



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102099479 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 08

(21) 申请号 200980127814. 9

代理人 黄革生 林柏楠

(22) 申请日 2009. 07. 09

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

61/135, 230 2008. 07. 17 US

08075648. 9 2008. 07. 18 EP

*C12N 15/82* (2006. 01)

*A01H 5/00* (2006. 01)

*C07K 14/415* (2006. 01)

*C12Q 1/68* (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 01. 17

(56) 对比文件

WO 2006009649 A, 2006. 01. 26,

WO 2004113542 A, 2004. 12. 29,

lysak martin a et al.. chromosome

triplication found across the tribe

brassicaceae. 《genome research》. 2005, 第 15 卷

(第 4 期),

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2009/005004 2009. 07. 09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/006732 EN 2010. 01. 21

审查员 张丽玮

(83) 生物保藏信息

NCIMB 41570 2008. 07. 07

NCIMB 41571 2008. 07. 07

NCIMB 41572 2008. 07. 07

NCIMB 41573 2008. 07. 07

NCIMB 41574 2008. 07. 07

NCIMB 41575 2008. 07. 07

(73) 专利权人 拜尔作物科学公司

地址 比利时迪海姆

(72) 发明人 B·拉加 B·登博尔 B·朗伯特

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

权利要求书3页 说明书63页

序列表21页

(54) 发明名称

包括一个突变体 INDEHISCENT 等位基因的芸  
薹属植物

(57) 摘要

本发明涉及作物植物, 这些作物植物的果实  
开裂特性是经过调制的。更确切地说, 本发明涉及  
用于减少种子落粒、或将种子落粒延迟到收获后  
而且同时保持这些荚果的一种农艺学相关的脱粒  
能力, 以及用于增加产量的改进的方法和手段。

1. IND 基因的部分敲除的突变体等位基因,其为编码下述氨基酸序列的核酸分子,所述氨基酸序列由 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:8 组成,其中在第 139 位的丙氨酸被苏氨酸取代。

2. 权利要求 1 的突变体等位基因,其选自

(a) 由 SEQ ID NO:3 的序列组成的核酸分子,其中在 415 位的 g 被 a 取代;和

(b) 由 SEQ ID NO:7 的序列组成的核酸分子,其中在 911 位的 g 被 a 取代。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的突变体等位基因,其来自欧洲油菜。

4. 突变体 IND 蛋白,该突变体 IND 蛋白是由根据权利要求 1-3 中任一项所述的突变体等位基因编码的。

5. 用于在生物样品中鉴定权利要求 1-3 中任一项的突变体 IND 等位基因的方法,该方法包括确定在该生物样品中存在的核酸中突变体 IND 特异性区域的存在,其包括使生物样品进行杂交测定,该测定使用特异性探针组,所述探针组包含由 SEQ ID NO:26 的序列组成的一种探针,和由 SEQ ID NO:27 的序列组成的一种探针。

6. 用于确定在植物、或其细胞、植物组织或器官、种子或子代中权利要求 1-3 中任一项的突变体 IND 等位基因的接合性状态的方法,该方法包括确定在所述植物、或其细胞、植物组织或器官、种子或子代的基因组 DNA 中突变体和 / 或相应的野生型 IND 特异区的存在,其包括使所述植物,或其细胞、植物组织或器官、种子或子代的基因组 DNA 进行杂交测定,所述测定使用探针组,所述探针组包含由 SEQ ID NO:26 的序列组成的一种探针,由 SEQ ID NO:27 的序列组成的一种探针,和由 SEQ ID NO:28 的序列组成的一种探针。

7. 用于鉴定生物样品中的权利要求 1-3 中任一项所述的突变体 IND 等位基因的试剂盒,该试剂盒包含探针组,所述探针组包含由 SEQ ID NO:26 的序列组成的一种探针,和由 SEQ ID NO:27 的序列组成的一种探针。

8. 用于在植物、或其细胞、植物组织或器官、种子或子代中确定权利要求 1-3 中任一项的突变体 IND 等位基因的接合性状态的试剂盒,该试剂盒包含探针组,其中至少一种所述探针特异地识别野生型 IND 等位基因并且其中至少一种所述探针特异地识别突变体 IND 等位基因,所述探针组包含由 SEQ ID NO:26 的序列组成的一种探针,由 SEQ ID NO:27 的序列组成的一种探针,和由 SEQ ID NO:28 的序列组成的一种探针。

9. 用于将至少两个拷贝的权利要求 1-3 中任一项所述的部分敲除的突变体 IND 等位基因组合入一株植物中的方法,该方法包括以下步骤:

(a) 根据权利要求 5 的方法来鉴定至少两株植物,这些植物各自包含至少一个拷贝的部分敲除的突变体 IND 等位基因,

(b) 将该至少两株植物进行杂交并且从该至少一种杂交物中收集 F1 杂交体种子,

(c) 任选地,根据权利要求 5 的方法来鉴定 F1 植物,该 F1 植物包含至少两个拷贝的部分敲除的突变体 IND 等位基因。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,该方法进一步包括通过根据权利要求 6 的方法,确定该选择的突变体 IND 等位基因的接合性状态来鉴定 F1 植物的步骤,该 F1 植物对于部分敲除的突变体 IND 等位基因是纯合的。

11. 用于将权利要求 1-3 中任一项的部分敲除的突变体 IND 等位基因从一株植物转移到另一株植物上的方法,该方法包括以下步骤:

(a) 根据权利要求 5 的方法来鉴定包含部分敲除的突变体 IND 等位基因的第一植物或

根据权利要求 9 的方法生成包含至少两个拷贝的部分敲除的突变体 IND 等位基因的第一植物，

(b) 将该第一植物与不包含该部分敲除的突变体 IND 等位基因的第二植物进行杂交并且从该杂交物中收集 F1 种子，

(c) 任选地，根据权利要求 5 的方法来鉴定 F1 植物，该 F1 植物包含该部分敲除的突变体 IND 等位基因，

(d) 将包含该部分敲除的突变体 IND 等位基因的 F1 植物与不包含该部分敲除的突变体 IND 等位基因的该第二植物回交至少一代 (x) 并且从这些杂交物中收集 BCx 种子，

(e) 根据权利要求 5 的方法在每一个世代中鉴定 BCx 植物，该 BCx 植物包含该部分敲除的突变体 IND 等位基因。

12. 根据权利要求 11 所述的方法，该方法进一步包括通过根据权利要求 6 的方法确定该部分敲除的突变体 IND 等位基因的接合性状态来鉴定 BCx 植物的步骤，该 BCx 植物对于部分敲除的突变体 IND 等位基因是纯合的或杂合的。

13. 用于制备包含至少一个拷贝的根据权利要求 1-3 中任一项所述的突变体等位基因的植物的方法，该方法包括根据权利要求 9 至 12 中任何一项的方法将根据权利要求 1-3 中任一项所述的突变体 IND 等位基因组合至一种芸薹属植物之中和 / 或转移至一种芸薹属植物。

14. 根据权利要求 13 的方法，其包括组合两个拷贝的根据权利要求 1-3 中任一项所述的突变体等位基因。

15. 根据权利要求 14 所述的方法，该方法进一步包括将根据权利要求 1-3 中任一项所述的部分敲除的突变体 IND 等位基因组合和 / 或转移在一种具有完全敲除的突变体 IND 等位基因的植物中和 / 或到一种包含完全敲除的突变体 IND 等位基因的植物，其中所述完全敲除的突变体 IND 等位基因选自

(a) 由 SEQ ID NO:1 的序列组成的核酸分子，其中在 364 位的 C 被 T 取代；和

(b) 由 SEQ ID NO:1 的序列组成的核酸分子，其中在 307 和 380 位的 G 被 A 取代。

16. 用于制备包含根据权利要求 1-3 中任一项所述的突变体等位基因的杂交体芸薹属种子或植物的方法，该方法包括以下步骤：

(a) 根据权利要求 6 的方法来鉴定包含处于纯合状态的根据权利要求 1-3 中任一项所述的部分敲除的突变体 IND 等位基因的第一植物以及包含处于纯合状态的根据权利要求 1-3 中任一项所述的部分敲除的突变体 IND 等位基因的第二植物，

(b) 将该第一和第二植物进行杂交并且从该杂交物中收集 F1 杂交体种子。

17. 根据权利要求 16 所述的方法，其中该第一植物额外地包含处于纯合状态的第一完全敲除的突变体 IND 等位基因并且该第二植物包含处于纯合状态的第二完全敲除的突变体 IND 等位基因，其中所述第一和第二完全敲除的突变体 IND 等位基因选自

(a) 由 SEQ ID NO:1 的序列组成的核酸分子，其中在 364 位的 C 被 T 取代；和

(b) 由 SEQ ID NO:1 的序列组成的核酸分子，其中在 307 和 380 位的 G 被 A 取代。

18. 根据权利要求 17 所述的方法，其中该第一和第二完全敲除的突变体 IND 等位基因是相同的。

19. 从包含根据权利要求 3 的突变体等位基因的种子得到的芸薹属植物的用途，其用

于培育目的,其中所述种子已经以登录号 NCIMB41574 保藏在 NCIMB 中。

20. 从包含根据权利要求 3 所述的突变体等位基因的种子得到的芸薹属植物的用途,其用于将根据权利要求 3 所述的突变体等位基因转移到其他植物,其中所述种子已经以登录号 NCIMB41574 保藏在 NCIMB 中。

21. 用于增加包含至少两个 IND 基因的欧洲油菜植物的产量的方法,该方法包括将两个拷贝的根据权利要求 1-3 中任一项所述的突变体 IND 等位基因引入其基因组中。

22. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的突变体 IND 等位基因的用途,其用于增加芸薹属植物中种子产量。

23. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的突变体 IND 等位基因用于增加欧洲油菜植物中荚果的抗落粒性的用途。

## 包括一个突变体 INDEHISCENT 等位基因的芸薹属植物

### 发明领域

[0001] 本发明涉及农业领域,更确切地讲是涉及用来改变裂开性种子植物、具体地是十字花科、特别是芸薹属属种,和 / 或用来加速培育此类裂开性种子植物的分子生物技术的用途。更确切地讲,本发明涉及用于在植物中如十字花科植物、具体地是在用于种子生产而生长的十字花科植物中减少种子落粒、或将种子落粒延迟到收获后,而同时维持荚果的一种农艺学相关的脱粒能力 (treshability) 的改进的方法和手段。还提供了用于在一个集合的裂开性种子植物中鉴别与减少或延迟种子落粒相关的分子标记的方法。还提供了用于增加产量、具体地是谷物和种子产量的方法和手段。可以从该减少或延迟种子落粒的表型中分离出产量增加的表型。

### [0002] 发明背景

[0003] 来自芸薹属植物的长角果或荚果通过一个称为果实开裂的过程释放它们的种子。一个长角果由两个边缘至边缘结合的心皮组成。这些边缘之间的缝形成了一个厚的肋状物,称为胎座框。当荚果接近成熟时,这两个瓣沿着荚果中所指定的弱线渐进地与该胎座框分离,最后导致附连到该胎座框上的种子的落粒。开裂区定义了瓣分离的精确位置。

[0004] 在作物收获之前或收获过程中由成熟荚果脱落种子 (也称作“种子落粒”或“荚果落粒”) 对于形成干的裂开性果实的作物是一种普遍的现象。过早的种子落粒导致种子回收率减少,这代表了主要为了种子而生长的作物 (如产油的芸薹属植物、具体地是油菜籽油菜) 中的一个问题。与过早的种子落粒相关的另一个问题是在随后的作物年度中自然落粒生长的增加。在油菜籽油菜中,与荚果落粒相关的产量损失平均是 20% (Child et al., 1998, J Exp Bot 49 :829-838)、但是可以达到高达 50%,这取决于气候条件 (MacLeod, 1981, Harvesting in Oilseed Rape, pp. 107-120, Cambridge Agricultural Publishing, Cambridge)。

[0005] 当前的商品化的油菜籽油菜品种对于落粒是非常敏感的。在欧洲油菜的现有的培育程序中对于落粒的耐受性存在很小的变化,但是已经在欧洲油菜 (甘蓝和芜菁) 的二倍体亲本中以及在芸薹属的其他成员 (值得注意的是芥菜、埃塞俄比亚芥以及黑芥) 中发现了抗性系。Kadkol 等人 (1986, Aust. J. Botany 34(5) :595-601) 报告了在芸薹的某些登记物中对于抗落粒性增加,这与将这些长角果瓣附连到该胎座框的区域中缺少一个分离层相关。Prakash 和 Chopra (1988, Plant breeding 101 :167-168) 描述了通过非同源重组将来自芥菜的对落粒的耐受性渗入到欧洲油菜中。Spence 等人 (1996, J of Microscopy 181 : 195-203) 描述了与欧洲油菜品系相比一些品系的芥菜显示出对于落粒减小的趋势。Morgan 等人, 1998 (Fields Crop Research 58, 153-165) 描述了在从合成的欧洲油菜所开发的油菜籽油菜的品系之中对于荚果抗落粒性的遗传变异,并且得出结论:需要大量能量来打开它们的荚果的品系似乎在开裂区具有增加的维管化作用并且似乎在开裂区具有减小的细胞壁降解。他们进一步发现了荚果的喙的长度与引起荚果落粒所需要的力之间的一个显著的负相关性。Child 和 Huttly (1999, Proc 10th Int. Rapeseed Congress) 描述了在一种辐射诱导的突变体欧洲油菜和它的亲本栽培品种 (Jet Neuf) 的一个集合中在荚果成熟中的

变化,其中该最大耐受性的野生型和突变体植物显示出遍及开裂区的多群细胞的大量的木质化作用并且其中位于邻近该突变体中开裂区的内部边缘处的维管迹线被描述为帮助固定这些瓣。Child 等人 (2003, *J Exp Botany* 54(389) :1919-1930) 进一步描述了增加的荚果抗落粒性与一个再合成的欧洲油菜品系的荚果中维管结构中的改变之间的联系。然而,在将抗落粒性引入油菜栽培品种中而不干扰其他想要的性状如早开花、早成熟和黑腿病耐受性方面传统的培育方法是不成功的 (Prakash and Chopra, 1990, *Genetical Research* 56 : 1-2)。

[0006] 已经通过突变体分析在拟南芥中鉴定了几个促进或抑制荚果开裂的基因:将突变体结合入 SHATTERPROOF1 (SHP1 ;最初称为 AGL1) 和 SHATTERPROOF2 (SHP2 ;最初称为 AGL5) 两者中导致了不裂开的长角果 (即在拟南芥中当成熟时仍然关闭的长角果) (Liljegren et al. , 2000, *Nature* 404, 766-770)。类似地,拟南芥 (Liljegren et al. , 2004, *Cell* 116 : 843-853 ;PCT 公开 WO 01/79517) 中 INDEHISCENT 基因 (称为 IND1) 中的突变体连同 ALCATRAZ (称为 ALC ;Rajani et al. 2001, *Current Biology* 11, 1914-1922) 中的突变体干扰了荚果开裂,导致了荚果抗落粒性。拟南芥中 FRUITFUL (FUL) (一个 SHP 和 IND 的阻抑物) 的组成型表达也导致了不裂开的长角果 (Ferrandiz et al. , 2000, *Science*, 289, 436-438)。这些转录因子被认为形成了一种非线性的转录网络,该非线性的转录网络控制了瓣边缘一致性以及荚果落粒。Liljegren 等人 (2004, *Cell* 116 :843-853) 进一步描述了 IND (一种非典型的碱性螺旋-环-螺旋 (bHLH) 基因) 指导瓣边缘在拟南芥中分化成分离层以及木质化层。邻近分离层的木质化细胞的层连同内果皮 b 层 (在各瓣中一个单个的木质化细胞层) 一起在干燥的果实中产生了一种类似弹簧的张力,该张力对它的打开有影响。该瓣内果皮 b 层的木质化作用要求 IND、SHP、ALC、以及 FUL (一个在瓣的所有各处表达的 MADS- 结构域转录因子) 的活性 (上述的 Liljegren et al. , 2004 ;Mandel and Yanofsky, 1995, *Plant Cell* 7, 1763-1771)。已经发现 FUL 和 REPLUMLESS (RPL) (一个在胎座框中表达的同源结构域转录因子) (Roeder et al. , 2003, *Curr Biol* 13, 1630-1635) 设定了提供瓣边缘一致性的基因的边界 (Gu et al. , 1998, *Development* 125, 1509-1517 ;Ferrandiz et al. , 2000, *Science*, 289, 436-438 ;上述的 Roeder et al. , 2003)。最后,鉴定了 FILAMENTOUS FLOWER (FIL) 以及 YABBY3 (YAB3) (两个 YABBY- 家族转录因子) (Sawa et al. , 1999, *Genes Dev* 13, 1079-1088 ;Siegfried et al. , 1999, *Development* 126, 4117-4128)、以及 JAGGED (JAG) (一个 C2H2 锌指转录因子) (Dinneny et al. , 2004, *Development* 131, 1101-1110 ;Ohno et al. , 2004, *Development* 131, 1111-1122) 通过以一种区域特异的方式促进 FUL 和 SHP 的表达从而冗余地对正常的瓣和瓣边缘的发育有影响 (Dinneny et al. , 2005, *Development* 132, 4687-4696)。还已经鉴定了对于多种水解酶如内切多聚半乳糖醛酸酶的基因,该内切多聚半乳糖醛酸酶在荚果开裂期间,在程序化地断裂来自芸薹属植物的荚果中的开裂区中起作用) (参见例如 WO 97/13865 ;Petersen et al. , *Plant. Mol. Biol.* , 1996, 31 :517-527)。

[0007] Liljegren 等人 (2004, *Cell* 116 :843-853) 描述了拟南芥属 IND 的五个突变体等位基因。开裂区中的木质化的细胞在包括这些突变体等位基因的植物中是不存在的或存在的,这取决于突变的严格性 (严格的 ind 突变体在对应于野生型植物中的瓣边缘的内部部分的区域中不包含木质化的细胞),但是在所有情况下长角果是不裂开的。Wu 等人 (2006, *Planta* 224, 971-979) 描述了拟南芥属 IND 的一个第六突变体等位基因。包括这个突变体

等位基因的植物在瓣边缘与胎座框的联接处没有显示出木质化的细胞,在七层细胞的一个区域中含有更少的细胞,这七层细胞似乎包围了野生型植物中通常已知的开裂区和胎座框边缘,并且在这个层中展示出不完全的细胞质分裂。

[0008] US 2005/0120417 和 US 2007/0006336 描述了来自欧洲油菜的两个 IND1 直向同源物的鉴定和分离。

[0009] W099/00503、W001/79517 以及 W00159122 描述了使用基因沉默技术(如反义抑制或共抑制)以及诱变来下调拟南芥属 ALC、IND、AGL1 以及 AGL5 基因及其直向同源物的表达。

[0010] Vancanneyt 等人,2002(XIII International Conference on Arabidopsis Research, Sevilla, Spain June 28-July 2 ;2002) 报告了在油菜籽油菜中在一个 CaMV 35S 启动子的控制下来自拟南芥的 FUL 的表达导致了多个荚果抗落粒性转化体。此类荚果抗落粒性品系的荚果不具有开裂区,并且荚果的打开仅能通过使用相当大的压力通过随机断裂这些瓣来实现。

[0011] Vancanneyt 等人,2002(XIII International Conference on Arabidopsis Research, Sevilla, Spain June 28-July 2 ;2002) 还报告了使用所谓的 dsRNA 沉默技术在拟南芥中将 IND 基因进行沉默导致了几乎完全的荚果抗落粒性。百分之九十八的转基因的拟南芥属品系发育成长角果,这些长角果不能沿着瓣缝打开,并且仅能通过向这些瓣施加相当大的压力来打开。

[0012] 重要的是认识到虽然种子落粒在油菜籽油菜培养中构成了一个重要的问题(这个问题最终可以通过开发荚果落粒抗性品系来解决),仍然要求从这些荚果中分离这些种子。在正常的农业实践中,这是通过一个联合收割机通过将荚果进行脱粒来实现的。通过一个联合收割机将这些荚果进行脱粒必须是完全的并且必须对如此释放的种子造成最小的损害。然而,随着荚果强度增加,将它们脱粒所要求的更严格的动作对种子造成不可接受的水平的损害。因此,荚果抗落粒性十字花科植物的荚果不应如此坚固以致不能将它们在一个联合收割机中进行脱粒(Bruce et al. 2001, J. Agric. Engng Res. 80, 343-350)。

[0013] WO 2004/113542 描述了十字花科植物中荚果的开裂区和瓣边缘的发育中所涉及的基因的中等程度的 dsRNA 基因沉默允许分离具有增加的荚果抗落粒性和减少的种子落粒性的转基因品系,然而这些转基因品系的荚果仍然可能通过施加有限的物理力沿着开裂区被打开。

[0014] W009/068313(要求了欧洲专利申请 EP 07023052 的优先权)披露了包括至少两个 IND 基因的芸薹属植物,具体地是欧洲油菜植物,其特征在于它们在其基因组中包括三个完全敲除的突变体 IND 等位基因并且其中与不包括突变体 IND 等位基因的植物荚果抗落粒性相比这些植物的荚果抗落粒性是显著地增加的,但是其中该植物优选地维持了这些荚果的一种农艺学相关的脱粒能力。

[0015] 在以下不同的实施方案、实例和权利要求中所描述的发明进一步提供了用于调节裂开性种子植物中的开裂特性的改进的方法和手段。更确切地讲,本发明进一步描述了用于在植物中(如十字花科植物、具体地是用于种子生产而生长的十字花科植物)减少种子落粒、或将种子落粒延迟到收获后,而同时维持这些荚果的一种农艺学相关的脱粒能力的改进的方法和手段。具体地,本申请披露了包括至少两个 IND 基因的芸薹属植物,具体地是

欧洲油菜植物,其特征在于它们在其基因组中包括两个部分敲除的突变体 IND 等位基因或两个部分敲除的突变体 IND 等位基因和两个完全敲除的突变体 IND 等位基因并且其中与不包括突变体 IND 等位基因的植物的荚果抗落粒性相比这些植物的荚果抗落粒性是显著地增加的,但是其中该植物优选地维持了这些荚果的一种农艺学相关的脱粒能力。还提供了用于增加产量、具体地是谷物和种子产量的方法和手段。可以从该减少或延迟种子落粒的表型中分离出产量增加的表型。

#### [0016] 发明概述

[0017] 本发明的诸位发明人发现具有类似于 W009/068313(要求欧洲专利申请 EP 07023052 的优先权)中描述的芸薹属植物的一种荚果落粒表型的欧洲油菜植物(即该欧洲油菜植物将增加的荚果抗落粒性与荚果的一种农艺学相关的脱粒能力进行结合)还可以通过将两个部分敲除的突变体 IND 等位基因与或不与两个完全敲除的突变体 IND 等位基因进行结合而不是将三个完全敲除的突变体 IND 等位基因进行结合而得到。

[0018] 因此,在一个第一方面,本发明提供了一种芸薹属植物,该芸薹属植物包括至少两个 IND 基因,或其一个细胞、部分、种子或子代,其特征在于它在其基因组中包括至少两个部分敲除的突变体 IND 等位基因。在一个实施方案中,这些 IND 基因是 IND-A1 或 IND-C1 基因。在另一个实施方案中,这些 IND 基因包括选自以下群组的一个核酸分子,该群组的组成为:一个核酸分子,该核酸分子包括与 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :3 从位置 46 处的核苷酸到位置 633 处的核苷酸、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :5、或 SEQ ID NO :7 至少 90% 序列一致性;以及一个核酸分子,该核酸分子编码一个氨基酸序列,该氨基酸序列包括与 SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :4 从位置 16 处的氨基酸到位置 21 处的氨基酸或 SEQ ID NO :4 至少 90% 序列一致性。在一个进一步的实施方案中,这些部分敲除的突变体 IND 等位基因是 IND-C1 基因的突变体 IND 等位基因。在又一个实施方案中,这些部分敲除的突变体 IND 等位基因是选自以下群组,其组成为:ind-a1-EMS06、ind-a1-EMS09、ind-a1-EMS13、ind-c1-EMS04、ind-c1-EMS08 以及 ind-c1-EMS09。在又一个实施方案中,该植物在其基因组中进一步包括至少一个完全敲除的突变体 IND 等位基因。在又一个实施方案中,该完全敲除的突变体 IND 等位基因是 IND-C1 基因的一个突变体 IND 等位基因。在另一个实施方案中,该完全敲除的突变体 IND 等位基因是选自以下群组,其组成为:ind-a1-EMS01、ind-a1-EMS05、ind-c1-EMS01 以及 ind-c1-EMS03。在又一个实施方案中,该植物对于该部分敲除的突变体 IND 等位基因和/或对于该完全敲除的突变体 IND 等位基因是纯合的。在又一个实施方案中,与由一种相应的不包括突变体 IND 等位基因的植物所产生的功能性 IND 蛋白的量相比,该植物产生了一个显著减少的量的功能性 IND 蛋白。在一个进一步的实施方案中,与一种相应的不包括突变体 IND 等位基因的植物种子落粒性相比,该植物的种子落粒性是显著地减少或延迟的。在一个甚至进一步的实施方案中,该植物维持了荚果的一种农艺学相关的脱粒能力。在又一个实施方案中,该植物是来自一种芸薹属作物属种的一种植物、优选地是欧洲油菜、芥菜、埃塞俄比亚芥、芜菁或甘蓝。在又一个实施方案中,该植物是来自一种芸薹属油籽属种的一种植物、优选地是欧洲油菜、芥菜、或芜菁。

[0019] 在另一个方面,本发明提供了一种植物、或其一个细胞、部分、种子或子代,该植物、或其一个细胞、部分、种子或子代,包括在其基因组中的一个 IND 基因的至少一个部分敲除的突变体等位基因,其中该 IND 基因包括选自以下群组的一个核酸分子,该群组的组

成为：一个核酸分子，该核酸分子包括与 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :3 从位置 46 处的核苷酸到位置 633 处的核苷酸、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :5、或 SEQ ID NO :7 至少 90% 序列一致性；以及一个核酸分子，该核酸分子编码一个氨基酸序列，该氨基酸序列包括与 SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :4 从位置 16 处的氨基酸到位置 21 处的氨基酸或 SEQ ID NO :4 至少 90% 序列一致性。在一个实施方案中，该部分敲除的突变体 IND 等位基因是选自以下群组，其组成为：ind-a1-EMS06、ind-a1-EMS09、ind-a1-EMS13、ind-c1-EMS04、ind-c1-EMS08 以及 ind-c1-EMS09。在另一个实施方案中，该突变体 IND 等位基因是从一个芸薹属种的一种植物得到的。在又一个实施方案中，该植物是来自一个芸薹属种的一种植物。

[0020] 在一个另外的方面，提供了一种能从本发明的植物得到的种子荚果。

[0021] 在又一个方面，提供了一个 IND 基因的一个部分敲除的突变体等位基因，其中该 IND 基因包括选自以下群组的一个核酸分子，该群组的组成为：一个核酸分子，该核酸分子包括与 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :3 从位置 46 处的核苷酸到位置 633 处的核苷酸、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :5、或 SEQ ID NO :7 至少 90% 序列一致性；以及一个核酸分子，该核酸分子编码一个氨基酸序列，该氨基酸序列包括与 SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :4 从位置 16 处的氨基酸到位置 21 处的氨基酸或 SEQ ID NO :4 至少 90% 序列一致性。在一个实施方案中，该突变体等位基因是选自以下群组，其组成为：ind-a1-EMS06、ind-a1-EMS09、ind-a1-EMS13、ind-c1-EMS04、ind-c1-EMS08 以及 ind-c1-EMS09。在另一个实施方案中，该突变体等位基因是从一种芸薹属种，优选地从一种芸薹属作物属种或一种芸薹属油籽属种的一种植物中得到的。在又一个方面，提供了一种突变体 IND 蛋白，该蛋白是由本发明的突变体 IND 等位基因所编码的。

[0022] 在甚至另一个方面，根据本发明在一个生物样品中提供了一种用于鉴定一个突变体 IND 等位基因的方法，该方法包括在该生物样品中存在的一种核酸中确定一个突变体 IND 特异性区域的存在。在一个实施方案中，该方法进一步包括使该生物样品经受一个聚合酶链式反应测定，该测定使用一组至少两种引物，所述至少两种引物的组选自以下群组，其组成为：一组引物，其中所述引物中的一种特异地识别该突变体 IND 等位基因的 5' 侧翼区并且所述引物中的另一种对应地特异地识别该突变体 IND 等位基因的 3' 侧翼区；一组引物，其中所述引物中的一种特异地识别该突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区并且所述引物中的另一种特异地识别该突变体 IND 等位基因的突变区；以及一组引物，其中所述引物中的一种特异地识别该突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区并且所述引物中的另一种对应地特异地识别位于该突变体 IND 等位基因的 3' 或 5' 侧翼区与突变区之间的连接区。在另一个实施方案中，特异地识别该突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区的引物包括一个 17 到 200 个连续核苷酸的核苷酸序列，该核苷酸序列对应地选自该突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼序列或选自其互补序列，或特异地识别该突变体 IND 等位基因的突变区的引物包括一个 17 到 200 个连续核苷酸的核苷酸序列，该核苷酸序列选自该突变体 IND 等位基因的突变序列或选自其互补序列，或特异地识别位于该突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区与突变区之间的连接区的引物包括一个 17 到 200 个连续核苷酸的核苷酸序列，该核苷酸序列选自跨越位于该突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区与突变区之间的连接区的一个序列或选自其互补序列，其中所述 17 到 200 个连续核苷酸不是唯一地从该突变序列亦或这些侧翼序列上得到的。在又一个实施方案中，特异地识别该突变体 IND 等位基因的 5'

或 3' 侧翼区的引物在其末端 3' 端处包括一个至少 17 个连续核苷酸的核苷酸序列,该核苷酸序列对应地选自该突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼序列或选自其互补序列,或特异地识别该突变体 IND 等位基因的突变区的引物在其末端 3' 端处包括一个至少 17 个连续核苷酸的核苷酸序列,该核苷酸序列选自该突变体 IND 等位基因的突变序列或选自其互补序列,或特异地识别位于该突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区与突变区之间的连接区的引物在其末端 3' 端处包括一个至少 17 个连续核苷酸的核苷酸序列,该核苷酸序列选自跨越位于该突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区与突变区之间的连接区的一个序列或选自其互补序列,其中所述位于 3' 的 17 个连续核苷酸不是唯一地从该突变序列亦或这些侧翼序列上得到的。在又一个实施方案中,该方法进一步包括使该生物样品经受一个杂交测定,该测定使用包括至少一种特异性探针的一组特异性探针,所述特异性探针组选自以下群组,其组成为:一组特异性探针,其中所述探针中的一种特异地识别该突变体 IND 等位基因的 5' 侧翼区并且所述探针中的另一种特异地识别该突变体 IND 等位基因的 3' 侧翼区;一组特异性探针,其中所述探针中的一种特异地识别该突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区并且所述探针中的另一种特异地识别该突变体 IND 等位基因的突变区;一组特异性探针,其中所述探针中的一种特异地识别该突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区并且所述探针中的另一种对应地特异地识别位于该突变体 IND 等位基因的 3' 或 5' 侧翼区与突变区之间的连接区;以及一种特异性探针,该探针特异地识别位于该突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区与突变区之间的连接区。在又一个实施方案中,特异地识别该突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区的探针包括一个 13 到 1000 个连续核苷酸的核苷酸序列,或一个具有与其至少 80% 序列一致性的序列,该核苷酸序列对应地选自该突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼序列或选自其互补序列,或特异地识别该突变体 IND 等位基因的突变区的探针包括一个 13 到 1000 个连续核苷酸的核苷酸序列,或一个具有与其至少 80% 序列一致性的序列,该核苷酸序列选自该突变体 IND 等位基因的突变序列或选自其互补序列,或特异地识别位于该突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区与突变区之间的连接区的探针包括一个 13 到 1000 个连续核苷酸的核苷酸序列,或一个具有与其至少 80% 序列一致性的序列,该核苷酸序列对应地选自跨越位于该突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区与突变区之间的连接区的一个序列或选自其互补序列,其中所述 13 到 1000 个连续核苷酸不是唯一地从该突变序列亦或这些侧翼序列上得到的。在一个具体实施方案中,特异地识别该突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区的探针包括一个至少 13 个连续核苷酸的核苷酸序列,该核苷酸序列对应地选自该突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼序列或选自其互补序列,或特异地识别该突变体 IND 等位基因的突变区的探针包括一个至少 13 个连续核苷酸的核苷酸序列,该核苷酸序列选自该突变体 IND 等位基因的突变序列或选自其互补序列,或特异地识别位于该突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区与突变区之间的连接区的探针包括一个至少 13 个连续核苷酸的核苷酸序列,该核苷酸序列对应地选自跨越位于该突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区与突变区之间的连接区的一个序列或选自其互补序列,其中所述至少 13 个连续核苷酸不是唯一地从该突变序列亦或这些侧翼序列上得到的。在另一个具体实施方案中,该 5' 或 3' 侧翼区对应地包括 SEQ ID NO :5 从核苷酸 1 至 929 或 931 至 1622 或其互补序列的核苷酸序列;所述突变区具有 SEQ ID NO :5 的核苷酸 930 或其互补序列的核苷酸序列;并且所述连接区对应地包括 SEQ ID NO :5 从核苷酸 1 至 930 或 930 至 1622 或其互补序列的核

