



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105123532 B

(45)授权公告日 2018.12.18

(21)申请号 201510550052.0

(22)申请日 2007.07.13

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105123532 A

(43)申请公布日 2015.12.09

(30)优先权数据
2006903810 2006.07.14 AU

(62)分案原申请数据
200780033971.4 2007.07.13

(73)专利权人 联邦科学技术研究组织
地址 澳大利亚澳大利亚首都地区

(72)发明人 E·怀特洛 S·拉赫曼 李忠谊
柳青 S·P·辛格 R·C·德费特

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

代理人 王健

(51)Int.Cl.
C12N 15/82(2006.01)
A01H 5/10(2018.01)
A01H 1/02(2006.01)
A01H 6/46(2018.01)

(56)对比文件

CN 1655669 A,2005.08.17,
CN 1705748 A,2005.12.07,
CN 1378602 A,2002.11.06,
E.S.Whitelaw et al..Investigation of
lipid synthesis in the rice grain:
modification of fatty acids in rice bran
oil.《Cereals 2004 , proceedings of the
54th Australian Cereal Chemistry
Conference and11th》.2004,第418页第2段及图
1.

Qing Liu et al..High-Stearic and High-
Oleic Cottonseed Oils Produced by Hairpin
RNA-Mediated Post-Transcriptional Gene
Silencing.《Plant Physiology》.2002,第129卷
第1732-1743页.

PeterA.Stoutjesdijk et al..hpRNA-
MediatedTargetingoftheArabidopsis FAD2
GeneGivesHighlyEfficientandStableSilencin
g.《Plant Physiology》.2002,第129卷第1723-
1731页.

审查员 夏文静

权利要求书1页 说明书42页
序列表39页 附图38页

(54)发明名称

改变水稻的脂肪酸组成

(57)摘要

本发明涉及油酸、棕榈酸和/或亚油酸水平改变的米糠油、米糠和水稻种子。本发明还提供了遗传修饰水稻植物的方法,由此该水稻植物产生的米糠油、米糠和水稻种子的油酸、棕榈酸和/或亚油酸的水平改变。特别地,这个目的通过调节Fad2和/或FatB表达而实现。

1. 一种产生水稻种子的方法,所述方法包括

i) 生长遗传修饰的水稻植物,相对于相应未修饰的植物,所述遗传修饰的水稻植物的具有FAD2活性的多肽表达降低,由此所述水稻植物的种子在其油中具有脂肪酸组成为大于60%的油酸,小于17%的棕榈酸和小于30%的亚油酸,其中所述具有FAD2活性的多肽是FAD2-1,所述FAD2-1多肽由SEQ ID NO:15所示氨基酸序列组成,并且其中相对于相应未修饰植物的种子,FAD2-1表达降低导致种子中棕榈酸水平降低,以及

ii) 从所述植物收获种子。

2. 根据权利要求1的方法,其中所述油的油酸与亚油酸的比率大于3:1。

3. 根据权利要求1或2的方法,其中所述油的脂肪酸组成具有小于12%的棕榈酸。

4. 根据权利要求1或2的方法,其中所述油的脂肪酸组成具有小于15%的亚油酸。

5. 一种获得水稻植物的方法,所述方法包括:

i) 使第一种亲代遗传修饰的水稻植物与第二种亲代水稻植物杂交,所述第一种亲代遗传修饰的水稻植物相对于相应未修饰的植物,具有FAD2活性的多肽表达降低,其中所述具有FAD2活性的多肽是FAD2-1,所述FAD2-1多肽由SEQ ID NO:15所示氨基酸序列组成,并且其中相对于相应未修饰植物的种子,FAD2-1表达降低导致第一种亲代遗传修饰的水稻植物的种子中棕榈酸水平降低,

ii) 从杂交中筛选相对于相应未修饰的植物所述具有FAD2活性的多肽表达降低的后代植物或种子,

iii) 分析所述杂交的种子的油的脂肪酸组成,及

viii) 选择相对于相应未修饰的植物所述具有FAD2活性的多肽表达降低的后代植物,由此所述后代植物的种子在其油中具有脂肪酸组成为大于60%的油酸,小于17%的棕榈酸和小于30%的亚油酸。

改变水稻的脂肪酸组成

[0001] 本申请是2007年7月13日提交的题为“改变水稻的脂肪酸组成”的中国专利申请200780033971.4的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及具有改变的油酸、棕榈酸和/或亚油酸水平的米糠油(rice oil)、米糠(rice bran)和水稻种子。本发明还提供了遗传修饰水稻植物的方法,由此从中产生的米糠油、米糠和水稻种子具有改变水平的油酸、棕榈酸和/或亚油酸。

[0003] 发明背景

[0004] 植物油是人体膳食脂肪的重要来源,在发达国家占大约25%的热量摄入(Broun et al.,1999)。目前世界植物油的产量为大约1亿1千万吨/年,其中86%用于人类消耗。几乎所有这些油均得自油料种子作物如大豆、油菜、向日葵、棉籽和落花生,或者得自种植园树木(plantation tree)如棕榈树、橄榄树和椰子树(Gunstone,2001;Oil World Annual,2004)。关于食用油的各个脂肪酸成分对于人体健康各个方面的影响的日益增长的科学了解和社会共识推动了具有改良的营养价值而同时保留各种食物应用所需的功能性的修饰的植物油的开发。这些修饰需要关于植物脂肪酸合成的代谢途径及编码这些途径的酶的基因的知识(Liu et al.,2002a;Thelen and Ohlrogge,2002)。

[0005] 对于各种脂肪和油的营养作用、特别是脂肪和油的组成成分对于心血管疾病、癌症和多种炎症性疾病的影响给予了很大关注。饮食中高水平的胆固醇和饱和脂肪酸被认为增加心脏病的风险,这个结果已经导致减少摄取胆固醇丰富的饱和动物脂肪而赞成摄取无胆固醇的不饱和植物油的营养学建议(Liu et al.,2002a)。

[0006] 虽然经膳食摄取动物脂肪中存在的胆固醇可以明显增加血液总胆固醇水平,但是也发现包含所述脂肪和油的脂肪酸自身对于血清胆固醇水平即可具有显著作用。特别感兴趣的是膳食脂肪酸对于血液中不希望的低密度脂蛋白(LDL)和希望的高密度脂蛋白(HDL)形式胆固醇的作用。通常,饱和脂肪酸、特别是在植物油中存在的主要饱和物豆蔻酸(14:0)和棕榈酸(16:0)具有增加血清LDL-胆固醇水平及随后增加心血管疾病风险的不希望的性质(Zock et al.,1994;Hu et al.,1997)。然而,已经充分确定在植物油中存在的另一种主要饱和物,硬脂酸(18:0)不增加LDL-胆固醇水平且也许实际上可降低总胆固醇水平(Bonanome and Grundy,1988;Dougherty et al.,1995)。因此,通常认为硬脂酸对于心血管疾病的风险至少是中性的(Tholstrup,et al.,1994)。另一方面,不饱和脂肪酸如单不饱和和油酸(18:1)和多不饱和亚油酸(18:2)以及 α -亚麻酸(ALA,18:3)对于降低LDL-胆固醇有益处(Mensink and Katan,1989;Roche and Gibney,2000),因此降低了心血管疾病的风险。

[0007] 尽管在营养方面是需要的,但是高不饱和油在用于许多食品应用中太不稳定,特别是在暴露于长时间高温和氧化条件下的商业性深度油炸应用方面太不稳定。在这种条件下,不饱和油中存在的许多碳双键的氧化性断裂导致短链醛、氢过氧化物和酮衍生物的产生,产生不合乎需要的味道且由于极性化合物水平增加而降低油炸性能(Chang et al.,

1978;Williams et al.,1999)。

[0008] 油加工商和食品生产商传统上依赖于氢化以降低油中不饱和脂肪酸的水平,从而增加其在油炸应用中的氧化稳定性且还提供了固体脂肪以用于人造黄油和起酥油中。氢化作用是一个化学过程,通过将碳双键转变为碳单键而降低了油的不饱和程度。完全氢化作用产生完全饱和脂肪。然而,部分氢化过程导致饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸的水平均增加。在部分氢化过程中形成的一些单不饱和物是反式异构体形式(如反油酸,油酸的反式异构体),而不是天然发生的顺式异构体(Sebedio et al.,1994;Fernandez San Juan, 1995)。与顺式不饱和脂肪酸相反,现在已知反式脂肪酸与棕榈酸在增加血清LDL胆固醇水平(Mensink and Katan,1990;Noakes and Clifton,1998)和降低血清HDL胆固醇(Zock and Katan,1992)方面具有同样效力,并因此导致心血管疾病风险增加(Ascherio and Willett,1997)。由于对于反式脂肪酸的反营养作用的了解日益增多,现在越来越多地倾向于在食品业中不使用氢化油,而赞成使用既具有营养益处且无需氢化而可提供需要的功能性的脂肪和油,特别是富含油酸(在需要液态油的情况中)或者硬脂酸(在优选固体或半固体脂肪的情况中)的那些脂肪和油。

[0009] 植物油几乎完全由三酰甘油(TAG)分子组成,所述分子由被酯化为甘油主链的三个脂肪酸(酰基)链组成且沉积于称作油质体的特定油体结构中(Stymne and Stobart, 1987)。这些贮存脂质作为幼苗发芽的能量来源,直至其能进行光合作用。常用的可食用植物油通常由5种主要脂肪酸组成-饱和棕榈酸和硬脂酸、单不饱和油酸和多不饱和亚油酸以及 α -亚麻酸。除了脂肪酸之外,植物油也含有一些重要的微量成分如维生素E、植物固醇、萜类和混合的类异戊二烯。对这些微量成分越来越感兴趣,因为一些这样的成分已经示出对于皮肤健康、衰老、视力和血液胆固醇发挥有益作用或者防止乳腺癌或者心血管疾病(Theriault et al.,1999;Moghadasian and Frohlich,1999)。

[0010] 种子中的脂肪酸和TAG合成

[0011] 图1示出了发育中的种子中脂肪酸合成的代谢途径示意图。脂肪酸合成的最初阶段发生在细胞的质体区室中,其中脂肪酸碳链的合成用C₂分子开始并且通过逐步缩合过程延伸,从而从丙二酰基-ACP贡献额外的C₂碳单位以延长酰基链。这个程序的第一步包括用丙二酰基-ACP缩合乙酰-CoA且通过 β -酮酯酰合酶III(KASIII)催化。随后的缩合循环由 β -酮酯酰合酶I(KASI)催化,导致最终形成与酰基载体蛋白(ACP)连接的饱和C₁₆酰基链,棕榈酰-ACP。质体内的最终延长由 β -酮酯酰合酶II(KASII)催化,形成饱和C₁₈酰基链,硬脂酰-ACP。当去饱和发生时,第一个双键通过质体中的可溶酶即硬脂酰-ACP Δ 9-去饱和酶被导入C₁₈链的 Δ 9位置,产生单不饱和的C₁₈:1油酰-ACP。

[0012] 因此合成的脂肪酸保留在质体中以进一步修饰并掺入质体脂质(plastidic lipid)中;或者通过酰基-硫酯酶(acyl-thioesterases)从其ACP中释放,产生游离脂肪酸,游离脂肪酸被输出到细胞溶胶中以进一步修饰并最终掺入TAG分子中。已经发现高等植物具有至少两种类型的酰基硫酯酶:FatA,其对于油酰-ACP(不饱和酰基-ACP)具有底物特异性;以及FatB,其对于饱和酰基-ACP具有偏爱性(Jones et al.,1995;Voelker et al., 1996)。

[0013] 在离开质体时,游离脂肪酸被酯化为辅酶A(CoA),然后可用于转移至三磷酸甘油(G-3-P)主链,形成溶血磷脂酸(LPA)、磷脂酸(PA)和磷脂酰胆碱(PC)。此外,在一些植物中,

特别是芸苔属 (*Brassica*) 物种中,被酯化为CoA的油酸能被延长以形成二十碳烯酸 (C20:1) 和芥子酸 (C22:1)。被酯化为PC的油酸可用于进一步修饰,之后被掺入TAG中。在可食用油中,对PC的主要修饰是分别通过微粒体 $\Delta 12$ -去饱和酶 (Fad2) 和 $\Delta 15$ -去饱和酶 (Fad3) 进行相继的油酸去饱和和形成亚油酸和 α -亚麻酸。

[0014] 现有脂肪酸生物合成酶的修饰

[0015] 基因失活方法如转录后基因沉默方法 (PTGS) 已经成功用于失活脂肪酸生物合成基因并且在油料种子作物中产生营养方面改良的植物油。例如,通过共抑制Fad2编码的微粒体 $\Delta 12$ -去饱和酶产生了在其种子油中具有80%油酸的大豆制品系 (Kinney, 1996)。这样降低了 $\Delta 12$ -去饱和水平,导致大量油酸聚集。使用相似的方法,基于共抑制的Fad2基因的沉默用于提高欧洲油菜 (*Brassica napus*) 和芥菜 (*B. juncea*) 中油酸水平 (Stoutjesdijk et al., 2000)。同样,发现得自油菜籽的Fad2基因的突变体等位基因在棉籽中的转基因表达能抑制内源棉花Fad2基因的表达并导致在大约一半的原始转基因棉花品系中油酸含量增加 (Chapman et al., 2001)。另外,通过自身切割核酶终止的Fad2基因在大豆中的转基因表达能失活内源Fad2基因,导致油酸水平增加 (Buhr et al., 2002)。RNAi-介导的基因沉默技术已经用于开发具有营养改良的脂肪酸组成的油料种子。在棉籽中,靶向ghFad2-1 (棉花Fad2基因家族的种子特异性成员) 的发夹RNA (hpRNA) 基因沉默构建体的转基因表达导致油酸从占油中总脂肪酸的15%的正常水平增加至直至77% (Liu et al., 2002b)。这种增加的代价主要是亚油酸从60%的正常水平降低至低如4%。

[0016] 谷物中的脂肪酸

[0017] 与在油料种子中进行的脂肪酸生物合成和修饰的大量工作形成对照,在谷物中相对未进行油修饰的研究。这可能是由于在谷粒中油的水平较低 (大约1.5-6%重量) 并且因此感觉到人类饮食中来自谷物的油的重要性较低的缘故。

[0018] 水稻 (*Oryza sativa* L.) 在发展中国家是最重要的谷物并且广泛生长,特别是在亚洲占全世界产量的大约90%。世界上绝大多数水稻以“精白米”形式食用,其基本上是水稻谷粒的胚乳,通过对收获的谷粒进行研磨以除去外层糠皮和胚芽 (胚和盾片) 而产生。这样做主要是因为“糙米”不好贮存,特别是在热带条件下不好保存。

[0019] 谷粒如水稻的油含量相对于油料种子非常低 (4%), 在油料种子中油可以组成谷粒重量的60% (Ohlrogge and Jaworski, 1997)。然而,脂质可仍包含直至37%干重的谷物胚 (Choudhury and Juliano 1980)。水稻谷粒中大多数脂质含量在外层糠皮中发现 (Resurreccion et al., 1979), 但是一些脂质也存在于胚乳中,至少一些与淀粉相关 (表1和2)。米糠油中的主要脂肪酸是棕榈酸 (16:0) (占TAG中总脂肪酸的大约20%)、油酸 (18:1) (大约40%) 和亚油酸 (18:2) (大约34%) (Radcliffe et al, 1997)。在不同水稻栽培种中,例如天然油酸水平范围是37.9%-47.5%,亚油酸 (18:2) 是38.2%-30.4% (Taira et al., 1988)。

[0020] 表1:各种植物油的选择的脂肪酸的典型脂肪酸组成 (总脂肪酸的wt%)

[0021]

植物	16:0	18:1	18:2
大麦	18	22	54
大豆	11	23	51

花生	8	50	36
油菜	4	63	20
橄榄	15	75	9
米糠	22	38	34

[0022] 虽然FatB基因已经示出高亲和性催化游离棕榈酸产生,所述棕榈酸随后在油料种子植物和双子叶植物中被转变为棕榈酰-CoA,但是没有关于FatB在水稻或其它谷物中作用的报道信息。

[0023] 表2:与淀粉相关植物脂质的选择的脂肪酸的脂肪酸组成(总脂肪酸的wt%)

[0024]

植物	16:0	18:1	18:2
小麦	35-44	6-14	42-52
大麦	55	4	36
黑麦	23	41	35
燕麦	40	22	35
玉米	37	11	46
玉米-高直链淀粉	36	20	38
玉米-蜡质	36	23	36
小米(Millet)	36	28	29
水稻	37-48	9-18	29-46

[0025] 数据根据Morrison(1988)改编。

[0026] 一些脂肪酸去饱和酶已经在水稻中鉴定,但不是Fad2。Akagai et al.,(1995)公布了水稻染色体4上编码发育中种子中硬脂酰-酰基载体蛋白去饱和酶的基因的核苷酸序列。该基因产物参与从硬脂酰ACP产生油酰ACP。Kodama et al.(1997)报道了水稻中Fad3的结构、染色体位置和表达。

[0027] 通过使用大豆Fad3表达技术,水稻种子油中亚麻酸(18:3)的比例增加了10倍(Anai et al.,2003)。近年来,已经报道了通过导入来自细菌的亚油酸异构酶基因在水稻中产生缀合的亚油酸(Kohno-Murase et al.,2006);据报道缀合的亚油酸具有抗癌活性。也已经报道了使用固定的微生物酶,以相似的机理(vein)在体外修饰米糠油以掺入癸酸,这样在一些疾病中可以改良膳食脂质的利用(Jennings and Akoh,2000)。在玉米中,对Fad2和FA-6去饱和酶基因已经被测序和染色体作图(Mikkilinen and Rocheford,2003)。对于玉米谷粒中油酸/亚油酸比率,Fad2和Fad6克隆不能作图至任何QTL。没有关于在水稻、玉米或小麦中鉴定的其它Fad2或FatB基因的公开报道。

[0028] 水稻的贮存

[0029] 水稻在高温下长期贮存削弱了谷粒品质,这是由于米糠油的水解和氧化变质所致。在收获期间脱去外壳以产生糙米破坏了外层糠皮,使得油扩散至外层。随后内源的和微生物脂肪酶催化三酰甘油水解为游离脂肪酸(FFA),其随后被氧化产生脱风味(off-flavour)(Yasumatsu et al.,1966,Tsuzuki et al,2004,Zhou et al,2002Champagne and Grimm,1995)。

[0030] 己醛是在高温下贮存的生的和煮熟的糙米的顶部空间中增加的主要成分(Boggs

et al.,1964,Shibuya et al.,1974,Tsugita et al.,1983)。然而,己醛自身不是“脱”风味的主要原因,变质的稻米的讨厌臭味和气味可能是由于在贮存后增加的混合挥发物所致。这些挥发物包括烷醛、烯醛(alkenals)、芳族醛、酮、2-戊基呋喃、4-乙基苯酚等(Tsugita et al.,1983)。然而,在贮存期间己醛水平示出与糙米中亚油酸(18:2)的氧化相关并因此是氧化变质的良好指征(Shin et al.,1986)。

[0031] 己醛从亚油酸产生可以通过脂加氧酶(LOX)催化(St Angelo et al.,1980)。Suzuki et al.(1999)鉴别了没有Lox3的水稻变种并发现该突变谷粒在35℃贮存8周,在生的和煮熟的糙米谷粒的顶部空间蒸汽中均形成较少的己醛。他们还发现突变水稻形成较少的戊醛和戊醇。

[0032] 通过磨去水稻谷粒外层获得的富有营养的外层米糠皮是极佳的食物源料,含有抗氧化化合物如生育三烯酚类和也是植物雌激素的 γ -谷维素(Rukmini and Raghuram,1991)。已经发现米糠油中存在的生物活性化合物降低人体胆固醇水平(Most et al.,2005)。这些生物活性成分也已经示出改善喂食高胆固醇饮食的大鼠的脂质谱(Ha et al.,2005)。主要在米糠中发现的另一种重要成分是维生素A前体。然而,由于对稻米进行研磨和食用精白米而丧失了这些营养和健康益处。

[0033] 仍需要这样的谷物如水稻的产生具有对于健康有益的改良的油组成的谷粒的变种,同时在贮存时更加稳定,使得在人膳食中可以更多地使用例如糙米。

[0034] 发明概述

[0035] 一方面,本发明提供了米糠油,其脂肪酸组成包含大于大约48%的油酸、小于大约17%的棕榈酸、小于大约30%的亚油酸和/或其任何组合。

[0036] 在一个实施方案中,油酸与亚油酸的比率大于1.5:1,优选大于2:1,更优选大于3:1,还更优选大于4:1。

[0037] 在另一个实施方案中,所述米糠油的脂肪酸组成包含大于大约48%的油酸、小于大约17%的棕榈酸和小于大约30%的亚油酸。

[0038] 在再一个实施方案中,所述米糠油的脂肪酸组成包含大于大约40%的油酸,优选大于大约50%的油酸,还更优选大于大约60%的油酸。在一个实施方案中,所述米糠油的脂肪酸组成的范围是48-80%的油酸、6-16%的棕榈酸和10-25%的亚油酸。

[0039] 在又一个实施方案中,所述米糠油的脂肪酸组成包含小于大约16%的棕榈酸,优选小于大约15%的棕榈酸,更优选小于大约14%的棕榈酸,更优选小于大约13%的棕榈酸,还更优选小于大约12%的棕榈酸。

[0040] 在另一个实施方案中,所述米糠油的脂肪酸组成包含小于大约25%的亚油酸,优选小于大约20%的亚油酸,还更优选小于大约15%的亚油酸。

[0041] 另一方面,本发明提供了米糠,其脂肪酸组成包含大于大约48%的油酸、小于大约17%的棕榈酸、小于大约30%的亚油酸和/或其任何组合。

[0042] 在一个实施方案中,油酸与亚油酸的比率大于1.5:1,优选大于2:1,更优选大于3:1,还更优选大于4:1。

[0043] 在另一个实施方案中,所述米糠的脂肪酸组成包含大于大约48%的油酸、小于大约17%的棕榈酸和小于大约30%的亚油酸。

[0044] 在再一个实施方案中,所述米糠的脂肪酸组成包含大于大约40%的油酸,优选大

于大约50%的油酸,还更优选大于大约60%的油酸。在一个实施方案中,所述米糠的脂肪酸组成处于48-80%的油酸、6-16%的棕榈酸和10-25%的亚油酸的范围。

[0045] 在又一个实施方案中,所述米糠的脂肪酸组成包含小于大约16%的棕榈酸,优选小于大约15%的棕榈酸,更优选小于大约14%的棕榈酸,更优选小于大约13%的棕榈酸,还更优选小于大约12%的棕榈酸。

[0046] 在另一个实施方案中,所述米糠的脂肪酸组成包含小于大约25%的亚油酸,优选小于大约20%的亚油酸,还更优选小于大约15%的亚油酸。

[0047] 另一方面,本发明提供了水稻种子,其脂肪酸组成包含大于大约48%的油酸、小于大约17%的棕榈酸、小于大约30%的亚油酸和/或其任何组合。

[0048] 在一个实施方案中,油酸与亚油酸的比率大于1.5:1,优选大于2:1,更优选大于3:1,还更优选大于4:1。

[0049] 在另一个实施方案中,所述水稻种子的脂肪酸组成包含大于大约48%的油酸、小于大约17%的棕榈酸和小于大约30%的亚油酸。

[0050] 在再一个实施方案中,所述水稻种子的脂肪酸组成(即种子内的油)包含大于大约40%的油酸,优选大于大约50%的油酸,还更优选大于大约60%的油酸。在一个实施方案中,所述水稻种子的脂肪酸组成处于48-80%的油酸、6-16%的棕榈酸和10-25%的亚油酸的范围。

[0051] 在又一个实施方案中,所述水稻种子的脂肪酸组成包含小于大约16%的棕榈酸,优选小于大约15%的棕榈酸,更优选小于大约14%的棕榈酸,更优选小于大约13%的棕榈酸,还更优选小于大约12%的棕榈酸。

[0052] 在另一个实施方案中,所述水稻种子的脂肪酸组成包含小于大约25%的亚油酸,优选小于大约20%的亚油酸,还更优选小于大约15%的亚油酸。

[0053] 在关于米糠或水稻种子的上述任何实施方案中,脂肪酸组成典型通过提取油并通过FAME/GC分析加以确定,如实施例1所述。各个脂肪酸的组成以占油中总脂肪酸的百分比(w/w)表示。

[0054] 另一方面,本发明提供了产生本发明的米糠油、米糠和/或水稻种子的水稻植物。

[0055] 另一方面,本发明提供了分离的多核苷酸,当其存在于水稻植物的细胞中时,与没有所述多核苷酸的细胞相比下调Fad2和/或FatB多肽在所述细胞中的活性水平。

[0056] 优选地,所述多核苷酸与能指导所述多核苷酸在水稻植物细胞中表达的启动子可操纵地连接。

[0057] 在一个实施方案中,所述多核苷酸下调从至少一个Fad2和/或FatB基因表达的mRNA水平。

[0058] 合适的多核苷酸的例子包括但不限于选自如下的多核苷酸:反义多核苷酸,有义多核苷酸,催化性多核苷酸,微小RNA(microRNA),编码结合Fad2或FatB多肽的多肽的多核苷酸和双链RNA。

[0059] 在一个实施方案中,所述多核苷酸是反义多核苷酸,其在生理条件下与包含SEQ ID NO:5-8、11-14或者19-25所示任一或多个核苷酸序列的多核苷酸杂交。

[0060] 在再一个实施方案中,所述多核苷酸是催化性多核苷酸,其能切割包含SEQ ID NO:5-8、11-14或者19-25所示任一或多个核苷酸序列的多核苷酸。

[0061] 在另一个实施方案中,所述多核苷酸是包含寡核苷酸的双链RNA(dsRNA)分子,所述寡核苷酸包含SEQ ID NO:5-8、11-14或者19-25所示任一或多个核苷酸序列的至少19个连续核苷酸,其中所述分子的双链部分长度为至少19碱基对且包含所述寡核苷酸。

[0062] 优选地,所述dsRNA从单启动子表达,其中双链部分的链通过单链部分连接。构建载体以产生这种dsRNA分子的例子在实施例5中提供。

[0063] 在优选的实施方案中,所述多核苷酸或其链在严格条件下能与包含SEQ ID NO:5-8、11-14或者19-25所示任一或多个核苷酸序列的多核苷酸杂交。

[0064] 另一方面,本发明提供了一种鉴别多核苷酸的方法,所述多核苷酸存在于水稻植物细胞中时,与没有所述多核苷酸的细胞相比下调所述细胞中Fad2和/或FatB多肽的活性水平,所述方法包括:

[0065] i) 确定候选多核苷酸下调细胞中Fad2和/或FatB多肽活性水平的能力,及

[0066] ii) 选择下调细胞中Fad2和/或FatB多肽活性水平的多核苷酸。

[0067] 步骤i)可依赖于例如分析细胞中Fad2和/或FatB多肽的量或酶活性或者编码Fad2和/或FatB多肽的mRNA量。或者,步骤i)可包括分析细胞或者包含所述细胞的种子或植物的脂肪酸含量。优选地,步骤i)包括在植物细胞、更优选在水稻细胞中导入候选多核苷酸或者包含与候选多核苷酸可操纵地连接的启动子的嵌合DNA,还更优选包括从所述植物细胞再生转基因植物以及从转基因植物产生种子的步骤。候选基因可以是一组候选基因之一,至少为2或3个。本发明因此提供了本发明的多核苷酸在筛选方法中的应用。

[0068] 多核苷酸可以是但不限于是反义多核苷酸,有义多核苷酸,催化性多核苷酸,微小RNA,编码结合Fad2或FatB多肽的多肽的多核苷酸和双链RNA。

[0069] 在一个实施方案中,所述反义多核苷酸在生理条件下与包含SEQ ID NO:5-8、11-14或者19-25所示任一或多个核苷酸序列的多核苷酸杂交。

[0070] 在另一个实施方案中,所述催化性多核苷酸能切割包含SEQ ID NO:5-8、11-14或者19-25所示任一或多个核苷酸序列的多核苷酸。

[0071] 在再一个实施方案中,所述双链RNA(dsRNA)分子包含寡核苷酸,所述寡核苷酸包含SEQ ID NO:5-8、11-14或者19-25所示任一或多个核苷酸序列的至少19个连续核苷酸,其中所述分子的双链部分长度为至少19碱基对且包含所述寡核苷酸。

[0072] 本发明还提供了使用本发明的方法鉴别的分离的多核苷酸。

[0073] 另一方面,本发明提供包含或者编码本发明多核苷酸的载体。

[0074] 优选地,所述多核苷酸或者编码所述多核苷酸的序列与启动子可操纵地连接。优选地,所述启动子赋予所述多核苷酸相对于水稻植物的至少一种其它组织或器官而优先在所述植物的胚、胚乳、糠皮和/或种子中表达。

[0075] 本发明还提供了包含本发明的载体和/或本发明的多核苷酸的细胞。

[0076] 在一个实施方案中,所述多核苷酸或载体被导入所述细胞或者所述细胞的祖细胞中。

[0077] 在再一个实施方案中,所述细胞是水稻细胞或者农杆菌(Agrobacterium)细胞。

[0078] 优选地,所述多核苷酸被整合进所述细胞的基因组中。

[0079] 另一方面,本发明提供了包含本发明细胞的水稻植物。

[0080] 再一方面,本发明提供了产生本发明细胞的方法,所述方法包括将本发明的多核

苷酸或者载体导入细胞中的步骤。

[0081] 优选地,所述方法进一步包括从所述细胞再生转基因植物的步骤。

[0082] 本发明还提供了本发明的多核苷酸或载体在生产重组细胞中的应用。

[0083] 再一方面,本发明提供了遗传修饰的水稻植物,其中与相应未修饰的植物相比,所述植物相中具有Fad2和/或FatB活性的多肽表达降低。

[0084] 优选地,所述植物已经被转化为包含本发明的多核苷酸或者其包含所述多核苷酸的后代植物。

[0085] 再一方面,本发明提供了一种产生本发明米糠油、米糠和/或水稻种子的方法,所述方法包括将水稻植物暴露于Fad2或FatB多肽的拮抗剂。

[0086] 另一方面,本发明提供了一种获得遗传修饰的水稻植物的方法,所述水稻植物可用于产生与未修饰的糙米种子相比贮存期延长的糙米种子,所述方法包括对所述植物进行遗传操作,由此与产生未修饰的糙米种子的相应植物相比,Fad2和/或FatB多肽的活性和/或产生水平在所述水稻种子中降低。

[0087] 优选地,Fad2和/或FatB多肽的活性和/或产生水平仅在所述植物种子中降低。

[0088] 在一个实施方案中,Fad2多肽的活性和/或产生水平降低。

[0089] 在再一个实施方案中,所述转基因植物包含本发明的多核苷酸或载体。

[0090] 另一方面,本发明提供了使用本发明的方法产生的遗传修饰的水稻植物或其后代。

[0091] 另一方面,本发明提供了一种选择水稻植物的方法,该植物可用于产生本发明的米糠油、米糠和/或水稻种子,所述方法包括:

[0092] i) 筛选诱变的水稻种子或者水稻植物群,及

[0093] ii) 选择能产生本发明的米糠油、米糠和/或水稻种子的种子或植物。

[0094] 在一个实施方案中,步骤i) 包括分析诱变的种子和/或植物的具有Fad2或FatB活性的多肽。

[0095] 在另一个实施方案中,步骤i) 包括分析诱变的种子和/或植物的Fad2或FatB基因的序列和/或表达水平。

[0096] 在再一个实施方案中,步骤i) 包括分析诱变的种子和/或植物的油、糠和/或种子的脂肪酸组成。

[0097] 另一方面,本发明提供了一种选择水稻植物的方法,该植物可用于产生本发明的米糠油、米糠和/或水稻种子,所述方法包括:

[0098] i) 分析得自候选水稻植物的米糠油、米糠和/或种子的脂肪酸含量,及

[0099] ii) 选择可用于产生本发明的米糠油、米糠和/或水稻种子的水稻植物。

[0100] 再一方面,本发明提供了一种选择水稻植物的方法,该植物可用于产生本发明的米糠油、米糠和/或水稻种子,所述方法包括:

[0101] i) 分析候选植物样品的具有Fad2或FatB活性的多肽,及

[0102] ii) 基于所述多肽的序列、产生水平和/或活性选择可用于产生本发明的米糠油、米糠和/或水稻种子的水稻植物。

[0103] 另一方面,本发明提供了一种选择水稻植物的方法,该植物可用于产生本发明的米糠油、米糠和/或水稻种子,所述方法包括:

- [0104] i) 分析候选植物的Fad2或FatB基因的序列和/或表达水平,及
- [0105] ii) 基于所述基因的序列和/或表达水平选择可用于产生本发明的米糠油、米糠和/或水稻种子的水稻植物。
- [0106] 再一方面,本发明提供了一种鉴别可用于产生本发明的米糠油、米糠和/或水稻种子的水稻植物的方法,所述方法包括检测所述植物的核酸分子,其中所述核酸分子与植物中Fad2基因和/或FatB基因的至少一部分连接和/或包含所述部分。
- [0107] 另一方面,本发明提供了一种鉴别可用于产生贮存期延长的糙米种子的水稻植物的方法,所述方法包括检测植物的核酸分子,其中所述核酸分子与植物中Fad2基因和/或FatB基因的至少一部分连接和/或包含所述部分。
- [0108] 在一个实施方案中,上述两种方法包括:
- [0109] i) 使第二种核酸分子与得自所述植物的所述核酸分子杂交,
- [0110] ii) 任选地使至少一种其它核酸分子与得自所述植物的所述核酸分子杂交,及
- [0111] iii) 检测所述杂交步骤的产物或者所述杂交步骤产物的不存在。
- [0112] 在一个实施方案中,所述第二种核酸分子用作引物以逆转录或者复制所述核酸分子的至少一部分。
- [0113] 可以使用任何技术检测核酸,所述技术例如但不限于限制片段长度多态性分析、扩增片段长度多态性分析、微卫星扩增和/或核酸测序。
- [0114] 在一个实施方案中,所述方法包括核酸扩增。在另一个实施方案中,所述方法分析基因的表达水平。
- [0115] 本发明还提供了一种获得水稻植物或种子的方法,所述方法包括:
- [0116] i) 使第一种亲代水稻植物与第二种亲代水稻植物杂交,所述第一种亲代水稻植物包含赋予植物谷粒油中油酸比例增加的Fad2等位基因,所述第二种亲代水稻植物包含赋予植物谷粒油中棕榈酸比例降低的FatB等位基因,
- [0117] ii) 从杂交后代中筛选存在这两个等位基因的后代植物或谷粒,及
- [0118] iv) 选择包含这两个等位基因且植物谷粒油中油酸比例增加以及棕榈酸比例降低的后代植物或谷粒。
- [0119] 另一方面,本发明提供了一种将Fad2等位基因导入水稻植物中的方法,所述方法包括:
- [0120] i) 使第一种亲代水稻植物与第二种亲代水稻植物杂交,其中第二种植物包含所述等位基因,及
- [0121] ii) 使步骤i)的杂交后代与和第一种亲代植物相同基因型的植物回交足够次数以产生具有第一种亲代植物大部分基因型但是包含所述等位基因的植物,
- [0122] iii) 选择具有第一种植物的大部分基因型且包含所述等位基因的植物,其中所述等位基因赋予植物的油、糠和/或种子中油酸的比例增加。
- [0123] 再一方面,本发明提供了一种将FatB等位基因导入水稻植物中的方法,所述方法包括:
- [0124] i) 使第一种亲代水稻植物与第二种亲代水稻植物杂交,其中第二种植物包含所述等位基因,及
- [0125] ii) 使步骤i)的杂交后代与和第一种亲代植物相同基因型的植物回交足够次数以

产生具有第一种亲代植物大部分基因型但是包含所述等位基因的植物，

[0126] iii) 选择具有第一种植物的大部分基因型且包含所述等位基因的植物，其中所述等位基因赋予植物的油、糠和/或种子中棕榈酸的比例降低。

[0127] 再者，本发明提供了一种增加水稻植物的油、糠和/或种子中油酸比例的方法，所述方法包括对所述植物进行遗传操作，由此当与野生型植物相比时Fad2多肽的产生减少，其中所述多肽具有 $\Delta 12$ 去饱和酶活性。

[0128] 再一方面，本发明提供了一种降低水稻植物的油、糠和/或种子中棕榈酸比例的方法，所述方法包括对所述植物进行遗传操作，由此当与野生型植物相比时FatB多肽的产生减少，其中所述多肽具有(FatB)活性。

[0129] 本发明还提供了使用本发明的方法获得的水稻植物或者其后代植物。

[0130] 另一方面，本发明提供了得自本发明植物的米糠油。

[0131] 另一方面，本发明提供了得自本发明植物的米糠。

[0132] 另一方面，本发明提供了得自本发明植物的水稻种子。

[0133] 再者，本发明提供了一种产生种子的方法，所述方法包括：

[0134] a) 生长本发明的植物，及

[0135] b) 收获种子。

[0136] 再一方面，本发明提供了包含本发明的米糠油、米糠和/或水稻种子的食品。

[0137] 另一方面，本发明提供了制备食品的方法，所述方法包括在本发明的米糠油中烹调可食用物质。

[0138] 显然，本发明一方面的优选特征和特性可适用于本发明的许多其它方面。

[0139] 在本说明书中，单词“包含”应理解为意味着包含指定要素、整数或步骤、或一组要素、整数或步骤，但是不排除任何其它要素、整数或步骤、或一组要素、整数或步骤。

[0140] 本发明在后文通过非限制性实施例以及附图加以描述。

[0141] 附图简述

[0142] 图1: 高等植物的质体和细胞溶胶中主要的脂肪酸生物合成途径。

[0143] 图2: 水稻FatB蛋白的序列对比。ProteinFATB2=SEQ ID NO:1, proteinFATB3=SEQ ID NO:2, proteinFATB1=SEQ ID NO:3, proteinFATB4=SEQ ID NO:4。

[0144] 图3: 水稻FatB基因结构。LOC_0s02g4=SEQ ID NO:5, LOC-0s11g4=SEQ ID NO:6, LOC-0s06g0=SEQ ID NO:7, LOC-0s06g3=SEQ ID NO:8。

[0145] 图4: 通过ClustalW对比FatB基因序列。使用默认参数，注意“基因”是不同长度的。

[0146] 图5: 相应于LOC-0s6g05130的FatB基因外显子-内含子结构。上面一行相应于mRNA编码序列(SEQ ID NO:9)的起始处，成对的第二行相应于基因(SEQ ID NO:10)。

[0147] 图6: 四个FatB同工型的编码序列对比示出分别以小写字母和大些字母交替表示的连续外显子以及用于通过RT-PCR区分同工型的引物的位置(下划线处)。起始密码子(起始位置1)以粗体表示。AC108870=SEQ ID NO:11, AP005291=SEQ ID NO:12, AP000399=SEQ ID NO:13, AP004236=SEQ ID NO:14。

[0148] 图7: 通过Clustal W对比Fad2同工型的推导的多肽序列。注意F_1品系相应于0s02g48560, F_2相应于0s07g23410, F_3相应于0s07g23430, 0_4相应于0s07g23390。使用ClustalW(Fast)程序默认参数。ProteinF_1=SEQ ID NO:15, ProteinF_3=SEQ ID NO:16,

ProteinF_2=SEQ ID NO:17,ProteinF_4=SEQ ID NO:18。

[0149] 图8:Fad2序列的对比示出同工型AP004047中5'UTR位置(小写字母)和用于通过RT-PCR进行扩增的引物的位置(下划线处)。终止密码子的位置在方框中示出,终止密码子下游的非翻译区以小写字母表示。AP005168=SEQ ID NO:19,AP004047=SEQ ID NO:20,Contig2654=SEQ ID NO:21。

[0150] 图9:水稻Fad2基因结构。

[0151] 图10:水稻Fad2基因的蛋白质编码区的核苷酸序列对比。品系0_2相应于Os07g23410,0_4相应于Os07g23390,0_1相应于Os02g48560,0_3相应于Os07g23410。使用ClustalW程序默认参数。CdsFAD20_2=SEQ ID NO:22,CdsFAD20_4=SEQ ID NO:23,CdsFAD20_1=SEQ ID NO:24,CdsFAD20_3=SEQ ID NO:25。

[0152] 图11:通过GC分析指定基因型谷粒的总油级分确定的棕榈酸、油酸和亚油酸的相对百分比示意图。

[0153] 图12:在对指定基因型谷粒进行的GC总脂质分析中棕榈酸与油酸的相对百分比示意图。

[0154] 图13:在对指定基因型谷粒进行的GC总脂质分析中亚油酸与油酸的相对百分比示意图。

[0155] 图14:散点图示出指定基因型的水稻植物谷粒中亚油酸对油酸的百分比。注意这两种脂肪酸量之间的关系(反应在直线的斜率中)在分析的所有品系中基本相同,但是库大小容量(pool size capacity)看起来不同(以不同品系沿着分析的空间位移表示)。

[0156] 图15:不同基因型的亚油酸对棕榈酸的百分比散点图。注意FatB中受影响的品系与在Fad2中受影响的品系的不同斜率。这提示这些成分之间的关系在不同基因型中是不同的,很可能反映了影响步骤中的不同。

[0157] 图16:不同基因型的油酸对棕榈酸百分比散点图。注意斜率的不同。

[0158] 图17:对Fad2 RNAi植物和FatB RNAi植物的油组成变异的主成分分析示意图。结果示出主成分2是亚油酸对油酸,主成分1是棕榈酸对亚油酸和油酸。

[0159] 图18:Western印迹示出抗肽抗血清反应。通过SDS-PAGE分析FatB-99抗总叶蛋白提取物。在Tos-17品系中缺少大约20kDa的肽。图中示出用免疫前血清的反应。R是指FatB RNAi品系,T是指Tos-17品系,W1和W2是野生型。

[0160] 序列索引

[0161] SEQ ID NO:1-水稻FatB2蛋白

[0162] SEQ ID NO:2-水稻FatB3蛋白

[0163] SEQ ID NO:3-水稻FatB1蛋白

[0164] SEQ ID NO:4-水稻FatB4蛋白

[0165] SEQ ID NO:5-水稻FatB3基因

[0166] SEQ ID NO:6-水稻FatB2基因

[0167] SEQ ID NO:7-水稻FatB1基因

[0168] SEQ ID NO:8-水稻FatB4基因

[0169] SEQ ID NO:9-编码水稻FatB1蛋白的cDNA.

