



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105246324 B

(45)授权公告日 2018.08.28

(21)申请号 201480028282.4

A01H 5/00(2018.01)

(22)申请日 2014.03.13

A01H 6/54(2018.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105246324 A

(43)申请公布日 2016.01.13

(30)优先权数据

61/790,655 2013.03.15 US

61/885,213 2013.10.01 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.11.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2014/059752 2014.03.13

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/141147 EN 2014.09.18

(73)专利权人 塞尔克蒂斯股份有限公司

地址 法国巴黎

(72)发明人 L·马西斯 D·F·沃塔斯 张峰

W·豪恩

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 杨昀 陶家蓉

(51)Int.Cl.

C12N 15/82(2006.01)

(56)对比文件

CN 1724669 A,2006.01.25,

WO 2012106105 A1,2012.08.09,

CN 102782140 A,2012.11.14,

Anh-Tung Pham等.Mutant alleles of FAD2-1A and FAD2-1B combine to produce soybeans with the high oleic acid seed oil trait.《BMC Plant Biology》.2010,195:1-13.

Anh-Tung Pham等.Mutant alleles of FAD2-1A and FAD2-1B combine to produce soybeans with the high oleic acid seed oil trait.《BMC Plant Biology》.2010,195:1-13.

Tomas Cermak等.Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting.《Nucleic Acids Research》.2011,e82:1-11.

审查员 徐俊

权利要求书1页 说明书17页

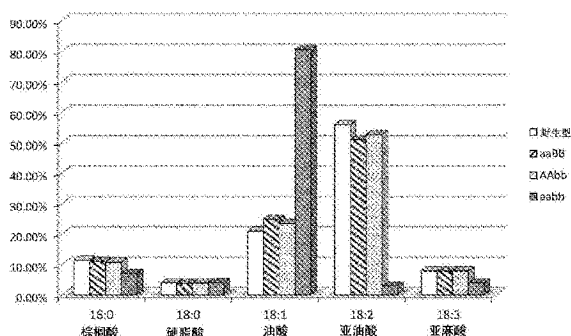
序列表10页 附图8页

(54)发明名称

通过靶向敲除FAD2-1A/1B基因来改良大豆油成分

(57)摘要

提供用于制备因FAD2-1A和FAD2-1B基因中突变而具有改变的油组成的大豆品种的材料和方法。



1. 一种生成具有提高的油酸含量和降低的亚油酸含量的大豆油的方法,所述方法包括:

(a) 提供大豆植物或植物部分,所述大豆植物或植物部分包含至少一个FAD2-1A等位基因中的缺失和至少一个FAD2-1B等位基因中的缺失,所述缺失是通过与SEQ ID NO:32和33结合的TAL效应物核酸内切酶诱导的;和

(b) 从所述植物或植物部分生成油。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述植物或植物部分不含转基因。

3. 一种制备大豆植物的方法,所述大豆植物包含至少一个FAD2-1A等位基因中的缺失和至少一个FAD2-1B等位基因中的缺失,所述方法包括:

(a) 使包含功能性FAD2-1A和FAD2-1B等位基因的大豆植物细胞的群与靶向SEQ ID NO:32和33所示序列的TAL效应物核酸内切酶接触,

(b) 从所述群选择细胞,所述细胞中至少一个FAD2-1A等位基因和至少一个FAD2-1B等位基因已失活,和

(c) 使所选植物细胞再生成大豆植物。

4. 如权利要求3所述的方法,其特征在于,所述大豆植物细胞包含子叶细胞。

5. 如权利要求4所述的方法,其特征在于,所述方法包括使用编码所述一种或多种稀切核酸内切酶的一种或多种载体转化所述子叶细胞。

6. 如权利要求3所述的方法,其特征在于,所述方法包括将一种或多种TAL效应物核酸内切酶蛋白导入所述植物细胞。

7. 如权利要求3所述的方法,其特征在于,所述方法还包括培养所述植物细胞以生成植物株系。

8. 如权利要求3所述的方法,其特征在于,所述方法还可包括:从所述植物细胞分离包含FAD2-1A基因座的至少部分或FAD2-1B基因座的至少部分的基因组DNA。

9. 如权利要求3所述的方法,其特征在于,所述植物细胞不含转基因。

通过靶向敲除FAD2-1A/1B基因来改良大豆油成分

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2013年10月1日提交的美国临时申请序列号61/885,213和2013年3月15日提交的美国临时申请序列号61/790,655的优先权。

技术领域

[0003] 本发明涉及用于制备大豆植物的材料和方法,所述大豆植物可用于生产具有相较于野生型植物改良的成分的油。本发明还涉及缺乏FAD2-1A/1B活性的大豆品种。

[0004] 背景

[0005] 大豆(Glycine max)是一种世界范围内重要的豆类作物,因其具有固定大气氮的能力。大豆还作为动物饲料蛋白的主要来源,并且其油在烹饪/煎炸到工业和生物柴油方面都有应用。通常采用氢化处理来增加大豆油的热稳定性,延长大豆油的保质期,并改善大豆油的口感。然而,氢化作用会增加生产成本,还会导致反式脂肪的形成,这与人类心血管疾病相关联。

发明内容

[0006] 本文提供用于改良大豆油成分的材料和方法,所述改良通过降低或消除 δ -12脂肪酸去饱和酶2(FAD2)1A和1B基因的表达,而不利用转基因法来实现。还提供具有所述改良的油成分的大豆品种。

[0007] 本文所述的方法采用序列特异性的稀切核酸内切酶,以在FAD2-1A和/或FAD2-1B编码序列中引入突变,由此敲除基因功能。这些方法介导FAD2-1A/1B沉默,而不插入转基因。含有转基因的植物在某些管辖区域(例如欧洲)高度规范化,并且,在某些管辖区域,获得监管审批所耗费的成本很高。本文所述的方法还可加速新品种的生产,并且可具有比转基因或传统培育方法更高的成本效益。

[0008] 一个方面中,本发明涉及一种大豆植物、植物部分或植物细胞,其具有一个或多个FAD2-1A等位基因中的突变、一个或多个FAD2-1B等位基因中的突变,或者一个或多个FAD2-1A等位基因中的突变和一个或多个FAD2-1B等位基因中的突变,其中与对应的野生型大豆植物、植物部分或植物细胞产出的油相比,所述植物、植物部分或植物细胞产出的油所具有的增加的油酸含量和减少的亚油酸含量。各突变可位于SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示的序列。各突变可由稀切核酸内切酶(例如,转录激活因子样(TAL)效应物核酸内切酶)诱导。TAL效应物核酸内切酶能够结合SEQ ID NOS:18-33中任一项所示的序列。各突变可以是多于一个核苷酸的插入、缺失或取代。各突变的FAD2-1A和/或FAD2-1B等位基因可具有改变的内源性核酸序列,但不包括任何外源核酸。在一些实施方式中,所述植物、植物部分或植物细胞不含转基因。所述植物部分可以是种子。

[0009] 在另一个方面中,本发明涉及一种大豆植物、植物部分或植物细胞,其具有一个或多个FAD2-1A等位基因中的突变,一个或多个FAD2-1B等位基因中的突变,或者一个或多个FAD2-1A等位基因中的突变和一个或多个FAD2-1B等位基因中的突变,其中所述植物、植物

部分或植物细胞产出的油的油酸含量大于30% (例如, 大于40%、大于50%或大于55%)。在一些实施方式中, 所述植物、植物部分或植物细胞不含转基因。

[0010] 在另一个方面中, 本发明涉及一种大豆植物、植物部分或植物细胞, 其具有一个或多个FAD2-1A等位基因中的突变, 一个或多个FAD2-1B等位基因中的突变, 或者一个或多个FAD2-1A等位基因中的突变和一个或多个FAD2-1B等位基因中的突变, 其中所述植物、植物部分或植物细胞产出的油的亚油酸含量少于10% (例如, 少于5%、少于3%或少于1%)。在一些实施方式中, 所述植物、植物部分或植物细胞不含转基因。

[0011] 在另一个方面中, 本发明涉及一种生产大豆油的方法, 所述大豆油具有提高的油酸含量和降低的亚油酸含量。所述方法可包括 (a) 提供一种大豆植物或植物部分, 其具有一个或多个FAD2-1A等位基因中的突变, 一个或多个FAD2-1B等位基因中的突变, 或者一个或多个FAD2-1A等位基因中的突变和一个或多个FAD2-1B等位基因中的突变; 和 (b) 从所述植物或植物部分生产油。各突变可由稀切核酸内切酶 (例如, TAL效应物核酸内切酶) 诱导。TAL效应物核酸内切酶能够结合SEQ ID NOS:18-33中任一项所示的序列。在一些实施方式中, 所述植物或植物部分不含转基因。

[0012] 在另一个方面, 本发明涉及一种制备大豆植物的方法, 所述大豆植物在各FAD2-1A等位基因中具有突变, 且在各FAD2-1B等位基因中具有突变。所述方法可包括: (a) 使具有功能性FAD2-1A和FAD2-1B等位基因的大豆植物细胞的群与靶向内源性FAD2-1A序列的一种或多种稀切核酸内切酶, 以及靶向内源性FAD2-1B序列的一种或多种稀切核酸内切酶接触, (b) 从所述群选择一种细胞, 其中各FAD2-1A等位基因和各FAD2-1B等位基因已失活, 和 (c) 使所选的植物细胞再生成大豆植物。所述大豆植物细胞可包含子叶细胞。该方法可包括: 采用编码一种或多种稀切核酸内切酶的一种或多种载体转化子叶细胞。该一种或多种稀切核酸内切酶可以是TAL效应物核酸内切酶。该TAL效应物核酸内切酶各自可靶向至SEQ ID NO: 18-33中任一序列。所述方法可包括: 将一种或多种TAL效应物核酸内切酶蛋白引入所述植物细胞。该方法还可包括培养所述植物细胞以生成植物株系。所述方法还可包括: 从所述植物细胞分离包含FAD2-1A基因座的至少部分或FAD2-1B基因座的至少部分的基因组DNA。在一些实施方式中, 所述植物细胞不含转基因。

[0013] 本发明还涉及一种产生大豆植物的方法, 所述大豆植物在各FAD2-1A等位基因中具有突变, 且在各FAD2-1B等位基因中具有突变。所述方法可包括 (a) 使在至少一个FAD2-1A等位基因中具有突变且在至少一个FAD2-1B等位基因中具有突变的第一大豆植物与在至少一个FAD2-1A等位基因中具有突变且在至少一个FAD2-1B等位基因中具有突变的第二大豆植物杂交, 以获得子代; 和 (b) 从所述子代选择一种大豆植物, 其各FAD2-1A和FAD2-1B等位基因中具有突变。各突变可由稀切核酸内切酶 (例如, TAL效应物核酸内切酶) 诱导。TAL效应物核酸内切酶能够结合SEQ ID NOS:18-33中任一项所示的序列。各突变可以是多于一个核苷酸的缺失。在一些实施方式中, 所述第一和第二大豆植物不含转基因。

[0014] 除非另外定义, 本文使用的所有技术和科学术语的意义与本发明所属领域普通技术人员通常所理解的相同。虽然与本文所述类似或等同的方法和材料可用来实施本发明, 但在下文描述合适的方法和材料。本文中述及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献都通过引用全文纳入本文。在抵触的情况下, 以本说明书 (包括定义在内) 为准。此外, 材料、方法和实施例都仅是说明性的, 并不意在构成限制。