核苷酸序列;或该 5' 或 3' 侧翼区对应地包括 SEQ ID NO :5 从核苷酸 1 至 995 或 997 至 1622 或其互补序列的核苷酸序列;所述突变区具有 SEQ ID NO :5 的核苷酸 996 或其互补序列的核苷酸序列;并且所述连接区对应地包括 SEQ ID NO :5 从核苷酸 1 至 996 或 996 至 1622 或其互补序列的核苷酸序列;或该 5' 或 3' 侧翼区对应地包括 SEQ ID NO :5 从核苷酸 1 至 1035 或 1037 至 1622 或其互补序列的核苷酸序列;所述突变区具有 SEQ ID NO :5 的核苷酸 1036 或其互补序列的核苷酸序列;并且所述连接区对应地包括 SEQ ID NO :5 从核苷酸 1 至 1036 或 1036 至 1622 或其互补序列的核苷酸序列;或该 5' 或 3' 侧翼区对应地包括 SEQ ID NO :7 从核苷酸 1 至 902 或 904 至 1593 或其互补序列的核苷酸序列;所述突变区具有 SEQ ID NO :7 的核苷酸 903 或其互补序列的核苷酸序列;并且所述连接区对应地包括 SEQ ID NO :7 从核苷酸 1 至 903 或 903 至 1593 或其互补序列的核苷酸序列;或该 5' 或 3' 侧翼区对应地包括 SEQ ID NO :7 从核苷酸 1 至 910 或 912 至 1593 或其互补序列的核苷酸序列;所述突变区具有 SEQ ID NO :7 的核苷酸 911 或其互补序列的核苷酸序列;并且所述连接区对应地包括 SEQ ID NO :7 从核苷酸 1 至 911 或 911 至 1593 或其互补序列的核苷酸序列;或该 5' 或 3' 侧翼区对应地包括 SEQ ID NO :7 从核苷酸 1 至 919 或 921 至 1593 或其互补序列的核苷酸序列;所述突变区具有 SEQ ID NO :7 的核苷酸 920 或其互补序列的核苷酸序列;并且所述连接区对应地包括 SEQ ID NO :7 从核苷酸 1 至 920 或 920 至 1593 或其互补序列的核苷酸序列。在又一个具体实施方案中,该组探针选自以下群组,其组成为:一组探针,该组探针包括一种包括 SEQ ID NO :11 的序列的探针和 / 或一种包括 SEQ ID NO :12 的序列的探针;一组探针,该组探针包括一种包括 SEQ ID NO :14 的序列的探针和 / 或一种包括 SEQ ID NO :15 的序列的探针;一组探针,该组探针包括一种包括 SEQ ID NO :17 的序列的探针和 / 或一种包括 SEQ ID NO :18 的序列的探针;一组探针,该组探针包括一种包括 SEQ ID NO :20 的序列的探针和 / 或一种包括 SEQ ID NO :21 的序列的探针;一组探针,该组探针包括一种包括 SEQ ID NO :23 的序列的探针和 / 或一种包括 SEQ ID NO :24 的序列的探针;一组探针,该组探针包括一种包括 SEQ ID NO :26 的序列的探针和 / 或一种包括 SEQ ID NO :27 的序列的探针。

[0023] 在又一个方面,提供了一种根据本发明用于在一种植物、或其一个细胞、部分、种子或子代中确定一个突变体 IND 等位基因的接合性状态的方法,该方法包括在所述植物、或其一个细胞、部分、种子或子代的基因组 DNA 中确定一个突变体和 / 或一个相应的野生型 IND 特异区的存在。在一个实施方案中,该方法进一步包括使所述植物、或其一个细胞、部分、种子或子代的基因组 DNA 经受一个聚合酶链式反应测定,该测定使用一组至少两种引物或至少三种引物,其中至少两种所述引物特异地识别该野生型 IND 等位基因,所述至少两种引物选自以下群组,其组成为:一种第一引物,该第一引物特异地识别该突变体以及该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区,以及一种第二引物,该第二引物对应地特异地识别该突变体以及该野生型 IND 等位基因的 3' 或 5' 侧翼区;一种第一引物,该第一引物特异地识别该突变体以及该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区,以及一种第二引物,该第二引物特异地识别该野生型 IND 等位基因的突变区;以及一种第一引物,该第一引物特异地识别该突变体以及该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区,以及一种第二引物,该第二引物对应地特异地识别位于该野生型 IND 等位基因的 3' 或 5' 侧翼区与突变区之间的连接区,并且其中至少两种所述引物特异地识别该突变体 IND 等位基因,所述至少两种引物选自以下群组,其组成为:该第一引物,该第一引物特异地识别该突变体以及该野生型

IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区, 以及该第二引物, 该第二引物对应地特异地识别该突变体以及该野生型 IND 等位基因的 3' 或 5' 侧翼区; 该第一引物, 该第一引物特异地识别该突变体以及该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区, 以及一种第三引物, 该第三引物特异地识别该突变体 IND 等位基因的突变区; 该第一引物, 该第一引物特异地识别该突变体以及该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区, 以及一种第三引物, 该第三引物对应地特异地识别位于该突变体 IND 等位基因的 3' 或 5' 侧翼区与突变区之间的连接区。在一个进一步的实施方案中, 特异地识别该突变体以及该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区的引物包括一个 17 到 200 个连续核苷酸的核苷酸序列, 该核苷酸序列对应地选自该突变体以及该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼序列或选自其互补序列; 或特异地识别该突变体或该野生型 IND 等位基因的突变区的引物包括一个 17 到 200 个连续核苷酸的核苷酸序列, 该核苷酸序列对应地选自该突变体或该野生型 IND 等位基因的突变序列或选自其互补序列; 或特异地识别位于该突变体或该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区与突变区之间的连接区的引物包括一个 17 到 200 个连续核苷酸的核苷酸序列, 该核苷酸序列对应地选自跨越位于该突变体或该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区与突变区之间的连接区的一个序列或选自其互补序列, 其中所述 17 到 200 个连续核苷酸不是唯一地从该突变区序列亦或从这些侧翼序列上得到的。在又一个实施方案中, 特异地识别该突变体以及该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区的引物在其末端 3' 端处包括一个 17 个连续核苷酸的核苷酸序列, 该核苷酸序列对应地选自该突变体以及该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼序列或选自其互补序列; 或特异地识别该突变体或该野生型 IND 等位基因的突变区的引物在其末端 3' 端处包括一个 17 个连续核苷酸的核苷酸序列, 该核苷酸序列对应地选自该突变体或该野生型 IND 等位基因的突变序列或选自其互补序列; 或特异地识别位于该突变体或该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区与突变区之间的连接区的引物在其末端 3' 端处包括一个 17 个连续核苷酸的核苷酸序列, 该核苷酸序列对应地选自跨越位于该突变体或该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区与突变区之间的连接区的一个序列或选自其互补序列, 其中所述位于 3' 的 17 个连续核苷酸不是唯一地从该突变位点或区域的序列亦或从这些侧翼序列上得到的。在又一个实施方案中, 该方法进一步包括使所述植物、或其一个细胞、部分、种子或子代的基因组 DNA 经受一个杂交测定, 该测定使用一组至少两种特异性探针, 其中至少一种所述特异性探针特异地识别该野生型 IND 等位基因, 所述至少一种探针选自以下群组, 其组成为: 一种第一探针, 该第一探针特异地识别该突变体以及该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区, 以及一种第二探针, 该第二探针对应地特异地识别该突变体以及该野生型 IND 等位基因的 3' 和 5' 侧翼区; 一种第一探针, 该第一探针特异地识别该突变体以及该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区, 以及一种第二探针, 该第二探针特异地识别该野生型 IND 等位基因的突变区; 一种第一探针, 该第一探针特异地识别该突变体以及该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区, 以及一种第二探针, 该第二探针对应地特异地识别位于该野生型 IND 等位基因的 3' 或 5' 侧翼区与突变区之间的连接区; 以及一种探针, 该探针特异地识别位于该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区与突变区之间的连接区; 并且其中至少一种所述特异性探针特异地识别该突变体 IND 等位基因, 所述至少一种探针选自以下群组, 其组成为: 该第一探针, 该第一探针特异地识别该突变体以及该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区, 以及该第二探针, 该第二探针对应地特异地识别该突变体以及该野

生型 IND 等位基因的 3' 或 5' 侧翼区 ; 该第一探针, 该第一探针特异地识别该突变体以及该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区, 以及一种第三探针, 该第三探针特异地识别该突变体 IND 等位基因的突变区 ; 该第一探针, 该第一探针特异地识别该突变体以及该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区, 以及一种第三探针, 该第三探针特异地识别位于该突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区与突变区之间的连接区 ; 以及一种探针, 该探针特异地识别位于该突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区与突变区之间的连接区。在一个具体实施方案中, 特异地识别该突变体以及该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区的探针包括一个 13 到 1000 个连续核苷酸的核苷酸序列, 或一个具有与其至少 80% 序列一致性的序列, 该核苷酸序列对应地选自该突变体或该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼序列或选自其互补序列, 或特异地识别该突变体或该野生型 IND 等位基因的突变区的探针包括一个 13 到 1000 个连续核苷酸的核苷酸序列, 或一个具有与其至少 80% 序列一致性的序列, 该核苷酸序列对应地选自该突变体或该野生型 IND 等位基因的突变区的序列, 或特异地识别位于该突变体或该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区与突变区之间的连接区的探针包括一个 13 到 1000 个连续核苷酸的核苷酸序列, 或一个具有与其至少 80% 序列一致性的序列, 该核苷酸序列对应地选自跨越位于该突变体或该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区与突变区之间的连接区的一个序列, 其中所述 13 到 1000 个连续核苷酸不是唯一地从该突变位点或区域的序列亦或从这些侧翼序列上得到的。在另一个具体实施方案中, 特异地识别该突变体以及该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区的探针包括一个至少 13 个连续核苷酸的核苷酸序列, 该核苷酸序列对应地选自该突变体或该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼序列或选自其互补序列, 或特异地识别该突变体或该野生型 IND 等位基因的突变区的探针包括一个至少 13 个连续核苷酸的核苷酸序列, 该核苷酸序列选自该突变体或该野生型 IND 等位基因的突变序列或选自其互补序列, 或特异地识别位于该突变体或该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区与突变区之间的连接区的探针包括一个至少 13 个连续核苷酸的核苷酸序列, 该核苷酸序列对应地选自跨越位于该突变体或该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区与突变区之间的连接区的一个序列或选自其互补序列, 其中所述至少 13 个连续核苷酸不是唯一地从该突变序列亦或这些侧翼序列上得到的。在一个进一步的具体实施方案中, 该 5' 或 3' 侧翼区对应地包括 SEQ ID NO :5 从核苷酸 1 至 929 或 931 至 1622 或其互补序列的核苷酸序列 ; 该野生型 IND 等位基因的所述突变区具有 SEQ ID NO :5 的核苷酸 930 或其互补序列的核苷酸序列 ; 该突变体 IND 等位基因的所述突变区具有序列 a 或其互补序列 ; 该野生型 IND 等位基因的所述连接区对应地包括 SEQ ID NO :5 从核苷酸 1 至 930 或 930 至 1622 或其互补序列的核苷酸序列 ; 并且该突变体 IND 等位基因的所述连接区对应地包括 SEQ ID NO :5 从核苷酸 1 至 929 随后是 a 或者 a 随后是核苷酸序列 SEQ ID NO :5 从核苷酸 931 至 1622 或其互补序列的核苷酸序列 ; 或该 5' 或 3' 侧翼区对应地包括 SEQ ID NO :5 从核苷酸 1 至 995 或 997 至 1622 或其互补序列的核苷酸序列 ; 该野生型 IND 等位基因的所述突变区具有 SEQ ID NO :5 的核苷酸 996 或其互补序列的核苷酸序列 ; 该突变体 IND 等位基因的所述突变区具有序列 a 或其互补序列 ; 该野生型 IND 等位基因的所述连接区对应地包括 SEQ ID NO :5 从核苷酸 1 至 996 或 996 至 1622 或其互补序列的核苷酸序列 ; 并且该突变体 IND 等位基因的所述连接区对应地包括 SEQ ID NO :5 从核苷酸 1 至 995 随后是 a 或者 a 随后是核苷酸序列 SEQ ID NO :5 从核苷酸 997 至 1622 或其互补序列的核苷酸序列 ; 或该

5' 或 3' 侧翼区对应地包括 SEQ ID NO :5 从核苷酸 1 至 1035 或 1037 至 1622 或其互补序列的核苷酸序列 ;该野生型 IND 等位基因的所述突变区具有 SEQ ID NO :5 的核苷酸 1036 或其互补序列的核苷酸序列 ;该突变体 IND 等位基因的所述突变区具有序列 t 或其互补序列 ;该野生型 IND 等位基因的所述连接区对应地包括 SEQ ID NO :5 从核苷酸 1 至 1036 或 1036 至 1622 或其互补序列的核苷酸序列 ;并且该突变体 IND 等位基因的所述连接区对应地包括 SEQ ID NO :5 从核苷酸 1 至 1035 随后是 t 或者 t 随后是核苷酸序列 SEQ ID NO :5 从核苷酸 1037 至 1622 或其互补序列的核苷酸序列 ;或该 5' 或 3' 侧翼区对应地包括 SEQ ID NO :7 从核苷酸 1 至 902 或 904 至 1593 或其互补序列的核苷酸序列 ;该野生型 IND 等位基因的所述突变区具有 SEQ ID NO :7 的核苷酸 903 或其互补序列的核苷酸序列 ;该突变体 IND 等位基因的所述突变区具有序列 t 或其互补序列 ;并且该野生型 IND 等位基因的所述连接区对应地包括 SEQ ID NO :7 从核苷酸 1 至 903 或 903 至 1593 或其互补序列的核苷酸序列 ;并且该突变体 IND 等位基因的所述连接区对应地包括 SEQ ID NO :7 从核苷酸 1 至 902 随后是 t 或者 t 随后是核苷酸序列 SEQ ID NO :7 从核苷酸 904 至 1593 或其互补序列的核苷酸序列 ;或该 5' 或 3' 侧翼区对应地包括 SEQ ID NO :7 从核苷酸 1 至 910 或 912 至 1593 或其互补序列的核苷酸序列 ;该野生型 IND 等位基因的所述突变区具有 SEQ ID NO :7 的核苷酸 911 或其互补序列的核苷酸序列 ;该突变体 IND 等位基因的所述突变区具有序列 a 或其互补序列 ;并且该野生型 IND 等位基因的所述连接区对应地包括 SEQ ID NO :7 从核苷酸 1 至 911 或 911 至 1593 或其互补序列的核苷酸序列 ;并且该突变体 IND 等位基因的所述连接区对应地包括 SEQ ID NO :7 从核苷酸 1 至 910 随后是 a 或者 a 随后是核苷酸序列 SEQ ID NO :7 从核苷酸 912 至 1593 或其互补序列的核苷酸序列 ;或该 5' 或 3' 侧翼区对应地包括 SEQ ID NO :7 从核苷酸 1 至 919 或 921 至 1593 或其互补序列的核苷酸序列 ;该野生型 IND 等位基因的所述突变区具有 SEQ ID NO :7 的核苷酸 920 或其互补序列的核苷酸序列 ;该突变体 IND 等位基因的所述突变区具有序列 t 或其互补序列 ;并且该野生型 IND 等位基因的所述连接区对应地包括 SEQ ID NO :7 从核苷酸 1 至 920 或 920 至 1593 或其互补序列的核苷酸序列 ;并且该突变体 IND 等位基因的所述连接区对应地包括 SEQ ID NO :7 从核苷酸 1 至 919 随后是 t 或者 t 随后是核苷酸序列 SEQ ID NO :7 从核苷酸 921 至 1593 或其互补序列的核苷酸序列。在一个具体实施方案中,该组的至少三种特异性探针选自以下群组,其组成为 :一组探针,该组探针包括一种包括 SEQ ID NO :11 的序列的探针、一种包括 SEQ ID NO :12 的序列的探针、和 / 或一种包括 SEQ ID NO :13 的序列的探针 ;一组探针,该组探针包括一种包括 SEQ ID NO :14 的序列的探针、一种包括 SEQ ID NO :15 的序列的探针、和 / 或一种包括 SEQ ID NO :16 的序列的探针 ;一组探针,该组探针包括一种包括 SEQ ID NO :17 的序列的探针、一种包括 SEQ ID NO :18 的序列的探针、和 / 或一种包括 SEQ ID NO :19 的序列的探针 ;一组探针,该组探针包括一种包括 SEQ ID NO :20 的序列的探针、一种包括 SEQ ID NO :21 的序列的探针、和 / 或一种包括 SEQ ID NO :22 的序列的探针 ;一组探针,该组探针包括一种包括 SEQ ID NO :23 的序列的探针、一种包括 SEQ ID NO :24 的序列的探针、和 / 或一种包括 SEQ ID NO :25 的序列的探针 ;以及一组探针,该组探针包括一种包括 SEQ ID NO :26 的序列的探针、一种包括 SEQ ID NO :27 的序列的探针、和 / 或一种包括 SEQ ID NO :28 的序列的探针。

[0024] 还提供了根据本发明用于鉴定一个生物样品中的一个突变体 IND 等位基因的试剂盒、以及根据本发明用于在一种植物、或其一个细胞、部分、种子或子代中确定一个突变

体 IND 等位基因的接合性状态的试剂盒,这些试剂盒包括如上所述的引物或探针,同样提供了根据本发明用于将这些突变体 IND 等位基因结合到一种植物中的方法、根据本发明用于将这些突变体 IND 等位基因从一株植物转移到另一株植物上的方法、以及根据本发明用于制造一种(杂交体)植物或种子的方法。

[0025] 在本发明的另一个实施方案中,使用本发明的突变体 IND 等位基因来增加从芸薹属植物所收获的种子或谷物的产量。所增加的产量可能是减少或延迟种子落粒的结果,但是还可能不依赖于该减少或延迟种子落粒。具体地,提供了包括至少两个 IND 基因的芸薹属植物、或其一个细胞、部分、种子或子代,其特征在于这些植物在其基因组中包括两个如在此所述的突变体纯合的 IND 等位基因。

[0026] 通用定义

[0027] 如在此使用的“增加荚果抗落粒性”以及“减少种子落粒性”是指芸薹属植物的减少的种子落粒趋势和/或种子落粒的时间上的延迟,特别是直到收获后,芸薹属植物的果实正常地不是同步地成熟,而是顺序地成熟,从而在收获之前或收获期间一些荚果崩裂开并且使它们的种子落粒。对于荚果落粒的耐受性的水平是正相关于并且可以例如通过确定在“拉伸分离试验”(Davies and Bruce, 1997, *J Mat Sci* 32 :5895-5899 ;Morgan et al. , 1998, *Fields Crop Research* 58, 153-165) 中破裂荚果所需要的力、在一个“随机冲击试验”中在例如 20 秒(‘IP20’;Morgan et al. , 1998, 上述的)、9.7 或 17 秒(Bruce et al. , 2002, *Biosystems Eng* 81(2) :179-184) 之后剩余的完整荚果的数目、在一个随机冲击试验中该荚果样品半衰期(以下也称为“LD50”)(即在所测试的荚果样品中引起 50%的荚果打开所需要的处理时间)、以及“对于落粒进行大田计分”(Morgan et al. , 1998, 上述)进行测量。随机冲击试验(RIT)以及用于在此类 RIT 中定义荚果样品半衰期的算法已经描述于 Bruce et al. , 2002(上述)、Morgan et al. , 1998(上述)以及以下实例中。这两个公开都通过引用结合在此。简言之,将完整的成熟荚果的一个样品与钢球一起放在一个封闭的滚筒中并且然后将该滚筒剧烈摇动持续逐渐增加的一段时间(例如 10s、20s、40s、80s)。在各段时间之后,将该滚筒打开并且对破碎和损坏的荚果的数目进行计数。对于每个品系的抗落粒性的水平的最精确的评价是通过对所有可获得的数据进行一个线性 x 线性曲线的拟合并且估计用于破碎一个样品中一半荚果所花费的时间(“荚果样品半衰期”或“LD50”)来计算的。然而重要的是,荚果主要沿着开裂区打开,并且不是如不裂开的荚果可能发生的简单地粉碎。

[0028] 如在此使用的,“荚果抗落粒性的农艺学相关的增加”是指一株植物中荚果抗落粒性的增加,该增加导致了大田中(收获之前)荚果落粒相关的产量损失低于对于大田中该植物所正常观察到那些产量损失。对于油菜籽油菜,据报告大田中荚果落粒相关的产量损失对于具有平均良好的生长条件的季节是大约 11%并且对于具有平均较差的生长条件的季节是大约 25%。在如由 Bruce et al. , 2002(*Biosystems Eng* 81(2) :179-184) 所描述的随机冲击试验中,发现了对应地在种子损失的这些水平与在 9.7s 和 17s 处理时间时的种子损失的水平之间一种正相关性,。可替代地,为了确定一株植物中对荚果落粒的耐受性的水平是否是农艺学相关的,可以将该植物的荚果样品半衰期(“LD50”,参见以上)与一个已知具有平均水平的荚果抗落粒性的植物的荚果样品半衰期进行比较,如对于油菜籽油菜,所有当前可商购的油菜籽油菜品种。

[0029] 如在此所使用的“荚果或种子落粒”或“果实或荚果开裂”是指在种子成熟后在一个果实中发生的一个过程，由此瓣从中央隔膜分离，释放种子。破裂的区域（即，该“开裂区”）蔓延瓣与胎座框（外隔膜）之间的果实的整个长度。在成熟时，该“开裂区”实质上是瓣中木质化细胞的一个区域与胎座框之间的细胞的一个非木质化层。由于开裂区中细胞壁松弛与由长角果中干燥细胞的不同机械特性而确立的张力的组合发生了落粒。

[0030] 如在此使用的，一个芸薹属“果实”是指一个芸薹属植物的一个器官，该器官从由融合心皮组成的一个雌蕊发育而来，当该雌蕊受精后，生长成为含有发育的种子的一个“（种子）荚果”或“长角果”。一个芸薹属“（种子）荚果”或“长角果”包括一个果实壁（心皮），该果实壁由隔膜分成封闭的两个小腔。该“开裂区”在邻近隔膜的心皮边缘处发育并且蔓延该长角果的长度。开裂区的细胞最后开始裂解并且这削弱了心皮壁或瓣与隔膜之间的接触。细胞内聚力的损失被限制在开裂区的细胞中并且由中间薄层断裂 (Meakin and Roberts, 1990, J Exp Bot 41, 995-1011) 而形成。

[0031] 如在此使用的，“开裂区”是指位于植物（特别是芸薹属植物）的两瓣荚果的两侧上的缝中所包含的简单的薄壁细胞的层。这些开裂区位于荚果瓣边缘与含有到茎或花梗的主维管束的一个中央胎座框之间。开裂区中细胞的分离发生在荚果老化期间并且是在荚果达到完全成熟时完成的 (Meakin and Roberts, 1990, 上述)。然后可以发生瓣分离。该开裂区包含维管迹线，这些维管迹线从荚果壁到花梗（茎）和胎座框。荚果落粒的过程仅发生在外力破碎该纤弱的维管线之后，允许瓣分离并且将种子落到地面上。这发生在冠层紊乱期间，例如在收获期间通过与联合收割机进行接触。该维管组织包含增厚的、木质化的细胞，这些细胞形成了在传导细胞附近发现的厚角的细胞集合 (Meakin and Roberts, 1990, 上述)。这向该组织提供了刚性并且推测提供了对于断裂的一些耐受性。

[0032] 如在此使用的，“一种农艺学相关的脱粒能力”是指当施加物理力（该力允许完全打开荚果同时避免对种子的损害，像例如它们在一个联合收割机中所使用的）时一个荚果（特别是一个油菜籽油菜荚果）对于沿着荚果的开裂区打开（同时释放种子）的耐受性。已经发现在随机冲击试验中一个荚果样品半衰期（‘LD50’）与它们的脱粒能力之间一种正相关性。如按照这些实例中所述进行的一个 RIT 中所确定的，相应于农艺学相关的脱粒能力的油菜籽油菜荚果样品半衰期不应该超过 80 秒。对于可商购的油菜籽油菜品种的对照品系的典型的样品半衰期值是大约 10 秒。因此，具有显著增加的荚果抗落粒性具有农艺学相关的脱粒能力的品系在 RIT 中具有荚果样品半衰期为约 10 秒至约 80 秒之间、约 10 秒至约 70 秒之间、约 15 秒至约 70 秒之间、约 10 秒至约 60 秒之间、约 10 秒至约 50 秒之间、约 20 秒至约 60 秒之间、约 20 秒至约 50 秒之间、约 40 秒至约 60 秒之间、约 57 秒。

[0033] “裂开性种子植物”是指生成一种干的裂开性果实的一种植物，该果实具有果实壁，将果实壁打开从而允许包含在其中的种子的释放。裂开性果实通常包含一些种子并且包括已知的果实，例如像豆类、蒴果类以及长角果。

[0034] “作物植物”是指作为一种作物进行栽培的植物属种，如欧洲油菜 (AACC,  $2n = 38$ )、芥菜 (AABB,  $2n = 36$ )、埃塞俄比亚芥 (BBCC,  $2n = 34$ )、芜菁（同义词芸薹）(AA,  $2n = 20$ )、甘蓝 (CC,  $2n = 18$ ) 或黑芥 (BB,  $2n = 16$ )。该定义不包括野草，如拟南芥。

[0035] 根据本发明术语“核酸序列”（或核酸分子）是指处于单链或双链形式的一个 DNA 或 RNA 分子、具体地编码一个蛋白或蛋白片段的一个 DNA。一个“内源核酸序列”是指一株

植物细胞内的一个核酸序列,例如一个芸薹属细胞的核基因组中存在的一个 IND 基因的一个内源等位基因。一个“分离的核酸序列”是用于指一个核酸序列,该核酸序列不再在其自然环境中,例如在体外或在一个重组细菌或植物宿主细胞中。

[0036] 术语“基因”是指一个 DNA 序列,该序列包括一个区(转录区),该区在一个细胞中被转录成一个 RNA 分子(例如转录成一个包括内含子序列的前体 mRNA,然后它被剪接成一个成熟 mRNA,或直接转录成不含内含子序列的一个 mRNA),该区可操作地连接到调节区上(例如一个启动子)。因此一个基因可以包括若干可操作地连接的序列,例如一个启动子、一个 5' 前导序列(包括例如涉及翻译起始的序列)、一个(蛋白)编码区(cDNA 或基因组 DNA) 以及一个 3' 非翻译序列(包括例如转录终止位点)。“内源基因”是用于与一个“外来基因”、“转基因”或“嵌合基因”进行区别,并且是指来自某一植物属、种或品种的一株植物的一个基因,该基因没有通过转化被引入到该植物中(即它不是一个“转基因”),但是该基因正常地存在于该属、种或品种的植物中,或该基因是通过常规培育技术或通过体细胞杂交(例如通过原生质体融合)从另一株植物属、种或品种的植物(其中该基因正常地是存在的)中引入该植物中的。类似地,一个基因的一个“内源等位基因”不是通过植物转化而引入到一株植物或植物组织中的,却是例如通过植物诱变和/或选择来产生的或是通过筛选植物的天然集合来获得的。

[0037] “一个基因的表达”或“基因表达”是指一个过程,其中可操作地连接到适合的调节区(具体地是一个启动子)上的一个 DNA 区被转录成一个 RNA 分子。然后在该细胞内将该 RNA 分子进一步加工(通过后转录过程),例如通过 RNA 剪接和翻译起始和翻译成一个氨基酸链(蛋白),并且通过翻译终止密码子终止翻译。术语“功能性表达”在此用于指生成了一个功能性蛋白;术语“非功能性表达”是指生成了一个具有显著减小的或无功能性(生物学活性)的蛋白或没有生成蛋白(进一步参见以下)。

[0038] 术语“蛋白”是指一个分子,该分子包括一个氨基酸链,不涉及作用的具体模式、大小、3 维空间结构或来源。因此,一个 IND 蛋白的一个“片段”或“部分”仍可以被称为一个“蛋白”。一个“分离的蛋白”是用于指一个蛋白,该蛋白不再在其自然环境中,例如在体外或在一个重组细菌或植物宿主细胞中。“氨基酸”是蛋白和酶的主要构造单元。当信使 RNA 由核糖体进行解码时,根据遗传密码,通过转运 RNA,将它们结合到蛋白中。在一个蛋白的最终组装期间或之后,氨基酸含量指示了该蛋白或酶的空间的和生物化学的特性。氨基酸主链决定了一个蛋白的一级序列,但是侧链的性质决定了蛋白的特性。如在此使用的,“类似的氨基酸”是指具有类似的氨基酸侧链的氨基酸,即具有极性、非极性或实际上中性侧链的氨基酸。如在此使用的“非类似的氨基酸”是指具有不同的氨基酸侧链的氨基酸,例如具有一个极性侧链的一个氨基酸是与具有一个非极性侧链的一个氨基酸非类似的。极性侧链通常趋向于存在于一个蛋白的表面上,在那里它们可以与细胞中发现的水性环境相互作用(“亲水性”氨基酸)。另一方面,“非极性”氨基酸趋向于驻留在蛋白的中心内,在那里它们可以与类似的非极性邻近物相互作用(“疏水性”氨基酸)。具有极性侧链的氨基酸的实例是精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、组氨酸、赖氨酸、丝氨酸、以及苏氨酸(全部是亲水性的,除了半胱氨酸之外,它是疏水性的)。具有非极性侧链的氨基酸的实例是丙氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、以及色氨酸(全部是疏水性的,除了甘氨酸之外,它是中性的)。

[0039] 术语“转录因子”是用于指一个蛋白,该蛋白包括至少两个不连续的结构域 - 一个 DNA 结合域和一个激活或抑制域 - 它们共同操作以调节从目标基因启动子的转录起始速率 (Ptashne, 1988, Nature 335, 683-689)。术语“碱性螺旋 - 环 - 螺旋 (bHLH) 结构域转录因子”是用于指一个转录因子,该转录因子除了该 bHLH DNA 结合域 (Heim et al., 2003, Mol Biol Evol 20, 735-747; Toledo-Ortiz et al., 2003, Plant Cell 15, 1749-1770) 之外还包括已知对于基因表达的调节是重要的结构域,它在来自不同种属的相关蛋白中在氨基酸水平上可以是保守的 (Quong et al., 1993, Mol Cell Biol 13, 792-800)。包括一个 bHLH 结构域的转录调节子通过碱性区中的残基结合 DNA, 而该螺旋 - 环 - 螺旋结构域促进了二聚作用, 允许了家族成员形成异源二聚体或同源二聚体 (Murre et al., 1989, Cell 56, 777-783)。

[0040] 术语“IND 基因”在此是指编码一个 INDEHISCENT (IND) 蛋白的一个核酸序列,该蛋白是一种对于种子传播所要求的碱性螺旋 - 环 - 螺旋 (bHLH) 结构域转录因子 (Liljegen et al., 2004, Cell 116 :843-853)。

[0041] 如在此使用的,术语“一个或多个等位基因”是指在一个特定基因座处一个基因的一种或多种替代形式的任何一种。在一个生物的一个二倍体 (或双二倍体) 细胞中,一个给定基因的等位基因位于一个染色体上一个特定的位置或基因座 (复数形式基因座 (loci)) 处。一个等位基因存在于同源染色体的对的每个染色体上。

[0042] 如在此使用的,术语“同源染色体”是指染色体,这些染色体含有用于相同的生物特征的信息,并且这些染色体在相同的基因座处含有相同的基因但可能是这些基因的不同等位基因。同源染色体是在减数分裂期间配对的染色体。代表一个生物的所有生物学特征的“非同源染色体”形成一个组,并且一个细胞中组的数目被称为倍性。二倍体生物含有两组非同源染色体,其中每个同源染色体是从一个不同的亲本遗传的。在一个双二倍体种属中,基本上存在两组二倍体基因组,由此这两个基因组的染色体被称为“部分同源染色体” (并且类似地,这两个基因组的基因座或基因被称为部分同源基因座或基因)。一个二倍体、或双二倍体植物属种在一个特定基因座处可以包括很多不同的等位基因。

[0043] 如在此使用的,术语“杂合的”是指当两个不同的等位基因位于一个特定的基因座处但是个别地位于细胞中同源染色体的相应的对上时存在的一种遗传条件。反之,如在此使用的,术语“纯合的”是指当两个相同的等位基因位于一个特定的基因座处,但是个别地位于细胞中同源染色体的相应的对上时存在的一种遗传条件。

