

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

C12Q 1/68

C12N 15/82 C12N 15/53

C12N 15/05

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97197340.7

[43]公开日 1999 年 9 月 8 日

[11]公开号 CN 1228126A

[22]申请日 97.6.16 [21]申请号 97197340.7

[30]优先权

[32]96.6.26 [33]US [31]60/020,553

[86]国际申请 PCT/CA97/00424 97.6.16

[87]国际公布 WO97/49831 英 97.12.31

[85]进入国家阶段日期 99.2.13

[71]申请人 麦吉尔大学

地址 加拿大魁北克

[72]发明人 格雷戈里·G·布朗 贝努瓦·兰德里

马丁·琼

[74]专利代理机构 柳沈知识产权律师事务所

代理人 张平元

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图页数 8 页

[54]发明名称 甘油醛-3-磷酸脱氢酶及胞质雄性不育的核恢复

[57]摘要

本发明涉及胞质雄性不育的核恢复基因的标记,更具体地是将甘油醛-3-磷酸脱氢酶 cDNA 用作这种标记。提供了胞质雄性不育核恢复的基因,更具体是 将编码甘油醛-3-磷酸脱氢酶的某种形式的基因用作此目的。最后,提供了 以此基因直接通过植物的遗传转化产生恢复系的方法。

ISSN 1008-4274



权 利 要 求 书

1. 特异于植物胞质雄性不育的核恢复的探针，其包括甘油醛-3-磷酸脱氢酶 cDNA 或基因组 DNA 序列或其杂交片段或者从其衍生的用作甘油醛-3-磷酸脱氢酶扩增的引物的任何 DNA 序列，其中所说的 DNA 序列或其杂交片段与作为具有核恢复因子基因的植株特征的特异 DNA 在严紧条件下杂交。
2. 植物中胞质雄性不育性核恢复的基因，它包括编码甘油醛-3-磷酸脱氢酶的 DNA 序列及周围序列。
3. 权利要求 2 的基因，其中所说的周围序列位于甘油醛-3-磷酸脱氢酶序列的 3'和/或 5'。
4. 权利要求 3 的基因，其中的周围序列约为 50kb。
5. 产生恢复系的方法，其包括用权利要求 2 的胞质雄性不育核恢复基因对植物进行遗传转化。

说明书

甘油醛-3-磷酸脱氢酶及胞质雄性不育的核恢复

5 发明背景

(a) 发明领域

本发明涉及胞质雄性不育核恢复的标记，更具体地是涉及将甘油醛-3-磷酸脱氢酶互补 DNA 用作这种标记的使用。本发明还涉及胞质雄性不育核恢复基因，并且更具体地为此目的而对一种形式的编码甘油醛-3-磷酸脱氢酶的基因的使用。最后，本发明还涉及以这种基因对植物直接通过遗传转化而生产恢复系。

(b) 现有技术描述

不同作物品种杂交可能使其产量比亲本系明显地有增加。这种现象被标为杂交优势。为了实现对杂交优势的利用，有必要建立一种方法以在杂交过程中预防亲本系中的一个或二者的自花授粉。达到这种目的方法有机械、化学和遗传手段。一种成熟的遗传方法是胞质雄性不育(CMS)的性状。CMS 的遗传决定因子，即父本传递的在产生可育花粉方面的无能力，位于线粒体基因组中。因为 CMS 植物是雄性不育的，其上所形成的全部种子都需要经过杂交。但是，由于 CMS 的父本传递性，其 F_1 杂交后代一般也是雄性不育的因此也不能进行自花授粉和产生种子。为了解决这个问题，可在杂交的授粉亲本中引入被称为育性恢复因子(Rf)的特定的抑制雄性不育表型的核基因。非雄性不育胞质具不育性的基因型可被称为保持者；而携带 Rf 基因的则称之为恢复者；可将保持和恢复 CMS 的基因看作是同一座位上的不同等位基因(分别为 rf 和 Rf)。

25 现有方案的缺陷

为了产生不同套系的利用 CMS 的杂交，必须有足够量的含有 Rf 基因的恢复系，以及因 CMS 胞质而不育的“保持者”系。图 1 中简单示意了这些系在杂交作物生产中的应用。通过传统遗传学来发展这些系是一个缓慢的过程，它至少需要几年的努力，并且目前在某些作物中进行基于 CMS 的杂交产生了严重的瓶颈问题，这是作物包括加拿大的主要经济作物 - Canola。例如，为了产生新的恢复系，有必要首先在一个提供 Rf 基因的现

表 1

在两个 *Brassica napus* 回交群体中用探针 cRF₁(GAPc)检测到的雄性育性恢复与 Rfp1 特异性 RFLP 等位基因的共分离

杂交	可育后代植株		不育后代植株	
	有 Rfp1 特异性 cRF ₁ 等位基因	无 Rfp1 特异性 cRF ₁ 等位基因	有 Rfp1 特异性 cRF ₁ 等位基因	无 Rfp1 特异性 cRF ₁ 等位基因
Westar × Westar-Rf	30	0	0	34
Karat × Westar-Rf	56	0	0	55
总计	86	0	0	89

