



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106793760 B

(45) 授权公告日 2021.03.09

(21) 申请号 201580035068.6

(22) 申请日 2015.06.29

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106793760 A

(43) 申请公布日 2017.05.31

(30) 优先权数据

2014-133378 2014.06.27 JP (续)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016.12.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2015/068713 2015.06.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/199242 JA 2015.12.30

(83) 生物保藏信息

FERM BP-22284 2015.02.25 (续)

(73) 专利权人 日本烟草产业株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 高仓由光 古贺一治 新城亮

宇田川久史

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 沈雪

(51) Int.Cl.

C12N 15/29 (2006.01) (续)

(56) 对比文件

WO 2005118850 A1, 2005.12.15

CN 101397569 A, 2009.04.01

Chikara Masuta等.A single Amino Acid

Change in Viral Genome-Associated

Protein of Potato Virus Y Correlates with Resistance Breaking in 'Virgin A mutant' Tobacco.《Phytopathology》.1999,第89卷(第2期),摘要.

X.H.Mo等.Complete nucleotide sequence and genome organization of a Chinese isolate of tobacco bushy top virus.《Achives of Virology》.2003,第148卷(第2期),摘要.

Marjo Ala-Poikela等.Helper Component Proteinase of the Genus Potyvirus Is an Interaction Partner of Translation Initiation Factors eIF(iso)4E and eIF4E and Contains a 4E Binding Motif.《JOURNAL OF VIROLOGY》.2011,第85卷(第13期),摘要.

E. Julio等.Characterization of PVY (Potato Virus Y) resistance in tobacco: potential role of an eIF4E gene identified by high throughput sequencing technologies..《International Plant & Animal Genome Conference XXI》.2013,第2-13页.

龚达平.烟草重要基因篇:1.烟草抗病相关基因.《中国烟草科学》.2014,第35卷(第1期),第134页第6节. (续)

审查员 吴涛

权利要求书5页 说明书40页

序列表17页 附图2页

(54) 发明名称

病毒抗性烟草及其制备方法

(57) 摘要

本发明的病毒抗性烟草在翻译起始因子eIF (iso) 4E基因中具有变异,由此,生产对病毒无功

能的eIF (iso) 4E蛋白质、或者抑制eIF (iso) 4E基因的表达式,或者本发明的病毒抗性烟草的eIF (iso) 4E基因的表达量与野生型相比为20%以下。

[转续页]

[接上页]

(30) 优先权数据

2014-194424 2014.09.24 JP

(83) 生物保藏信息

FERM BP-22285 2015.02.25

(51) Int.Cl.

C12N 15/11 (2006.01)

C12Q 1/6895 (2018.01)

A01H 5/00 (2018.01)

A01H 1/00 (2006.01)

A01H 1/06 (2006.01)

A01H 6/82 (2018.01)

(56) 对比文件

皮金鹏等.烟草马铃薯Y病毒病相关基因 eIF4E 的片段克隆及RNAi载体构建.《中国农学通报》.2012,第28卷(第18期),189-193.

Xinhua Wang等.Silencing of the Host Factor eIF(iso)4E Gene Confers Plum Pox Virus Resistance in Plum.《PLOS ONE》.2013,第8卷(第1期),第1-12页.

Miguel Angel Freire.Potyviral VPg and HC-Pro Proteins and the Cellular Translation Initiation Factor eIF(iso)4E Interact with Exoribonuclease Rrp6 and a Small α -Heat Shock Protein.《Plant Mol Biol Rep》.2013,第32卷(第2期),596-604.

Jungsu Jung等.Exploring Natural Variations in eIF4E and Screening for Potyviral Resistance in Diverse Nicotiana Species.《Hort. Environ. Biotechnol》.2013,第54卷(第5期),摘要、第431页左栏第2段、第438页右栏最后1段至第439页左栏第1段.

1. 一种病毒抗性 *Nicotiana tabacum* 的制备方法, 该方法包括通过向翻译起始因子 eIF (iso) 4E 基因导入变异来制备对病毒具有抗性的 *Nicotiana tabacum*, 所述变异是生产对病毒无功能的翻译起始因子 eIF (iso) 4E 蛋白质的变异、或者是抑制翻译起始因子 eIF (iso) 4E 基因的表达的变异,

所述病毒为打破 *Nicotiana tabacum* 的 Virgin A 突变体的病毒抗性的毒株, 且所述毒株为马铃薯病毒 Y 的毒株; 或者

所述病毒为烟草丛顶病毒,

所述病毒为烟草丛顶病毒时, 下述基因具有一个以上的变异:

(a) 编码由序列号 3 所示的氨基酸序列构成的 eIF (iso) 4E 蛋白质的野生型 eIF (iso) 4E 基因、(b) 编码与序列号 3 所示的氨基酸序列具有 99% 以上序列同源性的功能性 eIF (iso) 4E 蛋白质的野生型 eIF (iso) 4E 基因、(c) 生成由序列号 5 所示的碱基序列构成的 mRNA 的野生型 eIF (iso) 4E 基因、或者 (d) 生成与序列号 5 所示的碱基序列具有 99% 以上序列同源性的 mRNA 且编码功能性 eIF (iso) 4E 蛋白质的野生型 eIF (iso) 4E 基因,

所述病毒为打破 *Nicotiana tabacum* 的 Virgin A 突变体的病毒抗性的毒株, 且所述毒株为马铃薯病毒 Y 的毒株时, 下述基因具有一个以上的变异:

(a') 编码由序列号 4 所示的氨基酸序列构成的 eIF (iso) 4E 蛋白质的野生型 eIF (iso) 4E 基因、(b') 编码与序列号 4 所示的氨基酸序列具有 99% 以上序列同源性的功能性 eIF (iso) 4E 蛋白质的野生型 eIF (iso) 4E 基因、(c') 生成由序列号 6 所示的碱基序列构成的 mRNA 的野生型 eIF (iso) 4E 基因、或者 (d') 生成与序列号 6 所示的碱基序列具有 99% 以上序列同源性的 mRNA 且编码功能性 eIF (iso) 4E 蛋白质的野生型 eIF (iso) 4E 基因。

2. 根据权利要求 1 所述的病毒抗性 *Nicotiana tabacum* 的制备方法, 其中, 所述变异为无义变异。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的病毒抗性 *Nicotiana tabacum* 的制备方法, 其中, 所述变异是野生型翻译起始因子 eIF (iso) 4E 基因的外显子中下述 (1) ~ (4) 所示的 1 个以上的变异,

(1) 密码子 CAA 的 C 取代为 T、(2) 密码子 CGA 的 C 取代为 T、(3) 密码子 CAG 的 C 取代为 T、(4) 密码子 TGG 的第 1 个 G 取代为 A、密码子 TGG 的第 2 个 G 取代为 A 或者密码子 TGG 的 2 个 G 取代为 A, 并且,

所述病毒为烟草丛顶病毒时, 所述野生型翻译起始因子 eIF (iso) 4E 基因的外显子是 (a) 编码由序列号 3 所示的氨基酸序列构成的翻译起始因子 eIF (iso) 4E 蛋白质的野生型翻译起始因子 eIF (iso) 4E 基因的外显子、(b) 编码与序列号 3 所示的氨基酸序列具有 99% 以上序列同源性的功能性翻译起始因子 eIF (iso) 4E 蛋白质的野生型翻译起始因子 eIF (iso) 4E 基因的外显子、(c) 生成由序列号 5 所示的碱基序列构成的 mRNA 的野生型翻译起始因子 eIF (iso) 4E 基因的外显子、或者 (d) 生成与序列号 5 所示的碱基序列具有 99% 以上序列同源性的 mRNA 且编码功能性翻译起始因子 eIF (iso) 4E 蛋白质的野生型翻译起始因子 eIF (iso) 4E 基因的外显子; 或者

所述病毒为打破 *Nicotiana tabacum* 的 Virgin A 突变体的病毒抗性的毒株, 且所述毒株为马铃薯病毒 Y 的毒株时, 所述野生型翻译起始因子 eIF (iso) 4E 基因的外显子是 (a') 编码由序列号 4 所示的氨基酸序列构成的翻译起始因子 eIF (iso) 4E 蛋白质的野生型翻译起始因子 eIF (iso) 4E 基因的外显子、(b') 编码与序列号 4 所示的氨基酸序列具有 99% 以上序列

同源性的功能性翻译起始因子eIF (iso) 4E蛋白质的野生型翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的外显子、(c')生成由序列号6所示的碱基序列构成的mRNA的野生型翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的外显子、或者(d')生成与序列号6所示的碱基序列具有99%以上序列同源性的mRNA且编码功能性翻译起始因子eIF (iso) 4E蛋白质的野生型翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的外显子。

4. 根据权利要求1或2所述的病毒抗性*Nicotiana tabacum*的制备方法, 其中, 所述变异是基因组DNA中由序列号7所示的碱基序列构成的翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的下述(1)~(27)所示的1个以上的变异:

(1) 第270号的C取代为T、(2) 第295号的G取代为A、(3) 第296号的G取代为A、(4) 第304号的G取代为A、(5) 第305号的G取代为A、(6) 第315号的C取代为T、(7) 第330号的C取代为T、(8) 第343号的G取代为A、(9) 第344号的G取代为A、(10) 第357号的C取代为T、(11) 第394号的G取代为A、(12) 第395号的G取代为A、(13) 第1740号的C取代为T、(14) 第1813号的G取代为A、(15) 第1814号的G取代为A、(16) 第1846号的G取代为A、(17) 第1847号的G取代为A、(18) 第1888号的G取代为A、(19) 第1889号的G取代为A、(20) 第2050号的C取代为T、(21) 第2104号的C取代为T、(22) 第2123号的G取代为A、(23) 第2124号的G取代为A、(24) 第2152号的C取代为T、(25) 第4742号的G取代为A、(26) 第4743号的G取代为A、(27) 第4926号的C取代为T,

且所述病毒为烟草丛顶病毒。

5. 根据权利要求1或2所述的病毒抗性*Nicotiana tabacum*的制备方法, 其中, 所述变异是基因组DNA中由序列号8所示的碱基序列构成的翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的下述(1)~(26)所示的1个以上的变异:

(1) 第264号的C取代为T、(2) 第289号的G取代为A、(3) 第290号的G取代为A、(4) 第298号的G取代为A、(5) 第299号的G取代为A、(6) 第315号的C取代为T、(7) 第328号的G取代为A、(8) 第329号的G取代为A、(9) 第342号的C取代为T、(10) 第379号的G取代为A、(11) 第380号的G取代为A、(12) 第1630号的C取代为T、(13) 第1703号的G取代为A、(14) 第1704号的G取代为A、(15) 第1736号的G取代为A、(16) 第1737号的G取代为A、(17) 第1778号的G取代为A、(18) 第1779号的G取代为A、(19) 第1940号的C取代为T、(20) 第1994号的C取代为T、(21) 第2013号的G取代为A、(22) 第2014号的G取代为A、(23) 第2042号的C取代为T、(24) 第3224号的G取代为A、(25) 第3225号的G取代为A、(26) 第3406号的C取代为T,

且所述病毒为所述病毒为打破*Nicotiana tabacum*的Virgin A突变体的病毒抗性的毒株, 且所述毒株为马铃薯病毒Y的毒株。

6. 一种病毒抗性*Nicotiana tabacum*的制备方法, 该方法包括, 通过导入使翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的表达量抑制至与野生型相比为20%以下的因子来制备对病毒具有抗性的*Nicotiana tabacum*,

所述病毒为打破*Nicotiana tabacum*的Virgin A突变体的病毒抗性的毒株, 且所述毒株为马铃薯病毒Y的毒株; 或者

所述病毒为烟草丛顶病毒,

所述因子为RNAi构建物,

所述翻译起始因子eIF (iso) 4E基因为编码由序列号3或4所示的氨基酸序列构成的eIF (iso) 4E蛋白质的野生型eIF (iso) 4E基因、编码与序列号3或4所示的氨基酸序列具有99%

以上序列同源性的功能性eIF (iso) 4E蛋白质的野生型eIF (iso) 4E基因、生成由序列号5或6所示的碱基序列构成的mRNA的野生型eIF (iso) 4E基因、或者生成与序列号5或6所示的碱基序列具有99%以上序列同源性的mRNA且编码功能性eIF (iso) 4E蛋白质的野生型eIF (iso) 4E基因。

7. 根据权利要求6所述的病毒抗性Nicotiana tabacum的制备方法, 其中, 向Nicotiana tabacum导入使所述表达量抑制至与野生型相比为10%以下的因子。

8. 一种检测用多核苷酸, 其是用于检测烟草的翻译起始因子eIF (iso) 4E基因中的变异的多核苷酸, 其中, 该变异是生产对病毒无功能的翻译起始因子eIF (iso) 4E蛋白质的变异、或者是抑制翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的表达的变异,

所述病毒为打破Nicotiana tabacum的Virgin A突变体的病毒抗性的毒株, 且所述毒株为马铃薯病毒Y的毒株; 或者

所述病毒为烟草丛顶病毒,

所述病毒为烟草丛顶病毒时, 下述基因具有一个以上的变异:

(a) 编码由序列号3所示的氨基酸序列构成的eIF (iso) 4E蛋白质的野生型eIF (iso) 4E基因、(b) 编码与序列号3所示的氨基酸序列具有99%以上序列同源性的功能性eIF (iso) 4E蛋白质的野生型eIF (iso) 4E基因、(c) 生成由序列号5所示的碱基序列构成的mRNA的野生型eIF (iso) 4E基因、或者 (d) 生成与序列号5所示的碱基序列具有99%以上序列同源性的mRNA且编码功能性eIF (iso) 4E蛋白质的野生型eIF (iso) 4E基因,

所述病毒为打破Nicotiana tabacum的Virgin A突变体的病毒抗性的毒株, 且所述毒株为马铃薯病毒Y的毒株时, 下述基因具有一个以上的变异:

(a') 编码由序列号4所示的氨基酸序列构成的eIF (iso) 4E蛋白质的野生型eIF (iso) 4E基因、(b') 编码与序列号4所示的氨基酸序列具有99%以上序列同源性的功能性eIF (iso) 4E蛋白质的野生型eIF (iso) 4E基因、(c') 生成由序列号6所示的碱基序列构成的mRNA的野生型eIF (iso) 4E基因、或者 (d') 生成与序列号6所示的碱基序列具有99%以上序列同源性的mRNA且编码功能性eIF (iso) 4E蛋白质的野生型eIF (iso) 4E基因。

9. 根据权利要求8所述的检测用多核苷酸, 其中, 所述变异为无义变异。

10. 根据权利要求8或9所述的检测用多核苷酸, 其中, 所述变异是野生型翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的外显子中下述 (1) ~ (4) 所示的1个以上的变异,

(1) 密码子CAA的C取代为T、(2) 密码子CGA的C取代为T、(3) 密码子CAG的C取代为T、(4) 密码子TGG的第1个G取代为A、密码子TGG的第2个G取代为A或者密码子TGG的2个G取代为A,

所述病毒为烟草丛顶病毒时, 所述野生型翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的外显子是 (a) 编码由序列号3所示的氨基酸序列构成的翻译起始因子eIF (iso) 4E蛋白质的野生型翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的外显子、(b) 编码与序列号3所示的氨基酸序列具有99%以上序列同源性的功能性翻译起始因子eIF (iso) 4E蛋白质的野生型翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的外显子、(c) 生成由序列号5所示的碱基序列构成的mRNA的野生型翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的外显子、或者 (d) 生成与序列号5所示的碱基序列具有99%以上序列同源性的mRNA且编码功能性翻译起始因子eIF (iso) 4E蛋白质的野生型翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的外显子,

所述病毒为打破Nicotiana tabacum的Virgin A突变体的病毒抗性的毒株, 且所述毒

株为马铃薯病毒Y的毒株时,所述野生型翻译起始因子eIF(iso)4E基因的外显子是(a')编码由序列号4所示的氨基酸序列构成的翻译起始因子eIF(iso)4E蛋白质的野生型翻译起始因子eIF(iso)4E基因的外显子、(b')编码与序列号4所示的氨基酸序列具有99%以上序列同源性的功能性翻译起始因子eIF(iso)4E蛋白质的野生型翻译起始因子eIF(iso)4E基因的外显子、(c')生成由序列号6所示的碱基序列构成的mRNA的野生型翻译起始因子eIF(iso)4E基因的外显子、或者(d')生成与序列号6所示的碱基序列具有99%以上序列同源性的mRNA且编码功能性翻译起始因子eIF(iso)4E蛋白质的野生型翻译起始因子eIF(iso)4E基因的外显子。

11. 根据权利要求8或9所述的检测用多核苷酸,其中,所述变异是基因组DNA中由序列号7所示的碱基序列构成的翻译起始因子eIF(iso)4E基因的下述(1)~(27)所示的1个以上的变异:

(1) 第270号的C取代为T、(2) 第295号的G取代为A、(3) 第296号的G取代为A、(4) 第304号的G取代为A、(5) 第305号的G取代为A、(6) 第315号的C取代为T、(7) 第330号的C取代为T、(8) 第343号的G取代为A、(9) 第344号的G取代为A、(10) 第357号的C取代为T、(11) 第394号的G取代为A、(12) 第395号的G取代为A、(13) 第1740号的C取代为T、(14) 第1813号的G取代为A、(15) 第1814号的G取代为A、(16) 第1846号的G取代为A、(17) 第1847号的G取代为A、(18) 第1888号的G取代为A、(19) 第1889号的G取代为A、(20) 第2050号的C取代为T、(21) 第2104号的C取代为T、(22) 第2123号的G取代为A、(23) 第2124号的G取代为A、(24) 第2152号的C取代为T、(25) 第4742号的G取代为A、(26) 第4743号的G取代为A、(27) 第4926号的C取代为T,

且所述病毒为烟草丛顶病毒。

12. 根据权利要求8或9所述的检测用多核苷酸,其中,所述变异是基因组DNA中由序列号8所示的碱基序列构成的翻译起始因子eIF(iso)4E基因的下述(1)~(26)所示的1个以上的变异:

(1) 第264号的C取代为T、(2) 第289号的G取代为A、(3) 第290号的G取代为A、(4) 第298号的G取代为A、(5) 第299号的G取代为A、(6) 第315号的C取代为T、(7) 第328号的G取代为A、(8) 第329号的G取代为A、(9) 第342号的C取代为T、(10) 第379号的G取代为A、(11) 第380号的G取代为A、(12) 第1630号的C取代为T、(13) 第1703号的G取代为A、(14) 第1704号的G取代为A、(15) 第1736号的G取代为A、(16) 第1737号的G取代为A、(17) 第1778号的G取代为A、(18) 第1779号的G取代为A、(19) 第1940号的C取代为T、(20) 第1994号的C取代为T、(21) 第2013号的G取代为A、(22) 第2014号的G取代为A、(23) 第2042号的C取代为T、(24) 第3224号的G取代为A、(25) 第3225号的G取代为A、(26) 第3406号的C取代为T,

所述病毒为打破Nicotiana tabacum的Virgin A突变体的病毒抗性的毒株,且所述毒株为马铃薯病毒Y的毒株。

13. 根据权利要求8或9所述的检测用多核苷酸,其是包夹所述变异的核酸引物的组、或者其中之一或两者包含多核苷酸的核酸引物的组,所述多核苷酸由包含所述变异的连续的碱基序列或其互补序列构成。

14. 一种病毒抗性Nicotiana tabacum的筛选方法,该方法包括:

利用权利要求8~13中任一项所述的检测用多核苷酸检查在Nicotiana tabacum中是否有基因组DNA中的所述变异的检查工序,以及

将在所述检查工序中检测出所述变异的Nicotiana tabacum筛选为病毒抗性Nicotiana tabacum的筛选工序。

15.一种Nicotiana tabacum对病毒抗性的判定用DNA标记物,其包含由翻译起始因子eIF (iso) 4E基因中的含有变异的连续的碱基序列或其互补序列构成的多核苷酸,其中,该变异是生产对病毒无功能的翻译起始因子eIF (iso) 4E蛋白质的变异、或者是抑制翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的表达的变异,

所述病毒为打破Nicotiana tabacum的Virgin A突变体的病毒抗性的毒株,且所述毒株为马铃薯病毒Y的毒株;或者

所述病毒为烟草丛顶病毒,

所述病毒为烟草丛顶病毒时,下述基因具有一个以上的变异:

(a) 编码由序列号3所示的氨基酸序列构成的eIF (iso) 4E蛋白质的野生型eIF (iso) 4E基因、(b) 编码与序列号3所示的氨基酸序列具有99%以上序列同源性的功能性eIF (iso) 4E蛋白质的野生型eIF (iso) 4E基因、(c) 生成由序列号5所示的碱基序列构成的mRNA的野生型eIF (iso) 4E基因、或者(d) 生成与序列号5所示的碱基序列具有99%以上序列同源性的mRNA且编码功能性eIF (iso) 4E蛋白质的野生型eIF (iso) 4E基因,

所述病毒为打破Nicotiana tabacum的Virgin A突变体的病毒抗性的毒株,且所述毒株为马铃薯病毒Y的毒株时,下述基因具有一个以上的变异:

(a') 编码由序列号4所示的氨基酸序列构成的eIF (iso) 4E蛋白质的野生型eIF (iso) 4E基因、(b') 编码与序列号4所示的氨基酸序列具有99%以上序列同源性的功能性eIF (iso) 4E蛋白质的野生型eIF (iso) 4E基因、(c') 生成由序列号6所示的碱基序列构成的mRNA的野生型eIF (iso) 4E基因、或者(d') 生成与序列号6所示的碱基序列具有99%以上序列同源性的mRNA且编码功能性eIF (iso) 4E蛋白质的野生型eIF (iso) 4E基因。

病毒抗性烟草及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及病毒抗性烟草及其制备方法。

背景技术

[0002] 马铃薯Y病毒组 (Potyvirus) 属是植物病毒中最大的一族,以各种植物作为宿主。马铃薯病毒 (Potato virus) Y (以下称为PVY) 是马铃薯Y病毒组 (Potyvirus) 属的病毒,通过蚜虫而非持续性地传播,感染茄科植物的多个品种。其中,对于烟草而言,PVY引起作物生长高度的减少及叶脉的坏疽症状等,其结果是导致烟叶的品质及产量降低,对世界的烟草生产造成很大损害。而且,在使用感染PVY而品质降低的烟叶作为原料使用时,生产的烟草产品的品质也大幅降低。

[0003] 另一方面,烟草丛顶病毒 (Tobacco bushy top virus) (以下称为TBTV) 是属于伞形植物病毒属 (Umbravirus) 的病毒,作为非洲和亚洲发生的烟草丛顶病 (tobacco bushy top disease) 的致病病毒而周知。该病毒在自然界中通过蚜虫持续性地传播,对烟草引起生长停滞及叶的斑纹症状,导致品质及产量降低。烟草丛顶病特别是非洲各国的重要病害。

[0004] 对于烟草 (*Nicotiana tabacum*) 而言,已知有对PVY显示出抗性的现有遗传资源 Virgin A突变体 (以下称为VAM),并积极充分地用于烟草育种程序中。但是,最近世界上报告了打破VAM抗性的PVY新毒株的VAM-Breaking毒株 (有时也标记为PVY-Breaking毒株或PVY-B)。目前,强烈地需求对该VAM-Breaking毒株的抗性烟草。最近,报告了通过放射线照射而获得了对VAM-Breaking毒株的抗性的烟草 (非专利文献1),但尚未确定其引起抗性的基因。另外,已知例如非洲烟草 (*Nicotiana africana*) 等烟草野生种中存在对PVY-Breaking毒株显示抗性的物质,但尚未到达充分地用于育种程序的阶段。

[0005] 另外还报告了以下内容,使用43种烟草品种及烟草属 (*Nicotiana*) 野生种实施了对烟草丛顶病抗性源的探索,虽然在烟草品种中没有显示出抗性的品种,但数种野生种未表现出病毒病的症状 (非专利文献2)。但是,该抗性的遗传形式并不明确,在进一步从野生种向栽培种烟草 (烟草) 导入抗性的情况下,可以预测到也会同时导入对品质及产量造成不良影响性状,距离实用化尚有很长的路。

[0006] 约200种已知植物病毒抗性基因的约半数为隐性遗传 (非专利文献3)。可以认为这些是病毒繁殖及细胞间转移等所需要的宿主因子。通过近10年的研究,这些因子的一部分已经明确。例如,翻译起始因子,如eIF4E及eIF4G、DEAD框RNA螺旋酶样蛋白 (非专利文献4)、富含半胱氨酸的VPg-相互作用蛋白 (非专利文献5) 及翻译延长因子 (非专利文献6) 等被确定为隐性的病毒抗性遗传因子。当然,可以认为这并不是全部,另外还有多个候选因子 (非专利文献3),例如作为其它候选因子,可以列举与植物病毒的筛管运输相关的各种植物因子 (非专利文献7)。

[0007] 病毒在从自身的基因组合成蛋白质时利用宿主的翻译起始机制。2002年报告了拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中的对芜菁花叶病毒 (Turnip mosaic virus) (TuMV) 的隐性抗性遗传因子是作为翻译起始因子eIF (iso) 4E的变异 (非专利文献8)。自此以来,开始了在

数种植物中对于eIF4E基因家族与对已知的马铃薯Y病毒组属病毒的隐性抗性的相关性进行了研究。由此可知,实际上通过eIF4E或eIF (iso) 4E的变异而获得了隐性的病毒抗性。

[0008] 例如,在专利文献1中记载了一种利用eIF4E基因(不包含eIF (iso) 4E)的功能抑制而赋予病毒抗性的方法。另外,在专利文献2中记载了一种通过eIF4E基因或eIF (iso) 4E基因的剪接变异而具有病毒不发挥作用的eIF4E或eIF (iso) 4E的突变体。变异是在eIF4E或eIF (iso) 4E的非编码区域或剪接元件(外显子/内含子边界部位的±10碱基的区域)的至少1个碱基发生了插入、缺失或取代,优选内含子为对象,更优选第1内含子为对象。另外,专利文献3中记载了与利用eIF4E及eIF (iso) 4E两者中变异组合的对辣椒叶脉斑驳病(Pepper veinal mottle virus、PVMV)抗性植物的筛选相关的方法,具体而言,记载了筛选使eIF4E及eIF (iso) 4E完全不表达且表达变异eIF4E的植物的方法。