[0015] 在附图和以下描述中详细说明了本发明的一种或多种实施方式。本发明的其他特征、目的和优势通过描述、附图以及权利要求书将是显而易见的。

附图说明

[0016] 图1A和1B显示FAD2-1A和FAD2-1B中的不同TAL效应物核酸内切酶靶位点的DNA序列。FAD2-1A基因 (SEQ ID NO:1) 的DNA序列示于图1A, 而FAD2-1B基因 (SEQ ID NO:2) 的DNA序列示于图1B。下划线序列指示TAL效应物核酸内切酶的靶位点, 称为T1-T4。小写字母表示用于筛选TAL效应物核酸内切酶诱导的突变的限制性核酸内切酶位点。

[0017] 图2的凝胶照片显示来自用于筛选大豆毛状根的TAL效应物核酸内切酶诱导的FAD2-1A和FAD2-1B中的突变的PCR富集试验的产物。

[0018] 图3显示大豆毛状根中TAL效应物核酸内切酶诱导的FAD2-1A和FAD2-1B基因中突变的示例性DNA序列。顶行各图显示FAD2-1A中效应物核酸内切酶(下划线)的识别位点的DNA序列(顶部两图)和FAD2-1B中效应物核酸内切酶(下划线)的识别位点的DNA序列(底部两图)。其他序列显示由不精确的非同源末端连接(NHEJ)诱导的代表性突变, 右侧显示缺失的大小。

[0019] 图4的凝胶照片显示在再生的大豆植物上进行的T7E1试验的结果, 该试验用于鉴定FAD2-1A和FAD2-1B中的TAL效应物核酸内切酶诱导的突变。星号指示具有明显突变的样品。本文中的表4A提供关于凝胶中各泳道中分析的是何种再生植物和何种具体FAD2-1基因的信息。第一和最末泳道包含分子长度标志物, 从而不编号。表4A中列为“未切”的DNA样品不用T7E1处理。

[0020] 图5显示FAD2-1A和FAD2-1B中TAL效应物核酸内切酶诱导的突变的DNA序列。这些突变是遗传上可传播的。

[0021] 图6显示对于GM026-18衍生的不同子代进行脂肪酸成分分析的结果。带有aaBB基因型的植物在FAD2-1A的两个等位基因中具有突变。带有AAbb基因型的植物在FAD2-1B的两个等位基因中具有突变。aabb植物在FAD2-1A和FAD2-1B的两个等位基因中具有突变。

[0022] 图7显示FAD2-1突变体中TAL效应物核酸内切酶转基因的隔离。凝胶图像显示分别采用针对TAL效应物核酸内切酶编码序列和大豆醇脱氢酶(ADH)基因的引物组获得的PCR产物。凝胶图像下方的标记表示: 1-15, 个体T2突变株系; WT, 来自非转基因野生型大豆植物的DNA; 载体, 用于转化的载体DNA; 转基因, 来自包含T-DNA载体的转基因植物的阳性对照DNA; H₂O, 不含任何DNA的阴性对照。

[0023] 发明详述

[0024] 农产品大豆油由五种脂肪酸组成: 棕榈酸(10%)、硬脂酸(4%)、油酸(18%)、亚油酸(55%)和亚麻酸(13%)。具有高油酸含量的植物油可能需要较少处理以改善稳定性和/或口感。所述油也可更健康, 并且更适于生产生物柴油。油酸含量大于55%且亚油酸含量少于10%的大豆油尤其有用。已采用传统培育和诱变策略来产生包含升高的油酸水平的大豆品种, 但这些品种产量下降, 因此未被农民接受。

[0025] 已鉴定出负责从棕榈酸到亚麻酸的生物合成进程的酶。例如, FAD2基因负责在发育中的大豆种子中的油累积过程中将油酸前体转化成亚油酸前体。因为大豆古老的多倍体化, 大豆基因组中存在两个拷贝的FAD2 (FAD2-1A和FAD2-1B)。这些基因在DNA水平具有约

95%序列相同性,且编码的蛋白在氨基酸水平具有约99%序列相同性。天然产生的FAD2-1B突变等位基因上纯合的植物可具有中等增加(20.5%-29.4%)的油酸成分,如他处所述(Pham等,BMC Plant Biol.10:195,2010)。已通过X光诱变和TILLing法开发了FAD2-1A中的突变,以产生包含高达50%油酸的种子(Sandhu等,JAOCs 84:229-235,2007),而使FAD2-1A和FAD2-1B等位基因突变获得了油酸含量为82.2%的油(Pham等,同上)。

[0026] 本发明提供大豆植物,其具有减少的(例如,缺失)FAD2-1A和/或FAD2-1B活性,还提供用于产生所述植物,以及源自所述植物的油的方法。本文所述的方法可用于产生具有增加的油酸组分和减少的亚油酸组分的油的大豆品种,所述油酸组分增加至少30%(例如,至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%或至少80%),并且所述亚油酸组分减少至10%或更少(例如,8%或更少、5%或更少、4%或更少、3%或更少、2%或更少、1%或更少或0.5%或更少)。在一些实施方式中,所述对于大豆油成分的改良可通过完全敲除FAD2-1A和/或FAD2-1B基因的表达来实现。根据本文提供的一些方法,FAD2-1A和/或FAD2-1B基因的两个等位基因采用非转基因技术失活。移除FAD2-1A/1B的基因产物能够大幅降低大豆种子中油酸前体向亚油酸前体的转化。

[0027] 为了获得FAD2-1A/1B表达的完全消除,例如,设计了一种工程改造的稀切核酸酶,来识别FAD2-1基因的保守区域,并造成双链断裂。在DNA断裂位点处的归因于非同源末端接合(NHEJ)的不合适修复在FAD2-1A/1B编码区域中产生错义和/或无义突变,使FAD2-1A/1B RNA转录本不稳定,并在翻译前被靶向降解。

[0028] 天然产生的大豆FAD2-1A和FAD2-1B核苷酸序列的代表性示例示于表5。本文提供的大豆植物、细胞、植物部分、种子及其子代可在各内源性FAD2-1A和FAD2-1B等位基因中具有突变,从而各基因的表达被降低或完全抑制。或者,本文提供的大豆植物、细胞、植物部分、种子及其子代可在至少一个FAD2-1A等位基因和/或至少一个FAD2-1B等位基因中具有突变,从而各基因的表达被降低或完全抑制。所述大豆植物、细胞、部分、种子及其子代可具有相比野生型大豆植物、细胞、部分、种子及其子代而言升高的油酸水平和降低的亚油酸水平。

[0029] 在一些实施方式中,本文提供的所述植物、植物细胞、植物部分、种子及植物子代可采用TAL效应物核酸内切酶系统产生,以实现FAD2-1A和/或FAD2-1B基因中的靶向敲除。因此,本发明提供采用TAL效应物核酸内切酶来产生植物和相关产物(例如,种子和植物部分)的材料和方法,所述植物和相关产物适于生产具有升高的油酸含量和减少的亚油酸含量的大豆油。可使用其他稀切、序列特异性核酸酶以制备所需植物材料,包括工程改造的寻靶核酸内切酶或锌指核酸酶。

[0030] “植物”和“植物部分”指保留亲本植物的区别特征的细胞、组织、器官、种子和切断的部分(如根、叶和花)。“种子”指在开花时的正常成熟时间点之后由植物胚珠的连续分化形成的任何植物结构,不考虑其在受精还是未受精的情况下形成,也不考虑种子结构是可育的还是不可育的。

[0031] 术语“等位基因”指特定基因座处基因的一种或多种可选形式中的任一种。在生物体的二倍体(或双二倍体)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同源染色体对的各条染色体上。“杂合”等位基因是位于特定基因座的两个不同的等位基因,其单独地位于相应同源染色体对上。“纯合”等位基因是位于特

定基因座的两个相同的等位基因,其单独地位于细胞中相应同源染色体对上。

[0032] “野生型”在本文中指植物或基因在自然中最常见的典型形式。“野生型FAD2-1A等位基因”是编码功能性FAD2-1A蛋白的天然产生的FAD2-1A等位基因(例如发现于天然产生的大豆植物内),而“突变体FAD2-1A等位基因”是不编码功能性FAD2-1A蛋白的FAD2-1A等位基因。这类“突变体FAD2-1A等位基因”可在其核酸序列中包含一个或多个突变,其中该突变导致植物或植物细胞体内没有可检测量的功能性FAD2-1A蛋白。

[0033] 本文中术语“稀切核酸内切酶”指天然或工程改造的蛋白质,其具有针对含有长度为约12-40bp(如长度为14-40bp)的识别序列(目标序列)的核酸序列的核酸内切酶活性。典型的稀切核酸内切酶在其识别位点内部产生切割,形成具有3'OH或5'OH突出端的4nt交错切口。这些稀切核酸内切酶可以是大范围核酸酶,如野生型寻靶核酸内切酶或其变体蛋白质,更具体地属于十二肽家族(LAGLIDADG (SEQ ID NO:37);参见WO 2004/067736)或可以是来自关联DNA结合结构域与具有切割活性的催化结构域的融合蛋白。TAL效应物核酸内切酶和锌指核酸酶(ZFN)是DNA结合结构域与核酸内切酶FokI的催化结构域融合的示例。自定义的TAL效应物核酸内切酶可以商品名TALENTM(法国巴黎的赛勒柯蒂斯公司(Collectis))购得。关于稀切核酸内切酶的综述,参见Baker, Nature Methods 9:23-26, 2012。

[0034] “诱变”在本文中指将突变导入所选DNA序列的过程。内切核酸酶诱导的突变通常获自双链断裂,其引起插入或缺失(“插入缺失标记(indel)”),可由深度测序分析检测。此类突变通常为数个碱基对的缺失,并且具有失活突变等位基因的效果。例如,在本文所述方法中,诱变经由靶向植物细胞中所选DNA序列的TAL效应物核酸内切酶生成的双链DNA断裂发生。这类诱变导致“TAL效应物核酸内切酶诱导的突变”(例如,TAL效应物核酸内切酶诱导的敲除)并降低靶基因的表达。诱变后,可使用已知技术(例如根据自花受粉后的常规生长步骤种植种子)由经处理的细胞再生植物。

[0035] 在一些情况下,核酸可含有与代表性FAD2-1A或FAD2-1B核苷酸序列具有约75%序列相同性的核苷酸序列。例如,如表5所示,核苷酸序列可与代表性、天然产生的FAD2-1A或FAD2-1B核苷酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列相同性。

