



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108135145 A

(43)申请公布日 2018.06.08

(21)申请号 201680060199.4

(22)申请日 2016.10.13

(30)优先权数据

15190256.6 2015.10.16 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.04.13

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/074560 2016.10.13

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2017/064173 EN 2017.04.20

(83)生物保藏信息

NCIMB 42464 2015.10.05

NCIMB 42465 2015.10.05

(71)申请人 拜耳作物科学公司

地址 比利时迪海姆

(72)发明人 F·拉默恩 M·博茨 B·拉加

R-C·施密特 J·施密特

C·穆谢尔

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 凌立 黄革生

(51)Int.Cl.

A01H 5/10(2018.01)

C12N 9/06(2006.01)

C12N 15/82(2006.01)

权利要求书3页 说明书60页

序列表53页 附图2页

(54)发明名称

在种子生产中具有改变的性质的芸苔属植物

(57)摘要

本发明涉及具有增加的花数、荚数,和增加的千粒重(TSW)的植物。更具体地说,本发明涉及其中细胞分裂素氧化酶5或细胞分裂素氧化酶5和3的表达功能性减少的芸苔属植物。提供了包含突变CKX等位基因的芸苔属植物,以及其中CKX表达减少的芸苔属植物。还提供了生产具有增加的花数、荚数或TSW的芸苔属植物的方法和手段。

```

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

```

1. 一种包含至少一个CKX5基因的芸苔属植物,在其基因组中包含至少一个突变CKX5等位基因,其中所述突变CKX5等位基因是CKX5基因的突变等位基因,其包含选自以下的核酸序列:

- (a) 与SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:23具有至少90%序列同一性的核苷酸序列;
- (b) 包含与SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:23具有至少90%序列同一性的编码序列的核苷酸序列;和
- (c) 编码与SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:24具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的核苷酸序列。

2. 根据权利要求1所述的植物,其是包含两个CKX5基因的芸苔属植物,所述芸苔属植物选自欧洲油菜、芥菜和埃塞俄比亚芥。

3. 根据权利要求1或2所述的植物,其中所述突变CKX5等位基因选自:

- (a) 在对应于SEQ ID NO:19的位置465或SEQ ID NO:20的位置465的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因;
- (b) 在对应于SEQ ID NO:19的位置399或SEQ ID NO:20的位置399的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因;和
- (c) 在对应于SEQ ID NO:22的位置465或SEQ ID NO:23的位置399的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的植物,在其基因组中进一步包含至少两个CKX3基因,进一步包含至少两个突变CKX3等位基因,其中所述突变CKX3等位基因是包含选自以下的核酸序列的CKX3基因的突变等位基因:

- (a) 与SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:16具有至少90%序列同一性的核苷酸序列;
- (b) 包含与SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:17具有至少90%序列同一性的编码序列的核苷酸序列;和
- (c) 编码与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的核苷酸序列。

5. 根据权利要求3或4所述的植物,其是包含四个CKX3基因的芸苔属植物,所述芸苔属植物选自欧洲油菜、芥菜和埃塞俄比亚芥。

6. 根据权利要求5所述的植物,其中所述突变CKX3等位基因选自以下:

在对应于SEQ ID NO:7的位置2244或SEQ ID NO:8的位置1093的位置包含C至T取代的突变CKX3等位基因;

在对应于SEQ ID NO:10的位置2482或SEQ ID NO:11的位置1168的位置包含C至T取代的突变CKX3等位基因;

在对应于SEQ ID NO:13的位置1893或SEQ ID NO:14的位置876的位置包含G至A取代的突变CKX3等位基因;

在对应于SEQ ID NO:16的位置2171或SEQ ID NO:17的位置982的位置包含C至T取代的突变CKX3等位基因。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的植物,其具有增加的单株花数或增加的单株荚数或增加的主枝上荚数或具有增加的千粒重。

8. 权利要求1至7中任一一项的植物的植物细胞、荚、种子或子代。
9. 一种芸苔属CKX3或CKX5基因的突变等位基因,其中所述CKX5基因选自以下:
- (a) 与SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:23具有至少90%序列同一性的核苷酸序列;
 - (b) 包含与SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:23具有至少90%序列同一性的编码序列的核苷酸序列;和
 - (c) 编码与SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:24具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的核苷酸序列;并且其中所述CKX3基因选自以下
 - (d) 与SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:16具有至少90%序列同一性的核苷酸序列;
 - (e) 包含与SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:17具有至少90%序列同一性的编码序列的核苷酸序列;和
 - (f) 编码与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的核苷酸序列。
10. 根据权利要求9所述的突变等位基因,选自以下:
- a. 在对应于SEQ ID NO:19的位置465或SEQ ID NO:20的位置465的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因;
 - b. 在对应于SEQ ID NO:19的位置399或SEQ ID NO:20的位置399的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因;和
 - c. 在对应于SEQ ID NO:22的位置465或SEQ ID NO:23的位置399的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因;
 - d. 在对应于SEQ ID NO:7的位置2244或SEQ ID NO:8的位置1093的位置包含C至T取代的突变CKX3等位基因;
 - e. 在对应于SEQ ID NO:10的位置2482或SEQ ID NO:11的位置1168的位置包含C至T取代的突变CKX3等位基因;
 - f. 在对应于SEQ ID NO:13的位置1893或SEQ ID NO:14的位置876的位置包含G至A取代的突变CKX3等位基因;
 - g. 在对应于SEQ ID NO:16的位置2171或SEQ ID NO:17的位置982的位置包含C至T取代的突变CKX3等位基因。
11. 一种增加单株花数,增加千粒重或增加单株荚数的方法,包括将至少一个突变CKX5等位基因或至少一个突变CKX5等位基因和一个突变CKX3等位基因导入芸苔属植物的步骤。
12. 一种选自以下的芸苔属植物:
- 包含在对应于SEQ ID NO:19的位置465或SEQ ID NO:20的位置465的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因的芸苔属植物,包含所述等位基因的参照种子已经保藏于NCIMB Limited,保藏号为NCIMB42464;
 - 包含在对应于SEQ ID NO:19的位置399或SEQ ID NO:20的位置399的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因的芸苔属植物,包含所述等位基因的参照种子已经保藏于NCIMB Limited,保藏号为NCIMB42465;
 - 包含在对应于SEQ ID NO:22的位置465或SEQ ID NO:23的位置399的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因的芸苔属植物,包含所述等位基因的参照种子已经保藏于NCIMB

Limited,保藏号为NCIMB42464;

包含在对应于SEQ ID NO:7的位置2244或SEQ ID NO:8的位置1093的位置处包含C至T取代的突变CKX3等位基因的芸苔属植物,包含所述等位基因的参照种子已经保藏于NCIMB Limited,保藏号为NCIMB 42464;

包含在对应于SEQ ID NO:10的位置2482或SEQ ID NO:11的位点1168的位置处包含C至T取代的突变CKX3等位基因的芸苔属植物,包含所述等位基因的参照种子已经保藏于NCIMB Limited,保藏号为NCIMB 42464;

包含在对应于SEQ ID NO:13的位置1893或SEQ ID NO:14的位点876的位置包含G至A取代的突变CKX3等位基因的芸苔属植物,包含所述等位基因的参照种子已经保藏于NCIMB Limited,保藏号为NCIMB42464;

包含在对应于SEQ ID NO:16的位置2171或SEQ ID NO:17的位置982的位置处包含C至T取代的突变CKX3等位基因的芸苔属植物,包含所述等位基因的参照种子已经保藏于NCIMB Limited,保藏号为NCIMB 42464。

13.根据权利要求9或10所述的突变CKX5等位基因,或突变CKX5和突变CKX3等位基因在增加单株花数、单株荚数或增加芸苔属植物TSW中的应用。

14.根据权利要求1至6和12中任一项的芸苔属植物或这些植物的种子用于生产油籽油菜油或油籽油菜饼的用途。

15.一种生产食物、饲料或工业产品的方法,包括:

- a.获得权利要求1至6或权利要求12中任一项的植物或其部分,和
- b.从植物或其部分制备食物、饲料或工业产品。

在种子生产中具有改变的性质的芸苔属植物

技术领域

[0001] 本发明涉及芸苔属(*Brassica*)植物和部分,特别是欧洲油菜(*Brassica napus*)植物,其具有改变的花数、荚(*pod*)数和种子生产特征。本发明还涉及来自欧洲油菜的编码细胞分裂素氧化酶(CKX)的核酸,以及其影响欧洲油菜植物花、荚和种子生产的诱导的变体等位基因。

背景技术

[0002] 鉴于人口的增加和具有可以分配给农业的最佳特性的土地面积的持续减少,为满足日益增长的对食品、饲料和其他植物衍生产品的需求,农业生产力的提高是一个持续的目标。

[0003] 细胞分裂素是影响植物生长和发育的许多方面的植物激素。它刺激茎(*shoot*)分生组织的形成和活性,能够建立水槽组织(*sink tissue*),延缓叶衰老,抑制根生长和分枝,并在种子萌发和胁迫反应中起作用(Mok和Mok, 2001, *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 52, 89-118)。细胞分裂素的化学和生理学,以及细胞分裂素生物合成、代谢和信号转导的调节已被广泛研究。

[0004] 细胞分裂素氧化酶(CKX),也称为细胞分裂素脱氢酶,调节植物激素细胞分裂素的稳态。它们通过氧化侧链切割而在单个酶促步骤中催化细胞分裂素异戊烯基腺嘌呤、玉米素和它们的核糖苷的不可逆降解。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的基因组编码7个CKX基因,而稻的基因组至少包含CKX家族的10个成员。各个CKX蛋白质的催化性质,亚细胞定位及关于时间、发育阶段和组织的表达模式均不同。CKX酶负责大多数细胞分裂素分解代谢并使激素失活。由于CKX蛋白质水平或功能性的变化以及随后CKX活性的变化改变了组织中的细胞分裂素浓度,因此CKX酶在控制局部细胞分裂素水平方面是重要的并且有助于调节细胞分裂素依赖性过程。(Schmülling等人, 2003, *J. Plant Res.* 116, 241-252)。CKX基因表达和CKX蛋白质活性的调控已被用于生物技术应用,以改变植物形态、生物化学、生理学和发育。

[0005] W02001/96580描述了用于刺激根生长和/或增强侧生根或不定根形成和/或改变根向地性的方法,包括在植物或植物部分中表达植物细胞分裂素氧化酶或表达包含降低活性细胞分裂素水平的另一蛋白质。还描述了新的植物细胞分裂素氧化酶蛋白,编码细胞分裂素氧化酶蛋白的核酸序列以及包含这些序列的载体、宿主细胞、转基因细胞和植物。该文献还描述了这些序列用于改善根相关特性的用途,包括增加产量和/或增强早期活力和/或改变根冠比和/或改善抗倒伏抗性和/或增加耐旱性和/或促进外植体的体外繁殖和/或修饰细胞命运和/或植物发育和/或植物形态和/或植物生物化学和/或植物生理学。进一步描述的是这些序列在上述方法中的用途。用于鉴定并获得与细胞分裂素氧化酶蛋白质相互作用的蛋白质和化合物的方法以及这些化合物作为植物生长调节剂或除草剂的用途。

[0006] W02003/050287还描述了用于刺激根生长和/或增加侧根和/或不定根形成和/或改变根向地性的方法,该方法包括在植物或植物部分中表达植物细胞分裂素氧化酶或包括表达降低活性细胞分裂素水平的另一种蛋白质。也提供了增加种子大小和/或重量,胚大小

和/或重量,子叶大小和/或重量的方法。该方法包括在植物或植物部分中,植物细胞分裂素氧化酶的表达或降低活性细胞分裂素水平的另一种蛋白质的表达。该文献还描述了新的植物细胞分裂素氧化酶蛋白质,编码细胞分裂素氧化酶蛋白质的核酸序列及包含所述序列的载体,宿主细胞、转基因细胞和植物。也公开了这种序列用于改进根相关特性,包括增加产量和/或增强早期活力和/或修饰根冠比和/或改进倒伏抗性和/或增加干旱耐受性和/或促进外植体外繁殖和/或修饰细胞命运和/或植物发育和/或植物形态学和/或植物生物化学和/或植物生理学的用途。最后描述的技术还涉及这种序列在上述方法中的用途以及鉴定和获得与细胞分裂素氧化酶蛋白质相互作用的蛋白质和化合物的方法和这种化合物做为植物生长调节剂或除草剂的用途。

[0007] W02005/123926描述了用于提高植物种子产量的方法和组合物。该方法包括在种子的糊粉和/或胚中表达细胞分裂素氧化酶。进一步描述了包含编码细胞分裂素氧化酶的核酸的载体以及包含这种序列的宿主细胞,转基因细胞和植物,所述编码细胞分裂素氧化酶的核酸与能够在种子的糊粉粒和/或胚中驱动表达的启动子有效连接。还提供了这些序列用于增加产量的用途。

[0008] US2006123507描述了一个CKX基因,其调节谷物植物的颗粒承载数量(包括颖花、果实和种子)的增加和减少,该基因被成功分离并通过连锁分析鉴定。此外,还发现了利用这种基因来增加植物的颗粒承载数量(包括颖花、果实和种子)的育种方法。

[0009] US2013/014291描述了cytokining氧化酶样序列(来自玉米(*Zea mays*))和使用方法。所述序列可用于多种方法,包括调控根发育,调控花发育,调控叶和/或芽发育,调控种子大小和/或重量,调控非生物胁迫下的耐受性和调控对病原体的抗性。

[0010] Cervinkova等人(2013J.Exp.Bot.64,2805-2815)描述了具有异位增强的细胞分裂素氧化酶/脱氢酶基因表达的烟草植物的增强的干旱和热胁迫耐受性。

[0011] **Köllmer**等人(2014,Plant J.78,359-371)报道了来自拟南芥属的细胞细胞分裂素氧化酶/脱氢酶(CKX7)的过表达引起根生长和木质部分化的特异性变化。

[0012] W02011/004003涉及分离的植物细胞和植物,所述植物细胞和植物包含至少CKX3基因和另一个编码细胞分裂素氧化酶/脱氢酶的基因并与CKX3不同的基因的破坏,以及生产这种植物的方法和提高植物种子产量和/或植物高度的方法。

[0013] Batrina等人(2011,The Plant Cell 23,69-80)报道了茎端分生组织的大小和活性受转录因子和低分子量信号(包括植物激素细胞分裂素)调节。分生组织的细胞分裂素状态取决于不同的因素,包括由细胞分裂素氧化酶/脱氢酶(CKX)酶催化的激素的代谢降解。在该文献中,他们报道了CKX3和CKX5调节拟南芥生殖分生组织的活性。CKX3在中央WUSCHEL(WUS)结构域中表达,而CKX5表现出更广泛的分生组织表达。拟南芥中的CKX3 CKX5双突变体形成较大的花序和花分生组织。WUS结构域的大小增加和原基形成增强表明细胞分裂素在限定干细胞生态位和延迟细胞分化中具有双重功能。与此一致的是,在分生组织旁边表达的细胞分裂素信号传导负调节基因ARABIDOPSIS HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEIN 6的突变导致了分化的进一步延迟。终端细胞分化在CKX3 CKX5花中也受到阻滞,形成更多细胞并变大,证实了细胞分裂素调节花器官大小的作用。此外,CKX3 CKX5胎座组织的更高活性建立了额外的胚珠,导致每长角果种子集(seed set)增加。这些结果共同支持了细胞分裂素在生殖发育中的重要作用。增加的细胞分裂素含量导致拟南芥种子产量增加~

55%，突出了库强度(sink strength)作为产量因子的相关性。

[0014] Song等人(2015 J.Exp.Bot.66第5067-5082页)报道了欧洲油菜基因的表达式涉及叶、花、长角果和种子发育中的IPT、CKX、蔗糖转运蛋白、细胞壁转化酶和氨基酸通透酶基因家族成员。该出版物报道了在欧洲油菜中鉴定用于细胞分裂素降解的基因家族(BnCKX1至BnCKX7)，以及来自甘蓝(*B.oleracea*)和芜菁(*B.rapa.*)的同源物。没有公布序列的登录号(尽管补充数据附件1声称列出了这些号码)。BnCKX2和4被鉴定为TILLING、EcoTILLING和MAS的靶标，以努力提高种子产量而不影响饲料产量和饲料芸苔(*Brassica napus* cv.Greenland)品质，饲料芸苔是为营养生长和生物量生产培育的。

[0015] 因此，仍需要来自欧洲油菜的CKX3和CKX5基因的非功能变异等位基因，其可用于改变欧洲油菜的花生产、荚生产和种子生产以及种子特性。

发明内容

[0016] 本发明人已经发现，通过控制在所述植物中“功能性表达”的CKX5或CKX5和CKX3基因等位基因的数量和/或类型，即其导致功能性(生物活性)CKX5或CKX5和CKX3蛋白质在芸苔属植物中，可以调整每株植物的花数、荚数和种子数。

[0017] 通过组合CKX5或CKX5和CKX3基因的某些诱导变体等位基因，导致功能性CKX5或CKX5和CKX3蛋白质水平的降低，每株植物的花数可以增加，尤其是主枝上的花数可以在温室或田间试验条件下增加。此外，主枝上的荚数可以在田间试验条件下增加，以及主枝上每个荚的种子数。与其他产生较高千粒重(TSW)但用较低的种子数产量补偿这一点的方法相反，可以实现TSW的增加，特别是较高的TSW，而对种子产量没有显著的负面影响。

[0018] 在一个实施方式中，提供了包含至少一个CKX5基因的芸苔属植物，其在其基因组中包含至少一个突变CKX5等位基因，特别地，其中所述突变CKX5等位基因是CKX5基因的突变等位基因，其包含选自以下的核酸序列：包含与SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:23具有至少90%序列同一性的核苷酸序列；包含与SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:23具有至少90%序列同一性的编码序列的核苷酸序列；和编码与SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:24具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的核苷酸序列。

[0019] 芸苔属植物可以包含两个CKX5基因，并且可以选自欧洲油菜，芥菜(*Brassica juncea*)和埃塞俄比亚芥(*Brassica carinata*)。该植物还可以包含至少两个突变CKX5等位基因，或至少三个突变CKX5等位基因，或至少四个突变CKX5等位基因。

[0020] 在具体的实施方式中，突变CKX5等位基因可以选自：在对应于SEQ ID NO:19的位置465或对应于SEQ ID No.20的位置465的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因；在对应于SEQ ID NO:19的位置399或SEQ ID NO:20的位置399的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因；和在对应于SEQ ID NO:22的位置465或SEQ ID No.23的位置399的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因。

[0021] 在又一个实施方式中，所述植物可以进一步包含至少两个CKX3基因，在其基因组中进一步包含至少两个突变CKX3等位基因，特别是其中所述突变CKX3等位基因是CKX3基因的突变等位基因，其包含选自：包含与SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:10至少90%序列同一性的核苷酸序列；SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:16；包含与SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:11具有至少90%序列同一性的编码序列的核苷酸序列；SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:17；和编码包含与

SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:12至少90%序列同一性的氨基酸序列的核苷酸序列;SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18。

[0022] 芸苔属植物可以包含四种CKX3基因,所述芸苔属植物选自欧洲油菜、芥菜和埃塞俄比亚芥,并且可以进一步包含至少两个突变CKX3等位基因或至少三个突变CKX3等位基因,或者至少四个突变CKX3等位基因或至少五个突变CKX3等位基因或至少六个突变CKX3等位基因或至少七个突变CKX3等位基因或至少八个突变CKX3等位基因。

[0023] 在特定实施方式中,突变CKX3等位基因可选自在对应于SEQ ID NO:7的位置2244或SEQ ID No.8的位置1093的位置包含C至T取代的突变CKX3等位基因;在对应于SEQ ID NO:10的位置2482或SEQ ID NO:11的位置1168的位置包含C至T取代的突变CKX3等位基因;在对应于SEQ ID NO:13的位置1893或SEQ ID NO:14的位置876的位置包含G至A取代的突变CKX3等位基因;或在对应于SEQ ID NO:16的位置2171或SEQ ID NO:17的位置982的位置包含C至T取代的突变CKX3等位基因。

[0024] 芸苔属植物对于突变CKX3等位基因和/或对于突变CKX5等位基因可以是纯合的。

[0025] 这些植物可具有增加的单株花数,增加的单株荚数,例如植物主枝上增加的荚数或花数或者增加的千粒重(TSW)。

[0026] 本发明还提供了表征为存在本文所述突变等位基因的植物细胞、荚、种子或子代。

[0027] 本发明进一步提供了芸苔属CKX3或CKX5基因的突变等位基因,其中所述CKX5基因选自:(a)与SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:23具有至少90%序列同一性的核苷酸序列;(b)包含与SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:23具有至少90%序列同一性的编码序列的核苷酸序列;和编码与SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:24具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的核苷酸序列;并且其中所述CKX3基因选自与SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:10具有至少90%序列同一性的核苷酸序列;SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:16;包含与SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:11具有至少90%序列同一性的编码序列的核苷酸序列;SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:17;和编码包含与SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:12具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的核苷酸序列;SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18。

[0028] 在又一个实施方式中,提供了选自以下的突变等位基因:

[0029] a.在对应于SEQ ID NO:19的位置465或SEQ ID No.20的位置465的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因;

[0030] b.在对应于SEQ ID NO:19的位置399或SEQ ID NO:20的位置399的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因;和

[0031] c.在对应于SEQ ID NO:22的位置465或SEQ ID No.23的位置399的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因;

[0032] d.在对应于SEQ ID NO:7的位置2244或SEQ ID No.8的位置1093的位置包含C至T取代的突变CKX3等位基因;

[0033] e.在对应于SEQ ID NO:10的位置2482或SEQ ID NO:11的位置1168的位置包含C至T取代的突变CKX3等位基因;

[0034] f.在对应于SEQ ID NO:13的位置1893或SEQ ID NO:14的位置876的位置包含G至A取代的突变CKX3等位基因;

[0035] g.在对应于SEQ ID NO:16的位置2171或SEQ ID NO:17的位置982的位置包含C至T

取代的突变CKX3等位基因。

[0036] 本发明还提供了包含以下有效连接的DNA片段的嵌合基因：

[0037] (a) 植物可表达的启动子；

[0038] (b) DNA区，其在转录时产生抑制一个或多个CKX5或CKX5和CKX3基因或蛋白质的表达或活性的RNA或蛋白质分子；并且任选地，

[0039] (c) 涉及转录终止和聚腺苷酸化的3'端区域。

[0040] 本发明的又一个实施方式涉及用于鉴定生物样品中如本文所述的突变CKX5或CKX3等位基因的方法，其包括确定在所述生物样品中存在的核酸中突变CKX5或CKX3特异性区域的存在。

[0041] 本发明的再另一个实施方式涉及用于确定在芸苔属植物，植物材料或种子中如本文中所述的突变CKX3或CKX5等位基因的接合性状态的方法，其包括确定在所述植物、植物材料或种子的基因组DNA中突变的和/或相应的野生型CKX3或CKX5特异性区域的存在。

[0042] 本发明还提供了用于鉴定在生物样品中如本文所述的突变CKX3或CKX5等位基因的试剂盒，其包含一组至少两种引物，所述组选自：

[0043] (a) 一组引物，其中所述引物之一特异性识别突变等位基因的5'或3'侧翼区域，并且所述引物中的另一个特异性识别突变CKX3或CKX5等位基因的突变区域，和

[0044] (b) 一组引物，其中所述引物之一特异性识别突变CKX3或CKX5等位基因的5'或3'侧翼区域，并且所述引物中的另一个特异性识别3'或5'侧翼区之间的接合区和突变CKX3或CKX5等位基因的突变区域；

[0045] 或所述试剂盒包含一组至少一种探针，所述探针选自以下：

[0046] (a) 特异性识别突变CKX3或CKX5等位基因突变区域的探针，和

[0047] (b) 特异性识别突变CKX3或CKX5等位基因的突变区域之间的3'或5'侧翼区域之间的接合区的探针。

[0048] 还提供了用于将如本文所述的至少一种选择的突变CKX3或CKX5等位基因从一种植物转移到另一种植物的方法，包括以下步骤：

[0049] (a) 使用所描述的方法鉴定包含至少一个选择的突变CKX3或CKX5等位基因的第一植物，

[0050] (b) 将第一植物与不包含至少一种选择的突变CKX3或CKX5等位基因的第二植物杂交并从所述杂交中收集F1杂种种子，

[0051] (c) 任选地，使用所描述的方法鉴定包含至少一种选择的突变CKX3或CKX5等位基因的F1植物，

[0052] (d) 将包含所述至少一个选择的突变CKX3或CKX5等位基因的F1植物与不包含所述至少一个选择的突变CKX3或CKX5等位基因的第二植物回交至少一代(x)并从所述杂交中收集BC_x种子，和

[0053] (e) 使用根据所描述的方法鉴定在每代BC_x植物中包含至少一个选择的突变CKX3或CKX5等位基因的植物。

[0054] 在又一个实施方式中，本发明提供了增加单株花数的方法，包括将至少一种突变CKX5或一种突变CKX5和一种突变CKX3等位基因引入芸苔属植物中；或将本文所述的嵌合基因引入芸苔属植物。

[0055] 在又一个实施方式中,本发明提供了增加单株荚数的方法,包括将至少一种突变CKX5或一种突变CKX5和一种突变CKX3等位基因导入芸苔属植物中;或将本文所述的嵌合基因引入芸苔属植物。

[0056] 在又一个实施方式中,本发明提供了增加TSW的方法,包括将至少一种突变CKX5或一种突变CKX5和一种突变CKX3等位基因引入芸苔属植物中;或将本文所述的嵌合基因引入芸苔属植物。

[0057] 在一个具体的实施方式中,本发明提供了选自以下的芸苔属植物:

[0058] 包含在对应于SEQ ID NO:19的位置465或SEQ ID NO:20的位置465的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因的芸苔属植物,包含所述等位基因的参照种子已经在2015年10月5日保藏于NCIMB Limited,保藏号为NCIMB 42464;

[0059] 包含在对应于SEQ ID NO:19的位置399或SEQ ID NO:20的位置399的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因的芸苔属植物,包含所述等位基因的参考种子已经在2015年10月5日保藏于NCIMB Limited,保藏号为NCIMB 42465;

[0060] 包含在对应于SEQ ID NO:22的位置465或SEQ ID NO:23的位置399的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因的芸苔属植物,包含所述等位基因的参照种子已经在2015年10月5日保藏于NCIMB Limited,保藏号为NCIMB 42464;

[0061] 包含在对应于SEQ ID NO:7的位置2244或SEQ ID NO:8的位置1093的位置处包含C至T取代的突变CKX3等位基因的芸苔属植物,包含所述等位基因的参照种子已经在2015年10月5日保藏于NCIMB Limited,保藏号为NCIMB 42464;

[0062] 包含在对应于SEQ ID NO:10的位置2482或SEQ ID NO:11的位置1168的位置处包含C至T取代的突变CKX3等位基因的芸苔属植物,包含所述等位基因的参照种子已经在2015年10月5日保藏于NCIMB Limited,保藏号为NCIMB 42464;

[0063] 包含在对应于SEQ ID NO:13的位置1893或SEQ ID NO:14的位置876的位置处包含G至A取代的突变CKX3等位基因的芸苔属植物,包含所述等位基因的参考种子已经在2015年10月5日保藏于NCIMB Limited,保藏号为NCIMB 42464;

[0064] 包含在对应于SEQ ID NO:16的位置2171或SEQ ID NO:17的位置982的位置处包含C至T取代的突变CKX3等位基因的芸苔属植物,包含所述等位基因的参照种子已经在2015年10月5日保藏于NCIMB Limited,保藏号为NCIMB 42464。

[0065] 在再另一个实施方式中,本发明提供了如本文所述的突变CKX5或突变CKX5和突变CKX3等位基因或本文所述的嵌合基因用于增加单株花数、单株荚数或增加芸苔属植物的TSW或生产油籽油菜油(oilseed rape oil)或油籽油菜饼(oilseed rape seed cake)。

[0066] 附图简述

[0067] 图1:来自拟南芥的AtCKX3(SEQ ID NO.3)编码的;由BnCKX3-A1野生型等位基因(SEQ ID NO.9)编码的;由BnCKX3-A1 YIIN501等位基因(SEQ ID NO.25)编码的;由BnCKX3-A2野生型等位基因(SEQ ID No.12)编码的和由BnCKX3-A2 YIIN502等位基因(SEQ ID NO.26)编码的蛋白质的氨基酸序列的比对。方框和箭头指表1中所示的保守基序和位点。

[0068] 图2:来自拟南芥的AtCKX3(SEQ ID NO.3)编码的;由BnCKX3-C1野生型等位基因(SEQ ID NO.15)编码的;由BnCKX3-C1 YIIN521等位基因(SEQ ID NO.27)编码的;由BnCKX3-C2野生型等位基因(SEQ ID No.18)编码的或由BnCKX3-C1 YIIN531等位基因(SEQ

ID NO.28) 编码的蛋白质的氨基酸序列的比对。方框和箭头指表1中所示的保守基序和位点。

[0069] 图3:由来自拟南芥的AtCKX5 (SEQ ID NO.6) 编码的;由BnCKX5-A1野生型等位基因 (SEQ ID NO.21) 编码的;由BnCKX5-A1 YIIN801等位基因 (SEQ ID NO.29) 编码的;由BnCKX5-A1 YININ805等位基因 (SEQ ID NO.30) 编码的;由BnCKX3-C1野生型等位基因 (SEQ ID No.24) 编码的或由BnCKX3-C1 YIIN811等位基因 (SEQ ID NO.31) 编码的蛋白质的氨基酸序列的比对。方框和箭头指表2中所示的保守基序和位点。

[0070] 一般性定义

[0071] 在本文中使用时,芸苔属“果实”指芸苔属植物的从融合的心皮构成的雌蕊群发育来的器官,其在受精后生长成为含有发育中的种子的“(种子)荚果”或“长角果”。

[0072] “作物植物”指作为作物栽培的植物物种,例如欧洲油菜 (AACC, $2n=38$)、芥菜 (AABB, $2n=36$)、埃塞俄比亚芥 (BBCC, $2n=34$)、芜菁 (*Brassica rapa*) (同义词,芸苔) (AA, $2n=20$)、甘蓝 (*Brassica oleracea*) (CC, $2n=18$) 或黑芥 (*Brassica nigra*) (BB, $2n=16$)。该定义并不包括杂草,例如拟南芥。

[0073] 本文所用的“芸苔属植物”是指异源四倍体或双二倍体欧洲油菜 (AACC, $2n=38$), 芥菜 (AABB, $2n=36$), 埃塞俄比亚芥 (BBCC, $2n=34$) 或二倍体芜菁 (*Brassica rapa*, 与芸苔同义) (AA, $2n=20$), 甘蓝 (CC, $2n=18$) 或黑芥 (BB, $2n=16$)。

[0074] 如本文所用的“油籽油菜作物”是指作为作物如欧洲油菜、芥菜、埃塞俄比亚芥、芜菁(与芸苔同义)、甘蓝或黑芥栽培的油籽油菜。

[0075] 术语“核酸序列(或核酸分子)”指单链或双链形式的DNA或RNA分子,特别是编码根据本发明的蛋白质或蛋白质片段的DNA。“内源核酸序列”指植物细胞内的天然核酸序列,例如存在于芸苔属细胞的核基因组中的CKX3或CKX5基因的内源等位基因。“经分离的核酸序列”用于表示不再处于其天然环境中的核酸序列,例如,体外或在重组细菌或植物宿主细胞中。

[0076] 术语“基因”指细胞中的下述DNA序列,其中包含有被转录为RNA分子(例如前mRNA, 包含内含子序列,其再被剪接为成熟的mRNA,或者直接转录为没有内含子序列的mRNA)的区域(被转录的区域),其与调控区域(例如启动子)有效相连。因此,基因可以包含一些有效的连接的序列,例如启动子、包含例如翻译起始涉及的序列的5' 前导序列,(蛋白质)编码区(cDNA或基因组DNA)和包含例如转录终止位点的3' 非翻译序列。“内源基因”用于与“外来基因”、“转基因”或“嵌合基因”区分,指来自某植物属、物种或品种的植物基因,不是通过转化引入植物的(即,不是“转基因”),而是通常存在于所述植物属、物种或品种的植物中的,或者是从其通常存在的另一种植物属、物种或品种的植物中,通过普通的育种技术或通过体细胞杂交(例如,通过原生质体融合),引入到植物中的。相似的,基因的“内源等位基因”不是通过植物转化引入到植物或植物组织中的,而是例如通过植物诱变和/或选择产生的,或通过筛选天然的植物群体或通过基因靶向获得的。

[0077] “表达基因”或“基因表达”指这样的过程,其中与合适的调控区(特别是启动子)有效连接的DNA区域,转录成RNA分子。然后,RNA分子在细胞内被进一步加工(通过转录后过程),例如,通过RNA剪接和翻译起始,翻译成氨基酸链(蛋白质),并且通过翻译终止密码子结束翻译。术语“功能性表达”在本文中用于表示生产了功能性蛋白质,术语“非功能性表

达”表示生产的蛋白质具有显著降低的或没有功能(生物学活性),或者未生产蛋白质(也参见下文)。

[0078] 术语“蛋白质”是指由氨基酸的链构成的分子,无关特定作用模式、大小、3维结构或来源。CKX3或CK5蛋白质的“片段”或“部分”因此仍可被称作“蛋白质”。“经分离的蛋白质”用于表示不再处于其天然环境中的蛋白质,例如体外或在重组细菌或植物宿主细胞中。“氨基酸”是蛋白质和酶的主要构建块。它们通过根据遗传密码的转移RNA被整合到蛋白质中,而使RNA被核糖体解码。在最终组装蛋白质期间和之后,氨基酸含量决定蛋白质或酶的空间和生物化学性质。氨基酸骨架决定了蛋白质的主要序列,但侧链的性质决定了蛋白质的性质。如本文所用,“相似氨基酸”是指具有相似氨基酸侧链的氨基酸,即具有极性、非极性 or 实际中性侧链的氨基酸。如本文所用,“非相似性氨基酸”是指具有不同氨基酸侧链的氨基酸,例如具有极性侧链的氨基酸与具有非极性侧链的氨基酸不相似。极性侧链通常倾向于存在于蛋白质的表面,在那里它们可以与细胞中发现的水环境(“亲水性”氨基酸)相互作用。另一方面,“非极性”氨基酸倾向于驻留在蛋白质的中心,在那里它们可以与类似的非极性邻居(“疏水”氨基酸)相互作用。具有极性侧链的氨基酸的实例是精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、组氨酸、赖氨酸、丝氨酸和苏氨酸(除疏水性半胱氨酸外全部是亲水性的)。具有非极性侧链的氨基酸的实例是丙氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸和色氨酸(除中性的甘氨酸外都是疏水性的)。

[0079] 术语“CKX基因”在本文中是指编码细胞分裂素氧化酶/脱氢酶(CKX)蛋白质的核酸序列,其是酶(EC1.5.99.12和EC1.4.3.18,其可氧化降解细胞分裂素)。例如活性细胞分裂素异戊烯基腺嘌呤的分解产生腺嘌呤和不饱和醛3-甲基-2-丁烯醛。CKX酶是FAD依赖性氧化酶。

[0080] 在本文中使用时,术语“等位基因”表示在特定基因座上的基因的一种或多种备选形式。在生物的二倍体(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上。同源染色体对的每条染色体上存在一个等位基因。

[0081] 如本文中使用的,术语“同源染色体”意指这样的染色体,所述染色体含有相同生物学特征的信息,在相同基因座上含有相同的基因,但可能是这些基因的不同等位基因。同源染色体是在减数分裂过程中成对的染色体。“非同源染色体”代表了生物体的所有生物学特征,形成一组,而细胞内的组数被称为倍性。二倍体生物含有两组非同源染色体,其中每组同源染色体继承自不同的亲本。在双二倍体物种中,实质上存在两组二倍体基因组,从而将两组基因组的染色体称为部分同源染色体(相似的,两组基因组的基因座或基因被称为部分同源基因座或基因)。二倍体或双二倍体的植物品种在特定的基因座可以包含大量的不同等位基因。

[0082] 在本文中使用时,“杂合”表示这样的遗传条件,此时在特定基因座上存在两种不同的等位基因,它们各自位于细胞中同源染色体的相应的对上。相反,在本文中使用时,术语“纯合”表示这样的遗传条件,此时在特定基因座上存在两个相同的等位基因,它们各自位于细胞中同源染色体的相应的对上。

[0083] 在本文中使用时术语“基因座”表示染色体上发现了例如基因或遗传标记的特定位置或位点。例如,“CKX3-A1基因座”表示A基因组的染色体上可发现CKX3-A1基因(和两个CKX3-A1等位基因)的位置;“CKX3-A2基因座”表示A基因组的染色体上可发现CKX3-A2基因

(和两个CKX3-A2等位基因)的位置,“CKX3-C1基因座”表示C基因组的染色体上可发现CKX3-C1基因(和两个CKX3-C1等位基因)的位置,“CKX3-C2基因座”表示C基因组的染色体上可发现CKX3-C2基因(和两个CKX3-C2等位基因)的位置。同样,“CKX5-A1基因座”表示A基因组的染色体上可发现CKX5-A1基因(和两个CKX3-A1等位基因)的位置,而“CKX5-C1基因座”表示C基因组的染色体上可发现CKX5-C1基因(和两个CKX3-C1等位基因)的位置。

[0084] 根据本发明中无论何时提到“植物”,均应当理解,除非另有指明,此时还包括植物部分(细胞,组织或器官,种子荚果,种子,已分离的部分例如根、叶、花、花粉等等),保留有亲本的区别性特征(尤其是果实裂开性质)的植物子代,例如,通过自交或杂交获得的种子,例如杂种种子(通过将两种近交亲本品系杂交获得的),从其获得的杂种植物和植物部分。

[0085] “分子测定(或测试)”在本文中表示这样的测定,其确定(直接或间接)一种或多种特定CKX3或CKX5等位基因是否存在于一个或更多CKX3或CKX5基因座(例如,对于欧洲油菜,在CKX3-A1、CKX3-A2、CKX3-C1、CKX3-C2,CKX5-A1或CKX5-C1基因座中一个或多个处)上。在一种实施方式中,其允许人们确定任何个体植物中的基因座上特定(野生型或诱导的变体)CKX3和/或CKX5等位基因是纯合还是杂合的。

[0086] “野生型”在本文中使用时表示植物或基因在自然界最常出现的典型形式。“野生型植物”指具有此类植物在天然种群中最常见表型的植物。“野生型等位基因”指产生野生型表型所需的基因等位基因。相反,“诱导的变体”(或“突变植物”)指具有此类植物在天然种群中的不同的表型的植物,或通过人类的干涉,例如通过诱变产生的植物,并且“诱导的变体等位基因”(或“突变等位基因”)表示产生变体(或突变体)表型所需的基因等位基因。

[0087] 在本文中使用时,术语“野生型CKX3”表示在十字花科(Brassicaceae)植物,尤其是芸苔属植物中发现的天然存在的CKX3等位基因,其编码功能性CKX3蛋白质。如本文所用,术语“野生型CKX5”意指在十字花科植物,尤其是芸苔属植物中发现的天然存在的CKX5等位基因,其编码功能性CKX5蛋白质。

[0088] 相反,如本文所用,术语“变体CKX3”(或“诱导型变体CKX3”或“突变CKX3”)是指CKX3等位基因,其不编码功能性CKX3蛋白质,即编码非功能性CKX3蛋白质的CKX3等位基因,如本文所用,其指与相应的野生型功能性CKX3蛋白质相比不具有生物学活性或具有显著降低的生物学活性或根本不编码CKX3蛋白质的CKX3蛋白质。这种“突变CKX3等位基因”(也称为“完全敲除”或“无效”等位基因)是野生型CKX3等位基因,其在其核酸序列中包含一个或多个突变,由此突变优选产生在体内细胞中功能性CKX3蛋白质的量显著降低(绝对或相对)。如本文所用,“完全敲除的CKX3等位基因”是突变CKX3等位基因,其存在至少导致该植物上花和/或荚数增加,特别是在该植物的主枝上(可能与另一个CKX等位基因组合,例如突变CKX5等位基因)。同样,如本文所用,术语“变体CKX5”(或“诱导变体CKX5”或“突变CKX5”)是指CKX5等位基因,其不编码功能性CKX5蛋白质,即编码非功能性的CKX5蛋白质的CKX5等位基因,本文所用的,其是指CKX5蛋白质与相应的野生型功能性CKX5蛋白质相比不具有生物学活性或具有显著降低的生物学活性,或完全不编码CKX5蛋白质。这种“突变的CKX5等位基因”(也称为“完全敲除”或“无效”等位基因)是野生型CKX5等位基因,其在其核酸序列中包含一个或多个突变,由此突变优选导致在体内细胞中功能性CKX5蛋白质的量显著降低(绝对或相对)。如本文所用,“完全敲除CKX5等位基因”是突变CKX5等位基因,其存在至少导致该植物上的花和/或荚数增加,特别是在该植物的主枝上(可能与另一个CKX等位基因结

合,例如突变CKX3等位基因)。

[0089] 编码CKX3蛋白质的核酸序列的突变等位基因分别命名为“ckx3”(例如分别用于欧洲油菜,ckx3-a1,ckx3-a2,ckx3-c1或ckx3-c2)。编码CKX5蛋白质的核酸序列的突变等位基因被命名为“ckx5”(例如,分别用于欧洲油菜,ckx5-a1或ckx5-c1)。突变等位基因可以是“天然突变”等位基因,这是在自然界发现的突变等位基因(例如没有人应用诱变剂的情况下自发产生的),或者“诱导的突变”等位基因,这是通过人干涉诱导的,例如通过诱变。

[0090] “完全敲除突变CKX3等位基因”是例如野生型CKX3等位基因,其在其核酸序列中包含一个或多个突变,例如一个或多个无义或错义突变。具体而言,这种完全敲除突变CKX3等位基因是野生型CKX3等位基因,其包含优选导致产生缺少至少一个保守基序的CKX3蛋白质或截短的CKX3蛋白质的突变,例如包含在对应于AtCKX3(SEQ ID NO:3)的位置1-31的位置处的氨基酸残基的信号肽;包含在对应于AtCKX3(SEQ ID NO:3)的位置66至243的位置处的残基的FAD结合区域;包含在对应于AtCKX3(SEQ ID NO:3)的位置100至104的位置处的氨基酸的FAD结合氨基酸残基;包含在对应于AtCKX3(SEQ ID NO:3)的位置105至106的位置处的氨基酸的FAD结合氨基酸残基;在对应于AtCKX3(SEQ ID No.3)的位置105的位置处的FAD结合组氨酸;在对应于AtCKX3(SEQ ID No.3)的位置110的位置处的FAD结合氨基酸;在对应于AtCKX3(SEQ ID No.3)的位置167的位置处的FAD结合氨基酸;在对应于AtCKX3(SEQ ID No.3)的位置172的位置处的FAD结合氨基酸;在对应于AtCKX3(SEQ ID No.3)的位置178至182的位置处的FAD结合氨基酸;在对应于AtCKX3(SEQ ID No.3)的位置233的位置处的FAD结合氨基酸;在对应于AtCKX3(SEQ ID No.3)的位置476的位置处的FAD结合氨基酸;在AtCKX3(SEQ ID No.3)的位置244至517处的细胞分裂素结合氨基酸;在对应于AtCKX3(SEQ ID No.3)的位置374至385的位置处的GIWeVPHWLN基序或在对应于AtCKX3(SEQ ID No.3)的位置512至517的位置处的PGQxIF基序,使得CKX3蛋白质的生物学活性减少或完全消失,或者由此突变优选导致功能性CKX3蛋白质的量显著降低或不产生CKX3蛋白质。后者可以通过移除完整的CKX3编码核苷酸序列的缺失或通过包含CKX3编码区的5'端的缺失来完成。

[0091] “完全敲除突变CKX5等位基因”是例如野生型CKX5等位基因,其在其核酸序列中包含一个或多个突变,例如一个或多个无义或错义突变。特别地,这种完全敲除突变CKX5等位基因是野生型CKX5等位基因,其包含优选导致产生缺少至少一个保守基序的CKX5蛋白质或截短的CKX5蛋白质的突变,例如包含在对应于AtCKX5(SEQ ID NO:6)的位置1-24的位置处的氨基酸残基的信号肽;包含在对应于AtCKX5(SEQ ID NO:6)的位置63至241的位置处的残基的FAD结合区;包含在对应于AtCKX5(SEQ ID NO:6)的位置97至101的位置处的氨基酸的FAD结合氨基酸残基;包含在对应于AtCKX5(SEQ ID NO:6)的位置102至103的位置处的氨基酸的FAD结合氨基酸残基;在对应于AtCKX5(SEQ ID No.6)的位置102的位置处的FAD结合组氨酸;在对应于AtCKX5的位置107的位置处的FAD结合氨基酸;在对应于AtCKX5(SEQ ID No.6)的位置165的位置处的FAD结合氨基酸;在对应于AtCKX3(SEQ ID No.6)的位置170的位置处的FAD结合氨基酸;在对应于AtCKX5(SEQ ID No.6)的位置176至180的位置处的FAD结合氨基酸;在对应于AtCKX5(SEQ ID No.6)的位置231的位置处的FAD结合氨基酸;在对应于AtCKX5(SEQ ID No.6)的位置479的位置处的FAD结合氨基酸;在AtCKX5(SEQ ID No.6)的位置242-520的细胞分裂素结合氨基酸;在对应于AtCKX5(SEQ ID No.6)的位置374至385的位置处的GIWeVPHWLN基序或在对应于AtCKX5(SEQ ID No.6)的位置515至520的位置处的

PGQxIF基序,使得CKX5的生物学活性蛋白质减少或完全消除,或者其中突变优选导致功能性CKX5蛋白质的量显著减少或不产生CKX5蛋白质。后者可通过删除完整的CKX5编码核苷酸序列的缺失或通过包含CKX5编码区的5'端的缺失来完成。

[0092] 根据本发明的“对应位置”或“对应于位置的位置”应理解为核苷酸/氨基酸可以在所示数目上不同,但仍可具有相似的邻近核苷酸/氨基酸。所述可以交换、缺失或添加的核苷酸/氨基酸也由术语“对应位置”所包含。参考序列可以是来自拟南芥的AtCKX3或AtCKX5序列。表1和2中提供了来自拟南芥的CKX3和CKX5蛋白质的参考氨基酸序列与来自欧洲油菜的CKX3和CKX5蛋白质的示例性氨基酸序列之间的对应表。

[0093] 为了确定给定的CKX3或CKX5核苷酸/氨基酸序列中的核苷酸残基或氨基酸残基是否对应于另一CKX3或CKX5核苷酸或氨基酸序列的核苷酸序列中的某个位置,技术人员可以使用本领域众所周知的手段和方法,例如手工或通过使用计算机程序如BLAST (Altschul等人(1990), *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410) 进行比对,其代表Basic Local Alignment Search Tool或ClustalW (Thompson等人(1994), *Nucleic Acid Res.*, 22, 4673-4680) 或适合产生序列比对的任何其他合适的程序。对于拟南芥和芸苔属CKX3或CKX5氨基酸序列的比对,参见例如图1至图3。

[0094] “显著降低的功能性CKX3或CKX5蛋白质的量”指包含突变CKX等位基因的细胞生产的功能性CKX3或CKX5蛋白质的量分别较之不包含突变CKX3或CKX5等位基因的细胞生产的功能性CKX3或CKX5蛋白质的量而言降低至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100% (即,细胞不生产功能性CKX3或CKX5蛋白质)。该定义包括:产生不具有体内生物活性的“非功能性”CKX3或CKX5蛋白质 (例如截短的CKX3或CKX5蛋白质),功能性CKX3或CKX5蛋白质绝对量的降低 (例如,由于CKX3或CKX5基因的突变导致没有功能性CKX3或CKX5蛋白质被制造出来),生产较之功能性野生型CKX3或CKX5蛋白质的活性而言具有显著降低的生物活性的CKX3或CKX5蛋白质 (例如下述CKX3或CKX5蛋白质,其中对于被编码的CKX3或CKX5蛋白质的生物活性而言关键的一个或多个氨基酸残基 (如下文所例示) 被另外的氨基酸残基取代) 和/或显性负性CKX3或CKX5蛋白质对其他功能和/或部分功能性CKX3或CKX5蛋白质的不利影响。

