



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113271768 B

(45) 授权公告日 2024. 02. 06

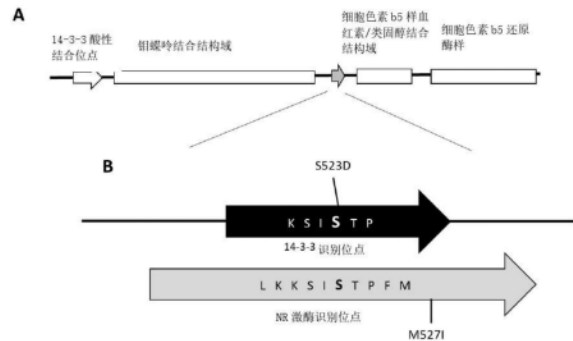
(21) 申请号 201980078526.2
 (22) 申请日 2019.12.16
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 113271768 A
 (43) 申请公布日 2021.08.17
 (30) 优先权数据
 18215913.7 2018.12.30 EP
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2021.05.28
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/EP2019/085321 2019.12.16
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02020/141062 EN 2020.07.09
 (73) 专利权人 菲利普莫里斯生产公司
 地址 瑞士纳沙泰尔
 (72) 发明人 L·博维特 P·坎帕尼
 S·格普费特
 (74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
 有限公司 11038
 专利代理师 张小勇

(51) Int.Cl.
 A01H 5/12 (2018.01)
 A01H 6/82 (2018.01)
 C12N 9/06 (2006.01)
 A24B 15/00 (2006.01)
 (56) 对比文件
 CN 107074919 A, 2017.08.18
 CN 105247053 A, 2016.01.13
 US 2017130239 A1, 2017.05.11
 植物生理学.
 Shane C. HARDIN et al..Coupling
 oxidative signals to protein
 phosphorylation via methionine.《Biochem.
 J.》.2009,
 陈秋会等.降低烟叶中硝酸盐和亚硝酸盐含
 量的途径.《西南农业学报》.2008,(第02期),
 李彦华等.不同小白菜品种硝酸盐含量、氮
 代谢关键酶活性及NRT1表达和亚细胞定位.《食
 品科学》.2017,(第07期),
 审查员 刘涛

权利要求书1页 说明书36页
 序列表14页 附图3页

(54) 发明名称
 经由硝酸盐还原酶的突变来调节植物中的
 硝酸盐水平

(57) 摘要
 一种植物细胞,其包含:(a) 编码硝酸盐还原
 酶多肽的多核苷酸序列,该硝酸盐还原酶多肽包
 括SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7的连续多肽序列,
 其中甲硫氨酸被与对照植物细胞相比降低植物
 细胞中的硝酸盐还原酶活性的氨基酸取代;(b)
 由(a)中陈述的多核苷酸序列编码的多肽序列;
 或(c)包含(b)中陈述的多核苷酸序列的构建体、
 载体或表达载体。



1. 一种用于产生烟草植物的方法,所述烟草植物在干制的叶中包含与对照植物相比降低的硝酸盐水平,所述方法包括以下步骤:

(a) 提供烟草植物细胞,所述植物细胞包含:

(i) SEQ ID NO:4示出的编码硝酸盐还原酶多肽的多核苷酸序列;

(ii) 由(i)中陈述的所述多核苷酸序列编码的并且如SEQ ID NO:3示出的多肽序列;或者

(iii) 包含(i)中陈述的所述多核苷酸序列的构建体、载体或表达载体;以及

(b) 将所述烟草植物细胞繁殖成烟草植物。

2. 一种用于生产干制的烟草植物材料的方法,所述干制的植物材料与对照烟草植物材料相比具有降低量的硝酸盐,所述方法包括以下步骤:

(a) 提供包含一种烟草植物细胞的烟草植物或其部分,其中所述烟草植物细胞包含:

(i) 如SEQ ID NO:4示出的编码硝酸盐还原酶多肽的多核苷酸序列;

(ii) 由(i)中陈述的所述多核苷酸序列编码的并且如SEQ ID NO:3示出的多肽序列;或者

(iii) 包含(i)中陈述的所述多核苷酸序列的构建体、载体或表达载体;

(b) 从所述烟草植物或其部分收获烟草植物材料;以及

(c) 干制所述烟草植物材料。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述烟草植物材料包括干制的叶。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述干制方法选自由晾干、火烤干制、烟熏干制和烟道干制组成的组。

5. 干制的烟草植物叶材料,其通过根据权利要求3所述的方法生产。

6. 根据权利要求5所述的干制的烟草植物叶材料,其中所述烟草植物是普通烟草(*Nicotiana tabacum*)植物。

7. 根据权利要求5所述的干制的烟草植物叶材料,其中所述烟草植物为来自普通烟草AA37栽培品种的植物。

8. 根据权利要求5所述的干制的烟草植物叶材料,其中所述干制的烟草植物叶材料是均质化的植物材料。

9. 根据权利要求5所述的干制的烟草植物叶材料,其中所述干制的烟草植物叶材料是晾干的或晒干的或烟道干制的植物材料。

10. 一种烟草产品,包含根据权利要求5至9中任一项所述的干制的烟草植物叶材料。

经由硝酸盐还原酶的突变来调节植物中的硝酸盐水平

技术领域

[0001] 本发明涉及具有降低的硝酸盐水平的植物、来源于所述植物的植物细胞、从所述植物产生的产物,以及通过使硝酸盐还原酶突变来调节植物中的硝酸盐水平的方法。

背景技术

[0002] 某些植物(诸如烟草植物)在其叶中积聚高水平的游离硝酸盐,这是不期望的,因为高水平的硝酸盐一直以来与致癌化合物(称为烟草特有的亚硝胺(TSNA))的形成相关联。TSNA是主要在烟草叶烘烤期间产生的一类化合物,但在随后的叶子加工和储存期间以及可能在燃烧期间通过高温合成另外形成。在干制的叶中发现的两种TSNA,分别为N-亚硝基去甲烟碱(NNN)和4-(甲基亚硝氨基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮(NNK),被国际癌症研究机构归类为I类致癌物(最高等级)。由于大量证据暗示这些化合物与各种烟草相关癌症有关,所以世界卫生组织已推荐实施强制执行以确保未来的烟草产品具有水平降低的这些毒物。TSNA表示烟草生物碱的亚硝化产物。在空气烘烤的烟草中,存在亚硝酸盐是直接造成TSNA形成的试剂的普遍共识。然而由于其细胞毒性,内源性亚硝酸盐在植物组织中的水平通常非常低。相反,据信TSNA形成中所涉及的绝大多数亚硝酸盐来源于6至10周干制过程期间驻留在叶表面上的微生物的硝酸盐还原酶活性,其中烘烤过程随着细胞膜和细胞器在该阶段期间变得降解,将叶硝酸盐池的一部分转化为亚硝酸盐。

[0003] TSNA主要在叶子烘烤加工期间形成并且涉及烟草生物碱的亚硝化。用于降低干制的叶中的TSNA含量和水平的遗传策略已聚焦于靶向:(1)生物碱前体;或(2)所涉及的亚硝化剂。改变烟草遗传学水平的减少TSNA的大部分工作使生物碱前体靶向TSNA。此类策略通过下调负责合成NNN的生物碱前体去甲烟碱的基因家族而提供NNN的显著减少。

[0004] 本申请人在W02016/046288中描述了具有降低的硝酸盐水平的经修饰烟草植物。如其中所述,硝酸盐还原酶的表达或活性被去调节。去调节的硝酸盐还原酶在对应于编码硝酸盐还原酶的多肽的位置523的位置处具有氨基酸取代。该突变称为S523D。突变型硝酸盐还原酶的过表达使硝酸盐同化显著增加,导致低硝酸盐/TSNA含量和更高的氨基酸水平。与对照相比,植物显示硝酸盐减少90%。

[0005] 可能期望开发非遗传修饰的生物体(非GMO)方法来减少硝酸盐积聚。由于在包括欧洲在内的国家地区中,遗传修饰的作物的生长和商业化存在困难,所以,可能有利的是使用以单核苷酸多态性为特征的突变体,而不是通过使用遗传工程技术所获得的突变体。

[0006] 因此,本领域仍然持续需要降低植物中的硝酸盐水平,尤其是经由非转基因方法。

发明内容

[0007] 本发明至少部分地基于以下发现:经由非转基因方法使普通烟草(*Nicotiana tabacum*)硝酸盐还原酶(NIA2)突变可以产生其干制的叶含有与来源于对照植物的干制的叶相比经调节(例如,降低)水平的硝酸盐的植物或植物材料。本文所述的一种此类突变位于普通烟草硝酸盐还原酶的铰链1结构域内的硝酸盐还原酶激酶识别位点中。

[0008] Hardin等人,(2009) *Biochem. J.* 422:305-312提出,拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) NIA2蛋白质中的位置538处的甲硫氨酸的氧化是抑制NIA2蛋白质磷酸化的机制。氧化防止14-3-3与硝酸盐还原酶结合,并且防止硝酸盐还原酶在暴露于反应性氧物质 (ROS) (诸如过氧化氢、羟基自由基) 时失活。由于硝酸盐还原酶将硝酸盐转化为亚硝酸盐,从而导致产生氨和氨基酸,预期硝酸盐还原酶的较高活化会降低硝酸盐水平,如W02016/046288中所证实的。因此,预期拟南芥的NIA2蛋白质中的M538氧化为甲硫氨酸亚砷导致硝酸盐水平降低。普通烟草NIA2蛋白质中的M527对应于拟南芥NIA2中的M538。本文所述的突变型普通烟草植物的特性是出乎意料的。普通烟草NIA2突变体M527I (如本领域所熟知的, M527I意味着位置527处的甲硫氨酸 (M) 被异亮氨酸 (I) 取代) 包括用不能被氧化的异亮氨酸来取代位置537处的甲硫氨酸。已知甲硫氨酸在硫残基上被氧化为甲硫氨酸亚砷,而异亮氨酸在其结构中不具有任何硫残基。基于这种差异,预期普通烟草NIA2突变体M527I在暴露于ROS时不能刺激硝酸盐还原酶活化,因此,消除了降低植物中的硝酸盐水平的机制。然而,已令人惊奇地发现,尽管发生了甲硫氨酸取代,但是本公开的突变型植物仍表现出硝酸盐水平的降低。

[0009] 根据本公开的生产植物提供了许多其他优点。例如,本文所述的植物可以是非遗传修饰的植物,其克服了遗传修饰的作物的生长和商业化的困难。通过另外的示例,可以实现硝酸盐水平的降低而不影响植物总收获生物量,以及叶中的烟碱、总生物碱、氨或还原糖含量。这可以提高植物、植物材料或植物产品的商业接受度。

[0010] 在一个方面,公开了一种植物细胞,其包含:(a) 编码硝酸盐还原酶多肽的多核苷酸序列,该硝酸盐还原酶多肽包括SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7的连续多肽序列,其中甲硫氨酸被与对照植物细胞相比降低植物细胞中的硝酸盐还原酶活性的氨基酸取代;(b) 由(a) 中陈述的多核苷酸序列编码的多肽序列;或(c) 包含(b) 中陈述的多核苷酸序列的构建体、载体或表达载体。

[0011] 适宜地,甲硫氨酸被不同的氨基酸取代,更适宜地,取代的氨基酸为异亮氨酸,更适宜地,其中该多肽包括SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的连续多肽序列

[0012] 适宜地,硝酸盐还原酶多肽包含在对应于与SEQ ID NO:1具有至少80%序列同一性的序列的位置527的位置处的氨基酸取代。

[0013] 适宜地,硝酸盐还原酶多肽包含以SEQ ID NO:3示出的多肽序列、由该多肽序列组成或基本上由该多肽序列组成。

[0014] 适宜地,该多核苷酸序列包括与SEQ ID NO:4具有至少80%序列同一性的多核苷酸序列、由该多核苷酸序列组成或基本上由该多核苷酸序列组成。

[0015] 适宜地,该多核苷酸序列包括以SEQ ID NO:4示出的多核苷酸序列、由该多核苷酸序列组成或基本上由该多核苷酸序列组成。

[0016] 适宜地,植物细胞为普通烟草植物细胞。

[0017] 适宜地,植物细胞为来自普通烟草AA37栽培品种的植物细胞。

[0018] 在另一个方面,公开了包含根据任一项前述权利要求的植物细胞的植物或其部分;适宜地,其中与对照植物或其部分相比,所述植物或其部分的干制的叶含有较低水平的硝酸盐,适宜地,其中与对照植物或其部分相比,硝酸盐的水平降低了约37%或更多。

[0019] 在另一个方面,公开了来源于本文所述的植物或其部分的植物材料、干制的植物

材料或均质化的植物材料,适宜地,其中该干制的植物材料是晾干的或晒干的或烟道干制的植物材料;适宜地,其中该植物材料、干制的植物材料或均质化的植物材料包括来自所述植物或其部分的生物量、种子、茎、花或叶。

[0020] 在另一个方面,公开了一种烟草产品,其包含本文所述的植物细胞、本文所述的植物的一部分,或本文所述的植物材料。

[0021] 在另一个方面,公开了一种用于生产本文所述的植物的方法,包括以下步骤:(a) 提供本文所述的植物细胞;以及(b) 将该植物细胞繁殖成植物。

[0022] 在另一个方面,公开了一种用于生产干制的植物材料的方法,该干制的植物材料与对照植物材料相比具有改变量的硝酸盐,所述方法包括以下步骤:(a) 提供如本文所述的植物或其部分,或者如本文所述的植物材料;(b) 任选地从植物或其部分收获植物材料;以及(c) 干制该植物材料。

[0023] 适宜地,该植物材料包括干制的叶。

[0024] 合适地,所述干制方法选自自由晾干、火烤干制(fire curing)、烟熏干制(smoke curing)和烟道干制(flue curing)组成的组。

附图说明

附图说明

[0025] 图1展示了NtNIA2蛋白质序列的结构域和共有序列。(A) 普通烟草硝酸盐还原酶NIA2蛋白质(GenBank:X14059)的主要结构域。(B) NtNIA2的铰链1内的硝酸盐还原酶激酶识别位点(LKKSISTPFM)和14-3-3识别位点。指示了来自W02016/046288的S523D突变和本文所述的M527I突变的位置。

[0026] 图2是一系列条形图,展示了来自第二次收获的干制叶的化学概况和总的鲜叶生物量。(A) 总收获叶的鲜重(FW),以每株植物的克数表示;(B) 干制叶烟碱含量,以微克/克干制材料表示;(C) 总生物碱含量,以干制材料干重的百分比表示;(D) 氮含量,以干制材料干重的百分比表示;(E) 还原糖含量,以干制材料干重的百分比表示;和(F) 硝酸盐含量,以干制材料干重的百分比表示。AA37对照指示未经受EMS处理的品系(n=6个图);NIA2_M527I_WT指示AA37外分离野生型品系(n=15个图);NIA2_M527I_HOMO指示NtNIA2 M527I纯合品系(n=11个图)。误差条指示使用t student检验计算的95%置信区间。

具体实施方式

[0027] 定义

[0028] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与所属领域普通技术人员通常所理解相同的含义。在有矛盾的情况下,将以本文档(包括定义)为准。下文描述优选方法和材料,但与本文所述的那些类似或等效的方法和材料可用于实施或测试本发明。本文所披露的所述材料、方法和实例仅仅是说明性的并且不打算限制性的。

[0029] 如本文所用的术语“包含”、“包括”、“具有(having/has)”、“可以”、“含有”以及它们的变体打算是开放性过渡短语、术语或措辞,不排除额外动作或结构的可能性。

[0030] 除非上下文另外明确规定,否则单数形式的“一个”、“一种”和“该”包括多个指示物。

[0031] 术语“和/或”意指(a)或(b)或者(a)和(b)两者。

[0032] 本公开考虑了“包含”本文呈现的实施方案或要素、“由其组成”和“基本上由其组成”的其他实施方案,无论是否明确地阐述。

[0033] 为了叙述本文的数值范围,明确涵盖它们之间具有相同精确度的每一个插入数值。举例来说,对于范围6-9,除了6和9之外涵盖数值7和8,并且对于范围6.0-7.0,明确涵盖数值6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9以及7.0。

[0034] 如整个说明书和权利要求书中所使用,以下术语具有以下含义:

[0035] “编码序列”或“多核苷酸编码”是指包含编码多肽的多核苷酸的核苷酸(RNA或DNA分子)。编码序列还可包括可操作地连接到调节元件的起始和终止信号,所述调节元件包括能够指导在施用多核苷酸的个体或哺乳动物的细胞中表达的启动子和聚腺苷酸化信号。编码序列可以经密码子优化。

[0036] “互补”或“互补的”可以指核苷酸或核苷酸类似物之间的Watson-Crick(例如,A-T/U和C-G)或Hoogsteen碱基配对。“互补性”是指两个多核苷酸之间共有的性质,使得当它们彼此反平行排列时,每个位置处的核苷酸碱基将是互补的。

[0037] “构建体”是指包含一种或多种多核苷酸的双链重组多核苷酸片段。构建体包括与互补“有义链或编码链”碱基配对的“模板链”。给定构筑体可以在两个可能方向中插入载体内,所述两个可能方向是关于位于载体(例如表达载体)内的启动子方向来说相同(或有义)方向或相反(或反义)方向。

[0038] 在对照植物或对照植物细胞的上下文中,术语“对照”意味着其中一个或多个基因或多肽的表达、功能或活性尚未被修饰(例如,增加或减少)并且因此其可以与其中相同的一个或多个基因或多肽的表达、功能或活性已被修饰的植物进行比较的植物或植物细胞。如本文所用,“对照植物”是除了测试参数以外全部参数大体上等效于测试植物或经修饰植物的植物。例如,当提及已引入突变的植物时,对照植物是尚未引入突变的等同植物。对照植物可以是外分离对照植物。

[0039] “表达”是指功能产物的产生。例如,多核苷酸片段的表达可以指多核苷酸片段的转录(例如,产生mRNA或功能RNA的转录)和/或mRNA翻译成前体或成熟多肽。

[0040] “功能”和“全功能”描述具有生物学功能或活性的多肽。“功能基因”是指转录成mRNA的基因,其被翻译成功能或活性多肽。

[0041] “基因构建体”是指包含编码多肽的多核苷酸的DNA或RNA分子。编码序列可包括可操作地连接到调节元件的起始和终止信号,所述调节元件包括能够指导表达的启动子和聚腺苷酸化信号。

[0042] 术语“同源性”或“相似性”是指通过序列比对比较的两个多肽之间或两个多核苷酸分子之间的序列相似性程度。被比较的两个离散多核苷酸之间的同源性程度是在可比较位置处的相同或匹配核苷酸的数目的函数。

[0043] 在两个或更多个多核苷酸或多肽的上下文中,“相同”或“同一性”是指序列在特定区域上具有特定百分比的相同残基。百分比可以通过最佳比对两个序列,比较两个序列的指定区域,测定两个序列中存在相同残基的位置数产生匹配位置数,匹配位置数除以指定区域中的位置总数,并且结果乘以100产生序列一致性百分比来计算。在两个序列具有不同长度或比对产生一个或多个交错端并且指定比较区域仅包括单个序列的情况下,单个序列

的残基包括于计算的分母而非分子中。当比较DNA和RNA时,胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)视为相当。同一性可以人工鉴定或通过使用计算机序列算法诸如ClustalW、ClustalX、BLAST、FASTA或Smith-Waterman测定。流行的多重比对程序ClustalW(Nucleic Acids Research(1994)22,4673-4680;Nucleic Acids Research(1997),24,4876-4882)是用于产生多肽或多核苷酸的多重比对的合适方式。ClustalW的合适参数可能如下:对于多核苷酸比对:缺口开放罚分=15.0,缺口延伸罚分=6.66,并且矩阵=一致性。对于多肽比对:缺口开放罚分=10.0,缺口延伸罚分=0.2,并且矩阵=Gonnet。对于DNA和蛋白质比对:ENDGAP=-1,并且GAPDIST=4。本领域技术人员将会意识到,可能有必要改变这些和其他参数以达到最佳序列比对。然后,由这样的比对合适地以(N/T)计算一致性百分比,其中N是序列共享一致残基的位置数,T是比较的位置总数,包含缺口但不包括突出端。

[0044] 术语“分离的”或“纯化的”是指基本上或实质上不含在其天然状态下通常伴随其的组分材料。纯度和均质性通常使用例如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱等分析化学技术测定。作为制剂中存在的主要种类的多肽是基本上纯化的。特别地,分离的多核苷酸与位于所需基因侧面并编码除所需多肽之外的多肽的开放阅读框分离。如本文所用,术语“纯化的”表示多核苷酸或多肽在电泳凝胶中产生实质上一个带。特别地,它是指多核苷酸或多肽的纯度为至少85%,更优选为至少95%,并且最优选为至少99%。分离的多核苷酸可以从其天然存在的宿主细胞纯化。技术人员已知的常规多核苷酸纯化方法可用于获得分离的多核苷酸。术语还涵盖重组多核苷酸和化学合成的多核苷酸。

[0045] “调节”是指引起或促进所关注的过程、途径、功能或活性的定性或定量变化、改变或修饰。非限制性地,这样的变化、改变或修饰可以是所关注的相关过程、途径、功能或活性的增加或减少。例如,可以调节基因表达或多肽表达或多肽功能或活性。通常,将通过与对照比较来确定相关变化、改变或修饰。

[0046] 术语“非天然存在”描述的不是自然界形成的或自然界中不存在的实体,诸如多核苷酸、基因突变、多肽、植物、植物细胞和植物材料。可以通过本文中所描述或本领域已知的方法来制备、合成、起始、修饰、干预或操纵这类非天然存在的实体或人工实体。可以由人制备、合成、起始、修饰、干预或操纵这类非天然存在的实体或人工实体。举例来说,非天然存在的实体可以是已通过已知诱导诱变的方法进行突变的实体,这些方法包括定点诱变、寡核苷酸定向诱变、化学诱导的诱变、辐射诱导的诱变、利用经修饰的碱基的诱变、利用缺口双链体DNA的诱变、双链断裂诱变、利用修复缺陷型宿主株的诱变、通过全基因合成的诱变、DNA改组和其他等效方法。例如,可以使用化学诱变,其涉及使用外源添加的化学物质(诸如诱变、致畸或致癌有机化合物)来诱导突变。然后可以选择和鉴定具有有利特性的突变体。

[0047] “寡核苷酸”或“多核苷酸”是指共价连接在一起的至少两个核苷酸。单链的描述还定义互补链的序列。因此,多核苷酸也涵盖所描绘的单链的互补链。多核苷酸的许多变体可以用于与给定多核苷酸相同的目的。因此,多核苷酸也涵盖基本上相同的多核苷酸及其互补物。单链提供可以在严格杂交条件下与给定序列杂交的探针。因此,多核苷酸也涵盖在严格杂交条件下杂交的探针。多核苷酸可以是单链或双链的,或者可以包含双链和单链序列的部分。多核苷酸可以是DNA(基因组DNA和cDNA两者)、RNA或杂交体,其中多核苷酸可以包含脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸的组合,以及包括尿嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、肌苷、黄嘌呤、次黄嘌呤、异胞嘧啶和异鸟嘌呤的碱基的组合。多核苷酸可以通过化学合

