

(19) 国家知识产权局



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109476715 B

(45) 授权公告日 2023.06.27

(21) 申请号 201780046313.2

(73) 专利权人 纽海姆有限公司

(22) 申请日 2017.05.19

地址 荷兰纽海姆

(65) 同一申请的已公布的文献号

(72) 发明人 A·西里佐蒂 R·B·贝勒生
H·W·维里森

申请公布号 CN 109476715 A

(43) 申请公布日 2019.03.15

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285
专利代理人 孙占华 张广育

(30) 优先权数据

16171462.1 2016.05.26 EP

(51) Int.CI.

C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2019.01.25

(56) 对比文件

US 2003037355 A1, 2003.02.20
JP 2001145430 A, 2001.05.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/062093 2017.05.19

审查员 吕丽珊

(87) PCT国际申请的公布数据

W02017/202715 EN 2017.11.30

权利要求书2页 说明书45页
序列表23页 附图3页

(54) 发明名称

产无籽果实的植物

(57) 摘要

本发明涉及产无籽果实的植物。本发明还包括产生所述植物的方法和编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的核酸用于产生无籽果实的用途。

1. 一种不能再生成整株植物的西瓜植物细胞,其特征在于所述植物细胞包含编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的基因的突变等位基因,其中所述突变等位基因在SEQ ID NO 1中包含突变,该突变导致所述突变等位基因编码氨基酸序列为SEQ ID NO 4或SEQ ID NO 18的蛋白。

2. 产生产无籽果实的西瓜植物的方法,其包括以下步骤:

a) 鉴定在编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的等位基因中具有突变的西瓜植物,其中所述突变等位基因在SEQ ID NO 1中包含突变,该突变导致所述突变等位基因编码氨基酸序列为SEQ ID NO 4或SEQ ID NO 18的蛋白,

b) 确定所述西瓜植物是否是雄性可育的,以及所述植物或通过自花受精产生的后代植物是否产生无籽果实,和

c) 选择包含至少一个拷贝的步骤a)的突变等位基因的西瓜植物。

3. 产生产无籽果实的西瓜植物的方法,其包括以下步骤:

a) 在西瓜植物群体中引入突变,

b) 选择产无籽果实的雄性可育西瓜植物,

c) 验证在b)中选择的西瓜植物是否在细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的等位基因中具有突变并选择包含这种突变的植物,

其中所述突变等位基因在SEQ ID NO 1中包含突变,该突变导致所述突变等位基因编码氨基酸序列为SEQ ID NO 4或SEQ ID NO 18的蛋白。

4. 根据权利要求3所述的方法,还包括步骤d) 种植/培育在c) 中获得的植物。

5. 编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的核酸分子用于产生产无籽果实的西瓜植物的用途,其中所述核酸分子在SEQ ID NO 1中包含突变,其中所述核酸分子编码氨基酸序列为SEQ ID NO 4的蛋白或氨基酸序列为SEQ ID NO 18的蛋白。

6. 产生无籽西瓜果实的方法,其包括种植细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因纯合型的植物,其中所述突变等位基因在SEQ ID NO 1中包含突变,该突变导致所述突变等位基因编码氨基酸序列为SEQ ID NO 4或SEQ ID NO 18的蛋白,并允许所述植物授粉并收获所述无籽果实。

7. 根据权利要求3所述的方法,其中省略了步骤a)。

8. 根据权利要求6所述的方法,包括将所述植物种植在田地或温室、隧道或网棚。

9. 用于鉴定和/或选择包含编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的基因的突变等位基因的种子、植物或植物部分的筛选方法,其中所述突变等位基因在SEQ ID NO 1中包含突变,该突变导致所述突变等位基因编码氨基酸序列为SEQ ID NO 4或SEQ ID NO 18的蛋白,所述方法包括:

使用KASP测定、TaqMan SNP基因分型测定、高分辨率熔解(HRM)测定、SNP基因分型阵列或DNA测序。

10. 用于繁殖产无籽果实的西瓜植物的方法,所述方法包括以下步骤:

a) 获得包含细胞周期蛋白SDS样蛋白的编码基因的突变等位基因的种子,其中所述突变等位基因在SEQ ID NO 1中包含突变,该突变导致所述突变等位基因编码氨基酸序列为SEQ ID NO 4或SEQ ID NO 18的蛋白;

b) 使植物从步骤a) 中获得的种子中长出,

- c) 从步骤b) 中长出的植物中选择产无籽果实的植物，
- d) 通过选自以下的方法繁殖在步骤c) 中选择的植物：
 - i) 将步骤c) 中选择的植物的部分嫁接到另一个砧木上，
 - ii) 在体外组织培养中培育在步骤c) 中选择的植物的部分并从组织培养物中再生新植物，
 - iii) 从步骤c) 中选择的植物的部分产生胚或愈伤组织培养物，并从组织培养物中再生新植物，
 - iv) 通过微繁殖技术产生其他植物。

11. 用于生产无籽果实的西瓜植物的方法，包括以下步骤：

- a) 在西瓜植物群体中引入突变，
- b) 鉴定包含细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的植物，其中所述突变等位基因在SEQ ID NO 1中包含突变，该突变导致所述突变等位基因编码氨基酸序列为SEQ ID NO 4或SEQ ID NO 18的蛋白，和
- c) 确定所述植物是否是雄性可育的，以及所述植物是否产生无籽果实，和
- d) 选择包含至少一个拷贝的步骤b) 的突变等位基因的植物。

12. 根据权利要求11的方法，其中省略了步骤a)。

产无籽果实的植物

[0001] 本发明涉及产无籽果实的植物。本发明还包括产生所述植物的方法和编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的核酸用于产生无籽果实的用途。

[0002] 大多数商业无籽果实已从植物中开发出来,这些植物的果实通常含有分布在其整个果肉中的许多相对较大的坚硬种子。例如,西瓜、番茄、黄瓜、茄子、葡萄、香蕉、柑橘类水果(如橙子、柠檬和酸橙)的无籽果实是众所周知的。由于无籽果实的食用通常更容易且更方便,它们被认为是有价值的。

[0003] 果实发育通常在花的胚珠室中的一个或多个卵细胞受到来自花粉的精核受精时开始。

[0004] 无籽果实可能由两种不同的现象导致。在一些情况下,果实在胚珠没有花粉受精的情况下发育,这种现象称为单性结实。在其他情况下,无籽果实发生于授粉后,此时种子(胚和/或胚乳)生长受到抑制或种子在早期死亡,而果实的其余部分继续生长(种子败育(stenospermocarpy))。与单性结实相比,种子败育需要授粉以开始果实生长。

[0005] 无籽橙子果实是单性结实的一个实例。一些橙子品种(例如脐橙)不产生有活力的花粉。但是,它们可以与来自其他品种的花粉进行异花授粉。如果只有雄性不育品种被种植在果园中,则不会发生授粉,并且将产生单性结实无籽果实。各橙树的繁殖通常通过插条和随后嫁接到另一个砧木(rootstock)上来进行。

[0006] 无籽香蕉是三倍体。虽然在某些情况下授粉可能是正常的,但绝大多数果实都是无籽的。这可以通过导致在减数分裂期间染色体的不正常分裂以及由此产生无活力花粉的不对称的染色体组(3x)来解释。没有受精,三倍体香蕉也能够结出和形成无籽果实。甚至在授粉发生时,至多三百分之一的果实包含一些种子。基于所解释过的原因,这可能是因为三倍体花粉是无活力的。因此,通常可以看到香蕉植物是单性结实的。香蕉植物通常由主茎基部的侧枝或吸根——其可被移出并再种植以继续栽培品种——来进行无性繁殖。种植者还通过组织培养繁殖香蕉,特别是用于产生无病材料。

[0007] 无籽黄瓜、无籽南瓜和无籽茄子是没有授粉(例如,在授粉受损的条件(例如,低温)下)而可以产生无籽果实(单性结实)的作物的实例。但是,在这些条件下可产生商业品质的果实。但是,所有这些作物在授粉后都可以产生带有种子的果实。因此,这些作物是兼性单性结实。所述作物的繁殖可以通过自花授粉或异花授粉、体外繁殖和嫁接来完成。

[0008] 从番茄突变体中还已知它们可以在正常授粉/受精受损的条件下(例如,在低温环境下)产生无籽果实。因此,这些突变体也是兼性单性结实。已知用于显示该表型的突变体是pat、pat-2和pat-3/pat-4系统。这些突变的基因尚不清楚,并且pat-3/pat-4系统似乎依赖于多个基因座。

[0009] 单性结实也已被通过遗传修饰引入到几种植物物种中。在胚珠和胎座特异性DefH9启动子控制下的赋予生长素合成的细菌色氨酸单加氧酶(iaaM)的表达确实诱导以下植物中的单性结实:黄瓜(Yin et al., 2006, Clular & molecular Biotech. Letters 11, 279-290)、茄子(Acciarri et al., 2002, BMC Biotech. 2(4))、番茄(Rotino et al., 2005, BMC Biotech. 5(32))和烟草。

[0010] 这些转基因植物证明了植物激素在种子和果实发育中的重要性。除其他因素以外种子和果实发育受到几种植物激素的强烈控制是本领域公知的。例如,也可通过外源施用植物激素(特别是生长素或赤霉素)来诱导单性结实(包括果实无籽的逻辑结果)(Ruan et al., Trends in Plant Sci.17(11),1360-1385)。

[0011] 育种者生产的无籽西瓜是种子败育作物的实例。正常的西瓜植物是二倍体(2n)。产无籽果实的西瓜是通过将雄性二倍体(2n)西瓜植物与雌性四倍体(4n)西瓜植物杂交产生的杂种。所得的F1杂交种子是三倍体(3n)。在F1杂交植物中诱导结实需要授粉。由于三倍体(3n) F1杂交植物不产生可育的花粉,必须在同一田地中种植所谓的授粉者或传粉者植物。所述授粉者植物是二倍体(2n)。通常,必须在给定方案中种植比例为约1/3的授粉者植物与杂交植物,以提供足够的花粉用于授粉所有F1杂交植物。二倍体(2n)授粉者与雌性三倍体(3n)杂交植物的花之间的异花授粉诱导结实,并导致在三倍体杂交植物上产生无籽三倍体果实。F1杂种的二倍体(2n)和四倍体(4n)亲本各自产生带有种子的果实,并且都可以通过自花授粉彼此独立繁殖。

[0012] 无籽葡萄可以由单性结实或种子败育的植物产生。品种黑科林斯(Black Corinth)是单性结实,而苏丹娜(Sultanina)是种子败育。藤本植物通常通过插条和相继嫁接到另一种砧木上来繁殖。

[0013] 减数分裂中的不规则性可以是导致产无籽果实的植物的一个因素。产无籽果实的植物的实例在Zhang et al., (2012, Scientia Horticulture 140, 107-114)中给出,其公开了无籽西瓜。在用 γ -射线照射其种子后,从F1-杂种的后代获得雄性和雌性不育(MFS)突变体。来自MFS突变体的花粉根本没有活力。当用来自雄性可育植物的花粉授粉时,MFS植物产生无籽果实。因此,MFS西瓜植物可被归类为是种子败育的。胚珠也几乎没有活力,因为MFS突变体与来自不同雄性可育植物的花粉异花授粉时几乎不产生种子。减数分裂过程中染色单体的不完全联会和异常分离在MFS突变体中观察到,并且被认为是雄性和雌性不育的原因。尚未鉴定出导致MFS突变体中存在的效果的基因,但看起来MFS突变体中的表型可能是由于单个隐性基因。

[0014] Pradillo et al., (2014, Frontiers in Plant Sci.5, Article 23, doi:10.3389/fpls.2014.00023)对本领域中关于在拟南芥属(*Arabidopsis*)的减数分裂过程中参与同源重组的基因的知识进行了综述。

[0015] Azumi et al., (2002, EMBO J. 21(12), 3081-3095)描述了在雄性减数分裂中具有联会和二价体形成的缺陷和(尽管在较小程度上,在雌性减数分裂中)具有类似缺陷的拟南芥属突变体的分离。该突变被命名为“Solo Dancers”(sds)并且被证明源自单个隐性基因。SDS突变体是雄性不育的并且在雌性育性方面严重受损。sds突变纯合型的植物是雄性不育的,但至少在很小的程度上是雌性可育的,这通过将sds突变植物用来自雄性可育植物的花粉的异花授粉来证明。因此,SDS突变体是雄性不育的并且在雌性育性方面严重受损。sds基因被鉴定为属于细胞周期蛋白型蛋白编码基因,并且已被证明与拟南芥属CDK、Cdc2a和Cdc2b蛋白相互作用。但是,SDS已被鉴定为一种新的、预先未知的细胞周期蛋白型蛋白。De Muyt et al., (2009, PLOS genet. 5(9) e1000654, doi:10.1371/journal.pgen.1000654)证实sds拟南芥属突变体在减数分裂中具有重组缺陷,并表明该缺陷是由在减数分裂期间细胞中的另一种蛋白(AtDMC1)的错误分配导致的。

[0016] 从以上讨论中可以明显看出,决定植物是否产生无籽果实的因素本质上是多重的,并且可存在于几种(例如形态学、生理学和/或遗传学)原因中。

[0017] 为了在种子败育作物中产生无籽果实,必须对植物的雌花部分授粉。当今种植的种子败育作物是雄性不育的。因此,除了雌性植物外,还必须在同一田地中种植不同的雄性可育植物(授粉者或传粉者)。由于用于授粉者植物的区域是以产无籽果实的雌性植物可用的区域为代价的,因此每单位栽培面积的产量降低。通常,授粉者植物是也可以自花授粉的正常植物。然而,由授粉者植物产生的果实确实会产生种子。在西瓜中,所述授粉者植物通常是二倍体($2n$),其在自花授粉时产生有籽果实,该果实在某些情况下也可被收获并单独出售(参见W02012069539)。出于商业原因,这些来自授粉者植物的有籽果实必须不能与无籽果实混合。因此,必须确保在收获时或收获后分离所述无籽果实和有籽果实,这可能使机器收获变得困难或不可能或在收获后需要进一步的加工步骤。那些待采取的额外预防措施增加了无籽果实生产的投入成本。此外,开发了授粉者植物,使得它们开花并产生足够的有活力的花粉,与此同时,雌性植物开花并且其柱头可接受用于诱导结实的花粉。因此,在开花和受精时间方面,授粉者植物必须与产无籽果实的雌性植物相适应。如果授粉者植物和相应的雌性植物的开花时间不充分同步,则授粉不会发生或仅在不足量的情况下发生。因此,种子败育雌性植物产生很少的果实。此外,本领域公知,气候条件(如雨,热等)可能以不同的方式影响授粉者植物的花粉产生和基因型不同的雌性植物的柱头育性时间。因此,气候条件也会导致授粉者和雌性植物的育性时间不同步,其效果是降低了产量。

[0018] 各个缺点不适用于下文所述的本发明的植物。

[0019] 因此,本发明的一个目的是克服目前栽培的产无籽果实的植物的缺点。

[0020] 在诱变的M2二倍体西瓜植物群体中,观察到产无籽果实的植物。将所述突变植物命名为EMB1。令人惊讶的是,所述植物的花粉可用于进行回交。因此,与本领域中已知的产无籽果实的植物相反,本文公开的植物是雄性可育的。使回交子代自花授粉,并且25%的由此获得的植物产生无籽果实。鉴定了导致无籽果实表型的突变等位基因(emb1),即当emb1纯合型(emb1/emb1)的二倍体植物自花授粉或通过来自另一植物的花粉授粉时,它们产生无籽的二倍体果实。因此,无籽果实表型发生在emb1等位基因中的隐性突变纯合型的植物中。由对应于本发明的突变emb1等位基因的野生型等位基因编码的野生型蛋白与细胞周期蛋白SDS蛋白具有一些相似性,但也有显著差异,因此被称为“细胞周期蛋白SDS样蛋白”。本领域中已知的细胞周期蛋白SDS蛋白和其编码核酸序列与本文公开的细胞周期蛋白SDS样蛋白的各序列之间的序列同一性是很低的。关于植物中的表型效应,本领域中已知的在细胞周期蛋白SDS蛋白中具有突变的植物具有雄性不育表型,而本文公开的在细胞周期蛋白SDS样蛋白中具有突变的植物是雄性可育的。

[0021] 本发明的第一实施方案涉及植物细胞、植物部分和植物,其特征在于与包含功能性野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白的植物细胞和植物相比,所述植物细胞或植物具有活性降低的细胞周期蛋白SDS样蛋白。

[0022] 在本发明的上下文中,“细胞周期蛋白SDS样蛋白”应理解为意指一种蛋白,当其活性降低或其表达在植物中被完全敲除时,导致(例如在编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的突变核苷酸序列纯合型的植物中)由该植物产生的雄性可育花粉,但同时在自花授粉时导致所述植物的无籽果实的产生。

[0023] 在本发明的上下文中，蛋白的“活性降低”应意指与相应的野生型植物细胞或相应的野生型植物相比时，细胞周期蛋白SDS样蛋白的活性降低。在一方面，降低应包括基因表达的完全敲除，或功能丧失或功能降低的细胞周期蛋白SDS样蛋白的产生，例如截短的SDS样蛋白可能功能丧失或功能下降。活性降低可以是编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的基因表达的降低(也称为敲低)，或者编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的基因表达的敲除和/或细胞中细胞周期蛋白SDS样蛋白的量降低或细胞中细胞周期蛋白SDS样蛋白的酶活性中的功能降低或功能丧失。

[0024] “敲除”或“完全敲除”应理解为各个基因的表达不再是可检测到的。

[0025] “功能丧失(在酶活性中)”在本发明的上下文中应意指尽管以与相应的野生型蛋白相同或相似的量存在，但所述蛋白不再发挥其作用，即突变等位基因在二倍体植物中以纯合形式存在时，所述植物是雄性可育的，但在授粉时仅产生无籽果实。术语“非功能性的”和“活性丧失”应具有与“功能丧失”相同的含义。所有这三个术语在本文中都可互换使用。因此，当提及编码非功能性蛋白的细胞周期蛋白SDS样基因时，所述基因可被表达，但所编码的蛋白不具有功能，例如，由于所述蛋白被截短或与野生SDS样蛋白相比包含一个或多个氨基酸置换、插入或缺失。

[0026] “功能的降低(在酶活性中)”或“功能降低”在本发明的上下文中应意指尽管以与相应的野生型蛋白相同或相似的量存在，但所述蛋白不再发挥其作用，即当在二倍体植物中以纯合形式存在时，所述植物是雄性可育的，但在授粉时仅产生无籽果实。

[0027] “保守的结构域”是指保守的蛋白结构域，例如Cyclin_N(pfam00134)和Cyclin_C结构域(pfam02984)。这些结构域可例如在NCBI的保守结构域数据库中找到(万维网：ncbi.nlm.nih.gov/cdd)。

[0028] 在本发明的上下文中，“M1代”或“M1植物”应是指由诱变处理直接产生的第一代。从用诱变剂处理的种子生长出的植物，例如，是M1代的代表。

[0029] “M2代”或“M2植物”在本文中应是指从M1代的自花授粉获得的世代。从获自自花授粉的M1植物的种子生长出的植物代表M2植物。

[0030] 表达的降低可以例如通过测量编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的RNA转录物的量来确定，例如，使用Northern印迹分析或RT-PCR。在本文，降低(reduction)优选意指转录物的量降低至少50%、特别是至少70%、优选至少85%、特别优选至少95%。

[0031] 细胞周期蛋白SDS样蛋白的量的降低——其导致这些蛋白在相关植物细胞或植物中的活性降低——可例如通过免疫学方法(例如Western印迹分析、ELISA(酶联免疫吸附测定)或RIA(放射免疫测定))来测定。在本文，降低优选意指细胞周期蛋白SDS样蛋白的量降低至少50%、特别是至少70%、优选至少85%、特别优选至少95%。

[0032] 制备与指定蛋白特异性反应，即与所述蛋白特异性结合的抗体的方法，是本领域技术人员已知的(参见，例如，Lottspeich和Zorbas(Eds.)，1998，Bioanalytik，Spektrum akad，Verlag，Heidelberg，Berlin，ISBN3-8274-0041-4)。这类抗体的制备由几家公司作为合同服务来提供。

[0033] 关于本发明，本发明的植物中的细胞周期蛋白SDS样蛋白的活性的降低也可以通过植物表型来确定。编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的突变等位基因纯合型的或具有活性降低的细胞周期蛋白SDS样蛋白的植物产生无籽果实并且是雄性可育的(产生有活力的花

粉)。

[0034] 在一个实施方案中,与相应的野生型植物细胞或野生型植物相比,本发明的植物细胞或植物中具有细胞周期蛋白SDS样功能的蛋白的活性降低。

[0035] 在本发明的上下文中,术语“野生型植物细胞”或“野生型植物”意指相关植物细胞或植物被用作产生本发明的植物细胞或植物的起始材料,即除了所引入的(遗传)修饰或突变之外,它们的遗传信息对应于本发明的植物细胞或植物的遗传信息。在一方面,所述野生型植物或野生型植物细胞是包含完全功能性的细胞周期蛋白SDS样蛋白的植物,例如关于西瓜植物或植物细胞,二倍体西瓜植物产生SEQ ID NO 2的蛋白并在自花授粉时产生有籽果实。或关于甜瓜植物或细胞,二倍体甜瓜植物产生SEQ ID NO 6的蛋白,或关于黄瓜植物或细胞,二倍体黄瓜植物产生SEQ ID NO 12的蛋白,或关于番茄植物或细胞,二倍体番茄植物产生SEQ ID NO19的蛋白,或关于辣椒植物或细胞,二倍体植物产生SEQ ID NO:20的蛋白。

[0036] 结合本发明,术语“相应的”意指,在几个对象的比较中,相互比较的相关对象被保持在相同的条件下。结合本发明,与野生型植物细胞或野生型植物相结合的术语“相应的”意指使被相互比较的植物细胞或植物在相同的培育条件下生长,使得它们具有相同(培育)年龄,以及使得除了所引入的(遗传)修饰或突变之外,它们的遗传信息对应于本发明的植物细胞或植物的遗传信息。在RNA和DNA分子的核酸序列彼此比较或彼此对应的情况下,本领域中公知DNA分子中的胸腺嘧啶(T)与RNA分子中的尿苷(U)等同。因此,当将这些分子相互比较时,DNA序列中的T应被理解为被RNA序列中的U置换,反之亦然。

[0037] 优选地,在本发明的实施方案中,野生型植物细胞、植物部分或野生型植物的细胞周期蛋白SDS样蛋白由选自以下的核酸分子编码:

[0038] a) 核酸分子,其编码具有以SEQ ID NO 2(西瓜细胞周期蛋白SDS样蛋白)或SEQ ID NO 6(甜瓜细胞周期蛋白SDS样蛋白)或SEQ ID NO 12(黄瓜细胞周期蛋白SDS样蛋白)或SEQ ID NO:19(番茄(*Solanum lycopersicum*)细胞周期蛋白SDS样蛋白)或SEQ ID NO:20(辣椒(*Capsicum annuum*)细胞周期蛋白SDS样蛋白)给出的氨基酸序列的蛋白;

[0039] b) 核酸分子,其编码一种蛋白,所述蛋白的序列与以SEQ ID NO 2或SEQ ID NO 6或SEQ ID NO 12或SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:20给出的氨基酸序列具有至少58%或至少60%、优选至少70%、更优选至少80%、甚至更优选至少90%、或者特别优选至少95%的同一性;

[0040] c) 核酸分子,其包含以SEQ ID NO 1或SEQ ID NO 5或SEQ ID NO17所示的核苷酸序列或其互补序列;

[0041] d) 核酸分子,其与c)中所述的核苷酸序列具有至少58%或至少60%、优选至少70%、更优选至少80%、甚至更优选至少90%或特别优选至少95%的同一性;

[0042] e) 核酸分子,其在严格条件下与a)、b)、c)或d)中所述的核酸分子中的至少一条链杂交;

[0043] f) 核酸分子,其核苷酸序列由于遗传密码的简并性而偏离a)、b)、c)或d)中鉴定的核酸分子的序列;和

[0044] g) 核酸分子,其代表a)、b)、c)或d)中鉴定的核酸分子的片段、等位基因变体和/或衍生物。

[0045] 以SEQ ID NO 1所示的基因组核苷酸序列和以SEQ ID NO 1所示的编码序列编码具有以SEQ ID NO 2所示的氨基酸序列的西瓜(*Citrullus lanatus*)的野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白。SEQ ID NO 5示出了编码具有以SEQ ID NO 6所示的氨基酸序列的来自甜瓜(*Cucumis melo*)的野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白的编码序列。SEQ ID NO 12示出了来自黄瓜(*Cucumis sativus*)的野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白。SEQ ID NO:19示出了番茄的野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白。SEQ ID NO:20示出了辣椒的野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白。

[0046] 本发明的植物细胞、植物部分或植物可以是来自任何物种的植物细胞或任何物种的植物。本发明的植物细胞可以是单子叶植物细胞和双子叶植物细胞，本发明的植物可以是单子叶植物和双子叶植物。优选地，本发明的植物细胞是蔬菜的植物细胞(蔬菜植物细胞)或植物是蔬菜植物，特别是蔬菜如番茄、洋葱、韭菜、大蒜、胡萝卜、辣椒、芦笋、朝鲜蓟、芹菜、黄瓜、甜瓜、葫芦、南瓜、生菜、西瓜、菠菜，卷心菜(甘蓝(*Brassica oleracea*))、玉米沙拉、茄子和秋葵。更优选来自蔬菜的植物细胞(蔬菜植物细胞)或来自葫芦科(*Cucurbitaceae*)或茄科(*Solanaceae*)的蔬菜植物。本发明的最优选的植物细胞和植物包括南瓜(西葫芦(*Cucurbita pepo*)、笋瓜(*Cucurbita maxima*)、南瓜(*Cucurbita moschata*)、瓠瓜(*Lagenaria siceraria*))、甜瓜、黄瓜、西瓜、番茄或辣椒植物细胞或植物，特别优选的是来自西瓜或甜瓜的植物细胞，或西瓜或甜瓜植物。在一个实施方案中，所述植物和植物细胞是这些物种的栽培植物，例如具有良好农艺特征，尤其是产生具有良好品质和均一性的可销售产品(例如果实)的近交系或品种。

[0047] 本发明的另一个实施方案涉及包含本发明的植物细胞的植物和植物部分。

[0048] 本发明的其他实施方案是植物细胞或植物，其特征在于与相应的野生型植物细胞或野生型植物相比，所述植物细胞或植物具有活性降低的细胞周期蛋白SDS样蛋白，其中所述相应的野生型植物细胞或野生型植物的细胞周期蛋白SDS样蛋白由选自以下的核酸分子编码：

[0049] a) 核酸分子，其编码具有以SEQ ID NO 2(西瓜细胞周期蛋白SDS样蛋白)或SEQ ID NO 6(甜瓜细胞周期蛋白SDS样蛋白)或SEQ ID NO 12(黄瓜细胞周期蛋白SDS样蛋白)或SEQ ID NO:19(番茄细胞周期蛋白SDS样蛋白)或SEQ ID NO:20(辣椒细胞周期蛋白SDS样蛋白)给出的氨基酸序列的蛋白；

[0050] b) 核酸分子，其编码一种蛋白，所述蛋白的序列与以SEQ ID NO 2或SEQ ID NO 6或SEQ ID NO 12或SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:20给出的氨基酸序列具有至少58%或至少60%、优选至少70%、更优选至少80%、甚至更优选至少90%、或者特别优选至少95%的同一性；

[0051] c) 核酸分子，其包含以SEQ ID NO 1或SEQ ID NO 5或SEQ ID NO17所示的核苷酸序列或其互补序列；

[0052] d) 核酸分子，其与c)中所述的核苷酸序列具有至少58%或至少60%、优选至少70%、更优选至少80%、甚至更优选至少90%或特别优选至少95%的同一性；

[0053] e) 核酸分子，其在严格条件下与a)、b)、c)或d)中所述的核酸分子中的至少一条链杂交；

[0054] f) 核酸分子，其核苷酸序列由于遗传密码的简并性而偏离a)、b)、c)或d)中鉴定的

核酸分子的序列;和

[0055] g) 核酸分子,其代表a)、b)、c)或d)中鉴定的核酸分子的片段、等位基因变体和/或衍生物。

[0056] 可使用全局或局部比对算法通过比对两个肽序列或两个核苷酸序列来确定“序列同一性”和“序列相似性”。然后,当通过例如程序GAP或BESTFIT或Emboss程序“Needle”(使用默认参数,参见下文)对序列进行最佳比对,这些序列共有至少某一最小的序列同一性百分比(如下文进一步定义的)时,其可被称为“基本相同”或“基本同一性”。这些程序使用Needleman和Wunsch全局比对算法来对两个序列在其全长上进行比对,该算法最大化匹配数并最小化空位数。通常,使用默认参数,其中空位生成(gap creation)罚分=10,空位延伸(gap extension)罚分=0.5(对于核苷酸和蛋白质比对)。对于核苷酸,所使用的默认评分矩阵是DNAFULL;对于蛋白质,默认评分矩阵是BLOSUM62(Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 10915-10919)。例如可使用计算机程序(例如可以`ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss`在万维网上访问的EMBOSS)来确定用于百分比序列同一性的序列比对和得分。或者,可通过使用通常已知的算法和输出格式(例如FASTA、BLAST等)的搜索数据库(例如EMBL、GenBank)来确定序列相似性或同一性,但是应检索命中并进行成对比以比较序列同一性。如果百分比序列同一性为至少58%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%或更高(如通过使用默认参数(即空位生成罚分=10,空位延伸罚分=0.5,对于核酸,使用得分矩阵DNAFULL,对于蛋白质,使用得分矩阵BLOSUM62)的Emboss“needle”所确定的),则两个蛋白质或两个蛋白质结构域或两个核酸序列具有“基本序列同一性”。此类序列在本文中也称为“变体”或“等位基因变体”或“衍生物”。除了本文公开的特定核酸和蛋白质序列,可鉴定细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因/等位基因和细胞周期蛋白SDS样蛋白的其他等位基因变体。因此,例如与SEQ ID NO:2的蛋白、或SEQ ID NO:6的蛋白、或SEQ ID NO:12的蛋白、或SEQ ID NO:18的蛋白、或SEQ ID NO:19的蛋白具有基本序列同一性的细胞周期蛋白SDS样蛋白是所提供的蛋白的变体。

