



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104619843 B

(45)授权公告日 2020.03.06

(21)申请号 201380039346.6

(22)申请日 2013.05.23

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104619843 A

(43)申请公布日 2015.05.13

(30)优先权数据

61/651131 2012.05.24 US

61/814888 2013.04.23 US

61/814892 2013.04.23 US

61/814899 2013.04.23 US

61/814890 2013.04.23 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2015.01.23

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/IL2013/050447 2013.05.23

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/175480 EN 2013.11.28

(73)专利权人 A.B.种子有限公司  
地址 以色列卢德

(72)发明人 A.阿夫尼伊 E.里多尔-尼里  
R.茂尔 O.梅尔  
O.奈维特-布里克 O.亚奈-阿祖拉

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001  
代理人 初明明 万雪松

(51)Int.Cl.  
C12N 15/113(2006.01)

(56)对比文件  
WO 2005007860 A1,2005.01.27,  
审查员 黎舒婷

权利要求书2页 说明书75页  
序列表76页 附图98页

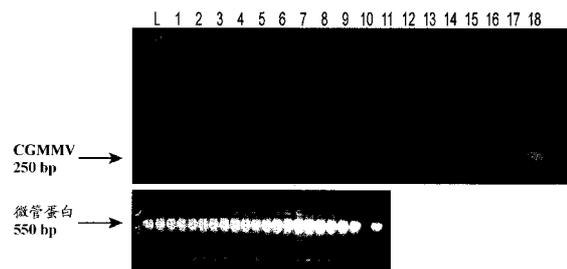
## (54)发明名称

用于使基因表达沉默的组合物和方法

## (57)摘要

提供一种将裸dsRNA引入种子中的方法。所述方法包括在允许dsRNA渗透入种子的条件下使种子与裸dsRNA接触,从而将dsRNA引入种子中。

水稻种子中 CGMMV 的稳定性



1. 一种将外源裸dsRNA引入种子的方法,所述方法包括:
  - a. 用水洗涤所述种子2-6小时;
  - b. 在20-30°C的温度下干燥种子至多24小时;和
  - c. 使种子与包含1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -261  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的裸dsRNA和0.1 mM EDTA的水溶液直接接触,其中裸dsRNA靶向内源植物基因或植物病毒病原体基因用于抑制,由此裸dsRNA渗透种子,从而将裸dsRNA引入种子中。
2. 一种产生植物的方法,所述方法包括:
  - (a) 按照权利要求1的方法将外源裸dsRNA引入种子中;和
  - (b) 使种子萌发以产生植物。
3. 一种调节自种子生长的植物中的基因表达的方法,所述方法包括:
  - (a) 用水洗涤所述种子2-6小时;
  - (b) 在20-30°C的温度下干燥种子至多24小时;
  - (c) 使种子与包含1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -261  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的裸dsRNA和0.1 mM EDTA的水溶液直接接触,由此裸dsRNA渗透种子,从而将dsRNA引入种子中;和
  - (d) 自种子产生植物,其中裸dsRNA靶向内源植物基因或病毒植物病原体基因用于抑制。
4. 权利要求1-3中任一项的方法,其中所述内源植物基因与对非生物胁迫或生物胁迫的耐受性有关。
5. 权利要求1-3中任一项的方法,其中所述接触通过在水溶液中浸泡种子进行,并且其中所述方法还包括在所述浸泡后将所述种子干燥。
6. 权利要求4的方法,所述方法还包括在所述产生后使所述植物在非生物胁迫或生物胁迫下生长。
7. 权利要求1或3的方法,其中设计所述裸dsRNA用于减量调节植物基因的表达。
8. 权利要求7的方法,其中所述植物基因是内源基因。
9. 权利要求1或3的方法,其中设计所述裸dsRNA用于减量调节病毒病原体基因的表达。
10. 权利要求1-3中任一项的方法,其中所述渗透是进入所述种子的胚乳中并且备选地或另外地进入所述种子的胚中。
11. 权利要求1-3中任一项的方法,其中所述裸dsRNA不整合至所述种子的基因组中。
12. 权利要求1-3中任一项的方法,其中在萌发后所述裸dsRNA在植物中存在至少10天。
13. 一种抑制植物病毒中目标基因的表达的方法,所述方法包括使植物病毒与通过权利要求2或3的方法产生的植物或植物部分接触,从而抑制植物病毒中目标基因的表达。
14. 权利要求13的方法,所述方法还包括观察在所述提供后所述病毒病原体可感染性或可复制性的降低。
15. 权利要求1-3中任一项的方法,其中所述dsRNA包含siRNA。
16. 权利要求1-3中任一项的方法,其中所述接触通过将种子浸泡在所述水溶液中来实行。
17. 权利要求1-3中任一项的方法,其中所述洗涤在4-28°C下实行。
18. 权利要求1-3中任一项的方法,其中所述干燥在25-30°C下实行10-16小时。
19. 权利要求1-3中任一项的方法,所述方法还包括在所述接触后用选自杀虫剂、杀真

菌剂、肥料、涂布剂和着色剂的作用剂处理种子。

20. 权利要求19的方法,其中所述处理包括用所述作用剂涂布种子。

21. 权利要求1-3中任一项的方法,其中所述种子来自单子叶植物或双子叶植物。

22. 权利要求1-3中任一项的方法,其中按照选自以下的参数调节裸dsRNA的浓度:种子大小、种子重量、种子体积、种子表面积、种子密度和种子透性。

23. 权利要求1和2中任一项的方法,其中所述接触在胚出现之前实行。

24. 权利要求1-3中任一项的方法,其中所述种子是经引发的种子。

25. 权利要求1-3中任一项的方法,其中所述种子是杂种种子。

## 用于使基因表达沉默的组合物和方法

### [0001] 发明领域和背景

[0002] 本发明在其一些实施方案中涉及将dsRNA导入植物种子以调节基因表达的方法。

[0003] 随着世界人口不断增加,对食物、燃料和纤维的需求日益增长以及变化万千的气候,农业面临着前所未有的挑战。非常需要研发具有改良性状的植物,其中对农民和种子公司有重大利益的一些主要性状包括改进的非生物胁迫耐受性、肥料使用效率、抗病性、产量等等。

[0004] 植物性状改良通常通过遗传工程或经典育种进行。非常需要通过特定的基因改变用于性状改良的新的方法。这些包括用于基因过量表达或基因沉默的方法。序列特异性基因沉默的一项强大技术是通过RNA干扰(RNAi)。RNAi最早发现于线虫秀丽隐杆线虫(*C. elegans*) (Fire等1998, *Nature*, 391:806-811),是其中可通过将与个别基因同源的双链RNA(dsRNA)导入细胞而使所选基因的表达特异性沉默的一种机制。在细胞内,dsRNA分子被RNA酶III相关酶(Dicer)切割成21-27个核苷酸的较短片段。这些片段,称为小干扰RNA(siRNA),被掺入RNA诱导的沉默复合体(RISC)中。在另外的加工之后,siRNA转化成单链RNA,用作最终切割目标信使RNA的指导序列。通过使用RNAi使相关目标基因特异性沉默,可改变生物体的基本性状。特别对于植物,对可能导致高的胁迫抗性和更好的作物产量的修饰有着不可思议的潜力。

[0005] 在植物中,通常通过产生过量表达经转录产生dsRNA的DNA片段的转基因植物,来进行RNAi。这种dsRNA随后被加工成介导目标基因切割和沉默的siRNA。

[0006] 这种技术的主要技术限制是许多重要的植物作物种难以或不可能转化,阻碍了指导dsRNA产生的构建体的组成型表达。而且,有关抗病毒转基因植物的潜在生态影响的问题迄今为止严重限制了它们的应用[Tepfer, 2002, *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 467-491]。

[0007] 获取转基因植物的另一个障碍归因于使转化和再生事件发生在同一细胞类型中的难度。

[0008] 因此开发用于获取不依赖于组织培养程序固有方法的转化种子的方法是植物分子生物学研究的前缘。

[0009] 其它背景技术包括:

[0010] 美国20040055041教导了通过利用超声处理系统接着用土壤杆菌感染的种子转化。

[0011] Chee等,1989 *Plant Physiol.* 91:1212-1218教导了使用含有表达转基因的二元载体的土壤杆菌接种发芽大豆的胚芽、子叶节和邻近的子叶组织进行的大豆转化。

[0012] 其它的相关背景技术:WO2011/001434、美国20080022423、WO 2011112570、WO 2007/080127、WO 2007/080126、美国20060272049、美国2010068172、美国20070250947、WO9926467、美国20030154508、WO 02/14472、美国20030150017、美国201000154083。

### [0013] 发明概述

[0014] 按照本发明一些实施方案的一个方面,提供将裸dsRNA引入种子的方法,所述方法

包括在允许dsRNA渗透入种子的条件下使种子与裸dsRNA接触,从而将dsRNA引入种子中。

[0015] 按照本发明一些实施方案的一个方面,提供包含外源裸dsRNA的分离种子,其中种子缺乏驱动dsRNA在植物中表达的异源启动子。

[0016] 按照本发明一些实施方案的一个方面,提供包含外源裸dsRNA的分离种子。

[0017] 按照本发明一些实施方案的一个方面,提供包含以类似浓度存在于种子的胚和胚乳中的外源dsRNA的分离种子。

[0018] 按照本发明一些实施方案的一个方面,提供包含空间上分布在植物种子的胚和胚乳中的外源dsRNA的分离种子,其空间分布不同于来源于重组表达外源dsRNA的转基因植物的种子的外源dsRNA的空间分布。

[0019] 按照本发明一些实施方案的一个方面,提供包含外源dsRNA的分离种子,其中与重组表达外源dsRNA的转基因种子相比,外源dsRNA与由其成熟的siRNA的浓度比率在所述种子中较高。

[0020] 按照本发明一些实施方案的一个方面,提供包含外源dsRNA的分离种子,其中植物种子缺乏驱动外源dsRNA表达的异源启动子,其中与重组表达外源dsRNA的转基因种子的空间分布相比,外源dsRNA和/或由其成熟的siRNA的空间分布在所述种子中改变。

[0021] 按照本发明一些实施方案的一个方面,提供包含外源裸dsRNA和缺乏驱动dsRNA在植物中表达的异源启动子的植物或植物部分。

[0022] 按照本发明一些实施方案的一个方面,提供包含大量种子的含种子装置。

[0023] 按照本发明一些实施方案的一个方面,提供包含大量任何种子的播种田(sown field)。

[0024] 按照本发明的一些实施方案,所述方法还包括在所述接触后将所述种子干燥。

[0025] 按照本发明的一些实施方案,所述方法还包括在所述产生后使所述植物在非生物胁迫或生物胁迫下生长。

[0026] 按照本发明的一些实施方案,设计裸dsRNA用于减量调节植物基因的表达。

[0027] 按照本发明一些实施方案的一个方面,提供产生植物的方法,所述方法包括:

[0028] (a) 提供任何种子;和

[0029] (b) 使种子萌发以产生植物。

[0030] 按照本发明一些实施方案的一个方面,提供调节基因表达的方法,所述方法包括:

[0031] (a) 在允许dsRNA渗透入种子的条件下使植物的种子与裸dsRNA接触,从而将dsRNA引入种子中;和任选

[0032] (b) 产生种子的植物。

[0033] 按照本发明的一些实施方案,设计裸dsRNA用于减量调节植物基因的表达。

[0034] 按照本发明的一些实施方案,设计裸dsRNA用于减量调节病毒病原体基因的表达。

[0035] 按照本发明的一些实施方案,渗透是进入种子的胚乳并且备选地或另外地进入种子的胚中。

[0036] 按照本发明的一些实施方案,裸dsRNA不整合到种子的基因组。

[0037] 按照本发明的一些实施方案,所述条件导致在萌发后dsRNA存在于植物中至少10天。

[0038] 按照本发明一些实施方案的一个方面,提供抑制植物病毒的目标基因的表达的方

法,所述方法包括向植物病毒提供植物或植物部分,从而抑制植物病毒的目标基因的表达。

[0039] 按照本发明的一些实施方案,所述方法还包括在提供后观察病毒病原体可感染性或可复制性的降低。

[0040] 按照本发明一些实施方案的一个方面,提供将裸dsRNA引入种子中的试剂盒,其包括;

[0041] (i) 裸dsRNA;和

[0042] (ii) 引发溶液(priming solution)。

[0043] 按照本发明的一些实施方案,裸dsRNA和引发溶液装在分开的容器中。

[0044] 按照本发明的一些实施方案,dsRNA包含siRNA。

[0045] 按照本发明的一些实施方案,dsRNA包含siRNA和dsRNA。

[0046] 按照本发明的一些实施方案,接触通过用dsRNA接种种子来实行。

[0047] 按照本发明的一些实施方案,所述方法还包括在接触前引发种子。

[0048] 按照本发明的一些实施方案,所述引发如下实行:

[0049] (i) 在接触前洗涤种子;和

[0050] (ii) 在步骤(i)后将种子干燥。

[0051] 按照本发明的一些实施方案,在双重去离子水存在下实行洗涤。

[0052] 按照本发明的一些实施方案,实行洗涤2-6小时。

[0053] 按照本发明的一些实施方案,洗涤在4-28℃下实行。

[0054] 按照本发明的一些实施方案,干燥在25-30℃下实行10-16小时。

[0055] 按照本发明的一些实施方案,在终浓度为0.001-100 μg/μl的裸dsRNA存在下实行接触。

[0056] 按照本发明的一些实施方案,在终浓度为0.001-0.5 μg/μl的裸dsRNA存在下实行接触。

[0057] 按照本发明的一些实施方案,所述方法还包括在接触后用选自杀虫剂、杀真菌剂、杀昆虫剂、肥料、涂布剂和着色剂的作用剂处理种子。

[0058] 按照本发明的一些实施方案,所述处理包括用作用剂涂布种子。

[0059] 按照本发明的一些实施方案,种子不含选自杀虫剂、杀真菌剂、杀昆虫剂、肥料、涂布剂和着色剂的作用剂。

[0060] 按照本发明的一些实施方案,dsRNA用于减量调节编码基因的表达。

[0061] 按照本发明的一些实施方案,dsRNA用于减量调节非编码基因的表达。

[0062] 按照本发明的一些实施方案,种子是绿色植物界(Viridiplantae)总科的。

[0063] 按照本发明的一些实施方案,所述条件允许dsRNA在种子的胚乳中蓄积以及备选地或另外地在种子的胚中蓄积。

[0064] 按照本发明的一些实施方案,按照选自以下的参数调节裸dsRNA的浓度:种子大小、种子重量、种子体积、种子表面积、种子密度和种子透性。

[0065] 按照本发明的一些实施方案,接触在打破种子休眠和胚出现之前实行。

[0066] 按照本发明的一些实施方案,种子是经引发的种子。

[0067] 按照本发明的一些实施方案,种子或植物包含扩大dsRNA表达的依赖于RNA的RNA聚合酶活性。

[0068] 按照本发明的一些实施方案,种子是杂种种子。

[0069] 按照本发明一些实施方案的一个方面,提供按照本文所述方法可获得的种子。

[0070] 除非另有说明,否则本文所用的所有技术和/或科学术语都具有本发明所属领域普通技术人员通常所理解的含义。虽然类似或等同于本文所述方法和材料的方法和材料可用于本发明实施方案的实践和测试,但下面描述了示例性的方法和/或材料。万一有冲突,则以本专利说明书,包括定义为准。另外,材料、方法和实施例只是说明性的,不必是限制性的。

[0071] 附图简述

[0072] 本文只通过实例,参照附图描述了本发明的一些实施方案。现具体参照详细的附图,要强调的是所显示的细节是通过实例并用于说明性论述本发明实施方案的目的。在这一方面,与附图一起的描述使本领域技术人员明白如何可实施本发明的实施方案。

[0073] 附图中:

[0074] 图1A-C显示在萌发后直到3周水稻苗中CGMMV的dsRNA的稳定性。图1A:在萌发后1周,通过RT-PCR鉴定的dsRNA。上图:L—100 bp DNA梯条带,泳道1-6:未处理对照种子,7-16:处理种子,泳道17:阴性对照(混合物),泳道18:阳性对照(质粒)。下图用作cDNA质量的阳性对照,持家基因—微管蛋白的PCR。图1B:在萌发后2周,通过PCR鉴定的dsRNA。上图:L—DNA梯条带,1-2对照种子,3-12 dsRNA处理种子,13阳性对照(质粒),14-15阴性对照(DDW)。下图显示微管蛋白持家基因的结果。图1C:在萌发后3周,dsRNA的稳定性。上图:L—DNA梯条带,1-4对照种子,5-9 dsRNA处理种子,11阳性对照(质粒),12为阴性对照(混合物)。下图显示微管蛋白持家基因的结果。

[0075] 图2A-B显示分别在萌发后10天和4周,通过RT-PCR对番茄和高粱苗的CGMMV dsRNA的鉴定。图2A:在萌发后10天,CGMMV dsRNA在番茄苗中是稳定的。L—DNA梯条带,1-4:对照种子,5-17:dsRNA处理种子,18-19:阴性对照(DDW),20:PCR阳性对照(质粒)。图2B:在萌发后4周,CGMMV dsRNA在高粱苗中是稳定的。1-2:对照种子,3-6:处理种子,7:阴性对照(DDW)。

[0076] 图3显示在萌发后5周,CGMMV来源的dsRNA不整合到处理水稻种子的基因组中。进行了3个不同的DNA PCR反应:(1)微管蛋白PCR(泳道1-5);1-2是对照植物,3-4是dsRNA处理植物,5是阴性对照(ddW),(2)DNA CGMMV的第一个PCR(泳道6-10);6-7是对照植物,8-9是dsRNA处理植物,10是阳性对照(携带CGMMV序列的质粒),(3)DNA CGMMV的第二个PCR(泳道11-16);11-12是对照植物,13-14是dsRNA处理植物,15是阴性对照(ddW),16是阳性对照(携带CGMMV序列的质粒)。L—100 bp DNA梯条带。

[0077] 图4A-C显示在萌发后7和15天,通过RT-PCR的玉米苗中GUS dsRNA的稳定性。图4A:在萌发后1周,GUS dsRNA在玉米苗嫩枝中是稳定的。L是DNA梯条带,1-5是对照植物,6-8和11-18是dsRNA处理植物,9是阴性对照(ddW),10是阳性对照(质粒)。图4B:在萌发后1周,GUS dsRNA在玉米苗根中是稳定的。1-5是对照植物,6-10是dsRNA处理植物,11是阴性对照(ddW),12是阳性对照(质粒)。图4C:在萌发后15天,GUS dsRNA在玉米苗根中是稳定的。L—DNA梯条带,1是阳性对照(质粒),2是对照植物,3是阴性对照(ddW),4是dsRNA处理植物。

[0078] 图5A-B显示在萌发后1周GUS dsRNA不整合到处理玉米种子的基因组中。上图凝胶显示对GUS基因的DNA PCR:1-3是对照植物,4-6是dsRNA处理植物,7是阳性对照(质粒)。下

图凝胶是用于DNA提取的阳性对照,显示对遍在蛋白基因的DNA PCR:1-3是对照植物,4-6是dsRNA处理植物,7是阴性对照(ddW)。

[0079] 图6显示实验前siGLO的凝胶电泳分析。L—100 bp梯条带,1—5  $\mu$ l的2  $\mu$ M siGLO溶液,2—15  $\mu$ l的2  $\mu$ M siGLO溶液,3—30  $\mu$ l的2  $\mu$ M siGLO溶液。可观察到与20-24 bp的荧光siRNA分子的预期大小相应的条带。

[0080] 图7A-C是显示荧光siRNA分子渗透入各种植物种子中的图像。两个左侧图像显示用荧光siRNA处理的种子,两个右侧图像显示未处理对照种子。荧光图像在种子用2  $\mu$ M浓度的siRNA处理后24小时拍摄。图7A—在10X物镜放大倍数下观察到的拟南芥(*Arabidopsis*)种子,图7B—在5X物镜放大倍数下观察到的水稻种子,图7C—在5X物镜放大倍数下观察到的番茄种子。

[0081] 图8A-C显示在用siGLO dsRNA处理后24小时的水稻种子。该图显示在不同放大倍数下各图像左边的处理种子,边上是对照未处理种子。

[0082] 图9A-F是用siGLO dsRNA处理后48小时切开的水稻种子的光图像和荧光图像。将siGLO处理水稻种子和对照水稻种子切片以使用荧光双目镜观察荧光dsRNA的内部分布。图9A—4粒水稻种子的光形态:底部2个siGLO处理种子,顶部2个未处理种子。图9B—图9A中观察的种子的荧光图像。图9C—siGLO处理水稻种子的荧光图像(见图9A和B左底部)的放大。图9D—未处理水稻种子的荧光图像的放大。图9E—siGLO处理种子的荧光图像的放大,显示与图9C中观察到种子相比更完全的染色模式。图9F—与图9E相比未处理种子的荧光图像的放大。

[0083] 图10A-E是用siGLO dsRNA处理后48小时切开的番茄种子的荧光图像。将siGLO处理番茄种子和对照番茄种子切片,以使用荧光双目镜观察荧光dsRNA的内部分布。图10A—未处理番茄种子的外表面的荧光图像。图10B—siGLO处理番茄种子外表面的荧光图像。图10C—siGLO处理番茄种子外表面切片(见图10B图像的方框)的放大图像。图10D—切开的未处理番茄种子的内表面的荧光图像。图10E—切开的siGLO处理番茄种子的内表面的荧光图像,胚的轮廓清楚可见。

[0084] 图11A-H是用siGLO dsRNA处理后48小时切开的黄瓜种子的荧光图像。将siGLO处理黄瓜种子和对照黄瓜种子切片,以使用荧光双目镜观察荧光dsRNA的内部分布。图11A—siGLO处理黄瓜种子内表面的荧光图像。图11B—未处理黄瓜种子内表面的荧光图像。图11C—E—siGLO处理黄瓜种子内表面的前部、中部和后部(分别)切片的放大图像。在中部切片中可观察到胚的轮廓(图11D)。图11F—H—未处理黄瓜种子内表面的前部、中部和后部(分别)切片的放大图像。

[0085] 图12A-D是用siGLO dsRNA处理后48小时各种植物种的切开种子的荧光图像,包括菜豆、番茄、高粱和小麦。将siGLO处理种子和对照种子切片,以使用荧光双目镜观察荧光dsRNA的内部分布。还拍摄了各种种子的光图像,并与种子的荧光图像放在一起以供参考。两个左侧图像显示dsRNA处理种子,两个右侧图像显示未处理对照种子。图12A显示dsRNA处理菜豆种子和对照菜豆种子的2个实例。图12B显示dsRNA处理番茄种子和对照番茄种子。图12C显示dsRNA处理高粱种子和对照高粱种子。图12D显示dsRNA处理小麦种子和对照小麦种子。

[0086] 图13显示水稻种子的时程siGLO处理结果。测试了用siGLO dsRNA培育时间对荧光

强度(表明dsRNA渗透的数量和质量)的作用。将未经处理(1)的对照种子与用siGLO dsRNA处理4个不同培育时间的种子在一起进行拍照;10分钟(2),3.5小时(3),5.5小时(4)和24小时(5)。

[0087] 图14A-D显示通过dsRNA/siRNA混合物使水稻中的PDS-1基因沉默。图14A—2%琼脂糖凝胶上PDS-1 dsRNA的分析。自左到右:100 bp,dsDNA和dsRNA产物1,在DNase turbo后的dsDNA和dsRNA, DNase turbo和RNase III后的dsDNA和dsRNA,空区和产物2的相同dsDNA和dsRNA。图14B—处理后5天萌发的水稻种子的照片,对照在左边。图14C—处理后7天萌发的水稻种子的照片,对照在下部。图14D—处理后14天种植的水稻种子的照片,红色x表示死的幼苗,对照在左边。

[0088] 图15是显示PDS-1沉默处理导致叶绿素漂白和生长抑制的照片。对照植物(在左边)显示正常着色和生长速率,而处理后30天,PDS沉默的植物(在右边)看上去颜色较浅和尺寸较小,表明叶绿素漂白和生长抑制的迹象。

[0089] 图16A-C显示通过实时PCR测定的PDS-1表达水平。图16A是处理后7天萌发的水稻种子的照片,对照在下部。图16B—处理后5周种植的水稻种子的照片,对照植物在左边,与PDS-1沉默的植物相比,有较暗的绿色。图16C—从对照和PDS-1沉默的植物提取RNA,通过实时PCR检查PDS-1表达水平。UBQ5表达水平用作归一化因子,对照植物中的PDS-1表达水平用作校准子,得到1的值。

[0090] 图17显示处理后5天对照(左)和Hap2e dsRNA处理的(右)萌发种子的根发育无表型差异。这就表明种子处理对种子发芽和最初发育没有任何负作用。

[0091] 图18A-C显示在萌发后5天使用在水稻苗叶片提取的RNA中测试3种不同引物组的RT-PCR,Hap2e(miR169目标基因)的成功的源于dsRNA的表达改变。图18A—用第一引物组的RT-PCR,其中两个引物位于dsRNA分子自身内。图18B—第二引物组,其中正向引物的5'部分在dsRNA中,3'部分在mRNA中,反向引物位于dsRNA之外。图18C—第3引物组,其中引物介于Hap2e基因上的dsRNA分子以外。用所有引物组的结果是一致的,并得到类似的定性数据。5株对照植物的Hap2e表达的平均倍数变化用作参比,并按具有1的值作图。经处理的样品分别作图,相对于对照植物的表达,计算其各自的Hap2e目标基因的倍数变化。与对照相比,9株dsRNA处理植物中5株显示Hap2e减量调节(5/9的处理植物,55.5%的效率)。

[0092] 图19显示在萌发后7天,使用上述图18C的第3引物组,通过对水稻苗叶片提取的RNA的RT-PCR检出的Hap2e(miR169目标基因)最终的源于dsRNA的表达变化。4株对照植物Hap2e表达的平均倍数变化用作阈值参比,并按具有1的值作图。经处理的样品分别作图,相对于对照植物的表达,计算其各自Hap2e目标基因的倍数变化。从总共16株植物中选择6株代表性处理植物,与对照植物一起作图,其4株处理植物显示与对照相比约50%或更高的Hap2e减量调节(4/16等于25%效率),包括1株植物中的完全沉默。

[0093] 图20显示在萌发后18天,通过对水稻苗叶片提取的RNA的RT-PCR检出的Hap2e(miR169目标基因)的源于dsRNA的减量调节。4株对照植物的Hap2e表达的平均倍数变化用作阈值参比,并按具有1的值作图(以红色条形柱显示)。经处理的样品分别作图,相对于对照植物的表达,计算其各自Hap2e目标基因的倍数变化。16株处理植物中11株显示一些Hap2e减量调节(以蓝色条形柱显示),其中8株显示与对照相比超过25%的Hap2e减量调节(8/16等于50%效率)。

[0094] 图21显示在萌发后10天对从对照和NFY dsRNA处理玉米种子中提取的RNA的RT-PCR的结果。对对照植物中NFY目标基因的表达水平取平均,并记作“1”用于dsRNA处理植物中观察到的比较参比。图中出现的8株处理植物中4株显示50%或更多的NFY减量调节(4/8, 50%的效率)。

[0095] 图22显示在萌发后3周,对自对照和NFY dsRNA处理番茄种子中提取的RNA的RT-PCR的结果。对8株对照植物(以红色显示)中NFY目标基因的表达水平取平均,并记作“1”用于dsRNA处理植物中所观察的(以蓝色条形柱显示)的比较参比。相对于对照植物,以23%效率(6/26)成功实现处理植物中40%或更多的减量调节。

[0096] 图23A-B显示在接种后55天对照和NFY dsRNA处理番茄植物的高度分布。图23A表示对照植物的高度分布(蓝色条形柱),图23B显示处理植物的高度分布(黄色条形柱)。

[0097] 图24显示在接种后55天对照和NFY dsRNA处理番茄植物的主要表型差异。对照植物见于各照片的左边,处理植物在右边。与对照植物相比,在较矮的处理植物中发育迟缓明显。上部照片是侧面图,下部照片是同一植物的顶视图。

[0098] 图25显示在萌发后10天自对照和NAC dsRNA处理玉米种子中提取的RNA的RT-PCR结果。对对照植物中NAC目标基因的表达水平取平均,并记作“1”用于dsRNA处理植物中所观察的比较参比。所有14株dsRNA处理植物显示NAC基因减量调节,其中1株植物显示基因完全沉默(#8)。

[0099] 图26A-B显示在萌发后18天,使用用随机引物(图26A)或寡dT(图26B)制备的cDNA,对自对照和ARF-8 dsRNA处理的水稻种子中提取的RNA的RT-PCR的结果。对9-10株对照植物中ARF-8目标基因的表达水平取平均,并记作“1”用于dsRNA处理植物所观察的比较参比。在图26A中,4株植物显示超过26%的ARF-8基因减量调节,在图26B中,7株植物显示超过50%的ARF-8基因减量调节。

[0100] 图27显示在处理5天,对照(上排)和SPL17 dsRNA处理(下排)的萌发水稻种子的根发育中无表型差异。

[0101] 图28A-B显示在萌发后5天对自对照叶片和SPL17(miR156目标基因)dsRNA处理水稻苗叶片中提取的RNA测试的2种不同引物组的RT-PCR结果。图28A—使用第一引物组的RT-PCR,其中两个引物位于dsRNA分子自身内。图28B—第二引物组,其中引物位于dsRNA分子之外的SPL17 ORF上。5株对照植物SPL17表达的平均倍数变化用作阈值参比,并按具有1的值作图。经处理的样品分别作图,相对于对照植物表达,计算其各自的SPL17目标基因的倍数变化。表明了引物组# 1可扩增内源序列和引入植物的dsRNA分子两者,而引物组# 2仅可扩增内源序列。

[0102] 图29显示在萌发后14周,自对照和SPL17(miR156目标基因)dsRNA处理水稻植物叶片中提取的RNA的RT-PCR结果。4株对照植物SPL17表达的平均倍数变化用作阈值参比,并按具有1的值作图。经处理的样品分别作图,相对于对照植物表达,计算其各自的SPL17目标基因的倍数变化。观察到高达90%的SPL17基因表达减量调节。10株dsRNA处理植物中7株显示超过65%的SPL17减量调节(7/10, 70%的效率)。

[0103] 图30A-B显示在植物中在萌发后3周和8周(分别为图30A和30B),自对照和ARF8(miR167目标基因)dsRNA处理番茄种子叶片中提取的RNA的RT-PCR结果。对8或20株对照植物(分别为图30A和30B)中ARF-8目标基因的表达水平取平均,并记作“1”用于dsRNA处理植物

所观察的比较参比。图30A—对每个个别的植物在萌发后3周对照(以红色条形柱显示)和dsRNA处理(以蓝色条形柱显示)番茄植物中ARF8表达的倍数变化作图,以表明dsRNA处理植物中ARF-8表达的大的变异。图中显示的8株处理植物中5株显示超过40%的ARF-8减量调节(5/8,62.5%的效率),图30B—与图30A中发芽后8周的番茄植物相同。图中显示的9株处理植物中6株显示超过30%的ARF-8减量调节(6/9,66.7%的效率)。

[0104] 图31A-D显示在处理55(图31A)、62(图31B)和72天(图31C),对照(蓝色条形柱)和ARF8 dsRNA处理的(栗色条形柱)番茄植物中高度的具体分布。图31D显示在处理62天与处理植物相比的对照植物的平均高度。

[0105] 图32A-B显示在种子处理后55(图32A)和72天(图32B),对照和ARF8 dsRNA处理植物的表型差异。对照植物见于各照片的左边,处理植物见于右边。在图32A中,上部照片是侧面图,下部照片是同一植物的顶视图。与同龄对照植物相比,处理植物较矮,分枝较多。

[0106] 图33A-B显示在萌发后9周自对照和FW2.2 dsRNA处理番茄植物的叶中提取的RNA的RT-PCR结果。图33A显示对照(以红色条形柱显示)和dsRNA处理(以蓝色条形柱显示)植物中FW2.2表达的倍数变化,对每个个别的植物作图以表明2个植物组中FW2.2基因表达水平的变异。图33B显示与处理植物(蓝色条形柱)相比,对照(红色条形柱)中FW2.2的平均表达。与对照植物相比,处理植物中FW2.2基因表达水平的减量调节明显。

[0107] 图34显示在处理72天对照和FW2.2 dsRNA处理植物之间无表型差异。对照植物(在左边)和dsRNA处理植物(在右边)两者平均起来具有相同高度,并显示类似的物理性质。

[0108] 图35A-B显示与对照植物(图35A)相比,自针对De11a基因处理的水稻种子生长的水稻苗(图35B)中根系较长和较发达。

[0109] 图36A-B显示当苗在无氮生长培养基中生长时,与对照植物(图36A)相比,在自针对NRR基因处理的水稻种子生长的水稻苗(图36B)中根系和茎轴系较长和较发达。

[0110] 图37A-C显示在萌发后18天,自对照水稻种子和用含有用于减量调节3种内源基因Hap2e、De11a和SQS的dsRNA分子的混合物处理的种子的叶片提取的RNA的RT-PCR结果(使用寡dT)。每个个别基因的表达水平以8株对照植物(以红色条形柱显示)取平均,并用作阈值参比(取1的值)用于处理植物的表达。对经处理的样品(以蓝色条形柱显示)分别作图,相对于对照植物的表达,计算其各自的各个目标基因表达水平的倍数变化。图37A—Hap2e基因的RT-PCR表达结果,图37B—De11a基因的RT-PCR表达结果,图37C—SQS基因的RT-PCR表达结果。在dsRNA处理植物中所有基因的减量调节明显,其范围为30%–100%(完全沉默)表达降低。

[0111] 图38A-D是显示荧光siRNA分子(红色,siGlo)渗透入番茄种子中的共焦图像。细胞核用Hoechst 33342(蓝色)染色。图38A和38C中显示用荧光siRNA处理的种子,而图38B和38D中显示未处理对照种子。图38A-B是荧光图像,而图38C-D显示透射光图像。在种子用终浓度为1  $\mu$ M的siRNA处理24小时时拍摄图像。

[0112] 图39A-D在种子处理之前(图39A和C)和之后(图B和D)、SPL (SEQ ID NO: 126,图39A和B)和GUS (SEQ ID NO: 21,图39C和D) dsRNA的HPLC分析的曲线图。箭头标明ssRNA和dsRNA。

[0113] 图40A-B是显示自用50  $\mu$ g/ml dsRNA处理24小时的种子萌发的17日龄番茄植物中SPL mRNA表达的实时PCR分析的柱状图。图40A显示在用SPL(蓝色条形柱,SEQ ID NO:

126)、GUS (红色条形柱,SEQ ID NO: 21)和FW2.2 (绿色条形柱,SEQ ID NO: 114) dsRNA处理后SPL mRNA表达的倍数变化。每个条形柱表示1株植物。将每个个别植物的表达值归一化至用GUS dsRNA处理的所有植物的表达中位值。图40B显示图40A中所示数据的中位值。对于相对于GUS的对照SPL表达水平的差异,p值=0.02,和对于相对于FW2.2对照SPL表达水平的差异,p值=0.07。误差条表示数据的标准差。

[0114] 图41A-B是显示自用50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA处理6小时的种子萌发的18日龄番茄植物中SPL mRNA表达的实时PCR分析的柱状图(dsRNA与图40A-B中一样)。图41A显示在用SPL dsRNA处理后SPL mRNA表达的倍数变化,为此GUS dsRNA处理用作对照基线。每个条形柱表示1株植物。将每个个别植物的表达值归一化至用GUS dsRNA处理的所有植物的表达中位值。图41B显示图41A中所示数据的中位值。表达相对于对照组的变化是显著的(p值=0.012)。误差条表示数据的标准差。

[0115] 图42A-B是显示自用50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA处理2小时的种子萌发的18日龄番茄植物中SPL mRNA表达的实时PCR分析的柱状图(dsRNA与图40A-B中一样)。图42A显示在用SPL dsRNA处理后SPL mRNA表达的倍数变化,为此GUS dsRNA处理用作对照基线。每个条形柱表示1株植物。将每个个别植物的表达值归一化至用GUS dsRNA处理的所有植物的表达中位值。图42B显示图42A中所示数据的中位值。表达相对于对照组的变化是显著的(p值=0.0015)。误差条表示数据的标准差。

[0116] 图43A-B是显示自用50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA处理10分钟种子萌发的18日龄番茄植物中SPL mRNA表达的实时PCR分析的柱状图(dsRNA与图40A-B中一样)。图43A显示在用SPL dsRNA处理后SPL mRNA表达的倍数变化,为此GUS dsRNA处理用作对照基线。每个条形柱表示1株植物。将每个个别植物的表达值归一化至用GUS dsRNA处理的所有植物的表达中位值。图43B显示图43A中所示数据的中位值。表达相对于对照组的变化是显著的(p值=0.0035)。误差条表示数据的标准差。

[0117] 图44A-B是显示自浸入50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA溶液中的种子萌发的13日龄番茄植物中SPL mRNA表达的实时PCR分析的柱状图(dsRNA与图40A-B中一样)。图44A显示在用SPL dsRNA处理后SPL mRNA表达的倍数变化,为此GUS dsRNA处理用作对照基线。每个条形柱表示1株植物。将每个个别植物的表达值归一化至用GUS dsRNA处理的所有植物的表达中位值。图44B显示图44A中所示数据的中位值。表达相对于对照组的变化是显著的(p值=0.017)。误差条表示数据的标准差。

[0118] 图45A-B是显示自用25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA处理24小时的种子萌发的17日龄番茄植物中SPL mRNA表达的实时PCR分析的柱状图(dsRNA与图40A-B中一样)。图45A显示在用SPL dsRNA处理后SPL mRNA表达的倍数变化,为此GUS dsRNA处理用作对照基线。每个条形柱表示1株植物。将每个个别植物的表达值归一化至用GUS dsRNA处理的所有植物的表达中位值。图45B显示图45A中所示数据的中位值。表达相对于对照组的变化是显著的(p值=0.049)。误差条表示数据的标准差。

[0119] 图46A-B是显示自用25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA处理2小时的种子萌发的18日龄番茄植物中SPL mRNA表达的实时PCR分析的柱状图(dsRNA与图40A-B中一样)。图46A显示在用SPL dsRNA处理后SPL mRNA表达的倍数变化,为此GUS dsRNA处理用作对照基线。每个条形柱表示1株植物。将每个个别植物的表达值归一化至用GUS dsRNA处理的所有植物的表达中位

值。图46B显示图46A中所示数据的中位值。表达相对于对照组的变化是显著的( $p$ 值=0.0062)。误差条表示数据的标准差。

[0120] 图47A-B是显示自用25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA处理10分钟种子中萌发的18日龄番茄植物中SPL mRNA表达的实时PCR分析的柱状图(dsRNA与图40A-B中一样)。图47A显示在用SPL dsRNA处理后SPL mRNA表达的倍数变化,为此GUS dsRNA处理用作对照基线。每个条形柱表示1株植物。将每个个别植物的表达值归一化至用GUS dsRNA处理的所有植物的表达中位值。图47B显示图47A中所示数据的中位值。误差条表示数据的标准差。

[0121] 图48A-B是显示自用1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA处理24小时的种子萌发的17日龄番茄植物中SPL mRNA表达的实时PCR分析的柱状图(dsRNA与图40A-B中一样)。图48A显示在用SPL dsRNA处理后SPL mRNA表达的倍数变化,为此GUS dsRNA处理用作对照基线。每个条形柱表示1株植物。将每个个别植物的表达值归一化至用GUS dsRNA处理的所有植物的表达中位值。图48B显示图48A中所示数据的中位值。误差条表示数据的标准差。

[0122] 图49A-B是显示自用1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA处理2小时的种子萌发的18日龄番茄植物中SPL mRNA表达的实时PCR分析的柱状图(dsRNA与图40A-B中一样)。图49A显示在用SPL dsRNA处理后SPL mRNA表达的倍数变化,为此GUS dsRNA处理用作对照基线。每个条形柱表示1株植物。将每个个别植物的表达值归一化至用GUS dsRNA处理的所有植物的表达中位值。图49B显示图49A中所示数据的中位值。误差条表示数据的标准差。

[0123] 图50A-B是显示自用1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA处理10分钟种子萌发的18日龄番茄植物中SPL mRNA表达的实时PCR分析的柱状图(dsRNA与图40A-B中一样)。图50A显示在用SPL dsRNA处理后SPL mRNA表达的倍数变化,为此GUS dsRNA处理用作对照基线。每个条形柱表示1株植物。将每个个别植物的表达值归一化至用GUS dsRNA处理的所有植物的表达中位值。图50B显示图50A中所示数据的中位值。误差条表示数据的标准差。

[0124] 图51A-B是显示自用50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  siRNA处理2小时的种子萌发的13日龄番茄植物中SPL mRNA表达的实时PCR分析的柱状图(dsRNA与图40A-B中一样)。图51A显示用SPL siRNA处理后SPL mRNA表达的倍数变化,为此GUS siRNA处理用作对照基线。将每个个别植物的表达值归一化至用GUS siRNA处理的所有植物的表达中位值。图51B显示图51A中所示数据的中位值。相对于对照组的表达变化的 $p$ 值为0.12。误差条表示数据的标准差。

[0125] 图52是显示处理前FW2.2 ssRNA/dsRNA (SEQ ID NO: 114)混合物的HPLC分析的曲线图。箭头标明ssRNA和dsRNA级分。

[0126] 图53A-B是显示自用50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA处理24小时的种子萌发的17日龄番茄植物中FW2.2 mRNA表达的实时PCR分析的柱状图。图53A显示在用FW2.2 dsRNA (SEQ ID NO: 114)处理后FW2.2 mRNA表达的倍数变化,为此GUS dsRNA (SEQ ID NO: 21)处理用作对照基线。每个条形柱表示1株植物。将每个个别植物的表达值归一化至用GUS dsRNA处理的所有植物的表达中位值。图53B显示图53A中所示数据的中位值。FW2.2表达相对于对照组的变化是显著的( $p$ 值=0.024)。误差条表示数据的标准差。

[0127] 图54A-B是显示自用50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA处理6小时的种子萌发的18日龄番茄植物中FW2.2 mRNA表达的实时PCR分析的柱状图(dsRNA与图53A-B中一样)。图54A显示在用FW2.2 dsRNA处理后FW2.2 mRNA表达的倍数变化,为此GUS dsRNA处理用作对照基线。每个条形柱表示1株植物。将每个个别植物的表达值归一化至用GUS dsRNA处理的所有植物的表达中位