成方法或通过重组方法获得。

[0048] 单链DNA杂交互补片段的特异性由反应条件的“严格性”决定(Sambrook等人, *Molecular Cloning and Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor(1989))。杂交严格度随着形成DNA双螺旋体的倾向降低而增加。在多核苷酸杂交反应中,可以选择严格性以有利于特异性杂交(高严格性),所述特异性杂交可用于例如从文库中鉴定全长克隆。低特异性杂交(低严格度)可用于鉴别相关但不精确(同源,但不相同)的DNA分子或区段。DNA双链体根据以下因素稳定:(1)互补碱基对的数目;(2)碱基对的类型;(3)反应混合物的盐浓度(离子强度);(4)反应温度;和(5)存在某些有机溶剂,诸如甲酰胺,其降低DNA双链体稳定性。一般来说,探针越长,适当退火所需的温度越高。常见方法是改变温度;较高相对温度导致较严格的反应条件。在“严格条件”下杂交描述了杂交方案,其中彼此至少60%同源的多核苷酸保持杂交。一般来说,选择严格条件比规定的离子强度和pH值下的特异性序列的热熔点(T_m)低约5°C。 T_m 是与给定序列互补的50%探针与给定序列在平衡下杂交的温度(在确定的离子强度、pH和多核苷酸浓度下)。由于给定序列通常过量存在,因此在 T_m 下,50%的探针处于平衡状态。

[0049] “严格杂交条件”是使探针、引物或寡核苷酸仅与其特定序列杂交的条件。严格条件是序列依赖性的并且将不同。严格条件通常包括:(1)低离子强度和高温洗涤,例如15mM氯化钠、1.5mM柠檬酸钠、0.1%十二烷基硫酸钠,在50°C下;(2)杂交过程中的变性剂,例如,50%(v/v)甲酰胺,0.1%牛血清白蛋白,0.1%Ficoll,0.1%聚乙烯吡咯烷酮,50mM磷酸钠缓冲液(750mM氯化钠,75mM柠檬酸钠,pH 6.5),在42°C;或(3)50%甲酰胺。洗涤通常还包括42°C处的5x SSC(0.75M NaCl、75mM柠檬酸钠)、50mM磷酸钠(pH 6.8)、0.1%焦磷酸钠、5x邓哈特溶液(Denhardt's solution)、超声处理的鲑鱼精子DNA(50 μ g/mL)、0.1%SDS以及10%硫酸葡聚糖,以及42°C处在0.2xSSC(氯化钠/柠檬酸钠)中以及55°C处在50%甲酰胺中的洗涤,随后是55°C处的由含有EDTA的0.1xSSC组成的高严格度洗涤。适当地,条件使得彼此至少约65%、70%、75%、85%、90%、95%、98%或99%同源的序列通常保持彼此杂交。

[0050] “中等严格条件”使用洗涤溶液和较不严格的杂交条件,使得多核苷酸将与多核苷酸的整体,片段、衍生物或类似物杂交。一个实例包含在55°C下在6xSSC、5x邓波特溶液、0.5%SDS以及100 μ g/mL变性鲑鱼精子DNA中杂交,随后在37°C下在1xSSC、0.1%SDS中一次或多次洗涤。可以调整温度、离子强度等来适应实验因素,例如探针长度。其他中等严格条件已经进行了描述(参见Ausubel等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, 第1-3卷, John Wiley&Sons, Inc., Hoboken, N.J. (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual*, Stockton Press, New York, N.Y. (1990); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, 第2版, John Wiley&Sons, New York, N.Y. (1988))。

[0051] “低严格条件”使用洗涤溶液和不如中等严格性的较不严格的杂交条件,使得多核苷酸将与多核苷酸的整体,片段、衍生物或类似物杂交。低严格性杂交条件的非限制性实例包括在35%甲酰胺、5xSSC、50mM Tris HCl(pH 7.5)、5mM EDTA、0.02%PVP、0.02%Ficoll、0.2%BSA、100 μ g/mL变性鲑鱼精子DNA、10%(重量/体积)硫酸葡聚糖在40°C下杂交,然后在2xSSC、25mM Tris HCl(pH 7.4)、5mM EDTA和0.1%SDS中在50°C下洗涤一次或多次。

[0052] 术语“植物”指处于其生命周期或发育的任何阶段的任何植物及其后代。在一个实

施方案中,植物是烟草植物,它指的是属于烟草属的植物。该术语包括提及的完整植物、植物器官、植物组织、植物繁殖体、植物种子、植物细胞及其后代。植物细胞包括(但不限于)来自种子、悬浮培养物、胚芽、分生组织区域、愈伤组织、叶子、根、嫩枝、配子体、孢子体、花粉以及花粉粒的细胞。本文描述了烟草植物的合适的种类、栽培种、杂种和品种。

[0053] “多核苷酸”、“多核苷酸序列”或“多核苷酸片段”在本文中可互换使用,并且是指单链或双链的RNA或DNA的聚合物,任选地包含合成的、非天然的或改变的核苷酸碱基。核苷酸(通常以其5'单磷酸酯形式存在)由其如下的单字母名称指代:“A”针对腺苷酸或脱氧腺苷酸(分别针对RNA或DNA),“C”针对胞苷酸或脱氧胞苷酸,“G”针对鸟苷酸或脱氧鸟苷酸,“U”针对尿苷酸,“T”针对脱氧胸苷酸,“R”针对嘌呤(A或G),“Y”针对嘧啶(C或T),“K”针对G或T,“H”针对A或C或T,“I”针对肌苷并且“N”针对任何核苷酸。多核苷酸可以是(但不限于)基因组DNA、互补DNA(cDNA)、mRNA或反义RNA或其片段。此外,多核苷酸可以是单链或双链的、单链和双链区的混合物、包括DNA和RNA的杂交分子或具有单链和双链区的混合物的杂交分子或其片段。另外,多核苷酸可以由包括DNA、RNA或两者的三链区或者其片段构成。多核苷酸可以含有一个或多个经修饰的碱基,例如硫代磷酸酯,并且可以是肽核酸(PNA)。一般来说,多核苷酸可以由分离的或克隆的cDNA片段、基因组DNA、寡核苷酸或个别核苷酸或前述的组合组装。尽管本文描述的多核苷酸显示为DNA序列,但是多核苷酸包括其相应的RNA序列以及它们的互补(例如,完全互补)的DNA或RNA序列,包括其反向互补物。本公开的多核苷酸在所附序列列表中列出。

[0054] “多肽”或“多肽序列”是指其中一种或多种氨基酸残基是对应的天然存在的氨基酸的人工化学类似物的氨基酸的聚合物,以及天然存在的氨基酸的聚合物。该术语还包括修饰,包括但不限于糖基化、脂质附着、硫酸化、谷氨酸残基的 γ -羧化、羟基化和ADP-核糖基化。本公开的多肽在所附序列列表中列出。

[0055] 如本文所用,“重组”是指两个另外分离的序列片段的人工组合,诸如通过化学合成或通过基因工程技术操作分离的多核苷酸片段。该术语还包括提及的已通过引入异源多核苷酸而被修饰的细胞或载体或来源于如此修饰的细胞的细胞,但不涵盖由于天然发生的事件(例如,自发突变、天然转化或转导或转座)诸如在没有人为干预的情况下发生的事件对细胞或载体的改变。

[0056] 术语“烟草”在总体意义上用于指烟草作物(例如,在田间生长的多种烟草植物而不是水培生长的烟草)、烟草植物及其部分,包括但不限于如本文所述制备和/或获得的根、茎、叶、花和种子。应当理解,烟草是指烟草植物及其产品。

[0057] 术语“烟草产品”是指消费者烟草产品,包括但不限于吸烟材料(例如,香烟、雪茄和烟斗烟草)、鼻烟、嚼用烟草、口香糖和锭剂,以及用于制造消费者烟草产品的组分、材料和成分。适宜地,这些烟草产品由从烟草收获的烟草的叶和茎制造,并且根据烟草制备中的常规技术对其进行切割、干燥、熟化和/或发酵。

[0058] 关于肽或多肽的“变体”是指通过氨基酸的插入、缺失或保守取代而在序列上不同但保留至少一种生物学功能或活性的肽或多肽。变体也可以指保留至少一种生物学功能或活性的多肽。氨基酸的保守取代,即用性质(例如,亲水性、带电区域的程度和分布)相似的不同氨基酸取代氨基酸,在本领域中被认为通常涉及微小变化。

[0059] 术语“品种”指共享恒定特征的植物群体,所述恒定特征使其与相同物种的其他植

物分开。尽管具有一种或多种独特性状,但品种的特征进一步在于所述品种内个体之间的极小整体变化。品种通常在市场上有出售。

[0060] “载体”指包含用于使得能够转运多核苷酸的多核苷酸组分、多核苷酸构建体和多核苷酸缀合物等的组合的多核苷酸媒介物。载体可以是病毒载体、细菌噬菌体、细菌人工染色体或酵母人工染色体。载体可以是DNA或RNA载体。合适的载体包括能够进行染色体外复制的附加体,例如环状双链核苷酸质粒;线性化的双链核苷酸质粒;以及任何来源的其他媒介。

[0061] 如本文所用,“表达载体”是包含用于使得能够表达多核苷酸的多核苷酸组分、多核苷酸构建体和多核苷酸缀合物等的组合的多核苷酸媒介物。合适的表达载体包括能够进行染色体外复制的附加体,例如环状双链核苷酸质粒;线性化的双链核苷酸质粒;以及任何来源的其他功能等效的表达载体。表达载体包含位于多核苷酸、多核苷酸构建体或多核苷酸缀合物的上游并与其可操作地连接的至少一个启动子,如下文所定义。

[0062] 除非本文另外定义,否则结合本发明使用的科学与技术术语将具有所属领域普通技术人员通常所理解的含义。例如,本文所述的与细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学以及多肽和多核苷酸化学和杂交有关使用的任何命名和技术是本领域熟知和常用的那些。术语的含义和范围应该明确;然而在具有任何潜在不明确性的事件中,本文提供的定义优先于任何词典或外来定义。另外,除非上下文另外需要,否则单数术语应包括复数并且复数术语应包括单数。

[0063] “基因组编辑”是指改变编码内源多肽的内源基因,从而获得截短的内源多肽或具有氨基酸修饰(诸如取代)的内源多肽的多肽表达。基因组编辑可以包括用修复机制(诸如同源性定向修复)将内源基因的待靶向的区域或整个内源基因替换为具有截短或氨基酸取代的基因的拷贝。基因组编辑还可包括通过在内源基因中产生双链断裂,然后使用NHEJ修复,从而在内源基因中产生氨基酸取代。在可产生氨基酸取代的修复期间,NHEJ可添加或缺失至少一个碱基对。基因组编辑还可以包括通过两种核酸酶对同一DNA股同时起作用来删除基因区段,从而在两个核酸酶目标位点之间形成截短并且通过NHEJ修复DNA断裂。

[0064] “同源介导的修复”或“HDR”是指当细胞核中存在同源的DNA片段时,主要在细胞周期的G2期和S期,细胞中修复双链DNA损伤的机制。HDR使用供体DNA或供体模板引导修复并且可用于形成基因组的特异性序列改变,包括靶向添加整个基因。如果供体模板与定点核酸酶一起提供,那么细胞机制将通过同源重组修复断裂,所述同源重组在DNA裂解存在下将加强几个数量级。当不存在同源的DNA片段时,可以替代地发生NHEJ。

[0065] 如本文所用的“非同源端接合(NHEJ)路径”指的是通过无需同源模板而直接接合断裂端修复DNA中的双股断裂的路径。不依赖于模板的通过NHEJ的DNA端再接合是随机易错修复方法,其在DNA断点处引入无规微插入和微缺失(插入缺失)。这一方法可用于有意中断、缺失或改变靶向基因序列的读取范围。NHEJ通常使用称为微同源性的短同源DNA序列来引导修复。这些微同源性通常存在于双股断裂的末端上的单股悬垂物中。当悬垂物完全相容时,NHEJ通常精准修复断裂,但也可能存在导致核苷酸损失的不精确修复,但当悬垂物不相容时更常见。

[0066] “位点特异性核酸酶”是指能够特异性识别和切割DNA序列的酶。定点核酸酶可以经工程改造。工程改造的定点核酸酶的实例包括锌指核酸酶(ZFN)、TAL效应子核酸酶

(TALEN)、CRISPR/Cas9类系统以及大范围核酸酶。

[0067] “转录激活子样效应子”或“TALE”是指识别并结合特定DNA序列的多肽结构。“TALE DNA结合域”指的是包括串联33-35个氨基酸重复的阵列的DNA结合域,也称为RVD模块,其中每一个特异性地识别单个DNA碱基对。RVD模块可以任何顺序安排来装配识别已确定序列的阵列。TALE DNA结合域的结合特异性通过RVD阵列随后20个氨基酸的单个截短重复确定。TALE DNA结合域可具有12到27个RVD模块,其中每一个含有RVD并且识别单个DNA碱基对。特异性RVD已鉴别四个可能DNA核苷酸(A、T、C和G)中每一个的识别。因为TALE DNA结合域是模块,所以识别四个不同DNA核苷酸的重复序列可以连接在一起来识别任何具体DNA序列。这些靶向DNA结合域又可与催化域组合形成功能性酶,包括人工转录因子、甲基转移酶、整合酶、核酸酶以及重组酶。

[0068] 本文可互换使用的“转录激活子样效应子核酸酶”或“TALEN”是指核酸酶的催化结构域(例如核酸内切酶FokI)和可靶向定制DNA序列的设计的TALE DNA结合结构域的工程化融合多肽。

[0069] “TALEN单体”是指具有催化核酸酶结构域和设计的TALE DNA结合结构域的工程化融合多肽。两个TALEN单体可以设计成目标并且裂解TALEN目标区域。

[0070] “锌指”是指识别并结合DNA序列的多肽结构。锌指结构域是人类蛋白质组中最常见的DNA结合基元。单个锌指含有约30个氨基酸并且结构域通常通过结合3个连续DNA碱基对通过每个碱基对单个氨基酸侧链的相互作用起作用。

[0071] “锌指核酸酶”或“ZFN”是指嵌合多肽分子,其包含至少一个锌指DNA结合结构域,所述至少一个锌指DNA结合结构域有效地连接到至少一种核酸酶或核酸酶的一部分,当完全组装时,所述核酸酶或核酸酶的一部分能够切割DNA。

具体实施方式

[0072] 在一个方面,提供了编码硝酸盐还原酶多肽的分离的多核苷酸序列,该硝酸盐还原酶多肽包括SEQ ID NO:5的连续多肽序列,其中甲硫氨酸被与对照植物细胞相比降低硝酸盐还原酶活性的氨基酸取代。

[0073] 适宜地,硝酸盐还原酶多肽具有SEQ ID NO:7的连续多肽序列,其中甲硫氨酸被与对照植物细胞相比降低硝酸盐还原酶活性的氨基酸取代。

[0074] 适宜地,该分离的多核苷酸序列编码下述硝酸盐还原酶多肽:其中甲硫氨酸被不同的氨基酸取代,优选地被脂族非极性氨基酸取代,更优选地被异亮氨酸取代。

[0075] 适宜地,脂族非极性氨基酸选自由下列各项组成的氨基酸组:甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸或缬氨酸。

[0076] 适宜地,脂族非极性氨基酸为异亮氨酸。根据该实施方案,硝酸盐还原酶具有经取代的SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的连续多肽序列。

[0077] 适宜地,该分离的多核苷酸序列编码下述硝酸盐还原酶多肽:其包含在对应于与SEQ ID NO:1具有至少80%序列同一性的序列的位置527的位置处的氨基酸取代、由该氨基酸取代组成或基本上由该氨基酸取代组成。

[0078] 适宜地,该分离的多核苷酸序列编码下述硝酸盐还原酶多肽:其包含以SEQ ID NO:3示出的序列、由该序列组成或基本上由该序列组成。

[0079] 适宜地,该分离的多核苷酸序列包括与SEQ ID NO:2具有至少80%序列同一性的

序列、由该序列组成或基本上由该序列组成。

[0080] 适宜地,该多核苷酸序列包括以SEQ ID NO:4示出的多核苷酸序列、由该多核苷酸序列组成或基本上由该多核苷酸序列组成。

[0081] 根据本公开的示例性取代突变在表1中列出。

[0082] 在某些实施方案中,该多核苷酸序列包括与本文所述的任何序列具有至少80%序列同一性的序列、由该序列组成或基本上由该序列组成,包括序列表中示出的任何多核苷酸。适宜地,该分离的多核苷酸包含与其具有至少80%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的序列、由该序列组成或基本上由该序列组成。

[0083] 适宜地,本文所述的多核苷酸编码下述活性硝酸盐还原酶多肽:其具有序列表中示出的多肽的功能或活性的至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。

[0084] 在另一个实施方案中,提供了SEQ ID NO:4的多核苷酸片段,这些多核苷酸片段编码与其具有基本同源性(即,序列相似性)或基本同一性的包括M527I突变的多肽序列,所述片段与SEQ ID NO:4的对应片段具有至少约80%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%的序列同一性。

[0085] 还公开了结合有本文所述突变的多核苷酸的片段。多核苷酸片段通常包含至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少100个或至少200个连续的核苷酸。

[0086] 如本文所描述的多核苷酸可以包含核苷酸聚合物,其可以是未经修饰或经修饰的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)。因此,多核苷酸可以是(但不限于)基因组DNA、互补DNA(cDNA)、mRNA或反义RNA,或者它们的片段或截短物。此外,多核苷酸可以是单链或双链DNA、单链和双链区混合的DNA、包括DNA和RNA的杂交分子或具有单链和双链区的混合物的杂交分子或其片段。另外,多核苷酸可以由包括DNA、RNA或两者的三链区或者其片段构成。一般来说,多核苷酸可以由分离的或克隆的cDNA片段、基因组DNA、寡核苷酸或个别核苷酸或前述的组合组装。尽管本文描述的多核苷酸显示为DNA序列,但是它们包括其相应的RNA序列以及它们的互补(例如,完全互补)的DNA或RNA序列,包括其反向互补物。

[0087] 如本文所述的多核苷酸将通常含有磷酸二酯键。其他类似多核苷酸包含具有阳性主链;非离子主链和非核糖主链的多核苷酸。核糖-磷酸主链的修饰可以出于多种原因而完成,例如增加此类分子在生理环境中的稳定性和半衰期,或作为生物芯片上的探针。可以制备天然存在的多核苷酸和类似物的混合物;或者,可以制备不同多核苷酸类似物的混合物,以及天然存在的多核苷酸和类似物的混合物。

[0088] 类似多核苷酸可以包括具有阳性骨架、非离子骨架和非核糖骨架的那些。还包含含有一种或多种碳环糖的多核苷酸。

[0089] 其他类似物包含作为肽多核苷酸类似物的肽多核苷酸。这些主链在中性条件下是基本上非离子的,与天然存在的多核苷酸的高度荷电的磷酸二酯主链形成对比。这可以产生优势。首先,肽多核苷酸主链可以显示出改善的杂交动力学。对于错配碱基对相对于完全匹配的碱基对,肽多核苷酸在解链温度方面具有更大变化。对于内部错配,DNA和RNA通常显示出解链温度的2-4°C下降。在非离子肽多核苷酸主链的情况下,下降接近于7-9°C。类似地,由于其非离子性质,连接至这些主链的碱基的杂交对盐浓度相对不敏感。另外,肽多核

核苷酸可以不被细胞酶降解或更少程度地被细胞酶降解,并且因此可以是更稳定的。

[0090] 在所公开的多核苷酸及其片段的用途中,有片段在杂交测定中作为探针的用途或在扩增测定中作为引物的用途。这类片段一般包括DNA序列的至少约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个或更多个邻接核苷酸。在其他实施方案中,DNA片段包括DNA序列的至少约10、15、20、30、40、50或60个或更多个邻接核苷酸。因此,在一个方面,还提供了一种用于检测多核苷酸的方法,该方法包括使用探针或引物或两者。示例性引物在本文中描述。

[0091] 影响杂交条件选择的基本参数和设计合适条件的指导由Sambrook, J., E.F.Fritsch和T.Maniatis(1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) 描述。使用遗传密码的知识与本文所述的多肽序列结合,可以制备简并寡核苷酸组。这类寡核苷酸可用作例如聚合酶链反应(PCR)中的引物,由此分离且扩增DNA片段。在某些实施方案中,简并引物可以用作基因文库的探针。这样的文库包括cDNA文库、基因组文库,以及甚至电子表达序列标签或DNA文库。通过这种方法鉴定的同源序列随后用作探针,以鉴定本文中鉴定的序列的同源物。

[0092] 如本文所述,在降低的严格条件(通常是中等严格条件)和通常高度严格条件下与多核苷酸杂交的多核苷酸和寡核苷酸(例如,引物或探针)也是潜在的用途。影响杂交条件选择的基本参数和设计合适条件的指导由Sambrook, J., E.F.Fritsch和T.Maniatis(1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) 阐述,并且可基于例如多核苷酸的长度或碱基组成,由本领域普通技术人员容易地确定。

[0093] 本文定义了达到中等和高度严格条件的一种方法。应当理解,如本领域技术人员已知的和下文进一步描述的,通过应用控制杂交反应和双链体稳定性的基本原理,可以根据需要调节洗涤温度和洗涤盐浓度以实现期望的严格程度(参见例如, Sambrook, J., E.F.Fritsch和T.Maniatis(1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)。当多核苷酸与未知序列的多核苷酸杂交时,假定杂交体长度是杂交多核苷酸的长度。当已知序列的多核苷酸杂交时,杂交长度可以通过比对这些多核苷酸的序列并且鉴定最佳序列互补性的一个或多个区域来确定。预期长度小于50个碱基对的杂交体的杂交温度应当比杂交体的解链温度低5°C至10°C,其中解链温度根据以下等式确定。对于长度小于18个碱基对的杂交体,解链温度(°C) = 2(A碱基+T碱基的数目)+4(G碱基+C碱基的数目)。对于长度大于18个碱基对的杂交体,解链温度(°C) = 81.5+16.6(log₁₀[Na⁺])+0.41(%G+C) - (600/N),其中N是杂交体中的碱基的数目,并且[Na⁺]是杂交缓冲液中的钠离子的浓度(1x标准柠檬酸钠的[Na⁺] = 0.165M)。通常,每种这样的杂交多核苷酸具有为其杂交的多核苷酸的长度的至少25%(通常至少50%、60%或70%,并且最通常至少80%)的长度,并且与其杂交的多核苷酸具有至少60%的序列同一性(例如,至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)。

[0094] 如本领域技术人员应理解,线性DNA具有两个可能定向:5'-至-3'方向和3'-至-5'方向。例如,如果第一序列以5'-至-3'方向定位,并且如果第二序列以5'-至-3'方向定位在相同多核苷酸分子/链内,则第一序列和第二序列以相同方向定向,或具有相同定向。通常,启动子序列和处于给定启动子调节下的目的基因以相同定向放置。然而,对于以5'-至-3'

方向定位的第一序列,如果第二序列以3'-至-5'方向定位在相同多核苷酸分子/链内,则第一序列和第二序列以反义方向定向,或具有反义定向。如果第一序列(5'-至-3'方向)和第一序列(以5'-至-3'定位的第一序列)的反向互补序列定位在相的多核苷酸分子/链内,则相对于彼此具有反义定向的两个序列可以替代地描述为具有相同定向。本文所示的序列以5'-至-3'方向显示。

[0095] 还提供含有重组多核苷酸构建体的载体,如本文中所描述的那些。合适的载体主链包含例如本领域常规使用的载体主链,如质粒、病毒、人工染色体、细菌人工染色体、酵母人工染色体或噬菌体人工染色体。合适的表达载体包含但不限于源自例如噬菌体、杆状病毒和逆转录病毒的质粒和病毒载体。众多载体和表达系统是商购可得的。