[0057] 等位基因变体可能存在其他栽培蔬菜植物细胞或植物,特别是蔬菜如番茄、洋葱、韭菜、大蒜、胡萝卜、辣椒、芦笋、朝鲜蓟、葫芦、南瓜、芹菜、黄瓜、甜瓜、生菜、西瓜、菠菜、卷心菜(芸苔属(*Brassica*))物种、玉米沙拉和秋葵等中。细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的这种等位基因变体中的突变对其他蔬菜植物的雄性和雌性育性和无籽果实产生具有相同的影响。特别地,细胞周期蛋白SDS样基因的等位基因变体可存在于来自葫芦科(Cucurbitaceae)(如甜瓜、黄瓜、西瓜、南瓜(西葫芦、笋瓜、南瓜、瓠瓜))的植物细胞或植物中,特别优选的细胞周期蛋白SDS样基因的等位基因变体可存在于西瓜、甜瓜或黄瓜的植物细胞或西瓜或甜瓜或黄瓜植物中。此外,细胞周期蛋白SDS样基因的等位基因变体也可存在于来自茄科(如番茄或番茄的野生近缘种(*S. pimpinelli*、契斯曼尼番茄(*S. cheesmaniae*)、多腺番茄(*S. galapagense*)、细叶番茄(*S. pimpinellifolium*)、克梅留斯基番茄(*S. chmielewskii*)、多毛番茄(*S. habrochaites*)、*S. neorickii*和潘那利番茄(*S. pennellii*)、*S. arcanum*、智利番茄(*S. chilense*)、*S. corneliomulleri*、*S. huaylasense*、和秘鲁番茄(*S. peruvianum*))、辣椒、茄子(*Solanum melongena*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)等)的植物细胞或植物中。

[0058] 等位基因变体也可存在于其他栽培作物植物中,例如大田作物(例如芸苔属物种、

玉米、水稻、大豆、小麦、大麦、棉花、烟草、咖啡等)或水果作物(例如葡萄、苹果、李子、柑橘类水果、草莓等)。

[0059] 应注意,葫芦科的细胞周期蛋白SDS样蛋白与彼此具有高度序列同一性(对于所提供的序列为至少70%) ,并且茄科的细胞周期蛋白SDS样蛋白也与彼此具有高度序列同一性。另一方面,葫芦科序列和茄科序列之间的序列同一性不高(40%或更低),参见下表A。

[0060] 表A-细胞周期蛋白SDS样蛋白序列同一性(使用Needleman和Wunsch的成对比对)

	西瓜 (SEQ ID NO 2)	甜瓜 (SEQ ID NO 6)	黄瓜 (SEQ ID NO 12)	马铃薯(SEQ ID NO 19)	辣椒 (SEQ ID NO 20)
[0061]	西瓜 (SEQ ID NO 2)	100%	73%	70%	34%
	甜瓜 (SEQ ID NO 6)		100%	86%	40%
[0062]	黄瓜 (SEQ ID NO 12)			100%	40%
	马铃薯(SEQ ID NO 19)				100%
	辣椒 (SEQ ID NO 20)				81%

[0063] “严格的杂交条件”可用于鉴定与给定核苷酸序列基本相同的核苷酸序列。严格的条件是序列依赖性的并且在不同的情况下是不同的。通常,选择严格条件为比特定的序列在确定的离子强度和pH下的热熔点(T_m)低约5℃。 T_m 是(在确定的离子强度和pH下)50%的靶序列杂交至完全配对的探针的温度。通常选择这样的严格条件,其中pH 7时盐浓度为约0.02摩尔,温度为至少60℃。降低盐浓度和/或增加温度可提高严格度。RNA-DNA杂交(使用例如100nt的探针的RNA印迹)的严格条件为例如包括在63℃下在0.2×SSC中进行至少1次持续20min的洗涤的那些,或等同的条件。DNA-DNA杂交(使用例如100nt的探针的DNA印迹)的严格条件为例如在至少50℃(通常约55℃)的温度下在0.2×SSC中进行至少1次(通常2次)持续20min的洗涤的那些,或等同的条件。还参见Sambrook et al. (1989)以及Sambrook and Russell (2001)。

[0064] 通过基因沉默效应也可实现本发明的植物细胞或植物中细胞周期蛋白SDS样蛋白的活性的降低。

[0065] 在本发明的其他实施方案中,本发明的植物细胞或植物中细胞周期蛋白SDS样蛋白的活性降低是由基因沉默效应引起的。

[0066] 具有活性降低的细胞周期蛋白SDS样蛋白的本发明的植物细胞和本发明的植物可以通过本领域技术人员已知的引起基因沉默效应的不同方法产生。这些包括,例如,表达相应的反义RNA或双链RNA构建体(RNAi技术)、提供赋予共抑制作用的核酸分子或载体、表达相应构建的分裂特定的编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的转录物的核酶。

[0067] 通过在各植物细胞或植物中表达反义序列,可实现本发明的植物细胞和植物中细胞周期蛋白SDS样蛋白活性的降低。

[0068] 通过同时表达待抑制的各靶基因,优选细胞周期蛋白SDS样细胞编码基因或等位基因的有义和反义RNA分子(RNAi技术),可以实现本发明的植物细胞和植物中的细胞周期蛋白SDS样蛋白活性的降低。

[0069] 除此之外,已知在植物中(*in planta*),启动子序列的双链RNA分子的形成可反向导致该启动子的同源拷贝的甲基化和转录失活(Mette et al.,EMBO J.19,(2000),5194-5201)。本发明的植物细胞和植物中细胞周期蛋白SDS样蛋白活性的降低可以通过同时表达启动待抑制的各靶基因,优选细胞周期蛋白SDS样细胞编码基因或等位基因的转录的启动子序列的有义和反义RNA分子(RNAi技术)来实现。

[0070] 本领域还描述了通过切割编码靶基因的RNA分子来降低蛋白表达的核酶。

[0071] 对本领域技术人员已知的各基因沉默技术的额外讨论将在本文下文进一步提供,并因此适用于本发明的植物细胞或植物。

[0072] “基因沉默效应”是指靶基因或基因家族的基因表达的下调或完全抑制。与相应的野生型植物细胞或相应的野生型植物相比,被沉默的植物细胞或植物产生各靶基因或等位基因的较低量的适合翻译的转录物(包括mRNA)。所述较低量的适合翻译的转录物(包括mRNA)可能是由于各个转录物的靶向降解。

[0073] “靶基因或等位基因”应理解为基因或等位基因或基因家族(或基因的一个或多个特定等位基因),其必须被调节用于赋予生物体(例如植物细胞或植物)以产生所需表型。关于雄性不育的产无籽果实的植物,例如,(a)靶基因或(a)靶等位基因是细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因。

[0074] 在本发明的其他实施方案中,本发明的植物细胞或植物中的细胞周期蛋白SDS样蛋白的活性降低是由免疫调节方法引起的。

[0075] 降低植物细胞或植物中蛋白的酶活性的其他可能方式是所谓的免疫调节方法。已知特异性识别植物蛋白的抗体的植物内表达会导致相关蛋白的活性降低。本文下文将进一步提供对本领域技术人员已知的相应技术的额外讨论。

[0076] 本发明的其他实施方案是植物细胞或植物,其特征在于其包含细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因。所述细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因可以纯合或杂合状态存在。在一方面,所述突变等位基因编码功能降低或功能丧失的细胞周期蛋白SDS样蛋白。所述突变等位基因可编码具有一个或多个氨基酸被置换、插入或缺失的蛋白,导致与野生型(功能性)蛋白相比功能降低或功能丧失的蛋白。在一方面,所述突变等位基因导致产生截短的细胞周期蛋白SDS样蛋白,该截短的蛋白具有降低的功能或功能丧失。在另一方面,所述突变等位基因编码在细胞周期蛋白SDS样蛋白的保守结构域(例如Cyclin_N结构域(pfam00134)或Cyclin_C结构域(pfam02984))中一个或多个氨基酸被置换、插入或缺失的蛋白。蛋白的Cyclin_N结构域和Cyclin_C结构域可以由技术人员鉴定,例如,通过NCBI网站上的蛋白比(against)蛋白BLAST(万维网:blast.ncbi.nlm.nih.gov)或通过在NCBI的保守域数据库中搜索(万维网:ncbi.nlm.nih.gov/cdd)。

[0077] 在SEQ ID NO:2中,Cyclin_N结构域的范围为第388位氨基酸至第463位氨基酸,并且Cyclin_C结构域的范围为第466至531位氨基酸。

[0078] 蛋白比蛋白BLAST提供了所用的搜索查询的Cyclin_N和Cyclin_C结构域,包括所查询的序列与所述结构域的比对。应注意,“从”某一数字“至”另一数字包括端点,即包括所

提到的第一个和最后一个数字。因此,对于本文提供的任何蛋白序列,或对于其他变体序列(例如,与本文提供的任何蛋白质序列(例如SEQ ID NO:2、6、12、19或20)包含至少70%、80%、90%、95%或更大的序列同一性的蛋白),可确定Cyclin_N和Cyclin_C结构域。

[0079] 在SEQ ID NO 6中,所述Cyclin_N结构域的范围为第351位氨基酸至第481位氨基酸,并且Cyclin_C结构域的范围为第486位氨基酸至第577位氨基酸。

[0080] 在SEQ ID NO:12中,所述Cyclin_N结构域的范围为第343位氨基酸至第473位氨基酸,并且Cyclin_C结构域的范围为第478位氨基酸至第569位氨基酸。

[0081] 在SEQ ID NO:19中,所述Cyclin_N结构域的范围为第362位氨基酸至第494位氨基酸,并且Cyclin_C结构域的范围为第499位氨基酸至第584位氨基酸。

[0082] 在SEQ ID NO:20中,所述Cyclin_N结构域的范围为第332位氨基酸至第464位氨基酸,并且Cyclin_C结构域的范围为第469位氨基酸至第554位氨基酸。

[0083] 细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因以杂合状态存在于其中的植物将产生种子并且是雄性可育的。因此,这些植物可用于将细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因引入到其他植物中,或者它们可用于将其他性状引入到细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因存在于其中的植物中。这些植物也可用于繁殖包含细胞周期蛋白SDS样编码基因的突变等位基因的植物。在每种情况下,50%的自花授粉后代仍然携带杂合状态的细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因。因此,其中存在细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的植物可用于例如育种中。

[0084] 因此,本发明的一个实施方案涉及本发明的植物细胞或植物,其是细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因杂合型的。

[0085] 在本发明的一个优选的实施方案中,本发明的植物细胞或植物中的细胞周期蛋白SDS样蛋白的活性降低分别是由于存在于植物细胞或植物中的细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因或由其引起或是其效果。

[0086] 在一方面,本发明的植物细胞或植物是编码功能降低的细胞周期蛋白SDS样蛋白或功能丧失的细胞周期蛋白SDS样蛋白的细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因纯合型的。细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因为纯合型的本发明的植物在用自身花粉或获自不同植物(例如来自野生型植物)的花粉授粉后产生无籽果实。

[0087] 因此,本发明的另一个实施方案涉及本发明的植物细胞或植物,其是细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因纯合型的。

[0088] 当植物是突变等位基因纯合型的时候,细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因导致所述植物是雄性可育的但产生无籽果实。关于本发明的实施方案,细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因中的突变可以是任何突变,包括缺失、截短、插入、点突变、无义突变、错义或非同义突变、剪接位点突变、移码突变和/或调控序列中的突变。优选地,细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因中的突变是点突变和/或剪接位点突变。所述突变可以在包含细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的编码序列的DNA序列中或在编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的RNA序列中发生,或者其可以在细胞周期蛋白SDS样蛋白的氨基酸中发生。关于细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的DNA序列,突变可以在编码序列(cds,由外显子组成)中发生,或者其可以在非编码序列(如细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的5'和3'非翻译区、内含子、启动子、增强子等)中发生。关于编码细胞周期蛋白SDS样蛋白

白的RNA,突变可发生在前体mRNA或mRNA中。在一方面,突变等位基因导致由于一个或多个氨基酸被置换、插入和/或缺失而功能丧失或功能降低的蛋白,例如导致在保守的Cyclin_N和/或Cyclin_C结构域中一个或多个氨基酸被置换、插入或缺失。例如,导致Cyclin_C结构域或其部分、或Cyclin_N结构域和Cyclin_C结构域或Cyclin_N结构域的部分和Cyclin_C结构域的缺失的蛋白的截短将导致蛋白的功能丧失或功能降低。

[0089] 因此,本发明的其他实施方案涉及本发明的植物细胞或植物,其包含细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因,其特征在于所述突变等位基因包含或产生(effect)一种或多种选自以下的突变:

[0090] a) 基因组序列中的缺失、截短、插入、点突变、无义突变、错义或非同义突变、剪接位点突变、移码突变;

[0091] b) 一个或多个调控序列中的突变;

[0092] c) 编码序列中的缺失、截短、插入、点突变、无义突变、错义或非同义突变、剪接位点突变、移码突变;

[0093] d) 前体mRNA或mRNA中的缺失、截短、插入、点突变、无义突变、错义或非同义突变、剪接位点突变、移码突变;

[0094] e) 细胞周期蛋白SDS样蛋白中的一个或多个氨基酸的缺失、截短、插入或置换。

[0095] 与SEQ ID NO 1相比,在本文公开为一个实施方案的细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因之一(存在于EMB1突变西瓜植物中)在SEQ ID NO 1的第2185位核苷酸处具有点突变(G被A置换)。在SEQ ID NO 3中示出了从所公开的细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因转录的mRNA。以SEQ ID NO 1示出的细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的野生型等位基因的第2186至2201位的相应核苷酸不存在于以SEQ ID NO 3示出的mRNA中。因此,在细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因中存在的点突变导致与转录自相应的野生型等位基因的mRNA相比转录自突变等位基因的mRNA中的16个核苷酸的缺失。通过导致相应mRNA的其他剪接的剪接位点的突变解释了转录自突变等位基因的mRNA中的缺失。此外,转录自所公开的细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的mRNA中的16个核苷酸的缺失导致与转录自相应的野生型等位基因的mRNA相比转录自突变等位基因的mRNA的读码框中的移码。翻译自细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的野生型等位基因的蛋白以SEQ ID NO 2示出。翻译自细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的蛋白以SEQ ID NO 4示出。相应的编码SEQ ID NO 2中第358至363位氨基酸(Ile-Leu-Arg-Phe-Glu-Glu)的核苷酸序列不存在于SEQ ID NO 4中,并且由于读码框中的移码,其余氨基酸序列是不同的,并且SEQ ID NO 2中的第364至562位氨基酸被SEQ ID NO 4中的8个异常氨基酸Asn-Trp-Thr-Met-Lys-Pro-Ile(即SEQ ID NO 4的第358至365位氨基酸)置换。与562个氨基酸的野生型蛋白相比,突变细胞周期蛋白SDS样蛋白短得多,只有365个氨基酸。因此,与以SEQ ID NO 2示出的野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白相比,如SEQ ID NO 4所示的突变细胞周期蛋白SDS样蛋白的氨基酸序列包含氨基酸缺失和氨基酸置换。此外,转录自SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的mRNA的读码框中的移码引起产生提前终止密码子(premature stop codon)的无义突变(SEQ ID NO 3中的第1096至1098位核苷酸),导致与以SEQ ID NO 2示出的野生型等位基因编码的相应氨基酸序列相比,由所述突变等位基因编码的氨基酸序列在C末端被截短197个氨基酸。因此,与野生型蛋白相比,野生型C-末端的

205个氨基酸由于移码而被C-末端处的8个不同(异常)氨基酸置换,产生了比野生型蛋白质短197个氨基酸的突变蛋白。因此,与野生型蛋白相比,突变蛋白是截短的,因为突变蛋白中缺少野生型C末端的205个氨基酸。野生型蛋白中的仅外显子1的氨基酸(SEQ ID NO:2的第1至357位氨基酸)仍存在于突变蛋白中。这意指保守蛋白结构域Cyclin_N和Cyclin_C也不存在,意味着突变蛋白没有功能(即突变等位基因是功能丧失的等位基因)或功能降低。

[0096] 总之,在一方面,本文中具体公开的用于举例说明本申请的是细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的核酸序列,其与相应野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的核酸序列相比具有点突变(核苷酸置换)。细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因中的点突变导致引起相应前体mRNA的可变剪接的剪接位点突变。可变剪接导致转录自细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的mRNA的开放阅读框中的移码。所述转录自细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的mRNA的开放阅读框中的移码导致核苷酸的缺失、核苷酸的置换(错义或非同义突变)和产生与转录自相应的野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的mRNA相比转录自细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的mRNA中的提前终止密码子的无义突变的产生。与翻译自从相应的野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因转录的mRNA的氨基酸序列相比,翻译自从突变的细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因转录的mRNA的蛋白的相应氨基酸序列显示出氨基酸的缺失、氨基酸的置换和C末端氨基酸序列的截短。由于点突变位于第一个内含子中,突变体中缺少野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白的外显子2、外显子3和外显子4编码的氨基酸,即只有野生型SDS样蛋白的外显子1编码的氨基酸存在于突变蛋白中。

[0097] 在西瓜中,细胞周期蛋白SDS样蛋白的外显子1编码SEQ ID NO 2的第1至357位氨基酸;在甜瓜中,细胞周期蛋白SDS样蛋白的外显子1编码SEQ ID NO:6中的第1至338位氨基酸;在黄瓜中,细胞周期蛋白SDS样蛋白的外显子1编码SEQ ID NO:12中的第1至330位氨基酸;在番茄中,细胞周期蛋白SDS样蛋白的外显子1编码SEQ ID NO 19中的第1至350位氨基酸;在辣椒中,细胞周期蛋白SDS样蛋白的外显子1编码SEQ ID NO 20中的第1至320位氨基酸。

[0098] 除了上文(和实施例)中描述的西瓜EMB1突变植物之外,通过诱变产生了另一种西瓜植物,其在细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因中包含不同突变。该突变体在SEQ ID NO:1的第1687处核苷酸包含C(胞嘧啶)至T(胸腺嘧啶)的核苷酸取代,导致密码子'cag'(编码氨基酸谷氨酰胺,野生型蛋白的第224位氨基酸)被改变为'tag',这是一个终止密码子。突变cDNA示于SEQ ID NO 17中,并且仅包含由外显子1编码的部分氨基酸(即仅第1至223位氨基酸而不是第1至357位氨基酸)的截短蛋白示于SEQ ID NO 18中。与在EMB1突变植物中一样,突变蛋白中缺少所述两个保守结构域,即Cyclin_N和Cyclin_C结构域。该突变体也导致细胞周期蛋白SDS样蛋白的功能丧失(或至少导致功能降低)。

[0099] 在本发明的一方面,细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因具有导致与野生型相比编码Cyclin_N和/或Cyclin_C结构域的一个或多个或所有氨基酸缺失或被不同的氨基酸置换的突变。在一方面,所述突变等位基因导致缺少全部或部分Cyclin_N和/或全部或部分Cyclin_C结构域的截短的蛋白。例如,所述突变等位基因含有导致提前终止密码子的突变,由此在所得的蛋白中不再存在全部或部分Cyclin_N和/或全部或部分Cyclin_C结构域。

[0100] 在一方面,所述突变等位基因是SEQ ID NO:1的西瓜细胞周期蛋白SDS样基因的突变等位基因,并且导致SEQ ID NO:4的蛋白或SEQ ID NO:18的蛋白。

[0101] 在本发明的一方面,细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因具有导致野生型蛋白的由外显子2、3和/或4编码的氨基酸不存在的突变。因此,在一方面,所述突变等位基因编码截短的细胞周期蛋白SDS样蛋白/或包含缺失的蛋白,其缺少野生型蛋白的由外显子2、3和/或4编码的氨基酸,即其缺少SEQ ID NO 2的第358至413位氨基酸(外显子2)或SEQ ID NO:6的第339至394位氨基酸(外显子2)、SEQ ID NO 12的第331至386位氨基酸(外显子2)、SEQ ID NO:19的第351至407位氨基酸、SEQ ID NO:20的第321至377位氨基酸(外显子2)、和/或SEQ ID NO 2的第414至469位氨基酸(外显子3)或SEQ ID NO 6的第395至493位氨基酸、SEQ ID NO 12的第387至485位氨基酸(外显子3)、SEQ ID NO 19的第408至506位氨基酸(外显子3)、SEQ ID NO 20的第378至476位氨基酸(外显子3)、和/或SEQ ID NO 2的第470至562位氨基酸(外显子4)或SEQ ID NO:6的第494至577位氨基酸(外显子4)或SEQ ID NO 12的第486至569位氨基酸(外显子4)、SEQ ID NO:19的第507至590位氨基酸(外显子4)、SEQ ID NO 20的第477至560位氨基酸(外显子4)。任选地,所述突变等位基因编码截短的细胞周期蛋白SDS样蛋白或包含缺失的蛋白质,其进一步缺少外显子1编码的氨基酸的全部或部分,即SEQ ID NO 2的第1至357位氨基酸或SEQ ID NO:6的第1至338位氨基酸或SEQ ID NO:12的第1至330位氨基酸或SEQ ID NO 19的第1至350位氨基酸,或SEQ ID NO 20的第1至320位氨基酸。对于其他细胞周期蛋白SDS样蛋白(例如来自其他物种的直系同源物)的由外显子1、2、3和4编码的相应氨基酸区域,可以通过基因组DNA或氨基酸序列的成对比对来鉴定。应注意,仅对于SEQ ID NO 2,外显子被确定为真实的外显子(由基因组DNA上的内含子分开),而对于其他序列,外显子通过比对被确定,并且可能不是真正的外显子,而是对应于SEQ ID NO 2的外显子的氨基酸,并且因此也可被简称为蛋白的氨基酸区域。

[0102] 在本发明的一个的优选实施方案中,细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因在其编码序列的5'末端(编码蛋白的N-末端)具有或导致突变。更优选的是,细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因在其编码序列的5'末端具有或导致点突变和/或截短。本领域公知,基因的起始密码子(ATG)中的突变将产生以下效果:相应基因不被翻译成相应的全长蛋白。对于翻译,可以使用下一个可能的起始密码子(ATG),但是这将导致蛋白在N-末端的氨基酸截短(在下一个ATG出现在相同的读码框的情况下),或导致产生具有不同氨基酸序列的蛋白。在这两种情况下,5'末端的相应突变将导致酶活性降低或丧失的蛋白的产生。在本发明的一个优选的实施方案中,细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因在起始密码子中具有突变。所述起始密码子中的突变可以是其三个核苷酸中的任意一个的点突变或起始密码子的至少第一个、至少第一个和第二个或至少所有三个核苷酸的缺失/截短。

[0103] 本发明的其他优选的实施方案是细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因,其导致其编码序列的3'末端(编码蛋白的C末端)缺失。由于保守的Cyclin_C结构域存在于蛋白的C末端,导致部分Cyclin_C结构域(例如Cyclin_C结构域的1、2、3、4、5或更多个氨基酸或甚至全部Cyclin_C结构域”)不存在的截短将导致功能降低或无功能的蛋白。C末端处的较长截短甚至会导致部分或全部Cyclin_N结构域缺失,这同样会导致功能降低或无功能的蛋白。Cyclin_C和Cyclin_N结构域之间只有五个氨基酸。C末端的约90个或更多个氨

基酸的截短导致大多数细胞周期蛋白SDS样蛋白缺少Cyclin_C结构域，并且95、100、110或更多个氨基酸的更长截短将导致Cyclin_N结构域至少部分缺失。如前所述，此类截短包括在本文中，因为其导致功能降低或无功能的蛋白。如前所述，为了测试蛋白质是否具有降低的功能或无功能，可以对突变体等位基因纯合型的突变植物进行表型测试，以观察是否出现预期的表型。

[0104] 优选地，细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因导致在蛋白编码序列的3'末端处的至少10、20、30、40或50个核苷酸，优选至少100个核苷酸，更优选至少200个核苷酸，甚至更优选至少300个核苷酸，还优选至少400个核苷酸，最优选至少500个核苷酸，特别优选至少615个核苷酸的截短。来自编码序列的591个核苷酸的截短转变为相应蛋白质序列的197个氨基酸的截短。与相应的野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白(SEQ ID NO 2)的氨基酸序列相比，具有197个氨基酸截短的细胞周期蛋白SDS样蛋白的优选实例示于SEQ ID NO 4中。另一个实例是与相应的野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白(SEQ ID NO 2)相比339个氨基酸(即编码区的1017个核苷酸)的截短，其示于SEQ ID NO 18中。

[0105] 在一个实施方案中，细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因在编码SEQ ID NO:2的蛋白的核酸序列中(导致所编码的蛋白包含与野生型相比的缺失或截短)、或在编码与SEQ ID NO 2包含至少70%、80%、90%、95%或更大的氨基酸序列同一性的蛋白(例如SEQ ID NO 6，其与SEQ ID NO 2具有71%的序列同一性)的任意核酸序列中具有上述任何突变。

[0106] 在另一个实施方案中，细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因在编码SEQ ID NO:6的蛋白的核酸序列中(导致所编码的蛋白包含与野生型相比的缺失或截短)、或在编码与SEQ ID NO 6具有至少70%、80%、90%、95%或更大的氨基酸序列同一性的蛋白的任意核酸序列中具有上述任何突变。

[0107] 在另一个实施方案中，细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因在编码SEQ ID NO:12的蛋白的核酸序列中(导致所编码的蛋白包含与野生型相比的缺失或截短)、或在编码与SEQ ID NO 12具有至少70%、80%、90%、95%或更大的氨基酸序列同一性的蛋白的任意核酸序列中具有上述任何突变。

[0108] 在另一个实施方案中，细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因在编码SEQ ID NO:19的蛋白的核酸序列中(导致所编码的蛋白包含与野生型相比的缺失或截短)、或在编码与SEQ ID NO 19具有至少70%、80%、90%、95%或更大的氨基酸序列同一性的蛋白的任意核酸序列中具有上述任何突变。

[0109] 在另一个实施方案中，细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因在编码SEQ ID NO:20的蛋白的核酸序列中(导致所编码的蛋白包含与野生型相比的缺失或截短)、或在编码与SEQ ID NO 20具有至少70%、80%、90%、95%或更大的氨基酸序列同一性的蛋白的任意核酸序列中具有上述任何突变。

[0110] 在其他优选的实施方案中，细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因在SEQ ID NO 1所示的核酸序列中或在与SEQ ID NO 1所示的核酸序列具有至少58%或60%、优选至少70%、更优选至少80%、甚至更优选至少90%或特别优选至少95%的同一性的序列中具有上述任何突变。在一方面，细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因在SEQ ID NO 1所示的核酸序列中或在与SEQ ID NO 1所示的核酸序列具有至少58%或60%、

优选至少70%、更优选至少80%、甚至更优选至少90%或特别优选至少95%的同一性的变体序列中包含突变,其中,SEQ ID NO 1中的第2185位核苷酸位置处的核苷酸鸟嘌呤(G)被腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)或胸腺嘧啶(T)置换,最优选SEQ ID NO 1中的第2185位核苷酸位置处的核苷酸鸟嘌呤(G)或变体序列中的等同核苷酸被腺嘌呤(A)置换。最优选地,细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因具有SEQ ID NO 1所示的核苷酸序列,除了SEQ ID NO 1中第2185位核苷酸位置处的核苷酸鸟嘌呤(G)被腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)或胸腺嘧啶(T)置换,最特别优选SEQ ID NO 1中的第2185位核苷酸位置处的核苷酸鸟嘌呤(G)被腺嘌呤(A)置换。在不同的方面,细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因在SEQ ID NO 1所示的核酸序列中或在与SEQ ID NO 1所示的核酸序列具有至少58%或60%、优选至少70%、更优选至少80%、甚至更优选至少90%或特别优选至少95%的同一性的变体序列中包含突变,其中,在细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因中,在第1687位核苷酸处的核苷酸胞嘧啶(C)或变体序列中的等同核苷酸被不同的核苷酸,优选被胸腺嘧啶(T)置换。

[0111] 本发明的另一个实施方案涉及包含或合成编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的mRNA的植物细胞、植物部分或植物,其中所述编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的mRNA具有一个或多个选自以下的突变:

- [0112] a) 缺失突变
- [0113] b) 错义或非同义突变;
- [0114] c) 移码突变;和/或
- [0115] d) 无义突变。

[0116] 在本发明的一个优选的实施方案中,本发明的植物细胞、植物部分或植物包含或合成编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的mRNA,所述蛋白具有一种或多种选自以下的突变:

- [0117] a) 缺失突变
- [0118] b) 错义或非同义突变;
- [0119] c) 移码突变;和/或
- [0120] d) 无义突变。

[0121] 关于一个或多个核苷酸的缺失和置换,本发明的植物细胞或植物优选包含或合成编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的mRNA,其中与编码野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白的mRNA相比,所述mRNA包含至少1个、至少2个、至少4个、至少5个、至少7个、至少8个、至少10个、至少11个、至少13个、至少14个或优选至少16个核苷酸的缺失。在一方面,所述mRNA中缺失的核苷酸是细胞周期蛋白SDS样蛋白的外显子1、外显子2、外显子3和/或外显子4的一个或多个核苷酸和/或所述mRNA中缺失的核苷酸是细胞周期蛋白SDS样蛋白的Cyclin_N或Cyclin_C结构域的一个或多个核苷酸。在一方面,所述核苷酸是外显子2的核苷酸,例如,从SEQ ID NO 1的第2186位核苷酸开始并在第2201位核苷酸结束的一个或多个或所有核苷酸。

[0122] 优选地,本发明的植物细胞或植物包含或合成编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的mRNA,其特征在于所述mRNA包含移码突变和/或无义突变。所述无义突变产生提前终止密码子以及因此mRNA编码序列的截短。本发明的一个优选实施方案涉及本发明的植物细胞或植物,其包含编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的mRNA,其特征在于所述mRNA包含编码序列的截短。与编码野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白的mRNA相比,所述细胞周期蛋白SDS样蛋白的

mRNA编码序列的截短优选是至少100个核苷酸的截短，优选至少200个核苷酸的截短，更优选至少300个核苷酸的截短，甚至更优选至少400个核苷酸的截短，还更优选至少500个核苷酸的截短，特别优选至少591个核苷酸的截短。在一方面，所述mRNA编码序列的截短导致外显子2、3和4不存在；或外显子3和4不存在；或外显子4不存在。在另一方面，所述mRNA编码序列的截短导致外显子1的全部或部分、外显子2的全部、外显子3的全部和外显子4的全部都不存在。在另一方面，所述移码突变导致外显子2的全部或部分处于不同的读码框中。在不同的方面，所述移码突变导致外显子3和/或外显子4的全部或部分处于不同的读码框中。所述移码可能是由于一个或多个(不是三的倍数的任意数，例如1、2、4、5、7、8、10等)核苷酸的缺失引起的，由此读码框被改变。