[0044] 如在此使用的,术语“基因座” (复数形式基因座 (loci)) 是指一个染色体上的一个具体的位置或多个位置或一个位点,例如在那里发现了一个基因或遗传标记。例如,“IND-A1 基因座”是指 A 基因组的一个染色体上的位置,其中可以发现 IND-A1 基因 (以及两个 IND-A1 等位基因),而“IND-C1 基因座”是指 C 基因组的一个染色体上的位置,其中可以发现 IND-C1 基因 (以及两个 IND-C1 等位基因)。

[0045] 根据本发明无论何时提及一个“植物”或“多个植物”时,应理解的是除非另外指明,在此还包括植物的部分 (细胞、组织或器官、种子荚果、种子、重要的部分如根、叶、花、花粉、等等)、保留了亲本的区别性特征的植物的子代 (尤其是果实开裂特性),如通过自交或杂交得到的种子,例如杂交种子 (通过将两个近交亲本品系杂交而得到),从其得到的杂交植物和植物部分。

[0046] 一种“分子测定” (或测试) 在此是指一种测定,该测定表明 (直接地或间接地)

在一个或两个 IND 基因座处（例如在 IND-A1 或 IND-C1 基因座的一个或两个处）一个或多个特定的 IND 等位基因存在或不存在。在一个实施方案中，它允许人们确定在任何单独的植物中的基因座处一个特定的（野生型或突变体）IND 等位基因是否是纯合的或杂合的。

[0047] 如在此使用的，“野生型”（也写作“野生类型”或“野生型的”）是指一个典型形式的一株植物或一个基因，与它最常见地在自然界中存在的一样。一个“野生型植物”是指具有此类植物在自然种群中最常见的表型的一株植物。一个“野生型等位基因”是指对于产生该野生型表型所需的一个基因的一个等位基因。作为对比，一个“突变体植物”是指具有此类植物在自然种群中一种不同的稀有的表型的一株植物、或通过人类干预而生成的一株植物（例如通过诱变），并且一个“突变体等位基因”是指对于产生该突变体表型所需的一个基因的一个等位基因。

[0048] 如在此使用的，术语“野生型 IND”（例如野生型 IND-A1 或 IND-C1）是指在植物中具体地在十字花科植物中，尤其是芸薹属植物中所发现的一个自然发生的 IND 等位基因，它编码了一个功能性 IND 蛋白（例如对应地一个功能性 IND-A1 或 IND-C1）。相比之下，如在此使用的，术语“突变体 IND”（例如突变体 IND-A1 或 IND-C1）是指一个 IND 等位基因，该等位基因不编码一个功能性 IND 蛋白，即是编码一个非功能性 IND 蛋白（例如对应地一个非功能性 IND-A1 或 IND-C1）或完全没有编码 IND 蛋白的一个 IND 等位基因，如在此使用的，该非功能性 IND 蛋白是指不具有生物学活性或具有与相应的野生型功能性 IND 蛋白相比显著减小的生物学活性的一个 IND 蛋白。如在此使用的，一个“完全敲除”或“无效”突变体 IND 等位基因是指一个突变体 IND 等位基因，它编码了与相应的野生型功能性 IND 蛋白相比不具有生物学活性的一个 IND 蛋白或它完全没有编码蛋白。这样一个“完全敲除的突变体 IND 等位基因”是例如一个野生型 IND 等位基因，该野生型 IND 等位基因在其核酸序列上包括一个或多个突变，例如一个或多个无义或错义突变。具体地，这样一个完全敲除的突变体 IND 等位基因是一个野生型 IND 等位基因，该野生型 IND 等位基因包括一个突变，该突变优选导致生成一个缺少至少一个功能域（如活化域、DNA 结合域和 / 或二聚化功能域）或缺少至少一个对其功能关键的氨基酸（如对于 DNA 结合是关键的一个氨基酸，例如 SEQ ID NO :2 中的位置 127 处或 SEQ ID NO :4 中的位置 140 处等的精氨酸等、或 SEQ ID NO :2 中的位置 122 处或 SEQ ID NO :4 中的位置 135 处等的谷氨酰胺等）的 IND 蛋白，从而使得该 IND 蛋白的生物学活性被完全消除，或由此这一个或多个突变优选地导致没有生成一个 IND 蛋白。如在此使用的，一个“部分敲除的”突变体 IND 等位基因是指一个突变体 IND 等位基因，它编码了与相应的野生型功能性 IND 蛋白相比具有显著减小的生物学活性的一个 IND 蛋白。这样一个“部分敲除的突变体 IND 等位基因”是例如一个野生型 IND 等位基因，该野生型 IND 等位基因在其核酸序列上包括一个或多个突变，例如一个或多个错义突变。具体地，这样一个部分敲除的突变体 IND 等位基因是一个野生型 IND 等位基因，该野生型 IND 等位基因包括一个突变，该突变优选地导致生成一个 IND 蛋白，其中至少一个保守的和 / 或功能性氨基酸被取代为另一个氨基酸，从而使得该生物学活性被显著减小但是没有完全消除。这样的完全敲除的突变体 IND 等位基因或部分敲除的突变体 IND 等位基因还可以编码一个显性阴性 IND 蛋白，该蛋白能够在相同的细胞内对其他 IND 蛋白的生物学活性产生不利影响。这样一个显性阴性 IND 蛋白可以是一个 IND 蛋白，该蛋白仍然能够与相同的元件（如野生型 IND 蛋白）相互作用，但是该蛋白限制了其功能的一些方面。显性阴性 IND 蛋白

的实例是 IND 蛋白,这些蛋白缺少活化域和 / 或二聚化功能域或对于活化和 / 或二聚化关键的特定氨基酸残基但是仍然含有 DNA 结合域,从而使得不仅它们自身的生物学活性被减少或消除,而且它们通过与存在于细胞中的野生型和 / 或部分敲除的 IND 蛋白竞争 DNA 结合位点,进一步减小了细胞中总 IND 活性。显性阴性 IND 蛋白的其他实例是 IND 蛋白,这些蛋白缺少活化域和 / 或 DNA 结合域或对于活化和 / 或 DNA 结合关键的特定的氨基酸残基但是仍然含有二聚化功能域,从而使得不仅它们自身的生物学活性被减少或消除,而且它们通过生成缺少至少一个功能域的蛋白二聚体进一步减少了细胞中总 IND 活性。编码 IND 蛋白的核酸序列的突变体等位基因在此被指定为“ind”(例如对应地 ind-a1 或 ind-c1)。突变体等位基因可以或是“天然突变体”等位基因(它是在自然界中发现的突变体等位基因)(例如在没有人类施加诱导剂下自发生成的)或是“诱导的突变体”等位基因(它是通过人类干预(例如通过诱变)诱导的)。

[0049] 一个“显著减少量的功能性 IND 蛋白”(例如功能性 IND-A1 或 IND-C1 蛋白)是指与由不包括该突变体 IND 等位基因的细胞生成的功能性 IND 蛋白的量相比,由包括一个突变体 IND 等位基因的细胞生成的一个功能性 IND 蛋白的量减少了至少 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 或 100% (即没有功能性 IND 蛋白由该细胞生成)。该定义包括在体内生成一个不具有生物学活性的“非功能性”IND 蛋白(例如截短的 IND 蛋白)、该功能性 IND 蛋白的绝对数量的减少(例如由于 IND 基因中的突变没有制造功能性 IND 蛋白)、与一个功能性野生型 IND 的活性相比生成一个具有显著减小的生物学活性的 IND 蛋白(例如一个 IND 蛋白,其中如以下所例证的一个或多个对于所编码的 IND 蛋白的生物学活性关键的氨基酸残基被取代为另一个氨基酸残基)和 / 或显性阴性 IND 蛋白对其他功能性和 / 或部分功能性 IND 蛋白的不利影响。

[0050] 如在此使用的,术语“突变体 IND 蛋白”是指由一个突变体 IND 核酸序列(“ind 等位基因”)所编码的一个 IND 蛋白,由此与由一个非突变体野生型 IND 序列(“IND 等位基因”)所编码的 IND 蛋白的活性相比,该突变导致了在体内显著减小的和 / 或无 IND 活性。

[0051] 如在此使用的,“诱变”是指一个过程,其中使植物细胞(例如多个芸薹属种子或其他部分,如花粉等)经受一种技术,该技术诱导了细胞的 DNA 中的突变,如与一种诱变剂(如一种化学物质(如乙基甲基磺酸酯(EMS)、乙基亚硝基脲(ENU)、等))或电离辐射(中子(如在快速中子诱变中、等)、 $\alpha$  射线、 $\gamma$  射线(如由一种钴 60 源提供的)、X 射线、紫外线辐射、等)、或这些的两种或更多种的一个组合进行接触。因此,一个或多个 IND 等位基因的所希望的诱变可以通过使用化学方法(如通过将一个或多个植物组织与乙基甲基磺酸酯(EMS)、乙基亚硝基脲等进行接触)、通过使用物理方法(如 x 射线等)、或通过  $\gamma$  辐射(如由一种钴 60 源提供的)来实现。虽然由辐射引起的突变经常是大的缺失或其他总的损伤如易位或复合体重排,由化学诱导剂引起的突变经常是更不连续的损伤如点突变。例如,EMS 烷基化鸟嘌呤碱基,它导致了碱基错配:一个烷基化的鸟嘌呤将与一个胸腺嘧啶碱基进行配对,主要地导致了 G/C 至 A/T 的转变。在诱变后,使用已知技术从这些处理过的细胞再生出芸薹属植物。例如,根据常规的生长步骤可以将生成的芸薹属种子进行种植并且在自花传粉之后在这些植物上形成种子。可替代地,可以提取出双单倍体小植株从而立即形成纯合植物,例如如由 Coventry 等人(1988, Manual for Microspore Culture Technique for Brassica napus. Dep. Crop Sci. Techn. Bull. OAC Publication 0489. Univ. of Guelph,

Guelph, Ontario, Canada) 所述。可以收获由于在现在世代或一个随后的世代中这种自花传粉而形成的另外的种子并且进行筛选检测突变体 IND 等位基因的存在。用于筛选特定的突变体等位基因的一些技术是已知的,例如 Deleteagene™(缺失一个基因;Li et al., 2001, Plant J 27 :235-242) 使用聚合酶链式反应 (PCR) 测定来筛选由快速中子诱变生成的缺失突变体, TILLING(基因组中靶向的诱导的局部损伤;McCallum et al., 2000, Nat Biotechnol 18 :455-457) 鉴别了 EMS 诱导的点突变、等。用于筛选特定的突变体 IND 等位基因的存在另外的技术描述于以下实例中。

[0052] 如在此使用的,术语“非自然发生的”或“培养的”当用于提及一株植物时是指具有已经由人类修饰的一个基因组的一株植物。例如一个转基因植物是含有一个外源核酸分子的一个非自然发生的植物,该外源核酸分子例如包括一个转录区的一个嵌合基因,该转录区当转录时产生了能够降低一个内源基因的表达的一个生物学活性 RNA 分子,如一个 IND 基因,并且因此已经由人类进行了遗传上的修饰。此外,由于暴露于一种诱变剂而含有在一个内源基因中的一个突变例如在一个内源 IND 基因中的一个突变(例如在一个调节元件中或在编码序列中)的一株植物也被认为是一种非天然植物,由于它已经由人类进行了遗传上的修饰。此外,含有在一个内源基因中例如在一个内源 IND 基因中的一个突变的一个特定属种的一种植物如欧洲油菜(该突变在该特定植物属种中在自然状态下不发生,由于例如与该植物相同或另一个属种的一种植物如芥菜或芜菁进行定向培育过程如标记协助的培育和选择或基因渗入)同样被认为是一种非天然发生的植物。相比之下,仅含有自发的或天然发生的突变的一株植物(即没有由人类进行遗传上的修饰的一株植物)不是一个如在此所定义的“非天然发生的植物”,并且因此没有包括在本发明之内。本领域的普通技术人员应理解的是虽然一个非天然发生的植物典型地具有一个与一个天然发生的植物相比改变的核酸序列,一个非天然发生的植物也可以是在没有改变其核酸序列下由人类进行了遗传上的修饰,例如通过改变其甲基化形式。

[0053] 术语一个基因或蛋白的“直向同源物”在此是指在另一个属种中发现的同源基因或蛋白,它与该基因或蛋白的功能相同,但是(通常)从当包含这些基因的这些种属偏离时的时间点开始在序列上不同(即这些基因从一个共同的祖先通过物种形成而进化)。因此欧洲油菜 IND 基因的直向同源物可以在其他植物种属(例如芥菜、等)中基于两个序列比较(例如基于对整个序列或对于特定结构域的百分比序列一致性)和/或功能分析进行鉴定。

[0054] 在此使用的一个“品种”与 UPOV 惯例一致并且是指最低已知等级的一个单个的植物学类名之内的一株植物分组,该分组可以通过由一个给定的基因型或基因型的组合造成的特征的表达来定义,可以通过至少一个所述特征的表达而从其他植物分组区分开并且被认为是关于其适合被无变化地(稳定)繁殖的一个单元。

[0055] 术语“包括”应被解释为指明了所陈述的部分、步骤或组分的存在,但不排除一种或多种另外的部分、步骤或组分的存在。因此包括某一性状的一种植物可以包括另外的性状。

[0056] 应当理解的是当以单数形式提及一个单词(例如植物或根)时,在此也包括复数形式(例如多个植物、多个根)。因此,通过不定冠词“一个”或“一种”提及一个元素时,不排除多于一种元素存在的可能性,除非上下文清楚地要求了存在一种并且仅有一种该元

素。因此,不定冠词“一个”或“一种”通常是指“至少一种”。

[0057] 出于本发明的目的,两个相关的核苷酸或氨基酸序列的“序列一致性”(表示为一个百分数)是指在这两个最佳比对序列中的具有相同残基的位置的数目(x100)除以所比较的位置的数目。一个缺口(即一个比对中的一个位置,其中一个残基在一个序列中存在但是在另一个序列中不存在)被视为具有不相同残基的一个位置。根据 Needleman 和 Wunsch 总体比对运算法则(Needleman and Wunsch, 1970, *J Mol Biol* 48(3):443-53)在欧洲分子生物学开放软件包(EMBOSS, Rice et al., 2000, *Trends in Genetics* 16(6):276-277; 参见例如 <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>)中使用缺省设置(缺口开放罚分=10(对于核苷酸)/10(对于蛋白)和缺口延长罚分=0.5(对于核苷酸)/0.5(对于蛋白))通过将两个序列对整个长度进行比对发现了两个序列的“最佳的比对”。对于核苷酸所使用的缺省记分矩阵是 EDNAFULL, 并且对于蛋白该缺省记分矩阵是 EBLOSUM62。

[0058] 如在此使用的“基本上一致”或“基本上相似”是指序列,当如以上定义进行最佳的比对时,该序列共享至少某一最小百分比的序列一致性(如以下进一步定义)。

[0059] 可以使用“严格的杂交条件”来鉴别核苷酸序列,这些核苷酸序列与一个给定的核苷酸序列是基本上一致的。严格的条件是序列依赖的并且在不同情况下将是不同的。总体上,选择严格条件为在一种限定的离子强度和 pH 下比该特异性序列的热解链温度( $T_m$ )低大约 5°C。 $T_m$  是 50%的目标序列杂交到一种完全匹配的探针上所处的温度(在限定离子强度及 pH 下)。典型地,将选择严格的条件,其中盐浓度是 pH 7 下大约 0.02 摩尔并且温度是至少 60°C。降低盐浓度和/或增加温度增加了严格性。对于 RNA-DNA 杂交(使用例如 100nt 的一个探针的 RNA 印迹法)的严格条件是例如包括在 63°C 下在 0.2X SSC 中至少一次洗涤持续 20 分钟的那些,或等效条件。

[0060] 可以例如通过在 65°C 下在一种含有 6x SSC(20x SSC 含有 3.0M NaCl、0.3M 柠檬酸钠、pH 7.0)、5x Denhardt's(100X Denhardt's 含有 2% Ficoll、2% 聚乙烯吡咯烷酮、2% 牛血清白蛋白)、0.5% 十二烷基硫酸钠(SDS)、以及 20 μg/ml 变性的载体 DNA(单链鱼精液 DNA,具有 120-3000 个核苷酸的平均长度)(作为非特异性竞争试剂)的水溶液中杂交而提供“高度严格条件”。杂交后,高度严格性洗涤可以是以若干步骤完成,其中在 0.2-0.1×SSC, 0.1% SDS 中在杂交温度下进行最终洗涤(大约 30 分钟)。

[0061] “中等程度严格条件”是指与在上述溶液中杂交等效的条件但是在大约 60°C -62°C 下。中等程度严格性洗涤可以在 1x SSC, 0.1% SDS 中在杂交温度下完成。

[0062] “低严格性”是指与在上述溶液中在大约 50°C -52°C 下杂交等效的条件。低严格性洗涤可以在 2x SSC, 0.1% SDS 中在杂交温度下完成。还参见 Sambrook et al. (1989) and Sambrook and Russell (2001)。

[0063] “增加的收获产量”或“增加的种子或谷物产量”是指根据本发明当与从一个相似数目的不含突变体 IND 等位基因的同基因植物收获的种子或谷物的量相比时,从各自包括突变体 IND 等位基因的多个植物收获的更大量的种子或谷物。产量典型地是以每表面单位所收获的种子或谷物的体积单位来表示的,如蒲式尔/英亩或 kg/ha。产量增加典型地是以百分比来表示的,由此参照或对照植物的产量被指定为 100%并且根据本发明的植物的产量表示为相对于该对照植物的产量的%。在根据本发明芸薹属植物中所观察到的产量增加范围是从至少 101%到至少 124%并且可预期的是更高的产量增加是可能的。产量增加还可以是

范围从 104% 到 108% 或 105% 到 110%。

[0064] 详细说明

[0065] 如 W009/068313 (要求欧洲专利申请 EP 07023052 的优先权) 中所述, 以前发现欧洲油菜植物 (它们在其两个 IND 基因 (即 IND-A1 或 IND-C1) 中仅有一个中对于一个完全敲除的 ind 等位基因是纯合的) 与不包括突变体 IND 等位基因的欧洲油菜植物相比没有显示出在荚果抗落粒性上的显著增加, 而在欧洲油菜植物中 (在两个 IND 基因中对于一个完全敲除的 ind 等位基因都是纯合的) 荚果抗落粒性是显著增加的, 但是荚果抗落粒性的水平是过高的从而不能维持一种农艺学相关的脱粒能力。通过对比, 在包括两个欧洲油菜 IND 基因的三个完全敲除的 ind 等位基因的欧洲油菜植物中, 荚果抗落粒性显著增加到一个水平的, 从而这些植物维持了一个农艺学相关的荚果脱粒能力。

[0066] 本发明的诸位发明人出人意料地发现具有类似于 W009/068313 (要求欧洲专利申请 EP 07023052 的优先权) 中描述的芸薹属植物的一种荚果落粒表型的欧洲油菜植物 (即该植物将增加的荚果抗落粒性与荚果的一种农艺学相关的脱粒能力进行结合) 还可以通过将两个部分敲除的突变体 IND 等位基因与两个完全敲除的突变体 IND 等位基因进行结合而不是将三个完全敲除的突变体 IND 等位基因进行结合而得到。进一步发现的是与 IND-A1 基因中的突变相比, IND-C1 基因中的突变导致了更强的荚果抗落粒性上的增加。例如与当这两个完全敲除的突变体 IND 等位基因是来自 IND-A1 基因并且这两个部分敲除的突变体 IND 等位基因是来自 IND-C1 基因时相比, 当这两个完全敲除的突变体 IND 等位基因是来自 IND-C1 基因的完全敲除的突变体 IND 等位基因并且这两个部分敲除的突变体 IND 等位基因是来自 IND-A1 基因的部分敲除的突变体 IND 等位基因时, 观察到在欧洲油菜植物中荚果抗落粒性上更强的增加。出人意料地, 将一个增加的荚果抗落粒性与一个农艺学相关的荚果脱粒能力进行结合的欧洲油菜植物还可以通过引入两个部分敲除的突变体 IND 等位基因、具体是单独的该 IND-C1 基因来得到。

[0067] 因此在本发明的一个实施方案中, 在此提供了包括至少两个 IND 基因的一个芸薹属植物、具体是包括一个 IND-A1 和一个 IND-C1 基因的一个欧洲油菜植物, 其特征在于它在其基因组中包括两个部分敲除的突变体 IND 等位基因、具体是一个 IND-A1 和 / 或一个 IND-C1 基因、优选地一个 IND-C1 基因, 由此这些 ind 等位基因导致了一个显著减少量的由这些突变体等位基因的野生型等效物编码的这种类型的功能性 IND 蛋白, 并且因此在这些植物细胞中、确切地在体内在发育的种子荚果中生成了一个总体上显著减少量的功能性 IND 蛋白。

[0068] 在另一个实施方案中, 该芸薹属植物在其基因组中进一步包括两个完全敲除的突变体 IND 等位基因、具体地对应地一个 IND-C1 和 / 或一个 IND-A1 基因、优选地一个 IND-C1 基因, 如 W009/068313 (要求欧洲专利申请 EP 07023052 的优先权) 中所述的那些, 例如 ind-a1-ems01、ind-a1-ems05、ind-c1-ems01、或 ind-c1-ems03、等。

[0069] 据认为通过将特定的部分敲除的突变体 IND 等位基因的足够的拷贝与特定的完全敲除的突变体和 / 或野生型 IND 等位基因的足够的拷贝在一株植物、具体是一个芸薹属植物中进行结合, 有可能很好地调节所制造的功能性 IND 蛋白的量和 / 或类型, 这反过来影响了该植物的果实开裂特性。因此可以以这样一种方式调节这些 IND 蛋白的绝对和相对量从而提供了植物, 这些植物产生足够的一种或多种 IND 蛋白, 从而能够具有一个农艺学相

关的种子荚果脱粒能力,同时在收获之前或收获过程中降低了种子落粒。

[0070] 因此,在本发明的另一个实施方案中,提供了一株植物、具体是一个芸薹属植物,该植物包括至少一个部分敲除的突变体 IND 等位基因,该基因编码了一个部分功能性 IND 蛋白,如以下所述的那些,例如 ind-a1-ems06、ind-a1-ems09、ind-a1-ems13、ind-c1-ems04、ind-c1-ems08、或 ind-c1-ems09、等,而剩下的等位基因可以是部分敲除的、完全敲除的和 / 或野生型 IND 等位基因。

[0071] 在本发明的一个方面,提供了包括至少两个 IND 基因的一个芸薹属植物、具体是包括该芸薹属植物、具体是欧洲油菜植物中的两个 IND 基因 (IND-A1 和 / 或 IND-C1 基因,优选 IND-C1 基因) 的两个部分敲除的 ind 等位基因和 n- 元组完全敲除的 ind 等位基因的一个欧洲油菜植物,由此  $n \leq 2$  (例如  $n = 0, 1, \text{或 } 2$ ),从而至少一个等位基因生成了至少部分功能性 IND 蛋白。

[0072] 在本发明的另一个方面,提供了包括至少两个 IND 基因的一个芸薹属种 (具体是欧洲油菜) 的一个纯合的 IND 单一突变体植物 ( $n = 2$ ,即对于一个 IND 基因的一个部分敲除的突变体等位基因是纯合的)、和 / 或一个纯合的 IND 双突变体植物 ( $n = 4$ ,即对于两个 IND 基因的一个完全敲除的突变体等位基因和 / 或一个部分敲除的突变体等位基因是纯合的),由此这些突变体等位基因是该芸薹属植物中的两个 IND 基因、具体是 IND-A1 和 / 或 IND-C1 基因的突变体等位基因。根据本发明此类突变体植物可以用于培育的目的。

[0073] 因此在本发明的一个实施方案中,在此提供了一个纯合的 IND 单个部分敲除的突变体欧洲油菜植物,其中该植物的基因型可以描述为 ind-a1<sup>P</sup>/ind-a1<sup>P</sup>、IND-C1/IND-C1、或 IND-A1/IND-A1、ind-c1<sup>P</sup>/ind-c1<sup>P</sup>。在本发明的另一个实施方案中,在此提供了一个纯合的 IND 双部分突变体欧洲油菜植物,其中该植物的基因型可以描述为 ind-a1<sup>P</sup>/ind-a1<sup>P</sup>、ind-c1<sup>P</sup>/ind-c1<sup>P</sup>。在本发明的又另一个实施方案中,在此提供了一个纯合的 IND 双部分突变体欧洲油菜植物和完全突变体欧洲油菜植物,其中该植物的基因型可以描述为或者 ind-a1<sup>F</sup>/ind-a1<sup>F</sup>、ind-c1<sup>P</sup>/ind-c1<sup>P</sup> 或者 ind-a1<sup>P</sup>/ind-a1<sup>P</sup>、ind-c1<sup>F</sup>/ind-c1<sup>F</sup>。

[0074] 在此进一步提供了来自芸薹属种的部分敲除的突变体 IND 基因 / 等位基因的新的核酸序列、以及部分敲除突变体 IND 蛋白。还提供了在芸薹属植物以及在其基因组中包括完全敲除的突变体 IND 等位基因和部分敲除的突变体 IND 等位基因的特定组合的芸薹属植物或植物部分中生成并且结合部分敲除的突变体 IND 等位基因的方法,由此在这些植物中种子落粒被减少了。用于将部分敲除的突变体 IND 等位基因转移到其他植物中的这些植物的用途也是本发明的一个实施方案,同样的是任何所述植物的植物的产品。此外,提供了用于结合或检测 IND 基因和 / 或等位基因的标记辅助选择 (MAS) 的试剂盒以及方法。在此以下详细描述了本发明的各实施方案。

[0075] 在此描述的展示出减少的或延迟的种子落粒的芸薹属植物具有所收获的种子产量上的增加。然而,观察到的是当与不包括这些突变体 IND 等位基因的同基因的芸薹属植物相比时,不仅来自仅包括处于纯合状态的 ind-c1-09 等位基因的芸薹属植物 (它显示出一个可观察的减少的或延迟的种子落粒表型) 的所收获的种子产量、而且来自仅包括处于纯化状态的两个突变体 IND 等位基因的其他芸薹属植物 (即其中该植物的基因型可以描述为 ind-a1<sup>P</sup>/ind-a1<sup>P</sup>、IND-C1/IND-C1、或 IND-A1/IND-A1、ind-c1<sup>P</sup>/ind-c1<sup>P</sup>) 的所收获的种子产量也显著地增加了,尽管在包括这些突变体 IND 等位基因的芸薹属植物中不存在一个可

观察到的减少的或延迟的种子落粒表型。因此,本发明还提供了包括至少两个 IND 基因的芸薹属植物,其中至少两个等位基因产生了一个功能性 IND 蛋白,该植物具有更高的种子产量。应当清楚的是处于 IND-A 基因座或处于 IND-C 基因座处的这两个突变体等位基因可以是相同的突变体等位基因或不同的突变体等位基因。

**[0076] 根据本发明的核酸序列**

**[0077]** 提供了来自十字花科、具体来自芸薹属种、尤其来自欧洲油菜、但是还来自其他芸薹属作物属种的 IND 基因的编码部分功能性 IND 蛋白(即具有显著减小的生物学活性的 IND 蛋白)的部分敲除的突变体 ind 核酸序列,(即包括一个或多个突变的 IND 核酸序列,这一个或多个突变导致了所编码的 IND 蛋白的显著减小的生物活性)。例如,根据本发明包括一个 A 和 / 或一个 C 基因组的芸薹属种可以包括 IND-A1 或 IND-C1 基因的等位基因,它们与本发明的部分敲除的突变体 IND 等位基因是基本上类似的并且它们可以在一个单个植物中被鉴定并且结合。此外,可以使用诱变方法以便在野生型 IND 等位基因中生成突变,由此生成了基本上与本发明的部分敲除的突变体 IND 等位基因类似的突变体 ind 等位基因以根据本发明使用。由于特定的 IND 等位基因可能通过杂交和选择被结合入一株植物中,在一个实施方案中将 ind 核酸序列提供于一株植物中(即内源地),例如一个芸薹属植物、优选地可以与欧洲油菜杂交的或可以用于制造一个“合成的”欧洲油菜植物的一个芸薹属植物。不同芸薹属种之间的杂交描述于本领域中,例如在 Snowdon (2007, Chromosome research 15 :85-95) 中所提及的。例如可以使用种间杂交将来自例如欧洲油菜中 C 基因组 (AACC) 的基因转移到埃塞俄比亚芥中 C 基因组 (BBCC) 中、或甚至从例如欧洲油菜中 C 基因组 (AACC) 到芥菜中 B 基因组 (AABB) 中(通过它们的 C 与 B 基因组之间的异常重组的偶尔发生的事件)。“再合成的”或“合成的”欧洲油菜品系可以通过将最初的祖先甘蓝 (CC) 与芜菁 (AA) 进行杂交来产生。例如通过胚挽救技术或原生质体融合(参见例如以上的 Snowdon) 可以在芸薹属作物属种和它们的相关物之间的杂交中成功地克服种间的以及还有属间的不相容性障碍。

**[0078]** 然而,在此还提供了分离的 ind 核酸序列(例如通过克隆从植物中分离的或通过 DNA 合成而合成地制造的)、及其变异体和这些的任何一项的片段,与可以用于确定哪个序列内源地存在于一株植物或植物部分中、该序列是否编码一个功能性的、一个部分功能性的、一个非功能性的蛋白或不编码蛋白(例如通过如以下所述在一个重组宿主细胞中进行表达)以及用于选择并将特定的等位基因从一株植物转移入另一株植物中的那些一样,用于生成具有所希望的部分敲除的突变体 IND 等位基因和 / 或完全敲除的突变体 IND 等位基因的组合的一株植物。

**[0079]** 已经从欧洲油菜中分离出野生型 IND-A1 和 IND-C1 的新的部分敲除的突变体 IND 核酸序列。如 W009/068313(要求欧洲专利申请 EP 07023052 的优先权)中所述的野生型 IND 序列描述于序列表的 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :5 和 SEQ ID NO :7 中,而这些序列以及基本上类似于这些的序列的新的部分敲除的突变体 ind 序列参照野生型 IND 序列描述于以下以及实例中。来自欧洲油菜的基因组的编码 IND 蛋白的 DNA 不包括任何内含子。

**[0080]** 根据本发明“IND-A1 核酸序列”或“IND-A1 变异体核酸序列”是编码一个氨基酸序列的核酸序列,该氨基酸序列具有与 SEQ ID NO :2 至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、98%、99% 或 100% 序列一致性、或具有与 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :5 至少

80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列一致性的核酸序列。这些核酸序列还可以称为是与序列表中所提供的 IND 序列“基本上类似的”或“基本上一致的”。

[0081] 根据本发明“IND-C1 核酸序列”或“IND-C1 变异体核酸序列”是编码一个氨基酸序列的核酸序列,该氨基酸序列具有与 SEQ ID NO :4(IND-C1-长)或与 SEQ ID NO :4 从位置 16 处的氨基酸到位置 210 处的氨基酸(IND-C1-短)至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、98%、99% 或 100% 序列一致性、或具有与 SEQ ID NO :3(IND-C1-长)或与 SEQ ID NO :3 从位置 46 处的核苷酸到位置 633 处的核苷酸(IND-C1-短)或与 SEQ ID NO :7 至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列一致性的核酸序列。这些核酸序列还可以被称为是与序列表中所提供的 IND 序列“基本上类似的”或“基本上一致的”。

[0082] 因此本发明提供了编码野生型、功能性 IND-A1 和 IND-C1 蛋白的核酸序列的新的部分敲除的突变体核酸序列,包括其变异体和片段(如以下进一步定义),由此与该野生型 IND 蛋白相比,在核酸序列中的突变优选地导致了一个或多个氨基酸被插入、缺失或取代,特别是一个或多个氨基酸被取代,并且由此该 IND 蛋白的生物学活性显著地降低了。IND 蛋白的生物学活性上的显著减少在此是指该 IND 蛋白的 DNA 结合活性、二聚作用能力和/或转录调节活性上的减少,从而与一个表达相应的野生型 IND 蛋白的植物相比,一个表达该突变体 IND 蛋白的植物的荚果抗落粒性是增加的。

[0083] 为了确定在植物、具体地在芸薹属植物中一个特定的 IND 等位基因/蛋白的功能性,这些植物中对荚果落粒的耐受性的水平可以通过在包括该特定的 IND 等位基因/蛋白的植物和相应的野生型植物的果实和花上进行宏观的、微观的和组织学的测定来确定,类似于如由 Liljegren 等人(2004, 上述)所述的或在以下实例中所述的在拟南芥属果实和花中进行的测定。简言之,荚果抗落粒性上的改变可以例如通过宏观测试来评价和/或测量,如用肉眼检查种子荚果来评价,例如存在或不存在瓣边缘、荚果的喙的长度、等;当轻轻地扭曲荚果时通过评价荚果打开的容易程度用来比较不同突变体 IND 品系与相应的野生型品系之间的荚果抗落粒性的水平的一个手动冲击试验(MIT);通过测量这些品系的荚果样品的半衰期用来比较对应地来自不同突变体 IND 品系与相应的野生型品系的来自植物的种子荚果的脱粒能力的一个随机冲击试验(RIT);和/或通过显微测试以检查例如瓣边缘处和种子荚果的开裂区处的细胞是否和如何被 IND 中的突变所影响。一旦鉴定并且表征了该 IND 蛋白(例如在这种情况下该 IND 蛋白本身其功能取决于一种同源二聚体的形成,或在这种情况下另一种蛋白其功能取决于一种异源二聚体的形成)的二聚作用配偶体和/或一个或多个基因(该一个或多个基因的转录被该 IND 蛋白所调节),一个特定的 IND 等位基因/蛋白的功能性可以可替代地通过本领域中已知的重组 DNA 技术来评价,例如通过在一个宿主细胞(例如一个细菌,如大肠杆菌)中共表达该二聚体的两个配偶体并且评价是否二聚体仍然可以形成、是否这些二聚体仍然可以结合到这一个或多个调节的基因的 bHLH 结合位点上、和/或是否这一个或多个基因的转录仍然由这种结合所调节。

