



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113512552 B

(45) 授权公告日 2022. 05. 17

(21) 申请号 202110718109.9

C12Q 1/6895 (2018.01)

(22) 申请日 2021.06.28

C12N 15/11 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 113512552 A

(56) 对比文件

CN 106279388 A, 2017.01.04

CN 108239647 A, 2018.07.03

(43) 申请公布日 2021.10.19

王刚. 芥菜型油菜多室基因 Bjmc2 的精细定位.《作物学报》.2016,第1735-1742页.

(73) 专利权人 华中农业大学  
地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

佚名.LOCUS XP\_009106236.《NCBI》.2020, 参见序列.

(72) 发明人 沈金雄 王刚 傅廷栋 文静  
易斌 赵伦

审查员 熊壮壮

(74) 专利代理机构 武汉智嘉联合知识产权代理  
事务所(普通合伙) 42231  
专利代理师 柏琳容

(51) Int. Cl.

权利要求书1页 说明书8页

C12N 15/29 (2006.01)

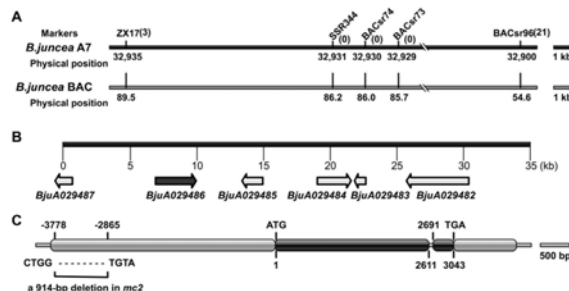
序列表9页 附图3页

## (54) 发明名称

与芥菜型油菜多室性状相关的两室基因 BjMc2和三室基因Bjmc2及其应用

## (57) 摘要

本发明公开了与芥菜型油菜多室性状相关的两室基因BjMc2和三室基因Bjmc2及其应用,属于油菜育种技术领域,其中两室基因BjMc2的启动子序列如SEQ ID NO.1所示,编码区序列如SEQ ID NO.2所示;所述两室基因BjMc2的等位基因即三室基因Bjmc2的启动子相较于两室基因BjMc2缺失了914bp。本发明通过图位克隆技术,首次从芥菜型油菜中成功克隆得到了芥菜型油菜的两室基因BjMc2和三室基因Bjmc2,可将其用于油菜的基因工程改造,根据需求获得不同表型的油菜。同时本发明还提供了一个可分别特异性扩增两室基因BjMc2和三室基因Bjmc2的分子标记CM2,可将其应用于芥菜型多室油菜育种中,用于辅助选择具备三室性状的芥菜型油菜,从而减少育种工作量,缩短育种年限,加快芥菜型多室油菜育种进程。



1. 一种与芥菜型油菜多室性状相关的两室基因BjMc2, 其特征在于, 所述两室基因BjMc2的启动子的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示, 所述两室基因BjMc2的编码区的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。

2. 如权利要求1所述的与芥菜型油菜多室性状相关的两室基因BjMc2编码的蛋白, 其特征在于, 所述蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示。

3. 如权利要求1所述的与芥菜型油菜多室性状相关的两室基因BjMc2在制备两室油菜中的应用。

4. 如权利要求1所述的两室基因BjMc2的等位基因, 其特征在于, 所述等位基因为三室基因Bjmc2, 所述三室基因Bjmc2的启动子核苷酸序列为: 在如SEQ ID NO.1所示的两室基因BjMc2的启动子核苷酸序列中缺失如SEQ ID NO.5所示的914bp的核苷酸序列。

5. 根据权利要求4所述的两室基因BjMc2的等位基因, 其特征在于, 所述三室基因Bjmc2的启动子核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示。

6. 根据权利要求4所述的两室基因BjMc2的等位基因, 其特征在于, 所述三室基因Bjmc2的编码区的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。

7. 如权利要求4-6任一项所述的两室基因BjMc2的等位基因在制备多室油菜中的应用。

8. 一种用于区分所述两室基因BjMc2及其等位基因三室基因Bjmc2的分子标记, 其特征在于, 所述分子标记的核苷酸序列如SEQ ID NO.6-8所示。

9. 如权利要求8所述的分子标记在油菜多室品种选育中的应用。

10. 一种油菜多室品种的选育方法, 其特征在于, 所述方法包括: 提取待测样品的总DNA, 采用如权利要求8所述的分子标记进行PCR扩增, 扩增产物进行电泳检测: 若电泳条带仅出现一条1299bp的特异性条带, 则待测样品为仅包含两室基因BjMc2的纯合型两室油菜; 若电泳条带只出现一条700bp的特异性条带, 则待测样品为仅包含三室基因Bjmc2的纯合型三室油菜; 若电泳条带同时包含一条1299bp和一条700bp的电泳条带, 则待测样品为杂合型两室油菜。

## 与芥菜型油菜多室性状相关的两室基因BjMc2和三室基因 Bjmc2及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于油菜育种技术领域,具体涉及与芥菜型油菜多室性状相关的两室基因BjMc2和三室基因Bjmc2及其应用。

### 背景技术

[0002] 油菜作为我国最重要的大宗油料作物,其菜籽油产量占我国食用植物油总产量的半壁江山。近年来,由于多室油菜的每角果粒数显著多于普通两室油菜,且已有几种自然变异多室油菜种质资源在不同的杂交组合后代中,多室单株产量均高于两室单株,所以越来越多研究者认为这一性状具有潜在的增产效益。

[0003] 研究人员在对油菜种质资源的收集、整理,发现几种特殊角果性状的种质资源,通过仔细观察发现其角果具有多个角果皮和果室,并称其为多室油菜。通常,普通油菜的成熟角果只有2个角果皮,角果内1个“T”型假隔膜将角果心房分为2个果室,每个果室都有1排沿果皮内则融合与假隔膜的连接处着生的种子,称为两室油菜;两室角果是由2个心皮先天性融合成柱状结构的雌蕊发育而来,而多室角果是由多个心皮的雌蕊发育而成,雌蕊的心皮数目不同导致发育成熟角果内的假隔膜类型不同,常见有“Y”型、“II”型和“+”型等,这些不同类型的假隔膜通常将角果分为3~4个果室,每个果室都含有1排以上种子。因此,多室油菜产量增加的主要原因是其每角果粒数要比普通两室油菜的显著增多。

[0004] 以芥菜型三室油菜J163-4和两室油菜J268-2、J248-2作为亲本,通过对正反交 $F_1$ 、 $F_1$ ,以及 $F_2$ 、 $BC_1F_1$ 群体单株的表型统计,证实J163-4的三室性状受2对独立遗传的隐性核基因控制,并命名为Bjmc1和Bjmc2,其中控制三室性状的其中一个基因Bjmc1已被成功克隆。现有技术虽然已将另一个基因Bjmc2精细定位到一段共线于白菜A7 scaffold000019的946~1014kb区间之间,约68kb物理距离,然而现有技术并未成功克隆到控制三室性状的另一个基因Bjmc2及其基因序列。

### 发明内容

[0005] 本发明针对现有技术的空白,提供了一种与芥菜型油菜多室性状相关的两室基因BjMc2和三室基因Bjmc2及其应用。

[0006] 本发明的目的之一在于提供一种与芥菜型油菜多室性状相关的两室基因 BjMc2,所述两室基因BjMc2的启动子的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,所述两室基因BjMc2的编码区的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0007] 本发明的目的之二在于提供上述两室基因BjMc2编码的蛋白,所述蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0008] 本发明的目的之三在于提供一种包含上述两室基因BjMc2的载体或遗传工程菌。

[0009] 本发明的目的之四在于提供了所述两室基因BjMc2和/或包含上述两室基因BjMc2的载体或遗传工程菌在制备两室油菜中的应用。

[0010] 本发明的目的之五在于提供了所述两室基因BjMc2的等位基因,所述等位基因为三室基因Bjmc2,所述三室基因Bjmc2的启动子核苷酸序列为:在如SEQ ID NO.1所示的两室基因BjMc2的启动子核苷酸序列中缺失如SEQ ID NO.5所示的914bp的核苷酸序列。

[0011] 进一步地,所述三室基因Bjmc2的启动子核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示。

[0012] 进一步地,所述三室基因Bjmc2的编码区的核苷酸序列与两室基因BjMc2 的编码区的核苷酸序列相同,如SEQ ID NO.2所示。

[0013] 本发明的目的之六在于提供了一种包含上述三室基因Bjmc2的载体或遗传工程菌。

[0014] 本发明的目的之七在于提供了所述三室基因Bjmc2和/或包含上述三室基因Bjmc2的载体或遗传工程菌在制备多室油菜中的应用。

[0015] 本发明的目的之八在于提供了一种用于区分所述两室基因BjMc2及其等位基因三室基因Bjmc2的分子标记,所述分子标记的核苷酸序列如SEQ ID NO.6-8 所示。

[0016] 本发明的目的之九在于提供了所述分子标记在油菜多室品种选育中的应用。

[0017] 本发明的目的之十在于提供了一种油菜多室品种的选育方法,所述方法包括:提取待测样品的总DNA,采用上述分子标记进行PCR扩增,扩增产物进行电泳检测:若电泳条带仅出现一条1299bp的特异性条带,则待测样品为仅包含两室基因BjMc2的纯合型两室油菜;若电泳条带只出现一条700bp的特异性条带,则待测样品为仅包含三室基因Bjmc2的纯合型三室油菜;若电泳条带同时包含一条1299bp和一条700bp的电泳条带,则待测样品为杂合型两室油菜。

[0018] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:本发明通过图位克隆技术,首次从芥菜型油菜中成功克隆得到了芥菜型油菜的两室基因BjMc2和三室基因 Bjmc2,可利用所述两室基因和三室基因对油菜进行基因工程改造,以根据需求获得不同表型的油菜,其中三室油菜的产量相对较高。同时本发明还提供了一个可分别特异性扩增两室基因BjMc2和三室基因Bjmc2的分子标记CM2,可将其应用于芥菜型多室油菜育种中,用于辅助选择具备三室性状的芥菜型油菜,从而克服了传统育种中依靠表型进行选择缺陷,减少育种工作量,缩短育种年限,加快了芥菜型多室油菜育种的进程。