与现有方案的不同点

由于 cRF₁ 与 Rfp1 完全连锁，因此将该探针用来对该恢复基因进行间接选择时的不确定性实际上已被除去了。

- 5 另外，并未分离到 Polina 的恢复基因或 pol CMS 系统，因此想直接通过遗传转化来产生恢复系是不可能的。这将使得利用间接选择来开发新恢复系(图 4)的花费大大降低。

- 10 检测到这种多态性的 DNA 探针是 *B.napus* 的互补 DNA(cDNA)，也就是与信使 RNA 分子(mRNA)互补的 DNA。该 cDNA 的 DNA 序列是被确定了的。对核苷酸数据库的分析表明该 cDNA 的序列与来自于拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)的糖酵解酶即由 GAPC 基因编码(Shih, M.-C.等, 1991, Gene, 104: 133-138)的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(图 3A 和 3B)的胞质型有 99 % 的。与恢复基因的完全连锁及 GAPC 多态性使得我们可以相信恢复基因有可能是 GAPC 的特定形式。

- 15 对 BC1 群体我们也作了相似类型的分析，其中对另一个不同的 *B.napus* CMS(即 nap)系统来说是分离的而且发现 nap 恢复因子仅仅是同一遗传座位上的不同等位基因而已。因此不同形式的 GAPC 相应于两种不同形式的 *B.napus* 核育性恢复基因。该结果进一步说明其它恢复基因也可能有相应的同种型 GAPC，并且还说明 GAPC 与恢复基因之间的关系可延伸到其它植物种类的其它 CMS 系统中。在此之前还没有提出过认为任何植物的 GAPC
20 与恢复其间之间有关系的。

因此，对此基因也可能通过单步的利用遗传转化将恢复因子特异性的 GAPC 基因导入到保持基因型(天然状态下不含恢复因子的基因型)中而建立恢复系。这种方法可能是极其经济的，因为它可以减少在建立这些系所必需的植物育种过程中的许多步骤。如果将 GAPC 和恢复基因之间的关系延伸到其它作物品种中，这在许多作物中将形成一种分离恢复基因及开发恢复系的基本方法。

参考下面的实施例将可以很容易地理解本发明，这些实施例是用于描述本发明而并非限制其范围的。

实施例 I

10 在生产新的恢复细胞系中用 GAPC 探针作为间接的选择标记
所研究的三种植物基因型为：

A. CMS 系；

B. 不含恢复基因而还含雄性可育胞质的雄性可育系；及

R. 含有恢复基因同时还含雄性不育胞质的雄性可育系。

15 假定 A 系和 B 系之间的通过人工遗传杂交产生的杂交种表现出相当程度的杂交优势；A 和 R 之间的杂交则没有杂交优势。由于 B 系不含有恢复基因，用 CMS 不可能在 A 系和 B 系之间的杂交产生雄性可育的杂种。但是如果可将恢复基因从 R 系转化到 B 系中，同时还不改变 B 系的性状，用 CMS 就可能使 A 系和 B 系之间的杂交得到雄性可育杂种。传统上，通过一下叫做渐渗的过程就可以完成。将 R 系用作雌株与 B 系杂交以产生 A 和 B 的雄性可育的 F_1 杂种，该杂种含有雄性不育胞质(杂种的胞质全部来自于雌性亲本)但仍是雄性可育的，这是由于它也从 R 亲本系中接受了一份拷贝的恢复基因。然后在杂种(作雌株)和 B 系之间进行第二次杂交(称之为回交)。在田间种植大量的后代，期望有同样数目的可育株和不育株。在第二次对 B 系 25 的杂交中将一株或更多株的可育株用作雌株；可育株被恢复并作为雌株与 B 系进行第三次杂交。将该过程重复多代，期望新的后代与 B 系越来越像(除了其具有恢复基因之外)。在每代中评价与 B 系相关的各种性状。最后，产生了具有 B 系的所有或绝大部分所需性状的新的恢复系。因此该系可用来大量生产 A 系和 B 系的杂种。

30 GAPC 探针将有助于该方法，这是由于它使得在幼苗阶段的后代植株中即可评价恢复基因的存在。从小量的叶物质中提取 DNA，用限制性内切

酶例如 Hind III(图 4 中所用)消化并以 GAPC 探针分析。作为恢复基因的特征的限制性片段的出现说明该幼苗具有恢复基因。以非常低的花销筛选了相当大量的植物，而这种花销在将同样的植株在田间长至成熟期时是必需的。而且，雄性不育的表型受多种不同条件的影响，通过筛选与其完全连锁的多态性来筛选该基因的存在将更方便地在渐渗过程中检测到该基因的存在。

