



(10) 申请公布号 CN 119325337 A

(43) 申请公布日 2025.01.17

(21) 申请号 202380034645.4

(22) 申请日 2023.02.14

(30) 优先权数据

63/317,272 2022.03.07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.10.17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/062580 2023.02.14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/172805 EN 2023.09.14

(71) 申请人 北卡罗莱纳州立大学

地址 美国北卡罗来纳州

(72) 发明人 R·刘易斯

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 张文辉

(51) Int.Cl.

A01H 5/12 (2018.01)

A01H 6/82 (2018.01)

A24B 13/00 (2006.01)

A24B 13/02 (2006.01)

A24B 15/00 (2006.01)

A24B 15/10 (2006.01)

权利要求书6页 说明书34页

序列表(电子公布) 附图8页

(54) 发明名称

生产烟碱类生物碱水平减少的烟草植物的方法和组合物

(57) 摘要

本公开提供了与烟草植物相关的组合物和方法。具体而言,本公开提供了用于生产具有低烟碱类生物碱含量的烟草植物和任何相关烟草产品的新方法。与天然存在的和转基因的烟草植物相比,根据本公开的方法生产的烟草植物表现出减少的烟碱类生物碱(例如,烟碱)的水平,并因此代表了目前可获得的烟草品种的具有商业价值的替代品。

1. 一种烟草栽培品种或其任何部分,所述栽培品种或其任何部分包含与对应的天然存在的烟草植物或其部分相比减少的水平的至少一种烟碱类生物碱。
2. 如权利要求1所述的烟草栽培品种,其中所述栽培品种是非转基因的。
3. 如权利要求1或权利要求2所述的烟草栽培品种,其中所述至少一种烟碱类生物碱选自自由烟碱、降烟碱、新烟草碱和假木贼碱组成的组。
4. 如权利要求1至3中任一项所述的烟草栽培品种,其中所述至少一种烟碱类生物碱是烟碱,并且其中所述栽培品种包含不超过0.35%的烟碱。
5. 如权利要求1至4中任一项所述的烟草栽培品种,其中所述至少一种烟碱类生物碱是降烟碱,并且其中所述栽培品种包含不超过0.04%的降烟碱。
6. 如权利要求1至5中任一项所述的烟草栽培品种,其中所述至少一种烟碱类生物碱是新烟草碱,并且其中所述栽培品种包含不超过0.06%的新烟草碱。
7. 如权利要求1至6中任一项所述的烟草栽培品种,其中所述至少一种烟碱类生物碱是假木贼碱,并且其中所述栽培品种包含不超过0.008%的假木贼碱。
8. 如权利要求1或权利要求2所述的烟草栽培品种,其中所述至少一种烟碱类生物碱是烟碱和降烟碱,并且其中所述栽培品种包含不超过0.35%的烟碱和不超过0.04%的降烟碱。
9. 如权利要求1至8中任一项所述的烟草栽培品种,其中所述栽培品种包含与野生型nic1相比具有减少的表达和/或功能的nic1等位基因。
10. 如权利要求1至9中任一项所述的烟草栽培品种,其中所述栽培品种包含与野生型nic2相比具有减少的表达和/或功能的nic2等位基因。
11. 如权利要求9或权利要求10所述的烟草栽培品种,其中所述nic1等位基因和/或所述nic2等位基因衍生自以下品系中的至少一种:LAFC53、MAFC5、LMAFC34、LA Burley 21、LI Burley 21和HI Burley 21。
12. 如权利要求1至11中任一项所述的烟草栽培品种,其中所述栽培品种包含功能性CYP82E2等位基因。
13. 如权利要求12所述的烟草栽培品种,其中所述CYP82E2等位基因衍生自林烟草。
14. 如权利要求1至13中任一项所述的烟草栽培品种,其中所述栽培品种包含功能性CYP82E3等位基因。
15. 如权利要求14所述的烟草栽培品种,其中所述CYP82E3等位基因衍生自绒毛状烟草。
16. 如权利要求12至15中任一项所述的烟草栽培品种,其中与天然存在的烟草植物相比,由所述CYP82E2等位基因和/或所述CYP82E3等位基因编码的蛋白质的烟碱N-去甲基化活性增加。
17. 一种后代植物、种子或细胞,所述后代植物、种子或细胞由如权利要求1至16所述的烟草栽培品种中的任一种产生。
18. 一种烟草产品,所述烟草产品衍生自如权利要求1至16所述的烟草栽培品种或其部分中的任一种。
19. 如权利要求18所述的烟草产品,其中所述产品选自自由烟叶、烟丝、生切烟丝、烟草末、烟草粉、烟草提取物、无烟烟草、湿鼻烟或干鼻烟、烟斗烟草、雪茄烟草、小雪茄烟草、香

烟烟草和嚼用烟草组成的组。

20. 如权利要求18所述的烟草产品,其中所述产品选自由小雪茄、丁香香烟、不通风的凹陷过滤嘴香烟、通风的凹陷过滤嘴香烟、雪茄、鼻烟、含烟草口香糖、含烟草含片和嚼用烟草组成的组。

21. 一种生产烟草栽培品种的方法,所述烟草栽培品种包含与对应的天然存在的烟草植物或其部分相比减少的水平的至少一种烟碱类生物碱,所述方法包括:

将包含第一低烟碱性状的第一烟草品种与包含第二低烟碱性状的第二烟草品种杂交以产生后代植物;

其中所述后代植物包含减少的浓度的至少一种烟碱类生物碱。

22. 如权利要求21所述的方法,其中所述方法包括回交。

23. 如权利要求21或权利要求22所述的方法,其中所述至少一种烟碱类生物碱选自由烟碱、降烟碱、新烟草碱和假木贼碱组成的组。

24. 如权利要求21至23中任一项所述的方法,其中所述至少一种烟碱类生物碱是烟碱,并且其中所述栽培品种包含不超过0.35%的烟碱。

25. 如权利要求21至24中任一项所述的方法,其中所述至少一种烟碱类生物碱是降烟碱,并且其中所述栽培品种包含不超过0.04%的降烟碱。

26. 如权利要求21至25中任一项所述的方法,其中所述至少一种烟碱类生物碱是新烟草碱,并且其中所述栽培品种包含不超过0.06%的新烟草碱。

27. 如权利要求21至26中任一项所述的方法,其中所述至少一种烟碱类生物碱是假木贼碱,并且其中所述栽培品种包含不超过0.008%的假木贼碱。

28. 如权利要求21至27中任一项所述的方法,其中所述至少一种烟碱类生物碱是烟碱和降烟碱,并且其中所述栽培品种包含不超过0.35%的烟碱和不超过0.04%的降烟碱。

29. 如权利要求21至28中任一项所述的方法,其中所述第一低烟碱性状和/或第二低烟碱性状包含与野生型nic1相比具有减少的表达和/或功能的nic1等位基因。

30. 如权利要求21至29中任一项所述的方法,其中所述第一低烟碱性状和/或第二低烟碱性状包含与野生型nic2相比具有减少的表达和/或功能的nic2等位基因。

31. 如权利要求21至30中任一项所述的方法,其中所述第一烟草品种和/或第二烟草品种包含衍生自以下品系中的至少一种的nic1等位基因和/或nic2等位基因:LAFC53、MAFC5、LMAFC34、LA Burley 21、LI Burley 21和HI Burley 21。

32. 如权利要求21至31中任一项所述的方法,其中所述第一烟草品种和/或第二烟草品种包含功能性CYP82E2等位基因。

33. 如权利要求32所述的方法,其中所述CYP82E2等位基因衍生自林烟草。

34. 如权利要求21至33中任一项所述的方法,其中所述第一烟草品种和/或第二烟草品种包含功能性CYP82E3等位基因。

35. 如权利要求34所述的方法,其中所述CYP82E3等位基因衍生自绒毛状烟草。

36. 如权利要求32至35中任一项所述的方法,其中与天然存在的烟草植物相比,由所述CYP82E2等位基因和/或所述CYP82E3等位基因编码的蛋白质的烟碱N-去甲基化活性增加。

37. 如权利要求21至36中任一项所述的方法,其中所述第一低烟碱性状包含与野生型nic1和/或nic2相比具有减少的表达和/或功能的nic1等位基因和/或nic2等位基因,并且

其中所述第二低烟碱性状包含功能性CYP82E2等位基因和/或功能性CYP82E3等位基因。

38. 如权利要求21至37中任一项所述的方法,其中所述第一烟草品种、所述第二烟草品种和所述后代植物是非转基因的。

39. 一种种子或细胞,所述种子或细胞获得自根据权利要求21所述的方法产生的后代植物。

40. 一种烟草产品,所述烟草产品衍生自根据权利要求21所述的方法产生的后代植物。

41. 如权利要求40所述的烟草产品,其中所述产品选自由烟叶、烟丝、生切烟丝、烟草末、烟草粉、烟草提取物、无烟烟草、湿鼻烟或干鼻烟、烟斗烟草、雪茄烟草、小雪茄烟草、香烟烟草和嚼用烟草组成的组。

42. 如权利要求40所述的烟草产品,其中所述产品选自由小雪茄、丁香香烟、不通风的凹陷过滤嘴香烟、通风的凹陷过滤嘴香烟、雪茄、鼻烟、含烟草口香糖、含烟草含片和嚼用烟草组成的组。

43. 如权利要求12或13所述的烟草栽培品种,其中所述CYP82E2等位基因包含编码相对于SEQ ID NO:1中所示的野生型CYP82E2氨基酸序列的K375E点突变和/或L422W点突变的核苷酸序列。

44. 如权利要求43所述的烟草栽培品种,其中:

(a) 所述CYP82E2等位基因包含编码CYP82E2蛋白的核苷酸序列,所述CYP82E2蛋白包含如SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列;

(b) 所述CYP82E2等位基因包含编码CYP82E2蛋白的核苷酸序列,所述CYP82E2蛋白包含如SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列;或

(c) 所述CYP82E2等位基因包含编码CYP82E2蛋白的核苷酸序列,所述CYP82E2蛋白包含如SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列。

45. 如权利要求14或15所述的烟草栽培品种,其中所述CYP82E3等位基因包含编码相对于SEQ ID NO:5中所示的野生型CYP82E3氨基酸序列的C330W点突变的核苷酸序列。

46. 如权利要求45所述的烟草栽培品种,其中所述CYP82E3等位基因包含编码CYP82E3蛋白的核苷酸序列,所述CYP82E3蛋白包含如SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列。

47. 如权利要求43-46中任一项所述的烟草栽培品种,其中所述栽培品种进一步包括所述栽培品种内以下至少一种的表达的抑制:NBB1、A622、喹啉酸磷酸核糖基转移酶(QPT)、腐胺N-甲基转移酶(PMT)、鸟氨酸脱羧酶(ODC)、天冬氨酸氧化酶(AO)、喹啉酸合酶(QS)、N-甲基腐胺氧化酶(MPO)、NtERF221、NtMYC1a、NtMYC1b、NtMYC-2a或NtMYC2b。

48. 如权利要求32或33所述的方法,其中所述CYP82E2等位基因包含编码相对于SEQ ID NO:1中所示的野生型CYP82E2氨基酸序列的K375E点突变和/或L422W点突变的核苷酸序列。

49. 如权利要求48所述的方法,其中:

(a) 所述CYP82E2等位基因包含编码CYP82E2蛋白的核苷酸序列,所述CYP82E2蛋白包含如SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列;

(b) 所述CYP82E2等位基因包含编码CYP82E2蛋白的核苷酸序列,所述CYP82E2蛋白包含如SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列;或

(c) 所述CYP82E2等位基因包含编码CYP82E2蛋白的核苷酸序列,所述CYP82E2蛋白包含如SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列。

50. 如权利要求34或35所述的方法,其中所述CYP82E3等位基因包含编码相对于SEQ ID NO:5中所示的野生型CYP82E3氨基酸序列的C330W点突变的核苷酸序列。

51. 如权利要求50所述的方法,其中所述CYP82E3等位基因包含编码CYP82E3蛋白的核苷酸序列,所述CYP82E3蛋白包含如SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列。

52. 一种用于在烟草植物细胞中的靶基因中产生点突变的方法,所述方法包括向所述细胞中引入成簇的规律间隔短回文重复序列(CRISPR)相关(CRISPR-Cas)系统,所述系统包括:

(a) 至少一种指导RNA(gRNA),其中所述至少一种gRNA包含能够与所述靶基因中的靶序列或其部分杂交的核苷酸序列,其中所述靶基因包含编码CYP82E2蛋白的核苷酸序列,

(b) 包含供体DNA序列的核酸,所述供体DNA序列包含:

(i) DNA片段,其中所述DNA片段替代所述靶基因中的所述靶序列或插入所述靶基因中的靶位点;和

(ii) 两个同源臂,每个臂位于所述DNA片段的相对侧侧翼,和

(c) 效应蛋白,或编码所述效应蛋白的一个或多个多核苷酸;

其中所述至少一种gRNA与所述效应蛋白形成复合物;并且

其中所述效应蛋白是包含核酸酶的Cas蛋白。

53. 如权利要求52所述的方法,其中:

(a) 所述点突变是相对于如SEQ ID NO:1中所示的野生型CYP82E2氨基酸序列的K375E点突变2或

(b) 所述点突变是相对于如SEQ ID NO:1中所示的野生型CYP82E2氨基酸序列的L422W点突变。

54. 如权利要求52所述的方法,其中产生至少两个点突变。

55. 如权利要求54所述的方法,其中所述至少两个点突变包括相对于SEQ ID NO:1中所示的野生型CYP82E2氨基酸序列的K375E点突变和相对于SEQ ID NO:1中所示的野生型CYP82E2氨基酸序列的L422W点突变。

56. 如权利要求52-55中任一项所述的方法,其中所述烟草植物进一步包含nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因。

57. 如权利要求52-56中任一项所述的方法,其进一步包括抑制所述烟草植物内以下至少一种的表达:NBB1、A622、喹啉酸磷酸核糖基转移酶(QPT)、腐胺N-甲基转移酶(PMT)、鸟氨酸脱羧酶(ODC)、天冬氨酸氧化酶(AO)、喹啉酸合酶(QS)、N-甲基腐胺氧化酶(MPO)、NtERF221、NtMYC1a、NtMYC1b、NtMYC2a或NtMYC2b。

58. 一种用于在烟草植物细胞中的靶基因中产生点突变的方法,所述方法包括向所述细胞中引入成簇的规律间隔短回文重复序列(CRISPR)相关(CRISPR-Cas)系统,所述系统包括:

(a) 至少一种指导RNA(gRNA),其中所述至少一种gRNA包含能够与所述靶基因中的靶序列或其部分杂交的核苷酸序列,其中所述靶基因包含编码CYP82E3蛋白的核苷酸序列,

(b) 包含供体DNA序列的核酸,所述供体DNA序列包含:

(i) DNA片段,其中所述DNA片段替代所述靶基因中的所述靶序列或插入所述靶基因中的靶位点;和

(ii) 两个同源臂,每个臂位于所述DNA片段的相对侧侧翼,和
(c) 效应蛋白,或编码所述效应蛋白的一个或多个多核苷酸;
其中所述至少一种gRNA与所述效应蛋白形成复合物;并且
其中所述效应蛋白是包含核酸酶的Cas蛋白。

59. 如权利要求58所述的方法,其中所述点突变是相对于如SEQ ID NO:5中所示的野生型CYP82E3氨基酸序列的C330W点突变。

60. 如权利要求58或权利要求59所述的方法,其中所述烟草植物进一步包含nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因。

61. 如权利要求58-60中任一项所述的方法,其进一步包括抑制所述烟草植物内以下至少一种的表达:NBB1、A622、喹啉酸磷酸核糖基转移酶(QPT)、腐胺N-甲基转移酶(PMT)、鸟氨酸脱羧酶(ODC)、天冬氨酸氧化酶(AO)、喹啉酸合酶(QS)、N-甲基腐胺氧化酶(MPO)、NtERF221、NtMYC1a、NtMYC1b、NtMYC2a或NtMYC2b。

62. 一种生产具有减少的烟碱类生物碱含量的烟草植物的方法,所述方法包括在烟草植物中组合:

(a) 增加CYP82E2和/或CYP82E3活性的一种或多种遗传修饰;和

(b) nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因,

其中与对应的天然存在的或非转化的对照烟草植物相比,所述烟草植物具有减少的烟碱类生物碱含量。

63. 如权利要求62所述的方法,其中所述烟草植物包含nic1的纯合隐性等位基因和/或nic2的纯合隐性等位基因。

64. 如权利要求62或权利要求63所述的方法,其中增加CYP82E2和/或CYP82E3活性的所述一种或多种遗传修饰是通过转录激活因子样效应核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶、锌指核酸酶、CRISPR/Cas9系统、CRISPR/Cpf1系统、CRISPR/Csm1系统、基因敲入技术(technique)或技术(technology)及其任何组合引入的。

65. 如权利要求62-64中任一项所述的方法,其中增加CYP82E2活性的所述一种或多种遗传修饰包括烟草植物细胞中的靶基因中的点突变,其中所述点突变选自相对于如SEQ ID NO:1中所示的野生型CYP82E2氨基酸序列的K375E点突变和相对于如SEQ ID NO:1中所示的野生型CYP82E2氨基酸序列的L422W点突变中的一种或多种。

66. 如权利要求62-64中任一项所述的方法,其中增加CYP82E3活性的所述一种或多种遗传修饰包括烟草植物细胞中的靶基因中的点突变,其中所述点突变是相对于如SEQ ID NO:5中所示的野生型CYP82E3氨基酸序列的C330W点突变。

67. 如权利要求65或权利要求66所述的方法,其中所述点突变通过成簇的规律间隔短回文重复序列(CRISPR)相关(CRISPR-Cas)系统引入所述植物,所述系统包括:

(a) 至少一种指导RNA(gRNA),其中所述至少一种gRNA包含能够与所述靶基因中的靶序列或其部分杂交的核苷酸序列,其中所述靶基因包含编码CYP82E2蛋白的核苷酸序列,

(b) 包含供体DNA序列的核酸,所述供体DNA序列包含:

(i) DNA片段,其中所述DNA片段替代所述靶基因中的所述靶序列或插入所述靶基因中的靶位点;和

(ii) 两个同源臂,每个臂位于所述DNA片段的相对侧侧翼,和

(c) 效应蛋白,或编码所述效应蛋白的一个或多个多核苷酸;
其中所述至少一种gRNA与所述效应蛋白形成复合物;并且
其中所述效应蛋白是包含核酸酶的Cas蛋白。

68. 如权利要求62-67中任一项所述的方法,其进一步包括抑制所述烟草植物内以下至少一种的表达:NBB1、A622、喹啉酸磷酸核糖基转移酶(QPT)、腐胺N-甲基转移酶(PMT)、鸟氨酸脱羧酶(ODC)、天冬氨酸氧化酶(AO)、喹啉酸合酶(QS)、N-甲基腐胺氧化酶(MPO)、NtERF221、NtMYC1a、NtMYC1b、NtMY2a或NtMYC2b。

69. 一种烟草植物,其通过如权利要求62-68中任一项所述的方法生产,其中所述植物包含:(A) 增加CYP82E2和/或CYP82E3活性的一种或多种遗传修饰;和(B) nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因。

70. 一种从如权利要求69所述的植物产生的后代植物或种子,其中所述后代植物或种子包含:(A) 增加CYP82E2和/或CYP82E3活性的一种或多种遗传修饰;和(B) nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因。

71. 一种烟草产品,所述烟草产品包含来自如权利要求69所述的烟草植物的烟草,其中所述植物包含:(A) 增加CYP82E2和/或CYP82E3活性的一种或多种遗传修饰;和(B) nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因。

72. 如权利要求71所述的烟草产品,其中:

(a) 所述烟草选自由烟叶、烟丝、生切烟丝、烟草末、烟草粉、烟草提取物、无烟烟草、湿鼻烟或干鼻烟、烟斗烟草、雪茄烟草、小雪茄烟草、香烟烟草和嚼用烟草组成的组;或

(b) 所述产品是烟碱减少的烟草产品,其选自由小雪茄、丁香香烟、不通风的凹陷过滤嘴香烟、通风的凹陷过滤嘴香烟、雪茄、鼻烟、口含烟、含烟草口香糖、含烟草含片和嚼用烟草组成的组。

生产烟碱类生物碱水平减少的烟草植物的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2022年3月7日提交的美国临时专利申请号63/317,272的优先权和权益,所述申请出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0003] 以电子方式提交的材料通过引用并入

[0004] 通过引用整体并入本文的是与本文同时提交的计算机可读核苷酸/氨基酸序列表,并且所述序列表标识如下:一个创建于2023年2月14日的名为“NCSU-40676.601”的9,320字节Byte ASCII(文本)文件。

技术领域

[0005] 本公开提供了与烟草植物相关的组合物和方法。具体而言,本公开提供了用于生产具有低烟碱类生物碱含量的烟草植物和任何相关烟草产品的新方法。与天然存在的和转基因的烟草植物相比,根据本公开的方法生产的烟草植物表现出减少的烟碱类生物碱(例如,烟碱)的水平,并因此代表了目前可获得的烟草品种的具有商业价值的替代品。

背景技术

[0006] 烟碱通常是烟草(*Nicotiana tabacum* L)产生的最丰富的吡啶生物碱,尽管由于编码烟碱去甲基化酶的基因活性增加,降烟碱可在一些植物中占主导地位(Sisson和Saunders,1982;Lewis等人,2010)。由于烟碱有助于香烟的成瘾性,一些公共卫生机构建议可能强制降低这些产品中的烟碱水平的研究,以减少人暴露于烟草烟雾相关毒物(美国食品药品监督管理局,2018)。世界卫生组织(WHO)建议将香烟烟草的烟碱水平减少至 0.4mg g^{-1} 或以下的据报告为非成瘾性的水平(WHO,2015)。这代表与目前香烟烟草中存在的水平相比减少大约95%。不存在常规表现出此类超低的叶片烟碱积累水平的可商购获得的烟草栽培品种(Lewis,2018)。因此,烟草界的一些人对开发具有低于提议的耐受阈值水平的烟碱水平的新栽培品种感兴趣。

发明内容

[0007] 本公开的实施方案包括烟草栽培品种或其任何部分,所述烟草栽培品种或其任何部分包含与对应的天然存在的烟草植物或其部分相比减少的至少一种烟碱类生物碱的水平。

[0008] 在一些实施方案中,栽培品种是非转基因的。

[0009] 在一些实施方案中,至少一种烟碱类生物碱选自烟碱、降烟碱、新烟草碱和假木贼碱组成的组。在一些实施方案中,至少一种烟碱类生物碱是烟碱,并且其中所述栽培品种包含不超过0.35%的烟碱。在一些实施方案中,至少一种烟碱类生物碱是降烟碱,并且其中所述栽培品种包含不超过0.04%的降烟碱。在一些实施方案中,至少一种烟碱类生物碱是新烟草碱,并且其中所述栽培品种包含不超过0.06%的新烟草碱。在一些实施方案中,至少一种烟碱类生物碱是假木贼碱,并且其中所述栽培品种包含不超过0.008%的假木贼碱。在

一些实施方案中,至少一种烟碱类生物碱是烟碱和降烟碱,并且其中所述栽培品种包含不超过0.35%的烟碱和不超过0.04%的降烟碱。

[0010] 在一些实施方案中,栽培品种包含与野生型nic1相比具有减少的表达和/或功能的nic1等位基因。在一些实施方案中,栽培品种包含与野生型nic2相比具有减少的表达和/或功能的nic2等位基因。在一些实施方案中,nic1等位基因和/或nic2等位基因衍生自以下品系中的至少一种:LAFC53、MAFC5、LMAFC34、LA Burley 21、LI Burley21和HI Burley 21。

[0011] 在一些实施方案中,栽培品种包含功能性CYP82E2等位基因。在一些实施方案中,CYP82E2等位基因衍生自林烟草(*N. sylvestris*)。在一些实施方案中,栽培品种包含功能性CYP82E3等位基因。在一些实施方案中,CYP82E3等位基因衍生自绒毛状烟草(*N. tomentosiformis*) (或相关物种,例如来自烟草属绒毛烟草组(*Nicotiana* Section *Tomentosae*))。在一些实施方案中,与天然存在的烟草植物相比,由CYP82E2等位基因和/或CYP82E3等位基因编码的蛋白质的烟碱N-去甲基化活性增加。

[0012] 本公开的实施方案还包括从本文所述的任何烟草栽培品种产生的后代植物、种子或细胞。

[0013] 本公开的实施方案还包括衍生自本文所述的任何烟草栽培品种或其部分的烟草产品。

[0014] 在一些实施方案中,烟草产品选自由烟叶、烟丝(shredded tobacco)、生切烟丝(cut tobacco)、烟草末、烟草粉、烟草提取物、无烟烟草、湿鼻烟或干鼻烟、烟斗烟草、雪茄烟草、小雪茄烟草、香烟烟草和嚼用烟草组成的组。

[0015] 在一些实施方案中,烟草产品选自由小雪茄、丁香香烟、不通风的凹陷过滤嘴香烟、通风的凹陷过滤嘴香烟、雪茄、鼻烟、含烟草口香糖、含烟草含片和嚼用烟草组成的组。

[0016] 本公开的实施方案还包括生产烟草栽培品种的方法,所述烟草栽培品种包含与对应的天然存在的烟草植物或其部分相比减少的水平的至少一种烟碱类生物碱。根据这些实施方案,所述方法包括将包含第一低烟碱性状的第一烟草品种与包含第二低烟碱性状的第二烟草品种杂交以产生后代植物。在一些实施方案中,后代植物包含减少的浓度的至少一种烟碱类生物碱。

[0017] 在一些实施方案中,所述方法包括回交。

[0018] 在一些实施方案中,至少一种烟碱类生物碱选自由烟碱、降烟碱、新烟草碱和假木贼碱组成的组。在一些实施方案中,至少一种烟碱类生物碱是烟碱,并且其中所述栽培品种包含不超过0.35%的烟碱。在一些实施方案中,至少一种烟碱类生物碱是降烟碱,并且其中所述栽培品种包含不超过0.04%的降烟碱。在一些实施方案中,至少一种烟碱类生物碱是新烟草碱,并且其中所述栽培品种包含不超过0.06%的新烟草碱。在一些实施方案中,至少一种烟碱类生物碱是假木贼碱,并且其中所述栽培品种包含不超过0.008%的假木贼碱。在一些实施方案中,至少一种烟碱类生物碱是烟碱和降烟碱,并且其中所述栽培品种包含不超过0.35%的烟碱和不超过0.04%的降烟碱。

[0019] 在一些实施方案中,第一低烟碱性状和/或第二低烟碱性状包含与野生型nic1相比具有减少的表达和/或功能的nic1等位基因。在一些实施方案中,第一低烟碱性状和/或第二低烟碱性状包含与野生型nic2相比具有减少的表达和/或功能的nic2等位基因。在一些实施方案中,第一烟草品种和/或第二烟草品种包含衍生自至少一种以下品系的nic1等

位基因和/或nic2等位基因:MAFC5、LMAFC34、LA Burley 21、LI Burley 21和HI Burley 21。在一些实施方案中,第一烟草品种和/或第二烟草品种包含nic1和/或nic2无效等位基因(缺失)。在一些实施方案中,nic1和/或nic2无效等位基因衍生自天然存在的烟草(N tabacum)种质。

[0020] 在一些实施方案中,第一烟草品种和/或第二烟草品种包含功能性CYP82E2等位基因。在一些实施方案中,CYP82E2等位基因衍生自林烟草。在一些实施方案中,第一烟草品种和/或第二烟草品种包含功能性CYP82E3等位基因。在一些实施方案中,CYP82E3等位基因衍生自绒毛状烟草(或相关物种,例如烟草属绒毛烟草组)。在一些实施方案中,与天然存在的烟草植物相比,由CYP82E2等位基因和/或CYP82E3等位基因编码的蛋白质的烟碱N-去甲基化活性增加。

[0021] 在一些实施方案中,第一低烟碱性状包含与野生型nic1和/或nic2相比具有减少的表达和/或功能的nic1等位基因和/或nic2等位基因,并且其中第二低烟碱性状包含功能性CYP82E2等位基因和/或功能性CYP82E3等位基因。

[0022] 在一些实施方案中,第一烟草品种、所述第二烟草品种和所述后代植物是非转基因的。

[0023] 本公开的实施方案还包括从根据本文所述的任何方法产生的后代植物获得的种子或细胞。

[0024] 本公开的实施方案还包括衍生自根据本文所述的任何方法产生的后代植物的烟草产品。

[0025] 在一些实施方案中,产品选自由烟叶、烟丝、生切烟丝、烟草末、烟草粉、烟草提取物、无烟烟草、湿鼻烟或干鼻烟、烟斗烟草、雪茄烟草、小雪茄烟草、香烟烟草和嚼用烟草组成的组。

[0026] 在一些实施方案中,产品选自由小雪茄、丁香香烟、不通风的凹陷过滤嘴香烟、通风的凹陷过滤嘴香烟、雪茄、鼻烟、含烟草口香糖、含烟草含片和嚼用烟草组成的组。

[0027] 在一些实施方案中,栽培品种包含CYP82E2等位基因,所述等位基因包含编码相对于SEQ ID NO:1中所示的野生型CYP82E2氨基酸序列的K375E点突变和/或L422W点突变的核苷酸序列。在一些实施方案中,(a) CYP82E2等位基因包含编码CYP82E2蛋白的核苷酸序列,所述CYP82E2蛋白包含如SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列;(b) CYP82E2等位基因包含编码CYP82E2蛋白的核苷酸序列,所述CYP82E2蛋白包含如SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列;或(c) CYP82E2等位基因包含编码CYP82E2蛋白的核苷酸序列,所述CYP82E2蛋白包含如SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列。

[0028] 在一些实施方案中,CYP82E3等位基因包含编码相对于SEQ ID NO:5中所示的野生型CYP82E3氨基酸序列的C330W点突变的核苷酸序列。在一些实施方案中,CYP82E3等位基因包含编码CYP82E3蛋白的核苷酸序列,所述CYP82E3蛋白包含如SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列。

[0029] 在一些实施方案中,栽培品种包含CYP82E2等位基因,所述等位基因包含编码相对于SEQ ID NO:1中所示的野生型CYP82E2氨基酸序列的K375E点突变和/或L422W点突变的核苷酸序列。在一些实施方案中,(a) CYP82E2等位基因包含编码CYP82E2蛋白的核苷酸序列,所述CYP82E2蛋白包含如SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列;(b) CYP82E2等位基因包含编码

CYP82E2蛋白的核苷酸序列,所述CYP82E2蛋白包含如SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列;或(c)CYP82E2等位基因包含编码CYP82E2蛋白的核苷酸序列,所述CYP82E2蛋白包含如SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列。

[0030] 在一些实施方案中,CYP82E3等位基因包含编码相对于SEQ ID NO:5中所示的野生型CYP82E3氨基酸序列的C330W点突变的核苷酸序列。在一些实施方案中,CYP82E3等位基因包含编码CYP82E3蛋白的核苷酸序列,所述CYP82E3蛋白包含如SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列。

[0031] 在一些实施方案中,栽培品种进一步包括栽培品种内以下至少一种的表达的抑制:NBB1、A622、喹啉酸磷酸核糖基转移酶(QPT)、腐胺N-甲基转移酶(PMT)、鸟氨酸脱羧酶(ODC)、天冬氨酸氧化酶(AO)、喹啉酸合酶(QS)、N-甲基腐胺氧化酶(MPO)、NtERF221、NtMYC1a、NtMYC1b、NtMYC2a或NtMYC2b。

[0032] 本公开的实施方案还包括一种用于在烟草植物细胞中的靶基因中产生点突变的方法。根据这些实施方案,所述方法包括向细胞中引入成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)相关(CRISPR-Cas)系统,所述系统包括:(a)至少一种指导RNA(gRNA),其中所述至少一种gRNA包含能够与靶基因中的靶序列或其部分杂交的核苷酸序列,其中所述靶基因包含编码CYP82E2蛋白的核苷酸序列;(b)包含供体DNA序列的核酸,所述供体DNA序列包含:(i)DNA片段,其中所述DNA片段替代靶基因中的靶序列或插入靶基因中的靶位点;和(ii)两个同源臂,每个臂位于DNA片段的相对侧侧翼;和(c)效应蛋白,或编码效应蛋白的一个或多个多核苷酸。在一些实施方案中,至少一种gRNA与效应蛋白形成复合物。在一些实施方案中,效应蛋白是包含核酸酶的Cas蛋白。

[0033] 在一些实施方案中,(a)点突变是相对于如SEQ ID NO:1中所示的野生型CYP82E2氨基酸序列的K375E点突变;或(b)点突变是相对于如SEQ ID NO:1中所示的野生型CYP82E2氨基酸序列的L422W点突变。

[0034] 在一些实施方案中,产生了至少两个点突变。在一些实施方案中,至少两个点突变包括相对于SEQ ID NO:1中所示的野生型CYP82E2氨基酸序列的K375E点突变和相对于SEQ ID NO:1中所示的野生型CYP82E2氨基酸序列的L422W点突变。

[0035] 在一些实施方案中,烟草植物进一步包含nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因。

[0036] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括抑制栽培品种内以下至少一种的表达:NBB1、A622、喹啉酸磷酸核糖基转移酶(QPT)、腐胺N-甲基转移酶(PMT)、鸟氨酸脱羧酶(ODC)、天冬氨酸氧化酶(AO)、喹啉酸合酶(QS)、N-甲基腐胺氧化酶(MPO)、NtERF221、NtMYC1a、NtMYC1b、NtMYC2a或NtMYC2b。

[0037] 本公开的实施方案还包括一种用于在烟草植物细胞中的靶基因中产生点突变的方法。根据这些实施方案,所述方法包括向细胞中引入成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)相关(CRISPR-Cas)系统,所述系统包括:(a)至少一种指导RNA(gRNA),其中所述至少一种gRNA包含能够与靶基因中的靶序列或其部分杂交的核苷酸序列,其中所述靶基因包含编码CYP82E3蛋白的核苷酸序列;(b)包含供体DNA序列的核酸,所述供体DNA序列包含:(i)DNA片段,其中所述DNA片段替代靶基因中的靶序列或插入靶基因中的靶位点;和(ii)两个同源臂,每个臂位于DNA片段的相对侧侧翼;和(c)效应蛋白,或编码效应蛋白的一个或多

个多核苷酸。在一些实施方案中,至少一种gRNA与效应蛋白形成复合物。在一些实施方案中,效应蛋白是包含核酸酶的Cas蛋白。

[0038] 在一些实施方案中,点突变是相对于如SEQ ID NO:5中所示的野生型CYP82E3氨基酸序列的C330W点突变。

[0039] 在一些实施方案中,烟草植物进一步包含nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因。

[0040] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括抑制烟草植物内以下至少一种的表达:NBB1、A622、喹啉酸磷酸核糖基转移酶(QPT)、腐胺N-甲基转移酶(PMT)、鸟氨酸脱羧酶(ODC)、天冬氨酸氧化酶(AO)、喹啉酸合酶(QS)、N-甲基腐胺氧化酶(MPO)、NtERF221、NtMYC1a、NtMYC1b、NtMYC2a或NtMYC2b。

[0041] 本公开的实施方案还包括生产具有减少的烟碱类生物碱含量的烟草植物的方法。根据这些实施方案,所述方法包括在烟草植物中组合:(a)增加CYP82E2和/或CYP82E3活性的一种或多种遗传修饰;和(b)nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因。在一些实施方案中,与对应的天然存在的或非转化的对照烟草植物相比,所述烟草植物具有减少的烟碱类生物碱含量。

[0042] 在一些实施方案中,烟草植物包含nic1的纯合隐性等位基因和/或nic2的纯合隐性等位基因。

[0043] 在一些实施方案中,增加CYP82E2和/或CYP82E3活性的一种或多种遗传修饰是通过转录激活因子样效应核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶、锌指核酸酶、CRISPR/Cas9系统、CRISPR/Cpf1系统、CRISPR/Csm1系统、基因敲入技术(technique)或技术(technology)及其任何组合引入的。

[0044] 在一些实施方案中,增加CYP82E2活性的一种或多种遗传修饰包括烟草植物细胞中的靶基因的点突变,其中所述点突变选自相对于如SEQ ID NO:1中所示的野生型CYP82E2氨基酸序列的K375E点突变和相对于如SEQ ID NO:1中所示的野生型CYP82E2氨基酸序列的L422W点突变中的一种或多种。

[0045] 在一些实施方案中,增加CYP82E3活性的一种或多种遗传修饰包括烟草植物细胞中的靶基因中的点突变,其中所述点突变是相对于如SEQ ID NO:5中所示的野生型CYP82E3氨基酸序列的C330W点突变。

[0046] 在一些实施方案中,通过成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)相关(CRISPR-Cas)系统将点突变引入植物中,所述系统包括:(a)至少一种指导RNA(gRNA),其中所述至少一种gRNA包含能够与靶基因中的靶序列或其部分杂交的核苷酸序列,其中所述靶基因包含编码CYP82E2蛋白的核苷酸序列;(b)包含供体DNA序列的核酸,所述供体DNA序列包含:(i)DNA片段,其中所述DNA片段替代靶基因中的靶序列或插入靶基因中的靶位点;和(ii)两个同源臂,每个臂位于DNA片段的相对侧侧翼;和(c)效应蛋白,或编码效应蛋白的一个或多个多核苷酸。在一些实施方案中,至少一种gRNA与效应蛋白形成复合物。在一些实施方案中,效应蛋白是包含核酸酶的Cas蛋白。

[0047] 本公开的实施方案还包括通过本文所述的任何方法生产的烟草植物,其中所述植物包含:(a)增加CYP82E2和/或CYP82E3活性的一种或多种遗传修饰;和(b)nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因。本公开的实施方案还包括由所述植物产生的后代植物或

种子,其中所述后代植物或种子包含:(A)增加CYP82E2和/或CYP82E3活性的一种或多种遗传修饰;和(B)nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因。本公开的实施方案还包括包含来自烟草植物的烟草的烟草产品,其中所述植物包含:(A)增加CYP82E2和/或CYP82E3活性的一种或多种遗传修饰;和(B)nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因。

[0048] 根据这些实施方案,(a)烟草选自由烟叶、烟丝、生切烟丝、烟草末、烟草粉、烟草提取物、无烟烟草、湿鼻烟或干鼻烟、烟斗烟草、雪茄烟草、小雪茄烟草、香烟烟草和嚼用烟草组成的组;或(b)产品是烟碱减少的烟草产品,其选自由小雪茄、丁香香烟、不通风的凹陷过滤嘴香烟、通风的凹陷过滤嘴香烟、雪茄、鼻烟、口含烟、含烟草口香糖、含烟草含片和嚼用烟草组成的组。

附图说明

[0049] 图1A至1D:根据本公开的一个实施方案,测试的低生物碱杂交品系(衍生自LAF53的Nic1基因座和Nic2基因座与衍生自绒毛状烟草的CYP82E3等位基因组合)和相关对照的生物碱组成的代表性图形数据。图1A包括烟碱百分比;图1B包括降烟碱百分比;图1C包括新烟草碱百分比;图1D包括假木贼碱百分比。平均值是针对三个现场环境取平均值。

[0050] 图2A至2D:根据本公开的一个实施方案,测试的低生物碱杂交品系(衍生自LAF53的Nic1基因座和Nic2基因座与衍生自绒毛状烟草的CYP82E3等位基因组合)和相关对照的产量和质量确定的代表性图形数据。图2A包括产量(1bs/A);图2B包括英担(Cwt)值(\$);图2C包括英亩值(\$);图2D包括等级指数。