[0095] 术语“突变CKX3或CKX5蛋白质”在本文中使用时指由突变CKX3或CKX5核酸序列 (“CKX3或CKX5等位基因”) 编码的下述CKX3或CKX5蛋白质,其中所述突变导致较之由非突变野生型CKX3或CKX5序列 (“CKX3或CKX5等位基因”) 编码的CKX3或CKX5蛋白质的活性而言显著降低和/或没有的体内CKX3或CKX5活性。

[0096] “诱变”或 (诱导变型) 在本文中使用时指这样的过程,其中对植物细胞 (例如多个芸苔属种子或其他部分例如花粉等等) 应用在细胞DNA中诱导突变的技术,例如将其与诱变剂接触,例如与化学物质 (例如甲基磺酸乙酯 (EMS)、乙基亚硝基脒 (ENU) 等等) 或电离辐射 (中子 (例如在快中子诱变等等)、 α 射线、 γ 射线 (例如通过钴60源提供的)、X-射线、UV辐射等等) 或上述中两种或多种的组合接触。因此,对一个或多个CKX等位基因的想要的诱变可通过使用化学手段 (例如通过将一种或多种植物组织与甲基磺酸乙酯 (EMS)、乙基亚硝基脒等接触) 或通过使用物理手段 (例如x射线等等或通过 γ 辐射,例如钴60源提供的) 来进行。通过照射制造的突变通常是大的缺失或者其他明显的损伤,例如易位或复杂重排,而通过化学诱变剂制造的突变通常是更离散的损伤,例如点突变。例如,EMS烷基化鸟嘌呤碱基,其

导致碱基错配：烷基化的鸟嘌呤将与胸腺嘧啶碱基配对，主要导致G/C向A/T的转变。诱变之后，使用已知技术从经处理的细胞再生芸苔属植物。例如，可根据传统种植流程，栽种得到的芸苔属种子，自花授粉后，在植物上形成种子。或者，可选出双单倍体小植株，立即形成纯合植物，例如如Coventry等人(1988, Manual for Microspore Culture Technique for Brassica napus. Dep. Crop Sci. Techn. Bull. 0489. Univ. of Guelph, Guelph, Ontario, 加拿大)所述。通过此类自花授粉在这代或后续代中形成的其他种子可被收获，并针对突变CKX等位基因的存在对其加以筛选。已知若干技术可用于筛选特定的突变等位基因，例如Deleteagene™ (Delete-a-gene; ; Li等人, 2001, Plant J 27:235-242) 使用聚合酶链式反应(PCR)测定，来筛选通过快中子诱变产生的缺失突变，TILLING (基因组中靶向诱导局部损伤; McCallum等人, 2000, Nat Biotechnol 18:455-457) 鉴定EMS诱导的点突变，等等。针对特定突变CKX3或CKX5等位基因的存在加以筛选的其他技术被描述于下文实施例中。诱变可以包括随机诱变，或者可以包含靶向诱变。诱变也可导致造成表观遗传沉默的表观突变。

[0097] 术语“基因靶向”在本文中是指使用诸如同源重组，错配修复或定点诱变的机制的定向基因修饰。该方法可用于取代、插入和删除内源序列或先前在植物细胞中引入的序列。用于基因靶向的方法可以在例如WO 2006/105946或WO2009/002150中找到。

[0098] 在本文中使用时，提到植物使用时，术语“非天然存在”或“培养的”表示具有经过人工修饰的基因组的植物。转基因植物，例如是含有外源核酸分子(例如包含转录区域的嵌合基因，当其转录时，产生能降低内源基因(例如CKX3或CKX5基因)表达的生物活性RNA分子)并且因此已经经人工遗传修饰的非天然存在的植物。此外，在内源基因中含有突变(例如内源CKX3或CKX5基因中的突变(例如在调控元件或在编码序列中)，由于暴露给诱变试剂导致的)的植物也被认为是非天然植物，因为其已经经人工遗传修饰过。此外，下述特定物种(例如欧洲油菜)的植物也被认为是非天然存在的植物，所述植物在内源基因(例如内源CKX3或CKX5基因)中含有天然不存在于该特定植物物种中的突变，这是用该植物相同或不同物种(例如欧洲油菜或芜菁)的植物进行的例如定向育种过程，例如标记辅助育种和选择，或者基因渗入的结果。相反，仅含自发或者天然存在的突变的植物，即，没有经过人工遗传修饰的植物，不是本文定义的“非天然存在的植物”并且因此不包括在本发明内。本领域技术人员理解，非天然存在的植物通常具有较之天然存在的植物而言经改变的核苷酸序列，但非天然存在的植物也可以是经过人工遗传修饰但是不改变其核苷酸序列，例如通过修饰其甲基化模式来进行。

[0099] 术语基因或蛋白质的“直向同源物”在本文中指在另一个物种中发现的同源基因或蛋白质，其具有与基因或蛋白质相同的功能，但(通常)从物种具有偏离的基因(即，通过物种形成从共同的祖先进化的基因)的时间点开始，其序列偏离。因此，可以基于序列比较(例如，基于整个序列或特定结构域的百分比序列同一性)和/或功能分析，在其他的植物物种(例如，其他豆类植物物种，例如其他十字花科植物，或豆科(Fabaceae)植物，例如如菜豆属(Phaseolus)物种或大豆(Glycine max))中鉴定欧洲油菜CKX3或CKX5基因的直向同源物。

[0100] 本文中使用的“品种”与UPOV规范一致，指在单个已知最低级别的植物分类单位中的植物分组，所述分组可以通过由给定基因型或基因型的组合所导致的特征的表达来定

义,可以通过至少一种所述特征的表达来与任何其他植物分组进行区分,并且在关于它进行无变化(稳定)繁殖的适合性方面可认为是一个单位。

[0101] 术语“包含”理解为具体说明了所陈述部分、步骤或组分的存在,但不排除存在一种或多种其他的部分、步骤或组分。因此,包含一些性状的植物可以包含其他的性状。

[0102] 可以理解,当以单数形式(例如,植物或根)指代词时,复数形式(例如,复数的植物,复数的根)也包括在内。因此,通过不定冠词但属性是(“a”或“an”)指代元件时,不排除存在一个以上的元件的可能性,除非上下文明确的要求有且仅有一个元件。因此,不定冠词单数形式(“a”或“an”)通常意指“至少一个”。

[0103] 出于本发明的目的,两个相关核苷酸或氨基酸序列的“序列同一性”表示为百分比,指两条最优比对的序列中具有相同残基的位置数($\times 100$)除以比较的位置数。将空位视为具有不相同残基的位置,所述空位是比对中这样的位置,所述位置上的残基存在于一条序列中,而不存在于另一条序列中。根据European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS, Rice等人, 2000, Trends in Genetics 16 (6): 276-277; 参见例如<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/CKX3或CKX5ex.html>)中的Needleman和Wunsch总体对比算法(Needleman和Wunsch, 1970, J Mol Biol 48 (3): 443-53), 使用缺省设置(空位开放罚分=10 (对于核苷酸)/10 (对于蛋白质)和空位延伸罚分=0.5 (对于核苷酸)/0.5 (对于蛋白质)), 通过在全长比对两条序列来发现两条序列的“最优比对”。对于核苷酸,使用的缺省评分矩阵是EDNAFULL,而对于蛋白质,缺省的评分矩阵是EBLOSUM62。

[0104] 如本文中使用的,“基本相同(substantially identical)”或“实质相似(essentially similar)”指,当如上述进行最优比对时,至少具有某一最小百分比的序列同一性(如下文进一步定义)的序列。

[0105] 可以使用“严格杂交条件”来鉴定与给定的核苷酸序列基本相同的核苷酸序列。严格条件是序列依赖性的,在不同环境中可以不同。通常,选择的严格条件是比特定的序列在定义的离子强度和pH下的热解链点(T_m)低约5℃。 T_m 是(在定义的离子强度和pH下)50%的靶序列与完全匹配的探针杂交的温度。通常,所选择的严格条件是在pH7和至少60℃的温度下,盐浓度为约0.02摩尔。降低盐浓度和/或增加温度,可增加严格性。用于RNA-DNA杂交的严格条件(Northern印迹,使用探针例如100nt)是,例如包括至少一次在63℃下,在0.2X SSC中洗涤20min(分钟)的条件,或等价的条件。

[0106] “高严格条件”可以例如通过如下提供:在65℃的水溶液中杂交,所述溶液含有6x SSC (20x SSC含有3.0M NaCl, 0.3M Na-柠檬酸, pH 7.0), 5x Denhardt's (100X Denhardt's含有2% Ficoll, 2% 聚乙烯吡咯烷酮, 2% 牛血清白蛋白), 0.5% 十二烷基硫酸钠(SDS), 和作为非特异性竞争物的20μg/ml变性的载体DNA(单链鱼精子DNA, 具有平均长度为120-3000核苷酸)。在杂交后,可以在若干步骤中进行高严格洗涤,最终洗涤(约30分钟)是在杂交温度下, 0.2-0.1X SSC, 0.1% SDS中进行。

[0107] “中严格条件”指与上述溶液杂交相当的条件,但是在约60-62℃。中等严格洗涤可以在杂交温度下, 1X SSC, 0.1% SDS中进行。

[0108] “低严格性”指与上述溶液杂交相当的条件,但是在约50-52℃。低严格洗涤可以在杂交温度下, 2X SSC, 0.1% SDS中进行。还参见Sambrook等人, (1989) 以及Sambrook和Russell (2001)。

[0109] “增加的产量”或“增加的收获产量”或“增加的种子或谷粒产量”指：较之从相似量的无突变CKX3或CKX5等位基因的等基因(isogenic)植物收获的种子或谷粒的量而言，从多株植物(每株包含根据本发明的突变CKX3或CKX5等位基因)收获的更大量的种子或谷粒。产量典型地以每表面单位收获的种子或谷粒的体积单位表示，例如蒲式耳/英亩或Kg/ha(尽管可以使用其他单位，例如克/测试图或甚至克/植物)。产量增加典型地以百分比表示，其中参照或对照植物的产量计为100%，根据本发明的植物的产量以相对对照植物的产量的%表示。产量增加可以是至少101%，至少102%，至少103%，至少105%，至少108%至少110%的产量。。

[0110] “千粒重”(TSW)是指千粒种子或谷粒的克数。增加的千粒重“是指当与从相似数量的没有突变CKX5或CKX3/CKX5等位基因的同基因植物收获的1000粒种子或谷粒的重量相比时，从包含根据本发明的突变CKX5或CKX3/CKX5等位基因的植物收获的1000粒种子的更大重量。

[0111] “增加的花数”或“增加的主枝上的花数”是指当与植物上的花量，相应地植物主枝上较大的花量，优选不含突变CKX5或CKX3/CKX5等位基因的等基因植物相比较时，包括根据本发明的突变CKX5或CKX3/CKX5优选等位基因的植物上的花量更大，相应地植物主枝上的花量更大。

[0112] “增加的荚数”或“增加的主枝上的荚数”是指植物上更大量的荚，即植物主要分支上更大量的荚，包含突变的CKX5或CKX3/CKX5等位基因根据本发明，当与植物上的荚量相比时，在没有突变的CKX5或CKX3/CKX5等位基因的植物的主要分支(诸如同基因植物)上分别具有更大量的荚。

[0113] 发明详述

[0114] 欧洲油菜(基因组AACC, $2n=4x=38$)，由于它来源于二倍体祖先，因此是一种基本上含有两个二倍体基因组(A和C基因组)的四倍体(双二倍体)物种。欧洲油菜在其基因组中包含四个CKX3基因；两个CKX3基因位于A基因组(以下称为CKX3-A1和CKX3-A2)，两个CKX3基因位于C基因组上，以下称为CKX3-C1和CKX3-C2。欧洲油菜在其基因组中还包含两个CKX5基因；一个CKX5基因位于A基因组(以下称为CKX5-A1)上，一个CKX5基因位于C基因组上，以下称为CKX5-C1。发明人发现，CKX5的突变等位基因或CKX5和CKX3的突变等位基因的存在增加了每株植物的花数，特别是主枝上的花数。还可以增加主枝上的荚数，以及主枝上每荚种子数。此外，可实现千粒重(TSW)的增加，特别是较高的TSW，而对种子产量没有显著的负面影响。

[0115] 本申请涉及其中CKX5或CKX5和CKX3的表达功能性降低的芸苔属植物。功能性降低的表达可以是CKX3/CKX5蛋白质生产和/或活性的降低。

[0116] 因此，第一方面，提供了包含至少一个，优选两个CKX5基因的芸苔属植物，其特征在于它在其基因组中包含至少一个突变CKX5等位基因。另一方面，提供了包含至少一个CKX5和至少两个CKX3基因，优选两个CKX5基因和四个CKX3基因的芸苔属植物，其特征在于它在其基因组中包含至少一个突变CKX5等位基因和一种突变CKX3。

[0117] 另一方面，突变CKX3等位基因是CKX3基因的突变等位基因，其包含选自以下的核酸序列：

[0118] -与SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:16具有至少90%序

列同一性的核苷酸序列；

[0119] -包含与SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:17具有至少90%序列同一性的编码序列的核苷酸序列；和

[0120] -编码与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的核苷酸序列；和

[0121] 突变型CKX 5等位基因是包含选自以下的核酸序列的CKX基因的突变型等位基因：

[0122] -与SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:23具有至少90%序列同一性的核苷酸序列；

[0123] -包含与SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:23具有至少90%序列同一性的编码序列的核苷酸序列；和

[0124] -编码与SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:24具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的核苷酸序列。

[0125] 另一方面，根据本发明的植物是包含两个CKX5和四个CKX3基因的芸苔属植物，所述芸苔属植物选自欧洲油菜、芥菜和埃塞俄比亚芥。在另一个实施方式中，根据本发明的植物包含至少两个突变CKX5等位基因或至少三个突变CKX5等位基因或四个变体CKX5等位基因或至少两个、三个或四个突变CKX5等位基因和三个突变CKX3等位基因，或至少四个突变CKX3等位基因或至少五个突变CKX3等位基因或至少六个突变CKX3等位基因或至少七个突变CKX3等位基因或至少八个突变CKX3等位基因。

[0126] 在又一个实施方式中，根据本发明的植物包含选自以下的突变CKX5等位基因：

[0127] -在对应于SEQ ID NO:19的位置465或SEQ ID No.20的位置465的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因；

[0128] -在对应于SEQ ID NO:19的位置399或SEQ ID NO:20的位置399的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因；

[0129] -在对应于SEQ ID NO:22的位置465或SEQ ID No.23的位置399的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因；

[0130] 或所述植物包含选自以下的突变CKX3等位基因：

[0131] -在对应于SEQ ID NO:7的位置2244或SEQ ID No.8的位置1093的位置包含C至T取代的突变CKX3等位基因；

[0132] -在对应于SEQ ID NO:10的位置2482或SEQ ID NO:11的位置1168的位置包含C至T取代的突变CKX3等位基因；

[0133] -在对应于SEQ ID NO:13的位置1893或SEQ ID No.14的位置876的位置包含G至A取代的突变CKX3等位基因；

[0134] -在对应于SEQ ID NO:16的位置2171或SEQ ID NO:17的位置982的位置包含C至T取代的突变CKX3等位基因。

[0135] 在又一个实施方式中，根据本发明的植物包含至少一种变体CKX5蛋白质，其中变体CKX5蛋白质包含选自以下的氨基酸序列：

[0136] -SEQ ID No.29的氨基酸序列；

[0137] -SEQ ID No.30的氨基酸序列；或

[0138] -SEQ ID No.31的氨基酸序列。

[0139] 根据本发明的植物可以除变体CKX5蛋白质之外还包含至少一种变体CKX3蛋白质，

其中变体CKX3蛋白质包含选自以下的氨基酸序列:

[0140] -SEQ ID No.25的氨基酸序列;

[0141] -SEQ ID No.26的氨基酸序列;

[0142] -SEQ ID No.27的氨基酸序列;或

[0143] -SEQ ID No.28的氨基酸序列。

[0144] 在又一个实施方式中,所述植物对于突变CKX5等位基因是纯合的,或者对于突变CKX5和突变CK3等位基因都是纯合的。在又一个实施方式中,所述植物具有每株植物增加的花数。在又一个实施方式中,所述植物具有增加的单株荚数。在又一个实施方式中,所述植物具有增加的TSW。

[0145] 另一个实施方式提供根据本发明的植物的植物细胞、荚、种子或子代。

[0146] 在又一个实施方式中,提供了芸苔属植物,其包含其中至少一个CKX5基因或至少一个CKX5和至少一个CKX3基因的表达减少。例如,可以通过将嵌合基因导入所述植物中来降低表达,所述植物包含产生抑制一个或多个CKX5或CKX5和CKX3基因表达的RNA分子的DNA区域。在一个实施方式中,所述植物包含嵌合基因,所述嵌合基因包含以下有效连接的DNA片段:

[0147] i.植物可表达的启动子;

[0148] ii.DNA区,当转录时产生抑制一种或多种编码CKX5或CKX5和CKX3基因的表达的RNA或蛋白质分子;并且任选地,

[0149] iii.涉及转录终止和聚腺苷酸化的3'端区域。

[0150] 所述DNA区域可以通过共抑制产生能够下调一个或多个CKX5或CKX3基因表达的有义RNA分子。转录的DNA区将在转录后产生能够以转录或转录后方式降低靶标植物或植物细胞中CKX5或CKX3基因表达的所谓有义RNA分子。转录的DNA区域(和所产生的RNA分子)包含与存在于植物细胞或植物中的一个或多个CKX5或CKX3基因的部分核苷酸序列具有至少95%的序列同一性,优选相同的至少19或20个连续的核苷酸。因此,对于CKX3抑制性RNA,DNA区域可以包含SEQ ID No:7、8、10、11、13、14、16或17的核苷酸序列的至少19或20个连续核苷酸和/或对于CKX5抑制性RNA,DNA区域可以包含SEQ ID No:19、20、22或23的核苷酸序列的至少19或20个连续核苷酸。

[0151] 所述DNA区域还可以产生能够下调一个或多个CKX5或CKX3基因表达的反义RNA分子。转录的DNA区在转录后将产生能够以转录或转录后方式降低靶标植物或植物细胞中CKX5或CKX3基因表达的所谓反义RNA分子。转录的DNA区域(和所得到的RNA分子)包含与植物细胞或植物中存在的一种或多种功能性CKX5或CKX3基因的核苷酸序列的互补序列具有至少95%序列同一性的至少20个连续核苷酸。因此,对于CKX3抑制性RNA,DNA区域可以包含SEQ ID No:7、8、10、11、13、14、16或17的核苷酸序列的互补序列的至少19或20个连续核苷酸和/或对于CKX5抑制性RNA,DNA区域可以包含SEQ ID No:19、20、22或23的核苷酸序列的互补序列的至少19或20个连续核苷酸。

[0152] 约20nt的CKX5或CKX3基因的反义或有义RNA区域的最小核苷酸序列可以包含在较大的RNA分子内,其大小从20nt变化到等于靶基因大小的长度。所提及的反义或有义核苷酸区域因此可以是约21nt至约1300nt长,例如21nt,40nt,50nt,100nt,200nt,300nt,500nt,1000nt或甚至约长度为1300nt或更大。此外,为了本发明的目的,所用的抑制性CKX5或

CKX3RNA分子的核苷酸序列或转基因的编码区与内源性CKX5或CKX3基因完全相同或互补，其表达的目标是在植物细胞中减少。序列越长，对整体序列同一性的要求就越不严格。因此，正义或反义区域可以具有与内源性CKX5或CKX3基因或其补体的核苷酸序列约40%或50%或60%或70%或80%或90%或100%的整体序列同一性。然而，如上所述，反义或有义区应包含与内源性CKX5或CKX3基因的核苷酸序列具有约95至约100%序列同一性的20个连续核苷酸的核苷酸序列。约95至约100%序列同一性的片段可以是约50、75或100nt。明确的是，所提及的长度和序列同一性之间的所有组合可以以有义和/或反义方向进行。

[0153] 上述嵌合基因对反义RNA或有义RNA介导的基因表达水平下调的效率可通过包含导致表达异常的非聚腺苷酸化的CKX5或CKX3抑制性RNA分子的DNA元件而进一步增强。适用于该目的的一种此类DNA元件是编码自剪切核酶的DNA区域，如WO 00/01133中所述。如WO 03/076619中所述，通过为产生的RNA分子提供核定位或保留信号也可以提高效率。

[0154] 所述DNA区域还可以产生能够下调CKX5或CKX3基因表达的双链RNA分子。在DNA区域转录后，RNA能够通过正义和反义区域之间的常规碱基配对形成dsRNA分子，其中正义和反义区域是如上所述的核苷酸序列。根据本发明的编码dsRNA的CKX5或CKX3表达减少的嵌合基因可以进一步包含内含子，例如异源内含子，例如位于根据WO 99/53050的公开内容（在此引入作为参考）的有义和反义RNA区域之间的间隔序列中。为了实现这种转基因的构建，可以使用WO 02/059294 A1中描述的载体。

[0155] 所述DNA区域还可以产生pre-miRNA分子，其被加工成能够指导CKX5或CKX3mRNA裂解的miRNA。miRNAs是调节植物中基因表达的小内源RNA，也在其他真核生物中的基因表达。在植物中，这些约21个核苷酸长的RNA通过DICERLIKE1 (DCL1) 的切割活性从长内源pre-miRNA的茎环区域加工而来。植物miRNA与保守的靶mRNA高度互补，并指导其靶标的切割。miRNA似乎是调节发育中涉及的复杂的通路网络的基因表达的关键组分。

[0156] 如本文所用，“miRNA”是长度约20至22个核苷酸的RNA分子，其可以加载到RISC复合物中并指导靶RNA分子的切割，其中靶RNA分子包含基本上与miRNA分子的核苷酸序列互补的核苷酸序列，从而可能发生一种或多种以下错配：

[0157] -所述miRNA的5'端的核苷酸与靶RNA分子中的相应核苷酸序列之间的错配；

[0158] -所述miRNA的位置1至位置9中的任何一个核苷酸与靶RNA分子中的相应核苷酸序列之间的错配；

[0159] -在所述miRNA的位置12位至位置21的任何一个核苷酸与靶RNA分子中的相应核苷酸序列之间存在三个错配，前提是不超过两个连续的错配；

[0160] -在miRNA的位置10和11不允许有任何错配（所有miRNA位置是从miRNA分子的5'端开始指示）。

[0161] 如本文所用，“pre-miRNA”分子是具有约100至约200个核苷酸，优选约100至约130个核苷酸的RNA分子，其可以采用包含dsRNA茎和单链RNA环的二级结构，并且在双链RNA茎中进一步包括miRNA的核苷酸序列以及它的补体(miRNA*)的序列。优选地，miRNA及其补体位于从miRNAdsRNA茎的自由端的约10个至约20个核苷酸处。单链环区的长度和序列不是关键的并且可以变化相当大，例如长度在30nt与50nt之间。优选地，在未配对RNA结构与配对RNA结构之间的自由能的差异在-20千卡/摩尔与-60千卡/摩尔之间，特别是在-40千卡/摩尔附近。miRNA与miRNA*之间的互补性不需要是完美的并且可以容忍未配对的核苷酸的约1

个至3个凸起。可以通过本领域中常规的计算机算法(例如mFold、UNAFold以及RNAFold)来预测RNA分子采用的二级结构。来自pre-miRNA的由DCL活性释放并且被装载到RISC复合体上的dsRNA茎的具体的链由5'末端的互补性的程度决定,由此在其5'末端最少涉及被切割的dsRNA茎的不同链的核苷酸之间的氢键作用的链被装载到RISC复合体上并且将决定靶RNA分子降解的序列特异性。然而,如果以经验为主地,因为“错的”链被装载到RISC复合体上,来自具体合成的pre-miRNA分子的miRNA分子是非功能性的,那么将立即明显的是这个问题可以通过交换miRNA分子及其补体在pre-miRNA分子的dsRNA茎的对应的链上的位置来解决。如本领域中已知的,涉及两个氢键的A与U之间的结合、或涉及两个氢键的G与U之间的结合比涉及三个氢键的G与C之间的结合要弱。

[0162] miRNA分子可以被包含在其天然pre-miRNA分子内,但是还可以通过将正常地加工自此类已经存在的pre-miRNA分子的miRNA分子的核苷酸序列换为感兴趣的另一个miRNA的核苷酸序列来将它们引入进已经存在的pre-miRNA分子支架中。pre-miRNA的支架还可以是完全合成的。同样地,合成的miRNA分子可以被包含在已经存在的pre-miRNA分子支架或合成的pre-miRNA分子支架中,并且从其中加工。

[0163] 也适用于本发明的是包含至少两个CKX5或CKX3基因的芸苔属植物,其中CKX5或CKX3蛋白质活性降低,例如包含编码显性负性CKX5或CKX3蛋白质的DNA构建体植物的芸苔属植物或者编码CKX5或CKX3蛋白质的失活抗体的DNA构建体,或者编码使CKX5或CKX3蛋白质特异性失活的蛋白质的DNA构建体,例如具有特异性CKX5或CKX3结合结构域和蛋白切割活性的蛋白。“抗CKX5或CKX3蛋白质的失活抗体”是特异性结合至少一些CKX5或CKX3PGAZ蛋白的表位并抑制靶蛋白活性的抗体或其部分。例如,通过聚集CKX5或CKX3蛋白质(参见例如W02007/071789)或通支架靶蛋白(参见例如W02009/030780)也可以降低CKX5或CKX3蛋白质活性。

[0164] 所述包含至少两个CKX5或CKX3基因(其中至少一个CKX5或CKX3基因的表达减少)的芸苔属植物可以是例如包含四个CKX5或CKX3基因的芸苔属植物,所述芸苔属植物选自欧洲油菜、芥菜和埃塞俄比亚芥。在所述芸苔属植物中,可以降低至少一种,或至少两种,或至少三种或四个CKX5或CKX3基因的表达。

[0165] 因此,第一方面,提供了包含至少一个,优选两个CKX5基因的芸苔属植物,其特征在于它在其基因组中包含至少一个突变CKX5等位基因。另一方面,提供了包含至少一个CKX5和至少两个CKX3基因,优选两个CKX5基因和四个CKX3基因的芸苔属植物,其特征在于它在其基因组中包含至少一个突变CKX5等位基因和一个突变CKX3。

[0166] 所述芸苔属植物包含至少一个CKX5基因,优选两个CKX5基因,其中至少一个CKX5基因的表达被降低,并且包含至少两个种,优选四个CKX3基因,其中至少一个CKX3基因的表达被降低,例如,可以是包含两个CKX5基因的芸苔属植物,所述芸苔属植物选自欧洲油菜、芥菜和埃塞俄比亚芥。在所述芸苔属植物中,可以减少至少一种,或至少两种,或至少三种或四个CKX3基因的表达,和/或可以减少至少一种或两个CKX5基因的表达。根据本发明,本发明的植物可以用于育种目的。

[0167] 在本发明的另一方面,提供了芸苔属CKX3或CKX5基因的突变等位基因,其中所述CKX3基因选自以下:

[0168] -与SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:16具有至少90%序

列同一性的核苷酸序列；

[0169] -包含与SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:17具有至少90%序列同一性的编码序列的核苷酸序列；和

[0170] -编码与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的核苷酸序列；和

[0171] 其中所述CKX5基因包含选自以下的核酸序列：

[0172] -与SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23具有至少90%序列同一性的核苷酸序列；；

[0173] -包含与SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:23具有至少90%序列同一性的编码序列的核苷酸序列；和

[0174] -编码与SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:24具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的核苷酸序列。

[0175] 在另一个实施方式中，所述突变等位基因选自以下：

[0176] -在对应于SEQ ID NO:19的位置465或SEQ ID No.20的位置465的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因；

[0177] -在对应于SEQ ID NO:19的位置399或SEQ ID NO:20的位置399的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因；

[0178] -在对应于SEQ ID NO:22的位置465或SEQ ID No.23的位置399的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因；

[0179] -在对应于SEQ ID NO:7的位置2244或SEQ ID No.8的位置1093的位置包含C至T取代的突变CKX3等位基因；

[0180] -在对应于SEQ ID NO:10的位置2482或SEQ ID NO:11的位置1168的位置包含C至T取代的突变CKX3等位基因；

[0181] -在对应于SEQ ID NO:13的位置1893或SEQ ID No.14的位置876的位置包含G至A取代的突变CKX3等位基因；

[0182] -在对应于SEQ ID NO:16的位置2171或SEQ ID NO:17的位置982的位置包含C至T取代的突变CKX3等位基因。

[0183] 还提供了在芸苔属植物中产生和组合突变体和野生型CKX等位基因的方法，由此在这些植物中花或荚数或TSW增加。这些植物用于将突变CKX等位基因转移到其他植物的用途也是本发明的一个实施方式，所描述的任何植物的植物产物也是如此。另外，提供了用于标记辅助选择(MAS)以组合或检测CKX基因和/或等位基因的试剂盒和方法。下面详细描述本发明的每个实施方式。

[0184] 本发明的核酸

[0185] 提供了来自十字花科(特别是来自芸苔属的物种，尤其是来自欧洲油菜)的CKX3和CKX5基因的野生型CKX3和CKX5核酸序列(编码功能性CKX3和CKX5蛋白质)和突变CKX3和CKX5核酸序列(包含一处或多处突变，优选地，导致编码的CKX3和CKX5蛋白质的生物活性显著降低或消失的突变，或者导致不产生CKX3和CKX5蛋白质的突变)。例如，包含A和/或C基因组的芸苔属的物种可包含CKX3-A或CKX3-C或CKX5-A和CKX5-C基因的不同等位基因，在根据本发明的单株植物中可鉴定和组合它们。此外，可使用诱变或基因靶向方法来在野生型

CKX3和CKX5等位基因中产生突变,由此产生根据本发明使用的突变CKX3和CKX5等位基因。因为优选通过杂交和选择在植物中组合特定的CKX3和CKX5等位基因,因此在一种实施方式中,在植物(例如芸苔属植物,优选是可与欧洲油菜杂交或可用于制造“合成”欧洲油菜植物的芸苔属植物)中提供CKX3和/或CKX5核酸序列(即,内源的)。不同芸苔属物种之间的杂交被描述于本领域中,例如参见Snowdon (2007, Chromosome research 15:85-95)。物种间杂交可例如用于将基因从例如欧洲油菜 (AACC) 中的C基因组转移到埃塞俄比亚芥 (BBCC) 中的C基因组,或者甚至从例如欧洲油菜 (AACC) 中的C基因组转移到芥菜 (AABB) 中的B基因组(通过其C和B基因组之间的非常规重组的散发事件进行)。可通过将原始祖先甘蓝 (CC) 和芜菁 (AA) 杂交来生产“再合成”或“合成”的欧洲油菜品系。在芸苔属作物物种及其亲属物种之间的杂交中,物种间以及属间不相容障碍可被成功克服,例如通过胚胎拯救技术或原生质体融合(见例如上文的Snowdon)。

[0186] 但是,本发明中还提供了经分离的CKX3和CKX5核酸序列(例如通过克隆从植物分离或通过DNA合成来合成制造)及其变体以及它们任何的片段,它们可用于确定植物或植物部分中内源存在哪些序列,所述序列是否编码功能性、非功能性的蛋白质或不编码蛋白质(例如通过按照下文所述在重组宿主细胞中表达)以及用于选择特定等位基因和将其从一种植物转移到另一种,以产生具有想要的功能性和突变等位基因组合的植物。

[0187] 已经从欧洲油菜分离出了CKX3和CKX5的核酸序列(BnCKX3-A1、BnCKX3-A2、BnCKX3-C1, 和BnCKX3-C2; BnCKX5-A1和BnCKX5-C1),如序列表中所示。描述了野生型CKX3和CKX5序列,同时下文和实施例中还参照野生型CKX3和CKX5序列描述了这些序列以及与其实质上相似的序列的突变CKX序列。来自欧洲油菜、芥菜和甘蓝和黑芥的编码CKX3和CKX5蛋白质的基因组DNA含有四个内含子。

[0188] 根据本发明的“BnCKX3-A1核酸序列”或“BnCKX3-A1变体核酸序列”是编码与SEQ ID NO:9具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的核酸序列,或是与SEQ ID NO:7具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列或是具有与SEQ ID NO:8具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的cDNA序列。这些核酸序列还可被称为与序列表中提供的CKX3序列“实质相似”或“实质相同”。

[0189] 根据本发明的“BnCKX3-A2核酸序列”或“BnCKX3-A2变体核酸序列”是编码与SEQ ID NO:12具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的核酸序列,或是与SEQ ID NO:10具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列或是具有与SEQ ID NO:11具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的cDNA序列。这些核酸序列还可被称为与序列表中提供的CKX序列“实质相似”或“实质相同”。

[0190] 根据本发明的“BnCKX3-C1核酸序列”或“BnCKX3-C1变体核酸序列”是编码与SEQ ID NO:15具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的核酸序列,或是与SEQ ID NO:13具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列或是具有与SEQ ID

NO:14具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的cDNA序列。这些核酸序列还可被称为与序列表中提供的CKX序列“实质相似”或“实质相同”。

[0191] 根据本发明的“BnCKX3-C2核酸序列”或“BnCKX3-C2变体核酸序列”是编码与SEQ ID NO:18具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的核酸序列,或是与SEQ ID NO:16具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列或是具有与SEQ ID NO:17具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的cDNA序列。这些核酸序列还可被称为与序列表中提供的CKX序列“实质相似”或“实质相同”。

[0192] 根据本发明的“BnCKX5-A1核酸序列”或“BnCKX5-A1变体核酸序列”是编码与SEQ ID NO:21具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的核酸序列,或是与SEQ ID NO:19具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列或是具有与SEQ ID NO:20具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的cDNA序列。这些核酸序列还可被称为与序列表中提供的CKX序列“实质相似”或“实质相同”。

[0193] 根据本发明的“BnCKX5-C1核酸序列”或“BnCKX5-C1变体核酸序列”是编码与SEQ ID NO:24具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的核酸序列,或是与SEQ ID NO:22具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列或是具有与SEQ ID NO:23具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的cDNA序列。这些核酸序列还可被称为与序列表中提供的CKX序列“实质相似”或“实质相同”。

[0194] 因此提供本发明编码野生型功能性CKX3和CKX5蛋白质的核酸序列,包括其变体和片段(如下文所定义的)以及上述任何的突变核酸序列,其中,核酸序列中的突变优选导致较之野生型CKX3或CKX5蛋白质而言一个或多个氨基酸被插入、缺失或取代。优选地,核酸序列中的一个或多个突变导致一处或多处氨基酸改变(即,相对于野生型氨基酸序列而言,一个或多个氨基酸被插入、缺失和/或取代),由此CKX3或CKX5蛋白质的生物活性显著降低或完全消失。CKX3或CKX5蛋白质的生物活性显著降低或完全消失在本文中表达CKX3或CKX5蛋白质的底物结合活性和/或催化能力降低或消失,使得表达突变CKX3或CKX5蛋白质的植物的花数、荚数和/或TSW较之表达相应野生型CKX3或CKX5蛋白质的植物而言有所增加。

[0195] 为了确定植物中,特别是芸苔属植物中特定CKX等位基因/蛋白质的功能性,植物上花数可以通过如下文实施例中所述的计数和/或通过显微测试来测定以检查,例如,分生组织特别是花分生组织是否以及如何受CKX5或CKX5和CKX3中的突变影响。或者,可通过本领域已知的重组DNA技术评估特定CKX3或CKX5等位基因/蛋白质的功能,例如通过在宿主细胞(例如细菌,如大肠杆菌)中表达CKX3或CKX5并评估例如底物结合活性或体外催化细胞分裂素如异戊烯基腺嘌呤的氧化。

[0196] 本文提供了内源和经分离的核酸序列。还提供了CKX3或CKX5序列的片段和CKX3或

CKX5变体核酸序列(如上文定义的),它们用作为引物或探针以及用作为根据本发明的另一方面(见下文)的试剂盒的组分。CKX3或CKX5或CKX核酸序列或其变体(如所定义的)的“片段”长度可以变化,例如,各CKX或CKX序列(或变体序列)的至少10、12、15、18、20、50、100、200、500、800、1000或1500个连续核苷酸。

[0197] 编码功能性CKX3或CKX5蛋白质的核酸序列

[0198] 序列表中示出的核酸序列编码来自欧洲油菜的野生型功能性CKX3或CKX5蛋白质。因此,这些序列对于从其中分离出它们的欧洲油菜植物而言是内源的。可对其他芸苔属作物物种、品种、育种品系或野生登记种加以筛选,来筛选其他CKX3或CKX5等位基因,其编码相同的CKX3或CKX5蛋白质或其变体。例如,可使用核酸杂交技术(例如Southern印迹分析,其中使用例如严格杂交条件)或基于PCR的技术,来鉴定其他芸苔属植物(例如多种欧洲油菜品种、品系或登记种)内源的CKX3或CKX5等位基因,以及可针对其他野生型CKX3或CKX5等位基因,来筛选芥菜(尤其是A-基因组上的CKX3或CKX5等位基因)、埃塞俄比亚芥(尤其是C-基因组上的CKX3或CKX5等位基因)和芜菁(尤其是A-基因组上的CKX3或CKX5等位基因)和甘蓝(尤其是C-基因组上的CKX3或CKX5等位基因)植物、器官和组织。为针对CKX3或CKX5等位基因的存在筛选此类植物、植物器官或组织,可使用序列表中提供的CKX3或CKX5核酸序列或任何这些的变体或片段。例如,完全序列或片段可用作探针或引物。例如,可使用特异性的或简并引物,从植物、植物器官或组织的基因组DNA中扩增编码CKX3或CKX5蛋白质的核酸序列。可使用标准分子生物学技术,对这些CKX3或CKX5核酸序列加以分离和测序。然后可使用生物信息学分析来分析等位基因,例如,以确定哪些CKX3或CKX5等位基因对应该序列以及哪些CKX3或CKX5蛋白质或蛋白质变体是该序列编码的。

[0199] 可通过本领域已知的重组DNA技术来分析核酸序列是否编码功能性CKX3或CKX5蛋白质,例如通过遗传学互补测试,其中使用例如对于完全敲除型ckx3或ckx5突变等位基因来说是纯合的拟南芥属植物,或者对于CKX3或CKX5-A1和CKX3或CKX5-C1基因二者或CKX5-A1和CKX3-C1所有的完全敲除型ckx3或ckx5突变等位基因来说是纯合的欧洲油菜植物。

[0200] 此外,应当理解,可通过计算机方式,通过针对实质上相似的序列筛选核酸数据库,来鉴定CKX3或CKX5核酸序列及其变体(或它们中任何的片段)。类似地,可化学合成核酸序列。还提供了根据本发明的核酸分子的片段,下文中将对其进行进一步描述。

[0201] 编码突变CKX3或CKX5蛋白质的核酸序列

[0202] 相对于野生型核酸序列,包含一个或多个核苷酸缺失、插入或取代的核酸序列是发明的另一个实施方式,同样地此类突变核酸分子的片段也是。如下文进一步描述的,可以利用多种已知的方法产生和/或鉴别此类突变核酸序列(称为ckx3或ckx5序列)。此外,以内源性形式和以分离的形式提供了此类核酸分子。在一个实施方式中,突变导致所编码的CKX3或CKX5蛋白质的氨基酸序列中的一个或多个改变(缺失、插入和/或取代)(即,不是“沉默突变”)。在另一个实施方式中,核酸序列中的突变导致相对于野生型蛋白质,所编码的CKX3或CKX5蛋白质的生物学活性显著降低或完全消失。

[0203] 因此,核酸分子可以包含一个或多个突变,例如:

[0204] (a) “错义突变”,所述突变是核酸序列中的改变,其导致氨基酸取代另一个氨基酸;

[0205] (b) “无义突变”或“STOP密码子突变”,所述突变是核酸序列中的改变,其导致引入

过早的STOP密码子,从而终止翻译(导致截短的蛋白质);植物基因包含翻译终止密码子“TGA”(RNA中的UGA)、“TAA”(RNA中的UAA)和“TAG”(RNA中的UAG);因此,在待翻译的成熟mRNA中(在阅读框中)导致上述密码子之一的任何核苷酸取代、插入、缺失将终止翻译。

[0206] (c) 一个或多个氨基酸的“插入突变”,原因是在核酸的编码序列中添加一个或多个密码子;

[0207] (d) 一个或多个氨基酸的“缺失突变”,原因是在核酸的编码序列中缺失一个或多个密码子;

[0208] (e) “移码突变”,导致在突变下游以不同的框翻译核酸序列。移码突变可以具有各种原因,例如一个或多个核苷酸的插入、缺失或重复,其数量不能被3除。

[0209] 如已经提到的,核酸序列中的突变优选导致下述突变蛋白质是想要的,所述蛋白质包含显著降低的或者没有体内生物活性,或者想要导致不生产蛋白质。基本上,导致产生相对于野生型蛋白质而言包含至少一处氨基酸插入、缺失和/或取代的蛋白质的任何突变可导致显著降低的生物活性或没有生物活性。但是,应当理解,蛋白质某些部分中的突变更易于导致突变的CKX3或CKX5蛋白质功能降低,例如导致截短的蛋白质的突变,由此缺乏功能性结构域(例如FAD结合基序、细胞分裂素结合基序、GIWeVPHWLN基序和/或PGQxIF基序)的显著部分。

[0210] 表1和2中示出了拟南芥属和芸苔属CKX3和CKX5蛋白质序列中保守基序和催化性残基的氨基酸位置。

[0211] 表1:来自拟南芥和欧洲油菜的CKX3蛋白质中的保守区域

[0212]

		AtCKX3	Bn-CKX3 -A1	Bn-CKX3 -A2	Bn-CKX3 -C1	Bn-CKX3 -C2	YHIN501	YHIN512	YHIN521	YHIN531
SEQ ID No.:		3	9	12	15	18	25	26	27	28
信号肽	[_(1)_]	1至31	1至32	1至30	1至32	1至31	1至32	1至30	1至32	1至31
FAD-结合 PCHM-类型	[_(2)_]	66至243	67至244	65至242	67至244	66至243	67至244	65至242	67至244	66至243
FAD-结合	▲	100至104	101至105	99至103	101至105	100至104	101至105	99至103	101至105	100至104
FAD-结合	▲	105至106	106至107	104至105	106至107	105至106	106至107	104至105	106至107	105至106
Pros-8α -FAD 组氨酸	▲	105	106	104	106	105	106	104	106	105
通过羧基氧 的 FAD-结合	▲	110	111	109	111	110	111	109	111	110
糖基化	◇	153	154	152	154	153	154	152	154	153
通过酰胺氮 的 FAD-结合	▲	167	168	166	168	167	168	166	168	167
FAD-结合	▲	172	173	171	173	172	173	171	173	172
FAD-结合	▲	178至182	179至183	177至181	179至183	178至182	179至183	177至181	179至183	178至182
通过酰胺氮 和羧基氧的 FAD-结合	▲	233	234	233	234	233	234	233	234	233
细胞分裂素 结合	[_(3)_]	244至517	245至518	243至516	245至518	244至517	不存在	不存在	不存在	不存在
糖基化	◇	408	409	407	409	408	不存在	不存在	不存在	不存在
FAD-结合	▲	476	477	475	477	476	不存在	不存在	不存在	不存在
GIWeVPHW LN基序	■	374至385	375至386	373至384	375至386	374至385	不存在	373至384	不存在	不存在
PGQxIF 基 序	■	512至517	513至518	511至516	513至518	512至517	不存在	不存在	不存在	不存在

[0213] 表2:来自拟南芥和欧洲油菜的CKX5蛋白质中的保守区域

[0214]

		AtCKX5	Bn-CKX5-A1	Bn-CKX5-C1	YIIN801	YIIN805	YIIN811
SEQ ID No.:		6	21	24	29	30	31
信号肽	_(1)_	1 至 24	1 至 18	1 至 18	1 至 18	1 to 18	1 to 18
FAD-结合 PCHM-类型	_(2)_	63 至 241	55 至 233	55 至 233	不存在	不存在	不存在
FAD-结合	▲	97 至 101	89 至 93	89 至 93	89 至 93	89 至 93	89 至 93
FAD 结合	▲	102-103	94 至 95	94 至 95	94 至 95	94 至 95	94 至 95
Pros-8α-FAD 组氨酸	▲	102	94	94	94	94	94
通过羧基氧的 FAD-结合	▲	107	99	99	99	99	99
通过酰胺氮的 FAD-结合	▲	165	157	157	不存在	不存在	不存在
FAD-结合	▲	170	162	162	不存在	不存在	不存在
FAD-结合	▲	176 至 180	168 至 172	168 至 172	不存在	不存在	不存在
通过酰胺氮和羧基氧的 FAD-结合	▲	231	223	223	不存在	不存在	不存在
细胞分裂素结合	_(3)_	242 至 520	234 至 512	234 至 512	不存在	不存在	不存在
糖基化	◇	310	302	302	不存在	不存在	不存在
糖基化	◇	406	398	398	不存在	不存在	不存在
FAD 结合	▲	479	471	471	不存在	不存在	不存在
GIWeVPHWLNL 基序	■	374 至 385	368 至 377	368 至 377	不存在	不存在	不存在
PGQxIF 基序	■	515 至 520	507 至 512	507 至 512	不存在	不存在	不存在

[0215] 拟南芥属CKX3和CKX5核酸(SEQ ID NO:1、2、4和5)和氨基酸(SEQ ID NO:3和6)序列与本发明的CKX3和CKX5核酸序列,特别是芸苔属CKX3和CKX5核酸和氨基酸序列的最佳比对,允许确定这些芸苔属序列中相应的保守结构域和氨基酸(关于芸苔属CKX3和CKX5序列,见表1和表2)的位置。

[0216] 因此,在一种实施方式中,提供了包含一种或多种任何类型的上文所述突变的核酸序列。在另一实施方式中,提供了包含一个或多个终止密码子(无义)突变、一个或多个错义突变和/或一个或多个移码突变的ckx3/ckx5-序列。提供了上述任何突变核酸序列本身(经分离的形式)以及内源包含此类序列的植物和植物部分。在下文的表中,描述了最优选的ckx3/ckx5-等位基因,如所示的,包含一个或多个ckx3/ckx5-等位基因的欧洲油菜种子的种子保藏物已被保藏。

[0217] 在本文中使用,CKX3或CKX5等位基因中的无义突变是CKX3或CKX5等位基因中的下述突变,由所述突变向相应野生型CKX3或CKX5等位基因的编码DNA和相应mRNA序列中引入一个或多个翻译终止密码子。翻译终止密码子是TGA(mRNA中是UGA)、TAA(UAA)和TAG(UAG)。因此,导致在编码序列中产生框内终止密码子的任何突变(缺失、插入或取代)将导致翻译终止以及氨基酸链的截短。在一种实施方式中,包含无义突变的突变CKX3或CKX5等位基因是这样的CKX3或CKX5等位基因,其中,通过单核苷酸取代,例如CAG至TAG、TGG至TAG、TGG至TGA或CAA至TAA的突变,在CKX3或CKX5密码子序列中引入框内终止密码子。在另一实施方式中,包含无义突变的突变CKX3或CKX5等位基因是这样的CKX3或CKX5等位基因,其中,通过双核苷酸取代,例如CAG至TAA、TGG至TAA或CGG至TAG或TGA的突变,在CKX3或CKX5密码子序列中引入框内终止密码子。在还一种实施方式中,包含无义突变的突变CKX3或CKX5等