[0170] SEQ ID NO:10-编码水稻FatB1蛋白的基因(仅部分序列,见图5-包括所有外显子

序列和一些侧翼序列和内含子序列)

- [0171] SEQ ID NO:11-编码水稻FatB2蛋白的开放读框
- [0172] SEQ ID NO:12-编码水稻FatB3蛋白的开放读框
- [0173] SEQ ID NO:13-编码水稻FatB1蛋白的开放读框
- [0174] SEQ ID NO:14-编码水稻FatB4蛋白的开放读框
- [0175] SEQ ID NO:15-水稻Fad2同工型1
- [0176] SEQ ID NO:16-水稻Fad2同工型3
- [0177] SEQ ID NO:17-水稻Fad2同工型2
- [0178] SEQ ID NO:18-水稻Fad2同工型4
- [0179] SEQ ID NO:19-水稻Fad2-3cDNA
- [0180] SEQ ID NO:20-水稻Fad2-1cDNA.
- [0181] SEQ ID NO:21-水稻Fad2-2cDNA
- [0182] SEQ ID NO:22-编码水稻Fad2-2的开放读框
- [0183] SEQ ID NO:23-编码水稻Fad2-4的开放读框
- [0184] SEQ ID NO:24-编码水稻Fad2-1的开放读框
- [0185] SEQ ID NO:25-编码水稻Fad2-3的开放读框
- [0186] SEQ ID NO:26-FatB共有序列
- [0187] SEQ ID NO:27-33-Fad2共有序列
- [0188] SEQ ID NO:34-55和60-63-寡核苷酸引物
- [0189] SEQ ID NO:56-59-抗原性水稻FatB肽
- [0190] SEQ ID NO:64-83-可用于RNAi的单链分子序列

[0191] 发明详述

[0192] 一般技术

[0193] 除非特别指出,本文所用所有技术和科学术语均具有本领域技术人员通常了解的含义(例如在细胞培养、植物分子生物学、分子遗传学、免疫学、免疫组织化学、蛋白质化学和生物化学领域)。

[0194] 除非特别指出,本发明利用的重组蛋白、细胞培养和免疫学技术均是为本领域技术人员熟知的标准程序。这些技术在例如如下文献中描述和解释:J.Perbal,A Practical Guide to Molecular Cloning,John Wiley and Sons(1984),J.Sambrook et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989),T.A.Brown(editor),Essential Molecular Biology:A Practical Approach, Volumes 1and 2,IRL Press(1991),D.M.Glover and B.D.Hames(editors),DNA Cloning:A Practical Approach,Volumes 1-4,IRL Press(1995and 1996)和F.M.Ausubel et al.(editors),Current Protocols in Molecular Biology,Greenlee Pub.Associates and Wiley-Interscience(1988,包括迄今为止的所有更新),Ed Harlow and David Lane(editors)Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbour Laboratory,(1988),以及J.E.Coligan et al.(editors)Current Protocols in Immunology,John Wiley&Sons(包括迄今为止的所有更新)。

[0195] 选择的定义

[0196] 如本文所用,术语“Fad2多肽”是指进行将油酸转变为亚油酸的去饱和酶反应的蛋白质。因此,术语“Fad2活性”是指将油酸转变为亚油酸。这些脂肪酸可以是酯化形式,例如是磷脂的一部分。水稻Fad2多肽的例子包括包含图7和SEQ ID NO:15-18所示的一种氨基酸序列的蛋白质以及其变体和/或突变体。这种变体和/或突变体与图7和SEQ ID NO:15-18所示任一多肽可是至少80%、更优选至少90%、更优选至少95%、还更优选至少99%相同的。

[0197] “Fad2多核苷酸”或“Fad2基因”编码Fad2多肽。Fad2多核苷酸的例子包括包含图8或图10以及SEQ ID NO:19-25所示的一种核苷酸序列的核酸以及其等位基因变体和/或突变体。Fad2基因的例子包括包含图8和SEQ ID NO:19-21所示的一种核苷酸序列的核酸以及其等位基因变体和/或突变体。这种等位基因变体和/或突变体与图8和/或图10和/或SEQ ID NO:19-25所示任一多核苷酸可是至少80%、优选至少90%、更优选至少95%、还更优选至少99%相同的。

[0198] 如本文所用,术语“FatB多肽”是指水解棕榈酰-ACP产生游离棕榈酸的蛋白质。因此,术语“FatB活性”是指水解棕榈酰-ACP产生游离棕榈酸。水稻FatB多肽的例子包括包含图2和SEQ ID NO:1-4所示的一种氨基酸序列的蛋白质以及其变体和/或突变体。这种变体和/或突变体与图2和SEQ ID NO:1-4所示任一多肽可是至少80%、优选至少90%、更优选至少95%、还更优选至少99%相同的。

[0199] “FatB多核苷酸”或“FatB基因”编码FatB多肽。FatB多核苷酸的例子包括包含图4和图6以及SEQ ID NO:5-8和11-14所示的一种核苷酸序列的核酸以及其等位基因变体和/或突变体。FatB基因的例子包括包含图4和SEQ ID NO:5-8所示的一种核苷酸序列的核酸以及其等位基因变体和/或突变体。这种等位基因变体和/或突变体与图4和/或图6和/或SEQ ID NO:5-8及11-14所示任一多核苷酸可是至少80%、优选至少90%、更优选至少95%、还更优选至少99%相同的。

[0200] 如本文所用,术语“水稻”是指稻属的任何物种,包括其祖先,以及通过与其它物种杂交产生的后代。优选所述植物是商业培育的稻属物种例如稻(*Oryza sativa*)的株系或栽培种或者变种或者适于商业产生谷粒的品系。

[0201] 如本文所用,术语“米糠油”是指得自水稻植物的种子/谷粒或者其一部分如糠皮的组合物,其包含至少60% (w/w) 脂质。米糠油在室温典型是液态。优选地,所述脂质包含长度为至少6个碳原子的脂肪酸。所述脂肪酸典型是酯化形式,例如三酰甘油、磷脂。本发明的米糠油包含油酸。本发明的米糠油也可以包含至少一些其它脂肪酸,例如棕榈酸、亚油酸、豆蔻酸、硬脂酸和/或亚麻酸。所述脂肪酸可以是游离脂肪酸和/或三酰甘油(TAG)。在一个实施方案中,本发明的米糠油中至少50%、更优选至少70%、更优选至少80%的脂肪酸是TAG。本发明的米糠油可以形成水稻谷粒/种子或其部分如糊粉层或胚/盾片,其统称作“米糠”。或者,本发明的米糠油已经从水稻谷粒/种子或者米糠中提取。这种提取方法的例子在实施例1中提供。因此,在一个实施方案中,本发明的“米糠油”是“基本纯化的”或者“纯化的”米糠油,其已经与一或多种其它脂质、核酸、多肽或者与其天然状态相关的其它污染分子分开。优选所述基本纯化的米糠油至少60%、更优选至少75%、更优选至少90%没有预期天然相关的其它成分。在优选的实施方案中,当与完整种子/谷粒或者糠中比率相比时,提取时油酸与亚油酸、棕榈酸与油酸和/或棕榈酸与亚油酸的比率无明显改变(例如不超过5%的变化)。在再一个实施方案中,米糠油未暴露于如氢化等方法,与完整种子/谷粒或者

糠中比率相比时,所述方法可以改变油酸与亚油酸的比率、棕榈酸与油酸的比率和/或棕榈酸与亚油酸的比率。本发明的米糠油可进一步包含非脂肪酸分子,例如但不限于 γ -谷维素和固醇。

[0202] 米糠油可以通过本领域已知的任何方法从水稻种子或者糠中提取。这典型包括用非极性溶剂提取,所述溶剂例如是乙醚、石油醚、氯仿/甲醇或者丁醇混合物。谷粒中与淀粉相关的脂质可以用水-饱和丁醇提取。米糠油可以通过本领域已知方法“脱胶”以除去多糖或者以其它方式处理以除去污染物或者改良纯度、稳定性或者色泽。油中的三酰甘油及其它酯可以被水解释放游离脂肪酸或者如本领域所已知对油进行氢化或者经化学或酶处理。

[0203] 从水稻种子或者糠中提取后的米糠油典型包含称作 γ -谷维素的脂质基团。如本文所用,“包含 γ -谷维素”是指所述油中存在至少0.1% (w/w) γ -谷维素化合物。在提取后和从TAG取出之前的米糠油中 γ -谷维素的水平典型为1.5-3.5% (w/w)。所述化合物典型是阿魏酸(4-羟基-3-甲氧基桂皮酸)的固醇酯及其它三萜酯的混合物。阿魏酸环阿屯酯(Cycloartenyl ferulate)、24-亚甲基环阿屯醇阿魏酸酯(24-methylene cycloartanyl ferulate)和菜油甾醇阿魏酸酯(campesteryl ferulate)是谷维素中的主要阿魏酸酯,阿魏酸 β -谷甾醇酯和阿魏酸豆甾醇酯水平较低。据认为 γ -谷维素的存在帮助米糠油的食用者对抗慢性疾病如心脏病和癌症,因此 γ -谷维素的存在是有益的。

[0204] 如本文所用,术语“米糠”是指内部精白米谷粒与水稻种子/谷粒的外壳之间的层(糊粉层)以及谷粒的胚/盾片。米糠通过对糙米抛光产生精白米的主要副产物。

[0205] 如本文所用,术语“贮存期延长”是指通过本发明的方法产生的种子/谷粒在收获时可以作为糙米贮存,与例如自野生型(未遗传修饰的)水稻植物中收获的糙米相比可贮存更长时间。如本文所述,一种测量糙米的“贮存期延长”的方法是在40°C贮存至少8周后测量己醛产生情况(见实施例8)。

[0206] 术语“植物”包括完整植物、植物结构(例如叶、茎)、根、花器官/结构、种子(包括胚、胚乳和种皮)、植物组织(例如维管结构、基本组织等)、细胞及其后代等。

[0207] “转基因植物”、“遗传修饰的植物”或者其变化用语是指含有在相同物种、变种或栽培种的野生型植物中未发现的基因构建体(转基因)的植物。“转基因”在本文具有生物技术领域的正常含义,包括通过重组DNA或RNA技术产生或改变的并已经导入植物细胞中的遗传序列。转基因可包括衍生自植物细胞的遗传序列。典型地,转基因通过人工操作例如通过转化方法导入植物中,但是可以使用本领域技术人员公认的任何方法。

[0208] 术语“种子”和“谷粒”在本文可互换应用。“谷粒”通常是指成熟的、收获的谷粒,但是根据情况也可以是指吸涨或发芽后的谷粒。成熟谷粒的含水量通常小于大约18-20%。

[0209] 如本文所用,术语“相应未修饰的植物”是指野生型植物。如本文所用“野生型”是指未根据本发明进行修饰的细胞、组织或植物。野生型细胞、组织或植物可以用作对照物以与如本文所述修饰的细胞、组织或植物对比外源核酸的表达水平或者性状修饰的程度和性质。适于作为参考标准的野生型水稻变种包括Nipponbare。

[0210] “核酸分子”是指寡核苷酸、多核苷酸或其任何片段。其可以是源于基因组或合成的DNA或RNA,双链或单链DNA或RNA,以及如本文限定与碳水化合物、脂质、蛋白质或者其它物质组合以进行特定活性的DNA或RNA。术语“核酸分子”和“多核苷酸”可互换应用。

[0211] 多核苷酸的%相同性通过GAP(Needleman and Wunsch,1970)分析(GCG程序)确

定, gap creation penalty=5, gap extension penalty=0.3。除非特别指出, 查询序列的长度为至少45个核苷酸, 所述GAP分析排列对比两个序列的至少45个核苷酸的区域。优选地, 查询序列的长度为至少150个核苷酸, GAP分析排列对比两个序列至少150个核苷酸的区域。更优选地, 查询序列的长度为至少300个核苷酸, GAP分析排列对比两个序列至少300个核苷酸的区域。还更优选地, GAP分析排列对比两个序列的全长。

[0212] “寡核苷酸”可以是RNA、DNA或者其衍生物。尽管术语多核苷酸与寡核苷酸具有重叠的含义, 但是寡核苷酸典型是相对短的单链分子。这种寡核苷酸的最小大小是为在寡核苷酸与靶核酸分子上互补序列之间形成稳定杂种所需的大小。优选地, 所述寡核苷酸的长度为至少15个核苷酸, 更优选至少18个核苷酸, 更优选至少19个核苷酸, 更优选至少20个核苷酸, 还更优选至少25个核苷酸。

[0213] 如本文所用, 术语“核酸扩增”是指使用DNA聚合酶增加核酸分子拷贝数的任何体外方法。核酸扩增导致核苷酸掺入DNA分子或者引物中, 从而形成与DNA模板互补的新DNA分子。新形成的DNA分子可以用作模板以合成另外的DNA分子。

[0214] 如本文所用, “可操纵地连接”是指两或多个核酸(例如DNA)节段之间的功能关系。典型地, 其是指转录调节元件(启动子)与转录序列的功能关系。例如, 如果启动子刺激或调节合适细胞中的编码序列如本文所述多核苷酸的转录, 则该启动子与该编码序列是可操纵地连接的。通常, 与转录序列可操纵地连接的启动子转录调节元件与转录序列是物理连续的, 即它们是顺式作用的。然而, 一些转录调节元件如增强子不需要与转录由所述增强子增强的编码序列物理连续或者位置紧密相邻。

[0215] 如本文所用, 采用术语“基因”的最广泛的含义, 包括脱氧核糖核苷酸序列, 包含结构基因的蛋白质编码区并且包括位于5'和3'末端距任一末端至少大约2kb且参与基因表达的编码区邻近的序列。位于编码区5'且存在于mRNA上的序列称作5'非翻译序列。位于编码区3'或下游且存在于mRNA上的序列称作3'非翻译序列。术语“基因”涵盖了cDNA和基因的基因组形式。基因的基因组形式或克隆含有由称作“内含子”或者“间插区”或者“间插序列”的非编码序列中断的编码区。内含子是被转录为核RNA(hnRNA)的基因节段; 内含子可含有调节元件如增强子。内含子从核或初级转录物中被除去或“剪接除去”, 因此在信使RNA(mRNA)转录物中没有内含子。mRNA在翻译期间起作用以指定初生多肽中氨基酸的序列或顺序。术语“基因”包括编码本发明所述全部或部分蛋白质的合成的或者融合分子以及上述任一序列的互补核苷酸序列。

[0216] 如本文所用, 术语“遗传连锁的”或者相似用语是指染色体上标记基因座与第二个基因座足够接近, 其在50%以上的减数分裂中例如非随机地一起遗传。这个定义包括其中标记基因座和第二个基因座形成相同基因的一部分的情况。另外, 这个定义包括其中标记基因座包含负责感兴趣性状的多态性的实施方案(换句话说, 所述标记基因座与表型直接“连锁”或者“完全连锁”)。在另一个实施方案中, 所述标记基因座与第二个基因座是不同的, 但在染色体上足够接近, 其在50%以上的减数分裂中一起遗传。在每个世代遗传连锁基因座之间观测到的重组百分比(厘摩(cM))小于50。在本发明的特殊实施方案中, 遗传连锁基因座在染色体上可以相距45、35、25、15、10、5、4、3、2或1cM或更低。优选地, 所述标记相距小于5cM, 且最优选大约0cM。

[0217] “等位基因”是指细胞、个体植物或者群体内的遗传序列(如基因)的一种特殊形

式,该特殊形式在序列上与相同基因的其他形式不同,在基因的序列中具有至少一个、通常具有一个以上的变异位点。在不同的等位基因之间不同的这些变异位点的序列称作“变异”、“多态性”或者“突变”。

[0218] 如本文所用,“多态性”是指不同物种、栽培种、株系或者植物个体的本发明基因座的等位基因之间核苷酸序列中的变化。“多态性位置”是基因序列中预先选择的核苷酸位置。在一些情况中,遗传多态性通过氨基酸序列变化而反映,因此多态性位置可以在多肽序列预定位置处氨基酸序列的多态性的位置。在其它情况中,多态性区域可以位于基因的非多肽编码区中,例如在启动子区域中,由此可以影响基因的表达水平。典型的多态性是缺失、插入或者取代。这些可以涉及单一核苷酸(单核苷酸多态性或SNP)或者两或多个核苷酸。

[0219] 术语“多肽”和“蛋白质”可互换应用,是指可以或者不可以通过添加非氨基酸基团修饰的单多肽链。应理解这种多肽连可以与其它多肽或蛋白质或者其它分子如辅因子结合。如本文所用,术语“蛋白质”和“多肽”也可包括如本文所述本发明多肽的变体、突变体、修饰物、类似物和/或衍生物。

[0220] 多肽的%相同性通过GAP (Needleman and Wunsch,1970) 分析(GCG程序)确定,gap creation penalty=5,gap extension penalty=0.3。查询序列的长度为至少25个氨基酸,GAP分析排列对比两个序列至少25个氨基酸的区域。更优选地,查询序列的长度为至少50个氨基酸,GAP分析排列对比两个序列至少50个氨基酸的区域。更优选地,查询序列的长度为至少100个氨基酸,GAP分析排列对比两个序列至少100个氨基酸的区域。还更优选地,查询序列的长度为至少250个氨基酸,GAP分析排列对比两个序列至少250个氨基酸的区域。甚至优选地,GAP分析排列对比两个序列的全长。

[0221] 反义多核苷酸

[0222] 术语“反义多核苷酸”意味着DNA或RNA或者其组合,与编码FatB或Fad2多肽的特异mRNA分子的至少一部分互补且能干干扰转录后事件如mRNA翻译的分子。反义方法的应用为本领域所熟知(见例如G Hartmann and S.Endres,Manual of Antisense Methodology, Kluwer (1999))。反义技术在植物中的应用参见Bourque,1995和Senior,1998所回顾。Bourque (1995)列出了作为一种基因失活方法反义序列怎样用于植物系统中的大量实例。她还指出达到任何酶活性的100%抑制不是必需的,因为部分抑制更可能在该系统中产生可测量的改变。Senior (1998)指出反义方法目前是充分认定的操纵基因表达的技术。

[0223] 本发明的反义多核苷酸在生理条件下与靶多核苷酸杂交。如本文所用,术语“在生理条件下杂交的反义多核苷酸”是指所述多核苷酸(全部或部分单链)至少能与编码如图2或7或者SEQ ID NO:1-4或者15-18所示蛋白质的mRNA在正常条件下在细胞、优选水稻细胞中形成双链多核苷酸。

[0224] 反义分子可包括相应于结构基因的序列或者实现控制基因表达或剪接事件的序列。例如,反义序列可相应于本发明基因的靶向编码区,或者5' -非翻译区(UTR)或者3' -UTR或者这些区域组合。其可以与内含子序列部分互补,内含子序列可以在转录期间或之后被剪接除去,优选仅互补于靶基因的外显子序列。就通常高多样化的UTR而言,靶向这些区域提供了基因抑制的更高特异性。

[0225] 反义序列的长度应为至少19个连续核苷酸,优选至少50个核苷酸,更优选至少

100、200、500或1000个核苷酸。可以使用与完整基因转录物互补的全长序列。所述长度最优选为100-2000个核苷酸。反义序列与靶向转录物的相同性程度应为至少90%，更优选95-100%。反义RNA分子当然可以包含不相关的序列，其可发挥稳定所述分子的功能。

[0226] 催化性多核苷酸

[0227] 术语催化性多核苷酸/核酸是指DNA分子或者含有DNA的分子(在本领域也称作“脱氧核酶”)或者特异性识别独特底物并催化该底物的化学修饰的RNA或含有RNA的分子(在本领域也称作“核酶”)。催化性核酸中的核酸碱基可以是碱基A、C、G、T(以及对于RNA的U)。

[0228] 典型地,催化性核酸含有特异性识别靶核酸以及核酸裂解酶活性的反义序列(在本文也称作“催化结构域”)。特别适于本发明的核酶的类型是锤头核酶(Haseloff and Gerlach,1988;Perriman et al,1992)和发夹核酶(Shippy et al,1999)。

[0229] 本发明的核酶及编码所述核酶的DNA可以通过使用本领域熟知的方法化学合成。所述核酶也可以从与RNA聚合酶启动子可操纵地连接的DNA分子制备(在转录时产生RNA分子),所述启动子例如是T7RNA聚合酶或者SP6 RNA聚合酶的启动子。因此,本发明还提供了编码本发明的催化性多核苷酸的核酸分子,即DNA或cDNA。当载体也含有与所述DNA分子可操纵地连接的RNA聚合酶启动子时,所述核酶可以在体外与RNA聚合酶和核苷酸一起保温而产生。在一个单独的实施方案中,所述DNA可以插入表达盒或者转录盒中。在合成之后,RNA分子可以通过与具有稳定核酶的能力并使其对于RNase具有抗性的DNA分子连接而修饰。

[0230] 如同本文所述反义多核苷酸一样,本发明的催化性多核苷酸应也能在“生理条件”下杂交靶核酸分子(例如编码图2或7或者SEQ ID NO:1-4或15-18所示任何多肽的mRNA),所述生理条件即在细胞内的那些条件(尤其是在植物细胞如水稻细胞中的条件)。

[0231] RNA干扰

[0232] RNA干扰(RNAi)特别适用于特异性抑制特定蛋白质的产生。尽管不希望受理论的限制,Waterhouse et al. (1998)已经提供了dsRNA(双链RNA)可用于降低蛋白质产生的机制模型。这种技术依赖于dsRNA分子的存在,其含有与感兴趣基因的mRNA、在本发明中编码本发明多肽的mRNA或其一部分基本相同的序列。所述dsRNA可以方便地在重组载体或宿主细胞中从单启动子产生,其中有义和反义序列的侧翼是不相关的序列,这样使得所述有义和反义序列能与形成环结构的不相关序列杂交形成dsRNA分子。适用于本发明的dsRNA分子的设计和产生为本领域技术人员所熟知,特别参见Waterhouse et al. (1998),Smith et al. (2000)、WO 99/32619、WO 99/53050、WO 99/49029和WO 01/34815所述。

[0233] 在一个实例中,导入DNA,其指导与被失活的靶基因同源的至少部分双链的RNA产物合成。因此所述DNA既包含有义序列也包含反义序列,但转录成RNA时可以杂交形成双链RNA区。在优选的实施方案中,所述有义和反义序列由间隔区分隔,所述间隔区包含当转录成RNA时被剪接除去的内含子。这种方式已经示出获得更高效率的基因沉默。双链区可包含自任一或者两个DNA区转录的一或两个RNA分子。据认为双链分子的存在引发内源植物系统的应答,破坏双链RNA以及来自靶植物基因的同源RNA转录物,有效地降低或者消除靶基因的活性。

[0234] 杂交的有义和反义序列的长度均应为至少19个连续核苷酸,优选至少30或50个核苷酸,更优选至少100、200、500或者1000个核苷酸。可以使用相应于完整基因转录物的全长序列。所述长度最优选为100-2000个核苷酸。所述有义和反义序列与靶向转录物的相同性

程度应至少为85%，优选至少90%，更优选为95-100%。RNA分子当然可以包含不相关的序列，该序列可发挥稳定该分子的功能。RNA分子可以在RNA聚合酶II或RNA聚合酶III启动子控制下表达。后者的例子包括tRNA或snRNA启动子。

[0235] 优选的小干扰RNA (siRNA) 分子包含与靶mRNA的大约19-21个连续核苷酸相同的核苷酸序列。优选地，靶mRNA序列从二核苷酸AA开始，包含大约30-70%的GC-含量(优选30-60%，更优选40-60%，更优选大约45%-55%)，且例如通过标准BLAST检索确定，与除了其被导入的植物(优选水稻)基因组中的靶序列之外的任何核苷酸序列均不具有高百分比相同性。

[0236] 本发明dsRNA分子的例子在实施例5中提供。进一步的例子包括包含SEQ ID NO: 64-73(对于Fad2而言)和SEQ ID NO: 74-83(对于FatB而言)所示序列的那些分子。

[0237] 微小RNA

[0238] 微小RNA调节是RNA沉默途径的一个清楚限定的分支，使基因调控得以进展，与常规RNAi/PTGS不同。微小RNA是小RNA的一个特殊类别，其在组构为特征性反向重复中的基因样元件中被编码。当转录时，微小RNA基因产生茎-环前体RNA，从中微小RNA随后被加工。微小RNA的长度典型为大约21个核苷酸。释放的miRNA被掺入含有发挥序列特异性基因阻抑作用的Argonaute蛋白的特定亚类的RISC-样复合物中(见例如Millar and Waterhouse, 2005; Pasquinelli et al, 2005; Almeida and Allshire, 2005)。

[0239] 共抑制

[0240] 可以使用的另一种分子生物学方法是共抑制。共抑制的机制还未完全了解，但是认为涉及转录后基因沉默(PTGS)，且与反义抑制的许多实例非常相似。所述方法包括将基因或其片段的额外拷贝以相对于启动子有义方向导入植物中表达。所述有义片段、其与靶基因区域的对应以及其与靶基因的序列相同性程度如上文关于反义序列所述一样。在一些情况中，基因序列的额外拷贝干扰靶植物基因的表达。参见WO 97/20936和EP 0465572中关于实施共抑制方法的内容。

[0241] 核酸杂交

[0242] 在一个实施方案中，本发明的多核苷酸或其链在生理条件下与包含SEQ ID NO: 5-8、11-14或者19-25所示任一或多个核苷酸序列的多核苷酸杂交。在再一个实施方案中，本发明的多核苷酸或其链在严格条件下还与包含SEQ ID NO: 5-8、11-14或19-25所示任一或多个核苷酸序列的多核苷酸杂交。

[0243] 如本文所用，短语“严格条件”是指在此条件下多核苷酸、探针、引物和/或寡核苷酸与其靶序列杂交，但是与其它序列不杂交。严格条件是序列依赖性的，且在不同情况中有所不同。较长的序列与较短的序列相比在较高温度下特异性杂交。通常，针对特定序列在指定离子强度和pH条件下，选择低于热解链点(T_m)大约5°C的严格条件。所述 T_m 是这样的温度(在指定离子强度、pH和核酸浓度下)，即在此温度下50%的与靶序列互补的探针与靶序列杂交达到平衡。由于靶序列通常是过量存在的，因此在 T_m ，50%的探针处于平衡状态。典型地，严格条件是其中盐浓度低于大约1.0M钠离子，典型为大约0.01至1.0M钠离子(或者其它盐)，pH 7.0-8.3，对于短探针、引物或者寡核苷酸(例如10nt-50nt)而言，温度为至少大约30°C，对于较长的探针、引物和寡核苷酸而言，温度为至少大约60°C。严格条件也可以通过加入去稳定剂如甲酰胺而实现。

[0244] 严格条件为本领域技术人员所已知,可见于Ausubel et al. (如前), *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley&Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6以及本发明的实施例所述。优选地,所述条件是这样的条件,即彼此至少大约65%、70%、75%、85%、90%、95%、98%或99%同源的序列典型地保持彼此杂交。严格杂交条件的一个非限制性例子是在高盐缓冲液中在65°C杂交,随后在50°C在0.2×SSC、0.01%BSA中洗涤一或多次,所述高盐缓冲液包含6×SSC、50mM Tris-HCl (pH 7.5)、1mM EDTA、0.02%PVP、0.02%Ficoll、0.02%BSA以及500mg/ml变性鲑精DNA。在另一个实施方案中,提供了可以与包含SEQ ID NO:5-8、11-14或19-25所示核苷酸序列的核酸分子在中等严格条件下杂交的核酸序列。中等严格杂交条件的一个非限制性例子是在6×SSC、5×Denhardt's溶液、0.5%SDS和100mg/ml变性鲑精DNA中在55°C杂交,随后在1×SSC、0.1%SDS中在37°C洗涤一或多次。可以使用的其它中等严格条件为本领域所熟知,见例如Ausubel et al. (如前)和Kriegler,1990; *Gene Transfer And Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY所述。在又一个实施方案中,本发明提供了可以与包含SEQ ID NO:5-8、11-14或19-25所示核苷酸序列的核酸分子在低严格条件下杂交的核酸。低严格杂交条件的一个非限制性例子是在35%甲酰胺、5×SSC、50mM Tris-HCl (pH 7.5)、5mM EDTA、0.02%PVP、0.02%Ficoll、0.2%BSA、100mg/ml变性鲑精DNA、10% (wt/vol) 硫酸葡聚糖中在40°C杂交,随后在2×SSC、25mM Tris-HCl (pH 7.4)、5mM EDTA和0.1%SDS中在50°C洗涤一或多次。可以使用的其它低严格条件为本领域所熟知,见例如Ausubel et al. (如前)和Kriegler,1990, *Gene Transfer And Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY以及本发明提供的实施例所。

[0245] 核酸构建体,载体和宿主细胞

[0246] 本发明包括遗传修饰的水稻植物的产生,其中与相应的未修饰的植物相比,所述植物中具有Fad2和/或FatB活性的多肽的表达降低。

[0247] 用于产生上述转基因植物的核酸构建体可以易于使用标准技术产生。

[0248] 当插入编码mRNA的区域时,所述构建体可包含内含子序列。这些内含子序列可有助于所述转基因在植物中表达。术语“内含子”以其通常的含义使用,是指被转录的但是不编码蛋白质且在翻译之前从RNA中被剪接去除的遗传片段。如果所述转基因编码翻译产物,则内含子可以掺入5'-UTR或者编码区中,或者如果其不编码翻译产物则可以掺入转录区的任何地方。然而,在优选的实施方案中,任何多肽编码区均以单一开放读框提供。本领域技术人员将意识到这种开放读框可以通过逆转录编码所述多肽的mRNA获得。

[0249] 为了保证编码感兴趣mRNA的基因合适表达,所述核酸构建体典型包含一或多个调节元件如启动子、增强子以及转录终止序列或者聚腺苷酸化序列。这种元件为本领域所熟知。

[0250] 可以提供包含调节元件的转录起始区,以在植物中调节表达或者组成型表达。优选地,表达至少在胚、胚乳、糠皮、发育中的种子和/或成熟种子(谷粒)的细胞中发生。在另一个实施方案中,调节元件可以是非特异于种子细胞的启动子(如遍在蛋白启动子或者CaMV35S或者增强的35S启动子)。

[0251] 可用于本发明中的种子特异性启动子的例子包括但不限于小麦低分子量麦谷蛋白启动子(Colot et al,1987)、在小麦种子中表达 α -淀粉酶的启动子(Stefanov et al., 1991)以及大麦醇溶蛋白启动子(Brandt et al.,1985)。

[0252] 已经描述了在植物细胞中具有活性的许多组成型启动子。对于在植物中组成型表达合适的启动子包括但不限于花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S启动子、Figwort花叶病毒 (FMV) 35S启动子、甘蔗杆状病毒启动子、鸭跖草黄斑驳病毒启动子、来自核酮糖-1,5-二-磷酸羧化酶的小亚基的光诱导启动子、水稻胞液磷酸丙糖异构酶启动子、拟南芥 (*Arabidopsis*) 腺嘌呤磷酸核糖基转移酶启动子、水稻肌动蛋白1基因启动子、甘露碱合酶和章鱼碱合酶启动子、Adh启动子、蔗糖合酶启动子、R基因复合物启动子以及叶绿素 α/β 结合蛋白基因启动子。这些启动子已经用于产生在植物中表达的DNA构建体；见例如PCT出版物WO 8402913所述。所有这些启动子均已经用于产生各种类型的植物可表达的重组DNA载体。

[0253] 启动子可以通过如温度、光或者应激等因素调节。通常，调节元件提供在表达的遗传序列的5'。所述构建体也可以含有增强转录的其它元件，如nos 3' 或者ocs 3' 聚腺苷酸化区域或者转录终止子。

[0254] 5' 非翻译前导序列可以衍生自选择的启动子，所述启动子表达本发明多核苷酸的异源基因序列，且如果需要则可以特异性修饰以增加mRNA的翻译。见Kozziel et al. (1996) 关于转基因的优化表达的回顾。5' 非翻译区也可以得自植物病毒RNA (烟草花叶病毒、烟草蚀刻病毒、玉米矮花叶病毒、苜蓿花叶病毒等)，得自合适的真核基因、植物基因 (小麦和玉米叶绿素 α/b 结合蛋白基因前导序列)，或者得自合成的基因序列。本发明不限于其中非翻译区衍生自伴随启动子序列的5' 非翻译序列的构建体。前导序列也可以衍生自不相关的启动子或者编码序列。可用于本发明的前导序列包含玉米Hsp70前导序列 (U.S. 5,362,865和U.S. 5,859,347) 以及TMV omega元件。

[0255] 转录的终止通过在嵌合载体中3' 非翻译序列与感兴趣的多核苷酸可操纵地连接而完成。重组DNA分子的3' 非翻译区含有聚腺苷酸化信号，其在植物中起作用，导致在RNA的3' 末端添加腺苷酸核苷酸。3' 非翻译区可以得自在植物细胞中表达的各种基因。通常使用的是胭脂碱合酶3' 非翻译区，来自豌豆小亚基Rubisco基因的3' 非翻译区，来自大豆7S种子贮存蛋白基因的3' 非翻译区。含有农杆菌肿瘤诱导 (Ti) 质粒基因的聚腺苷酸信号的3' 转录的非翻译区也是合适的。

[0256] 典型地，所述核酸构建体包含可选择的标记。可选择的标记有助于已经用外源核酸分子转化的植物或细胞的鉴别与筛选。可选择的标记基因可为水稻细胞提供抗生素或者除草剂抗性，或者使得可以利用底物如甘露糖。所述可选择的标记优选赋予水稻细胞潮霉素抗性。

[0257] 优选地，所述核酸构建体被稳定掺入植物基因组中。因此，所述核酸包含允许所述分子掺入基因组中的合适元件，或者所述构建体置于可掺入植物细胞染色体中的合适载体中。

[0258] 本发明的一个实施方案包括重组载体，其包括至少一个本发明的多核苷酸分子，其插入能输送该核酸分子至宿主细胞的任何载体中。这种载体含有异源核酸序列，即所述核酸序列非天然发现其与本发明的核酸分子相邻、且优选衍生自除了所述核酸分子衍生自其中的物种之外的物种。所述载体可以是原核或真核RNA或者DNA，典型是病毒或者质粒。

[0259] 适于稳定转染植物细胞或者适于建立转基因植物的众多载体已经在例如Pouwels et al. *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, 1985, supp. 1987; Weissbach and Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, 1989和Gelvin et

al, Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers, 1990中描述。典型地, 植物表达载体包括例如在5' 和3' 调节序列转录控制下的一或多个克隆的植物基因以及显性可选择标记。这种植物表达载体也可以含有启动子调节区(例如控制可诱导或组成型表达、环境或发育调控的或者组织特异性表达的调节区域)、转录起始位点、核糖体结合位点、RNA加工信号、转录终止位点和/或聚腺苷酸化信号。

[0260] 本发明的另一个实施方案包括重组细胞, 其包含用本发明的一或多种重组分子转化的宿主细胞。核酸分子转化进细胞中可以通过可以将核酸分子插入细胞中的任何方法实现。转化技术包括但不限于转染、电穿孔、显微注射、脂染、吸附和原生质体融合。重组细胞可以保持单细胞, 或者可以生长为组织、器官或者多细胞生物体。本发明的转化的核酸分子可以保持在染色体外, 或者可以整合进转化的(即重组的)细胞的染色体的一或多个位点, 由此保留其被表达的能力。优选的宿主细胞是植物细胞, 更优选是谷物细胞, 更优选是水稻细胞。

[0261] 转基因植物

[0262] 转基因水稻(在本文也称作遗传修饰的水稻)可以使用本领域已知的技术产生, 如 A. Slater et al., Plant Biotechnology-The Genetic Manipulation of Plants, Oxford University Press (2003) 以及 P. Christou and H. Klee, Handbook of Plant Biotechnology, John Wiley and Sons (2004) 所述。

[0263] 在优选的实施方案中, 转基因植物对于已经导入的每个多核苷酸(转基因)均是纯合的, 由此其后代对于希望的表型不分离。转基因植物对于导入的转基因也可以是杂合的, 例如在已经从杂种种子生长的F1后代中。这种植物可提供如本领域熟知的杂种优势这样的优势。

[0264] 已经描述了直接将基因输送至细胞中的四种普通方法:(1) 化学方法(Graham et al., 1973); (2) 物理方法, 如显微注射(Capecci, 1980)、电穿孔法(见例如W0 87/06614、US 5, 472, 869、5, 384, 253、W0 92/09696和W093/21335)和基因枪(见例如US 4, 945, 050和US 5, 141, 131); (3) 病毒载体(Clapp, 1993; Lu et al., 1993; Eglitis et al., 1988); (4) 受体介导机制(Curiel et al., 1992; Wagner et al., 1992)。

[0265] 可以使用的加速方法包括例如微粒轰击等。将转化核酸分子输送至植物细胞的方法的一个例子是微粒轰击法。这种方法已经由Yang et al., Particle Bombardment Technology for Gene Transfer, Oxford Press, Oxford, England (1994) 综述。非生物学颗粒(微粒)可以用核酸包被, 并且通过推力输送至细胞中。所述颗粒的例子包括包含钨、金、铂等的那些颗粒。除了是可再生地转化单子叶植物的有效方式之外, 微粒轰击的一个特别优势之处是既不需要分离原生质体, 也不需要对于农杆菌感染的易感性。通过加速方法将DNA输送至玉米(Zea mays)细胞中的方法的一个举例性实施方案是生物弹(biolistics) α -颗粒输送系统, 其可用于推动用DNA包被的颗粒透过屏如不锈钢或者Nytex屏到达悬浮培养的玉米细胞覆盖的滤膜表面上。适用于本发明中的颗粒输送系统是可得自Bio-Rad Laboratories的氦加速PDS-1000/He枪。

[0266] 对于轰击而言, 可以将悬浮液中的细胞集中于滤膜上。将含有被轰击的细胞的滤膜置于微粒挡板(stopping plate)下方合适距离。如果需要, 也可以将一或多个屏置于枪与被轰击的细胞之间。

[0267] 或者,可以将不成熟的胚或者其它靶细胞排列在固体培养基上。被轰击的细胞以合适距离位于微粒挡板之下。如果需要,在加速装置和被轰击的细胞之间也可以放置一或多个屏。通过使用本文所述的技术,可以获得直至1000或更多个瞬时表达标记基因的细胞转化灶(foci)。在轰击后48小时表达外源基因产物的转化灶中细胞的数目通常是1-10个,平均为1-3个。

[0268] 在轰击转化中,可以优化轰击前培养条件和轰击参数以产生最大数目的稳定转化体。在这种技术中,轰击的物理和生物学参数均是重要的。物理因素是参与操纵DNA/微粒沉淀的那些因素或者影响巨粒(macroprojectile)或微粒的飞行和速度的那些因素。生物学因素包括在轰击之前和之后立即参与细胞操纵的所有步骤,帮助减轻与轰击相关的损伤的对靶细胞的渗透调节,以及转化DNA的性质,例如线性化DNA或者完整的超螺旋质粒。确信轰击前操作对于成功转化不成熟的胚是非常重要的。

[0269] 在另一个实施方案中,质体可以被稳定转化。关于在高等植物中质体转化的方法包括基因枪输送含有可选择标记的DNA并且通过同源重组使得该DNA靶向于质体基因组(U.S.5,451,513、U.S.5,545,818、U.S.5,877,402、U.S.5,932479和WO 99/05265)。

[0270] 因此,预期希望可以在小规模研究中调整轰击参数的各个方面以充分优化条件。特别希望可以调整物理参数如缺口距离、飞行距离、组织距离以及氦压。也可以通过更改影响受体细胞生理状态、且因此可影响转化和整合效率的条件使得损伤降低因素最小化。例如,可以调整受体细胞的渗透状态、组织水合作用和传代培养阶段或者细胞周期以优化转化。本领域技术人员通过本发明的揭示将获知其它常规调整方法。

[0271] 农杆菌介导的转移是将基因导入植物细胞的广泛应用的系统,因为可以将DNA导入完整的植物组织中,从而不需要从原生质体中再生完整植物。使用农杆菌介导的植物整合载体将DNA导入植物细胞中为本领域所熟知(见例如US 5,177,010、US 5,104,310、US 5,004,863、US 5,159,135)。另外,T-DNA的整合是相对精确的方法,产生很少的重排。被转移的DNA区域由边界序列限定,且在植物基因组中通常插入间插DNA。

[0272] 现代农杆菌转化载体能在大肠杆菌(E.coli)以及农杆菌中复制,使得可以对其方便地进行操纵(Klee et al, In: Plant DNA Infectious Agents, Hohn and Schell, eds., Springer-Verlag, New York, pp.179-203 (1985)。此外,农杆菌介导的基因转移的载体中的技术优势改善了载体中基因和限制位点的排列,促进了能表达多种多肽编码基因的载体的构建。所述载体具有便利的多接头区,两侧是启动子和聚腺苷酸化位点以指导插入的多肽编码基因的表达,所述载体适于本发明。另外,既含有armed Ti基因也含有disarmed Ti基因的农杆菌可用于转化。在农杆菌介导的转化是有效的那些植物变种中,由于基因转移的易做到和限定性质,这是一种可选方法。

[0273] 使用农杆菌转化方法形成的转基因植物在一个染色体上典型含有一个遗传基因座。这种转基因植物可以被认为对于添加的基因是半合子的。更优选的是对于添加的结构基因是纯合的转基因植物,即转基因植物含有两个添加的基因,一个基因位于一对染色体的每个染色体上的相同位置。纯合转基因植物可以通过有性交配(自花授粉)含有一个添加的基因的独立分离的转基因植物、使产生的一些种子萌发以及针对感兴趣的基因分析所得植物而获得。

[0274] 也应理解两个不同的转基因植物也可以交配以产生含有两个独立分离外源基因

的后代。合适后代的自花授粉可以产生对于这两个外源基因均是纯合的植物。也可以进行与亲代植物的回交以及与非转基因植物的异型杂交,这是植物繁殖的方式。对于通常用于不同性状和作物的其它培育方法的描述可见于Fehr, In: Breeding Methods for Cultivar Development, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987)。

[0275] 植物原生质体的转化可以使用基于磷酸钙沉淀、聚乙二醇处理、电穿孔以及这些处理方法的组合而实现。这些系统应用于不同植物变种依赖于从原生质体再生特定的植物株的能力。从原生质体再生谷物的举例方法在 (Fujimura et al., 1985; Toriyama et al., 1986; Abdullah et al., 1986) 中描述。

[0276] 也可以使用其它的细胞转化方法, 这些方法包括但不限于通过将DNA直接转移进花粉中、通过将DNA直接注射进植物的生殖器官中、或者通过将DNA直接注射进不成熟胚的细胞中即随后再水合粉状胚而将DNA导入植物中。

[0277] 植物从单一植物原生质体转化体或者从多个转化的外植体的再生、发育和培育为本领域所熟知 (Weissbach et al., In: Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, San Diego, Calif., (1988)。这种再生和生长过程典型包括选择转化的细胞、培养那些个体化的细胞从胚发育的通常阶段至生根的小植物阶段等步骤。相似地再生转基因胚和种子。随后将所得转基因的生根的苗种植于合适的植物生长基质如土壤中。

[0278] 含有外来的、外源基因的植物体的发育或再生为本领域所熟知。优选地, 使再生的植物自花授粉, 提供纯合的转基因植物。此外, 可以将得自所述再生植物的花粉与农业重要品系的种子生长植物杂交。相反地, 将这些重要品系的植物花粉用于对再生植物授粉。使用本领域技术人员熟知的方法栽培本发明的含有希望的外源核酸的转基因植物。

[0279] 通过导入外源核酸而将遗传变异导入植物中以转化谷类植物如水稻以及从原生质体或者不成熟的植物胚再生植物的方法为本领域所熟知, 见例如加拿大专利申请No. 2, 092, 588、澳大利亚专利申请No. 61781/94、澳大利亚专利No. 667939、美国专利No. 6, 100, 447、国际专利申请PCT/US97/10621、美国专利No. 5, 589, 617、美国专利No. 6, 541, 257所述, 以及在专利说明书W099/14314中阐述的其它方法。优选地, 转基因水稻植物通过根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导的转化方法产生。水稻的农杆菌介导的转化的例子在本文实施例5中提供。携带希望的核酸构建体的载体可以被导入组织培养植物或外植体的可再生的水稻细胞或合适植物系统如原生质体。

[0280] 可再生的水稻细胞优选来自不成熟胚的盾片、成熟胚、衍生自其中的愈伤组织或者分生组织。

[0281] 为了证实转基因细胞和植物中转基因的存在, 可以使用本领域技术人员已知的方法进行聚合酶链反应 (PCR) 扩增或者Southern印迹分析。转基因的表达产物可以根据产物的性质以各种方式检测, 包括Western印迹和酶测定法。一种特别有用的在不同植物组织中量化蛋白质表达和检测复制的方法是使用报道基因如GUS。一旦获得转基因植物, 则可以使其生长以产生具有希望表型的植物组织或者部分。可以收获所述植物组织或者植物部分, 和/或收集种子。所述种子可作为源头, 生长具有希望特性的组织或部分的另外的植物。

[0282] 标记辅助选择

[0283] 当在传统培育程序中与回归亲本回交时, 标记辅助选择方法是选择杂合植物的一种公认方法。每个回交世代的植物群对于在回交群中以1:1比率正常存在的感兴趣的基因

而言是杂合的,所述分子标记可用于区分基因的两个等位基因。通过从例如幼苗中提取DNA并用特异性标记检测渐渗的希望性状,初步选择植物进行进一步回交,同时将精力和资源集中于少数植物上。为了进一步加速回交程序,可以从不成熟的种子(开花后25天)中切除胚,并使其在无菌条件下在营养培养基中生长,而不是使全部种子成熟。在三叶阶段组合应用这种称作“胚拯救”的方法与DNA提取方法,并且分析希望的基因型,可以快速选择携带希望性状的植物,该植物可以在温室或田野中培育至成熟,随后与回归亲本进一步回交。

[0284] 在本发明方法中可以使用能检测Fad2或FatB基因的任何本领域已知的分子生物学技术。这种方法包括但不限于使用核酸扩增、核酸测序、核酸与合适标记的探针杂交、单链构象分析(SSCA)、变性梯度凝胶电泳(DGGE)、异源双链体分析(HET)、化学切割分析(CCM)、催化性核酸切割或其组合(见例如Lemieux,2000;Langridge et al.,2001)。本发明还包括使用分子标记技术以检测与(例如)赋予希望表型的Fad2或FatB基因的等位基因连锁的多态性。这种方法包括检测或分析限制片段长度多态性(RFLP)、RAPD、扩增片段长度多态性(AFLP)和微卫星(简单序列重复,SSR)多态性。紧密连锁的标记可以易于通过本领域熟知的方法获得,如Langridge et al.(2001)回顾的分离群体分组分析法。

[0285] “聚合酶链反应(PCR)”是这样的反应,其中复制拷贝由靶多核苷酸组成,使用由“上游”和“下游”引物组成的“一对引物”或者“一组引物”以及聚合催化剂如DNA聚合酶,典型为热稳定的聚合酶。PCR方法为本领域所已知,见例如“PCR”(Ed.MJ.McPherson and S.G.Moller(2000)BIOS Scientific Publishers Ltd,Oxford)所教导。可以对逆转录分离自植物细胞的mRNA获得的cDNA进行PCR。然而,如果PCR是针对分离自植物的基因组DNA进行,则其通常较简单。

[0286] 引物是寡核苷酸序列,其能以序列特异性方式与靶序列杂交并且在PCR期间被延伸。扩增子或者PCR产物或者PCR片段或者扩增产物是延伸产物,其包含所述引物以及新合成的靶序列的拷贝。多重PCR系统含有多组引物,导致同时产生一个以上的扩增子。引物可以与靶序列完全匹配,或者其可以含有内部错配碱基,可以导致在特定靶序列中导入限制酶或者催化性核酸识别/切割位点。引物也可以含有另外的序列和/或含有修饰或标记的核苷酸以便于捕获或者检测扩增子。DNA热变性、引物与其互补序列退火以及用聚合酶延伸退火的引物的重复循环导致靶序列指数式扩增。术语靶或靶序列或者模板是指被扩增的核酸序列。

[0287] 直接测序核苷酸序列的方法为本领域技术人员所熟知,可见于例如Ausubel et al.(如前)和Sambrook et al.(如前)所述。可以通过任何合适的方法进行测序,例如双脱氧测序法、化学测序法或其变化方法。直接测序具有确定特定序列的任何碱基对中的变化的优势。

[0288] 基于杂交的检测系统包括但不限于TaqMan测定和分子信标。TaqMan测定(US 5,962,233)使用等位基因特异性(ASO)探针,在其一端具有供体染料以及在另一端具有受体染料,由此所述染料对通过荧光共振能量转移(FRET)而相互作用。靶序列通过被修饰为包括加入标记的ASO探针的PCR扩增。对PCR条件进行调整,由此一个核苷酸的差异即影响探针的结合。由于Taq聚合酶的5'核酸酶活性,因此在PCR期间完全互补的探针被切割,而具有一个错配碱基的探针不被切割。探针的切割使得供体染料与猝灭受体染料解离,明显增加供体荧光。

[0289] TaqMan测定的另一种选择是分子信标测定(US 5,925,517)。在分子信标测定中,ASO探针含有位于靶特异性物质(species)侧翼的互补序列,由此形成发夹结构。发夹的环与靶序列互补,而发夹的每个臂均含有供体或者受体染料。当未与供体序列杂交时,所述发夹结构使得供体和受体染料靠近在一起,从而熄灭供体荧光。然而当与特定靶序列杂交时,所述供体和受体染料被分开,随之荧光增加直至900倍。分子信标可以与通过PCR扩增靶序列联合应用,提供了实时检测靶序列的存在的方法或者可以在扩增后使用。

[0290] TILLING

[0291] 本发明的植物可以使用称作TILLING(靶向诱导基因组局部损伤(Targeting Induced Local Lesions IN Genomes))的方法产生。第一步,通过用化学诱变剂处理种子(或者花粉)而在植物群体中诱导导入的突变如新的单碱基对改变,然后使植物产生下一代,其中所述突变被稳定遗传。提取DNA,贮存该群体所有成员的种子以产生可以随时重复存取的资源。

[0292] 对于TILLING测定,设计PCR引物以特异性扩增感兴趣的单一基因靶。如果靶是基因家族的成员或者多倍体基因组的一部分,则特异性尤为重要。其次,可以使用染料标记的引物从多个个体的混合DNA中扩增PCR产物。这些PCR产物被变性和再退火,使得错配的碱基对形成。错配或者异源双链体是指天然发生的单核苷酸多态性(SNP)(即所述群体中的一些植物很可能具有相同多态性)以及诱导的SNP(即很少的个体植物可能展示突变)。在异源双链体形成之后,使用内切核酸酶如识别并切割错配DNA的Ccl I是在TILLING群体中发现新SNP的关键。

[0293] 使用这种方法,可以筛选数千种植物以鉴别在基因组的任何基因或特定区域中具有单碱基改变以及小插入或缺失(1-30bp)的任何个体。被测定的基因组片段的大小可以是0.3-1.6kb。在8-倍混合中,每个测定具有1.4kb片段(扣除片段的末端,其中由于噪声而使得难以进行SNP检测)和96个泳道,这种组合允许每一次测定可筛选直至百万个基因组DNA的碱基对,由此TILLING是一种高通量技术。