具体实施方式

[0051] 本公开的实施方案提供了用于生产具有低烟碱类生物碱含量的烟草植物和任何相关烟草产品的新方法。与天然存在的和转基因的烟草植物相比,根据本公开的方法生产的烟草植物表现出减少的烟碱类生物碱(例如,烟碱)的水平,并因此代表了目前可获得的烟草品种的具有商业价值的替代品。

[0052] 如本章节中使用的章节标题和本文的全部公开内容仅用于组织目的,并非旨在限制。

[0053] 1. 定义

[0054] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的相同的含义。如有冲突,以本文件(包括定义)为准。尽管与本文描述的那些方法和材料类似或等效的方法和材料可用于本公开的实践或测试中,但在下文中描述了优选方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献均通过引用整体并入。本文公开的材料、方法和实例仅为说明性的,并非旨在限制。

[0055] 术语“约”将被本领域普通技术人员理解并且将基于其使用的上下文而在某种程度上变化。如果在给定其使用上下文的情况下有本领域普通技术人员不清楚的所述术语的用途,则“约”将最多意指特定术语的正负10%。例如,在一些实施方案中,它将意指特定术语的正负5%。在本文中,使用前面有术语“约”的数值来呈现某些范围。本文使用术语“约”为它之后的精确数字以及接近或近似所述术语之后数字的数字提供文字支持。在确定数字是否接近或近似具体列举的数字时,接近或近似未列举的数字可为在提出其的上下文中提供

具体列举的数字基本等同值的数字。

[0056] 如本文所用,术语“包含(comprise)”、“包括(include)”、“具有(having)”、“具有(has)”、“可以(can)”、“含有(contain)”及其变体旨在是不排除另外行为或结构的可能性的开放式过渡短语、术语或词语。除非上下文中另外明确指定,否则单数形式“一种/一个(a)”、“一种/一个(an)”和“所述(the)”包括复数指代物。本公开还考虑了其他实施方案“包含文中提出的实施方案或元素”、“由文中提出的实施方案或元素组成”和“基本上由文中提出的实施方案或元素组成”,无论是否明确阐述。

[0057] 对于本文中数值范围的叙述,明确地考虑了其具有相同精确度的每个中间数值。例如,对于6-9的范围,除了6和9之外还考虑数字7和8,并且对于6.0-7.0的范围,明确考虑数字6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9和7.0。

[0058] 如本文所用,“与之相关”是指与之比较。

[0059] 如本文所用,术语“核酸分子”是指任何含有核酸的分子,包括但不限于DNA或RNA。所述术语涵盖包含任何已知DNA和RNA的碱基类似物的序列,所述碱基类似物包括但不限于4-乙酰胞嘧啶、8-羟基-N6-甲基腺苷、氮丙啶基胞嘧啶、假异胞嘧啶、5-(羧基羟甲基)尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、肌苷、N6-异戊烯基腺嘌呤、1-甲基腺嘌呤、1-甲基假尿嘧啶、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-甲基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、 β -D-甘露糖基腺苷(mannosylqueosine)、5'-甲氧基羧基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N6-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧乙酸、氧基丁氧基胸苷(oxybutoxosine)、假尿嘧啶、腺苷、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、N-尿嘧啶-5-氧乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧乙酸、假尿嘧啶、腺苷、2-硫胞嘧啶和2,6-二氨基嘌呤。

[0060] 术语“基因”是指包含用于产生多肽、前体或RNA(例如rRNA、tRNA、sRNA、微小RNA、lincRNA)的编码序列的核酸(例如DNA)序列。多肽可由全长编码序列或由编码序列的任何部分编码,只要保留全长或片段的期望活性或功能特性(例如酶活性、配体结合、信号转导、免疫原性等)。所述术语还涵盖结构基因的编码区域和位于5'和3'端的编码区域附近的序列,其任一端的距离为约1 kb或更长,使得所述基因对应于全长mRNA的长度。位于编码区域5'并且存在于mRNA上的序列称为5'非翻译序列。位于编码区域3'或下游并且存在于mRNA上的序列称为3'非翻译序列。术语“基因”涵盖基因的cDNA和基因组形式。基因的基因组形式或克隆含有被称为“内含子”或“插入区”或“插入序列”的非编码序列中断的编码区域。内含子是转录成核RNA(hnRNA)的基因区段;内含子可含有调控元件,诸如增强子。内含子从核转录本或初级转录本中移出或“剪除”;因此,在信使RNA(mRNA)转录本中不存在内含子。mRNA在翻译期间发挥作用,指定新生多肽中氨基酸的序列或顺序。

[0061] 如本文所用,术语“异源基因”是指不存在于其自然环境中的基因。例如,异源基因包括从一个物种引入另一个物种的基因。异源基因还包括以某种方式改变(例如,突变、以多个拷贝添加、连接至非天然调控序列等)的生物体天然基因。异源基因与内源基因的区别在于,异源基因序列通常连接至未发现与染色体中的基因序列天然相关与自然界中未发现的染色体部分相关的DNA序列(例如,在基因通常不表达的基因座表达的基因)。

[0062] 如本文所用,“可操作地连接”是指两个或更多个元件之间的功能性连接。例如,感兴趣的多核苷酸和调控序列(例如启动子)之间的可操作的连接是允许感兴趣的多核苷酸表达的功能性连接。可操作地连接的元件可以是连续的或非连续的。

[0063] 如本文所用,“基因表达”是指基因产物的生物合成或产生,包括基因产物的转录和/或翻译。

[0064] 如本文所用,术语“寡核苷酸”是指短长度的单链多核苷酸链。寡核苷酸的长度通常小于约300个残基(例如,15至100个残基之间),然而,如本文所用,所述术语还旨在涵盖更长的多核苷酸链。寡核苷酸通常以其长度来指代。例如,24个残基的寡核苷酸被称为“24-mer”。寡核苷酸可通过自杂交或通过与其他多核苷酸杂交形成二级结构和三级结构。此类结构可包括但不限于双链体、发夹、十字、弯曲和三链体。

[0065] 术语“同源性”和“同源”是指同一性程度。可存在部分同源性或完全同源性。部分同源序列是与另一个序列低于100%同一的序列。

[0066] 如本文所用,术语“互补”和“互补性”用于指通过碱基配对规则相关的多核苷酸(例如,核苷酸的序列,诸如寡核苷酸或靶核酸)。例如,序列“5'-A-G-T-3'”与序列“3'-T-C-A-5'”互补。互补性可以是“部分的”,其中仅一些核酸的碱基根据碱基配对规则匹配。或者,核酸之间可存在“完全”或“全部”互补性。核酸链之间的互补性程度对核酸链之间的杂交效率和强度具有显著影响。这在依赖于核酸之间的结合的扩增反应以及检测方法中特别重要。任一术语也可用于指单独的核苷酸,特别是在多核苷酸的上下文中。例如,寡核苷酸内的特定核苷酸可因其与另一核酸链内的核苷酸的互补性或缺乏互补性而被注意到,与寡核苷酸的其余部分和核酸链之间的互补性形成对比或比较。

[0067] 在一些上下文中,术语“互补性”和相关术语(例如“互补”、“互补体”)是指可通过氢键与另一核酸序列结合的核酸序列的核苷酸,例如能够碱基配对的核苷酸,例如通过沃森-克里克碱基配对(Watson-Crick base pairing)或其他碱基配对。可形成碱基对(例如,彼此互补)的核苷酸是以下对:胞嘧啶和鸟嘌呤、胸腺嘧啶和腺嘌呤、腺嘌呤和尿嘧啶,以及鸟嘌呤和尿嘧啶。百分比互补性不需要根据核酸序列的整个长度来计算。互补性的百分比可限于碱基配对的核酸序列的特定区域,例如从第一个碱基配对的核苷酸开始到最后一个碱基配对的核苷酸结束。如本文所用,核酸序列的互补体是指当与核酸序列比对使得一个序列的5'端与另一个序列的3'端配对时处于“反平行缔合”的寡核苷酸。天然核酸中不常见的某些碱基可包含在本发明的核酸中,并且包括例如肌苷和7-脱氮鸟嘌呤。互补性不必完全;稳定的双链体可含有错配的碱基对或不匹配的碱基。核酸技术领域的技术人员可凭经验考虑许多变量来确定双链体稳定性,所述变量包括例如寡核苷酸的长度、寡核苷酸的碱基组成和序列、离子强度和错配碱基对的发生率。

[0068] 因此,在一些实施方案中,“互补”是指第一核碱基序列与第二核碱基序列的互补体在8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100或更多个核碱基的区域上至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%同一,或两个序列在严格杂交条件下杂交。“完全互补”意指第一核酸的每个核碱基能够与第二核酸中对应位置处的每个核碱基配对。例如,在某些实施方案中,其中每个核碱基与核酸具有互补性的寡核苷酸具有在8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、

85、90、95、100个或更多个核碱基的区域上与核酸的互补体同一的核碱基序列。

[0069] 如本文所用,“双链核酸”可以是核酸的一部分、较长核酸的区域或整个核酸。“双链核酸”可以是例如但不限于双链DNA、双链RNA、双链DNA/RNA杂交体等。具有二级结构(例如,碱基配对的二级结构)和/或更高级结构的单链核酸包括“双链核酸”。例如,三链体结构被认为是“双链的”。在一些实施方案中,任何碱基配对的核酸都是“双链核酸”。

[0070] 当与核酸相关使用时,如在“分离的寡核苷酸”或“分离的多核苷酸”中使用时,术语“分离的”是指从在其天然来源中通常与其相关的至少一种组分或污染物中鉴定并分离的核酸序列。分离的核酸以不同于在自然界中发现的形式或设置存在。相比之下,非分离的核酸如核酸诸如DNA和RNA在其存在于自然界中的状态下被发现。例如,在宿主细胞染色体上接近邻近基因处发现给定的DNA序列(例如基因);RNA序列,诸如编码特定蛋白质的特定mRNA序列,在细胞中作为与编码多种蛋白质的许多其他mRNA的混合物发现。然而,编码给定蛋白质的分离的核酸包括例如在通常表达给定蛋白质的细胞中的此类核酸,其中所述核酸在与天然细胞不同的染色体位置中,或者另外由不同于自然界中发现的核酸序列侧接。分离的核酸、寡核苷酸或多核苷酸可以单链或双链形式存在。当分离的核酸、寡核苷酸或多核苷酸用于表达蛋白质时,寡核苷酸或多核苷酸将最少含有有义链或编码链(即寡核苷酸或多核苷酸可以是单链的),但可同时含有义链和反义链(即,寡核苷酸或多核苷酸可以是双链的)。

[0071] 如本文所用,“基因座”是多态性核酸、性状决定簇、基因或标志物所在的染色体区域。本公开的基因座包括群体中的一种或多种多态性;例如,一些个体中存在替代等位基因。如本文所用,“等位基因”是指特定基因座处的替代核酸序列。等位基因的长度可小到1个核苷酸碱基,但通常更大。例如,第一等位基因可出现在一条染色体上,而第二等位基因出现在第二条同源染色体上,例如,出现在杂合个体的不同染色体上,或者出现在群体中不同的纯合或杂合个体之间。如本文所用,术语“染色体间隔”指位于单个染色体上的基因组DNA的连续线性跨度。

[0072] 如本文所用,“基因渗入(introgression)”或“基因渗入(introgress)”是指将遗传基因座的期望等位基因从一种遗传背景传递到另一种遗传背景。

[0073] 如本文所用,“杂交的”或“杂交”意指经由受精产生后代(例如细胞、种子或植物),并且包括植物之间的杂交(有性杂交)和自体受精(自交)。

[0074] 如本文所用,“回交(backcross)”和“回交(backcrossing)”是指将后代植物反复杂交回其亲本之一的过程。在回交方案中,“供体”亲本是指具有待基因渗入的期望基因或基因座的亲本植物。“受体”亲本(使用一次或多次)或“轮回”亲本(使用两次或更多次)是指基因或基因座被基因渗入的亲本植物。初始杂交产生了F1代。术语“BC 1”是指轮回亲本的第二次使用,“BC2”是指轮回亲本的第三次使用,依此类推。在一些方面,重复进行回交,每个连续回交的后代个体本身与相同的亲本基因型回交。

[0075] 如本文所用,“单基因转变(single gene converted)”或“单基因转变(single gene conversion)”是指使用称为回交的植物育种技术或经由遗传工程开发的植物,其中除了经由回交技术或经由遗传工程转移到品种中的单个基因之外,还恢复了品种基本上所有的期望形态和生理特征。

[0076] 如本文所用,术语“品种”是指共享将其与相同物种的其他植物区分开的恒定特征

的植物群体。尽管并非总是如此,但品种经常进行商业销售。虽然品种具有一个或多个独特的性状,但品种的进一步特征是此品种内个体之间的整体变异非常小。可通过几代自花授粉和选择,或使用组织或细胞培养技术从单个亲本进行营养繁殖来创造“纯系”品种。品种可基本上衍生自另一个品系或品种。如《国际植物新品种保护公约》(1961年12月2日,1972年11月10日;1978年10月23日;和1991年3月19日在日内瓦修订)所定义,如果满足以下,则品种“基本上衍生自”初始品种:a)所述品种主要衍生自初始品种,或衍生自主要衍生自初始品种的品种,同时保留了由初始品种的基因型或基因型组合所产生的基本特征的表达;b)所述品种与初始品种有明显的区别;以及c)除了衍生行为产生的差异外,所述品种在由初始品种的基因型或基因型组合所产生的基本特征的表达上符合初始品种。基本上衍生的品种可例如通过从初始品种、回交或转化的植物中选择天然或诱导的突变体、体细胞克隆变体、变体个体来获得。第一烟草品种和第一品种基本上衍生自的第二烟草品种被认为具有基本上同一的遗传背景。与品种不同的是,“品系”通常表示非商业使用的一组植物,例如在植物研究中。品系通常显示个体之间一个或多个感兴趣的性状的整体变化很小,尽管个体之间其他性状可能存在一些变化。

[0077] 如本文所用,“优良品种”意指由育种和选择而产生的具有优越农学性能的任何品种。

[0078] 如本文所用,标志物辅助选择或育种上下文中的“选择(selecting)”或“选择(selection)”是指基于某些预定标准通常从群体中挑选或选择期望个体的行为。

[0079] 如本文所用,术语“性状”是指可受基因型影响的细胞或生物体的一个或多个可检测的特征。表型可肉眼观察到,或通过本领域已知的任何其他评估手段观察到,所述手段例如显微镜、生化分析、基因组分析、特定疾病耐受性的测定等。在一些情况下,表型直接由单个基因或基因座控制,例如“单基因性状”。在其他情况下,表型是多个基因的结果。

[0080] 如本文所用,术语“基因突变”或“基因改变”是指引入基因以改变基因编码的产物的表达或活性的可遗传的遗传修饰。此种修饰可在基因的任何序列区域中,例如启动子、5'UTR、外显子、内含子、3'UTR或终止子区域中。在一个方面,突变减少、抑制或消除基因产物的表达或活性。在另一个方面,突变增加、提升、加强或增强了基因产物的表达或活性。在一个方面,突变不是存在于特定烟草品种或栽培品种中的天然多态性。如本文所用,“突变体等位基因”是指来自其中等位基因包含突变的基因座的等位基因。如本文所用,“诱变”是指产生突变而不涉及转基因或在最终突变体中没有剩余与突变相关的转基因。在一个方面,诱变是顺基因的。在另一个方面,诱变是经由基因或基因组编辑的。在又一个方面,诱变是经由随机诱变,例如化学诱变(例如,EMS)或物理诱变(α -辐射)的。

[0081] 如本文所用,“多态性”意指群体中存在一个或多个变化。多态性可表现为核酸的核苷酸序列的变化,或蛋白质的氨基酸序列的变异。多态性包括在一个或多个个体的群体中的一个或多个基因座处存在核酸序列或核酸特征的一个或多个变化。变化可包括但不限于一个或多个核苷酸碱基变化、一个或多个核苷酸的插入或一个或多个核苷酸的缺失。多态性可由核酸复制中的随机过程、通过诱变、由于移动基因组元件、由拷贝数变化和在减数分裂过程诸如不平等交换、基因组复制以及染色体断裂和融合中产生。变化可在群体内常见或以低频率存在,前者在一般植物育种中具有更大的实用性,而后者可与罕见但重要的表型变化相关。有用的多态性可包括单核苷酸多态性(SNP)、DNA序列中的插入或缺失

(Indel)、DNA序列的简单序列重复(SSR)、限制性片段长度多态性(RFLP)和标签SNP。遗传标志物、基因、DNA衍生序列、RNA衍生序列、启动子、基因的5'非翻译区、基因的3'非翻译区、微小RNA、siRNA、耐受基因座、卫星标志物、转基因、mRNA、ds mRNA、转录谱和甲基化模式也可包括多态性。此外,前述的存在、不存在或拷贝数的变化可包括多态性。

[0082] 如本文所用,术语“植物”涵盖整个植物、嫁接植物、植物的祖先和后代以及植物部分,包括种子、芽、茎、根(包括块茎)、砧木、接穗以及植物细胞、组织和器官。植物可以是任何形式,包括悬浮培养物、胚胎、分生区、愈伤组织、叶、配子体、孢子体、花粉和小孢子。在本公开的方法中特别有用的植物包括属于烟草科的所有植物。

[0083] 如本文所用,术语“烟草”是指产生烟碱类生物碱的烟草属中的任何植物。烟草还指包含由烟草属植物产生的材料的产品,因此包括例如由GE烟碱增加的烟草制成的膨胀烟草、再造烟草、香烟、雪茄、嚼用烟草或无烟烟草形式、鼻烟和口含烟。烟草属物种的实例包括但不限于以下:丛生烟草(*Nicotiana acaulis*)、渐尖叶烟草(*Nicotiana acuminata*)、渐尖叶烟草(*Nicotiana acuminata* var. *multiflora*)、非洲烟草(*Nicotiana africana*)、花烟草(*Nicotiana alata*)、抱茎烟草(*Nicotiana amplexicaulis*)、阿伦特氏烟草(*Nicotiana arentsii*)、渐狭叶烟草(*Nicotiana attenuata*)、贝纳米特氏烟草(*Nicotiana benavidesii*)、本塞姆氏烟草(*Nicotiana benthiana*)、毕基劳氏烟草(*Nicotiana bigelovii*)、博内里烟草(*Nicotiana bonariensis*)、洞生烟草(*Nicotiana cavicola*)、克利夫兰式烟草(*Nicotiana clevelandii*)、心叶烟草(*Nicotiana cordifolia*)、伞状烟草(*Nicotiana corymbosa*)、迪勃纳氏烟草(*Nicotiana debneyi*)、高烟草(*Nicotiana excelsior*)、福尔吉特氏烟草(*Nicotiana forgetiana*)、香烟草(*Nicotiana fragrans*)、粉蓝烟草(*Nicotiana glauca*)、粘烟草(*Nicotiana glutinosa*)、古特斯皮德氏烟草(*Nicotiana goodspeedii*)、哥西氏烟草(*Nicotiana gossei*)、混合烟草(*Nicotiana hybrid*)、因古儿巴烟草(*Nicotiana ingulba*)、川上烟草(*Nicotiana kawakamii*)、奈特氏烟草(*Nicotiana knightiana*)、蓝格斯多夫烟草(*Nicotiana langsdorffii*)、狭叶烟草(*Nicotiana linearis*)、长花烟草(*Nicotiana longiflora*)、海滨烟草(*Nicotiana maritima*)、拟似烟草(*Nicotiana megalosiphon*)、摩西烟草(*Nicotiana miersii*)、夜花烟草(*Nicotiana noctiflora*)、裸茎烟草(*Nicotiana nudicaulis*)、耳状烟草(*Nicotiana obtusifolia*)、西方烟草(*Nicotiana occidentalis*)、西方subsp. *Hesperis*烟草(*Nicotiana occidentalis* subsp. *hesperis*)、耳状烟草(*Nicotiana otophora*)、圆锥烟草(*Nicotiana paniculata*)、少花烟草(*Nicotiana pauciflora*)、碧东烟草(*Nicotiana petunioides*)、蓝茉莉叶烟草(*Nicotiana plumbaginifolia*)、四科烟草(*Nicotiana quadrivalvis*)、雷蒙德氏烟草(*Nicotiana raimondii*)、残波烟草(*Nicotiana repanda*)、莲座p烟草(*Nicotiana rosulata*)、莲座叶subsp. *Ingulba*烟草(*Nicotiana rosulata* subsp. *ingulba*)、圆叶烟草(*Nicotiana rotundifolia*)、黄花烟草(*Nicotiana rustica*)、赛特式烟草(*Nicotiana setchellii*)、特大管烟草(*Nicotiana simulans*)、茄叶烟草(*Nicotiana solanifolia*)、斯佩格茨烟草(*Nicotiana spagazzinii*)、斯托克通氏烟草(*Nicotiana stocktonii*)、香甜烟草(*Nicotiana suaveolens*)、林烟草、普通烟草、蓝烟草(*Nicotiana thyrsoiflora*)、绒毛烟草(*Nicotiana tomentosa*)、绒毛状烟草、三角叶烟草(*Nicotiana trigonophylla*)、阴生烟草