实施例 II

经转化通过恢复基因形式的 GAPC 的导入生产新的恢复因子细胞系
根据本方法在将研究实施例 I 中的三种植物基因型。

10 在本实施例中，问题与实施例中的是一致的，即在不改变 B 系其它性状的情况下将 R 系的恢复基因导入到 B 系中。但是，在这种情况下，我们将假定该种形式的代表恢复基因的 GAPC 基因已被分离而且可以作为克隆的 DNA 区段克隆到适当的植物根瘤土壤杆菌(*grobacterium tumefaciens*)转化载体例如 pRD400(Datla Rss, Hammer Lindl JK, Panchuk B, Pelcher LE &
15 Keller W.(1992)Gene 211: 383-384)中。与实施例 I 中冗长的回交程序不同，通过农杆菌介导的转化将 GAPC 基因转入 B 系中。

为了本实施例的目的，我们也将假定 A 系、B 系及 R 系是 *Brassica napus* 系，而且克隆的恢复基因与 R 系的恢复基因是相同的。用 Moloney 等人所描述的方法(Moloney, M., Walker, J. & Sharma, K.(1989)Plant
20 Cell.Rep.8: 283-242), 用含整合了该基因的 prRD 400 载体的农杆菌株接种来自于菌株 B 幼苗的子叶。通过抗生素处理除去农杆菌，并将所得植物组织置于含抗生素卡那霉素的培养基上。含该基因的 pRD 400 是卡那霉素抗性，于是在该抗生素上生长的细胞就有可能获得卡那霉素基因，同时还有克隆到 pRD 400 中的恢复基因。然后用 GAPC 探针测试特异于恢复因子的
25 植物形式的限制性片段的存在来直接鉴定恢复基因在这些植物中的存在性。期望如果它们含有雄性不育胞质的话这些植株将被变成可育的，同时 A 系(作为雌性)和新转基因系杂交而来的 F_1 后代也将是雄性可育的。

这种方法具有两个明显特征：它比传统的植物育种方法更快和更便宜，它仅仅需要很少几个月而不是传统上建立该系所需的数年时间。而且，
30 恢复基因的存在是 B 系和新恢复系的基因组之间存在的唯一区别。因此 B 系的性状完整性将更不会被受到损伤。

序列表

(1) 基本信息

(i) 申请人: McGill 大学等

(ii) 发明名称: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶及胞质雄性不育的核恢复

5 (iii) 序列数: 3

(iv) 通讯地址:

(A) 通信人: SWABEY OGILVY RENAULT

(B) 街道: 1981 McGill College Ave.-Suite 1600

(C) 城市: Montreal

10 (D) 州: QC

(E) 国家: 加拿大

(F) ZIP: H3A 2Y3

(v) 计算可读形式:

(A) 介质类型: 软盘

15 (B) 计算机: IBM 兼容

(C) 操作系统: DOS

(D) 软件: FastSEQ for Windows 版本 2.0

(vi) 当前申请资料:

(A) 申请号:

20 (B) 申请日:

(C) 分类:

(vii) 在先申请资料:

(A) 申请号: 60/020,553

(B) 申请日: 1996 年 6 月 26 日

25 (viii) 律师/代理人信息

(A) 姓名: Cote, France

(B) 注册号: 4166

(C) 案卷号: 1770-152 “PCT” FC

(ix) 电信信息:

30 (A) 电话: 514 845-7126

(B) 电传: 514-288-8389

(C) 电报:

(2) SEQ ID NO: 1 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 1207 碱基对

5 (B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: cNDA

(xi) SEQ ID NO: 1 的序列描述:

10 TCTCGATCTC ATCGACACCC TCTGATATCG AAATGGCTGA CAAGAAGATT AAGATCGGAA 60
TCAACGGTTT CGGAAGAATC GGTCGCTTGG TGGCTAGAGT TATCCTTCAG AGGAACGATG 120
TTGAGCTCGT CGCTGTTAAC GACCCCTTCA TCACCACCGA GTACATGACG TACATGTTTA 180
AGTATGACAG TGTTACCGGT CAGTGGGAGC ACAACGAGCT CAAGGTTAAG GATGAGAAGA 240
CACTTCTCTT CGGTGAGAAG CCTGTCACTG TTTTCGGCAT CAGGAACCTT GAGGATATGC 300
CCATGGGGTG AGGCTGGAGC TGACTTTGGG GTTGAGTCTA CTGGTGTCTT CACCGACAAG 360
GACAAGGCTG CTGCTCACTT GAAGGGTGGT GCGAAGAAAG TTGTCATCTC TGCACCAAGC 420
AAAGATGCTC CCATGTTCTG TGTTGGTGTG AATGAGCATG AGTACAAGTC TGATCTCAAC 480
ATTGTTTCCA ACGCTAGTGC ACCACTAACT GCCTTGCTCC ACTTGCCAAG GTTATCANCG 540
ACAGGTTTGG AATTGTCGAG GGACTCATGA CCACCGTCCA CTCTATCACT GCAACTCAGA 600
AGACAGTTGA TGGTCCATCA ATGAAGGACT GGAGAGGTGG AAGAGCCGCT TCCTTCAACA 660
15 TCATTCCCAG CAGCACCGGA GTGCCAAGG CTGTCGGAAA GGTTCTTCCA CAGCTCAACG 720
GAAAGCTGAC CGGTATGTCC TTCCGTGTTC CCACCGTTGA TGTTCAGTT GTTGACTCAC 780
GGTTAGACTC GAGAAAGCTG CAACCTACGA TGAAATCAAG AAGGCTATCA AGGAGGAATC 840
TGAGGGCAAG CTAAAGGGAA TCCTTGTTTA CACAGAGGAT GATGTTGTCT CAACCGACTT 900
CGTTGGTGAC AACAGGTCGA GCATTTTTGA CGCAAAGGCT GGAATCGCGT TGAGTGACAA 960
CTTTGTGAAG CTGGTGTCTG GGTACGACAA CGAATGGGGT TACAGTACCC GTGTGGTCGA 1020
CTTGATCATT CACATGTCCA AGGCCTAAGT CGATGAAGAT CTCGAGTGAT GTAATGGTGT 1080
TTTTAAATTG TTGTTTTTAT CGAATAAATT TTCTTGGGTT TTGAAACCTT TATGGTTTTG 1140
GCGAATTCTC TACTTTCACG TGACGTGATA AGAAGTTTGT AGACCGGTTG TTTTTTATTT 1200
TTACTGA 1207