[0009] 另外,例如报告了胡椒的引起对PVY的隐性抗性的基因为eIF4E(非专利文献9)。另外,报告了三叶草黄叶脉病毒(Clover yellow vein virus)在eIF (iso) 4E缺失拟南芥中繁殖,但在eIF4E缺失拟南芥中不繁殖,并且与此相反,TuMV在eIF4E缺失拟南芥中繁殖,但在eIF (iso) 4E缺失拟南芥中不繁殖(非专利文献10)。另外,为了获得对PVMV的抗性,必须使eIF4E及eIF (iso) 4E两者同时丧失功能(非专利文献11)。作为对近年的翻译起始因子及植物病毒抗性的综述,有例如非专利文献12及非专利文献13等。

[0010] 还指出了马铃薯Y病毒组属病毒以外的有限数目的病毒与翻译起始因子的相关性。例如,黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus) (CMV) 是黄瓜花叶病毒组(Cucumovirus)属病毒,在eIF4E或eIF4G被破坏的拟南芥中,与CMV的细胞间转移有关的3a蛋白的生产受到阻碍。另外,水稻黄斑点病毒(Rice yellow mottle virus) (RYMV) 是南方菜豆花叶病毒组(Sobemovirus)属病毒,eIF (iso) 4G突变的稻变得对该病毒具有抗性(非专利文献14及非专利文献15)。

[0011] 对于与烟草相同为茄科植物的番茄而言,基于番茄突变体实验对象集合的整体分析,研究了马铃薯Y病毒组抗性与翻译起始因子eIF4E的关系。其中报告了,eIF4E基因家族之一的eIF4E1的功能抑制赋予对PVY及胡椒斑点病毒(Pepper mottle virus) (PepMoV) 的抗性,而另一方面不赋予对烟草蚀刻病毒(Tobacco etch virus) (TEV) 的抗性(非专利文献16)。另外,eIF4E2、eIF (iso) 4E、eIF4G及eIF (iso) 4G的功能抑制同时表现出不赋予对这些马铃薯Y病毒组属病毒的抗性的情况。另外,如果使用RNAi (RNA干扰) 对eIF4E1和eIF4E2同时进行功能抑制,则显示出对包含PVY、PepMoV及TEV的7种马铃薯Y病毒组属病毒的抗性。但是另一方面,有趣的是eIF (iso) 4E的RNAi表现出对这些病毒均没有抗性(非专利文献17)。另外,还表现出番茄的eIF (iso) 4E与马铃薯Y病毒组属以外的病毒抗性没有相关性(非专利文献17)。

[0012] 由此,目前为止在任意植物中被指出与PVY抗性相关性的均为eIF4E,与eIF (iso) 4E的相关性尚未报告。eIF (iso) 4E虽然被分类为eIF4E家族,但在植物中,通常eIF4E与eIF (iso) 4E的DNA序列同源性不满足60%。而且,eIF (iso) 4E形成与eIF4E不同的翻译复合体。具体而言,eIF (iso) 4E与eIF (iso) 4G一起形成被称为eIF (iso) 4F的翻译复合体,eIF4E与eIF4G一起形成被称为eIF4F的翻译复合体。

[0013] 有在烟草(Nicotiana tabacum)中使eIF4E1或eIF (iso) 4E的表达量降低的报告(非专利文献18)。在该报告中记载了使用反义技术抑制了烟草的eIF4E1或eIF (iso) 4E的转

录。并且,虽然记载了制备了eIF4E1转录物的量被抑制为对照的30~40%的烟草和eIF (iso) 4E转录物的量被抑制为对照的60%的烟草,以及在两者交配而得到的后代中eIF4E1转录物的量降低至对照的26%、eIF (iso) 4E转录物的量降低至对照的31%,但完全没有记载与病毒抗性的相关性。另外,虽然根据使用了本生烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 的检测体系暗示了PVY的HC-Pro蛋白质与烟草的eIF (iso) 4E发生相互作用的可能性(非专利文献19),但并未指出与抗性的相关性。

[0014] 另外,对于烟草而言,根据PVY抗性的VAM烟草及PVY敏感性的烟草的转录物的整体分析,发现了在VAM烟草中特异性地在转录量低的基因中存在eIF4E,该基因发生变异的烟草表现出PVY抗性(非专利文献20)。

[0015] 但是另一方面,也有烟草的马铃薯Y病毒组抗性与翻译起始因子的eIF4E及eIF (iso) 4E的变异不相关的报告(非专利文献21)。在该报告中,关于作为感染烟草的马铃薯Y病毒组属病毒的PVY及PepMoV,研究了在对这些病毒的抗性品种及敏感性品种中eIF4E及eIF (iso) 4E基因的碱基序列。其结果表明,未观察到两基因发生的变异与对这些病毒的抗性/敏感性的相关性。例如,某PVY抗性品种的eIF4E及eIF (iso) 4E基因中未检测出变异,而另一方面在PVY敏感性品种的eIF4E及eIF (iso) 4E基因中发现了变异。至此为止,对于其它植物而言,在相同的实验中在PVY抗性品种的eIF4E及eIF (iso) 4E基因中检测出变异,可以认为该变异是抗性的原因,由此在非专利文献21中给出了以下结论,对于烟草而言,与其它茄科植物不同,PVY抗性与翻译起始因子eIF4E及eIF (iso) 4E没有相关性。如上所述,关于烟草,与其它植物不同,马铃薯Y病毒组抗性与翻译起始因子的相关性仍然处于混沌不清的情况。

[0016] 另外,在包括烟草的所有植物品种中,翻译起始因子与对伞形植物病毒属病毒的抗性的相关性完全未知。

[0017] 烟草(*Nicotiana tabacum*)是双二倍体,与通常的二倍体植物相比,基因数量多,源自林烟草(*Nicotiana sylvestris*)的基因和源自绒毛状烟草(*Nicotiana tomentosiformis*)的基因基本上通常各存在1对。即,在烟草中至少存在2组同源基因。因此,与其它的二倍体植物相比,遗传形式复杂。可以认为,在拟南芥中,存在3种eIF4E,且存在1种eIF (iso) 4E(非专利文献12),在烟草中,拟南芥中可观察到的翻译起始因子均成对存在。可知,如果包含与eIF4E在功能上类似的cap结合蛋白时,则烟草的eIF4E家族至少存在12个(非专利文献20)。进而,如果包含eIF4G及eIF (iso) 4G,则其数量更多。

[0018] 现有技术文献

[0019] 专利文献

[0020] 专利文献1:美国专利第7772462号说明书

[0021] 专利文献2:美国专利申请公开第2013/117879号说明书

[0022] 专利文献3:国际公开第2005/118850号

[0023] 非专利文献

[0024] 非专利文献1:Pulcinelli et al. (2009) Reporting a source of PVYntn resistance in *Nicotiana tabacum* L. CORESTA Joint Study Groups Meeting, Rovinj, Croatia.

[0025] 非专利文献2:De Bruin. (1990) Sources of resistance in the genus

Nicotiana to the virus causing bushy top disease in tobacco. *Phytophylactica*.22:263-264.

[0026] 非专利文献3:Truniger V,Aranda MA. (2009) Recessive resistance to plant viruses. *Adv Virus Res*.75:119-159.

[0027] 非专利文献4:Huang et al. (2010) A host RNA helicase-like protein, AtRH8, interacts with the potyviral genome-linked protein, VPg, associates with the virus accumulation complex, and is essential for infection. *Plant Physiol*.152: 255-266.

[0028] 非专利文献5:Dunoyer et al. (2004) A Cysteine-Rich Plant Protein Potentiates Potyvirus Movement through an Interaction with the Virus Genome-Linked Protein VPg. *J. Virol*.78:2301-2309.

[0029] 非专利文献6:Hwang et al. (2013) Translation elongation factor 1B (eEF1B) is an essential host factor for Tobacco mosaic virus infection in plants. *Virology*439:105-114.

[0030] 非专利文献7:Hipper et al. (2013) Viral and cellular factors involved in Phloem transport of plant viruses. *Front Plant Sci*.4:article154.

[0031] 非专利文献8:Lellis et al. (2002) Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Curr Biol*.12:1046-1051.

[0032] 非专利文献9:Ruffel et al. (2002) A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J*.32,1067-1075.

[0033] 非专利文献10:Sato et al. (2005) Selective involvement of members of the eukaryotic initiation factor 4E family in the infection of *Arabidopsis thaliana* by potyviruses. *FEBS Lett*.579:1167-1171.

[0034] 非专利文献11:Ruffel et al. (2006) Simultaneous mutations in translation initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E are required to prevent pepper vein mottle virus infection of pepper. *J Gen Virol*.87,2089-2098.

[0035] 非专利文献12:Robaglia and Caranta. (2006) *Trends in Plant Science* 11: 40-45.

[0036] 非专利文献13:Fritsche-Neto and Borem. (2012) *Plant breeding for biotic stress resistance*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

[0037] 非专利文献14:Yoshii et al. (2004) The *Arabidopsis* Cucumovirus Multiplication and 2 Loci Encode Translation Initiation Factors 4E and 4G. *J Virol*.78:6102-6111.

[0038] 非专利文献15:Albar et al. (2006) Mutations in the eIF(iso)4G translation initiation factor confer high resistance of rice to Rice yellow mottle virus. *Plant J*.47:417-426.

[0039] 非专利文献16:Piron et al. (2010) *PLOS ONE* 5:e11313.

[0040] 非专利文献17:Mazier et al.(2011)PLOS ONE 6:e29595.

[0041] 非专利文献18:Combe et al.(2005)Translation initiation factors eIF4E and eIFiso4E are required for polysome formation and regulate plant growth in tobacco.Plant Molecular Biology 57:749-760.

[0042] 非专利文献19:Ala-Poikela et al.(2011)Helper Component Proteinase of the Genus Potyvirus Is an Interaction Partner of Translation Initiation Factors eIF(iso)4E and eIF4E and Contains a 4E Binding Motif.J Virol.85:6784-6794.

[0043] 非专利文献20:Julio et al.(2013)Characterisation of PVY(Potato Virus Y)resistance in tobacco:potential role of an eIF4E gene identified by high throughput sequencing technologies.CORESTA Meeting Agro-Phyto Groups abstr.AP 29.

[0044] 非专利文献21:Jung and Yeam.(2013)Exploring Natural Variations in eIF4E and Screening for Potyviral Resistance in Diverse Nicotiana Species.Hort. Environ. Biotechnol. 54:430-440.

发明内容

[0045] 发明要解决的课题

[0046] 虽然已知对PVY-Breaking毒株具有抗性的烟草,但如上所述,仅有一例,其抗性的持续性也尚不明确。因此,为了避免潜在的基因易损性(genetic vulnerability),当务之急是开发其它新型对包含PVY-Breaking毒株的病毒的抗性烟草。另外,抗性的基因尚未确定是精密的标记育种的阻碍。

[0047] 另外,关于TBTv,虽然以栽培品种为中心进行了抗性品种的探索,但未发现显示出对该病毒抗性的品种,其后也未进行抗性品种的开发。

[0048] 本发明是鉴于上述课题而完成的,其主要目的在于提供一种对病毒具有抗性的烟草及其制备方法。

[0049] 解决课题的方法

[0050] 本发明的病毒抗性烟草的一个方式的特征在于,在翻译起始因子eIF(iso)4E基因中具有变异,由此,生产对病毒无功能的翻译起始因子eIF(iso)4E蛋白质、或者抑制了翻译起始因子eIF(iso)4E基因的表达。

[0051] 本发明的病毒抗性烟草的另一个方式的特征在于,翻译起始因子eIF(iso)4E基因的表达量与野生型相比为20%以下。

[0052] 本发明的病毒抗性烟草制备方法的一个方式的特征在于,通过将变异导入翻译起始因子eIF(iso)4E基因来制备对病毒具有抗性的烟草,所述变异是生产对病毒无功能的翻译起始因子eIF(iso)4E蛋白质的变异、或者是抑制翻译起始因子eIF(iso)4E基因的表达的变异。

[0053] 本发明的病毒抗性烟草制备方法的另一个方式的特征在于,通过导入因子来制备对病毒具有抗性的烟草,所述因子使翻译起始因子eIF(iso)4E基因的表达量抑制至与野生型相比为20%以下。

[0054] 本发明的检测用多核苷酸的一个方式的特征在于,其是用于检测烟草的翻译起始因子eIF (iso) 4E基因中的变异的多核苷酸,该变异是生产对病毒无功能的翻译起始因子eIF (iso) 4E蛋白质的变异、或者是抑制翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的表达的变异。

[0055] 本发明的烟草对病毒抗性的判定用DNA标记物的一个方式的特征在于,其包含由翻译起始因子eIF (iso) 4E基因中含有变异的连续碱基序列或其互补序列构成的多核苷酸,该变异是生产对病毒无功能的翻译起始因子eIF (iso) 4E蛋白质的变异、或是抑制翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的表达的变异。

[0056] 发明的效果

[0057] 根据本发明,可以提供对病毒具有抗性的烟草。

附图说明

[0058] 图1是示出本发明的实施例中利用实时PCR进行的eIF (iso) 4E的基因表达分析的结果(将作为非重组体的WT的值设为1的相对值)的图。各柱状图上的直线表示标准差。

[0059] 图2是示出烟草(*Nicotiana tabacum*)的S型(源自林烟草)eIF (iso) 4E的基因结构的示意图。

[0060] 图3是示出烟草(*Nicotiana tabacum*)的T型(源自绒毛状烟草)eIF (iso) 4E的基因结构的示意图。

[0061] 图4是示出本发明的实施例中利用ASP标记物进行的突变体检测的结果的图。

[0062] 图5是示出本发明的实施例中利用dCAPS标记物进行的突变体检测的结果的图。

[0063] 图6是示出本发明的实施例中利用定量PCR进行的eIF (iso) 4E的基因表达分析的结果(将SSTT系的转录物的量的平均值设为1时的相对表达量)的图。各柱状图上的直线表示标准差。

具体实施方式

[0064] (1. 病毒抗性烟草及其制备方法)

[0065] 本发明的一个方式涉及对病毒具有抗性的烟草(病毒抗性烟草),更具体而言,涉及在细胞内对病毒有功能的翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的表达量(例如,转录物的量)减少的病毒抗性烟草。另外,本发明的另一个方式涉及制备对病毒具有抗性的烟草的方法(病毒抗性烟草制备方法),更具体而言,涉及通过使细胞内对病毒有功能的eIF (iso) 4E基因的表达量(例如,转录物的量)减少来制备病毒抗性烟草的方法。

[0066] 烟草为双二倍体,具有源自作为原种的林烟草的基因组(S型基因组)及源自绒毛状烟草的基因组(T型基因组)两者。因此,烟草具有碱基序列不同的2组eIF (iso) 4E基因(等位基因)。另外,烟草的S型及T型的eIF (iso) 4E基因均分别示于图2及3,具有5个外显子和4个内含子。需要说明的是,在图2及图3中,下部记载的数字表示无义变异的候选部位的数量,箭头表示实施例中的引物的位置。将S型的野生型eIF (iso) 4E基因的cDNA序列的一个例子示于序列号1 (GenBank收录号:AY699609)。在序列号1中,可读框为第70号~第672号的碱基。将T型的野生型eIF (iso) 4E基因的cDNA序列的一个例子示于序列号2 (GenBank收录号:EB683576)。在序列号2中,可读框为第37号~第624号的碱基。另外,将S型的野生型eIF (iso) 4E蛋白质的氨基酸序列的一个例子示于序列号3。将T型的野生型eIF (iso) 4E蛋白质

的氨基酸序列的一个例子示于序列号4。另外,将S型的野生型eIF (iso) 4E基因的mRNA序列(将cDNA序列中的t变更为u后的序列)的一个例子示于序列号5。将T型的野生型eIF (iso) 4E基因的mRNA序列(将cDNA序列中的t变更为u后的序列)的一个例子示于序列号6。另外,将S型的野生型eIF (iso) 4E基因的基因组的碱基序列的一个例子示于序列号7。将T型的野生型eIF (iso) 4E基因的基因组的碱基序列的一个例子示于序列号8。在序列号7中,外显子为第132号~第397号的碱基(第1外显子)、第1730号~第1898号的碱基(第2外显子)、第2029号~第2154号的碱基(第3外显子)、第4723号~第4785号的碱基(第4外显子)及第4893号~第5096号的碱基(第5外显子)。在序列号8中,外显子为第164号~第382号的碱基(第1外显子)、第1620号~第1788号的碱基(第2外显子)、第1919号~第2044号的碱基(第3外显子)、第3205号~第3267号的碱基(第4外显子)及第3373号~第3593号的碱基(第5外显子)。

[0067] 具有相同功能的植物基因的蛋白质编码区域的碱基序列根据基因可以在栽培品种之间有1%~数%左右的差异,可以在栽培品种与亲缘野生种之间有数%~10%左右的差异。在本说明书中,发生变异前的野生型eIF (iso) 4E基因中包含生成由序列号5或序列号6所示的碱基序列构成的mRNA的基因、以及编码由序列号3或序列号4所示的氨基酸序列构成的eIF (iso) 4E蛋白质的基因。另外,在本说明书中,发生变异前的野生型eIF (iso) 4E基因中包含下述基因,所述基因生成与序列号5或序列号6所示的碱基序列具有92%以上、优选95%以上、更优选97%以上、进一步优选99%以上的序列同源性的mRNA,且编码功能性eIF (iso) 4E蛋白质。另外,在本说明书中,野生型eIF (iso) 4E基因中包含下述基因,所述基因编码与序列号3或序列号4所示的氨基酸序列具有92%以上、优选95%以上、更优选97%以上、进一步优选99%以上的序列同源性的功能性eIF (iso) 4E蛋白质。另外,在本说明书中,野生型eIF (iso) 4E基因包含下述基因,所述基因生成具有在序列号5或序列号6所示的碱基序列中取代、缺失、插入和/或添加了1~50个、1~40个、1~30个、1~20个、1~15个、1~12个、1~10个、1~8个、1~5个、1~3个、1~2个或1个碱基后的碱基序列的mRNA,且编码功能性eIF (iso) 4E蛋白质。另外,在本说明书中,野生型eIF (iso) 4E基因包含下述基因,所述基因编码具有在序列号3或序列号4所示的氨基酸序列中取代、缺失、插入和/或添加了1~20个、1~15个、1~12个、1~10个、1~8个、1~5个、1~4个、1~3个、1~2个或1个氨基酸后的氨基酸序列的功能性eIF (iso) 4E蛋白质。需要说明的是,在本说明书中,只要没有特别说明,表示数值范围的“A~B”表示“A以上、B以下”的意思。

[0068] 例如,在本说明书中,发生变异前的野生型的T型eIF (iso) 4E基因中包含cDNA序列为GenBank收录号FN666434的序列的基因的。该序列是来自于源自烟草品种Samsun NN的T型eIF (iso) 4E基因的序列,与源自烟草品种K326的T型eIF (iso) 4E的cDNA序列EB683576(序列号2)的序列同源性为97%。这2个基因所编码的蛋白质的氨基酸序列的同源性(identity)为97%、相似性(similarity)为99%。

[0069] 需要说明的是,在本说明书中,“碱基序列的同源性”是指在多个碱基序列中完全相同的碱基的排列以多大程度的比率存在。“氨基酸序列的同源性”是指在多个氨基酸序列中完全相同的氨基酸的排列以多大程度的比率存在。“氨基酸序列的相似性”是指在多个氨基酸序列中完全相同的氨基酸或性质相似的氨基酸的排列以多大程度的比率存在。性质相似的氨基酸的例子可以列举例如:具有带正电荷的残基的赖氨酸、精氨酸及组氨酸;具有带负电荷的残基的天冬氨酸及谷氨酸;具有非极性即疏水性的残基的丙氨酸、缬氨酸、亮氨

酸、异亮氨酸、蛋氨酸、色氨酸、苯丙氨酸及脯氨酸;有极性但无电荷的甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺及谷氨酰胺。关于“碱基序列的同源性”、“氨基酸序列的同源性”或“氨基酸序列的相似性”,可以用本领域技术人员通常使用的序列分析(相同性检索)程序BLAST(文献:Altschul et al.(1990)Basic local alignment search tool.J Mol Biol.215:403-410.)等或市售的核酸/氨基酸分析软件来进行计算。BLAST检索可以在GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)或日本DNA数据库(DNA Data Bank of Japan)(<http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>)等网站进行。此时,可以更改各种检索参数,但通常使用默认值。

[0070] 需要说明的是,在本说明书中,“烟草”不仅指烟草,也包括相同烟草属的其它种。作为烟草属的其它种,可以列举例如:*N.paniculata*、*N.knightiana*、*N.solanifolia*、*N.benavidesii*、*N.cordifolia*、*N.raimondii*、*N.cutleri*、*N.rustica*、*N.tomentosa*、绒毛状烟草、*N.otophora*、*N.kawakamii*、*N.setchellii*、*N.undulata*、*N.arentsii*、*N.wigandioides*、*N.glutinosa*、*N.thyrsiflora*、*N.obtusifolia*、*N.palmeri*、*N.langsdorffii*、*N.alata*、*N.forgetiana*、*N.bonariensis*、*N.longiflora*、*N.plumbaginifolia*、*N.azambujae*、*N.mutabilis*、林烟草、*N.repanda*、*N.stocktonii*、*N.nesophila*、*N.nudicaulis*、*N.noctiflora*、*N.petunioides*、*N.acaulis*、*N.ameghinoi*、*N.glauc*、*N.paa*、*N.acuminata*、*N.pauciflora*、*N.attenuata*、*N.longibracteata*、*N.miersii*、*N.corymbosa*、*N.linearis*、*N.spegazzinii*、*N.quadrivalvis*、*N.clevelandii*、*N.benthamiana*、*N.umbratica*、*N.cavicola*、*N.debneyi*、*N.gosseii*、*N.amplexicaulis*、*N.maritima*、*N.velutina*、*N.hesperis*、*N.occidentalis*、*N.simulans*、*N.megalosiphon*、*N.rotundifolia*、*N.excelsior*、*N.suaveolens*、*N.ingulba*、*N.exigua*、*N.goodspeedii*、*N.rosulata*、*N.fragrans*、*N.africana*、*N.burbidgeae*、*N.heterantha*、*N.stenocarpa*、*N.Truncata*及*N.wuttkei*。另外,“烟草”可以包含烟草的植物整体、植物组织(例如,叶、茎、花、根、生殖器官、胚及它们的一部分等)、苗及种子、以及干燥的叶、茎、花、根及种子等。

[0071] 可以认为这些烟草属植物的eIF(iso)4E基因的cDNA序列与序列号1所示的碱基序列具有90%以上的序列同源性。实际上,序列号1所示的碱基序列与林烟草的eIF(iso)4E基因的cDNA序列显示出100%的序列同源性(内含子除外)。序列号2所示的碱基序列与绒毛状烟草的eIF(iso)4E的cDNA序列显示出99%的序列同源性(内含子除外)。序列号1所示的碱基序列及序列号2所示的碱基序列分别与*N.Otophora*的eIF(iso)4E的cDNA序列显示出98%和99%的序列同源性(内含子除外)。另外,林烟草、绒毛状烟草及*N.Otophora*的eIF(iso)4E基因的结构均具有与烟草的基因相同数量的外显子(5个)、相同数量的内含子(4个)。

[0072] 上述野生种eIF(iso)4E基因的碱基序列可以使用序列号1所示的碱基序列,利用BLAST程序等对GenBank中收录的林烟草、绒毛状烟草或*N.Otophora*的基因组(全基因组鸟枪法重叠群(Whole genome shotgun contigs))进行相同性检索而得到。或者,源自烟草属植物的植物种的eIF(iso)4E基因的碱基序列可以使用例如序列号25~36所示的引物序列,利用PCR法从该植物种的基因组DNA扩增eIF(iso)4E基因并确定碱基序列来得到。作为相同性检索,可以使用BLAST程序,也可以使用市售的核酸/氨基酸序列分析软件。

[0073] 另外,使用序列号1或序列号2所示的碱基序列作为探针,根据烟草野生种的基因组文库或cDNA文库在严格条件进行杂交实验,由此能够获得烟草野生种的eIF(iso)4E基因

的碱基序列。

[0074] 病毒抗性烟草显示出抗性的病毒没有特别限定,可以列举例如:感染烟草的苜蓿花叶病毒(Alfamovirus)属病毒(例如苜蓿花叶病毒)、植物昆虫病毒(Curtovirus)属病毒(例如昆虫曲顶病毒(Beet curly top virus))、菜豆金色花叶病毒属(Begomovirus)属病毒(例如烟草曲叶病毒(Tobacco leaf curl virus))、黄瓜花叶病毒组(Cucumovirus)属病毒(例如黄瓜花叶病毒和花生矮化病毒)、等轴不稳定环斑病毒组(Illarvirus)属病毒(例如烟草条纹病毒(Tobacco streak virus))、马铃薯Y病毒组属病毒(例如马铃薯病毒Y(PVY)、烟草蚀纹病毒、烟草叶脉斑点病毒(Tobacco vein mottling virus)及烟草脉带花叶病毒(Tobacco vein banding mosaic virus))、烟草花叶病毒组(Tobamovirus)属病毒(例如烟草花叶病毒)、烟草脆裂病毒组(Tobravirus)属病毒(例如烟草脆裂病毒)、坏死病毒(Necrovirus)属病毒(例如烟草坏死病毒(Tobacco necrosis virus))、巨脉病毒属(Varicosavirus)属病毒(例如Tobacco stunt virus)、Nepovirus属病毒(例如Tobacco ringspot virus)、伞形植物病毒属属病毒(例如烟草丛顶病毒和烟草矮化病毒(Tobacco mottle virus))、马铃薯卷叶病毒属(Polerovirus)属病毒(例如烟草脉曲黄病毒(Tobacco vein distorting virus))、玉米线条病毒属(Mastrevirus)属病毒(例如烟草黄矮病毒(Tobacco yellow dwarf virus))、以及蕃茄斑萎病毒属(Tospovirus)属病毒(例如蕃茄斑萎病毒(Tomato spotted wilt virus))等病毒。本发明的病毒抗性烟草可以对1种病毒具有抗性,也可以对多种病毒具有抗性。本发明的病毒抗性烟草可以对马铃薯Y病毒组属病毒具有明显的抗性,其中,能够具有对马铃薯病毒Y(PVY)的PVY-O毒株、PVY-C毒株、PVY-Z毒株、PVY-N(包含NTN和NW)毒株、特别是对打破烟草的Virgin A突变体的病毒抗性的PVY毒株(VAM-Breaking毒株)的抗性。另外,本发明的病毒抗性烟草可以对伞形植物病毒属属病毒具有明显的抗性,其中,能够具有对烟草丛顶病毒(TBTv)的抗性。