值。图54B显示图54A中所示数据的中位值。FW2.2表达相对于对照组的变化的p值为0.1。误差条表示数据的标准差。

[0128] 图55A-B是显示自用50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA处理2小时的种子萌发的18日龄番茄植物中FW2.2 mRNA表达的实时PCR分析的柱状图(dsRNA与图53A-B中一样)。图55A显示在用FW2.2 dsRNA处理后FW2.2 mRNA表达的倍数变化,为此GUS dsRNA处理用作对照基线。每个条形柱表示1株植物。将每个个别植物的表达值归一化至用GUS dsRNA处理的所有植物的表达中位值。图55B显示图55A中所示数据的中位值。FW2.2表达相对于对照组的变化是显著的(p值=0.049)。误差条表示数据的标准差。

[0129] 图56A-B是显示自用142  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA处理24小时的13日龄水稻植物中DELLA mRNA表达的实时PCR分析的柱状图。图56A显示在用DELLA dsRNA (SEQ ID NO: 123)处理后DELLA mRNA表达的倍数变化,为此GUS dsRNA (SEQ ID NO: 21)处理用作对照基线。每个条形柱表示1株植物。将每个个别植物的表达值归一化至用GUS dsRNA处理的所有植物的表达中位值。图56B显示图56A中所示数据的中位值。DELLA表达相对于对照组的变化是显著的(p值= $6.28 \times 10^{-4}$ )。误差条表示数据的标准差。

[0130] 图57是显示在处理3天后萌发小麦种子的图像。上一用0.1mM EDTA处理的对照种子,中一用GUS dsRNA (SEQ ID NO: 21)处理的对照种子,下一用PDS dsRNA (SEQ ID NO: 44和45)处理的种子。

[0131] 图58A-B是显示自用25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA处理24小时的种子萌发的7.5周龄玉米植物中TB1 mRNA表达的实时PCR分析的柱状图。图58A显示在用TB1 dsRNA (SEQ ID NO: 145)和作为对照的CGMMV dsRNA (SEQ ID NO: 8和11)处理后TB1 mRNA表达的倍数变化。每个条形柱表示1株植物。将每个个别植物的表达值归一化至用CGMMV dsRNA处理的所有植物的表达中位值。图58B显示图58A中所示数据的中位值。TB1表达相对于CGMMV对照的变化的p值为0.065。误差条表示数据的标准差。

[0132] 图59A-C是显示自用50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA处理24小时的种子萌发的5日龄玉米嫩枝和12日龄叶片的NAC mRNA表达的实时PCR分析的柱状图。图59A—在用dsRNA (NAC和GUS分别为SEQ ID NO: 83和21)处理后放入萌发箱的种子。图59B—用dsRNA处理后经洗涤和干燥的种子。GUS dsRNA用作对照。每个圆点表示一株植物。图59C—自以与图59A和59B中相同的方式处理的种子萌发并种植在土壤中的12日龄玉米叶中NAC mRNA表达的实时PCR分析。注意在萌发后5天NAC mRNA增量调节,此后减量调节。

[0133] 图60A-D是显示自用50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA处理24小时的种子萌发的1周龄和2周龄莴苣植物中HY5 mRNA表达的实时PCR分析的示图。图60A显示在用HY5.5 dsRNA (SEQ ID NO: 156)、HY5.6 dsRNA (SEQ ID NO: 160)或两种的混合物(1:1,共50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )处理后1周龄植物中HY5.5 mRNA的表达水平。GUS dsRNA (SEQ ID NO: 21)或0.1mM EDTA (缓冲液)用作对照。每个圆点表示一株植物。图60B显示在用HY5.5 dsRNA、HY5.6 dsRNA或两种的混合物处理后1周龄植物中HY5.6 mRNA的表达水平。GUS dsRNA或0.1mM EDTA (缓冲液)用作对照。每个圆点表示一株植物。图60C显示在用HY5.5 dsRNA (SEQ ID NO: 156)、HY5.6 dsRNA (SEQ ID NO: 160)或两种的混合物(1:1,共50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )处理后2周龄植物中HY5.5 mRNA的表达水平。GUS dsRNA (SEQ ID NO: 21)、DHFR dsRNA (SEQ ID NO: 167)或0.1mM EDTA (缓冲液)用作对照。每个圆点表示一株植物。图60D显示在用HY5.5 dsRNA (SEQ ID NO: 156)、HY5.6

dsRNA (SEQ ID NO: 160) 或两种的混合物 (1:1, 共50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 处理后2周龄植物中HY5.6 mRNA的表达水平。GUS dsRNA (SEQ ID NO: 21)、DHFR dsRNA (SEQ ID NO: 167) 或0.1mM EDTA (缓冲液) 用作对照。每个圆点表示一株植物。

[0134] 图61是显示自用50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA (SEQ ID NO: 167) 处理24小时的种子萌发的1周龄莴苣植物中DHFR mRNA表达的实时PCR分析的示意图。GUS dsRNA (SEQ ID NO: 21) 或0.1mM EDTA (缓冲液) 用作对照。每个圆点表示一株植物。

[0135] 图62A-B显示用DND1 dsRNA处理的黄瓜种子的作用。图62A是显示自用100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA (SEQ ID NO: 171和172) 处理24小时的种子萌发的15日龄黄瓜植物中DND1 mRNA表达的实时PCR分析的示意图。GUS dsRNA (SEQ ID NO: 21) 或0.1mM EDTA (制剂) 用作对照。每个圆点表示一株植物。图62B显示用DND1 dsRNA处理种子后11天黄瓜根的百分比瘿瘤评级。GFP dsRNA和0.1 mM EDTA (制剂) 为对照处理。

[0136] 图63是显示自用100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA (SEQ ID NO: 180和181) 处理24小时的种子萌发的15日龄黄瓜植物中PMR5 mRNA表达的实时PCR分析的示意图。GFP dsRNA (SEQ ID NO: 176) 或0.1mM EDTA (制剂) 用作对照。每个圆点表示一株植物。

[0137] 图64是显示自用100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA (SEQ ID NO: 185和186) 处理24小时的种子萌发的15日龄黄瓜植物中TubG mRNA表达的实时PCR分析的示意图。GFP dsRNA (SEQ ID NO: 176) 或0.1mM EDTA (制剂) 用作对照。每个圆点表示一株植物。

[0138] 图65是显示自用100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA (SEQ ID NO: 24和25) 处理24小时的种子萌发的15日龄番茄植物中DND1 mRNA表达的实时PCR分析的示意图。GFP dsRNA (SEQ ID NO: 176) 或0.1mM EDTA (制剂) 用作对照。每个圆点表示一株植物。

[0139] 图66是显示自用100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA (SEQ ID NO: 32) 处理24小时的种子萌发的15日龄番茄植物中PMR5 mRNA表达的实时PCR分析的示意图。GFP dsRNA (SEQ ID NO: 176) 或0.1mM EDTA (制剂) 用作对照。每个圆点表示一株植物。

[0140] 图67是显示自用100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA (SEQ ID NO: 37和38) 处理24小时的种子萌发的15日龄番茄植物中MLO mRNA表达的实时PCR分析的示意图。GFP dsRNA (SEQ ID NO: 176) 或0.1mM EDTA (制剂) 用作对照。每个圆点表示一株植物。

[0141] 图68是显示自用Bi1 (SEQ ID NO: 42和43) 和PMR5 (SEQ ID NO: 198) dsRNA处理的种子萌发的15日龄番茄植物中白粉病的平均百分比的柱状图。GFP dsRNA用作对照。

[0142] 图69是显示自用50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA (SEQ ID NO: 190和194) 处理24小时的种子萌发的1周龄大豆植物中PHYAE3 mRNA表达的实时PCR分析的示意图。GUS dsRNA (SEQ ID NO: 21) 用作对照。每个圆点表示一株植物。

[0143] 本发明具体实施方案的描述

[0144] 本发明在其一些实施方案中涉及将dsRNA导入植物种子以调节基因表达的方法。

[0145] 在详细解释本发明的至少一个实施方案之前, 要了解本发明不必将其应用局限于下面的描述中所提供的或通过实施例所例示的细节。本发明能够以各种方式实施或进行其它的实施方案。

[0146] 随着世界人口的大量增长及植物生长和栽培产地有限, 在这些变换的条件下迫切需要提高植物产量。

[0147] RNAi已显现为调节基因表达的有力工具, 其可用于产生胁迫耐受性改进的植物。

[0148] 在植物中,通常通过产生过量表达经转录产生dsRNA的DNA片段的转基因植物来进行RNAi。这种dsRNA然后被加工成siRNA,siRNA通常通过RNA诱导沉默复合体(RISC)或通过翻译抑制而靶向目标基因切割,来介导目标基因的沉默。

[0149] 这项技术的主要技术限制是许多重要的植物作物种难以或不可能转化,阻碍了指导dsRNA产生的构建体的组成型表达。而且,有关抗病毒转基因植物潜在的生态影响的问题迄今为止严重限制了它们的应用[Tepfer, 2002, Annu. Rev. Phytopathol. 40, 467-491]。

[0150] 本发明人现已设计出将dsRNA分子直接引入植物种子中的新的技术。这些dsRNA进入种子,并开始在植物的生命周期内持续的沉默过程,产生具有改良的目标性状的植物。被引入的dsRNA是裸露的,因此没有外源转录调节元件被引入植物中,因此减少了与转基因植物相关的环境顾虑。另外,修饰种子可萌发生成植物而不需要进行费力和繁重的组织培养再生步骤。

[0151] 如下文和接下来的实施例部分中的描述,本发明人能够设置将裸dsRNA引入种子所必需的条件(参见例如实施例1)。裸dsRNA不整合至基因组中,并且在植物中和在溶液中十分稳定(实施例2-4)。裸dsRNA通过单子叶植物和双子叶植物两者的种皮(即testa)渗入,并分布在种子的胚乳和胚中(实施例5-6)。本发明人能够改变内源基因(实施例7-14)以及外源病毒基因(实施例2)的表达。这些结果在单子叶植物和双子叶植物组两者中的许多植物中再现。因此本发明人能够提供导致基因表达显著改变的大范围的剂量和动力学(参见例如实施例23-29)。这些结果在小麦中被进一步确定,并通过显示萌发延迟的生物作用来证实(实施例30)。在引入用于不同目标的dsRNA后,基因表达在玉米中改变(实施例31和32)。用dsRNA处理的其它蔬菜包括黄瓜和莴苣(实施例33-37)。本发明人还能够显示在另一种经济作物即大豆中的基因表达改变(参见实施例42)。因此,本发明的结果足以表明本发明的教导提供有成本效益的植物种子的处理以获得所需的农业和园艺表型。不受理论束缚,认为新提出的转化形式和基因表达的调节取决于并与以下有关:

[0152] (i) 将裸dsRNA引入种子内部(与仅种皮相对)。通过将种子浸泡在包含dsRNA的溶液中使得dsRNA通过种皮渗入,或者通过浸渍使得dsRNA涂布种子并在播种后通过种皮渗入,来实行引入;

[0153] (ii) dsRNA信号的扩增;和

[0154] (iii) dsRNA信号扩散在整株植物中。

[0155] 第一步只在最初的种子处理期间和种子处理后不久发生一次,而第二步和第三步以重复回路发生,只要沉默信号在植物中保持活性。

[0156] 所述发明的一种提议的无约束作用方式基于以下各个步骤:

[0157] 将dsRNA引入种子中

[0158] 一个典型的成熟种子由包裹在母本种皮(testa)内的胚和胚与种皮之间大量的胚乳组织层组成。胚乳在种子发育、萌发和幼苗建植期间用作胚的营养源。

[0159] 种子萌发通常始于将种子暴露于水中,水被胚和胚乳吸收。然后胚乳的体积膨大,一些植物种的胚乳能够生长到其最初体积的数倍。休眠直到该阶段的胚,此时从休眠中解除,开始细胞分裂、增殖和分化。胚乳为发育中的胚提供养分,直到它发育到足以开始光合作用和自养生长。

[0160] 根据这些种子萌发的已知机制,提出了“将dsRNA引入种子中”的初始步骤的两种可能的作用方式:

[0161] dsRNA分子被用于种子处理的基于水的溶液携带直接进入胚中。

[0162] dsRNA分子作为胚乳吸水过程的一部分进入胚乳。这些分子随后在萌发和种子发育期间,在胚发育时作为来自胚乳的养分流的一部分供给胚。

[0163] 根据图7-13所述结果,估计发生两种选择的组合。也就是说,dsRNA中的一些直接进入胚中,一些保留在胚乳中,并在种子萌发期间供给发育中的胚。

[0164] dsRNA信号的扩增

[0165] 一旦dsRNA分子进入胚中,则被RNA酶III样酶例如Dicer或Dicer样(DCL)酶识别和加工。DCL酶将长的dsRNA分子加工成短的双链RNA(称为siRNA或shRNA),其通常为21-24个核苷酸(nt)长。siRNA链之一通常快速降解,第二链可掺入RISC(RNA诱导沉默复合体)蛋白质复合体中,所述复合体含有Argonaute(AGO)蛋白。AGO蛋白含有结合siRNA的PIWI结构域和具有RNA酶活性的PAZ结构域。随后,siRNA/AGO复合体识别与siRNA互补的mRNA分子,并通过切割或翻译抑制导致其沉默。

[0166] siRNA然后从RISC复合体中释放,此时可用作依赖RNA的RNA聚合酶(RDRP)的引物,所述酶是一种植物界特有的酶,可通过产生新的dsRNA分子(第二siRNA),来产生扩增的沉默信号。这些新合成的dsRNA可再次如上文所述加工,因此维持和扩增沉默信号。

[0167] 沉默信号的扩散

[0168] 沉默扩散在植物中是已知的和被充分认识的现象。短距离的细胞到细胞的扩散被认为是通过胞间连丝而发生。这个过程被认为由21nt长的作为DCL酶的产物的siRNA介导。此外,通过穿过整株植物的韧皮部从源到库(sink)实现系统扩散。

[0169] 假设在所述方法中,一旦沉默信号开始并如上所述扩增,则发生沉默信号的扩散。这可包括通过各种siRNA信号分子的短距离扩散和系统扩散两者。

[0170] 因此按照本发明的一方面,提供将裸露的双链RNA(dsRNA)引入种子中的方法,所述方法包括在允许dsRNA渗透入种子的条件下使种子与裸dsRNA接触,从而将dsRNA引入种子中。

[0171] 本文所用短语“裸dsRNA”是指在植物细胞中不可转录的dsRNA核酸分子。因此,裸dsRNA分子不包含在核酸表达构建体(例如病毒载体)中。按照本发明的一些实施方案,裸dsRNA分子不来源于病毒载体。按照一些实施方案,dsRNA不是天然病毒感染的产物。按照一些实施方案,裸dsRNA可包含用于体外转录的调节元件,例如T7启动子。按照本发明的一些实施方案,裸dsRNA可被修饰例如化学修饰以赋予较高的生物利用度、渗透入种子中和/或延长的保存期限。

[0172] 本文所用术语“dsRNA”涉及通过碱基配对保持在一起的反向平行的聚核糖核酸的二条链。两条链可以是相同长度或不同长度,只要以超过全长至少80%、90%、95%或100%互补性形成的双链结构的两条链之间有足够的序列同源性。按照本发明的一个实施方案,dsRNA分子没有突出端。按照本发明的另一个实施方案,dsRNA分子包含突出端。按照其它的实施方案,使链对齐,使得不对齐的(即相对链上不存在互补的碱基)的链的末端有至少1、2或3个碱基,使得当链退火时,双链体的一端或两端存在1、2或3个残基的突出端。

[0173] 所述任何dsRNA分子可按照本发明的教导使用,只要通过依赖RNA的RNA聚合酶

(RDRP) 进行扩增。

[0174] 本发明的教导涉及不同长度的dsRNA,其中较短的形式即x短于或等于50 bp (例如17-50),被称为siRNA或miRNA。51-600个较长的dsRNA分子在本文被称为dsRNA,其可被进一步加工用于siRNA分子。

[0175] 术语“siRNA”是指诱导RNA干扰(RNAi)途径的小的抑制性RNA双链体(通常介于17-30个碱基对之间,但也有较长的碱基对例如31-50 bp)。通常,siRNA以化学方法合成作为21聚体,其具有中心19 bp双链体区和末端上对称的2碱基3'-突出端,尽管最近描述了与在相同位置的21聚体相比,长为25-30个碱基的化学合成的RNA双链体的效能可增加多达100倍。据推理,在触发RNAi中使用较长RNA所获得的实测效能的增加产生于给Dicer提供底物(27聚体)而不是产物(21聚体),而且这提高了siRNA双链体进入RISC的速率或效率。

[0176] 已发现,3'-突出端的位置影响siRNA的效能,且在反义链上具有3'-突出端的不对称双链体一般比有义链上具有3'-突出端的那些更有效(Rose等,2005)。这可归因于加载入RISC的不对称链,因为当靶向反义转录物时,观察到相反的功效模式。

[0177] 双链干扰RNA(例如siRNA)的链可连接形成发夹或茎环结构(例如shRNA)。因此,如所提及的,本发明的一些实施方案的RNA沉默剂也可为短发夹RNA(shRNA)。

[0178] 本文所用术语“shRNA”是指这样的RNA剂,即具有茎环结构、包含互补序列的第一和第二区域、区域的互补程度和取向足够使得区域之间发生碱基配对、第一区域和第二区域通过环区域连接、环因环区域内核苷酸(或核苷酸类似物)之间缺乏碱基配对所引起。环中核苷酸的数目介于3-23或5-15或7-13或4-9或9-11之间并包括3、23或5、15或7、13或4、9或9、11。环中的一些核苷酸可参与与环中其它核苷酸的碱基对的相互作用。可用来形成环的寡核苷酸序列的实例包括5'-UUCAAGAGA-3'(Brummelkamp, T. R.等(2002) Science 296: 550, DEQ ID NO: 22)和5'-UUUGUGUAG-3'(Castanotto, D.等(2002) RNA 8:1454, SEQ ID NO: 23)。本领域技术人员应认识到,所得的单链寡核苷酸形成包含能够与RNAi机器相互作用的双链区域的茎-环或发夹结构。

[0179] 本文所用短语“微小RNA(本文亦可互换称为“miRNA”或“miR”)或其前体”是指用作转录后调节物的微小RNA(miRNA)分子。通常,miRNA分子是长度约20-22核苷酸的RNA分子,其可加载至RISC复合体中,并且直接切割另一种RNA分子,其中其它RNA分子包含与miRNA分子的核苷酸序列基本互补的核苷酸序列。

[0180] 通常,miRNA分子自“pre-miRNA”或如本文所述的pre-miRNA分子的前体被存在于任何植物细胞中的蛋白质(例如DCL蛋白)加工,并加载至RISC复合体中,在所述复合体中可指导目标RNA分子的切割。

[0181] Pre-微小RNA分子通常自pri-微小RNA分子(初级转录物)加工。侧接pre-微小RNA的单链RNA区段对于pri-miRNA加工成pre-miRNA是重要的。切割位点似乎取决于距茎-ssRNA连接点的距离(Han等,2006, Cell 125, 887-901, 887-901)。

[0182] 本文所用的“pre-miRNA”分子是可呈二级结构的约100-约200个核苷酸,优选约100-约130个核苷酸的RNA分子,该二级结构包含不完整的双链RNA茎和单链RNA环(亦称为“发夹”),并且还包含双链RNA茎中miRNA(及其互补序列)的核苷酸序列。根据一个具体的实施方案,miRNA及其互补序列位于距miRNA双链RNA茎的游离端约10-约20个核苷酸。单链环区域的长度和序列不是决定性的,可相当大地在长度例如30和50 nt之间变化。miRNA与

其互补序列之间的互补性不必是完全的,可容许约1-3个不配对核苷酸的凸出。可通过本领域的常规计算机算法(例如mFOLD)预测RNA分子所采取的二级结构。来自被DCL活性释放并加载至RISC复合体中的pre-miRNA的双链RNA茎的特定链取决于5'端的互补程度,籍此在该链(其在5'端上最少参与被切割的dsRNA茎的不同链的核苷酸之间的氢键结合)被加载至RISC复合体中,并决定目标RNA分子降解的序列特异性。然而,如果来自特定合成的pre-miRNA分子的miRNA分子凭经验不是功能性的(因为“错误”链加载至RISC复合体中),则可通过交换pre-miRNA分子的dsRNA茎各个链上的miRNA分子及其互补序列的位置来解决这个问题,这将是极显然的。如本领域已知,涉及两个氢键结合的A和U或涉及两个氢键结合的G和U之间的结合没有涉及3个氢键结合的G和C的强。下表1-8提供示例性的发夹序列。

[0183] 天然存在的miRNA分子可包含在其天然存在的pre-miRNA分子中,但也可通过交换自所述现有pre-miRNA分子正常加工的miRNA分子的核苷酸序列为另一目标miRNA的核苷酸序列,将它们引入现有的pre-miRNA分子支架。pre-miRNA的支架也可以是完全合成的。同样地,合成miRNA分子可包含在现有的pre-miRNA分子支架或合成的pre-miRNA支架内,并自其加工。对于其正确加工成设计的微小RNA的效率,特别是当作为嵌合基因(其中除pre-微小RNA以外其它DNA区域例如非翻译前导序列或转录终止和聚腺苷酸化区域被掺入初级转录物中)表达时,相对于其它pre-miRNA支架,一些pre-miRNA支架可能是优选的。

[0184] 根据本发明的教导,dsRNA分子可以是天然存在的或合成的。

[0185] dsRNA可以是长和短dsRNA分子的混合物,例如dsRNA、siRNA、siRNA+dsRNA、siRNA+miRNA或所述这些的组合。根据一个具体的实施方案,dsRNA是siRNA (100%)。根据一个具体的实施方案,dsRNA是不同比率的siRNA+dsRNA组合。例如1-1的比率:在RNA酶III处理后,一种dsRNA与相同序列混合。按照另一个实施方案,dsRNA与siRNA的比率为2:1、1.5:1、1.3:1、1:0.01、1:0.05或1:0.1。按照另一个实施方案,dsRNA与siRNA的比率为2:1-1:0.1。根据一个具体的实施方案,dsRNA是纯化的dsRNA (100%)。

[0186] 设计dsRNA分子用于特异性靶向目标靶基因。应认识到,dsRNA可用来减量调节一种或多种目标基因。如果靶向多种目标基因,则使用包含靶向许多目标基因的多种dsRNA分子的异质组合物。或者,将所述多种dsRNA分子分别施用于种子(但不是作为单一组合物)。根据一个具体的实施方案,使用用于单一靶的多种不同dsRNA分子,其可单独或同时(即共制剂)施用。

[0187] 按照本发明的一个实施方案,目标基因是植物内源性的。减量调节所述基因通常对于赋予植物改良的农业、园艺、营养性状是重要的(“改进”或“提高”在下文中进一步定义)。应认识到,用dsRNA处理可导致目标基因的增量调节(其遵循下文提供的建议机制),然而,所述增量调节可能是瞬时的。本发明人能够通过调节黄瓜和番茄中内源基因的表达赋予对生物性胁迫的抗性,从而赋予对感染的抗性,如实施例35和41所示。

[0188] 本文所用的“内源的”是指表达(mRNA或蛋白质)发生在植物中的基因。通常,内源基因在植物中天然表达或来源于植物。因此,植物可以是野生型植物。然而,植物还可以是遗传修饰的植物(转基因)。

[0189] 目标基因的减量调节可能对赋予改进的生物量、生长势、产量、非生物胁迫耐受性、生物性胁迫耐受性之一或至少一个(例如两个或更多个)或改进的氮利用效率是重要的。

[0190] 示例性的目标基因包括但不限于酶、结构蛋白质、植物调节蛋白、miRNA目标基因或非编码RNA例如植物miRNA。WO2011067745、WO 2009125401和WO 2012056401提供表达可被沉默以改进植物性状的miRNA序列或miRNA的靶的实例(分别例如mRNA167、miRNA 156、miR164及其靶NFY、SPL17和NAC)。随后实施例部分中描述了可按照本发明的教导进行调节的目标基因的其他实例。

[0191] 目标基因可包含转录为编码多肽的mRNA的核酸序列。

[0192] 或者,目标基因可以是非编码基因例如miRNA或siRNA。

[0193] 例如,为了使目标mRNA的表达沉默,可如下选择适于与本发明的一些实施方案一起使用的dsRNA的合成。第一,扫描mRNA序列,包括3' UTR和5' UTR。

[0194] 第二,应用任何序列比对软件,例如可获自NCBI服务器的BLAST软件([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)),将mRNA序列与合适的基因组数据库进行比较。滤出显示与其它编码序列有明显同源性的mRNA序列的推定区域。

[0195] 选择合格的目标序列作为dsRNA合成的模板。优选的序列是与基因组中的其它基因几乎没有同源性的那些序列以降低“脱靶”作用。

[0196] 应认识到,本发明的一些实施方案的RNA沉默剂不必限于仅含有RNA的那些分子,而且还包括化学修饰的核苷酸和非核苷酸。

[0197] dsRNA可采用本领域已知的任何方法合成,包括酶合成或固相合成。在含或不含上述修饰的短多核苷酸序列的情况下,这些尤其有用。用于执行固相合成的装置和试剂是市售的,可获自例如Applied Biosystems。也可采用用于所述合成的任何其它方法;寡核苷酸的实际合成尽在本领域技术人员的能力范围内,并可通过详述于以下文献的已确立方法,应用固相化学,例如氰基乙基亚磷酸胺接着脱保护、脱盐并通过例如自动化trityl-on方法或HPLC纯化来完成:例如Sambrook, J.和Russell, D. W. (2001), “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”; Ausubel, R. M.等编辑(1994, 1989), “Current Protocols in Molecular Biology,” 第I-III卷, John Wiley & Sons, Baltimore, Maryland; Perbal, B. (1988), “A Practical Guide to Molecular Cloning,” John Wiley & Sons, New York; 以及Gait, M. J.编辑(1984), “Oligonucleotide Synthesis”。

[0198] 如所提及的,使裸dsRNA分子与种子直接接触。

[0199] 种子可以是任何植物的种子,例如绿色植物界总科包括单子叶植物和双子叶植物的种子。下文中列举了其它植物。按照本发明的一个实施方案,植物的细胞包含依赖于RNA的RNA聚合酶活性和dsRNA的目标RNA分子以确保dsRNA的扩增。

[0200] 本文所用术语“植物”包括整株植物、植物的祖代和子代及植物部分,包括种子、嫩枝、茎、根(包括块茎)和分离的植物细胞、组织和器官。植物可呈现任何形式,包括悬浮培养物、胚、分生组织区、愈伤组织、叶、配子体、孢子体、花粉和小孢子。应认识到,植物或其种子可以是转基因植物。

[0201] 本文所用短语“植物细胞”是指来源于或自破碎的植物细胞组织或植物细胞培养物分离的植物细胞。

[0202] 本文所用短语“植物细胞培养物”是指任何类型的天然(天然存在的)植物细胞、植物细胞系和遗传修饰的植物细胞,其不装配形成完整植物,使得植物的至少一个生物结构不存在。任选本发明这个方面的植物细胞培养物可包含特定类型的植物细胞或多种不同类

型的植物细胞。应注意,任选特征是特定类型的植物细胞的植物培养物最初可来源于多个不同类型的所述植物细胞。

[0203] 按照本发明的一些实施方案,预期任何有市场或科学价值的植物。特别可用于本发明方法的植物包括属于总科绿色植物界的所有植物,特别是包含饲料或豆科饲料、观赏植物、粮食作物、乔木或灌木的单子叶植物和双子叶植物,其选自:金合欢(*Acacia* spp.)、槭(*Acer* spp.)、猕猴桃(*Actinidia* spp.)、七叶树(*Aesculus* spp.)、澳洲贝壳杉(*Agathis australis*)、*Albizia amara*、*Alsophila tricolor*、须芒草(*Andropogon* spp.)、落花生(*Arachis* spp.)、槟榔(*Areca catechu*)、*Astelia fragrans*、鹰嘴紫云英(*Astragalus cicer*)、红苏木(*Baikiaea plurijuga*)、桦木(*Betula* spp.)、芸苔(*Brassica* spp.)、木榄(*Bruguiera gymnorrhiza*)、*Burkea africana*、*Butea frondosa*、*Cadaba farinosa*、朱樱花(*Calliandra* spp.)、茶(*Camellia sinensis*)、美人蕉(*Canna indica*)、辣椒(*Capsicum* spp.)、决明(*Cassia* spp.)、*Centroema pubescens*、*Chacomeles* spp.、肉桂(*Cinnamomum cassia*)、咖啡树(*Coffea arabica*)、*Colophospermum mopane*、多变小冠花(*Coronilla varia*)、沙梅子(*Cotoneaster serotina*)、山楂(*Crataegus* spp.)、黄瓜(*Cucumis* spp.)、柏木(*Cupressus* spp.)、银蕨(*Cyathea dealbata*)、榲桲(*Cydonia oblonga*)、日本柳杉(*Cryptomeria japonica*)、香茅(*Cymbopogon* spp.)、*Cynthea dealbata*、榲桲、*Dalbergia monetaria*、*Davallia divaricata*、山蚂蝗(*Desmodium* spp.)、粗糙蚌贝蕨(*Dicksonia squarosa*)、*Dibeteropogon amplexans*、*Dioclea* spp.、扁豆(*Dolichos* spp.)、*Dorycnium rectum*、锥形稗(*Echinochloa pyramidalis*)、*Ehaffia* spp.、*Eleusine coracana*、画眉草(*Eragrostis* spp.)、刺桐(*Erythrina* spp.)、桉树(*Eucalyptus* spp.)、*Euclea schimperii*、*Eulalia villosa*、*Pagopyrum* spp.、*Feijoa sellowiana*、草莓(*Fragaria* spp.)、千斤拔(*Flemingia* spp.)、*Freycinetia banksii*、童氏老鹳草(*Geranium thunbergii*)、银杏(*Ginkgo biloba*)、*Glycine javanica*、*Gliricidia* spp.、陆地棉(*Gossypium hirsutum*)、银桦(*Grevillea* spp.)、*Guibourtia coleosperma*、岩黄耆(*Hedysarum* spp.)、牛鞭草(*Hemaphysalis altissima*)、*Heteropogon contortus*、大麦(*Hordeum vulgare*)、红苞茅(*Hyparrhenia rufa*)、小连翘(*Hypericum erectum*)、*Hypochaeris dissoluta*、*Indigo tinctoria*、鸢尾(*Iris* spp.)、*Leptarrhena pyrolifolia*、胡枝子(*Lespedeza* spp.)、莴苣(*Lettuca* spp.)、银合欢(*Leucaena leucocephala*)、*Loudetia simplex*、*Lotus bainesii*、百脉根(*Lotus* spp.)、*Macrotyloma axillare*、苹果(*Malus* spp.)、木薯(*Manihot esculenta*)、紫花苜蓿(*Medicago sativa*)、水杉(*Metasequoia glyptostroboides*)、大蕉(*Musa sapientum*)、烟草(*Nicotiana* spp.)、*Onobrychis* spp.、*Ornithopus* spp.、水稻(*Oryza* spp.)、*Peltophorum africanum*、狼尾草(*Pennisetum* spp.)、鳄梨(*Persea gratissima*)、牵牛花(*Petunia* spp.)、菜豆(*Phaseolus* spp.)、加那利海枣(*Phoenix canariensis*)、*Phormium cookianum*、石楠(*Photinia* spp.)、白云杉(*Picea glauca*)、松(*Pinus* spp.)、豌豆(*Pisum sativum*)、桃柘罗汉松(*Podocarpus totara*)、*Pogonarthria fleckii*、*Pogonarthria squarrosa*、杨(*Populus* spp.)、*Prosopis cineraria*、花旗松(*Pseudotsuga menziesii*)、*Pterolobium stellatum*、西洋梨(*Pyrus communis*)、栎(*Quercus* spp.)、*Rhaphiolepis umbellata*、*Rhopalostylis sapida*、*Rhus natalensis*、*Ribes grossularia*、*Ribes* spp.、

刺槐 (*Robinia pseudoacacia*)、蔷薇 (*Rosa* spp.)、悬钩子 (*Rubus* spp.)、柳 (*Salix* spp.)、*Schyzachyrium sanguineum*、金松 (*Sciadopitys vefficillata*)、北美红杉 (*Sequoia sempervirens*)、巨杉 (*Sequoiadendron giganteum*)、高粱 (*Sorghum bicolor*)、菠菜 (*Spinacia* spp.)、*Sporobolus fimbriatus*、*Stiburus alopecuroides*、矮柱花草 (*Stylosanthes humilis*)、葫芦茶 (*Tadehagi* spp)、落羽杉 (*Taxodium distichum*)、*Themeda triandra*、车轴草 (*Trifolium* spp.)、小麦 (*Triticum* spp.)、异叶铁杉 (*Tsuga heterophylla*)、越桔 (*Vaccinium* spp.)、蚕豆 (*Vicia* spp.)、葡萄 (*Vitis vinifera*)、*Watsonia pyramidata*、马蹄莲 (*Zantedeschia aethiopica*)、玉米 (*Zea mays*)、苋、洋蓟、芦笋、花椰菜、抱子甘蓝、甘蓝、欧洲油菜 (*canola*)、胡萝卜、花椰菜、芹菜、绿叶羽衣甘蓝 (*collard greens*)、亚麻、羽衣甘蓝、小扁豆、油籽油菜、黄秋葵、洋葱、马铃薯、水稻、大豆、水稻草、糖甜菜、甘蔗、向日葵、番茄、南瓜、茶、玉米、小麦、大麦、黑麦、燕麦、花生、豌豆、小扁豆和苜蓿、棉、油菜籽、欧洲油菜、胡椒、向日葵、烟草、茄子、桉树、乔木、观赏植物、多年生草和饲料作物。或者，藻和其它非绿色植物界可用于本发明的方法。

[0204] 按照本发明的一些实施方案，本发明方法使用的植物是作物植物，包括但不限于棉、芸苔属植物、油籽油菜、芝麻、橄榄树、棕榈油、香蕉、小麦、玉米 (*corn*或*maize*)、大麦、苜蓿、花生、向日葵、水稻、燕麦、甘蔗、大豆、草皮草、大麦、黑麦、高粱、甘蔗、菊苣、莴苣、番茄、西葫芦、甜椒、茄子、黄瓜、甜瓜、西瓜、菜豆、木槿、黄秋葵、苹果、玫瑰、草莓、红辣椒、大蒜、豌豆、小扁豆、欧洲油菜、菊花、拟南芥、花椰菜、甘蓝、甜菜、昆诺阿藜、菠菜、南瓜、洋葱、韭葱、烟草、马铃薯、甜菜、番木瓜、菠萝、芒果、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和还用于园艺、花卉栽培或林业的植物，例如但不限于杨树、冷杉、桉树、松树、观赏植物、多年生草和饲料作物、松柏类植物、藓类、藻，以及列于World Wide Web ([dot](http://dot.nationmaster.com/encyclopedia/Plantae)) nationmaster ([dot](http://dot.com/encyclopedia/Plantae)) com/encyclopedia/Plantae的其它植物。

[0205] 根据一个具体的实施方案，植物选自玉米、水稻、小麦、番茄、棉和高粱。

[0206] 根据一个具体的实施方案，种子是没有经过化学/物理处理的未包覆的或新鲜的种子。

[0207] 种子的洗涤实行30分钟-4小时。其它示例性的洗涤范围为1分钟-10分钟、10分钟-30分钟。洗涤溶液可包括弱洗涤剂例如Twee-20。洗涤剂的浓度可为0.01-0.2%或0.2-1%。

[0208] 种子在与dsRNA接触之前可进行引发或洗涤。

[0209] 本文所用术语“引发”是指控制种子内的水合水平使得萌发所需的代谢活性可出现，但防止胚根出现。种子内不同的生理活性可以不同的水分水平存在 (Leopold和Vertucci, 1989; Taylor, 1997)。萌发过程中最后的生理活性是胚根出现。胚根出现的开始需要高的种子含水量。通过限制种子含水量，可存在萌发所需的所有代谢步骤而无胚根出现的不可逆行为。在胚根出现之前，种子被认为是耐干燥的，因此可通过干燥降低引发种子的含湿量。在干燥后，引发种子可保存直到播种的时候。

[0210] 商业上使用数种不同的引发方法。其中，液体或渗透引发和固体基质引发似乎具有最多追随者 (Khan等, 1991)。

[0211] 按照本发明的一个实施方案，引发在盐、螯合剂、聚乙二醇或其组合 (例如螯合剂和盐) 存在下实行。

[0212] 或者，引发在水 (例如去离子水或双重去离子水) 存在下实行。根据一个具体的实

施方案,引发在100% ddW存在下实行。

[0213] 通常使用几种类型的种子引发:

[0214] 渗透引发(渗透调节)一是标准引发技术。将种子在具有低水势的充分充气的溶液中培育,然后洗涤并干燥。可通过加入渗透剂例如甘露糖醇、聚乙二醇(PEG)或盐像KCl实现溶液的低水势。

[0215] 水引发(滚筒引发)一通过将有限量的水持续或相继地加入种子中来实现。滚筒被用于这个目的,并且也可通过湿空气施加水分。“田间浸渍”是一项价廉有用的技术,通过将种子(谷类、豆类)在温水中培育有限时间来实施。

[0216] 基质引发(基质调节)一是将种子培育在含有限量的水的固体不溶性基质(蛭石、硅藻土、交联高吸水性聚合物)中。该方法提供慢的吸涨作用。

[0217] 预萌发种子一仅对少数种是可行的。与正常引发形成对比,允许种子进行胚根突出。这之后是针对特定阶段分选、再诱导耐干燥性的处理以及干燥。预萌发种子的使用引起快速均匀的幼苗发育。

[0218] 因此,按照示例性的实施方案,种子是经引发的种子。

[0219] 值得注意的是,在与dsRNA接触前将种子用水(重蒸水, ddW)处理而不引起种子的任何引发是可能的。例如,用水处理片刻(例如30秒钟-1小时、30秒钟-0.5小时、30秒钟-10分钟、30秒钟-5分钟或45秒钟-5分钟)。

[0220] 应认识到,dsRNA可包含在水(例如自来水、蒸馏水或重蒸水)中,即没有任何上述引发有效浓度的盐、螯合剂、聚乙二醇或其组合(例如螯合剂和盐)。

[0221] 按照示例性的实施方案,种子是未经引发的种子。

[0222] 实施例1中提供了将dsRNA引入种子中的一种非限制性示例性方法,其被视为本说明书的组成部分。

[0223] 在洗涤/引发和干燥步骤时的温度可相同或不同。

[0224] 按照示例性的实施方案,洗涤/引发在4-28℃下实行。

[0225] 按照示例性的实施方案,引发/洗涤溶液或含dsRNA的溶液缺乏固体载体。

[0226] 按照示例性的实施方案,引发/洗涤溶液或含dsRNA的溶液缺乏转移剂,例如表面活性剂或盐。

[0227] 按照本发明的另一个实施方案,对与dsRNA分子进行接触的种子进行洗涤,以除去种子曾接触过的作用剂,例如杀虫剂、杀真菌剂、杀昆虫剂、肥料、涂布剂和着色剂。

[0228] 因此,按照示例性的实施方案,种子(在用dsRNA处理前)基本上不含(即不含有效量的)杀虫剂、杀真菌剂、杀昆虫剂、肥料、涂布剂和着色剂。

[0229] 然后对种子进行干燥。

[0230] 按照示例性的实施方案,干燥在20-37℃、20-30℃、22-37℃、15-22℃或20-25℃下实行10-20小时、10-16小时或甚至2-5小时。

[0231] 当计算接触溶液中裸dsRNA的浓度时,要考虑各种因素。

[0232] 这些取决于以下至少一种:种子大小、种子重量、种子体积、种子表面积、种子密度和种子透性。

[0233] 例如,就种子大小、重量、体积和表面积而言,估计玉米种子比拟南芥和番茄种子需要较长处理。至于透性和密度,估计小麦种子比番茄种子需要在较高浓度下的较长处理。

[0234] 处理溶液中dsRNA的示例性浓度包括但不限于0.01-0.3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、0.01-0.15  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、0.04-0.15  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、0.1-100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、0.1-50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、0.1-10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、0.1-5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、0.1-1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、0.1-0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、0.15-0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、0.1-0.3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、0.01-0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、0.01-0.05  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、0.02-0.04  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、0.001-0.02  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。根据一个具体的实施方案,处理溶液中dsRNA的浓度为0.01-0.15或0.04-0.15  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

[0235] 根据一个具体的实施方案,与dsRNA的接触在螯合剂例如EDTA或另一处螯合剂例如DTPA (0.01-0.1 mM)存在下实行。

[0236] 接触溶液可包含转移剂,例如表面活性剂或盐。

[0237] 所述转移剂的实例包括但不限于盐例如脂肪酸(例如动物脂或牛油脂肪胺或磷脂脂质转染胺或脂质转染试剂(1-20 nM或0.1-1 nM))的钠或锂盐和有机硅表面活性剂。其它有用的表面活性剂包括有机硅表面活性剂,包括非离子有机硅表面活性剂,例如乙氧基化三硅氧烷表面活性剂或硅氧烷聚醚共聚物例如聚环氧烷改性七甲基三硅氧烷和烯丙氧基聚丙二醇甲基醚的共聚物(以Silwet™ L-77表面活性剂市售可获得,CAS编号27306-78-1和EPA编号:CAL.REG.NO. 5905-50073-AA,现可获自Momentive Performance Materials, Albany, N.Y.)。

[0238] 有用的物理作用剂可包括(a)研磨剂,例如金刚砂、刚玉、沙、方解石、浮石、石榴石等,(b)纳米粒,例如碳纳米管,或(c)物理力。碳纳米管披露于Kam等(2004) J. Am. Chem. Soc., 126 (22):6850-6851;Liu等(2009) Nano Lett., 9(3):1007-1010;及Khodakovskaya等(2009) ACS Nano, 3(10):3221-3227。物理力因子可包括加热、冷却、施加正压或超声处理。用于植物被多核苷酸渗透入的实验室调节的作用剂包括例如施加化学试剂、酶处理、加热或冷却、用正压或负压处理或超声处理。在田间用于调节植物的作用剂包括化学试剂,例如表面活性剂和盐。

