



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107815455 A

(43)申请公布日 2018.03.20

(21)申请号 201711321010.5

(22)申请日 2017.12.12

(71)申请人 中国农业科学院麻类研究所

地址 410205 湖南省长沙市岳麓区长沙市
望城坡产业基地(咸嘉西路348号)

(72)发明人 刘头明 许晓敏 朱四元

(74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理
事务所(普通合伙) 11371

代理人 李永宏

(51) Int. Cl.

C12N 15/29(2006.01)

C12N 15/82(2006.01)

C07K 14/415(2006.01)

A01H 6/56(2018.01)

A01H 6/04(2018.01)

权利要求书1页 说明书5页
序列表4页

(54)发明名称

控制大蒜蒜瓣厚度性状的5个基因及其应用

(57)摘要

本发明涉及分子育种技术领域,具体而言,涉及一种控制大蒜蒜瓣厚度性状的5个基因及其应用。本发明所提供的5个控制大蒜蒜瓣厚度性状的基因可应用于葱属植物的育种及性状改善,并可帮助本领域技术人员深入了解大蒜蒜瓣厚度性状的调控机制。

1. 分离的核酸片段,其选自下列组的序列之一:
 - a)、核苷酸序列分别如SEQ ID NO:1~5所示的核酸片段中的一个或多个;
 - b)、在严格条件下能够与a)所述核苷酸序列杂交的核苷酸序列;
 - c)、与a)或b)所述序列互补的核苷酸序列。
2. 一种表达载体,其包含权利要求1所述的核酸片段。
3. 一种宿主细胞,其被权利要求2所述的表达载体所转化。
4. 根据权利要求3所述的宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞包括:农杆菌。
5. 权利要求1所述的核酸片段在调控葱属植物鳞茎的瓣厚中的应用。
6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,包括:将所述核酸片段通过转基因方法转入葱属植物,或沉默a)中所述的核苷酸序列对应的基因以调控葱属植物鳞茎的瓣厚。
7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述转基因方法具体包括:
 - (1) 构建权利要求2所述的表达载体;
 - (2) 将步骤(1)获得的表达载体直接导入葱属植物细胞;或通过权利要求3或4所述的宿主细胞介导导入葱属植物细胞;
 - (3) 再生出转基因植物;和
 - (4) 选择出转基因植物;并且
 - (5) 任选地,增殖步骤(4)获得的植物以获得后代。
8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述直接导入葱属植物的方法包括:基因枪介导转化法、花粉管通道法或脂质体转化法。
9. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述沉默a)中所述的核苷酸序列对应的基因的方法所采用的技术包括:

Cre/loxP或CRISPR/Cas9介导的基因敲除技术,siRNA、反义核酸技术或植物病毒载体介导的基因沉默技术。
10. 根据权利要求5~9任一项所述的应用,其特征在于,所述葱属植物为洋葱组植物、葱组植物或长齿组植物;

更优选的,所述洋葱组植物为洋葱*A. cepa* L.;

更优选的,所述葱组植物为葱*A. fistulosum* L.;

更优选的,所述长齿组植物为大蒜*Allium sativum* L.。

控制大蒜蒜瓣厚度性状的5个基因及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及分子育种技术领域,具体而言,涉及一种控制大蒜蒜瓣厚度性状的5个基因及其应用。

背景技术

[0002] 大蒜(*Allium sativum* L.)属百合科葱属植物,起源于中亚地区,4000多年前就已经开始种植,具有食用、保健、药用的功效,长期以来深受人们的喜爱具有药食两用的功效;通常大蒜也特指该植物的球形鳞茎。大蒜的食用部分主要是白色的肉质鳞茎,它含胡萝卜素很少,但含有较丰富的蛋白质、碳水化合物、硫、多种维生素及微量元素,其中微量元素硒含量较高。一些有效成分(例如维生素、含硫化合物、硒等)具有抗氧化活性,是氧自由基清除剂,可以溶解人体内合成的亚硝胺,对癌症和心血管疾病具有预防与治疗作用。大蒜中含有抗氧化物质,它来自食源性蔬菜,安全性高,在食品中具有广阔的应用前景。

