttagat tctcgaatta gctaatcagg tgctgttata gcccttaatt 780
ttgagttttt tttcggttgt tttgatggaa aaggcctaaa atttgagttt ttttacgttg 840
gtttgatgga aaaggcctac aattggagtt ttccccgttg ttttgatgaa aaagccccta 900
gtttgagatt ttttttctgt cgattcgatt ctaaaggttt aaaattagag tttttacatt 960
tgtttgatga aaaaggcctt aaatttgagt ttttccggtt gatttgatga aaaagcccta 1020

gaatttgtgt tttttcgtcg gtttgattct gaaggcctaa aatttgagtt tctccggctg 1080
ttttgatgaa aaagccctaa atttgagttt ctccggctgt tttgatgaaa aagccctaaa 1140
tttgagtttt ttccccgtgt tttagattgt ttggttttaa ttctcgaatc agctaatcag 1200
ggagtgtgaa aagccctaaa atttgagttt ttttcgttgt tctgattgtt gtttttatga 1260
atttgcagat ggatatctgt gctctctatg caaatctagc ttttcgaatg agagtgataa 1320
gagagtgagg attgtgaatt attttattga tgaagattgg agaagtcaat tattgattca 1380
cacacaggaa ttaagtgtgt tgtgttgcgt cctcttgtgg aaattaaatg tcacccttttt 1440
tttatttatc aataaaagca cgaaaatctc ctgcactact cccctgcact ctcttatatt 1500
tgtccatttc ccacaaatcc ctaacttaat tacttaccca cactctaagc ttttgatttt 1560
aatgtttagc aaatgtccta tcagttttct ctttttgtcg aacggtaatt tagagttttt 1620
tttgctatat ggattttcgt ttttgatgta tgtgacaacc ctcgggattg ttgatttatt 1680
tcaaaactaa gagtttttgc ttattgttct cgtctatttt ggatatcaat cttagtttta 1740
tatcttttct agttctctac gtgttaaatg ttcaacacac tagcaatttg gctgcagcgt 1800
atggattatg gaactatcaa gtctgtggga tcgataaata tgcttctcag gaatttgaga 1860
ttttacagtc tttatgctca ttgggttgag tataatatag taaaaaaata gtctaga 1917

<210>24
<211>1585
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：与 L 葡聚糖磷酸化酶基因相连的前导区的有义和反义拷贝的替换性
表达盒

<400>24
ggtaccgaac catgcatctc aatcttaata ctaaaaaatg caacaaaatt ctagtggagg 60
gaccagtacc agtacattag atattatctt ttattactat aataatattt taattaacac 120
gagacatagg aatgtcaagt ggtagcggta ggagggagtt ggttcagttt tttagatact 180
aggagacaga accggagggg cccattgcaa ggcccaagtt gaagtccagc cgtgaatcaa 240
caaagagagg gcccataata ctgtcgatga gcatttccct ataatacagt gtccacagtt 300
gccttccgct aagggatagc cacccgctat tctcttgaca cgtgtcactg aaacctgcta 360
caaataaggc aggcacctcc tcattctcac actcactcac tcacacagct caagaaggat 420
ccgagtgtgg gtaagtaatt aagttaggga tttgtgggaa atggacaaat ataagagagt 480
gcaggggagt agtgcaggag attttcgtgc ttttattgat aaataaaaaa agggtgacat 540
ttaatttcca caagaggacg caacacaaca cacttaattc ctgtgtgtga atcaataatt 600
gacttctcca atcttcatca ataaaataat tcacaatcct cactctctta tcactctcat 660
tcgaaaagct agatttgcat agagagcaca gaattcgtgg taacttttac tcatctcctc 720

caattatttc tgatttcatg catgtttccc tacattctat tatgaatcgt gttatggtgt 780
ataaacgttg tttcatatct catctcatct attctgattt tgattctctt gcctactgaa 840
tttgacccta ctgtaatcgg tgataaatgt gaatgcttcc tcttcttctt cttcttctca 900
gaaatcaatt tctgttttgt ttttgttcat ctgtagcttg atatctgtgc tctctatgca 960
aatctagctt ttcgaatgag agtgataaga gagtgaggat tgtgaattat tttattgatg 1020
aagattggag aagtcaatta ttgattcaca cacaggaatt aagtgtgttg tgttgcgtcc 1080
tcttgtggaa attaaatgtc acccttttt tatttatcaa taaaagcacg aaaatctcct 1140
gcactactcc cctgcactct cttatatttg tccatttccc acaaatccct aacttaatta 1200
cttacccaca ctctaagctt ttgattttaa tgtttagcaa atgtcctatc agttttctct 1260
ttttgtcgaa cggtaattta gagttttttt tgctatatgg attttcgttt ttgatgtatg 1320
tgacaaccct cgggattgtt gatttatttc aaaactaaga gtttttgctt attgttctcg 1380
tctattttgg atatcaatct tagttttata tcttttctag ttctctacgt gttaaatgtt 1440
caacacacta gcaatttggc tgcagcgtat ggattatgga actatcaagt ctgtgggatc 1500
gataaatatg cttctcagga atttgagatt ttacagtctt tatgctcatt gggttgagta 1560
taatatagta aaaaaatagt ctaga 1585

<210>25
<211>2193
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：与 L 葡聚糖磷酸化酶基因相连的前导区的有义和反义拷贝的替换性
表达盒

<400>25
ggtaccgaac catgcatctc aatcttaata ctaaaaaatg caacaaaatt ctagtggagg 60
gaccagtacc agtacattag atattatctt ttattactat aataatattt taattaacac 120
gagacatagg aatgtcaagt ggtagcggta ggagggagtt ggttcagttt tttagatact 180
aggagacaga accggagggg cccattgcaa ggcccaagtt gaagtccagc cgtgaatcaa 240
caaagagagg gcccataata ctgtcgatga gcatttccct ataatacagt gtccacagtt 300
gccttccgct aagggatagc cacccgctat tctcttgaca cgtgtcactg aaacctgcta 360
caaataaggc aggcacctcc tcattctcac actcactcac tcacacagct caacaagtgg 420
taacttttac tcatctcctc caattatttc tgatttcatg catgtttccc tacattctat 480
tatgaatcgt gttatggtgt ataaacgttg tttcatatct catctcatct attctgattt 540
tgattctctt gcctactgaa tttgacccta ctgtaatcgg tgataaatgt gaatgcttcc 600
tcttcttctt cttcttctca gaaatcaatt tctgttttgt ttttgttcat ctgtagcttg 660
gtagattccc ctttttgtag accacacatc acggatccga gtgtgggtaa gtaattaagt 720

tagggatttg tgggaaatgg acaaatataa gagagtgcag gggagtagtg caggagattt 780
tcgtgctttt attgataaat aaaaaaaggg tgacatttaa tttccacaag aggacgcaac 840
acaacacact taattcctgt gtgtgaatca ataattgact tctccaatct tcatcaataa 900
aataattcac aatcctcact ctcttatcac tctcattcga aaagctagat ttgcatagag 960
agcacagaat tcaaggttag aaatcttctc tatttttggt ttttgtctgt ttagattctc 1020
gaattagcta atcaggtgct gttatagccc ttaattttga gtttttttc ggttgttttg 1080
atggaaaagg cctaaaattt gagtttttt acgttggttt gatggaaaag gcctacaatt 1140
ggagttttcc ccgttgtttt gatgaaaaag cccctagttt gagatttttt ttctgtcgat 1200
tcgattctaa aggtttaaaa ttagagtttt tacatttgtt tgatgaaaaa ggccttaaat 1260
ttgagttttt ccggttgatt tgatgaaaaa gccctagaat ttgtgttttt tcgtcggttt 1320
gattctgaag gcctaaaatt tgagtttctc cggctgtttt gatgaaaaag ccctaaattt 1380
gagtttctcc ggctgttttg atgaaaaagc cctaaatttg agtttttcc ccgtgtttta 1440
gattgtttgg ttttaattct cgaatcagct aatcagggag tgtgaaaagc cctaaaattt 1500
gagttttttt cgttgttctg attgttgttt ttatgaattt gcagatggat atctgtgctc 1560
tctatgcaaa tctagctttt cgaatgagag tgataagaga gtgaggattg tgaattattt 1620
tattgatgaa gattggagaa gtcaattatt gattcacaca caggaattaa gtgtgttgtg 1680
ttgcgtcctc ttgtggaaat taaatgtcac cctttttta tttatcaata aaagcacgaa 1740
aatctcctgc actactcccc tgcactctct tatatttgtc catttcccac aaatccctaa 1800
cttaattact tacccacact ctaagctttt gattttaatg tttagcaaat gtcctatcag 1860
ttttctcttt ttgtcgaacg gtaatttaga gtttttttg ctatatggat tttcgttttt 1920
gatgtatgtg acaaccctcg ggattgttga tttatttcaa aactaagagt ttttgcttat 1980
tgttctcgtc tattttggat atcaatctta gttttatatc ttttctagtt ctctacgtgt 2040
taaatgttca acacactagc aatttggctg cagcgtatgg attatggaac tatcaagtct 2100
gtgggatcga taaatatgct tctcaggaat ttgagatttt acagtcttta tgctcattgg 2160
gttgagtata atatagtaaa aaaatagtct aga 2193

<210>26
<211>1861
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：与 L 葡聚糖磷酸化酶基因相连的前导区的有义和反义拷贝的替换性
表达盒

<400>26
ggtaccgaac catgcatctc aatcttaata ctaaaaaatg caacaaaatt ctagtggagg 60
gaccagtacc agtacattag atattatctt ttattactat aataatattt taattaacac 120

gagacatagg aatgtcaagt ggtagcggta ggagggagtt ggttcagttt tttagatact 180
aggagacaga accggagggg cccattgcaa ggcccaagtt gaagtccagc cgtgaatcaa 240
caaagagagg gcccataata ctgtcgatga gcatttccct ataatacagt gtccacagtt 300
gccttccgct aagggatagc cacccgctat tctcttgaca cgtgtcactg aaacctgcta 360
caaataaggc aggcacctcc tcattctcac actcactcac tcacacagct caacaagtgg 420
taacttttac tcatctcctc caattatttc tgatttcatg catgtttccc tacattctat 480
tatgaatcgt gttatggtgt ataaacgttg tttcatatct catctcatct attctgattt 540
tgattctctt gcctactgaa tttgacccta ctgtaatcgg tgataaatgt gaatgcttcc 600
tcttcttctt cttcttctca gaaatcaatt tctgttttgt ttttgttcat ctgtagcttg 660
gtagattccc ctttttgtag accacacatc acggatccga gtgtgggtaa gtaattaagt 720
tagggatttg tgggaaatgg acaaatataa gagagtgcag gggagtagtg caggagattt 780
tcgtgctttt attgataaat aaaaaaaggg tgacatttaa tttccacaag aggacgcaac 840
acaacacact taattcctgt gtgtgaatca ataattgact tctccaatct tcatcaataa 900
aataattcac aatcctcact ctcttatcac tctcattcga aaagctagat ttgcatagag 960
agcacagaat tcgtggtaac ttttactcat ctcctccaat tatttctgat ttcatgcatg 1020
tttccctaca ttctattatg aatcgtgtta tggtgtataa acgttgtttc atatctcatc 1080
tcatctattc tgattttgat tctcttgcct actgaatttg accctactgt aatcggtgat 1140
aaatgtgaat gcttcctctt cttcttcttc ttctcagaaa tcaatttctg ttttgttttt 1200
gttcatctgt agcttgatat ctgtgctctc tatgcaaatc tagcttttcg aatgagagtg 1260
ataagagagt gaggattgtg aattatttta ttgatgaaga ttggagaagt caattattga 1320
ttcacacaca ggaattaagt gtgttgtgtt gcgtcctctt gtggaaatta aatgtcaccc 1380
ttttttttatt tatcaataaa agcacgaaaa tctcctgcac tactcccctg cactctctta 1440
tatttgtcca tttcccacaa atccctaact taattactta cccacactct aagcttttga 1500
ttttaatgtt tagcaaatgt cctatcagtt ttctcttttt gtcgaacggt aatttagagt 1560
tttttttgct atatggattt tcgtttttga tgtatgtgac aaccctcggg attgttgatt 1620
tatttcaaaa ctaagagttt ttgcttattg ttctcgtcta ttttggatat caatcttagt 1680
tttatatctt ttctagttct ctacgtgtta aatgttcaac acactagcaa tttggctgca 1740
gcgtatggat tatggaacta tcaagtctgt gggatcgata aatatgcttc tcaggaattt 1800
gagattttac agtctttatg ctcattgggt tgagtataat atagtaaaaa aatagtctag 1860
a 1861