(*Nicotiana umbratica*)、波叶烟草(*Nicotiana undulata*)、颤毛烟草(*Nicotiana velutina*)、芹烟草(*Nicotiana wigandioides*)和花烟草(*Nicotiana x sanderae*)。

[0084] 如本文所用,术语“转基因植物”是指包含本身也存在于另一生物或物种中或相对于宿主密码子使用而从另一生物或物种优化的核酸序列的植物。单子叶和双子叶被子植物或裸子植物细胞均可以本领域已知的各种方式进行转化。例如,参见Klein等人,*Biotechnology* 4:583-590(1993);Bechtold等人,*C.R.Acad.Sci.Paris* 316:1194-1199(1993);Bent等人,*Mol.Gen.Genet.*204:383-396(1986);Paszowski等人,*EMBO J.*3:2717-2722(1984);Sagi等人,*Plant Cell Rep.*13:262-266(1994)。

[0085] 除非本文另有定义,否则与本公开结合使用的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。例如,与本文所述的细胞和组织培养、分子生物学、植物生物学、遗传学以及蛋白质和核酸化学以及杂交结合使用的任何命名法和所述领域的技术是本领域众所周知和常用的那些命名法和术语。术语的含义和范围应该是清楚的;然而,如果存在任何潜在的歧义,则本文提供的定义优先于任何词典或外部定义。此外,除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数并且复数术语应包括单数。

[0086] 2. 低烟碱烟草植物

[0087] 烟草生物碱积累被认为受到复杂的遗传控制。研究人员历来研究使用Nic1和Nic2基因座(在一些文献中也称为A基因座和B基因座)处天然存在的等位基因变异性来实现烟草中的较低烟碱水平。此类变异性已被用于开发低生物碱育种品系,诸如LA Burley 21(Legg等人,1970)和LAF53(Chaplin,1975)。然而,这些基因型通常不会产生平均烟碱水平低于 0.4mg g^{-1} 的烤烟叶(Lewis,2018)。

[0088] 已发现Nic2基因座包含烟草连锁群19上的一系列基因,所述基因编码乙烯反应因子(ERF)转录因子,所述转录因子全面影响烟草生物碱生物合成途径中结构基因的表达。发现这组基因在‘LA Burley21’(Burley 21的回交衍生的nic1/nic1 nic2/nic2版本)中被删除。类似的基因阵列位于烟草连锁群7上的Nic1基因座处或附近(Sui等人,2020;Qin等人,2021),其中ERF199的表观遗传沉默等位基因可解释对LA Burley 21中此基因座处生物碱积累的影响(Qin等人,2021)。

[0089] 编码烟碱去甲基化酶(NDM)的基因座处天然存在的变异性也可能借助增加/减少其去甲基化以形成降烟碱而显著影响烟碱水平。然而,将烟碱生化转化为降烟碱历来被认为是一种不具吸引力的减少烟草植物中烟碱水平的方法,这是因为在烤烟的烘烤和储存期间,降烟碱形成其对应的致癌烟草特异性亚硝胺(TSNA)即N'-亚硝基降烟碱(NNN)的趋势增加。此生物碱的大量积累也会不期望地改变烤烟叶的物理和感官特性。烟草中的烟碱去甲基化程度被认为是遗传上不稳定的性状,而烟草的祖先物种林烟草和绒毛状烟草表现出稳定且高水平的烟碱去甲基化。

[0090] 如本文进一步所述,本公开的实施方案包括开发新烟草基因型的植物育种方法,其中衍生自LAF53的Nic1基因座和Nic2基因座的遗传变异性与衍生自林烟草或绒毛状烟草的编码稳定且高水平的NDM活性的遗传变异性组合。使用这些遗传组合,Nic1基因座和Nic2基因座处的变异性会减少参与烟碱生物合成的结构基因的表达,但不会将烟碱减少至零,甚至通常不会将烟碱减少至低于 0.4mg g^{-1} 。大部分剩余的烟碱经由编码NDM酶的林烟草或绒毛状烟草衍生的基因的活性去除。此策略的结果是田间生长的烟草的产生最低的公开

报告和可商购获得的烟碱水平,以及假木贼碱、新烟草碱和降烟碱的对应减少(相对于标准烤烟栽培品种)的基因型。重要的是,相对于标准烟草栽培品种,降烟碱水平没有增加。

[0091] 影响低烟碱含量的Nic1基因座和Nic2基因座处的遗传变异性的来源衍生自烤烟育种品系L AFC53。编码稳定且高水平的烟碱去甲基化酶活性的遗传变化的来源最终衍生自林烟草或绒毛状烟草。育种品系SC58 CsCs是先前通过使用常规种间杂交然后是回交育种以将来自林烟草的主要NDM基因转移到旧烤烟栽培品种‘SC 58’的遗传背景中而开发的。同样,还使用将主要的NDM基因从绒毛状烟草转移到‘SC 58’的遗传背景中的类似的育种方法开发了育种品系SC58 CtCt。后来发现,SC58 CsCs拥有被指定为CYP82E2的NDM基因,所述基因与栽培烟草中天然存在的基因不同,其中烟草版本通过两个退化突变而失活(Chakrabarti等人,2007)。叶片衰老会刺激衍生自SC58 CsCs的CYP82E2的表达。后来发现,SC58 CtCt拥有被指定为CYP82E3的烟碱去甲基化酶基因,所述基因与栽培烟草中天然存在的基因不同,其中烟草版本通过单碱基对突变而失活(Gavilano等人,2007)。衍生自SC58 CtCt的CYP82E3在绿叶中活跃,使得此基因在使烟碱脱甲基以形成降烟碱方面极其有效(比CYP82E2更有效)。

[0092] 在优良的烤烟遗传背景中,使用回交育种方法以将衍生自L AFC53的nic1等位基因和nic2等位基因与分别衍生自林烟草或绒毛状烟草的CYP82E2或CYP82E3组合。使用六代回交将感兴趣的等位基因转移到栽培品种‘K326’(开放授粉的烤烟栽培品种)的遗传背景中。第六代回交后,携带感兴趣的等位基因变异性的BC₆F₁植物进行自花授粉,并且鉴定了纯合感兴趣的等位基因的BC₆F₂个体。选择的BC₆F₂植物进行自花授粉以产生稳定的BC₆F₃种源。通过将前述自交系作为花粉亲本与K326的Cms版本杂交产生细胞质雄性不育(Cms)F₁杂交体,经由回交育种程序将衍生自L AFC53的nic1等位基因和nic2等位基因转移到其中。衍生自林烟草或绒毛状烟草的NDM基因在F₁杂交体中以杂合状态部署,目的是减少可能存在的任何有害连锁累赘的影响。

[0093] 根据上述内容,本公开的实施方案包括烟草栽培品种或其任何部分,所述烟草栽培品种或其任何部分包含与对应的天然存在的烟草植物或其部分相比减少的水平的至少一种烟碱类生物碱。在一些实施方案中,根据本公开的方法生产的烟草栽培品种包括选自烟碱、降烟碱、新烟草碱和假木贼碱组成的组的至少一种烟碱类生物碱。

[0094] 在一些实施方案中,本公开的烟草栽培品种包含减少的水平的烟碱。在一些实施方案中,烟草栽培品种包含不超过0.35%的烟碱。在一些实施方案中,烟草栽培品种包含不超过0.30%的烟碱。在一些实施方案中,烟草栽培品种包含不超过0.25%的烟碱。在一些实施方案中,烟草栽培品种包含不超过0.20%的烟碱。在一些实施方案中,烟草栽培品种包含不超过0.15%的烟碱。在一些实施方案中,烟草栽培品种包含不超过0.10%的烟碱。在一些实施方案中,烟草栽培品种包含不超过0.09%的烟碱。在一些实施方案中,烟草栽培品种包含不超过0.08%的烟碱。在一些实施方案中,烟草栽培品种包含不超过0.07%的烟碱。在一些实施方案中,烟草栽培品种包含不超过0.06%的烟碱。在一些实施方案中,烟草栽培品种包含不超过0.05%的烟碱。在一些实施方案中,烟草栽培品种包含不超过0.04%的烟碱。在一些实施方案中,烟草栽培品种包含不超过0.03%的烟碱。在一些实施方案中,烟草栽培品种包含不超过0.02%的烟碱。在一些实施方案中,烟草栽培品种包含不超过0.01%的烟碱。在一些实施方案中,烟草栽培品种包含约0.1%至约0.35%的烟碱。在一些实施方案中,烟

草栽培品种包含约0.1%至约0.25%的烟碱。在一些实施方案中,烟草栽培品种包含约0.1%至约0.15%的烟碱。在一些实施方案中,烟草栽培品种包含约0.1%至约0.10%的烟碱。在一些实施方案中,烟草栽培品种包含约0.15%至约0.35%的烟碱。在一些实施方案中,烟草栽培品种包含约0.25%至约0.35%的烟碱。在一些实施方案中,烟草栽培品种包含约0.10%至约0.20%的烟碱。在一些实施方案中,烟草栽培品种包含约0.01%至约0.10%的烟碱。在一些实施方案中,烟草栽培品种包含约0.01%至约0.5%的烟碱。在一些实施方案中,烟草栽培品种包含约0.01%至约0.03%的烟碱。

[0095] 在一些实施方案中,本公开的烟草栽培品种包含减少的水平的降烟碱。在一些实施方案中,栽培品种包含不超过0.04%的降烟碱。在一些实施方案中,栽培品种包含不超过0.03%的降烟碱。在一些实施方案中,栽培品种包含不超过0.02%的降烟碱。在一些实施方案中,栽培品种包含不超过0.01%的降烟碱。在一些实施方案中,栽培品种包含不超过0.005%的降烟碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.005%至约0.04%的降烟碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.01%至约0.04%的降烟碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.02%至约0.04%的降烟碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.03%至约0.04%的降烟碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.005%至约0.03%的降烟碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.005%至约0.02%的降烟碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.005%至约0.01%的降烟碱。

[0096] 在一些实施方案中,本公开的烟草栽培品种包含减少的水平的新的烟草碱。在一些实施方案中,栽培品种包含不超过0.06%的新的烟草碱。在一些实施方案中,栽培品种包含不超过0.05%的新的烟草碱。在一些实施方案中,栽培品种包含不超过0.04%的新的烟草碱。在一些实施方案中,栽培品种包含不超过0.03%的新的烟草碱。在一些实施方案中,栽培品种包含不超过0.02%的新的烟草碱。在一些实施方案中,栽培品种包含不超过0.01%的新的烟草碱。在一些实施方案中,栽培品种包含不超过0.005%的新的烟草碱。在一些实施方案中,栽培品种包含不超过0.001%的新的烟草碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.001%至约0.06%的新的烟草碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.005%至约0.06%的新的烟草碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.01%至约0.06%的新的烟草碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.02%至约0.06%的新的烟草碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.03%至约0.06%的新的烟草碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.04%至约0.06%的新的烟草碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.05%至约0.06%的新的烟草碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.005%至约0.05%的新的烟草碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.005%至约0.04%的新的烟草碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.005%至约0.03%的新的烟草碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.005%至约0.02%的新的烟草碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.005%至约0.01%的新的烟草碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.01%至约0.05%的新的烟草碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.02%至约0.04%的新的烟草碱。

[0097] 在一些实施方案中,本公开的烟草栽培品种包含减少的水平的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品种包含不超过0.008%的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品种包含不超过0.007%的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品种包含不超过0.006%的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品种包含不超过0.005%的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品

种包含不超过0.004%的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品种包含不超过0.003%的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品种包含不超过0.002%的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品种包含不超过0.001%的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品种包含不超过0.0005%的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.0005%至约0.008%的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.001%至约0.008%的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.002%至约0.008%的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.003%至约0.008%的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.004%至约0.008%的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.005%至约0.008%的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.006%至约0.008%的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.007%至约0.008%的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.0005%至约0.007%的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.0005%至约0.006%的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.0005%至约0.005%的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.0005%至约0.005%的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.0005%至约0.004%的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.0005%至约0.003%的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.0005%至约0.002%的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.0005%至约0.001%的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.001%至约0.006%的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.002%至约0.005%的假木贼碱。在一些实施方案中,栽培品种包含约0.003%至约0.006%的假木贼碱。

[0098] 在一些实施方案中,栽培品种包含与野生型nic1相比具有减少的表达和/或功能的nic1等位基因。在一些实施方案中,栽培品种包含与野生型nic2相比具有减少的表达和/或功能的nic2等位基因。在一些实施方案中,栽培品种包含与野生型nic1等位基因和野生型nic2等位基因相比具有减少的表达和/或功能的nic1等位基因和nic2等位基因。在一些实施方案中,nic1等位基因和/或nic2等位基因衍生自以下品系中的至少一种:L AFC53、MAFC5、LMAFC34、LA Burley 21、LI Burley 21和HI Burley 21。在一些实施方案中,第一烟草品种和/或第二烟草品种包含nic1和/或nic2无效等位基因(缺失)。在一些实施方案中,nic1和/或nic2无效等位基因衍生自天然存在的烟草种质。

[0099] 在一些实施方案中,栽培品种包含功能性CYP82E2等位基因。在一些实施方案中,CYP82E2等位基因衍生自林烟草。在一些实施方案中,栽培品种包含功能性CYP82E3等位基因。在一些实施方案中,所述CYP82E3等位基因衍生自绒毛状烟草,或相关物种(例如烟草属绒毛烟草组)。在一些实施方案中,栽培品种包含衍生自林烟草的功能性CYP82E2等位基因和衍生自绒毛状烟草或相关物种(例如烟草属绒毛烟草组)的功能性CYP82E3等位基因。在一些实施方案中,与天然存在的烟草植物相比,由CYP82E2等位基因和/或CYP82E3等位基因编码的蛋白质的烟碱N-去甲基化活性增加。

[0100] 在一些实施方案中,本公开的烟草栽培品种是非转基因(例如,不具有异源转基因)的。根据这些实施方案,本公开的烟草栽培品种可通过具有对应于减少的水平的至少一种烟碱类生物碱的期望性状的各种烟草品系的育种(例如,回交)来产生。因此,本公开的烟草栽培品种不是天然存在的。

[0101] 如本领域普通技术人员基于本公开将理解的,还可使用转基因方法产生具有如本

文所述的减少的水平的至少一种烟碱类生物碱的烟草栽培品种。在一些实施方案中,本公开的烟草栽培品种可被工程化以包含对应于减少的水平的至少一种烟碱类生物碱的一种或多种性状。例如,烟草植物可被工程化以包含与LAF53、MAFC5、LMAFC34、LA Burley 21、LI Burley 21和HI Burley 21中发现的那些等位基因基本上类似的nic1等位基因和/或nic2等位基因。这些nic1等位基因和/或nic2等位基因可具有一种或多种基因改变,所述基因改变导致至少一种烟碱类生物碱的水平减少(例如,功能丧失或质形突变(hylomorphic mutation))。此类基因改变可使用本领域已知的任何手段被工程化,所述手段包括但不限于转录激活因子样效应核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶、锌指核酸酶和成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)/Cas9系统、CRISPR/Cpf1系统、CRISPR/Csm1系统及其组合(参见例如Gaj等人,Trends in Biotechnology,31(7):397-405(2013))。

[0102] 如本文所述的具有减少的水平的至少一种烟碱类生物碱的烟草栽培品种还可被工程化以包含除nic1和/或nic2的改变之外的对应于减少的水平的至少一种烟碱类生物碱的一种或多种性状。例如,与对应的天然存在的烟草植物相比,烟草植物可被工程化以包含功能性的CYP82E2等位基因和/或功能性CYP82E3等位基因。在一些实施方案中,CYP82E2等位基因和/或CYP82E3等位基因被工程化以恢复通过基因突变变为非功能性的对应CYP82E2蛋白和/或CYP82E3蛋白的野生型功能。在一些实施方案中,CYP82E2等位基因和/或CYP82E3等位基因可被工程化以具有一种或多种基因改变,所述基因改变导致至少一种烟碱类生物碱的水平减少(例如,功能获得或超形态突变)。此类基因改变可使用本领域已知的任何手段被工程化,所述手段包括但不限于转录激活因子样效应核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶、锌指核酸酶和成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)/Cas9系统、CRISPR/Cpf1系统、CRISPR/Csm1系统及其组合(参见例如Gaj等人,Trends in Biotechnology,31(7):397-405(2013))。

[0103] 在一些实施方案中,与对应的天然存在的或非转化的对照烟草植物相比,烟草植物被工程化以包含功能性的CYP82E2等位基因和/或CYP82E3等位基因。例如,在一些实施方案中,CYP82E2等位基因被工程化以恢复通过基因突变变为非功能性的对应CYP82E2蛋白的功能,或者增加与对应的天然存在的或非转化的对照烟草植物相比的对应CYP82E2蛋白的活性。在一些实施方案中,烟草植物的CYP82E2等位基因被工程化以包含编码相对于野生型CYP82E2氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:1)的K375E点突变和/或L422W点突变的核苷酸序列。示例性野生型CYP82E2氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示(GenBank登录号ABA07806):

MVFPPIEAFVGLVTFTFLLYFLWTK

KSQKLPKPLPPKIPGGWPVIGHLFHFNNDGDDRPLARKLGDLDK
 YGPVFTFRLGLPLVLVSSYEAIKDCFSTNDAIFSNRPAFLYGEYL
 GYNNTMLFLANYGPYWRKNRKLVIQEVLSASRLEKFKQVRFTRI
 QTSIKNLYTRINGNSSTINLTDWLEELNFGGLIVKMIAGKNYESGKG
 DEQVERFKNAFKDFMVLSMEFVLWDAFPIPLFKWVDFQGHKAM
 KRTRFKDIDSVFQNWLEEHINKREKMEVGAEGNEQDFIDVVLSKLS
 KEYLDEGYSRDRTVIKATVFSLVLDAADTVLHINWGMTLLINNQ
 NALMKAQEEIDTKVGKDRWVEESDIKDLVYLQAIVKKVLRLYPP
 GPLLVPHENVKDCVVSgyHIPKGTRLFANVMKLQRDPKLLSNPD
 KFDPERFIAGDIDFRGHHYEFIPFGSGRRSCPGMTYALQVEHLTMA
 HLIQGFNYKTPNDEALDMKEGAGITIRKVNVPVELIITPRLAPELY
 (SEQ ID NO: 1)。

[0104] 包含相对于野生型CYP82E2氨基酸序列的K375E点突变的示例性CYP82E2氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示(点突变在下面以粗体和下划线文本显示)：