[0294] TILLING在Slade and Knauf(2005)和Henikoff et al.(2004)中进一步描述。

[0295] 除了可以有效检测突变之外,高通量TILLING技术对于天然多态性的检测也是理想的。因此,通过与已知序列形成异源双链体而查询未知同源DNA示出多态性位点的数目和位置。核苷酸改变以及小插入和缺失均得以鉴别,包括至少一些重复数目多态性。这被称作Ecotilling(Comai et al.2004)。

[0296] 每个SNP均由其在几个核苷酸内的大约位置记录。因此,每个单元型可以基于其迁移率而存档。使用用于错配-切割测定的相同扩增的DNA等份可以相对较小增加付出而获得序列数据。通过其与所述多态性的接近性选择用于单一反应的左侧或者右侧测序引物。序列分析仪软件进行多重对比,揭示碱基改变,在每种情况中均证实了凝胶条带。

[0297] Ecotilling与目前用于大多数SNP揭示的完全测序方法相比可以更简便地进行。可以筛选含有阵列的生态型DNA的平板,而不用筛选来自诱变的植物的DNA库。因为检测是在接近碱基对分辨率的凝胶上并且背景模式在泳道间是一致的,因此可以匹配相同大小的条带,由此在一个步骤中揭示SNP并确定其基因型。在这种方式中,最后的SNP测序简便且有效,可以对用于筛选的相同PCR产物的等份进行DNA测序。

[0298] 诱变程序

[0299] 本领域已知产生突变水稻植物品系的技术。可用于产生突变体水稻植物的诱变剂的例子包括放射诱变和化学诱变。突变体也可以通过如T-DNA插入和转座子诱导的诱变产生。所述诱变程序可以对于水稻植物的任何亲代细胞进行,例如种子或者组织培养中的亲代细胞。

[0300] 化学诱变剂可通过化学性质分类,例如烷化剂、交联剂等。可用的化学诱变剂包括但不限于N-乙基-N-亚硝基脲(ENU)、N-甲基-N-亚硝基脲(MNU)、盐酸甲基苄肼、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、甲磺酸甲酯(MMS)、甲磺酸乙酯(EMS)、硫酸二乙酯、丙烯酰胺单体、三亚乙基三聚氰胺(TEM)、苯丙氨酸氮芥、氮芥、长春花新碱、二甲基亚硝胺、N-甲基-N'-硝基-亚硝基胍(MNNG)、7,12-二甲基苯并蒽(DMBA)、环氧乙烷、六甲基磷酰胺,以及bisulfan。

[0301] 诱导突变的合适辐射的例子是通过 γ 射线辐射,如由铯137放射源提供。所述 γ 射线辐射优选以大约60-200Krad的剂量提供给植物细胞,最优选大约60-90Krad的剂量。

[0302] 典型地,将植物暴露于诱变剂持续足够时间以达到希望的遗传修饰,而不足以完全破坏细胞的生存力及其再生为植物的能力。

[0303] 抗体

[0304] 特异性结合FatB或Fad2多肽的单克隆或多克隆抗体可用于本发明的一些方法中。

[0305] 术语“特异性结合”是指抗体结合FatB或Fad2多肽而不结合水稻的其它蛋白质、尤其是水稻种子蛋白的能力。

[0306] 如本文所用,术语“表位”是指抗体结合的FatB或Fad2多肽的区域。可以将表位给予动物以产生抗该表位的抗体,然而,在完整多肽的情况中,用于本文所述方法的抗体优选特异性结合表位区。

[0307] 如果希望是多克隆抗体,则用如图2或7或者SEQ ID NO:1-4或者15-18所示那些免疫原性多肽免疫接种选择的哺乳动物(例如小鼠、兔、山羊、马等)。收集经免疫动物的血清并根据已知程序处理。如果含有多克隆抗体的血清含有其它抗原的抗体,则该多克隆抗体可以通过免疫亲和性层析纯化。产生和处理多克隆抗血清的技术为本领域所已知。为了可以产生这种抗体,本发明还提供了使本发明的肽或其片段,其半抗原化至另一种在动物中用作免疫原的肽。

[0308] 抗本发明多肽的单克隆抗体也可以由本领域技术人员容易地产生。通过杂交瘤产生单克隆抗体的一般方法为本领域所熟知。无限增殖的抗体产生细胞系可以通过细胞融合产生,也可以通过其它技术如用致癌DNA直接转化B淋巴细胞或者用Epstein-Barr病毒转染而获得。产生的单克隆抗体群可以针对各种性质筛选,即针对同种型和表位亲和性进行筛选。

[0309] 另一种技术包括筛选噬菌体展示文库,其中例如噬菌体在其用大量不同的互补决定区(CDR)包被的表面上表达scFv片段。这种技术为本领域所熟知。

[0310] 对于本发明而言,除非特别指定相反含义,术语“抗体”包括完整抗体的保留其靶抗原结合活性的片段。这种片段包括Fv、F(ab')和F(ab')₂片段,以及单链抗体(scFv)。此外,所述抗体及其片段可以是人源化抗体,例如EP-A-239400所述。

[0311] 抗体可以结合固体支持物和/或在合适的容器中包装于试剂盒中,试剂盒中还包含合适的试剂、对照物、说明书等。

[0312] 优选地,所述抗体被可检测地标记。允许直接测量抗体结合的可检测的标记的例

子包括放射性标记、荧光团、染料、磁珠、化学发光剂、胶体颗粒等。允许间接测量结合的标记的例子包括酶,其中底物可提供给有色或荧光产物。可检测的标记的其它例子包括共价结合酶,其在加入合适底物之后能提供可检测的产物信号。用于缀合物的合适的酶的例子包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、苹果酸脱氢酶等。在不可商购的情况中,这种抗体-酶缀合物易于通过本领域技术人员已知的技术产生。可检测的标记的另一例子包括生物素,其高亲和性结合抗生物素蛋白或者链霉抗生物素蛋白;荧光染料(例如藻胆蛋白、藻红蛋白和别藻蓝蛋白;荧光素和Texas红),其可与荧光激活细胞分选仪一起应用;半抗原等。优选地,所述可检测的标记允许在平板发光计中直接测量,例如生物素。这种标记的抗体可用于本领域已知技术中以检测本发明多肽。

实施例

[0313] 实施例1:材料与amp;方法

[0314] 用甲醇钠提取油

[0315] 对于脂肪酸及其它分析,除非特别指出,则如下所述从水稻谷粒中提取总脂质。在一些情况中,由一半谷粒组成的样品用于提取,含有胚的另一半谷粒用于胚拯救。该技术也可以用于其他谷物。

[0316] 将一粒发育中的种子或者半粒种子在滤纸之间挤压并置于试管中。加入2ml 0.5M 甲醇钠,紧密密封该试管,然后在80℃保温10分钟。在试管冷却后,加入0.1ml冰乙酸,随后加入2ml蒸馏水和2ml石油精。将该混合物涡旋10秒钟,在各相分离后,将上层石油层移至小试管中。向该试管中加入大约1g的碳酸氢钾/硫酸钠混合物并涡旋所得混合物。将样品溶液移至自动取样器小瓶中,在-20℃于冷冻装置中贮存直至进行如Soutjesdic et al. (2002) 所述GC分析。

[0317] 从高水含量组织中提取脂质(Bligh-Dyer方法)

[0318] 这个方法是对Bligh and Dyer (1959) 所述方法加以调整而得。将1.5ml的CHCl₃/MeOH (1:2) 加入于0.4ml缓冲液中的组织样品中,剧烈涡旋样品。再加入0.5ml的CHCl₃,再次涡旋该样品。加入0.5ml的H₂O,再次涡旋该样品。将该试管在3000rpm短暂离心以分离各相,白色沉淀物出现在分界处。将有机相(下层)移至新的试管中并在真空下浓缩。如果提取酸性脂质,则加入0.5ml的1%HC1O₄代替0.5ml的H₂O。上述程序的体积可以更改,只要保持CHCl₃/MeOH/H₂O比率即可。

[0319] 制备脂肪酸甲酯(FAME)以定量确定脂肪酸含量

[0320] 为了直接从谷粒制备FAME,精确称重10-15粒种子并将其移至玻璃管中。向每个种子样品中加入内部标准10μl的1mg/ml 17:0-甲酯。向每个试管中加入0.75ml的1N盐酸甲醇(methanolic-HCl, Supelco),盖紧盖子并在80℃回流至少2-3小时或者过夜。冷却样品,加入0.5ml NaCl (0.9%w/v),随后加入300μl己烷。再次盖上试管盖子并剧烈涡旋。将上层己烷相(200-250μl)小心移至Eppendorf管中。在氮气下使样品完全干燥。将干燥的FAME样品溶解于20μl己烷中并移至小瓶中的圆锥形玻璃衬管中以进行GC分析。

[0321] 通过气相层析进行FA分析

[0322] 如下所述通过碱性转甲基作用制备脂肪酸甲酯。将一个种子样品在滤纸盘之间挤压。然后将移至滤纸盘中的脂质中的脂肪酸在2mL的0.02M甲醇钠中于80℃甲基化10分钟,

随后冷却30分钟。然后加入0.1mL冰乙酸,随后依次加入2mL蒸馏水和2mL己烷。在涡旋及相分离之后,将含有脂肪酸甲酯的上层己烷层移至微量小瓶中。通过如先前所述(Stoutjesdijk et al.,2002)的气液层析法分析脂肪酸甲酯。

[0323] 水稻的转化

[0324] 如下所述对水稻(cv.Nipponbare)进行转化。

[0325] i) 愈伤组织诱导与培养

[0326] 去除成熟谷粒的外壳,然后将其浸泡在70%EtOH中30秒以除去外层蜡状物。将清洁的谷粒用无菌H₂O洗涤3次并浸泡在25%漂白液(加入2滴Tween-20去污剂)中振荡20分钟以使其表面无菌。在无菌条件下,将该谷粒用70%EtOH短暂漂洗,用无菌H₂O彻底洗涤8-10次并铺板于N₆D培养基上。将平板用Micropore带密封,在28℃全日照保温。6-8周后产生愈伤组织,然后将其移至NB培养基中。将其用石蜡纸密封,置于28℃,每4周在新鲜NB平板上传代培养。在5次以上传代培养之后,愈伤组织不再用于转化。

[0327] ii) 转化

[0328] 从传代培养平板中挑取看起来健壮的愈伤组织,将其移至新鲜NB平板上,密度为25-30个愈伤组织/平板。两天后,建立含有使用的构建体的农杆菌菌株的新鲜培养物,在28℃保温。培养基是补加了100μM乙酰丁香酮的NB培养基。将愈伤组织在细胞悬浮液中浸泡10分钟。在排出过量的悬浮液之后,将愈伤组织置于补加了100μM乙酰丁香酮的NB培养基上,在25℃在黑暗中保温3天(共培养)。在共培养步骤之后,将愈伤组织在试管中用含有150mg/ml Timetin的无菌水轻轻洗涤3次。将愈伤组织在滤纸上吸干水分,并且以合适间隔铺板于NBCT平板上(如果使用卡那霉素可选择的标记基因或者合适的其它选择剂,则该平板中含有100μg/ml卡那霉素,150μg/ml Timentin和200μg/ml Claroforan)。该平板在黑暗中在26-28℃保温3-4周。大约10天后观测到抗性愈伤组织,将其移至NBCT+选择平板中,于黑暗中进一步保温14-21天。将健壮的愈伤组织移至PRCT+选择平板上,于黑暗中保温8-12天,然后移至RCT+选择平板上,并且在28℃全日照保温30天。之后,将已经发育的小植物移至组织培养罐中1/2MS培养基中,在日照下保温10-14天以进一步生长直至移至土壤中。

[0329] iii) 用于水稻组织培养的培养基组成和成分

[0330] N₆大量元素(20X)(g/l):(NH₄)₂SO₄,9.3;KNO₃,56.6;KH₂PO₄,8;MgSO₄·7H₂O,3.7;CaCl₂·2H₂O,3.3。

[0331] N₆微量元素(1000X)(mg/100ml):MnSO₄·4H₂O,440;ZnSO₄·7H₂O,150;H₃BO₃,160;KI,80。

[0332] N₆维生素(100X)(mg/100ml):甘氨酸,20,盐酸硫胺素,10;维生素B₆,5;烟酸,5。

[0333] B₅微量元素(100X)(mg/1000ml):MnSO₄·4H₂O,1000;Na₂MoO₄·2H₂O,25;H₃BO₃,300;ZnSO₄·7H₂O,200;CuSO₄·5H₂O,3.87;CoCl₂·6H₂O,2.5;KI,75。

[0334] 来自Sigma细胞培养的B₅维生素(100X)和Gamborg's维生素溶液(1000x)。

[0335] FeEDTA(200X)(g/200ml):铁-钠盐,1.47。

[0336] 2,4-D(1mg/ml):将100mg的2,4-二氯-苯氧乙酸溶解于1ml无水乙醇中,加入3ml的1N KOH,用1N HCl调节为pH 6。

[0337] BAP(1mg/ml):来自Sigma细胞培养的6-苄氨基嘌呤。

[0338] NAA(1mg/ml):来自Sigma细胞培养的萘乙酸。

- [0339] ABA (2.5mg/ml) :将250mg的脱落酸溶解于2ml的1M NaOH中,用无菌蒸馏水制成100ml。终背景浓度为20mM NaOH。
- [0340] 潮霉素 (50mg/ml) :潮霉素溶液来自Roche。
- [0341] Timetin (150mg/ml) :将3100mg的Timetin溶解于20.66ml无菌水中。终浓度为150mg/ml。
- [0342] Claforan (200mg/ml) 。将4gm的Claforan溶解于20ml无菌水中。
- [0343] MS盐:Murashige-Skoog最小有机培养基。
- [0344] N6D培养基(每升的量) :
- [0345] N6大量元素(10X) 100ml
- [0346] N6微量元素(1000X) 1ml
- [0347] N6维生素(1000X) 1ml
- [0348] MS铁/EDTA 5ml
- [0349] 肌醇 100mg
- [0350] 酪蛋白氨基酸 300mg
- [0351] 脯氨酸 2.9g
- [0352] 2,4-D(1mg/ml) 2ml
- [0353] 蔗糖 30g
- [0354] 用1M KOH将pH调节为5.8,加入3g phytogel/升,高压灭菌NB培养基(每升的量) :
- [0355] N6大量元素(20X) 50ml
- [0356] B5微量元素(100X) 10ml
- [0357] B5维生素(100X) 10ml
- [0358] FeEDTA(200X) 5ml
- [0359] 2,4-D(1mg/ml) 2ml
- [0360] 蔗糖 30g
- [0361] 脯氨酸 500mg
- [0362] 谷氨酰胺 500mg
- [0363] 酪蛋白酶水解产物(CEH) 300mg
- [0364] NBO:NB培养基,加上30g/1甘露醇和30g/1山梨醇,之后调节pH值。
- [0365] NBCT+选择培养基(潮霉素-H30) :NB培养基加上30mg/1潮霉素、Timetin 150mg/ml、Claforan 200mg/1。
- [0366] NBCT+选择培养基(潮霉素-H50) :NB培养基加上选择50mg/1潮霉素,200mg/1 Claforan和Timetin 150mg/ml。
- [0367] PRCT+选择培养基:NB培养基,无2,4-D,在高压灭菌后加入:BAP,2mg/1;NAA,1mg/1;ABA,5mg/1;Claforan,100g/1;Timetin;150mg/ml+选择培养基。
- [0368] RCT+选择培养基:NB培养基,无2,4-D,在高压灭菌后加入:BAP,3mg/1;NAA,0.5mg/1;Timetin,150mg/ml;Claforan,100mg/1+选择培养基。
- [0369] 1/2 MS培养基:MS盐于维生素混合物,2.21g;蔗糖,10g每升,加入2.5g phytogel/1,高压灭菌后加入0.05mg/1NAA和Timetin 150mg/ml。
- [0370] 实施例2:从水稻中鉴别和分离FatB基因

[0371] FatB基因编码棕榈酰-ACP硫酯酶,该酶具有从酰基载体蛋白中优先转移长度为16个或更少个碳原子的脂肪酸至酰基-CoA的活性,并因此防止脂肪酸碳链进一步延长。使用Genbank登录拟南芥基因座AtACPT32和Iris基因座AF213480的序列,使用基于同源性的检索方法鉴别了推定的水稻FatB序列。使用的检索程序为在NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 可获得的Megablast。使用NCBI默认参数,使用的数据库对于水稻(*Oryza sativa*)而言是非冗余(nr)且高通量的基因序列(htgs)。然后翻译通过Megablast程序从水稻中选择的最相似的序列并检查在所有FatB序列中发现的保守序列NQHVVN(SEQ ID NO:26)的存在。确信在拟南芥中是必需的其他氨基酸残基是半胱氨酸264,天冬酰胺227和组氨酸229(其均存在于保守序列NQHVVN中)包含提议的催化三联体。中国水稻数据库(网站地址<http://rise.genomics.org.cn/rice/index2.jsp>)也有限程度地应用,使用BLAST检索的默认参数及拟南芥序列和Iris序列。翻译的序列在图2中对比。

[0372] 关于所有FatB基因结构的总述在图3中示出。如下述,所述基因相应于所讨论的蛋白质序列:AC 108870相应于Os11g43820,AP005291相应于Os02g43090,AP000399相应于Os06g5130,AP004236相应于Os06g39520。注意来自一个基因的多个转录物的可能性在图中示出。图4示出使用默认参数的“基因”序列的CLUSTAL W(fast)对比-注意所述“基因”的长度不同。

[0373] 所述基因包含6个外显子。Os06g5130描述的基因的结构详细示于图5。

[0374] 图6示出FatB cDNA的编码序列的对比,标示了用于选择性PCR扩增的不同引物。

[0375] Os06g5130与Os06g39520(相应于图2中序列ap000399和ap004236)的翻译的肽序列之间的序列相同性整体是74%,完整编码序列在核苷酸水平的相同性是69%。在这两种情况中,使用默认参数的BESTFIT程序。从Os02g43090(一个转录物)、Os06g05130、Os06g39520和Os011g43820推导的多肽分别相应于298、427、423和425个氨基酸。

[0376] 编码的蛋白质的活性通过与已知示出具有这种活性的多肽的高度序列相同性推测。另外,观测到的基于这些序列的基因失活构建体对于棕榈酸水平的作用也与这种推测一致(见下文所述)。

[0377] 基因家族的表达是复杂的,从这四个基因中推测具有至少7个转录物。基于进行的RT-PCR实验以及从EST文库中回收的克隆的相关数目,看起来来自Os06g5130的RNA在谷粒中相对丰富,而Os11g43820在该组织中中等水平表达,其它基因仅低水平表达。

[0378] 实施例3:从水稻中鉴别和分离Fad2基因

[0379] 由Fad2基因编码的蛋白质(脂肪酸去饱和酶2)在18:1脂肪酸中导入双键-它们是 $\Delta 12$ 去饱和酶。拟南芥基因座athd12aaa的Genbank序列用于针对水稻(*Oryza sativa*)检索nr和htgs数据库,使用默认设置Megablast。翻译从水稻中检索到的最相似的序列,并检测如下序列的存在:保守疏水性基序FSYVVHDLVIVAALLFALVMI(SEQ ID NO:27)、AWPLYIAQGCVLTVGVVIA(SEQ ID NO:28)、ISDVGVSAGLALFKLSSAFGF(SEQ ID NO:29)、VVRVYGVPLLVNWLVLITYLQ(SEQ ID NO:30)以及组氨酸水稻序列HECGHH(SEQ ID NO:31)、HRRHHA(SEQ ID NO:32)和HVAHH(SEQ ID NO:33)。获得的同工型的翻译的氨基酸序列示于图7。

[0380] 图8提供了Fad2序列对比,示出在同工型AP004047中5'UTR的位置(小写字母)以及用于RT-PCR扩增的引物的位置(下划线)。终止密码子的位置以方框标示,终止密码子下游

非翻译区以小写字母表示。

[0381] 当编码具有AP004047氨基酸序列的蛋白质的核苷酸序列用于检索水稻基因组时(使用默认参数BLAST程序),从水稻基因组中获得高度相似四个基因序列。这些基因的整体结构示于图9。如下述,所述基因相应于蛋白质序列。蛋白质序列AP004047(在本文也称作FAD2-1)相应于基因Os02g48560,序列AP005168(在本文也称作FAD2-2)相应于Os07g23410,序列contig2654相应于Os07g23430。另外,存在与这些序列具有感兴趣程度的序列相同性但是又与这些序列明显不同的一个序列,其也许是假基因。这个序列是Os07g23390。

[0382] 与FatB基因不同,Fad2基因不含有任何内含子。所有蛋白质编码序列的对比示于图10。Os02g48560与Os07g23410的完整编码区的序列相同性为79%。

[0383] 由Os02g48560编码的多肽(即AP004047)的分子量在加工之前为44.35kDa,含有388个氨基酸。Os07g23410编码的多肽的分子量为44.9kDa,含有390个氨基酸。利用默认参数的BESTFIT程序确定这些推导的多肽具有77%的序列相同性。从Os07g23430中推导的多肽的分子量为41kDa(363个氨基酸),从Os07g23390中推导的多肽的分子量为24kDa(223个氨基酸)。所有推导的多肽序列的对比示于图7。

[0384] 相应于Os02g48560的序列在谷粒中表达,这个观测结果与这个基因在EST文库中的克隆的相关频率数据一致,其中同族序列从谷粒cDNA文库中回收。相应于在染色体7上编码的两个同工型(Os07g23430、23410)的序列从叶EST文库中回收,但是至今没有关于相应于其它基因(Os07g23390)的序列的报道;我们推断其也许根本就是低水平表达。

[0385] 总之,水稻Fad2基因家族也是复杂的基因家族。从Os02g48560中推导的两个转录物通过序列不可区分。从Os02g48560中推导的序列在谷粒中显著表达。

[0386] 实施例4:FatB和Fad2基因在水稻中的表达

[0387] 为了确定如实施例2和3所述在水稻中鉴别的4个推定的FatB基因和3个Fad2基因可以在发育中的水稻谷粒中表达,进行逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)。由于所述基因在序列上密切相关,因此需要设计特异于每个基因的引物,以特异性测定每个基因的转录物。从序列对比(图6和8)中鉴别序列趋异的区域并且设计和检测一些引物对。检测推定的FatB基因表达的引物序列在表3和表4中示出。作为内部标准以对比表达水平,对于编码 α -微管蛋白的水稻基因OsTubA1的表达,对RNA也进行RT-PCR。已知这个基因在所有活跃分裂组织中表达且不受激素ABA的影响,因此适合用作叶和谷粒分析的组成型表达对照。

[0388] 使用Qiagen RNeasy试剂盒根据厂商指导从开花后大约15天的水稻谷粒中制备RNA。然后使用DNase处理(DNA-free试剂盒,Ambion)以从RNA制备物中除去污染的DNA。RT-PCR混合物含有5 μ l的5 \times Qiagen OneStep RT-PCR缓冲液、1 μ l的dNTP混合物(含有10mM每种dNTP)、15pmol每种引物和大约20pg的RNA,终体积为25 μ l。使用如下RT-PCR循环程序进行RT-PCR扩增:30分钟50 $^{\circ}$ C(逆转录),15分钟95 $^{\circ}$ C(初始PCR活化),30次循环(1分钟94 $^{\circ}$ C,1分钟57 $^{\circ}$ C,1分钟72 $^{\circ}$ C)(PCR扩增),然后在72 $^{\circ}$ C最后延伸10分钟。

[0389] 表3:设计用于使用一步RT-PCR扩增和区分推定的FatB转录物的相对表达的引物

[0390] 扩增的基因	Genbank ID/ Chinese Contig no.ID	引物名称	引物序列

[0391]	FatB-1	AP000399	p0399F2	CGCTGCTACCAAACAATTCA (SEQ ID NO:34)
			p0399R2	TTCTGTGTTGCCATCATCG (SEQ ID NO:35)
	FatB-2	AC108870	p5291_F2	CAGGAAATAAAGTTGGTGATGATG (SEQ ID NO:36)
			p8870R	CTTCACAATATCAGCTCCTGACTC (SEQ ID NO:37)
	FatB-3	AP005291	p5291_F2	CAGGAAATAAAGTTGGTGATGATG (SEQ ID NO:38)
			p5291R	CTTCACAATGTCAGCCTTCAC (SEQ ID NO:39)
	FatB-4	AP004236	p4236F2	ACAGGCCTGACTCCACGAT (SEQ ID NO:40)
			p4236R2	GTCCAGAGTGCTTGTTCAG (SEQ ID NO:41)
	OsTubA1	AF182523	OSTUBA1_F	TACCCACTCCCTCCTTGAGC (SEQ ID NO:42)
			OSTUBA1_R	AGGCACTGTTGGTGATCTCG (SEQ ID NO:43)

[0392] 表4:设计用于使用一步RT-PCR扩增和区分推定的Fad2转录物的相对表达的引物

扩增的 基因	Genbank ID/ Chinese Contig no.ID	引物名称	引物序列	
[0393]	Fad2-1	AP004047	pFad2-1F	CACAAAGAGGGAGGGAACAA (SEQ ID NO:44)
			pFad2-1R	GAAGGACTTGATCACCGAGC (SEQ ID NO:45)
	Fad2-2	Contig2654	UTR_2654_F	CACAACATCACGGACACACA (SEQ ID NO:46)
			UTR_2654_R	GCAAGACCGACATGGCTAAT (SEQ ID NO:47)
	Fad2-3	AP005168	UTR_5168_F	ACGTCCTCCACCACCTCTT (SEQ ID NO:48)
			UTR_5168_R	CAGAAGCAGTGACATACCCAAG (SEQ ID NO:49)
[0394]	OsTubA1	AF182523	OSTUBA1_F	TACCCACTCCCTCCTTGAGC (SEQ ID NO:50)
			OSTUBA1_R	AGGCACTGTTGGTGATCTCG (SEQ ID NO:51)

[0395] RT-PCR实验结果表明Fad2-1基因序列(TIGR水稻数据库标识符LOC_0s02g48560)相对于编码其它同工型的基因在谷粒和叶中均高水平表达。其它两个Fad2基因(LOC_0s07g23410和LOC_0s07g23430)看起来在叶中低水平表达且主要在叶中表达。对编码FatB同工型的基因进行分析示出FatB-1(Genbank标识符AP000399,Tigr LOC_0s06g05130)和

FatB-2 (Genbank标识符AC108870, TIGR标识符Os11g43820) 与其它两个基因相比在谷粒中更高水平表达。Tos-17转座插入突变体在编码AP000399的基因中具有插入序列。

[0396] 参考基因mRNA转录物的相对丰度, FatB-1 (Genbank标识符AP000399, TIGR LOC_0s06g05130) 和FatB-4 (AP004236, TIGR LOC_0s06g39520) 在叶组织中更高水平表达。当与作为标准的微管蛋白基因转录物的丰度相对比时(其在小麦谷粒中具有中等丰度的mRNA且因此期望在水稻谷粒中是相似地丰度), 通过RT-PCR确定所有FatB和Fad2mRNA低水平聚集。然而, 这个结论基于这样的假定, 即每种检测基因的引物与靶转录物以与微管蛋白引物/转录物相似效率地杂交。

[0397] 这个结论通过EST数据库检索确认。当Fad2-1 (TIGR 0s02g48560) 序列用于检索水稻EST序列时, 转录物序列存在于圆锥花序、根和整个植物cDNA文库中。相反, Fad2-2 (TIGR 0s07g23410) 和Fad2-3 (TIGR 0s07g23430) 序列仅存在于叶、茎干或者整个植物文库中。0s07g23390的序列被认为是假基因的Fad2-样基因, 在任何EST文库中均不存在。相似地, FatB-1 (TIGR 0s06g05130) 序列在叶和圆锥花序EST文库中均存在, 而FatB-2序列 (TIGR 0s11g43820) 仅存在于圆锥花序或者整个植物EST文库中, FatB-4 (TIGR 0s06g39520) 仅存在于叶文库中。尽管通过RT-PCR判断FatB-3 (AP005291, 0s02g430900) 序列与其它序列相比在叶和谷粒中均相对低水平表达, 但是其存在于圆锥花序和整个植物EST文库中。这些检索使用NCBI网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>) 上的BLAST程序, 使用EST数据库和限制从水稻中检索序列。

[0398] 基于这些数据认为Fad2-1和FatB-2是应下调谷粒脂质改变的基因。关于这方面, 认为FatB-3也是重要的。

[0399] 实施例5: 基因沉默构建体的构建和水稻的转化

[0400] 抑制Fad2表达的双链RNA构建体的产生

[0401] 设计在发育中的水稻谷粒中表达双链RNA (发夹RNA) 的构建体以降低Fad2-1的表达。通过靶向三个Fad2基因序列的共有区域, 设计所述构建体, 由此其对于在水稻谷粒中鉴别的所有三个Fad2基因均有效, 以潜在地使对于脂肪酸组成的作用最大化。为了改善沉默效率, 所述构建体在如Smith et al. (2000) 所述的反向重复序列的有义与反义部分之间含有内含子。

[0402] 使用如下寡核苷酸通过PCR从Fad2-1基因的5' 末端扩增一个505碱基对的片段: pFad2-F 5'-AAAGGATCCTCTAGAGGGAGGAGCAGCAGAA GC-3' (SEQ ID NO:52) 和pFad2-R 5'-AAAAGTAGTGAATTCTACACGTAC GGGGTGTACCA-3' (SEQ ID NO:53)。将此PCR产物连接进pGEM-Teasy中, 转化进大肠杆菌和鉴别含有该插入体的菌落。然后将来自称作pGEM-T-Fad2的质粒的含有505bp Fad2片段的XbaI/EcoRI片段以有义方向连接进含有内含子Rint9的载体ZLRint9_BC3895 (得自Zhongyi Li, CSIRO Plant Industry) 中。然后将来自pGEM-T-Fad2的BamHI/SpeI片段连接进 (以反义方向) 所得质粒中, 由此形成含有发夹构建体的内含子。然后将含有具有发夹的Fad2-1内含子的BamHI/KpnI片段插入pBx17casNOT载体 (Zhongyi Li, 个人通讯) 的相同限制位点中, 所述载体含有具有Nos终止子/聚腺苷酸化序列的Bx17种子特异性启动子, 由此所述沉默基因在发育中的种子中以 (启动子) 有义-内含子-反义 (终止子) 顺序表达。然后将含有Bx17启动子和Fad2-1反向重复区的HindIII/NotI片段插入二元载体pWBvec8 (Wang et al, 1998) 的相同限制位点中, 所述载体含有赋予潮霉素抗性的可选

择标记基因。然后将这个载体导入农杆菌中并用于水稻转化,如实施例1所述。所述双链RNA构建体称作dsRNA-Fad2-1。

[0403] 抑制FatB表达的双链RNA构建体的产生

[0404] 使用具有如下序列的引物通过PCR扩增水稻棕榈酰-ACP硫酯酶FatB-1基因(Tigr LOC_0s06g05130)的665碱基对片段:Rte-s1,5'-AGTCAT GGCTGGTTCTCTTGCGGC-3'(SEQ ID NO:54)和Rte-a1,5'-ACCATCACCT AAGAGACCAGCAGT-3'(SEQ ID NO:55)。这个PCR片段用于产生反向重复构建体,其具有有义方向的所述片段的一个拷贝和反义方向的另一个拷贝,由来自棉花微粒体 ω 6-去饱和酶GhFad2-1基因(Liu et al.,1999)的5'UTR的内含子序列分隔。随后将反向重复构建体插入pUbilcasN0T(Zhongyi Li基于Li et al.,1997所述序列)的Ubil1启动子与Nos终止子之间的SacI位点。然后将具有pUbil1启动子水稻FatB的反向重复部分插入二元载体pWBVec8的NotI位点中并如上文针对Fad2构建体所述导入农杆菌中。所述双链RNA构建体称作dsRNA-FatB-1。

[0405] 在转化的水稻中分析脂肪酸组成

[0406] 使用相应于启动子区域内位点的一种引物以及Fad2序列末端的另一种引物通过PCR检测获得的具有dsRNA-Fad2-1的十个单独的可繁殖的转基因植物中dRNA基因的存在。发现这十个植物中的九个植物在PCR反应中是阳性的,因此含有Fad2 RNAi构建体。相似地,对23个可繁殖的转基因品系针对FatB RNAi构建体进行检测,发现其中20个品系是PCR阳性的。

[0407] 为了分析转基因对于脂肪酸组成的作用,从转化的水稻植物的谷粒和叶样品中分离全部脂质。对于在FatB-1基因中含有Tos17插入序列的水稻突变品系(TIGR基因座0s06g5130相应于登录号AP000399鉴别的蛋白质)也进行如此操作以对比特异性失活该基因的效果。如实施例1所述,通过GC-FAME确定每种脂质提取物的脂肪酸组成。数据示于表5-7,一些数据在图11-13中示出。每种脂肪酸的比例以占谷粒的种子油中总脂肪酸的百分比表示,如实施例1所述通过HPLC确定。

[0408] 最惊人的结果是在Fad2dsRNA植物中谷粒的油酸和亚油酸组成中的改变程度。在一些品系中油酸的比例从36%增加至至少65%(w/w),在最受影响的水稻品系(品系22A)中亚油酸的比例从37%降低至大约13%。令人惊奇地,Fad2品系中棕榈酸的比例也降低,例如品系22A中低于14%,相比之下对照组为18%。

[0409] 在FatB dsRNA品系中,谷粒中棕榈酸的比例降低与亚油酸含量增加相关,而油酸与亚麻酸的比例基本不变。注意Fad2与FatB这两个转基因品系中棕榈酸比例的降低程度相似,但是FatB品系中亚油酸水平增加的程度远低于在Fad2品系中观测到的降低程度。即具有Fad2构建体的亚油酸水平的变化程度较高。

[0410] 关于该途径的FatB催化步骤的感兴趣的认识是通过分析FatB的一个同工型FatB-1的Tos-17插入敲除而提供的。在Tos-17突变体中,棕榈酸和油酸的比例的改变程度与FatB dsRNA品系相比是降低的。这些结果表明编码FatB同工型的基因在其功能方面有所不同。

[0411] 当将亚油酸与油酸的比例结果绘制成散点图(图14)时,显然Fad2敲除品系中这两种脂肪酸之间的关系与野生型水稻相同,但是亚油酸的比例显著降低。相反,在FatB敲除品系中及在FatB Tos-17品系中程度较低,尽管亚油酸与油酸之间的关系相似,但是有一恒定变化。这意味着与野生型植物或者Fad2敲除植物相比,在FatB敲除植物中对于一定量的油

酸而言存在更多的亚油酸。这个结果与这样的想法一致,即FatB的敲除影响控制油酸和亚油酸的量的途径而不影响由Fad2控制的直接联系油酸和亚油酸的步骤。

[0412] 将所有分析的水稻品系的亚油酸与棕榈酸的比例的结果也绘制成图。对于Fad2敲除品系观测到正线性关系,而对于亚油酸与油酸观测到相反的结果。然而对于FatB品系,观测到不同的关系(图15)。当将Fad2 dsRNA植物和FatB dsRNA植物绘制成散点图时(图16)也观测到油酸与棕榈酸之间的关系差别。这些结果证实棕榈酸与亚油酸(和油酸)之间的关系对于所述途径的两个干扰(perturbations)是不同的。

[0413] 在不同途径干扰下对各个脂肪酸比例进行的主成分分析证实:主成分1(表示导致最大变异的轴)由亚油酸对油酸的比例组成,而主成分2(其次重要的轴)由亚油酸和油酸对棕榈酸的比例组成)。这个结果在图17中例证。

[0414] 我们从这个实施例的结果中推断使dsRNA Fad2植物与dsRNA FatB植物或者Tos-17 FatB植物杂交以组合突变将进一步增加油酸的比率以及进一步降低棕榈酸和亚油酸水平。

[0415] 表5:FatB和Fad2突变体的水稻谷粒中脂肪酸组成的GC分析

[0416]

谷粒-突变体	豆蔻酸 (C14:0)	棕榈酸 (C16:0)	硬脂酸 (C18:0)	油酸 (C18:1)	亚油酸 (C18:2)	亚麻酸 (C18:3)
野生型 (WH12)	0.70	18.83	1.64	38.41	36.42	1.29
FatB Tos17 插入突变体	0.72	15.13	2.33	37.15	38.61	1.87
FatB dsRNA 转化系	0.58	11.43	1.81	34.92	46.60	1.91
Fad2 dsRNA 转化系	0.58	14.26	2.11	64.94	12.62	1.23
Tos17对照	0.85	17.91	2.60	33.23	39.84	1.76
FatB dsRNA 对照	1.03	18.86	1.84	34.08	39.63	1.75
Fad2 dsRNA 对照	1.02	17.47	2.38	36.03	37.42	1.50

[0417]

表 6: *FatB* 和 *Fad2* 突变体的水稻叶中脂肪酸组成的 GC 分析

叶-突变体	月桂酸 (C12:0)	豆蔻酸 (C14:0)	棕榈酸 (C16:0)	硬脂酸 (C18:0)	油酸 (C18:1)	亚油酸 (C18:2)	亚麻酸 (C18:3)
野生型(WF2)		0.80	14.43	1.90	2.32	8.99	68.96
<i>FatB</i> Tos17插入突变体		0.34	11.55	1.84	2.24	15.04	67.70
<i>FatB</i> dsRNA转化系	0.56	1.01	14.39	2.09	2.07	13.21	64.56
<i>Fad2</i> dsRNA转化系							
Tos17对照		0.39	10.52	1.80	2.30	15.61	67.65
<i>FatB</i> dsRNA对照	0.72	1.15	13.30	2.03	4.04	24.62	52.28

[0418]

表7: 与相应对照系相比突变系中谷粒脂肪酸相对量(%突变系/%相应对照系)

	豆蔻酸 (C14:0)	棕榈酸 (C16:0)	硬脂酸 (C18:0)	油酸 (C18:1)	亚油酸 (C18:2)	亚麻酸 (C18:3)
谷粒脂肪酸						
FatB Tos17插入突变体	0.85	0.8451*	0.899	1.118*	0.9691	1.06
FatB dsRNA转化系	0.57*	0.6060*	0.980	1.025	1.176*	1.09
Fad2 dsRNA转化系	0.570	0.8167*	0.887*	1.802*	0.3373*	0.822*
叶脂肪酸						
FatB Tos17插入突变体	nd	0.911*	0.977	1.03	1.037	0.9992
FatB dsRNA转化系	nd	0.9247	0.969	1.95*	1.864*	0.8098*

* 统计学显著改变

[0419]

实施例6 抗体的产生和应用

[0420]

通过合成存在于FatB的推导的序列中的15或16聚体肽产生抗体。用于产生抗FatB

的抗体的肽是：

[0421] FatB-U1 Ac-CGMNKNTRRLSKMPDE (SEQ ID NO:56)。该肽相应于从氨基酸位置259翻译的FatB序列(登录号AP000399)并还在从AP005291, AC108870和AC004236翻译的序列中发现。但是,这一序列在4个同工型中仅在序列TRRLSKMPDE (SEQ ID NO:57)中相同。

[0422] FatB-U2.Ac-CGEKQWTLDDWKPKKPD (SEQ ID NO:58)。这一序列在所有4个FatB同工型的翻译序列中发现。

[0423] FatB-99.Ac-CGAQGEENMGFFPAES (SEQ ID NO:59)。这一序列仅在AP00399中发现并且在推导的多肽的最C端。

[0424] 在合成后,用标准技术使用交联剂MBS(马来酰亚胺苯甲酸-N-羟基琥珀酸酰胺酯)将这些肽与卵清蛋白或匙孔血蓝蛋白(KLH)偶联。透析并冻干交联的肽并以大约1mg/ml的浓度用弗氏不完全佐剂以2周间隔注射进兔中,共两个月。抗FatB-99产生的抗血清检测到FatB同工型之间的明显差异,即在野生型水稻中存在的20kDa的多肽在相应于TIGR标识符Os06g5130的基因中有插入序列的Tos-17突变品系中不存在,该产物相应于FatB-1,序列由登录号AP000399表示(图18)。尽管这与大约40kDa的预期大小不同,但是这种差异先前已经在FatB同工型中注意到。不同大小的FatB产物已经在发育的和成熟的*Cuphea wrightii*种子中观察到,显示有5种不同的FatB同工型,在成熟种子中大小较长,在成熟种子中产物较短(Leonard et al.,1997)。

[0425] 可以使用所述抗血清检测转基因和突变植物样品中的FatB蛋白并证实基因失活程度。

[0426] 实施例7.水稻Fad2中的突变体的鉴别

[0427] 从提取自大量不同水稻登录的水稻DNA中产生跨越Fad2-1(编码序列相应于NCBI数据库中的AP00 4047, TIGR基因座标识符LOC_Os02g48560)的活性位点(如果起始ATG被用作TIGR Loc_Os2g48560中编号的起点,则基本上是位置330至1020)的PCR产物。根据所用引物,这些产物的大小高至800bp。可能需要使用两组重叠引物对。一组可能的引物是:

[0428] 组A

[0429] GTGCCGGCGGCAGGATGACGG (SEQ ID NO:60) (在图10的序列对比中的位置5-20)

[0430] GCCGACGATGTCGTCGAGCAC (SEQ ID NO:61) (在图10的序列对比中的位置379-398的反向互补序列)

[0431] 组B

[0432] TGCCTTCTCCGACTACTCGG (SEQ ID NO:62) (图10中的位置360-379)
CCTCGGCCATGTCGCTTGG (SEQ ID NO:63) (图10中的位置1099-1118的反向互补序列)。

[0433] 退火的产物然后在Rotorgene 6000仪器(Corbett Life Science)或相当的仪器中解链,在所述仪器中异源双链的解链中的差异可以通过染料LC Green的荧光改变而灵敏地检测。通过这一技术每天可以筛选几百个、可能几千个水稻品系。

[0434] 来自显示改变的热谱的样品的PCR产物被测序并鉴别Fad2中的突变。然后失活Fad2的选择的突变体可以杂交进良种水稻品系以产生具有降低的Fad2活性并因此具有高油酸的水稻品系。如果需要消除两个或全部Fad2同工型,则这可以通过鉴别在不同同工型中具有所需突变的品系并通过标记辅助育种将所述突变组合在良种水稻品系中而实现。至少Fad2-1基因需要是无活性的以相当大地增加油酸含量或降低亚油酸含量。一或多个额外

Fad2基因的失活会进一步增加油酸含量和降低亚油酸护理。在额外的Fad2基因中具有突变的突变体可以使用用于额外Fad基因的特异引物如Fad2-1以相同方式鉴别。

[0435] 实施例8.稳定性分析-贮存中己醛产生的检测

[0436] 正在用FSA,Werribee进行实验以在野生型水稻中检测贮存中的己醛产生。这涉及GC,使用取样器检测在高温(40℃)贮存的谷粒的顶部空间中的挥发物。一旦优化系统后(并且我们有足够量的谷粒),我们将进行野生型和Fad2 RNAi和FatB RNAi水稻品系贮存后挥发物特别是己醛的产生的比较和基因型的合适组合。这是水稻产业中谷粒贮存和糠贮存的重要质量问题。可能具有影响谷粒质量的作用的其它挥发物的产生和检测也正在用FSA,Werribee和CSIRO昆虫学进行研究。

[0437] 顶部空间分析需要大约10g的糙米。糙米在4℃(对照)和35℃贮存8周。从糙米释放的气体样品可以通过在80℃加热或通过自然扩散而在小瓶的顶部空间中获得。顶部空间中的挥发成分然后通过直接注射进GC或GC-MS仪器并分析气相层析谱而分析(Suzuki et al.,1999)。分析顶部空间中的挥发物的另一种方法是通过如Nielsen et al.(2004)所述用氮气作为吹扫气将挥发物捕获在合适的基质(例如250mg Tenax GR)上而进行。然后加热进行芳香化合物的脱附,用GC分析捕获的分子并使用标准进行鉴别。

[0438] 在具有低亚油酸的水稻品系中水稻贮存会改善的预期是基于一些观察。Suzuki et al.(1999)提供了数据表明在贮存过程中游离亚油酸的量增加,并且在35℃挥发性醛如戊醛、己醛和戊醇的量增加3倍。己醛和有气味挥发性醛的相关性也已被其它作者注意到。另一方面,Zhou et al.(2002)发现贮存时总亚油酸的降低并将这与亚油酸分解为其它产物包括导致产生臭气的挥发物相关联。结果中的差异可能是由于提取和分析方法的差异所致。

[0439] 体外亚油酸产生己醛由Nielsen et al.(2004)证实。

[0440] 本领域技术人员应理解可以对特异实施方案中所示的本发明进行各种改变和/或修改而不偏离广泛描述的本发明的精神和范围。本发明的实施方案因此被认为是示例性的,不是限制性的。

[0441] 所有本文讨论和或引用的出版物以其全文并入本文。

[0442] 本申请要求AU 2006903810的优先权,其全文并入本文。

[0443] 对本说明书中包括的文件、法令、材料、装置等的任何讨论仅为本发明提供上下文的目的。其不应被看作承认这些物质的任何或全部在本发明优先权日之前构成现有技术部分或是与本发明相关领域的普遍知识。

[0444] 参考文献

[0445] Abdullah et al.(1986)Biotechnology 4:1087.

[0446] Akagi et al.(1995)Plant Physiol.108,845-846

[0447] Almeida and Allshire(2005)TRENDS Cell Biol 15:251-258.

[0448] Anai et al.(2003)Plant Cell Rep.21,988-992.

[0449] Ascherio and Willett(1997)Am.J.Clin.Nutr.66:1006S-1010S.

[0450] Bligh and Dyer Canadian J.Biochem.(1959)37:911-917.

[0451] Boggs et al.(1964)J.Food Sci.29:487-489.

[0452] Bonanome and Grundy(1988).N.Engl.Med.318:1244-1248.