[0036] 如下所述测定特定核酸或氨基酸序列与特定序列识别号所指示的序列之间的序列相同性百分比。首先,使用来自含有BLASTN版本2.0.14和BLASTP版本2.0.14的BLASTZ独立版本的BLAST 2序列(B12seq)程序比较核酸或氨基酸序列与特定序列识别号所指示的序列。该BLASTZ独立版本可在fr.com/blast或ncbi.nlm.nih.gov在线获取。解释如何使用B12seq程序的说明书可参见BLASTZ附带的自述文件。B12seq使用BLASTN或BLASTP算法在两条序列之间进行比较。BLASTN用于比较核酸序列,而BLASTP用于比较氨基酸序列。为比较两条核酸序列,如下所述设置选项:-i 设为含有待比较的第一核酸序列的文件(如C:\seq1.txt);-j 设为含有待比较的第二核酸序列的文件(如C:\seq2.txt);-p 设为blastn;-o 设为任何需要的文件名(如C:\output.txt);-q 设为-l;-r 设为2;且所有其他选项都设为其默认设置。例如,以下命令可用于生成含有两条序列之间比较的输出文件:C:\B12seq-i c:\seq1.txt-j c:\seq2.txt-p blastn-o c:\output.txt-q l-r 2。为比较两条氨基酸序列,如下所述设置B12seq的选项:-i 设为含有待比较的第一氨基酸序列的文件(如C:\seq1.txt);-j 设为含有待比较的第二氨基酸序列的文件(如C:\seq2.txt);-p 设为

blastp;-o 设为任何需要的文件名(如C:\output.txt);且所有其他选项都设为其默认设置。例如,以下命令可用于生成含有两条氨基酸序列之间比较的输出文件:C:\B12seq-ic:\seq1.txt-j c:\seq2.txt-p blastp-o c:\output.txt。如果两条比较的序列具有同源性,则指定的输出文件会以经比对序列的形式显示那些同源区域。如果比较的两条序列不具有同源性,则指定的输出文件不会显示经比对的序列。

[0037] 一旦进行比对,即通过对两条序列中存在相同核苷酸或氨基酸的位置的数目进行计数来确定匹配的数目。将匹配的数目除以鉴定的序列(如SEQ ID NO:1)中所列序列长度或连接的长度(如来自鉴定的序列中所列序列的100个连续核苷酸或氨基酸残基),随后将结果值乘以100,从而确定序列相同性百分比。例如,与SEQ ID NO:1中所列序列比对时具有250个匹配的核酸序列与SEQ ID NO:1中所列序列具有86.5%相同性(即 $250 \div 289 \times 100 = 86.5$)。应注意序列相同性百分比值四舍五入至小数点后第一位。例如,75.11、75.12、75.13和75.14向下四舍五入至75.1,而75.15、75.16、75.17、75.18和75.19向上四舍五入至75.2。还应注意,长度值始终是整数。

[0038] 可如他处所述进行用于选择内源性目标序列和生成靶向这类序列的TAL效应物核酸内切酶的方法。参见例如,PCT公开号WO 2011/072246(其通过引用全文纳入本文)。TAL效应物发现于黄单胞菌属(Xanthomonas)中的植物病原性细菌中。这些蛋白质通过结合宿主DNA并激活效应器特异性宿主基因在疾病或触发防卫方面起重要作用(参见例如,Gu等,Nature 435:1122-1125,2005;Yang等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 103:10503-10508,2006;Kay等,Science 318:648-651,2007;Sugio等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 104:10720-10725,2007;和Römer等,Science 318:645-648,2007)。特异性取决于效应物-可变不完善数目(effector-variable number of imperfect),通常是34个氨基酸重复(Schornack等,J.Plant Physiol.163:256-272,2006;和WO 2011/072246)。多态性主要发生在重复位置12和13,本文将之称为重复可变双残基(RVD)。

[0039] TAL效应物的RVD以直接、线性形式对应于其靶位点的核苷酸,一种RVD对应于一种核苷酸,有一些简并性且没有明显的环境依赖性。该蛋白质-DNA识别机制能针对新的靶标特异性TAL效应物进行靶位点预测,以及靶位点选择和对与所选位点具有结合特异性的新TAL效应物进行工程改造。

[0040] TAL效应物DNA结合结构域可与其他序列(如核酸内切酶序列)融合,生成靶向特定、经选择的DNA序列的嵌合核酸内切酶并导致在被靶向的序列处或附近的后续DNA切割。DNA中的这类切割(即双链断裂)可通过例如NHEJ或同源重组在野生型DNA序列中诱导突变。在一些情况下,TAL效应物核酸内切酶可用于促进复杂基因组中的定点诱变,高度准确且高效地敲除或改变基因功能。如下文实施例所述,靶向大豆FAD2-1A和FAD2-1B等位基因的TAL效应物核酸内切酶可用于诱变内源性基因,生成其中这些基因的表达下降的植物(例如,不具有可检测的表达)。可使用一些内切核酸酶(如FokI)以二聚物形式起作用的现象来提高TAL效应物核酸内切酶的靶标特异性。例如,在一些情况下,可使用靶向不同DNA序列的一对TAL效应物核酸内切酶单体(如图1A和1B中所示带下划线的靶序列)。当两个TAL效应物核酸内切酶识别位点紧邻时,如图1A和1B所示,无活性的单体可聚集在一起以生成切割DNA的功能性酶。通过需要DNA结合来激活核酸酶,可产生高度位点特异性的限制性酶。

[0041] 术语“表达”在本文中指转录特定核酸序列以生成正义或反义mRNA,和/或翻译正

义mRNA分子以生成多肽(如治疗性蛋白质),伴随或不伴随后续的翻译后事件。

[0042] 对于植物或植物细胞中的基因或多肽,“降低表达”包括抑制、中断、敲除或敲减基因或多肽,使得基因的转录和/或所编码多肽的翻译与相应野生型植物或植物细胞相比降低。可使用例如以下方法测量表达水平:反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)、Northern印迹、点印迹杂交、原位杂交、核连缀(nuclear run-on)和/或核失控(nuclear run-off)、RNA酶保护或免疫和酶方法(如ELISA、放射性免疫试验和western印迹)。

[0043] 使用TAL效应物核酸内切酶来生成在内源性基因中具有突变的植物、植物细胞或植物部分的方法包括,例如,本文实施例中所述的那些。例如,可将编码靶向所选FAD2-1A或FAD2-1B序列(如图1A所示的FAD2-1A序列或图1B所示的FAD2-1B序列)的TAL效应物核酸内切酶的核酸转化至植物细胞(如子叶中的细胞)中,该核酸在其中表达。随后可以例如如上文所述通过基于核酸的试验或基于蛋白质的试验检测表达水平,或者使用基于核酸的试验(例如PCR和DNA测序,或PCR之后的T7E1试验;Mussolino等,Nucleic Acids Res.39:9283-9293,2011)检测基因组基因座处的突变,从而对细胞进行后续分析以确定是否已将突变导入靶位点。

[0044] 可对诱变的群体或该群体的后代筛选因突变所致的所需特征(例如,具有改变的油组成的植物)。或者,可以筛选诱变的群体或该群体的后代的FAD2-1A或FAD2-1B基因中的突变。例如,可以评价 M_1 植物的后代 M_2 代中是否存在FAD2-1A或FAD2-1B基因中的突变。“群体”是具有共同的基因池的个体的任何组。如本文所使用,“ M_0 ”指与TAL效应物核酸酶接触的植物细胞(和由此长成的植物),而“ M_1 ”指由 M_0 植物自花授粉产生的种子和由该种子长成的植物。“ M_2 ”是自花授粉的 M_1 植物的子代(种子和植物),“ M_3 ”是自花授粉的 M_2 植物的子代,且“ M_4 ”是自花授粉的 M_3 植物的子代。“ M_5 ”是自花授粉的 M_4 植物的子代。“ M_6 ”、“ M_7 ”等各自是前一代自花授粉植物的子代。术语“自交”在本文中指自花授粉。

[0045] 一种或多种 M_1 大豆植物可获自单个、诱变的 M_0 植物细胞(和由其长成的植物),且至少一种所述植物可以被鉴定为含有FAD2-1A或FAD2-1B基因中的突变。 M_1 大豆植物可以是FAD2-1A和/或FAD2-1B基因座处突变体等位基因的杂合子,并由于存在野生型等位基因而表现出 δ 十二脂肪酸去饱和酶活性。或者, M_1 大豆植物可在FAD2-1A或FAD2-1B基因座具有突变的等位基因,并显示出缺乏 δ 十二脂肪酸去饱和酶活性的表型。这类植物可以是杂合子并且由于诸如显性负抑制(dominant negative suppression)的现象而缺失 δ 十二脂肪酸去饱和酶活性(即便存在野生型等位基因也是如此),或者可以由于FAD2-1A或FAD2-1B基因座处全部两个等位基因中的独立诱导的突变而成为纯合子。

[0046] 携带突变的FAD2-1A和FAD2-1B等位基因的大豆植物可用于植物育种项目以创建新型且有用的株系和品种。因此,在一些实施方式中,将在FAD2-1A基因中含有至少一个突变且在FAD2-1B基因中含有至少一个突变的 M_1 、 M_2 、 M_3 或后代大豆植物与第二大豆植物杂交,并鉴定其中存在FAD2-1A和FAD2-1B基因突变的杂交后代。还应理解,该第二大豆植物可含有与其杂交的植物相同的FAD2-1A和FAD2-1B突变,不同的FAD2-1A和FAD2-1B突变或者在FAD2-1A和/或FAD2-1B基因座处为野生型。

[0047] 可通过已知方法进行育种。DNA指纹图谱、SNP或类似技术可用于标志物辅助选择(MAS)育种项目以将突变体FAD2-1A和FAD2-1B等位基因转移或培育至其他大豆植物内。例如,培育者可从含有突变体等位基因的基因型与农学上需要的基因型的杂交中创建分离

群。可使用由FAD2-1A和FAD2-1B序列或其片段开发的标志物筛选F₂或回交代的植物。经鉴定为具有突变体等位基因的植物可回交或自花授粉以创建待筛选的第二群体。取决于预期的遗传模式或使用的MAS技术,需要在各回交循环前对所选植物进行自花授粉以辅助鉴定所需单个植物。可重复回交或其他育种过程直至恢复所需回归亲本的表型。

[0048] 成功的杂交生成可育且能够在需要时与亲本之一回交的F₁植物。在一些实施方式中,筛选F₂代中植物群体的FAD2-1A和FAD2-1B基因表达,例如由于根据标准方法不存在FAD2-1A和FAD2-1B基因而将植物鉴定为无法表达FAD2-1A和FAD2-1B,例如使用PCR方法,其中使用基于本文所述FAD2-1A和FAD2-1B的核苷酸序列信息的引物。随后将选定的植物与亲本之一回交并使第一回交(BC₁)代植物自花授粉以生成BC₁F₂群体,再次筛选其中变体FAD2-1A和FAD2-1B基因表达(例如沉默类型的FAD2-1A和FAD2-1B基因)。重复回交、自花授粉和筛选过程,例如重复至少4次直至最终的筛选生成可育且与回归亲本合理类似的植物。需要时,该植物可以自花授粉并且可随后再次筛选后代以确认植物缺失FAD2-1A和FAD2-1B基因表达。可任选地对所选植物进行细胞遗传分析以确认染色体互补和染色体配对关系。可使用标准方法生成培育者的所选植物的种子,包括例如田间试验、确认FAD2-1A和FAD2-1B的沉默状态和/或分析油以确定油酸和亚油酸的水平。

[0049] 在将由第一、突变体大豆亲本与第二、野生型大豆亲本之间杂交得到的最初的F₁杂交代杂交或回交至突变体大豆亲本的情况下,回交的后代可以自花授粉以建立BC₁F₂代,对其筛选突变体FAD2-1A和FAD2-1B等位基因。