[0003] 在我国,大蒜拥有世界上最大的种植面积,约为世界总种植面积的多。品种资源丰富,南北方均有栽培,产量占世界总产量的1/4多,因此,大蒜是我国重要的出口创汇蔬菜之一。我国是世界上重要的大蒜贸易国,在大蒜贸易方面起着举足轻重的作用。由于我国大蒜种质资源众多,再加上不同大蒜栽培地区生态环境迥异,因此不同地区的栽培品种一般具有显著的区域适应性,形成了形态各异的生态型,产生了地方名优大蒜品种,如山东苍山大蒜、山东金乡大蒜、陕西蔡家坡蒜等,并在此基础上形成了许多知名大蒜产区。

[0004] 大蒜具有非常大的基因组(16Gb),致使对大蒜中的遗传和基因组资源的研究非常困难,大蒜中各重要农艺性状遗传和分子调控机制,仍未解析。大蒜鳞茎是一种变态的腋芽器官,目前还没有大蒜鳞茎的瓣厚控制相关基因被报道。

[0005] 有鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0006] 本发明涉及分离的核酸片段,其选自下列组的序列之一:

[0007] a)、核苷酸序列分别如SEQ ID NO:1~5所示的核酸片段中的一个或多个;

[0008] b)、在严格条件下能够与a)所述核苷酸序列杂交的核苷酸序列;

[0009] c)、与a)或b)所述序列互补的核苷酸序列。

[0010] 本发明所提供的5个控制大蒜蒜瓣厚度性状的基因可应用于葱属植物的育种及性状改善,并可帮助本领域技术人员深入了解大蒜蒜瓣厚度性状的调控机制。

[0011] 本发明所请求保护的核酸片段基因还包括与核苷酸序列SEQ ID NO:1~5所示的核酸片段中的一个或多个高度同源,并且具有同样的调控葱属植物鳞茎的瓣厚功能的高度同源的等价体序列。

[0012] 所述高度同源的功能等价体序列包括在严格条件下能够与具有SEQ ID NO:1~5中任一项所示的序列的DNA杂交的DNA序列。本发明中使用的“严格条件”是公知的,包括诸如在含400mM NaCl、40mM PIPES(pH6.4)和1mM EDTA的杂交液中于60℃杂交12~16小时,然

后在65℃下用含0.1%SDS、和0.1%SSC的洗涤液洗涤15~60分钟。

[0013] 功能等价体序列还包括与SEQ ID NO:1~5中任一项所示序列有至少90%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性,且具有调控葱属植物鳞茎的瓣厚功能的基因序列,可以从任何植物中分离获得。其中,序列同一性的百分比可以通过公知的生物信息学算法来获得,包括Myers和Miller算法(Bioinformatics,4(1):11-17,1988)、Needleman-Wunsch全局比对法(J.Mol.Biol.,48(3):443-53,1970)、Smith-Waterman局部比对法(J.Mol.Biol.,147:195-197,1981)、Pearson和Lipman相似性搜索法(PNAS,85(8):2444-2448,1988)、Karlin和Altschul的算法(Altschul等,J.Mol.Biol.,215(3):403-410,1990;PNAS,90:5873-5877,1993)。这对于本领域技术人员来说是熟悉的。

[0014] 本发明还涉及一种表达载体,其包含如上所述的核酸片段。

[0015] 本发明还涉及一种宿主细胞,其被如上所述的表达载体所转化。

[0016] 本发明所提供的核酸片段可被插入质粒、粘粒、酵母人工染色体、细菌人工染色体或其他适合转化进宿主细胞中的任何载体中。优选的宿主细胞是细菌细胞,尤其是用于克隆或储存多核苷酸、或用于转化植物细胞的细菌细胞,例如大肠杆菌、农杆菌、根瘤土壤杆菌和毛根土壤杆菌。