MVFPIEAFVGLVTFTFLLYFLWTKKSQKLPK
 PLPPKIPGGWPVIGHLFHFNNDGDDRPLARKLGDLDKYG
 PVFTFRLGLPLVLVSSYEAIKDCFSTNDAIFSNRPAFLY
 GEYLGYNNTMLFLANYGPYWRKNRKLVIQEVLSASRLEK
 FKQVRFTRIQT
 SIKNLYTRINGNSSTINLTDWLEELNFGGLIVKMIAGKN
 YESGKGDEQVERFKNAFKDFMVLSMEFVLWDAFPIPLFK
 WVDFQGHKAMKRTRFKDIDSVFQNWLEEHINKREKMEV
 GAEGNEQDFIDVVLSKLSKEYLDEGYSRDRTVIKATV
 FSLVLDAADTVLHINWGMTLLINNQNALMKAQEEIDTK
 VGKDRWVEESDIKDLVYLQAIVKEVLRLYPPGPLLVPH

[0105] ENVKDCVVSgyHIPKGTRLFANVMKLQRDPKLLSNPD
 KFDPERFIAGDIDFRGHHYEFIPFGSGRRSCPGMTYALQ
 VEHLTMAHLIQGFNYKTPNDEALDMKEGAGITIRKVN
 VPVELIITPRLAPELY (SEQ ID NO: 2)。

[0106] 包含相对于野生型CYP82E2氨基酸序列的L422W点突变的示例性CYP82E2氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示(点突变在下面以粗体和下划线文本显示)：

MVFPIEAFVGLVTFTFLLYFLWTKKSQKLPK

PLPPKIPGGWPVIGHLFHFNNDGDDRPLARKLGDLADKYGPVFTF
 RLGLPLVLVVSSYEAIKDCFSTNDAIFSNRPAFLYGEYLGYNNTM
 LFLANYGPYWRKNRKLVIQEVLSASRLEKFKQVRFTRIQTSIKNL
 YTRINGNSSTINLTDWLEELNFGLIVKMIAGKNYESGKGDEQVER
 FKNAFKDFMVLSMEFVLWDAFPIPLFKWVDFQGHKAMKRTFKD
 IDSVFQNWLEEHINKREKMEVGAEGNEQDFIDVVLSKLSKEYLDE
 GYSRDTVIKATVFSVLDAADTVLHINWGMTLLINNQNALMKA
 QEEIDTKVGKDRWVEESDIKDLVYLQAIKKVLRLYPPGPLLVP
 HENVKDCVVS^{**Y**}GYHIPKGTRLFANVMKLQRDPKLWSNPDKFDPERF
 IAGDIDFRGHHYEFIPFGSGRRSCPGMTYALQVEHLTMAHLIQGFN
 YKTPNDEALDMKEGAGITIRKVNVELIITPRLAPELY (SEQ ID N
 O: 3)。

[0107] 包含相对于野生型CYP82E2氨基酸序列的K375E点突变和L422W点突变的示例性CYP82E2氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示(点突变在下面以粗体和下划线文本显示):

MVFPIEAFVGLVTFTFLLY
 FLWTKKSQKLPKPLPPKIPGGWPVIGHLFHFNNDGDDRPLARKLG
 DLADKYGPVFTFRLGLPLVLVVSSYEAIKDCFSTNDAIFSNRPAFL
 YGEYLGYNNTMLFLANYGPYWRKNRKLVIQEVLSASRLEKFKQV
 RFTRIQTSIKNLYTRINGNSSTINLTDWLEELNFGLIVKMIAGKNYE
 SGKGDEQVERFKNAFKDFMVLSMEFVLWDAFPIPLFKWVDFQGH
 IKAMKRTFKDIDSVFQNWLEEHINKREKMEVGAEGNEQDFIDVV
 LSKLSKEYLDEGYSRDTVIKATVFSVLDAADTVLHINWGMTLL
 INNQNALMKAQEEIDTKVGKDRWVEESDIKDLVYLQAIKKEVLRLYPPGPLLVP
 HENVKDCVVS^{**Y**}GYHIPKGTRLFANVMKLQRDPKLWSNPDKFDPERFIAGDIDFRGHHYEFIPFGSGRRSCPGMTYALQVEH
 LTMAHLIQGFNYKTPNDEALDMKEGAGITIRKVNVELIITPRLAP
 ELY (SEQ ID NO: 4)。

[0108]

[0109] 在一些实施方案中,CYP82E3等位基因被工程化以恢复通过基因突变变为非功能性的对应CYP82E3蛋白的功能,或者增加与对应的天然存在的或非转化的对照烟草植物相比的对应CYP82E3蛋白的活性。在一些实施方案中,烟草植物的CYP82E3等位基因被工程化以包含编码相对于野生型CYP82E3氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:5)的C330W点突变的核苷酸序列。示例性野生型CYP82E3氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示(NCBI参考序列:NM_

001326063.1) :

MVFPVEAIVGLVTFTFLFYFLWTKKSQKPSKPLPPKIPGGWPVIGH
 LFYFDDDGDDRPLARKLGDLDADKYGPVFTFRLGLPLVLVVSSYE
 AIKDCFSTNDAIFSNRPAFLYGEYLGYNAMFLANYGSYWRKN
 RKLIIQEVLSASRLEKFKHVRFARIQTSIKNLYTRIDGNSSTINLTD
 WLEELNFGLIVKMIAGKNYESGKGDEQVERFKKAFKDFMILSME
 FVLWDAFPIPLFKWVDFQGHVKAMKRTFKDIDSVFQNWLEEHK
 [0110] KREKIMEVGTEGNEQDFIDVVLKMSNEYLGEYSRDTVIKATVF
 SLVLDAADTVLHINCGMALLINNQNALKKAQEEIDTKVGKDRW
 VEESDIKDLVYLQAIVKEVLRLYPPGPLLVPHENVEDCVVSGYHIP
 KGTRLFANVMKLQRDPKLWSNPDKFNPERFIARDIDFHGQHYEYI
 PFGSGRRSCPGMTYALQVEHLTMAHLIQGFNYRTPTDEPLDMKE
 GAGITIRKVNPKVIITPRLAPELY (SEQ ID NO: 5)。

[0111] 包含相对于野生型CYP82E3氨基酸序列的C330W点突变的示例性CYP82E3氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示(点突变在下面以粗体和下划线文本显示) :

MVFPVEAIVGLVTFTFLFYFLWTKKSQKPSK
 PLPPKIPGGWPVIGHLFYFDDDGDDRPLARKLGDLDADKYGPVFTF
 RLGLPLVLVVSSYEAIKDCFSTNDAIFSNRPAFLYGEYLGYNAM
 LFLANYGSYWRKNRKLIIQEVLSASRLEKFKHVRFARIQTSIKNLY
 TRIDGNSSTINLTDWLEELNFGLIVKMIAGKNYESGKGDEQVERF
 KKAFKDFMILSMEFVLWDAFPIPLFKWVDFQGHVKAMKRTFKDI
 DSVFQNWLEEHKREKIMEVGTEGNEQDFIDVVLKMSNEYLGE
 GYSRDTVIKATVFSVLDAADTVLHIN**W**GMALLINNQNALKKA
 QEEIDTKVGKDRWVEESDIKDLVYLQAIVKEVLRLYPPGPLLVP
 HENVEDCVVSGYHIPKGTRLFANVMKLQRDPKLWSNPDKFNPERFI
 ARDIDFHGQHYEYIPFGSGRRSCPGMTYALQVEHLTMAHLIQGFN
 YRTPTDEPLDMKEGAGITIRKVNPKVIITPRLAPELY (SEQ ID N
 O: 6)。

[0112] 在一些实施方案中,本技术提供了用于生产具有减少的烟碱类生物碱含量的烟草植物的方法,所述方法包括在烟草植物(例如,烟草)中组合:(A)与对应的天然存在的或非转化的对照烟草植物相比增加CYP82E2和/或CYP82E3活性的遗传修饰;和(B)nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因。

[0113] 在一些实施方案中,引入nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因可包括经由常规育种将一个或多个隐性等位基因掺入例如烟草植物(例如,烟草)中,所述烟草植物包含与野生型烟草植物相比增加烟草植物中CYP82E2和/或CYP82E3的活性的一种或多种遗传修饰。

[0114] 在一些实施方案中,通过本技术的方法生产的具有(A)增加CYP82E2和/或CYP82E3活性的遗传修饰;和(B)nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因的烟草植物可包含与对应的天然存在的或非转化的对照烟草植物相比减少至少约40%(例如至少约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%或更多,或者其中的任何范围或值)的烟碱类生物碱含量。在一些实施方案中,烟草植物中减少的烟碱类生物碱可以是烟碱,其中与对应的天然存在的或非转化的对照烟草植物相比,烟碱含量可减少约90%或更多(例如约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)。

[0115] 在一些实施方案中,通过本技术的方法生产的具有(A)增加CYP82E2和/或CYP82E3活性的遗传修饰;和(B)nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因的烟草植物包含减少的水平烟碱。在一些实施方案中,烟草植物包含不超过约0.35%的烟碱。在其他实施方案中,烟草植物包含不超过约0.30%的烟碱、不超过约0.25%的烟碱、不超过约0.20%的烟碱、不超过约0.15%的烟碱、不超过约0.10%的烟碱、不超过约0.09%的烟碱、不超过约0.08%的烟碱、不超过约0.07%的烟碱、不超过约0.06%的烟碱、不超过约0.05%的烟碱、不超过约0.04%的烟碱、不超过约0.03%的烟碱、不超过约0.02%的烟碱,或不超过约0.01%的烟碱。

[0116] 在一些实施方案中,烟草植物包含约0.1%至约0.35%的烟碱、约0.1%至约0.25%的烟碱、约0.1%至约0.15%的烟碱、约0.1%至约0.10%的烟碱、约0.15%至约0.35%的烟碱、约0.25%至约0.35%的烟碱、约0.10%至约0.20%的烟碱、约0.01%至约0.10%的烟碱、约0.01%至约0.5%的烟碱,或约0.01%至约0.03%的烟碱。

[0117] 在一些实施方案中,通过本技术的方法生产的具有(A)增加CYP82E2和/或CYP82E3活性的遗传修饰;和(B)nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因的烟草植物包含减少的水平降烟碱。在一些实施方案中,植物包含不超过约0.04%的降烟碱、不超过约0.03%的降烟碱、不超过约0.02%的降烟碱、不超过约0.01%的降烟碱,或不超过约0.005%的降烟碱。在一些实施方案中,植物包含约0.005%至约0.04%的降烟碱、约0.01%至约0.04%的降烟碱、约0.02%至约0.04%的降烟碱、约0.03%至约0.04%的降烟碱、约0.005%至约0.03%的降烟碱、约0.005%至约0.02%的降烟碱,或约0.005%至约0.01%的降烟碱。

[0118] 在一些实施方案中,通过本技术的方法生产的具有(A)增加CYP82E2和/或CYP82E3活性的遗传修饰;和(B)nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因的烟草植物包含减少水平的新烟草碱。在一些实施方案中,植物包含不超过约0.06%的新烟草碱、不超过约0.05%的新烟草碱、不超过约0.04%的新烟草碱、不超过约0.03%的新烟草碱、不超过约0.02%的新烟草碱、不超过约0.01%的新烟草碱、不超过约0.005%的新烟草碱,或不超过

约0.001%的新烟草碱。在其他实施方案中,植物包含约0.001%至约0.06%的新烟草碱、约0.005%至约0.06%的新烟草碱、约0.01%至约0.06%的新烟草碱、约0.02%至约0.06%的新烟草碱、约0.03%至约0.06%的新烟草碱、约0.04%至约0.06%的新烟草碱、约0.05%至约0.06%的新烟草碱、约0.005%至约0.05%的新烟草碱、约0.005%至约0.04%的新烟草碱、约0.005%至约0.03%的新烟草碱、约0.005%至约0.02%的新烟草碱、约0.005%至约0.01%的新烟草碱、约0.01%至约0.05%的新烟草碱,或约0.02%至约0.04%的新烟草碱。

[0119] 在一些实施方案中,通过本技术的方法生产的具有(A)增加CYP82E2和/或CYP82E3活性的遗传修饰;和(B)nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因的烟草植物包含减少的水平假木贼碱。在一些实施方案中,植物包含不超过约0.008%的假木贼碱、不超过约0.007%的假木贼碱、不超过约0.006%的假木贼碱、不超过约0.005%的假木贼碱、不超过约0.004%的假木贼碱、不超过约0.003%的假木贼碱、不超过约0.002%的假木贼碱、不超过约0.001%的假木贼碱,或不超过约0.0005%的假木贼碱。在其他实施方案中,植物包含约0.0005%至约0.008%的假木贼碱、约0.001%至约0.008%的假木贼碱、约0.002%至约0.008%的假木贼碱、约0.003%至约0.008%的假木贼碱、约0.004%至约0.008%的假木贼碱、约0.005%至约0.008%的假木贼碱、约0.006%至约0.008%的假木贼碱、约0.007%至约0.008%的假木贼碱、约0.0005%至约0.007%的假木贼碱、约0.0005%至约0.006%的假木贼碱、约0.0005%至约0.005%的假木贼碱、约0.0005%至约0.005%的假木贼碱、约0.0005%至约0.004%的假木贼碱、约0.0005%至约0.003%的假木贼碱、约0.0005%至约0.002%的假木贼碱、约0.0005%至约0.001%的假木贼碱、约0.001%至约0.006%的假木贼碱、约0.002%至约0.005%的假木贼碱,或约0.003%至约0.006%的假木贼碱。

[0120] 如本文所述,可使用本领域已知的任何手段对遗传修饰进行工程化,所述手段包括但不限于转录激活因子样效应核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶、锌指核酸酶、CRISPR/Cas9系统、CRISPR/Cpf1系统、CRISPR/Csm1系统、基因敲入技术(technique)或技术(technology),或其任何组合。

[0121] 例如,在一些实施方案中,本技术的方法涉及使用结合基因组中感兴趣区域中的靶位点的CRISPR/Cas系统,其中CRISPR/Cas系统包括CRISPR/Cas核酸酶和工程化的crRNA/tracrRNA(或单指导RNA(sgRNA)或指导RNA(gRNA))。在一些实施方案中,CRISPR系统一般包括(i)编码Cas蛋白的多核苷酸,和(ii)至少一种用于植物细胞中RNA指导的基因组工程化的sgRNA。Cas蛋白的非限制性实例包括Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(也称为Csn1和Csx12)、Cas10、Csy1、Csy2、Cys3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Smr1、Cmr3、Cmr4、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、其同源物或其修饰版本。在一些实施方案中,Cas蛋白是化脓性链球菌Cas9蛋白。这些酶是已知的。例如,化脓性链球菌Cas9蛋白的氨基酸序列可在SwissProt数据库中以登录号Q99ZW2找到。在一些实施方案中,本技术的方法涉及使用与基因组中感兴趣区域中的靶位点结合的CRISPR/Cpf1系统。在一些实施方案中,本技术的方法涉及使用与基因组中感兴趣区域中的靶位点结合的CRISPR/Csm1系统。

[0122] 在一些实施方案中,CRISPR/Cas、CRISPR/Cpf1或CRISPR/Csm1系统识别CYP82E2或CYP82E3的一个或多个中的靶位点。在一些实施方案中,CRISPR/Cas、CRISPR/Cpf1或

CRISPR/Csm1系统在CYP82E2或CYP82E3基因中产生特定的序列变化,诸如导致CYP82E2氨基酸序列中的K375E点突变和/或L422W点突变的突变或导致CYP82E3氨基酸序列中的C330W点突变的突变。在一些实施方案中,CRISPR/Cas、CRISPR/Cpf1或CRISPR/Csm1系统经由基因敲入或基因替代产生特定的序列变化。基因敲入或基因替代的方法是本领域众所周知的。基于CRISPR的基因敲入或基因替代方法可利用同源定向修复(HDR)机制、非同源末端连接(NHEJ)机制,或HDR和NHEJ机制。利用HDR和NHEJ机制的基于CRISPR的方法的非限制性实例称为串联重复-HDR(TR-HDR),描述于Lu等人,“Targeted, efficient sequence insertion and replacement in rice,” *Nature Biotechnology*, 38(12):1402-1407. doi:10.1038/s41587-020-0581-5, (2020), 其通过引用整体并入本文。

[0123] 在一些实施方案中,本文所述的方法采用大范围核酸酶DNA结合结构域来结合植物细胞基因组中感兴趣的区域。大范围核酸酶是天然存在的限制性酶的工程化版本,其通常具有延伸的DNA识别序列(例如,长度约14至约40个碱基对)。大范围核酸酶(也称为归巢核酸内切酶)通常基于序列和结构基序分为五个家族:LAGLIDADG家族、GIY-YIG家族、His-Cyst box家族、PD-(D/E)XK家族和HNH家族。在一些实施方案中,大范围核酸酶包括工程化的归巢核酸内切酶。归巢核酸内切酶和大范围核酸酶诸如I-Sce、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII和I-TevIII的识别序列是已知的。

[0124] 在一些实施方案中,大范围核酸酶被定制以识别CYP82E2或CYP82E3的一个或多个中的靶标。在一些实施方案中,大范围核酸酶在CYP82E2或CYP82E3基因中产生特定的序列变化,诸如导致CYP82E2氨基酸序列中的K375E点突变和/或L422W点突变的突变或导致CYP82E3氨基酸序列中的C330W点突变的突变。

[0125] 在一些实施方案中,本文所述的方法采用转录激活因子样效应核酸酶(TALEN)通过诱导双链断裂(DSB)来编辑植物基因组。TALEN是可经工程化以裂解特定DNA序列的限制性酶。TALEN是通过将TAL效应DNA结合结构域与DNA裂解结构域(例如核酸酶结构域,诸如衍生自FokI核酸内切酶的核酸酶结构域)融合而构建的。转录激活因子样效应子(TALE)可根据本领域已知的方法进行工程化以结合期望DNA序列,并且当与核酸酶组合时,提供在特定位置切割DNA的技术。例如,在一些实施方案中,TALEN技术的使用在CYP82E2或CYP82E3基因中产生特定的序列变化,诸如导致CYP82E2氨基酸序列中的K375E点突变和/或L422W点突变的突变或导致CYP82E3氨基酸序列中的C330W点突变的突变。

[0126] 在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法采用锌指核酸酶(ZFN)通过诱导双链断裂(DSB)来编辑植物基因组。ZFN是通过将锌指DNA结合结构域与DNA裂解结构域(例如核酸酶结构域,诸如衍生自FokI核酸内切酶的核酸酶结构域)融合而产生的人工限制性酶。ZFN可被工程化以结合和裂解特定位置处的DNA。ZFN含有两个蛋白质结构域。第一结构域是DNA结合结构域,其含有真核转录因子和锌指。第二结构域是核酸酶结构域,其含有负责裂解DNA的FokI限制性酶。可根据本领域已知的方法对ZFN进行工程化以结合期望DNA序列并在特定位置处裂解DNA。例如,在鉴定出烟碱生物合成基因中的靶序列后,对应的ZFN序列被工程化并插入质粒中。所述质粒被插入到靶细胞中,在靶细胞中被翻译产生功能性ZFN,然后ZFN进入细胞核,在其中结合并裂解其靶序列,从而引入双链断裂(DSB)。当DSB通过同源定向修复或非同源末端连接进行修复时,可采用此种方法将外源DNA序列引入靶基因。例

如,在一些实施方案中,ZFN技术的使用在CYP82E2或CYP82E3基因中产生特定的序列变化,诸如导致CYP82E2氨基酸序列中的K375E点突变和/或L422W点突变的突变或导致CYP82E3氨基酸序列中的C330W点突变的突变。