[0050] 使用本文所述突变体大豆植物进行的植物育种项目可获得新颖且有用的株系和品种。本文所用术语“品种”指共有恒定特性的植物群体,该特性将其与相同种的其他植物区分开来。品种通常(但不是始终)在市场上有售。虽然具有一种或多种不同性状,但可通过品种内个体之间非常小的总体差异对该品种进行表征。“纯系”品种可通过若干代自花授粉和选择来创建,或使用组织或细胞培养技术由单一亲本无性繁殖。某一品种可基本来源于另一株系或品种。根据《保护植物新品种国际公约》(1961年12月2日,于1972年11月10日、1978年10月23日和1991年3月19日在日内瓦修订)的定义,某一品种“基本来源”于某一初始品种的前提是:a)其主要来源于该初始品种,或者来源于主要源自该初始品种的品种,同时保留该初始品种的基因型或基因型组合所导致的基本特性的表达;b)其与该初始品种明显不同;以及c)除了衍生作用导致的差异外,其在该初始品种的基因型或基因型组合所导致的基本特性的表达方面与该初始品种一致。基本衍生的品种可通过例如选择天然或诱导的突变体、体细胞克隆变体、来自初始品种、回交或转化的植物的变体个体来获得。不同于某一品种的某一“株系”通常指非商业使用(例如在植物研究中使用)的一组植物。某一株系通常显示一种或多种感兴趣特征在个体之间的微小总体差异,但对于其他特征而言个体之间可能存在一些差异。

[0051] 本文提供的方法可用于产生:相比来自野生型植物的对应的植物部分或产物,具有升高的油酸含量和降低的亚油酸含量的植物部分(例如,种子)或植物产物(例如,油)。植物部分,或者植物产物的脂肪酸含量可采用标准方法评价,例如本文中实施例5中描述的那些。

[0052] 以下实施例进一步描述了本发明,这些实施例并不限制权利要求书所述的本发明范围。

实施例

[0053] 实施例1-工程改造序列特异性核酸酶以诱变FAD2-1A和FAD2-1B基因

[0054] 为了使大豆 (*G.max*) 中的FAD2-1A和FAD2-1B基因的等位基因完全失活或敲除, 设计了序列特异性核酸酶, 其靶向起始密码子附近的蛋白质编码区域。使用特异性鉴定TAL效应物核酸内切酶识别位点的软件 (如TALE-NT2.0 (Doyle等, *Nucleic Acids Res.* 40:W117-122, 2012)) 设计了八对TAL效应物核酸内切酶对, 以在编码序列的前500bp内靶向FAD2-1基因家族。FAD2-1基因的TAL效应物核酸内切酶识别位点在图1中带下划线并列于表1。使用与他处所述的那些方法类似的方法合成TAL效应物核酸内切酶 (Cermak等, *Nucleic Acids Res.* 39:e82, 2011; Reyon等, *Nat. Biotechnol.* 30:460-465, 2012; 和Zhang等, *Nat. Biotechnol.* 29:149-153, 2011)。

[0055] 实施例2-酵母中的FAD2-1TAL效应物核酸内切酶活性

[0056] 为评估靶向FAD2-1基因的TAL效应物核酸内切酶的活性, 通过与他处所述方法 (Christian等, *Genetics* 186:757-761, 2010) 类似的方法在酵母中进行活性试验。对于这些试验, 构建目的质粒, 其中将TAL效应物核酸内切酶识别位点克隆至非功能性 β -半乳糖苷酶报告基因中 (表2)。靶位点侧接 β -半乳糖苷酶编码序列的直接重复, 从而如果报告基因被TAL效应物核酸内切酶切割, 则在直接重复之间会发生重组并修复 β -半乳糖苷酶基因的功能。因此, β -半乳糖苷酶活性被用于测量TAL效应物核酸内切酶切割活性。结果总结在表3中。全部FAD2-1TAL效应物核酸内切酶对显示切割活性。将切割活性对基准核酸酶I-SceI进行标准化。

[0057] 表1

[0058] TAL效应物核酸内切酶靶序列

[0059]

基因	靶序列左	SEQ ID NO:	靶序列右	SEQ ID NO:
FAD2_T 01_C11	GCCACCACCTACTTCCACCTC CT	18	ATTGCATGGCCAATCT	19
FAD2_T 01_C40	GCCACCACCTACTTCCACCTC CT	20	ATTGCATGGCCAATCT	21
FAD2_T 02_C11	ACATTGCCACCACCTACTTCC ACCT	22	ATTGCATGGCCAATCT	23
FAD2_T 02_C40	ACATTGCCACCACCTACTTCC ACCT	24	ATTGCATGGCCAATCT	25
FAD2_T 03_C11	CTCATGGAAAATAAGCCAT	26	ACCGTGATGAAGTGT TTGTCCC	27
FAD2_T 03_C40	CTCATGGAAAATAAGCCAT	28	ACCGTGATGAAGTGT TTGTCCC	29

[0060]

FAD2_T 04_C11	ATTTCTCATGGAAAATAAGCC AT	30	ACCGTGATGAAGTGT TTGTCCC	31
FAD2_T 04_C40	ATTTCTCATGGAAAATAAGCC AT	32	ACCGTGATGAAGTGT TTGTCCC	33

[0061] 表2

[0062] 用于酵母试验的FAD2TAL效应物核酸内切酶靶序列

[0063]

TAL效应物核酸内切酶靶标*	TAL效应物核酸内切酶靶序列	SEQ ID NO:
FAD2靶标1	GCCACCACCTACTTCCACCTCCTTCCTCAAC CCTTTTCCTCATTGCATGGCCAATCT	34
FAD2靶标2	ACATTGCCACCACCTACTTCCACCTCCTTCCTCA ACCCTTTTCCTCATTGCATGGCCAATCT	35
FAD2靶标3	CTCATGGAAAATAAGCCATCGCCGCCATCACTCCA ACACAGGTTCCCTTGACCGTGATGAAGTGTTGTCCC	36
FAD2靶标4	ATTTCTCATGGAAAATAAGCCATCGccgcCATCACTCCA ACACAGGTTCCCTTGACCGTGATGAAGTGTTGTCCC	7

[0064] 表3

[0065] 酵母中的FAD2TAL效应物核酸内切酶活性

[0066]

TAL效应物核酸内切酶亚基	酵母中的活性*			
	FAD2_T 1	FAD2_T 2	FAD2_T 3	FAD2_T 4
FAD2_T01_左_C11	0.73	0.87	0.00	0.00
FAD2_T01_右_C11				
FAD2_T01_左_C40	0.79	0.73	0.00	0.00
FAD2_T01_右_C40				
FAD2_T02_左_C11	0.00	0.97	0.00	0.00
FAD2_T01_右_C11				

[0067]	FAD2_T02_左_C40	0.00	0.96	0.00	0.00
	FAD2_T01_右_C40				
	FAD2_T03_左_C11	0.00	0.00	0.65	0.53
	FAD2_T03_右_C11				
	FAD2_T03_左_C40	0.00	0.00	0.63	0.51
	FAD2_T03_右_C40				
	FAD2_T04_左_C11	0.00	0.00	0.00	0.54
	FAD2_T03_右_C11				
	FAD2_T04_左_C40	0.00	0.00	0.00	0.52
	FAD2_T03_右_C40				

[0068] *标准化至I-SceI (最大值=1.0)

[0069] 实施例3-大豆毛状根中的TAL效应物核酸内切酶表达和活性

[0070] 基于酵母中不同FAD2TAL效应物核酸内切酶的活性,选择两种不同支架中的四种TAL效应物核酸内切酶来进行大豆细胞中的表达:C40构架中的FAD2_T01,C40构架中的FAD2_T02,C40构架中的FAD2_T03,和C11构架中的FAD2_T04。这些TAL效应物核酸内切酶的活性以其在大豆中的内源性靶位点评估,采用他处所述的毛状根试验(Curtin等,Plant Physiology 156 (2):466-473,2011)。首先,将各TAL效应物核酸内切酶克隆进入T-DNA载体的雌二醇诱导型启动子的下游(Zuo等,Plant J.24:265-273,2000),然后转化进入发根土壤杆菌(Agrobacterium rhizogenes)的K599菌株(Govindarajulu等,Mol.Plant Microbe Interact.21:1027-1035,2008)。然后用带有不同TAL效应物核酸内切酶的发根土壤杆菌菌株感染大豆的半-子叶,并产生转基因毛状根。感染后三周,收集毛状根并在液氮中冷冻,之后采用标准方法制备基因组DNA(Murray等,Nucl.Acids Res.8 (19):4321-4325,1980)。

[0071] 为确定NHEJ介导的突变是否由TAL效应物核酸内切酶在大豆基因组的靶位点处产生,对来自九例毛状根的DNA进行PCR富集试验(Zhang等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 107 (26):12028-12033,2010)。该试验监测因NHEJ诱导的突变所致的TAL效应物核酸内切酶间隔子序列中的限制酶位点的损失。该试验中所用的限制酶位点示于图1(由小写字母表示)。源自表达FAD2_T01的三例毛状根样品的基因组DNA用MnII消化,以监测FAD2-1A基因座处的突变。采用HphI来监测由FAD2_T01所致的FAD2-1B处的突变。采用AciI来监测来自表达FAD2_T04的六例毛状根样品的消化的基因组DNA中的FAD2-1A和FAD2-1B基因座处的突变。消化之后,取一等份各反应物作为PCR模板,其中引物侧接在FAD2_T01或FAD2_T04靶位点。为了评估FAD2_T01活性,采用针对FAD2-1A和FAD2-1B具有特异性的引物进行分开的PCR反应。首先在1%琼脂糖凝胶上分析PCR产物以检验是否已发生扩增,然后用定位于分析的特定TAL效应物核酸内切酶的间隔子序列中的限制酶消化。然后在2%琼脂糖凝胶上分析该第二限制性消化反应,同时采用来自野生型样品的消化的和未消化的对照DNA。具有TAL效应物核酸内切酶诱导的NHEJ突变的样品可缺失间隔子序列中的限制酶位点,导致未消化的

PCR产物,其显示为凝胶上的全长条带。如图2所示,针对相同样品中的FAD2-1A,FAD2-1B或这两种基因观察到未消化的PCR产物。例如,图2C中的样品“b”显示突变存在于FAD2-1B中,图2B中的样品“d”显示突变存在于FAD2-1A中,而图2B和2D中的样品“f”显示突变存在于FAD2-1A和FAD2-1B中。

[0072] 未消化的PCR产物经克隆并测序以检验其是否包含间隔子序列中的TAL效应物核酸内切酶诱导的突变。PCR产物采用凯杰(Qiagen) TOP0克隆试剂盒,按照生产商说明克隆。对源自给定未消化的片段的给体克隆测序,并将DNA序列与野生型FAD2-1A或FAD2-1B序列比对。如图3中所示,多重、独立的缺失在FAD2-1A和FAD2-1B中恢复,大小为6-92个碱基对。

[0073] 实施例4-在FAD2基因中具有TAL效应物核酸内切酶诱导的突变的大豆植物的再生

[0074] 在检验FAD2_TAL01和FAD2_TAL04在内源性靶位点产生靶向改良之后,进行试验以产生FAD2-1A和FAD2-1B中带有突变的大豆植物。为了完成该试验,将四种FAD2-1TAL效应物核酸内切酶各克隆进入T-DNA载体,并通过花椰菜花叶病毒35S启动子或雌二醇诱导的XVE启动子系统来驱动TAL效应物核酸内切酶表达(Zuo等,同上)。T-DNA载体还包含条状可检测标志物,其对草铵膦有抗性。