[0075] 在本说明书中,“病毒抗性”是指与易感性烟草品种相比,由于病毒感染而发生于烟草上的症状延迟或不发生的情况。作为发生于烟草上的症状,可以列举:生长停滞、叶脉坏疽、茎坏疽、明脉及斑纹等。或者,“病毒抗性”是指与易感性烟草品种相比,病毒的繁殖受到抑制或病毒的细胞间转移受到抑制的情况。

[0076] (病毒抗性烟草及其制备方法的方式1)

[0077] 本发明的病毒抗性烟草的一个方式是病毒抗性烟草,其在eIF(iso)4E基因具有变异,由此,生产对病毒无功能的翻译起始因子eIF(iso)4E蛋白质,或者抑制了翻译起始因子eIF(iso)4E基因的表达。

[0078] 在本说明书中,“变异”是指DNA中的点变异、缺失、插入、重复、易位及倒位,在没有特别说明的情况下是指相对于野生型的碱基序列的差异。

[0079] 另外,在本说明书中,“eIF(iso)4E基因”是指在基因组中,不仅包括编码eIF(iso)4E蛋白质的编码区域,还包括内含子、调节区域及其他非翻译序列等eIF(iso)4E蛋白质的表达所需要的非编码区域的概念。

[0080] “对病毒无功能的eIF(iso)4E蛋白质”是指病毒自身繁殖或细胞间转移时无法利用(利用至少受到部分阻碍)的eIF(iso)4E蛋白质,包括在烟草中不发挥正常的eIF(iso)4E蛋白质的功能(作为翻译起始因子的功能)的情况、以及在烟草中虽然发挥正常的eIF(iso)4E蛋白质的功能但病毒无法利用的情况两者。需要说明的是,如下面叙述的实施例所示,发

明人发现了在烟草中野生型(未导入变异的植物)的eIF(iso)4E蛋白质用于病毒的自身繁殖或细胞间转移的可能性。

[0081] “eIF(iso)4E基因的表达量”可以是eIF(iso)4E转录为mRNA的量(转录水平或转录物的量)和翻译为eIF(iso)4E蛋白质的量(翻译水平或翻译产物的量)中的任一者,也可以是两者。因此,“eIF(iso)4E的表达受到抑制”包括与野生型相比转录受到抑制的情况、与野生型相比翻译受到抑制的情况、与野生型相比转录和翻译两者受到抑制的情况。需要说明的是,“转录受到抑制”包括转录物被分解的情况。

[0082] 如上所述,可以认为烟草具有S型和T型2组、总计4个(S型2个、T型2个)eIF(iso)4E基因。在一个例子中,病毒抗性烟草优选至少在S型的eIF(iso)4E基因中具有变异。在该情况下,病毒抗性烟草至少可以具有对伞形植物病毒属病毒(例如,TBTV)的抗性。在另外一例中,病毒抗性烟草优选至少在T型的eIF(iso)4E基因中具有变异。在该情况下,病毒抗性烟草至少可以具有对马铃薯Y病毒组属的病毒(例如,PVY-B毒株)的抗性。另外,在另一例中,病毒抗性烟草更优选在S型和T型两者的eIF(iso)4E基因中具有变异。在该情况下,病毒抗性烟草至少具有对伞形植物病毒属病毒和马铃薯Y病毒组属病毒两者的抗性。另外,1个类型的变异可以是纯合(例如,在S型的2个eIF(iso)4E基因两者中导入了变异),也可以是杂合,优选为纯合。

[0083] 因此,病毒抗性烟草的一个例子在野生型eIF(iso)4E基因中具有1个以上变异,具有对伞形植物病毒属病毒的抗性,所述野生型eIF(iso)4E基因是(a)编码由序列号3所示的氨基酸序列构成的eIF(iso)4E蛋白质的野生型eIF(iso)4E基因、(b)编码与序列号3所示的氨基酸序列具有92%以上序列同源性的功能性eIF(iso)4E蛋白质的野生型eIF(iso)4E基因、(c)生成由序列号5所示的碱基序列构成的mRNA的野生型eIF(iso)4E基因、或者(d)生成与序列号5所示的碱基序列具有92%以上序列同源性的mRNA的野生型eIF(iso)4E基因,而且编码功能性eIF(iso)4E蛋白质。另外,病毒抗性烟草的另外一例在野生型eIF(iso)4E基因中具有1个以上变异,具有对马铃薯Y病毒组属病毒的抗性,所述野生型eIF(iso)4E基因是(a)编码由序列号4所示的氨基酸序列构成的eIF(iso)4E蛋白质的野生型eIF(iso)4E基因、(b)编码与序列号4所示的氨基酸序列具有92%以上序列同源性的功能性eIF(iso)4E蛋白质的野生型eIF(iso)4E基因、(c)生成由序列号6所示的碱基序列构成的mRNA的野生型eIF(iso)4E基因、或者(d)生成与序列号6所示的碱基序列具有92%以上序列同源性的mRNA的野生型eIF(iso)4E基因,而且编码功能性eIF(iso)4E蛋白质。

[0084] 另外,1个eIF(iso)4E基因可以有多个变异。另外,多个eIF(iso)4E基因中的变异可以相同,也可以相互不同。

[0085] 需要说明的是,在2组中的1组丧失了原本功能(因自然变异)的情况下,只要在没有丧失功能的1组中具有变异即可。另外,在2组中的1组完全丧失功能但剩余1组中一个丧失功能、一个未丧失功能的情况下,即,在4个中的3个丧失了功能的情况下,只要eIF(iso)4E的表达量足够低,就可得到病毒抗性。另外,在烟草野生种(烟草属)的情况下,在原本仅具有1组eIF(iso)4E的情况下,只要在1组eIF(iso)4E中发生变异即可。

[0086] 在本发明的病毒抗性烟草在编码区域具有变异的情况下,eIF(iso)4E蛋白质的氨基酸序列中存在变异。作为变异,可以列举:取代、缺失及插入等。在变异为氨基酸的取代的情况下,取代的氨基酸及取代后的氨基酸只要是使eIF(iso)4E蛋白质为对病毒无功能的蛋

白质即可,没有特别限定,例如,优选为非保守取代(non-conservative substitutions)。作为非保守取代,可以列举:将氨基酸取代为电荷或疏水性不同的其它氨基酸(从碱性氨基酸取代为酸性氨基酸或从极性氨基酸取代为非极性氨基酸等)、以及将某氨基酸取代为支链大小不同的其它氨基酸。另外,在编码区域具有变异的情况下,可以是移码变异或无义变异。在无义变异(变成终止密码子的变异)的情况下,发生无义介导的mRNA衰变(文献: Brogna and Wen 2009, Nat. Structural Mol. Biol. 16:107-113),有时转录物被分解。在该情况下,无义变异的位置优选位于第1外显子、第2外显子和/或第3外显子,更优选位于第1外显子和/或第2外显子。在移码变异或无义变异的情况下,对于该变异的位置而言,与基因的5'末端侧的一半左右相比,优选为5'末端侧。具体而言,优选在第1外显子、第2外显子和/或第3外显子存在变异。越接近5'末端,蛋白质中的正常部分越短,因此对病毒无功能的可能性增高。在烟草所具有的全部(例如烟草中全部4个)eIF(iso)4E基因的编码区域存在变异的情况下,完全不能生成对病毒有功能的eIF(iso)4E蛋白质。

[0087] 在本发明的病毒抗性烟草在非编码区域具有变异的情况下,虽然对编码的eIF(iso)4E蛋白质的氨基酸序列不造成影响,但可以使DNA或mRNA的二级结构改变、使用于转录或翻译机制的结合部位改变、或者使tRNA结合效率降低。由此,可以使转录水平降低、使翻译水平降低。

[0088] 或者,在5'末端侧的非编码区域具有变异的情况下,因该变异而在与正确的可读框不同的可读框中产生ATG(起始密码子)时,有可能从该错误的可读框开始翻译。即使在这样的情况下也不能生产正常的eIF(iso)4E蛋白质。例如,在变异原为下面叙述的甲磺酸乙酯(EMS)的情况下,GTG的G变异为A时或ACG的C变异为T时,产生新的ATG。在该情况下可读框错位时,无法翻译正确的eIF(iso)4E蛋白质。

[0089] 在eIF(iso)4E基因的转录受到抑制的情况下,eIF(iso)4E基因的转录物的量与野生型相比优选为20%以下,更优选为15%以下,进一步优选为10%以下。另外,在eIF(iso)4E基因的翻译受到抑制的情况下,eIF(iso)4E基因的翻译产物的量与野生型相比优选为20%以下,更优选为15%以下,进一步优选为10%以下。

[0090] 另外,由于eIF(iso)4E基因的变异,RNA的剪接也可能无法正常地进行。例如,在内含子的5'末端侧的包含GT的前后10碱基、优选为5碱基、更优选为1碱基发生变异的情况下、或者在内含子的3'末端侧的包含AG的前后10碱基、优选为5碱基、更优选为1碱基发生变异的情况下,无法良好地进行内含子的切除,产生异常的mRNA,可以生产对病毒无功能的eIF(iso)4E蛋白质、或者抑制eIF(iso)4E基因的翻译。

[0091] 使eIF(iso)4E基因产生变异的方法没有特别限定,可以使用公知的方法。

[0092] 作为变异原,可以使用例如:甲磺酸乙酯(EMS)、叠氮化钠、溴化乙啶及亚硝酸等化学试剂,但使烟草的基因组DNA发生变异的化学试剂并不限于此。另外,作为变异原,可以列举例如:γ射线、重离子束、X射线、中子射线或UV等,但使烟草的基因组DNA发生变异的放射线等并不限于此。作为变异原,优选EMS。

[0093] 作为变异原处理的烟草的组织或器官,可以列举:种子、根、叶及花等,只要能使植物体再生即可,对其种类没有特别限定,优选为种子。关于诱变群体,对各种类型的植物组织经验性地确定诱变性的化学试剂或放射线的用量,使得能够得到低于达到致死性或生殖不育性的阈值水平的变异频率。

[0094] 另外,作为变异原,也可以使用转座子(可移动遗传因子)。转座子在烟草基因组上转移,可以抑制eIF(iso)4E基因的功能。作为这样的转座子的优选例子,可以举出烟草的反转录转座子tnt1。或者也可以将其它植物的转座子导入烟草来使用。作为这样的转座子,可以列举例如:玉米的转座子Ac/Ds、Spm/dSpm及Mu、稻的转座子nDart、以及金鱼草的转座子tam等,但并不限于此。

[0095] 另外,将存在于土壤杆菌的Ti质粒中的T-DNA随机地(at random)插入烟草,也可以抑制eIF(iso)4E基因的功能。因此,可以制备插入了T-DNA的烟草突变体群体(实验对象集合),并以eIF(iso)4E的碱基序列为指标从其中筛选功能受到抑制的个体。

[0096] 在2组(4个)eIF(iso)4E基因中具有变异的病毒抗性烟草的制备方法的一例中,如上所述用变异原对烟草进行处理,制备使烟草基因组全体发生变异的烟草突变体群体(实验对象集合),提取基因组DNA。利用基因特异性引物,由实验对象集合的各个基因组DNA或它们混合而成的DNA对eIF(iso)4E基因进行扩增,确定其产物的碱基序列,筛选导入了纯合接合变异的品系。首先,分别获得在S型基因组导入了纯合变异的品系及在T型基因组导入了纯合变异的品系,制备使它们交配而得到的F1。进而培养其自交的后代(F2),从其中获得在S型基因组和T型基因组两者中导入了纯合变异的品系(由于双因子隐性,可以以1/16的概率得到)。对由此得到的eIF(iso)4E基因是在S型基因组和T型基因组两者中变异的品系进行病毒检测,确认抗性。此时,可以使用定量PCR等进行eIF(iso)4E基因的表达分析,确认降低了转录量。

[0097] 因此,在病毒抗性烟草制备方法的一个方式中,可以包括以下至少1个工序:制备使烟草基因组全体发生变异的烟草突变体群体(实验对象集合)的工序、提取基因组DNA的工序、确定eIF(iso)4E基因的碱基序列的工序、筛选导入了纯合变异的品系的工序、以及进行病毒检测确认抗性的工序。

[0098] 另外,为了去除eIF(iso)4E基因以外的DNA部位中导入的变异,可以使变异处理后的品系与未进行变异处理的品系在任意时机进行杂交。

[0099] 从烟草突变体中提取基因组DNA只要基于公知的方法来进行即可,也可以使用市售的提取试剂盒。另外,基因组DNA可以是粗纯化物,也可以是经过若干纯化工序后的纯化品。

[0100] 多核苷酸的扩增可以通过例如PCR法来进行,也可以通过其它公知的基因扩增方法、例如LCR(连接酶链式反应,ligase chain reaction)法或LAMP(环介导的等温扩增,Loop-Mediated Isothermal Amplification)法等来进行。

[0101] 用于扩增各多核苷酸的引物序列例如可以根据序列号7的碱基序列或者根据序列号8的碱基序列来设计。根据序列号7(S型eIF(iso)4E基因)的碱基序列和序列号8(T型eIF(iso)4E基因)的碱基序列的同源性分析结果,首先找到S型特异性区域及T型特异性区域。通过对该区域设计引物,可以从S型与T型混在一起的烟草基因组中分别特异性地对S型及T型基因进行扩增。作为设计的部位,可以从S型或T型特异性区域选择,优选为内含子、5'非翻译区域或3'非翻译区域。引物的长度优选为15碱基~30碱基,特别优选为17碱基~25碱基。引物序列可以基于对序列号7的碱基序列特异性的区域、或对序列号8的碱基序列特异性的区域、或与两碱基序列共同的区域的序列来进行设计。另外,只要能够作为对包含变异部位的给定碱基数的序列进行扩增的引物而发挥作用即可,该序列中可以包含1个或1个以

上的取代、缺失和/或添加。另外,引物可以根据需要用荧光物质或放射性物质等进行标记。

[0102] 扩增的各多核苷酸的长度只要是能够利用下面叙述的各种检测方法的长度即可,没有特别限定,例如为20碱基~5000碱基,更优选为50碱基~2000碱基,进一步优选为100碱基~700碱基,更进一步优选为100碱基~500碱基。

[0103] 以下,作为检测变异的方法,举出代表性的方法,但并不限于此。

[0104] (1) 通过利用市售的测序仪等直接读取各多核苷酸的碱基序列来检测有无变异的方法。

[0105] (2) 使用SSCP(单链构象多态性,Single Strand Conformation Polymorphism:单链构型多态性)法检测有无变异的方法。

[0106] 从利用上述方法检测出变异的烟草突变体中,利用eIF(iso) 4E基因特异性引物确认扩增后的(PCR)产物的碱基序列,由此可以弄清楚变异是纯合变异还是杂合变异,或者是S型基因组发生的变异还是T型基因组发生的变异。

[0107] 在EMS处理的情况下,多数DNA的变异为C→T和G→A。因此,通过EMS处理进行变异时,成为终止密码子(即,成为无义变异的候选)的密码子为CAA(最初的C取代为T)、CGA(最初的C取代为T)、TGG(第2个G或第3个G取代为A)及CAG(最初的C取代为T)这4种。

[0108] 例如,在序列号7的情况下,如果(1)第270号的C取代为T、(2)第295号的G取代为A、(3)第296号的G取代为A、(4)第304号的G取代为A、(5)第305号的G取代为A、(6)第315号的C取代为T、(7)第330号的C取代为T、(8)第343号的G取代为A、(9)第344号的G取代为A、(10)第357号的C取代为T、(11)第394号的G取代为A、(12)第395号的G取代为A、(13)第1740号的C取代为T、(14)第1813号的G取代为A、(15)第1814号的G取代为A、(16)第1846号的G取代为A、(17)第1847号的G取代为A、(18)第1888号的G取代为A、(19)第1889号的G取代为A、(20)第2050号的C取代为T、(21)第2104号的C取代为T、(22)第2123号的G取代为A、(23)第2124号的G取代为A、(24)第2152号的C取代为T、(25)第4742号的G取代为A、(26)第4743号的G取代为A、或者(27)第4926号的C取代为T,则成为终止密码子(TAA、TAG或TGA)。因此,在病毒抗性烟草的一个优选例中,变异是基因组DNA中由序列号7所示的碱基序列构成的eIF(iso) 4E基因的上述(1)~(27)所示的1个以上的变异。其中,优选发生(1)~(26)中任意变异的情况,更优选发生(1)~(24)中任意变异的情况。

[0109] 例如,在序列号8的情况下,如果(1)第264号的C取代为T、(2)第289号的G取代为A、(3)第290号的G取代为A、(4)第298号的G取代为A、(5)第299号的G取代为A、(6)第315号的C取代为T、(7)第328号的G取代为A、(8)第329号的G取代为A、(9)第342号的C取代为T、(10)第379号的G取代为A、(11)第380号的G取代为A、(12)第1630号的C取代为T、(13)第1703号的G取代为A、(14)第1704号的G取代为A、(15)第1736号的G取代为A、(16)第1737号的G取代为A、(17)第1778号的G取代为A、(18)第1779号的G取代为A、(19)第1940号的C取代为T、(20)第1994号的C取代为T、(21)第2013号的G取代为A、(22)第2014号的G取代为A、(23)第2042号的C取代为T、(24)第3224号的G取代为A、(25)第3225号的G取代为A、或者(26)第3406号的C取代为T,则成为终止密码子(TAA、TAG或TGA)。因此,在病毒抗性烟草的一个优选例中,变异是基因组DNA中由序列号8所示的碱基序列构成的eIF(iso) 4E基因的上述(1)~(26)所示的1个以上的变异。其中,优选发生(1)~(25)中任意变异的情况,更优选发生(1)~(23)中任意变异的情况。

[0110] 或者,变异可以是野生型翻译起始因子eIF(iso)4E基因的外显子中下述(1)~(4)所示的1个以上的变异:(1)密码子CAA的C取代为T、(2)密码子CGA的C取代为T、(3)密码子CAG的C取代为T、(4)密码子TGG的G(2个G中的任一个或两个)取代为A,所述野生型翻译起始因子eIF(iso)4E基因的外显子是(a)编码与序列号3或序列号4所示的氨基酸序列具有92%以上序列同源性的功能性翻译起始因子eIF(iso)4E蛋白质的野生型翻译起始因子eIF(iso)4E基因的外显子、或者(b)生成与序列号5或序列号6所示的碱基序列具有92%以上序列同源性的mRNA的野生型翻译起始因子eIF(iso)4E基因的外显子,而且编码功能性翻译起始因子eIF(iso)4E蛋白质。

[0111] 作为使eIF(iso)4E基因发生变异的其它方法,也可以使用基因编辑技术。基因编辑技术是指向基因组的任意区域导入变异的技术。作为这样的技术,可以列举例如:TALEN(转录激活物样效应物,Transcription activator-like effector)、CRISPR(聚簇规则散布短回文重复,Clustered regularly interspaced short palindromic repeat)/CAS、ODM(寡核苷酸指导的诱变,Oligonucleotide Directed Mutagenesis)及ZFN(锌指核酸酶,Zinc Finger Nuclease)等。

[0112] ODM和ZFN的定义记载于文献:Lusser et al.(2012)Nature Biotechnology 30:231-239。另外,对于ODM,例如在文献:Zhu et al.(1999)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96:8768-8773、以及文献:Oh and May(2001)Current Opinion in Biotechnology 12:169-172.中记载了对植物的应用。对于ZFN,在文献:Durai et al.(2005)Nucleic Acids Res 33:5978-5990中记载了对植物的应用。按照上述记载的方法可以向eIF(iso)4E基因中导入变异。

[0113] 对于TALEN,如下所述。源自植物病原菌的DNA结合蛋白转录激活物样(TAL)效应物具有34个氨基酸重复的结构部分,该重复结构逐个碱基识别DNA的碱基。DNA中有4种碱基(A、T、G、C),但由TAL效应物的重复结构的第13号和第14号2个氨基酸决定DNA序列的结合特异性。即,通过选择各重复结构的第13~14号氨基酸,能够人为地使TAL效应物与希望的DNA区域结合。将使该TAL效应物与在二聚体时显示出DNA切断活性的酶FokI融合而成的酶称为TAL效应物核酸酶(TALEN)。当设计为使2个该TALEN在彼此附近结合时,Fok I形成二聚体,切断2个TALEN之间的DNA。发生切断后,可以进行DNA的修复,但此时,有时切断部位稍被切除或导入了新的添加。已知TALEN对植物也起作用(文献:Zhang et al.(2013)Plant Physiology 161:20-27)。

[0114] 例如,序列号1或2中,优选在蛋白质编码区域中,对eIF(iso)4E特异性的优选15碱基~25碱基、更优选18碱基~22碱基的核苷酸序列进行设计。另外,在距其优选9碱基~15碱基的部位同样地设计核苷酸序列。上述2个核苷酸所包夹的部分随后被切断。

[0115] 为了判断设计的核苷酸序列是否为eIF(iso)4E基因特异性,可以通过对例如烟草(Nicotiana tabacum)或林烟草或绒毛状烟草的公知的序列数据库对设计的核苷酸序列进行同源性检索,来研究序列本身以外是否具有包含该序列的同源性高的区域。作为序列数据库,可以利用例如:GenBank、EMBL(欧洲分子生物学实验室,The European Molecular Biology Laboratory)或DDBJ(日本DNA数据库,DNA Data Bank of Japan)等。作为序列分析算法,可以利用例如BLAST等。另外,作为数据库的序列的种类,有核苷酸集合(Nucleotide Collection)(nr/nt)、表达序列标签(Expressed Sequence Tags)(EST)、基

基因组测量序列 (Genomic survey sequences) (GSS)、以及全基因组鸟枪法重叠群 (Whole genome shotgun contigs) (WGS) 等,但并不限于此。

[0116] 基于设计的特异性核苷酸序列,对TALE的基因序列进行设计。多个重复结构的结合可以使用例如GoldenGateTALEN Kit (Addgene公司),但并不限于此。在使TALE与FokI融合时,例如可以设置适当的接头序列。需要说明的是,FokI序列收录于公知数据库。用于使TALE/FokI融合基因在烟草中表达的启动子优选为高表达的启动子,可以列举:花椰菜花叶病毒35S RNA基因的启动子、肌动蛋白基因的启动子及泛素基因的启动子等的组成性表达启动子;Rubisco小亚基基因的启动子、PPDK基因启动子等绿色组织特异性启动子;以及其它的器官或时期特异性启动子,但并不限于此。为了提高表达量,可以在启动子与TALE/FokI之间设置希望的内含子。进而,为了提高表达量,还可以将TALE/FokI的密码子最优化为植物(烟草)的密码子。植物密码子记载于例如密码子选择数据库 (Codon Usage Database) (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) 等公知的数据库中。

[0117] 在用于将TALEN表达盒 (expression cassette) 导入植物的载体中,除了上述以外,还可以加入用于筛选导入了表达盒的植物细胞的耐药性基因(筛选标记物)的表达盒。作为耐药性基因,可以是能够筛选烟草细胞的药剂的耐受性基因,可以列举例如:卡那霉素抗性基因(新霉素磷酸转移酶:NPT-II)及潮霉素抗性基因(潮霉素磷酸转移酶:HPT)等,但并不限于此。另外,只要启动子是组成性表达即可,没有特别限定。

[0118] 另外,在将TALEN表达盒稳定地导入植物时利用土壤杆菌的情况下,TALEN表达盒和筛选标记物表达盒需要存在于T-DNA中。在该情况下,作为T-DNA的边界序列,右边界(RB)序列和左边界(LB)序列设置于T-DNA的两端。

[0119] 作为能够将基因导入烟草的载体,所述载体是用于将TALEN表达盒导入植物的载体,可以列举例如:pBI系、pSB系(文献:Komari et al.2006Methods in Mol.Biol.343:15-41.)、pLC系(文献:美国专利第8298819号说明书)、以及pGreen(文献:Hellens et al.2000Plant Mol.Biol.42:819-832.)等,但并不限于此。

[0120] 将TALEN表达盒导入植物的方法没有特别限定,可以使用上述使用土壤杆菌的方法、基因枪法、PEG法、电穿孔法或农杆菌渗入法(Agroinfiltration)等本领域技术人员通常使用的方法。另外,作为导入的烟草的组织或器官,只要能使植物体再生即可,对其种类没有特别限定,可以列举例如:种子、根、叶及花等。

[0121] 对于转化植物的筛选及培育而言,只要是本领域技术人员就能够容易地实施。作为用于筛选的药剂,并不限于此,可以列举:卡那霉素和潮霉素等。药剂的浓度可以设为例如20mg/mL~200mg/mL,优选为50mg/mL~100mg/mL。植物培养物的培育用的培养基可以是通常使用的培养基,作为无机盐的种类,可以列举MS和LS等,向其中添加例如:蔗糖、琼脂或植物激素等。它们的使用浓度可以按照本领域技术人员通常使用的技术方案作为基准。

[0122] 作为进行基因导入的组织或器官,除了上述以外,还可以使用原生质体。原生质体可以使用细胞壁分解酶按照通常方法制备。另外,作为基因导入法,除了上述的稳定转化法,还可以使用瞬时法(transient method)。瞬时试验(transient assay)可以使用电穿孔法或PEG法等通常方法来实施。另外,作为其它瞬时试验法,可以列举:农杆菌渗入法和病毒载体等。作为病毒载体,可以使用ALSV(苹果潜在球形病毒,Apple latent spherical virus)或TRV(烟草脆裂病毒)等,但并不限于此。

[0123] 在从导入了基因的细胞再生得到的个体或组织或器官中,eIF(iso)4E基因中是否产生了变异可以通过以下方式来确认:以包夹作为目标的区域的方式设计引物,从希望的植物组织中提取DNA,通过PCR等对该区域进行扩增,并弄清楚其产物的碱基序列。

[0124] 分析基因表达的方法没有特别限定,可以用RNA印迹杂交(northern杂交)法或定量PCR法等公知的方法来进行。用于杂交的探针可以是序列号1的碱基序列或其一部分(例如序列号9)、或者序列号2的碱基序列或其一部分、或者上述序列中存在1个或多个碱基的取代、缺失或插入的碱基序列,探针长度可以为例如20碱基~序列全长。

[0125] 用于进行上述表达分析的RNA提取可以通过盐酸胍法或SDS-苯酚法等公知的方法来进行,也可以使用市售的试剂盒。另外,可以从总RNA中进一步对mRNA(polyA+RNA)进行纯化。

[0126] 用于实施定量PCR的cDNA的合成可以通过使用了逆转录酶和低聚dT引物或基因特异性引物的公知方法来进行,也可以使用市售的试剂盒。

[0127] 另外,用于定量PCR的引物可以基于序列号1或序列号2来设计。作为引物的长度,优选为15碱基~30碱基,特别优选为17碱基~25碱基。通过一组引物组扩增的靶序列的长度没有特别限定,例如可以为40碱基~序列全长,优选为50碱基~500碱基。