[0239] 种子与dsRNA的接触可采用本领域已知的任何方法实行,只要抑制量的dsRNA进入种子。这些实例包括但不限于浸湿、喷施或用粉末、乳液、混悬液或溶液涂布;同样,通过任何合适的方法将多核苷酸分子施于植物,例如喷施或擦拭溶液、乳液或混悬液。

[0240] 本文所用的“抑制量”是指足以减量调节目标基因达至少20%、30%、40%、50%或更高、比如说60%、70%、80%、90%或更高甚至100%的dsRNA的量。抑制量可以是在植物中放大形成的结果。

[0241] 根据一个具体的实施方案,接触可通过浸湿(即接种)实行,使得种子用处理溶液振荡可提高渗入和浸透,因此缩短处理时间。振荡通常在50-150 RPM下实行,并取决于处理溶液的体积。振荡可实行4-24小时(1-4小时、10分钟-1小时或30秒钟-10分钟)。本文的教导还设想短的培育时间例如至多10分钟。实施例包括但不限于30秒钟-7分钟、30秒钟-5分钟、30秒钟-3分钟、30秒钟-2分钟、30秒钟-1分钟,1分钟-10分钟或1分钟-5分钟。在本发明的范围内还考虑了浸渍。因此,将种子浸入dsRNA溶液中数秒例如1-10秒钟、1-5秒钟、1-3秒钟或1-2秒钟。在此期间,dsRNA可吸附在种子表面。所吸附的涂布种子的dsRNA在萌发时可渗透种子或幼苗。培养在4-28°C或15-22°C(例如8-15°C、4-8°C、22-28°C)下在暗中进行。

[0242] 根据一个具体的实施方案,接触发生在种子休眠中断和胚出现之前。

[0243] 在接触之后,优选在种子休眠中断和胚出现之前,可用上述作用剂(例如杀虫剂、杀真菌剂等)对种子进行处理(例如涂布)。

[0244] 实行接触,使得dsRNA进入胚、胚乳、种皮或3种的组合中。

[0245] 在与处理溶液接触之后,可在25-37℃下对种子进行干燥至多30小时。例如,在30℃下将种子干燥16小时。

[0246] 根据一个具体的实施方案,种子(例如分离的种子)包含外源裸dsRNA,且其中至少10或20个分子的dsRNA进入分离种子的胚乳中。

[0247] 本文所用术语“分离的”是指从天然生理环境中分离。在种子的情况下,分离种子从植物的其它部分分离。在核酸分子(例如dsRNA)的情况下从胞质分离。

[0248] 根据一个具体的实施方案,dsRNA不是从植物基因组中表达,因此不是基因组的组成部分。

[0249] 根据一个具体的实施方案,提供包含在种子的胚和胚乳中以类似浓度(例如约1:1、2:1或1:2)存在的外源dsRNA的分离种子。研究表明与当dsRNA从核酸表达构建体表达时所观察到的相比,将裸dsRNA直接引入种子中导致胚乳中较高浓度的dsRNA。

[0250] 根据一个具体的实施方案,提供包含空间上分布在植物种子的胚和胚乳中的外源dsRNA的分离种子,其空间分布不同于来源于重组表达外源dsRNA的转基因植物的种子中的所述外源dsRNA的空间分布。

[0251] 测量RNA分子在种子中的定位的方法是本领域众所周知的。实施例部分中所述siGlo的使用就是这种方法的一个实例。

[0252] 按照备选或其它的实施方案,提供包含外源dsRNA的分离种子,其中与重组表达所述外源dsRNA的转基因种子相比,所述外源dsRNA与由其成熟的siRNA的浓度比例在种子中较高。

[0253] 本文所用术语“较高”是指高至少约3%、5%、7%、10%、15%、20%、25%、30%、50%、60%、70%、80%、90%或甚至几倍。

[0254] 按照备选或其它的实施方案,提供包含外源dsRNA的分离种子,其中植物种子缺乏用于驱动所述外源dsRNA表达的异源启动子,其中与重组表达所述外源dsRNA的转基因种子相比,所述外源dsRNA和/或由其成熟的siRNA在种子中的空间分布改变。

[0255] 术语“重组表达”是指自核酸构建体表达。

[0256] 按照另一个实施方案,提供可通过本文所述任何方法获得(或得到)的植物种子。

[0257] 确定成功引入dsRNA的方法包括但不限于RT-PCR(例如定量测定目标基因或裸dsRNA的水平)、表型分析例如生物量、生长势、产量和胁迫耐受性、根结构、叶尺寸、谷粒大小和重量、含油量、纤维素以及细胞生物学技术。

[0258] 按照本发明的实施方案,有时观察到通过本文所述种子处理所靶向的基因增量调节。这主要在起主要调节物作用的基因例如微小RNA的靶(例如SPL和NAC)和参与调节关键过程的其它基因(例如HY5)中观察到。参见例如接下来的实施例部分的实施例23和32。

[0259] 不受理论束缚,研究表明,这种现象可能与这些基因表达调节中的潜在反馈回路有关。这些基因可能被严格调节,因此植物可能通过过度补偿一个方向的基因表达的强变化而起反应以在相反方向上改变其表达。因此,例如有可能基因将在处理后前几个小时或几天最初呈现减量调节,在植物生命周期的后期可能变成增量调节。参见例如接下来的实施例部分的实施例32。因此,本发明人观察到玉米在处理5天NAC基因增量调节,而在处理后10和12天减量调节。这在莠苳中针对Hy 5.5或5.6基因得到了进一步证实。

[0260] 种子可在种植前保存1天至数月(例如在4-10℃下)。

[0261] 所得种子可在暗中萌发以产生植物。

[0262] 因此提供包含外源裸dsRNA且没有驱动dsRNA在植物中表达的异源启动子的植物或植物部分。

[0263] 本文所用的“没有驱动dsRNA表达的异源启动子”意指植物或植物细胞不包括在植物中转录dsRNA的顺式作用调节序列(例如异源序列)。本文所用术语“异源的”是指外源的、非天然存在于天然植物细胞内的(例如通过整合的位置或是非天然存在于植物细胞内的)。因此分离种子在驱动dsRNA在植物中表达的异源启动子序列不存在时,包含植物不能转录的dsRNA的同基因(在扩增前)或异基因(第二siRNA,在扩增后)群。

[0264] 本发明方法可用于例如在植物中调节基因表达,所述方法包括:

[0265] (a) 在允许dsRNA渗入种子的条件下使植物的种子与裸dsRNA接触,从而将dsRNA引入种子中;和任选

[0266] (b) 产生种子的植物。

[0267] 当用于减量调节植物基因时,应用本领域众所周知的生物信息工具(例如BLAST),设计所需特异性的裸dsRNA。

[0268] 该方法可用于自基础研究(例如为了评价基因功能)开始直到产生具有有价值的商业用途的性状改变的植物为止的各种应用。

[0269] 所述植物可显示农业有益性状,包括形态学改变、开花改变、胁迫耐受性(即病毒生物性胁迫和/或非生物胁迫)改变、生物量生长势和/或产量改变等。

[0270] 本文所用的短语“非生物胁迫”是指对植物的代谢、生长、生存力和/或生殖的任何不良作用。非生物胁迫可通过以下任何亚最适环境生长条件诱导:例如水分不足或干旱、洪涝、冰冻、低温和高温、大风、重金属毒性、缺氧生活、高或低养分水平(例如养分缺乏)、高或低盐水平(例如盐分)、大气污染、高或低光强度(例如光线不足)或UV照射。非生物胁迫可以是短期作用(例如急性作用,例如持续约一周),或者可以是持续的(例如慢性作用,例如持续例如10天以上)。本发明考虑其中存在单一非生物胁迫条件的情况,或者出现两种或更多种非生物胁迫的情况。

[0271] 按照示例性的实施方案,非生物胁迫是指盐分。

[0272] 按照另一个示例性的实施方案,非生物胁迫是指干旱。

[0273] 按照另一个示例性的实施方案,非生物胁迫是指温度胁迫。

[0274] 本文所用短语“非生物胁迫耐受性”是指植物耐受非生物胁迫而不显示可观的生理或物理损害(例如植物代谢、生长、生存力和/或繁殖力的改变)的能力。

[0275] 本文所用短语“氮利用效率(NUE)”是指每单位氮肥输入的作物产量的度量。肥料使用效率(FUE)是NUE的度量。作物产量可通过生物量、生长势或产量测量。植物的氮利用效率通常是被植物吸收的氮的吸收、扩散、吸收率、蓄积、再分配(在植物中)和利用的至少一种改变的结果。改进的NUE是就相同种和相同发育阶段并生长在相同条件下的非转基因植物(即缺乏转基因植物的转基因)而言。

[0276] 本文所用短语“氮限制条件”是指包括所施加的低于最适植物代谢、生长、繁殖和/或生存力所需水平的氮(例如铵或硝酸盐)的水平(例如浓度)的生长条件。

[0277] 本文所用的术语/短语“生物量”、“植物的生物量”或“植物生物量”是指从生长季

节中的植物产生组织的量(例如以风干组织的克数测量)。植物生物量的增加可以是整株植物或其部分例如地上(例如可收获)部分、营养生物量、根和/或种子或其内容物(例如油、淀粉等)的增加。

[0278] 本文所用的术语/短语“生长势”、“植物的生长势”或“植物生长势”是指在规定时间内由植物产生的组织的量(例如通过重量测量)。生长势提高可决定或影响植物产量或每生长时间或生长面积的产量。另外,早期生长势(例如种子和/或幼苗)导致场林分(field stand)改进。

[0279] 本文所用的术语/短语“产量”、“植物的产量”或“植物产量”是指每株植物或每个生长季节所产生的组织或器官量(例如通过重量或大小测量)或数量(例如数目)。植物的高产量可能影响在某一生长面积和/或生长时间内可从植物中获得的经济利益。

[0280] 按照示例性的实施方案,产量通过纤维素含量、含油量、淀粉含量等测量。

[0281] 按照另一个示例性的实施方案,产量通过含油量测量。

[0282] 按照另一个示例性的实施方案,产量通过蛋白质含量测量。

[0283] 按照另一个示例性实施方案,产量通过每株植物或其部分(例如种仁、豆)的种子数、种子重量、果实数或果实重量测量。

[0284] 植物产量可受不同参数的影响,包括但不限于植物生物量;植物生长势;植物生长速率;种子产量;种子或谷粒数量;种子或谷粒品质;油产量;收获器官(例如植物的种子或营养部分)的油、淀粉和/或蛋白质含量;每个圆锥花序的花(例如小花)的数目(例如表示为饱满种子的数目相对于主要圆锥花序的数目的比率);收获指数;每面积生长的植物的数目;每株植物和每面积收获器官的数目和大小;每生长面积的植物数目(例如密度);田间收获器官的数目;总的叶面积;碳同化和碳分配(例如植物内碳的分布/配置);耐荫性;每个豆荚的可收获器官(例如种子)、种子的数目、每个种子的重量;和改进的体系结构[例如增加茎直径、厚度或改进物理性质(例如弹性)]。

[0285] 改进的植物NUE在田间被解释成在施用较少肥料的同时收获类似产量的数量,或施用相同水平的肥料获得高的产量。因此,改进的NUE或FUE对田间的植物产量有直接作用。

[0286] 本文所用术语“改进”或“提高”是指与天然或野生型植物[即本发明的同基因植物(未经修饰以包含dsRNA)]相比,植物的NUE、胁迫耐受性、产量、生物量或生长势提高至少约2%、至少约3%、至少约4%、至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或更高。

[0287] 按照所述,dsRNA的目标基因可以不是内源植物基因而是植物的外源基因,例如以植物为食或依赖于植物而生长、复制和/或存活的植物病毒或细菌的外源基因。

[0288] 因此,按照本发明的一方面,提供抑制植物病毒的目标基因的表达的方法,所述方法包括将本文所述植物(其至少部分包括裸dsRNA)提供(在感染条件下接触)给植物病毒,从而抑制植物病毒的目标基因的表达。

[0289] 许多病毒属被土壤传播的游动孢子原生动物持续和非持续的传播。这些原生动物不是病毒病原体本身,而是寄生性的。当病毒与植物根结合时,便发生病毒的传播。实例包括显示在谷类作物中传播植物病毒病的禾谷多粘菌(*Polymyxa graminis*)和传播甜菜坏死黄脉病毒的甜菜多粘菌(*Polymyxa betae*)。原生质动物(Plasmodiophorid)还在植物根中

造成其它病毒可通过其进入的创伤。

[0290] 可按照本发明的教导靶向的病毒的具体实例包括但不限于：

[0291] (1) 感染植物、尤其烟草和茄科 (*Solanaceae*) 的其它成员的烟草花叶病毒 (TMV, RNA病毒)。

[0292] (2) 引起代表35个植物科的许多经济上重要的植物(包括双子叶植物和单子叶植物)的严重病害的番茄斑萎病毒 (TSWV, RNA病毒)。观赏植物、蔬菜和大田作物的这种广泛的宿主范围是在植物感染性病毒中独有的。属于地中海地区的番茄斑萎病毒影响蔬菜作物, 尤其是番茄、胡椒和莴苣 (Turina等, 2012, *Adv Virus Res* 84;403-437)。

[0293] (3) 被粉虱传播的番茄黄曲叶病毒 (TYLCV) 主要影响番茄植物。菜豆金色花叶病毒属 (Begomovirus) (包括sweepoviruses和legumoviruses) 中的双粒病毒组 (DNA病毒) —影响多种栽培作物(包括木薯、甘薯、菜豆、番茄、棉和籽用豆类) 的最具破坏性的病原体 (Rey等, 2012, *Viruses* 4;1753-1791)。成员包括上述TYLCV和番茄曲叶病毒 (ToLCV)。

[0294] (4) 黄瓜花叶病毒 (CMV) —CMV具有广泛的宿主, 并侵染种类繁多的蔬菜、观赏植物和其它植物(多至40个科中的191个宿主种)。被受黄瓜花叶病影响的最重要的蔬菜为辣椒 (*Capsicum annuum L.*)、葫芦、番茄 (*Lycopersicon esculentum Mill.*) 和香蕉 (*Musa L. spp.*)。

[0295] 其它蔬菜宿主包括: 黄瓜、香瓜、南瓜、番茄、菠菜、芹菜、胡椒、水田芥、甜菜、甘薯、芜菁、佛手瓜、小黄瓜、西瓜、南瓜、枸橼、葫芦、利马豆、蚕豆、洋葱、灌木樱、茄子、马铃薯、大黄、胡萝卜、苜蓿、茴香、欧洲防风、香芹菜、丝瓜和洋葱 (Chabbouh和Cherif, 1990, *FAO Plant Prot. Bull.* 38:52-53)。

[0296] 观赏植物宿主包括: 翠菊、菊花、翠雀花、鼠尾草、天竺葵、吉莉草、唐菖蒲、天芥菜、风信子、飞燕草、百合、金盏花、牵牛花、旱金莲、长春花、矮牵牛、天蓝绣球、金鱼草、郁金香和百日草 (Chupp和Sherf, 1960; Agrios, 1978)。

[0297] (5) 马铃薯病毒Y (PVY) —影响马铃薯产量的最重要的植物病毒之一。

[0298] (6) 花椰菜花叶病毒 (CaMV, DNA病毒 (Rothnie等, 1994))。

[0299] (7) 非洲木薯花叶病毒 (ACMV)。

[0300] (8) 李痘病毒 (PPV) 是来自李属 (*Prunus*) 的核果的最具破坏性的病毒病。

[0301] (9) 雀麦花叶病毒 (BMV) —通常感染无芒雀麦 (*Bromus inermis*) 和其它草, 可存在于小麦生长的几乎任何地方。

[0302] (10) 马铃薯病毒X (PVX) —这个病毒没有昆虫或真菌传播媒介。该病毒在大多数马铃薯变种引起轻微症状或无症状, 但是当马铃薯病毒Y存在时, 这些两种病毒间的协同作用引起马铃薯的严重症状。

[0303] 其它病毒:

[0304] 柑桔速衰病毒 (CTV) —对柑桔造成最大经济损害病害, 包括酸橙 (*Citrus aurantium*) 和嫁接到酸橙根茎上的任何柑桔属种、甜橙 (*C. sinensis*)、葡萄柚 (*C. paradisi*)、来檬和塞维利亚柑橘 (*C. aurantifolia*) 和桔 (*C. reticulata*)。还已知CTV感染 *Aeglopsis chevalieri*、*Afraegle paniculata*、*Pamburus missionis* 和细柱西番莲 (*Passiflora gracilis*)。CTV分布在全世界, 柑桔树生长的任何地方都可发现。

[0305] 大麦黄矮病毒 (BYDV) —最广泛分布的谷类病毒病。它影响经济上重要的作物种大

麦、燕麦、小麦、玉米、小黑麦和水稻。

[0306] 马铃薯卷叶病毒 (PLRV) 感染马铃薯和茄科的其它成员。

[0307] 番茄丛矮病毒 (TBSV), RNA病毒, 番茄丛矮病毒属 (Tombusvirus) 的成员, 主要影响番茄和茄子。

[0308] 其它综述:

[0309] Hamilton等, 1981, *J Gen Virol* 54;223-241—提及TMV、PVX、PVY、CMV、CaMV。

[0310] 其它科学著作:

[0311] Makkouk等, 2012, *Adv Virus Res* 84;367-402—影响豌豆和菜豆的具有狭窄(蚕豆坏死黄化病毒 (FBNYN)) 和宽泛(苜蓿花叶病毒 (AMV) 和CMV) 宿主范围的病毒。

[0312] 植物病毒的目标基因编码对病毒病原体的生存力和/或感染性必不可少的产物, 因此其减量调节(通过裸dsRNA) 导致病原体存活和感染宿主细胞的能力下降。因此, 这种减量调节导致对维持病毒病原体的生存力和/或感染性的“有害作用”, 因为妨碍或降低病原体从来源于宿主细胞的养分摄食和从中存活的能力。由于病毒病原体生存力和/或感染性的这种降低, 因此促进植物细胞中对被病原体感染的抗性和/或高的耐受性。可在成熟(成体)期、未成熟(幼小)期或胚期靶向病原体中的基因。

[0313] 本文所用的“植物病毒抗性”性状是植物所特有的, 引起植物宿主抵抗来自通常能够使植物遭受损害或损失的病毒病原体的攻击。一旦向病毒病原体提供包含裸dsRNA的植物物质, 目标病毒内基因的表达被dsRNA抑制, 且目标病毒中基因表达的抑制引起植物对病毒的抗性。

[0314] 为了证实抗病毒活性, 本文的教导还考虑了观察在所述提供后可感染性或可复制性和宿主症状程度的降低。

[0315] 为了提高抗病毒活性, 本发明的实施方案还提供含有两种或更多种分别对同一植物病毒有毒的不同作用剂的组合物, 其至少一种包含本文所述dsRNA。在某些实施方案中, 第二作用剂可为选自以下的作用剂: 参与氨基酸或碳水化合物合成的代谢酶的抑制剂; 细胞分裂的抑制剂; 细胞壁合成抑制剂; DNA或RNA合成抑制剂、促旋酶抑制剂、微管蛋白装配抑制剂、ATP合成抑制剂; 氧化磷酸化解偶联剂; 蛋白质合成抑制剂; MAP激酶抑制剂; 脂质合成或氧化抑制剂; 甾醇合成抑制剂和黑色素合成抑制剂。

[0316] 另外, 按照本发明的教导产生的植物或其部分可显示营养或治疗效能改变, 因此可应用于食物或饲料和药物工业。同样地, 按照本发明的教导产生的植物或其部分可显示油或纤维素含量改变, 因此可在建筑业或油工业中实施。

[0317] 可将本发明的种子包装在包含大量种子的含种子装置中, 其中至少一些(例如5%、10%或更高)含有外源裸dsRNA, 其中种子缺乏驱动dsRNA表达的异源启动子。

[0318] 含种子装置可以是袋、塑料袋、纸袋、软壳容器或硬壳容器。

[0319] 可将本发明的试剂包装在试剂盒中, 所述试剂盒包括裸dsRNA、将dsRNA引入种子中的说明书和任选引发溶液。

[0320] 如有需要, 本发明一些实施方案的组合物可以包装或分配装置提供, 所述装置可装有含有活性成分的一种或多种剂型。例如, 包装可包含金属箔或塑料箔, 例如泡罩包装。包装或分配装置可附有用于引入到种子中的说明书。

[0321] 按照示例性的实施方案, 裸dsRNA和引发溶液装在单独的容器中。

[0322] 本文所用术语“约”是指 $\pm 10\%$ 。

[0323] 术语“包含”、“含”、“包括”、“装有”、“具有”及其变化形式意指“包括但不限于”。

[0324] 术语“由……组成”意指“包括并限于”。

[0325] 术语“基本由……组成”意指组合物、方法或结构可包括额外的成分、步骤和/或部分,但只要该额外的成分、步骤和/或部分不实质性地改变所要求保护的组合物、方法或结构的基本的和新的特性。

[0326] 本文所用的单数形式“a”、“an”和“the”包括复数对象,除非文中另有明确规定。例如,术语“一种化合物”或“至少一种化合物”可包括多种化合物,包括其混合物。

[0327] 在整个申请书中,本发明的不同实施方案以范围格式提供。应理解,范围格式中的描述只是出于方便和简明,不应解释为对本发明范围的不可变更的限制。因此,范围的描述就视为明确公开了所有可能的亚范围以及该范围内的各个数值。例如,范围的描述例如1-6应视为明确公开了亚范围,例如1-3、1-4、1-5、2-4、2-6、3-6等,以及该范围的各个数字,例如1、2、3、4、5和6。不论范围宽度都适用。

[0328] 每当本文规定数字范围时,是指包括规定范围内的任何引用的数字(分数或整数)。短语“介于”第一标示数值和第二标示数值“之间的范围”和“从”第一标示数值“到”第二标示数值“之间的范围”在本文中可互换使用,意指包括第一和第二标示的数值和其间的分数和整数。

[0329] 本文所用术语“方法”是指完成指定任务的方式、手段、技术和程序,包括但不限于化学、药理学、生物学、生物化学和医学领域从业人员已知的或化学、药理学、生物学、生物化学和医学领域从业人员自己知的方式、手段、技术和程序容易开发的方式、手段、技术和程序。

[0330] 要认识到,为清楚起见,在单独的实施方案的情况下描述的本发明的某些特征,也可在单一实施方案中组合提供。相反,为简明起见,在单一实施方案的情况下描述的本发明的各种特征,也可单独或以任何合适的亚组合或合适时以本发明的任何其它所述实施方案提供。在不同实施方案的情况下描述的某些特征不应视为所述实施方案的必需特征,除非没有所述要素时实施方案无法实施。

[0331] 在下面的实施例中提供对上文描述的和随附权利要求书中所要求保护的本发明的不同实施方案和方面的实验支持。

## 实施例

[0332] 下面参照以下实施例,连同上文描述,以非限制性方式对本发明进行说明。

[0333] 通常,本文所用命名法和用于本发明的实验室程序包括分子、生物化学、微生物学和重组DNA技术。在文献中详尽解释了所述技术。参见例如“Molecular Cloning: A laboratory Manual” Sambrook等, (1989); “Current Protocols in Molecular Biology” 第I-III卷, Ausubel, R. M.编辑(1994); Ausubel等, “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley和Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley和Sons, New York (1988); Watson等, “Recombinant DNA”, Scientific American Books, New York; Birren等(编辑) “Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”, 第1-4卷, Cold Spring

Harbor Laboratory Press, New York (1998);美国专利号4,666,828、4,683,202、4,801,531、5,192,659和5,272,057提供的方法;“Cell Biology: A Laboratory Handbook”,第I-III卷, Cellis, J. E.编辑(1994);Freshney的“Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique”, Wiley-Liss, N. Y. (1994), 第3版;“Current Protocols in Immunology”第I-III卷, Coligan J. E.编辑(1994);Stites等(编辑), “Basic and Clinical Immunology” (第8版), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994);Mishell和Shiigi (编辑), “Selected Methods in Cellular Immunology”, W. H. Freeman and Co., New York (1980);可获得的免疫测定广泛描述于专利和科技文献,参见例如美国专利号3,791,932、3,839,153、3,850,752、3,850,578、3,853,987、3,867,517、3,879,262、3,901,654、3,935,074、3,984,533、3,996,345、4,034,074、4,098,876、4,879,219、5,011,771和5,281,521;“Oligonucleotide Synthesis” Gait, M. J.编辑(1984);“Nucleic Acid Hybridization” Hames, B. D.和Higgins S. J., 编辑.(1985);“Transcription and Translation” Hames, B. D.和Higgins S. J., 编辑.(1984);“Animal Cell Culture” Freshney, R. I.编辑(1986);“Immobilized Cells and Enzymes” IRL Press, (1986);“A Practical Guide to Molecular Cloning” Perbal, B., (1984)和“Methods in Enzymology”第1-317卷, Academic Press;“PCR Protocols: A Guide To Methods and Applications”, Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak等, “Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual” CSHL Press (1996);所有文献都通过引入并入就像在本文全部提供一样。本文件全文中提供了其它通用参考文献。其中的程序被认为是本领域众所周知的,出于读者方便而提供。其中所含全部信息通过引用结合到本文中。

[0334] 实施例1

[0335] 用于dsRNA产生和种子处理的方案

[0336] 产生dsRNA/siRNA序列

[0337] 采用PCR产物的体外转录,定制各基因的dsRNA序列。使用在任一侧含有T7启动子序列的基因特异性引物,PCR扩增mRNA的部分,包括用于dsRNA产生的ORF、3' UTR或5' UTR。使用商用试剂盒例如MaxiScript dsRNA试剂盒(Life Technologies)或T7高产量RNA合成试剂盒(NEB),将该产物用作dsRNA产生的模板。接下来,在37°C下将样品用DNase Turbo处理15-30分钟,接着苯酚处理和核酸沉淀。接下来,进行了两个不同的反应之一:(1) dsRNA备好待用,(2) dsRNA用Dicer (Shortcut RNA酶III (NEB))加工以产生小干扰RNA (siRNA)。

[0338] 如下所述将任一种dsRNA或dsRNA和siRNA的组合用于种子处理。本文提供的所有dsRNA序列作为DNA列出(通过转化T>U来进行简单转化)。

[0339] 使用dsRNA/siRNA混合物的基因沉默的通用种子处理方案

[0340] 无涂层的有机玉米种子来自变种“popcorn”,无涂层的有机整粒水稻种子和有机大豆购自Nitsat Haduvdevan (Israel)。小麦种子来自A.B. Seeds (Israel)。莴苣种子来自变种Sun Valley。新鲜番茄种子采自内部繁殖的M82番茄果实。在处理之前,将无涂层的或新鲜植物种子用重蒸水(DDW)洗涤4小时。接下来,将种子在20-30°C下干燥至多24小时。在干燥步骤后,种子用含有dsRNA制剂的溶液处理,该溶液由含终浓度为1-261 µg/ml的

dsRNA的0.1mM EDTA制成。在无光生长室中在15-25℃下,通过在溶液中轻轻振荡种子至多60小时,来进行处理。最后,短暂洗涤种子达到3次,种植在土壤中,或在无光生长室中在25℃下萌发并种植在土壤中,或干燥0-30小时和在无光生长室中在25℃下萌发并种植在土壤中,或直接种植在土壤中。以类似方式,用没有dsRNA或具有非特异性dsRNA的制剂处理对照种子。

[0341] 实施例2

[0342] 水稻、番茄和高粱苗中DSRNA的稳定性

[0343] 作为植物中不存在/不表达的外源基因的实例,采用实施例1所述方案,将编码复制酶和CGMMV (黄瓜绿斑花叶病毒,登记号AF417242)的外被蛋白的ORF用作植物种子dsRNA处理的靶标。将水稻、番茄和高粱种子在20℃下洗涤4小时,将番茄和高粱在30℃下干燥,水稻在20℃下干燥过夜。对于水稻,将种子在15℃下用132.7 μg/ml dsRNA (终浓度)直接处理39小时,如图1所示;对于番茄用93.8 μg/ml dsRNA (终浓度)处理48小时,如图2A所示,对于高粱用75 μg/ml dsRNA (终浓度)处理40小时,如图2B所示。简单地说,用在其5'含有T7序列(5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3', SEQ ID NO: 1)的特别设计的正向和反向引物,通过PCR扩增病毒来源的ORF (参见下表1)。PCR产物用琼脂糖凝胶纯化,因为它们的两端携带T7启动子,因此用作T7依赖性体外转录的模板,产生CGMMV基因的dsRNA产物。对持家基因微管蛋白的PCR用作阳性对照(正向引物5'-GGTGCTCTGAACGTGGATG-3' (SEQ ID NO: 2)和反向引物5'-CATCATCGCCATCCTCATTCTC-3' (SEQ ID NO: 3))。

[0344] 表1:PCR引物用作体外转录的模板和CGMMV和CGMMV dsRNA产物的检测。



[0346]	CGMM V dsRNA 产物 2	TAATACGACTCACTATAGGG GCTTTACCGCCACTAAGAAC TCTGTACACTCCCTTGCGGG TGGTCTGAGGCTTCTTGAAT TGGAATATATGATGATGCAA GTGCCCTACGGCTCACCTTG TTATGACATCGGCGGTA ACT ATACGCAGCACTTGTTCAA GGTAGATCATATGTGCATTG CTGCAATCCGTGCCTAGATC TTAAAGATGTTGCGAGGAAT GTGATGTACAACGATATGAT CACGCAACATGTACAGAGG CACAAGGGATCTGGCGGGT GCAGACCTCTTCCA ACTTT CAGATAGATGCATT CAGGAG GTACGATAGTTCTCCCTGTG CGGTCACCTGTT CAGACGTT TTCCAAGAGTGTT CCTATGA TTTTGGGAGTGGTAGGGATA ATCATGCAGTCTCGTTGCAT TCAATCTACGATATCCCTTA TTCTTCGATCGGACCTGCTC TTCATAGGAAAATGTGCGA GTTTGTATGCAGCCTTTCAT TTCTCGGAGGCATTGCTTTT AGGTTCGCCTGTAGGTAATT TAAATAGTATTGGGGCTCAG TTTAGGGTTCGATGGTGATGC CCTATAGTGAGTCGTATTA/1	TAATACG ACTCACT ATAGGGG CTTTACC GCCACTA AGAAC /10	第 3 组: TAATACG ACTCACT ATAGGGC ATCACCA TCGACCC TAAAC /9
--------	----------------------------	--	---	---

[0347] 发现外源dsRNA在水稻苗中至少3周是稳定的,如图1A-C中可见,在番茄苗中至少10天,在高粱植物中4周,如图2A-B中可见。

[0348] 实施例3

[0349] dsRNA不整合至水稻的基因组中

[0350] 同实施例2一样,将水稻种子用外源dsRNA处理。植物萌发并生长5周,提取DNA,进行PCR反应以证实dsRNA不整合至水稻的基因组中(图3)。使用当检查RNA水平时给出阳性反应的两组引物,第1组(参见表1)引物是用于扩增模板(全部dsRNA序列)的引物组。第2组(参见表1)是用于图1中的PCR的引物。水稻内源持家基因(微管蛋白)用作PCR反应的阳性对照(参见表2)。

[0351] 表2:用于PCR扩增的微管蛋白引物。

[0352]	引物名称和方向	引物序列/(SEQ ID NO: )	引物长度
	osa_TubA1_736F	GGTGCTCTGAACGTGGATG/12	19
	osa_TubA1_1342R	CATCATCGCCATCCTCATTCTC/13	22

[0353] 实施例4

[0354] 外源dsRNA分子是非常稳定的且不掺入到处理植物的基因组中

[0355] 采用实施例1所述方案处理玉米种子,在20℃下洗涤种子4小时,在30℃下干燥过夜,在15℃下用针对β-葡糖醛酸糖苷酶 (GUS) 报道基因的40 μg/ml dsRNA (终浓度)直接处理60小时,干燥并使之萌发。在萌发后7和15天,从对照和dsGUS处理的植物收获叶和根。从收获的组织提取RNA,用特异性GUS引物运行RT-PCR (表3)。另外,玉米内源持家基因(遍在蛋白)用作PCR反应的阳性对照。发现GUS dsRNA分子在处理的种子中极其稳定,并且在种子萌发后7和15天,可在玉米植物中检出(图4A-C)。此外,在萌发后1周,GUS dsRNA分子不掺入至处理的玉米植物的基因组中(图5A-B)。

[0356] 表3:用于GUS和遍在蛋白基因PCR扩增的引物和GUS dsRNA产物。

引物名称	引物序列/SEQ ID NO:	引物长度
GUS_T7_For	TAATACGACTCACTATAGGGAGATCGACGGCCTGTGGGCATTC/15	
GUS_T7_Rev	TAATACGACTCACTATAGGGAGCATTCCCGGCGGGATAGTCTG/16	43
GUS208For	CAGCGCGAAGTCTTTATAACC/17	43
GUS289Rev	CTTTGCCGTAATGAGTGACC/18	20
zmaUBQ-947F	CCATAACCCTGGAGGTTGAG/19	20
zmaUBQ1043R	ATCAGACGCTGCTGGTCTGG/20	20
[0357] GUS dsRNA产物	TAATACGACTCACTATAGGGAGATCGACGGCCTGTGGGCATTCAGTCTGGATCGCGAAAAGTGTGGAATTGATCAGCGTTGGTGGGAAAGCGCGTTACAAGAAAGCCGGGCAATTGCTGTGCCAGGCAGTTTTAACGATCAGTTCGCCGATGCAGATATTCGTAATTATGCGGGCAACGTCTGGTATCAGCGCGAAGTCTTTATAACCGAAAGGTTGGGCAGGCCAGCGTATCGTGCTGCGTTTCGATGCGGGTCACTCATTACGGCAAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTGATGGAGCATCAGGGCGGCTATACGCCATTTGAAGCCGATGTCACGCCGTATGTTATTGCCGGGAAAAGTGTACGTATCACCGTTTGTGTGAACAACGAACTGAACTGGCAGACTATCCCGCCGGGAATGCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA/21	

[0358] 实施例5

[0359] 各种植物种子中siRNA序列的荧光显微术

[0360] 植物种子按照实施例1所述方案处理。在20℃下洗涤种子4小时,在25℃下干燥,在15℃下用荧光siRNA (siGL0,2μM终浓度,Thermo Scientific)直接处理24小时。

[0361] 通过凝胶电泳分析验证siGL0的质量,如图6中可见。

[0362] 处理后24-48小时,使用Olympus显微镜在最低物镜放大倍数下(5X用于较大种子例如水稻和番茄种子,10X用于较小的种子例如拟南芥种子),拍摄种子的荧光照片。为了消除非特异性自发荧光的可能性,将各dsRNA处理种子与未经处理的对照种子放在一起显示(图7-8)。

[0363] 为了评价种子内荧光siRNA的分布效率,在处理48小时,将不同的植物种子切成片,并用荧光双目镜拍摄。对各处理的种子与对照未处理种子放在一起拍照。在施用于水

稻、番茄、黄瓜、菜豆、高粱和小麦种子样品时,拍摄光图像和荧光图像(图9-12)。显然siRNA以不同水平分布在胚和胚乳之间。这就支持下列模型:

[0364] dsRNA分子被用于种子处理的基于水的溶液携带直接进入胚中。

[0365] dsRNA分子作为胚乳吸水过程的部分进入胚乳。这些分子随后在萌发和种子发育期间,在胚发育时作为来自胚乳的养分流的一部分供给胚。

[0366] 这些本发明的研究结果表明,用来处理的种子的RNA分子渗入胚中且在胚发育时在胚中起作用,而且还渗入胚乳中,并在萌发后为胚提供养分。

[0367] 实施例6

[0368] 用siGL0处理的时程实验

[0369] 对水稻种子进行了时程实验以监测在种子处理后siGL0渗透入种子的动力学(图13)。结果表明采用实施例1所述方案,siRNA有效地渗透入植物种子中。

[0370] 实施例7

[0371] 通过dsRNA/siRNA混合物使水稻中的PDS-1基因沉默

[0372] 将水稻种子在20°C下在洗涤溶液中洗涤4小时,在25°C下干燥,用总浓度为60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的dsRNA/siRNA的混合物在15°C下直接处理40小时。使种子在室温下萌发几天,并监测种子发育。用PDS和dsRNA/siRNA混合物处理的种子显示发育受阻和延缓,如苗较小和生根减少所观察到的。在这些实验中,将PDS-1基因的两种产物混合(参见表4)。

[0373] 表4:被dsRNA/siRNA混合物沉默的两种PDS-1基因产物。

基因名称	生物体	NCBI 登记号	核苷酸序列-产物 1/SEQ ID NO:	核苷酸序列-产物 2/SEQ ID NO:
八氢番茄红素去饱和酶 (PDS-1)	玉米	BT084155.1	TAATACGACTCAC TATAGGGAGATTG GCGAGCTTAGGAT TGAGGATCGTTTA CAGTGGAAAGAAC ACTCTATGATATT CGCCATGCCAAAC AAGCCAGGAGAAT TCAGCCGGTTTGA TTTCCAGAAACT TTGCCAGCACCTA TAAATGGGATATG GGCCATATTGAGA AACAAATGAAATGC TTACCTGGCCCGA GAAGGTGAAGTTT GCAATCGGACTTC TGCCAGCAATGGT TGGTGGTCAACCT TATGTTGAAGCTC AAGATGGCTTAAC CGTTTCAGAATGG ATGAAAAAGCAGG GTGTTCCCTGATCG GGTGAACGATGAG GTTTTTATTGCAAT GTCCAAGGCACTC AATTCATAAAATC CTGATGAGCTATC TATGCAGTGCATT TTGATTGCTTTGA ACCGATTTCTTCA GGAGAAGCATGGT TCTAAAATGGCAT TCTTGGATGGTAA TCCGCCTGAAAGG CTATCTCCCTATA GTGAGTCGTATTA/ 44	TAATACGACTCAC TATAGGGTGATCG GGTGAACGATGAG GTTTTTATTGCAAT GTCCAAGGCACTC AATTCATAAAATC CTGATGAGCTATC TATGCAGTGCATT TTGATTGCTTTGAA CCGATTTCTTCAG GAGAAGCATGGTT CTAAAATGGCATT CTTGGATGGTAAT CCGCCTGAAAGGC TATGCATGCCTATT GTTGATCACATTC GGTCTAGGGGTGG AGAGGTCCGCCTG AATTCTCGTATTA AAAAGATAGAGCT GAATCCTGATGGA ACTGTAAAACACT TCGCACTTAGTGA TGGAACTCAGATA ACTGGAGATGCTT ATGTTTGTGCAAC ACCAGTCGATATC TTCAAGCTTCTTGT ACCTCAAGAGTGG AGTGAAATTACTT ATTTCAAGAAACT GGAGAAGTTGGTG GGAGTTCCTGTTA TCAATGTTTCATAT ATGGTTTGACAGA AAACTGAACAACA CATATGACCACCT TCTTTTCAGCAGG AGTTCACTTTTAA GTGTCTATGCAGA CATGTCAGTAACC TGCAAGGAATACT ATGACCCAAACCG TTCAATGCTGGCC CTATAGTGAGTCG TATTA/45

[0374]

[0375] 实验在3个生物学重复中进行,结果见图14A-D。

[0376] 实施例8

[0377] PDS沉默后的叶绿素漂白和生长抑制

[0378] 水稻种子如实施例7所述处理,监测其随后的发育和幼苗生长。在PDS-1沉默处理后30天,记录2个植物组(对照和PDS沉默)的总体表型。所报告,PDS沉默引起叶绿素漂白和生长抑制(Peretz等, 2007, *Plant Physiol* 145: 1251-1263),这与本发明的PDS沉默的植物的表型相关联,因为与对照植物相比,它们分别看起来尺寸较小,颜色较浅(参见图15)。

[0379] 实施例9

[0380] 通过实时PCR检测两种PDS-1基因产物

[0381] 如实施例7所述,在用dsRNA/siRNA混合物(比率1:1)处理后,使用特别设计的引物(正向:GATTGCTGGAGCAGGATTAG SEQ ID NO: 46,反向:CCCTGCCTCAAGCAATATG,SEQ ID NO: 47),通过实时PCR测定PDS-1基因产物的表达水平。出于归一化目的,还使用引物(正向-ACCACTTCGACCGCCACTACT,SEQ ID NO: 48,反向-ACGCCTAAGCCTGCTGGTT,SEQ ID NO: 49)测定了UBQ5表达。结果见图16A-C。

[0382] 实施例10

[0383] HAP2E目标基因沉默

[0384] 水稻种子采用实施例1所述方案处理,将种子在室温下洗涤4小时,在25℃下干燥过夜,用152μg/ml的Hap2e dsRNA浓度在15℃下直接处理41小时(对于Hap2e dsRNA序列参见下表11)。处理后5天萌发的对照和Hap2e dsRNA处理的水稻种子在其根发育中没有显示任何差异(图17)。在萌发后5和7天,从萌发种子的嫩枝提取RNA,并运行RT-PCR。在测试3个位于dsRNA分子的不同区域(图18)的不同引物组(参见表6)后,使用最佳引物组(引物组3)评价dsRNA处理植物中相对于对照(未处理)植物的内源Hap2e表达水平。与对照植物相比,在处理植物中实现Hap2e mRNA表达以约50%沉默或更高的水平减量调节,其效率为25%(图19)。

[0385] 其它水稻种子在图17的相同条件下用145.7 μg/ml的Hap2e dsRNA浓度处理42小时。使用随机引物+寡dT对萌发后18天从苗中提取的RNA的RT-PCR,也显示dsRNA处理植物中Hap2e mRNA减量调节(图20),其以50%效率达到与对照相比超过25%的减量调节。

[0386] 表5:用于Hap2e dsRNA分子的RT-PCR的引物

引物组	引物组位置	引物名称和方向	引物序列/SEQ ID NO:	引物长度
[0387] 1	在dsRNA中	osaHAP2E501F3	ACCGGCATCAGCTCAGTCTC/50	20
		osaHAP2E589R3	TGCTGTTCTCTGGGCACAGG/51	20
2	连接处	osaHAP2E11F5	TCCCCTCAGATATTAACAAC/52	20
		osaHAP2E108R5	AGGAGGAAAGGCAGCTTCTGTG/53	22
3	在dsRNA以外	osaHAP2E122F7	GTGACTCGTCACCAACAAAG/54	20
		osaHAP2E202R7	TGTGTTGTCCGTTGAGACTG/55	20