[0075] 采用标准根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)转化方案来产生表达TAL效应物核酸内切酶的转基因大豆植物(Curtin等,同上)。在用大豆半子叶(品种Bert)增殖含有T-DNA的根癌土壤杆菌之后,再生了推定的转基因植物。将该植物转移至土壤中,并在生长约4周之后,从各植物收取小片叶片用于DNA提取和基因型分析。各DNA样品首先采用PCR筛选T-DNA的存在。然后对所有T-DNA-阳性植物进行T7E1试验已鉴定在FAD2-1A和FAD2-1B TAL效应物核酸内切酶识别位点处带有突变的植物(Kim等,Genome Res.19:1279-1288,2009)。简言之,产生跨越TAL效应物核酸内切酶识别位点的PCR产物,并对其变性以允许重新退火。当野生型DNA片段用载有TAL效应物核酸内切酶诱导的突变的片段退火时,向退火的产物添加T7E1核酸内切酶以切割产生的异源双链体,并通过琼脂糖凝胶电泳观察切割产物。如图4所示,四种植物显示TAL效应物核酸内切酶诱导的突变的证据(GM026-18,GM026-23,GM027-06和GM027-07)。此外,全部四种植物在FAD2-1A和FAD2-1B处均具有突变,指示两种基因同时诱变。全部再生植物的基因型分析数据示于表4B。

[0076] 为了确定叶组织中通过TAL效应物核酸内切酶引入的突变是否传递至下一代,从M0植物GM026-18,GM026-23和GM027-06收集种子。在各M1群体中,20-60例个体植物经基因型分析以确认突变的传递。FAD2-1A和FAD2-1B突变均在GM026-18的M1子代中隔离。相反,仅FAD2-1A或FAD2-1B突变被分别传递进入GM-026-23和GM027-6的M1子代。可遗传的突变的DNA序列示于图5。

[0077] 实施例5-由大豆FAD2基因中TAL效应物核酸内切酶诱导的突变产生的种子的脂肪酸概况分析

[0078] 使大豆株系GM026-18生长至成熟,并允许自花授粉,产生在FAD2-1A中纯合突变的种子(称为aaBB)或FAD2-1B中纯合突变的种子(称为AAbb),或对于FAD2-1A和FAD2-1B均为纯合型的种子(称为aabb)。分析这些种子的脂肪酸成分。简言之,粉碎个体大豆种子,并从磨细的组织的部分制备DNA,然后分析以建立各种子的基因型。利用脂肪酸甲基酯(FAME)气相色谱法对来自FAD2-1A纯合型(AAbb)、FAD2-1B纯合型(aaBB)或FAD2-1A/FAD2-1B双纯合型(aabb)敲除种子的剩余粉碎组织进行脂肪酸成分测定(Beuselinck等,Crop Sci.47:

747-750, 2006)。本分析的结果列于图6。如图所示,野生型植物和aaBB和AAbb株系显示相似的脂肪酸概况-约20%油酸和50%亚油酸。然而,对于FAD2-1A和FAD2-1B为纯合型突变的aabb株系显示大幅提高的油酸水平,约80%。aabb株系中的亚油酸水平大幅减少,少于3%。

[0079] 表4A

[0080] 再生植物和图4中分析的FAD2-1基因的列表

[0081]

泳道	DNA	基因
1	GM026-7a	FADII 1A
2	GM026-17	FADII 1A
3	GM026-18	FADII 1A
4	GM026-20	FADII 1A
5	GM026-23	FADII 1A
6	GM027-3	FADII 1A
7	GM027-6	FADII 1A
8	GM027-7	FADII 1A
9	GM027-10	FADII 1A
10	GM027-11	FADII 1A
11	GM008-6	FADII 1A
12	Bert野生型	FADII 1A
13	GM026-7a	FADII 1A未切
14	GM026-17	FADII 1A未切
15	GM026-18	FADII 1A未切
16	GM026-7a	FADII 1B
17	GM026-17	FADII 1B
18	GM026-18	FADII 1B
19	GM026-20	FADII 1B
20	GM026-23	FADII 1B
21	GM027-3	FADII 1B
22	GM027-6	FADII 1B
23	GM027-7	FADII 1B
24	GM027-10	FADII 1B
25	GM027-11	FADII 1B
26	GM008-6	FADII 1B
27	Bert野生型	FADII 1B
28	GM026-7a	FADII 1B未切

[0082]

29	GM026-17	FADII 1B未切
30	GM026-18	FADII 1B未切

[0083] 表4B

[0084] T0转基因大豆植物中的突变筛选

[0085]

	GM02 6-7a	GM02 6-17	GM02 6-18	GM02 6-20	GM02 6-23	GM0 27-3	GM0 27-6	GM0 27-7	GM02 7-10	GM02 7-11
FAD 2-1A	Wt	Wt	突变	Wt	突变	Wt	突变	突变	Wt	Wt
FAD 2-1B	Wt	Wt	突变	Wt	突变	Wt	突变	突变	Wt	Wt

[0086] *Wt表示野生型基因型,基于T7E1试验

[0087] 表5

[0088] 代表性FAD2-1A和FAD2-1B编码序列*

[0089]

FAD2-1A

ATGgtcatgatttcaactctctctaatactctccattcattttagttagtgcattatctttagattttcactacctggttta
 aaattgagggattgtagttctgttggtacatattacacattcagcaaaacaact
 gaaactcaactgaactgtttatactttgacacagGGTCTAGCAAAGGAAACAACAATG
 GGAGGTAGAGGTCGTGTGGCCAAAGTGGAAG
 TTCAAGGGAAGAAGCCTCTCTCAAGGGTTCCAAACACAAAGCCAC
 CATTCACTGTTGGCCAACTCAAGAAAGCAAT
 TCCACCACACTGCTTTCAGCGCTCCCTCCTCACTTCATTCTCCTAT
 GTTGTTTATGACCTTTCATTTGCCTTCATTTTCT
 ACATTGCCACCACCTACTTCCACCTCCTCCTCAACCCTTTTCCCT
 CATTGCATGGCCAATCTATTGGGTTCTCCAAGG
 TTGCCTTCTCACTGGTGTGTGGGTGATTGCTCACGAGTGTGGTCA
 CCATGCCTTCAGCAAGTACCAATGGGTTGATG
 ATGTTGTGGGTTTGACCCTTCACTCAACACTTTTAGTCCCTTATTT
 CTCATGGAAAATAAGCCATCGCCGCCATCACTC
 CAACACAGGTTCCCTTGACCGTGATGAAGTGTTTGTCCCAAAC

[0090]

CAAAATCCAAAGTTGCATGGTTTTCCAAGTACTT
AAACAACCCTCTAGGAAGGGCTGTTTCTCTTCTCGTCACACTCA
CAATAGGGTGGCCTATGTATTTAGCCTTCAATGT
CTCTGGTAGACCCTATGATAGTTTTGCAAGCCACTACCACCCTT
ATGCTCCCATATATTCTAACCGTGAGAGGCTTCT
GATCTATGTCTCTGATGTTGCTTTGTTTTCTGTGACTTACTCTCT
CTACCGTGTTGCAACCCTGAAAGGGTTGGTTTGG
CTGCTATGTGTTTATGGGGTGCCTTTGCTCATTGTGAACGGTTT
TCTTGTGACTATCACATATTTGCAGCACACACAC
TTTGCCTTGCCTCATTACGATTCATCAGAATGGGACTGGCTGAA
GGGAGCTTTGGCAACTATGGACAGAGATTATGG
GATTCTGAACAAGGTGTTTCATCACATAACTGATACTCATGTGG
CTCACCATCTCTTCTCTACAATGCCACATTACCA
TGCAATGGAGGCAACCAATGCAATCAAGCCAATATTGGGTGAG
TACTACCAATTTGATGACACACCATTTTACAAG
GCACTGTGGAGAGAAGCGAGAGAGTGCCTCTATGTGGAGCCAG
ATGAAGGAACATCCGAGAAGGGCGTGTATTGGT
ACAGGAACAAGTATTGA (SEQ ID NO:38)

FAD2-1B

ATGgtcatgatttcaactctctetaatctgtcaacttccctccattcattttgtacttctcatattttcaacttctg
gttgaaaattgtagttctcttggtacatactagiattagacattcagcaacaacaactgaa
ctgaacttctttatactttgacacagGGTCTAGCAAAGGAAACAATAATGGGAG
GTGGAGGCCGTGTGGCCAAAGTTGAAATTCAGCAG
AAGAAGCCTCTCTCAAGGGTTCCAAACACAAAGCCACCATTCA
CTGTTGGCCAACTCAAGAAAGCCATTCCACCGCACT
GCTTTCAGCGTTCCCTCCTCACTTCATTGTCCTATGTTGTTTAT
GACCTTTCATTGGCTTTCATTTTCTACATTGCCACCAC
CTACTTCCACCTCCTCCCTCACCCCTTTTCCCTCATTGCATGGC
CAATCTATTGGGTTCTCCAAGGTTGCATTCTTACTGG
CGTGTGGGTGATTGCTCACGAGTGTGGTCACCATGCCTTCAGC
AAGTACCCATGGGTTGATGATGTTATGGGTTTGACC

[0091]

GTTCACTCAGCACTTTTAGTCCCTTATTTCTCATGGAAAATAA
GCCATCGCCGCCACCACTCCAACACGGGTTCCTTGA
CCGTGATGAAGTGTTTGTCCCAAACCAAATCCAAAGTTGC
ATGGTACACCAAGTACCTGAACAACCCTCTAGGAAGG
GCTGCTTCTCTTCTCATCACACTCACAATAGGGTGGCCTTTGT
ATTTAGCCTTCAATGTCTCTGGCAGACCCTATGATGG
TTTTGCTAGCCACTACCACCCTTATGCTCCCATATATTCAAAT
CGTGAGAGGCTTTTGATCTATGTCTCTGATGTTGCTT
TGTTTTCTGTGACTTACTTGCTCTACCGTGTTGCAACTATGAA
AGGGTTGGTTTGGCTGCTATGTGTTTATGGGGTGCCA
TTGCTCATTGTGAACGGTTTTCTTG TGACCATCACATATCTGC
AGCACACACACTATGCCTTGCCTCACTATGATTCATC
AGAATGGGATTGGCTGAGGGGTGCTTTGGCAACTATGGACAG
AGATTATGGAATTCTGAACAAGGTGTTTCACCACAT
AACTGATACTCATGTGGCTCACCATCTTTTCTCTACAATGCC
ACATTACCATGCAACGGAGGCAACCAATGCAATGAAG
CCAATATTGGGTGAGTACTACCGATTTGATGACACACCATT
TTACAAGGCACTGTGGAGAGAAGCAAGAGAGTGCCTCT
ATGTGGAGCCAGATGAAGGAACATCCGAGAAGGGCGTGTA
TTGGTACAGGAACAAGTATTGA (SEQ ID NO:39)

[0092] *内含子序列以小写字母表示

[0093] 实施例6-不含转基因的突变的大豆株系的生成

[0094] 为获得具有FAD2-1突变但缺乏FAD2_T04TAL效应物核酸内切酶构建体及其相关可选择标志物的大豆株系,对GM026-18的子代筛选aabb基因型。然后采用PCR策略寻找突变的、不含转基因的隔离物,该PCR策略采用两组引物对:一组跨越TAL效应物核酸内切酶编码序列,而另一组是内源性大豆醇脱氢酶基因(PCR反应的对照;图7)。分析了十五种aabb子代,六种显示其基因组中没有TALEN序列的证据,表明TAL效应物核酸内切酶构建体已在这些植物中被隔离开。这些结果指示采用FAD2-1A和FAD2-1B基因中的突变产生不含转基因的株系的可行性。