## 附图说明

[0019] 图1为本发明实施例1中分离克隆候选基因区段的物理图谱,其中A为将 BjMc2基因登陆到芥菜型油菜A7染色体标记ZX17和BACsr96之间的35kb物理区间内,括号内的数字表示相应标记的交换单株数,下面的灰色物理图谱是标记ZX17和BACsr96在BAC测序序列contig1对应的物理区间;B为BjMc2 位点的35kb物理区间在芥菜型油菜参考基因组中包含6个注释基因,灰色箭头表示BjMc2的候选基因;C为候选基因的基因结构以及在双亲中的多态性,深灰色柱代表外显子,浅灰色柱代表启动子和3'UTR区,灰色虚线表示三室基因Bjmc2启动子区缺失914bp序列;

[0020] 图2为本发明实施例2中利用分子标记CM2在芥菜型油菜不同群体中单株基因组DNA的扩增结果,其中A为以J163-4和J268-1为双亲构建的F<sub>2</sub>群体中单株检测结果;B为以J163-4和J268-2为双亲构建的BjMc2位点NIL-BC<sub>7</sub>F<sub>1</sub>群体中单株检测结果,图中M为DNA Marker;

[0021] 图3为本发明实施例3中分2段在芥菜型油菜J163-4和J268-1的基因组DNA中分别扩增Bjmc2和BjMc2的检测结果,其中A为片段1(包含启动子)扩增结果,左边为三室基因Bjmc2(3060bp),右边为两室基因BjMc2(4014bp);,B为片段2扩增结果,左边为三室基因Bjmc2,右边为两室基因BjMc2,片段大小均为3936bp,图中M为DNA Marker;

[0022] 图4为本发明实施例3中互补载体的构建图,其中A为载体pMc2::Mc2;B 为载体pmc2::Mc2;

[0023] 图5为本发明实施例3中阳性植株的PCR鉴定结果图,图中M为DNA Marker,DNA Marker左边为pmc2::Mc2转基因植株检测结果,DNA Marker右边为pMc2::Mc2转基因植株检测结果;

[0024] 图6为本发明实施例3中qRT-PCR分析T<sub>1</sub>代转基因株系不同组织中BjMc2 的表达情况;

[0025] 图7为本发明实施例3中BjMc2和Bjmc2基因在芥菜型油菜中互补验证的表型结果,其中图A为A-Bi株系植株的花发育第12期雌蕊横切、成熟果枝和角果表型;图B为A-Tri株系植株的花发育第12期雌蕊横切、成熟果枝和角果表型;图C为T<sub>1</sub>代pMc2::Mc2转基因植株的花发育第12期雌蕊横切、成熟果枝和角果表型;图D为T<sub>1</sub>代pmc2::Mc2转基因植株的花发育第12期雌蕊横切、成熟果枝和角果表型。

## 具体实施方式

[0026] 下面将结合本发明中的实施例,对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动条件下所获得的所有其它实施例,都属于本发明保护的范围。

[0027] 实施例1芥菜型油菜两室基因BjMc2和三室基因Bjmc2序列的获得

[0028] 1、精细定位区间的染色体登陆

[0029] 现有技术通过精细定位已经把BjMc2基因限定在分子标记ZX17和BACsr96 之间,遗传距离分别为0.048cM、0.34cM,并共线于白菜A7 scaffold000019的 946~1014kb之间,约68kb物理距离。随后,将挑到的两个BAC阳性单克隆(002-0-21和009-M-2)的全长测序序列组装完成,一共获得3个contigs(分别命名为contig1、2、3)。经比对发现,标记ZX17和BACsr96在contig1的物理位置分别为89.5kb和54.6kb,覆盖34.9kb的物理区间。当芥菜型油菜的全基因组序列测序完成后,标记ZX17和BACsr96标记分别在芥菜型油菜参考基因组A7的物理位置为32935kb和32900kb,覆盖35kb的物理区间,说明之前BjMc2位点的定位结果是可靠的(如1-A所示,其中括号内的数字表示相应标记的交换单株数,下面的灰色物理图谱是标记ZX17和BACsr96在BAC测序序列contig1对应的物理区间)。如图1-B所示,这段基因组区域包含6个有注释的候选基因(BjuA029482、BjuA029483、BjuA029484、BjuA029485、BjuA029486 和BjuA029487),其中BjuA029487只包含部分CDS。通过对6个候选基因的序列进行分析,预测其中BjuA029486可能是BjMc2的候选基因,并进一步对其进行验证。

[0030] 2、两室基因BjMc2的候选基因BjuA029486在双亲中序列比较分析

[0031] 为了确定BjMc2位点的候选基因,基于contig1测序序列,设计一系列特异引物,如表1所示:

[0032] 表1候选基因比较测序的引物核苷酸序列

标记	上游引物序列 (5'-3')	下游引物序列 (5'-3')	片段长度 (bp)
CLV1-7.1	CAGTGGATTATGGGTTTG	GTTGAAGTAGCCGACGTACAT	1306
CLV1-7.2	ACTAACTTGATCGCCTTCTGA	CGACGCTGCTTCTCCTTC	1269
CLV1-7.3	TGCTGAACCGTCTTGTGA	TGAGGGAGGCAGAGGTAA	1573
CLV1-7.4	GAAACCCTTACCTCTGCC	CAAATCACATTACAGAGGG	1377
CLV1-7.5	TAAACGGGTAAACGGACATC	AACCCCAAGTGTATGGATT	1863
CLV1-7.6	AAATCCATACACTCGGGGTT	CAAGCACCAAGTGAAAAGTAGC	725 <sup>a</sup>
CLV1-7.7	AAATCCATACACTCGGGGTT	GTTCTTATCAAAAACGGAGGT	2653 <sup>b</sup>

[0034] 注:a在三室亲本中扩增无条带;b在三室亲本中扩增条带大小为1739bp

[0035] 分别以两室亲本268-1和三室亲本163-4的基因组DNA为模板,利用高保真PCR方法进行基因扩增。TA克隆测序结果表明,在两室亲本268-1和三室亲本163-4中该基因的编码区(3043bp)和3'UTR(1248bp)序列没有差异,而在起始密码子ATG的上游启动子区域有差异,相较两室亲本,三室亲本在起始密码子ATG的上游-2865bp到-3778bp(914-bp)大片段缺失(如图1-C所示,其中深灰色柱代表外显子,浅灰色柱代表启动子和3'UTR区,灰色虚线表示三室基因Bjmc2启动子区缺失914-bp序列)。由此,得到了芥菜型油菜两室基因 BjMc2的候选基因完整序列,其启动子核苷酸序列(起始密码子ATG的上游序列,下同)如SEQ ID NO.1所示,编码区核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示,编码的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示。同时,还得到了该基因在三室亲本J163-4中的等位基因完整序列,即三室基因Bjmc2,其启动子核苷酸序列为SEQ ID NO.4所示,相较于两室基因BjMc2的启动子序列,三室基因Bjmc2的启动子序列缺失了如SEQ ID NO.5所示的914bp序列。

[0036] 实施例2与芥菜型油菜三室性状相关的分子标记及其应用

[0037] 1、与芥菜型油菜三室性状相关的分子标记CM2的开发

[0038] 本发明根据已获得的BjMc2基因和Bjmc2基因序列信息,在Bjmc2启动子缺失位点附近开发共分离分子标记CM2(包含CM2-F1、CM2-F2和CM2-R三条引物)。PCR扩增芥菜型两室油菜J268-1和芥菜型三室油菜J163-4的基因组DNA,在J268-1中分子标记CM2预期扩增出1299bp的片段,而在J163-4中CM2预期扩增出700bp的片段。

[0039] 本实施例所开发的CM2共分离分子标记的序列如下:

[0040] CM2-F1:TACTACTTCCGTTGCCTTTTCG

[0041] CM2-F2:AAAATACTGGTGTACATTGGAA

[0042] CM2-R:AAATCCATACACTTGGGGTT

[0043] 2、分子标记CM2在不同群体中的应用

[0044] 采用本领域常规方法提取以J163-4和J268-2为双亲构建的BjMc2位点NIL-BC<sub>7</sub>F<sub>1</sub>群体和以J163-4和J268-1为双亲构建的F<sub>2</sub>及BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>群体的单株叶片总DNA,利用上述开发的分子标记CM2进行PCR扩增。

[0045] PCR的反应体系如下:1×PCR buffer,1.35mM MgCl<sub>2</sub>,0.08mM dNTP s,1.0U DNA聚合酶(均购自MBI Fermentas,Lithuanian公司),100ng DNA,两条正向引物CM2-F1和CM2-F2各加0.5uM,反向引物CM2-R加1uM,ddH<sub>2</sub>O补充至终体积20ul。

[0046] 热循环参数为:94℃5min;94℃30sec,55℃30sec,72℃90sec,35个循环;72℃10min,1个循环。

[0047] 扩增产物在水平电泳槽上1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。检测结果如图2所示,其中图2-A为F<sub>2</sub>群体中单株检测结果,共检测出3种带型:同时包含1299bp和700bp上下2条条带的BjMc2位点为杂合型,其基因型为Mc2/mc2;只含有1条上条带(1299bp)的BjMc2位点为显性纯合型,其基因型为Mc2/Mc2;只含有1条下条带(700bp)的BjMc2位点为隐性纯合型,其基因型为mc2/mc2。图2-B为BjMc2位点NIL-BC<sub>7</sub>F<sub>1</sub>群体中单株检测结果,共检测出2种带型,其中同时包含上下2条条带的BjMc2位点为杂合型,其基因型为mc1mc1Mc2mc2(田间表型为两室),只含有1条下条带的BjMc2位点为隐性纯合型,其基因型为mc1mc1mc2mc2(田间表型为三室)。上述结果说明,本发明开发的CM2分子标记可以作为芥菜型油菜三室性状的共显性分子标记。因此,CM2结合专利CN201610979823.2中公开的BjMc1位点的M1-1分子标记,可以在不同杂交组合的低世代(例如F<sub>2</sub>)就能对不同基因型的两室和三室单株进行区分,从而有效缩短了多室油菜的选育年限,提高选择效率。