- [0453] Brandt et al. (1985) *Carlsberg Res. Commun.* 50:333-345.
- [0454] Broun et al., (1999) *Annu. Rev. Nutr.* 19:197-216.
- [0455] Buhr et al. (2002) *Plant J.* 30:155-163.
- [0456] Capecchi (1980) *Cell* 22:479-488.
- [0457] Champagne et al. (1995) *Cereal Chem* 72:255-258.
- [0458] Chang et al., (1978) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 55:718-727.
- [0459] Chapman et al., (2001) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78:941-947.
- [0460] Choudry et al. (1980) *Phytochemistry* 19:1063-1069.
- [0461] Clapp (1993) *Clin. Perinatol.* 20:155-168.
- [0462] Colot et al. (1987) *EMBO J* 6:3559-3564.
- [0463] Comai et al. (2004) *Plant J* 37:778-786.
- [0464] Curiel et al. (1992) *Hum. Gen. Ther.* 3:147-154.
- [0465] Dougherty et al. (1995) *Am. J. Clin. Nutr.* 61:1120-1128.
- [0466] Eglitis et al. (1988) *Biotechniques* 6:608-614.
- [0467] Fenandez San Juan (1995) *Alimentaria* 33:93-98.
- [0468] Fujimura et al. (1985) *Plant Tissue Culture Letters* 2:74.
- [0469] Graham et al. (1973) *Virology* 54:536-539.
- [0470] Gunstone (2001) *Inform* 11:1287-1289.
- [0471] Ha (2005) *Nutrition research* 25,597-606.
- [0472] Haseloff and Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591.
- [0473] Henikoff et al. (2004) *Plant Physiol* 135:630-636.
- [0474] Hu et al. (1997) *N. Engl. J. Med.* 337:1491-1499.
- [0475] Jennings and Akoh (2000) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 4439-4443.
- [0476] Jones et al. (1995) *Plant Cell* 7:359-371.
- [0477] Kinney (1996) *J. Food Lipids* 3:273-292.
- [0478] Kodama et al. (1997) *Plant Molecular Biology* 33:493-502.
- [0479] Kohno-Murase et al. (2006) *Transgenic Research* 15:95-100.
- [0480] Koziel et al. (1996) *Plant Mol. Biol.* 32:393-405.
- [0481] Langridge et al. (2001) *Aust J Agric Res* 52:1043-1077.
- [0482] Lemieux (2000) *Current Genomics* 1:301-311.
- [0483] Leonard et al. (1997) *Plant Molecular Biology*, Volume 34, Issue 4:669-679.
- [0484] Li et al. (1997) *Molec Breeding* 3:1-14.
- [0485] Lu et al. (1993) *J. Exp. Med.* 178:2089-2096.
- [0486] Liu et al. (1999) *Aust. J. Plant Physiol.* 26:101-106.
- [0487] Liu et al. (2002a) *J. Am. Coll. Nutr.* 21:205S-211S.
- [0488] Liu et al. (2002b) *Plant Physiol.* 129:1732-1743.
- [0489] Mensink and Katan (1990) *N. Engl. J. Med.* 323:439-445.

- [0490] Mikkilineni and Rocheford (2003) *Theor. Applied Genetics*, 106, 1326-1332.
- [0491] Millar and Waterhouse (2005) *Funct Integr Genomics* 5:129-135.
- [0492] Moghadasian and Frohlich (1999) *Am. J. Med.* 107:588-94.
- [0493] Morrison (1988) *J Cereal Sci.* 8:1-15.
- [0494] Most et al. (2005) *Am J Clin Nutr* 81:64-8.
- [0495] Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453.
- [0496] Nielsen et al. (2004) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 2315-2321.
- [0497] Noakes and Clifton (1998) *Am. J. Clin. Nutr.* 98:242-247.
- [0498] Ohlrogge and Jaworski (1997) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 48: 109-136.
- [0499] Oil World Annual (2004) International Seed Testing Association (ISTA) Mielke GmbH, Hamburg, Germany
- [0500] Pasquinelli et al. (2005) *Curr Opin Genet Develop* 15:200-205.
- [0501] Perriman et al. (1992) *Gene* 113:157-16.
- [0502] Radcliffe et al (1997) *Biochem Arch* 13:87-95.
- [0503] Resurreccion et al (1979) *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 30:475-481.
- [0504] Roche and Gibney (2000) *Am. J. Clin. Nutr.* 71:232S-237S.
- [0505] Rukmini et al. (1991). *Journal of The American College of Nutrition* 10: 593-601.
- [0506] Sebedio et al. (1994) *Fett. Wiss. Technol.* 96:235-239.
- [0507] Senior (1998) *Biotech. Genet. Engin. Revs.* 15:79-119.
- [0508] Shibuya et al. (1974) *Journal of the Japanese Society of Food Science and Technology* 21:597-603.
- [0509] Shin et al. (1986) *J. Food Sci.* 51:460-463.
- [0510] Shippy et al. (1999) *Mol. Biotech.* 12:117-129.
- [0511] Slade and Knauf (2005) *Transgenic Res* 14:109-115.
- [0512] Smith et al. (2000) *Nature* 407:319-320.
- [0513] St Angelo et al. (1980) *J Lipids* 1:45-49.
- [0514] Stefanov et al. (1991) *Acta Biologica Hungarica* 42:323-330.
- [0515] Stoutjesdijk et al., (2000). *Biochem. Soc. Trans.* 28:938-940.
- [0516] Stoutjesdijk et al. (2002) *Plant Physiology* 129:1723-1731.
- [0517] Stymne and Stobart (1987) *Lipids*, Vol. 9:175-214.
- [0518] Suzuki et al. (1999) *J. Agric. Food Chem.* 47:1119-1124.
- [0519] Taira et al. (1988) *J. Agric. Food Chem.* 34:542-545.
- [0520] Thelen and Ohlrogge (2002) *Metabolic Engineering* 4:12-21
- [0521] Theriault et al. (1999). *Clin. Biochem.* 32:309-19.
- [0522] Tholstrup et al. (1994) *Am. J. Clin. Nutr.* 59:371-377.

- [0523] Toriyama et al. (1986) Theor. Appl. Genet. 205:34.
- [0524] Tsugita et al (1983) Agricultural and Biological Chemistry 47:543-549.
- [0525] Tsuzuki et al (2004) Lipids 39:475-480.
- [0526] Voelker et al. (1996) .Plant J.9:229-241.
- [0527] Wagner et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6099-6103.
- [0528] Wang et al. (1998) ACTA Hort. 461:401-407.
- [0529] Waterhouse et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13959-13964.
- [0530] Williams et al. (1999) J. Am. Coll. Cardiol. 33:1050-1055.
- [0531] Yasumatsu et al. (1966) Agric. Biol. Chem. 30:483-486.
- [0532] Zhou et al. (2002) Journal of Cereal Science 35:65-78.
- [0533] Zock et al. (1994) Arterioscler Thromb. 14:567-575.

<110> 联邦科学技术研究组织

<120> 改变水稻的脂肪酸组成

<130> 505729

<150> AU 2006903810

<151> 2006-07-14

<160> 83

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 425

<212> PRT

<213> *Oryza sativa*

<400> 1

[0001]

```

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

```

His Val Arg Asp Tyr Asn Ser Gly Arg Thr Ile Leu Arg Ala Thr Ser
 245 250 255
 Val Trp Val Met Met His Lys Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Met Pro
 260 265 270
 Asp Glu Val Arg Ala Glu Ile Gly Pro Tyr Phe Asn Asp Arg Ser Ala
 275 280 285
 Ile Thr Glu Glu Gln Ser Glu Lys Leu Ala Lys Thr Gly Asn Lys Val
 290 295 300
 Gly Asp Asp Ala Thr Glu Gln Phe Ile Arg Lys Gly Leu Thr Pro Arg
 305 310 315 320
 Trp Gly Asp Leu Asp Val Asn Gln His Val Asn Asn Val Lys Tyr Ile
 325 330 335
 Gly Trp Ile Leu Glu Ser Ala Pro Ile Ser Val Leu Glu Lys His Glu
 340 345 350
 Leu Ala Ser Met Thr Leu Asp Tyr Arg Lys Glu Cys Gly Arg Asp Ser
 355 360 365
 Val Leu Gln Ser Leu Thr Thr Val Ser Gly Glu Cys Thr Ser Ile Gly
 370 375 380
 Ala Asp Lys Gln Ala Ser Ala Ile Gln Cys Asp His Leu Leu Gln Leu
 385 390 395 400
 Glu Ser Gly Ala Asp Ile Val Lys Ala His Thr Glu Trp Arg Pro Lys
 405 410 415
 [0002] Arg Ser His Ala Ala Ala Glu Asn Ala
 420 425
 <210> 2
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa
 <400> 2
 Met Ala Gly Ser Leu Ala Ala Ser Ala Phe Phe Pro Gly Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Pro Ala Ala Ser Ala Arg Ser Ser Lys Asn Ala Ala Val Thr Gly
 20 25 30
 Glu Leu Pro Glu Asn Leu Ser Val Cys Gly Ile Val Ala Lys Pro Asn
 35 40 45
 Pro Pro Pro Ala Ala Met Gln Val Lys Ala Gln Ala Gln Thr Leu Pro
 50 55 60
 Lys Val Asn Gly Thr Lys Val Asn Leu Lys Thr Val Lys Pro Asp Met
 65 70 75 80
 Glu Glu Thr Val Pro His Ser Ala Pro Lys Thr Phe Tyr Asn Gln Leu
 85 90 95
 Pro Asp Trp Ser Met Leu Leu Ala Ala Ile Thr Thr Ile Phe Leu Ala
 100 105 110
 Ala Glu Lys Gln Trp Thr Leu Leu Asp Trp Lys Pro Lys Lys Pro Asp
 115 120 125
 Met Leu Val Asp Thr Phe Gly Phe Gly Arg Ile Ile Gln Asp Gly Met

130 135 140
 Val Phe Arg Gln Asn Phe Met Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Ala Asp
 145 150 155 160
 Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr Ala
 165 170 175
 Leu Asn His Val Arg Thr Ala Gly Leu Leu Gly Asp Gly Phe Gly Ala
 180 185 190
 Thr Pro Glu Met Ser Lys Arg Asn Leu Ile Trp Val Val Ser Lys Ile
 195 200 205
 Gln Leu Leu Val Glu Gln Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Met Val Gln Val
 210 215 220
 Asp Thr Trp Val Ala Ala Ala Gly Lys Asn Gly Met Arg Arg Asp Trp
 225 230 235 240
 His Val Arg Asp Tyr Asn Ser Gly Arg Thr Ile Leu Arg Ala Thr Ser
 245 250 255
 Val Trp Val Met Met His Lys Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Met Pro
 260 265 270
 Asp Glu Val Arg Ala Glu Ile Gly Pro Tyr Phe Asn Asp Arg Ser Ala
 275 280 285
 Ile Thr Glu Glu Gln Ser Glu Lys Leu Ala
 290 295
 <210> 3
 <211> 427
 <212> PRT
 <213> *Oryza sativa*
 <400> 3
 Met Ala Gly Ser Leu Ala Ala Ser Ala Phe Phe Pro Val Pro Gly Ser
 1 5 10
 Ser Pro Ala Ala Ser Ala Arg Ser Ser Lys Asn Thr Thr Gly Glu Leu
 20 25 30
 Pro Glu Asn Leu Ser Val Arg Gly Ile Val Ala Lys Pro Asn Pro Ser
 35 40 45
 Pro Gly Ala Met Gln Val Lys Ala Gln Ala Gln Ala Leu Pro Lys Val
 50 55 60
 Asn Gly Thr Lys Val Asn Leu Lys Thr Thr Ser Pro Asp Lys Glu Asp
 65 70 75 80
 Ile Ile Pro Tyr Thr Ala Pro Lys Thr Phe Tyr Asn Gln Leu Pro Asp
 85 90 95
 Trp Ser Met Leu Leu Ala Ala Val Thr Thr Ile Phe Leu Ala Ala Glu
 100 105 110
 Lys Gln Trp Thr Leu Leu Asp Trp Lys Pro Lys Lys Pro Asp Met Leu
 115 120 125
 Ala Asp Thr Phe Gly Phe Gly Arg Ile Ile Gln Asp Gly Leu Val Phe
 130 135 140
 Arg Gln Asn Phe Leu Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Ala Asp Arg Thr
 145 150 155 160

[0003]

Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr Ala Leu Asn
165 170 175

His Val Lys Thr Ala Gly Leu Leu Gly Asp Gly Phe Gly Ala Thr Pro
180 185 190

Glu Met Ser Lys Arg Asn Leu Ile Trp Val Val Ser Lys Ile Gln Leu
195 200 205

Leu Val Glu Arg Tyr Pro Ser Trp Gly Asp Met Val Gln Val Asp Thr
210 215 220

Trp Val Ala Ala Ala Gly Lys Asn Gly Met Arg Arg Asp Trp His Val
225 230 235 240

Arg Asp Tyr Asn Ser Gly Gln Thr Ile Leu Arg Ala Thr Ser Val Trp
245 250 255

Val Met Met Asn Lys Asn Thr Arg Arg Leu Ser Lys Met Pro Asp Glu
260 265 270

Val Arg Ala Glu Ile Gly Pro Tyr Phe Asn Gly Arg Ser Ala Ile Ser
275 280 285

Glu Glu Gln Gly Glu Lys Leu Pro Lys Pro Gly Thr Thr Phe Asp Gly
290 295 300

Ala Ala Thr Lys Gln Phe Thr Arg Lys Gly Leu Thr Pro Lys Trp Ser
305 310 315 320

Asp Leu Asp Val Asn Gln His Val Asn Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp
325 330 335

[0004] Ile Leu Glu Ser Ala Pro Ile Ser Ile Leu Glu Lys His Glu Leu Ala
340 345 350

Ser Met Thr Leu Asp Tyr Arg Lys Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu
355 360 365

Gln Ser Leu Thr Ala Val Ser Gly Glu Cys Asp Asp Gly Asn Thr Glu
370 375 380

Ser Ser Ile Gln Cys Asp His Leu Leu Gln Leu Glu Ser Gly Ala Asp
385 390 395 400

Ile Val Lys Ala His Thr Glu Trp Arg Pro Lys Arg Ala Gln Gly Glu
405 410 415

Gly Asn Met Gly Phe Phe Pro Ala Glu Ser Ala
420 425

<210> 4
<211> 423
<212> PRT
<213> *Oryza sativa*

<400> 4

Met Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ser Ala Phe Leu Pro Gly Ser Pro Ala
1 5 10 15

Ala Ala Pro Pro Lys Ser Val Leu Gly Glu Arg Pro Asp Ser Leu Asp
20 25 30

Val Arg Gly Ile Ala Ala Lys Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ala
35 40 45

Leu Arg Ala Gly Lys Thr Arg Thr His Ala Ala Ile Pro Lys Val Asn
50 55 60

Gly Gly Ser Ser Ala Leu Ala Asp Pro Glu His Asp Thr Met Ser Ser
 65 70 75 80
 Ser Ser Ser Ser Ala Ala Pro Arg Thr Phe Tyr Asn Gln Leu Pro Asp
 85 90 95
 Trp Ser Met Leu Leu Ala Ala Ile Thr Thr Ile Phe Leu Ala Ala Glu
 100 105 110
 Lys Gln Trp Thr Leu Leu Asp Trp Lys Pro Lys Arg Pro Asp Met Leu
 115 120 125
 Thr Asp Thr Phe Gly Phe Gly Arg Met Ile His Glu Gly Leu Met Phe
 130 135 140
 Arg Gln Asn Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Ala Asp Arg Thr
 145 150 155 160
 Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr Ala Leu Asn
 165 170 175
 His Val Lys Ser Ala Gly Leu Leu Gly Asp Gly Phe Gly Ser Thr Pro
 180 185 190
 Glu Met Ser Lys Arg Asp Leu Phe Trp Val Val Ser Gln Met Gln Ala
 195 200 205
 Ile Val Glu Arg Tyr Pro Cys Trp Gly Asp Thr Val Glu Val Asp Thr
 210 215 220
 Trp Val Gly Ala His Gly Lys Asn Gly Met Arg Arg Asp Trp His Ile
 225 230 235 240
 [0005] Arg Asp Ser Val Thr Gly His Thr Ile Leu Lys Ala Thr Ser Lys Trp
 245 250 255
 Val Met Met His Lys Leu Thr Arg Arg Leu Ala Arg Ile Pro Asp Glu
 260 265 270
 Val Arg Thr Glu Ile Glu Pro Tyr Phe Phe Glu His Ala Ser Ile Val
 275 280 285
 Asp Glu Asp Asn Gln Lys Leu Pro Lys Leu Pro Asp Ile Glu Gly Ala
 290 295 300
 Asn Val Ala Lys Tyr Val Arg Thr Gly Leu Thr Pro Arg Trp Ala Asp
 305 310 315 320
 Leu Asp Ile Asn Gln His Val Asn Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile
 325 330 335
 Leu Glu Ser Ala Pro Ile Ser Ile Leu Glu Lys His Glu Leu Ala Ser
 340 345 350
 Ile Val Leu Asp Tyr Lys Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Gln
 355 360 365
 Ser His Thr Thr Val Tyr Thr Asp Cys Asn Lys His Ser Gly Gln Thr
 370 375 380
 Thr Leu His Cys Glu His Leu Leu Ser Leu Glu Ser Gly Pro Thr Ile
 385 390 395 400
 Val Lys Ala Arg Thr Met Trp Arg Pro Lys Gly Thr Arg Pro Gln Glu
 405 410 415
 Ser Ile Ile Pro Ser Ser Ser
 420

	<210>	5	
	<211>	6943	
	<212>	DNA	
	<213>	<i>Oryza sativa</i>	
	<400>	5	
		ccatatgtgc agcataaaaag gcaaatcage cctgittgac atggctccaa tgcttaaatt	60
		ctttagagaa aaaacagact ttgtagatta aatcaaagtg gcataatctt tttatittga	120
		taaaaatatt agaaaatate atacccta atctcttagca tagtactcca ttcactctcac	180
		ttattaaggt acgatcaaac ttgcatagtt ctccaagggc tgtgttcttt cccccatttt	240
		cctaaccat ctatctcggt ttccgcgcac acattttica aactgctaaa cgggtgatt	300
		tatgcaaaaa ctcttatatg aaagttgttt aaaaaaatca tattaatcca ttttttaaaa	360
		aaatcagtta atacttaatt aatcatgcaa taaaacgaac ttcattttgc gtgctgggga	420
		ggaggggctc ccaaccctc ctccgaacac agccaaaagc tacttttggc ctttaaattt	480
		gtcatatatt ataagtctc tagtaacaaa accatagtca tatgaaagta aatttaaatt	540
		ataatccaat gatattttt tcatcaata gaatttaatt tataataaac tatttattga	600
		taaaatattc agagagttga atattaaat acctgtgtgc cttagtgagt gggccaaatt	660
		aattaatgga gtagtaacag cttaaccaa agaaatttca acaatttccc aagctagaaa	720
		aaaccaact ccaaaataaa cttagattag aactgtgta agcacctaaa ttgtaatacc	780
[0006]		tgttactctc tegtctcat tctatatttg tctaagtta aatatactca ctttttttta	840
		tctgtcctaa gtttaactatg tgiatgtcta tctttctac tactccctcc gtttcaggtt	900
		ataagacgtt ttgactttgg tcaaagtcaa actgctttaa gittgactaa gttttagaa	960
		aaaataataa cattttcaac ccaagacaaa tttattatga aaatatgttc aattattgat	1020
		ttaatgaaac taatttggtt ttataaatat tattataatt atatataaac ttagttaaatt	1080
		ttaaagtagt ttaagtttga tcaaagtcaa aatgttttat aacctgaaat ggagggagta	1140
		agtaatttga aacgaagaga gcagacaaat aataaactag taaagcctgt gacttgggtt	1200
		ctagtcattg atcgtgtaca tgiaggtctt gtttagatcc caaaaaattt tagccaaaac	1260
		ctcacatcaa atatttggac acatgcacce ctaccagtgt gtggaggeat tgcatacacg	1320
		aaacatgtaa aaggaatcaa cttagagagt tagacctgct agctctacta ggtctggatg	1380
		gtcatgcatt tttttttgaa aaaaaccacg ctgcaagctc gacagcctca acctcaatgg	1440
		caaccatgac aataaatatg atgacaatgg tgtaggagaa aagacacgct gataacccaa	1500
		gggcgcgget gcgcatacaa aggcggagag aaggaacgat gttggctcaa aaagaaagag	1560
		cgctcgtggc agtgggtgct ggagcgacac taaagttagt gtttctgat ggtctcacac	1620
		aatcccta atcgaaatattt atttttttt acttagtatt gctgatccgt gggccaccag	1680
		ccaatcataa agaaaaatgt tgagataaaa ggtggagtat ctccccctc ctccctttt	1740
		tgactgaaa aaaaaaagcg tgggtggcgg ccgtgcgigt aacaacacta aagttagtgg	1800
		ttgctggtgg tctgacacaa tccctaatac agtttgataa taataataat ttatttctc	1860

ttattagtat	tgctgatgcg	tgggccacca	atcaatcgta	aagaaaaaaa	atggtgagat	1920	
aaaaggfggg	ggtatettct	ccttctcttt	ttttttgget	aaaataaaag	tggtttctgg	1980	
taglclgaca	caalelctaa	tcgaaatatt	latllllllc	lclltaglatt	getgalacgt	2040	
gggccaccag	ccantaataa	agaaaaaaa	tgttagagat	aaaaggcgga	gagtatcttc	2100	
cccttccctt	tttttggegt	aaatgaaaga	aaagagaaaa	tctcccgtcg	tcctcttctt	2160	
tgcgccaaga	aagacgagcc	gcggctcaac	accggagggg	aggggcgccg	atctccatcg	2220	
ccaaggagag	cagagcaggg	gaggggatcc	tggtagacct	ctcttctctg	attcatctct	2280	
ctcccattct	agcttcgggg	gactactttt	gcttgggaatt	tgctcgcgtt	cgttcgtgcg	2340	
tctgttcggt	aaccttagct	tcttctcttc	tagatctgga	ggaagctctt	ctctctctta	2400	
atttcagagc	cttaatacaa	gtagtaacag	tttaacctcc	cccattgccc	aagttggatc	2460	
cgccccctcg	agttccgata	tgggctctc	ccaattctca	atgccatttt	gttcatcggg	2520	
gggcataagg	tccatttttg	ccctgcattga	ttcaaatgtg	gtttcgaatc	gtttgtgaaa	2580	
ttcgggggig	tacllgtlll	lgataaalga	ggcctlllll	cccccalgag	gaggcaaaat	2640	
ttttagtggg	tggatccact	agttcatgcc	tcaatttttt	ttctctcttt	tttaagttttc	2700	
caaagagcta	cattgttgta	aagtgtctga	tacaattgat	tgtttattca	ggttagcget	2760	
tttgccgtgt	gattgatttc	taaacgaatt	tgggcccgtg	aggggaagtt	caatcatggc	2820	
agggtctctt	gccgcctcag	cattcttccc	aggtccaggc	tcattctctg	cagcatcagc	2880	
[0007]	tagaagctcc	aagaatgcig	cigllaccgg	cgaallgccg	gagaalltga	glgtclglgg	2940
cattgtcgea	aagcctaacc	cacctctcgc	agccatgcaa	gtaaaggeac	aggetcaaac	3000	
ctctcccaag	gttaatggta	cgaaggttaa	cctcaagacg	gtgaagcctg	acatggagga	3060	
aacgggtcct	cacagtgcct	caaagacggt	ctataaccaa	ctgccggatt	ggagcatgct	3120	
tcttgcgget	attacaacca	tcttctctgc	cgcagagaag	cagtggacac	tgcttgattg	3180	
gaagccgaag	aaaccclgaca	lgcllglgga	cacalllggc	tlggtagga	tcattccagga	3240	
cggtatggtg	tttaggcaga	aettcatgat	tgggtctctc	gagattggcg	ctgatctgae	3300	
agcttctata	gagacattga	tgaatcattt	acaggttaagt	ggttgcacat	tctgttttta	3360	
gtttcatttc	tcatttcagc	atlltgttat	agattctgat	gtctctttca	agetggcaat	3420	
tattttaa	atlltgcaggaa	acggctctta	accatgtaag	gactgctggg	cttcttggag	3480	
alggllllgg	ggclacaccg	gagatgagca	aacggaacct	galalgggll	glcagcaaaa	3540	
tccagcttct	tgttgagcaa	taccccgcat	ggtacttttt	tgcacacctt	tgtctctctt	3600	
gatatatgta	tctttggttt	ctttctatca	attcttact	ctaagttgtc	atttaatttt	3660	
cacattttaa	attacttcat	atlltgtttg	cttcttttac	agatctggtt	ttatgtacta	3720	
ctttacagct	gtgtgtcctt	tgcataattg	tttttatttg	tttaagaag	attcttacac	3780	
aagcaacagt	agtattttagc	tcaatatitc	cttttaacatg	gtttatcata	ttgttgtgtg	3840	
gatctctggt	cigatttctc	catacactgg	ttggttgatg	aaaatcaagt	gaatctttta	3900	
cttgcctgta	aatttcgctg	ctgcaggttt	gcaagaatat	gggttgaagt	ttttatactg	3960	

ctatagaagg	ccatgttttt	ctttgatttc	ccgtgatagg	cccatgttt	tggaggttct	4020	
gttattcctc	cttggttgac	taagaaatgt	gtagtaatat	cagctccagt	tttgttggat	4080	
caaggataga	ttttgtggca	aactaaatit	tccaattagg	aagaaatgaa	tatattccta	4140	
cttaagtggg	aggagcatgc	actttgtttc	caattgtcga	gccttgatta	taacacaaaac	4200	
tatcaagtta	tttctttgca	tttagaaaaca	ggatttgcac	cttgggtaac	cctcattaaa	4260	
gacataatct	agcttttagta	catgcaacac	aaaagttatg	atgcccacag	gcctttttgg	4320	
tacagcactg	taagtctgta	gctctccttg	ctctatgttg	tectcaaaag	acacacacac	4380	
agttaaaaga	acagtaatct	ctcctttaga	cgtaattat	tagtggagta	gtaatttaga	4440	
tccaagagca	acttcatttg	ttacgcctta	ttcattgccc	aaagctgcct	cattaaatga	4500	
tgtctctctc	gtgcttcctt	ggatcttgaa	ttatgctgag	tgggaatgcc	agaacgggca	4560	
tgtacttaacg	ttttccagcg	ataagctccg	ttttaaaaat	aaattagcaa	gtgatttatt	4620	
tgcatttata	aacaaaaatt	taccactcgg	gtagttcata	ttaaagttat	tgtctagctt	4680	
tattacaagc	agcatgaaag	ttacgatacc	ccaaggcctg	agtttggcag	cacttaactc	4740	
tgttgccctg	ttttgtcttg	aaaagtataa	catcacttag	caggacaatg	ctctcccga	4800	
aacataactg	attagtggat	agagggagag	gttttagtcc	aatagataat	tgactggtta	4860	
cttcatattc	atgcccaga	getgcctcat	taaagtctct	gtcctgtget	ttcttggatc	4920	
ttgaattaaa	agacgtctgt	acagggtacc	acacctcaag	ggatcacac	tcagaaagtt	4980	
[0008]	tccttttatt	gggetgcagt	aaatgattcc	atcgtgtaga	aaagaacaaa	agcaattaat	5040
	gctgtcccat	atcatgggag	aagctaagga	ccgatctaga	acagtgaact	tttgttgaac	5100
	agcatctgtc	agtttaaat	cttaggtggt	catcattcat	caaataagtg	gtgctagtac	5160
	tactatcac	acgttatgtt	taaatctctt	tgtaactgt	gtcaacaagt	ggttgaaaaac	5220
	ttcttttttg	gggttttgag	ttagaaaaat	ggaagtgcaa	tttcaaactg	tttttttagt	5280
	tcagatacaa	ttgccgatgt	ctttctgttg	atcaaaaaga	atgacagatg	tattgtacca	5340
	acctgctatg	gttttagggg	agatatggtt	caagttgaca	catgggtcgc	tgtctctggc	5400
	aaaaatggca	tgcgtcgaga	ctggcatggt	cgtgactaca	actctggccg	aacaatcttg	5460
	agagctacaa	ggtttgggct	tcaactgtat	tctattgcaa	gaatcatctg	tatcattttt	5520
	tttgtgagga	catccaatct	tggatattct	gcttggteac	atcattgata	atcactaatt	5580
	gtgctccttt	tccaatccat	ttgttgcagt	gtttgggtga	tgatgcacaa	gaaaactaga	5640
	agactttcaa	aaatgccaga	tgaagttaga	gctgaaatag	gccatattt	caatgaccgt	5700
	tcagctataa	cagaggagca	gagtgaaaag	ttagcctaga	caggaaataa	agttggtgat	5760
	gatgctacag	agcaattcat	aagaaagggg	ctcactgtaa	gtcagctaga	catggttaca	5820
	tactgaatta	tcattatgcc	tcaactgcta	tcatttatct	aagaaaaaca	gtaataatig	5880
	atctcaccce	tcattttatt	taaagtatat	ttgatggact	cttgtttact	gcaacagcct	5940
	agatggggtg	acctcgaigt	caatcagcat	gtgaacaatg	ttaaatatat	tgggtggatc	6000

```

cttgagggtgg ttattcttgt cccttatatt cattgttttag agaaaaataa ttggcctta 6060
tccctttata tggtaactcc ttgtttcac aatgtaagtc atttiagcat tcccatatt 6120
tatatttatg ctaatgaatc taaatagata tatgtgteta gattcattgg catcaatatg 6180
aatgtgagaa atgctaaaaat gacttacatt atgaaacgga gggagtagtt gttagggaac 6240
cattttatgt agtacttgca attatcttct agagattctg atctgaccat ctgtattgtt 6300
gatattgtca ttagtcttac atctggtcag tcagaagget ttcaaacatg tttctgagtt 6360
ctttctaatt ttttccccc gagtgcctca atttcagtac tggagaagca tgagcttgca 6420
ageatgacce tggattacag gaaggagtgt ggcgagaca gcgtgctgca atcacttacc 6480
accgtgctag gggaatgca cagcattggc gccacaagc aggcctctgc catccagtgc 6540
gaccatcttg tgaaggetga cattgtgaag gcacacacag agtggcgacc aaagegatcg 6600
catgcagcag ctgagaacgc gtaaacaaac aaaccgacga aaatctgtgg tagggagaat 6660
afcaaaactc ccttgcctct gtgcccctga agctgatctt gaagtgtgag ttgtattctg 6720
taaaaaatta gtagtctcca tagtgtgagg ttggagggga ggtgttggtg ctigectact 6780
gtacctgeta catctattat ttcttgatc ttgttctgct ttttttttc tttttgttt 6840
ttaaccctcg tggagataag acaggttttg aagtgtgaa gaggttgttt caatcgteta 6900
atlgattcaa clalttagca agtaaacgca tccatggaaa ttt 6943

```

[0009]

```

<210> 6
<211> 4799
<212> DNA
<213> Oryza sativa

```

```

<400> 6
agaggagaaa ttctcccgtc gtctccttcc ttgcccag aaagacgagc cgcggetcaa 60
cagcggagtg gagggggccc gatctccatc gccgaggaga gcagagcagg ggaggggagg 120
ggatcctggg gagcctcctc ttcttgatc acctctctct cattctagct tcgggggact 180
acttttgcct cgaatttgc tgcgttctgt cgtaaaccct agcttcttct ctcttagatc 240
tggaggaagc tcttctcctc ctttaattca gacccttaat acaagtagta acagttaaac 300
ccccccccc cccatgtccc aagtggatc cgcctctgag agttccgata ttgggtcctc 360
ccaattctca atgccatctt gtccatcggg ggcacatagg ttcattttgc ctgcattgat 420
tcaaatgtgg tttcgaatcg ttgggaaat tcgegggtgt acttgtttat gatatatgag 480
gccctttttt tccccatgag gaggcacaacl ttttagtggg tggatccact agttcatgcc 540
tcaatttttt ttctctctct ttaagtttcc caaagagcta cattgttgta aagtgtetaa 600
tacaattgat tgtttattca gtttagcgtt ttggcgtgt gattgatttc taaacgaatt 660
ttgggcctg aaggggaagt caatcatgac aggtctctct gccgcctcag cattcttccc 720
aggctcagge tcatctctg cagcatcagc tagaagetcc aagaatgctg ctgttaaccg 780
cgaattgccc gagaatttga ggttccgigg cattgtcgca aagcctaacc caccctctgc 840
agccatgcaa gtaaaggcac aggcctcaaac ccttcccag gttaatggta cgaaggttaa 900

```

	cctcaagacg gtaagcctg acatggagga aacgggtgcoct tacagtgtct caaagacggt	960
	ctataaccaa ctgceggatt ggagcatgct tcttgeggct attacaacca tcttcttgc	1020
	cgcagagaag cagtggacac tgcctgattg gaagccaaag aaacctgaca tgcctgttga	1080
	cacatttgcg tttgtagga ttatecagga cggfatggtg tttagcaga acctcatgat	1140
	tcggtcctac gagattggtg ctgatcgtac agcttctata gagacattga tgaatcattt	1200
	acaggtagt ggttgcacat tctgtttta gttttatttc tcatttcagc atttgttat	1260
	agattcatat gtctctttca agctggcaat tttttaaata tttgcaggaa acagctetta	1320
	accatgtgag gactgctggt ctcttggag atggttttgg ggctacacog gagatgagca	1380
	aacggaactt gatatgggtt gtcagcaaaa tccagctctt tgttagacaa taccctcat	1440
	ggtaactctt tgcaaacctt tgetctctt aatataatga tctttggtg ctctctatca	1500
	attccttacc gtaagtctt atttttgca ctttttaaat tacttcatat ttgttttgc	1560
	tcttttacag atatcgtttt atgtactact ttatagctgt gtgtccttgg catatttgtt	1620
	tetatttgtt taaagaagat tcttactcag gcaacagtag tatttagctc aatatttact	1680
	ttaacatggt ttatcataat gttgtgtgga tctctgtctt gatttctcca tatactggtt	1740
	ggttgatgaa aatcaagtga atcttttact tggctgtata ttcctctctt gctggtttgc	1800
	aagaatatgg gttgaaattt ttactctat agaaggccat gttttctttt gatttccctt	1860
	gataggctc atgttttaga ggtgctgta ttcctcattg gttgactaag aatgtgtag	1920
[0010]	taatatcagc tccagtttg ttggatcaag gatagagttt gtggcaaac aaattttcca	1980
	attaggaaga aatgaatata ttctactta agtggggagg agcatgcact ttgtttccaa	2040
	ttgctgagcc ctgattataa cacaaactat caagttattt ctgtgctttt agaaacagga	2100
	tttgcattct gagtaactct cattaaagac ataactctagc tttagtacat gcaacataaa	2160
	agttctgatg ccccaaggcc tttttgtac agcactgta gctcttagct atcttgcctc	2220
	taigtgttcc tcaaaagaca caacatcagt taaaaacaaa gaagaacagt aatctctct	2280
	ttagacgtea gttattagtg gagtagtaat ttgatccaa gagcaactt atttgttacg	2340
	ccttattcat tgcccaagc tgcctcatta aatgatgtct tctctgtctt tcttggatc	2400
	tigaattaig ttgagtggga atgccagaac gggcatgtac tttcttttc cagcgataag	2460
	ctcgtttta aaaataaatt agcaagtgat ttatttacct ttacaacaa aaattttacca	2520
	ctcggtagt tcacattaaa attattgtct agctttatta caagcaacat gaaaatttct	2580
	ataccccaag gcctgagttt ggcagcacta taactctgtt gcctgtttt gtcttgaaaa	2640
	gtataatate acttaacagg acaatgctct cccgaaaaca taactgatta gtggatagag	2700
	agagtgtttt aggtgtgtt tggatccggg gactaaattt tagttcatgt cacatcggat	2760
	gtttggacac taantagaaa tattaacat agactaataa taaaatttag tcccaataga	2820
	taattgactg gttacttcat attcattgcc cagagctgcc tcattaaatg ttgtctgttc	2880
	tgtctttct tggacttga attaaaagac gctctgtacag ggtaccacac ctcaagggat	2940
	cacaattcag aaagtctcc tttattggc tgcagtaaat gattccatct tatagaaaag	3000

aacaaaagca	attaatgctg	tgccatatca	tgggagaagc	taaggacceca	tctagaacag	3060	
tgaacttttg	ttgaacagca	tctgtcagtt	taaaaateta	gggtgtcate	atccatcaaa	3120	
taagtgtgtc	tagtgetact	attgcacacg	ttatgtttaa	atcctcttgt	caactgtgtc	3180	
aacaagtggg	fgaaaacttc	tttttggggg	ttttgagtta	taaaaatgga	ggtgcaattt	3240	
caaattgttt	ttttagtcca	gatacaattg	ccgacgtett	tctgtggatc	aaaaaaatga	3300	
cagatgtatt	gtaccaacct	gctatggttt	taggggagat	acggttcaag	ttgacacatg	3360	
ggttgctgct	gctggcaaaa	atggcatgcg	tcgagactgg	catgttcgtg	actacaactc	3420	
tggccgaaca	atcttgagag	ctacaagggt	tgggettcaa	ctttattcta	ttgcaagaat	3480	
catctgtatc	gtttttttta	tgaggatata	caatcttggg	atctctgctt	gatcacatca	3540	
ttgataattg	ctaattgfgc	tccttttcca	atcctttctt	gcagtgtttg	ggtgatgatg	3600	
cacaagaaaa	ctagaagact	ttcaaaaatg	ccagatgaag	ttagagctga	aataggcceca	3660	
tatttcaatg	accgttcagc	tataacagag	gagcagagtg	aaaagttagc	caagacagga	3720	
aataaagttg	gtgatgatgc	tacagagcaa	ttcataagaa	aggggctcac	tgtaatcag	3780	
ctagacatag	ttacatacta	aattatcatt	atgectcaac	tgcaatcatt	tatctaagaa	3840	
aaatagtaat	atttgccttc	accctcatt	tattttaaat	gatctttgat	ggactcttgt	3900	
ttactgcaac	agcctagatg	gggtgacctc	gatgtcaatc	agcatgtgaa	caatgttaaa	3960	
tatattgggt	ggatccttga	ggtggttatt	cttgtccctt	ttattcattg	tttagagaaa	4020	
[0011]	aataatttgg	ctttatectt	ttatattggtg	gittgttaggg	aaccatttta	tgtagtactt	4080
	gcaattatct	tctagagatt	ctgatctgac	catctgtatt	gttgatattg	tcattagtct	4140
	tacatctggt	cagtcagaag	gettccaaac	atgtttttga	gttctttcta	attttttccc	4200
	ccagagtgct	ccaatttcag	tactggagaa	gcatgagctt	gcaagcatga	ccctggatta	4260
	caggaaggag	tgtggtcgag	acagcgtgct	gcaatcactt	accaccgtgt	caggggaatg	4320
	caccagcatt	ggcgcegaca	agcaggcttc	tgccatccag	tgcgaccate	ttcttcagct	4380
	tgagtcagga	gctgatattg	tgaaggcaca	cacagagtgg	cgaccaaaagc	gatcgcacgc	4440
	agcagctgag	aacgcgtaaa	caaacaaacc	gacgaaaatc	tgtgggaggg	agaataatcaa	4500
	acttcccttg	cctctgttgc	cctgaagctt	atcttgaagt	gtgagttgta	ttctgtaaaa	4560
	aattagtagt	ttccatagtg	tgaggttgga	ggggaggtgt	tgggtccttgc	ctactgtacc	4620
	tgtacatct	attatttctt	gattttttgt	tcgctttttt	ttttcttttt	tgtttttaac	4680
	ccctgtggag	ataagacagg	tttgaagtg	tggaagaggt	tgtttcaatc	gtctaattga	4740
	ttcaactatt	cagcaagtaa	actgctccat	ggaatttcat	cgtttggttg	gagcctgag	4799
	<210>	7					
	<211>	4753					
	<212>	DNA					
	<213>	Oryza sativa					
	<400>	7					
	cgcgctcgtgt	gagttggcga	gcccgaggag	cggagcgggc	cacaagtcta	atccgcgtcg	60

tctgcgcggtt	cgtagggcgag	gaggagaaag	aagaggagga	agagagggaa	gggggcttga	120	
tttgatttgg	gcgcgtctcg	tggagtatcc	ggtgagttct	tggcgatctg	gcgaggcgag	180	
tgatgagtga	ttcctgctgc	tgcctgggga	ttttggcgtg	attttcgttg	gttgcatttt	240	
gttttttttt	tttigtatcg	attigtgga	gctttattcg	gtagatctgg	tcgattccat	300	
ggtgagttgt	atcggcgcg	gagtgatagc	tgattctggt	tttttgtgtg	attttttttt	360	
tgttttggaa	atagggtttg	tgtcgaattg	agggcatttt	tttcccttag	gcaatgcagg	420	
atftcgtttt	gtatgttttt	gcgtggaatg	gatatgaaca	gacctcgaac	aaatggaaga	480	
atftgtattt	tgtatgatgg	attgcaatgc	gataacttgt	tggggcgtg	attcgatiga	540	
aataaatgaa	atattagagt	tattttggga	ttcctgtttg	ctgcgccttt	tttttiagca	600	
tttcttgata	tgaacaagag	aagaagggtc	gaattttttt	cttagctttg	gaggcattta	660	
ctgtcccagt	atfttctcct	accggaagca	gaatattttg	tttgattgga	gggttgcctc	720	
cctttgccaa	attgaaatca	atgttctcgg	atgttttaaa	atftccgtgg	actctttttg	780	
ccccagggga	gaccgccttt	agcagctgga	tcctcgtttt	tcatttcaag	ttcttgtttt	840	
cctagtctcc	atatatttct	gattgttaac	tcgtattctc	tacctcacat	atgcaaaatc	900	
acacttgcgt	cgttctgtaa	ttagttagat	tctgcaagaa	aaatccggaa	ttttcaagca	960	
tgetagtagt	tttaaatgga	tgcctatgtt	tttagacaat	gttaattgat	gccatattgac	1020	
talaggacac	attatattgc	gtttctgaat	ataccacctc	atgaaactca	taatttttgt	1080	
[0012]	gattaattgt	tcaggttgcc	ccttctagtg	tgttaacttg	agcaaatgtg	gacctgaga	1140
cgcaaatcag	tcattgctgg	ttctcttggc	gcgtctgcat	tcttccctgt	cccagggtct	1200	
tcctctgcag	cttccgctag	aagctctaa	aacacaaccg	gtgaattgcc	agagaatttg	1260	
agtgtccgcg	gaatcgtcgc	gaagccta	ccgtctccag	gggccatgca	agtcaaggcg	1320	
caggcgcaag	cccttccata	gtttaatgga	accaaggtta	acctgaagac	tacaagccca	1380	
gacaaggagg	atataatacc	gtacactgct	ccgaagacat	tctataacca	attgccagac	1440	
tggagcatgc	ttcttgcagc	tgtcacgacc	atfttctctg	cagctgagaa	gcagtggact	1500	
ctgcttgact	ggaagccgaa	gaagcctgac	atgettgctg	acacattcgg	ctttgttagg	1560	
atcatccaag	acgggcttgt	gtttaggcaa	aaacttctga	ttcggctcta	cgagatttgt	1620	
gctgategta	cagcttctat	tgagacatta	atgaatcatt	tacaggtgat	acaatggagc	1680	
tatgtctgct	tagcttttct	tccttatttt	tcactattgg	tacattatgt	tcgtggcata	1740	
ctaactgtaa	tttgaagctt	tgcaggaaac	agctctgaac	catgtgaaaa	ctgctggctc	1800	
cttaggtgat	gtttttgtgt	ctacgccgga	gatgagcaaa	cggaaactta	tatgggttgt	1860	
cagcaaaatt	cagcttcttg	ttgagcgata	cccatcatgg	tactttttct	gcaatecact	1920	
actctccaca	tcattttctt	ggatggcaaa	acttctcttt	ttactcttaa	ttcataacat	1980	
tttttctatt	cttaatggag	tacttttctc	cccgttgcct	ttagtgtcac	aatttaatgt	2040	
ttacatggta	cgggaaagat	ttatcactca	atatccacgg	tgtaatgttt	ttagctaaac	2100	

tcaatatcca	cggtgtaatg	tttttagcta	aacttgcott	cagtcctttt	ttcctttttc	2160	
cciatgtttg	tgtgctgtgg	cattcgatgg	atcategaga	ctctgagtag	acgtagatte	2220	
ttgcaltcct	lafgegacal	gaggeacaig	ttcgagtgtt	talccacceta	catgaaaacc	2280	
tttccctaet	aagttgetgc	ttctattgtt	ctgcagatat	aageaatatt	tttgcctatt	2340	
tttctgttgc	tttgaacttc	tcgttaggtc	atggcccaca	accitttagca	ggeatagtgc	2400	
cttgaatgg	agtattacac	tcaaaaagcat	aacaataaca	tgtattgcct	tgtatgataa	2460	
gatgagtgat	agatcttttg	aaatcattta	ctgaggaaaa	cgtttgttta	tttgacaaga	2520	
caatgtattg	atgaactaga	actgctctat	taagtggat	ctgccctgtg	tctcctttcg	2580	
tacaaattgt	tgcaccctg	ttcatgttac	ttctcacttt	tcaccatgge	aggcatgttt	2640	
agaaaatcat	ttgattttac	agggcattac	catgtgacce	cttaataact	aacaaatata	2700	
ttttgggtcc	accaaatctg	tggtagatgg	aaagggaaat	taataaacac	aatggaaaa	2760	
ttcttcattg	tgaaacgtga	taaggacaaa	ttttgtgaat	aaataaagta	acaaaaaatg	2820	
getaglatll	gcclacalat	agaglacacc	icaagagala	ngaaaagttg	cclllatllga	2880	
tggagtaatt	gaattagtag	taagcaataa	attctgtgga	cctaggggac	atccctgacc	2940	
tagatcgagt	tttgatctca	tgtacatttt	aatcttccat	gtcagcaact	ttcagtacct	3000	
gctattaaat	ttcccctgtt	cttctgacga	ttgatgcaat	ttaagtitta	tgagaaggaa	3060	
aacggtctgc	tgtttttgaa	ttctgaatgt	agtttacaca	atttctcata	ggtgaaatt	3120	
[0013]	ttggttgcaa	atllttaggg	gagalatggt	ccaagtggac	acatgggtag	ctgetgctgg	3180
caaaaatgge	atgctctgag	attggcaigt	tcgggaactac	aactctggtc	aaacaatctt	3240	
gagggtctaca	aggtttgtgt	ttatcgtttg	catttgttgc	atttcttttg	tttcatgctg	3300	
tttaccagea	tgttttatte	cttttcgatt	gctaattggt	cctctcttgt	ttgcagtgtt	3360	
tgggtgatga	tgaataagaa	cactagaaga	ctttcaaaaa	tgccagatga	agttagaget	3420	
gaatalaggcc	cgtatllcaa	tggecgtlcl	gcialatcag	aggagcaggg	tgaaaagttg	3480	
ectaaagccag	ggaccacatt	tgtgcttgtt	accgtcattc	attttgctgg	tgtttctcat	3540	
gcataaaatt	tctcatgagg	gatcctttgt	tcatgtcage	cgaagtggag	tgacctgat	3600	
gtcaaccagc	atgtgaacaa	tgtgaagtat	attggttggg	tacttgaggt	aaattctttt	3660	
tecttttctc	tateccaaca	tgtatctct	agatcagaaa	agagagtgtc	tgatcgtaat	3720	
taglaacctl	gllcctagtc	alafgccaag	cigtaaaaac	acttgcactg	talatlcaaa	3780	
agctattea	atttctgagt	acgttttgtt	tttttttct	cagagtgtct	caatttcgat	3840	
actggagaag	cacgagcttg	caagcatgac	cttgatttac	aggaaggagt	gtggccgtga	3900	
cagtgtgctt	cagtcgetta	ccgctgtttc	aggfgaatgc	gatgatggca	acacagaatc	3960	
ctccatccag	tgtgaccate	tgtctcagct	ggagtccgga	gcagacattg	tgaaggctca	4020	
cacagagtgg	cgaccgaagc	gagctcaggg	cgaggggaac	atgggctttt	tcccagctga	4080	
gagtgcatal	gcgcttctgt	agtttatccg	gcaagtaacc	tctttgagaa	gtgcagatcc	4140	
taacttggct	agcaacacag	gacaaatgat	tgttgggtggg	aaatttggca	tgccgagcct	4200	