位基因是这样的CKX3或CKX5等位基因,其中,通过三核苷酸取代,例如CGG至TAA的突变,在CKX3或CKX5密码子序列中引入框内终止密码子。截短的蛋白质缺乏突变下游的编码DNA编码的氨基酸(即CKX3或CKX5蛋白质的C-末端部分),但保持了突变上游的编码DNA编码的氨基酸(即,CKX3或CKX5蛋白质的N-末端部分)。在一种实施方式中,含无义突变的突变CKX3或CKX5是这样的,其中,无义突变在对应于SEQ ID NO:3的512-517的位置出的PGQXIF基序之前的任何地方存在,使得至少缺乏保守结构域PGQXIF。较之野生型CKX3或CKX5蛋白质而言突变CKX3或CKX5蛋白质越截短,截短越可能导致显著降低的CKX3或CKX5蛋白质活性或者没有活性。因此,在另一实施方式中,提供了包含导致少于大约517,518或516(缺乏完整的细胞分裂素结合位点)、少于大约244或245或243(缺乏完整的细胞分裂素结合位点)、少于大约233或234个氨基酸(缺乏在位置233的FAD结合氨基酸)、或者甚至氨基酸长度更短。参见表1和表2,指示特定YIIN等位基因中不再存在的保守区和结构域。

[0218] 如本文实施例中所述,明确的是,在对应于SEQ ID NO:3的位置364(YINN501)或对应于SEQ ID NO.3的位置389的位置截短的CKX等位基因(缺乏完整的细胞分裂素结合基序,GIWeVPHWLN基序和PGQxIF基序以及在对应于SEQ ID No.3的位置476或SEQ ID No.6的位置479的位置处的FAD结合位点,这是这些实施例中最大的截短的CKX蛋白质)有助于增加花数和TSW。因此,在一个具体的实施方式中,根据本发明的CKX3或CKX5等位基因编码缺乏GIWeVPHWLN基序,以及PGQxIF基序以及在对应于位置476的位置处的FAD结合位点的截短蛋白质。

[0219] 明显地,突变不限于上面表示的这些,应当理解,除了序列表中所示的和上表中提到的那些之外,其他ckx3/ckx5等位基因中也可存在类似的STOP(终止)突变。

[0220] 在本文中使用时,CKX3或CKX5等位基因中的错义突变是CKX3或CKX5等位基因中的下述任何突变(缺失、插入或取代),所述突变使得相应野生型CKX3或CKX5等位基因的编码DNA和相应mRNA序列中一个或多个密码子改变,导致野生型CKX3或CKX5蛋白质中的一个或多个氨基酸在突变CKX3或CKX5蛋白质中被取代为一个或多个其他氨基酸。在一种实施方式中,包含错义突变的突变CKX3或CKX5等位基因是下述CKX3或CKX5等位基因,其中,上文示出的或表1或2中的保守氨基酸中的一个或多个被取代。导致例如对应于SEQ ID NO:3的位置100至104、105至106、110、153、167、172、178至182、233、476、374至385或512至517的位置的氨基酸取代的错义突变的更可能导致CKX3蛋白质的显著降低或消失活性。类似的错义突变导致例如对应于SEQ ID NO:6的位置97至101、102至103、107、165、170、176至180、231、479、374至385或515至520位置处的氨基酸的取代更可能导致CKX5蛋白质的活性显著降低或无活性。

[0221] 在本文中使用时,CKX3或CKX5等位基因中的移码突变是CKX3或CKX5等位基因中的下述突变(缺失、插入、重复等等),其导致核酸序列在突变下游以不同的框被翻译。在一个实施方式中,包含移码突变的突变CKX3或CKX5等位基因是CKX3或CKX5等位基因,其包含编码PGQxIF基序的第一个氨基酸的密码子上游对应于SEQ ID NO:3的位置512或SEQ ID NO.6的位置515的移码突变,或者包含编码GIWeVPHWLN基序的第一个氨基酸的密码子的上游对应于SEQ ID NO:3的位置374或SEQ ID NO:6的位置374的移码突变,或包含编码细胞分裂素结合基序的第一个氨基酸的密码子上游的对应于SEQ ID NO:3的位置244或SEQ ID NO:6的位置242的移码突变,或者包含编码FAD基序的第一个氨基酸的密码子的上游对应于SEQ

ID NO:3的位置66或SEQ ID NO.6的位置63的移码突变,或包含编码FAD结合氨基酸的密码子上游的或对应于SEQ ID NO:3的位置100至104、105至106、110、153、167、172、178至182、233、476、374至385或512至517的位置处或对应于SEQ ID NO:6的位置97至101、102至103、107、165、170、176至180、231、479、374至385或515至520位置的移码突变。

[0222] 突变的CKX3或CKX5等位基因也可以是不产生CKX3或CKX5蛋白质的CKX3或CKX5等位基因。不产生蛋白质的突变等位基因的实例是具有导致mRNA不产生或降解的突变的等位基因,例如消除mRNA产生的启动子区域中的突变,导致mRNA降解的终止密码子突变(无义介导的衰变;参见,例如Baker和Parker,2004,Curr Opin Cell Biol 16:293),导致RNA降解的剪接位点突变(参见例如Isken和Maquat,2007,Genes Dev 21:1833)或蛋白质编码序列中的突变包含ATG起始密码子的突变或缺失,从而不产生蛋白质,或导致缺失(部分)蛋白质编码序列的基因的缺失。

[0223] 因此,根据本发明的突变CKX3或CKX5等位基因可以包含与SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:22具有至少90%但小于100%序列同一性的核苷酸序列;或可以包含含有与SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:23具有至少90%但小于100%序列同一性的编码序列的核苷酸序列;或可包含编码与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:24具有至少90%但小于100%序列同一性的氨基酸序列的核苷酸序列。所述至少90%可以是至少90%、或至少93%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%或99%。然而,根据本发明的突变CKX3或CKX5等位基因不能包含与上述序列具有100%序列同一性的核苷酸序列。此外,根据本发明的突变CKX3或CKX5等位基因可包含与上述序列低于90%的序列同一性,例如当部分或全部野生型CKX3或CKX5基因缺失时。在这种情况下,突变CKX3或CKX5等位基因也可以指对应于野生型CKX3或CKX5等位基因的遗传基因座的遗传基因座,其中CKX3或CKX5等位基因与野生型等位基因具有小于100%的序列同一性或者其中一部分或完整的CKX3或CKX5基因被删除。

[0224] 本发明的氨基酸序列

[0225] 提供了来自十字花科(特别是来自芸苔属的物种,尤其是来自欧洲油菜,芜菁,甘蓝和黑芥也可来自其他芸苔属作物物种)的野生型(功能性)CKX3或CKX5氨基酸序列和突变CKX3或CKX5氨基酸序列(包含一处或多处突变,优选是导致CKX3或CKX5蛋白质的生物活性显著降低或者没有活性的突变)两者。例如,包含A和/或C基因组的芸苔属物种可编码不同的CKX3-A或CKX3-A或CKX5-C或CKX5-C氨基酸。此外,可使用诱变或基因靶向方法来在野生型CKX3或CKX5等位基因中产生突变,由此产生可编码其他突变CKX3或CKX5蛋白质的突变等位基因。在一种实施方式中,在芸苔属植物中提供了野生型和/或突变CKX3或CKX5氨基酸序列(即,内源的)。但是,本发明还提供了经分离的CKX3或CKX5氨基酸序列(例如从植物分离的或者合成制造的)以及其变体和它们任何的片段。

[0226] CKX5或CKX3蛋白质的显著降低的或没有生物活性可以是与功能性CKX5或CKX3蛋白质(如由野生型CKX3或CKX5等位基因编码的功能性CKX5或CKX3蛋白质)相比,至少10%、或至少20%、或至少40%、或至少60%、或至少80%、或至少90%、或至少95%、或至少98%或100%的减少,其中不能检测到蛋白活性。细胞分裂素氧化酶活性可以例如如Liberos-Minotta和Tipton(1995) Analytical Biochemistry 231,339-341或Frebort等人(2002)

Analytical Biochemistry 306,1-7 (均通过引用并入本文)中所述来测定。

[0227] 已从欧洲油菜分离出了CKX3和CKX5蛋白质的氨基酸序列,如序列表所示。示出了野生型CKX3和CKX5序列,下文中参照野生型CKX3和CKX5序列描述了这些序列的以及与这些实质上相似的序列的突变CKX3和CKX5序列。

[0228] 如上文所述,本文所述的芸苔属的CKX3或CKX5蛋白质长度为大约520个氨基酸,其包含多个结构和功能结构域。

[0229] 根据本发明的“BnCKX3-A1氨基酸序列”或“BnCKX3-A1变体氨基酸序列”是与SEQ ID NO:9具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。这些氨基酸序列还被称为与序列表中提供的CKX3序列“实质上相似”或“实质上相同”。

[0230] 根据本发明的“BnCKX3-A2氨基酸序列”或“BnCKX3-A2变体氨基酸序列”是与SEQ ID NO:12具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。这些氨基酸序列还被称为与序列表中提供的CKX3序列“实质上相似”或“实质上相同”。

[0231] 根据本发明的“BnCKX3-C1氨基酸序列”或“BnCKX3-C1变体氨基酸序列”是与SEQ ID NO:15具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。这些氨基酸序列还被称为与序列表中提供的CKX3序列“实质上相似”或“实质上相同”。

[0232] 根据本发明的“BnCKX3-C2氨基酸序列”或“BnCKX3-C2变体氨基酸序列”是与SEQ ID NO:18具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。这些氨基酸序列还被称为与序列表中提供的CKX3序列“实质上相似”或“实质上相同”。

[0233] 根据本发明的“BnCKX5-A1氨基酸序列”或“BnCKX5-A1变体氨基酸序列”是与SEQ ID NO:21具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。这些氨基酸序列还被称为与序列表中提供的CKX5序列“实质上相似”或“实质上相同”。

[0234] 根据本发明的“BnCKX5-C1氨基酸序列”或“BnCKX5-C1变体氨基酸序列”是与SEQ ID NO:24具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。这些氨基酸序列还被称为与序列表中提供的CKX5序列“实质上相似”或“实质上相同”。

[0235] 因此,本发明提供野生型功能性CKX3或CKX5蛋白质的氨基酸序列,包括其变体和片段(如下文所定义的)以及上述任何的突变氨基酸序列,其中氨基酸序列中的突变优选导致较之相应野生型CKX3或CKX5蛋白质的生物活性而言CKX3或CKX5蛋白质的生物活性显著降低或完全消失。CKX3或CKX5蛋白质的生物活性显著降低或完全消失在本文中表示CKX3或CKX5蛋白质的底物结合活性或催化能力的降低或消失,使得相比于相应野生型植物的花数、荚数和/或TSW,表达突变CKX3或CKX5蛋白质的植物的花数、荚数和/或TSW较之表达相应野生型CKX3或CKX5蛋白质的植物而言有所增加。

[0236] 内源和经分离的氨基酸序列都被提供于本文中。还提供了CKX3或CKX5氨基酸序列和上文定义的CKX3或CKX5变体氨基酸序列的片段。CKX3或CKX5氨基酸序列或者其变体(如

上文所定义的)的“片段”长度可变,例如CKX3或CKX5序列(或其变体序列)的至少10、12、15、18、20、50、100、150、175、200、150、300、350或400个连续氨基酸。用于CKX3蛋白质的这种片段的实例是由SEQ ID No.25、SEQ ID No.26、SEQ ID No.27或SEQ ID No.28中的任一个的氨基酸序列组成的那些。用于CKX5蛋白质的这种片段的实例是由SEQ ID No.29、SEQ ID No.30或SEQ ID No.31中任一项的氨基酸序列组成的那些。

[0237] 功能性CKX3或CKX5蛋白质的氨基酸序列

[0238] 序列表中示出的氨基酸序列是来自欧洲油菜的野生型功能性CKX3或CKX5蛋白质。因此,这些序列是从其中分离出它们的芸苔属欧洲油菜植物内源的。可按照上文所述,针对具有相同氨基酸序列或其变体的其他功能性CKX3或CKX5蛋白质,对其他芸苔属作物物种、品种、育种品系或野生登记种加以筛选。

[0239] 此外,应当理解,可通过计算机方式,通过针对实质上相似的序列筛选氨基酸数据库,来鉴定CKX3或CKX5氨基酸序列及其变体(或它们中任何的片段)。还提供了根据本发明的氨基酸分子的片段。

[0240] 突变CKX3或CKX5蛋白质的氨基酸序列

[0241] 相对野生型氨基酸序列而言包含一处或多处氨基酸缺失、插入或取代的氨基酸序列也是本发明的另一实施方式,此类突变氨基酸分子的片段也如是。可使用多种已知方法(如上文描述的)来产生和/或鉴定此类突变氨基酸序列。此外,本文提供了内源形式和经分离形式的此类氨基酸分子。

[0242] 在一种实施方式中,氨基酸序列中的突变导致CKX3或CKX5蛋白质较之野生型蛋白质而言生物活性显著降低或完全消失。如上文所述,基本上,导致蛋白质相对野生型蛋白质而言包含至少一处氨基酸插入、缺失和/或取代的任何突变都可能导致显著降低的生物活性或没有生物活性。但是应当理解,在蛋白质某些部分的突变更可能导致突变CKX3或CKX5蛋白质的功能降低,例如,导致截短的蛋白质的突变,由此如表1或表2中所描述的保守结构域的显著部分缺乏或被取代。

[0243] 因此,在一种实施方式中,提供了包含一处或多处缺失或插入突变的突变CKX3或CKX5蛋白质,由此导致在体内具有显著降低的或没有活性的突变蛋白中的缺失或插入。此类突变CKX3或CKX5蛋白质是这样的CKX3或CKX5蛋白质,其中与野生型CKX3或CKX5蛋白质相比,至少1个,至少至少2、3、4、5、10、20、30、50、100、100、150、175、180、200、250、300、350、400或更多个氨基酸缺失或插入,由此所述插入或缺失导致产生具有显著降低的体内活性或者没有体内活性的突变蛋白质。

[0244] 在另一实施方式中,提供了截短的突变CKX3或CKX5蛋白质,其中所述截短导致产生具有显著降低的体内活性或者没有体内活性的突变蛋白质。此类截短的CKX3或CKX5蛋白质是这样的CKX3或CKX5蛋白质,其缺乏相应野生型CKX3或CKX5蛋白质C-末端部分的功能性结构域,但是保留相应野生型CKX3或CKX5蛋白质的N-末端部分。因此在一个实施方式中,提供了下述截短的CKX3或CKX5蛋白质,其包含相应野生型CKX3或CKX5蛋白质的N-末端部分直到但是不包括PGQxIF基序的第一个氨基酸(位于对应于SEQ ID NO:3的位置512的位置)。突变蛋白质较之野生型蛋白质越截短,则截短就越可能导致CKX3或CKX5蛋白质显著降低的活性或没有活性。因此,在另一实施方式中,提供了下述截短的CKX3或CKX5蛋白质,其包含相应野生型CKX3或CKX5蛋白质的N-末端部分,但是缺乏部分或全部的FAD结合基序,和/或缺

乏部分或全部的细胞分裂素基序(如上文所述)。

[0245] 在还一实施方式中,提供了包含一处或多处取代突变的突变CKX3或CKX5蛋白质,其中所述取代导致产生具有显著降低的体内活性或者没有体内活性的突变蛋白质。此类突变CKX3或CKX5蛋白质是这样的CKX3或CKX5蛋白质,其中具有特定功能,底物结合或催化功能(如上所述)的保守氨基酸残基被取代。因此,在一个实施方式中,提供了包含具有生物功能的保守氨基酸残基(例如细胞分裂素结合基序、FAD结合基序、GIWeVPHPWLNL基序或PGQxIF基序的保守氨基酸)取代的突变CKX3或CKX5蛋白质。

[0246] 本发明的方法

[0247] 可使用本领域中传统的多种方法,例如,使用基于PCR的方法扩增CKX3或CKX5基因组或cDNA的全部或部分,来产生(例如通过诱变诱导或基因靶向)和/或鉴定突变CKX3或CKX5等位基因。

[0248] 诱变之后,使用已知技术,从经处理的种子种植植物,或者从经处理的细胞再生植物。例如,可按照传统种植流程,种植经诱变处理的种子,自花授粉之后,在植物上形成种子。或者,可从经处理的小孢子或花粉细胞中提取出双单倍体小植株,立即形成纯合植物,例如如Coventry等人(1988,Manual for Microspore Culture Technique for Brassica napus.Dep.Crop Sci.Techn.Bull.OAC Publication 0489.Univ.of Guelph,Guelph,Ontario,加拿大)所述。通过此类自花授粉在这次或后续代中形成的其他种子可被收获,并针对突变CKX3或CKX5等位基因的存在对其加以筛选,其中使用本领域传统的技术,例如基于聚合酶链式反应(PCR)的技术(CKX3/CKX5等位基因扩增)或基于杂交的技术,例如,Southern印迹分析、BAC文库筛选等等,和/或对ckx3/ckx5等位基因直接测序。为针对突变CKX3或CKX5等位基因中点突变(所谓的单核苷酸多态性或SNPs)的存在加以筛选,可使用本领域中传统的SNP检测方法,例如,基于寡连接(oligoligation)的技术,基于单碱基延伸的技术或者基于限制性位点差异的技术,例如TILLING。

[0249] 如上文所述,对特定野生型CKX3或CKX5等位基因的诱变(自发以及诱导的)导致在得到的突变CKX3或CKX5等位基因中存在一处或多处缺失的、插入的或取代的核苷酸(下文中称为“突变区域”)。因此可通过野生型CKX3或CKX5等位基因中一个或多个被缺失、插入或取代的核苷酸的位置和构型来表征突变CKX3或CKX5等位基因。其中分别被插入、缺失或取代的一个或多个核苷酸在野生型CKX3或CKX5等位基因中的位点在本文中也称为“突变区域或序列”。“5' 或3' 侧翼区域或序列”在本文中使用指突变(或相应野生型)CKX3或CKX5等位基因中DNA的至少20bp,优选至少50bp,至少750bp,至少1500bp以及可多至5000bp的与含有一处或多处被缺失、插入或取代的核苷酸的DNA有所不同的DNA区域或序列,优选地,来自突变(或相应野生型)CKX3或CKX5等位基因的位于突变CKX3或CKX5等位基因(或相应野生型CKX3或CKX5等位基因)中突变区域的恰好上游并与其邻接的(5' 侧翼区域或序列)或恰好下游并与其邻接的(3' 侧翼区域或序列)DNA。“接合区”在本文中使用指突变(或相应野生型)CKX3或CKX5等位基因中的下述DNA区域,突变区域和5' 或3' 侧翼区域在此处相互连接。“跨越突变区域和5' 或3' 侧翼区域之间的接合区的序列”由此包含突变序列以及与其邻接的侧翼序列。

[0250] 变体CKX5或CKX3等位基因也可通过鉴定花数、荚数或每荚种子数以及鉴定潜在的CKX基因的QTL来鉴定。类似地,变体CKX5或CKX3等位基因也可通过表型筛选花数,荚数或者

每荚或每枝种子数或花序分生组织大小并鉴定潜在的CKX3或CKX5基因/等位基因来鉴定。

[0251] 开发来鉴定特定突变CKX3或CKX5等位基因或包含特定突变CKX3或CKX5等位基因的植物或植物材料或包含含有特定突变CKX3或CKX5等位基因的植物材料的产品工具基于特定突变CKX3或CKX5等位基因较之相应野生型CKX3或CKX5等位基因的基因组特征而言的特定基因组特征,例如,包含突变区域的基因组区域的特异性限制性图谱、分子标记或侧翼和/或突变区域的序列。

[0252] 一旦测序了特定突变CKX3或CKX5等位基因,就可以通过分子生物学技术开发引物和探针,所述引物和探针特异性识别样品核酸(DNA或RNA)中突变CKX3或CKX5等位基因的5'侧翼、3'侧翼和/或突变区域中的序列。例如,可以开发鉴别生物学样品(例如植物、植物材料或包含植物材料的产品样品)中的突变CKX3或CKX5等位基因的PCR方法。此类PCR是基于至少两种特异性的“引物”:分别是一种识别突变CKX3或CKX5等位基因的5'或3'侧翼区中的序列,另一种识别突变CKX3或CKX5等位基因的3'或5'侧翼区中的序列;或者一种识别突变CKX3或CKX5等位基因的5'或3'侧翼区中的序列,另一种识别突变CKX3或CKX5等位基因的突变区中的序列;或者分别是一种识别突变CKX3或CKX5等位基因的5'或3'侧翼区中的序列,另一种识别跨越特定突变CKX3或CKX5等位基因的3'或5'侧翼区和突变区之间的接合区的序列(如下所述)。

[0253] 用于鉴定根据本发明的突变CKX3或CKX5等位基因的合适方法是包括使用一组至少两种引物对生物样品进行扩增反应测定的方法,所述组选自:

[0254] (a) 一组引物,其中所述引物之一特异性识别突变CKX3或CKX5等位基因的5'或3'侧翼区域,另一个所述引物特异性识别突变CKX3或CKX5等位基因的突变区域,和

[0255] (b) 一组引物,其中所述引物之一特异性识别突变CKX3或CKX5等位基因的5'或3'侧翼区,并且所述引物中的另一个特异性识别突变CKX3或CKX5等位基因的3'或5'侧翼区和突变区域之间的接合区。

[0256] 引物优选具有在15至35个核苷酸之间的序列,在优化的PCR条件下“特异性识别”在5'或3'侧翼区中的序列,在突变区中的序列,或者跨越特定突变CKX3或CKX5等位基因的3'或5'侧翼区和突变区之间的接合区的序列,从而从包含特定突变CKX3或CKX5等位基因的核酸样品中扩增特定的片段(“突变CKX3或CKX5特定片段”或鉴别性扩增子)。这意味着在优化的PCR条件下仅靶向突变CKX3或CKX5等位基因,而非植物基因组中的其他序列被扩增出来。

[0257] 适用于本发明的PCR引物可以是下述这些:

[0258] -寡核苷酸,长度为17nt至大约200nt,其包含选自特定突变CKX3或CKX5等位基因的5'或3'侧翼序列的至少17个连续核苷酸,优选20个连续核苷酸的核苷酸序列或其互补序列(即,例如,本发明的突变CKX3或CKX5等位基因中一个或多个被缺失、插入或取代的核苷酸的5'或3'侧翼的序列,例如,上文所述的无义、错义或移码突变5'或3'侧翼的序列,或者上文表中指出的终止密码子突变或上文指出的取代突变5'或3'侧翼的序列,或其互补序列)(识别5'侧翼序列的引物);或

[0259] -寡核苷酸,长度为17nt至大约200nt,其包含选自特定突变CKX3或CKX5等位基因的突变区域的序列的至少17个连续核苷酸,优选20个连续核苷酸的核苷酸序列或其互补序列(即,例如,本发明CKX3或CKX5基因中被插入或取代的核苷酸的序列或其互补序列)(识别

突变序列的引物)。

[0260] 引物理所当然的可以长于所述的17个连续的核苷酸,可以是例如18、19、20、21、30、35、50、75、100、150、200nt长或更长。引物可以完全由选自所述侧翼和突变序列的核苷酸序列的核苷酸序列组成。然而,引物5'末端的核苷酸序列(即,位于3' -的17个连续核苷酸外侧)较不关键。因此,视情况,引物的5'序列可以包括选自侧翼或突变序列的核苷酸序列,但也可以含有一些(例如,1、2、5、10个)错配。引物的5'序列甚至可以完全由侧翼或突变序列不相关的核苷酸序列组成,例如,表示限制性酶识别位点的核苷酸序列。此类不相关的序列或具有错配的侧翼DNA序列应该优选的不长于100个,更优选的不长于50个或者甚至25个核苷酸。

[0261] 此外,合适的引物可包含跨越侧翼和突变序列之间的接合区(即,例如,本发明的突变CKX3或CKX5等位基因中一个或多个被缺失、插入或取代的核苷酸5'或3'侧翼的序列,和插入或取代的一个或多个核苷酸的序列;或分别地在一个或多个缺失的核苷酸3'或5'侧翼的序列之间的接合区,例如上文所述的本发明的CKX3或CKX5基因中无义、错义或移码突变5'或3'侧翼的序列,和无义、错义或移码突变的序列之间的接合区;或者上文表中指出的可能的终止密码子突变或上文指出的取代突变5'或3'侧翼的序列,和分别地可能的终止密码子突变或取代突变的序列之间的接合区)的核苷酸序列或由所述核苷酸序列构成,条件是所述核苷酸序列不仅仅源于突变区域或侧翼区域。

[0262] 对本领域技术人员也是显而易见的,适当选定的PCR引物对还应当不包含彼此互补的序列。

[0263] 出于发明的目的,“SEQ ID NO:X代表的核苷酸序列的互补序列”是这样的核苷酸序列,所述序列可以源自将所代表的核苷酸序列,根据沙加夫法则(Chargaff's rules) ($A \leftrightarrow T$; $G \leftrightarrow C$)通过其互补的核苷酸来取代核苷酸,并以5'至3'方向阅读序列,即,与所代表的核苷酸序列相反的方向。

[0264] 适合鉴别特定突变CKX3或CKX5等位基因的引物实例描述在实施例中。

[0265] 如本文中使用的,“SEQ ID NO:Z从第X至第Y位的核苷酸序列”表示包括两个核苷酸端点的核苷酸序列。

[0266] 优选的,扩增的片段具有在50和1000核苷酸之间的长度,例如在50和500核苷酸之间的长度,或在100和350核苷酸之间的长度。特定的引物可以具有与以下序列80至100%同一性的序列,所述序列是5'或3'侧翼区中的序列、突变区中的序列或跨越特定突变CKX3或CKX5等位基因的3'或5'侧翼和突变区之间的接合区的序列,条件是错配仍然允许用这些引物在优化的PCR条件下特异性鉴别特定的突变CKX3或CKX5等位基因。但是,通过实验可以容易的确定可允许的错配范围,这是本领域技术人员已知的。

[0267] “突变CKX3或CKX5特异性片段”的检测和/或鉴别可以以不同的方式发生,例如,在凝胶或毛细管电泳后通过大小评估,或通过基于荧光的检测方法。还可以直接测序突变CKX3或CKX5特异片段。用于检测扩增的DNA片段的其他序列特异性方法也是本领域已知的。

[0268] 本领域描述了标准的PCR规程,例如“PCR应用手册”(Roche Molecular Biochemicals,第3版,2006)和其他参考文献。对于各个特定的突变CKX3或CKX5等位基因,“PCR应用手册”中详细说明了优化的PCR条件,包括特异性引物的序列。然而,可以理解,需要调整PCR鉴别规程中的多个参数适应特定的实验室条件,并可以轻微调节来获得相似的

结果。例如,使用不同的制备DNA的方法可以需要调整例如引物的量、聚合酶、MgCl₂浓度或使用的退火条件。相似的,其他引物的选择可以指定用于PCR鉴别规程的其他优化条件。然而,这些调整对本领域技术人员是显而易见的,进一步详述在目前的PCR应用手册中,例如上文引用的。

[0269] 实施例中描述了用于鉴别特定突变CKX3或CKX5等位基因的PCR鉴别规程的实例。

[0270] 或者,可以使用特定的引物来扩增突变CKX3或CKX5特异性片段,所述片段可以用作“特异性探针”,用于鉴别生物学样品中的特定突变CKX3或CKX5等位基因。在允许探针与核酸中相应片段杂交的条件下,将生物学样品的核酸与探针接触,导致形成核酸/探针杂合体。可以检测该杂合体的形成(例如,核酸或探针的标记),从而该杂合体的形成表示特定突变CKX3或CKX5等位基因的存在。本领域中已经描述了此类基于特异性探针杂交(在固相载体或溶液中)的鉴别方法。特异性探针优选的是序列,其在优化的条件下,与特定突变CKX3或CKX5等位基因的5'或3'侧翼区和/或突变区(后文称为“突变CKX3或CKX5特定区”)中的区域特异性杂交。优选的,特异性探针包括10至1000bp、50至600bp、100至500bp、150至350bp之间的序列,其与特定区域的核苷酸序列至少80%,优选的80至85%,更优选的85至90%,特别优选的90至95%,最优选的95%至100%相同(或互补)。优选的,特异性探针可以包括约13至约100个连续的核苷酸的序列,所述序列与特定突变CKX3或CKX5等位基因的特定区相同(或互补)。

[0271] 用于鉴定突变CKX3或CKX5等位基因的合适方法是包括使用至少一种特异性探针对于生物学样品进行杂交测定的方法,所述探针选自以下:

[0272] (a) 特异性识别突变CKX3或CKX5等位基因突变区的探针,和

[0273] (b) 特异性识别突变CKX3或CKX5等位基因的突变区和3'或5'侧翼区域之间的接合区的探针。

[0274] 适用于本发明的特异性探针可以是下述这些:

[0275] -寡核苷酸,长度为13nt至大约1000nt,其包含选自特定突变CKX3或CKX5等位基因的5'或3'侧翼序列的至少13个连续核苷酸的核苷酸序列或其互补序列(即,例如,本发明的突变CKX3或CKX5等位基因中一个或多个被缺失、插入或取代的核苷酸的5'或3'侧翼的序列,例如,上文所述的无义、错义或移码突变5'或3'侧翼的序列,或者上文表中指出的终止密码子突变或上文指出的取代突变5'或3'侧翼的序列)或与其具有至少80%序列同一性的序列(识别5'侧翼序列的探针);或

[0276] -寡核苷酸,长度为13nt至大约1000nt,其包含选自特定突变CKX3或CKX5等位基因的突变序列的至少13个连续核苷酸的核苷酸序列或其互补序列(即,例如,本发明CKX3或CKX5基因中被插入或取代的核苷酸的序列或其互补序列)或与其具有至少80%序列同一性的序列(识别突变序列的探针)。

[0277] 探针可以完全由选自所述的核苷酸序列侧翼和突变序列的核苷酸序列组成。然而,在探针的5'或3'末端的核苷酸序列较不关键。因此,视情况,探针的5'或3'序列可以由选自侧翼或突变序列的核苷酸序列组成,但也可以由与侧翼或突变序列不相关的核苷酸序列组成。此类不相关的序列应该优选的不长于50,更优选的不长于25或者甚至不长于20或15个核苷酸。

[0278] 此外,合适的探针可包含跨越侧翼和突变序列之间的接合区(即,例如,本发明的

突变CKX3或CKX5等位基因中一个或多个被缺失、插入或取代的核苷酸5'或3'侧翼的序列和插入或取代的一个或多个核苷酸的序列或分别在一个或多个缺失的核苷酸3'或5'侧翼的序列之间的接合区,例如上文所述的本发明的CKX3或CKX5基因中无义、错义或移码突变5'或3'侧翼的序列和无义、错义或移码突变的序列之间的接合区,或者上文表中指出的可能的终止密码子突变或上文指出的取代突变的5'或3'侧翼的序列和分别地可能的终止密码子或取代突变的序列之间的接合区)的核苷酸序列或由所述核苷酸序列构成,条件是所述核苷酸序列不仅仅源于突变区域或侧翼区域。

[0279] 实施例中描述了适合鉴别特定突变CKX3或CKX5等位基因的特异性探针的实例。

[0280] 与特异性探针杂交的“突变CKX3或CKX5特异区”的检测和/或鉴别可以以不同的方式进行,例如,在凝胶电泳后通过大小评估,或通过基于荧光的检测方法。其他用于检测与特异性探针杂交的“突变CKX3或CKX5特异区”的序列特异性方法也是本领域已知的。

[0281] 或者,可以利用其他方法产生和鉴别包含一个或多个突变ckx5或ckx5和ckx3等位基因的植物或植物部分,例如“Delete-a-geneTM”方法,所述方法使用PCR筛选通过快中子诱变(综述见Li和Zhang,2002,Funct Integr Genomics 2:254-258)产生的缺失突变,通过鉴别EMS-诱导的点突变的TILLING方法(在基因组中靶向诱导的局部损伤),其使用变性高效液相色谱(DHPLC)鉴别EMS-诱导的点突变,从而通过异源双链体分析(McCallum等人,2000,Nat Biotech 18:455,和McCallum等人,2000,Plant Physiol.123,439-442)检测碱基对改变等。如上所述,TILLING使用高通量筛选突变(例如,使用突变体-野生型DNA异源双链体的Cel 1切割,和使用凝胶测序系统检测)。因此,本文涵盖了使用TILLING鉴别包含一个或多个突变ckx5或ckx3等位基因的植物或植物部分,以及用于产生和鉴别此类植物、植物器官、组织和种子的方法。因此,在一个实施方式中,根据本发明的方法包括步骤诱变植物种子(例如,EMS诱变),植物个体或DNA的混合,目标区域的PCR扩增,异源双链体形成和高通量检测,突变植物的鉴别,突变PCR产物的测序。可以理解其他诱变和选择方法可以等价的用于产生此类突变植物。

[0282] 除了在CKX3或CKX5等位基因中诱导突变以外,可以通过本领域已知的方法鉴别天然(自发)突变等位基因。例如,可以使用ECOTILLING(Henikoff等人,2004,Plant Physiology 135(2):630-6)在多种(a plurality of)的植物或植物部分中筛选天然突变ckx3/ckx5等位基因的存在。对于上述诱变技术,优选的筛选包含A和/或C基因组的芸苔属物种,使鉴别的ckx3/ckx5等位基因可以通过杂交(种间或种内杂交)和选择,随后引入到其他芸苔属物种中,例如欧洲油菜。在ECOTILLING中,通过上述TILLING方法学,筛选育种品系或相关物种中的天然多态性,其中,使用单个植物或植物库进行PCR扩增ckx3/ckx5靶,异源双链体形成和高通量分析。然后可以选择具有所需突变的单个植物,其随后可以用于育种项目中来掺入所需的突变等位基因。

[0283] 然后,可以测序所鉴别的突变等位基因,序列可以与野生型等位基因比较,来鉴别突变。任选的,如上文所述来测试功能。利用该方法可以鉴别多种的突变ckx3/ckx5等位基因(和含有一个或多个所述基因的芸苔属植物)。然后,如下文所述,可以通过杂交和选择方法,将理想的突变等位基因与理想的野生型等位基因组合。最后,产生包含理想数量的突变CKX3/CKX5和理想数量的野生型CKX3或CKX5等位基因的单个植物。

[0284] 适合作为PCR引物或特异性探针,用于检测特定突变CKX3或CKX5等位基因的寡核

苷酸也可用于开发确定特定突变CKX3或CKX5等位基因接合性状态的方法。

[0285] 为了确定特定突变CKX3或CKX5等位基因的接合性状态,可以开发基于PCR的检测,来确定突变体和/或相应野生型CKX3或CKX5特异性等位基因的存在:

[0286] 为了确定特定突变CKX3或CKX5等位基因的接合性状态,可以以这样的方式设计特异性识别野生型CKX3或CKX5等位基因的两种引物,所述方式使所述引物针对彼此,并具有位于引物之间的突变区。这些引物可以是分别特异性识别5' 和3' 侧翼序列的引物。该组引物允许突变体以及相应的野生型CKX3或CKX5等位基因的同时诊断性PCR扩增。

[0287] 或者,为了确定特定突变CKX3或CKX5等位基因的接合性状态,可以以这样的方式设计特异性识别野生型CKX3或CKX5等位基因的两种引物,所述方式使所述引物针对彼此,并且其中之一特异性的识别突变区。这些引物可以是分别特异性识别野生型CKX3或CKX5等位基因的5' 或3' 侧翼区和突变区序列的引物。该组引物与特异性识别突变CKX3或CKX5等位基因中的突变区序列的第三引物一起,允许突变CKX3或CKX5基因以及野生型CKX3或CKX5基因的同时诊断性PCR扩增。

[0288] 或者,为了确定特定突变CKX3或CKX5等位基因的接合性状态,可以以这样的方式设计特异性识别野生型CKX3或CKX5等位基因的两种引物,所述方式使所述引物针对彼此,并且其中之一特异性的识别在5' 或3' 侧翼区和突变区之间的接合区。这些引物可以是分别特异性识别野生型CKX3或CKX5等位基因的5' 或3' 侧翼序列,和在突变区和3' 或5' 侧翼区之间的接合区的引物。这组引物与第三引物一起,允许突变CKX3或CKX5基因以及野生型CKX3或CKX5基因的同时诊断性PCR扩增,所述第三引物特异性的识别突变CKX3或CKX5等位基因的在突变区和3' 或5' 侧翼区之间的接合区。

[0289] 或者,可以通过使用替代的引物组,确定特定突变CKX3或CKX5等位基因的接合性状态,所述引物组特异性识别突变体和野生型CKX3或CKX5等位基因。

[0290] 用于确定突变CKX3或CKX5等位基因的接合性状态的合适方法包括使用一组至少两个或至少三个引物对所述植物或其细胞,部分,种子或其子代的基因组DNA进行扩增反应,其中所述引物中至少两种特异性识别野生型CKX3或CKX5等位基因,所述至少两种引物选自以下:

[0291] (a) 特异性识别突变体和野生型CKX3或CKX5等位基因的5' 或3' 侧翼区的第一引物和特异性识别野生型CKX3或CKX5等位基因的突变区的第二引物,和

[0292] (b) 特异性识别突变体和野生型CKX3或CKX5等位基因的5' 或3' 侧翼区域的第一引物和特异性识别野生型CKX3或CKX5等位基因的3' 或5' 侧翼区域与突变区之间的接合区的第二引物,和

[0293] 其中所述引物中的至少两种特异性识别突变CKX3或CKX5等位基因,所述至少两种引物选自以下:

[0294] (a) 特异性识别突变体和野生型CKX3或CKX5等位基因的5' 或3' 侧翼区的第一引物和特异性识别突变CKX3或CKX5等位基因的突变区的第三引物,和

[0295] (b) 特异性识别突变体和野生型CKX3或CKX5等位基因的5' 或3' 侧翼区域的第一引物和特异性识别突变CKX3或CKX5等位基因的3' 或5' 侧翼区域与突变区之间的接合区的第三引物。

[0296] 如果对于突变CKX3或CKX5基因或相应的野生型CKX3或CKX5基因,植物是纯合的,

则不论对于突变或野生型CKX3或CKX5等位基因,上述诊断性PCR测定可以产生典型的单PCR产物,优选在长度上具有典型性。如果对于突变CKX3或CKX5基因,植物是杂合的,则会出现两种特异的PCR产物,反映了突变体和野生型CKX3或CKX5等位基因的扩增。

[0297] 进行野生型和突变CKX3或CKX5特异性PCR产物的鉴别,例如可以通过在凝胶或毛细管电泳后的大小评估(例如,对于包含多个插入或缺失的核苷酸的突变CKX3或CKX5等位基因,导致从野生型和突变CKX3或CKX5等位基因扩增的片段之间的大小差异,从而所述片段可以在凝胶上可视的分离);通过在凝胶或毛细管电泳后,评估两种不同片段的的存在或缺失,从而突变CKX3或CKX5等位基因的诊断性PCR扩增可以任选的与野生型CKX3或CKX5等位基因的诊断性PCR扩增分别实施;通过扩增片段的直接测序;或通过基于荧光的检测方法。

[0298] 实施例中描述了适合确定特定突变CKX3或CKX5等位基因接合性的引物实例。

[0299] 或者,为了确定特定突变CKX3或CKX5等位基因的接合性状态,可以开发基于杂交的测定,来确定突变体和/或相应野生型CKX3或CKX5特定等位基因的存在:

[0300] 为了确定特定突变CKX3或CKX5等位基因的接合性状态,可以以这样的方式设计识别野生型CKX3或CKX5等位基因的两种特异性探针,所述方式使每种探针特异性识别CKX3或CKX5野生型等位基因中的序列,并且突变区位于探针识别的序列之间。这些探针可以是分别特异性识别5' 和3' 侧翼序列的探针。一种或,优选的两种上述探针的使用,允许突变以及相应的野生型CKX3或CKX5等位基因的同时诊断杂交。

[0301] 或者,为了确定特定突变CKX3或CKX5等位基因的接合性状态,可以以这样的方式设计识别野生型CKX3或CKX5等位基因的两种特异性探针,所述方式使探针之一特异性识别CKX3或CKX5野生型等位基因中在突变区上游或下游的序列,优选的在突变区上游,且探针之一特异性识别突变区。这些探针可以是分别特异性识别野生型CKX3或CKX5等位基因的5' 或3' 侧翼区序列,优选的5' 侧翼区序列,和突变区序列的探针。一种或,优选的两种上述探针,任选的与第三探针一起使用,允许突变以及野生型CKX3或CKX5基因的诊断杂交,所述第三探针特异性识别突变CKX3或CKX5等位基因的突变区序列。

[0302] 或者,为了确定特定突变CKX3或CKX5等位基因的接合性状态,可以以这样的方式设计识别野生型CKX3或CKX5等位基因的特异性探针,所述方式使探针特异性识别在野生型CKX3或CKX5等位基因的5' 或3' 侧翼区(优选的5' 侧翼区)和突变区之间的接合区。该探针任选的与第二探针一起,允许突变以及野生型CKX3或CKX5基因的诊断杂交,所述第二探针特异性识别突变CKX3或CKX5等位基因的5' 或3' 侧翼区,优选的5' 侧翼区和突变区之间的接合区。

[0303] 或者,可以通过使用替代的探针组,来确定特定突变CKX3或CKX5等位基因的接合性状态,所述探针组特异性识别突变体和野生型CKX3或CKX5等位基因。

[0304] 用于确定突变CKX3或CKX5等位基因的接合性状态的合适方法包括使用一组至少两种特异性探针使所述植物的基因组DNA或其细胞,部分,种子或其子代进行杂交测定,其中至少一种所述特异性探针特异性识别野生型CKX3或CKX5等位基因,所述至少一种探针选自:

[0305] (a) 特异性识别突变体和野生型CKX3或CKX5等位基因的5' 或3' 侧翼区的第一探针和特异性识别野生型CKX3或CKX5等位基因的突变区的第二探针,

[0306] (b) 特异性识别突变体和野生型CKX3或CKX5等位基因的5' 或3' 侧翼区域的第一探

针和特异性识别野生型CKX3或CKX5等位基因的3'或5'侧翼区域与突变区之间的接合区域的第二探针,和

[0307] (c) 特异性识别野生型CKX3或CKX5等位基因的5'或3'侧翼区和突变区之间的接合区的探针,以及

[0308] 其中至少一种所述特异性探针特异性识别突变CKX3或CKX5等位基因,所述至少一种探针选自以下:

[0309] (a) 特异性识别突变体和野生型CKX3或CKX5等位基因的5'或3'侧翼区的第一探针和特异性识别突变CKX3或CKX5等位基因突变区的第三探针,

[0310] (b) 特异性识别突变体和野生型CKX3或CKX5等位基因的5'或3'侧翼区域的第一探针和特异性识别突变CKX3或CKX5等位基因的5'或3'侧翼区域与突变区域之间的接合区的第三探针,和

[0311] (c) 特异性识别突变CKX3或CKX5等位基因的5'或3'侧翼区域和突变区域之间的接合区的探针。

[0312] 如果对于突变CKX3或CKX5基因或相应的野生型CKX3或CKX5基因,植物是纯合的,则无论对于突变或野生型CKX3或CKX5基因,上述诊断杂交测定可以产生典型的单特异性杂交产物,例如一种或多种杂交DNA(限制性)片段,优选的在长度上具有典型性。如果对于突变CKX3或CKX5等位基因,植物是杂合的,则可以出现两种特异性杂交产物,反映了突变体和野生型CKX3或CKX5基因的杂交。

[0313] 进行野生型和突变CKX3或CKX5特异性杂交产物的鉴别,例如可以通过在凝胶或毛细管电泳后的大小评估(例如,对于包含多个插入或缺失的核苷酸的突变CKX3或CKX5等位基因,导致来自野生型和突变CKX3或CKX5等位基因的杂交DNA(限制性)片段之间的大小差异,从而所述片段可以在凝胶上可视的分离);通过在凝胶或毛细管电泳后,评估两种不同的特异性杂交产物的存在或缺失,从而突变CKX3或CKX5等位基因的诊断杂交可以任选的与野生型CKX3或CKX5等位基因的诊断杂交分别实施;通过杂交DNA(限制性)片段的直接测序;或通过基于荧光的检测方法。

[0314] 实施例中描述了适合确定特定突变CKX3或CKX5等位基因接合性的探针实例。

[0315] 此外,还可以利用本文提供的特定突变CKX3或CKX5等位基因的特异性序列信息,开发特异性针对特定突变CKX3或CKX5等位基因的、不同于基于PCR-或基于杂交扩增方法的检测方法。此类替代的检测方法包括基于特定核酸结构的侵入性切割的线性信号扩增检测方法,也已知为Invader™技术(描述在例如美国专利5,985,557“*Invasive Cleavage of Nucleic Acids*”,6,001,567“*Detection of Nucleic Acid sequences by Invader Directed Cleavage*”,或Lyamichev等人,1999,Nature Biotechnology 17:292,通过引用整合到本文中),基于RT-PCR的检测方法,例如Taqman,或其他检测方法,例如SNplex。简言之,在Invader™技术中,靶突变序列可以是例如与包含突变序列的核苷酸序列或跨越3'侧翼区和突变区之间的连接区的序列的经标记的第一核酸寡核苷酸杂交,并与包含就在突变序列下游并且紧邻它的5'侧翼序列的第二核酸寡核苷酸杂交,其中第一和第二寡核苷酸的至少一个核苷酸重叠。此外,靶突变序列可以是例如杂交与突变序列的核苷酸序列互补的经标记的第一核酸寡核苷酸或跨越5'侧翼区域和突变区域之间的连接区域的序列,以及杂交就在突变序列下游并且紧邻它的3'侧翼序列的第三核酸寡核苷酸,其中所述第一或第二

寡核苷酸至少有一个核苷酸重叠。通过该杂交产生的双链体或三链体结构允许用酶 (**Cleavase®**) 进行选择性的探针切割, 留下完整的靶序列。切割下来的经标记探针随后被检测, 这可能通过中间步骤进行, 导致进一步的信号扩增。在进一步的实施方式中, 第一核酸寡核苷酸在其 5' 端包含不互补或对应于靶突变体或野生型序列的 5' 翘起 (flag), 以及就在翘起的下游在 3' 侧翼区和突变区之间的接合区, 其中突变序列位于所述接合区的 5' 端, 并且所述第二核酸寡核苷酸包含就在突变区上游并与其邻接的 5' 侧翼序列, 并且在其 3' 端紧邻 5' 侧翼序列下游的一个额外的核苷酸, 其可以是任何核苷酸。在另一个实施方式中, 第一核酸寡核苷酸在其 5' 端包含与靶突变体或野生型序列不互补或对应的 5' 翘起, 就在翘起的下游的与 5' 侧翼区和突变区之间的接合区互补的序列, 其中突变序列的互补位于所述接合区的 5' 端, 并且所述第二核酸寡核苷酸与就在突变区上游并紧邻突变区的 3' 侧翼序列互补, 并且在 3' 端紧邻 3' 侧翼序列的互补序列的下游的一个额外的核苷酸, 其可以是任何核苷酸。与第一寡核苷酸中的接合区对应或互补的序列的长度可以是至少 5、或至少 8、或至少 10、或至少 15、或至少 20、或至少 25、或至少 30、或至少 40、或至少 50 个核苷酸。与第二寡核苷酸中的侧翼序列对应或互补的序列的长度可以是至少 5、或至少 8、或至少 10、或至少 15、或至少 20、或至少 25、或者至少 30、或至少 40、或至少 50 个核苷酸。第一寡核苷酸的 5' 翘起的长度可以是至少 3、或至少 5、或至少 8、或至少 10、或至少 15、或至少 20 个核苷酸。