<210>27
<211>1788
<212>DNA
<213>Solanum tuberosum

<400>27
atggcaagct tgtgcaatag tagtagtaca tctctcaaaa ctccttttac ttcttcctcc 60
acttctttat cttccactcc taagccctct caacttttca tccatggaaa acgtaaccaa 120

atgttcaaag tttcatgcaa ggttatcaat aataacggtg accaaaacgt tgaaacgaat 180
tctgttgatc gaagaaatgt tcttcttggc ttaggtggtc tttatggtgt tgctaatgct 240
ataccattag ctgcatccgc tgctccaact ccacctcctg atctctcgtc ttgtagtata 300
gccaggatta acgaaaatca ggtggtgccg tacagttgtt gcgcgcctaa gcctgatgat 360
atggagaaag ttccgtatta caagttccct tctatgacta agctccgtgt ccgtcagcct 420
gctcatgaag ctaatgagga gtatattgcc aagtacaatc tggcgattag tcgaatgaga 480
gatcttgata agacacaacc tttaaaccct attggtttta agcaacaagc taatatacat 540
tgtgcttatt gtaatggtgc ttatagaatt ggtggcaaag agttacaagt tcataattct 600
tggcttttct tcccgttcca tagatggtac ttgtacttcc acgagagaat cgtgggaaaa 660
ttcattgatg atccaacttt cgctttgcca tattggaatt gggaccatcc aaagggtatg 720
cgttttcctg ccatgtatga tcgtgaaggg acttcccttt tcgatgtaac acgtgaccaa 780
agtcaccgaa atggagcagt aatcgatctt ggtttttcg gcaatgaagt cgaaacaact 840
caactccagt tgatgagcaa taatttaaca ctaatgtacc gtcaaatggt aactaatgct 900
ccatgtcctc ggatgttctt tggtgggcct tatgatctcg ggattaacac tgaactcccg 960
ggaactatag aaaacattcc tcacggtcct gtccacatct ggtctggtac agtgagaggt 1020
tcaactttgc ccaatggtgc aatatcaaac ggtgagaata tgggtcattt ttactcagct 1080
gctttggacc cggttttctt ttgccatcac agcaatgtgg atcggatgtg gagcgaatgg 1140
aaagcgacag gagggaaaag aacagatatc acacataaag gttggttgaa ctccgagttc 1200
tttttctatg atgaaaatga aaacccttac cgtgtgaaag tccgagactg tttggacacg 1260
aagaagatgg ggtatgatta tgcaccaatg gccaccccgt ggcgtaactt caagccaata 1320
acaaaaacta cagctgggaa agtgaataca gcttctcttc cgccagctag caatgtattc 1380
ccagtggcta aactcgacaa agcaatttcg ttttccatca ataggccgac ttcgtcaagg 1440
actcaacaag agaaaaatgc acaagaggag atgttgacat tcagtagcat aagatatgat 1500
aacagagggt acataaggtt cgatgtgttc ctgaacgtgg acaataatgt gaatgcgaat 1560
gagcttgaca aggcggagtt tgcggggagt tatactagtt tgccacatgt tcatagagct 1620
ggtgagacta atcatatcgc gactgttgat ttccagctgg cgataacgga actgttggag 1680
gatattggtt tggaagatga agatactatt gcggtgactc tggtgccaaa gagaggtggt 1740
gaaggtatct ccattgaaag tgcgacgatc agtcttgcag attgttaa 1788

<210>28
<211>1788
<212>DNA
<213>Solanum tuberosum

<400>28
atggcaagct tgtgcaatag tagtagtaca tctctcaaaa ctccttttac ttcttcctcc 60
acttctttat cttccactcc taagccctct caacttttca tccatggaaa acgtaaccaa 120
atgttcaaag tttcatgcaa ggttatcaat aataacggtg accaaaacgt tgaaacgaat 180
tctgttgatc gaagaaatgt tcttcttggc ttaggtggtc tttatggtgt tgctaatgct 240

ataccattag ctgcatccgc tgctccaact ccacctcctg atctctcgtc ttgtagtata 300
gccaggatta acgaaaatca ggtggtgccg tacagttgtt gcgcgcctaa gcctgatgat 360
atggagaaag ttccgtatta caagttccct tctatgacta agctccgtgt ccgtcagcct 420
gctcatgaag ctaatgagga gtatattgcc aagtacaatc tggcgattag tcgaatgaga 480
gatcttgata agacacaacc tttaaaccct attggtttta agcaacaagc taatatacag 540
tgggcttatg gtaatggtgc ttatagaatt ggtggcaaag agttacaagt tcataattct 600
tggcttttct tcccgttcca tagatggtac ttgtacttcc acgagagaat cgtgggaaaa 660
ttcattgatg atccaacttt cgctttgcca tattggaatt gggaccatcc aaagggtatg 720
cgttttcctg ccatgtatga tcgtgaaggg acttcccttt tcgatgtaac acgtgaccaa 780
agtcaccgaa atggagcagt aatcgatctt ggtttttcg gcaatgaagt cgaaacaact 840
caactccagt tgatgagcaa taatttaaca ctaatgtacc gtcaaatggt aactaatgct 900
ccatgtcctc ggatgttctt tggtgggcct tatgatctcg ggattaacac tgaactcccg 960
ggaactatag gaaacattcc tctcggtcct gtccacatct ggtctggtac agtgagaggt 1020
tcaactttgc ccaatggtgc aatatcaaac ggtgagaata tgggtcattt ttactcagct 1080
gctttggacc cggttttctt ttgccatcac agcaatgtgg atcggatgtg gagcgaatgg 1140
aaagcgacag gagggaaaag aacagatatc acacataaag gttggttgaa ctccgagttc 1200
tttttctatg atg aaatga aaacccttac cgtgtgaaag tccgagactg tttggacacg 1260
aagaagatgg ggtatgatta tgcaccaatg gccacccccgt ggcgtaactt caagccaata 1320
acaaaaacta cagctgggaa agtgaataca gcttctcttc cgccagctag caatgtattc 1380
ccagtggcta aactcgacaa agcaatttcg ttttccatca ataggccgac ttcgtcaagg 1440
actcaacaag agaaaaatgc acaagaggag atgttgacat tcagtagcat aagatatgat 1500
aacagagggt acataaggtt cgatgtgttc ctgaacgtgg acaataatgt gaatgcgaat 1560
gagcttgaca aggcggagtt tgcggggagt tatactagtt tgccacatgt tcatagagct 1620
ggtgagacta atcatatcgc gactgttgat ttccagctgg cgataacgga actgttggag 1680
gatattggtt tggaagatga agatactatt gcggtgactc tggtgccaaa gagaggtggt 1740
gaaggtatct ccattgaaag tgcgacgatc agtcttgcag attgttaa 1788

<210>29
<211>154
<212>DNA
<213>Solanum tuberosum

<400>29
ttagtctcta ttgaatctgc tgagattaca ctttgatgga tgatgctctg tttttgtttt 60
cttgttctgt tttttcctct gttgaaatca gctttgttgc ttgatttcat tgaagttgtt 120
attcaagaat aaatcagtta caattatgtt tggg 154

<210>30
<211>1691

<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :与 PPO 基因相连的尾随区的有义和反义拷贝的表达盒

<400>30
ggtaccgaac catgcatctc aatcttaata ctaaaaaatg caacaaaatt ctagtggagg 60
gaccagtacc agtacattag atattatctt ttattactat aataatattt taattaacac 120
gagacatagg aatgtcaagt ggtagcggta ggagggagtt ggttcagttt tttagatact 180
aggagacaga accggagggg cccattgcaa ggcccaagtt gaagtccagc cgtgaatcaa 240
caaagagagg gcccataata ctgtcgatga gcatttccct ataatacagt gtccacagtt 300
gccttccgct aagggatagc cacccgctat tctcttgaca cgtgtcactg aaacctgcta 360
caaataaggc aggcacctcc tcattctcac actcactcac tcacacagct caagaaggat 420
ccttagtctc tattgaatct gctgagatta cactttgatg gatgatgctc tgtttttgtt 480
ttcttgttct gttttttcct ctgttgaaat cagctttgtt gcttgatttc attgaagttg 540
ttattcaaga ataaatcagt tacaattatg gaattcaagg ttagaaatct tctctatttt 600
tggtttttgt ctgtttagat tctcgaatta gctaatcagg tgctgttata gcccttaatt 660
ttgagttttt tttcggttgt tttgatggaa aaggcctaaa atttgagttt ttttacgttg 720
gtttgatgga aaaggcctac aattggagtt ttccccgttg ttttgatgaa aaagccccta 780
gtttgagatt ttttttctgt cgattcgatt ctaaaggttt aaaattagag tttttacatt 840
tgtttgatga aaaaggcctt aaatttgagt ttttccggtt gatttgatga aaaagcccta 900
gaatttgtgt tttttcgtcg gtttgattct gaaggcctaa aatttgagtt tctccggctg 960
ttttgatgaa aaagccctaa atttgagttt ctccggctgt tttgatgaaa aagccctaaa 1020
tttgagtttt ttccccgtgt tttagattgt ttggttttaa ttctcgaatc agctaatcag 1080
ggagtgtgaa aagccctaaa atttgagttt ttttcgttgt tctgattgtt gtttttatga 1140
atttgcagat ggatatcctt ctttgatgct gatccataat tgtaactgat ttattcttga 1200
ataacaactt caatgaaatc aagcaacaaa gctgatttca acagaggaaa aaacagaaca 1260
agaaaaacaaa aacagagcat catccatcaa agtgtaatct cagcagattc aatagagact 1320
aagcttttga ttttaatgtt tagcaaatgt cctatcagtt ttctcttttt gtcgaacggt 1380
aatttagagt tttttttgct atatggattt tcgttttga tgtatgtgac aaccctcggg 1440
attgttgatt tatttcaaaa ctaagagttt ttgcttattg ttctcgtcta ttttggatat 1500
caatcttagt tttatatctt ttctagttct ctacgtgtta aatgttcaac acactagcaa 1560
tttggctgca gcgtatggat tatggaacta tcaagtctgt gggatcgata aatatgcttc 1620
tcaggaattt gagattttac agtctttatg ctcattgggt tgagtataat atagtaaaaa 1680
aatagtctag a 1691