gggttttgtg atgcacacag cacacattca gatttgaaga ttgagagatg cttcttattg	4260
gcagcttggt cagaaagatg actaagcggf ttgggataaa atcagctgat tgggaaacat	4320
tagcaggatg ataageatga ctgggtgtac caatgaaaag ggttgaatc ctttgcattg	4380
ttcatttgtt gtggagcaag agtggccgca gttgettate acacaggatg atggagggtg	4440
ttgtgtgaag cttattgctg aagctggatt gttttgacc tgtgtttcta aaagaaaagg	4500
gaaaagaaga agctgtgat tgaggccgga gcagcagaga tattacaatc gacatagata	4560
aataagatgt aatactaatt tagcccggt ggtttgtgtg tggagatgca atccattgta	4620
gtaacagcct aacttgtaaa ttcttgceat cttttccta ttaattgaat gaatgaatg	4680
cagacctcct gcgttttcat caataattga aatgacttct gcttcatcaa gaattgaatg	4740
aattgtctgt ctg	4753
<210> 8	
<211> 4441	
<212> DNA	
<213> <i>Oryza sativa</i>	
<400> 8	
gcgatgcgag cctgtgttga cagcggagaa agcagtgtaa tccggtcceg ccaccgcagc	60
cgctccacc tctcttcccg ggcctaatgg ccgcgtctgt aagcgcagca gcagcagcag	120
cagcggagac agcggcagaa gctttgccta aggtcggttt gcttcccgc ctccgcccga	180
[0014] ttcggttgg agttttgccc gtgttcgtcg gcggtttctt ggctggccgg atgaattgtt	240
gtggggaggg ggagggggag gggctctctc acgcactcgc tgcctggattt cggttaggtt	300
tcgcggctgg gggaaatcgc ggggaattca ggatctttgt tttgttagtt cttctttcgg	360
gcggggttgg atctcgagta atctgcgtcg tttatttgc cgcgagattt ggtgttttt	420
ttctctctc cgcctcttc tctctcttc cttctctgt acggtctagt ggtggtctac	480
gggtacggc cgtggtaaaa gtttctctag attttggtc tcttttttt ctttatttta	540
ggcgcttgc tttgcttgc ctgctttgac gtttgaccag cgtttfatcc tctgattatc	600
ttctctgta gtcgtgagca agctatgatt tgcagctaat gatttttgtg cttggattag	660
ataaaagatg cttctcactc ttcttttgtt tccattttct ggaatttgtg atttcttgg	720
gatgataatg ttgtgctgt gttgattcag gttgggatcc tccctattcg cgcgcgtctt	780
tgatttggcg cgtaaagtgt taatccgtac tccggatggc cggeteaate gcccctcgg	840
cgttcttgcc ggggtcggc gggccgcgc gccecaagag cgtcttgggc gagcgccegg	900
acagcctgga cgtccgcgc atcggcggga agccgggctc ctcgtctcgc gccgcccgc	960
tgaggccgg caagacgcgc acccagcgc ccatcccaa ggtgaacggc ggcagttcgg	1020
cgctggcgga tccggagcac gacacgatgt cctctctc ctcctcgcg gcgccgagga	1080
cgttetacaa ccagctcccc gactggagca tctctctcgc agccatcacg accatctct	1140
tggcgcggga gaagcagtgg acgtgctgg actggaagcc gaagcggccc gacatgctca	1200
ccgacacggt cgtttcggc aggatgatac atgaggggt catgttcagg cagaacttct	1260

cgattaggtc ctatgagatc ggggcccgata ggacggcgtc tatagaaacg ctgatgaacc	1320
atitgcaggt gaaatattgt gaattttcag gcgtcggatt getcgggctg ggcatcagaa	1380
cattgaaatg tttttggtt tgatgcagga aaccgcactg aatcatgtga agagcgtgg	1440
getgetagga gatggttttg gctcaacgcc agagatgagt aaacgagact tgttctgggt	1500
tgtcagccaa atgcaggcaa tcggtgagcg ttatccgtgc tggataata ctataatttc	1560
acatacagc atgttcttgg tttgttttc ttacatagtt tgagctcaa atagggtgtt	1620
gcftttctgc tttcgtgta catgacaatt aggaggcaca tagatgtatg gttgctgtc	1680
acagtacgtt acgttagita tagtagctat catcttgett cacagcagtc atggaataac	1740
aggtttaggt aaatggagtt ttcaagttgt ttggcaatga atatgaaaaa gattttccca	1800
agtgtttgta tcaattttaa atggatgagc aactcccate tettaactgt ttttgcatac	1860
ggcattaaat atitgtgcaa ctggtagact ttcagtaaac gatgatgatg cagaagcctc	1920
ctgtgetctt aatattattg atcatgtatc atattttctg tgagatgtta taattgttcg	1980
tgtttgttac ctgaaagtgc catgttgcca ataattaact tcttatctgt gtgcaggggt	2040
gatactgtcg aagtagatac atgggttggg gctcatggta aaaatggaat gcgcagagac	2100
tggeatatac gtgattctgt aacaggccat acaatattga aggetacaag gtttgaatta	2160
ttgtcaactc cataaatact gatgateatg aaaactgtat tagcatctgc tattcaactt	2220
ectaccacac ttallaccac tglitgcata tgaagctag aagttctgtt tcttctgaac	2280
[0015] atattataag ctgccttaca gcaacatgaa getaectatt tgcctaatt gtttgcctaa	2340
tgtgcagtaa atgggttatg atgcacaagc ttacaaggag gctagcaaga attcctgatg	2400
aagtaactac tgaatagag ccatactttt ttgagcatgc ttctattgta gatgaagaca	2460
accagaaact tccaaaactg ccagatattg aaggtgetaa tgtagccaaa tatgtccgga	2520
caggcctgac tgtaagtttt gtggaattat acaagattac agtttacaag tatacaaaa	2580
gtgcatgttt ttcttctatt tttacatct tcttctgtct cataatgcag ccacgatggg	2640
ccgaccttga tatcaatcag catgttaata acgttaaata catagggtgg atcctagagg	2700
taaaaaaagt tcccctatta tttcatctt tattgcccit gctaacacct ctgtcctaga	2760
tgattcttga gggaaaaaaa tgcttcttga agttcagtat gttactttca gaaaaaatat	2820
ccatttgttt ttatttactg taaacactcc atggagttgc tgttaggcat ctttgtcgcg	2880
gtattcatta ttaagttgic acatggtgga gcataacttt gtgttgettt acttgccttt	2940
ttctcttgg gcatacattt agtactattg atggtgtctac ataattcaaa gagattcatt	3000
tatctcgtca tatttcccat atgttatgtt ccaagaattt gggataaac agtaatcaga	3060
agagtaactg atitgttagt actttatttt ttgtgtgtgt gtgtgggggg gggggggggc	3120
tcagatcatg cctatgatta ggcattactg taggagtta gataaacttg gtcaaggtcc	3180
caaaagggtg tgcctatggt tctacaagtg tccacctaac tttatctca agcacgcaac	3240
cacttatctg gcagcttigt actctttcaa gctatacga aaatatctgt tgcactagtt	3300

	ggagaagtaa tgtatcctag cagattttac tacattaggt tggtcaceta cgtacctaac	3360
	cctgtacgct tgttgcttcc gataaagagc ttggctggaa tacttatatg caatttgatc	3420
	acaagtcatt cacittaatic aatftttttt agagtgatca acacctgcat ataatgcata	3480
	tttgectggt tgacaatctg cctgtgtgat gtgtgttttg gaagaagggg aggggtagtc	3540
	atglatgtat ttatccagtg gaccacataa tgaggaaaaa gaaattgttc aggtgaectg	3600
	caacctagat gggcccaaaa caacccaaaa tattagggaa attaacactt caggcatttc	3660
	ctaacataca gaaatattta ttaccaacat gcgcacatgt tgcctaacce taccfttttg	3720
	tectfttttc cectcagagc gcaccaatct ccattctgga gaaacatgag ctggcaagta	3780
	ttgtctgga ttacaagagg gagtgtggcc gagacagcgt gctgcaatca cacactaccg	3840
	tgtacactga ctgcaacaag cactctggac aaaccacttt gcactgtgag catitgetga	3900
	gccctggaatc aggacctacc atcgtcaagg ccaggaccat gtggaggcca aaaggaacca	3960
	ggcccaaga gagtalcatt cctcttctgt cgtgaagcgc gtaaaatctt tcatgtgttg	4020
	atfttgtag caacaacttg gttaaacca gacaagtgg acaacaactt gtgttcteta	4080
	tggaaaggca aaacctggat gaacataacg acggggacgt aagttattta cagacaaaat	4140
	gtaiggattt ggaggagttc aaaagagggg gggggggggg ggggcaagat ggaggtaaaa	4200
	tgcagaaaag acagaaggcg latlgtlcat gatlgtlgt ttacgctttt ccttctatlt	4260
	ttcctttcct tagcaagat atteaattac acagatgggt gttgtaagta ttgaaattgt	4320
[0016]	agctactgct gtacaatggg aagtgaatg cttctcatgc atgtttctgt ctgggetatg	4380
	tctatattat gagcctcga aagcagattg cctggtecga attgtttgaa atftttaagtt	4440
	t	4441

<210> 9
 <211> 1284
 <212> DNA
 <213> *Oryza sativa*

	<400> 9	
	atggctggtt ctcttgcggc gctctcattc ttccctgtcc cagggtcttc ccctgcagct	60
	tggctagaa gctctaagaa cacanceggt gaattgccag agaatttgag tgtcccgga	120
	atcgtcga agcctaatec gctccaggg gccatgcaag tcaaggcga ggcgcaagcc	180
	cttctaagg ttaatggaac caaggttaac ctgaagacta caagcccaga caaggaggat	240
	ataataccgt acactgcicc gaagacattc tataaccaat tgcagactg gagcaigctt	300
	cttgcagctg tcacgacctt ttctctggca gctgagaagc agtggactct gcttgaactg	360
	aagccgaaga agcctgacat gctggctgac acattcggct ttggtaggat catccaagac	420
	gggetggtgt ttaggcaaaa cttcttgatt cgttctacg agattggtgc tgatcgtaca	480
	gcttctattg agacattaat gaatcattta caggaaacag ctctgaacca tgtgaaaact	540
	gctgtctct taggtgatgg ttttggtgct acgccggaga tgagcaaacg gaacttaata	600
	tgggtgtgca gcaaaattca gcttcttgtt gagegatacc cateatgggg agatattgctc	660

	caagttgaca catgggtagc tgcctgctggc aaaaatggca tgcctgcaga ttggcatggt	720
	cgggactaca actctgggtca aacaatcttg agggctacaa gtttttgggt gatgatgaat	780
	aagaacacta gaagactttc aaaaatgccca gatgaagtta gagctgaaat aggccccgat	840
	ttcaatggcc gttctgetat atcagaggag cagggtgaaa agttgcctaa gccagggacc	900
	acatttgatg gcgetgetac caaacaattc acaagaaaag ggettactcc gaagtggagt	960
	gaccttgatg tcaaccagca lglgaacaat glgaaglata ttggltggat actigagagt	1020
	gctccaattt cgatactgga gaagcacgag cttgcaagca tgaccttga ttacaggaag	1080
	gagtggtggc gtgacagtgt gcttcagtgc cttaccgctg tttcaggta atgcatgat	1140
	ggcaacacag aatctctcat ccagtgtgac catctgcttc agctggagtc cggagcagac	1200
	attgtgaagg ctcacacaga gtggcgaccg aagcagctc agggcgaggg gaacatgggc	1260
	tttttccag ctgagagtgc atga	1284
	<210> 10	
	<211> 1500	
	<212> DNA	
	<213> <i>Oryza sativa</i>	
	<400> 10	
	tcatggctgg ttctcttggc gegictgcat tcttccctgt cccagggctt tcccctgcag	60
	cttcggetag aagetetaag aacacaacog gtgaattgce agagaatttg agtgctcggc	120
[0017]	gaatcgtcgc gaagcetaat ccgtctccag gggccatgca agtcaaggcg caggcgcgaag	180
	cccctcctaa ggttaatgga accaaggta acctgaagac tacaagccca gacaaggagg	240
	atataatacc gtacactgct ccgaagacat tctataacca attgccagac tggagcatgc	300
	ttcttgcagc tgtcacgacc attttcttgg cagctgagaa gcagtggtact ctgcttgact	360
	ggaagccgaa gaagcctgac atgctggtg acacattcgg ctttggtagg atcatccaag	420
	acgggctggg gtttaggcaa aacttcttga ttccgtccta cgagattggt gctgatcgt	480
	cagcttctat tgagacatta atgaatcatt tacagtgat acaatggagc tatgctgctt	540
	tagcttttct tttgaagctt tgcaggaaac agctctgaac catgtgaaaa ctgctgttct	600
	cttagtgat ggttttggg ctacgccgga gatgagcaaa cggaaactta fatgggtgt	660
	cagcaaaatt cagcttcttg ttgagcgata cecatcatg atttctcata ggetgaaatt	720
	ttggttgcaa atttttaggg gagatatggt ccaagttgac acatgggtag ctgctgctgg	780
	caaaaatggc atgctctgag attgctatgt tcgggactac aactctggtc aaacaattct	840
	gaggctaca ttgcagtgtt tgggtgatga tgaataagaa cactagaaga ctttcaaaaa	900
	tgccagatga agttagagct gaaataggcc cgtatttcaa tggccgttct gctatatcag	960
	aggagcaggg tgaagattg cctaagccag ggaccacatt tgatggcct gctaccaaac	1020
	aattcacaag aaaaggctt actgtaagtc taaaatttct catgaggat cctttgttca	1080
	tgctagccga agtggagiga ccttgatgct aaccagcatg tgaacaatgt gaagtatatt	1140
	ggttggatac ttgaggtaac ttcttttcc ttttctctat ccgaacatgc fatctctaga	1200

tctgagtagc ttttggTTTT ttttctctcag agtgcctccaa ttctgatact ggagaagcac 1260
 gagcttgcaa gcatgacctt ggattacagg aaggagtgtg gccgtgacag tgtgcttcag 1320
 tcgcttaccg ctgtttcagg tgaatgcgat gatggcaaca cagaatcctc catccagtgt 1380
 gaccatctgc ttcagctgga gtccggagca gacattgtga aggetcacac agagtggcga 1440
 ccgaagcgag ctccagggcga ggggaacatg ggctttttcc cagctgagag tgcattgagc 1500

<210> 11
 <211> 1278
 <212> DNA
 <213> *Oryza sativa*

[0018]

<400> 11
 atggcagggt ctcttgccgc ctccagcatc ttcccaggtc caggctcacc tctgacgca 60
 tcagctagaa gctccaagaa tgctgctgtt accggcgaat tgccggagaa tttgagtgtc 120
 cgtggcattg tegcaaaacc taaccacact cctgcagcca tgcaagtaaa ggacacaggt 180
 caaaccttcc ccaaggttaa tggtacgaag gttaacctca agacgggtga gctgacatg 240
 gaggaaacgg tgccttacag tgctccaaag acgttctata accaactgcc ggattggagc 300
 atgcttcttg cggctattac aaccatcttc ctggcccgag agaagcagtg gacactgctt 360
 gallggaagc caaagaaaac tgacatgctt gttgacacat ttggctttgg taggattacc 420
 caggacggta tgggtgtttg gcagaacttc atgattcggg cctaccagat tgggtctgat 480
 cgtacagctt ctatagagac attgatgaat catttacagg aaacagctct taaccatgtg 540
 aggactgctg gtcttcttgg agatggtttt ggggctacac cggagatgag caaacggaac 600
 ttgatatggg ttgtcagcaa aatccagctt cttgttgagc aatacccgc atggggagat 660
 acggttcaag ttgacacatg ggttgetgct getggcaaaa atggcatgag tcgagactgg 720
 catgttcgtg actacaactc tggccgaaca atcttgagag ctacaagtgt ttgggtgatg 780
 atgcacaaga aaactagaag actttcaaaa atgccagatg aagtttagagc tgaatatggc 840
 ccatatttca atgaccgttc agctataaca gaggagcaga gtgaaaagtt agccaagaca 900
 ggaaataaag ttggtgatga tgctacagag caattcataa gaaaggggct cactcctaga 960
 tggggtgacc tegatgtcaa tcagcatgtg aacaatgta aatataattg gttgatcctt 1020
 gagagtgttc caatttcagt actggagaag catgagcttg caagcatgac cctggattac 1080
 aggaaggagt gtggtcgaga cagcgtgctg caatcactta ccaccgtgtc aggggaatgc 1140
 accagcattg gcgccgaca gcaggcttct gccatccagt gcgaccatct tcttcagctt 1200
 gagtcaggag ctgatattgt gaaggecacac acagagtggc gaccaaagcg atgcacgca 1260
 gcagctgaga acccgtaa 1278

<210> 12
 <211> 897
 <212> DNA
 <213> *Oryza sativa*

<400> 12
 atggcagggt ctcttgccgc ctccagcatc ttcccaggtc caggctcacc tctgacgca 60

tcagctagaa gctccaagaa tgcctgctgtt accggcgaat tgccggagaa ttgagtgtc 120
 tgtggcattg tegcaaaacc taaccacact cctgcagcca tgcaagtaaa ggcacaggct 180
 caaacccctc ccaaggtaa tggtaacgaag gttaacctca agacggtgaa gcctgacatg 240
 gaggaaacgg tgcctcacag tgcctcaaaag acgttctata accaactgcc ggattggagc 300
 atgcttcttg cggtattac aaccatcttc ctgcccagc agaagcagtg gacactgett 360
 gattggaagc cgaagaaacc tgacatgctt gttgacacat ttggctttgg taggatcate 420
 caggacggta tgggttttag gcagaacttc atgattcggc cctacagatc ttggcctgat 480
 cgtacagctt ctatagagac attgatgaat catttacagg aaacggctct taaccatgta 540
 aggactgctg gtcttcttgg agatggtttt ggggctacac cggagatgag caaacggaac 600
 ttgatatggg ttgctagcaa aatccagctt cttgttgagc aatacccgcg atggggagat 660
 atggttcaag ttgacacatg ggtcgtctgt gctggcaaaa atggcatgcg tcgagactgg 720
 catgttcgtg actacaactc tggccgaaca atcttgagag ctacaagtgt ttgggtgatg 780
 atgcacaaga aaactagaag accttcaaaa atgccagatg aagttagagc tgaatataggc 840
 ccatatttca atgaccgttc agctataaca gaggagcaga gtgaaaagtt agcctag 897

<210> 13
 <211> 1284
 <212> DNA
 <213> *Oryza sativa*

[0019]

<400> 13
 atggetgggt ctcttgcggc gctgcattc ttcctgtcc cagggtcttc cctgcagct 60
 tcggctagaa gctctaagaa cacaaccggt gaattgccag agaattgagc tgcctcggga 120
 atcgtcgcga agcctaatec gctccaggg gccatgcaag tcaaggcga ggcgcaagcc 180
 ctctctaagg ttaatggaac caaggttaac ctgaagacta caagccaga caaggaggat 240
 ataataccgt aactgtctc gaagacattc tataaccaat tgccagactg gagcatgctt 300
 cttgcagctg tcacgacctt tttcttgcca gctgagaagc agtggactct gcttgactgg 360
 aagccgaaga agcctgacat gctggctgac acattcggct ttggtaggat catccaagac 420
 gggetggtgt ttaggcaaaa ettcttgatt cggctctacg agattggtgc tgatcgtaca 480
 gcttctattg agacattaat gaatcattc caggaaacag ctctgaacca tgtgaaaact 540
 getggtctct taggtgatgg ttttggtgct acgccggaga tgagcaaacg gaacttaata 600
 tgggttgtea gcaaaattca gcttcttgtt gagegatacc catcatgggg agatatggc 660
 caagttgaca catgggtagc tgcctgctgc aaaaatggca tgcctcaga ttggcatggt 720
 cgggactaca actctggtea aacaatcttg aggctacaa gtgtttgggt gatgatgaat 780
 aagaacacta gaagacttc aaaaatgcca gatgaagtt gagctgaaat agccccgat 840
 ttcaatggcc gttctgctat atcagaggag cagggtgaaa agttgcctaa gccagggacc 900
 acatttgatg gcctgctac caacaattc acaagaaaag ggcttactcc gaagtggagt 960
 gaccttgatg tcaaccagca tgtgaacaat gtgaagtata ttggttgatc acttgagagt 1020

	gctccaatTT cgatactgga gaagcacgag cttgcaagca tgaccttga ttacaggaag	1080
	gagtgtggcc gtgacagtgt gcttcagtgc cttaccgctg tttcaggtga atgcgatgat	1140
	ggcaacacag aatcctccat ccagtgtgac catctgcttc agctggagtc cggagcagac	1200
	attgtgaagg ctcaacacaga gtggcgaccg aagcgagctc agggcgaggg gaacatgggc	1260
	tttttcccag ctgagagtgc atga	1284
	<210> I4	
	<211> 1272	
	<212> DNA	
	<213> <i>Oryza sativa</i>	
	<400> I4	
	atggcgggct caatcgcgc ctoeggcttc ttgcgggggt cgccgggggc cgcgccgcc	60
	aagagcgtcc tgggcgagcg ccggacagc ctggacgtcc gggcctcgc cgcgaagccg	120
	ggctcctcgt cgtcggccgc cgcctgagg gccgcaaga cgcgcacca cgcgccctc	180
	cccaaggTga acggcggcag ttcggcgtg gccgatccgg agcacgacac gatgtcctc	240
	tcctcctcct ccgcggcgc gaggacgttc tacaaccagc tccccactg gagcatgctc	300
	ctcgcagcca tcaagccat ctctttggcc gccgagaagc agtggacgt gctggactgg	360
	aagcgaagc ggcccacat gctcaccgac acgttcggtt tcggcaggat gatacatgag	420
	ggctcatgt tcaggcagaa ctctcgtatt aggtcctatg agatcggggc cgtataggacg	480
[0020]	gegtctatag aaacgtgat gaaccattg caggaaaccg cactgaatca tgtgaagagc	540
	gctggcctgc taggagatgg ttttggctca acgccagaga tgagtaaacg agacttgctc	600
	tgggtgtca gccaaatgca ggcaatcgtt gagegttatc cgtgctgggg tgatactgc	660
	gaagtagata catgggttg tctcatggt aaaaatggaa tgcgcagaga ctggcatata	720
	cgtgattctg taacaggcca tacaatattg aagcctacaa gtaaattgggt tatgatgac	780
	aagcttaca ggaggctagc aagaattcct gatgaagtac gtactgaaat agagccatac	840
	tttttgagc atgcttctat tglagalga gacaaccaga aacttccaaa actgccagat	900
	attgaaggTg ctaatgtagc caaatatgct cggacaggcc tgaactccacg atgggccgac	960
	cttgatatca atcagcatgt taataacgtt aaatacatag ggtggatcct agagagcgea	1020
	ccaatctcca ttctggagaa acatgagctg gcaagtattg tcctggatta caagagggag	1080
	tgtggccgag acagcgtgct gcaatcacac actaccgtgt aactgactg caacaagcac	1140
	tctggacaaa ccactttgca ctgtgagcat ttgctgagcc tggaatcagg acctaccatc	1200
	gtcaaggcca ggaccatgtg gagccaaaa ggaaccaggc cccaagagag tatcattccg	1260
	tcttctcgt ga	1272
	<210> 15	
	<211> 388	
	<212> PRT	
	<213> <i>Oryza sativa</i>	
	<400> 15	

Met Gly Ala Gly Gly Arg Met Thr Glu Lys Glu Arg Glu Glu Gln Gln
 1 5 10 15
 Lys Leu Leu Gly Arg Ala Gly Asn Gly Ala Ala Val Gln Arg Ser Pro
 20 25 30
 Thr Asp Lys Pro Pro Phe Thr Leu Gly Gln Ile Lys Lys Ala Ile Pro
 35 40 45
 Pro His Cys Phe Gln Arg Ser Val Ile Lys Ser Phe Ser Tyr Val Val
 50 55 60
 His Asp Leu Val Ile Val Ala Ala Leu Leu Tyr Phe Ala Leu Val Met
 65 70 75 80
 Ile Pro Val Leu Pro Ser Gly Met Glu Phe Ala Ala Trp Pro Leu Tyr
 85 90 95
 Trp Ile Ala Gln Gly Cys Val Leu Thr Gly Val Trp Val Ile Ala His
 100 105 110
 Glu Cys Gly His His Ala Phe Ser Asp Tyr Ser Val Leu Asp Asp Ile
 115 120 125
 Val Gly Leu Val Leu His Ser Ser Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp
 130 135 140
 Lys Tyr Ser His Arg Arg His His Ser Asn Thr Gly Ser Leu Glu Arg
 145 150 155 160
 Asp Glu Val Phe Val Pro Lys Gln Lys Ser Ala Met Ala Trp Tyr Thr
 165 170 175
 [0021] Pro Tyr Val Tyr His Asn Pro Ile Gly Arg Leu Val His Ile Phe Val
 180 185 190
 Gln Leu Thr Leu Gly Trp Pro Leu Tyr Leu Ala Phe Asn Val Ser Gly
 195 200 205
 Arg Pro Tyr Pro Arg Phe Ala Cys His Phe Asp Pro Tyr Gly Pro Ile
 210 215 220
 Tyr Asn Asp Arg Glu Arg Val Gln Ile Phe Ile Ser Asp Val Gly Val
 225 230 235 240
 Val Ser Ala Gly Leu Ala Leu Phe Lys Leu Ser Ser Ala Phe Gly Phe
 245 250 255
 Trp Trp Val Val Arg Val Tyr Gly Val Pro Leu Leu Ile Val Asn Ala
 260 265 270
 Trp Leu Val Leu Ile Thr Tyr Leu Gln His Thr His Pro Ala Leu Pro
 275 280 285
 His Tyr Asp Ser Ser Glu Trp Asp Trp Leu Arg Gly Ala Leu Ala Thr
 290 295 300
 Val Asp Arg Asp Tyr Gly Ile Leu Asn Lys Val Phe His Asn Ile Thr
 305 310 315 320
 Asp Thr His Val Ala His His Leu Phe Ser Thr Met Pro His Tyr His
 325 330 335
 Ala Met Glu Ala Thr Lys Ala Ile Arg Pro Ile Leu Gly Glu Tyr Tyr
 340 345 350
 Gln Phe Asp Pro Thr Pro Val Ala Lys Ala Thr Trp Arg Glu Ala Lys
 355 360 365

Glu Cys Ile Tyr Val Glu Pro Glu Asp Asn Lys Gly Val Phe Trp Tyr
 370 375 380
 Asn Asn Lys Phe
 385
 <210> 16
 <211> 362
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa
 <400> 16
 Met Gln Arg Ser Pro Val Asp Lys Pro Pro Phe Thr Leu Gly Asp Ile
 1 5 10 15
 Lys Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe His Arg Ser Val Ile Lys Ser
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Leu Leu His Asp Leu Ala Ile Ala Ala Gly Leu Leu Tyr
 35 40 45
 Phe Ala Leu Val Gly Ile Pro Ala Leu Pro Ser Ile Leu Arg Leu Val
 50 55 60
 Ala Trp Pro Leu Tyr Trp Ala Ala Gln Gly Ser Val Leu Thr Gly Val
 65 70 75 80
 Trp Val Ile Gly His Glu Cys Gly His His Ala Phe Ser Asp Tyr Leu
 85 90 95
 Leu Leu Asp Asn Leu Val Gly Leu Val Leu His Ser Ala Leu Leu Thr
 100 105 110
 [0022] Pro Phe Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Arg Arg His His Ala Asn Thr
 115 120 125
 Gly Ser Met Glu Lys Asp Glu Val Tyr Val Ala Lys Lys Lys Ser Ala
 130 135 140
 Leu Pro Trp Tyr Thr Pro Tyr Val Phe Gly Asn Pro Val Gly Arg Leu
 145 150 155 160
 Val Tyr Ile Ala Leu Gln Leu Thr Leu Ala Trp Pro Leu Tyr Leu Ala
 165 170 175
 Phe Asn Leu Ser Gly Gln Pro Tyr Pro Arg Leu Val Thr Cys His Tyr
 180 185 190
 Asp Pro Tyr Ser Pro Leu Phe Ser Asp Gln Glu Arg Val Gln Val Leu
 195 200 205
 Val Ser Asp Ala Ala Ile Leu Ala Val Leu Leu Ala Leu His Arg Leu
 210 215 220
 Thr Ala Ala Tyr Gly Leu Trp Trp Val Val Arg Val Tyr Gly Val Pro
 225 230 235 240
 Val Met Ile Val Gly Ala Leu Phe Val Leu Ile Thr Tyr Leu His His
 245 250 255
 Thr His Arg Ala Leu Pro His Tyr Asp Ser Ser Glu Trp Glu Trp Leu
 260 265 270
 Arg Gly Ser Leu Ala Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly Val Leu Asn Arg
 275 280 285
 Val Leu His Asn Val Thr Asp Thr His Val Leu His His Leu Phe Pro

Gly Phe Trp Trp Val Val Arg Val Tyr Gly Val Pro Leu Leu Val Val
 260 265 270
 Asn Ala Trp Leu Val Val Val Thr Tyr Leu His His Thr His Arg Ala
 275 280 285
 Ile Pro His Tyr Asp Ser Ser Glu Trp Asp Trp Leu Arg Gly Ala Leu
 290 295 300
 Ala Thr Val Asp Arg Asp Tyr Ser Phe Leu Asn Arg Val Phe His Asn
 305 310 315 320
 Ile Thr Asp Thr His Val Val His His Leu Phe Pro Thr Ile Pro His
 325 330 335
 Tyr His Ala Val Glu Ala Thr Lys Ala Ile Arg Pro Ile Leu Gly Glu
 340 345 350
 Tyr Tyr Gln Phe Asp Pro Thr Pro Ile Val Lys Ala Ile Trp Arg Glu
 355 360 365
 Ala Lys Glu Cys Ile Tyr Ile Gln Ser Glu Asp His Lys Gly Val Phe
 370 375 380
 Trp Tyr Ser Asn Lys Phe
 385 390
 <210> 18
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> *Oryza sativa*
 <400> 18

[0024]

Met Ala Gly Gly Arg Arg Trp Gly Gly Trp Arg Glu Gln Glu Pro Pro
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Gly Ser Ser Ala Ala Val Gln Arg Phe His Arg Ser Val
 20 25 30
 Ile Lys Ser Phe Ser Tyr Leu Leu Arg Asp Val Ala Ile Ala Ala Gly
 35 40 45
 Leu Leu Asn Phe Ala Leu Val Gly Ile Pro Val Leu Pro Ala Gly Val
 50 55 60
 Leu Arg Pro Pro Arg Arg Leu Ala Val Leu Leu Gly Arg Ala Gly Leu
 65 70 75 80
 Leu Pro Val Arg Gly Val Asp His Arg Ala Arg Val Arg Ala Pro Arg
 85 90 95
 Ala Pro Arg Arg His Pro Arg Ser Gly Pro Ala Leu Val Ala Ser Gly
 100 105 110
 Thr Ile Leu Leu Val Glu Ile Gln Pro Pro Ala Ala Pro Leu Gln His
 115 120 125
 Gln Leu Thr Gly Ala Arg Arg Gly Val Arg Pro Gln Val Gln Val Arg
 130 135 140
 Ser Ala Val Glu Leu Pro Val Arg Val Gln Val Gln Gln Arg Pro Val
 145 150 155 160
 Ala Arg Leu Leu Leu Leu Gly Met Gln Leu Thr Val Gly Trp Pro Met
 165 170 175
 Tyr Leu Val Phe Asn Thr Trp Gly Arg Trp Tyr Pro Arg Phe Ala Ser
 180 185 190

His Phe Asp Pro Ser Gly Ala Ile Tyr Met Arg Arg Glu Arg Val Phe
 195 200 205

Ile Ala Ile Ser Asp Ile Gly Met Leu Ala Val Ser Leu Ala Leu
 210 215 220

<210> 19
 <211> 1267
 <212> DNA
 <213> *Oryza sativa*

<400> 19
 acggtggtgg aggggaagaa acaggageta ctactcgcgc gticcgcgag cagcgcagcc 60
 atgcagcgct caccggtgga caaacgcgcg ttcacgetgg gggacataaa gaagccatc 120
 ccgcgcgact gcttccaccg ctcctgatec aagtcattct cctacctgct ccacgacctt 180
 gccatcgccg ctggcctcct ctactttgct ctggtcgga tccctgccct cccaagcatc 240
 ctcgcctcgc tcgctcggcc gctctactgg gccgcgcagg gcagtgtact caccgcgctg 300
 lgggtcctcg ggcaagagt lggccaccac gccctctcgg actacttctt cctcgacaac 360
 ctcgtgggcc tagtgcctca ctcggcctt ctcacgcct tcttctcgtg gaagtacagc 420
 caccggcgcc accacgccaa caccggctcc atggagaaag acgaggtgta cgtcgcgaag 480
 aagaagtcgc cgtgcctggt gtacaccccg taagtgttcg gcaaccccg cgggcgctg 540
 gfgtacctcg cccctcagct caccctcgcg lggccactct accctcgttt caacctctcc 600
 gggcagcctg acccagcct cgtcacctgc cactacgacc cctacagccc gctgttcagc 660
 gaccaggagc ggtccaagt cctcgtctcc gacgcgcgca tccctggcct gctgctcgcg 720
 ctgcacaggc tgacggcggc gtacgggctc tggctgggtg tgccgctgta cggcgtcgcg 780
 gtgatgatcg tgggcgcgct gttcgtgctc atcacgtacc tgcaccacac ccaccggcgc 840
 ctccgcgact acgactccag cgagtgggag tggtcgcgtg gctcgcctgc caccgtcga 900
 cgcgactacg gcgtcctcaa ccgcgtgctg cacaacgtca cggacacgca cgtcctccac 960
 cactcttcc ccagcatgcc aactaccac gccatggagg ccaccagggc agcgaggccc 1020
 gtctcgggtg agtaclaaa gtttgaccgc acgccatca tcgaggcaac atggcgtgag 1080
 gccaaaggag gcatgtactg tgagcccagg gacgcgatg gtatctactg gtacaacaac 1140
 aagttttagc tacagacagg ggatgagatt aagatatgat tataagtttt atatacttgg 1200
 gtatgtcact gcttctgaat aatatggtg ctggtctcac aataattaat taaggggacc 1260
 ggccaac 1267

[0025]

<210> 20
 <211> 1491
 <212> DNA
 <213> *Oryza sativa*

<400> 20
 cctcctctcc tctcctcctg cacagaccac tcgttctctc cacaaagagg gagggacaaa 60
 gggaaaggtg tcgcccgcgc cccaccccca tctgcctcgc ccgctccgct cctcgcgcgc 120
 tgcgaaatct accaacgcta actcagcaag atgggtgccc gcggcaggat gacggagaag 180

gagcgggagg agcagcagaa gctgctcggc cgcgccggca atggcgcggc cgtgcagcgg	240
tcgcgcacgg acaagccgcc gttcacgctg gggeagatca agaaggccat cccgcctcac	300
tgcttcacgc gctcgggatg caagtccttc tctacgtgg tccatgacct cgtgatcgtc	360
gccgcgctgc tctacttcgc gctggctcag atcccctgce tgcgcagcgg gatggagttc	420
gcggcatggc cgcctctactg gatcgcgcag ggcctcgtgc tcaccggcgt gtgggtcate	480
gcgcacgagt gcggccacca tgccttctcc gactactcgg tgctegacga catcgtcggc	540
ctcgtgetgc actcgtcget gctcgtccc taactctcgt ggaagtacag ccaccggcgc	600
caccactcca acaccgggtc gctggagcgc gacgaggigt tcgtcccga gcagaagtgc	660
gcgatggcgt ggtacacccc gtacgtgtac cacaacccga tcggccggct ggtgcacatc	720
ttcgtgcagc tcaccctcgg gtggccgctg taactggcgt tcaacgtgc cggccgcccg	780
taccgcgct tcgcgtgcca ctccgacccc taaggcccga tctacaacga ccgggagcgc	840
gtccagatct tcattccga cgtcggcgtc gtgtcccggg ggctcgcct gttcaagctg	900
tcgtcggcgt tcgggtctg gtgggtgggt cgcgtctac gcgtcccgt cctgatcgtg	960
aacgcgtggc tgggtctcat cactacctg cagcaacccc acccggcgt gccgcactac	1020
gactcagcgc agtgggactg gctccgcggc gcctggcca ccgtggaccg cactacggc	1080
atctcaaca aggtgttcca caacatcac gacacgcacg tcgcgcacca cctctctccc	1140
accatgcgcg actaccacgc catggaggcc actaaggcga tcgcgccat cctcggcgag	1200
[0026] tactaccagt tcgaccgac gcccgctgcc aaggcgacat ggccgcaggc caaggagtgc	1260
atctacgtcg agcctgagga caacaagggc gtctctgggt acaacaacaa gttctaactg	1320
ctgtctctgt gaaatcagca tcacacatcc atagccaagc agcaaacaaa ttgagaag	1380
aagattacaa gggaagagaa gatagtgtct tcggaaatcg tcgtagcaag tatccatcca	1440
tccatccaac ccatgaacaa tcgtctatct atccatgcat ctatctatgg t	1491
<210> 21	
<211> 1361	
<212> DNA	
<213> <i>Oryza sativa</i>	
<400> 21	
ttgatgaacg tgttgactga ttgcttcgtg taattgcggt cagcagcagt acgtatgggt	60
accagcagcc ggccgacgac ggtgaaggag gggaagaaac tagaggcgc cgcctgccc	120
ggcagccatg cagccgtgaa gcgctctccg gtggacaagc cgccttcac cctgggcgac	180
atcagaaagg ccatccaccc gcactgcttc caccgctccg tgatcaagtc attctctac	240
ctgctccacg accttgccat tgcgcgggce ctctctact ttgctctgggt cgtcatccct	300
gccctcccag gcgtctccg cctcgtcgcg tgccgcttct actgggcccgc gcaggggtgc	360
ttcctgttcg ggggtgtgat catcgcgcac gactcgggce accacgcgtt ctggggccc	420
gcactcctcg acgacaccct cggcctggtc ctgcactcat ggctcctagc gccatacttc	480
tcgtggaaat acaccaccca acggcaccac tccaacacca gctcacagga gcgcgacgag	540

gtgttcgtcc ccaggttcaa gtccgacctg ccgtggact ccccatacct gtacaagtac 600
 aacaaccccg tegctegget gctgctcctc gtctgtcagc tcacegtcgg gtggccgatg 660
 tatttgggtg tcaacacctg gggtcgccag tacccaaggt tggccagcca ctccgatccc 720
 tctgggcccc tctacaaggg gggggagcgc gtcttcatcg ccactctgga catcggcgatg 780
 ctggccgtgt cgctcgcgct gtacaggctt ggggagggtt acgggttttg gtgggtggtg 840
 cgcgtctacg gcgtgccgct gcttgtcgtc aacgcgtggc ttgtggctgt cacgtacctg 900
 catcacactc accgggcgat cccacactac gaectcagcg agtgggactg gttgcgcggg 960
 gcgctcgcca ccgtggaccg cgactacagc ttcttaace gagtgtttca caacatcacg 1020
 gacacacacg tegtgcacca cctgttccct accatcccgc actaccagc tgtggaggcg 1080
 accaaggcga tccgcctfat cctcggcgag tactaccagt tggatccac acccatcgtc 1140
 aaggcgatat ggccgcaggc taaggagtgc atctacatcc agtccgagga ccacaagggc 1200
 gtcttctggt acagcaaaa gttctagtac ctgtagcagc ggcaagcggg cgtataggaa 1260
 gggetgacag aattagccat gtgggtcttg cctcctcgtc tcattataac ccataateta 1320
 cttgaagtct tgaattaatt gtaaacctca atgaaattcc c 1361

<210> 22
 <211> 1173
 <212> DNA
 <213> *Oryza sativa*

[0027]

<400> 22
 atgggtacca gcagccggcc gacgacgggt aaggagggga agaaactaga ggcgccccgc 60
 cgtgccggca gccatgcagc cgtgaagcgc tctcgggtgg acaagccgcc gttcacgctg 120
 ggcgacatca gaaaggccat cccaccgcac tgettecacc gctcctgat caagtcattc 180
 tctacctgc tccacgacct tgccattgcc ggggectcc tctactttgc tctggctcgc 240
 atcctgccc tcccaggcgt cctccgctc gtccctggc cgttctactg gcccgcgcag 300
 ggggtcttcc tgttcgggtg gtggatcacc gcgcacgagt gcgggcacca cgcgttctcg 360
 ggccacgcac tctcagcga caccctcggc ctggctctgc actcatggct cctagcgcga 420
 tacttctcgt ggaatacac ccaccaacgg caccactcca caaccagctc acaggagcgc 480
 gacgaggtgt tegtcccag gtteaagtc gacctgcctt ggtactccc atactgttac 540
 aagtacaaca acccctcgc teggtctctg ctctctctg tgcagctca cgtcgggtgg 600
 ccgatgtatt tgggtttcaa cacctgggtg cgccagtagc caaggttcgc cagccacttc 660
 gatccctctg ggccatcta caagggcgg gagcgcgtct tcatcgccat ctggacatc 720
 ggcattctgg ccgtgtcct cgcctgttac aggtctcgg agggttacgg gttttggtgg 780
 gtggtgcgcg tctacggctg gccctgctt gtctgcaacg cgtggcttgt gtcctcacg 840
 tacctgcacc aactcaccg ggcgatccc aactacgact ccagcagtg gactggttg 900
 cgcggggcgc tgcaccctg ggaccgcgac tacagcttcc ttaaccgagt gtttcacaac 960
 atcacggaca cacacgtctg gcaccacctg ttccctacca tcccgcacta ccacgtctg 1020

gaggcgacca aggcgatecg cccatatectc ggcgagtact accagttcga tcccacaccc 1080
 atcgtcaagg cgatatggcg cgaggctaag gagtgeatct acatecagtc cgaggaccac 1140
 aaggcgctet tctggtacag caacaagttc tag 1173

<210> 23
 <211> 672
 <212> DNA
 <213> *Oryza sativa*

<400> 23
 atggcgggcg gacggcggtg gggcggatgg cgtgaacagg agccgcctcg ccgtgccggc 60
 agcagtgacag ccgtgcagcg ettcaccgc tccgtgatca agtcattctc ctacctgctc 120
 cgtgacgtag ccattgccgc gggectctc aactttgcgc tggtcggcat cctgtctctc 180
 cctgcaggcg tccctccggcc gctctgctgc ctggccgttc taetgggccc cgcagggctg 240
 cttctgttcc gtgggtgga tcctcgcga cgagtgcggg caccacgcgc tccaagacga 300
 caccctcggc ctggctctgc acttggtggt tctggacca tacttctctg gaaatacag 360
 ccaccagcgg caccacteca acaccagctc acaggagcgc gacgaggtgt tegtcccag 420
 gttcaagtc gatctgccg ggaactcccc gtacgtgtac aagtacaaca acgcccctgc 480
 gcccgctac tgctcctcgg catgcagctc actgtcgggt gccgatgta tttgggttcc 540
 aacacctggg gtcgctggta cccgcggttc gccagccact tgatecctc cggagccatc 600
 [0028] tacatgagc gggagcggc ctteatgcc atctcggaca tcggcatgct ggccgigtgc 660
 ctgcgctgt aa 672

<210> 24
 <211> 1167
 <212> DNA
 <213> *Oryza sativa*

<400> 24
 atgggtgccg gcggcaggat gacggagaag gagcgggagg agcagcagaa gctgctcggc 60
 cgcgccgcca atggcgcggc cgtgcagcgg tcgccgacgg acaagccgcc gttcacgctg 120
 gggcagatca agaaggccat ccccccacac tgcctccagc gctcggatgat caagtcttcc 180
 tctaacgtgg tccatgacct cgtgatcgtc gccgcgctgc tctacttccg cctggctcatg 240
 atcccctgctc tgccgagcgg gatggagttc gcggcatggc cgtctctactg gatcgcgcag 300
 ggtcgcgtgc tcaccggcgt gtgggtcctc gcgcacagat geggccacca tgccttctcc 360
 gactactcgg tgctcgaaga catcgtcggc ctctgtctgc actcgtctct gctctctccc 420
 tacttctctg gaaagtacag ccaccggcgc caccactcca acaccgggtc gctggagcgc 480
 gacgaggtgt tegtcccga gcagaagtgc gcgatggcgt ggtacacecc gtacgtgtac 540
 cacaaccgca tcggccggtt ggtgcacatc ttcgtgcagc tcaccctcgg gtggccgctg 600
 tacttggcgt tcaactgttc cggccgcccg taccccgctc tcgctgcca ctctgacccc 660
 tacggcccga tetacaacga ccgggagcgc gtccagatct tcatctccga cgtcggcgtc 720

gtgtccgcgg ggctcgcct gtteaagctg tctcggcgt tcgggttctg gtgggtggtg 780
 cgcgtctaac gcgtgccgt gctgatctg aacgcgtggc tgggtctcat cactacctg 840
 cagcacacc acccggcgt gccgcactac gactcgagcg agtgggactg gctccgggc 900
 gcctgggcca ccgtggacc cgactacgga atcctcaaca aggtgttcca caacatcac 960
 gacacgcacg tcgcgcaeca cctctctcc accatgccgc actaccacgc catggaggcc 1020
 actaaggcga tccgcccct cctcggcgg tactaccagt tcgacccgac gcccgctgcc 1080
 aaggcgacat ggcgcgagge caaggagtgc atctacgtcg agcctgagga caacaagggc 1140
 gtctctggt acaacaaca gttctaa 1167

<210> 25
 <211> 1089
 <212> DNA
 <213> *Oryza sativa*

[0029]