[0388] 实施例11

[0389] 玉米种子中的NFY目标基因沉默

[0390] 玉米种子采用实施例1所述方案处理,将种子在室温下洗涤4小时,在30℃下干燥

过夜,用56 $\mu$ g/ml的NFY dsRNA浓度在15 $^{\circ}$ C下直接处理40小时(对于NFY dsRNA序列参见表11)。在萌发后10天,对从对照和NFY dsRNA处理玉米种子的嫩枝中提取的RNA进行了RT-PCR,以测定NFY目标基因的表达水平(参见表6)。如图21所示成功实现基因的减量调节。

[0391] 表6:用于萌发后10天玉米种子中NFYA dsRNA分子的RT-PCR的引物。

引物名称和方向	引物序列	引物长度
zma-NFYA3_345 F3	TCGGAAGCCGTACCTTCGTG/57	20
zma-NFYA3_442R3	CCTGGAGCTGCTGCTTTGTG/58	20
zma-NFYA3_457F4	TACCAGGCGTCGAGTGGTTC/59	20
zma-NFY-A3_542R4	GAAGAGGGCGTGCAAATGGG/60	20

[0393] 实施例12

[0394] 番茄种子中的NFY目标基因沉默

[0395] 番茄种子采用实施例1所述方案处理。未经洗涤的种子用200 $\mu$ g/ml的NFY dsRNA浓度在15 $^{\circ}$ C下处理24小时,将种子短暂洗涤两次,在不干燥的情况下立即种植在土壤中。在萌发后3周,对从对照和NFY dsRNA处理的番茄种子的嫩枝中提取的RNA进行RT-PCR,以测定NFY目标基因的表达水平(参见表7)。如图22所示成功实现基因的减量调节。

[0396] 将用NFY dsRNA分子处理后55天的番茄植物与同龄对照植物进行比较。在比较时主要表型差异是明显的,最值得注意的是高度的改变,其中处理的植物显得比未处理的对照植物显著较矮(图23,24)。

[0397] 表7:用于番茄中NFYA dsRNA分子的RT-PCR的引物和NFY dsRNA产物

引物名称和方向	引物序列/ SEQ ID NO:	引物长度
slyNFYA125F3	CTATTGCGTGTGCTCCAAAC/61	20
slyNFYA212R3	ACATGAGGAGGAACCAAAGG/62	20
NFY dsRNA 产物 1	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGCTCAAG AACCAGTTTATGTTAATGCTAAGCAGTATCGA AGGATCCTGCAGCGAAGACAGTCACGTGCTAA AGCAGAACTTGAAAAGAAGCAAATAAAGGGT AGAAAGCCATATCTTCACGAGTCTCGACATCA GCATGCACTGAGGAGGGTAAGGGCCTCGGGT GGACGTTTTGCCAAAAAGACAGATGCTTCTAA GGGTA CTGGTTCTGTGAGTTCATCGGGTTCTG AACCTTTGCAGTTC AATGCTGCTGATATTCAA AAGAGGAATGAAAATGGAAGGTTGGCCGAGC TTCAGCAGTCTTATTCAAATGGTAGCAGTTAT GGCAATCAAAGTAGCTTTCAAGAATCCAAGGA TGAGTACCAGTTTGCTAAAAGCAGGGAAGGA GGTTTTTTTTGTCAAGTAATTGGAGATACGTTCA TGTGTA AACTAGCTCTTGCCCTCTCCCTATAGT GAGTCGTATTAG/63	产物 1
NFY dsRNA 产物 2	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCAGTTAT GGCAATCAAAGTAGCTTTCAAGAATCCAAGGA TGAGTACCAGTTTGCTAAAAGCAGGGAAGGA GGTTTTTTTTGTCAAGTAATTGGAGATACGTTCA TGTGTA AACTAGCTCTTGCCCTGCAACGAGGG TAGAGTATGAGCAAGAGGAGTTTACAGGGATT GTTTCATTTCTTGGCTTTTCAAGATAGGCGGCA ATTCATTCTTGGCTTTTTACTTTAGTGTTAAAG GGAGCAACAGAGGTGACGAGGGTATCAGTGT TGCAGCATTGCTTGGAGATTACATCTTCCCTT ATGTACAGAGATGGATGAACTTAGAACTAGG ATTAGAAAGTTTTTTCAGTAAGTTTATGTTTGGC CAGTTACTGTAGTTTTAGTTTAGGAGACCATG TAAAAGGTTGTTAGTTTTGCAAAGGATCTT TTTTCTTCCCTAATTGGTGCATTCTCCCTATA GTGAGTCGTATTAG/64	产物 2

[0399] 实施例13

[0400] 玉米种子中的NAC目标基因沉默

[0401] 玉米种子采用实施例1所述方案处理,将种子在室温下洗涤4小时,在30℃下干燥过夜,用90μg/ml的NAC dsRNA浓度在15℃下直接处理40小时并立即萌发(对于NAC dsRNA序列参见表11)。在萌发后10天对从对照和NAC dsRNA处理的玉米种子的嫩枝中提取的RNA进行了RT-PCR,以测定NAC目标基因的表达水平(参见表8)。如图25所示成功实现基因的减量调节。

[0402] 表8:用于玉米中NAC dsRNA分子的RT-PCR的引物。

引物名称和方向	引物序列	引物长度
zmaNAC5_267F3	CGAGTCGGGATACTGGAAGG/65	20

zmaNAC5_342R3	CTTCTTCATGCCGACGAGGG/66	20
zmaNAC5_187F4	ACGATGGGCGAGAAGGAGTG/67	20
zmaNAC5_250R4	TCAGTCCCCTCGGGTACTTG/68	20

[0404] 实施例14

[0405] 水稻种子中的ARF-8目标基因沉默

[0406] 水稻种子采用实施例1所述方案处理,将种子洗涤4小时,在20℃下干燥过夜,并用66.2μg/ml的ARF-8 dsRNA浓度在15℃下直接处理42小时。在萌发后18天,对从对照和ARF-8 dsRNA处理的水稻种子中提取的RNA进行RT-PCR,以测定ARF-8目标基因的表达水平(参见表9)。如图26所示成功实现基因的减量调节。

[0407] 表9:用于水稻中ARF-8 mRNA分子的RT-PCR的引物和ARF-8 dsRNA产物

引物名称和方向	引物序列	引物长度
osaARF8_140 F3	AGGGTCACATCCCGAACTAC/69	20
osaARF8_233 R3	ACCTCGTCAGTCTCCACATC/70	20
osaARF8_167 4F4	GTTGGATTTCGAGCTTCCTTC/71	20
osaARF8_175 7R4	TGCTGCTGCTCACTAGCTAC/72	20
ARF8 dsRNA 产物	CTAATACGACTCACTATAGGGAGACAGTCCGTTG GCCTAGTTCCTATTGGAGATCTGTGAAGGTTGGT TGGGATGAATCAACTGCAGGGGAAAGACCACCA AGAGTTTCTTTATGGGAAATTGAACCATTGACAA CCTTTCCAATGTATCCATCTCTGTTCCCACTGAGA GTTAAGCATCCTTGGTATTCAGGAGTTGCTTCCC TGCATGATGACAGCAATGCTTTAATGTGGCTGAG AGGAGTTGCTGGTGAGGGAGGTTTTTCAGTCTCTG AACTTTCAGTCACCTGGTATTGGCTCCTGGGGAC AACAGAGGCTCCATCCATCCTTACTGAGCAGCGA TCACGATCAGTACCAAGCAGTAGTTGCTGCTGCT GCTGCTTCCCAATCTGGTGGTACTTAAAACAGC AATTCTTGACCTTCAGCAACCTATGCAGTCCCC TCAAGAACTGCAACCTCAACCCTCTCCCTATA GTGAGTCGTATTAG/73	

[0409] 实施例15

[0410] 水稻种子中的SPL17目标基因沉默

[0411] 水稻种子采用实施例1所述方案处理,将种子洗涤4小时,在20℃下干燥过夜,并用200μg/ml的SPL17 dsRNA浓度在15℃下直接处理41小时(对于SPL17 dsRNA序列参见表11)。在处理5天萌发的对照和SPL17 dsRNA处理的水稻种子不显示任何可看得见的差异(图27)。从这些萌发种子的5日龄嫩枝中提取RNA,运行RT-PCR,以测定对照和处理植物组中的SPL17表达水平。测定了位于dsRNA分子不同区域的两个不同的引物组(参见表10)(图28)。与对照植物相比,当对从14周龄植物中提取的RNA运行RT-PCR时,以高效率实现处理植物中SPL17 mRNA表达的减量调节(图29)。

[0412] 表10:用于萌发后5天水稻种子中的SPL17 dsRNA分子的RT-PCR的引物。

引物组和位置	引物名称和方向	引物序列	引物长度
1-在 dsRNA 中	osaSPL17_119F3	CTCAGCCATGGGATACTACC/74	20
	osaSPL17_189R3	GCTGGCCGTTGACGACATTG/75	20
2-在 dsRNA 之外	osa spl17 454Fwd	TTCAGCCACTCCACCAATG/76	19
	osa spl17 512Rev	AAGAAGATGATCAATGGTCTC/77	21

[0414] 实施例16

[0415] 具有互补dsRNA/siRNA的微小RNA目标基因的沉默

[0416] 通过目标基因特异性dsRNA的转录后基因沉默的高特异性和效率已成为产生优选表型真核生物的优选方法,其中一种或多种基因的表达降低或失活。设计使玉米(*Zea mays*)和水稻(*Oryza sativa*)微小RNA目标基因沉默的特定dsRNA序列。具体地说,将使用显示与非生物胁迫耐受性改进有关的微小RNA。下表11提供采用PCR扩增产生的目标基因序列的几个实例,以测试其各自的dsRNA/siRNA混合物的基因沉默能力。然后将使用这些dsRNA分子以减少选定目标基因的内源水平。

[0417] 表11:目标基因序列和PCR的引物

Mir 的靶	目标基因	生物体	登记号	目标序列/SEQ ID NO:	正向引物 /SEQ ID NO:	反向引物 /SEQ ID NO:	产物长度
miR169	NFY-A3	玉米	NM_001153839	GATGAAGATCATGGGAA GGATAATCAGGACACATT GAAGCCAGTATTGTCCTT GGGGAAGGAAGGGTCTG CCTTTTTGGCCCCAAAAA TAGATTACAACCCGTCTT TTCCTTATATTCCTTATAAC TGCTGACGCTTACTATGG TGGCGTTGGGGTCTTGAC AGGATATGCTCCGCATGC CATTGTCCATCCCCAGCA AAATGATACAACAAATA GTCCGGTTATGTTGCCTG CGGAACCTGCAGAAGAA GAACCAATATATGTCAAT GCAAAACAATACCATGC GATCCTTAGGAGGAGGC AGACACGTGCTAAACTGG AGGCGCAAAACAAGATG GTGAAAGGTCGGAAGCC GTACCTTCGTGAGTCTCG ACACCGTCATGCCATGAA GCGGGCCCGTGGCTCAGG AGGGCGGTTCCCTCAACAC AAAGCAGCAGCTCCAGG AGCAGAACCAGCAGTAC CAGGCGTCGAGTGGTCA ATGTGCTCAAAGACCATT GGCGACAGCGTAATCTCC CAAAGTGGCCCCATTTGC ACGCCCTCTTCTGACGCT GCAGGTGCTTCAGCAGCC AGCCAGGACCGGGCTG CTTGCCCTCGGTTGGCTT CCGCCCCACAGCCAATT CAGTGAGCAAGGTGGAG GCGGCTCGAAGCTGGTCG TGAACGGCATGCAGCAG CGTGTTCACCATAAAG TGAAGAGAAGTGGGCAC GACACCATTCAGGCGC GCACTGCCTGTGGCAACT CATCCTTGGCTTTTGAAA CTATGAATATGCAATGGA CATGTAGCTTTGAGTTCC TCAGAATAA/78	TAATA CGACT CACTA TAGGG CCGCA TGCCA TTGTC CATCC/ 84	TAATAC GACTCA CTATAG GGTGCA TGCCGT TCACGA CCAG/85	537 bp
				TAATA CGACT CACTA TAGGG CAAAT AGTCC GGTTA TGTTG/ 86	TAATAC GACTCA CTATAG GGGCTA CATGTC CATTGC ATATTC/ 87	619 bp	
	HAP2 E	水稻	AB288031.1	TCAGTGTGTTGTCCTCA GATATTAACAACAATGAT AGTTGTGGGAGCGGGA CCATGGCACTAAGTCGGT ATTGTCTTTGGGGAACAC AGAAGCTGCCTTTCCTCC	TAATA CGACT CACTA TAGGG CTGCC TTTCC	TAATAC GACTCA CTATAG GGTGCT GTTCTC TGGGCA	535 bp

[0418]

[0419]

				TTCAAAGTTCGATTACAA CCAGCCTTTTGCATGTGT TTCTTATCCATATGGTAC TGATCCATATTATGGTGG AGTATCAACAGGATACAC TTCACATGCATTTGTTCA TCCTCAAATTACTGGTGC TGCAAACCTTAGGATGCC ATGGGCTGTTGATCCTTC TGTAGAAGAGCCCATATT TGTC AATGCAAAGCAATA CAATGCGATCCTTAGAAG AAGGCAAACGCGTGCAA AATTGGAGGCCAAAAT AAGGCGGTGAAAGGTCG GAAGCCTTACCTCCATGA ATCTCGACATCATCATGC TATGAAGCGAGCCCGTGG ATCAGGTGGTCGGTTCT TACCAAAAAGGAGCTGCT GGAACAGCAGCAGCAGC AGCAGCAGCAGAAGCCA CCACCGGCATCAGCTCAG TCTCCAACAGGTAGAGCC AGAACGAGCGGCGGTGC CGTTGTCCTTGCAAGAA CCTGTGCCCAGAGAACAG CACATCCTGCTCGCCATC GACACCGACAGGCTCCG AGATCTCCAGCATCTCAT TTGGGGGCGGCATGCTGG CTCACCAAGAGCACATCA GCTTCGCATCCGCTGATC GCCACCCACAATGAACC AGAACACCCTGTCCCG TCATGAGGTGAAAACCTC GGGATCGCGGGACACGG GCGGTTCTGGTTTACCCT CACTGGCGCACTCCGGTG TGCCCGTGGCAATTCATC CTTGGCTTATGAAGTATC TACCTGATAATAGTCTGC TGTCAGTTTATATGCAAT GCAACCTCTGTCAGATAA ACTCTTATAGTTTGTTTTA TTGTAAGCTATGACTGAA CGAACTGT/79	TCCTT CAAAG TTC/88  TAATA CGACT CACTA TAGGG CATTG GCTGT TGATC CTTCT G/90	CAGG/89  TAATAC GACTCA CTATAG GGTTCCG TTCAGT CATAGC TTAC/91	722 bp
miR156	SPL17	水稻	JN192 988.1	CATGGTGGCTCAGCGGCT GGGGCACCAATGCTCCAC CACCCAGCCTTTGAGCTC ACCTCAGGTGGATGTCTC GCGGGAGTCGCCACCGA CTCCAGCTGTGCTCTCTC TCTTCTGTCAACTCAGCC ATGGGATACTACCCAAAG CACCAGCAGCCACAACC	TAATA CGACT CACTA TAGGG TCACC TCAGG TGGAT GTCTC/ 92	TAATAC GACTCA CTATAG GGCATT GGTGGA GTGGCT GAAG/93	500 bp

				GGTCCCCGCCAATGTCGT CAACGGCCAGCGCCTTCG GAGGCGGCAACAACCCG GTGTGCGCCCTCGGTCATG GCAAGCAACTACATGGC GGCGAGCCCCGGCTGGA ACAGCTCCAGCCGGGGCC ATGACGGCGCCAGGAAC GTGCACCTGCCGCCACCG CACGGGGTTGTGCTGAAC GAGGTCCCTCCGGGCTCT GTCCACCACGGCCATTTC TCCGGCGAGCTCGAGCTC GCACTGCAGGGAGGTGC CCCGTCCAACCGGCCGGA AGCCAAGCATGGCTCCGG CAGCGGCGCCTTCAGCCA CTCCACCAATGCCATGAA CTGGTCTCTGTAGAGACC ATTGATCATCTTCTT/80	TAATA CGACT CACTA TAGGG CCAAT GCTCC ACCAC CCAGC CTTT/9 4	TAATAC GACTCA CTATAG GGAGTT CATGGC ATTGGT GGAGTG G/95	497 bp
[0420]	SBP-A 3	玉米	HQ85 8696.1	ATGGAAGGAAACGGTGG CGCGGGCGGCGGTAGCG GAAGCGCGGCACCGCCCT GGGATCTCGCCATGCACT GGGCACCCGCCGTAGTGT CGTCTACCCGCCGCAGC CCTTGAGCTGCAGCAGC AGGAGCTTACCTGCCTCA AGCTGGGGAAGCGGCC GCCTGCTGCTGGGCAGGG GCGCCGGGCAACCAAGC GGCGCAGGTCCACGGCA ATGGCGGCGCTGGTGGCG CAGCTGCTGAGGGTAAG AGGAAGGACAAGGCGCC TGCCGCGGCGGCCGTGAC GAGGTGCCAGGTGGAGG GGTGCCACCTGTCGCTGG CGGACGCCAAGGAGTAC CACCGGCGGCACAAGGT GTGCGAGGCGCACTCAA GTGCGCCCCGGGTCGTCGT CCTCGGCGCCGAGCAGCG CTTCTGCCAGCAGTGCAG CCGGTCCACGCGATCTC GGAGTTCGACGACGCGA AGCGGAGCTGCCGACGG CGTCTGGCCGGGCACAAC GAGCGGCGGCGGAAGAG CAACGCCAGCGAGGCCA TGGCAAGAGGCGTCGCG CACCCACACGGAGTGAC GGCTTTCGGCCACGGCGG CTTCTGCCCTCGCGCGG CCTCGTCCCCGCAGGGTC GTCCCCGGCGGCGGCTGG	TAATA CGACT CACTA TAGGG CGCCG TAGTG TCGTC CTACC/ 96	TAATAC GACTCA CTATAG GGAAAG CCGTCA CTCCGT GTGG/97	529 bp
				TAATA CGACT CACTA TAGGG CGCAG GTCCA CGGCA ATG/98	TAATAC GACTCA CTATAG GGCGGT CGGAGA CGAAGT ACTGC/9 9	650 bp	

				TGCTCTCTCTCTTCTGTCA TCGGCCAGAGGCAGCGT GGCGGGCGCCAGCGGGC CCTGGCTGGTCACGGCGG CGCGGGAGGACATCCCG GCGCGCTCCAGCGCGGCG CTCGACGACCTTATCGCC GAGAACC GCGCCCGCCG GCTCCTCGCGCGGCAGTA CTTCGTCTCCGACCGCTC GCCGGCGCCAGACGGG ATTCGTGCGCTCT/81			
miR164	NAC (TF 同 系物)	水稻	NM_0 01064 881.1	ATGAGCGGGATGAATTCG CTGAGCATGGTGGAGGC GAGGCTGCCCGCGGGT CAGGTTCCACCCGCGAGA CGACGAGCTCGTGCTGGA CTACCTGGAAGGAAGCT CCTCGACGGCGGCGTGGG CGGCGCCGCGGCGGCGG CGGCGGCGGTACCATCT ACGGCTGCCCGGTGATGG TCGACGTCGATCTCAACA AGTGCAGCCATGGGAC CTTCCTGAGATCGCTTGC GTTGGTGGCAAGGAGTG GTACTTCTATAGCCTTAG GGATAGGAAGTATGCAA CTGGCCAACGAACAAAT AGAGCAACCGAATCGGG CTACTGGAAGGCCACAG GAAAAGATCGCCAATA AGCCGGAAGGATTGCTC GTCGGTATGCGAAAAACC CTGGTGTTCTACAAAGGT AGAGCCCCTAAGGGGAA GAAGACCGAGTGGGTCA TGCATGAATCCGCAAAG AAGGACAAGGGGATCCG ATGAAGTTGCCTCTCAAG GAGGACTGGGTCTTGTGT AGAGTCTTCTACAAGAGT AGGACAACCATTGCCAA GCTGCCAACGGAGGGTA GCTACAACAATATTGACA GTGTGGCCACAACCTCAC TGCCTCCCTCACTGACA ACTACATTGCATTTGATC AGCCTGGTTCAATGCAAA ACCTAGAGGGTTATGAGC AAGTGCCCTGCTTCTCCA ATAATCCCTCTCAACAGC CATCGTCGTCGATGAATG TTCCGTTGACATCGGCCA TGGTTGATCAAGAGCAAA ACAATATGGGTAGGGCG	TAATA CGACT CACTA TAGGG TTCAG GTTCC ACCCG CGAGA C/100	TAATAC GACTCA CTATAG GGCCGT TGGCAG CTTGGC AATGG/1 01	545 bp
				ACGGCTGCCCGGTGATGG TCGACGTCGATCTCAACA AGTGCAGCCATGGGAC CTTCCTGAGATCGCTTGC GTTGGTGGCAAGGAGTG GTACTTCTATAGCCTTAG GGATAGGAAGTATGCAA CTGGCCAACGAACAAAT AGAGCAACCGAATCGGG CTACTGGAAGGCCACAG GAAAAGATCGCCAATA AGCCGGAAGGATTGCTC GTCGGTATGCGAAAAACC CTGGTGTTCTACAAAGGT AGAGCCCCTAAGGGGAA GAAGACCGAGTGGGTCA TGCATGAATCCGCAAAG AAGGACAAGGGGATCCG ATGAAGTTGCCTCTCAAG GAGGACTGGGTCTTGTGT AGAGTCTTCTACAAGAGT AGGACAACCATTGCCAA GCTGCCAACGGAGGGTA GCTACAACAATATTGACA GTGTGGCCACAACCTCAC TGCCTCCCTCACTGACA ACTACATTGCATTTGATC AGCCTGGTTCAATGCAAA ACCTAGAGGGTTATGAGC AAGTGCCCTGCTTCTCCA ATAATCCCTCTCAACAGC CATCGTCGTCGATGAATG TTCCGTTGACATCGGCCA TGGTTGATCAAGAGCAAA ACAATATGGGTAGGGCG	TAATA CGACT CACTA TAGGG CGTGC TGGAC TACCT GGAAA G/102	TAATAC GACTCA CTATAG GGCAAC CATGGC CGATGT CAAC/10 3	708 bp

[0421]

[0422]	NAC5	玉米	NM_001154298.1	ATCAAGGATGTGCTGAGC CAATT/82 ATGGAGCACGACGTGCA CCACCAGCAGGCCATGG AGCTGCCGCCGGGGTTCC GATTCCACCCACCGACG AGGAGCTCATCACGCACT ACCTCGCCAGGAAGGCC GCCGACGCCCGCTTCGCC CCGCGCGCCGTCGGCGAG GCCGACCTCAACAAGTGC GAGCCATGGGACCTGCCA TCCCGGGCGACGATGGGC GAGAAGGAGTGGTACTTC TTCTGCGTCAAGGACCGC AAGTACCCGACGGGACT GAGGACGAACCGGGCCA CCGAGTCGGGATACTGGA AGGCGACGGGCAAGGAC AGGGAGATCTTCAGGAG CAAGGCCCTCGTCGGCAT GAAGAAGACGCTCGTCTT CTACACGGGGAGGGCGC CCAGGGGAGGCAAGACC GGCTGGGTCATGCACGAG TACCGCCTCCACGGCAAG CACGCCAGCAGCAGCCG CCTCATGCCGTCGTCGGT CAGAGCTGGCGCGTCAA AGGACGAGTGGGTGCTGT GCAGGGTGTTCAAGAAG AGCATCGAGCCGCCCGCG TCAGTGGGCAAGAGGTC GTCGGTCGCGTGTACGGG GATGATGTTGGTGGAGGA CGTCGTGGGACCGCCGTC CATGTCCATGGAGGACGA CCTCGCCGCGTGCGCGCT GCCTCCGCTGATGGACGT GTCCGGCGGTGGCGGCGC CAACATGGCGGCGGCGTC CATCGAGCTGCTGGCGCC ACCGGCACCACACGTGAC CTGCTTCTCCAACGCGCT GGAGGGCCAGTTCCTTCT GAACCCACCCTGCCTCCA CCCCTCCACGTCGCCGCT CC/83	TAATA CGACT CACTA TAGGG CCACC GACGA GGAGC TCATC/ 104 TAATA CGACT CACTA TAGGG AGGCC GACCT CAACA AGTG/ 106	TAATAC GACTCA CTATAG GGCGAC GTCCCTC CACCAA CATC/ 105 TAATAC GACTCA CTATAG GGTCAG GAAGAA CTGCC CTCCAG/ 107	565 bp 664 bp
--------	------	----	----------------	---	---	--	------------------------

[0423] 实施例17

[0424] 番茄种子中的ARF-8基因沉默

[0425] 番茄种子采用实施例1所述方案处理,未经洗涤的种子用200µg/ml的ARF-8 dsRNA浓度在15°C下处理24小时,并立即种植在土壤中。在处理3和8周,采用RT-PCR检查基因的表达水平(参见表12)。处理后3周,在dsRNA处理植物中观察到表达的变化(图30A-B)。

[0426] 与对照植物相比,用对ARF8基因是特异性的dsRNA分子处理的植物显示表型差异。在不同的时间点(55、62和72天)观察到这种表型差异,并通过高度降低来证实(图31A-C)。虽然对照植物的平均高度约为36cm,但dsRNA处理的植物平均起来高为约30cm(图31D)。除

了其高度降低(垂直发育延迟)以外,与对照植物相比,dsRNA处理的植物显得较多分枝(水平发育提高)。因此,在处理55和72天,相对于其对照对应物,用对ARF8有特异性的dsRNA处理的植物显得较矮和较多分枝,如图32A和32B中可见。

[0427] 表12:用于番茄中ARF-8 mRNA分子的RT-PCR的引物和ARF-8 dsRNA产物

引物名称和方向	引物序列	引物长度
slyARF_8_1816F4	CCTCAACAGTCCTGGATGTC/108	20
slyARF_8_1896R4	CCCGTAAGTTGGAAGTGATG/109	20
ARF 8 dsRNA 产物 1	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCTTCTC CTCCCTACAACGTGTCTAACGTCGCTACTAC ATCAATTGATGCTGATATATCCTCTATGCCAC TAGGGACTTCTGGATTCCGAATCCCTTGTAT AGTTATGTGCAAGATTCTACTGACTTGTTGCA TAATGTAGGGCAAGCTGATGCACAACTGTG CCCCGTACATTTGTCAAGGTTTACAAATCAG CGTCCCTTGGGAGGTCATTGGACATCACTCG GTTCAACAGCTATCATGAGCTGCGACAGGAA TTAGGGCAGATGTTTCGGTATCGAAGGGTTGC TTGAAGACCCTCAAAGATCAGGCTGGCAGCT TGTATTTGTTGACAGGGAGAATGATGTCCTT CTCCTTGGAGACGATCCGTGGGAGGAATTTG TCAATAATGTTTGGTACATCAAATTCCTTCA CCCGAGGATGTGCAGAACTGGGGAAAGAG GAGGTTGGATCCCTCTCCCTATAGTGAGTCG TATTAG/110	产物 1
ARF 8 dsRNA 产物 2	CTAATACGACTCACTATAGGGAGATGGGAGA TTGAGCCTTTGACTACTTTTCCGATGTATCCA TCTCTTTTTCTCTAAGGCTAAAGAGGCCTTT CTATCAAGGAACCTCATCTTATCAGGATAGT ACAATGAAGCTATTAATCGAATGTCATGGT TAAGAGGGAATGCTGGTGAGCTAGGACATCA TTCAATGAATCTTCAGTCTTTTGGCATGCTTC CTTGATGCAACAGAGAGTCGATTCAACAAT TCTCCCAAATGATATTAATCAGCACTATCAA GCTATGCTGGCTACTGGCTTGCAAAGTTTTG GGAGTGGAGATTTACTGAAACAGCAATTAAT GCAGTTTCAGCAGCCTGTCCAATATCTGCAA CATGCAAGTACTGAGAATTCAATTTTGCATC AGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAAATAATGC AGCAAGCAGTTCATCAGCATATGCTGCCTGC TCAAACCCAAATGCTGTCAGAGAACCTTCAA AGGCAATCCAGCATCAATCCATCTCCCTAT AGTGAGTCGTATTAG/111	产物 2

[0428]

[0429] 实施例18

[0430] 番茄种子中的FW2.2基因沉默

[0431] 番茄种子采用实施例1所述方案处理,未洗涤的种子用100 $\mu$ g/ml的FW2.2 dsRNA浓

度在15℃下处理24小时,并立即种植在土壤中。在萌发后9周,采用RT-PCR检查基因的表达水平(引物列于表13中)。与对照植物相比,在dsRNA处理植物中检出FW2.2的表达水平降低将近2倍(图33)。

[0432] 虽然如此,与对照植物相比,用对FW2.2基因有特异性的dsRNA分子处理的植物不显示表型差异,排除了作为之前实施例中观察到的表型作用的替代解释的毒性作用。在处理72天后,植物呈现类似的高度和外观(图34)。

[0433] 表13:用于番茄中FW2.2 dsRNA分子的RT-PCR的引物和FW2.2 dsRNA产物

引物名称和方向	引物序列	引物长度
slyFW2_316F2	GAGGCACCTTGTGTTGATTG/112	20
slyFW2_406R2	CAAAGCCACGGTTCCTTAAGC/113	20
[0434] FW2.2 dsRNA 产物	CTAATACGACTCACTATAGGGAGATCCAGGTCCA ATGAAACAACCTTATGTTCCCTCACTATGTAT CTGCCCCCGGCACCACCACGGCGCGGTGGTCGA CTGGTCTTTGTCATTGTTTTGATGACCCTGCTAAC TGTTTAGTTACTAGTGTGGCCCTGTATCACCTT TGGACAGATTTCTGAAATACTAAACAAAGGAAC AACTTCATGTGGGAGTAGAGGTGCATTATATTGT TTGCTGGGATTGACAGGATTGCCTAGCCTATATT CCTGCTTCTACAGGTCTAAAATGAGGGGGCAATA TGATCTGGAAGAGGCACCTTGTGTTGATTGTCTT GTACATGTATTCTGTGAACCTTGTGCTCTTTGCCA AGAATACAGAGAGCTTAAGAACCGTGGCTTTGA TATGGGAATAGGGTGGCAAGCTAATATGGATAG ACAAAGCCGAGGAGTTACCATGCCCCCTTATCAT GCAGGCATGACCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATT AG/114	

[0435] 实施例19

[0436] 水稻中的DELLA基因减量调节导致萌发种子的根较发达

[0437] 水稻种子采用实施例1所述方案处理,将种子洗涤4小时,在室温下干燥24小时,并用66μg/ml的DELLA dsRNA浓度在15℃下直接处理36小时。水稻种子用针对Della基因的dsRNA处理(参见下表15),Della基因是已知的植物生长阻抑物。具有突变型Della基因的拟南芥苗较大,具有较长的根系(Josse, E.M., Gan, Y., Bou-Torrent, J., Stewart, K.L., Gilday, A.D., Jeffree, C.E., Vaistij, F.E., Martínez-García, J.F., Nagy, F., Graham, I.A.和Halliday, K.J. (2011) A DELLA in disguise: SPATULA restrains the growth of the developing Arabidopsis seedling (伪装中的DELLA: SPATULA抑制发育中的拟南芥幼苗的生长). Plant Cell 23: 1337-1351)。图35显示使用dsRNA种子处理的拟南芥表型的拟态,其与对照苗相比,经处理的苗较大,根较长。

[0438] 实施例20

[0439] 水稻中的NRR基因减量调节导致萌发种子的根和嫩枝较发达

[0440] 水稻种子采用实施例1所述方案处理,将种子洗涤4小时,在室温下干燥24小时,并

用约13 $\mu$ g/ml的NRR dsRNA浓度在15 $^{\circ}$ C下直接处理36小时。水稻种子用针对NRR基因的dsRNA处理,发现其因响应水稻中的大量营养素而调节根生长(Zhang等, 2012, *Mol Plant* 5 (1):63-72)。使用RNAi的具有NRR水平降低的转基因水稻苗显示当在氮限制条件下生长时具有较长的根。图36显示使用dsRNA种子处理的该表型的拟态,与对照苗相比,所得的经处理的苗较大,并具有较长的根。

[0441] 表14: 水稻中NRR dsRNA分子的产物

引物名称和方向	引物序列	引物长度
NRR dsRNA 产物 1	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGCTCCTGA ACCCATCATTGAAGAACCAGTGCTTAGCCTTGA TCCAGTTGCAGCAGCCATTTTCGATGATGTCTGG CAGTGAGAACGTAATGGATGAAACTATAGAGG TTGCAGATATCAGCGACATTCAGAATGACTCTC TTTTAAGCGAAGTATTATACGAGTGCGAGAAGG AACTCATGGAGAAGTCCGCAATCGAAGAGACT ATTTCTGAACTGCTGGACGTCAAGATTCCTATG CTGCAAGTGGAAAGAGTTCCCTAGGGAAACCCA AGTACAACCTACCGCCATGGAGAAGGAGAAGC CATCAGTTCCTGAATGTTGTTCACTCCAGAAAA GTGTCAGTTCTGGGTGCCTCAACTCAGCTGATT GGATCAATGGACCAGCCAGGCCAAACTTCCTGG ACTTCCAAGGATTGGACTTTGAGACAGCGTTTG GGTTGAGGAGGGCATAACAGCGAAGGAGACATT CTCCCTATAGTGAGTCGTATTAG/115	产物 1
NRR dsRNA 产物 2	CTAATACGACTCACTATAGGGAGACATGGAGA AGTCCGCAATCGAAGAGACTATTTCTGAACTGC TGGACGTCAAGATTCCTATGCTGCAAGTGGAAAG AGTTCCCTAGGGAAACCCAAGTACAACCTACCGG CCATGGAGAAGGAGAAGCCATCAGTTCCTGAA TGTTGTTCACTCCAGAAAAGTGTCAGTTCTGGG TGCCTCAACTCAGCTGATTGGATCAATGGACCA GCCAGGCCAAACTTCCTGGACTTCCAAGGATTG GACTTTGAGACAGCGTTTGGGTTGAGGAGGGCA TACAGCGAAGGAGACATTCAGAATCTTGGAGCT AGCACCCCTCGACCCGGAACTCAGGAAACGC TCAATTAGCATCTTGCGAGAGGCTTGTAACCAT CAGTGACCTGAAATCTGAAGAAAGGAAGCAGA AGCTATCTAGGTACAGAAAGAAGAAGGTGAAG AGAAACTTTGGCAGAAAGATCAAGTATGCTTGC AGGAAGGCTCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA G/116	产物 2

[0442] 实施例21

[0443] 3种内源基因的同时沉默

[0444] 在本实施例中,同时测试了使3种基因沉默的作用。水稻种子采用实施例1所述方案处理,将种子洗涤4小时,在室温下干燥过夜,用含有针对以下3种基因的dsRNA的混合物(152.3 $\mu$ g/ml终浓度)的溶液在15 $^{\circ}$ C下直接处理42小时:Hap2e (59.9 $\mu$ g/ml,参见表11)、Della (44 $\mu$ g/ml,参见下表15)和SQS (48.4 $\mu$ g/ml,参见下表16)。在萌发后18天,从萌发种

子的嫩枝中提取RNA,对3种基因的每一种运行RT-PCR (参见下表15)。如图37中可见图,所有3种基因的减量调节是非常有效的,经处理的植物显示不同量的每个单独基因的表达降低,范围从最小降低10%到基因完全沉默(等于100%减量调节)。

[0446] 表15:用于Hap2e、De11a和SQS基因的表达水平的RT-PCR分析的引物和dsRNA产物。

引物名称和方向	引物序列	引物长度
osaHAP2E122F7	GTGACTCGTCACCAACAAAG/117	20
osaHAP2E202R7	TGTGTTGTCCGTTGAGACTG/118	20
osaDella1410F5	CAGTTCGCGCACACCATTTCG/119	20
osaDella1494R5	GCAGCATGAACGGCTCCAAG/120	20
osaSQS465F3	TCCGCAATGCCGTGTGCATC/121	20
osaSQS543R3	GCGGCAGGAATGCTAGTGTC/122	20
Della dsRNA 产物	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCCCACTT CTACGAGTCCTGCCCTACCTCAAGTTCGCC ACTTCACCGCAAATCAAGCCATCCTCGAGGCT TTCGCCGGCTGCCACCGCGTCCACGTCGTCGA CTTCGGCATCAAGCAGGGGATGCAATGGCCA GCTCTCCTCCAGGCCCTCGCCCTTCGTCCCGG GGCCCCCATCGTTCCGCCTACCGGCGTCGG CCCCCGCAGCCGGACGAGACCGACGCCTTGC AGCAGGTGGGTTGGAAGCTTGCCCAGTTCGCG CACACCATTTCGCGTTCGACTTCCAGTACCGGG ACTCGTCGCCGCCACTCTCGCGGACTTGGAGC CGTTCATGCTGCAGCCGGAGGGCGAGGCGGA CGCGAACGAGGAGCCTGAGGTGATCGCCGTC AACTCGGTGTTTCGAGCTGCACCGGCTGCTCGC GCAGCCCGGCGCGCTGGAGAAGGTCCTGGGC ACGGTGCACGCGGTGCGGCCAAGGATCGTCA CCGTGGTAGAGTCTCCCTATAGTGAGTCGTAT TAG/123	
SQS dsRNA 产物 1	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAATATCTAC AACC GCGACTGGCATTATTCATGTGGAACAAA AGACTACAAATTACTGATGGATAAGTTTCGCC TTGTCTCCACGGCTTTCTTGGAGCTTGGTCAAG GTTATCAAGAGGCAATTGAAGAAATCACTAG GCTAATGGGAGCAGGAATGGCAAATTTATCT GCAAGGAGGTTGAAACTGTTGATGACTACAAT GAGTACTGTCACTATGTAGCAGGGCTAGTGGG GTATGGGCTTTCAGGCTCTTTCATGCTGGTG GGACGGAAGATCTGGCTTCAGATTCACCTTCA AATTC AATGGGCTTGTTCCTGCAGAAAATCAA TATAATTAGGGATTATTTGGAGGACATAAACG AGATACCAAAGTACGATGTTCTGGCCTCGA GAAATATGGAGTAAATATGTCAATAAACTCGA GGATTTGAAATACGAGGAAAATTCAGAAAAG GCAGTTCAGTGTGTTGAATGATATGGTGACTAA CGCTCTGTCTCATCTCCCTATAGTGAGTCGTAT TAG/56	产物 1
SQS dsRNA 产物 2	CTAATACGACTCACTATAGGGAGACGCTCTGT CTCATGCTGAAGACTGCCTCCAATACATGTCA	产物 2

[0447]

[0448]	<p>物 2</p> <p>GCATTGAAGGATCATGCCATTTTCCGTTTTTGT  GCAATACCTCAGATAATGGCAATTGGGACATG  TGCTATTTGCTACAATAATGTGAATGTCTTTAG  AGGAGTTGTTAAGATGAGGCGTGGGCTCACTG  CACGAGTAATTGATGAGACAAACACAATGTC  AGATGTCTATACTGCTTTCTATGAGTTCTCTTC  GCTGATAGAATCGAAGATTGATAATAATGATC  CAAATGCTTCCCTAACGCGGAAACGTGTTGAT  GCGATAAAGAGAACCTGCAAGTCATCTTGCTC  ACTAAAGAGAAGGGGATACGATTTGGAGAAG  TCAAAGTACAACCTCCATGCTGATAATGGTTGT  ACTTCTGTTGGTGGCTCTCCCTATAGTGAGTCG  TATTAG/14</p>	
--------	--	--

[0449] 实施例22

[0450] 番茄中siRNA片段的荧光显微术

[0451] 番茄种子用荧光siRNA (siGLO, 1 $\mu$ M终浓度, Thermo Scientific) 在15 $^{\circ}$ C下处理24小时。

[0452] 处理后24小时将种子切成片, 使用Leica共焦显微镜拍摄荧光照片。如图38A-D所示, 将经处理的种子 (图38A, C) 与用缓冲液处理的对照种子 (图38B, D) 在一起显示。显然, siRNA以不同水平分布在胚和胚乳中。

[0453] 实施例23-29

[0454] 受剂量影响的SPL表达和DSRNA种子处理的动力学

[0455] 实施例23

[0456] 番茄中用50  $\mu$ g/ml dsRNA处理后SPL表达的改变

[0457] 按照实施例1所述方案, 番茄种子用来源于SPL基因的dsRNA (SEQ ID NO: 126) 和作为对照的GUS dsRNA处理。在无光生长室中在15-25 $^{\circ}$ C下通过在溶液中轻轻振荡种子至多24小时来进行处理, 接着用水洗涤3次持续1分钟。处理后, 将种子种植在土壤中, 并以16小时光周期在约25 $^{\circ}$ C下生长。需要时植物用自来水浇水。用于SPL dsRNA体外转录的引物和dsRNA的序列列于表16中。GUS dsRNA的序列见表3。

[0458] 表16: 用于SPL dsRNA体外转录的引物和所得dsRNA产物。

靶		序列/SEQ ID NO:	长度 (nt)
[0459] SPL	正向引物	CTAATACGACTCACTATAGGGAGATGGCCC AATAGGTTCTCCTCA/124	45
	反向引物	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCTGCC ATTGATGCTGATGC/125	44
	dsRNA	CTAATACGACTCACTATAGGGAGATGGCCC AATAGGTTCTCCTCATATGGATGGAACTA ACAAATGGGAAGGGAAGAGAAGCATTACT GAAGCTGAAAAGGAAGAGGATGAACATGG AAGTGTTGAAGAGGATAGCAAAAGAAAA GGGTATTGACTCTCTCTGGTAGGAAGCTAG TTGGTGAAGGGTCGGCACATCCTTCTTGCCA GGTCGATCAGTGCAGTGCAGATATGGCAGA TGCCAAGCCATACCATCGCCGCCACAAGGT GTGTGAGTTCCATTCAAAGTCTCCAATAGTA CTTATTAGTGGACTCCAGAAGCGATTCTGTC AGCAATGTAGCAGATTTTCATCTGTTAGCAG AGTTTGATGATGCTAAGAGGAGTTGCCGAA GGCGTTTGGCAGGTCACAATGAGCGCCGCC GTAAAATTACATATGACTCTCATGGAGAAA ATTTGGGCTGAAGAAGCATCAGCATCAATG GCAGCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAG/126	509