<210>31
<211>1359

<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :与 PPO 基因相连的尾随区的有义和反义拷贝的表达盒

<400>31
ggtaccgaac catgcatctc aatcttaata ctaaaaaatg caacaaaatt ctagtggagg 60
gaccagtacc agtacattag atattatctt ttattactat aataatattt taattaacac 120
gagacatagg aatgtcaagt ggtagcggta ggagggagtt ggttcagttt tttagatact 180
aggagacaga accggagggg cccattgcaa ggcccaagtt gaagtccagc cgtgaatcaa 240
caaagagagg gcccataata ctgtcgatga gcatttccct ataatacagt gtccacagtt 300
gccttccgct aagggatagc cacccgctat tctcttgaca cgtgtcactg aaacctgcta 360
caaataaggc aggcacctcc tcattctcac actcactcac tcacacagct caagaaggat 420
ccttagtctc tattgaatct gctgagatta cactttgatg gatgatgctc tgtttttgtt 480
ttcttgttct gttttttcct ctgttgaaat cagctttgtt gcttgatttc attgaagttg 540
ttattcaaga ataaatcagt tacaattatg gaattcgtgg taacttttac tcatctcctc 600
caattatttc tgatttcatg catgtttccc tacattctat tatgaatcgt gttatggtgt 660
ataaacgttg tttcatatct catctcatct attctgattt tgattctctt gcctactgaa 720
tttgacccta ctgtaatcgg tgataaatgt gaatgcttcc tcttcttctt cttcttctca 780
gaaatcaatt tctgttttgt ttttgttcat ctgtagcttg atatccttct ttgatgctga 840
tccataattg taactgattt attcttgaat aacaacttca atgaaatcaa gcaacaaagc 900
tgatttcaac agaggaaaaa acagaacaag aaaacaaaaa cagagcatca tccatcaaag 960
tgtaatctca gcagattcaa tagagactaa gcttttgatt ttaatgttta gcaaatgtcc 1020
tatcagtttt ctctttttgt cgaacggtaa tttagagttt tttttgctat atggattttc 1080
gtttttgatg tatgtgacaa ccctcgggat tgttgattta tttcaaaact aagagttttt 1140
gcttattgtt ctcgtctatt ttggatatca atcttagttt tatatctttt ctagttctct 1200
acgtgttaaa tgttcaacac actagcaatt tggctgcagc gtatggatta tggaactatc 1260
aagtctgtgg gatcgataaa tatgcttctc aggaatttga gattttacag tctttatgct 1320
cattgggttg agtataatat agtaaaaaaa tagtctaga 1359

<210>32
<211>1967
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :与 PPO 基因相连的尾随区的有义和反义拷贝的表达盒

<400>32

ggtaccgaac catgcatctc aatcttaata ctaaaaaatg caacaaaatt ctagtggagg 60
gaccagtacc agtacattag atattatctt ttattactat aataatattt taattaacac 120
gagacatagg aatgtcaagt ggtagcggta ggagggagtt ggttcagttt tttagatact 180
aggagacaga accggagggg cccattgcaa ggcccaagtt gaagtccagc cgtgaatcaa 240
caaagagagg gcccataata ctgtcgatga gcatttccct ataatacagt gtccacagtt 300
gccttccgct aagggatagc cacccgctat tctcttgaca cgtgtcactg aaacctgcta 360
caaataaggc aggcacctcc tcattctcac actcactcac tcacacagct caacaagtgg 420
taacttttac tcatctcctc caattatttc tgatttcatg catgtttccc tacattctat 480
tatgaatcgt gttatggtgt ataaacgttg tttcatatct catctcatct attctgattt 540
tgattctctt gcctactgaa tttgacccta ctgtaatcgg tgataaatgt gaatgcttcc 600
tcttcttctt cttcttctca gaaatcaatt tctgttttgt ttttgttcat ctgtagcttg 660
gtagattccc ctttttgtag accacacatc acggatcctt agtctctatt gaatctgctg 720
agattacact ttgatggatg atgctctgtt tttgttttct tgttctgttt tttcctctgt 780
tgaaatcagc tttgttgctt gatttcattg aagttgttat tcaagaataa atcagttaca 840
attatggaat tcaaggttag aaatcttctc tatttttggt ttttgtctgt ttagattctc 900
gaattagcta atcaggtgct gttatagccc ttaattttga gttttttttc ggttgttttg 960
atggaaaagg cctaaaattt gagtttttt acgttggttt gatggaaaag gcctacaatt 1020
ggagttttcc ccgttgtttt gatgaaaaag cccctagttt gagatttttt ttctgtcgat 1080
tcgattctaa aggtttaaaa ttagagtttt tacatttgtt tgatgaaaaa ggccttaaat 1140
ttgagttttt ccggttgatt tgatgaaaaa gccctagaat ttgtgttttt tcgtcggttt 1200
gattctgaag gcctaaaatt tgagtttctc cggctgtttt gatgaaaaag ccctaaattt 1260
gagtttctcc ggctgttttg atgaaaaagc cctaaatttg agtttttcc ccgtgtttta 1320
gattgtttgg ttttaattct cgaatcagct aatcagggag tgtgaaaagc cctaaaattt 1380
gagtttttt cgttgttctg attgttgttt ttatgaattt gcagatggat atccttcttt 1440
gatgctgatc cataattgta actgatttat tcttgaataa caacttcaat gaaatcaagc 1500
aacaaagctg atttcaacag aggaaaaaac agaacaagaa aacaaaaaca gagcatcatc 1560
catcaaagtg taatctcagc agattcaata gagactaagc ttttgatttt aatgtttagc 1620
aaatgtccta tcagttttct ctttttgtcg aacggtaatt tagagttttt tttgctatat 1680
ggattttcgt ttttgatgta tgtgacaacc ctcgggattg ttgatttatt tcaaaactaa 1740
gagtttttgc ttattgttct cgtctatttt ggatatcaat cttagtttta tatcttttct 1800
agttctctac gtgttaaatg ttcaacacac tagcaatttg gctgcagcgt atggattatg 1860
gaactatcaa gtctgtggga tcgataaata tgcttctcag gaatttgaga ttttacagtc 1920
tttatgctca ttgggttgag tataatatag taaaaaaata gtctaga 1967

<210>33
<211>1635
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：与 PPO 基因相连的尾随区的有义和反义拷贝的表达盒

<400>33
ggtaccgaac catgcatctc aatcttaata ctaaaaaatg caacaaaatt ctagtggagg 60
gaccagtacc agtacattag atattatctt ttattactat aataatattt taattaacac 120
gagacatagg aatgtcaagt ggtagcggta ggagggagtt ggttcagttt tttagatact 180
aggagacaga accggagggg cccattgcaa ggcccaagtt gaagtccagc cgtgaatcaa 240
caaagagagg gcccataata ctgtcgatga gcatttccct ataatacagt gtccacagtt 300
gccttccgct aagggatagc cacccgctat tctcttgaca cgtgtcactg aaacctgcta 360
caaataaggc aggcacctcc tcattctcac actcactcac tcacacagct caacaagtgg 420
taacttttac tcatctcctc caattatttc tgatttcatg catgtttccc tacattctat 480
tatgaatcgt gttatggtgt ataaacgttg tttcatatct catctcatct attctgattt 540
tgattctctt gcctactgaa tttgacccta ctgtaatcgg tgataaatgt gaatgcttcc 600
tcttcttctt cttcttctca gaaatcaatt tctgttttgt ttttgttcat ctgtagcttg 660
gtagattccc ctttttgtag accacacatc acggatcctt agtctctatt gaatctgctg 720
agattacact ttgatggatg atgctctgtt tttgttttct tgttctgttt tttcctctgt 780
tgaaatcagc tttgttgctt gatttcattg aagttgttat tcaagaataa atcagttaca 840
attatggaat tcgtggtaac ttttactcat ctcctccaat tatttctgat ttcatgcatg 900
tttccctaca ttctattatg aatcgtgtta tggtgtataa acgttgtttc atatctcatc 960
tcatctattc tgattttgat tctcttgcct actgaatttg accctactgt aatcggtgat 1020
aaatgtgaat gcttcctctt cttcttcttc ttctcagaaa tcaatttctg ttttgttttt 1080
gttcatctgt agcttgatat ccttctttga tgctgatcca taattgtaac tgatttattc 1140
ttgaataaca acttcaatga aatcaagcaa caaagctgat ttcaacagag gaaaaaacag 1200
aacaagaaaa caaaaacaga gcatcatcca tcaaagtgta atctcagcag attcaataga 1260
gactaagctt ttgattttaa tgtttagcaa atgtcctatc agttttctct ttttgtcgaa 1320
cggtaattta gagtttttt tgctatatgg attttcgttt ttgatgtatg tgacaaccct 1380
cgggattgtt gatttatttc aaaactaaga gtttttgctt attgttctcg tctattttgg 1440
atatcaatct tagttttata tcttttctag ttctctacgt gttaaatgtt caacacacta 1500
gcaatttggc tgcagcgtat ggattatgga actatcaagt ctgtgggatc gataaatatg 1560
cttctcagga atttgagatt ttacagtctt tatgctcatt gggttgagta taatatagta 1620
aaaaaatagt ctaga 1635

<210>34
<211>240
<212>DNA
<213>Solanum tuberosum

<400>34
gtccatgatg tcttcagggt ggtagcattg actgatggca tcatagtttt ttttttaaaa 60
gtatttcctc tatgcatatt attagtatcc aataaattta ctggttgttg tacatagaaa 120
aagtgcattt gcatgtatgt gtttctctga aattttcccc agtttttggt gctttgcctt 180
tggagccaag tctctatatg tataagaaaa ctaagaacaa tcacatatat caaatattag 240

<210>35
<211>228
<212>DNA
<213>Solanum tuberosum

<400>35
acgaacttgt gatcgcgttg aaagatttga acgctacata gagcttcttg acgtatctgg 60
caatattgca tcagtcttgg cggaatttca tgtgacaaca aggtttgcaa ttctttccac 120
tattagtagt gcaacgatat acgcagagat gaagtgctga acaaacatat gtaaaatcga 180
tgaatttatg tcgaatgctg ggacgggctt cagcaggttt tgcttagt 228

<210>36
<211>2204
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：ω-突变的 virD2 基因的表达盒