[0128] 在实施使用了荧光PCR装置的定量PCR时,除了上述引物,还可以在靶序列中设定探针序列。靶序列的长度优选为40碱基~200碱基,进一步优选为50碱基~150碱基。作为标记引物和探针的报告染料(reporter dye),可以列举:FAM、HEX、TET及Cyanine5,并且淬灭染色,可以列举:TAMRA和BHQ1等,但并不限于此,本领域技术人员可以适当选择并组合。用作定量PCR的内标物的基因,只要是组成性表达基因即可,没有特别限定,作为优选的基因,可以列举:延长因子基因及肌动蛋白基因等。

[0129] 对于CRISPR/CAS,如下所述。CRISPR/CAS系统是使用识别DNA序列的指导RNA和CAS核酸酶的基因编辑技术,已知在植物中也发挥作用(文献:Belhaj et al.(2013) Plant Methods 9:39)。该技术是切断基因组上具有希望的序列的DNA的技术,关于靶基因组序列的缺失、添加及插入,与TALEN一样,依赖于宿主的DNA修复系统的错误。

[0130] 作为用于在植物中使CAS9表达的启动子,优选高表达的启动子,可以列举例如:上述的35S RNA基因的启动子、泛素基因的启动子及PPDK基因启动子等,但并不限于此。为了提高表达量,也可以将希望的内含子设置于启动子与CAS9之间。需要说明的是,CAS9的碱基序列是公知的。另外,为了提高表达量,还可以将CAS9的密码子最优化为植物(烟草)的密码子。另外,还可以在CAS9中添加核定位信号NLS(Nuclear localize Signal)。

[0131] 设计希望的基因组序列和互补的指导RNA。例如,在序列号1或2中,优选在蛋白质编码区域确定eIF(iso)4E特异性的优选19碱基~22碱基的核苷酸序列。此时,在该序列的3'末端侧需要存在被称为原间隔物相邻基序(protospacer-adjacent motif)(PAM)的NGG序列。另外,在下面叙述的启动子的种类为U6的情况下,转录起始点(指导RNA的5'末端)需要为G,在U3启动子的情况下需要为A。

[0132] 为了判断指导RNA的序列是否具有eIF(iso)4E基因特异性,可以对例如烟草(Nicotiana tabacum)或林烟草或绒毛状烟草的序列数据库对于设计的序列进行同源性检索,来研究序列本身以外是否具有包含该序列的同源性高的区域。关于序列数据库及分析算法,与上述相同。

[0133] 设计指导RNA之后,在其3'末端侧融合sgRNA支架(scaffold)序列,形成sgRNA(指导(g)RNA+gRNA支架),制备用于表达该sgRNA的构建物(construct)。此时,作为启动子,可以使用RNA聚合酶III的U6或U3等的启动子。使用适当的载体将完成的构建物导入烟草,对重组体进行筛选、再生。需要说明的是,为了更可靠地产生变异,可以在eIF(iso)4E内部设计多个指导RNA,并将表达它们的构建物同时导入烟草。在该情况下,可以在1个T-DNA上同时设置多个指导RNA表达盒和CAS9表达盒。

[0134] 需要说明的是,用于将使指导RNA和CAS9表达的盒导入植物的载体、以及烟草转化的方法与上述TALEN中的说明相同。

[0135] 作为进行基因导入的组织或器官,除了上述以外,还可以使用原生质体。原生质体可以按照通常方法使用细胞壁分解酶来制备。另外,作为基因导入法,除了上述稳定转化法,可以使用瞬时法。对于瞬时试验,与上述TALEN中的说明相同。

[0136] 在从导入了基因的细胞再生而成的个体或组织或器官中是否使eIF(iso)4E基因产生变异,可以按照与上述TALEN中的说明相同的方法来确认。

[0137] 作为病毒检测方法,可以列举:病毒溶液与碳化硅等固体粉末组合的机械接种法、以及使用感染病毒的蚜虫的接种法等,但并不限于此。另外,使用的病毒没有特别限定,作为病毒抗性烟草显示出抗性的病毒,可以使用上述列举的病毒。

[0138] (病毒抗性烟草及其制备方法的方式2)

[0139] 本发明的病毒抗性烟草的另外一个方式是eIF(iso)4E基因的表达量与野生型相比为20%以下的病毒抗性烟草。表达受到抑制的烟草的eIF(iso)4E基因的表达量在将野生型的表达量设为100%时优选为15%以下,更优选为10%以下。这里,“野生型”是指未导入使eIF(iso)4E基因的表达受到抑制的因子、且eIF(iso)4E基因中不具有变异的烟草。

[0140] 这样的病毒抗性烟草的制备可以使用现有公知的方法,可以列举例如利用反义、共抑制、RNA干扰(RNAi)、microRNA、VIGS、核酶、同源重组、以及显性负性基因产物的表达等的方法。具体而言,可以通过将使eIF(iso)4E基因表达量抑制至与野生型相比为20%以下、优选为15%以下、更优选为10%以下的因子导入烟草中来制备。

[0141] 作为抑制eIF(iso)4E的表达的方法,优选RNAi。具体而言,制备RNAi构建物,并与植物中表达的启动子融合,使用载体将其导入烟草中,所述RNAi构建物使用eIF(iso)4E基因的碱基序列(例如序列号1)或其一部分(例如序列号9)、或者例如序列号2的碱基序列或其一部分作为触发器(trigger)。然后,使RNAi构建物表达,得到使eIF(iso)4E基因的表达受到抑制的病毒抗性烟草。因此,一个方式中的病毒抗性烟草可以保持用于抑制eIF(iso)4E基因的表达的RNAi构建物。

[0142] 触发器的长度可以为例如21碱基~序列全长,优选为50碱基以上,更优选为100碱基以上。触发器序列中可以有1个或多个碱基的取代、缺失或插入。

[0143] 在RNAi中,将触发器序列功能性连接,使得其1个为正义方向另1个为反义方向,制备触发器序列反向重复的RNAi构建物。此时,两触发器之间优选加入间隔序列。作为这样的间隔序列,优选为烟草的基因组中不含有的序列、或者内含子序列等成熟mRNA中不含有的区域。作为这样的序列,可以列举例如: β 葡萄糖醛酸酶(GUS)基因、丙酮酸脱氢酶激酶(pyruvate dehydrogenase kinase)(pdk)及过氧化氢酶(cat)基因等的内含子序列,但并不限于此。

[0144] 作为用于使RNAi构建物在植物中转录的启动子,可以列举例如:花椰菜花叶病毒(Cauliflower mosaic virus) 35S RNA基因的启动子、肌动蛋白基因的启动子、以及泛素基因的启动子等组成性表达启动子;Rubisco小亚基基因的启动子及PPDK基因启动子等绿色组织特异性启动子;以及其它器官或时期特异性启动子,但并不限于此。作为上述启动子,优选为在病毒感染的组织中表达的启动子。

[0145] 另外,作为终止子,可以列举:花椰菜花叶病毒35S RNA或19S RNA基因的终止子、以及胭脂碱合成酶基因的终止子等,只要在植物中发挥作用即可,但并不限于此。

[0146] 在用于将RNAi表达盒导入植物的载体中,除了上述以外,还可以加入耐药性基因的表达盒,所述耐药性基因的表达盒用于筛选导入了上述RNAi表达盒的植物细胞。作为耐药性基因,只要是能够筛选烟草细胞的耐药性基因即可,可以列举例如:卡那霉素抗性基因(新霉素磷酸转移酶:NPT-II)及潮霉素抗性基因(潮霉素磷酸转移酶:HPT)等,但并不限于此。另外,只要启动子也是进行组成性表达的启动子即可,没有特别限定。

[0147] 另外,在稳定地向植物中导入RNAi表达盒时利用土壤杆菌的情况下,RNAi表达盒和筛选标记物表达盒需要存在于T-DNA中。在该情况下,作为T-DNA的边界序列,右边界(RB)序列及左边界(LB)序列可以分别设置于T-DNA的两端。

[0148] 另外,为了从视觉上预测基因表达,可以在T-DNA中设置荧光蛋白质的表达盒。作为荧光蛋白质,可以列举例如绿色荧光蛋白质(GFP)及黄色荧光蛋白质(YFP)等,但并不限于此。作为荧光蛋白质,优选为GFP。荧光可以用图像分析仪进行观察。

[0149] 作为能够将基因导入烟草中的载体,其用于将RNAi表达盒导入植物,可以列举例如:pBI系、pSB系(文献:Komari et al.2006Methods in Mol.Biol.343:15-41.)、pLC系(文献:美国专利第8298819号说明书)、pGreen(文献:Hellens et al.2000Plant Mol.Biol.42:819-832.)、pHellsgate(文献:Wesley et al.2001Plant J 27:581-590.)、以及pSP231(文献:国际公开第2011/102394号公报)等,但并不限于此。

[0150] 将RNAi表达盒导入植物的方法没有特别限定,可以利用使用上述土壤杆菌的方法、基因枪法、PEG法、电穿孔法或农杆菌渗入法等本领域技术人员通常使用的方法。另外,作为导入的烟草组织或器官,只要能够使植物体再生即可,对其种类没有特别限定,可以列举例如:种子、根、叶及花等。

[0151] 对于转化植物的筛选和培育而言,只要是本领域技术人员就能够容易地实施。作为用于筛选的药剂,可以列举:卡那霉素和潮霉素等,但并不限于此。药剂的浓度可以为例如20mg/mL~200mg/mL,优选为50mg/mL~100mg/mL。植物培养物的培育用培养基可以使用通常所用的培养基,作为无机盐的种类,可以举出MS和LS等,可以向其中添加例如:蔗糖、琼脂或植物激素等。这些的使用浓度只要按照本领域技术人员通常使用的实验方案即可。

[0152] 对于分析基因表达的方法和病毒检测方法,如上所述。

[0153] (2.对烟草赋予病毒抗性的方法)

[0154] 另外,本发明提供对烟草赋予病毒抗性的方法。

[0155] 在该方法的一个方式中,通过向翻译起始因子eIF(iso) 4E基因中导入变异来对烟草赋予病毒抗性,所述变异是生产对病毒无功能的翻译起始因子eIF(iso) 4E蛋白质的变异、或者抑制翻译起始因子eIF(iso) 4E基因的表达的变异。对于导入这样的变异的方法,如(1.病毒抗性烟草及其制备方法)项中记载所述。

[0156] 另外,在该方法的另一个方式中,通过导入使翻译起始因子eIF(iso)4E基因的表达量抑制至与野生型相比为20%以下、优选为15%以下、更优选为10%以下的因子,对烟草赋予病毒抗性。对于导入这样的因子的方法,如(1.病毒抗性烟草及其制备方法)项中记载所述。

[0157] (3.DNA标记物及其利用)

[0158] 在本发明中,可以利用烟草eIF(iso)4E基因上发生的变异来开发DNA标记物,可以将其充分应用于标记物育种。“DNA标记物”是指品种之间或个体之间的DNA碱基序列的差异(变异或多态性)、或者用于检测该差异的工具,是指成为用于识别品种或个体的标记物的碱基序列的差异(变异或多态性)、或者用于检测该差异的工具。在eIF(iso)4E基因中的变异确定,并确认了由该变异引起对病毒的抗性的情况下,可以将产生了该变异的烟草突变体用作该病毒抗性的育种亲本。此时,由于已知与抗性相关的引起抗性的变异,因此,可以在eIF(iso)4E基因上设计能够用于识别引起抗性的变异的标记物。由于该变异与病毒抗性的关系不因遗传分离而切断,因此能够进行精密的标记物育种。如果检测出有无该变异,则在反复进行交配等时不需要每次确认病毒抗性。

[0159] 可以基于通常方法进行从烟草提取基因组DNA,可以使用市售的提取试剂盒,但没有特别限定。另外,基因组DNA可以是粗纯化物,也可以是经过若干纯化工序后的纯化品。作为检测有无变异的技术,有例如:应用了RFLP或将单链DNA用于探针的核酸(也称为“多核苷酸”)的杂交的技术、以及PCR等这样的伴随多核苷酸扩增的技术等,只要可以检测变异即可,没有特别限定。

[0160] 在对多核苷酸进行扩增的情况下,可以通过例如PCR法进行,也可以通过其它公知的基因扩增方法、例如、LCR法、SDA(链置换扩增,Strand Displacement Amplification)法或LAMP法等来进行。扩增的各多核苷酸的长度只要是能够用下面叙述的各种检测方法的长度即可,没有特别限定,优选为例如40碱基~5000碱基,更优选为100碱基~1000碱基,进一步优选为100碱基~700碱基,更进一步优选为100碱基~500碱基。

[0161] 用于扩增各多核苷酸的引物序列优选设计为包夹变异部位或者包含变异部位,但设计引物序列的位置没有特别限定。引物的长度优选为15碱基~30碱基,特别优选为17碱基~25碱基。另外,作为用于对包含变异部位的给定碱基数的序列进行扩增的引物,只要能够发挥作用即可,可以在该序列中包含1个或1个以上的取代、缺失和/或添加。另外,引物可以根据需要用荧光物质或放射性物质等进行标记。

[0162] 检测的变异是生产对病毒无功能的eIF(iso)4E蛋白质的变异、或者是抑制eIF(iso)4E基因的表达的变异。其具体例子如(1.病毒抗性烟草及其制备方法)项所述。

[0163] 以下,作为检测变异的方法,可以举出代表性的方法,但并不限于此。

[0164] (1)通过利用市售的测序仪等直接读取扩增的多核苷酸的碱基序列来检测有无变异的方法。

[0165] (2)使用SSCP(单链置换多态性,Single Strand Conformation Polymorphism)法检测扩增的多核苷酸上有无变异的方法。

[0166] (3)对于扩增的多核苷酸,利用特异性识别变异部位序列(变异前的序列或变异后的序列)的限制酶进行处理,然后通过是否切断来进行判断的方法(CAPS(切割扩增多态性方法,Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)法)。另外,可以使用通过包含有意设计

的错配引物的引物组来制备限制酶识别部位的dCAPS (衍生CAPS, derived CAPS) 法。作为这样的引物组,例如,作为用于检测序列号7所示的S型eIF (iso) 4E基因的碱基序列第330号碱基的C→T变异的引物,可以列举:由序列号45所示的碱基序列构成的核酸及由序列号46所示的碱基序列构成的核酸的组,但并不限于此。另外,在如序列号46所示的碱基序列一样使用错配引物的情况下,有时扩增效率不好,在这样的情况下,可以在靶序列的外侧部位设计无错配的引物(在上述情况下,例如由序列号25和26所示的碱基序列构成的核酸引物的组),预先进行一次PCR,以该PCR产物的一部分为模板,用错配引物进行再扩增,并将得到的PCR产物用限制酶进行处理,由此检测变异。

[0167] 另外,作为包含上述错配引物的引物组,例如,作为用于检测序列号8所示的T型eIF (iso) 4E基因的碱基序列第299号碱基的G→A变异的引物,可以列举:由序列号47所示的碱基序列构成的核酸及由序列号48所示的碱基序列构成的核酸的组,但并不限于此。另外,在如序列号48所示的碱基序列一样使用错配引物的情况下,有时扩增效率不好,在这样的情况下,可以在靶序列的外侧部位设计无错配的引物(在上述情况下,例如由序列号31和32所示的碱基序列构成的核酸引物的组),预先进行一次PCR,以该PCR产物的一部分为模板,用错配引物进行再扩增,并将得到的PCR产物用限制酶进行处理,由此检测变异。

[0168] 需要说明的是,在检测上述例示的变异以外的变异时,本领域技术人员可以不需要花费很多的劳动设计引物序列,进行PCR,检测希望的变异。例如,可以通过网络进行引物序列的设计(文献:Neff et al. (2002) Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis. *TRENDS in Genetics* 18:613-615)。

[0169] 需要说明的是,在引物之一的3'末端附近导入错配的情况下,在使用具有校对活性的DNA聚合酶进行PCR时,错配被修正,有可能无法被限制酶切断。因此,在dCAPS法中,在使用错配引物时,优选不具有校对活性的DNA聚合酶。作为这样的DNA聚合酶,可以举出TaKaRa Taq™ (TAKARA BIO公司),但并不限于此。另外,在引物的3'末端附近导入限制酶切断部位的情况下,可以以引物长度的差异的形式来检测是否切断。

[0170] (4) 通过设计在变异部分特异性地杂交的探针并使其杂交来确认有无变异的方法。

[0171] 分析方法没有特别限定,可以使用例如:使用TaqMan (注册商标) 探针法的PCR、或者作为利用TOF-MS的测定技术的MassARRAY (注册商标) 分析等。

[0172] (5) 设计引物序列使一部分含有变异部位的序列(变异前的序列和/或变异后的序列),并通过PCR法等使其扩增,由此通过有无扩增来检测有无变异的方法(等位基因特异性PCR法)。作为这样的引物,例如,作为用于检测序列号7所示的S型eIF (iso) 4E基因的碱基序列第330号碱基的C→T变异的引物,可以列举由序列号37所示的碱基序列构成的核酸及由序列号39所示的碱基序列构成的核酸的组,但并不限于此。在该情况下,作为对照,例如可以使用由对变异前的碱基序列特异性的序列号38所示的碱基序列构成的核酸引物。

[0173] 另外,例如,作为用于检测序列号8所示的T型eIF (iso) 4E基因的碱基序列第299号碱基的G→A变异的引物,可以列举:由序列号40所示的碱基序列构成的核酸及由序列号42所示的碱基序列构成的核酸的组,但并不限于此。在该情况下,作为对照,例如可以使用由对变异前的碱基序列特异性的序列号41所示的碱基序列构成的核酸引物。

[0174] 需要说明的是,在引物的3'末端附近导入目的变异的碱基时,其位置优选为末端

或者从末端至数个碱基之间。另外,在引物的3'末端附近导入目的变异时,除了变异型的序列,有时也一起对未变异的野生型序列进行扩增。在这样的情况下,可以将目标错配以外的错配用变异型检测用引物和野生型检测用引物导入相同位置(例如序列号38、39、41及42的小字所示的碱基)进行PCR,得到对变异型或野生型特异性的扩增。

[0175] 另外,根据需要,除了作为目标的基因用引物,还可以在PCR反应液中加入作为PCR内标物的基因用引物(例如由序列号43和44所示的碱基序列构成)。

[0176] 需要说明的是,在检测上述例示的变异以外的变异时,本领域技术人员可以不需要花费很多的劳动设计引物序列,进行PCR,检测希望的变异。

[0177] 需要说明的是,基因变异的检测技术详细地记载于以下文献:日本专利厅的网站<http://www.jpo.go.jp/shiryou/s_sonota/hyoujun_gijutsu/kakusan/0025.html>。另外,基因变异的检测和分析方法详细地记载于以下文献:日本专利厅的网站<http://www.jpo.go.jp/shiryou/s_sonota/hyoujun_gijutsu/kakusan/0028.html>。或者可以参考文献:Agarwal et al. (2008) Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. Plant Cell Rep. 27:617-631.、Neff et al. (1998) dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in Arabidopsis thaliana genetics. Plant J. 14:387-392.。

[0178] 因此,本发明提供用于检测eIF(iso)4E基因中的变异的多核苷酸。该变异是生产对病毒无功能的eIF(iso)4E蛋白质的变异、或者是抑制eIF(iso)4E基因的表达的变异。其具体例子如(1.病毒抗性烟草及其制备方法)项所述。

[0179] 另外,上述检测用多核苷酸的一个方式为核酸引物或核酸引物的组。核酸引物的组可以是包夹上述变异的核酸引物的组,也可以是其中之一或两者包含多核苷酸的核酸引物的组,所述多核苷酸由包含上述变异的连续的碱基序列或其互补序列构成。上述检测用多核苷酸的另一个方式是与包含上述变异的连续的碱基序列或其互补序列杂交的核酸探针。

[0180] 另外,本发明提供烟草对病毒的抗性的判定方法,该方法的特征在于,在烟草的基因组DNA中,将eIF(iso)4E基因中发生了上述变异作为病毒抗性的指标。

[0181] 另外,本发明提供烟草对病毒的抗性的判定试剂盒,其特征不在于具备用于检测eIF(iso)4E基因中的上述变异的核酸引物的组。

[0182] 另外,本发明提供本发明提供烟草对病毒的抗性的判定试剂盒,其特征不在于具备与eIF(iso)4E基因中包含上述变异的连续的碱基序列或其互补序列杂交的探针。

[0183] 另外,本发明提供病毒抗性烟草的育种方法,该方法的特征在于包括使用上述判定方法筛选对病毒的抗性的烟草的筛选工序。

[0184] 另外,本发明提供病毒抗性烟草筛选方法,该方法的特征在于包括以下工序:在烟草中利用上述检测用多核苷酸检查基因组DNA中是否有上述变异的检查工序、将该检查工序中检测出上述变异的烟草作为病毒抗性烟草进行筛选的筛选工序。利用检测用多核苷酸的检查方法的详细情况如上所述。

[0185] 另外,本发明提供烟草对病毒抗性的判定用DNA标记物,其特征不在于包含由eIF(iso)4E基因中的含有上述变异的连续的碱基序列或其互补序列构成的多核苷酸。

[0186] (4.烟叶及烟草产品)

[0187] 栽培本发明的病毒抗性烟草而生产的烟叶不感染该病毒(例如,打破Virgin A突变体的病毒抗性的PVY毒株或TBTv)所引起的病。因此,特别是在发生该病的环境中进行栽培的情况下,与栽培没有病毒抗性的烟草而生产的烟叶相比,品质降低减轻,具有高品质。其结果是能够生产更高质量的烟草产品。

[0188] “烟叶”是收获烟草植物的原叶后使其干燥而得到的,是指成为用于制造烟草产品的原料的叶。“烟草产品”是指纸烟(带过滤嘴、无过滤嘴)(CIGARETTE)、雪茄(CIGAR)、小雪茄(CIGARILLO)、瑞典口含烟(SNUS)、鼻烟(SNUFF)、嚼烟及电子烟等。

[0189] 因此,本发明提供由上述病毒抗性烟草生产的烟叶。

[0190] 另外,本发明提供含有上述烟叶作为原料的烟草产品。

[0191] (5.总结)

[0192] 如上所述,为了解决课题,本申请发明人等进行了深入研究,其结果是首次发现通过在烟草中抑制eIF(iso)4E的功能可以使该烟草对PVY-breaking毒株和TBTv具有抗性。另外,弄清楚了存在于烟草基因组中的2组eIF(iso)4E基因中的一组与对PVY-breaking毒株的抗性相关,另一组与对TBTv的抗性相关,发现通过抑制上述单组基因的功能能够赋予对各病毒的抗性。另外,确认了eIF(iso)4E功能抑制烟草不导致繁殖障碍,从而完成了本发明。

[0193] 本发明的病毒抗性烟草的一个方式在翻译起始因子eIF(iso)4E基因中具有变异,由此,其特征在于生产对病毒无功能的翻译起始因子eIF(iso)4E蛋白质、或者抑制了翻译起始因子eIF(iso)4E基因的表达。

[0194] 在本发明的病毒抗性烟草的一个方式中,上述变异优选为无义变异。

[0195] 在本发明的病毒抗性烟草的一个方式中,上述变异可以是野生型翻译起始因子eIF(iso)4E基因的外显子中下述(1)~(4)所示的1个以上的变异:(1)密码子CAA的C取代为T、(2)密码子CGA的C取代为T、(3)密码子CAG的C取代为T、(4)密码子TGG的G(2个G中的任一个或两个)取代为A,所述野生型翻译起始因子eIF(iso)4E基因的外显子是(a)编码由序列号3或序列号4所示的氨基酸序列构成的翻译起始因子eIF(iso)4E蛋白质的野生型翻译起始因子eIF(iso)4E基因的外显子、(b)编码与序列号3或序列号4所示的氨基酸序列具有92%以上序列同源性的功能性翻译起始因子eIF(iso)4E蛋白质的野生型翻译起始因子eIF(iso)4E基因的外显子、(c)生成由序列号5或序列号6所示的碱基序列构成的mRNA的野生型翻译起始因子eIF(iso)4E基因的外显子、或者(d)生成与序列号5或序列号6所示的碱基序列具有92%以上序列同源性的mRNA的野生型翻译起始因子eIF(iso)4E基因的外显子,而且编码功能性翻译起始因子eIF(iso)4E蛋白质。

[0196] 在本发明的病毒抗性烟草的一个方式中,上述变异可以是基因组DNA中由序列号7所示的碱基序列构成的翻译起始因子eIF(iso)4E基因的下述(1)~(27)所示的1个以上的变异:(1)第270号的C取代为T、(2)第295号的G取代为A、(3)第296号的G取代为A、(4)第304号的G取代为A、(5)第305号的G取代为A、(6)第315号的C取代为T、(7)第330号的C取代为T、(8)第343号的G取代为A、(9)第344号的G取代为A、(10)第357号的C取代为T、(11)第394号的G取代为A、(12)第395号的G取代为A、(13)第1740号的C取代为T、(14)第1813号的G取代为A、(15)第1814号的G取代为A、(16)第1846号的G取代为A、(17)第1847号的G取代为A、(18)第

1888号的G取代为A、(19)第1889号的G取代为A、(20)第2050号的C取代为T、(21)第2104号的C取代为T、(22)第2123号的G取代为A、(23)第2124号的G取代为A、(24)第2152号的C取代为T、(25)第4742号的G取代为A、(26)第4743号的G取代为A、(27)第4926号的C取代为T。

[0197] 在本发明的病毒抗性烟草的一个方式中,上述变异可以是基因组DNA中由序列号8所示的碱基序列构成的翻译起始因子eIF(iso)4E基因的下述(1)~(26)所示的1个以上的变异:(1)第264号的C取代为T、(2)第289号的G取代为A、(3)第290号的G取代为A、(4)第298号的G取代为A、(5)第299号的G取代为A、(6)第315号的C取代为T、(7)第328号的G取代为A、(8)第329号的G取代为A、(9)第342号的C取代为T、(10)第379号的G取代为A、(11)第380号的G取代为A、(12)第1630号的C取代为T、(13)第1703号的G取代为A、(14)第1704号的G取代为A、(15)第1736号的G取代为A、(16)第1737号的G取代为A、(17)第1778号的G取代为A、(18)第1779号的G取代为A、(19)第1940号的C取代为T、(20)第1994号的C取代为T、(21)第2013号的G取代为A、(22)第2014号的G取代为A、(23)第2042号的C取代为T、(24)第3224号的G取代为A、(25)第3225号的G取代为A、(26)第3406号的C取代为T。