[0084] 在此提供了内源的和分离的核酸序列两者。根据本发明的另一个方面,还提供了以上定义的这些突变体 IND 序列和突变体 IND 变异体核酸序列的片段,用作引物或探针以及用作试剂盒的组分(进一步参见以下)。一个 ind 核酸序列或其变异体(如所定义的)

的一个“片段”可以具有不同的长度,如至少 10、12、15、18、20、50、100、200、500、600 个相邻的核苷酸的 IND 或 ind 序列(或该变异体序列)。

[0085] 编码功能性 IND 蛋白的核酸序列

[0086] 在序列表中描述的核酸序列编码来自欧洲油菜的野生型、功能性 IND 蛋白。因此,这些序列对于欧洲油菜植物(这些序列是从这些植物中分离出的)是内源的。可以筛选其他芸薹属作物属种、品种、培育品系或野生登记物检测编码相同的 IND 蛋白或其变异体的其他 IND 等位基因。例如,可以使用核酸杂交技术(例如 DNA 印迹分析,使用例如严格杂交条件)或基于 PCR 的技术来鉴定与其他芸薹属植物、例如不同的欧洲油菜品种、品系或登记物内源的 IND 等位基因,并且还可以筛选芥菜(尤其是 A- 基因组上的 IND 等位基因)、埃塞俄比亚芥(尤其是 C- 基因组上的 IND 等位基因)以及芜菁(A- 基因组)和甘蓝(C- 基因组)植物、器官和组织检测其他的野生型 IND 等位基因。为了筛选这类植物、植物器官或组织检测 IND 等位基因的存在,可以使用序列表中提供的 IND 核酸序列、或变异体或这些任何一种的片段。例如,可以使用全部序列或片段作为探针或引物。例如,可以使用特异的或简并的引物来扩增来自该植物、植物器官或组织的基因组 DNA 的编码 IND 蛋白的核酸序列。可以使用标准的分子生物学技术来分离和测序这些 IND 核酸序列。然后可以使用生物信息学分析来表征这一个或多个等位基因,例如为了确定该序列对应于哪个 IND 等位基因以及哪个 IND 蛋白或蛋白变异体被该序列编码。

[0087] 不论一个核酸序列是否编码一个功能性 IND 蛋白,可以通过本领域中已知的重组 DNA 技术进行分析,例如通过一个遗传互补测试,使用例如一个拟南芥属植物,分析 IND-A1 和 IND-C1 基因两者哪个对于一个完全敲除的 ind 突变体等位基因是纯合的,或使用一个欧洲油菜植物,分析 IND-A1 和 IND-C1 基因两者哪个对于一个完全敲除的 ind 突变体等位基因是纯合的。。

[0088] 此外,应当理解的是这些 IND 核酸序列及其变异体(或这些中任何一项的片段)可以在基于硅的计算机中通过筛选核酸数据库检测基本上类似的序列而进行鉴定。同样,可以用化学方法合成一个核酸序列。根据本发明还提供了核酸分子的片段,这些片段在以下被进一步描述。片段包括仅编码该 bHLH 结构域的核酸序列、或包括部分该 bHLH 结构域(如碱性结构域或该 HLH 结构域、等)的较小的片段。

[0089] 编码突变体 IND 蛋白的核酸序列

[0090] 本发明提供了相对于描述于序列表的 SEQ ID NO :1、3、5 和 7 中的野生型 IND 核酸序列包括一个或多个核苷酸缺失、插入或取代的核酸序列,其中核酸序列中的一个或多个突变导致了所编码的 IND 蛋白相对于野生型 IND 蛋白的显著减小的生物活性,即一种部分敲除的生物活性,连同此类突变体核酸分子的片段。此类突变体核酸序列(称为 ind<sup>p</sup> 序列)可以如以下进一步描述使用不同的已知方法来生成和 / 或鉴定。此外,此类核酸分子以内源形式以及以分离的形式两者进行提供。

[0091] 基本上,在野生型 IND 核酸序列中的任何突变(该突变导致包括相对于野生型 IND 蛋白至少一个氨基酸插入、缺失和 / 或取代的一种 IND 蛋白)可以导致显著减小的生物活性或无生物活性。然而,应当理解的是 IND 蛋白中的某些突变更有可能导致该 IND 蛋白的生物学活性的完全消除,如由此这些功能域的重要部分如 DNA 结合域(‘b’)、二聚化功能域(‘HLH’)和 / 或转录调节域缺失的突变,或由此这些结构域之内的某些关键的氨基酸

残基如由 Heim 等人 (2003, Mol Biol Evol 20, 735-747 ; 分别对应于 SEQ IDNO :10 中位置 123、127 和 131、以及 128 和 130, 参见表 1) 定义的共有区 bHLH 结构域序列的位置 5、9、和 13 处的 Gln(Q)、Ala(A) 以及 Arg(R) 氨基酸或位置 10 和 12 处的碱性氨基酸残基 (特别是 Arg(R) 残基) 缺失或被取代, 优选地被不相似的或非保守的氨基酸取代, 而 IND 蛋白中其他突变更有可能导致该 IND 蛋白的生物学活性的显著减小, 如导致特定的氨基酸 (例如表 1 中所指示的保守的氨基酸) 被取代的突变, 导致更小地有效 DNA 结合、一个更小地有效的二聚作用、和 / 或一个更小的有效地调节转录, 而没有完全消除所编码的 IND 蛋白的生物学活性。W009/068313 (要求欧洲专利申请 EP 07023052 的优先权) 描述了例如完全敲除的突变体 IND 等位基因, 具体是 ind-a1-ems01、ind-c1-ems01 和 ind-c1-ems03, 它们包括一种无义突变, 该无义突变导致了生成缺少 bHLH 结构域的截短的 IND 蛋白, 以及完全敲除的突变体 IND 等位基因, 具体是 ind-a1-ems05, 它编码了一个突变体 IND 蛋白, 其中共有区 bHLH 结构域的位置 10 处的保守的 Arg 被取代为一个芳香族的 His, 同时本发明描述了部分敲除的突变体 IND 等位基因, 具体是例如 ind-c1-ems09, 它编码了一个突变体 IND 蛋白, 其中共有区 bHLH 结构域的位置 9 处的保守的 Ala 被取代为一个 Thr, 以及 ind-c1-ems04, 它编码了一个突变体 IND 蛋白, 其中共有区 bHLH 结构域的位置 12 处的保守的 Arg 被取代为一个 Cys。

[0092] 这些核酸分子可以包括一个或多个突变, 如 :

[0093] - 一个“错义突变”, 它是核酸序列上的一个改变, 该改变导致了一个氨基酸被取代为另一个氨基酸 ;

[0094] - 一个“无义突变”或“STOP 密码子突变”, 它是核酸序列上的一个改变, 该改变导致将一个过早的 STOP 密码子引入并且因此终止了翻译 (导致了一个截短的蛋白); 植物基因含有这些翻译终止密码子“TGA” (在 RNA 中是 UGA)、“TAA” (在 RNA 中是 UAA) 以及“TAG” (在 RNA 中是 UAG); 因此导致这些密码子之一出现在正在翻译的成熟的 mRNA (在阅读框中) 中的任何核苷酸取代、插入或缺失将终止翻译 ;

[0095] - 一个或多个氨基酸的一个“插入突变”, 由于一个或多个密码子已被加入到该核酸的编码序列中 ;

[0096] - 一个或多个氨基酸的一个“缺失突变”, 由于一个或多个密码子已在该核酸的编码序列中被缺失 ;

[0097] - 一个“移码突变”, 导致了将该核酸序列被翻译在该突变下游一个不同的框内。一个移码突变可能具有不同的原因, 如一个或多个核苷酸的插入、缺失或复制。

[0098] 表 1 对应地指出了 SEQ ID NO :10 中的拟南芥属 IND 蛋白、SEQ IDNO :9 中的 DNA 编码的拟南芥属 IND、以及 SEQ ID NO :2 和 6 以及 SEQ ID NO :4 和 8 中欧洲油菜 IND-A1 和 IND-C1 蛋白的长度 ; 该 bHLH 结构域在欧洲油菜 IND-A1 和 IND-C1 蛋白中的位置 (基于根据拟南芥属信息资源 (TAIR) 数据库 (<http://www.arabidopsis.org/> ; 基因座 At4g00120. 1, 通过引用结合在此 ; SEQ ID NO :10) 拟南芥属 IND 蛋白的所指出的 pfam 结构域 PF00010、smart 结构域 SM00353、prosite 结构域 PS50888 以及 superfam 结构域 G3D. 4. 10. 280. 10 或 SSF47459 的位置) ; bHLH 结构域和保守的氨基酸在欧洲油菜 IND-A1 和 IND-C1 蛋白中的位置 (基于根据 Heim 等人 (2003, Mol Biol Evol 20, 735-747)、根据 Toledo-Ortiz 等人 (2003, Plant Cell 15 :1749-1770)、以及根据 Liljegren 等人 (2004, Cell, 116, 843-853), 通过引用结合

在此)所指出的 bHLH 结构域和保守的氨基酸在拟南芥属 IND 蛋白中的位置);如进一步在 W009/068313(要求欧洲专利申请 EP 07023052 的优先权)中所描述,将其通过引用结合在此。

[0099] 表 1IND 蛋白 - 氨基酸 (AA) 区和位置

[0100]

		AtIND1 (SEQ ID NO: 10)	AtIND1 (SEQ ID NO: 9)	BnIND-A1 (SEQ ID NO: 2/6)	BnIND-C1a/b (SEQ ID 4/8 来自 16-210 / SEQ ID 4/8)
<u>编码区</u>	<u>TAIR:</u>  PF00010 SM00353 PS50888 G3D.4.10.280.10 SSF47459 <u>Liljegren 等人</u>	1-198 (198 AA) 121-168 124-173 112-168 114-196 114-198 30-198 (169 AA)	1-594  361-504 370-519 334-504 340-588 340-594 88-594	1-185 (185 AA) 120-167 123-172 111-167 - -	16-210 / 1-210 (195 / 210 AA) 133-180 136-185 124-180 127-208 127-210
<u>bHLH:</u>	<u>Heim 等人</u> <u>Toledo-Ortiz 等人</u> <u>Liljegren 等人</u>	119-174 115-167 119-167	355-523 343-501 355-501	118-173 114-166 118-166	131-186 127-179 131-179
<b>b</b>	<u>Heim 等人</u> <u>Toledo-Ortiz 等人</u> <u>Liljegren 等人</u>	119-131 115-131 119-131	355-393 343-393 355-393	118-132 114-132 118-132	131-145 127-145 131-145
<b>H1</b>	<u>Heim 等人</u> <u>Toledo-Ortiz 等人</u> <u>Liljegren 等人</u>	132-146 132-146 132-145	394-438 394-438 394-435	133-145 133-145 133-144	146-158 146-158 146-157
<b>L</b>	<u>Heim 等人</u> <u>Toledo-Ortiz 等人</u> <u>Liljegren 等人</u>	147-152 147-152 146-152	439-456 439-456 436-456	146-151 146-151 145-151	159-164 159-164 158-164
<b>H2</b>	<u>Heim 等人</u> <u>Toledo-Ortiz 等 人</u> <u>Liljegren 等人</u>	153-174 153-167 153-167	457-523 457-501 457-501	152-173 152-166 152-166	165-186 165-179 165-179
<u>保守的 AA</u>	N (1 <sup>T</sup> ) V (2 <sup>T</sup> ) Q (5 <sup>H</sup> )	115 116 123	343-345 346-348 367-379	114 115 122	127 128 135

[0101]

	A (9 <sup>H</sup> - 13 <sup>T</sup> )	127	379-381	126	139
	R (10 <sup>H</sup> - 14 <sup>T</sup> )	128	382-384	127	140
	R (12 <sup>H</sup> - 16 <sup>T</sup> )	130	388-390	129	142
	R (13 <sup>H</sup> )	131	391-393	130	143
	I (16 <sup>H</sup> - 20 <sup>T</sup> )	134	400-403	133	146
	S (21 <sup>T</sup> )	135	404-406	134	147
	I (20 <sup>H</sup> - 24 <sup>T</sup> )	138	412-414	137	150
	L (23 <sup>H</sup> - 27 <sup>T</sup> )	141	421-423	140	153
	K (28 <sup>T</sup> )	142	424-426	141	154
	V (27 <sup>H</sup> )	145	433-435	144	157
	K (39 <sup>T</sup> )	150	448-450	149	162
	T (42 <sup>T</sup> )	153	460-463	152	165
	A (36 <sup>H</sup> )	154	460-462	153	166
	M (45 <sup>T</sup> )	156	466-468	155	168
	L (39 <sup>H</sup> -46 <sup>T</sup> )	157	469-471	156	169
	A (49 <sup>T</sup> )	160	478-480	159	172
	I (43 <sup>H</sup> - 50 <sup>T</sup> )	161	481-483	160	173
	Y (52 <sup>T</sup> )	163	487-489	162	175
	T (53 <sup>T</sup> )	164	490-492	163	176
	L (49 <sup>H</sup> -56 <sup>T</sup> )	167	499-501	166	179
	V (53 <sup>H</sup> )	171	511-513	170	183
	L (56 <sup>H</sup> )	174	580-582	173 (A)	186
<u>在 ind</u>	<i>ind-5</i>	42	124-126	25	41
	(W13>STOP) <sup>L</sup>				
	<i>ind-2</i> (A26>FS) <sup>L</sup>	55	163-165	-	-
	<i>ind-6</i> <sup>W</sup>	在 61 后插 入	在 185 后 插入	-	-
	<i>ind-4</i>	92	274-276	91	104
	(Q63>STOP) <sup>L</sup>				
	<i>ind-3</i> (R99>H) <sup>L</sup>	128	382-384	127	140
	<i>ind-1</i> (L112>F) <sup>L</sup>	141	421-423	140	153

[0102] Heim 等人,<sup>H</sup>:Heim et al., 2003, Mol Biol Evol 20, 735-747 ; Toledo-Ortiz 等人,<sup>T</sup>:Toledo-Ortiz et al., 2003, Plant Cell 15 :1749-1770 ; Liljegren 等人,<sup>L</sup>:Liljegren et al., 2004, Cell, 116, 843-853 ;<sup>W</sup>:Wu et al, 2006, Planta 224, 971-979.

[0103] 拟南芥属核酸 IND 核酸 (SEQ ID NO :9) 和具有 IND 核酸序列的氨基酸 (SEQ ID NO :

10) 序列、特别是芸薹属 IND 核酸 (SEQ ID NO :1 和 3) 和本发明的氨基酸 (SEQ ID NO :2 和 4) 序列的最佳比对允许确定这些芸薹属序列中相应的保守的结构域和氨基酸的位置 (对于 SEQ ID NO :1 至 4 的芸薹属 IND 序列参见表 1)。

[0104] 因此在一个实施方案中,提供了包括一个或多个上述类型的突变中任何一种的部分敲除的突变体 IND 核酸序列。在另一个实施方案中,提供了包括一个或多个终止密码子(无义)突变、一个或多个错义突变和/或一个或多个移码突变的部分敲除的 ind 序列。提供了以上突变体核酸序列中任何一项本身(处于分离的形式),同样提供了内源地包括此类序列的植物和植物部分。在此以下的表中,描述了最优的 ind 等位基因,并且如所指示将包括一个或多个 ind 等位基因的欧洲油菜种子的种子存储物进行存储。

[0105] 如在此使用的一个 IND 等位基因中的一个无义突变是在一个 IND 等位基因中的一个突变,由此将一个或多个翻译终止密码子引入到相应的野生型 IND 等位基因的编码 DNA 以及相应的 mRNA 序列中。翻译终止密码子是 TGA(在 mRNA 中是 UGA)、TAA(UAA) 以及 TAG(UAG)。因此,导致在编码序列中生成一个框内终止密码子的任何突变(缺失、插入或取代)将导致翻译的终止以及氨基酸链的平截。在一个实施方案中,提供了包括一个无义突变的一个部分敲除的突变体 IND 等位基因,其中将一个框内终止密码子通过一个单个的核苷酸取代(如 CAG 到 TAG、TGG 到 TAG、TGG 到 TGA、或 CAA 到 TAA 的突变)引入到该 IND 密码子序列中。在另一个实施方案中,提供了包括一个无义突变的一个部分敲除的突变体 IND 等位基因,其中将一个框内终止密码子通过双核苷酸取代(如 CAG 到 TAA、TGG 到 TAA、或 CGG 到 TAG 或 TGA 的突变)引入到该 IND 密码子序列中。在又一个实施方案中,提供了包括一个无义突变的一个部分敲除的突变体 IND 等位基因,其中将一个框内终止密码子通过三核苷酸取代(如 CGG 到 TAA 的突变)引入到该 IND 密码子序列中。该截短的蛋白缺少由该突变下游的编码 DNA 编码的氨基酸(即 IND 蛋白的 C 端部分)并且维持了由该突变上游的编码 DNA 编码的氨基酸(即该 IND 蛋白的 N 端部分)。在一个实施方案中,提供了包括一个无义突变的一个部分敲除的突变体 IND 等位基因,该无义突变存在于该 H2 结构域的保守的 Leu 残基之前的任何地方(如由 Heim et al., 2003 所述,处于共有区 bHLH 结构域序列的位置 56 处,参见表 1),从而至少该保守的 Leu 残基是缺失的。与该野生型 IND 蛋白相比该突变体 IND 蛋白愈是截短的,该平截可能愈是更多地导致该 IND 蛋白的显著减小的活性。据信为了使该突变体 IND 蛋白保留一些生物活性,应该至少包括 DNA 结合(b)域。因此在另一个实施方案中,提供了包括一个无义突变的一个部分敲除的突变体 IND 等位基因,该无义突变导致了一个截短的蛋白,该蛋白具有小于约 170 个氨基酸(缺少保守的 Leu)、小于约 150 个氨基酸(缺少 H2 结构域)、小于约 145 个氨基酸(缺少 L 和 H2 结构域)、或小于约 130 个氨基酸(缺少 HLH 结构域)(参见表 1)。

[0106] 在此以下的多个表格描述了在在此提供的欧洲油菜 IND 序列中的一系列可能的无义突变:

[0107] 表 2a 在 IND-A1 (SEQ ID NO :1) 中潜在的 STOP 密码子突变

氨基酸位置	核苷酸位置	野生型 → 突变体密码子	野生型 → 突变体氨基酸	
[0108]	25	74	tgg → tag	TRP → STOP
		75	tgg → tga	TRP → STOP
		74+75	tgg → taa	TRP → STOP
57	169	cag → tag	GLN → STOP	
	169+171	cag → taa	GLN → STOP	
91	271	caa → taa	GLN → STOP	
98	292	cag → tag	GLN → STOP	
	292+294	cag → taa	GLN → STOP	
122	364	cag → tag	GLN → STOP	
	364+366	cag → taa	GLN → STOP	
128	382+383	cgg → tag	ARG → STOP	
	382+384	cgg → tga	ARG → STOP	
	382+383+384	cgg → taa	ARG → STOP	
[0109]	138	412+413	cgg → tag	ARG → STOP
		412+414	cgg → tga	ARG → STOP
		412+413+414	cgg → taa	ARG → STOP
168	502+503	cgg → tag	ARG → STOP	
	502+504	cgg → tga	ARG → STOP	
	502+503+504	cgg → taa	ARG → STOP	
169	505	cag → tag	GLN → STOP	
	505+507	cag → taa	GLN → STOP	
181	542	tgg → tag	TRP → STOP	
	543	tgg → tga	TRP → STOP	
	542+543	tgg → taa	TRP → STOP	

[0110] 表 2b 在 IND-C1 (SEQ ID NO :3) 中潜在的 STOP 密码子突变

氨基酸位置	核苷酸位置	野生型→突变体密码子	野生型→突变体氨基酸
41	122	tgg → tag	TRP → STOP
	123	tgg → tga	TRP → STOP
	122+123	tgg → taa	TRP → STOP
50	148	caa → taa	GLN → STOP
[0111] 73	271	cag → tag	GLN → STOP
	271+272	cag → taa	GLN → STOP
	310	caa → taa	GLN → STOP
104	310	caa → taa	GLN → STOP
111	331	cag → tag	GLN → STOP
	331+333	cag → taa	GLN → STOP
	403	cag → tag	GLN → STOP
135	403	cag → tag	GLN → STOP
	403+405	cag → taa	GLN → STOP
141	421+422	cgg → tag	ARG → STOP
	421+423	cgg → tga	ARG → STOP
	421+422+423	cgg → taa	ARG → STOP
151	451+452	cgg → tag	ARG → STOP
	451+453	cgg → tga	ARG → STOP
	451+452+453	cgg → taa	ARG → STOP
[0112] 181	541+542	cgg → tag	ARG → STOP
	541+543	cgg → tga	ARG → STOP
	541+542+543	cgg → taa	ARG → STOP
182	544	cag → tag	GLN → STOP
	544+546	cag → taa	GLN → STOP
187	559	cag → tag	GLN → STOP
	559+561	cag → taa	GLN → STOP
191	571	cag → tag	GLN → STOP
	571+573	cag → taa	GLN → STOP

[0113] 显而易见地,突变不限于以上表中所示的这些,并且应当理解的是类似的 STOP 突变可以存在于除了序列中所描述的以及以上的表中所提及的那些等位基因的 ind 等位基因中。

[0114] 如在此使用的一个 IND 等位基因中的一个错义突变是在一个 IND 等位基因中的任何突变(缺失、插入或取代),由此一个或多个密码子被改变成相应的野生型 IND 等位基因的编码 DNA 和相应的 mRNA 序列,导致了野生型 IND 蛋白中的一个或多个氨基酸被取代为

突变体 IND 蛋白中的一个或多个其他氨基酸。在一个实施方案中,提供了包括一个错义突变的一个部分敲除的突变体 IND 等位基因,该错义突变导致了 SEQ ID NO :2、或基本上与其类似的一个序列中 IND 蛋白的位置 124 处的一个缬氨酸 (Val) 残基特别地被一个甲硫氨酸 (Met) 残基所取代,如 ind-a1-EMS06 等位基因 (表 3a)。在另一个实施方案中,提供了包括一个错义突变的一个部分敲除的突变体 IND 等位基因,该错义突变导致了 SEQ ID NO :2、或基本上与其类似的一个序列中的 IND 蛋白的位置 146 处的一个甘氨酸 (Gly) 残基特别地被一个丝氨酸 (Ser) 残基所取代,如 ind-a1-EMS09 等位基因 (表 3a)。在又一个实施方案中,提供了包括一个错义突变的一个部分敲除的突变体 IND 等位基因,该错义突变导致了 SEQ ID NO :2、或基本上与其类似的一个序列中的 IND 蛋白的位置 159 处的一个丙氨酸 (Ala) 残基特别地被一个缬氨酸 (Val) 残基所取代,如 ind-a1-EMS13 等位基因 (表 3a)。在又一个实施方案中,提供了包括一个错义突变的一个部分敲除的突变体 IND 等位基因,该错义突变导致了 SEQ ID NO :4、或基本上与其类似的一个序列中 IND 蛋白的位置 136 处的一个苏氨酸 (Thr) 残基特别地被一个甲硫氨酸 (Met) 残基所取代,如 ind-c1-EMS08 等位基因 (表 3b)。在一个进一步的实施方案中,提供了包括一个错义突变的一个部分敲除的突变体 IND 等位基因,该错义突变导致了 SEQ ID NO :4、或基本上与其类似的一个序列中 IND 蛋白的位置 139 处的一个丙氨酸 (Ala) 残基特别地被一个苏氨酸 (Thr) 残基所取代,如 ind-c1-EMS09 等位基因 (表 3b)。在又一个实施方案中,提供了包括一个错义突变的一个部分敲除的突变体 IND 等位基因,该错义突变导致了 SEQ ID NO :4、或基本上与其类似的一个序列中 IND 蛋白的位置 142 处的一个精氨酸 (Arg) 残基特别地被一个半胱氨酸 (Cys) 残基所取代,如 ind-c1-EMS04 等位基因 (表 3b)。包括处于纯合状态的 ind-a1-EMS06、ind-a1-EMS09、ind-a1-EMS13、ind-c1-EMS08、ind-c1-EMS09、以及 ind-c1-EMS04 等位基因的参照种子已对应地在登录号 NCIMB 41570、NCIMB 41571、NCIMB41572、NCIMB 41573、NCIMB 41574、以及 NCIMB 41575 下在 2008 年 7 月 7 日存放在 NCIMB Limited (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, Scotland, AB219YA, UK) 处。

[0115] 表 3a :IND-A1 中的错义突变

[0116]

氨基酸位置	核苷酸位置		野生型 → 突变体密 码子	野生型 → 突变 体氨基酸	等位基因名称	保存编号
	SEQ ID: 2/6	SEQ ID: 1   SEQ ID: 5				

[0117]

124	370	930	gtg → atg	VAL → MET	ind-a1-EMS06	NCIMB 41570
146	436	996	ggc → agc	GLY → SER	ind-a1-EMS09	NCIMB 41571
159*	476	1036	gcc → gtc	ALA → VAL	ind-a1-EMS13	NCIMB 41572

[0118] 表 3b :IND-C1 中的错义突变

[0119]

氨基酸位置	核苷酸位置		野生型 → 突变体密 码子	野生型 → 突 变体氨基酸	等位基因名称	保存编号
<i>SEQ ID: 4/8</i>	<i>SEQ ID: 3</i>	<i>SEQ ID: 7</i>				
136		903	acg → atg	THR → MET	<i>ind-c1-EMS08</i>	NCIMB 41573
	407					
139*		911	gct → act	ALA → THR	<i>ind-c1-EMS09</i>	NCIMB 41574
	415					
142*		920	cgt → tgt	ARG → CYS	<i>ind-c1-EMS04</i>	NCIMB 41575
	424					

[0120] 在另一个实施方案中,提供了包括一个错义突变的一个部分敲除的突变体 IND 等位基因,该突变体编码一个 IND 蛋白,其中在以上或表 1 中所指出的一个或多个保守的氨基酸被取代,如部分敲除的突变体 IND 等位基因 *ind-a1-EMS13*、*ind-c1-EMS04* 和 *ind-c1-EMS09*(在表 3 中用 \* 指出)。如在 Heim 等人 (2003, Mol Biol Evol 20, 735-747)、Toledo-Ortiz 等人 (2003, Plant Cell 15 :1749-1770)、Liljegren 等人 (2004, Cell, 116, 843-853)、以及 W009/068313(要求欧洲专利申请 EP 07023052 的优先权)中所述,一些保守的氨基酸比其他氨基酸对该 IND 蛋白的生物活性更加关键。因此,例如,导致了例如由 Heim 等人(上述)所定义的共有区 bHLH 结构域序列的位置 5、9(例如 *ind-c1-EMS09*)、和 13 处或位置 10(例如 *ind-a1-EMS05*)和 12(例如 *ind-c1-EMS04*)处的氨基酸的取代的错义突变更有可能导致显著减小的活性,这些由于该 IND 蛋白结合到目标 DNA 上的能力减小了。类似地,导致了例如由 Heim 等人(上述)所定义的共有区 bHLH 结构域序列的螺旋 1 中的位置 16、20、23、27 处、或螺旋 2 中的位置 36、39、43、49(例如 *ind-a1-EMS13*)、53 和 56 处的氨基酸的取代的错义突变更有可能导致显著减小的活性,由于该 IND 蛋白的二聚作用能力减小了。

[0121] 在又一个实施方案中,可以根据本发明使用的包括一个错义突变的一个部分敲除的突变体 IND 等位基因是包括一个错义突变(对应于拟南芥属部分敲除的 *ind-1*(Liljegren et al., 2004, 上述)等位基因(参见表 1)中的错义突变)的一个 IND 等位基因。

[0122] 如在此使用的一个 IND 等位基因中的一个移码突变是在一个 IND 等位基因中的一个突变(缺失、插入、复制、等),该突变导致了该核酸序列被翻译在该突变的下游一个不同的框内。

[0123] 根据本发明的氨基酸序列

[0124] 提供了来自十字花科、具体来自芸薹属种、尤其是来自欧洲油菜、但是也来自其他芸薹属作物属种的部分敲除的突变体 IND 氨基酸序列(即包括一个或多个突变的 IND 氨基酸序列,这一个或多个突变导致了该 IND 蛋白的显著减小的生物活性)。例如,包括一个 A 和 / 或一个 C 基因组的芸薹属种可以编码不同的 IND-A1 或 IND-C1 氨基酸,这些氨基酸与

本发明的新颖的部分敲除的突变体 IND 蛋白是基本上类似的。此外,可以使用诱变方法在野生型 IND 等位基因中产生突变,由此产生了可以编码另外的突变体 IND 蛋白的突变体等位基因,该突变体 IND 蛋白与本发明的部分敲除的突变体 IND 蛋白是基本上类似的。在一个实施方案中,在一个芸薹属植物中(即内源地)提供了该突变体 IND 氨基酸序列。然而,在此还提供了分离的 IND 氨基酸序列(例如从植物分离的或合成制备的)、以及其变异体和任何这些的片段。

[0125] 与本发明的新颖的部分敲除的突变体 IND 蛋白基本上类似的氨基酸序列可以通过用具有类似特性(如类似的疏水性、亲水性、抗原性、形成或打破  $\alpha$  螺旋结构或  $\beta$  折叠结构的倾向)的其他氨基酸替代本发明的部分敲除的 IND 氨基酸序列中的氨基酸来得到。保守的取代表在本领域中是已知的(参见例如 Creighton(1984)Proteins. W. H. Freeman and Company 以及本发明申请书的表 4)。

[0126] 表 4:保守的氨基酸取代的实例

[0127]

残基	保守性替换	残基	保守性替换
Ala	Ser	Leu	Ile, Val
Arg	Lys	Lys	Arg, Gln
Asn	Gln, His	Met	Leu, Ile
Asp	Glu	Phe	Met, Leu, Tyr
Gln	Asn	Ser	Thr, Gly
Cys	Ser	Thr	Ser, Val
Glu	Asp	Trp	Tyr
Gly	Pro	Tyr	Trp, Phe
His	Asn, Gln	Val	Ile, Leu
Ile	Leu, Val		

[0128] 已经从欧洲油菜中分离了野生型 IND-A1 和 IND-C1 蛋白的新颖的部分敲除的突变体 IND 氨基酸序列。如在 W009/068313(要求欧洲专利申请 EP 07023052 的优先权)中所述的野生型 IND 序列被描述于 SEQ ID NO :2 和 SEQ ID NO :4 中,而这些序列以及基本上类似于这些的序列的新颖的部分敲除的突变体 IND 序列参照野生型 IND 序列被描述在此以下以及在实例中。如上所述,欧洲油菜的野生型 IND 蛋白的长度是大约 185-210 个氨基酸并且包括多个结构域和功能域。

[0129] 根据本发明,“IND-A1 氨基酸序列”或“IND-A1 变异体氨基酸序列”是具有与 SEQ

ID NO :2 至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、98%、99% 或 100% 序列一致性的氨基酸序列。这些氨基酸序列还可以称为是与在序列表中所提供的 IND 序列“基本上类似的”或“基本上一致的”。

[0130] 根据本发明,“IND-C1 氨基酸序列”或“IND-C1 变异体氨基酸序列”是具有与 SEQ ID NO :4(IND-C1-长) 或与 SEQ ID NO :4 从位置 16 处的氨基酸到位置 210 处的氨基酸(IND-C1-短) 至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列一致性的氨基酸序列。这些氨基酸序列还可以称为是与在序列表中所提供的 IND 序列“基本上类似的”或“基本上一致的”。

[0131] 因此,本发明提供了野生型、功能性 IND-A1 和 IND-C1 蛋白的氨基酸序列的新颖的部分敲除的突变体序列,包括其变异体或片段(如以下进一步定义),与相应的野生型 IND 蛋白的生物活性相比,由此氨基酸序列中的突变优选地导致 IND 蛋白的生物活性显著减小。IND 蛋白的生物活性的显著减少在此是指该 IND 蛋白的 DNA 结合活性、二聚作用能力和/或转录调节活性上的减少,从而与一个表达相应的野生型 IND 蛋白的植物相比,表达该突变体 IND 蛋白的植物的荚果抗落粒性与一个相应的野生型植物的荚果抗落粒性相比是增加的。