[0048] 实施例3两室基因BjMc2和三室基因Bjmc2在芥菜型油菜中的互补验证

[0049] 1、遗传互补载体的构建

[0050] 为了验证该候选基因的功能,根据比较测序得到的序列,设计特异引物在三室亲本J163-4和两室材料J268-1中分别扩增出该候选基因的基因组序列。本发明所用到的互补载体包括:pMc2::Mc2和pmc2::Mc2。其中,pMc2::Mc2的外源片段是通过两对引物G2EinfusionF/G2&G3MedinfuR(扩增条带大小为4014bp)和G2&G3MedinfuF/G2&G3KinfusionR(扩增条带大小为3936bp)分2段扩增J268-1的基因组DNA,引物序列为:

[0051] G2EinfusionF: CTATGACATGATTACGAATTCGAATTGAAACCACTTTTTTTACACC

[0052] G2&G3MedinfuR: AGTGAGCTGAGGGGAAGTGGAGTGAACCCAGTCGTGGAG

[0053] G2&G3MedinfuF: CACTTCCCCCTCAGCTCACTGTTCTTTCTCCGGCGTTTCA

[0054] G2&G3KinfusionR: TCTAGAGGATCCCCGGGTACCAACATGGCTTTTATTTATTAATCTCCAC

[0055] PCR产物经过1.0%TAE琼脂糖凝胶电泳,检测结果如图3所示,其中3-A为片段1(包含启动子)扩增结果,图3-B为片段2的扩增结果。将目的条带进行挖胶回收(琼脂糖凝胶DNA纯化回收试剂盒,Cat.No.DP219,天根),再通过同源重组(CloneExpress II One Step Cloning Kit,Vazyme)的方法与经过EcoR I和KpnI双酶切处理的pCAMBIA 2300空载体连接,pMc2::Mc2载体的构建图如图4-A所示。插入片段为BjMc2全长7930bp的基因组序列,其中包括gDNA序列3043bp、上游启动子序列3818bp和下游5'UTR序列1069bp。获得的阳性克隆经过PCR扩增、测序与比较测序序列比对无突变后,用于后续遗传转化。

[0056] 同样,pmc2::Mc2的外源片段也是通过两对引物G3EinfusionF/G2&G3MedinfuR(扩增条带大小为3060bp)和G2&G3MedinfuF/G2&G3KinfusionR(扩增条带大小为3936bp)分2段扩增J163-4的基因组DNA,引物序列为:

[0057] G3EinfusionF: CTATGACATGATTACGAATTCGTACATTGGAAATGCAACTCCAGC

[0058] 另外3条引物序列同上,PCR产物经过1.0%TAE琼脂糖凝胶电泳,检测结果如图3所

示。将目的条带进行挖胶回收,扩增片段同样通过同源重组的方法与经过EcoRI和KpnI双酶切处理的pCAMBIA2300空载体连接,pmc2::Mc2 载体的构建图如图4-B所示。插入片段为Bjmc2全长6976bp的基因组序列,其中包括gDNA序列3043bp、上游启动子序列2864bp和下游5'UTR序列1069bp。阳性克隆经PCR扩增、测序与比较测序序列比对无突变后,用于后续遗传转化。

#### [0059] 2、农杆菌介导的遗传转化

[0060] 选择构建的BjMc2位点NIL-BC<sub>7</sub>F<sub>1</sub>群体中两室单株(基因型为 mc1mc1Mc2mc2)进行自交,接着在BC<sub>7</sub>F<sub>2</sub>株系中继续选择两室单株(基因型为 mc1mc1Mc2Mc2)和三室单株(基因型为mc1mc1mc2mc2)进行多代自交留种,并命名为A-Bi (BC<sub>7</sub>F<sub>2</sub>-Bi)和A-Tri (BC<sub>7</sub>F<sub>2</sub>-Tri)株系。正确的重组质粒通过常规冻融法导入农杆菌菌株GV3101,然后通过农杆菌介导的油菜下胚轴侵染法转入芥菜型油菜,受体材料均为A-Tri三室自交株系植株,具体操作方法为:

[0061] 种子灭菌用75%酒精浸泡3min后,放入无菌水中冲洗1min。然后放入0.1%升汞中浸泡10min后,无菌水冲洗6-7次。将灭菌后的种子播种到种子萌发培养基上(所述的种子萌发培养基为:MS基本培养基+7g/L琼脂粉,pH值为 5.9)。于25℃按培养7天。在超净工作台内将获得的试管幼苗下胚轴切成1cm 左右的小段外植体,接种至含有农杆菌(悬浮过夜至对数生长期)的MS液体培养基(pH值为5.9)侵染10-15min后,吸干液体,于25℃黑暗条件下在共培养基上(所述的共培养基包括:MS培养基+30g/L蔗糖+18g/L甘露醇+1 mg/L 2,4-D+0.3mg/L Kinetin+100um/L乙酰丁香酮+6g/L琼脂粉,pH 值为5.9)共培养36h。将外植体转移到愈伤诱导培养基上(所述的愈伤诱导培养基包括:MS培养基+30g/L蔗糖+18g/L甘露醇+1mg/L 2,4-D+0.3mg/L Kinetin+300mg/L特美汀+50mg/L卡那霉素+0.03μM/L[Ag(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup>+6g/L 琼脂粉,pH值为5.9),25℃光照培养12-14d。将外植体转入不定芽诱导培养基上(所述的不定芽诱导培养基包括:MS培养基+30g/L蔗糖+1.5g/L TDZ+0.1 g/L NAA+300mg/L特美汀+50mg/L卡那霉素+5.0mg/L硝酸银+7g/L琼脂粉,pH值为5.9),25℃光照培养12-14d。获得的带有不定芽点的愈伤组织转移到不定芽生长培养基中,进行生长培养。还未生长出不定芽点的外植体,则继续放到不定芽诱导培养基中进行诱导培养,待长出不定芽点后,转移到不定芽生长培养基中(所述的不定芽生长培养基包括:MS培养基+10g/L葡萄糖+ 0.25g/L木糖+0.6g/L MES+2.0mg/L反式-Zeatin+0.1mg/L IAA +300mg/L 特美汀+25mg/L卡那霉素+6g/L琼脂粉,pH值为5.9)。每15-20d继代一次,直至生长成幼苗。当幼苗长至2-3cm高时,将幼苗转入生根培养基中培养(所述生根培养基包括:MS培养基+10g/L蔗糖+10g/L琼脂粉,pH值为5.9)。对已生根的小苗进行炼苗,按常规方法移栽到温室里,进行土培生长。

#### [0062] 3、阳性转化单株的分子及表型鉴定

[0063] 从获得的阳性植株上按照常规方法提取叶片总DNA,用片段中间引物 CLV1-7.2F和通用引物M13-47(扩增条带大小约1.2kb)进行PCR鉴定,鉴定所用的引物序列如下:

[0064] CLV1-7.2F:ACTAAGTTGATCGCCTTCTGA

[0065] M13-47:CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC

[0066] PCR扩增的反应体系是:30ng模板DNA,各35ng正向和反向特异引物(如上所示),1×PCR缓冲液,1U Taq酶,0.15mmol/L dNTPs和2.0mmol/L Mg<sup>2+</sup>,加ddH<sub>2</sub>O到总体积为15μL。PCR循环参数为94℃(30s)—55℃(30s)—72℃(90s),共35个循环。

[0067] 扩增结束后用1.0%琼脂凝胶检测扩增产物。检测结果如图5所示,图中M 为DNA

Marker, 片段大小从上至下依次为3000bp、2000bp、1000bp、750bp 和500bp, DNA Marker左边的条带为pMc2::Mc2转基因植株的检测结果, DNA Marker右边的条带为pMc2::Mc2转基因植株的检测结果, 片段大小均约为1.2 kb, 该结果说明阳性植株中包含候选基因。

[0068] 对所有T<sub>0</sub>代阳性植株的表型进行鉴定, 其中pMc2::Mc2载体18株有表型, pMc2::Mc2载体31株有表型。继续种植有表型的单株T<sub>1</sub>代, 取苗期幼叶、花序和雌蕊子房提取总RNA (百泰克, RP3202, <http://cn.bioteke.cn/>)。每个样品吸取2毫克的总RNA进行反转录 (Fermentas, RevertAid First Strand cDNA Synthes K1622)。将合成的第一链cDNA稀释20倍用作qRT-PCR的模板, 在qRT-PCR 专用96孔板中先加入上下游引物 (5.0μM) 等比例混合液3.2μL, 模板2.0μL 和2×SYBR<sup>®</sup> Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO) 10μL, 最后补ddH<sub>2</sub>O 至20μL, 每对引物3个技术重复, 每个组织3次生物学重复, Actin2内参基因作为对照。qRT-PCR引物序列为:

[0069] RTA7Mc2F: TCAAGAATCTCCTCAACGGTAC

[0070] RTA7Mc2F: AGAAGAAGTTATCGGTGAGCTC

[0071] Actin2-F: GGAGCTGAGAGATTCCGTTG

[0072] Actin2-R: GAACCACCACTGAGGACGAT

[0073] 反应程序如下: 95℃预变性60s; 95℃变性15s, 55℃退火15s, 72℃延伸 30s, 39个cycles; 熔解曲线程序: 95℃10s, 95℃-65℃5s, -0.5℃per cycle, 收集数据。qRT-PCR在Bio-Red CFX96 Touch<sup>™</sup>荧光定量PCR仪上进行, 依照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析基因的相对表达量。