[0198] 在本发明的病毒抗性烟草的一个方式中,上述变异是野生型翻译起始因子eIF(iso)4E基因中的1个以上变异,上述病毒为伞形植物病毒属病毒,所述野生型翻译起始因子eIF(iso)4E基因是(a)编码由序列号3所示的氨基酸序列构成的翻译起始因子eIF(iso)4E蛋白质的野生型翻译起始因子eIF(iso)4E基因、(b)编码与序列号3所示的氨基酸序列具有92%以上序列同源性的功能性翻译起始因子eIF(iso)4E蛋白质的野生型翻译起始因子eIF(iso)4E基因、(c)生成由序列号5所示的碱基序列构成的mRNA的野生型翻译起始因子eIF(iso)4E基因、或者(d)生成与序列号5所示的碱基序列具有92%以上序列同源性的mRNA的野生型翻译起始因子eIF(iso)4E基因,而且编码功能性翻译起始因子eIF(iso)4E蛋白质。

[0199] 在本发明的病毒抗性烟草的一个方式中,上述伞形植物病毒属病毒优选为烟草丛顶病毒。

[0200] 在本发明的病毒抗性烟草的一个方式中,上述变异是野生型翻译起始因子eIF(iso)4E基因中的1个以上变异,上述病毒为马铃薯Y病毒组属病毒,所述野生型翻译起始因子eIF(iso)4E基因是(a)编码由序列号4所示的氨基酸序列构成的翻译起始因子eIF(iso)4E蛋白质的野生型翻译起始因子eIF(iso)4E基因、(b)编码与序列号4所示的氨基酸序列具有92%以上序列同源性的功能性翻译起始因子eIF(iso)4E蛋白质的野生型翻译起始因子eIF(iso)4E基因、(c)生成由序列号6所示的碱基序列构成的mRNA的野生型翻译起始因子eIF(iso)4E基因、或者(d)生成与序列号6所示的碱基序列具有92%以上序列同源性的mRNA的野生型翻译起始因子eIF(iso)4E基因,而且编码功能性翻译起始因子eIF(iso)4E蛋白质。

[0201] 上述马铃薯Y病毒组属病毒优选为打破烟草的Virgin A突变体的病毒抗性的毒株,所述毒株是马铃薯病毒Y的毒株。

[0202] 本发明的病毒抗性烟草的另一个方式的特征在于翻译起始因子eIF(iso)4E基因的表达量与野生型相比为20%以下。

[0203] 在本发明的病毒抗性烟草的另一个方式中,更优选上述表达量与野生型相比为10%以下。

[0204] 在本发明的病毒抗性烟草的另一个方式中,可以保持用于抑制翻译起始因子eIF (iso) 4E基因表达的RNAi构建物。

[0205] 本发明的病毒抗性烟草制备方法的一个方式的特征在于,通过将变异导入翻译起始因子eIF (iso) 4E基因来制备对病毒具有抗性的烟草,所述变异是生产对病毒无功能的翻译起始因子eIF (iso) 4E蛋白质的变异、或者是抑制翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的表达的变异。

[0206] 在本发明的病毒抗性烟草制备方法的一个方式中,上述变异优选为无义变异。

[0207] 在本发明的病毒抗性烟草制备方法的一个方式中,优选通过甲磺酸乙酯产生上述变异。

[0208] 在本发明的病毒抗性烟草制备方法的一个方式中,上述变异可以是野生型翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的外显子中下述(1)~(4)所示的1个以上的变异:(1)密码子CAA的C取代为T、(2)密码子CGA的C取代为T、(3)密码子CAG的C取代为T、(4)密码子TGG的G(2个G中的任一个或两个)取代为A,所述野生型翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的外显子是(a)编码由序列号3或序列号4所示的氨基酸序列构成的翻译起始因子eIF (iso) 4E蛋白质的野生型翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的外显子、(b)编码与序列号3或序列号4所示的氨基酸序列具有92%以上序列同源性的功能性翻译起始因子eIF (iso) 4E蛋白质的野生型翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的外显子、(c)生成由序列号5或序列号6所示的碱基序列构成的mRNA的野生型翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的外显子、或者(d)生成与序列号5或序列号6所示的碱基序列具有92%以上序列同源性的mRNA的野生型翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的外显子,而且编码功能性翻译起始因子eIF (iso) 4E蛋白质。

[0209] 在本发明的病毒抗性烟草制备方法的一个方式中,上述变异可以是基因组DNA中由序列号7所示的碱基序列构成的翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的下述(1)~(27)所示的1个以上的变异:(1)第270号的C取代为T、(2)第295号的G取代为A、(3)第296号的G取代为A、(4)第304号的G取代为A、(5)第305号的G取代为A、(6)第315号的C取代为T、(7)第330号的C取代为T、(8)第343号的G取代为A、(9)第344号的G取代为A、(10)第357号的C取代为T、(11)第394号的G取代为A、(12)第395号的G取代为A、(13)第1740号的C取代为T、(14)第1813号的G取代为A、(15)第1814号的G取代为A、(16)第1846号的G取代为A、(17)第1847号的G取代为A、(18)第1888号的G取代为A、(19)第1889号的G取代为A、(20)第2050号的C取代为T、(21)第2104号的C取代为T、(22)第2123号的G取代为A、(23)第2124号的G取代为A、(24)第2152号的C取代为T、(25)第4742号的G取代为A、(26)第4743号的G取代为A、(27)第4926号的C取代为T。

[0210] 在本发明的病毒抗性烟草制备方法的一个方式中,上述变异可以是基因组DNA中由序列号8所示的碱基序列构成的翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的下述(1)~(26)所示的1个以上的变异:(1)第264号的C取代为T、(2)第289号的G取代为A、(3)第290号的G取代为A、(4)第298号的G取代为A、(5)第299号的G取代为A、(6)第315号的C取代为T、(7)第328号的G取代为A、(8)第329号的G取代为A、(9)第342号的C取代为T、(10)第379号的G取代为A、(11)第380号的G取代为A、(12)第1630号的C取代为T、(13)第1703号的G取代为A、(14)第1704号的G取代为A、(15)第1736号的G取代为A、(16)第1737号的G取代为A、(17)第1778号的G取代为A、(18)第1779号的G取代为A、(19)第1940号的C取代为T、(20)第1994号的C取代为T、(21)

第2013号的G取代为A、(22) 第2014号的G取代为A、(23) 第2042号的C取代为T、(24) 第3224号的G取代为A、(25) 第3225号的G取代为A、(26) 第3406号的C取代为T。

[0211] 本发明的病毒抗性烟草制备方法的另一个方式的特征在于通过导入因子来制备对病毒具有抗性的烟草,所述因子将翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的表达式抑制至与野生型相比为20%以下。

[0212] 在本发明的病毒抗性烟草制备方法的另一个方式中,更优选向烟草中导入使上述表达式抑制至与野生型相比为10%以下的因子。

[0213] 在本发明的病毒抗性烟草制备方法的另一个方式中,上述因子优选为RNAi构建物。

[0214] 在本发明的病毒抗性烟草制备方法中,上述病毒优选为马铃薯Y病毒组属病毒。

[0215] 在本发明的病毒抗性烟草制备方法中,上述马铃薯Y病毒组属病毒更优选为马铃薯病毒Y。

[0216] 在本发明的病毒抗性烟草制备方法中,上述马铃薯Y病毒组属病毒更优选为打破烟草的Virgin A突变体(VAM烟草)的病毒抗性的毒株,所述毒株是马铃薯病毒Y的毒株。

[0217] 在本发明的病毒抗性烟草制备方法中,上述病毒优选为伞形植物病毒属病毒。

[0218] 在本发明的病毒抗性烟草制备方法中,上述伞形植物病毒属病毒更优选为烟草丛顶病毒。

[0219] 本发明的检测用多核苷酸的一个方式是用于检测烟草的翻译起始因子eIF (iso) 4E基因中的变异的多核苷酸,其特征在于,该变异是生产对病毒无功能的翻译起始因子eIF (iso) 4E蛋白质的变异、或者是抑制翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的表达的变异。

[0220] 在本发明的检测用多核苷酸的一个方式中,上述变异优选为无义变异。

[0221] 在本发明的检测用多核苷酸的一个方式中,上述变异可以是野生型翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的外显子中下述(1)~(4)所示的1个以上的变异:(1) 密码子CAA的C取代为T、(2) 密码子CGA的C取代为T、(3) 密码子CAG的C取代为T、(4) 密码子TGG的G(2个G中的任一或两个)取代为A,所述野生型翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的外显子是(a) 编码由序列号3或序列号4所示的氨基酸序列构成的翻译起始因子eIF (iso) 4E蛋白质的野生型翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的外显子、(b) 编码与序列号3或序列号4所示的氨基酸序列具有92%以上序列同源性的功能性翻译起始因子eIF (iso) 4E蛋白质的野生型翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的外显子、(c) 生成由序列号5或序列号6所示的碱基序列构成的mRNA的野生型翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的外显子、或者(d) 生成与序列号5或序列号6所示的碱基序列具有92%以上序列同源性的mRNA的野生型翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的外显子,而且编码功能性翻译起始因子eIF (iso) 4E蛋白质。

[0222] 在本发明的检测用多核苷酸的一个方式中,上述变异可以是基因组DNA中由序列号7所示的碱基序列构成的翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的下述(1)~(27)所示的1个以上的变异:(1) 第270号的C取代为T、(2) 第295号的G取代为A、(3) 第296号的G取代为A、(4) 第304号的G取代为A、(5) 第305号的G取代为A、(6) 第315号的C取代为T、(7) 第330号的C取代为T、(8) 第343号的G取代为A、(9) 第344号的G取代为A、(10) 第357号的C取代为T、(11) 第394号的G取代为A、(12) 第395号的G取代为A、(13) 第1740号的C取代为T、(14) 第1813号的G取代为A、(15) 第1814号的G取代为A、(16) 第1846号的G取代为A、(17) 第1847号的G取代为A、(18) 第

1888号的G取代为A、(19)第1889号的G取代为A、(20)第2050号的C取代为T、(21)第2104号的C取代为T、(22)第2123号的G取代为A、(23)第2124号的G取代为A、(24)第2152号的C取代为T、(25)第4742号的G取代为A、(26)第4743号的G取代为A、(27)第4926号的C取代为T。

[0223] 在本发明的检测用多核苷酸的一个方式中,上述变异可以是基因组DNA中由序列号8所示的碱基序列构成的翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的下述(1)~(26)所示的1个以上的变异:(1)第264号的C取代为T、(2)第289号的G取代为A、(3)第290号的G取代为A、(4)第298号的G取代为A、(5)第299号的G取代为A、(6)第315号的C取代为T、(7)第328号的G取代为A、(8)第329号的G取代为A、(9)第342号的C取代为T、(10)第379号的G取代为A、(11)第380号的G取代为A、(12)第1630号的C取代为T、(13)第1703号的G取代为A、(14)第1704号的G取代为A、(15)第1736号的G取代为A、(16)第1737号的G取代为A、(17)第1778号的G取代为A、(18)第1779号的G取代为A、(19)第1940号的C取代为T、(20)第1994号的C取代为T、(21)第2013号的G取代为A、(22)第2014号的G取代为A、(23)第2042号的C取代为T、(24)第3224号的G取代为A、(25)第3225号的G取代为A、(26)第3406号的C取代为T。

[0224] 本发明的检测用多核苷酸的一个方式是包夹上述变异的核酸引物的组、或者其中之一或两者包含多核苷酸的核酸引物的组,所述多核苷酸由包夹上述变异的连续的碱基序列或其互补序列构成。

[0225] 本发明的病毒抗性烟草筛选方法的一个方式的特征在于包括以下工序:利用权利要求27~32中任一项所述的检测用多核苷酸检查在烟草中是否有基因组DNA中的上述变异的检查工序、以及将在上述检查工序中检测出上述变异的烟草筛选为病毒抗性烟草的筛选工序。

[0226] 本发明的烟草对病毒的抗性的判定用DNA标记物的一个方式的特征在于:包含由翻译起始因子eIF (iso) 4E基因中的含有变异的连续的碱基序列或其互补序列构成的多核苷酸,该变异是生产对病毒无功能的翻译起始因子eIF (iso) 4E蛋白质的变异、或者是抑制翻译起始因子eIF (iso) 4E基因的表达的变异。

[0227] 需要说明的是,目前为止,在任意植物中被指出与PVY抗性具有相关性的是eIF4E,并未公开与eIF (iso) 4E相关的信息。虽然有使eIF (iso) 4E的表达量一定程度降低的烟草的报告,但完全没有提及与病毒抗性的相关性。另外,在烟草中,虽然指出了PVY抗性与eIF4E的相关性,但另一方面也有马铃薯Y病毒组抗性与eIF4E或eIF (iso) 4E的变异无关的报告,状况尚处于混沌状态。另外,关于伞形植物病毒属的病毒,对其的抗性与翻译起始因子的相关性没有任何报告。而且,对于病毒繁殖所需要的宿主因子而言,由于除了翻译起始因子以外,如上所述还有DEAD框RNA螺旋酶样蛋白、VPg相互作用蛋白及翻译延长因子等其它多个候选,而且由于烟草的eIF4E家族中存在多个基因,因此从其中发现有效的基因需要很多的劳动和时间,因此处于无法容易地推测出与对PVY-Breaking毒株或TBTV的抗性相关的烟草基因的状况。

[0228] 以下示出实施例对本发明的实施方式进行更详细地说明。当然,本发明并不限定于以下实施例,不言而喻,细节部分可以是各种方式。另外,本发明并不限定于上述实施方式,在权利要求所示的范围内可以进行各种变更,将各个公开的技术方法适当组合而得到的实施方式包含于本发明的技术范围内。另外,参考并引用本说明书中记载的文献的全部内容。

[0229] 实施例

[0230] (实施例1)

[0231] (基因的获得)

[0232] 进行公开数据库检索,获得烟草(*Nicotiana tabacum*)的翻译起始因子eIF4E1 (GenBank收录号:AY702653)的cDNA碱基序列(序列号10)及eIF (iso) 4E (GenBank收录号:AY699609)的cDNA碱基序列(序列号1)。

[0233] 根据使用了GenBank数据库的WGS(全基因组鸟枪法重叠群)的BLAST分析表明,收录号为AY699609的eIF (iso) 4E源自于林烟草。另外,作为源自于绒毛状烟草的烟草(*Nicotiana tabacum*) eIF (iso) 4E,确定了GenBank收录号为EB683576(序列号2)及FN666434两者。将这些基因或其序列信息供于以下实验。FN666434是来自于源自烟草品种Samsun NN的T型eIF (iso) 4E基因的序列,与上述的源自烟草品种K326的T型eIF (iso) 4E序列(EB683576)的序列同源性的97%。这2个基因所编码的蛋白质的氨基酸序列的同源性(identity)为97%、相似性(similarity)为99%。可以认为这些序列的差别是由来源的品种之间的差异所导致的。另外,S型eIF (iso) 4E(AY699609)与T型eIF (iso) 4E(EB683576)的DNA的序列同源性的91%。另外,S型eIF (iso) 4E的氨基酸序列(序列号3)与T型eIF (iso) 4E的氨基酸序列(序列号4)的同源性的91%、相似性为96%。需要说明的是,序列同源性的分析使用了核酸/氨基酸序列分析软件GENETYX(注册商标)(ver.12)(GENETYX公司)。

[0234] (RNAi构建物的构建)

[0235] 为了制备eIF4E1表达抑制烟草及eIF (iso) 4E表达抑制烟草,构建了以这些基因的内部序列作为触发器的RNAi构建物。

[0236] 首先,制备了对eIF4E1的触发器序列(序列号11)及eIF (iso) 4E的触发器序列(序列号9)进行特异性扩增的引物(表1)。在各个基因的FW引物的5'末端添加用于在后面叙述的克隆中使用的CACC序列。

[0237] 【表1】

[0238] 表1:用于克隆翻译起始因子的RNAi触发器序列的引物

引物名称	序列(5' -3')	靶基因	序列号
Nt-eIF4E1-FW (CACC)	CACCGAAGACTAATACTCGTGAGG	Nt-eIF4E1	序列号1 2
Nt-eIF4E1-RV	TCCGTTGGCGCAGACAGG		序列号1 3
Nt-eIF (iso) 4E-FW (CACC)	CACCAGAGGCGACGGAGGTTCC	Nt-eIF (iso) 4E	序列号1 4
Nt-eIF (iso) 4E-RV	TCTGCTGCTCGTAACAGTCC		序列号1 5

[0240] 使用MagDEA(注册商标)RNA100 (GC) (Precision System Science公司),从烟草幼苗提取RNA并纯化。接着,使用PrimeScript™ RT试剂试剂盒(TAKARA BIO公司)由纯化后的RNA合成了cDNA。以该cDNA为模板,使用表1所示的基因特异性引物,对eIF4E1和eIF (iso) 4E的基因片段进行了扩增。具体而言,20μL反应液中含有模板DNA 10ng、引物各5pmoles,酶使用PrimeSTAR Max DNA聚合酶(TAKARA BIO公司),进行了35次1循环:98℃10秒钟、55℃15秒钟、72℃15秒钟的反应。使用MiniElute PCR纯化试剂盒(Qiagen公司)对PCR产物(eIF4E1约320bp、eIF (iso) 4E约310bp)进行纯化,然后克隆至载体pENTR™/D-TOP0(注册商标)(Life Technologies公司)。确认了插入序列的碱基序列之后,使用Gateway(注册商标)LR Clonase(注册商标)II酶混合物(Life Technologies公司),将插入序列克隆至RNAi载体pSP231(文献:参考国际公开第2011/102394号公报)。pSP231是在pHellsgate 12(文献:

Wesley et al., 2001, Plant J., 27, 581-590参照)的SacI部位插入了GFP(绿色荧光蛋白基因)表达盒的载体,是用花椰菜花叶病毒35SRNA基因启动子驱动触发器序列的反向重复序列包夹pdk/cat内含子的类型的RNAi序列的形式的双元载体。在克隆于pSP231之后,确认RNAi触发器序列及其朝向,制成最终的RNAi构建物。

[0241] 通过电穿孔法将制备的RNAi构建物导入土壤杆菌LBA4404株。

[0242] (烟草转化)

[0243] 烟草的转化用通常方法(叶盘法)进行。烟草品种使用了Petit Havana SR1。

[0244] 剪切烟草子叶的四角,使切下的叶在土壤杆菌溶液中浸渍10分钟。擦拭多余的液体,然后将叶置于LS固体培养基(含有3%蔗糖、0.8%琼脂)上。在25℃、3天、黑暗下进行培养,由此使重组土壤杆菌感染烟草,将各翻译起始因子的RNAi构建物导入SR1。在含有250mg/L的头孢噻肟和作为植物激素的2-异戊烯腺嘌呤(2iP)(10mg/L)及IAA(0.3mg/L)的LS固体培养基上将叶切片放置4天,对土壤杆菌进行除菌。重组体的筛选在以上述浓度含有头孢噻肟和植物激素的LS培养基中进一步含有50mg/L卡那霉素而得到的培养基上进行。将从筛选的重组体再分化而得到苗置于生根培养基(含有1.5%蔗糖、0.3%结冷胶、以及上述浓度的头孢噻肟和卡那霉素的LS固体培养基)中使其生根。在温室培育得到的重组烟草。

[0245] (转化初代重组烟草中的翻译起始因子的转录分析)

[0246] 对于重组烟草,为了研究eIF4E1或eIF(iso)4E基因的表达,基于各基因的碱基序列设计了实时PCR用的引物组/探针(表2)。另外,使用Rneasy Plant Mini Kit(QIAGEN公司)从各重组烟草的叶提取了总RNA。使用Prime Script reagent Kit(TAKARA BIO公司)从得到的RNA合成cDNA,作为实时PCR的模板。在实时PCR中,使用TaqMan Fast Advanced Master mix(Life technologies公司)进行扩增反应。反应条件为在50℃2分钟、95℃20秒钟之后进行40次95℃1秒钟、60℃20秒钟的循环。表达分析使用StepOne Software v2.2(Life technologies公司)。使用延长因子(EF1- α)基因作为PCR的内标物,通过与该基因的表达量相比计算出靶基因的相对基因表达量。使用了非重组烟草(SR1)作为对照。

[0247] 【表2】

[0248] 表2:用于定量PCR的引物和探针

	靶基因	引物/探针	序列(5' -3')	序列号
[0249]	eIF4E1	Forward	CGAGTTAGACAAGAAAAAATAGCTTTGT	序列号16
		Reverse	ATCCAGAAATTCCTTCCAYGTTT*	序列号17
		Probe	ACCAGGAATGCTGCCAATGAAACAGC	序列号18
	eIF(iso)4E	Forward	GCCACTGAAGCACCGATAGAG	序列号19
		Reverse	TTATCGAACCAGAAATGTCCATCTC	序列号20
		Probe	TCCGCCGGCGTCAGCGAC	序列号21
	EF- α	Forward	CTAAGGGTGCTGCCAGCTTT	序列号22
		Reverse	GTCAAGCACTGGAGCATATCCA	序列号23
		Probe	ATCATGAACCATCCAGGACAGATTGG	序列号24

[0250] *Y=C/T

[0251] 其结果是,与对照的表达量相比,导入了eIF4E1的RNAi构建物的烟草eIF4E1基因的转录物的量、以及导入了eIF(iso)4E的RNAi构建物的烟草eIF(iso)4E基因的转录物的量明显降低。作为在转化初代中转录抑制程度高的品系,在eIF4E1中选择#1、#2、#3、#7、#8(各对照品种SR1的1%、1%、1%、36%、1%的表达量)这5个品系,在eIF(iso)4E中选择、#1、#7、#15(对照品种SR1的4%、6%、5%的表达量)这3个品系。

[0252] (转化次代的重组烟草的分离)

[0253] 将转化初代中转录抑制程度高的eIF4E1的5个品系及eIF (iso) 4E的3个品系的种子无菌地播种于LS固体培养基(含有3%蔗糖、0.8%琼脂)上。使用Fluor Imager 595 (Molecular Dynamics公司)测定了发芽、生长的幼植物体的GFP荧光。如上所述,用于构建物导入的pSP231在T-DNA区域上的RNAi表达盒相邻处设置有35S启动子-GFP表达盒。在幼植物体中,将发强GFP荧光的植物判断为对RNAi构建物的纯合品系、将完全没有荧光的植物判断为对RNAi构建物的无效分离(null segregant)品系(不存在RNAi构建物)、将发弱荧光的植物判断为对RNAi构建物的半合子品系。将播种后3周的植物转移至温室,移植至培养土壤中进行培育。

[0254] (转化次代的重组烟草中的翻译起始因子的转录分析)

[0255] 为了研究各重组烟草品系的次代中的eIF (iso) 4E基因的表达,如上所述从重组烟草的叶提取RNA,合成cDNA,作为实时PCR的模板。如上所述进行实时PCR,使用EF1- α 基因作为内标物,使用非重组烟草(SR1)作为对照植物。

[0256] 根据利用实时PCR进行的eIF (iso) 4E的基因表达分析的结果(图1)可以确认,eIF (iso) 4E表达抑制品系#1、#7及#15的纯合品系的表达分别被抑制至非重组系统(SR1)的8%、6%、6%左右。另外,在eIF (iso) 4E的无效分离品系的3个品系中确认了未发生表达抑制。

[0257] (翻译起始因子的转录受到抑制的重组烟草植物的病毒接种试验)

[0258] 将PVY (PVY-N)、PVY-B或TBTv(烟草丛顶病毒)接种于移植于培养土壤后10天的个体。PVY-B是用于在日本烟草产业株式会社烟叶研究所分离的病毒毒株,使PVY抗性的烟草现有品种Virgin A突变体发生坏疽症状的VAM breaking毒株。TBTv是伞形植物病毒属病毒,对烟草的叶引起斑纹症状。接种源使用感染各病毒而发病的黄色种TSUKUBA(つくば)1号的患病叶。品种TSUKUBA 1号是对PVY、PVY-B及TBTv易感性的品种,通过接种显示出明确的病状。将采集的患病叶在乳钵中与0.01N磷酸盐缓冲液一起磨碎。使用碳化硅将该磨碎液涂抹接种于移植1周后的烟草苗的最大叶(从下起第4或5片)的半个叶片。然后,在温室内进行栽培,观察适时病状。

[0259] 其结果是,关于eIF4E1功能抑制烟草品系(eIF4E1的#1、#2、#3、#7、#8),基本上全部个体中观察到了PVY及PVY-B两者的病毒、以及由TBTv引起的发病,具有与对照品种和无效分离品系没有差别的敏感性。

[0260] 将eIF (iso) 4E功能抑制烟草的病毒接种试验结果示于表3。

[0261] 在PVY-B接种后第7天的病状评价中,对于eIF (iso) 4E功能抑制烟草(eIF (iso) 4E的#1、#7、#15)的纯合品系而言,3个品系(共计9个个体)均没有观察到发病的个体。确认了不具有eIF (iso) 4E的RNAi构建物的无效分离品系及对照品种的SR1的全部个体发病。由此可知,eIF (iso) 4E功能抑制烟草具有对PVY-B的抗性。可以认为,在eIF (iso) 4E功能抑制烟草(eIF (iso) 4E的转录物的量降低的烟草)中病毒的繁殖或细胞间转移受到阻碍。另一方面,关于PVY,eIF (iso) 4E功能抑制烟草的纯合品系虽然在3个品系9个个体中的5个个体中观察到了发病,但4个个体未观察到发病。需要说明的是,没有观察到任何对eIF (iso) 4E功能抑制烟草的生长抑制。

[0262] 在TBTv接种后第9天的病状评价中,对于eIF (iso) 4E功能抑制烟草系(eIF (iso) 4E

的#1、#7、#15)的纯合系统而言,3个系统(共计9个个体)均没有观察到发病的个体。另一方面,确认了不具有eIF(iso)4E的RNAi构建物的无效分离品系及对照品种的SR1的全部个体发病。由此可知,eIF(iso)4E功能抑制烟草具有对TBTv的抗性。

[0263] 以上结果表明,通过抑制烟草的翻译起始因子eIF(iso)4E的功能,能够赋予对PVY-B及TBTv的抗性。

[0264] [表3]