[0460] 在处理之前,通过吸光度 (NanoDrop) 和通过HPLC评价dsRNA浓度和纯度。按照NanoDrop测量的dsRNA的浓度对于SPL为1864  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,对于GUS为1964  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。HPLC显示,样品主要含有dsRNA,但其它分子(包括核苷酸和ssRNA)也存在于溶液中。按照HPLC分析,SPL溶液含有1219  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的dsRNA和838  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的ssRNA。GUS溶液含有633  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的dsRNA和167  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的ssRNA (参见图39A-B)。

[0461] 种子用浓度为50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (通过HPLC测量测定)的dsRNA处理10分钟、2、6和24小时。在种子培育后,SPL和GUS dsRNA溶液另外的HPLC分析显示ssRNA峰消失(参见图39)。

[0462] 处理后17天(在处理24小时的植物中)和18天(在处理10分钟、2和6小时的植物中),从萌发种子的叶中提取总RNA。使用寡dT引物制备cDNA,用SYBR Green (Quanta BioSciences)通过实时PCR,在处理植物和对照植物中测定SPL mRNA的表达水平。用于SPL的实时PCR的引物位于dsRNA区之外,在3' UTR处。引物序列与用作归一化子(在SPL的情况下,Expressed用作归一化子)的持家基因(Expressed和CAC)一起列于表17中。

[0463] 表17:用于通过实时PCR测定SPL mRNA的表达水平的引物

[0464]

靶	实时 PCR 方法		序列/SEQ ID NO:	长度 (nt)
SPL	SYBR Green	正向引物	CAATTCCTGGATTCTAAGC/1 27	20
		反向引物	CCCTTTACACAAGGGAAATG/1 28	20
	Taqman	正向引物	TTCTGAAGCAACATAAACAAG ATGTG/129	26
		反向引物	AATTTGCTTAGAAATCCGGGA AT/130	23
		Taqman 探针	6FAM-TTAAGCATGCTCTCTAT CT-MGBNFQ/131	19
Expressed	SYBR Green	正向引物	GCTAAGAACGCTGGACCTAAT G/132	22
		反向引物	AGAATAGCATCCGGTCTCAG/1 33	20
CAC	Taqman	正向引物	GGTGGCGCCTTTGATGAA/134	18
		反向引物	TCCAATAGCTCGTAAATCAGA ACAA/135	25
		Taqman 探针	VIC-ATGCCATCCGCAATAA-M GBNFQ/136	16

[0465] 该分析显示,在所有培育时间内SPL mRNA的增量调节显著(Wilcoxon秩和检验,p值<0.05)。在用SPL dsRNA处理10分钟、2小时、6小时和24小时的植物中SPL的中位值表达水平分别是用GUS dsRNA处理的对照植物的2.54、2.85、2.69和2.73倍(图40A-B至43A-B)。

[0466] 为了证实对SPL mRNA的作用明确由用SPL dsRNA处理引起,在用GUS dsRNA(番茄基因组中没有沉默相关同源性的对照序列)和FW2.2 dsRNA(这是番茄内源序列,参见表13)两者处理后,测量SPL mRNA的水平。当用SPL序列处理时,用50 µg/ml dsRNA处理24小时的植物显示SPL增量调节,但当用GUS或FW2.2序列处理时不增量调节(图40A-B)。图41A-B至43A-B显示不同处理时间对SPL表达的作用。所有所测试的处理时间即24小时-10分钟,均显示SPL mRNA水平的作用。

[0467] 在另一项实验中,0regon Spring变种的番茄种子用独立制备的针对SPL基因的dsRNA以50 µg/ml的浓度处理24小时。种子然后用水洗涤3次,并转移到含有12 ml水的种子萌发箱(每箱9粒种子)中。使箱中的种子在有光的生长室中在25°C下萌发7天,然后收获嫩枝组织用于RNA分析。通过Taqman进行RNA分析,使用番茄CAC测定法用于将值归一化以校正样品浓度的差异(表17)。表18显示与自用GUS dsRNA处理的种子萌发的苗相比,自用SPL dsRNA处理的种子萌发的苗中,SPL基因的mRNA水平升高约7倍。与用GUS dsRNA处理相比,用AFR8 dsRNA和0.1 mM EDTA(缓冲液)处理对SPL mRNA水平没有显著作用。

[0468] 表18:番茄幼苗嫩枝组织中SPL基因的mRNA浓度。

处理	数目	平均 RQ	标准差	与 GUS 对照的 %变化	倍数变化	Dunnett p 值
缓冲液	12	0.298	0.551	330%	4.3	0.4723
GUS	15	0.069	0.059	0%	1.0	1
Sl. ARF8-1	11	0.196	0.338	183%	2.8	0.846
Sl. SPL	18	0.463	0.655	568%	6.7	0.0577

[0470] 实施例24

[0471] 在番茄种子浸渍在dsRNA中后SPL表达改变

[0472] 如实施例1和23中所述,番茄种子用来源于SPL基因的dsRNA处理。

[0473] 通过将种子在室温下浸渍在dsRNA溶液中以50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度进行dsRNA处理,直接用重蒸水(DDW)洗涤。在处理13天,从萌发种子的叶中提取总RNA。如实施例23中所述,使用寡dT引物制备cDNA,在处理植物和对照植物中通过实时PCR测定SPL mRNA的表达水平。

[0474] 该分析显示SPL mRNA的显著( $p < 0.05$ )增量调节(图44A-B)。在用SPL dsRNA处理的植物中,SPL的中位值表达水平是用50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  GUS dsRNA浸渍的对照植物的1.78倍。

[0475] 实施例25

[0476] 番茄中用25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA处理后SPL表达变化

[0477] 如实施例1和23中所述,番茄种子用来源于SPL基因的dsRNA处理。

[0478] 种子用浓度为25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的dsRNA处理10分钟、2和24小时。在处理17天(在处理24小时的植物中)和18天(在处理10分钟和2小时的植物中),从萌发种子的叶中提取总RNA。如实施例23中所述,使用寡dT引物制备cDNA,在处理植物和对照植物中通过实时PCR测定SPL mRNA的表达水平。

[0479] 该分析显示,对于2和24小时的培育时间SPL mRNA显著( $p < 0.05$ )增量调节,对于10分钟培育时间显示增量调节趋势(图45A-B至47A-B)。在用SPL dsRNA处理2和24小时的植物中SPL的中位值表达水平分别是用GUS dsRNA处理的对照植物的2.23和2.48倍。

[0480] 实施例26

[0481] 番茄中用1或5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA处理后SPL表达改变

[0482] 如实施例1和23中所述,番茄种子用来源于SPL基因的dsRNA处理。

[0483] 种子用浓度为1或5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的dsRNA处理10分钟、2和24小时。在处理17天(在处理24小时的植物中)和18天(在处理10分钟和2小时的植物中),从萌发种子的叶中提取总RNA。如实施例23中所述,使用寡dT引物制备cDNA,在处理植物和对照植物中通过实时PCR测定SPL mRNA的表达水平。

[0484] 对于所有培育时间用1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA处理检测到SPL mRNA表达的增量调节趋势(图48A-B至50A-B)。

[0485] 实施例27

[0486] 番茄中用SPL siRNA处理后SPL表达改变

[0487] 如实施例1中所述,来源于SPL基因的dsRNA(表16)用ShortCut<sup>®</sup> RNA酶III(NEB)加工。

[0488] 将番茄种子在25 $^{\circ}\text{C}$ 下以50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度用所得siRNA处理2小时。处理后13天从萌发种子的叶中提取总RNA。如实施例23中所述,使用寡dT引物制备cDNA,在处理植物和对照

植物中通过实时PCR测定SPL mRNA的表达水平。

[0489] 检测到SPL mRNA表达的增量调节趋势。在用SPL siRNA处理的植物中SPL的中位值表达水平是用GUS siRNA处理的对照植物的1.89倍(图51A-B)。

[0490] 实施例28

[0491] 番茄中用50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dsRNA处理后FW2.2表达改变

[0492] 如实施例1和23中所述,番茄种子用来源于FW2.2基因的dsRNA处理。作为对照,种子用相同浓度的GUS dsRNA处理。FW2.2 dsRNA序列见表13。

[0493] 在处理之前,通过吸光度(NanoDrop)和通过HPLC评价dsRNA浓度和纯度。按照NanoDrop测量的dsRNA的浓度为1791  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。HPLC显示,样品主要含有dsRNA,但其它种类(核苷酸和ssRNA)也存在于溶液中。按照HPLC分析,FW2.2溶液含有1410  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的dsRNA和473  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的ssRNA(参见图52A-B)。

[0494] 种子用dsRNA以50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度(通过HPLC测量测定)处理2、6和24小时。处理后17天(在处理24小时的植物中)和18天(在处理2和6小时的植物中)从萌发种子的叶中提取总RNA。使用寡dT引物制备cDNA,在处理植物和对照植物中通过实时PCR测定FW2.2 mRNA的表达水平。用于FW2.2实时PCR的引物为TCTCTGGGCTGTATCATCC(正向引物,SEQ ID NO: 137)和GCTGCTCAAGGTGTTTGTG(反向引物,SEQ ID NO: 138)。这些引物位于dsRNA区以外,在3' UTR处。

[0495] 在所有培育时间内,实现种子处理后FW2.2 mRNA的减量调节( $p$ 值 $\leq 0.1$ )。在用FW2.2 dsRNA处理2、6和24小时的植物中FW2.2的中位值表达水平分别是用GUS dsRNA处理的对照植物的1/1.26、1/1.09和1/1.41(图53A-B至55A-B)。

[0496] 实施例29

[0497] 水稻中用DELLA dsRNA处理后DELLA表达改变

[0498] 水稻种子采用实施例1所述方案处理。将种子洗涤4小时,在室温下干燥过夜,并用DELLA dsRNA(参见表15)以142  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度在15 $^{\circ}\text{C}$ 下处理24小时。处理后13天从萌发种子的叶中提取总RNA。使用寡dT引物制备cDNA,在处理植物和对照植物中通过实时PCR测定DELLA mRNA的表达水平(参见表15)。

[0499] 该分析显示DELLA mRNA的显著( $p$ 值 $< 0.05$ )减量调节。在用DELLA dsRNA处理的植物中DELLA的中位值表达水平是用GUS dsRNA处理的对照植物中的1/3.73(图56A-B)。

[0500] 实施例30

[0501] 小麦中PDS dsRNA处理后幼苗发育延迟和PDS表达改变

[0502] 小麦种子采用实施例1所述方案处理。种子用两种PDS dsRNA片段(参见表19)的混合物在15 $^{\circ}\text{C}$ 下处理4小时,然后在湿纸巾上萌发。混合物中dsRNA的浓度对于片段#1(SEQ ID NO: 141)为136  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,对于片段#2(SEQ ID NO: 144)为125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在处理3天,用PDS dsRNA混合物处理的种子显示发育受阻和延迟,如通过与用200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  GUS dsRNA或0.1mM EDTA处理的对照种子相比苗较小和生根减少所见一样(图57A-B)。

[0503] 表19:用于小麦PDS dsRNA体外转录的引物和所得dsRNA产物。

[0504]

靶		序列/SEQ ID NO:	长度 (nt)
PDS	正向引物#1	CTCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAA CAAGAATCTGCCGGACTAC/139	47
	反向引物#1	CTCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAC ATCCTTCCATGCAGCTAAC/140	47
	dsRNA #1	CTCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAA CAAGAATCTGCCGGACTACTTGCTTCAG TATGGATACCAGCTGCCTATCATCTATG AACATAGCTGGAGCGAAGCAAGTAAGA TCTTTTGGCTGGACAACTTCATACGCAGA GGTGTTCACAAGTAGCAGCGTCCAGGC ACTAAAACTAGTCATCGTACGACCTCC CTTGGCTTAAGGAATAAAGTAAAAGGA TCACGTCATGGACTTCGTGCTCTGCAGG TTGTTTGCCAAGATTTTCCAAGGCCTCC	517

[0505]

		ACTAGAGAACACGATTA ACTATTTGGA AGCTGGCCAGCTTTCTTCGTCGTTTAGA AGCAGTGAACGCCCCAGTAAACCATTA CAGGTCGTGATTGCTGGTGCAGGACTGG CTGGTCTATCAACTGCAAATACTGGC AGACGCTGGCCACAAACCCATAGTGCTT GAGGCAAGAGATGTGTTGGGCGGAAAG TTAGCTGCATGGAAGGATGTCGCCCTAT AGTGAGTCGTATTACGAG/141	
	正向引物#2	CTCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAC GGAACAGTGAAGCACTTTG/142	47
	反向引物#2	CTCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAT TCGGGACGGTCTTGTA AAC/143	47
	dsRNA #2	CTCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAC GGAACAGTGAAGCACTTTGCACTTACTG ATGGGACTCAAATAACTGGAGATGCAT ATGTTTTTGCAGCACCAGTTGATATCTT CAAGCTTCTTGTACCACAAGAGTGGAG AGAGATCTCTTATTTCAA AAGGCTGGAT AAGTTGGTGGGAGTTCCTGTCATCAATG TTCATATATGGTTTGACAGAAA ACTGAA GAACACGTATGACCACCTTCTTTTCAGC AGGAGTTCACTTTTAAGCGTTTATGCAG ACATGTCTTTAGCGTGCAAGGAGTACTA TGATCCAAACCGTTCGATGCTGGAGTTG GTTTTTGGCTCCAGCAGAGGAATGGATCG GACGGAGTGACACCGAAATCATCGAAG CAACTATGCTAGAGCTAGCCAAGTTGTT TCCTGATGAAATCGCTGCTGACCAGAGT AAAGCAAAGATTCTTAAATACCATGTTG TGAAGACACCGAGGTCCGTTTACAAGA CCGTCCCGAATCGCCCTATAGTGAGTCG TATTACGAG/144	537

[0506] 实施例31

[0507] 玉米中用TB1 dsRNA处理后TB1表达改变

[0508] 玉米种子采用实施例1所述方案处理。将种子洗涤4小时,在30℃下干燥过夜,用TB1 dsRNA (参见表20)以25 µg/ml的浓度在15℃下处理24小时。作为对照,种子用相同浓度的CGMMV dsRNA (表1,产物1,SEQ ID NO: 8)处理。在萌发后7.5周,从萌发种子的叶中提取总RNA。使用寡dT引物制备cDNA,在处理植物和对照植物中通过实时PCR测定TB1 mRNA的表达水平,使用GPM120作为归一化子(参见表20)。

[0509] 该分析显示dsRNA处理后TB1 mRNA的减量调节。在用TB1 dsRNA处理的植物中TB1的中位值表达水平是用CGMMV dsRNA处理的对照植物中的1/9.88 (图58A-B)。

[0510] 表20:玉米TB1的dsRNA和用于TB1和GPM120 mRNA实时PCR的引物。

靶		序列/SEQ ID NO:	长度(nt)
TB1	dsRNA	CTAATACGACTCACTATAGGG AGGTGATCAACTCGCCGGACC TGCCGGTGCAGGCGCTGATGG ACCACGCGCCGGCGCCGGCTA CAGAGCTGGGCGCCTGCGCCA GTGGTGCAGAAGGATCCGGCG CCAGCCTCGACAGGGCGGCTG CCGCGGCGAGGAAAGACCGGC ACAGCAAGATATGCACCGCCG GCGGGATGAGGGACCGCCGGA TGCGGCTCTCCCTTGACGTTCG GCGCAAATTCTTCGCGCTGCA GGACATGCTTGGCTTCGACAA GGCAAGCAAGACGGTACAGTG GCTCCTCAACACGTCCAAGTC CGCCATCCAGGAGATCATGGC CGACGACGCGTCTTCGGAGTG CGTGGAGGACGGCTCCAGCAG CCTCTCCGTCGACGGCAAGCA CAACCCGGCAGAGCAGCTGGG AGGAGGAGGAGATCAGAAGC CCAAGGGTAATTGCCGTCTCC CTATAGTGAGTCGTATTAG/145	481
	正向引物	AATCGGTGTCGTCGATTTGG/146	20
	反向引物	GGCGGATACTGTTTGATCTC/147	20
GPM120	正向引物	GCTGCGTGTTGTGCGTTCTG/148	20
	反向引物	TCGTCGCGTGCTGTCTGTTC/149	20

[0512] 实施例32

[0513] 玉米中用NAC dsRNA处理后NAC表达改变

[0514] 采用convergent T7 RNA聚合酶方法,体外合成两种标示的NAC dsRNA序列(表11),并在0.1 mM EDTA中稀释至50 µg/ml总核酸的浓度。在轻轻振荡的同时,将15粒近交

(LH244) 玉米种子在7.5 ml的该dsRNA溶液中在15 ml管中在15℃下避光培育24小时。用dsRNA处理后，一组种子用水洗涤3次，然后在30℃下干燥过夜。第二组种子在dsRNA溶液中吸涨后直接种植。

[0515] 在处理后将种子转移到含有湿润滤纸的种子萌发箱(每箱15粒种子)，并在生长室装置中在25℃下避光萌发，或种植在土壤中并在温室中萌发。

[0516] 在萌发箱中处理后5天，从萌发种子中收获嫩枝组织(包括中胚轴和胚芽鞘基部)用于RNA分析。已干燥的种子只要4天萌发，而没有干燥步骤而萌发的种子需要5天以萌发。然而，干燥导致萌发同步性改进使得2组植物跨越相似的发育阶段。通过Taqman进行RNA分析，使用Zm. GPM120基因用于将值归一化以校正样品浓度的差异(表21)。将RQ值转化成log10用于分析。离群数据点定义为距均值3标准差，并在分析前从数据集剔除。

[0517] 种子用NAC dsRNA处理导致NAC表达增加，使得NAC mRNA水平是GUS对照值的1.7-2.2倍(表22和图59A和59B)。

[0518] 在另一项实验中，种子如上所述进行处理，并直接种植在土壤中。种植后12天，在种植前未洗涤和干燥的种子的V1叶中NAC mRNA表达降低(图59C和表23)。这些植物还显示种植后16天植物高度降低(表24)。

[0519] 表21:用于通过实时PCR测定NAC mRNA表达水平的引物。

靶		序列/SEQ ID NO:	长度 (nt)
[0520] NAC	正向引物	CTGGATTGGAACTGGGATTGT/150	22
	反向引物	TTGCCCCATTTTGCATATAGC/151	21
	Taqman 探针	6FAM-ATTGTGCCGTTGAATAT-MGBNFQ/152	17
GPM120	正向引物	AGGCTTTCGCTGCGTGTT/153	18
	反向引物	TGGCCCATCCAACTCAGA/154	19
	Taqman 探针	VIC-TGCGTTCTGCTTGAAT-MGBNFQ/155	16

[0521] 表22:玉米5日龄幼苗嫩枝组织中NAC基因的mRNA浓度。

处理	数目	平均 RQ	标准差	标准误差均值	下限 95%	上限 95%	倍数变化	以 log10 转化的 RQ 值与对照的 Dunnett 比较(如果 P 值 <0.05 则为显著)
[0522] NAC	22	0.904	1.225	0.261	0.361	1.447	1.7	0.0882
GUS	22	0.543	0.623	0.133	0.267	0.819		1.0000
NAC_干燥	21	0.401	0.267	0.058	0.279	0.522	2.2	0.0004
GUS_干燥	21	0.185	0.092	0.020	0.142	0.227		1.0000

[0523] GUS\_干燥和NAC\_干燥，用dsRNA处理后将种子洗涤并干燥。其它组在用dsRNA处理后直接放入种子萌发箱。适当时，与对照的比较采用Dunnett方法，对照组= GUS\_干燥或GUS。

[0524] 表23:玉米12日龄叶组织中NAC基因的mRNA浓度。

处理	数目	平均 RQ	标 准 差	标准 误差 均值	下限 95%	上限 95%	与 GUS 对照 的% 变化	倍数 变化	Dunnett p 值
GUS	22	2.56	1.17	0.25	2.04	3.08			1
NAC	21	1.94	0.72	0.16	1.62	2.27	-24.2%	0.76	0.0441

[0526] 表24:16日龄玉米植物的高度。

处理	N	平均高度 (cm)	标准差	标准 误差 均值	上限 95% 均值	下限 95% 均值	%变化	Dunnett p 值
GUS	43	48.91	3.37	0.51	49.94	47.87		1.0000
NAC	43	45.47	2.86	0.44	46.34	44.59	-7.04%	0.0001

[0528] 实施例33

[0529] 种子用HY5 dsRNA处理后莴苣植物中HY5 mRNA表达变化

[0530] LONG HYPOCOTYL 5 (HY5) 基因编码植物响应光的关键正调节物 (Oyama, Shimura 等, 1997)。莴苣在彼此具有79% DNA序列同一性的染色体5和6上含有与拟南芥HY5有关的2个基因。从各基因的cDNA序列中选择约500 bp区域作为触发物(表25), 并采用convergent T7 RNA聚合酶方法体外制备dsRNA。将dsRNA以50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度溶于0.1 mM EDTA中。在轻轻振荡的同时, 将30粒变种Sun Valley的莴苣种子在2 ml微量离心管中的1.5 ml的该dsRNA溶液中在15 $^{\circ}\text{C}$ 下避光培育24小时。种子然后用水洗涤3次, 然后转移到含有12 ml水的种子萌发箱(每箱9粒种子)中, 或转移到土壤中。使箱中的种子在25 $^{\circ}\text{C}$ 下在光下萌发7天, 然后收获嫩枝组织用于RNA分析。通过Taqman进行RNA分析, 使用莴苣遍在蛋白测定法用于值的归一化以校正样品浓度的差异(表25)。

[0531] 表25:HY5.5和HY5.6的dsRNA和用于实时PCR的引物。

[0532]

靶		序列/SEQ ID NO:	长度 (nt)
HY5.5	dsRNA	AGAGTTTCGGCTCAACAAGCAAGGGAGAG GAAGAAGGCATACTTGAATGAATTGGAAG TGCGAGTAAAAGAAATTGAAAAGAAGAA CTCCGAGCTTGAAGAGCGACTTTCACCTCT CCAAAATGAGAATCAAATGCTTAGACATA TCTTGAAAAACACTACAGCCGGTATGCAA GAAAAGAAGTAGACATATGATTAGAAGAG GAAAAGCATTACATGTGCAATCCGAATCA TAGCTTGAAAATCGAAGGGTTTGGTTT GATCGAGACTTGTTATTGTGGTTATTTCTT TTCTAGCAAACATAATGAGAATCCAACC ATCTTTACGTACGATTCGATTAAAGATCTT TAAGTCATGTAGGTGGTAATGGGCTGTGTT TCTAAATGACCAAAAAGATGTAAAGTAT TGCATATGATATGGGTTTTAATTTGTAGCA C/156	440
	F 引物	CATGTGCAATCCGAATCATAGC/157	22
	R 引物	ACCACAATAACAAGTCTCGATCCTAA/158	26
	Taqman 探针	6FAM-TGAAAATCGAAGGGTTTG-MGBNFQ/ 159	18
HY5.6	dsRNA	ATGCAGGAGCAAGCAGCAACGAGTTCCAT GGCGGCTAGTCTACCTTCAAGTAGCGAGA GATCTTCAAGCTCTGCTCTACAAATTGAAA TTAAAGAAGGAATGGAAAGTGATGACGAG ATCAGAAGAGTGCCGATATGGGCGGAGA AGCCGCCGGAGCATCAAGATCCGGCAGAG AAACCGGTTCAAATCAAATAATCCAGAC CGGGTTCAACACTCAGCTGAAGGAACAAA GAAAAGAGGGAAAACCTCTGCTGATAGAG AAAGCAAGCGATTAAAGAGATTGTTGAGG AATAGAGTATCGGCTCAACAAGCAAGAGA GAGAAAGAAGGCGTACATGACCGAGTTGG AGAGCCGAGTTAAAGAGTTGGAGAAGAA GAACTCGGAGCTTGAAGAACGTTT/160	401
	F 引物	CCACAATGCAAAATGAAAACCA/161	22
	R 引物	GCATCCAGACGTTGTGTTCT/162	21
	Taqman 探针	6FAM-TGCTTAGACACATCTTG-MGBNFQ/16 3	17
遍在蛋白	F 引物	TTGTCTTGAATTTTAGCTTTGACGTT/164	26
	R 引物	CCTTGACCGGAAAAACAATCA/165	21
	Taqman 探针	VIC-TCAATGGTGTCGGAGCTTCCACTTCC -TAMRA/166	27

[0533] 表26和图60A显示与用GUS dsRNA处理的种子的苗相比,当种子用来自HY5.5或HY5.6基因的dsRNA处理时, HY5.5基因的mRNA水平升高2-3倍。与用GUS dsRNA处理相比, HY5.6基因的mRNA水平在用HY5 dsRNA处理后升高约2倍(表27和图60B)。

[0534] 表26:用不同dsRNA处理的1周龄苗的嫩枝中HY5.5 mRNA的浓度。

HY5.5, 单因素方差分析的均值,  $\alpha=0.05$

处理	数目	平均 RQ	标准差	标准误差 均值	下限 95%	上限 95%	与 GUS 对照的% 变化	Dunnett p 值
缓冲液对照	28	0.013	0.005	0.001	0.011	0.015	-8%	0.9960
GUS-1 dsRNA	29	0.014	0.005	0.001	0.012	0.016	0%	1.0000
Sl.Hy5-5 + Sl.Hy5-6 dsRNA	25	0.033	0.013	0.003	0.028	0.038	135%	<.0001
Sl.Hy5-5 dsRNA	27	0.035	0.019	0.004	0.028	0.042	148%	<.0001
Sl.Hy5-6 dsRNA	30	0.046	0.026	0.005	0.037	0.056	227%	<.0001

[0536] 采用Dunnett方法与对照的比较,对照组= GUS-1。

[0537] 表27:用不同dsRNA处理的1周龄苗的嫩枝中HY5.6 mRNA的浓度。

HYS.6, 单因素方差分析的均值,  $\alpha=0.05$

处理	数目	平均 RQ	标准差	标准误差 均值	下限 95%	上限 95%	与 GUS 对照的% 变化	Dunnett p 值
缓冲液对照	28	0.002	0.001	0.000	0.002	0.003	-22%	0.2116
GUS-1 dsRNA	29	0.003	0.001	0.000	0.003	0.003	0%	1.0000
Sl.Hy5-5 + Sl.Hy5-6 dsRNA	25	0.005	0.002	0.000	0.004	0.005	53%	0.0002
Sl.Hy5-5 dsRNA	27	0.005	0.002	0.000	0.004	0.005	48%	0.0006
Sl.Hy5-6 dsRNA	29	0.008	0.002	0.000	0.007	0.008	142%	0.0000

[0539] 采用Dunnett方法与对照的比较,对照组= GUS-1。

[0540] 在另一项实验中,植物如上述处理,并在温室中生长2周。然后,收获穿孔叶片,分析mRNA浓度。在这些较老的植物中,观察到HY5表达降低。表28和图60C显示与自用作为对照的GUS dsRNA和莨苳DHFR dsRNA (表30)处理的种子生长的植物相比,当种子用来自HY5.5或HY5.6基因的dsRNA处理时植物中HY5.5基因的mRNA水平。表29和图60D显示与自用作为对照的GUS dsRNA和莨苳DHFR dsRNA (表30)处理的种子生长的植物相比,当种子用来自HY5.5或HY5.6基因的dsRNA处理时植物中HY5.6基因的mRNA水平。

[0541] 表28:用不同dsRNA处理的2周龄植物的叶中HY5.5 mRNA的浓度。

处理	数 目	平均 RQ	标准 差	标准 误差 均值	下限 95%	上限 95%	与 GUS 对照的 %变化	倍数 变化	Dunnett p 值
缓冲液	29	0.179	0.086	0.016	0.146	0.212	45%	1.4	0.0028
GUS-1	26	0.124	0.076	0.015	0.093	0.154	0%	1.0	1
Ls. DHFR	29	0.103	0.048	0.009	0.084	0.121	-17%	0.8	0.533
Ls. Hy5-5	28	0.058	0.038	0.007	0.043	0.073	-53%	0.5	0.0003
Ls. Hy5-5 + Ls. Hy5-6	29	0.065	0.030	0.006	0.054	0.076	-47%	0.5	0.0013
Ls. Hy5-6	27	0.061	0.054	0.010	0.040	0.082	-51%	0.5	0.0007

[0543] 表29:用不同dsRNA处理的2周龄植物的叶中HY5.6 mRNA的浓度。

[0544]

处理	数目	平均 RQ	标准差	标准误差均值	下限 95%	上限 95%	与 GUS 对照的 %变化	倍数变化	Dunnett p 值
缓冲液	29	0.005	0.003	0.001	0.004	0.006	41%	1.4	0.0166
GUS-1	26	0.003	0.002	0.000	0.003	0.004	0%	1.0	1.000
Ls. DHFR	28	0.003	0.001	0.000	0.003	0.004	-4%	1.0	0.9984
Ls. Hy5-5	29	0.003	0.002	0.000	0.002	0.003	-20%	0.8	0.4458
Ls. Hy5-5 + Ls. Hy5-6	29	0.002	0.001	0.000	0.002	0.002	-43%	0.6	0.009
Ls. Hy5-6	26	0.002	0.001	0.000	0.002	0.002	-41%	0.6	0.0188

[0545] 实施例34

[0546] 种子用DHFR dsRNA处理后莴苣植物中黄烷酮醇4-还原酶 (DHFR) mRNA表达改变

[0547] 黄烷酮醇4-还原酶 (DHFR) 是花色苷生物合成途径中的酶。在莴苣中鉴定出一种 DHFR基因,且524 bp区域选自cDNA序列作为触发物(表30)。采用针对DFR和GUS对照序列的 convergent T7 RNA聚合酶方法,体外制备dsRNA。

[0548] 表30:DHFR的dsRNA和用于实时PCR的引物。

[0549]

靶		序列/SEQ ID NO:	长度 (nt)
DHFR	dsRNA	AGAGGATTCTCCGACCACCGTGTGTGTCAC TGGAGCTGCCGATTCAATTGGTTCATGGCTC GTTATGAGACTTCTTGAACGTGGGTATAAT GTTTCATGCCACTGTTTCGTGACCCTGATGACA TAAAGAAAGTGAAACATTTATTGGAACACTAC CAAAAGCAGCAACAACTTGACGTTATGGA AGGCAGATTTGACACAAGAAGGAAGCTTTG ATGAAGCCATTGAAGGTTGTCATGGAGTCT TTCATGTGGCTACGCCTATGGACTTTCAGTC CAAGGATCCTGAGAATGAGATCATAAAGCC ACAATAGAAGGTGTATTAAGCATCGTAAG ATCATGTGTGAAAGTCAAAACAGTCAAGAA ATTGGTGTTCATCCTCTGCGGGGACAGTG AACGTGCACGAAATGATCAACTTCCGGTC TATGACGAGTCTCATTGGAGCGATTTGGAC TTCATCTACTCCAAGAAAATGACTGCATGG ATGTATTCGTATCAAAAACATTGGCAGAA AAAGCAGCAT/167	524
	F 引物	GGAGATGTTCAAAGGAGCAATTG/168	23
	R 引物	TTGATTGTGGAATATGGAAGCATT/169	24
	Taqman 探针	6FAM-TAGTTGCAGAGAGAAAG-MGBNFQ/170	17

[0550] 将dsRNA以50 µg/ml的浓度溶于0.1 mM EDTA中。莴苣变种8N LLF 65-2713141

Batavia是用于这些研究的深着色为红色的变种。在轻轻振荡的同时,将30粒莴苣种子在2 ml微量离心管中的1.5 ml的dsRNA溶液中在15℃下避光培育24小时。种子然后用水洗涤3次,然后转移到含有12 ml水的种子萌发箱(每箱10粒种子),或转移到土壤中。箱中的种子在光中在20℃下萌发7天,然后收获嫩枝组织用于RNA分析。通过Taqman进行RNA分析,使用莴苣遍在蛋白测定法用于值的归一化以校正样品浓度的差异(表25和30)。

[0551] 与用GUS dsRNA或缓冲液对照处理的种子相比,当种子用针对DHFR的dsRNA处理时DHFR的mRNA水平显著降低(表31和图61)。

[0552] 表31:用dsRNA处理的1周龄苗的嫩枝中DHFR mRNA的浓度。

处理	数目	平均 RQ	标准差	标准误差 均值	下限 95%	上限 95%	倍数变化	与对照的 Dunnett 比较
缓冲液对照	25	7.800	3.555	0.711	6.333	9.268	1.1	0.7386
GUS-2 dsRNA	28	7.256	2.792	0.528	6.173	8.338	1.0	1
Ls.DHFR dsRNA	23	4.966	2.548	0.531	3.864	6.068	0.7	0.0159

[0554] 采用Dunnett方法与对照的比较,对照组= GUS-2。

[0555] 实施例35

[0556] 用DND1 dsRNA处理种子后黄瓜中DND1 mRNA的表达改变和RKN根瘿形成减少

[0557] DND1 (defense no death),是一种植物防御的负调节物。DND1的突变导致组成型系统抗性和水杨酸水平升高(Clough等,2000)。在室温下(约20C),将Straight 8黄瓜变种的种子以单层放在塑料箱中,并覆盖5-12体积的水。轻轻搅拌的同时将种子在水中洗涤4小时。洗涤后,将种子在约30C下在滤纸上风干12-24小时。将黄瓜DND1 dsRNA(表32)悬浮于0.1mM EDTA(用0.5M pH8.0原液稀释)中至100µg/ml。使用1:5(w/v)比率的dsRNA溶液与种子(例如对于1克种子用含dsRNA的EDTA的5mL溶液)。将种子放入50mL锥形管,在15C下轻轻搅拌的同时培育24小时。培养后,轻轻搅拌的同时将种子各自在至完全充满塑料容器的体积的水中洗涤3次1分钟,并在种植前在滤纸上干燥。

[0558] 表32:GFP和黄瓜DND1的dsRNA和用于实时PCR的引物。

[0559]

靶		序列/SEQ ID NO:	长度 (nt)
DND1	dsRNA #1 (T33787)	GTCTTGGAATGCTACGCCTGTACCCAAGTG GGCGTTCCAGCCTTCCACTCCACCAGCTGCG ACCACGCCACCAACAACCCGAATGGGAAG CCTCCGCGGGCTCTTCCCTGGTTCCAATCCA ACCCACAAAATCCTCACCAGCGCCCCGACA TTCTTCGGCGGGTTGCTTCGGGACGGTTCTG GACCCAAGAAAGAAACCGGTTTCAGAGATG GAACCGGGTTCTGTTATTGGCCCCGGGAAT GTCTCTTGCGGTTGATCCGCTTTACTTCTAT GCTCTGTCTATTGGAAGAGGAGGATGGCCT TGCCTGTACATGGATGGTGGGTTGGCTGCC GGAGTTACGGTGGTTCGAACGTGTCTTGAT ATAGTGCACCTGTGGCACGTGTGGCTTCAGT TCAGGCTTGCTTACGTGTCGAAAGAGAGTA TGGTGATTGGGTGTGGGAAACTGGTGTGGG ATGCACGTGATATTGCTTCTCACTATGTTTCG TTCTTTCAAAGGC/171	498
	dsRNA #2 (T33788)	GTACGGTGCTTAGTGGATTGTTGCTTTTCAC TCTTTTGATTGGTAATATTCAGGTACTTTTG CACGCTGTCATGGCAAGGAGGCGAAAAATG CAGCTGAGATGTCGAGATTTGGAGTGGTGG ATGAGGAGACGACAATTGCCATCTCGTTTG AAACATCGAGTTCGACACTATGAGCACCAG AGATGGGCAGCTATGGGAGGAGAAGATGA GATGGAACATAATCAATGATTTGCCAGAAGG TCTTAGAAGAGATATCAAACGTCATCTTTGT GTTGACCTAATCAGAAAGGTGCCTCTCTTTC AAAACCTGGAGGAGCTGATTCTAGACAACA TATGTGACAAAGTCAAGCCACTTGTATTCTC CAAAGATGAAAAGATAATCAGAGAAGGAG ATCCTGTTCCAAGGATGTTATTCATAGTGTG TGGACGAGTAAAACGTAGCCAAAGCCTGAG CAAGGGCATGACAGCGACAAGTTTTATTGA ACCGGGAGGATTTCTTGGTGAC/172	506
	F 引物	CAGCGAGTTGCTTCTTGTATCCA/173	23
	R 引物	TCCTCAGAGCAAGACAAAGATAAGTTG/174	27
	Taqman 探针	6FAM-ACATTGTGAGAGAAACAAGT-MGBNF Q/175	20
GFP	dsRNA	GGTGATGCAACATACGGAAAACCTACCCTT AAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTG TTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCTC TTATGGTGTTCAATGCTTTTCAAGATACCCA GATCATATGAAGCGGCACGACTTCTTCAAG AGCGCCATGCCTGAGGGATACGTGCAGGAG AGGACCATCTTCTTCAAGGACGACGGGAAC TACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAG	499

[0560]		GGAGACACCCTCGTCAACAGGATCGAGCTT AAGGGAATCGATTTCAAGGAGGACGGAAA CATCCTCGGCCACAAGTTGGAATACAATA CAACTCCCACAACGTATACATCATGGCCGA CAAGCAAAAGAACGGCATCAAAGCCAATT CAAGACCCGCCACAACATCGAAGACGGCGG CGTGCAACTCGCTGATCATTATCAACAAAA TACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTA CCAGACAACCATTACC/176	
	F 引物	ATGGCTTGCTGCCTGATGTATC/177	22
	R 引物	GGTGGCAACAGCAGCATTCA/178	20
	Taqman 探针	VIC-ATGTTGTGCCTAAGGAC-MGBNFQ/179	17

[0561] 通过Taqman实时PCR进行RNA分析,使用黄瓜ELF1a测定法用于值的归一化以校正样品浓度的差异(对于引物和Taqman探针序列参见表32)。对自用DND1 dsRNA处理的种子萌发的15日龄黄瓜叶样品的分析证实,与用GFP dsRNA处理的对照种子相比DND1基因的表达改变(对于GFP dsRNA序列参见表32,对于实时PCR分析见表33和图62A)。

[0562] 表33:用DND1 dsRNA处理的15日龄黄瓜叶中DND1 mRNA的浓度。

处理	数目	平均 RQ	标准差	标准误差 均值	下限 95%	上限 95%	与 GFP 对照的% 变化	倍数变化	LOG10RQ 的Dunnett p 值
制剂 NI	19	0.806	0.157	0.036	0.730	0.881	3%	1.0	0.8571
T33776 GFP NI	20	0.782	0.209	0.047	0.684	0.879	0%	1.0	1.0000
T33787 DND NI	20	0.934	0.150	0.033	0.864	1.004	19%	1.2	0.0117
T33788 DND NI	20	1.060	0.204	0.046	0.965	1.156	36%	1.4	<.0001

[0564] 采用Dunnett方法与对照的比较,对照组= GFP-1。

[0565] 在另一项实验中,如上所述,将100粒黄瓜种子用含有黄瓜DND1转录序列的dsRNA(表32,dsRNA #2 T33788)处理。将处理种子置于1/4MS板中3天。将10 ml干沙加入各玻璃小瓶中,通过倾斜小瓶并将幼苗以正确方向铺放,使得子叶恰好沙上面,然后回倾以用沙覆盖胚根,来种植苗。将3.3 ml水加入各小瓶中,把小瓶放在荧光工作台下的托架上。将250个蠕虫状卵(vermiform egg)或300 J2 RKN接种在各管的50 ul去离子或矿泉水中。需要时给植物浇水。在接种后11天,通过洗掉根上的沙,进行黄瓜植物的收获。对各个样品进行的根的百分比瘿瘤评级,表明当与分别用0.1 mM EDTA和GFP dsRNA处理的对照相比时,RKN瘿瘤形成减少26%和21% (图62B)。

[0566] 实施例36

[0567] 种子用PMR5 dsRNA处理后黄瓜中PMR5 mRNA的表达改变

[0568] PMR5属于未知功能的植物特异性基因家族。拟南芥基因PMR5 的突变(白粉病抗性),具有富含果胶的细胞壁,并赋予白粉病抗性(Vogel等,2004)。

[0569] 如实施例35中所述,黄瓜种子用PMR5 dsRNA处理(表34)。如实施例35中所述分析自处理种子萌发的叶。与GFP处理种子相比,PMR5处理种子中表明PMR5基因的表达改变(表35和图63)。

[0570] 表34:黄瓜PMR5的dsRNA和用于实时PCR的引物。

靶	序列/SEQ ID NO:	长度 (nt)	
[0571] PMR5	dsRNA #1 (T33789) GATCCTGAGTTCAACTGCCAAGCTTACGGC AGACCCGATTCAAATTACCTCAAGTACCGT TGGCAGCCGCTCGATTGTGAGCTCCCAAGG TTCGATGGGGCTGAGTTTTTGTGAGAATG AGAGGAAGAAGTGTGATGTTTGTGGTGAT TCATTGGGGAGAAACCAATGGGAGTCATTG ATTTGTTTGTATCGTGTCTCTCTCCTCAA CTCCTACTCAAATGACTAGAGGAGAACCTC TTTCAACCTTCAGATTCTGGAATATGAGTT AACTGTGTCCTATTACAAAGCCCCGTATCTT GTGGACATAGAGATAGAGAATGGGAAGAG AGTGTTGAAGCTGGAGGAGATATCAATGAA TGGAAATGCTTGGGTTGGAGCTGATGTTATT TCCTTCAACACTGGACATTGGTGGAGCCAC ACTGGCTCTCTACAAGGGTGGGATTACATG GAATCAGGAGGATCATACTATCAAGACATG GATCGGTTGGGTGCAATGGAAAAGGC/180	509	
	dsRNA #2 (T33790) GGCTCTCTACAAGGGTGGGATTACATGGAA TCAGGAGGATCATACTATCAAGACATGGAT CGGTTGGGTGCAATGGAAAAGGCTTTAAGA ACATGGGCTGATTGGGTTGAGAAGAACATT GATGTCTCTAGAACAAGGGTTTTCTTCCAAG CTATCTCCCCCACACATTACAATCCATCTGA ATGGAACACGGGGACAGCATCGATGATGAC ATCAACGAAAAATTGTTATGGGGAAACGGC ACCAATGGGGGGGACGACGTACCCGGGAG GGTACCCTATTCAAATGAGGGTTGTGGATG AAGTGATAAGGGAGATGAGGAAGCCAGTA TACTTATTGGACATAACAATGTTATCTGAGC TAAGAAAAGATGGACACCCTTCCATTTATA GTGGTGATTTGAATCCTCAACAAGGGCTA ACCCAGATAGATCAGCGGATTGTAGCCATT GGTGTCTTCTGGCTTACCAGATACTTGGAA CCAATTGTTTTATACTGC/181	500	
	F 引物	AGCTTCCTCAGCTTTGATTCTCAGT/182	25
	R 引物	GCGATTATGGTGGTCGCTGTT/183	21
	Taqman 探针	6FAM-TGAAGCACCATTACCG-MGBNFQ/184	16