[0017] 如上所述的核酸片段在调控葱属植物鳞茎的瓣厚中的应用。

[0018] 优选的,如上所述的应用,包括:将所述核酸片段通过转基因方法转入葱属植物,或沉默a)中所述的核苷酸序列对应的基因以调控葱属植物鳞茎的瓣厚。

[0019] 优选的,如上所述的应用,所述转基因方法具体包括:

[0020] (1) 构建如上所述的表达载体;

[0021] (2) 将步骤(1)获得的表达载体直接导入葱属植物细胞;或通过如上所述的宿主细胞介导导入葱属植物细胞;

[0022] (3) 再生出转基因植物;和

[0023] (4) 选择出转基因植物;并且

[0024] (5) 任选地,增殖步骤(4)获得的植物以获得后代。

[0025] 本发明的转基因方法使用植物生物技术领域技术人员已知的转化方法制备。任何方法可被用于将重组表达载体转化进植物细胞中,以产生本发明的转基因植物。转化方法可包括直接和间接的转化方法。合适的直接方法包括脂质体介导的转化、使用基因枪导入、电穿孔、以及花粉管通道法等。

[0026] 优选的,如上所述的应用,所述沉默a)中所述的核苷酸序列对应的基因的方法所采用的技术包括:

[0027] Cre/loxP或CRISPR/Cas9介导的基因敲除技术,siRNA、反义核酸技术或植物病毒载体介导的基因沉默技术。

[0028] 优选的,如上所述的应用,所述葱属植物为洋葱组植物、葱组植物或长齿组植物;

[0029] 更优选的,所述洋葱组植物为洋葱*A. cepa* L.;

[0030] 更优选的,所述葱组植物为葱*A. fistulosum* L.;

[0031] 更优选的,所述长齿组植物为大蒜*Allium sativum* L.。

[0032] 因此本发明提供的核酸片段序列尤其适用于上述植物的细胞,但不排除在其它物种中也具有调控葱属植物鳞茎的瓣厚的作用。

具体实施方式

[0033] 全基因组关联分析 (Genome-wide association study; GWAS) 是一种鉴定复杂性状基因的有力工具,但其应用受限于研究物种参考基因组序列的需求。本发明提出一种方法,即转录组参考的关联分析技术 (transcriptome-referenced association study, TRAS),其使用由单分子实时测序产生的转录组作为参考序列来评估基因序列和基因表达的种群变异。当两个评分都与性状相关时,候选基因被鉴定,并且它们的潜在相互作用通过表达数量性状基因座分析来确定。在下面的实施例中,通过应用这种方法描述102个地方品种的大蒜鳞茎性状特点,我们确定了控制大蒜蒜瓣厚度性状的5个基因。TRAS作为独立于参考基因组的关联研究的有效工具,将关联研究的适用性扩展到广泛的物种。

[0034] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0035] 实施例1

[0036] 一、方法

[0037] 1. 植物材料,实验设计和表型测量

[0038] 我们收集了92个中国地方品种和10个海外品种,总共102个大蒜地方品种于2014年9月种植于中国农业科学院麻类研究所实验田。田间试验采取随机的完全区块设计,每块两个重复。每个重复种植一个品种的36瓣大蒜,分三行,每行间隔10cm,两个重复之间间隔20cm。2015年收获成熟的大蒜,取三行中间的30株。然后,风干表面,用游标卡尺测量它们的厚度。

[0039] 2. PacBio单分子实时测序文库构建及测序

[0040] 本发明从102个大蒜地方品种中选取地方品种——阳溪,做单分子测序。使用 Clontech SMARTer cDNA合成试剂盒 (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) 和 oligo dT引物,将约1 μ g发育鳞茎的总RNA用于逆转录合成全长cDNA。反应重复三次。使用 AMPure PB beads (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA) 纯化PCR产物。使用 BluePippin系统对获得的dsDNA进行大小选择并随后进行再扩增。最后,将产物纯化并经受 Iso-Seq SMRTBell文库制备 (<https://pacbio.secure.force.com/SamplePrep>) 以产生三个文库 (1-2kb, 2-3kb和3-6kb), 使用P6-C4chemistry试剂盒在PacBio RSII平台上将这三个文库测序。