[0096] 在一个方面,提供了一种分离的多肽,其包括与本文所述的任何多肽具有至少80%序列同一性的多肽、由该多肽组成或基本上由该多肽组成,包括序列表中示出的任何多肽。适宜地,该分离的多肽包含与其具有至少80%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%的序列同一性的序列、由该序列组成或基本上由该序列组成。

[0097] 在另一个方面,公开了由本文所述的多核苷酸序列编码的多肽序列。

[0098] 在另一个方面,公开了包含SEQ ID NO:5的连续多肽序列的硝酸盐还原酶多肽,其中甲硫氨酸被与对照植物细胞相比降低硝酸盐还原酶活性的氨基酸取代。序列SEQ ID NO:5充当用于结合负责NtNIA2氨基酸S523磷酸化的硝酸盐还原酶激酶的识别位点。

[0099] 适宜地,该硝酸盐还原酶包含SEQ ID NO:7的连续多肽序列,其中甲硫氨酸被与对照植物细胞相比降低硝酸盐还原酶活性的氨基酸取代。

[0100] 适宜地,甲硫氨酸被不同的氨基酸取代,该氨基酸诸如脂族非极性氨基酸,其可以选自由下列各项组成的氨基酸组:甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸或缬氨酸。

[0101] 适宜地,该脂族非极性氨基酸为I。根据该实施方案,该硝酸盐还原酶包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的连续多肽序列。

[0102] 适宜地,该硝酸盐还原酶多肽包含在对应于与SEQ ID NO:1具有至少80%序列同一性的序列的位置527的位置处的氨基酸取代、由该氨基酸取代组成或基本上由该氨基酸取代组成。

[0103] 合适地,该硝酸盐还原酶多肽包含在与SEQ ID NO:1具有至少80%序列同一性的序列中的氨基酸取代M527I、由该氨基酸取代组成或基本上由该氨基酸取代组成。

[0104] 适宜地,该硝酸盐还原酶多肽包含以SEQ ID NO:3示出的序列、由该序列组成或基本上由该序列组成。

[0105] 还公开了结合有本文所述突变的多肽的片段。多肽的片段通常保留全长序列的一些或全部功能或活性。多肽片段通常包含至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少100个或至少200个连续的氨基酸。本文所公开的多肽包括至少一个通过引入任何类型的一个或多个改变而产生的突变,其可以是天然分离的。适宜地,向其中引入突变的硝酸盐还原酶多肽的功能或活性通过引入该突变而得到调节(例如,降低)。适宜地,该突变为取代。取代是指硝酸盐还原酶多肽的至少一个氨基酸由具有相似特性(诸如相似的疏水性、亲水性、抗原性、形成或破坏 α -螺旋结构或 β -片层结构的倾向,等等)的另一个氨基酸替换。

[0106] 适宜地,该突变是SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7的连续多肽序列中的甲硫氨酸取代,其中甲硫氨酸被下述氨基酸取代:其中与对照植物相比,携带该取代的植物具有降低的硝酸盐还原酶活性。在一个实施方案中,甲硫氨酸被脂族非极性氨基酸(诸如甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸或缬氨酸)取代。在一个实施方案中,脂族非极性氨基酸为异亮氨酸,适宜地,连续多肽序列则为SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8。在一个实施方案中,取代为M527I。携带M527I突变的示例性硝酸盐还原酶多肽序列为SEQ ID NO:3。

[0107] 公开了在本文所述的一种或多种多核苷酸或多肽中包含或携带突变的植物或植物细胞,其中所述突变导致硝酸盐还原酶的功能或活性得到调节。本文所述的突变可以包括人为突变或合成突变。本文所述的多核苷酸和多肽中的突变可以通过包括体外或体内操作步骤的过程获得或可获得的突变。本文所述的多核苷酸和多肽中的突变可以通过包括人为干预的过程获得或可获得的突变。提供了用于调节(干制)植物或(干制)植物材料中的多肽的水平的方法,所述方法包括将调节至少一种基因的表达的一个或多个突变引入到所述植物的基因组中,其中所述至少一个突变选自根据本公开的序列,诸如M527I。适宜地,该基因编码如本文所述的普通烟草硝酸盐还原酶多肽。

[0108] 还公开了对于根据本公开的一个或多个突变是杂合的或纯合的植物或植物细胞,其中所述突变导致基因的表达或者由其编码的多肽的功能或活性得到调节。

[0109] 如果植物中本公开的一种或多种多肽的功能或活性低于或高于植物中相同多肽的功能或活性,则功能或活性增加或降低,所述植物未被修饰以抑制所述多肽的功能或活性并且已经使用相同方案培养、收获和干制。

[0110] 还公开了用于获得如本文所述的突变型多核苷酸和多肽的方法。感兴趣的植物,诸如烟草,包括植物细胞或植物材料,可以通过各种已知诱导诱变的方法进行遗传修饰,这些方法包括定点诱变、寡核苷酸定向诱变、化学诱导的诱变、辐射诱导的诱变、利用经修饰的碱基的诱变、利用缺口双链体DNA的诱变、双链断裂诱变、利用修复缺陷型宿主株的诱变、通过全基因合成的诱变、DNA改组和如下文所讨论的其他方法。

[0111] 在多核苷酸中随机引入突变的方法可以包括化学诱变和辐射诱变。化学诱变涉及使用外源添加的化学物质(诸如诱变、致畸或致癌的有机化合物)来诱发突变。主要产生点突变和短缺失、插入、错义突变、简单序列重复、颠换和/或转换的诱变剂(包括化学诱变剂或辐射)可用于产生突变。诱变剂包括甲磺酸乙酯、甲磺酸甲酯、N-乙基-N-亚硝基脒、三乙基三聚氰胺、N-甲基-N-亚硝基脒、丙卡巴肼、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、硫酸二乙酯、丙烯酰胺单体、美法仑、氮芥、长春新碱、二甲基亚硝胺、N-甲基-N'-硝基-亚硝基胍、亚硝基胍、2-氨基嘌呤、7,12-二甲基-苯并(a)蒽、环氧乙烷、六甲基磷酰胺、白消安(bisulfan)、二环氧烷烃(二环氧辛烷、二环氧丁烷等)、2-甲氧基-6-氯-9-[3-(乙基-2-氯-乙基)氨基丙基氨基]吡啶二盐酸盐和甲醛。

[0112] 将一个或多个靶向突变引入到多核苷酸序列中的方法包括但不限于基因组编辑技术,特别是锌指核酸酶介导的诱变、TILLING(靶向基因组中的诱导局部病变)、同源重组、寡核苷酸定向诱变和大范围核酸酶介导的诱变。

[0113] 锌指多肽可以用于将一个或多个靶向突变引入到多核苷酸序列中。在多个实施方案中,通过锌指核酸酶介导的诱变修饰包括多核苷酸编码序列的一部分或全部的基因组DNA序列。在基因组DNA序列中搜索锌指多肽结合的独特位点。替代地,在基因组DNA序列中

搜索锌指多肽结合的两个独特位点,其中两个位点在相对的链上并靠近在一起,例如相隔1、2、3、4、5、6或更多个碱基对。因此,提供了结合多核苷酸的锌指多肽。锌指多肽可被工程化以识别基因中的选定靶位点。锌指多肽可包含通过截短或扩展或定点诱变过程结合选择方法的来源于天然锌指DNA结合结构域和非天然锌指DNA结合结构域的基序的任何组合,所述选择方法诸如但不限于噬菌体展示选择、细菌双杂交选择或细菌单杂交选择。术语“非天然锌指DNA结合结构域”是指结合多核苷酸靶内的三碱基对序列并且不存在于包含待修饰的多核苷酸的细胞或生物体中的锌指DNA结合结构域。设计结合靶基因独特的特异性多核苷酸的锌指多肽的方法是本领域已知的。用于将锌指多肽和锌指核酸酶递送到植物的方法与下文所述用于递送大范围核酸酶的方法相似。

[0114] 大范围核酸酶,诸如I-CreI,可以用于将一个或多个靶向突变引入到多核苷酸序列中。天然存在的大范围核酸酶以及重组大范围核酸酶可以用于特异性引起在植物基因组DNA的单个位点或相对少数位点处的双链断裂,以允许破坏本文所述的一种或多种多核苷酸。大范围核酸酶可以是具有改变的DNA识别特性的经工程改造的大范围核酸酶。大范围核酸酶多肽可以通过本领域已知的多种不同机制递送到植物细胞中。大范围核酸酶可以用于切割在多核苷酸的编码区内的大范围核酸酶识别位点。这类切割通常导致在通过非同源末端连接的诱变DNA修复后,在大范围核酸酶识别位点处的DNA缺失。基因编码序列中的这类突变通常足以使基因失活。这种修饰植物细胞的方法首先涉及使用合适的转化方法将大范围核酸酶表达盒递送至植物细胞。为了最高效率,期望将大范围核酸酶表达盒连接至可选标记,且在选择剂的存在下选择成功转化的细胞。这种方法使得大范围核酸酶表达盒整合到基因组内,然而,如果植物可能需要监管机构批准,那么这可能是不理想的。在这类情况下,使用常规育种技术,大范围核酸酶表达盒(和连接的可选标记基因)可以在后续植物世代中分离。在大范围核酸酶表达盒递送后,植物细胞最初在对于使用的具体转化程序典型的条件下生长。这可能意味着在低于26°C的温度下,通常在黑暗中,使经转化的细胞在培养基上生长。这类标准条件可以使用一段时间,优选1-4天,以允许植物细胞从转化过程恢复。在该初始恢复期之后的任何时间点,可以升高生长温度以刺激工程化的大范围核酸酶切割和突变大范围核酸酶识别位点的功能。

[0115] 一种基因组编辑方法涉及使用转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN),其诱导双链断裂,细胞可以用修复机制对所述双链断裂作出响应。NHEJ从双链断裂的任一侧重重新连接DNA,其中有很少或没有用于退火的序列重叠。这一修复机制经由插入或缺失、或染色体重排诱导基因组中的错误。任何这类误差可以致使在所述位置处编码的基因产物无功能。对于某些应用,可能需要从植物基因组中精确除去多核苷酸。这类应用可能使用一对经工程改造的大范围核酸酶,所述一对大范围核酸酶各自切割在预期缺失的任一侧上的大范围核酸酶识别位点。也可以使用能够识别并结合基因并将双链断裂引入基因组的TALEN。

[0116] 另一种基因组编辑方法涉及使用细菌CRISPR/Cas系统。细菌和古细菌显示出称为规律成簇间隔短回文重复(clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR)的染色体元件,它是适应性免疫系统的一部分,防止侵入病毒和质粒DNA。在II型CRISPR系统中,CRISPR RNA(crRNA)与反式激活crRNA(tracrRNA)和CRISPR相关联的(Cas)多肽一起发挥作用,以在靶DNA中引入双链断裂。通过Cas9的靶切割要求在crRNA和tracrRNA之间的碱基配对,以及在crRNA和靶DNA之间的碱基配对。靶识别通过称为原型间

隔序列毗邻基序 (protospacer-adjacent motif, PAM) 的短基序的存在得到促进, 所述PAM符合序列NGG。这一系统可以用于基因组编辑。Cas9通常通过双重RNA按程序工作, 所述双重RNA由crRNA和tracrRNA组成。然而, 这些RNA的核心组分可以组合成单一杂交物‘引导RNA’用于Cas9靶向。对靶DNA使用非编码RNA引导用于位点特异性切割有希望比现有技术(如TALEN)明显更直截了当。使用CRISPR/Cas策略, 重新靶向核酸酶复合物仅需要引入新的RNA序列, 而无需重新设计多肽转录因子的特异性。CRISPR/Cas技术是以国际申请W0 2015/189693的方法在植物中实施的, 该方法公开了广泛适用于植物物种的病毒介导的基因组编辑平台。烟草脆裂病毒 (TRV) 的RNA2基因组被设计以携带指导RNA并将其递送到过表达Cas9核酸内切酶的圆叶烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 植物中。在本公开的上下文中, 指导RNA可以来源于本文公开的任何序列, 并且W02015/189693的教导内容适用于编辑植物细胞的基因组并获得所需的突变型植物。该技术的快速发展产生了在植物中具有广泛适用性的各种方案, 这些方案已在许多最近的科学综述文章中很好地编目(例如, *Plant Methods* (2016) 12:8; 以及 *Front Plant Sci.* (2016) 7:506)。*Biotechnology Advances* (2015) 33, 1, 41-52) 中描述了对CRISPR/Cas系统的综述, 该文献特别关注于其应用。*Acta Pharmaceutica Sinica B* (2017) 7, 3, 292-302和 *Curr. Op. in Plant Biol.* (2017) 36, 1-8中讨论了CRISPR/Cas用于操作植物基因组的用途的更新进展。非盈利质粒库 (addgene.org) “addgene” 中列出了用于植物的CRISPR/Cas9质粒, 并且CRISPR/Cas质粒是可商购的。

[0117] 一个或多个引入的突变(诸如本文所述的突变)可以使用本领域技术人员已知的方法(诸如Southern印迹分析、DNA测序、PCR分析或表型分析)来鉴定或选择。可以使用本领域众所周知的方法来确定影响基因表达或干扰所编码的多肽的功能的突变。

[0118] 根据本公开的植物或植物细胞包含所述突变, 并且任选地包含在一个或多个基因中的一个或多个另外的突变的任何组合。例如, 所述植物或植物细胞可以具有单个基因中的单个突变; 单个基因中的多个突变; 两个或更多个基因或者三个或更多个基因或者四个或更多个基因中的单个突变; 或者两个或更多个基因或者三个或更多个基因或者四个或更多个基因中的多个突变。本文描述了一个这样的突变的示例。

[0119] 在一个实施方案中, 使来自植物的种子诱变且随后生长成第一代突变型植物。随后使第一代植物自花授粉, 并且使来自第一代植物的种子生长成第二代植物, 所述第二代植物随后就其基因座中的突变(诸如本文所述的突变)进行筛选。尽管诱变的植物材料可以针对突变进行筛选, 但筛选第二代植物的优点在于所有体细胞突变都对应于生殖系突变。本领域技术人员应当理解, 多种植物材料(包括但不限于种子、花粉、植物组织或植物细胞)可以进行诱变, 以便产生突变型植物。然而, 当筛选植物多核苷酸的突变时, 诱变的植物材料的类型可能有影响。举例来说, 当在非诱变植物授粉之前对花粉实施诱变时, 使授粉获得的种子生长成第一代植物。第一代植物的每一个细胞将含有在花粉中产生的突变; 因此这些第一代植物随后可针对突变进行筛选, 而不是等到第二代进行。

[0120] 从个体植物、植物细胞或植物材料制备的多核苷酸可以任选地合并, 以便加速在源自诱变的植物组织、细胞或材料的植物群体中至少筛选本文所述的突变。可以筛选植物、植物细胞或植物材料的一个或多个后续世代。任选合并的群组的大小取决于使用的筛选方法的灵敏度。

[0121] 任选合并样品后, 可以对其进行多核苷酸特异性扩增技术, 诸如PCR。对该基因或

紧邻该基因的序列特异的任何一种或多种引物或探针可用于扩增任选合并的样品内的序列。合适地,一个或多个引物或探针设计为扩增最可能出现有用突变的基因座的区域。最优选地,引物设计为检测多核苷酸区域内的突变。另外,引物和探针优选避免已知的多态性位点,以便容易筛选点突变。为了便于扩增产物的检测,可以使用任何常规标记方法来标记一个或多个引物或探针。使用本领域充分理解的方法,可以基于本文中所描述的序列来设计引物或探针。

[0122] 为了便于检测扩增产物,可以使用任何常规标记方法来标记引物或探针。使用本领域充分理解的方法,可以基于本文中所描述的序列来设计这些引物或探针。

[0123] 可以通过本领域已知的方法鉴定多态性,并且一些多态性已在文献中得到描述。

[0124] 因此,在另一个方面,提供了制备包含本文所述突变的植物的方法。该方法涉及提供包含编码功能性硝酸盐还原酶多核苷酸的基因的植物的至少一个细胞。接下来,在能有效地调节硝酸盐还原酶多核苷酸的功能的条件下对该植物的至少一个细胞进行处理。然后将至少一个突变型植物细胞繁殖成突变型植物,其中该突变型植物与对照植物相比具有经调节水平的硝酸盐还原酶多肽。在一个实施方案中,处理步骤涉及在能有效地获得至少一个突变型植物细胞的条件下,使所述至少一个细胞经受如本文所述的化学诱变剂。在这一方法的另一个实施方案中,处理步骤涉及在有效获得至少一个突变型植物细胞的条件下,使至少一个细胞经受辐射源。术语“突变型植物”包括其中与对照植物相比基因型被修饰(合适地,通过除基因工程或基因修饰之外的方式)的突变型植物。

[0125] 在某些实施方案中,突变型植物、突变型植物细胞或突变型植物材料可以包括一个或多个突变,所述一个或多个突变在另一种植物、植物细胞或植物材料中天然存在,且赋予所需性状。该突变可引入(例如基因渗入)另一种植物、植物细胞或植物材料(例如具有与突变源自于其的植物不同的遗传背景的植物、植物细胞或植物材料)内,以对其赋予该性状。因此,例如,可以将第一植物中天然发生的突变引入第二植物中,诸如具有与第一植物不同的遗传背景的第二植物。技术人员因此能够搜索且鉴定在基因组中天然携带本文中所描述基因的一种或多种突变等位基因的植物,所述基因赋予所需性状。可以通过多种方法(包含育种、回交和基因渗入)将天然存在的突变体等位基因转移到第二植物,以产生在本文中所描述基因中具有一个或多个突变的品系、品种或杂交物。相同的技术也可以应用于一个或多个非天然突变从第一植物到第二植物的基因渗入。可以在突变型植物的库中筛选展示所需性状的植物。合适地,利用如本文所述的多核苷酸的知识进行选择。因此,能够与对照相比筛选基因性状。这样的筛选方法可以涉及如本文讨论的常规扩增和/或杂交技术的应用。因此,本公开的另一方面涉及鉴定突变型植物的方法,该方法包括以下步骤:(a) 提供包含来自植物的多核苷酸的样品;(b) 确定多核苷酸的序列,其中多核苷酸的序列与对照植物的多核苷酸相比的差异表明所述植物是突变型植物。在另一个方面,提供了用于鉴定突变型植物的方法,该突变型植物与对照植物相比积聚了水平降低的硝酸盐,该方法包括以下步骤:(a) 提供来自待筛选植物的样品;(b) 确定所述样品是否在硝酸盐还原酶多核苷酸中包含如本文所述的一个或多个突变;以及(c) 确定所述植物中的硝酸盐水平。适宜地,硝酸盐水平在干制的叶中测定。在另一个方面,提供了用于制备突变型植物的方法,该突变型植物与对照植物相比具有水平降低的硝酸盐,该方法包括以下步骤:(a) 提供来自第一植物的样品;(b) 确定所述样品是否在硝酸盐还原酶多核苷酸中包含导致硝酸盐水平降

低的如本文所述的一个或多个突变;以及(c)将所述一个或多个突变转移到第二植物中。适宜地,硝酸盐水平在干制的叶中测定。可以使用本领域已知的多种方法,如通过基因工程改造、基因操纵、基因渗入、植物育种、回交等等,将突变转移到第二植物内。在一个实施方案中,第一植物是天然存在的植物。在一个实施方案中,第二植物具有与第一植物不同的基因背景。在另一个方面,提供了用于制备突变型植物的方法,该突变型植物与对照植物相比具有水平降低的硝酸盐,该方法包括以下步骤:(a)提供来自第一植物的样品;(b)确定所述样品是否在硝酸盐还原酶多核苷酸中包含导致硝酸盐水平降低的如本文所述的一个或多个突变;以及(c)将所述一个或多个突变从第一植物基因渗入到第二植物中。适宜地,硝酸盐水平在干制的叶中测定。在一个实施方案中,基因渗入步骤包括植物育种,任选地包含回交等等。在一个实施方案中,第一植物是天然存在的植物。在一个实施方案中,第二植物具有与第一植物不同的基因背景。在一个实施方案中,第一植物不是栽培品种或优良栽培品种。在一个实施方案中,第二植物是栽培品种或优良栽培品种。另一方面涉及通过本文中所描述的方法获得或可获得的突变型植物(包含栽培品种或优良栽培品种突变型植物)。在某些实施方式中,“突变型植物”可具有仅定位于植物的特定区域,例如在本文所述的一种或多种多核苷酸的序列内的一个或多个突变。根据这一实施方案,突变型植物的剩余基因组序列将与诱变前的植物相同或基本上相同。

[0126] 在另一个方面,提供了鉴定植物、植物细胞或植物材料的方法,该植物、植物细胞或植物材料在编码硝酸盐还原酶多核苷酸的基因中包含突变,该方法包括:(a)使植物、植物细胞或植物材料经受诱变;(b)从所述植物、植物细胞或植物材料或者它们的后代获得样品;以及(c)确定携带本文所述突变的突变多核苷酸序列的存在。

[0127] 所公开的组合物和方法可以应用于烟草属的任何物种,包括黄花烟草(*N. rustica*)和烟草(例如,LA B21、LN KY171、TI 1406、Basma、Galpao、Perique、Beinhart 1000-1和Petico)。其他物种包括无茎烟草(*N. acaulis*)、尖叶烟草(*N. acuminata*)、非洲烟草(*N. africana*)、花叶烟草(*N. alata*)、阿米基诺氏烟草(*N. ameghinoi*)、抱茎烟草(*N. amplexicaulis*)、阿伦兹氏烟草(*N. arentsii*)、渐狭叶烟草(*N. attenuata*)、阿姆布吉烟草(*N. azambujae*)、贝纳莫特氏烟草(*N. benavidesii*)、本赛姆氏烟草(*N. benthamiana*)、印度烟草(*N. bigelovii*)、博内里烟草(*N. bonariensis*)、洞生烟草(*N. cavicola*)、克利夫兰氏烟草(*N. clevelandii*)、心叶烟草(*N. cordifolia*)、伞床烟草(*N. corymbosa*)、迪伯纳氏烟草(*N. debneyi*)、木丝烟草(*N. excelsior*)、福尔吉特氏烟草(*N. forgetiana*)、香烟草(*N. fragrans*)、粉蓝烟草(*N. glauca*)、粘烟草(*N. glutinosa*)、古特斯比氏烟草(*N. goodspeedii*)、哥西氏烟草(*N. gossei*)、杂交烟草(*N. hybrid*)、因古儿巴烟草(*N. ingulba*)、卡瓦卡米氏烟草(*N. kawakamii*)、奈特氏烟草(*N. knightiana*)、郎氏烟草(*N. langesdorffii*)、渐尖叶烟草(*N. linearis*)、长花烟草(*N. longiflora*)、海滨烟草(*N. maritima*)、特大管烟草(*N. megalosiphon*)、摩西氏烟草(*N. miersii*)、夜花烟草(*N. noctiflora*)、裸茎烟草(*N. nudicaulis*)、欧布斯特烟草(*N. obtusifolia*)、西方烟草(*N. occidentalis*)、西方亚种香芥烟草(*N. occidentalis* subsp. *hesperis*)、耳状烟草(*N. otophora*)、圆维烟草(*N. paniculata*)、少花烟草(*N. pauciflora*)、矮牵牛状烟草(*N. petunioides*)、蓝茉莉叶烟草(*N. plumbaginifolia*)、夸德瑞伍氏烟草(*N. quadrivalvis*)、雷蒙德氏烟草(*N. raimondii*)、波缘烟草(*N. repanda*)、莲座烟草