[0127] 在一些实施方案中,本技术提供了用于生产具有减少的烟碱类生物碱含量(例如,如上所述的通过本技术生产的具有(A)增加CYP82E2和/或CYP82E3活性的遗传修饰;和(B)nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因的植物的总烟碱类生物碱含量、烟碱、降烟碱、新烟草碱和/或假木贼碱的减少)的烟草植物的方法,所述方法包括在烟草植物中组合(a)如本文所述的增加CYP82E2和/或CYP82E3活性的遗传修饰;和(b)与对应的天然存在的或非转化的对照烟草植物相比,抑制以下的修饰:(i)ERF199和/或ERF189的活性,或(ii)编码ERF199的核酸和/或编码ERF189的核酸的表达。

[0128] 在一些实施方案中,本技术进一步包括抑制编码正向调控生物碱产生的转录因子的内源基因(诸如NtERF221、NtMYC1a、NtMYC1b、NtMYC2a和/或NtMYC2b基因)的表达,以降低植物中的烟碱类生物碱水平。

[0129] 在一些实施方案中,本技术进一步包括抑制一种或多种烟碱类生物碱生物合成基因诸如A622、NBB1、QPT(喹啉酸磷酸核糖基转移酶)、PMT(腐胺甲基转移酶)、ODC(鸟氨酸脱羧酶)、AO(天冬氨酸氧化酶)、QS(喹啉酸合酶)和MPO(N-甲基腐胺氧化酶)基因的表达,以降低植物中的烟碱类生物碱水平。

[0130] 可用于抑制ERF199、ERF189、NtERF221、NtMYC1a、NtMYC1b、NtMYC2a、NtMYC2b、A622、NBB1、QPT、PMT、ODC、AO、QS和/或MPO基因的方法的实例包括但不限于反义、有义共抑制、RNAi、人工微小RNA、病毒诱导的基因沉默(VIGS)、反义、有义共抑制、靶向诱变和靶向基因组工程化方法,包括但不限于转录激活因子样效应核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶、锌指核酸酶和成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)/Cas9系统、CRISPR/Cpf1系统、CRISPR/Csm1系统及其任何组合。

[0131] 根据上述内容,本公开的实施方案还包括使用转基因和/或非转基因方法从本文所述的任何烟草栽培品种产生的后代植物、种子或细胞。本公开的实施方案还包括衍生自本文所述的任何烟草栽培品种或其部分的烟草产品。在一些实施方案中,烟草产品选自烟叶、烟丝、生切烟丝、烟草末、烟草粉、烟草提取物、无烟烟草、湿鼻烟或干鼻烟、烟斗烟草、雪茄烟草、小雪茄烟草、香烟烟草和嚼用烟草组成的组。在一些实施方案中,烟草产品选自小雪茄、丁香香烟、不通风的凹陷过滤嘴香烟、通风的凹陷过滤嘴香烟、雪茄、鼻烟、含烟草口香糖、含烟草含片和嚼用烟草组成的组。

[0132] 本公开的实施方案还包括生产烟草栽培品种的方法,所述烟草栽培品种包含与对应的天然存在的烟草植物或其部分相比减少的水平的至少一种烟碱类生物碱。根据这些实施方案,所述方法包括将包含第一低烟碱性状的第一烟草品种与包含第二低烟碱性状的第二烟草品种杂交以产生后代植物。在一些实施方案中,后代植物包含减少的浓度的至少一种烟碱类生物碱。在一些实施方案中,所述方法包括回交。如本领域的普通技术人员可认识到,可使用转基因和/或非转基因方法来生产具有减少的水平的至少一种烟碱类生物碱的此类烟草栽培品种。

[0133] 在一些实施方案中,并且如上文进一步所述的,至少一种烟碱类生物碱选自烟碱、降烟碱、新烟草碱和假木贼碱组成的组。在一些实施方案中,至少一种烟碱类生物碱是

烟碱,并且其中所述栽培品种包含不超过0.35%的烟碱。在一些实施方案中,至少一种烟碱类生物碱是降烟碱,并且其中所述栽培品种包含不超过0.04%的降烟碱。在一些实施方案中,至少一种烟碱类生物碱是新烟草碱,并且其中所述栽培品种包含不超过0.06%的新烟草碱。在一些实施方案中,至少一种烟碱类生物碱是假木贼碱,并且其中所述栽培品种包含不超过0.008%的假木贼碱。在一些实施方案中,至少一种烟碱类生物碱是烟碱和降烟碱,并且其中所述栽培品种包含不超过0.35%的烟碱和不超过0.04%的降烟碱。

[0134] 在一些实施方案中,第一低烟碱性状和/或第二低烟碱性状包含与野生型nic1相比具有减少的表达和/或功能的nic1等位基因。在一些实施方案中,第一低烟碱性状和/或第二低烟碱性状包含与野生型nic2相比具有减少的表达和/或功能的nic2等位基因。在一些实施方案中,所述第一烟草品种和/或第二烟草品种包含衍生自以下品系中的至少一种的nic1等位基因和/或nic2等位基因:LAFC53、MAFC5、LMAFC34、LA Burley 21、LI Burley 21和川Burley 21。在一些实施方案中,第一烟草品种和/或第二烟草品种包含nic1和/或nic2无效等位基因(缺失)。在一些实施方案中,nic1和/或nic2无效等位基因衍生自天然存在的烟草种质。

[0135] 在一些实施方案中,第一烟草品种和/或第二烟草品种包含功能性CYP82E2等位基因。在一些实施方案中,CYP82E2等位基因衍生自林烟草。在一些实施方案中,第一烟草品种和/或第二烟草品种包含功能性CYP82E3等位基因。在一些实施方案中,所述CYP82E3等位基因衍生自绒毛状烟草,或相关物种(例如烟草属绒毛烟草组)。在一些实施方案中,与天然存在的烟草植物相比,由CYP82E2等位基因和/或CYP82E3等位基因编码的蛋白质的烟碱N-去甲基化活性增加。

[0136] 在一些实施方案中,第一低烟碱性状包含与野生型nic1和/或nic2相比具有减少的表达和/或功能的nic1等位基因和/或nic2等位基因,并且其中第二低烟碱性状包含功能性CYP82E2等位基因和/或功能性CYP82E3等位基因。

[0137] 在一些实施方案中,第一烟草品种、所述第二烟草品种和所述后代植物是非转基因的。在一些实施方案中,第一烟草品种、第二烟草品种和/或后代植物的一种或多种是转基因的。

[0138] 本公开的实施方案还包括从根据本文所述的任何方法产生的后代植物获得的种子或细胞。本公开的实施方案还包括衍生自根据本文所述的任何方法产生的后代植物的烟草产品。在一些实施方案中,产品选自由烟叶、烟丝、生切烟丝、烟草末、烟草粉、烟草提取物、无烟烟草、湿鼻烟或干鼻烟、烟斗烟草、雪茄烟草、小雪茄烟草、香烟烟草和嚼用烟草组成的组。在一些实施方案中,产品选自由小雪茄、丁香香烟、不通风的凹陷过滤嘴香烟、通风的凹陷过滤嘴香烟、雪茄、鼻烟、含烟草口香糖、含烟草含片和嚼用烟草组成的组。

[0139] 在一些实施方案中,栽培品种包含CYP82E2等位基因,所述等位基因包含编码相对于SEQ ID NO:1中所示的野生型CYP82E2氨基酸序列的K375E点突变和/或L422W点突变的核苷酸序列。在一些实施方案中,(a) CYP82E2等位基因包含编码CYP82E2蛋白的核苷酸序列,所述CYP82E2蛋白包含如SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列;(b) CYP82E2等位基因包含编码CYP82E2蛋白的核苷酸序列,所述CYP82E2蛋白包含如SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列;或(c) CYP82E2等位基因包含编码CYP82E2蛋白的核苷酸序列,所述CYP82E2蛋白包含如SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列。

[0140] 在一些实施方案中,CYP82E3等位基因包含编码相对于SEQ ID NO:5中所示的野生型CYP82E3氨基酸序列的C330W点突变的核苷酸序列。在一些实施方案中,CYP82E3等位基因包含编码CYP82E3蛋白的核苷酸序列,所述CYP82E3蛋白包含如SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列。

[0141] 在一些实施方案中,栽培品种包含CYP82E2等位基因,所述等位基因包含编码相对于SEQ ID NO:1中所示的野生型CYP82E2氨基酸序列的K375E点突变和/或L422W点突变的核苷酸序列。在一些实施方案中,(a)所述CYP82E2等位基因包含编码CYP82E2蛋白的核苷酸序列,所述CYP82E2蛋白包含如SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列;(b)所述CYP82E2等位基因包含编码CYP82E2蛋白的核苷酸序列,所述CYP82E2蛋白包含如SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列;或(c)所述CYP82E2等位基因包含编码CYP82E2蛋白的核苷酸序列,所述CYP82E2蛋白包含如SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列。

[0142] 在一些实施方案中,CYP82E3等位基因包含编码相对于SEQ ID NO:5中所示的野生型CYP82E3氨基酸序列的C330W点突变的核苷酸序列。在一些实施方案中,CYP82E3等位基因包含编码CYP82E3蛋白的核苷酸序列,所述CYP82E3蛋白包含如SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列。

[0143] 在一些实施方案中,栽培品种进一步包括栽培品种内以下至少一种的表达的抑制:NBB1、A622、喹啉酸磷酸核糖基转移酶(QPT)、腐胺N-甲基转移酶(PMT)、鸟氨酸脱羧酶(ODC)、天冬氨酸氧化酶(AO)、喹啉酸合酶(QS)、N-甲基腐胺氧化酶(MPO)、NtERF221、NtMYC1a、NtMYC1b、NtMYC2a或NtMYC2b。

[0144] 本公开的实施方案还包括一种用于在烟草植物细胞中的靶基因中产生点突变的方法。根据这些实施方案,所述方法包括向细胞中引入成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)相关(CRISPR-Cas)系统,所述系统包括:(a)至少一种指导RNA(gRNA),其中所述至少一种gRNA包含能够与靶基因中的靶序列或其部分杂交的核苷酸序列,其中所述靶基因包含编码CYP82E2蛋白的核苷酸序列;(b)包含供体DNA序列的核酸,所述供体DNA序列包含:(i)DNA片段,其中所述DNA片段替代靶基因中的靶序列或插入靶基因中的靶位点;和(ii)两个同源臂,每个臂位于DNA片段的相对侧侧翼;和(c)效应蛋白,或编码效应蛋白的一个或多个多核苷酸。在一些实施方案中,至少一种gRNA与效应蛋白形成复合物。在一些实施方案中,效应蛋白是包含核酸酶的Cas蛋白。

[0145] 在一些实施方案中,(a)点突变是相对于如SEQ ID NO:1中所示的野生型CYP82E2氨基酸序列的K375E点突变;或(b)点突变是相对于如SEQ ID NO:1中所示的野生型CYP82E2氨基酸序列的L422W点突变。

[0146] 在一些实施方案中,产生了至少两个点突变。在一些实施方案中,至少两个点突变包括相对于SEQ ID NO:1中所示的野生型CYP82E2氨基酸序列的K375E点突变和相对于SEQ ID NO:1中所示的野生型CYP82E2氨基酸序列的L422W点突变。

[0147] 在一些实施方案中,烟草植物进一步包含nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因。

[0148] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括抑制栽培品种内以下至少一种的表达:NBB1、A622、喹啉酸磷酸核糖基转移酶(QPT)、腐胺N-甲基转移酶(PMT)、鸟氨酸脱羧酶(ODC)、天冬氨酸氧化酶(AO)、喹啉酸合酶(QS)、N-甲基腐胺氧化酶(MPO)、NtERF221、

NtMYC1a、NtMYC1b、NtMYC2a或NtMYC2b。

[0149] 本公开的实施方案还包括一种用于在烟草植物细胞中的靶基因中产生点突变的方法。根据这些实施方案,所述方法包括向细胞中引入成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)相关(CRISPR-Cas)系统,所述系统包括:(a)至少一种指导RNA(gRNA),其中所述至少一种gRNA包含能够与靶基因中的靶序列或其部分杂交的核苷酸序列,其中所述靶基因包含编码CYP82E3蛋白的核苷酸序列;(b)包含供体DNA序列的核酸,所述供体DNA序列包含:(i)DNA片段,其中所述DNA片段替代靶基因中的靶序列或插入靶基因中的靶位点;和(ii)两个同源臂,每个臂位于DNA片段的相对侧侧翼;和(c)效应蛋白,或编码效应蛋白的一个或多个多核苷酸。在一些实施方案中,至少一种gRNA与效应蛋白形成复合物。在一些实施方案中,效应蛋白是包含核酸酶的Cas蛋白。

[0150] 在一些实施方案中,点突变是相对于如SEQ ID NO:5中所示的野生型CYP82E3氨基酸序列的C330W点突变。在一些实施方案中,烟草植物进一步包含nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因。

[0151] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括抑制烟草植物内以下至少一种的表达:NBB1、A622、喹啉酸磷酸核糖基转移酶(QPT)、腐胺N-甲基转移酶(PMT)、鸟氨酸脱羧酶(ODC)、天冬氨酸氧化酶(AO)、喹啉酸合酶(QS)、N-甲基腐胺氧化酶(MPO)、NtERF221、NtMYC1a、NtMYC1b、NtMYC2a或NtMYC2b。

[0152] 本公开的实施方案还包括生产具有减少的烟碱类生物碱含量的烟草植物的方法。根据这些实施方案,所述方法包括在烟草植物中组合:(a)增加CYP82E2和/或CYP82E3活性的一种或多种遗传修饰;和(b)nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因。在一些实施方案中,与对应的天然存在的或非转化的对照烟草植物相比,所述烟草植物具有减少的烟碱类生物碱含量。

[0153] 在一些实施方案中,烟草植物包含nic1的纯合隐性等位基因和/或nic2的纯合隐性等位基因。

[0154] 在一些实施方案中,增加CYP82E2和/或CYP82E3活性的一种或多种遗传修饰是通过转录激活因子样效应核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶、锌指核酸酶、CRISPR/Cas9系统、CRISPR/Cpf1系统、CRISPR/Csm1系统、基因敲入技术(technique)或技术(technology)及其任何组合引入的。

[0155] 在一些实施方案中,增加CYP82E2活性的一种或多种遗传修饰包括烟草植物细胞中的靶基因的点突变,其中所述点突变选自相对于如SEQ ID NO:1中所示的野生型CYP82E2氨基酸序列的K375E点突变和相对于如SEQ ID NO:1中所示的野生型CYP82E2氨基酸序列的L422W点突变中的一种或多种。

[0156] 在一些实施方案中,增加CYP82E3活性的一种或多种遗传修饰包括烟草植物细胞中的靶基因中的点突变,其中所述点突变是相对于如SEQ ID NO:5中所示的野生型CYP82E3氨基酸序列的C330W点突变。

[0157] 在一些实施方案中,通过成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)相关(CRISPR-Cas)系统将点突变引入植物中,所述系统包括:(a)至少一种指导RNA(gRNA),其中所述至少一种gRNA包含能够与靶基因中的靶序列或其部分杂交的核苷酸序列,其中所述靶基因包含编码CYP82E2蛋白的核苷酸序列;(b)包含供体DNA序列的核酸,所述供体DNA序列

包含：(i) DNA片段，其中所述DNA片段替代靶基因中的靶序列或插入靶基因中的靶位点；和(ii) 两个同源臂，每个臂位于DNA片段的相对侧侧翼；和(c) 效应蛋白，或编码效应蛋白的一个或多个多核苷酸。在一些实施方案中，至少一种gRNA与效应蛋白形成复合物。在一些实施方案中，效应蛋白是包含核酸酶的Cas蛋白。

[0158] 本公开的实施方案还包括通过本文所述的任何方法生产的烟草植物，其中所述植物包含：(a) 增加CYP82E2和/或CYP82E3活性的一种或多种遗传修饰；和(b) nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因。本公开的实施方案还包括由所述植物产生的后代植物或种子，其中所述后代植物或种子包含：(A) 增加CYP82E2和/或CYP82E3活性的一种或多种遗传修饰；和(B) nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因。本公开的实施方案还包括包含来自烟草植物的烟草的烟草产品，其中所述植物包含：(A) 增加CYP82E2和/或CYP82E3活性的一种或多种遗传修饰；和(B) nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因。

[0159] 根据这些实施方案，(a) 烟草选自自由烟叶、烟丝、生切烟丝、烟草末、烟草粉、烟草提取物、无烟烟草、湿鼻烟或干鼻烟、烟斗烟草、雪茄烟草、小雪茄烟草、香烟烟草和嚼用烟草组成的组；或(b) 产品是烟碱减少的烟草产品，其选自自由小雪茄、丁香香烟、不通风的凹陷过滤嘴香烟、通风的凹陷过滤嘴香烟、雪茄、鼻烟、口含烟、含烟草口香糖、含烟草含片和嚼用烟草组成的组。

[0160] 3. 实施例

[0161] 对本领域技术人员显而易见的是，本文所述的本公开方法的其他合适的修改和调整是容易应用和可理解的，并且可使用合适的等效物进行，而不脱离本公开的范围或本文公开的方面和实施方案。现在已详细描述了本公开，通过参考以下实施例将对其有更明确理解，所述实施例仅意图用于说明本公开的一些方面和实施方案，并且不应被视为对本公开范围的限制。本文引用的所有期刊参考文献、美国专利和公布的公开内容据此通过引用以其整体并入。

[0162] 本公开具有多个方面，通过以下非限制性实例说明。

[0163] 实施例1

[0164] Cms NCLA杂合体。鉴于世界各国(包括美国)可能强制将常规香烟中的烟碱水平降低至所谓的“亚成瘾阈值水平”以下，因此，如下的烟草栽培品种具有商业利益：所述烟草栽培品种可生产出具有使制造商能够达到目标烟碱水平的烟碱水平的烤烟叶。目前，正在讨论和/或建议香烟烟草填充物烟碱水平为0.04%。目前还没有获得通常积累如此低水平烟碱的烤烟栽培品种(在常规农艺管理系统下生长，并且针对所有茎秆位置取平均值)。

[0165] 因此，本公开的实施方案包括新建立的细胞质雄性不育(Cms)烤烟杂合体NCLA杂合体1、NCLA杂合体2和NCLA杂合体3(衍生自LAF53的Nic1基因座和Nic2基因座与衍生自绒毛状烟草的CYP82E3等位基因组合)的超低烟碱含量。这些杂合体栽培品种积累已公开报道的任何遗传材料的最低水平的烟碱。如本文所述，使用天然存在的遗传变异和常规育种方法开发这些新的F1杂合体(即，没有使用基因编辑、遗传工程或新育种方法来开发这些材料)。这些杂合体可在世界任何地方生长，而不必担心专利侵权，或有关基因编辑或遗传工程育种结果的法规。

[0166] 支持这些新杂交体的低烟碱表型的数据产生自三个北卡罗莱纳州研究站的实地评估。每个位置的实验设计都是随机完全区组设计，重复四次。地块由20个植物行组成，根

据北卡罗莱纳州烤烟生产建议进行管理。烟叶经过四次采收来收获、烘烤,并由前USDA烟草分级员进行分级。使用气相色谱方法分析复合烤烟叶样品的生物碱组成。

[0167] 第一次实验中评估的材料如下:K326-标准烤烟栽培品种;LAFC53-含有隐性等位基因Nic1基因座和Nic2基因座的烤烟栽培品种NC95的近等基因版本;K326 nic1/nic2-含有隐性等位基因Nic1基因座和Nic2基因座的烤烟栽培品种K326的近等基因版本。图1A至1D提供了在三个NC位置评估的前述材料的生物碱概况。图2A至2D呈现了这些材料的产量和质量确定。总体而言,在实验中,Cms NCLA杂交体产生所有材料中的最低的烟碱水平。Cms NCLA杂交体的降烟碱水平与K326的降烟碱水平类似,但略低于K326的降烟碱水平。新杂交体的新烟草碱和假木贼碱水平低于K326的新烟草碱和假木贼碱水平。