<400>36
ccgcggtttt ctctccatcg cgtcagaggc cggttttcgt cggcatcgaa gagggccact 60
cgtttaccgt catttgccaa agcagcgcaa aggcccatga gtgcggtggt tttgccagca 120
ccccctttga aagagcaaaa cgtcaaaagt tgcatattct gatcccgcct gtcctgtgaa 180
acggagtgca tttgtatttt tgttcgtata aatgtttttg tgattatcga tgagtaaaag 240
cgttgttaca ctatttttta tttcaaattc gttataatta aattgcaatt gtagcaatta 300
tattcggttt ttcctgtaaa tatactgttg atttcatatc gagtagggct agactttaat 360
ctgtctaccc gggcacattt cgtgctggag tattcagacc ttccgctttt tttggaggaa 420
gctatgtcaa aacacaccag agtcacgtcg agtgagactg ccatcaacca gcatcgatcc 480
ctgaacgttg aagggtttaa ggtcgtgagt gcccgtctgc gatcggccga gtatgaaacc 540
ttttcctatc aagcgcgcct gctgggactt tcggatagta tggcaattcg cgttgcggtg 600
cgtcgcatcg ggggctttct cgaaatagat gcacacaccc gagaaaagat ggaagccata 660
cttcagtcca tcggaatact ctcaagtaat gtatccatgc ttctatctgc ctacgccgaa 720
gaccctcgat cggatctgga ggctgtgcga gatgaacgta ttgcttttgg tgaggctttc 780

gccgccctcg atggcctact ccgctccatt ttgtccgtat cccggcgacg gatcgacggt 840
tgctcgctat tgaaaggtgc cttgtagcac ttgaccacgc acctgacggg agaaaattgg 900
atgcccgatc gcgctcaagt aatcattcgc attgtgccag gaggtggaac caagaccctt 960
cagcagataa tcaatcagtt ggagtacctg tcccgtaagg gaaagctgga actgcagcgt 1020
tcagcccggc atctcgatat tcccgttccg ccggatcaaa tccgtgagct tgcccaaagc 1080
tgggttacgg aggccgggat ttatgacgaa agtcagtcag acgatgatag gcaacaagac 1140
ttaacaacac acattattgt aagcttcccc gcaggtaccg accaaaccgc agcttatgaa 1200
gccagccggg aatgggcagc cgagatgttt gggtcaggat acgggggtgg ccgctataac 1260
tatctgacag cctaccacgt cgaccgcgat catccacatt tacatgtcgt ggtcaatcgt 1320
cgggaacttc tggggcacgg gtggctgaaa atatccaggc gccatcccca gctgaattat 1380
gacggcttac ggaaaaagat ggcagagatt tcacttcgtc acggcatagt cctggatgcg 1440
acttcgcgag cagaaagggg aatagcagag cgaccaatca catatgctga acatcgccgc 1500
cttgagcgga tgcaggctca aaagattcaa ttcgaagata cagattttga tgagacctcg 1560
cctgaggaag atcgtcggga cctcagtcaa tcgttcgatc catttcgatc ggacccatct 1620
accggcgaac cggaccgtgc aacccgacat gacaaacaac cgcttgaaca gcacgcccgt 1680
ttccaggagt ccgccggctc cagcatcaaa gccgacgcac ggatccgcgt atcattggag 1740
agcgagcgga gtgcccaacc atccgcgtcc aaaatccctg taattgggca tttcgggatt 1800
gagacttcct atgtcgctga agccagcgtg cgcaaacgaa gcggcatttt cggtacttct 1860
cgcccggtga ctgacgttgc catgcacaca gtcaagcgcc agcagcgatc aaaacgacgt 1920
aatgacgagg aggcaggtcc gagcggagca aaccgtaaag gattgaaggc tgcgcaagtt 1980
gattccgagg caaatgtcgg tgagcaagac actcgcgatg acagcaacaa ggcggctgat 2040
ccggtgtctg cttccatcgg taccgagcaa ccggaagctt ctccaaagcg tccgcgtgac 2100
cgtcacgatg gagaattggg tggacgcaaa cgtgcaagag gtaatcgtcg ctcgagctcg 2160
agcgggggga cctagagaca ggaaggaccg aataatggcc gcgg 2204

<210>37
<211>1621
<212>DNA
<213>Solanum tuberosum

<400>37
atggcttctg tgctggcttc tctgtttcca aaactgggct ctttgggtac ttcagatcat 60
gcttctgttg tatccatcaa cctctttgtg gcactccttt gtgcttgcat catcattggt 120
catctcttgg aggagaaccg ctgggttaat gagtccatta ctgccctcat aattggtttg 180
tgtacaggag tggttatctt gctcgtaagt ggtggaaaga gctcacacct tctggttttc 240
agtgaagatc tctttttcat atatgtactt cctccaatca tatttaatgc agggtttcag 300
gtaaaaaaga agcaattttt cgtaaacttc attactataa tgatgttcgg agccattggt 360
accctggtct catgtgccat tatatcatta ggtgccattc aaactttcaa gaagttggac 420
attgaatttc tagatattgg ggattatctt gcaattggag caatatttgc tgccacagat 480

tccgtctgca cattgcaggt cctacatcag gatgagacac ccctccttta cagtcttgta 540
tttggagaag gagttgtaaa tgatgctaca tcggtggtgc ttttcaatgc tattcaaaac 600
ttcgacctta cgagcatgaa tcccagtata gccctcagtt tccttggcaa cttcttctat 660
ctgttccttg ctagcacttt actgggagca ggaactggtc ttcttagtgc ttacattatc 720
aagaagctat attttggcag gcactccaca gatcgtgagg ttgcccttat gatgctcatg 780
gcttacttat catacttgct ggccgaatta ttctatttga gtgggattct caccgtcttt 840
ttctgtggta ttgtaatgtc tcactacact tggcacaatg tgaccgagag ttcaagagtc 900
actacaaggc acacttttgc aactttgtca tttcttgcag agactttcct cttcctctat 960
gtcggcatgg atgctttgga tatcgagaag tggaaatttg ttggtgacag gcctggatta 1020
tcaatttccg tgagttcaat actgatggga ctaatcttgc ttgggagagc tgcctttgtt 1080
tttccattat cattcttatc caacttaatg aagaaatcct cggagcaaaa aattaccttt 1140
aggcagcaag tgataatatg gtgggcaggt ttgatgagag gcgcagtgtc catggcactg 1200
gcatataata agttcactcg tgggggacac actcaactgc aggacaatgc aataatgatt 1260
accagcacga taaccattgt tctattcagc acaatggtat tcggtttaat gacaaaaccc 1320
cttataagtc tcctgctgcc accacagagg caattgagta cagtgtcatc aggcgcaaat 1380
actccaaagt ctctaacagc cccactccta ggcagtcgag aggactctga agttgattta 1440
aatgttccag atcttcctca cccaccaagt ttgaggatgc tacttaccgc accaagtcat 1500
aaagtgcatc ggtactggcg caagtttgac gatgcattca tgcgccctat gtttggtggt 1560
cggggatttg ctcctcctgc ccctggttct ccaacggaac agggtccatg aggtaccaat 1620
c 1621

<210>38
<211>1620
<212>DNA
<213>Solanum tuberosum

<400>38
atggcttctg tgctggcttc tctgtttcca aaactgggct ctttgggtac ttcagatcat 60
gcttctgttg tatccatcaa cctctttgtg gcactccttt gtgcttgcat catcattggt 120
catctcttgg aggagaaccg ctgggttaat gagtccatta ctgccctcat aattggtttg 180
tgtacaggag tggttatctt gctcgtaagt ggtggaaaga actcacacct tctggttttc 240
agtgaagatc tctttttcat atatgtactt cctccaatca tatttaatgc agggtttcag 300
gtaaaaaaga agcaattttt cgtgaacttc attactataa tgatgttcgg agccattggt 360
accctggtct catgtgccat tatatcatta ggtgcaattc aaactttcaa gaagttggac 420
attgaatttc tagatattgg ggattatctt gcaattggag caatatttgc tgccacagat 480
tccgtctgca cattgcaggt cctacatcag gatgagacac ccctccttta cagtcttgta 540
tttggagaag gagttgtaaa tgatgctaca tcggtggtgc ttttcaatgc tattcaaaac 600
tttgacctta cgagcgtgaa tcccagtata gccctcagtt tccttggcaa cttcttctat 660
ctgttccttg ctagcacttt actgggagca ggaactggtc ttcttagtgc ttacattatc 720

aagaagctgt attttggcag gcactccaca gatcgtgagg ttgcccttat gatgctcatg 780
gcttacttat catacatgct ggctgaacta ttctatttga gtgggattct cactgtattt 840
ttctgtggta ttgtaatgtc tcattacact tggcacaatg tgaccgagag ttcaagagtc 900
actacaaggc acgcttttgc aactttgtca tttcttgcag agactttcct cttcctctat 960
gtcggcatgg atgctttgga tatcgagaag tggaaatttg ttggtgacag gcctggatta 1020
tcaatttccg tgagttcaat actgatggga ttaatcttgc tggggagagc tgcctttgtt 1080
tttccattat cattcttctc caacttaatg aagaaatcct cggagcaaaa aattaccttt 1140
aggcagcaag tgataatatg gtgggcaggt ttgatgagag gcgcagtgtc catggcactg 1200
gcatataata agttcactcg tgggggacac actcaactgc aggacaatgc aataatgatt 1260
accagcacga taaccattgt tctattcagc acaatggtat tcggtttaat gacaaaaccc 1320
cttataagtc tcctgctgcc accacagagg caattgagta cagtgtcatc aggtgcaaat 1380
actccaaagt ctctaacagc cccactccta ggcagtcgag aggactctga agttgattta 1440
aatgttccag atcttcctca cccaccaagt ttgaggatgc tacttaccgc accaagtcat 1500
aaagtgcatc ggtactggcg caagtttgac gatgcattca tgcgccctat gtttggtggt 1560
cggggatttg ctcctcctgc ccctggttct ccaacggaac agggtccatg aggtacaatc 1620

<210>39
<211>747
<212>DNA
<213>Solanum tuberosum

<400>39
atggaaaatt cggtacccag gactgtagaa gaagtattca acgatttcaa aggtcgtaga 60
gctggtttaa tcaaagcact aactacagat gtcgagaagt tttatcaatc gtgtgatcct 120
gaaaaggaga acttgtgtct ctatgggctt cctaatgaaa catgggaagt aaacctccct 180
gtagaggagg tgcctccaga acttccggag ccagcattgg gcataaactt cgcacgtgat 240
ggaatgcaag agaaagactg gttatcactt gttgctgttc acagtgattc atggctgctt 300
tctgttgcat tttactttgg tgcaaggttt gggttcggca agagtgaaag gaagaggctt 360
ttccaaatga taaatgatct cccaacagtg tttgaagttg ttaccggagc tgctaaacag 420
acacgtgatc cccctcacaa caatagcaac aaaagcaaat caagtggaaa gcctcgacag 480
ccagagtccc aactcaaggc agtaaaggtg tctccaccta aaatggagaa cgacagtggg 540
gaggaggaag aagaagaaga ggatgaacaa ggagcaactc tctgtggagc ttgtggtgat 600
aattatgcca ctgatgaatt ctggatttgc tgtgatattt gtgagagatg gttccatggc 660
aaatgtgtga agattacccc agcaaaagct gagcatatca agcagtacaa gtgtcctagt 720
tgcagtagca agagagctag agtttaa 747

<210>40
<211>741
<212>DNA

<213>Solanum tuberosum

<400>40

tgacatctgc caataaagcc aagaataatt ggcattaaca tgaccaaaaa aatggtttgg 60
cagcattaag tcaaataaaa aagctacttt aatataaaat aatattaaaa tgcttaataa 120
ccaacagttt ataagaaggt taatgttaac atggatgagg aatgaccaaa aggggaatta 180
tatattaacc tttaaatcaa tctaattctc tctttttgtt tctagctata tttactcgat 240
agataaactc tcttacttga cgaatttttt gatacaagaa gacatatttc atcatgattt 300
taattcgtcg tgtcaaattt attaaatagt ttaattttaa tcgtaaattt agatatgaaa 360
tttaaaaaaa aataaatata tacatatttg aagaatacat aaaaagtaca tataaatcac 420
aaatatttaa taattcaaga tattaaaaca catagaaaaa taattactta caaagaaatt 480
cttatttgaa tcctctaaat tcgagaagtg caacacaaac tgagacgaag aaaatgaata 540
atatttgata agaaatttat tataattgaa tgaccattta agtaattacg ggtaataaca 600
acacaataag gaactgtagt cattttaat acatggcaag gaatatgaga gtgtgatgag 660
tctataaata gaaggcttca ttagtgtaga ggagtcacaa acaagcaata cacaaataaa 720
attagtagct taaacaagat g 741

<210>41

<211>25

<212>DNA

<213>Agrobacterium sp.