(*N. rosulata*)、莲座亚种因古儿巴烟草(*N. rosulata* subsp. *ingulba*)、圆叶烟草(*N. rotundifolia*)、赛特氏烟草(*N. setchellii*)、拟似烟草(*N. simulans*)、前叶烟草(*N. solanifolia*)、斯佩格茨氏烟草(*N. spegazzinii*)、斯托可通氏烟草(*N. stocktonii*)、香甜烟草(*N. suaveolens*)、美花烟草(*N. sylvestris*)、拟穗状烟草(*N. thyrsoflora*)、绒毛烟草(*N. tomentosa*)、绒毛状烟草(*N. tomentosiformis*)、三角叶烟草(*N. trigonophylla*)、荫生烟草(*N. umbratica*)、波叶烟草(*N. undulata*)、颤毛烟草(*N. velutina*)、序叶烟草(*N. wigandioides*)和花烟草(*N. x sanderae*)。

[0128] 在一个实施方案中,植物是烟草。

[0129] 本文还涵盖使用烟草栽培品种和优良烟草栽培品种。因此,该植物可以是包含一个或多个基因突变的烟草品种或优良烟草栽培品种。基因突变(例如,一种或多种多态性)可以是非天然存在于个别烟草品种或烟草栽培品种(例如,优良烟草栽培品种)中的突变,或可以是的天然存在的基因突变,条件是所述突变并非天然存在于个别烟草品种或烟草栽培品种(例如,优良烟草栽培品种)中。

[0130] 普通烟草品种包括白肋烟型烟草、黑烟型烟草、烤烟型烟草和东方型烟草。品种或栽培品种的非限制性实例是:AA37、BD 64、CC 101、CC 200、CC 27、CC 301、CC 400、CC 500、CC 600、CC 700、CC 800、CC 900、Coker 176、Coker 319、Coker 371Gold、Coker 48、CD 263、DF911、DT 538LC Galpao烟草、GL 26H、GL 350、GL 600、GL 737、GL 939、GL 973、HB 04P、HB 04P LC、HB3307PLC、杂交403LC、杂交404LC、杂交501LC、K 149、K 326、K 346、K 358、K394、K 399、K 730、KDH 959、KT 200、KT204LC、KY10、KY14、KY 160、KY 17、KY 171、KY 907、KY907LC、KY14xL8 LC、Little Crittenden、McNair373、McNair 944、msKY 14×L8、窄叶Madole、窄叶Madole LC、NBH98、N-126、N-777LC、N-7371LC、NC 100、NC 102、NC 2000、NC 291、NC 297、NC 299、NC 3、NC 4、NC 5、NC 6、NC7、NC 606、NC 71、NC 72、NC 810、NC BH 129、NC 2002、Neal Smith Madole、OXFORD207、PD 7302LC、PD 7309LC、PD 7312LC、“Perique”烟草、PVH03、PVH09、PVH19、PVH50、PVH51、R 610、R 630、R 7-11、R 7-12、RG17、RG 81、RG H51、RGH 4、RGH 51、RS 1410、Speight 168、Speight172、Speight 179、Speight 210、Speight 220、Speight 225、Speight 227、Speight 234、Speight G-28、Speight G-70、Speight H-6、Speight H20、Speight NF3、TI 1406、TI 1269、TN 86、TN86LC、TN 90、TN 97、TN97LC、TN D94、TN D950、TR (Tom Rosson) Madole、VA 309、VA359、AA37-1、B 13P、Xanthi (Mitchell-Mor)、Bel-W3、79-615、Samsun Holmes NN、KTRDC 2号杂交种49、白肋21、KY 8959、KY 9、MD 609、PG01、PG 04、P01、P02、P03、RG 11、RG 8、VA 509、AS44、Banket A1、Basma Drama B84/31、Basma I Zichna ZP4/B、Basma Xanthi BX 2A、Batek、Besuki Jember、C104、Coker 347、Criollo Misionero、Delcrest、Djebel 81、DVH 405、Galpão Comum、HB04P、希克斯阔叶种、Kabakulak Ellassona、Kutsage E1、LA BU 21、NC 2326、NC 297、PVH 2110、Red Russian、Samsun、Saplak、Simmaba、Talgat 28、Wislica、Yayaldag、Prilep HC-72、Prilep P23、Prilep PB 156/1、Prilep P12-2/1、Yaka JK-48、Yaka JB 125/3、TI-1068、KDH-960、TI-1070、TW136、Basma、TKF 4028、L8、TKF 2002、GR141、Basma xanthi、GR149、GR153、Petit Havana。即使本文未特别指明,也设想上述的低转化亚变种。

[0131] 在一个实施方案中,栽培品种为AA37,其通常被理解为南美深色烟草与美国白肋烟种质之间的杂交。

[0132] 实施方案还涉及用于产生已被修饰以调节本文所述的多核苷酸(或如本文所述的其任何组合)的表达或功能的植物的组合物和方法。有利地,所获得的植物可以在整体外观上与对照植物相似或基本上相同。多种表型特征,如成熟程度、每一植物叶数、秆高、叶插入角度、叶大小(宽度和长度)、节间距离以及叶片-中脉比可以通过田地观测进行评价。

[0133] 一个方面涉及本文所述植物的种子。优选地,所述种子是烟草种子。另一个方面涉及本文所述植物的花粉或胚珠。此外,提供了还包含赋予雄性不育性的多核苷酸的如本文所述的植物。

[0134] 还提供了如本文所述的植物的可再生细胞的组织培养物,该培养物再生能够表达亲本的所有形态特征和生理特征的植物。可再生细胞包括来自叶、花粉、胚、子叶、下胚轴、根、根尖、花药、花及其部分、胚珠、芽、茎、柄、髓和囊的细胞或来源于它们的愈伤组织或原生质体。

[0135] 一个目的是提供在植物材料中(例如,在干制的叶中)表现出经调节的硝酸盐水平的植物或其部分。适宜地,所述植物或其部分与对照植物相比表现出经调节的硝酸盐水平。

[0136] 适宜地,所述植物或其部分具有与对照植物基本上相同的总收获生物量(以每株植物的鲜叶生物量表示)。

[0137] 适宜地,所述植物或其部分具有与对照植物基本上相同的烟碱叶含量水平。

[0138] 适宜地,所述植物或其部分具有与对照植物基本上相同的总生物碱叶含量水平。

[0139] 适宜地,所述植物或其部分具有与对照植物基本上相同的氨叶含量水平。

[0140] 适宜地,所述植物或其部分具有与对照植物基本上相同的还原糖叶含量水平。

[0141] 因此,本文描述了与对照细胞或对照植物相比具有经调节的硝酸盐水平的植物或其部分或者植物细胞。所述植物或植物细胞被修饰,以通过调节一种或多种本文所述的对应多核苷酸的表达来调节一种或多种本文所述多肽的合成或功能。适宜地,在干制的叶中观察到经调节的硝酸盐水平。在某些实施方案中,该植物(诸如干制的叶或干制的烟草)中的硝酸盐水平降低。

[0142] 另一个方面涉及植物或植物细胞,其中一种或多种本文所述多肽的表达或功能得到调节,并且与其中所述多肽的表达或功能尚未被调节的对照植物相比,该植物(例如,干制的叶或干制的烟草)的一部分在其中具有至少降低约37%的硝酸盐水平。在某些实施方案中,该植物(诸如干制的叶或干制的烟草)中的硝酸盐水平可以降低例如至少约30%或更多、或者约35%或更多、或者约37%或更多,或者约40%或更多。

[0143] 再一个方面涉及来源于或可来源于如本文所述的植物或植物细胞的干制的植物材料(诸如干制的叶或干制的烟草),其中一种或多种本文所述多核苷酸的表达或由其编码的多肽的功能得到调节,并且其中与对照植物相比,硝酸盐水平被调节至少约37%,例如,至少约30%或更多、或者约35%或更多,或者约40%或更多。

[0144] 实施方案还涉及用于产生植物或植物细胞的组合物和方法,所述植物或植物细胞已被修饰以调节本文所述的一种或多种多核苷酸或多肽的表达或功能,这可以产生具有经调节的硝酸盐含量的植物或植物组分(例如,叶(诸如干制的叶)或烟草)或者植物细胞。

[0145] 与对照相比,功能或活性的增加可以为约5%至约100%,或增加至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或100%或更多,诸如200%、300%、500%、1000%或更多。

[0146] 与对照相比,功能或活性的降低可以为约5%至约100%,或降低至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或100%。

[0147] 在硝酸盐还原酶多核苷酸中携带本文所述突变的植物可以用于植物育种程序,以产生有用的品系、品种和杂种。特别地,可以使该突变体基因渗入到上述商业上重要的品种中。因此,提供了用于培育植物的方法,其包括将如本文所述的植物与包含不同遗传同一性的植物杂交。所述方法可以进一步包括将后代植物与另一植物杂交,且任选地重复杂交直到获得具有期望的基因性状或基因背景的后代。这类育种方法发挥的一个目的是将期望的基因性状引入其他品种、育种品系、杂种或栽培品种,尤其是具有商业利益的那些。另一个目的是便于在单个植物品种、品系、杂种或栽培品种中叠加不同基因的基因修饰。考虑种内以及种间交配。源自这类杂交的后代植物,也称为育种品系,是本公开的植物的示例。

[0148] 在一个实施方案中,提供了用于产生植物的方法,包括:(a)将本公开的植物与第二植物杂交,以获得后代烟草种子;(b)使后代烟草种子在植物生长条件下生长,以获得非天然存在的植物。该方法可以还包括:(c)将上一代非天然存在的植物与其自身或另一种植物杂交,以获得后代烟草种子;(d)使步骤(c)的后代烟草种子在植物生长条件下生长,以获得另外的非天然存在的植物;以及(e)重复(c)和(d)的杂交步骤和生长步骤多次,以产生非天然存在的植物的进一步后代。该方法可以任选地包括在步骤(a)之前提供亲本植物的步骤,该亲本植物包含得到表征且不同于本公开的植物的遗传同一性。在一些实施方案中,取决于育种计划,将杂交和生长步骤重复0至2次、0至3次、0至4次、0至5次、0至6次、0至7次、0至8次、0至9次或0至10次,以便产生非天然存在的植物的世代。回交是这类方法的实例,其中后代与其亲本之一或与其亲本基因相似的另一植物进行杂交,以便获得在下一代中具有更接近于亲本之一的基因一致性的后代植物。用于植物育种,特别是植物育种的技术是众所周知的,并且可用于本公开的方法中。某些实施方案不包含选择植物的步骤。

[0149] 根据本公开内容,在育种计划中,成功的杂交获得能育的F1植物。所选择的F1植物可与亲本之一杂交,并且第一回交世代植物进行自花授粉,以产生再次筛选变体基因表达(例如,基因的无效版本)的群体。将回交、自花授粉和筛选的过程重复例如至少4次,直到最终筛选产生可育且与轮回亲本相当相似的植物。如果需要的话,这种植物进行自花授粉,并且随后再次筛选后代,以确认植物展现变体基因表达。在一些实施方案中,筛选F2代中植物群体的变体基因表达,例如根据标准方法鉴定由于缺乏基因而不能表达多肽的植物,例如通过使用PCR方法,其中引物基于本文所述的多核苷酸(或如本文所述的其任何组合)的多核苷酸序列信息。

[0150] 除了本文所述的突变之外,本文所述的植物或植物细胞可以在如本文所述的相同多核苷酸或多肽中或者在基因组内的一种或多种其他多核苷酸或多肽中具有一个或多个另外的突变。

[0151] 非限制性地,本文所述的植物及其部分可以在根据本公开的一种或多种多核苷酸和/或多肽的表达、功能或活性已被调节之前或之后被修饰。

[0152] 以下另外的基因修饰(例如,突变)中的一者或多者可以存在于所述植物和其部分中。

[0153] 可以修饰(例如,突变)参与氮代谢中间体转化的一个或多个基因,从而降低至少

一种烟草特异性亚硝酸胺 (TSNA) 的水平。此类基因的非限制性实例包括编码尼古丁脱甲基酶的那些 (诸如W02006/091194、W02008/070274、W02009/064771和W02011/088180中所述的CYP82E4、CYP82E5和CYP82E10), 以及硝酸还原酶, 如W02016046288中所述的。

[0154] 可以修饰 (例如, 突变) 参与重金属吸收或重金属转运的一个或多个基因, 从而降低重金属含量。非限制性实例包括以下中的基因: 多药抗性相关多肽家族、阳离子扩散促进因子 (CDF) 家族、Zrt-Irt样多肽 (ZIP) 家族、阳离子交换剂 (CAX) 家族、铜转运蛋白 (COPT) 家族、重金属ATP酶家族 (例如HMA, 如W02009/074325和W02017/129739中所述)、天然抗性相关巨噬细胞多肽 (NRAMP) 的同系物家族和ATP结合盒 (ABC) 转运蛋白家族的其他成员 (例如MRP), 如W02012/028309中所述, 其参与重金属诸如镉的转运。

[0155] 其他示例性修饰 (例如, 突变) 可以产生具有经调节的表达或功能的异丙基苹果酸合酶的植物, 该经调节的表达或功能导致蔗糖酯组成的变化, 该变化可以用于改变风味特征 (参见W02013029799)。

[0156] 其他示例性修饰 (例如, 突变) 可以产生具有经调节的表达或功能的苏氨酸合酶的植物, 其中甲硫基丙醛的水平可以被调节 (参见W02013029800)。

[0157] 其他示例性修饰 (例如, 突变) 可以产生下述植物: 其具有表达或功能经调节的新黄质合酶、番茄红素 β 环化酶和9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶中的一者或多者, 以调节 β -大马酮含量来改变风味特征 (参见W02013064499)。

[0158] 其他示例性修饰 (例如, 突变) 可以产生下述植物: 其具有表达或功能经调节的CLC氯通道家族成员, 以调节其中的硝酸盐水平 (参见W02014096283和W02015197727)。

[0159] 其他示例性修饰 (例如, 突变) 可以产生下述植物: 其具有表达或功能经调节的一种或多种天冬酰胺合成酶, 以调节叶中的天冬酰胺的水平并且调节在加热或燃烧叶时所产生的气溶胶中的丙烯酰胺的水平 (参见W02017042162)。

[0160] 其他修饰 (例如, 突变) 的示例包括调节除草剂耐受性, 例如, 草甘膦是许多广谱除草剂的活性成分。

[0161] 另一种示例性修饰 (例如, 突变) 产生对昆虫具有抗性的植物。苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 毒素可以提供一种有效方式来延迟抗Bt害虫的出现, 如在花椰菜中最近说明的, 其中金字塔形cry1Ac和cry1C Bt基因控制对任一单个多肽具有抗性的小菜蛾, 并且显著延迟抗性昆虫的进化。

[0162] 另一种示例性修饰 (例如, 突变) 产生对由病原体 (例如, 病毒、细菌、真菌) 引起的疾病具有抗性的植物。已经设计了表达Xa21基因 (抗白叶枯病) 的植物和表达Bt融合基因和几丁质酶基因 (抗三化螟和耐鞘) 的植物。

[0163] 另一种示例性修饰 (例如, 突变) 产生改变的生殖能力, 诸如雄性不育性。

[0164] 另一种示例性修饰 (例如, 突变) 产生对非生物胁迫 (例如, 干旱、温度、盐度) 耐受的植物。

[0165] 另一种示例性修饰 (例如, 突变) 产生其中一种或多种糖基转移酶 (诸如N-乙酰葡萄糖胺基转移酶、 β (1, 2) - 木糖基转移酶和 α (1, 3) - 岩藻糖基转移酶) 的活性得到调节的植物 (参见W0/2011/117249)。

[0166] 另一种示例性修饰 (例如, 突变) 产生下述植物: 其中一种或多种烟碱N-脱甲基酶的活性得到调节, 使得可以调节在干制期间形成的降烟碱和降烟碱代谢物的水平 (参见

W02015169927)。

[0167] 其他示例性修饰(例如,突变)可以产生具有改善的储存多肽和油的植物、具有增强的光合效率的植物、具有延长的保存期限的植物、具有增强的碳水化合物含量的植物,以及抗真菌的植物。

[0168] 可以修饰(例如,突变)参与烟碱合成途径的一个或多个基因,从而得到在干制时产生经调节的烟碱水平的植物或植物部分。尼古丁合成基因可以选自由以下组成的组:A622、BBLa、BBLb、JRE5L1、JRE5L2、MATE1、MATE 2、MP01、MP02、MYC2a、MYC2b、NBB1、nic1、nic2、NUP1、NUP2、PMT1、PMT2、PMT3、PMT4和QPT或它们中的一个或多个的组合。

[0169] 可以修饰(例如,突变)参与控制一种或多种生物碱的量的一个或多个基因,从而得到产生经调节的生物碱水平的植物或植物部分。生物碱水平控制基因可以选自由以下组成的组:BBLa、BBLb、JRE5L1、JRE5L2、MATE1、MATE 2、MYC2a、MYC2b、nic1、nic2、NUP1和NUP2或它们中的一个或多个的组合。

[0170] 本文所述植物的部分,特别是这些植物的叶片和中脉,可以掺入或用于制备各种消耗品,包括但不限于气溶胶形成材料、气溶胶形成装置、吸烟制品、可抽吸制品、无烟产品、医药或美容产品、静脉内制剂、片剂、粉末和烟草产品。气溶胶形成材料的实例包括烟草组合物、烟草、烟草提取物、烟丝、切丝填料、干制的烟草、膨胀烟草、均质烟草、再造烟草和烟斗烟草。吸烟制品和可抽吸制品是气溶胶形成装置的类型。吸烟制品或可抽吸制品的实例包含香烟、小雪茄和雪茄。无烟产品的实例包括嚼烟和鼻烟。在某些气溶胶形成装置而不是燃烧中,烟草组合物或另一气溶胶形成材料被一个或多个电加热元件进行加热,以产生气溶胶。在另一类型的被加热的气溶胶形成装置中,通过将热量从可燃性燃料元件或热源转移到物理上分开的气溶胶形成材料来产生气溶胶,所述气溶胶形成材料可以位于热源内、热源周围或热源下游。无烟烟草产品和多种含烟草的气雾形成材料可包含任何形式的烟草,包括沉积在其他成分上、混合于其他成分中、由其他成分包围或以其他方式与其他成分组合的干燥颗粒、碎片、小颗粒、粉末或浆料,所述其他成分采取任何形式,例如絮片、膜、卡(tab)、泡沫或珠。如本文中所使用,术语“烟雾”用于描述由例如香烟等吸烟制品或通过燃烧气溶胶形成材料而产生的一类气溶胶。

[0171] 在一个实施方案中,还提供了来自本文所述植物的干制植物材料。熟化绿色烟叶的工艺是本领域技术人员已知的,并且包括但不限于如本文所述的晾干、火烤熟化、烟道熟化和晒干。

[0172] 在另一个实施方案中,描述了包括含烟草的气溶胶形成材料在内的烟草产品,所述气溶胶形成材料包括来自本文所述烟草植物的植物材料,诸如叶,优选地为干制的叶。本文中所描述的烟草产品可以是掺合的烟草产品,其还可包括未修饰的烟草。

[0173] 用于作物管理和农业的产品和方法

[0174] 这些植物可以在例如农业中具有其他用途。例如,本文所述的植物可以用于制备动物饲料和人类食物产品。

[0175] 本公开还提供了用于产生种子的方法,包括栽培本文所述的植物,并且从栽培的植物收集种子。来自本文所述植物的种子可通过本领域中已知的方式进行条件处理,且包装在包装材料中,以形成制造物品。如纸和布等包装材料是本领域众所周知的。种子的包装可带有描述其中种子的性质的标记,例如固定到包装材料的标签或标记、印刷在包装上的

标记。

[0176] 用于对植物基因分型以鉴定、选择或育种的组合物、方法和试剂盒可包括检测多核苷酸样品中的多核苷酸(或如本文中所描述的其任何组合)存在的方式。因此,描述了一种组合物,其包含用于特异性扩增一种或多种多核苷酸的至少一部分的一种或多种引物,以及用于进行扩增或检测的任选地一种或多种探针和任选地一种或多种试剂。

[0177] 相应地,公开了基因特异性的寡核苷酸引物或探针,其包含对应于本文所述的多核苷酸的约10个或更多个邻接多核苷酸。所述引物或探针可包括以下或由以下组成:约15、20、25、30、40、45或50个或更多个邻接多核苷酸,所述引物或探针与本文所述的多核苷酸杂交(例如,特异性杂交)。

[0178] 在一些实施方案中,引物或探针可包含约10至50个连续核苷酸、约10至40个连续核苷酸、约10至30个连续核苷酸或约15至30个连续核苷酸,或由其组成,其可用于基因鉴定(例如,Southern杂交)或分离(例如,细菌菌落或噬菌斑的原位杂交)或基因检测(例如,作为扩增或检测中的一种或多种扩增引物)的序列依赖性方法。可设计一个或多个特异性引物或探针,且用于扩增或检测多核苷酸的部分或全部。作为具体实例,可以在PCR方案中使用两种引物来扩增多核苷酸片段。PCR也可以使用来源于多核苷酸序列的一种引物与多核苷酸序列上游或下游序列杂交的第二种引物进行,所述多核苷酸序列诸如启动子序列、mRNA前体的3'端或来源于载体的序列。用于体外扩增多核苷酸的热和等温技术的实例是本领域众所周知的。样品可以是或可源自植物、植物细胞或植物材料,或者由如本文所述的植物、植物细胞或植物材料制备或衍生的烟草产品。

[0179] 在另一方面,还提供了检测样品中本文所述的多核苷酸(或如本文所述的其任何组合)的方法,该方法包括以下步骤:(a)提供包含或疑似包含多核苷酸的样品;(b)使所述样品与一种或多种引物或一种或多种探针接触,以特异性检测多核苷酸的至少一部分;以及(c)检测扩增产物的存在,其中扩增产物的存在指示样品中多核苷酸的存在。在另一方面,还提供了一种或多种引物或探针用于特异性检测多核苷酸的至少一部分的用途。还提供了用于检测至少一部分多核苷酸的试剂盒,其包含用于特异性检测至少一部分多核苷酸的一种或多种引物或探针。试剂盒可包含用于多核苷酸扩增(如PCR)的试剂,或用于探针杂交检测技术(如DNA印迹、RNA印迹、原位杂交或微阵列)的试剂。试剂盒可包括用于抗体结合检测技术(如蛋白质印迹、ELISA、SELDI质谱法或测试条)的试剂。试剂盒可包括用于DNA测序的试剂。试剂盒可包括试剂和使用说明。

[0180] 在一些实施方案中,试剂盒可包括用于所述方法中的一种或多种的说明书。所述试剂盒可用于遗传一致性确定、系统发生研究、基因分型、单倍体分型、谱系分析或植物育种,特别是共显性评分。

[0181] 本公开还提供了对包括如本文所述的多核苷酸的植物、植物细胞或植物材料进行基因分型的方法。基因分型提供了区分染色体对同源物的手段,并且可用于区分植物群体中的分离体。分子标记方法可用于系统发生研究、表征作物品种之间的遗传关系、鉴定杂交或体细胞杂种、定位影响单基因性状的染色体区段、图位克隆和定量遗传研究。基因分型的具体方法可采用任意数目的分子标记分析技术,包含扩增片段长度多态性(AFLP)。AFLP是由多核苷酸变异性引起的扩增片段之间的等位基因差异的产物。因此,本公开进一步提供了使用诸如AFLP分析的技术来追踪一个或多个基因或多核苷酸以及与这些基因或多核