[0041] 3. PacBio测序数据分析

[0042] 利用 SMRT 分析软件对测序数据进行处理 (<http://pacificbiosciences.github.com/DevNet/>)。从亚读数文件产生的环化测序读数利用如下程序得来:最小长度300;max_drop_fraction,0.8;min_passes,1;min_predicted_accuracy,0.8。根据是否具有polyA尾和最小测序长度300两个参数,把产生的环化测序读数分为全长和非全长。在默认设置下,全长和非全长环化序列都属于同类型的簇。把那些非冗余且没有末端的序列定义为转录本。因为PacBio读数相较于更短测序读数的二代测序有较高的核苷酸错误,所以利用proovread软件基于阳溪大蒜的Illumina RNA测序数据纠正。

冗余的序列放到CD-HIT中。

[0043] 4. 转录组的注释

[0044] 我们使用Coding Potential Calculator来根据转录组的质量、完整性以及与当前数据库的相似序列的开放阅读框比对等检测转录本的编码潜能。那些没有蛋白质编码潜能的被分为长链非编码RNA (lncRNA), 其余的如以前研究一样进行七个公共数据库的注释。每个转录本的编码序列 (CDS) 利用BLAST搜索在NCBI非冗余蛋白序列数据库和SwissProt蛋白数据库预测功能, 以及进行ESTscan程序。

[0045] 5. Illumina RNA测序文库构建及测序

[0046] 为表征群体SNPs (单核苷酸) 和GE (基因表达) 变异, 所有102个品种都进行Illumina RNA测序。利用试剂盒【NEBNext®Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina® (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)】把每个个体的总RNA构建成片段长度为250bp (± 25 bp) 的cDNA组成的混合片段文库。然后, 使用Illumina测序平台 (HiSeq™ 2500) 结合HiSeq PE Cluster Kit v4 cBot进行测序。最后, 筛选过滤原始数据 (raw reads), 得到可分析数据 (clean reads)。

[0047] 6. 表达分析

[0048] 为了量化102个品种的转录本的表达量, 每个品种的所有clean Illumina reads通过Bowtie 2比对到PacBio测序得到的转录本。使用RSEM, 通过评估测得的每百万碱基转录本序列的每千碱基片段的期望值来分析每个样品的每个转录本的表达水平。使用R语言包中的加权基因共表达网络分析 (WGCNA) 对102种基因型中的转录物进行共表达分析, 并在群体中显示共表达的转录本分配到一个模块。最小模块大小被设置为30个转录本, 并且如果它们具有不小于25%的相似性, 则模块被合并。然后, 估计各模块的特征值, 并基于Pearson相关因子分析模块与性状的相关性, 识别与性状相关的共表达模块。

[0049] 7. 群体SNP检测和系统发育分析

[0050] 为了鉴定来自102个地方品种的SNP, 通过使用Picard中的Samtools, 将每个样品的所有Illumina读数与参照转录组进行比对。删除没有独特位置的读数后, 使用GATK软件来进行群体的SNP调用; 这个过程要求SNP质量 ≥ 40 。为了排除不正确比对导致的SNP调用错误, 只保留高质量的SNP (覆盖深度 ≥ 2 , 次要等位基因频率 ≥ 0.05 , 缺失基因型频率 ≤ 0.5)。利用TreeBest (<http://treesoft.sourceforge.net/treebest.shtml>) 构建了一个基于个体的邻接树, 以明确102个地方种群之间的系统发育关系, 并在Figtree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) 中可视化。