<400> 25
 atgcagcgt caccggtgga caaacgccg ttcacgtgg gggacataaa gaaggccatc 60
 ccgcgcact gcttccacc ctccgtgatc aagtcattct cctacctgct ccacgacctt 120
 gccatgcgc ctggcctct ctactttgct ctggctggca tccctgcctt cccaageatc 180
 ctccgcctcg tcgctggcc gctctactgg gccgcgcagg gcagtgtact caccggcgtg 240
 tgggtcatcg ggcaagagt tggecaccac gccctctcgg actacttctt cctcgacaac 300
 ctctggggc tagtgtcca ctccggcctt ctacgccct tottctctg gaagtacagc 360
 caccggcggc accacgcaa caccggctcc atggagaaag acgaggtgta cgtcgcgaag 420
 aagaagtccg cgtcgcgtg gtacacccg tacgtgttc gcaaccccg cggcggtg 480
 gtgtacatg cctcgcagt caccctcgc tggccaactt acctcgcgtt caacctgtcc 540
 gggcagccgt acccaagcct cgtcaccgc cactacgacc cctacagccc gctgttccgc 600
 gaccaggagc gcgtccaagt cctcgtctcc gacgccgcca tcttgcccgt gctgctcggc 660
 ctgcacaggc tgacggcggc gtaaggctc tgggtgggtg tgcgcgtgta eggcgtgccg 720
 gtgatgatc tgggcgcgt gttcgtctc atcacgtacc tgcaccacac ccaccgggcg 780
 ctccgcact acgactccag cgagtgggag tggctcgtg gctcgtcgc caccgtcagc 840
 cgcgactacg gcgtctcaa ccgcgtgct cacaacgtca eggacagca cgtctctcac 900
 cactcttcc ccagcatgcc aactaccac gccatggagg ccaccagggc agcgagccc 960
 gtcctcgtg agtaataaa gtttgaccgc acgcccata tcgaggeaac atggcgtgag 1020
 gccaaaggat gcatgtact tgagcccagg gagcgcgat gtatctact gtacaacaac 1080
 aagttttag 1089

<210> 26
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> FatB consensus sequence

<400> 26

Asn Gln His Val Asn Asn
1 5

<210> 27

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Fad2 consensus sequence

<400> 27

Phe Ser Tyr Val Val His Asp Leu Val Ile Val Ala Ala Leu Leu Phe
1 5 10 15

Ala Leu Val Met Ile
20

<210> 28

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Fad2 consensus sequence

<400> 28

Ala Trp Pro Leu Tyr Ile Ala Gln Gly Cys Val Leu Thr Gly Val Trp
1 5 10 15

[0030]

Val Ile Ala

<210> 29

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Fad2 consensus sequence

<400> 29

Ile Ser Asp Val Gly Val Ser Ala Gly Leu Ala Leu Phe Lys Leu Ser
1 5 10 15

Ser Ala Phe Gly Phe
20

<210> 30

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Fad2 consensus sequence

<400> 30

Val Val Arg Val Tyr Gly Val Pro Leu Leu Ile Val Asn Ala Trp Leu
1 5 10 15

Val Leu Ile Thr Tyr Leu Gln

20

<210> 31
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fad2 consensus sequence

<400> 31

His Glu Cys Gly His His
 1 5

<210> 32
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fad2 consensus sequence

<400> 32

His Arg Arg His His Ala
 1 5

<210> 33
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

[0031]

<220>
 <223> Fad2 consensus sequence

<400> 33

His Val Ala His His
 1 5

<210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleotide primer

<400> 34
 cgctgctacc aaacaattca

20

<210> 35
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleotide primer

<400> 35
 ttctgtgttg ccatcatcg

19

<210> 36
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

	<220>		
	<223>	Oligonucleotide primer	
	<400>	36	
		caggaaataa agttggtgat gatg	24
	<210>	37	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleotide primer	
	<400>	37	
		cttcacaata tcagctctg actc	24
	<210>	38	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleotide primer	
	<400>	38	
		caggaaataa agttggtgat gatg	24
	<210>	39	
	<211>	21	
[0032]	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleotide primer	
	<400>	39	
		cttcacaatg tcagcctca c	21
	<210>	40	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleotide primer	
	<400>	40	
		acaggcctga ctccacgat	19
	<210>	41	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleotide primer	
	<400>	41	
		gtccagagtg ctgttgcag	20
	<210>	42	

	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleotide primer	
	<400> 42	
	taeccactec ctccttgagc	20
	<210> 43	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleotide primer	
	<400> 43	
	aggcactgtt ggtgatctcg	20
	<210> 44	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleotide primer	
	<400> 44	
	cacaaagagg gaggaacaa	20
[0033]	<210> 45	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleotide primer	
	<400> 45	
	gaaggacttg atcaccgagc	20
	<210> 46	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleotide primer	
	<400> 46	
	cacaacatca cggacacaca	20
	<210> 47	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleotide primer	
	<400> 47	
	gcaagaccga catggctaat	20

	<210> 48	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleotide primer	
	<400> 48	
	acgtectcca ccaactctt	19
	<210> 49	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleotide primer	
	<400> 49	
	cagaagcagt gacataccca ag	22
	<210> 50	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleotide primer	
[0034]	<400> 50	
	taccactcc etccttgagc	20
	<210> 51	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleotide primer	
	<400> 51	
	aggcactggt ggtgatctcg	20
	<210> 52	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleotide primer	
	<400> 52	
	aaaggatcct ctagaggag gagcagcaga agc	33
	<210> 53	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleotide primer	

	<400> 53 aaaactagtg aattctacac gtacggggtg tacca	35
	<210> 54 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial	
	<220> <223> Oligonucleotide primer	
	<400> 54 agtcatggct ggttctcttg eggc	24
	<210> 55 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial	
	<220> <223> Oligonucleotide primer	
	<400> 55 accatcacct aagagaccag cagt	24
	<210> 56 <211> 16 <212> PRT <213> Oryza sativa	
[0035]	<400> 56 Cys Gly Met Asn Lys Asn Thr Arg Arg Leu Ser Lys Met Pro Asp Glu 1 5 10 15	
	<210> 57 <211> 10 <212> PRT <213> Oryza sativa	
	<400> 57 Thr Arg Arg Leu Ser Lys Met Pro Asp Glu 1 5 10	
	<210> 58 <211> 17 <212> PRT <213> Oryza sativa	
	<400> 58 Cys Gly Glu Lys Gln Trp Thr Leu Leu Asp Trp Lys Pro Lys Lys Pro 1 5 10 15 Asp	
	<210> 59 <211> 16 <212> PRT <213> Oryza sativa	

	<400> 65 gcugcucggc cgcgcggc	19
	<210> 66 <211> 19 <212> RNA <213> Artificial	
	<220> <223> RNAi molecule	
	<400> 66 uggcgcggcc gugcagcgg	19
	<210> 67 <211> 19 <212> RNA <213> Artificial	
	<220> <223> RNAi molecule	
	<400> 67 gccgccguuc acgcugggg	19
	<210> 68 <211> 19 <212> RNA <213> Artificial	
[0037]	<220> <223> RNAi molecule	
	<400> 68 gaaggccauc ccgccucac	19
	<210> 69 <211> 19 <212> RNA <213> Artificial	
	<220> <223> RNAi molecule	
	<400> 69 ggccaucgcc ccucacugc	19
	<210> 70 <211> 19 <212> RNA <213> Artificial	
	<220> <223> RNAi molecule	
	<400> 70 guccuucucc uacgugguc	19
	<210> 71 <211> 19 <212> RNA <213> Artificial	
	<220> <223> RNAi molecule	

	<400> 71 guacagccac cggcgccac	19
	<210> 72 <211> 19 <212> RNA <213> Artificial	
	<220> <223> RNAi molecule	
	<400> 72 caccgggucg cuggagcgc	19
	<210> 73 <211> 19 <212> RNA <213> Artificial	
	<220> <223> RNAi molecule	
	<400> 73 gcagaagucg gcgauggcg	19
	<210> 74 <211> 19 <212> RNA <213> Artificial	
[0038]	<220> <223> RNAi molecule	
	<400> 74 gcuccaagaa ugcugcugu	19
	<210> 75 <211> 19 <212> RNA <213> Artificial	
	<220> <223> RNAi molecule	
	<400> 75 gaaugcugcu guuaccggc	19
	<210> 76 <211> 19 <212> RNA <213> Artificial	
	<220> <223> RNAi molecule	
	<400> 76 ugcugcuguu accggcgaa	19
	<210> 77 <211> 19 <212> RNA <213> Artificial	
	<220> <223> RNAi molecule	
	<400> 77	

	uugccggaga auuugagug	19
	<210> 78	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> RNAi molecule	
	<400> 78	
	uuugaguguc cguggcauu	19
	<210> 79	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> RNAi molecule	
	<400> 79	
	agccuaaccc accuccugc	19
	<210> 80	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> RNAi molecule	
[0039]	<400> 80	
	cccaccuccu gcagccaug	19
	<210> 81	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> RNAi molecule	
	<400> 81	
	gaaaaggcac aggcuaaaa	19
	<210> 82	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> RNAi molecule	
	<400> 82	
	aggcacaggc ucaaaccu	19
	<210> 83	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> RNAi molecule	
	<400> 83	
	accuuccca agguuaaug	19

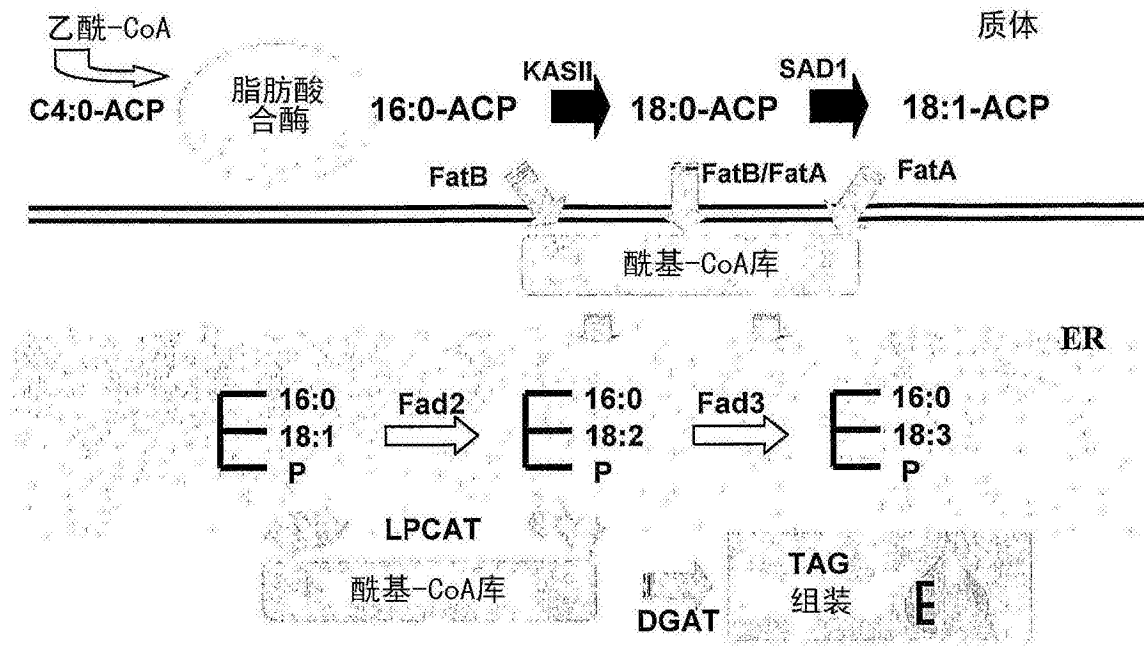


图1

1	11	21	31	41	51
蛋白 FATB2	MAGSLAASAFFP	PGSSPAASARSSKNA	AVTGE	PENLSVRG	IVAKPNPPPAAMQVKA..
蛋白 FATB3	MAGSLAASAFFP	PGSSPAASARSSKNA	AVTGE	PENLSVCCG	IVAKPNPPPAAMQVKA..
蛋白 FATB1	MAGSLAASAFFP	VGSSPAASARSSKN..	TTGEL	PENLSVRG	IVAKPNPSPGAMQVKA..
蛋白 FATB4	MAGSIAASAF	LPG...SPAAAPK	...VLGER	PD	SLDVRGLAAKPGSSSSAAAIRAGK
61	71	81	91	101	111
蛋白 FATB2	..QAQTL	PKVNGTKVNLK	TVKPD	.MEET	VPYSAPKTFY
蛋白 FATB3	..QAQTL	PKVNGTKVNLK	TVKPD	.MEET	VPHSAPKTFY
蛋白 FATB1	..QAQAL	PKVNGTKVNLK	TTSPD	.KEDI	IPTYAPKTFY
蛋白 FATB4	TRTHAA	IPKVN	GGSSALADPE	HDTM	SSSSAAAPRFFYNQL
121	131	141	151	161	171
蛋白 FATB2	QWTL	LDWKPKKPD	MLVDT	FGFR	IIQDGMVFRQ
蛋白 FATB3	QWTL	LDWKPKKPD	MLVDT	FGFR	IIQDGMVFRQ
蛋白 FATB1	QWTL	LDWKPKKPD	MLADT	FGFR	IIQDGLVFRQ
蛋白 FATB4	QWTL	LDWKPKR	PDMLIDT	FGGR	MIHEGLMFRQ
181	191	201	211	221	231
蛋白 FATB2	ALNHV	RTAGLL	GDGEGAT	PMSKRN	LIWVYSKIQLL
蛋白 FATB3	ALNHV	RTAGLL	GDGEGAT	PMSKRN	LIWVYSKIQLL
蛋白 FATB1	ALNHV	KTAGLL	GDGEGAT	PMSKRN	LIWVYSKIQLL
蛋白 FATB4	ALNHV	KSAGLL	GDGFCG	STPMSKRD	LEFWVYSQQA
241	251	261	271	281	291
蛋白 FATB2	MRRD	WHV	RDYNSG	RTIL	RATSVWVMHKKTR
蛋白 FATB3	MRRD	WHV	RDYNSG	RTIL	RATSVWVMHKKTR
蛋白 FATB1	MRRD	WHV	RDYNSG	OTIL	RATSVWVMNKNTR
蛋白 FATB4	MRRD	WH	IRDSVT	GHTIL	KATSKWVMHKKL

图2

301	311	321	331	341	351
KLAKTGNKVGDDATEQFTRRGLTFRWGDLVDVNHQHVNNVKYIGWILESAPISVLEKHELAS					
KLA*					
KLPKPGFTFDGAATKQFTRKGLTPKWSDDLVDVNHQHVNNVKYIGWILESAPISILEKHELAS					
KLPKLPD.IEGANVAKYVVRTGLTFRWADLDINQHVNNVKYIGWILESAPISILEKHELAS					
361	371	381	391	401	411
MTLDYRKECGRDSVLOSLTIVSGETSIGADKQASAIQCDDHLLQLESGADIVKAHTWRP					
MTLDYRKECGRDSVLOSLTAVSGECDDGNTL...SSIQCDDHLLQLESGADIVKAHTWRP					
IVLDYRKECGRDSVLOSHFTVYTDCL...NKHSGQTLHCEHLLSLESGPTIVKARTMWRP					
421	431				
KRSHAAENA*					
KRAQEGNMGFFAESA*					
KGTRPQESIIPSS*					

蛋白 FATB2
 蛋白 FATB3
 蛋白 FATB1
 蛋白 FATB4

蛋白 FATB2
 蛋白 FATB3
 蛋白 FATB1
 蛋白 FATB4

蛋白 FATB2
 蛋白 FATB3
 蛋白 FATB1
 蛋白 FATB4

图 2a

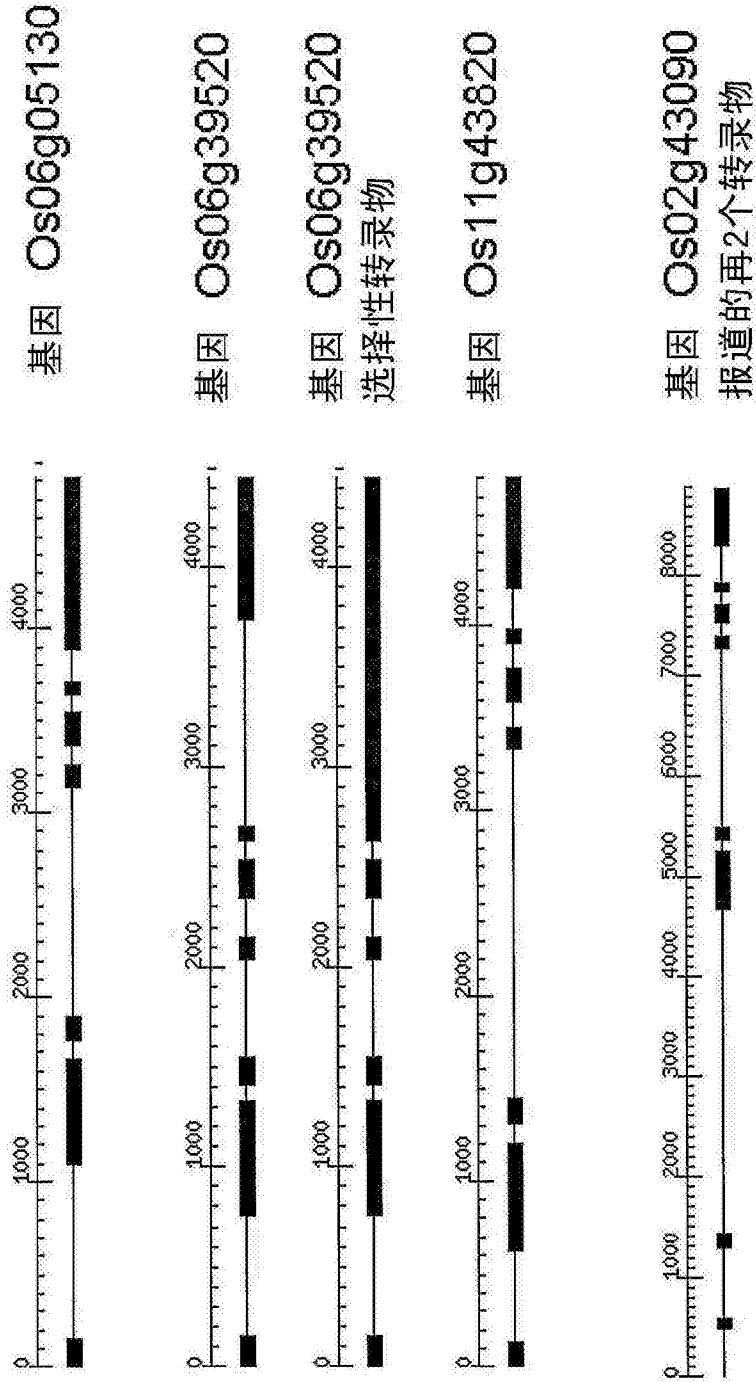


图3

```

LOC_Os02g4 CCATATGTGCAGCATAAAAAGGCAAATCAGCCCTGTTTGACATGGCTCCAATGCTTAAATT
LOC_Os11g4 -----
LOC_Os06g0 -----
LOC_Os06g3 -----

1981      1991      2001      2011      2021      2031
LOC_Os02g4 CTTTAGAGAAAAACAGACTTTGTAGATTAAATCAAAGTGGCATAATCTTTTTATTTTGA
LOC_Os11g4 -----
LOC_Os06g0 -----
LOC_Os06g3 -----

2041      2051      2061      2071      2081      2091
LOC_Os02g4 TAAAAATATTAGAAAATATCATACCCTAATATCTTAGCATAGTACTCCATTTCATCTCAC
LOC_Os11g4 -----
LOC_Os06g0 -----
LOC_Os06g3 -----

2101      2111      2121      2131      2141      2151
LOC_Os02g4 TTATTAAGGTACGATCAAACCTTGGCATAGTCTTCAAAGGCTGTGTTCTTCCCCCATTTT
LOC_Os11g4 -----
LOC_Os06g0 -----
LOC_Os06g3 -----

2161      2171      2181      2191      2201      2211
LOC_Os02g4 CCTAACCCATCTATCTCGTTTTCCGCGCACACATTTTCAAAGTACTAAACGGTGTGATT
LOC_Os11g4 -----
LOC_Os06g0 -----
LOC_Os06g3 -----

2221      2231      2241      2251      2261      2271
LOC_Os02g4 TATGCAAAAACCTCTATATGAAAGTTGTTAAAAAAATCATATTAATCCATTTTAAAAA
LOC_Os11g4 -----
LOC_Os06g0 -----
LOC_Os06g3 -----

2281      2291      2301      2311      2321      2331
LOC_Os02g4 AAATCAGTTAATACTTAATTAATCATGCAATAAAACGAACTTCATTTTGCCTGCTGGGGA
LOC_Os11g4 -----
LOC_Os06g0 -----
LOC_Os06g3 -----

2341      2351      2361      2371      2381      2391
LOC_Os02g4 GGAGGGGCTCCAACCCCTCCTCCGAACACAGCCAAAAGCTACTTTTGGACTTTAAATTT
LOC_Os11g4 -----
LOC_Os06g0 -----
LOC_Os06g3 -----

2401      2411      2421      2431      2441      2451
LOC_Os02g4 GTCATATATTATAATGTTCTAGTAACAAAACCATAGTCATATGAAAGTAAATTTAAATG
LOC_Os11g4 -----
LOC_Os06g0 -----
LOC_Os06g3 -----

2461      2471      2481      2491      2501      2511
LOC_Os02g4 ATAATCCAATGATATTATTTTCATCAATAGAAATTTAATTTATAATAAACTATTTATTGA
LOC_Os11g4 -----
LOC_Os06g0 -----
LOC_Os06g3 -----

2521      2531      2541      2551      2561      2571
LOC_Os02g4 TAAAAATATTCAGAGAGTTGAATATTTAAATACCTGTGTGCCTTAGTGAGTGGGCCAAATT
LOC_Os11g4 -----
LOC_Os06g0 -----
LOC_Os06g3 -----

```

图4a

	2581	2591	2601	2611	2621	2631
LOC_Os02g4	AATTAATGGAGTAGTAACAGCTTTAACCAAAGAAATTTCAACAATTTCCCAAGCTAGAAA					
LOC_Os11g4	-----					
LOC_Os06g0	-----					
LOC_Os06g3	-----					
	2641	2651	2661	2671	2681	2691
LOC_Os02g4	AAACCCAACCTCCAAAATAAAGTTGAGTTAGAACTGTGTTAAGCACCTAAATTTGTAATACC					
LOC_Os11g4	-----					
LOC_Os06g0	-----					
LOC_Os06g3	-----					
	2701	2711	2721	2731	2741	2751
LOC_Os02g4	TGTTACTCTCTCGTTCTCATTCTATATTTGTCCTAAGTTAAATATATCTACCTTTTTTTTA					
LOC_Os11g4	-----					
LOC_Os06g0	-----					
LOC_Os06g3	-----					
	2761	2771	2781	2791	2801	2811
LOC_Os02g4	TCTGTCCTAAGTTAACTATGTGTATGTCTATCTTTTCTACTACTCCCTCCGTTTCAGGTT					
LOC_Os11g4	-----					
LOC_Os06g0	-----					
LOC_Os06g3	-----					
	2821	2831	2841	2851	2861	2871
LOC_Os02g4	ATAAGACGTTTTGACTTTGGTCAAAGTCAAAGTGCCTTAAGTTTGACTAAGTTTGTAGAA					
LOC_Os11g4	-----					
LOC_Os06g0	-----					
LOC_Os06g3	-----					
	2881	2891	2901	2911	2921	2931
LOC_Os02g4	AAAATAATAACATTTTCAACCCAAGACAAATTTATATGAAAAATATGTTCAATTATTGAT					
LOC_Os11g4	-----					
LOC_Os06g0	-----					
LOC_Os06g3	-----					
	2941	2951	2961	2971	2981	2991
LOC_Os02g4	TTAATGAAACTAATTTGGTATTATAAATATTATTATATTTATATATAAACTTAGTTAAAT					
LOC_Os11g4	-----					
LOC_Os06g0	-----					
LOC_Os06g3	-----					
	3001	3011	3021	3031	3041	3051
LOC_Os02g4	TTAAAGTAGTTAAGTTTGATCAAAGTCAAATGTTTTATAACCTGAAATGGAGGGAGTA					
LOC_Os11g4	-----					
LOC_Os06g0	-----					
LOC_Os06g3	-----					
	3061	3071	3081	3091	3101	3111
LOC_Os02g4	AGTAATTTGAAACGAAGAGAGACAGACAAATAATAAACTAGTAAAGCCTGTGACTTGGGTT					
LOC_Os11g4	-----					
LOC_Os06g0	-----					
LOC_Os06g3	-----					
	3121	3131	3141	3151	3161	3171
LOC_Os02g4	CTAGTCATTGATCGTGTACATGTAGGTCTTGTTTAGATCCCAAAAATTTTAGCCAAAAC					
LOC_Os11g4	-----					
LOC_Os06g0	-----					
LOC_Os06g3	-----					
	3181	3191	3201	3211	3221	3231
LOC_Os02g4	CTCACATCAAATATTTGGACACATGCACCCCTACCAGTGTGTGGAGGCATTGCATACACG					
LOC_Os11g4	-----					
LOC_Os06g0	-----					
LOC_Os06g3	-----					

图4b

	3241	3251	3261	3271	3281	3291
LOC_Os02g4	AAACATGAAAAGGAATCAACTTGAGAGGTTAGACCTGCTAGCTCTACTAGGCTGGATG					
LOC_Os11g4	-----					
LOC_Os06g0	-----					
LOC_Os06g3	-----					
	3301	3311	3321	3331	3341	3351
LOC_Os02g4	GTCATGCATTTTTTTTGA AAAAACCACGCTGCAAGCTCGACAGCCTCAACCTCAATGG					
LOC_Os11g4	-----					
LOC_Os06g0	-----					
LOC_Os06g3	-----					
	3361	3371	3381	3391	3401	3411
LOC_Os02g4	CAACCATGACAATAATATGCATGACAATGGTGTAGGAGAAAAGACACGTCGATAACCAAA					
LOC_Os11g4	-----					
LOC_Os06g0	-----					
LOC_Os06g3	-----					
	3421	3431	3441	3451	3461	3471
LOC_Os02g4	GGGCGCGCTGCGCATACAAAGCGGAGAGAAGGAACGATGGTGGCTCAAAAAGAAAGAG					
LOC_Os11g4	-----					
LOC_Os06g0	-----					
LOC_Os06g3	-----					
	3481	3491	3501	3511	3521	3531
LOC_Os02g4	CGTCGGTGGCAGTGGTGCCTGGAGCGACACTAAAGTTAGTGGTTGCTGATGGTCTCACAC					
LOC_Os11g4	-----					
LOC_Os06g0	-----					
LOC_Os06g3	-----					
	3541	3551	3561	3571	3581	3591
LOC_Os02g4	AATCCCTAATCGAAATATTTATTTTTTTTCACTTAGTATTGCTGATCCCGTGGGCCACCAG					
LOC_Os11g4	-----					
LOC_Os06g0	-----CGCGTCGCTG					
LOC_Os06g3	-----					
	3601	3611	3621	3631	3641	3651
LOC_Os02g4	CCAATCATAAAGAAAAATGTTGAGATAAAAAGGTGGAGTATCTTCCCTTCCTTCCCTTTT					
LOC_Os11g4	-----					
LOC_Os06g0	TGAGTTGGCGAGCCCGAGGAGCGGAGGCGGCCACAAGTCTAATCCGCGTCTCTGCGCGT					
LOC_Os06g3	-----					
	3661	3671	3681	3691	3701	3711
LOC_Os02g4	TGACTCGAAAAAAAAGCGTCGGTGGCGGCCGTGCGTGTAAACAACACTAAAGTTAGTGG					
LOC_Os11g4	-----					
LOC_Os06g0	TCGTGGCGAGGAGGAGAAAGAAGAGGAGGAAGAGAGGGGAGGGGGCTTGA--TTTGATT					
LOC_Os06g3	-----					
	3721	3731	3741	3751	3761	3771
LOC_Os02g4	TTGCTGGTGGTCTGACACAATCCCTAATCAAGTTTGATAATAATAATAATTTATTTCCCTC					
LOC_Os11g4	-----					
LOC_Os06g0	TGGGCGCGTCTCGTGGAGTATCCGCTGAGTCTTTGGCGATCTGGCGAGGGCAGTGATGAG					
LOC_Os06g3	-----					
	3781	3791	3801	3811	3821	3831
LOC_Os02g4	TTATTAGTATTGCTGATGCGTGGGCCACCAATCAATCGTAAAGAAAAAAAATGTTGAGAT					
LOC_Os11g4	-----					
LOC_Os06g0	TGATTCTGCTGCTGCTGGGGGATTTGGCGTGATTTTCGTTGGTTGCATTTTGTTCCTT					
LOC_Os06g3	-----					
	3841	3851	3861	3871	3881	3891
LOC_Os02g4	AAAAGGTGGGGTATCTTCTCTCTCTTTTTTTTTGGCTAAAATAAAAAGTGGTTTCTGG					
LOC_Os11g4	-----					
LOC_Os06g0	TTTTTTGTATCGATTGTGGAGCT-TTATTCCGTTAGTCTGGTCGATTCCATGGTGG					
LOC_Os06g3	-----					

图4c

```

3901      3911      3921      3931      3941      3951
LOC_Os02g4 TAGTCTGACACAATCTCTAATCGAAATATTTATTTTTTCTCTTAGTATTGCTGATACGT
LOC_Os11g4 -----
LOC_Os06g0 TTGTATCGGCGCCGGAGTGATAGCTGATTCTGTTTTTTTTGTGTGATTTTTTTTTTGTTTT
LOC_Os06g3 -----GCGATGCGGAGCCTGTGTTGACAGCGGAGAA-AGCAGTGTATCC

3961      3971      3981      3991      4001      4011
LOC_Os02g4 GGGCCACCAGCCAATAATAAAGAAAAAAATGTTAGAGATAAAAGGCGGAGAGTATCTTC
LOC_Os11g4 -----
LOC_Os06g0 GGAAATAGGGTTTGTGTGCAATTGAGGCCATTTTTTTTCCCTTAGGCAATGCAGGAT-TTC
LOC_Os06g3 GGTCCCGCCACCGCAGCCGCTCCACCTCTCTTCCCGCGCCAATGGCCGCTCGT-GAA

4021      4031      4041      4051      4061      4071
LOC_Os02g4 CCCTTCCTTTTTTTTGGCGTAAATGAAAGAAAAGAGAAAATCTCCCGTCGTCCTCCTCCT
LOC_Os11g4 -----AGAGGAGAAATCTCCCGTCGTCCTCCTCCT
LOC_Os06g0 GTTTTGTATGTTTTTGCCTGGAATGGATATGAACAGACCTCGAACAAATGGAAGAA--T
LOC_Os06g3 GCGCAGCAGCAGCAGCAGCGGAGACAGCGGCAGAAGC'TTGCCTAAGGTCGGTTTGC

4081      4091      4101      4111      4121      4131
LOC_Os02g4 TCGGCCAAGAAAGACGAGCCGCGCTCAACACCGGAGGGGAGGGGCGC--CGATCTCCAT
LOC_Os11g4 TGCGCCAAGAAAGACGAGCCGCGCTCAACACCGGAGTGGAGGGGCGC--CGATCTCCAT
LOC_Os06g0 TGTATTTGTATGATGGATTGCAATGCGATACTTGT'TTTGGGGCGTGATTCGATTGAAAT
LOC_Os06g3 CTCCCGCCTCCGCGCATTCGGTGGAGTTTTGTCCGTTTCGTCGG-CGGTTTCT-T

4141      4151      4161      4171      4181      4191
LOC_Os02g4 CGCCAAGGAGAGCAGAGCAGGGGAGGGGA-----TCCTGGT-GAGCCTCCTCTCCCTGAT
LOC_Os11g4 CGCCGAGGAGAGCAGAGCAGGGGAGGGGAGGGGATCCTGGT-GAGCCTCCTCTCCCTGAT
LOC_Os06g0 AAATGAA-ATATTAGAGTTATTTTGGGAT-----TCCTGTTGCTGCGCCTTTTTTTTA
LOC_Os06g3 GGCTGGCCGGAT--GAATTGTTGTGGGAGGGG-GAGGGGAGGGGCTC-TCTACGCAC

4201      4211      4221      4231      4241      4251
LOC_Os02g4 TCATCTCTCTCCATT--CTAGCTTCGGGGACT--ACTTTGCTGGAATTTGCTCGCG
LOC_Os11g4 TCACCTCTCTCTCATT--CTAGCTTCGGGGACT--ACTTTGCTCGAATTTGCT----
LOC_Os06g0 GCATTTCT-TGATATGAACAAGAGAAGAGGGCTGAATTTTTTCTTAGCTTTGGAGGCA
LOC_Os06g3 TCGCTGCT-GGATTCGGTTAGGTTTCGCGCTGGGGGAATCGCGGGGAATTCAGGATC

4261      4271      4281      4291      4301      4311
LOC_Os02g4 TTCGPTCGTGGCTCGTTCGT--TAACCCTAGCTTCTTCTCTTCTAGATCTGGAGGAAGC
LOC_Os11g4 -----TGCGTTCGTTTCGT--TAACCCTAGCTTCTTCTTCTAGATCTGGAGGAAGC
LOC_Os06g0 TTTACTGTCCAGTATTTCTCCTACCGAAGCAGAATATTTGTTGATTGGAGGGTTG
LOC_Os06g3 TT---TGTTTGTAGTTCTTCTTTTCGGGCGGGTGGATCTCGAGTAATCTGCGTTCGTG

4321      4331      4341      4351      4361      4371
LOC_Os02g4 TCTTCTCCTCCTTAATT-----TCAGAGCCTT---AATACAAGTAGTAACAG
LOC_Os11g4 TCTTCTCCTCCTTAATT-----TCAGAGCCTT---AATACAAGTAGTAACAG
LOC_Os06g0 CCTCCCTTTGCCAAATGAATCAAATGTTCTCGGATGTTTTAAAATTTCCGPGGACTCTT
LOC_Os06g3 TTATTTGCCGCGAGATT-----TGGGTGTTTT---TTTCTTCTCTCCGCAT

4381      4391      4401      4411      4421      4431
LOC_Os02g4 TTTAACCTCCCC-----ATGTCCCAAGTGGATCCGCCCTGCGAGTTCGGATATTGG
LOC_Os11g4 TTTAACCCCCCCCCCCCCATGTCCCAAGTGGATCCGCCCTGCGAGTTCGGATATTGG
LOC_Os06g0 TTTGCCCGAGGGAGACCGCTTTTAGCAGCTGGATCCCGTGT'TTTCATTCAAGTCTTG
LOC_Os06g3 CTTCTCTCTCGTT-----CCTTCGTCTGTACGGTCTAGTGGTGGTCTACGGGCTACGGC

4441      4451      4461      4471      4481      4491
LOC_Os02g4 GTCC'TCCCAATTCTCAATGCCATTTTGTTCATCGGGGGCATATGGTTCATTTTGCCTG
LOC_Os11g4 GTCC'TCCCAATTCTCAATGCCATTTTGTTCATCGGGGGCATATGGTTCATTTT-GCCTG
LOC_Os06g0 TT--TTCCTAGTCTCCATATATTTCFGATTGTTAACTCGTATTCTTACCTCAC-ATATG
LOC_Os06g3 CGTGGTAAAAGTTTCTTAGATTTTGGTTC-TCGTTTTTTCTTTATTTTAGCGGCTTG

4501      4511      4521      4531      4541      4551
LOC_Os02g4 CATTGATTCAAATGTGGTTTCGAATCGTTTGTGAAAT-TC-GCGGGTGTACTTGT'TTATG
LOC_Os11g4 CATTGATTCAAATGTGGTTTCGAATCGTTTGGGAAAT-TC-GCGGGTGTACTTGT'TTATG
LOC_Os06g0 CAAATCACACTTGCCTGCTTCTGTAATTAGTTAGAT-TCTGCAAGAAAAATCCGGAAT
LOC_Os06g3 CTTTGCTTCGCTGCTTTGACGTTTGACCAGCGGTTTATCCTCGATTATTCCTCCTCGT

```

图4d

```

4561      4571      4581      4591      4601      4611
LOC_Os02g4 ATACATGAGGGCCTTTTTC-CCCCATGAGGAGGCAAACCTTTTATGTTGGGTGGATCCACTA
LOC_Os11g4 ATATATGAGGGCCTTTTTC-CCCCATGAGGAGGCAAACCTTTTATGTTGGGTGGATCCACTA
LOC_Os06g0 TTCAAGCATGCTAGTAGTTTAAATFGATG--CCATGTTTTTTAGACAATGT-----TA
LOC_Os06g3 AGTCGTGA-GCAAGCTATG---ATTGTCAG--CTAATGATTTTTGTGCTTGATTAGATA

4621      4631      4641      4651      4661      4671
LOC_Os02g4 GTTCATGC--CTCA--ATT--TTTTTCTCCTCTTTAAGTTTTCCAAAGAGCTACATTG
LOC_Os11g4 GTTCATGC--CTCA--ATT--TTTTTCTCCTCTTTAAGTTTTCCAAAGAGCTACATTG
LOC_Os06g0 ATTGATGC--CATATGACT--ATAGGACACATTATATTGCGTTTCTGAATA--TACCACC
LOC_Os06g3 AAAGATGCTTCTCACTCTTCGTTTGTTCATTTTCTGGAATTTGTGATTTCTCTGG--TG

4681      4691      4701      4711      4721      4731
LOC_Os02g4 TTGTAAAGTGCTGATACAAATGATTGTTTATTTCAGGTTAGCGCTTTTGGCGTG--TGAT
LOC_Os11g4 TTGTAAAGTGCTAATACAAATGATTGTTTATTTCAGGTTAGCGCTTTTGGCGTG--TGAT
LOC_Os06g0 TCATGAAACTCATAAATTTGTTGATTAATGTTTCAGGTTGCCCTTCTAGTGTG--TAAC
LOC_Os06g3 ATGATAATGTTGTGCTCGTGTGATTTCAG--GTTGGGATCCTCCCTATTTCGCGCGCTCTT

4741      4751      4761      4771      4781      4791
LOC_Os02g4 TGATTTCTAAACGAATTTTGGGCCGTGAGGGGAAGTTCAATCATGGCAGGGTCTCTTGCC
LOC_Os11g4 TGATTTCTAAACGAATTTTGGGCCGTGAGGGGAAGTTCAATCATGGCAGGGTCTCTTGCC
LOC_Os06g0 T-----TGGAGCAAATTTGACCCTGAGACGCAAATCAGTCATGGCTGTTCTCTTGCC
LOC_Os06g3 TGATTTGGCGCGTAAAGTTG-----TAATCCGTAATCCGG--ATGCGCGCTCAATCGCC

4801      4811      4821      4831      4841      4851
LOC_Os02g4 GCCTCAGCATCTTCCAGGTCAGGCTCATCTCCTGCAGCATCAGCTAGAAGCTCCAAG
LOC_Os11g4 GCCTCAGCATCTTCCAGGTCAGGCTCATCTCCTGCAGCATCAGCTAGAAGCTCCAAG
LOC_Os06g0 GCCTCAGCATCTTCCAGGTCAGGCTCATCTCCTGCAGCATCAGCTAGAAGCTCCAAG
LOC_Os06g3 GCCTCAGGCTCTTTCGCGG-----GGTCGCGGGCGCCGCGCCGCGCCAAAGAGCG-----

4861      4871      4881      4891      4901      4911
LOC_Os02g4 AATGCTGCTGTTACCGGCGAATTGCGGGAGAATTTGAGTGTCTGTGGCATTGTGCGCAAAG
LOC_Os11g4 AATGCTGCTGTTACCGGCGAATTGCGGGAGAATTTGAGTGTCTGTGGCATTGTGCGCAAAG
LOC_Os06g0 AACACA-----ACCGGTGAATTGCCAGAGAATTTGAGTGTCTGTGGCATTGTGCGCAAAG
LOC_Os06g3 --TCTG-----GGCGAGCGCCGGACAGCCTGGACGTCCGCGGCATCGCGCGGAAG

4921      4931      4941      4951      4961      4971
LOC_Os02g4 CCTAACCCACCTCCTGCAGCC-----ATGCAAGTAAAGGCACAGGCTCAAACCC--
LOC_Os11g4 CCTAACCCACCTCCTGCAGCC-----ATGCAAGTAAAGGCACAGGCTCAAACCC--
LOC_Os06g0 CCTAATCCGTCCTCCAGGGGCC-----ATGCAAGTCAAGGCGCAGGCGCAAGCCC--
LOC_Os06g3 CCGGGCTCCTCGTCTCGGCCGCCGCCCTGAGGGCCGGCAAGACGCGCACCCACGCCGCC

4981      4991      5001      5011      5021      5031
LOC_Os02g4 -TTCCCAAGTTAATGGTACGAAGTTAACCTCAAGACGGTGAAGCCTGACATGGAGGAA
LOC_Os11g4 -TTCCCAAGTTAATGGTACGAAGTTAACCTCAAGACGGTGAAGCCTGACATGGAGGAA
LOC_Os06g0 -TTCCTAAGTTAATGGAACCAAGTTAACCTCAAGACTACAAGCCAGACAAGGAGGAT
LOC_Os06g3 ATCCCAAGTTGAACGGCGGCAETTCGGCGCTGGCGGATCCGGAGCACGACAG--ATGTC

5041      5051      5061      5071      5081      5091
LOC_Os02g4 ACGGTGC---CTCAGTGTCTCCAAAGACGTTCTATAACCAACTGCCGGATTGGAGCAT
LOC_Os11g4 ACGGTGC---CTTACAGTGTCTCCAAAGACGTTCTATAACCAACTGCCGGATTGGAGCAT
LOC_Os06g0 ATAATAC---CGTACACTGTCCGAAGACATTTCTATAACCAATTGCCAGACTGGAGCAT
LOC_Os06g3 CTCTCTCTCTCTCTCCGCGCGCCGAGGACGTTCTACAACCAGCTCCCCGACTGGAGCAT

5101      5111      5121      5131      5141      5151
LOC_Os02g4 GCTTCTTGGCGCTATTACAACCATCTTCTCGCCGAGAGAAGCAGTGGACACTGCTTGA
LOC_Os11g4 GCTTCTTGGCGCTATTACAACCATCTTCTCGCCGAGAGAAGCAGTGGACACTGCTTGA
LOC_Os06g0 GCTTCTTGCAGCTGTACGACCATTTTCTTGGCAGCTGAGAAGCAGTGGACTCTGCTTGA
LOC_Os06g3 GCTCTCTCGAGCCATCAGACCATCTTCTTGGCCGCGGAGAAGCAGTGGACGCTGCTTGA

5161      5171      5181      5191      5201      5211
LOC_Os02g4 TTGGAAGCCGAAGAACCTGACATGCTTGTGTGACACATTTGGCTTTGGTAGGATCATCCA
LOC_Os11g4 TTGGAAGCCGAAGAACCTGACATGCTTGTGTGACACATTTGGCTTTGGTAGGATCATCCA
LOC_Os06g0 CTGGAAGCCGAAGAACCTGACATGCTTGTGTGACACATTTGGCTTTGGTAGGATCATCCA
LOC_Os06g3 CTGGAAGCCGAAGCGGCCGACATGCTCACCGACACGTTTCGGTTTCGGCAGGATGATACA

```

图4e

	5221	5231	5241	5251	5261	5271
LOC_Os02g4	GGACGGTATGGTGTTTAGGCAGAACTTCATGATTCGGTCCCTACGAGATTGGCGCTGATCG					
LOC_Os11g4	GGACGGTATGGTGTTTAGGCAGAACTTCATGATTCGGTCCCTACGAGATTGGTGCTGATCG					
LOC_Os06g0	AGACGGGCTGGTGTTTAGGCAAAACCTTCTGATTCGGTCCCTACGAGATTGGTGCTGATCG					
LOC_Os06g3	TGAGGGCTCATGTTCCAGGCAGAACTTCTCGATTAGGTCCCTATGAGATCGGGCCGATAG					
	5281	5291	5301	5311	5321	5331
LOC_Os02g4	TACAGCTTCTATAGAGACATTGATGAATCATTACAGGTAAGTGGTTGCAC--ATTCTGT					
LOC_Os11g4	TACAGCTTCTATAGAGACATTGATGAATCATTACAGGTAAGTGGTTGCAC--ATTCTGT					
LOC_Os06g0	TACAGCTTCTATTGAGACATTAATGAATCATTACAGGTGATACAATGGAGCTATGCTGC					
LOC_Os06g3	GACGGCTCTATAGAAACGCTGATGAACCATTTCAGGTGAAATAATGATGATTTTCAGG					
	5341	5351	5361	5371	5381	5391
LOC_Os02g4	TTTTAGTTTCATTTCTCATTTTCAGCATTTTGTTATAGATTCGTATGTCTCTTTCAAGCTG					
LOC_Os11g4	TTTTAGTTTTATTTCTCATTTTCAGCATTTTGTTATAGATTCATATGTCTCTTTCAAGCTG					
LOC_Os06g0	TTTAGCTTTTCTCCGTATTTTCACTATTGGTAC--AT---TATGTTCTGGGCATACTA					
LOC_Os06g3	CGTCGGATTGCTCGGC-----TGGCATCAGAAC--ATTGAAATGTTTTGGT-----					
	5401	5411	5421	5431	5441	5451
LOC_Os02g4	GCAATTATTTAAAATTTTGCAGGAAACGGCTCTTAACCATGTAAGGACTGCTGGTCTTCT					
LOC_Os11g4	GCAATTATTTAAAATTTTGCAGGAAACAGCTCTTAACCATGTGAGGACTGCTGGTCTTCT					
LOC_Os06g0	ACTGTAATTTGAAGCTTGCAGGAAACAGCTCTGAACCATGTGAAAACGCTGGTCTTCT					
LOC_Os06g3	----T---TTGA----TGCAGGAAACCGCACTGAATCATGTGAAGAGCGCTGGGCTGCT					
	5461	5471	5481	5491	5501	5511
LOC_Os02g4	TGGAGATGGTTTTGGGGCTACACCGGAGATGAGCAAACGGAACTTGATATGGGTTGTCAG					
LOC_Os11g4	TGGAGATGGTTTTGGGGCTACACCGGAGATGAGCAAACGGAACTTGATATGGGTTGTCAG					
LOC_Os06g0	AGGTGATGGTTTTGGTGCTACGCCGGAGATGAGCAAACGGAACTTAATATGGGTTGTCAG					
LOC_Os06g3	AGGAGATGGTTTTGGTCAACGCCAGAGATGAGTAAACGAGACTTTTCTGGGTTGTCAG					
	5521	5531	5541	5551	5561	5571
LOC_Os02g4	CAAATCCAGCTTCTTGGTTGAGCAATACCCCGCATGGTACTTTTT-TGCAAACCTTTGCT					
LOC_Os11g4	CAAATCCAGCTTCTTGGTTGAGCAATACCCCGCATGGTACTTCTT-TGCAAACCTTTGCT					
LOC_Os06g0	CAAATCCAGCTTCTTGGTTGAGCGATACCCCATCATGGTACTTTTTCTGCAATCCA---CT					
LOC_Os06g3	CCAAATGCAGGCAATCGTTGAGCGTTATCCGTGCTGGTA----TAATACTATAAT---TT					
	5581	5591	5601	5611	5621	5631
LOC_Os02g4	CCTCTTGATATATGTATCTTTGGTTTCTTTCTATCAAT--TCCTTACTCTAAGTTGTCAT					
LOC_Os11g4	CCTCTTAATATATGTATCTTTGGTTGCTTTCTATCAAT--TCCTTACCCTAAGTTTTCAT					
LOC_Os06g0	ACTCTCCACATCATTTTCTTGGATGGCAAACCTTCTCT--TTTTACTCTTAATTCATAAC					
LOC_Os06g3	-CACATATCAGCATGTTCTTGGTTTTGTTTTCTTACATAGTTTGAGCTCCAAATAGGGTG					
	5641	5651	5661	5671	5681	5691
LOC_Os02g4	TTAATTTTCACATTTTAAATTAATTTACTTCATATTTGTTTGGTCTCTTTTACAGATATCGTTTT					
LOC_Os11g4	TT--TTGTACATTTTAAATTAATTTACTTCATATTTGTTTGGTCTCTTTTACAGATATCGTTTT					
LOC_Os06g0	AT--TTCTTTCAATCTTAATGGAGTACTTTTGTCCCGGTGCATTTAGTGTACACAATTTA					
LOC_Os06g3	TTGCTTTTCTGCTTTCGTGTTACATGACAAT---AGGAGGCACATAGATGTATGTTGG					
	5701	5711	5721	5731	5741	5751
LOC_Os02g4	ATGTAATTTACAGCTGTGTGCTCTTTGCATATTTGTTTTATTGTTTTAAAGAAGAT					
LOC_Os11g4	ATGTAATTTATAGCTGTGTGCTCTTTGCATATTTGTTTTATTGTTTTAAAGAAGAT					
LOC_Os06g0	ATG-----TTTACA--TG---GTACGGGAAAGATTTATCACTCAATATCCACGGTGTA					
LOC_Os06g3	CTGTC--ACAGTACG--TTACTGTAGTTATAGTAGCTATCA-TCTTGCTTTCACAGCAG--					
	5761	5771	5781	5791	5801	5811
LOC_Os02g4	TCTTACACAAGCAACAGTAGTATTTAGCTCAATATTTACTTTAACATGGTTTATCATATTT					
LOC_Os11g4	TCTTACTCAGGCAACAGTAGTATTTAGCTCAATATTTACTTTAACATGGTTTATCATATTT					
LOC_Os06g0	TGTTTT-----TAGC--TAAACTCAATATCCACGGTGTAATGTTTTTAGCTAAA					
LOC_Os06g3	TCATGG-----AATAACAGG-TTTAGGTAATGGA---GTTTTCAAGTTCTTTGGCAAT					
	5821	5831	5841	5851	5861	5871
LOC_Os02g4	GTTGTGTGGATCTCTGGTCTGATTTCTCCATACACTGGTTGGTTGATGAAAATCAAGTGA					
LOC_Os11g4	GTTGTGTGGATCTCTGGTCTGATTTCTCCATATACTGGTTGGTTGATGAAAATCAAGTGA					
LOC_Os06g0	CTTGTCTCAGTCCCTTTTTCTTTTTCCCTATGTTTGTGTGCTG-TGGCATTGCA-TGG					
LOC_Os06g3	GAA-TATGAAAA-----GATTTTCCCAAGT----GTTTGT--ATCAATTTTAAATGG					