[0132] 在此提供了内源的和分离的氨基酸序列两者。还提供了以上定义的 IND 氨基酸序列以及 IND 变异体氨基酸序列的片段。一个 IND 氨基酸序列或其变异体的一个“片段”(如所定义的)可以不同的长度,如 IND 序列(或该变异体序列)的至少 10、12、15、18、20、50、100、150、175、180 个邻接的氨基酸。

[0133] 功能性 IND 蛋白的氨基酸序列

[0134] 序列表中所述的氨基酸序列是来自欧洲油菜的野生型、功能性 IND 蛋白。因此,这些序列对于欧洲油菜植物(这些序列是从该植物中分离出的)是内源的。如上所述,可以筛选其他芸薹属作物种属、品种、培育品系或野生的登记物检测具有相同的氨基酸序列或其变异体的其他功能性 IND 蛋白。

[0135] 此外,应当理解的是这些 IND 氨基酸序列及其变异体(或任何这些的片段)可以在硅芯片计算机中通过筛选氨基酸数据库检测基本上类似的序列进行鉴定。根据本发明还提供了氨基酸分子的片段。这些片段包括该 bHLH 结构域或更小的片段的氨基酸序列、该更小的片段包括该 bHLH 结构域的部分(如碱性结构域或该 HLH 结构域、等)。

[0136] 突变体 IND 蛋白的氨基酸序列

[0137] 本发明提供了相对于描述于序列表的 SEQ ID NO :2 和 4 中的野生型 IND 氨基酸序列包括一个或多个氨基酸缺失、插入或取代的氨基酸序列,其中在该氨基酸序列中的一个或多个突变导致了所编码的 IND 蛋白连同此类突变体氨基酸分子的片段相对于野生型蛋白的显著减小的生物活性,即一种部分敲除的生物活性。如上所述可以使用不同的已知方法来生成和/或鉴定此类突变体氨基酸序列。此外,此类氨基酸分子以内源形式以及以分离的形式两者进行提供。

[0138] 如上所述,基本上,野生型 IND 氨基酸序列中的任何突变(这导致一种 IND 蛋白,该蛋白包括相对于野生型 IND 蛋白至少一个氨基酸插入、缺失和/或取代)可以导致显著减小的生物活性或无生物活性。然而已经了解到在 IND 蛋白中的某些突变更有可能导致该 IND 蛋白的生物活性的完全消除,如导致截短的蛋白的突变,由此这些功能域的重要部分

(如 DNA 结合域 (‘b’)、二聚化功能域 (‘HLH’) 和 / 或在转录调节中重要的氨基酸 (参见表 1)) 缺失了, 或由此这些结构域之内的某些关键的氨基酸残基如由 Heim 等人 (上述; 分别对应于 SEQ ID NO :10 中的位置 123、127 和 131、以及 128 和 130, 参见表 1) 所定义的共有区 bHLH 结构域序列的位置 5、9、和 13 处的 Gln(Q)、Ala(A) 以及 Arg(R) 氨基酸或位置 10 和 12 处的碱性氨基酸残基 (特别是 Arg(R) 残基) 缺失或被取代 (优选地被不相似的或非保守的氨基酸取代) 的突变, 而该蛋白中的其他突变更有可能导致该 IND 蛋白的生物活性的显著减小, 如导致特定的氨基酸的取代的突变, 例如表 1 中所指示的保守的氨基酸导致更低效的 DNA 结合、更低效的二聚作用、和 / 或更低效地调节转录, 而没有完全消除所编码的 IND 蛋白的生物活性。

[0139] 因此在一个实施方案中, 提供了包括一个或多个缺失或插入突变的部分敲除的突变体 IND 蛋白, 由此这一个或多个缺失或插入导致了一种突变体蛋白, 该突变体蛋白在体内具有显著减小的活性。此类突变体 IND 蛋白是与野生型 IND 蛋白相比其中至少 1、至少 2、3、4、5、10、20、30、50、100、100、150、175、180 或更多个氨基酸被缺失或插入的 IND 蛋白, 由此这一个或多个缺失或插入导致了一种突变体蛋白, 该突变体蛋白在体内具有显著减小的活性。

[0140] 在另一个实施方案中, 提供了部分敲除的突变体 IND 蛋白, 该部分敲除的突变体 IND 蛋白是截短的, 由此该平截导致了在体内具有显著减小的活性的一种突变体蛋白。此类截短的 IND 蛋白是缺少相应的野生型 IND 蛋白的 C 端部分中的功能域的并且维持了相应的野生型 IND 蛋白的 N 端部分的 IND 蛋白。因此在一个实施方案中, 提供了包括相应的野生型 IND 蛋白的 N 端部分一直到但是不包括 H2 结构域的保守的 Leu 残基 (处于由 Heim et al., 2003 所述的共有区 bHLH 结构域序列的位置 56 处, 参见以上) 的一个部分敲除的突变体 IND 蛋白。该突变体蛋白与该野生型蛋白相比较愈是截短的, 该平截可能愈是更多地导致该 IND 蛋白的显著减小的活性。所相信的是为了使该突变体 IND 蛋白保留一些生物活性, 应该至少包括该 DNA 结合 (b) 域。因此在另一个实施方案中, 提供了一个部分敲除的突变体 IND 蛋白, 该部分敲除的突变体 IND 蛋白包括该相应的野生型 IND 蛋白的 N 端部分、缺少部分或全部的第二 H 结构域、和 / 或缺少部分或全部的 L 结构域、和 / 或缺少部分或全部的第一 H 结构域 (参见表 1)。

[0141] 在又一个实施方案中, 提供了包括一个或多个取代突变的部分敲除的突变体 IND 蛋白, 由此这一个或多个取代导致了一种突变体蛋白, 该突变体蛋白在体内具有显著减小的活性。在一个实施方案中, 提供了包括一个取代突变的一个部分敲除的突变体 IND 蛋白, 该取代突变导致了在 SEQ ID NO :2、或基本上与其类似的一个序列中的 IND 蛋白的位置 124 处的一个缬氨酸 (Val) 残基特别地被一个甲硫氨酸 (Met) 残基所取代, 如由 ind-a1-EMS06 等位基因所编码的部分敲除的突变体 IND 蛋白 (表 3a)。在另一个实施方案中, 提供了包括一个取代突变的一个部分敲除的突变体 IND 蛋白, 该取代突变导致了在 SEQ ID NO :2、或基本上与其类似的一个序列中的 IND 蛋白的位置 146 处的一个甘氨酸 (Gly) 残基特别地被一个丝氨酸 (Ser) 残基所取代, 如由 ind-a1-EMS09 等位基因所编码的部分敲除的突变体 IND 蛋白 (表 3a)。在又一个实施方案中, 提供了包括一个取代突变的一个部分敲除的突变体 IND 蛋白, 该取代突变导致了在 SEQ ID NO :2、或基本上与其类似的一个序列中的 IND 蛋白的位置 159 处的一个丙氨酸 (Ala) 残基特别地被一个缬氨酸 (Val) 残基所

取代,如由 ind-a1-EMS13 等位基因所编码的部分敲除的突变体 IND 蛋白(表 3a)。在又一个实施方案中,提供了包括一个取代突变的一个部分敲除的突变体 IND 蛋白,该取代突变导致了在 SEQ ID NO :4、或基本上与其类似的一个序列中的 IND 蛋白的位置 136 处的一个苏氨酸(Thr) 残基特别地被一个甲硫氨酸(Met) 残基所取代,如由 ind-c1-EMS08 等位基因所编码的部分敲除的突变体 IND 蛋白(表 3b)。在一个进一步的实施方案中,提供了包括一个取代突变的一个部分敲除的突变体 IND 蛋白,该取代突变导致了在 SEQ ID NO :4、或基本上与其类似的一个序列中的 IND 蛋白的位置 139 处的一个丙氨酸(Ala) 残基特别地被一个苏氨酸(Thr) 残基所取代,如由 ind-c1-EMS09 等位基因所编码的部分敲除的突变体 IND 蛋白(表 3b)。在又一个实施方案中,提供了包括一个取代突变的一个部分敲除的突变体 IND 蛋白,该取代突变导致了在 SEQ ID NO :4、或基本上与其类似的一个序列中的 IND 蛋白的位置 142 处的一个精氨酸(Arg) 残基特别地被一个半胱氨酸(Cys) 残基所取代,如由 ind-c1-EMS04 等位基因所编码的部分敲除的突变体 IND 蛋白(表 3b)。

[0142] 在另一个实施方案中,提供了包括一个取代突变的一个部分敲除的突变体 IND 蛋白,该取代突变导致了如以上或表 1 中所指出的一个保守的氨基酸残基的取代,如由 ind-a1-EMS13、ind-c1-EMS04 或 ind-c1-EMS09 所编码的部分敲除的突变体 IND 蛋白(在表 3 中用 \* 指示)。

#### [0143] 根据本发明的方法

[0144] 在本发明的另一个方面,提供了用于生成并选择含有至少一个部分敲除的 ind 等位基因和 / 或至少一个完全敲除的 ind 等位基因的裂开性种子植物、及其细胞、部分、种子和子代的方法。具体地,提供了用于生成并选择包括至少两个 IND 基因的芸薹属植物、具体是欧洲油菜植物、及其细胞、部分、种子和子代的方法,该植物及其细胞、部分、种子和子代在该基因组中在至少两个不同的 IND 基因座中的至少一个处(例如在芸薹属 IND-A1 和 IND-C1 基因的至少两个不同的基因座中的至少一个处)含有至少一个部分敲除的 ind 等位基因和 / 或至少一个完全敲除的 ind 等位基因,并且从而在一个裂开性种子植物或植物部分中进行完全敲除的 ind 等位基因、部分敲除的 ind 等位基因与野生型 IND 等位基因的存在之间的区别。因此提供了用于生成和 / 或鉴定部分敲除的 ind 等位基因和 / 或完全敲除的 ind 等位基因或包括此类 ind 等位基因的裂开性种子植物或植物部分的方法(如诱变和 / 或标记辅助选择)、以及用于将一个适合数目的部分敲除的 ind 等位基因和 / 或完全敲除的 ind 等位基因和 / 或不同类型的部分敲除的 ind 等位基因和 / 或完全敲除的 ind 等位基因结合入一个单个的裂开性种子植物中以便改变这些植物的果实开裂特性、特别是以便减少种子落粒、或将种子落粒延迟到收获之后,而同时维持一种农艺学相关的荚果脱粒能力的方法。

[0145] 根据本发明可以使用一系列方法来生成(例如通过诱变进行诱导)和 / 或鉴定部分敲除的突变体 ind 等位基因和完全敲除的突变体 ind 等位基因,这些方法在本领域中是常规的,例如使用基于 PCR 的方法来扩增部分或全部的 ind 基因组 DNA 或 cDNA。

[0146] 在诱变后,使用已知技术将植物从这些处理的种子中生长出来、或从这些处理的细胞中再生出来。例如,可以根据常规的生长步骤将诱变过的种子进行种植并且在自花传粉之后在这些植物上形成种子。可替代地,可以从处理过的小孢子或花粉细胞中提取出双单倍体小植株以立即形成纯合的植物,例如由 Coventry 等人(1988, Manual

for Microspore Culture Technique for Brassica napus. Dep. Crop Sci. Techn. Bull. OAC Publication 0489. Univ. of Guelph, Guelph, Ontario, Canada) 所述。使用本领域中常规的技术（例如基于聚合酶链式反应 (PCR) 的技术（扩增该 ind 等位基因）或基于杂交的技术，例如 DNA 印迹分析、BAC 文库筛选、等，和 / 或 ind 等位基因的直接测序）可以将由于在当前世代或一个随后的世代中的这种自花传粉而形成的另外的种子进行收获并且筛选检测突变体 IND 等位基因的存在。为了在突变体 IND 等位基因中进行筛选检测点突变（所谓的单核苷酸多态性或 SNPs）的存在，可以使用本领域中常规的 SNP 检测方法，例如基于寡连接的技术、基于单个碱基延长的技术或基于限制性酶切位点中的差别的技术，如 TILLING。

[0147] 如上所述，一个特定的野生型 IND 等位基因的诱变（自发的以及诱导的）导致了在所得到的突变体 IND 等位基因中存在一个或多个缺失的、插入的、或取代的核苷酸（以下称为“突变区”）。因此该突变体 IND 等位基因的特征是在野生型 IND 等位基因中该一个或多个缺失的、插入的、或取代的核苷酸的位置和构型。该一个或多个核苷酸被对应地插入、缺失、或取代的该野生型 IND 等位基因中的位置在此也称为“突变区或序列”。如在此使用的一个“5' 或 3' 侧翼区或序列”是指在与含有一个或多个缺失的、插入的、或取代的核苷酸的 DNA 不同的至少 20bp、优选地至少 50bp、至少 750bp、至少 1500bp、以及高达 5000bp 的 DNA 的突变体（或相应的野生型）IND 等位基因中的一个 DNA 区或序列，优选来自该突变体（或该相应的野生型）IND 等位基因的 DNA，该 IND 等位基因位于该突变体 IND 等位基因（或该相应的野生型 IND 等位基因）中或者突变区的紧邻上游并且与（5' 侧翼区或序列”）邻接或者该突变区的紧邻下游并且与其（3' 侧翼区或序列”）邻接。如在此使用的一个“连接区”是指在一个突变体（或相应的野生型）IND 等位基因中的一个 DNA 区，其中该突变区与该 5' 或 3' 侧翼区彼此相连。因此，一个“跨越该突变区与该 5' 或 3' 侧翼区之间的连接区的序列”包括了一个突变序列以及与其邻接的侧翼序列。

[0148] 所开发的用来鉴定一个特定的突变体 IND 等位基因或包括一个特定的突变体 IND 等位基因的植物或植物材料、或包括植物材料（该植物材料包括一个特定的突变体 IND 等位基因）的产物的工具是基于与相应的野生型 IND 等位基因的基因组特征相比该特定的突变体 IND 等位基因的特定的基因组特征，如包括该突变区的基因组区域的一个特异的限制性酶切图谱、分子标记或侧翼区和 / 或突变区的序列。

[0149] 一旦对一个特定的突变体 IND 等位基因进行了测序，可以通过一种分子生物学技术来开发特异地识别一个样品的核酸 (DNA 或 RNA) 中的突变体 IND 等位基因的 5' 侧翼、3' 侧翼和 / 或突变区之内的一个序列的引物和探针。例如，可以开发一种 PCR 方法来鉴定生物样品（例如植物、植物材料或包括植物材料的产物的样品）中的突变体 IND 等位基因。这样一种 PCR 是基于至少两个特异性“引物”：一个识别该突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区之内的一个序列，并且另一个对应地识别该突变体 IND 等位基因的 3' 或 5' 侧翼区之内的一个序列；或一个识别该突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区之内的一个序列，并且另一个识别该突变体 IND 等位基因的突变区之内的一个序列；或一个识别该突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区之内的一个序列，并且另一个对应地识别跨越该特定的突变体 IND 等位基因（如以下进一步描述）的 3' 或 5' 侧翼区与突变区之间的连接区的一个序列。

[0150] 这些引物优选具有 15 与 35 个核苷酸之间的一个序列，该序列在最佳的 PCR 条件下“特异地识别”该 5' 或 3' 侧翼区之内的一个序列、该突变区之内的一个序列、或跨越该

特定的突变体 IND 等位基因的 3' 或 5' 侧翼区与突变区之间的连接区的一个序列,从而从包括该特定的突变体 IND 等位基因的一个核酸样品扩增一个特定的片段(“突变体 IND 特定片段”或识别扩增子)。这意味着在最佳的 PCR 条件下在植物基因组中仅目标突变体 IND 等位基因、而没有其他序列被扩增。

[0151] 适合用于本发明的 PCR 引物可以是以下各项:

[0152] - 寡核苷酸,长度范围从 17nt 到约 200nt,包括至少 17 个连续核苷酸、优选 20 个连续核苷酸的一个核苷酸序列,这些连续核苷酸选自一个特定的突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼序列或其互补序列(即例如,本发明的突变体 IND 等位基因中一个或多个核苷酸被缺失、插入或取代的 5' 或 3' 侧翼序列,如以上所述的无义、错义或移码突变的 5' 或 3' 侧翼序列或以上表格中所示的 STOP 密码子突变或以上所示的取代突变的 5' 或 3' 侧翼序列或其互补序列)(识别 5' 侧翼序列的引物);或

[0153] - 寡核苷酸,长度范围从 17nt 到约 200nt,包括至少 17 个连续核苷酸、优选 20 个连续核苷酸的一个核苷酸序列,这些连续核苷酸选自一个特定的突变体 IND 等位基因的突变区的序列或其互补序列(即例如,在本发明的 IND 基因中所插入的或取代的核苷酸的序列或其互补序列)(识别突变序列的引物)。

[0154] 这些引物当然可以长于所提到的 17 个连续核苷酸,并且可以例如是 18、19、20、21、30、35、50、75、100、150、200nt 长的或甚至更长的。这些引物可以完全由选自所提到的侧翼序列和突变序列的核苷酸序列的核苷酸序列组成。然而,在这些引物在其 5' 端的核苷酸序列(即位于 3' 的 17 个连续核苷酸之外)是较不关键的。因此,适当时,这些引物的 5' 序列可以由选自侧翼序列或突变序列的一个核苷酸序列组成,但是可以含有一些(例如 1、2、5、10)错配。这些引物的 5' 序列甚至可以完全由一个与该侧翼序列或突变序列不相关的核苷酸序列组成,例如像表示限制性酶识别位点的一个核苷酸序列。这些不相关的序列或具有错配的侧翼 DNA 序列应该优选地是不长于 100、更优选地不长于 50 或甚至 25 个核苷酸。

[0155] 此外,适合的引物可以包含或包括一个核苷酸序列,该核苷酸序列跨越了位于侧翼序列与突变序列之间的连接区(即例如,对应地位于一个本发明的突变体 IND 等位基因中一个或多个核苷酸被缺失、插入或取代的 5' 或 3' 侧翼序列与该一个或多个核苷酸被插入或取代的序列,或该一个或多个核苷酸被缺失的 3' 或 5' 侧翼序列之间的连接区,如位于上述本发明的 IND 基因中无义、错义或移码突变的一个 5' 或 3' 侧翼序列与该无义、错义或移码突变的序列之间的连接区、或对应地位于如以上表格中所示的一个潜在的 STOP 密码子突变或以上所示的取代突变的一个 5' 或 3' 侧翼序列与该潜在的 STOP 密码子突变或取代突变的序列之间的连接区),条件是该核苷酸序列不是唯一地从该突变区亦或这些侧翼区上得到的。

[0156] 对于熟练的技工还应该马上清楚的是适当地选择的 PCR 引物对还应当不包括彼此互补的序列。

[0157] 出于本发明的目的,“以 SEQ ID No :X 表示的一个核苷酸序列的互补序列”是核苷酸序列,该核苷酸序列可以从所表示的核苷酸序列通过将这些核苷酸用它们的互补核苷酸(根据 Chargaff's 法则( $A \leftrightarrow T$ ;  $G \leftrightarrow C$ ))进行替代并且将序列以 5' 至 3' 方向(即以所表示的核苷酸序列的相反的方向)进行读取而得到。

[0158] 适合用于识别特定的突变体 IND 等位基因的引物的实例描述于这些实例中。

[0159] 如在此所使用的,“SEQ ID No. Z 从位置 X 到位置 Y 的核苷酸序列”表示包括两个核苷酸端点的核苷酸序列。

[0160] 优选地,所扩增的片段具有 50 至 1000 个核苷酸之间的长度,如 50 至 500 个核苷酸之间的长度、或 100 至 350 个核苷酸之间的长度。这些特异性引物可以具有与该 5' 或 3' 侧翼区之内的一个序列、与该突变区之内的一个序列、或与跨越该特定的突变体 IND 等位基因的 3' 或 5' 侧翼区与突变区之间的连接区的一个序列 80% 至 100% 之间一致性的一个序列,条件是这些错配仍然允许用这些引物在最佳的 PCR 条件下特异地识别该特定的突变体 IND 等位基因。然而,可允许的错配的范围可以通过实验方法容易地确定并且对于本领域的普通技术人员是已知的。

[0161] 可以以不同的方法,例如通过在凝胶或毛细管电泳之后进行大小评估或通过基于荧光的检测方法,进行一个“突变体 IND 特异片段”的检测和 / 或鉴别,。还可以将这些突变体 IND 特异片段直接进行测序。用于检测扩增的 DNA 片段的其他序列特异性方法在本领域中也是已知的。

[0162] 标准的 PCR 科学试验计划描述在本领域中,如在“PCR 应用手册”(Roche Molecular Biochemicals, 2nd Edition, 1999) 以及其他参考文献中。对于每个特定的突变体 IND 等位基因,对于 PCR 最佳的条件(包括特异性引物的序列)详细说明在一个“PCR 鉴别科学试验计划”中。然而应当理解的是可能需要将 PCR 鉴别科学试验计划中的多个参数调整到特定的实验室条件,并且可能进行轻微修改以获得类似的结果。例如,使用一种用于制备 DNA 的不同方法可能要求调整例如引物、聚合酶、MgCl<sub>2</sub> 浓度或所使用的退火条件的量。类似地,选择其他引物可能要求用于该 PCR 鉴别科学试验计划的其他最佳条件。然而,这些调整对于本领域的普通技术人员应该是清楚的、并且进一步详细描述于现在的 PCR 应用手册(如以上所举例的这个)中。

[0163] 用来鉴别特定的突变体 IND 等位基因的 PCR 鉴别科学试验计划的实例描述于这些实例中。

[0164] 可替代地,可以使用特异性引物来扩增一个突变体 IND 特异片段,该片段可以被用作一个用于鉴别生物样品中的一个特定的突变体 IND 等位基因的“特异性探针”。将一个生物样品的核酸与该探针在允许该探针与该核酸中其相应的片段杂交的条件下进行接触,导致形成一个核酸 / 探针杂交体。可以检测这种杂交体的形成(例如标记该核酸或探针),由此这种杂交体的形成表明了该特定的突变体 IND 等位基因的存在。基于用一个特异性探针进行杂交的这类鉴定方法(或者在一个固相载体上或者在溶液中)已经描述于本领域中。该特异性探针优选地是一个序列,该序列在最佳条件下特异地杂交到该特定的突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区之内的和 / 或突变区(在下文中称为“突变体 IND 特异区”)之内的一个区域上。优选地,该特异性探针包括 10 至 1000bp 之间、50 至 600bp 之间、100 至 500bp 之间、150 至 350bp 之间的一个序列,该序列与一个特异区的核苷酸序列是至少 80%、优选地 80% 至 85% 之间、更优选地 85% 至 90% 之间、尤其优选地 90% 至 95% 之间、最优选地 95% 至 100% 之间一致的(或互补的)。优选地,该特异性探针将包括与该特定的突变体 IND 等位基因的一个特异区大约 13 个至大约 100 个连续核苷酸一致的(或互补的)一个序列。

[0165] 适合用于本发明的特异性探针可以是以下各项:

[0166] -寡核苷酸,长度范围从 13nt 到约 1000nt,包括至少 13 个连续核苷酸的一个核苷酸序列,这些连续核苷酸选自一个特定的突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼序列或其互补序列(即例如,本发明的突变体 IND 等位基因中一个或多个核苷酸缺失的、插入的或取代的 5' 或 3' 侧翼序列,如以上所述的无义、错义或移码突变的 5' 或 3' 侧翼序列或以上表格中所示潜在的 STOP 密码子突变或以上所示取代突变的 5' 或 3' 侧翼序列),或具有与其至少 80% 序列一致性的一个序列(识别 5' 侧翼序列的探针);或

[0167] -寡核苷酸,长度范围从 13nt 到约 1000nt,包括至少 13 个连续核苷酸的一个核苷酸序列,这些连续核苷酸选自一个特定的突变体 IND 等位基因的突变序列或其互补序列(即例如,在本发明的 IND 基因中核苷酸被插入或被取代的序列,或其互补序列),或具有与其至少 80% 序列一致性的一个序列(识别突变序列的探针)。

[0168] 这些探针可以完全由选自所提到的侧翼序列和突变序列的核苷酸序列的核苷酸序列组成。然而,这些探针的核苷酸序列在其 5' 或 3' 端是较不关键的。因此,适当时,这些探针的 5' 或 3' 序列可以由选自该侧翼序列或突变序列的一个核苷酸序列组成,但是可以由与该侧翼序列或突变序列不相关的一个核苷酸序列组成。这类不相关的序列应该优选地不长于 50、更优选地不长于 25 或甚至不长于 20 或 15 个核苷酸。

[0169] 此外,适合的探针可以包含或包括一个核苷酸序列,该核苷酸序列跨越了位于侧翼序列与突变序列之间的连接区(即例如,对应地,位于本发明的突变体 IND 等位基因中一个或多个核苷酸被缺失、插入或取代的一个 5' 或 3' 侧翼序列与该一个或多个核苷酸被插入或取代的序列,或该一个或多个核苷酸被缺失的 3' 或 5' 侧翼序列之间的连接区,如位于以上所述的本发明的 IND 基因中无义、错义或移码突变的一个 5' 或 3' 侧翼序列与该无义、错义或移码突变的序列之间的连接区、或对应地位于如以上表格中所示的一个潜在的 STOP 密码子突变或以上所示的取代突变的一个 5' 或 3' 侧翼序列与该潜在的 STOP 密码子或取代突变的序列之间的连接区),条件是所提到的核苷酸序列不是唯一地从该突变区亦或这些侧翼区上得到的。

[0170] 适合用于识别特定的突变体 IND 等位基因的特异性探针的实例描述于这些实例中。

[0171] 例如通过在凝胶电泳之后进行大小评估或通过基于荧光的检测方法可以以不同的方法进行杂交到一个特异性探针上的一个“突变体 IND 特异区”的检测和/或鉴别。用于杂交到一个特异性探针上的一个“突变体 IND 特异区”的检测的其他序列特异性方法在本领域中也是已知的。

[0172] 可替代地,可以使用其他方法,如“缺失-一个-基因<sup>TM</sup>”方法(该方法使用 PCR 进行筛选检测通过快速中子诱变(由 Li 和 Zhang, 2002, *Funct Integr Genomics* 2 :254-258 所进行的回顾)生成的缺失突变体),通过 TILLING(基因组中靶向诱导的局部损伤)方法(该方法使用变性高效液相色谱法(DHPLC)来检测碱基对改变通过异源双链体分析(McCallum et al., 2000, *Nat Biotech* 18 :455, 以及 McCallum et al. 2000, *Plant Physiol.* 123, 439-442)鉴定了 EMS- 诱导的点突变),等,生成和鉴定包括一个或多个突变体 ind 等位基因的植物或植物部位。如所提到的,TILLING 使用高通量筛选突变体(例如使用 Cel 1 切割突变体-野生型 DNA 异源双链体并且使用一个测序凝胶系统进行检测)。因此,在此包括了用于鉴定包括一个或多个突变体 ind 等位基因的植物或植物部分的 TILLING 的用途、以及

用于生成并鉴定此类植物、植物器官、组织或种子的方法。因此在一个实施方案中,根据本发明的方法包括以下步骤:将植物种子进行诱变(例如 EMS 诱变)、将植物个体或 DNA 进行合并、将感兴趣的一个区域进行 PCR 扩增、形成异源双链体并且进行高通量检测、鉴定突变体植物、对该突变体 PCR 产物进行测序。应当理解的是可以相同地使用其他诱变和选择方法来生成此类突变体植物。

[0173] 除了在 IND 等位基因中诱导突变,可以通过本领域中已知的方法鉴定天然的(自发的)突变体等位基因。例如可以使用 ECOTILLING (Henikoff et al. 2004, Plant Physiology 135(2):630-6) 来筛选多个植物或植物部分检测天然突变体 ind 等位基因的存在。关于以上的诱变技术,优选地对包括一个 A 和 / 或一个 C 基因组的芸薹属种属进行筛选,从而可以随后通过杂交(种间或种内杂交)和选择将所鉴定的 ind 等位基因引入其他芸薹属种、如欧洲油菜中。在 ECOTILLING 中,通过上述的 TILLING 方法对培育品系或相关属种中的天然多态性进行筛选,其中使用植物的个体或集合来 PCR 扩增该 ind 目标物、形成异源双链体并且进行高通量分析。在其之后可以选择具有所要求的突变的单个的植物,该植物可以随后用于培育计划中来合并所希望的突变体等位基因。

[0174] 然后可以对所鉴定的突变体等位基因进行测序并且可以将该序列与野生型等位基因进行对比以鉴定这一个或多个突变。可任选地,可以如以上所示来测试功能性。使用这种方法,可以鉴定多个突变体 ind 等位基因(以及包括一个或多个这些等位基因的芸薹属植物)。然后可以将所希望的突变体等位基因与所希望的野生型等位基因通过如以下进一步描述的杂交和选择方法进行合并。最后,生成了包括所希望数目的突变体 ind 和所希望数目的野生型 IND 等位基因的一个单个植物。

[0175] 还可以使用适合作为 PCR 引物或用于检测一个特定的突变体 IND 等位基因的特异性探针的寡核苷酸来开发用于确定该特定的突变体 IND 等位基因的接合性状态的方法。

[0176] 为了确定一个特定的突变体 IND 等位基因的接合性状态,可以开发一种基于 PCR 的测定来确定一个突变体和 / 或相应的野生型 IND 特异性等位基因的存在。

[0177] 为了确定一个特定的突变体 IND 等位基因的接合性状态,可以以这样一种方式设计特异地识别该野生型 IND 等位基因的两个引物,即它们指向彼此,并且具有位于这些引物之间的突变区。这些引物可以是对应地特异地识别该 5' 和 3' 侧翼序列的引物。这组引物允许同时诊断性 PCR 扩增该突变体、以及相应的野生型 IND 等位基因。

[0178] 可替代地,为了确定一个特定的突变体 IND 等位基因的接合性状态,可以以这样一种方式设计特异地识别该野生型 IND 等位基因的两个引物,即它们指向彼此,并且它们中的一个特异地识别该突变区。这些引物可以是对应地特异地识别该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区和突变区的序列的引物。这组引物与一个第三引物(该第三引物特异地识别了该突变体 IND 等位基因中的突变区的序列)一起允许同时诊断性 PCR 扩增该突变体 IND 基因、以及该野生型 IND 基因。

[0179] 可替代地,为了确定一个特定的突变体 IND 等位基因的接合性状态,可以以这样一种方式设计特异地识别该野生型 IND 等位基因的两个引物,即它们指向彼此,并且它们中的一个特异地识别位于该 5' 或 3' 侧翼区与突变区之间的连接区。这些引物可以对应地是特异地识别该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼序列和位于突变区与 3' 或 5' 侧翼区之间的连接区的引物。这组引物与一个第三引物(该第三引物对应地特异地识别了位

于该突变体 IND 等位基因的突变区与 3' 或 5' 侧翼区之间的连接区) 一起允许同时诊断性 PCR 扩增该突变体 IND 基因、以及该野生型 IND 基因。

[0180] 可替代地, 可以通过使用替代的引物组来确定一个特定的突变体 IND 等位基因的接合性状态, 该替代的引物组特异地识别了突变体和野生型 IND 等位基因。

[0181] 如果该植物对于该突变体 IND 基因或相应的野生型 IND 基因是纯合的, 以上所述的诊断性 PCR 测定将生成一种单个的 PCR 产物, 该产物对于该突变体或野生型 IND 等位基因是典型的、优选在长度上是典型的。如果该植物对于该突变体 IND 基因是杂合的, 将会出现两种特异性 PCR 产物, 反映突变体和野生型 IND 等位基因两者的扩增。

[0182] 可以例如通过在凝胶或毛细管电泳之后进行大小估计 (例如对于包括多个插入的或缺失的核苷酸的突变体 IND 等位基因, (这些插入的或缺失的核苷酸导致了从野生型和突变体 IND 等位基因所扩增出的片段之间大小不同, 从而所述片段可以在一个凝胶上被可见地分离)); 通过在凝胶或毛细管电泳之后估计两个不同的片段的存或不存, 由此任选地该突变体 IND 等位基因的诊断性 PCR 扩增可以与该野生型 IND 等位基因的诊断性 PCR 扩增分开地进行; 通过将所扩增的片段直接进行测序; 或通过基于荧光的检测方法, 进行该野生型和突变体 IND 特异性 PCR 产物的鉴定。

[0183] 适合用于确定特定的突变体 IND 等位基因的接合性的引物的实例描述于这些实例中。

[0184] 可替代地, 为了确定一个特定的突变体 IND 等位基因的接合性状态, 可以开发一种基于杂交的测定来确定一个突变体和 / 或相应的野生型 IND 特异等位基因的存在:

[0185] 为了确定一个特定的突变体 IND 等位基因的接合性状态, 可以以这样一种方式设计识别该野生型 IND 等位基因的两个特异性探针, 即每个探针特异地识别该 IND 野生型等位基因之内的一个序列并且该突变区位于由这些探针所识别的序列之间。这些探针可以是对应地特异地识别该 5' 和 3' 侧翼序列的探针。优选地, 使用这些探针中的一个或两个允许同时诊断性杂交该突变体、以及相应的野生型 IND 等位基因。