[0572] 表 35:自用PMR5 dsRNA处理的种子萌发的15日龄黄瓜叶中PMR5 mRNA的浓度。

处理	数目	平均 RQ	标准差	标准误差 均值	下限 95%	上限 95%	与 GFP 对照的% 变化	倍数变化	LOG10RQ 的Dunnett p 值
制剂_NI	20	0.304	0.118	0.026	0.249	0.359	13%	1.1	0.6213
T33776_GFP_NI	20	0.268	0.119	0.027	0.212	0.323	0%	1.0	1.0000
T33789_PMR5_NI	18	0.604	0.233	0.055	0.488	0.721	126%	2.3	<.0001
T33790_PMR5_NI	19	0.536	0.279	0.064	0.401	0.670	100%	2.0	<.0001

[0574] 实施例37

[0575] 种子用TubG dsRNA处理后黄瓜中TubG mRNA表达改变

[0576] TubG编码  $\gamma$ -微管蛋白 (Snustad, D.P., 等, 1992)。如实施例35中所述, 黄瓜种子用TubG dsRNA处理 (表36)。如实施例35中所述, 分析自处理种子萌发的叶。证实与GFP处理种子相比, 处理种子的叶中TubG基因的表达改变 (表37和图64)。

[0577] 表36: 黄瓜TubG的dsRNA和用于实时PCR的引物。

靶	序列/SEQ ID NO:	长度 (nt)
TubG	dsRNA #1 (T33791) GTGGGAACCAGATCGGAATGGAGTTCTGGA AGCAGCTTTGCCTCGAGCATGGAATCAGCA AAGACGGCATTCTTGAAGATTTTGCTACTCA GGGAGGTGACCGAAAGATGTATTCTTCTA TCAAGCCGATGATCAGCACTACATACCAAG AGCTTTACTTATTGACCTGGAGCCCAGGGTC ATTAATGGTATCCAGAACAGTGAATATCGA AATCTCTACAACCACGAGAACATCTTTGTTT CAGATCATGGAGGTGGTGGTGGAAATAACT GGGCCAGTGGATATCATCAGGGAAAGGGCG TTGAAGAGGATATCATGGACATGATTGACA GAGAAGCAGATGGAAGCGATAGCCTTGAG GGTTTTGTTCTATGCCACTCAATTGCTGGAG GGACAGGATCGGGCATGGGTTTCATATCTTC TGGAGACTCTGAATGATCGCTACAGCAAAA AACTGGTTCAGACGTACAGTGTTTTTCCTAA TCAGATGGAAACAAGTGATGTTGTAGTC/185	512
	dsRNA #2 (T33792) GCCTTACAACACTCACTTTTGACTTTAAAGCGA CTAACACTCAATGCTGATTGTGTTGTTGTTTC TTGATAATACTGCCCTAAATAGAATAGCTG TAGAACGCCTTCATCTATCAAATCCAACCTT TGCACAAACAACTCCTTAGTGTCGACTGT AATGTCAGCTAGCACAACTTTGAGATA CCCAGGATATATGAACAATGACTTGGTTGG ACTCTTGGCCTCTCTAATTCCAACACCAAGA TGCCATTTTCTAATGACAGGATACACACCA CTCACGGTTGAGCGCCAGGCTAATGTGATA AGGAAAACCACTGTTCTTGATGTCATGAGA AGACTTCTCCAGACAAAAAATATTATGGTC TCCTCGTATGCTCGAACAAAAGAAGCTAGT CAAGCAAAATACATATCAATATTGAATATC ATACAGGGAGAAGTGGACCCTACACAGGTT CATGAAAGTTTGCAGAGAATACGTGAAAGA AAGCTGGTGAATTTTATTGAGTGGGGGC/186	512
	F 引物 GGGTCAGTGGTCTTATGTTAGC/187	22
	R 引物 TTCTCAACTTCTCATACTGGCTC/188	23
Taqman 探针 6FAM-AGTATCCGGCATCTTTTCAGCAAGTG T-3IABkFQ/189	27	

[0579] 表37: 自用TubG dsRNA处理的种子萌发的15日龄黄瓜叶中TubG mRNA的浓度。

处理	数目	平均 RQ	标准差	标准误差 均值	下限 95%	上限 95%	与 GFP 对照的% 变化	倍数变化	LOG10RQ 的Dunnett p 值
制剂_NI	20	0.562	0.215	0.048	0.462	0.663	18%	1.2	0.4562
T33776_GFP_NI	20	0.478	0.177	0.040	0.395	0.561	0%	1.0	1.0000
T33791_TubG_NI	20	1.252	0.493	0.110	1.021	1.483	162%	2.6	<.0001
T33792_TubG_NI	18	1.117	0.360	0.085	0.938	1.297	134%	2.3	<.0001

[0581] 实施例38

[0582] 用DND1 dsRNA处理种子后番茄中DND1 mRNA表达改变

[0583] 如实施例35中所述(只是在dsRNA培育步骤中使用2ml微量离心管而不是50ml锥形管),Microtom变种番茄种子用DND1 dsRNA处理(表38)。通过Taqman实时PCR进行RNA分析,采用番茄TIP41测定法用于值的归一化以校正样品浓度的差异(对于引物和Taqman探针序列参见表38)。证实了与GFP处理种子相比,处理种子的叶中DND1基因的表达改变(表39和图65)。

[0584] 表38:番茄DND1的dsRNA和用于实时PCR的引物。

[0585]

靶		序列/SEQ ID NO:	长度 (nt)
DND1	dsRNA #1 (T33781)	GATGACGACATCAATCCAATCTCAAATTCC ATTGAATGTTATGCATGTAAGTTGGCG TCCCTGTTTTTCCACTCCACCAGTTGCGATGG AGCTAACCAACCGGAGTGGGAAGCTTCAGC CGTTCTTCTCTAGTTCCAATTCAAACCGG ACGGATTCAAAAACCGGAAAATCCCGGTCC AGTCGCAGCCGGCACACATCGGGGCCGTTT GGGCGTGTATTAGACCTCGAAGCAAGCGC GTGCAGAGATGGAACCGAATGATTTTATTG GCACGTGGCATGGCTTTAGCCGTTGATCCTC TATTCTTTTACGCCTTATCCATCGGCCGCGG TGGATCGCCGTGTTTGTACATGGACGGCAG CCTGGCGGCTATCGTCACCGTGATTTCGGACT AGCGTCGACGCCGTGCACCTCTTCCATTTGT GGTTGCAGTTTCGTTTGGCTTACGTGTCGAG AGAATCGCTGGTGGTTGGTTGTGGGAAACT CGTGTGGGATGC/24	500
	dsRNA #2 (T33782)	GATTTTGGTTCGATGCTTTTGTATCCTTCC CGTTCCACAGGCTGTATTCTGGCTGGTGGTT CCAAAATAATAAGAGAAGAGCAGATAAA GCTTATAATGACGATCCTTTTATTAATGTTT TTGTTCCAGTTCCTTCCCAAAGTTTATCACT GTATAAGCTTAATGAGAAGGATGCAAAGG TTACAGGATATATTTTGGTACCATCTGGTG GGGATTTGGACTTAATCTCATTGCTTATTTT ATTGCTTCTCATGTTGCTGGGGGATGCTGGT ATGTTCTTGCAATACAAAGAGTGGCTTCAT GTCTAAGGCAGCAGTGTGAGCGCAACCCTT CGTGTAACTATCTTTGTCTTGCTCAGAGGA GGTGTGTTATCAGTTTCTGTTGCCAACAGGA ACTGTGGGAAATCCATGTGCTGGGAACTCA ACAACAGTGACCAGGAAGCCAATGTGTTTG GATGTCAATGGACCATTTCATATGGGATA TACCAATGGGCAC/25	501
	F 引物	CTCACCAAGACGTCGCTTCT/26	21
	R 引物	GGTTGAACTGATCTTCGTCGGAAT/27	24
	Taqman 探针	6FAM-CTCTCAAAGTGGTTTGGC-MGBNFQ/28	18
	TIP41	F 引物	AACAGGTGGTGTCTCGACTATGACT/29
	R 引物	TGCTTTCGACAGTTTCACTTCCA/30	23
	Taqman 探针	VIC-ACCTTCACAACACCTTACT-MGBNFQ/31	19

[0586] 表 39:自用DND1 dsRNA处理的种子萌发的15日龄番茄叶中DND1 mRNA的浓度。

均值和标准差, SLDNDI									
处理	数目	平均 RQ	标准差	标准误差 均值	下限 95%	上限 95%	与 GFP 对照的% 变化	倍数变化	LOG10RQ 的Dunnett p 值
制剂_NI	19	1.078	0.265	0.061	0.950	1.205	23%	1.2	0.0836
T33776_GFP_NI	19	0.879	0.303	0.070	0.733	1.025	0%	1.0	1
T33781_DND1_NI	17	0.599	0.213	0.052	0.489	0.709	-32%	0.7	0.0018
T33782_DND1_NI	17	0.501	0.164	0.040	0.417	0.586	-43%	0.6	<.0001

[0588] 实施例39

[0589] 种子用PMR5 dsRNA处理后番茄中PMR5 mRNA的表达改变

[0590] 如实施例35和39中所述,番茄种子用PMR5 dsRNA处理(表40)。如实施例38中所述,分析自处理种子萌发的叶。证实了与GFP处理种子相比,处理种子的叶中PMR5基因的表达改变(表41和图66)。

[0591] 表40:番茄PMR5的dsRNA和用于实时PCR的引物。

[0592]

靶		序列/SEQ ID NO:	长度 (nt)
PMR5	dsRNA #1 (T33783)	GTAGCTTTATCTGTTATATTATTAAGGAATC ACCATAATAATAACAATAATTATAATAACC CAAATCACAGAAACCCAATTCTTCAAGGAA ATCAAACCTTCATGTTCTCTCTTTATAGGTAG TTGGGTTTACGATGAAACTTACCCATTTTAC CAATCAGCTTCTTGCCCCGCCGTCGATCCAC AGTTCAACTGTCAACTCTACGGCCGACCCG ATACGGAATACCTAAAGTATCGATGGAAAC CGGCGAACTGTGAGCTACCCAGGTTTAATG GGCTTGAGTTTCTGTTGAAAATGAAAGGGA AAACAGTGATGTTTGTGGGTGATTATTAG GCCGGGATCAGTGGGAGTCGTTGATTTGTA TGATTTTACGCTGATGTACCTAAAGCTCAA CGCAGATGTCGAGGCTTTACCCTATTTCAAC TTTCAAGTTCTGATTACGGAGTTGCTATT TCATATTACAAAGCACCATATCTAGTGGAC ATAGACACTGTAC/32	499
	dsRNA #2 (T33784)	GATGTATTATCTTTAATACTGGTCATTGGT GGACTCACAAAGGTCCTCTTCAAGGGTGGG ACAACGTAGAAGCAGGAGGGACAATGTAT GAAGACATGGATCCACTAATTGCAATGGAA AAAGGGCTAAGAACGTGGGCAAGATGGGTT GATACCAATATTGACAGAAGTAGAACCGA CTCTTCTTTCAGGGCATTTCACCTACGCACT ACAATCCGAGTGAATGGAACGCGGGTGCAT CAACAGGGAGTTGTTACGGGGAGACAATCC CCGTAACAACCACCCCTATGACGAGCACGT ACCCGGGTCCCGATTTGGATCAATCAAATG TGATCCAAAAGTTATAAGAGAAATGGACA ATCCACCTTCTTGCTAGACATAACATTGTT ATCAACAATGAGGAAAGATGCACATCCATC TATTTACAGTGGTGATCTCAATTCTCAACAA AGAATTAACCCTAACAAACCTGATTGTAGC CATTGGTGTCTGCCTGGC/33	501
	F 引物	CTCTTTCCTTAACCCTTTTTTAAATTTCTC/34	30
	R 引物	AGAAGAAGACATAATGTAGTTGAAGAACA AG/35	31
	Taqman 探针	6FAM-CAAATGGAGCTTCTCTC-MGBNFQ/36	17

[0593] 表41:自PMR5 dsRNA处理的种子萌发的15日龄番茄叶中PMR5 mRNA的浓度。

[0594]

均值和标准差, SLPMS									
处理	数目	平均 RQ	标准差	标准误差 均值	下限 95%	上限 95%	与 GFP 对照的% 变化	倍数变化	LOG10RQ 的Dunnett p 值
制剂 NI	19	0.295	0.223	0.051	0.188	0.402	54%	1.5	0.3817
T33776_GFP_NI	19	0.192	0.060	0.014	0.163	0.221	0%	1.0	1.0000
T33783_PM5_NI	10	0.512	0.427	0.135	0.206	0.817	167%	2.7	0.0118
T33784_PM5_NI	11	0.479	0.368	0.111	0.232	0.727	150%	2.5	0.0118

[0595] 实施例40

[0596] 种子用MLO dsRNA处理后番茄中MLO mRNA的表达改变

[0597] MLO, 霉病抗性基因座O蛋白编码植物特异性膜蛋白, 并被证实在拟南芥、大麦和番茄的白粉病抗性中起作用 (Bai等, 2007)。如实施例35和38中所述, 番茄种子用MLO dsRNA处理 (表42)。如实施例38中所述, 分析自处理种子萌发的叶。证实了与GFP处理种子相比, 处理种子的叶中MLO基因的表达改变 (表43和图67)。

[0598] 表42: 番茄MLO的dsRNA和用于实时PCR的引物。

靶		序列/SEQ ID NO:	长度 (nt)
MLO	dsRNA #1 (T33779)	GCACTTGAAAAGATCAAAGCTGAACTTATGCTGTTGGGATTCTTATCACTGTTGTTGACAGTGTTGCAAGATCCAGTTTCTAACTTATGTGTCCCAAGAGTGTGGTTATTCATGGCATCCTTGTATGGCAAAGGAAGATGCCAAGTCTGAGTATGATGACCCTTGTCTACCAAAGGGAAAA GTGCAATTTGCATCTTCATATGCAATACACCAGCTCCATATCTTCATCTTTGTATTGGCAGT TGCTCATGTATTGTACTGTATAGCAACTTTT GCTTTGGGCAGGCTAAAGATGAGAAAATGGAGGGCATGGGAGGATGAAACAAAAACAATGGAGTACCAATTCTACAACGACCCTGAGAGATTCAGATTTGCAAGGGAGACCTCGTTTGGACGTAGGCATTTGCATTTCTGGAGCAAGTCCCCGTGTTGCTCTCGATAGTTTGTTCCTTCGGCAATTCTTCTCATCAGTTGCAAAGTTGACTATTTAACCCCTTAGAC/37	505
	dsRNA #2 (T33780)	GGCACATTTAACTCCACAAAATCAAATAA TTTTGATTTTCAATTATACATTAACAGAGCA GTTGACAAAGACTTCAAAGTTGTTGTTGGAATAAGTCCTGCATTATGGCTCTCACGGTGC TATATTTTCTGACTACTACCGATCGATTGTA CTCGTATCTTTGGGTGCCATTTATCCCACTT GTAATAATATTGCTAGTTGGCACAAAACCTCAAATGATCATAACAGAAATGGGAGTAAGG ATTTTCAGAAAGGGGAGACATAGTAAAAGGTGTACCTGTGGTGGAGACTGGTGACCATCTTTCTGGTTTAATCGCCCTGCCCTTGTCTTATTCTTGATTAACCTTTGACTCTTTCAGAATGCGTTTCAAGTTGCTTTCTTTTTTTGGAGTTGGTGAAATTTGGTTTCCCATCTTGCTTTCATAAG AATGCTGCAGACCTAGCCATAAGGCTAACCATGGGGGTGATCATAACAGGTCCATTGCAGC TATGTGACTC/38	500
	F 引物	GCAATTGCTGTGGTTTGCTTCA/39	22
	R 引物	TTTCCAGTAACCACTCTCCAATGTG/40	25
	Taqman 探针	6FAM-CTTGCTCGCTATTTCTA-MGBNFQ/41	17

[0600] 表43: 自用MLO dsRNA处理的种子萌发的15日龄番茄叶MLO mRNA的浓度。

均值和标准差, SIMLO									
处理	数目	平均 RQ	标准差	标准误差 均值	下限 95%	上限 95%	与 GFP 对照的% 变化	倍数变化	LOG10RQ 的Dunnett p 值
制剂 NI	19	2.098	0.441	0.101	1.885	2.311	-2%	1.0	0.9964
T33776_GFP_NI	19	2.151	0.327	0.075	1.994	2.309	0%	1.0	1.0000
T33779_MLO_NI	17	0.863	0.425	0.103	0.645	1.082	-60%	0.4	<.0001
T33780_MLO_NI	17	0.895	0.434	0.105	0.672	1.118	-58%	0.4	<.0001

[0602] 实施例41

[0603] 种子用dsRNA处理后番茄白粉病的减轻和mRNA表达的调节

[0604] Bi1是一种程序性细胞死亡的负调节物。如实施例35和38中所述, Microtom番茄种子用含有番茄Bi1的dsRNA (表44, dsRNA #2) 和PMR5 (表40, dsRNA #1) dsRNA处理。

[0605] 表44: 番茄Bi1 dsRNA。

靶		序列/SEQ ID NO:	长度 (nt)
Bi1	dsRNA #1 (T33777)	GTGCTTTAGTGGCATCGGCTGCTGGGGCTTA CCTTCACATTCTATGGAATATCGGTGGCCTC CTCACAACAATGGCTTGCATGGGAAGCATG GTGTGGCTTCTCTCAGCTCCTCCTTATCAAG AGCAAAAAGGGTGGCTCTTCTGATGGCAG CTGCACTTTTTGAAGGCGCCTCTATTGGTCC TCTGATTGAGCTGGGCATTA ACTTCGATCCA AGCATTGTGTTTGGCGCTTTTGTAGGTTGTG CTGTGGTTTTTGGTTGCTTCTCAGCTGCTGC CATGTTGGCAAGGCGCAGGGAGTACTTGTA CCTCGGGGGCCTTCTTTCATCTGGCGTCTCC CTTCTCTTCTGGTTGCACTTTGCATCCTCCAT TTTTGGTGGTTCCATGGCTGTTTTCAAGTTT GAGTTGTATTTGGACTCTTGGTGTGTTGTGG GCTACATCGTCTTTGACACCCAAGAAATTAT TGAGAAGGCTCACTTGGGTGATATGGATTA CGTTAAGC/42	501
	dsRNA #2 (T33778)	GCCAGATCTCACCTCTCGTTCAA ACTCATCT CAAGCAGGTGTACCTTACGCTATGCTGTGCT TTAGTGGCATCGGCTGCTGGGGCTTACCTTC ACATTCTATGGAATATCGGTGGCCTCCTCAC ACAATGGCTTGCATGGGAAGCATGGTGTG GCTTCTCTCAGCTCCTCCTTATCAAGAGCAA AAAAGGGTGGCTCTTCTGATGGCAGCTGCA CTTTTTGAAGGCGCCTCTATTGGTCCTCTGA TTGAGCTGGGCATTA ACTTCGATCCAAGCA TTGTGTTTGGCGCTTTTGTAGGTTGTGCTGT GGTTTTTGGTTGCTTCTCAGCTGCTGCCATG TTGGCAAGGCGCAGGGAGTACTTGACCTC GGGGGCCTTCTTTCATCTGGCGTCTCCCTTC TCTTCTGGTTGCACTTTGCATCCTCCATTTTT GGTGGTTCCATGGCTGTTTTCAAGTTTGAGT TGTATTTTGGACTCTTGGTGTGTTGTGGGCTA CATCGTC/43	500

[0607] 将用dsRNA处理的种子种植在掺肥料的M200土壤 (Hummerts) 中, 并放入生长室。每盆种植1粒番茄种子, 约1/4”进入土壤中, 土壤的上部用水湿透。生长室设置为26/24C, 16小时

光照周期,50%湿度,光强度3,通过自动地下灌溉浇水4x/周。种植后14天,将盆按类似大小有条理摆放。重复数为5株植物/处理。在第15天,随机选择植物,并转移到以下生长室条件:22/20C,16小时光照周期,70%湿度,光强度3,M,W,F浇水。如下感染番茄白粉病(新番茄粉孢菌(*Oidium neolycopersici*)):

[0608] 1.  $\mu$ l Tween-20在250ml长颈瓶中在200 ml的d. i. H<sub>2</sub>O中混合。

[0609] 2. 极重的番茄母株上切下约20-25片叶,放入第二长颈瓶中。将约100-200 ml的Tween 20溶液加入叶中直到霉进入溶液中。这通过振荡长颈瓶完成。然后将溶液转移到喷药瓶中,插入喷嘴,完成在植物上的均匀喷洒。在喷施期间将育苗盘旋转4次。

[0610] 感染后8天,取样品用于qPCR。PMR5 (表40,dsRNA #1)处理植物显示与用GFP和0.1mM EDTA (制剂)作为对照处理的植物相比,PMR5表达显著增量调节(表45)。

[0611] 表45:自用PMR5 dsRNA处理的种子萌发并被白粉病感染的21日龄番茄叶中PMR5 mRNA的浓度。

处理	数目	平均 RQ	标准差	标准误差均值	下限 95%	上限 95%	与 GFP 对照的 % 变化	倍数 变化	LOG10 RQ 的 Dunnett p 值
制剂_PM	18	0.392	0.077	0.018	0.354	0.430	-7%	0.9	0.9246
T33776_GFP_PM	18	0.421	0.105	0.025	0.369	0.474	0%	1.0	1.0000
T33783_PMR5_PM	16	0.734	0.426	0.106	0.507	0.961	74%	1.7	0.0071

[0613] 染病后14天,针对被白粉病覆盖的叶面积的百分比对发育进行评分。评定值设定为0、10、25和50%感染。采用Anova单因素分析( $\alpha=.1$ )对数据进行分析。计算 $\frac{1}{2}$  LSD,产生示图的自定义误差条。利用处理平均数绘制与GFP对照相比病害减少百分比的示图。该分析表明与GFP处理的番茄种子相比,病害减少23% (p值<0.1,图68)。

[0614] 实施例42

[0615] 种子用dsRNA处理后大豆中PHYA mRNA表达的调节

[0616] 通过将种子用含有来自大豆植物光敏素A (PHYA) 基因E3和E4的序列的dsRNA处理,来靶向这些基因。采用convergent T7 RNA聚合酶方法,体外合成PHYAE3和PHYAE4 dsRNA序列(表46)。将两种基因的dsRNA混合,并使之达到在0.1 mM EDTA中的50  $\mu$ g/ml总核酸的终浓度。在轻轻振荡的同时,将15粒大豆(Williams 82)种子在15 ml管中的7.5 ml该dsRNA溶液中或在来自GUS对照的dsRNA中在15C下避光培育24小时。处理后,将种子转移到含有湿润滤纸的种子萌发箱(每箱15粒种子)中,并在设置为25C下避光的生长室中萌发。

[0617] 处理后5天,从萌发箱中萌发的种子中收获嫩枝组织(不包括子叶)用于RNA分析。通过Taqman进行RNA分析,使用Gm.ref16基因用于值的归一化以校正样品浓度的差异(表46)。在剔除离群值后,将RQ值转化成log10用于分析。

[0618] 种子用PHYAE3和PHYAE4 dsRNA处理导致幼苗嫩枝中PHYAE3表达增加,使得PHYAE3 mRNA水平是GUS对照值的1.7倍(表47和图69)。

[0619] 表46:大豆PHYAE3和PHYAE4 dsRNA和用于实时PCR的引物。

[0620]

靶		序列/SEQ ID NO:	长度 (nt)
PHYA E3	dsRNA	TCAAGAAGATGTTGGACATGGCATTGCAGG GTGAGGAAGAGAGAAATGTCCAATTTGAGA TCCAAACACATCATATGAAGATTGATTCTG GTCCATCAGCTTGGTAGTTAATGCTTGTGC AAGCAGGGATCTTCAAGATAATGTTGTGGG AGTTTGTCTTCTGGCACAAGATATAACTGCT CAGAAAACAATGATGGACAAATTCACCCGA ATTGAAGGTGACTACAAGGCAATTGTACAG AACCCAAACCCATTGATCCCTCCAATATTTG GCACAGATGAATTTGGTTGGTGTGTGAAT GGAATTCAGCTATGGCAAATTA ACTGGAT GGAAGCGAGAGGAGGTAATGGATAAAATG CTTTAGGAGAGGTTTTTCGGGACCCAAATA GCTTGTTGTCGCCTAAGGAATCATGAAGCT GTTGTTAACTTTAGCATTGTACTTAATACAG CCATGGCTGGTTTGGAAACAGAGAAGGTTTC CTTTGGTTTCTTTGCTCGTGATGGAAAGC/1 90	513
	正向引物	TCCCTCTTAGGTATGCTTGTCAATT/191	25
	反向引物	TCTCTAGCTCTTTGCTCACATGAAC/192	25
	Taqman 探针	6FAM-CTGGCTCAAGTATTTG-MGBNFQ/193	16
PHYA E4	dsRNA	TCAAGAAGATGCTTAACTTAGCACTGCTAG GTGAAGAAGAGAAGAATGTCCAATTTGAGA TCAAACACATGGGTCTAAGATGGATTCTG GTCCTATTAGTTTAGTAGTAAATGCTTGCGC AAGCAGGGATCTTCGAGATAATGTTGTTGG GGTTTGTCTTGTGGCCCATGATATAACTGCT CAGAAGAATGTCATGGACAAATTTACGCGT ATTGAAGGTGATTACAAGGCAATTGTACAG AACCGCAATCCATTAATCCCTCCTATATTTG GCACAGATGAATTTGGCTGGTGTGTGAGT GGAATCCAGCTATGACGAAGTTAACTGGAT GGAAGCGAGAGGAGGTGATGGATAAAATG CTTTGGGAGAGCTTTTTGGCACCCATATGG CTGCTTGTCGCCTAAAGAATCAAGAAGCTT TTGTTAATTTGGGTGTTGTACTTAATAAAGC CATGACTGGTTTGGAAACAGAGAAGGTTCC TTTTGGTTTCTTTGCTCGGAATGGCAAGTAT GTGGAATGCC/194	525
	Gm. ref16	CAAGGTTATGAAAATTATGGGTATGC/195	26
		CCCGGATAACTGCCATACATG/196	21
	VIC-CTGCTGCTGGACAGGATCCCA-TAMRA/ 197	21	

[0621] 表47:1周大豆幼苗嫩枝组织中PHYA基因的mRNA浓度。

[0622]

处理	测定	数目	平均 RQ	标准差	标准误差均值	下限 95%	上限 95%	倍数变化	对 RQ log <sub>10</sub> 分析的 Dunnett p 值
GUS	PHYAE3	15	0.045	0.012	0.003	0.038	0.052		1
PHYAE3E4	PHYAE3	15	0.076	0.047	0.012	0.050	0.101	1.7	0.0141

[0623] 虽然结合其具体实施方案描述了本发明,但是要明白,许多备选方案、修改和变化对于本领域技术人员而言应是显而易见的。因此,意欲包括落入随附权利要求书的精神和宽范围内的所有这样的备选方案、修改和变化。

[0624] 本说明书中所提及的所有出版物、专利和专利申请在本文均通过引用到本说明书中以其整体结合到本文中,其程度就像每个单独的出版物、专利或专利申请具体而单独指明通过引用结合到本文一样。另外,本申请的任何参考文献的引用或确认不应解释为承认所述文献可作为本发明的先有技术而获得。就使用章节标题而言,它们不应解释为必然限制性的。

## 序列表

<110> A. B. SEEDS LTD.  
 Avniel, Amir  
 Lidor-Nili, Efrat  
 Maor, Rudy  
 Meir, Ofir  
 Noivirt-Brik, Orly  
 Yanai-Azulay, Osnat

<120> 用于使基因表达沉默的组合物和方法

<130> 56394

<150> US 61/651, 131  
 <151> 2012-05-24

<150> US 61/814, 888  
 <151> 2013-04-23

[0001] <150> US 61/814, 892  
 <151> 2013-04-23

<150> US 61/814, 899  
 <151> 2013-04-23

<150> US 61/814, 890  
 <151> 2013-04-23

<160> 197

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> T7 引物序列

<400> 1  
 taatacgact cactataggg

	<210> 2	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 2	
	ggtgctctga acgtggatg	19
	<210> 3	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 3	
[0002]	catcatgcc atcctcattc tc	22
	<210> 4	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 4	
	taatacgact cactataggg gaagaccctc gaaactaagc	40
	<210> 5	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	

	<400> 5		
	taatacgact cactataggg ggtaagcggc attctaaacc		40
	<210> 6		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸		
	<400> 6		
	actcagcagt cgtaggattg		20
	<210> 7		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
[0003]	<220>		
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸		
	<400> 7		
	cttcttatgt tccgctcagg		20
	<210> 8		
	<211> 616		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> CGMMV dsRNA 产物 1		
	<400> 8		
	taatacgact cactataggg ggtaagcggc attctaaacc tccaaatcgg aggttgact		60
	ctgcttctga agagtccagt tctgtttctt ttgaagatgg cttacaatcc gatcacacct		120
	agcaaaactta ttgcgttttag tgcttcttat gttcccgtea ggactttact taattttcta		180

gttgcttcac aaggtaccgc tttccagact caagcgggaa gagattcttt cgcgagtc 240

ctgtctgcgt taccctcgtc tgtcgtagat attaattcta gattcccaga tgcgggtttt 300

tacgctttcc tcaacggtec tgtgttgagg cctatcttcg tttcgcttct cagctccacg 360

gatacgcgta atagggatcat tgaggttgta gatcctagca atcctacgac tgctgagtcg 420

cttaacgccg taaagcgtac tgatgacgcg tctacggccg ctagggctga gatagataat 480

ttaatagagt ctatttctaa gggttttgat gtttacgata gggcttcatt tgaagccgcg 540

ttttcggtag tctggtcaga ggctaccacc tcgaaagctt agtttcgagg gtcttccct 600

atagtgagtc gtatta 616

<210> 9  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

[0004]

<220>  
 <223> 单链 DNA 寡核苷酸

<400> 9  
 taatacgact cactataggg catcaccatc gaccctaaac 40

<210> 10  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 单链 DNA 寡核苷酸

<400> 10  
 taatacgact cactataggg gctttaccgc cactaagaac 40

<210> 11  
 <211> 598  
 <212> DNA

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> CGMMV dsRNA 产物 2	
	<400> 11	
	taatacgaact cactataggg gctttacegc cactaagaac tctgtacact cccttgcggg	60
	tggtctgagg cttcttgaat tggaatata gatgatgcaa gtgccctacg gtcaccttg	120
	ttatgacatc ggcgtaact atacgcagca cttgttcaaa ggtagatcat atgtgcattg	180
	ctgcaatccg tgcctagatc ttaaagatgt tgcgaggaat gtgatgtaca acgatatgat	240
	cacgcaacat gtacagaggc acaagggatc tggcgggtgc agacctcttc caactttcca	300
	gatagatgca ttcaggaggt acgatagtcc tcctgtgctg gtcacctgtt cagacgtttt	360
	ccaagagtgt tcctatgatt ttgggagtgg tagggataat catgcagtct cgttgcattc	420
	aatctacgat atcccttatt cttcgatcgg acctgctctt cataggaaaa atgtgcgagt	480
[0005]	ttgttatgca gcctttcatt tctcggaggc attgctttta ggttcgctg taggtaattt	540
	aaatagtatt ggggctcagt ttaggtcga tggatgatcc ctatagtgag tcgtatta	598
	<210> 12	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 12	
	ggtgctctga acgtgatg	19
	<210> 13	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
	<400>	13	
		catcatcgcc atcctcattc tc	22
	<210>	14	
	<211>	456	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	SQS dsRNA 产物 2	
	<400>	14	
		ctaatacgac tcactatagg gagacgctct gtctcatgct gaagactgcc tccaatacat	60
		gtcagcattg aagatcatg ccattttcgg tttttgtgca atacctcaga taatggcaat	120
		tgggacatgt gctatattgct acaataatgt gaatgtcttt agaggagtgg ttaagatgag	180
[0006]		gcgtgggctc actgcacgag taattgatga gacaaacaca atgtcagatg tctatactgc	240
		tttctatgag ttctcttcgc tgatagaatc gaagattgat aataatgatc caaatgcttc	300
		cctaacgcgg aaacgtgttg atgcgataaa gagaacctgc aagtcattctt gctcactaaa	360
		gagaagggga tacgatttgg agaagtcaaa gtacaactcc atgctgataa tggttgtact	420
		tctgttggtg gctctcccta tagtgagtgc tattag	456
	<210>	15	
	<211>	43	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
	<400>	15	
		taatacgact cactataggg agcattcccg gcgggatagt ctg	43

	<210> 16	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 16	
	taatagcact cactataggg agcattcccg gcgggatagt ctg	43
	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 17	
[0007]	cagcgcgaag tctttatacc	20
	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 18	
	ctttgccgta atgagtgacc	20
	<210> 19	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	

	<400> 19	
	ccataaccct ggaggttgag	20
	<210> 20	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 20	
	atcagacgct gctggtctgg	20
	<210> 21	
	<211> 443	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0008]	<220>	
	<223> GUS dsRNA 产物	
	<400> 21	
	taatacgact cactataggg agatcgacgg cctgtgggca ttcagtctgg atcgcaaaa	60
	ctgtggaatt gatcagcgtt ggtgggaaag cgcgttacia gaaagccggg caattgctgt	120
	gccaggcagt ttaacgac agttcgcga tgcagatatt cgtaattatg cgggcaacgt	180
	ctggtatcag cgcgaagtct ttataccgaa aggttgggca ggccagcgta tcgtgctgcg	240
	tttcgatgcg gtcactcatt acggcaaagt gtgggtcaat aatcaggaag tgatggagca	300
	tcaggcgcgc tatacgccat ttgaagccga tgtcacgccg tatgttattg ccgggaaaag	360
	tgtacgtatc accgtttgtg tgaacaacga actgaactgg cagactatcc cgccgggaat	420
	gctccctata gtgagtcgta tta	443
	<210> 22	

<211> 9	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 可用于形成 shRNA 环的寡核苷酸序列的实例	
<400> 22	
uucaagaga	9
<210> 23	
<211> 9	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 可用于形成 shRNA 环的寡核苷酸序列的实例	
<400> 23	
uuuguguag	9
[0009]	
<210> 24	
<211> 500	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 番茄 DND1 dsRNA 产物#1 (T33781)	
<400> 24	
gatgacgaca tcaatccaat ctcaaattcc attgaatggt atgcatgtac tcaagttggc	60
gtccctgttt tccactccac cagttgcgat ggagctaacc aaccggagtg ggaagcttca	120
gccggttctt ctctagttcc aattcaaac cggacggatt caaaaaccgg aaaatcccgg	180
tccagtcgca gccggcacac atcggggccg ttcgggcgtg tattagacc tcgaagcaag	240
cgcgtgcaga gatggaaccg aatgatTTTA ttggcacgtg gcatggcttt agccgttgat	300
cctctattct tttacgcctt atccatcggc cgcggtggat cgccgtgttt gtacatggac	360

	ggcagcctgg cggctatcgt caccgtgatt cggactagcg tcgacgccgt gcacctcttc	420
	catttgtggt tgcagtttcg tttggcttac gtgtcgagag aatcgctggt ggttggttgt	480
	gggaaactcg tgtgggatgc	500
	<210> 25	
	<211> 501	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 番茄 DND1 dsRNA 产物#2 (T33782)	
	<400> 25	
	gattttggtt cgatgctttt gtcaccttc ccgttcaca ggctgtattc tggctggtgg	60
	ttccaaaact aataagagaa gagcagataa agcttataat gacgatcctt ttattaatgt	120
	tcttgttcca gttccttccc aaagtttata actgtataag cttaatgaga aggatgcaaa	180
[0010]	aggttacagg atatatTTTT ggtaccatct ggtggggatt tggacttaat ctcattgctt	240
	atTTtattgc ttctcatggt gctgggggat gctggtatgt tcttgcaata caaagagtgg	300
	cttcatgtct aaggcagcag tgtgagcga acccttcgtg taatctatct ttgtcttgc	360
	cagaggaggt gtgTtatcag tttctgttgc caacaggaac tgtgggaaat ccatgtgctg	420
	ggaactcaac aacagtgacc aggaagccaa tgtgtttgga tgtcaatgga ccatttccat	480
	atgggatata ccaatgggca c	501
	<210> 26	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 26	

	ctcaccaaga cgtccgcttc t	21
	<210> 27	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 27	
	ggttgaactg atcttcgtcg gaat	24
	<210> 28	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0011]	<223> Taqman 探针	
	<220>	
	<221> 其它特征	
	<223> 5' 缀合 6FAM	
	<220>	
	<221> 其它特征	
	<223> 3' 缀合 MGBNFQ	
	<400> 28	
	ctctcaaagt ggtttgcc	18
	<210> 29	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	

	<400> 29	
	aacaggtggt gctcgactat gact	24
	<210> 30	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 30	
	tgctttcgac agtttcactt cca	23
	<210> 31	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0012]	<220>	
	<223> Taqman 探针	
	<220>	
	<221> 其它特征	
	<223> 5' 缀合 VIC	
	<220>	
	<221> 其它特征	
	<223> 3' 缀合 MGBNFQ	
	<400> 31	
	ggttgaactg atcttcgtcg gaat	24
	<210> 32	
	<211> 499	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 番茄 PMR5 dsRNA 产物#1 (T33783)	

	<400> 32	
	gtagctttat ctgttatatt attaaggaat caccataata ataacaataa ttataataac	60
	ccaaatcaca gaaacccaat tcttcaagga aatcaaactt catgttctct ctttataggt	120
	agttgggttt acgatgaaac ttaccattt taccaatcag cttcttgccc cgccgtcgat	180
	ccacagtca actgtcaact ctacggccga cccgatacgg aatacctaaa gtatcgatgg	240
	aaaccggcga actgtgagct acccaggttt aatgggettg agtttctggt gaaaatgaaa	300
	gggaaaacag tgatgtttgt gggatgattca ttaggccggg atcagtggga gtcgttgatt	360
	tgtatgattt cagctgatgt acctaaagct caaacgcaga tgtcgaggct ttaccctatt	420
	tcaactttca agttcctgga ttacggagtt gctatttcat attacaaagc accatatcta	480
	gtggacatag aactgtac	499
[0013]	<210> 33	
	<211> 501	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 番茄 PMR5 dsRNA 产物#2 (T33784)	
	<400> 33	
	gatgtattat cttttaatac tggtcattgg tggactcaca aaggtcctct tcaagggtgg	60
	gacaacgtag aagcaggagg gacaatgtat gaagacatgg atccactaat tgcaatggaa	120
	aaagggctaa gaacgtgggc aagatgggtt gataccaata ttgacagaag tagaaccaga	180
	ctcttctttc agggcatttc acctacgcac tacaatccga gtgaatggaa cgcgggtgca	240
	tcaacagga gttgttacgg ggagacaatc cccgtaacaa ccaccctat gacgagcacg	300
	taccggggtc ccgatttga tcaatcaaat gtgatccaaa aagttataag agaaatggac	360
	aatccacctt tcttgetaga cataacattg ttatcaacaa tgaggaaaga tgcacatcca	420

tctatttaca gtggtgatct caattctcaa caagaatta accctaaca acctgattgt	480
agccattggt gtctgcctgg c	501
<210> 34	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
<400> 34	
ctctttcctt aacccttttt taaatttctc	30
<210> 35	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
[0014] <220>	
<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
<400> 35	
agaagaagac ataatgtagt tgaagaacaa g	31
<210> 36	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Taqman 探针	
<220>	
<221> 其它特征	
<223> 5' 缀合 6FAM	
<220>	
<221> 其它特征	