[0265] 表3:对翻译起始因子的转录受到抑制的重组烟草的病毒接种试验结果

系统		表达量	PVY (接种后7天) (发病个体数)/ (试验个体数)	PVY-B (接种后7天) (发病个体数)/ (试验个体数)	TBTv (接种后9天) (发病个体数)/ (试验个体数)
eIF(iso)4E #1	纯合	WT的8%	3/3	0/3	0/3
	空白	与WT相等	1/1	1/1	1/1
eIF(iso)4E #7	纯合	WT的6%	1/3	0/3	0/3
	空白	与WT相等	1/2	2/2	2/2
eIF(iso)4E #15	纯合	WT的6%	1/3	0/3	0/3
	空白	与WT相等	2/2	2/2	3/3
eIF(iso)4E 总计	纯合	WT的6~8%	5/9 (56%)	0/9 (0%)	0/9 (0%)
	空白	与WT相等	4/5 (80%)	5/5 (100%)	6/6 (100%)
SR1 (对照-WT)			5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)

[0267] (实施例2)

[0268] (eIF(iso)4E烟草突变体的筛选)

[0269] 使用S型eIF(iso)4E(AY699609)和T型eIF(iso)4E(EB683576)的mRNA序列检索GenBank数据库的烟草的全基因组鸟枪法重叠群,结果可以获得在内含子区域以外的蛋白编码区域中显示出100%序列同源性的基因组序列(S型的收录号为AWOJ01412288、T型的收录号为AWOJ01054542)。在这些序列中,将eIF(iso)4E基因部分的序列示于序列号7(S型eIF(iso)4E基因的基因组序列)和序列号8(T型eIF(iso)4E基因的基因组序列)。两个序列是源自烟草品种K326的基因组序列。

[0270] 另外,弄清楚了eIF(iso)4E基因由5个外显子和4个内含子构成。图2示出了S型eIF(iso)4E基因的外显子/内含子结构的示意图。图3示出了T型eIF(iso)4E基因的外显子/内含子结构的示意图。需要说明的是,在图2及图3中,记载于下部的数字表示可以通过利用EMS处理产生的由G至A的变异或由C至T的变异而发生的无义变异的候选部位的数量,箭头表示实施例中的引物的位置。对于通过利用EMS处理产生的由G至A的变异或由C至T的变异能够形成终止密码子的碱基而言,在S型eIF(iso)4E的情况下,第1外显子中为12个(序列号7的第270号的C、第295号的G、第296号的G、第304号的G、第305号的G、第315号的C、第330号的C、第343号的G、第344号的G、第357号的C、第394号的G、第395号的G),第2外显子中为7个(第1740号的C、第1813号的G、第1814号的G、第1846号的G、第1847号的G、第1888号的G、第1889号的G),第3外显子中为5个(第2050号的C、第2104号的C、第2123号的G、第2124号的G、第2152号的C),第4外显子中为2个(第4742号的G、第4743号的G),第5外显子中为1个(第4926号的C)。

[0271] 另一方面,在T型eIF(iso)4E的情况下,第1外显子中为11个(序列号8的第264号的C、第289号的G、第290号的G、第298号的G、第299号的G、第315号的C、第328号的G、第329号的G、第342号的C、第379号的G、第380号的G),第2外显子中为7个(第1630号的C、第1703号的G、第1704号的G、第1736号的G、第1737号的G、第1778号的G、第1779号的G),第3外显子中为5个(第1940号的C、第1994号的C、第2013号的G、第2014号的G、第2042号的C),第4外显子中为2个(第3224号的G、第3225号的G),第5外显子中为1个(第3406号的C)。

[0272] 对第1外显子、第2外显子及第3外显子设计了对包含外显子和外显子/内含子边界部位的区域进行扩增的引物(表4)。需要说明的是,表中“S型eIF(iso)4E”是指源自林烟草的eIF(iso)4E(烟草序列)，“T型eIF(iso)4E”是指源自绒毛状烟草的eIF(iso)4E(烟草序列)。

[0273] 【表4】

[0274] 表4:用于烟草突变体筛选的引物

[0275]

靶位点	引物	序列(5' - 3')	序列号
S 型 eIF(iso)4E 外显子 1 组合 1	正向	GGCCTAAACGTTGTAAGACAA	序列号 25
	反向	TGCTTAGTTAAATGCTACAGGG	序列号 26
S 型 eIF(iso)4E 外显子 1 组合 2	正向	TTACGCCTCTCCGTTTCGCTA	序列号 27
	反向	TGCTTAGTTAAATGCTACAGGG	序列号 26
S 型 eIF(iso)4E 外显子 2&3 组合 1	正向	CTGGGTTTGTGTTGTGTAAGTA	序列号 28
	反向	CACAGTTTTTCAGTTCAGTAAC	序列号 29
S 型 eIF(iso)4E 外显子 2&3 组合 2	正向	CTGGGTTTGTGTTGTGTAAGTA	序列号 28
	反向	GATGGGCCATATCATCATCAT	序列号 30
T 型 eIF(iso)4E 外显子 1 组合 1	正向	GACCTGAACATTGCAAGATGA	序列号 31
	反向	GGCTTACTTGAATGCTACAAGG	序列号 32
T 型 eIF(iso)4E 外显子 1 组合 2	正向	TTACGCCTCAATCGACACAA	序列号 33
	反向	GGCTTACTTGAATGCTACAAGG	序列号 32
T 型 eIF(iso)4E 外显子 2&3 组合 1	正向	CCCCAGTAATGGATTCTACC	序列号 34
	反向	ATCAGATTTAGGATATAGGGG	序列号 35

[0276]	T 型 eIF(iso)4E 外显子 2&3 组 合 2	正向	CCCCAGTAATGGATTCTACC	序列号 34
		反向	CAGATACTATTTGACACCAC	序列号 36

[0277] 实施PCR,确认了产物的碱基序列。使用烟草(品种TSUKUBA 1号)基因组5ng,在20μL的反应体系中进行了PCR。酶使用Tks Gflex™ DNA聚合酶(TAKARA BIO公司)。反应在94℃2分钟之后进行40次94℃30秒钟、60℃30秒钟、72℃1分30秒的循环。其结果是可以仅得到希望长度的产物,能够确认碱基序列。即,使用上述引物从烟草基因组成功地进行了S型特异性和T型特异性的eIF(iso)4E基因区域的扩增。

[0278] 从具有利用EMS处理的变异的个体提取基因组DNA,通过使用了上述引物的PCR对S型特异性和T型特异性的eIF(iso)4E基因区域进行扩增,通过确认扩增产物的碱基序列,对在第1外显子、第2外显子或第3外显子内生成了终止密码子的eIF(iso)4E烟草突变体进行筛选。

[0279] 具体而言,按照田岛等(文献:平成23年度日本植物病理学会大会、P234、“Production of panel of tobacco mutants”(烟草突变体实验对象集合的制备))对制备的烟草突变体实验对象进行了筛选。该实验对象集合由以下的组构成:对烟草品种TSUKUBA 1号的种子(数千个)以变异原处理的形式进行EMS处理,由每个培育而成的个体(M1代)得到的突变体自身繁殖后代种子(M2混合种子)的组、播种这些M2种子并从培育而成的各品系8个个体的幼苗提取出的混合DNA的组。

[0280] (eIF(iso)4E基因的S型突变体的筛选)

[0281] 以上述DNA样品(1974品系的DNA样品)作为模板,使用表4的引物中S型eIF(iso)4E-Exon 1组合1(序列号25和26)及S型eIF(iso)4E-Exon 2&3组合1(序列号28和29)进行了PCR。确定了得到的PCR产物的碱基序列,结果是在外显子1中58个样品(50个部位)中检测出变异,在外显子2和外显子3中共计58个样品(45个部位)中检测出变异。变异均为杂合的。检测出无义变异(产生终止密码子的变异)的样品在外显子1中为4个样品(序列号7的第295、394或395号的G变异为A、第330号的C变异为T),在外显子2和外显子3中为1个样品(序列号7的第1814号的G变异为A)。其中,播种第330号的C变异为T的品系(M2),从24个个体提取DNA,确定了碱基序列,结果是得到了11个个体的以纯合方式具有目标变异的个体(eIF(iso)4E_S型变异纯合个体)。

[0282] (eIF(iso)4E基因的T型突变体的筛选)

[0283] 以上述DNA样品(1974品系的DNA样品)为模板,使用表4的引物中T型eIF(iso)4E-Exon 1组合1(序列号31和32)及T型eIF(iso)4E-Exon 2&3组合2(序列号34和36)进行了PCR。与上述同样地确定了得到的PCR产物的碱基序列,结果是在外显子1中43样品(38个部位)中检测出变异,在外显子2和外显子3中共计66样品(55个部位)中检测出变异。变异均为杂合的。检测出无义变异的样品在外显子1中为5个样品(序列号8的第289、299、328、329或380号的G变异为A)、在外显子2和外显子3中为4个样品(序列号8的第1704号的G变异为A的有3个、第1737的G变异为A的有1个)。其中,对于第299号的G变异为A的品系(M2),从24个个体

体提取DNA,确定了碱基序列,结果是得到了8个个体的以纯合方式具有目标变异的个体(eIF(iso)4E__T型变异纯合个体)。

[0284] (eIF(iso)4E__ST双纯合突变体的培育和筛选)

[0285] 使上述eIF(iso)4E__S型变异纯合个体与eIF(iso)4E__T型变异纯合个体交配。通过该交配,制备了在S型eIF(iso)4E的基因座和T型eIF(iso)4E的基因座两者中以杂合接合方式保持有野生型(无变异)与变异型的F1系统。使F1系自身受粉(自身繁殖),得到了F2系统。在该F2系中,对于S型和T型两者,以纯合方式具有变异的个体的比例的理论值为1/16。播种F2系统,从700个个体提取了DNA。

[0286] DNA提取如下所述进行。将烟草叶样品(1cm×1cm)放入2mL管中,加入400μL提取液(组成为200mM Tris-HCl(pH7.5),250mM NaCl,25mM EDTA,0.5%SDS)和200μL的蛋白质沉淀溶液(QIAGEN公司制),然后加入金属锥进行破碎,以13000rpm离心分离10分钟。将上清液300μL转移至新的1.5mL管中,加入800μL的100%乙醇翻转混和。以15000rpm离心分离10分钟,然后完全除去上清液。确认了颗粒干燥之后,加入TE(10mM Tris-HCl(pH7.5),1mM EDTA)50μL。

[0287] 设计了ASP(等位基因特异性引物)标记物作为PCR用标记物。ASP标记物是利用了下述性质的标记物,即,设计在引物序列的3'末端侧设置了单核苷酸多态性(SNP)的引物,仅能够从具有特定多态性的样品中得到PCR产物,而由于错配从除此以外的样品中无法得到PCR产物。制备的引物如表5所示。

[0288] 【表5】

[0289] 表5:用于烟草突变体筛选的ASP标记物的引物

靶位点	引物	序列 (5' - 3')	序列号
eIF(iso)4E_S_WT	正向(F)	CCATACCCTGATTC TCTTCC	序列号 37
	反向(R)	AACTTCCCCAAGC GGCTCaTaGT*	序列号 38
eIF(iso)4E_S_Mut	正向(F)	CCATACCCTGATTC TCTTCC	序列号 37
	反向(R)	AACTTCCCCAAGC GGCTCaTaAT*	序列号 39
eIF(iso)4E_T_WT	正向(F)	GCCTCAATCGACA CAAAAGGGAGAG	序列号 40
	反向(R)	TTGCTTCGGCTTAT CGAtCC*	序列号 41
eIF(iso)4E_T_Mut	正向(F)	GCCTCAATCGACA CAAAAGGGAGAG	序列号 40
	反向(R)	TTGCTTCGGCTTAT CGAtTC*	序列号 42
Nia2 (Control)	正向(F)	CCGAGTAAAGATG AATGTGTGC	序列号 43
	反向(R)	TTGCCAGGAGAGT CAGAGGT	序列号 44

[0291] *小写字母指示引起与靶模板DNA的错配的碱基。

[0292] 首先,制备了用于检测未产生变异的野生型(WT)eIF(iso)4E基因的引物混合物。组成为eIF(iso)4E__S__WT的F和R各10 μ M、eIF(iso)4E__T__WT的F和R各10 μ M、Nia2基因(对照,文献:Vincentz and Caboche(1991)Constitutive expression of nitrate reductase allows normal growth and development of *Nicotiana plumbaginifolia* plants.EMBO J.10:1027-1035.)的F和R各1 μ M。接着,制备变异型(Mut)的eIF(iso)4E基因检测用引物混合物。组成为eIF(iso)4E__S__Mut的F和R各10 μ M、eIF(iso)4E__T__Mut的F和R各10 μ M、Nia2基因(对照)的F和R各1 μ M。将这些引物混合物分别供于野生型(WT)eIF(iso)4E基因检测用的PCR和变异型(Mut)eIF(iso)4E基因检测用的PCR。PCR条件如下所述。将调节为5ng/ μ L的DNA溶液1 μ L、WT或Mut检测用引物混合物1 μ L、灭菌水3 μ L、Multiplex PCR 2 \times Master Mix(QIAGEN公司)5 μ L进行混合,在10 μ L的体系中进行了PCR。PCR进行1次95 $^{\circ}$ C 15分钟,进行40次94 $^{\circ}$ C 30秒钟、59 $^{\circ}$ C 1分30秒及72 $^{\circ}$ C 1分钟的循环,进行1次72 $^{\circ}$ C 10分钟。用QIAxcel(Qiagen公司)对PCR产物进行电泳,进行检测。

[0293] 将结果的一部分示于图4。首先确认了作为对照使用的Nia2基因的扩增(图4的上部的441bp条带)。对于野生型的WT检测用引物混合物而言,在S型和T型两者中检测WT,对于变异型的Mut检测用引物混合物而言,在S型和T型两者中检测Mut。因此,变异的类型根据WT和Mut两者的结果来判断。例如,在eIF(iso)4E__S__WT引物中未观察到扩增产物,在eIF(iso)4E__T__WT中检测出扩增产物,而且在eIF(iso)4E__S__Mut中检测出扩增产物,在eIF(iso)4E__T__Mut中未检测出的情况下,判断为仅S型为变异型的基因型ssTT。另外例如,在2个WT引物中均未检测到PCR产物,在2个Mut引物中均检测出PCR产物的情况下,判断为S型和T型两者为变异型的基因型sstt。需要说明的是,可以认为图4右端的泳道(Mut检测用、SSTT)中观察到的伪带(feint band)是人工制品。

[0294] 由此,从F2系中通过使用了DNA标记物的多态性分析得到了eIF(iso)4E__ST双纯合突变体(S/T两型变异型纯合个体,基因型为sstt)及对照的eIF(iso)4E__野生型个体(S/T两型野生型个体,基因型为SSTT)。对筛选的个体的PCR产物的DNA序列进行解读,确认变异,确认了DNA标记物筛选的结果是正确的。

[0295] (eIF(iso)4E__S型突变体和eIF(iso)4E__T型突变体的增殖)

[0296] 培育上述eIF(iso)4E__S型突变体(S型eIF(iso)4E基因中具有纯合型变异。基因型为ssTT)或eIF(iso)4E__T型突变体(T型eIF(iso)4E基因中具有纯合型变异。基因型为SStt),得到自身繁殖后代,由此进行种子的增殖。对于得到的后代种子,培育一部分,如上所述提取DNA,实施使用了DNA标记物的多态性分析,确认了分别以纯合方式具有S型或T型的变异。

[0297] 需要说明的是,确认了变异的这些种子以eIF(iso)4E__S型突变体为NtS1、eIF(iso)4E__T型突变体为NtT1的方式保藏于独立行政法人制品评价技术基础机构专利生物保藏中心(独立行政法人製品評価技術基盤機構特許生物寄託センター;International Patent Organisms Depositary of the National Institute of Technology and Evaluation)(日本千叶县木更津市かずさ鎌足2-5-8-1 120号室;日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8-1 120号室;2-5-8-1,120,Kazusakamatari,Kisarazu-shi,Chiba, Japan)。保藏编号分别为FERM BP-22284(保藏日:2015年2月25日)和FERM BP-22285(保藏日:2015年2月25日)。

[0298] (识别突变体的基因型的dCAPS标记物的开发)

[0299] 作为用于检测eIF (iso) 4E基因的多态性的检测可靠性更高的DNA标记物,开发了dCAPS标记物。在限制酶的识别序列存在多态性的情况下,可以通过检测限制酶处理后的片段长度的差异来判断多态性,将其称为CAPS标记物、PCR-RFLP标记物。在eIF (iso) 4E基因中产生的本次变异(在S型中序列号7的第330号的C变异为T,在T型中序列号8的第299号的G变异为A)的情况下,SNP附近的序列不包含限制酶的识别序列。因此,在设计PCR中使用的引物时,在SNP(单核苷酸多态性)附近人为地导入限制酶位点。对于本次利用的变异而言,在变异型基因中,为了成为限制位点(在S型中Nla III:CATG,在T型中Mbo I:GATC),需要两个碱基的变异,另一方面,在野生型基因中,为了成为限制位点,一个碱基的变异即可。因此,在本实施例中,通过导入一个碱基变异,制备了在野生型中被限制酶切断而在变异型中不被切断的dCAPS标记物。另外,在该情况下,片段长度的差异以引物长度之差的方式进行检测。制备的引物如表6所示。

[0300] 例如,在序列号46的情况下,3'末端侧的CaT的下一个碱基在野生型模板DNA中为G,成为Nla III部位(CATG),但在变异型模板DNA中为A,不形成限制位点。另外,在序列号48的情况下,3'末端侧的Gat的下一个碱基在野生型模板DNA中为C,成为Mbo I部位(GATC),但在变异型模板DNA中为T,不形成限制位点。

[0301] 在引物的3'末端附近导入了错配的情况下,使用具有校对活性的DNA聚合酶进行PCR时,引物的错配被改正,有可能无法用限制酶切断。实际上,使用具有校对的Tks Gflex™ DNA聚合酶(TAKARA BIO公司制)以基因组DNA为模板进行PCR,在进行了限制酶处理的产物中未检测到多态性。另一方面,在使用不具有校对活性的TaKaRa Taq™(TAKARA BIO公司)以基因组DNA为模板进行PCR的情况下,无法获得充分的扩增。因此,进行nested PCR,通过使用了Tks Gflex™ DNA聚合酶(具有校对功能)的1st PCR对包含SNP区域的附近区域进行特异性扩增,然后通过使用了TaKaRa Taq™(不具有校对功能)的2nd PCR制备了限制酶的识别部位。

[0302] 【表6】

[0303] 用于烟草突变体筛选的dCAPS标记物的引物

[0304]

靶位点	引物	序列 (5' - 3')	序列号
eIF(iso)4E_S_1 st PCR	正向(F)	GGCCTAAACGTT GTAAGACAA	序列号 25
	反向(R)	TGCTTAGTTAAAT GCTACAGGG	序列号 26
eIF(iso)4E_S_2 nd PCR	正向(F)	AAATCGACACAA AGGGAGGAG	序列号 45
	反向(R)	AACTTCCCCAAGC GGCTCCaT*	序列号 46
eIF(iso)4E_T_1 st PCR	正向(F)	GACCTGAACATT GCAAGATGA	序列号 31
	反向(R)	GGCTTACTTGAAT GCTACAAGG	序列号 32
eIF(iso)4E_T_2 nd PCR	正向(F)	GCCTCAATCGAC ACAAAAGGGAGA G	序列号 47
	反向(R)	AGCGCCTTGCTTC GGCTTATCGAt*	序列号 48

[0305] 对2nd PCR的引物设计了错配,使得对于eIF(iso)4E__S而言,仅在包含野生型SNP时被限制酶Nla III切断,另外,对于eIF(iso)4E__T而言,仅在包含野生型SNP时被限制酶Mbo I切断。

[0306] 首先,使用Tks Gflex™ DNA聚合酶进行了1st PCR。以约5ng基因组DNA作为模板,制备为引物浓度1μM,使用添加了酶的缓冲液。PCR进行1次94℃1分钟,30次98℃10秒钟、60℃15秒钟及68℃30秒钟的循环,1次68℃90秒钟。然后,将1st PCR产物稀释至100倍,以1μL作为模板用TaKaRa Taq™进行了2nd PCR。与1st PCR一样地制备为引物浓度1μM,使用添加了酶的缓冲液。PCR进行1次94℃2分钟,40次94℃30秒钟、52℃30秒钟及72℃30秒钟的循环,1次72℃90秒钟。用Nla III(New England Biolabs公司)对eIF(iso)4E__S的2nd PCR产物进行了处理。用Mbo I(TAKARA BIO公司)对eIF(iso)4E__T的2nd PCR产物进行了处理。

[0307] 将结果示于图5。在对用eIF(iso)4E__S引物扩增后的产物进行了限制酶处理的情况下,可以将未观察到切断的样品的基因型判断为ss,在对用eIF(iso)4E__T引物扩增后的产物进行了限制酶处理的情况下,可以将未观察到切断的样品的基因型判断为tt。可以容易地进行如下判断:例如,用eIF(iso)4E__S引物未发生切断且用eIF(iso)4E__T引物发生了切断的样品的基因型为ssTT,用eIF(iso)4E__S引物发生切断且用eIF(iso)4E__T引物未发生切断的样品的基因型为SStt,两种引物均发生了切断的样品的基因型为SSTT,两种引物均未发生切断的样品的基因型为sstt,出现两种引物均发生了切断的情况和未发生切断的情况的样品的基因型为SsTt。因此,本dCAPS标记物也与上述ASP标记物一样地显示出能够充分用于烟草eIF(iso)4E基因中发生了变异的个体的基因型的识别的性质。

[0308] (eIF(iso)4E烟草突变体的表达分析)

[0309] 对各种eIF(iso)4E烟草突变体进行了eIF(iso)4E基因的转录分析。与上述同样地从通过DNA标记物筛选的eIF(iso)4E__S型突变体(ssTT)、eIF(iso)4E__T型突变体(SStt)、eIF(iso)4E__ST双纯合突变体(sstt)及eIF(iso)4E__野生型系统(SSTT)中提取RNA,合成cDNA,进行了定量PCR。引物/探针组在S型eIF(iso)4E基因用的情况下使用了表2所示的序

列号19、20及21。另外,在T型eIF (iso) 4E基因用的情况下,新设计表6所示的序列号49、50及51供于实验。

[0310] 【表7】

[0311] 表7:用于T型eIF (iso) 4E基因的定量PCR的引物组和探针

靶基因	引物/探针	序列(5' - 3')	序列号
eIF(iso)4E-T	正向	GCCGGATACGGTGGAGAAG	序列号49
	反向	CCAAACAGCGCCTTGCTT	序列号50
	探针	ATGGACATTCTGGTTCGAT	序列号51

[0313] 将测定结果示于图6。在图6中,以将基因型为SSTT的品系的转录物的量的平均值设为1时的相对表达量表示eIF (iso) 4E基因的表达量。横轴表示各突变体的基因型,用括号内的数字表示分析个体数。纵轴表示具有各基因型的品系中的转录物量的相对平均值,直线表示标准差。在基因型为SS_{stt}的品系中S型eIF (iso) 4E基因的转录物的量为对照的73%,而完全未检测到T型eIF (iso) 4E基因的转录物。另一方面,在ssTT中,T型eIF (iso) 4E基因的转录物的量为对照的73%,而S型eIF (iso) 4E基因的转录物的蓄积减少至对照的8.0%。另外,在sstt中,完全未检测到T型eIF (iso) 4E基因的转录物,S型eIF (iso) 4E基因的转录物的量也减少至对照的8.3%。以上的结果表明,在SS_{stt}中T型eIF (iso) 4E基因的表达特异性地受到抑制,在ssTT中S型eIF (iso) 4E基因的表达特异性地受到抑制,另外,在sstt中S型和T型eIF (iso) 4E两个基因的表达均受到抑制。

[0314] 需要说明的是,作为通过无义变异而使转录受到抑制的原因,可以考虑无义介导的mRNA衰变(NMD)(文献:Baker and Parker 2004、Current Opinion in Cell Biology 16:293-299)。

[0315] (对eIF (iso) 4E烟草突变体的病毒接种试验)

[0316] 向移植于培养土壤后2周的个体接种PVY-B(马铃薯病毒Y的VAM breaking系统)或TBTv(烟草丛顶病毒)。病毒接种源的制备及对烟草的接种方法用与实施例1相同的方法实施。接种后,在温室内进行栽培,在合适的时间时观察适当病状。将eIF (iso) 4E功能缺失突变体烟草的病毒接种试验结果示于表8和表9。

[0317] 在PVY-B接种后第10天和之前的病状评价中,在eIF (iso) 4E__ST双纯合突变体系统(ST两型变异型纯合系统,基因型为sstt)中没有观察到发病的个体。另一方面,在PVY-B接种后第8天的病状评价中,eIF (iso) 4E__野生型系统(ST两型野生型纯合系统,基因型为SSTT)和栽培品种TN90在全部个体中确认到了发病。由此表明,S型和T型两者eIF (iso) 4E功能缺失突变体烟草具有对PVY-B的抗性。另外,对于仅使T型eIF (iso) 4E功能缺失的系统(eIF (iso) 4E__T型突变体系统,对于T型eIF (iso) 4E基因纯合型变异。基因型为SS_{stt})而言,在PVY-B接种后第10天和之前的病状评价中,与eIF (iso) 4E__野生型系统、栽培品种TN90及仅使S型eIF (iso) 4E功能缺失的系统(eIF (iso) 4E__S型突变体系,对于S型eIF (iso) 4E基因具有纯合型的变异。基因型为ssTT)相比,大幅抑制了发病。由此可以推测,PVY-B主要在其繁殖、细胞间转移等病状表现中利用T型eIF (iso) 4E,可以认为发病抑制能够通过抑制T型

eIF (iso) 4E的表达来进行。

[0318] 在对TBTV接种后第12天和之前的病状评价中,eIF (iso) 4E__ST双纯合突变体系(ssst)中没有观察到发病的个体。另一方面,在TBTV接种后第10天的病状评价中,eIF (iso) 4E__野生型系(SSTT)和栽培品种TN90在半数以上的个体中确认到了发病。由此表明,S型和T型eIF (iso) 4E功能缺失突变体烟草具有对TBTV的抗性。另外,仅使S型eIF (iso) 4E功能缺失的品系(eIF (iso) 4E__S型突变体系,ssTT)与eIF (iso) 4E__野生型系(SSTT)、栽培品种TN90及仅使T型eIF (iso) 4E功能缺失的系统(eIF (iso) 4E__T型突变体系统,SSst)相比,大幅抑制了发病。由此可以推测,TBTV主要在其繁殖、细胞间转移等病状表现中利用S型eIF (iso) 4E,可以认为发病抑制能够通过抑制S型eIF (iso) 4E的表达来进行。

