

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480017657.3

[51] Int. Cl.

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

[45] 授权公告日 2010 年 1 月 27 日

[11] 授权公告号 CN 100584952C

[22] 申请日 2004.6.23

[21] 申请号 200480017657.3

[30] 优先权

[32] 2003.6.23 [33] EP [31] 03076952.5

[86] 国际申请 PCT/EP2004/006888 2004.6.23

[87] 国际公布 WO2004/113542 英 2004.12.29

[85] 进入国家阶段日期 2005.12.23

[73] 专利权人 拜尔生物科学公司

地址 比利时根特

共同专利权人 加利福尼亚大学董事会

[72] 发明人 G·万卡尼特 M·亚诺夫斯基
S·肯皮恩

[56] 参考文献

CN1401002A 2003.3.5

WO9900502A 1999.1.7

Podshatter resistance; exploitation of Arabidopsis genes to develop a productivity trait in oilseed rape. Vancanneyt G. et al. XIII International Conference on Arabidopsis Research. 2002

审查员 于娜

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 隗永良

权利要求书 3 页 说明书 35 页 附图 1 页

[54] 发明名称

延迟植物中种子落粒的方法和手段

[57] 摘要

本发明涉及用于在植物例如十字花科植物中调节果实开裂特性的方法和组合物，特别涉及用于在十字花科植物尤其是为产油而生长的十字花科植物中减少种子落粒至农学上重要的程度的方法和手段。

1. 减少十字花科植物中种子落粒的方法，所述方法包括下列步骤：

(1)产生所述植物的转基因品系群体，其中所述群体的所述转基因品系显示出荚果落粒抗性的变异，其中通过

(i)将嵌合基因导入所述植物的细胞以产生转基因细胞，所述嵌合基因包含下列有效连接的DNA：

(a) 植物可表达的启动子，选自来源于农杆菌菌种的冠瘿碱合成酶启动子、胭脂碱合成酶启动子、章鱼碱合成酶启动子、农杆菌碱合成酶启动子、甘露碱合成酶启动子或者开裂带或裂片边缘选择性启动子；

(b) DNA 区，当其转录时产生双链RNA分子，所述RNA分子包含第一和第二个RNA区，其中

(i)所述第一个RNA区具有SEQ ID No 1的核苷酸27到239的核苷酸序列；SEQ ID No 2的核苷酸31到299的核苷酸序列；SEQ ID No 3的核苷酸30到290的核苷酸序列；SEQ ID No 9的核苷酸258到375的核苷酸序列；或SEQ ID No 9的核苷酸567到762的核苷酸序列；

(ii)所述第二个RNA区具有与所述第一个RNA区互补的核苷酸序列；

(iii)所述第一和第二个RNA区能够在所述第一和第二区之间碱基配对形成双链RNA分子；

(c) 任选地，3'末端区，其包含在所述植物细胞中发挥功能的转录终止和多腺苷酸化信号；

其中所述嵌合基因当在所述十字花科植物的细胞中表达时，与未转化的十字花科植物中的荚果落粒抗性相比增加了荚果落粒抗性，而保持所述植物的所述荚果的农学相关的可脱粒性；

(ii)从所述转基因细胞再生转基因品系得到所述群体和

(2)从所述群体选择荚果落粒抗性植物，其中所述植物具有表现种子落粒减少的荚果。

2. 权利要求 1 的方法, 其中所述十字花科植物是油籽油菜。

3. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中所述农学相关的可脱粒性对应于在随机碰撞试验中 10 到 60 秒的荚果半寿期。

4. 权利要求 3 的方法, 其中所述农学相关的可脱粒性对应于在随机碰撞试验中 40 到 60 秒的荚果半寿期。

5. 减少油籽油菜植物中种子落粒的方法, 所述方法包括下列步骤:

(1) 产生所述油籽油菜植物的转基因品系群体, 其中所述群体的所述转基因品系显示出荚果落粒抗性的变异, 其中通过

(i) 将嵌合基因导入所述油籽油菜植物的细胞以产生转基因细胞, 所述嵌合基因包含下列有效连接的 DNA:

(a) CaMV 35S 启动子;

(b) DNA 区, 当其转录时产生双链 RNA 分子, 所述 RNA 分子包含第一和第二个 RNA 区, 其中

(i) 所述第一个 RNA 区具有 SEQ ID No 1 的核苷酸 27 到 239 的核苷酸序列; SEQ ID No 9 的核苷酸 258 到 375 的核苷酸序列; 或 SEQ ID No 9 的核苷酸 567 到 762 的核苷酸序列;

(ii) 所述第二个 RNA 区具有与所述第一个 RNA 区互补的核苷酸序列;

(iii) 所述第一和第二个 RNA 区能够在所述第一和第二区之间碱基配对形成双链 RNA 分子;

(c) 3'末端区, 其包含在所述植物细胞中发挥功能的转录终止和多腺苷酸化信号;

其中所述嵌合基因当在所述油籽油菜植物的细胞中表达时, 与未转化的油籽油菜植物中的荚果落粒抗性相比增加了荚果落粒抗性, 而保持所述植物的所述荚果的农学相关的可脱粒性;

(ii) 从所述转基因细胞再生转基因品系得到所述群体和

(2) 从所述群体选择荚果落粒抗性植物, 其中所述植物具有表现种子

落粒减少的荚果。

6. 权利要求 5 的方法，其中所述农学相关的可脱粒性对应于在随机碰撞试验中 10 到 60 秒的荚果半寿期。

7. 权利要求 6 的方法，其中所述农学相关的可脱粒性对应于在随机碰撞试验中 40 到 60 秒的荚果半寿期。

8. 嵌合基因，其如权利要求 1 至 7 中任一项描述。

9. 十字花科植物的细胞，其包含根据权利要求 8 的嵌合基因。

10. 农业方法，其包括

(i) 在田间播种包含权利要求 8 的嵌合基因的十字花科植物的种子或种植包含权利要求 8 的嵌合基因的十字花科植物；

(ii) 培育所述植物直至荚果成熟；

(iii) 通过用联合收割机脱粒从所述荚果收获种子。

11. 权利要求 10 的农业方法，其中所述十字花科植物为油籽油菜植物。

延迟植物中种子落粒的方法和手段

发明领域

本发明涉及植物遗传工程。特别地，本发明涉及用于调节植物特别是十字花科（*Brassicaceae*）植物中果实开裂特征的方法和组合物，特别涉及用于在植物，例如十字花科植物，特别是种植用于油料生产的十字花科植物中减少种子落粒或在收获前减少种子落粒至农学上重要的程度的改进方法和手段。

背景

来自十字花科植物长角果或荚果通过称为开裂的过程释放其种子。长角果由两片边缘相连的心皮构成。两个边界之间的缝形成了厚棱，称作胎座框。当荚果接近成熟时，两个裂片从胎座框沿着指定的荚果上的薄弱线逐渐分开，最后导致附着在胎座框上的种子落粒。开裂带确定了裂片分离的确切位置。

在作物收获前或期间，成熟荚果的种子脱落（也称种“种子脱粒”、“荚果脱粒”）是发育干裂果的作物的普遍现象。早熟种子脱落导致减少的种子回收，代表了在主要为获得种子的作物例如生产油料的十字花科植物特别是油籽油菜中的问题。另一个涉及早熟种子落粒的问题是在随后的作物年份自生生长的增加。在油籽油菜中，涉及荚果落粒的产量损失通常是为 10 至 28%，但也可高达 50%，这依赖于天气条件。

目前商业油籽油菜变种极其容易落粒。Kadkol 等人[(1986), *Aust. J. Biol.* 34: 79]报道了一种澳大利亚油菜对落粒的抗性增加。在从辐射处理的种子生长的油菜突变体中进一步观察到荚果成熟中的变化[Luczkiewicz (1987), *Proc. 7th Int. Rapeseed Congress* 2: 463]。然而常规的育种方法未曾

成功地给油菜栽培种引入落粒抗性而又不干扰其它所希望的性状，例如早开花期、成熟和黑胫病抗性[Prakash 和 Chopra (1990), *Genetical Research* 56:1]。

通过突变体分析，已经在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中鉴定了几种促进或抑制荚果开裂的基因。这些基因编码假定的 MADS 盒和基本螺旋-环螺旋-突变。SHATTERPROOF1 (SHPI ; 最初称作 AGL1) 和 SHATTERPROOF2 (SHP2 ; 最初称作 AGL5) 的组合突变产生不开裂的长角果 (即，在拟南芥中成熟时保持闭合的长角果) (Liljegren 等人, 2000, *Nature* 404,766-770)。类似地，在拟南芥中 INDEHISCENT 基因 (PCT 公开 WO 01/79517), 以及 ALCATRI1Z (Rajani 等人 2001, *Current Biology* 11,1914-1922) 中突变体干扰了荚果开裂，导致荚果落粒抗性。FRUITFUL (FUL) (SHP 和 IND 的抑制基因) 在拟南芥中组成型表达时也导致不开裂的长角果 (Ferrandiz 等人, 2000, *Science*, 289,436-438)。因此这些转录因子调节裂片包括裂片边缘和开裂带的发育。

也已经鉴定了许多水解酶 (如内聚半乳糖醛酸酶) 的基因，在荚果开裂期，所述基因在来自十字花科植物的荚果的开裂带程序化分裂中起作用 (见，例如，WO 97/13865; Petersen 等人, *Plant. Mol. Biol.*, 1996, 31:517-527)。

分离在经济上重要的十字花科植物例如油籽油菜中对应于 ind、alc 或 shpl-shp2 的突变等位基因是件费力和耗时的的工作。此外，由于油籽油菜中的双二倍性和因此产生的相应基因的功能冗余使这种分离复杂化。