	<223> 3' 缀合 MGBNFQ	
	<400> 36	
	caaatggagc ttctctc	17
	<210> 37	
	<211> 505	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 番茄 MLO dsRNA 产物#1 (T33779)	
	<400> 37	
	gcacttgaaa agatcaaagc tgaacttatg ctgttgggat tcttatcact gttgttgaca	60
	gtgttgcaag atccagtttc taacttatgt gtccccaaga gtgttggtta ttcatggcat	120
	ccttgatgg caaaggaaga tgccaagtct gagtatgatg acccttgtct accaaagga	180
[0015]	aaagtgaat ttgcatcttc atatgcaata caccagctcc atatcttcat ctttgtattg	240
	gcagttgctc atgtattgta ctgtatagca acttttgctt tgggcaggct aaagatgaga	300
	aatggaggg catgggagga tgaacaaaa acaatggagt accaattcta caacgacct	360
	gagagattca gatttgcaag ggagacctcg tttggacgta ggcatTTGca tttctggagc	420
	aagTcccccg tgttgcctc gatagtttgt ttctttcggc aattcttctc atcagttgca	480
	aaagttgact atttaacct tagac	505
	<210> 38	
	<211> 500	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 番茄 MLO dsRNA 产物#2 (T33780)	
	<400> 38	
	ggcacattta actccacaaa atcaaaataa ttttgatttt caattataca ttaacagagc	60

	agttgacaaa gacttcaaag ttgttgttgg aataagtcct gcattatggc tcttcacggt	120
	gctatatttt ctgactacta ccgatcgatt gtactcgtat ctttgggtgc catttatccc	180
	acttgtaata atattgctag ttggcacaaa acttcaaag atcataacag aaatgggagt	240
	aaggatttca gaaaggggag acatagtaaa aggtgtacct gtggtggaga ctggtgacca	300
	tcttttctgg tttaatcgcc ctgcccttgt cctattcttg attaactttg tactctttca	360
	gaatgcgttt caagttgctt tctttttttg gagttggtgg aaatttggtt tcccatcttg	420
	ctttcataag aatgctgcag acctagccat aaggctaacc atgggggtga tcatacaggt	480
	ccattgcagc tatgtgactc	500
	<210> 39	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0016]	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 39	
	gcaattgctg tggtttgctt ca	22
	<210> 40	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 40	
	tttccagtaa ccactctcca atgtg	25
	<210> 41	
	<211> 17	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Taqman 探针	
	<220>	
	<221> 其它特征	
	<223> 5' 缀合 6FAM	
	<220>	
	<221> 其它特征	
	<223> 3' 缀合 MGBNFQ	
	<400> 41	
	cttgctcgct atttcta	17
	<210> 42	
	<211> 501	
[0017]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 番茄 Bi1 dsRNA 产物#1 (T33777)	
	<400> 42	
	gtgctttagt ggcacggct gctggggctt accttccat tctatggaat atcggtggcc	60
	tcctcacaac aatggcttgc atggaagca tgggtgtgct tctctcagct cctccttacc	120
	aagagcaaaa aagggtggct cttctgatgg cagctgcact tttgaaggc gcctctattg	180
	gtcctctgat tgagctgggc attaacttcg atccaagcat tgtgtttggc gctttttag	240
	gttgtgctgt ggtttttggg tgcctctcag ctgctgccat gttggcaagg cgcagggagt	300
	acttgtaacct cgggggcctt ctttcatctg gcgtctccct tctcttctgg ttgcactttg	360
	catcctccat ttttgggtgt tccatggctg ttttcaagtt tgagttgtat tttggactct	420
	tggtgtttgt gggctacatc gtctttgaca cccaagaaat tattgagaag gctcacttgg	480

	gtgatatgga ttacgttaag c	501
	<210> 43	
	<211> 500	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 番茄 Bi1 dsRNA 产物#2 (T33778)	
	<400> 43	
	gccagatctc acctctcggt caaactcacc tcaagcaggt gtaccttacg ctatgctgtg	60
	ctttagtggc atcggtctgt ggggcttacc ttcacattct atggaatata ggtggcctcc	120
	tcacaacaat ggcttgcatt ggaagcattg tgtggcttct ctcagctcct ccttatcaag	180
	agcaaaaaag ggtggctctt ctgatggcag ctgcactttt tgaaggcgcc tctattggtc	240
	ctctgattga gctgggcatt aacttcgacc caagcattgt gtttggcgt tttgtaggtt	300
[0018]	gtgetgtggt ttttggttgc ttctcagctg ctgcatggt ggcaaggcgc agggagtact	360
	tgtacctcgg gggccttctt tcatctggcg tctcccttct cttctggttg cactttgcat	420
	cctccatttt tgggtgttcc atggctgttt tcaagtttga gttgtatttt ggactcttgg	480
	tgtttgtggg ctacatcgtc	500
	<210> 44	
	<211> 495	
	<212> DNA	
	<213> 玉米	
	<400> 44	
	taatacgact cactataggg agattggcga gcttaggatt gaggatcggt tacagtggaa	60
	agaacactct atgatattcg ccatgcaaaa caagccagga gaattcagcc ggtttgattt	120
	cccagaaact ttgccagcac ctataaatgg gatatgggcc atattgagaa acaatgaaat	180
	gcttacctgg cccgagaagg tgaagtttgc aatcggactt ctgccagcaa tggttggtgg	240

tcaaccttat gttgaagctc aagatggctt aaccgtttca gaatggatga aaaagcaggg	300
tgttcctgat cgggtgaacg atgaggtttt tattgcaatg tccaaggcac tcaatttcat	360
aaatcetgat gagctatcta tgcagtgcac ttigattgct ttgaaccgat ttcttcagga	420
gaagcatggt tctaaaatgg cattcttggc tggtaatccg cctgaaagc tatctccta	480
tagtgagtcg tatta	495
<210> 45	
<211> 594	
<212> DNA	
<213> 玉米	
<400> 45	
taatacgact cactataggg tgatcgggtg aacgatgagg tttttattgc aatgtccaag	60
gcactcaatt tcataaatcc tgatgagcta tctatgcagt gcattttgat tgetttgaac	120
[0019] cgattttcttc aggagaagca tggttctaaa atggcattct tggatggtaa tccgcctgaa	180
aggctatgca tgcctattgt tgatcacatt cggcttaggg gtggagaggt ccgcctgaat	240
tctcgtatta aaaagataga gctgaatcct gatggaactg taaaacactt cgcacttagt	300
gatggaactc agataactgg agatgcttat gtttgtgcaa caccagtcga tatcttcaag	360
cttctgtac ctcaagagtg gagtgaaatt acttatttca agaaactgga gaagttggtg	420
ggagttcctg ttatcaatgt tcatatatgg ttgacagaa aactgaacaa cacatatgac	480
caccttcttt tcagcaggag ttcactttta agtgtctatg cagacatgtc agtaacctgc	540
aaggaatact atgacceaaa cgttcaatg ctggcctat agtgagtcgt atta	594
<210> 46	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
	<400>	46	
		gattgctgga gcaggattag	20
	<210>	47	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
	<400>	47	
		cccttgctc aagcaatag	20
	<210>	48	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
[0020]	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
	<400>	48	
		accaattga ccgcaactac t	21
	<210>	49	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
	<400>	49	
		acgcctaagc ctgctggtt	19
	<210>	50	

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 单链 DNA 寡核苷酸  
  
 <400> 50  
 accggcatca gctcagtctc 20

<210> 51  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 单链 DNA 寡核苷酸  
  
 <400> 51  
 tgctgttctc tgggcacagg 20

[0021]

<210> 52  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 单链 DNA 寡核苷酸  
  
 <400> 52  
 tcccctcaga tattaacaac 20

<210> 53  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 单链 DNA 寡核苷酸  
  
 <400> 53

	aggaggaaaag gcagcttctg tg	22
	<210> 54	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 54	
	gtgactcgtc accaacaag	20
	<210> 55	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0022]	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 55	
	tgtgtgtgcc gttgagactg	20
	<210> 56	
	<211> 547	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> SQS dsRNA 产物 1	
	<400> 56	
	ctaatacgac tcactatagg gagaatatct acaaccgca ctggcattat tcatgtggaa	60
	caaaagacta caaattactg atggataagt ttgccttgt ctccacggct ttcttgagc	120
	ttggcaagg ttatcaagag gcaattgaag aatcactag gctaattgga gcaggaatgg	180
	caaaatztat ctgcaaggag gttgaaactg ttgatgacta caatgagtac tgcactatg	240

	tagcaggct agtgggtat gggctttcca ggctctttca tgctggtgg acggaagatc	300
	tggcttcaga ttcactttca aattcaatgg gcttgtttct gcagaaaatc aatataatta	360
	gggattatth ggaggacata aacgagatac caaagtcacg tatgttctgg cctcgagaaa	420
	tatggagtaa atatgtcaat aaactcgagg atttgaaata cgaggaaaat tcagaaaagg	480
	cagttcagtg tttgaatgat atggtgacta acgctctgtc tcatctcct atagtgagtc	540
	gtattag	547
	<210> 57	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
[0023]	<400> 57	
	tcggaagccg taccttcgtg	20
	<210> 58	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 58	
	cctggagctg ctgctttgtg	20
	<210> 59	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	

	<400> 59		
	taccagcgt cgagtggttc		20
	<210> 60		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸		
	<400> 60		
	gaagaggcgt tgcaaatggg		20
	<210> 61		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
[0024]	<220>		
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸		
	<400> 61		
	ctattgcgtg tgctccaaac		20
	<210> 62		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸		
	<400> 62		
	acatgaggag gaaccaaagg		20
	<210> 63		
	<211> 490		
	<212> DNA		

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 番茄 NFY dsRNA 产物 1	
	<400> 63	
	ctaatacgac tcactatagg gagaggetca agaaccagtt tatgttaatg ctaagcagta	60
	tcgaaggatc ctgcagcgaa gacagtcacg tgctaaagca gaacttgaaa agaagcaaat	120
	aaagggtaga aagccatata ttcacgagtc tcgacatcag catgcactga ggagggtaaag	180
	ggcctcgggt ggacgttttg ccaaaaagac agatgcttct aagggtactg gttctgtgag	240
	ttcatcgggt tctgaacctt tgcagttcaa tgctgctgat attcaaaaga ggaatgaaaa	300
	tggaaggttg gccgagcttc agcagtcctta ttcaaatggt agcagttatg gcaatcaaag	360
	tagctttcaa gaatccaagg atgagtacca gtttgctaaa agcaggaag gaggtttttt	420
	tgtcaagtaa ttggagatac gttcatgtgt aaactagctc ttgccctctc cctatagtga	480
[0025]	gtcgtattag	490
	<210> 64	
	<211> 497	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 番茄 NFY dsRNA 产物 2	
	<400> 64	
	ctaatacgac tcactatagg gagagcagtt atggcaatca aagtagcttt caagaatcca	60
	aggatgagta ccagtttgct aaaagcaggg aaggaggttt tttgtcaag taattggaga	120
	tacgttcatg tgtaaactag ctcttgccct gcaacgaggg tagagtatga gcaagaggag	180
	tttacagga ttgtttcatt tcttggttt tcaagatagg cggcaattca ttcttggett	240
	tttactttag tgtaaaggg agcaacagag gtgacgaggg tatcagtgtt gcagcatttg	300

	cttgagatt acatcttccc ttatgtacag agatggatga acttagaact aggattagaa	360
	agtttttcag taagtttatg tttggccagt tactgtagtt ttagtttagg agaccatgta	420
	aaaaggttgt tagttttgca aaaggatctt ttttcttcc ctaattggtg cattctcct	480
	atagtgagtc gtattag	497
	<210> 65	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 65	
	cgagtcggga tactggaagg	20
[0026]	<210> 66	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 66	
	cttcttcatg ccgacgagg	20
	<210> 67	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 67	
	acgatggcg agaaggagt	20

	<210> 68	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 68	
	tcagtcctcgt cgggtacttg	20
	<210> 69	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 69	
[0027]	agggtcacat cccgaactac	20
	<210> 70	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 70	
	acctgctcag tctccacatc	20
	<210> 71	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	

<400> 71		
gttggattcg agcttccttc		20
<210> 72		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 单链 DNA 寡核苷酸		
<400> 72		
tgctgctgct cactagctac		20
<210> 73		
<211> 490		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
[0028]		
<220>		
<223> 玉米 ARF8 dsRNA 产物		
<400> 73		
ctaatacgac tcactatagg gagacagtcc gttggcctag ttctattgg agatctgtga		60
aggttggttg ggatgaatca actgcagggg aaagaccacc aagagtttct ttatgggaaa		120
ttgaaccatt gacaaccttt ccaatgtatc catctctggt cccactgaga gttaagcacc		180
cttggtatcc aggagttgct tccctgcatg atgacagcaa tgctttaatg tggctgagag		240
gagttgctgg tgaggagggt tttcagtctc tgaactttca gtcacctggt attggctcct		300
ggggacaaca gaggtccat ccctccttac tgagcagcga tcacgatcag taccaagcag		360
tagttgctgc tgctgctgct tcccaatctg gtggttactt aaaacagcaa ttcttgcacc		420
ttcagcaacc tatgcagtcc cctcaagaac actgcaacct caacctctc cctatagtga		480
gtcgtattag		490

	<210> 74	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 74	
	ctcagccatg ggatactacc	20
	<210> 75	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 75	
[0029]	gctggccggtt gacgacattg	20
	<210> 76	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 76	
	acctcaggtg gatgtctc	18
	<210> 77	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	

	<400> 77		
	tgctggtgct ttgggtag		18
	<210> 78		
	<211> 530		
	<212> DNA		
	<213> 玉米		
	<400> 78		
	taccatgcga tccttaggag gaggcagaca cgtgctaaac tggaggcgca aaacaagatg		60
	gtgaaaggtc ggaagccgta ccttcgtgag tctcgacacc gtcatgcat gaagcgggcc		120
	cgtggetcag gagggcggtt cctcaacaca aagcagcagc tccaggagca gaaccagcag		180
	taccaggcgt cgagtggttc aatgtgctca aagaccattg gcgacagcgt aatctcccaa		240
	agtggcccca ttgcaagcc ctcttctgac gctgcagggtg cttcagcagc cagccaggac		300
[0030]	cgcggtgct tgcctcgggt tggcttccgc cccacagcca acttcagtga gcaaggtgga		360
	ggcggtcga agctggcgt gaacggcatg cagcagcgtg tttccacat aaggtgaaga		420
	gaagtgggca cgacaccatt cccaggcgcg cactgcctgt ggcaactcat ccttggcttt		480
	tgaaactatg aatatgcaat ggacatgtag ctttgagttc ctcagaataa		530
	<210> 79		
	<211> 936		
	<212> DNA		
	<213> 水稻		
	<400> 79		
	tcagtgtttg tcccctcaga tattaacaac aatgatagtt gtggggagcg ggaccatggc		60
	actaagtcgg tattgtcttt gggaacaca gaagctgcct ttctccttc aaagttcgat		120
	tacaaccagc cttttgcatg tgtttcttat ccatatggta ctgatccata ttatggtgga		180
	gtatcaacag gatacacttc acatgcattt gttcatcctc aaattactgg tgetgcaaac		240

tctaggatgc cattggctgt tgatccttct gtagaagagc ccatatttgt caatgcaaag	300
caatacaatg cgatccttag aagaaggcaa acgcgtgcaa aattggaggc ccaaaataag	360
gcggtgaaag gtcggaagcc ttacctccat gaatctcgac atcatcatgc tatgaagcga	420
gccccgtgat caggtggctg gttccttacc aaaagagagc tgctggaaca gcagcagcag	480
cagcagcagc agaagccacc accggcatca gctcagtctc caacaggtag agccagaacg	540
agcggcggtg cegttgtcct tggcaagaac ctgtgccag agaacagcac atcctgctcg	600
ccatcgacac cgacaggctc cgagatctcc agcatctcat ttggggcgcg catgctggct	660
caccaagagc acatcagctt cgcattccgt gatcgccacc ccacaatgaa ccagaaccac	720
cgtgtccccg tcatgaggtg aaaacctcgg gatcgcgga cacggcggt tctggtttac	780
cctcactggc gcactccggt gtgcccgtgg caattcatcc ttggcttatg aagtatctac	840
ctgataatag tctgctgca gtttatatgc aatgcaacct ctgtcagata aactcttata	900
[0031] gtttgtttta ttgtaagcta tgactgaacg aactgt	936
<210> 80	
<211> 512	
<212> DNA	
<213> 水稻	
<400> 80	
catggtggct cagcggctgg ggcaccaatg ctccaccacc cagcctttga gctcacctca	60
ggtggatgtc tcgcgggagt cgccaccgac tccagctgtg ctctctctct tctgtcaact	120
cagccatggg atactaccca aagcaccagc agccacaacc ggtccccgcc aatgtcgtca	180
acggccagcg ctttcggagg cggcaacaac ccggtgtcgc cctcggatcat ggcaagcaac	240
tacatggcgg cgagccccgg ctggaacagc tccagccggg gccatgacgg cgccaggaac	300
gtgcacctgc cgccaccgca cggggtttgt ctgaacgagg tccctccggg ctctgtccac	360
cacggccatt tctccggcga gctcgagctc gcactgcagg gaggtgcccc gtccaaccgg	420

	ccggaagcca agcatggctc cggcagcggc gccttcagcc actccaccaa tgccatgaac	480
	tggtctctgt agagaccatt gatcatcttc tt	512
<210>	81	
<211>	840	
<212>	DNA	
<213>	玉米	
<400>	81	
	atggaaggaa acggtggcgc gggcggcggg agcgggaagcg cggcaccgcc ctgggatctc	60
	gccatgcaact gggcaccgcc cgtagtgtcg tcctaccgcc cgcagccctt ggagctgcag	120
	cagcaggagc ttacctgcct caagctgggg aagcggcccc cctgctgctg ggcaggggcg	180
	ccgggcaacc aagcggcgca ggtccacggc aatggcggcg ctggtggcgc agctgctgag	240
	ggtaagagga aggacaaggc gcctgccgcg gcggccgtga cgaggtgcca ggtggagggg	300
[0032]	tgccacctgt cgctggcgga cgccaaggag taccaccggc ggcacaaggt gtgcgaggcg	360
	cactccaagt cgccccgggt cgtcgtcctc ggcgcggagc agcgttctg ccagcagtgc	420
	agccggttcc acgcgatctc ggagttcgac gacgcgaagc ggagctgccg acggcgtctg	480
	gccgggcaca acgagcggcg gcggaagagc aacgccagcg aggccatggc aagaggcgtc	540
	gcgcaccac acggagtgac ggctttcggc cacggcggct tcctgcctc gcgcggcctc	600
	gtccccgag ggtcgtcccc ggcgcggtt ggtgctctct ctcttctgtc atcgccaga	660
	ggcagcgtgg cgggcgccag cgggccttg ctggtcacgg cggcgcggga ggacatccc	720
	gcgcgtcca gcgcggcgt cgacacctt atcgccgaga accgcgccgc cgcgtcctc	780
	gcgcggcagt acttcgtctc cgaccgtcg ccggcgccea gacggattt cgtcgcctct	840
<210>	82	
<211>	800	
<212>	DNA	

<213> 水稻	
<400> 82	
atgagcggga tgaattcgct gagcatggtg gaggcgaggc tgccgccggg gttcaggttc	60
cacccgcgag acgacgagct cgtgctggac tacctggaaa ggaagctcct cgacggcggc	120
gtgggcggcg ccgcggcggc ggcggcggcg gtcaccatct acggctgccc ggtgatggtc	180
gacgtcgatc tcaacaagtg cgagccatgg gaccttctg agatcgcttg cgttggtggc	240
aaggagtggc acttctatag ccttagggat aggaagtatg caactggcca acgaacaaat	300
agagcaaccg aatcgggcta ctggaaggcc acaggaagag atgcccgaat aagccggaaa	360
ggattgctcg tcggtatgcg aaaaaccctg gtgttctaca aaggtagagc ccctaagggg	420
aagaagaccg agtgggtcat gcatgaattc cgcaaagaag gacaagggga tccgatgaag	480
ttgcctctca aggaggactg ggtcttgtgt agagtcttct acaagagtag gacaaccatt	540
[0033] gccaaactgc caacggaggg tagctacaac aatattgaca gtgtggccac aacttcaactg	600
cctcccctca ctgacaacta cattgcattt gatcagcctg gttcaatgca aaacctagag	660
ggttatgagc aagtgccttg cttctccaat aatccctctc aacagccatc gtcgtcgatg	720
aatgttccgt tgacatcggc catggttgat caagagcaaa acaatatggg tagggcgatc	780
aaggatgtgc tgagccaatt	800
<210> 83	
<211> 799	
<212> DNA	
<213> 玉米	
<400> 83	
atggagcaag acgtgcacca ccagcaggcc atggagctgc cgccgggggtt ccgattccac	60
cccaccgacg aggagctcat cacgcactac ctcgccagga aggccgccga cgcccgttc	120
gccccgcgcg ccgtcggcga ggccgacctc aacaagtgcg agccatggga cctgccaacc	180

cgggcgacga tgggcgagaa ggagtgtac ttcttctgcg tcaaggaccg caagtaccg	240
acgggactga ggacgaaccg ggccaccgag tcgggatact ggaaggcgac gggcaaggac	300
agggagatct tcaggagcaa ggcctctgct ggcatgaaga agacgctcgt cttctacacg	360
gggagggcgc ccaggggagg caagaccgac tgggtcatgc acgagtaccg cctccacggc	420
aagcacgcca gcagcagccg cctcatgccg tcgtcgggtca gagctggcgc gtcaaaggac	480
gagtgggtgc tgtgcagggt gttcaagaag agcatcgagc cgcccgctc agtgggcaag	540
aggtcgtcgg tcgcgtgtac ggggatgatg ttggtggagg acgtcgtggg accgccgtcc	600
atgtccatgg aggacgacct cgcccgctgc gcgctgcctc cgctgatgga cgtgtccggc	660
ggtggcggcg ccaacatggc ggcggcgtcc atcgagctgc tggcgccacc ggcaccacac	720
gtgacctgct tctccaacgc gctggagggc cagtcttcc tgaaccacc ctgcctccac	780
ccctccacgt cgccgtcc	799

[0034]

&lt;210&gt; 84

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 单链 DNA 寡核苷酸

&lt;400&gt; 84

taatacgact cactataggg ccgcatgcca ttgtccatcc

40

&lt;210&gt; 85

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 单链 DNA 寡核苷酸

&lt;400&gt; 85

	taatacgact cactataggg tgcatgccgt tcacgaccag	40
	<210> 86	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 86	
	taatacgact cactataggg caaatagtcc ggttatgttg	40
	<210> 87	
	<211> 42	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0035]	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 87	
	taatacgact cactataggg gctacatgtc cattgcatat tc	42
	<210> 88	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 88	
	taatacgact cactataggg ctgcctttcc tccttcaaag ttc	43
	<210> 89	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
	<400>	89	
		taatacgact cactataggg tgctgttctc tgggcacagg	40
	<210>	90	
	<211>	41	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
	<400>	90	
		taatacgact cactataggg cattggctgt tgatccttct g	41
	<210>	91	
	<211>	40	
	<212>	DNA	
[0036]	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
	<400>	91	
		taatacgact cactataggg ttcgttcagt catagcttac	40
	<210>	92	
	<211>	40	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
	<400>	92	
		taatacgact cactataggg tcacctcagg tggatgtctc	40
	<210>	93	

<211> 40  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 单链 DNA 寡核苷酸  
  
 <400> 93  
 taatacgact cactataggg cattggtgga gtggctgaag 40

<210> 94  
 <211> 44  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 单链 DNA 寡核苷酸  
  
 <400> 94  
 taatacgact cactataggg ccaatgctcc accaccage cttt 44

[0037]

<210> 95  
 <211> 43  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 单链 DNA 寡核苷酸  
  
 <400> 95  
 taatacgact cactataggg agttcatggc attggtggag tgg 43

<210> 96  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 单链 DNA 寡核苷酸  
  
 <400> 96

	taatacgact cactataggg cgccgtagtg tcgtcctacc	40
	<210> 97	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 97	
	taatacgact cactataggg aaagccgtca ctccgtgtgg	40
	<210> 98	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0038]	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 98	
	taatacgact cactataggg cgcaggtcca cggcaatg	38
	<210> 99	
	<211> 41	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 99	
	taatacgact cactataggg cggtcggaga cgaagtactg c	41
	<210> 100	
	<211> 41	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
	<400>	100	
		taatacgact cactataggg ttcaggttcc acccgcgaga c	41
	<210>	101	
	<211>	41	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
	<400>	101	
		taatacgact cactataggg cgttggcag cttggcaatg g	41
	<210>	102	
	<211>	41	
	<212>	DNA	
[0039]	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
	<400>	102	
		taatacgact cactataggg cgtgctggac tacctgaaa g	41
	<210>	103	
	<211>	40	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
	<400>	103	
		taatacgact cactataggg caacatggc cgatgtcaac	40
	<210>	104	

<211> 40  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 单链 DNA 寡核苷酸  
  
 <400> 104  
 taatacgact cactataggg ccaccgacga ggagctcatc 40

<210> 105  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 单链 DNA 寡核苷酸  
  
 <400> 105  
 taatacgact cactataggg cgacgtcctc caccaacatc 40

## [0040]

<210> 106  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 单链 DNA 寡核苷酸  
  
 <400> 106  
 taatacgact cactataggg aggccgacct caacaagtg 39

<210> 107  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 单链 DNA 寡核苷酸  
  
 <400> 107

	taatacgact cactataggg tcaggaagaa ctggccctcc ag	42
	<210> 108	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 108	
	cctcaacagt cctggatgtc	20
	<210> 109	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0041]	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 109	
	cccgtaagtt ggaagtgatg	20
	<210> 110	
	<211> 506	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> ARF 8 dsRNA 产物 1	
	<400> 110	
	ctaatacgac tcactatagg gagagcttct cctccctaca actgtgtcta acgtegetac	60
	tacatcaatt gatgctgata tatcctctat gccactaggg acttctggat ttccgaatcc	120
	cttgtatagt tatgtgcaag attctactga cttgttgcatt aatgtagggc aagctgatgc	180
	acaaactgtg ccccgatcat ttgtcaaggt ttacaaatca gcgtcccttg ggaggtcatt	240

ggacatcact cggttcaaca gctatcatga gctgcgacag gaattagggc agatgttcgg	300
tatcgaaggg ttgcttgaag accctcaaag atcaggctgg cagcttgtat ttgttgacag	360
ggagaatgat gtccttctcc ttggagacga tccgtgggag gaatttgtca ataatgtttg	420
gtacatcaaa attctttcac ccgaggatgt gcagaaactg gggaaagagg aggttggatc	480
cctctcccta tagtgagtcg tattag	506
<210> 111	
<211> 544	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> ARF 8 dsRNA 产物 2	
<400> 111	
ctaatacgac tcactatagg gagatgggag attgagcctt tgactacttt tccgatgtat	60
[0042] ccatctcttt ttctcttaag gctaaagagg cctttctatc aaggaacctc atcttatcag	120
gatagtaaca atgaagctat taatcgaatg tcatggtaa gagggaatgc tggtagccta	180
ggacatcatt caatgaatct tcagtctttt ggcattgctt cttggatgca acagagagtc	240
gattcaacaa ttctccaaa tgatattaat cagcactatc aagctatgct ggctactggc	300
ttgcaaagtt ttgggagtgg agatttactg aaacagcaat taatgcagtt tcagcagcct	360
gtccaatata tgcaaatgc aagtactgag aattcaattt tgcatcagca gcagcagcag	420
cagcagcaaa taatgcagca agcagttcat cagcatatgc tgcttctca aacccaaatg	480
ctgtcagaga accttcaaag gcaatcccag catcaatcca tctccctata gtgagtcgta	540
ttag	544
<210> 112	
<211> 20	
<212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 112	
	gaggcacctt gtgttgattg	20
	<210> 113	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 113	
	caaagccacg gttcttaagc	20
[0043]	<210> 114	
	<211> 511	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> FW2.2 dsRNA 产物	
	<400> 114	
	ctaatacgac tcactatagg gagatccagg tccaatgaaa caaccttatg ttcctcctca	60
	ctatgtatct gccccggca ccaccacggc gcggtggtcg actggtcttt gtcattgttt	120
	tgatgaccct gctaactgtt tagttactag tgtttgcct tgtatcacct ttggacagat	180
	ttctgaaata ctaaacaag gaacaacttc atgtgggagt agaggtgcat tatattgttt	240
	gctgggattg acaggattgc ctagcctata ttctgcttc tacaggtcta aatgagggg	300
	gcaatatgat ctggaagagg caccttgtgt tgattgtctt gtacatgtat tctgtgaacc	360
	ttgtgctctt tgccaagaat acagagagct taagaaccgt ggctttgata tgggaatagg	420

	gtggcaagct aatatggata gacaaagccg aggagttacc atgccccctt atcatgcagg	480
	catgacctct ccctatagtg agtcgtatta g	511
	<210> 115	
	<211> 513	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> NRR dsRNA 产物 1	
	<400> 115	
	ctaatacgac tcactatagg gagaagctcc tgaacccatc attgaagaac cagtgccttag	60
	ccttgatcca gttgcagcag ccatttcgat gatgtctggc agtgagaacg taatggatga	120
	aactatagag gttgcagata tcagcgacat tcagaatgac tctcttttaa gcgaagtatt	180
	atacgagtgc gagaaggaac tcatggagaa gtccgcaatc gaagagacta tttctgaact	240
[0044]	gctggacgtc aagattccta tgctgcaagt ggaagagttc cctagggaaa cccaagtaca	300
	actaccggcc atggagaagg agaagccatc agttcctgaa tgttgttcac tccagaaaag	360
	tgtcagttct ggggtgcctca actcagctga ttggatcaat ggaccagcca ggccaaactt	420
	cctggacttc caaggattgg actttgagac agcgtttggg ttgaggaggg catacagcga	480
	aggagacatt ctccctatag tgagtcgtat tag	513
	<210> 116	
	<211> 524	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> NRR dsRNA 产物 2	
	<400> 116	
	ctaatacgac tcactatagg gagacatgga gaagtccgca atcgaagaga ctattttctga	60

actgctggac gtcaagattc ctatgctgca agtggagag ttccttagg aaaccaagt 120

acaactaccg gccatggaga aggagaagcc atcagttcct gaatgttgtt cactccagaa 180

aagtgtcagt tctgggtgcc tcaactcagc tgattggatc aatggaccag ccaggccaaa 240

cttctctggac ttccaaggat tggactttga gacagcgttt gggttgagga gggcatacag 300

cgaaggagac attcagaatc ttggagctag caccctcga cccgggaact caggaaacgc 360

tcaattagca tcttgcgaga ggcttgtaac catcagtgc ctgaaatctg aagaaaggaa 420

gcagaagcta tctaggtaca gaaagaagaa ggtgaagaga aactttggca gaaagatcaa 480

gtatgcttgc aggaaggctc tctccctata gtgagtcgta ttag 524

<210> 117  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

[0045]

<220>  
 <223> 单链 DNA 寡核苷酸

<400> 117  
 gtgactcgtc accaacaag 20

<210> 118  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 单链 DNA 寡核苷酸

<400> 118  
 tgtgttgctc gttgagactg 20

<210> 119  
 <211> 20  
 <212> DNA

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 119	
	cagttcgcgc acaccattcg	20
	<210> 120	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 120	
	gcagcatgaa cggctccaag	20
[0046]	<210> 121	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 121	
	tccgcaatgc cgtgtgcatc	20
	<210> 122	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 122	
	gcggcaggaa tgctagtgtc	20

<210>	123	
<211>	543	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Della dsRNA 产物	
<400>	123	
	ctaatacgac tcactatagg gagagcccac ttctacgagt cctgccccta cctcaagttc	60
	gcccacttca ccgcaaatca agccatcctc gaggctttcg ccggtgcca ccggtccac	120
	gtcgtcgact tcggcatcaa gcaggggatg caatggccag ctctcctcca ggcctcgcc	180
	cttcgtcccg gcggccccc atcgttccgc ctaccggcg tcggccccc gcagccggac	240
	gagaccgacg ccttgcagca ggtgggttgg aagcttgccc agttcgcgca caccattcgc	300
	gtcgacttcc agtaccgggg actcgtcgcc gccactctcg cggacttga gccgttcatg	360
[0047]	ctgcagccgg agggcgaggc ggacgcgaac gaggagcctg aggtgatcgc cgtaactcg	420
	gtgttcgagc tgcaccgget gctcgcgcag cccggcgcgc tggagaaggt cctgggcacg	480
	gtgcacgcgg tgcggccaag gatcgtcacc gtggtagagt ctccctatag tgagtcgtat	540
	tag	543
<210>	124	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
<400>	124	
	ctaatacgac tcactatagg gagatggccc aatagtttct cctca	45
<210>	125	

	<211> 44	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 125	
	ctaatacgac tcactatagg gagagctgcc attgatgctg atgc	44
	<210> 126	
	<211> 509	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> SPL dsRNA 产物	
	<400> 126	
[0048]	ctaatacgac tcactatagg gagatggccc aataggttct cctcatatgg atggaaacta	60
	acaaatggga agggaagaga agcattactg aagctgaaaa ggaagaggat gaacatggaa	120
	gtgttgaaga ggatagcaaa agaaaaaggg tattgactct ctctggtagg aagctagtgt	180
	gtgaagggtc ggcacatcct tcttgccagg tcgatcagtg cactgcagat atggcagatg	240
	ccaagccata ccatgccgc cacaaggtgt gtgagttcca ttcaaagtct ccaatagtac	300
	ttattagtgg actccagaag cgattctgtc agcaatgtag cagatttcat ctgttagcag	360
	agtttgatga tgctaagagg agttgccgaa ggcgtttggc aggtcacaat gagcgccgcc	420
	gtaaaattac atatgactct catggagaaa atttgggctg aagaagcatc agcatcaatg	480
	gcagctctcc ctatagtgag tcgtattag	509
	<210> 127	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
	<400>	127	
		caattcccgg atttctaagc	20
	<210>	128	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
	<400>	128	
		ccctttacac aagggaatg	20
	<210>	129	
	<211>	26	
	<212>	DNA	
[0049]	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
	<400>	129	
		ttctgaagca acataaaca gatgtg	26
	<210>	130	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
	<400>	130	
		aatttgctta gaaatccggg aat	23
	<210>	131	

	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Taqman 探针	
	<220>	
	<221> 其它特征	
	<223> 5' 缀合 6FAM	
	<220>	
	<221> 其它特征	
	<223> 3' 缀合 MGBNFQ	
	<400> 131	
	ttaagcatgc tctctatct	19
[0050]	<210> 132	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 132	
	gctaagaacg ctggacctaa tg	22
	<210> 133	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 133	
	agaatagcat ccggtctcag	20

	<210> 134	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 134	
	ggtggcgcct ttgatgaa	18
	<210> 135	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 135	
[0051]	tccaatagct cgtaaatacag aacaa	25
	<210> 136	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Taqman 探针	
	<220>	
	<221> 其它特征	
	<223> 5' 缀合 VIC	
	<220>	
	<221> 其它特征	
	<223> 3' 缀合 MGBNFQ	
	<400> 136	
	atgcatccg caataa	16

	<210> 137	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 137	
	tctctgggct tgtatcatcc	20
	<210> 138	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 138	
[0052]	gctgctcaag gtgtttgtg	19
	<210> 139	
	<211> 47	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 139	
	ctcgtaat ac gactcactat agggcgaaca agaatctgcc ggactac	47
	<210> 140	
	<211> 47	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	

<400> 140		
ctcgtataac gactcactat agggcgacat ccttccatgc agctaac		47
<210> 141		
<211> 517		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 小麦 PDS dsRNA 产物#1		
<400> 141		
ctcgtataac gactcactat agggcgaaca agaatctgcc ggactacttg cttcagtatg		60
gataccagct gcctatcatc tatgaacata gctggagcga agcaagtaag atcttttgc		120
ggacaacttc atacgcagag gtgtttcaca agtagcagcg tccaggcact aaaaactagt		180
catcgtacga cctcccttgg ctttaaggaat aaagtaaaag gatcacgtca tggacttcgt		240
[0053] gctctgcagg ttgtttgcc aagattttcca aggcctccac tagagaacac gattaactat		300
ttggaagctg gccagctttc ttcgtcgttt agaagcagtg aacgccccag taaaccatta		360
caggctcgtga ttgctggtgc aggactggct ggtctatcaa ctgcaaaata cctggcagac		420
gctggccaca aacctatagt gcttgaggca agagatgtgt tggcggaata gttagctgca		480
tggaaggatg tcgccctata gtgagtcgta ttacgag		517
<210> 142		
<211> 47		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 单链 DNA 寡核苷酸		
<400> 142		
ctcgtataac gactcactat agggcgacgg aacagtgaag cactttg		47

	<210> 143	
	<211> 47	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 143	
	ctcgttaatac gactcactat agggcgattc gggacgtct tgtaaac	47
	<210> 144	
	<211> 537	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 小麦 PDS dsRNA 产物#2	
	<400> 144	
[0054]	ctcgttaatac gactcactat agggcgacgg aacagtgaag cactttgcac ttactgatgg	60
	gactcaaata actggagatg catatgtttt tgcagcacca gttgatatct tcaagcttet	120
	tgtaccacaa gaggtagag agatctctta tttcaaaagg ctggataagt tggtaggag	180
	tcctgtcatc aatgttcata tatggtttga cagaaaactg aagaacacgt atgaccacct	240
	tcttttcagc aggagttcac ttttaagcgt ttatgcagac atgtctttag cgtgcaagga	300
	gtactatgat ccaaaccgtt cgatgctgga gttggttttt gctccagcag aggaatgat	360
	cggacggagt gacaccgaaa tcatcgaagc aactatgcta gagctagcca agttgtttcc	420
	tgatgaaatc gctgctgacc agagtaaagc aaagattctt aaataccatg ttgtgaagac	480
	accgaggtcc gtttacaaga ccgtcccga tgcacctata gtgagtcgta ttacgag	537
	<210> 145	
	<211> 481	
	<212> DNA	

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 玉米 TB1 dsRNA 产物	
<400> 145	
ctaatacagac tcactatagg gaggtgatca actcgccgga cctgccggtg caggcgtga	60
tggaccacgc gccggcgccg gctacagagc tgggcgcctg cgccagtggg gcagaaggat	120
ccggcgccag cctcgacagg gcggtgccg cggcgaggaa agaccggcac agcaagatat	180
gcaccgccgg cgggatgagg gaccgccgga tgcggctctc cttgacgtc gcgcgcaaat	240
tcttcgcgct gcaggacatg ctggcttcg acaaggcaag caagacgta cagtggctcc	300
tcaacacgtc caagtccgc atccaggaga tcatggccga cgacgcgtct tcggagtgcg	360
tggaggacgg ctccagcagc ctctccgtcg acggcaagca caaccggca gacagctgg	420
gaggaggagg agatcagaag cccaaggta attgccgtct ccctatagtg agtegtatta	480
[0055] g	481
<210> 146	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
<400> 146	
aatcgtgtgc gtcgatttgg	20
<210> 147	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 单链 DNA 寡核苷酸	

	<400> 147	
	ggcggatact gtttgatctc	20
	<210> 148	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 148	
	gctgcgtggtt gtgcgttctg	20
	<210> 149	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0056]	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 149	
	tcgtcgcgtg ctgtctgttc	20
	<210> 150	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 150	
	ctggattgga aactgggatt gt	22
	<210> 151	
	<211> 21	
	<212> DNA	

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
<400> 151	
ttgccccatt ttgcatatag c	21
<210> 152	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Taqman 探针	
<220>	
<221> 其它特征	
<223> 5' 缀合 6FAM	
[0057]	
<220>	
<221> 其它特征	
<223> 3' 缀合 MGBNFQ	
<400> 152	
attgtgccgt tgaatat	17
<210> 153	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
<400> 153	
aggctttcgc tgcgtgtt	18
<210> 154	
<211> 19	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 154	
	tggcccatcc aaactcaga	19
	<210> 155	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Taqman 探针	
	<220>	
	<221> 其它特征	
[0058]	<223> 5' 缀合 VIC	
	<220>	
	<221> 其它特征	
	<223> 3' 缀合 MGBNFQ	
	<400> 155	
	tgcgttctgc ttgaat	16
	<210> 156	
	<211> 440	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 莴苣 HY5.5 dsRNA 产物	
	<400> 156	
	agagtttcgg ctcaacaagc aaggagagg aagaaggcat acttgaatga attggaagtg	60
	cgagtaaaag aaattgaaa gaagaactcc gagcttgaag agcgactttc aactctccaa	120

	aatgagaatc aaatgcttag acatatcttg aaaaacacta cagccggtat gcaagaaaag	180
	aagtagacat atgattagaa gaggaaaagc attacatgtg caatccgaat catagcttga	240
	aaatcgaagg gtttggttta ggatcgagac ttgttattgt ggttatttct tttcctagca	300
	aacataatga gaatccaacc atctttacgt acgattcgat taaagatctt taagtcatgt	360
	aggtggtaat gggctgtggt tctaaatgac caaaaagat gtaaagtatt gcatatgata	420
	tgggttttaa tttgtagcac	440
	<210> 157	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
[0059]	<400> 157	
	catgtgcaat ccgaatcata gc	22
	<210> 158	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 158	
	accacaataa caagtctcga tcctaa	26
	<210> 159	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Taqman 探针	

	<220>		
	<221>	其它特征	
	<223>	5' 缀合 6FAM	
	<220>		
	<221>	其它特征	
	<223>	3' 缀合 MGBNFQ	
	<400>	159	
		tgaaaaatcga agggtttg	18
	<210>	160	
	<211>	401	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	莴苣 HY5.6 dsRNA 产物	
[0060]	<400>	160	
		atgcaggagc aagcagcaac gagttccatg gcggttagtc taccttcaag tagcgagaga	60
		tcttcaagct ctgctctaca aattgaaatt aaagaaggaa tggaaagtga tgacgagatc	120
		agaagagtgc cggatatggg cggagaagcc gccggagcat caagatccgg cagagaaacc	180
		ggttcaaadc aaaataatcc agaccgggtt caaacctcag ctgaaggaac aaagaaaaga	240
		gggaaaactc ctgetgatag agaaagcaag cgattaaaga gattgttgag gaatagagta	300
		tcggctcaac aagcaagaga gagaaagaag gcgtacatga ccgagttgga gagccgagtt	360
		aaagagttgg agaagaagaa ctcggagctt gaagaacgtt t	401
	<210>	161	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		

	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 161	
	ccacaatgca aaatgaaaac ca	22
	<210> 162	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 162	
	gcatcccaga cgttgtgttc t	21
	<210> 163	
	<211> 17	
	<212> DNA	
[0061]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Taqman 探针	
	<220>	
	<221> 其它特征	
	<223> 5' 缀合 6FAM	
	<220>	
	<221> 其它特征	
	<223> 3' 缀合 MGBNFQ	
	<400> 163	
	tgcttagaca catcttg	17
	<210> 164	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
	<400>	164	
		ttgtcttgaa ttttagcttt gacgtt	26
	<210>	165	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
	<400>	165	
		ccttgaccgg aaaaacaatc a	21
	<210>	166	
	<211>	27	
	<212>	DNA	
[0062]	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	Taqman 探针	
	<220>		
	<221>	其它特征	
	<223>	5' 缀合 VIC	
	<220>		
	<221>	其它特征	
	<223>	3' 缀合 TAMRA	
	<400>	166	
		tcaatggtgt cggagctttc cacttcc	27
	<210>	167	
	<211>	524	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	