[0319] 需要说明的是,完全未观察到对eIF (iso) 4E功能抑制烟草的生长抑制。

[0320] 以上结果表明,为了赋予PVY-B抗性,只要抑制烟草的翻译起始因子eIF (iso) 4E的功能即可,另外表明,可以仅抑制T型eIF (iso) 4E。另外,为了赋予TBTV抗性,只要抑制烟草的翻译起始因子eIF (iso) 4E的功能即可,另外表明,可以仅抑制S型eIF (iso) 4E。

[0321] 【表8】

[0322] 表8:eIF (iso) 4E功能缺乏烟草突变体上的PVY-B接种测试的结果

[0323]	品系(基因型)	接种后 7 天的患有疾病的个体的数目/测试下的个体的数目	接种后 8 天的患有疾病的个体的数目/测试下的个体的数目	接种后 10 天的患有疾病的个体的数目/测试下的个体的数目
	eIF(iso)4E_ST 双重纯合突变体系(ssst)	0/9 (0.0%)	0/9 (0.0%)	0/9 (0.0%)
	eIF(iso)4E_T 型突变体系(SSst)	0/10 (0.0%)	1/10 (10.0%)	3/10 (30.0%)
	eIF(iso)4E_S 型突变体系(ssTT)	10/10 (100.0%)	10/10 (100.0%)	10/10 (100.0%)
	eIF(iso)4E_野生型系(SSTT)	8/8 (100.0%)	8/8 (100.0%)	8/8 (100.0%)
	TN90 (对照; 栽培种)	5/9 (55.6%)	9/9 (100.0%)	9/9 (100.0%)

[0324] 【表9】

[0325] 表9:表8:eIF (iso) 4E功能缺乏烟草突变体上的TBTV接种测试的结果

[0326]	品系(基因型)	接种后 7 天的患有疾病的个体的数目/测试下的个体的数目	接种后 10 天的患有疾病的个体的数目/测试下的个体的数目	接种后 12 天的患有疾病的个体的数目/测试下的个体的数目
	eIF(iso)4E_ST 双重纯合突变体系(ssst)	0/10 (0.0%)	0/10 (0.0%)	0/10 (0.0%)
	eIF(iso)4E_T 型突变体系(SStt)	3/10 (30.0%)	5/10 (50.0%)	7/10 (70.0%)
	eIF(iso)4E_S 型突变体系(ssTT)	0/10 (0.0%)	1/10 (10.0%)	2/10 (20.0%)
	eIF(iso)4E_野生型系(SSTT)	5/10 (50.0%)	6/10 (60.0%)	6/10 (60.0%)
	TN90 (对照; 栽培种)	4/9 (44.4%)	6/9 (66.7%)	6/9 (66.7%)

[0327] 工业实用性

[0328] 本发明可以用于烟草的育种。

[0329] 保藏编号

[0330] FERM BP-22284

[0331] FERM BP-22285

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 日本烟草产业株式会社 (JAPAN TOBACCO INC.)
- [0003] <120> 病毒抗性烟草及其制备方法
- [0004] <130> NTF15-0027
- [0005] <140> PCT/JP2015/068713
- [0006] <141> 2015-06-29
- [0007] <150> JP 2014-133378
- [0008] <151> 2014-06-27
- [0009] <150> JP 2014-194424
- [0010] <151> 2014-09-24
- [0011] <160> 51
- [0012] <170> PatentIn version 3.5
- [0013] <210> 1
- [0014] <211> 867
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> 烟草
- [0017] <400> 1
- [0018] tccattacgc ctctccgttc gctaaaaatc gacacaaagg gaggagagga ttttttgagg 60
- [0019] caaaaaatcaa tggccactga agcaccgata gaggcgacgg aggttccgcc ggcgtcagcg 120
- [0020] acggagacgg tggcgaagca gccacataag ctagagagga gatggacatt ctggttcgat 180
- [0021] aatcaatcta agccgaaaca aggagccgct tggggaagtt ctcttcgaaa agcttatact 240
- [0022] ttcgaaactg ttgaggaatt ctggagtta tatgatcaga tattcaagcc cagcaagttg 300
- [0023] actgctaatacg cgactttca tttgttcaaa gctgggattg agcccaaatg ggaagatcct 360
- [0024] gagtgtgcta gtggtggcaa gtggactgtt acgagcagca gaaaggctaa tcttgagact 420
- [0025] atgtggcttg aaactctgat ggcattggtc ggtgagcagt ttgatgagtc agaggagata 480
- [0026] tgtggagtgg ttgccagtgt acgtcggagt caggataaac tttccttatg gactaagact 540
- [0027] gcctccaatg aagcaattca gatgagcatt ggtaggaagt ggaaggagat cattgatgct 600
- [0028] gaaaaaatat cctatagttt ccatgatgac tctaaaagg aaaggtcagc taagagtcga 660
- [0029] tatactgtgt gaattccttt attgtgtggg attgacactg gtccttagat tttccaatac 720
- [0030] tgaaaattgt acgattagca cagttttgcg cttgtctgct gcaaaatttt gatatttctt 780
- [0031] ttaaatttat tcgcacttga tatggatctt tggatgtatt gtgttaaaga ttttgtttgg 840
- [0032] ttctgtgtta aaaaaaaaa aaaaaaa 867
- [0033] <210> 2
- [0034] <211> 805
- [0035] <212> DNA
- [0036] <213> 烟草
- [0037] <400> 2
- [0038] gacacaaaag ggagaggatt ttttgaggca aaatcaatgg ccactgaagc accgatagag 60
- [0039] gcgacggagg ttctgccggc gccgatacg gtggagaagc agccgcataa gctagagagg 120
- [0040] agatggacat tctggttcga taagccgaag caaggcgtg tttgggcaag tgctcttcga 180
- [0041] aaagcctata ctttcgaaac tgttgaggaa ttctggagtt tatatgatca gatattcaag 240

[0042] cccagcaagt tgactgctaa tgcggacttt catttgttca aagctgggat tgagcccaaa 300
 [0043] tgggaagatc ctgagtgtgc caatggtggc aagtggactg tcacgagcag cagaaaggct 360
 [0044] aatcttgaga ctatgtggtc tgaactctg atggcattgg tgggtgagca atttgatgaa 420
 [0045] tcagaagaga tatgtggagt ggttgccagt gttcgtcgga gtcaggataa actttccttg 480
 [0046] tggactagga ctgcctccaa tgaagcagct cagatgagca ttggtaggaa gtggaaggag 540
 [0047] atcatcgatg ctgaaaaaat atcctatagt ttccatgatg actctaaaaa ggaaagggtca 600
 [0048] gttaagagtc gatatactgt gtgaattccc ttattgtgtg ggattgacac cggtccttaa 660
 [0049] gtttactgaa aattgtacga ttagcattag tttgcgcttg tctgctgcaa attttgattt 720
 [0050] tcttgaaatt tattcgtact tgatatgtat ctttgatgt attgtgttaa agattttgtt 780
 [0051] tgcttctttg ttacttgaaa aaaaa 805
 [0052] <210> 3
 [0053] <211> 200
 [0054] <212> PRT
 [0055] <213> 烟草
 [0056] <400> 3
 [0057] Met Ala Thr Glu Ala Pro Ile Glu Ala Thr Glu Val Pro Pro Ala Ser
 [0058] 1 5 10 15
 [0059] Ala Thr Glu Thr Val Ala Lys Gln Pro His Lys Leu Glu Arg Arg Trp
 [0060] 20 25 30
 [0061] Thr Phe Trp Phe Asp Asn Gln Ser Lys Pro Lys Gln Gly Ala Ala Trp
 [0062] 35 40 45
 [0063] Gly Ser Ser Leu Arg Lys Ala Tyr Thr Phe Glu Thr Val Glu Glu Phe
 [0064] 50 55 60
 [0065] Trp Ser Leu Tyr Asp Gln Ile Phe Lys Pro Ser Lys Leu Thr Ala Asn
 [0066] 65 70 75 80
 [0067] Ala Asp Phe His Leu Phe Lys Ala Gly Ile Glu Pro Lys Trp Glu Asp
 [0068] 85 90 95
 [0069] Pro Glu Cys Ala Ser Gly Gly Lys Trp Thr Val Thr Ser Ser Arg Lys
 [0070] 100 105 110
 [0071] Ala Asn Leu Glu Thr Met Trp Leu Glu Thr Leu Met Ala Leu Val Gly
 [0072] 115 120 125
 [0073] Glu Gln Phe Asp Glu Ser Glu Glu Ile Cys Gly Val Val Ala Ser Val
 [0074] 130 135 140
 [0075] Arg Arg Ser Gln Asp Lys Leu Ser Leu Trp Thr Lys Thr Ala Ser Asn
 [0076] 145 150 155 160
 [0077] Glu Ala Ile Gln Met Ser Ile Gly Arg Lys Trp Lys Glu Ile Ile Asp
 [0078] 165 170 175
 [0079] Ala Glu Lys Ile Ser Tyr Ser Phe His Asp Asp Ser Lys Arg Glu Arg
 [0080] 180 185 190
 [0081] Ser Ala Lys Ser Arg Tyr Thr Val
 [0082] 195 200
 [0083] <210> 4

[0084]	<211> 195
[0085]	<212> PRT
[0086]	<213> 烟草
[0087]	<400> 4
[0088]	Met Ala Thr Glu Ala Pro Ile Glu Ala Thr Glu Val Leu Pro Ala Pro
[0089]	1 5 10 15
[0090]	Asp Thr Val Glu Lys Gln Pro His Lys Leu Glu Arg Arg Trp Thr Phe
[0091]	20 25 30
[0092]	Trp Phe Asp Lys Pro Lys Gln Gly Ala Val Trp Ala Ser Ala Leu Arg
[0093]	35 40 45
[0094]	Lys Ala Tyr Thr Phe Glu Thr Val Glu Glu Phe Trp Ser Leu Tyr Asp
[0095]	50 55 60
[0096]	Gln Ile Phe Lys Pro Ser Lys Leu Thr Ala Asn Ala Asp Phe His Leu
[0097]	65 70 75 80
[0098]	Phe Lys Ala Gly Ile Glu Pro Lys Trp Glu Asp Pro Glu Cys Ala Asn
[0099]	85 90 95
[0100]	Gly Gly Lys Trp Thr Val Thr Ser Ser Arg Lys Ala Asn Leu Glu Thr
[0101]	100 105 110
[0102]	Met Trp Leu Glu Thr Leu Met Ala Leu Val Gly Glu Gln Phe Asp Glu
[0103]	115 120 125
[0104]	Ser Glu Glu Ile Cys Gly Val Val Ala Ser Val Arg Arg Ser Gln Asp
[0105]	130 135 140
[0106]	Lys Leu Ser Leu Trp Thr Arg Thr Ala Ser Asn Glu Ala Ala Gln Met
[0107]	145 150 155 160
[0108]	Ser Ile Gly Arg Lys Trp Lys Glu Ile Ile Asp Ala Glu Lys Ile Ser
[0109]	165 170 175
[0110]	Tyr Ser Phe His Asp Asp Ser Lys Lys Glu Arg Ser Val Lys Ser Arg
[0111]	180 185 190
[0112]	Tyr Thr Val
[0113]	195
[0114]	<210> 5
[0115]	<211> 867
[0116]	<212> RNA
[0117]	<213> 烟草
[0118]	<400> 5
[0119]	uccauuacgc cucuccguuc gcuaaaaauc gacacaaagg gaggagagga uuuuuugagg 60
[0120]	caaaaaucaa ugccacuga agcaccgaua gaggcgacgg agguuccgcc ggcgucagcg 120
[0121]	acggagacgg uggcgaagca gccacauaag cuagagagga gauggacauu cugguucgau 180
[0122]	aaucaaucua agccgaaaca aggagccgcu uggggaaguu cucuucgaaa agcuuauacu 240
[0123]	uucgaaacug uugaggaauu cuggaguuuu uaugaucaga uauucaagcc cagcaaguug 300
[0124]	acugcuaaug cggacuuuca uuuguuacaa gcugggauug agcccaaaug ggaagaucuu 360
[0125]	gagugugcua gugguggcaa guggacuguu acgagcagca gaaaggcuua ucuugagacu 420

[0126]	auguggcuug aaacucugau ggcauugguc ggugagcagu uugaugaguc agaggagaua	480
[0127]	uguggagugg uugccagugu acgucggagu caggauaaac uuuccuuaug gacuaagacu	540
[0128]	gccuccaauug aagcaauuca gaugagcauu gguaggaagu ggaaggagau cauugaugcu	600
[0129]	gaaaaauau ccuauaguuu ccaugaugac ucuaaaaggg aaaggucagc uaagagucga	660
[0130]	uauacugugu gaauuccuuu auuguguggg auugacacug gucccuagau uuuccaauac	720
[0131]	ugaaaauugu acgauuagca caguuuugcg cuugucugcu gcaaaaauuu gauuuucuuu	780
[0132]	uuaaaauuau ucgcacuuga uauggaucuu uggauguauu guguuaaaaga uuuuguuugg	840
[0133]	uucuguguua aaaaaaaaaa aaaaaaa	867
[0134]	<210>	6
[0135]	<211>	805
[0136]	<212>	RNA
[0137]	<213>	烟草
[0138]	<400>	6
[0139]	gacacaaaag ggagaggauu uuuugaggca aaaucaauug ccacugaagc accgauagag	60
[0140]	gcgacggagg uucugccggc gccggauacg guggagaagc agccgcuaaa gcuagagagg	120
[0141]	agauggacau ucugguucga uaagccgaag caaggcgugc uuugggcaag ugcucuucga	180
[0142]	aaagccuaua cuuucgaaac uguugaggaa uucuggaguu uauaugauca gauauucaag	240
[0143]	cccagcaagu ugacugcuua ugcggacuuu cauuguuua aagcugggau ugagcccaaa	300
[0144]	ugggaagauc cugagugugc caaugguggc aaguggacug ucacgagcag cagaaaggcu	360
[0145]	aaucuuagaga cuauuggcu ugaaacucug auggcauugg ugguugagca auuugaugaa	420
[0146]	ucagaagaga uauuggagu gguugccagu guucgucgga gucaggauaa acuuuccuug	480
[0147]	uggacuagga cugccuccaa ugaagcagcu cagaugagca uugguaggaa guggaaggag	540
[0148]	aucaucgaug cugaaaaau auccuauagu uuccaugaug acucuaaaaa ggaaaggua	600
[0149]	guuaagaguc gauauacugu gugaauuccc uuauugugug ggauugacac cggucccuua	660
[0150]	guuuacugaa aauguuacga uuagcauuag uuugcgcuug ucugcugcaa auuuugauuu	720
[0151]	ucuuagaaau uauucguacu ugauauguau cuuuggaugu auuguguuaa agauuuuguu	780
[0152]	ugcuucuuug uuacuugaaa aaaaa	805
[0153]	<210>	7
[0154]	<211>	5140
[0155]	<212>	DNA
[0156]	<213>	烟草
[0157]	<220>	
[0158]	<221>	misc_feature
[0159]	<222>	(4151) .. (4151)
[0160]	<223>	n是a, c, g, 或t
[0161]	<400>	7
[0162]	caccgcgggt tggaataccg gccagtcta tcaatatggg cctaaacgtt gtaagacaag	60
[0163]	tcccactaat atcaatcaac tgggtacca taaataattc cagctccata ccctgattct	120
[0164]	cttccaacaa ttccattacg cctctccgtt cgctaaaaat cgacacaaag ggaggagagg	180
[0165]	attttttgag gcaaaaatca atggccactg aagcaccgat agaggcgacg gaggttccgc	240
[0166]	cggcgtcagc gacggagacg gtggcgaagc agccacataa gctagagagg agatggacat	300
[0167]	tctggttcga taatcaatct aagccgaaac aaggagccgc ttggggaagt tctcttcgaa	360

[0168]	aagcttatac	tttcgaaact	gttgaggaat	tctggaggta	tacaaaaaat	acaaaacacg	420
[0169]	agatctcttt	tagattcttc	tggttatatt	ttttttgccc	taatttagat	tttttaatga	480
[0170]	aattttatca	attgttttat	gaattgggta	atagcacttt	tgattcataa	gttattgaga	540
[0171]	aattctgatt	ttgttccctg	tagcatttaa	ctaagcatat	ttaacctttt	attcattaaa	600
[0172]	atgtgtgttt	tttgggtcca	ttacatagga	aaatatgttt	acatttagat	tagtttttaga	660
[0173]	actatattac	ccttaaatat	gaagtagtag	tacaaattta	acataacata	tggttactta	720
[0174]	aatgatttaa	aagttaatag	ttcgttaaag	tggttagatt	cacaaataga	aggatgaaaa	780
[0175]	gtgcacattt	taattaattc	aagtttaagt	atgcataaac	agatagcaca	aggactataa	840
[0176]	ctagaatatt	tcaacattta	agggtcaaaa	agaacactct	tccgtcctta	attaattaag	900
[0177]	atgctttcat	gttgcaatgt	tatgttgatg	taagagtata	tgaatatgtt	accttcacaa	960
[0178]	agagagagca	catgtcttgg	acctactttg	tgctggaaac	atattaaaaa	ttatactttc	1020
[0179]	tactacctgc	tcgtcatat	gaaactctgt	tttgggagtt	cgaaaaaata	ttcaccatta	1080
[0180]	cgtaattat	ggagtattat	ttatggaaaa	gttccattaa	gaatattgtc	ctatgcatct	1140
[0181]	tttgcaattt	tcaagaatct	aagtgcacct	aaggggtgg	gctagtggtc	aatgaagtac	1200
[0182]	gagaagaacc	ttgagatctc	aggttcaagt	tccagcggag	gcgaaaaata	gtaggtgatt	1260
[0183]	tcttccaatt	tgcttaagcc	ttggtaggca	gaatacccga	taccaggtag	caggtacacg	1320
[0184]	gcagaagccg	gacatcacgt	cataaaaaaa	tcaagaattt	gaattattta	acaatccaaa	1380
[0185]	gcttgtgata	tgttctctgt	acacctaaagt	tttttaggtat	caatttagta	ttttctttaa	1440
[0186]	ccaccactaa	tataattact	atacagtcaa	gcatttgtct	ataaaaccaa	acagtgccat	1500
[0187]	ttttatctta	aatttcataa	ttttccatgt	aatgaattta	ctgctgcaat	ttatccatag	1560
[0188]	tttggatgtt	gtgtggcttt	attttaattc	attaatgaga	tattactggt	tagaaagtgt	1620
[0189]	aatagttcca	ctatgtggga	ttatactggg	tttgttgtg	taaagtataa	tagttggata	1680
[0190]	gaagctgctt	ttaaatgtca	attgaagtgt	tagatctttc	tcttttcagt	ttatatgac	1740
[0191]	agatattcaa	gccagcaag	ttgactgcta	atgcggactt	tcatttgttc	aaagctggga	1800
[0192]	ttgagcccaa	atgggaagat	cctgagtggtg	ctagtgggtg	caagtggact	gttacgagca	1860
[0193]	gcagaaaggc	taatcttgag	actatgtggc	ttgaaactgt	aataaaatct	tctctttact	1920
[0194]	tttcttggtt	tctgttcagt	aggcaggatg	tcatgaaagc	attatgttga	ttagtttcta	1980
[0195]	gttaaagatg	ctcacatgtt	gtttgtctga	tggaattctt	ttgaatagct	gatggcattg	2040
[0196]	gtcggtgagc	agtttgatga	gtcagaggag	atatgtggag	tggttgccag	tgtacgtcgg	2100
[0197]	agtcaggata	aactttcctt	atggactaag	actgcctcca	atgaagcaat	tcaggttatt	2160
[0198]	ggaattctca	tgatgtagaa	tagttactga	actgaaaact	gtgttatgtt	ttaccctata	2220
[0199]	tcataaatct	gatatgaaat	attattttaaa	aaagaatata	ccagaatatg	atctttttct	2280
[0200]	taatgatgat	gatatggccc	atcttccctt	ctaaaaaagg	agctatctcc	aattcttttt	2340
[0201]	taaatgctga	aaaaggagag	cgtattttatt	tgagcactga	attttgagaa	caagggaagc	2400
[0202]	atgcccttcc	ccgttgtagc	ccatggatgg	aacactagat	ctagttatta	aatatcggtt	2460
[0203]	aaaaccatca	catgccttag	ctaactcagt	gctgaaacta	gtatttcttg	gtaggggaagt	2520
[0204]	ccttgatatt	tcctttaact	tgtctctaac	cggagttggc	agatatgatg	ttgtttttgt	2580
[0205]	aatggatga	cctctacat	gtatttggtt	tgaatttttt	cttttgataa	agtaaataat	2640
[0206]	tttcttagtg	atggggtagc	cccgatatca	agcctatacc	aaaaagtgga	gaacctacaa	2700
[0207]	caaaatatgg	ttgtcagtga	aagaaaccaa	tcattttatac	acataaagac	ctcatgggta	2760
[0208]	cacaaaaaag	ctagaaacga	gaggtcgttt	tgcaattttt	cgaaagcatt	atcaacctct	2820
[0209]	tcaaatactc	tcatgttcc	ctctttccat	agaaccacaa	taatggctga	tggggaaaca	2880

[0210]	tcccatgccc tcggtcttct cttcctcctg aaggcccaag tatgcaacgc ctcttttcatt	2940
[0211]	gtgcacgcat cacgcattat attcgaaacc aatttaggac caccgaccgc aactgtccag	3000
[0212]	ccacatgaca acgcaacaag agatggtttt acacctttgc ccgcacaact gtacaagatg	3060
[0213]	caacaactaa ccatttggtc ttattatggg ccttttggtg ccgttttgca ttaggccttc	3120
[0214]	gctaaaaaca ctttgaccct ggctcatatc cttgaaactg atctatggac atataggcat	3180
[0215]	ctgaatgtgc ttcatittca tcttctaaag tacccttggtg cttgaaatcg aaatttgctg	3240
[0216]	tgtggtgatg ttctatagat catagatggg aagaaattcc aaaagggtgt gaagtttgca	3300
[0217]	aagggttcc ctagaagtct gtactcatca gcttctcatc taaacacagg aatgtggtta	3360
[0218]	ttttgaaggg ttttacttgt cacgaagtgg atgcaggacc ccctcccccc caacacacac	3420
[0219]	acacaacaca cccaccacc caatatgtct ttgtctccaa tttaattact taatgattat	3480
[0220]	ggatttgga aaatggaaat atgctatctg gactttaagg ttgtactttg caatctttta	3540
[0221]	acctttccga cttgaaactg ataataaatt gataatgtta caacgacctt ttaacatttg	3600
[0222]	tttagaaaaa agggcaactc ggtgcatgat gcatcccgcg ttacacaag atccggtgaa	3660
[0223]	gagccgcaac actagtgcgt gtgatggaaa caactttact gttgctccaa gactccattt	3720
[0224]	caccttttta acattttagt tttttatatt aagtttgggg gtgggaagag ggatttcaa	3780
[0225]	tggagacgtg tacactagaa agaactaact gaaaaaggac aaaggacaga taacctata	3840
[0226]	ctgtacctgg gacataaacc atttctctta tctttgcctt catgatttag tgatttttct	3900
[0227]	cttttttctt ttccttgca agttttcaca ttgcctctta aaatgtttaa aaactcgta	3960
[0228]	gggtggtaaa gtgcaatagg cttttatac gaatgaaaag acaaagaaac agctaaactg	4020
[0229]	aaatagtatt tcttcaatct cacctaacag ttctattcat ttacagtgtta cctaattctg	4080
[0230]	gttggtcttg tttaatacac cttctcctgt gtgtaccact aatgcacttg ctaaggatga	4140
[0231]	tttaattccc nacacacaca cccaccacc cacacaaaag atgctggaaa atgtatcttt	4200
[0232]	ctccctctga atatgcagct tggagtitta gacacaagtt cttgtatttc attcgttaag	4260
[0233]	cactattcca tattatacta aaagcttata ttagacatgt tcatcttaca gtattgcaag	4320
[0234]	acacaagggt caatttaaat tccattacat tgctccacta ggtttctttt ttgttttatt	4380
[0235]	gttggtgtgac tgcatgtgtt ttctgtcttt taacacatgt aacatgtctg gatatcaaca	4440
[0236]	atcttcattc ctaacctttg ttttttgca tgatgctaca cttgatgcat tgttttcctg	4500
[0237]	cttttaacac atgtaacatg tctggatata aacaatcttc attcctaacc ttgtttttt	4560
[0238]	ggcatgatgc tacacttgat gcattgtttt cctgctttta acacatgtaa cacgtctgga	4620
[0239]	tatcaacaat cttcattcct aacctttgtt ttttgcatg atgctacact tgatgcattg	4680
[0240]	tggtttcgca attatatata accggttggg tttatgtctg agatgagcat tggtaggaag	4740
[0241]	tgggaaggaga tcattgatgc tgaaaaaata tcctatagtt tccatgtaac ttcccttgcc	4800
[0242]	gcttgccatt attgcaaagt caagtgtctt ttatctttcc tctgttaat ttcttttctt	4860
[0243]	ctcgtaatca accaatcttt tggctgttgc aggatgactc taaaaggga aggtcagcta	4920
[0244]	agatcgata tactgtgtga attcctttat tgtgtgggat tgacactggt ccctagattt	4980
[0245]	tccaatactg aaaattgtac gattagcaca gttttgcgct tgtctgctgc aaaattttga	5040
[0246]	ttttcttttt aaatttatc gcacttgata tggatctttg gatgtattgt gttaaagatt	5100
[0247]	ttgtttggtt ctgtgttact tatctggagc ctgccccatg	5140
[0248]	<210> 8	
[0249]	<211> 3620	
[0250]	<212> DNA	
[0251]	<213> 烟草	

