



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117089525 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 21

(21) 申请号 202310851781.4

(22) 申请日 2017.03.13

(30) 优先权数据

62/307,035 2016.03.11 US

62/399,181 2016.09.23 US

(62) 分案原申请数据

201780028908.5 2017.03.13

(71) 申请人 奥驰亚客户服务有限公司

地址 美国弗吉尼亚州

(72) 发明人 许冬梅 J·弗雷德里克

C·库迪西普迪 Y·沈

J·斯特里克兰德 J·杨

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 孟凡宏 谢燕军

(51) Int.Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

A01H 5/00 (2018.01)

A01H 6/82 (2018.01)

权利要求书2页 说明书78页

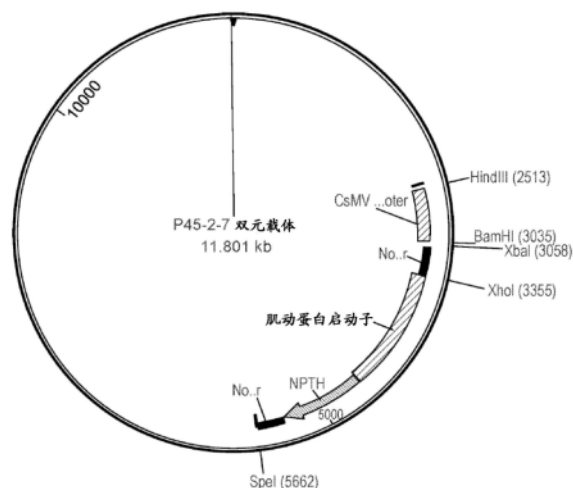
序列表(电子公布) 附图21页

(54) 发明名称

用于生产烟杈减少或消除的烟草植物和制品的组合物和方法

(57) 摘要

本公开提供了涉及烟草中烟杈生长的基因的鉴定。还提供了优选在烟草腋芽中具有活性的启动子。还提供了包含减少的或不包含烟杈生长的改良烟草植物。还提供了用于生产包含减少的或不包含烟杈生长的改良烟草植物的方法和组合物。



1.改良烟草植物细胞,包含转基因,其中所述转基因包含与启动子可操作地连接的编码序列,其中所述启动子包含与SEQ ID NO:117的核酸序列至少95%相同的核酸序列,其中所述编码序列包含编码其氨基酸序列与SEQ ID NO:233至少95%相同的多肽的核酸序列,并且其中所述改良烟草植物细胞不是繁殖材料并且不介导植物的天然繁殖。

2.权利要求1所述的改良烟草植物细胞,其中所述编码序列包含SEQ ID NO:232的核酸序列。

3.来自烟草植物的熟化烟草材料,所述烟草植物包含转基因,其中所述转基因包含与启动子可操作地连接的编码序列,其中所述启动子包含与SEQ ID NO:117至少95%相同的核酸序列,并且其中所述编码序列包含编码其氨基酸序列与SEQ ID NO:233至少95%相同的多肽的核酸序列。

4.权利要求3所述的熟化烟草材料,其中当在可比条件下生长时,与缺少所述转基因的相同品种的对照烟草植物相比,所述改良烟草植物不包含或包含减少的烟杈。

5.权利要求4所述的熟化烟草材料,其中所述减少的烟杈包含减少的质量、减少的长度,或两者。

6.权利要求3所述的熟化烟草材料,其中所述编码序列包含SEQ ID NO:232的核酸序列。

7.权利要求3所述的熟化烟草材料,其中所述熟化烟草材料包含熟化烟叶材料。

8.权利要求3所述的熟化烟草材料,其中所述熟化烟草材料选自:烤制熟化烟草材料、晒制熟化烟草材料和晾制熟化烟草材料。

9.权利要求3所述的熟化烟草材料,其中所述熟化烟草材料为明火烤制熟化烟草材料。

10.权利要求8或9所述的熟化烟草材料,其中所述烤制熟化烟草衍生自选自以下的品种:Coker 48、Coker 176、Coker 371-Gold、Coker 319、Coker 347、GL 939、K 149、K326、K 340、K 346、K 358、K 394、K 399、K 730、NC 27NF、NC 37NF、NC 55、NC 60、NC 71、NC 72、NC 82、NC 95、NC 297、NC 606、NC 729、NC 2326、McNair373、McNair 944、Ox 207、Ox 414NF、Reams 126、Reams 713、Reams744、RG 8、RG 11、RG 13、RG 17、RG 22、RG 81、RG H4、RG H51、Speight H-20、Speight G-28、Speight G-58、Speight G-70、Speight G-108、Speight G-111、Speight G-117、Speight 168、Speight 179、Speight NF-3、Va 116和Va 182。

11.权利要求3所述的熟化烟草材料,其中所述烟草植物选自:白肋烟草植物、马里兰烟草植物、弗吉尼亚烟草植物、土耳其烟草植物和Galpão烟草植物。

12.权利要求3所述的熟化烟草材料,其中所述烟草植物衍生自选自以下的烟草品种:BU 64、CC 101、CC 200、CC 13、CC 27、CC 33、CC 35、CC 37、CC 65、CC 67、CC 301、CC 400、CC 500、CC 600、CC 700、CC 800、CC 900、CC 1063、Coker 176、Coker 319、Coker 371Gold、Coker 48、CU 263、DF911、Galpão、GL 26H、GL 338、GL 350、GL 395、GL 600、GL 737、GL 939、GL 973、GF 157、GF 318、RJR 901、HB 04P、K 149、K 326、K 346、K 358、K394、K 399、K 730、NC 196、NC 37NF、NC 471、NC 55、NC 92、NC2326、NC 95、NC 925、PVH 1118、PVH 1452、PVH 2110、PVH 2254、PVH 2275、VA 116、VA 119、KDH 959、KT 200、KT204LC、KY 10、KY 14、KY 160、KY 17、KY 171、KY 907、KY 907LC、KTY14 x L8 LC、Little Crittenden、McNair 373、McNair 944、male sterile KY 14x L8、Narrow Leaf Madole、MS KY171、Narrow Leaf

Madole(phph)、MS Narrow Leaf Madole、MS TND950、PD 7302LC、PD 7305LC、PD 7309LC、PD 7312LC、PD 7318LC、PD 7319LC、MSTKS 2002、TKF 2002、TKF 6400、TKF 4028、TKF 4024、KT206LC、KT209LC、KT210LC、KT212LC、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、OXFORD 207、'Perique'、PVH03、PVH09、PVH19、PVH50、PVH51、R 610、R 630、R 7-11、R 7-12、RG 17、RG 81、RGH 4、RGH 51、RS 1410、Speight168、Speight 172、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、TN90LC、TN 97、TN97LC、TN D94、TN D950、a TR(Tom Rosson)Madole、VA 309 和VA 359。

13. 一种烟草制品,包含来自烟草植物的熟化烟草材料,所述烟草植物包含转基因,其中所述转基因包含与启动子可操作地连接的编码序列,其中所述启动子包含与SEQ ID NO: 117至少95%相同的核酸序列,并且其中所述编码序列包含编码其氨基酸序列与SEQ ID NO:233至少95%相同的多肽的核酸序列。

14. 权利要求13所述的烟草制品,其中所述编码序列包含SEQ ID NO:232的核酸序列。

15. 权利要求13所述的烟草制品,其中所述烟草制品包含膨化烟草或再造烟草。

16. 权利要求13所述的烟草制品,其中所述熟化烟草材料包含熟化烟叶材料。

17. 权利要求13所述的烟草制品,其中所述烟草制品选自:不通风过滤嘴香烟、雪茄、鼻烟、烟斗烟、嚼烟、叶烟、水烟、烟碎和烟丝。

18. 权利要求13所述的烟草制品,其中所述烟草制品为小雪茄。

19. 权利要求13所述的烟草制品,其中所述烟草制品为雪茄烟。

20. 权利要求13所述的烟草制品,其中所述烟草制品为比迪烟。

21. 权利要求13所述的烟草制品,其中所述烟草制品为通风过滤嘴香烟。

22. 权利要求13所述的烟草制品,其中所述烟草制品为卷烟。

23. 权利要求13所述的烟草制品,其中所述烟草制品是无烟烟草制品。

24. 权利要求23所述的烟草制品,其中所述无烟烟草制品选自嚼烟、潮湿无烟烟草和鼻烟。

25. 权利要求23所述的烟草制品,其中所述无烟烟草制品为干鼻烟。

用于生产烟杈减少或消除的烟草植物和制品的组合物和方法

[0001] 本申请是申请日为2017年3月3日、申请号为201780028908.5、发明名称为“用于生产烟杈减少或消除的烟草植物和制品的组合物和方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 本申请要求于2016年3月11日提交的美国临时专利申请第62/307,035号和于2016年9月23日提交的美国临时专利申请第62/399,181号的权益。所述申请的全文通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本公开鉴定了涉及烟杈(sucker)生长的腋芽特异性的启动子和基因。还提供了与减少或消除烟草植物中的烟杈、通过育种或转基因方法开发它们以及从那些烟草植物生产烟草制品有关的方法和组合物。

[0004] 序列表的并入

[0005] (MS-Windows®中测量为) 735,049字节并于2017年2月24日创建的文件“P34370W000_SL.TXT”中包含的序列表在此电子提交,其全文通过引用并入本文。

背景技术

[0006] 烟草是一种表现出特别强的顶端优势的植物物种。来自茎尖分生组织(SAM)的分子信号介导有效抑制腋芽生长的激素信号。在去除SAM(也称为“打顶”)后,发生生理和分子变化,使得能够从腋生分生组织(芽)生长新枝(或“烟杈”)。烟杈生长导致产量和叶片质量的损失。通过人工去除和施用化学品来控制烟杈。通常将马来酰肼和氟甲脞用于顶部植物以抑制腋芽生长(“分杈(suckering)”)。然而,控制烟杈的劳动力和化学试剂非常昂贵。通过常规育种、突变育种和转基因方法控制烟草中的分杈已成为几十年的主要目标,但是迄今为止,通过这些方法尚未成功抑制或消除分杈。因此,开发具有有限分杈或无分杈的烟草性状将导致化学试剂的使用减少并且将降低与烟草生产相关的成本和劳动力。

[0007] 发明简述

[0008] 在一个方面,本公开提供一种改良的烟草植物,当在可比条件(comparable condition)下生长时,与相同品种的对照烟草植物相比,其不包含分杈或包含减少的分杈。

[0009] 在一个方面,本公开提供一种改良的烟草植物,其中当在可比条件下生长时,与相同品种的对照烟草植物相比,所述改良的烟草植物表现出:抑制或消除的腋生分生组织生长;抑制或消除的腋生分生组织维持;或者它们的组合。

[0010] 在一个方面,本公开提供一种包含重组多核苷酸的植物或种子,其中所述重组多核苷酸包含在L1层、L2层、L3区、肋区、中心区、外围区或其任何组合中起作用的启动子,所述启动子与包含核酸序列的结构性核酸分子可操作地连接,其中所述核酸序列编码与选自下组的多肽具有至少70%序列同一性的多肽:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、

253和255。

[0011] 在一个方面,本公开提供一种重组DNA构建体,其包含在L1层、L2层、L3区、肋区、中心区、外围区或其组合中起作用的启动子;和异源且可操作地连接的核酸序列,其中所述核酸序列编码非编码RNA或多肽。

[0012] 在一个方面,本公开提供一种减少或消除烟草植物中的打顶诱导的分权的方法,其中所述方法包括用重组DNA构建体转化烟草植物,所述重组DNA构建体包含在L1层、L2层、L3区、肋区、中心区、外围区或其组合中起作用的启动子。

[0013] 在一个方面,本公开提供一种包括用重组DNA构建体转化烟草植物的方法,所述重组DNA构建体包含在L1层、L2层、L3区、肋区、中心区、外围区或其组合中起作用并且与多核苷酸可操作地连接的启动子,所述多核苷酸被转录为抑制内源基因水平的RNA分子,其中所述内源基因促进腋生分生组织生长、腋生分生组织维持、或两者,或是腋生分生组织生长、腋生分生组织维持、或两者所需的。

[0014] 在一个方面,本公开提供一种用于生产烟草植物的方法,包括使第一烟草品种的至少一种烟草植物与第二烟草品种的至少一种烟草植物杂交,其中当在可比条件下生长时,与相同品种的对照烟草植物相比,所述第一烟草品种的至少一种烟草植物没有表现出或表现出减少的打顶诱导的分权;和选择当在可比条件下生长时,与相同杂交的对照烟草植物相比,没有表现出或表现出减少的打顶诱导的分权的子代烟草植物。

[0015] 在一个方面,本公开提供一种烟草植物或其部分,其包含与多核苷酸可操作地连接的异源启动子,所述多核苷酸编码与选自下组的多肽具有至少70%序列同一性的多肽:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。

[0016] 在一个方面,本公开提供一种重组DNA构建体,其包含与多核苷酸可操作地连接的异源启动子,所述多核苷酸编码与选自下组的多肽具有至少70%序列同一性的多肽:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。

[0017] 在一个方面,本公开提供一种生长改良的烟草植物的方法,包括种植改良的烟草种子,所述改良的烟草种子包含与多核苷酸可操作地连接的异源启动子,所述多核苷酸编码与选自下组的多肽具有至少70%序列同一性的多肽:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255;和从所述种子生长所述改良的烟草植物。

[0018] 在一个方面,本公开提供一种控制植物中的打顶诱导的分权的方法,包括用重组DNA构建体转化所述植物,其中所述重组DNA构建体包含与多核苷酸可操作地连接的异源启动子,所述多核苷酸编码与选自下组的多肽具有至少70%序列同一性的多肽:SEQ ID NO:

2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。

[0019] 在一个方面,本公开提供一种烟草植物或其部分,其包含与编码非编码RNA分子的多核苷酸可操作地连接的异源启动子,所述非编码RNA分子能够结合编码多肽的RNA,所述多肽与选自下组的多肽具有至少70%序列同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、161-185、187、189、191、197、199、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255,其中所述非编码RNA分子抑制所述多肽的表达。

[0020] 在一个方面,本公开提供一种重组DNA构建体,其包含与编码非编码RNA分子的多核苷酸可操作地连接的异源腋生分生组织特异性的启动子,所述非编码RNA分子能够结合编码多肽的RNA,所述多肽与选自下组的多肽具有至少70%序列同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、161-185、187、189、191、197、199、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255,其中所述非编码RNA分子抑制所述多肽的表达。

[0021] 在一个方面,本公开提供一种生长改良的烟草植物的方法,包括种植含有重组DNA构建体的改良的烟草种子,所述重组DNA构建体包含在L1层、L2层、L3区、肋区、中心区、外围区或其组合中起作用并且与编码非编码RNA分子的多核苷酸可操作地连接的异源启动子,其中所述非编码RNA分子能够结合编码多肽的RNA,所述多肽与选自下组的多肽具有至少70%序列同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、161-185、187、189、191、197、199、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255,其中所述非编码RNA分子抑制所述多肽的表达;和从所述种子生长所述改良的烟草植物。

[0022] 在一个方面,本公开提供一种控制植物中的打顶诱导的分权的方法,包括用重组DNA构建体转化所述植物,其中所述重组DNA构建体包含在L1层、L2层、L3区、肋区、中心区、外围区或其组合中起作用的异源启动子,其中所述启动子与编码非编码RNA分子的多核苷酸可操作地连接,其中所述非编码RNA分子能够结合编码多肽的RNA,所述多肽与选自下组的多肽具有至少70%序列同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、161-185、187、189、191、197、199、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255,其中所述非编码RNA分子抑制所述多肽的表达。

[0023] 在一个方面,本公开提供包含本文提供的重组DNA构建体的细菌细胞。

[0024] 在一个方面,本公开提供包含本文提供的重组DNA构建体的植物基因组。

[0025] 在一个方面,本公开提供一种制造改良种子的方法,包括将本文提供的重组DNA构建体引入植物细胞;筛选植物细胞群体的重组DNA构建体;从所述群体选择一个或多个植物细胞,从所述一个或多个植物细胞产生一种或多种改良植物;和从所述一种或多种改良植物收集一种或多种改良种子。

[0026] 在一个方面,本公开提供一种生产改良的烟草植物以减少或消除分权的方法,其中所述方法包括在一个或多个烟草基因组位点引入一个或多个突变。

[0027] 在一个方面,本公开提供一种生产改良的烟草植物以减少或消除分权的方法,其中所述方法包括在一个或多个烟草基因组位点引入一个或多个突变,和其中从所述改良的烟草植物制造烟草制品。

[0028] 在一个方面,本公开提供一种包含重组多核苷酸的植物或种子,其中所述重组多核苷酸包含在L1层、L2层、L3区、肋区、中心区、外围区或其组合中起作用并且与包含核酸序列的结构性核酸分子可操作地连接的启动子,其中所述核酸序列编码生长素生物合成蛋白或生长素转运蛋白。

[0029] 在一个方面,本公开提供一种包含启动子和异源可操作地连接的核酸序列的重组DNA构建体,所述启动子在L1层、L2层、L3区、肋区、中心区、外围区或其组合中起作用,所述核酸序列编码生长素生物合成蛋白或生长素转运蛋白。

[0030] 在一个方面,本公开提供一种重组DNA构建体,其包含与编码生长素生物合成蛋白或生长素转运蛋白的多核苷酸可操作地连接的异源腋生分生组织特异性的启动子。

[0031] 在一个方面,本公开提供一种烟草植物或其部分,其包含与编码生长素生物合成蛋白或生长素转运蛋白的多核苷酸可操作地连接的异源启动子,所述异源启动子与选自下组的多核苷酸具有至少90%序列同一性:SEQ ID NO:113-118、148-160、204及其片段。

[0032] 在一个方面,本公开提供了一种控制植物中的打顶诱导的分权的方法,包括用重组DNA构建体转化所述植物,其中所述重组DNA构建体包含与编码生长素生物合成蛋白或生长素转运蛋白的多核苷酸可操作地连接的启动子。

[0033] 序列简述

[0034] SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83-160、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225-228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252和254是核酸序列。SEQ ID NO:83-101是RNAi构建体。SEQ ID NO:113-118、148-160和204是启动子或调控核酸序列。SEQ ID NO:119-122是用于TALEN诱变的序列。

[0035] SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255是多肽序列。本文提供的SEQ ID NO的其他描述可见于表1。

[0036] 表1. 序列的描述

[0037]

SEQ ID NO	序列类型	序列描述	BLAST 检索的最高 命中的 NCBI 登录号
1	核酸	转录因子 CYCLOIDEA-样	XM_009609861.1
2	肽	转录因子 CYCLOIDEA-样	
3	核酸	花特异性 γ -硫堇	P32026.1
4	肽	花特异性 γ -硫堇	
5	核酸	多酚氧化酶	XP_006347083.1
6	肽	多酚氧化酶	
7	核酸	UDP-葡萄糖: 葡糖基转移酶	BAG80546.1
8	肽	UDP-葡萄糖: 葡糖基转移酶	
9	核酸	肿瘤相关蛋白	BAA05479.1
10	肽	肿瘤相关蛋白	
11	核酸	假定蛋白	CAN66732.1
12	肽	假定蛋白	
13	核酸	TCP1 蛋白样基因	FJ194953.1
14	肽	TCP1 蛋白样基因	
15	核酸	叶绿素酶-2	EYU43828.1
16	肽	叶绿素酶-2	
17	核酸	含有 AP2/ERF 结构域的转录因子	XP_006363442.1
18	肽	含有 AP2/ERF 结构域的转录因子	
19	核酸	推定的神秘果素	XP_006360306.1
20	肽	推定的神秘果素	
21	核酸	油质蛋白	XP_004236249.1
22	肽	油质蛋白	
23	核酸	ACC 合成酶	XP_006356827.1
24	肽	ACC 合成酶	
25	核酸	含有 LOB 结构域的蛋白 18-样	XP_007052037.1
26	肽	含有 LOB 结构域的蛋白 18-样	
27	核酸	维辛样抗菌肽 Cupin 超家族	XP_006363154.1
28	肽	维辛样抗菌肽 Cupin 超家族	

[0038]

SEQ ID NO	序列类型	序列描述	BLAST 检索的最高命中的 NCBI 登录号
29	核酸	脱落酸不敏感	XP_006341248.1
30	肽	脱落酸不敏感	
31	核酸	Seipin 样	XP_004237589.1
32	肽	Seipin 样	
33	核酸	转录因子 CYCLOIDEA 样	XM_009618194.1
34	肽	转录因子 CYCLOIDEA 样	
35	核酸	转录因子 DICHOTOMA 样	XM_009593876.1
36	肽	转录因子 DICHOTOMA 样	
37	核酸	转录因子 CYCLOIDEA 样	XM_009764845.1
38	肽	转录因子 CYCLOIDEA 样	
39	核酸	RING-H2 手指蛋白 ATL11 样	XP_004251547.1
40	肽	RING-H2 手指蛋白 ATL11 样	
41	核酸	同源盒亮氨酸拉链蛋白 ATHB-40 样	XP_004232382.1
42	肽	同源盒亮氨酸拉链蛋白 ATHB-40 样	
43	核酸	未表征蛋白- LOC102586855 异构体 X1	XP_006357617.1
44	肽	未表征蛋白- LOC102586855 异构体 X1	
45	核酸	未知	CAN63006.1
46	肽	未知	
47	核酸	影响开花 5-样异构体 X1/X2 的 MADS	XP_006366525.1
48	肽	影响开花 5-样异构体 X1/X2 的 MADS	
49	核酸	核转录因子 Y 亚单元	XP_006351227.1
50	肽	核转录因子 Y 亚单元	
51	核酸	核转录因子 Y 亚单元 A-7 样	XP_006351229.1
52	肽	核转录因子 Y 亚单元 A-7 样	
53	核酸	转录因子 CYCLOIDEA 样	XM_009767637.1
54	肽	转录因子 CYCLOIDEA 样	
55	核酸	拟南芥细胞分裂素氧化酶	NM_129714.3
56	肽	拟南芥细胞分裂素氧化酶	
57	核酸	红花烟草(<i>Nicotianatabacum</i>)细胞分裂素氧化酶	XM_009611148.1
58	肽	红花烟草细胞分裂素氧化酶	
59	核酸	红花烟草细胞分裂素氧化酶	XM_009632505.1
60	肽	红花烟草细胞分裂素氧化酶	
61	核酸	红花烟草异戊烯基转移酶基因(IPT-g120126)	XM_009784416.1
62	肽	红花烟草异戊烯基转移酶基因(IPT-g120126)	
63	核酸	红花烟草 WUSCHEL (WUS- g151887)	XM_009589135.1
64	肽	红花烟草 WUSCHEL (WUS- g151887)	

[0039]

SEQ ID NO	序列类型	序列描述	BLAST 检索的最高命中的 NCBI 登录号
65	核酸	红花烟草 WUSCHEL (WUS- g135280)	XM_009793912.1
66	肽	红花烟草 WUSCHEL (WUS- g135280)	
67	核酸	拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)CLAVATA3 (CLV3)	NM_001124926.1
68	肽	拟南芥 CLAVATA3 (CLV3)	
69	核酸	红花烟草 CLAVATA3 (Scaffold00010610)	XM_009628563.1
70	肽	红花烟草 CLAVATA3 (Scaffold00010610)	
71	核酸	红花烟草侧枝抑制子 (g56830)	XM_009619761.1
72	肽	红花烟草侧枝抑制子(g56830)	
73	核酸	红花烟草侧枝抑制子(scafflod0004261)	XM_009766770.1
74	肽	红花烟草侧枝抑制子(scafflod0004261)	
75	核酸	红花烟草腋生分生组织调节子 (RAX- scaffold0000950)	XM_009802273.1
76	肽	红花烟草腋生分生组织调节子 (RAX- scaffold0000950)	
77	核酸	红花烟草腋生分生组织调节子 (RAX- scaffold00001904)	XM_009602411.1
78	肽	红花烟草腋生分生组织调节子 (RAX- scaffold00001904)	
79	核酸	解淀粉芽孢杆菌(<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>) 胞外核糖核酸酶(Barnase)	CP009748.1
80	肽	解淀粉芽孢杆菌胞外核糖核酸酶(Barnase)	
81	核酸	拟南芥 BRANCHED1	NM_001125184.1
82	肽	拟南芥 BRANCHED1	
83	核酸	RNAi_1 (靶向 SEQ ID NO: 1)	
84	核酸	RNAi_2 (靶向 SEQ ID NO: 3)	
85	核酸	RNAi_5 (靶向 SEQ ID NO: 9)	
86	核酸	RNAi_7 (靶向 SEQ ID NO: 13)	
87	核酸	RNAi_8 (靶向 SEQ ID NO: 15)	
88	核酸	RNAi_9 (靶向 SEQ ID NO: 17)	
89	核酸	RNAi_10 (靶向 SEQ ID NO: 19)	
90	核酸	RNAi_12 (靶向 SEQ ID NO: 21)	
91	核酸	RNAi_14 (靶向 SEQ ID NO: 25)	
92	核酸	RNAi_15 (靶向 SEQ ID NO: 27)	
93	核酸	RNAi_16 (靶向 SEQ ID NO: 29)	
94	核酸	RNAi_17 (靶向 SEQ ID NO: 31)	

[0040]

SEQ ID NO	序列类型	序列描述	BLAST 检索的最高命中的 NCBI 登录号
95	核酸	RNAi_18 (靶向 SEQ ID NO: 35)	
96	核酸	RNAi_26 (靶向 SEQ ID NO: 49)	
97	核酸	RNAi_61 (靶向 SEQ ID NO: 61)	
98	核酸	RNAi_63 和 65 (靶向 SEQ ID NO: 63 和 65)	
99	核酸	RNAi_71 和 73 (靶向 SEQ ID NO: 71 和 73)	
100	核酸	RNAi_75 和 77 (靶向 SEQ ID NO: 75 和 77)	
101	核酸	RNAi_CET-26-6 (靶向 SEQ ID NO: 11、49、108、109 和 110)	
102	核酸	RNAi_45-2-7-TDNA-145337-RI (靶向 SEQ ID NO: 39)	
103	核酸	RNAi_45-2-7-TDNA-348CDS-RI (靶向 SEQ ID NO:41)	
104	核酸	RNAi_45-2-7-TDNA-131180CDS-RI (靶向 SEQ ID NO: 43)	
105	核酸	RNAi_45-2-7-TDNA-22266-RI (靶向 SEQ ID NO: 45)	
106	核酸	RNAi_45-2-7-TDNA-53803/75660-RI (靶向 SEQ ID NO: 49)	
107	核酸	RNAi_45-2-7-TDNA-21860-RI (靶向 SEQ ID NO: 47)	
108	核酸	CEN 样蛋白 2 (CET2) g114109	AF145260.1
109	核酸	CEN 样蛋白 2 (CET2) g2420	XM_009596199.1
110	核酸	CEN 样蛋白 2 (CET2) Scaffold0003597 CDS	XM_009787775.1
111	核酸	转化盒	
112	核酸	农杆菌转化载体 p45-2-7	
113	核酸	编码 SEQ ID NO:2 的基因的启动子序列 (基因 1)	
114	核酸	编码 SEQ ID NO:8 的基因的启动子序列 (基因 4)	
115	核酸	编码 SEQ ID NO:14 的基因的启动子序列 (基因 7)	
116	核酸	SEQ ID NO: 275 的启动子 (基因 11)	
117	核酸	编码 SEQ ID NO: 28 的基因的启动子序列(基因 15)	
118	核酸	编码 SEQ ID NO: 4 的基因的启动子序列(基因 2)	
119	核酸	TALEN 供体的序列, 其靶向编码 SEQ ID NO: 1 的基因	

[0041]

SEQ ID NO	序列类型	序列描述	BLAST 检索的最高命中的 NCBI 登录号
120	核酸	TALEN 结合位点的序列, 其靶向编码 SEQ ID NO: 1 的基因	
121	核酸	TALEN 的序列, 包括靶向编码 SEQ ID NO: 13 的基因的启动子 NO: 118、NO:113	
122	核酸	TALEN 结合位点的序列, 其靶向编码 SEQ ID NO: 13 的基因	
123	核酸	红花烟草 T2 Rnase	XP_009794914.1
124	核酸	红花烟草 T2 Rnase	XP_009766067.1
125	核酸	红花烟草 T2 Rnase	XP_009597823.1
126	核酸	红花烟草 Rnase	XP_009775662.1
127	核酸	红花烟草 T2 Rnase	XM_009794797.1
128	核酸	红花烟草 T2 Rnase	XM_009627900.1
129	核酸	红花烟草 T2 Rnase	JQ041907.1
130	核酸	红花烟草 T2 Rnase	XM_009795594.1
131	核酸	红花烟草 T2 Rnase	XM_009795502.1
132	核酸	红花烟草 T2 Rnase	XM_009606804.1
133	核酸	红花烟草 T2 Rnase	XM_009794798.1
134	核酸	红花烟草 T2 Rnase	AB034638.1
135	核酸	红花烟草 T2 Rnase	XM_009784762.1
136	核酸	红花烟草 T2 Rnase	XM_009798107.1
137	核酸	VPE14	XM_009773063.1
138	核酸	VPE15	XM_009594104.1
139	核酸	VPE16	XM_009784979.1
140	核酸	VPE17	XM_009765910.1
141	核酸	VPE4	XM_009623321.1
142	核酸	VPE6	XM_009764257.1
143	核酸	VPE7	AB075949.1
144	核酸	红花烟草蛋白酶	XM_009801188.1
145	核酸	红花烟草蛋白酶	XM_009792063.1
146	核酸	红花烟草蛋白酶	XM_009779330.1
147	核酸	红花烟草蛋白酶	XM_009764284.1
148	核酸	硫堇 5' 上游调控序列	
149	核酸	红花烟草侧枝抑制子 1 (LAS1) 的 5' 上游调控序列	
150	核酸	红花烟草 LAS1 3'下游调控序列	
151	核酸	红花烟草 LAS2 5'上游调控序列	

[0042]

SEQ ID NO	序列类型	序列描述	BLAST 检索的最高命中的 NCBI 登录号
152	核酸	红花烟草 LAS2 3'下游调控序列	
153	核酸	红花烟草腋分生组织调节子(RAX1) 的 5' 上游调控序列	
154	核酸	红花烟草 RAX1 3' 下游调控序列	
155	核酸	红花烟草 RAX2 5'上游调控序列	
156	核酸	红花烟草 RAX2 3'下游调控序列	
157	核酸	SEQ ID NO: 27 5' 上游调控序列	
158	核酸	SEQ ID NO: 27 3'下游调控序列	
159	核酸	SEQ ID NO: 27 同源物 5' 上游调控序列	
160	核酸	SEQ ID NO: 27 同源物 3'下游调控序列	
161	肽	SEQ ID NO: 123 编码的红花烟草 T2 Rnase	
162	肽	SEQ ID NO: 124 编码的红花烟草 T2 Rnase	
163	肽	SEQ ID NO: 125 编码的红花烟草 P1 Rnase	
164	肽	SEQ ID NO: 126 编码的红花烟草 Rnase	
165	肽	SEQ ID NO: 127 编码的红花烟草 T2 Rnase	
166	肽	SEQ ID NO: 128 编码的红花烟草 T2 Rnase	
167	肽	SEQ ID NO: 129 编码的红花烟草 T2 Rnase	
168	肽	SEQ ID NO: 130 编码的红花烟草 T2 Rnase	
169	肽	SEQ ID NO: 131 编码的红花烟草 T2 Rnase	
170	肽	SEQ ID NO: 132 编码的红花烟草 T2 Rnase	
171	肽	SEQ ID NO: 133 编码的红花烟草 T2 Rnase	
172	肽	SEQ ID NO: 134 编码的红花烟草 T2 Rnase	
173	肽	SEQ ID NO: 135 编码的红花烟草 T2 Rnase	
174	肽	SEQ ID NO: 136 编码的红花烟草 T2 Rnase	
175	肽	SEQ ID NO: 137 编码的 VPE14	
176	肽	SEQ ID NO: 138 编码的 VPE15	
177	肽	SEQ ID NO: 139 编码的 VPE16	
178	肽	SEQ ID NO: 140 编码的 VPE17	
179	肽	SEQ ID NO: 141 编码的 VPE4	
180	肽	SEQ ID NO: 142 编码的 VPE6	
181	肽	SEQ ID NO: 143 编码的 VPE7	
182	肽	SEQ ID NO: 144 编码的红花烟草蛋白酶	
183	肽	SEQ ID NO: 145 编码的红花烟草蛋白酶	
184	肽	SEQ ID NO: 146 编码的红花烟草蛋白酶	
185	肽	SEQ ID NO: 147 编码的红花烟草蛋白酶	
186	核酸	C12866 (基因 11)	XP_006467846.1

[0043]

SEQ ID NO	序列类型	序列描述	BLAST 检索的最高命中的 NCBI 登录号
187	肽	C12866 (基因 11)	
188	核酸	红花烟草 STM 同源物(NTH15)	AB004785
189	肽	红花烟草 STM 同源物(NTH15)	
190	核酸	红花烟草(Grassy Tillers1) GT1 同源物	
191	肽	红花烟草(Grassy Tillers1) GT1 同源物	
192	核酸	拟南芥更多腋生分枝 1 (MAX1)	AK316903.1
193	肽	拟南芥更多腋生分枝 1 (MAX1)	
194	核酸	拟南芥 MAX2	AAK97303.1
195	肽	拟南芥 MAX2	
196	核酸	红花烟草 MAX1 同源物	XM_009801023.1
197	肽	红花烟草 MAX1 同源物	
198	核酸	红花烟草 MAX2 同源物	XM_009625596.1
199	肽	红花烟草 MAX2 同源物	
200	核酸	拟南芥侧枝抑制子 (LAS)	BT026519.1
201	肽	拟南芥侧枝抑制子(LAS)	
202	核酸	拟南芥腋生分生组织调节子 (RAX)	AY519628.1
203	肽	拟南芥腋生分生组织调节子 (RAX)	
204	核酸	SEQ ID NO: 28 的番茄 (<i>Solanum lycopersicum</i>) 同源物的调控区	
205	核酸	SEQ ID NO: 28 的番茄同源物	HG975514.1
206	肽	SEQ ID NO: 28 的番茄同源物	
207	核酸	拟南芥 ALCATRAZ	
208	肽	拟南芥 ALCATRAZ	
209	核酸	拟南芥 VND6	
210	肽	拟南芥 VND6	
211	核酸	拟南芥 VND7	
212	肽	拟南芥 VND7	
213	核酸	番茄 Adi3	
214	肽	番茄 Adi3	
215	核酸	拟南芥 XCP1	
216	肽	拟南芥 XCP1	
217	核酸	拟南芥 XCP2	
218	肽	拟南芥 XCP2	
219	核酸	拟南芥 Metacaspase 2d (ATMC4)	
220	肽	拟南芥 Metacaspase 2d (ATMC4)	
221	核酸	拟南芥抗病蛋白 RPS5	

[0044]

SEQ ID NO	序列类型	序列描述	BLAST 检索的最高命中的 NCBI 登录号
222	肽	拟南芥抗病蛋白 RPS5	
223	核酸	红花烟草 TMV 抗性 N 基因	
224	肽	红花烟草 TMV 抗性 N 基因	
225	核酸	甘蔗属(<i>Saccharum spp.</i>)的成熟 miRNA159	
226	核酸	红花烟草前体 miRNA159	
227	核酸	红花烟草成熟 miRNA159	
228	核酸	烟草 NAC089	
229	肽	烟草 NAC089	
230	核酸	烟草(<i>Nicotiana</i>)BAG6	
231	肽	烟草 BAG6	
232	核酸	烟草促分裂素原活化蛋白激酶 2 (NtMEK2)	
233	肽	烟草促分裂素原活化蛋白激酶 2 (NtMEK2)	
234	核酸	拟南芥黄素单加氧酶(YUCCA1)	
235	肽	拟南芥黄素单加氧酶(YUCCA1)	
236	核酸	拟南芥 Pin 型 1 (PIN1)	
237	肽	拟南芥 Pin 型 1 (PIN1)	
238	核酸	拟南芥色氨酸氨基转移酶 1/转运抑制剂应答 2 (TAA1/TIR2)	
239	肽	拟南芥色氨酸氨基转移酶 1/转运抑制剂应答 2 (TAA1/TIR2)	
240	核酸	拟南芥醛氧化酶 1 (AAO1)	
241	肽	拟南芥醛氧化酶 1 (AAO1)	
242	核酸	拟南芥吡啶-3-乙酰胺水解酶 1 (AMI1)	
243	肽	拟南芥吡啶-3-乙酰胺水解酶 1 (AMI1)	
244	核酸	烟草黄素单加氧酶(NtYUCCA 样 1)	
245	肽	烟草黄素单加氧酶(NtYUCCA 样 1)	
246	核酸	烟草黄素单加氧酶 (NtYUCCA 样 2)	
247	肽	烟草黄素单加氧酶(NtYUCCA 样 2)	
248	核酸	烟草 Pin 型 1 样 (NtPIN1 样)	
249	肽	烟草 Pin 型 1 样 (NtPIN1 样)	
250	核酸	烟草色氨酸氨基转移酶 1/转运抑制剂应答 2 样 (NtTAA1/TIR2 样)	
251	肽	烟草色氨酸氨基转移酶 1/转运抑制剂应答 2 样 (NtTAA1/TIR2 样)	
252	核酸	烟草醛氧化酶 1 样 (NtAAO1 样)	
253	肽	烟草醛氧化酶 1 样 (NtAAO1 样)	

SEQ ID NO	序列类型	序列描述	BLAST 检索的最高 命中的 NCBI 登录号
[0045] 254	核酸	烟草吡啶-3-乙酰胺水解酶 1 样 (NtAMI1 样)	
255	肽	烟草吡啶-3-乙酰胺水解酶 1 样 (NtAMI1 样)	
256	肽	6x 组氨酸标签	

附图说明

[0046] 图1是双元载体p45-2-7(SEQ ID NO:112)的质粒图。

[0047] 图2显示了对照烟草植物和过表达SEQ ID NO:11(其编码的产物促进烟草中的烟杈生长)的改良烟草植物的照片。显示打顶时(0小时)和打顶后一周的植物。与对照植物相比,改良植物表现出增加的烟杈生长。

[0048] 图3显示了对照烟草植物和过表达SEQ ID NO:81(其编码拟南芥BRANCHED1)的改良烟草植物的照片。图3A显示打顶时(0小时)和打顶后一周的植物。与对照植物相比,改良植物表现出减少的烟杈生长。图3B表明与对照植物相比,过表达SEQ ID NO:81的改良植物表现出生长迟缓。

[0049] 图4显示了对照烟草植物和表达SEQ ID NO:83(用于抑制的靶向SEQ ID NO:1的RNAi构建体)的改良烟草植物的照片。显示打顶时(0小时)和打顶后一周的植物。与对照植物相比,改良植物表现出增加的分杈。