[0095] 其他实施方式

[0096] 应理解虽然本发明已结合其详述进行描述,但以上描述意在说明而不是限制本发明的范围,该范围由所附权利要求的范围限定。其他方面、优点和修改在以下权利要求的范围内。

序列表

<110> 塞尔克蒂斯股份有限公司(Collectis)

<120> 通过靶向敲除 FAD2-1A/1B 基因来改良大豆油成分

<130> 36861-0002W01

<150> 61/885, 213

<151> 2013-10-01

<150> 61/790, 655

<151> 2013-03-15

<160> 39

<170> FastSEQ 用于 Windows 4.0 版

<210> 1

<211> 289

<212> DNA

<213> 大豆(Glycine max)

<400> 1

```
ttcattttct acattgccac cacctacttc caccctcttc ctcaaccctt ttccttcatt 60
gcatggccaa tctattgggt tctccaaggt tgccttctca ctggtgtgtg ggtgattgct 120
cacgagtgtg gtcaccatgc cttcagcaag taccaatggg ttgatgatgt tgtgggtttg 180
acccttcact caacaatttt agtcccttat ttctcatgga aaataagcca tcgccgccat 240
cactccaaca caggttccct tgaccgtgat gaagtgtttg tcccaaac 289
```

<210> 2

<211> 289

<212> DNA

<213> 大豆(Glycine max)

<400> 2

```
ttcattttct acattgccac cacctacttc caccctcttc ctcaaccctt ttccttcatt 60
gcatggccaa tctattgggt tctccaaggt tgcattctta ctggcgtgtg ggtgattgct 120
cacgagtgtg gtcaccatgc cttcagcaag taccaatggg ttgatgatgt tatgggtttg 180
accgttcact cagcaatttt agtcccttat ttctcatgga aaataagcca tcgccgccac 240
cactccaaca cgggttccct tgaccgtgat gaagtgtttg tcccaaac 289
```

[0001]

<210> 3
<211> 76
<212> DNA
<213> 大豆(Glycine max)

<400> 3
gccaccacct acttccacct ccttcctcaa cctttttecc tcattgcatg gccaatctat 60
tgggttctcc aagggt 76

<210> 4
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 4
gccaccacct acttccacct ccttcctcaa gattgccaat ctattgggtt ctccaagggt 60

[0002] <210> 5
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 5
gcatggccaa tctattgggt tctccaaggt t 31

<210> 6
<211> 62
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 6
gccaccacct acttccacct cctccctcat tgcattggcca atctattggg ttctccaagg 60
tt 62

	<210> 7	
	<211> 76	
	<212> DNA	
	<213> 大豆(Glycine max)	
	<400> 7	
	atttctcatg gaaaataagc catcgccgcc atcactccaa cacaggctcc cttgaccgtg	60
	atgaagtgtt tgtccc	76
	<210> 8	
	<211> 68	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 8	
	atttctcatg gaaaataagc catcgccgcc atcactccaa cacttgaccg tgatgaagtg	60
	tttgtccc	68
[0003]	<210> 9	
	<211> 46	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 9	
	atttctcatg gaaaataagc catcgccgcg atgaagtgtt tgtccc	46
	<210> 10	
	<211> 70	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 10	
	atttctcatg gaaaataagc catcgccgcc accactccaa cacccttgac cgtgatgaag	60
	tgtttgtccc	70

	<210> 11	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 11	
	tgaagtgttt gtcce	15
	<210> 12	
	<211> 54	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 12	
	atttctcatg gaaaataaca cgggttcct tgaccgtgat gaagtgttg tccc	54
[0004]	<210> 13	
	<211> 77	
	<212> DNA	
	<213> 大豆(Glycine max)	
	<400> 13	
	atttctcatg gaaaataage catcgccgcc atcactccaa cacagggtcc cttgaccgtg	60
	atgaagtgtt tgtccca	77
	<210> 14	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 14	
	cttgaccgtg atgaagtgtt tgtccca	27
	<210> 15	
	<211> 77	

	<212> DNA	
	<213> 大豆(Glycine max)	
	<400> 15	
	atttctcatg gaaaataagc catcgccgcc accactccaa cacgggttcc ettgaccgtg	60
	atgaagtgtt tgtecca	77
	<210> 16	
	<211> 54	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 16	
	atttctcatg gaaaataagc catcgccctt gaccgtgatg aagigtgtgt ccca	54
	<210> 17	
	<211> 63	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0005]	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 17	
	atttctcatg gaaaataagc catcgccctca gggtcccttg accgtgatga agtggttgte	60
	cca	63
	<210> 18	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 大豆(Glycine max)	
	<400> 18	
	gccaccacct acttcacct cet	23
	<210> 19	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 大豆(Glycine max)	
	<400> 19	

	attgcatggc caatct	16
	<210> 20	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 大豆 (Glycine max)	
	<400> 20	
	gccaccacct acttcacct ect	23
	<210> 21	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 大豆 (Glycine max)	
	<400> 21	
	attgcatggc caatct	16
	<210> 22	
	<211> 25	
	<212> DNA	
[0006]	<213> 大豆 (Glycine max)	
	<400> 22	
	acattgccac cacctacttc cacct	25
	<210> 23	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 大豆 (Glycine max)	
	<400> 23	
	attgcatggc caatct	16
	<210> 24	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 大豆 (Glycine max)	
	<400> 24	
	acattgccac cacctacttc cacct	25
	<210> 25	
	<211> 16	

	<212> DNA	
	<213> 大豆(Glycine max)	
	<400> 25	
	attgcatggc caatct	16
	<210> 26	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 大豆(Glycine max)	
	<400> 26	
	ctcatggaaa ataagccat	19
	<210> 27	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 大豆(Glycine max)	
	<400> 27	
	accgtgatga agtgtttgtc cc	22
[0007]	<210> 28	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 大豆(Glycine max)	
	<400> 28	
	ctcatggaaa ataagccat	19
	<210> 29	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 大豆(Glycine max)	
	<400> 29	
	accgtgatga agtgtttgtc cc	22
	<210> 30	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 大豆(Glycine max)	
	<400> 30	

	atttctcatg gaaaataagc cat	23
	<210> 31	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 大豆(Glycine max)	
	<400> 31	
	accgtgatga agtgtttgtc cc	22
	<210> 32	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 大豆(Glycine max)	
	<400> 32	
	atttctcatg gaaaataagc cat	23
	<210> 33	
	<211> 22	
	<212> DNA	
[0008]	<213> 大豆(Glycine max)	
	<400> 33	
	accgtgatga agtgtttgtc cc	22
	<210> 34	
	<211> 58	
	<212> DNA	
	<213> 大豆(Glycine max)	
	<400> 34	
	gccaccacct atttcacct ccttcctcaa cctttttccc tcattgcatt gccaatct	58
	<210> 35	
	<211> 63	
	<212> DNA	
	<213> 大豆(Glycine max)	
	<400> 35	
	acattgccac cacctacttc cacctccttc ctcaaccctt ttcctcatt geatggccaa	60
	tct	63
	<210> 36	

<211> 72

<212> DNA

<213> 大豆(Glycine max)

<400> 36

```
ctcatggaaa ataageccatc gccgceatca ctccaacaca ggttcccttg accgtgatga 60
agtgtttgtc cc 72
```

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 共有序列

<400> 37

```
Leu Ala Gly Leu Ile Asp Ala Asp Gly
1          5
```

[0009]

<210> 38

<211> 1331

<212> DNA

<213> 大豆(Glycine max)

<400> 38

```
atggtcatga tttaactctc tetaatctct ccattcattt tgtagttgtc attatcttta 60
gattttttcac tacctggttt aaaattgagg gattgtagtt ctgttggtac atattacaca 120
ttcagcaaaa caactgaaac tcaactgaac ttgtttatac ttgacacag ggtctagcaa 180
aggaaacaac aatgggaggt agaggtegtg tggccaaagt ggaagttcaa gggaagaagc 240
ctctctcaag gggttcaaac acaaagccac cattcactgt tggccaacac aagaaagcaa 300
ttccaccaca ctgctttcag cgtctccctc tcacttcatt ctctatgtt gtttatgacc 360
tttcatttgc cttaattttc tacattgcca ccacctactt ccacctcctt cctcaaccct 420
tttccctcat tgcattgcca atctattggg ttctccaagg ttgccttctc actggtgtgt 480
gggtgattgc tcacgagtgt ggtaaccatg ccttcagcaa gtaccaatgg gttgatgatg 540
ttgtgggttt gacccttcac tcaacaattt tagtccctta ttctcatgg aaaataagcc 600
atcgccgcca tcaactcaac acaggttccc ttgaccgtga tgaagtgttt gtcccaaaac 660
caaaatccaa agttgcatgg ttttccaagt acttaaaaca cctctagga agggctgttt 720
ctcttctcgt cacactcaca atagggtggc ctatgtattt agccttcaat gtctctggta 780
gacctatga tagttttgca agccactacc acccttatgc tcccatatat tctaacctgt 840
agaggcttct gatctatgtc tctgatgttg ctttgttttc tctgacttac tctctctacc 900
gtgttgcaac cctgaaaggg ttggtttggc tgetatgtgt ttatgggggtg cctttgtcca 960
ttgtgaacgg tttctttgtg actatcaca atttgeagca cacacacttt gccttgcctc 1020
```

```

attacgattc atcagaatgg gactggctga agggagcttt ggcaactatg gacagagatt 1080
atgggattct gaacaagggt tttcatcaca taactgatac tcatgtggct caccatctct 1140
tctctacaat gccacattac catgcaatgg aggcaaccaa tgcaatcaag ccaatattgg 1200
gtgagtacta ccaatttgat gacacaccat tttaacaagg actgtggaga gaagegagag 1260
agtgcctcta tgtggagcca gatgaaggaa catecgagaa gggcgtgtat tggtagagga 1320
acaagtattg a
1331

```

<210> 39

<211> 1324

<212> DNA

<213> 大豆(Glycine max)

<400> 39

```

[0010] atgggtcatga tttcactctc tctaactctgt cacttccctc cattcatitt gtacttctca 60
tatttttcaac ttcttggttg aaaattgtag ttctcttggt acatactagt attagacatt 120
cagcaacaac aactgaactg aacttcttta tactttgaca cagggtctag caaaggaaac 180
aataatggga ggtggaggcc gtgtggccaa agttgaaatt cagcagaaga agcctctctc 240
aagggttcca aacacaaagc caccattcac tgttggccaa ctcaagaaag ccattccacc 300
gcactgcttt cagcgttccc tctcacttcc attgtcctat gttgtttatg acctttcatt 360
ggcttttcatt ttctacattg ccaccacctc ctccacctc ctccctcacc ccttttccct 420
cattgcatgg ccaatctatt gggttctcca aggttgcatt ctactggcg tgtgggtgat 480
tgctcacgag tgtggtcacc atgccctcag caagtaccca tgggttgatg atgttatggg 540
tttgaccgtt cactcageac ttttagtccc ttatttctca tggaaaataa gccatgcgcg 600
ccaccactcc aacacgggtt ccttgaccg tgatgaagtg ttgttcccaa aaccaaate 660
caaagttgca tggtagacca agtacctgaa caacctctc ggaagggtg cttctctct 720
catcacactc acaatagggt gccctttgta tttagccttc aatgtctctg gcagacccta 780
tgatggtttt gctagccact accaccctta tgctcccata tattcaaate gtgagaggct 840
tttgatctat gtctctgatg ttgctttgtt ttctgtgact tacttgcct accgtgttgc 900
aactatgaaa gggtttggtt ggctgctatg tgtttatggg gtgccattgc tcattgtgaa 960
cggttttctt gtgaccatca catactgca gcacacacac tatgccttgc ctactatga 1020
ttcatcagaa tgggattggc tgaggggtgc tttggcaact atggacagag attatggaat 1080
tctgaacaag gtgtttcacc acataactga tactcatgtg gctcaccatc ttttctctac 1140
aatgccacat taccatgcaa cggaggcaac caatgcaatg aagccaatat tgggtgagta 1200
ctaccgattt gatgacacac cattttaca ggcactgtgg agagaagcaa gagagtgcct 1260
ctatgtggag ccagatgaag gaacatccga gaaggcgtg tatttgtaca ggaacaagta 1320
ttga
1324