图4f

```

5881      5891      5901      5911      5921      5931
LOC_Os02g4 ATCTTTTACTTGCTCGTAAATTCGCTGCTGCAGGTTGCAAGAATATGGGTTGAAGTTT
LOC_Os11g4 ATCTTTTACTTGGTCGTATATTCGCTGCTGCTGGTTGCAAGAATATGGGTTGAATTT
LOC_Os06g0 ATC-----AT--CG-----AGACTCTGAGTAGACGTA-
LOC_Os06g3 ATG-----AGCAACT-----C-CCATCTCTTAACGT-

5941      5951      5961      5971      5981      5991
LOC_Os02g4 TTATACTGCTATAGAAGGCCATGTTTTCTTTGATTCCCGTGATAGG-CCTCATGTTTT
LOC_Os11g4 TT--ACTGCTATAGAAGGCCATGTTTTCTTTGATTCCCGTGATAGG-CCTCATGTTTA
LOC_Os06g0 -G-----AT-----TCTTGCATTCCCTATGCGACATGAG-GCACATGTT--
LOC_Os06g3 -----TTTTGCTATCGGCATTAATATTTGTGCAACTGTT--

6001      6011      6021      6031      6041      6051
LOC_Os02g4 GGAGGTTCTGTTATTCCTCCTTGGTTGACTAAGAAATGTGTAGTAATATCAGCTCCAGTT
LOC_Os11g4 GGAGGTGCTGTTATTCCTCATTTGGTTGACTAAGAAATGTGTAGTAATATCAGCTCCAGTT
LOC_Os06g0 CGAG---TGTTTATCACCT-----AC-ATGAAA-----ACCTTTCCTACTAAG
LOC_Os06g3 AGACTTTCAGTAAACGATGAT--G---ATGCAGAAGCCT-----CCTGTGCTCTTAAT

6061      6071      6081      6091      6101      6111
LOC_Os02g4 TTGTTGGATCAAGGATAGATTTTGTGGCAAACATAAATTTCCAATTAGGAAGAAATGAAT
LOC_Os11g4 TTGTTGGATCAAGGATAGATTTTGTGGCAAACATAAATTTCCAATTAGGAAGAAATGAAT
LOC_Os06g0 TTGCTGCTTCTA-----TTG-----TTCTGCAGATAT-AAGCAAT--AT
LOC_Os06g3 ATTATTGATCATG-----TATC-----ATATTTTCTGTGAG-ATGTTAT--AA

6121      6131      6141      6151      6161      6171
LOC_Os02g4 ATATTCCTACTTAAGTGGG-AGGAGCATGCACCTTTGTTTCCAATTGTCGAGCCCTGATTA
LOC_Os11g4 ATATTCCTACTTAAGTGGGAGGAGCATGCACCTTTGTTTCCAATTGTCGAGCCCTGATTA
LOC_Os06g0 TTTTGCCTATTT--TT-----CCTGTGCTTTGA--AC--TTCTCGTAG---GTTCA
LOC_Os06g3 TTGTTGCTGTTT--GTT---ACCTGAAAGTGCCATGTTGCCAATAATTAACCTCTTATCT

6181      6191      6201      6211      6221      6231
LOC_Os02g4 TAACACAAACTATCAAGTTATTTCTTTGCATTTAGAAACAGGATTTGCATCTTGGGTAAT
LOC_Os11g4 TAACACAAACTATCAAGTTATTTCTTTGCATTTAGAAACAGGATTTGCATCTTGGGTAAT
LOC_Os06g0 TGGCCCA-----CAA-----CCT-----TTAG---CAGGCATAGTGCCCTGA-----
LOC_Os06g3 GTGTGCAGGGGTGATA-----CTGTGCAAGTAGATACATGGGTTGGTGTCTCATG-----

6241      6251      6261      6271      6281      6291
LOC_Os02g4 CCTCATTAAGACATAATCTAGCTTTAGTACATGCAACATAAAAAGTTATGATGCCCAAG
LOC_Os11g4 CCTCATTAAGACATAATCTAGCTTTAGTACATGCAACATAAAAAGTTCTGATGCCCAAG
LOC_Os06g0 -----AATGGAG--TATTACACTCAA-AA-----G-----
LOC_Os06g3 -----GTAAAATGGAA-----TGCCGAGAGACT-----

6301      6311      6321      6331      6341      6351
LOC_Os02g4 GCCTTTTTGGTACAGCACTGTAAGTCTGTAGCTCTCCTTGCTCTATGTTGTCTCAAAAAG
LOC_Os11g4 GCCTTTTTGGTACAGCACTGTAAGTCTGTAGCTATCCTTGCTCTATGTTGTCTCAAAAAG
LOC_Os06g0 -----CATA--ACAATAACA--TGTA--TTGCCTTG---TATGAT-----
LOC_Os06g3 -----GGCATAT-AC-GTGATTCTGTACAGGCCATACAATATGTA-----

6361      6371      6381      6391      6401      6411
LOC_Os02g4 ACACAACATCAGTTAAAA-----GAACAGTAATCTCTCCTTTAGACGTCAATTATTA
LOC_Os11g4 ACACAACATCAGTTAAAAACAAGAAGAACAGTAATCTCTCCTTTAGACGTCAATTATTA
LOC_Os06g0 ---AAGATGAGTGATAG-----ATCT-----TTTGAAATCATTTACT-
LOC_Os06g3 AGGCTACAAG-GTTTGAAT-----TATTGTCACTCTCATAAAT-ACTGATGA

6421      6431      6441      6451      6461      6471
LOC_Os02g4 GTGGAGTAGTAATTTAGATCCAAGAGCAACTTCATTTGTTACGCCCTTATTCATTGCCCAA
LOC_Os11g4 GTGGAGTAGTAATTTAGATCCAAGAGCAACTTCATTTGTTACGCCCTTATTCATTGCCCAA
LOC_Os06g0 ---GAGGAAAACGTTTGTFT-----ATTTGACAAG--ACAATGTATTGATGAAGTAG
LOC_Os06g3 T--CATGAAAACGTATTAGCATCTGCTATTCACACTTCCTAC-CCATCTTATT--ACCAC

6481      6491      6501      6511      6521      6531
LOC_Os02g4 AGCTGCCTCATTAATGATGTCTTCTCTGTGCTTCCTTGGATCTTGAATTAATGCTGAGTG
LOC_Os11g4 AGCTGCCTCATTAATGATGTCTTCTCTGTGCTTCCTTGGATCTTGAATTAATGCTGAGTG
LOC_Os06g0 AACTGCTCTATTAAGTGGTATCTGCCCTGTGCTCCTT---TCGTACAAATGTTTGC---
LOC_Os06g3 TGTTCATATGAAGTC-TAGAAGTCTGTTCTTCTG--AACATATTATAAGCTGCCT-

```

图4g

```

6541      6551      6561      6571      6581      6591
LOC_Os02g4  GGAATGCCAGAACGGGCATGTA CTTACGTTTCCAGCGATAAGCTCCGTTTAAAAATAA
LOC_Os11g4  GGAATGCCAGAACGGGCATGTA CTTACGTTTCCAGCGATAAGCTCCGTTTAAAAATAA
LOC_Os06g0  ---ACCCCTGTTTCATGTTACTTCTCACTTTTCACCATGGCAGGCAT-GTTTAGAAAATCA
LOC_Os06g3  ----TACAGCAACATGAAGCTACCTATTTGTCCTAATTGTTGCTCAATGTGCA--GTAA

6601      6611      6621      6631      6641      6651
LOC_Os02g4  ATTAGCAAGTGATTTATTTGCATTTATAAACAAAAATTTACCACTCGGGTAGTTCATATT
LOC_Os11g4  ATTAGCAAGTGATTTATTTACATTTTACAACAAAAATTTACCACTCGGGTAGTTCACATT
LOC_Os06g0  TT-----TGATTT-T-----ACAGGGCATTACCA-----
LOC_Os06g3  AT-----GGGTTATG-----ATGCACAAGCTTACAAGGAGGCTAGCA-----

6661      6671      6681      6691      6701      6711
LOC_Os02g4  AAAGTTATTGTCTAGCTTTATTACAAGCAGCATGAAAGTTACGATACCCCCAAGGCCTGAG
LOC_Os11g4  AAAATTATTGTCTAGCTTTATTACAAGCAACATGAAATTTGATACCCCCAAGGCCTGAG
LOC_Os06g0  -----TG TGACCCCTTAATA--ACTAACA--AATAT-----AT
LOC_Os06g3  -----A--GAATTCCTGATGAAGTACGTACTGAAATAGAGCCATAC-----T

6721      6731      6741      6751      6761      6771
LOC_Os02g4  TTTGGCAGCACT-TAACTCTGTTGCCCTGTTTGTCTTGAAAAGTATAACATCACTTAGC
LOC_Os11g4  TTTGGCAGCACTATAACTCTGTTGCCCTGTTTGTCTTGAAAAGTATAACATCACTTAGC
LOC_Os06g0  TTTGGTCCACC--AAATCTGTGG---TGGATGAAAGGGAATTA-ATAACAC--AAA
LOC_Os06g3  TTTTGTAGCATGCTTCTATTGTAGA--TGAAGACAACCAGAACTTCCAAAAGTCCGAGA

6781      6791      6801      6811      6821      6831
LOC_Os02g4  AGGACAATGCTCTCCCGAAAACATAACTGATTAGTGGATAGAGGGAG-AGGTTTAG----
LOC_Os11g4  AGGACAATGCTCTCCCGAAAACATAACTGATTAGTGGATAGAGAGAG-TGGTTTAGGTGG
LOC_Os06g0  TGGAAAATTCTTCATTGTGAA---ACGTGATAAG-----GACAA-ATTTTGTG----
LOC_Os06g3  TATTGAAGGTGCTAATGTAGCCAAATATGTCCGGACAGGCCTGACTGTAAGTTTGG----

6841      6851      6861      6871      6881      6891
LOC_Os02g4  -----
LOC_Os11g4  TGTTTGGATCCGGGGACTAAATTTTAGTTCATGTACATCGGATGTTTGGACACTAATTA
LOC_Os06g0  -----
LOC_Os06g3  -----

6901      6911      6921      6931      6941      6951
LOC_Os02g4  -----TCCCAATAGATAAATTGACTGGTTACT
LOC_Os11g4  GAAATATTAACATAGACTAATAATAAAAATTTAGTCCCAATAGATAAATTGACTGGTTACT
LOC_Os06g0  -----AATAAATAA-----
LOC_Os06g3  -----TGGAATTATACAAGATTACAGTT----

6961      6971      6981      6991      7001      7011
LOC_Os02g4  TCATATTCATTGCCAGAGCTGCCATTAATGTT--CTGTCCTGTGCTTCTTTGGATC
LOC_Os11g4  TCATATTCATTGCCAGAGCTGCCATTAATGTTGTCCTGTTCTGTGCTTCTTTGGATC
LOC_Os06g0  ---AGTAA-----C---AAAAAATGG---CTAGTATTTGCCCTAC-----
LOC_Os06g3  TACAAGTAT-----ACAAAATGT---GCATGTTTCTTCTTCAT-----

7021      7031      7041      7051      7061      7071
LOC_Os02g4  TTGAATTTAAAAGACGTCTGTACAGGGTACCACACCTCAAGGGATCACAATTCAGAAAAGTT
LOC_Os11g4  TTGAATTTAAAAGACGTCTGTACAGGGTACCACACCTCAAGGGATCACAATTCAGAAAAGTT
LOC_Os06g0  ---ATATAGAGT-----ACACCTCAAGAGATCA-----GAAAAGT
LOC_Os06g3  -TTTTTACATCTTCTTCTGTCTCATAATGCAGCCACGATGGGCCGACCTTGATATCAATC

7081      7091      7101      7111      7121      7131
LOC_Os02g4  TCCCT-TTATTGGGCTGCAGTAAAT-GATTCCATCGTGTAGAAAAGAACAAGCAATTA
LOC_Os11g4  TCCCT-TTATTGGTCTGCAGTAAAT-GATTCCATCGTATAGAAAAGAACAAGCAATTA
LOC_Os06g0  TGCCCT-TTATTG--ATGGAGTAAT-GAATTAGTAGT-----A-----AGCAATAA
LOC_Os06g3  AGCATGTTAATAACGTTAATAACATAGGGTGGATCCTAGAGGTAAAAAAGTTCCCCT--

7141      7151      7161      7171      7181      7191
LOC_Os02g4  ATGCTGTGCCATATCATGGGAGAAGCTAAGGACCGATCTAGAACAGTGAACCTTTTGTG-
LOC_Os11g4  ATGCTGTGCCATATCATGGGAGAAGCTAAGGACCGATCTAGAACAGTGAACCTTTTGTG-
LOC_Os06g0  AFTCTGTGG-ACCT-AGGGGACATCC-----CTGATCTAGATC----GAGTTTGTGAT--
LOC_Os06g3  ATTATGTTTCATCTTTAATTGCCCTTGCTAA---CACCTCTTGCTAGATGATTCTTGAGGG

```

图4h

```

7201      7211      7221      7231      7241      7251
LOC_Os02g4 AACAGCATCTGTCAGTTTAAATTTCTAGGTGGTCATTCATCAAATAAGTGGTGCTAG
LOC_Os11g4 AACAGCATCTGTCAGTTTAAAAATCTAGGTGGTCATTCATCAAATAAGTGGTGCTAG
LOC_Os06g0 ---CTCATGCTACA-TTTAATCTTCCATGTCAGCAACTTTCA-----GTAC---
LOC_Os06g3 AAAAAATGCTTC--T-TGAAGTTTCAGTATGTT--ACTTTCAGAAAAAT--ATCCATT

7261      7271      7281      7291      7301      7311
LOC_Os02g4 TACTACTATT-CACACGTTATGTTTAAATCCTCTGTCAACTGTGTCAACAAGTGGTTGA
LOC_Os11g4 TGCTACTATTGCACACGTTTATGTTTAAATCCTCTGTCAACTGTGTCAACAAGTGGTTGA
LOC_Os06g0 ---CTGCTATT-----AAATT----TCCCCTGTTCTTCTG-----ACGATTGATGCA
LOC_Os06g3 TGTTTTTATT-----TACTGTAAACACTCCATGGAGTTGCTGTTAGGCATCTTTGT

7321      7331      7341      7351      7361      7371
LOC_Os02g4 AAAC TTCTTTTGGGGGTTTGGAGTTAGAAAAATGGAAGTGCAATTTCAAAC TGTTTTTT
LOC_Os11g4 AAAC TTCTTTTGGGGGTTTGGAGTTATAAAAAATGGAGCTGCAATTTCAAAT TGTTTTTT
LOC_Os06g0 --A-----TTT-TAAGTTTATGAGA-AGGAAAACGGTCTGCTGTTTTGAAATTCGAATG
LOC_Os06g3 CGC-----GGTATTCATTATAAGT-TGTCACATGGTGGAGCA-T----AACTTTGTGT-

7381      7391      7401      7411      7421      7431
LOC_Os02g4 TAGTTCAGATACAATFGCCGATGTCTTTCTGTGGATCAAAAAGAATGACAGATGTATTGT
LOC_Os11g4 TAGTTCAGATACAATFGCCGACGTCTTTCTGTGGATCAAAA- AATGACAGATGTATTGT
LOC_Os06g0 TAGTTTACA--CAATT-----TCTCATAGGCTGAAAT----T--T-----TG--GT
LOC_Os06g3 TGCTTTACTTGCCTTT-----T---TCTCTTTGGGCATACA-----TTTAGT

7441      7451      7461      7471      7481      7491
LOC_Os02g4 ACCAACCTGCTATGGTTTTAGGGGAGATATGGTTCAAGTTGACACATGGGTGCTGCTGC
LOC_Os11g4 ACCAACCTGCTATGGTTTTAGGGGAGATACGGTTC AAGTTGACACATGGGTGCTGCTGC
LOC_Os06g0 TGCAA-----AT--TTTTAGGGGAGATATGGTCCAAGTTGACACATGGGTAGCTGCTGC
LOC_Os06g3 ACTA-----TTGATGGTGCTACATAAATTC AAAGAGATTCAATTTATCTCGCTATA

7501      7511      7521      7531      7541      7551
LOC_Os02g4 TGGCAAAAATGGCATGCGTCGAGACTGGCATGTTTCGTGACTACAAC TCTGGCCGAAACAAT
LOC_Os11g4 TGGCAAAAATGGCATGCGTCGAGACTGGCATGTTTCGTGACTACAAC TCTGGCCGAAACAAT
LOC_Os06g0 TGGCAAAAATGGCATGCGTCGAGATTGGCATGTTTCGGGACTACAAC TCTGGTCAACAACAAT
LOC_Os06g3 TTTCCCATATGTTATGTTCCAAGAA-----TTTGGGAATA-AACAGT-----AAT

7561      7571      7581      7591      7601      7611
LOC_Os02g4 CTTGAGAGCTACAAGSTTTGGGCTTCAACTGTATTCTATTGCAAGAATCATCTGTATCAT
LOC_Os11g4 CTTGAGAGCTACAAGSTTTGGGCTTCAACTTTATTTCTATTGCAAGAATCATCTGTATCGT
LOC_Os06g0 CTTGAGGGCTACAAGSTTTGTGTTA-----T---CGTTTGCA-----TTTGTGTCAT
LOC_Os06g3 CAGAAGAG-TACTGGATTTGTAGGTA--CTTTAT-TTTTTGTG-----TGTGTGT-GT

7621      7631      7641      7651      7661      7671
LOC_Os02g4 TTTTTTTGTGAGGACATCCAATCTTGGTATTTCTGCTTGGTCACATCATTGATAATCACT
LOC_Os11g4 TTTTTTTATGAGGATATCCAATCTTGGTATTTCTGCTTGGTCACATCATTGATAATGCT
LOC_Os06g0 TTCTTTTGT-----TTC--ATGCTG-TTTACCAGCATGTTTATTCCTTTTCGATTTGCT
LOC_Os06g3 GGGGGGGGGGGGGGCTCAGATCATG-CCTATGATTAGGCATTACTGTAGGAGTTTAGAT

7681      7691      7701      7711      7721      7731
LOC_Os02g4 AATTGTGCTCCTTTTCCAATCCATTTGTTGCAGTGTTTGGGTGATGATGCACAAGAAAAC
LOC_Os11g4 AATTGTGCTCCTTTTCCAATCC-TTCTTGCAGTGTTTGGGTGATGATGCACAAGAAAAC
LOC_Os06g0 AATTGT--TCCTCT-----C-TTGTTCAGTGTTTGGGTGATGATGAATAAGAACAC
LOC_Os06g3 AAAC TTGGTCAAGG-----TCCAAAAGGGTGTCCCTATGGTCTACAAGTGTCC

7741      7751      7761      7771      7781      7791
LOC_Os02g4 TAGAAGACTTTCAAAAATGCCAGATGAAGTTAGAGCTGAAATAGGCCCATATTTCAATGA
LOC_Os11g4 TAGAAGACTTTCAAAAATGCCAGATGAAGTTAGAGCTGAAATAGGCCCATATTTCAATGA
LOC_Os06g0 TAGAAGACTTTCAAAAATGCCAGATGAAGTTAGAGCTGAAATAGGCCCATATTTCAATGG
LOC_Os06g3 -ACCTAACTTT--A---TCCTCAAGCAGCAGCAACCACTTATCTGGCAGCTTTGTACTCTTT

7801      7811      7821      7831      7841      7851
LOC_Os02g4 CCGTTCAGCTATAACAGAGG-AGCAGAGTGAAAAGTTAGCCTAGACAGGAAATAAAGTTG
LOC_Os11g4 CCGTTCAGCTATAACAGAGG-AGCAGAGTGAAAAGTTAGCCAAGACAGGAAATAAAGTTG
LOC_Os06g0 CCGTTCAGCTATAACAGAGG-AGCAGGGTGAAAAGTTGCCTAAGCCAGGGACCAATTTG
LOC_Os06g3 CA----AGCTATACGAAAAATATCTGTTGCACTAGTTGGAGAAGTAATG---TATCCTAG

```

图4i


```

7861      7871      7881      7891      7901      7911
LOC_Os02g4 GTGATGATGCTACAGAGCAATTCATAAGAAAGGGGCTCAC--TGTAAGTCAGCTAGACAT
LOC_Os11g4 GTGATGATGCTACAGAGCAATTCATAAGAAAGGGGCTCAC--TGTAAGTCAGCTAGACAT
LOC_Os06g0 ATGGCGCTGCTACCAAACAATTCACAAGAAAGGGGCTTAC--TGTAAGTCAGTTA-ATAT
LOC_Os06g3 CAGATTTTACTACATTAGGTTGGTCCACTACGTACCTAACCCGTGACGCTTGTG-CTTC

7921      7931      7941      7951      7961      7971
LOC_Os02g4 GGTTACATACTGAATTATCATTATGCCTCAACTGCATCATTATCTAAGAAAAACAGTA
LOC_Os11g4 AGTTACATACTAAATTATCATTATGCCTCAACTGCAATCATTATCTAAGAAAAATAGTA
LOC_Os06g0 TGCTTGTTACCG-----TCATT-----CATTGCTGG-----
LOC_Os06g3 CGATAAAGAGCTTGCTGGAATA---CTTATATG---CAATTTGATCACAAAG-----

7981      7991      8001      8011      8021      8031
LOC_Os02g4 ATAATTGATCTCACCCCTCATTATTTTAAATGATATTTGATGGACTCTTGTTTACTGCA
LOC_Os11g4 ATATTTGATCTCACCCCTCATTATTTTAAATGATCTTTGATGGACTCTTGTTTACTGCA
LOC_Os06g0 ----TGTTCTCATGCATAAAATTTCTCA-----TGAGGGATCCTTTGTTCAATGT-
LOC_Os06g3 ----TCATTCACTTAATTCATTTTTTTAGAG----TGATCAACACCTGCATATAAT-

8041      8051      8061      8071      8081      8091
LOC_Os02g4 ACAGCCTAGATGGGGTGACCTCGATGTCAATCAGCA-TGTGAACAATGTTAAATATATTG
LOC_Os11g4 ACAGCCTAGATGGGGTGACCTCGATGTCAATCAGCA-TGTGAACAATGTTAAATATATTG
LOC_Os06g0 -CAGCCGAAGTGAGTGACCTTGATGTCAACCAGCA-TGTGAACAATGTGAAGTATATTG
LOC_Os06g3 ---GCATATTG-----CCTGGTTGACAATCTGCCGTGTGTA---TGTG---TGTTTTG

8101      8111      8121      8131      8141      8151
LOC_Os02g4 GGTGGATCCTTGAGGTGGTTATTCTTGTCCCTTATATTCATTGTTTAGAGAA--AAATAA
LOC_Os11g4 GGTGGATCCTTGAGGTGGTTATTCTTGTCCCTTATATTCATTGTTTAGAGAA--AAATAA
LOC_Os06g0 GTTGGATACCTTGAGGTAAC--TTCTTTTCCTT-----TTCTCTATCCGA--ACATGC
LOC_Os06g3 GAAGAAGGGGAGGGGTAGT---CATGTATGTAT-----TTATCCAGTGACCACATAA

8161      8171      8181      8191      8201      8211
LOC_Os02g4 TTTGGCTTTATCCTTTTATATGGTACTTCCTTTGTTTCAACAATGTAAGTCATTTTAGCAT
LOC_Os11g4 TTTGGCTTTATCCTTTTATATGGTG-----
LOC_Os06g0 TATCTCTAGATCAGAAAAGAGAGTG-----
LOC_Os06g3 TGAGGAAAAGAAATTGTTTCAGGTG-----

8221      8231      8241      8251      8261      8271
LOC_Os02g4 TTCCCATATTTATATTTATGCTAATGAATCTAAATAGATATATGTTGCTAGATTCATTGG
LOC_Os11g4 -----
LOC_Os06g0 -----
LOC_Os06g3 -----ACCTG-----

8281      8291      8301      8311      8321      8331
LOC_Os02g4 CATCAATATGAATGTGAGAAATGCTAAAATGACTTACATTATGAAACGGAGGGAGTAGTT
LOC_Os11g4 -----G-----TT
LOC_Os06g0 -----
LOC_Os06g3 ---CAACCT-----AGA-----TG

8341      8351      8361      8371      8381      8391
LOC_Os02g4 GTTAGGGAACCATTTTATGTAGTACTTGCAATTATTTCTAGAGATTCTGATCTGACCAT
LOC_Os11g4 GTTAGGGAACCATTTTATGTAGTACTTGCAATTATTTCTAGAGATTCTGATCTGACCAT
LOC_Os06g0 -----TCFGATCGTAATTAGTA-----ACCTAGTTCCTAG-----TCATATGCCAAG
LOC_Os06g3 GGCCCAAACAACCCAAAATATTAGG-GAAATTAACACTTCAGG-----CATTTCTTAAC

8401      8411      8421      8431      8441      8451
LOC_Os02g4 CTGTATTGTTGATATTGTCATTAGTCTTACATCTGGTCAGTCAGAAGGCTTTCAAACATG
LOC_Os11g4 CTGTATTGTTGATATTGTCATTAGTCTTACATCTGGTCAGTCAGAAGGCTTTCAAACATG
LOC_Os06g0 CTGTA-----AAA-ACACTTGCA-CTGTATATTCAAAGCTATTCAA-----
LOC_Os06g3 ATACA-----GAAATATTTATTAC--CAACATGCCACATGTTGCTTAAC-----

8461      8471      8481      8491      8501      8511
LOC_Os02g4 TTTCTGAGTCTTTTCTAATTTTTTCCCC-CAGAGTGCTCCAATTTTCAGTACTGGAGAAGC
LOC_Os11g4 TTTTGGAGTCTTTTCTAATTTTTTCCCC-CAGAGTGCTCCAATTTTCAGTACTGGAGAAGC
LOC_Os06g0 TTTCTGAGTACGTTTTGTTTTTTTTTCTCAGAGTGCTCCAATTTTCGATCTGGAGAAGC
LOC_Os06g3 ---CCTACCTTTTTGTCCTTTTTTCCCTCAGAGCCACCAATCTCCATTTCTGGAGAAGC

```

图4j

```

8521      8531      8541      8551      8561      8571
LOC_Os02g4 ATGAGCTTGAAGCATGACCCCTGGATTACAGGAAGGAGTGTGGCCGAGACAGCGTGTCTGC
LOC_Os11g4 ATGAGCTTGAAGCATGACCCCTGGATTACAGGAAGGAGTGTGGTTCGAGACAGCGTGTCTGC
LOC_Os06g0 ACGAGCTTGAAGCATGACCTTGGATTACAGGAAGGAGTGTGGCCGTGACAGTGTGCTTC
LOC_Os06g3 ATGAGCTGGCAAGTATTGTCTGGATTACAAGAGGGAGTGTGGCCGAGACAGCGTGTCTGC

8581      8591      8601      8611      8621      8631
LOC_Os02g4 AATCACTTACCACCGTGTGAGGGGAATGCACCAGCATTGGCGCCGACAAGCAGGCTTCTG
LOC_Os11g4 AATCACTTACCACCGTGTGAGGGGAATGCACCAGCATTGGCGCCGACAAGCAGGCTTCTG
LOC_Os06g0 AGTCGCTTACCCTGTTTCAGGTGAATGCGA-----TGATGGCAACA--CAGAATCTT-
LOC_Os06g3 AATCACACACTACCGTGTACTGACTGCAACA----AGCACTCTGGA--CAAACCACT-

8641      8651      8661      8671      8681      8691
LOC_Os02g4 CCATCCAGTGCACCATCTTGTGAAG-----GCTGACATTGTGAAGGCACACA
LOC_Os11g4 CCATCCAGTGCACCATCTTCTTCAGCTTGTAGTCAAGGAGTGTATTTGTGAAGGCACACA
LOC_Os06g0 CCATCCAGTGTGACCATCTGCTTCAGCTGGAGTCCGGAGCAGACATTGTGAAGGCTCACA
LOC_Os06g3 --TTGCACTGTGAGCATTTTCTGAGCCTGGAATCAGGACCTACCATCGTCAAGGCCAGGA

8701      8711      8721      8731      8741      8751
LOC_Os02g4 CAGAGTGGCGACCAAAGCGATCGCATGCAGCAGCTGAGAACGCG----TAAACAACAA
LOC_Os11g4 CAGAGTGGCGACCAAAGCGATCGCACGCAGCAGCTGAGAACGCG----TAAACAACAA
LOC_Os06g0 CAGAGTGGCGACCAAAGCGAGCTCAGGGCG--AGGGGAACATGGGCT--TTTCCCAGCTG
LOC_Os06g3 CCATGTGGAGGCCAAAGGAAC-CAGGCCCAAGAGATATCATTCCGCTCTCGTCTGTA

8761      8771      8781      8791      8801      8811
LOC_Os02g4 ACCGACGAAAATCTGTGGTAGGGAGAATATCAAACCTTCCCTTGCCTCTGTGCCCCGAAG
LOC_Os11g4 ACCGACGAAAATCTGTGGTAGGGAGAATATCAAACCTTCCCTTGCCTCTGTGCCCCGAAG
LOC_Os06g0 AGAGTGCATGAGCGCT--TCTGTAGTTTATCCGGCAAG--TAACCTCT-TTGA---GAAG
LOC_Os06g3 AGCGCGTAAAATCTTTCATGTGTTGATTTT---GTAGCAACAACCTGGTTAAAC-CAAG

8821      8831      8841      8851      8861      8871
LOC_Os02g4 CTGATCTTGA-AGTGTGAGTTGTATTCTGTAAAAAATTAGTAGTTTCCATAGTGTGAGGT
LOC_Os11g4 CTTATCTTGA-AGTGTGAGTTGTATTCTGTAAAAAATTAGTAGTTTCCATAGTGTGAGGT
LOC_Os06g0 TGCAGATTCT-AACTTGGCTAGCAACACAGGACAAATGATTTGTTGGTGGGAAATTTGGCA
LOC_Os06g3 GACAAGTGGACAACAACCTTGTGTTCTCTATGGAAGGCCAAACCTGGATGAACATAACGA

8881      8891      8901      8911      8921      8931
LOC_Os02g4 TGGAGGGGAGGTGTTGGTGTCTTGCCTACTGTACCTGCT-ACATCT-ATTATTTCTTGATT
LOC_Os11g4 TGGAGGGGAGGTGTTGGTGTCTTGCCTACTGTACCTGCT-ACATCT-ATTATTTCTTGATT
LOC_Os06g0 TGCCGAGCCTGGGTTTTGTGATGCACACAGCACACATTAGATTGAAGATTGAGAGATG
LOC_Os06g3 CGGGGACGTAAGTTATTTACAGACAAAATGTATGGATT-----TGGAGGAGTTCAAAGA

8941      8951      8961      8971      8981      8991
LOC_Os02g4 CTTTGTTCGCTTTTTTTTTCTTTTTTGTTTTTTAACCCCTGTGGAGATAAGA-CAGGT--
LOC_Os11g4 CTTTGTTCGCTTTTTTTTTCTTTTTTGTTTTTTAACCCCTGTGGAGATAAGA-CAGGT--
LOC_Os06g0 CTTCTTATTGGCAGCTTGTTCAGAAAGATGACTAAGCGGTTTGG-GATAAAATCAGCTGA
LOC_Os06g3 GG--GGGGGGGGGGGGGGCAAGATGGAGGTAAAA-----TGCAGAAAAGA-CAGAAGG

9001      9011      9021      9031      9041      9051
LOC_Os02g4 TTTGAAGTGTGGAAGAGGTTGTTTCAATCGTCTAATTGATTCAACTATTTCAGCAAGTAAA
LOC_Os11g4 TTTGAAGTGTGGAAGAGGTTGTTTCAATCGTCTAATTGATTCAACTATTTCAGCAAGTAAA
LOC_Os06g0 TTGGGAAACATTAGCAGGATGATAAGCATGACTGGTGGTACCAATGAAAAGGGTTGAAAT
LOC_Os06g3 CGTATTGTGCATGATTTGTGTTTTCAGCTTTTCTCTAATTTTTCTTTCTTAGCAAAAG

9061      9071      9081      9091      9101      9111
LOC_Os02g4 CTGCTCCATGGAA-ATTT-----
LOC_Os11g4 CTGCTCCATGGAA-TTTCATCGTTTGGTTGGAGCCTGAG-----
LOC_Os06g0 CCTTTGCATTTGTTTCAATTTGTGTTGGAGCAAGAGTGGCCGAGTTGCTTATCACACAGGAT
LOC_Os06g3 ATATTCAATTACACAGATGG-GTGTGTAAAGTATTGAAATGTAGTACTGCTGTACAAT

9121      9131      9141      9151      9161      9171
LOC_Os02g4 -----
LOC_Os11g4 -----
LOC_Os06g0 GATG-GAGGTGTTTGTGTGAAGCTTATTGCTGAAGCTGGATTGTTTTGACCTGTGTTTC
LOC_Os06g3 GGGAAAGTGAATGCTTCTCATGCAATTTCTGTCTGGCTATGCTATATATPATGAGCCCT

```

图4k

	9181	9191	9201	9211	9221	9231
LOC_Os02g4	-----					
LOC_Os11g4	-----					
LOC_Os06g0	TAAAAGAAAAGGGAAAAGAAGAAGCTGTGGATTGAGGCCGGAGCAGCAGAGATATTACAA					
LOC_Os06g3	CGAAAGCAGATTGCCTGGTCCGAATTGTTTGAATTTTAAGTTT-----					
	9241	9251	9261	9271	9281	9291
LOC_Os02g4	-----					
LOC_Os11g4	-----					
LOC_Os06g0	TCGACATAGATAAATAAGATGTAATACTAATTTAGCCCAGGTGGTTTGTGTGTGGAGATG					
LOC_Os06g3	-----					
	9301	9311	9321	9331	9341	9351
LOC_Os02g4	-----					
LOC_Os11g4	-----					
LOC_Os06g0	CAATCCATTGTAGTAACAGCCTAACTTGTACATTCTTGCCATCTTTTCTTATTAATTGA					
LOC_Os06g3	-----					
	9361	9371	9381	9391	9401	9411
LOC_Os02g4	-----					
LOC_Os11g4	-----					
LOC_Os06g0	ATGAATGAATCGCAGACCTCCTGCGTTTTTCATCAATAATTGAAATGACTTCTGCTTCATC					
LOC_Os06g3	-----					
	9421	9431	9441			
LOC_Os02g4	-----					
LOC_Os11g4	-----					
LOC_Os06g0	AAGAATTGAATGAATTGTCTGTCTG					
LOC_Os06g3	-----					

图41

```

1 ..ATGGCTGGTTCTCTTGCGGCGTCTGCATTCTTCCCTGTCCCAGGGTCT 48
  |||
1151 TCATGGCTGGTTCTCTTGCGGCGTCTGCATTCTTCCCTGTCCCAGGGTCT 1200

49 TCCCCTGCAGCTTCGGCTAGAAGCTCTAAGAACACAACCGGTGAATTGCC 98
  |||
1201 TCCCCTGCAGCTTCGGCTAGAAGCTCTAAGAACACAACCGGTGAATTGCC 1250

99 AGAGAATTTGAGTGTCCGCGGAATCGTCGCGAAGCCTAATCCGTCTCCAG 148
  |||
1251 AGAGAATTTGAGTGTCCGCGGAATCGTCGCGAAGCCTAATCCGTCTCCAG 1300

149 GGGCCATGCAAGTCAAGGCGCAGGCGCAAGCCCTTCTAAGGTTAATGGA 198
  |||
1301 GGGCCATGCAAGTCAAGGCGCAGGCGCAAGCCCTTCTAAGGTTAATGGA 1350

199 ACCAAGGTTAACCTGAAGACTACAAGCCCAGACAAGGAGGATATAATACC 248
  |||
1351 ACCAAGGTTAACCTGAAGACTACAAGCCCAGACAAGGAGGATATAATACC 1400

249 GTACACTGCTCCGAAGACATTCTATAACCAATTGCCAGACTGGAGCATGC 298
  |||
1401 GTACACTGCTCCGAAGACATTCTATAACCAATTGCCAGACTGGAGCATGC 1450

299 TTCTTGCAGCTGTCACGACCATTTTCCTGGCAGCTGAGAAGCAGTGGACT 348
  |||
1451 TTCTTGCAGCTGTCACGACCATTTTCCTGGCAGCTGAGAAGCAGTGGACT 1500

349 CTGCTTGACTGGAAGCCGAAGAAGCCTGACATGCTGGCTGACACATTCGG 398
  |||
1501 CTGCTTGACTGGAAGCCGAAGAAGCCTGACATGCTGGCTGACACATTCGG 1550

399 CTTTGGTAGGATCATCCAAGACGGGCTGGTGTGTTAGGCAAAACTTCTTGA 448
  |||
1551 CTTTGGTAGGATCATCCAAGACGGGCTGGTGTGTTAGGCAAAACTTCTTGA 1600

449 TTCGGTCCTACGAGATTGGTGCTGATCGTACAGCTTCTATTGAGACATTA 498
  |||
1601 TTCGGTCCTACGAGATTGGTGCTGATCGTACAGCTTCTATTGAGACATTA 1650

499 ATGAATCATTTA..... 510
  |||
1651 ATGAATCATTTACAGGTGATACAATGGAGCTATGCTGCTTTAGCTTTTCT 1700

  .
  .
  .

```

图5a

```

511 .....CAGGAAACAGCTCTGAACCATGTGAAAAGTCTGGTCT 548
      |||
1751 TTTGAAGCTTTGCAGGAAACAGCTCTGAACCATGTGAAAAGTCTGGTCT 1800

549 CTTAGGTGATGGTTTTGGTGCTACGCCGAGATGAGCAAACGGAACCTAA 598
      |||
1801 CTTAGGTGATGGTTTTGGTGCTACGCCGAGATGAGCAAACGGAACCTAA 1850

599 TATGGGTTGTCAGCAAATTCAGCTTCTTGTGAGCGATAACCCATCAT.. 646
      |||
1851 TATGGGTTGTCAGCAAATTCAGCTTCTTGTGAGCGATAACCCATCATGG 1900

      .
      .
      .

647 .....GGGGAGATATGGT 659
      |||
3101 ATTTCTCATAGGCTGAAATTTTGGTTGCAAATTTTAGGGGAGATATGGT 3150

660 CCAAGTTGACACATGGGTAGCTGCTGCTGGCAAAAATGGCATGCGTCGAG 709
      |||
3151 CCAAGTTGACACATGGGTAGCTGCTGCTGGCAAAAATGGCATGCGTCGAG 3200

710 ATTGGCATGTTGCGGACTACAACCTCTGGTCAAACAATCTTGAGGGCTACA 759
      |||
3201 ATTGGCATGTTGCGGACTACAACCTCTGGTCAAACAATCTTGAGGGCTACA 3250

      .
      .
      .

760 ....AGTGTTTGGGIGATGATGAATAAGAACACTAGAAGACTTTCAAAAA 805
      |||
3351 TTGCAGTGTTTGGGIGATGATGAATAAGAACACTAGAAGACTTTCAAAAA 3400

806 TGCCAGATGAAGTTAGAGCTGAAATAGGCCCGTATTTCAATGGCCGTTCT 855
      |||
3401 TGCCAGATGAAGTTAGAGCTGAAATAGGCCCGTATTTCAATGGCCGTTCT 3450

856 GCTATATCAGAGGAGCAGGGTGAAAAGTTGCCTAAGCCAGGGACCACATT 905
      |||
3451 GCTATATCAGAGGAGCAGGGTGAAAAGTTGCCTAAGCCAGGGACCACATT 3500

906 TGATGGCGCTGCTACCAACAATTCACAAGAAAAGGGCTTACT..... 948
      |||
3501 TGATGGCGCTGCTACCAACAATTCACAAGAAAAGGGCTTACTGTAAGTC 3550

      .
      .
      .