[0074] qRT-PCR分析结果如图6所示 (Student's t检验显著性差异, NS: 不显著 (P ≥ 0.05); \*\*\*: 极显著 (P < 0.001)), 其中pMc2::Mc2转基因植株的苗期幼叶、花序和雌蕊子房中BjMc2转录本的相对表达量相较于受体材料均有显著性提高。同样, pMc2::Mc2转基因植株的苗期幼叶和花序中BjMc2转录本的相对表达量相较于受体材料也有显著性提高, 且和pMc2::Mc2转基因植株间没有显著性差异。然而, pMc2::Mc2转基因植株的雌蕊子房中BjMc2转录本的相对表达量相较于受体材料没有显著性差异, 但显著性低于pMc2::Mc2转基因植株。这些结果表明Bjmc2启动子缺失914-bp不影响BjMc2基因在苗期幼叶和花序中的表达, 但会影响BjMc2基因在雌蕊子房中表达。

[0075] 同时取有表型T<sub>1</sub>代株系的花蕾做石蜡切片, 不同植株的花发育第12期雌蕊横切、成熟果枝和角果表型的切片结果如图7所示, 其中图7-A为A-Bi株系植株; 图7-B为A-Tri株系植株; 图7-C为T<sub>1</sub>代pMc2::Mc2转基因植株; 图7-D 为T<sub>1</sub>代pMc2::Mc2转基因植株。

[0076] 根据图7-C, 其中pMc2::Mc2转基因植株的雌蕊可以将三室株系A-Tri恢复成由两个心皮和一个“I”型假隔膜组成的两室表型, 和图7-A中BC<sub>7</sub>F<sub>2</sub>-Bi (A-Bi) 两室株系的雌蕊表型类似。而图7-D中pMc2::Mc2转基因植株的雌蕊不可以恢复为两室表型, 其雌蕊由4个心皮和1个“II”型假隔膜或3个心皮和1个“Y”型假隔膜组成的三室表型, 和图7-B中BC<sub>7</sub>F<sub>2</sub>-Tri (A-Tri) 三室株系的雌蕊表型类似。在成熟果枝和角果也能看出pMc2::Mc2转基因植株主要是两室角果组成, 而pMc2::Mc2转基因植株仍然主要是三室角果组成, 表明pMc2::Mc2转基因植株可恢复成两室角果表型, 而pMc2::Mc2转基因植株不能恢复两室角果表型。

[0077] 综上所述, 本发明成功筛选克隆得到了两室基因BjMc2, 其启动子核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示, 编码区的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示, 编码的氨基酸序列如序列表SEQ ID NO.3所示; 该两室基因的启动子突变等位基因即三室基因Bjmc2的启动子核苷酸序

列如SEQ ID NO.4所示,三室基因Bjmc2启动子相较于两室基因BjMc2启动子缺失的914bp核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示。将该两室基因BjMc2通过基因工程改造技术导入至以J163-4和J268-2为双亲构建的BjMc2位点NIL-BC<sub>7</sub>F<sub>2</sub>三室自交株系(A-Tri)植株中,可恢复两室角果表型,证明了这段914bp启动子核苷酸序列是两室基因BjMc2恢复两室角果表型所必须的。

[0078] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,可轻易想到的变化或替换,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

[0001]	序列表	
[0002]	<110> 华中农业大学	
[0003]	<120> 与芥菜型油菜多室性状相关的两室基因BjMc2和三室基因Bjmc2及其应用	
[0004]	<160> 8	
[0005]	<170> SIPOSequenceListing 1.0	
[0006]	<210> 1	
[0007]	<211> 3838	
[0008]	<212> DNA	
[0009]	<213> 芥菜型油菜 ( <i>Brassica juncea</i> )	
[0010]	<400> 1	
[0011]	atgtttgagt ttctggcaaa gaattgaaac cacttttttt acaccaaaaa aaaataactgg	60
[0012]	tgttgccctct tcatgatgta aaataaatca aaattatitt tagatatctg ccgtgcaatg	120
[0013]	gaacaaaaag tgaaggtga ttcaagacct caagggtcat ggattgtgag aagtttcttc	180
[0014]	gtccaatatc attgcatggt ttgaatagat ttgggactaa agctgccaat agacagagag	240
[0015]	aattcggtag tgactgaagc aaaagctcaa aatgccatta ggcaatcccc cgtttccaag	300
[0016]	acagatagtg taagacacac ttgtgacaca actttgtctt cgtcttcac atcatcttct	360
[0017]	actactacta ctccggtgc cttttcgttt aattattaac ttgattgaca agacaatgac	420
[0018]	ctatatttct tataatcatca ttgctctcaa tttgtttctt ttaataattg cttttgaaag	480
[0019]	gtttatccca aatgattag tgcgttgatt atatgtgaaa caacaagct gatcacgaat	540
[0020]	gaatcatgta tcatcttcta gatatttact caaaaacgtt tactagattt ttagtagaaat	600
[0021]	tttgaatgac aatacgecca ttttatitaa aatttgtatg ttttatitaa ttgtatttaa	660
[0022]	gagtttaata ttttatatit taactcatgt agtttaactg aaaactaaaa tatgtgatgg	720
[0023]	gattatitaa ttagaaaaag agaaataact aataaaataa agtatgtatg tatataattt	780
[0024]	caaaaacgta tgatacaatt taaaacatca atctttcaaa tacataagaa atattatata	840
[0025]	aacttgattt ttcttagccg ttttagattt gttctcccct caagttgcat atgattttca	900
[0026]	aattgcttga gacaaacttt ttaaacagca attaaccttc aagcaccag tgaaaagtag	960
[0027]	catatgatgc aaattgtaca ttggaaatgc aactccagct tctacagtc tactacctaa	1020
[0028]	tcatgtttct ctttcttata attagtttca caaatttatt aattagcatt catctagaag	1080
[0029]	ctagcctaaa gttcattcag acattcacca taaatcatta atgataaatg tcttacatta	1140
[0030]	tgctcctaag tgtattgtca tgttatatca aaaaatgccc aaagttcata ttctctctta	1200
[0031]	cataaagaaa aatttctaata tactaagaaa agctcctttt ctgctgaaga gaacataaac	1260
[0032]	ctttattccc caaagctcac aagtttgggc attttcagcg aatcagagaa aatagcttc	1320
[0033]	tcttctcat cacatattga catctccctt gtttcaagac agtaccggtg gctctgattg	1380
[0034]	tgtaaaccgt ccaatccagt tgaaccggtc aacagtatta attaaccaaa aataacacgt	1440
[0035]	gaaagcatat atttatgttg ttaggtatgt atagcgttta ctttcttaaa tttaatgcat	1500
[0036]	caagatcaaa tccaaaagag aatacacac atcatataaa atgagaaatt cgctgcgcca	1560
[0037]	tttaggaaag ggcctttata ccaatatgcc gcatatatgt agaacattgg tccccaagtg	1620
[0038]	tatatgtgtg tgtgtgtcta tgcaacccc aagtgtatgg atttctcaac aatcaaaagg	1680
[0039]	ccctttgttg gtaaagctcc tcttgatatt taatcgtata aaatattgtt agcggggtga	1740
[0040]	agatatattc gccaaaaacg gtagtgcttg tataaccgga aaccaataat ttacaaatag	1800
[0041]	cattagcttt tatgttataa atgttgagag aatgaataca cggaaccaa taatttataa	1860

[0042]	atagccttag cttttatggt acaaatgttg agagaataca ttttaattct ggcagaatcg	1920
[0043]	attctgcata aaacttgat aaactataac atggcttttg taactaaaa ataatattg	1980
[0044]	gaaataaatt ggatatctcg cggatcaaac tcgtaaagtt cttaaactct gtaaaagtta	2040
[0045]	tgaaaaaca atggaacac ttgaaaatgt gtatcagcga tagtataata ttaagtaaga	2100
[0046]	cacacatttg ctattcgatt tctctctagc aaaagctttg ttatgtagtt gtggacataa	2160
[0047]	gcatacgatc agcgatatat atatctcgtt ctttgttttg ttatcgtcac acgattagca	2220
[0048]	atcgcgatca aatagttggt gttcatcatt tcatttcagt gtttgccat tgatagaca	2280
[0049]	gatagtcaa agtcgctaga actttcagag tttctaaact aacgacagat tatttgttcc	2340
[0050]	aataaagatc taagtgtgtg atattcgagc gtttcacta tgattttatt tatgattagt	2400
[0051]	cattgttaac aactaaaact gtaagactat ccgaatttt tcacatattc cgaaattaat	2460
[0052]	tcgagcttat tatcaaatca acgattttca taaggatatag tttaaaaaaa aaaattaca	2520
[0053]	gagagaagat aagggtaaag tcagagagat ctgcaaaacc aaaggtaaat aacacacaac	2580
[0054]	gtggggacc tgaagcacag cagaagaagg tctacaagaa gaggtagtgt cgacaaagac	2640
[0055]	aagaaaagga gcggtgacta ttagattgaa gccaaaatag aaggggcaga tttgtctctt	2700
[0056]	ttggaagga cacagacaat cttttatagc ggccatttaa taactaggcc ctacttaata	2760
[0057]	agccattaa ctccctctt tgtctttta agtttttaa atatatttc cattttcctt	2820
[0058]	atcacgtgac aatgagaagg aaacgtcgtc ggattaaact gtttgagatg acaagacggc	2880
[0059]	gataagaaga aagaaaccac agcagctata ggcagggaac gtaaagttaa gtctgtctat	2940
[0060]	catctattaa cggtcagttc agatcataga cattgtaata gcgttttctt tgtcccgta	3000
[0061]	cattttaaac gccgtgaaga tatccattta tttgatata tatagccaaa aagataaact	3060
[0062]	ttctcgattt acatcgtgc agaagattta acagaggaaa gaagacgatc acgacgttc	3120
[0063]	ccggttttc atgtctgtg tagtggcggc tactaacca ataatctgt ccgtaaaaac	3180
[0064]	tgtaaaaaag actatggtaa aagtttctt agtatgtta ctctgcat atagcagtg	3240
[0065]	attatgggtt tgcattaca ttttagcaca aatcgtttag ttaccacaa aaatatcata	3300
[0066]	gattctctaa aatcacatg attaatgac atttacaata ttttgatgatt attactcgga	3360
[0067]	ataattcaaa gaaaaatatt atttgagcac attacaata atggaagtt tgaagtatgt	3420
[0068]	gacgtataaa gccaatgaaa gactgacact tcattgacca caagtcgtag ttcgtatcta	3480
[0069]	caagctggat gtccgtttac ccgtttatat ccgtatgata atttcataaa tctaactcga	3540
[0070]	taagtaaca tcacaaaaat tacaagatac attggagaaa aaaaaggtt ttattcggcg	3600
[0071]	cattattct agtggtatat ttattctcat tcaaagtc ataaaaaag attttaaagt	3660
[0072]	aaaaatattc tctctgaaag tctagcagta ttttagaaca gtaccactac gattctctc	3720
[0073]	ttatcctct tcataatag ccattgtggt gattgttcat atatctatat gtacctccta	3780
[0074]	tcgcataaga ctacgctaa cttcttattc tctctcaaaa gacagctttt aaataaaa	3838
[0075]	<210> 2	
[0076]	<211> 3043	
[0077]	<212> DNA	
[0078]	<213> 芥菜型油菜 (Brassica juncea)	
[0079]	<400> 2	
[0080]	atggagatga gacttctgaa aactcacctt ctgtttctcc atcttcatta cgttatctcg	60
[0081]	atctccttc tatgtttctc actatgcctc gcttccactg acatggacca tctcctcaac	120
[0082]	ctcaaatcct ccatggtcgg cccaacggc cacggcctcc acgactgggt tcaactcact	180
[0083]	tcacctcag ctactgttc tttctcggc gtttcatgac acggcgacgc tcgtgtcact	240