苷酸基因连接的染色体序列的分离的方法。

[0182] 还在以下实例中描述了本发明,提供所述实例以更详细地描述本发明。这些实例阐述目前设想用于进行本发明的优选模式,意图说明而不是限制本发明。

[0183] 实施例

[0184] 用甲磺酸乙酯(EMS)以不同的浓度和暴露时间处理普通烟草AA37的M0种子,以产生具有随机点突变的植物群体。对于每个处理在M1代时估计杀死曲线,连同致死率、能育性和嵌合率。M1植物自花受精产生M2家族的种子,以允许隐性等位基因作为纯合子回收,并且允许致死等位基因作为杂合子回收。提取来自EMS诱变群体的每个家族的八个M2植物的基因组DNA并且筛选突变体,同时收集M2植物材料和M3种子,并且储存用于将来的分析。为了鉴定且表征突变型变体,将来自M2植物的基因组DNA样品按组合并,并且通过靶向基因片段的测序进行筛选。使用表2中示出的烟草NIA2基因特异性引物来扩增靶基因片段。通过测序个别DNA片段检索靶基因中的突变。烟草NIA2突变M527I描述于表1中。将突变型植物与AA37野生型和自交的杂合F1杂交。通过定量核酸扩增法(TaqMan)分析F2分离体。

[0185] 在田间试验中,针对5种外分离纯合野生型品系和未经受EMS处理的1种AA37对照品系,测试了三种NIA2 M527I纯合突变品系。田地设计显示了随机分布的20个植物地块中的植物,以最小化由于田地不均匀性而引起的位置效应。植物根据瑞士标准“good agricultural practices for burley tobacco(白肋烟的良好农业实践)”来种植。在收获时,测量总的鲜叶生物量。叶植物生物量测量通过在收获时将叶切割并且记录叶的鲜重来进行。

[0186] 然后将来自第二次收获的叶(茎中间位置)晾干,并且经由标准Skalar方法分析样品的化学概况。

[0187] 结果在图2中报告。突变型植物品系NtNIA2 M527在田间试验中证实,与外分离野生型对照植物相比,干制叶中的硝酸盐水平降低37%。没有观察到对植物总收获生物量(以每株植物的鲜叶生物量表示)和对烟碱、总生物碱、氨和还原糖的叶含量的影响。

[0188] 在本文中引用的或描述的任何出版物都提供了在本申请的提交日期之前公开的有关信息。本文中的陈述不应解释为承认发明人丧失先于这样的公开的资格。在上面的说明书中提及的所有出版物都通过引用并入本文。在不脱离本发明的范围和精神的情况下,本发明的各种修改和变化对于所属领域的技术人员来说将是显而易见的。尽管已经结合特定优选实施方案来描述本发明,但应理解,如所要求的本发明不应不恰当地限于此类特定实施方案。实际上,对于细胞生物学、分子生物学和植物生物学或相关领域的技术人员显而易见的用于实现本发明的所描述模式的各种改进旨在属于权利要求书的范围内。

[0189] 序列表

[0190] SEQ ID NO:1普通烟草的硝酸盐还原酶NIA2基因的野生型多肽序列,GenBank登录号X14059。充当用于结合负责NtNIA2氨基酸S523磷酸化的硝酸盐还原酶激酶的认识位点的序列以粗体和下划线突出显示。

[0191]

MAASVENRQFSHLEAGLSRSFKPRSDSPVRGCNFPSPNSTNFQKK
PNSTIYLDYSSSEDDDDDDDEKNEYLQMIKKGNSELEPSVHDTRDEGT
ADNWIERNFSMIRLTGKHPFNSEPLNRLMHHGFITPVPLHYVRNHGP
VPKGTWDDWTVEVTGLVKRPMKFTMDQLVNEFPCREL PVTLCAG
NRRKEQNMVKQTIGFNWGAAAVSTTIWRGVPLRALLKRCGVFSKNK
GALNVCFEGADVLPGGGGSKYGTSIKKEFAMDPARDIIVAYMQNGE
KLAPDHGFPVRMIIPGFIGGRMVKWKRIIVTTQESDSYYHFKDNRVL
PPHVDAELANTEAWWYKPEYIINELNINSVITTPCHEEILPINAWTTQR
PYTLRGYSYSGGGKKVTRVEVTLDGGETWQVSTLDHPEKPTKYGKY
WCWCFWSLEVEVLDLLSAKEIAVRAWDETLNTQPEKLIWNVMGMM
NNCWFRVKMNVCKPHKGEIGIVFEHPTQPGNQSGGWMakerHLEIS
AEAPQT**LKKSISTPFM**NTASKMYSMSEVRKHSSADSAWIIVHGHYD
ATRFLKDHPGGTDSILINAGTDCTEEFDAIHSDKAKKLLDFRIGELIT
TGYTSDSPGNSVHGSSSFSSFLAPIKELVPAQRSVALIPREKIPCKLIDK
QSISHDVRKFRFALPSEDQVLGLPVGKHIFLCAVIDDKLCMRAYTPTS
TIDEVGYFELVVKIYFKGIHPKFPNGGQMSQYLDSMPLGSFLDVKGPL
GHIEYQGKGNFLVHGKQKFAKKLAMIAGGTGITPVYQVMQAILKDP
EDDTEMYVVYANRTEDDILLKEELDSWAEKIPERVKVWYVVQDSIK
EGWKYSIGFITEAILREHIPEPSHTTLALACGPPPMIQFAVNP NLEKMG
YDIKDSLLVF

[0192] SEQ ID NO:2普通烟草的硝酸盐还原酶NIA2基因的野生型多核苷酸序列,GenBank
登录号X14059。充当用于结合负责NtNIA2氨基酸S523磷酸化的硝酸盐还原酶激酶的识别位
点的序列以粗体和下划线突出显示。

1 tacatacaag ggcgcgaata aactttttt aaagtaaatg tatatgaact tgcaatgaaa
61 gaggacctta acttgttgt cttgttgc tctgcaaat ttcacctaa cagcccattt
121 gagattgatt tagttagtta taacaattag ttaaatgctt gtgtaattg aagaaaatat
181 ttggacgtgc tcgctgaaaa cattatactc ctatataata gaaatacttt ctgaaaagt
241 ggtcttgctc aaaaacgtat aagagagttg gtcttctcat aatagtcac tagctttctg
301 attttttc actttctata tcacgtaaat aggtactcaa attgatatt tacaccaaac
361 aatgaaaat aggatattg ttttcatac gtatattat ctactgtact taatgataca
421 tacatataca tataacctta cttttgatt actaaaaatt taattatatt taattgggt
481 aatatcaga tgccacaaaa catttaccta gccactgitt ttgactacta aaaatattat
541 tatgtttage ttgggtaaat atcagatgct actaaacatt ttacctagcc attcctccga
601 aaagaaattg agaaggaaat tagagttagt ggagccataa taatgttaa tgtgaccata
661 actcggtgaa aaccacggca agaataagaa acagctgta aggctaacca
acagctgcat
721 atcttaage cattgctat taceccaaca tcgcatctc ctctgatccc gacctacgg
781 gcgtaaaaag tgtaaatcgt tagaattgtt ttattattt tatgatgca ctattttta
841 aatcaaaat taaattgggg tctcatttt ttgggtcct gcttatgat agtatggcgc
[0193] 901 tatggaggca ctgagagagt ccgaaacgtt tctatataag gccacccac
gcattcacia
961 actcgttc caaacagaac aagaaaatca aatctcggag agagagagag
agaaatatt
1021 tgagagagaa atacagaaaa tctctcttc tctttcctt tttttcaa tccccattca
1081 tattctttt ttagaataat ctatggcggc atctgtcgaa aacaggcagt tcagtcacct
1141 agaagccggt ttatccggt cttcaagcc ccggtctgat tccccggtc
gtggctgcaa
1201 ctcccttcg cccaacagta ctaattcca aaagaaacca aattcacca ttacctga
1261 ttactcgtc agtgaagacg acgatgatga tgacgaaaaa aatgagtacc
ttcaaatgat
1321 taaaaaggg aattcagagt tagagccatc tgtcatgac actagggacg
aaggtaccgc
1381 tgataattgg attgaacgca actttccat gattcgtctc accggaaagc atccattaa
1441 ctccgaacca ccgtgaacc ggtcctgca ccacggctt atcacaccg
tcccattca

1501 ttacgttcgt aaccatggac cggttcccaa gggcacgtgg gatgactgga
 ccgtggaagt
 1561 cacgggacta gtgaagcgtc ctatgaaatt cacaatggac cagttggta
 acgaattccc
 1621 ttgtagagaa ttgcccgtta cgcttgttg tgctggcaat cgaaggaaag
 aacagaacat
 1681 ggtaaacia accattgggt tcaactgggg cgccgctgcc gttcaacia
 cgatatggcg
 1741 cggggtacce ctccgcgctt tgctaaaacg gtgcggtgtt ttagcaaga
 ataaaggggc
 1801 gcttaatgtt tgcttcaag gagctgatgt gttgcccgga ggtggtggt
 caaagtatgg
 1861 aaccagcatt aagaaggaat ttgcaatgga tccagcacga gatatcatg
 tagcctacat
 1921 gcagaacgga gaaaaattgg cacccgacca cgggttcca gtacgaatga
 taattccagg
 [0194] 1981 attcattgga ggaagaatgg tgaatggat aaagaggatt atagtcacca
 cccaagaatc
 2041 agacagctat taccattca aggacaatag agttcttct cccatggtg atgctgaact
 2101 tgcaataacc gaaggtacgt accgtaacta ttcaattta ttaactcatt tgtccaatt
 2161 tatgtgaacc tatttcttt ttggtccgtt caaaaaagaa tgaaccttt ctaaattgg
 2221 taacaattta gcttaaactt acaactcac cctaatgag aaactttat aaccacaaa
 2281 ataccctggg gccatttgg actgttttag gtcgacaaat tcaaaaagt tttttttt
 2341 cttaaacttc gtgtcagtc aacaggttc acgtaaattg aaacggagag agtatcatt
 2401 ttattaaggg gtataaatat atttaatta gttgagactt gcacatacaa gtaaatatt
 2461 tcttagaata caaatcaac tgaagctta cttaatta tatggtttg aatttctt
 2521 tcaatgaagt aaataaaaag gaaacaatta tattcaacgc atgtaggtat atggtctgt
 2581 cattatctca aatcaaatgg ttaagaca aaggacttg gaaacataga attgtcagct
 2641 ttatagttat ggagtactat attagttagc tgtttgcatc tattcataat tggctctat
 2701 gtgtgcagca tgggtgtaca agccagagta tcatcaat gagcttaata ttaactctg
 2761 cattacgacg ccgtgtcatg aagaaatft gccaatnac gctggacga
 ctcagcgacc
 2821 ttacacgttg agggctatt ctattctgg ttagtattt tatatttcc gattttgctg
 2881 agaatacat atttctagt tttgtgata catgatatcc ttaactctg acgtttact

2941 tcgtccttat gcaccactt acgtccttac ttctcagac agtttattga tgaaaactac
 3001 ttactatfff cgaccgata gcctcagcgt ccttaattaa atgtgatggt ttgaaagaga
 3061 tattctctcc cgtctatfff aattaatfff tggctgffff tatacgtggg aatctatfff
 3121 taacattaat taatatagaa atgaaccata ttaatattat taattcttc attgaaaata
 3181 caacaaatac tcttcggctc ttactacaat gacaatfff aagaaaaata attaattcct
 3241 tctaataatc tgaaaaatca aatattgtgg accataaaaa aaggtaaaaa aattaattaa
 3301 aatgaactgg agagagtaaa ttgaaaaata taattatagc actagtaatt aaagtatta
 3361 gatgtcttct ttaaaaagcg tgtgaaaact taaagacga aatataatat gaatattatc
 3421 taatacttag aaagtgtcaa taattggtag acaatftaaa ctatatacta gtaaaaaagt
 3481 ctgtcaatac aactattagt attggggatt agagagaata gtagtaaaat ggagtaattg
 3541 gacgcatgag cttgggcatg ctgattgctg tcagcttgtt tgctaattgt
 aaaaagaaaa
 3601 tagtaagaaa aggccaacat ggttttgttt atttattat gtggtagtac acaaaaacct
 3661 ggggagcttt cctagttctg aagagtcggt ctttggtagc acaaaaattaa tagtatagta
 3721 taccaagtga atattaaatt caattgtcta aagcacggaa tcttttgac tactttagtt
 3781 cctgcatctt gggttgctc aacaacacce ttattgaat tattatagta atgttcaata
 3841 taatatacaa ttgaaaaaca ctctaagtgg tcactttata tggatctagt caatactatt
 3901 tcttetaaac aacgtgctc attacttccc actttccagt acatgaccac cattaagttt
 3961 aatftttgtc aattccttgt gcaattggcc ctcaaatga gcagaagtgt tacgtaggaa
 4021 aactaactc agctactatt ataggagtaa acctgttagg aaaagatgct
 cgaggaactg
 4081 acaaaactg tagaataatt agccattgta ttgattgaaa tactgattgt gaacgtgtaa
 4141 caaacaggcg gagggaaaaa agtaacgca gtagaagtga cgttgatgg
 aggagaaaca
 4201 tggcaagtta gcacactaga tcaccagag aagcccacca aatatggcaa
 gtactggtgt
 4261 tgggtctfff ggtcactcga ggttgaggtg ttgacttgc tcagtctaa agaaattgct
 4321 gttcgagctt gggatgagac cctcaatact caaccgaga agcttattg
 gaacgtcatg
 4381 gtacgttca tcttctfff acctttatt ctttaactt ctatatacta gcggtgtaaa
 4441 gttatfttac accataagtt aacttcaaaa aatatgtaac tatttatact acgagtgatg
 4501 agggcaagaa ggggtttaag tatttgacaa taaatgtaaa ccctgcaatt ttgttctaa
 4561 tttttatcc tttcaactc ttgtgattgc ttattatct agattcacag agcacatggt
 4621 ttcacatgcc aaaacaaaa actacaaaca aaaaaactt tcaactagct tagtctaaga

[0195]

4681 ttccccttt ttttttggg aggtgtgtg tccatactcc atagatcaat tccagccact
 4741 gacgtaccaa accctgaaaa ttctagtag ttatagegac gtacaatcat ttcattat
 4801 gtaagcagag acgtgatcac atgaactaga tgtgaatacc acttgcccag
 tccaccaggt
 4861 caattcatct agatgtgtaa atcttgacac cagcactggg tcaactttat aacactagca
 4921 ttaacaaca ttcatcctt gaacattact tgggctaatt aataagtatt tttttata
 4981 tactctaaaa attgtaatta cataaatgaa ttaacttat acacgctgac aatgttacta
 5041 attccacttt ttacggacgg ttatctatag aatcattta ggtgaaacaa ttctettaca
 5101 ctatgatcag tgtagtaca taatggttat tacattttct aatattgtg ctatgttga
 5161 atgttcaggg aatgatgaat aattgctggt tccagataaa gatgaatgtg
 tgcaagcctc
 5221 acaagggaga gattggaata gtgttgagc atccgactca acctggaac
 caatcaggtg
 5281 gatggatggc gaaggagaga catttgaga taccagcaga ggcacctcaa
 aactaaaga
 5341 agagtatctc aactcattc atgaacacag cttccaagat gtactccatg
 [0196] tccgaggtca
 5401 ggaaacacag ctctgetgac tctgcttga tcatagtcca tggatcatc
 tatgacgcca
 5461 cgcgtttctt gaaagatcac cctggtggga ctgacagcat tctcatcaat
 gctggcactg
 5521 attgcaactga ggaattgat gcaattcatt ctgataaggc taagaagctc ttggaggatt
 5581 tcaggattgg tgaactcata actactggtt acacctetga ctctctggc aactccgtgc
 5641 acggatcttc ttcttcage agctttctag cacctattaa ggaacttgtt ccagcgcaga
 5701 ggagtgtggc cctaattcca agagagaaaa tccatgcaa actcatcgac
 aagcaatcca
 5761 tctccatga tgtaggaaa ttctgattg cattgccctc tgaggatcaa gtcttgggct
 5821 tgctgttgg aaaacatate ttctctgtg ccgttattga cgataagctc tgcacgagc
 5881 cttacagcc tactagcag atcgatgagg tgggtactt cgagtgggtt
 gtcaagatat
 5941 acttcaaagg aattcacct aattcecca atggaggga aatgtcacag tatcttgatt
 6001 ctatgcegtt agggctcatt ctcgacgtga aaggctcatt aggtcacatt
 gaataccaag

6061 gaaagggaaa tttcttagtt catggcaaac agaagtttgc caagaagttg
 gccatgatag
 6121 caggtggaac aggaataact ccagtgtatc aagtcatgca ggcaattctg
 aaagatccag
 6181 aagatgacac agaaatgtat gtggtgtatg ctaacagaac agaggatgat
 attttactta
 6241 aggaagagct tgattcatgg gctgagaaaa ttccagagag ggttaaagtt
 tggatgtgg
 6301 ttcaggatc tattaagaa ggatggaagt acagcattgg tttattaca gaagccattt
 6361 tgagagaaca taccctgag ccatcaca caaactggc tttgctgtg
 ggaccacctc
 [0197] 6421 ctatgattca atttctgtt aatccaaact tggagaagat gggctatgac attaaggatt
 6481 ccttattggt gttctaatt taaaacaaa acaatatctg caggaataaa tttttttt
 6541 cccctatca gttgtacata ttgtattgg ttatcacc ccatgtacta cgtagtgtt
 6601 gtagttctta cattttatt tttagaatt ttttaaacc ttaggatata aaggtttct
 6661 ctccaacaa agtgattct tagggaagaa atgtactgta ctgtactagt atgtctaage
 6721 cgaaagttgt aatgttacc atgacaaatt gtattcaatt cctcatggaa tagtaacatt
 6781 gtgttcatgt gtcttctgt aagcgatctt caaataatca atgtatat atagtaattg
 6841 caaacattg ttcctttcc cgatgtagt aactactct tcttagct ctagtctctg
 6901 gtgaatatt ttttctat aactcttaa ttaatacggc cttaaataag agaaaagttt
 6961 aaaccacgaa taccattatg cagacgtata ggtaattaat ctacttttg aaaaaaatc
 7021 tatttctt atgtgtct tcaaaataat attctagaac ctttgtata ttccttta
 7081 acttctatt agttt

[0198] SEQ ID NO:3普通烟草的硝酸盐还原酶NIA2基因的突变型多肽序列。在用于结合硝酸盐还原酶激酶的识别位点中的突变多肽以粗体和下划线突出显示。

MAASVENRQFSHLEAGLSRSFKPRSDSPVRGCNFPSPNSTNFQKK
 PNSTIYLDYSSSEDDDDDEKNEYLQMIKKGNSELEPSVHDTRDEGT
 ADNWIERNFSMIRLTGKHPFNSEPLNRLMHHGFITPVPLHYVRNHGP
 [0199] VPKGTWDDWTVEVTGLVKRPMKFTMDQLVNEFPCRELPTLV CAG
 NRRKEQNMVKQTIGFNWGA AVSTTIWRGVPLRALLKRCGVFSKNK
 GALNVCFEGADVLPGGGSKYGTSIKKEFAMDPARDIIVAYMQNGE
 KLAPDHGFPVRMIIPGFIGGRMVKWKRIIVTTQESDSYYHFKDNRVL

PPHVDAELANTEAWWYKPEYIINELNINSVITTPCHEEILPINAWTTQR
 PYTLRGYSYSGGGKKVTRVEVTLDDGGETWQVSTLDHPEKPTKYGKY
 WCWCFWSLEVEVLDLLSAKEIAVRAWDETLNTQPEKLIWNVMGMM
 NNCWFRVKMNVCKPHKGEIGIVFEHPTQPGNQSGGWMakerHLEIS
 AEAPQTLKKSISTPFINTASKMYSMSEVRKHSSADSAWIIVHGHYDA
 TRFLKDHPGGTDSILINAGTDCTEEFDAIHSDKAKKLEDFRIGELITT
 [0200] GYTSDSPGNSVHGSSSFSSFLAPIKELVPAQRSVALIPREKIPCKLIDKQ
 SISHDVRKFRFALPSEDQVLGLPVGKHIFLCAVIDDKLCMRAYTPTSTI
 DEVG YFELVVKIYFKGIHPKFPNGGQMSQYLDSMPLGSFLDVKGPLG
 HIEYQGKGNFLVHGKQKFAKKLAMIAGGTGITPVYQVMQAILKDPE
 DDTEMYVVYANRTEDDILLKEELDSWAEKIPERVKVWYVVQDSIKE
 GWKYSIGFITEAILREHIPEPSHTTLALACGPPPMIQFAVNP NLEKMGY
 DIKDSLLVF

[0201] SEQ ID NO:4普通烟草的硝酸盐还原酶NIA2基因的突变型多核苷酸序列。充当用于结合负责NtNIA2氨基酸S523磷酸化的硝酸盐还原酶激酶的识别位点的序列以粗体突出显示。g到a的突变以下划线标出。

1 tacatacaag ggcgcgaata aactttttt aaagtaaatg tatatgaact tgcaatgaaa
 61 gaggacctta acttgttgt cttgttget ttctgcaaat ttcacctaa cagcccattt
 121 gagattgatt tagttagtta taacaattag ttaaatgctt gtgtaatttg aagaaaatat
 181 ttggacgtgc tcgctgaaaa cattatactc ctatataata gaaatacttt ctgaaaagt
 241 ggtcttgctc aaaaacgtat aagagagttg gtcttctcat aaatagtcac tagctttctg
 301 attttttctc actttctata tcacgtaaat aggtactcaa attgatatt tacaccaaac
 361 aatgaaaat aggatatttg ttttcatac gtatattat ctactgtact taatgataca
 421 tacatataca tataacctta cttttgatt actaaaaatt taattatatt taattgggt
 481 aaatatcaga tgccacaaaa catttaccta gccactgitt ttgactacta aaaattaat
 [0202] 541 tatgttttagc ttgggtaaat atcagatgct actaaacatt ttacctagcc attcctccga
 601 aaagaaattg agaaggaaat tagagttagt ggagccataa taatgtttaa tgtgaccata
 661 actcggtgaa aaccacggca agaataagaa acagctgta aggctaacca
 acagetgcat
 721 atctttaagc catttgctat tacccecaaca tcgcatcttc ctctgatecc gaccctacgg
 781 gcgtaaaaag tgtaaatcgt tagaattggt ttatttatt tatgatgtca ctattttta
 841 aatcaaaat taaattgggg tctcatttt tttgggtcct gcttatgtat agtatggcgc
 901 tatggaggca ctgagagagt ccgaaacgtt tctatataag gccacccac
 gcattcacia