已描述了通过使用基因沉默技术例如反义抑制或共抑制 (WO99/00503; WO01/79517; WO0159122) 可下调 ALC、IND、AGL1 和 AGL5 基因的表达。

Vancanneyt 等人, 2002 (XIII International Conference on Arabidopsis Research, Sevilla, Spain , 6月28日-7月2日; 2002) 报导了来自拟南芥处于 CaMV 35S 启动子控制下的 FUL 在油籽油菜中的表达产生了大量荚果落粒的抗性转化体。这种荚果落粒抗性品系的荚果没有开裂带，并且只能通过施加相当大的压力随机地破碎裂片才能打开所述荚果。

Vancanneyt 等人, 2002 (XIII International Conference on Arabidopsis Research, Sevilla, Spain, 6 月 28 日-7 月 2 日; 2002)还报导了通过使用所称作的 dsRNA 沉默技术沉默拟南芥中 IND 基因产生几乎完全荚果落粒抗性。98%的所述转基因拟南芥品系发育出不会沿着裂片缝打开和只能通过对所述裂片施加相当压力的才能打开的长荚果。

此外, 描述于本申请(参见下文)的实验表明使用 dsRNA 基因沉默技术在欧洲油菜 (*Brassica napus*) 中沉默 IND 基因产生了具有在标准化的随机碰撞试验中只能通过裂片随机破裂打开的荚果的荚果脱粒抗性品系, 其中所述 dsRNA 序列与欧洲油菜的 IND 一种同源物的序列相同。

认识到尽管种子落粒在油籽油菜栽培中构成重要问题时, 仍要求从荚果中分离种子是很重要的, 其中所述问题可以通过培育荚果落粒抗性品系解决。在正常农业实践中, 通过联合收割机对荚果脱粒可实现这个目的。通过联合收割机对荚果进行脱粒必须完全和必须使对所释放的种子的损伤减小到最小。然而, 随着荚果强度增加, 对其进行脱粒所要求的更强的作用力对种子产生了不可接受的破坏。因此荚果落粒抗性十字花科植物的荚果不应当太强以至其不能在联合收割机中进行脱粒(Bruce 等人 2001, *J. Agric. Engng Res.*:80,343-350)。

因此本领域在提供用于减少在十字花科植物特别是在油籽油菜中种子落粒而保留足够的脱粒能力的方法和手段中仍有缺陷。

如通过本发明简述、详述和权利要求中描述的多种实施方案所表明的, 通过本发明可实现这些和其它目标。

发明简述

在本发明的一个实施方案中, 提供了用于减少植物, 优选地十字花科植物(例如油籽油菜植物)中种子落粒的方法, 包括步骤:

-产生植物, 优选地十字花科植物的转基因品系群体, 其中所述群体的转基因品系在荚果落粒抗性上表现出变异, 并且其中所述群体可通过下列方式获得:

-向植物，优选十字花科植物的细胞中导入嵌合基因以产生转基因细胞，所述嵌合基因包含下列有效地连接的 DNA 片段：

-植物可表达的启动子；

-DNA 区，其转录时产生能够减少植物，优选十字花科植物的内源基因表达的双链 RNA 分子，所述基因涉及植物，优选十字花科植物的荚果开裂带和裂片边缘的发育，此类基因选自来自拟南芥的 INDEHISCENT 基因、来自拟南芥的 ALCATRAZ 基因、来自拟南芥的 SHATTERPROOF1 基因、来自拟南芥的 SHATTERPROOF2 基因或存在于十字花科植物中的其同源基因，并且所述 RNA 分子包含第一和第二个 RNA 区，其中

(i) 第一个 RNA 区包含与涉及荚果开裂带和裂片边缘发育的内源基因的核苷酸序列具有约 94% 序列同一性的至少 19 个连续核苷酸的核苷酸序列；

(ii) 第二个 RNA 区包含与第一个 RNA 区的所述 19 个连续核苷酸互补的核苷酸序列；

(iii) 第一和第二个 RNA 区能够在第一和第二区的至少所述 19 个连续核苷酸之间碱基配对形成双链 RNA 分子；

(b) 3'末端区包含在所述植物细胞中发挥功能的转录终止和多腺苷酸化信号。

其中所述嵌合基因，当在植物，优选十字花科植物的细胞中表达时，与未转化的植物，优选未转化的十字花科植物中的荚果脱粒抗性相比增加了荚果脱粒抗性，同时保持了所述植物荚果的农学上相关的可脱粒性；

-从所述转基因细胞再生转基因品系；和

-从所述群体中选择荚果落粒抗性植物，其中所述植物具有表现延迟的种子落粒的荚果。

农学上相关的可脱粒性优选地对应于随机碰撞试验中 10 到 60 秒、优

选地 40 到 60 秒的荚果半寿期。

在本发明的实施方案中，所述植物可表达启动子可以是相对较弱的植物可表达启动子，例如来自农杆菌 (*Agrobacterium* spp.) 的冠瘿碱合成酶启动子、章鱼碱合成酶启动子、农杆糖酯合成酶启动子或甘露碱合成酶启动子或开裂带或裂片边缘选择性启动子，并且所述正义和反义 RNA 区可包含约 19 至约 500 个连续核苷酸的核苷酸序列，其与所述内源基因核苷酸序列具有约 90% 至约 100% 的序列相似性。

在本发明的另一个实施方案中，第一个 RNA 区可包含具有与所述内源基因约 50% 至约 88%，优选地约 65% 至约 75% 的序列同一性的约 50 至约 500 个连续核苷酸的序列；所述第二个 RNA 可包含具有与第一个 RNA 区的核苷酸序列的互补序列约 90 至约 100% 的序列相似性的核苷酸序列；并且第一和第二个 RNA 区能够形成双链 RNA 区。

在本发明的另一具实施方案中，十字花科植物可以是油籽油菜植物；所述第一个 RNA 区可包含含有至少 19 个连续核苷酸的核苷酸序列，所述连续核苷酸来自涉及荚果的开裂带和裂片边缘发育的第二种基因的核苷酸序列，所述第二种基因是不同于油籽油菜的十字花科植物的内源基因，例如所述第二种基因是选自来源于拟南芥的 INDEHISCENT 基因、来源于拟南芥的 ALCATRAZ 基因、来源于拟南芥的 SHATTERPROOF1 基因、来源于拟南芥的 SHATTERPROOF2 基因；所述第二个 RNA 包含与所述第一个 RNA 区的核苷酸序列的互补序列具有约 90% 至约 100% 序列相似性的核苷酸序列。

在本发明的另一个实施方案中，提供了用于减少油籽油菜植物中种子落粒的方法，其包括下列步骤：

(2) 产生所述油籽油菜植物的转基因品系群体，其中所述转基因品系群体在荚果落粒抗性上表现出变异，其中所述群体通过下列步骤获得：

(i) 将嵌合型基因导入所述油籽油菜植物的细胞以产生转基因细胞，所述嵌合基因包含下列有效连接的 DNA：

(a) 植物可表达启动子;

(b) DNA 区, 其转录时产生可减少油籽油菜植物内源基因的表达, 所述基因涉及所述油籽油菜植物荚果的开裂带和裂片边缘的发育, 例如所述基因选自来源于拟南芥的 INDEHISCENT 基因、来源于拟南芥的 ALCATRAZ 基因、来源于拟南芥的 SHATTERPROOF1 基因、来源于拟南芥的 SHATTERPROOF2 基因, 并且所述 RNA 分子包含第一和第二个 RNA 区, 其中

(i) 所述第一个 RNA 区包含至少 50 个连续核苷酸的核苷酸序列, 其与来源于拟南芥的基因的核苷酸序列具有至少约 90% 序列同一性, 所述基因涉及荚果的开裂带和裂片边缘发育;

(ii) 所述第二个 RNA 区包含与所述第一个 RNA 区的 50 个连续核苷酸互补的核苷酸序列;

(iii) 所述第一和第二个 RNA 区能够碱基配对以在第一和第二个区之间形成至少 50 个连续核苷酸的双链 RNA 分子。

(c) 3' 区, 所述 3' 区包含在所述植物细胞中发挥功能的转录终止和多腺苷酸化信号;

(ii) 从转基因细胞再生转基因品系; 和

(3) 从所述群体中选择荚果落粒抗性基因, 其中所述植物具有表现减少的种子落粒性的荚果。

本发明还涉及根据本发明的嵌合基因以及这样的嵌合基因的十字花科植物的细胞和其种子和后代, 和可通过本发明的方法获得的十字花科植物。

本发明的另一个目的是提供分离的 DNA 片段, 所述分离的 DNA 片段包含来自 SEQ ID No 2 或 SEQ ID No 3 的核苷酸序列和获自十字花科植物的分离 DNA 片段, 其在严紧条件下与包含 SEQ ID No 2 或 SEQ ID No 3 的核苷酸序列的 DNA 片段杂交。本发明还涉及这种分离的 DNA 片段的用

途，用于在十字花科植物例如油籽油菜中减少种子落粒或增加荚果落粒抗性。

本发明还提供了包含下列步骤的农业方法：

- (i) 在田中播种根据本发明的种子或种植根据本发明的植物；
- (ii) 培育所述植物直至荚果成熟；
- (iii) 通过用联合收割机脱粒从荚果收获种子。

附图简述

图 1: 来自 AT-IND、BN1-IND 和 BN2-IND 的可读框的 5'末端的比对。

本发明的不同实施方案详述

本发明基于意外的观察：涉及十字花科植物特别是油籽油菜植物中荚果的开裂带和裂片边缘的发育的基因的适度 dsRNA 基因沉默允许分离转基因品系，其具有增加的荚果落粒抗性和减少的种子落粒，然而通过施加有限的物理力量仍能沿着开裂带打开所述品系的荚果。这与例如本领域中所描述的转基因十字花科植物相反，在所述十字花科植物中 dsRNA 沉默更加显著，这造成具有不裂的荚果的转基因品系，所述荚果不再能够沿开裂带开裂，并且只有在施加显著的物理力量通过荚果的随机破裂才能打开，其中所述种子仍主要保留在荚果残骸中。