[0084]	tccctcaacg	tctctttcac	tcctctcttc	ggaaccatct	cgccagagat	tgggatgctg	300
[0085]	aaccgtcttg	tgaatctcac	gtagctgct	aataacttct	ccggtatggt	gccgctggag	360
[0086]	atgaagagtc	tcacttctct	aaaggttctc	aacatctcca	acaacgtgaa	cctcaacggg	420
[0087]	accttccccg	gagagattct	cactcccatg	gtggacctcg	aagtctctga	cgcgtacaac	480
[0088]	aacaacttca	caggccatt	acccccggag	atccccgggc	tcaagaagct	gagacacctc	540
[0089]	tctctcgag	gaaacttctt	aaccggagag	atcccagaga	gttacggaga	tatccaaagc	600
[0090]	ttggagtatc	ttggcctcaa	cggagccgga	ctctccggtg	aatctccggc	gttcttgtct	660
[0091]	cgctcaaga	atcttaaaga	aatgtacgtc	ggctacttca	acagctacac	cggcggtgtt	720
[0092]	ccgccggagt	tcggtgaatt	gacaaacctc	gaggtcctcg	acatggcgag	ctgtactctc	780
[0093]	acaggagaga	ttccgacaac	actaagtaat	ctaaaacatt	tgcacacttt	gtttctccac	840
[0094]	atcaacaact	taaccggaaa	catcccacca	gaactctccg	gtttaatcag	tttaaatctc	900
[0095]	ctagacctct	caataaacca	gctaaccgga	gagattctct	agagcttcat	ctccctagga	960
[0096]	aacatcactc	tcatcaacct	cttcagaaac	aatctccacg	ggccgatacc	ggacttcttc	1020
[0097]	ggagacatgc	cgaacctcca	agtcctccag	gtgtgggaga	acaacttcac	gctagagcta	1080
[0098]	ccggcgaatc	tcggccgga	cgggaatctg	aaaaagctcg	acgtctctga	taaccatctt	1140
[0099]	accggactca	tccccatgga	tttgtgcaga	ggcgggaagc	tggagacget	cgtgctctcc	1200
[0100]	aacaacttct	tcttcggctc	gatccctgag	aagctaggtc	aatgcaaatc	gctaaacaag	1260
[0101]	atcagaatcg	tcaagaatct	cctcaacggt	acggttccgg	agggattatt	caatctaccg	1320
[0102]	ctcgtaacga	tcatcgagct	caccgataac	ttcttctccg	gggagcttcc	gggggagatg	1380
[0103]	tcaggcgacg	ttctcgatca	tatctactta	tctaacaatt	ggtttaccgg	tttaatcccc	1440
[0104]	ccggtatctg	gtaattttaa	aaatctacaa	gatttattct	tagaccggaa	ccggttttagc	1500
[0105]	gggaatatcc	cgagggaagt	tttcgagtta	aagcatctaa	cgaagatcaa	cacgagtgtc	1560
[0106]	aacaacctaa	ccggcgacat	ccctgactcg	atctctcgct	gcacttctct	aatctccgtc	1620
[0107]	gatctcagcc	gtaaccgaat	cggcggagat	attcctaaag	acatccacga	cgtgattaac	1680
[0108]	ttaggaactc	taaactctct	cgggaatcaa	ctcaccggtc	cgatcccgat	cggaatcggg	1740
[0109]	aagatgacga	gcttaaccac	tctcgatctc	tccttcaacg	acctctccgg	gagagtccca	1800
[0110]	ctcggcggcc	agttctagt	cttcaacgac	acttctctcg	ccggaacc	ttacctctgc	1860
[0111]	ctccctcacc	acgtctctg	ccttacgctg	ccggaacaaa	cctccgatcg	tatccacacg	1920
[0112]	gctctcttct	ctccgtcgag	gatcgttate	acgatcgtcg	cagcgatcac	ggcgttgatc	1980
[0113]	cttatcagcg	tcgcatctg	tcagatgaac	aagaagaagc	acgagagatc	tctctctctg	2040
[0114]	aagctaaccg	ccttccaaag	actcgatttc	aaagcgggaag	acgtctctga	gtgtctccag	2100
[0115]	gaagagaaca	taatcgcaa	aggcggagcg	gggatcgtct	accgcggatc	catgccgaac	2160
[0116]	aacgtcgacg	tcgcatcaa	acgccttgta	ggacgcggaa	cagggaggag	cgatcacgga	2220
[0117]	ttcacggcgg	agatacagac	gctagggaga	atccgccacc	gtcatatagt	gagactctct	2280
[0118]	ggatacgtgg	cgaacaagga	cacgaacctg	cttctctacg	agtacatgcc	taacgggagc	2340
[0119]	ctcggggagc	ttttgcacgg	atctaaagga	ggtcatcttc	agtgggagac	gaggcacaga	2400
[0120]	gtagccgtgg	aagcggcgaa	aggactgtgt	tatcttctac	atgactgttc	gccgttgatc	2460
[0121]	ttgcatagag	acgttaagtc	caataacatt	ttactggact	ctgattttga	ggcccatggt	2520
[0122]	gctgattttg	ggcttgctaa	gttcttagtg	gacggtgctg	cttctgagtg	tatgtctctg	2580
[0123]	atagctggct	cctatggata	catcgtcca	ggttagttta	aacatgtttt	aaataacaaa	2640
[0124]	taatatgtat	aaaactaact	attgtttgtt	ttggttttga	atthttgatag	agtatgctta	2700
[0125]	cactctcaaa	gtggatgaga	agagtgatgt	gtatagtctc	ggagtgggtg	tattggagct	2760

[0126] gatagctggg aagaaaccag ttggtgagtt tggggaagga gtggatatag tgaggtgggt 2820  
 [0127] gaggaacacg gaggtgaga tacctcagcc gtcggatgca gctactgttg tggcgatcgt 2880  
 [0128] tgaccagagg ttgactggtt acccgttgac tagtgtgatt cacgtgttca agatagcgt 2940  
 [0129] gatgtgtgtg gaggatgagg cagcgacaag gccgacgatg agggaagttg tgcacatgct 3000  
 [0130] cactaacct cccaagtccg tcactaactt gatgccttc tga 3043  
 [0131] <210> 3  
 [0132] <211> 987  
 [0133] <212> PRT  
 [0134] <213> 芥菜型油菜 (Brassica juncea)  
 [0135] <400> 3  
 [0136] Met Glu Met Arg Leu Leu Lys Thr His Leu Leu Phe Leu His Leu His  
 [0137] 1 5 10 15  
 [0138] Tyr Val Ile Ser Ile Ser Leu Leu Cys Phe Ser Leu Cys Leu Ala Ser  
 [0139] 20 25 30  
 [0140] Thr Asp Met Asp His Leu Leu Asn Leu Lys Ser Ser Met Val Gly Pro  
 [0141] 35 40 45  
 [0142] Asn Gly His Gly Leu His Asp Trp Val His Ser Thr Ser Pro Ser Ala  
 [0143] 50 55 60  
 [0144] His Cys Ser Phe Ser Gly Val Ser Cys Asp Gly Asp Ala Arg Val Ile  
 [0145] 65 70 75 80  
 [0146] Ser Leu Asn Val Ser Phe Thr Pro Leu Phe Gly Thr Ile Ser Pro Glu  
 [0147] 85 90 95  
 [0148] Ile Gly Met Leu Asn Arg Leu Val Asn Leu Thr Leu Ala Ala Asn Asn  
 [0149] 100 105 110  
 [0150] Phe Ser Gly Met Leu Pro Leu Glu Met Lys Ser Leu Thr Ser Leu Lys  
 [0151] 115 120 125  
 [0152] Val Leu Asn Ile Ser Asn Asn Val Asn Leu Asn Gly Thr Phe Pro Gly  
 [0153] 130 135 140  
 [0154] Glu Ile Leu Thr Pro Met Val Asp Leu Glu Val Leu Asp Ala Tyr Asn  
 [0155] 145 150 155 160  
 [0156] Asn Asn Phe Thr Gly Pro Leu Pro Pro Glu Ile Pro Gly Leu Lys Lys  
 [0157] 165 170 175  
 [0158] Leu Arg His Leu Ser Leu Gly Gly Asn Phe Leu Thr Gly Glu Ile Pro  
 [0159] 180 185 190  
 [0160] Glu Ser Tyr Gly Asp Ile Gln Ser Leu Glu Tyr Leu Gly Leu Asn Gly  
 [0161] 195 200 205  
 [0162] Ala Gly Leu Ser Gly Glu Ser Pro Ala Phe Leu Ser Arg Leu Lys Asn  
 [0163] 210 215 220  
 [0164] Leu Lys Glu Met Tyr Val Gly Tyr Phe Asn Ser Tyr Thr Gly Gly Val  
 [0165] 225 230 235 240  
 [0166] Pro Pro Glu Phe Gly Glu Leu Thr Asn Leu Glu Val Leu Asp Met Ala  
 [0167] 245 250 255