20

(2) SEQ ID NO: 2 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 1091 碱基对

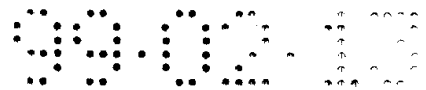
(B) 类型: 核酸

25 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

SEQ ID NO: 2 的序列描述

30 TTTTCGAAATG GCTGACAAGA AGATTAAGAT CGGAATCAAC GGTTCGGAA GAATCGGTCTG 60
TTTGGTGGCT AGAGTTATCC TTCAGAGGAA CGATGTTGAG CTCGTCGCTG TTAACGATCC 120
CTTCATCACC ACCGAGTACA TGACGTACAT GTTTAAGTAT GACAGTGTTT ATGGTCAGTG 180
GAAGCACAAT GAGCTCAAGG TGAAGGATGA GAAAACACTT CTCTTCGGAG AGAAGCCTGT 240
CACTGTTTTT GGCATCAGGA ACCCTGAGGA TATCCCATGG GGTGAGGCCG GAGCTGACTT 300
TGTTGTTGAG TCTACTGGTG TCTTCACTGA CAAGGACAAG GCTGCTGCTC ACTTGAAGGG 360
TGGTGCCAAG AAAGTTGTCA TCTCTGCACC AAGCAAAGAT GCTCCTATGT TCGTTGTTGG 420



TGTC	CAATGAG	CATGAGTACA	AGTCTGATCT	CAACATTGTT	TCCAACGCTA	GTTGCACCAC	480
TAACTG	CCCTT	GCTCCACTTG	CCAAGGTTAT	CAACGACAGG	TTTGGAATTG	TCGAGGGACT	540
CATGACT	ACT	GTCCACTCTA	TCACTGCTAC	TCAGAAGACA	GTTGATGGTC	CATCAATGAA	600
GGACTGG	GAGA	GGTGGAAGAG	CCGCTTCCTT	CAACATCATT	CCCAGCAGCA	CCGGAGCTGC	660
CAAGGCTG	TGTC	GGAAAGGTGC	TTCCACAGCT	CAATGGAAAA	TTGACCGGAA	TGTCCTTCCG	720
TGTTCCCA	CC	GTTGATGTTT	CAGTTGTCGA	CCTCACGGTT	AGACTCGAGA	AAGCTGCAAC	780
CTACGATG	AA	ATCAAGAAGG	CTATCAAGGA	GGAGTCTCAG	GGCAAGCTAA	AGGGAATCCT	840
TGGTTACA	CA	GAGGATGATG	TTGTCTCAAC	TGACTTCGTT	GGTGACAACA	GGTCGAGCAT	900
CTTTGACG	CC	AAGGCTGGAA	TCGCATTGAG	TGACAACTTC	GTGAAGCTGG	TGTCGTGGTA	960
TGACAACG	AA	TGGGGTTACA	GTACCCGTGT	GGTCGACTTG	ATCATTCATA	TGTCCAAGGC	1020
CTAAACGCT		GAAGATCTAC	AATGATGTAA	TGGTGTCTTA	ATTTGTGGTT	TTCGAATAAG	1080
ATTTCTTTG	G						1091

SEQ ID NO: 3 的信息

(i) 序列特征:

- 10 (A) 长度: 1295 碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑学: 线性

(xi) SEQ ID NO: 3 的序列描述

CTCATCTTCA	ACCTCTCTCT	AACTCTCGTT	TTCGATTCTA	CAATGGCTGA	CAAGAAGATT	60
AGGATCGGAA	TCAACGGATT	CGGAAGAATT	GGTCGTTTGG	TTGCTAGAGT	TGTTCTCCAG	120
AGGGACGATG	TTGAGCTCGT	CGCTGTCAAC	GACCCCTTCA	TCACTACTGA	GTACATGACC	180
TACATGTTCA	AGTACGACAG	TGTTACGGT	CAATGGAAAC	ACAATGAAC	CAAGATCAAG	240
GATGAGAAGA	CCCTTCTCTT	CGGTGAGAAG	CCAGTCACTG	TTTTCGGCAT	CAGGAACCCT	300
GAGGATATCC	CATGGGCCGA	GGCTGGAGCT	GACTACGTTG	TTGAGTCTAC	TGGTGTCTTC	360
ACTGACAAAG	ACAAGGCTGC	AGCTCACTTG	AAGGGTGGTG	CCAAGAAGGT	TGTTATCTCT	420
GAACCCAGCA	AAGACGCTCC	AATGTTTGTT	GTTGGTGTCA	ACGAGCACGA	ATACAAGTCC	480
GACCTTGACA	TTGTCTCCAA	CGCTAGCTGC	ACCACTAACT	GCCTTGCTCC	CCTTGCCAAG	540
GTTATCAATG	ACAGATTGG	AATTGTTGAG	GGTCTTATGA	CTACAGTCCA	CTCAATCACT	600
GCTACTCAGA	AGACTGTTGA	TGGGCCTTCA	ATGAAGGACT	GGAGAGGTGG	AAGAGCTGCT	660
TCATTCAACA	TTATTCCCAG	CAGCACTGGA	GCTGCCAAGG	CTGTCGGAAA	GGTGCTTCCA	720
GCTCTTAACG	GAAAGTTGAC	TGGAATGTCT	TTCCGTGTCC	CAACCGTTGA	TGTCTCAGTT	780
GTTGACCTTA	CTGTCACT	CGAGAAAGCT	GCTACCTACG	AAGAAATCAA	AAAGGCTATC	840
AAGGAGGAAT	CCGAAGGCAA	ACTCAAGGGA	ATCCTTGGAT	ACACCGAGGA	TGATGTTGTC	900
TCAACTGACT	TCGTTGGCGA	CAACAGGTCG	AGCATTTTTG	ACGCCAAGGC	TGGAATTGCA	960
TTGAGCGACA	AGTTTGTGAA	ATTGGTGTCA	TGGTACGACA	ACGAATGGGG	TTACAGTTCC	1020
CGTGTGGTCG	ACTTGATCGT	CCACATGTCA	AAGGCCTAAG	CTAAGAAGCA	GATCTCGAAT	1080
GATAGGGAGT	GGAAAGTCAT	CTGTTCATCC	CCTTTTATGG	TCTGAATTTG	TCGTTTTTCGA	1140
ATAAAATTTT	TTTGAACCTG	GAACTTTTTT	TTTTTTTGGT	TTTCTTAATT	CTCATTCATG	1200
TGAGGTGATG	GGAGTTTGTA	GACCGATGTT	TTACTGGAAG	CCCTTTGTTT	TTGGCTTTTG	1260
ATATATTGAG	TTAACGTTAT	GGTTTTAAAA	AAAAA			1295