[0186] 可替代地, 为了确定一个特定的突变体 IND 等位基因的接合性状态, 可以以这样一种方式设计识别该野生型 IND 等位基因的两个特异性探针, 即它们中的一个特异地识别该 IND 野生型等位基因之内的一个序列 (野生型等位基因位于该该突变区上游或下游、优选地位于该突变区的上游), 并且它们中的一个特异地识别该突变区。这些探针可以是对应地特异地识别该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区 (优选 5' 侧翼区) 和突变区的序列的探针。优选地这些探针中的一个或两个任选地与一个第三探针 (该第三探针特异地识别该突变体 IND 等位基因中的突变区的序列) 一起使用允许诊断性杂交该突变体以及该野生型 IND 基因。

[0187] 可替代地, 为了确定一个特定的突变体 IND 等位基因的接合性状态, 可以以这样一种方式设计识别该野生型 IND 等位基因的一个特异性探针, 即该探针特异地识别位于该野生型 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区 (优选 5' 侧翼区) 与突变区之间的连接区。可任选地, 该探针与一个第二探针 (该第二探针特异地识别位于该突变体 IND 等位基因的 5' 或 3' 侧翼区 (优选 5' 侧翼区) 与突变区之间的连接区) 一起允许诊断性杂交该突变体以及该野生型 IND 基因。

[0188] 可替代地, 可以通过使用替代组的探针来确定一个特定的突变体 IND 等位基因的

接合性状态,该替代组的探针特异地识别突变体和野生型 IND 等位基因。

[0189] 如果该植物对于该突变体 IND 基因或相应的野生型 IND 基因是纯合的,以上所述的诊断性杂交测定将生成一种单个的特定的杂交产物(如一个或多个杂交 DNA(限制性)片段),该产物对于该突变体或野生型 IND 等位基因其中一项是典型的、优选在长度上是典型的。如果该植物对于该突变体 IND 基因是杂合的,将会出现两种特定的杂交产物,反映该突变体和野生型 IND 等位基因的两个杂交。

[0190] 可以例如通过在凝胶或毛细管电泳之后对大小进行估计(例如对于包括多个插入的或缺失的核苷酸的突变体 IND 等位基因(这些插入的或缺失的核苷酸导致了来自野生型和突变体 IND 等位基因的杂交 DNA(限制性)片段之间大小不同,从而所述片段可以在一个凝胶上被可见地分离));通过在凝胶或毛细管电泳之后估计两个不同的特异性杂交产物的存在或不存在,由此任选地该突变体 IND 等位基因的诊断性杂交可以与该野生型 IND 等位基因的诊断性杂交分开地进行;通过将杂交 DNA(限制性)片段直接进行测序;或通过基于荧光的检测方法,进行该野生型和突变体 IND 特异性杂交产物的鉴定。

[0191] 适合用于确定特定的突变体 IND 等位基因的接合性的探针的实例描述于这些实例中。

[0192] 此外,还可以使用在此提供的特定的突变体 IND 等位基因特异性序列信息来开发对于一个特定的突变体 IND 等位基因特异性的检测方法,该方法不同于基于 PCR 或基于杂交的扩增方法。这些替代的检测方法包括:基于侵入性酶切特定的核酸结构的线性信号扩增检测方法,也称为 Invader™ 技术(如例如美国专利 5,985,557 “Invasive Cleavage of Nucleic Acids”、6,001,567 “Detection of Nucleic Acid sequences by Invader Directed Cleavage”中所描述,通过引用结合在此),基于 RT-PCR 的检测方法,如 Taqman,或其他检测方法,如 SNPlex、单个碱基延长(SBE),等。简言之,在 Invader™ 技术中,例如可以将目标突变序列与一个标记的第一核酸寡核苷酸(该寡核苷酸包括该突变序列或跨越位于该 5' 侧翼区与该突变区之间的连接区的一个序列的核苷酸序列)进行杂交并且与一个第二核酸寡核苷酸(该寡核苷酸包括在该突变序列的紧邻下游并且邻近该突变序列的 3' 侧翼序列)进行杂交,其中该第一和第二寡核苷酸重叠至少一个核苷酸。通过这种杂交生成的双链体或三链体结构允许用一种酶(**Cleavase®**)进行选择性的探针切割,留下目标序列保持完整。潜在地通过一个中间步骤随后检测所切割的标记的探针,导致了进一步的信号扩增。

[0193] 如在此使用的,一个“试剂盒”是指用于实现本发明的方法的目的(更具体地,鉴定生物样品中的一个特定的突变体 IND 等位基因或确定包括一个特定的突变体 IND 等位基因的植物材料的接合性状态)的一组试剂。更具体地,如上所述,本发明的试剂盒的一个优选实施方案包括用于鉴定一个特定的突变体 IND 等位基因的至少两个特异性引物或用于确定接合性状态的至少两个或三个特异性引物。可任选地,该试剂盒可以进一步包括在此所述的 PCR 鉴别科学试验计划中的任何其他试剂。可替代地,根据本发明的另一个实施方案,如以上所述,该试剂盒可以包括用于鉴定一个特定的突变体 IND 等位基因的至少一个特异性探针(该探针特异地与生物样品的核酸进行杂交以鉴定其中的一个特定突变体 IND 等位基因的存在)或用于确定接合性状态的至少两个或三个特异性探针。可任选地,该试剂盒可以进一步包括使用该特异性探针用于来鉴定生物样品中的一个特定的突变体 IND

等位基因的任何其他试剂（例如但不限于杂交缓冲剂、标记）。

[0194] 出于质量控制（例如种子批次的纯度）、检测一个特定的突变体 IND 等位基因在植物材料或包括或得自植物材料的材料（例如但不限于食物或饲料产品）中存在或不存在的目的，可以使用本发明的试剂盒，并且其组分可以被特异性地调节。

[0195] 如在此使用的术语“引物”包括能够在一个依赖模板的过程（如 PCR）中启动一个新的核酸的合成的任何核酸。典型地，引物是从 10 到 30 个核苷酸的寡核苷酸，但是可以采用更长的序列。引物可以以双链形式提供，虽然单链形式是优选的。探针可以被用作引物，但是探针被设计用来结合到目标 DNA 或 RNA 上并且不需要用在一个扩增过程中。

[0196] 当提及特异性引物时，如在此使用的术语“识别”是指以下事实，即这些特异性探针在方法中列出的条件（如 PCR 鉴别科学试验计划的条件）下特异地杂交到一个特定的突变体 IND 等位基因中的一个核酸序列上，由此通过阳性和阴性对照的存在来确定该特异性。

[0197] 当提及特异性探针时，如在此使用的术语“杂交”是指以下事实，即该探针在标准的严格条件下结合到一个特定的突变体 IND 等位基因的核酸序列中的一个特定区域上。如在此使用的标准的严格条件是指在此所述的用于杂交的条件或是指如由 Sambrook et al., 1989 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY) 所述的常规的杂交条件，例如它可以包括以下步骤：1) 将植物基因组 DNA 片段或 BAC 文库 DNA 固定到一个滤纸上，2) 将该滤纸在 65°C 下在 6X SSC、5X Denhardt's 试剂、0.5% SDS 和 20 μg/ml 变性的载体 DNA 中预杂交 1 到 2 小时，3) 加入已经被标记的杂交探针，4) 孵化 16 到 24 小时，5) 将该滤纸在 68°C 下在 6X SSC、0.1% SDS 中洗涤一次持续 30 分钟，6) 将滤纸在 68°C 下在 2X SSC、0.1% SDS 中洗涤三次（两次在 30ml 中持续 30 分钟并且一次在 500ml 中持续 10 分钟），并且 7) 将该滤纸在 -70°C 下暴露于 X 射线 4 到 48 小时。

[0198] 如在此使用的，一个“生物样品”是一株植物、植物材料或包括植物材料的产品的一个样品。术语“植物”旨在包括植物组织（处于任何成熟度阶段）、以及从任何此类植物取得或得到的任何细胞、组织、或器官，包括但不限于任何种子、叶、茎、花、根、单细胞、配子、细胞培养物、组织培养物或原生质体。如在此使用的“植物材料”是指从一株植物获得或得到的材料。包括植物材料的产品涉及食品、饲料、或使用植物材料生产的或可以被植物材料污染的其他产品。应当理解的是在本发明的上下文中对此类生物样品进行测试检测对于一个特定的突变体 IND 等位基因特异性的核酸的存在，意味着样品中核酸的存在。因此，在此提及的用于鉴定生物样品中一个特定的突变体 IND 等位基因的这些方法涉及在生物样品中鉴定核酸，该核酸包括该特定的突变体 IND 等位基因。

[0199] 本发明还涉及了将多个特定的 IND 等位基因结合入一株植物中、涉及将一个或多个特定的突变体 IND 等位基因从一株植物转移到另一株植物中、涉及包括一个或多个特定的突变体 IND 等位基因的植物、从这些植物得到的子代、并且涉及从这些植物得到的植物细胞、植物部分、以及植物种子。

[0200] 在一个实施方案中，提供了用于将一个适合的数目的部分敲除的 ind 等位基因和 / 或完全敲除的 ind 等位基因和 / 或不同类型的部分敲除的 ind 等位基因和 / 或完全敲除的 ind 等位基因结合入一个单个的裂开性种子植物中从而改变该植物的果实开裂特性、特

别是从而减少种子落粒、或将种子落粒延迟到收获之后，而同时维持一个农艺学相关的荚果脱粒能力的一种方法。

[0201] 在一个方面，提供了用于改变包括至少两个 IND 基因的一个芸薹属植物的果实开裂特性、特别是用于减少种子落粒、或将种子落粒延迟到收获之后，而同时维持一个农艺学相关的荚果脱粒能力的一种方法，该方法包括以下步骤：

[0202] - 如上所述，生成和 / 或选择包括至少两个 IND 基因的一个芸薹属植物，其中该至少两个 IND 基因的至少两个等位基因是部分敲除的 ind 等位基因，

[0203] - 选择具有改变的果实开裂特性的一株植物，特别是其中将种子落粒减少或延迟到收获之后而荚果同时维持一种农艺学相关的脱粒能力的一株植物。

[0204] 在这个方面的一个实施方案中，包括至少两个 IND 基因的芸薹属植物是包括一个 IND-A1 和一个 IND-C1 基因的一个欧洲油菜植物。在这个实施方案的一个具体方面，该至少两个部分敲除的 ind 等位基因是 IND-C1 基因的部分敲除的 ind 等位基因。

[0205] 在另一个方面，如上所述，该方法进一步包括生成和 / 或选择包括至少两个 IND 基因的一个芸薹属植物的步骤，其中该至少两个 IND 基因的至少两个另外的等位基因是完全敲除的 ind 等位基因。在一个实施方案中，包括至少两个 IND 基因的芸薹属植物是包括一个 IND-A1 和一个 IND-C1 基因的一个欧洲油菜植物。在这个实施方案的一个具体方面，该至少两个部分敲除的 ind 等位基因是 IND-A1 基因的部分敲除的 ind 等位基因并且该至少两个完全敲除的 ind 等位基因是 IND-C1 基因的完全敲除的 ind 等位基因。

[0206] 在本发明的另一个实施方案中，用于制造包括至少两个 IND 基因的一种杂交体芸薹属作物植物或种子、特别是一个杂交体欧洲油菜植物或种子的一种方法，其中该植物或从该种子生长的植物的果实开裂特性被改变，特别是其中将种子落粒减少或延迟到收获之后而荚果同时维持一种农艺学相关的脱粒能力，该方法包括以下步骤：

[0207] - 如上所述，生成和 / 或鉴定包括处于纯合状态的一个第一部分敲除的 ind 等位基因的一个第一植物以及包括处于纯合状态的一个第二部分敲除突的 ind 等位基因的一个第二植物，

[0208] - 将该第一与该第二植物进行杂交并且从包括该至少两个 IND 基因的两个部分敲除的 ind 等位基因的杂交物中收集 F1 杂交种子。

[0209] 在本发明的一个进一步的实施方案中，如上所述，该第一植物额外地包括处于纯合状态的一个第一完全敲除的 ind 等位基因并且该第二植物额外地包括处于纯合状态的一个第二完全敲除的 ind 等位基因，并且收集了包括该至少两个 IND 基因的两个部分敲除的 ind 等位基因和两个完全敲除的 ind 等位基因的 F1 杂交种子。

[0210] 使用包括处于纯合状态的一个部分敲除的 ind 等位基因和 / 或一个完全敲除的 ind 等位基因的亲本植物来生成杂交种子（从该种子可以生长出植物，这些植物显示出减小的或延迟的种子落粒而同时维持一个农艺学相关的荚果脱粒能力）的可能性提供了超过使用包括处于纯合状态的两个完全敲除的 ind 等位基因的一个亲本植物以及包括一个完全敲除的 ind 等位基因状态的一个亲本植物（如 W009/068313（要求欧洲专利申请 EP 07023052 的优先权）中所述）的优点，因为这两个亲本植物都生成了显示一种农艺学相关的脱粒能力的荚果，而包括处于纯合状态的两个完全敲除的 ind 等位基因的亲本植物的荚果生成了管样的荚果，从这种荚果中难以收获种子。

[0211] 在本发明的一个方面,该第一和第二部分敲除的 ind 等位基因是相同的,从而这些 F1 杂交种子对于一个部分敲除的 ind 等位基因是纯合的。在本发明的另一个方面,该第一和第二完全敲除的 ind 等位基因是相同的,从而这些 F1 杂交种子对于一个完全敲除的 ind 等位基因是纯合的。

[0212] 根据标准培育技术可以根据本发明将完全敲除 ind 等位基因(即其功能性表达被完全消除的 IND 等位基因)(如 W009/068313(要求欧洲专利申请 EP 07023052 的优先权)中所述的那些)、和/或部分敲除的 ind 等位基因(即其功能性表达被部分消除的 IND 等位基因)进行组合。

[0213] 例如通过以下各项可以将部分敲除的 ind 等位基因和/或完全敲除的 ind 等位基因结合入一个单个的裂开性种子植物中:

[0214] (a) 生成和/或鉴定两个或多个植物,它们各自包括一个或多个选择的部分敲除的 ind 等位基因和/或完全敲除的 ind 等位基因(对于部分敲除的 ind 等位基因如以上所述,并且对于完全敲除的 ind 等位基因如 W009/068313(要求欧洲专利申请 EP 07023052 的优先权)中所述),

[0215] (b) 如以上所述,将包括一个或多个选择的部分敲除的 ind 等位基因和/或完全敲除的 ind 等位基因的一个第一植物与包括一个或多个其他选择的部分敲除的 ind 等位基因和/或完全敲除的 ind 等位基因的一个第二植物进行杂交,从这些杂交物中收集 F1 种子,并且任选地鉴定包括来自该第一植物的一个或多个选择的部分敲除的 ind 等位基因和/或完全敲除的 ind 等位基因与来自该第二植物的一个或多个选择的部分敲除的 ind 等位基因和/或完全敲除的 ind 等位基因的一个 F1 植物,

[0216] (c) 可任选地,重复步骤 (b) 直到获得包括所有选择的部分敲除的 ind 等位基因和/或完全敲除的 ind 等位基因的一个 F1 植物,

[0217] (d) 可任选地,

[0218] - 通过确定这些突变体 IND 等位基因的接合性状态鉴定一个 F1 植物,该 F1 植物对于一个选择的部分敲除的 ind 等位基因和/或完全敲除的 ind 等位基因是纯合的或杂合的(对于部分敲除的 ind 等位基因如以上所述,并且对于完全敲除的 ind 等位基因如 W009/068313(要求欧洲专利申请 EP07023052 的优先权)中所述),或

[0219] - 通过执行以下步骤中的一项,生成对于一个或多个选择的部分敲除的 ind 等位基因和/或完全敲除的 ind 等位基因是纯合的植物:

[0220] - 如以上所述,从包括该一个或多个选择的部分敲除的 ind 等位基因和/或完全敲除的 ind 等位基因的 F1 植物的处理过的小孢子或花粉细胞中提取双单倍体植物,

[0221] - 如以上所述,将包括该一个或多个选择的部分敲除的 ind 等位基因和/或完全敲除的 ind 等位基因的 F1 植物自交一个或多个世代 (y),从这些自交物中收集 F1Sy 种子,并且鉴定这些 F1Sy 植物,这些 F1Sy 植物对于该一个或多个部分敲除的 ind 等位基因和/或完全敲除的 ind 等位基因是纯合的。

[0222] 可以例如通过以下各项将部分敲除的 ind 等位基因和/或完全敲除的 ind 等位基因从一个裂开性种子植物转移到另一个裂开性种子植物中:

[0223] (a) 如以上所述,生成和/或鉴定包括一个或多个所选择的部分敲除的 ind 等位基因和/或完全敲除的 ind 等位基因的一个第一植物,或如以上所述(其中该第一植物对

于该一个或多个部分敲除的 ind 等位基因和 / 或完全敲除的 ind 等位基因是纯合的或杂合的), 通过将一个或多个选择的部分敲除的 ind 等位基因和 / 或完全敲除的 ind 等位基因结合入一株植物中来生成该第一植物,

[0224] (b) 将包括该一个或多个部分敲除的 ind 等位基因和 / 或完全敲除的 ind 等位基因的该第一植物与不包括该一个或多个部分敲除的 ind 等位基因和 / 或完全敲除的 ind 等位基因的一个第二植物进行杂交, 从该杂交物中收集 F1 种子 (其中如果该第一植物对于该部分敲除的 ind 等位基因和 / 或完全敲除的 ind 等位基因是纯合的, 这些种子对于一个部分敲除的 ind 等位基因和 / 或完全敲除的 ind 等位基因是杂合的, 并且其中如果该第一植物对于该部分敲除的 ind 等位基因和 / 或完全敲除的 ind 等位基因是杂合的, 对于一个部分敲除的 ind 等位基因和 / 或完全敲除的 ind 等位基因, 一半种子是杂合的并且一半种子是不成对的 (即不包括)), 并且如以上所述任选地鉴定包括一个或多个选择的部分敲除的 ind 等位基因和 / 或完全敲除的 ind 等位基因的一个 F1 植物,

[0225] (c) 将包括一个或多个选择的部分敲除的 ind 等位基因和 / 或完全敲除的 ind 等位基因的 F1 植物与不包括该一个或多个选择的部分敲除的 ind 等位基因和 / 或完全敲除的 ind 等位基因的该第二植物回交一个或多个世代 (x), 从这些杂交物中收集 BCx 种子, 并且如以上所述在每个世代中鉴定包括该一个或多个选择的部分敲除的 ind 等位基因和 / 或完全敲除的 ind 等位基因的 BCx 植物,

[0226] (d) 可任选地, 通过执行以下步骤中的一项生成对于该一个或多个选择的部分敲除的 ind 等位基因和 / 或完全敲除的 ind 等位基因是纯合的 BCx 植物:

[0227] - 如以上所述, 从包括该一个或多个所希望的部分敲除的 ind 等位基因和 / 或完全敲除的 ind 等位基因的 BCx 植物的处理过的小孢子或花粉细胞中提取双单倍体植物,

[0228] - 如以上所述, 将包括该一个或多个所希望的部分敲除的 ind 等位基因和 / 或完全敲除的 ind 等位基因的 BCx 植物自交一个或多个世代 (y), 从这些自交物中收集 BCx Sy 种子, 并且鉴定这些 BCx Sy 植物, 这些 BCxSy 植物对于该一个或多个所希望的部分敲除的 ind 等位基因和 / 或完全敲除的 ind 等位基因是纯合的。

[0229] 该第一和第二裂开性种子植物可以是十字花科植物、特别是芸薹属植物、尤其是欧洲油菜植物或来自另一个芸薹属作物种属的植物。可替代地, 该第一植物可以是一个十字花科植物、特别是一个芸薹属植物、尤其是一个欧洲油菜植物或来自另一个芸薹属作物种属的一株植物, 并且该第二植物可以是来自一个十字花科培育品系、特别是来自一个芸薹属培育品系、尤其是来自一个欧洲油菜培育品系或来自另一个芸薹属作物种属的一个培育品系的一株植物。如在此使用的“育种品系”优选是通过一个优选的基因型和 / 或表型而区别于其他植物品系的一个纯合的植物品系, 使用该选的基因型和 / 或表型产生杂交后代。

[0230] 序列

[0231] SEQ ID NO :1 :IND-A1 基因的编码 DNA, 该基因编码来自欧洲油菜的一个野生型 IND-A1 蛋白。

[0232] SEQ ID NO :2 :由 SEQ ID NO :1 编码的野生型 IND-A1 蛋白。

[0233] SEQ ID NO :3 :IND-C1 基因的编码 DNA, 该基因编码来自欧洲油菜的一个野生型 IND-C1 蛋白。

- [0234] SEQ ID NO :4 :由 SEQ ID NO :3 编码的野生型 IND-C1 蛋白。
- [0235] SEQ ID NO :5 :IND-A1 基因的基因组 DNA,该基因编码来自欧洲油菜的一个野生型 IND-A1 蛋白。
- [0236] SEQ ID NO :6 :由 SEQ ID NO :5 编码的野生型 IND-A1 蛋白。
- [0237] SEQ ID NO :7 :IND-C1 基因的基因组 DNA,该基因编码来自欧洲油菜的一个野生型 IND-C1 蛋白。
- [0238] SEQ ID NO :8 :由 SEQ ID NO :7 编码的野生型 IND-C1 蛋白。
- [0239] SEQ ID NO :9 :拟南芥属 IND1 基因的编码 DNA。
- [0240] SEQ ID NO :10 :由 SEQ ID NO :9 编码的拟南芥属 IND1 蛋白。
- [0241] SEQ ID NO :11 :用于检测 IND-A1-EMS06 和 IND-A1-WT 的寡核苷酸
- [0242] SEQ ID NO :12 :用于检测 IND-A1-EMS06 的寡核苷酸
- [0243] SEQ ID NO :13 :用于检测 IND-A1-WT 的寡核苷酸
- [0244] SEQ ID NO :14 :用于检测 IND-A1-EMS09 和 IND-A1-WT 的寡核苷酸
- [0245] SEQ ID NO :15 :用于检测 IND-A1-EMS09 的寡核苷酸
- [0246] SEQ ID NO :16 :用于检测 IND-A1-WT 的寡核苷酸
- [0247] SEQ ID NO :17 :用于检测 IND-A1-EMS13 和 IND-A1-WT 的寡核苷酸
- [0248] SEQ ID NO :18 :用于检测 IND-A1-EMS13 的寡核苷酸
- [0249] SEQ ID NO :19 :用于检测 IND-A1-WT 的寡核苷酸
- [0250] SEQ ID NO :20 :用于检测 IND-C1-EMS04 和 IND-C1-WT 的寡核苷酸
- [0251] SEQ ID NO :21 :用于检测 IND-C1-EMS04 的寡核苷酸
- [0252] SEQ ID NO :22 :用于检测 IND-C1-WT 的寡核苷酸
- [0253] SEQ ID NO :23 :用于检测 IND-C1-EMS08 和 IND-C1-WT 的寡核苷酸
- [0254] SEQ ID NO :24 :用于检测 IND-C1-EMS08 的寡核苷酸
- [0255] SEQ ID NO :25 :用于检测 IND-C1-WT 的寡核苷酸
- [0256] SEQ ID NO :26 :用于检测 IND-C1-EMS09 和 IND-C1-WT 的寡核苷酸
- [0257] SEQ ID NO :27 :用于检测 IND-C1-EMS09 的寡核苷酸
- [0258] SEQ ID NO :28 :用于检测 IND-C1-WT 的寡核苷酸
- [0259] 除非在实例中另外说明,所有重组 DNA 技术是按照如 Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning :A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, in Volumes 1 and 2 of Ausubel et al. (1994) Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols, USA and in Volumes I and II of Brown (1998) Molecular Biology LabFax, Second Edition, Academic Press (UK)* 中所描述的标准分子生物学技术来实现的。用于植物分子工作的标准材料和方法描述于 *Plant Molecular Biology Labfax (1993) by R. D. D. Croy, jointly published by BIOS Scientific Publications Ltd (UK) and Blackwell Scientific Publications, UK* 中。用于聚合酶链式反应的标准材料和方法可以在 *Dieffenbach and Dveksler (1995) PCR Primer : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press* 中,以及在 *McPherson et al. (2000) PCR-Basics :From Background to Bench, First Edition, Springer Verlag, Germany* 中找到。用于 AFLP 分析的标准程序描述于 Vos 等人 (1995, NAR 23 :4407-4414) 中

以及公开的 EP 专利申请 EP 534858 中。

[0260] 实例

[0261] 实例 1- 部分敲除的突变体 IND 等位基因 (ind) 的生成和分离

[0262] 如下生成并且鉴定序列表中 SEQ IN NO :1 或 3 以及 5 或 7 中所述的 IND 基因中的多个突变：

[0263] - 将来自一个原种春油菜籽油菜育种品系 (M0 种子) 的 30,000 粒种子在湿滤纸上在去离子水或者蒸馏水中预先吸收水分两小时。将这些种子的一半暴露于 0.8% EMS 中并且将另一半暴露于 1% EMS (Sigma :M0880) 中并且孵化 4 小时。

[0264] - 将这些诱变的种子 (M1 种子) 冲洗 3 次并且在一个通风橱中干燥过夜。将 30,000 个 M1 植物生长于土壤中并且进行自交从而生成 M2 种子。对于每个单独的 M1 植物收获 M2 种子。

[0265] - 将从不同的 M1 植物得到的两倍的 4800 个 M2 植物进行生长并且根据 CTAB 方法 (Doyle and Doyle, 1987, Phytochemistry Bulletin 19 :11-15) 从每个单独的 M2 植物的叶子样品进行 DNA 样品制备。

[0266] - 通过使用标准测序技术 (Agowa) 直接测序并且使用 NovoSNP 软件 (VIB Antwerp) 分析这些序列检测点突变的存在, 对这些 DNA 样品进行筛选检测这些 IND 基因中点突变的存在, 这些点突变是由于取代了这些 IND 蛋白中的氨基酸, 具体地这些 IND 蛋白的 bHLH 结构域中的氨基酸所引起的。

[0267] - 因此鉴定了以上表 3a 以及 b 中所指示的部分敲除的突变体 IND 等位基因 (ind)。

[0268] 总之, 以上的实例显示了部分敲除的突变体 IND 等位基因可以如何被生成并且分离。并且, 如以下实例中所述, 可以使用包括这类突变体等位基因的植物材料来将选定的突变体 IND 等位基因结合入一株植物中。

[0269] 实例 2- 包括一个部分敲除的突变体芸薹属 IND 等位基因的一种芸薹属植物的鉴定

[0270] 如下鉴定实例 1 中所鉴定的 IND 基因中包括多个突变的芸薹属植物：

[0271] - 对于在一个 M2 植物的 DNA 样品中所鉴定的每个突变体 IND 基因, 将从与包括该 IND 突变 M2 植物相同的 M1 植物得到的至少 50 株 M2 植物进行生长并且从每个单独的 M2 植物的叶子样品进行 DNA 样品制备。

[0272] - 如以上实例 1 中所述, 对这些 DNA 样品进行筛选检测所鉴定的 IND 点突变的存在。

[0273] - 将包括相同突变的杂合的以及纯合的 (基于电泳图进行确定) M2 植物进行自交并且收获 M3 种子。

[0274] 实例 3- 包括一个部分敲除的突变体芸薹属 IND 基因和 / 或完全敲除的突变体芸薹属 IND 基因的芸薹属植物的果实开裂特性的分析

[0275] 为了确定芸薹属植物中部分敲除的突变体 IND 基因和 / 或完全敲除的突变体 IND 基因的存在与这些芸薹属植物的果实开裂特性之间的相关性, 如下述在温室中以及在大田中对单独地以纯合体形式包括一个部分敲除的突变体 IND 基因或者以纯合体形式包括一个部分敲除的突变体 IND 基因和一个完全敲除的突变体 IND 基因两者的欧洲油菜植物的果实开裂特性进行分析并且与如 W009/068313 (要求欧洲专利申请 EP 07023052 的优先权) 中

所述的包括 2 至 4 个完全敲除的 ind 油菜籽油菜等位基因的欧洲油菜植物的果实开裂特性进行比较。

[0276] - 为了检查瓣边缘和种子荚果开裂特性是否以及如何受部分敲除的突变体 IND 基因和 / 或完全敲除的突变体 IND 基因的存在的影响, 使用如下宏观试验将 ind 果实与野生型果实进行比较。

[0277] (a) 用肉眼从总体上检查种子荚果和植物以确定由不同的部分敲除的突变体 IND 基因和 / 或完全敲除的突变体 IND 基因的存在所引起的这些荚果和植物的表型上的差异。确定这些荚果的表型: 当荚果完全生长并且被填满时, 正好在黄化之前, 在两个瓣不再接触 (在荚果的远端) 的区域上对 5 个随机的荚果 (来自不同的植物, 如果一个品系多株植物可供使用) 的描绘瓣以及喙的区域的锐度进行评估并且给予一个从 0 至 10 或者从 1 至 5 的分数。对应地, 0 或 1 表示一个清晰的凹陷以及分隔瓣和喙的非常尖锐的区域; 对应地, 1 至 3 或 2 表示一些凹陷以及尽管更模糊, 但将瓣从喙中分隔出来的清晰的区域; 对应地, 4 至 6 或 3 表示仍然可以当做两个不同的组织被很好地观察到瓣和喙, 但是它们之间有一个非常平滑的过渡; 对应地, 7 至 9 或 4 表示几乎不能当做两个不同的组织被观察到瓣和喙; 对应地, 10 或 5 表示瓣和喙之间一个完全地平滑的过渡, 两种组织类型之间没有任何清晰的区别, 即在那些荚果的远端处瓣和喙之间的凹陷越小, 分数越高。对应地, 分数 0 或 1 (瓣和喙之间急剧的凹陷) 相应于这些荚果的野生型表型, 更确切地说是这些荚果的一种荚果落粒敏感型表型; 对应地, 分数 1 至 9 或 2 至 4 (瓣和喙之间更平缓的过渡) 相应于这些荚果的一种荚果抗落粒性表型, 其中种子落粒被显著地减少或延迟, 而这些荚果的一种农艺学相关的脱粒能力被维持, 从而这些荚果仍然可以通过施加有限的物理力沿着开裂区被打开; 并且对应地, 分数 10 或 5 (瓣和喙之间没有凹陷) 相应于这些荚果的一种荚果抗落粒性表型, 其中种子落粒被减少或延迟到一个不再允许这些荚果的一种农艺学相关的脱粒能力的程度, 从而这些荚果不能通过施加有限的物理力沿着开裂区被打开。

[0278] (b) 用于确定由不同的部分敲除的突变体 IND 基因和 / 或完全敲除的突变体 IND 基因的存在所引起的荚果抗落粒性增加的手动冲击试验 (MIT)。在这些荚果上通过手动施加扭力通过确定打开封闭的成熟的荚果所需要的物理力以半定量的方式将以单独地纯合体形态包括一个部分敲除的突变体 IND 基因或者以纯合体形态包括一个部分敲除的突变体 IND 基因和一个完全敲除的突变体 IND 基因两者的欧洲油菜品系的荚果抗落粒性的水平与包括相应的野生型 IND 等位基因的芸薹属品系的荚果抗落粒性的水平进行比较。这些荚果的荚果抗落粒性根据这个物理力被给予一个从 1 至 5 的分数: 1 表示在最轻微的扭力下沿开裂区完全打开的荚果, 2 至 4 表示仅在开裂区的底部打开并且需要更强的扭力来完全打开的荚果, 并且 5 表示只能被压碎并且沿开裂区不能打开的荚果。

[0279] (c) 用于确定由不同的部分敲除的突变体 IND 基因和 / 或完全敲除的突变体 IND 基因的存在所引起的荚果抗落粒性增加的随机冲击试验 (RIT)。根据 Bruce et al. (2002, 上述) 所述通过确定来自两个品系的荚果样品的半衰期以定量的方式将以纯合体形态单独地包括一个部分敲除的突变体 IND 基因或者以纯合体形态包括一个部分敲除的突变体 IND 基因和一个完全敲除的突变体 IND 基因两者的欧洲油菜品系的荚果抗落粒性的水平与包括相应的野生型 IND 等位基因的芸薹属品系的荚果抗落粒性的水平进行比较。更确切地说, 将来自各品系的 20 个完整的成熟的荚果的两个重复样品进行一个 RIT。将 20 个荚果和

12.5mm 直径的六个钢球一起置于一个轴线垂直的直径 20cm 的圆柱形容器中。然后将该容器进行频率为 4.98Hz 的简谐运动以及水平面上冲程 51mm 的简谐运动。将这些荚果（测试前检查过坚固性）进行震动持续累积时间为 10、20、40 以及 80 秒（如果多于 50% 的荚果仍然完整）。每个周期之后将滚筒打开并且对封闭的荚果的数量进行计数。如果两个瓣的开裂区仍然是封闭的，对这些荚果进行检查并且归类为“封闭的”。因此，如果这些瓣的一个或两个是分离的，将这些荚果归类为“打开的”，从而将种子释放。如果这些荚果的大多数被破碎或者损坏但是没有打开开裂区，该样品被标记为“不可数的”（在表 5b 中用 \* 标示）。为了给每个点相等的权重，通过加 1 和取  $\log_{10}$  将数据均匀间隔于独立变量、时间中。打开的荚果的百分比  $p$  通过对数转换进行转换，即  $\text{logit } p = \log_e(p/100-p)$ 。然后对转换的时间以及百分比数据拟合一个线性的模型并且使用它来估计该半衰期。