[0050] 图5显示了对照烟草植物和表达SEQ ID NO:83(用于抑制的靶向SEQ ID NO:1的RNAi构建体)的改良烟草植物中的腋生枝生长。图5A显示代表性对照和改良烟草植物的照片,以及在打顶后两周来自一株植物的所有腋生枝。图5B是显示在打顶后两周来自对照和改良植物的腋生枝的总鲜重的图。与对照植物相比,改良植物表现出增加的腋生枝质量。

[0051] 图6显示了对照烟草植物和表达SEQ ID NO:86(用于抑制的靶向SEQ ID NO:13的RNAi构建体)的改良烟草植物的照片。显示打顶时(0小时)和打顶后一周的植物。与对照植物相比,改良植物表现出增加的分杈。

[0052] 图7是显示在打顶后两周来自对照和表达SEQ ID NO:86(用于抑制的靶向SEQ ID NO:13的RNAi构建体)的改良烟草植物的腋生枝的总鲜重的图。显示了来自六个独立的改良烟草品系的数据。与对照植物相比,改良植物表现出增加的烟杈质量。

[0053] 图8示出了表达SEQ ID NO:95(用于抑制的靶向SEQ ID NO:35的RNAi构建体)的改良烟草植物的照片。改良烟草植物在打顶之前表现出烟杈长出。箭头指向烟杈。

[0054] 图9显示了对照烟草植物和表达SEQ ID NO:101(靶向烟草CENTRORADIALIS的RNAi构建体(SEQ ID NO:108-110))的改良烟草植物的三个独立品系的照片。照片显示打顶后一周的植物顶端(上图)或整个植物(下图)。改良植物中的烟杈生长减少。

[0055] 图10显示了对照烟草植物和表达SEQ ID NO:96(用于抑制的靶向SEQ ID NO:49的RNAi构建体)的改良烟草植物的照片。与对照烟草植物相比,改良烟草植物表现出减少的烟杈生长(箭头)。

[0056] 图11显示了在打顶时(0小时)的烟草茎尖分生组织(SAM)中和在0小时、打顶后24小时和打顶后72小时的腋芽中,与 β -葡萄糖醛酸糖苷酶(GUS)融合的启动子P1(SEQ ID NO:113)的表达模式。GUS积累的暗区显示启动子P1活跃的位置。启动子P1在茎尖和腋芽中均有

功能。

[0057] 图12显示了在烟草幼苗、烟草幼苗的茎尖分生组织 (SAM)、打顶时 (0小时) 的成熟 SAM和在打顶时、打顶后3天、打顶后5天和打顶后7天的腋芽中, 与 β -葡萄糖醛酸糖苷酶 (GUS) 融合的启动子P11 (SEQ ID NO:116) 的表达模式。GUS积累的暗区显示启动子P11活跃的位置。启动子P11在打顶之前的腋芽中活性较弱, 并且在打顶后3天的腋芽中活性较高。打顶后5天和7天, 启动子P11的活性降低。启动子P11在打顶之前的SAM中也具有活性。在幼苗中未检测到GUS染色。

[0058] 图13显示了烟草中与 β -葡萄糖醛酸糖苷酶 (GUS) 融合的启动子P15 (SEQ ID NO:117) 的表达模式。GUS积累的暗区显示启动子P15活跃的位置。图13A显示了在烟草幼苗、烟草幼苗的茎尖分生组织 (SAM)、打顶时 (0小时) 的成熟SAM和在打顶时、打顶后3天、打顶后5天和打顶后7天和打顶后15天的腋芽中的启动子P15的活性。启动子P15在幼苗中不具有活性。启动子P15在SAM底部具有活性, 但它在花分生组织中不具有活性。启动子P15在打顶之前的腋芽中显示强活性, 并且活性维持至少打顶后15天。图13B进一步证明启动子P15的腋芽特异性。图13B显示了在打顶时 (0小时)、打顶后7天和打顶后10天由启动子P15驱动的GUS表达。在各个时间点, 显示来自两个独立的改良烟草品系的腋芽的示例性GUS染色。图13C显示在打顶时 (0小时)、打顶后24小时和打顶后72小时, 来自独立植物的多个腋芽的GUS染色。

[0059] 图14显示的显微镜照片示出了与绿色荧光蛋白 (GFP) 融合的腋芽特异性启动子的活性。图14A显示了茎尖分生组织 (SAM) 和腋芽 (左图) 和腋芽 (右图) 中的启动子P15 (SEQ ID NO:117) ::GFP融合体的结果。启动子P15的活性仅限于腋芽。图14B显示了茎尖分生组织 (SAM) 和腋芽 (左图) 和腋芽 (右图) 中的启动子P1 (SEQ ID NO:113) ::GFP融合体的结果。

[0060] 图15显示了在打顶时 (0小时) 和打顶后30小时的烟草顶端和腋生分生组织中与 β -葡萄糖醛酸糖苷酶 (GUS) 融合的腋芽特异启动子 (pABTh, SEQ ID NO:118) 的表达模式。GUS积累的暗区显示启动子P15活跃的位置。

[0061] 图16显示了启动子P1 (SEQ ID NO:113)、启动子P15 (SEQ ID NO:117) 和启动子 pABTh (SEQ ID NO:118) 中顺式调节元件的位置。+1表示转录起始位点。

[0062] 图17显示了对照烟草植物和表达由腋芽特异性启动子P15 (SEQ ID NO:117) 驱动的 SEQ ID NO:81 (编码拟南芥BRANCHED1并抑制烟杈生长) 和SEQ ID NO:101 (靶向烟草 CENTRORADIALIS并且减少烟杈生长的RNAi构建体) 的改良烟草植物的照片。显示打顶后8天和打顶后15天的植物。与对照植物相比, 改良植物表现出减少的烟杈生长 (箭头)。

[0063] 图18显示了打顶后8天, 对照植物和在启动子P15 (SEQ ID NO:117) 的控制下表达 SEQ ID NO:59 (烟草细胞分裂素氧化酶13) 的改良烟草植物的照片。与对照植物相比, 改良植物表现出减少的烟杈生长 (箭头)。

[0064] 图19显示了对照植物和在启动子P15 (SEQ ID NO:117) 的控制下表达SEQ ID NO:79 (Barnase) 的改良烟草植物的两个独立品系的照片。与对照植物相比, 改良植物表现出减少的烟杈生长 (箭头)。在打顶改良植物之前没有观察到腋生分生组织原基。

[0065] 图20显示了对照植物和在启动子P15 (SEQ ID NO:117) 的控制下表达SEQ ID NO:79 (Barnase) 的改良烟草植物的两个独立品系的照片。改良植物在打顶后一周 (图20A)、打顶后两周 (图20B) 和打顶后三周 (图20C) 表现出与对照植物相比减少的烟杈生长 (箭头)。

[0066] 图21显示了如实施例15中所述进行农杆菌渗入的烟叶的照片。表达SEQ ID NO:79

(Barnase)的载体用作阳性对照,缺少插入物的载体(空载体)用作阴性对照。根据实施例15检查目标基因在烟叶中诱导细胞死亡的能力。例如,当在烟叶中表达时,SEQ ID NO:232导致细胞死亡。

[0067] 发明详述

[0068] 除非另外定义,否则本文使用的技术和科学术语具有的含义与本领域普通技术人员通常理解的含义相同。本领域技术人员将认识到,可以在本公开的实施中使用许多方法。实际上,本公开绝不限于所描述的方法和材料。出于本公开的目的,以下术语定义如下。

[0069] 本文引用的任何参考文献(例如,所有专利、公开的专利申请和非专利出版物)的全文通过引用并入本文。

[0070] 如本文所用,单数形式“一”、“一个”和“所述”包括复数指代,除非上下文另有明确说明。例如,术语“化合物”或“至少一种化合物”可以包括多种化合物,包括其混合物。

[0071] 术语“约”在本文中用于表示大约、大致、左右或在区间内。当术语“约”与数值范围结合使用时,它通过扩展所示数值的上下边界来修改该范围。

[0072] 如本文所用,烟草植物可以来自红花烟草属的任何植物,包括但不限于红花烟草;抱茎烟草(Nicotianamplexicaulis),PI 271989;本塞姆氏烟草(Nicotianbenthamiana)PI 555478;毕基劳氏烟草(Nicotianbigelovii)PI 555485;迪勃纳氏烟草(Nicotiandebneyi);高烟草(Nicotiexcelsior)PI 224063;粘烟草(Nicotiglutinosa)PI 555507;古特斯比氏烟草(Nicotigoodspeedii)PI 241012;哥西氏烟草(Nicotiangosseii)PI 230953;西烟草(Nicotianhesperis)PI 271991;奈特氏烟草(Nicotianknightiana)PI 555527;NicotianmaritimPI 555535;特大管烟草(Nicotianmegalosiphon)PI 555536;Nicotiannudicaulis PI 555540;圆锥烟草(Nicotianpaniculata)PI 555545;蓝茉莉叶烟草(Nicotianplumbaginifolia)PI 555548;残波烟草(Nicotianrepanda)PI 555552;黄花烟草(Nicotianrustica);Nicotiansuaveolens PI 230960;林烟草(Nicotiansylvestris)PI 555569;绒毛烟草(Nicotiantomentosa)PI 266379;绒毛状烟草(Nicotiantomentosiformis);和三角叶烟草(Nicotiantrigonophylla)PI 555572。

[0073] 在一个方面,本公开提供了与改良烟草植物、种子、植物组分、植物细胞和由改良烟草植物、种子、植物部分和植物细胞制成的产品有关的方法和组合物。在一个方面,本文提供的改良种子产生本文提供的改良植物。在一个方面,本文提供的改良植物、种子、植物组分、植物细胞或植物基因组包含本文提供的重组DNA构建体。在另一个方面,本文提供的熟化烟草材料或烟草制品包含本文提供的改良烟草植物、植物组分、植物细胞或植物基因组。

[0074] 如本文所用,“改良的”是指经历诱变、基因组编辑、遗传转化或其组合的植物、种子、植物组分、植物细胞和植物基因组。

[0075] 在一个方面,当在可比条件下生长时,与相同品种的对照烟草植物相比,本文提供的改良烟草植物没有表现出或表现出减少的分权。在一个方面,当在可比条件下生长时,与相同品种的对照烟草植物相比,本文提供的改良烟草植物没有表现出或表现出减少的打顶诱导的分权。本文还提供了生产改良烟草植物的方法,当在可比条件下生长时,与相同品种的对照烟草植物相比,所述改良烟草植物没有表现出或表现出减少的分权。在一个方面,本文提供的方法产生改良烟草植物,当在可比条件下生长时,与相同品种的对照烟草植物相

比,所述改良烟草植物没有表现出或表现出减少的打顶诱导的分权。

[0076] 如本文所用,“同源转基因”或“顺化基因”是指植物、植物细胞或植物基因组的遗传修饰,其中所有组分(例如,启动子、供体核酸、选择基因)仅具有植物来源(即,不使用非植物来源的组分)。在一个方面,本文提供的改良植物、植物细胞或植物基因组是顺化基因的。本文提供的顺化基因植物、植物细胞和植物基因组可产生即用型烟草品系。在另一个方面,本文提供的改良烟草植物不包含非烟草的遗传物质或序列。

[0077] 如本文所用,“分权”是指在叶和茎之间生长的来自腋生分生组织的腋生(或侧枝)芽(“烟权”)的发育和/或生长。腋芽是胚芽,其包含腋生分生组织、周围的叶组织和周围的茎组织。在一个方面,通过打顶植物诱导分权。

[0078] 如本文所用,“打顶”是指当植物接近成熟时去除茎尖,包括SAM、花、并且直至几片相邻的叶。打顶烟草植物导致丧失顶端优势。在打顶之前,通过SAM发出的激素信号使得分权很大程度上处于休眠状态;打顶去除激素信号,并且可以让烟权长出(“打顶诱导的分权”)。如果充分控制分权,则打顶增加产量、增加每英亩的价值,并产生烟叶的物理和化学性质的理想改良。

[0079] 如本文所用,“可比的生长条件”是指用于生长两种或更多种植物基因型并在它们之间进行有意义的比较的类似环境条件和/或农艺实践,使得环境条件和农学实践均不会有助于或解释在两种或更多种植物基因型之间观察到的任何差异。环境条件包括例如光、温度、水、湿度和营养(例如氮和磷)。农艺实践包括例如播种、剪枝、底切、移栽、打顶和分权。参见Chapters 4B and 4C of Tobacco, Production, Chemistry and Technology, Davis&Nielsen, eds., Blackwell Publishing, Oxford (1999), pp. 70-103。

[0080] 如本文所用,“减少的打顶诱导的分权”是指当在可比条件下生长时,与对照植物相比,烟权数量减少;烟权大小(例如生物量)减少,和/或烟权对农艺性能(例如,植物的产量、质量和总生产力)的影响减少。如本文所用,烟权数量、烟权大小和/或烟权对农艺性能的影响“减少”是指统计学上显著的减少。如本文所用,“统计学上显著的”是指当使用适当的统计显著性的度量(例如,单尾双样本t检验)时,p值小于0.05,p值小于0.025,p值小于0.01,或p值小于0.001时。

[0081] 本公开提供了具有期望或增强性质的改良烟草植物,例如在打顶之前或之后抑制或减少的烟权生长。在一个方面,当在可比条件下生长时,与缺乏这种修饰的对照植物相比,本文提供的改良植物包含的总烟权更少、烟权更小或两者。在一个方面,当在可比条件下生长时,与对照植物的烟权相比,本文提供的改良植物的较小烟权包含质量减少、长度减少、直径减少或其组合。在与植物主茎连接的烟权底部测量烟权的直径。

[0082] 在一个方面,当在可比条件下生长时,与未改良对照烟草植物的烟权质量相比,本文提供的改良烟草植物的烟权质量减少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。在一个方面,当在可比条件下生长时,与未改良对照烟草植物的烟权质量相比,本文提供的改良烟草植物的烟权质量减少1%-25%、1%-50%、1%-75%、1%-100%、5%-25%、5%-50%、5%-75%、5%-100%、10%-25%、10%-50%、10%-75%、10%-100%、25%-50%、25%-75%、25%-100%、50%-75%或50%-100%。另一个方面,当在可比条件下生长时,与未改良对照烟草植物的烟权长度相比,本文提供的改良烟草植物的烟

杈长度减少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。在一个方面,当在可比条件下生长时,与未改良对照烟草植物的烟杈长度相比,本文提供的改良烟草植物的烟杈长度减少1%-25%、1%-50%、1%-75%、1%-100%、5%-25%、5%-50%、5%-75%、5%-100%、10%-25%、10%-50%、10%-75%、10%-100%、25%-50%、25%-75%、25%-100%、50%-75%或50%-100%。在一个方面,当在可比条件下生长时,与未改良对照烟草植物的烟杈直径相比,本文提供的改良烟草植物的烟杈直径减少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。在一个方面,当在可比条件下生长时,与未改良对照烟草植物的烟杈直径相比,本文提供的改良烟草植物的烟杈直径减少1%-25%、1%-50%、1%-75%、1%-100%、5%-25%、5%-50%、5%-75%、5%-100%、10%-25%、10%-50%、10%-75%、10%-100%、25%-50%、25%-75%、25%-100%、50%-75%或50%-100%。

[0083] 在另一个方面,当在可比条件下生长时,本文提供的改良烟草植物包含的总烟杈比未改良对照烟草植物少至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少15个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个或至少60个。在一个方面,当在可比条件下生长时,本文提供的改良烟草植物包含的烟杈比未改良对照烟草植物少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。在一个方面,当在可比条件下生长时,与未改良对照烟草植物的烟杈数相比,本文提供的改良烟草植物包含的烟杈数减少1%-25%、1%-50%、1%-75%、1%-100%、5%-25%、5%-50%、5%-75%、5%-100%、10%-25%、10%-50%、10%-75%、10%-100%、25%-50%、25%-75%、25%-100%、50%-75%或50%-100%。

[0084] 茎尖和腋生分生组织具有两个主要功能:维持自身成为一组多能细胞,并产生植物的侧向地上器官(例如,茎、叶、花)。如果分生组织由于任何原因不能维持自身,它最终将耗尽其多能细胞并停止产生额外的器官。在一个方面,当在可比条件下生长时,与相同品种的对照烟草植物相比,本文提供的改良烟草植物表现出抑制或消除的腋生分生组织生长;抑制或消除的腋生分生组织维持;或其组合。

[0085] 在一个方面,当在可比条件下生长时,与对照烟草植物相比,本文提供的改良烟草植物具有相似或更高的叶产量。在一个方面,叶产量选自:新鲜产量、干产量和熟化产量。在一个方面,当在可比条件下生长时,与对照烟草植物相比,本文提供的改良烟草植物产生的叶产量质量在约50%内、约45%内、约40%内、约35%内、约30%内、约25%内、约20%内、约15%内、约10%内、约5%内、约4%内、约3%内、约2%内、约1%内或约0.5%内。在另一个方面,当在可比条件下生长时,本文提供的改良烟草植物产生的叶产量质量比对照烟草植物高至少0.25%、0.5%、1%、2.5%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或超过100%。在另一个方面,当在可比条件下生长时,本文提供的改良烟草植物产生的叶产量质量比对照烟草植物高0.25%-100%、0.5%-100%、1%-100%、2.5%-100%、5%-100%、10%-100%、15%-100%、20%-100%、25%-100%、30%-100%、40%-100%、50%-100%、60%-100%、70%-100%、80%-100%、90%-100%、100%-200%、100%-175%、100%-150%、100%-125%、0.25%-50%、0.5%-50%、1%-

50%、2.5%-50%、5%-50%、10%-50%、15%-50%、20%-50%、25%-50%、30%-50%、40%-50%、50%-200%、50%-175%、50%-150%、50%-125%、0.25%-25%、0.5%-25%、1%-25%、2.5%-25%、5%-25%、10%-25%、15%-25%、20%-25%、25%-200%、25%-175%、25%-150%或25%-125%。在一个方面,本文提供的改良烟草植物产生的叶片数是在可比条件下生长的未改良对照烟草植物产生的叶片数的75%内、60%内、50%内、45%内、40%内、35%内、30%内、25%内、20%内、15%内、10%内、5%内、4%内、3%内、2%内、1%内或0.5%内。

[0086] 在一个方面,当在可比条件下生长时,与对照烟草植物相比,本文提供的改良烟草植物具有相似或更高的株高。在一个方面,当在可比条件下生长时,与对照烟草植物相比,本文提供的改良烟草植物的高度在约50%内、约45%内、约40%内、约35%内、约30%内、约25%内、约20%内、约15%内、约10%内、约5%内、约4%内、约3%内、约2%内、约1%内或约0.5%内。在另一个方面,当在可比条件下生长时,本文提供的改良烟草植物的高度比对照烟草植物高至少0.25%、0.5%、1%、2.5%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或超过100%。在另一个方面,当在可比条件下生长时,本文提供的改良烟草植物的高度比对照烟草植物高0.25%-100%、0.5%-100%、1%-100%、2.5%-100%、5%-100%、10%-100%、15%-100%、20%-100%、25%-100%、30%-100%、40%-100%、50%-100%、60%-100%、70%-100%、80%-100%、90%-100%、100%-200%、100%-175%、100%-150%、100%-125%、0.25%-50%、0.5%-50%、1%-50%、2.5%-50%、5%-50%、10%-50%、15%-50%、20%-50%、25%-50%、30%-50%、40%-50%、50%-200%、50%-175%、50%-150%、50%-125%、0.25%-25%、0.5%-25%、1%-25%、2.5%-25%、5%-25%、10%-25%、15%-25%、20%-25%、25%-200%、25%-175%、25%-150%或25%-125%。

[0087] 在一个方面,当在可比条件下生长时,与对照烟草植物相比,本文提供的改良烟草植物产生的叶具有相似或更高的USDA等级指数值。在一个方面,当在可比条件下生长时,与对照烟草植物相比,本文提供的改良烟草植物产生的叶具有的USDA等级指数值在约50%内、约45%内、约40%内、约35%内、约30%内、约25%内、约20%内、约15%内、约10%内、约5%内、约4%内、约3%内、约2%内、约1%内或约0.5%内。在一个方面,本文提供的改良烟草植物能够产生USDA等级指数值为55或更高、60或更高、65或更高、70或更高、75或更高、80或更高、85或更高、90或更高或95或更高的叶。在一个方面,当在可比条件下生长时,本文提供的改良烟草植物产生的叶的USDA等级指数值比对照烟草植物高至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、35个、40个、45个、50个或超过50个单位。在一个方面,当在可比条件下生长时,本文提供的改良烟草植物产生的叶的USDA等级指数值比对照烟草植物高1-50个、1-45个、1-40个、1-35个、1-30个、1-29个、1-28个、1-27个、1-26个、1-25个、1-24个、1-23个、1-22个、1-21个、1-20个、1-19个、1-18个、1-17个、1-16个、1-15个、1-14个、1-13个、1-12个、1-11个、1-10个、1-9个、1-8个、1-7个、1-6个、1-5个、1-4个、1-3个、1-2个、2-50个、2-45个、2-40个、2-35个、2-30个、2-29个、2-28个、2-27个、2-26个、2-25个、2-24个、2-23个、2-22个、2-21个、2-20个、2-19个、2-18个、2-17个、2-16个、2-15个、2-14个、2-13个、2-12个、2-11个、2-10个、2-9个、2-8个、2-7个、2-6个、2-5个、2-4个、2-3个、3-

50个、3-45个、3-40个、3-35个、3-30个、3-29个、3-28个、3-27个、3-26个、3-25个、3-24个、3-23个、3-22个、3-21个、3-20个、3-19个、3-18个、3-17个、3-16个、3-15个、3-14个、3-13个、3-12个、3-11个、3-10个、3-9个、3-8个、3-7个、3-6个、3-5个、3-4个、4-50个、4-45个、4-40个、4-35个、4-30个、4-29个、4-28个、4-27个、4-26个、4-25个、4-24个、4-23个、4-22个、4-21个、4-20个、4-19个、4-18个、4-17个、4-16个、4-15个、4-14个、4-13个、4-12个、4-11个、4-10个、4-9个、4-8个、4-7个、4-6个、4-5个、5-50个、5-45个、5-40个、5-35个、5-30个、5-29个、5-28个、5-27个、5-26个、5-25个、5-24个、5-23个、5-22个、5-21个、5-20个、5-19个、5-18个、5-17个、5-16个、5-15个、5-14个、5-13个、5-12个、5-11个、5-10个、5-9个、5-8个、5-7个、5-6个、10-50个、10-40个、10-30个、10-20个、20-50个、20-30个、20-40个或20-30个单位。

[0088] 基于包括但不限于以下的因素评估烟草等级:叶柄位置、叶大小、叶颜色、叶均匀性和完整性、成熟度、质地、弹性、光泽(与叶的强度和着色深度以及光亮相关)、吸湿性(烟叶吸收并保持环境水分的能力)、绿色细微差别或落叶病(cast)。例如,可以使用美国农业部农业营销服务部公布的官方标准等级(7U.S.C. §511)来确定叶等级。参见例如Official Standard Grades for Burley Tobacco(U.S.Type 31and Foreign Type 93),1990年11月5日生效(55F.R.40645);Official Standard Grades for Flue-Cured Tobacco(U.S.Types 11,12,13,14and Foreign Type 92),1989年3月27日生效(54F.R.7925);Official Standard Grades for PennsylvaniSeedleaf Tobacco(U.S.Type 41),1965年1月8日生效(29F.R.16854);Official Standard Grades for Ohio Cigar-Leaf Tobacco(U.S.Types 42,43,and 44),1963年12月8日生效(28F.R.11719and 28F.R.11926);Official Standard Grades for Wisconsin Cigar-Binder Tobacco(U.S.Types 54and 55),1969年11月20日生效(34F.R.17061);Official Standard Grades for Wisconsin Cigar-Binder Tobacco(U.S.Types 54and 55),1969年11月20日生效(34F.R.17061);Official Standard Grades for Georgian and Florida Shade-Grown Cigar-Wrapper Tobacco(U.S.Type 62),1971年4月生效。USDA等级指数值可根据行业认可的等级指数确定。参见例如Bowman等,Tobacco Science,32:39-40(1988);Legacy Tobacco Document Library(Bates Document#523267826-523267833,July 1,1988,Memorandum on the Proposed Burley Tobacco Grade Index);和Miller等,1990,Tobacco Intern.,192:55-57(所有前述参考文献的全文通过引用并入本文)。或者,可以通过高光谱成像确定叶的等级。参见例如WO 2011/027315(2011年3月10日公开,其全文通过引用并入本文)。

[0089] 在一个方面,当在可比条件下生长时,与对照植物相比,本文提供的改良植物需要减少的管理来控制分枝。如本文所用,“管理”是指人工去除烟杈、施用化学品(例如马来酰肼、氟甲脞)以抑制或除去烟杈,或两者。在一个方面,当在可比条件下生长时,与对照植物相比,本文提供的改良植物需要的人工烟杈去除频率降低、化学品施用频率降低、化学品施用量降低或其组合。参见例如,其全文通过引用并入本文的Fisher等“Topping,Managing Suckers,and Using Ethephon,”pages 96-117In:2016Flue-Cured Tobacco Information,North Carolina State University。在一个方面,当在可比条件下生长时,本文提供的改良植物需要的人工去除烟杈的频率是对照植物的10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在一个方面,当在可比条件下生长时,本文提供的改良植物需要的人工去除烟杈的频率比对照植物低10%、低20%、低30%、低40%、低

50%、低60%、低70%、低75%、低80%、低85%、低90%或低95%。在一个方面,当在可比条件下生长时,本文提供的改良植物需要的人工去除烟杈的频率是对照植物的10%-95%、20%-95%、30%-95%、40%-95%、50%-95%、60%-95%、70%-95%、80%-95%、85%-95%、90%-95%、10%-50%、20%-50%、30%-50%、40%-50%、10%-20%、10%-30%、10%-40%、10%-50%、10%-60%、10%-70%、10%-80%、10%-85%或10%-90%。在一个方面,当在可比条件下生长时,本文提供的改良植物需要的控制分杈的化学品施用频率是对照植物的10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在一个方面,当在可比条件下生长时,本文提供的改良植物需要的控制分杈的化学品施用频率比对照植物低10%、低20%、低30%、低40%、低50%、低60%、低70%、低75%、低80%、低85%、低90%或低95%。在一个方面,当在可比条件下生长时,本文提供的改良植物需要的控制分杈的化学品施用频率是对照植物的10%-95%、20%-95%、30%-95%、40%-95%、50%-95%、60%-95%、70%-95%、80%-95%、85%-95%、90%-95%、10%-50%、20%-50%、30%-50%、40%-50%、10%-20%、10%-30%、10%-40%、10%-50%、10%-60%、10%-70%、10%-80%、10%-85%或10%-90%。在一个方面,当在可比条件下生长时,本文提供的改良植物需要的化学品喷雾体积是对照植物控制分杈所用体积的10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在一个方面,当在可比条件下生长时,本文提供的改良植物需要的化学品喷雾体积比对照植物控制分杈所用的体积少10%、少20%、少30%、少40%、少50%、少60%、少70%、少75%、少80%、少85%、少90%或少95%。在一个方面,当在可比条件下生长时,本文提供的改良植物需要的化学品喷雾体积比对照植物少10%-95%、20%-95%、30%-95%、40%-95%、50%-95%、60%-95%、70%-95%、80%-95%、85%-95%、90%-95%、10%-50%、20%-50%、30%-50%、40%-50%、10%-20%、10%-30%、10%-40%、10%-50%、10%-60%、10%-70%、10%-80%、10%-85%或10%-90%。

[0090] 除非另有说明,否则本文提及的烟草植物、品种、栽培种或品系的烟杈长度、烟杈质量、烟杈数、叶产量或叶等级指数值的测量是指平均测量值,包括例如,单个植株的多片叶的平均值(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20或更多片叶)或来自单个品种、栽培种或品系的烟草植物群的平均测量值。用于测定平均测量值(例如,鲜重或叶分级)的烟草植物群或烟叶集合可以是任何大小,例如5、10、15、20、25、30、35、40或50。遵循行业认可的标准方案来测定平均测量值或等级指数值。

[0091] 在一个方面,当在可比条件下生长时,与对照植物相比,改良植物或叶具有相似的叶化学谱。不受限制,叶化学谱可包括烟草植物或烟叶中的生物碱(例如,烟碱、降烟碱、新烟碱、新烟草碱)、苹果酸和还原糖(例如葡萄糖)或其组合的量。在一个方面,当在可比条件下生长时,本文提供的改良植物或叶包含的总生物碱水平在对照植物的总生物碱水平的约50%内、约45%内、约40%内、约35%内、约30%内、约25%内、约20%内、约15%内、约10%内、约5%内、约4%内、约3%内、约2%内、约1%内或约0.5%内。在一个方面,当在可比条件下生长时,本文提供的改良植物或叶包含的烟碱水平在对照植物的烟碱水平的约50%内、约45%内、约40%内、约35%内、约30%内、约25%内、约20%内、约15%内、约10%内、约5%内、约4%内、约3%内、约2%内、约1%内或约0.5%内。在一个方面,当在可比条件下生长时,本文提供的改良植物或叶包含的降烟碱水平在对照植物的降烟碱水平的约50%内、约

45%内、约40%内、约35%内、约30%内、约25%内、约20%内、约15%内、约10%内、约5%内、约4%内、约3%内、约2%内、约1%内或约0.5%内。在一个方面,当在可比条件下生长时,本文提供的改良植物或叶包含的新烟碱水平在对照植物的新烟碱水平的约50%内、约45%内、约40%内、约35%内、约30%内、约25%内、约20%内、约15%内、约10%内、约5%内、约4%内、约3%内、约2%内、约1%内或约0.5%内。在一个方面,当在可比条件下生长时,本文提供的改良植物或叶包含的新烟草碱水平在对照植物的新烟草碱水平的约50%内、约45%内、约40%内、约35%内、约30%内、约25%内、约20%内、约15%内、约10%内、约5%内、约4%内、约3%内、约2%内、约1%内或约0.5%内。在一个方面,当在可比条件下生长时,本文提供的改良植物或叶包含的苹果酸水平在对照植物的苹果酸水平的约50%内、约45%内、约40%内、约35%内、约30%内、约25%内、约20%内、约15%内、约10%内、约5%内、约4%内、约3%内、约2%内、约1%内或约0.5%内。在一个方面,当在可比条件下生长时,本文提供的改良植物或叶包含的还原糖水平在对照植物的还原糖水平的约50%内、约45%内、约40%内、约35%内、约30%内、约25%内、约20%内、约15%内、约10%内、约5%内、约4%内、约3%内、约2%内、约1%内或约0.5%内。在一个方面,当在可比条件下生长时,本文提供的改良植物或叶包含的葡萄糖水平在对照植物的葡萄糖水平的约50%内、约45%内、约40%内、约35%内、约30%内、约25%内、约20%内、约15%内、约10%内、约5%内、约4%内、约3%内、约2%内、约1%内或约0.5%内。

[0092] 在一个方面,当在可比条件下生长时,与对照植物相比,本文提供的改良植物或叶不包含或包含减少的烟杈,并且包含的烟碱水平比对照植物的烟碱水平低至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或至少99.9%。

[0093] 在一个方面,本文提供的植物组分包括但不限于叶、茎、根、种子、花、花粉、花药、胚珠、花梗、果实、分生组织、子叶、下胚轴、果荚、胚、胚乳、外植体、愈伤组织、组织培养物、嫩芽、细胞和原生质体。在其他方面,本公开提供了不是繁殖材料并且不介导植物的天然繁殖的烟草植物细胞、组织和器官。在另一方面,本公开还提供是繁殖材料并介导植物的天然繁殖的烟草植物细胞、组织和器官。在另一方面,本发明提供了不能通过光合作用维持自身的烟草植物细胞、组织和器官。另一方面,本发明提供了体细胞烟草植物细胞。与生殖细胞相反,体细胞不介导植物繁殖。

[0094] 所提供的细胞、组织和器官可以来自种子、果实、叶、子叶、下胚轴、分生组织、胚、胚乳、根、嫩芽、茎、果荚、花、花序、叶柄、花梗、花柱、柱头、花托、花瓣、萼片、花粉、花药、花丝、子房、胚珠、果皮、韧皮部和维管组织。另一方面,本公开提供烟草植物叶绿体。在进一步的方面,本公开提供表皮细胞、气孔细胞、叶毛(毛状体)、根毛或贮藏根。在另一方面,本公开提供烟草原生质体。

[0095] 技术人员理解,烟草植物通过种子自然繁殖,而不是通过无性繁殖或营养繁殖。在一个方面,本公开提供烟草胚乳。另一方面,本公开提供烟草胚乳细胞。在进一步的方面,本公开提供一种雄性或雌性不育的烟草植物,其在没有人为干预的情况下不能繁殖。

[0096] 在一个方面,本文提供的改良植物、种子、植物部分或植物细胞包含一种或多种非天然存在的突变。在一个方面,本文提供的突变抑制植物中的分权。另一方面,本文提供的突变抑制植物中的打顶诱导的分权。还在另一方面,本文提供的突变在打顶之前抑制植物

中的分权。本文提供的突变类型包括例如取代(点突变)、缺失、插入、重复和倒位。期望这种突变存在于基因的编码区中;然而,启动子或其他调节区、内含子、内含子-外显子边界或基因的非翻译区中的突变也可能是期望的。

[0097] 在一个方面,本文提供的方法能够使用诱变产生具有减少的分权的烟草植物。诱变方法包括但不限于化学诱变,例如用甲基硫酸乙酯(EMS)处理种子(Hildering and Verkerk, In, The use of induced mutations in plant breeding. Pergamon Press, pp. 317-320, 1965);或UV辐射、X射线、电子束、离子束(例如碳离子束、氮离子束、氦离子束)和快中子辐照(参见例如, Verkerk, Neth. J. Agric. Sci. 19:197-203, 1971; Poehlman, Breeding Field Crops, VNostrand Reinhold, New York (3. sup. rd ed.), 1987; 和 Tanaka, J. Radiat. Res. 51:223-233, 2010);转座子标记(Fedoroff等, 1984; 美国专利号4,732,856 和美国专利号5,013,658)和T-DNA插入方法(Hoekema等, 1983; 美国专利号5,149,645)。EMS诱导的诱变包括在基因组长度上化学诱导随机点突变。快中子诱变包括将种子暴露于中子轰击,其通过双链DNA断裂引起大的缺失。转座子标记包括在内源基因中插入转座子以减少或消除基因的表达。

[0098] 此外,用于筛选化学诱导的突变的快速且可自动化的方法、TILLING(靶向诱导的基因组局部损伤)、使用变性HPLC或选择的PCR产物的选择性核酸内切酶消化也适用于本公开。参见McCallum等(2000) Nat. Biotechnol. 18:455-457。可以使用本领域熟知的方法确定本文提供的影响基因表达或干扰基因功能的突变。基因外显子中的插入突变通常导致无效突变体。保守残基中的突变可以特别有效地抑制蛋白质的功能。

[0099] 可以通过本领域普通技术人员已知的任何方法筛选和选择诱变的烟草植物。筛选和选择方法的实例包括但不限于Southern分析、用于检测多核苷酸的PCR扩增、Northern印迹、RNase保护、引物延伸、用于检测RNA转录物的RT-PCR扩增、Sanger测序、下一代测序技术(例如, Illumina、PacBio、Ion Torrent、454)、用于检测多肽和多核苷酸的酶或核酶活性的酶促分析,以及用于检测多肽的蛋白质凝胶电泳、Western印迹、免疫沉淀和酶联免疫测定。其他技术如原位杂交、酶染色和免疫染色也可用于检测多肽和/或多核苷酸的存在或表达。用于进行所有所指技术的方法是已知的。

[0100] 在一个方面,与天然存在的多核苷酸相比,本文提供的多核苷酸包含至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个或超过10个突变。在另一个方面,本文提供的突变位于选自下组的多核苷酸中:SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83-160、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225-228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252和254。在一个方面,本文提供的突变位于编码选自下组的多肽的多核苷酸中:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。

[0101] 在一个方面,本文提供的植物基因组通过选自以下的核酸酶突变(编辑):大范围核酸酶、锌指核酸酶(ZFN)、转录激活子样效应子核酸酶(TALEN)、CRISPR/Cas9核酸酶或

CRISPR/Cpf1核酸酶。在另一方面,本文提供的植物基因组通过CRISPR/CasX或CRISPR/CasY核酸酶突变。如本文所用,“编辑”或“基因组编辑”是指内源植物基因组核酸序列的至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、或至少10个核苷酸的定向诱变,或去除或替换内源植物基因组的核酸序列。在一个方面,本文提供的经编辑的核酸序列与内源核酸序列具有至少99.9%、至少99.5%、至少99%、至少98%、至少97%、至少96%、至少95%、至少94%、至少93%、至少92%、至少91%、至少90%、至少85%、至少80%或至少75%的序列同一性。在一个方面,本文提供的经编辑的核酸序列与选自以下的多核苷酸具有至少99.9%、至少99.5%、至少99%、至少98%、至少97%、至少96%、至少95%、至少94%、至少93%、至少92%、至少91%、至少90%、至少85%、至少80%或至少75%的序列同一性:SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83-160、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225-228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254及其片段。在另一个方面,本文提供的经编辑的核酸序列与编码选自以下的多肽的多核苷酸具有至少99.9%、至少99.5%、至少99%、至少98%、至少97%、至少96%、至少95%、至少94%、至少93%、至少92%、至少91%、至少90%、至少85%、至少80%或至少75%的序列同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253、255及其片段。

[0102] 在一个方面,本文提供的核酸酶用于编辑植物基因组位点,所述植物基因组位点编码的序列与选自以下的多核苷酸具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性:SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83-160、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225-228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254及其片段。

[0103] 在另一个方面,本文提供的核酸酶用于编辑植物基因组位点,所述植物基因组位点编码的多肽与选自以下的多肽具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。在另一个方面,本文提供的核酸酶用于编辑植物基因组位点,所述植物基因组位点编码的多肽与选自以下的多肽具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列相似性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、

229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。

[0104] 大范围核酸酶、ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9和CRISPR/Cpf1在基因组序列的靶位点诱导双链DNA断裂,其然后通过同源重组(HR)或非同源末端连接(NHEJ)的自然过程修复。然后在切割位点发生序列修饰,其可包括在NHEJ的情况下导致基因破坏的缺失或插入,或通过HR整合供体核酸序列。在一个方面,本文提供的方法包括用本文提供的核酸酶经由具有供体多核苷酸的HR编辑植物基因组以突变植物基因组中的至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个或超过10个核苷酸。在一个方面,本文提供的突变由使用核酸酶编辑基因组引起。在另一方面,本文提供的突变由非同源末端连接或同源重组引起。

[0105] 通常在微生物中鉴定的大范围核酸酶是具有高活性和长识别序列(>14bp)的独特酶,其导致靶DNA的位点特异性消化。天然存在的大范围核酸酶的工程化版本通常具有延长的DNA识别序列(例如,14至40bp)。