通过例如将编码 dsRNA 的 DNA 区有效连接相对较弱的启动子区或通过例如选择编码 dsRNA 的 DNA 区的互补的有义和反义部分之间的序列同一性低于 90%和优选地在约 60%至 80%范围内，可方便地实现基因的适度 dsRNA 基因沉默。

不意在将本发明限定于具体作用方式，认为在这些实例中涉及开裂带和裂片边缘发育的内源基因表达水平的沉默是不完全的，从而在本发明的所述基因沉默性嵌合基因存在下，所述内源基因的表达为约 5%至约 20%，特别在本发明的所述基因沉默性嵌合基因存在下内源基因的表达为约

10%。

因此，在本发明的一个实施方案中，提供了通过产生十字花科植物的转基因品系群体减少十字花科植物中种子落粒的方法，其中所述群体的所述转基因品系在荚果落粒抗性上表现变异。通过将嵌合基因导入十字花科植物的细胞以产生转基因细胞可获得该群体，其中所述嵌合基因包含有效连接至 DNA 区的植物可表达启动子和 3'末端，所述 DNA 区转录时产生能够减少十字花科植物中涉及所述十字花科植物荚果的开裂带和裂片边缘的发育的内源基因表达的双链 RNA 分子，所述 3'末端包含在十字花科植物的细胞中发挥功能的转录终止和多腺苷酸化信号。所述 RNA 分子包含第一个（有义）RNA 区和第二个（反义）RNA 区，其中

- 所述第一个 RNA 区包含至少 19 个连续核苷酸的核苷酸序列，其与所述内源基因的核苷酸序列具有约 94%的序列同一性；

- 所述第二个 RNA 区包含与所述第一个 RNA 区的至少 19 个连续核苷酸互补的核苷酸序列；

- 所述第一和第二个 RNA 区能够碱基配对从而在所述第一和第二个区的至少 19 个连续核苷酸之间形成双链 RNA 分子。

相对于未转化的十字花科植物的荚果落粒抗性，在十字花科植物中所述嵌合基因的表达增加了荚果落粒抗性，然而保持了荚果农学上相关的可脱粒性。在从包含本发明的嵌合基因的转基因细胞再生转基因品系后，可从所产生的群体中选择荚果脱粒抗性植物。

如此处所用的，涉及荚果开裂带和裂片边缘发育的基因是指这样的基因，当所述基因在植物中单独突变或与其它此类基因组合突变时，导致荚果的发育，其中荚果开裂带和/或缝发育不充分或没有发育。这些基因包括来自拟南芥的 INDEHISCENT 基因、来自拟南芥的 ALCATRAZ 基因、来自拟南芥的 SHATTERPROOF1 基因、来自拟南芥的 SHATTERPROOF2 基因或其同源基因。这些基因编码包含 MADS 盒或基本螺旋-环-螺旋结构域的蛋白质并据认为是转录激活因子。

可在数据库中发现这些基因的核苷酸序列或其部分并且这些序列具有

下列检索号：AT-SHP1 (M55553; AV557878 ;AV556852); AT-SHP2 (M55550 ; BG459390): AT-IND (AX320925); 来自芜菁 (*Brassica rapa*) Pekinenis 亚种的 AT-IND 的同源物 (AT002234);AT ALC (AX211753; AX211755 ; AX211760)。所有这些核苷酸序列此处引用作为参考。

通过本领域公知的方法可从其它十字花科植物特别是从其它油籽油菜植物、亚种或变种中分离包含上述核苷酸序列的变体序列的 DNA 片段。这些方法包括在严紧条件下将来源于此类其它植物、亚种或变种的基因组或 cDNA 文库与由上面提到的基因的任一种的所有或部分组成的探针杂交。

通过例如使用合适的寡核苷酸对，使用聚合酶链反应扩增可鉴定和分离涉及开裂带和裂片边缘发育的基因的这类变体或其合适部分，所述寡核苷酸具有上述涉及英果的开裂带和裂片边缘发育的基因的核苷酸序列的至少约 16 个连续核苷酸，特别地至少约 50 个连续核苷酸，更特别地至少约 100 个连续核苷酸。优选地，所述寡核苷酸序列来源于涉及十字花科植物英果的开裂带和裂片边缘发育的基因的核苷酸序列的部分，所述部分与编码常见蛋白质基序例如 MADS 盒或 K 区或基本螺旋-环-螺旋区的这些基因的部分不同。涉及十字花科植物英果的开裂带和裂片边缘发育的基因的 PCR 扩增序列的实例是具有 SEQ ID No 2 或 SEQ ID No 3 的序列的 DNA 分子。用于扩增涉及十字花科植物英果的开裂带和裂片边缘发育的基因部分的合适的寡核苷酸引物的核苷酸序列的实例以 SEQ ID No 4 到 SEQ ID No 8 代表。

如此处所用的“严紧杂交条件”是指在探针和靶序列之间存在至少 95%和优选地至少 97%的序列同一性时杂交通常会发生的条件。严紧杂交条件的实例为：在含有 50% 甲酰胺、 5 x SSC (150 mM NaCl,15 mM 柠檬酸三钠)、 50 mM 磷酸钠(pH 7.6)、 5x Denhardt's 溶液,10% 硫酸葡聚糖和 20µg/ml 变性的经剪切的载体 DNA 例如鲑精 DNA 的溶液中温育过夜，然后在约 65℃下用 0.1 x SSC 清洗杂交支持体。其它杂交和清洗条件是熟知的并于 Sambrook 等人 Molecular Cloning: A Laboratory Manual,

第二版,Cold Spring Harbor,NY (1989),特别是第 11 章中给出示例。

如此所用的,“十字花科植物的内源基因”是指天然地发生于十字花科的种中的基因,所述基因被选择用于调节荚果落粒抗性。

如此处所用的,“农学相关的脱粒性”是指当施加允许荚果完全打开同时防止破坏种子的物理力,例如联合收割机中所用力时,荚果,特别是油籽油菜荚果对沿着荚果开裂带开裂同时释放种子的抗性。已发现在随机碰撞试验(RITs)中荚果的半寿期与其可脱粒性具有良好相关性。在 Bruce 等人,2001 (J. Agric. Engng Res. 80,343-350) 和 Morgan 等人,1988 (Fields Crop Research 58,153-165) 已描述了随机碰撞试验和确定在此类 RITs 中荚果的半寿期的算法。两篇文献在此引用作为参考。简而言之,将未成熟荚果的样品放入带有钢球的封闭的鼓室中,然后以不断增加的时间周期(例如 5s、10s、20s、40s)猛烈搅动鼓。每个周期过后,将鼓打开和技术裂开和受损的荚果数。通过将所有可获得的数据拟合线性 x 线性曲线并估计样品中一半荚果破碎所用时间(“荚果落粒半寿期”)来计算对各品系落粒抗性水平最精确的估计。然而重要的是荚果主要沿着开裂带开裂,而不是如不裂荚果那样简单地被粉碎。如在 RIT 中所确定的,对应于农学相关脱粒性的油籽油菜的荚果落粒半寿期不应当超过 60 秒。商业可购得的油籽油菜变种对照系的典型值是约 10 秒。因此,具有改善的荚果落粒抗性并且具有农学相关可脱粒性的品系在 RIT 中的荚果落粒半寿期为约 10 到约 60 秒、优选地约 20 到约 60 秒、特别优选地约 40 秒到约 60 秒。

在本发明方法的特定实施方案中,通过使用相对弱的植物可表达启动子可实现适度基因沉默。

如此处所使用的,术语“启动子”是指在转录起始期间由 DNA 依赖性 RNA 聚合酶识别和(直接和间接)结合的任意 DNA。启动子包括转录起始位点和用于转录超始因子和 RNA 聚合酶的结合位点,并且可包含基因表达调节蛋白可结合的多种其它位点(例如,增强子)。

如此处所用的,术语“调节区”指涉及驱动转录和控制(即调节)给定的 DNA 序列,例如编码蛋白或多肽的 DNA 转录的计时和水平的任意

DNA。例如，5'调节区（或“启动子区”）是位于编码序列的上游（即5'）的DNA序列并且所述DNA序列包含启动子和5'未翻译的前导序列。3'调节区是位于编码序列的下游（即3'）的序列并且所述调节区包含合适的转录终止和/或调节信号，包括一个或多个多腺苷酸化信号。

如此处所用的，术语“植物可表达启动子”是指能够在植物细胞中控制（启动）转录的DNA序列。其不仅包括植物来源的任意启动子，还包括能够在植物细胞中指导转录的非植物来源的任意启动子，即某些病毒或细菌来源的启动子，例如CaMV35S(Hapster等人1988,Mol. Gen. Genet. 212,182-190)、地三叶(subterranean clover)病毒启动子No 4或No 7(W09606932)或T-DNA基因启动子。