961 acttcgtcc caaacagaac aagaaatca aatctcggag agagagagag
 agaaatatt
 1021 tgagagagaa atacagaaaa tctctctcc ttcttctt ttttttcaa tccccattca
 1081 tattctttt ttagaataat ctatggcggc atctgtcgaa aacaggcagt tcagtcacct
 1141 agaagccggt ttatcccgtt cttcaagcc cgggtctgat tccccggtc
 gtggctgcaa
 1201 ctcccttcg cccaacagta ctaattcca aaagaaacca aattccacca ttaccttga
 1261 ttactcgtcg agtgaagacg acgatgatga tgacgaaaa aatgagtacc
 ttcaaatgat
 1321 taaaaaaggg aattcagagt tagagccatc tgttcatgac actagggacg
 aaggtaccgc
 1381 tgataattgg attgaacgca acttttccat gattegtctc accggaaage atccatttaa
 1441 ctccgaacca ccgttgaacc ggctcatgca ccacggcttt atcacaccgg
 tcccacttca
 1501 ttacgttcgt aaccatggac cggttcccaa gggcacgtgg gatgactgga
 ccgtggaagt
 [0203] 1561 cacgggacta gtgaagcgtc ctatgaaatt cacaatggac cagttggta
 acgaattccc
 1621 ttgtagagaa ttgcccgtta cgcttgtttg tgctggcaat cgaaggaaag
 aacagaacat
 1681 ggtaaacia accattggtt tcaactgggg cgccgctgcc gttcaacia
 cgatatggcg
 1741 cggggtacc ctccgcgctt tgctaaaacg gtgcggtggt ttagcaaga
 ataaaggggc
 1801 gcttaatgtt tgcttcaag gagctgatgt gttgcccgga ggtggtggt
 caaagtatgg
 1861 aaccagcatt aagaaggaat ttgcaatgga tccagcacga gatatcatcg
 tagcctacat
 1921 gcagaacgga gaaaaattgg caccgacca cgggtttcca gtacgaatga
 taattccagg
 1981 attcattgga ggaagaatgg tgaaatggat aaagaggatt atagtcacca
 cccaagaatc
 2041 agacagctat taccattca aggacaatag agttcttct cccatgttg atgctgaact
 2101 tgcaaatacc gaaggtacgt accgtaacta ttcaattta ttactcatt tgttccaatt

2161 tatgtgaacc tatttccttt ttggtccgtt caaaaaagaa tgaacccttt ctaaatttgg
 2221 taacaattta gcttaaacctt acaacttcac ccttaatgag aaacttttat aaccacacaa
 2281 ataccctggg gccatttgg acttgtttag gtcgacaaat tccaaaagtt ttatTTTTT
 2341 cttaaacttc gtgtcagtc aaacaggttc acgtaaattg aaacggagag agtatcattt
 2401 ttattaaggg gtataaatat attttaatta gttgagactt gcacatacaa gtaaaatatt
 2461 tcttagaata caaaatcaac tgaagctta cttctaatta tatggTTTT aatttctct
 2521 tcaatgaagt aaataaaaag gaaacaatta tattcaacgc atgtaggtat atggctctgt
 2581 cattatctca aatcaaatgg tttaaagaca aaggactttg gaaacataga attgtcagct
 2641 ttatagtat ggagtactat attagttage tgtttgcate tattcataat tggctctatc
 2701 gtgtgcagca tgggtgtaca agccagagta tatcatcaat gagcttaata ttaactctgt
 2761 cattacgacg ccgtgtcatg aagaaatttt gccaat AAC gcctggacga
 ctcagcgacc
 2821 ttacacgttg aggggctatt cttattctgg ttagtatttt tatattttcc gattttgctg
 2881 agaatacat atttcttagt tttgtcgata catcgtatcc tctaactctg acgttttact
 2941 tegtcttat gcaccactt acgtcttac tttctcagac agtttattga tgaaaactac
 3001 ttactatttt cgaccgata gccctcagct ccttaattaa atgtgatgtt ttgaaagaga
 [0204] 3061 tattctctcc cgtctatttt aattaatttt tggctgtttt tatacgtggg aatctatttt
 3121 taacattaat taatatacaa atgaaccata ttaatattat taatttcttc attgaaaata
 3181 caacaaatac tcttcggctc ttactacaat gacaattttg aagaaaaata attaattcct
 3241 tctaataatc tgaaaaatca aatattgtgg accataaaaa aaggtcaaaa aattaattaa
 3301 aatgaactgg agagagtaaa ttagaaaata taattatagc actagtaatt aaagttatta
 3361 gatgtcttct ttaaaaagcg tgtgaaaact ttaaagacga aatataatat gaatattatc
 3421 taatacttag aaagtgtcaa taattggtag acaatttaaa ctatatacta gttaaaaagt
 3481 ctgtcaatac aactattagt attggggatt agagagaata gtagtaaaat ggagtaattg
 3541 gacgcatgag cttgggcatg ctgattgctg tcagcttgtt tgctaatgtg
 aaaaagaaaa
 3601 tagtaagaaa aggccaacat ggTTTTgttt atttattat gtggtagtac aaaaaacct
 3661 ggggagcttt ctagttctg aagagtcggt ctttggtagc acaaaattaa tagtatagta
 3721 taccaagtga atattaaatt caattgtcta aagcacggaa tcttttgac tactttagtt
 3781 cctgcatctt gggttgcctc aacaacacce ttattgaat tattatagta atgttcaata
 3841 taatatacaa ttagaaaaca ctctaagtgg tcactttata tggatctagt caatactatt
 3901 tcttctaaac aacgtgccta attactccc actttccagt acatgaccac cattaagttt
 3961 aattttgtc aattccttgt gcaattggcc ctcaaatga gcagaagtgt tacgtaggaa

4021 aactaactc agctactatt ataggagtaa acctgtagg aaaagatgct
 cgaggaactg
 4081 acaaaactg tagaataatt agccattgta ttgattgaaa tactgattgt gaacgtgtaa
 4141 caaacaggcg gagggaaaaa agtaacgcga gtagaagtga cgttggatgg
 aggagaaaca
 4201 tggcaagtta gcacactaga tcaccagag aagcccacca aatatggcaa
 gtactggtgt
 4261 tggcgcttt ggtcactcga ggttgagggtg ttagacttgc tcagtgctaa agaaattgct
 4321 gtctgagctt gggatgagac cctcaatact caaccgaga agcttatttg
 gaacgtcatg
 4381 gtacgttcac ttctctttt acctttattt cttttaactt ctatatacta gcggtgtaaa
 4441 gttattttac accataagt aacttaca aaatagtac tatttatact acgagtgatg
 4501 agggcaagaa ggggttaag tatttgacaa taaatgtaa ccctgcaatt ttgtctca
 4561 tttttatcc ttcaactct ttgtattgc tcattatct agattcacag agcacatgtg
 4621 ttcacatgcc aaaacaaaa actacaaaca aaaaaactt tcactagctt tagtctaaga
 4681 tcccccttt ttttttggg aggtgtgtgg tccatactcc atagatcaat tccagccact
 4741 gacgtacca accctgaaaa ttctagtag ttatagcgac gtacaatcat tcatattat
 4801 gtaagcagag acgtgatcac atgaactaga tgtgaatacc acttgcccag
 tccaccaggt
 4861 caatcatct agatgtgtaa atcttgacac cagcactggg tcaactttat aacactagca
 4921 ttaacaaca tttcatcctt gaacattact tgggctaatt aataagtatt tttttata
 4981 tactctaaaa attgtaatta cataaatgaa ttaacttat acacgctgac aatgttacta
 5041 attccacttt ttacggacgg ttatctatag aaatcattta ggtgaaacaa ttctcttaca
 5101 ctatgatcag tgtagtaca taatggttat tacattttct aaatattgtg ctatgttgea
 5161 atgttcaggg aatgatgaat aattgctggt tccagtaaa gatgaatgtg
 tgcaagcctc
 5221 acaagggaga gattggaata gtgtttgagc atccgactca acctggaac
 caatcaggtg
 5281 gatggatggc gaaggagaga catttgaga tatcagcaga ggcacctcaa
 aactaaaga
 5341 agagtatctc **aactccatte** **ataaacacag** **cttccaagat** gtactccatg
 tccgaggtca
 5401 ggaaacacag ctctgctgac tctgcttga tcatagtcca tggctatate
 tatgacgcca

[0205]

5461 cgcgtttctt gaaagatcac cctgggtgga ctgacagcat tctcatcaat
 gctggcactg
 5521 attgcaactga ggaatttgat gcaattcatt ctgataaggc taagaagctc ttggaggatt
 5581 tcaggattgg tgaactcata actactgggt acacctctga ctctctggc aactccgtgc
 5641 acggatctc ttccttcage agctttctag cacctattaa ggaacttggt ccagcgcaga
 5701 ggagtgtggc cctaattcca agagagaaaa tcccatgcaa actcatcgac
 aagcaatcca
 5761 tctcccatga tgttaggaaa ttctgattg cattgcctc tgaggatcaa gtcttgggct
 5821 tgctgttg aaaacatate ttctctgtg cctgtattga cgataagctc tgcatgcgcg
 5881 cttacacgcc tactagcacg atcgatgagg tggggtactt cgagtgtgtt
 gtcaagatat
 5941 acttcaaagg aattcacct aaattcecca atggagggca aatgacacag tatcttgatt
 6001 ctatgccgtt agggtcatt ctcgacgtga aaggccatt aggtcacatt
 gaataccaag
 6061 gaaagggaaa ttcttagtt catggcaaac agaagttgc caagaagttg
 gccatgatag
 [0206] 6121 caggtggaac aggaataact ccagtgtatc aagtcatgca ggcaattctg
 aaagatccag
 6181 aagatgacac agaaatgtat gtggtgtatg ctaacagaac agaggatgat
 atttactta
 6241 aggaagagct tgattcatgg gctgagaaaa ttccagagag ggttaaagtt
 tggatgtgg
 6301 ttcaggatc tattaaagaa ggatggaagt acagcattgg tttattaca gaagccattt
 6361 tgagagaaca taccctgag ccatctaca caaactggc tttggctgtg
 ggaccacctc
 6421 ctatgattca attgctgtt aatccaaact tggagaagat gggctatgac attaaggatt
 6481 ccttattgt gtctaat taaaacaaa acaatatctg caggaataaa tttttttt
 6541 cccctatca gttgtacata ttgtattgg ttatcacc ccatgtacta cgtagtgtt
 6601 gtagttctta cattttatt tttagaatt ttttaaacc ttaggatata aaggtttct
 6661 ctccaacaa agtgattct tagggaagaa atgtactgta ctgtactagt atgtctaage
 6721 cgaaagttgt aatgttacc atgacaaatt gtattcaatt cctcatggaa tagtaacatt
 6781 gtgttcatgt gtctctgt aagcattct caaataatca atgtatata atagtaattg
 6841 caaacattg ttcctttcc cgatgtagt aactactct tcttagct ctagtctctg
 6901 gtgaatatt ttttctat aactcttaa ttaacggc cttaataag agaaaagtt

6961 aaaccacgaa taccattatg cagacgtata ggtaattaat ctactttttg aaaaaaaatc

[0207] 7021 tattttcttt atgtggctct tcaaaataat attctagaac cttttgtata tccctttta
7081 acttctattt agtttt

[0208] SEQ ID NO:5充当用于结合负责NtNIA2氨基酸S523磷酸化的硝酸盐还原酶激酶的识别位点的多肽序列,所述NtNIA2氨基酸S523来自普通烟草的硝酸盐还原酶NIA2基因的野生型多肽序列,GenBank登录号X14059。

[0209] LK(K或R) (S或T) (I或V或A)S(T或S)PFM

[0210] SEQ ID NO:6SEQ ID NO:5的突变型多肽序列。

[0211] LK(K或R) (S或T) (I或V或A)S(T或S)PFI

[0212] SEQ ID NO:7充当用于结合负责NtNIA2氨基酸S523磷酸化的硝酸盐还原酶激酶的识别位点的野生型多肽序列,所述NtNIA2氨基酸S523来自普通烟草的硝酸盐还原酶NIA2基因的野生型多肽序列,GenBank登录号X14059。

[0213] LKKSISTPFM

[0214] SEQ ID NO:8(SEQ ID NO:7的突变型多肽序列) . .

[0215] LKKSISTPFI

[0216] 表1

[0217] NtNIA2 M527I突变细节

突变体	突变之前的序列	突变之后的序列	原始密码子	原始氨基酸	突变密码子	突变氨基酸
M527I	ctccattcat	aacacagctt	atG	Met	atA	Ile

[0219] 示出了突变NtNIA2 M527I的序列信息。第二列和第三列示出了紧接在突变核苷酸之前的10个核苷酸,以及在突变核苷酸之后的10个核苷酸。第四列和第五列(分别)报告了原始密码子和氨基酸,如野生型序列中的那些。最后两列(分别)报告了突变序列中的密码子和氨基酸。G到A的突变以粗体和下划线标出。

[0220] 表2

[0221] NtNIA2特异性引物细节

引物	序列5'至3'
NIA2正向	CCACTTTTTACGGACGGTTATCT
NIA2反向	GCAAATCGAAATTCCTAACATCAT

[0223] 报告了NtNIA2特异性引物的序列细节。第二列指示引物的DNA序列。

[0001] 序列表
 [0002] <110> Philip Morris Products S.A.
 [0003] <120> 经由硝酸盐还原酶的突变来调节植物中的硝酸盐水平
 [0004] <130> P10597EP
 [0005] <160> 13
 [0006] <170> PatentIn版本3.5
 [0007] <210> 1
 [0008] <211> 904
 [0009] <212> PRT
 [0010] <213> 普通烟草(Nicotiana tabacum)
 [0011] <400> 1
 [0012] Met Ala Ala Ser Val Glu Asn Arg Gln Phe Ser His Leu Glu Ala Gly
 [0013] 1 5 10 15
 [0014] Leu Ser Arg Ser Phe Lys Pro Arg Ser Asp Ser Pro Val Arg Gly Cys
 [0015] 20 25 30
 [0016] Asn Phe Pro Ser Pro Asn Ser Thr Asn Phe Gln Lys Lys Pro Asn Ser
 [0017] 35 40 45
 [0018] Thr Ile Tyr Leu Asp Tyr Ser Ser Ser Glu Asp Asp Asp Asp Asp Asp
 [0019] 50 55 60
 [0020] Glu Lys Asn Glu Tyr Leu Gln Met Ile Lys Lys Gly Asn Ser Glu Leu
 [0021] 65 70 75 80
 [0022] Glu Pro Ser Val His Asp Thr Arg Asp Glu Gly Thr Ala Asp Asn Trp
 [0023] 85 90 95
 [0024] Ile Glu Arg Asn Phe Ser Met Ile Arg Leu Thr Gly Lys His Pro Phe
 [0025] 100 105 110
 [0026] Asn Ser Glu Pro Pro Leu Asn Arg Leu Met His His Gly Phe Ile Thr
 [0027] 115 120 125
 [0028] Pro Val Pro Leu His Tyr Val Arg Asn His Gly Pro Val Pro Lys Gly
 [0029] 130 135 140
 [0030] Thr Trp Asp Asp Trp Thr Val Glu Val Thr Gly Leu Val Lys Arg Pro
 [0031] 145 150 155 160
 [0032] Met Lys Phe Thr Met Asp Gln Leu Val Asn Glu Phe Pro Cys Arg Glu
 [0033] 165 170 175
 [0034] Leu Pro Val Thr Leu Val Cys Ala Gly Asn Arg Arg Lys Glu Gln Asn
 [0035] 180 185 190
 [0036] Met Val Lys Gln Thr Ile Gly Phe Asn Trp Gly Ala Ala Ala Val Ser
 [0037] 195 200 205
 [0038] Thr Thr Ile Trp Arg Gly Val Pro Leu Arg Ala Leu Leu Lys Arg Cys
 [0039] 210 215 220
 [0040] Gly Val Phe Ser Lys Asn Lys Gly Ala Leu Asn Val Cys Phe Glu Gly
 [0041] 225 230 235 240

[0042]	Ala Asp Val Leu Pro Gly Gly Gly Gly Ser Lys Tyr Gly Thr Ser Ile
[0043]	245 250 255
[0044]	Lys Lys Glu Phe Ala Met Asp Pro Ala Arg Asp Ile Ile Val Ala Tyr
[0045]	260 265 270
[0046]	Met Gln Asn Gly Glu Lys Leu Ala Pro Asp His Gly Phe Pro Val Arg
[0047]	275 280 285
[0048]	Met Ile Ile Pro Gly Phe Ile Gly Gly Arg Met Val Lys Trp Ile Lys
[0049]	290 295 300
[0050]	Arg Ile Ile Val Thr Thr Gln Glu Ser Asp Ser Tyr Tyr His Phe Lys
[0051]	305 310 315 320
[0052]	Asp Asn Arg Val Leu Pro Pro His Val Asp Ala Glu Leu Ala Asn Thr
[0053]	325 330 335
[0054]	Glu Ala Trp Trp Tyr Lys Pro Glu Tyr Ile Ile Asn Glu Leu Asn Ile
[0055]	340 345 350
[0056]	Asn Ser Val Ile Thr Thr Pro Cys His Glu Glu Ile Leu Pro Ile Asn
[0057]	355 360 365
[0058]	Ala Trp Thr Thr Gln Arg Pro Tyr Thr Leu Arg Gly Tyr Ser Tyr Ser
[0059]	370 375 380
[0060]	Gly Gly Gly Lys Lys Val Thr Arg Val Glu Val Thr Leu Asp Gly Gly
[0061]	385 390 395 400
[0062]	Glu Thr Trp Gln Val Ser Thr Leu Asp His Pro Glu Lys Pro Thr Lys
[0063]	405 410 415
[0064]	Tyr Gly Lys Tyr Trp Cys Trp Cys Phe Trp Ser Leu Glu Val Glu Val
[0065]	420 425 430
[0066]	Leu Asp Leu Leu Ser Ala Lys Glu Ile Ala Val Arg Ala Trp Asp Glu
[0067]	435 440 445
[0068]	Thr Leu Asn Thr Gln Pro Glu Lys Leu Ile Trp Asn Val Met Gly Met
[0069]	450 455 460
[0070]	Met Asn Asn Cys Trp Phe Arg Val Lys Met Asn Val Cys Lys Pro His
[0071]	465 470 475 480
[0072]	Lys Gly Glu Ile Gly Ile Val Phe Glu His Pro Thr Gln Pro Gly Asn
[0073]	485 490 495
[0074]	Gln Ser Gly Gly Trp Met Ala Lys Glu Arg His Leu Glu Ile Ser Ala
[0075]	500 505 510
[0076]	Glu Ala Pro Gln Thr Leu Lys Lys Ser Ile Ser Thr Pro Phe Met Asn
[0077]	515 520 525
[0078]	Thr Ala Ser Lys Met Tyr Ser Met Ser Glu Val Arg Lys His Ser Ser
[0079]	530 535 540
[0080]	Ala Asp Ser Ala Trp Ile Ile Val His Gly His Ile Tyr Asp Ala Thr
[0081]	545 550 555 560
[0082]	Arg Phe Leu Lys Asp His Pro Gly Gly Thr Asp Ser Ile Leu Ile Asn
[0083]	565 570 575

[0084]	Ala Gly Thr Asp Cys Thr Glu Glu Phe Asp Ala Ile His Ser Asp Lys
[0085]	580 585 590
[0086]	Ala Lys Lys Leu Leu Glu Asp Phe Arg Ile Gly Glu Leu Ile Thr Thr
[0087]	595 600 605
[0088]	Gly Tyr Thr Ser Asp Ser Pro Gly Asn Ser Val His Gly Ser Ser Ser
[0089]	610 615 620
[0090]	Phe Ser Ser Phe Leu Ala Pro Ile Lys Glu Leu Val Pro Ala Gln Arg
[0091]	625 630 635 640
[0092]	Ser Val Ala Leu Ile Pro Arg Glu Lys Ile Pro Cys Lys Leu Ile Asp
[0093]	645 650 655
[0094]	Lys Gln Ser Ile Ser His Asp Val Arg Lys Phe Arg Phe Ala Leu Pro
[0095]	660 665 670
[0096]	Ser Glu Asp Gln Val Leu Gly Leu Pro Val Gly Lys His Ile Phe Leu
[0097]	675 680 685
[0098]	Cys Ala Val Ile Asp Asp Lys Leu Cys Met Arg Ala Tyr Thr Pro Thr
[0099]	690 695 700
[0100]	Ser Thr Ile Asp Glu Val Gly Tyr Phe Glu Leu Val Val Lys Ile Tyr
[0101]	705 710 715 720
[0102]	Phe Lys Gly Ile His Pro Lys Phe Pro Asn Gly Gly Gln Met Ser Gln
[0103]	725 730 735
[0104]	Tyr Leu Asp Ser Met Pro Leu Gly Ser Phe Leu Asp Val Lys Gly Pro
[0105]	740 745 750
[0106]	Leu Gly His Ile Glu Tyr Gln Gly Lys Gly Asn Phe Leu Val His Gly
[0107]	755 760 765
[0108]	Lys Gln Lys Phe Ala Lys Lys Leu Ala Met Ile Ala Gly Gly Thr Gly
[0109]	770 775 780
[0110]	Ile Thr Pro Val Tyr Gln Val Met Gln Ala Ile Leu Lys Asp Pro Glu
[0111]	785 790 795 800
[0112]	Asp Asp Thr Glu Met Tyr Val Val Tyr Ala Asn Arg Thr Glu Asp Asp
[0113]	805 810 815
[0114]	Ile Leu Leu Lys Glu Glu Leu Asp Ser Trp Ala Glu Lys Ile Pro Glu
[0115]	820 825 830
[0116]	Arg Val Lys Val Trp Tyr Val Val Gln Asp Ser Ile Lys Glu Gly Trp
[0117]	835 840 845
[0118]	Lys Tyr Ser Ile Gly Phe Ile Thr Glu Ala Ile Leu Arg Glu His Ile
[0119]	850 855 860
[0120]	Pro Glu Pro Ser His Thr Thr Leu Ala Leu Ala Cys Gly Pro Pro Pro
[0121]	865 870 875 880
[0122]	Met Ile Gln Phe Ala Val Asn Pro Asn Leu Glu Lys Met Gly Tyr Asp
[0123]	885 890 895
[0124]	Ile Lys Asp Ser Leu Leu Val Phe
[0125]	900