[0106] 在一个方面,本文提供的大范围核酸酶编辑与选自以下的多核苷酸具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多核苷酸:SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83-160、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225-228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254及其片段。在一个方面,本文提供的大范围核酸酶编辑编码多肽的多核苷酸,所述多肽与选自以下的多肽具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。在另一个方面,本文提供的大范围核酸酶编辑编码多肽的多核苷酸,所述多肽与选自以下的多肽具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列相似性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。

[0107] 大范围核酸酶的工程化可能比ZFN和TALEN更具挑战性,因为大范围核酸酶的DNA识别和切割功能在单个结构域中交织。已经使用专门的诱变方法和高通量筛选来产生新的大范围核酸酶变体,其识别独特序列并具有提高的核酸酶活性。

[0108] ZFN是合成蛋白质,其由与FokI限制性内切核酸酶的切割结构域融合的工程化锌指DNA结合结构域组成。ZFN可以设计成切割几乎任何长链的双链DNA,用于修饰锌指DNA结合结构域。ZFN由单体形成二聚体,所述单体由与工程化以结合靶DNA序列的锌指阵列融合的FokI核酸内切酶的非特异性DNA切割结构域组成。

[0109] ZFN的DNA结合结构域通常由3-4个锌指阵列组成。可以改变和定制相对于锌指 ∞ -

螺旋的起始位置-1、+2、+3和+6的氨基酸(其有助于与靶DNA的位点特异性结合)以适合特定的靶标列。其他氨基酸形成共有骨架以产生具有不同序列特异性的ZFN。用于选择ZFN的靶序列的规则是本领域中已知的。

[0110] FokI核酸酶结构域需要二聚化以切割DNA,因此需要两个具有C末端区域的ZFN来结合切割位点的相对DNA链(分开5-7bp)。如果两个ZF结合位点是回文的,那么ZFN单体可以切割靶标位点。如本文所用,术语ZFN是广义的并且包括单体ZFN,其可以在没有另一个ZFN帮助的情况下切割双链DNA。术语ZFN还用于指一对ZFN的一个或两个成员,其被工程化以共同作用以在同一位点切割DNA。

[0111] 不受任何科学理论的限制,因为锌指结构域的DNA结合特异性原则上可以使用各种方法之一进行重新工程化,理论上可以构建定制的ZFN以靶向几乎任何基因序列。用于工程化锌指结构域的公众可得的方法包括依赖于上下文的装配(CoDA)、寡聚化池工程(OPEN)和模块化装配。

[0112] 在一个方面,本文提供的ZFN编辑与选自以下的多核苷酸具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多核苷酸:SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83-160、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225-228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254及其片段。在另一个方面,本文提供的ZFN编辑编码多肽的多核苷酸,所述多肽与选自以下的多肽具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。在另一个方面,本文提供的ZFN编辑编码多肽的多核苷酸,所述多肽与选自以下的多肽具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列相似性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。

[0113] TALEN是通过将转录激活子样效应子(TALE)DNA结合结构域与FokI核酸酶结构域融合而产生的人工限制酶。当TALEN对的每个成员与靶标位点侧翼的DNA位点结合时,FokI单体二聚化并导致靶标位点处的双链DNA断裂。

[0114] 如本文所用,术语TALEN是广义的并且包括单体TALEN,其可以在没有另一个TALEN帮助下切割双链DNA。术语TALEN还用于指一对TALEN的一个或两个成员,它们共同作用以在同一位点切割DNA。

[0115] 可以工程化转录激活子样效应子(TALE)以实际上结合任何DNA序列。TALE蛋白质是衍生自黄单胞菌(Xanthomonas)属的各种植物细菌病原体的DNA结合结构域。X病原体在

感染期间将TALE分泌到宿主植物细胞中。TALE移动到细胞核,在那里它识别并结合宿主基因组中特定基因的启动子区域中特定DNA序列的启动子区域中的特定DNA序列。TALE具有13-28个重复的33-34个氨基酸的单体组成的中心DNA结合结构域。除第12位和第13位的高变氨基酸残基外,每种单体的氨基酸都高度保守。两种可变氨基酸称为重复可变的双残基(RVD)。RVD的氨基酸对NI、NG、HD和NN分别优先识别腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶和鸟嘌呤/腺嘌呤,并且RVD的调节可以识别连续的DNA碱基。氨基酸序列和DNA识别之间的这种简单关系允许通过选择含有适当RVD的重复区段的组合来工程化特定的DNA结合结构域。

[0116] 除了野生型FokI切割结构域之外,已经设计了具有突变的FokI切割结构域的变体以改善切割特异性和切割活性。FokI结构域作为二聚体起作用,其需要两个构建体,所述构建体具有对于靶基因组中具有适当方向和间距的位点具有独特性的DNA结合结构域。TALEN DNA结合结构域和FokI切割结构域之间的氨基酸残基数和两个单独TALEN结合位点之间的碱基数均是实现高水平活性的参数。

[0117] 氨基酸序列与TALE结合结构域的DNA识别之间的关系允许可设计的蛋白质。诸如DNA Works的软件程序可用于设计TALE构建体。设计TALE构建体的其他方法是本领域技术人员已知的。参见Doyle等, *Nucleic Acids Research* (2012) 40:W117-122.; Cermak等, *Nucleic Acids Research* (2011) .39:e82; 和 tale-nt.cac.cornell.edu/about。

[0118] 在一个方面,本文提供的TALEN编辑与选自以下的多核苷酸具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多核苷酸:SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83-160、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225-228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254及其片段。在另一个方面,本文提供的TALEN编辑编码多肽的多核苷酸,所述多肽与选自以下的多肽具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。在另一个方面,本文提供的TALEN编辑编码多肽的多核苷酸,所述多肽与选自以下的多肽具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列相似性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。

[0119] CRISPR/Cas9系统或CRISPR/Cpf1系统是基于FokI的方法ZFN和TALEN的替代方案。CRISPR系统基于RNA引导的工程化核酸酶,其使用互补碱基配对来识别靶标位点处的DNA序列

[0120] CRISPR/Cas9系统是细菌和古细菌的适应性免疫系统的一部分,通过以序列依赖

性方式切割外源DNA来保护它们免受入侵核酸如病毒的侵害。通过在CRISPR位点近端的两个相邻重复序列之间整合称为间隔子的入侵DNA的短片段来获得免疫力。CRISPR阵列(包括间隔子)在随后与侵入性DNA相遇时被转录,并被加工成长度约为40nt的小干扰CRISPR RNA(crRNA),其与反式激活CRISPR RNA(tracrRNA)结合以激活并引导Cas9核酸酶。这切割了入侵DNA中称为原型间隔子的同源双链DNA序列。切割的前提是在靶DNA下游存在保守的原型间隔子-邻近基序(PAM),其通常具有序列5-NGG-3,较少具有序列NAG。特异性由PAM上游约12个碱基的所谓“种子序列”提供,其必须在RNA和靶DNA之间匹配。Cpf1以与Cas9类似的方式起作用,但Cpf1不需要tracrRNA。

[0121] 在一个方面,本文提供的工程化引导RNA将Cas9或Cpf1核酸酶导向与选自以下的多核苷酸具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多核苷酸:SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83-160、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225-228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254及其片段。在另一个方面,本文提供的工程化引导RNA将Cas9或Cpf1核酸酶导向编码多肽的多核苷酸,所述多肽与选自以下的多肽具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。在另一个方面,本文提供的工程化引导RNA将Cas9或Cpf1核酸酶导向编码多肽的多核苷酸,所述多肽与选自以下的多肽具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列相似性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。

[0122] 在一个方面,本文提供的Cas9或Cpf1核酸酶切割与选自以下的多核苷酸具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多核苷酸:SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83-160、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225-228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254及其片段。在另一个方面,本文提供的Cas9或Cpf1核酸酶切割编码多肽的多核苷酸,所述多肽与选自以下的多肽具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、

199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。在另一个方面,本文提供的Cas9或Cpf1核酸酶切割编码多肽的多核苷酸,所述多肽与选自以下的多肽具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列相似性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。

[0123] 在一个方面,本文提供的诱变系统(例如,化学诱变、辐射诱变、转座子诱变、农杆菌介导的转化、大范围核酸酶、ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9系统、CRISPR/Cpf1系统),或本文提供的诱变系统的组合用于将一个或多个突变引入烟草基因的方法中,所述烟草基因在至少一种烟草腋生分生组织细胞中天然表达。

[0124] 还在另一个方面,本文提供的改良烟草植物进一步在编码烟碱脱甲基酶(例如,CYP82E4、CYP82E5、CYP82E10)的一个或多个基因座中包含一个或多个突变,与在编码烟碱脱甲基酶的一个或多个基因座中缺少一个或多个突变的对照植物相比,其赋予减少量的降烟碱(参见美国专利号8,319,011;8,124,851;9,187,759;9,228,194;9,228,195;9,247,706)。在另一个方面,本文提供的烟草植物进一步在Nic1基因座、Nic2基因座或两者中包含一个或多个突变,与在Nic1基因座、Nic2基因座或两者中缺少一个或多个突变的对照植物相比,其赋予减少量的烟碱。

[0125] 在一个方面,本文提供的重组DNA构建体或表达盒包含选自以下的启动子:组成型启动子、诱导型启动子和组织优选启动子(例如,但不限于,叶特异性启动子、根特异性启动子或分生组织特异性启动子)。

[0126] 在一个方面,本文提供的启动子是腋芽特异性启动子。在一个方面,本文提供的启动子是腋生分生组织特异性启动子。在一个方面,本文提供的腋生分生组织特异性启动子在L1层、L2层、L3层或其组合中起作用或优先起作用。双子叶茎尖和腋生分生组织包含三个不同的细胞层:L1层(最外层)、L2层(中间层)和L3层(最内层)。L1和L2层组成原套,并且它们背斜分裂(分裂平面垂直于分生组织的表面)。L3层或原体在各个方向分裂。L1层最终产生表皮组织;L2层产生地面组织(例如薄壁组织、厚角组织、厚壁组织);L3层通常产生维管组织(例如木质部、韧皮部)。

[0127] 茎尖和腋生分生组织也可以分成三个区域:中心区、外围区和肋区。来自中心区的细胞包括分生组织顶部的L1、L2和L3层的部分,用于组织和维持分生组织;中央区包含多能干细胞。外围区围绕中心区域并将形成器官(例如叶原基、花原基)并经历形态发生;该区域包含高有丝分裂活性。肋区或肋分生组织位于中心区下方;肋区产生茎和维管组织。在一个方面,本文提供的腋生分生组织特异性启动子在中心区、外围区、肋区或其组合中起作用或优先起作用。

[0128] 在一个方面,腋芽特异性启动子包含与选自以下的多核苷酸具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多核苷酸序列:SEQ ID NO:113-118、148-160、204及其片段。在另一个方面,腋生分生组织特异性启动子包含与选自以下的多核苷酸具有至少60%、至少

70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多核苷酸序列:SEQ ID NO:113-118、148-160、204及其片段。还在另一个方面,在L1层、L2层、L3层或其组合中有活性的启动子包含选自SEQ ID NO:113-118、148-160、204及其片段的多核苷酸序列。在另一个方面,在中心区、外围区、肋区或其组合中有活性的启动子包含选自SEQ ID NO:113-118、148-160、204及其片段的多核苷酸序列。在一个方面,本文提供的启动子片段的长度为至少50、至少75、至少100、至少200、至少300、至少400、至少500、至少600、至少700、至少800、至少900、至少1000、至少1250、至少1500、至少1750、至少2000、至少2500、至少3000、至少3500、至少4000、至少4500或至少4999个核苷酸。在另一个方面,本文提供的启动子片段的长度为50至200、100至200、100至300、100至400、100至500、100至600、100至700、100至800、100至900、100至1000、100至2000、200至300、200至400、200至500、200至600、200至700、200至800、200至900、200至1000、200至2000、200至2500、200至3000、500至1000、500至1500、500至2000、500至2500、500至3000、1000至2000、1000至3000、1500至2000、1500至2500、1500至3000、2000至3000、100至3500、100至4000、100至4500、100至4999、500至3500、500至4000、500至4500、500至4999、1000至3500、1000至4000、1000至4500、1000至4999、2000至3500、2000至4000、2000至4500、2000至4999、3000至3500、3000至4000、3000至4500、3000至4999、3500至4000、3500至4500、3500至4999、4000至4500、4000至4999或在4500至4999个核苷酸。

[0129] 在一个方面,本公开的重组DNA构建体包含选自SEQ ID NO:113-118、148-160、204及其片段的多核苷酸,所述多核苷酸与编码选自以下的多肽具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽的多核苷酸可操作地连接:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。

[0130] 在一个方面,本公开的重组DNA构建体包含选自SEQ ID NO:113-118、148-160、204及其片段的多核苷酸,所述多核苷酸与编码选自以下的多肽具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列相似性的多肽的多核苷酸可操作地连接:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。

[0131] 在一个方面,本公开的重组DNA构建体包含选自SEQ ID NO:113-118、148-160、204及其片段的多核苷酸,所述多核苷酸与选自以下的多核苷酸具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的多核苷酸可操作地连接:SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83-160、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、205、207、209、211、213、215、

217、219、221、223、225-228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254及其片段。

[0132] 在一个方面,本公开的烟草植物或其部分包含与选自SEQ ID NO:113-118、148-160、204及其片段的多核苷酸具有至少90%序列同一性的异源启动子,所述异源启动子与编码生长素生物合成蛋白或生长素转运蛋白的多核苷酸可操作地连接。

[0133] 示例性的组成型启动子包括Rsyn7启动子的核心启动子和美国专利号6,072,050中公开的其它组成型启动子;核心CaMV 35S启动子(Odell等(1985)Nature 313:810-812);泛素(Christensen等人1989)Plant Mol.Biol.12:619-632和Christensen等(1992)Plant Mol.Biol.18:675-689);pEMU(Last等(1991)Theor.Appl.Genet.81:581-588);MAS(Velten等(1984)EMBO J 3:2723-2730);ALS启动子(美国专利号5,659,026)等。

[0134] 示例性的化学诱导型启动子包括由水杨酸活化的烟草PR-1a启动子。其它感兴趣的化学诱导型启动子包括类固醇反应性启动子(参见例如,Schena等(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.US88:10421-10425和McNellis等(1998)Plant J.14(2):247-257)中的糖皮质激素诱导型启动子)和四环素诱导型启动子(参见例如,Gatz等(1991)Mol.Gen.Genet.227:229-237和美国专利号5,814,618和5,789,156)。可用于本文的其他示例性启动子是那些负责热调节的基因表达、光调节的基因表达(例如豌豆rbcS-3A;玉米rbcS启动子;在豌豆中发现的叶绿素alb结合蛋白基因;或者阿拉伯苏启动子)、激素调节的基因表达(例如,来自小麦Em基因的脱落酸(ABA)反应序列;ABA诱导型HVA1和HVA22,以及大麦和拟南芥的rd29A启动子;和伤口诱导的基因表达(例如wun1)、器官特异性基因表达(例如,块茎特异性储存蛋白基因;来自玉米的23kDa玉米醇溶蛋白基因;或法国豆(β -菜豆蛋白基因)或病原体-诱导型启动子(例如PR-1、prp-1或 β -1,3葡聚糖酶启动子、小麦的真菌诱导型wirla启动子,以及线虫诱导型启动子,烟草和欧芹的TobRB7-5A和Hmg-1)。

[0135] 其他示例性组织优选的启动子包括在以下中公开的那些:Yamamoto等(1997)Plant J.12(2):255-265;Kawamata等(1997)Plant Cell Physiol.38(7):792-803;Hansen等(1997)Mol.Gen.Genet.254(3):337-343;Russell等(1997)Transgenic Res.6(2):157-168;Rinehart等(1996)Plant Physiol.112(3):1331-1341;VCamp等(1996)Plant Physiol.112(2):525-535;Canevascini等(1996)Plant Physiol.112(2):513-524;Yamamoto等(1994)Plant Cell Physiol.35(5):773-778;Lam(1994)Results Probl.Cell Differ.20:181-196;Orozco等(1993)Plant Mol.Biol.23(6):1129-1138;Matsuoka等(1993)Proc Natl.Acad.Sci.US90(20):9586-9590;和Guevara-Garci等(1993)Plant J.4(3):495-505。

[0136] 如本文所用,“可操作地连接”是指两个或更多个元件之间的功能性连接。例如,目标多核苷酸和调控序列(例如启动子)之间的可操作连接是允许目标多核苷酸表达的功能性连接。可操作地连接的元件可以是连续的或非连续的。在一个方面,本文提供的启动子与选自以下的多核苷酸可操作地连接:SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83-160、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225-228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254及其片段。在另一个方面,本文提供的启动子与编码选自以下的多肽的多核苷酸可操作

地连接:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。

[0137] 如本文所用,“异源”是指序列源自外来物种,或者,如果源自相同物种,则通过有意的人为干预实质上改变它在组合物和/或基因组位点中的天然形式。该术语也适用于核酸构建体,在本文中也称为“多核苷酸构建体”或“核苷酸构建体”。以这种方式,“异源”核酸构建体旨在表示构建体源自外来物种,或者,如果源自相同物种,则通过有意的人为干预实质上改变它在组合物和/或基因组位点中的天然形式。异源核酸构建体包括但不限于例如通过转化方法或随后用另一种目标植物育种转基因植物而已经引入植物或其植物部分的重组核苷酸构建体。

[0138] 在一个方面,本文提供的改良植物、种子、植物组分、植物细胞或植物基因组包含与多核苷酸可操作地连接的异源启动子,所述多核苷酸编码的多肽与选自以下的多肽具有至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。在另一个方面,本文提供的重组DNA构建体包含与多核苷酸可操作地连接的异源启动子,所述多核苷酸编码的多肽与选自以下的多肽具有至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。

[0139] 增强子元件是可以被蛋白质结合以激活RNA转录的DNA区域。在一个方面,本文提供的启动子序列与增强子元件可操作地连接。在另一方面,选自SEQ ID NO:113-118、148-160、204及其片段的多核苷酸与增强子元件可操作地连接。在一个方面,本文提供的增强子元件的长度为至少10、至少25、至少50、至少75、至少100、至少150、至少200、至少250、至少300、至少350、至少400、至少450、至少500、至少550、至少600、至少650、至少700、至少750、至少800、至少850、至少900、至少950、至少1000、至少1100、至少1200、至少1300、至少1400、至少1500、至少1750、至少2000、至少2500、至少3000、至少3500、至少4000、至少4500、或至少5000个核苷酸。在在在一个方面,本文提供的增强子元件是CsVMV启动子。

[0140] 很多基因启动子含有调节基因转录的顺式调控元件。顺式调控元件通常充当转录因子的结合位点。在一个方面,本文提供的启动子包含选自以下的至少1种、至少2种、至少3种、至少4种、至少5种、或至少6种顺式调控元件:芽休眠元件(BDE)、腋芽生长UP1元件、腋芽生长UP2元件、蔗糖响应元件(SRE)、糖抑制元件(SURE)和芽激活或TCP结合元件(BAE)。在另

一个方面,本文提供的重组核苷酸包含启动子,其中所述启动子包含选自以下的至少1种、至少2种、至少3种、至少4种、至少5种或至少6种顺式元件:芽休眠元件(BDE)、腋芽生长UP1元件、腋芽生长UP2元件、蔗糖响应元件(SURE)、糖抑制元件(SRE)和芽激活或TCP结合元件(BAE)。

[0141] 在一个方面,本文提供的启动子在转录起始位点的1、3、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3100、3200、3300、3400、3500、3600、3700、3800、3900、4000、4100、4200、4300、4400、4500、4600、4700、4800、4900、5000、7500或10,000个核苷酸内包含至少1种、至少2种、至少3种、至少4种、至少5种、或至少6种顺式调控元件。在另一个方面,本文提供的启动子在转录起始位点的1-10,000、1-7500、1-5000、1-4900、1-4800、1-4700、1-4600、1-4500、1-4400、1-4300、1-4200、1-4100、1-4000、1-3900、1-3800、1-3700、1-3600、1-3500、1-3400、1-3300、1-3200、1-3100、1-3000、1-2900、1-2800、1-2700、1-2600、1-2500、1-2400、1-2300、1-2200、1-2100、1-2000、1-1900、1-1800、1-1700、1-1600、1-1500、1-1400、1-1300、1-1200、1-1100、1-1000、1-900、1-800、1-700、1-600、1-500、1-400、1-300、1-200、1-100、1-75、1-50、1-45、1-40、1-35、1-30、1-25、1-20、1-15、5-10,000、5-7500、5-5000、5-4900、5-4800、5-4700、5-4600、5-4500、5-4400、5-4300、5-4200、5-4100、5-4000、5-3900、5-3800、5-3700、5-3600、5-3500、5-3400、5-3300、5-3200、5-3100、5-3000、5-2900、5-2800、5-2700、5-2600、5-2500、5-2400、5-2300、5-2200、5-2100、5-2000、5-1900、5-1800、5-1700、5-1600、5-1500、5-1400、5-1300、5-1200、5-1100、5-1000、5-900、5-800、5-700、5-600、5-500、5-400、5-300、5-200、5-100、5-75、5-50、5-45、5-40、5-35、5-30、5-25、5-20、20-10,000、20-7500、20-5000、20-4900、20-4800、20-4700、20-4600、20-4500、20-4400、20-4300、20-4200、20-4100、20-4000、20-3900、20-3800、20-3700、20-3600、20-3500、20-3400、20-3300、20-3200、20-3100、20-3000、20-2900、20-2800、20-2700、20-2600、20-2500、20-2400、20-2300、20-2200、20-2100、20-2000、20-1900、20-1800、20-1700、20-1600、20-1500、20-1400、20-1300、20-1200、20-1100、20-1000、20-900、20-800、20-700、20-600、20-500、20-400、20-300、20-200、20-100、20-75、20-50、20-45、20-40、20-35、20-30、20-25、50-10,000、50-7500、50-5000、50-4900、50-4800、50-4700、50-4600、50-4500、50-4400、50-4300、50-4200、50-4100、50-4000、50-3900、50-3800、50-3700、50-3600、50-3500、50-3400、50-3300、50-3200、50-3100、50-3000、50-2900、50-2800、50-2700、50-2600、50-2500、50-2400、50-2300、50-2200、50-2100、50-2000、50-1900、50-1800、50-1700、50-1600、50-1500、50-1400、50-1300、50-1200、50-1100、50-1000、50-900、50-800、50-700、50-600、50-500、50-400、50-300、50-200、50-100、50-75、100-10,000、100-7500、100-5000、100-4900、100-4800、100-4700、100-4600、100-4500、100-4400、100-4300、100-4200、100-4100、100-4000、100-3900、100-3800、100-3700、100-3600、100-3500、100-3400、100-3300、100-3200、100-3100、100-3000、100-2900、100-2800、100-2700、100-2600、100-2500、100-2400、100-2300、100-2200、100-2100、100-2000、100-1900、100-1800、100-1700、100-1600、100-1500、100-1400、100-1300、100-1200、100-1100、100-1000、100-900、100-800、100-700、100-600、100-500、100-400、100-300、100-200、500-10,000、500-7500、500-5000、500-4900、500-4800、500-4700、500-4600、500-4500、500-

4400、500-4300、500-4200、500-4100、500-4000、500-3900、500-3800、500-3700、500-3600、500-3500、500-3400、500-3300、500-3200、500-3100、500-3000、500-2900、500-2800、500-2700、500-2600、500-2500、500-2400、500-2300、500-2200、500-2100、500-2000、500-1900、500-1800、500-1700、500-1600、500-1500、500-1400、500-1300、500-1200、500-1100、500-1000、500-900、500-800、500-700或500-600个核苷酸内包含至少1种、至少2种、至少3种、至少4种、至少5种、或至少6种顺式调控元件。

[0142] 在一个方面,本文提供的启动子在腋芽细胞中起作用并且包含选自以下的至少1种、至少2种、至少3种、至少4种、至少5种或至少6种顺式调控元件:芽休眠元件(BDE)、腋芽生长UP1元件、腋芽生长UP2元件、蔗糖响应元件(SURE)、糖抑制元件(SRE)和芽激活或TCP结合元件(BAE)。

[0143] 本文还提供了使用本领域已知的任何合适的转化方法用本文所述的重组构建体或表达盒转化烟草植物。将多核苷酸序列引入烟草植物的方法是本领域已知的,包括但不限于稳定转化方法、瞬时转化方法和病毒介导的方法。“稳定转化”是指其中引入植物的目标核苷酸构建体整合到植物的基因组中并且能够被其后代继承的转化。“瞬时转化”意指将序列引入植物中并且仅在时间上表达或仅瞬时存在于植物中。

[0144] 在一个方面,本文提供的方法和组合物包括将一种或多种多核苷酸引入一种或多种植物细胞中。在一个方面,改造本文提供的植物基因组以包括引入的多核苷酸或重组DNA构建体。如本文所用,“植物基因组”是指植物细胞的核基因组、线粒体基因组或质体(例如叶绿体)基因组。在另一个方面,将本文提供的多核苷酸整合到人工染色体中。在一个方面,将包含本文提供的多核苷酸的人工染色体整合到植物细胞中。

[0145] 在一个方面,本文提供的改良植物、种子、植物组分、植物细胞或植物基因组包含一个或多个转基因。在一个方面,本文提供的转基因抑制植物中的分权。在另一个方面,本文提供的转基因抑制植物中的打顶诱导的分权。在另一个方面,本文提供的转基因在打顶之前抑制植物中的分权。如本文所用,“转基因”是指通过本领域已知的任何方法转移到基因组中的多核苷酸。在一个方面,转基因是外源多核苷酸。在一个方面,转基因是内源多核苷酸,其整合到通常其不存在的新基因组位点中。

[0146] 在一个方面,本文提供的转基因包含重组DNA构建体。在一个方面,本文提供的重组DNA构建体或表达盒可包含用于选择转基因细胞的选择性标记基因。选择性标记基因包括但不限于编码抗生素抗性的基因,例如编码新霉素磷酸转移酶II(NEO)和潮霉素磷酸转移酶(HPT)的基因,以及赋予对除草剂化合物,例如草铵膦、溴苯腈、咪唑啉酮类、三唑并嘧啶类、磺酰脲类(例如氯磺隆和甲磺隆)和2,4-二氯苯氧基乙酸酯(2,4-D)抗性的基因。其他选择性标记包括表型标记,例如 β -半乳糖苷酶和荧光蛋白,例如绿色荧光蛋白(GFP)。

[0147] 在一个方面,本文提供的方法和组合物包含载体。如本文所用,术语“载体”或“质粒”可互换使用,是指与染色体DNA物理分离的环状双链DNA分子。在一个方面,本文使用的质粒或载体能够在体内复制。如本文所用,“转化载体”是能够转化植物细胞的质粒。在一个方面,本文提供的质粒是细菌质粒。在另一个方面,本文提供的质粒是土壤杆菌Ti质粒或源自土壤杆菌Ti质粒。

[0148] 在一个方面,本文提供的质粒或载体是重组载体。如本文所用,术语“重组载体”是指通过遗传重组的实验室方法(例如分子克隆)形成的载体。在另一个方面,本文提供的质

粒是合成质粒。如本文所用,“合成质粒”是人工产生的质粒,其能够具有与天然质粒(例如Ti质粒)相同的功能(例如复制)。不受限制,本领域技术人员可以通过单个核苷酸或通过将来自不同预先存在的质粒的核酸分子拼接在一起来合成质粒,从而重新产生合成质粒。

[0149] 载体可商购获得或可通过本领域常规的重组DNA技术制备。在一个方面,本文提供的载体包含SEQ ID NO:112的全部或部分。含有核酸的载体可以具有与这种核酸可操作地连接的表达元件,并且还可以包括序列诸如编码可选择标记的那些(例如抗生素抗性基因)。含有核酸的载体可以编码嵌合或融合多肽(即,与异源多肽可操作地连接的多肽,其可以位于多肽的N-末端或C-末端)。代表性的异源多肽是可用于纯化编码多肽的那些(例如,6xHis标签(SEQ ID NO:256)、谷胱甘肽S-转移酶(GST))。

[0150] 将多核苷酸(例如转基因、重组载体、重组DNA构建体、表达盒)引入本公开的植物细胞的合适方法包括微注射(Crossway等(1986) *Biotechniques* 4:320-334)、电穿孔(Shillito等(1987) *Meth. Enzymol.* 153:313-336; Riggs等(1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5602-5606)、农杆菌介导的转化(美国专利号5,104,310、5,149,645、5,177,010、5,231,019、5,463,174、5,464,763、5,469,976、4,762,785、5,004,863、5,159,135、5,563,055和5,981,840)、直接基因转移(Paszowski等(1984) *EMBO J.* 3:2717-2722)和弹道粒子加速(参见例如美国专利号4,945,050、5,141,131、5,886,244、5,879,918和5,932,782;Tomes等(1995) *in Plant Cell, Tissue, and Org Culture Fundamental Methods*, ed. Gamborg and Phillips (Springer-Verlag, Berlin); McCabe等(1988) *Biotechnology* 6:923-926)。还可以参见Weissinger等(1988) *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477; Christou等(1988) *Plant Physiol.* 87:671-674 (soybean); McCabe等(1988) *Bio/Technology* 6:923-926 (soybean); Finer and McMullen (1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P:175-182 (soybean); Singh等(1998) *Theor. Appl. Genet.* 96:319-324 (soybean); De Wet等(1985) *in The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. Chapman等 (Longman, N.Y.), pp. 197-209 (花药); Kaeppler等(1990) *Plant Cell Reports* 9:415-418和Kaeppler等(1992) *Theor. Appl. Genet.* 84:560-566 (晶须介导的转化); D'Halluin等(1992) *Plant Cell* 4:1495-1505 (电穿孔)。在一个方面,本文提供的细菌细胞包含本文提供的重组DNA构建体或重组载体。

[0151] 在另一个方面,可以通过使植物与病毒或病毒核酸接触将本文提供的重组构建体或表达盒引入植物。通常,此类方法涉及将本公开的表达盒整合入病毒DNA或RNA分子中。已经认识到,用于本文提供的表达盒的启动子还包括用于通过病毒RNA聚合酶的转录的启动子。用于将多核苷酸(包括病毒DNA或RNA分子)引入植物并表达在其中编码的蛋白质的方法是本领域已知的。参见例如美国专利号5,889,191、5,889,190、5,866,785、5,589,367、5,316,931和Porta等(1996) *Molecular Biotechnology* 5:209-221。

[0152] 可以用本文提供的重组构建体或表达盒转化可以使用克隆方法随后繁殖(无论是通过器官发生还是胚胎发生)的任何植物组织。“器官发生”是指从分生组织中心依次发育芽和根的过程。“胚胎发生”是指芽和根从体细胞或配子以协调方式(不是依次)一起发育的过程。适用于本文所述的各种转化方案的示例性组织包括但不限于愈伤组织、已有的分生组织(例如茎尖分生组织、腋芽和根分生组织)和诱导的分生组织(例如子叶分生组织和下胚轴分生组织)、下胚轴、子叶、叶盘、花粉、胚等。

[0153] 在一个方面,本公开提供了包含重组多核苷酸的植物或种子,其中所述重组多核苷酸包含在L1层、L2层、L3区、肋区、中心区、外围区或其任何组合中起作用的启动子,所述启动子与包含核酸序列的结构性核酸分子可操作地连接,其中所述核酸序列编码的多肽与选自以下的多肽具有至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。

[0154] 在一个方面,生长素生物合成蛋白或生长素转运蛋白选自SEQ ID NO:235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。在另一个方面,生长素生物合成蛋白或生长素转运蛋白包含与选自SEQ ID NO:235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255的多肽具有至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性。在另一个方面,生长素生物合成蛋白或生长素转运蛋白包含与选自SEQ ID NO:235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255的多肽具有至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列相似性。在一个方面,生长素生物合成蛋白或生长素转运蛋白由核酸序列编码,其中所述核酸序列编码的多肽与选自SEQ ID NO:235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255的多肽具有至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性。

[0155] 在一个方面,生长素生物合成蛋白或生长素转运蛋白由选自SEQ ID NO:234、236、238、240、242、244、246、248、250、252和254的多核苷酸编码。在一个方面,生长素生物合成蛋白或生长素转运蛋白由多核苷酸编码,所述多核苷酸与选自SEQ ID NO:234、236、238、240、242、244、246、248、250、252和254的多核苷酸具有至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性。

[0156] 在一个方面,本公开提供了包含重组多核苷酸的植物或种子,其中所述重组多核苷酸包含在L1层、L2层、L3区、肋区、中心区、外围区或其任何组合中起作用的启动子,所述启动子与包含核酸序列的结构性核酸分子可操作地连接,其中所述核酸序列编码生长素生物合成蛋白或生长素转运蛋白。

[0157] 在另一个方面,本公开提供了包含启动子和异源且可操作连接的核酸序列的重组DNA构建体,所述启动子在L1层、L2层、L3区、肋区、中心区、外围区或其任何组合中起作用,其中所述核酸序列编码非编码RNA或多肽。在另一个方面,本公开提供了包含启动子和异源且可操作连接的核酸序列的重组DNA构建体,所述启动子在L1层、L2层、L3区、肋区、中心区、外围区或其任何组合中起作用,其中所述核酸序列编码生长素生物合成蛋白或生长素转运

蛋白。

[0158] 在一个方面,本公开提供了一种重组DNA构建体,其包含与编码生长素生物合成蛋白或生长素转运蛋白的多核苷酸可操作地连接的异源腋生分生组织特异性启动子。

[0159] 在一个方面,本公开提供了减少或消除烟草植物中的打顶诱导的分权的方法,包括用重组DNA构建体转化烟草植物,所述重组DNA构建体包含在L1层、L2层、L3区、肋区、中心区、外围区或其任何组合中起作用的启动子。在另一个方面,本公开提供了一种方法,包括用含有异源启动子的重组DNA构建体转化烟草植物,所述异源启动子在L1层、L2层、L3区、肋区、中心区、外围区或其任何组合中起作用并且与转录为RNA分子的多核苷酸可操作地连接,所述RNA分子抑制内源基因的水平,其中所述内源基因促进腋生分生组织生长、腋生分生组织维持或两者,或是腋生分生组织生长、腋生分生组织维持或两者所需的。

[0160] 在一个方面,本公开提供了一种用于控制植物中的打顶诱导的分权的方法,包括用重组DNA构建体转化所述植物,其中所述重组DNA构建体包含与多核苷酸可操作地连接的启动子,所述多核苷酸编码的多肽与选自以下的多肽具有至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。

[0161] 在一个方面,本公开提供了一种用于控制植物中的打顶诱导的烟权的方法,包括用重组DNA构建体转化所述植物,其中所述重组DNA构建体包含与多核苷酸可操作地连接的启动子,所述多核苷酸编码生长素生物合成蛋白或生长素转运蛋白。

[0162] 应理解,本公开内任何改良烟草植物可进一步包含额外的农学上的期望性状,例如,通过使用本领域已知的技术用遗传构建体或转基因进行转化。非限制性的,期望性状的实例是抗除草剂、抗虫性、抗病性、高产量、高等级指数值、熟化性、熟化质量、机械收成、保持能力、叶质量、高度、植物成熟(例如早熟、早中熟、中熟、中晚熟、或晚熟)、杆大小(例如小杆、中杆、或大杆)、每株植物的叶数(例如少量(例如5-10片叶)、中量(例如11-15片叶)或大量(例如16-21)片叶),或任何组合。在一个方面,本文提供的减少分权的烟草植物或种子包含表达一种或多种杀虫蛋白的一个或多个转基因,所述杀虫蛋白例如苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)的晶体蛋白或来自蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)的营养性杀虫蛋白入VIP3(参见例如Estruch等(1997)*Nat. Biotechnol.* 15:137)。在另一个方面,本文提供的烟草植物进一步包含赋予对褐腐病抗性(美国专利号5,689,035)或对胞囊线虫抗性(美国专利号5,491,081)的渗入性状。

[0163] 本文提供的多肽的水平和/或活性可以通过使用在转化植物中不能指导蛋白质或RNA表达的多核苷酸来调节。例如,本发明的多核苷酸可用于设计多核苷酸构建体,其可用于改变或突变生物体中的基因组核苷酸序列的方法。此类多核苷酸构建体包括但不限于RNA:DNA载体、RNA:DNA突变载体、RNA:DNA修复载体、混合双链体寡核苷酸、自身互补RNA:DNA寡核苷酸和重组发生的寡核苷酸碱基。此类核苷酸构建体和使用方法是本领域已知的。参见美国专利号5,565,350;5,731,181;5,756,325;5,760,012;5,795,972和5,871,984,其

全文通过引用并入本文。还参见国际专利申请公开号WO 98/149350、WO 99/107865和WO 99/125921；和Beetham等(1999)Proc.Natl.Acad.Sci.US96:8774-8778,其全文通过引用并入本文。

[0164] 本公开提供用于抑制植物,尤其是红花烟草属的植物(包括各种商业品种的烟草植物)中选自以下的一个或多个多肽的表达或功能的组合物和方法:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。

[0165] 在一个方面,可以通过RNA干扰(RNAi)通过表达本文提供的多核苷酸来抑制本文提供的一种或多种多肽的表达。在一个方面,RNAi包括表达非编码RNA。如本文所用,“非编码RNA”选自microRNA(miRNA)、小干扰RNA(siRNA)、反式作用siRNA(ta-siRNA)、转移RNA(tRNA)、核糖体RNA(rRNA)、内含子、发夹RNA(hpRNA)和包含内含子的发夹RNA(ihpRNA)。在一个方面,本文提供的单个非编码RNA抑制至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个或多于10个多肽的表达。在一个方面,将本文提供的非编码RNA稳定地转化到植物基因组中。在另一方面,将本文提供的非编码RNA瞬时转化到植物基因组中。

[0166] 在一个方面,本公开提供了用于抑制选自以下的一个或多个多肽的表达或功能的RNA分子:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。在一个方面,本文提供的RNA分子是非编码RNA。

[0167] 在另一个方面,重组DNA构建体编码双链RNA。还提供了包含这些重组DNA构建体的改良烟草植物或其部分、熟化的烟草材料或烟草制品。在一个方面,与不含重组DNA构建体的对照烟草植物相比,这些转基因植物、熟化的烟草材料或烟草制品包含减少的分权。还提供了减少烟草植物的烟杈生长的方法,该方法包括用任何这些重组DNA构建体转化烟草植物。

[0168] 在一个方面,本文提供的烟草植物或其部分包含与编码非编码RNA分子的多核苷酸可操作地连接的异源启动子,其中所述非编码RNA分子能够结合编码多肽的RNA,所述多肽与选自以下的多肽具有至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、161-185、187、189、191、193、195、197、199、224、229、231、233、245、247、249、251、253和255,并且其中所述非编码RNA分子抑制所述多肽的表达。