```

图5b

蛋白 F_1	MGAGRMTEKEREFEQOKLLGRAGNGAAVORSPTDKPFFTIGQIKKAIPPHCFORSVIKSE			
蛋白 F_3	-----MQRSPVDKPPFTIGDIKKAIPPHCFHRSVIKSE			
蛋白 F_2	MGTSSRPTTVKEGKKLEAPRRAGSHAAVKRSVDPKPPFTLGDIRKALPPHCFHRSVIKSE			
蛋白 F_4	-----MAGRRRWGGWREQEPPRRAGSSAAVQREHRSVIKSE			
蛋白 F_1	61	71	81	91
蛋白 F_3				101
蛋白 F_2				111
蛋白 F_4				
蛋白 F_1	SYVVDLIVIVAALLYFALVMI PVLPSGMEFAAMPLYWIAQGCVL TGWVIAHECGHHAFS			
蛋白 F_3	SYLLHDLAIAAGLLYFALVGI PALPSILRLVAMPLYWAAQGSVLTGVWVIGHECGHHAFS			
蛋白 F_2	SYLLHDLAIAAGLLYFALVVI PALPGVLRLLVAMPFYWAAQGCFLFGVWIIAHECGHHAFS			
蛋白 F_4	SYLLRDVAIAAGLLNFALVGI PVI PAGVLRPPRLAVILGRAGLLPVRGVDHRRVRAPR			
蛋白 F_1	121	131	141	151
蛋白 F_3				161
蛋白 F_2				171
蛋白 F_4				
蛋白 F_1	DYSVLDDIVGLVHSSLLV PYESWKYSHRRHHSNTGSLERDEVFVPKQKSAMAWYTPYVY			
蛋白 F_3	DYLLLDNLVGLVLSALL TPFSSWKYSHRRHHSNTGSMKDEVYVAKKKSALPWYTPYVF			
蛋白 F_2	GHALLDDTLGLVLSWLL APYFSWKYTHORHHSNTSSOERDEVEVPRFKSDLPWYSPYVY			
蛋白 F_4	APRRHPRSGPALVASGT ILLVEIQPPAAPLQHLTGARRGVRPQVRSAREL PVRVQVQ			
蛋白 F_1	181	191	201	211
蛋白 F_3				221
蛋白 F_2				231
蛋白 F_4				
蛋白 F_1	H--NPIGRLVHIFVQLTIGWPL YLAFNLSGRPYPRFA-CHFDPPYGPYINDRERVQIFISD			
蛋白 F_3	G--NPVGRIVYIALQLTIAWPL YLAFNLSGOPYPRLV TCHYDYPSPLEFSDQERVQVLVSD			
蛋白 F_2	KYNNPVARILLIVVQLT VGWPMYLVNTWGRQYPRFA-SHFDPSGPIYKGRERVFIAISD			
蛋白 F_4	Q--RPVARILLIGMQLTVGWPMYLVNTWGRWYPRFA-SHEDPSGAIYMRERVFIAISD			

图7a

蛋白 F_1	241	251	261	271	281	291
蛋白 F_3						
蛋白 F_2						
蛋白 F_4						

蛋白 F_1	301	311	321	331	341	351
蛋白 F_3						
蛋白 F_2						
蛋白 F_4						

蛋白 F_1	361	371	381			
蛋白 F_3						
蛋白 F_2						
蛋白 F_4						

VGVVSAGLALFKLSSAFGEWVVRVYGVPELLLVNAWLVLITYLQHTHPALPHYDSSEWDW
 AAILAVLLALHRLTAAYGLWVVRVYGVPMIVGALFVLTLYLHHTHRALPHYDSSEW
 IGMMLAVSLALYRLAEGYGEWVVRVYGVPELLLVNAWLWVVTYLHHTHRAIPHYDSSEWDW
 IGMMLAVSLAL
 LRGALATVDRDYGLLNKVEHNIETDTHVAHHILFSTMPHYHAMEATKPAIRPILGEYYQFDPT
 LRGSLATVDRDYGVINRVLHNVTDTHTVHLHILFSPMPHYHAMEATRAARPVLGEYYKEDRT
 LRGALATVDRDYSEFNLNRVFNITDTHVVHHLFTTIPHYHAVEATKPAIRPILGEYYQFDPT
 PVAKATWREAKECIYVEPEDNKGVFWYNNKE
 PILEATWREAKECMYVEPRERDGIYWYNNKE
 PIVKAIWREAKECIYIQSEDHKGVFWYSNKE

图7b

1 11 21 31 41 51 61 71 81 91
 cctctctctccctcacagaccactgcttctccacaaaggggagaaagggaggggtgccccccccccccccgatatgctctcg
 ~~~~~~TTGA  
 AP005168  
 AP004047  
 Contig2654  
  
 101 111 121 131 141 151 161 171 181 191  
 ccgctccctccctccgctgcaatctaccacgctaaactcagcaagatgggtgccccggcagagatgacggagagaggggagcagcagaa  
 ~~~~~~ACGGTGGTGGAGGGGAAGAACAAGAGCT  
 AP005168
 AP004047
 Contig2654

 201 211 221 231 241 251 261 271 281 291
 ACTACTCCGCGTCCGGCAGCAGCGCCATCGCGGTGACAAACCGCGTTCACGCTGGGGACATAAAGAGGCCATCCGGCCGGAC
 ~~~~~~GCTGTCCGGCCGGCCGAAATGGCCCGCGGTGGAGCGGTGGCGACGGAACCGCGGTTCACGCTGGGGCAGATCAAGAAAGCCATCCGCGCTCAC  
 GCGCCCGCGGTGCCGGCAGCCATGCAAGCGGTGAAAGCGCTCTCCGGTGGACAAAGCCCGGTTCACGCTGGGGCAGATCAGAAAGGCCATCCACCGCGAC  
  
 301 311 321 331 341 351 361 371 381 391  
 TGCCTCCACCGCTCCGCTGATCAAGTCAATTCCTACCTGCTCCACGACCTTGCATCGCCGCTGGCCCTCTACTTTCTCTGGTGGGCATCCCTGCC  
 ~~~~~~TGCCTCCACCGCTCCGCTGATCAAGTCAATTCCTACCTGCTCCACGACCTTGCATCGCCGCTGGCCCTCTACTTTCTCTGGTGGGCATCCCTGCC  
 TGCCTCCACCGCTCCGCTGATCAAGTCAATTCCTACCTGCTCCACGACCTTGCATCGCCGCTGGCCCTCTACTTTCTCTGGTGGGCATCCCTGCC

 401 411 421 431 441 451 461 471 481 491
 TCCCAAGCATCCTCCGCGCTGCTCCCTGGCCGCTTACTGGCCCGCAGGGCAGTCTACTCACCGGCGTGTGGGTCATCGGACAGTGTGGCCACCA
 ~~~~~~TCCCAAGCATCCTCCGCGCTGCTCCCTGGCCGCTTACTGGCCCGCAGGGCAGTCTACTCACCGGCGTGTGGGTCATCGGACAGTGTGGCCACCA  
 TCCCAAGCATCCTCCGCGCTGCTCCCTGGCCGCTTACTGGCCCGCAGGGCAGTCTACTCACCGGCGTGTGGGTCATCGGACAGTGTGGCCACCA  
  
 501 511 521 531 541 551 561 571 581 591  
 CGCCFTCCGGACTACTTGTCTCTGACAACTCGTGGCCTAGTCTCCACTCGCGGCTTCTCACGCCCTTCTCTGTTGGAAGTACAGCCACCGCGCG  
 ~~~~~~CGCCFTCCGGACTACTTGTCTCTGACAACTCGTGGCCTAGTCTCCACTCGCGGCTTCTCACGCCCTTCTCTGTTGGAAGTACAGCCACCGCGCG  
 TCCCAAGCATCCTCCGCGCTGCTCCCTGGCCGCTTACTGGCCCGCAGGGCAGTCTACTCACCGGCGTGTGGGTCATCGGACAGTGTGGCCACCA

 601 611 621 631 641 651 661 671 681 691
 CACCAAGCATCCTCCGCGCTGCTCCCTGGCCGCTTACTGGCCCGCAGGGCAGTCTACTCACCGGCGTGTGGGTCATCGGACAGTGTGGCCACCA
 ~~~~~~CACCAAGCATCCTCCGCGCTGCTCCCTGGCCGCTTACTGGCCCGCAGGGCAGTCTACTCACCGGCGTGTGGGTCATCGGACAGTGTGGCCACCA  
 CACCAAGCATCCTCCGCGCTGCTCCCTGGCCGCTTACTGGCCCGCAGGGCAGTCTACTCACCGGCGTGTGGGTCATCGGACAGTGTGGCCACCA  
  
 701 711 721 731 741 751 761 771 781 791  
 ACCCGTCCGGCGGTGGTGTACATCGCCCTGACCTCACCCTGGCCACTTACTCCGCTTCAACCTGTCCGGGACCCGACCCAGGCTCGT  
 ~~~~~~ACCCGTCGCTCCGCTGCTCCCTGGCCGCTTACTGGCCCGCAGGGCAGTCTACTCACCGGCGTGTGGGTCATCGGACAGTGTGGCCACCA  
 ACCCGTCCGGCGGTGGTGTACATCGCCCTGACCTCACCCTGGCCACTTACTCCGCTTCAACCTGTCCGGGACCCGACCCAGGCTCGT
 ACCCGTCCGGCGGTGGTGTACATCGCCCTGACCTCACCCTGGCCACTTACTCCGCTTCAACCTGTCCGGGACCCGACCCAGGCTCGT
 ACCCGTCCGGCGGTGGTGTACATCGCCCTGACCTCACCCTGGCCACTTACTCCGCTTCAACCTGTCCGGGACCCGACCCAGGCTCGT

8a

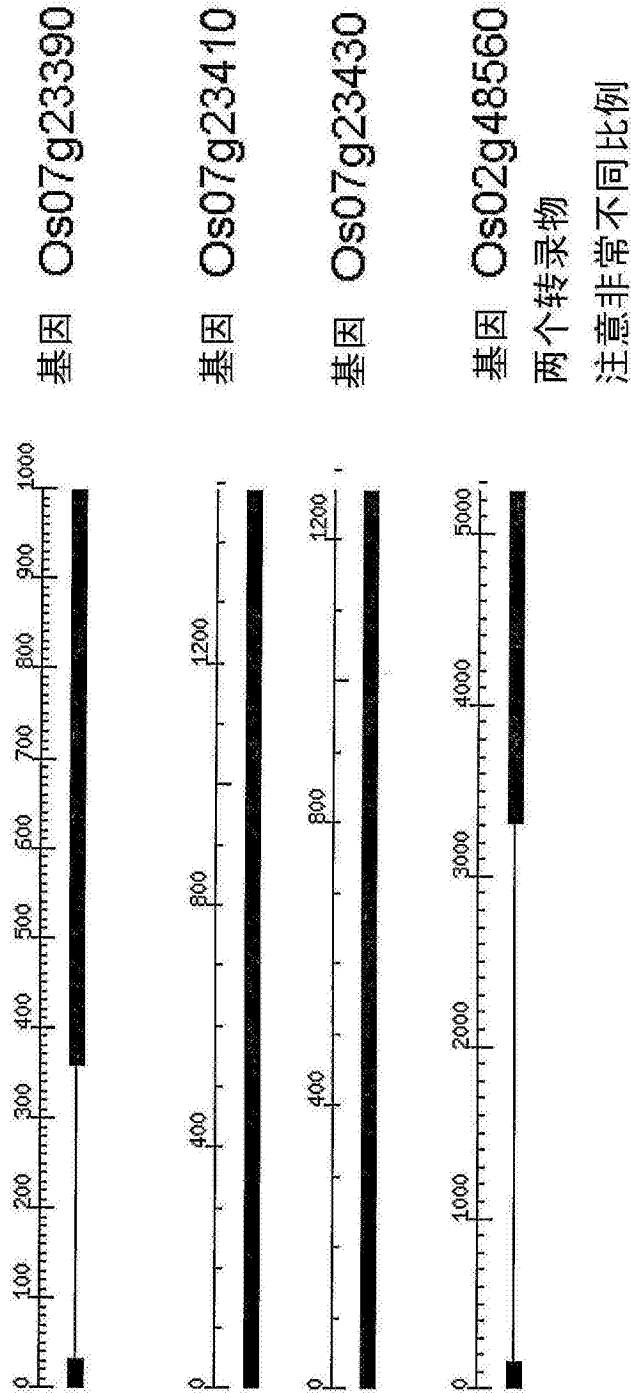


图9

```

cdsFAD20_2 ATGGGTACCAGCAGCCGGCCGACGACGGTGAAGGAGGGGAAGAACTAGAGCGCCCCCGC
cdsFAD20_4 -----
cdsFAD20_1 ATGGGTGCCGGGGCAGGATGACGGAGAGGAGCCGGAGGACAGCAGAAAGCTGCTCGGC
cdsFAD20_3 -----
61      71      81      91      101      111
CGTGCCGGCAGCCATGCAGCCGTGAAGCGCTCTCCGTGGACA--AGCCGCCGTTACAGC
cdsFAD20_2 ----ATGGCGGGGACGGCGGTGGGGCGATGGCG--TGAACAGGAGCCGCC--TCGCCG
cdsFAD20_4 ----ATGGCGGGGACGGCGGTGGGGCGATGGCG--TGAACAGGAGCCGCC--TCGCCG
cdsFAD20_1 CGCGCCGGCAATGGCGGGCCGTGCAGGGTGGCGGACGGACA--AGCCGCCGTTACAGC
cdsFAD20_3 ----ATGCAGCGCTCACCCGGTGGACA--AACCGCCGTTACAGC
121      131      141      151      161      171
TGGCGGACATCAGAAAGGCCATCCACCAGACTGGTTCCACCCGCTCCGTGATCAAGTCAT
cdsFAD20_2 TGC-CGGCAGCAGTGCAGCCGT-----GCAGCGCTCCACCCGCTCCGTGATCAAGTCAT
cdsFAD20_4 TGGGCAGATCAAGAAGGCCATCCCGCCTCAC TGCTTCCAGCGCTCGGTGATCAAGTCCT
cdsFAD20_1 TGGGGACATAAAGAAGGCCATCCCGCCGACTGGTTCCACCCGCTCCGTGATCAAGTCAT
cdsFAD20_3 -----
181      191      201      211      221      231
TCTCCTACCTGCTCCACGACCTTGCCATFGCCGGGGGCTCCTTACTTTGCTCTGGTCCG
cdsFAD20_2 TCTCCTACCTGCTCCGTGACGTAGCCAATGGCCGGGGCTCCTCAACTTTGCGCTGGTCCG
cdsFAD20_4 TCTCCTACCTGCTCCATGACCTCGTGTGATCGTCCCGCCGCTGCTTACTTCGGGCTGGTCA
cdsFAD20_1 TCTCCTACCTGCTCCACGACCTTGCCATFGCCGGTGGCTCCTTACTTTGCTCTGGTCCG
cdsFAD20_3 -----
241      251      261      271      281      291
TCATCCCTGCCCTCCC---AGSCGTCCTC---CGCCTCGTCGCTGGCCGTTCTACTGG
cdsFAD20_2 GCATCCCTGCTCCTCCCTGCAGGCTCCTCGGCGCGCTCGTCGCTGGCCGTTCTACTGG
cdsFAD20_4 TGATCCCGTGTGTGCC---GAGCGGGATG---GAGTTGCGGGCATGGCCGCTCTACTGG
cdsFAD20_1 GCATCCCTGCCCTCCC---AAGCATCCTC---CGCCTCGTCGCTGGCCGCTCTACTGG
cdsFAD20_3 -----

```

图10a

```

301      311      321      331      341      351
GCCGCGCAGGGGTGCTTCCTGTTCCGGGTGGATCATCGGCACGAGTGGGGCACCAC
cdfsFAD20_2
GCCGCGCAGGGTCTTCTTCTGTTGGTGGATCATCGGCACGAGTGGGGCACCAC
cdfsFAD20_4
ATCGCGCAGGGCTCGGTGCTCACCGGCGTGGGTTCATCGGCACGAGTGGGGCACCAC
cdfsFAD20_1
GCCGCGCAGGGCAGTGTACTCACCGGCGTGGGTTCATCGGCACGAGTGGGGCACCAC
cdfsFAD20_3

361      371      381      391      401      411
GCGTTCCTCGGGCCACGCACCTCTCGACGACACCCCTCGGCCCTGGTCTTGCACATGGCTC
cdfsFAD20_2
GCG-----CTCAAGACGACACCCCTCGGTCTGGTCTTGCACATGTGGCTT
cdfsFAD20_4
GCCTTCTCCGACTACTCGGTGCTCGACGACATCGTGGCCCTCGTGTGCACATCGTCCGTTG
cdfsFAD20_1
GCCTTCTCCGACTACTTGTCTCTCGACAACCTCGTGGGCCCTAGTGTCCACTCGGGCGCTT
cdfsFAD20_3

421      431      441      451      461      471
CTAGCGCCATACTTCTCGTGGAAATACACCCACCACCGGCACCCACTCCAACACCAGCTCA
cdfsFAD20_2
CTGGCACCATACTTCTCGTGGAAATACAGCCACCAGGGCACCCACTCCAACACCAGCTCA
cdfsFAD20_4
CTCGTCCCCTACTTCTCGTGGAAATACAGCCACCAGGGCACCCACTCCAACACCAGGGTCCG
cdfsFAD20_1
CTCACGCCCTTCTTCTCGTGGAAATACAGCCACCAGGGCACCCACTCCAACACCAGGGCTCC
cdfsFAD20_3

481      491      501      511      521      531
CAGGAGCGCGACGAGGTGTTCTGTTCCCAGGTTCAAGTCCGACCTGCCGTGGTACTCCCCA
cdfsFAD20_2
CAGGAGCGCGACGAGGTGTTCTGTTCCCAGGTTCAAGTCCGATCTGCCGTGGAATCCCCG
cdfsFAD20_4
CTGGAGCGCGACGAGGTGTTCTGTTCCCAGGTTCAAGTCCGATCCGCGATGGCGTGGTACACCCCG
cdfsFAD20_1
ATGGAGAAAACGACGAGGTGTACGTCGCGAAGAGAGTCCGCGCTGCCGTGGTACACCCCG
cdfsFAD20_3

541      551      561      571      581      591
TACGTTTACAAGTACAACAAC--CCCGTCGTCGGTGTGCTCTCTCGTGCAGTCA
cdfsFAD20_2
TACGTTTACAAGTACAACAACGGCCCGTCGCCGGCTACTGTCTCTCGGCATGCAGTCA
cdfsFAD20_4
TACGTTGTAC-----CACAAAC--CCGATCGGCCGGTGGTGCACATCTTCTGTGCAGTCA
cdfsFAD20_1
TACGTTGTTC-----GGCAAC--CCCGTCGGGCGGCTGGTGTACATCGCCCTGCAGTCA
cdfsFAD20_3

```

图 10b

```

601      611      621      631      641      651
cdsFAD20_2 CCGTCGGGTGGCCGATGTAATTGGTGTCAACACCTGGGGTCCCCAGTACCCAAAGGTTCCG
cdsFAD20_4 CTGTCCGGTGGCCGATGTAATTGGTGTCAACACCTGGGGTCCCTGGTACCCCGGGTTCCG
cdsFAD20_1 CCCTCGGGTGGCCGCTGTACCTGGCGTTCAACGTTCCGGCCGCCCTACCCCGGCTTCG
cdsFAD20_3 CCCTCGGGTGGCCACTTACCTTCGCGTTCAACCTGTCCGGGCAGCCGTACCCACGCCTCG

661      671      681      691      701      711
cdsFAD20_2 ---CCAGCCACTTCGATCCCTCTGGGCCCATCTACAAGGGGGCGGAGCGGCTTTCATCG
cdsFAD20_4 ---CCAGCCACTTCGATCCCTCCGGAGCCATCTACATGAGCGGGAGCGGCTTTCATCG
cdsFAD20_1 ---CGTGCCTACTTCGACCCCTACGGCCCGGATCTACAACGACCCGGAGCGGCTCCAGATCT
cdsFAD20_3 TCACCTGCCACTACGACCCCTACAGCCCGCTGTTCAGCGACCAGGAGCGGTTCCAAGTCC

721      731      741      751      761      771
cdsFAD20_2 CCATCTCGGACATCGGCATGCTGGCCGTTGCTCGCTGCCTGTACAGGCTTGCGGAGGGTT
cdsFAD20_4 CCATCTCGGACATCGGCATGCTGGCCGTTGCTCGCTGCCTGTAA-----
cdsFAD20_1 TCATCTCCGACGTCGGCGTGGTGTCCGGGGGCTCGCCCTGTCAAGCTGTCTCGGCGGT
cdsFAD20_3 TCGTCTCCGACGCCGCCATCTTGGCCGTGCTCGCGTGCACAGGCTGACGGCGGGCGGT

781      791      801      811      821      831
cdsFAD20_2 ACGGGTGTGGTGGTGGTGGTGTACGGCGTGTACGGCGTGCCTGTCTGTCTCAACGCGTGGC
cdsFAD20_4 -----
cdsFAD20_1 TCGGGTCTGGTGGTGGTGGTGTACGGCGTGTACGGCGTGCCTGTCTGTCTCAACGCGTGGC
cdsFAD20_3 ACGGGTCTGGTGGTGGTGGTGTACGGCGTGCCTGTCTGTCTCAACGCGTGGCCTGT

841      851      861      871      881      891
cdsFAD20_2 TTGTGGTCTACGTACCTGCATTCACACTCACCGGGCGATCCCACACTACGACTCCAGCG
cdsFAD20_4 -----
cdsFAD20_1 TGGTGTCACTACCTGCAGCACACCCCGGGGCTGCCGCACTACGACTCGAGCG
cdsFAD20_3 TCGTGTCACTACGTACCTGCACACACCCCGGGGCTCCCGCACTACGACTCCAGCG

```

图10c


```

901      911      921      931      941      951
AGTGGACTGGTTGGCGGGCGCTCGCCACCGTGGACCGGACTACAGCTTCCTTAACC
-----
AGTGGACTGGCTCCGCGGGCGGTGGCCACCGTGGACCGGACTACGGCATCCTCAACA
AGTGGAGTGGCTGGCTGGCTCGCTCGCCACCGTCGACCGGACTACGGCGTCTCAACC

961      971      981      991      1001     1011
GAGTGTTCACAACATCAGGGACACACACACGTCGTGCACCACCTGTCCCTACCATCCCGC
-----
AGGTGFTCCACAACATCAGGCACACGACGTCGGCACACCTCTTCTCCACCATGCCGC
GGTGTGCACAACGTCACGGACACGACGTCCTCCACCACCTCTTCCCCAGCATGCCAC

1021     1031     1041     1051     1061     1071
ACTACCACGCTGTGGAGGCGACCAAGGGGATCCGCCCTATCCTCGGGGAGTACTACCAGT
-----
ACTACCACGCGCATGGAGGCCACTAAGGCGATCCGCCCATCCTCGGGGAGTACTACCAGT
ACTACCACGCGCATGGAGGCCACCAGGGCAGCGAGGCCCGTCCCTCGGTGAGTACTACAAGT

1081     1091     1101     1111     1121     1131
TCGATCCCACACCCATCGTCAAGGCGATATGGCGGAGGCTAAGGAGTGCATCTACATCC
-----
TCGACCCGACGCCCCGTCCCAAGGCGACATGGCGGAGGCCAAGGAGTGCATCTACGTCG
TTGACCCGACGCCCCATCATCGAGGCCAACATGGCGTGAGGCCAAGGAGTGCATGTACGTTG

1141     1151     1161     1171     1181
AGTCCGAGGACCACAAGGGCGTCTCTGGTACAGCAACAAGTTCTAG
-----
AGCCTGAGGACAACAAGGGCGTCTCTGGTACAACAACAAGTTCTAA
AGCCAGGGAGCGCGATGGTATCTACTGGTACAACAACAAGTTTATAG

```

cdsFAD20_2
cdsFAD20_4
cdsFAD20_1
cdsFAD20_3

cdsFAD20_2
cdsFAD20_4
cdsFAD20_1
cdsFAD20_3

cdsFAD20_2
cdsFAD20_4
cdsFAD20_1
cdsFAD20_3

cdsFAD20_2
cdsFAD20_4
cdsFAD20_1
cdsFAD20_3

图 10

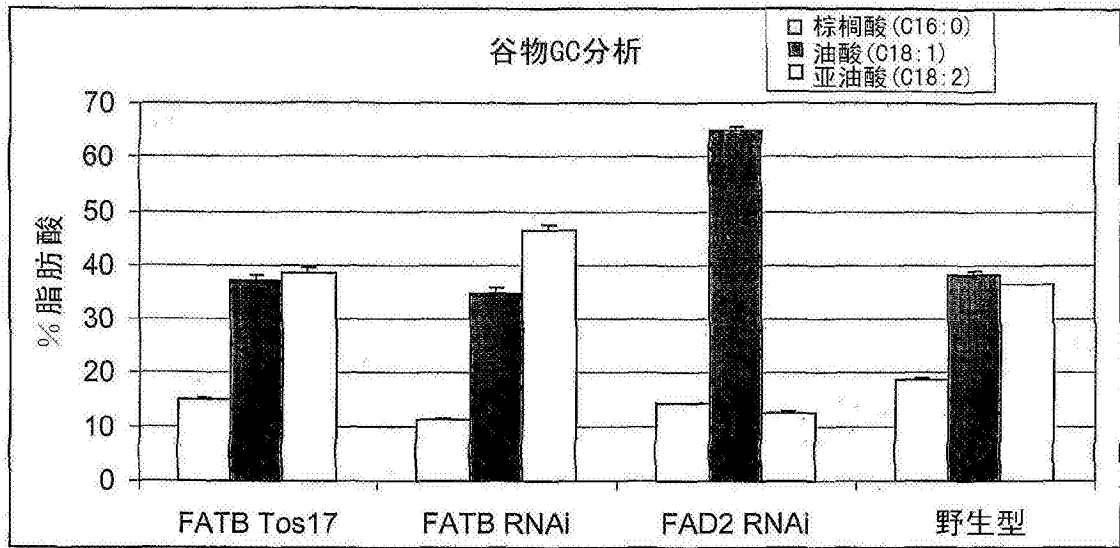


图11

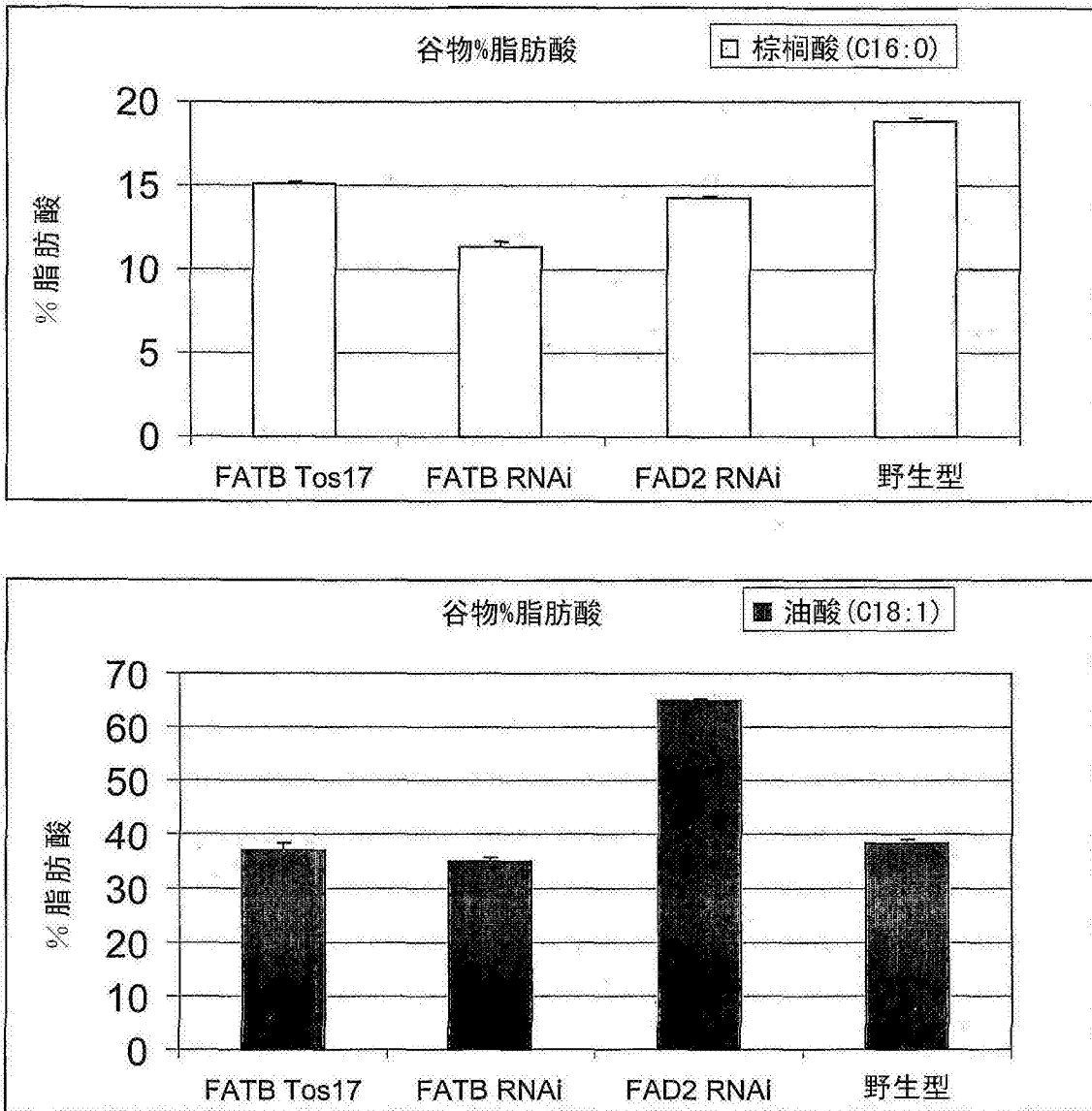


图12

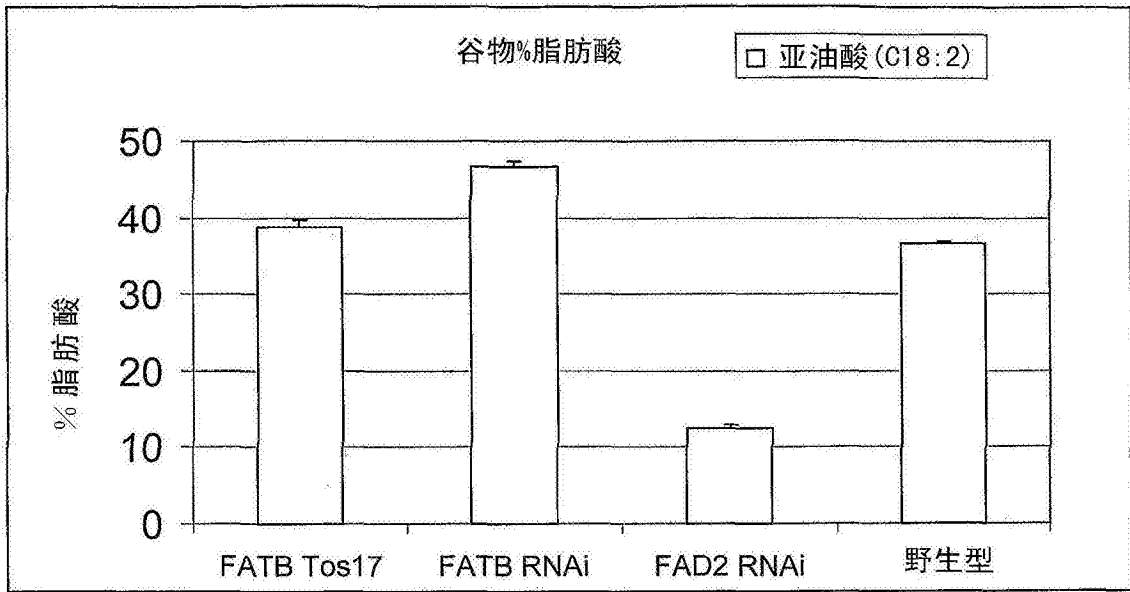


图13

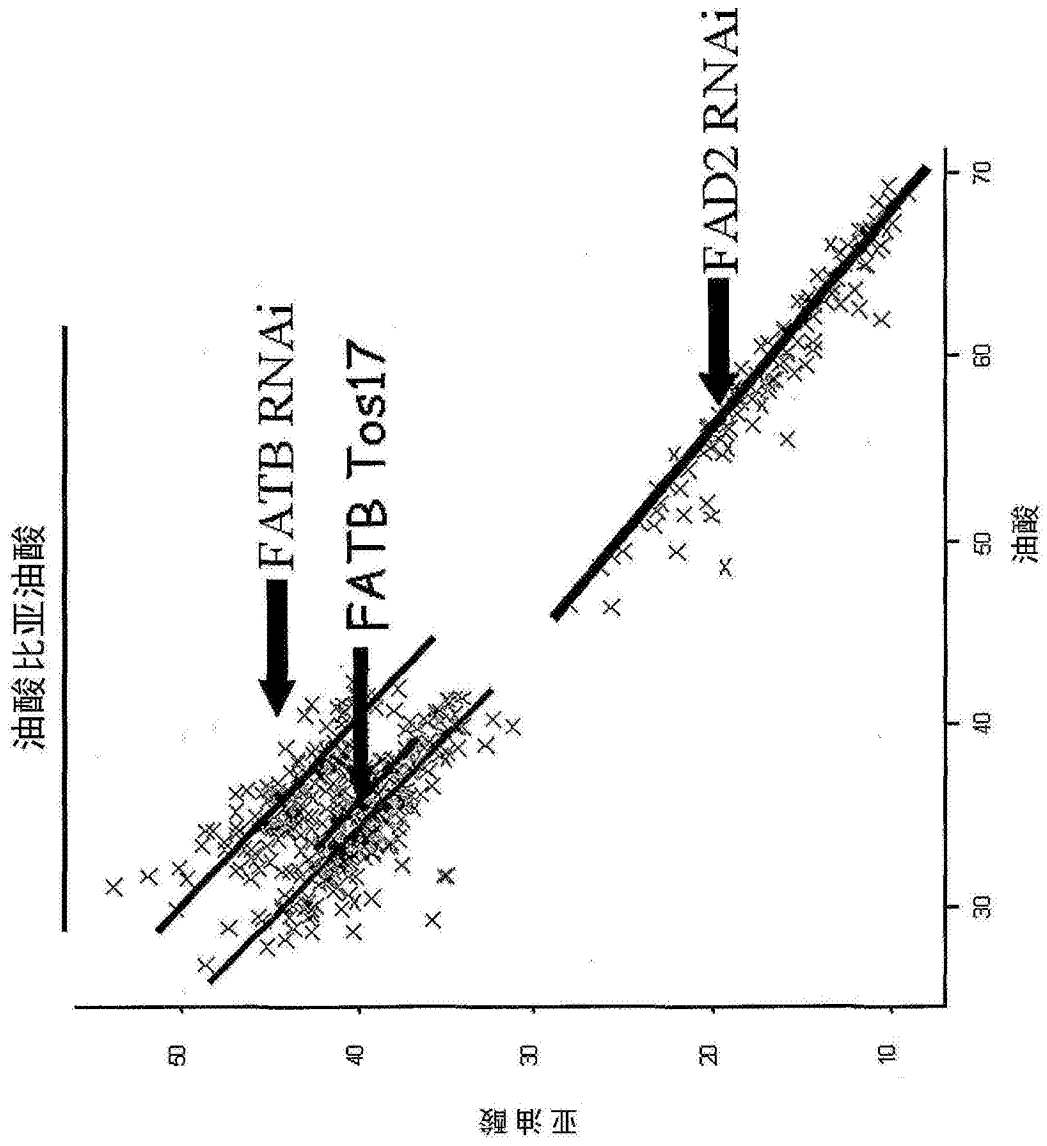


图14

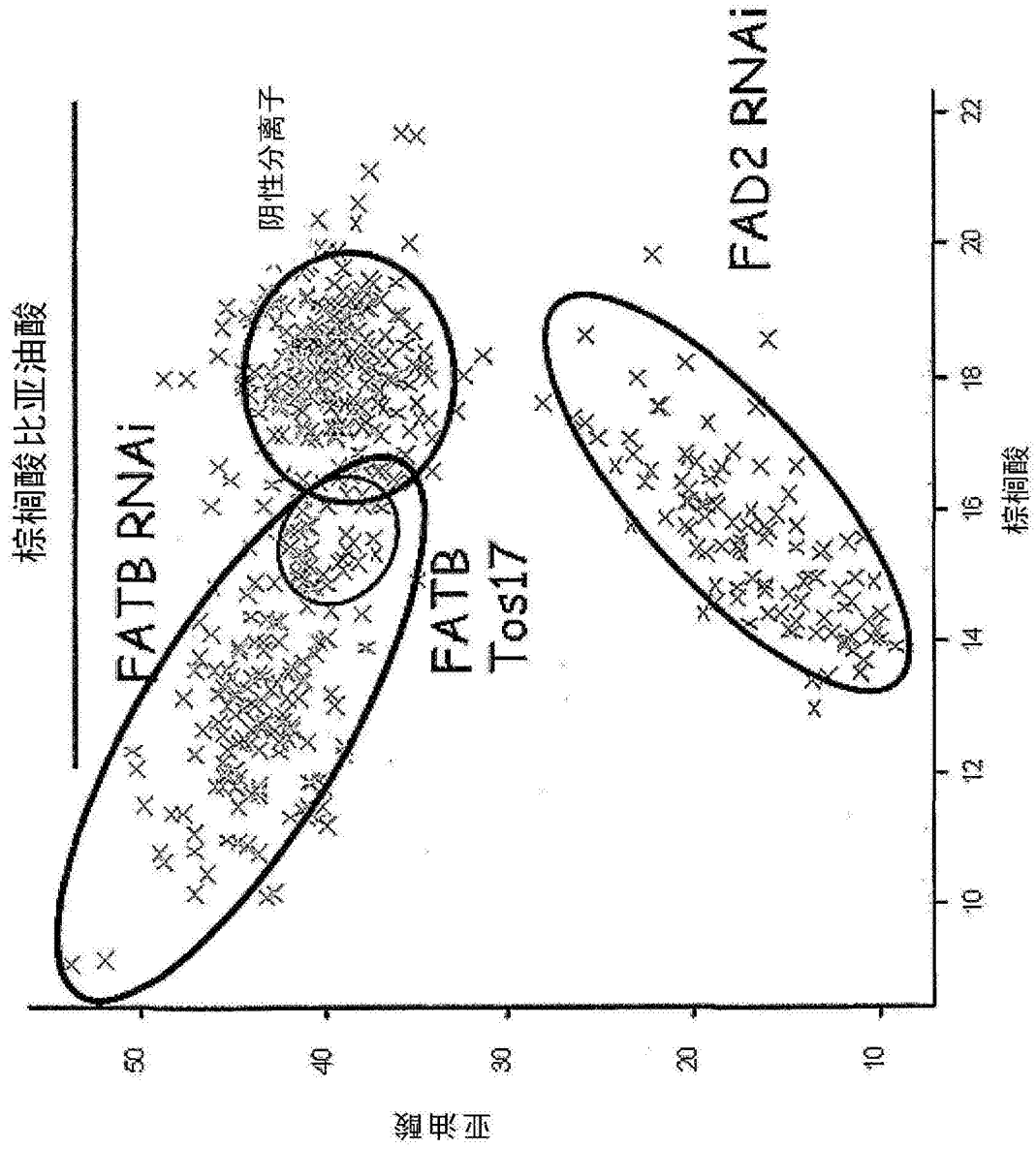


图15

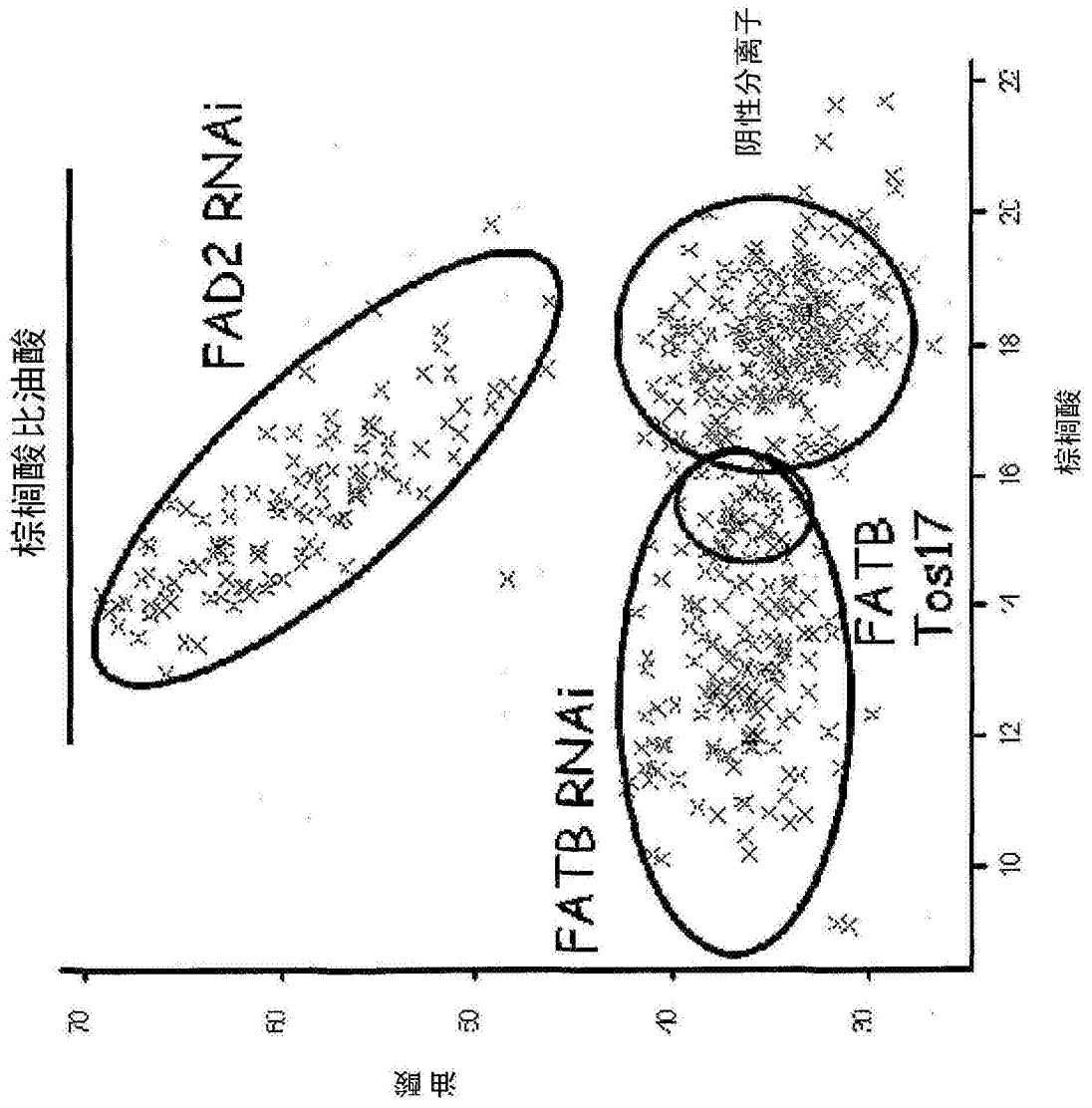


图16

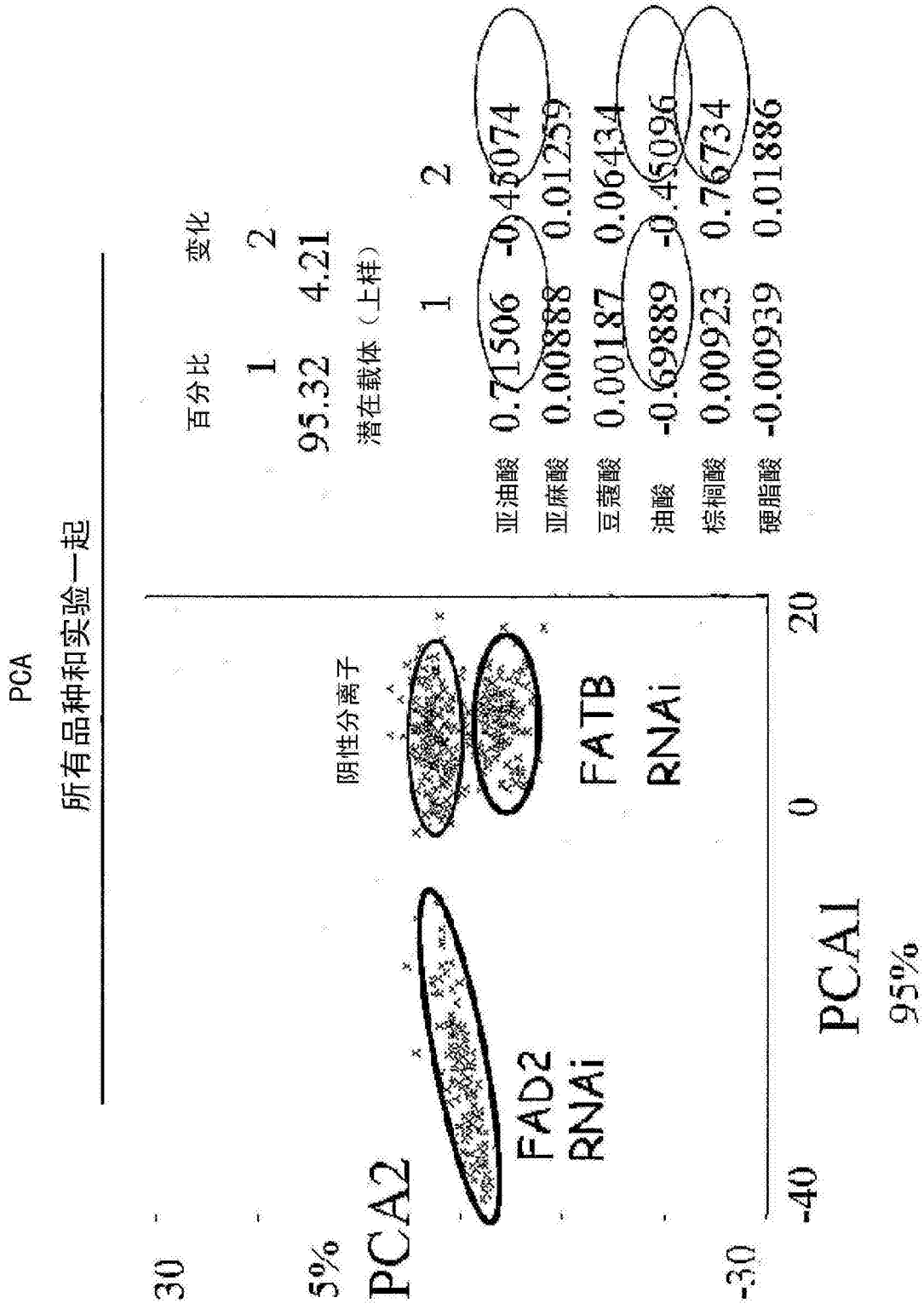


图17

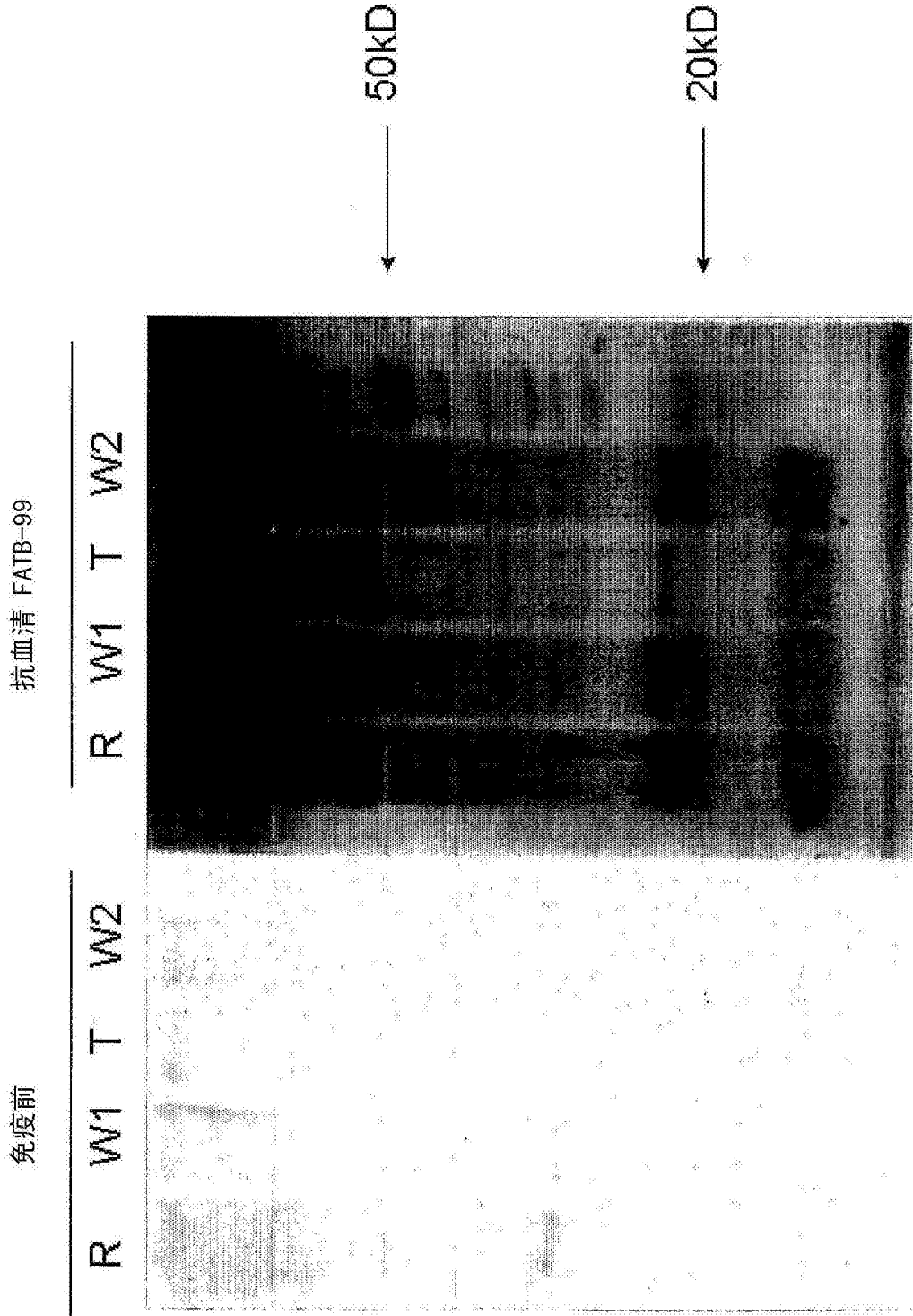


图18