<400>41

tgacaggata tattggcggg taaac 25

<210>42

<211>25

<212>DNA

<213>Agrobacterium sp.

<400>42

tggcaggata tattgtggtg taaac 25

<210>43

<211>25

<212>DNA

<213>Agrobacterium sp.

<400>43

tggcaggata tataccgttg taatt 25

<210>44
<211>25
<212>DNA
<213>Agrobacterium sp.

<400>44
cggcaggata tattcaattg taatt 25

<210>45
<211>25
<212>DNA
<213>Agrobacterium sp.

<400>45
tggtaggata tataccgttg taatt 25

<210>46
<211>25
<212>DNA
<213>Agrobacterium sp.

<400>46
tggcaggata tatggtactg taatt 25

<210>47
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :共有序列

<220>
<221> 修改的碱基
<222>(16)
<223>a, t, c 或 g

<400>47
ygryaggata tatwsnvbkg taawy 25

<210>48
<211>25
<212>DNA
<213>Rhizobium leguminosarum

<400>48
cggcaggata tatcctgatg taaat 25

<210>49
<211>25
<212>DNA
<213>Thermoanaerobacter tengcongensis

<400>49
tggcaggagt tattcgaggg taaac 25

<210>50
<211>25
<212>DNA
<213>Arabidopsis thaliana

<400>50
tgacaggata tatcgtgatg tcaac 25

<210>51
<211>25
<212>DNA
<213>Arabidopsis thaliana

<400>51
gggaagtaca tattggcggg taaac 25

<210>52
<211>25
<212>DNA
<213>Oryza sativa

<400>52
ttacaggata tattaatatg tatga 25

<210>53
<211>25
<212>DNA
<213>Homo sapiens

<400>53
taacatgata tattcccttg taaat 25

<210>54
<211>25
<212>DNA
<213>Solanum tuberosum

<400>54
tgacaggata tatggtaatg taaac 25

<210>55
<211>25
<212>DNA
<213>Solanum tuberosum

<400>55
tggcaggata tataccgatg taaac 25

<210>56
<211>292
<212>DNA
<213>Saccharomyces cerevisiae

<400>56
ttcttcgcca gaggtttggt caagtctcca atcaaggttg tcggcttgtc taccttgcca 60
gaaatttacg aaaagatgga aaagggtcaa atcgttggta gatacgttgt tgacacttct 120
aaataagcga atttcttatg atttatgatt tttattatta aataagttat aaaaaaaata 180
agtgtataca aattttaaag tgactcttag gttttaaaac gaaaattctt attcttgagt 240
aactctttcc tgtaggtcag gttgctttct caggtatagc atgaggtcgc tc 292

<210>57
<211>25
<212>DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<220>
<221> 修改的碱基
<222>(14)
<223>a, t, c 或 g

<220>
<221> 修改的碱基
<222>(16)
<223>a, t, c 或 g

<220>
<221> 修改的碱基
<222>(18)
<223>a, t, c 或 g

<400>57
tgrcaggata tatnvndntg taaac 25

<210>58
<211>23
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>58
ccgcggtgat cacaggcagc aac 23

<210>59
<211>30
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物
<400>59
aagcttccag ccagccaaca gctccccgac 30

<210>60
<211>45
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>60
aagcttggct actagtgcga gatctctaag agaaaagagc gttta 45

<210>61
<211>41
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>61
gcatgctcga gataggtgac cacatacaaa tggacgaacg g 41

<210>62
<211>34
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>62
actagtgttt acccgccaat atatcctgtc agag 34

<210>63

<210>35
<211>35
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>63
aagctttggc aggatatatt gtggtgtaaa cgaag 35

<210>64
<211>27
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>64
cggtgtaagt gaactgcagt tgccatg 27

<210>65
<211>26
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>65
catcggcctc actcatgagc agattg 26

<210>66
<211>24
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :合成的寡核苷酸

<400>66
cacgctaagt gccggccgtc cgag 24
<210>67
<211>24
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :合成的寡核苷酸

<400>67
tcctaatcga cggcgcaccg gctg 24

<210>68
<211>29
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>68
aaagttgaat tcaaatgaga aatttattc 29

<210>69
<211>28
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>69
ttttaagctt tcataataac attctaat 28

<210>70
<211>18
<212>DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物
<400>70
gaaccatgca tctcaatc 18

<210>71
<211>30
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>71
gtcaggatcc ctaccaagct acagatgaac 30

<210>72
<211>27
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>72
ggatccgagt gtgggtaagt aattaag 27

<210>73
<211>29
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>73
gaattctgtg ctctctatgc aaatctagc 29

<210>74
<211>18
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>74
ggaacattga agctgtgg 18

<210>75
<211>27
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>75
cgaattcatg gcaagcttgt gcaatag 27

<210>76
<211>30
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>76
cgaattctta acaatctgca agactgatcg 30

<210>77
<211>24
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>77
gagagatctt gataagacac aacc 24
<210>78
<211>35
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<220>
<221>misc_feature
<222>(7)
<223>″ a″ to″ c″ mutation

<220>
<221>misc_feature
<222>(14)
<223>″ a″ to″ c″ mutation

<220>
<221>misc_feature
<222>(17)
<223>″ a″ to″ c″ mutation

<400>78
cattaccata agcccactgt atattagctt gttgc 35

<210>79
<211>20
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>79
gtgcttatag aattggtggc 20

<210>80
<211>20
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>80
tagttcccgg gagttcagtg 20

<210>81
<211>50
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<220>
<221>misc_feature
<222>(17)
<223>″ a″ to″ g″ mutat ion

<220>
<221>misc_feature
<222>(29)
<223>″ a″ to″ t″ mutation

<400>81
ctcccgggaa ctataggaaa cattcctctc ggtcctgtcc acatctggtc 50

<210>82
<211>21
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>82
gtgtgatatc tgttcttttc c 21

<210>83
<211>22
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>83
gaatgagctt gacaaggcgg ag 22

<210>84
<211>21
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>84
ctggcgataa cggaactgtt g 21

<210>85
<211>24
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>85
gtccatgatg tcttcagggt ggta 24

<210>86
<211>24
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>86
ctaatatttg atatatgtga ttgt 24
<210>87
<211>24
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>87
acgaacttgt gatcgcgttg aaag 24

<210>88
<211>24
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>88
actaagcaaa acctgctgaa gccc 24

<210>89
<211>24
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>89
cccgggatgg cttctgtgct ggct 24

<210>90
<211>24
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>90
ggtacctcat ggaccctgtt ccgt 24

<210>91
<211>32
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>91
cccgggtatg gaaaattcgg tacccaggac tg 32

<210>92
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>92
actagttaaa ctctagctct cttgc 25

<210>93
<211>17

<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<220>
<221> 修改的碱基
<222>(2)
<223>a, t, c 或 g

<220>
<221> 修改的碱基
<222>(6)
<223>a, t, c 或 g

<220>
<221> 修改的碱基
<222>(10)..(15)
<223>a, t, c 或 g

<400>93
angatntatn nnnnngt 17

<210>94
<211>25
<212>DNA
<213>Triticum sp.

<400>94
tggcaggata tatgagtgtg taaac 25

<210>95
<211>26
<212>DNA
<213>Triticum sp.

<400>95
ttggcaggat atatccctct gtaaac 26

<210>96
<211>244
<212>DNA
<213>Solanum tuberosum

<400>96
gtccatgatg tcttcagggt ggtagcattg actgattgca tcatagtttt ttttttttt 60
ttaagtattt cctctatgca tattattagt atccaataaa tttactggtt gttgtacata 120
gaaaaagtgc atttgcatgt atgtgtttct ctgaaatttt ccccagtttt tggtgctttg 180
cctttggagc caagtctcta tatgtaataa gaaaactaag aacaatcaca tatatcaaat 240
atta 244
<210>97
<211>239
<212>DNA
<213>Solanum tuberosum

<400>97
acgaacttgt gatcgcgttg aaagatttga acgctacttg gtcatccaca tagagcttct 60
tgacgtatct ggcaatattg catcagtctt ggcggaattt catgtgacaa aaggtttgca 120
attctttcca ctattagtag tgcaacgata tacgcagaga tgaagtgctg aacaaacata 180
tgtaaaatcg atgaatttat gtcgaatgct gggacgggct tcagcaggtt ttgcttagt 239

<210>98
<211>416
<212>DNA
<213>Solanum tuberosum

<400>98
gtttacatta ccatatatcc tgtcagaggt atagaggcat gactggcatg atcactaaat 60
tgatgcccac agaggagact tataacctac aggggcacgt agttctagga cttgaaagtg 120
actgaccgta gtccaactcg gtataaagcc tactcccaac taaatatatg aaatttatag 180
cataactgca gatgagctcg attctagagt aggtaccgag ctcgaattcc ttactcctcc 240
acaaagccgt aactgaagcg acttctattt ttctcaacct tcggacctga cgatcaagaa 300
tctcaatagg tagttcttca taagtgagac tatccttcat agctacactt tctaaaggta 360
cgatagattt tggatcaacc acacacactt cgtttacatc ggtatatatc ctgcca 416

<210>99
<211>181

<212>PRT
<213>Solanum tuberosum

<400>99

```
Met Arg Asn Leu Phe Pro Ile Leu Met Leu Ile Thr Asn Leu Ala Leu
  1               5                  10                  15
Asn Asn Asp Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Tyr Asn Leu
             20                  25                  30
Ile His Ala Thr Cys Arg Glu Thr Pro Tyr Tyr Ser Leu Cys Leu Thr
         35                  40                  45
Thr Leu Gln Ser Gly Pro Arg Ser Asn Glu Val Glu Gly Gly Asp Ala
     50                  55                  60
Ile Thr Thr Leu Gly Leu Ile Met Val Asp Ala Val Lys Ser Lys Ser
 65                  70                  75                  80
Ile Glu Ile Met Glu Lys Ile Lys Glu Leu Glu Lys Ser Asn Pro Glu
                 85                  90                  95
Trp Arg Ala Pro Leu Ser Gln Cys Tyr Val Ala Tyr Asn Ala Val Leu
            100                 105                 110
Arg Ala Asp Val Thr Val Ala Val Glu Ala Leu Lys Lys Gly Ala Pro
        115                 120                 125
Lys Phe Ala Glu Asp Gly Met Asp Asp Val Val Ala Glu Ala Gln Thr
    130                 135                 140
Cys Glu Tyr Ser Phe Asn Tyr Tyr Asn Lys Leu Asp Phe Pro Ile Ser
145                 150                 155                 160
Asn Leu Ser Arg Glu Ile Ile Glu Leu Ser Lys Val Ala Lys Ser Ile
                165                 170                 175
Ile Arg Met Leu Leu
            180
```