[0252]	<400> 8	
[0253]	acaacaaata cccgaggtag gattaccggc ccagtctgtc atcatatatg gacctgaaca	60
[0254]	ttgcaagatg aggccaata atagcaatca actgggccag tataaataaa attccagctc	120
[0255]	cataacctga ttttcttccc aacaattcca ttacgcctca atcgacacaa aaggagagagg	180
[0256]	atTTTTtgag gcaaaaatca atggccactg aagcacccgat agaggcgacg gaggttctgc	240
[0257]	cggcgccgga tacggtggag aagcagccgc ataagctaga gaggagatgg acattctggt	300
[0258]	tcgataagcc gaagcaagge gctgtttggg caagtgtctt tcgaaaagcc tatactttcg	360
[0259]	aaactgttga ggaattctgg aggtatacaa aaaatacaaa acacgagatc acttctagat	420
[0260]	tcttctggtt atatttattt gccctaattt agatctttaa tgaaattttg tcaattgttt	480
[0261]	tattaattgg gataatagca cttttgatca tcagttattg ataaattcgg attttgttcc	540
[0262]	ttgtagcatt caagtaagcc tatttaacct tgaattcatt aaaatgtgtg tttttggtcc	600
[0263]	ctttacatag gaaatatgtt acatttagat tagttttaga actatattac cctaaaataa	660
[0264]	gaagtgtctag taaaaattta acataacata ggggtactta aatgatattg aaagttaaca	720
[0265]	attcattaaa gttgtgtaga ttcacaaata gaaggatcaa aagtgcacat ttttaattaat	780
[0266]	tcaaggttaa gtatgcataa gcagatagca caaggactat aactagaata tgtcaatgtt	840
[0267]	taagggacaa aaagcacaat cttccattct taattagtta agatgctttc atgctgcaag	900
[0268]	gttctatgtt gatgtaagag tatatgaata tgttacctc acaaaaagag aacatatatc	960
[0269]	ttggaccttc tttgtgctgg aaaacatatt gaaaattata ctttctactt cctgcttata	1020
[0270]	tgactctctg ttttgggact tcaggaattt ttcaccatta cactaattat tgagtattat	1080
[0271]	tatggaaaag tttctttaag aatattgttc tatgcatctt ttgcaatttt caagaatcta	1140
[0272]	actgcaacca atgggtgtag ctagtggtga atgaagtggg agaagaacct tgaggctctg	1200
[0273]	ggttcaaatt acagcggcag tgaaaagaat actagttccc atttgcaggt acccgcgga	1260
[0274]	agctggatac cgcatcattht aaaaaaac aagaatttga attatttaac aatccaaagc	1320
[0275]	ttgtgatatg ttctctataa aactaacttt ttagatatca atttagtgtt ttcttcaacc	1380
[0276]	tccactaata taattactgt ccagtcaagc agtgtgctat aaaaccaaac cgtgcatttt	1440
[0277]	tatcttaaat ttcataattt cccagtaat ggattctacc gctgcaattt atccatactt	1500
[0278]	gggatgttgt gtggctttat ttttaattcat tgacgagata ttattattta gaaagtgtaa	1560
[0279]	tagttggata gaagctgctt ttaaattgcca attgaagtgt tagatctttc tctttgcagt	1620
[0280]	ttatatgac agatattcaa gccagcaag ttgactgcta atgcggactt tcatthgttc	1680
[0281]	aaagctggga ttgagcccaa atgggaagat cctgagtgtg ccaatggtgg caagtggact	1740
[0282]	gtcacgagca gcagaaagge taatcttgag actatgtggc ttgaaactgt aataaagtct	1800
[0283]	tccctttgct tctgttggtt tctgttcagt aggcaggatg tcatgaaagc attatgttga	1860
[0284]	ttattttctt gctaaagatg ctacatatatt gtttgcctga tggatttctt ttgggcagct	1920
[0285]	gatggcattg gtgggtgagc aatttgatga atcagaagag atatgtggag tggttgccag	1980
[0286]	tgttcgtcgg agtcaggata aactttcctt gtggactagg actgcctcca atgaagcagc	2040
[0287]	tcaggttagt ttggaattct cgtggtgtca aatagtatct gaaattctga actaaaaact	2100
[0288]	gtgttatttt ttccctata tcctaaatct gatatgaaat attattaaaa aaagatatata	2160
[0289]	ccagaatatt atctttttct taatgatgat ctgtcccatc tccaattttt ttgtaaacgc	2220
[0290]	tgaaaaagga gagcagcttt atttgagcac cgaattttga gaacaagaaa agaattgcct	2280
[0291]	tccccattgt gacctatgga tggagcacta gatctgttat tcaatatata atttaaatat	2340
[0292]	caattaaaaac catcacatac cctagctaata cagtggctga aattattatt tttcttggca	2400
[0293]	gggaatcctt gatatttctt ttcacttatt ctctaaccat aattggcagc tatgacgttt	2460

[0294]	ttatttattg taatgggtata gcttttctct ggcatttgtt cagttttctt gataaagtaa	2520
[0295]	ataattttat tagtgatggg gagaccccgat atacaagcct ataccaaaaa gtggagaacc	2580
[0296]	tacaacagaa tacggttctc catgaaagaa atacacatag gtacctcatg ggtacatcaa	2640
[0297]	aaagaaacta gacaagagat tgttttgcaa ttttactaaa tcattatcaa ccccttcaaa	2700
[0298]	tgctctcatg ttctttctt tccatataac ccacataatg gctgatgggg cgacatcaca	2760
[0299]	tgccctcaat cttctgttcc tctcctgaa ggcccaacta tgcaacacct ccttcattgt	2820
[0300]	gcccgcata cccattgtat tccaaaaaaa aagatgctgg aaaatgtatc ttttccctc	2880
[0301]	tgaacatgca gcttgaggt tgacataagt ttttgattt cattctgtaa gcactgttcc	2940
[0302]	agattatact aaaagcttat attagacatg ttcatcttac agtattgcaa tacacaaggt	3000
[0303]	ttcaatttaa attcgattac atttctccac taggttcct ttttgttta ttgttgtctg	3060
[0304]	actgcgtata tttctgctt ttgacctgt aacctgtctg gatatacaaca atcttcaactc	3120
[0305]	ttacttttg tttcttgga tggtgtaca ctgatgctc catggttttg caatgatata	3180
[0306]	tgactgggtg gttttatgct gcagatgagc attggttaga agtggaagga gatcatcgat	3240
[0307]	gctgaaaaa taccctatag tttccatgta acttctgttg ccccttacca ttattgcaa	3300
[0308]	atcaagtgtc ttttatctt cctcctgtta attttttct tcttaataca acctttctt	3360
[0309]	tggtgtgtgc aggatgactc taaaaaggaa aggtcagta agagtcgata tactgtgtga	3420
[0310]	attcccttat tgtgtgggat tgacaccggt ccctaagtt actgaaaatt gtacgattag	3480
[0311]	cattagtttg cgctgtctg ctgcaattt tgattttctt gaaatttatt cgtacttgat	3540
[0312]	atgtatctt ggatgtattg tgtaaagat tttgttgct tctttgttac ttgtctaaag	3600
[0313]	tgtgcctcat gtcttaattt	3620
[0314]	<210>	9
[0315]	<211>	313
[0316]	<212>	DNA
[0317]	<213>	人工序列
[0318]	<220>	
[0319]	<223>	RNAi 触发器
[0320]	<400>	9
[0321]	agaggcgacg gaggttccgc cggcgtcagc gacggagacg gtggcgaagc agccacataa	60
[0322]	gctagagagg agatggacat tctggttcga taatcaatct aagccgaaac aaggagccgc	120
[0323]	ttggggaagt tctcttcgaa aagcttatac tttcgaaact gttgaggaat tctggagttt	180
[0324]	atatgatcag atattcaagc ccagcaagtt gactgctaata gcggacttgc atttgttcaa	240
[0325]	agctgggatt gagcccaaat gggaagatcc tgagtgtgct agtggtggca agtgactgt	300
[0326]	tacgagcagc aga	313
[0327]	<210>	10
[0328]	<211>	954
[0329]	<212>	DNA
[0330]	<213>	烟草
[0331]	<400>	10
[0332]	ggcacgagga aacattgaac ttttctacg aatacaaatt cggaatttct gtgagaagtt	60
[0333]	acacatttgc agttgaaacc catcacaaa agtccaaaat cacaatttc cagacgaaag	120
[0334]	ctatagtgtt gagaacacca aaatggttga tgaagtagag aaaccggtgt cgtagagga	180
[0335]	atcgaagact aatactcgtg aggtggaaga ggaaggagag atcgtggggg aatcagacga	240

[0336] tacgatgtcg tctttaggga acccaagcat ggcaatgaaa cgcgcgctag aacattcatg 300
 [0337] gacatttttg ttcgataacc catcaggga atcaaaacag gctgcttggg gtagttccat 360
 [0338] tcgaccaatt tacaccttct ccactgtcga agatttttgg agtgtgtaca acaatatcca 420
 [0339] ccaccaagc aaattggctg tgggggcaga ctttactgt tttaagaata aaattgagcc 480
 [0340] aaagtgggag gatcctgtct gcgccaacgg aggaaagg acaatgagct tttcgagggg 540
 [0341] taaatctgat acctgtggc tgtatacgct gctggctatg attggagaac aatttgactg 600
 [0342] cggagatgaa atttgtggag ctgttattaa gtctcgagtt agacaagaaa aaatagcttt 660
 [0343] gtggaccagg aatgctgcca atgaaacagc tcaggtgagc attggtaaac agtgaagga 720
 [0344] atttctggat tacaatgact cggttggtt tatatttcat gatgatgcaa agaagctaga 780
 [0345] cagagctgcc aagaatcggt attctgtgta gttctatcgt tacaatagga attgtgaacg 840
 [0346] acacagttac tgagaagcag tcacctgtgg ctgcctgttt tgaccgctta catttggtatt 900
 [0347] cacagttttc ataaggaaat ttgtttggtt ttgaaaaaa aaaaaaaaa aaaa 954
 [0348] <210> 11
 [0349] <211> 329
 [0350] <212> DNA
 [0351] <213> 人工序列
 [0352] <220>
 [0353] <223> RNAi 触发器
 [0354] <400> 11
 [0355] cgaagactaa tactcgtgag gtggaagagg aaggagagat cgtgggggaa tcagacgata 60
 [0356] cgatgtcgtc tttagggaac ccaagcatgg caatgaaaca cgcgctagaa cattcatgga 120
 [0357] cattttggtt cgataaccca tcagggaat caaaacaggc tgcttgggtt agttccattc 180
 [0358] gaccaattta caccttctcc actgtcgaag atttttggag tgtgtacaac aatatccacc 240
 [0359] acccaagcaa attggctgtg ggggcagact ttactgttt taagaataaa attgagccaa 300
 [0360] agtgggagga tcctgtctgc gccaacgga 329
 [0361] <210> 12
 [0362] <211> 24
 [0363] <212> DNA
 [0364] <213> 人工序列
 [0365] <220>
 [0366] <223> 引物
 [0367] <400> 12
 [0368] caccgaagac taatactcgt gagg 24
 [0369] <210> 13
 [0370] <211> 18
 [0371] <212> DNA
 [0372] <213> 人工序列
 [0373] <220>
 [0374] <223> 引物
 [0375] <400> 13
 [0376] tccgttggcg cagacagg 18
 [0377] <210> 14

[0378]	<211> 22
[0379]	<212> DNA
[0380]	<213> 人工序列
[0381]	<220>
[0382]	<223> 引物
[0383]	<400> 14
[0384]	caccagaggc gacggaggtt cc 22
[0385]	<210> 15
[0386]	<211> 20
[0387]	<212> DNA
[0388]	<213> 人工序列
[0389]	<220>
[0390]	<223> 引物
[0391]	<400> 15
[0392]	tctgctgctc gtaacagtcc 20
[0393]	<210> 16
[0394]	<211> 28
[0395]	<212> DNA
[0396]	<213> 人工序列
[0397]	<220>
[0398]	<223> 引物
[0399]	<400> 16
[0400]	cgagttagac aagaaaaaat agctttgt 28
[0401]	<210> 17
[0402]	<211> 24
[0403]	<212> DNA
[0404]	<213> 人工序列
[0405]	<220>
[0406]	<223> 引物
[0407]	<400> 17
[0408]	atccagaaat tccttcayt gttt 24
[0409]	<210> 18
[0410]	<211> 26
[0411]	<212> DNA
[0412]	<213> 人工序列
[0413]	<220>
[0414]	<223> 引物
[0415]	<400> 18
[0416]	accaggaatg ctgccaatga aacagc 26
[0417]	<210> 19
[0418]	<211> 21
[0419]	<212> DNA

[0420] <213> 人工序列
[0421] <220>
[0422] <223> 引物
[0423] <400> 19
[0424] gccactgaag caccgataga g 21
[0425] <210> 20
[0426] <211> 24
[0427] <212> DNA
[0428] <213> 人工序列
[0429] <220>
[0430] <223> 引物
[0431] <400> 20
[0432] ttatcgaacc agaattgtcca tctc 24
[0433] <210> 21
[0434] <211> 18
[0435] <212> DNA
[0436] <213> 人工序列
[0437] <220>
[0438] <223> 探针
[0439] <400> 21
[0440] tccgccggcg tcagcgac 18
[0441] <210> 22
[0442] <211> 20
[0443] <212> DNA
[0444] <213> 人工序列
[0445] <220>
[0446] <223> 引物
[0447] <400> 22
[0448] ctaagggtgc tgccagcttt 20
[0449] <210> 23
[0450] <211> 22
[0451] <212> DNA
[0452] <213> 人工序列
[0453] <220>
[0454] <223> 引物
[0455] <400> 23
[0456] gtcaagcact ggagcatatc ca 22
[0457] <210> 24
[0458] <211> 26
[0459] <212> DNA
[0460] <213> 人工序列
[0461] <220>

[0462]	<223> 探针
[0463]	<400> 24
[0464]	atcatgaacc atccaggaca gattgg 26
[0465]	<210> 25
[0466]	<211> 21
[0467]	<212> DNA
[0468]	<213> 人工序列
[0469]	<220>
[0470]	<223> 引物
[0471]	<400> 25
[0472]	ggcctaaacg ttgtaagaca a 21
[0473]	<210> 26
[0474]	<211> 22
[0475]	<212> DNA
[0476]	<213> 人工序列
[0477]	<220>
[0478]	<223> 引物
[0479]	<400> 26
[0480]	tgcttagtta aatgctacag gg 22
[0481]	<210> 27
[0482]	<211> 20
[0483]	<212> DNA
[0484]	<213> 人工序列
[0485]	<220>
[0486]	<223> 引物
[0487]	<400> 27
[0488]	ttacgcctct ccgttcgcta 20
[0489]	<210> 28
[0490]	<211> 22
[0491]	<212> DNA
[0492]	<213> 人工序列
[0493]	<220>
[0494]	<223> 引物
[0495]	<400> 28
[0496]	ctgggtttgt tgttgtaaag ta 22
[0497]	<210> 29
[0498]	<211> 21
[0499]	<212> DNA
[0500]	<213> 人工序列
[0501]	<220>
[0502]	<223> 引物
[0503]	<400> 29

[0504] cacagttttc agttcagtaa c 21
[0505] <210> 30
[0506] <211> 21
[0507] <212> DNA
[0508] <213> 人工序列
[0509] <220>
[0510] <223> 引物
[0511] <400> 30
[0512] gatgggccat atcatcatca t 21
[0513] <210> 31
[0514] <211> 21
[0515] <212> DNA
[0516] <213> 人工序列
[0517] <220>
[0518] <223> 引物
[0519] <400> 31
[0520] gacctgaaca ttgcaagatg a 21
[0521] <210> 32
[0522] <211> 22
[0523] <212> DNA
[0524] <213> 人工序列
[0525] <220>
[0526] <223> 引物
[0527] <400> 32
[0528] ggcttacttg aatgctacaa gg 22
[0529] <210> 33
[0530] <211> 20
[0531] <212> DNA
[0532] <213> 人工序列
[0533] <220>
[0534] <223> 引物
[0535] <400> 33
[0536] ttacgcctca atcgacacaa 20
[0537] <210> 34
[0538] <211> 20
[0539] <212> DNA
[0540] <213> 人工序列
[0541] <220>
[0542] <223> 引物
[0543] <400> 34
[0544] cccagtaat ggattctacc 20
[0545] <210> 35

[0546] <211> 21
[0547] <212> DNA
[0548] <213> 人工序列
[0549] <220>
[0550] <223> 引物
[0551] <400> 35
[0552] atcagattta ggatatagg g 21
[0553] <210> 36
[0554] <211> 20
[0555] <212> DNA
[0556] <213> 人工序列
[0557] <220>
[0558] <223> 引物
[0559] <400> 36
[0560] cagatactat ttgacaccac 20
[0561] <210> 37
[0562] <211> 20
[0563] <212> DNA
[0564] <213> 人工序列
[0565] <220>
[0566] <223> 引物
[0567] <400> 37
[0568] ccataccctg attctcttcc 20
[0569] <210> 38
[0570] <211> 23
[0571] <212> DNA
[0572] <213> 人工序列
[0573] <220>
[0574] <223> 引物
[0575] <400> 38
[0576] aacttcccca agcggtcat agt 23
[0577] <210> 39
[0578] <211> 23
[0579] <212> DNA
[0580] <213> 人工序列
[0581] <220>
[0582] <223> 引物
[0583] <400> 39
[0584] aacttcccca agcggtcat aat 23
[0585] <210> 40
[0586] <211> 25
[0587] <212> DNA

[0588] <213> 人工序列
[0589] <220>
[0590] <223> 引物
[0591] <400> 40
[0592] gcctcaatcg acacaaaagg gagag 25
[0593] <210> 41
[0594] <211> 20
[0595] <212> DNA
[0596] <213> 人工序列
[0597] <220>
[0598] <223> 引物
[0599] <400> 41
[0600] ttgcttcggc ttatcgatcc 20
[0601] <210> 42
[0602] <211> 20
[0603] <212> DNA
[0604] <213> 人工序列
[0605] <220>
[0606] <223> 引物
[0607] <400> 42
[0608] ttgcttcggc ttatcgattc 20
[0609] <210> 43
[0610] <211> 22
[0611] <212> DNA
[0612] <213> 人工序列
[0613] <220>
[0614] <223> 引物
[0615] <400> 43
[0616] ccgagtaaag atgaatgtgt gc 22
[0617] <210> 44
[0618] <211> 20
[0619] <212> DNA
[0620] <213> 人工序列
[0621] <220>
[0622] <223> 引物
[0623] <400> 44
[0624] ttgccaggag agtcagaggt 20
[0625] <210> 45
[0626] <211> 21
[0627] <212> DNA
[0628] <213> 人工序列
[0629] <220>

[0630] <223> 引物
[0631] <400> 45
[0632] aaatcgacac aaagggagga g 21
[0633] <210> 46
[0634] <211> 21
[0635] <212> DNA
[0636] <213> 人工序列
[0637] <220>
[0638] <223> 引物
[0639] <400> 46
[0640] aacttcccca agcggtcca t 21
[0641] <210> 47
[0642] <211> 25
[0643] <212> DNA
[0644] <213> 人工序列
[0645] <220>
[0646] <223> 引物
[0647] <400> 47
[0648] gcctcaatcg acacaaaagg gagag 25
[0649] <210> 48
[0650] <211> 24
[0651] <212> DNA
[0652] <213> 人工序列
[0653] <220>
[0654] <223> 引物
[0655] <400> 48
[0656] agcgccttgc ttcggcttat cgat 24
[0657] <210> 49
[0658] <211> 19
[0659] <212> DNA
[0660] <213> 人工序列
[0661] <220>
[0662] <223> 引物
[0663] <400> 49
[0664] gccggatacg gtggagaag 19
[0665] <210> 50
[0666] <211> 18
[0667] <212> DNA
[0668] <213> 人工序列
[0669] <220>
[0670] <223> 引物
[0671] <400> 50

[0672] ccaaacagcg ccttgctt 18
[0673] <210> 51
[0674] <211> 19
[0675] <212> DNA
[0676] <213> 人工序列
[0677] <220>
[0678] <223> 探针
[0679] <400> 51
[0680] atggacattc tggttcgat 19

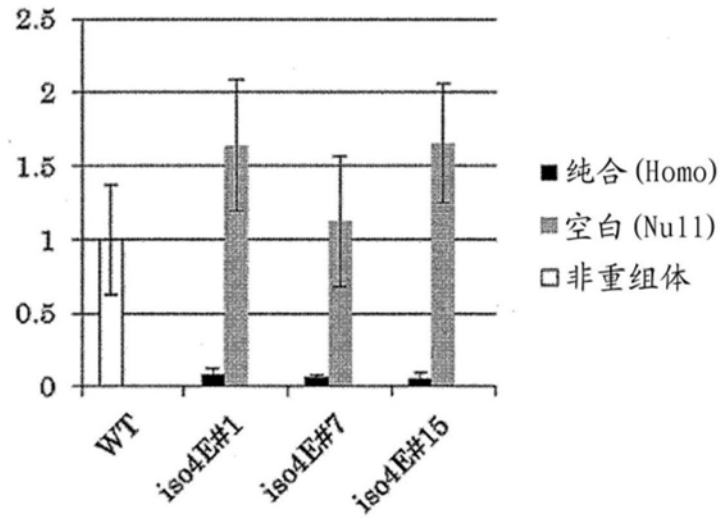


图1

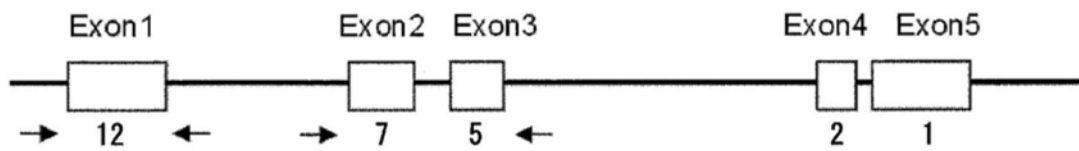


图2

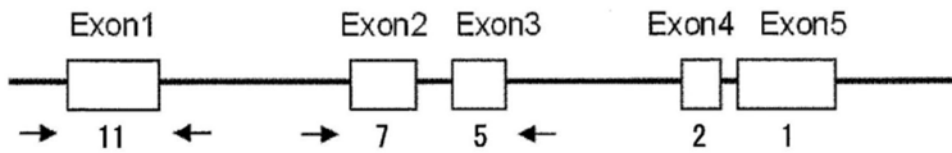


图3

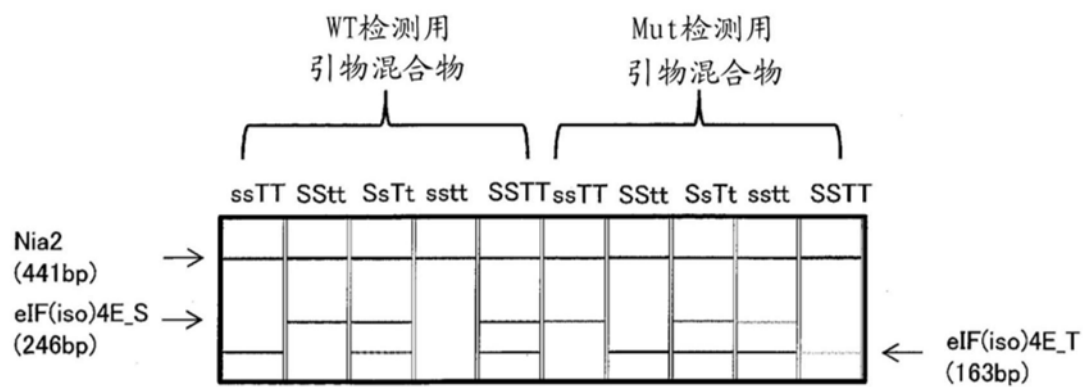


图4

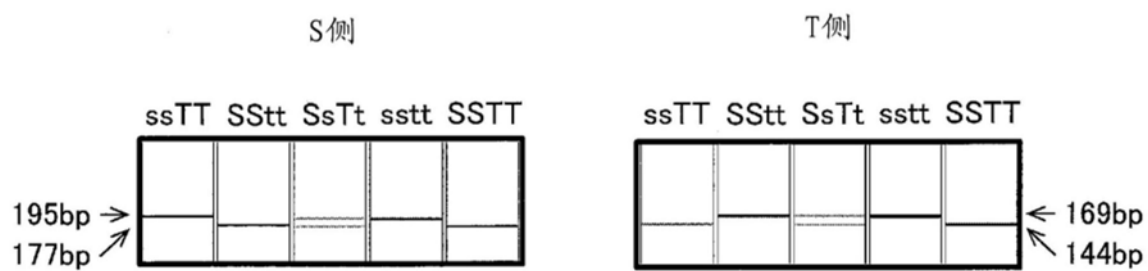


图5

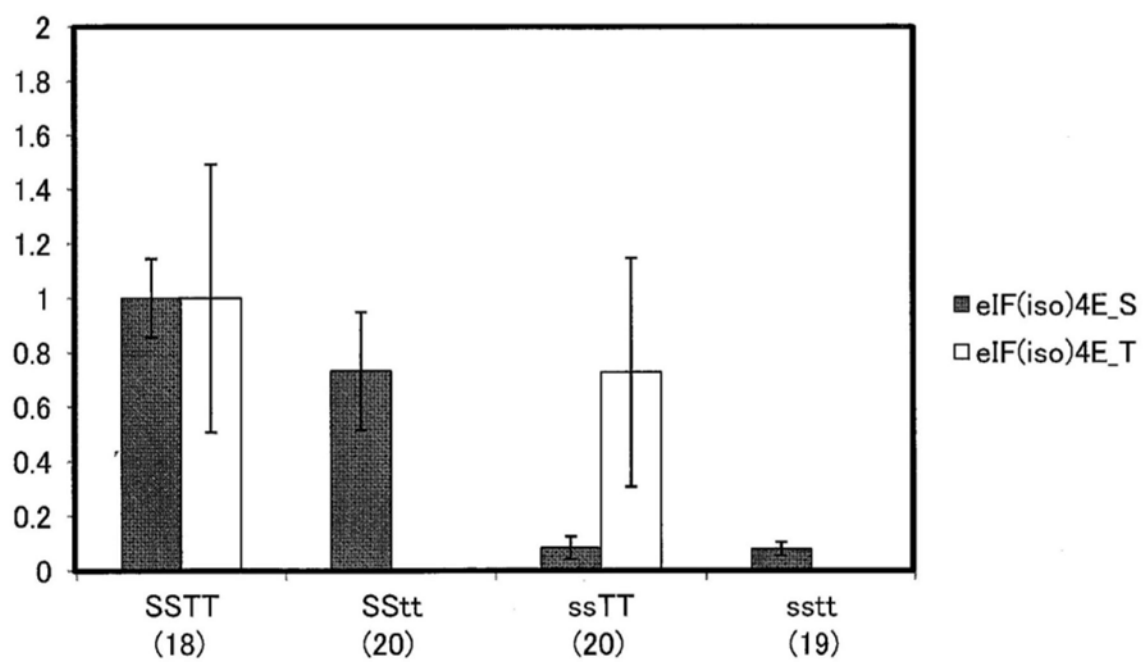


图6