如此所用的，“相对弱的植物可表达启动子”是指启动和控制有效连接的DNA片段的转录的效率为最优CaMV35S启动子的效率约1/10至约1/100的启动子。相对弱的植物可表达启动子包括来自农杆菌(*Agrobacterium* spp.)的冠瘿碱合成酶基因的启动子或启动子区，例如胭脂碱合成酶的启动子或启动子区、章鱼碱合成酶的启动子或启动子区、甘露碱合成酶的启动子或启动子区、农杆菌碱合成酶的启动子或启动子区和任意在转录起始中具相当活性的植物可表达启动子。其它相对较弱的植物可表达启动子可以是开裂带选择性启动子或主要或选择性地在十字花科荚果特别是油籽油菜荚果的开裂带和/或裂片边缘中表达的启动子，例如描述于W097/13865的启动子。

在本发明的实施方案中，所述嵌合基因可包含编码dsRNA的转录DNA区，其中所述有义和反义RNA区包含与十字花科植物的内源基因（或其互补序列）具有高度序列同一性的核苷酸序列，所述内源基因使得所述十字花科植物的荚果更具抗性。因此，有义和反义RNA区可包含与所述十字花科植物的内源基因或其具有互补序列具有约90%至约100%的序列同一性的至少50、100、200、500个或更多个连续的核苷酸。

对于本发明，表示为百分比的两个相关核苷酸或氨基酸序列的“序列同一性”是指在两个最优比对的序列中具有相同残基的位置数(x100)除以所

比较的位置数。缺口，即在比对中被认为是不具有同一残基的位置，在所述位置上出现在一个序列上的残基在另一个序列中不存在。根据 Needleman 和 Wunsch 算法(Needleman 和 Wunsch 1970)通过计算机辅助的序列比对进行两个序列的比对，通过使用例如 GAP，用默认得分矩阵，以缺口产生罚分为 50 和缺口延伸罚分为 3 可方便地进行两个序列的比对，所述 GAP 是 Wisconsin Package 10.1 版本 (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA) 的部分。

很清楚无论何时通过参考对应的 DNA 分子的核苷酸序列来确定 RNA 分子的核苷酸序列，核苷酸序列中的胸腺嘧啶 (T) 都应当被尿嘧啶 (U) 代替。根据本申请的上下文可清楚地判断参照 RNA 还是 DNA。

在本发明的另一个实施方案中，通过使用第一和第二个 RNA 区可获得适度基因沉默，所述 RNA 区与涉及莢果的开裂带和裂片边缘发育的内源基因、或其部分、或其互补序列具有约 60 至约 88% 的序列同一性，优选约 60 至约 75% 的序列同一性。所述有义和反义 RNA 区可以是至少 50、100、200、500 个或更多个核苷酸。

通过用于实施例的嵌合基因的来源于拟南芥的 IND 的序列的有义 RNA 区 (或反义区的互补序列) 和欧洲油菜 IND 基因核苷酸序列的相应区的比对观察到不止存在一个 21 个连续核苷酸的亚区，所述亚区在每个欧洲油菜序列和拟南芥序列之间是相同的或只有一个错配 (参见图 2)。然而，所述序列具有只有一个错配 (即具有约 94% 的同一性的序列) 的 19 个连续核苷酸的数个亚序列。尽管不意在将本发明限定在特定的实施方案中，但认为在所述 dsRNA 分子和内源基因之间 21 个核苷酸的核苷酸序列“字符”的缺少可在基因沉默的节制方面起着重要作用，因为通常预期这 21 聚体在启动和维持 dsRNA 介导的转录后沉默上起着重要作用。

对于油籽油菜植物，通过使用编码 dsRNA 分子的嵌合基因可方便地实现适度基因沉默应答，其中所述有义和反义区包含与至少 19 个连续核苷酸的核苷酸序列具有约 90% 或 95% 的序列同一性，尤其相同的核苷酸序列，其中所述至少 19 个连续核苷酸的核苷酸序列来源于拟南芥中涉及长角

果的开裂带和裂片边缘发育的基因。然而,所述核苷酸序列可长于 19 个核苷酸并且长度可以是 50、100、200、500 个或甚至更多个核苷酸。

在本发明的特定实施方案中,通过使用编码 dsRNA 分子的嵌合基因可在油籽油菜中实现减少的种子落粒,其中所述有义和反应区对应于拟南芥 IND 基因的从核苷酸+12 至+223(相对于拟南芥 IND 基因的 ATG 起始密码子)的核苷酸序列或其互补序列,即从 SEQ ID No 1 中 27 位核苷酸至 237 位核苷酸。

根据 WO 99/53050 (此处引用作为参考)的公开内容,本发明的编码 dsRNA 的嵌合基因可包含位于有义和反义 RNA 区之间的间隔序列中的异源内含子。

本发明还提供了包含 SEQ ID No 2 或 SEQ ID No 3 的核苷酸序列的新的分离的 DNA 片段以及其用途,用于调节或增加植物,例如十字花科植物,特别是油籽油菜植物中英果落粒抗性。

除了欧洲油菜以外,根据本发明处理的优选的十字花科植物包括芥菜 (*Brassica juncea*)、甘蓝(*Brassica oleraceae*)、*Brassica carinata*、*Brassica nigra*、芸苔(*Brassica campestris*)等和其任意基因间杂交品系或合成品系。可通过本发明方法处理的其它十字花科植物包括 *Brassica cretica* (芥菜)、*Brassica elongata* (长芥菜)、塌棵菜(*Brassica narinosa*) (broadbeaked mustard)、*Brassica nigra* (黑芥菜)、芜菁(*Brassica rapa*) (田野芥菜)、*Brassica rapistris* (芥菜)、*Brassica tournefortii* (亚洲芥菜)。欧洲油菜 (2n=38,基因组 AACC)是来源于芜菁(同义词:芸苔; 2n=2Q,AA) 和甘蓝 (2n=18,CC) 自然杂交的双二倍体品系。欧洲油菜包含这两个二倍体基因的全套染色体。

如此处所用的“来自十字花科的植物”或“十字花科植物”是指根据目前植物学标准被分类到十字花科(以前为 *Cruciferaeae*)的植物。十字花科(Mustard)成员很容易区分。它们是一年生或多年生植物,具有无托叶的互生叶并且具有简单的花序或分枝总状花序。花双侧对称和下位的。除了少数例外,花具有与 4 个萼片(自由的)互生的 4 个花瓣(自由的); 6 个

雄蕊(4个长的和2个短的)、具有部分胎座的2个单生心皮构成的子房、通过形成膜状假隔膜产生的2个小室;果实是通过2个裂片打开的开裂蒴果。十字花科包括下列属:大蒜芥属(*Sisymbrium*)、*Descurania*、葱芥属(*Alliaria*)、拟南芥属(*Arabidopsis*)、*Myagrurn*、*Isatis*、匙芥属(*Bunia*)、*Erysium*、香花芥属(*Hesperis*)、涩芥属(*Malcolmia*)、紫罗兰属(*Matthiola*)、*Chorispora*、乌头芥属(*Euclidium*)、山芥属(*Barbarea*)、焯菜属(*Rorippa*)、辣根属(*Armoracia*)、豆瓣菜属(*Nasturtium*)、碎米荠属(*Dentaria*)、碎米荠属(*Cardamine*)、*Cardaminopsis*、南芥属(*Arabis*)、*Lunaria*、庭荠属(*Alyssum*)、团扇芥属(*Berteroa*)、香雪球属(*Lobularia*)、葶苈属(*Draba*)、*Erophila*、岩芥属(*Cochlearia*)、亚麻荠属(*Camelina*)、球果芥属(*Neslia*)、芥属(*Capsella*)、*Hornungia*、*Thlsapi*、屈曲花属(*Iberis*)、独行菜属(*Lepidium*)、群心菜属(*Cardaria*)、臭芥属(*Coronopus*)、*Subularia*、线果芥属(*Conringia*)、二行芥属(*Diploaxis*)、芸苔属(*Brassica*)、白芥属(*Sinapsis*)、芝麻菜属(*Eruca*)、*Erucastrum*、*Coincya*、*Hirschfeldia*、*Cakile*、*Rapistum*、两节芥属(*Crambe*)、*Enarthrocarpus*、*Rhaphanus*和香芥属(*Clausia*)等等。

如此处所用的,“油籽油菜”应当被理解为包括欧洲油菜、芥菜(*Brassica juncea*)和芸苔(*Brassica campestris*)种。

本发明的手段和方法也可用于除了十字花科以外的植物,特别是具有必须通过裂片分开释放种子的果实或荚果的植物。这些包括豆科(*Fabaceae*)成员,例如豌豆、菜豆、大豆等。

提供含有本发明的嵌合基因或RNA分子的植物细胞和植物也是本发明的目的。通过常规育种方法产生的含有本发明的嵌合基因的配子、种子(包括碾碎的种子和种子饼)、合子或体细胞胚、植物的后代或杂种也包括在本发明的范围内。

通过常规的育种技术可将通过此处描述的方法获得的植物进一步与其它植物杂交以获得包含本发明嵌合基因的荚果落粒抗性的后代植物。

下列非限定性的实施例描述了用于在十字花科植物减少种子落粒或调

节果实开裂的嵌合基因的构建, 和包含这类嵌合基因的十字花科植物, 其在农学相关范围内表现出减少的种子落粒。

在实施例中除了另外声明, 所有的重组 DNA 技术都根据标准的实验方法进行, 所述实验方法描述于 Sambrook 等人 (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY 和 Ausubel 等人 (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, USA. 的第 1 和第 2 卷中。用于植物分子工作的标准材料和方法描述于 R. D. D. Croy 的 *Plant Molecular Biology Labfax* (1993), BIOS Scientific Publications Ltd(UK)和 Blackwell Scientific Publications, UK 联合出版。其它标准分子生物学技术的文献包括 Sambrook 和 Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第三版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Brown (1998) *Molecular Biology LabFax*, 第二版, Academic Press (UK) 的第 1 和第 2 卷。用于聚合酶链反应的标准的材料和方法可见 Dieffenbach 和 Dveksler (1995) *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press 和在 McPherson 等人(2000) *PCR-Basics: From Background to Bench*, 第 4 版 Springer Verlag, Germany.