[0123] 在一个优选的实施方案中，本发明的植物细胞、植物部分或植物包含或合成编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的mRNA，所述mRNA与SEQ ID NO 1或SEQ ID NO 5或SEQ ID NO 17中所示的相应编码序列具有至少58%或至少60%、优选至少70%、更优选至少80%、甚至更优选至少90%或特别优选至少95%的序列同一性，前提是所述编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的mRNA包含无义突变或提前终止密码子。在一个实施方案中，所述终止密码子位于SEQ ID NO:1的外显子1中，例如，在第1687至1689位核苷酸处。在其他优选的实施方案中，本发明的植物细胞、植物部分或植物包含或合成编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的mRNA，所述mRNA与SEQ ID NO 3中所示的编码序列具有至少58%或至少60%、优选至少70%、更优选至少80%、甚至更优选至少90%或特别优选至少95%的序列同一性，前提是SEQ ID NO 3中的第1096至1098位核苷酸代表终止密码子。在本发明的最优选的实施方案中，本发明的植物细胞或植物包含或合成编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的mRNA，所述mRNA具有SEQ ID NO 3所示的序列。

[0124] 在本发明的另一个实施方案中，本发明的植物细胞或植物包含或合成编码具有一个或多个突变的细胞周期蛋白SDS样蛋白的mRNA，其中所述mRNA从细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因转录。由本发明的这些实施方案包含的是本发明的植物细胞、植物部分或植物，其包含或合成从细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因转录的mRNA，其特征在于与mRNA从其中转录的细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的相应(DNA)编码序列相比，所述mRNA包含缺失突变和/或错义或非同义突变和/或移码突变和/或无义突变。因此，在一方面，包括影响前体mRNA剪接的任何突变，即其修饰正常的前mRNA剪接过程，从而产生不同的mRNA分子。

[0125] 关于缺失突变，在一方面，本发明的植物细胞或植物包含或合成从细胞周期蛋白SDS样蛋白质编码基因的突变等位基因转录的mRNA，其中与mRNA从其中转录的细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的相应(DNA)编码序列相比，所述mRNA包含至少1个、至少2个、至少4个、至少5个、至少7个、至少8个、至少10个、至少11个、至少13个、至少14个或至少16个核苷酸的缺失。在一方面，所述mRNA中缺失的核苷酸是细胞周期蛋白SDS样蛋白的外显子1、外显子2、外显子3和/或外显子4的一个或多个核苷酸。在一方面，所述核苷酸是外显子2的核苷酸，例如，从SEQ ID NO 1的第2186位核苷酸开始并在第2201位核苷酸结束的一个或多个或所有核苷酸。

[0126] 优选地，本发明的植物细胞或植物包含或合成从细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因转录的mRNA，其特征在于与mRNA从其中转录的细胞周期蛋白SDS样蛋白

编码基因的突变等位基因的(DNA)编码序列相比,所述mRNA包含移码突变和/或无义突变。所述无义突变在mRNA中产生提前终止密码子,其导致mRNA编码序列的3'末端截短和细胞周期蛋白SDS样蛋白的C末端处的截短。因此,本发明的一个优选的实施方案涉及本发明的植物细胞或植物,其包含或合成从细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因转录的mRNA,其特征在于与mRNA从其中转录的细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的(DNA)编码序列相比,所述mRNA包含编码序列的截短。细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的mRNA编码序列的截短优选是至少100个核苷酸的截短,更优选至少200个核苷酸的截短,甚至更优选至少300个核苷酸的截短,更优选至少400个核苷酸的截短,更优选至少500个核苷酸的截短,特别优选至少591个核苷酸的截短。在一方面,所述mRNA编码序列的截短导致外显子2、3和4不存在;或外显子3和4不存在;或外显子4不存在。在另一方面,所述mRNA编码序列的截短导致外显子1的全部或部分、外显子2的全部、外显子3的全部和外显子4的全部都不存在。在另一方面,所述移码突变导致外显子2的全部或部分处于不同的读码框中。在不同的方面,所述移码突变导致外显子3和/或外显子4的全部或部分处于不同的读码框中。所述移码突变可能是由于一个或多个(不是三的倍数的任意数,例如1、2、4、5、7、8、10等)核苷酸的缺失引起的,由此读码框被改变。

[0127] 在其他优选的实施方案中,本发明的植物细胞或植物包含或合成与SEQ ID NO 1中所示的相应(DNA)编码序列具有至少58%或至少60%、优选至少70%、更优选至少80%、甚至更优选至少90%或特别优选至少95%的同一性的mRNA,前提是与SEQ ID NO 1中所示的相应(DNA)编码序列相比,所述mRNA序列包含至少一个无义突变或提前终止密码子,优选地,所述无义突变发生在SEQ ID NO 3中的第1096至1098位核苷酸处。在一方面,所述提前终止密码子位于SEQ ID NO:1的第1687至1689位核苷酸处。在本发明一个特别优选的实施方案中,本发明的植物细胞或植物包含具有SEQ ID NO 3所示的核苷酸序列的mRNA。

[0128] “mRNA编码序列”在本文中应具有通用含义。mRNA编码序列对应于基因/等位基因的相应DNA编码序列,除了胸腺嘧啶(T)被尿嘧啶(U)置换。

[0129] 对于任何上述突变或突变组合(例如导致移码的核苷酸缺失),应理解它们导致本发明的植物细胞、植物部分或中细胞周期蛋白SDS样蛋白活性的功能降低或功能丧失。

[0130] 本发明的另一个实施方案涉及包含或合成细胞周期蛋白SDS样蛋白的植物细胞、植物部分或植物,其特征在于与相应的野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白相比,所述细胞周期蛋白SDS样蛋白的氨基酸序列包含突变。所述细胞周期蛋白SDS样蛋白中的突变导致本发明的植物细胞、植物部分或植物中细胞周期蛋白SDS样蛋白活性的功能降低或功能丧失。

[0131] 特别优选的是包含或合成细胞周期蛋白SDS样蛋白的本发明的植物细胞、植物部分或植物,其特征在于与相应的野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白相比,所述细胞周期蛋白SDS样蛋白的氨基酸序列包含突变。

[0132] 与野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白的氨基酸序列相比,所述细胞周期蛋白SDS样蛋白中的突变可以是氨基酸置换、插入、缺失和/或截短。在本发明的一个优选实施方案中,所述细胞周期蛋白SDS样蛋白的氨基酸序列包含缺失或截短,更优选在N-末端和/或C-末端的截短,甚至更优选在C-末端的截短。优选地,与相应的野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白相比,从所述氨基酸序列的N-末端或C-末端缺失至少10个,至少25个,优选至少50、60、70、80、90或100个,更优选至少150个,甚至更优选至少197个或至少200、250、300或339个氨基酸。关

于C-末端，细胞周期蛋白SDS样蛋白中的突变是与相应的野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白相比至少25个，优选至少50、60、70、80、90个，优选至少100个，更优选至少150个，甚至更优选至少197个或至少200、250、300或339个氨基酸的截短。在另一方面，所述细胞周期蛋白SDS样蛋白的突变导致由外显子2、3和4编码的氨基酸不存在；或由外显子3和4编码的氨基酸不存在；或由外显子4编码的氨基酸不存在。在另一方面，所述突变导致由外显子1编码的全部或部分氨基酸、由外显子2编码的全部氨基酸、由外显子3编码的全部氨基酸和由外显子4编码的全部氨基酸不存在。在另一方面，所述突变导致由外显子2编码的全部或部分氨基酸被不同的氨基酸置换（例如由于读码框移位）。在不同的方面，所述突变导致由外显子3和/或外显子4的全部或部分编码的氨基酸被不同的氨基酸置换（例如由于阅读框移位）。在不同的方面，所述突变导致全部或部分Cyclin_C和/或Cyclin_N结构域不存在。在另一个不同的方面，所述突变导致Cyclin_C和/或Cyclin_N结构域包含被置换、插入或缺失的一个或多个氨基酸。

[0133] 还提供了本发明的植物细胞、植物部分或植物，其包含或合成与SEQ ID NO 4或SEQ ID NO 18中所示的氨基酸序列具有至少58%或至少60%、优选至少70%、更优选至少80%、甚至更优选至少90%或特别优选至少95%的同一性的细胞周期蛋白SDS样蛋白。在最优选的实施方案中，所述在在植物细胞、植物部分或植物中包含或合成的蛋白具有SEQ ID NO 4或SEQ ID NO 18中所示的氨基酸序列。

[0134] 因此，本发明的其他实施方案涉及选自物种西瓜、甜瓜、黄瓜、番茄和辣椒的植物细胞或植物，其包含细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因，其特征在于所述突变等位基因包含或影响一种或多种选自以下的突变：

[0135] a) 基因组序列中的缺失、截短、插入、点突变、无义突变、错义或非同义突变、剪接位点突变、移码突变；

[0136] b) 一个或多个调控序列中的突变；

[0137] c) 编码序列中的缺失、截短、插入、点突变、无义突变、错义或非同义突变、剪接位点突变、移码突变；

[0138] d) 前体mRNA或mRNA中的缺失、截短、插入、点突变、无义突变、错义或非同义突变、剪接位点突变、移码突变；和/或

[0139] e) 细胞周期蛋白SDS样蛋白中的一个或多个氨基酸的缺失、截短、插入或置换。

[0140] 与野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白相比，上述突变等位基因导致突变的细胞周期蛋白SDS样蛋白的活性降低。所述活性降低是由于细胞周期蛋白SDS样基因表达的敲除、基因表达的敲低、所编码的突变细胞周期蛋白SDS样蛋白的功能丧失或突变细胞周期蛋白的功能的降低。

[0141] 在一方面，其中所述植物细胞或植物是西瓜，所述细胞周期蛋白SDS样蛋白的突变等位基因是编码以下蛋白的等位基因的突变等位基因：SEQ ID NO:2的蛋白或在将功能性SDS样蛋白的两个全长序列进行成对比对时与SEQ ID NO:2包含基本序列同一性（优选至少60%、70%、80%、90%的序列同一性）的蛋白。

[0142] 在另一方面，其中所述植物细胞或植物是甜瓜，所述细胞周期蛋白SDS样蛋白的突变等位基因是编码以下蛋白的等位基因的突变等位基因：SEQ ID NO:6的蛋白或在将功能性SDS样蛋白的两个全长序列进行成对比对时与SEQ ID NO:6包含基本序列同一性（优选至

少60%、70%、80%、90%的序列同一性)的蛋白。

[0143] 在另一方面,其中所述植物细胞或植物是黄瓜,所述细胞周期蛋白SDS样蛋白的突变等位基因是编码以下蛋白的等位基因的突变等位基因:SEQ ID NO:12的蛋白或在将功能性SDS样蛋白的两个全长序列进行成对比对时与SEQ ID NO:12包含基本序列同一性(优选至少60%、70%、80%、90%的序列同一性)的蛋白。

[0144] 在另一方面,其中所述植物细胞或植物是番茄,所述细胞周期蛋白SDS样蛋白的突变等位基因是编码以下蛋白的等位基因的突变等位基因:SEQ ID NO:19的蛋白或在将功能性SDS样蛋白的两个全长序列进行成对比对时与SEQ ID NO:19包含基本序列同一性(优选至少60%、70%、80%、90%的序列同一性)的蛋白。

[0145] 在另一方面,其中所述植物细胞或植物是辣椒,所述细胞周期蛋白SDS样蛋白的突变等位基因是编码以下蛋白的等位基因的突变等位基因:SEQ ID NO:20的蛋白或在将功能性SDS样蛋白的两个全长序列进行成对比对时与SEQ ID NO:20包含基本序列同一性(优选至少60%、70%、80%、90%的序列同一性)的蛋白。

[0146] 在一方面,所述西瓜、甜瓜、黄瓜、番茄或辣椒植物包含杂合形式的突变细胞周期蛋白SDS样等位基因。在另一方面,所述西瓜、甜瓜、黄瓜、番茄或辣椒植物包含纯合形式的突变细胞周期蛋白SDS样等位基因,由此所述植物在用自身花粉或其他花粉授粉后产生无籽果实。在一个优选的方面,所述突变的细胞周期蛋白SDS样等位基因是敲除(即基因不表达)或所述等位基因编码无功能的细胞周期蛋白SDS样蛋白。

[0147] 本文涵盖了可以生长出这些植物的种子,以及当等位基因是纯合形式时由所述植物产生的无籽果实,或者当等位基因是杂合形式时由所述植物产生的有籽果实。还提供了在其基因组中包含至少一个突变的细胞周期蛋白SDS样等位基因的任何植物部分,例如插条、营养繁殖体、细胞等。

[0148] 本文还提供了包含至少一个拷贝的突变细胞周期蛋白SDS样等位基因拷贝的繁殖和非繁殖细胞。应理解,这种繁殖或非繁殖细胞可以是植物器官或整个植物的一部分,或者它们可以是分离的,例如在细胞或组织培养中。

[0149] 本文提供的在其基因组中包含至少一个突变的细胞周期蛋白SDS样等位基因的种子、植物和植物部分优选是农艺学上有用的植物,例如近交系、育种系、品种或栽培种或F1杂种。优选地,它们具有良好的农艺学特性,特别是产生具有良好果实品质和果实均一性的可销售的果实。

[0150] 本文使用的术语“品种”或“栽培种”意指在已知的最低等级的单个植物分类群内的一组植物,其可通过由给定基因型或基因型组合产生的特征的表达来定义。

[0151] “F1杂种”植物(或F1杂种种子)是通过杂交两个近交亲本株系获得的世代。因此,F1杂种种子是长出F1杂种植物的种子。由于杂种优势,F1杂种更有活力、产量更高。近交系在基因组中的大多数基因座处基本上是纯合的。

[0152] “植物系”或“育种系”是指植物及其后代。本文使用的术语“近交系”是指已经反复自交并且几乎是纯合的植物系。因此,“近交系”或“亲本系”是指经历了几代(例如,至少5、6、7或更多代)近交的植物,导致具有高度均一性的植物系。

[0153] 西瓜细胞周期蛋白SDS样等位基因位于基因组的第7号染色体上(在第7450185和7445051位核苷酸之间)。所述染色体位置可通过对整个基因组进行BLAST(例如,在万维网

(icugi.org/pub/genome/watermelon/97103)上来确定。黄瓜细胞周期蛋白SDS样等位基因似乎也位于黄瓜基因组的第5号染色体上(在第848447和852718位核苷酸之间)(万维网(icugi.org/pub/genome/cucumber/Chinese_long/)。

[0154] 对于西瓜,可以从以NCIMB 42532保藏的细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因杂合型或纯合型的西瓜种子中获得细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因。可以从以NCIMB 42532保藏的野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因杂合型或纯合型的西瓜种子中获得细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的野生型等位基因。对于经保藏的种子,细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的相应等位基因被命名为emb1。细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的其他突变等位基因可以从头产生,例如,通过诱变或本领域技术人员已知的其他方法。这适用于任何植物物种。

[0155] 在实施例中提供了在西瓜中从头生成另一种突变SDS样等位基因的一个实例。在本文,发明人通过诱变西瓜种子来产生突变群体,然后使用TILLING鉴定包含突变SDS样等位基因的植物。经鉴定的等位基因在SEQ ID NO:1的第1687位核苷酸处包含单核苷酸置换,产生终止密码子。因此,突变等位基因编码截短的细胞周期蛋白SDS样蛋白,其仅包含野生型蛋白的第1至223位氨基酸(参见SEQ ID NO:18)。

[0156] 从以NCIMB 42532保藏的、SDS样蛋白编码基因的等位基因杂合型或纯合型的种子中可获得的/获得的植物细胞、植物部分或植物或其后代也是本发明的一个实施方案。在一个优选的实施方案中,从以NCIMB42532保藏的种子获得的植物细胞、植物部分或植物或其后代是细胞周期蛋白SDS样编码基因的突变等位基因纯合型的。本发明还包括的实施方案涉及植物细胞、植物部分或植物,其为在将获自保藏登录号为NCIMB42532的种子的西瓜植物与另一植物杂交后获得/可获得的细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因纯合型的。优选地,随后使在将获自保藏登录号为NCIMB 42532的种子的植物与另一植物杂交后获得/可获得的植物细胞或植物自花授粉,并且任选地在其他步骤中选择产生无籽果实的植物和/或选择细胞周期蛋白SDS样编码基因的突变等位基因为纯合型的植物。

[0157] 术语“等位基因”意指特定基因座上的基因的一种或多种替代形式中的任一种,所有这些等位基因均与特定基因座处的一种性状或特征相关。在生物的二倍体细胞中,给定基因的等位基因位于染色体上的特定位置或基因座。一个等位基因存在于一对同源染色体中的每条染色体上。二倍体植物物种可以在特定的基因座上包含大量不同的等位基因。这些等位基因可以是所述基因的相同等位基因(纯合的)或两个不同的等位基因(杂合的)。

[0158] “野生型等位基因”在本文中是指编码完全功能性的蛋白(野生型蛋白)的基因的形式。编码完全功能性的细胞周期蛋白SDS样蛋白的基因的序列例如是SEQ ID NO 1(来自栽培西瓜)和SEQ ID NO 5(来自栽培甜瓜)所示的野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白序列的编码序列。由该野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因编码的氨基酸序列分别描述于SEQ ID NO 2或SEQ ID NO 6中。其他野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白示于SEQ ID NO 12(黄瓜)、SEQ ID NO:19(番茄)和SEQ ID NO:20(辣椒)中。编码完全功能性的细胞周期蛋白SDS样蛋白等位基因(即变体等位基因或等位基因变体)的其他细胞周期蛋白SDS样蛋白编码核酸序列存在于其他植物中,并且可至少与以SEQ ID NO 1或SEQ ID NO 5示出的核酸序列的编码序列、或以SEQ ID NO 2或SEQ ID NO 6或SEQ ID NO:12、或SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:20示出的氨基酸序列包含基本序列同一性。例如,SEQ ID NO 12的栽培黄瓜细胞周期蛋白SDS

样蛋白与甜瓜的野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白 (SEQ ID NO 6) 具有86%的氨基酸序列同一性，并且与西瓜的野生型SDS样蛋白 (SEQ ID NO 2) 具有70%氨基酸序列同一性。

[0159] 结合本发明，“突变等位基因”应理解为意指与相应的野生型等位基因相比具有突变的等位基因。从细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因转录的mRNA的实例示于SEQ ID NO 3中。由SEQ ID NO 3所示的mRNA编码的相应氨基酸序列示于SEQ ID NO 4中。

[0160] 术语“基因座”意指染色体上的存在例如基因或遗传标记物的一个或多个具体位置或位点。

[0161] 核酸分子 (DNA或RNA) 中的“突变”是与相应的野生型序列相比一个或多个核苷酸的改变，例如通过一个或多个核苷酸的置换、缺失或插入。这种突变的实例是点突变、无义突变、错义突变、剪接位点突变、移码突变或调控序列中的突变。

[0162] “核酸分子”应具有本领域中的通用理解。其由包含糖类脱氧核糖 (DNA) 或核糖 (RNA) 的核苷酸组成。

[0163] “点突变”是单个核苷酸的置换，或单个核苷酸的插入或缺失。

[0164] “无义突变”是编码蛋白的核酸序列中的(点)突变，由此核酸分子中的一个密码子变为终止密码子。这导致在mRNA中存在提前终止密码子并导致截短的蛋白的翻译。截短的蛋白可能具有降低的功能或丧失功能。

[0165] “错义或非同义突变”是编码蛋白的核酸序列中的(点)突变，由此一个密码子变为编码不同氨基酸的密码子。所产生的蛋白质可能具有降低的功能或丧失功能。

[0166] “剪接位点突变”是编码蛋白的核酸序列中的突变，由此前体mRNA的RNA剪接发生改变，产生了具有与野生型不同的核苷酸序列的mRNA和具有与野生型不同的氨基酸序列的蛋白。所产生的蛋白可能具有降低的功能或丧失功能。

[0167] “移码突变”是编码蛋白质的核酸序列中的突变，由此mRNA的读码框发生改变，产生不同的氨基酸序列。所产生的蛋白质可能具有降低的功能或丧失功能。

[0168] 本发明上下文中的“缺失”应意指与相应的野生型序列的核酸序列相比在给定核酸序列中的任意位置处缺少至少一个核苷酸，或与相应(野生型)序列的氨基酸序列相比在给定氨基酸序列中的任意位置处缺少至少一个氨基酸。

[0169] “截短”应理解为意指与相应野生型序列的核酸序列相比在核苷酸序列的3'末端或5'末端处缺少至少一个核苷酸，或与相应野生型蛋白的氨基酸序列相比在蛋白的N-末端或C-末端处缺少至少一个氨基酸，由此在在3'末端或C末端截短中，5'末端处的至少第一个核苷酸或N末端处的至少第一个氨基酸分别仍存在，或在5'末端或N末端截短中，3'末端处的至少最后一个核苷酸或N末端处的至少最后一个氨基酸分别仍存在。5'末端由ATG密码子决定，该密码子在相应野生型核酸序列的翻译中用作起始密码子。

[0170] “置换”应意指与相应的野生型核酸序列或相应的野生型氨基酸序列相比核酸序列中的至少一个核苷酸或蛋白序列中的至少一个氨基酸分别是不同的，这是由于各蛋白的编码序列中的核苷酸的交换。

[0171] “插入”应意指与相应的野生型核酸序列或相应的野生型氨基酸序列相比核酸序列或蛋白的氨基酸序列分别包含至少一个额外的核苷酸或氨基酸。

[0172] 与本发明相关的“提前终止密码子”意指终止密码子存在于编码序列 (cds) 中，其与相应野生型编码序列的终止密码子相比更接近5'末端的起始密码子。

[0173] “调控序列中的突变”，例如在基因的启动子或增强子中，是与野生型序列相比一个或多个核苷酸的改变，例如通过置换、缺失或插入一个或多个核苷酸，导致例如所制备的基因的mRNA转录物减少或没有。

[0174] “纯合的”在本文中是指细胞或生物体中相应染色体基因座处的给定基因或等位基因的所有拷贝是相同的。“突变等位基因纯合型”意指细胞或生物体中相应染色体基因座上各突变等位基因的所有拷贝是相同的。

[0175] “杂合的”在本文中是指细胞或生物体中特定染色体基因座处的给定基因或等位基因的至少一个拷贝与其他染色体上的相应基因座处的基因或等位基因的其他拷贝不同。“突变等位基因杂合型”是指细胞或生物体中特定染色体基因座处的至少一个等位基因与其他染色体中相应基因座处的等位基因具有不同的序列。

[0176] “蛋白中的突变”是与野生型序列相比一个或多个氨基酸残基的改变，例如，通过置换、缺失、截短或插入一个或多个氨基酸残基。

[0177] 用于将突变引入到植物细胞或植物的所需基因/等位基因的生物技术方法是本领域中已知的。因此，通过使用这些方法，可以在植物细胞或植物中产生细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因。这些技术的实例特别是诱变技术或在植物基因组中诱导双链DNA断裂(双链DNA断裂诱导酶(DSBI))的酶。已知和实践的技术是罕见切割内切核酸酶和定制的(custom-tailored)罕见切割内切核酸酶，包括但不限于归巢内切核酸酶(homing endonuclease)——也称为大范围核酸酶(meganuclease)，与核酸酶的催化结构域融合的转录激活因子样效应物(TALEN)和所谓的CRISPR/Cas系统。

[0178] 所有这些技术都适合在植物细胞或植物中引入基因突变。因此，具有细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的本发明的植物细胞和植物——其中通过罕见切割核酸内切酶或定制的罕见切割核酸内切酶将突变引入至突变等位基因，也是本发明的一个实施方案。关于定制的罕见切割核酸内切酶，优选通过大范围核酸酶、TALEN或CRISPR/Cas系统引入细胞周期蛋白SDS样蛋白的突变等位基因中的突变。

[0179] 本文使用的“双链DNA断裂诱导酶(DSBI)”是能够在特定核苷酸序列处(称为“识别位点”)诱导双链DNA断裂的酶。罕见切割内切核酸酶是具有约14至70个连续核苷酸的识别位点的DSBI酶，因此具有非常低的切割频率，甚至在较大的基因组如大多数植物基因组中也是如此。

[0180] “归巢内切核酸酶，也称为大范围核酸酶”构成了这种罕见切割内切核酸酶的家族。它们可以由内含子、独立基因或间插序列编码，并且呈现出显著的结构和功能特性，使其与通常来自细菌限制修饰II型系统的更传统的限制酶区分开来。它们的识别位点具有一般的不对称性，这与大多数限制酶识别位点的特征二元对称性形成对比。已经证明由内含子或内含肽编码的几种归巢内切核酸酶促进其各自遗传元件归巢至等位基因无内含子或无内含肽位点。通过在无内含子或无内含肽等位基因中产生位点特异性双链断裂，这些核酸酶产生重组源末端，其参与基因转换过程，该过程复制编码序列并导致在DNA水平上内含子或间插序列的插入。

[0181] WO 03/004659的表I(第17至20页)(通过引用的方式纳入本文)中提供了其他罕见切割大范围核酸酶及其各自识别位点的列表。这些包括I-Sce I、I-Chu I、I-Dmo I、I-Cre I、I-Csm I、PI-Fli I、Pt-Mtu I、I-Ceu I、I-Sce II、I-Sce III、HO、PI-Civ I、PI-Ctr I、

PI-Aae I、PI-BSU I、PI-DhaI、PI-Dra I、PI-Mav I、PI-Mch I、PI-Mfu I、PI-Mf1 I、PI-Mga I、PI-Mgo I、PI-Min I、PI-Mka I、PI-Mle I、PI-Mma I、PI-Msh I、PI-Msm I、PI-Mth I、PI-Mtu I、PI-Mxe I、PI-Npu I、PI-Pfu I、PI-Rma I、PI-Spb I、PI-Ssp I、PI-Fac I、PI-Mja I、PI-Pho I、PI-Tag I、PI-Thy I、PI-Tko I或PI-Tsp I。

[0182] 此外,方法可用于设计“定制的罕见切割内切核酸酶”,其基本上识别任何选择的靶核苷酸序列。简言之,可以使用设计用于识别特定核苷酸序列的锌指结构域和来自天然限制酶(例如FokI)的非特异性DNA切割结构域之间的杂交来制备嵌合限制酶。这类方法已记载于例如WO 03/080809、W094/18313或W095/09233和Isalan et al., 2001, Nature Biotechnology 19, 656-660; Liu et al. 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 5525-5530中。如W02004/067736中所述,可以通过从变体文库中选择来产生定制的大范围核酸酶。定制的具有改变的序列特异性和DNA结合亲和力的大范围核酸酶也可以通过W02007/047859中描述的合理设计来获得。

[0183] 定制设计的内切核酸酶的另一个实例包括所谓的“TALE核酸酶(TALEN)”,其基于来自与核酸酶(例如FOKI)的催化结构域融合的细菌黄单胞杆菌属(Xanthomonas)的转录激活因子样效应物(TALE)。这些TALE的DNA结合特异性由串联排列的34/35-氨基酸重复单元的重复可变双残基(RVD)定义,使得一个RVD特异性识别靶DNA中的一个核苷酸。可以组装重复单元以基本上识别任何靶序列并与核酸酶的催化结构域融合以产生序列特异性的内切核酸酶(参见,例如Boch et al., 2009, Science 326:p1509-1512; Moscou and Bogdanove, 2009, Science 326:p1501; Christian et al., 2010, Genetics 186:p757-761; 和W010/079430, W011/072246, W02011/154393, W011/146121, W02012/001527, W02012/093833, W02012/104729, W02012/138927, W02012/138939)。W02012/138927还记载了单体(致密)TALEN和具有多种催化结构域及其组合的TALEN。

[0184] 最近,已描述了一种新型可定制的核酸内切酶系统;所谓的“CRISPR/Cas系统”,其使用赋予序列特异性的特定RNA分子(crRNA)来指导相关核酸酶Cas9的切割(Jinek et al., 2012, Science 337:p816-821)。这种定制设计的罕见切割内切核酸酶也称为非天然存在的罕见切割内切核酸酶。

[0185] 本领域中已知的用于将突变引入到植物细胞或植物的基因/等位基因的其他方法是所谓的“体内诱变”。在下文给出对相应技术的进一步讨论。

[0186] 具有细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的本发明的植物细胞或植物——其中通过体内诱变将突变引入突变等位基因,也是本发明的一个实施方案。

[0187] 本领域公知的多种技术适于在植物细胞或植物中产生插入突变。

[0188] 本发明的其他实施方案是具有细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的本发明的植物细胞和植物,其中通过插入诱变将突变引入突变等位基因。

[0189] 具有细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的本发明的植物细胞和本发明的植物可以通过所谓的插入诱变产生。特别地,将转座子和转移DNA(T-DNA)序列插入至编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的基因/等位基因中适用于降低整合它们的各基因/等位基因的表达和/或活性(Thorneycroft et al., 2001, Journal of experimental Botany 52 (361), 1593-1601)。

[0190] 下文将进一步提供对本领域技术人员已知的各个技术的额外讨论。

[0191] “插入诱变”应理解为特别意指将转座子或所谓的转移DNA (T-DNA) 插入到编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的基因中,由此,相关细胞中的SDS样蛋白的活性降低或产生非功能性的细胞周期蛋白SDS样蛋白。

[0192] 在其他优选的实施方案中,本发明的植物是雄性可育植物。

[0193] 当突变的细胞周期蛋白SDS样等位基因以纯合形式存在时,本发明的植物是雄性可育的并且产生无籽果实。雄性可育植物相对于雄性不育植物的优势在于它们将产生有活力的花粉,因此不需要在同一田地中种植第二种所谓的授粉者植物以用于在产无籽果实的雌性植物上诱导结实和果实发育。因此,整个栽培区域可被种植产无籽果实的植物,导致每栽培面积的无籽果实的产量增加。此外,对于雄性和雌性植物部分,给出了开花和受精时间的同步,因为胚珠和花粉由同一植物产生。这确保了发生足够的授粉以产生最可能量的果实。

[0194] 在本发明的上下文中,“雄性可育植物”应理解为产生有活力的花粉的植物。所产生的有活力的或可育的花粉可以例如通过使用来自相应植物的花粉来异花授粉另一种不同的植物,并从这种杂交中获得有活力的种子来证明。

[0195] 在一方面,本发明的产无籽果实的植物表型不仅在二倍体植物中产生,也在多倍体植物中产生。在一方面,本发明的植物在具有不同的倍性程度时也产生无籽果实。因此,应很好地理解,本发明的植物细胞或植物包含具有任何倍性程度的植物,包括具有偶数倍性程度($2n$ 、 $4n$ 、 $6n$ 、 $8n$ 等)的植物和具有奇数倍性程度($3n$ 、 $5n$ 等)的植物。在一方面,突变的细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因在二倍体植物中是纯合的,但在另一方面,突变的SDS样蛋白在多倍体植物(例如四倍体西瓜)中是纯合的。“多倍体植物中纯合的”意指每条染色体上的基因座都包含基因的突变等位基因而非野生型等位基因。