```

FAD2_1A_T1
 TTCAATTTTCTACATTGCCACCACCTACTTCCACCTCCCTTCCCTCAACCCCTTTTCcctcaTTGCAATGGCCAATCTATTGGGTTC
 TCCAAGGTTGCCCTTCTCACTGGTGTGGTGATTGCTCAGAGTGTGGTCACCATGCCCTTCAGCAAGTACCAATGGG
 TTGATGATGTTGTGGTTTGACCCCTTCACTCAACACTTTTAGTCCCTTATTCTCATGGAATAAGCCATCGccgcCATC
 ACTCCAACACAGGTTCCCTTGACCGTGATGAAGTGTTGTCCCAAAC (SEQ ID NO:1)

FAD2_1A_T2
 TTCAATTTTCTACATTGCCACCACCTACTTCCACCTCCCTTCCCTCAACCCCTTTTCcctcaTTGCAATGGCCAATCTATTGGGTTC
 TCCAAGGTTGCCCTTCTCACTGGTGTGGTGATTGCTCAGAGTGTGGTCACCATGCCCTTCAGCAAGTACCAATGGG
 TTGATGATGTTGTGGTTTGACCCCTTCACTCAACACTTTTAGTCCCTTATTCTCATGGAATAAGCCATCGccgcCATC
 ACTCCAACACAGGTTCCCTTGACCGTGATGAAGTGTTGTCCCAAAC (SEQ ID NO:1)

FAD2_1A_T3
 TTCAATTTTCTACATTGCCACCACCTACTTCCACCTCCCTTCCCTCAACCCCTTTTCcctcaTTGCAATGGCCAATCTATTGGGTTC
 TCCAAGGTTGCCCTTCTCACTGGTGTGGTGATTGCTCAGAGTGTGGTCACCATGCCCTTCAGCAAGTACCAATGGG
 TTGATGATGTTGTGGTTTGACCCCTTCACTCAACACTTTTAGTCCCTTATTCTCATGGAATAAGCCATCGccgcCATC
 ACTCCAACACAGGTTCCCTTGACCGTGATGAAGTGTTGTCCCAAAC (SEQ ID NO:1)

FAD2_1A_T4
 TTCAATTTTCTACATTGCCACCACCTACTTCCACCTCCCTTCCCTCAACCCCTTTTCcctcaTTGCAATGGCCAATCTATTGGGTTC
 TCCAAGGTTGCCCTTCTCACTGGTGTGGTGATTGCTCAGAGTGTGGTCACCATGCCCTTCAGCAAGTACCAATGGG
 TTGATGATGTTGTGGTTTGACCCCTTCACTCAACACTTTTAGTCCCTTATTCTCATGGAATAAGCCATCGccgcCATC
 ACTCCAACACAGGTTCCCTTGACCGTGATGAAGTGTTGTCCCAAAC (SEQ ID NO:1)

图1A

FAD2_1B_T1
 TTCAATTTTCTACATTGCCACCACCTACTTCCACCCTCCTCCCTaccCCTTTCCCTCATTTGCATGGCCAAATCTATTGGGTTCT
 CCAAGGTTGCATTCTTACTGGCGTGTGGGTGATTGCTCACGAGTGTGGTCACCATGCCCTTCAGCAAGTACCCATGGGTT
 GATGATGTTATGGGTTTGACCGTTCACTCAGCACCTTTAGTCCCTTATTTCTCATGGAAAATAAGCCATCGccgcCACCACCT
 CCAACACGGGTTCCCTTGACCGTGATGAAGTGTGTGCCAAAAC (SEQ ID NO:2)

FAD2_1B_T2
 TTCAATTTTCTACATTGCCACCACCTACTTCCACCCTCCTCCCTaccCCTTTCCCTCATTTGCATGGCCAAATCTATTGGGTTCT
 CCAAGGTTGCATTCTTACTGGCGTGTGGGTGATTGCTCACGAGTGTGGTCACCATGCCCTTCAGCAAGTACCCATGGGTT
 GATGATGTTATGGGTTTGACCGTTCACTCAGCACCTTTAGTCCCTTATTTCTCATGGAAAATAAGCCATCGccgcCACCACCT
 CCAACACGGGTTCCCTTGACCGTGATGAAGTGTGTGCCAAAAC (SEQ ID NO:2)

FAD2_1B_T3
 TTCAATTTTCTACATTGCCACCACCTACTTCCACCCTCCTCCCTaccCCTTTCCCTCATTTGCATGGCCAAATCTATTGGGTTCT
 CCAAGGTTGCATTCTTACTGGCGTGTGGGTGATTGCTCACGAGTGTGGTCACCATGCCCTTCAGCAAGTACCCATGGGTT
 GATGATGTTATGGGTTTGACCGTTCACTCAGCACCTTTAGTCCCTTATTTCTCATGGAAAATAAGCCATCGccgcCACCACCT
 CCAACACGGGTTCCCTTGACCGTGATGAAGTGTGTGCCAAAAC (SEQ ID NO:2)

FAD2_1B_T4
 TTCAATTTTCTACATTGCCACCACCTACTTCCACCCTCCTCCCTaccCCTTTCCCTCATTTGCATGGCCAAATCTATTGGGTTCT
 CCAAGGTTGCATTCTTACTGGCGTGTGGGTGATTGCTCACGAGTGTGGTCACCATGCCCTTCAGCAAGTACCCATGGGTT
 GATGATGTTATGGGTTTGACCGTTCACTCAGCACCTTTAGTCCCTTATTTCTCATGGAAAATAAGCCATCGccgcCACCACCT
 CCAACACGGGTTCCCTTGACCGTGATGAAGTGTGTGCCAAAAC (SEQ ID NO:2)

图1B

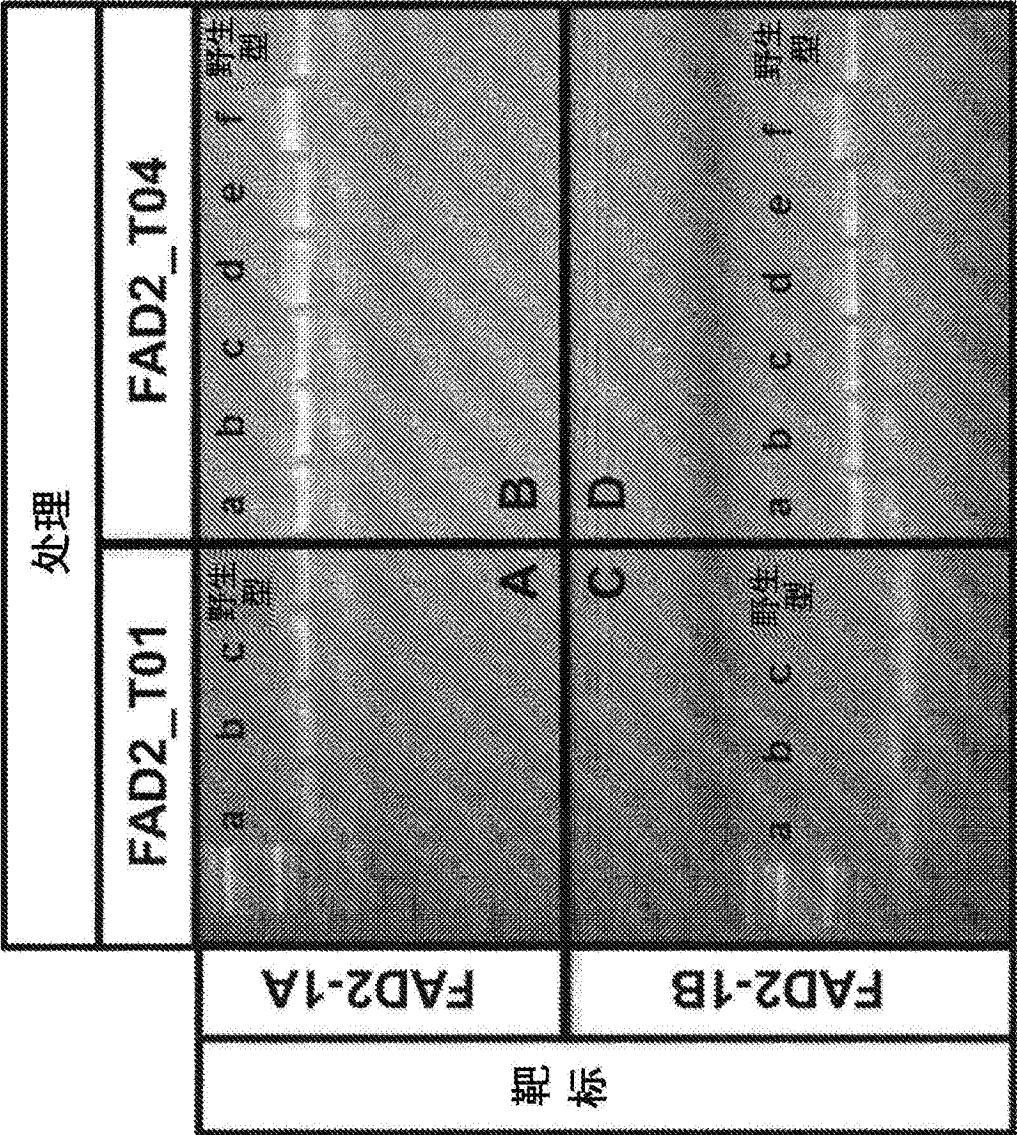


图2

	缺失/插入	SEQ ID NO:
FAD2-1A (FAD2_T1_C40)		
<u>GCCACCACTACTTCCACCTCCCTTCCTCAACCCCTTTTCCCTCATTTGCATGGCCAATCTATTGGGTTCTCCAAGGTT</u>	0	3
<u>GCCACCACTACTTCCACCTCCCTTCCCTCAA-----GATT-----GCCAATCTATTGGGTTCTCCAAGGTT</u>	-16/+4	4
<u>GC-----ATGGCCAATCTATTGGGTTCTCCAAGGTT</u>	-45	5
FAD2-1B (FAD2_T1_C40)		
<u>GCCACCACTACTTCCACCTCCCTCCCTCACCCTTTTCCCTCATTTGCATGGCCAATCTATTGGGTTCTCCAAGGTT</u>	0	3
<u>GCCACCACTACTTCCACCTCCCTCCCTCA-----TTGCATGGCCAATCTATTGGGTTCTCCAAGGTT</u>	-14	6
FAD2-1A (FAD2_T4_C11)		
<u>ATTTCTCATGGAAAATAAGCCATCGCGGCCATCACTCCAACACACAGGTTCCCTTGACCGTGATGAAGTGTTTGTCCC</u>	0	7
<u>ATTTCTCATGGAAAATAAGCCATCGCGGCCATCACTCCAACAC-----TTGACCGTGATGAAGTGTTTGTCCC</u>	-8	8
<u>ATTTCTCATGGAAAATAAGCCATCGCGGC-----GATGAAGTGTTTGTCCC</u>	-30	9
FAD2-1B (FAD2_T4_C11)		
<u>ATTTCTCATGGAAAATAAGCCATCGCGGCCATCACTCCAACACAGGTTCCCTTGACCGTGATGAAGTGTTTGTCCC</u>	0	7
<u>ATTTCTCATGGAAAATAAGCCATCGCGGCCACCACTCCAACAC-----CCTTGACCGTGATGAAGTGTTTGTCCC</u>	-6	10
<u>ATTTCTCATGGAAAATAA-----TGAAGTGTTTGTCCC</u>	-92	11
<u>ATTTCTCATGGAAAATAA-----CACGGTTCCCTTGACCGTGATGAAGTGTTTGTCCC</u>	-22	12