在整个描述和实施例中, 涉及下列序列:

SEQ ID No.1: 拟南芥 INDEHISCENT 基因 (AT-IND) 的核苷酸序列

SEQ ID No.2: 来源于欧洲油菜的 INDEHISCENT 同源物的核苷酸序列 (BN1-IND)

SEQ ID No.3: 来源于欧洲油菜的另一种 INDEHISCENT 同源物的核苷酸序列 (BN2-IND)

SEQ ID No.4: 寡核苷酸 C0109/CO111 的共有核苷酸序列

SEQ ID No.5: 寡核苷酸 CO110/CO112 的共有核苷酸序列

SEQ ID No.6: 寡核苷酸 C0113/CO114 的共有核苷酸序列

SEQ ID No.7: 寡核苷酸 CO115/CO117 的共有核苷酸序列

SEQ ID No.8: 寡核苷酸 CO116/CO118 的共有核苷酸序列

SEQ ID No.9: 拟南芥 SHATTERPROOF 1 基因(AT-SHP1)的核苷酸序列

SEQ ID No.10: 拟南芥 SHATTERPROOF 2 (AT-SHP2)的核苷酸序列

SEQ ID No.11: 拟南芥 ALCATRAZ 基因 (AT-ALC)的核苷酸序列

实施例

实施例 1: 构建编码能够减少涉及开裂带和裂片边缘发育的基因表达的 dsRNA 的嵌合基因和导入植物中

A. 基于 IND 基因序列

通过 PCR 在标准条件下扩增拟南芥的 IND 基因或欧洲油菜的同源基因的 5'末端片段, 在所述 PCR 反应中使用来自拟南芥的基因组 DNA 或从欧洲油菜 PCR 扩增的 DNA 作为模板, 所述从欧洲油菜 PCR 扩增的 DNA 包含 SEQ ID No 2 或 SEQ ID No 3 和下列寡核苷酸的序列:

-对于 At-IND 基因的 5'末端: 包含 SEQ ID No 7 的序列的寡核苷酸和包含 SEQ ID No 8 的序列的寡核苷酸, 在所述寡核苷酸的 5'末端配备合适的限制性酶切位点以允许定向克隆。

-对于 BN1-IND 基因的 5'末端: 包含 SEQ ID No 4 的序列的寡核苷酸和包含 SEQ ID No 6 的序列的寡核苷酸, 在所述寡核苷酸的 5'末端配备合适的限制性酶切位点以允许定向克隆。

-对于 BN2-IND 基因的 5'末端: 包含 SEQ ID No 4 的序列的寡核苷酸和包含 SEQ ID No 5 的序列的寡核苷酸, 在所述寡核苷酸的 5'末端配备合适的限制性酶切位点以允许定向克隆。

来自欧洲油菜的同源基因的扩增 PCR 片段具有约 90% 的序列同一性, 而 At-Ind 基因和各 BN-Ind 间的序列同一性约为 65% (参见图 1)。

使用标准的克隆技术已构建了下列嵌合基因并将其连同合适的选择性标记基因 (植物可表达的 bar 基因) 导入 T-DNA 载体中, 其中所述嵌合基因编码能够降低涉及英果的开裂带和/或裂片边缘发育的基因的表达的 dsRNA。

pTC0219

pTC0219 是在 T-DNA 边界之间包含下列序列的 T-DNA 载体:

1. 包含下列有效连接的 DNA 片段的编码 dsRNA 的嵌合基因 (p35S-dsRNA/AtIND) :
 - p35S:来自花椰菜花叶病毒 35S 的启动子区 (Odell 等人 (1985) Nature 313: 810-812)
 - AtIND^{有义}:相对于拟南芥 Ind1 基因的 ATG 起始密码子从核苷酸 +12 至+223 的 211 bp 片段, 所述片段编码涉及荚果开裂的基本螺旋环螺旋蛋白质 (对应于 SEQ ID No 1 序列上的从 27 位核苷酸至 239 位核苷酸)。该片段按有义方向克隆。
 - Pdk-内含子:来自 *Flaveria trinervia* (Rosche & Westhoff (1995) Plant Molecular Biology 29-4: 663-678)的丙酮酸正磷酸二激酶基因 (称作 pdk 基因) 的第二个内含子的序列。
 - AtIND^{反义}:相对于拟南芥 Ind1 基因的 ATG 起始密码子从核苷酸 +12 至+223 的 211 bp 片段, 所述片段编码涉及荚果开裂的基本螺旋环螺旋蛋白质 (对应于 SEQ ID No 1 序列上的从 27 位核苷酸至 239 位核苷酸)。该片段以反义方向克隆。
 - 3'ocs: 来自章鱼碱合成酶基因的 3'非翻译末端(De Greve 等人 (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:499-512 ; Gielen 等人 (1984) EMBO J. 3: 835-846)。
2. 包含下列有效连接的 DNA 片段的嵌合 bar 基因:
 - pSSuAra:来自拟南芥 rbcS AT51A 基因(Krebbers 等人, 1988, Plant Mol. Biol. 11:745-759)的启动子和前导序列的 1726bp DNA 片段。
 - bar:来自吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) 的 bialaphos 抗性基因的编码序列(Thompson 等人,1987,EMBO 6,2519)。
 - 3'g7: 含有获自 pTiB6S3 上的 TL-DNA 基因的 3'非翻译区的 3'末端形成信号的 211bp DAN 片段(Dhaese 等人, 1983,EMBO 2: 419;

Velten 和 Schell,1985,Nucl. Acids Res.13:6981)。

质粒 pTC0219 来源 pGSV1。基本中间载体 pGSV1 已基本上衍生于 pGSC1700((Cornelissen 和 Vandewiele,1989)和包含下列结构元件:

-包含来源于用于在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中复制的质粒 pBR322 (Bolivar 等人, 1977)的复制起点(pBRori)的质粒核心和包含来自用于在根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 中复制的假单胞菌 (*Pseudomonas*) 质粒 pVS 1 (Itoh 等人, 1984)的复制起点的限制性片段(pVSlori);

-提供用于在大肠杆菌和根癌农杆菌中进行繁殖和选择的抗链霉素和壮观霉素抗性的选择标记基因;

由来自 pTiB6S3 的 TL-DNA 的左边界和右边界序列和多位点接头组成的人工 T-区允许在 T-DNA 边界之间插入 GOI。

pTKC89

pTKC89 是类似于 pTCO219 的 T-DNA 载体, 其中通过标准克隆技术已将 CaMV35S 启动子交换成来自根癌农杆菌的胭脂碱合成酶启动子。

pTCO212

pTCO212 是在 T-DNA 边界之间包含下列序列的 T-DNA 载体:

1. 包含下列有效连接的 DNA 片段的编码 dsRNA 的嵌合基因 (p35S-dsRNA/BN2-IND):

- p35S: 来自花椰菜花叶病毒 35S 的启动子区 (Odell 等人 (1985) Nature 313: 810-812)
- BN2-IND^{有义}: 相对于拟南芥 Ind1 基因的欧洲油菜同源物 (同源物 2) 的 ATG 起始密码子从核苷酸+12 至+273 的 261 bp 片段, 所述片段编码涉及荚果开裂的基本螺旋环螺旋蛋白质 (对应于 SEQ ID No 3 序列上的从 30 位核苷酸至 290 位核苷酸)。该片段按有义方向克隆。
- Pdk-内含子: 来自 *Flaveria trinervia* (Rosche & Westhoff (1995) Plant Molecular Biology 29-4: 663-678)的丙酮酸正磷

酸二激酶基因（称作 *pdk* 基因）的第二个内含子的序列。

- **BN2-IND^{反义}**: 相对于拟南芥 *Ind1* 基因的欧洲油菜同源物（同源物 2）的 ATG 起始密码子从核苷酸+12 至+273 的 261 bp 片段，所述片段编码涉及荚果开裂的基本螺旋环螺旋蛋白质（对应于 SEQ ID No 3 序列上的从 30 位核苷酸至 290 位核苷酸）。该片段以反义方向克隆。
- **3'ocs**: 来自章鱼碱合成酶基因的 3'非翻译末端(De Greve 等人 (1982) *J. Mol. Appl. Genet.* 1:499-512 ; Gielen 等人 (1984) *EMBO J.* 3: 835-846)。

2. 包含下列有效连接的 DNA 片段的嵌合 *bar* 基因:

- **pSSuAra**:来自拟南芥 *rbcS* *ATS1A* 基因(Krebbers 等人, 1988, *Plant Mol. Biol.* 11:745-759)的启动子和前导序列的 1726bp DNA 片段。
- **bar**: 来自吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) 的 *bialaphos* 抗性基因的编码序列(Thompson 等人,1987,*EMBO* 6,2519)。
- **3'g7**: 含有获自 *pTiB6S3* 上的 *TL-DNA* 基因的 3'非翻译区的 3'末端形成信号的 211bp DNA 片段(Dhaese 等人,1983,*EMBO* 2: 419; Velten 和 Schell,1985,*Nucl. Acids Res.*13:6981)。

PTCO212 来源于 *pGVS1*(见上文)。

● **pTCO218**

pTCO218 是在 T-DNA 边界之间包含下列序列的 T-DNA 载体:

1. 包含下列有效连接的 DNA 片段的编码 *dsRNA* 的嵌合基因 (*p35S-dsRNA/BN1-IND*):
 - **p35S**:来自花椰菜花叶病毒 35S 的启动子区 (Odell 等人 (1985) *Nature* 313: 810-812)
 - **BN1-IND^{有义}**:相对于拟南芥 *Ind1* 基因的欧洲油菜同源物（同

源物 1) 的 ATG 起始密码子从核苷酸+12 至+281 的 269 bp 片段, 所述片段编码涉及荚果开裂的基本螺旋环螺旋蛋白质 (对应于 SEQ ID No 2 序列上的从 31 位核苷酸至 299 位核苷酸)。该片段按有义方向克隆。

- Pdk-内含子: 来自 *Flaveria trinervia* (Rosche & Westhoff (1995) *Plant Molecular Biology* 29-4: 663-678) 的丙酮酸正磷酸二激酶基因 (称作 *pdk* 基因) 的第二个内含子的序列。
- BN1-IND^{反义}: 相对于拟南芥 *Ind1* 基因的欧洲油菜同源物 (同源物 2) 的 ATG 起始密码子从核苷酸+12 至+281 的 269 bp 片段, 所述片段编码涉及荚果开裂的基本螺旋环螺旋蛋白质 (对应于 SEQ ID No 2 序列上的从 31 位核苷酸至 299 位核苷酸)。该片段以反义方向克隆。
- 3'ocs: 来自章鱼碱合成酶基因的 3'非翻译末端 (De Greve 等人 (1982) *J. Mol. Appl. Genet.* 1:499-512 ; Gielen 等人 (1984) *EMBO J.* 3: 835-846)。

2. 包含下列有效连接的 DNA 片段的嵌合 *bar* 基因:

- pSSuAra: 来自拟南芥 *rbcS* *ATS1A* 基因 (Krebbers 等人, 1988, *Plant Mol. Biol.* 11:745-759) 的启动子和前导序列的 1726bp DNA 片段。
- *bar*: 来自吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) 的 *bialaphos* 抗性基因的编码序列 (Thompson 等人, 1987, *EMBO* 6,2519)。
- 3'g7: 含有获自 pTiB6S3 上的 TL-DNA 基因的 3'非翻译区的 3'末端形成信号的 211bp DNA 片段 (Dhaese 等人, 1983, *EMBO* 2: 419; Velten 和 Schell, 1985, *Nucl. Acids Res.* 13:6981)。

pTCO218 来源于 pGVS1 (见上文)。

B. 基于 SHP1(SHP2) 基因序列

通过 PCR 已扩增两个分别标记为 AB 和 CD 的来自拟南芥 SHP1 基因的序列区并已将它们用于构建 TDNA 载体, 所述载体含有编码能够降低 SHP 基因表达的嵌合 dsRNA。标记为“AB”的区与 SHP1 具有 100% 的序列同一性, 与 SHP2 具有约 88% 的序列同一性, 而标记为“CD”的区与 SHP1 具有 100% 的序列同一性和与 SHP2 具有约 77% 的序列同一性。

pTCO233

pTCO233 是在 T-DNA 边界之间包含下列序列的 T-DNA 载体:

1. 包含下列有效连接的 DNA 片段的编码 dsRNA 的嵌合基因 (p35S-dsRNA/At-SHP1^{AB}):
 - p35S: 来自花椰菜花叶病毒 35S 的启动子区 (Odell 等人 (1985) Nature 313: 810-812)
 - At-SHP1/AB^{有义}: 拟南芥 SHP1 基因对应于 SEQ ID No 9 的核苷酸序列的第 258 位核苷酸至第 375 位核苷酸的片段。该片段以有义方向克隆。
 - Pdk-内含子: 来自 *Flaveria trinervia* (Rosche & Westhoff (1995) Plant Molecular Biology 29-4: 663-678) 的丙酮酸正磷酸二激酶基因 (称作 pdk 基因) 的第二个内含子的序列。
 - At-SHP1/AB^{反义}: 拟南芥 SHP1 基因对应于 SEQ ID No 9 的核苷酸序列的第 258 位核苷酸至第 375 位核苷酸的片段。该片段以反义方向克隆。
 - 3'ocs: 来自章鱼碱合成酶基因的 3'非翻译末端 (De Greve 等人 (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:499-512 ; Gielen 等人 (1984) EMBO J. 3: 835-846)。
2. 包含下列有效连接的 DNA 片段的嵌合 bar 基因:
 - pSSuAra: 来自拟南芥 rbcS AT5G1A 基因 (Krebbers 等人, 1988, Plant Mol. Biol. 11:745-759) 的启动子和前导序列的 1726bp DNA 片段。

- **bar**: 来自吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) 的 **bialaphos** 抗性基因的编码序列(Thompson 等人,1987,EMBO 6,2519)。
- **3'g7**: 含有获自 pTiB6S3 上的 TL-DNA 基因的 3'非翻译区的 3'末端形成信号的 211bp DNA 片段(Dhaese 等人, 1983,EMBO 2: 419; Velten 和 Schell,1985,Nucl. Acids Res.13:6981)。

pTCO233 来源于 pGVS1(见上文)。

- **pTCO234**

pTCO234 是在 T-DNA 边界之间包含下列序列的 T-DNA 载体:

1. 包含下列有效连接的 DNA 片段的编码 dsRNA 的嵌合基因 (p35S-dsRNA/At-SHP1^{CD}):

- **p35S**:来自花椰菜花叶病毒 35S 的启动子区 (Odell 等人 (1985) Nature 313: 810-812)
- **At-SHP1/CD^{有义}**: 拟南芥 SHP1 基因对应于 SEQ ID No 9 的核苷酸序列的第 567 位核苷酸至第 762 位核苷酸的片段。该片段以有义方向克隆。
- **Pdk-内含子**:来自 *Flaveria trinervia* (Rosche & Westhoff (1995) Plant Molecular Biology 29-4: 663-678)的丙酮酸正磷酸二激酶基因 (称作 **pdk** 基因) 的第二个内含子的序列。
- **At-SHP1/CD^{反义}**: 拟南芥 SHP1 基因对应于 SEQ ID No 9 的核苷酸序列的第 567 位核苷酸至第 762 位核苷酸的片段。该片段以反义方向克隆。
- **3'ocs**: 来自章鱼碱合成酶基因的 3'非翻译末端(De Greve 等人 (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:499-512 ; Gielen 等人 (1984) EMBO J. 3: 835-846)。

2. 包含下列有效连接的 DNA 片段的嵌合 **bar** 基因:

- **pSSuAra**:来自拟南芥 **rbcS** **ATS1A** 基因(Krebbers 等人, 1988,

Plant Mol. Biol. 11:745-759)的启动子和前导序列的 1726bp DNA 片段。

- bar:来自吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)的 bialaphos 抗性基因的编码序列(Thompson 等人,1987,EMBO 6,2519)。
- 3'g7: 含有获自 pTiB6S3 上的 TL-DNA 基因的 3'非翻译区的 3'末端形成信号的 211bp DAN 片段(Dhaese 等人, 1983,EMBO 2: 419; Velten 和 Schell,1985,Nucl. Acids Res.13:6981)。

pTCO234 来源于 pGVS1(见上文)。

将上述 T-DNA 载体导入农杆菌 pGV4000。该宿主株系是将 pTiC58 导入 C58 得到的抗利福平衍生株系(C58ClRifR) (Van Larebeke 等人,1974)。非致癌接纳体 Ti 质粒(pGV4000)来源于胭脂碱 Ti 质粒 pTiC58。来自 pTiC58 的整个 T-DNA 区已被替代从而产生 pMP90(Koncz 和 Schell,1986)。如 Deblaere 等人, 1985 所描述的, 通过导入氯霉素抗性基因已从 pMP90 中衍生出质粒 pGV4000。

根据花浸透法(Bechtold 等人 1993.,C. R. Acad. Sci. Paris,Sciences de la vie/Life Sciences,316,1194-1199)将所获得的农杆菌株系用于转化拟南芥植物或根据下胚轴外植体接种方法(基本如 De Block 等人的 1989,Plant Physio,91: 64 或 WO00/04173 中所描述的)转化欧洲油菜植物。使用来源于 N90-740 的单倍体加倍系进行所有的欧洲油菜转化。

实施例 2: 包含实施例 1 的嵌合基因的转基因拟南芥品系和欧洲油菜品系的分析。

A. 转基因拟南芥品系

通过使用实施例 1 中所有的 T-DNA 载体转化获得转基因拟南芥品系。就荚果落粒抗性对所获得的品系进行分析。来自未转化野生型拟南芥品系的荚果在成熟时自动开裂。相反地, 使用特定 T-DNA 载体转化的各转基因品系群体包含转基因品系, 所述转基因品系中的植物发育出在成熟时不

开裂的荚果（此处称为荚果落粒抗性）。在用特定 T-DNA 载体转化的系的总群体中，具有荚果落粒抗性的转基因品系所占比例在 23%到 98%之间变化（参见表 1）。通过使用两个手指之间的压力以半定量的方式确定打开落粒抗性转基因品系闭合的成熟荚果所需要的物理力量。以最小的压力沿着开裂带完全打开的荚果被分级为“+”，而只在开裂带基部打开并且需要更大压力完全打开的荚果被分级为“++”。只能被碾碎（和不能沿着开裂带打开）的荚果分级为“+++”。