[0196] 多倍化在植物中广泛存在。它负责增加遗传多样性并产生表现出稳健性、大小、活力和抗病性增加的物种。多倍体植物的明显优势是杂种优势和基因冗余。

[0197] 许多当今栽培的大面积土地(broad acre)和种植园作物已经历了一个或多个基因组增倍(duplication)。实例为棉花(倍增系数x6)、马铃薯(x2,x3)、面包小麦(x3)、油籽(x3)、玉米(x2)、大豆(x2)、向日葵(x2)、香蕉(x2)、苹果(x2)和咖啡(x2)(Renny-Byfield 7Wendel, 2014, American J.Botany, 101 (10), 1711-1725)。

[0198] 特别是在蔬菜育种中,通过使用化学品(包括秋水仙碱、秋水仙胺、黄草消、秋水米特、氟乐灵或甲基胺草磷)诱导多种植物中的多倍性。通过使用化学品产生的蔬菜中的基因组重复的实例是来自单倍体植物(2x)的二倍体球芽甘蓝、四倍体豌豆(2x)、四倍体西瓜(2x)、四倍体甜瓜(2x)、四倍体洋葱(2x)、八倍体芋头(4x)、四倍体蛇葫芦(2x),三倍体和四倍体有凹槽的南瓜(1,5x,2x),四倍体黄瓜(2x)和四倍体法国豆(2x)(Kazi, 2015, J.Global Biosciences 4(3), 1774-1779)。

[0199] 包含细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的植物可以通过本领域技术人员公知的多种方法产生。这些方法包括使用以登录号NCIMB 42532保藏的种子。这些经保藏的种子的一个特殊优势是从包含突变等位基因的种子生长出的植物将是雄性可育的。因此,通过使用包含细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的植物的花粉来使其他植物、特别是其他西瓜植物、尤其是栽培的西瓜受精,可将存在于这些植物中的细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因引入到其他植物中。由于细胞周期蛋白SDS样蛋

白编码基因的突变等位基因是隐性的,只有在相应植物中不存在细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的显性野生型等位基因时才能看到无籽果实产生。因此,在植物中存在细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的野生型等位基因的情况下,这些植物产生有籽果实。当将来自细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因纯合型的二倍体种子(例如,来自保藏登录号NCIMB 42532或其后代)的细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因转移到另一种不含有细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的隐性突变等位基因的植物中时,F1代将是杂合的并且不会显示无籽果实表型。由于存在两个拷贝(纯合)的隐性突变等位基因,F1首先需要自花授粉以获得包含无籽果实表型的植物。

[0200] 包含两个拷贝的细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的二倍体植物可用于制备包含四个拷贝的细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的四倍体植物。这种四倍体将具有与二倍体相同的表型,即产生无籽果实(其为四倍体)和有活力的花粉。

[0201] 当将来自四倍体植物的细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因转移到不包含细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的隐性突变等位基因的另一种四倍体植物中时,F1代将是杂合的并且不显示无籽果实表型。同样地,无籽果实表型将仅在从自花授粉的F1代获得的世代中看到。

[0202] 如上所述,包含无籽果实表型的四倍体植物可以通过复制细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因纯合型的二倍体植物的染色体(例如,来自保藏登录号为NCIMB 42532的、细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因纯合型的种子,或来自在将获自保藏登录号为NCIMB 42532的种子的植物与另一植物杂交并任选地随后使获自所述杂交的植物自花授粉后获得的细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因纯合型的植物)而产生。如此获得的四倍体植物包含四个拷贝的细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因。

[0203] 本领域中公知,植物的有性繁殖细胞(花粉和胚珠)包含一组染色体,其是所述植物的其余细胞的染色体组的一半。植物花粉和胚珠可以再生成整株植物。在具有偶数倍性程度的植物的情况下,因此通常可以在花粉或胚珠再生时将倍性程度降低一半。从具有偶数倍性程度(例如 $2n$ 、 $4n$ 、 $6n$ 、 $8n$ 等)的本发明的植物中,可通过花粉或胚珠再生产生具有二等分组的染色体(例如分别为 $1n$ 、 $2n$ 、 $3n$ 、 $4n$ 等)的植物。

[0204] 本发明的二倍体植物可以例如从包含细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的花粉或胚珠细胞再生,所述花粉或胚珠细胞从包含细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的四倍体植物中获得。优选地,从四倍体植物获得的花粉或胚珠细胞包含纯合状态的细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因。所衍生的二倍体植物可接着用于进一步育种和产生具有无籽果实表型的植物。

[0205] 三倍体植物可以通过将本发明的二倍体($2n$)植物与本发明的四倍体($4n$)植物杂交来产生。源自所述杂交的杂交植物种子将是三倍体($3n$)。优选地,彼此杂交的本发明的二倍体($2n$)和四倍体($4n$)植物都是细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因纯合型的。所得的三倍体种子(和从种子生长出的三倍体植物)将具有三个拷贝的突变等位基因。用于产生三倍体杂种的二倍体植物可以是例如从获自保藏登录号为NCIMB 42532的种子的细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因纯合型的种子中获得/可获得的植物。

[0206] 包含通过以上描述的方法之一可获得/获得的细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的植物(例如二倍体、三倍体或四倍体或另一种倍体)和植物部分(例如果实)也是本发明的一个实施方案。此外,可生长出此类植物的种子也是本发明的一个实施方案。

[0207] 在本发明的一个优选的实施方案中,本发明的植物细胞或植物具有偶数倍性程度,优选地,它们是二倍体($2n$)或四倍体($4n$)。

[0208] 具有奇数倍性程度的植物,例如三倍体($3n$)植物通常是雄性和雌性不育的,因为在减数分裂过程中染色体不能平均分配给子细胞。具有偶数倍性程度的植物(例如,二倍体($2n$)或四倍体($4n$)植物)相比于具有奇数倍性程度的植物(例如,三倍体($3n$)植物)的优势是具有偶数倍性程度的植物可以产生有活力的花粉和/或有活力的胚珠。因此,可以种植具有偶数倍性倍性的植物,而不需要第二种不同的所谓的授粉者植物——其是具有奇数倍性程度的植物中诱导结实和果实发育所需要的。授粉植物也将产生通常带有种子(或有籽)的果实。这些带有种子的果实必须在收获时或收获后与无籽果实分开。因此,具有偶数倍性程度的植物相比于具有奇数倍性程度的植物的优势是不需要将由授粉者植物产生的不需要的带有种子的果实与所需的无籽果实分开。

[0209] 在本发明的上下文中,“偶数倍性程度(even numbered degree of ploidy)”意指当除以2时细胞或生物体中存在的同源染色体组的数目产生整数。因此,所述细胞或生物体是二倍体($2n$)、四倍体($4n$)、六倍体($6n$)、八倍体($8n$)等。

[0210] 在本发明的上下文中,“奇数倍性程度(uneven numbered degree of ploidy)”意指当除以2时细胞或生物体中存在的同源染色体组的数目不产生整数。因此,所述细胞或生物体是单倍体($1n$)、三倍体($3n$)等。

[0211] 在本发明的上下文中,“二倍体植物细胞或植物”意指具有两组相应染色体(在本文中称为 $2n$)的植物、营养植物部分、果实或种子或植物细胞。

[0212] 在本发明的上下文中,“四倍体细胞或植物”意指具有四组相应染色体(在本文中称为 $4n$)的植物、营养植物部分、果实或种子或植物细胞。

[0213] 本发明的植物细胞可以是可再生成整株植物的那些植物细胞或不能再生成整株植物的那些。因此,本发明的植物细胞可以是不适合再生整株植物的那些植物细胞。

[0214] 在一个优选的实施方案中,本发明的植物是雄性可育的并且具有偶数倍性程度。优选地,本发明的植物是雄性可育的并且是二倍体($2n$)或四倍体($4n$)。

[0215] 在另一个优选的实施方案中,本发明的植物是种子败育植物。更优选地,本发明的植物是雄性可育的种子败育植物。甚至还优选的是,本发明的植物是雄性可育的、种子败育的并且具有偶数倍性程度。特别优选的是雄性可育的、种子败育的二倍体($2n$)或四倍体($4n$)的本发明的植物。

[0216] 种子败育植物产生无籽果实。雄性可育的种子败育植物与已知的种子败育植物相比具有以下优势:它们不需要在同一区域种植的不同授粉者植物,但它们仍然产生无籽果实。授粉者植物将产生不需要的带有种子的果实,其必须与无籽果实分开。因此,种子败育的雄性可育植物具有以下优势:在产生所需无籽果实的植物和授粉者植物之间不存在生长空间和营养物的竞争,这增加了每单位可用种植面积的所需无籽果实的产量。

[0217] “种子败育”在本领域中被一般性理解,并且还应结合本发明理解为意指结实和果

实发育的诱导需要授粉但没有产成熟或有活力的种子的果实。由于在达到成熟之前种子发育停滞或胚珠和/或胚和/或胚乳的退化或胚珠和/或胚和/或胚乳的败育(abortion), 成熟或有活力的种子不会在种子败育植物中发育。

[0218] 区别于种子败育的是单性结实。“单性结实”在本领域中被一般性理解, 并且还应结合本发明理解为描述没有雌性胚珠受精的果实的发育。不需要授粉过程来产生果实, 但是由于缺乏授粉, 所述果实是无籽的。

[0219] 在本发明的其他优选实施方案中, 本发明的植物产生无籽果实。

[0220] 本发明的植物的果实可含有具有种子样外观的结构。与野生型植物的深棕色或黑色且坚硬的种子相比, 具有种子样外观的这些结构通常是白色和柔软的。在本发明的植物的果实中具有种子样外观的结构有时被表示为空种子。但是, 它们不是真正的种子, 因为它们不包含有活力的胚, 而是源自胚珠珠被的结构。

[0221] 在本发明的一个更优选的实施方案中, 本发明的植物产生无籽果实和/或是雄性可育的和/或具有偶数倍性程度和/或是种子败育的。甚至更优选的是, 本发明的植物产生无籽果实、是雄性可育的、是二倍体(2n)或四倍体(4n)并且是种子败育的。

[0222] 植物学意义上的术语“果实”通常被理解为由被子植物花的子房发育的带有种子的结构。

[0223] 在本领域中, 特别是在育种中常用的“无籽果实”, 尽管在某种程度上与“果实”的植物学含义相矛盾, 但在本发明的上下文中应理解为没有成熟或有活力的种子的果实。成熟或有活力的种子可以在适合于相应植物的条件下在土壤中发芽并生长成植物。该测试可用于确定植物是否产生无籽果实。无籽果实不会产生将在适合于相应植物的条件下发芽并生长成植物的种子。

[0224] 通过了解本文公开的用于产生无籽果实的原因基因(causative gene), 现在可以通过多种已知方法产生无籽果实的植物。这些方法可依赖于通过使用常规突变剂(如化学品、高能辐射(例如, x-射线、中子辐射、 γ 辐射或UV辐射))来产生和选择具有编码非功能性的细胞周期蛋白SDS样蛋白的突变等位基因或编码具有功能降低或功能丧失的细胞周期蛋白SDS样蛋白的突变等位基因的植物。通过基因技术也可以产生具有非功能性的细胞周期蛋白SDS样蛋白或具有活性降低的细胞周期蛋白SDS样蛋白的植物。

[0225] 本发明的植物可以通过将一个或多个突变引入到细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的等位基因中来产生。

[0226] 因此, 本发明的其他实施方案涉及一种产生植物的方法, 所述方法包括以下步骤:

[0227] a) 在植物群体中引入突变

[0228] b) 选择产无籽果实的雄性可育植物

[0229] c) 验证在b)中选择的植物是否在细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的等位基因中具有突变, 任选地

[0230] d) 种植/培育在c)中获得的植物。

[0231] 因此, 一方面是用于产生植物的方法, 所述方法包括以下步骤:

[0232] a) 在植物群体中引入突变

[0233] b) 选择产无籽果实的雄性可育植物

[0234] c) 验证在b)中选择的植物是否在细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的等位基因中

具有突变并选择包含这种突变的植物,以及任选地

[0235] d) 种植/培育在c)中获得的植物,

[0236] 其中所述基因的野生型等位基因编码细胞周期蛋白SDS样蛋白,所述蛋白与选自以下的任一蛋白包含至少60%的序列同一性:SEQ ID NO 2或SEQ ID NO 6或SEQ ID NO 12或SEQ ID NO:NO 19或SEQ ID NO 20。

[0237] 然而,在一方面,所述步骤的顺序也可以是不同的。

[0238] 因此,在一方面,提供了一种用于产生植物的方法,其包括以下步骤:

[0239] a) 在植物群体中引入突变

[0240] b) 鉴定在编码细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的等位基因中具有突变的植物,以及任选地

[0241] c) 确定所述植物是否是雄性可育的,以及所述植物或通过自花受精产生的后代植物是否产生无籽果实。

[0242] 任选地,所述方法包括选择包含至少一个拷贝的编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的基因的突变等位基因的植物。当处于纯合形式时,所述突变等位基因导致无籽果实的产生。包含所述等位基因的植物是雄性可育的。

[0243] 在一方面,所述基因的野生型等位基因编码细胞周期蛋白SDS样蛋白,其与选自以下的任一蛋白包含至少60%的序列同一性:SEQ ID NO 2或SEQ ID NO 6或SEQ ID NO 12或SEQ ID NO 19或SEQ ID NO 20。

[0244] 此外,在上述方法中也可省略这些方法的步骤a) (即在植物群体中引入突变)。

[0245] “植物群体”在本发明的上下文中应意指不止一个整株植物,并且还应包含植物部分、果实、种子或植物细胞。在每种情况下,所述植物部分、果实、种子或植物细胞来自不止一种植物,意味着关于“植物部分、果实、种子或植物细胞的群体”,所述植物部分、果实、种子或植物细胞分别不是从单一植物而是从多种植物获得。

[0246] 可用于产生化学诱导突变的化学物质和由相应诱变剂的作用产生的突变例如记载于Ehrenberg和Husain,1981,(Mutation Research 86,1-113),Miiller,1972(Biologisches Zentralblatt 91(1),31-48)中。使用 γ 辐射、甲基磺酸乙酯(EMS)、N-甲基-N-亚硝基脲或叠氮化钠(NaN₃)产生水稻突变体记载于例如Jauhar和Siddiq(1999, Indian Journal of Genetics,59(1),23-28),in Rao(1977,Cytologica 42,443-450), Gupta和Sharma(1990,Oryza 27,217-219)以及Satoh和Omura(1981,Japanese Journal of Breeding 31 (3),316-326)中。使用NaN₃或马来酰肼产生小麦突变体记载于Arora et al. (1992,Annals of Biology 8(1),65-69)中。使用不同类型的富含能量的辐射和化学物质产生小麦突变体的概述在Scarascia-Mugnozza et al.(1993,Mutation Breeding Review 10,1-28)中提出。Svec et al.(1998,Cereal Research Communications 26(4),391-396)描述了使用N-乙基-N-亚硝基脲在小黑麦中产生突变。在Shashidhara et al.(1990, Journal of Maharashtra Agricultural Universities 15(1),20-23)中描述了使用MMS(甲基甲磺酸)和 γ 辐射来产生小米突变体。

[0247] 已经描述了主要进行无性繁殖的植物物种中的突变体的制备,例如,对于马铃薯,其产生改性淀粉(Hovenkamp-Hermelink et al.(1987,Theoretical and Applied Genetics 75,217-221),对于薄荷,其具有增加的油产量或改进的油质量(Dwivedi et

al., 2000, Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences 22, 460-463)。

[0248] 所有这些方法都基本上适用于本发明的产生植物的方法,用于在编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的基因中产生突变等位基因。在本发明的产生植物的方法中,优选地,通过将甲基磺酸乙酯(EMS)施用于植物或植物的种子以引入突变来产生突变群体。

[0249] 选择产无籽果实的植物可以通过简单地对果实进行可见的筛选/表型分析来完成。由于仅在纯合条件下观察到无籽的表型,在表型分析之前优选经诱变的植物群体的自交。由植物产生的这种可育的花粉可例如通过使用来自相应植物的花粉来异花授粉另一种不同的雌性可育植物来证明。如果来自该杂交的种子是有活力的,则在异花授粉中使用的花粉是可育的。可以借助于本领域技术人员已知的方法找到适当等位基因,特别是细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的等位基因中的突变。特别地,基于与探针的杂交(Southern印迹)、通过聚合酶链式反应(PCR)的扩增、相关基因组序列的测序和对单个核苷酸交换的搜索的分析可用于此目的。基于杂交模式鉴定突变的方法是,例如,搜索限制性片段长度差异(限制性片段长度多态性,RFLP)(Nam et al., 1989, The Plant Cell 1, 699-705; Leister and Dean, 1993, The Plant Journal 4(4), 745-750)。基于PCR的方法是,例如,扩增片段长度差异(扩增片段长度多态性,AFLP)分析(Castiglioni et al., 1998, Genetics 149, 2039-2056; Meksem et al., 2001, Molecular Genetics and Genomics 265, 207-214; Meyer et al., 1998, Molecular and General Genetics 259, 150-160)。用限制性内切核酸酶切除的扩增片段(切割的扩增产物多态性序列,CAPS)的使用也可用于鉴定突变(Konieczny和Ausubel, 1993, The Plant Journal 4, 403-410; Jarvis et al., 1994, Plant Molecular Biology 24, 685-687; Bachem et al., 1996, The Plant Journal 9(5), 745-753)。测定SNP的方法已由Qi et al. (2001, Nucleic Acids Research 29(22), e116)、Drenkard et al. (2000, Plant Physiology 124, 1483-1492) 和Cho et al. (1999, Nature Genetics 23, 203-207) 等记载。允许在短时间内研究几种植物的某些基因中突变的方法是特别合适的。这类方法,即所谓的TILLING(靶向诱导的基因组局部损伤)已经由McCallum et al. (2000, Plant Physiology 123, 439-442) 记载。

[0250] 本领域中公知,当今其他方法也可用于鉴定具有细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的本发明的植物细胞和本发明的植物。这些方法包括例如所谓的前向筛选(forward screening)方法。在所述前向筛选方法中,产生突变群体。筛选所述突变群体的植物(例如M2植物)的产无籽果实的植物,然后将其与多种不同的近交系杂交以产生作图群体。然后通过本领域中公知的方法分析所述作图群体,以鉴定引起无籽果实表型的等位基因。用于鉴定植物细胞或植物是否包含细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的其他方法包括使用本领域常用并例如在Thomson (2014, Plant Breeding and Biotechnology 2, 195-212) 中讨论的方法对各等位基因测序和进行SNP标记物分析。

[0251] 这些方法基本上适用于鉴定具有细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的本发明的植物细胞和本发明的植物。

[0252] 种植在本发明的产生植物的方法中鉴定的具有细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的雄性可育的、产无籽果实的植物可以通过常规方法在温室或田间进行。这些植物的培育和/或繁殖可以通过本领域常用的方法进行,例如,通过插条,体外组织、细胞、原生质体、胚或愈伤组织培养或微繁殖或通过将插条嫁接到不同的砧木上。

[0253] 在本发明的一个优选的实施方案中,将本发明的产生植物的方法用于产生本发明的植物。因此,上述本发明的植物的优选实施方案适用于本发明的产生植物的方法。

[0254] 通过本发明的产生植物的方法可获得/获得的植物也是本发明的一个实施方案。

[0255] 基因技术中可用的多种方法为产生具有细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因或具有非功能性的细胞周期蛋白SDS样蛋白或具有活性降低的细胞周期蛋白SDS样蛋白或显示表达降低的细胞周期蛋白SDS样蛋白的植物提供了进一步的可能性。

[0256] 所有这些方法都基于将一种或几种外源核酸分子引入到植物细胞或植物的基因组中,因此基本上适合于产生本发明的植物细胞和本发明的植物。

[0257] 因此,本发明的其他实施方案涉及一种产生植物的方法,其包括以下步骤:

[0258] a) 将外源核酸分子引入到植物中,其中所述外源核酸分子选自以下:

[0259] i) DNA分子,其编码至少一种反义RNA,所述反义RNA导致编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的内源基因的表达的降低;

[0260] ii) DNA分子,其通过共抑制作用导致编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的内源基因的表达的降低;

[0261] iii) DNA分子,其编码至少一种核酶,所述核酶分裂编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的内源基因的特定转录物;

[0262] iv) DNA分子,其同时编码至少一种反义RNA和至少一种有义RNA,其中所述反义RNA和所述有义RNA形成双链RNA分子,其导致编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的内源基因的表达的降低(RNAi技术);

[0263] v) 通过体内诱变引入的核酸分子,其导致在编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的内源基因中的突变或异源序列的插入,其中所述突变或插入导致编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的基因的表达的降低或导致无活性的细胞周期蛋白SDS样蛋白的合成;

[0264] vi) 核酸分子,其编码抗体,其中由于抗体与内源细胞周期蛋白SDS样蛋白的结合,所述抗体导致编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的内源基因的活性降低,

[0265] vii) DNA分子,其含有转座子,其中这些转座子的整合导致在编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的内源基因中的突变或插入,这导致编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的内源基因的表达降低,或导致无活性的细胞周期蛋白SDS样蛋白的合成;

[0266] viii) T-DNA分子,由于在编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的内源基因中的插入,其导致编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的内源基因的表达的降低,或导致无活性的细胞周期蛋白SDS样蛋白的合成,和/或

[0267] ix) 编码罕见切割核酸内切酶或定制的罕见切割核酸内切酶(优选大范围核酸酶、TALEN或CRISPR/Cas系统)的核酸分子,

[0268] b) 选择产无籽果实的植物,任选地

[0269] c) 验证在b)中选择的植物与其基因组未整合外源核酸分子的野生型植物相比是否具有活性降低的细胞周期蛋白SDS样蛋白,以及任选地

[0270] d) 种植/培育在c)中获得的植物。

[0271] 在本发明的一个优选的实施方案中,包括将外源核酸分子引入到植物细胞中的本发明的方法涉及一种产生雄性可育植物的方法,这意味着进行对雄性可育的并产生无籽果实的植物的选择(在步骤b和/或c中)。

[0272] 通过反义或共抑制构建体的表达,可以实现本发明的植物细胞或植物或包括将外源核酸分子引入到植物细胞中的本发明的方法中的细胞周期蛋白SDS样蛋白的活性的降低。

[0273] 为了通过反义或共抑制技术抑制基因的表达,例如,可以使用DNA分子——其包括细胞周期蛋白SDS样蛋白的完整编码序列,包括任何已存在的侧翼序列,以及DNA分子——其仅包括部分编码序列,其中这些部分必须足够长以分别在细胞中产生反义效应或共抑制效应。通常,最小长度为20bp或21bp(或核苷酸),优选最小长度为至少100bp(或核苷酸),特别优选至少500bp(或核苷酸)的序列是合适的。例如,DNA分子的长度为21-100bp(或核苷酸),优选100-500bp(或核苷酸),特别优选超过500bp(或核苷酸)。

[0274] 使用与植物细胞中存在的内源序列具有高度同一性并编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的DNA序列也适用于反义或共抑制制品。最小的同一性应大于约65%、优选大于80%。使用具有至少90%、特别是95%至100%的同一性的序列是优选的。术语“序列同一性”的含义在本文别处定义。

[0275] 此外,也可以考虑使用内含子,即编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的基因的非编码区域,以实现反义或共抑制效应。使用内含子序列来抑制编码淀粉生物合成蛋白的基因的基因表达,已例如记载于国际专利申请W097/04112、W097/04113、W098/37213、W098/37214中。

[0276] 本领域技术人员知道如何实现反义和共抑制效应。例如,共抑制的抑制作用的方法已记载于Jorgensen (Trends Biotechnol. 8 (1990), 340-344)、Niebel et al., (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 91-103)、Flavell et al. (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 43-46)、Palaqui 和 Vaucheret (Plant. Mol. Biol. 29 (1995), 149-159)、Vaucheret et al., (Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 311-317)、de Borne et al. (Mol. Gen. Genet. 243 (1994), 613-621) 中。

[0277] 用于降低细胞中特定酶的活性的核酶的表达也是本领域技术人员已知的,并且记载于例如EP-B1 0321201中。核酶在植物细胞中的表达已记载于,例如,Feyter et al. (Mol. Gen. Genet. 250, (1996), 329-338) 中。

[0278] 本发明的植物细胞或植物或包括将外源核酸分子引入到植物细胞中的本发明的方法中的细胞周期蛋白SDS样蛋白的活性的降低也可以通过同时表达待抑制的各靶基因,优选细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的有义和反义RNA分子(RNAi技术)来实现。

[0279] 这可以通过,例如,使用嵌合构建体来实现,所述嵌合构建体含有各靶基因或靶基因部分的“反向重复序列”。在这种情况下,所述遗传构建体编码各靶基因的有义和反义RNA分子。在植物中同时合成有义和反义RNA作为RNA分子,其中有义和反义RNA通过间隔区彼此分开,并且能够形成双链RNA分子。

[0280] 已经表明,将反向重复DNA构建体引入到植物细胞或植物的基因组中是一种非常有效的抑制对应于反向重复DNA构建体的基因的方法(Waterhouse et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, (1998), 13959-13964; Wang 和 Waterhouse, Plant Mol. Biol. 43, (2000), 67-82; Singh et al., Biochemical Society Transactions Vol. 28 part 6 (2000), 925-927; Liu et al., Biochemical Society Transactions Vol. 28 part 6 (2000), 927-929; Smith et al., (Nature 407, (2000), 319-320; 国际专利申请W099/53050 A1)。靶基因的有义和反义序列也可以通过相似或不同的启动子彼此分开

表达(Nap, J-P et al., 6th International Congress of Plant Molecular Biology, Quebec, 18th-24th June, 2000; Poster S7-27, Presentation Session S7)。因此,通过产生双链RNA分子,也可以实现本发明的植物细胞或本发明的植物中细胞周期蛋白SDS样蛋白的活性的降低。在这一点上,优选将细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的DNA分子或eDNA的“反向重复序列”引入到植物的基因组中,其中待转录的DNA分子(细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因或eDNA或这些基因或cDNA的片段)是在启动子的控制下,该启动子控制所述DNA分子的表达。

[0281] 因此,编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的任何核酸分子的片段也是本发明的一方面。这些片段具有多种用途,例如,作为引物或探针,或者它们可以整合到转化载体中并用于产生无籽果实的植物。

[0282] 编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的核酸分子的这些片段可具有多种大小,例如,至少10个核苷酸、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少200个、至少300个、至少400个、至少500个核苷酸或更多个。

[0283] 除此之外,已知在植物中形成启动子DNA分子的双链RNA分子可反式导致这些启动子的同源拷贝的甲基化和转录失活,所述启动子在下文中被称为靶启动子(Mette et al., EMBO J. 19, (2000), 5194-5201)。因此,通过使靶启动子失活,可以降低天然在该靶启动子控制下的特定靶基因(例如细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因)的基因表达。这意味着,在这种情况下,与植物中启动子的原始功能相反,包括待抑制的基因(靶基因)的靶启动子的DNA分子不用作基因或cDNA表达的控制元件,但它们本身被用作可转录的DNA分子。

[0284] 为了在植物中产生双链靶启动子RNA分子——其可以作为RNA发夹分子存在,优选使用含有靶启动子DNA分子的“反向重复”的构建体,其中所述靶启动子DNA分子是在启动子的控制下,所述启动子控制所述靶启动子DNA分子的基因表达。随后将这些构建体引入到植物的基因组中。植物中所述靶启动子DNA分子的“反向重复”的表达导致双链靶启动子RNA分子的形成(Mette et al., EMBO J. 19, (2000), 5194-5201)。通过这种方法可以使靶启动子失活。因此,通过将细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的启动子序列的双链RNA分子引入到植物细胞或植物中,也可以实现本发明的植物细胞和本发明的植物中细胞周期蛋白SDS样蛋白的活性的降低。在这一点上,优选将细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的启动子DNA分子的“反向重复序列”引入到植物的基因组中,其中待转录的靶启动子DNA分子(细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的启动子)是在启动子的控制下,所述启动子控制所述靶启动子DNA分子的表达。

[0285] 为了通过同时表达有义和反义RNA分子(RNAi技术)来抑制基因的表达,例如,可以使用DNA分子——其包括细胞周期蛋白SDS样蛋白的完整编码序列,包括任何已存在的侧翼序列,以及DNA分子——其仅包括部分编码序列,其中这些部分必须足够长以分别在细胞中产生所谓的RNAi效应。细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的部分可选自编码序列、非翻译的下游或上游序列、内含子、启动子和/或增强子。通常,最小长度为20bp(或核苷酸),优选最小长度为至少25bp(或核苷酸),特别优选至少50bp(或核苷酸)的序列是合适的。例如,DNA分子的长度为20至25bp(或核苷酸),优选26至50bp(或核苷酸),特别优选大于50bp(或核苷酸)。

[0286] 使用与植物细胞中存在的内源序列具有高度同一性并编码细胞周期蛋白SDS样蛋

白的DNA序列也适用于有义和反义RNA分子的同时表达(RNAi技术)。最小同一性应大于约65%，优选大于80%。特别优选使用具有至少90%，特别是95%至100%的同一性的序列。包含由SEQ ID NO 1所示的核酸序列组成的连续核酸序列片段(stretch)的序列特别适用于通过RNAi技术抑制细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因。

[0287] 本发明的植物细胞和本发明的植物或包括将外源核酸分子引入到植物细胞中的本发明的方法中的细胞周期蛋白SDS样蛋白的活性降低可通过所谓的“体内诱变”来实现，其中将杂合RNA-DNA寡核苷酸(“Chimeroplast”)引入到植物细胞中(Kipp,P.B.et al., Poster Session at the "5th International Congress of Plant Molecular Biology, 21st-27th September 1997,Singapore;R.A.Dixon和C.J.Arntzen,meeting report on "Metabolic Engineering in Transgenic Plants",Keystone Symposia,Copper Mountain,CO,USA,TIBTECH 15,(1997),441-447;国际专利申请WO 9515972;Kren et al., Hepatology 25,(1997),1462-1468;Cole-Strauss et al.,Science 273,(1996),1386-1389;Beetham et al.,1999,PNAS 96,8774-8778)。