[0169] 如本文所用,术语“抑制”定义为本领域已知的或本文所述的降低目标基因产物(例如mRNA、蛋白质、非编码RNA)的表达或功能的任何方法。“抑制”可以在两种植物(例如改良植物与对照植物)之间进行比较。或者,抑制靶基因产物的表达或功能可以在相同植物内

的植物细胞、细胞器、器官、组织或植物组分之间或不同植物之间进行比较,并且包括在同一植物或植物组分内的发育阶段或时间阶段之间或在植物或植物组分之间的比较。“抑制”包括目标基因产物的功能或产生的任何相对减少,直至并包括完全消除该基因产物的功能或产生。术语“抑制”包括下调靶基因产物的翻译和/或转录或靶基因产物的功能活性的任何方法或组合物。

[0170] 术语“抑制性序列”包括能够抑制植物中基因表达或功能的任何多核苷酸或多肽序列,例如全长多核苷酸或多肽序列、截短的多核苷酸或多肽序列、多核苷酸或多肽序列的片段、多核苷酸或多肽序列的变体、有义方向的核苷酸序列、反义方向的核苷酸序列、有义或反义方向的核苷酸序列的互补序列、核苷酸序列的反向区域、核苷酸序列的发夹、双链核苷酸序列、单链核苷酸序列、其组合等。术语“多核苷酸序列”包括RNA、DNA、化学修饰的核酸、核酸类似物、其组合等的序列。

[0171] 本文通过靶基因产物的名称命名抑制性序列。因此,作为非限制性实例,“NTH15抑制性序列”是指能够抑制植物中NTH15基因座表达的抑制序列(例如在转录和/或翻译水平),或能够抑制基因产物的功能。当在多核苷酸抑制性序列的背景下使用短语“能够抑制”时,意指抑制性序列本身发挥抑制作用;或者,当抑制性序列编码抑制性核苷酸分子(例如发夹RNA、miRNA或双链RNA多核苷酸)或编码抑制性多肽(例如抑制靶基因产物的表达或功能的多肽)时,在其转录后(例如在编码发夹RNA、miRNA或双链RNA多核苷酸的抑制性序列的情况下)或其转录和翻译(在编码抑制性多肽的抑制性序列的情况下)后,转录或翻译产物分别对靶基因产物发挥抑制作用(例如抑制靶基因产物的表达或功能)。

[0172] 本文提供的抑制性序列可以通过本领域已知的任何沉默途径或机制触发基因沉默的序列,包括但不限于有义抑制/共抑制、反义抑制、双链RNA(dsRNA)干扰、发夹RNA干扰和包含内含子的发夹RNA干扰、扩增子介导的干扰、核酶、小干扰RNA、人工或合成的microRNA、以及人工反式作用siRNA。取决于所需的结果,抑制性序列可以为至少约20个核苷酸、至少约50个核苷酸、至少约70个核苷酸、至少约100个核苷酸、至少约150个核苷酸、至少约200个核苷酸、至少约250个核苷酸、至少约300个核苷酸、至少约350个核苷酸、至少约400个核苷酸,直至编码本公开蛋白质的全长多核苷酸。在一个方面,抑制性序列可以是长度为约50至约400个核苷酸、约70至约350个核苷酸、约90至约325个核苷酸、约90至约300个核苷酸、约90至约275个核苷酸、约100至约400个核苷酸、约100至约350个核苷酸、约100至约325个核苷酸、约100至约300个核苷酸、约125至约300个核苷酸或约125至约275个核苷酸的片段。

[0173] 在一个方面,本发明提供包含启动子的重组DNA构建体,所述启动子在烟草细胞中起作用并且与编码RNA分子的多核苷酸可操作地连接,所述RNA分子能够结合编码多肽的RNA,所述多肽与选自以下的多肽具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、161-185、187、189、191、197、199、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253、255及其片段。在一个方面,本发明提供包含启动子的重组DNA构建体,所述启动子在烟草细胞中起作用并且与多核苷酸可操作地连接,所述多核苷酸与选自以下的多核苷酸具有至少60%、至少70%、至少75%、至少

80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的同一性:SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83-160、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225-228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254及其片段。

[0174] 在一个方面,本发明提供包含启动子的重组DNA构建体,所述启动子在烟草细胞中起作用并且与编码RNA分子的多核苷酸可操作地连接,所述RNA分子能够结合编码多肽的RNA,所述多肽的氨基酸序列与选自以下的多肽具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、161-185、187、189、191、197、199、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253、255及其片段,并且其中所述RNA分子抑制所述多肽的表达。在一个方面,本发明提供包含启动子的重组DNA构建体,所述启动子在烟草细胞中起作用并且与多核苷酸可操作地连接,所述多核苷酸与选自以下的多核苷酸具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的同一性:SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83-160、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225-228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254及其片段,并且其中所述RNA分子抑制所述多肽的表达。

[0175] 在一个方面,本发明提供一种重组DNA构建体,其包含与编码非编码RNA分子的多核苷酸可操作地连接的异源腋生分生组织特异性启动子,其中所述非编码RNA分子能够结合编码多肽的RNA,所述多肽与选自以下的多肽具有至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、161-185、187、189、191、197、199、224、229、231、233、245、247、249、251、253和255,并且其中所述非编码RNA分子抑制所述多肽的表达。

[0176] 在一个方面,本公开提供了一种用于控制植物中的打顶诱导的分权的方法,包括用重组DNA构建体转化所述植物,其中所述重组构建体包含在L1层、L2层、L3区、肋区、中心区、外围区或其组合中起作用的异源启动子,所述启动子与编码非编码RNA分子的多核苷酸可操作地连接,其中所述非编码RNA分子能够结合编码多肽的RNA,所述多肽与选自以下的多肽具有至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、161-185、187、189、191、197、199、224、229、231、233、245、247、249、251、253和255,并且其中所述非编码RNA分子抑制所述多肽的表达。

[0177] MicroRNA(miRNA)是非蛋白质编码RNA,通常在约19至约25个核苷酸之间(在植物中通常约20-24个核苷酸),其引导靶标转录物的反式切割,负调节参与各种调控和发育途径的基因的表达(Bartel(2004)Cell,116:281-297)。在一些情况下,miRNA用于引导siRNA初级转录物的同相加工(参见Allen等(2005)Cell,121:207-221)。

[0178] 已经鉴定了许多microRNA基因(MIR基因)并可在数据库中公开获得(“miRBase”、在microrna.sanger.ac.uk/sequences可在线获得;还参见Griffiths-Jones等(2003)Nucleic Acids Res.,31:439-441)。据报道,MIR基因出现在基因间区域(在基因组中是分离的和成簇的),但也可以完全或部分位于其他基因(蛋白质编码和非蛋白质编码)的内含子中。关于miRNA生物发生的最新综述,参见Kim(2005)Nature Rev.Mol.Cell.Biol.,6:376-385。至少在某些情况下,MIR基因的转录可以在MIR基因自身启动子的促进控制下进行。初级转录物,称为“pri-miRNA”,可以是相当大的(几千碱基)并且可以是多顺反子的,包含一个或多个pre-miRNA(折叠结构包含茎环排列,其被加工成成熟miRNA)以及mRNA常有的5’“帽”和多腺苷酸化尾。参见例如Kim(2005)Nature Rev.Mol.Cell.Biol.,6:376-385的图1。

[0179] 来自其相应前体(pri-miRNA和pre-miRNA)的成熟miRNA的成熟在动物和植物之间显著不同。例如,在植物细胞中,microRNA前体分子被认为主要在细胞核中完全加工成成熟miRNA,而在动物细胞中,pri-miRNA转录物在细胞核中由动物特异性酶Drosha加工,然后pre-miRNA被输出到细胞质中,进一步加工成成熟的miRNA。植物中的成熟miRNA的长度通常为21个核苷酸。关于植物和动物中miRNA生物发生的最新综述,参见Kim(2005)Nature Rev.Mol.Cell.Biol.,6:376-385。miRNA生物发生和功能的其他综述可见于例如Bartel(2004)Cell,116:281-297;Murchison and Hannon(2004)Curr.Opin.Cell Biol.,16:223-229;和Dugas and Bartel(2004)Curr.Opin.Plant Biol.,7:512-520。

[0180] 转基因表达miRNA(无论是天然存在的序列还是人工序列)可用于调节miRNA的一种或多种靶基因的表达。在转基因表达的转录物中包含miRNA识别位点也可用于调节转录物的表达;参见例如Parizotto等(2004)Genes Dev.,18:2237-2242。已经在mRNA的所有区域中验证了miRNA的识别位点,包括5’非翻译区、编码区和3’非翻译区,表明miRNA靶位点相对于编码序列的位置可能不一定影响抑制(参见例如,Jones-Rhoades and Bartel(2004).Mol.Cell,14:787-799,Rhoades等(2002)Cell,110:513-520,Allen等(2004)Nat.Genet.,36:1282-1290,Sunkar and Zhu(2004)Plant Cell,16:2001-2019)。因为miRNA是真核生物中重要的调控元件,所以miRNA的转基因抑制可用于操纵生物途径和反应。最后,MIR基因的启动子可以具有非常特异的表达模式(例如细胞特异性、组织特异性、时间特异性或可诱导),因此可用于重组构建体以诱导与它们可操作地连接的DNA序列的这种特异性转录。miRNA、它们的前体、它们的识别位点和它们的启动子的各种用途在通过引用并入本文的美国专利申请公开2006/0200878A1中有详细描述。这些用途的非限制性实例包括:(1)表达天然miRNA或miRNA前体序列以抑制靶基因;(2)表达人工miRNA或miRNA前体序列以抑制靶基因;(3)表达具有miRNA识别位点的转基因,其中当表达成熟miRNA时转基因被抑制;(4)表达由miRNA启动子驱动的转基因。

[0181] 如Zeng等(2002)Mol.Cell,9:1327-1333所证明,对于miRNA前体的miRNA茎区中的核苷酸,设计人工miRNA序列可以像替换与预期靶标互补的序列一样简单。用于确定天然

miRNA序列中的核苷酸变化以制备工程化miRNA前体的一般方法的一个非限制性实例包括以下步骤：(a) 选择靶基因特异性的至少18个核苷酸的独特靶序列，例如，通过使用序列比对工具如烟草cDNA和基因组DNA数据库的BLAST（参见例如，Altschul等（1990）*J.Mol.Biol.*, 215:403-410; Altschul等（1997）*Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402），以鉴定靶转录物直系同源物和与无关基因的任何潜在匹配，从而避免非靶标序列的无意沉默；(b) 分析不需要的序列的靶基因（例如，与来自非靶标物种的序列匹配），并对每个潜在的19-聚体片段的以下进行评分：GC含量、Reynolds得分（参见Reynolds等（2004）*Nature Biotechnol.*, 22:326-330）和由自由能的负差异表征的功能不对称性（“.DELTA..DELTA.G”或“ $\Delta \Delta G$ ”）（参见Khvorova等（2003）*Cell*, 115:209-216）。优选选择具有所有或大多数以下特征的19-聚体：(1) Reynolds得分 >4 ，(2) GC含量为约40%至约60%，(3) 负的 $\Delta \Delta G$ ，(4) 末端腺苷，(5) 缺乏连续4个或更多个相同的核苷酸；(6) 位于靶基因3'末端附近；(7) 与miRNA前体转录物的差异最小。据报道，siRNA中每个第三个核苷酸的位置对影响RNAi效力特别重要，可在rna.chem.tu-tokyo.ac.jp/siexplorer.htm公开获得算法“siExplorer”（参见Kato and Suzuki（2007）*Nucleic Acids Res.*, 10.1093/nar/gkl1120）；(c) 确定所选19聚体的反向互补序列用于制备修饰的成熟miRNA。第20位的其他核苷酸优选与选择的靶序列匹配，并且优选选择第21位的核苷酸不配对以防止沉默在靶转录物上扩散，或选择与靶序列配对以促进沉默在靶序列上扩散；和(d) 将人工miRNA转入植物。

[0182] 在一个方面，本文提供的人工miRNA与选自以下的多核苷酸具有至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多核苷酸互补：SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、83-160、186、188、190、196、198、223、225-228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254及其片段。在另一个方面，本文提供的人工miRNA与编码多肽的多核苷酸互补，所述多肽与选自以下的多肽具有至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性：SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、161-185、189、191、197、199、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。还在另一个方面，本文提供的人工miRNA与编码多肽的多核苷酸互补，所述多肽与选自以下的多肽具有至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列相似性：SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、161-185、189、191、197、199、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。

[0183] 在一个方面，本文提供的人工miRNA降低或消除靶基因的RNA转录或蛋白质翻译。

[0184] 在一个方面，本文提供的miRNA或人工miRNA处于组织特异性启动子的控制下。在另一个方面，本文提供的miRNA或人工miRNA处于选自SEQ ID NO:113-118、148-160、204及

其片段的启动子的控制下。在一个方面,本文提供的改良植物包含在异源启动子控制下的人工miRNA,所述异源启动子选自SEQ ID NO:113-118、148-160、204及其片段。

[0185] 植物microRNA通过识别并结合靶转录物中几乎完全互补的序列(miRNA识别位点),然后通过RNase III酶如Argonaute1切割转录物来调控它们的靶基因。在植物中,给定miRNA识别位点和相应的成熟miRNA之间的某些错配是不耐受的,特别是在成熟miRNA的第10和11位的错配核苷酸。成熟miRNA内的位置以5'至3'方向给出。在给定miRNA识别位点和相应的成熟miRNA之间,通常需要成熟miRNA的第10和11位完全互补。参见例如Franco-Zorrill等(2007)Nature Genetics,39:1033-1037;和Axtell等(2006)Cell,127:565-577。

[0186] 利用植物miRNA的这种特征来获得预测“microRNA诱饵序列”(即,可被内源成熟miRNA识别并结合,产生miRNA诱饵序列与内源成熟miRNA之间的碱基配对,从而形成由于在miRNA诱饵序列和成熟miRNA之间存在错配而未被切割的抗切割RNA双链体)的规则。错配包括标准错配(例如G-A、C-U、C-A)以及G:U摆动对和indel(核苷酸插入或缺失)。通常,这些规则定义(1)需要的错配,以及(2)允许但不需要的错配。

[0187] 需要的错配包括:(a)在内源成熟miRNA的第9、10或11位的miRNA诱饵序列和内源成熟miRNA之间的至少1个错配,或(b)在对应于内源成熟miRNA的第9、10或11位的miRNA诱饵序列的位置的1、2、3、4或5个插入(即,额外的核苷酸)。

[0188] 允许但不需要的错配包括:(a)在内源成熟miRNA的第1、2、3、4、5、6、7、8和9位的miRNA诱饵序列和内源成熟miRNA之间的0、1或2个错配,和(b)在内源成熟miRNA的第12位至最后一位(即,在21个核苷酸的成熟miRNA的第21位)的miRNA诱饵序列和内源成熟miRNA之间的0、1、2或3个错配,其中在内源成熟miRNA的第12位至最后一位的每一个错配邻近至少一个互补的碱基对(即,在内源成熟miRNA的第12位至最后一位没有超过2个的连续错配)。

[0189] miRNA诱饵序列可具有任何长度,只要其被内源成熟miRNA识别并结合以形成抗切割RNA双链体即可。在一个方面,miRNA诱饵序列包含约18至约36个核苷酸。在另一个方面,本文提供的miRNA诱饵是能够结合成熟miRNA的至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少21个、至少22个、至少23个、至少24个、至少25个、至少26个、至少27个、至少28个、至少29个、至少30个或超过30个核苷酸的小RNA分子。参见例如,WO 2008/133643,其全文通过引用并入本文。

[0190] 在一个方面,内源miRNA通过本文提供的miRNA诱饵调控。本文提供的microRNA诱饵能够阻止互补的成熟miRNA与其天然的靶基因结合,从而增加靶基因的表达。

[0191] 在另一个方面,本文提供的重组DNA构建体包含至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个或超过10个miRNA诱饵。在一个方面,本文提供的miRNA诱饵处于选自SEQ ID NO:113-118、148-160、204及其片段的调控序列的控制下。

[0192] 在另一个方面,用本文提供的位点特异性核酸酶编辑内源miRNA靶标以突变至少一个miRNA结合位点,从而使内源miRNA靶标对miRNA介导的降解具有抗性。如本文所用,“miRNA靶标”是指与成熟miRNA具有至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的至少18个、至少19个、至少20个、至少21个、至少22个、至少23个、至少24个、至少25个、至少26个、至少27个、至少28个、至少29个、至少30个或多于30个

核苷酸的连续延伸。在一个方面,miRNA靶标能够与成熟miRNA杂交,然后在典型的细胞条件下被成熟的miRNA/Argonaute RNA诱导的沉默复合物切割。

[0193] 本文还提供了由本文提供的烟草植物或植物组分制成的熟化烟草材料。“熟化”是一种陈化过程,其减少水分并导致叶绿素的破坏,使烟叶呈现金黄色,淀粉也转化为糖。因此,与收获的绿叶相比,熟化烟草具有更高的还原糖含量和更低的淀粉含量。在一个方面,本文提供的烟草植物或植物组分可以使用常规方法熟化,例如烤制熟化、仓房熟化(barn-cured)、明火烤制熟化、晾制熟化或晒制熟化。对于各种类型的熟化方法的描述,参见例如(1999,Chapter 1 in Tobacco,Production,Chemistry and Technology,Davis&Nielsen,eds.,Blackwell Publishing,Oxford)。熟化烟草通常在水分含量为10%至约25%的压缩条件下在木桶(例如大桶)或纸板箱中陈化数年(例如2至5年)。参见美国专利号4,516,590和5,372,149。然后可以进一步加工熟化和陈化的烟草。进一步加工包括在引入或不引入各种温度的蒸汽、巴氏杀菌和发酵的情况下在真空下调制烟草。通常,发酵的特征是初始水分含量高、产生热量和干重损失10至20%。参见例如美国专利号4,528,993、4,660,577、4,848,373、5,372,149;美国公开号2005/0178398;和Tso(1999,Chapter 1 in Tobacco,Production,Chemistry and Technology,Davis&Nielsen,eds.,Blackwell Publishing,Oxford)。可以进一步加工熟化的、陈化的和发酵的烟草(例如切割、切碎、膨化或混合)。参见例如美国专利号4,528,993;4,660,577和4,987,907。在一个方面,本公开的熟化烟草材料是烤制熟化、晒制熟化、晾制熟化或明火烤制熟化。

[0194] 从本公开的改良烟草品系、品种或杂交种获得的烟草材料可用于制备烟草制品。如本文所用,“烟草制品”定义为意欲用于人类使用或消费的由烟草制备或衍生的任何产品。在一个方面,本文提供的烟草制品包含来自本文提供的改良烟草植物的熟化组分。在另一个方面,本文提供的烟草制品包含来自本文提供的改良烟草植物的熟化烟叶。

[0195] 本文提供的烟草制品包括但不限于卷烟制品(例如卷烟、比迪烟、kreteks)、雪茄制品(例如雪茄、雪茄包皮烟和小雪茄)、烟斗烟制品、衍生自烟草的制品、来自烟草的烟碱制品、无烟烟草制品(例如湿鼻烟、干鼻烟、嚼烟、潮湿无烟烟草、细切嚼烟、长切嚼烟、袋装嚼烟)、膜、可嚼的(例如口香糖)、含片、溶解条、标签、片剂、成形部分、凝胶、消费品单元、不溶性基质、中空形状、再造烟草、膨化烟草等。参见例如美国专利公开号US 2006/0191548。

[0196] 如本文所用,“卷烟”是指具有“棒”和“填料”的烟草制品。卷烟“棒”包括卷烟纸、滤嘴、滤棒(用于容纳过滤材料)、将卷烟纸(包括填料)固定在滤嘴上的接装纸,以及将这些部件固定在一起的所有胶水。“填料”包括(1)所有烟草,包括但不限于再造烟草和膨化烟草,(2)非烟草替代品(包括但不限于草药、非烟草植物材料和可能伴随烟草卷入卷烟纸的其他香料),(3)外壳,(4)调味料,和(5)(混入烟草和替代品并卷入卷烟的)所有其他添加剂。

[0197] 在一个方面,本公开提供了衍生的烟碱和从本文提供的改良烟草植物产生用于制品的烟碱的方法。

[0198] 在一个方面,本文提供的方法包括使用来自本文提供的改良烟草植物的熟化烟叶制备烟草制品。

[0199] 如本文所用,“再造烟草”是指加工成片状并切成条状以模拟烟草的由烟草粉末和其他烟草废料制成的一部分烟草填料。除了节省成本之外,再造烟草由于通过使用氨和糖之间的反应加工风味发展有助于香烟味道的贡献而非常重要。

[0200] 如本文所用,“膨化烟草”是指一部分烟草填料,其通过合适气体的膨胀进行处理,使得烟草“膨化”,导致密度降低和填充能力增加。它减少了卷烟中使用的烟草的重量。

[0201] 来自本公开的植物的烟草制品还包括卷烟和其他吸烟制品,特别是那些包括过滤元件的吸烟制品,其中可吸烟材料棒包括烟草混合物中的熟化烟草。在一个方面,本公开的烟草制品选自:小雪茄、不通风过滤嘴香烟、通风过滤嘴香烟、比迪烟、雪茄(cigar)、鼻烟、烟斗烟、雪茄烟(cigar tobacco)、卷烟、嚼烟、叶烟、水烟、烟碎(shredded tobacco)和烟丝(cut tobacco)。在另一个方面,本公开的烟草制品是无烟烟草制品。无烟烟草制品不燃烧,包括但不限于嚼烟、潮湿无烟烟草、鼻烟和干鼻烟。嚼烟是粗分的烟叶,其通常包装在大袋状包装中并用于塞子或捻。潮湿无烟烟草是一种潮湿的、更细分的烟草,以松散的形式或以小袋的形式提供,并且通常包装在圆形罐中并用作夹(pinch)在或放置在成人烟草消费者的脸颊和牙龈之间的小袋中。鼻烟是经过热处理的无烟烟草。干鼻烟是放在嘴里或用于鼻腔的精细研磨的烟草。在进一步的方面,本公开的烟草制品选自散叶嚼烟、塞嚼烟(plug chewing tobacco)、湿鼻烟和鼻烟(nasal snuff)。还在另一个方面,本公开的烟草制品选自电子加热的卷烟、e-卷烟、电子蒸发装置。

[0202] 本公开还提供了一种制造烟草制品的方法,所述烟草制品包含来自本文提供的烟草植物的烟草材料。在一个方面,本文提供的方法包括调制由本文提供的烟草植物制成的陈化烟草材料,以将其水分含量从约12.5%至约13.5%增加至约21%,混合经调制的烟草材料以产生所需的混合物。在一个方面,本文提供的制备烟草制品的方法进一步包含将所述混合物进行加料(casing)或调味。通常,在加料工序中,在混合物中加入加料或调味的材料,通过平衡化学组成来提高它们的质量并开发某些期望的风味特征。加料工艺的进一步细节可见于L.Davis和M.Nielsen主编的Tobacco Production, Chemistry and Technology, Blackwell Science, 1999。

[0203] 本文提供的烟草材料也可以使用包括但不限于热处理(例如烹饪、烘烤)、调味、酶处理、膨化和/或熟化的方法进行加工。可以使用这些技术加工发酵和非发酵烟草。合适的加工烟草的实例包括深色晾制熟化的、深色明火烤制熟化的、白肋烟、烤制熟化的和雪茄填料或包装纸,以及来自整个叶片干燥操作的制品。在一个方面,烟草纤维包括基于鲜重高达70%的深色烟草。例如,如美国公开号2004/0118422或2005/0178398中所述,可通过加热、出汗和/或巴氏杀菌步骤来调制烟草。

[0204] 本文提供的烟草材料可以进行发酵。通常,发酵的特征是初始水分含量高、产生热量和干重损失10至20%。参见例如美国专利号4,528,993;4,660,577;4,848,373和5,372,149。除了改变叶片的香气外,发酵还可以改变叶片的颜色和质地。同样在发酵过程中,可以产生演化气体,可以吸收氧气,可以改变pH值,可以改变保留的水量。参见例如美国公开号2005/0178398和Tso (1999, Chapter 1 in Tobacco, Production, Chemistry and Technology, Davis&Nielsen, eds., Blackwell Publishing, Oxford)。在加入口腔用制品之前,可以进一步加工(例如切割、膨化、混合、研磨或粉碎)熟化或熟化并发酵的烟草。在某些情况下,烟草是长切发酵的熟化湿烟草,在与共聚物和任选的食用香料和其他添加剂混合之前,其烘箱挥发物含量为48-50重量%。

[0205] 在一个方面,本文提供的烟草材料可以加工成所需的尺寸。在某些方面,烟草纤维可以加工成平均纤维尺寸小于200微米。在一个方面,烟草纤维为75至125微米。在另一个方

面,将烟草纤维加工成具有75微米或更小的尺寸。在一个方面,烟草纤维包括长切烟草,其可被切割或切碎成宽度为约10切/英寸(cut/inch)直至约110切/英寸,长度为约0.1英寸至约1英寸。双切烟草纤维可具有一定范围的颗粒尺寸,使得约70%的双切烟草纤维落在-20目至80目的筛目尺寸之间。

[0206] 本文提供的烟草材料可以加工成总烘箱挥发物含量为约10重量%或更高;约20重量%或更高;约40重量%或更高;约15重量%至约25重量%;约20重量%至约30重量%;约30重量%至约50重量%;约45重量%至约65重量%或约50重量%至约60重量%。本领域技术人员将理解,“潮湿”烟草通常是指烘箱挥发物含量为约40重量%至约60重量%(例如约45重量%至约55重量%,或约50%重量)的烟草。如本文所用,“烘箱挥发物”通过计算在预热的强制通风烘箱中于110℃干燥样品3.25小时后样品的失重百分比来确定。口腔用制品的总烘箱挥发物含量可与用于制备口腔用制品的烟草纤维的烘箱挥发物含量不同。本文描述的加工步骤可以减少或增加烘箱挥发物含量。

[0207] 在一个方面,本文提供的烟草植物、种子、植物组分、植物细胞和植物基因组来自选自下组的烟草类型:烤制熟化烟草、晒制熟化烟草、晾制熟化烟草、深色晾制熟化烟草和深色明火烤制熟化烟草。在另一个方面,本文提供的烟草植物、种子、植物组分、植物细胞和植物基因组来自选自以下的烟草类型:白肋烟、马里兰烟、金黄色烟、弗吉尼亚烟、东方烟草、土耳其烟草和**Galpão**烟草。在一个方面,本文提供的烟草植物或种子是杂交种植物或种子。如本文所用,通过杂交来自不同品种或物种的两种植物产生“杂交种”,使得子代包含来自每个亲本的遗传物质。熟练的技术人员认识到也可以生成更高阶的杂交种。例如,可以通过将品种C与品种D杂交以产生C x D杂交种来制备第一杂交种,并且可以通过将品种E与品种F杂交以产生E x F杂交种来制备第二杂交种。可以进一步杂交第一和第二杂交种以产生包含来自所有四个亲本品种的遗传信息的高阶杂交种(C x D) x (E x F)。

[0208] 烤制熟化烟草(也称为弗吉尼亚烟或金黄色烟)占世界烟草产量的约40%。因为在熟化期间其达到金黄色至深橘色,烤制熟化烟草也常常称为“金黄色烟”。烤制熟化烟草具有淡淡的、明亮的香气和味道。烤制熟化烟草通常糖含量高,油含量低。主要的烤制熟化烟草种植国家有阿根廷、巴西、中国、印度、坦桑尼亚和美国。在一个方面,本文提供的改良烟草植物或种子是选自以下的烤制熟化烟草背景:CC 13、CC 27、CC 33、CC35、CC 37、CC 65、CC 67、CC 700、GF 318、GL 338、GL 368、GL 939、K 346、K 399、K326、NC 102、NC 196、NC 291、NC 297、NC 299、NC 471、NC 55、NC 606、NC 71、NC 72、NC 92、PVH 1118、PVH 1452、PVH 2110、SPEIGHT 168、SPEIGHT 220、SPEIGHT 225、SPEIGHT 227、SPEIGHT 236,以及基本上衍生自上述品种任意之一的任何品种。在另一个方面,本文提供的改良烟草植物或种子是选自以下的烤制熟化烟草背景:Coker 48、Coker 176、Coker 371-Gold、Coker 319、Coker 347、GL 939、K 149、K326、K 340、K 346、K 358、K 394、K 399、K 730、NC 27NF、NC 37NF、NC 55、NC 60、NC 71、NC 72、NC 82、NC 95、NC 297、NC 606、NC 729、NC 2326、McNair 373、McNair 944、Ox 207、Ox 414NF、Reams 126、Reams 713、Reams 744、RG 8、RG 11、RG 13、RG 17、RG 22、RG 81、RG H4、RG H51、Speight H-20、Speight G-28、Speight G-58、Speight G-70、Speight G-108、Speight G-111、Speight G-117、Speight168、Speight 179、Speight NF-3、V116、V182,以及基本上衍生自上述品种任意之一的任何品种。参见WO 2004/041006 A1。还在进一步的方面,本文提供的改良烟草植物、种子、杂交种、品种或品系是选自以下的

任何烤制熟化背景:K326、K346和NC196。

[0209] 晾制熟化烟草包括白肋烟、马里兰烟和暗烟草。共同因素是,熟化主要没有人工的热源和湿度。白肋烟的颜色是浅棕色至深棕色,油含量高、且糖含量低。白肋烟在仓房里晾制熟化。主要的白肋烟种植国家有阿根廷、巴西、意大利、马拉维和美国。马里兰烟极度蓬松,具有良好的燃烧性能、低烟碱和中性的香气。主要的马里兰烟种植国家包括美国和意大利。在另一个方面,本文提供的改良烟草植物或种子是选自以下的白肋烟背景:Clay 402、Clay 403、Clay 502、Ky 14、Ky 907、Ky 910、Ky 8959、NC 2、NC 3、NC 4、NC 5、NC 2000、TN 86、TN 90、TN 97、R 610、R 630、R 711、R 712、NCBH 129、HB4488PLC、PD 7319LC、Bu 21×Ky 10、HB04P、Ky 14×L 8、Kt 200、Newton 98、Pedigo 561、Pf561和V509。在进一步的方面,本文提供的改良烟草植物、种子、杂交种、品种或品系是选自以下的任何白肋烟背景:TN 90、KT 209、KT 206、KT212和HB 4488。在另一个方面,本文提供的改良烟草植物或种子是选自以下的马里兰烟背景:Md 10、Md 40、Md 201、Md 609、Md 872和Md 341。

[0210] 深色晾制熟化烟草与其他类型的主要区别在于熟化过程,其给予深色晾制熟化烟草中褐色至深棕色的颜色和不同的香气。深色晾制熟化烟草主要用于生产嚼烟和鼻烟。在一个方面,本文提供的改良烟草植物或种子是选自以下的深色晾制熟化烟草背景:Sumatra、Jatim、DominicCubano、Besuki、One sucker、Green River、Virginisun-cured和ParaguPassado。

[0211] 深色明火烤制熟化烟草通常用封闭的熟化室底板上的低燃烧木火熟化。深色明火烤制熟化烟草用于制造管烟、卷烟、嚼烟、鼻烟和烈性雪茄。深色明火烤制熟化烟草的主要种植区域是美国的田纳西、肯塔基和弗吉尼亚。在一个方面,本文提供的改良烟草植物或种子是选自以下的深色明火烤制熟化烟草背景:窄叶马多尔、Improved Madole、Tom Rosson Madole、Newton's VH Madole、Little Crittenden、Green Wood、Little Wood、Small Stalk Black Mammoth、DT 508、DT 518、DT 592、KY 171、DF 911、DF 485、TN D94、TN D950、V309和V359。

[0212] 东方烟草也称为希腊香气和土耳其烟草,因为它们通常种植在东地中海区域例如土耳其、希腊、保加利亚、马其顿、叙利亚、黎巴嫩、意大利和罗马尼亚。今天的东方品种的特征是植物和叶的尺寸小,以及它独特的香气特性,这是植物在过去的许多世纪中适应贫瘠土壤和恶劣的气候条件的结果。在一个方面,本文提供的改良烟草植物或种子是选自以下的东方烟草背景:Izmir、Katerini、Samsun、Basma和Krumovgrad、Trabzon、Thesalian、Tasova、Sinop、Izmit、Hendek、Edirne、Semdinli、Adiyanman、Yayladag、Iskenderun、Duzce、Macedonian、Mavra、Prilep、Bafra、Bursa、Bucak、Bitlis、Balikesir,以及基本上衍生自上述品种任意之一的任何品种。

[0213] 在一个方面,本文提供的改良烟草植物、种子、杂交种、品种或品系基本上衍生自以下品种或是选自以下品种的遗传背景:BU 64、CC 101、CC 200、CC 13、CC 27、CC 33、CC 35、CC 37、CC 65、CC 67、CC 301、CC 400、CC 500、CC 600、CC 700、CC 800、CC 900、CC 1063、Coker 176、Coker 319、Coker 371Gold、Coker 48、CU 263、DF911、Galpão、GL 26H、GL 338、GL 350、GL 395、GL 600、GL 737、GL 939、GL 973、GF 157、GF 318、RJR 901、HB 04P、K 149、K 326、K 346、K 358、K394、K 399、K 730、NC 196、NC 37NF、NC 471、NC 55、NC 92、NC2326、NC 95、NC 925、PVH 1118、PVH 1452、PVH 2110、PVH 2254、PVH 2275、V116、

V119、KDH 959、KT 200、KT204LC、KY 10、KY 14、KY 160、KY 17、KY 171、KY 907、KY 907LC、KTY14 x L8 LC、Little Crittenden、McNair 373、McNair 944、雄性不育KY 14x L8、窄叶马多尔、MS KY171、窄叶马多尔 (phph)、MS窄叶马多尔、MS TND950、PD 7302LC、PD 7305LC、PD 7309LC、PD 7312LC、PD 7318LC、PD 7319LC、MSTKS 2002、TKF 2002、TKF6400、TKF 4028、TKF 4024、KT206LC、KT209LC、KT210LC、KT212LC、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、OXFORD 207、‘Perique’、PVH03、PVH09、PVH19、PVH50、PVH51、R 610、R 630、R 7-11、R 7-12、RG 17、RG 81、RG H51、RGH 4、RGH 51、RS 1410、Speight168、Speight 172、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、TN90LC、TN 97、TN97LC、TN D94、TN D950、TR (Tom Rosson) Madole、V309、V359, 或根据本领域已知的标准烟草育种技术的任何商业化烟草品种。

[0214] 所有前面提及的深色晾制熟化、白肋、马里兰、深色明火烤制熟化或东方类型的具体品种仅出于示例性目的而列出。在本申请中还预期任何其他的深色晾制熟化、白肋、马里兰、深色明火烤制熟化或东方品种。

[0215] 本文还提供了本文所述的烟草植物的群体。在一个方面, 本文提供的烟草植物群体的种植密度为每英亩约5,000至约8000、约5,000至约7,600、约5,000至约7,200、约5,000至约6,800、约5,000至约6,400、约5,000至约6,000、约5,000至约5,600、约5,000至约5,200、约5,200至约8,000、约5,600至约8,000、约6,000至约8,000、约6,400至约8,000、约6,800至约8,000、约7,200至约8,000、或约7,600至约8,000株植物。在另一个方面, 本文提供的烟草植物群体是在具有低至中等肥力的土壤类型中。

[0216] 本文还提供了来自本文所述烟草植物的种子的容器。本公开的烟草种子的容器可包含任何数量、重量或体积的种子。例如, 容器可以包含至少或大于约100、至少或大于约200、至少或大于约300、至少或大于约400、至少或大于约500、至少或大于约600、至少或大于约700、至少或大于约800、至少或大于约900、至少或大于约1000、至少或大于约1500、至少或大于约2000、至少或大于约2500、至少或大于约3000、至少或大于约3500、至少或大于约4000粒或更多的种子。或者, 容器可含有至少或大于约1盎司、至少或大于约5盎司、至少或大于约10盎司、至少或大于约1磅、至少或大于约2磅、至少或大于约3磅、至少或大于约4磅、至少或大于约5磅或更多种子。烟草种子的容器可以是本领域可用的任何容器。作为非限制性示例, 容器可以是盒子、袋子、小包、小袋、带卷、管或瓶子。

[0217] 本公开还提供了用于育种包括减少或消除的分权的烟草品系、栽培种或品种的方法。可以通过任何已知的程序进行育种。DNA指纹分析、SNP作图、单倍型作图或类似技术可用于标记辅助选择 (MAS) 育种程序, 以将期望的性状或等位基因转移或繁殖到烟草植物中。例如, 育种者可以使用本文提供的F₁杂交种植物在F₂或回交代中产生分离群体, 或者进一步使F₁杂交种植物与具有农学上期望基因型的其他供体植物杂交。可以使用本领域已知的或本文列出的技术之一筛选F₂或回交代植物的期望农艺性状或期望化学谱。取决于预期的遗传模式或所使用的MAS技术, 可以在每个回交循环之前对所选植物进行自花授粉以帮助鉴定所需的单株植物。可以重复回交或其他育种程序, 直到恢复轮回亲本的期望表型。在一个方面, 本公开的轮回亲本可以是烤制熟化品种、白肋品种、深色晾制熟化品种、深色明火烤

制熟化品种,或东方品种。在另一个方面,轮回亲本可以是改良的烟草植物、品系或品种。其他育种技术可见于例如Wernsman, E. A., and Rufty, R. C. 1987. Chapter Seventeen. Tobacco. Pages 669-698 In: Cultivar Development. Crop Species. W. H. Fehr (ed.), MacMillan Publishing Co., Inc., New York, N. Y., 其全文通过引用并入本文。

[0218] 使用本文所述的改良烟草植物的植物育种程序的结果包括本公开的有用品系、栽培种、品种、子代、近交系和杂交种。如本文所用,术语“品种”是指具有将其与相同物种的其他植物分离的恒定特征的植物群体。品种通常,尽管并不总是,商业销售的。当具有一个或多个特殊性状,品种的进一步特征是在那个品种内个体之间非常小的总体差异。可通过数代自花受粉和选择,或使用组织或细胞培养技术从单个亲本无性繁殖生成“纯系”品种。品种可以基本上衍生自另一个品系或品种。根据国际公约对植物新品种保护的定义(1961年12月2日,于1972年11月10日、1978年10月23日和1991年3月19日在日内瓦修订),品种“基本上衍生”自初始品种,如果:a)它主要衍生自初始品种,或衍生自主要衍生自初始品种的品种,同时保留由所述初始品种的基因型或基因型组合产生的必要特征的表达;b)它与初始品种有明显区别;c)除了由衍生行为产生的差异,它在由所述初始品种的基因型或基因型组合产生的必要特征的表达中与初始品种相符合。可通过例如选择天然或诱导的突变体、体细胞无性变体、来自初始品种植物的变异个体、回交或转化获得基本上衍生的品种。认为第一烟草品种和第一品种基本上从其衍生的第二烟草品种具有基本上相同的遗传背景。与品种不同,“品系”最通常是指非商业使用的一组植物,例如用于植物研究。品系通常对于一个或多个目标性状在个体间显示非常小的总体差异,尽管对于其他性状在个体间可能存在一些差异。