图3

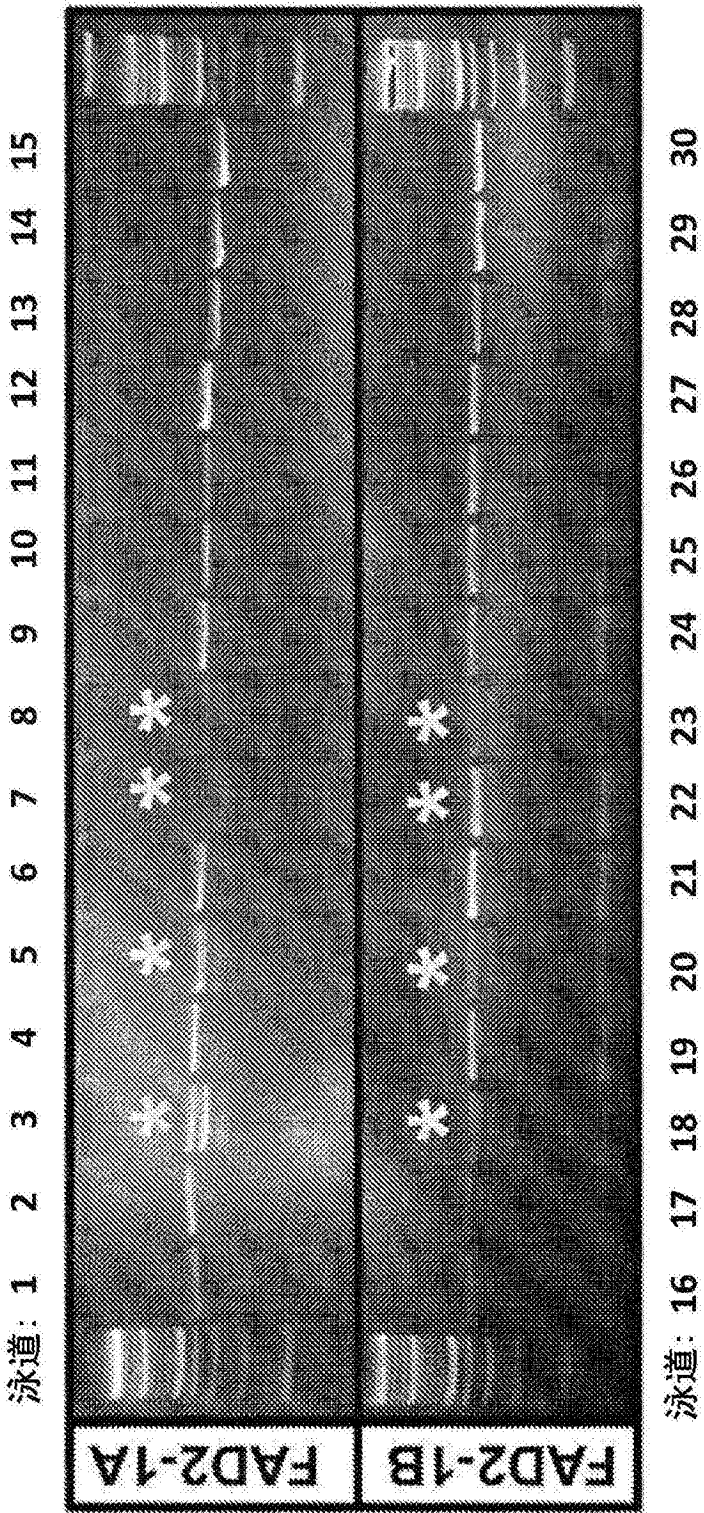


图4

GM026-18	
序列 (FAD2-1A)	SEQ ID NO:
ATTTCATGGGAAATAAGCCATCGCCGCCATCACTCCAACACAGGTCCCTTGACCGTGATGAAGTGTGTGCCCCA	13
-----CTTGACCGTGATGAAGTGTGTGCCCCA	14
序列 (FAD2-1B)	
ATTTCATGGGAAATAAGCCATCGCCGCCACCACCTCCAACACAGGGTCCCTTGACCGTGATGAAGTGTGTGCCCCA	15
ATTTCATGGGAAATAAGCCATCGCC-----CTTGACCGTGATGAAGTGTGTGCCCCA	16
GM026-23	
序列 (FAD2-1A)	
ATTTCATGGGAAATAAGCCATCGCCGCCATCACTCCAACACAGGTCCCTTGACCGTGATGAAGTGTGTGCCCCA	13
ATTTCATGGGAAATAAGCCATCGCC-----T-----CAGGTCCCTTGACCGTGATGAAGTGTGTGCCCCA	17
GM027-06	
序列 (FAD2-1B)	
ATTTCATGGGAAATAAGCCATCGCCGCCACCACCTCCAACACAGGGTCCCTTGACCGTGATGAAGTGTGTGCCCCA	15
ATTTCATGGGAAATAAGCCATCGCC-----CTTGACCGTGATGAAGTGTGTGCCCCA	16

图5

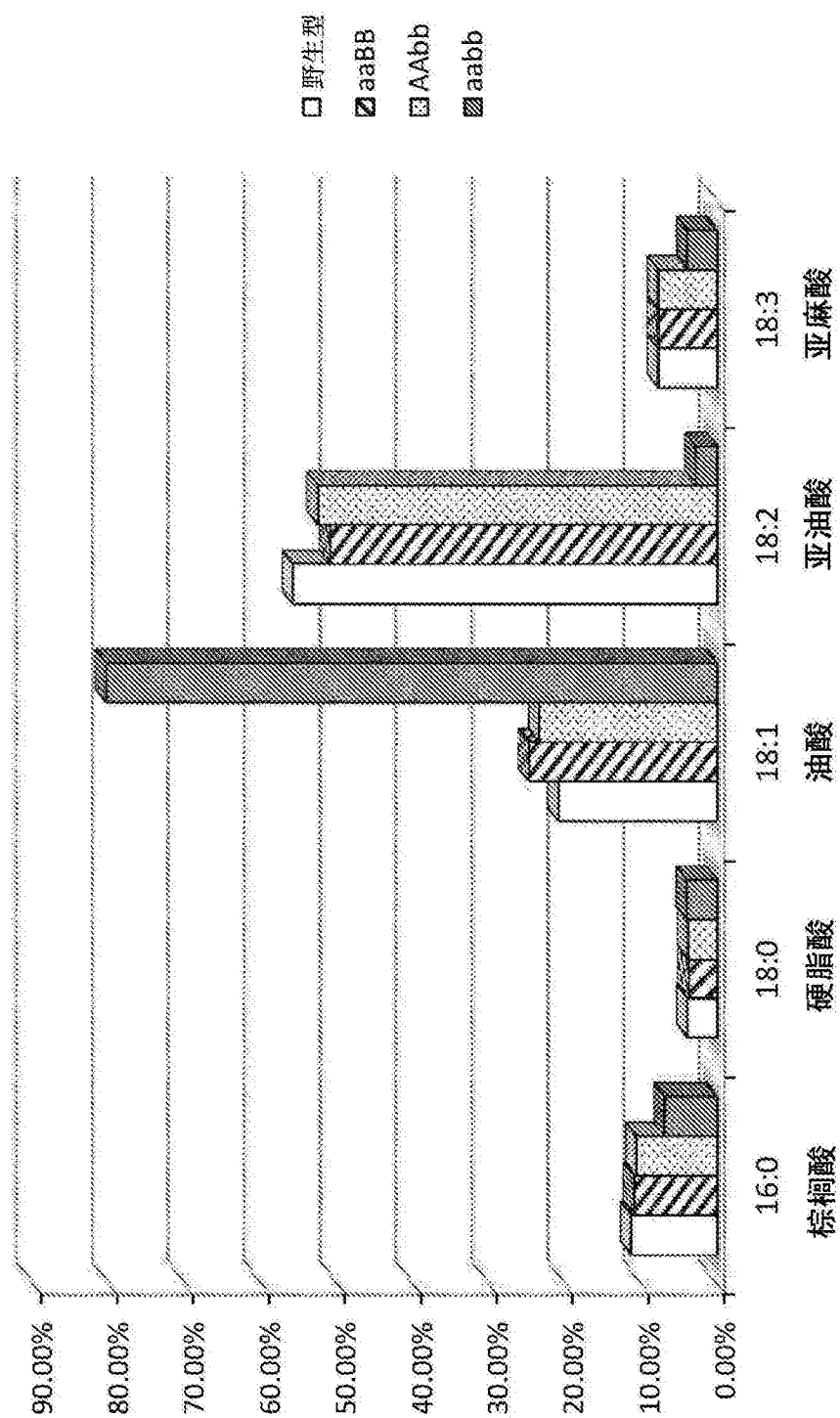


图6

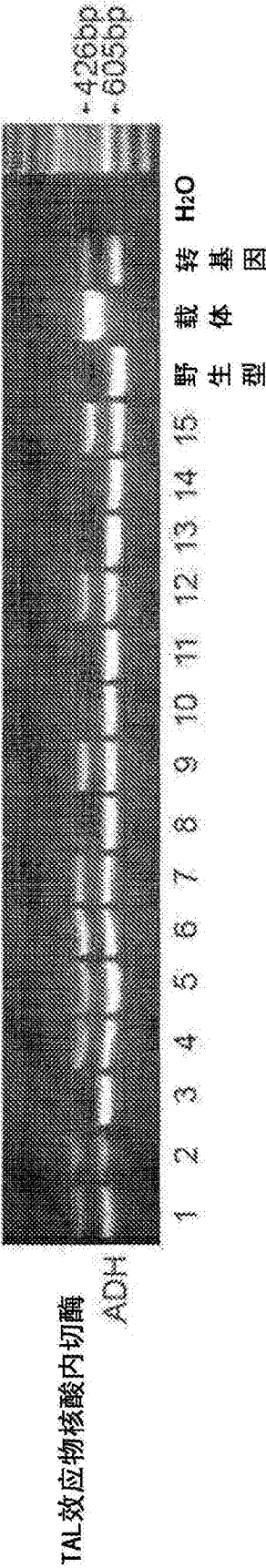


图7