[0288] RNA-DNA寡核苷酸的DNA组分的一部分与内源性细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的核酸序列同源，但与内源性细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的核酸序列相比，其具有突变或包含被同源区包围的异源区。通过RNA-DNA寡核苷酸的同源区域与内源核酸分子的碱基配对，然后通过同源重组，RNA-DNA寡核苷酸的DNA组分中包含的突变或异源区域可被转移到植物细胞的基因组中。这导致一种或多种细胞周期蛋白SDS样蛋白的活性的降低。

[0289] 本发明的植物细胞和本发明的植物或包括将外源核酸分子引入到植物细胞中的本发明的方法中的细胞周期蛋白SDS样蛋白的活性的降低可通过将编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的拮抗剂/抑制剂的核酸分子引入到植物细胞中来实现。本领域技术人员已知，细胞周期蛋白SDS样蛋白活性的降低可通过表达这些蛋白的非功能性衍生物，特别是反式显性突变，和/或通过表达这些蛋白的拮抗剂来实现。这些蛋白的拮抗剂/抑制剂包括，例如具有类似结合特征的抗体、抗体片段或分子。例如，细胞质scFv抗体已被用于调节转基因烟草植物中的光敏色素A蛋白的活性(Owen,Bio/Technology 10(1992),790-4;Review:Franken,E,Teuschel,U.and Hain,R.,Current Opinion in Biotechnology 8,(1997),411-416;Whitelam,Trends Plant Sci.1(1996),268-272;Conrad和Manteufel,Trends in Plant Science 6,(2000),399-402;De Jaeger et al.,Plant Molecular Biology 43,(2000),419-428)。通过表达特异性抗体降低马铃薯植物中分支酶的活性已由Jobling et al.(Nature Biotechnology 21,(2003),77-80)记载。在本文，提供了具有质体靶序列的抗体，使得保证了对质体中定位的蛋白的抑制。

[0290] 本发明的植物细胞和本发明的植物或包括将外源核酸分子引入到植物细胞中的本发明的方法中的细胞周期蛋白SDS样蛋白的活性的降低可通过将包含转座子序列的核酸分子引入到植物细胞来实现。将转座子序列插入内源细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的序列中将导致内源细胞周期蛋白SDS样蛋白的表达的降低。

[0291] 转座子可以是内源转座子(与植物同源)以及不天然存在于所述细胞中的那些(与植物异源)，但在每种情况下都必须通过基因工程方法(例如，细胞的转化)引入到植物细胞或植物中。通过转座子改变基因的表达是本领域技术人员已知的。使用内源和异源转座子作为植物生物技术中的工具的概述在Ramachandran和Sundaresan(2001,Plant

Physiology and Biochemistry 39,234-252)中提出。鉴定其中通过转座子插入诱变使特定基因失活的突变的可能性在Maes et al.的综述(1999,Trends in Plant Science 4 (3),90-96)中提出。借助内源转座子产生水稻突变体由Hirochika(2001,Current Opinion in Plant Biology 4,118-122)记载。借助内源反转录转座子鉴定玉米基因例如由Hanley et al.(2000,The Plant Journal 22(4),557-566)提出。借助反转录转座子制备突变体的可能性和鉴定突变体的方法由Kumar和Hirochika(2001,Trends in Plant Science 6(3),127-134)记载。已记载了双子叶植物和单子叶植物的不同物种中技术(人工)转座子的活性:例如,对于水稻(Greco et al.,2001,Plant Physiology 125,1175-1177;Liu et al.,1999,Molecular and General Genetics 262,413-420;Hiroyuki et al.,1999,The Plant Journal 19(5),605-613;Jeon和Gynheung,2001,Plant Science 161,211-219)、大麦(2000,Koprek et al.,The Plant Journal 24(2),253-263)、拟南芥(Arabidopsis thaliana)(Aarts et al.,1993,Nature 363,715-717,Schmidt和Willmitzer,1989,Molecular and General Genetics 220,17-24;Altmann et al.,1992/Theoretical and Applied Genetics 84,371-383;Tissier et al.,1999,The Plant Cell 11,1841-1852)、番茄(Belzile和Yoder,1992,The Plant Journal 2(2),173-179)和马铃薯(Frey et al.,1989,Molecular and General Genetics 217,172-177;Knapp et al.,1988,Molecular and General Genetics 213,285-290)。

[0292] 基本上,本发明的植物细胞和本发明的植物都可以借助于同源和异源转座子产生。

[0293] 结合本发明,本发明的植物细胞和植物也可通过使用所谓的插入诱变来产生(概述性文章:Thorneycroft et al.,2001,Journal of experimental Botany 52(361),1593-1601)。本发明的植物细胞和本发明的植物或包括将外源核酸分子引入到植物细胞中的本发明的方法中的细胞周期蛋白SDS样蛋白的活性的降低可通过将包含T-DNA序列的核酸分子引入到植物细胞中来实现。

[0294] T-DNA插入诱变基于以下事实:来自农杆菌属(*Agrobacterium*)的Ti质粒的某些片段(T-DNA)可以整合到植物细胞的基因组中。植物染色体中的整合位置没有被确定,但可在任意点发生。如果T-DNA整合到构成基因功能的染色体的一部分中,那么这可以导致基因表达的改变,因此也导致由相关基因编码的蛋白的活性的变化。特别地,T-DNA整合到蛋白的编码区域中通常导致相应的蛋白根本不再能够被相关细胞合成,或者不再被相关细胞以活性形式合成。例如,对于拟南芥(Krysan et al.,1999,The Plant Cell 11,2283-2290;Atipiroz-Leehan and Feldmann,1997,Trends in genetics 13(4),152-156;Parinov和Sundaresan,2000,Current Opinion in Biotechnology 11,157-161)和水稻(Jeon和An,2001,Plant Science 161,211-219;Jeon et al.,2000,The Plant Journal 22(6),561-570),描述了使用T-DNA插入以产生突变体。用于鉴定已借助于T-DNA插入诱变产生的突变体的方法例如由Young et al.,(2001,Plant Physiology 125,513-518)、Parinov et al.(1999,The Plant cell 11,2263-2270)、Thorneycroft et al.(2001,Journal of Experimental Botany 52,1593-1601)和McKinney et al.(1995,The Plant Journal 8 (4),613-622)记载。

[0295] T-DNA插入突变体已被大量产生(例如用于拟南芥),并且可通过不同的培养物保

藏中心(“原种中心(Stock centre)”,例如Salk Institute Genomic Analysis Laboratory,10010N.Torrey Pines Road,La Jolla,CA92037,<http://signal.salk.edu/>)获得。

[0296] T-DNA诱变基本上适合于产生具有活性降低的细胞周期蛋白SDS样蛋白的本发明的植物细胞和植物。

[0297] 结合本发明,术语“外源核酸分子”应理解为意指在相应的野生型植物细胞或植物中天然不存在的、或在野生型植物细胞或植物中的具体空间排列中天然不存在的、或者定位于其天然不存在于其中的植物细胞或植物的基因组中的位置处的这类核酸分子。优选地,所述外源核酸分子是重组分子,其由不同的元件组成,其组合或特定的空间排列不在植物细胞或植物中天然存在。

[0298] 原则上,外源核酸分子可以是任意导致细胞周期蛋白SDS样蛋白活性降低的核酸分子。上文已经描述了这种核酸分子。

[0299] 结合本发明,术语“基因组”应理解为意指植物细胞中存在的遗传物质的总和。本领域技术人员已知,除细胞核外,其他区室(例如质体、线粒体)也含有遗传物质。

[0300] 许多技术可用于将DNA引入到植物宿主细胞中。这些技术包括使用根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)或发根土壤杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)作为转化媒介用T-DNA转化植物细胞、原生质体的融合、核酸的注射、核酸的电穿孔、通过生物射弹方法引入核酸以及其他可能性。

[0301] 已经深入研究了农杆菌介导的植物细胞的转化的用途,并在EP 120516;Hoekema, IN:The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V.,Alblasserdam (1985),Chapter V;Fraley et al.,*Crit.Rev.Plant Sci.*4,1-46和An et al.*EMBO J.*4,(1985),277-287中进行了充分描述。对于马铃薯的转化,参见,例如Rocha-Sosa et al.,*EMBO J.*8,(1989),29-33。

[0302] 还记载了通过基于农杆菌转化的载体转化单子叶植物(Chan et al.,*Plant Mol.Biol.*22,(1993),491-506;Hiei et al.,*Plant J.*6,(1994) 271-282;Deng et al,*Science in China* 33,(1990),28-34;Wilmink et al.,*Plant Cell Reports* 11,(1992),76-80;May et al.,*Bio/Technology* 13,(1995),486-492;Conner和Domisse,*Int.J.Plant Sci.*153(1992),550-555;Ritchie et al.,*Transgenic Res.*2,(1993),252-265)。转化单子叶植物的替代系统是通过生物射弹方法转化(Wan和Lemaux,*Plant Physiol.*104,(1994),37-48;Vasil et al.,*Bio/Technology* 11(1993),1553-1558;Ritala et al.,*Plant Mol.Biol.*24,(1994),317-325;Spencer et al.,*Theor.Appl.Genet.*79,(1990),625-631)、原生质体转化、部分透化细胞的电穿孔和通过玻璃纤维引入DNA。特别地,玉米的转化已在文献中多次记载(参见,例如W095/06128,W095/06128、EP0513849、EP0465875、EP0292435;Fromm et al.,*Biotechnology* 8,(1990),833-844;Gordon-Kamm et al.,*Plant Cell* 2,(1990),603-618;Koziel et al.,*Biotechnology* 11(1993),194-200;Moroc et al.,*Theor.Appl.Genet.*80,(1990),721-726)。其他类型谷物的成功转化也已有记载,例如对于大麦(Wan和Lemaux,见上文;Ritala et al.,见上文;Krens等,Krens et al.,*Nature* 296,(1982),72-74)和对于小麦(Nehra et al.,*Plant J.*5,(1994),285-297;Becker et al.,1994,*Plant Journal* 5,299-307)。所有上述方法都适用于本发明的范围

内。蔬菜作物的转化也是本领域公知的。在Curtis (2012, Springer Science&Business Media, ISBN:1402023332, 9781402023330) 中, 尤其公开了用于转化咖啡、菠萝、梨、萝卜、胡萝卜、豌豆、卷心菜、花椰菜和西瓜的方法。香蕉、柑橘、芒果、木瓜、西瓜、鳄梨、葡萄、(甜)甜瓜、猕猴桃、咖啡、可可等蔬菜作物的转化已描述于Pua和Davey (2007, Springer Science&Business Media, ISBN:3540491619, 9783540491613) 中。

[0303] 为了表达核酸分子, 如赋予基因沉默效应或用于将突变引入到植物细胞或植物中的等位基因的那些, 优选将这些核酸与调控DNA序列(包括在植物细胞中启动转录的那些(启动子))连接。同时, 可选择启动子使得表达组成型地发生或仅在某些组织中、在植物发育的某个阶段或在由外部影响确定的时间发生。启动子相对于植物和相对于核酸分子都可以是同源的或异源的。因此, 核酸分子通常不是天然存在于植物中, 而是重组的核酸分子, 这意味着核酸分子所包含的不同遗传元件(例如编码序列、RNAi互补序列、启动子)的组合不天然存在于该组合中。

[0304] 合适的启动子是本领域公知的, 例如, 用于组成型表达的花椰菜花叶病毒35S RNA的启动子和来自玉米的遍在蛋白启动子、用于在马铃薯中块茎特异性表达的patatin启动子B33(Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8(1989), 23-29)或确保仅在光合作用活跃的组织中表达的启动子如ST-LS1启动子(Stockhaus et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA84(1987), 7943-7947; Stockhaus et al., EMBO J. 8(1989), 2445-2451)或来自小麦的用于胚乳特异性表达的HMG启动子、USP启动子、菜豆蛋白启动子、来自玉米的玉米醇溶蛋白基因启动子(Pedersen et al., Cell 29(1982), 1015-1026; Quattroccio et al., Plant Mol.Biol.15(1990), 81-93), 谷蛋白启动子(Leisy et al., Plant Mol.Biol.14(1990), 41-50; Zheng et al., Plant J. 4(1993), 357-366; Yoshihara et al., FEBS Lett. 383(1996), 213-218)或shrunken-1启动子(Werr et al., EMBO J. 4(1985), 1373-1380)。然而, 还可使用仅在由外界影响决定的时间活化的启动子(参见例如WO 9307279)。在本文中, 允许简单诱导的热休克蛋白的启动子特别有用。此外, 还可使用种子特异性启动子, 如确保在蚕豆(Vicia faba)和另一些植物中种子特异性表达的来自蚕豆的USP启动子(Fiedler et al., Plant Mol.Biol.22(1993), 669-679; Bäumlein et al., Mol.Gen.Genet.225(1991), 459-467)。

[0305] 重组核酸分子还可含有终止序列(多聚腺苷酸化信号), 其用于向转录物添加多聚A尾。稳定转录物的功能归因于多聚A尾。这种类型的元件记载于文献中(参见Gielen et al., EMBO J. 8(1989), 23-29)并可随意交换。

[0306] 内含子序列也可以存在于例如启动子和编码区之间。这样的内含子序列可以导致表达的稳定性和植物中表达的增加(Callis et al., 1987, Genes Devel.1, 1183-1200; Luehrs and Walbot, 1991, Mol.Gen.Genet.225, 81-93; Rethmeier, et al., 1997, Plant Journal.12(4): 895-899; Rose and Beliakoff, 2000, Plant Physiol.122(2), 535-542; Vasil et al., 1989, Plant Physiol.91, 1575-1579; XU et al., 2003, Science in China Series C Vol.46 No.6, 561-569)。合适的内含子序列是, 例如, 来自玉米的sh1基因的第一个内含子, 来自玉米的多聚泛蛋白基因1的第一个内含子, 来自水稻的epsps基因的第一个内含子或来自拟南芥属的PAT1基因的前两个内含子中的一个。

[0307] 对于本发明的产生植物的方法, 在本文已经描述的关于验证植物是否在编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的核酸序列或基因或等位基因中具有突变以及关于种植/培育植物的

内容在这里也适用于本发明的包括将外源核酸分子引入到植物细胞中的方法。

[0308] 在本发明的其他实施方案中,本发明的产生植物的方法和包括将外源核酸分子引入到植物细胞中的本发明的方法包括其他步骤,所述步骤其包括从在本发明的每种方法中从步骤d)获得的植物中产生其他植物。所产生的其他植物的特征在于它们包含至少一个细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因,或者由于如上所述引入外源核酸分子,它们具有活性降低的细胞周期蛋白SDS样蛋白。这些其他植物可以通过营养(无性)或生殖(有性(gamic),有性)繁殖来产生。适合于营养繁殖的是例如插条、体外组织、细胞、原生质体、胚或愈伤组织培养物、微繁殖、根茎或块茎。其他繁殖材料包括,例如果实、种子、幼苗,其是细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因杂合型的或纯合型的。

[0309] 用于营养(无性)繁殖的技术(包括植物的微繁殖)是本领域公知的,并且例如,针对香蕉、柑橘、芒果、木瓜、鳄梨、(甜)甜瓜,已记载于Pua和Davey (2007, Springer Science & Business Media, ISBN:3540491619, 9783540491613) 中。例如,Sultana和Rhaman (2012, LAP Lambert Academic Publishing, ISBN-13:978-3-8484-3937-9)公开了西瓜的多种组织培养和微繁殖方法。

[0310] 通过包括将外源核酸分子引入到植物细胞中的本发明的方法可获得/获得的植物,也是本发明的一个实施方案。

[0311] 本发明的其他实施方案涉及一种用于繁殖产无籽果实的植物的方法,所述方法包括以下步骤:

[0312] a) 获得生长出本发明的植物的种子或获得以登录号NCIMB 42532保藏的种子或其后代,

[0313] b) 使植物从步骤a)中获得的种子中长出,

[0314] c) 从在步骤b)中长出的植物中选择产无籽果实的植物,

[0315] d) 通过选自以下的方法繁殖在步骤c)中选择的植物:

[0316] i) 将步骤c)中选择的植物的部分嫁接到另一个砧木上,

[0317] ii) 在体外组织培养中培育在步骤c)中选择的植物的部分并任选地从组织培养物中再生新植物,

[0318] iii) 任选地从步骤c)中选择的植物部分产生胚或愈伤组织培养物,并任选地从组织培养物中再生新植物,

[0319] iv) 任选地通过微繁殖技术产生其他植物。

[0320] 通过嫁接和繁殖来繁殖植物部分以及任选地通过组织培养方法再生植物是本领域公知的。这些方法记载于多种科学出版物中,并在许多科学书籍中进行了综述和总结,例如,Smith (2012, Academic Press, ISBN-13:978-0124159204)、Gayatri & Kavyashree (2015, Alpha Science International Ltd, ISBN-13:978-1842659618) 等。对于西瓜,例如,由Sultana和Rhaman (2012, LAP Lambert Academic Publishing, ISBN-13:978-3848439379)记载了各种方法。

[0321] 通过本发明的用于繁殖产无籽果实的植物的方法可获得/获得的植物或植物部分也是本发明的一个实施方案。

[0322] 在本发明的其他实施方案中,本发明的产生植物的所有方法或任选地本文公开的本发明的繁殖产无籽果实的植物的方法可用于产生本发明的植物。

[0323] 本发明的其他实施方案涉及本发明的植物的繁殖材料,和/或包含本发明的植物细胞的植物的繁殖材料或通过本发明用于产生植物的方法可获得/获得的植物的繁殖材料或通过包括将外源核酸分子引入到植物细胞中的本发明的方法可获得/获得的植物的繁殖材料或从可任选通过本发明的用于繁殖产无籽果实的植物的方法获得的植物中可获得/获得的植物的繁殖材料。本发明的一个具体包含的实施方案是从以登录号NCIMB 42532保藏的种子可获得/获得的植物的繁殖材料,优选从细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因为杂合型的或纯合型的、以登录号NCIMB 42532保藏的种子可获得/获得的植物的繁殖材料。本发明还包括细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因杂合型或纯合型的植物的繁殖材料,其中所述繁殖材料是从源自从保藏登录号NCIMB 42532的种子获得的植物与另一植物杂交的植物获得/可获得的。

[0324] 在本文,术语“繁殖材料”包括植物的那些适于通过营养(无性)或生殖(有性,有性)途径产生后代的成分。适合于营养繁殖的是例如插条、体外组织、细胞、原生质体、胚或愈伤组织培养物、微繁殖方法,根茎或块茎。其他繁殖材料包括,例如,果实、种子、幼苗,其是细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因杂合型的。在一方面,繁殖材料采用例如通过嫁接到另一种砧木上被繁殖的插条的形式,或体外组织培养材料、特别是胚培养物的形式。特别优选的是体外组织培养材料,特别是体外胚培养物的形式的繁殖材料。通过营养繁殖产生的植物在本文中也称为无性繁殖植物。特别是突变细胞周期蛋白SDS样等位基因以纯合形式存在于其中的植物优选进行无性繁殖(因为它们的果实是无籽的)。

[0325] 本发明的其他实施方案涉及本发明的植物的部分,和/或包含本发明的植物细胞的植物的部分或通过本发明的产生植物的方法可获得/获得的植物的部分或通过包括将外源核酸分子引入到植物细胞中的本发明的方法可获得/获得的植物的部分或通过本发明的用于繁殖产无籽果实的植物的方法可任选获得的植物中可获得/获得的植物的部分。本发明其他包括的实施方案涉及从以登录号NCIMB 42532保藏的种子(或其后代)可获得/获得的植物的部分,优选从细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因杂合型的或纯合型的、以保藏号NCIMB 42532保藏的种子(或其后代)可获得/获得的植物的植物部分。本发明还包括细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因杂合型的或纯合型的植物的植物部分,其中所述植物部分是从源自保藏登录号NCIMB 42532的种子获得的植物与另一种植物杂交的植物获得的或可获得的。

[0326] 本发明的其他实施方案涉及一种产无籽果实的方法,所述方法包括种植本发明的植物和/或种植包含本发明的植物细胞的植物或种植通过本发明的产生植物的方法可获得/获得的植物或种植通过包括将外源核酸分子引入到植物细胞中的本发明的方法可获得/获得的植物的果实或种植通过在田地或温室(例如温室、隧道或网棚)中繁殖产无籽果实的植物的本发明的方法任选获得/可获得的植物中可获得/获得的植物,使得植物能够被授粉并收获无籽果实。优选地,在本发明的用于产生无籽果实的方法中种植的植物是细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因纯合型的。

[0327] 已令人惊讶地发现,用来自不同植物的花粉授粉包含纯合状态的细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的植物将导致植物产生无籽果实。如果细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因纯合型的植物的柱头由包含细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的野生型等位

基因的花粉授粉，则不是决定性的。在任何情况下，不论花粉的基因型，细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因纯合型的雌性植物将产生无籽果实。甚至当通过来自野生型植物的花粉进行异花授粉时，细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因纯合型的本发明的植物将产生无籽果实。因此，当培育本发明的植物时，无论如何都将获得无籽果实。

[0328] “温室”应结合本发明理解为意指用于种植植物的建筑物或隔间，其具有由玻璃、塑料、聚乙烯、gaze、网等组成的透明材料的屋顶和壁。温室可能有或没有其他用于加热、冷却、遮阳、自动浇水、施肥、二氧化碳浓度调整等的技术设备。本文使用的术语“温室”应包含具有任何类型的技术设备的温室。

[0329] 本发明的另一个实施方案涉及本发明的植物的果实或从本发明的植物可获得/获得的果实，和/或包含本发明的植物细胞的果实或通过本发明的产生植物的方法可获得/获得的植物的果实或通过包括将外源核酸分子引入到植物细胞中的本发明的方法可获得/获得的植物的果实或通过用于繁殖产无籽果实的植物的本发明的方法可任选获得的植物中可获得/获得的植物的果实或通过本发明的用于产生无籽果实的方法获得/可获得的植物的果实。本发明的其他包括的实施方案涉及可从以登录号为NCIMB42532保藏的种子(或其后代)可获得/获得的植物的果实，优选从细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因杂合型的或纯合型的、从以登录号为NCIMB 42532保藏的种子(或其后代)可获得/获得的植物的果实。本发明还包括细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因杂合型的或纯合型的果实，其中所述果实是从源自保藏登录号NCIMB42532的种子获得的植物与另一种植物杂交的植物获得的或可获得的。果实可以是细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因杂合型的并产生带种子的果实，或者可以是细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因纯合型的并产生无籽果实。细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因杂合型的果实可用于繁殖包含细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的植物。优选地，本发明的果实是细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因纯合型的和/或产生无籽果实。出于合乎逻辑的原因，无籽果实不适合用于从这些果实中生长出其他植物。因此，本发明的一个实施方案涉及本发明的果实，其是无籽果实并且其不适合用于繁殖或其不能繁殖或其是非繁殖性的。

[0330] 本发明的其他实施方案涉及选自以下的编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的核酸分子用于产生产无籽果实的植物的用途：

[0331] a) 核酸分子，其编码具有以SEQ ID NO 2或SEQ ID NO 4或SEQ ID NO 6或SEQ ID NO 12或SEQ ID NO 19或SEQ ID NO 20给出的氨基酸序列的蛋白，

[0332] b) 核酸分子，其编码一种蛋白，所述蛋白的序列与以SEQ ID NO 2或SEQ ID NO 4或SEQ ID NO 6或SEQ ID NO 12或SEQ ID NO 19或SEQ ID NO 20给出的氨基酸序列具有至少58%或至少60%、优选至少70%、更优选至少80%、甚至更优选至少90%或特别优选至少95%的同一性；

[0333] c) 核酸分子，其包含以SEQ ID NO 1或SEQ ID NO 3或SEQ ID NO 5或SEQ ID NO 17所示的核苷酸序列或互补序列；

[0334] d) 核酸分子，其与c)中描述的核酸序列具有至少58%或至少60%、优选至少70%、更优选至少80%、甚至更优选至少90%或特别优选至少95%的同一性；

[0335] e) 核酸分子,其在严格条件下与a)、b)、c)或d)中描述的核酸分子的至少一条链杂交;

[0336] f) 核酸分子,其核苷酸序列由于遗传密码的简并性而偏离在a)或b)中鉴定的核酸分子的序列;和

[0337] g) 核酸分子,其代表在a)、b)、c)或d)中鉴定的核酸分子的片段、等位基因变体和/或衍生物。

[0338] 在编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的核酸分子的用途的优选实施方案中,所述编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的核酸分子用于产生本发明的植物,在特别优选的实施方案中,使用编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的核酸分子用于产生本发明的产无籽果实的植物。

[0339] 在另一个优选的实施方案中,编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的核酸分子用于产生本发明的植物部分或本发明的果实。

[0340] 在其他优选的实施方案中,编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的核酸分子用于本文公开的任何本发明方法中。编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的核酸分子可例如用于本发明的用于产生植物的方法中或本发明的包括将源核酸分子引入到植物细胞中的方法中或本发明的用于繁殖产无籽果实的植物的方法中或本发明的用于产无籽果实的方法中。

[0341] 在另一个优选的实施方案中,编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的核酸分子用于鉴定植物细胞或植物是否包含细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因,或植物细胞或植物是否合成编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的突变mRNA或植物细胞或植物是否具有活性降低的细胞周期蛋白SDS样蛋白。优选地,编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的核酸分子用于鉴定产无籽果实的植物是否包含细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因,或植物是否合成编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的突变mRNA或植物是否具有活性降低的细胞周期蛋白SDS样蛋白。如何识别这种植物已在上文中描述并且因此适用于此。

[0342] 关于编码细胞周期蛋白SDS样蛋白的核酸分子的优选实施方案已在上文中描述,并因此适用于本发明的用途。

[0343] 在一方面,提供了用于从在其基因组中包含细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的种子、植物或植物部分中鉴定和/或选择这些种子、植物或植物部分或DNA的筛选方法。

[0344] 所述方法包括使用已知方法在DNA、RNA(或cDNA)或蛋白水平上进行筛选,以检测突变等位基因的存在。有许多检测基因的突变等位基因存在的方法。

[0345] 例如,如果野生型和突变等位基因之间存在单核苷酸差异(单核苷酸多态性, SNP),则可以使用SNP基因分型测定来检测植物或植物部分或细胞是否在其基因组中包含野生型核苷酸或突变核苷酸。例如,可使用KASP测定法(参见万维网:kpbioscience.co.uk)或其他SNP基因分型测定法容易地检测SNP。为了开发KASP测定,可选择例如SNP的上游70个碱基对和下游70个碱基对,并且可以设计两个等位基因特异性的正向引物和一个等位基因特异性的反向引物。参见,例如Allen et al. 2011, Plant Biotechnology J. 9, 1086-1099, 特别是用于KASP测定方法的p097-1098。

[0346] 同样可以使用其他基因分型测定。例如,同样可以使用TaqMan SNP基因分型测定、高分辨率熔解(HRM)测定、SNP-基因分型测定(例如Fluidigm、Illumina等)或DNA测序。

[0347] 二倍体植物或植物部分(细胞、叶、DNA等)的基因分型可区分SNP基因型,例如,在

SEQ ID NO:1的第1687位核苷酸包含CC(野生型核苷酸纯合型)的植物或部分可以与其基因组中SEQ ID NO:1的第1687位核苷酸包含CT(突变核苷酸杂合型)的植物或部分区分开。四倍体植物或植物部分(细胞、叶、DNA等)的基因分型可以与二倍体相同的方式进行,例如使用KASP测定来区分SNP基因型,例如在SEQ ID NO:1的第1687位核苷酸包含CCCC(野生型核苷酸纯合型)的植物或部分可以与其基因组中包含SNP的其他基因型(例如CCCA、CCAA等)的植物或部分区分开。这同样适用于三倍体。这同样也适用于其他多倍体。

[0348] 在上述方法的一个优选的方面,包含至少一个拷贝的细胞周期蛋白SDS样蛋白质编码基因的突变等位基因的植物、植物细胞和植物部分是西瓜植物,尤其是栽培西瓜,例如二倍体、四倍体或三倍体栽培西瓜。

[0349] 所述西瓜植物可以是育品种系或品种。细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因可以在任何栽培的西瓜中产生或被引入(例如从以NCIMB42532保藏的种子或其后代)至其中,以产生包含优选纯合形式的SDS样蛋白的突变等位基因的品系或品种。栽培西瓜产生多种果实大小(例如非常小,如WO2012069539中所述,例如小于0.9kg或甚至等于或小于0.65kg;单人用大小的(personal-size)为约3-7磅,即约1.4至3.2kg;冰箱大小的(icebox size)为约6-12磅,即约2.7至5.5kg;较大尺寸,最多达35磅,即约15.9kg)、果肉颜色、果实形状和不同的外皮颜色。因此,所述突变等位基因可以例如通过育种被引入到栽培西瓜中,所述栽培西瓜产生任意果实形状(例如细长、椭圆形,椭圆细长、块状、块状细长、球形或圆形)、果实表面(例如有沟痕的、光滑)、果肉颜色(例如红色、深红色、猩红色、珊瑚红色、橙色、橙红色或粉红色、黄色、淡黄色或白色)、外皮颜色(例如浅绿色、深绿色、带有窄、中或宽条纹的绿色条纹;灰色类型;有或没有斑点;金黄色;深红色外皮,银禧型外皮;Allsweet型外皮;黑色/深绿色)、外皮厚度、果皮韧性、外皮图案(例如条纹、非条纹,网状)、果肉结构/果肉硬度、番茄红素和/或维生素含量、不同的糖酸比例、非常好的果实风味等。参见Guner和Wehner2004,Hort Science 39 (6) :1175-1182,特别是描述了果实特征基因的第1180-1181页。通常,重要的育种目标是早熟、高果实产量、高内果品质(均匀的颜色、高糖、适当的糖:酸比、良好的风味、高维生素和番茄红素含量、坚实的肉质、非纤维的肉质、没有空心、外皮坏死、蒂腐病或cross stitch等缺陷,良好的外皮特性和抗裂性)。由该品系或品种产生的果实优选是可销售的果实。在一方面,平均白利糖度为至少6.0、7.0、8.0或至少9.0,优选至少10.0,更优选至少11.0或更多。

[0350] 果实颜色可以是任何颜色,例如红色、深红色、猩红色、珊瑚红色、橙色、橙红色、粉色、粉红色、黄色、淡黄色或白色。优选果肉颜色均匀。

[0351] 保藏信息

[0352] Nunhems B.V.根据《布达佩斯条约》于2016年1月27日将用于分离细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的突变等位基因的二倍体西瓜植物种子以登录号NCIMB 42532保藏在NCIMB Ltd. (英格兰,阿伯丁郡AB219YA,巴克斯本)。对于种子保藏物,将细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的等位基因命名为emb1。Expert Solution适用。