从表 1 概括的结果中可得出下列结论。

在使用具有强启动子和与拟南芥内源 IND 基因完全同源的有义/反义区的 dsRNA 嵌合基因(pTC0219)的情况下，

- a) 几乎所有转基因品系发育出在成熟时保持闭合的荚果，
- b) 几乎所有这些转基因品系的荚果要求相当大的力量才能打开。

在使用具有相对弱的启动子和与拟南芥内源 IND 基因完全同源的有义/反义区的 dsRNA 嵌合基因(pTKC89)的情况下，

- a) 约 58%的转基因品系发育出在成熟时保持闭合的荚果，
- b) 约一半的这些转基因品系的荚果只需要轻微至中等的物理力量就可打开。

在使用具有强启动子和具有与拟南芥内源 IND 基因约 65%的序列同一性的有义/反义区的 dsRNA 嵌合基因(pTCO212 和 pTCO218)的情况下

- a) 只有约三分之一的所述转基因品系发育出在成熟时保持闭合的荚果，
- b) 这些转基因品系的绝大部分荚果只需要轻微至中等的物理力量就可打开。

在使用具有强启动子和具有与拟南芥内源 SHP1 基因约 100%的序列同一性和与拟南芥内源 SHP2 基因约 71%或 88%的序列同一性的有义/反义区的 dsRNA 嵌合基因(pTCO233 和 pTCO234)的情况下，

- a) 只有约四分之一至一半的所述转基因品系发育出在成熟时保持闭合的荚果，

b) 这些转基因品系的绝大部分荚果只需要轻微 (pTCO233) 至中等 (pTCO234) 的物理力量就可打开。

从这些结果可得出使用相对弱的启动子或表现与参与开裂带和裂片边缘发育的基因相比低于 88% 和特别是约 65% 的序列同一性的适度基因沉默可用于产生荚果落粒抗性拟南芥品系, 只需要施加中等物理力量就可沿开裂带打开所述品系中的所有荚果。

表 1. 转基因拟南芥品系中荚果落粒抗性

DsRNA 嵌合基因	T-DNA 载体	与靶标的序 列相似性	# 分析的 转化体	落粒 抗性	应用压力后的 落粒抗性		
					+++	++	+
35S/AT-IND	PTCO219	100%	203	199 (98%)	199	0	0
NOS/AT-IND	PTKC89	100%	146	85 (58%)	36	19	30
35S/BN1-IND	PTCO218	65%	152	50 (33%)	20	12	18
35S/BN2-IND	PTCO212	65%	202	73 (36%)	20	20	33
35S/AT-SHP ^{AB}	PTCO233	100-88%	153	80 (52%)	19	43	17
35S/AT-SHP ^{CD}	PTCO234	100-71%	115	27 (23%)	7	7	13

B. 转基因欧洲油菜品系

通过使用实施例 1 中的 T-DNA 载体 pTCO212、pTCO218 和 pTCO219 进行转化可获得转基因欧洲油菜品系。选择含有单拷贝 T-DNA 插入的品系。就荚果落粒抗性对这些系进行分析。来自未转化的野生型欧洲油菜品系的荚果在成熟时通常保持闭合, 但只要施加相对轻微的力就能打开。为确定荚果落粒抗性, 使用随机碰撞试验 (如上所述) 确定所述荚果的半寿期 (表 2 和图 3 概括的结果)。

非转基因对照品系在 RIT 中具有约 10 秒的荚果半寿期。

使用具有强启动子和与内源欧洲油菜 IND 基因（与拟南芥 IND 基因同源）具有约 90%至约 100%序列同一性的有义/反义区的 dsRNA 嵌合基因（pTCO212 和 pTCO218），英果不沿着开裂带开裂并且在鼓中经历长时间后被磨碎。不能确定有意义的半寿期。

使用具有强启动子和与内源欧洲油菜 IND 基因（与拟南芥 IND 基因同源）具有约 65%序列同一性的有义/反义区的 dsRNA 嵌合基因（pTCO219），在 RIT 中确定英果半寿期为约 15 至约 40 秒。

表 2.包含 35S-AT-IND 嵌合基因的转基因欧洲油菜品系中的英果落粒抗性（通过 RIT 确定）

英果品系	构建体	半寿期 (秒)	lld50	uld50	校正的下 部 95%	校正的上 部 95%
对照	pTCO199	8.62	5.17	10.98	3.45	2.36
对照	WT	11.44	9.02	13.54	2.42	2.1
对照	pTCO199	11.93	8.45	15.52	3.48	3.59
品系 1	pTCO219	15.97	12.44	22.68	3.53	6.71
品系 2	pTCO219	16.43	12.27	25.57	4.16	9.14
品系 3	pTCO219	16.54	14.43	19.05	2.11	2.51
品系 4	pTCO219	18.55	15.13	22.51	3.42	3.96
品系 5	pTCO219	20.5	15.13	28.58	5.37	8.08
品系 6	pTCO219	31.29	26.21	39.65	5.08	8.36
品系 7	pTCO219	32	25.63	44.98	6.37	12.98
品系 8	pTCO219	42.7	33.61	57.45	9.09	14.75

从这些结果可得出，如在拟南芥中所示例的，本发明的方法在油籽油菜作物植物中产生类似的结果。

序 列 表

<110> 拜尔生物科学公司
加利福尼亚大学董事会

<120> 延迟植物中种子落粒的方法和手段

<130> BCS 03-2003

<150> EP 03076952.5

<151> 2003-06-23

<160> 11

<170> PatentIn 版本 3.0

<210> 1

<211> 597

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 拟南芥 INDEHISCENT 基因(AT-IND)的核苷酸序列

<400> 1

```

atggaaaatg gtatgtataa aaagaaagga gtgtgcgact cttgtgtctc gtccaaaagc      60
agatccaacc acagccccaa aagaagcatg atggagcctc agcctcacca tctcctcatg      120
gattggaaca aagctaatga tcttctcaca caagaacacg cagcttttct caatgatcct      180
caccatctca tgtagatcc acctcccgaa accctaattc acttgacga agacgaagag      240
tacgatgaag acatggatgc gatgaaggag atgcagtaca tgatcgccgt catgcagccc      300
gtagacatcg accctgccac ggtccctaag ccgaaccgcc gtaacgtaag gataagcgac      360
gatcctcaga cgggtggttg tcgtcggcgt cgggaaagga tcagcgagaa gatccgaatt      420
ctcaagagga tcgtgcctgg tggcggaag atggacacag cttccatgct cgacgaagcc      480
atacgttaca ccaagttctt gaaacggcag gtgaggattc ttcagcctca ctctcagatt      540
ggagctccta tggctaacct ctcttacctt tgttattacc acaactccca accctga      597

```

<210> 2

<211> 643

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 欧洲油菜的 INDEHISCENT 同源物(BN1-IND)的核苷酸序列

<400> 2

```

gaattcgccc ttcgcatgta taaaaagaag ggtctatgcg tctctagtcc aaaaactcta      60
tatgtctggg tcaaaagcag atgcagcagc catagcccca atagtcatga tggagcctca      120
tcattctcctt atgaactgga acaaacctat tgatctcatt acacaagaaa actcttttaa      180

```

ccacaatcct catttcatgg tagatccacc ttccgaaacc ctaagccact tccagccccc 240
gccgacagtc ttctccgatc ccggaggagg agaggaagca gaagacgaag aaggagagga 300
agagatagat gagatgaagg agatgcaata cgcgattgct gccatgcagc ccgtagacat 360
cgatccagcc accgttccta agccgaaccg ccgtaacgta agggtaagcg aggaccccca 420
gacggtgggtg gctcgtcggc gtagagaaag gataagcgag aagatccgga tattgaagag 480
gatggtgcca ggcggtgcaa agatggacac tgcctccatg cttgacgaag ccatccgcta 540
caccaagttc ttgaaacggc aggtgaggct tcttcagcct cacactcagc ttggggctcc 600
tatgtctgac ctttctcgcc ttgtttatta ccacaactct caa 643

<210> 3

<211> 660

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 欧洲油菜的另一种 INDEHISCENT 同源物 (BN2-IND) 的核苷酸序列

<400> 3

gaattcgccc ttggcatgta caagaagaaa ggtctatgcg tctctagtcc aaaaactcta 60
tatatgtctg gctcaaaagc agatgcagcc atagccccaa tagtcatgat ggagcatcat 120
catctcctta tgaattggaa caaacctatt gatctcatta cagaagaaaa ctcttttaac 180
cacaatcttc atttcatagt agatccacct tccgaaacct taagccactt ccagcccccg 240
ccgacaatct tctccggtca cggaggagga gaggaagcag cagaagaaga agaagaagaa 300
ggagaggaag agatggatcc gatgaagaag atgcaatacg cgattgctgc catgcagccc 360

gtagacctcg atccagccac cgttcctaag ccgaaccgcc gtaacgtaag ggtaagcgac	420
gaccttcaga cgggtggtggc tcgtcggcgt agagaaagga taagcgagaa gatccggata	480
ttgaggagga tggtgccagg cggtgcaaag atggacactg cctccatgct cgacgaagcc	540
atccgctaca ccaagttctt gaaacggcag gtgaggctag cttcttcagc ctcacactca	600
gcttgagct cctatgtctg acccttcttg cctttgttat taccataact cgcagccctg	660

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸 C0109/C0111 的共有核苷酸序列

<400> 4

aggtctatgc gtctctagtc	20
-----------------------	----

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸 C0110/C0112 的共有核苷酸序列

<400> 5

tcttcttctg ctgcttcctc

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸 C0113/C0114 的共有核苷酸序列

<400> 6

cctctccttc ttcgtcttct

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸 C0115/C0117 的共有核苷酸序列

<400> 7

aggagtgtgc gactcttgtg

20

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸 C0116/C0118 的共有核苷酸序列

<400> 8
tcttcgtctt cgtccaagt 19

<210> 9

<211> 895

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 拟南芥的 SHATTERPROOF 1 基因(AT-SHP1)的核苷酸序列