[0051] 8. 识别性状候选转录本

[0052] 为挖掘CT (瓣厚) 的候选转录本, 我们进行了全转录组范围的分析以检测与性状相关的可能基因位点。在包含102个样品的联合小组中, 采取混合线性模型, 使用总共19,912个高质量SNP对CT进行关联分析。建议性 (1/N) P值阈值被设置控制来错误率, 结果是P值阈值 5×10^{-5} 。为了验证建议位点与性状之间的关联性, 计算了与建议位点相关的转录物的表达与性状表型之间的Pearson相关性; 在 $P < 0.05$ 时假设显著相关性。在序列和表达水平上都与性状相关的转录本被定义为性状的候选转录本。

[0053] 9. eQTL分析检测潜在相互作用

[0054] 将基因表达水平变化与基因型相联系的eQTL已经被证实可以检测基因的相互作

用。为确定候选转录本的相互关系,采用混合线性模型对TRAS (转录组参考的关联分析)的102个当地品种进行eQTL分析。在我们的eQTL分析中,将19,912个SNP定义为基因型,并将候选转录本的表达定义为表型。显著(0.05/N)P值阈值被设置为 2.5×10^{-6} 的来控制错误率。如果一个转录本定位于另一个转录本的eQTL中,我们认为这两个转录本可能相互作用。

[0055] 二、结果

[0056] 1.三代测序(Pacific Biosciences)获得发育中的瓣的转录组数据

[0057] 当地品种阳溪总共有36,321个转录本,共计5448万个碱基。转录本长度120bp至4803bp,平均1500bp。检测PloyA和PloyT,发现70%为全长转录本。31125个转录本有功能注释,287个没有注释,4909个为lncRNA(长链非编码RNA)。

[0058] 2.性状,序列和基因表达的种群变异

[0059] 102个品种的瓣型特征的变异数,瓣厚3.6倍。

[0060] 为了对102个地方品种的基因型进行序列和表达分析,我们对群体中发育鳞茎的转录组进行了测序,并获得了大约60.5亿个clean read,每个地方品种的平均读数为5930万。这些序列比对到参考转录组(三代测序),覆盖率为51.3%~80.2%。这些比对读数进一步用于对基因序列(SNP)和基因表达(GE)中的变异进行评分。从8,245转录本中识别出来55,012个SNPs,说明在这个102品种中77%的转录本是保守的。过滤后,从5,408个转录本获得19,912个高质量的SNP,其中一半位于编码序列区域内,剩余的SNP位于3'和5'非编码区。基于SNP基因型的系统发育分析将102个大蒜地方品种分为三个不同的组。有趣的是,来自中国的地方品种呈现出明显的地理分布。我们还对GE进行了量化,并在瓣扩张阶段对每个地方品种的全基因组表达谱进行了表征。基于加权基因的共表达网络分析,36,321个转录本涉及46个共表达模型(CEMs),每个模型包含的基因范围从37-7,132个。

[0061] 3.瓣厚相关的候选转录本

[0062] 通过本发明,我们发现:

[0063] (1)5个大蒜基因的DNA序列与蒜瓣厚度性状存在关联,是该性状的候选基因。这5个基因分别是ASTG35908,ASTG3459,ASTG33419,ASTG180,ASTG33293,序列分别如SEQ ID NO:1~5所示。这5个基因的SNP与蒜瓣厚度性状的相关性P值分别是 4.8×10^{-5} , 4.1×10^{-5} , 2.2×10^{-5} , 2.5×10^{-5} , 5.1×10^{-6} ,均小于阈值 5×10^{-5} 。

[0064] (2)通过基因表达相关性分析,我们进一步验证了这5个基因为候选基因。这5个基因的表达值与蒜瓣厚度性状的相关性P值分别是 6.6×10^{-3} , 1.9×10^{-2} , 8.3×10^{-3} , 4.6×10^{-2} , 3.3×10^{-3} ,均小于阈值0.05。

[0065] 最后应说明的是:以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明,但本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

SEQUENCE LISTING

<110> 中国农业科学院麻类研究所

<120> 控制大蒜蒜瓣厚度性状的5个基因及其应用

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1639

<212> DNA

<213> *Allium sativum* L.