99.00.00

说明书附图

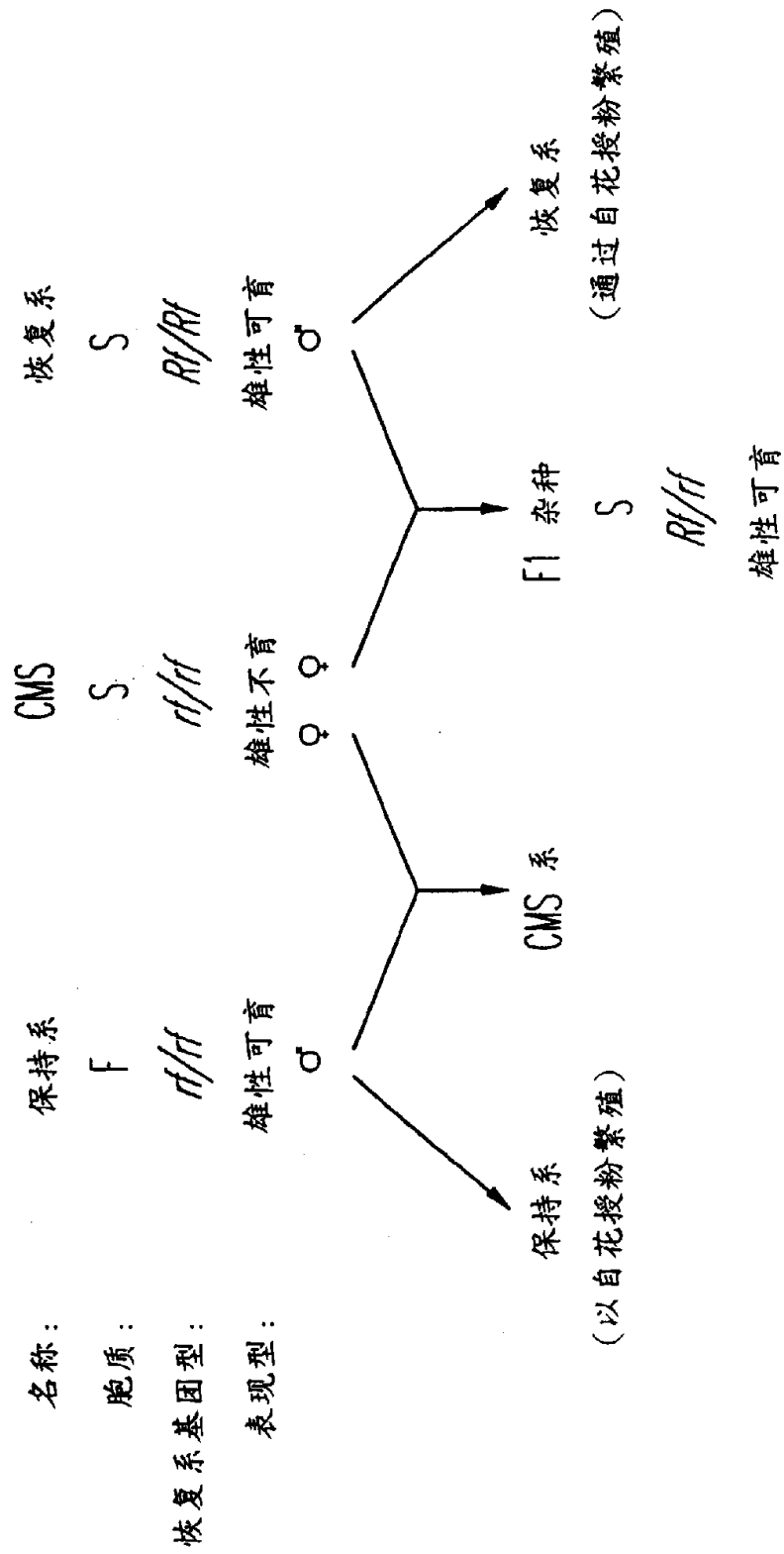
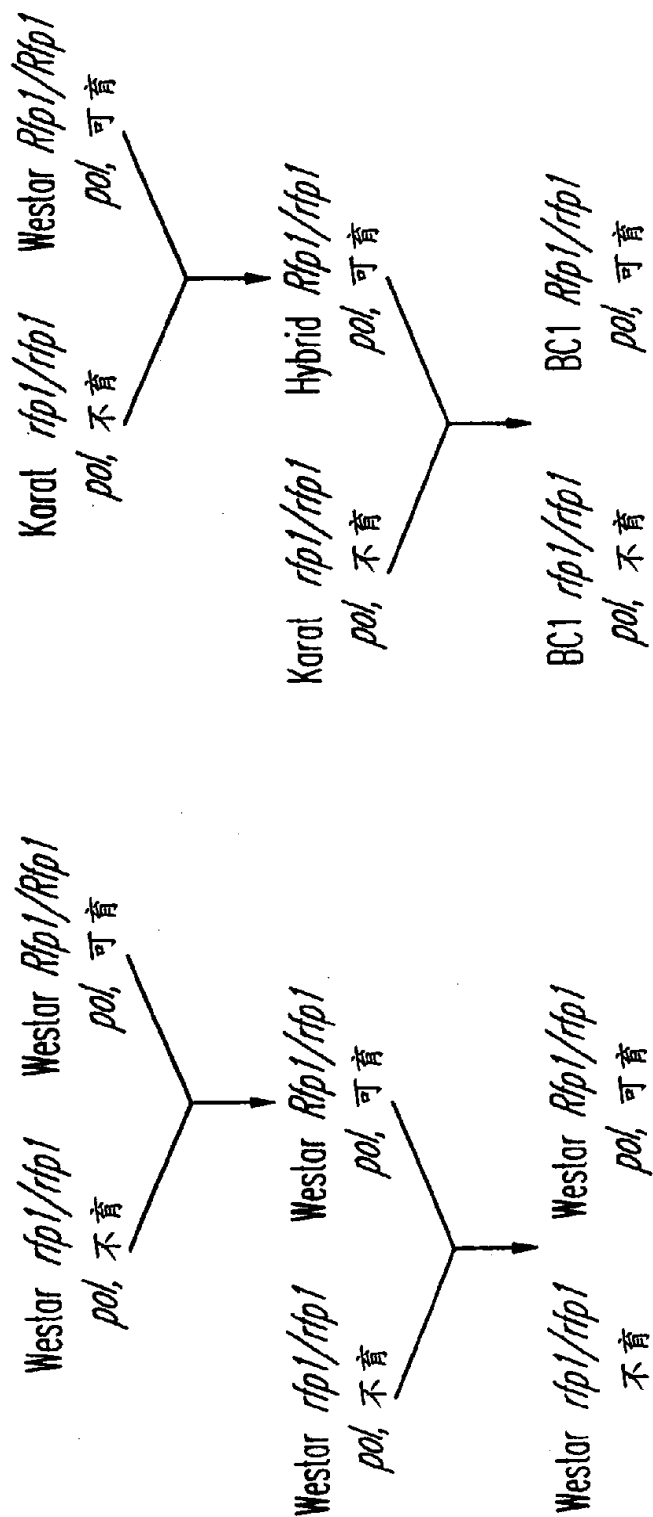