[0168] 下表1提供了来自另外的实验的数据。以粗体突出显示的生物碱数据大约为分析设备最低检测水平的一半,因为这些数字低于检测限。(这样做是为了允许进行方差分析。)

[0169]

表 1: 来自 2022 年实地研究的生物碱数据。

实验	位置	基因型	%烟碱	%降烟碱	%假木贼碱	%新烟草碱
EX22K291	金斯顿	K326	2.3261	0.0410	0.0152	0.0606
EX22K291	金斯顿	K326 222 (22) (0.0086)	0.0376	0.0062	0.0001	0.0001
EX22K291	金斯顿	K346	2.6808	0.0408	0.0183	0.0828
EX22K291	金斯顿	Cms LA K326 x LA K326 CsCs; F1 杂交体 1	0.1232	0.0384	0.0001	0.0104
EX22K291	金斯顿	Cms LA K326 x LA K326 CtCt; F1 杂交体 1	0.0245	0.0174	0.0001	0.0052
EX22K291	金斯顿	LAFc53	0.2227	0.0085	0.0001	0.0078
EX22K291	金斯顿	K326	2.3419	0.0400	0.0152	0.0636
EX22K291	金斯顿	K262 nic1/nic2	0.2436	0.0067	0.0001	0.0099
EX22K291	金斯顿	K326 222	0.3003	0.0941	0.0108	0.0059
EX22K291	金斯顿	K326 222 (22) (0.0086)	0.1590	0.0063	0.0001	0.0073
EX22K291	金斯顿	LAFc53	0.2146	0.0085	0.0001	0.0072
EX22K291	金斯顿	Cms LA K326 x LA K326 CsCs; F1 杂交体 1	0.0403	0.0427	0.0001	0.0063
EX22K291	金斯顿	K326	2.6240	0.0521	0.0175	0.0823
EX22K291	金斯顿	K262 nic1/nic2	0.1572	0.0047	0.0001	0.0062
EX22K291	金斯顿	K346	2.5422	0.0339	0.0171	0.0794
EX22K291	金斯顿	K326	2.7306	0.0477	0.0182	0.0810
EX22K291	金斯顿	Cms LA K326 x LA K326 CtCt; F1 杂交体 1	0.0387	0.0154	0.0001	0.0051
EX22K291	金斯顿	K326 222	0.2866	0.1025	0.0114	0.0060
EX22K291	金斯顿	K326 222	0.2989	0.1019	0.0107	0.0052
EX22K291	金斯顿	K346	2.9874	0.0719	0.0203	0.0924
EX22K291	金斯顿	K326	2.2057	0.2587	0.0165	0.0743
EX22K291	金斯顿	Cms LA K326 x LA K326 CsCs; F1 杂交体 1	0.0240	0.0555	0.0001	0.0077

[0170]

EX22K291	金斯顿	K326 222 (22) (0.0086)	0.0319	0.0048	0.0001	0.0001
EX22K291	金斯顿	Cms LA K326 x LA K326 CtCt; F1 杂交体 1	0.0237	0.0176	0.0001	0.0050
EX22K291	金斯顿	K326	2.5721	0.0440	0.0162	0.0659
EX22K291	金斯顿	L AFC53	0.1790	0.0065	0.0000	0.0063
EX22K291	金斯顿	K262 nic1/nic2	0.1515	0.0052	0.0001	0.0050
EX22R291	落基山	K326 222 (22) (0.0086)	0.1102	0.0070	0.0021	0.0053
EX22R291	落基山	K326 222	0.2213	0.0787	0.0078	0.0052
EX22R291	落基山	K326	2.0460	0.0301	0.0141	0.0521
EX22R291	落基山	Cms LA K326 x LA K326 CtCt; F1 杂交体 1	0.0051	0.0312	0.0001	0.0055
EX22R291	落基山	K346	1.0151	0.5268	0.0116	0.0504
EX22R291	落基山	K326	2.2771	0.0362	0.0129	0.0506
EX22R291	落基山	Cms LA K326 x LA K326 CsCs; F1 杂交体 1	0.0174	0.0701	0.0020	0.0083
EX22R291	落基山	K262 nic1/nic2	0.1742	0.0089	0.0016	0.0077
EX22R291	落基山	L AFC53	0.1668	0.0056	0.0018	0.0065
EX22R291	落基山	K326 222 (22) (0.0086)	0.0388	0.0047	0.0001	0.0001
EX22R291	落基山	K326	2.2850	0.0325	0.0111	0.0467
EX22R291	落基山	Cms LA K326 x LA K326 CsCs; F1 杂交体 1	0.0464	0.0659	0.0001	0.0081
EX22R291	落基山	L AFC53	0.2749	0.0066	0.0019	0.0097
EX22R291	落基山	Cms LA K326 x LA K326 CtCt; F1 杂交体 1	0.0088	0.0281	0.0001	0.0055
EX22R291	落基山	K346	2.1607	0.0298	0.0132	0.0609
EX22R291	落基山	K326	2.1878	0.0309	0.0121	0.0441
EX22R291	落基山	K326 222	0.2082	0.0861	0.0078	0.0048
EX22R291	落基山	K262 nic1/nic2	0.1531	0.0047	0.0001	0.0065
EX22R291	落基山	Cms LA K326 x LA K326 CtCt; F1 杂交体 1	0.0014	0.0342	0.0001	0.0056
EX22R291	落基山	Cms LA K326 x LA K326 CsCs; F1 杂交体 1	0.0104	0.0701	0.0001	0.0081

[0171]

EX22R291	落基山	K346		2.3458	0.1139	0.0164	0.0750
EX22R291	落基山	K326 222 (22) (0.0086)		0.0497	0.2018	0.0026	0.0123
EX22R291	落基山	K326		1.8547	0.0278	0.0100	0.0381
EX22R291	落基山	K326 222		0.2544	0.0821	0.0080	0.0049
EX22R291	落基山	K326		1.8507	0.0234	0.0109	0.0428
EX22R291	落基山	K262 nic1/mic2		0.1716	0.0045	0.0001	0.0061
EX22R291	落基山	L AFC53		0.2147	0.0066	0.0017	0.0074
EX22X291	牛津	K326		3.5830	0.0655	0.0196	0.0948
EX22X291	牛津	K326 222		0.5953	0.1233	0.0118	0.0180
EX22X291	牛津	K346		3.7520	0.0501	0.0252	0.1242
EX22X291	牛津	Cms LA K326 x LA K326 CsCs; F1 杂交体 1		0.1472	0.0595	0.0001	0.0100
EX22X291	牛津	K326 222 (22) (0.0086)		0.0932	0.0071	0.0001	0.0001
EX22X291	牛津	L AFC53		0.3579	0.0129	0.0001	0.0125
EX22X291	牛津	K262 nic1/mic2		0.2889	0.0117	0.0001	0.0103
EX22X291	牛津	Cms LA K326 x LA K326 CtCt; F1 杂交体 1		0.0733	0.0339	0.0001	0.0081
EX22X291	牛津	K326		3.4929	0.0523	0.0211	0.0894
EX22X291	牛津	K326 222 (22) (0.0086)		0.0963	0.0195	0.0001	0.0001
EX22X291	牛津	K262 nic1/mic2		0.2029	0.0314	0.0001	0.0080
EX22X291	牛津	Cms LA K326 x LA K326 CsCs; F1 杂交体 1		0.0567	0.0905	0.0001	0.0109
EX22X291	牛津	K326		3.7131	0.0789	0.0205	0.1044
EX22X291	牛津	K326		3.2027	0.0500	0.0174	0.0750
EX22X291	牛津	K326 222		1.2559	0.1025	0.0140	0.0329
EX22X291	牛津	L AFC53		0.4617	0.0108	0.0030	0.0157
EX22X291	牛津	Cms LA K326 x LA K326 CtCt; F1 杂交体 1		0.1074	0.0379	0.0001	0.0105
EX22X291	牛津	K346		3.3122	0.0649	0.0225	0.1001

[0172]

EX22X291	牛津	K326 222	0.3656	0.1335	0.0117	0.0080
EX22X291	牛津	K346	2.9800	0.0731	0.0204	0.0970
EX22X291	牛津	Cms LA K326 x LA K326 CtCt; F1 杂交体 I	0.0760	0.0320	0.0001	0.0072
EX22X291	牛津	K326 222 (22) (0.0086)	0.1897	0.0093	0.0001	0.0066
EX22X291	牛津	K262 nic1/nic2	0.2537	0.0081	0.0001	0.0088
EX22X291	牛津	K326	3.4317	0.1700	0.0197	0.0895
EX22X291	牛津	LAF53	0.4690	0.0125	0.0028	0.0161
EX22X291	牛津	K326	3.8257	0.0662	0.0219	0.0937
EX22X291	牛津	Cms LA K326 x LA K326 CsCs; F1 杂交体 I	0.1010	0.0945	0.0001	0.0119

[0173] 实施例2

[0174] 使用CRISPR/Cas9进行靶向诱变以调节烟草中的烟碱生物合成。本实施例展示了

使用CRISPR/Cas9通过在植物中组合以下来减少烟草植物中的烟碱生物合成：(A) 增加CYP82E2和/或CYP82E3活性的一种或多种遗传修饰；和(B) nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因。

[0175] 方法。nic1隐性等位基因和/或nic2隐性等位基因可衍生自以下烟草植物品系之一：LAFC53 (nic1/nic1)、MAFC5 (Nic1/Nic1nic2/nic2)、LMAFC34 (nic1/nic1 Nic2/Nic2)、LA Burley 21 (nic1/nic1nic2/nic2)、LI Burley 21 (nic1/nic1 Nic2/Nic2) 或HI Burley 21 (Nic1/Nic1 nic2/nic2)，或具有在其中已在Nic1Nic2基因座处掺入隐性等位基因的基因组的任何烟草植物品系。

[0176] 使用本领域已知的标准方法制备Cas9和sgRNA载体，以在烟草植物的CYP82E2蛋白中引入K375E点突变和/或L422W点突变和/或在烟草植物的CYP82E3蛋白中引入C330W点突变。参见，例如Schiml等人，*Methods in Molecular Biology*, 1469:11 1-122 (2016)。使用序列分析软件，可确定与规范形式5'-NGG匹配的紧邻原型间隔区相邻基序 (PAM) 序列的5'的预期sgRNA靶向序列。

[0177] 根据本领域已知的方法，以单链DNA供体寡核苷酸或DNA供体质粒的形式制备包含供体DNA的修复模板，所述供体DNA包含期望突变（例如，相对于野生型CYP82E2氨基酸序列（例如，SEQ ID NO:1）的K375E点突变和/或L422W点突变和/或相对于野生型CYP82E3氨基酸序列（例如，SEQ ID NO:5）的C330W点突变）。参见，例如Ran等人，*Nature Protocols*, 8(11): 2281-2308 (2013) 和Lu等人，“Targeted, efficient sequence insertion and replacement in rice,” *Nature Biotechnology*, 38(12):1402-1407. doi:10.1038/s41587-020-0581-5, (2020)。将包含Cas9和sgRNA的载体以及供体寡核苷酸或质粒转化到根瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 中。进行稳定的根瘤农杆菌介导的转化，转化到以下品系中的一种中：MAFC5、LMAFC34、LA Burley 21、LI Burley 21或HI Burley 21（例如，通过花浸转化或农杆菌渗入方法）。转化后10-14天，从植物中提取DNA样品并进行诱变事件测定。这些CRISPR/Cas诱导的突变可通过例如PCR/限制性酶测定、Surveyor核酸酶测定和/或测序来鉴定。

[0178] 结果：预测与对应的天然存在的或非转化的一种或多种对照烟草植物相比，包含nic1隐性等位基因和/或nic2隐性等位基因以及烟草植物的CYP82E2蛋白中的K375E点突变和/或L422W点突变和/或CYP82E3蛋白中的C330W点突变的遗传工程化的烟草植物将具有减少的烟碱类生物碱诸如烟碱、降烟碱、新烟草碱和/或假木贼碱的积累。

[0179] 因此，这些结果将表明本技术的方法可用于生产具有减少的烟碱类生物碱含量的烟草植物，其中增加CYP82E2和/或CYP82E3的活性的一个或多个遗传修饰和nic1的隐性等位基因和/或nic2的隐性等位基因组合。

[0180] 生物寄存物

[0181] 育种品系SC58 CsCs和SC58 CtCt的再生材料分别寄存于北卡罗莱纳州立大学作物与土壤科学系，罗利市，NC 27695。SC58 CsCs，被鉴定为LA K326 CsCs，以登录号GH21-190-17寄存。SC58 CtCt，被鉴定为LA K326 CtCt，以登录号GH21-191-13寄存。经NCSU事先批准的第三方专家可以经由向北卡罗莱纳州立大学研究商业化办公室主任提出书面请求来获得任一品系的生物材料样品，所述办公室位于波尔顿创新中心2楼，1021主校区大道，罗利市，NC 27606。

[0182] 除37CFR§1.808(b)允许的情况外,一旦授予来自本申请或出于优先权目的引用本申请的任何申请的专利,对公众可获得的寄存的生物材料施加的所有限制将不可撤销地去除。

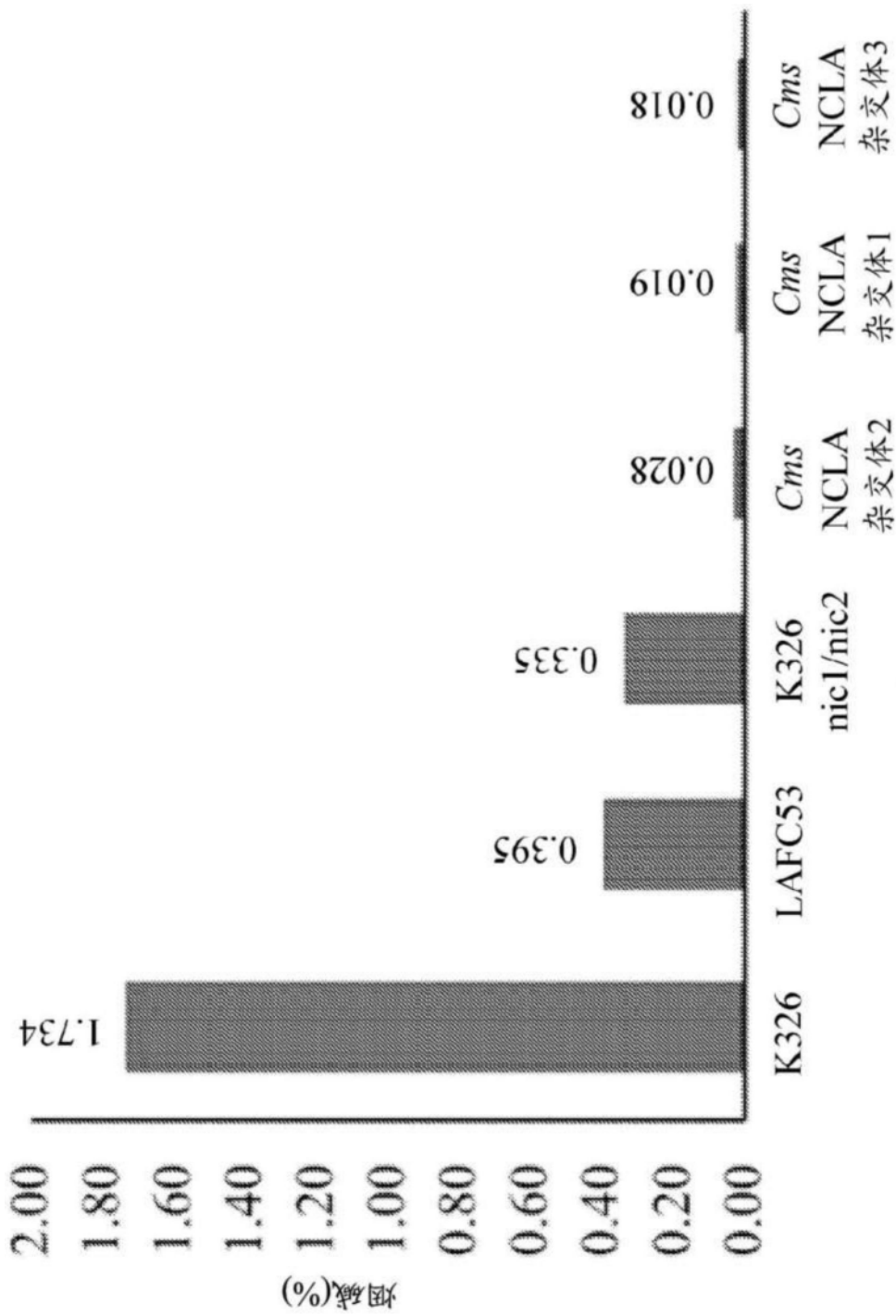


图 1A

图1A-1D



图1A-1D(续)

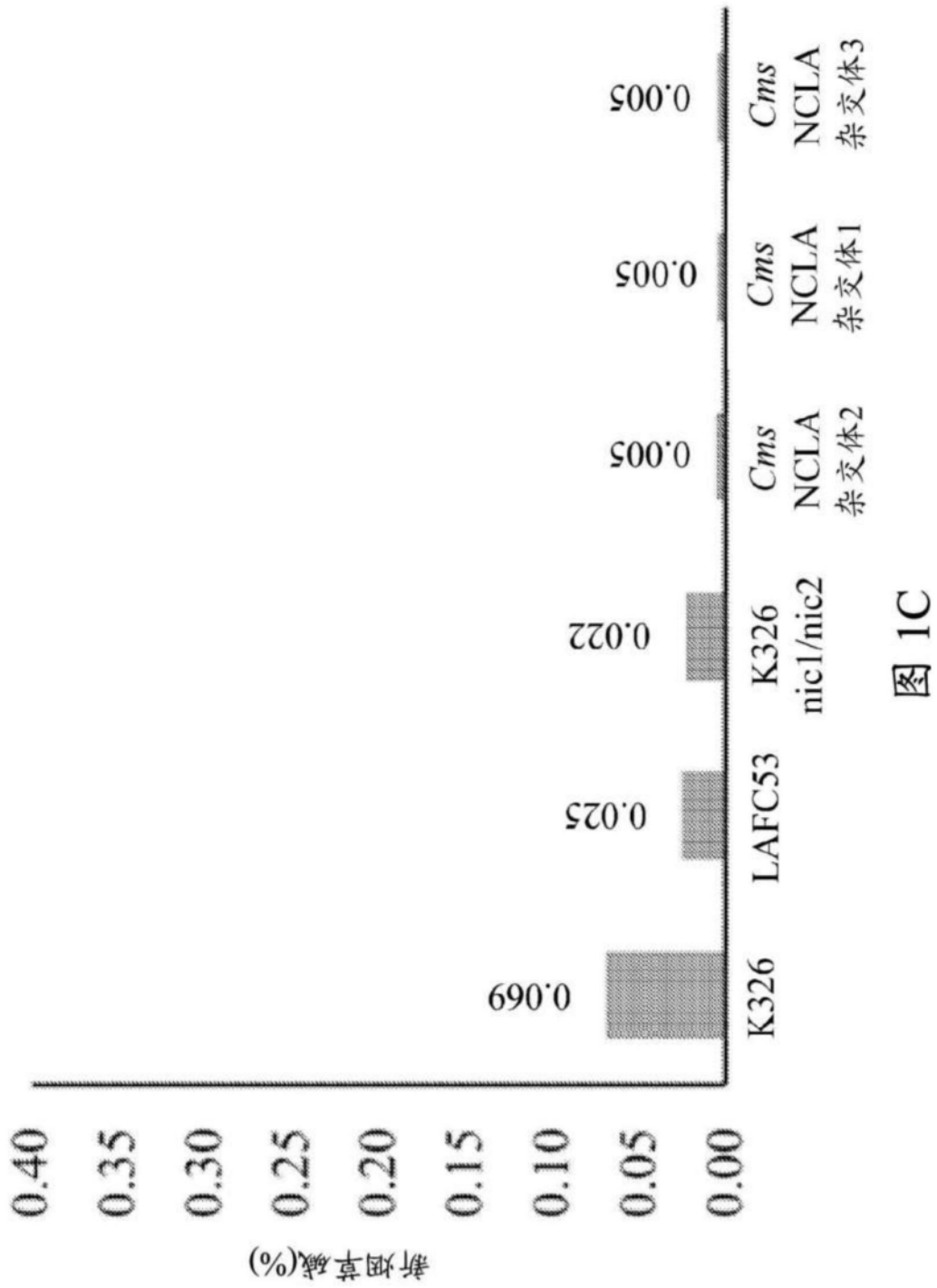


图 1C

图1A-1D(续)