<210>100
<211>172
<212>PRT
<213>Nicotiana tabacum

<400>100

```
Met Arg Asn Leu Phe Pro Ile Phe Met Leu Ile Thr Asn Leu Ala Phe
  1               5                  10                  15
Asn Asp Asn Asn Asn Ser Asn Asn Ile Ile Asn Thr Thr Cys Arg Ala
             20                  25                  30
```

Thr Thr Asn Tyr Pro Leu Cys Leu Thr Thr Leu His Ser Asp Pro Arg
35 40 45
Thr Ser Glu Ala Glu Gly Ala Asp Leu Thr Thr Leu Gly Leu Val Met
50 55 60
Val Asp Ala Val Lys Leu Lys Ser Ile Glu Ile Met Lys Ser Ile Lys
65 70 75 80
Lys Leu Glu Lys Ser Asn Pro Glu Leu Arg Leu Pro Leu Ser Gln Cys
85 90 95
Tyr Ile Val Tyr Tyr Ala Val Leu His Ala Asp Val Thr Val Ala Val
100 105 110
Glu Ala Leu Lys Arg Gly Val Pro Lys Phe Ala Glu Asn Gly Met Val
115 120 125
Asp Val Ala Val Glu Ala Glu Thr Cys Glu Phe Ser Phe Lys Tyr Asn
130 135 140
Gly Leu Val Ser Pro Val Ser Asp Met Asn Lys Glu Ile Ile Glu Leu
145 150 155 160
Ser Ser Val Ala Lys Ser Ile Ile Arg Met Leu Leu
165 170

<210>101
<211>166
<212>PRT
<213>Nicotiana tabacum

<400>101
Met Lys Asn Leu Ile Phe Leu Thr Met Phe Leu Thr Ile Leu Leu Gln
1 5 10 15
Thr Asn Ala Asn Asn Leu Val Glu Thr Thr Cys Lys Asn Thr Pro Asn
20 25 30
Tyr Gln Leu Cys Leu Lys Thr Leu Leu Ser Asp Lys Arg Ser Ala Thr
35 40 45
Gly Asp Ile Thr Thr Leu Ala Leu Ile Met Val Asp Ala Ile Lys Ala
50 55 60
Lys Ala Asn Gln Ala Ala Val Thr Ile Ser Lys Leu Arg His Ser Asn
65 70 75 80
Pro Pro Ala Ala Trp Lys Gly Pro Leu Lys Asn Cys Ala Phe Ser Tyr
85 90 95
Lys Val Ile Leu Thr Ala Ser Leu Pro Glu Ala Ile Glu Ala Leu Thr
100 105 110

Lys Gly Asp Pro Lys Phe Ala Glu Asp Gly Met Val Gly Ser Ser Gly
115 120 125
Asp Ala Gln Glu Cys Glu Glu Tyr Phe Lys Gly Ser Lys Ser Pro Phe
130 135 140
Ser Ala Leu Asn Ile Ala Val His Glu Leu Ser Asp Val Gly Arg Ala
145 150 155 160
Ile Val Arg Asn Leu Leu
165

<210>102
<211>277
<212>DNA
<213>Solanum tuberosum

<400>102
ctggcgataa cggaactgtt ggaggatatt ggtttggaag atgaagatac tattgcggtg 60
actctggtgc caaagagagg tggtgaaggt atctccattg aaagtgcgac gatcagtctt 120
gcagattgtt aattagtctc tattgaatct gctgagatta cactttgatg gatgatgctc 180
tgtttttgtt ttcttgttct gttttttcct ctgttgaaat cagctttgtt gcttgatttc 240
attgaagttg ttattcaaga ataaatcagt tacaatt 277

<210>103
<211>300
<212>DNA
<213>Solanum tuberosum

<400>103
ctggcgataa cggaactgtt ggaggatatt ggattggaag atgaagatac tattgcggta 60
actttggttc caaaagtagg tggtgaaggt gtatccattg aaagtgtgga gatcaagctt 120
gaggattgtt aagtcctcat gagttggtgg ctacggtacc aaattttatg tttaattagt 180
attaatgtgt gtatgtgttt gattatgttt cggttaaaat gtatcagctg gatagctgat 240
tactagcctt gccagttgtt aatgctatgt atgaaataaa taaataaatg gttgtcttct 300
<210>104
<211>296
<212>DNA
<213>Solanum tuberosum

<220>
<221> 修改的碱基

<222>(54)
<223>a,t,c 或 g

<220>
<221> 修改的碱基
<222>(166)
<223>a,t,c 或 g

<220>
<221> 修改的碱基
<222>(223)
<223>a,t,c 或 g

<400>104
ctggcgataa cggaactgtt ggaggataat ggattggaag atgaaggtac tatngcggta 60
actttggttc caaaagttgg tggtgaaggt gtatccattg aaagtgcgga gatcaagctt 120
gaggattgtt aagtcctcat gagttggtgg ctatggtacc aaattntatg tttaattagt 180
attaatgtgt gtgtttgatt atgtttcggt taaaatgtat canctggata gctgattact 240
agccttccca gttgttaatg ctatgtatga aatacataaa taaatggttg tcttcc 296

<210>105
<211>13
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>105
ygrcaggata tat 13

<210>106
<211>22
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<220>

<221> 修改的碱基
<222>(11)..(15)
<223>a,t,c 或 g

<400>106
caggatatat nnnnnkgtaa ac 22

<210>107
<211>25
<212>DNA
<213>Arabidopsis thaliana

<400>107
tggtaggata cattctgatg tagat 25

<210>108
<211>25
<212>DNA
<213>Arabidopsis thaliana

<400>108
tgacaggata tatcgtgatg tcaac 25

<210>109
<211>25
<212>DNA
<213>Arabidopsis thaliana

<400>109
tggtaggata cattctgatg tagta 25

<210>110
<211>25
<212>DNA
<213>Oryza sp.
<400>110
tggcaggata tcttggcatt taaac 25

<210>111

<211>25
<212>DNA
<213>Oryza sp.

<400>111
tgtcaggata tatatcgata tgaac 25

<210>112
<211>25
<212>DNA
<213>Oryza sp.

<400>112
tgtcaggata tatatcgata tgaac 25

<210>113
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物
<220>
<221> 修改的碱基
<222>(14)..(18)
<223>a, t, c 或 g

<400>113
ygrcaggata tatnnnnnkg taaac 25

<210>114
<211>18
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>114
gaccacaccc gtcctgtg 18

<210>115
<211>13
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>115
ygrcaggata tat 13

<210>116
<211>12
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>116
atggcgacca ca 12

<210>117
<211>22
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<220>
<221> 修改的碱基
<222>(11)..(15)
<223>a, t, c 或 g
<400>117
caggatatat nnnnnkgtaa ac 22

<210>118

<211>22
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>118
gtccaacttg cacaggaaag ac 22

<210>119
<211>22
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>119
catggatgaa atactcctga gc 22

<210>120
<211>24
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<400>120
gttcagacaa gaccacagat gtga 24

<210>121
<211>74
<212>PRT
<213>Solanum tuberosum

<400>121
Met Ser Ser Thr Ser Asn Val Gly Gln Asp Cys Leu Ala Glu Val Thr

1 5 10 15
Ile Ser Tyr Gln Trp Val Gly Arg Val Ile Asn Tyr Asn Phe Phe Leu
20 25 30
Leu Ile His Trp Tyr Thr Val Val Glu Ala Ser Thr Gly Ile Thr Phe
35 40 45
Gln Ile Phe Pro Ile Gly Ile Arg Ser Glu Asp Asp Arg Ser Phe Tyr
50 55 60
Glu Lys Ala Asp Arg Phe Ala Trp Val Thr
65 70

<210>122
<211>51
<212>PRT
<213>Solanum tuberosum

<400>122
Met Ser Ser Glu Ser Thr Phe Ser Lys Thr Pro Asn Gly Arg Ala Thr
1 5 10 15
Asp Val Gly Ile Pro Thr Glu Glu Gly Thr Phe Pro Phe Arg Tyr Ala
20 25 30
Ile Leu Arg Asp Leu Ala Pro Thr Ile Ser Leu Val Asn Ser Ser Ala
35 40 45
Asp Ile Ala
50

<210>123
<211>76
<212>PRT
<213>Solanum tuberosum

<400>123
Met Ser Glu Gly Val Gly Phe Lys Ser Lys Ile Leu Pro Ser Phe Ala
1 5 10 15
Trp Arg Ser Ala Asn Ile Leu Gly Ser Lys His Val Ala Lys Gln Thr
20 25 30
Phe Pro Phe Leu Ala Arg Thr Glu Thr Cys Glu Arg Thr Ser Gly Met
35 40 45
Ser Gly Val Ile Arg Ala Thr Ala Pro Ser Gly Ile Ser Ser Ser Pro
50 55 60

Leu Thr Asp Phe Ala Thr Lys Ile Val Gly Phe Ser
65 70 75

<210>124
<211>62
<212>PRT
<213>Solanum tuberosum

<400>124
Val Cys Ser Pro Ala Leu Lys Ala Asp Lys Ser Lys Ser Ala Asp Gly
1 5 10 15
Thr Cys Val Asp His Ser Arg Arg Leu Ile Val Val Leu Val Leu Tyr
20 25 30
Pro Gly Met Gly Thr Ser Tyr Ala Thr Ala Phe Ile Ser Ser Pro Pro
35 40 45
Ile Gln Tyr Leu Phe Pro Ser Asp Pro Val Glu Thr Phe Pro
50 55 60

<210>125
<211>50
<212>PRT
<213>Solanum tuberosum

<400>125
Met Leu Gly Ser Leu Val Leu Pro Lys Ser Pro Glu Asn Arg Lys Gln
1 5 10 15
Ala Val Pro Asn Pro His Phe Gln Glu Gln His Leu Val Pro Glu Lys
20 25 30
Pro His Phe Leu Asp Cys Gly Gln Gly Phe Ser Lys Leu Pro Gln Met
35 40 45
His Gln
50

<210>126
<211>65
<212>PRT
<213>Solanum tuberosum

<400>126

Met Val Asn Phe Leu Thr Gln Gly Ile Val Asp Met Glu Thr Ala Phe
1 5 10 15
Gly Ser Pro Lys Met Gly Gly Phe Gly Lys Glu Gln Phe Gly Ala Cys
20 25 30
Val Ser Arg Ser Glu Met Asp Glu Ser Gly Ile Gly Ala Val Met Val
35 40 45
Glu Gln Val Cys Ser Ile Cys Ser Arg His Phe Val Leu Ser Met Gln
50 55 60
Ile
65

<210>127
<211>77
<212>PRT
<213>Solanum tuberosum

<400>127
Met Leu Glu Gly Ser Met Trp Pro Trp Asn Gln Glu Ser Met Lys Arg
1 5 10 15
Ala Phe Leu Asn His His Phe Leu Met Leu His Leu Phe Pro Ala Gln
20 25 30
Arg Pro Pro Gln Ala Ala Asp Pro Val Cys Leu Lys His Gln His Met
35 40 45
His Cys Gly Cys Leu Ser Phe Gln Leu His Leu Ser Lys Leu Ala Pro
50 55 60
Gly Asp Thr Pro Leu Ile Ser Ser Met Phe Ala Leu Asp
65 70 75