[0316] 用于鉴定突变 CKX3 或 CKX5 等位基因的合适方法是包括使生物学样品与下述物质进行杂交测定的方法,

[0317] (a) 标记的第一核酸寡核苷酸, 所述第一核酸寡核苷酸包含突变序列的核苷酸序列或跨越 3' 侧翼区和突变区之间的接合区的序列, 以及第二核酸寡核苷酸, 其包含就在突变序列的下游并紧邻该突变序列的 5' 侧翼序列, 并且其中所述第一和第二寡核苷酸至少一个核苷酸重叠; 或

[0318] (b) 标记的第一核酸寡核苷酸, 所述第一核酸寡核苷酸互补于突变序列的核苷酸序列或跨越 5' 侧翼区和突变区之间的接合区的序列, 以及第二核酸寡核苷酸, 其互补于就在突变序列下游并紧邻突变序列的 3' 侧翼序列, 并且其中所述第一和第二寡核苷酸至少一个核苷酸重叠。

[0319] 突变 CKX3 或 CKX5 等位基因也可以通过确定 CKX3 或 CKX5 等位基因的序列来鉴定。测序可以通过本领域已知的方法进行。

[0320] 如本文中使用的, “试剂盒” 指用于实施发明方法的目的的试剂集合, 更特别的, 用于生物学样品中特定突变 CKX3 或 CKX5 等位基因的鉴别, 或包含特定突变 CKX3 或 CKX5 等位基因的植物材料的接合性状态的确定等目的。更特别的, 发明的试剂盒的优选实施方式包括, 如上所述, 用于特定突变 CKX3 或 CKX5 等位基因鉴别的至少两种特异性引物, 或者用于接合性状态确定的至少两种或三种特异性引物。任选的, 试剂盒还可以包括任何本文中描述的 PCR 鉴别规程中的其他试剂。或者, 根据本发明的另一个实施方式, 试剂盒可以包含至少一种特异性探针, 如上所述, 所述探针与生物学样品的核酸特异性杂交, 来鉴别其中特定突变 CKX3 或 CKX5 等位基因的存在, 用于特定突变 CKX3 或 CKX5 等位基因的鉴别, 或者包含至少两种或三种用于确定接合性状态的特异性探针。任选的, 试剂盒还可以包括任何其他试剂 (例如但不限于杂交缓冲液, 扩增缓冲液, 标记), 利用特异性探针, 用于生物学样品中特定突变 CKX3 或 CKX5 等位基因的鉴别。

[0321] 本发明的试剂盒可以用于质量控制(例如,种子批次的纯度)、检测植物材料或包含或源自植物材料的材料(例如但不限于食品或饲料产品)中特定突变CKX3或CKX5等位基因的存在或缺失的目的,并且它的组分可以特异性调节用于上述目的。

[0322] 如本文中使用的,术语“引物”涵盖了能够在依赖模板的过程,例如PCR中,引发新生核酸合成的任何核酸。通常,引物是10至30个核苷酸的寡核苷酸,但可以使用更长的序列。可以以双链形式提供引物,尽管单链形式是优选的。探针可以作为引物使用,但被设计用于与靶DNA或RNA结合,而不需要在扩增过程中使用。

[0323] 如本文中使用的,当术语“识别”指特异性引物时,指在方法所述条件下(例如PCR鉴别规程的条件),特异性引物与特定突变CKX3或CKX5等位基因中的核酸序列特异性杂交的事实,从而通过阳性和阴性对照的存在确定特异性。

[0324] 如本文中使用的,当术语“杂交”指特异性探针时,指在标准严格条件下,探针与特定突变CKX3或CKX5等位基因的核酸序列中的特定区域结合的事实。如本文中使用的,标准严格条件指本文描述的用于杂交的条件,或Sambrook等人,1989(Molecular Cloning: A Laboratory Manual,第二版,Cold Spring Harbour Laboratory Press,NY)描述的常规杂交条件,例如可以包括下列步骤:1)在滤膜上固定植物基因组DNA片段或BAC文库DNA,2)在65℃,6X SSC,5X Denhardt氏试剂,0.5% SDS和20μg/ml变性载体DNA中预杂交滤膜1至2小时,3)添加已经标记的杂交探针,4)孵育16至24小时,5)在68℃,6X SSC,0.1% SDS中,洗涤滤膜一次30分钟,6)在68℃,2X SSC,0.1% SDS中,洗涤滤膜三次(在30ml中两次,各30分钟,在500ml中1次,10分钟),和7)将滤膜在-70℃下暴露于X射线膜4至48小时。

[0325] 如本文中使用的,“生物学样品”是植物、植物材料或包含植物材料的产品样品。优选地,生物学样品含有核酸如DNA或RNA。术语“植物”意在涵盖任何成熟阶段的植物组织,以及来自或衍生自任何此类植物的任何细胞、组织或器官,包括但不限于任何种子、叶、茎、花、根、单细胞、配子、细胞培养物、组织培养物或原生质体。如本文中使用的,“植物材料”指从植物获得的或源自植物的材料。包含植物材料的产品涉及食品、饲料或其他产品,所述产品使用植物材料生产或可以被植物材料污染。可以理解,在本发明的上下文中,在此类生物学样品中测试特异性针对特定突变CKX3或CKX5等位基因的核酸的存在,提示样品中核酸的存在。因此,本文所指的用于在生物学样品中鉴别特定突变CKX3或CKX5等位基因的方法,涉及鉴别生物学样品的核酸,所述核酸包含特定突变CKX3或CKX5等位基因。

[0326] 本发明还涉及在一株植物中特定CKX3或CKX5等位基因的组合,涉及将一个或多个特定突变CKX3或CKX5等位基因从一株植物转移到另外的植物,涉及包含一个或多个特定突变CKX3或CKX5等位基因的植物,从这些植物获得的子代,还涉及源于这些植物的植物细胞、植物部分和植物种子。

[0327] 因此,在本发明的一种实施方式中,提供了在一株植物中组合两个或多个选择的突变CKX3或CKX5等位基因的方法,所述方法包括下述步骤:

[0328] (a) 产生和/或鉴定两株或多株植物,它们每株包含一个或多个选择的突变CKX3或CKX5等位基因,如上文所述,

[0329] (b) 将包含一个或多个选择的突变CKX3或CKX5等位基因的第一植物与包含一个或多个其他选择的突变CKX3或CKX5等位基因的第二植物杂交,从杂交收集F1种子,以及任选地,鉴定出包含来自第一植物的一个或多个选择的突变CKX3或CKX5等位基因以及来自第二

植物的一个或多个选择的突变CKX3或CKX5等位基因的F1植物,如上文所述,

[0330] (c) 任选地,重复步骤(b),直到获得包含所有选择的突变CKX3或CKX5等位基因的F1植物,

[0331] (d) 任选地,

[0332] -通过测定突变CKX3或CKX5等位基因的接合性状态,鉴定对于选择的突变CKX3或CKX5等位基因来说纯合或杂合的F1植物,如上文所述,或

[0333] -通过进行下述步骤之一,产生对于选择的突变CKX3或CKX5等位基因中之一或多种来说纯合的植物:

[0334] -从包含一个或多个选择的突变CKX3或CKX5等位基因的F1植物的经处理的小孢子或花粉细胞提取双单倍体植物,如上文所述,

[0335] -将包含一个或多个选择的突变CKX3或CKX5等位基因的F1植物自交一代或多代(y),从自交中收集F1 Sy种子,以及鉴定对于一个或多个突变CKX3或CKX5等位基因来说纯合的F1 Sy植物,如上文所述。

[0336] 在本发明的另一实施方式中,提供了将一个或多个突变CKX3或CKX5等位基因从一株植物转移到另外的植物的方法,所述方法包括下述步骤:

[0337] (a) 产生和/或鉴定包含一个或多个选择的突变CKX3或CKX5等位基因的第一植物,如上文所述,或者,通过在一株植物中组合一个或多个选择的突变CKX3或CKX5等位基因,产生第一植物,如上文所述(其中,所述第一植物对于一个或多个突变CKX3或CKX5等位基因来说是纯合或杂合的),

[0338] (b) 将包含一个或多个突变CKX3或CKX5等位基因的第一植物与不包含一个或多个突变CKX3或CKX5等位基因的第二植物杂交,从杂交收集F1种子(其中,如果第一植物对于该突变CKX3或CKX5等位基因来说是纯合的话,所述种子对于突变CKX3或CKX5等位基因来说是杂合的;以及其中,如果第一植物对于该突变CKX3或CKX5等位基因来说是杂合的话,种子中的一半对突变CKX3或CKX5等位基因来说是杂合的,种子中的一半是不成对的(azygous),即不包含突变CKX3或CKX5等位基因),以及任选地,鉴定包含一个或多个选择的突变CKX3或CKX5等位基因的F1植物,如上文所述,

[0339] (c) 将包含一个或多个选择的突变CKX3或CKX5等位基因的F1植物与不包含一个或多个选择的突变CKX3或CKX5等位基因的第二植物回交一代或多代(x),从杂交中收集BCx种子,以及在每代中鉴定包含一个或多个选择的突变CKX3或CKX5等位基因的BCx植物,如上文所述,

[0340] (d) 任选地,产生对一个或多个选择的突变CKX3或CKX5等位基因来说纯合的BCx植物,这通过进行下述步骤之一来实现:

[0341] -从包含一个或多个想要的突变CKX3或CKX5等位基因的BCx植物的经处理的小孢子或花粉细胞提取双单倍体植物,如上文所述,

[0342] -将包含一个或多个想要的突变CKX3或CKX5等位基因的BCx植物自交一代或多代(y),从自交收集BCx Sy种子,以及鉴定出对于一个或多个想要的突变CKX3或CKX5等位基因来说纯合的BCx Sy植物,如上文所述。

[0343] 所述用于将一种或多种突变CKX3或CKX5等位基因从一种植物转移到另一种植物的方法也适合于在一种植物中组合一种或多种突变CKX3或CKX5等位基因,所述用于组合至

少两种选择的突变CKX3或CKX5等位基因的方法包括以下步骤:

[0344] (a) 鉴定至少两种植物,每种植物包含至少一种选择的突变CKX3或CKX5等位基因,

[0345] (b) 将所述至少两种植物杂交并从所述至少一种杂交中收集F1杂合种子,和

[0346] (c) 任选地,鉴定包含至少两种选择的突变CKX3或CKX5等位基因的F1植物。

[0347] 包含所述至少一种选择的突变CKX3或CKX5等位基因的所述植物可使用本文所述的方法鉴定。

[0348] 在本发明的一个方面,第一和第二植物是十字花科植物,特别是芸苔属植物,尤其是欧洲油菜植物或来自另外的芸苔属作物物种的植物。在本发明的另一方面,第一植物是十字花科植物,特别是芸苔属植物,尤其是欧洲油菜植物或来自另外的芸苔属作物物种的植物,并且,第二植物是来自十字花科育种品系,特别是来自芸苔属育种品系,尤其是来自欧洲油菜育种品系或者来自另外的芸苔属作物物种的育种品系的植物。“育种品系”在本文中使用,是可通过优选的基因型和/或表型与其他植物品系区分开的优选纯合的植物品系,其用于产生杂交代子代。

[0349] 在本发明的又一实施方式中,提供了一种制备植物(特别是芸苔属作物植物,例如欧洲油菜植物)的方法,所述植物中花数、荚数或TSW增加,所述方法包括将根据本发明的突变CKX5或CKX5和CKX3等位基因组合和/或转移进一株芸苔属植物,或组合和/或转移至一株芸苔属植物,如上文所述。

[0350] 本文还提供了增加花数、荚数或TSW的方法,包括将至少一个突变CKX5等位基因或至少一个突变CKX5和至少一个突变CKX3等位基因导入芸苔属植物,或者包括将根据本发明的嵌合基因导入芸苔属植物中。

[0351] 可以使用本文所述的方法将突变CKX3或CKX5等位基因引入所述芸苔属植物中,所述方法包括将根据本发明的突变CKX3或CKX5等位基因组合和/或转移至一种芸苔属植物中。突变CKX3或CKX5等位基因也可以通过例如诱变或基因靶向导入。所述方法可以进一步包括使用本文所述的方法鉴定突变CKX3或CKX5等位基因的存在。

[0352] 可以使用转化将根据本发明的嵌合基因导入芸苔属植物。

[0353] 增加花数、荚数或TSW的方法可以包括

[0354] (a) 向植物细胞提供一种或多种嵌合基因以产生转基因植物细胞,所述嵌合基因包含以下有效连接的DNA片段

[0355] i. 植物可表达的启动子;

[0356] ii. DNA区域,当转录时产生RNA或蛋白质分子,抑制一个或多个CKX5基因/蛋白质或两个CKX5和一个或多个CKX3基因或蛋白质的表达或蛋白质活性;并且任选地,

[0357] iii. 涉及转录终止和聚腺苷酸化的3'端区域;

[0358] (b) 从所述转基因植物细胞再生转基因植物品系群体;和

[0359] (c) 鉴定在所述转基因植物品系群体内花数增加的植物品系。

[0360] 制备嵌合基因的手段在本领域是公知的。在US4971908,US4940835,US4769061和US4757011中描述了制备嵌合基因的方法和特别适合于植物转化的包含这种嵌合基因的载体。嵌合基因也可以含有一个或多个额外的核酸序列。

[0361] 所述嵌合基因可以通过转化导入所述芸苔属植物中。本文中的术语“转化”是指将核酸导入(或转移)到受体宿主例如植物或任何植物部分或组织,包括植物细胞、原生质体、

愈伤组织、根、块茎、种子、茎、叶、幼苗、胚胎和花粉。含有转化的核酸序列的植物被称为“转基因植物”。转化的、转基因的和重组的是指宿主生物体,如导入了异源核酸分子(例如表达盒或重组载体)的植物。转化的核酸可以稳定整合到植物的基因组中。

[0362] 如本文所用,短语“转基因植物”是指具有稳定导入植物基因组(例如核或质体基因组)中的转化核酸的植物。换句话说,含有转化的核酸序列的植物被称为“转基因植物”。转基因和重组是指已经导入了异源核酸分子(例如本文所述的启动子、嵌合基因或载体)的植物的宿主生物体。核酸可以稳定整合到植物的基因组中。

[0363] 转化方法在本领域中是公知的并且包括农杆菌介导的转化。已经描述了农杆菌介导的棉花转化,例如在美国专利5,004,863、美国专利6,483,013和W02000/71733中。植物也可以通过粒子轰击来转化:金或钨粒子被DNA包被,然后射入年轻的植物细胞或植物胚胎。该方法还允许转化植物质体。根据病毒基因组的性质,病毒转化(转导)可以用于瞬时或稳定表达基因。将所需的遗传物质包装入合适的植物病毒中,并使修饰的病毒感染植物。感染植物的子代不含病毒,也不含插入的基因。例如在W0 90/12107、W0 03/052108或W0 2005/098004中描述或进一步详述了用于病毒转化的合适方法。本领域公知的其他合适方法是显微注射,完整细胞的电穿孔,聚乙二醇介导的原生质体转化,原生质体的电穿孔,脂质体介导的转化,硅晶须介导的转化等。所述转基因可以稳定整合到所述植物细胞中,产生转化的植物细胞。然后可以将以这种方式获得的转化的植物细胞再生成成熟可育的转化植物。

[0364] 在本发明的一个方面,根据本发明的植物是包含至少一个CKX5基因至少两个CKX3基因的芸苔属植物,其中花数增加或TSW增加,这通过将根据本发明的六个突变体等位基因组合和/或转移进芸苔属植物,或组合和/或转移至芸苔属植物来实现,如上文所述(四个CKX3和两个CKX5等位基因)。

[0365] 在本发明的又一实施方式中,提供了制造包含至少两个CKX5和至少四个CKX3基因的杂交体芸苔属作物种子或植物(特别是杂交体欧洲油菜种子或植物)的方法,其中花数或TSW增加,所述方法包括下述步骤:

[0366] (a) 产生和/或鉴定包含纯合状态的第一和第二选择的突变CKX5等位基因的第一植物和包含纯合状态的至少一个选择的突变CKX等位基因的第二植物,如上文所述,

[0367] (b) 杂交第一和第二植物,从杂交收集F1杂种种子。

[0368] 在本发明的一个方面,第一或第二选择的突变CKX5等位基因可与第三选择的突变CKX3或CKX5等位基因相同的突变CKX5等位基因,从而F1杂种种子对于一种突变CKX5等位基因来说是纯合的并且对于另一种是杂合的。在本发明的另一方面,第一植物用作为雄性亲本植物,第二植物用作为雌性亲本植物。

[0369] 根据本发明中无论何时提到“植物”,均应当理解,除非另有指明,此时还包括植物部分(细胞、组织或器官、种子荚、种子、部分例如根、叶、花、花粉等),保留有亲本的区别性特征(尤其是果实开裂性质)的植物子代,例如,通过自交或杂交获得的种子,例如杂种种子(通过将两种近交亲本品系杂交获得的),从其获得的杂种植物和植物部分。

[0370] 在一些实施方式中,本发明的植物细胞,即包含至少一个突变CKX5或至少一个突变CKX3或CKX5等位基因的植物细胞,或其中至少一个CKX5的或至少一个CKX5和一个CKX3基因表达被减少的植物细胞,以及根据本发明的方法产生的植物细胞可以是非繁殖细胞。

[0371] 所获得的根据本发明的植物可以用于常规育种方案中以产生具有相同特征的更

多植物或引入至少一个突变CKX5等位基因的存在特征,其在相同或相关植物物种的其他品种中,或在杂种植物中具有降低的至少一个CKX5的表达。所获得的植物可以进一步用于产生繁殖材料。根据本发明的植物还可以用于产生配子、种子(包括磨碎的种子和种子饼)、种子油、胚、或合子或体细胞,通过本发明的方法获得的植物的子代或杂种。由本发明植物获得的种子也包括在本发明中。

[0372] 如本文所用,“创造繁殖材料”涉及本领域已知的任何用于生产其他植物、植物部分或种子的手段,并且尤其包括营养繁殖方法(例如空气或地面分层,分裂,(芽)嫁接,微繁殖,匍匐茎或根茎(runner),贮藏器官如鳞茎、球茎、块茎和根茎,生根(striking)或插条(cutting),双鳞片(twin-scale)),有性生殖(与另一种植物杂交)和无性繁殖(例如无融合生殖,体细胞杂交)。

[0373] 如本文中所使用的,“包含”应被解释为指定所提及的所陈述的特征、整体、步骤或组分的存在,但并不排除存在或添加一个或多个特征、整体、步骤或组分或其组合。因此,例如,包含核苷酸或氨基酸序列的核酸或蛋白质可以包含比实际引用的核苷酸或氨基酸更多的核苷酸或氨基酸,即包埋在更大的核酸或蛋白质中。包含功能上或结构上限定的核酸的嵌合基因可以包含额外的DNA区域等。

[0374] 序列表包含在名为“BCS15-2012_ST25.txt”的文件,它是142千字节(如在Microsoft **Windows®**中测得的大小)中,含有45个序列,SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:45,在此通过电子提交的方式提交并且通过引用作为参考。

[0375] 在说明书和实施例中,参考以下序列:

[0376] 序列

[0377] SEQ ID No.1:拟南芥CKX3基因组序列At5g56970

[0378] SEQ ID No.2:拟南芥CKX3 cDNA序列(编码序列)

[0379] SEQ ID No.3:拟南芥CKX3氨基酸序列

[0380] SEQ ID No.4:拟南芥CKX5基因组序列At1g75450

[0381] SEQ ID No.5:拟南芥CKX5 cDNA序列(编码序列)

[0382] SEQ ID No.6:拟南芥CKX5氨基酸序列

[0383] SEQ ID No.7:欧洲油菜CKX3-A1基因组序列

[0384] SEQ ID No.8:欧洲油菜CKX3-A1 cDNA序列(编码序列)

[0385] SEQ ID No.9:欧洲油菜CKX3-A1氨基酸序列

[0386] SEQ ID No.10:欧洲油菜CKX3-A2基因组序列

[0387] SEQ ID No.11:欧洲油菜CKX3-A2 cDNA序列(编码序列)

[0388] SEQ ID No.12:欧洲油菜CKX3-A2氨基酸序列

[0389] SEQ ID No.13:欧洲油菜CKX3-C1基因组序列

[0390] SEQ ID No.14:欧洲油菜CKX3-C1 cDNA序列(编码序列)

[0391] SEQ ID No.15:欧洲油菜CKX3-C1氨基酸序列

[0392] SEQ ID No.16:欧洲油菜CKX3-C2基因组序列

[0393] SEQ ID No.17:欧洲油菜CKX3-C2 cDNA序列(编码序列)

[0394] SEQ ID No.18:欧洲油菜CKX3-C2氨基酸序列

[0395] SEQ ID No.19:欧洲油菜CKX5-A1基因组序列

- [0396] SEQ ID No.20:欧洲油菜CKX5-A1 cDNA序列(编码序列)
- [0397] SEQ ID No.21:欧洲油菜CKX5-A1氨基酸序列
- [0398] SEQ ID No.22:欧洲油菜CKX5-C1基因组序列
- [0399] SEQ ID No.23:欧洲油菜CKX5-C1 cDNA序列(编码序列)
- [0400] SEQ ID No.24:欧洲油菜CKX5-C1氨基酸序列
- [0401] SEQ ID No.25:欧洲油菜CKX3-A1 YIIN501氨基酸序列
- [0402] SEQ ID No.26:欧洲油菜CKX3-A2 YIIN512氨基酸序列
- [0403] SEQ ID No.27:欧洲油菜CKX3-C1 YIIN521氨基酸序列
- [0404] SEQ ID No.28:欧洲油菜CKX3-C2 YIIN531氨基酸序列
- [0405] SEQ ID No.29:欧洲油菜CKX5-A1 YIIN801氨基酸序列
- [0406] SEQ ID No.30:欧洲油菜CKX5-A1 YIIN805氨基酸序列
- [0407] SEQ ID No.31:欧洲油菜CKX5-C1 YIIN811氨基酸序列
- [0408] SEQ ID No.32:KASP引物BnCKX3-A1 WT等位基因
- [0409] SEQ ID No.33:KASP引物BnCKX3-A1 YIIN501等位基因
- [0410] SEQ ID No.34:KASP引物BnCKX3-A2 WT等位基因
- [0411] SEQ ID No.35:KASP引物BnCKX3-A2 YIIN512等位基因
- [0412] SEQ ID No.36:KASP引物BnCKX3-C1 WT等位基因
- [0413] SEQ ID No.37:KASP引物BnCKX3-C1 YIIN521等位基因
- [0414] SEQ ID No.38:KASP引物BnCKX3-C2 WT等位基因
- [0415] SEQ ID No.39:KASP引物BnCKX3-C2 YIIN531等位基因
- [0416] SEQ ID No.40:KASP引物BnCKX5-A1 WT等位基因
- [0417] SEQ ID No.41:KASP引物BnCKX5-YIIN801 WT等位基因
- [0418] SEQ ID No.42:KASP引物BnCKX5-A1 WT等位基因
- [0419] SEQ ID No.43:KASP引物BnCKX5-A1 YIIN805等位基因
- [0420] SEQ ID No.44:KASP引物BnCKX5C1 WT等位基因
- [0421] SEQ ID No.45:KASP引物BnCKX5-C1 YIIN811等位基因

实施例

[0422] 除非在实施例中另外陈述,所有重组DNA技术都根据标准分子生物学技术来进行,如Sambrook和Russell(2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY,Ausubel等人,(1994)Current Protocols in Molecular Biology,Current Protocols,USA的第1和2卷,以及Brown(1998)Molecular Biology LabFax,第二版,Academic Press(UK)的卷I和II中描述的。用于植物分子工作的标准材料和方法描述在R.D.D.Croy的Plant Molecular Biology Labfax(1993)中,由BIOS Scientific Publications Ltd(UK)和Blackwell Scientific Publications,UK联合出版。用于聚合酶链式反应的标准材料和方法可见于Dieffenbach和Dveksler(1995)PCR Primer:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,和McPherson等人,(2000)PCR-Basics:From Background to Bench,第一版,Springer Verlag,德国中。

[0423] 实施例1-CKX3和CKX5基因的DNA序列的分离

[0424] 已经如下确定了来自欧洲油菜的CKX3和CKX5核苷酸序列。

[0425] 使用标准程序分离来自欧洲油菜的基因组DNA。如上所述,使用基于拟南芥CKX3和CKX5基因序列的引物,通过PCR在欧洲油菜基因组DNA上分离CKX3和CKX5基因的片段。克隆PCR产物并测定序列。

[0426] 随后,来自PCR产物的CKX3和CKX5序列被用作在欧洲油菜品系的内部序列数据库的BLAST同源性检索中的查询。在欧洲油菜中鉴定了四个CKX3基因和两个CKX5基因。使用EST序列信息并与拟南芥CKX3基因At5g56970和CKX5基因At1g75450序列信息比较来确定CKX3和CKX5序列的基因和编码区。芸苔属CKX3和CKX5序列有五个外显子。

[0427] SEQ ID NO:7、10、13和16分别是欧洲油菜BnCKX3-A1、Bn CKX3-A2、Bn CKX3-C1和Bn CKX3-C2的基因组序列。SEQ ID NO:8、11、14和17分别是BnCKX3-A1、Bn CKX3-A2、Bn CKX3-C1和Bn CKX3-C2的cDNA(编码)序列。由BnCKX3-A1、Bn CKX3-A2、Bn CKX3-C1和Bn CKX3-C2编码的蛋白质的氨基酸序列分别在SEQ ID NO:9、12、15和18中给出。

[0428] SEQ ID NO:19和22分别是欧洲油菜BnCKX5-A1和Bn CKX5-C1的基因组序列。SEQ ID NO:20和23分别是BnCKX5-A1和Bn CKX5-C1的cDNA(编码)序列。由BnCKX5-A1和Bn CKX5-C1编码的蛋白质的氨基酸序列分别在SEQ ID NO:21和24中给出。

[0429] 实施例2-产生和分离突变CKX3和CKX5等位基因

[0430] 按照下文所述,产生和鉴定实施例1中鉴定的欧洲油菜的CKX3和CKX5基因中的突变:

[0431] -将来自原种春油菜育种品系的30,000颗种子(M0种子)在去离子水或蒸馏水中的湿滤纸上预吸胀2h(小时)。将一半种子暴露于0.8%EMS,一半暴露于1%EMS(Sigma:M0880),并孵育4h。

[0432] -将经诱变处理的种子(M1种子)漂洗3次,在通风橱中干燥过夜。在土壤中种植30,000株M1植物,自交产生M2种子。针对每株各M1植物收获M2种子。

[0433] -种植从不同M1植物获得的二倍的4800株M2植物(two times 4800 M2 plants),按照CTAB方法,从每株单个M2植物的叶样品制备DNA样品(Doyle和Doyle,1987,Phytochemistry Bulletin 19:11-15)。

[0434] -通过按照标准测序技术(LGC)进行直接测序,以及使用NovoSNP软件(VIB Antwerp)针对点突变的存在来分析序列,针对CKX3和CKX5基因中导致在CKX3和CKX5基因的蛋白质编码区域引入终止密码子或引入其他氨基酸的点突变的存在,筛选DNA样品。

[0435] -由此鉴定出了表3中的突变CKX3和CKX5基因等位基因:

[0436] 表3:CKX3和CKX5-A1中的终止密码子突变

[0437]

核苷酸位置		氨基酸位置	核苷酸序列	氨基酸序列	等位基因名称
CKX3-A1					
SEQ ID No 7	SEQ ID No 8	SEQ ID No 9			
2244	1093	365	C 至 T	Arg 至终止	YIIN501*
CKX3-A2					
SEQ ID No 10	SEQ ID No 11	SEQ ID No 12			
2482	1168	390	C 至 T	Gln 至终止	YIIN512*
CKX3-C1					
SEQ ID No 13	SEQ ID No 14	SEQ ID No 15			
1893	876	292	G 至 A	Tryp 至终止	YIIN521*
CKX3-C2					
SEQ ID No 16	SEQ ID No 17	SEQ ID No 18			
2172	981	328	C 至 T	Gln 至终止	YIIN531*
CKX5-A1					
SEQ ID No 19	SEQ ID No 20	SEQ ID No 21			
465	465	155	G 至 A	Trp 至终止	YIIN801*
399	399	133	G 至 A	Trp 至终止	YIIN805*

[0438]

CKX5-C1					
SEQ ID No 22	SEQ ID No 23	SEQ ID No 24			
465	465	155	G 至 A	Trp 至终止	YIIN811*

[0439] *包含处于纯合状态的等位基因YIIN501、YINN512、YIIN521、YIIN531、YIIN801和YIIN811的植物的种子已于2015年10月5日根据布达佩斯条约保藏于英国NCIMB, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB 21 9YA, 保藏号为NCIMB 42464; 包含处于纯合状态的等位基因YIIN501、YINN512、YIIN521、YIIN531、YIIN805和YIIN811的植物种子已于2015年10月5日根据布达佩斯条约保藏于英国NCIMB, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB 21 9YA, 保藏号为NCIMB 42465。

[0440] 实施例3-鉴定包含突变芸苔属CKX5等位基因, 或CKX3和CKX5等位基因的芸苔属植物

[0441] 按照下文所述, 鉴定包含实施例2中鉴定的CKX3和CKX5基因中突变的芸苔属植物:

[0442] -对于M2植物的DNA样品中鉴定的每种突变CKX3或CKX5基因, 种植至少50株M2植物(包含CKX3或CKX5突变, 从与M2植物相同的M1植物获得), 从每种各M2植物的叶样品制备DNA样品。

[0443] -针对按照上面实施例4中所述鉴定的点CKX3或CKX5突变的存在, 筛选DNA样品。

[0444] -将包含相同突变的杂合和纯合(基于电泳图测定的)M2植物自交, 收获M3种子。

[0445] 实施例4-在温室条件下分析包含突变芸苔属CKX5和CKX3等位基因的芸苔属植物

[0446] 在所有CKX5和CKX3基因中突变纯合的芸苔属植物在温室条件下生长直至完全成熟。在没有强制授粉技术(没有自身套袋,没有昆虫传粉者)的情况下,在生长室条件下,对所有CKX5和CKX3基因突变纯合的芸苔属植物计算花数总结果。具体目标是确定CKX5/CKX3突变体对单株花数和枝间效应分布的绝对影响。

[0447] 以下芸苔属植物进行了测试:

[0448]

谱系	缩写名称
BC4S4(YIIN501/YIIN512/YIIN521/YIIN531/YIIN801/YIIN811) (A1A1/A2A2/C1C1/C2C2/A1A1/C1C1)	CKX3/CKX5 6x (1)
BC4S4 (YIIN501/YIIN512/YIIN521/YIIN531/YIIN801/YIIN811) (-/-/-/-/-/-)	CKX3/CKX5 WTS (1)
BC4S4(YIIN501/YIIN512/YIIN521/YIIN531/YIIN805/YIIN811) (A1A1/A2A2/C1C1/C2C2/A1A1/C1C1)	CKX3/CKX5 6x (2)
BC4S4 (YIIN501/YIIN512/YIIN521/YIIN531/YIIN805/YIIN811) (-/-/-/-/-/-)	CKX3/CKX5 WTS (2)
未受到诱变的原始芸苔属品系	WT

[0449] 在试验中对以下变量进行评分和测量:

[0450]

变量	缩写	阶段	度量或单位	度量 1	度量 5	度量 9
分支数 (包括主)	NBR	开花结束	数量			
花数 (总数)	NFL ¹	开花结束	数量			
主枝上的花数	NFLM ¹	开花结束	数量			
侧枝上的花数 (每枝, 按照从上到下的顺序)	NFLS ¹	开花结束	数量			
主枝上的花百分比	PFLM ¹	开花结束	百分比 ²			
侧枝上的花百分比 (每枝, 按照从上到下的顺序)	PFLS1 到 PFLS7 ¹	开花结束	百分比 ²			

[0451] 1 (基于) 开花, 败育花和荚的总和

[0452] 2 (根据NFL计数) 计算的

[0453] 表4示出了变量的ANOVA分析(具有随机块效应)的总体估计的概况,包括突变品系和相应野生型分离子之间对比的显著性检验($p < 0.05$) (*) 以及野生型分离子(WTS)和野生型(WT)检验(**)之间的对比。应指出,没有统计差异并不意味着等效。

[0454] 表4总体估计

基因型	NBR	NFL	NFLM	NFLS1	NFLS2	NFLS3	NFLS4	NFLS5	NFLS6	NFLS7
	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
CKX3/CKX5 6x (1)	6.3*	926.2*	131.0*	135.9	162.7*	162.3*	157.1*	134.5*	42.8	0.0
CKX3/CKX5 WTS (1)	5.6	616.1	101.7**	128.1	107.3	121.6	77.7**	57.0	21.2	1.7
CKX3/CKX5 6x (2)	5.4	838.5*	137.8*	161.7*	163.9*	164.6*	141.4	69.2	0.0	0.0
CKX3/CKX5 WTS (2)	5.8	623.1	92.8	98.7	122.9	115.0	110.6	71.5	11.7	0.0
WT	5.8	584.5	90.7	105.8	101.4	103.9	115.5	62.0	5.4	0.0
CV	11.4	10.0	12.7	34.6	30.3	27.8	44.2	78.7	257.1	>999
基因型	PFLM	PFLS1	PFLS2	PFLS3	PFLS4	PFLS5	PFLS6	PFLS7		
	%	%	%	%	%	%	%	%		
CKX3/CKX5 6x (1)	14.2*	14.7*	17.5	17.6	16.9	14.5*	4.7	0.0		
CKX3/CKX5 WTS (1)	16.6	21.0	17.5	19.9	12.8**	8.9	3.0	0.2		
CKX3/CKX5 6x (2)	16.5*	19.4	19.6	19.6	16.6	8.1	0.0	0.0		
CKX3/CKX5 WTS (2)	15.1	15.9	19.8	18.4	18.0	11.1	1.5	0.0		
WT	15.6	18.2	17.3	17.9	19.6	10.4	0.9	0.0		
CV	15.7	33.4	29.5	27.5	41.6	78.2	258.4	>999		

[0457] *突变体与WTS显著不同

[0458] **WTS与WT检验显著不同

[0459] 所有CKX5和CKX3基因突变纯合的芸苔属植物品系都表现出花数量显著增加。花朵数量的增加在花枝上均匀分布。

[0460] 实施例5-在田间条件下分析包含突变芸苔属CKX5和CKX3等位基因的芸苔属植物

[0461] 在所有CKX5,所有CKX3基因和所有CKX5和CKX3基因中的突变纯合的芸苔属植物在欧洲和北美不同地点的田间条件下生长。

[0462] 测试了以下芸苔属植物:

[0463]

谱系	缩写名称
BC4S4 (YIIN501/YIIN512/YIIN521/YIIN531/YIIN801/YIIN811) (A1A1/A2A2/C1C1/C2C2/A1A1/C1C1)	CKX3/CKX5 6x (1)
BC4S4 (YIIN501/YIIN512/YIIN521/YIIN531/YIIN801/YIIN811) (--/--/--/--/--)	CKX3/CKX5 WTS (1)
BC4S4 (YIIN501/YIIN512/YIIN521/YIIN531/YIIN805/YIIN811) (A1A1/A2A2/C1C1/C2C2/A1A1/C1C1)	CKX3/CKX5 6x (2)
BC4S4 (YIIN501/YIIN512/YIIN521/YIIN531/YIIN805/YIIN811) (--/--/--/--/--)	CKX3/CKX5 WTS (2)
BC4S3 (YIIN801/YIIN811) (A1A1/C1C1)	CKX5 2x (1)
BC4S3 (YIIN801/YIIN811) (--/--)	CKX5 WTS (1)
BC4S3 (YIIN805/YIIN811) (A1A1/C1C1)	CKX5 2x (2)
BC4S3 (YIIN805/YIIN811) (--/--)	CKX5 WTS (2)
BC5S3 (YIIN501/YIIN512/YIIN521/YIIN531) (A1A1/A2A2/C1C1/C2C2)	CKX3 4x
BC5S3 (YIIN501/YIIN512/YIIN521/YIIN531) (--/--/--/--)	CKX3 WTS
未受到诱变的原始芸苔属品系	WT

[0464] 在试验中对以下变量进行评分和测量:

[0465]

变量	缩写	阶段	度量或单位	度量 1	度量 5	度量 9
主枝上的花数	NFLM	开花	数/植株			
开花-结束	EOF	90%开花结束	播种后天数			
植株高度	HICM	开花结束	cm			
荚数(总计)	NPOD	成熟	数/植株			
主枝上的荚百分比	PPODM	成熟	%/植株			
成熟	DTM	成熟	播种后天数			
成熟时的抗倒伏	LOM	成熟	(1-9)	0 度 (平)	45 度	90 度 (直立)
在 8%水分时每块地的种子产量	YLD	种子	克/播种地			
在 8%水分时每株植物的种子产量	YLDPL ¹	种子	克/播种地			

[0466]

主枝上每荚种子	SPODM ²	种子	数/荚			
千粒重	TSW	种子	克/1000 种子			
NIR 分析	GLUN OILN PRON	种子	μmol/克 全部种子% 全部种子%			

[0467]
$$1 YLDPL = \frac{YLD}{PLDE}$$

[0468] ²SPODM: 主枝上4个最老的荚的平均数

[0469] 表5示出了欧洲田间试验的对于变量的ANOVA分析(具有随机块效应)的总体估计的概述,表6示出了北美田间试验,包括突变品系和相应的野生型分离子(*)之间的对比以及野生型分离子(WTS)和野生型(WT)核查(**)之间的对比的显著性检验(p<0.05)。应指出,没有统计差异并不意味着等效。

[0470] 表5: 总体估计(欧洲)

[0471]

基因型	LOM (1-9)	YLD g	YLDPL g	TSW g	OILN %	PRON %	GLUN μmol/g	NPOD 荚	PPODM %	SPODM 种子
CKX3/CKX5 6x (1)	9.0	2251	3.44	3.81*	47.8	22.3	12.5*	77.5	57.6*	42.6*
CKX3/CKX5 WTS (1)	9.0	2281	3.65	3.42	48.1	22.1	10.8	83.4**	43.1	37.6
CKX3/CKX5 6x (2)	9.0	2220	3.50	4.02*	47.0*	23.0	13.0*	80.5	55.6*	42.6*
CKX3/CKX5 WTS (2)	9.0	2348	3.56	3.37	48.2	22.3	11.2	77.7	45.9	35.1
CKX5 2x (1)	9.0	2312	3.71	3.58*	47.6	22.3	11.4*	76.3	48.5*	39.4*
CKX5 WTS (1)	9.0	2339	3.74	3.35	48.3	21.8	10.2	89.4**	42.0	36.6
CKX5 2x (2)	9.0	2337	3.65	3.67*	47.5	22.5	11.2	79.4	47.6	40.9*
CKX5 WTS (2)	9.0	2362	3.96**	3.40	47.9	22.7**	11.1	83.5**	44.0	33.1**
CKX3 4x	9.0	2485	3.51	3.55*	48.3	22.1	11.5	77.2	47.7	36.2
CKX3 WTS	9.0	2467	3.58	3.42	48.0	22.2	11.5	74.4	47.4	35.4
98-55-013	9.0	2338	3.42	3.37	48.6	21.7	10.6	70.9	46.9	36.0
CV	0.0	10.1	18.1	2.9	2.4	4.3	11.4	41.5	36.1	10.2

[0472] 表6: 总体估计(北美)

[0473]

基因型	EST1 (1-9)	PLDE 植株	VIG1 (1-9)	DTF 天	EOF 天	HICM cm	DTM 天	LOM (1-9)	YLD g	YLDPL g	TSW g	OILN %	PRON %	GLUN μmol/g	NFLM 花
CKX3/CKX5 6x (1)															63.9*
CKX3/CKX5 WTS (1)															49.3
CKX3/CKX5 6x (2)															60.5*
CKX3/CKX5 WTS (2)															52.0
CKX5 2x (1)															51.9*
CKX5 WTS (1)															49.0
CKX5 2x (2)															53.6*
CKX5 WTS (2)															50.5
CKX3 4x															54.3*
CKX3 WTS															50.6
WT															50.1
CV															12.9

[0474] 总的来说,可以得出以下结论:

[0475] a.主枝上有更多花(侧枝未计数)

[0476] b.主枝上有更多荚

[0477] c.主枝上每个荚的种子更多(侧枝未测量)

[0478] d.较高的TSW(主+侧枝的种子大小(seed bulk))

[0479] e.只对种子产量有限的影响

[0480] f.对每株植物的种子产量没有明显的影响,这可能是由于每块地内的地块和植物距离之间的植物密度的可变性

[0481] 更具体地:

[0482] a.突变CKX3/CKX5 6x (1) 显示主枝上花数(29%)和荚数(33%)增加最多,但TSW仅增加11%,主枝上每荚种子数增加13%。对种子产量没有影响。

[0483] b.两个CKX5突变体对TSW、主枝上的花和荚数显示出中等效果,对种子产量没有影响。不清楚的是YIIN805/YIIN811在主枝上每个荚的种子数最高,而与其他突变体的参数结果没有直接关系。

[0484] 实施例6-检测突变的CKX5和CKX3基因和/或其转移进入(原种)芸苔品系

[0485] 为选择在CKX5或CKX3等位基因中包含点突变的植物,可使用通过本领域已知的标准测序技术,例如,实施例2描述的那些的直接测序。或者,可开发基于PCR的测定,来区别在CKX5或CKX3等位基因中包含特定点突变的植物和不包含该特定点突变的植物。开发了下述KASP测定,来检测实施例2中鉴定的突变等位基因(见表3)的存在与否和接合状态:

[0486] -模板DNA:

[0487] -分离自纯合或杂合突变芸苔属植物(包含突变CKX5或CKX3等位基因,下文中被称为“CKXx-Xx-YIINxxx”)的叶材料的基因组DNA。

[0488] -野生型DNA对照:分离自野生型芸苔属植物(包含突变CKX5或CKX3等位基因野生型等同物,下文中被称为“WT”)的叶材料的基因组DNA。

[0489] -阳性DNA对照:分离自己知包含CKXx-Xx-YIINxxx的突变纯合芸苔属植物的叶材料的基因组DNA。

[0490] -用于突变体和相应野生型靶CKX5或CKX3基因的引物和探针示于表7中。

[0491] 表7:用于检测野生型和突变CKX5或CKX3等位基因的引物和探针

靶	突变	引物_WT 等位基因	引物_MUT 等位基因
CKX3-A1	YIIN501	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTATATGGATTCTTAAACCGGGTTC (SEQ ID No. 32)	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTCGTATATGGATTCTTAAACCGGGTTT (SEQ ID No. 33)
CKX3-A2	YIIN512	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGCTTAATCTCTTTGTACCAAAATCTC (SEQ ID No. 34)	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTATGGCTTAATCTCTTTGTACCAAAATCTT (SEQ ID No. 35)
CKX3-C1	YIIN521	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGTGGATAGTAAGTGACCGC (SEQ ID No. 36)	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTCGGTGGATAGTAAGTGGACCGT (SEQ ID No. 37)
[0492] CKX3-C2	YIIN531	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGACCTCGTTGACTGAGTGTG (SEQ ID No. 38)	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTCGGACCTCGTTGACTGAGTGTG (SEQ ID No. 39)
CKX5-A1	YIIN801	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCAACGGAAAGATACAAAGTAATCAGTC (SEQ ID No. 40)	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCCAACGGAAAGATACAAAGTAATCAGTT (SEQ ID No. 41)
CKX5-A1	YIIN805	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCATCAACCCATAACTCTCCACCC (SEQ ID No. 42)	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTACATCAACCCATAACTCTCCACCT (SEQ ID No. 43)
CKX5-C1	YIIN811	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCAACGGAAAGATACAGGTAATCAGTC (SEQ ID No. 44)	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCAACGGAAAGATACAGGTAATCAGTT (SEQ ID No. 45)

[0493] 实施例7:在温室条件下对包含突变芸苔属CKX5和CKX3等位基因的芸苔属植物的进一步分析

[0494] 在所有CKX5和CKX3基因中突变纯合的芸苔属植物在温室条件下生长并表型化。应注意的是,在比实施例4中用于温室试验的更大的盆中使植物生长。预计在更小的盆中更致密生长更能准确地反映田间条件。

[0495] 测试了以下芸苔属植物:

谱系	缩写名称
BC4S4 (YIIN501/YIIN512/YIIN521/YIIN531/YIIN801/YIIN811) (A1A1/A2A2/C1C1/C2C2/A1A1/C1C1)	CKX3/CKX5 6x (1) 变体 1
BC4S4 (YIIN501/YIIN512/YIIN521/YIIN531/YIIN801/YIIN811) (---/--/--) wild type segregant	CKX3/CKX5 WTS (1)
BC4S4 (YIIN501/YIIN512/YIIN521/YIIN531/YIIN805/YIIN811) (A1A1/A2A2/C1C1/C2C2/A1A1/C1C1)	CKX3/CKX5 6x (2) 变体 2
BC4S4 (YIIN501/YIIN512/YIIN521/YIIN531/YIIN805/YIIN811) (---/--/--)wild type segregant	CKX3/CKX5 WTS (2)
未受到诱变的原始芸苔属品系	WT

[0497] 在试验中对以下变量进行评分和测量:

变量	缩写	阶段	单位
分支数	NBR	成熟	nr
[0498] 主枝上的花数	NFLM ¹	成熟	nr
侧枝上的花数	NFLS ¹⁺²	成熟	nr

主枝上的荚数	NPODM ³	成熟	nr
侧枝上的荚数	NPODS ²⁺³	成熟	nr
[0499] 主枝种子产量(重量)	YLDWM	种子	g(准确 mg)
侧枝种子产量(重量)	YLDWS ²	种子	g(准确 mg)
主枝种子产量(种子数量)	YLD SM	种子	nr
侧枝种子产量(种子数量)	YLDSS ²	种子	nr

[0500] ¹荚总数和败育的花蕾/荚总数

[0501] ²分别为每个侧枝(从上到下分枝数,S1到S_x,x=NBR-1)

[0502] ³变厚的所有荚

[0503] 计算以下变量:

[0504]

变量	缩写	单位	方程
主枝总花百分比	PFLM ¹	%	$PFLM = \frac{NFLM}{NFL} * 100$
侧枝总花百分比	PFLS ¹⁺²	%	$PFLS = \frac{NFLS}{NFL} * 100$
败育花/英百分比 (总数)	PABR	%	$PABR = \frac{NFL - NPOD}{NFL} * 100$
主枝上的败育花百分比/英百分比	PABRM	%	$PABRM = \frac{NFLM - NPODM}{NFLM} * 100$
侧枝上的败育花百分比/英百分比	PABRS ²	%	$PABRS = \frac{NFLS - NPODS}{NFLS} * 100$
英数 (总数)	NPOD ³	nr	$NPOD = NPODM + NPODS$
主枝上的总英数百分比	PPODM ³	%	$PPODM = \frac{NPODM}{NPOD} * 100$
侧枝上的总英数百分比	PPODS ²⁺³	%	$PPODS = \frac{NPODS}{NPOD} * 100$
种子产量 (总重量)	YLDW	g (准确 mg)	$YLDW = YLDWM + YLDWS$
主枝上的总种子产量百分比 (重量)	PYLDWM	%	$PYLDWM = \frac{YLDWM}{YLDW} * 100$
侧支上的总种子产量 (重量) 的百分比	PYLDWS ²	%	$PYLDWS = \frac{YLDWS}{YLDW} * 100$
种子产量 (总种子数量)	YLDS	nr	$YLDS = YLDSM + YLDSS$
主枝上的总种子产量百分比 (种子数量)	PYLDSM	%	$PYLDSM = \frac{YLDSM}{YLDS} * 100$
侧枝上的总种子产量 (种子数量) 百分比	PYLDSS ²	%	$PYLDSS = \frac{YLDSS}{YLDS} * 100$
每英的种子数 (每株植物的平均数)	SPOD	nr	$SPOD = \frac{YLDS}{NPOD}$