[0219] 在一个方面,本公开提供了一种生产烟草植物的方法,包括使第一烟草品种的至少一种烟草植物与第二烟草品种的至少一种烟草植物杂交,其中与在可比条件下生长的相同品种的对照烟草植物相比,所述第一烟草品种的至少一种烟草植物没有表现出或表现出减少的打顶诱导的分权;选择与在可比条件下相同杂交的对照烟草植物相比,没有表现出或表现出减少的打顶诱导的分权的子代烟草植物。在一个方面,本文提供的第一烟草品种包含改良烟草植物。在另一个方面,本文提供的第二烟草品种包含改良烟草植物。在一个方面,第一或第二烟草品种是雄性不育的。在另一个方面,第一或第二烟草品种是细胞质雄性不育的。在另一个方面,第一或第二烟草品种是雌性不育的。在一个方面,第一或第二烟草品种是优良品种。在另一个方面,第一或第二烟草品种是杂交种。

[0220] 在一个方面,本公开提供了一种将一个或多个转基因渗入烟草品种的方法,该方法包括:(a)将包含一个或多个转基因的第一烟草品种与不含所述一个或多个转基因的第二烟草品种杂交以产生一种或多种子代烟草植物;b)对一种或多种子代烟草植物进行一个或多个转基因的基因分型;和(c)选择包含一个或多个转基因的子代烟草植物。在另一个方面,这些方法还包括使所选择的子代烟草植物与第二烟草品种回交。在进一步的方面,这些方法还包括:(d)将选择的子代植物与其自身或与第二烟草品种杂交以产生一种或多种进一步的子代烟草植物;和(e)选择包含一个或多个转基因的进一步的子代烟草植物。在一个方面,第二烟草品种是优良品种。

[0221] 在一个方面,本公开提供了一种将一个或多个突变渗入烟草品种的方法,该方法包括:(a)将包含一个或多个突变的第一烟草品种与不含所述一个或多个突变的第二烟草

品种杂交以产生一种或多种子代烟草植物；(b) 对一种或多种子代烟草植物进行一个或多个突变的基因分型；和(c) 选择包含一个或多个突变的子代烟草植物。在另一个方面, 这些方法还包括使所选择的子代烟草植物与第二烟草品种回交。在进一步的方面, 这些方法还包括：(d) 将选择的子代植物与其自身或与第二烟草品种杂交以产生一种或多种进一步的子代烟草植物；和(e) 选择包含一个或多个突变的进一步的子代烟草植物。在一个方面, 第二烟草品种是优良品种。

[0222] 在一个方面, 本公开提供了一种生长不包含或包含减少的分枝的改良烟草植物的群体的方法, 其中该方法包括种植包含一个或多个突变、一个或多个转基因或两者的烟草种子的群体, 其中, 当在可比条件下生长时, 与相同品种的对照烟草植物相比, 所述一种或多种改良烟草植物没有表现出或表现出减少的分枝。

[0223] 在一个方面, 本公开提供了一种生长改良烟草植物的方法, 包括种植包含异源启动子的改良烟草种子, 所述异源启动子与编码多肽的多核苷酸可操作地连接, 所述多肽与选自以下的多肽具有至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性: SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255; 和从所述种子生长所述改良烟草植物。在另一个方面, 本公开提供了一种生长改良烟草植物的方法, 包括种植包含重组DNA构建体的改良烟草种子, 所述重组DNA构建体包含异源启动子, 所述异源启动子在L1层、L2层、L3区、肋区、中心区、外围区或其组合中起作用并且与编码非编码RNA分子的多核苷酸可操作地连接, 其中所述非编码RNA分子能够结合编码多肽的RNA, 所述多肽与选自以下的多肽具有至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性: SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、161-185、187、189、191、197、199、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255, 其中所述非编码RNA分子抑制所述多肽的表达; 和从所述种子生长所述改良植物。在一个方面, 生长包括种子萌发。在另一个方面, 生长包括将幼苗置于土壤、琼脂、基于琼脂的培养基或水培系统中。在另一个方面, 生长包括为种子或植物提供水、光(例如人工光、日光)、肥料、生根培养基或其组合。在一个方面, 生长可以在室内(例如温室)或室外(例如田间)进行。在一个方面, 生长包括将种子或植物置于容器中。

[0224] 在一个方面, 本公开提供了用于制备改良种子的方法, 包括将本文提供的重组DNA构建体引入植物细胞中; 筛选植物细胞群体的重组DNA构建体; 从群体中选择一个或多个植物细胞; 从一个或多个植物细胞产生一株或多株改良植物; 从一株或多株改良植物收集一粒或多粒改良种子。

[0225] 如本文所用, “基因座”是多态性核酸、性状决定簇、基因或标志物所在的染色体区域。本公开的基因座包含群体中的一种或多种多态性; 例如, 一些个体中存在替代等位基

因。如本文所用,“等位基因”是指特定基因座处的替代核酸序列。等位基因的长度可以小至1个核苷酸碱基,但通常更大。例如,第一等位基因可以出现在一条染色体上,而第二等位基因出现在第二条同源染色体上,例如,对于在杂合个体的不同染色体,或者在群体中不同的纯合或杂合个体之间出现。如本文所用,当仅存在一个基因座拷贝时,二倍体植物中的染色体是“半合子的”。例如,当插入的转基因仅插入一条姐妹染色体时(即,第二条姐妹染色体不含插入的转基因),插入的转基因是半合子的。

[0226] 在一个方面,改良的植物、种子、植物组分、植物细胞或植物基因组对于本文提供的转基因是纯合的。在另一个方面,改良的植物、种子、植物组分、植物细胞或植物基因组对于本文提供的转基因是杂合的。在一个方面,改良的植物、种子、植物组分、植物细胞或植物基因组对于本文提供的转基因是半合子的。在一个方面,改良的植物、种子、植物组分、植物细胞或植物基因组对于本文提供的突变是纯合的。在另一个方面,改良的植物、种子、植物组分、植物细胞或植物基因组对于本文提供的突变是杂合的。在一个方面,改良的植物、种子、植物组分、植物细胞或植物基因组对于本文提供的突变是半合子的。

[0227] 如本文所用,“基因渗入”是指遗传基因座的所需等位基因从一个遗传背景传递至另一个遗传背景。

[0228] 如本文所用,“杂交”是指通过受精产生子代(例如细胞、种子或植物),并且包括不同植物之间的杂交(有性)和自体受精(自交)。

[0229] 如本文所用,“回交”是指子代植物与其亲本之一重复杂交的过程。在回交方案中,“供体”亲本是指具有待渗入的所需基因或基因座的亲本植物。“受体”亲本(使用一次或多次)或“轮回”亲本(使用两次或更多次)是指基因或基因座被渗入其中的亲本植物。最初的杂交产生 F_1 代。术语“BC1”是指第二次使用轮回亲本,“BC2”是指第三次使用轮回亲本,依此类推。在一个方面,重复进行回交,每个连续回交代的子代个体自身与相同的亲本基因型回交。

[0230] 如本文所用,“优良品种”是指由于优良的农艺性能从育种和选择产生的任何品种。

[0231] 如本文所用,在育种背景下的“选择”是指基于某些预定标准通常从群体挑选或选择期望个体的行为。

[0232] 在一个方面,本文提供的烟草植物是杂交种植物。杂交种可以通过以下来产生:阻止第一品种的雌性亲本植物(例如种子亲本)自花授粉,允许第二品种的雄性亲本植物的花粉受精雌性亲本植物,并允许 F_1 杂交种子在雌性植物上形成。可以通过在花发育早期将花去雄来阻止雌性植物的自花授粉。或者,可以使用雄性不育的形式阻止在雌性亲本植物上形成花粉。例如,可以通过雄性不育(MS)或其中转基因抑制小孢子发生和/或花粉形成的转基因雄性不育或自交不亲和来产生雄性不育。包含MS的雌性亲本植物尤其有用。在雌性亲本植物是MS的方面,可以从雄性可育植物收获花粉,并人工授至MS雌性亲本植物的柱头,并收获所得的 F_1 种子。此外,雌性不育植物也可以用于阻止自花授粉。

[0233] 植物可用于形成单交烟草 F_1 杂交种。将来自雄性亲本植物的花粉人工转移至去雄的雌性亲本植物或雄性不育的雌性亲本植物以形成 F_1 种子。或者,可以进行三向杂交,其中单交 F_1 杂交种用作母本并与不同的父本杂交。作为另一种选择,可以产生双交杂交种,其中两个不同单交的 F_1 子代与其自身杂交。当形成双交杂交种时,自交不亲和性可以特别有利

地用于阻止雌性亲本的自花授粉。

[0234] 在一个方面,本文提供的烟草品种是雄性不育。在另一个方面,本文提供的烟草品种是细胞质雄性不育(CMS)。雄性不育的烟草植物可以通过本领域已知的任何方法产生。产生雄性不育烟草的方法描述于Wernsman,E.A.,and Rufty,R.C.1987.Chapter Seventeen.Tobacco.Pages 669-698In:Cultivar Development.Crop Species.W.H.Fehr (ed.),MacMillPublishing Go.,Inc.,New York,N.Y.761pp。在另一个方面,本文提供的烟草品种是雌性不育。作为非限制性的实例,可以通过突变STIG1基因来制备雌性不育植物。参见例如Goldman等1994,EMBO Journal 13:2976-2984。

[0235] 如本文所用,在两个多核苷酸或多肽序列的上下文中,术语“序列同一性”或“同一性”指的是当在指定的比较窗口上比对最大对应性时两个序列中的残基相同。当对蛋白质使用序列同一性百分比时,认识到不相同的残基位置通常通过保守氨基酸取代而不同,其中氨基酸残基被具有相似化学性质(例如电荷或疏水性)的其他氨基酸残基取代,因此不会改变分子的功能特性。当序列在保守取代上不同时,可以向上调整序列同一性百分比以校正取代的保守性质。通过这种保守取代而不同的序列称为具有“序列相似性”或“相似性”。

[0236] 术语“多核苷酸”的使用不旨在将本公开限制于包含DNA的多核苷酸。本领域普通技术人员将认识到,多核苷酸和核酸分子可包含核糖核苷酸以及核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸的组合。这种脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸包括天然存在的分子和合成的类似物。本公开的多核苷酸还涵盖所有形式的序列,包括但不限于单链形式、双链形式、发夹、茎环结构等。

[0237] 如本文所用,术语“多肽”是指至少两个共价连接的氨基酸的链。

[0238] 本公开提供了重组、纯化、分离或加工的核酸和多肽。在一个方面,本公开提供的核酸分子与选自以下的序列具有至少约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%的同一性:SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83-160、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225-228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254及其片段。在一个方面,本公开提供的核酸分子包含与选自以下的多核苷酸相同的至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少26、至少27、至少28、至少29、至少30或超过30个连续核苷酸:SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83-160、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225-228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252和254。

[0239] 在另一个方面,本公开提供了编码多肽的多核苷酸,所述多肽与选自以下的多肽序列具有至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%的序列同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、

36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。在另一个方面,本公开提供了编码多肽的多核苷酸,所述多肽与选自以下的多肽序列具有至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%的相似性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。

[0240] 在一个方面,本公开提供的多肽与选自以下的氨基酸序列具有至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%的同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。在一个方面,本公开提供的多肽与选自以下的氨基酸序列具有至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%的相似性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。在一个方面,本公开提供的多肽包含与选自以下的多肽的氨基酸序列相同的至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少30、至少40、至少50或超过50个连续氨基酸:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。

[0241] 在另一个方面,本公开提供具有选自以下的氨基酸序列的蛋白质的生物活性变体:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。本公开的蛋白质的生物活性变体与所述蛋白质的差异可以少至1-15个氨基酸、少至10个、少至9个、少至8个、少至7个、少至6个、

少至5个、少至4个、少至3个、少至2个或少至1个氨基酸残基。本文还提供了直系同源基因或基因的蛋白质或选自以下的蛋白质:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。“直系同源物”是指衍生自共同祖先基因的基因,其由于特定化而发现于不同的物种。直系同源物可以在核苷酸序列和/或氨基酸序列水平具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更高的序列一致性或相似性。直系同源物的功能在物种间通常是高度保守的。

[0242] 本文提供的核酸分子、多肽或蛋白质可以是分离的或基本纯化的。“分离的”或“纯化的”核酸分子、多肽、蛋白质或其生物活性部分实质上或基本上不含通常与其天然存在的环境中发现的多核苷酸或蛋白质相伴或相互作用的组分。例如,当通过重组技术产生时,分离的或纯化的多核苷酸或蛋白质基本上不含其他细胞物质或培养基,或当化学合成时,基本上不含化学前体或其他化学品。在一个方面,本文提供的分离的多核苷酸可以包含少于约5000个核苷酸、少于约4000个核苷酸、少于约3000个核苷酸、少于约2000个核苷酸、少于约1000个核苷酸、少于约500个核苷酸、少于约500个核苷酸或少于约100个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列天然地位于衍生多核苷酸的细胞的基因组DNA中的多核苷酸侧翼。在一个方面,本文提供的分离的多核苷酸可包含100-5000、500-5000、1000-5000、2000-5000、3000-5000、4000-5000、1-500、1-1000、1-2000、1-3000、1-4000、1-5000、100-500、100-1000、100-2000、100-3000或100-4000个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列天然地位于衍生多核苷酸的细胞的基因组DNA中的多核苷酸侧翼。在另一个方面,本文提供的分离的多肽在制剂中基本上不含细胞物质,所述制剂的化学前体或非目标蛋白化学品的含量小于约30%、小于约20%、小于约10%、小于约5%、或小于约1% (干重)。所公开的多核苷酸和由其编码的多肽的片段也包括在本发明中。多核苷酸片段可以编码保留天然多肽的生物活性的多肽片段。或者,使用本领域已知的方法用作杂交探针或PCR引物的多核苷酸片段通常不编码保留生物活性的片段多肽。取决于所需的结果,本文提供的多核苷酸片段可以为至少约20个核苷酸、约50个核苷酸、约70个核苷酸、约100个核苷酸、约150个核苷酸、约200个核苷酸、约250个核苷酸、约300个核苷酸,并且直至编码本发明多肽的全长多核苷酸。

[0243] 可以使用本领域的常规技术分离核酸。例如,可以使用包括但不限于以下的任何方法分离核酸:重组核酸技术和/或聚合酶链式反应(PCR)。一般的PCR技术描述于例如PCR Primer:Laboratory Manual, Dieffenbach&Dveksler, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995。重组核酸技术包括,例如限制性酶消化和连接,其可用于分离核酸。分离的核酸也可以作为单个核酸分子或作为一系列寡核苷酸化学合成。可以通过已知方法,例如DEAE离子交换、凝胶过滤和羟基磷灰石层析从天然来源(例如生物样品)中纯化多肽。例如,也可以通过在表达载体中表达核酸来纯化多肽。另外,可以通过化学合成获得纯化的多肽。多肽的纯度可以使用任何合适的方法测量,例如柱色谱、聚丙烯酰胺凝胶电泳或HPLC分析。

[0244] 在一个方面,本公开提供了检测植物细胞中的重组核酸和多肽的方法。非限制性

地,也可以使用杂交检测核酸。核酸之间的杂交详细讨论于Sambrook等(1989,Molecular Cloning:Laboratory Manual,2ndEd.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY)。

[0245] 可以使用抗体检测多肽。使用抗体检测多肽的技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、Western印迹、免疫沉淀和免疫荧光。本文提供的抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。可以使用本领域熟知的方法制备对本文提供的多肽具有特异性结合亲和力的抗体。可以使用本领域已知的方法将本文提供的抗体附着于固体支持物,如微量滴定板。

[0246] 可以使用可检测标签进行检测(例如,扩增产物、杂交复合物、多肽)。术语“标签”旨在包括使用直接标签以及间接标签。可检测标签包括酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和放射性材料。

[0247] 预期以下示例性的非限制性实施方案:

[0248] 1.一种改良烟草植物,当在可比条件下生长时,与相同品种的对照烟草植物相比,其不包含或包含减少的烟杈。

[0249] 2.实施方案1的改良烟草植物,其中所述烟杈是打顶诱导的烟杈。

[0250] 3.实施方案1的改良烟草植物,其中所述改良烟草植物包含一个或多个突变。

[0251] 4.实施方案1的改良烟草植物,其中所述改良烟草植物包含一个或多个转基因。

[0252] 5.实施方案3的改良烟草植物,其中所述一个或多个突变抑制烟杈。

[0253] 6.实施方案4的改良烟草植物,其中所述一个或多个转基因抑制烟杈。

[0254] 7.实施方案3的改良烟草植物,其中所述一个或多个突变抑制打顶诱导的烟杈。

[0255] 8.实施方案4的改良烟草植物,其中所述一个或多个转基因抑制打顶诱导的烟杈。

[0256] 9.实施方案3的改良烟草植物,其中所述一个或多个突变在打顶之前抑制烟杈。

[0257] 10.实施方案4的改良烟草植物,其中所述一个或多个转基因在打顶之前抑制烟杈。

[0258] 11.实施方案3的改良烟草植物,其中所述一个或多个突变选自插入、缺失、倒位、取代及其组合。

[0259] 12.实施方案4的改良烟草植物,其中所述一个或多个转基因包含腋生分生组织特异性启动子。

[0260] 13.实施方案12的改良烟草植物,其中所述腋生分生组织特异性启动子在L1层、L2层、L3区或其组合中起作用或优先起作用。

[0261] 14.实施方案12的改良烟草植物,其中所述腋生分生组织特异性启动子在腋生分生组织的中心区、外围区、肋区或其组合中起作用或优先起作用。

[0262] 15.实施方案11的改良烟草植物,其中所述一个或多个突变通过选自以下的系统引入:化学诱变、辐射诱变、转座子诱变、农杆菌介导的转化、大范围核酸酶、锌指核酸酶(ZFN)、转录激活子样效应子核酸酶(TALEN)、簇间规则的间隔短回文重复序列(CRISPR)/Cas9系统、CRISPR/Cpf1系统及其组合。

[0263] 16.实施方案11的改良烟草植物,其中所述一个或多个突变位于编码与选自以下的多肽具有至少70%序列同一性的多肽的基因中:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、

212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。

[0264] 17. 实施方案3或4的改良烟草植物,其中当在可比条件下生长时,与所述对照烟草植物相比,所述改良烟草植物具有相似或更高的叶产量。

[0265] 18. 实施方案17的改良烟草植物,其中所述更高的叶产量是高至少0.5%、1%、2.5%、5%、10%、15%或至少20%。

[0266] 19. 实施方案3或4的改良烟草植物,其中当在可比条件下生长时,与所述对照烟草植物相比,所述改良烟草植物具有相似的株高。

[0267] 20. 实施方案19的改良烟草植物,其中所述相似的株高是在1%、5%、10%、20%或25%内。

[0268] 21. 实施方案3或4的改良烟草植物,其中当在可比条件下生长时,与所述对照烟草植物相比,所述改良烟草植物具有相似的熟化叶化学谱。

[0269] 22. 实施方案3或4的改良烟草植物,其中当在可比条件下生长时,与所述对照烟草植物的熟化叶相比,所述改良烟草植物产生的熟化叶具有相似或更高的USDA等级指数值。

[0270] 23. 实施方案1的改良烟草植物,其中当在可比条件下生长时,与所述对照烟草植物的打顶诱导的烟杈相比,所述减少的打顶诱导的烟杈包含更少的总烟杈、更小的烟杈,或两者。

[0271] 24. 实施方案23的改良烟草植物,其中当在可比条件下生长时,与所述对照烟草植物的打顶诱导的烟杈相比,所述更小的烟杈包含减少的质量、减少的长度,或两者。

[0272] 25. 实施方案3或4的改良烟草植物,其中当在可比条件下生长时,与对照烟草植物相比,所述改良烟草植物需要的用于控制烟杈的管理减少。

[0273] 26. 实施方案25的改良烟草植物,其中当在可比条件下生长时,与对照烟草植物相比,所述减少的管理包括控制烟杈的人工去除频率降低、控制烟杈的化学品施用频率降低、控制烟杈的化学品施用量降低,或其任何组合。

[0274] 27. 实施方案26的改良烟草植物,其中当在可比条件下生长时,所述控制烟杈的人工去除频率降低比对照植物的频率低10%、低20%、低30%、低40%、低50%、低60%、低70%、低75%、低80%、低85%、低90%或低95%。

[0275] 28. 实施方案3或4的改良烟草植物,其中所述改良烟草植物对于所述一个或多个转基因或所述一个或多个突变是纯合的。

[0276] 29. 实施方案3或4的改良烟草植物,其中所述改良烟草植物对于所述一个或多个转基因或所述一个或多个突变是半合子的。

[0277] 30. 实施方案3或4的改良烟草植物,其中所述改良烟草植物对于所述一个或多个转基因或所述一个或多个突变是杂合的。

[0278] 31. 实施方案1的改良烟草植物,其中所述植物选自烤制熟化品种、金黄色品种、白肋品种、弗吉尼亚品种、马里兰品种、深色品种、东方品种和土耳其品种。

[0279] 32. 实施方案1的改良烟草植物,其中所述植物选自BU 64植物、CC 101植物、CC 200植物、CC 13植物、CC 27植物、CC 33植物、CC 35植物、CC 37植物、CC 65植物、CC 67植物、CC 301植物、CC 400植物、CC 500植物、CC 600植物、CC 700植物、CC 800植物、CC 900植物、CC 1063植物、Coker 176植物、Coker 319植物、Coker 371Gold植物、Coker 48植物、CU

263植物、DF911植物、Galpao植物、GL 26H植物、GL 338植物、GL 350植物、GL 395植物、GL600植物、GL 737植物、GL 939植物、GL 973植物、GF 157植物、GF 318植物、RJR 901植物、HB 04P植物、K 149植物、K 326植物、K 346植物、K 358植物、K394植物、K 399植物、K 730植物、NC 196植物、NC 37NF植物、NC 471植物、NC 55植物、NC 92植物、NC2326植物、NC 95植物、NC 925植物、PVH 1118植物、PVH 1452植物、PVH 2110植物、PVH 2254植物、PVH 2275植物、V116植物、V119植物、KDH 959植物、KT 200植物、KT204LC植物、KY 10植物、KY 14植物、KY 160植物、KY 17植物、KY 171植物、KY 907植物、KY 907LC植物、KTY14 x L8 LC植物、Little Crittenden植物、McNair373植物、McNair 944植物、雄性不育KY 14x L8植物、窄叶马多尔(Narrow Leaf Madole)植物、MS KY171植物、窄叶马多尔(phph)植物、MS窄叶马多尔植物、MS TND950植物、PD 7302LC植物、PD 7305LC植物、PD 7309LC植物、PD 7312LC植物、PD 7318LC植物、PD 7319LC植物、MSTKS 2002植物、TKF 2002植物、TKF 6400植物、TKF 4028植物、TKF 4024植物、KT206LC植物、KT209LC植物、KT210LC植物、KT212LC植物、NC 100植物、NC 102植物、NC 2000植物、NC 291植物、NC 297植物、NC 299植物、NC 3植物、NC 4植物、NC 5植物、NC 6植物、NC7植物、NC 606植物、NC 71植物、NC 72植物、NC 810植物、NC BH 129植物、NC 2002植物、Neal Smith Madole植物、OXFORD 207植物、‘Perique’植物、PVH03植物、PVH09植物、PVH19植物、PVH50植物、PVH51植物、R 610植物、R 630植物、R 7-11植物、R 7-12植物、RG 17植物、RG 81植物、RG H51植物、RGH 4植物、RGH 51植物、RS 1410植物、Speight 168植物、Speight 172植物、Speight 179植物、Speight 210植物、Speight 220植物、Speight 225植物、Speight 227植物、Speight234植物、Speight G-28植物、Speight G-70植物、Speight H-6植物、Speight H20植物、Speight NF3植物、TI 1406植物、TI 1269植物、TN 86植物、TN86LC植物、TN 90植物、TN90LC植物、TN 97植物、TN97LC植物、TN D94植物、TN D950植物、TR(Tom Rosson)Madole植物、V309植物和V359植物。

[0280] 33. 实施方案1的改良烟草植物,其中所述改良烟草植物是杂交种。

[0281] 34. 实施方案1的改良烟草植物,其中所述改良烟草植物是雄性不育或细胞质雄性不育(CMS)。

[0282] 35. 实施方案1的改良烟草植物,其中所述改良烟草植物是雌性不育。

[0283] 36. 实施方案1的改良烟草植物的烟叶。

[0284] 37. 实施方案36的烟叶,其中所述烟叶是熟化烟叶。

[0285] 38. 实施方案36的烟叶,其中所述熟化烟叶是晾制熟化、明火烤制熟化、晒制熟化或烤制熟化的。

[0286] 39. 一种烟草制品,包含来自实施方案1的改良烟草植物的烟草材料。

[0287] 40. 实施方案39的烟草制品,其中所述烟草制品选自:卷烟、kretek、比迪烟、雪茄、小雪茄、不通风香烟、通风过滤嘴香烟、烟斗烟、鼻烟、嚼烟、潮湿无烟烟草、细切嚼烟、长切嚼烟、袋装嚼烟、口香糖、片剂、含片和溶解条。

[0288] 41. 产生实施方案1的改良烟草植物的种子。

[0289] 42. 一种方法,包括用来自实施方案1的改良烟草植物的熟化烟叶制备烟草制品。

[0290] 43. 一种改良烟草植物,其中当在可比条件下生长时,与相同品种的对照烟草植物相比,所述改良烟草植物表现出:

[0291] a. 抑制或消除的腋生分生组织生长;

- [0292] b.抑制或消除的腋生分生组织维持;或
- [0293] c.它们的组合。
- [0294] 44.包含重组多核苷酸的植物或种子,其中所述重组多核苷酸包含:
- [0295] a.在L1层、L2层、L3区、肋区、中心区、外围区或其任何组合中起作用的启动子,其与以下可操作地连接
- [0296] b.包含核酸序列的结构性核酸分子,其中所述核酸序列编码的多肽与选自以下的多肽具有至少70%序列同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。
- [0297] 45.实施方案43的植物或种子,其中所述启动子包含的核酸序列与选自以下的多核苷酸具有至少90%序列同一性:SEQ ID NO:113-118、148-160、204及其片段。
- [0298] 46.实施方案43的植物或种子,其中所述植物或种子是烟草植物或种子。
- [0299] 47.一种重组DNA构建体,包含:
- [0300] a.在L1层、L2层、L3区、肋区、中心区、外围区或其组合中起作用的启动子,和
- [0301] b.异源且可操作地连接的核酸序列,其中所述核酸序列编码非编码RNA或多肽。
- [0302] 48.实施方案47的重组DNA构建体,其中所述启动子包含的核酸序列与选自以下的多核苷酸具有至少90%序列同一性:SEQ ID NO:113-118、148-160、204及其片段。
- [0303] 49.一种减少或消除烟草植物中的打顶诱导的烟杈的方法,所述方法包括用重组DNA构建体转化烟草植物,所述重组DNA构建体包含在L1层、L2层、L3区、肋区、中心区、外围区或其组合中起作用的启动子。
- [0304] 50.实施方案48的方法,其中所述启动子包含的核酸序列与选自以下的多核苷酸具有至少90%序列同一性:SEQ ID NO:113-118、148-160、204及其片段。
- [0305] 51.一种方法,包括用包含异源启动子的重组DNA构建体转化烟草植物,所述异源启动子在L1层、L2层、L3区、肋区、中心区、外围区或其组合中起作用并且与转录为RNA分子的多核苷酸可操作地连接,所述RNA分子抑制内源基因的水平,其中所述内源基因促进腋生分生组织生长、腋生分生组织维持,或两者,或是腋生分生组织生长、腋生分生组织维持,或两者所需的。
- [0306] 52.用于生产烟草植物的方法,包括:
- [0307] a.使第一烟草品种的至少一种烟草植物与第二烟草品种的至少一种烟草植物杂交,其中与在可比条件下生长的相同品种的对照烟草植物相比,所述第一烟草品种的至少一种烟草植物没有表现出或表现出减少的打顶诱导的烟杈;和
- [0308] b.选择与在可比条件下生长的相同杂交的对照烟草植物相比,没有表现出或表现出减少的打顶诱导的烟杈的子代烟草植物。
- [0309] 53.一种烟草植物或其部分,其包含与编码多肽的多核苷酸可操作地连接的异源启动子,所述多肽与选自以下的多肽具有至少70%序列同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、

247、249、251、253和255。

[0310] 54. 实施方案52的烟草植物或其部分,其中所述启动子包含的核酸序列与选自以下的多核苷酸具有至少90%序列同一性:SEQ ID NO:113-118、148-160、204及其片段。

[0311] 55. 实施方案52的烟草植物或其部分,其中所述多核苷酸与选自以下的多核苷酸具有至少90%序列同一性:SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83-160、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225-228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252和254。

[0312] 56. 实施方案52的烟草植物或其部分,其中所述多肽包含与选自以下的多肽相同的至少15个连续氨基酸残基:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。

[0313] 57. 一种重组DNA构建体,包含与编码多肽的多核苷酸可操作地连接的异源启动子,所述多肽与选自以下的多肽具有至少70%序列同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。

[0314] 58. 一种生长改良烟草植物的方法,包括种植包含异源启动子的改良烟草种子,所述异源启动子与编码多肽的多核苷酸可操作地连接,所述多肽与选自以下的多肽具有至少70%序列同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255;和从所述种子生长所述改良烟草植物。

[0315] 59. 一种控制植物中的打顶诱导的分权的方法,包括用重组DNA构建体转化所述植物,其中所述重组DNA构建体包含与编码多肽的多核苷酸可操作地连接的启动子,所述多肽与选自以下的多肽具有至少70%序列同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、161-185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。

[0316] 60. 一种烟草植物或其部分,包含与编码非编码RNA分子的多核苷酸可操作地连接的异源启动子,其中所述非编码RNA分子能够结合编码多肽的RNA,所述多肽与选自以下的多肽具有至少70%序列同一性:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、161-185、187、189、191、193、195、197、199、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255,其中所述非编码RNA分子抑制所述多肽的表达。

[0317] 61. 实施方案59的烟草植物或其部分, 其中所述启动子包含的核酸序列与选自以下的多核苷酸具有至少90%序列同一性: SEQ ID NO: 113-118、148-160、204及其片段。

[0318] 62. 实施方案59的烟草植物或其部分, 其中所述多核苷酸与选自SEQ ID NO: 83-101的多核苷酸具有至少90%序列同一性。

[0319] 63. 实施方案59的烟草植物或其部分, 其中所述多核苷酸包含与选自SEQ ID NO: 83-101的多核苷酸相同的至少18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或超过30个连续核苷酸。

[0320] 64. 一种重组DNA构建体, 包含与编码非编码RNA分子的多核苷酸可操作地连接的异源腋生分生组织特异性启动子, 其中所述非编码RNA分子能够结合编码多肽的RNA, 所述多肽与选自以下的多肽具有至少70%序列同一性: SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、161-185、187、189、191、193、195、197、199、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255, 其中所述非编码RNA分子抑制所述多肽的表达。

[0321] 65. 一种生长改良烟草植物的方法, 包括种植包含重组DNA构建体的改良烟草种子, 所述重组DNA构建体包含在L1层、L2层、L3区、肋区、中心区、外围区或其组合中起作用并且与编码非编码RNA分子的多核苷酸可操作地连接的异源启动子, 其中所述非编码RNA分子能够结合编码多肽的RNA, 所述多肽与选自以下的多肽具有至少70%序列同一性: SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、161-185、187、189、191、193、195、197、199、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255, 其中所述非编码RNA分子抑制所述多肽的表达; 和从所述种子生长所述改良烟草植物。

[0322] 66. 一种控制植物中的打顶诱导的烟权的方法, 包括用重组DNA构建体转化所述植物, 其中所述重组DNA构建体包含在L1层、L2层、L3区、肋区、中心区、外围区或其组合中起作用的异源启动子, 其中所述启动子与编码非编码RNA分子的多核苷酸可操作地连接, 其中所述非编码RNA分子能够结合编码多肽的RNA, 所述多肽与选自以下的多肽具有至少70%序列同一性: SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、161-185、187、189、191、193、195、197、199、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255, 其中所述非编码RNA分子抑制所述多肽的表达。

[0323] 67. 一种细菌细胞, 包含实施方案46、56或63任何一项的重组DNA构建体。

[0324] 68. 一种植物基因组, 包含实施方案46、56或63任何一项的重组DNA构建体。

[0325] 69. 一种用于制造改良种子的方法, 所述方法包括:

[0326] a. 将实施方案46、56或63任何一项的重组DNA构建体引入植物细胞;

[0327] b. 筛选植物细胞群体的所述重组DNA构建体;

[0328] c. 从所述群体选择一个或多个植物细胞;

[0329] d. 从所述一个或多个植物细胞产生一株或多株改良植物; 和

[0330] e. 从所述一株或多株改良植物收集一粒或多粒改良种子。

[0331] 70. 一种生产改良烟草植物以减少或消除烟权的方法, 所述方法包括在一个或多个烟草基因组位点中引入一个或多个突变。

[0332] 71. 实施方案69的方法, 其中所述一个或多个突变通过选自以下的系统引入: 化学诱变、辐射诱变、转座子诱变、农杆菌介导的转化、大范围核酸酶、ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9系统、CRISPR/Cpf1系统及其组合。

[0333] 72. 一种重组DNA构建体, 包含:

[0334] a. 在L1层、L2层、L3区、肋区、中心区、外围区或其组合中起作用的启动子; 和

[0335] b. 异源且可操作连接的人工microRNA, 其中所述人工miRNA与编码多肽的RNA具有至少70%同一性, 所述多肽与选自以下的多肽具有至少70%序列同一性: SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、161-185、187、189、191、193、195、197、199、224、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255, 其中所述人工microRNA抑制所述多肽的表达。

[0336] 73. 包含重组多核苷酸的植物或种子, 其中所述重组多核苷酸包含:

[0337] a. 在L1层、L2层、L3区、肋区、中心区、外围区或其任何组合中起作用的启动子, 其与以下可操作地连接

[0338] b. 包含核酸序列的结构性核酸分子,

[0339] 其中所述核酸序列编码生长素生物合成蛋白或生长素转运蛋白。

[0340] 74. 一种重组DNA构建体, 包含:

[0341] a. 在L1层、L2层、L3区、肋区、中心区、外围区或其任何组合中起作用的启动子; 和

[0342] b. 异源且可操作连接的核酸序列, 其中所述核酸序列编码生长素生物合成蛋白或生长素转运蛋白。

[0343] 75. 一种重组DNA构建体, 包含与编码生长素生物合成蛋白或生长素转运蛋白的多核苷酸可操作地连接的异源腋生分生组织特异性启动子。

[0344] 76. 实施方案74的重组DNA构建体, 其中所述生长素生物合成蛋白或生长素转运蛋白由编码多肽的多核苷酸编码, 所述多肽与选自以下的多肽具有至少70%序列一致性: SEQ ID NO: 235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。

[0345] 77. 一种烟草植物或其部分, 其包含与编码生长素生物合成蛋白或生长素转运蛋白的多核苷酸可操作连接的异源启动子, 所述异源启动子与选自以下的多核苷酸具有至少90%序列一致性: SEQ ID NO: 113-118、148-160、204及其片段。

[0346] 78. 实施方案76的烟草植物或其部分, 其中所述生长素生物合成蛋白或生长素转运蛋白由编码多肽的多核苷酸编码, 所述多肽与选自以下的多肽具有至少70%序列一致性: SEQ ID NO: 235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。

[0347] 79. 一种控制植物中的打顶诱导的烟权的方法, 包括用重组DNA构建体转化所述植物, 其中所述重组DNA构建体包含与编码生长素生物合成蛋白或生长素转运蛋白的多核苷酸可操作连接的启动子。

[0348] 80. 实施方案78的方法, 其中所述生长素生物合成蛋白或生长素转运蛋白由编码多肽的多核苷酸编码, 所述多肽与选自以下的多肽具有至少70%序列一致性: SEQ ID NO: 235、237、239、241、243、245、247、249、251、253和255。

[0349] 81. 实施方案23的改良烟草植物, 其中所述更少的总烟权包含的总烟权比在可比条件下生长的未改良对照烟草植物少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、

至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。

[0350] 82. 实施方案24的改良烟草植物,其中所述减少的质量包含的质量比在可比条件下生长的未改良对照烟草植物的烟杈质量减少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。

[0351] 83. 实施方案24的改良烟草植物,其中所述减少的长度包含的长度比在可比条件下生长的未改良对照烟草植物的烟杈长度减少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。

[0352] 现在已经总体描述了本公开,通过参考以下实施例将更容易理解本公开,除非另有说明,所述实施例以说明性方式提供并且不旨在限制本公开。

具体实施方式

[0353] 实施例1. 鉴定打顶诱导的基因

[0354] 从10种组织类型(打顶前的腋芽;打顶后2小时的腋芽;打顶后6小时的腋芽;打顶后24小时的腋芽;打顶后72小时的腋芽;打顶前的根;打顶后24小时的根;打顶后72小时的根;打顶时的幼叶;以及茎尖分生组织)获得来自4周大TN90烟草植物的RNA样品。将得到的RNA样品(每种组织类型三个独立收集的样品)用作Illumina 1x100bp测序的起始材料。

[0355] 将Illumina读取序列(reads)进行映射(mapping)并用于鉴定表现出高腋芽表达的候选基因列表。用RT-PCR确认候选基因的表达。参见2015年10月6日提交的美国专利申请号14/875,928(于2016年9月29日公布为US 2016/0281100),其通过引用整体并入本文。确认候选基因在腋芽中差异性表达后,使用从预测的全长cDNA序列设计的基因特异性引物克隆全长候选基因(表2A)。表2B中提供了所选基因座的标准化Illumina读取序列计数。

[0356] 表2A. 选择的在腋芽中表现出差异性表达的全长候选烟草基因

[0357]

SEQ ID NO (DNA/肽)	编码序列	多核苷酸长度 (核苷酸)	多肽长度 (氨基酸)	注释
1/2	确认全长	987	328	转录因子 CYCLOIDEA 样
3/4	确认全长	318	105	花特异性 γ -硫堇
5/6	确认全长	1797	598	多酚氧化酶
7/8	确认全长	1392	463	UDP-葡萄糖: 葡糖基转移酶
9/10	确认全长	405	134	肿瘤相关蛋白
11/12	确认全长	630	209	假想蛋白
13/14	确认全长	1143	380	TCP1 蛋白样基因
15/16	确认全长	915	304	叶绿素酶-2
17/18	确认全长	1353	450	含有 AP2/ERF 结构域的转录因子
19/20	确认全长	732	243	推定的神秘果素
186/187	假基因	2340	87	(E,E)-香叶林醇合成酶
21/22	确认全长	471	156	油质蛋白
23/24	确认全长	1437	478	ACC 合成酶
25/26	确认全长	645	214	含有 LOB 结构域的蛋白 18 样
27/28	确认全长	2205	734	维辛样抗菌肽 Cupin 超家族
29/30	确认全长	1302	433	脱落酸不敏感
31/32	确认全长	1266	421	Seipin 样
33/34	确认全长	597	198	转录因子 CYCLOIDEA 样