<400> 9
ggatcaatgg aggaaggtgg gagtagtcac gacgcagaga gtagcaagaa actagggaga 60
gggaaaatag agataaagag gatagagaac acaacaaatc gtcaagttac tttctgcaaa 120
cgacgcaatg gtctttctcaa gaaagcttat gaactctctg tcttggtgtga tgccgaagtt 180
gccctcgtca tcttctccac tcgtggccgt ctctatgagt acgccaacaa cagtgtgagg 240
ggtacaattg aaaggtacaa gaaagcttgt tccgatgccg tcaaccctcc ttccgtcacc 300
gaagctaata ctcagtacta tcagcaagaa gcctctaagc ttcggaggca gattcgagat 360
attcagaatt caaataggca tattgttggg gaatcacttg gttccttgaa cttcaaggaa 420
ctcaaaaacc tagaaggacg tcttgaaaaa ggaatcagcc gtgtccgctc caaaaagaat 480

gagctgttag tggcagagat agagtatatg cagaagaggg aaatggagtt gcaacacaat 540
 aacatgtacc tgcgagcaaa gatagccgaa ggcgccagat tgaatccgga ccagcaggaa 600
 tcgagtgtga tacaaggac gacagtttac gaatccggtg tatcttctca tgaccagtcg 660
 cagcattata atcggaacta tattccggtg aaccttcttg aaccgaatca gcaattctcc 720
 ggccaagacc aacctcctct tcaacttggtg taactcaaaa catgataact tgtttcttcc 780
 cctcataacg attaagagag agacgagaga gttcatttta tatttataac gcgactgtgt 840
 attcatagtt taggttctaa taatgataat aacaaaactg ttgtttcttt gcttc 895

<210> 10

<211> 963

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 拟南芥的 SHATTERPROOF 2 基因(AT-SHP2)的核苷酸序列

<400> 10

gaattcatct tcccatcctc acttctcttt ctttctgac ataattaatc ttgctaagcc 60
 agctagggct tatagaaatg gaggtggtg cgagtaatga agtagcagag agcagcaaga 120
 agatagggag agggaagata gagataaaga ggatagagaa cactacgaat cgtcaagtca 180
 ctttctgcaa acgacgcaat ggtttactca agaaagctta tgagctctct gtcttgtgtg 240
 acgtgaggt tgctcttgct atcttctcca ctcgaggccg tctctacgag tacgccaaca 300
 acagtgtgag aggaacaata gaaaggtaca agaaagcttg ctccgacgcc gttaaccctc 360
 cgaccatcac cgaagctaact actcagtact atcagcaaga ggctgtctaaa ctccggagac 420

```

agattcggga cattcagaat ttgaacagac acattcttgg tgaatctctt ggttccttga 480
actttaagga actcaagaac cttgaaagta ggcttgagaa aggaatcagt cgtgtccgat 540
ccaagaagca cgagatgtta gttgcagaga ttgaatacat gcaaaaaagg gaaatcgagc 600
tgcaaaacga taacatgtat ctccgctcca agattactga aagaacaggt ctacagcaac 660
aagaatcgag tgtgatacat caagggacag tttacgagtc ggggtgttact tcttctcacc 720
agtcggggca gtataaccgg aattatattg cggttaacct tcttgaaccg aatcagaatt 780
cctccaacca agaccaacca cctctgcaac ttgtttgatt cagtctaaca taagcttctt 840
tcctcagcct gagatcgatc tatagtgtca cctaaatgcg gccgcgtccc tcaacatcta 900
gtcgcaagct gaggggaacc actagtgtca tacgaacctc caagagacgg ttacacaaac 960
ggg 963

```

<210> 11

<211> 931

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 拟南芥的 ALCATRAZ 基因的核苷酸序列

<400> 11

```

agagagagag agagagagag agatgggtga ttctgacgtc ggtgatcgtc ttccccctcc 60
atcttcttcc gacgaactct cgagctttct ccgacagatt ctttcccgta ctcctacagc 120
tcaaccttct tcaccaccga agagtactaa tgtttcctcc gctgagacct tcttccttc 180

```

cgtttccggc ggagctgttt cttccgtcgg ttatggagtc tctgaaactg gccaaagacaa	240
atatgctttc gaacacaaga gaagtggagc taaacagaga aattcgttga agagaaacat	300
tgatgctcaa ttccacaact tgtctgaaaa gaagaggagg agcaagatca acgagaaaat	360
gaaagctttg cagaaactca ttcccaattc caacaagact gataaagcct caatgcttga	420
tgaagctata gaatatctga agcagcttca acttcaagtc cagactttag ccgttatgaa	480
tggttttaggc ttaaacccta tgcgattacc acaggttcca cctccaactc atacaaggat	540
caatgagacc ttagagcaag acctgaacct agagactctt ctgctgctc ctcactcgt	600
ggaaccagct aaaacaagtc aaggaatgtg cttttccaca gccactctgc tttgaagata	660
acattcagac aatgatgatg atcggaattc ctctagtacc tgccagacag gagtgaacaa	720
tgttttgagt tttagcattg gccagatttc tatgttcagt tatagttatg ctaataagct	780
ttaggagtga acaaaatctg agtagtttga ttataatgat gtctgaagca gattatatat	840
aaaagactaa ttacttaca tatgagatga ttattacaac tatcaaataga ctatgtctgt	900
gagttgcac caaaaaaaaa aaaaaaaaaa a	931

图1

IND1Atgene	1	---atggaaaatggtatgtataaaaagaaaggagtgtgcgactcttgt--
IND Bngene1	1	gaattcgcccttcgcatgtataaaaagaagggtctatgcgtctctagtc
IND Bngene2	1	gaattcgcccttggcatgtacaagaagaagggtctatgcgtctctagtc
IND1Atgene	46	-----gtctcgtccaaaagcagatccaac---cacagccc
IND Bngene1	51	aaaaactctatat--gtctggttcaaaagcagatgcagcagccatagccc
IND Bngene2	51	aaaaactctatatatgtctggctcaaaagcagat--gcagccatagccc
IND1Atgene	78	caaaagaagcatgatggagcctcagcctcaccatctcctcatggattgga
IND Bngene1	99	caatag--tcatgatgg-----agcctcatcatctccttatgaactgga
IND Bngene2	98	caatag--tcatgatgg-----agcatcatcatctccttatgaattgga
IND1Atgene	128	acaaagctaattgatcttctcacacaagaacacgcagcttttctcaatgat
IND Bngene1	141	acaaacctattgatctcattacacaagaaaac---tcttttaaccacaat
IND Bngene2	140	acaaacctattgatctcattacagaagaaaac---tcttttaaccacaat
IND1Atgene	178	cctcaccatctcatggttagatccacctcccgaaccctaattcacttg--
IND Bngene1	188	cct---catttcatggttagatccaccttccgaaccctaagccacttcca
IND Bngene2	187	cct---catttcatagtagatccaccttccgaaccctaagccacttcca
IND1Atgene	226	-----
IND Bngene1	235	gccccgcgcgacagtcttctccgatcccgaggaggagaggaagcag---
IND Bngene2	234	gccccgcgcgacaatcttctccggtcacggaggaggagaggaagcagcag
IND1Atgene	226	--gacgaagacgaagagtacgatgaagacatggatgcgatgaaggagatg
IND Bngene1	282	-----aagacgaagaaggagaggaagagatagatgagatgaaggagatg
IND Bngene2	284	aagaagaagaagaagaaggagaggaagagatggatccgatgaagaagatg
IND1Atgene	274	cagtacatgatcgccgtcatgcagcccgtagacatcgaccctgccacgg
IND Bngene1	326	caatacgcgattgctgcatgcagcccgtagacatcgatccagccaccgt
IND Bngene2	334	caatacgcgattgctgcatgcagcccgtagacctcgatccagccaccgt
IND1Atgene	324	ccctaagccgaaccgccgtaacgtaaggataaagcgacgatcctcagacgg
IND Bngene1	376	tcctaagccgaaccgccgtaacgtaagggttaagcgaggacccccagacgg
IND Bngene2	384	tcctaagccgaaccgccgtaacgtaagggttaagcgacgacccctcagacgg
IND1Atgene	374	tggttgctcgtcggcgtcgggaaaggatcagcgagaagatccgaattctc
IND Bngene1	426	tggtggctcgtcggcgtagagaaaggataaagcgagaagatccggatattg
IND Bngene2	434	tggtggctcgtcggcgtagagaaaggataaagcgagaagatccggatattg
IND1Atgene	424	aagaggatcgtgcctgggtggtgcgaagatggacacagcttccatgctcga
IND Bngene1	476	aagaggatggtgccaggcgggtgcaaagatggacactgcctccatgcttga
IND Bngene2	484	aggaggatggtgccaggcgggtgcaaagatggacactgcctccatgctcga
IND1Atgene	474	cgaagccatacgttacaccaagttcttgaaacggcaggtgaggat----t
IND Bngene1	526	cgaagccatccgctacaccaagttcttgaaacggcaggtgaggct----t
IND Bngene2	534	cgaagccatccgctacaccaagttcttgaaacggcaggtgaggctagctt
IND1Atgene	520	cttcagcctcactctcagattggagctcctatggctaaccctcttacct
IND Bngene1	572	cttcagcctcacactcagcttggggctcctatgtctgaccttctcgcct
IND Bngene2	584	cttcagcctcacactcagcttggagctcctatgtctgaccttcttgcct
IND1Atgene	570	ttgttattaccacaactcccaaccctga
IND Bngene1	622	ttgttattaccacaactctcaa-----
IND Bngene2	634	ttgttattatcataactcgcagccctg-