[0505]

主枝上每英的种子数	SPODM	nr	$SPODM = \frac{YLDSM}{NPODM}$
侧支上每英的种子数	SPODS ²	nr	$SPODS = \frac{YLDSS}{NPODS}$
种子重量 (每株植物的平均数)	SW	mg (准确 μg)	$SW = \frac{YLDW}{YLDS} * 1000$
主枝上的种子重量	SWM	mg (准确 μg)	$SWM = \frac{YLDWM}{YLDSM} * 1000$
侧枝上的种子重量	SWS ²	mg (准确 μg)	$SWS = \frac{YLDWS}{YLDSS} * 1000$

[0506] ¹英总数和败育的花蕾/英总数[0507] ²分别为每个侧枝 (从上到下分枝数, S1到S_x, x=NBR-1)[0508] ³变厚的所有英

[0509] 表8示出了来自变量的ANOVA分析的总体估计的概况,包括突变品系与相应野生型分离子之间对比以及野生型分离子和野生型检查(**)之间的对比的显著性检验 ($p < 0.05$) (*).应指出,没有统计差异并不意味着等效。

[0510] 表8:总体估计

[0511]

变量	单位	CKX3/CKX5 (1)	CKX3/CKX5 WTS (1)	CKX3/CKX5 (2)	CKX3/CKX5 WTS (2)	WT	CV
NBR	nr	10.7*	9.4**	9.1	9.5**	8.5	14.8
NFL	nr	661*	499**	537	540	547	10.2
NFLM	nr	99*	69	89*	69	72	9.0
NFLS	nr	562*	430**	448	471	475	11.5
NFLS1	nr	58*	46	49	45	45	25.2
NFLS2	nr	60*	51	54	55	58	24.0
NFLS3	nr	61	59**	56	63	67	22.4
NFLS4	nr	62	55	57	61	59	22.1
NFLS5	nr	62	55**	57	60	66	24.8
NFLS6	nr	51	45**	41*	53	54	28.7
NFLS7	nr	40	37**	42	46	54	32.7
NFLS8	nr	39	32	34	31	43	57.6
NFLS9	nr	44*	23	25	25	19	75.1
NFLS10	nr	36*	17	22	22**	6	97.9
NFLS11	nr	32*	8	9	11	2	152.2
NFLS12	nr	18*	2	2	0	2	298.8
PFLM	%	15.1*	13.9	16.8*	12.9	13.3	11.5
PFLS	%	84.9*	86.1	83.2*	87.1	86.7	1.9
PFLS1	%	8.9	9.4	9.2	8.5	8.3	27.0

[0512]

PFLS2	%	9.1	10.3	10.1	10.1	10.6	20.5
PFLS3	%	9.2*	11.7	10.5	11.6	12.2	21.1
PFLS4	%	9.3*	11.0	10.6	11.4	10.8	19.9
PFLS5	%	9.4*	11.1	10.6	11.2	12.1	23.3
PFLS6	%	7.5*	9.1	7.5*	9.7	9.9	24.7
PFLS7	%	6.0	7.6**	7.7	8.5	10.0	31.4
PFLS8	%	5.9	6.1	6.3	5.8	7.7	56.6
PFLS9	%	6.7	4.6	4.7	4.4	3.5	78.6
PFLS10	%	5.5	3.4**	3.9	3.9**	1.0	99.6
PFLS11	%	4.8*	1.5	1.6	2.0	0.3	153.9
PFLS12	%	2.7*	0.4	0.4	0.0	0.3	301.4
NPOD	nr	518*	380**	436	418	424	9.8
NPODM	nr	90*	58	79*	59	61	11.0
NPODS	nr	428*	322**	357	359	363	11.2
NPODS1	nr	45*	36	40	34	32	26.2
NPODS2	nr	48*	39	44	41	43	25.3
NPODS3	nr	48	44**	46	46	51	23.5
NPODS4	nr	46	43	47	47	45	23.9
NPODS5	nr	47	43**	47	48	51	27.2
NPODS6	nr	37	33**	31*	41	44	32.7
NPODS7	nr	27	27**	32	36**	44	36.8
NPODS8	nr	28	23	25	24	33	63.7
NPODS9	nr	32*	16	20	18	13	80.3
NPODS10	nr	28*	12	18	16**	4	101.3
NPODS11	nr	26*	5	7	8	1	153.5
NPODS12	nr	16*	1	2	0	2	300.4
PPODM	%	17.4*	15.5	18.3*	14.3	14.5	12.8
PPODS	%	82.6*	84.5	81.7*	85.7	85.5	2.4
PPODS1	%	8.8	9.5**	9.3	8.3	7.6	27.7
PPODS2	%	9.2	10.3	10.0	9.8	10.2	22.7
PPODS3	%	9.4*	11.5	10.5	11.1	12.1	22.1
PPODS4	%	9.0*	11.3	10.7	11.3	10.7	21.2
PPODS5	%	9.1*	11.2	10.7	11.4	11.9	24.5
PPODS6	%	7.0*	8.8	6.9*	9.8	10.3	29.0
PPODS7	%	5.1*	7.1	7.2	8.5**	10.3	34.5
PPODS8	%	5.5	5.8	5.6	5.8	7.6	62.0
PPODS9	%	6.3	4.1	4.7	4.2	3.2	83.3
PPODS10	%	5.4*	3.2**	4.1	3.7**	0.9	103.3
PPODS11	%	4.9*	1.4	1.6	1.9	0.2	155.7
PPODS12	%	2.9*	0.3	0.5	0.0	0.3	300.0
PABR	%	21.5	23.8	18.7*	22.5	22.1	23.4
PABRM	%	9.7*	15.2	11.5	14.5	15.3	44.0
PABRS	%	23.6	25.1	20.1	23.7	23.2	25.2
PABRS1	%	22.3	21.9**	19.0	23.3	27.9	42.0
PABRS2	%	20.1	24.1	20.0	24.7	25.5	40.8
PABRS3	%	20.0	25.1	18.8*	25.2	22.8	42.2
PABRS4	%	25.1	21.5	18.4	22.5	22.8	41.0
PABRS5	%	24.5	22.8	17.8	20.9	23.4	40.5
PABRS6	%	29.7	27.1**	27.8	22.1	18.7	51.3

[0513]

PABRS7	%	35.4	29.4**	25.4	22.8	18.5	46.8
PABRS8	%	29.4	29.0	31.9	23.2	23.4	55.3
PABRS9	%	29.8	34.1	21.7	27.5	29.3	47.2
PABRS10	%	23.8	31.9	17.8	26.4	32.1	46.2
PABRS11	%	18.1*	30.5	17.0	23.6	34.4	41.0
PABRS12	%	14.1*	48.6**	17.4	#N/A	21.1	36.9
YLDW	g	9.757*	11.775**	9.631*	13.525**	14.962	13.3
YLDWM	g	2.298	2.192**	2.330*	2.050**	2.445	16.8
YLDWS	g	7.459*	9.583**	7.301*	11.475**	12.639	15.8
YLDWS1	g	0.788*	1.030	0.838	0.958	0.978	36.1
YLDWS2	g	0.898*	1.269	0.886*	1.407	1.443	32.8
YLDWS3	g	0.920*	1.323**	1.006*	1.579**	1.827	24.1
YLDWS4	g	0.878*	1.282**	1.059*	1.411**	1.638	25.8
YLDWS5	g	0.926*	1.282**	1.065*	1.447**	1.763	26.0
YLDWS6	g	0.746*	1.079**	0.664*	1.463**	1.638	28.1
YLDWS7	g	0.525*	0.883**	0.665*	1.206**	1.629	32.3
YLDWS8	g	0.395	0.641**	0.466*	0.871	1.134	66.3
YLDWS9	g	0.444	0.360	0.306*	0.555	0.381	96.4
YLDWS10	g	0.426	0.300	0.218	0.375**	0.126	111.0
YLDWS11	g	0.338*	0.109	0.095	0.205**	0.029	182.4
YLDWS12	g	0.214*	0.025	0.033	0.000	0.052	328.5
PYLDWM	%	24.1*	18.9	24.5*	15.2	16.3	20.8
PYLDWS	%	75.9*	81.1**	75.5*	84.8	84.5	5.5
PYLDWS1	%	8.1	8.8**	8.6*	7.1	6.5	32.9
PYLDWS2	%	9.2*	10.7	9.1	10.3	9.6	26.7
PYLDWS3	%	9.4*	11.2	10.6	11.5	12.2	18.7
PYLDWS4	%	8.8*	10.8	10.9	10.4	11.0	21.9
PYLDWS5	%	9.3*	10.9	11.2	10.7	11.8	23.6
PYLDWS6	%	7.5*	9.1**	7.0*	10.8	11.0	28.0
PYLDWS7	%	5.4*	7.5**	7.0*	8.9**	10.9	33.9
PYLDWS8	%	4.0	5.2**	4.7	6.4	7.5	61.8
PYLDWS9	%	4.5	2.9	3.1	4.1	2.6	89.3
PYLDWS10	%	4.4*	2.7	2.1	2.7**	0.8	102.8
PYLDWS11	%	3.5*	1.1	0.9	1.7**	0.2	176.1
PYLDWS12	%	2.4*	0.2	0.4	0.0	0.3	329.2
YLDS	nr	2745*	3453**	2590*	4234**	4641	12.5
YLD SM	nr	660	659**	643	653**	761	17.4
YLDSS	nr	2085*	2794**	1948*	3581**	3917	15.0
YLDSS1	nr	218*	289	227*	283	294	39.1
YLDSS2	nr	257*	370	236*	423	426	33.0
YLDSS3	nr	259*	381**	278*	483**	557	22.9
YLDSS4	nr	243*	368**	280*	443**	516	26.6
YLDSS5	nr	257*	369**	284*	444**	543	26.7
YLDSS6	nr	208*	327**	180*	460**	519	28.2
YLDSS7	nr	149*	267**	177*	387**	518	32.0
YLDSS8	nr	112	190**	125*	290	368	66.7
YLDSS9	nr	124	107	77*	183	121	98.7
YLDSS10	nr	116	87	53*	119**	36	111.8
YLDSS11	nr	93*	34	23	67**	7	190.2

[0514]

YLDSS12	nr	60*	7	8	0	13	327.1
PYLDSSM	%	24.5*	19.4**	25.2*	15.5	16.4	21.9
PYLDSS	%	75.5*	80.6**	74.8*	84.5	84.4	5.9
PYLDSS1	%	7.9	8.4**	8.6*	6.7	6.3	35.4
PYLDSS2	%	9.3	10.7	9.0	9.9	9.2	27.8
PYLDSS3	%	9.4*	11.0	10.8	11.3	12.0	19.3
PYLDSS4	%	8.7*	10.7	10.7	10.4	11.1	23.2
PYLDSS5	%	9.1	10.6	11.1	10.5	11.7	24.1
PYLDSS6	%	7.5*	9.3**	7.0*	10.9	11.2	27.9
PYLDSS7	%	5.5*	7.7**	6.9*	9.1**	11.2	34.2
PYLDSS8	%	4.0	5.3**	4.7*	6.8	7.8	61.6
PYLDSS9	%	4.5	3.0	2.9	4.4**	2.6	88.9
PYLDSS10	%	4.2*	2.6**	1.9	2.8**	0.8	101.8
PYLDSS11	%	3.4*	1.1	0.8	1.7**	0.2	178.1
PYLDSS12	%	2.3*	0.2	0.3	0.0	0.3	330.9
SPOD	nr	5.3*	9.1**	6.0*	10.2**	11.0	14.9
SPODM	nr	7.3*	11.4	8.2*	11.1**	12.6	19.4
SPODS	nr	4.9*	8.7**	5.5*	10.1	10.9	16.5
SPODS1	nr	4.8*	8.1	6.1*	8.2	9.0	34.0
SPODS2	nr	5.6*	9.8	5.7*	10.4	9.8	36.1
SPODS3	nr	5.6*	9.0**	6.4*	10.6	11.5	28.7
SPODS4	nr	5.2*	8.9**	6.4*	9.6**	11.7	31.4
SPODS5	nr	5.4*	9.0**	6.6*	9.6	10.8	29.0
SPODS6	nr	5.1*	9.7**	6.6*	11.7	12.1	28.8
SPODS7	nr	5.1*	10.1**	6.1*	11.3	12.1	31.9
SPODS8	nr	3.9*	8.3**	5.6*	11.9	11.2	31.5
SPODS9	nr	3.6*	6.1**	4.1*	10.2	8.6	34.3
SPODS10	nr	5.7	6.9	3.1*	7.3	9.0	61.8
SPODS11	nr	3.5*	6.5	3.1*	7.9	6.8	47.7
SPODS12	nr	3.8*	7.1	4.3	#N/A	8.7	31.8
SW	mg	3.555*	3.414**	3.720*	3.194	3.228	4.4
SWM	mg	3.494*	3.330**	3.641*	3.150	3.209	4.1
SWS	mg	3.577*	3.434**	3.757*	3.203	3.233	4.9
SWS1	mg	3.646	3.603**	3.769*	3.443	3.370	8.1
SWS2	mg	3.515	3.434	3.762*	3.321	3.430	6.5
SWS3	mg	3.574	3.472**	3.659*	3.269	3.280	6.8
SWS4	mg	3.643*	3.475**	3.803*	3.202	3.213	6.9
SWS5	mg	3.633*	3.497**	3.747*	3.266	3.263	6.5
SWS6	mg	3.595*	3.310	3.653*	3.182	3.173	7.8
SWS7	mg	3.535*	3.342**	3.779*	3.126	3.155	7.3
SWS8	mg	3.549*	3.382**	3.615*	2.999	3.142	7.6
SWS9	mg	3.538*	3.314	3.949*	3.030**	3.271	7.2
SWS10	mg	3.668*	3.426	4.093*	3.127**	3.548	7.8
SWS11	mg	3.676*	3.214**	4.077*	3.151**	4.085	4.4
SWS12	mg	3.625	3.664	4.067	#N/A	3.981	8.4

[0515] CKX突变体显示对主枝和两个第一侧枝上的荚数(NPOD)增加的影响,导致荚总数更高。对于较低的分支,效果变小,甚至在中侧分支的高度产生负面影响,但是在最低分支处再次显示,由于在最低分支处发育的荚数量低,在这些最低分支处对荚总数没有显著影响。考察每枝对总荚数(PPOD)贡献的影响,主枝变得比其在野生型中更具优势。

[0516] 增加的对荚数量的影响是通过在主枝和前4侧枝上的花和荚果败育减少而增强

的。

[0517] 增加的对主枝的显性效应导致该主枝上较高的种子产量重量,但是也导致所有侧枝上的产量重量减少,造成种子总产量重量减少。这可以解释为什么田间试验对种子产量的负面影响不那么强烈,因为植物在较高的植物密度下生长,侧枝少得多。

[0518] 对主枝上种子数量的中性影响表明种子较大,这由种子重量结果证实。所有分支都可以观察到增加的种子重量(大小)。

[0519] 以下段落总结了本发明的不同实施方式:

[0520] 1.一种包含至少一个CKX5基因的芸苔属植物,其基因组中包含至少一个突变CKX5等位基因。

[0521] 2.根据段落1所述的植物,其中所述突变CKX5等位基因是CKX5基因的突变等位基因,其包含选自以下的核酸序列:

[0522] (a)与SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:23具有至少90%序列同一性的核苷酸序列;

[0523] (b)包含与SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:23具有至少90%序列同一性的编码序列的核苷酸序列;和

[0524] (c)编码与SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:24具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的核苷酸序列。

[0525] 3.根据段落1或2所述的植物,其是包含两个CKX5基因的芸苔属植物,所述芸苔属植物选自欧洲油菜、芥菜和埃塞俄比亚芥。

[0526] 4.根据段落1至3中任一段落所述的植物,其包含至少两个突变CKX5或至少三个突变CKX5等位基因或至少四个突变CKX5等位基因。

[0527] 5.根据段1至4中任一段所述的植物,其中所述突变CKX5等位基因选自以下:

[0528] (a)在对应于SEQ ID NO:19的位置465或SEQ ID NO:20的位置465的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因;

[0529] (b)在对应于SEQ ID NO:19的位置399或SEQ ID NO:20的位置399的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因;和

[0530] (c)在对应于SEQ ID NO:22的位置465或SEQ ID No.23的位置399的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因。

[0531] 6.根据段落1至5中任一段落所述的植物,其对于突变CKX5等位基因是纯合的。

[0532] 7.根据段落1至6中任一段所述的植物,在其基因组中进一步包含至少两个CKX3基因,进一步包含至少两个突变CKX3等位基因。

[0533] 8.根据段落7所述的植物,其中所述突变CKX3等位基因是CKX3基因的突变等位基因,其包含选自以下的核酸序列:

[0534] (a)与SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:16具有至少90%序列同一性的核苷酸序列;

[0535] (b)包含与SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:17具有至少90%序列同一性的编码序列的核苷酸序列;和(c)编码与SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的核苷酸序列。

[0536] 9.根据段落7或8所述的植物,其是包含四个CKX3基因的芸苔属植物,所述芸苔属植物选自欧洲油菜、芥菜和埃塞俄比亚芥。

[0537] 10. 根据段落7至9中任一段落所述的植物,其包含至少两个突变CKX3等位基因,或至少三个突变CKX3等位基因,或至少四个突变CKX3等位基因,或至少五个突变CKX3等位基因,或至少六个突变CKX3等位基因,或至少七个突变CKX3等位基因,或至少八个突变CKX3等位基因。

[0538] 11. 根据段落7至10中任一段所述的植物,其中所述突变CKX3等位基因选自以下:

[0539] 在对应于SEQ ID NO:7的位置2244或SEQ ID No.8的位置1093的位置包含C至T取代的突变CKX3等位基因;

[0540] 在对应于SEQ ID NO:10的位置2482或SEQ ID NO:11的位置1168的位置包含C至T取代的突变CKX3等位基因;

[0541] 在对应于SEQ ID NO:13的位置1893或SEQ ID NO:14的位置876的位置包含G至A取代的突变CKX3等位基因;

[0542] 在对应于SEQ ID NO:16的位置2171或SEQ ID NO:17的位置982的位置包含C至T取代的突变CKX3等位基因。

[0543] 12. 根据段落1至5中任一段所述的植物,其对于突变CKX3等位基因是纯合的。

[0544] 13. 一种包含至少两个CKX5基因的芸苔属植物,其中至少一个CKX5基因的表达降低。

[0545] 14. 根据段落1至13中任一段所述的植物,其具有增加的单株花数。

[0546] 15. 根据段落1至13中任一段所述的植物,其具有增加的千粒重。

[0547] 16. 根据段落1至15中任一段的植物的植物细胞、莢、种子或子代。

[0548] 17. 一种芸苔属CKX3或CKX5基因的突变等位基因,其中所述CKX5基因选自以下:

[0549] (a) 与SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:23具有至少90%序列同一性的核苷酸序列;

[0550] (b) 包含与SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:23具有至少90%序列同一性的编码序列的核苷酸序列;和

[0551] (c) 编码与SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:24具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的核苷酸序列;并且其中所述CKX3基因选自以下

[0552] (d) 与SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:16具有至少90%序列同一性的核苷酸序列;

[0553] (e) 包含与SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:17具有至少90%序列同一性的编码序列的核苷酸序列;和

[0554] (f) 编码与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的核苷酸序列。

[0555] 18. 根据段落17所述的突变等位基因,其选自:

[0556] a. 在对应于SEQ ID NO:19的位置465或SEQ ID NO:20的位置465的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因;

[0557] b. 在对应于SEQ ID NO:19的位置399或SEQ ID NO:20的位置399的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因;和

[0558] c. 在对应于SEQ ID NO:22的位置465或SEQ ID No.23的位置399的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因;

[0559] d. 在对应于SEQ ID NO:7的位置2244或SEQ ID No.8的位置1093的位置包含C至T

取代的突变CKX3等位基因；

[0560] e. 在对应于SEQ ID NO:10的位置2482或SEQ ID NO:11的位置1168的位置包含C至T取代的突变CKX3等位基因；

[0561] f. 在对应于SEQ ID NO:13的位置1893或SEQ ID NO:14的位置876的位置包含G至A取代的突变CKX3等位基因；

[0562] g. 在对应于SEQ ID NO:16的位置2171或SEQ ID NO:17的位置982的位置包含C至T取代的突变CKX3等位基因。

[0563] 19. 一种嵌合基因,其包含以下有效连接的DNA片段:

[0564] (a) 植物可表达的启动子;

[0565] (b) DNA区,其在转录时产生抑制一个或多个CKX5或CKX5和CKX3基因或蛋白质的表达或活性的RNA或蛋白质分子;并且任选地,

[0566] (c) 涉及转录终止和聚腺苷酸化的3'端区域。

[0567] 20. 一种鉴定在生物样品中的根据段落17或18的突变CKX5或CKX3等位基因的方法,其包括确定存在于所述生物样品中的核酸中存在突变CKX5或CKX3特异性区域。

[0568] 21. 一种测定在芸苔属植物、植物材料或种子中的根据段落17或18的突变CKX3或CKX5等位基因的接合性状态的方法,其包括测定所述植物,植物材料或种子的基因组DNA中突变体和/或相应野生型CKX3或CKX5的特定区域的存在。

[0569] 22. 一种鉴定在生物样品中的根据段落17或18的突变CKX3或CKX5等位基因的试剂盒,其包含一组至少两种引物,所述组选自:

[0570] (a) 一组引物,其中所述引物之一特异性识别突变等位基因的5'或3'侧翼区,并且所述引物中的另一个特异性识别突变CKX3或CKX5等位基因的突变区域,和

[0571] (b) 一组引物,其中所述引物之一特异性识别突变CKX3或CKX5等位基因的5'或3'侧翼区,并且所述引物中的另一个特异性识别突变CKX3或CKX5等位基因的3'或5'侧翼区和突变区域之间的接合区;

[0572] 或所述试剂盒包含一组至少一种探针,所述探针选自以下:

[0573] (a) 特异性识别突变CKX3或CKX5等位基因突变区的探针,和

[0574] (b) 特异性识别突变CKX3或CKX5等位基因的3'或5'侧翼区域和突变区域之间的接合区的探针。

[0575] 23. 一种用于将至少一个选择的根据段落17或18的突变CKX3或CKX5等位基因从一个植物转移到另一个植物的方法,包括以下步骤:

[0576] (a) 使用根据段落22的方法鉴定包含至少一个选择的突变CKX3或CKX5等位基因的第一植物,

[0577] (b) 将第一植物与不包含至少一个选择的突变CKX3或CKX5等位基因的第二植物杂交并从所述杂交中收集F1杂种种子,

[0578] (c) 任选地,使用根据段落22的方法鉴定包含至少一个选择的突变CKX3或CKX5等位基因的F1植物,

[0579] (d) 将包含所述至少一个选择的突变CKX3或CKX5等位基因的F1植物与不包含所述至少一个选择的突变CKX3或CKX5等位基因的第二植物回交至少一代(x),并从所述杂交中收集BC_x种子,和

[0580] (e) 使用根据段落22的方法鉴定在每代BC_x植物中包含至少一个选择的突变CKX3或CKX5等位基因的植物。

[0581] 24. 一种增加单株花数的方法, 包括

[0582] a. 将至少一个突变CKX5等位基因或至少一个突变CKX5等位基因和一个突变CKX3等位基因导入芸苔属植物; 或

[0583] b. 将段落19的嵌合基因导入芸苔属植物。

[0584] 25. 一种增加芸苔属植物种子的千粒重的方法, 包括

[0585] a. 将至少一个突变CKX5等位基因或至少一个突变CKX5等位基因和一个突变CKX3等位基因导入芸苔属植物; 或

[0586] b. 将段落19的嵌合基因导入芸苔属植物。

[0587] 26. 一种增加单株荚数的方法, 包括

[0588] a. 将至少一个突变CKX5等位基因或至少一个突变CKX5等位基因和一个突变CKX3等位基因导入芸苔属植物; 或

[0589] b. 将段落19的嵌合基因导入芸苔属植物。

[0590] 27. 一种生产种子的方法, 所述方法包括播种根据段落16的种子, 从所述种子生长植物, 并从所述植物收获种子。

[0591] 28. 一种选自以下的芸苔属植物:

[0592] 包含在对应于SEQ ID NO:19的位置465或SEQ ID NO:20的位置465的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因的芸苔属植物, 包含所述等位基因的参照种子已经于2015年10月5日保藏在NCIMB Limited, 保藏号为NCIMB 42464;

[0593] 包含在对应于SEQ ID NO:19的位置399或SEQ ID NO:20的位置399的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因的芸苔属植物, 包含所述等位基因的参照种子已经于2015年10月5日保藏在NCIMB Limited, 保藏号为NCIMB 42465;

[0594] 包含在对应于SEQ ID NO:22的位置465或SEQ ID NO:23的位置399的位置包含G至A取代的突变CKX5等位基因的芸苔属植物, 包含所述等位基因的参照种子已经于2015年10月5日保藏在NCIMB Limited, 保藏号为NCIMB 42464;

[0595] 包含在对应于SEQ ID NO:7的位置2244或SEQ ID NO:8的位置1093的位置处包含C至T取代的突变CKX3等位基因的芸苔属植物, 包含所述等位基因的参照种子已经于2015年10月5日保藏在NCIMB Limited, 保藏号为NCIMB 42464;

[0596] 包含在对应于SEQ ID NO:10的位置2482或SEQ ID NO:11的位置1168的位置处包含C至T取代的突变CKX3等位基因的芸苔属植物, 包含所述等位基因的参照种子已经于2015年10月5日保藏在NCIMB Limited, 保藏号为NCIMB 42464;

[0597] 包含在对应于SEQ ID NO:13的位置1893或SEQ ID NO:14的位置876的位置处包含G至A取代的突变CKX3等位基因的芸苔属植物, 包含所述等位基因的参照种子已经于2015年10月5日保藏在NCIMB Limited, 保藏号为NCIMB 42464;

[0598] 包含在对应于SEQ ID NO:16的位置2171或SEQ ID NO:17的位置982的位置处包含C至T取代的突变CKX3等位基因的芸苔属植物, 包含所述等位基因的参照种子已经于2015年10月5日保藏在NCIMB Limited, 保藏号为NCIMB 42464;

[0599] 29. 根据段落17或18的突变CKX5等位基因或突变CKX5和突变CKX3等位基因或根据

段落19的嵌合基因在增加每株植物的花数、单株荚数或增加芸苔属植物中的TSW中的用途。

[0600] 30. 根据段1至15中任一段的芸苔属植物或根据段落27的种子用于生产油籽油菜油或油籽油菜饼的用途。

[0601] 31. 一种生产食物、饲料或工业产品的方法, 包括:

[0602] a. 获得段落1至15中任一段落的植物或其部分或段落27的种子, 和

[0603] b. 从植物或其部分制备食物、饲料或工业产品。

[0604] 32. 根据段落31所述的方法, 其中

[0605] a. 食物或饲料是油、粕、谷物、淀粉、面粉或蛋白质; 或

[0606] b. 工业产品是生物燃料、工业化学品、药物或营养品。

<110> 拜耳作物科学公司(Bayer CropScience NV)

<120> 在种子生产中具有改变的性质的芸苔属植物

<130> BCS15-2012

<160> 45

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 3325

<212> DNA

<213> 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)

<400> 1

[0001]

```

aaaagactta ttctcaaaa aaaatggcga gttataatct tcgttcacaa gtctgtctta      60
tagcaataac aatagtaac atcattactc tctcaacacc gatacaaac aacacatcac      120
cacaaccaatg gaataatctt tcacacaacg aattcgccgg aaaactcacc tctctctctt      180
ctctcgtega atcagccgcc acagatttcg gccacgtcac caaaatcttc ccttcgcgcg      240
tcttaatccc ttctccgtt gaagacatca cagatctcat aaaactctct ttigactctc      300
aactgtcttt tcttttagcc gctcgiggtc acggacacag ccacgtggtc caagcctcgg      360
ctaaagacgg agttgtggtc aacatgcggt ccattggtaaa cggggataga ggtatcaagg      420
tgtctaggac ctgtttatat gttagcgtgg acgtcgcggt gctatggatt gaggtgttga      480
ataaaacttt ggagttaggg ttaacgccgg ttctctggac ggattatttg tatttaacag      540
tcggtgggac gttatcaaac ggcggaatta gtggacaaac gtctcggtac ggtccacaga      600
tcactaatgt tctagagatg gatgttatta ctggtacgta ccacgatctt ttccacacag      660
agattaaaaa aaacagtaat agtgatttta acttcgtacg ttcttgatag acaacaaaga      720
acttcgtacg ttttcgaag tttttcgtc tttttcattt tagatctgeg cggccatttt      780
tggttatget attgtttgtt tgtatigtgt gtctctgttt atttattctf cgaactgttt      840
gatagctttt cttcttttca cactcaatc taatcacctt ttttggtctt aagattagaa      900
agaagatacg gactaggtaa aaataggtgg ttgtaaacgt agacgcatta aaaaaatatt      960
ggttttttta ttttttgata agcaaaattg gtggttggtc taagattata aacttgatat      1020
taatgcaaag gtctgatctag caatagaaga ttaatcaata ttcttggtgt tttacaaca      1080
gattatttca tcatlaaaat cgtgaaacaa agaaattttg gtagtataca ttacgtgtag      1140
ttttgtagt ttattaaaaa aaatagtata tagttttgtt aaaacgcgat ttatttagta      1200
acacattagt atattacacg tttaaccaac taaacttttt tttttgaata attatgttct      1260
atattttctt ctcaaattat gcaaaattcg tggattcgaa gtcaaatctc tgcgaaattt      1320
acatgggtcat atattataaa actgttcata taaccgggtg aacaacaga caattaaggg      1380
tttgaatggt tacggcgggt ggggcggaca caaccgtcaa tagatcagac cgttttttat      1440
ttaccattca tcaattatat tccgcagtgg tttggggtaa aaaaaataga agaaaaccgc      1500
ageggaccaaa ttccataccg tttttacata caaataaaca tgggtcgcaa cggttttattg      1560
tccgcctcaa aaatgaaatg gactaaaccg cagataaatt agaccgcttt gtccgcigcc      1620
tccattcata gactaaaaaa aaacaaccaaa aaaaaaatg gtccacgcc catgatttta      1680
cacgagggtt ctgttgccgt aaggacaaaa ctcaaaagtt cataacgttt ggtcctaacc      1740
agggtgaatg gattaagtaa cagtcaattt tcttattata gctgtatcca ttatgtccac      1800
atatgatcc atatacatta cactgttggt ctcaagtgta gttagattac gaagacttcc      1860
aagttccatt ttttggttag gagataaaca taatttaatg ataccgactt tagcactcta      1920
ggetcaaaac aagtacagaa gagaatagtt ttatttcaaa ctcggtgcct tgttgaatca      1980

```

attaattgtg ttagtctttg tatattccta cataacgggc caagtttggt gaaatagttt	2040
acttactaaa ctttccetaa tggggcmeta ttttatitta taggaaaagg agagattgca	2100
acttggtcca aggacatgaa cteggatctt ttcttcggcg tgttaggagg tttgggtcaa	2160
ttcggeatta taacaagagc cagaattaaa cttgaagtag ctccgaaaag ggtatgttaa	2220
atttgtaaat tatgcaacta cagaaaatfc tatgaaattt atgaatgaac atatatgcat	2280
ttttggattt ttgtaggcca agtgggttaag gtttetatac atagatttct ccgaattcac	2340
aagagatcaa gaacgagtga tatcgaaaac ggacgggtga gatttcctag aaggttccat	2400
tatggtggac catgcccac cggataactg gagatccacg tattatccac cgtccgata	2460
cttgaggatc gcccaatgg tcaaacgaca tegtgtcacc tactgccttg aagtcgtcaa	2520
gtattacgac gaaactcttc aatacacagt caacgaggtc cgtacataca tacaatcata	2580
aatcatacat gtataattgg gagatcitta tgcattatfc aattataita atttacttta	2640
gttatttaac ttatgcagga aatggaggag ttaagcgata gtttaaacca tgtaaagggt	2700
tttaigtacg agaaagatgt gacgtatgtg gatttccata accgagttcg aaccggagag	2760
ctaaacctga aatccaaagg ccaatgggat gtccacatc catggcttaa tctcttcgta	2820
ccaaaaactc aaatctccaa atttgaigat ggtgttttta agggatattat cctaagaaat	2880
aacateacta geggtcctgt tctgttttat cctatgaate gcaacaagta agtttaactc	2940
gatattgcaa aatttactat ctacattttc gttttggaat ccgaaatatt cttacaagct	3000
aattttatgc ggcgttttta ggtggaatga tccgatgtct gccgtatac ccgaggaaga	3060
tgtattttat gcggtagggt ttttaagatc cgcgggtttt gacaattggg aggttttga	3120
tcaagaaaac atggaatac tgaagttttg tgaggatgct aatatggggg ttatacaata	3180
tcttccttat cattcatcac aagaaggatg ggtagacat tttggtcga ggtggaatat	3240
tttcgtagag agaaaatata aatatgatcc caaaatgata ttatcccggt gacaaaatat	3300
atttcaaaaa ataaactcga gtttag	3325

[0002]

<210> 2

<211> 1572

<212> DNA

<213> 拟南芥

<400> 2

atggcgagtt ataattctcg ttcaacagtt cgtcttatag caataacaat agtaatcacc	60
attactctct caactccgat cacaaccaac acatccacc acacatggaa tatctttca	120
cacaacgaat tcgcggaaa actcaactcc tctctctct cgtcgatc agccgccaca	180
gatttcggcc acgtcaacca aatcttccct tcgcggctct taatcccttc ctccgttgaa	240
gacatcacag atctcataaa actctctttt gactctcaac tgtcttttcc tttagccgt	300
cgtggtcacg gacacageca ccgtggccaa gctcggcta aagacggagt tgtggtaac	360
atgcggteca tggtaaaccg ggategaggt atcaagggtg ctaggacctg tttatatgtt	420
gacgtggacg ctgcgtggct atggattgag gtgttgaata aaactttgga gttagggtta	480
acgcgggttt ctggacgga ttatttgtat ttaacagtcg gtgggacgtt atcaaacggc	540
ggaattagtg gacaaaagtt tcggtacggc ccacagatca ctaatgttct agagatggat	600
gttattactg gaaaaggaga gattgcaact tgttccaagg acatgaacte ggatcttttc	660
ttcgcggtgt taggaggttt ggtcaattc ggcatataa caagagccag aattaaactt	720
gaagtagctc cgaaggggc caagtgggtt aggtttctat acatagattt ctccgaattc	780
acaagagatc aagaacgagt gatatcgaaa acggacgggt tagatttctt agaaggttcc	840
attatggltg accatggccc accggataac tggagatcca cgtattatcc accgtccgat	900
caatigagga tcgcctcaat ggtcaaacga catcgtgtca tctactgctt tgaagtcgtc	960

```

aagtattacg acgaaacttc tcaatacaca gtcaacgagg aaatggagga gttaagcgat 1020
agtttaaacc atgtaagagg gtttatgtac gagaaagatg tgacgtatat ggatttccta 1080
aaccgagttc gaaccggaga gctaaacctg aaatccaaag gccaatggga tgttccacat 1140
ccatggctta atctcttcgt accaaaaact caaatctcca aatttgatga tgggtgtttt 1200
aagggtatta tcctaagaaa taacatcaet agcggctctg ttcttgttta tcctatgaat 1260
cgcaacaagt ggaatgateg gatgtctgcc gctatacccg aggaagatgt attttatgeg 1320
gtagggtttt taagatccgc gggttttgac aattgggagg ctittgatca agaaaacatg 1380
gaaatactga agttttgtga ggatgetaat atgggggtta tacaatatct tccttateat 1440
tcatcacaaag aaggatgggt tagacatttt ggtecgaggt ggaatatatt cgtagagaga 1500
aaatataaat atgatcccaa aatgatatta tcaccgggac aaaatatatt tcaaaaaata 1560
aactcgagtt ag 1572

```

<210> 3

<211> 523

<212> PRT

<213> 拟南芥

<400> 3

[0003]

```

Met Ala Ser Tyr Asn Leu Arg Ser Gln Val Arg Leu Ile Ala Ile Thr
1          5          10          15
Ile Val Ile Ile Ile Thr Leu Ser Thr Pro Ile Thr Thr Asn Thr Ser
20          25          30
Pro Gln Pro Trp Asn Ile Leu Ser His Asn Glu Phe Ala Gly Lys Leu
35          40          45
Thr Ser Ser Ser Ser Ser Val Glu Ser Ala Ala Thr Asp Phe Gly His
50          55          60
Val Thr Lys Ile Phe Pro Ser Ala Val Leu Ile Pro Ser Ser Val Glu
65          70          75          80
Asp Ile Thr Asp Leu Ile Lys Leu Ser Phe Asp Ser Gln Leu Ser Phe
85          90          95
Pro Leu Ala Ala Arg Gly His Gly His Ser His Arg Gly Gln Ala Ser
100          105          110
Ala Lys Asp Gly Val Val Val Asn Met Arg Ser Met Val Asn Arg Asp
115          120          125
Arg Gly Ile Lys Val Ser Arg Thr Cys Leu Tyr Val Asp Val Asp Ala
130          135          140
Ala Trp Leu Trp Ile Glu Val Leu Asn Lys Thr Leu Glu Leu Gly Leu
145          150          155          160
Thr Pro Val Ser Trp Thr Asp Tyr Leu Tyr Leu Thr Val Gly Gly Thr
165          170          175
Leu Ser Asn Gly Gly Ile Ser Gly Gln Thr Phe Arg Tyr Gly Pro Gln
180          185          190
Ile Thr Asn Val Leu Glu Met Asp Val Ile Thr Gly Lys Gly Glu Ile
195          200          205
Ala Thr Cys Ser Lys Asp Met Asn Ser Asp Leu Phe Phe Ala Val Leu
210          215          220

```

	Gly Gly Leu Gly Gln Phe Gly Ile Ile Thr Arg Ala Arg Ile Lys Leu	
	225	230 235 240
	Glu Val Ala Pro Lys Arg Ala Lys Trp Leu Arg Phe Leu Tyr Ile Asp	
	245	250 255
	Phe Ser Glu Phe Thr Arg Asp Gln Glu Arg Val Ile Ser Lys Thr Asp	
	260	265 270
	Gly Val Asp Phe Leu Glu Gly Ser Ile Met Val Asp His Gly Pro Pro	
	275	280 285
	Asp Asn Trp Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Pro Ser Asp His Leu Arg Ile	
	290	295 300
	Ala Ser Met Val Lys Arg His Arg Val Ile Tyr Cys Leu Glu Val Val	
	305	310 315 320
	Lys Tyr Tyr Asp Glu Thr Ser Gln Tyr Thr Val Asn Glu Glu Met Glu	
	325	330 335
	Glu Leu Ser Asp Ser Leu Asn His Val Arg Gly Phe Met Tyr Glu Lys	
	340	345 350
	Asp Val Thr Tyr Met Asp Phe Leu Asn Arg Val Arg Thr Gly Glu Leu	
	355	360 365
	Asn Leu Lys Ser Lys Gly Gln Trp Asp Val Pro His Pro Trp Leu Asn	
	370	375 380
	Leu Phe Val Pro Lys Thr Gln Ile Ser Lys Phe Asp Asp Gly Val Phe	
	385	390 395 400
[0004]	Lys Gly Ile Ile Leu Arg Asn Asn Ile Thr Ser Gly Pro Val Leu Val	
	405	410 415
	Tyr Pro Met Asn Arg Asn Lys Trp Asn Asp Arg Met Ser Ala Ala Ile	
	420	425 430
	Pro Glu Glu Asp Val Phe Tyr Ala Val Gly Phe Leu Arg Ser Ala Gly	
	435	440 445
	Phe Asp Asn Trp Glu Ala Phe Asp Gln Glu Asn Met Glu Ile Leu Lys	
	450	455 460
	Phe Cys Glu Asp Ala Asn Met Gly Val Ile Gln Tyr Leu Pro Tyr His	
	465	470 475 480
	Ser Ser Gln Glu Gly Trp Val Arg His Phe Gly Pro Arg Trp Asn Ile	
	485	490 495
	Phe Val Glu Arg Lys Tyr Lys Tyr Asp Pro Lys Met Ile Leu Ser Pro	
	500	505 510
	Gly Gln Asn Ile Phe Gln Lys Ile Asn Ser Ser	
	515	520
<210>	4	
<211>	3905	
<212>	DNA	
<213>	拟南芥	
<400>	4	
	ataaaegcac aaactcggtta aatttgiacg aataataattt tttttaaaac actcgttata	60

	atatattaaa gtttcaccca aaccgaaaaa agagagaatc tgtgcatgtt gctcagaaaa	120
	lcttcaaagc glaatctggg cttaacgttag ctctcacgaa cccccaagga tcttctatct	180
	atgttttttc atttccccat aaaaattttc attatctaaa aaatattatt atcgatcttt	240
	ttttcttcta tatattcttc ctctcaate ttgattcttg tttcttgagt attctttgat	300
	gaatcgtgaa atgaacgtcaa gttttcttct cctgaacgtt gccatagtta aactgateat	360
	agcgtgggt ctaaacgtgg gcccagtgga gctctccgc atcggagcca tagatgtcga	420
	cggccacttc accgtccacc ctccagactt agcctccgc tcctcagact tcggtatgct	480
	gaatcacct gaagagccat tggcgtgct tcatecatca tcggccgaag acgtggcacg	540
	actcgtcaga acagcttacg gttcagccac ggcgtttccg gtctcagccc gaggccacgg	600
	ccattccata aacggacaag ccgcggcggg gaggaacggt gtggtgggtg aaatgaacca	660
	cggcgttaacc gggacgcca agccactcgt ccgaccgat gaaatgtatg tggatgtatg	720
	gggtggagag ttatgggtcg atgtgttgaa gaaaacgttg gagcatggct tagcaccaaa	780
	atcaiggacg gallacttgi atctaaccgt tggaggtaaa ctctccaatg caggaatcag	840
	tggteaaget ttccaccatg gtctcaaat tagtaacgtc cttagctcg acgttgtaac	900
	tggttagtat taaaacattc aagttcatat attttaaag ctcttgctg aagttttact	960
	aataacaaga aattgatacc aaaaagtagg gaaaggagag gtgatgagat gctcagaaga	1020
	agagaacaca agcctattcc atggagttct tgggtgatta ggtcaatttg ggatcatcac	1080
	tcgagcacga atctctctcg aaccagctcc ccaaagggtg atattttttt aatgactagc	1140
	tatcaaaaat ccttgccggg tccatacgtt gtaatctttt tagtttttac tgttgatggt	1200
	attttttata tattttggat aataaaacc ctaaaatggtg tatttgtatg acaggtgaga	1260
	tggatacggg tattgtattc gagcttcaaa gtgtttacgg aggaccaaga gtacttaate	1320
	tcattgcatg gtcaattaaa gtttgattac gtggaagggt ttgtgattgt ggacgaagga	1380
[0005]	ctcgtcaaca attggagac ttcttcttc tctccacgta accccgtaaa gactctctct	1440
	gttagttcca accgctctgt ttgtatttgc cttagatca ccaagaacta ccacgactcc	1500
	gaetccgaaa tctgtgatca ggtcaccttc attattcact tagaaaaaag cgatatttcc	1560
	attttttata ttgatgaata tctggaagga ttttaacgta tgcgactatt gggaaateat	1620
	tatgaaaaaa tatttagttt atatgattga aagtggtctc catagtattt ttgttgtgtc	1680
	gactttatta taacttaaat ttggaagagg acatgaagaa gaagccagag aggatctaca	1740
	gagatctagc tttccacct gaacttaata atgcacattt atataattat tttcttctt	1800
	ctaaagttaa gtttatcact agcgaattaa tcatgtttac taattagta gtggacaggg	1860
	tcatggacca ctactcacc aaataatgat tctcttttac tcttaagttt aattttaata	1920
	aaaccaactc tacttggaate ttaacttata ctgtgtttg gttagctttt atagcaaacac	1980
	ggttttttta attttctat tccagatttt gtatatataa tgtcgatttt tttcttttt	2040
	gttccaggaa gttgagattc tgatgaagaa attgaatttc ataccgacat cggctctttac	2100
	aacggattta caatatgttg actttctcga cgggtacac aagcccgaa tgaagctccg	2160
	gtccaagaat ttatgggagg ttccacacce atggtcaca cctctcgtgc caaaatcaag	2220
	aatctctgac ttcgataaag gcgttttcaa gggcattttg ggaaataaaa caagtggccc	2280
	tattcttata taccctatga acaaagacaa gtaagtcttg acattacctt tgattaactac	2340
	ttctaaattt ctctctaga aaaaagaata aaacgagttt tgcattgcat gcatgcaaaag	2400
	ttacacttgt ggggattaat tagtggtcca agaaaaaag tttgtcaaaa ttgaaaaaaa	2460
	ctagacacgt ggtacatggg attgtccgaa aaacgttgtc cacatgtgca tcgaaccagc	2520
	taagattgac aacaacactt cgtcgctcgt tatttctctt tttgttttgt gaccaaatcc	2580
	gatgggtccag attgggttta tttgttttta agttcttaga actcatgggt ggtgggtccc	2640
	aalcagattc tctagacca aaccgatctc aacgaacctt ccgcacatca ttgattatta	2700
	cattaatata gatattgtcg ttgtgacgt gtctgaattt gatgttattg tcagatggga	2760

```

cgagaggagc tcagccgtga cgccggatga ggaagttttc tatctggtgg ctctattgag 2820
alcagcttta acggacggig aagagacaca gaagctagag tatctgaaag atcagaaccg 2880
tcggatcttg gagttctgtg aacaagccaa gateaatgtg aagcagtatc ttcctcacca 2940
cgcaacacag gaagagtggg tggctcattt tggggacaag tgggateggt tcagaagctt 3000
aaaggtgag ttigatecgc gacacatact cgetactggt cagagaatct ttcaaaaccc 3060
atctttgtet ttgtttctc cgctcgtcgc ttcttegtca geggettcac ggtgacacag 3120
gacaaaacca agaggaaagt agtagtigag aaatattctt cctgatgtat atatatgacc 3180
taatagagaa gcatcagaga gattagggtg ggtcttttgt tagtaggggt tttaaaatta 3240
gagtagaaga ttcaaaatta gtcaaattta ttgtgttgtt tttatacatc acggattttg 3300
gaaatgggtt tgggacagct taaaccaat taaattaaaa atagacaaca aacctcaaag 3360
actgttttgg actattttac attttttttg gttgategag gtttatactt tatcgtcgtg 3420
gaaccaccat cgggtctctt ttggagatct tccgttetta caattcttca catatcggtc 3480
attatcggtt ggctgttgtt gcaacaaaac aagccaagcg agacgaaggt tcagcttcag 3540
caacaaagag atcaaagttt atatattaat ggtgagtgta agagctgtaa gtaccttttc 3600
agtcgagctt gagagcatgg agaggatgct aatgcagata gaactcaccg tcattgctgg 3660
agaccacgaa tcatacaaaa tatctgcaac gatgatacac aacatcagat actttctcca 3720
ggaggcctat gttaaataat aagctactga aatttgagtg tacccttggg tctaaaagca 3780
aaatctcaag caatatgagt ttcaagagg gtcttatctt cgggtaagac ttcaaatgag 3840
tttaggtata caaacgactt atgttacctc tcacattgtg attattaata tattagagat 3900
catac 3905

```

[0006]