[0353] 从emb1突变等位基因纯合型的植物与emb1野生型等位基因纯合型的自花授粉的回交获得经保藏的种子。因此,25%的经保藏的种子是emb1突变等位基因纯合型的并产生无籽果实,50%是所述突变等位基因杂合型的,并且25%是编码野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白的野生型等位基因纯合型的。

[0354] 在本申请未决期间,由美国专利局主任决定的有资格的人员在提出请求后可获得所述保藏物。

[0355] 受37C.F.R. §1.808(b)的制约,保藏者针对保藏物的公众可得性提出的所有限制都会在专利授权时通过提供保藏物而被永久取消。所述保藏物在最近一次请求之后会被维持30年或5年的时间,或被维持到专利的有效寿命期,以较长时间为准,在此期间如果所述保藏物一旦不能存活,都要将其置换。申请人不会放弃任何本申请的专利或植物品种保护法(7USC 2321et seq.)授予的权利。

[0356] 序列描述

[0357] SEQ ID NO 1:来自西瓜的野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的基因组序列。

[0358] SEQ ID NO 2:来自西瓜的SDS样蛋白的氨基酸序列。所述氨基序列可源自SEQ ID NO 1的编码序列。

[0359] SEQ ID NO 3:来自西瓜的细胞周期蛋白SDS样蛋白的突变等位基因的mRNA序列。

[0360] SEQ ID NO 4:SDS样蛋白的突变等位基因的氨基酸序列。所述氨基酸序列可源自SEQ ID NO 3。

[0361] SEQ ID NO 5:来自甜瓜的野生型细胞周期蛋白SDS样蛋白编码基因的核酸序列。

[0362] SEQ ID NO 6:来自甜瓜的SDS样蛋白的氨基酸序列。所述氨基酸序列可源自SEQ ID NO 5的编码序列。

[0363] SEQ ID NO 7:在PCR和/或测序反应中用作引物(A4532)的人工序列。

[0364] SEQ ID NO 8:在PCR和/或测序反应中用作引物(A4533)的人工序列。

[0365] SEQ ID NO 9:在PCR和/或测序反应中用作引物(A4534)的人工序列。

[0366] SEQ ID NO 10:在PCR和/或测序反应中用作引物(A4535)的人工序列。

[0367] SEQ ID NO 11:在PCR和/或测序反应中用作引物(A4538)的人工序列。

[0368] SEQ ID NO 12:来自黄瓜的SDS样蛋白的氨基酸序列。

[0369] SEQ ID NO 13:图2的样品114和115的序列

[0370] SEQ ID NO 14:图2的样品114和115的序列

[0371] SEQ ID NO 15:图2的样品116和117的序列

[0372] SEQ ID NO 16:图2的样品116和117的序列

[0373] SEQ ID NO 17:西瓜突变细胞周期蛋白SDS样基因的cDNA序列,其在第670位核苷酸处包含C至T突变,导致在第670至671位核苷酸处的终止密码子

[0374] SEQ ID NO 18:由SEQ ID NO 17的cDNA编码的西瓜突变细胞周期蛋白SDS样蛋白

[0375] SEQ ID NO 19:来自番茄的野生型SDS样蛋白的氨基酸序列

[0376] SEQ ID NO 20:来自辣椒的野生型SDS样蛋白的氨基酸序列

附图说明

[0377] 图1:来自野生型植物的西瓜果实(1A),与来自EMB1突变植物的果实相比的野生型植物(1B),来自EMB1突变植物的无籽果实切片(1C)和EMB1突变植物的开放无胚种子(1D)。

[0378] 图2:比较所获得的样品编号114、115、116和117的序列的序列比对。右上侧的数字表示SEQ NO 1中所示的相应序列中的核苷酸位置。样品编号116和117获自EMB1突变植物。

样品编号114和115获自野生型植物。

[0379] 图3:在聚丙烯酰胺凝胶上对获自样品编号114、115、116和117的cDNA的PCR产物的电泳分析。样品编号114和115获自野生型植物。样品编号116和117获自EMB1突变植物。

[0380] 一般方法

[0381] 1.RNA的分离

[0382] 将幼小的子房组织切成小块,在液氮中冷冻并储存在-80°C直至进一步使用。将冷冻的组织块用活塞(piston)和研钵在液氮中研磨成粉末,以使粉末冷冻。根据制造商的方案(RNeasy Plant Mini Kit,Qiagen),使用植物RNA分离试剂盒,使用100mg粉末分离总RNA。

[0383] 2.cDNA的制备

[0384] 用DNase(TURBODNA-free,Ambion)处理RNA,并根据制造商的方案(iScript cDNA Synthesiskit,BioRad)将0.9μg RNA用于逆转录。

[0385] 3.对cDNA进行PCR

[0386] PCR在总体积为20μL的缓冲液(Phire反应缓冲液,Thermo Fisher Scientific)中进行,所述缓冲液含有0.2mM dNTP、0.4μL Phire Hot Start II DNA聚合酶(Thermo Fisher Scientific)、0.25μM的各引物和0.4μL cDNA混合物。在90°C下30分钟的初始变性步骤后,进行98°C下10秒、60°C下15秒和72°C下30秒的40个循环,并在72°C下3分钟完成反应。

[0387] 4.测序

[0388] 使用QIAxcel Advanced System(Qiagen)分析PCR产物大小,并将PCR反应混合物送至服务提供商以进行测序(BaseClear,NL)。

实施例

[0389] 1.无籽果实突变体的分离

[0390] 通过用EMS处理来自近交系(WMZD0048TYY,以下缩写为TYY)的约10,000个西瓜种子数小时并随后在流动的自来水中洗涤种子30分钟来建立突变体群。之后,将种子保持湿润直至在土壤中播种。使M1植物从经诱变的种子中生长、自花授粉并收获种子(M2代)。播种来自3000个M2家族中的每一个的8个种子,使其生长并分离产无籽果实的突变植物。将这些突变植物之一命名为EMB1。通过将EMB1突变植物的插条嫁接到未经诱变的西瓜植物的砧木上来进行EMB1突变植物的繁殖。

[0391] 2.无籽果实表型的确认

[0392] 使用来自EMB1突变体(BC1代)的花粉,将EMB1突变体与原始的未经诱变的西瓜TYY近交系回交。25%的从自花授粉的BC1代生长出的植物确实产生了无籽果实。

[0393] 来自EMB1突变体的花粉也用于与不同的西瓜近交系杂交以建立定位(mapping)群体。25%的所述定位群体的自花授粉植物产生无籽果实。

[0394] 来自各个回交和杂交的结果——其中来自EMB1突变体的花粉用于受精其他近交系——清楚地证明EMB1突变体的花粉是可育的。

[0395] 在进一步杂交中,emb1突变等位基因纯合型的EMB1突变植物被用作母本,并用来自多种不同的其他品系的花粉授粉。100%的来自这些杂交中的每一种的植物产生无籽果

实。

[0396] 从不同杂交获得的结果显示emb1突变是由单个隐性等位基因引起的。结果还证明,当来自产种子的植物的花粉被用于受精EMB1突变植物时,无籽果实表型被保持。因此,无籽果实表型不是由于EMB1突变体的异常花粉,而是可归因于胚发育中的缺陷。

[0397] 3. 导致无籽果实表型的基因的鉴定

[0398] 分析通过用来自EMB1突变植物的花粉授粉不同的西瓜近交系建立的定位群体并且在SEQ ID NO 1所示的基因组序列中检测单核多态性(SNP)。SEQ ID NO 1示出了野生型等位基因的序列。在EMB1突变植物的相应等位基因中,SEQ ID NO 1中第2185位的核苷酸鸟嘌呤(G)被腺嘌呤(A)置换。

[0399] 4. 对转录自emb1等位基因的mRNA的分析

[0400] 从田间生长的植物收获不同大小的花蕾。样品编号114和115是来自命名为TYY、被用于诱变的原始近交系的植物的花蕾。因此,TYY代表包含野生型emb1等位基因的野生型植物。样品编号115和116是来自包含突变emb1等位基因的产无籽果实的EMB1突变植物的花蕾。表1中给出了各个样品编号的表型、采收材料和分析的概述。

[0401]

样品编号	植物样品名称	所收集的组织	表型
114	TYY(101)	花蕾1mm	带有野生型种子的果实
115	TYY(102)	花蕾3-4mm	带有野生型种子的果实
116	EMB1(103)	花蕾1mm	无籽果实
117	EMB1(104)	花蕾3-4mm	无籽果实

[0402] 表1

[0403] 从不同样品编号的花蕾中分离RNA。将每个样品编号的700ng RNA用于cDNA合成。对所获得的每种cDNA样品进行使用引物A4532(SEQ ID NO 7)和A4533(SEQ ID NO 8)的PCR反应。设计引物以扩增SEQ ID NO 1中所示的编码序列的emb1等位基因的一部分。在聚丙烯酰胺凝胶上分析PCR产物,如图3所示。从图3中可以清楚地得出,与所有其他样品编号相比,样品编号116和117确实得到更短的PCR片段。这清楚地表明,与样品编号114和115中的相应野生型等位基因相比,emb1突变等位基因的mRNA包含核苷酸的缺失。

[0404] 5. 对emb1等位基因的cDNA序列分析

[0405] 使用SEQ ID NO 7所示的引物A4532、SEQ ID NO 11所示的引物A4538、引物A4534SEQ ID NO 9和引物A4535SEQ ID NO 10对样品编号114、115、116和117的cDNA进行测序。获自样品编号116和117中每一个的序列在SEQ ID NO 3中示为mRNA分子。从样品编号114和115中每一个获得的序列与SEQ ID NO 1中所示的编码序列相同。对获自样品编号114、115、116和117的序列的比较显示,与样品编号114和115中每一个的序列相比,样品编号116和117中每一个的序列都具有16个连续核苷酸的缺失。另外,与样品编号114和115中每一个的序列相比,样品编号116和117中每一个的序列都具有引起编码序列中的提前终止密码子的移码。对相关序列部分的比对示于图2中。

[0406] 结论是,样品编号116和117的emb1突变等位基因被转录成mRNA,其与转录自样品编号114和115的野生型等位基因的mRNA相比具有缺失、读码框中的移码和提前终止密码子。此外,从图2中可以看出,从样品编号116和117的emb1突变等位基因转录的mRNA编码一种蛋白,其中与由转录自样品编号114和115的野生型等位基因的mRNA编码的蛋白相比,8个

氨基酸被置换。

[0407] 6. 另一种西瓜突变植物的产生

[0408] 已知细胞周期蛋白SDS样基因序列使得在SDS样基因中产生其他突变等位基因成为可能。用在结构域上设计的引物筛选EMS诱变的TILLING群体,其中EMS突变可将氨基酸编码密码子转化为终止密码子。

[0409] 正向引物:CGAAGAGAAAGGATTAGACGTTG (SEQ ID NO:21)

[0410] 反向引物:TCTGAGCAGTCAGTATCAGACG (SEQ ID NO:22)

[0411] 鉴定了包含突变细胞周期蛋白SDS样等位基因的植物。所鉴定的等位基因在SEQ ID NO:1的第1687位核苷酸处包含单核苷酸置换,产生终止密码子。因此,所述突变等位基因编码截短的细胞周期蛋白SDS样蛋白,其仅包含SEQ ID NO:2的野生型蛋白的第1至223位氨基酸。所述突变等位基因的cDNA在SEQ ID NO:17中提供,由所述突变等位基因编码的截短蛋白在SEQ ID NO:18中提供。

- [0001] 序列表
[0002] <110> 纽海姆有限公司
[0003] <120> 产无籽果实的植物
[0004] <130> BCS 16-8014
[0005] <150> EP16171462.1
[0006] <151> 2016-05-26
[0007] <160> 22
[0008] <170> SIPOSequenceListing 1.0
[0009] <210> 1
[0010] <211> 5135
[0011] <212> DNA
[0012] <213> 西瓜(Citrullus lanatus)
[0013] <400> 1
[0014] aaacattcat acttttgaag aaaatttagta tattatttat ttatattataa tttacagatt 60
[0015] atttattgtat tatttttaaa atatttattg aattttttat aatataataa aaatgtcgac 120
[0016] atgtcaacac aaaattaatt tcattttatg aattagaagt aggaaataag agtatttttg 180
[0017] gaataaaattt tcaagtattt aattttaaaa ataagtcact tc当地agaaa tataagtgtt 240
[0018] tgccaaccac tcaaactgta ttttaaaagc catttgtc tttattataa atactttct 300
[0019] tatcaaaaatgtt gtttaaatga aaataaaaatgtt ttgaagacat ttctttcta ggttaatcga 360
[0020] atggcttcta aatttaagat ttatcaaattt gatatggat gtttgggtca aaagagtttt 420
[0021] tgagcttata attaaagaac atcaatctca tgacttataa atttttgtt atgtgttattt 480
[0022] aaaaaaaaaaa agaaataaaaaa aagaaaaaaga aaagaaaaaac attttgcattt aggaccctac 540
[0023] aattaaacaa tttaggacat gtcttagggag tgattctaaa atagttaaat ccactttgt 600
[0024] tattattgaa atcacttta aatattcaaa atcttccaaa cacaaaattt attatataaa 660
[0025] aattataactt aaaaatgtt aattaaatac taaatttattt tggagtgtt taatatatgt 720
[0026] tttgggata tatccatttc aaaatcactc caaatatgaa tttcataaaaa tt当地agttga 780
[0027] atatttgcattt gtagaagact aaaatggaaa agaatataga ggtgaggggc caaaaatgata 840
[0028] tt当地actaaa taatttattt tatttttag attagcacga gagggaggtt cagtgaggga 900
[0029] ccctctccaa aaaaaaaaaaa aactcacttc caattcacaat ttctttttt ct当地cttaact 960
[0030] tccataactg ctctgcttcc catcagaaa ctcataatca tcttcttcat tc当地acaatg 1020
[0031] aagtccaaaga agccaaagggc aaatccaaa cccgaatcct actctccgcc gaagaagaag 1080
[0032] ctccgttctc agcttccacg gcgcagacgc tctcggattt ct当地ttttt ct当地cttgc 1140
[0033] gactccgatt cccctgctcc ttcttaccacc attgcttttgc tt当地tcttcc ct当地gtgcc 1200
[0034] gccgaatcca gctccacttc ct当地ccacgca ggccggacccg aggtttctag ccagctcaac 1260
[0035] gctgttttgc gattccagag ggccaaatttgc cggaagagac gatttgggtt gggtgggttt 1320
[0036] aatttggatg aagtttcgaa gaaggaggtt ggagtaggaa gtaatgttggaa agtgtctgaa 1380
[0037] tc当地tgcgttgc tt当地atcaaa ttcttggatg gattttgggtt ttctcggacc aagcacttagc 1440
[0038] tccaggttgc agatttgcattt tgatatttgc agaactattt acgaaaatgtt agatccaaatc 1500
[0039] gatcaagcgg ataatggatg tgatgttttgc caatttgcacgg atgctgtatgt ct当地tgcgaag 1560
[0040] ct当地gttgcggaa agggagctgtt gcccacttcaact ct当地gttggag agtcttgcgc tgatgtctatc 1620
[0041] ttccagagcgtt tttgttgcgtt cgaagagaaa ggatttagacg tt当地agaaaaa cagactatgg 1680

[0042] gaatttcagt taccagaact accgagaaat gagatcaatg aaacttcac tgttcgaag 1740
 [0043] tcggattcga cgatagaaca gtggccta atgcttgaat ttgaatcgga tcttgcttgc 1800
 [0044] acggagcaat tctcttatga gaatgttgc gaatactcta gccaggcggt gtccgagctt 1860
 [0045] caatcaacaa ttctatttgg gacgtctgat actgactgtc cagattacac tccttcaatt 1920
 [0046] ttttggaat ccggaagcga atttcagag aaatcgaacg acgacgcgc tccttcgtca 1980
 [0047] acattttagca tggtgctgca gtacagacgc gactttctaa acttaaatgc ctctccagac 2040
 [0048] atcagaacta gctcgtctat tgaagaagag aaagttagatc aatctacggt aattcgctat 2100
 [0049] cttcatgctt ccttgacggt tcatttgcaa caaacctgaa gctaatcaaa caactatata 2160
 [0050] tatatatattt ttgattttaa attagatttt gagatttggaa gaattggacg atgaagaagc 2220
 [0051] ctatctaattt ttcagaagta gagaagacg ccaattgattt attcgcgact acgttagagga 2280
 [0052] gtatcggtcc acaacggattt atggcgatctt catttccttca caacggtcaa atgtggtcca 2340
 [0053] atggatagttt gaagtaagtc ctgtatcca aaccaccgtg tttctctcaa taattcctga 2400
 [0054] attagcatga gatattttgc tccgggtttc cattttcatc gttaatagca ttggatttct 2460
 [0055] gagacattgg aactgttttag tgtatcgagg tagtttggaa cactgactct catatttcaa 2520
 [0056] ttgcactga atcgcttaattt agttcttaac atctcataaa atgagttccc ttgccttattt 2580
 [0057] tgctatggaa ctttatccga cagcgatctt ttctgatttgc gctatcccaa caatgtgattt 2640
 [0058] tactaatgaa aattacaaaatc tcattaccat gatcatactt tccactactt aaaagccagc 2700
 [0059] agtttatgtat cttgcacctg ttacatcttag ttgttataag ctcattctaa cgaatgaggc 2760
 [0060] ctgccaccag cacaacgcattt ctggcatctt gaatcaacta agtttaactg atttttcattt 2820
 [0061] tctttctta cttctgccttta aatatattttt ctgtttgtt ttcatcttaa taatagaata 2880
 [0062] cagattcata accgcgagat ttgtgcttatt tactgtggat gttgacattt tcttaggaat 2940
 [0063] actccaatgtt agttgcattt tcatcatctg ttgacgttcc tagtcaagg aatacatttct 3000
 [0064] ttatactattt ttatttcattt ttctgcgtta atacttgtca ccaaccaattt gggtaaaattt 3060
 [0065] ttttacatta tggtgctttg tttgttggaa tggatgcagcg atcgagagat tccaaacttc 3120
 [0066] atcaggagac gacatttttta ggagttaccc tcctggacca gattctgagc agaggattct 3180
 [0067] tcaaagctgg aagacacccattt caaattctgg gcatagcatg tctaactttt gcgactagaa 3240
 [0068] ttgaagaaaa tcagtcatac agtgggtgac tttttttctt tctttgtctt atttgtgtgc 3300
 [0069] atctcagttt taactatata acaagtgttgc ttcttctatca ctgtaacttc aacttaactt 3360
 [0070] cgttagtattt atgaatatttgc ctgtaaaaca aactgtatgc cagttggctt tcttgcgtt 3420
 [0071] atccaaaggaa gtgaaatttgg gtaagtttgc atcgaatgtt aagtagtactt agaaataata 3480
 [0072] atcagaaaatgtt attgttattttt agttaatttggaa tctaataatgc ttgaatattttt tttctaaatgtt 3540
 [0073] tcaaagtgtc gggccgtttaa gctttgcgtt tacatggacc aaagtaatgtt tggatata 3600
 [0074] tcgttagtcc tcttataatgc attatgttacaa aaataatagc catacatttttgc tgcataaca 3660
 [0075] caccacccgtt acggtaatgtt agtgcataatgc tgccataaca ctatcttca gttcttattgtt 3720
 [0076] taacaatttca tggcacaca agagacccggaa gacccacccaa gaaaacatttca tctttgtt 3780
 [0077] gtatataatgtt ctctaaatgtt agtcaatgtt aaaaacatttca tttttttttt tttcttctt 3840
 [0078] tcaaacttcc ttttgcgttcc ttcatatttttgc ttttgcgtt aattttatgc aaaaatgtt 3900
 [0079] aataattgtt attttttttttaa tttaaatagatc ctttgcgtt aattttatgc aaaaatgtt 3960
 [0080] ctgggtgggtc tcgagcttgg tggatatttttataaagctt tggataggactt gattttttttt 4020
 [0081] atttttggc atttcagggtt gcagcaaagg aatatccgtt tagagagccaa cacgtacaga 4080
 [0082] agatctgaag ttgttggcat ggaatggctt gttgaagaag tcttaaagttt ccattgtttc 4140
 [0083] ttgcacactt tttacaactt ctatgttgc atcttcctt gactaacttgc accattgggtt 4200

[0084] ggaagggaaa aagtttccc ttcgtgcattcatttcaa taaactcctt ccggccatta 4260
 [0085] acaatttcaa tctactgcga ataacatgct ttatccaatt ttctttttt gaaaattatc 4320
 [0086] ttagttcta cctgaaagct gctggagctg actcgaattt ggagaatcga gctaagaact 4380
 [0087] ttgcggagct ggttcttca gacaaagtcc aatttgtta tttcccttca actattgcag 4440
 [0088] ctgcgggtgt catcttggcg tccttaggag aaaaacaaga tgccaccaagt caacgagtca 4500
 [0089] ttgaggtaca taaatacataa tacctgttag agagaaaact ccttatctt tatattgacc 4560
 [0090] caattgaaca aataaacaag tatttgaaa tcgagaagaa actttaaagt tttacaaaaaa 4620
 [0091] caccataatc taaatccat tagattcaac tgtaatgtaa agtacaataa taaaatacat 4680
 [0092] ataccataag gaaatggtag gttatagtgt ttgttcaat tagatattca atttatatat 4740
 [0093] tagttatgtgt tgttaatctc cctgaatatttcttactaac ttgaggaagg ttcctgtct 4800
 [0094] tctggaaacc cttccatgcc caaaatttca gccttctgttattccatttca agtcaaacat 4860
 [0095] gtaatgagtt tactttttt ttccttcta attattaattttaata atttattttgt 4920
 [0096] ctaattcatt ttctgttagtc tgaacccacg aacttgctta tcacaaaatc caaaacccaaa 4980
 [0097] aaccccatca caatttgga aattttttga agaactgcta ctataaccat gtaatttctt 5040
 [0098] tcaaaatcta caaaaataga aataacactt atttagacta tctgtggtagc tatctcataa 5100
 [0099] catctggtgc attgtggcattt tgccagacgca tgtca 5135
 [0100] <210> 2
 [0101] <211> 562
 [0102] <212> PRT
 [0103] <213> 西瓜(Citrullus lanatus)
 [0104] <400> 2
 [0105] Met Lys Ser Lys Lys Pro Arg Ala Asn Pro Lys Pro Glu Ser Tyr Ser
 [0106] 1 5 10 15
 [0107] Pro Pro Lys Lys Lys Leu Arg Ser Gln Leu Pro Arg Arg Arg Ser
 [0108] 20 25 30
 [0109] Arg Ile Ser Pro Phe Phe Cys Ser Leu Asp Ser Asp Ser Pro Ala Pro
 [0110] 35 40 45
 [0111] Ser Thr Thr Ile Ala Phe Ala Ser Ser Ser Phe Ala Ala Ala Glu Ser
 [0112] 50 55 60
 [0113] Ser Ser Thr Phe His Ala Gly Gly Pro Glu Val Ser Ser Gln Leu
 [0114] 65 70 75 80
 [0115] Asn Ala Cys Phe Gly Phe Gln Arg Pro Asn Leu Arg Lys Arg Arg Phe
 [0116] 85 90 95
 [0117] Gly Ser Gly Gly Val Asn Leu Asp Glu Val Ser Lys Lys Glu Val Gly
 [0118] 100 105 110
 [0119] Val Gly Ser Asn Val Glu Val Ser Glu Ser Ser Cys Val Glu Ser Asn
 [0120] 115 120 125
 [0121] Ser Gly Val Asp Phe Gly Val Leu Gly Pro Ser Thr Ser Ser Arg Leu
 [0122] 130 135 140
 [0123] Lys Ile Arg Ser Asp Phe Arg Arg Thr Ile Asp Glu Asn Glu Asp Pro
 [0124] 145 150 155 160
 [0125] Ile Asp Gln Ala Asp Asn Gly Val Val Lys Phe Gln Leu Thr Asp Ala

[0126]	165	170	175
[0127]	Asp Val Ser Ser Lys Leu Cys Glu Lys Gly Ala Val Pro Leu Thr Pro		
[0128]	180	185	190
[0129]	Cys Gly Glu Ser Cys Ala Glu Ser Ile Phe Gln Ser Val Cys Ser Phe		
[0130]	195	200	205
[0131]	Glu Glu Lys Gly Leu Asp Val Glu Glu Asn Arg Leu Trp Glu Phe Gln		
[0132]	210	215	220
[0133]	Leu Pro Glu Leu Pro Arg Asn Glu Ile Asn Glu Thr Phe Thr Val Ser		
[0134]	225	230	235
[0135]	Lys Ser Asp Ser Thr Ile Glu Gln Trp Pro Asn Ser Leu Lys Phe Glu		
[0136]	245	250	255
[0137]	Ser Asp Leu Ala Cys Thr Glu Gln Phe Ser Tyr Glu Asn Val Ser Glu		
[0138]	260	265	270
[0139]	Tyr Ser Ser Gln Ala Leu Ser Glu Leu Gln Ser Thr Ile Leu Leu Glu		
[0140]	275	280	285
[0141]	Thr Ser Asp Thr Asp Cys Ser Asp Tyr Thr Pro Ser Ile Phe Leu Glu		
[0142]	290	295	300
[0143]	Ser Gly Ser Glu Phe Ser Glu Lys Ser Asn Asp Asp Ala Ala Pro Ser		
[0144]	305	310	315
[0145]	Ser Thr Phe Ser Met Leu Leu Gln Tyr Arg Arg Asp Phe Leu Asn Leu		
[0146]	325	330	335
[0147]	Asn Ala Ser Pro Asp Ile Arg Thr Ser Ser Ser Ile Glu Glu Glu Lys		
[0148]	340	345	350
[0149]	Val Asp Gln Ser Thr Ile Leu Arg Phe Glu Glu Leu Asp Asp Glu Glu		
[0150]	355	360	365
[0151]	Ala Tyr Leu Met Phe Arg Ser Arg Glu Arg Arg Gln Leu Ile Ile Arg		
[0152]	370	375	380
[0153]	Asp Tyr Val Glu Glu Tyr Arg Ser Thr Thr Asp Tyr Gly Asp Leu Ile		
[0154]	385	390	395
[0155]	Leu Gln Gln Arg Ser Asn Val Val Gln Trp Ile Val Glu Arg Ser Arg		
[0156]	405	410	415
[0157]	Asp Ser Lys Leu His Gln Glu Thr Thr Phe Leu Gly Val Thr Leu Leu		
[0158]	420	425	430
[0159]	Asp Gln Ile Leu Ser Arg Gly Phe Phe Lys Ala Gly Arg His Leu Gln		
[0160]	435	440	445
[0161]	Ile Leu Gly Ile Ala Cys Leu Thr Leu Ala Thr Arg Ile Glu Glu Asn		
[0162]	450	455	460
[0163]	Gln Ser Tyr Ser Trp Phe Tyr Leu Lys Ala Ala Gly Ala Asp Ser Asn		
[0164]	465	470	475
[0165]	Leu Glu Asn Arg Ala Lys Asn Phe Ala Glu Leu Val Leu Ser Asp Lys		
[0166]	485	490	495
[0167]	Val Gln Phe Cys Tyr Phe Pro Ser Thr Ile Ala Ala Val Val Ile		

[0168]	500	505	510
[0169]	Leu Ala Ser Leu Gly Glu Lys Gln Asp Ala Pro Ser Gln Arg Val Ile		
[0170]	515	520	525
[0171]	Glu Val His Lys Tyr Lys Tyr Leu Leu Glu Arg Lys Leu Leu Tyr Leu		
[0172]	530	535	540
[0173]	Tyr Ile Asp Pro Ile Glu Gln Ile Asn Lys Tyr Phe Glu Ile Glu Lys		
[0174]	545	550	555
[0175]	Lys Leu		
[0176]	<210> 3		
[0177]	<211> 1673		
[0178]	<212> RNA		
[0179]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0180]	<220>		
[0181]	<221> mRNA		
[0182]	<222> (1) .. (1673)		
[0183]	<220>		
[0184]	<221> CDS		
[0185]	<222> (1) .. (1098)		
[0186]	<400> 3		
[0187]	aug aag ucc aag aag cca agg gca aau ccc aaa ccc gaa ucc uac ucu 48		
[0188]	Met Lys Ser Lys Lys Pro Arg Ala Asn Pro Lys Pro Glu Ser Tyr Ser		
[0189]	1 5 10 15		
[0190]	ccg ccg aag aag cuc cgu ucu cag cuu cca cgg cgc aga cgc ucu 96		
[0191]	Pro Pro Lys Lys Lys Leu Arg Ser Gln Leu Pro Arg Arg Arg Ser		
[0192]	20 25 30		
[0193]	cgg auu ucu ccu uuu uuc ugc ucc uug gac ucc gau ucc ccu gcu ccu 144		
[0194]	Arg Ile Ser Pro Phe Phe Cys Ser Leu Asp Ser Asp Ser Pro Ala Pro		
[0195]	35 40 45		
[0196]	ucu acc acc auu gcu uuu gcu ucu ucc uuu gcu gcc gcc gaa ucc 192		
[0197]	Ser Thr Thr Ile Ala Phe Ala Ser Ser Phe Ala Ala Ala Glu Ser		
[0198]	50 55 60		
[0199]	agc ucc acu ucc uuc cac gca ggc gga ccu gag guu ucu agc cag cuc 240		
[0200]	Ser Ser Thr Ser Phe His Ala Gly Gly Pro Glu Val Ser Ser Gln Leu		
[0201]	65 70 75 80		
[0202]	aac gcg ugu uuu gga uuc cag agg ccg aau uug cgg aag aga cga uuu 288		
[0203]	Asn Ala Cys Phe Gly Phe Gln Arg Pro Asn Leu Arg Lys Arg Arg Phe		
[0204]	85 90 95		
[0205]	ggu ucg ggu ggu guu aau uug gau gaa guu ucg aag aag gag guu gga 336		
[0206]	Gly Ser Gly Gly Val Asn Leu Asp Glu Val Ser Lys Lys Glu Val Gly		
[0207]	100 105 110		
[0208]	gua ggg agu aau gug gaa gug ucu gaa ucg ucu ugc guu gaa uca aau 384		
[0209]	Val Gly Ser Asn Val Glu Val Ser Glu Ser Ser Cys Val Glu Ser Asn		