<400> 1

```

caccctcctc gcctacaaac ttaaagaaat agctacaacg atccaatcgc atttcagaag 60
ctccatgttc tcatactctc tcagtateta tccaaacaat atcaggttcc ttctccagtt 120
ccttgtaaac ttcaggttcc ttctetatta ccatgctgac ttcagggatt ttaacttttg 180
gcaccacat tctagtcgaa ggccataggaa gtgggacttt ctcggtacat gactcatcaa 240
caggtagata gcacatttgt tgacttacia gtgttaciaa tgtttggttt ccatttatat 300
gagacttcaa ccaagtattc attgccttcg atacattcct tcaactgata aggaagatgg 360
ttgttgggag taatttcaat taaagctcgg gcaaaaacta agttcttctc agcaaccgtg 420
ttagcatcaa agcacttgag cttacaaatg tgacacgcca accagttgag gccaataaga 480
agctgcagag ctgaaggaac attagtgaat tgggtccaaa tcgggatgga gagaacttga 540
tctttagctt tatctactga ggcatccaa gaagtaactc taaagggttt tagacgtata 600
attgtaggaa caacttctaa cactctaatt ttccctcatt agacgaaaac ttcatgtaga 660
acataccatt gataatagat atatagagct caccccaaag tcggcaggca ctacgacatg 720
cagctcgcac atcaaagtta ggcaactttg aatccaaaaa aaaacctaca atgtagtttt 780
gccagaaaga agctgcttca cttagtatta ccattgggtg agaagaagcc ttatcagtcc 840
ttgttatgtt aaaatccatg ggttgatatg gaccggcatt attgggtagt ttgtcgtaga 900
gagagttcca tattcgggaa acaggcagct ttacatttgt aggtatggca ttttgacaag 960
tatttgtgtg cttgcatcat cacggtgttc gaaagcacca gacacaacag gaacagacac 1020
tcccacacac ccagtattag tcaaattagc agttcgttta gcaacattca aaatactatt 1080
accacctgac tgatctacat tattctcagt aactccttac tcatcgactg attagcatct 1140
ttcaaaccac aatttacatc caaaacagtt tttcatac accagtaatc gttgaacgaa 1200
ggacattacc ttggagatcg ggccaactcc aaggggcaga gaaaatcaat tgggagacag 1260
acgaattgcc aaagcagaca gtttcgctat cgatttggaa attaggaggt gcagcgattt 1320
ctttagtaga atcaccaaga ggatttacag ttgccaaacg gactattggg gaggccaacg 1380
tgtagtccga gttaccagaa tccgacaagt cgtattcacc aaagcatcca accaagttac 1440
gaaatttgcg cccagatctg gtgctcgagt ctggagaacg agacatgaat ctcggttgg 1500
atctcctgtt tttagcatg agcagatcga ggtggtaagg aagaaaggtg gaagaagagg 1560
gatgggatta gactgatagg agatggaagc ggcagatctg acgcagactt ggaggttgcc 1620
attaataata tgaattcac 1639

```


<210> 2

<211> 826

<212> DNA

<213> *Allium sativum* L.