[0358]

SEQ ID NO (DNA/肽)	编码序列	多核苷酸长度 (核苷酸)	多肽长度 (氨基酸)	注释
35/36	确认全长	1038	345	转录因子 DICHOTOMA 样
37/38	确认全长	1014	337	转录因子 CYCLOIDEA 样

[0359] 表2B. 选择的候选基因的标准化Illumina读取序列计数

[0360]

SEQ ID NO (DNA/肽)	打顶前的 腋芽	打顶后的腋芽				打顶前的 根	打顶后的根		茎尖分 生组织	幼叶
		2 小 时	6 小 时	24 小 时	72 小 时		24 小时	72 小 时		
1/2	1,072	998	1,346	663	652	7	9	11	180	47
3/4	1,387	927	3,527	44,790	23,270	108	90	128	8,913	72
5/6	763	1,132	1,852	5,559	2,644	110	156	80	513	7
9/10	2,342	2,357	2,992	3,143	2,190	38	28	27	26	103
11/12	47	29	54	18	17	1	0	0	23	1
13/14	128	131	187	69	54	0	1	1	13	0
15/16	124	308	1,619	337	136	217	143	160	88	234
17/18	3	162	186	9	9	22	22	29	6	2
19/20	41	98	334	136	101	1	0	0	50	0
186/187	1,479	1,486	4,216	16,176	12,228	46	36	33	2,144	839
21/22	52	27	81	13	9	2	1	3	5	1
23/24	152	114	135	46	45	2	2	2	1	0
25/26	60	34	22	17	13	2	4	1	30	1
29/30	624	583	1,279	300	215	14	9	18	71	9
31/32	176	121	253	95	70	7	1	1	69	27
33/34	268	279	410	231	207	1	1	1	22	11
35/36	193	241	366	117	123	2	2	2	13	1
37/38	394	353	505	207	204	2	2	1	34	2

[0361] 实施例2.开发改良植物

[0362] 将表达载体p45-2-7 (SEQ ID NO:112;图1) 用作骨架以产生多个转化载体 (参见实施例6-10和13-20)。p45-2-7含有CsVMV启动子、NOS终止子和包含与Actin2启动子和NOS终止子可操作地连接的卡那霉素选择标志物 (NPT II) 的盒。通过农杆菌转化将包含目标转基因的核酸载体引入烟草叶盘。参见例如Mayo等, 2006, Nat Protoc.1:1105-11and Horsch et al., 1985, Science 227:1229-1231。

[0363] 在Magenta™ GA-7盒中生长窄叶马多尔 (NLM) 烟草植物, 切割叶盘并置于培养板中。通过在50mL离心管中以3500RPM离心20mL细胞悬浮液10分钟来收集包含转化载体的根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 细胞。除去上清液, 将根癌农杆菌细胞沉淀重悬于40mL液体再悬浮培养基中。用#15剃刀刀片将烟草叶片切成8个0.6cm的圆盘 (避免中脉), 并倒置在培养板中。将具有B5维生素液体再悬浮培养基的薄层Murashige&Skoog添加到培养板中, 并用细针均匀地戳叶片。将约25mL根癌农杆菌悬浮液加入培养板中, 并将叶盘在悬浮液中孵育10分钟。

[0364] 将叶盘转移至共培养的培养板 (1/2MS培养基) 中, 将圆盘倒置放置, 与覆盖在共培养TOM培养基 (含有20g/L蔗糖; 1mg/L吲哚-3-乙酸和2.5mg/L 6-苄基氨基嘌呤 (BAP) 的MS培养基) 上的滤纸接触。将培养板用封口膜密封, 然后在昏暗的光照 (60-80mE/ms) 中以18小时光照、6小时黑暗的光周期在24℃下孵育6小时, 持续3天。孵育后, 将叶盘转移至再生/选择TOM K培养基的培养板 (TOM培养基加300mg/L卡那霉素)。在昏暗的光照中以18小时光照、6小时黑暗的光周期在24℃下每两周将叶盘传代培养至新鲜的TOM K培养基, 直至嫩芽变得

可切除。用镊子取出叶片的嫩芽,并插入含有100mg/L卡那霉素的MS基础培养基中。在24℃下以18小时光照、6小时黑暗的光周期(高强度光照,6080mE/ms)在含有100mg/L卡那霉素的MS基础培养基上孵育嫩芽,以诱导生根。

[0365] 当含有嫩芽和根的小植株长得足够大时(例如,达到Magenta™ GA-7盒的大约一半高度),将它们转移到土壤中。将已建立的幼苗转移到温室中进行进一步分析并结种。通过将改良植物(T0、T1、T2或更晚代)和对照植物生长至团棵期(layby stage)来评估分权表型。对照植物是未转化的NLM植物或用空p45-2-7载体转化的NLM植物。对已经达到团棵期的植物进行人工打顶(去除茎尖分生组织和周围组织),并在打顶后的特定时间点评估腋芽生长。通常在打顶时(即0小时)、打顶后24小时(即1天)、打顶后7-8天(即一周)和/或14-15天(即,打顶后两周)进行观察。观察包括定性检查是否存在腋芽生长和整体植物外观。观察还包括在打顶后的特定时间点定量测量所有腋芽的鲜重和/或在打顶后的特定时间点定量测量所有腋芽长出的长度。

[0366] 实施例3. 鉴定在烟杈发育中起作用的烟草基因

[0367] 制备转化载体和改良烟草植物以从烟草基因(例如SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、57、59和69)过表达全长编码序列。

[0368] 作为说明,将SEQ ID NO:11整合入p45-2-7转化载体中,并根据实施例2产生改良烟草植物。根据实施例2,将改良烟草植物(T0代)和对照烟草植物生长至团棵期,然后将植物打顶以去除茎尖分生组织。在打顶时和打顶后一周评估烟杈生长。SEQ ID NO:11的过表达增加了烟草中的芽长出,表明SEQ ID NO:11的表达促进了烟杈生长(图2)。

[0369] 实施例4. 表达影响烟草烟杈生长的非烟草来源的基因

[0370] 已经鉴定出多种基因在非烟草物种中的烟杈生长中起作用。制备转化载体和改良烟草植物以表达非烟草来源的全长基因(例如,SEQ ID NO:55、67、79和81)。将SEQ ID NO:81(编码拟南芥BRANCHED1(BRC1))整合入p45-2-7转化载体中,并根据实施例2产生改良烟草植物。在拟南芥中,BRC1在发育中的芽中表达,其作用是阻止芽发育。参见例如其全文通过引用并入本文的González-Grandío等,2013,Plant Cell 25:834-850。

[0371] 根据实施例2,将改良烟草植物(T0代)和对照烟草植物生长至团棵期,然后将植物打顶以去除茎尖分生组织。在打顶时和打顶后一周评估烟杈生长(图3A)。SEQ ID NO:81在烟草中的过表达减少了芽生长。这些植物也表现出生长迟缓(图3B)。

[0372] 实施例5. 鉴定抑制烟杈生长的天然烟草基因

[0373] 制备转化载体和改良烟草植物以使用RNAi来抑制内源烟草基因(例如,SEQ ID NO:83-107)并鉴定它们在烟杈长出中的作用。

[0374] 三个烟草基因(SEQ ID NO:1、13和35)被鉴定为与拟南芥BRC1具有同源性的TCP家族蛋白。根据实施例2制备转化载体和改良烟草植物;根据实施例2,在打顶后对得到的改良烟草植物进行表型评估。

[0375] 第一个转化载体包含插入p45-2-7骨架的SEQ ID NO:83,用于通过RNAi组成性抑制天然SEQ ID NO:1,并且下文将包含该载体的植物称为RNAi_1植物。将RNAi_1烟草植物(T0代)和对照烟草植物生长至团棵期,然后将植物打顶以去除茎尖分生组织。在打顶时和打顶后一周评估烟杈生长。芽长出在打顶之前的RNAi_1植物中是明显的,并且芽长出在打

顶后增加(图4)。在打顶后至少两周,RNAi_1T1代植物继续显示增加的芽长出(图5A和B)。在打顶后两周,T1RNAi_1植物所有腋生枝的鲜重平均为~600克;在打顶后两周,对照植物所有腋生枝的鲜重为~300克(图5B)。这些结果表明SEQ ID NO:1具有抑制烟草中烟杈长出的作用。

[0376] 第二个转化载体包含插入p45-2-7骨架的SEQ ID NO:86。设计该第二个转化载体以通过RNAi机制抑制天然SEQ ID NO:13,并且下文将包含该载体的植物称为RNAi_7植物。将RNAi_7烟草植物(T0代)和对照烟草植物生长至团棵期,然后将植物打顶以去除茎尖分生组织。在打顶时和打顶后一周评估烟杈生长。RNAi_7植物的芽长出增加(图6)。在打顶后至少两周,T1代RNAi_7植物继续显示增加的芽长出(图7)。在打顶后两周,七个T1 RNAi_7植物品系中所有腋生枝的鲜重平均为~600克、~700克、~400克、~250克、~200克、~375克;在打顶后两周,对照植物所有腋生枝的鲜重为~300克(图7)。这些结果表明SEQ ID NO:13具有抑制烟草中烟杈长出的作用。

[0377] 第三个转化载体包含插入p45-2-7骨架的SEQ ID NO:95。设计该第三个转化载体以通过RNAi机制抑制天然SEQ ID NO:35,并且下文将包含该载体的植物称为RNAi_18植物。在打顶之前,RNAi_18植物在每个节点处形成腋生分枝(图8)。这些结果表明SEQ ID NO:35具有抑制烟草中烟杈长出的作用。

[0378] 实施例6. 鉴定促进烟杈生长的天然烟草基因

[0379] 一些烟草基因天然地具有促进烟杈长出的作用。使用RNAi构建体抑制这些基因可减少烟杈长出,并将这些基因阳性鉴定为烟草中烟杈长出的启动子。根据实施例2产生设计用于通过RNAi机制抑制预测的烟杈长出的启动子的转化载体;根据实施例2,产生包含转化载体的改良烟草植物并进行表型评估。

[0380] 制备的转化载体在p45-2-7骨架中包含SEQ ID NO:101,其与CET2区域,一种来自烟草的CENTRORADIALIS(CEN)样基因(SEQ ID NO:108-110)同源。CET基因不在烟草的茎尖分生组织中表达,尽管CEN是茎尖分生组织在金鱼草(*Antirrhinum majus*)中生长所必需的。在烟草中,CEN的表达延长营养期并延迟开花。参见例如其全文通过引用并入本文的Amaya等,1999,Plant Cell 11:1405-1418。下文将包含含有SEQ ID NO:101的转化载体的植物称为RNAi_NtCET2植物。

[0381] 将RNAi_NtCET2烟草植物(T0代)和对照烟草植物生长至团棵期,然后将植物打顶以去除茎尖分生组织。在打顶时和打顶后一周评估烟杈生长。RNAi_NtCET2植物的芽长出减少(图9),表明天然NtCET2促进烟杈长出。

[0382] 另一个转化载体包含SEQ ID NO:96,并且下文将包含该载体的植物称为RNAi_26植物。将RNAi_26烟草植物(T0代)和对照烟草植物生长至团棵期,然后将植物打顶以去除茎尖分生组织。在打顶时和打顶后一周评估烟杈生长。RNAi_26植物的芽长出减少(图10),表明SEQ ID NO:49天然具有促进烟杈长出的作用。

[0383] 实施例7. 鉴定腋芽特异性启动子

[0384] 如果以组织依赖性方式表达多核苷酸(例如,仅在腋芽中),可以将SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、67、69、79、81和83-107的表达(参见实施例6-8)更好地用于减少或消除改良植物中的烟杈长出。分析了28个候选基因的表达模式,并选择在腋芽中高表达但在其他组织中低

表达的基因的启动子(表3)。通过实时PCR分析确认候选基因的表达模式。使用基因特异性引物,通过PCR方法从烟草TN90基因组DNA克隆六个腋生分生组织特异性启动子(SEQ ID NO:113-118)。

[0385] 通过用实施例2中描述的相同质粒骨架(p45-2-7)内的嵌合候选启动子:: β -葡萄糖醛酸糖苷酶(GUS)报告基因转化烟草来分析候选启动子的表达模式。通过农杆菌介导的转化将嵌合基因引入NLM系。按照Crone等,2001,Plant Cell Environ.24:869-874的方法,使用GUS染色来鉴定组织特异性启动子的表达。

[0386] 简言之,将来自包含候选启动子::GUS转化构建体的幼苗的组织置于冰冷的90%丙酮中。收获所有样品后,将样品置于室温下20分钟。将样品放回冰上并除去样品中的丙酮。接下来,将染色缓冲液(0.2%Triton X-100;50mM NaHPO₄,pH7.2;2mM亚铁氰化钾)加入样品中。将X-Gluc加入染色缓冲液中至终浓度为2mM。从样品中除去染色缓冲液,并加入含有X-Gluc的新鲜染色缓冲液。然后将样品在真空下冰上浸润15至20分钟。将样品在37℃下孵育2-18小时,然后除去染色缓冲液。在黑暗中通过乙醇系列(即10%、30%、50%、70%、95%)洗涤样品,每次洗涤30分钟。最后,将样品转移到100%乙醇中。

[0387] 用亮视野显微镜(Leica Q500MC;Cambridge,England)以低放大倍数检查GUS阳性植物组织,并用数码相机拍照。图11、12和13分别示出了使用三个不同启动子(SEQ ID NO:113、116和117)的实验结果。这些启动子序列可用于驱动目标序列仅在或主要在腋芽内的表达,同时限制在植物其余部分的表达。

[0388] GUS阳性表达(表明由SEQ ID NO:113、116和117驱动的表达)集中在腋芽中。因此,SEQ ID NO:113、116和117是组织特异性启动子,其在腋芽中具有活性,但在茎或叶组织中没有活性(图11、12和13)。在打顶后,在SEQ ID NO:113(下文中的启动子P1)和116(下文中的启动子P11)指导下的GUS表达降低,这与观察到的通常由这些启动子调控的内源基因的基因表达模式一致(图11和12)。启动子P1和启动子P11在烟草茎尖分生组织中也具有功能(图11和12)。

[0389] 相反,SEQ ID NO:117(下文中的启动子P15)在打顶之前和在打顶后至少十五天驱动腋生分生组织中的GUS表达,这与观察到的通常由该启动子调控的内源基因的基因表达模式一致(图13A-C)。启动子P15在茎尖分生组织的底部也具有功能(图13A)。

[0390] 用于控制烟杈长出的打顶可诱导且组织特异性的启动子的其他候选启动子包括SEQ ID NO:148-160和204,其代表腋芽特异性疏堇5'上游调控序列(SEQ ID NO:148);烟草侧枝抑制子1(LAS1)5'上游调控序列(SEQ ID NO:149);LAS1 3'下游调控序列(SEQ ID NO:150);LAS2 5'上游调控序列(SEQ ID NO:151);LAS2 3'下游调控序列(SEQ ID NO:152);烟草腋生分生组织1调节子(RAX1)的5'上游调控序列(SEQ ID NO:153);RAX1 3'下游调控序列(SEQ ID NO:154);RAX2 5'上游调控序列(SEQ ID NO:155);RAX2 3'下游调控序列(SEQ ID NO:156);启动子P15的5'区域(SEQ ID NO:157);启动子P15的3'下游区域(SEQ ID NO:158);P15同源物的5'上游调控序列(SEQ ID NO:159);P15同源物的3'下游调控序列(SEQ ID NO:160)和来自番茄的P15同源物的调节区(SEQ ID NO:204)。使用基因特异性引物,通过PCR方法从NLM基因组DNA克隆序列。如启动子P1、P11和P15所示,测试这些调节序列的组织特异性和发育调节。表现出腋生分生组织特异性或优先表达的调控序列用于驱动异源基因表达并调节烟杈长出。

[0391] 表3.选择的用于启动子分析的克隆

[0392]	SEQ ID NO	启动子长度
	113	2248
	114	2800
	115	3356
	116	3150
	117	2964
	118	941
	148	5000
	149	5000
	150	5000
	151	5000
	152	5000
	153	5000
	154	5000
	155	5000
	156	5000
	157	5000
	158	5000
	159	5000
	160	5000
	204	5000

[0393] 表4.优选腋芽的启动子顺式元件

	<u>顺式调控元件名称</u>	<u>顺式调控元件的核苷酸序列</u>
	芽休眠元件(BDE)	CACGTG
	腋芽生长 (Up1)	GGCCCAW
[0394]	腋芽生长(Up2)	AAACCCTA
	蔗糖反应元件 (SURE)	AATAGAAAA
	糖抑制元件 (SRE)	TTATCC
[0395]	芽活化元件或 TCP 结合元件 (BAE)	GGCCCAT

[0396] 实施例8.启动子P1、启动子P15和启动子PAB疏堇的细胞特异性

[0397] 为了在细胞水平分析启动子P1(SEQ ID NO:113)和启动子P15(SEQ ID NO:117)在分生组织区域中的表达模式,如实施例2所述,制备包含在启动子P1或启动子P15控制下的绿色荧光蛋白(GFP)基因的载体。通过农杆菌介导的转化将嵌合载体引入NLM烟草植物中。使用荧光显微镜观察GFP表达。启动子P15限于腋芽内的组织(图14A)。启动子P1具有略广的表达模式(图14B)。

[0398] 为了在细胞水平分析0.9kb长的启动子PAB疏堇(pABTh-0.9kb,SEQ ID NO:118)在

分生组织区域中的表达模式,如实施例2所述,制备包含在启动子PAB硫酸控制下的GUS基因的载体。通过农杆菌介导的转化将嵌合载体引入NLM烟草植物中。在腋芽组织和分生组织中观察到GUS表达(图15)。

[0399] 分析启动子P1、P15和PAB硫酸(pABth-5kb,SEQ ID NO:148)的相似和/或独特的顺式调控元件。在由启动子P1、P15和PAB硫酸天然调控的基因的转录起始位点上游鉴定了6个顺式调控元件(表4)(图16)。这些顺式调控元件对调控烟杈特异性或分生组织特异性的表达模式可以具有直接和/或间接作用。

[0400] 实施例9.烟杈抑制构建体的效果测试

[0401] 在转基因植物中使用启动子::GUS融合分析测试了候选启动子的组织特异性表达模式后,如实施例2所述,构建载体和改良植物,以仅在腋芽中表达靶基因。表5示出了示例性构建体。

[0402] 表5.用于靶基因的腋芽特异性表达的示例性构建体

构建体	启动子	靶基因
	SEQ ID NO.	SEQ ID NO.
1	113	17
2	113	104

[0404]

构建体	启动子 SEQ ID NO.	靶基因 SEQ ID NO.
3	113	7
4	113	41
5	113	5
6	118	17
7	118	104
8	118	7
9	118	41
10	118	5
11	115	17
12	115	104
13	115	7
14	115	41
15	115	5
16	117	17
17	117	104
18	117	7
19	117	41
20	117	5

[0405] 在温室和田间条件下进行构建体1-20影响的效果测试。如实施例2所述,将转基因植物和匹配的野生型对照生长至团棵期,然后打顶并进行表型评估。田间效果测试还测定在正常农学实践下需要的烟杈控制化学品施用的类型和程度。

[0406] 实施例10.通过过表达基因调控腋芽长出

[0407] 可通过改变调控分枝的基因和/或遗传途径的表达来调控烟杈长出。一些基因天然地具有限制芽长出的作用,并且由具有增加分枝的突变体定义,例如拟南芥BRANCHED1基因(SEQ ID NO:81)和烟草同源物(SEQ ID NO:1、13、35、37和39);和拟南芥MORE AXILLARY BRANCHING1 (MAX1)和MAX2基因(SEQ ID NO:193和195)和烟草同源物(SEQ ID NO:197和199)。参见例如其全文通过引用并入文本的Stirnberg等,2002,Development 129:1131-1141。

[0408] 产生转化载体以过表达限制烟草中烟杈长出的蛋白质。将包含SEQ ID NO:1、13、35、37、39和81之一的单独的转化载体整合入p45-2-7转化载体。产生另外的转化载体,其包含由腋芽特异性启动子P15(SEQ ID NO:117)驱动的SEQ ID NO:1、13、35、37、39和81之一。根据实施例2从这些转化载体制备改良烟草植物。然后如实施例2所述,对改良烟草植物(T0代)和对照烟草植物进行表型评估。与对照烟草植物相比,改良烟草植物表现出减少的烟杈

生长。

[0409] 实施例11.通过抑制促进烟杈生长的基因调控腋芽长出

[0410] 一些基因促进腋生分生组织发育,并且由分枝减少的突变体所定义。例如,拟南芥LAS基因(SEQ ID NO:201)和烟草中的同源物(SEQ ID NO:71和73);以及拟南芥RAX基因(SEQ ID NO:203)和烟草同源物(SEQ ID NO:75和77)。参见例如其全文通过引用并入本文的Greb等,2003,Genes&Development 17:1175-1187;和Keller等,2006,Plant Cell 18:598-611。

[0411] 设计含有RNAi构建体的转化载体以抑制促进烟杈长出的烟草蛋白。单独的转化载体包含整合入p45-2-7转化载体中的SEQ ID NO:71、73、75和77之一。制备包含由腋芽特异性启动子P15(SEQ ID NO:117)驱动的SEQ ID NO:71、73、75和77之一的额外的转化载体。根据实施例2用这些载体制备改良烟草植物。然后如实施例2所述,对改良烟草植物和对照烟草植物进行表型评估。与对照烟草植物相比,改良烟草植物表现出减少的烟杈生长。

[0412] 实施例12.用RNAi、人工miRNA和基因过表达调控烟杈生长

[0413] 制备转化载体,其中启动子P15(SEQ ID NO:117)以组织特异性的方式驱动SEQ ID NO:81(BRC1)和101(靶向NtCET2的RNAi)的表达。启动子P15::BRC1::NtCET2载体在腋芽中过表达BRC1并且抑制NtCET2。如实施例2所述制备转化载体和改良烟草植物。

[0414] 将具有启动子P15::BRC1::NtCET2构建体的改良烟草植物(T0代)和对照烟草植物生长至团棵期,然后将植物打顶以去除茎尖分生组织。在打顶时、打顶后8天和打顶后15天评估烟杈生长(图17)。由启动子P15驱动的SEQ ID NO:81和101的表达消除了烟草中的烟杈生长。

[0415] 制备其他转化载体,其中启动子P15(SEQ ID NO:117)驱动人工miRNA的表达,所述人工miRNA设计用于降低以下的转录或翻译:SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、69、71、73、75、77、123-147、186、188、190、196和198。如实施例2所述制备转化载体和改良烟草植物。

[0416] 将具有启动子P15::人工miRNA构建体的改良烟草植物(T0代)和对照烟草植物生长至团棵期,然后将植物打顶以去除茎尖分生组织。然后根据实施例2对改良和对照烟草植物进行表型评估。

[0417] 实施例13.通过改变细胞分裂素的合成和分布调控烟杈生长

[0418] 去除茎尖分生组织从休眠中释放腋芽并促进烟杈长出。源自完整的茎尖分生组织的生长素抑制烟杈长出,而通过去除茎尖分生组织诱导的细胞分裂素促进烟杈长出。

[0419] 通过用腋芽特异性启动子过表达参与细胞分裂素分解代谢的基因来消耗腋芽区中的细胞分裂素,以减少细胞分裂素并抑制腋生分生组织长出。例如,测试了拟南芥细胞分裂素氧化酶(CKX;SEQ ID NO:55)、烟草CKX(SEQ ID NO:57和59)和烟草腺苷磷酸-异戊烯基转移酶基因(SEQ ID NO:61)。根据实施例2制备包含由启动子P15(SEQ ID NO:117)驱动的SEQ ID NO:59的转化载体。根据实施例2,使用该载体产生改良烟草植物,然后进行表型评估。与对照烟草植物相比,改良烟草植物表现出减少的烟杈生长(图18)。

[0420] 实施例14.通过抑制腋生分生组织干细胞信号传导调控烟杈生长

[0421] 茎分生组织包含通过涉及WUSCHEL(WUS)-CLAVATA(CLV)信号传导途径的反馈回路连续补充的干细胞。参见例如,其全文通过引用并入本文的Yadav等,2011,Genes&

Development 25:2025-2030。来自该途径的基因包括例如WUS (SEQ ID NO:63和65)、CLV1、CLV2和CLV3 (SEQ ID NO:67和69)。制备包含由启动子P15 (SEQ ID NO:117) 驱动的SEQ ID NO:67的转化载体,其导致腋芽中CLV3的过表达。根据实施例2,使用该转化载体产生改良烟草植物,并进行表型评估。与对照烟草植物相比,改良烟草植物表现出减少的烟杈生长。

[0422] 根据实施例2产生通过RNAi抑制WUS的另外的转化载体,其包含由启动子P15 (SEQ ID NO:117) 驱动的SEQ ID NO:63或65。根据实施例2,使用这些转化载体产生改良烟草植物,然后进行表型评估。与对照烟草植物相比,改良烟草植物表现出减少的烟杈生长。

[0423] 拟南芥SHOOT MERISTEMLESS (STM) 是KNOX蛋白,其对于茎分生组织的形成和维持是必需的。参见例如,其全文通过引用并入本文的Long等,1996,Nature 379:66-69。NTH15 (SEQ ID NO:189) 是STM的烟草同源物,其在烟草分生组织中表达。参见例如,其全文通过引用并入本文的Tanaka-Ueguchi等,1998,Plant Journal 15:391-400。制备包含RNAi构建体的转化载体,所述RNAi构建体靶向由启动子P15 (SEQ ID NO:117) 驱动的SEQ ID NO:188用于抑制。根据实施例2,使用这些转化载体产生改良烟草植物,然后进行表型评估。与对照烟草植物相比,改良烟草植物表现出减少的烟杈生长。

[0424] 实施例15. 使用农杆菌渗入法筛选控制烟杈的基因

[0425] 当在某些时间和/或细胞类型表达时,一些植物基因的表达(不限于例如RNA酶、蛋白酶、细胞周期基因、转录因子、激酶、半胱天冬酶)可引发细胞死亡反应。需要鉴定这些基因,因为它们可以与腋芽优选或腋芽特异性的启动子(例如,启动子P15/SEQ ID NO:117)可操作地连接,以减少或消除腋芽生长和/或发育。

[0426] 用农杆菌渗入法在烟草叶中瞬时表达烟草基因(例如SEQ ID NO:201-222、228、230和232)。将目标植物基因插入pBIN19质粒,并转化到根癌农杆菌细胞中。将转化的细菌在液体培养基中生长、洗涤并悬浮于缓冲溶液中。将含有转化的根癌农杆菌细胞的缓冲溶液注入一个或多个活的烟草叶中。然后在5天后评估植物叶表型是否存在细胞死亡。空质粒用作阴性对照,而含有Barnase基因 (SEQ ID NO:79) 的质粒用作阳性对照。在烟叶中诱导细胞死亡的植物基因用于减少腋芽生长和/或发育。例如,参见图21。

[0427] 已经鉴定了红花烟草有丝分裂原活化的蛋白激酶激酶2 (NtMEK2; SEQ ID NO:232) 能够在烟草中诱导细胞死亡反应。通过用启动子P15 (SEQ ID NO:117) 驱动其表达,将SEQ ID NO:232的表达引导至腋芽。

[0428] 根据实施例2制备单独的转化载体,以包含由启动子P15 (SEQ ID NO:117) 驱动的SEQ ID NO:201-222、228、230和232之一。然后根据实施例2,用启动子P15::细胞死亡基因载体产生改良烟草植物,然后进行表型评估。与对照烟草植物相比,改良烟草植物表现出减少的烟杈生长。

[0429] 实施例16. 用RNase调控烟杈生长

[0430] 一些以升高水平存在的蛋白质(在它们通常不表达的细胞中,或在它们通常不位于的亚细胞位置)可以诱导细胞死亡。使用腋芽特异性启动子,例如启动子P1 (SEQ ID NO:113) 和启动子P15 (SEQ ID NO:117) 表达对腋芽有害并最终导致其死亡的异源基因。

[0431] 当用启动子P15 (SEQ ID NO:117) 驱动其表达时,降解RNA的酶,例如细菌RNase Barnase (SEQ ID NO:79和参见例如,Hartley,1989,Trends in Biochemical Sciences 14:450-454) 用于诱导腋芽中的细胞死亡。根据实施例2制备转化载体,其包含由启动子P15

(SEQ ID NO:117)驱动的SEQ ID NO:79。然后根据实施例2用启动子P15::Barnase载体产生改良烟草植物。将改良烟草植物(T0代)和对照烟草植物生长至团棵期,然后将植物打顶以去除茎尖分生组织。在打顶时、打顶后24小时、打顶后一周、打顶后两周和打顶后三周观察烟杈生长(图19和20)。由启动子P15驱动的SEQ ID NO:79的表达消除了烟草中的烟杈长出。

[0432] 使用内源性烟草RNase例如:RNase Phy3(SEQ ID NO:123)、RNase H(SEQ ID NO:124)、RNase P(SEQ ID NO:125)、RNase III(SEQ ID NO:126)和RNase T2(SEQ ID NO:127-136)代替Barnase(SEQ ID NO:79)制备类似于启动子P15::Barnase的其他转化载体。如实施例2中所述,用这些载体中的每一种产生改良烟草植物,然后对烟草植物进行表型评估。与对照烟草植物相比,改良烟草植物表现出减少的烟杈生长。

[0433] 实施例17.用液泡加工酶调控烟杈生长

[0434] 液泡加工酶(VPE)是在正常植物生长和发育中起作用的蛋白酶,并且还通过其半胱天冬酶样活性参与液泡依赖性的程序性细胞死亡。在烟草基因组中发现的17种VPE蛋白中的8种包含含有半胱天冬酶样活性所需的所有残基的蛋白酶结构域(SEQ ID NO:137-143)。通过用启动子P15(SEQ ID NO:117)驱动它们的表达,将SEQ ID NO:137-143的表达导向腋芽。通过包括N末端液泡分选信号,由SEQ ID NO:137-143编码的蛋白质的表达可以进一步限于腋芽细胞内的液泡。

[0435] 根据实施例2制备单独的转化载体,以包含由启动子P15(SEQ ID NO:117)驱动的SEQ ID NO:137-143之一。然后根据实施例2,用启动子P15::VPE载体产生改良烟草植物,然后进行表型评估。与对照烟草植物相比,改良烟草植物表现出减少的烟杈生长。

[0436] 实施例18.用蛋白酶调控烟杈生长

[0437] 在某些组织中表达另外的植物蛋白酶以消除负责腋生枝分生组织发育的细胞。基于其催化结构域将蛋白水解酶分为四组:天冬氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、金属蛋白酶和丝氨酸蛋白酶。所有这些蛋白酶家族都存在于烟草中,并用于抑制腋生枝分生组织的发育。例如,天冬氨酸蛋白酶(SEQ ID NO:144)、半胱氨酸蛋白酶(SEQ ID NO:145)、金属蛋白酶(SEQ ID NO:146)或丝氨酸蛋白酶(SEQ ID NO:147)用组织特异性启动子(例如,SEQ ID NO:113-118、148-160和204)表达。

[0438] 根据实施例2制备单独的转化载体,以包含由启动子P15(SEQ ID NO:117)驱动的SEQ ID NO:144-147之一。然后根据实施例2用启动子P15::蛋白酶载体产生改良烟草植物,然后进行表型评估。与对照烟草植物相比,改良烟草植物表现出减少的烟杈生长。

[0439] 实施例19.使用TALEN进行基因组编辑

[0440] 使用转录激活子样效应子核酸酶(TALEN)技术来改良商业烟草品种,例如TN90、K326和窄叶马多尔。TALEN通过诱导DNA靶序列中的双链断裂(DSB)实现遗传修饰。通过非同源末端连接(NHEJ)或同源定向修复(HDR)介导的途径进行随后的DNA断裂修复,以引入所需的修饰(例如基因破坏、基因校正或基因插入)。

[0441] 使用PEG介导的原生质体转化将TALEN和供体DNA分子引入植物细胞。将来自无菌培养的4-8周龄烟草植物的烟叶切成小块并转移到含有过滤灭菌酶溶液(含1.0% Cellulase onuzuka R10和0.5% Macerozym)的培养皿中。使用干燥器,将培养皿中的叶条在真空中真空渗透30分钟。孵育后,通过在45R.P.M.摇动230分钟重悬消化的叶片,然后通过无菌100 μ m尼龙过滤器过滤,并收集在50mL离心管中。将溶液应用于Lymphoprep并以

100×g离心10分钟分离。使用移液管收集原生质体条带,并用等体积的含有NaCl、CaCl₂、KCl、MES和葡萄糖的W5n溶液洗涤纯化的原生质体,然后在2000R.P.M.下额外离心5分钟。将原生质体沉淀以 2×10^5 /mL重悬于W5n溶液中,并在冰上放置30分钟。然后,除去上清液,将原生质体沉淀重悬于含有甘露醇、MgCl₂和MES的过滤灭菌的MMM溶液中。

[0442] 根据经过一些修改的Zhang等人描述的方法(2013, Plant Physiology 161:20-27)进行烟草原生质体的PEG转染。将500μL等份的原生质体悬浮液转移到10mL培养管中,并将25μL (~10μg)质粒DNA缓慢加入到原生质体悬浮液中。接下来,将525μL PEG溶液添加到原生质体-DNA溶液中并通过小心地轻拍管混合。将管孵育20分钟,然后加入2.5mL W5n溶液以终止反应。将溶液以100×g离心5分钟,并用原生质体培养基洗涤。将PEG处理的原生质体重悬于含有0.1mg/L NAA和0.5mg/L BAP的1mL培养基中,并与1mL低熔点琼脂混合以制备原生质体珠。在液体培养基中培养原生质体珠,将从原生质体珠生长的愈伤组织转移到固体生枝培养基上。当枝发育良好时,将它们转移到Magenta™ GA-7盒中以形成根。当根系完全发育并恢复枝生长时,将植物移植到土壤中。

[0443] 使用多种TALEN方法防止或减少烟草中的烟杈生长。与使用常规转化方法将基因随机插入烟草基因组中不同,TALEN用于靶向替换内源编码序列。在一个实例中,目标编码序列(例如SEQ ID NO:123-147)可以置于腋芽特异性启动子序列(例如,SEQ ID NO:113-118、148-160和204)的控制下,该构建体可与TALEN一起使用,以使构建体同源重组成由启动子控制的内源基因组区域。TALEN供体序列显示在SEQ ID NO:119中,TALEN靶序列显示在SEQ ID NO:120中。

[0444] 第二个实例将腋芽特异性启动子和目标编码序列置于天然的腋芽特异性启动子的控制下,以提供两个剂量的启动子控制。使用TALEN将包含第一启动子(SEQ ID NO:118)、第二启动子(SEQ ID NO:113)和编码序列(SEQ ID NO:13)的构建体同源重组到含有天然SEQ ID NO:118的基因组区域中,从而指导两种启动子(SEQ ID NO:118和113)表达编码序列。TALEN供体序列显示在SEQ ID NO:121中。

[0445] 第三个实例使用TALEN破坏促进烟杈生长和/或发育的靶基因。鉴定核酸序列(例如SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、69、71、73、75、77、108-110、123-147、186、188、190、196、198)和编码多肽的核酸序列(例如SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、70、72、74、76、78、161-185、187、189、191、197、199)的TALEN靶序列。设计基因特异性TALEN并将其引入烟草细胞以引起内源靶基因的缺失或插入。例如,鉴定编码序列(SEQ ID NO:11)中潜在的TALEN靶位点,并选择基因编码序列内的同源重组位点。TALEN靶序列显示在SEQ ID NO:122中(靶序列加下划线)。

[0446] 实施例20. 使用基因编辑技术调控烟杈生长的其他方法使用基因编辑技术如CRISPR/Cas9、CRISPR/Cpf1、锌指核酸酶(ZFN)和转录激活因子样效应子核酸酶(TALEN)来替换具有细胞死亡/腋生枝抑制序列的腋生分生组织特异性基因的编码区。这些基因编辑技术还用于编辑或替换内源启动子序列以驱动其在腋芽中的同源蛋白表达。例如,编辑或替换内源RNase启动子,使得RNase仅在腋芽中表达,其中它可以通过诱导细胞死亡来减少烟杈长出。或者,突变(编辑)腋生分生组织调控基因的启动子以消除在烟杈激活和/或长出期

间及时表达所需的调节区域,这可导致腋生枝的生长缺陷和/或死亡。基因编辑技术进一步用于编辑或替换天然在腋芽中起作用的内源基因。编辑内源基因如NtCET2,使其不再产生功能性蛋白质,从而抑制烟杈长出。

[0447] 构建单独的CRISPR/Cas9或CRISPR/Cpf1引导RNA以识别和杂交SEQ ID NO:123-147的每一个的启动子序列。向烟草植物提供工程化的引导RNA和包含启动子P15(SEQ ID NO:117)的供体多核苷酸,使启动子P15替换SEQ ID NO:123-147的内源启动子并将内源SEQ ID NO:123-147的表达限于腋芽。与对照烟草植物相比,经编辑的烟草植物表现出减少的烟杈生长。

[0448] 实施例21.经由随机诱变开发新突变

[0449] 使用甲磺酸乙酯(EMS)诱变或快中子轰击进行烟草植物的随机诱变。EMS诱变在于化学诱导随机的点突变。快中子诱变在于将种子暴露于中子轰击,其通过双链DNA断裂引起大的缺失。

[0450] 对于EMS诱变,将1克(约10,000粒种子)Tennessee 90烟草(TN90)种子在0.1% Tween中洗涤15分钟,然后在30mL ddH₂O中浸泡2小时。然后将150μL的0.5% EMS(Sigma,目录号M-0880)混合到种子/ddH₂O溶液中并在室温下(RT;约20°C)在罩下孵育8-12小时(以30RPM旋转)。然后除去种子中的液体,并将其混合到1MNaOH中过夜以进行净化和处理。然后用100mL ddH₂O洗涤种子两次,持续2-4小时。然后将洗过的种子悬浮于0.1%琼脂溶液中。