<210>128
<211>49
<212>PRT
<213>Solanum tuberosum

<400>128
Met Lys Leu Cys Ser Ser Ile Ile Leu Ser Ile Ile Lys Gln Lys Gln
1 5 10 15
Val Glu Ile Leu Arg Ala Cys Phe Gly Phe Pro Glu Thr Lys Thr Ile
20 25 30
Ser Val Phe Ser Ser Val Ser Trp Asn Trp His Ile Ile Cys Lys Ser

35 40 45

Leu

<210>129
<211>64
<212>PRT
<213>Solanum tuberosum

<400>129
Met Thr Lys Lys Pro Asp Arg Lys Asp Asn Ile Met Pro Tyr Asn Phe
1 5 10 15
Pro Gly Thr Lys Phe Leu Gln Pro Ile Phe Arg Asn Phe Phe Leu Pro
20 25 30
Ser Leu Cys Asp Lys Leu Leu Lys Lys Ser Ile Ser Val Pro Gln Ala
35 40 45
Ile Thr Pro Cys Trp Lys Val Gln Cys Gly His Gly Ile Lys Lys Ala
50 55 60

<210>130
<211>115
<212>PRT
<213>Solanum tuberosum

<400>130
Thr Ile Leu Lys Leu Asp Leu His Thr Phe Asn Gly His Phe Phe Thr
1 5 10 15
Ala Ser Phe Trp Asn Gln Ser His Arg Asn Ser Ile Phe Ile Phe Gln
20 25 30
Ser Asn Ile Leu Gln Gln Phe Ser Tyr Arg Gln Leu Glu Ser Asn Thr
35 40 45
Gly Asn Met Ile Ser Ile Thr Ser Met Asn Met Arg Gln Ala Ser Ile
50 55 60
Thr Pro Cys Lys Leu Arg Leu Ile Lys Leu Ile Cys Ile His Ser Leu
65 70 75 80
Val His Val Gln Lys His Ile Glu Pro Tyr Ile Val Pro Ile Ile Ile
85 90 95
Arg Tyr Phe Ile Glu Cys Gln Tyr Leu Leu Leu Leu Ile Phe Leu Leu
100 105 110
Cys Cys Pro

115

<210>131
<211>122
<212>PRT
<213>Solanum tuberosum

<400>131
Met Lys Gly Lys Glu Lys Pro Arg Glu Met Asn Leu Gln Phe Phe Thr
1 5 10 15
Thr Asn Phe Val Ser Thr Val Ala Ile Ser Thr Met Asn Ile Ser Leu
20 25 30
Leu Phe Lys Ala Lys Arg Val Lys Gly Val Phe Ile Lys Phe Pro His
35 40 45
Ser Thr Arg Ser Gln Leu Ile Leu Gly Tyr Val Leu Leu Ile Arg Arg
50 55 60
Met Ser Arg Gly Ala Asp Ala Glu Phe Ser His Arg Arg Glu Leu Val
65 70 75 80
Val Arg Asn Thr Ile Asp Leu Ile Gly Tyr Arg Arg Ala Thr Thr Val
85 90 95
Tyr Tyr Ile Asn Thr Phe Phe Tyr Met Gly Ser Thr Thr Arg Leu Glu
100 105 110
Ile Arg Arg Trp Tyr Arg Cys Ser Ser Arg
115 120

<210>132
<211>104
<212>PRT
<213>Solanum tuberosum

<400>132
Met Glu Trp Ala Leu Ala Arg Asn Arg Ile Pro Phe Phe Tyr Cys Pro
1 5 10 15
Asn Ser Leu Arg Thr Ser His Gly Lys Gly Tyr Asp Phe His Arg Arg
20 25 30
Lys Arg Ile Gln Ser Ser Thr Asn Leu Tyr Leu Leu Asn Pro Phe Phe
35 40 45
Ser Arg Gln Leu Ile Ser Ile His Ser Thr Ser Cys Pro His Trp His
50 55 60

Gly Gly Ser Lys Lys Ser Asp Leu Asn Arg Val Ser Arg Asn Tyr Pro
65 70 75 80
Cys Leu His Arg Phe Phe Asp Glu Val Cys His Arg Ser Arg Cys Glu
85 90 95
Pro Glu Tyr Glu Gly Cys Phe Gln
100

<210>133
<211>92
<212>PRT
<213>Solanum tuberosum

<400>133
Met Asn Asn Ile Thr His Ser Pro Ile Leu Ile Pro Phe Leu Glu Gln
1 5 10 15
Leu Asn Pro Phe Ile Ser Asn Cys His Met Gln Pro Ile Val Lys Ala
20 25 30
Asn Thr Pro Ile Leu Asn Gly Asn Thr Lys Cys Arg His Ser Ala Asn
35 40 45
Ile Phe Thr Asn Gly Asn Cys Ile Trp Glu Lys Pro Met Asn Lys Ile
50 55 60
Val Asp Gln His Gln Ile His Asn Ser Ile His Ile Ser Cys Glu Ser
65 70 75 80
Lys Val Phe Leu Val Val Pro Ser Glu Ser His Arg
85 90

<210>134
<211>57
<212>PRT
<213>Solanum tuberosum

<400>134
Met Lys Phe Arg Tyr Pro Ser Pro Pro Asn Pro Ile Val Thr Ser Leu
1 5 10 15
Ile Ile Leu Cys Asn Ala Ile Pro Arg Ser Ile Asn Asp Val Asp Gly
20 25 30
Leu Ser Arg Ala Ile Lys Ser Tyr Ile Ser Leu Ser Ile Ser Gln Asn
35 40 45
Ala Ile Val Leu Ser Pro Thr Arg Ala

50 55

<210>135
<211>70
<212>PRT
<213>Solanum tuberosum

<400>135
Met Val Asn Ile Met Thr Ser Ser Ser Met Ala Thr Lys Phe Pro Ser
1 5 10 15
Ile Thr Val Gln Cys Asn Ser Val Leu Pro Trp Gln Val Thr Ser Asn
20 25 30
Phe Ile Pro Phe Val Cys Val Leu Trp Val Glu Val Glu Tyr Lys Tyr
35 40 45
Gln Val Thr Thr Phe Lys His Asn Asn Leu Ile Ile Ile Ile His Ala
50 55 60
Ala Tyr Tyr Leu Phe Ser
65 70

<210>136
<211>51
<212>PRT
<213>Solanum tuberosum

<400>136
Met Ala Lys Leu Val Thr His Glu Ile Glu Val Pro Leu Ser Ser Gln
1 5 10 15
Gly His Cys Glu Lys Met Asp His Leu Val Lys Arg Asn Ser Ser Ile
20 25 30
Asn Asn Arg Arg Ser Ile Cys Gln Ala Arg His Ala Arg Ile His Leu
35 40 45
Phe Val His
50

<210>137
<211>72
<212>PRT
<213>Solanum tuberosum

<400>137

Met Phe Glu Thr Lys Leu Asn Ser Gly Val Val Trp Asn Asp Trp Leu
1 5 10 15
Thr Val Asn Ile Arg Asn Ser Asn Thr Pro Asn Thr Lys Leu Val Leu
20 25 30
Leu His His Val Val Arg Thr Val Pro Ser Ile Glu Ile Ala Asn Asn
35 40 45
Phe Val Phe Leu Ser Ser Arg Ser Pro Phe Thr Ile Asp Tyr Ala Thr
50 55 60
Ile Phe Pro Val Glu Ser Lys Phe
65 70

<210>138
<211>66
<212>PRT
<213>Solanum tuberosum

<400>138

Met Leu Tyr Thr Ser Leu Tyr Ile Ser Tyr Leu Ser Asn Ser Met Leu
1 5 10 15
Leu Pro Ser Trp Thr Asn Leu His His Ser Tyr Ser Leu Asn Asn Leu
20 25 30
Ser Thr Tyr Leu Gly Leu Pro Leu Pro Gly Gly Asn Gln Asn Gln Phe
35 40 45
Leu Pro Gln Lys Gln Ala Gly Gln Gly Pro Ala Tyr Gln Lys His Leu
50 55 60
Arg Gln
65