[0168]	Ser Cys Thr Leu Thr Gly Glu Ile Pro Thr Thr Leu Ser Asn Leu Lys
[0169]	260 265 270
[0170]	His Leu His Thr Leu Phe Leu His Ile Asn Asn Leu Thr Gly Asn Ile
[0171]	275 280 285
[0172]	Pro Pro Glu Leu Ser Gly Leu Ile Ser Leu Lys Ser Leu Asp Leu Ser
[0173]	290 295 300
[0174]	Ile Asn Gln Leu Thr Gly Glu Ile Pro Gln Ser Phe Ile Ser Leu Gly
[0175]	305 310 315 320
[0176]	Asn Ile Thr Leu Ile Asn Leu Phe Arg Asn Asn Leu His Gly Pro Ile
[0177]	325 330 335
[0178]	Pro Asp Phe Ile Gly Asp Met Pro Asn Leu Gln Val Leu Gln Val Trp
[0179]	340 345 350
[0180]	Glu Asn Asn Phe Thr Leu Glu Leu Pro Ala Asn Leu Gly Arg Asn Gly
[0181]	355 360 365
[0182]	Asn Leu Lys Lys Leu Asp Val Ser Asp Asn His Leu Thr Gly Leu Ile
[0183]	370 375 380
[0184]	Pro Met Asp Leu Cys Arg Gly Gly Lys Leu Glu Thr Leu Val Leu Ser
[0185]	385 390 395 400
[0186]	Asn Asn Phe Phe Phe Gly Ser Ile Pro Glu Lys Leu Gly Gln Cys Lys
[0187]	405 410 415
[0188]	Ser Leu Asn Lys Ile Arg Ile Val Lys Asn Leu Leu Asn Gly Thr Val
[0189]	420 425 430
[0190]	Pro Glu Gly Leu Phe Asn Leu Pro Leu Val Thr Ile Ile Glu Leu Thr
[0191]	435 440 445
[0192]	Asp Asn Phe Phe Ser Gly Glu Leu Pro Gly Glu Met Ser Gly Asp Val
[0193]	450 455 460
[0194]	Leu Asp His Ile Tyr Leu Ser Asn Asn Trp Phe Thr Gly Leu Ile Pro
[0195]	465 470 475 480
[0196]	Pro Ala Ile Gly Asn Phe Lys Asn Leu Gln Asp Leu Phe Leu Asp Arg
[0197]	485 490 495
[0198]	Asn Arg Phe Ser Gly Asn Ile Pro Arg Glu Val Phe Glu Leu Lys His
[0199]	500 505 510
[0200]	Leu Thr Lys Ile Asn Thr Ser Ala Asn Asn Leu Thr Gly Asp Ile Pro
[0201]	515 520 525
[0202]	Asp Ser Ile Ser Arg Cys Thr Ser Leu Ile Ser Val Asp Leu Ser Arg
[0203]	530 535 540
[0204]	Asn Arg Ile Gly Gly Asp Ile Pro Lys Asp Ile His Asp Val Ile Asn
[0205]	545 550 555 560
[0206]	Leu Gly Thr Leu Asn Leu Ser Gly Asn Gln Leu Thr Gly Ser Ile Pro
[0207]	565 570 575
[0208]	Ile Gly Ile Gly Lys Met Thr Ser Leu Thr Thr Leu Asp Leu Ser Phe
[0209]	580 585 590

[0210]	Asn Asp Leu Ser Gly Arg Val Pro Leu Gly Gly Gln Phe Leu Val Phe
[0211]	595 600 605
[0212]	Asn Asp Thr Ser Phe Ala Gly Asn Pro Tyr Leu Cys Leu Pro His His
[0213]	610 615 620
[0214]	Val Ser Cys Leu Thr Arg Pro Glu Gln Thr Ser Asp Arg Ile His Thr
[0215]	625 630 635 640
[0216]	Ala Leu Phe Ser Pro Ser Arg Ile Val Ile Thr Ile Val Ala Ala Ile
[0217]	645 650 655
[0218]	Thr Ala Leu Ile Leu Ile Ser Val Ala Ile Arg Gln Met Asn Lys Lys
[0219]	660 665 670
[0220]	Lys His Glu Arg Ser Leu Ser Trp Lys Leu Thr Ala Phe Gln Arg Leu
[0221]	675 680 685
[0222]	Asp Phe Lys Ala Glu Asp Val Leu Glu Cys Leu Gln Glu Glu Asn Ile
[0223]	690 695 700
[0224]	Ile Gly Lys Gly Gly Ala Gly Ile Val Tyr Arg Gly Ser Met Pro Asn
[0225]	705 710 715 720
[0226]	Asn Val Asp Val Ala Ile Lys Arg Leu Val Gly Arg Gly Thr Gly Arg
[0227]	725 730 735
[0228]	Ser Asp His Gly Phe Thr Ala Glu Ile Gln Thr Leu Gly Arg Ile Arg
[0229]	740 745 750
[0230]	His Arg His Ile Val Arg Leu Leu Gly Tyr Val Ala Asn Lys Asp Thr
[0231]	755 760 765
[0232]	Asn Leu Leu Leu Tyr Glu Tyr Met Pro Asn Gly Ser Leu Gly Glu Leu
[0233]	770 775 780
[0234]	Leu His Gly Ser Lys Gly Gly His Leu Gln Trp Glu Thr Arg His Arg
[0235]	785 790 795 800
[0236]	Val Ala Val Glu Ala Ala Lys Gly Leu Cys Tyr Leu His His Asp Cys
[0237]	805 810 815
[0238]	Ser Pro Leu Ile Leu His Arg Asp Val Lys Ser Asn Asn Ile Leu Leu
[0239]	820 825 830
[0240]	Asp Ser Asp Phe Glu Ala His Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Lys Phe
[0241]	835 840 845
[0242]	Leu Val Asp Gly Ala Ala Ser Glu Cys Met Ser Ser Ile Ala Gly Ser
[0243]	850 855 860
[0244]	Tyr Gly Tyr Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Thr Leu Lys Val Asp Glu
[0245]	865 870 875 880
[0246]	Lys Ser Asp Val Tyr Ser Phe Gly Val Val Leu Leu Glu Leu Ile Ala
[0247]	885 890 895
[0248]	Gly Lys Lys Pro Val Gly Glu Phe Gly Glu Gly Val Asp Ile Val Arg
[0249]	900 905 910
[0250]	Trp Val Arg Asn Thr Glu Gly Glu Ile Pro Gln Pro Ser Asp Ala Ala
[0251]	915 920 925