[0210]	115	120	125
[0211]	ucu gga guu gau uuu ggu guu cuc gga cca agc acu acg ucc agg uug 432		
[0212]	Ser Gly Val Asp Phe Gly Val Leu Gly Pro Ser Thr Ser Ser Arg Leu		
[0213]	130	135	140
[0214]	aag auu aga agu gau uuu agg aga acu auu gac gaa aau gaa gau cca 480		
[0215]	Lys Ile Arg Ser Asp Phe Arg Arg Thr Ile Asp Glu Asn Glu Asp Pro		
[0216]	145	150	155
[0217]	auc gau caa gcg gau aau gga guu gug aag uuu caa uug acg gau gcu 528		
[0218]	Ile Asp Gln Ala Asp Asn Gly Val Val Lys Phe Gln Leu Thr Asp Ala		
[0219]	165	170	175
[0220]	gau guc ucg ucg aag cuu ugu gaa aag gga gcu gug cca cuc acu ccu 576		
[0221]	Asp Val Ser Ser Lys Leu Cys Glu Lys Gly Ala Val Pro Leu Thr Pro		
[0222]	180	185	190
[0223]	ugu gga gag ucu ugc gcu gag ucu auc uuc cag agc guu ugu ucg uuc 624		
[0224]	Cys Gly Glu Ser Cys Ala Glu Ser Ile Phe Gln Ser Val Cys Ser Phe		
[0225]	195	200	205
[0226]	gaa gag aaa gga uua gac guu gaa aac aga cua ugg gaa uuu cag 672		
[0227]	Glu Glu Lys Gly Leu Asp Val Glu Glu Asn Arg Leu Trp Glu Phe Gln		
[0228]	210	215	220
[0229]	uuu cca gaa cua ccg aga aau gag auc aau gaa acu uuc acu guu ucg 720		
[0230]	Leu Pro Glu Leu Pro Arg Asn Glu Ile Asn Glu Thr Phe Thr Val Ser		
[0231]	225	230	235
[0232]	aag ucg gau ucg acg aua gaa cag ugg ccu aau agc uug aag uuu gaa 768		
[0233]	Lys Ser Asp Ser Thr Ile Glu Gln Trp Pro Asn Ser Leu Lys Phe Glu		
[0234]	245	250	255
[0235]	ucg gau cuu gcu ugc acg gag caa uuc ucu uau gag aau guu ucg gaa 816		
[0236]	Ser Asp Leu Ala Cys Thr Glu Gln Phe Ser Tyr Glu Asn Val Ser Glu		
[0237]	260	265	270
[0238]	uac ucu agc cag gcg uug ucc gag cuu caa uca aca auu cua uug gag 864		
[0239]	Tyr Ser Ser Gln Ala Leu Ser Glu Leu Gln Ser Thr Ile Leu Leu Glu		
[0240]	275	280	285
[0241]	acg ucu gau acu gac ugc uca gau uac acu ccu uca auu uuu uug gaa 912		
[0242]	Thr Ser Asp Thr Asp Cys Ser Asp Tyr Thr Pro Ser Ile Phe Leu Glu		
[0243]	290	295	300
[0244]	ucc gga agc gaa uuu uca gag aaa ucg aac gac gac gca gcu ccu ucg 960		
[0245]	Ser Gly Ser Glu Phe Ser Glu Lys Ser Asn Asp Asp Ala Ala Pro Ser		
[0246]	305	310	315
[0247]	uca aca uuu agc aug uug cug cag uac aga cgc gac uuu cua aac uua 1008		
[0248]	Ser Thr Phe Ser Met Leu Leu Gln Tyr Arg Arg Asp Phe Leu Asn Leu		
[0249]	325	330	335
[0250]	aau gcc ucu cca gac auc aga acu agc ucg ucu auu gaa gaa gag aaa 1056		
[0251]	Asn Ala Ser Pro Asp Ile Arg Thr Ser Ser Ser Ile Glu Glu Glu Lys		

[0252]	340	345	350
[0253]	gua gau caa ucu acg aau ugg acg aug aag aag ccu auc uaa uguucagaag	1108	
[0254]	Val Asp Gln Ser Thr Asn Trp Thr Met Lys Lys Pro Ile		
[0255]	355	360	365
[0256]	uagagaaaaga cgccaaauuga uuauucgcga cuacguagag gaguaucggu ccacaacgga	1168	
[0257]	uuauuggcgau cucauucucc agcaacgguc aaaugugguc caauggauag uugaacgauc	1228	
[0258]	gagagauucc aaacuucauc aggagacgac auuuuuagga guuacccucc uggaccagau	1288	
[0259]	ucugagcaga ggauuucuca aagcuggaag acaccuucaa auucuggca uagcaugucu	1348	
[0260]	aacuuuggcg acuagaauug aagaaaaauca gucauacagc uggiuucuacc ugaaagcugc	1408	
[0261]	uggagcugac ucgaauuugg agaaucgagc uaagaacuuu gcggagcugg uucuuucaga	1468	
[0262]	caaaguccaa uuuuguuauu uccuucaac uauugcagcu gcgguguca ucuuggcguc	1528	
[0263]	ccuaggagaa aaacaagaug caccaaguca acgagucauu gagguacaua aauacaaaua	1588	
[0264]	ccuguuagag agaaaaacucc uuuauuuua uauugaccca auugaacaaa uaaacaagua	1648	
[0265]	uuuugaaauc gagaagaaac uuuuaa	1673	
[0266]	<210> 4		
[0267]	<211> 365		
[0268]	<212> PRT		
[0269]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0270]	<400> 4		
[0271]	Met Lys Ser Lys Lys Pro Arg Ala Asn Pro Lys Pro Glu Ser Tyr Ser		
[0272]	1 5 10 15		
[0273]	Pro Pro Lys Lys Lys Leu Arg Ser Gln Leu Pro Arg Arg Arg Arg Ser		
[0274]	20 25 30		
[0275]	Arg Ile Ser Pro Phe Phe Cys Ser Leu Asp Ser Asp Ser Pro Ala Pro		
[0276]	35 40 45		
[0277]	Ser Thr Thr Ile Ala Phe Ala Ser Ser Ser Phe Ala Ala Ala Glu Ser		
[0278]	50 55 60		
[0279]	Ser Ser Thr Ser Phe His Ala Gly Gly Pro Glu Val Ser Ser Gln Leu		
[0280]	65 70 75 80		
[0281]	Asn Ala Cys Phe Gly Phe Gln Arg Pro Asn Leu Arg Lys Arg Arg Phe		
[0282]	85 90 95		
[0283]	Gly Ser Gly Gly Val Asn Leu Asp Glu Val Ser Lys Lys Glu Val Gly		
[0284]	100 105 110		
[0285]	Val Gly Ser Asn Val Glu Val Ser Glu Ser Ser Cys Val Glu Ser Asn		
[0286]	115 120 125		
[0287]	Ser Gly Val Asp Phe Gly Val Leu Gly Pro Ser Thr Ser Ser Arg Leu		
[0288]	130 135 140		
[0289]	Lys Ile Arg Ser Asp Phe Arg Arg Thr Ile Asp Glu Asn Glu Asp Pro		
[0290]	145 150 155 160		
[0291]	Ile Asp Gln Ala Asp Asn Gly Val Val Lys Phe Gln Leu Thr Asp Ala		
[0292]	165 170 175		
[0293]	Asp Val Ser Ser Lys Leu Cys Glu Lys Gly Ala Val Pro Leu Thr Pro		

[0294]	180	185	190
[0295]	Cys Gly Glu Ser Cys Ala Glu Ser Ile Phe Gln Ser Val Cys Ser Phe		
[0296]	195	200	205
[0297]	Glu Glu Lys Gly Leu Asp Val Glu Glu Asn Arg Leu Trp Glu Phe Gln		
[0298]	210	215	220
[0299]	Leu Pro Glu Leu Pro Arg Asn Glu Ile Asn Glu Thr Phe Thr Val Ser		
[0300]	225	230	235
[0301]	Lys Ser Asp Ser Thr Ile Glu Gln Trp Pro Asn Ser Leu Lys Phe Glu		
[0302]	245	250	255
[0303]	Ser Asp Leu Ala Cys Thr Glu Gln Phe Ser Tyr Glu Asn Val Ser Glu		
[0304]	260	265	270
[0305]	Tyr Ser Ser Gln Ala Leu Ser Glu Leu Gln Ser Thr Ile Leu Leu Glu		
[0306]	275	280	285
[0307]	Thr Ser Asp Thr Asp Cys Ser Asp Tyr Thr Pro Ser Ile Phe Leu Glu		
[0308]	290	295	300
[0309]	Ser Gly Ser Glu Phe Ser Glu Lys Ser Asn Asp Asp Ala Ala Pro Ser		
[0310]	305	310	315
[0311]	Ser Thr Phe Ser Met Leu Leu Gln Tyr Arg Arg Asp Phe Leu Asn Leu		
[0312]	325	330	335
[0313]	Asn Ala Ser Pro Asp Ile Arg Thr Ser Ser Ser Ile Glu Glu Glu Lys		
[0314]	340	345	350
[0315]	Val Asp Gln Ser Thr Asn Trp Thr Met Lys Lys Pro Ile		
[0316]	355	360	365
[0317]	<210> 5		
[0318]	<211> 2348		
[0319]	<212> DNA		
[0320]	<213> 甜瓜(Cucumis melo)		
[0321]	<220>		
[0322]	<221> CDS		
[0323]	<222> (192) .. (1925)		
[0324]	<300>		
[0325]	<308> GenBank/XM_008454203.1		
[0326]	<309> 2014-06-25		
[0327]	<313> (1) .. (2348)		
[0328]	<400> 5		
[0329]	aactgataaa aacattccaa attgagggat caaatgata tttcacacga aaaggaggag 60		
[0330]	gagggtggga cccacttcga gagaaacctc aattcgaatt cacattctc cttcgcttc 120		
[0331]	ttaacttcc taactgctct gcttccatc acgaaactcc atcttcatct tcctccttaa 180		
[0332]	tcgcaaacac c atg aaa tcc aag aaa cga agg cct aat ccc aac cct caa 230		
[0333]	Met Lys Ser Lys Lys Arg Arg Pro Asn Pro Asn Pro Gln		
[0334]	1	5	10
[0335]	tcc ttc tct cca ccc aag aac aag aag ctc cgt tct cac ctt cca cgc 278		

[0336]	Ser Phe Ser Pro Pro Lys Asn Lys Lys Leu Arg Ser His Leu Pro Arg
[0337]	15 20 25
[0338]	cgc aaa cgc cgc agg att tca cct ttt ctc tgc tct aat ttg gtt tcc 326
[0339]	Arg Lys Arg Pro Arg Ile Ser Pro Phe Leu Cys Ser Asn Leu Val Ser
[0340]	30 35 40 45
[0341]	cat tcc ccc gct ccc tcc acc acc ttt gct ttg gct gcc gca gaa tcc 374
[0342]	His Ser Pro Ala Pro Ser Thr Thr Phe Ala Leu Ala Ala Glu Ser
[0343]	50 55 60
[0344]	acc tcc act tcc ttc tac aca tcc cga cct gac gtt tct agc cac ctc 422
[0345]	Thr Ser Thr Ser Phe Tyr Thr Ser Arg Pro Asp Val Ser Ser His Leu
[0346]	65 70 75
[0347]	age gct ccc aat ttc agg aag aga cga ttt gat tcc aag aag gag gtt 470
[0348]	Ser Ala Pro Asn Phe Arg Lys Arg Arg Phe Asp Ser Lys Lys Glu Val
[0349]	80 85 90
[0350]	gga gta ggg agt aat gtg gaa gtg tct gaa tct tct tgt gtt gaa tct 518
[0351]	Gly Val Gly Ser Asn Val Glu Val Ser Glu Ser Ser Cys Val Glu Ser
[0352]	95 100 105
[0353]	aat tct gga gtt gat ttt ggt gtt tcc gga cca agc act act tcg aag 566
[0354]	Asn Ser Gly Val Asp Phe Gly Val Ser Gly Pro Ser Thr Thr Ser Lys
[0355]	110 115 120 125
[0356]	tta aag aat agg agt agt ttt agg aca act att aac gga aat gaa gat 614
[0357]	Leu Lys Asn Arg Ser Ser Phe Arg Thr Thr Ile Asn Gly Asn Glu Asp
[0358]	130 135 140
[0359]	caa att gat cca gcg gag aat gga gtt gag aag ttc gaa ttc acg gat 662
[0360]	Gln Ile Asp Pro Ala Glu Asn Gly Val Glu Lys Phe Glu Phe Thr Asp
[0361]	145 150 155
[0362]	gtt gat gtc tcg tcg aag ctt tgt gga aag gaa gct gtg gta ctc act 710
[0363]	Val Asp Val Ser Ser Lys Leu Cys Gly Lys Glu Ala Val Val Leu Thr
[0364]	160 165 170
[0365]	tct tgt gta gag tct tgt gct gaa tct atc ttt cag agt gtt tgt ccg 758
[0366]	Ser Cys Val Glu Ser Cys Ala Glu Ser Ile Phe Gln Ser Val Cys Pro
[0367]	175 180 185
[0368]	ttc gaa gag aaa cga tta gaa gtt gaa gat aac aga cta tgg gaa ttt 806
[0369]	Phe Glu Glu Lys Arg Leu Glu Val Glu Asp Asn Arg Leu Trp Glu Phe
[0370]	190 195 200 205
[0371]	cag tta cct gag cta ccg aga aat gag att aat gaa act ttc act gtt 854
[0372]	Gln Leu Pro Glu Leu Pro Arg Asn Glu Ile Asn Glu Thr Phe Thr Val
[0373]	210 215 220
[0374]	tcg aag tcg gat tcg acg ata gaa cag tgg cct ggc agc ttg aag ttt 902
[0375]	Ser Lys Ser Asp Ser Thr Ile Glu Gln Trp Pro Gly Ser Leu Lys Phe
[0376]	225 230 235
[0377]	gaa tcg gat ctt gct tgc acg gag caa ttc tct tac gat gat gtt tcg 950

[0378]	Glu Ser Asp Leu Ala Cys Thr Glu Gln Phe Ser Tyr Asp Asp Val Ser		
[0379]	240	245	250
[0380]	gaa tac tct agc cag gcg ttg tcg ctt cag tca act att cta ttg gag	998	
[0381]	Glu Tyr Ser Ser Gln Ala Leu Ser Leu Gln Ser Thr Ile Leu Leu Glu		
[0382]	255	260	265
[0383]	act tct gat gag tac tgc tca gat tac act cca tca att ttc ttg gaa	1046	
[0384]	Thr Ser Asp Glu Tyr Cys Ser Asp Tyr Thr Pro Ser Ile Phe Leu Glu		
[0385]	270	275	280
[0386]	tcc gga agc gaa ttt tca gag aaa tcg aac gaa gac gca gct cct tca	1094	
[0387]	Ser Gly Ser Glu Phe Ser Glu Lys Ser Asn Glu Asp Ala Ala Pro Ser		
[0388]	290	295	300
[0389]	tcg aca ttt aga atg ttg ctg cag tac aga cgc gac ttt cta agc tta	1142	
[0390]	Ser Thr Phe Arg Met Leu Leu Gln Tyr Arg Arg Asp Phe Leu Ser Leu		
[0391]	305	310	315
[0392]	aat tcc tct cca gac atc aga act agc tcg cct att gaa gaa gaa aaa	1190	
[0393]	Asn Ser Ser Pro Asp Ile Arg Thr Ser Ser Pro Ile Glu Glu Glu Lys		
[0394]	320	325	330
[0395]	gta gat caa tct acg att ctg aga ttt gaa gaa ttg gac gac gaa gaa	1238	
[0396]	Val Asp Gln Ser Thr Ile Leu Arg Phe Glu Glu Leu Asp Asp Glu Glu		
[0397]	335	340	345
[0398]	gcc tat cga atg ttc aga aat aga gaa aga cgc caa ttg att att cac	1286	
[0399]	Ala Tyr Arg Met Phe Arg Asn Arg Glu Arg Arg Gln Leu Ile Ile His		
[0400]	350	355	360
[0401]	gac tac ata gag gag tat cga tcc aca acg gat tat ggc gat ctc att	1334	
[0402]	Asp Tyr Ile Glu Glu Tyr Arg Ser Thr Thr Asp Tyr Gly Asp Leu Ile		
[0403]	370	375	380
[0404]	ctt cag caa cgg tca aat atg gtc caa tgg ata gtt gaa cga tct aga	1382	
[0405]	Leu Gln Gln Arg Ser Asn Met Val Gln Trp Ile Val Glu Arg Ser Arg		
[0406]	385	390	395
[0407]	gaa aac aaa ctt cat cag gag acg aca ttt tta gga gtt acc ctt cta	1430	
[0408]	Glu Asn Lys Leu His Gln Glu Thr Thr Phe Leu Gly Val Thr Leu Leu		
[0409]	400	405	410
[0410]	gac cag att ctg agc aaa gga ttc ttc aaa gct gaa agt cgc ctt caa	1478	
[0411]	Asp Gln Ile Leu Ser Lys Gly Phe Phe Lys Ala Glu Ser Arg Leu Gln		
[0412]	415	420	425
[0413]	att cta ggc ata gca tgt cta act ttg gcg act aga att gaa gaa aat	1526	
[0414]	Ile Leu Gly Ile Ala Cys Leu Thr Leu Ala Thr Arg Ile Glu Glu Asn		
[0415]	430	435	440
[0416]	cag tca tac agc tgg tta cag caa agg aat atc cat gta ggg agc aac	1574	
[0417]	Gln Ser Tyr Ser Trp Leu Gln Gln Arg Asn Ile His Val Gly Ser Asn		
[0418]	450	455	460
[0419]	acg tac aga aga gca gaa gtt gtt ggc atg gaa tgg ctt gtt gaa gaa	1622	

[0420] Thr Tyr Arg Arg Ala Glu Val Val Gly Met Glu Trp Leu Val Glu Glu
[0421] 465 470 475
[0422] gtt ctt aag ttc cat tgt ttc ttg cca act gtt tac aac ttc ttg tgg 1670
[0423] Val Leu Lys Phe His Cys Phe Leu Pro Thr Val Tyr Asn Phe Leu Trp
[0424] 480 485 490
[0425] ttc tac ctg aaa gct gct gga gct aac tca gat ttg gag aat cga gct 1718
[0426] Phe Tyr Leu Lys Ala Ala Gly Ala Asn Ser Asp Leu Glu Asn Arg Ala
[0427] 495 500 505
[0428] aag aat ttc gca gtg ctc gtt ctt gca gac aaa gtc caa ttt tgt tat 1766
[0429] Lys Asn Phe Ala Val Leu Val Ala Asp Lys Val Gln Phe Cys Tyr
[0430] 510 515 520 525
[0431] ttc cct tca aca att gca gct gca gtt gtc atc ttg gcg tcc tta gga 1814
[0432] Phe Pro Ser Thr Ile Ala Ala Val Val Ile Leu Ala Ser Leu Gly
[0433] 530 535 540
[0434] gaa aaa caa gat gca cca agt caa cga gtc att gag aca cat gtc aga 1862
[0435] Glu Lys Gln Asp Ala Pro Ser Gln Arg Val Ile Glu Thr His Val Arg
[0436] 545 550 555
[0437] aca gaa aac gac gat ctg cct gaa tgt atc gag agc ttg gag tgg cta 1910
[0438] Thr Glu Asn Asp Asp Leu Pro Glu Cys Ile Glu Ser Leu Glu Trp Leu
[0439] 560 565 570
[0440] tta aag ctt tta tga tggaaggcatc aaatcctaac acagcaaaaa agaaaagcaag 1965
[0441] Leu Lys Leu Leu
[0442] 575
[0443] caattggctc ttttgacata ttcttgacca cttaaacatc atcttgaaca cagctagtga 2025
[0444] agctcacccct ccgaaaccag ctatatagggt aagacattca tcaattcagt tctttcttat 2085
[0445] tctatcacca acagaatgaa aatttggttt ttcccttcaa attttattat aacaagagat 2145
[0446] tgaatcagga cctagtcaag tccaaaaacca aatagtattt gattttcatt tacatgcttt 2205
[0447] cataatttca tgtattttagt agtgttgaat tacaggatgt atgtaattga tactcagacc 2265
[0448] taatgactct atattcttca cccaaacaaa caatggttac gatgagattt tcaatactcg 2325
[0449] agcaattgaa gcttaaaatg taa 2348
[0450] <210> 6
[0451] <211> 577
[0452] <212> PRT
[0453] <213> 甜瓜(Cucumis melo)
[0454] <400> 6
[0455] Met Lys Ser Lys Lys Arg Arg Pro Asn Pro Asn Pro Gln Ser Phe Ser
[0456] 1 5 10 15
[0457] Pro Pro Lys Asn Lys Lys Leu Arg Ser His Leu Pro Arg Arg Lys Arg
[0458] 20 25 30
[0459] Pro Arg Ile Ser Pro Phe Leu Cys Ser Asn Leu Val Ser His Ser Pro
[0460] 35 40 45
[0461] Ala Pro Ser Thr Thr Phe Ala Leu Ala Ala Glu Ser Thr Ser Thr

[0462]	50	55	60
[0463]	Ser Phe Tyr Thr Ser Arg Pro Asp Val Ser Ser His Leu Ser Ala Pro		
[0464]	65	70	75
[0465]	Asn Phe Arg Lys Arg Arg Phe Asp Ser Lys Lys Glu Val Gly Val Gly		
[0466]	85	90	95
[0467]	Ser Asn Val Glu Val Ser Glu Ser Ser Cys Val Glu Ser Asn Ser Gly		
[0468]	100	105	110
[0469]	Val Asp Phe Gly Val Ser Gly Pro Ser Thr Thr Ser Lys Leu Lys Asn		
[0470]	115	120	125
[0471]	Arg Ser Ser Phe Arg Thr Thr Ile Asn Gly Asn Glu Asp Gln Ile Asp		
[0472]	130	135	140
[0473]	Pro Ala Glu Asn Gly Val Glu Lys Phe Glu Phe Thr Asp Val Asp Val		
[0474]	145	150	155
[0475]	Ser Ser Lys Leu Cys Gly Lys Glu Ala Val Val Leu Thr Ser Cys Val		
[0476]	165	170	175
[0477]	Glu Ser Cys Ala Glu Ser Ile Phe Gln Ser Val Cys Pro Phe Glu Glu		
[0478]	180	185	190
[0479]	Lys Arg Leu Glu Val Glu Asp Asn Arg Leu Trp Glu Phe Gln Leu Pro		
[0480]	195	200	205
[0481]	Glu Leu Pro Arg Asn Glu Ile Asn Glu Thr Phe Thr Val Ser Lys Ser		
[0482]	210	215	220
[0483]	Asp Ser Thr Ile Glu Gln Trp Pro Gly Ser Leu Lys Phe Glu Ser Asp		
[0484]	225	230	235
[0485]	Leu Ala Cys Thr Glu Gln Phe Ser Tyr Asp Asp Val Ser Glu Tyr Ser		
[0486]	245	250	255
[0487]	Ser Gln Ala Leu Ser Leu Gln Ser Thr Ile Leu Leu Glu Thr Ser Asp		
[0488]	260	265	270
[0489]	Glu Tyr Cys Ser Asp Tyr Thr Pro Ser Ile Phe Leu Glu Ser Gly Ser		
[0490]	275	280	285
[0491]	Glu Phe Ser Glu Lys Ser Asn Glu Asp Ala Ala Pro Ser Ser Thr Phe		
[0492]	290	295	300
[0493]	Arg Met Leu Leu Gln Tyr Arg Arg Asp Phe Leu Ser Leu Asn Ser Ser		
[0494]	305	310	315
[0495]	Pro Asp Ile Arg Thr Ser Ser Pro Ile Glu Glu Glu Lys Val Asp Gln		
[0496]	325	330	335
[0497]	Ser Thr Ile Leu Arg Phe Glu Glu Leu Asp Asp Glu Glu Ala Tyr Arg		
[0498]	340	345	350
[0499]	Met Phe Arg Asn Arg Glu Arg Arg Gln Leu Ile Ile His Asp Tyr Ile		
[0500]	355	360	365
[0501]	Glu Glu Tyr Arg Ser Thr Thr Asp Tyr Gly Asp Leu Ile Leu Gln Gln		
[0502]	370	375	380
[0503]	Arg Ser Asn Met Val Gln Trp Ile Val Glu Arg Ser Arg Glu Asn Lys		

[0504]	385	390	395	400
[0505]	Leu His Gln Glu Thr Thr Phe Leu Gly Val Thr Leu Leu Asp Gln Ile			
[0506]		405	410	415
[0507]	Leu Ser Lys Gly Phe Phe Lys Ala Glu Ser Arg Leu Gln Ile Leu Gly			
[0508]		420	425	430
[0509]	Ile Ala Cys Leu Thr Leu Ala Thr Arg Ile Glu Glu Asn Gln Ser Tyr			
[0510]		435	440	445
[0511]	Ser Trp Leu Gln Gln Arg Asn Ile His Val Gly Ser Asn Thr Tyr Arg			
[0512]		450	455	460
[0513]	Arg Ala Glu Val Val Gly Met Glu Trp Leu Val Glu Glu Val Leu Lys			
[0514]		465	470	475
[0515]	Phe His Cys Phe Leu Pro Thr Val Tyr Asn Phe Leu Trp Phe Tyr Leu			
[0516]		485	490	495
[0517]	Lys Ala Ala Gly Ala Asn Ser Asp Leu Glu Asn Arg Ala Lys Asn Phe			
[0518]		500	505	510
[0519]	Ala Val Leu Val Leu Ala Asp Lys Val Gln Phe Cys Tyr Phe Pro Ser			
[0520]		515	520	525
[0521]	Thr Ile Ala Ala Ala Val Val Ile Leu Ala Ser Leu Gly Glu Lys Gln			
[0522]		530	535	540
[0523]	Asp Ala Pro Ser Gln Arg Val Ile Glu Thr His Val Arg Thr Glu Asn			
[0524]		545	550	555
[0525]	Asp Asp Leu Pro Glu Cys Ile Glu Ser Leu Glu Trp Leu Leu Lys Leu			
[0526]		565	570	575
[0527]	Leu			
[0528]	<210> 7			
[0529]	<211> 38			
[0530]	<212> DNA			
[0531]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0532]	<400> 7			
[0533]	gtaaaaacgac ggccagttgc ctctccagac atcagaac 38			
[0534]	<210> 8			
[0535]	<211> 38			
[0536]	<212> DNA			
[0537]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0538]	<400> 8			
[0539]	caggaaacag ctagcacca tccgttgtgg accgatac 38			
[0540]	<210> 9			
[0541]	<211> 38			
[0542]	<212> DNA			
[0543]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0544]	<400> 9			
[0545]	gtaaaaacgac ggccagtgtct cttcgtaaa cattttc 38			

[0546]	<210>	10		
[0547]	<211>	40		
[0548]	<212>	DNA		
[0549]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[0550]	<400>	10		
[0551]	caggaaacag ctaggacatt ggccgttttc tctacttctg	40		
[0552]	<210>	11		
[0553]	<211>	38		
[0554]	<212>	DNA		
[0555]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[0556]	<400>	11		
[0557]	caggaaacag ctaggaccct ggtccaggag ggtaactc	38		
[0558]	<210>	12		
[0559]	<211>	569		
[0560]	<212>	PRT		
[0561]	<213>	黄瓜(Cucumis sativus)		
[0562]	<400>	12		
[0563]	Met Lys Ser Lys Lys Arg Arg Pro Asn Pro Lys Pro Gln Ser Phe Ser			
[0564]	1	5	10	15
[0565]	Pro Pro Lys Asn Lys Lys Leu Arg Ser Gln Leu Pro Arg Arg Lys Arg			
[0566]	20	25	30	
[0567]	Pro Leu Ile Leu Pro Phe Phe Cys Cys Tyr Leu Asp Ser Asp Ser Pro			
[0568]	35	40	45	
[0569]	Pro Pro Ser Thr Thr Phe Ser Phe Ala Ser Ser Ser Ser Phe Thr Ala			
[0570]	50	55	60	
[0571]	Ala Gln Ser Thr Ser Thr Ser Phe Phe Pro Thr Gly Pro Glu Val Ser			
[0572]	65	70	75	80
[0573]	Ser His Leu Asn Pro Leu Asn Phe Arg Lys Thr Arg Phe Asp Ser Asn			
[0574]	85	90	95	
[0575]	Lys Glu Val Gly Val Gly Ser Asn Glu Gln Val Ser Glu Ser Ser Cys			
[0576]	100	105	110	
[0577]	Val Glu Ser Asn Ser Gly Leu Asp Phe Gly Val Ser Gly Pro Ser Thr			
[0578]	115	120	125	
[0579]	Thr Ser Lys Leu Lys Asn Arg Arg Thr Ile His Gly Asn Glu Asp Pro			
[0580]	130	135	140	
[0581]	Ile Asp Pro Ala Glu Asn Gly Val Asp Ala Ser Ser Lys Leu Cys Gly			
[0582]	145	150	155	160
[0583]	Lys Gly Ala Val Val Leu Thr Ser Cys Val Glu Ser Cys Ala Glu Ser			
[0584]	165	170	175	
[0585]	Ile Phe Gln Ser Val Cys Ser Phe Glu Glu Lys Gly Leu Glu Val Glu			
[0586]	180	185	190	
[0587]	Asp Asn Arg Leu Trp Glu Phe Gln Leu Pro Glu Leu Gln Lys Asn Glu			