<210> 5

<211> 1623

<212> DNA

<213> 拟南芥

<400> 5

```

atgaatcgtg aaatgacgtc aagctttctt ctcttgacgt tcgccatgtg taaactgate 60
atagccgtgg gtctaaacgt gggccccagt gagctcctcc gcatcggagc catagatgtc 120
gacggccact tcaccgtcca ccttccgac ttagcctccg tctctcaga cttcggtatg 180
ctgaagtca ctaagagcc attggccgtg ctctatecat catcggccga agacgtggca 240
cgactcgtca gaacagctta cggctcagcc acggcgttcc cggctctcagc ccgaggccac 300
ggccattcca taaacggaca agccgcggcg gggaggaacg gtgtggtggt tgaatatgaac 360
cacggcgtaa ccgggaagcc caagccactc gtcgacccgg atgaaatgta tgtggatgta 420
tggggtggag agttatgggt cgatgtgttg aagaaaacgt tggagcatgg cttagcacca 480
aatcatgga cggattactt gtatctaacc gttggaggta cactctccaa tgcaggaaatc 540
agtggctcaag cttttcacca tggctctcaa attagtaacg tcttgagct cgacgttgta 600
actgggaaag gagaggatg gatagctca gaagaagaga acacaaggct attccatgga 660
gttcttgggt gattaggtea atttgggac atcactcgag cagcaatctc tctcgaacca 720
gtccccaaa gggtagatg gatacgggta ttgtattcga gcttcaaagt gtttacggag 780
gaaccaagat acttaatctc aatgcatggt caattaaagt ttgattacgt ggaaggtttt 840
gtgattgtgg acgaaggact cgtcaacaat tggagatctt ctttctctc tccacgtaac 900
cccgtaaga tctctctgt tagttccaac ggctctgttt tgtattgctt tgagatcacc 960
aagaactacc acgactccga ctccgaaatc gttgacagg aagttgagat tctgatgaag 1020
aaatigaatt tcataccgac atcggctctt acaacggatt tacaatatgt ggactttctc 1080
gaccgggtac acaaggccga attgaagctc cggttccaaga atttatggga ggttcacac 1140

```

```

ccatggetca accctcttctg gccaaaatca agaattctctg acttcgataa aggcgttttc 1200
aagggcattt tgggaaataa aacaagtggc cctattctta tctaccccat gaacaaagac 1260
aaatgggacg agaggagctc agccgtgacg ccggaatgagg aagttttcta tctgggtgct 1320
ctattgagat cagctttaac ggacggtgaa gagacacaga agctagagta tctgaaagat 1380
cagaaccgtc ggatcttgga gttctgtgaa caagccaaga tcaatgtgaa gcagtatctt 1440
cctcaccacg caacacagga agagtgggtg gctcattttg gggacaagtg ggatcggttc 1500
agaagcttaa aggetgagtt tgatecgcga cacatactcg ctactggtea gagaatcttt 1560
caaaacceat ctttctcttt gtttcctccg tegtctgttt ctctgtcagc ggcttcaigg 1620
tga 1623

```

<210> 6

<211> 540

<212> PRT

<213> 拟南芥

<400> 6

[0007]

```

Met Asn Arg Glu Met Thr Ser Ser Phe Leu Leu Thr Phe Ala Ile
1          5          10          15
Cys Lys Leu Ile Ile Ala Val Gly Leu Asn Val Gly Pro Ser Glu Leu
          20          25          30
Leu Arg Ile Gly Ala Ile Asp Val Asp Gly His Phe Thr Val His Pro
          35          40          45
Ser Asp Leu Ala Ser Val Ser Ser Asp Phe Gly Met Leu Lys Ser Pro
          50          55          60
Glu Glu Pro Leu Ala Val Leu His Pro Ser Ser Ala Glu Asp Val Ala
65          70          75          80
Arg Leu Val Arg Thr Ala Tyr Gly Ser Ala Thr Ala Phe Pro Val Ser
          85          90          95
Ala Arg Gly His Gly His Ser Ile Asn Gly Gln Ala Ala Ala Gly Arg
          100          105          110
Asn Gly Val Val Val Glu Met Asn His Gly Val Thr Gly Thr Pro Lys
          115          120          125
Pro Leu Val Arg Pro Asp Glu Met Tyr Val Asp Val Trp Gly Gly Glu
          130          135          140
Leu Trp Val Asp Val Leu Lys Lys Thr Leu Glu His Gly Leu Ala Pro
145          150          155          160
Lys Ser Trp Thr Asp Tyr Leu Tyr Leu Thr Val Gly Gly Thr Leu Ser
          165          170          175
Asn Ala Gly Ile Ser Gly Gln Ala Phe His His Gly Pro Gln Ile Ser
          180          185          190
Asn Val Leu Glu Leu Asp Val Val Thr Gly Lys Gly Glu Val Met Arg
          195          200          205
Cys Ser Glu Glu Glu Asn Thr Arg Leu Phe His Gly Val Leu Gly Gly
          210          215          220
Leu Gly Gln Phe Gly Ile Ile Thr Arg Ala Arg Ile Ser Leu Glu Pro
225          230          235          240

```

	Ala Pro Gln Arg Val Arg Trp Ile Arg Val Leu Tyr Ser Ser Phe Lys		
	245	250	255
	Val Phe Thr Glu Asp Gln Glu Tyr Leu Ile Ser Met His Gly Gln Leu		
	260	265	270
	Lys Phe Asp Tyr Val Glu Gly Phe Val Ile Val Asp Glu Gly Leu Val		
	275	280	285
	Asn Asn Trp Arg Ser Ser Phe Phe Ser Pro Arg Asn Pro Val Lys Ile		
	290	295	300
	Ser Ser Val Ser Ser Asn Gly Ser Val Leu Tyr Cys Leu Glu Ile Thr		
	305	310	315
	Lys Asn Tyr His Asp Ser Asp Ser Glu Ile Val Asp Gln Glu Val Glu		
	325	330	335
	Ile Leu Met Lys Lys Leu Asn Phe Ile Pro Thr Ser Val Phe Thr Thr		
	340	345	350
	Asp Leu Gln Tyr Val Asp Phe Leu Asp Arg Val His Lys Ala Glu Leu		
	355	360	365
	Lys Leu Arg Ser Lys Asn Leu Trp Glu Val Pro His Pro Trp Leu Asn		
	370	375	380
	Leu Phe Val Pro Lys Ser Arg Ile Ser Asp Phe Asp Lys Gly Val Phe		
	385	390	395
	Lys Gly Ile Leu Gly Asn Lys Thr Ser Gly Pro Ile Leu Ile Tyr Pro		
	405	410	415
[0008]	Met Asn Lys Asp Lys Trp Asp Glu Arg Ser Ser Ala Val Thr Pro Asp		
	420	425	430
	Glu Glu Val Phe Tyr Leu Val Ala Leu Leu Arg Ser Ala Leu Thr Asp		
	435	440	445
	Gly Glu Glu Thr Gln Lys Leu Glu Tyr Leu Lys Asp Gln Asn Arg Arg		
	450	455	460
	Ile Leu Glu Phe Cys Glu Gln Ala Lys Ile Asn Val Lys Gln Tyr Leu		
	465	470	475
	Pro His His Ala Thr Gln Glu Glu Trp Val Ala His Phe Gly Asp Lys		
	485	490	495
	Trp Asp Arg Phe Arg Ser Leu Lys Ala Glu Phe Asp Pro Arg His Ile		
	500	505	510
	Leu Ala Thr Gly Gln Arg Ile Phe Gln Asn Pro Ser Leu Ser Leu Phe		
	515	520	525
	Pro Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ser Trp		
	530	535	540
	<210> 7		
	<211> 2796		
	<212> DNA		
	<213> 欧洲油菜 (Brassica napus)		
	<220>		
	<221> 外显子		

<222>	(1).. (613)	
<223>	外显子 1	
<220>		
<221>	外显子	
<222>	(1546).. (1673)	
<223>	外显子 2	
<220>		
<221>	外显子	
<222>	(1780).. (2040)	
<223>	外显子 3	
<220>		
<221>	外显子	
<222>	(2154).. (2422)	
<223>	外显子 4	
<220>		
<221>	变化	
<222>	(2244).. (2244)	
<223>	在 YIIN501 中 C 取代为 T	
<220>		
<221>	外显子	
<222>	(2508).. (2796)	
<223>	外显子 5	
[0009]	<400> 7	
	atg gtg agc tat aat ttt cca tca caa att cat ctt cta atg ata acg	48
	Met Val Ser Tyr Asn Phe Pro Ser Gln Ile His Leu Leu Met Ile Thr	
	1 5 10 15	
	ata tta gtt atc atc aca act ctt tta act ccg atc aca acc aac aca	96
	Ile Leu Val Ile Ile Thr Thr Leu Leu Thr Pro Ile Thr Thr Asn Thr	
	20 25 30	
	tca tca cta ccg tgg aat atc ctt tcc aat gac aac ttc gcc gga aaa	144
	Ser Ser Leu Pro Trp Asn Ile Leu Ser Asn Asp Asn Phe Ala Gly Lys	
	35 40 45	
	ctc act acc gca tca tcc tcc gtc gaa tca gct gcc act gat ttc ggc	192
	Leu Thr Thr Ala Ser Ser Ser Val Glu Ser Ala Ala Thr Asp Phe Gly	
	50 55 60	
	cac atc acc aaa atc ttt ccc tcc gcc gtc tta aac cct tcc tcc gtc	240
	His Ile Thr Lys Ile Phe Pro Ser Ala Val Leu Asn Pro Ser Ser Val	
	65 70 75 80	
	caa gac atc acc gat ctt ata aaa ctt tct ttc gat tct caa tcc tct	288
	Gln Asp Ile Thr Asp Leu Ile Lys Leu Ser Phe Asp Ser Gln Ser Ser	
	85 90 95	
	ttt cct cta gcc gct cgt ggc cac gga cac agc cac cgt ggt caa gcc	336
	Phe Pro Leu Ala Ala Arg Gly His Gly His Ser His Arg Gly Gln Ala	
	100 105 110	
	gcg gct aaa gac gga gtc gtg gtc aac atg cgg tca atg gta aac agg	384

[0010]	Ala Ala Lys Asp Gly Val Val Val Asn Met Arg Ser Met Val Asn Arg	
	115 120 125	
	gac cga ggc atc aag gtg tct agg acc ggt tta tat gct gac gtg gac	432
	Asp Arg Gly Ile Lys Val Ser Arg Thr Gly Leu Tyr Ala Asp Val Asp	
	130 135 140	
	agc gcg tgg cta tgg atc gag gtg ttg aat aaa acg ttg gag tta ggg	480
	Ser Ala Trp Leu Trp Ile Glu Val Leu Asn Lys Thr Leu Glu Leu Gly	
	145 150 155 160	
	ctg acg ccg gtt tct tgg acg gat tat ttg tat tta acg gtc ggt gga	528
	Leu Thr Pro Val Ser Trp Thr Asp Tyr Leu Tyr Leu Thr Val Gly Gly	
	165 170 175	
	acg tta tct aac ggc ggt ata agc gga caa acg ttt cgg tat ggt cca	576
	Thr Leu Ser Asn Gly Gly Ile Ser Gly Gln Thr Phe Arg Tyr Gly Pro	
	180 185 190	
	cag atc agt aat gtt tta gag atg gat gtt att act g gtacgtacca	623
	Gln Ile Ser Asn Val Leu Glu Met Asp Val Ile Thr	
	195 200	
	tgatgatttt ttacatgcat tctaaatata tgaacacagta atgacitttta cticgtacat	683
	ttggcaataa aaaaaatata gtacgtttttt cgtcttttct ttaagatctg tgcgctcact	743
	tatgtttiatg etcttggttg ttigtaccgt ttgtctcttg ttctatttat ttctaaaact	803
	tgttgatagc tgttcttctt ttacacacac tagctaatca cattattgag tagaaaaaca	863
	cacgagctat gtgattttat gtttttttct taatttgata ctgaattctg ttaacaaatt	923
	atatittttt tttttgacaa cgtaaacaaa ttatattata agttaagaac caaatgtttg	983
	aaaaattatt tctataattt cttacatatt atgaacgttt cgtggaatct actgcgattt	1043
	ttacattatg gtaataaatg agattagatt acgtaactgt tcataaaacc cggtagacaa	1103
	acaaaaaaaa aagacaaatg aaaatcaacc aaaaatgggtc ccacgtttga tttttcaoga	1163
	ggtttcttgt tggcataagg acacaagtca caagtttata aattttgggtc ctaaccaggt	1223
	gtaatggatt taagtaacag tcagttttct tattatagct gtatccatta tgteccacaca	1283
	tgcatacttc cacatacacc tttttgacaa catatatata tatacataca ttaatacaac	1343
	tggttctctc aaatgtagtt agttaacgat gatittctag ttccattgig tggttaagag	1403
	ataagataaa ttaatgagac cgacttcaac acttttaggt caaacacagc atagtccttat	1463
	ctgaaactcg ttgcattagt tgaaaaagtt ttaagagtaa ctttctaaact tggtcagttt	1523
	tgttttacct ggaattttat ag ga aaa gga gag att gca act tgt tcc aaa	1574
	Gly Lys Gly Glu Ile Ala Thr Cys Ser Lys	
	205 210	
	gac atg aac tca gat ctt ttc tat gcc gcg tta gga ggt tta ggt caa	1622
	Asp Met Asn Ser Asp Leu Phe Tyr Ala Ala Leu Gly Gly Leu Gly Gln	
	215 220 225 230	
	ttc gga att ata acg aga gca aga atc aaa ctc gaa tta gct ccg aaa	1670
	Phe Gly Ile Ile Thr Arg Ala Arg Ile Lys Leu Glu Leu Ala Pro Lys	
	235 240 245	
	aag gtatgttata tatgtaaatt atacaataat atttatgtta tgtaagctat	1723
	Lys	

	ttaaatctat ataaaataat aaataaactt atctgcaa at ttggaaaaa tticag gct	1782
	Ala	
	aaa tgg tta agg ttt cta tac act gat ttc tct gag ttt aca aga gat	1830
	Lys Trp Leu Arg Phe Leu Tyr Thr Asp Phe Ser Glu Phe Thr Arg Asp	
	250 255 260	
	caa gaa cga ttg ata tca gaa acg aac ggg cca cat ttc ctg gaa ggt	1878
	Gln Glu Arg Leu Ile Ser Glu Thr Asn Gly Pro His Phe Leu Glu Gly	
	265 270 275 280	
	tct gtt atg tta gac cat ggc cca cct gat aac tgg cgg tcc act tac	1926
	Ser Val Met Leu Asp His Gly Pro Pro Asp Asn Trp Arg Ser Thr Tyr	
	285 290 295	
	tat cca ccg tcc gag cac atg agg atc gtc tca atg gtc aaa caa cat	1974
	Tyr Pro Pro Ser Glu His Met Arg Ile Val Ser Met Val Lys Gln His	
	300 305 310	
	cgt gtc atc tac tgc ctt gaa gtc gtc aag tat tac gac gaa act tcc	2022
	Arg Val Ile Tyr Cys Leu Glu Val Val Lys Tyr Tyr Asp Glu Thr Ser	
	315 320 325	
	caa cac tca gtc aac gag gtcgtacac attatacata attgtacaag	2070
	Gln His Ser Val Asn Glu	
	330	
[0011]	tatagtcaca atctttactc ataacgaagc cactcttcca taattataat tttattgatt	2130
	gtcgaatcat ttagacaatg cag gaa atg gag gag tta agc gac agt tta aac	2183
	Glu Met Glu Glu Leu Ser Asp Ser Leu Asn	
	335 340	
	tat gaa cga ggg ttt gtg tac gag aaa gat gtg acg tat atg gat ttc	2231
	Tyr Glu Arg Gly Phe Val Tyr Glu Lys Asp Val Thr Tyr Met Asp Phe	
	345 350 355 360	
	tta aac cgg gtt cga acc gga gag cta aaa ctg aaa tcc aaa ggc aag	2279
	Leu Asn Arg Val Arg Thr Gly Glu Leu Lys Leu Lys Ser Lys Gly Lys	
	365 370 375	
	tgg gat gtt cca cat cca tgg ctt aat ctt ttc gta cca aaa tct cag	2327
	Trp Asp Val Pro His Pro Trp Leu Asn Leu Phe Val Pro Lys Ser Gln	
	380 385 390	
	att tca aga ttc gag tat ggc gtt ttt aag ggt att atc ctt aga aat	2375
	Ile Ser Arg Phe Glu Tyr Gly Val Phe Lys Gly Ile Ile Leu Arg Asn	
	395 400 405	
	aac atc act acc ggt ccc ctt ctt gtt tat ccc atg aac cgc aac aa	2422
	Asn Ile Thr Thr Gly Pro Leu Leu Val Tyr Pro Met Asn Arg Asn Lys	
	410 415 420	
	gtaagttata atcaatatag ccacattatc tacagtttca aaattttcaa atgcgaaata	2482
	ctttaaatec gaggttttaa tticag g tgg aat gat cga atg tgg acc gtt ata	2535
	Trp Asn Asp Arg Met Ser Thr Val Ile	

425	430	
ccc gag gaa gat gta ttt tat gct gta gga ttt tta cga tcg gcg agt	2583	
Pro Glu Glu Asp Val Phe Tyr Ala Val Gly Phe Leu Arg Ser Ala Ser		
435	440	445
ttt gac aat tgg gat gat tat gaa aaa gaa aac atg gaa gta tta aag	2631	
Phe Asp Asn Trp Asp Asp Tyr Glu Lys Glu Asn Met Glu Val Leu Lys		
450	455	460
465		
ttt tgt gag gat gct aat atg agg gtc ata caa tat ctt cct tac tat	2679	
Phe Cys Glu Asp Ala Asn Met Arg Val Ile Gln Tyr Leu Pro Tyr Tyr		
470	475	480
gca tca caa gaa gga tgg gtt ggc cat ttt ggt ccg agg tgg aat att	2727	
Ala Ser Gln Glu Gly Trp Val Gly His Phe Gly Pro Arg Trp Asn Ile		
485	490	495
ttt ctc gaa aga aaa tat aga tat gat cct aga atg ata ttg tcc cct	2775	
Phe Leu Glu Arg Lys Tyr Arg Tyr Asp Pro Arg Met Ile Leu Ser Pro		
500	505	510
gga caa aat ata ttt cca taa	2796	
Gly Gln Asn Ile Phe Pro		
515		

<210> 8

<211> 1560

[0012]

<212> DNA

<213> 欧洲油菜

<220>

<221> 变化

<222> (1093)..(1093)

<223> 在 YIIN501 中 C 取代为 T

<400> 8

atggtgagct ataattttcc atcacaatt catettctaa tgataacgat attagttatc	60
atcacaactc tttaaactcc gatcacaacc aacacatcat cactaccgtg gaataatcctt	120
tcgaatgaca acttcgcggg aaaactcact acegeatcat cctccgtcga atcagctgcc	180
actgatttcc gccacatcac caaaatcttt cctccgcggg tcttaaaccc ttctccgtc	240
caagacatca ccatctttat aaaactttct ttcatctc aatcctctt ttctctagcc	300
gtctgtggcc acggacacag ccaccgtggt caagecggcg cttaaagacgg agtcgtggtc	360
aacatgcggt caatggtaaa cagggaccga ggcataaagg tgtctaggac cggtttatat	420
gtgacgtgg acagcgcgtg gctatggatc gaggtgtga ataaaacgtt ggagttaggg	480
ctgacgcggg tttcttggaac ggattatttg tatttaacgg tgggtggaac gttatctaac	540
ggcggataaa gcggacaaac gtttcggtat ggtccacaga tcagtaatgt tttagagatg	600
gatgttatta ctggaaaagg agagattgca acttggtcca aagacatgaa ctcagatctt	660
ttctatgccg cgttaggagg tttaggtcaa ttccgaatta taacgagagc aagaatcaaa	720
ctcgaattag ctccgaaaaa ggctaaatgg ttaaggtttc tataactga tttctctgag	780
tttacaagag atcaagaacg attgatatca gaaacgaac ggccacattt cctggaaggt	840
tcgttatgt tagaccatgg ccacctgat aactggcggg ccaettacta tccaccgtcc	900
gagcacatga ggatcgtctc aatggctaaa caacatcgtg tcattctactg ccttgaagtc	960

```

gtcaagtatt acgacgaaac ttcccaacac tcagtcacg aggaaatgga ggagttaagc 1020
gacagtttaa actatgaacg agggtttggtg tacgagaaag atgtgacgta tatggatttc 1080
ttaaaccggg ttcgaaacgg agagclaaaa clgaaatcca aaggcaagtg ggaatgtcca 1140
catecatggt ttaatctttt cgtacaaaaa tctcagattt caagattcga gtatggcggt 1200
tttaagggtg ttatccittag aaataacatc actaccggtc cccttcctgt ttatcccatg 1260
aaccgcaaca agtggaatga tcgaatgtcg accgttatac ccgaggaaga tgtattttat 1320
gctgtaggat ttttacgacg ggcgagtttt gacaaatggg atgattatga aaaagaaaac 1380
atggaagtat taaagttttg tgaggatgct aataatgagg tcatacaata tcttccttac 1440
tatgcacac aagaaggatg ggttgcccat tttgtccga ggtggaatat ttttctcgaa 1500
agaaaatata gatatgatcc tagaatgata ttgtccctg gacaaaatat atttcataa 1560

```

<210> 9

<211> 519

<212> PRT

<213> 欧洲油菜

<400> 9

[0013]

```

Met Val Ser Tyr Asn Phe Pro Ser Gln Ile His Leu Leu Met Ile Thr
1           5           10           15
Ile Leu Val Ile Ile Thr Thr Leu Leu Thr Pro Ile Thr Thr Asn Thr
20          25          30
Ser Ser Leu Pro Trp Asn Ile Leu Ser Asn Asp Asn Phe Ala Gly Lys
35          40          45
Leu Thr Thr Ala Ser Ser Ser Val Glu Ser Ala Ala Thr Asp Phe Gly
50          55          60
His Ile Thr Lys Ile Phe Pro Ser Ala Val Leu Asn Pro Ser Ser Val
65          70          75          80
Gln Asp Ile Thr Asp Leu Ile Lys Leu Ser Phe Asp Ser Gln Ser Ser
85          90          95
Phe Pro Leu Ala Ala Arg Gly His Gly His Ser His Arg Gly Gln Ala
100         105         110
Ala Ala Lys Asp Gly Val Val Val Asn Met Arg Ser Met Val Asn Arg
115         120         125
Asp Arg Gly Ile Lys Val Ser Arg Thr Gly Leu Tyr Ala Asp Val Asp
130         135         140
Ser Ala Trp Leu Trp Ile Glu Val Leu Asn Lys Thr Leu Glu Leu Gly
145         150         155         160
Leu Thr Pro Val Ser Trp Thr Asp Tyr Leu Tyr Leu Thr Val Gly Gly
165         170         175
Thr Leu Ser Asn Gly Gly Ile Ser Gly Gln Thr Phe Arg Tyr Gly Pro
180         185         190
Gln Ile Ser Asn Val Leu Glu Met Asp Val Ile Thr Gly Lys Gly Glu
195         200         205
Ile Ala Thr Cys Ser Lys Asp Met Asn Ser Asp Leu Phe Tyr Ala Ala
210         215         220
Leu Gly Gly Leu Gly Gln Phe Gly Ile Ile Thr Arg Ala Arg Ile Lys

```

225	230	235	240
Leu Glu Leu Ala Pro Lys Lys Ala Lys Trp Leu Arg Phe Leu Tyr Thr			
	245	250	255
Asp Phe Ser Glu Phe Thr Arg Asp Gln Glu Arg Leu Ile Ser Glu Thr			
	260	265	270
Asn Gly Pro His Phe Leu Glu Gly Ser Val Met Leu Asp His Gly Pro			
	275	280	285
Pro Asp Asn Trp Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Pro Ser Glu His Met Arg			
	290	295	300
Ile Val Ser Met Val Lys Gln His Arg Val Ile Tyr Cys Leu Glu Val			
305	310	315	320
Val Lys Tyr Tyr Asp Glu Thr Ser Gln His Ser Val Asn Glu Glu Met			
	325	330	335
Glu Glu Leu Ser Asp Ser Leu Asn Tyr Glu Arg Gly Phe Val Tyr Glu			
	340	345	350
Lys Asp Val Thr Tyr Met Asp Phe Leu Asn Arg Val Arg Thr Gly Glu			
	355	360	365
Leu Lys Leu Lys Ser Lys Gly Lys Trp Asp Val Pro His Pro Trp Leu			
	370	375	380
Asn Leu Phe Val Pro Lys Ser Gln Ile Ser Arg Phe Glu Tyr Gly Val			
385	390	395	400
Phe Lys Gly Ile Ile Leu Arg Asn Asn Ile Thr Thr Gly Pro Leu Leu			
[0014]	405	410	415
Val Tyr Pro Met Asn Arg Asn Lys Trp Asn Asp Arg Met Ser Thr Val			
	420	425	430
Ile Pro Glu Glu Asp Val Phe Tyr Ala Val Gly Phe Leu Arg Ser Ala			
	435	440	445
Ser Phe Asp Asn Trp Asp Asp Tyr Glu Lys Glu Asn Met Glu Val Leu			
	450	455	460
Lys Phe Cys Glu Asp Ala Asn Met Arg Val Ile Gln Tyr Leu Pro Tyr			
465	470	475	480
Tyr Ala Ser Gln Glu Gly Trp Val Gly His Phe Gly Pro Arg Trp Asn			
	485	490	495
Ile Phe Leu Glu Arg Lys Tyr Arg Tyr Asp Pro Arg Met Ile Leu Ser			
	500	505	510
Pro Gly Gln Asn Ile Phe Pro			
	515		
<210>	10		
<211>	2991		
<212>	DNA		
<213>	欧洲油菜		
<220>			
<221>	外显子		
<222>	(1).. (607)		

	<223> 外显子 1	
	<220>	
	<221> 外显子	
	<222> (1710)..(1834)	
	<223> 外显子 2	
	<220>	
	<221> 外显子	
	<222> (1944)..(2204)	
	<223> 外显子 3	
	<220>	
	<221> 外显子	
	<222> (2311)..(2579)	
	<223> 外显子 4	
	<220>	
	<221> 变化	
	<222> (2482)..(2482)	
	<223> 在 YIIN512 中 C 取代为 T	
	<220>	
	<221> 外显子	
	<222> (2703)..(2991)	
	<223> 外显子 5	
	<400> 10	
[0015]	atg gea agt aat aat ttt cca tcc caa agl cat ctt cta gta ata ata 48	
	Met Ala Ser Asn Asn Phe Pro Ser Gln Ser His Leu Leu Val Ile Ile	
	1 5 10 15	
	ata ttt atc aca act ctt tta act ccg atc aca acc aac aca tca cca 96	
	Ile Phe Ile Thr Thr Leu Leu Thr Pro Ile Thr Thr Asn Thr Ser Pro	
	20 25 30	
	caa cca tgg aat atc ctt tcc aac gac aac ttc gcc gga aaa ctc acc 144	
	Gln Pro Trp Asn Ile Leu Ser Asn Asp Asn Phe Ala Gly Lys Leu Thr	
	35 40 45	
	tec gca tcc tcc tcc gtc gaa gca get tcc atc gat ttc ggc cac gtc 192	
	Ser Ala Ser Ser Ser Val Glu Ala Ala Ser Ile Asp Phe Gly His Val	
	50 55 60	
	acc aaa att cta ccc tcc gcc gtc tta aac cct tcc tcc gtc caa gac 240	
	Thr Lys Ile Leu Pro Ser Ala Val Leu Asn Pro Ser Ser Val Gln Asp	
	65 70 75 80	
	atc atc gat ctc ata aaa ctt tct ttc gac tct caa tcc tct ttc cct 288	
	Ile Ile Asp Leu Ile Lys Leu Ser Phe Asp Ser Gln Ser Ser Phe Pro	
	85 90 95	
	ata gcc gct cgt gcc cac gga cac agc ttc cgt gcc caa gcc gct gct 336	
	Ile Ala Ala Arg Gly His Gly His Ser Phe Arg Gly Gln Ala Ala Ala	
	100 105 110	
	aaa gac gga gtc glg gtc aac atg cgg tca atg gta aac gag gac cga 384	
	Lys Asp Gly Val Val Val Asn Met Arg Ser Met Val Asn Glu Asp Arg	

	115	120	125	
	ggc ala aag gtg tct agg acc ggt tta tat gcg gac glg gac act gcg			432
	Gly Ile Lys Val Ser Arg Thr Gly Leu Tyr Ala Asp Val Asp Thr Ala			
	130	135	140	
	tgg cta tgg att gag gtg ttg aat aaa acg ttg gag ttg ggg tta acg			480
	Trp Leu Trp Ile Glu Val Leu Asn Lys Thr Leu Glu Leu Gly Leu Thr			
	145	150	155	160
	ccg gtt tct tgg acg gac tat ttg tat tta acg gtc ggt gga acg tta			528
	Pro Val Ser Trp Thr Asp Tyr Leu Tyr Leu Thr Val Gly Gly Thr Leu			
	165	170	175	
	tcc aac ggc gga ata agc gga caa acg tct cgg tac ggt cca cag atc			576
	Ser Asn Gly Gly Ile Ser Gly Gln Thr Ser Arg Tyr Gly Pro Gln Ile			
	180	185	190	
	agt aat gtt ctt gag ctg gat att att act g gtacgtacca tgattttac			627
	Ser Asn Val Leu Glu Leu Asp Ile Ile Thr			
	195	200		
	atatattcca aatctatgca ataacttactt cgtacgtttg acgacaaaaa taaaatacaa			687
	taaaaacgta cgttttttta gatctgggtg gtcacttgtg tttatgctct tgttttgitt			747
	aatattgtgt cttttttacg tatttgtcga acttgttgat agcttttctt gttttcacac			807
	atctagctaa tcacattatt tttgcgtcta agagtagaaa gaaacacggg ctatgtataa			867
	aataagtggg tgaagaaaa gatttttctt tgtttagtg atagaagatt tagcattatt			927
	gtttttttgc aacagaaatt tcaaatfana attcgtgaaa gatacgtgta ataatatata			987
[0016]	gtctctactt gaaagtgtg cacaaaaaaa aagtcctiac ttgaaagtgt aaacagaaca			1047
	atttttttga ttttatgttc atattacgat tttgtaactaa cgctatatat aacaagttac			1107
	taactaaata gtttttgaaa ttttgaaatt tataatttct tacatattat ggatgtttcg			1167
	tgaatctaa ttttgttctc cgcgaaattt acataatggt cagcgcgcgc acgttaatgt			1227
	tatgtaattg ttcataataa ccggtgacaa acaaatatta aaaatggtec cagcgtatg			1287
	ttttttcag aggtttcttg tggcatagag acaaaactca aaatcttata acgtttggtc			1347
	ataattaacc aggtgtaatg aatttaagta acagtcatt ttcittattat agctaatagt			1407
	tgtaccaeta tgcacacata tgcatccata attccatata cgaacactgt tggctgaag			1467
	tttagttcgt ttacgaagac ttcttagttc caaagtttgg ttaggacita ggagataaga			1527
	tatattaatg ggaccgaatt taacatttta ggctttaaac aacgatagtt ttatttgaaa			1587
	ctcgttgcat cttttatata aactatgata ttctttgtat agtattacgg tccaaatatg			1647
	ttgaaatagt ttaagactga actttctaatt taggtcagct attttcccc ggaactttat			1707
	ag ga aaa ggg gag att gca act tgt tcc aac gac atg aac tca gat			1753
	Gly Lys Gly Glu Ile Ala Thr Cys Ser Asn Asp Met Asn Ser Asp			
	205	210	215	
	ctt ttc tac gcg gcg tta gga ggt ttg ggt caa ttc gga att ata aca			1801
	Leu Phe Tyr Ala Ala Leu Gly Gly Leu Gly Gln Phe Gly Ile Ile Thr			
	220	225	230	
	aga gcc agg att aaa ctg gaa tta gct cca aaa aggttatggt atattaatat			1854
	Arg Ala Arg Ile Lys Leu Glu Leu Ala Pro Lys			
	235	240		
	gtaaattatt caatatafat tttatataag taagaataat ttaccgaaat ttttgatlaa			1914
	atatatctct tttgttgaa acttttcag gct aaa tgg tta agg ttt cta tac			1967

	Ala Lys Trp Leu Arg Phe Leu Tyr	
	245	250
	act gat ttc tct gaa ttc aca aga gat caa gaa cga ttg ata tca gaa	2015
	Thr Asp Phe Ser Glu Phe Thr Arg Asp Gln Glu Arg Leu Ile Ser Glu	
	255	260
	gcg ggc ggt tta cat ttc ttg gaa ggt tcc gtt atg ctt gac cat ggc	2063
	Ala Gly Gly Leu His Phe Leu Glu Gly Ser Val Met Leu Asp His Gly	
	270	275
	cca cct gat aac tgg aga tct act tac tat cca ccg tcc gat cac ttg	2111
	Pro Pro Asp Asn Trp Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Pro Ser Asp His Leu	
	285	290
	agg atc gtc tca atg ata aaa cga cac cgt gtc atc tac tgt ctc gaa	2159
	Arg Ile Val Ser Met Ile Lys Arg His Arg Val Ile Tyr Cys Leu Glu	
	305	310
	gtc gtc aag tat tac gac gaa ttt tct caa cac tca gtc aac gag	2204
	Val Val Lys Tyr Tyr Asp Glu Phe Ser Gln His Ser Val Asn Glu	
	320	325
	gtccgtacac atatacacia gtataattag gatctccact cacaattaaa aaactctatc	2264
	ttatattata tgtttattaa ttttctcaat tatttaaact ttgcag gaa atg gag	2319
		Glu Met Glu
	gag tta agc gag agt tta aac ttt gta aga ggg ttt gtg tac gag aaa	2367
[0017]	Glu Leu Ser Glu Ser Leu Asn Phe Val Arg Gly Phe Val Tyr Glu Lys	
	335	340
	gat gtg acg tat ata gat ttc ttg aac cgg gtt cga acg gga gag cta	2415
	Asp Val Thr Tyr Ile Asp Phe Leu Asn Arg Val Arg Thr Gly Glu Leu	
	355	360
	aac ctg aaa tcc aaa ggc caa tgg gat gtt cca cat cca tgg ctt aat	2463
	Asn Leu Lys Ser Lys Gly Gln Trp Asp Val Pro His Pro Trp Leu Asn	
	370	375
	ctc ttt gta cca aaa tct cag att tca aga ttt gat tat ggt gtc ttt	2511
	Leu Phe Val Pro Lys Ser Gln Ile Ser Arg Phe Asp Tyr Gly Val Phe	
	385	390
	aag ggt att atc ctt aga aat aac atc act acc ggt cca ctt ctt gtt	2559
	Lys Gly Ile Ile Leu Arg Asn Asn Ile Thr Thr Gly Pro Leu Leu Val	
	400	405
	tat ccc atg aag cgc att at gtaagttaaa atatagagcg atcatccatt	2609
	Tyr Pro Met Lys Arg Ile Met	
	415	420
	caatttttta tattaaagtt cttaactaaat gttaatggcc tccaaaattt cagctttgtg	2669
	tttaaataac tgacttttaa ggttttgctt cag g tgg aat gat caa atg tcc	2721
		Trp Asn Asp Gln Met Ser
		425
	acc gct ata ccc gaa gaa gat gta ttt tat geg gta ggg ttc tta cga	2769
	Thr Ala Ile Pro Glu Glu Asp Val Phe Tyr Ala Val Gly Phe Leu Arg	

	430	435	440	
	tct gcg gag ttt gat aat tgg gag gct tat gat aaa gaa aat atg gag			2817
	Ser Ala Glu Phe Asp Asn Trp Glu Ala Tyr Asp Lys Glu Asn Met Glu			
	445	450	455	
	gta ttg atg ttt tgt gag gat gct aaa atg gat gtc ata cag tat ctt			2865
	Val Leu Met Phe Cys Glu Asp Ala Lys Met Asp Val Ile Gln Tyr Leu			
	460	465	470	475
	cct tat cat gca tca caa gaa gga tgg gtt aga cat ttt ggt ccg agg			2913
	Pro Tyr His Ala Ser Gln Glu Gly Trp Val Arg His Phe Gly Pro Arg			
	480	485	490	
	tgg aat act ttt gta gag aga aaa tat aaa tac gat cct aaa atg ata			2961
	Trp Asn Thr Phe Val Glu Arg Lys Tyr Lys Tyr Asp Pro Lys Met Ile			
	495	500	505	
	ttg tct cca gga caa aat ata ttt caa taa			2991
	Leu Ser Pro Gly Gln Asn Ile Phe Gln			
	510	515		
	<210> 11			
	<211> 1554			
	<212> DNA			
	<213> 欧洲油菜			
[0018]	<220>			
	<221> 变化			
	<222> (1168).. (1168)			
	<223> 在 YIIN512 中 C 取代为 T			
	<400> 11			
	atggcaagta ataattttcc atcccaaagt catcttctag taataataat atttatcaca			60
	actcttttaa ctcgatcac aaccaacaca tcaccacaac catggaatat cctttccaac			120
	gacaacttcg ccggaanaact cactccgca tcttcctccg tegaagcage ttccatcgat			180
	ttcgccacag tcacaaaaat tctaccctcc gccgtcttaa acccttcctc cgtccaagac			240
	atcctcgatc tcataaaaact ttctttcgac tctcaatcct ctttccctat agccgctcgt			300
	ggccacggac acagcttccg tggccaagcc gctgctaaag acggagtcgt ggccaacatg			360
	cgtlcaatgg taaacgagga ccgaggcata aaggtgtcta ggaccggttt atatgcggac			420
	gtggacactg cgtggctatg gattgagggt ttgaataaaa cgttggagtt ggggttaacg			480
	ccggtttctt ggacggacia ttgtatttta acggtcgggt gaacgttate caacggcgga			540
	ataagcggac aaacgtctcg gtacggteca cagatcagta atgttcttga gctggatatt			600
	attactggaa aaggggagat tgcaacttgt tccaacgaca tgaactcaga tctttctac			660
	gcggcgtag gaggtttggg tcaattcgga attataacaa gaccaggat taaactcgaa			720
	ttagctccaa aaagggttaa atggttaagg tttctataca ctgatttctc tgaattcaca			780
	agagatcaag aacgattgat atcagaagcg ggcggtttac atttcttgga aggttccgtt			840
	atgcttgacc atgcccacc tgataactgg agatctactt actatccacc gtccgateac			900
	ttgaggatcg tctcaatgat aaaacgacac cgtgtcatct actgtctcga agtcgtcaag			960
	tattacgacg aattttctea aactcagtc aacaggaaa tggaggagtt aagcgagagt			1020
	ttaaactttg taagagggtt tgtgtacgag aaagaigtga cgtatataga tttcttgaac			1080

```

cgggttcgaa cgggagagct aaacctgaaa tccaaaggcc aatgggatgt tccacateca 1140
tggcttaatc tctttgtacc aaaatctcag atttcaagat ttgattatgg tgtctttaag 1200
ggtattatcc ttagaaataa catcactacc ggtecaette ttgtttatcc catgaagcgc 1260
attatgtgga atgatcaaat gtccaccgct ataccgaag aagatgtatt ttatgcggtg 1320
gggttcttac gatctgcgga gtttgataat tgggaggett atgataaaga aaatatggag 1380
gtattgatgt tttgtgagga tgctaaaatg gatgtcatac agtatettcc ttatcatgca 1440
tcacaagaag gatgggtag acattttggg ccgagggtga atacttttgt agagagaaaa 1500
tataaatatcg atcctaaaat gatattgtct ccaggacaaa atatatttca ataa 1554

```

<210> 12

<211> 517

<212> PRT

<213> 欧洲油菜

<400> 12

[0019]

```

Met Ala Ser Asn Asn Phe Pro Ser Gln Ser His Leu Leu Val Ile Ile
1          5          10         15
Ile Phe Ile Thr Thr Leu Leu Thr Pro Ile Thr Thr Asn Thr Ser Pro
20         25         30
Gln Pro Trp Asn Ile Leu Ser Asn Asp Asn Phe Ala Gly Lys Leu Thr
35         40         45
Ser Ala Ser Ser Ser Val Glu Ala Ala Ser Ile Asp Phe Gly His Val
50         55         60
Thr Lys Ile Leu Pro Ser Ala Val Leu Asn Pro Ser Ser Val Gln Asp
65         70         75         80
Ile Ile Asp Leu Ile Lys Leu Ser Phe Asp Ser Gln Ser Ser Phe Pro
85         90         95
Ile Ala Ala Arg Gly His Gly His Ser Phe Arg Gly Gln Ala Ala Ala
100        105        110
Lys Asp Gly Val Val Val Asn Met Arg Ser Met Val Asn Glu Asp Arg
115        120        125
Gly Ile Lys Val Ser Arg Thr Gly Leu Tyr Ala Asp Val Asp Thr Ala
130        135        140
Trp Leu Trp Ile Glu Val Leu Asn Lys Thr Leu Glu Leu Gly Leu Thr
145        150        155        160
Pro Val Ser Trp Thr Asp Tyr Leu Tyr Leu Thr Val Gly Gly Thr Leu
165        170        175
Ser Asn Gly Gly Ile Ser Gly Gln Thr Ser Arg Tyr Gly Pro Gln Ile
180        185        190
Ser Asn Val Leu Glu Leu Asp Ile Ile Thr Gly Lys Gly Glu Ile Ala
195        200        205
Thr Cys Ser Asn Asp Met Asn Ser Asp Leu Phe Tyr Ala Ala Leu Gly
210        215        220
Gly Leu Gly Gln Phe Gly Ile Ile Thr Arg Ala Arg Ile Lys Leu Glu
225        230        235        240
Leu Ala Pro Lys Arg Ala Lys Trp Leu Arg Phe Leu Tyr Thr Asp Phe

```

245 250 255
 Ser Glu Phe Thr Arg Asp Gln Glu Arg Leu Ile Ser Glu Ala Gly Gly
 260 265 270
 Leu His Phe Leu Glu Gly Ser Val Met Leu Asp His Gly Pro Pro Asp
 275 280 285
 Asn Trp Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Pro Ser Asp His Leu Arg Ile Val
 290 295 300
 Ser Met Ile Lys Arg His Arg Val Ile Tyr Cys Leu Glu Val Val Lys
 305 310 315 320
 Tyr Tyr Asp Glu Phe Ser Gln His Ser Val Asn Glu Glu Met Glu Glu
 325 330 335
 Leu Ser Glu Ser Leu Asn Phe Val Arg Gly Phe Val Tyr Glu Lys Asp
 340 345 350
 Val Thr Tyr Ile Asp Phe Leu Asn Arg Val Arg Thr Gly Glu Leu Asn
 355 360 365
 Leu Lys Ser Lys Gly Gln Trp Asp Val Pro His Pro Trp Leu Asn Leu
 370 375 380
 Phe Val Pro Lys Ser Gln Ile Ser Arg Phe Asp Tyr Gly Val Phe Lys
 385 390 395 400
 Gly Ile Ile Leu Arg Asn Asn Ile Thr Thr Gly Pro Leu Leu Val Tyr
 405 410 415
 Pro Met Lys Arg Ile Met Trp Asn Asp Gln Met Ser Thr Ala Ile Pro
 [0020] 420 425 430
 Glu Glu Asp Val Phe Tyr Ala Val Gly Phe Leu Arg Ser Ala Glu Phe
 435 440 445
 Asp Asn Trp Glu Ala Tyr Asp Lys Glu Asn Met Glu Val Leu Met Phe
 450 455 460
 Cys Glu Asp Ala Lys Met Asp Val Ile Gln Tyr Leu Pro Tyr His Ala
 465 470 475 480
 Ser Gln Glu Gly Trp Val Arg His Phe Gly Pro Arg Trp Asn Thr Phe
 485 490 495
 Val Glu Arg Lys Tyr Lys Tyr Asp Pro Lys Met Ile Leu Ser Pro Gly
 500 505 510
 Gln Asn Ile Phe Gln
 515

<210> 13

<211> 2776

<212> DNA

<213> 欧洲油菜

<220>

<221> 外显子

<222> (1)..(613)

<223> 外显子 1

<220>

	<221>	外显子	
	<222>	(1525)..(1652)	
	<223>	外显子 2	
	<220>		
	<221>	外显子	
	<222>	(1759)..(2019)	
	<223>	外显子 3	
	<220>		
	<221>	变化	
	<222>	(1893)..(1893)	
	<223>	在 YIIN521 中 G 至 A 取代	
	<220>		
	<221>	外显子	
	<222>	(2133)..(2401)	
	<223>	外显子 4	
	<220>		
	<221>	外显子	
	<222>	(2488)..(2776)	
	<223>	外显子 5	
	<400>	13	
	atg gtg agc tat aat ttt cca tca caa att cat ctt cta atg ata acg		48
	Met Val Ser Tyr Asn Phe Pro Ser Gln Ile His Leu Leu Met Ile Thr		
[0021]	1 5 10 15		
	ata tta gta atc atc aca act ctt ttc act cgg atc aca acc aac aca		96
	Ile Leu Val Ile Ile Thr Thr Leu Phe Thr Pro Ile Thr Thr Asn Thr		
	20 25 30		
	tca tca cta cca tgg aat atc ctt tcc aat gac aac ttc gcc cga aaa		144
	Ser Ser Leu Pro Trp Asn Ile Leu Ser Asn Asp Asn Phe Ala Arg Lys		
	35 40 45		
	ctc act act gca tca tcc tcc gtc gaa tca gct gcc act gat ttc ggc		192
	Leu Thr Thr Ala Ser Ser Ser Val Glu Ser Ala Ala Thr Asp Phe Gly		
	50 55 60		
	cac atc acc aaa atc ttt ccc tcc gcc gtc tta aac cct tcc tcc gtc		240
	His Ile Thr Lys Ile Phe Pro Ser Ala Val Leu Asn Pro Ser Ser Val		
	65 70 75 80		
	caa gac atc acc gat ctt ata aaa ctt tct ttc gat tct caa tct tct		288
	Gln Asp Ile Thr Asp Leu Ile Lys Leu Ser Phe Asp Ser Gln Ser Ser		
	85 90 95		
	ttt cct cta gcc gct cgt ggc cac gga cac agc cac cgt ggt caa gcc		336
	Phe Pro Leu Ala Ala Arg Gly His Gly His Ser His Arg Gly Gln Ala		
	100 105 110		
	gcg gct aat gac gga gtc gtg gtc aac atg cgg tca atg gta aac agg		384
	Ala Ala Asn Asp Gly Val Val Val Asn Met Arg Ser Met Val Asn Arg		
	115 120 125		
	gac cga ggc atc aag gtg tct agg aca ggt tta tat gct gac gtg gac		432