[0280] (d) 用于确定植物中荚果抗落粒性、脱粒能力以及产量与某些突变体 IND 等位基因的存在之间的关系的大田试验。以半定量的方式通过确定并且比较种子落粒 (SHAT) 的水平、联合收割机收获能力 (CHA1) 以及脱粒能力 (CHA2) 以及以定量的方式通过确定并且比较联合收割后每块地的种子产量 (YLDP) 以及种植 ind 植物的地块与种植野生型植物的地块之间的大田中秸秆脱粒后的种子产量 (YLDS)，将包括突变体 IND 等位基因的芸薹属品系的荚果抗落粒性的水平、脱粒能力以及产量与包括相应的野生型 IND 等位基因的芸薹属品系的荚果抗落粒性的水平、落粒能力以及产量进行比较。这些地块被给予一个 1 至 9 的分数用于表示收获之前这块地上种子落粒的水平：从分数 1（表示实际上这块地上的所有植物在收获前都落粒）到分数 9（表示实际上这块地上没有植物在收获前落粒）。这些地块被给予一个 1 至 5 的分数用于表示这块地上联合收割机收获能力的水平：分数 1、到 3 或者到 5 对应地用于表示用联合收割机收获这块地是困难的、到可行的、或者到容易的。这些地块被给予一个 1 至 5 的分数用于表示这块地的脱粒能力的水平分数 1、到 3 或者到 5 对应地表示在联合收割机收获后手工收获秸秆中剩余的种子是困难的、到可行的、或者到容易的。通过用联合收割机收获每块地的种子并且将这些种子称重来确定联合收割后每块地的种子产量 (YLDP；用每块地克数表达)，并且通过手工收获用联合收割机收获种子后在秸秆中剩余的种子来确定秸秆脱粒后的种子产量 (YLDS；用秸秆的重量%表达)。

[0281] - 为了更严密地检查种子荚果的瓣边缘处的细胞是否以及如何受部分敲除的突变体 IND 基因和 / 或完全敲除的突变体 IND 基因存在的影响，通过微观评估种子荚果将 ind 果实的切片与野生型果实的切片进行比较：

[0282] - 外植体：从生长在温室中的植物（每个基因型三个荚果）收获从相似发育阶段（在开花后大约 35 天 (DAA)，一个发育阶段，该发育阶段紧密地相应于可见的果皮黄化的发生）以及相似大小的荚果的中心以及远端取得的大约 3mm 的外植体。从荚果上切开开裂区。

[0283] - 固定：在含有 10% 福尔马林和 0.25% 戊二醛，pH7 的 100mM 磷酸钾缓冲液中持续共 4 小时进行固定。1 和 2 小时后进行真空渗入持续 15 分钟。每次真空渗入后将固定剂进行更新。

[0284] - 脱水：用 100mM 磷酸钾缓冲液 pH7 将该样品冲洗 2 次每次 30 分钟。用工业乙醇（用 0.85% NaCl 水溶液稀释进行稀释）进行脱水：室温下 50% 乙醇中 60 分钟，70% 乙醇中 90 分钟，80% 乙醇中 90 分钟，90% 乙醇中 90 分钟，95% 乙醇中 90 分钟，100% 乙醇中 90 分钟

[0285] - 包埋：使用 Leica 7022-31731Historesin 或者 Kulzer Histo-Technik7100(Heraeus) 包埋试剂盒进行包埋,这些试剂盒是三种组分树脂(一种碱性树脂,一种活化剂以及一种硬化剂)试剂盒。如下以生产厂家所建议的比例使用这三种组分:将样品在 50%乙醇/50%碱性树脂中孵化 4 小时,在 30%乙醇/70%碱性树脂中过夜(任选:4°C),在 100%碱性树脂中 2 至 4 小时,更新碱性树脂后在 100%碱性树脂中一天并且真空渗入 20 分钟(任选:4°C)后,在渗透介质中真空渗入 20 分钟后在碱性树脂+活化剂(1%)(“渗透介质”)中持续一天。用碱性树脂+活化剂(1%)+硬化剂(1ml,15ml 中)(“包埋介质”)洗涤样品。在平的包埋模子(具有大约 300  $\mu$ l 腔体的 AGAR 平的包埋模子 G3531:14mm 长  $\times$  6mm 宽  $\times$  4mm 深)中进行包埋加入 100 至 125  $\mu$ l 包埋介质/腔体,将包埋介质在 55°C 下聚合大约一小时,将组织置于该聚合的包埋介质上(1 个外植体/腔体),用包埋介质装满这些腔体,将包埋介质在 55°C 下聚合 3 至 5 小时,将模子冷却下来,从模子中取出塑胶块并且在室温下保存在密封的容器(例如 eppendorf 管)中。

[0286] - 切片:将这些塑胶块用其平的侧面粘在一个 1cm<sup>3</sup> 的 perpex 块上并且环绕该样品进行方方正正地裁剪。在切片机上用 ralph 玻璃刀(在 Reichert-Jung 的组织制刀机的 -1 位置上用 6mm 厚的玻璃棒在大约 6 的切角下进行制备)切成 4  $\mu$ m 切片(每个基因型 3 至 4 个外植体,每个外植体大约 25 个切片)。将这些切片附连在玻璃载玻片上,这些载玻片已用 Vectabond(Vector 实验室)处理过。

[0287] - 木质素的证明:使用装备有荧光(带有 Zeiss 滤片组 02)的显微镜检查固定在 Eukitt 中的未染色的切片。木质素发清晰的浅蓝色荧光。

[0288] - 组织学评估:通过使用 DIC-Normaski 或者自身荧光(带有 Zeiss 滤片组 18- 激发 BP390-420;发射 LP450)可以看见未染色的切片。

[0289] 植物材料:

[0290] 一种植物品系的子代,包括 IND-A1 基因中一个完全敲除的突变(表示为 ind-a1<sup>F</sup>),特别地是 W009/068313(要求欧洲专利申请 EP 07023052 的优先权)中所述的 ind-a1-EMS01 等位基因(在表 5 中表示为 ind-a1-01),以及 IND-C1 基因中一个部分敲除的突变(表示为 ind-c1<sup>P</sup>),特别地是表 3b 中所表示的 ind-c1-EMS04、ind-c1-EMS08 以及 ind-c1-EMS09 等位基因(在表 5 中表示为 ind-c1-04、ind-c1-08 以及 ind-c1-09),具有基因型 ind-a1<sup>F</sup>/ind-a1<sup>F</sup>、ind-c1<sup>P</sup>/ind-c1<sup>P</sup>(即纯合的双突变体植物),IND-A1/IND-A1、ind-c1<sup>P</sup>/ind-c1<sup>P</sup>(即纯合的单突变体植物),以及 IND-A1/IND-A1、IND-C1/IND-C1(即野生型植物)。

[0291] 一种植物品系的子代,包括 IND-A1 基因中一个部分敲除的突变(表示为 ind-a1<sup>P</sup>),特别地是表 3a 中所表示的 ind-a1-EMS06、ind-a1-EMS09 以及 ind-a1-EMS13 等位基因(在表 5 中表示为 ind-a1-06、ind-a1-09 以及 ind-a1-13),以及 IND-C1 基因中一个完全敲除的突变(表示为 ind-c1<sup>F</sup>),特别地是 W009/068313(要求欧洲专利申请 EP 07023052 的优先权)中所述的 ind-c1-EMS01 等位基因以及 ind-c1-EMS03 等位基因(在表 5 中表示为 ind-c1-01 以及 ind-c1-03),具有基因型 ind-a1<sup>P</sup>/ind-a1<sup>P</sup>、ind-c1<sup>F</sup>/ind-c1<sup>F</sup>(即纯合的双突变体植物),IND-A1/IND-A1、ind-c1<sup>F</sup>/ind-c1<sup>F</sup>(即纯合的单突变体植物),以及 IND-A1/IND-A1、IND-C1/IND-C1(即野生型植物)。

[0292] 宏观评估:

[0293] a) 用肉眼检查种子荚果和植物。

[0294] - 来自具有基因型  $\text{ind-a1}^{\text{F}}/\text{ind-a1}^{\text{F}}$ 、 $\text{ind-c1}^{\text{P}}/\text{ind-c1}^{\text{P}}$  或者  $\text{ind-a1}^{\text{P}}/\text{ind-a1}^{\text{P}}$ 、 $\text{ind-c1}^{\text{F}}/\text{ind-c1}^{\text{F}}$  的纯合的双突变体 IND 亲缘性植物的荚果表现出一种类似于来自某些植物的荚果的表型, 这些植物包括 W009/068313 (要求欧洲专利申请 EP 07023052 的优先权) 中所述的处于纯合态的一个完全敲除的 ind 等位基因以及处于杂合态的一个完全敲除的 ind 等位基因 (基因型为:  $\text{ind-a1}^{\text{F}}/\text{ind-a1}^{\text{F}}$ 、 $\text{IND-C1}/\text{ind-c1}^{\text{F}}$  或者  $\text{IND-A1}/\text{ind-a1}^{\text{F}}$ 、 $\text{ind-c1}^{\text{F}}/\text{ind-c1}^{\text{F}}$ , 其中  $\text{ind-a1}^{\text{F}}$  是一个完全敲除的 ind-a1 等位基因, 特别地是 W009/068313 (要求欧洲专利申请 EP 07023052 的优先权) 中所述的 ind-a1-EMS01 或者 ind-a1-EMS05 等位基因, 并且其中  $\text{ind-c1}^{\text{F}}$  是一个完全敲除的 ind-c1 等位基因, 特别地是 W009/068313 (要求欧洲专利申请 EP 07023052 的优先权) 中所述的 ind-c1-EMS01 或者 ind-c1-EMS03 等位基因。更确切地说, 总体上这些突变体 IND 亲缘性植物的荚果的瓣边缘比在 W009/068313 (要求欧洲专利申请 EP 07023052 的优先权) 中所述的纯合的双完全敲除的突变体 IND 亲缘性植物中更轮廓分明 (与来自野生型 IND 亲缘性植物的荚果相比, 后者表现出合适的瓣边缘轮廓的缺失, 在果实的近端和远端这两端特别明显), 但是在野生型亲缘性植物中这些荚果的远端处瓣与喙之间急剧的凹陷在这些突变体植物中仍然像在这些纯合的双完全敲除的 ind 亲缘性植物中一样是大量地缺少的, 后者也表现出瓣和喙组织之间一个更平缓的过渡 (也参见表 5a 中对温室生长的植物以及表 5b 中对大田生长的植物的视觉评分)。

[0295] - 来自纯合的单突变体 IND 亲缘性植物的荚果 (基因型:  $\text{IND-A1}/\text{IND-A1}$ 、 $\text{ind-c1}^{\text{P}}/\text{ind-c1}^{\text{P}}$  或者  $\text{ind-a1}^{\text{P}}/\text{ind-a1}^{\text{P}}$ 、 $\text{IND-C1}/\text{IND-C1}$ ) 表现出与来自野生型 IND 亲缘性植物的荚果相似的一种荚果形态, 除了来自具有基因型  $\text{IND-A1-EMS01}/\text{IND-A1-EMS01}$ 、 $\text{ind-c1-EMS09}/\text{ind-c1-EMS09}$  的纯合的单突变体 IND 亲缘性植物的荚果, 它们表现出与来自具有基因型  $\text{ind-a1}^{\text{F}}/\text{ind-a1}^{\text{F}}$ 、 $\text{ind-c1}^{\text{P}}/\text{ind-c1}^{\text{P}}$  或者  $\text{ind-a1}^{\text{P}}/\text{ind-a1}^{\text{P}}$ 、 $\text{ind-c1}^{\text{F}}/\text{ind-c1}^{\text{F}}$  的纯合的双突变体 IND 亲缘性植物的荚果相似的一种改变的荚果形态 (也参见表 5a 中对温室生长的植见, 以及表 5b 中对大田生长的植物的视觉评分)。进一步观察到植物 (基因型:  $\text{IND-A1}/\text{IND-A1}$ 、 $\text{IND-C1}/\text{ind-c1-EMS09}$ ) 中处于杂合态的 ind-c1-EMS09 等位基因的存在足以引起与来自具有基因型  $\text{ind-a1}^{\text{F}}/\text{ind-a1}^{\text{F}}$ 、 $\text{ind-c1}^{\text{P}}/\text{ind-c1}^{\text{P}}$  或者  $\text{ind-a1}^{\text{P}}/\text{ind-a1}^{\text{P}}$ 、 $\text{ind-c1}^{\text{F}}/\text{ind-c1}^{\text{F}}$  的纯合的双突变体 IND 亲缘性植物的荚果相似的一种改变的荚果形态。据认为包括碱性 DNA 结合域的一个保守氨基酸中的一个取代突变的 ind-c1-EMS09 等位基因可以产生一个显性阴性 IND 蛋白, 该蛋白仍然能够形成二聚物, 但是不能结合到该一个或多个调节基因的 bHLH 结合位点上。

[0296] b) 随机冲击试验:

[0297] - 表 5 显示了总体上来自包括处于纯合态的一个完全敲除的 ind-c1 等位基因以及处于纯合态的一个部分敲除的 ind-a1 等位基因的植物的荚果的 LD50 值大于来自包括处于纯合态的一个完全敲除的 ind-a1 等位基因以及处于纯合态的一个部分敲除的 ind-c1 等位基因的植物的荚果的 LD50 值, 表明 IND-C1 等位基因中的突变可能比 IND-A1 等位基因中的突变在荚果抗落粒性方面具有更强的影响。

[0298] 表 5a

[0299]

基因型	视觉荚果评分 (0 至 10)	LD50 (秒)	修正过的 低于 95%	修正过的 高于 95%
<i>IND-A1-06/IND-A1-06、IND-C1-01/IND-C1-01</i>	0	8.06	3.1	1.78
<i>ind-a1-06/ind-a1-06、IND-C1-01/IND-C1-01</i>	0	9.05	2.83	2.15
<i>ind-a1-06/ind-a1-06、ind-c1-01/ind-c1-01</i>	7	26.31	4.83	7.64
<i>IND-A1-06/IND-A1-06、IND-C1-03/IND-C1-03</i>	0	8.86	*	*
<i>ind-a1-06/ind-a1-06、IND-C1-03/IND-C1-03</i>	0	5.74	4.2	2.06
<i>ind-a1-06/ind-a1-06、ind-c1-03/ind-c1-03</i>	7	29.38	3.8	5.18
<i>IND-A1-09/IND-A1-09、IND-C1-01/IND-C1-01</i>	0	9.36	2.6	1.7
<i>ind-a1-09/ind-a1-09、IND-C1-01/IND-C1-01</i>	1	9.05	2.83	2.15

[0300]

<i>IND-C1-01</i> <i>ind-a1-09/ind-a1-09、ind-c1-01/</i> <i>ind-c1-01</i>	8	52.03	8.96	14.03
<i>IND-A1-09/IND-A1-09、IND-C1-03/</i> <i>IND-C1-03</i>	0	8.44	2.74	2.26
<i>ind-a1-09/ind-a1-09、IND-C1-03/</i> <i>IND-C1-03</i>	0	9.05	2.83	2.15
<i>ind-a1-09/ind-a1-09、ind-c1-03/</i> <i>ind-c1-03</i>	8.5	85.57	23.34	64.64
<i>IND-A1-13/IND-A1-13、IND-C1-01/</i> <i>IND-C1-01</i>	3	12.91	2.4	2.46
<i>ind-a1-13/ind-a1-13、IND-C1-01/</i> <i>IND-C1-01</i>	2	14.2	2.2	2.59
<i>ind-a1-13/ind-a1-13、ind-c1-01/</i> <i>ind-c1-01</i>	7	61.21	9.6	15.18
<i>IND-A1-13/IND-A1-13、IND-C1-03/</i> <i>IND-C1-03</i>	0	8.86	*	*
<i>ind-a1-13/ind-a1-13、IND-C1-03/</i> <i>IND-C1-03</i>	0	7.74	3.98	1.54
<i>ind-a1-13/ind-a1-13、ind-c1-03/</i> <i>ind-c1-03</i>	9	56.68	8.9	13.6
<i>IND-A1-01/IND-A1-01、IND-C1-04/</i> <i>IND-C1-04</i>	0	7.89	2.88	2
<i>IND-A1-01/IND-A1-01、ind-c1-04/</i> <i>ind-c1-04</i>	0	10.91	2.5	2
<i>ind-a1-01/ind-a1-01、ind-c1-04/</i> <i>ind-c1-04</i>	9	37.8	5.77	8.4
<i>IND-A1-01/IND-A1-01、IND-C1-08/</i> <i>IND-C1-08</i>	0	8.94	2.78	2.38
<i>IND-A1-01/IND-A1-01、ind-c1-08/</i> <i>ind-c1-08</i>	0	9.8	2.8	2.1
<i>ind-a1-01/ind-a1-01、ind-c1-08/</i>	8.5	31.81	6.66	10.45

[0301]

<i>ind-c1-08</i>				
<i>IND-A1-01/IND-A1-01、IND-C1-09/ IND-C1-09</i>	<b>0</b>	<b>7.22</b>	<b>3.56</b>	<b>1.82</b>
<i>IND-A1-01/IND-A1-01、ind-c1-09/ ind-c1-09</i>	<b>8.5</b>	<b>46.6</b>	<b>7.82</b>	<b>11.48</b>
<i>ind-a1-01/ind-a1-01、ind-c1-09/ ind-c1-09</i>	<b>9</b>	<b>90.11</b>	<b>*</b>	<b>*</b>

[0302] 表 5b

[0303]

基因型	视觉荚果评分 (1 至 5)	基于打开封闭的成熟的荚果所需要的物理力的评分 (1 至 5)	LD50 (秒)	
			1 号地	2 号地
<i>IND-A1-06/IND-A1-06、 IND-C1-01/IND-C1-01</i>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>9.7</b>	<b>7.2</b>
<i>ind-a1-06/ind-a1-06、IND-C1-01/ IND-C1-01</i>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>6.2</b>	<b>8.3</b>
<i>ind-a1-06/ind-a1-06、ind-c1-01/ ind-c1-01</i>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>17.0</b>	<b>16.6</b>
<i>IND-A1-06/IND-A1-06、 IND-C1-03/IND-C1-03</i>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>6.5</b>	<b>6.6</b>
<i>ind-a1-06/ind-a1-06、IND-C1-03/ IND-C1-03</i>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>7.4</b>	<b>5.3</b>
<i>ind-a1-06/ind-a1-06、ind-c1-03/ ind-c1-03</i>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>15.3</b>	<b>12.4</b>
<i>IND-A1-09/IND-A1-09、 IND-C1-01/IND-C1-01</i>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>7.5</b>	<b>6.9</b>
<i>ind-a1-09/ind-a1-09、IND-C1-01/ IND-C1-01</i>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>5.4</b>	<b>7.2</b>
<i>ind-a1-09/ind-a1-09、ind-c1-01/ ind-c1-01</i>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>60.1</b>	<b>77.0</b>
<i>IND-A1-09/IND-A1-09、 IND-C1-03/IND-C1-03</i>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>6.6</b>	<b>6.2</b>
<i>ind-a1-09/ind-a1-09、IND-C1-03/ IND-C1-03</i>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>7.7</b>	<b>7.0</b>

[0304]

<i>IND-C1-03</i>				
<i>ind-a1-09/ind-a1-09、ind-c1-03/ind-c1-03</i>	3	4	49.8	63.0
<i>IND-A1-13/IND-A1-13、IND-C1-01/IND-C1-01</i>	1	1	11.7	10.7
<i>ind-a1-13/ind-a1-13、IND-C1-01/IND-C1-01</i>	1	1	10.7	7.9
<i>ind-a1-13/ind-a1-13、ind-c1-01/ind-c1-01</i>	3	3	19.1	22.9
<i>IND-A1-13/IND-A1-13、IND-C1-03/IND-C1-03</i>	1	1	5.4	5.7
<i>ind-a1-13/ind-a1-13、IND-C1-03/IND-C1-03</i>	1	1	9.2	8.3
<i>ind-a1-13/ind-a1-13、ind-c1-03/ind-c1-03</i>	3	3	10.2	38.6
<i>IND-A1-01/IND-A1-01、IND-C1-04/IND-C1-04</i>	1	1	6.5	7.4
<i>IND-A1-01/IND-A1-01、ind-c1-04/ind-c1-04</i>	1	2	9.5	7.2
<i>ind-a1-01/ind-a1-01、ind-c1-04/ind-c1-04</i>	3	5	87.7	126.6
<i>IND-A1-01/IND-A1-01、IND-C1-08/IND-C1-08</i>	1	1	9.7	8.3
<i>IND-A1-01/IND-A1-01、ind-c1-08/ind-c1-08</i>	1	1	4.9	9.0
<i>ind-a1-01/ind-a1-01、ind-c1-08/ind-c1-08</i>	3	3	14.9	23.7
<i>IND-A1-01/IND-A1-01、IND-C1-09/IND-C1-09</i>	1	1	9.1	8.3
<i>IND-A1-01/IND-A1-01、ind-c1-09/ind-c1-09</i>	3	2	7.9	8.3
<i>ind-a1-01/ind-a1-01、ind-c1-09/ind-c1-09</i>	5	5	*	*

[0305] \* :不可数的

[0306] c) 田间试验

[0307] 表 5c 显示了如所示的如上所述对于种植 ind 植物以及野生型植物的田间地块所确定的种子落粒 (SHAT)、联合收割机收获能力 (CHA1)、脱粒能力 (CHA2)、联合收割后每块

地的种子产量 (YLDP) 以及秸秆脱粒后的种子产量 (YLDS) 的水平。YieldWTSe% 值以一个分离群体中野生型分离子的百分比表示 YLDP。

[0308] 表 5c

[0309]

基因型	SHAT (1-9)	CHA1 (1-5)	CHA2 (1-5)	YLDP (每块地 克数)	Yield WTSe g%	YLDS 秸秆的 wt%
<i>IND-A1-06/ IND-A1-06、 IND-C1-01/ IND-C1-01</i>	8.3	5.0	5.0	2263.3	100	0.4
<i>ind-a1-06/ ind-a1-06、 IND-C1-01/ IND-C1-01</i>	8.4	4.6	5.0	2274.9	101	0.3
<i>ind-a1-06/ ind-a1-06、 ind-c1-01/ ind-c1-01</i>	8.7	4.4	4.9	2525.1	112	1.1
<i>IND-A1-06/ IND-A1-06、 IND-C1-03/ IND-C1-03</i>	8.6	4.6	4.9	2102.0	100	0.5
<i>ind-a1-06/ ind-a1-06、 IND-C1-03/ IND-C1-03</i>	8.7	4.8	5.0	2292.7	109	0.4
<i>ind-a1-06/ ind-a1-06、 ind-c1-03/ ind-c1-03</i>	8.8	4.1	4.6	2276.2	108	1.3
<i>IND-A1-09/ IND-A1-09、 IND-C1-01/ IND-C1-01</i>	8.3	5.0	4.9	1964.2	100	0.3
<i>ind-a1-09/ ind-a1-09、 IND-C1-01/ IND-C1-01</i>	8.0	4.7	5.0	1872.0	95	0.4
<i>ind-a1-09/ ind-a1-09、 ind-c1-01/ ind-c1-01</i>	9.0	2.7	3.8	2323.3	118	5.7
<i>IND-A1-09/ IND-A1-09、 IND-C1-03/ IND-C1-03</i>	8.6	4.8	5.0	2168.9	100	0.5
<i>ind-a1-09/ ind-a1-09、</i>	8.3	4.7	5.0	1985.6	92	0.4

[0310]

<i>IND-C1-03/IND-C1-03</i> <i>ind-a1-09/ind-a1-09、ind-c1-03/ind-c1-03</i>	9.0	1.9	3.6	1726.7	80	13.6
<i>IND-A1-13/IND-A1-13、IND-C1-01/IND-C1-01</i> <i>ind-a1-13/ind-a1-13、IND-C1-01/IND-C1-01</i>	8.3	4.8	5.0	1977.1	100	0.4
<i>ind-a1-13/ind-a1-13、IND-C1-01/IND-C1-01</i> <i>ind-a1-13/ind-a1-13、ind-c1-01/ind-c1-01</i>	8.4	4.2	4.9	1929.3	98	0.5
<i>ind-a1-13/ind-a1-13、ind-c1-01/ind-c1-01</i>	8.9	3.6	4.7	2445.6	124	2.0
<i>IND-A1-13/IND-A1-13、IND-C1-03/IND-C1-03</i> <i>ind-a1-13/ind-a1-13、IND-C1-03/IND-C1-03</i>	8.3	4.2	5.0	1885.1	100	0.4
<i>ind-a1-13/ind-a1-13、IND-C1-03/IND-C1-03</i> <i>ind-a1-13/ind-a1-13、ind-c1-03/ind-c1-03</i>	8.3	4.8	5.0	2137.8	113	0.6
<i>ind-a1-13/ind-a1-13、ind-c1-03/ind-c1-03</i>	8.9	2.8	3.9	2120.9	113	4.8
<i>IND-A1-01/IND-A1-01、IND-C1-04/IND-C1-04</i> <i>IND-A1-01/IND-A1-01、ind-c1-04/ind-c1-04</i>	8.8	4.9	4.8	2120.4	100	0.6
<i>IND-A1-01/IND-A1-01、ind-c1-04/ind-c1-04</i> <i>ind-a1-01/ind-a1-01、ind-c1-04/ind-c1-04</i>	8.6	4.8	5.0	2136.4	101	0.6
<i>ind-a1-01/ind-a1-01、ind-c1-04/ind-c1-04</i>	9.0	1.8	2.8	1437.0	68	19.1
<i>IND-A1-01/IND-A1-01、IND-C1-08/IND-C1-08</i> <i>IND-A1-01/IND-A1-01、ind-c1-08/ind-c1-08</i>	8.0	4.8	5.0	2250.4	100	0.6
<i>IND-A1-01/IND-A1-01、ind-c1-08/ind-c1-08</i> <i>ind-a1-01/ind-a1-01、ind-c1-08/ind-c1-08</i>	8.3	4.3	4.9	2131.3	95	0.5
<i>ind-a1-01/ind-a1-01、ind-c1-08/ind-c1-08</i>	8.9	3.0	4.1	2385.1	106	2.5
<i>IND-A1-01/IND-A1-01、IND-C1-09/IND-C1-09</i> <i>IND-A1-01/IND-A1-01、ind-c1-09/ind-c1-09</i>	8.7	4.9	5.0	2080.0	100	0.4
<i>IND-A1-01/IND-A1-01、ind-c1-09/ind-c1-09</i> <i>ind-a1-01/ind-a1-01、ind-c1-09/ind-c1-09</i>	8.7	4.6	4.6	2447.8	118	1.0
<i>ind-a1-01/ind-a1-01、ind-c1-09/ind-c1-09</i>	9.0	1.1	1.8	589.6	28	28.4

[0311] 微观评估:

[0312] - 生长在温室条件下的来自具有基因型  $ind-a1^F/ind-a1^F$ 、 $ind-c1^P/ind-c1^P$  或者  $ind-a1^P/ind-a1^P$ 、 $ind-c1^F/ind-c1^F$  的纯合的双突变体 IND 亲缘性植物的荚果以及来自具有

基因型 IND-A1-EMS01/IND-A1-EMS01、ind-c1-EMS09/ind-c1-EMS09 的纯合的单突变体 IND 亲缘性植物的荚果在其远端表现出遍及全部开裂区的木质化以及属于该开裂区的细胞与邻近的细胞类型的较差的区别,例如维管组织细胞以及通常在内荚果壁处发现的细胞的木质化层(即末端细胞)。在荚果的中心,木质化没有遍及全部开裂区发生,但是这些荚果反而在内荚果壁附连到隔膜处展示出仅仅一些额外的木质化细胞的层。

[0313] - 来自具有基因型 ind-a1-EMS01/ind-aA1-EMS01、ind-c1-EMS09/ind-c1-EMS09 的纯合的双突变体 IND 亲缘性植物的荚果在其远端处以及这些荚果的中心处两者显示了遍及全部开裂区的木质化以及属于开裂区的细胞与邻近的细胞类型较差的区别,例如维管组织细胞以及通常在内荚果壁处发现的细胞的木质化层(即末端细胞)。

[0314] 实例 4- 突变体 IND 基因的检测和 / 或将它们转入(原种)芸薹属品系中

[0315] 通过以下方法将突变体 IND 基因转入(原种)芸薹属培养品系中:将包括一个突变体 IND 基因的一株植物(供体植物)与一株(原种)芸薹属品系(原种亲本 / 轮回亲本)或者缺少该突变体 IND 基因的品种进行杂交。使用如下的渗入方案(突变体 IND 基因被缩写为 ind 而野生型被描述为 IND):

[0316] 初始杂交:ind/ind(供体植物)×IND/IND(原种亲本)

[0317] F1 植物:IND/ind

[0318] BC1 杂交:IND/ind×IND/IND(轮回亲本)

[0319] BC1 植物:50% IND/ind 和 50% IND/IND

[0320] 使用对于突变体 IND 等位基因(ind)的分子标记(例如 AFLP、PCR、Invader™ 等;也参见下文)选择该 50% IND/ind。

[0321] 回交 2 杂交:IND/ind(BC1 植物)×IND/IND(轮回亲本)

[0322] BC2 植物:50% IND/ind 和 50% IND/IND

[0323] 使用对于突变体 IND 等位基因(ind)的分子标记选择该 50% IND/ind。

[0324] 重复回交直到 BC3 至 BC6

[0325] BC3 至 BC6 植物:50% IND/ind 和 50% IND/IND

[0326] 使用对于突变体 IND 等位基因(ind)的分子标记选择该 50% IND/ind。为了减少回交的数量(例如直到 BC3,而不是 BC6),可以使用对原种亲本遗传背景特异性的分子标记。

[0327] BC3 至 BC6S1 杂交:IND/ind×IND/ind

[0328] BC3 至 BC6S1 植物:25% IND/IND 和 50% IND/ind 和 25% ind/ind

[0329] 使用对于突变体 IND 等位基因(ind)的分子标记选择包括 ind 的植物。使用对于突变体以及野生型 IND 等位基因的分子标记选择对于该突变体 IND 等位基因(ind/ind)是纯合的单独的 BC3 至 BC6S1 植物。然后使用这些植物进行种子生产。

[0330] 为了选择一个 IND 等位基因中包括一个点突变的植物,可以使用本领域已知的标准的测序技术进行直接测序(例如实例 1 中所述的那些)。

[0331] 可替代地,可以开发 PCR 测定来将 IND 等位基因中包括一个特异的点突变的植物与不包括该特异的点突变的植物区别开。因此可以开发如下的差别 PCR 测定来检测实例 1 中所鉴定的突变体等位基因的存在或者缺失以及接合性状态(参见表 3a 以及 3b)。

[0332] - 模板 DNA:

[0333] - 从纯合的或者杂合的突变体芸薹属植物（包括一个突变体 IND 等位基因，在下文中被称为“IND-Xx-EMSXX”）的叶子材料中分离的基因组 DNA。

[0334] - 野生型 DNA 对照物：从野生型芸薹属植物（包括突变体 IND 等位基因的野生型等效物，在下文中被称为“IND-Xx-WT”）的叶子材料中分离的基因组 DNA。

[0335] - 阳性 DNA 对照物：从已知包括 IND-Xx-EMSXX 的纯合的突变体芸薹属植物的叶子材料中分离的基因组 DNA。

[0336] - 总体上说，每个引物组包括一个对突变体和野生型目标基因两者特异的引物（例如对于 IND-A1-EMS06 以及 IND-A1-WT 两者特异的引物）以及一个对核苷酸差异特异的引物（例如对于 IND-A1-EMS06 等位基因或者 IND-A1-WT 等位基因其中一项特异的引物）。通常地，后一个引物的最后一个核苷酸与核苷酸差异相配，但是可以增加一个（或者多个）额外的目标特异性核苷酸用于改善该引物与其目标序列之间的退火。

[0337] - PCR 混合物：2.5  $\mu$ l 10x PCR 缓冲液 (15mM MgCl<sub>2</sub>)，0.25  $\mu$ l dNTP's (20mM)，1  $\mu$ l 正向引物 (10  $\mu$ M)，1  $\mu$ l 反向引物 (10  $\mu$ M)，0.25  $\mu$ l Taq 聚合酶 (5U/ $\mu$ l)，19.5  $\mu$ l Milli-Q 水，0.5  $\mu$ l DNA (20-50ng/ $\mu$ l) = 总体积 25  $\mu$ l；