[0126]	<210>	2	
[0127]	<211>	7096	
[0128]	<212>	DNA	
[0129]	<213>	普通烟草	
[0130]	<400>	2	
[0131]	tacatacaag	ggcgcgaata	aacttttttt aaagtaaag tatatgaact tgcaatgaaa 60
[0132]	gaggacctta	acttgtttgt	ctttgttgc tttctgcaat ttcaccttaa cageccattt 120
[0133]	gagattgatt	tagttagttt	taacaattag ttaaagctt gtgtaatttg aagaaaatat 180
[0134]	ttggacgtgc	tcgctgaaaa	cattatactc ctatataata gaaatacttt ctgaaaagtt 240
[0135]	ggtcttggtc	aaaaacgtat	aagagagttg gtcttctcat aaatagtcac tagctttctg 300
[0136]	atTTTTTt	actttctata	tcacgtaaag aggtactcaa atttgatatt tacaccaaac 360
[0137]	aatgaaaat	aggatatgtg	ttttcatac gtatatttat ctatcgtact taatgataca 420
[0138]	tacataaca	tataacctta	ctttttgatt actaaaaatt taattatatt taatttgggt 480
[0139]	aaatatcaga	tgccacaaaa	catttaccta gccactgtt ttgactacta aaaatttaac 540
[0140]	tatgtttagc	ttgggtaaat	atcagatgtc actaaacatt ttacctagc attcctccga 600
[0141]	aaagaaattg	agaaggaaat	tagagttagt ggagccataa taatgtttaa tgtgaccata 660
[0142]	actcggtgaa	aaccacggca	agaataagaa acagctgtta aggctaacca acagctgcat 720
[0143]	atctttaagc	catttgctat	tacccaaca tcgcatctc ctctgatccc gaccctacgg 780
[0144]	gcgtaaaaag	tgtaaatcgt	tagaattggt ttatttttt tatgatgtca ctatttttta 840
[0145]	aatcaaaaat	taatttgggg	tgctgatttt tttgggtcct gcttatgtat agtatggcgc 900
[0146]	tatggaggca	ctgagagagt	ccgaaacgtt tctatataag gccacccac gcattcaca 960
[0147]	acttcgttcc	caaacagaac	aagaaaatca aatctcggag agagagagag agaaatattt 1020
[0148]	tgagagagaa	atacagaaaa	tctctcttcc ttctttcctt ttttttcaa tccccattca 1080
[0149]	tattcttttt	ttagaataat	ctatggcggc atctgtcga aacagcagc tcagtcacct 1140
[0150]	agaagccggt	ttatcccgtt	ctttcaagc ccggtctgat tccccggtc gtggctgcaa 1200
[0151]	cttcccttcg	cccaacagta	ctaatttcca aaagaaacca aattccacca tttaccttga 1260
[0152]	ttactcgtcg	agtgaagacg	acgatgatga tgacgaaaa aatgagtacc ttcaaatgat 1320
[0153]	taaaaaaggg	aattcagagt	tagagccatc gtttcatgac actagggacg aaggtaccgc 1380
[0154]	tgataattgg	attgaacgca	acttttccat gattcgtctc accggaaagc atccatttaa 1440
[0155]	ctccgaacca	cggttgaacc	ggctcatgca ccacggctt atcacaccgg tcccacttca 1500
[0156]	ttacgttcgt	aaccatggac	cggttcccaa gggcacgtgg gatgactgga ccgtggaagt 1560
[0157]	cacgggacta	gtgaagcgtc	ctatgaaatt cacaatggac cagttggta acgaattccc 1620
[0158]	ttgtagagaa	ttgcccgtaa	cgcttgttg tgctggcaat cgaaggaaag aacagaacat 1680
[0159]	ggttaaacia	accattgggt	tcaactgggg cgccgctgcc gtttcaacia cgatatggcg 1740
[0160]	cggggtacc	ctccgcgctt	tgctaaaacg gtgcggtgtt tttagcaaga ataaaggggc 1800
[0161]	gcttaatggt	tgcttcgaag	gagctgatgt gttgcccgga ggtggtggtt caaagtatgg 1860
[0162]	aaccagcatt	aagaaggaat	ttgcaatgga tccagcacga gatatcatc tagcctacat 1920
[0163]	gcagaacgga	gaaaaattgg	caccgacca cgggtttcca gtacgaatga taattccagg 1980
[0164]	attcattgga	ggaagaatgg	tgaaatggat aaagaggatt atagtcacca cccaagaatc 2040
[0165]	agacagctat	tatcatttca	aggacaatag agttcttct ccccatgttg atgctgaact 2100
[0166]	tgcaaatacc	gaaggtacgt	accgtaacta tttcaattta ttactccatt tgtttcaatt 2160
[0167]	tatgtgaacc	tatttctttt	ttgggtccgtt caaaaaagaa tgaaccttt ctaaatttgg 2220

[0168]	taacaattta gcttaaactt acaacttcac ccttaatgag aaacttttat aaccacacaa	2280
[0169]	atacctggg gccatttgg acttgtttag gtcgacaaat tccaaaagtt ttattttttt	2340
[0170]	cttaaacttc gtgctcagtc aaacaggttc acgtaaattg aaacggagag agtatcattt	2400
[0171]	ttattaaggg gtataaatat attttaatta gttgagactt gcacatacaa gtaaaatatt	2460
[0172]	tcttagaata caaaatcaac tgaagctta cttctaatta tatggttttg aattttcctt	2520
[0173]	tcaatgaagt aaataaaaag gaaacaatta tattcaacgc atgtaggtat atggctctgt	2580
[0174]	cattatctca aatcaaatgg tttaaagaca aaggactttg gaaacataga attgtcagct	2640
[0175]	ttatagttat ggagtactat attagttagc tgtttgcatc tattcataat tggctctatc	2700
[0176]	gtgtgcagca tgggtgtaca agccagagta tatcatcaat gagcttaata ttaactctgt	2760
[0177]	cattacgacg ccgtgtcatg aagaaatfff gccaat AAC gcctggacga ctcagcgacc	2820
[0178]	ttacacgttg aggggtatt cttattctgg ttagtatttt tatattttcc gattttgctg	2880
[0179]	agaatatcat atttcttagt tttgtcgata catcgatcc tctaactctg acgttttact	2940
[0180]	tcgtccttat gcaccactt acgtccttac tttctcagac agttttattga tgaaaactac	3000
[0181]	ttactatttt cgaccgata gcctcagcgt ccttaattaa atgtgatgtt ttgaaagaga	3060
[0182]	tattctctcc cgtctatttt aattaatttt tggctgtttt tatacgtggg aatctatttt	3120
[0183]	taacattaat taatatagaa atgaaccata ttaatattat taatttcttc attgaaaata	3180
[0184]	caacaatac tcttcggctc ttactacaat gacaattttg aagaaaaata attaattcct	3240
[0185]	tcctaatac tgaaaaatca aatattgtgg accataaaaa aaggtcaaaa aattaattaa	3300
[0186]	aatgaactgg agagagtaaa ttagaaaata taattatagc actagtaatt aaagttatta	3360
[0187]	gatgtcttct ttaaaaagcg tgtgaaaact ttaaagacga aatataatat gaatattatc	3420
[0188]	taatacttag aaagtgtcaa taattggtag acaatttaaa ctatatacta gttaaaaagt	3480
[0189]	ctgtcaatac aactattagt attggggatt agagagaata gtagtaaaat ggagtaattg	3540
[0190]	gacgcatgag cttgggcatg ctgattgctg tcagcttgtt tgctaattgtg aaaaagaaaa	3600
[0191]	tagtaagaaa aggccaacat ggttttgttt attttattat gtggtagtac acaaaaacct	3660
[0192]	ggggagcttt cctagtctg aagagtcggt ctttggtagc acaaaattaa tagtatagta	3720
[0193]	taccaagtga atattaaatt caattgtcta aagcacggaa tctttttgac tacttttagt	3780
[0194]	cctgcatctt gggttgcctc aacaacacc tttattgaat tattatagta atgttcaata	3840
[0195]	taatatacaa ttagaaaaca ctctaagtgg tcactttata tggatctagt caatactatt	3900
[0196]	tcttetaaac aacgtgccta attacttccc actttccagt acatgaccac cattaagttt	3960
[0197]	aatttttgtc aattccttgt gcaattggcc cttcaaatga gcagaagtgt tacgtaggaa	4020
[0198]	aactaacttc agctactatt ataggagtaa acctgttagg aaaagatgct cgaggaactg	4080
[0199]	acaaaacttg tagaataatt agccattgta ttgattgaaa tactgattgt gaacgtgtaa	4140
[0200]	caaacaggcg gagggaaaaa agtaacgcga gtagaagtga cgttggatgg aggagaaaca	4200
[0201]	tggcaagtta gcacactaga tcaccagag aagcccacca aatattggcaa gtactggtgt	4260
[0202]	tgggtctttt ggtcactcga ggttgagggt ttagacttgc tcagtgctaa agaaattgct	4320
[0203]	gttcgagctt gggatgagac cctcaactact caaccgaga agcttatttg gaacgtcatg	4380
[0204]	gtacgttcac ttcttctttt acctttattt cttttaactt ctatatacta gcggtgtaaa	4440
[0205]	gttattttac accataagtt aacttacaaa aatatgtaac tatttatact acgagtgatg	4500
[0206]	agggaagaa ggggtttaag tatttgacaa taaatgtaaa ccctgcaatt ttgttccetaa	4560
[0207]	ttttttatcc tttcaactct ttgtgattgc ttcattatct agattcacag agcacatgtg	4620
[0208]	ttcacatgcc aaaacaaaaa actacaacaa aaaaaacttt tcaactagct tagtctaaga	4680
[0209]	ttcccccttt ttttttggg aggtgtgtgg tccatactcc atagatcaat tccagccact	4740

[0210]	gacgtaccaa accctgaaaa ttcctagtag ttatagcgac gtacaatcat ttcattattat	4800
[0211]	gtaagcagag acgtgatcac atgaactaga tgtgaatacc acttgcccag tccaccaggt	4860
[0212]	caattcatct agatgtgtaa atcttgacac cagcactggg tcacttttat aacactagca	4920
[0213]	tttaacaaca tttcatcctt gaacattact tgggctaatt aataagtatt tttttttata	4980
[0214]	tactctaaaa attgtaatta cataaatgaa tttaacttat acacgctgac aatgttacta	5040
[0215]	attccacttt ttacggacgg ttatctatag aaatcattta ggtgaaacaa ttctcttaca	5100
[0216]	ctatgatcag tgtagtaca taatggttat tacattttct aaatattgtg ctatgttga	5160
[0217]	atgttcaggg aatgatgaat aattgctggt tccgagtaa gatgaatgtg tgcaagcctc	5220
[0218]	acaagggaga gattggaata gtgtttgagc atccgactca acctggaac caatcaggtg	5280
[0219]	gatggatggc gaaggagaga catttgaga tatcagcaga ggcacctca acactaaaga	5340
[0220]	agagtatctc aactccatc atgaacacag cttccaagat gtactccatg tccgaggtca	5400
[0221]	ggaaacacag ctctgctgac tctgcttga tcatagtcca tggtcatac tatgacgcca	5460
[0222]	cgcgtttctt gaaagatcac cctggtgga ctgacagcat tctcatcaat gctggcactg	5520
[0223]	attgactga ggaattgat gcaattcatt ctgataaggc taagaagctc ttggaggatt	5580
[0224]	tcaggattgg tgaactcata actactggtt acacctctga ctctcctggc aactccgtgc	5640
[0225]	acggatcttc ttcctcagc agctttctag cacctattaa ggaacttgtt ccagcgcaga	5700
[0226]	ggagtgtggc cctaattcca agagagaaaa tcccatgcaa actcatcgac aagcaatcca	5760
[0227]	tctcccatga tgtaggaaa tttcgattg cattgccctc tgaggatcaa gtcttgggct	5820
[0228]	tgctgttgg aaaacatac ttcctctgtg ccgttattga cgataagctc tgcatgctgc	5880
[0229]	cttacacgcc tactagcac atcgatgagg tggggtactt cgagttggtt gtcaagatat	5940
[0230]	acttcaaagg aattcacct aaattcccca atggagggca aatgtcacag tatcttgatt	6000
[0231]	ctatgccgtt aggttcattt ctcgacgtga aaggtccatt aggtcacatt gaataccaag	6060
[0232]	gaaagggaaa tttcttagtt catggcaaac agaagtttgc caagaagttg gccatgatag	6120
[0233]	caggtggaac aggaataact ccagtgtatc aagtcatgca ggcaattctg aaagatccag	6180
[0234]	aagatgacac agaaatgat gtggtgatg ctaacagaac agaggatgat attttactta	6240
[0235]	aggaagagct tgattcatgg gctgagaaaa ttccagagag ggttaaagtt tggtagtgg	6300
[0236]	ttcaggattc tattaagaa ggatggaagt acagcattgg ttttattaca gaagccattt	6360
[0237]	tgagagaaca tatccctgag ccatctcaca caacctggc tttggcttgt ggaccacctc	6420
[0238]	ctatgattca atttgctgtt aatccaaact tggagaagat gggctatgac attaaggatt	6480
[0239]	ccttattggt gttctaattt taaaaacaaa acaatatctg caggaataaa tttttttttt	6540
[0240]	cccctatca gttgtacata ttgtatttgg tttatcacc ccatgtacta cgtagtgttt	6600
[0241]	gtagttctta catttttatt ttttagaatt tttttaaac ttaggatata aaggttttct	6660
[0242]	cttccaacaa agtgattctt tagggaagaa atgtactgta ctgtactagt atgtctaagc	6720
[0243]	cgaagttgt aatgtttacc atgacaaatt gtattcaatt cctcatggaa tagtaacatt	6780
[0244]	gtgttcatgt gtcttctgt aagcgtctt caaaatatca atgtatata atagtaattg	6840
[0245]	caaaccattg ttccttttcc cgatgtagtt aactactctt tcttttagct ctagtctctg	6900
[0246]	gtgaatattt tttttctat aactctttaa ttaatacggc cttaaataag agaaaagttt	6960
[0247]	aaaccacgaa tatcattatg cagacgtata ggtaattaat ctactttttg aaaaaaatc	7020
[0248]	tattttcttt atgtggtcct tcaaaataat attctagaac cttttgtata ttccctttta	7080
[0249]	acttctattt agtttt	7096
[0250]	<210> 3	
[0251]	<211> 904	

[0252] <212> PRT
 [0253] <213> 普通烟草
 [0254] <400> 3
 [0255] Met Ala Ala Ser Val Glu Asn Arg Gln Phe Ser His Leu Glu Ala Gly
 [0256] 1 5 10 15
 [0257] Leu Ser Arg Ser Phe Lys Pro Arg Ser Asp Ser Pro Val Arg Gly Cys
 [0258] 20 25 30
 [0259] Asn Phe Pro Ser Pro Asn Ser Thr Asn Phe Gln Lys Lys Pro Asn Ser
 [0260] 35 40 45
 [0261] Thr Ile Tyr Leu Asp Tyr Ser Ser Ser Glu Asp Asp Asp Asp Asp Asp
 [0262] 50 55 60
 [0263] Glu Lys Asn Glu Tyr Leu Gln Met Ile Lys Lys Gly Asn Ser Glu Leu
 [0264] 65 70 75 80
 [0265] Glu Pro Ser Val His Asp Thr Arg Asp Glu Gly Thr Ala Asp Asn Trp
 [0266] 85 90 95
 [0267] Ile Glu Arg Asn Phe Ser Met Ile Arg Leu Thr Gly Lys His Pro Phe
 [0268] 100 105 110
 [0269] Asn Ser Glu Pro Pro Leu Asn Arg Leu Met His His Gly Phe Ile Thr
 [0270] 115 120 125
 [0271] Pro Val Pro Leu His Tyr Val Arg Asn His Gly Pro Val Pro Lys Gly
 [0272] 130 135 140
 [0273] Thr Trp Asp Asp Trp Thr Val Glu Val Thr Gly Leu Val Lys Arg Pro
 [0274] 145 150 155 160
 [0275] Met Lys Phe Thr Met Asp Gln Leu Val Asn Glu Phe Pro Cys Arg Glu
 [0276] 165 170 175
 [0277] Leu Pro Val Thr Leu Val Cys Ala Gly Asn Arg Arg Lys Glu Gln Asn
 [0278] 180 185 190
 [0279] Met Val Lys Gln Thr Ile Gly Phe Asn Trp Gly Ala Ala Ala Val Ser
 [0280] 195 200 205
 [0281] Thr Thr Ile Trp Arg Gly Val Pro Leu Arg Ala Leu Leu Lys Arg Cys
 [0282] 210 215 220
 [0283] Gly Val Phe Ser Lys Asn Lys Gly Ala Leu Asn Val Cys Phe Glu Gly
 [0284] 225 230 235 240
 [0285] Ala Asp Val Leu Pro Gly Gly Gly Gly Ser Lys Tyr Gly Thr Ser Ile
 [0286] 245 250 255
 [0287] Lys Lys Glu Phe Ala Met Asp Pro Ala Arg Asp Ile Ile Val Ala Tyr
 [0288] 260 265 270
 [0289] Met Gln Asn Gly Glu Lys Leu Ala Pro Asp His Gly Phe Pro Val Arg
 [0290] 275 280 285
 [0291] Met Ile Ile Pro Gly Phe Ile Gly Gly Arg Met Val Lys Trp Ile Lys
 [0292] 290 295 300
 [0293] Arg Ile Ile Val Thr Thr Gln Glu Ser Asp Ser Tyr Tyr His Phe Lys

[0294]	305	310	315	320
[0295]	Asp Asn Arg Val Leu Pro Pro His Val Asp Ala Glu Leu Ala Asn Thr			
[0296]		325	330	335
[0297]	Glu Ala Trp Trp Tyr Lys Pro Glu Tyr Ile Ile Asn Glu Leu Asn Ile			
[0298]		340	345	350
[0299]	Asn Ser Val Ile Thr Thr Pro Cys His Glu Glu Ile Leu Pro Ile Asn			
[0300]		355	360	365
[0301]	Ala Trp Thr Thr Gln Arg Pro Tyr Thr Leu Arg Gly Tyr Ser Tyr Ser			
[0302]		370	375	380
[0303]	Gly Gly Gly Lys Lys Val Thr Arg Val Glu Val Thr Leu Asp Gly Gly			
[0304]	385	390	395	400
[0305]	Glu Thr Trp Gln Val Ser Thr Leu Asp His Pro Glu Lys Pro Thr Lys			
[0306]		405	410	415
[0307]	Tyr Gly Lys Tyr Trp Cys Trp Cys Phe Trp Ser Leu Glu Val Glu Val			
[0308]		420	425	430
[0309]	Leu Asp Leu Leu Ser Ala Lys Glu Ile Ala Val Arg Ala Trp Asp Glu			
[0310]		435	440	445
[0311]	Thr Leu Asn Thr Gln Pro Glu Lys Leu Ile Trp Asn Val Met Gly Met			
[0312]		450	455	460
[0313]	Met Asn Asn Cys Trp Phe Arg Val Lys Met Asn Val Cys Lys Pro His			
[0314]	465	470	475	480
[0315]	Lys Gly Glu Ile Gly Ile Val Phe Glu His Pro Thr Gln Pro Gly Asn			
[0316]		485	490	495
[0317]	Gln Ser Gly Gly Trp Met Ala Lys Glu Arg His Leu Glu Ile Ser Ala			
[0318]		500	505	510
[0319]	Glu Ala Pro Gln Thr Leu Lys Lys Ser Ile Ser Thr Pro Phe Ile Asn			
[0320]		515	520	525
[0321]	Thr Ala Ser Lys Met Tyr Ser Met Ser Glu Val Arg Lys His Ser Ser			
[0322]		530	535	540
[0323]	Ala Asp Ser Ala Trp Ile Ile Val His Gly His Ile Tyr Asp Ala Thr			
[0324]	545	550	555	560
[0325]	Arg Phe Leu Lys Asp His Pro Gly Gly Thr Asp Ser Ile Leu Ile Asn			
[0326]		565	570	575
[0327]	Ala Gly Thr Asp Cys Thr Glu Glu Phe Asp Ala Ile His Ser Asp Lys			
[0328]		580	585	590
[0329]	Ala Lys Lys Leu Leu Glu Asp Phe Arg Ile Gly Glu Leu Ile Thr Thr			
[0330]		595	600	605
[0331]	Gly Tyr Thr Ser Asp Ser Pro Gly Asn Ser Val His Gly Ser Ser Ser			
[0332]		610	615	620
[0333]	Phe Ser Ser Phe Leu Ala Pro Ile Lys Glu Leu Val Pro Ala Gln Arg			
[0334]	625	630	635	640
[0335]	Ser Val Ala Leu Ile Pro Arg Glu Lys Ile Pro Cys Lys Leu Ile Asp			

[0336]		645		650		655
[0337]	Lys Gln Ser Ile Ser His Asp Val Arg Lys Phe Arg Phe Ala Leu Pro					
[0338]		660		665		670
[0339]	Ser Glu Asp Gln Val Leu Gly Leu Pro Val Gly Lys His Ile Phe Leu					
[0340]		675		680		685
[0341]	Cys Ala Val Ile Asp Asp Lys Leu Cys Met Arg Ala Tyr Thr Pro Thr					
[0342]		690		695		700
[0343]	Ser Thr Ile Asp Glu Val Gly Tyr Phe Glu Leu Val Val Lys Ile Tyr					
[0344]		705		710		715
[0345]	Phe Lys Gly Ile His Pro Lys Phe Pro Asn Gly Gly Gln Met Ser Gln					
[0346]		725		730		735
[0347]	Tyr Leu Asp Ser Met Pro Leu Gly Ser Phe Leu Asp Val Lys Gly Pro					
[0348]		740		745		750
[0349]	Leu Gly His Ile Glu Tyr Gln Gly Lys Gly Asn Phe Leu Val His Gly					
[0350]		755		760		765
[0351]	Lys Gln Lys Phe Ala Lys Lys Leu Ala Met Ile Ala Gly Gly Thr Gly					
[0352]		770		775		780
[0353]	Ile Thr Pro Val Tyr Gln Val Met Gln Ala Ile Leu Lys Asp Pro Glu					
[0354]		785		790		795
[0355]	Asp Asp Thr Glu Met Tyr Val Val Tyr Ala Asn Arg Thr Glu Asp Asp					
[0356]		805		810		815
[0357]	Ile Leu Leu Lys Glu Glu Leu Asp Ser Trp Ala Glu Lys Ile Pro Glu					
[0358]		820		825		830
[0359]	Arg Val Lys Val Trp Tyr Val Val Gln Asp Ser Ile Lys Glu Gly Trp					
[0360]		835		840		845
[0361]	Lys Tyr Ser Ile Gly Phe Ile Thr Glu Ala Ile Leu Arg Glu His Ile					
[0362]		850		855		860
[0363]	Pro Glu Pro Ser His Thr Thr Leu Ala Leu Ala Cys Gly Pro Pro Pro					
[0364]		865		870		875
[0365]	Met Ile Gln Phe Ala Val Asn Pro Asn Leu Glu Lys Met Gly Tyr Asp					
[0366]		885		890		895
[0367]	Ile Lys Asp Ser Leu Leu Val Phe					
[0368]		900				
[0369]	<210> 4					
[0370]	<211> 7096					
[0371]	<212> DNA					
[0372]	<213> 普通烟草					
[0373]	<400> 4					
[0374]	tacatacaag ggcgcgaata aacttttttt aaagtaaag tatatgaact tgcaatgaaa 60					
[0375]	gaggacctta acttgtttgt ctttgttgct ttctgcaaat ttcaccttaa cagcccattt 120					
[0376]	gagattgatt tagttagtta taacaattag ttaaagcgtt gtgtaattg aagaaaatat 180					
[0377]	ttggacgtgc tcgctgaaaa cattatactc ctatataata gaaatacttt ctgaaaagtt 240					