<400> 2

ataaacatag tgggtgtcag agctatagtt aatgactact catagtcagg tcagaaggct 60
 cggaggaaat gtaaaaatca tagtcattta tctgtatagg atttccaggt actgaagtaa 120
 ctaaaagtta ctctgcaagg tgtataaaat taatatctat aattttgtca ctcatgaatt 180
 catccaaaag ttttaggtca tttcectaat tttgacttat tttatctgtc tatttatttt 240
 ctgggttgtt ttctcttctt cggtttggct agatteccag atgcgaaca aggtaaaaca 300
 taaatacaaa gctggcaatg atttatttca tatagtgaat taaatacaaa ctcatgtgtg 360
 tacgttctct tgcccaaaact tgtctcaagt ccgatctagt ggtcctttat gtactgtaca 420
 aggagggaga gttggatgca agaaatgtac aggattcttc cagtgcctta cgtatgtttg 480
 ctggtgttct tgggaagaaa acgcacaagt ctgtcttgc gttgtcgagg tgaggatgcc 540
 aatggttgat gatggacatg gatggtgttc ccaggctttg agtaagattt atggttcagc 600
 cgtggattta gttagccatt agagagtgag atgagttgta tattgctgtt gcatgtcttg 660
 tgtgagagtg cgtgtgttgt catttggatt tgactgtgtt ggctaattat tgcttccctc 720
 tgtttcagaa cccaactttg aaagatgcac gcagtatccc ttgatgcagc agtataatgg 780
 tcaatgtggt cttgtatgct tcaatgcggc tggagtgatg tccttt 826

<210> 3

<211> 715

<212> DNA

<213> *Allium sativum* L.

<400> 3

atacaaaata catataaaaa aaaaaactct ttgctaagtc ccaatcgatg ttcccagcac 60
 aaaatcatgt tgaaccctta agttctctg ttaacataaa agacagaaga aactgttaag 120
 caaattgaag aattaaacaa gcaatccagg tataactcac gttttctttt cgactgtatt 180
 ttcttcagta cagaattttg ggtatttgat gatatcgact tctgttttga tcagatctta 240
 taactgctcc tttcatattt agattttttt tgactttttt ctgtcaataa ttgttcgtat 300
 aactcacggt ttcttttcga ctgtattttc ttcagtacag aattttgggt atttgatgat 360
 atcgacttct gttttgatca gatcttataa ctgctccttt catattttaga ttttttttga 420
 cttttttctg tcaataattg ttcgtacatt ttttttttaa ttcactctaa attgtgatgc 480
 tccgtactcg gctcaaattt tgetgagcca aggcagagct gtcacctatg tgcttctgaa 540
 gtgtatgttt ggttgggtga tgcaagtgtt aattcatgaa tcattgattt ggaacacaaa 600
 ctatttatgg ctacttgggt tttgttaaag ctcttttaca aaagatcaaa tgggacttat 660
 ttgtcatctt caacccttc catgaaaaca gaggcagcca tctgtaagat gaaaa 715

<210> 4

<211> 912

<212> DNA

<213> *Allium sativum* L.

<400> 4

ctgctttctt cttccctacc aaaattcccc aatatgattt ccaccgaaat ccctacgcct 60
 gcttctcadc cacttccctc ccaacaaatg ccacaaatc ctggatccaa ttacggcggt 120
 caacctacgc ataagaacga tctggtattt ggtccatacc caaattgaaa accctgattt 180
 gtaccaccaa catcaacgcc cattgcgact gctacacatc attccctaca ctatcatcat 240
 tacatttctt ctgacgaccg cagcccccca tactagacag tccaacaagt aacttaatcc 300
 tcattcccca tcccacaacc cacttaceca acaactgttg aacctgcgat ctcttctcaa 360
 tttgcttcca ccattaccaa atcatcaact gcatcggtg acgaaagaat gacctacaaa 420
 catgtgacgc caaacgatat ctcaactgcc cctaateact aggatttgaa tcatcacaga 480
 gctgcaggaa cgctagagca aagagaaaga tactgctaca gagtaaagg tctacaaatt 540
 tggtcacca ttcaataacc aaatgccggt tgtgcacaca tggtaatgga ccagccagaa 600
 acatcaatag ctgtacgaga ctttgtgca gacatgtgca actaatagtc aaattgaatc 660
 taaaaattgc tgaacaccga aaacgagtct gccatctcaa tcgagcgtca agacatcacc 720
 acttgaagca taaaactgcc aaattgttac ttacaggtgg catagaaata caacatgttc 780
 gttgtccacc caattctttt ccaactggtg aaaattttga caaacgacgg ctgtcaaatt 840
 caaccaccac cgaacattcg gaaccagttg aagcaccaag tcacctcaa tgtgcaggaa 900
 gaagtatgga gc 912

<210> 5

<211> 1926

<212> DNA

<213> *Allium sativum* L.