	Asp Arg Gly Ile Lys Val Ser Arg Thr Gly Leu Tyr Ala Asp Val Asp	
	130 135 140	
	agc gcg tgg cta tgg atc gag gtg ttg aat aaa acg ttg gag tta ggg	480
	Ser Ala Trp Leu Trp Ile Glu Val Leu Asn Lys Thr Leu Glu Leu Gly	
	145 150 155 160	
	ctg acg ccg gtt tct tgg acg gat tat ttg cat tta acg gtc ggt gga	528
	Leu Thr Pro Val Ser Trp Thr Asp Tyr Leu His Leu Thr Val Gly Gly	
	165 170 175	
	acg tta tct aac ggc ggt ata agc gga caa act ttt cgg tat ggt cca	576
	Thr Leu Ser Asn Gly Gly Ile Ser Gly Gln Thr Phe Arg Tyr Gly Pro	
	180 185 190	
	cag atc agt aat gtt tta gag atg gat gtt att act g gtacgtacca	623
	Gln Ile Ser Asn Val Leu Glu Met Asp Val Ile Thr	
	195 200	
	tgatgatttt ttacatgcat tctaaatata tgaaacagta atgactttta ctctgtacat	683
	ttggcaataa aaaaaatata gtacgttttt cgtcttttct ttaagatctg tgcgctcaat	743
	ttatgtttat gctcttgttt gttgtactg tttgtgtctt gttctattta tttctataac	803
	ttgttgatag cgttcttctt ttccacacat tttagctaate acattattga gtagaaaaac	863
	acacgagcta tgtgatttta tggttttttc taatttgata atgaattact gttaaaaaat	923
	tatatataaa gttaataacc aaatgtttga aaatttattt ctataatttc ttacatattt	983
	tgacgtttcg ctgaatctac tgccaatttt acatgatggt aataaatgag atcagattac	1043
	gtaactgttc ataaaaccgg gtgaccaaac aaacaaaaaa gacaaatgaa aatcaaccaa	1103
[0022]	aaatggtecc acacttgatt tttaacgagg ttctctgttg gcataaggac acaagtcaca	1163
	agtttataaa ttttggtcct aaccagggtgt aatggattta agtaacagtc agttttccta	1223
	ttatagctgt atccattatg tccacacatg catccattcc atatacacet ttttgacaac	1283
	atatatatat atatatatat atacatacat taalacaact gttagcctca aatglagta	1343
	gttaacgatg actttctagt tccattgtgt ggttaagaga taagataaat taatgagacc	1403
	gaactcaaca ctttaggctc aaaacagcga tagtctaate tgaaactcgt tgcatttgtt	1463
	gaaaaagttt taagagttaac ttctaaactt ggtcagtitt gttttaccgg gaattttata	1523
	g ga aaa gga gag att gca act tgt tcc aaa gac atg aac tca gat ctt	1571
	Gly Lys Gly Glu Ile Ala Thr Cys Ser Lys Asp Met Asn Ser Asp Leu	
	205 210 215 220	
	ttc tat gcc gcg tta gga ggt tta ggt caa ttc gga att ata acg aga	1619
	Phe Tyr Ala Ala Leu Gly Gly Leu Gly Gln Phe Gly Ile Ile Thr Arg	
	225 230 235	
	gca aga atc aaa ctc gaa tta gct ccg aaa aat gtatgttata tatgtaaatt	1672
	Ala Arg Ile Lys Leu Glu Leu Ala Pro Lys Asn	
	240 245	
	atataataat atttatgtta tattagctat ttaaatctat ataaaataat aaataaacat	1732
	atctgcaaat ttgggaaaat ttccag gct aaa tgg tta agg ttt cta tac act	1785
	Ala Lys Trp Leu Arg Phe Leu Tyr Thr	
	250 255	
	gat ttc tct gag ttt aca aga gat caa gaa cga ttg ata tca gaa acg	1833
	Asp Phe Ser Glu Phe Thr Arg Asp Gln Glu Arg Leu Ile Ser Glu Thr	
	260 265 270	

	aac ggg cta cat ttc ctg gaa ggt tct gtt atg tta gac cat ggc cca	1881
	Asn Gly Leu His Phe Leu Glu Gly Ser Val Met Leu Asp His Gly Pro	
	275 280 285	
	cct gat aac tgg cgg tcc act tac tat cca ccg tcc gag cac atg agg	1929
	Pro Asp Asn Trp Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Pro Ser Glu His Met Arg	
	290 295 300	
	atc gtc tca atg gtc aaa caa cat cgt gtc atc tac tgc ctt gaa gtc	1977
	Ile Val Ser Met Val Lys Gln His Arg Val Ile Tyr Cys Leu Glu Val	
	305 310 315 320	
	gtc aag tat tac gac gaa act tcc caa cac tca gtc aac gag	2019
	Val Lys Tyr Tyr Asp Glu Thr Ser Gln His Ser Val Asn Glu	
	325 330	
	gtccgtacac attatacata attgtacaag tatagtcacg atctttactc ataacgaagc	2079
	cactcttcca taattataat ttatigatt gatcaatcat ttaaacaatg cag gaa	2135
	Glu	
	335	
	atg gag gag tta agc gac agt tta aac tat gaa cga ggg ttt gtg tac	2183
	Met Glu Glu Leu Ser Asp Ser Leu Asn Tyr Glu Arg Gly Phe Val Tyr	
	340 345 350	
	gag aaa gat gtg acg tat atg gat ttc tta aac cgg gtt cga acc gga	2231
	Glu Lys Asp Val Thr Tyr Met Asp Phe Leu Asn Arg Val Arg Thr Gly	
	355 360 365	
[0023]	gag cta aaa ctg aaa tcc aaa ggc cag tgg gat gtt cca cat cca tgg	2279
	Glu Leu Lys Leu Lys Ser Lys Gly Gln Trp Asp Val Pro His Pro Trp	
	370 375 380	
	ctt aat ctt ttc gta cca aaa tct cag att tca aga ttc gag tat ggc	2327
	Leu Asn Leu Phe Val Pro Lys Ser Gln Ile Ser Arg Phe Glu Tyr Gly	
	385 390 395	
	gtt ttt aag ggt att atc ctt aga aat aac atc act act ggt ccc ctt	2375
	Val Phe Lys Gly Ile Ile Leu Arg Asn Asn Ile Thr Thr Gly Pro Leu	
	400 405 410 415	
	ctt gtt tat ccc atg aac cgc aac aa gtaagttatg atcaatatag	2421
	Leu Val Tyr Pro Met Asn Arg Asn Lys	
	420	
	ccacattatc tacagtttca aaattttcaa aatgcgaaat acitaaatct cgaggtttta	2481
	attcag g tgg aat gat cga atg tgc acc gtt tta cct gag gaa gac gta	2530
	Trp Asn Asp Arg Met Ser Thr Val Leu Pro Glu Glu Asp Val	
	425 430 435	
	ttt tat gct gtc ggg ttt tta cga tgc gcg agt ttt gac aat tgg gat	2578
	Phe Tyr Ala Val Gly Phe Leu Arg Ser Ala Ser Phe Asp Asn Trp Asp	
	440 445 450	
	gat tat gaa aaa gaa aac atg gaa gta tta aag ttt tgc gag gat gct	2626
	Asp Tyr Glu Lys Glu Asn Met Glu Val Leu Lys Phe Cys Glu Asp Ala	
	455 460 465 470	
	aat atg agg gtc ata caa tat ctt cct tac tat gca tca caa gaa gga	2674

	Asn Met Arg Val Ile Gln Tyr Leu Pro Tyr Tyr Ala Ser Gln Glu Gly	
	475 480 485	
	tgg gtt gga cat ttt ggt acg agg tgg aat att ttt ctc gaa aga aaa	2722
	Trp Val Gly His Phe Gly Thr Arg Trp Asn Ile Phe Leu Glu Arg Lys	
	490 495 500	
	tat aga tat gat cct aga atg ata ttg tcc cct gga caa aat ata ttt	2770
	Tyr Arg Tyr Asp Pro Arg Met Ile Leu Ser Pro Gly Gln Asn Ile Phe	
	505 510 515	
	cca taa	2776
	Pro	
	<210> 14	
	<211> 1560	
	<212> DNA	
	<213> 欧洲油菜	
	<220>	
	<221> 变化	
	<222> (876).. (876)	
	<223> 在 YIIN521 中 G 至 A 取代	
	<400> 14	
[0024]	atggtgagct ataattttcc atcacaatt catcttctaa tgataacgat attagtaate	60
	atcacaactc ttttcaactc gatcacaacc aacacatcat cactaccaig gaatactctt	120
	tccaatgaca acttcecccg aaaactcact actgcatcat cctccgtcga atcagctgcc	180
	actgatttcg gccacatcac caaaactctt ccctccgcg tcttaaaccc ttcctccgtc	240
	caagacatca ccatctctat aaaactttct ttcgattctc aatcttcttt tctctagcc	300
	gctcgtggcc acggacacag ccaccgtggt caagccgcgg ctaatgacgg agtcgtggtc	360
	aacatgcgggt caatggtaaa cagggaccga ggcatcaagg tgtctaggac aggtttatat	420
	gctgacgtgg acagcgcgtg gctatggatc gaggtgttga ataaacgtt ggagttaggg	480
	cigacgcggg tttcttggac ggattatttg catttaacgg tcggtggaac gttatctaac	540
	ggcgttataa gcggacaaac ttttcggtat ggtccacaga tcagtaatgt tttagagatg	600
	gatgttatta ctggaaaagg agagattgca acttgttcca aagacatgaa ctcagatctt	660
	ttctatgccg cgttaggagg tttaggteaa ttccggaatta taacgagagc aagaatcaaa	720
	ctcgaattag ctccgaaaaa tgcataatgg ttaaggtttc tataactga tttctctgag	780
	tttacaagag atcaagaacg attgatatca gaaacgaac ggetacattt cctggaaggt	840
	ictgttatgt tagaccatgg ccacctgat aactggcggg ccacttacta tccaccgtcc	900
	gagcacatga ggatcgtctc aatggteaaa caacatcgtg tcatctactg ccttgaagtc	960
	gtcaagtatt acgacgaaac ttccaacac tcagteaacg aggaaatgga ggagttaagc	1020
	gacagttaa actatgaacg agggtttgtg tacgagaaag atgtgacgtg tatggatttc	1080
	ttaaaccggg ttccaaccgg agagctaaaa ctgaaatcca aagccagtg ggatgttcca	1140
	catccatggc ttaatctttt cgtaccaaaa tctcagattt caagattcga gtatggcgtt	1200
	tttaagggtg ttatccttag aaataacatc actactggtc cccttcttgt ttatcccatg	1260
	aaccgcaaca agtggaatga tcgaatgtcg accgtttttac ctgaggaaga cgtattttat	1320
	gctgtcgggt ttttacgacg ggcgagtttt gacaaatggg atgattatga aaaagaaaac	1380
	atggaagtat taaagttttg cgaggatgct aataigaggg tcatacaata tcttccttac	1440

fatgcatcac aagaaggatg ggttggacat ttgtgtacga ggtggaatat ttttctcgaa 1500
agaaaatata gatatgatcc tagaatgata ttgtcccttg gacaaaatat atttccataa 1560

<210> 15

<211> 519

<212> PRT

<213> 欧洲油菜

<400> 15

Met Val Ser Tyr Asn Phe Pro Ser Gln Ile His Leu Leu Met Ile Thr

1 5 10 15

Ile Leu Val Ile Ile Thr Thr Leu Phe Thr Pro Ile Thr Thr Asn Thr

20 25 30

Ser Ser Leu Pro Trp Asn Ile Leu Ser Asn Asp Asn Phe Ala Arg Lys

35 40 45

Leu Thr Thr Ala Ser Ser Ser Val Glu Ser Ala Ala Thr Asp Phe Gly

50 55 60

His Ile Thr Lys Ile Phe Pro Ser Ala Val Leu Asn Pro Ser Ser Val

65 70 75 80

Gln Asp Ile Thr Asp Leu Ile Lys Leu Ser Phe Asp Ser Gln Ser Ser

85 90 95

Phe Pro Leu Ala Ala Arg Gly His Gly His Ser His Arg Gly Gln Ala

100 105 110

[0025] Ala Ala Asn Asp Gly Val Val Val Asn Met Arg Ser Met Val Asn Arg

115 120 125

Asp Arg Gly Ile Lys Val Ser Arg Thr Gly Leu Tyr Ala Asp Val Asp

130 135 140

Ser Ala Trp Leu Trp Ile Glu Val Leu Asn Lys Thr Leu Glu Leu Gly

145 150 155 160

Leu Thr Pro Val Ser Trp Thr Asp Tyr Leu His Leu Thr Val Gly Gly

165 170 175

Thr Leu Ser Asn Gly Gly Ile Ser Gly Gln Thr Phe Arg Tyr Gly Pro

180 185 190

Gln Ile Ser Asn Val Leu Glu Met Asp Val Ile Thr Gly Lys Gly Glu

195 200 205

Ile Ala Thr Cys Ser Lys Asp Met Asn Ser Asp Leu Phe Tyr Ala Ala

210 215 220

Leu Gly Gly Leu Gly Gln Phe Gly Ile Ile Thr Arg Ala Arg Ile Lys

225 230 235 240

Leu Glu Leu Ala Pro Lys Asn Ala Lys Trp Leu Arg Phe Leu Tyr Thr

245 250 255

Asp Phe Ser Glu Phe Thr Arg Asp Gln Glu Arg Leu Ile Ser Glu Thr

260 265 270

Asn Gly Leu His Phe Leu Glu Gly Ser Val Met Leu Asp His Gly Pro

275 280 285

Pro Asp Asn Trp Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Pro Ser Glu His Met Arg

290 295 300
 Ile Val Ser Met Val Lys Gln His Arg Val Ile Tyr Cys Leu Glu Val
 305 310 315 320
 Val Lys Tyr Tyr Asp Glu Thr Ser Gln His Ser Val Asn Glu Glu Met
 325 330 335
 Glu Glu Leu Ser Asp Ser Leu Asn Tyr Glu Arg Gly Phe Val Tyr Glu
 340 345 350
 Lys Asp Val Thr Tyr Met Asp Phe Leu Asn Arg Val Arg Thr Gly Glu
 355 360 365
 Leu Lys Leu Lys Ser Lys Gly Gln Trp Asp Val Pro His Pro Trp Leu
 370 375 380
 Asn Leu Phe Val Pro Lys Ser Gln Ile Ser Arg Phe Glu Tyr Gly Val
 385 390 395 400
 Phe Lys Gly Ile Ile Leu Arg Asn Asn Ile Thr Thr Gly Pro Leu Leu
 405 410 415
 Val Tyr Pro Met Asn Arg Asn Lys Trp Asn Asp Arg Met Ser Thr Val
 420 425 430
 Leu Pro Glu Glu Asp Val Phe Tyr Ala Val Gly Phe Leu Arg Ser Ala
 435 440 445
 Ser Phe Asp Asn Trp Asp Asp Tyr Glu Lys Glu Asn Met Glu Val Leu
 450 455 460
 Lys Phe Cys Glu Asp Ala Asn Met Arg Val Ile Gln Tyr Leu Pro Tyr
 [0026] 465 470 475 480
 Tyr Ala Ser Gln Glu Gly Trp Val Gly His Phe Gly Thr Arg Trp Asn
 485 490 495
 Ile Phe Leu Glu Arg Lys Tyr Arg Tyr Asp Pro Arg Met Ile Leu Ser
 500 505 510
 Pro Gly Gln Asn Ile Phe Pro
 515

<210> 16
 <211> 2964
 <212> DNA
 <213> 欧洲油菜
 <220>
 <221> 外显子
 <222> (1)..(610)
 <223> 外显子 1
 <220>
 <221> 外显子
 <222> (1699)..(1826)
 <223> 外显子 2
 <220>
 <221> 外显子
 <222> (1928)..(2188)

<223> 外显子 3	
<220>	
<221> 变化	
<222> (2171)..(2171)	
<223> 在 YIIN531 中 C 取代为 T	
<220>	
<221> 外显子	
<222> (2283)..(2551)	
<223> 外显子 4	
<220>	
<221> 外显子	
<222> (2676)..(2964)	
<223> 外显子 5	
<400> 16	
[0027]	atg gca agt aat aat ttt cca tca caa agt cat ctt cta gta ata ata 48
	Met Ala Ser Asn Asn Phe Pro Ser Gln Ser His Leu Leu Val Ile Ile
	1 5 10 15
	ata ttt atc aca act ctt tta act cag atc aca acc aac aac aca tca 96
	Ile Phe Ile Thr Thr Leu Leu Thr Pro Ile Thr Thr Asn Asn Thr Ser
	20 25 30
	cca caa cca tgg aat atc ctt tcc aac gac aac ttc gcc gga aaa ctg 144
	Pro Gln Pro Trp Asn Ile Leu Ser Asn Asp Asn Phe Ala Gly Lys Leu
	35 40 45
	acc tcc gca tcc tcc tcc gtc gaa gca gct gcc atc gat ttc ggc cac 192
	Thr Ser Ala Ser Ser Ser Val Glu Ala Ala Ala Ile Asp Phe Gly His
	50 55 60
	gtc acc aaa att cta ccc tca gcc gtc tta aac cct tcc tcc gtc caa 240
	Val Thr Lys Ile Leu Pro Ser Ala Val Leu Asn Pro Ser Ser Val Gln
	65 70 75 80
	gac atc atc gat etc ata aaa ctt tet ttc gac tet caa tcc tet ttc 288
	Asp Ile Ile Asp Leu Ile Lys Leu Ser Phe Asp Ser Gln Ser Ser Phe
	85 90 95
	cct ata gcc gct cgt ggc cac gga cac age ttc cgt ggc caa gcc gct 336
	Pro Ile Ala Ala Arg Gly His Gly His Ser Phe Arg Gly Gln Ala Ala
	100 105 110
	gct aaa gac gga gtc gtg gtc aac atg cgg tca atg gta aac gag gac 384
	Ala Lys Asp Gly Val Val Val Asn Met Arg Ser Met Val Asn Glu Asp
	115 120 125
	cga ggc ata aag gtg tet agg acc ggt tta tat gcg gat gtg gac act 432
	Arg Gly Ile Lys Val Ser Arg Thr Gly Leu Tyr Ala Asp Val Asp Thr
	130 135 140
	gca tgg cta tgg att gag gtg ttg aat aaa acg ttg gag ttg ggg tta 480
	Ala Trp Leu Trp Ile Glu Val Leu Asn Lys Thr Leu Glu Leu Gly Leu
	145 150 155 160
	acg cct gtt tet tgg acg gac tat ttg tat tta acg atc ggt gga acg 528

[0028]	Thr Pro Val Ser Trp Thr Asp Tyr Leu Tyr Leu Thr Ile Gly Gly Thr	
	165 170 175	
	tta tcc aac gcc gga ata agc gga caa acg tct cgg tac ggt cca cag	576
	Leu Ser Asn Gly Gly Ile Ser Gly Gln Thr Ser Arg Tyr Gly Pro Gln	
	180 185 190	
	atc agt aat gtt cta gag ctg gat gtt att act g gtaacgtacca	620
	Ile Ser Asn Val Leu Glu Leu Asp Val Ile Thr	
	195 200	
	tgcattttaca tatattccaa atctatgcaa tatttacttc gtacgtttga cgacaaaaat	680
	aaaatacaat aaaatcgtac gtattttaga tctgcgtggg cacttggttt tatgctcttg	740
	ttttgtttat attgttttg tcttttgtac afatttctcg aactagcttt tcttgttttc	800
	acacactag ctaalcacat tattttttg tctaagagta gaaagaaaca cgggcctatg	860
	ataaaatagg tggttgttag aaaagatttt tctttgttgt acgtatgat agaagattta	920
	gcattattgc tgtttttgca acaaaaattt caaattaaaa ttctgaaag atacgtgtaa	980
	ttataatata ttgtctctac ttgaaagtgt tgcacaaaaa aagtgtctac ttgaaagttg	1040
	aaacagaaca attttttttt gattttatgt ttttattacg attttgtact aacgtatat	1100
	ataacaagtt caattactaa ctaaatagtt ttccaattt tgaattttat aatttcttac	1160
	atattatgga tgtttcgtcg aatctaagtt tgatctccgc gaaatttaca taatggtcac	1220
	gcgcgcacg ttaatgttat gtaattgttc atataaacg gtgacaaaca aatattcaac	1280
	caaaaatggg cccacgcgta tgttttttca cgaggtttct tgtggcatag agacaaaact	1340
	caaaagctta taacgttttg tcataaccag gtgtaaaattt tcttattaca gctaatagtt	1400
	glaccaatat gtcacatat gcacccalat ataattccat alacaaacac tgttggctct	1460
	aagtttagtt cgtttacgaa gactttctag ttccaaagtt tggtaggag ataagatata	1520
	ttaatgggac cgaatttaac attttaggct taaacaacg atagttttat ttgaaactcg	1580
	ttgcattttt tctataaaact atgatattct ttgtatagtc ttacggteca aatatgtga	1640
	aatagtttaa gactgaactt tctaattggg tcagtatttt ttcccggaa ctttatag	1698
	ga aaa ggg gag att gca act tgt tcc aac gac acg aac tca gat ctt	1745
	Gly Lys Gly Glu Ile Ala Thr Cys Ser Asn Asp Thr Asn Ser Asp Leu	
	205 210 215	
	ttc tac gcg gcg tta gga ggt ttg ggt caa ttc gga att ata aca aga	1793
	Phe Tyr Ala Ala Leu Gly Gly Leu Gly Gln Phe Gly Ile Ile Thr Arg	
	220 225 230 235	
	gcc agg att aaa ctc gaa tta gct cca aaa agg gtatgttaaa tatgtaaatt	1846
	Ala Arg Ile Lys Leu Glu Leu Ala Pro Lys Arg	
	240 245	
	attcaatata tattttatac aagtaagaat atttaccgaa atttttgatt aaatatatct	1906
	cttttgttgg aaacttttca g gct aaa tgg tta agg ttt cta tac act gat	1957
	Ala Lys Trp Leu Arg Phe Leu Tyr Thr Asp	
	250 255	
	ttc tct gaa ttc aca aga gat caa gaa cga ttg ata tca gaa acg gac	2005
	Phe Ser Glu Phe Thr Arg Asp Gln Glu Arg Leu Ile Ser Glu Thr Asp	
	260 265 270	
	ggg tta cat ttc ttg gaa ggt tcc gtt atg ctt gac cat ggc cca cct	2053
	Gly Leu His Phe Leu Glu Gly Ser Val Met Leu Asp His Gly Pro Pro	

	275	280	285	
	gat aac tgg aga tct act tac tat cca ccg tcc gat cac ttg agg atc			2101
	Asp Asn Trp Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Pro Ser Asp His Leu Arg Ile			
	290	295	300	
	gtc tca atg atc aaa cga tac cgt gtc atc tac tgt ctc gaa gtc gcc			2149
	Val Ser Met Ile Lys Arg Tyr Arg Val Ile Tyr Cys Leu Glu Val Ala			
	305	310	315	320
	aag tat tac gac gaa act tct caa cac tca gtc aac gag gtccgtacac			2198
	Lys Tyr Tyr Asp Glu Thr Ser Gln His Ser Val Asn Glu			
	325	330		
	atatacagca tctctactca taattaaaca acctctatctt atattataig ttctttaatt			2258
	ttctcaattta tttaaactat gcag gaa att gag aag tta agc gag agt ttg			2309
		Glu Ile Glu Lys Leu Ser Glu Ser Leu		
		335	340	
	aac tat gta aga ggg ttt gtg tac gag aaa gat gtg acg tat ata gat			2357
	Asn Tyr Val Arg Gly Phe Val Tyr Glu Lys Asp Val Thr Tyr Ile Asp			
	345	350	355	
	ttc ttg aac cgg gtt cga acg gga gag cta aac ctg aaa tcc aaa ggc			2405
	Phe Leu Asn Arg Val Arg Thr Gly Glu Leu Asn Leu Lys Ser Lys Gly			
	360	365	370	
	caa tgg gat gtt cca cat cca tgg ctt aat ctc ttt gta cca aaa tct			2453
	Gln Trp Asp Val Pro His Pro Trp Leu Asn Leu Phe Val Pro Lys Ser			
[0029]	375	380	385	390
	cag att tca aga ttt gat tat ggt gtc ttt aag ggt att atc ctt aga			2501
	Gln Ile Ser Arg Phe Asp Tyr Gly Val Phe Lys Gly Ile Ile Leu Arg			
	395	400	405	
	aat aac atc act acc ggt cca ctt ctt gtt tat ccc atg aag cgc att			2549
	Asn Asn Ile Thr Thr Gly Pro Leu Leu Val Tyr Pro Met Lys Arg Ile			
	410	415	420	
	at gtaagttaaa actatagagc gatcatccat tcaatttttt ttattaaagt			2601
	Met			
	tcttactaaa tgtttatggc ctccaaaatt tcagctttgt gtttaaataa ctgactttta			2661
	aggtttttget tcag g tgg aat gat caa atg tct acc get ata ccc gaa gaa			2712
		Trp Asn Asp Gln Met Ser Thr Ala Ile Pro Glu Glu		
	425	430	435	
	gat gta ttt tat gcg gta ggg ttc tta cga tct gcc gag ttt gac aat			2760
	Asp Val Phe Tyr Ala Val Gly Phe Leu Arg Ser Ala Glu Phe Asp Asn			
	440	445	450	
	tgg gag gct tat gat aaa gaa aat atg gag gta tta aag ttt tgt gag			2808
	Trp Glu Ala Tyr Asp Lys Glu Asn Met Glu Val Leu Lys Phe Cys Glu			
	455	460	465	
	gat gct aaa atg gat gtc ata cag tat ctt cct tat cat gca tca caa			2856
	Asp Ala Lys Met Asp Val Ile Gln Tyr Leu Pro Tyr His Ala Ser Gln			
	470	475	480	

```

gaa gga tgg gtt aga cat ttt ggt ccg atg tgg aat act ttt gta gag      2904
Glu Gly Trp Val Arg His Phe Gly Pro Met Trp Asn Thr Phe Val Glu
      485              490              495
aga aaa tat aga tac gat cct aaa atg ata ttg tct cca gga caa aat      2952
Arg Lys Tyr Arg Tyr Asp Pro Lys Met Ile Leu Ser Pro Gly Gln Asn
500              505              510              515
ata ttt cga taa      2964
Ile Phe Arg

```

```

<210> 17
<211> 1557
<212> DNA
<213> 欧洲油菜
<220>
<221> 变化
<222> (982).. (982)
<223> 在 YIIN531 中 C 取代为 T
<400> 17

```

[0030]

```

atggcaagta ataattttcc atcacaagat catcttctag taataataat atttatcaca      60
actcttttaa ctccgatacc aaccaacaac acatcaccac aacctggaat tatectttcc      120
aacgacaact tcgcgggaaa actgacctcc gcatctctct ccgtcgaagc agctgccatc      180
gatttcggcc acgtcaccac aattctaccc tcagccgtct taaaccttcc ctccgtccaa      240
gacatcatcg atctcataaa actttctttc gactctcaat cctctttccc tatagccgct      300
cgtggccacg gacacagctt ccgtggccaa gccgtgcta aagacggagt cgtggtaaac      360
atgcggtcaa tggtaaacga ggaccgagcc ataaagggtg ctaggaccgg tttatatgcg      420
gatgtggaca ctgcattgct atggattgag gtgttgaata aaacgttga gttggggta      480
acgcctgttt cttggacgga ctatttgtat ttaacgacg gtggaacgtt atccaacggc      540
ggaataagcg gacaaacgtc tcggtacggt ccacagatca gtaatgttct agagctggat      600
gittattact gaaaaggga gattgcaact tgttccaacg acacgaactc agatcttttc      660
tacgcggcgt taggaggttt ggttcaattc ggaattataa caagagccag gattaaactc      720
gaattagctc caaaaagggc taaatgggta aggtttctat acactgattt ctctgaattc      780
acaagagatc aagaacgatt gataacagaa acggacgggt tacatttctt ggaagggtcc      840
gttatgcttg accatggccc acctgataac tggagatcta ctactatcc accgtccgat      900
cacttgagga tcgtctcaat gatcaaacga taaccgttca tctactgtct cgaagtcgcc      960
aagtattacg acgaaacttc tcaaacctca gtcaacgagg aaattgagaa gtttaagcag      1020
agtttgaact atgtaagagg gtttgtgtac gagaaagatg tgacgtatat agatttcttg      1080
aaccgggttc gaacgggaga gctaaacctg aaatccaaag gccaatggga tgttcacat      1140
ccatggctta atctctttgt accaaaatct cagatttcaa gatttgatta tgggtgtctt      1200
aagggtatta tcttagaaa taacatcaat accggtccac ttcttgttta tcccatgaag      1260
cgcattatgt ggaatgatca aatgtctacc gctataccgg aagaagatgt attttatgcg      1320
gtagggttct tacgatctgc cgagtttgac aattgggagg cttatgataa agaaaatatg      1380
gaggfatta agttttgtga ggatgctaaa atggatgtca tacagtatct tctttatcat      1440
gcatcacaag aaggatgggt tagacatttt ggctccatgt ggaatacttt tctagagaga      1500
aaatatagat acgacccata aatgatattg tctccaggac aaaatatatt tegtataa      1557

```

<210> 18
 <211> 518
 <212> PRT
 <213> 欧洲油菜
 <400> 18
 Met Ala Ser Asn Asn Phe Pro Ser Gln Ser His Leu Leu Val Ile Ile
 1 5 10 15
 Ile Phe Ile Thr Thr Leu Leu Thr Pro Ile Thr Thr Asn Asn Thr Ser
 20 25 30
 Pro Gln Pro Trp Asn Ile Leu Ser Asn Asp Asn Phe Ala Gly Lys Leu
 35 40 45
 Thr Ser Ala Ser Ser Ser Val Glu Ala Ala Ala Ile Asp Phe Gly His
 50 55 60
 Val Thr Lys Ile Leu Pro Ser Ala Val Leu Asn Pro Ser Ser Val Gln
 65 70 75 80
 Asp Ile Ile Asp Leu Ile Lys Leu Ser Phe Asp Ser Gln Ser Ser Phe
 85 90 95

 Pro Ile Ala Ala Arg Gly His Gly His Ser Phe Arg Gly Gln Ala Ala
 100 105 110
 Ala Lys Asp Gly Val Val Val Asn Met Arg Ser Met Val Asn Glu Asp
 115 120 125
 Arg Gly Ile Lys Val Ser Arg Thr Gly Leu Tyr Ala Asp Val Asp Thr
 130 135 140
 Ala Trp Leu Trp Ile Glu Val Leu Asn Lys Thr Leu Glu Leu Gly Leu
 145 150 155 160
 Thr Pro Val Ser Trp Thr Asp Tyr Leu Tyr Leu Thr Ile Gly Gly Thr
 165 170 175
 Leu Ser Asn Gly Gly Ile Ser Gly Gln Thr Ser Arg Tyr Gly Pro Gln
 180 185 190
 Ile Ser Asn Val Leu Glu Leu Asp Val Ile Thr Gly Lys Gly Glu Ile
 195 200 205
 Ala Thr Cys Ser Asn Asp Thr Asn Ser Asp Leu Phe Tyr Ala Ala Leu
 210 215 220
 Gly Gly Leu Gly Gln Phe Gly Ile Ile Thr Arg Ala Arg Ile Lys Leu
 225 230 235 240
 Glu Leu Ala Pro Lys Arg Ala Lys Trp Leu Arg Phe Leu Tyr Thr Asp
 245 250 255
 Phe Ser Glu Phe Thr Arg Asp Gln Glu Arg Leu Ile Ser Glu Thr Asp
 260 265 270
 Gly Leu His Phe Leu Glu Gly Ser Val Met Leu Asp His Gly Pro Pro
 275 280 285
 Asp Asn Trp Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Pro Ser Asp His Leu Arg Ile
 290 295 300

[0031]

Val Ser Met Ile Lys Arg Tyr Arg Val Ile Tyr Cys Leu Glu Val Ala
 305 310 315 320
 Lys Tyr Tyr Asp Glu Thr Ser Gln His Ser Val Asn Glu Glu Ile Glu
 325 330 335
 Lys Leu Ser Glu Ser Leu Asn Tyr Val Arg Gly Phe Val Tyr Glu Lys
 340 345 350
 Asp Val Thr Tyr Ile Asp Phe Leu Asn Arg Val Arg Thr Gly Glu Leu
 355 360 365
 Asn Leu Lys Ser Lys Gly Gln Trp Asp Val Pro His Pro Trp Leu Asn
 370 375 380
 Leu Phe Val Pro Lys Ser Gln Ile Ser Arg Phe Asp Tyr Gly Val Phe
 385 390 395 400
 Lys Gly Ile Ile Leu Arg Asn Asn Ile Thr Thr Gly Pro Leu Leu Val
 405 410 415
 Tyr Pro Met Lys Arg Ile Met Trp Asn Asp Gln Met Ser Thr Ala Ile
 420 425 430
 Pro Glu Glu Asp Val Phe Tyr Ala Val Gly Phe Leu Arg Ser Ala Glu
 435 440 445
 Phe Asp Asn Trp Glu Ala Tyr Asp Lys Glu Asn Met Glu Val Leu Lys
 450 455 460
 Phe Cys Glu Asp Ala Lys Met Asp Val Ile Gln Tyr Leu Pro Tyr His
 465 470 475 480
 [0032] Ala Ser Gln Glu Gly Trp Val Arg His Phe Gly Pro Met Trp Asn Thr
 485 490 495
 Phe Val Glu Arg Lys Tyr Arg Tyr Asp Pro Lys Met Ile Leu Ser Pro
 500 505 510
 Gly Gln Asn Ile Phe Arg
 515

<210> 19
 <211> 2863
 <212> DNA
 <213> 欧洲油菜
 <220>
 <221> 外显子
 <222> (1)..(580)
 <223> 外显子 1
 <220>
 <221> 变化
 <222> (399)..(399)
 <223> 在 YIIN805 中 G 至 A 取代
 <220>
 <221> 变化
 <222> (465)..(465)
 <223> 在 YIIN801 中 G 至 A 取代

<220>			
<221> 外显子			
<222> (665).. (792)			
<223> 外显子 2			
<220>			
<221> 外显子			
<222> (952).. (1218)			
<223> 外显子 3			
<220>			
<221> 外显子			
<222> (1799).. (2061)			
<223> 外显子 4			
<220>			
<221> 外显子			
<222> (2506).. (2863)			
<223> 外显子 5			
<400> 19			
atg acg tca agc ttt ctt ctc atg aca ttc gcg att tgt aca ctg atc			48
Met Thr Ser Ser Phe Leu Leu Met Thr Phe Ala Ile Cys Thr Leu Ile			
1 5 10 15			
ata gcc gtt ggt ccc agc gag ctc ctc cgc atc gga gcc ata gac gtc			96
Ile Ala Val Gly Pro Ser Glu Leu Leu Arg Ile Gly Ala Ile Asp Val			
[0033] 20 25 30			
gac ggc cac ttc acc ttc aag cct tcc gac tta gcc tcc gtc tgc tgc			144
Asp Gly His Phe Thr Phe Lys Pro Ser Asp Leu Ala Ser Val Ser Ser			
35 40 45			
gac ttc ggt atg cta aag tcg ccg gag gag cca tta gcc gta ctt cat			192
Asp Phe Gly Met Leu Lys Ser Pro Glu Glu Pro Leu Ala Val Leu His			
50 55 60			
cca tcc tca gct gaa gac gtg gca cgg ctc atc aga aca gct tac ggc			240
Pro Ser Ser Ala Glu Asp Val Ala Arg Leu Ile Arg Thr Ala Tyr Gly			
65 70 75 80			
tea gcc acg gcc ttt ccg gtc tea gcc cgt ggc cac ggc cat tcc ata			288
Ser Ala Thr Ala Phe Pro Val Ser Ala Arg Gly His Gly His Ser Ile			
85 90 95			
aac gga cag gct tcg aca ggg agg aac ggt gtg gtg gtg gag atg agc			336
Asn Gly Gln Ala Ser Thr Gly Arg Asn Gly Val Val Val Glu Met Ser			
100 105 110			
cac cgc aac ata ggg acg ccg gag cca cta gtt gaa ccc gag gaa atg			384
His Arg Asn Ile Gly Thr Pro Glu Pro Leu Val Glu Pro Glu Glu Met			
115 120 125			
tat gtg gac gtt tgg ggt gga gag tta tgg gtt gat gtg ttg aaa aaa			432
Tyr Val Asp Val Trp Gly Gly Glu Leu Trp Val Asp Val Leu Lys Lys			
130 135 140			
acg ttg gag cat ggc tta gca cca aag tea tgg act gat tac ttg tat			480

Thr Leu Glu His Gly Leu Ala Pro Lys Ser Trp Thr Asp Tyr Leu Tyr				
145	150	155	160	
ctt tcc gtt ggt ggt aca ctc tct aat gca gga att agt ggt caa gct	528			
Leu Ser Val Gly Gly Thr Leu Ser Asn Ala Gly Ile Ser Gly Gln Ala				
165	170	175		
ttt eac cat ggt cct caa att agt aac gtc ctt gag cta gac gtt gta	576			
Phe His His Gly Pro Gln Ile Ser Asn Val Leu Glu Leu Asp Val Val				
180	185	190		
act g gttagtataa aacgttcaag ttcatatatt tggttcttga attgattttc	630			
Thr				
aatattttata acaaacaaat tgaatcaaaa acag gg aga gga gag gtg atg aga	684			
Gly Arg Gly Glu Val Met Arg				
195	200			
tgt tca gaa gaa gag aac aca agg tta ttc cat gga gtt ctt ggt ggg	732			
Cys Ser Glu Glu Glu Asn Thr Arg Leu Phe His Gly Val Leu Gly Gly				
205	210	215		
tta ggt caa ttt ggg atc att aca cga gca cga atc tct ctc gaa cct	780			
Leu Gly Gln Phe Gly Ile Ile Thr Arg Ala Arg Ile Ser Leu Glu Pro				
220	225	230		
gct ccc caa agg gtaaatgttt ttaaattttg attctatggt gtaagaaat	832			
Ala Pro Gln Arg				
[0034]	235			
aaaaactgcc aggcgggtcc atgagttaca ttaacatttt cactgttgtg gtgacatatt	892			
ttgtttttata aattttattaa atttagttaa tgaaccctta aataataatc gtctgacag	951			
gta aga tgg ata aga gtg ttg tat tgc agc ttc gaa gtg ttt aca gag	999			
Val Arg Trp Ile Arg Val Leu Tyr Ser Ser Phe Glu Val Phe Thr Glu				
240	245	250		
gac caa gaa tac tta ata tct atg cat ggt caa tca aag ttt gat tac	1047			
Asp Gln Glu Tyr Leu Ile Ser Met His Gly Gln Ser Lys Phe Asp Tyr				
255	260	265		
gtg gaa ggg ttt gtg atc gtg gac gaa ggt ctc gtc aac aac tgg aga	1095			
Val Glu Gly Phe Val Ile Val Asp Glu Gly Leu Val Asn Asn Trp Arg				
270	275	280		
tca tct ttc ttc tct cct cgt aac ccc gtt aaa att tct tcc gtt age	1143			
Ser Ser Phe Phe Ser Pro Arg Asn Pro Val Lys Ile Ser Ser Val Ser				
285	290	295	300	
tct aac ggc tcc gtt ctg tat tgc ctt gag atc acc aag aac tac cgc	1191			
Ser Asn Gly Ser Val Leu Tyr Cys Leu Glu Ile Thr Lys Asn Tyr Arg				
305	310	315		
gag tcc gag tcc gac acc gtc gat cag gtaaaattta attaagaagt	1238			
Glu Ser Glu Ser Asp Thr Val Asp Gln				
320	325			
tcctaatitit ttttctcaat tagataaaga gatatttttc tttttataat gatgaataic	1298			
tggaacgatt taacgctatg cgattattga ggaaatcatg attaaaaaaaaa ttggtttttct	1358			

	tttagtttat atgattgaaa gtggctctccc tagtatTTTT gttgtgtcgg ctttataata	1418
	taattaaatt gttattata atttaaatta ggaagaagac atgaaaaaga agccagagag	1478
	galctacaga gatctagctt tccacciga actattalgt ttagtllatc actagcgaat	1538
	taatcatggt tactaataaa gtagtggacg gggtcatgga ccaetaccca aataatgatt	1598
	cccccttact ctaattaaagt ttttaataaaa ccaactctac tggaatctta acttatectt	1658
	ggttttgata gactttaata gcaaaacagt tttttaattt tctcttttaa ctttaatttt	1718
	tttttttttt gaaaaatect ttaactttta ttttctagct ctggttttaa taaattaaaa	1778
	gtgggttttg tttgctccag gaa gta gag att ttg atg aag aaa tta aat ttt	1831
	Glu Val Glu Ile Leu Met Lys Lys Leu Asn Phe	
	330 335	
	ata ccg aca tcg gta ttc acg acg gat ttg caa tat gtg gat ttc ttg	1879
	Ile Pro Thr Ser Val Phe Thr Thr Asp Leu Gln Tyr Val Asp Phe Leu	
	340 345 350	
	gac egg gtt cac aag geg gag ctg aag ctc egg tcg aag aat tta tgg	1927
	Asp Arg Val His Lys Ala Glu Leu Lys Leu Arg Ser Lys Asn Leu Trp	
	355 360 365	
	gag gtt cca cac cca tgg ctc aac cta ttc gta cca aaa tcg aga atc	1975
	Glu Val Pro His Pro Trp Leu Asn Leu Phe Val Pro Lys Ser Arg Ile	
	370 375 380	
	tct gat ttt gac aaa ggc gtt ttc aag ggc att tta ggg aat aaa act	2023
	Ser Asp Phe Asp Lys Gly Val Phe Lys Gly Ile Leu Gly Asn Lys Thr	
	385 390 395 400	
[0035]	agt ggc cct atc ctt atc tac cca atg aac aaa gac aa gtaagtctcg	2071
	Ser Gly Pro Ile Leu Ile Tyr Pro Met Asn Lys Asp Lys	
	405 410	
	atcgatatta ccagcgttta cttagaaatt tcttttcaga aacaaaagaa taaaacgagt	2131
	tttgcattgca tgcaaagtta cacttggtgg gattaaatta gtgtccaag aaaataaatg	2191
	ttttgtcgaa actgtaaaga actactgaca cgtgttacct gggattgtcc gaaaaacttt	2251
	gttcacatgt gcctogaate gaaccagcta agattgataa taacgcatca tcgtcgctc	2311
	atctttctct tttggttcgt tgtccaatct ggacggteca gattgggtct attgtttttt	2371
	agttctata actaatggtg gtgggtccca atcgattct actaaaccaa accgatctca	2431
	acgacctcc ctcacatcat ttattaacta taagattatg tcgtgtgac gtgacgtact	2491
	ttttgtaatg ccag a tgg gac gaa aga agc tcg gcc gtt aca ccg gac gag	2542
	Trp Asp Glu Arg Ser Ser Ala Val Thr Pro Asp Glu	
	415 420 425	
	gaa gtt ttc tac ctc gtg get tta ctg aga tca get tta tcg gac ggt	2590
	Glu Val Phe Tyr Leu Val Ala Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ser Asp Gly	
	430 435 440	
	gag gaa acg cag aag cta gag tat ttg aaa gat cag aac cgt cgg atc	2638
	Glu Glu Thr Gln Lys Leu Glu Tyr Leu Lys Asp Gln Asn Arg Arg Ile	
	445 450 455	
	ttg gag ttc tgt gaa caa gcc aag atc aat gtg aag cag tac ctt cct	2686
	Leu Glu Phe Cys Glu Gln Ala Lys Ile Asn Val Lys Gln Tyr Leu Pro	
	460 465 470	
	cac cat gca acg caa gag gag tgg gtg get cat tat gga gac aaa tgg	2734

His His Ala Thr Gln Glu Glu Trp Val Ala His Tyr Gly Asp Lys Trp	
475	480
gat cag ttt aga agc atg aag gct gag ttc gat cca cgg cat ata ctc	2782
Asp Gln Phe Arg Ser Met Lys Ala Glu Phe Asp Pro Arg His Ile Leu	
490	495
gct acc ggt cag aaa atc ttt cag aac cca tct ctg get ttg ttt cgt	2830
Ala Thr Gly Gln Lys Ile Phe Gln Asn Pro Ser Leu Ala Leu Phe Arg	
510	515
cca tct tct tct tct tct tca gct tca tgg taa	2863
Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ser Trp	
525	530

<210> 20
 <211> 1596
 <212> DNA
 <213> 欧洲油菜
 <220>
 <221> 变化
 <222> (399).. (399)
 <223> 在 YIIN805 中 G 至 A 取代
 <220>
 <221> 变化
 <222> (465).. (465)
 <223> 在 YIIN801 中 G 至 A 取代
 <400> 20

[0036]

atgacgtcaa gctttcttct catgacattc gcgatttgta cactgatcat agcggttggt	60
cccagcgagc tcttcgcat cggagccata gacgtcgacg gccacttcac ctccaagcct	120
tccgacttag cctccgtctc gtccgacttc ggtatgctaa agtcgccgga ggagccattt	180
gccgtacttc atccatcttc agctgaugac gtggcacggc tcatcagaac agcttacggc	240
tcagccaagg ctttccgggt ctacgccgtt ggccacggcc attccataaa cggacagget	300
tcgacaggga ggaacggtgt ggtggtggag atgagccacc gcaacatagg gacgccggag	360
ccactagtgt aacctgagga aatgtatgtg gacgtttggg gtggagagtt atgggttgat	420
gtgttgaaaa aaacgttgga gcatggttta gcaccaaagt catggactga ttacttgat	480
ctttccgttg gtgttacact ctctaatgca ggaattagtg gtcaagcttt tcaccatggt	540
cttcaaattt gtaacgtcct tgagctagac gtgttaactg ggagaggaga ggtgatgaga	600
tggtcagaag aagagaacac aaggttatct catggagtgc ttggtgggtt aggtcaattt	660
gggacattt cagcagcagc aatctctctc gaacctctc cccaaagggt aagatggata	720
agagtgttgt attcagctt cgaagtgttt acagaggacc aagaatactt aatctctatg	780
catggteaat caaagtttga ttacgtggaa gggtttgga tctgtgacga aggtctctgc	840
aacaactgga gatcatcttt cttctctctc cgtaaccccg ttaaaatttc ttccgttagc	900
tctaacggct cgtttctgta ttgccttgag ataccaaga actaccgga gtccgagtc	960
gacaccgtcg atcaggaagt agagattttg atgaagaaat taaattttat accgacatcg	1020
gtattcacga cggatttgca atatgtggat ttcttgacc gggttcaca ggccggagctg	1080
aagctccggc cgaagaattt atgggagggt ccacacccat ggtcaacct attcgtacca	1140
aaatcgagaa tctctgattt tgacaaagge gttttcaagg gcattttagg gaataaaact	1200

```

agtggcccta tccttatcta cccaatgaac aaagacaaat gggacgaaag aagctcggcc 1260
gttacaccgg acgaggaagt tttctacctc gtggctttac tgagatcagc tttatcggac 1320
ggtagagaaa cgcagaagct agagtatttg aaagatcaga accgtcggat ctggagttc 1380
tgtgaacaag ccaagatcaa tgtgaagcag taccttcctc accatgcaac gcaagaggag 1440
tggttggttc attatggaga caaatgggat cagtttagaa gcatgaaggc tgagttcgat 1500
ccaaggcata tactcgttac cggtcagaaa atctttcaga acccatctct ggttttgitt 1560
cgtccatcgt cgtcttcgtc gtcagcttca tggtaa 1596

```

<210> 21

<211> 531

<212> PRT

<213> 欧洲油菜

<400> 21

[0037]

```

Met Thr Ser Ser Phe Leu Leu Met Thr Phe Ala Ile Cys Thr Leu Ile
1           5           10           15
Ile Ala Val Gly Pro Ser Glu Leu Leu Arg Ile Gly Ala Ile Asp Val
          20           25           30
Asp Gly His Phe Thr Phe Lys Pro Ser Asp Leu Ala Ser Val Ser Ser
          35           40           45
Asp Phe Gly Met Leu Lys Ser Pro Glu Glu Pro Leu Ala Val Leu His
          50           55           60
Pro Ser Ser Ala Glu Asp Val Ala Arg Leu Ile Arg Thr Ala Tyr Gly
65           70           75           80
Ser Ala Thr Ala Phe Pro Val Ser Ala Arg Gly His Gly His Ser Ile
          85           90           95
Asn Gly Gln Ala Ser Thr Gly Arg Asn Gly Val Val Val Glu Met Ser
          100          105          110
His Arg Asn Ile Gly Thr Pro Glu Pro Leu Val Glu Pro Glu Glu Met
          115          120          125
Tyr Val Asp Val Trp Gly Gly Glu Leu Trp Val Asp Val Leu Lys Lys
          130          135          140
Thr Leu Glu His Gly Leu Ala Pro Lys Ser Trp Thr Asp Tyr Leu Tyr
          145          150          155          160
Leu Ser Val Gly Gly Thr Leu Ser Asn Ala Gly Ile Ser Gly Gln Ala
          165          170          175
Phe His His Gly Pro Gln Ile Ser Asn Val Leu Glu Leu Asp Val Val
          180          185          190
Thr Gly Arg Gly Glu Val Met Arg Cys Ser Glu Glu Glu Asn Thr Arg
          195          200          205
Leu Phe His Gly Val Leu Gly Gly Leu Gly Gln Phe Gly Ile Ile Thr
          210          215          220
Arg Ala Arg Ile Ser Leu Glu Pro Ala Pro Gln Arg Val Arg Trp Ile
          225          230          235          240
Arg Val Leu Tyr Ser Ser Phe Glu Val Phe Thr Glu Asp Gln Glu Tyr
          245          250          255