图 1



用于鉴定与育性基因的 *Pfp1* 恢复因子完全连锁的标记的杂交。将 CMS 系 Westar (*pol*) 和 Karat (*pol*) 与恢复系 Westar-Rf 杂交产生杂种植株，然后再与两个 CMS 系杂交产生两个回交群体，收获了大约相等数量的可育株和不育株(见表1)，如同所期望的一样。

图 2

Brassica napus cDNA 克隆 2NC10 与来自 Sinapis alba 及

Arabidopsis thaliana 的胞质甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPC) 之比较

Brassica napus 克隆	2NC10	tctcgatctc atcgacaccc tct----- gatatc
Sinapis alba GAPC		-----tttc
Arabidopsis thaliana GAPC		-----ctc atcttcaacc tctctctaac tctcgttttc

41	ga-----aa tggctgacaa gaagattaag atcggaatca acggtttcgg aagaatcgggt
	ga-----aa tggctgacaa gaagattaag atcggaatca acggtttcgg aagaatcgggt
	gattctacaa tggctgacaa gaagattagg atcggaatca acggattcgg aagaattgggt

101	cgcttgggtg ctagagttat ccttcagagg aacgatgttg agctcgtcgc tgttaacgac
	cgttgggtg ctagagttat ccttcagagg aacgatgttg agctcgtcgc tgttaacgat
	cgttgggtg ctagagttgt tctccagagg gacgatgttg agctcgtcgc tgtcaacgac

161	cccttcatca ccaccgagta catgacgtac atgtttaagt atgacagtgt tcacgggtcag
	cccttcatca ccaccgagta catgacgtac atgtttaagt atgacagtgt tcacgggtcag
	cccttcatca ctactgagta catgacgtac atgttcaagt acgacagtgt tcacgggtcaa

图 3A

221 tggaagcaca acgagctcaa ggttaaggat gagaagacac ttctcttcgg tgagaagcct
 tggaagcaca atgagctcaa ggtgaaggat gagaaaaacac ttctcttcgg agagaagcct
 tggaaacaca atgaactcaa gatcaaggat gagaagaccc ttctcttcgg tgagaagcca

 281 gtcactgttt tcggcatcag gaaccctgag gatatgcccc tggggtgagg ctggagctga
 gtcactgttt tcggcatcag gaaccctgag gatat-cccc tggggtgagg ccggagctga
 gtcactgttt tcggcatcag gaaccctgag gatat-cccc tgggcccagg ctggagctga

 341 ctttggggtt gagtctactg gtgtcttcac cgacaaggac aaggctgctg ctcacttgaa
 ctttgtttgt gagtctactg gtgtcttcac tgacaaggac aaggctgctg ctcacttgaa
 ctacgtttgt gagtctactg gtgtcttcac tgacaaggac aaggctgca g ctcacttgaa

 401 gggtgggtgcg aagaaagtgt tcatctctgc accaagcaaa gatgctccca tgttcgttgt
 gggtgggtgcc aagaaagtgt tcatctctgc accaagcaaa gatgctccca tgttcgttgt
 gggtgggtgcc aagaaagtgt ttatctctga acccagcaaa gacgctccaa tgttcgttgt

 461 tgggtgtcaat gagcatgagt acaagtctga tctcaacatt gttccaacg ctagt-gcac
 tgggtgtcaat gagcatgagt acaagtctga tctcaacatt gttccaacg ctagtgcac
 tgggtgtcaac gagcacgaat acaagtccga ccttgacatt gtccaacg ctagtgcac

图 3B

621 cactaaactgc cttgctccac ttgccaagggt tatcancgac aggtttggaa ttgtcgagggg
cactaaactgc cttgctccac ttgccaagggt tatcaacgac aggtttggaa ttgtcgagggg
cactaaactgc cttgctcccc ttgccaagggt tatcaatgac agatttgaa ttgttgagggg

681 actcatgacc accgtccact ctatcactgc aactcagaag acagttgatg gtccatcaat
actcatgact actgtccact ctatcactgc tactcagaag acagttgatg gtccatcaat
tcttatgact acagtccact caatcactgc tactcagaag actgttgatg ggccttcaat

741 gaaggactgg agaggtggaa gagccgcttc cttcaacatc attcccagca gcaccggagc
gaaggactgg agaggtggaa gagccgcttc cttcaacatc attcccagca gcaccggagc
gaaggactgg agaggtggaa gagctgcttc attcaacatt attcccagca gcaactggagc