[0252] Thr Val Val Ala Ile Val Asp Gln Arg Leu Thr Gly Tyr Pro Leu Thr  
 [0253] 930 935 940  
 [0254] Ser Val Ile His Val Phe Lys Ile Ala Met Met Cys Val Glu Asp Glu  
 [0255] 945 950 955 960  
 [0256] Ala Ala Thr Arg Pro Thr Met Arg Glu Val Val His Met Leu Thr Asn  
 [0257] 965 970 975  
 [0258] Pro Pro Lys Ser Val Thr Asn Leu Ile Ala Phe  
 [0259] 980 985  
 [0260] <210> 4  
 [0261] <211> 2924  
 [0262] <212> DNA  
 [0263] <213> 芥菜型油菜 (*Brassica juncea*)  
 [0264] <400> 4  
 [0265] atgtttgagt ttctggcaaa gaattgaaac cacttttttt acaccaaaaa aaaatactgg 60  
 [0266] tgtacattgg aatgcaact ccagcttcta cagtttact acctaactat gtttctctt 120  
 [0267] cttataatta gtttcacaaa tttattaatt agcattcatc tagaagctag cctaaagtgc 180  
 [0268] attcagacat tcaccataaa tcattaatga taaatgtctt acattatgct cctaagtgtg 240  
 [0269] ttgtcatggt atatcaaaaa atgcccaag ttcatttcc tctctacata aagaaaaatt 300  
 [0270] tctaattact aagaaaagct cttttctgc tgaagagaac ataaccttt attcccaaaa 360  
 [0271] gtcacaagt ttgggcatth tcagegaatc agagaaaata tgcttctctt cttcatcaca 420  
 [0272] tattgacatc tcccttggt caagacagta ccggtggctc tgattgtgta aaccgtccaa 480  
 [0273] tccagttgaa ccggtcaaca gtattaatta accaaaaata acacgtgaaa gcatatattt 540  
 [0274] atgttgtag gtatgtatag cgtttacttt cttaaattta atgcatcaag atcaaatcca 600  
 [0275] aaagagaata cacaacatca tataaaatga gaaattcgtc gcgccattta ggaaagggcc 660  
 [0276] tttataccaa tatgccgat atatgtagaa cattgggtccc caagtgtata tgtgtgtgtg 720  
 [0277] tgtctatgtc aacccaagt gtatggattt ctcaacaaat caaaggcct ttgttggtaa 780  
 [0278] agctcctctt gatatttaac cgtataaaat attgtagcg gggatgaagat atattcgcca 840  
 [0279] aaaacggtag tgcttgata accggaacc aataatttac aaatagcatt agcttttatg 900  
 [0280] ttacaaatgt tgagagaatg aatacacgga aaccaataat ttacaaatag ccttagcttt 960  
 [0281] tatgttacia atgttgagag aatacatttt aattctggca gaatcgatc tgcataaaac 1020  
 [0282] ttgtataaac tataacatgg cttttgtaac taaaaataa atattggaaa taaattggat 1080  
 [0283] atctcgcgga tcaactcgt aaagttctta aaatctgtaa aagttatgaa aaacaaatgg 1140  
 [0284] aaacacttga aatgtgtat cagcgatagt ataattata gtaagacaca catttgctat 1200  
 [0285] tcgatttctc tctagcaaaa gctttgttat gtagttgtgg acataagcat acgatcagcg 1260  
 [0286] atatataat ttcgttcttt gttttgttat cgtcacacga ttagcaatcg cgatcaaata 1320  
 [0287] gttgtgttc atcattcat ttcagtgttt ggccattgat agacaagata tgtcaaagtc 1380  
 [0288] gctagaactt tcagagttc taaactaacg acagattatt tttccaata aagatctaag 1440  
 [0289] tgtgtgatat tcgagcgttt ccactatgat tttatttatg attagtcatt gttacaact 1500  
 [0290] aaaactgtaa gactatccga atttttcac atattccgaa attaatcga gcttattatc 1560  
 [0291] aatcaacga ttttcataag gtatagtta aaaaaaaaa ttacaagaga gaagataagg 1620  
 [0292] gtaaagtcag agagatctgc aaaaccaaag gtaaataaca cacaacgtgg ggaccctgaa 1680  
 [0293] gcacagcaga agaaggtcta caagaagagt gagtgtcgac aaagacaaga aaaggagcgt 1740

[0294]	tgactattag attgaagcca aaatagaagg ggcagatttg tctcttttgg aaaggacaca	1800
[0295]	gacaatcttt tatacgggcc atttaataac taggccttac ttaataagcc cattaactcc	1860
[0296]	cttctttgtc cttttaagtt tttaaaatat atattccatt ttccttatca cgtgacaatg	1920
[0297]	agaaggaaac gtcgtcggat taaactggtt gagatgacaa gacggcgata agaagaaaga	1980
[0298]	aaccacagca gctataggca gggaacgtaa agttaagtct gtctatcatc tattaacggt	2040
[0299]	cagttcagat catagacatt gtaatagcgt tttctttgtc ccgttacatt ttaaacgccg	2100
[0300]	tgaagatata catttatctt gatataata gccaaaaaga taaactttct cgatttacat	2160
[0301]	cgtgtcagaa gatttaacag aggaaagaag acgatcacga cgtttcccgg ttttccatgt	2220
[0302]	cttgtgtagt ggcggctact aaccaataa ctttgtccgt aaaaactgta aaaaagacta	2280
[0303]	tggtaaaagt ttctttagta tgtttactct gcacatatag cagtggatta tgggtttgca	2340
[0304]	ttacaattta agcacaatc gtttagttac ccacaaaaat atcatagatt ctctaaaaat	2400
[0305]	cacatgatta aatgacattt acaaaatttt gtgattatta ctcggaataa ttcaaagaaa	2460
[0306]	aatattattt gagcacatta acaaaaaatg gaagtttgaa gtatgtgacg tataaagcca	2520
[0307]	atgaaagact gacacttcat tgaccacaag tcgtagttcg tatctacaag ctggatgtcc	2580
[0308]	gtttaccctt ttatatccgt atgataattt cataaatcta actcgataag taacatcac	2640
[0309]	aaaaattaca agatacattg gagaaaaaaa aggtttttat tcggcgcatt atttctagt	2700
[0310]	gtatatttat tctcattcaa agtcatataa aaaaagattt taaagtaaaa atattctctc	2760
[0311]	tgaaagtcta gcagtatttt agaacgtac cactacgatt ctctttctca tctcttcat	2820
[0312]	aatatgccat tgtggtgatt gttcatatat ctatatgtac ctctatcgc ataagactca	2880
[0313]	cgtaacttc ttattctctc tcaaaagaca gcttttaaat aaaa	2924
[0314]	<210>	5
[0315]	<211>	914
[0316]	<212>	DNA
[0317]	<213>	芥菜型油菜 ( <i>Brassica juncea</i> )
[0318]	<400>	5
[0319]	atgtgcatca tatgctactt ttcacttggg gcttgaaagt taattgctgt ttaaaaagtt	60
[0320]	tgtctcaagc aatttgaaaa tcatatgcaa cttgagggga gaacaaatct aaaacggcta	120
[0321]	agaaaaatca agtttatata atatttctta tgtatttgaa agattgatgt tttaaattgt	180
[0322]	atcatacgtt tttgaaatta tatacataca tactttattt tattagttat ttctcttttt	240
[0323]	ctaataaaat aatcccatca catattttag ttttcagtta aactacatga gttaaaatat	300
[0324]	aaaatattaa actcttaaat acaaaaaaat aaaacataca aatttttaaat aaaatggcg	360
[0325]	tattgtcatt caaaatttac taaaaatct agtaaactgt tttgagtaaa tatctagaaa	420
[0326]	atgatacatg attcattcgt gatcagcttg tttgtttcac atataatcaa cgcactaatc	480
[0327]	attttgggat aaaccttca aaagcaatta ttaaagaaa caaattgaga gcaatgatga	540
[0328]	tataagaaat ataggtcatt gtcttgtaa tcaagttaat aattaaacga aaaggcaacg	600
[0329]	gaagtagtag tagtagaaga tgatgatgaa gacgaagaca aagttgtgtc acaagtgtgt	660
[0330]	cttactat ctgtcttga aacgggggat tgcctaatgg cattttgagc ttttgctta	720
[0331]	gtcactaccg aattctctct gtctattggc agctttagtc ccaaatctat tcaaaacatg	780
[0332]	caatgatatt ggacgaagaa acttctcaca atccatgacc cttgaggtct tgaatcacct	840
[0333]	ttacttttt gttccattgc acggcagata tctaaaaata attttgattt attttacatc	900
[0334]	atgaagaggc aaca	914
[0335]	<210>	6

- 
- [0336] <211> 22  
[0337] <212> DNA  
[0338] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
[0339] <400> 6  
[0340] tactacttcc gttgcctttt cg 22  
[0341] <210> 7  
[0342] <211> 22  
[0343] <212> DNA  
[0344] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
[0345] <400> 7  
[0346] aaaatactgg tgtacattgg aa 22  
[0347] <210> 8  
[0348] <211> 20  
[0349] <212> DNA  
[0350] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
[0351] <400> 8  
[0352] aatccatac acttggggtt 20