[0451] 将琼脂溶液中的EMS处理的种子以~2000粒/板均匀地涂布在水浸泡的平板中的Carolina's Choice Tobacco Mix(Carolina Soil Company,Kinston,NC)上。然后用塑料包裹膜覆盖平板并将其置于生长室中。一旦幼苗从土壤中出来,就会刺破塑料包裹膜以使湿度逐渐下降。两周后完全除去塑料包裹膜。将平板移至温室并用NPK肥料施肥。将幼苗重新插入浮盘中并生长直至移栽大小。随后将植物移植到田地中。在生长期,植物自花授粉形成M1种子。在成熟阶段,从每株植物收获五粒荚,并对来自每株植物的一组种子单独命名。这形成了M1群体。生长来自每种M0植物的M1种子的复合物,并如实施例2所述对植物进行表型评估。选择表现出增加或减少的烟杈生长的M1植物,并使用本领域已知的DNA测序和基因映射技术筛选突变。

[0452] 实施例22.使用诱导型启动子调控烟杈生长

[0453] 还使用诱导型启动子以受控方式表达功能基因以减少或消除烟杈发育。通过化学品喷雾或在某些时间点(即在打顶后)诱导这些启动子。示例性启动子包括醇调节的启动子;四环素调节的启动子;类固醇调节的启动子(例如,糖皮质激素(参见例如其全文通过引用并入本文的Scheda等,1991,Proceedings of the National Academy of Sciences USA 88:10421-10425)、人雌激素、蜕皮激素);和金属调节的启动子。例如,用诱导型启动子在烟草植物中表达RNase(例如SEQ ID NO:79和123-136)、VPE(例如SEQ ID NO:137-143)或蛋白酶(例如SEQ ID NO:144-147)。

[0454] 在第一个实例中,根据实施例2制备第一载体和第二载体,其中第一载体含有在组成型CsVMV启动子控制下的大鼠糖皮质激素受体,第二载体含有与一种或多种糖皮质激素响应元件可操作地连接的目标序列(例如,SEQ ID NO:83-101)。然后产生含有这两种载体的改良烟草植物。对植物喷洒地塞米松以诱导目标序列的表达,然后对植物进行表型评估。与对照烟草植物相比,改良烟草植物表现出减少的烟杈生长。

[0455] 在第二个实例中,根据实施例2制备第一载体和第二载体,其中第一载体含有在启动子P15(SEQ ID NO:117)控制下的大鼠糖皮质激素受体,第二载体含有与一种或多种糖皮质激素响应元件可操作地连接的目标序列(例如SEQ ID NO:79和123-147)。然后产生含有这两种载体的改良烟草植物。对植物喷洒地塞米松以诱导目标序列的表达,然后对植物进行表型评估。与对照烟草植物相比,改良烟草植物表现出减少的烟杈生长。

[0456] 实施例23.用植物毒素与免疫受体调控烟杈生长

[0457] 对烟草植物进行代谢工程化以在腋生分生组织中产生一种或多种植物毒素(例如野火毒素、冠菌素、丁香霉素、丁香肽素、菜豆毒素)或免疫受体,以抑制腋生枝分生组织内的细胞生长或细胞分裂。参见例如,其全文通过引用并入本文的Bender等,1999, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63:266-292。例如,用组织特异性启动子(例如SEQ ID NO:113-118、148-160和204)表达产生野火毒素所需的来自丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)的tabA/tblA基因。

[0458] 免疫受体基因包括广泛的基因。一些实例包括拟南芥抗病蛋白RPS5(SEQ ID NO:222)和烟草TMV抗性N基因(SEQ ID NO:224)。

[0459] 根据实施例2制备转化载体,其包含由启动子P15(SEQ ID NO:117)驱动的SEQ ID NO:221。然后根据实施例2,用启动子P15::RPS5载体产生改良烟草植物,然后进行表型评估。与对照烟草植物相比,改良烟草植物表现出减少的烟杈生长。

[0460] 实施例24.用诱导程序性细胞死亡的基因调控烟杈生长

[0461] 一些以升高水平存在的蛋白质(在它们通常不表达的细胞中,或在它们通常不位于的亚细胞位置)可以诱导细胞死亡。使用腋芽特异性启动子,例如启动子P1(SEQ ID NO:113)和启动子P15(SEQ ID NO:117)表达对腋芽有害并最终导致其死亡的异源基因。

[0462] 当由启动子P15(SEQ ID NO:117)驱动其表达时,使用程序性细胞死亡诱导(PCD诱导)酶(例如转录因子(SEQ ID NO:208、210和212)、激酶(SEQ ID NO:214)、半胱氨酸蛋白酶(SEQ ID NO:216和218)和半胱天冬酶(SEQ ID NO:220);参见表6)来诱导腋芽中的细胞死亡。根据实施例2制备转化载体,以包含由启动子P15(SEQ ID NO:117)驱动的SEQ ID NO:208、210、212、214、216、218和220。然后根据实施例2,用启动子P15::PCD诱导酶载体产生改良烟草植物。将改良烟草植物(T0代)和对照烟草植物生长至团棵期,然后将植物打顶以去除茎尖分生组织。在打顶时、打顶后24小时和打顶后一周观察烟杈生长。由启动子P15驱动的PCD诱导酶的表达消除了烟草中的烟杈长出。

[0463] 表6.诱导程序性细胞死亡(PCD)的酶

[0464]

SEQ ID NO (核酸/蛋白)	基因名称	物种	序列描述	序列来源
207/208	ALCATRAZ	拟南芥	转录因子 (myc/bHLH), 果实开裂	<i>Current Biology</i> 2001, 11:1941-1922
209/210	VND6	拟南芥	转录因子, PCD-木质部发生	<i>JEB</i> 2014, 65:1313-1321
211/212	VND7	拟南芥	转录因子, PCD-木质部发生	<i>JEB</i> 2014, 65:1313-1321
213/214	Adi3	番茄	AGC 激酶, 负调节因子, 伴病原体攻击的 PCD	<i>EMBO</i> 2006, 25:255-265
215/216	XCP1	拟南芥	半胱氨酸蛋白酶, PCD-木质部发生	<i>Plant Journal</i> 2008, 56:303-315
217/218	XCP2	拟南芥	半胱氨酸蛋白酶, PCD-木质部发生	<i>Plant Journal</i> 2008, 56:303-315
	SlCysEP	番茄	半胱氨酸蛋白酶, 蓖麻糖体蛋白酶, PCD-胚乳	<i>Planta</i> 2013, 237:664-679
219/220	Metacaspase 2d (ATMC4)	拟南芥	蛋白酶, 生物和非生物胁迫期间的 PCD	<i>Plant Journal</i> 2011, 66:969-982
	半胱天冬酶样蛋白酶	番茄	PCD, 与哺乳动物细胞中的细胞凋亡类似	<i>Planta</i> 2000, 211:656-662

[0465] 实施例25. 通过调控microRNA来调控烟杈生长

[0466] miRNA可以参与腋芽发育的调节。参见See Ortiz-Morea等, 2013, *Journal of Experimental Botany* 64:2307-2320; 和Wang等, 2010, *Molecular Plant* 3:794-806, 其全文通过引用并入本文。为了鉴定涉及烟草烟杈发育的miRNA, 在打顶前和打顶后的几个时间点 (例如打顶后2小时、打顶后6小时、打顶后24小时、打顶后72小时、打顶后96小时) 从4周龄TN90烟草植物的腋芽和韧皮部中提取总RNA样品。从总RNA中分离并纯化小RNA (sRNA)。处理所得的sRNA样品 (每种组织类型三个独立收集的样品) 并进行Illumina测序。将Illumina读取序列进行映射并用于评估miRNA和其他小RNA (例如小干扰RNA (siRNA)、反式作用siRNA) 的表达谱。鉴定了在打顶之前和之后在腋芽中表现出差异表达的小RNA, 包括miRNA。这些sRNA在烟杈的形成或长出中起作用。随后鉴定了鉴定的sRNA的前体序列和基因组序列。

[0467] 一些烟草sRNA与减少的烟杈发育和/或生长有关。使用这些sRNA的过表达来抑制烟杈。根据实施例2, 将发现与减少的烟杈发育和/或生长相关的sRNA置于在腋芽中起作用的启动子 (例如SEQ ID NO: 113-118、148-160和204), 或组成型启动子 (例如CaMV 35S) 的调节下。

[0468] 根据实施例2制备转化载体, 其包含由启动子P1、P11、P15或PAB疏堇 (SEQ ID NO: 118) 驱动的目标sRNA。然后根据实施例2产生改良烟草植物, 并进行表型评估。与对照烟草植物相比, 改良烟草植物表现出减少的烟杈生长。

[0469] 根据实施例2, 通过制备构建体来靶向调节miRNA, 所述miRNA通过抑制基因来促进烟杈形成或长出, 所述基因抑制烟杈形成或长出, 所述构建体包含在腋芽中起作用的启动子 (例如SEQ ID NO: 113-118、148-160和204) 或组成型启动子调节下的至少一个miRNA诱饵。

[0470] 根据实施例2制备转化载体,其包含由启动子P1、P11、P15或PAB疏堇 (SEQ ID NO: 118) 驱动的目标miRNA。然后根据实施例2产生改良烟草植物,并进行表型评估。与对照烟草植物相比,改良烟草植物表现出减少的烟杈生长。

[0471] 根据实施例2制备进一步的转化载体,其包含由启动子PAB疏堇 (SEQ ID NO:118) 驱动的miR159诱饵。烟草成熟miR159诱饵 (SEQ ID NO:227) 与至少SEQ ID NO:1、13和35 (均起抑制烟草中的烟杈生长的作用) 互补。然后根据实施例2,用腋生分生组织启动子::miR159诱饵载体产生改良烟草植物,并进行表型评估。与对照烟草植物相比,改良烟草植物表现出减少的烟杈生长。

[0472] 实施例26. 通过改变生长素合成和转运调控烟杈生长

[0473] 去除茎尖分生组织从休眠中释放腋芽并促进烟杈长出。来自完整的茎尖分生组织的生长素抑制烟杈长出。通常,通过去除茎尖分生组织诱导的细胞分裂素促进腋生分生组织长出。不受任何科学理论束缚,在去除茎尖分生组织后保持腋芽中和腋芽周围的高生长素:细胞分裂素比率可以抑制腋芽长出。

[0474] 腋芽区域中和区域周围的生长素浓度的局部增加可以抑制烟杈长出。当用启动子P15 (SEQ ID NO:117) 或其他在腋芽中起作用的启动子 (例如SEQ ID NO:113-118、148) 驱动其表达时,使用与生长素生物合成和/或转运相关的基因来抑制腋生分生组织长出。根据实施例2制备转化载体,其包含由启动子P15 (SEQ ID NO:117) 驱动的SEQ ID NO:234 (YUCCA1; 黄素单加氧酶)。然后根据实施例2,用启动子P15::YUCCA1载体产生改良烟草植物。将改良烟草植物 (T0代) 和对照烟草植物生长至团棵期,然后将植物打顶以去除茎尖分生组织。在打顶时、打顶后24小时、打顶后一周、打顶后两周和打顶后三周观察烟杈生长 (图19和20)。由启动子P15驱动的SEQ ID NO:234的表达抑制烟草中的烟杈长出。

[0475] 使用来自拟南芥的其他生长素生物合成和生长素转运基因,例如:PIN-型1 (PIN1; SEQ ID NO:236)、色氨酸氨基转移酶1/转运抑制剂应答2 (TAA1/TIR2; SEQ ID NO:238); 醛氧化酶1 (AAO1; SEQ ID NO:240); 和吲哚-3-乙酰胺水解酶1 (AMI1; SEQ ID NO:242) 来制备类似于启动子P15::YUCCA1的其他转化载体。除了启动子P15之外,使用在腋芽中起作用的几个启动子 (例如SEQ ID NO:113-118、148-160、204及其片段) 驱动生长素生物合成和生长素转运基因 (例如SEQ ID NO:234、236、238、240和242) 的表达。此外,在具有启动子P15以及在腋芽中起作用的其他启动子 (例如SEQ ID NO:113-118、148、160、204及其片段) 包括与拟南芥生长素生物合成和生长素转运基因同源的烟草基因 (例如NtYUCCA样, SEQ ID NO:244和246; NtPIN1样, SEQ ID NO:248; NtTAA1/NtTIR2样, SEQ ID NO:250; NtAAO1样, SEQ ID NO:252; 和NtAMI1样, SEQ ID NO:254)。

[0476] 如实施例2所述,用这些载体中的每一个产生改良烟草植物,然后进行表型评估。与对照烟草植物相比,改良烟草植物表现出减少的烟杈生长。

[0477] 表7. 生长素生物合成和生长素转运基因

[0478]

SEQ ID NO (核酸/蛋白)	基因名称	物种	序列描述	序列来源
234/235	YUCCA1	拟南芥	黄素单加氧酶	<i>Plant Cell</i> 2007, 19:2430-2439
236/237	PIN1	拟南芥	PIN-型 1	<i>Science</i> 1998, 282: 2226-2230
238/239	TAA1/TIR2	拟南芥	色氨酸氨基转移酶转运抑制剂应答 2	<i>Cell</i> 1998, 133: 177-191; <i>Plant Physiology</i> 2009, 151:168-179
240/241	AAO1	拟南芥	醛氧化酶 1	<i>J Biochem</i> 1999, 126:395-401
242/243	AMI1	拟南芥	吲哚-3-乙酰胺水解酶	<i>FEBS J</i> 2007, 274:3440-3451