801 tgccaaggct gtcggaaaagg ttcttccaca gctc--aacg gaaagctgac cggtatgtcc
tgccaaggct gtcggaaaagg tgcttccaca gctc--aatg gaaaattgac cggaatgtcc
tgccaaggct gtcggaaaagg tgcttcca- - gctcttaacg gaaagttgac tggaatgtct

861 ttccgtgttc ccaccgttga tgtttcagtt gttga-ctca cggttagact cgagaaagct
ttccgtgttc ccaccgttga tgtttcagtt gtcgacctca cggttagact cgagaaagct
ttccgtgttc caaccgttga tgtctcagtt gttgacctta ctgtcagact cgagaaagct

图 3C

```

921  gcaacctacg atgaaatcaa gaaggctatc aaggaggaat ctgagggcaa gctaaagggg
gcaacctacg atgaaatcaa gaaggctatc aaggaggaat ctgagggcaa gctaaagggg
gctacctacg aagaaatcaa aaaggctatc aaggaggaat ccgaaggcaa actcaagggg

981  atccttggtt acacagagga tgatgttgct tcaaccgact tcgttggtga caacagggtcg
atccttggtt acacagagga tgatgttgct tcaactgact tcgttggtga caacagggtcg
atccttggtt acaccgagga tgatgttgct tcaactgact tcgttggtga caacagggtcg

1041 agcatttttg acgcaaaggg tggaatcgcg ttgagtgaca actttgtgaa gctggtggtcg
agcatctttg acgccaaagg tggaatcgca ttgagtgaca acttcgtgaa gctggtggtcg
agcatttttg acgccaaagg tggaattgca ttgagcgaca agtttgtgaa attggtgtca

1101 tggtagcaca acgaatgggg ttacagtacc cgtgtggtcg acttgatcat tcacatgtcc
tggtagcaca acgaatgggg ttacagtacc cgtgtggtcg acttgatcat tcacatgtcc
tggtagcaca acgaatgggg ttacagtacc cgtgtggtcg acttgatcgt ccacatgtca

1161 aaggcctaag tcgatga--- --agatctcg agtga--gt aatgg-----
aaggcctaag acgctga--- --agatctac aatga--gt aatgg-----
aaggcctaag --gctaagaa gcagatctcg aatgataagg agtggaagt catctgttca

```

图 3D

.


```

1221 ----- tgtttttaa ttgtgtttt tatgaataa attttct-tg ggttttgaa
----- tg-tcttaat ttgtggttt ---cgaataa gatttctttg gg-----
tcccccttta tggcttgaat ttgtcgtttt ---cgaataa aatttctttg aacttgga-

1281 cctttatgg- -ttttg--- --cgaattct ctactttcac gtgacgtgat aagaagtttg
----- -
-ctttttttt tttttggttt tcttaattct ca---ttcat gtgaggtgat -gggagtttg

1341 tagaccggtt gttttttatt ttactga-- -----
----- -
tagaccg-at g-----t ttactggaa gccctttgtt ttgggctttt gatatttga

1401 ----- -
----- -
gttaacgtta tggttttaa aaaaa

```

图 3E

3000

用 cRF1 探针在 *Brassica napus* 及 Rfp1 基因的分离遗传群体中
 检测到的多态性。可育株具 Rfp1 基因，不育株则无。
 箭头指与育性恢复连锁的多态性限制性片段。

RI=恢复系亲本
 可育株
 不育株

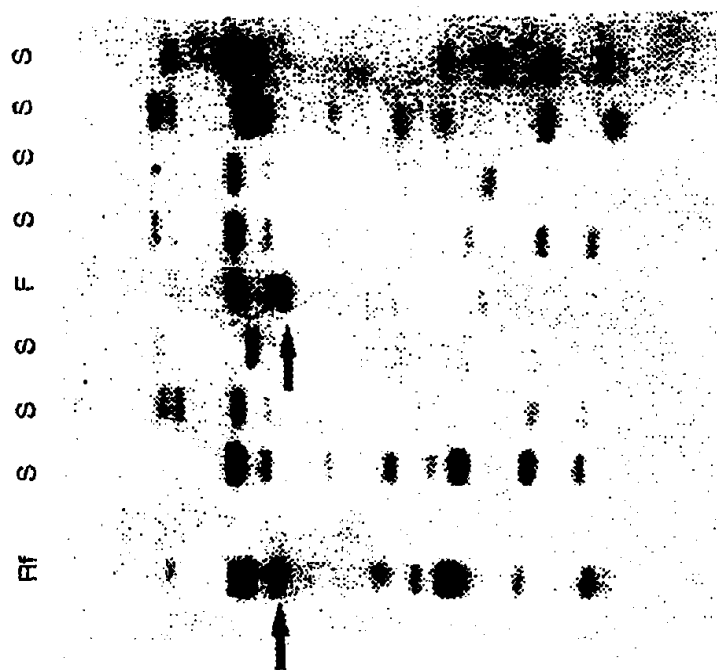


图 4