<210>139
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述 :引物

<220>
<221> 修改的碱基

<222>(8)
<223>a,t,c 或 g

<220>
<221> 修改的碱基
<222>(10)
<223>a,t,c 或 g

<220>
<221> 修改的碱基
<222>(12)
<223>a,t,c 或 g

<400>139
gtttacanhn bnatatatcc tgyca 25

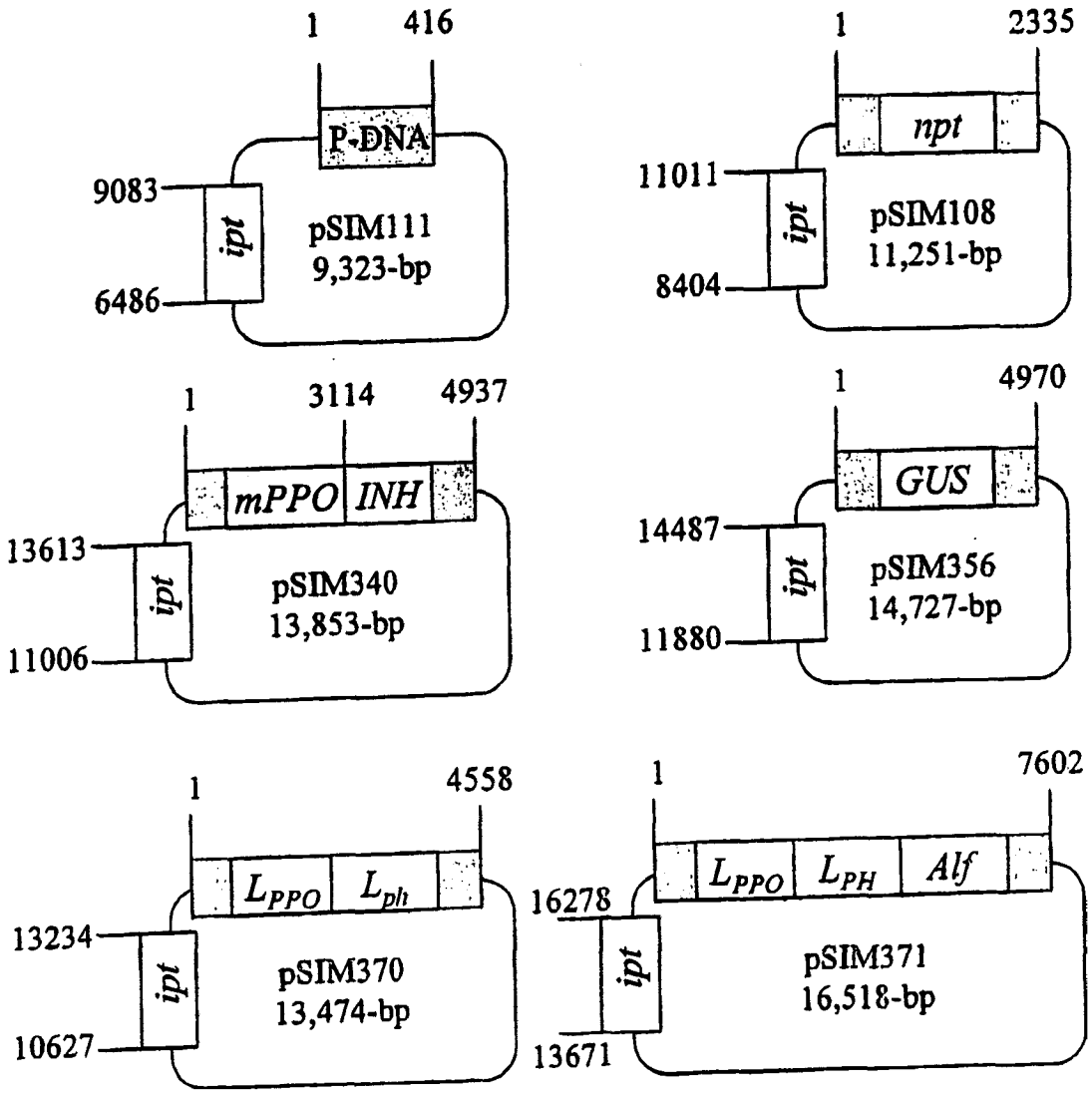


图 1 一些 P—DNA 载体的示意图

A.

```
St-inh1         MRNLFPILMLITNLALNNDNNNNNNNNNNYNLIHATCRETPYYSLCLTTLQSGPRSNEVE 60
Nt-inhh         MRNLFPIFMLITNLAFN-DNNNSNN------IINTTCRATTNYPLCLTTLHSDPRTSEAE 53
                *******:*******:* ****.**       :*::*** *. *.******:*.**:.*.*

St-inh1         GGDAITTLGLIMVDAVKSKSIEIMEKIKELEKSNPEWRAPLSQCYVAYNAVLRADVTVAV 120
Nt-inhh         GAD-LTTLGLVMVDAVKLKSIEIMKSIKKLEKSNPELRLPLSQCYIVYYAVLHADVTVAV 112
                *.* :*****:****** ******:.**:******* * ******:.* ***:*******

St-inh1         EALKKGAPKFAEDGMDDVVAEAQTCEYSFNYYNKLDFPISNLSREIIELSKVAKSIIRML 180
Nt-inhh         EALKRGVPKFAENGMVDVAVEAETCEFSFK-YNGLVSPVSDMNKEIIELSSVAKSIIRML 171
                ****:*.*****:** **..**:***:**: ** *  *:*:;.:******.*********

St-inh1         L 181
Nt-inhh         L 172
                *
```

B.

```
St-inh1         MRNLFPILMLITNLALNNDNNNNNNNNNNYNLIHATCRETPYYSLCLTTLQSGPRSNEVE 60
Nt-inh1         MKNLIFLTMFLTILLQTNANN----------LVETTCKNTPNYQLCLKTLLSDKRS--AT 48
                *:**: : *::* *  .* **          *:.:**::** *.***.** *. **  .

St-inh1         GGDAITTLGLIMVDAVKSKSIEIMEKIKELEKSNP--EWRAPLSQCYVAYNAVLRADVTV 118
Nt-inh1         G--DITTLALIMVDAIKAKANQAAVTISKLRHSNPPAAWKGPLKNCAFSYKVILTASLPE 106
                *   ****.******:*:*: :   .*.:*.:***   *:.**.:* .:*:.:* *.:.

St-inh1         AVEALKKGAPKFAEDGMDDVVAEAQTCEYSFNYYNKLDFPISNLSREIIELSKVAKSIIR 178
Nt-inh1         AIEALTKGDPKFAEDGMVGSSGDAQECE---EYFKGSKSPFSALNIAVHELSDVGRAIVR 163
                *:***.** ******** .  .:** **   :*::  . *:* *.  : ***.*.::*:*

St-inh1         MLL 181
Nt-inh1         NLL 166
                **
```

图 2 马铃薯和烟草转化酶抑制物蛋白的比对



启动子	SOI*	间隔区	总大小
P:GBSS-小	前导区 a/w** R1	Ubi 内含子	1729-bp
P:GBSS-小	前导区 a/wR1	GBSS 间隔区	1397-bp
P:GBSS-大	前导区 a/wR1	Ubi 内含子	2005-bp
P:GBSS-大	前导区 a/wR1	GBSS 间隔区	1397-bp
P:GBSS-小	尾随区 a/wR1	GBSS 间隔区	2042-bp
P:GBSS-小	尾随区 a/wR1	Ubi 内含子	1705-bp
P:GBSS-大	尾随区 a/wR1	GBSS 间隔区	2313-bp
P:GBSS-大	尾随区 a/wR1	Ubi 内含子	1981-bp
P:GBSS-小	前导区 a/wPhosph.	GBSS 间隔区	-
P:GBSS-小	前导区 a/wPhosph.	Ubi 内含子	-
P:GBSS-大	前导区 a/wPhosph.	GBSS 间隔区	1852-bp
P:GBSS-大	前导区 a/wPhosph.	Ubi 内含子	2184-bp
P:GBSS-大	前导区 a/wPPO	Ubi 内含子	1958-bp
P:GBSS-大	前导区 a/wPPO	GBSS 间隔区	1626-bp
P:GBSS-小	前导区 a/wPPO	Ubi 内含子	-
P:GBSS-小	前导区 a/wPPO	GBSS 间隔区	-

*: 目标序列; **: "与...相连"

图 3 无基因的表达盒

```
P-PPO3      CTGGCGATAACGGAACTGTTGGAGGATATTGGTTTGGAAGATGAAGATACTATTGCGGTG 60
PPOM-41     CTGGCGATAACGGAACTGTTGGAGGATATTGGATTGGAAGATGAAGATACTATTGCGGTA 60
PPOM-44     CTGGCGATAACGGAACTGTTGGAGGATAATGGATTGGAAGATGAAGGTACTATNGCGGTA 60

P-PPO3      ACTCTGGTGCCAAAGAGAGGTGGTGAAGGTATCTCCATTGAAAGTGCGACGATCAGTCTT 120
PPOM-41     ACTTTGGTTCCAAAAGTAGGTGGTGAAGGTGTATCCATTGAAAGTGTGGAGATCAAGCTT 120
PPOM-44     ACTTTGGTTCCAAAAGTTGGTGGTGAAGGTGTATCCATTGAAAGTGCGGAGATCAAGCTT 120

P-PPO3      GCAGATTGTTAATTAGTCTCTA-TTGA-ATCTGCTG----AGATTACAC-TTTGATGGAT 173
PPOM-41     GAGGATTGTTAAGTCCTCATGAGTTGGTGGCTACGGTACCAAATTTTATGTTTAATTAGT 180
PPOM-44     GAGGATTGTTAAGTCCTCATGAGTTGGTGGCTATGGTACCAAATTNTATGTTTAATTAGT 180

P-PPO3      GATGCTCTGTT--TTTGTTTTCTTGTTCTGTTTTTTCCTC-TGTTGAAATCAGCTTTGTT 230
PPOM-41     ATTAATGTGTGTATGTGTTTGATTATGTTTCGGTTAAAATGTATCAGCTGGATAGCTGAT 240
PPOM-44     ATTAATGTGTG----TGTTTGATTATGTTTCGGTTAAAATGTATCANCTGGATAGCTGAT 236

P-PPO3      -GCTTGATTTe---ATTGAAGTTGTTATTCAAGAA-TAAATCAGTTA-CAATT------- 277
PPOM-41     TACTAGCCTTGCCAGTTGTTAATGCTATGTATGAAATAAATAAATAAATGGTTGTCTTCT 300
PPOM-44     TACTAGCCTTCCCAGTTGTTAATGCTATGTATGAAATACATAAATAAATGGTTGTCTTCC 296
```

图 4 块茎表达的 PPO 基因的 3′ - 末端和与这些基因相连的尾随区的比对。

终止密码子（′ TAA′ ）以下划线标出。用于马铃薯植物的遗传修改的尾随区序列是从′ P-PP03′ 中分离的，位于终止密码子的下游（TTAGTC...ACAATT）

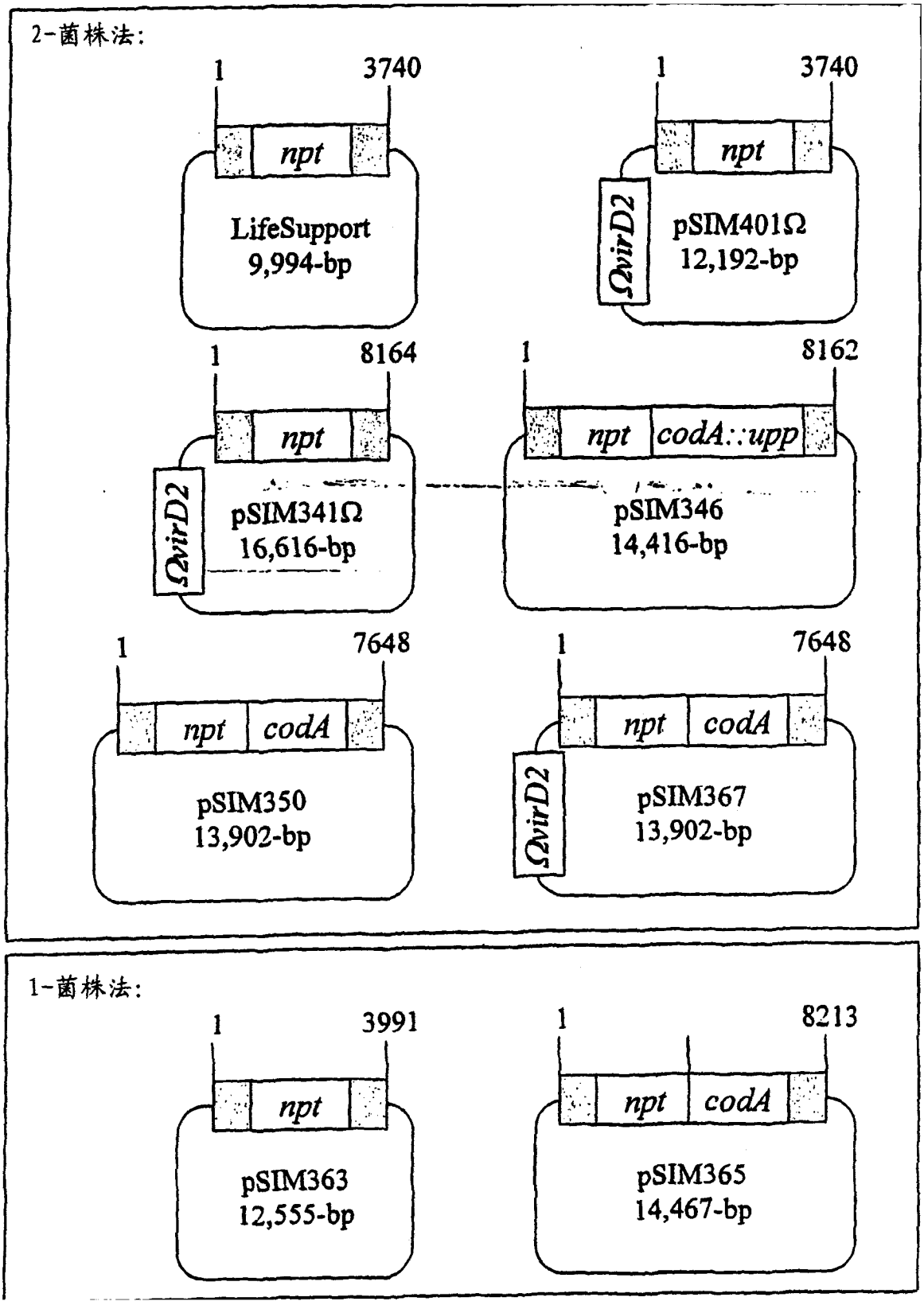


图 5 一些 LifeSuppoft 载体的示意图