```

	Leu Ile Ser Met His Gly Gln Ser Lys Phe Asp Tyr Val Glu Gly Phe	
	260	265 270
	Val Ile Val Asp Glu Gly Leu Val Asn Asn Trp Arg Ser Ser Phe Phe	
	275	280 285
	Ser Pro Arg Asn Pro Val Lys Ile Ser Ser Val Ser Ser Asn Gly Ser	
	290	295 300
	Val Leu Tyr Cys Leu Glu Ile Thr Lys Asn Tyr Arg Glu Ser Glu Ser	
	305	310 315 320
	Asp Thr Val Asp Gln Glu Val Glu Ile Leu Met Lys Lys Leu Asn Phe	
	325	330 335
	Ile Pro Thr Ser Val Phe Thr Thr Asp Leu Gln Tyr Val Asp Phe Leu	
	340	345 350
	Asp Arg Val His Lys Ala Glu Leu Lys Leu Arg Ser Lys Asn Leu Trp	
	355	360 365
	Glu Val Pro His Pro Trp Leu Asn Leu Phe Val Pro Lys Ser Arg Ile	
	370	375 380
	Ser Asp Phe Asp Lys Gly Val Phe Lys Gly Ile Leu Gly Asn Lys Thr	
	385	390 395 400
	Ser Gly Pro Ile Leu Ile Tyr Pro Met Asn Lys Asp Lys Trp Asp Glu	
	405	410 415
	Arg Ser Ser Ala Val Thr Pro Asp Glu Glu Val Phe Tyr Leu Val Ala	
	420	425 430
[0038]	Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ser Asp Gly Glu Glu Thr Gln Lys Leu Glu	
	435	440 445
	Tyr Leu Lys Asp Gln Asn Arg Arg Ile Leu Glu Phe Cys Glu Gln Ala	
	450	455 460
	Lys Ile Asn Val Lys Gln Tyr Leu Pro His His Ala Thr Gln Glu Glu	
	465	470 475 480
	Trp Val Ala His Tyr Gly Asp Lys Trp Asp Gln Phe Arg Ser Met Lys	
	485	490 495
	Ala Glu Phe Asp Pro Arg His Ile Leu Ala Thr Gly Gln Lys Ile Phe	
	500	505 510
	Gln Asn Pro Ser Leu Ala Leu Phe Arg Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser	
	515	520 525
	Ala Ser Trp	
	530	
	<210> 22	
	<211> 2804	
	<212> DNA	
	<213> 欧洲油菜	
	<220>	
	<221> 外显子	
	<222> (1)..(580)	
	<223> 外显子 1	

<220>		
<221>	变化	
<222>	(465)..(465)	
<223>	在 YIIN811 中 G 至 A 取代	
<220>		
<221>	外显子	
<222>	(664)..(791)	
<223>	外显子 2	
<220>		
<221>	外显子	
<222>	(950)..(1216)	
<223>	外显子 3	
<220>		
<221>	外显子	
<222>	(1765)..(2027)	
<223>	外显子 4	
<220>		
<221>	外显子	
<222>	(2447)..(2804)	
<223>	外显子 5	
<400>	22	
[0039]	atg acg tca agc ttt ctt ctc gtg aca ttc gcg att tgt aca ctg atc	48
	Met Thr Ser Ser Phe Leu Leu Val Thr Phe Ala Ile Cys Thr Leu Ile	
	1 5 10 15	
	ata gcc gtt ggt ccc agc gag ctc ctc cgc atc gga gcc ata gac gtc	96
	Ile Ala Val Gly Pro Ser Glu Leu Leu Arg Ile Gly Ala Ile Asp Val	
	20 25 30	
	gac gcc cac ttc acc ttc aag cct tcc gac tta gcc tcc gtc tcg tcg	144
	Asp Gly His Phe Thr Phe Lys Pro Ser Asp Leu Ala Ser Val Ser Ser	
	35 40 45	
	gac ttc ggt atg cta aag tcg ccg gag gag cca tta gcc gta ctt cat	192
	Asp Phe Gly Met Leu Lys Ser Pro Glu Glu Pro Leu Ala Val Leu His	
	50 55 60	
	cca tcc tca gct gaa gac gtg gca cgg ctc atc aga aca gct tac gcc	240
	Pro Ser Ser Ala Glu Asp Val Ala Arg Leu Ile Arg Thr Ala Tyr Gly	
	65 70 75 80	
	tca gcc acg gcc ttt ccg gtc tca gcc cgt gcc cac gcc cat tcc ata	288
	Ser Ala Thr Ala Phe Pro Val Ser Ala Arg Gly His Gly His Ser Ile	
	85 90 95	
	aac gga cag gct tcg aca ggg agg aac ggt gtg gtg gtg gag atg agc	336
	Asn Gly Gln Ala Ser Thr Gly Arg Asn Gly Val Val Val Glu Met Ser	
	100 105 110	
	cac cgc aac ata ggg acg ctg gag cca cta gtt gaa ccg gag gaa atg	384
	His Arg Asn Ile Gly Thr Leu Glu Pro Leu Val Glu Pro Glu Glu Met	
	115 120 125	

	tat gtg gac gtt tgg ggt gga gag tta tgg gtt gat gtg ttg aaa aaa	432
	Tyr Val Asp Val Trp Gly Gly Glu Leu Trp Val Asp Val Leu Lys Lys	
	130 135 140	
	acg ttg gag cat ggc tta gca cca aag tca tgg act gat tac ctg tat	480
	Thr Leu Glu His Gly Leu Ala Pro Lys Ser Trp Thr Asp Tyr Leu Tyr	
	145 150 155 160	
	ctt tcc gtt ggt ggt aca ctc tcc aat gca gga att agt ggt caa gct	528
	Leu Ser Val Gly Gly Thr Leu Ser Asn Ala Gly Ile Ser Gly Gln Ala	
	165 170 175	
	ttt cac cat ggt cct caa att agt aac gtc ctt gag cta gac gtt gta	576
	Phe His His Gly Pro Gln Ile Ser Asn Val Leu Glu Leu Asp Val Val	
	180 185 190	
	act g gttagtataa aacgtticaag ttcatatatt tggttcttga attgattttc	630
	Thr	
	atatttaataa caaacatatt gaatcaaaaa cag gg aga gga gag gtg atg aga	683
	Gly Arg Gly Glu Val Met Arg	
	195 200	
	tgt tca gaa gaa gag aac aca agg ctt ttc cat gga gtt ctt ggt ggg	731
	Cys Ser Glu Glu Glu Asn Thr Arg Leu Phe His Gly Val Leu Gly Gly	
	205 210 215	
[0040]	tta ggt caa ttt ggg atc att aca cga gca cga atc tct ctc gaa cct	779
	Leu Gly Gln Phe Gly Ile Ile Thr Arg Ala Arg Ile Ser Leu Glu Pro	
	220 225 230	
	gct ccc caa agg gtaaatgttt ttaaatittg attctatggt gtcacgatat	831
	Ala Pro Gln Arg	
	235	
	aaaactgcca ggagggtcca tgagttacat taaccttttc actattgtgg tgacatattt	891
	tgttttataa atttattaaa tttagttaat gaaaccttaa atgataatct tgtgacag	949
	gta aga tgg ata aga gtg ttg tat teg agc ttc gaa gtg ttt aca gat	997
	Val Arg Trp Ile Arg Val Leu Tyr Ser Ser Phe Glu Val Phe Thr Asp	
	240 245 250	
	gac caa gaa tac tta ata tct atg cat ggt cat tca aag ttt gat tac	1045
	Asp Gln Glu Tyr Leu Ile Ser Met His Gly His Ser Lys Phe Asp Tyr	
	255 260 265	
	gtg gaa ggg ttt gtg atc gtg gac gaa ggt ctc gtc aac aac tgg aga	1093
	Val Glu Gly Phe Val Ile Val Asp Glu Gly Leu Val Asn Asn Trp Arg	
	270 275 280	
	tcc tct ttc ttc tct cct cat aac ccc gtt aaa att tct tcc gtt agc	1141
	Ser Ser Phe Phe Ser Pro His Asn Pro Val Lys Ile Ser Ser Val Ser	
	285 290 295 300	
	tct aac ggc tcc gtt ctg tat tgc ctt gag atc acc aag aac tac cac	1189
	Ser Asn Gly Ser Val Leu Tyr Cys Leu Glu Ile Thr Lys Asn Tyr His	
	305 310 315	
	gag tcc gag tcc gac acc gtc gat cag gtaaaattta attaagaagl	1236

Glu Ser Glu Ser Asp Thr Val Asp Gln		
320	325	
tctcaatttt ttttcttctc aattagataa agagatatta ttttttttat aatgatgaal		1296
atctggaacg atttaacget atgcgattat tgaggaaate atgattaaaa aatttggttt		1356
tcttttagtt tatatgattg aaagtggctt ccatagtatt tttgttggtt cggcittatt		1416
atataattaa aatagtttat tataatttaa attaggaaga aggcatgaaa aagaagcgag		1476
agaggateta cagagateta gcttttccac ctgaactatt atgtttagtt tatcactage		1536
gaattaatca tggttactaa ttaagtagtg gacggggcca tggaccactc accaaataat		1596
gattccccct tactetaatt aagtittaat aaaaccaact ctactggaat cttaacttat		1656
ccttggtttt ggtaggcttt aatagcaaaa cagtttttta attttctcct aactttaatt		1716
ttcctattct ggtttaaata aattaaaagt gggttttggt tgctccag gaa gta gag		1773
Glu Val Glu		
att ttg atg aag aaa tta aat ttt ata ccg aca teg gta ttc acg aca		1821
Ile Leu Met Lys Lys Leu Asn Phe Ile Pro Thr Ser Val Phe Thr Thr		
330	335	340
gat ttg caa tat gtg gat ttc ctg gac cgg gtt cac aag gcg gag ctg		1869
Asp Leu Gln Tyr Val Asp Phe Leu Asp Arg Val His Lys Ala Glu Leu		
345	350	355 360
aag etc cgg tgg aag aat tta tgg gag gtt cca cac cca tgg etc aac		1917
Lys Leu Arg Ser Lys Asn Leu Trp Glu Val Pro His Pro Trp Leu Asn		
365	370	375
[0041] cta ttc gta cca aaa tca aga atc tet gat ttt gac aaa ggc gtt ttc		1965
Leu Phe Val Pro Lys Ser Arg Ile Ser Asp Phe Asp Lys Gly Val Phe		
380	385	390
aag ggc att ttg ggg aat aaa act agt ggc cct atc ctt atc tac cca		2013
Lys Gly Ile Leu Gly Asn Lys Thr Ser Gly Pro Ile Leu Ile Tyr Pro		
395	400	405
atg aac aaa gac aa gtaagttccg atcgatatta ccaccgttta cttagaaatt		2067
Met Asn Lys Asp Lys		
410		
tcttttcaga aacaaaagaa taaaacgagt ttgcatgca tgcaaagtta cacttggtgt		2127
ccaaaaaaat aaatgttttg tcgaaactgt aaattagtgg tacatgggat tgtccgaaaa		2187
acttgttca catgtgcac gaalegaacc agctaagatt galaataacg catcatcgc		2247
ggctcatctt tctcttttgg ttcattgtcc gatctggacg gtccagattg ggtctatgt		2307
tttttagtte ctataactaa tgggtgtggg tcccaatcgg attctacgac acggaaccga		2367
tetcaacgac cctccccac atcatttatt aactataaga ttatgtctgt ctgacgtgtc		2427
ggattttttg taatgtcag a tgg gac gaa aga agc tgg gcc gtt aca ccg		2477
Trp Asp Glu Arg Ser Ser Ala Val Thr Pro		
415	420	
gac gag gaa gtt ttc tac ctg gtg gct cta ttg aga tca gct tta tgg		2525
Asp Glu Glu Val Phe Tyr Leu Val Ala Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ser		
425	430	435
gat ggt gag gaa acg cag aag cta gag tat ttg aaa gat cag aac cgt		2573
Asp Gly Glu Glu Thr Gln Lys Leu Glu Tyr Leu Lys Asp Gln Asn Arg		

440	445	450	455	
egg atc ttg gag ttc tgt gaa caa gcc aag atc aat gtg aag cag tac				2621
Arg Ile Leu Glu Phe Cys Glu Gln Ala Lys Ile Asn Val Lys Gln Tyr				
	460	465	470	
ctt cct cac cat gca acg caa gag gag tgg gtg gat cat tat gga gac				2669
Leu Pro His His Ala Thr Gln Glu Glu Trp Val Asp His Tyr Gly Asp				
	475	480	485	
aga tgg gat cag ttt aga agc atg aag act gag ttc gat cca cgg cat				2717
Arg Trp Asp Gln Phe Arg Ser Met Lys Thr Glu Phe Asp Pro Arg His				
	490	495	500	
ata ctc gct acc ggt cag aaa atc ttt cag aac cca tct ctg gct ttg				2765
Ile Leu Ala Thr Gly Gln Lys Ile Phe Gln Asn Pro Ser Leu Ala Leu				
	505	510	515	
ttt cct cca tgg cgg tct tca tgg tca gct tca tgg tga				2804
Phe Pro Pro Ser Pro Ser Ser Ser Ala Ser Trp				
520	525	530		

<210> 23

<211> 1596

<212> DNA

<213> 欧洲油菜

<220>

[0042]

<221> 变化

<222> (465).. (465)

<223> 在 YIIN811 中 G 至 A 取代

<400> 23

atgacgtcaa gctttcttct cgtgacattc gcgatttgta cactgatcat agccgttgg	60
cccagcgagc tctccgcat cggagccata gacgtcgacg gccacttcac ctccaagcct	120
tccgacttag cctccgtctc gtccgacttc ggtatgctaa agtcgccgga ggagccatta	180
gccgaatttc atccatcttc agctgaagac gtggcaccgc tcacagaac agcttacggc	240
tcagccacgg cctttccggt ctacgcccgt ggccaccgccc attccataaa cggacaggct	300
tcgacaggga ggaacggtgt ggtgtggag atgagccacc gcaacatagg gacgtggag	360
ccactagtgt aaccggagga aatgtatgtg gacgtttggg gtggagagtt atgggttgat	420
gtgttgaaaa aaacgttga gcatggtta gcaccaaagt catggactga ttacctgat	480
ctttccgttg gtgtacact ctccaatgca ggaattagt gtaagcttt tcaccatggt	540
cctcaaatta gtaacgtcct tgagctagac gttgtaactg ggagaggaga ggtgatgaga	600
tgttcagaag aagagaacac aagcttttc catggagtgc ttggtgggtt aggtcaattt	660
gggatcatta caccgacagc aatctctctc gaacctctc cccaaagggt aagatggata	720
agagtgtgtt attcgagctt cgaagtgttt acagatgacc aagaatactt aatatctatg	780
catggctcatt caaagtttga ttacgtggaa gggttttgta tcgtggacga aggtctctgc	840
aacaactgga gatctctttt ctctctctct cataaccctg ttaaaatttc ttccgttagc	900
tctaaccggt ccgttctgta ttgccttgag ataccaaga actaccacga gtccgagtc	960
gacaccgtcg atcaggaagt agagattttg atgaagaaat taaattttat accgacatcg	1020
gtattcacga cagatttgca atatgtggat ttcttgacc gggttcacaa ggccgagctg	1080
aagctccggt cgaagaattt atgggagggt ccacacccat ggctcaacct attcgtacca	1140

```

aatcaagaa tctctgattt tgacaaaggc gttttcaagg gcattttggg gaataaaact 1200
agtggcccta tccttatcta cccaatgaac aaagacaaat gggacgaaag aagctcggcc 1260
gttacaccgg acgaggaagt tttctaccig gggcclclal tgagatcagc tttatcggal 1320
ggtgaggaaa cgcagaaget agagtatttg aaagatcaga accgtcggat ctggagttc 1380
tgtgaacaag ccaagatcaa tgtgaagcag taccttcctc accatgcaac gcaagaggag 1440
tggttggtatc attatggaga cagatgggat cagtttagaa gcatgaagac tgagttcgat 1500
ccacggcata tactcgttac cggtcagaaa atcttcaga acccatctct ggtttgttt 1560
cctccatcgc cgtcttcac gtcagcttca tgggtga 1596

```

<210> 24

<211> 531

<212> PRT

<213> 欧洲油菜

<400> 24

[0043]

```

Met Thr Ser Ser Phe Leu Leu Val Thr Phe Ala Ile Cys Thr Leu Ile
1           5           10          15
Ile Ala Val Gly Pro Ser Glu Leu Leu Arg Ile Gly Ala Ile Asp Val
          20          25          30
Asp Gly His Phe Thr Phe Lys Pro Ser Asp Leu Ala Ser Val Ser Ser
          35          40          45
Asp Phe Gly Met Leu Lys Ser Pro Glu Glu Pro Leu Ala Val Leu His
          50          55          60
Pro Ser Ser Ala Glu Asp Val Ala Arg Leu Ile Arg Thr Ala Tyr Gly
65          70          75          80
Ser Ala Thr Ala Phe Pro Val Ser Ala Arg Gly His Gly His Ser Ile
          85          90          95
Asn Gly Gln Ala Ser Thr Gly Arg Asn Gly Val Val Val Glu Met Ser
          100         105         110
His Arg Asn Ile Gly Thr Leu Glu Pro Leu Val Glu Pro Glu Glu Met
          115         120         125
Tyr Val Asp Val Trp Gly Gly Glu Leu Trp Val Asp Val Leu Lys Lys
          130         135         140
Thr Leu Glu His Gly Leu Ala Pro Lys Ser Trp Thr Asp Tyr Leu Tyr
          145         150         155         160
Leu Ser Val Gly Gly Thr Leu Ser Asn Ala Gly Ile Ser Gly Gln Ala
          165         170         175
Phe His His Gly Pro Gln Ile Ser Asn Val Leu Glu Leu Asp Val Val
          180         185         190
Thr Gly Arg Gly Glu Val Met Arg Cys Ser Glu Glu Glu Asn Thr Arg
          195         200         205
Leu Phe His Gly Val Leu Gly Gly Leu Gly Gln Phe Gly Ile Ile Thr
          210         215         220
Arg Ala Arg Ile Ser Leu Glu Pro Ala Pro Gln Arg Val Arg Trp Ile
          225         230         235         240
Arg Val Leu Tyr Ser Ser Phe Glu Val Phe Thr Asp Asp Gln Glu Tyr

```

	245	250	255
	Leu Ile Ser Met His Gly His Ser Lys Phe Asp Tyr Val Glu Gly Phe		
	260	265	270
	Val Ile Val Asp Glu Gly Leu Val Asn Asn Trp Arg Ser Ser Phe Phe		
	275	280	285
	Ser Pro His Asn Pro Val Lys Ile Ser Ser Val Ser Ser Asn Gly Ser		
	290	295	300
	Val Leu Tyr Cys Leu Glu Ile Thr Lys Asn Tyr His Glu Ser Glu Ser		
	305	310	315
	Asp Thr Val Asp Gln Glu Val Glu Ile Leu Met Lys Lys Leu Asn Phe		
	325	330	335
	Ile Pro Thr Ser Val Phe Thr Thr Asp Leu Gln Tyr Val Asp Phe Leu		
	340	345	350
	Asp Arg Val His Lys Ala Glu Leu Lys Leu Arg Ser Lys Asn Leu Trp		
	355	360	365
	Glu Val Pro His Pro Trp Leu Asn Leu Phe Val Pro Lys Ser Arg Ile		
	370	375	380
	Ser Asp Phe Asp Lys Gly Val Phe Lys Gly Ile Leu Gly Asn Lys Thr		
	385	390	395
	Ser Gly Pro Ile Leu Ile Tyr Pro Met Asn Lys Asp Lys Trp Asp Glu		
	405	410	415
	Arg Ser Ser Ala Val Thr Pro Asp Glu Glu Val Phe Tyr Leu Val Ala		
[0044]	420	425	430
	Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ser Asp Gly Glu Glu Thr Gln Lys Leu Glu		
	435	440	445
	Tyr Leu Lys Asp Gln Asn Arg Arg Ile Leu Glu Phe Cys Glu Gln Ala		
	450	455	460
	Lys Ile Asn Val Lys Gln Tyr Leu Pro His His Ala Thr Gln Glu Glu		
	465	470	475
	Trp Val Asp His Tyr Gly Asp Arg Trp Asp Gln Phe Arg Ser Met Lys		
	485	490	495
	Thr Glu Phe Asp Pro Arg His Ile Leu Ala Thr Gly Gln Lys Ile Phe		
	500	505	510
	Gln Asn Pro Ser Leu Ala Leu Phe Pro Pro Ser Pro Ser Ser Ser		
	515	520	525
	Ala Ser Trp		
	530		
	<210>	25	
	<211>	364	
	<212>	PRT	
	<213>	欧洲油菜	
	<400>	25	
	Met Val Ser Tyr Asn Phe Pro Ser Gln Ile His Leu Leu Met Ile Thr		
	1	5	10
			15

[0045]

Ile	Leu	Val	Ile	Ile	Thr	Thr	Leu	Leu	Thr	Pro	Ile	Thr	Thr	Asn	Thr
20			25			30									
Ser	Ser	Leu	Pro	Trp	Asn	Ile	Leu	Ser	Asn	Asp	Asn	Phe	Ala	Gly	Lys
35			40			45									
Leu	Thr	Thr	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Glu	Ser	Ala	Ala	Thr	Asp	Phe	Gly
50			55			60									
His	Ile	Thr	Lys	Ile	Phe	Pro	Ser	Ala	Val	Leu	Asn	Pro	Ser	Ser	Val
65			70			75			80						
Gln	Asp	Ile	Thr	Asp	Leu	Ile	Lys	Leu	Ser	Phe	Asp	Ser	Gln	Ser	Ser
85			90			95									
Phe	Pro	Leu	Ala	Ala	Arg	Gly	His	Gly	His	Ser	His	Arg	Gly	Gln	Ala
100			105			110									
Ala	Ala	Lys	Asp	Gly	Val	Val	Val	Asn	Met	Arg	Ser	Met	Val	Asn	Arg
115			120			125									
Asp	Arg	Gly	Ile	Lys	Val	Ser	Arg	Thr	Gly	Leu	Tyr	Ala	Asp	Val	Asp
130			135			140									
Ser	Ala	Trp	Leu	Trp	Ile	Glu	Val	Leu	Asn	Lys	Thr	Leu	Glu	Leu	Gly
145			150			155			160						
Leu	Thr	Pro	Val	Ser	Trp	Thr	Asp	Tyr	Leu	Tyr	Leu	Thr	Val	Gly	Gly
165			170			175									
Thr	Leu	Ser	Asn	Gly	Gly	Ile	Ser	Gly	Gln	Thr	Phe	Arg	Tyr	Gly	Pro
180			185			190									
Gln	Ile	Ser	Asn	Val	Leu	Glu	Met	Asp	Val	Ile	Thr	Gly	Lys	Gly	Glu
195			200			205									
Ile	Ala	Thr	Cys	Ser	Lys	Asp	Met	Asn	Ser	Asp	Leu	Phe	Tyr	Ala	Ala
210			215			220									
Leu	Gly	Gly	Leu	Gly	Gln	Phe	Gly	Ile	Ile	Thr	Arg	Ala	Arg	Ile	Lys
225			230			235			240						
Leu	Glu	Leu	Ala	Pro	Lys	Lys	Ala	Lys	Trp	Leu	Arg	Phe	Leu	Tyr	Thr
245			250			255									
Asp	Phe	Ser	Glu	Phe	Thr	Arg	Asp	Gln	Glu	Arg	Leu	Ile	Ser	Glu	Thr
260			265			270									
Asn	Gly	Pro	His	Phe	Leu	Glu	Gly	Ser	Val	Met	Leu	Asp	His	Gly	Pro
275			280			285									
Pro	Asp	Asn	Trp	Arg	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Pro	Ser	Glu	His	Met	Arg
290			295			300									
Ile	Val	Ser	Met	Val	Lys	Gln	His	Arg	Val	Ile	Tyr	Cys	Leu	Glu	Val
305			310			315			320						
Val	Lys	Tyr	Tyr	Asp	Glu	Thr	Ser	Gln	His	Ser	Val	Asn	Glu	Glu	Met
325			330			335									
Glu	Glu	Leu	Ser	Asp	Ser	Leu	Asn	Tyr	Glu	Arg	Gly	Phe	Val	Tyr	Glu
340			345			350									
Lys	Asp	Val	Thr	Tyr	Met	Asp	Phe	Leu	Asn	Arg	Val				
355			360												

<210> 26
 <211> 389
 <212> PRT
 <213> 欧洲油菜
 <400> 26
 Met Ala Ser Asn Asn Phe Pro Ser Gln Ser His Leu Leu Val Ile Ile
 1 5 10 15
 Ile Phe Ile Thr Thr Leu Leu Thr Pro Ile Thr Thr Asn Thr Ser Pro
 20 25 30
 Gln Pro Trp Asn Ile Leu Ser Asn Asp Asn Phe Ala Gly Lys Leu Thr
 35 40 45
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Glu Ala Ala Ser Ile Asp Phe Gly His Val
 50 55 60
 Thr Lys Ile Leu Pro Ser Ala Val Leu Asn Pro Ser Ser Val Gln Asp
 65 70 75 80
 Ile Ile Asp Leu Ile Lys Leu Ser Phe Asp Ser Gln Ser Ser Phe Pro
 85 90 95
 Ile Ala Ala Arg Gly His Gly His Ser Phe Arg Gly Gln Ala Ala Ala
 100 105 110
 Lys Asp Gly Val Val Val Asn Met Arg Ser Met Val Asn Glu Asp Arg
 115 120 125
 Gly Ile Lys Val Ser Arg Thr Gly Leu Tyr Ala Asp Val Asp Thr Ala
 [0046] 130 135 140
 Trp Leu Trp Ile Glu Val Leu Asn Lys Thr Leu Glu Leu Gly Leu Thr
 145 150 155 160
 Pro Val Ser Trp Thr Asp Tyr Leu Tyr Leu Thr Val Gly Gly Thr Leu
 165 170 175
 Ser Asn Gly Gly Ile Ser Gly Gln Thr Ser Arg Tyr Gly Pro Gln Ile
 180 185 190
 Ser Asn Val Leu Glu Leu Asp Ile Ile Thr Gly Lys Gly Glu Ile Ala
 195 200 205
 Thr Cys Ser Asn Asp Met Asn Ser Asp Leu Phe Tyr Ala Ala Leu Gly
 210 215 220
 Gly Leu Gly Gln Phe Gly Ile Ile Thr Arg Ala Arg Ile Lys Leu Glu
 225 230 235 240
 Leu Ala Pro Lys Arg Ala Lys Trp Leu Arg Phe Leu Tyr Thr Asp Phe
 245 250 255
 Ser Glu Phe Thr Arg Asp Gln Glu Arg Leu Ile Ser Glu Ala Gly Gly
 260 265 270
 Leu His Phe Leu Glu Gly Ser Val Met Leu Asp His Gly Pro Pro Asp
 275 280 285
 Asn Trp Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Pro Ser Asp His Leu Arg Ile Val
 290 295 300
 Ser Met Ile Lys Arg His Arg Val Ile Tyr Cys Leu Glu Val Val Lys
 305 310 315 320

Tyr Tyr Asp Glu Phe Ser Gln His Ser Val Asn Glu Glu Met Glu Glu
 325 330 335
 Leu Ser Glu Ser Leu Asn Phe Val Arg Gly Phe Val Tyr Glu Lys Asp
 340 345 350
 Val Thr Tyr Ile Asp Phe Leu Asn Arg Val Arg Thr Gly Glu Leu Asn
 355 360 365
 Leu Lys Ser Lys Gly Gln Trp Asp Val Pro His Pro Trp Leu Asn Leu
 370 375 380

Phe Val Pro Lys Ser
 385

<210> 27

<211> 291

<212> PRT

<213> 欧洲油菜

<400> 27

[0047]

Met Val Ser Tyr Asn Phe Pro Ser Gln Ile His Leu Leu Met Ile Thr
 1 5 10 15
 Ile Leu Val Ile Ile Thr Thr Leu Phe Thr Pro Ile Thr Thr Asn Thr
 20 25 30
 Ser Ser Leu Pro Trp Asn Ile Leu Ser Asn Asp Asn Phe Ala Arg Lys
 35 40 45
 Leu Thr Thr Ala Ser Ser Ser Val Glu Ser Ala Ala Thr Asp Phe Gly
 50 55 60
 His Ile Thr Lys Ile Phe Pro Ser Ala Val Leu Asn Pro Ser Ser Val
 65 70 75 80
 Gln Asp Ile Thr Asp Leu Ile Lys Leu Ser Phe Asp Ser Gln Ser Ser
 85 90 95
 Phe Pro Leu Ala Ala Arg Gly His Gly His Ser His Arg Gly Gln Ala
 100 105 110
 Ala Ala Asn Asp Gly Val Val Val Asn Met Arg Ser Met Val Asn Arg
 115 120 125
 Asp Arg Gly Ile Lys Val Ser Arg Thr Gly Leu Tyr Ala Asp Val Asp
 130 135 140
 Ser Ala Trp Leu Trp Ile Glu Val Leu Asn Lys Thr Leu Glu Leu Gly
 145 150 155 160
 Leu Thr Pro Val Ser Trp Thr Asp Tyr Leu His Leu Thr Val Gly Gly
 165 170 175
 Thr Leu Ser Asn Gly Gly Ile Ser Gly Gln Thr Phe Arg Tyr Gly Pro
 180 185 190
 Gln Ile Ser Asn Val Leu Glu Met Asp Val Ile Thr Gly Lys Gly Glu
 195 200 205
 Ile Ala Thr Cys Ser Lys Asp Met Asn Ser Asp Leu Phe Tyr Ala Ala
 210 215 220

Leu Gly Gly Leu Gly Gln Phe Gly Ile Ile Thr Arg Ala Arg Ile Lys
 225 230 235 240
 Leu Glu Leu Ala Pro Lys Asn Ala Lys Trp Leu Arg Phe Leu Tyr Thr
 245 250 255
 Asp Phe Ser Glu Phe Thr Arg Asp Gln Glu Arg Leu Ile Ser Glu Thr
 260 265 270
 Asn Gly Leu His Phe Leu Glu Gly Ser Val Met Leu Asp His Gly Pro
 275 280 285
 Pro Asp Asn
 290

<210> 28

<211> 327

<212> PRT

<213> 欧洲油菜

<400> 28

Met Ala Ser Asn Asn Phe Pro Ser Gln Ser His Leu Leu Val Ile Ile
 1 5 10 15
 Ile Phe Ile Thr Thr Leu Leu Thr Pro Ile Thr Thr Asn Asn Thr Ser
 20 25 30
 Pro Gln Pro Trp Asn Ile Leu Ser Asn Asp Asn Phe Ala Gly Lys Leu
 35 40 45
 [0048] Thr Ser Ala Ser Ser Ser Val Glu Ala Ala Ala Ile Asp Phe Gly His
 50 55 60
 Val Thr Lys Ile Leu Pro Ser Ala Val Leu Asn Pro Ser Ser Val Gln
 65 70 75 80
 Asp Ile Ile Asp Leu Ile Lys Leu Ser Phe Asp Ser Gln Ser Ser Phe
 85 90 95
 Pro Ile Ala Ala Arg Gly His Gly His Ser Phe Arg Gly Gln Ala Ala
 100 105 110
 Ala Lys Asp Gly Val Val Val Asn Met Arg Ser Met Val Asn Glu Asp
 115 120 125
 Arg Gly Ile Lys Val Ser Arg Thr Gly Leu Tyr Ala Asp Val Asp Thr
 130 135 140
 Ala Trp Leu Trp Ile Glu Val Leu Asn Lys Thr Leu Glu Leu Gly Leu
 145 150 155 160
 Thr Pro Val Ser Trp Thr Asp Tyr Leu Tyr Leu Thr Ile Gly Gly Thr
 165 170 175
 Leu Ser Asn Gly Gly Ile Ser Gly Gln Thr Ser Arg Tyr Gly Pro Gln
 180 185 190
 Ile Ser Asn Val Leu Glu Leu Asp Val Ile Thr Gly Lys Gly Glu Ile
 195 200 205
 Ala Thr Cys Ser Asn Asp Thr Asn Ser Asp Leu Phe Tyr Ala Ala Leu
 210 215 220
 Gly Gly Leu Gly Gln Phe Gly Ile Ile Thr Arg Ala Arg Ile Lys Leu

225 230 235 240
 Glu Leu Ala Pro Lys Arg Ala Lys Trp Leu Arg Phe Leu Tyr Thr Asp
 245 250 255
 Phe Ser Glu Phe Thr Arg Asp Gln Glu Arg Leu Ile Ser Glu Thr Asp
 260 265 270
 Gly Leu His Phe Leu Glu Gly Ser Val Met Leu Asp His Gly Pro Pro
 275 280 285
 Asp Asn Trp Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Pro Ser Asp His Leu Arg Ile
 290 295 300
 Val Ser Met Ile Lys Arg Tyr Arg Val Ile Tyr Cys Leu Glu Val Ala
 305 310 315 320
 Lys Tyr Tyr Asp Glu Thr Ser
 325

<210> 29

<211> 154

<212> PRT

<213> 欧洲油菜

<400> 29

Met Thr Ser Ser Phe Leu Leu Met Thr Phe Ala Ile Cys Thr Leu Ile
 1 5 10 15
 Ile Ala Val Gly Pro Ser Glu Leu Leu Arg Ile Gly Ala Ile Asp Val
 20 25 30
 Asp Gly His Phe Thr Phe Lys Pro Ser Asp Leu Ala Ser Val Ser Ser
 35 40 45
 Asp Phe Gly Met Leu Lys Ser Pro Glu Glu Pro Leu Ala Val Leu His
 50 55 60
 Pro Ser Ser Ala Glu Asp Val Ala Arg Leu Ile Arg Thr Ala Tyr Gly
 65 70 75 80
 Ser Ala Thr Ala Phe Pro Val Ser Ala Arg Gly His Gly His Ser Ile
 85 90 95
 Asn Gly Gln Ala Ser Thr Gly Arg Asn Gly Val Val Val Glu Met Ser
 100 105 110
 His Arg Asn Ile Gly Thr Pro Glu Pro Leu Val Glu Pro Glu Glu Met
 115 120 125
 Tyr Val Asp Val Trp Gly Gly Glu Leu Trp Val Asp Val Leu Lys Lys
 130 135 140
 Thr Leu Glu His Gly Leu Ala Pro Lys Ser
 145 150

<210> 30

<211> 132

<212> PRT

<213> 欧洲油菜

<400> 30

[0049]

```

Met Thr Ser Ser Phe Leu Leu Met Thr Phe Ala Ile Cys Thr Leu Ile
1           5           10          15
Ile Ala Val Gly Pro Ser Glu Leu Leu Arg Ile Gly Ala Ile Asp Val
           20           25           30
Asp Gly His Phe Thr Phe Lys Pro Ser Asp Leu Ala Ser Val Ser Ser
           35           40           45
Asp Phe Gly Met Leu Lys Ser Pro Glu Glu Pro Leu Ala Val Leu His
           50           55           60
Pro Ser Ser Ala Glu Asp Val Ala Arg Leu Ile Arg Thr Ala Tyr Gly
65           70           75           80
Ser Ala Thr Ala Phe Pro Val Ser Ala Arg Gly His Gly His Ser Ile
           85           90           95
Asn Gly Gln Ala Ser Thr Gly Arg Asn Gly Val Val Val Glu Met Ser
           100          105          110
His Arg Asn Ile Gly Thr Pro Glu Pro Leu Val Glu Pro Glu Glu Met
           115          120          125
Tyr Val Asp Val
           130

```

<210> 31

<211> 154

<212> PRT

[0050]

<213> 欧洲油菜

<400> 31

```

Met Thr Ser Ser Phe Leu Leu Val Thr Phe Ala Ile Cys Thr Leu Ile
1           5           10          15
Ile Ala Val Gly Pro Ser Glu Leu Leu Arg Ile Gly Ala Ile Asp Val
           20           25           30
Asp Gly His Phe Thr Phe Lys Pro Ser Asp Leu Ala Ser Val Ser Ser
           35           40           45
Asp Phe Gly Met Leu Lys Ser Pro Glu Glu Pro Leu Ala Val Leu His
           50           55           60
Pro Ser Ser Ala Glu Asp Val Ala Arg Leu Ile Arg Thr Ala Tyr Gly
65           70           75           80
Ser Ala Thr Ala Phe Pro Val Ser Ala Arg Gly His Gly His Ser Ile
           85           90           95
Asn Gly Gln Ala Ser Thr Gly Arg Asn Gly Val Val Val Glu Met Ser
           100          105          110
His Arg Asn Ile Gly Thr Leu Glu Pro Leu Val Glu Pro Glu Glu Met
           115          120          125
Tyr Val Asp Val Trp Gly Gly Glu Leu Trp Val Asp Val Leu Lys Lys
           130          135          140
Thr Leu Glu His Gly Leu Ala Pro Lys Ser
145           150

```

[0051]	<210>	32	
	<211>	47	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	KASP 引物 BnCKX3-A1 WT 等位基因	
	<400>	32	
		gaaggtgacc aagttcatgc tgtatatgga tttcttaaac cgggttc	47
	<210>	33	
	<211>	48	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	KASP 引物 BnCKX3-A1 YIIN501 等位基因	
	<400>	33	
		gaaggtcgga gteaacggat tegtatatgg atttcttaaa cgggttt	48
	<210>	34	
	<211>	48	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	KASP 引物 BnCKX3-A2 WT 等位基因	
	<400>	34	
		gaaggtgacc aagttcatgc tggcttaatc tctttgtacc aaaatctc	48
	<210>	35	
	<211>	50	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	KASP 引物 BnCKX3-A2 YIIN512 等位基因	
	<400>	35	
		gaaggtcgga gteaacggat taiggttaa tctctttgta ccaaaatctt	50
	<210>	36	
	<211>	42	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	KASP 引物 BnCKX3-C1 WT 等位基因	
	<400>	36	
		gaaggtgacc aagttcatgc tggtagtag taagtgacc gc	42

[0052]	<210>	37	
	<211>	43	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	KASP 引物 BnCKX3-C1 YIIN521 等位基因	
	<400>	37	
		gaaggtcgga gtcacggat tcggtggata gtaagtggac cgt	43
	<210>	38	
	<211>	43	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	KASP 引物 BnCKX3-C2 WT 等位基因	
	<400>	38	
		gaaggtgacc aagttcatgc tggacctcgt tgactgagtg ttg	43
	<210>	39	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	KASP 引物 BnCKX3-C2 YIIN531 等位基因	
	<400>	39	
		gaaggtcgga gtcacggat tcggacctcg ttgactgagt gtta	44
	<210>	40	
	<211>	47	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	KASP 引物 BnCKX5-A1 WT 等位基因	
	<400>	40	
		gaaggtgacc aagttcatgc tcaacggaaa gatacaagta atcagtc	47
	<210>	41	
	<211>	48	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	KASP 引物 BnCKX5-YIIN801 WT 等位基因	
	<400>	41	
		gaaggtcgga gtcacggat tccaacggaa agatacaagt aatcagtt	48

	<210> 42	
	<211> 44	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> KASP 引物 BnCKX5-A1 WT 等位基因	
	<400> 42	
	gaaggtgacc aagttcatgc tcatcaaccc ataactctcc accc	44
	<210> 43	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> KASP 引物 BnCKX5-A1 YIIN805 等位基因	
	<400> 43	
	gaaggtcgga gtcaacggat tacatcaacc cataactctc cacct	45
[0053]	<210> 44	
	<211> 47	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> KASP 引物 BnCKX5C1 WT 等位基因	
	<400> 44	
	gaaggtgacc aagttcatgc tcaacggaaa gatacaggta atcagtc	47
	<210> 45	
	<211> 47	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> KASP 引物 BnCKX5-C1 YIIN811 等位基因	
	<400> 45	
	gaaggtcgga gtcaacggat tcaacggaaa gatacaggta atcagtt	47

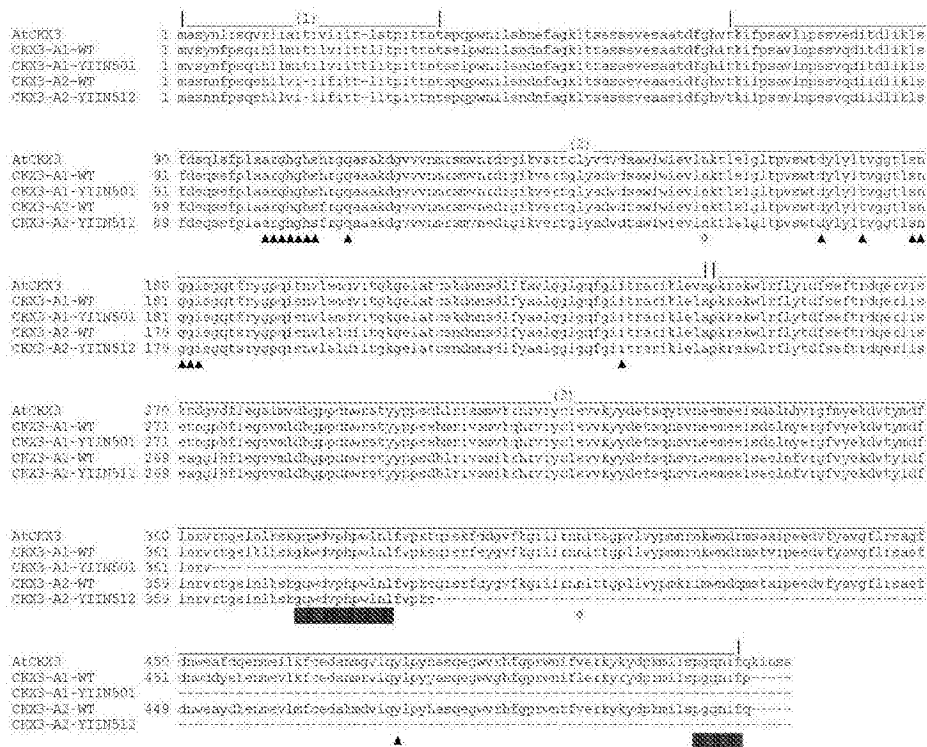


图1

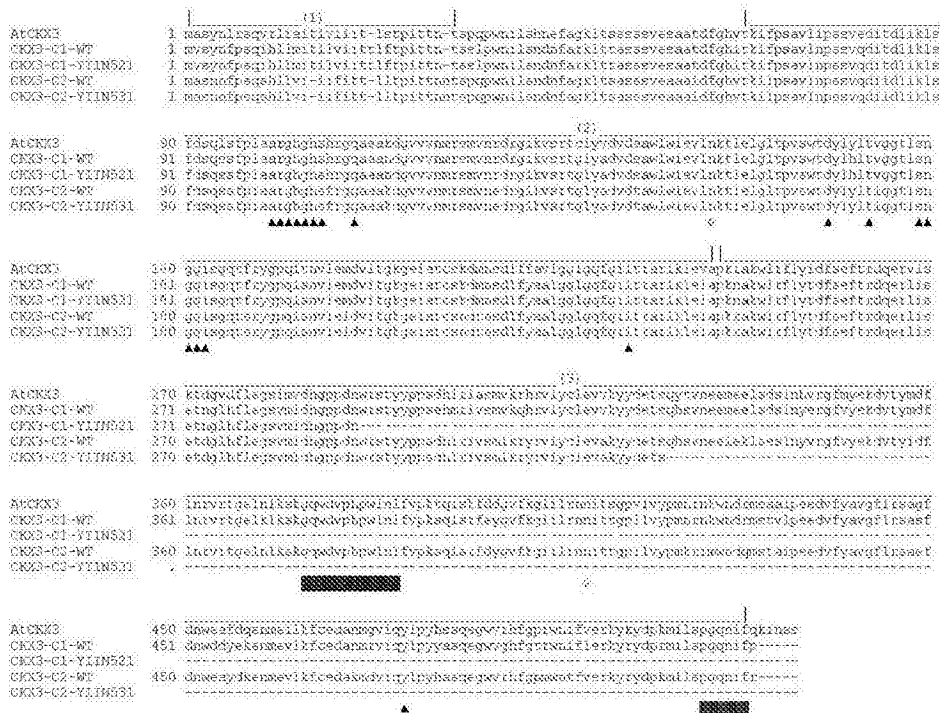


图2

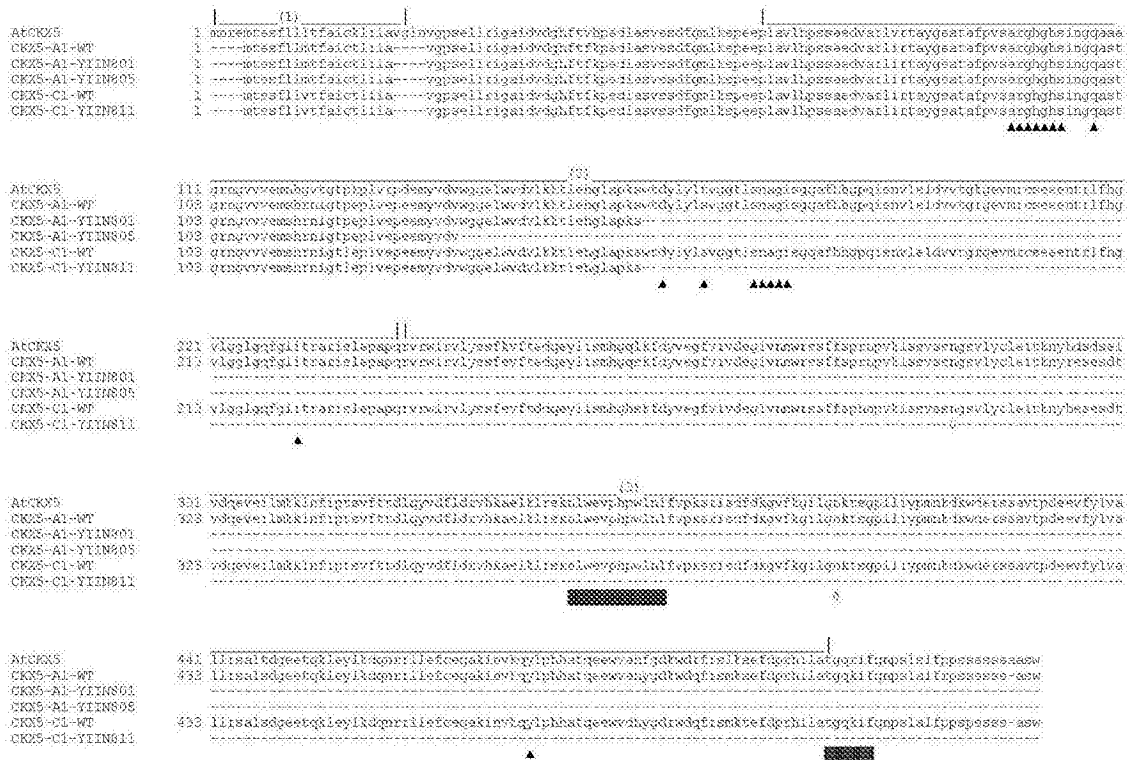


图3