<400> 5

tctgttaata tcatgattga ttttgctaaa atggttgaaa cacaattcaa ttccaaaatt 60
 aagtgtgta gatctgataa tgcaaaagaa ttatgtgaag gagacatgaa agtgttttaa 120
 aaaatatggg aatattacac caaactagct gtccatacac accccagcaa aatggtgttg 180
 ttgaaaggaa gcacagacat cttctagaaa ctgcaagagc tttgtacatt caatcaatgg 240
 ttccagttag attttgggga gaatgtgtga tgtgtgctgc ctatttgata aatagaatgc 300
 ctctaaaagc aattatcaat gatattcett atcaaagact gcacaacaaa attcctgctg 360
 tagatcattt gaagacattt ggggttttgt gttatgtgta tacttcaaga atcaacaaag 420
 ggaagatgga tcaaaggggt tctcettgtg ttttcttagg atattegggt agacaaaagg 480
 gatataaagt tttatatatt gccagttgaa aattaatagt aaccaggeat gtcaaattcc 540
 atgaaaggca ttttccatat catettette acaacaaaa gaatctctca tatttaciaa 600
 ctgcagteta tcttctaca tctacagetc agtttttttt atcaaacctc tgaatttact 660
 tcacctgatt atatttctcc ttccaatgat tatgcatcaa ataatecaa tgatgatgtt 720
 ttctcttcag atccaaatca tacciaattc tcaaacataa ttgacatgac ccagaattta 780
 cccactgaaa ctattagaag atccaactga actcataaaa ccccatctta tttgagtgat 840
 taaaaatgta atgtcattac tccacactga tgtaatttga tatcttataa ccattttcta 900
 ataatecaaa agcttttcta tcccaagcat gtgaactaca tgaaccaaatt tcttatgaag 960

aagcaaccac taatccaatt tggactgaag ctatgaacaa agaaattgta gctttgatgc 1020
aaaatggtac aagggaaactt gttgatctac ccaaagacaa gaaggcaata ggttgtaagt 1080
gggtatataa aataaaaactg aaggcaaactg gagaactgga acggtgtaaa gcaagattag 1140
tagcaaaggg cttcaatcaa aaatatggag ttgattacga tgaaactttc agtccagtag 1200
taaagatgag tacagtaaga tgtttaattg ctttagcagc caacagagaa tgagaattgt 1260
ttcaatttga cgtaaataat gcatttttgc atggagactt gaaagaagaa atatacatga 1320
aggtaacctga aggcatttca aatcctgaaa acaaggatat gttttacttc ttggacagtc 1380
acctattgtg tggaaatcaa agaaacaaag tattacttct aaagctgaat acagggcaat 1440
ggctgcagca gcatttgagg ttacatggat cgtaacgattg ctggaagaat taggcgttca 1500
aagtttaaaa tctgtcattc ttcaactgtga caactagtct gctccgcata ttgctcgaaa 1560
tcctgttttt catgaacgaa caaagcacat tgacattgat tgtcatttta caaggagaaa 1620
agtcttggaa gggttgatac aattgaetta cttgectact caatctcagc ttgtgtatgt 1680
gttcacaaaa attctgcett catctcagca taaggatttg ttgtccaagt taggaattac 1740
attttcatga cattctaact tgaggggggc taatgaatat atattgaatg caacagcaag 1800
ttacatattg ccagccagat gacaggetgg cgttggatga caagctgaca catttttctt 1860
ttcattcttt ttcgttactt tgtattttta gctttcgtat ataaaaggat tttttttcga 1920
tttggc 1926