[0588]	195	200	205
[0589]	Ile Asn Lys Thr Phe Thr Val Ser Lys Ser Asp Ser Thr Ile Glu Gln		
[0590]	210	215	220
[0591]	Trp Pro Gly Ser Leu Lys Ile Glu Ser Asp Leu Ala Cys Thr Glu Gln		
[0592]	225	230	235
[0593]	Phe Ser Tyr Asp Asp Val Ser Glu Tyr Leu Ser Gln Pro Leu Ser Leu		
[0594]	245	250	255
[0595]	Gln Ser Thr Ile Leu Leu Glu Met Ser Asp Asp Cys Ser Asp Tyr Thr		
[0596]	260	265	270
[0597]	Pro Ser Ile Phe Leu Glu Ser Gly Ser Glu Phe Ser Glu Lys Ser Asn		
[0598]	275	280	285
[0599]	Glu Asp Ala Ala Pro Thr Ser Thr Phe Thr Met Leu Leu Gln Tyr Arg		
[0600]	290	295	300
[0601]	Arg Glu Phe Ile Ser Leu Asn Phe Ser His Ile Arg Thr Ser Ser Ser		
[0602]	305	310	315
[0603]	Ile Glu Glu Glu Glu Val Asp Gln Ser Thr Ile Leu Arg Phe Glu Glu		
[0604]	325	330	335
[0605]	Leu Asp Asp Glu Glu Ala Tyr Arg Met Phe Arg Asn Arg Glu Arg Arg		
[0606]	340	345	350
[0607]	Gln Leu Ile Ile Cys Asp Tyr Ile Glu Glu Tyr Arg Ser Thr Thr Asp		
[0608]	355	360	365
[0609]	Tyr Gly Asp Phe Ile Leu Gln Gln Arg Ser Asn Met Val Gln Trp Ile		
[0610]	370	375	380
[0611]	Val Glu Arg Ser Arg Glu Lys Lys Leu His Gln Glu Thr Thr Phe Leu		
[0612]	385	390	395
[0613]	Gly Val Thr Leu Leu Asp Gln Ile Leu Ser Lys Gly Phe Phe Lys Ala		
[0614]	405	410	415
[0615]	Glu Thr His Leu Gln Ile Leu Gly Ile Ala Cys Leu Thr Leu Ala Thr		
[0616]	420	425	430
[0617]	Arg Ile Glu Glu Asn Gln Ser Tyr Ser Trp Leu Gln Gln Arg Asn Ile		
[0618]	435	440	445
[0619]	His Val Gly Ser Asn Thr Tyr Arg Arg Ser Lys Val Val Gly Met Glu		
[0620]	450	455	460
[0621]	Trp Leu Val Glu Glu Val Leu Lys Phe His Cys Phe Leu Pro Thr Val		
[0622]	465	470	475
[0623]	Tyr Asn Phe Leu Trp Phe Tyr Leu Lys Ala Ala Gly Ala Asn Ser Asp		
[0624]	485	490	495
[0625]	Leu Glu Asn Arg Ala Lys Asn Phe Ala Val Leu Val Leu Ala Glu Lys		
[0626]	500	505	510
[0627]	Val Gln Phe Cys Tyr Phe Pro Ser Thr Ile Ala Ala Val Val Ile		
[0628]	515	520	525
[0629]	Leu Ala Ser Leu Gly Glu Lys Gln Asp Ala Pro Ser Glu Arg Val Ile		

[0630] 530 535 540
[0631] Glu Ile His Val Arg Thr Glu Asn Asp Asp Leu Pro Glu Cys Ile Glu
[0632] 545 550 555 560
[0633] Ser Leu Glu Trp Leu Leu Lys Phe Leu
[0634] 565
[0635] <210> 13
[0636] <211> 50
[0637] <212> DNA
[0638] <213> 人工(Artificial)
[0639] <400> 13
[0640] acgatttga gatttgaaga attggacgat gaagaagcct atctaattgtt 50
[0641] <210> 14
[0642] <211> 17
[0643] <212> PRT
[0644] <213> 人工(Artificial)
[0645] <400> 14
[0646] Thr Ile Leu Arg Phe Glu Glu Leu Asp Asp Glu Glu Ala Tyr Leu Met
[0647] 1 5 10 15
[0648] Phe
[0649] <210> 15
[0650] <211> 34
[0651] <212> DNA
[0652] <213> 人工(Artificial)
[0653] <400> 15
[0654] acgaattgga ccatgaagaa gccttatctaa tttt 34
[0655] <210> 16
[0656] <211> 9
[0657] <212> PRT
[0658] <213> 人工(Artificial)
[0659] <400> 16
[0660] Thr Asn Trp Thr Met Lys Lys Pro Ile
[0661] 1 5
[0662] <210> 17
[0663] <211> 1689
[0664] <212> DNA
[0665] <213> 人工(Artificial)
[0666] <220>
[0667] <221> CDS
[0668] <222> (1) .. (672)
[0669] <400> 17
[0670] atg aag tcc aag aag cca agg gca aat ccc aaa ccc gaa tcc tac tct 48
[0671] Met Lys Ser Lys Lys Pro Arg Ala Asn Pro Lys Pro Glu Ser Tyr Ser

[0672]	1	5	10	15
[0673]	ccg ccg aag aag aag ctc cgt tct cag ctt cca cgg cgc aga cgc tct	96		
[0674]	Pro Pro Lys Lys Lys Leu Arg Ser Gln Leu Pro Arg Arg Arg Arg Ser			
[0675]	20	25	30	
[0676]	cgg att tct cct ttt ttc tgc tcc ttg gac tcc gat tcc cct gct cct	144		
[0677]	Arg Ile Ser Pro Phe Phe Cys Ser Leu Asp Ser Asp Ser Pro Ala Pro			
[0678]	35	40	45	
[0679]	tct acc acc att gct ttt gct tct tcc ttt gct gcc gcc gaa tcc	192		
[0680]	Ser Thr Thr Ile Ala Phe Ala Ser Ser Ser Phe Ala Ala Ala Glu Ser			
[0681]	50	55	60	
[0682]	agc tcc act tcc ttc cac gca ggc gga cct gag gtt tct agc cag ctc	240		
[0683]	Ser Ser Thr Ser Phe His Ala Gly Gly Pro Glu Val Ser Ser Gln Leu			
[0684]	65	70	75	80
[0685]	aac gcg tgt ttt gga ttc cag agg ccg aat ttg cgg aag aga cga ttt	288		
[0686]	Asn Ala Cys Phe Gly Phe Gln Arg Pro Asn Leu Arg Lys Arg Arg Phe			
[0687]	85	90	95	
[0688]	ggt tcg ggt ggt aat ttg gat gaa gtt tcg aag aag gag gtt gga	336		
[0689]	Gly Ser Gly Gly Val Asn Leu Asp Glu Val Ser Lys Lys Glu Val Gly			
[0690]	100	105	110	
[0691]	gta ggg agt aat gtg gaa gtg tct gaa tcg tct tgc gtt gaa tca aat	384		
[0692]	Val Gly Ser Asn Val Glu Val Ser Glu Ser Ser Cys Val Glu Ser Asn			
[0693]	115	120	125	
[0694]	tct gga gtt gat ttt ggt gtt ctc gga cca agc act agc tcc agg ttg	432		
[0695]	Ser Gly Val Asp Phe Gly Val Leu Gly Pro Ser Thr Ser Ser Arg Leu			
[0696]	130	135	140	
[0697]	aag att aga agt gat ttt agg aga act att gac gaa aat gaa gat cca	480		
[0698]	Lys Ile Arg Ser Asp Phe Arg Arg Thr Ile Asp Glu Asn Glu Asp Pro			
[0699]	145	150	155	160
[0700]	atc gat caa gcg gat aat gga gtt gtg aag ttt caa ttg acg gat gct	528		
[0701]	Ile Asp Gln Ala Asp Asn Gly Val Val Lys Phe Gln Leu Thr Asp Ala			
[0702]	165	170	175	
[0703]	gat gtc tcg tcg aag ctt tgt gaa aag gga gct gtg cca ctc act cct	576		
[0704]	Asp Val Ser Ser Lys Leu Cys Glu Lys Gly Ala Val Pro Leu Thr Pro			
[0705]	180	185	190	
[0706]	tgt gga gag tct tgc gct gag tct atc ttc cag agc gtt tgt tcg ttg	624		
[0707]	Cys Gly Glu Ser Cys Ala Glu Ser Ile Phe Gln Ser Val Cys Ser Phe			
[0708]	195	200	205	
[0709]	gaa gag aaa gga tta gac gtt gaa gaa aac aga cta tgg gaa ttt tag	672		
[0710]	Glu Glu Lys Gly Leu Asp Val Glu Glu Asn Arg Leu Trp Glu Phe			
[0711]	210	215	220	
[0712]	ttaccagaac taccgagaaaa tgagatcaat gaaaactttca ctgtttcgaa gtcggattcg	732		
[0713]	acgatagaac agtggctaa tagcttgaag tttgaatcgg atcttgcttg cacggagcaa	792		

[0714] ttctcttatg agaatgttc ggaatactct agccaggcgt tgtccgagct tcaatcaaca 852
 [0715] attctattgg agacgtctga tactgactgc tcagattaca ctccctcaat tttttggaa 912
 [0716] tccggaagcg aattttcaga gaaatcgAAC gacgacgcAG ctccttcgtc aacatTTAGC 972
 [0717] atgttgctgc agtacagacg cgactttcta aacttaatg cctctccaga catcagaact 1032
 [0718] agctcgtctA ttgaagaaga gaaagttagat caatctacga ttttgagatt tgaagaattg 1092
 [0719] gacgatgaag aaggcctatct aatgttcaga agtagagaaa gacgccaatt gattattcgc 1152
 [0720] gactacgttag aggagtatcg gtcacacaacg gattatggcg atctcattct ccagcaacgg 1212
 [0721] tcaaATgtgg tccaaatggat agttaacga tcgagagatt ccaaacttca tcaggagacg 1272
 [0722] acatTTTtag gagttaccct cctggaccag attctgagca gaggattctt caaagctgga 1332
 [0723] agacacCCtC aaattctggg catagcatgt ctaactttgg cgactagaat tgaagaaaat 1392
 [0724] cagtcatACA gctggttcta cctgaaagct gctggagctg actcgaattt ggagaatcga 1452
 [0725] gctaagaact ttgoggagct ggttcttca gacaaagtcc aattttgtta tttcccttca 1512
 [0726] actattgcag ctgcgggtgt catcttggcg tcccttaggag aaaaacaaga tgcaccaagt 1572
 [0727] caacgagtca ttgaggtaca taaatacAAA tacctgttag agagaaaaact cctttatctt 1632
 [0728] tatattgacc caattgaaca aataaacaag tattttgaaa tcgagaagaa actttaa 1689
 [0729] <210> 18
 [0730] <211> 223
 [0731] <212> PRT
 [0732] <213> 人工(Artificial)
 [0733] <400> 18
 [0734] Met Lys Ser Lys Lys Pro Arg Ala Asn Pro Lys Pro Glu Ser Tyr Ser
 [0735] 1 5 10 15
 [0736] Pro Pro Lys Lys Lys Leu Arg Ser Gln Leu Pro Arg Arg Arg Arg Ser
 [0737] 20 25 30
 [0738] Arg Ile Ser Pro Phe Phe Cys Ser Leu Asp Ser Asp Ser Pro Ala Pro
 [0739] 35 40 45
 [0740] Ser Thr Thr Ile Ala Phe Ala Ser Ser Ser Phe Ala Ala Ala Glu Ser
 [0741] 50 55 60
 [0742] Ser Ser Thr Ser Phe His Ala Gly Gly Pro Glu Val Ser Ser Gln Leu
 [0743] 65 70 75 80
 [0744] Asn Ala Cys Phe Gly Phe Gln Arg Pro Asn Leu Arg Lys Arg Arg Phe
 [0745] 85 90 95
 [0746] Gly Ser Gly Gly Val Asn Leu Asp Glu Val Ser Lys Lys Glu Val Gly
 [0747] 100 105 110
 [0748] Val Gly Ser Asn Val Glu Val Ser Glu Ser Ser Cys Val Glu Ser Asn
 [0749] 115 120 125
 [0750] Ser Gly Val Asp Phe Gly Val Leu Gly Pro Ser Thr Ser Ser Arg Leu
 [0751] 130 135 140
 [0752] Lys Ile Arg Ser Asp Phe Arg Arg Thr Ile Asp Glu Asn Glu Asp Pro
 [0753] 145 150 155 160
 [0754] Ile Asp Gln Ala Asp Asn Gly Val Val Lys Phe Gln Leu Thr Asp Ala
 [0755] 165 170 175

[0756]	Asp Val Ser Ser Lys Leu Cys Glu Lys Gly Ala Val Pro Leu Thr Pro		
[0757]	180	185	190
[0758]	Cys Gly Glu Ser Cys Ala Glu Ser Ile Phe Gln Ser Val Cys Ser Phe		
[0759]	195	200	205
[0760]	Glu Glu Lys Gly Leu Asp Val Glu Glu Asn Arg Leu Trp Glu Phe		
[0761]	210	215	220
[0762]	<210> 19		
[0763]	<211> 590		
[0764]	<212> PRT		
[0765]	<213> 人工(Artificial)		
[0766]	<400> 19		
[0767]	Met Lys Arg Lys Leu His Ala Glu Ala Val Gln Pro Ala Val Gln Gln		
[0768]	1 5 10 15		
[0769]	Pro Lys Glu Ile Leu Pro Ala Val Lys Arg Gln Leu Arg Ser Lys Leu		
[0770]	20 25 30		
[0771]	Pro Arg Arg Lys Arg Ser His Ile Ser Pro Ile Leu Arg Ser Phe Ser		
[0772]	35 40 45		
[0773]	Ile Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Thr Ser Glu Val Ser Arg Gln Ser Ser		
[0774]	50 55 60		
[0775]	Lys Gly Ser Val Asn Lys Glu Val Lys Lys Arg Glu Ile Glu Gly Glu		
[0776]	65 70 75 80		
[0777]	Glu Phe Arg Arg Ile Thr Arg Ala Tyr Phe Arg Lys Lys Leu Leu Val		
[0778]	85 90 95		
[0779]	Asp Gln Lys Lys Asp Ser Glu Val Glu Leu Ser Glu Cys Ser Cys Val		
[0780]	100 105 110		
[0781]	Asp Ser Cys Ser Glu Val Ile Gly Lys Ile Ile Lys Ile Glu Asp Pro		
[0782]	115 120 125		
[0783]	Val Asp Ile Ser Arg Asp Ile Val Ser Lys Arg Asn Arg Asn Ala Lys		
[0784]	130 135 140		
[0785]	Val Ile Glu Gly Thr Glu Asp Ser Glu Val Ile Ser Arg Phe Leu Lys		
[0786]	145 150 155 160		
[0787]	Ala Ser Gly Gly Phe Cys Gly Glu Ser Ser Lys Ser Gly Glu Asp Ala		
[0788]	165 170 175		
[0789]	Val Ala Arg Ser Arg Asn Ala Ala Lys Ile Ile His Glu Asp Val Val		
[0790]	180 185 190		
[0791]	Ser Phe Asn Ser Val Leu Gln Ser Pro Ser Glu Ser Lys Cys Gly Asn		
[0792]	195 200 205		
[0793]	Leu Ser Val Gln Ser Ile Lys Cys Ser Glu Asn Arg Ala Ala Glu Glu		
[0794]	210 215 220		
[0795]	Val Glu Ser Glu Val Ser Arg Val Cys Pro Glu Val Glu Leu Ser Ala		
[0796]	225 230 235 240		
[0797]	Val Glu Gln Ala His Glu Lys Leu Val Glu Ala Glu Leu Asp Leu Glu		

[0798]	245	250	255
[0799]	Cys Ser Glu Asn Phe Ser Ile Val Asp Val Ser Asp Asp Tyr Ser Ser		
[0800]	260	265	270
[0801]	Ala Tyr Ser Glu Leu Gln Ser Glu Ile Phe Pro Glu Ser Ser Asp Ile		
[0802]	275	280	285
[0803]	Asp Ile Ser Asp Tyr Ser Pro Ser Tyr Trp Tyr Asp Ser Gly Ser Gln		
[0804]	290	295	300
[0805]	Phe Ser Glu Lys Ser Asn Ala Asp Ala Ser Pro Ser Pro Thr Phe Thr		
[0806]	305	310	315
[0807]	Leu Phe Leu Arg Phe Gly Gln Gln Phe Cys Arg Ser Thr Ala Ala Leu		
[0808]	325	330	335
[0809]	Gln Ser Thr Pro Ile Asn Ser Ser Glu Asp Gln Ile Ser Thr Glu Phe		
[0810]	340	345	350
[0811]	Thr Gly Leu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Ser Tyr Arg Met Ile Arg		
[0812]	355	360	365
[0813]	Asn Arg Glu Arg Arg Gln Leu Tyr Leu His Asp Tyr Ala Glu Glu Tyr		
[0814]	370	375	380
[0815]	Cys Ser Thr Thr Asp Tyr Gly Asp Leu Ile Val Gln Gln Arg Leu Gln		
[0816]	385	390	395
[0817]	Met Val His Trp Ile Leu Glu Gln Ala Thr Arg Lys Asp Leu Gln Lys		
[0818]	405	410	415
[0819]	Glu Thr Met Phe Leu Ser Val Asn Leu Phe Asp Arg Phe Leu Ser Lys		
[0820]	420	425	430
[0821]	Gly Tyr Phe Lys Thr Lys Arg Cys Leu Gln Ile Ala Gly Ile Ala Cys		
[0822]	435	440	445
[0823]	Leu Thr Leu Ala Val Arg Ile Glu Glu Asn Gln Pro Phe Asn Ser Ile		
[0824]	450	455	460
[0825]	Arg Gln Lys Thr Phe Ser Val Ala Gly Thr Thr Tyr Ser Cys Ser Glu		
[0826]	465	470	475
[0827]	Val Val Ala Met Glu Trp Leu Val Gln Glu Val Leu Asn Phe Gln Cys		
[0828]	485	490	495
[0829]	Phe Leu Pro Thr Ile Tyr Asn Phe Leu Trp Phe Tyr Leu Lys Ala Ala		
[0830]	500	505	510
[0831]	Thr Ala Thr Glu Tyr Met Glu Lys Thr Ala Lys Tyr Leu Ala Val Leu		
[0832]	515	520	525
[0833]	Ala Leu Leu Gly His Glu His Leu Cys Tyr Arg Pro Ser Thr Val Ala		
[0834]	530	535	540
[0835]	Ser Ala Leu Val Ile Leu Ala Leu Ser Ala Ala Asn Leu Tyr Ala Ser		
[0836]	545	550	555
[0837]	Cys His Leu Val Thr Lys Thr His Ala Lys Ile Glu Asp Glu Asp Leu		
[0838]	565	570	575
[0839]	Pro Glu Cys Ile Lys Ser Leu Glu Trp Leu Val Lys Tyr Ile		

[0840]	580	585	590
[0841]	<210> 20		
[0842]	<211> 560		
[0843]	<212> PRT		
[0844]	<213> 辣椒(Capsicum annuum)		
[0845]	<400> 20		
[0846]	Met Lys Arg Asn Leu His Ala Glu Ala Ala Glu Ile Leu Pro Ala Met		
[0847]	1 5 10 15		
[0848]	Lys Lys Gln Leu Arg Ser Lys Leu Pro Arg Arg Lys Arg Ser His Ile		
[0849]	20 25 30		
[0850]	Ser Pro Ile Leu Leu Ser Val Asn Lys Glu Thr Val Val Val Val Lys		
[0851]	35 40 45		
[0852]	Lys Lys Arg Glu Ile Glu Val Asp Glu Phe Arg Arg Ile Thr Arg Ala		
[0853]	50 55 60		
[0854]	Tyr Leu Lys Lys Asp Ala Glu Val Glu Leu Ser Glu Cys Ser Cys		
[0855]	65 70 75 80		
[0856]	Val Asp Ser Cys Ser Glu Ile Val Gly Lys Ile Val Lys Ile Glu Asp		
[0857]	85 90 95		
[0858]	Pro Val Asp Ile Ser His Asp Ile Val Ser Lys Gln Lys Arg Asn Ala		
[0859]	100 105 110		
[0860]	Lys Val Val Glu Gly Thr Glu Asp Ser Asp Ala Ile Ser Phe Leu Lys		
[0861]	115 120 125		
[0862]	Asn Ala Ser Gly Phe Phe Gly Glu Ser Ser Lys Ser Gly Val Asp Val		
[0863]	130 135 140		
[0864]	Ser Val Glu Gly Ser Arg Thr Thr Glu Lys Ile Asn Asp Glu Asp Val		
[0865]	145 150 155 160		
[0866]	Val Ser Phe Asn Ser Val Leu Gln Ser Pro Ser Glu Ser Lys Cys Gly		
[0867]	165 170 175		
[0868]	Asn Leu Ser Val Gln Thr Ile Lys Cys Thr Glu Asn Arg Ala Ala Glu		
[0869]	180 185 190		
[0870]	Glu Asp Ile Glu Ser Glu Val Ser Arg Ile Tyr Pro Glu Val Glu Leu		
[0871]	195 200 205		
[0872]	Ser Ala Leu Glu Asn Ala Asn Glu Lys Leu Val Glu Pro Glu Phe Asp		
[0873]	210 215 220		
[0874]	Leu Glu Cys Ser Glu Asn Phe Ser Val Leu Asp Val Thr Ala Asp Tyr		
[0875]	225 230 235 240		
[0876]	Ser Ser Ala Tyr Ser Glu Leu Gln Ser Glu Ile Phe Pro Glu Ser Ser		
[0877]	245 250 255		
[0878]	Asp Phe Asp Leu Ser Asp Tyr Ser Pro Ser Tyr Trp Tyr Asp Ser Gly		
[0879]	260 265 270		
[0880]	Ser Gln Phe Ser Glu Lys Ser Asn Gly Asp Ala Thr Pro Ser Pro Thr		
[0881]	275 280 285		

[0882]	Leu Thr Leu Phe Leu Arg Phe Ser Gln Gln Phe Cys Arg Ser Thr Ala		
[0883]	290	295	300
[0884]	Ala Leu Gln Phe Thr Ser Val Asn Ser Ser Glu Asp His Ile Ser Thr		
[0885]	305	310	315
[0886]	Glu Ile Thr Gly Leu Lys Asp Glu Glu Asp Glu Glu Ser Tyr Met Leu		
[0887]	325	330	335
[0888]	Ile Arg Asn Arg Glu Arg Arg Gln Leu Tyr Leu His Asp Tyr Ala Glu		
[0889]	340	345	350
[0890]	Glu Tyr Cys Ser Thr Thr Asp Ser Gly Asp Leu Ile Val Gln Gln Arg		
[0891]	355	360	365
[0892]	Leu Leu Met Val His Trp Ile Leu Glu Gln Ala Thr Arg Lys Asp Leu		
[0893]	370	375	380
[0894]	Leu Lys Glu Thr Met Phe Leu Ser Val Asn Leu Phe Asp Arg Phe Leu		
[0895]	385	390	395
[0896]	Ser Lys Gly Tyr Phe Lys Thr Lys Arg Cys Leu Gln Ile Val Gly Ile		
[0897]	405	410	415
[0898]	Ala Cys Leu Thr Leu Ala Val Arg Ile Glu Glu Asn Gln Pro Phe Asn		
[0899]	420	425	430
[0900]	Ser Ile Arg Gln Lys Thr Phe Thr Val Ala Gly Thr Ala Tyr Ser Cys		
[0901]	435	440	445
[0902]	Ser Glu Val Val Ala Met Glu Trp Leu Val Gln Glu Val Leu Asn Phe		
[0903]	450	455	460
[0904]	Gln Cys Phe Leu Pro Thr Ile Tyr Asn Phe Leu Trp Phe Tyr Leu Lys		
[0905]	465	470	475
[0906]	Ala Ala Arg Ala Thr Glu Tyr Met Glu Arg Thr Thr Lys Tyr Leu Ala		
[0907]	485	490	495
[0908]	Val Leu Ala Leu Leu Gly His Glu His Leu Cys Tyr Arg Pro Ser Thr		
[0909]	500	505	510
[0910]	Val Ala Ser Ala Leu Val Ile Leu Ala Leu Ser Ala Ala Asn Leu Tyr		
[0911]	515	520	525
[0912]	Val Ser Cys His Leu Val Thr Lys Thr His Ala Lys Ile Lys Asp Glu		
[0913]	530	535	540
[0914]	Asp Leu Pro Glu Cys Ile Lys Ser Leu Glu Trp Leu Val Lys Tyr Ile		
[0915]	545	550	555
[0916]	<210> 21		
[0917]	<211> 23		
[0918]	<212> DNA		
[0919]	<213> 人工(Artificial)		
[0920]	<400> 21		
[0921]	cgaagagaaa ggatttagacg ttg 23		
[0922]	<210> 22		
[0923]	<211> 22		

- [0924] <212> DNA
- [0925] <213> 人工(Artificial)
- [0926] <400> 22
- [0927] tctgagcagt cagtatcaga cg 22

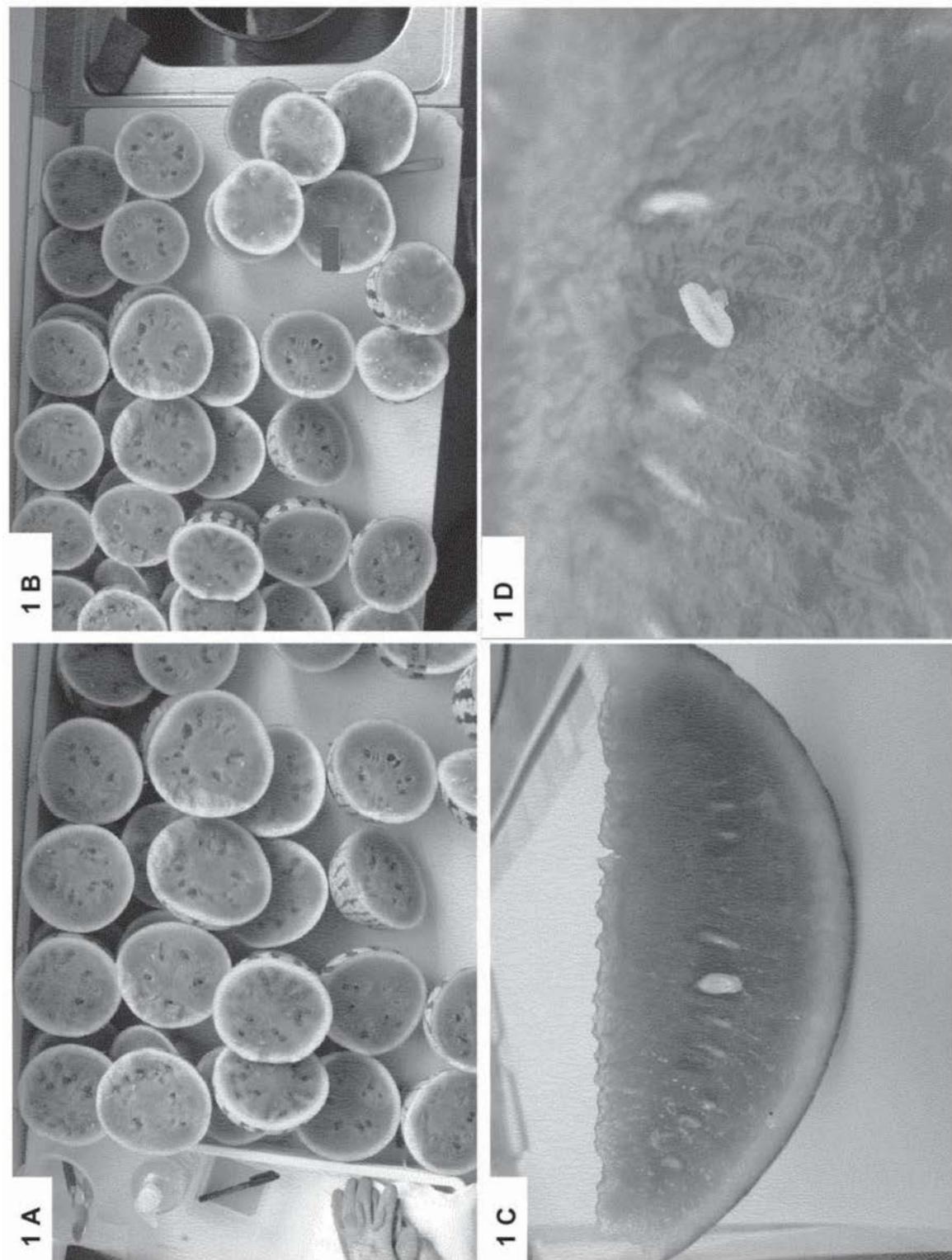


图1

2232

```

ACGATTTGA GATTGAAGA ATTGGACGAT GAAGAACCT ATCTAATGTT 114
T   I   L   R   F   E   E   L   D   D   E   E   A   Y   L   M   F
ACGATTTGA GATTGAAGA ATTGGACGAT GAAGAACCT ATCTAATGTT 115
T   I   L   R   F   E   E   L   D   D   E   E   A   Y   L   M   F
ACG- - - - - - - - - A ATTGGACGAT GAAGAACCT ATCTAATGTT 116
N   W   T   M   K   K   P   I   *   C
ACG- - - - - - - - - A ATTGGACGAT GAAGAACCT ATCTAATGTT 117
T   N   W   T   M   K   K   P   I   *   C

```

图2

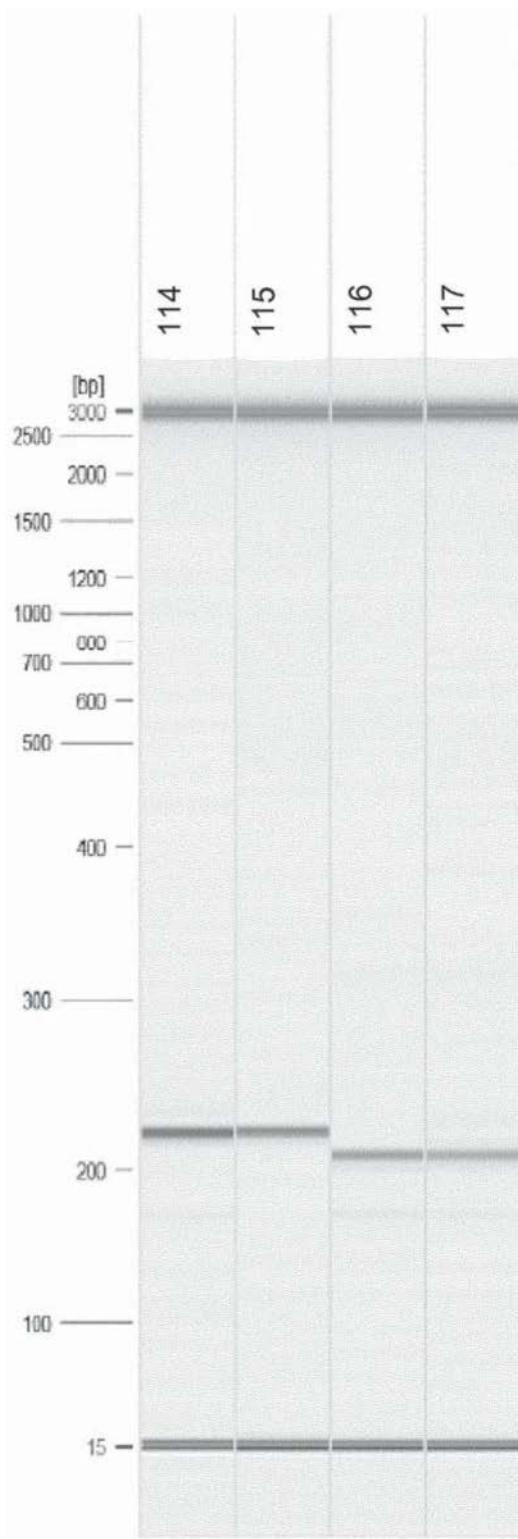


图3