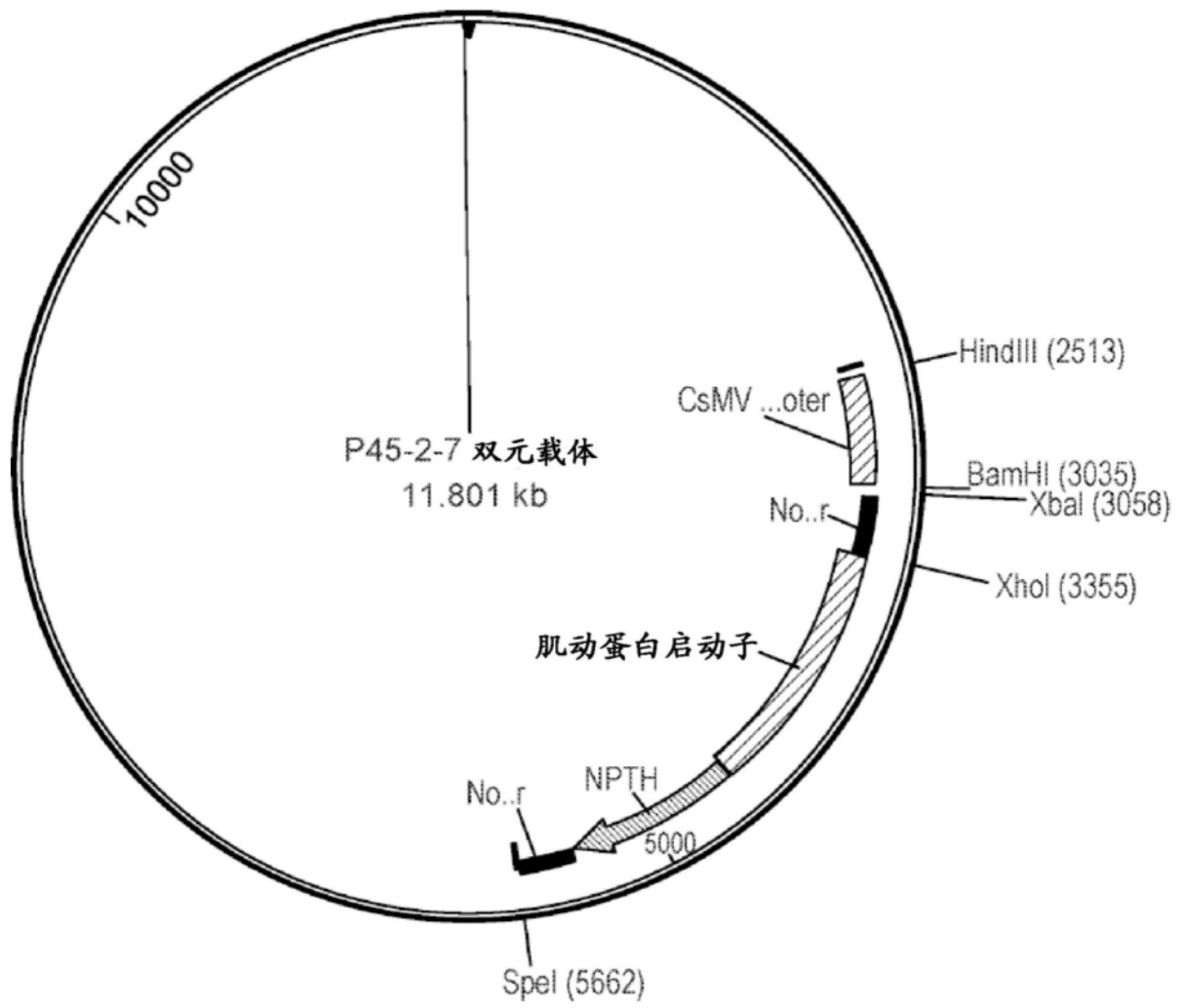


图1

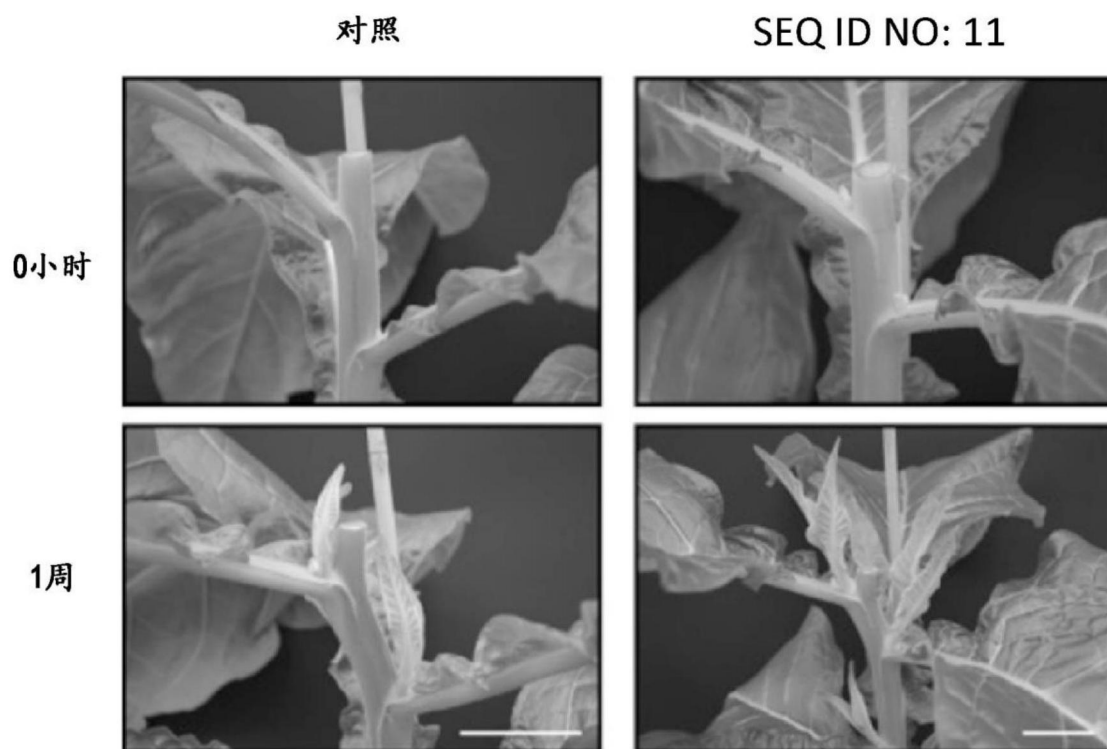


图2

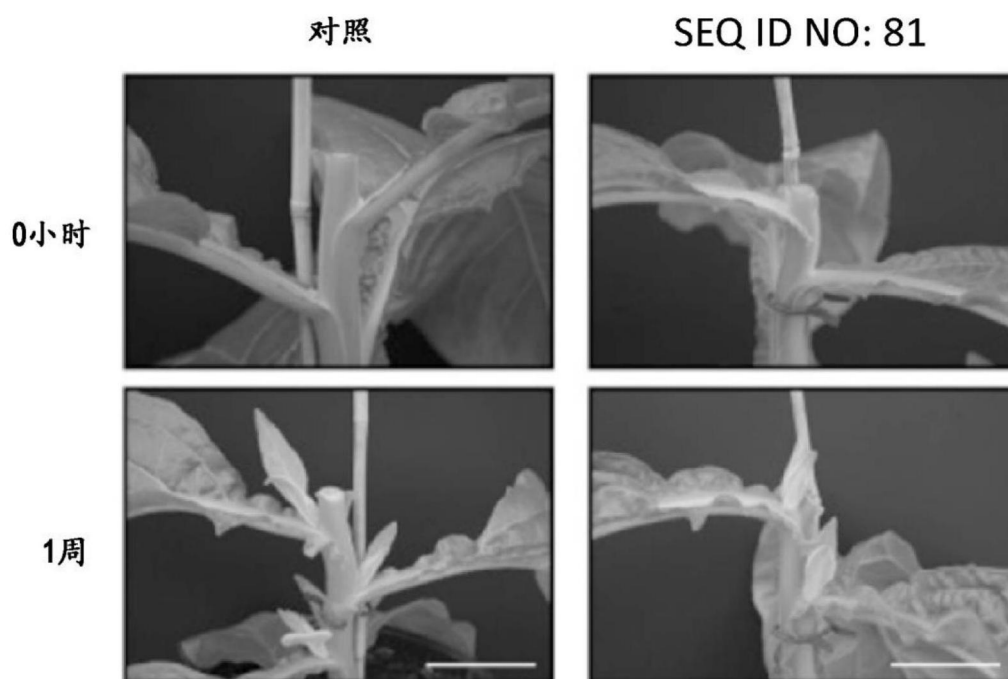


图3A

图3

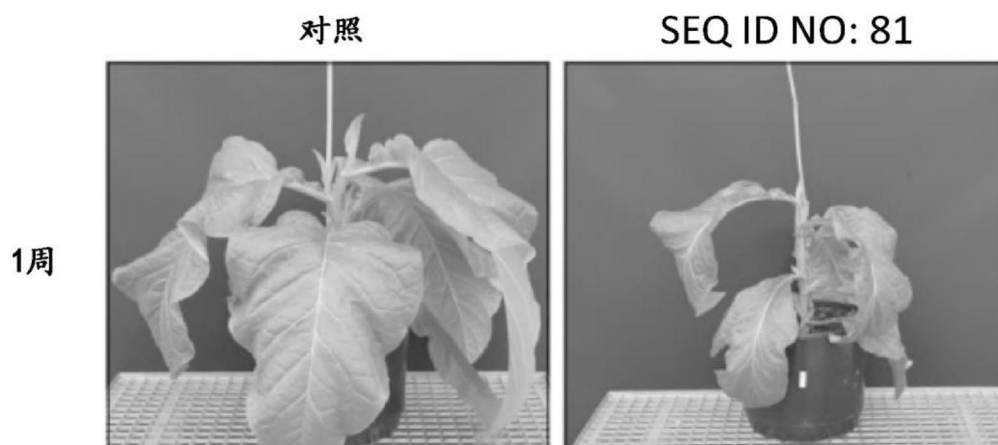


图3B

图3

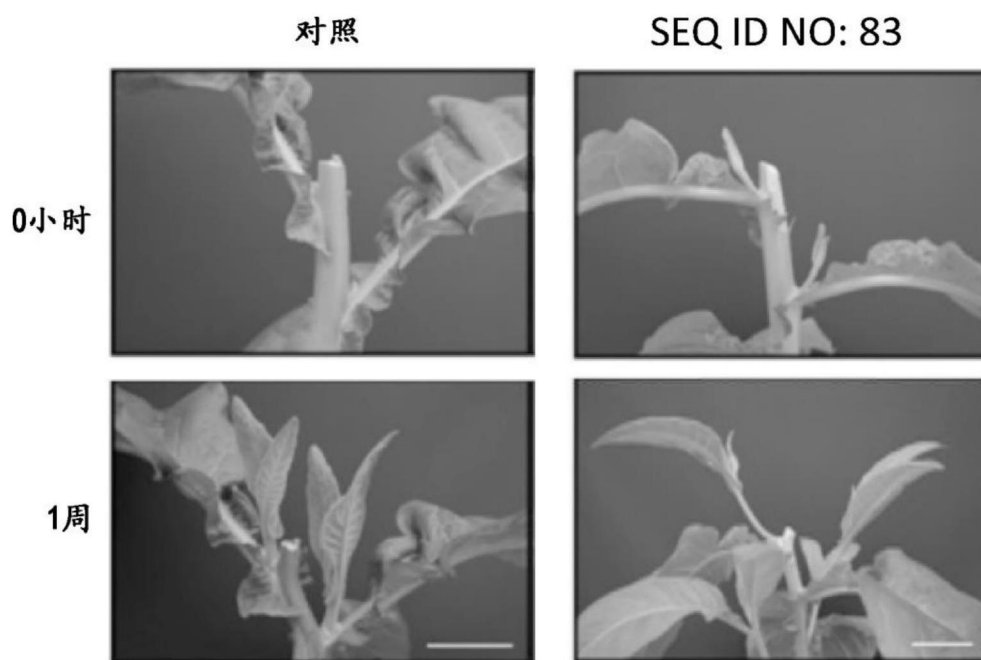


图4

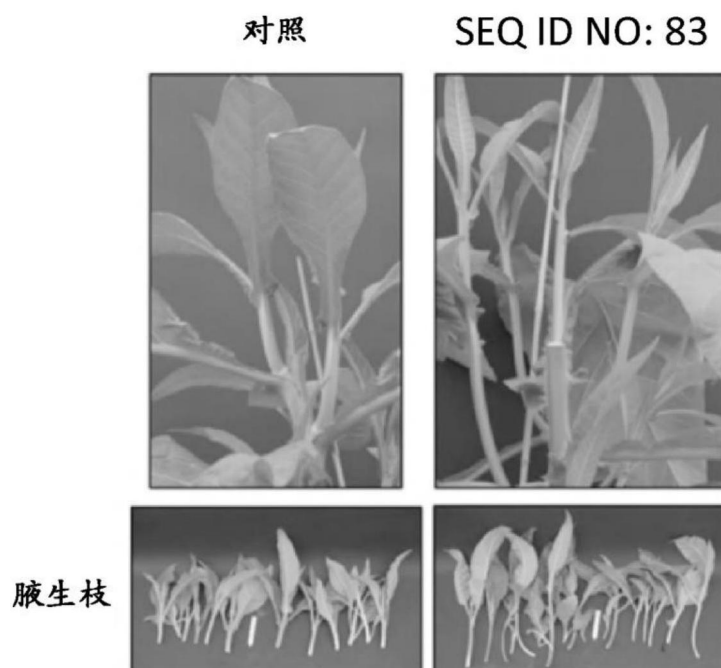


图5A

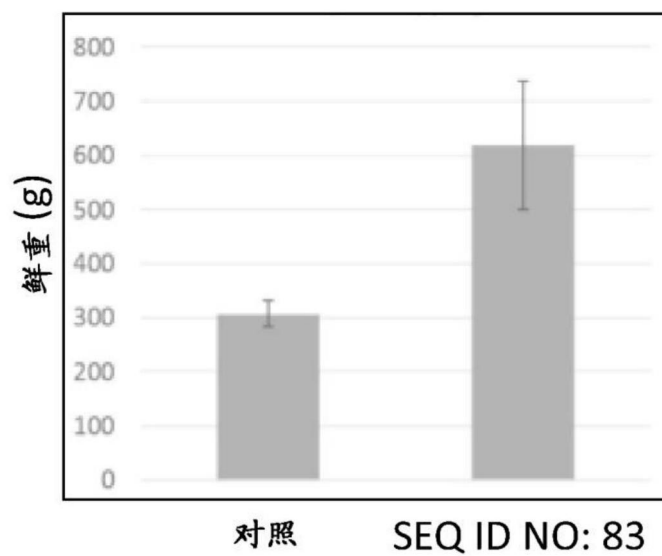


图5B

图5

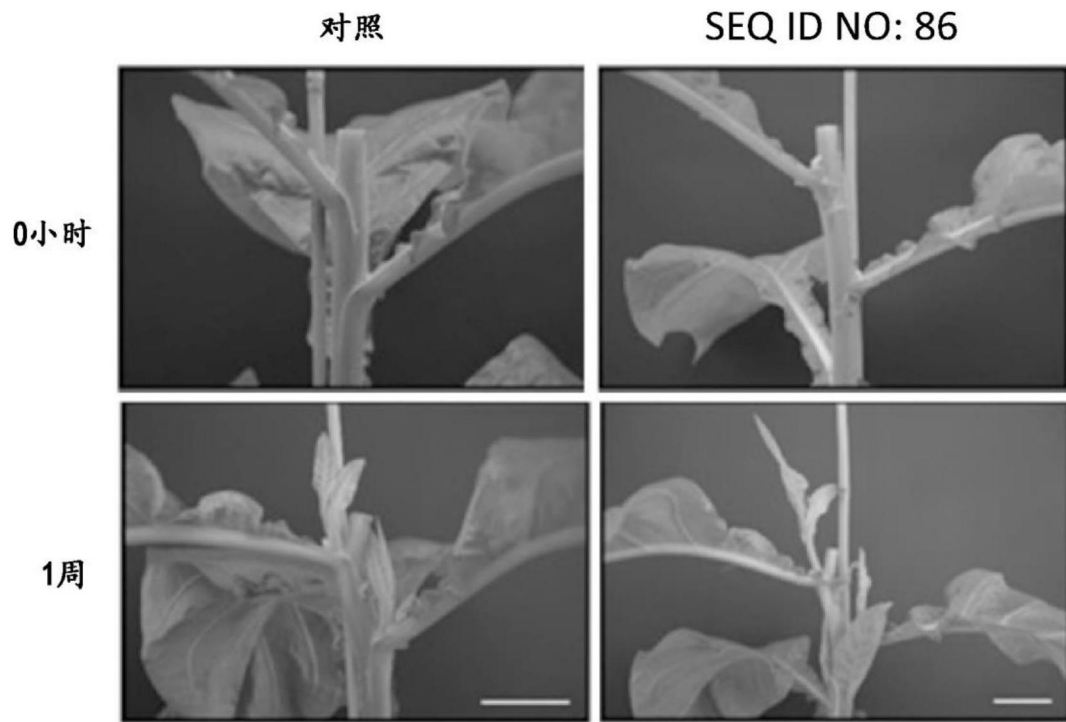


图6

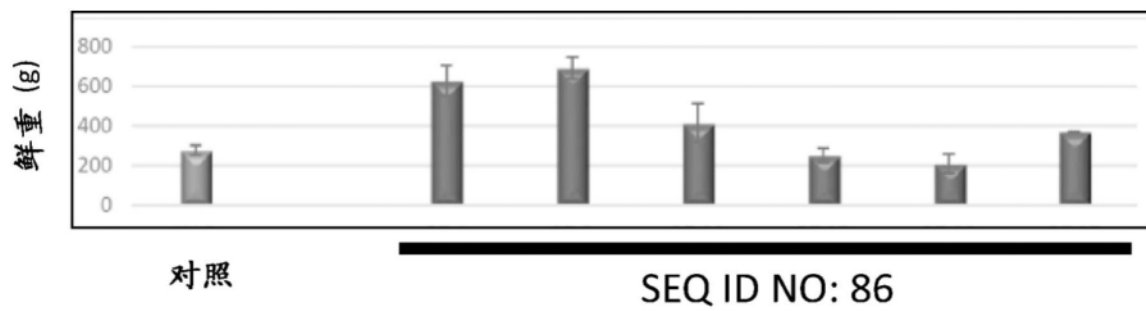


图7



图8

SEQ ID NO: 101

对照

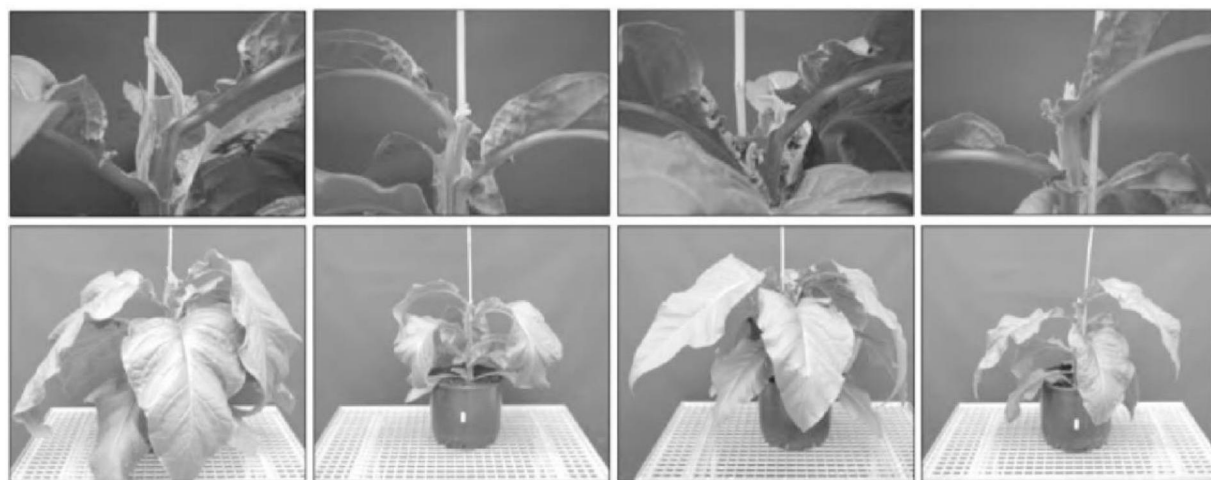


图9

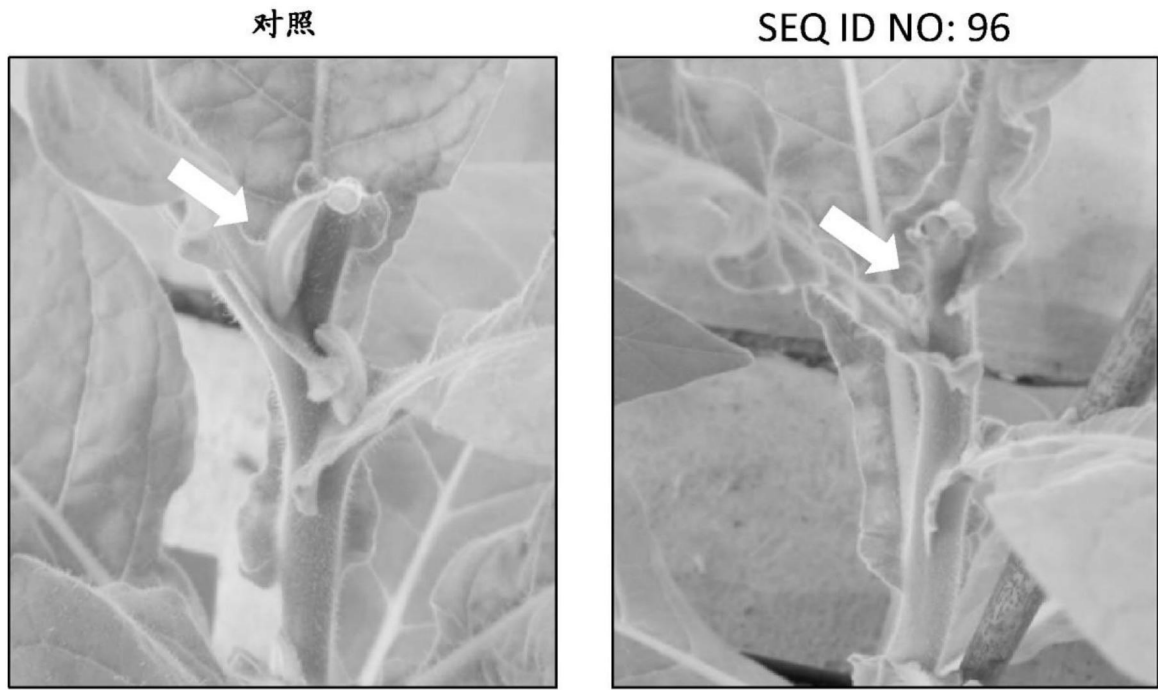


图10

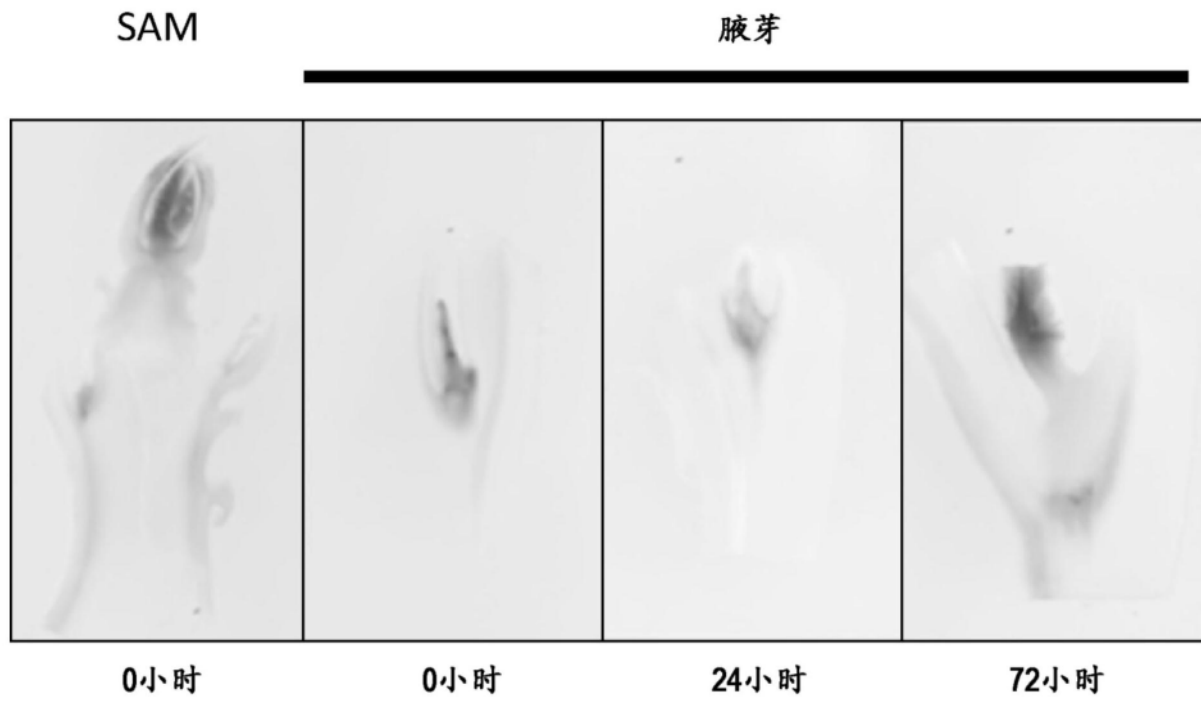


图11



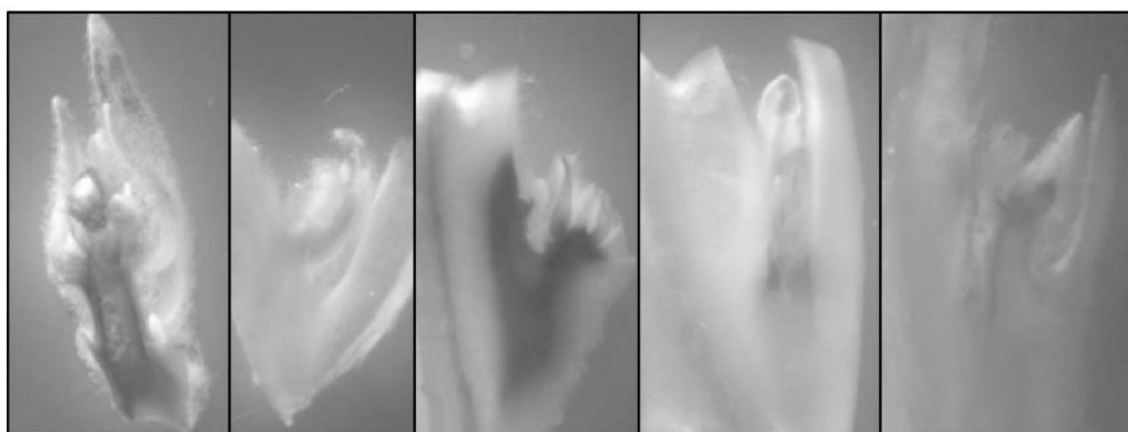
幼苗



幼苗 SAM

SAM

腋芽



0小时

0小时

3天

5天

7天

图12

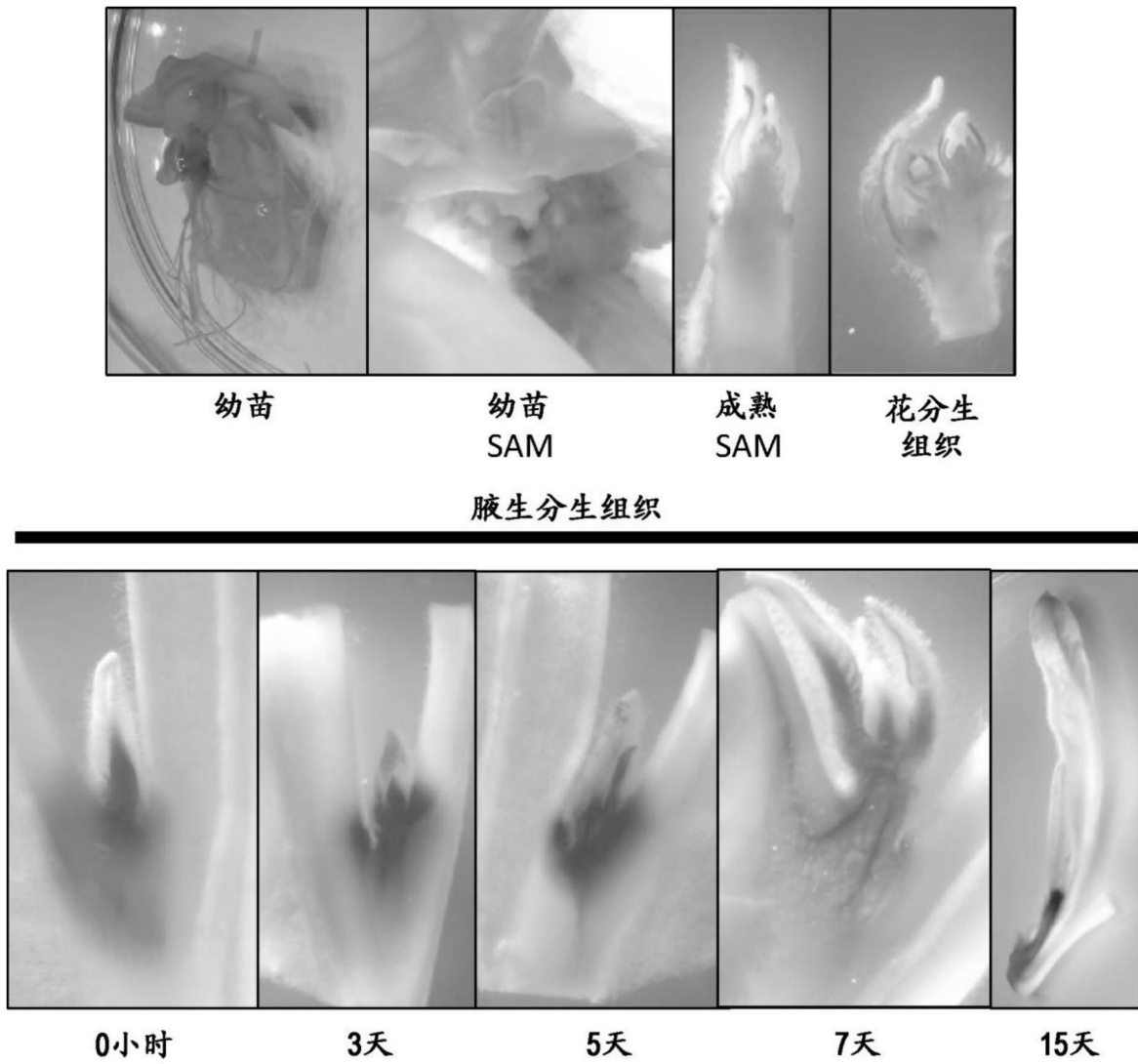


图13A

图13

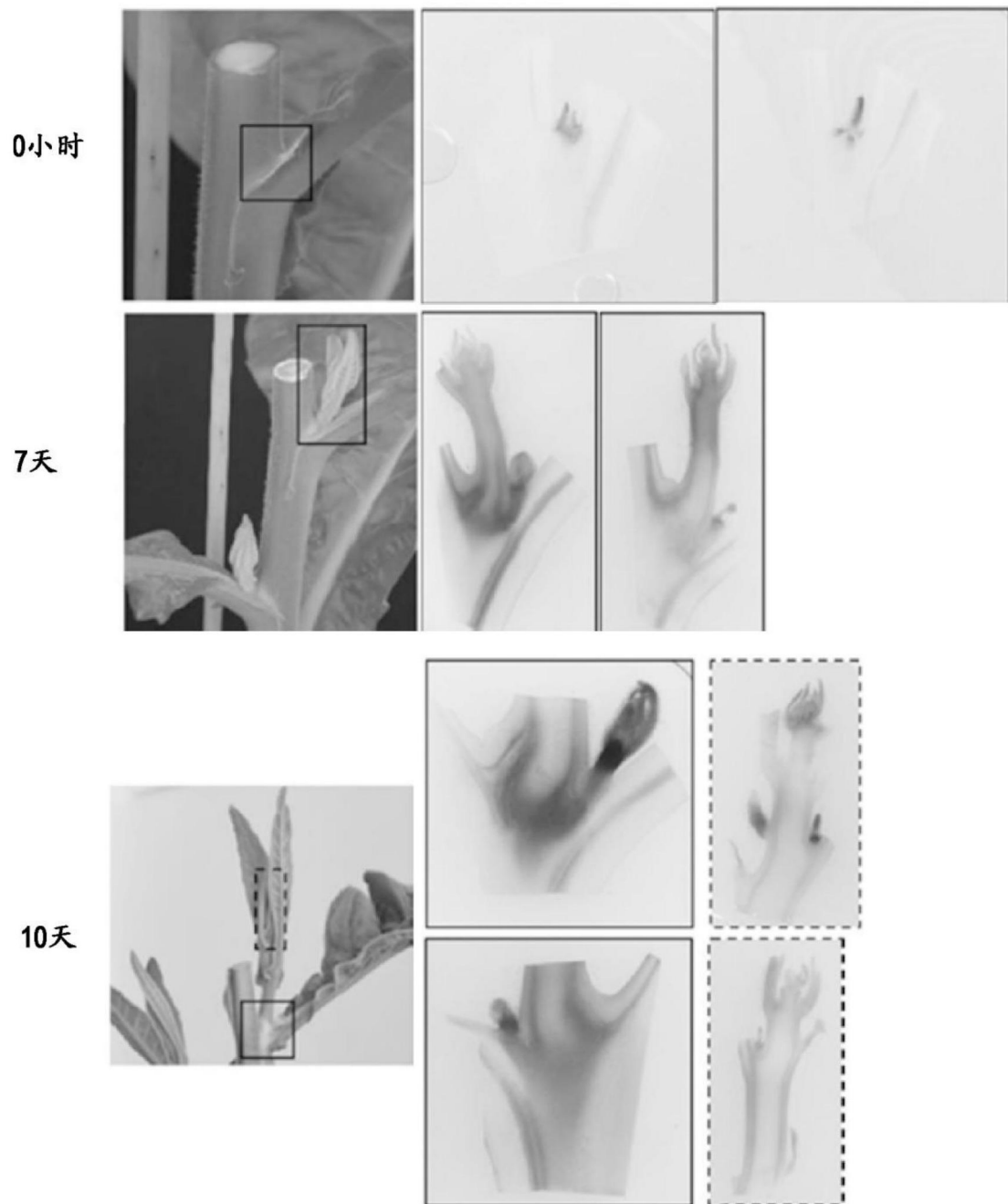


图13B

图13

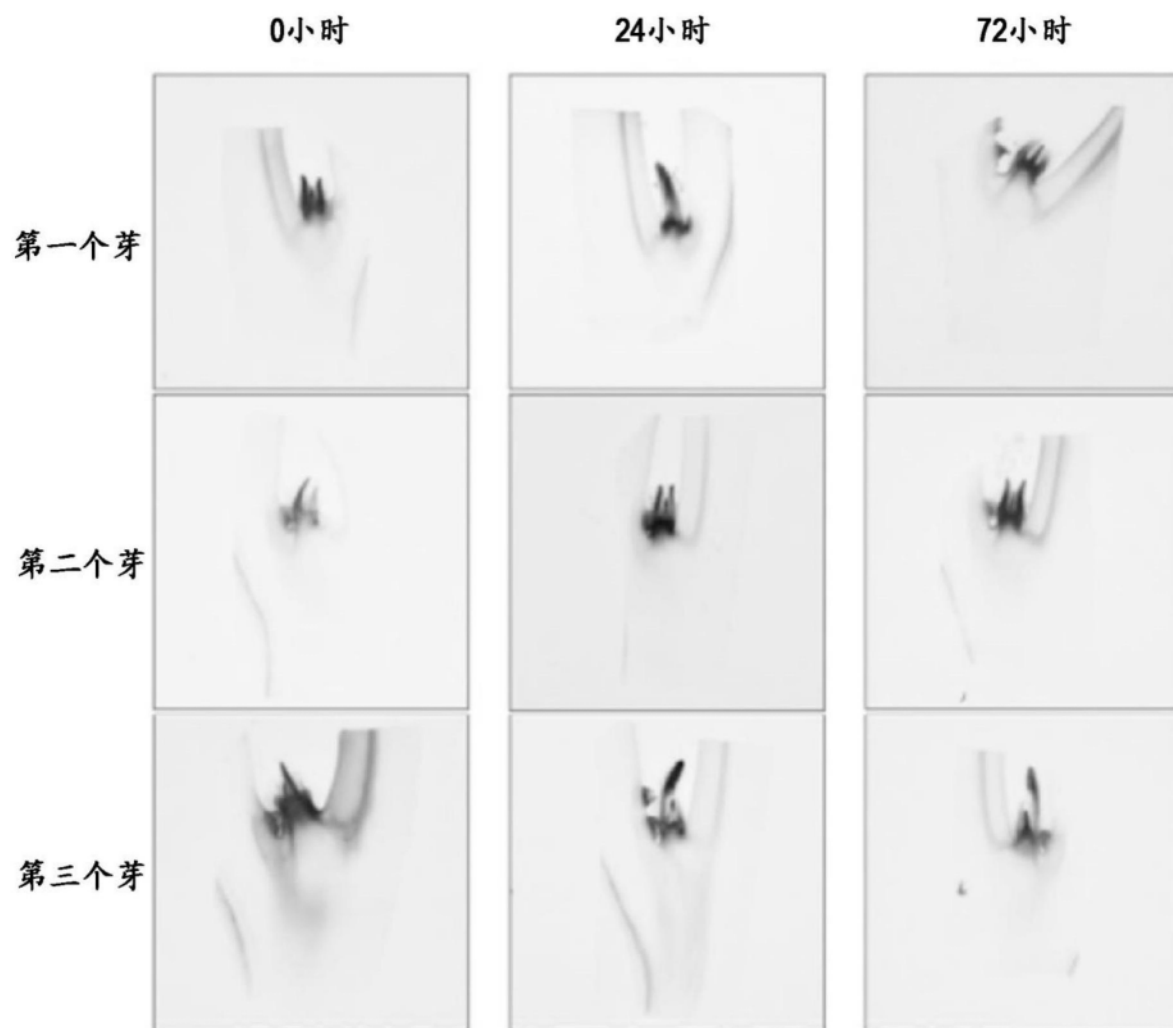
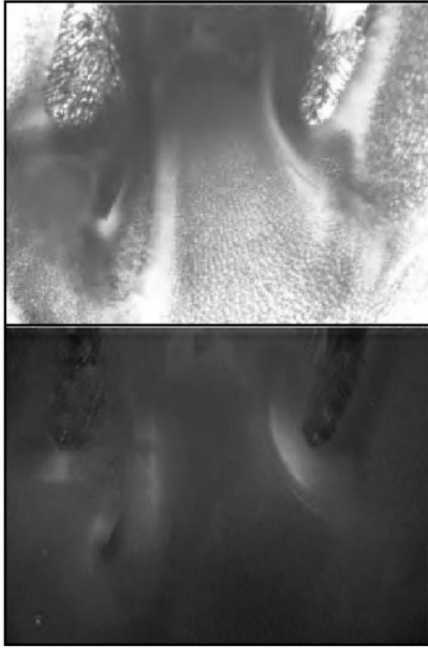


图13C

图13

SAM 和腋芽

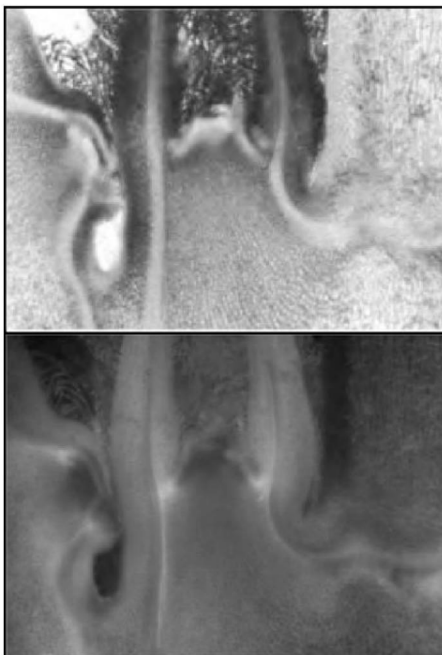


腋芽



图14A

SAM 和腋芽



腋芽



图14B

图14

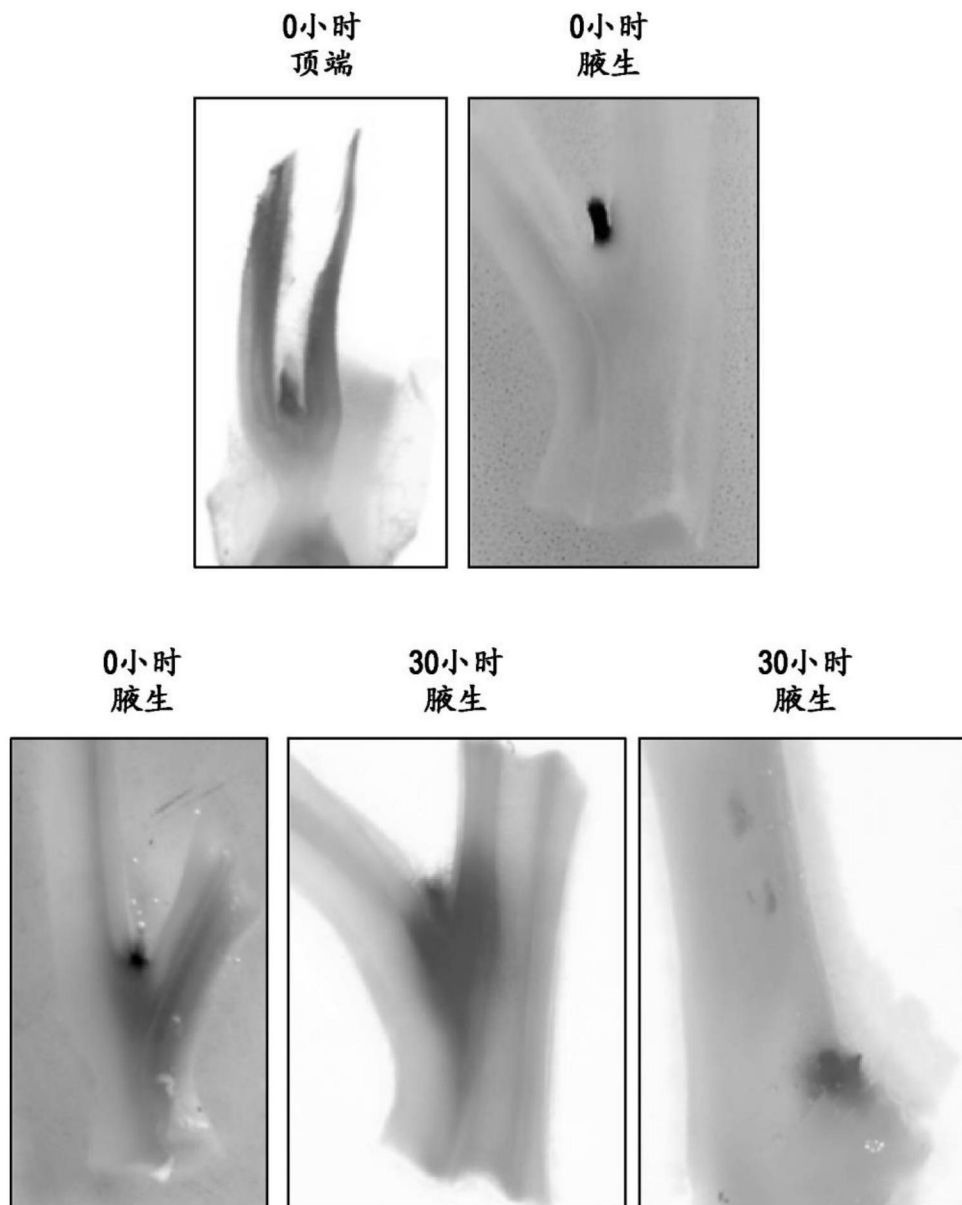


图15

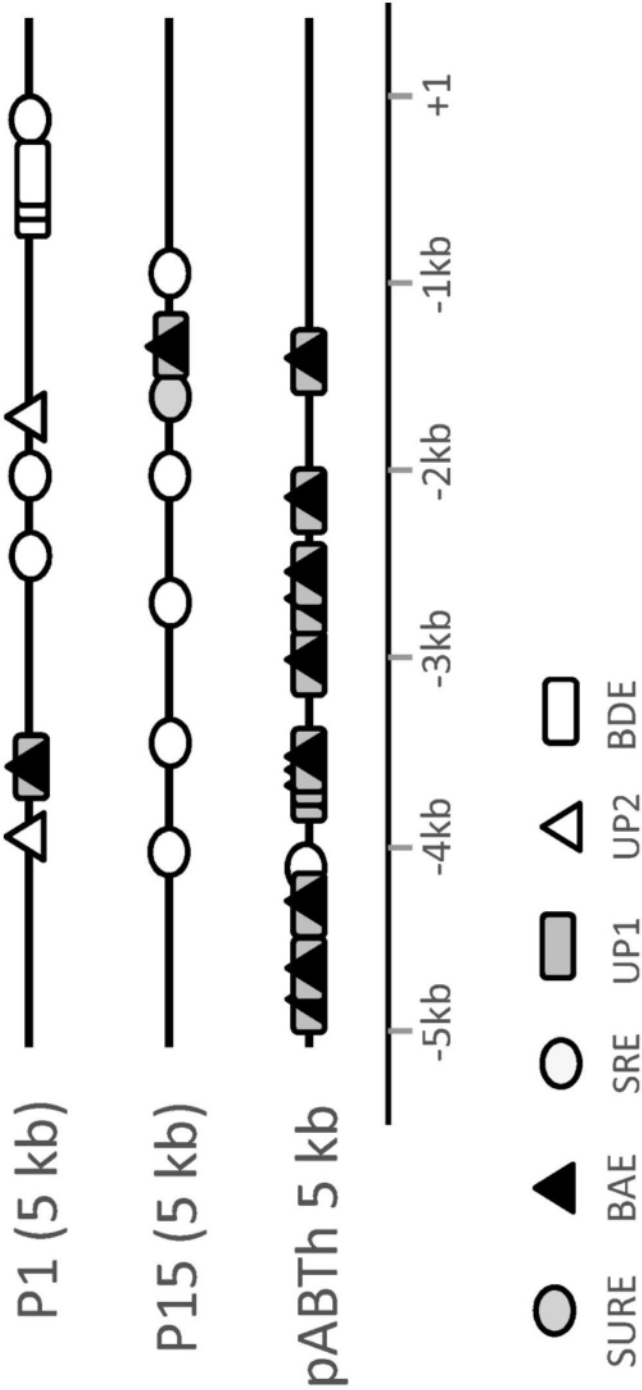


图16

SEQ ID NO: 117

(启动子)驱动的

SEQ ID NOs: 81和101

对照

8天



15天

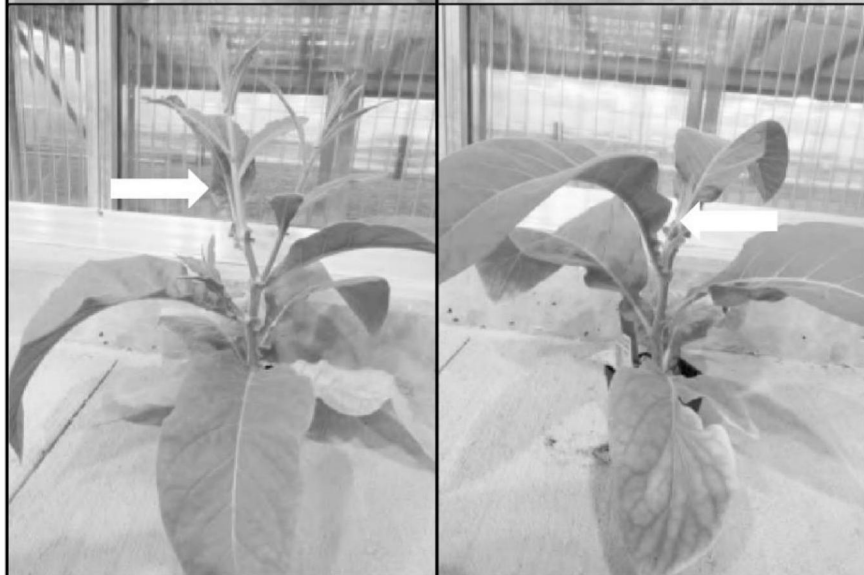


图17

SEQ ID NO: 117
(启动子) 驱动的 SEQ ID
NO: 59

对照

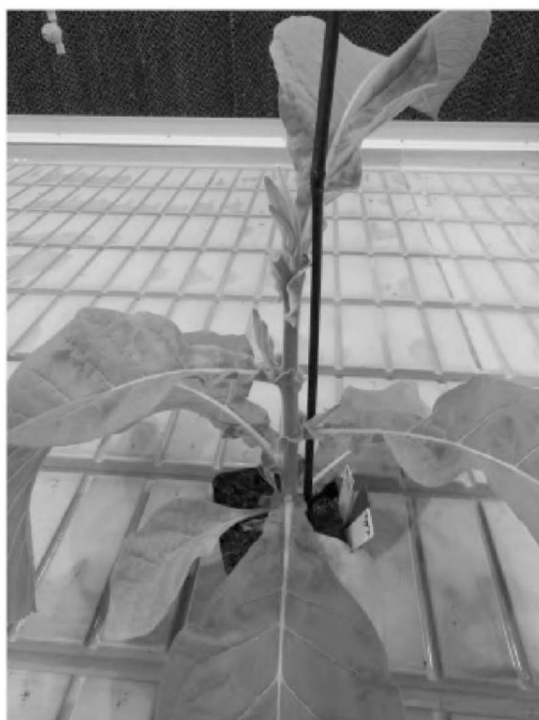


图18

SEQ ID NO: 117 (启动子)

驱动的 SEQ ID NO: 79

对照

品系 10

品系 11

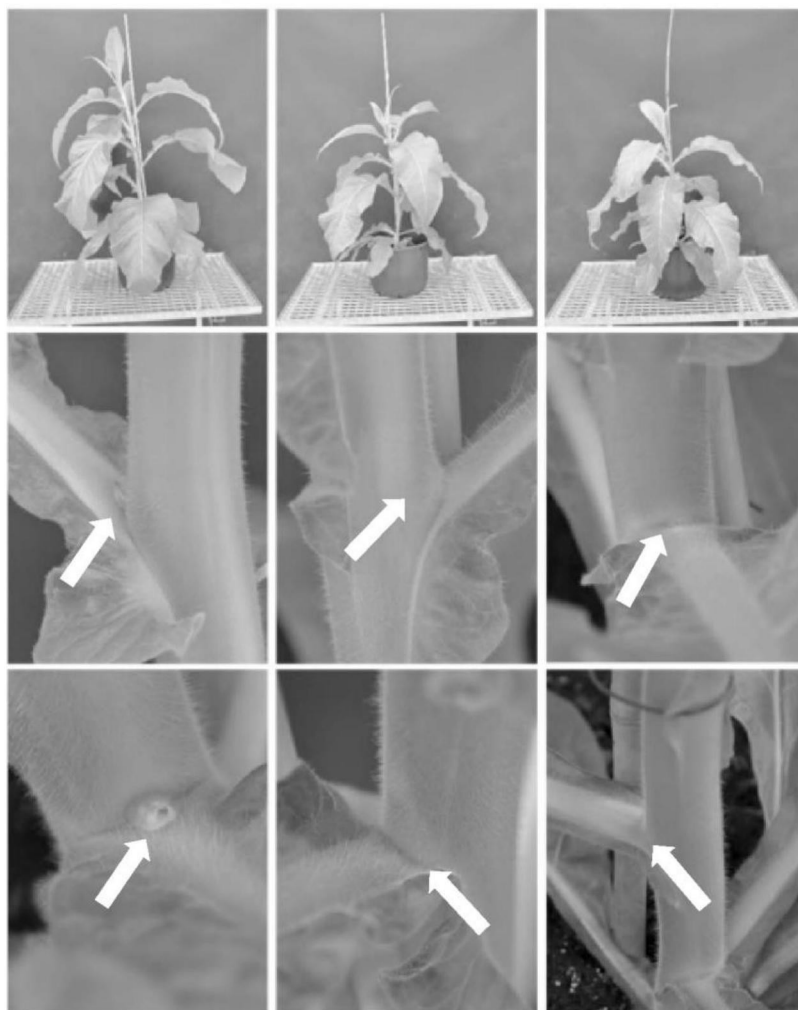


图19

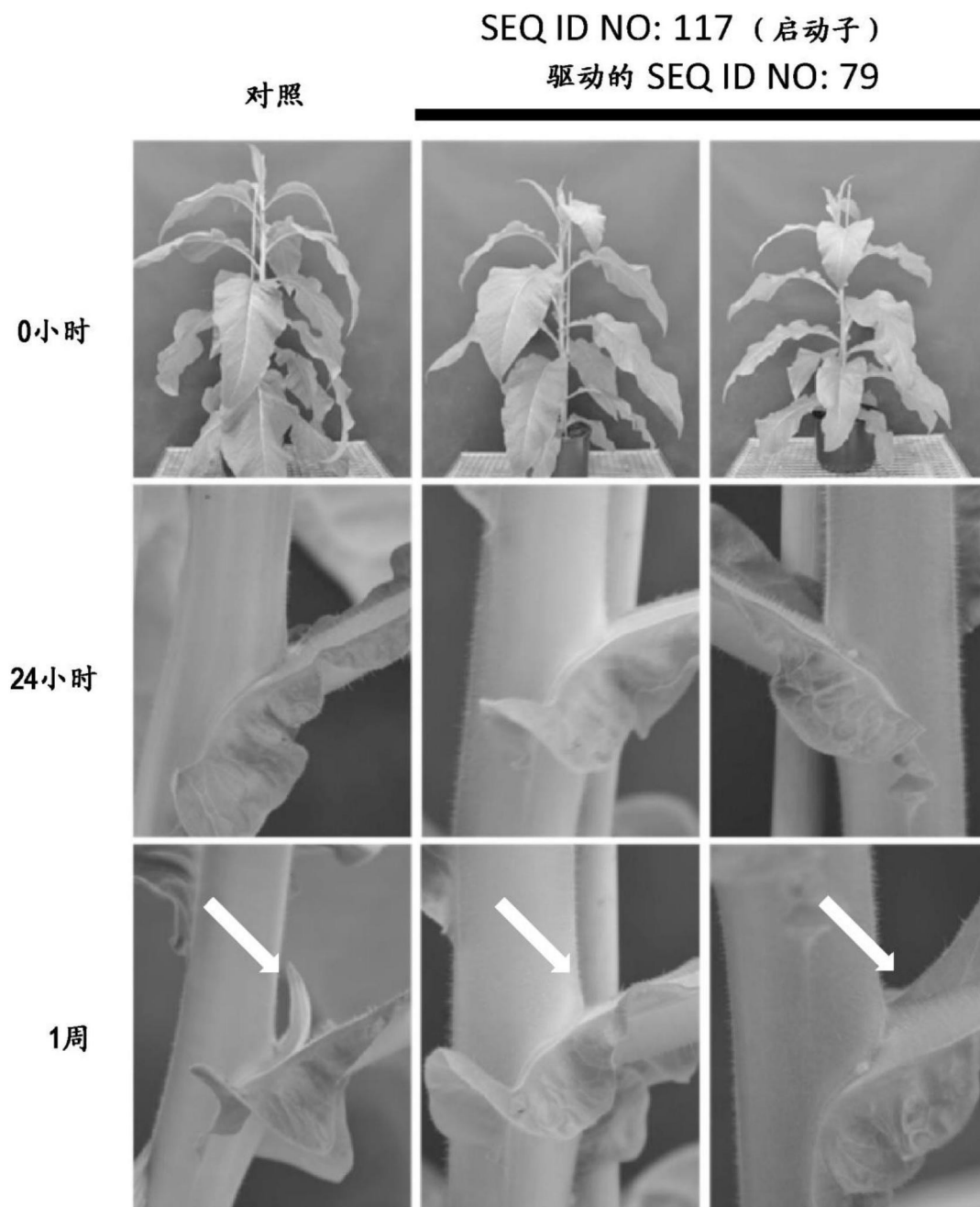


图20A

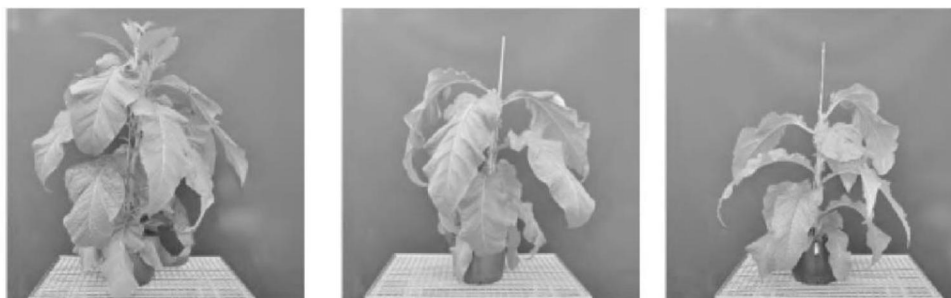
图20

SEQ ID NO: 117 (启动子)

驱动的 SEQ ID NO: 79

对照

0小时



2周

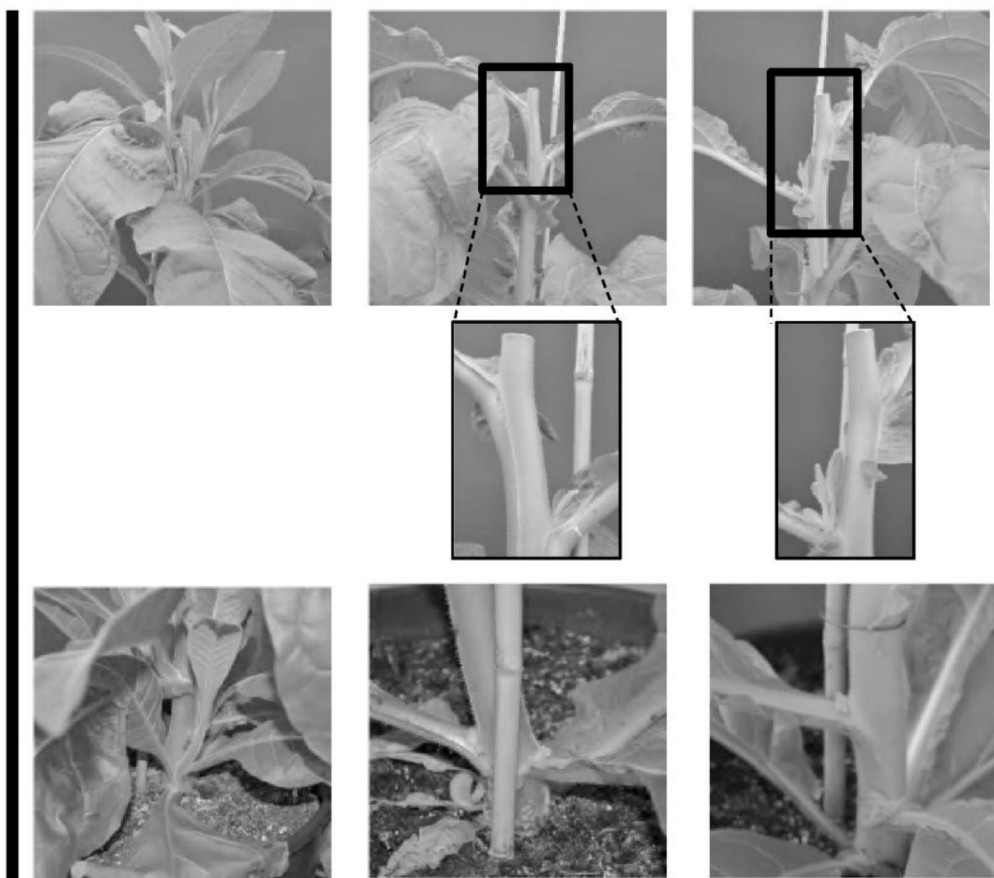


图20B

图20

SEQ ID NO: 117 (启动子)

驱动的 SEQ ID NO: 79

对照

0小时



3周



图20C

图20

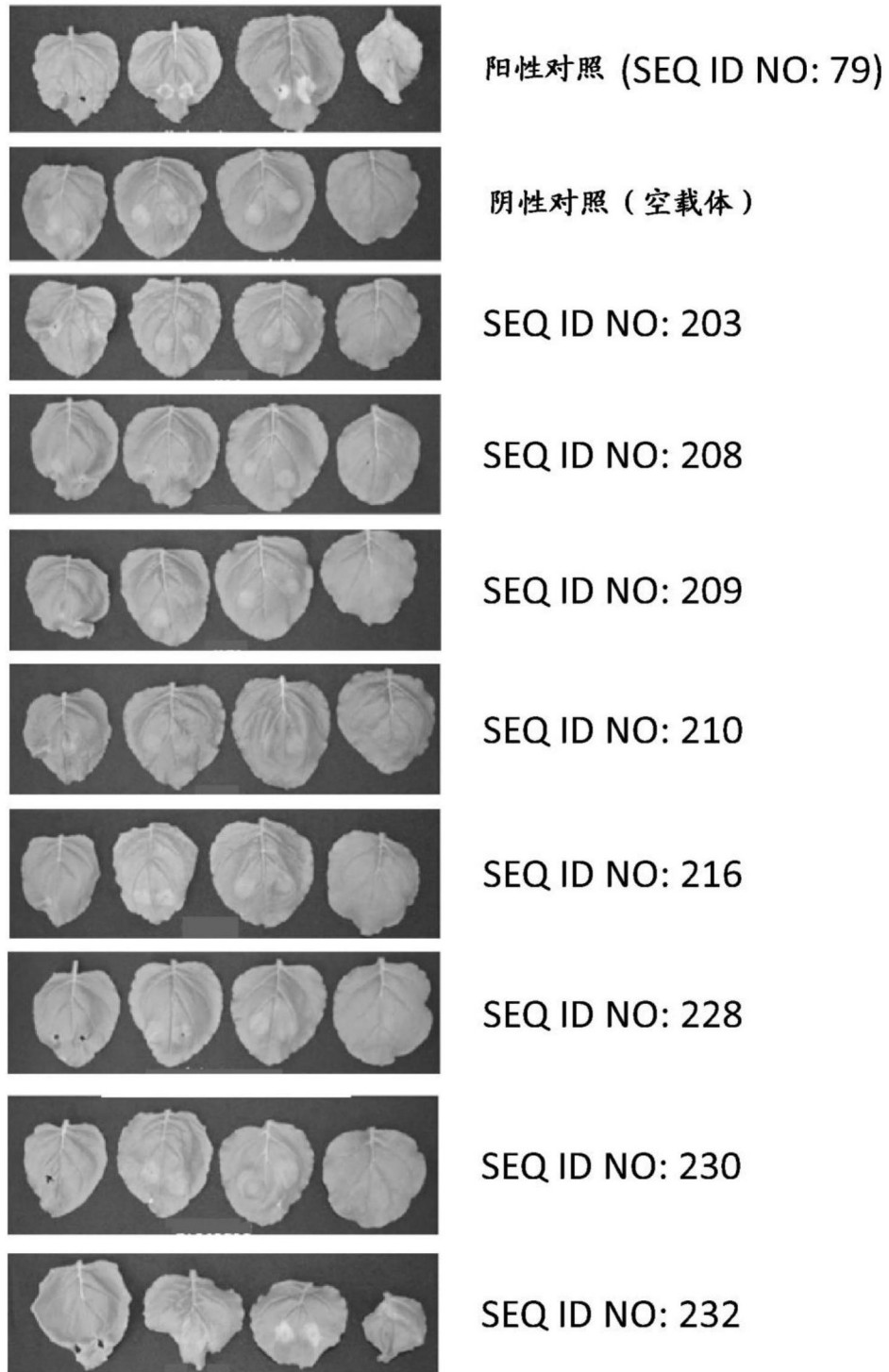


图21