[0338] - 热循环曲线：95°C 4 分钟；30x[95°C 1 分钟（变性）以及退火温度下 1 分钟以及 72°C（伸长）2 分钟]；72°C 5 分钟；冷却到 4°C。通过温度梯度 PCR 可以确定最佳退火温度，其中例如在 MJ Research 热循环仪 PTC-200 (Biozym) 上，该退火温度可以在 57°C 至 70°C 之间变化。对于野生型 IND 特异性引物的最佳退火温度是这样的温度，在该温度下对于来自野生型芸薹属植物的 DNA 样品、并且不是对于来自突变体芸薹属植物的 DNA 样品的可以检测到一个预期大小的清晰的 PCR 片段（如下所述）。对于突变体 IND 特异性引物的最佳退火温度是这样的温度，在该温度下对于来自该突变体芸薹属植物的 DNA 样品、并且不是对于来自该野生型芸薹属植物的 DNA 样品可以检测到一个预期大小的清晰的 PCR 片段（如下所述）。

[0339] - 扩增之后，将 5  $\mu$ l 上样染料（橙色染料）加入 15  $\mu$ l PCR 样品中并且将样品加载到一块 1.5% 琼脂糖凝胶上。

[0340] - 如下对突变体芸薹属植物的基因组 DNA 扩增后得到的带型进行评估：

[0341] - 在一个单独的 PCR 运行以及一个单独的 PCR 混合物中从这些突变体芸薹属植物的叶子材料中分离的 DNA 样品的数据不应当被接受，除非：

[0342] - 对于 IND-Xx-WT 特异性 PCR 测定该野生型 DNA 对照物显示了预期大小的 PCR 片段并且对于 IND-Xx-EMSXX 特异性 PCR 测定不显示预期大小的 PCR 片段。

[0343] - 对于 IND-Xx-EMSXX 特异性 PCR 测定阳性 DNA 对照物显示预期大小的 PCR 片段并且对于 IND-Xx-WT 特异性 PCR 测定不显示预期大小的 PCR 片段。

[0344] - 对于 IND-Xx-WT 特异性 PCR 测定泳道不显示预期大小的 PCR 产物并且对于 IND-Xx-EMSXX 特异性 PCR 测定显示预期大小的 PCR 片段，表明从中制备基因组模板 DNA 的相应的植物对于 IND-Xx-EMSXX 是一个纯合的突变体。

[0345] - 对于 IND-Xx-WT 特异性 PCR 测定以及 IND-Xx-EMSXX 特异性 PCR 测定泳道显示预期大小的 PCR 片段，表明从其中制备基因组模板 DNA 的相应的植物对于 IND-Xx-EMSXX 是一个杂合的突变体。

[0346] - 对于 IND-Xx-WT 特异性 PCR 测定泳道显示预期大小的 PCR 片段并且对于

IND-Xx-EMSXX 特异性 PCR 测定不显示预期大小的 PCR 产物,表明从其中制备基因组模板 DNA 的相应的植物是一个野生型植物。

[0347] 可替代地,可以使用 Invader™ 技术 (Third Wave Agbio) 来将 IND 等位基因中包括一个特异的点突变的植物与不包括该特异的点突变的植物区别开。因此开发了以下的差别 Invader™ 探针来检测实例 4 中所鉴定的突变体等位基因的存在或者缺失以及接合性状态 (参见表 6:

[0348] - 表 6 中指示了对于突变体或者相应的野生型目标 IND 基因特异性 (对应地表示为“5' flap1-x”以及“5' flap2-x”) 探针以及可以与它们结合使用的“入侵”探针。总体上说,每个探针组包括一个对于该突变体或者该野生型目标基因特异性的探针 (所谓的“初级探针”;例如具有 SEQ ID NO:12 的探针对于 IND-A1-EMS06 是特异性的并且具有 SEQ ID NO:13 的探针对于 IND-A1-WT 是特异性的),该目标基因 5' flap 序列后面的第一个核苷酸与核苷酸差异 (表 6 中加下划线的核苷酸) 相匹配,以及一个对于该核苷酸差异的上游的核苷酸特异性的探针 (所谓的“**invader**®寡聚物”;例如具有 SEQ ID NO:11 的探针对于 IND-A1-EMS06 与 IND-A1-WT 之间的核苷酸差异的上游的核苷酸是特异性的)。后一个引物的最后一个核苷酸可以与突变体 (表 6 中通过粗体核苷酸指示) 中的核苷酸差异相匹配,但是其他核苷酸也可以被用做这个最后一个核苷酸,只要当与目标 DNA 杂交从而生成被 **Cleavase**® 酶 (Third Wave Agbio) 所识别的特异的入侵结构时初级探针和 **invader**® 寡聚物仍然能够形成一个单个碱基重叠。

[0349] - 按生产厂家 (Third Wave Agbio) 所规定的进行 Invader™ 测定过程以及数据的解释。简言之,表 6 中表示为“flap1”和“flap2”的核苷酸序列代表 5' “flaps” 的序列,这些序列是在 Invader™ 测定的初级阶段从初级探针中切割下来的并且这些序列对应地与 FRET™ 盒 1 和 2 中的序列互补,并且不与目标突变体或者野生型序列互补。如果这些初级探针在初级阶段被切割并且在第二阶段中 flap1 探针和 / 或 flap2 探针对应地与 FRET™ 盒 1 和 2 杂交,产生一个信号,对应地表明样品中存在该突变体或者相应的野生型目标 IND 基因。

[0350] 表 6

[0351]

等位基因编号	探针
IND-A1-EMS06	5' CGTAAGGGTAAGCGACGACCCTCAGACGT 3' SEQ ID NO:11)
	5' flap1- <u>A</u> TGGTGGCTCGTCG 3' SEQ ID NO:12)
IND-A1-WT	5' CGTAAGGGTAAGCGACGACCCTCAGACGT 3' SEQ ID NO:11)
	5' flap2- <u>G</u> TGGTGGCTCGTC 3' SEQ ID NO:13)
IND-A1-EMS09	5' GGAGGCAGTGTCCATCTTTGCACCGCA 3' SEQ ID NO:14)
	5' flap1- <u>T</u> TGGCACCATCCTCT 3' SEQ ID NO:15)
IND-A1-WT	5' GGAGGCAGTGTCCATCTTTGCACCGCA 3' SEQ ID NO:14)
	5' flap2- <u>C</u> TGGCACCATCCTCT 3' SEQ ID NO:16)

[0352]

<b>IND-A1-EMS13</b>	5' CCTGCCGTTTCAAGAACTTGGTGTAGCGGATGT 3'	SEQ ID NO:17)
	5' flap1- <u>A</u> CTTCGTCGAGCATG 3'	SEQ ID NO:18)
<b>IND-A1-WT</b>	5' GGAGGCAGTGTCCATCTTTGCACCGCA 3'	SEQ ID NO:17)
	5' flap2- <u>G</u> CTTCGTCGAGCATG 3'	SEQ ID NO:19)
<b>IND-C1-EMS04</b>	5' CATCCTCTTCAATATCCGGATCTTCTCGCTTATCC TTTCTCTACT 3'	SEQ ID NO:20)
	5' flap1- <u>A</u> CCGACGAGCCAC 3'	SEQ ID NO:21)
<b>IND-C1-WT</b>	5' CATCCTCTTCAATATCCGGATCTTCTCGCTTATCC TTTCTCTACT 3'	SEQ ID NO:20)
	5' flap2- <u>G</u> CCGACGAGCCAC 3'	SEQ ID NO:22)
<b>IND-C1-EMS08</b>	5' CGTAAGGGTAAGCGAGGACCCCCAGA 3'	SEQ ID NO:23)
	5' flap1- <u>T</u> GGTGGTGGCTCG 3'	SEQ ID NO:24)
<b>IND-C1-WT</b>	5' CGTAAGGGTAAGCGAGGACCCCCAGA 3'	SEQ ID NO:23)
	5' flap2- <u>C</u> GGTGGTGGCTCG 3'	SEQ ID NO:25)
<b>IND-C1-EMS09</b>	5' CGAGGACCCCCAGACGGTGGTGT 3'	SEQ ID NO:26)
	5' flap1- <u>A</u> CTCGTCGGCGTAG 3'	SEQ ID NO:27)
<b>IND-C1-WT</b>	5' CGAGGACCCCCAGACGGTGGTGT 3'	SEQ ID NO:26)
	5' flap2- <u>G</u> CTCGTCGGCGT 3'	SEQ ID NO:28)

[0001]

## 序列表

- <110> 拜尔生物科学公司  
 B·拉加  
 B·登 博尔  
 B·朗伯特
- <120> 包括一个突变体 INDEHISCENT 等位基因的芸薹属植物
- <130> BCS 08-2010
- <160> 28
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1  
 <211> 558  
 <212> DNA  
 <213> 欧洲油菜野生型 IND-A1 编码序列
- <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(555)
- <400> 1  
 atg tct ggc tca aaa gca gat gca gcc ata gcc cca ata gtc atg atg 48  
 Met Ser Gly Ser Lys Ala Asp Ala Ala Ile Ala Pro Ile Val Met Met  
 1 5 10 15  
 gag cat cat cat ctc ctt atg aat tgg aac aaa cct att gat ctc att 96  
 Glu His His His Leu Leu Met Asn Trp Asn Lys Pro Ile Asp Leu Ile  
 20 25 30  
 aca gaa gaa aac tct ttt aac cac aat cct cat ttc ata gta gat cca 144  
 Thr Glu Glu Asn Ser Phe Asn His Asn Pro His Phe Ile Val Asp Pro  
 35 40 45  
 cct tcc gaa acc cta agc cac ttc cag ccc ccg ccg aca atc ttc tcc 192  
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser His Phe Gln Pro Pro Pro Thr Ile Phe Ser  
 50 55 60  
 gat cac gga gga gga gag gaa gca gaa gaa gaa gaa gaa gaa gaa gga 240

[0002]

Asp His Gly Gly Gly Glu Glu Ala Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly  
 65 70 75 80  
  
 gag gaa gag atg gat ccg atg aag aag atg caa tac gcg att gct gcc 288  
 Glu Glu Glu Met Asp Pro Met Lys Lys Met Gln Tyr Ala Ile Ala Ala  
 85 90 95  
  
 atg cag ccc gta gac ctc gat cca gcc acc gtt cct aag ccg aac cgc 336  
 Met Gln Pro Val Asp Leu Asp Pro Ala Thr Val Pro Lys Pro Asn Arg  
 100 105 110  
  
 cgt aac gta agg gta agc gac gac cct cag acg gtg gtg gct cgt cgg 384  
 Arg Asn Val Arg Val Ser Asp Asp Pro Gln Thr Val Val Ala Arg Arg  
 115 120 125  
  
 cgt aga gaa agg ata agc gag aag atc cgg ata ttg aag agg atg gtg 432  
 Arg Arg Glu Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile Leu Lys Arg Met Val  
 130 135 140  
  
 cca gcc ggt gca aag atg gac act gcc tcc atg ctc gac gaa gcc atc 480  
 Pro Gly Gly Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met Leu Asp Glu Ala Ile  
 145 150 155 160  
  
 cgc tac acc aag ttc ttg aaa cgg cag gtg agg cta gct tct tea gcc 528  
 Arg Tyr Thr Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg Leu Ala Ser Ser Ala  
 165 170 175  
  
 tea cae tea gct tgg agc tcc tat gtc tga 558  
 Ser His Ser Ala Trp Ser Ser Tyr Val  
 180 185

<210> 2

<211> 185

<212> PRT

<213> 欧洲油菜野生型 IND-A1 编码序列

<400> 2

Met Ser Gly Ser Lys Ala Asp Ala Ala Ile Ala Pro Ile Val Met Met  
 1 5 10 15

Glu His His His Leu Leu Met Asn Trp Asn Lys Pro Ile Asp Leu Ile

[0003]

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

<210> 3

[0004]



Arg Val Ser Glu Asp Pro Gln Thr Val Val Ala Arg Arg Arg Arg Glu  
 130 135 140

agg ata agc gag aag atc cgg ata ttg aag agg atg gtg cca ggc ggt 480  
 Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile Leu Lys Arg Met Val Pro Gly Gly  
 145 150 155 160

gca aag atg gac act gcc tcc atg ctt gac gaa gcc atc cgc tac acc 528  
 Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met Leu Asp Glu Ala Ile Arg Tyr Thr  
 165 170 175

aag ttc ttg aaa cgg cag gtg agg ctt ctt cag cct cac act cag ctt 576  
 Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg Leu Leu Gln Pro His Thr Gln Leu  
 180 185 190

ggg get cct atg tet gac cct tet cgc ctt tgt tat tac cac aac teg 624  
 Gly Ala Pro Met Ser Asp Pro Ser Arg Leu Cys Tyr Tyr His Asn Ser  
 195 200 205

gat acc taa 633  
 Asp Thr  
 210

<210> 4  
 <211> 210  
 <212> PRT  
 <213> 欧洲油菜野生型 IND-C1 编码序列

<400> 4

Met Tyr Lys Arg Lys Val Tyr Ala Ser Leu Val Gln Lys Leu Tyr Met  
 1 5 10 15

Ser Gly Ser Lys Ala Asp Ala Ala Ala Ile Ala Pro Ile Val Met Met  
 20 25 30

Glu Pro His His Leu Leu Met Asn Trp Asn Lys Pro Ile Asp Leu Ile  
 35 40 45

Thr Gln Glu Asn Ser Phe Asn His Asn Pro His Phe Met Val Asp Pro

[0006]

50	55	60																	
Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser	His	Phe	Gln	Pro	Pro	Pro	Thr	Val	Phe	Ser				
65					70				75					80					
Asp	Pro	Gly	Gly	Gly	Glu	Glu	Ala	Glu	Asp	Glu	Glu	Gly	Glu	Glu	Glu				
				85				90						95					
Ile	Asp	Glu	Met	Lys	Glu	Met	Gln	Tyr	Ala	Ile	Ala	Ala	Met	Gln	Pro				
			100				105						110						
Val	Asp	Ile	Asp	Pro	Ala	Thr	Val	Pro	Lys	Pro	Asn	Arg	Arg	Asn	Val				
			115				120						125						
Arg	Val	Ser	Glu	Asp	Pro	Gln	Thr	Val	Val	Ala	Arg	Arg	Arg	Arg	Glu				
			130			135						140							
Arg	Ile	Ser	Glu	Lys	Ile	Arg	Ile	Leu	Lys	Arg	Met	Val	Pro	Gly	Gly				
145				150				155					160						
Ala	Lys	Met	Asp	Thr	Ala	Ser	Met	Leu	Asp	Glu	Ala	Ile	Arg	Tyr	Thr				
				165				170						175					
Lys	Phe	Leu	Lys	Arg	Gln	Val	Arg	Leu	Leu	Gln	Pro	His	Thr	Gln	Leu				
			180				185						190						
Gly	Ala	Pro	Met	Ser	Asp	Pro	Ser	Arg	Leu	Cys	Tyr	Tyr	His	Asn	Ser				
			195				200						205						
Asp	Thr																		
			210																
<210>	5																		

[0007]

<211>	1622	
<212>	DNA	
<213>	欧洲油菜野生型 IND-A1 基因组序列	
<220>		
<221>	CDS	
<222>	(561)..(1118)	
<400>	5	
tttgacaatc tacatacata accaacaatac agtagaatac cttgaaaatc taaaacccaa		60
aatatgatgt aaaactcaag cttggtccag agcataaaaa aattaaagcc atcgctttgg		120
tatcacatat ttaaactgca gttttttttt tttttttggg gggggggggg ggggtaatat		180
aaaaatataa ttaacaaaaa aaaattatga aacaattage atgtaaaaca ctaatctttt		240
ggttgtgaca aaacgttttc acaaatgttc tataaataaa ttcaagtgca ttttatctgc		300
aaaatatata ctttactca taaaataaga gcgtttaaaa cattcataca cgcactacat		360
tgacatgaca aaagaaatcc gcaaatacac atgatgatg tcgaaaaaaaa caaaaaatac		420
acatgatgta tatatagaga ggatagtatc taggaaataa gactatatta tatatataaa		480
gaaaatagag aaaagataaa aatataaatt ggtatgtata aaagaaaggt ctatgcgtct		540
ctagtccaaa aactctatat atg tct ggc tca aaa gca gat gca gcc ata gcc		593
	Met Ser Gly Ser Lys Ala Asp Ala Ala Ile Ala	
	1 5 10	
cca ata gtc atg atg gag cat cat cat ctc ctt atg aat tgg aac aaa		641
Pro Ile Val Met Met Glu His His His Leu Leu Met Asn Trp Asn Lys		
	15 20 25	
cct att gat ctc att aca gaa gaa aac tct ttt aac cac aat cct cat		689
Pro Ile Asp Leu Ile Thr Glu Glu Asn Ser Phe Asn His Asn Pro His		
	30 35 40	
ttc ata gta gat cca cct tcc gaa acc cta age cac ttc cag ccc ceg		737
Phe Ile Val Asp Pro Pro Ser Glu Thr Leu Ser His Phe Gln Pro Pro		
	45 50 55	

[0008]



agcctttctc taatccctaa gattatagct actgaaacaa tgaacaatg aagaatcagt 1538  
 tgggcattag taaaaaaaaa agaatcagtt gggttgetta taaaattttg ttataaaatt 1598  
 tatgtcgtat gtgtgtttagc cgta 1622

<210> 6

<211> 185

<212> PRT

<213> 欧洲油菜野生型 IND-A1 基因组序列

<400> 6

Met Ser Gly Ser Lys Ala Asp Ala Ala Ile Ala Pro Ile Val Met Met  
 1 5 10 15

Glu His His His Leu Leu Met Asn Trp Asn Lys Pro Ile Asp Leu Ile  
 20 25 30

Thr Glu Glu Asn Ser Phe Asn His Asn Pro His Phe Ile Val Asp Pro  
 35 40 45

Pro Ser Glu Thr Leu Ser His Phe Gln Pro Pro Pro Thr Ile Phe Ser  
 50 55 60

Asp His Gly Gly Gly Glu Glu Ala Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly  
 65 70 75 80

Glu Glu Glu Met Asp Pro Met Lys Lys Met Gln Tyr Ala Ile Ala Ala  
 85 90 95

Met Gln Pro Val Asp Leu Asp Pro Ala Thr Val Pro Lys Pro Asn Arg  
 100 105 110

Arg Asn Val Arg Val Ser Asp Asp Pro Gln Thr Val Val Ala Arg Arg  
 115 120 125

[0010]

Arg Arg Glu Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile Leu Lys Arg Met Val  
 130 135 140

Pro Gly Gly Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met Leu Asp Glu Ala Ile  
 145 150 155 160

Arg Tyr Thr Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg Leu Ala Ser Ser Ala  
 165 170 175

Ser His Ser Ala Trp Ser Ser Tyr Val  
 180 185

<210> 7  
 <211> 1593  
 <212> DNA  
 <213> 欧洲油菜野生型 IND-C1 基因组序列

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (497)..(1126)

<400> 7  
 tgccatacat aaccacggat catagtcgac acctcaacgt gaagcaaatt tgacaatcta 60  
 catacataac caacaaaaag tagaataccg tgaaaaccta aacccaaaat atgatgtaaa 120  
 actcaagctt ggtccagagc ataaaaaaat taaagccatc gctttggtat cacatattta 180  
 aacgtcagtt ttttttggg gaagtaatat aaaaatataa ttaacaagaa aatttatgaa 240  
 ataattagca tgtaaaacac tagtcttttg gttgtgacaa aacgttttca caaatgttct 300  
 ataaataaat tcaagcacat tttatctgca aaatatatac tttcaactcat aaaataagag 360  
 cgtttaaaac attcatatac gcaactacatt gacatgacaa aagaaatccg caaatataaa 420  
 catatttagt tcggatatat ctaggaaata agactatatt atatataaa agaaattaga 480

[0011]

aaaaaagaaa attggt atg tat aaa aga aag gtc tat gcg tct cta gtc caa	532
Met Tyr Lys Arg Lys Val Tyr Ala Ser Leu Val Gln	
1 5 10	
aaa ctc tat atg tct ggt tca aaa gca gat gca gca gcc ata gcc cca	580
Lys Leu Tyr Met Ser Gly Ser Lys Ala Asp Ala Ala Ala Ile Ala Pro	
15 20 25	
ata gtc atg atg gag cct cat cat ctc ctt atg aac tgg aac aaa cct	628
Ile Val Met Met Glu Pro His His Leu Leu Met Asn Trp Asn Lys Pro	
30 35 40	
att gat ctc att aca caa gaa aac tct ttt aac cac aat cct cat ttc	676
Ile Asp Leu Ile Thr Gln Glu Asn Ser Phe Asn His Asn Pro His Phe	
45 50 55 60	
atg gta gat cca cct tcc gaa acc cta agc cac ttc cag ccc ccg ccg	724
Met Val Asp Pro Pro Ser Glu Thr Leu Ser His Phe Gln Pro Pro Pro	
65 70 75	
aca gtc ttc tcc gat ccc gga gga gga gag gaa gca gaa gac gaa gaa	772
Thr Val Phe Ser Asp Pro Gly Gly Gly Glu Glu Ala Glu Asp Glu Glu	
80 85 90	
gga gag gaa gag ata gat gag atg aag gag atg caa tac gcg att gct	820
Gly Glu Glu Glu Ile Asp Glu Met Lys Glu Met Gln Tyr Ala Ile Ala	
95 100 105	
gcc atg cag ccc gta gac atc gat cca gcc acc gtt cct aag ccg aac	868
Ala Met Gln Pro Val Asp Ile Asp Pro Ala Thr Val Pro Lys Pro Asn	
110 115 120	
cgc cgt aac gta agg gta agc gag gac ccc cag acg gtg gtg gct cgt	916
Arg Arg Asn Val Arg Val Ser Glu Asp Pro Gln Thr Val Val Ala Arg	
125 130 135 140	
cgg cgt aga gaa agg ata agc gag aag atc cgg ata ttg aag agg atg	964
Arg Arg Arg Glu Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile Leu Lys Arg Met	
145 150 155	
gtg cca ggc ggt gca aag atg gac act gcc tcc atg ctt gac gaa gcc	1012
Val Pro Gly Gly Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met Leu Asp Glu Ala	
160 165 170	

[0012]

atc cgc tac acc aag ttc ttg aaa cgg cag gtg agg ctt ctt cag cct Ile Arg Tyr Thr Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg Leu Leu Gln Pro 175 180 185	1060
cac act cag ctt ggg gct cct atg tct gac cct tct cgc ctt tgt tat His Thr Gln Leu Gly Ala Pro Met Ser Asp Pro Ser Arg Leu Cys Tyr 190 195 200	1108
tac cac aac tcg gat acc taattataat tctatcacgc gtttcatggt Tyr His Asn Ser Asp Thr 205 210	1156
gatatatata gataaatggt tgaataagga tttcgatega agattgtatg gctattgatt	1216
acattatata ttgtacaata aatgatgtgt gtatttctat taatgtatat atgatatata	1276
tctgtttgca gtatgcattt atattctatt ctttataggg aggcaacatg cggattagg	1336
gctttgatcg tatgcaagtt ttccgaccaa aatatgaaa tacttgtttg gatataacat	1396
atgaatcgga taagtgttac tagttatata actggaaaa attgtttgggt ataagaatte	1456
ccgggagaac caagccttcc tetaatecct aagatcatag ctactgaaat aatgaaaaaa	1516
aacaaaaaaa aaacaatgaa gaatcagttg ggcattagtc caaaaaaaa aaagaatcag	1576
ttgattgct tataaaa	1593

<210> 8

<211> 210

<212> PRT

<213> 欧洲油菜野生型 IND-C1 基因组序列

<400> 8

Met Tyr Lys Arg Lys Val Tyr Ala Ser Leu Val Gln Lys Leu Tyr Met  
1 5 10 15

Ser Gly Ser Lys Ala Asp Ala Ala Ala Ile Ala Pro Ile Val Met Met  
20 25 30

[0013]

Glu Pro His His Leu Leu Met Asn Trp Asn Lys Pro Ile Asp Leu Ile  
 35 40 45

Thr Gln Glu Asn Ser Phe Asn His Asn Pro His Phe Met Val Asp Pro  
 50 55 60

Pro Ser Glu Thr Leu Ser His Phe Gln Pro Pro Pro Thr Val Phe Ser  
 65 70 75 80

Asp Pro Gly Gly Gly Glu Glu Ala Glu Asp Glu Glu Gly Glu Glu Glu  
 85 90 95

Ile Asp Glu Met Lys Glu Met Gln Tyr Ala Ile Ala Ala Met Gln Pro  
 100 105 110

Val Asp Ile Asp Pro Ala Thr Val Pro Lys Pro Asn Arg Arg Asn Val  
 115 120 125

Arg Val Ser Glu Asp Pro Gln Thr Val Val Ala Arg Arg Arg Arg Glu  
 130 135 140

Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile Leu Lys Arg Met Val Pro Gly Gly  
 145 150 155 160

Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met Leu Asp Glu Ala Ile Arg Tyr Thr  
 165 170 175

Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg Leu Leu Gln Pro His Thr Gln Leu  
 180 185 190

Gly Ala Pro Met Ser Asp Pro Ser Arg Leu Cys Tyr Tyr His Asn Ser  
 195 200 205

[0014]

Asp Thr  
210

<210> 9  
<211> 597  
<212> DNA  
<213> 拟南芥 IND1

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(594)

<400> 9  
atg gaa aat ggt atg tat aaa aag aaa gga gtg tgc gac tct tgt gtc 48  
Met Glu Asn Gly Met Tyr Lys Lys Lys Gly Val Cys Asp Ser Cys Val  
1 5 10 15  
  
tcg tcc aaa agc aga tcc aac cac agc ccc aaa aga agc atg atg gag 96  
Ser Ser Lys Ser Arg Ser Asn His Ser Pro Lys Arg Ser Met Met Glu  
20 25 30  
  
cct cag cct cac cat ctc ctc atg gat tgg aac aaa gct aat gat ctt 144  
Pro Gln Pro His His Leu Leu Met Asp Trp Asn Lys Ala Asn Asp Leu  
35 40 45  
  
ctc aca caa gaa cac gea gct ttt ctc aat gat cct cac cat ctc atg 192  
Leu Thr Gln Glu His Ala Ala Phe Leu Asn Asp Pro His His Leu Met  
50 55 60  
  
tta gat cca cct ccc gaa acc cta att cac ttg gac gaa gac gaa gag 240  
Leu Asp Pro Pro Pro Glu Thr Leu Ile His Leu Asp Glu Asp Glu Glu  
65 70 75 80  
  
tac gat gaa gac atg gat gcg atg aag gag atg cag tac atg atc gcc 288  
Tyr Asp Glu Asp Met Asp Ala Met Lys Glu Met Gln Tyr Met Ile Ala  
85 90 95  
  
gtc atg cag ccc gta gac atc gac cct gcc acg gtc cct aag ccg aac 336  
Val Met Gln Pro Val Asp Ile Asp Pro Ala Thr Val Pro Lys Pro Asn  
100 105 110

[0015]

cgc cgt aac gta agg ata agc gac gat cct cag acg gtg gtt gct cgt 384  
 Arg Arg Asn Val Arg Ile Ser Asp Asp Pro Gln Thr Val Val Ala Arg  
 115 120 125

cgg cgt cgg gaa agg atc agc gag aag atc cga att ctc aag agg atc 432  
 Arg Arg Arg Glu Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile Leu Lys Arg Ile  
 130 135 140

gtg cct ggt ggt gcg aag atg gac aca gct tcc atg ctc gac gaa gcc 480  
 Val Pro Gly Gly Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met Leu Asp Glu Ala  
 145 150 155 160

ata cgt tac acc aag ttc ttg aaa cgg cag gtg agg att ctt cag cct 528  
 Ile Arg Tyr Thr Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg Ile Leu Gln Pro  
 165 170 175

cac tct cag att gga gct cct atg gct aac ccc tct tac ctt tgt tat 576  
 His Ser Gln Ile Gly Ala Pro Met Ala Asn Pro Ser Tyr Leu Cys Tyr  
 180 185 190

tac cac aac tcc caa ccc tga 597  
 Tyr His Asn Ser Gln Pro  
 195

<210> 10

<211> 198

<212> PRT

<213> 拟南芥 IND1

<400> 10

Met Glu Asn Gly Met Tyr Lys Lys Lys Gly Val Cys Asp Ser Cys Val  
 1 5 10 15

Ser Ser Lys Ser Arg Ser Asn His Ser Pro Lys Arg Ser Met Met Glu  
 20 25 30

Pro Gln Pro His His Leu Leu Met Asp Trp Asn Lys Ala Asn Asp Leu  
 35 40 45

[0016]

Leu Thr Gln Glu His Ala Ala Phe Leu Asn Asp Pro His His Leu Met  
50 55 60

Leu Asp Pro Pro Pro Glu Thr Leu Ile His Leu Asp Glu Asp Glu Glu  
65 70 75 80

Tyr Asp Glu Asp Met Asp Ala Met Lys Glu Met Gln Tyr Met Ile Ala  
85 90 95

Val Met Gln Pro Val Asp Ile Asp Pro Ala Thr Val Pro Lys Pro Asn  
100 105 110

Arg Arg Asn Val Arg Ile Ser Asp Asp Pro Gln Thr Val Val Ala Arg  
115 120 125

Arg Arg Arg Glu Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile Leu Lys Arg Ile  
130 135 140

Val Pro Gly Gly Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met Leu Asp Glu Ala  
145 150 155 160

Ile Arg Tyr Thr Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg Ile Leu Gln Pro  
165 170 175

His Ser Gln Ile Gly Ala Pro Met Ala Asn Pro Ser Tyr Leu Cys Tyr  
180 185 190

Tyr His Asn Ser Gln Pro  
195

<210> 11  
<211> 29  
<212> DNA

[0017]

- <213> 人工的
- <220>
- <223> 用于检测 IND-A1-EMS06 和 IND-A1-WT 的寡核苷酸
- <400> 11  
cgtaagggtgta agcgacgacc ctcagacgt 29
- <210> 12
- <211> 14
- <212> DNA
- <213> 人工的
- <220>
- <223> 用于检测 IND-A1-EMS06 的寡核苷酸
- <400> 12  
atggtggctc gtcg 14
- <210> 13
- <211> 13
- <212> DNA
- <213>人工的
- <220>
- <223> 用于检测 IND-A1-WT 的寡核苷酸
- <400> 13  
gtggtggctc gtc 13
- <210> 14
- <211> 27
- <212> DNA
- <213>人工的
- <220>
- <223> 用于检测 IND-A1-EMS09 和 IND-A1-WT 的寡核苷酸
- <400> 14  
ggaggcagtg tccatctttg caccgca 27

[0018]

- <210> 15  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> 人工的  
  
 <220>  
 <223> 用于检测 IND-A1-EMS09 的寡核苷酸  
  
 <400> 15  
 ttggcaccat cctct 15
- <210> 16  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> 人工的  
  
 <220>  
 <223> 用于检测 IND-A1-WT 的寡核苷酸  
  
 <400> 16  
 etggcaccat cctct 15
- <210> 17  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工的  
  
 <220>  
 <223> 用于检测 IND-A1-EMS13 和 IND-A1-WT 的寡核苷酸  
  
 <400> 17  
 cctgccgttt caagaacttg gtgtagcgga tgt 33
- <210> 18  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> 人工的  
  
 <220>  
 <223> 用于检测 IND-A1-EMS13 的寡核苷酸

[0019]

<400> 18  
acttcgtcga gcatg 15

<210> 19  
<211> 15  
<212> DNA  
<213>人工的

<220>  
<223> 用于检测 IND-A1-WT 的寡核苷酸

<400> 19  
gcttcgtcga gcatg 15

<210> 20  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工的

<220>  
<223> 用于检测 IND-C1-EMS04 和 IND-C1-WT 的寡核苷酸

<400> 20  
catcctcttc aatatccgga tcttctcgt tctcctttct ctact 45

<210> 21  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> 人工的

<220>  
<223> 用于检测 IND-C1-EMS04 的寡核苷酸

<400> 21  
accgacgagc cac 13

<210> 22  
<211> 13  
<212> DNA

[0020]

<213>人工的	
<220>	
<223> 用于检测 IND-C1-WT 的寡核苷酸	
<400> 22	
gccgacgagc cac	13
<210> 23	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 用于检测 IND-C1-EMS08 和 IND-C1-WT 的寡核苷酸	
<400> 23	
cgtaagggtgta agcgaggacc cccaga	26
<210> 24	
<211> 13	
<212> DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223> 用于检测 IND-C1-EMS08 的寡核苷酸	
<400> 24	
tgggtggtggc tcg	13
<210> 25	
<211> 13	
<212> DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223> 用于检测 IND-C1-WT 的寡核苷酸	
<400> 25	
cggtggtggc tcg	13

[0021]

<210> 26	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 用于检测 IND-C1-EMS09 和 IND-C1-WT 的寡核苷酸	
<400> 26	
cgaggacccc cagacggtgg tgt	23
<210> 27	
<211> 14	
<212> DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>用于检测 IND-C1-EMS09 的寡核苷酸	
<400> 27	
actcgtcggc gtag	14
<210> 28	
<211> 12	
<212> DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223> 用于检测 IND-C1-WT 的寡核苷酸	
<400> 28	
gctcgtcggc gt	12