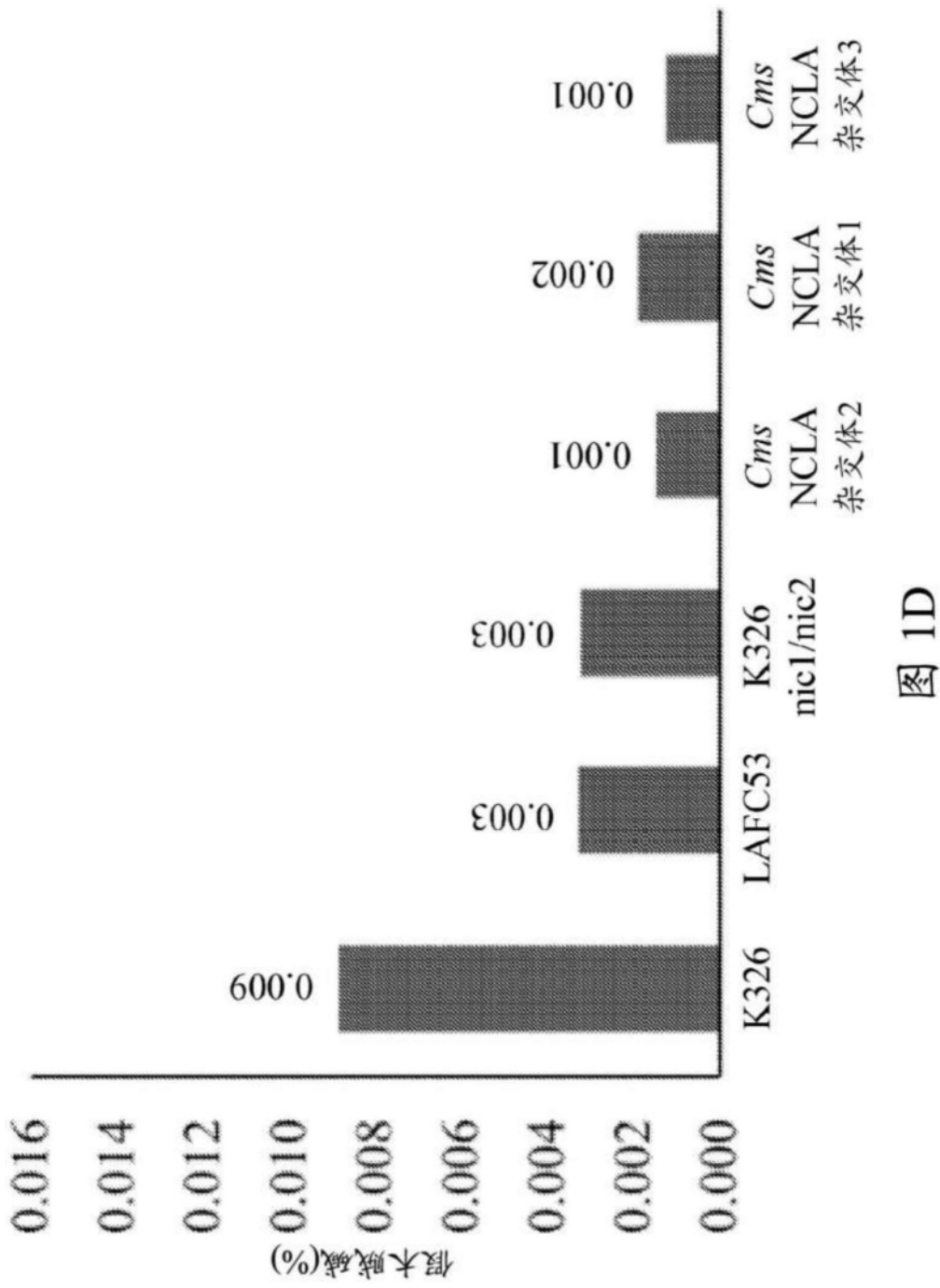


图1A-1D(续)

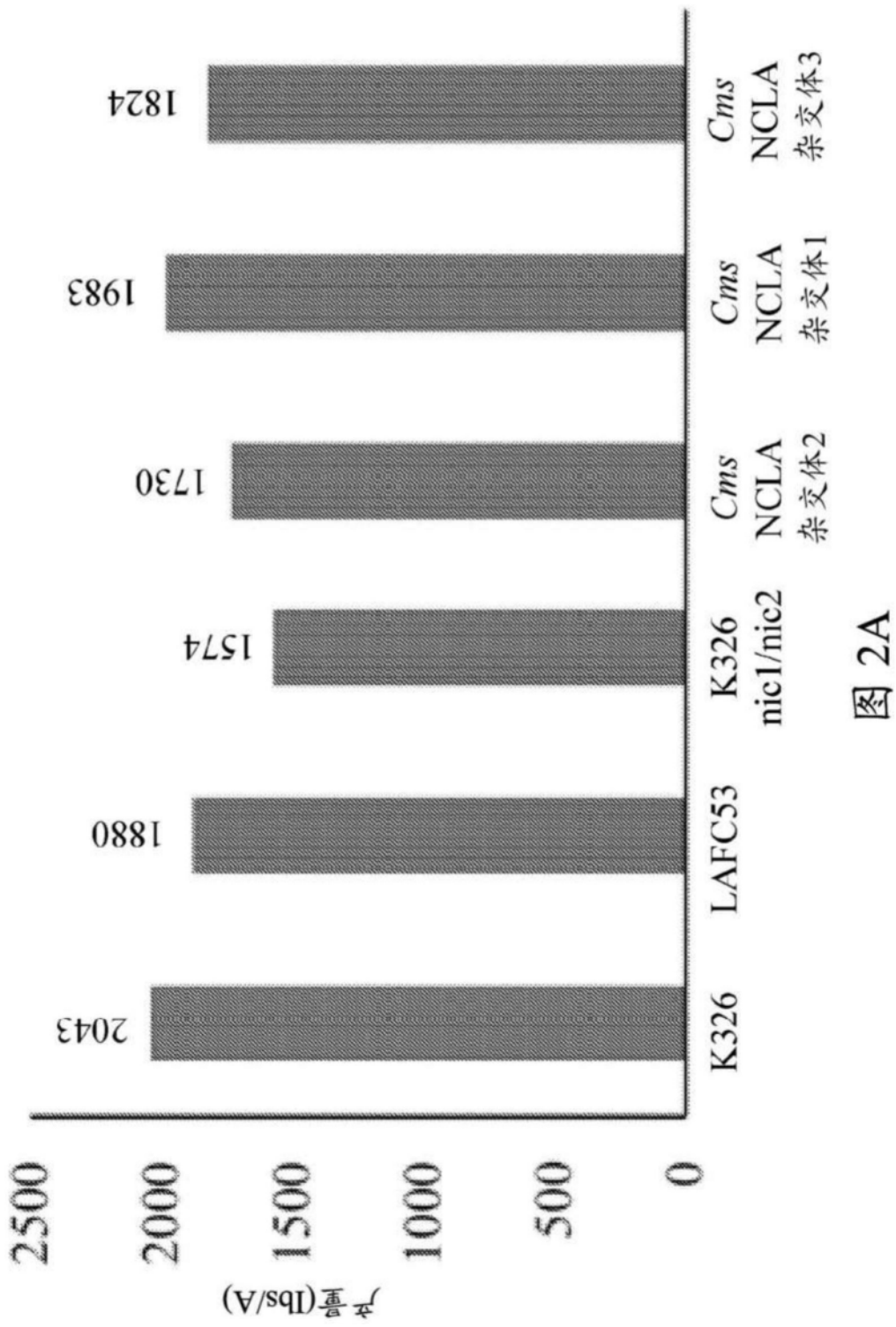


图2A-2D

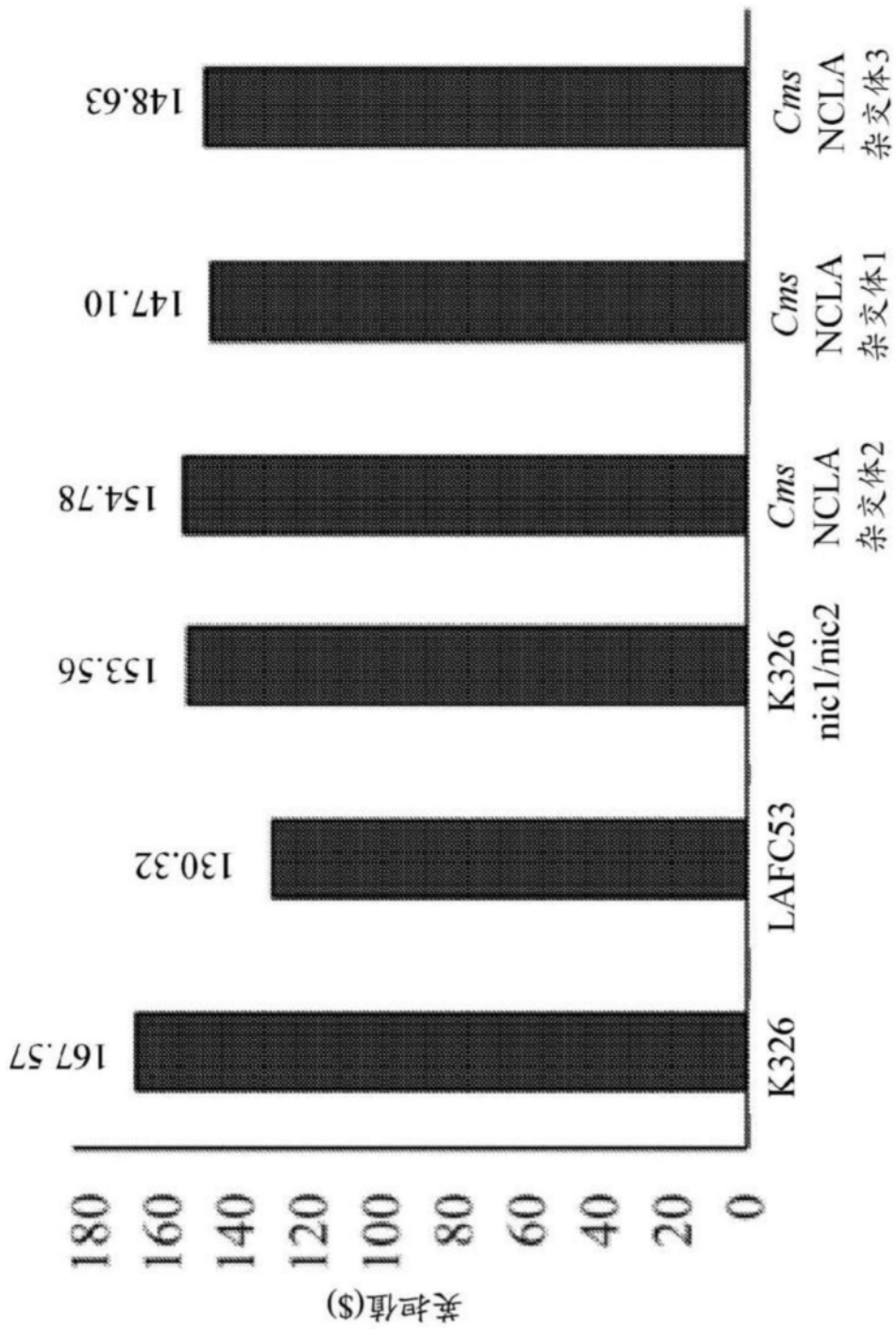


图 2B

图2A-2D(续)

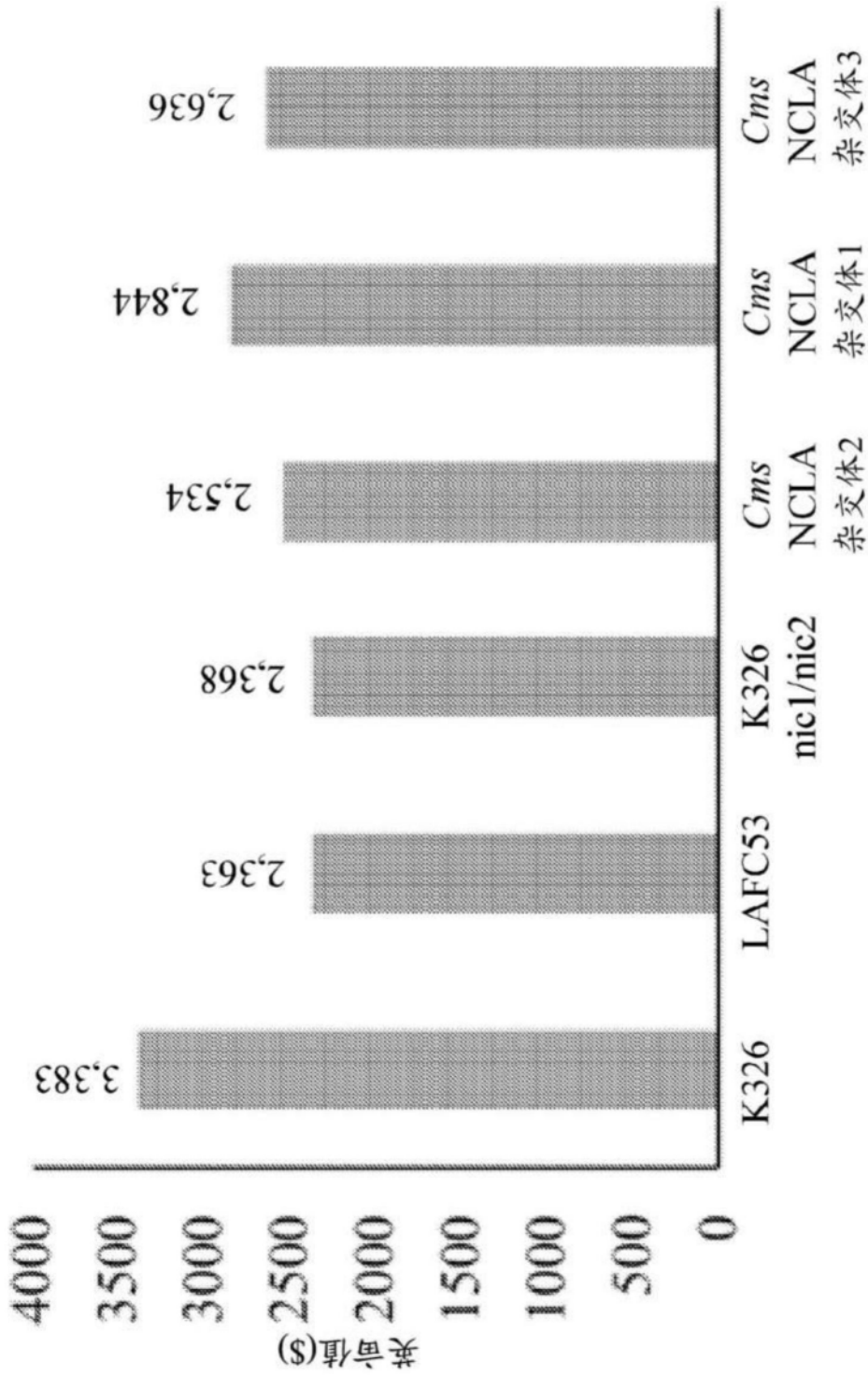


图 2C

图2A-2D(续)

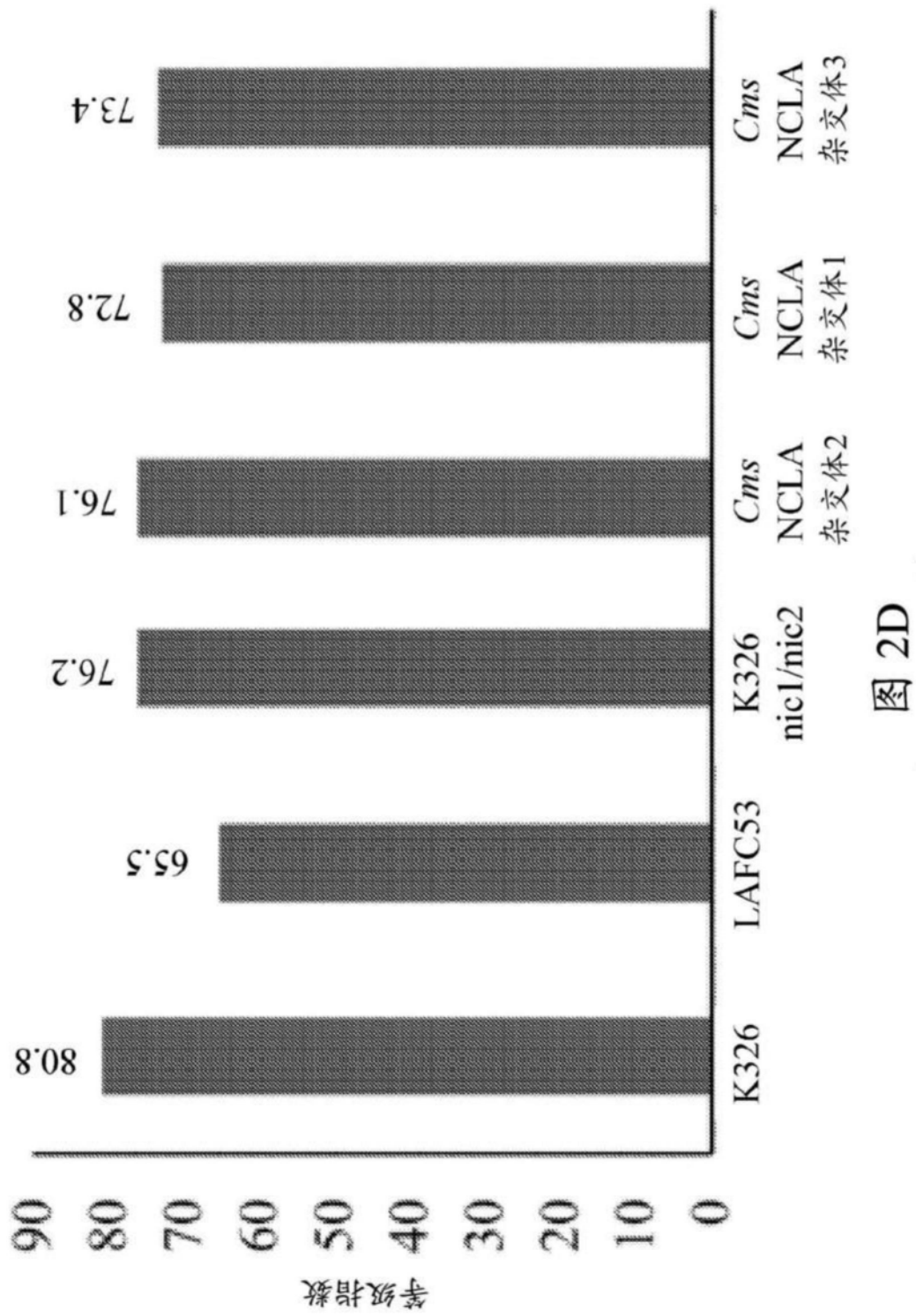


图 2D

图2A-2D(续)