[0378]	ggtcttggtc	aaaaacgtat	aagagagttg	gtcttctcat	aaatagtcac	tagctttctg	300
[0379]	atTTTTTtTc	actttctata	tcacgtaa	aggtactcaa	atttgatatt	tacaccaa	360
[0380]	aatgaaaat	aggatatgtg	TTTTcatac	gtatatttat	ctatcgtact	taatgataca	420
[0381]	tacatataca	tataacctta	ctttttgatt	actaaaaatt	taattatatt	taatttgggt	480
[0382]	aaatatacaga	tgccacaaaa	catttaccta	gccactgttt	ttgactacta	aaaattta	540
[0383]	tatgitttagc	ttgggtaaat	atcagatgtc	actaaacatt	ttacctagcc	attcctccga	600
[0384]	aaagaaattg	agaaggaaat	tagagttagt	ggagccataa	taatgtttaa	tgtgaccata	660
[0385]	actcggtgaa	aaccacggca	agaataagaa	acagctgtta	aggctaacca	acagctgcat	720
[0386]	atctttaagc	catttgctat	tacccaaca	tcgcatcttc	ctctgatccc	gaccctacgg	780
[0387]	gcgtaaaaag	tgtaaatcgt	tagaattggt	ttattttttt	tatgatgtca	ctatttttta	840
[0388]	aatcaaaaat	taaattgggg	tgctgatttt	ttgggtcct	gcttatgtat	agtatggcgc	900
[0389]	tatggaggca	ctgagagagt	ccgaaacgtt	tctatataag	gccacccac	gcattcaca	960
[0390]	acttcgttcc	caaacagaac	aagaaaatca	aatctcggag	agagagagag	agaaatattt	1020
[0391]	tgagagagaa	atacagaaaa	tctctcttcc	ttctttcctt	TTTTTTcaa	tccccattca	1080
[0392]	tattcttttt	ttagaataat	ctatggcggc	atctgtcga	aacaggcagt	tcagtcacct	1140
[0393]	agaagccggt	ttatcccgtt	ctttcaagcc	ccggtctgat	tccccggttc	gtggctgca	1200
[0394]	cttcccttcg	cccaacagta	ctaattcca	aaagaaacca	aattccacca	tttaccttga	1260
[0395]	ttactcgtcg	agtgaagacg	acgatgatga	tgacgaaaa	aatgagtacc	ttcaaatgat	1320
[0396]	taaaaaagg	aattcagagt	tagagccatc	tgttcatgac	actagggacg	aaggtaccgc	1380
[0397]	tgataattgg	attgaacgca	acttttccat	gattcgtctc	accggaaagc	atccatttaa	1440
[0398]	ctccgaacca	ccgttgaacc	ggctcatgca	ccacggcttt	atcacaccgg	tcccacttca	1500
[0399]	ttacgttcgt	aaccatggac	cggttcccaa	gggcacgtgg	gatgactgga	ccgtggaagt	1560
[0400]	cacgggacta	gtgaagcgtc	ctatgaaatt	cacaatggac	cagttgggta	acgaattccc	1620
[0401]	ttgtagagaa	ttgcccggtta	cgcttggttg	tgctggcaat	cgaaggaaag	aacagaacat	1680
[0402]	ggttaaacia	accattgggt	tcaactgggg	cgccgctgcc	gtttcaacia	cgatatggcg	1740
[0403]	cggggtacc	ctccgcgctt	tgctaaaacg	gtgcgggtgt	tttagcaaga	ataaaggggc	1800
[0404]	gcttaatggt	tgcttcaag	gagctgatgt	gttgcccgga	ggtggtggtt	caaagtatgg	1860
[0405]	aaccagcatt	agaaggaat	ttgcaatgga	tccagcacga	gatatcatcg	tagcctacat	1920
[0406]	gcagaacgga	gaaaaattgg	caccgacca	cggttttcca	gtacgaatga	taattccagg	1980
[0407]	attcattgga	ggaagaatgg	tgaaatggat	aaagaggatt	atagtcacca	cccaagaatc	2040
[0408]	agacagctat	tatcatttca	aggacaatag	agttcttctc	ccccatgttg	atgctgaact	2100
[0409]	tgcaataacc	gaaggtacgt	accgtaacta	tttcaattta	ttactccatt	tgttccaatt	2160
[0410]	tatgtgaacc	tatttccttt	ttggtccggt	caaaaaagaa	tgaacctttt	ctaaatttgg	2220
[0411]	taacaattta	gcttaaactt	acaacttcac	ccttaatgag	aaacttttat	aaccacacia	2280
[0412]	ataccctggg	gcccatttgg	acttggttag	gtcgacaaat	tccaaaagtt	ttattttttt	2340
[0413]	cttaaaacttc	gtgctcagtc	aaacaggttc	acgtaaattg	aaacggagag	agtatcattt	2400
[0414]	ttattaagg	gtataaatat	attttaatta	ggtgagactt	gcacatacaa	gtaaaatatt	2460
[0415]	tcttagaata	caaatcaac	tgaaagctta	cttctaatta	tatggttttg	aattttcctt	2520
[0416]	tcaatgaagt	aaataaaaag	gaaacaatta	tattcaacgc	atgtaggtat	atggctctgt	2580
[0417]	cattatctca	aatcaaatgg	tttaaagaca	aaggactttg	gaaacataga	attgtcagct	2640
[0418]	ttatagttat	ggagtactat	attagttagc	tgtttgcatc	tattcataat	tggcttatct	2700
[0419]	gtgtgcagca	tggtggtaca	agccagagta	tatcatcaat	gagcttaata	ttaactctgt	2760

[0420]	cattacgacg ccgtgtcatg aagaaatfff gccaatfaac gcctggacga ctcagcgacc	2820
[0421]	ttacacgttg aggggctatt cttattctgg ttagtatttt tatattttcc gattttgctg	2880
[0422]	agaatatcat atttcttagt tttgtcgata catcgatcc tctaactctg acgttttact	2940
[0423]	tcgtccttat gcaccactt acgtccctac tttctcagac agttttattga tgaaaactac	3000
[0424]	ttactatfff cgaccgata gcctcagcgt ctttaattaa atgtgatgtt ttgaaagaga	3060
[0425]	tattctctcc cgtctatfff aattaatfff tggctgffff tatacgtggg aatctatfff	3120
[0426]	taacattaat taatatagaa atgaaccata ttaatattat taatttcttc attgaaaata	3180
[0427]	caacaaatac tcttcggctc ttactacaat gacaatfff aagaaaaata attaattcct	3240
[0428]	tcctaataatc tgaaaaatca aatattgtgg accataaaaa aaggtcaaaa aattaattaa	3300
[0429]	aatgaactgg agagagtaaa ttagaaaata taattatagc actagtaatt aaagttatta	3360
[0430]	gatgtcttct ttaaaaagcg tgtgaaaact ttaaagacga aatataatat gaatattatc	3420
[0431]	taatacttag aaagtgtcaa taattggtag acaatftaaa ctatatacta gttaaaaagt	3480
[0432]	ctgtcaatac aactattagt attggggatt agagagaata gtagtaaaat ggagtaattg	3540
[0433]	gacgcatgag cttgggcatg ctgattgctg tcagcttgtt tgctaattgtg aaaaagaaaa	3600
[0434]	tagtaagaaa agccaacat ggttttgttt atftttattat gtggtagtac acaaaaacct	3660
[0435]	ggggagcttt ctagttctg aagagtcggt ctttggtagc acaaaattaa tagtatagta	3720
[0436]	taccaagtga atattaaatt caattgtcta aagcacggaa tctfttttgac tacttttagtt	3780
[0437]	cctgcactct gggttgctc aacaacacc tttattgaat tattatagta atgttcaata	3840
[0438]	taatatacaa ttagaaaaca ctctaagtgg tcactftata tggatctagt caatactatt	3900
[0439]	tcttetaaac aacgtgccta attacttccc actfttccagt acatgaccac cattaagttt	3960
[0440]	aatftttgtc aattccttgt gcaattggcc cttcaaatga gcagaagtgt tacgttagaa	4020
[0441]	aactaacttc agctactatt ataggagtaa acctgttagg aaaagatgct cgaggaactg	4080
[0442]	acaaaacttg tagaataatt agccattgta ttgattgaaa tactgattgt gaacgtgtaa	4140
[0443]	caaacaggcg gagggaaaa agtaacgca gtagaagtga cgttggatgg aggagaaaca	4200
[0444]	tggcaagtta gcacactaga tcaccagag aagcccacca aatatggcaa gtactggtgt	4260
[0445]	tgggtctftt ggtcactcga ggttgaggtg ttagacttgc tcagtgctaa agaaattgct	4320
[0446]	gttcgagctt gggatgagac cctcaactc caaccgaga agcttatttg gaacgtcatg	4380
[0447]	gtacgtcac tcttctftt accttattt cfttftaact ctatatacta gcggtgtaaa	4440
[0448]	gttattttac accataagtt aacttacaaa aatatgtaac tatttatact acgagtgatg	4500
[0449]	agggcaagaa ggggtttaag tatttgacaa taaatgtaaa ccttgcaatt ttgttcttaa	4560
[0450]	ftttttatcc tftcaactct ttgtgattgc ttcattatct agattcacag agcacatgtg	4620
[0451]	ttcacatgcc aaaacaaaa actacaacaa aaaaaactft tcactagctt tagtctaaga	4680
[0452]	ttcccctftt ftftfttggg aggtgtgtgg tccatactcc atagatcaat tccagccact	4740
[0453]	gacgtaccaa acctgaaaa tftctagtag ttatagcgac gtacaatcat tftcatattat	4800
[0454]	gtaagcagag acgtgatcac atgaactaga tgtgaatacc acttggccag tccaccaggt	4860
[0455]	caattcatct agatgtgtaa atcttgacac cagcactggg tcactftttat aacactagca	4920
[0456]	fttaacaaca tftcatcctt gaacattact tgggctaatt aataagtatt ftftftftata	4980
[0457]	tactctaaaa attgtaatta cataaatgaa fttaacttat acacgctgac aatgttacta	5040
[0458]	attccactft ttacggacgg ttatctatag aatcattta ggtgaaacaa tftctftaca	5100
[0459]	ctatgatcag tgttagtaca taatggttat tacatfttct aatattgtg ctatgttgca	5160
[0460]	atgttcaggg aatgatgaat aattgctggt tccgagtaaa gatgaatgtg tgcaagcctc	5220
[0461]	acaagggaga gattggaata gtgtttgagc atccgactca acctggaaac caatcaggtg	5280

[0462]	gatggatggc gaaggagaga catttggaga tatcagcaga ggcacctcaa aactaaaga	5340
[0463]	agagtatctc aactccattc ataaacacag cttccaagat gtactccatg tccgaggta	5400
[0464]	ggaaacacag ctctgtgac tctgttga tcatagtcca tggatcatc tatgacgcca	5460
[0465]	cgcgtttctt gaaagatcac cctgggtgga ctgacagcat tctcatcaat gctggcactg	5520
[0466]	attgactga ggaattgat gcaattcatt ctgataaggc taagaagctc ttggaggatt	5580
[0467]	tcaggattgg tgaactcata actactggtt acacctctga ctctcctgac aactccgtgc	5640
[0468]	acggatcttc ttcttcagc agctttctag cacctattaa ggaacttgtt ccagcgcaga	5700
[0469]	ggagtgtggc cctaattcca agagagaaaa tcccatgcaa actcatcgac aagcaatcca	5760
[0470]	tctcccatga tgtaggaaa tttcgatttg cattgccctc tgaggatcaa gtcttgggct	5820
[0471]	tgctgttgg aaaacatctc ttctctgtg ccgttattga cgataagctc tgcatgctgc	5880
[0472]	cttacacgcc tactagcag atcgatgagg tgggtactt cgagttggtt gtcaagatat	5940
[0473]	acttcaaagg aattcacct aaattcccca atggaggga aatgtcacag tatcttgatt	6000
[0474]	ctatgccgtt agggtcattt ctgacgtga aaggtccatt aggtcacatt gaataccaag	6060
[0475]	gaaagggaaa tttcttagtt catggcaaac agaagttgc caagaagttg gccatgatag	6120
[0476]	caggtggaac aggaataact ccagtgtatc aagtcatgca ggcaattctg aaagatccag	6180
[0477]	aagatgacac agaaatgtat gtggtgatg ctaacagaac agaggatgat attttactta	6240
[0478]	aggaagagct tgattcatgg gctgagaaaa ttccagagag ggttaaagtt tggatgtgg	6300
[0479]	ttcaggattc tattaagaa ggatggaagt acagcattgg ttttattaca gaagccattt	6360
[0480]	tgagagaaca tatccctgag ccatctcaca caaactggc tttggcttgt ggaccacctc	6420
[0481]	ctatgattca atttgtgtt aatccaaact tggagaagat gggctatgac attaaggatt	6480
[0482]	ccttattggt gttctaattt taaaaacaaa acaatatctg caggaataaa tttttttttt	6540
[0483]	cccctatca gttgtacata ttgtatttgg tttatcacc ccatgtacta cgtagtgttt	6600
[0484]	gtagttctta catttttatt ttttagaatt tttttaaac ttaggatata aaggttttct	6660
[0485]	cttccaacaa agtgattctt tagggaagaa atgtactgta ctgtactagt atgtctaagc	6720
[0486]	cgaaagttgt aatgtttacc atgacaaatt gtattcaatt cctcatggaa tagtaacatt	6780
[0487]	gtgttcatgt gtcttctgt aagcgtctt caaaatatca atgtatatat atagtaattg	6840
[0488]	caaaccattg ttcttttcc cgatgtagtt aactactctt tctttagctt ctagtctctg	6900
[0489]	gtgaatattt tttttctat aactctttaa ttaatacggc cttaaataag agaaaagttt	6960
[0490]	aaaccacgaa tatcattatg cagacgtata ggtaattaat ctactttttg aaaaaaatc	7020
[0491]	tattttcttt atgtgtcct tcaaaataat attctagaac cttttgtata ttccctttta	7080
[0492]	acttctattt agtttt	7096
[0493]	<210> 5	
[0494]	<211> 10	
[0495]	<212> PRT	
[0496]	<213> 普通烟草	
[0497]	<220>	
[0498]	<221> MISC_FEATURE	
[0499]	<222> (3) .. (3)	
[0500]	<223> Lys或Arg	
[0501]	<220>	
[0502]	<221> MISC_FEATURE	
[0503]	<222> (4) .. (4)	

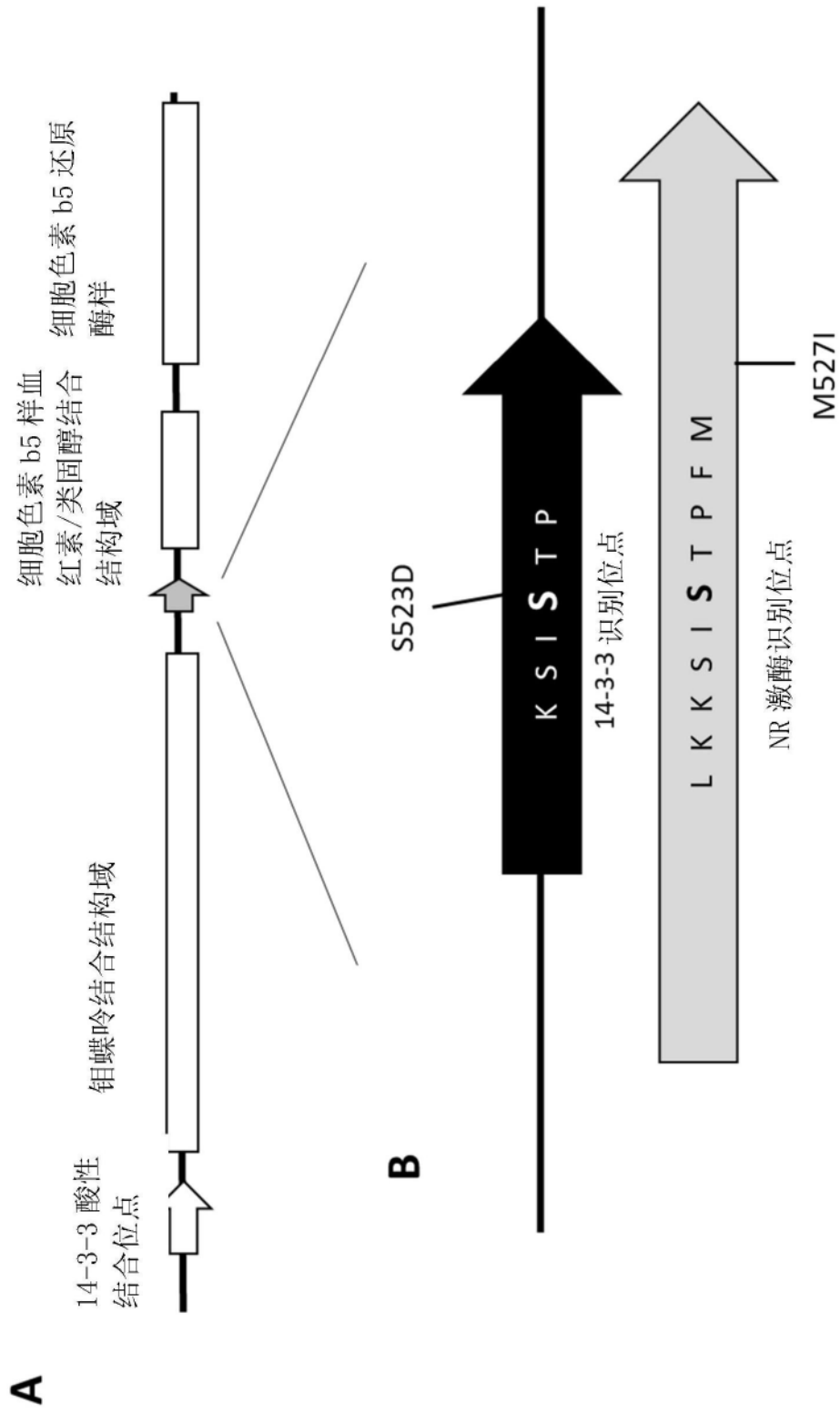


图1

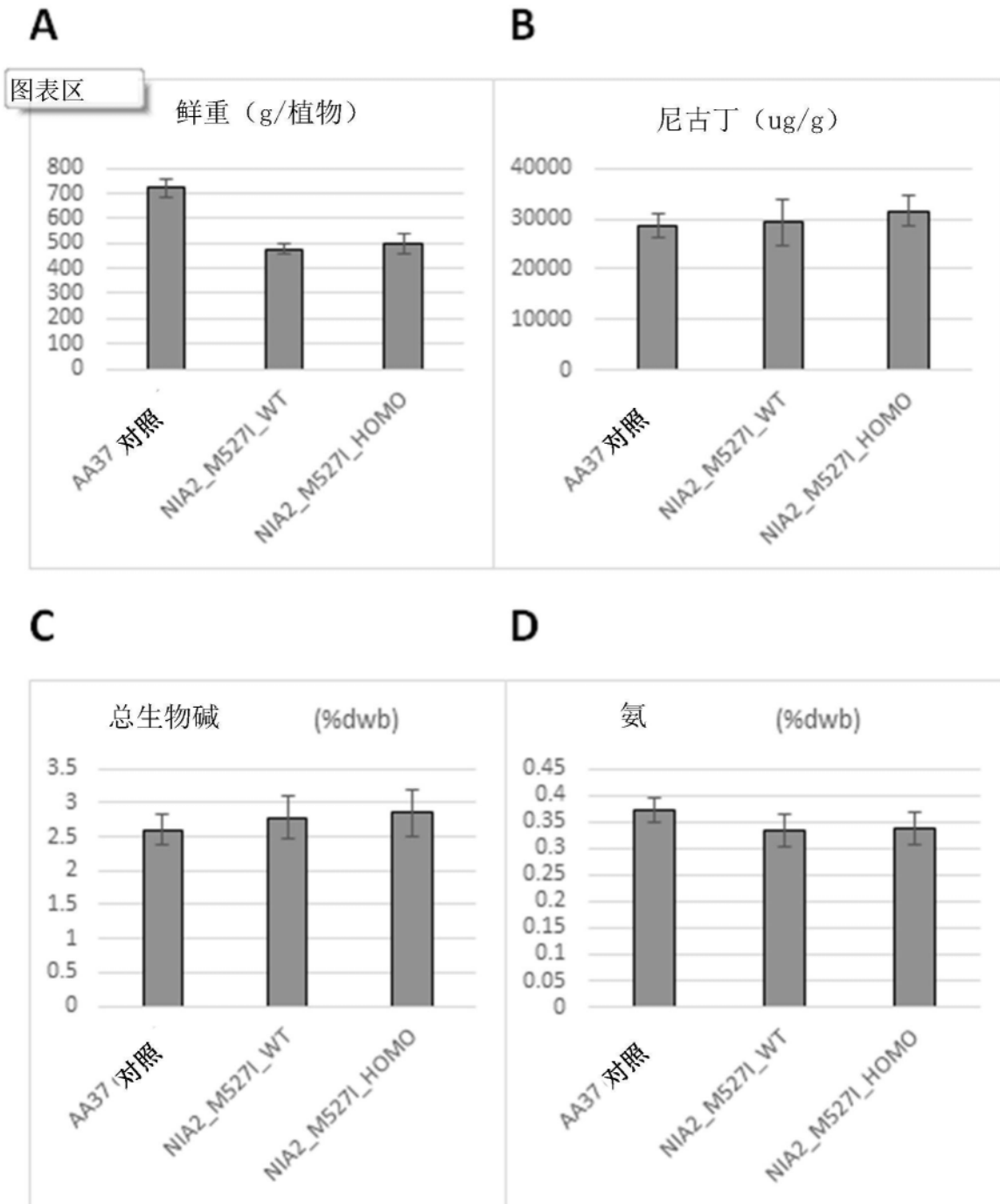


图2

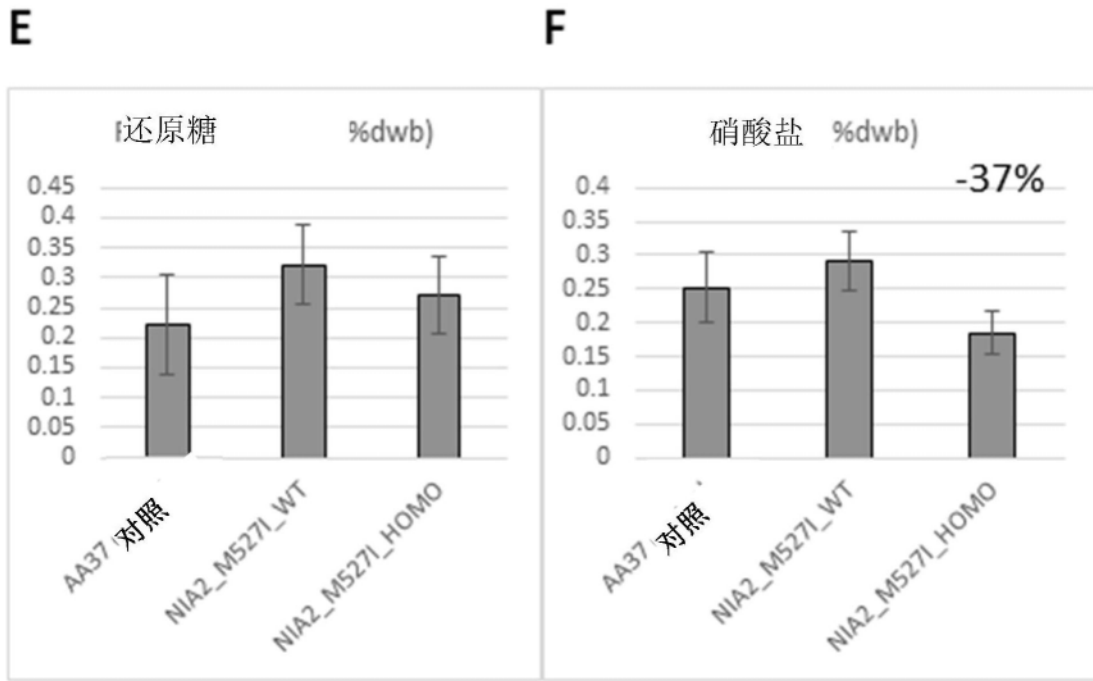


图2续图