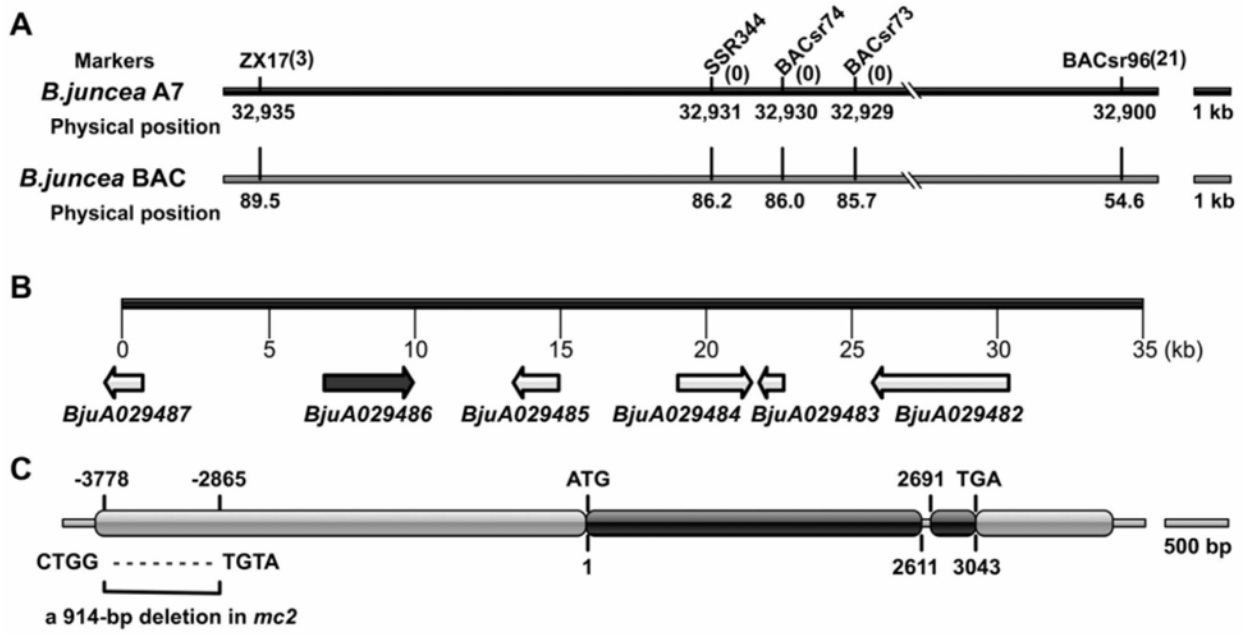


图1

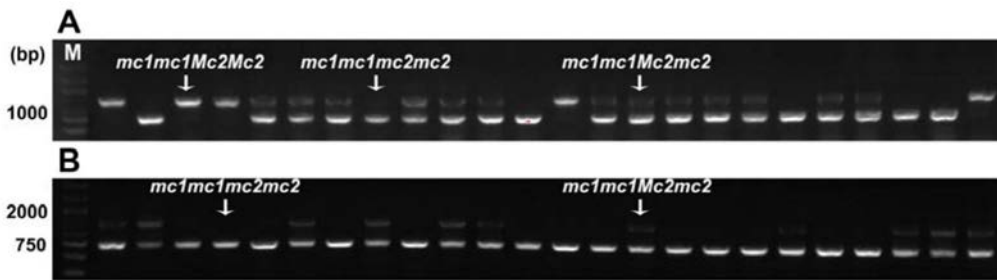


图2

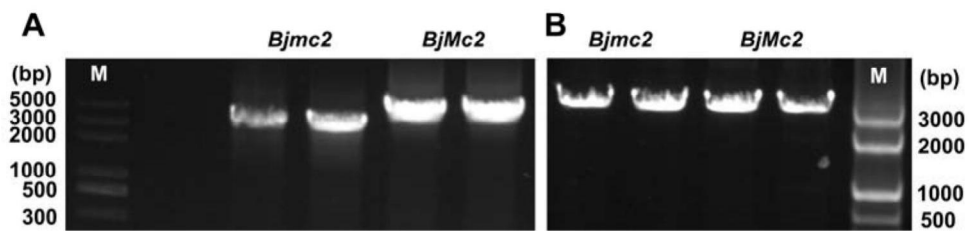


图3

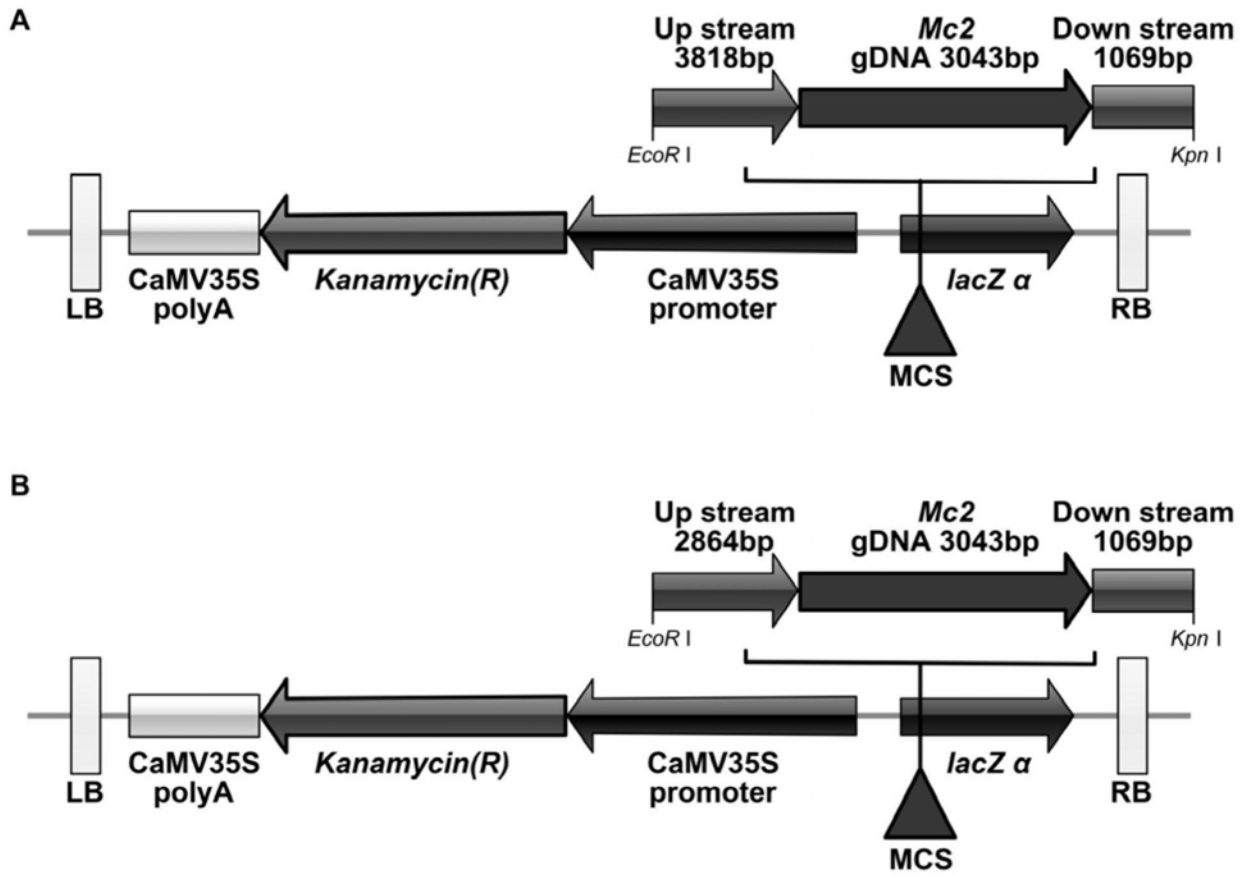


图4

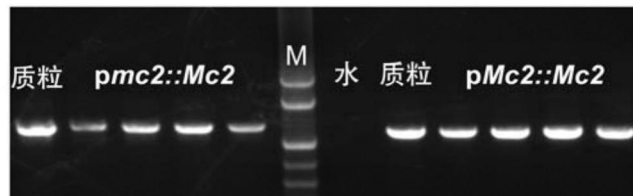


图5

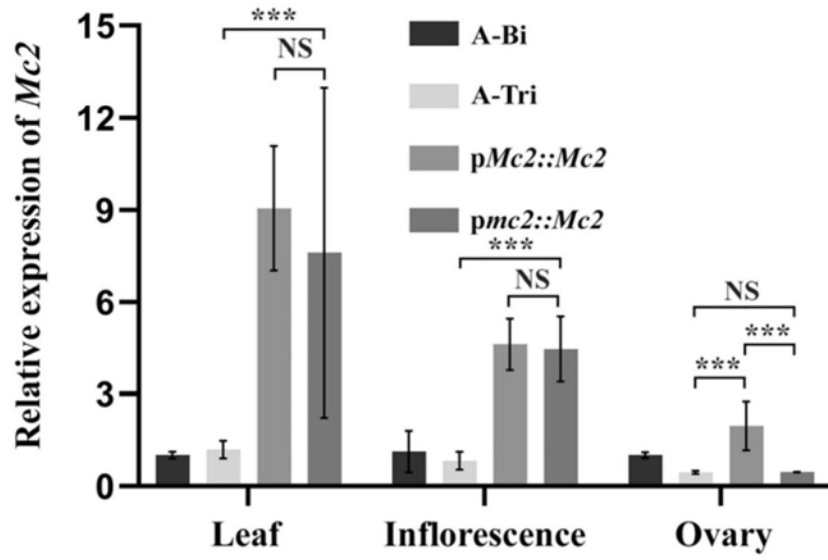


图6

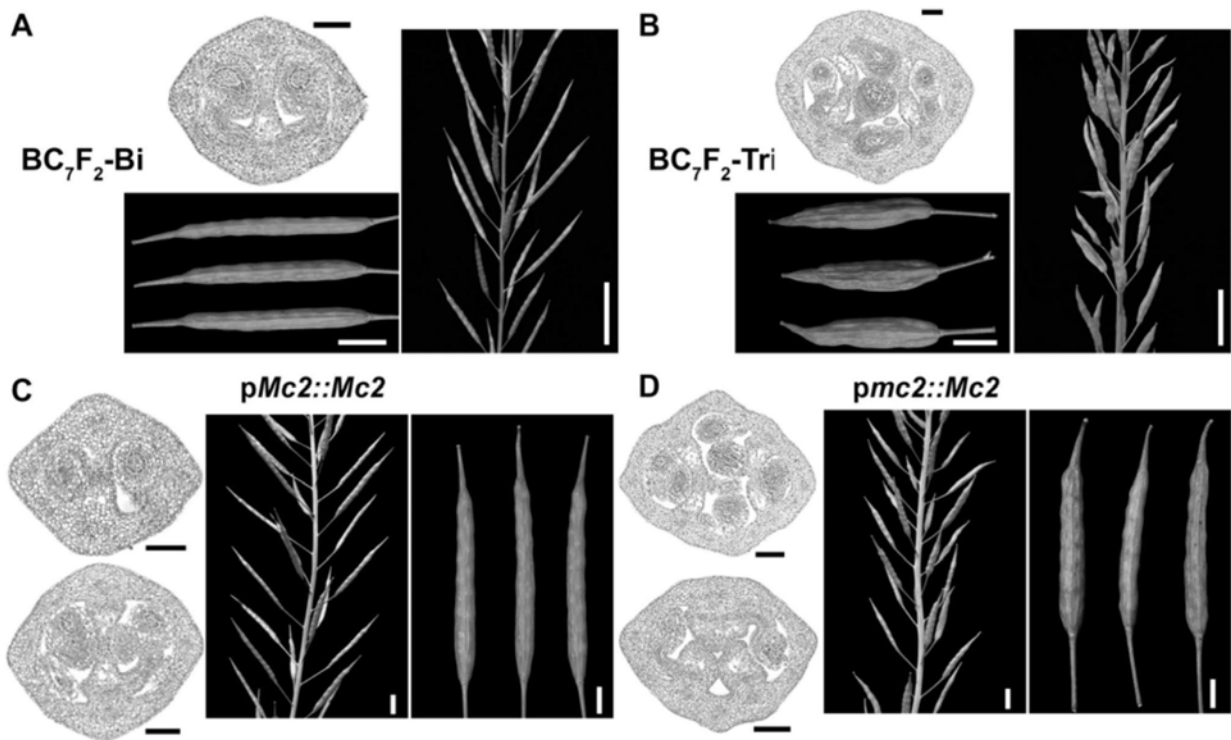


图7