<220>		
<223>	莴苣 DHFR dsRNA 产物	
<400>	167	
	agaggattct cgcaccaccg tgtgtgtcac tggagctgcc ggattcattg gttcatgget	60
	cgttatgaga cttcttgaac gtgggtataa tgttcatgcc actgttcgtg accctgatga	120
	cataaagaaa gtgaaacatt tattggaact accaaaagca gcaacaaact tgacgttatg	180
	gaaggcagat ttgacacaag aaggaagctt tgatgaagcc attgaaggtt gtcattggagt	240
	ctttcatgtg gctacgccta tggactttca gtccaaggat cctgagaatg agatcataaa	300
	gccacaata gaaggtgtat taagcatcgt aagatcatgt gtgaaagtca aaacagtcaa	360
	gaaattggtg tttacatcct ctgcggggac agtgaacgtg cacggaaatg atcaacttcc	420
	ggtctatgac gagtctcatt ggagcgtatt ggacttcate tactccaaga aatgactgc	480
[0063]	atggatgtat ttcgtatcaa aaacattggc agaaaaagca gcat	524
<210>	168	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
<400>	168	
	ggagatgttc aaaggagcaa ttg	23
<210>	169	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	单链 DNA 寡核苷酸	

	<400> 169 ttgattgtgg aatatggaag catt	24
	<210> 170 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> Taqman 探针	
	<220> <221> 其它特征 <223> 5' 缀合 6FAM	
	<220> <221> 其它特征 <223> 3' 缀合 MGBNFQ	
[0064]	<400> 170 tagttgcaga gagaaag	17
	<210> 171 <211> 498 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 黄瓜 DND1 dsRNA #1	
	<400> 171 gtcttggaaat gctacgcctg tacccaagtg ggcgttccag cttccactc caccagctgc	60
	gaccacgecc accaacaacc cgaatgggaa gcctccgcgg gctcttcct ggttccaatc	120
	caaccacaa aatcctcacc agcgccecca cattcttcgg cgggttgctt cgggacggtt	180
	ctggacccaa gaaagaaacc ggttcagaga tggaaccggg ttctgttatt ggcccgggga	240
	atgtctcttg cggttgatcc gctttacttc tatgctctgt ctattggaag aggaggatgg	300

ccttgccctgt acatggatgg tgggttggct gccggagtta cggtggttcg aacgtgtcctt	360
gatatagtgc acttgtggca cgtgtggcctt cagttcagge ttgcttacgt gtcgaaagag	420
agtatggtga ttgggtgtgg gaaactgggtg tgggatgcac gtgatattgc ttctcactat	480
gttcgttctt tcaaaggc	498
<210> 172	
<211> 506	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 黄瓜 DND1 dsRNA #2	
<400> 172	
gtacggtgct tagtggattg ttgcttttca ctcttttgat tggtaatatt caggtacttt	60
tgcacgctgt catggcaagg aggcgaaaaa tgcagctgag atgtcgagat ttggagtgg	120
[0065] ggatgaggag acgacaattg ccatctcgtt tgaacatcg agttcgacac tatgagcacc	180
agagatgggc agctatggga ggagaagatg agatggaact aatcaatgat ttgccagaag	240
gtcttagaag agatatcaaa cgtcatcttt gtgttgacct aatcagaaag gtgcctctct	300
ttcaaacct ggaggagctg attctagaca acatattgta caaagtcaag ccacttgtat	360
tctccaaaga tgaaaagata atcagagaag gagatcctgt tccaaggatg ttattcatag	420
tgtgtggacg agtaaacgt agccaaagcc tgagcaagg catgacagcg acaagtttta	480
ttgaaccggg aggatttctt ggtgac	506
<210> 173	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 单链 DNA 寡核苷酸	

	<400> 173 cagcgagttg cttcttgat cca	23
	<210> 174 <211> 27 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 174 tcctcagagc aagacaaaga taagttg	27
	<210> 175 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
[0066]	<220> <223> Taqman 探针	
	<220> <221> 其它特征 <223> 5' 缀合 6FAM	
	<220> <221> 其它特征 <223> 3' 缀合 MGBNFQ	
	<400> 175 acattgtgag agaaacaagt	20
	<210> 176 <211> 499 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220>	

<223> GFP dsRNA 产物	
<400> 176	
ggtgatgcaa catacggaaa acttaccctt aaatttattt gcactactgg aaaactacct	60
gttccatggc caacaacttgt cactactttc tttatgggtg ttcaatgctt ttcaagatac	120
ccagatcata tgaagcggca cgacttcttc aagagcgcca tgctgaggg atacgtgcag	180
gagaggacca tcttcttcaa ggacgacggg aactacaaga cacgtgctga agtcaagttt	240
gagggagaca ccctcgtaaa caggatcgag cttaagggaa tcgatttcaa ggaggacgga	300
aacatcctcg gccacaagtt ggaatacaac tacaactccc acaacgtata catcatggcc	360
gacaagcaaaa agaacggcat caaagccaac ttcaagacc gccacaacat cgaagacggc	420
ggcgtgcaac tcgctgatca ttatcaaaa aatactcaa ttggcgatgg ccctgtcctt	480
ttaccagaca accattacc	499
[0067]	
<210> 177	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
<400> 177	
atggcttgct gcctgatgta tc	22
<210> 178	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
<400> 178	
ggtggcaaca gcagcattca	20

<210>	179	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Taqman 探针	
<220>		
<221>	其它特征	
<223>	5' 缀合 VIC	
<220>		
<221>	其它特征	
<223>	3' 缀合 MGBNFQ	
<400>	179	
	atgtttgtgcc taaggac	17

## [0068]

<210>	180	
<211>	509	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PMR5 dsRNA 产物#1 (T33789)	
<400>	180	
	gatcctgagt tcaactgcca agcttacggc agacccgatt caaattacct caagtaccgt	60
	tggcagccgc tcgattgtga gctcccaagg ttcgatgggg ctgagttttt gatgagaatg	120
	agaggaagaa ctgtgatggt tgttggtgat tcattgggga gaaaccaatg ggagtcattg	180
	atttgtttga tcgtgtcatc ttctctcaa actctactc aatgactag aggagaacct	240
	ctttcaacct tcagattcct ggaatatgag ttaactgtgt cctattacaa agccccgtat	300
	cttgtggaca tagagataga gaatgggaag agagtgttga agctggagga gatatcaatg	360

aatgaaatg cttgggttgg agctgatgtt atttcttca aacttgaca ttggtggagc	420
cacactggct ctctacaagg gtgggattac atggaatcag gaggatcata ctatcaagac	480
atggatcggg tgggtgcaat ggaaaaggc	509
<210> 181	
<211> 500	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PMR5 dsRNA 产物#2 (T33790)	
<400> 181	
ggctctctac aagggtggga ttacatggaa tcaggaggat catactatca agacatggat	60
cggttgggtg caatggaaaa ggctttaaga acatgggctg attgggttga gaagaacatt	120
gatgtctcta gaacaagggt tttcttcaa gctatctccc ccacacatta caatccatct	180
[0069] gaatggaaca cggggacagc atcgatgatg acatcaacga aaaattgtta tggggaaacg	240
gcaccaatgg gggggacgac gtacceggga ggtacccta ttcaaatgag ggttgtggat	300
gaagtataa gggagatgag gaagccagta tacttattgg acataacaat gtatctgag	360
ctaagaaaag atggacacce ttccatttat agtggtgatt tgaatcctca acaaaggct	420
aaccagata gatcagcgga ttgtagccat tgggtcttcc ctggettacc agatacttgg	480
aaccaattgt tttatactgc	500
<210> 182	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
<400> 182	

	agcttcctca gctttgattc tcagt	25
	<210> 183	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 183	
	gcgattatgg tggtcgctgt t	21
	<210> 184	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0070]	<223> Taqman 探针	
	<220>	
	<221> 其它特征	
	<223> 5' 缀合 6FAM	
	<220>	
	<221> 其它特征	
	<223> 3' 缀合 MGBNFQ	
	<400> 184	
	tgaagcacca ttaccg	16
	<210> 185	
	<211> 512	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 黄瓜 TubG dsRNA 产物#1 (T33791)	

	<400> 185	
	gtgggaacca gatcggaatg gagttctgga agcagctttg cctcgagcat ggaatcagca	60
	aagacggcat tcttgaagat tttgctactc agggaggtga ccgaaagat gtattcttct	120
	atcaagccga tgatcagcac tacataccaa gagctttaet tattgacctg gageccagg	180
	tcattaatgg tatccagaac agtgaatata gaaatcteta caaccagag aacatctttg	240
	tttcagatca tggaggtggt gctggaaata actgggccag tggatatcat cagggaagg	300
	gcgttgaaga ggatatcatg gacatgattg acagagaagc agatggaagc gatagccttg	360
	agggttttgt tctatgccac tcaattgctg gagggacagg atcgggcatg ggttcatatc	420
	ttctggagac tctgaatgat cgctacagca aaaaactggt tcagacgtac agtgtttttc	480
	ctaatacagat ggaacaagt gatgtttag tc	512
	<210> 186	
	<211> 512	
[0071]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 黄瓜 TubG dsRNA 产物#2 (T33792)	
	<400> 186	
	gccttacaac tcacttttga ctttaaagcg actaacactc aatgctgatt gtgttgttgt	60
	tcttgataat actgcctaa atagaatagc tgtagaacgc cttcatctat caaatccaac	120
	ctttgcacaa acaaactcct tagtgtcgac tgtaatgtca gctagcacia ccactttgag	180
	ataccagga tatatgaaca atgacttgg tggactcttg gcctctctaa ttccaacacc	240
	aagatgcat tttctaatga caggatacac accactcacg gttgagcgcc aggctaattg	300
	gataaggaaa accactgttc ttgatgtcat gagaagactt ctccagacia aaaatattat	360
	ggtctcctcg tatgctcgaa caaagaagc tagtcaagca aaatacatat caatattgaa	420
	tatcatacag ggagaagtgg accctacaca gtttcatgaa agtttgcaga gaatacgtga	480

	aagaaagctg gtgaatttta ttgagtgggg gc	512
	<210> 187	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 187	
	gggtcagtgg tcttatgtta gc	22
	<210> 188	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0072]	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 188	
	ttctcaactt ctcatactgg ctc	23
	<210> 189	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Taqman 探针	
	<220>	
	<221> 其它特征	
	<223> 5' 缀合 6FAM	
	<220>	
	<221> 其它特征	
	<223> 3' 缀合 3IABkFQ	

<400> 189		
agtatccggc atcttttcag caagtgt		27
<210> 190		
<211> 513		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 大豆 PHYAE3 dsRNA 产物		
<400> 190		
tcaagaagat gttggacatg gcattgcagg gtgaggaaga gagaaatgtc caatttgaga		60
tccaaacaca tcatatgaag attgattctg gtccatcag cttgtagtt aatgcttgtg		120
caagcaggga tcttcaagat aatgttgtgg gagtttgttt tctggcacia gatataactg		180
ctcagaaaac aatgatggac aaattcaccc gaattgaagg tgactacaag gcaattgtac		240
[0073] agaacccaaa cccattgatc cctccaatat ttggcacaga tgaatttggg tgggtttgtg		300
aatggaattc agctatggca aaattaactg gatggaagcg agaggaggta atggataaaa		360
tgcttttagg agaggttttc gggacccaaa tagcttgttg tgcctaagg aatcatgaag		420
ctgttgtaa ctttagcatt gtacttaata cagccatggc tggtttgaa acagagaagg		480
ttccttttgg tttctttgct cgtgatggaa agc		513
<210> 191		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 单链 DNA 寡核苷酸		
<400> 191		
tcctcttag gtatgcttgt caatt		25

	<210> 192	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
	<400> 192	
	tctctagctc tttgctcaca tgaac	25
	<210> 193	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Taqman 探针	
[0074]	<220>	
	<221> 其它特征	
	<223> 5' 缀合 6FAM	
	<220>	
	<221> 其它特征	
	<223> 3' 缀合 MGBNFQ	
	<400> 193	
	ctggctcaag tatttg	16
	<210> 194	
	<211> 525	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 大豆 PHYAE4 dsRNA 产物	
	<400> 194	
	tcaagaagat gcttaactta gcactgctag gtgaagaaga gaagaatgtc caatttgaga	60

tcaaaacaca tgggtctaag atggattctg gtctattag tttagtagta aatgcttgcg	120
caagcaggga tcttcgagat aatgittgtt gggtttgttt tgtggcccat gatataactg	180
ctcagaagaa tgtcatggac aaatttacgc gtattgaagg tgattacaag gcaattgtac	240
agaaccgcaa tccattaatc cctcctatat ttggcacaga tgaatttggc tgggtttgtg	300
agtggaatcc agctatgacg aagttaactg gatggaagcg agaggaggtg atggataaaa	360
tgcttttggg agagcttttt ggcaccata ttgctgcttg tcgcctaaag aatcaagaag	420
cttttgtaa tttgggtgtt gtacttaata aagccatgac tggtttgaa acagagaagg	480
ttccttttgg tttcttttget cggaatggca agtatgtgga atgcc	525
<210> 195	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
[0075]	
<220>	
<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
<400> 195	
caaggttatg aaaattatgg gtatgc	26
<210> 196	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
<400> 196	
cccgataac tgccatacat g	21
<210> 197	
<211> 21	

---

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Taqman 探针	
	<220>	
[0076]	<221> 其它特征	
	<223> 5' 缀合 VIC	
	<220>	
	<221> 其它特征	
	<223> 3' 缀合 TAMRA	
	<400> 197	
	ctgctgctgg acaggatccc a	21

水稻种子中 CGMMV 的稳定性

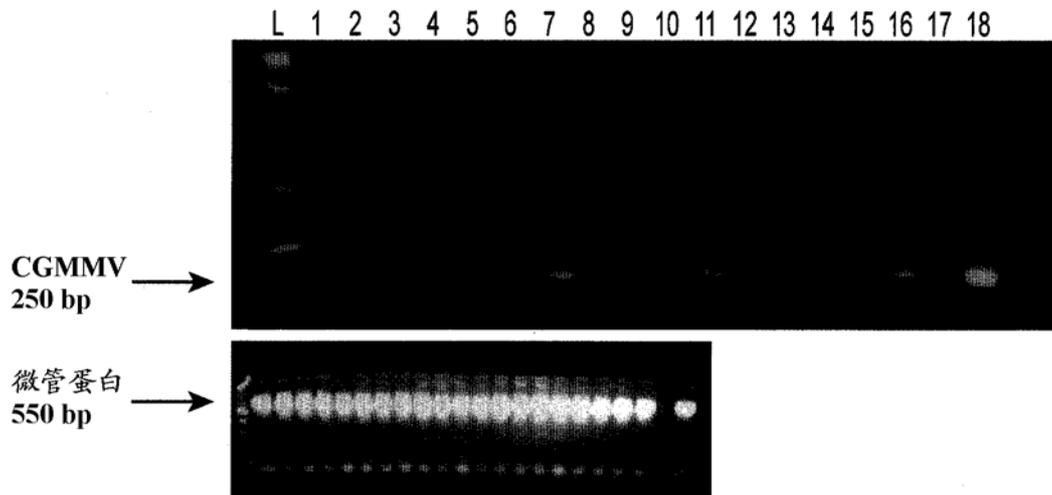


图 1A

水稻种子中 CGMMV 的稳定性

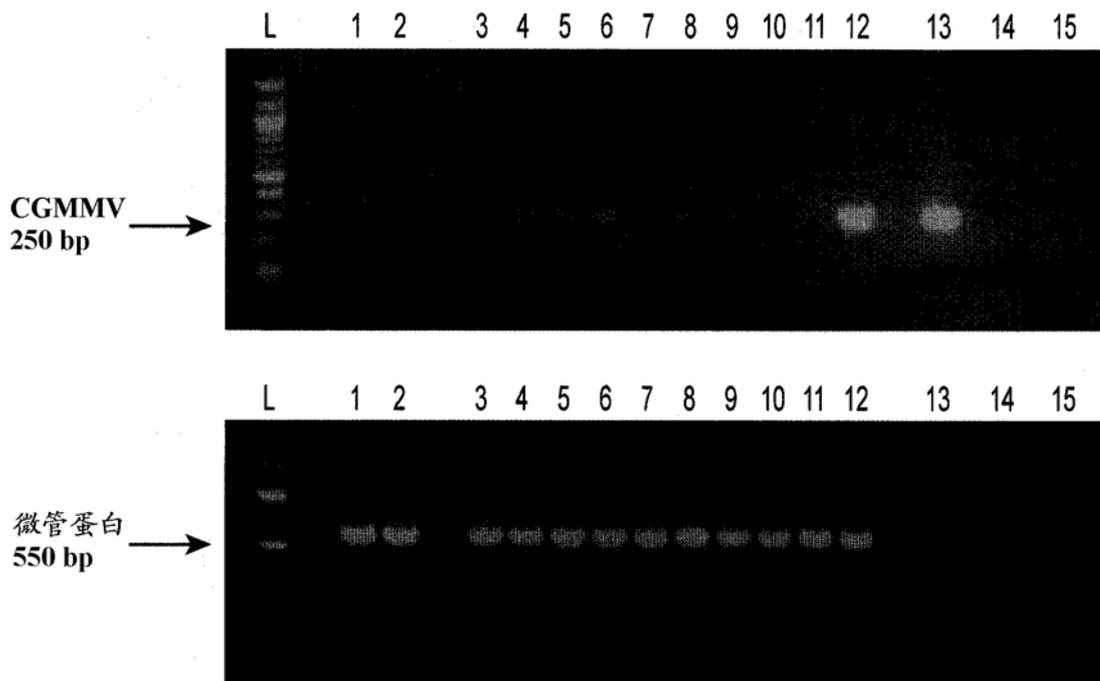


图 1B

水稻种子中 CGMMV 的稳定性

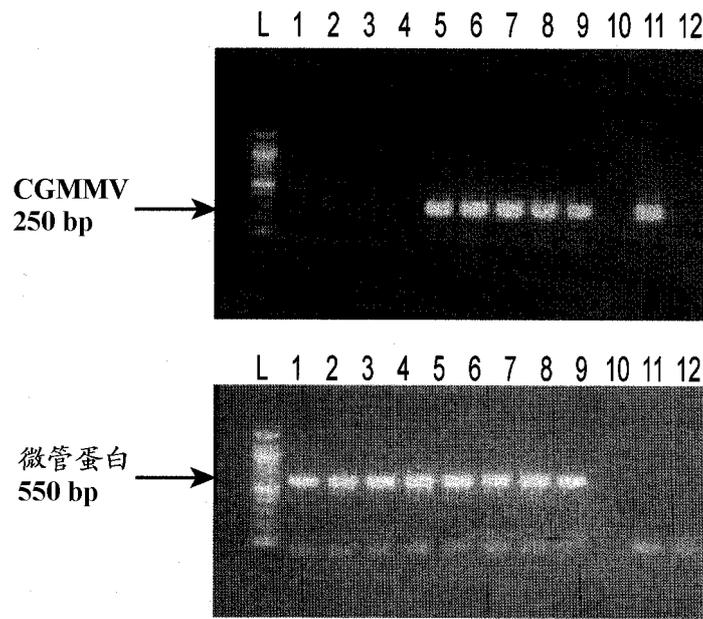


图 1C

番茄 10 天和高粱 4 周中 CGMMV 的稳定性

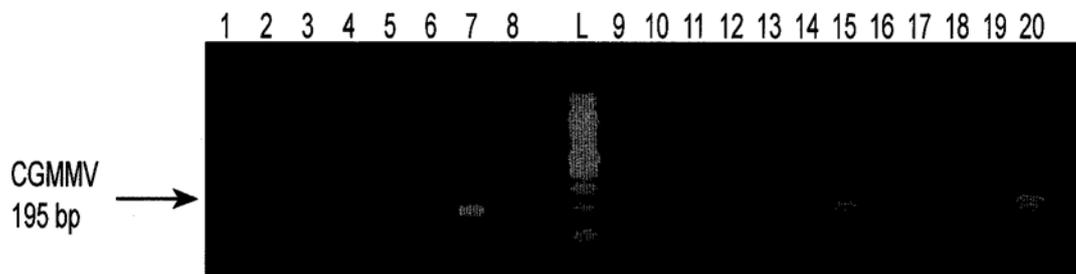


图 2A

番茄 10 天和高粱 4 周中 CGMMV 的稳定性

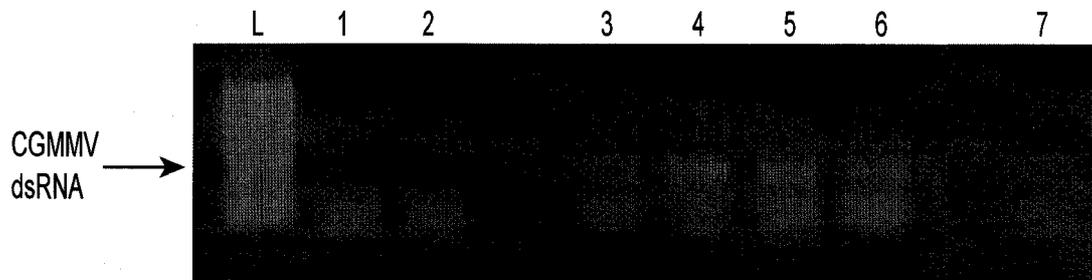


图 2B

CGMMV dsRNA 不整合到基因组中

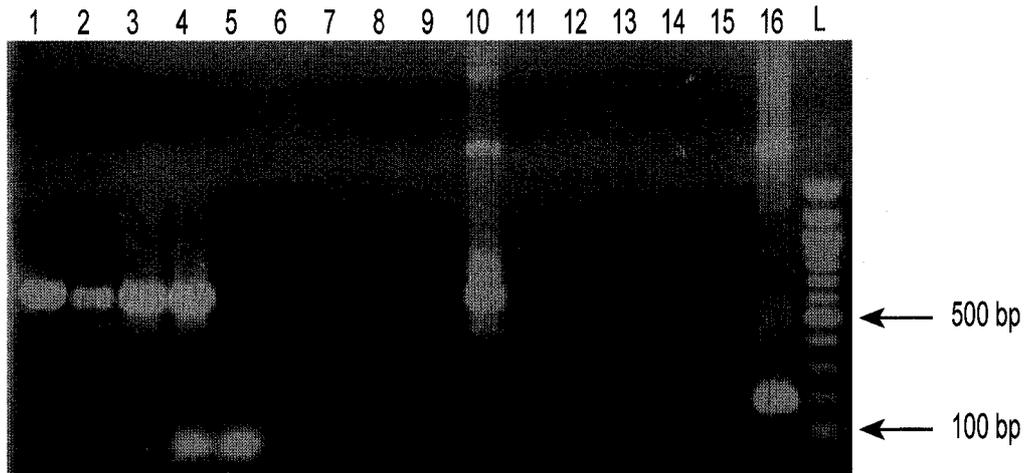


图 3

玉米根/嫩枝中的 GUS, 7 天、15 天



图 4A

玉米根/嫩枝中的 GUS, 7 天、15 天

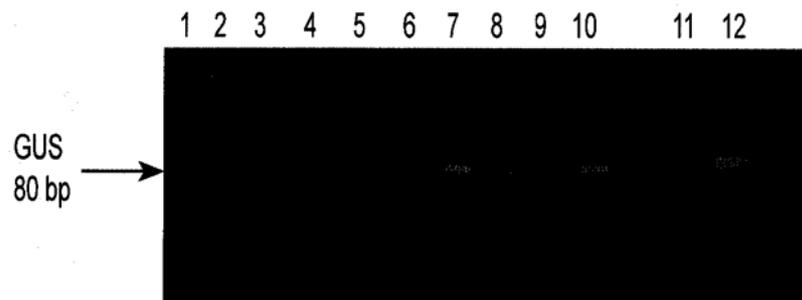


图 4B

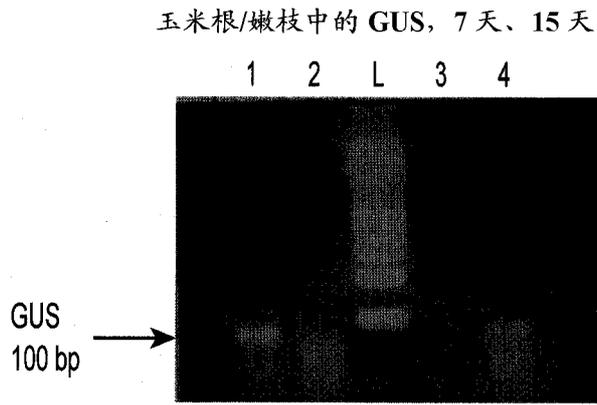


图 4C

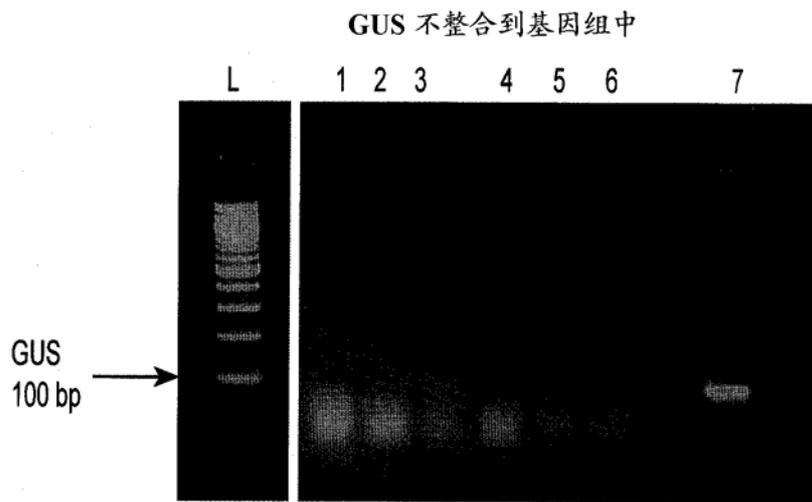


图 5A

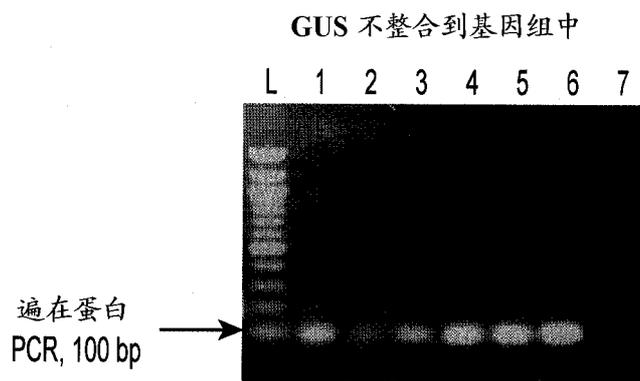


图 5B

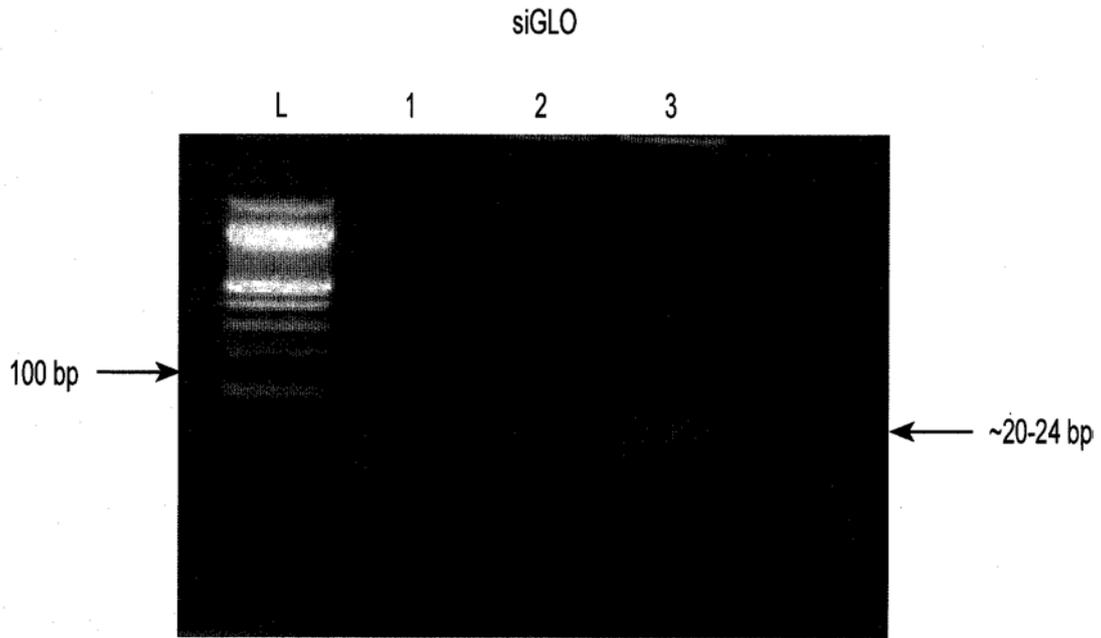
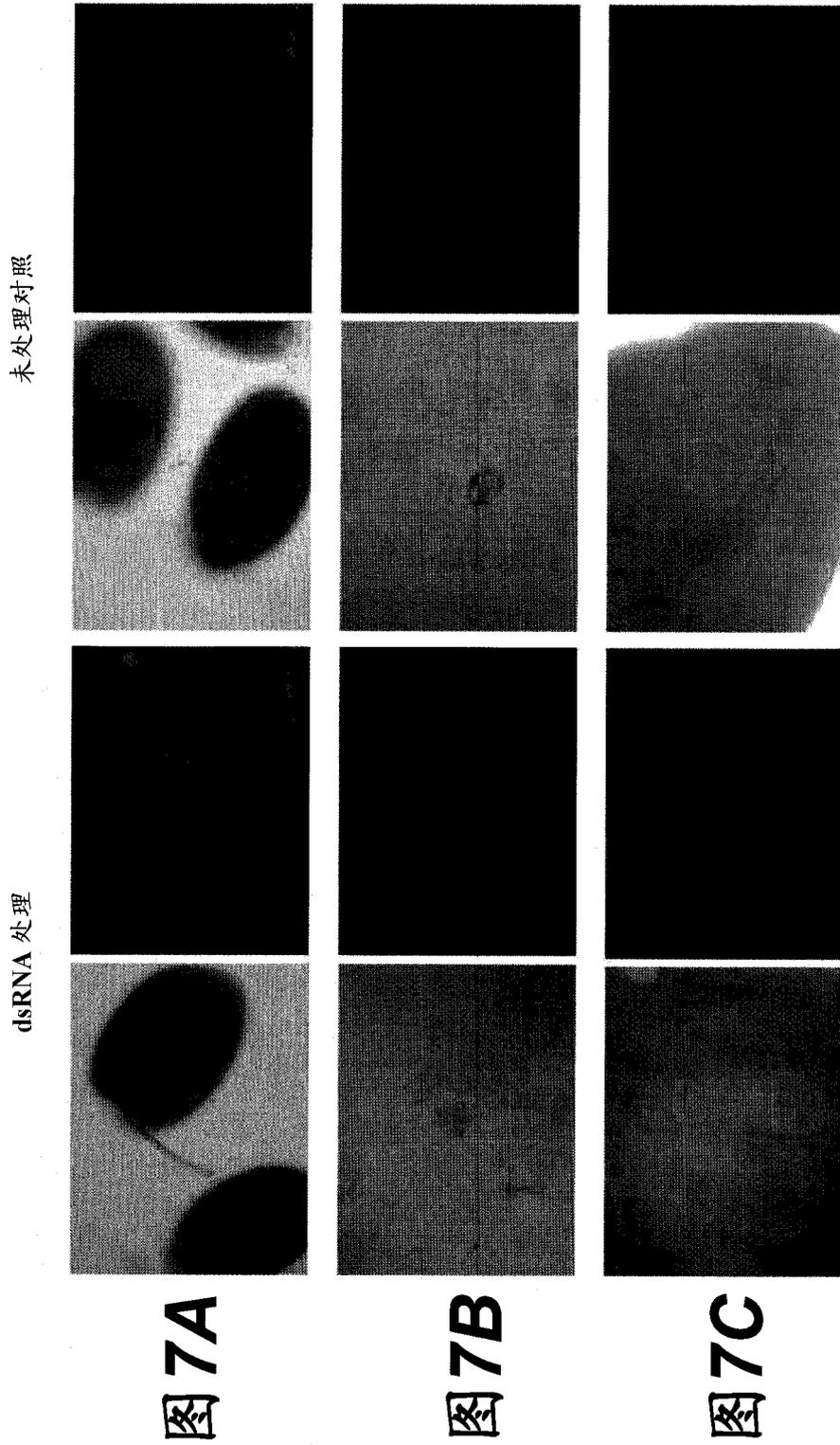


图 6



24 小时水稻(*Oryza sativa*)

处理

对照

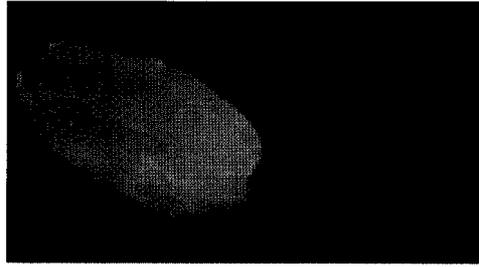


图 8A

24 小时水稻(*Oryza sativa*)

处理

对照

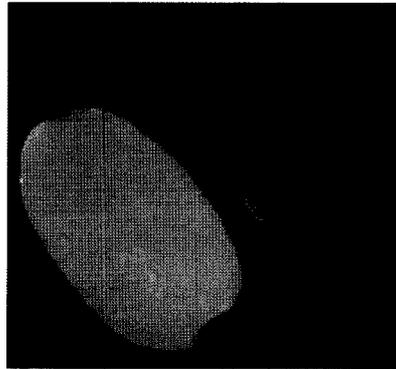


图 8B

24 小时水稻(*Oryza sativa*)

处理

对照

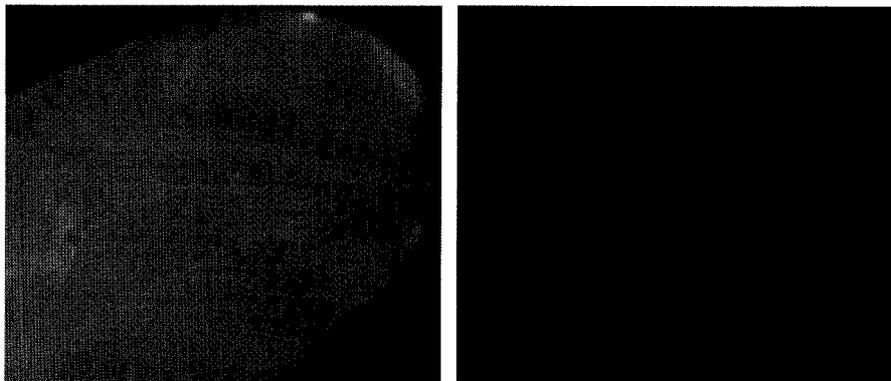


图 8C

48 小时水稻(*Oryza sativa*)切片

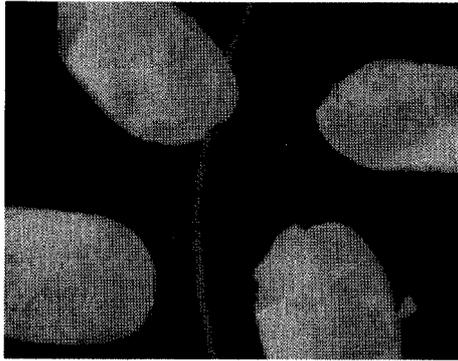


图 9A

48 小时水稻(*Oryza sativa*)切片

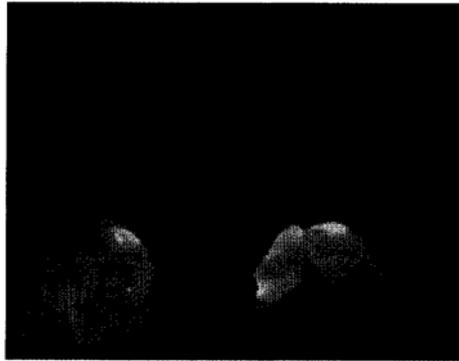


图 9B

48 小时水稻(*Oryza sativa*)切片



图 9C

48 小时水稻(*Oryza sativa*)切片

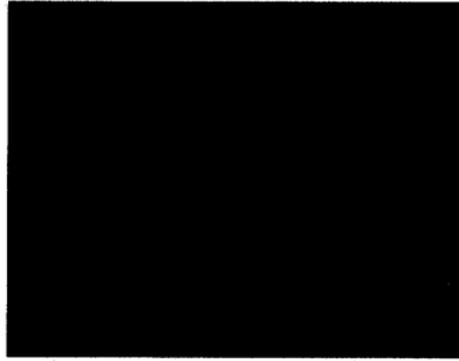


图 9D

48 小时水稻(*Oryza sativa*)切片

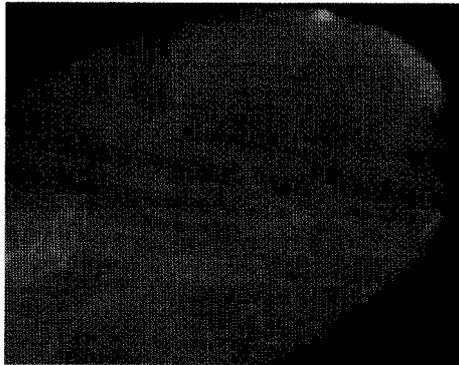


图 9E

48 小时水稻(*Oryza sativa*)切片



图 9F

48小时番茄切片



图 10A

48小时番茄切片

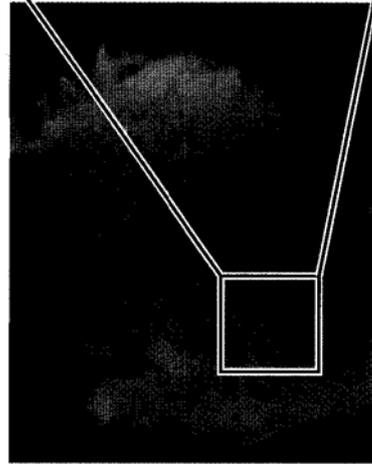


图 10B

48小时番茄切片

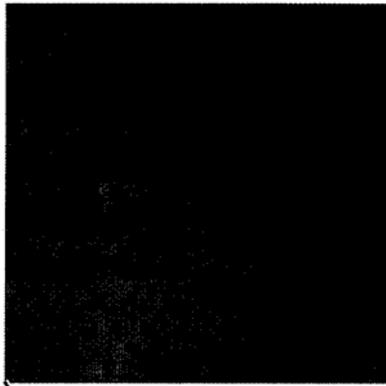


图 10C

48 小时番茄切片



图 10D

48 小时番茄切片

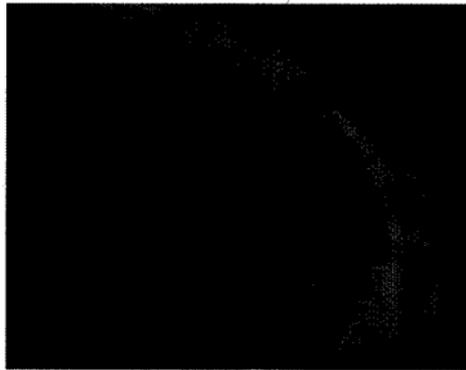


图 10E

48 小时黄瓜(*Cucumis sativus*)切片



图 11A

48 小时黄瓜(*Cucumis sativus*)切片

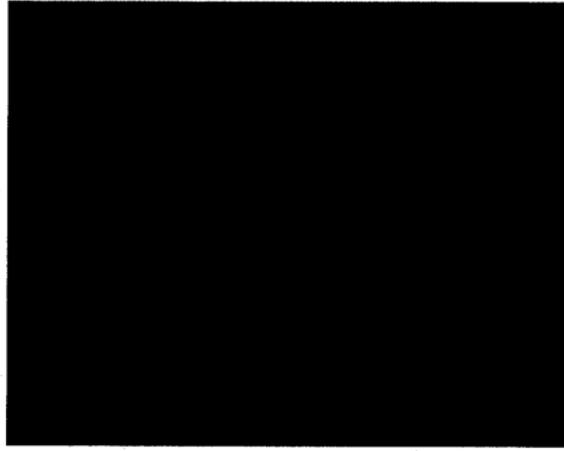


图 11B

48 小时黄瓜(*Cucumis sativus*)切片



图 11C

48 小时黄瓜(*Cucumis sativus*)切片



图 11D

48 小时黄瓜(*Cucumis sativus*)切片

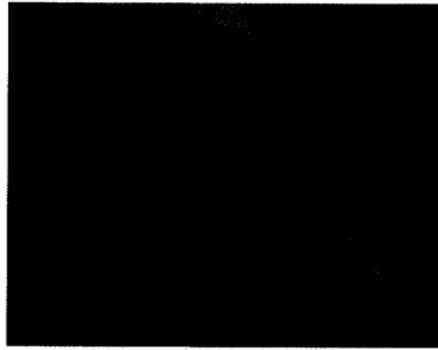


图 11E

48 小时黄瓜(*Cucumis sativus*)切片

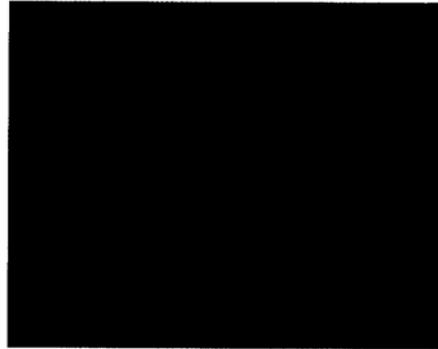


图 11F

48 小时黄瓜(*Cucumis sativus*)切片

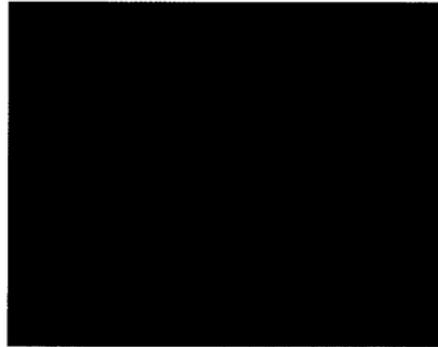


图 11G

48 小时黄瓜(*Cucumis sativus*)切片

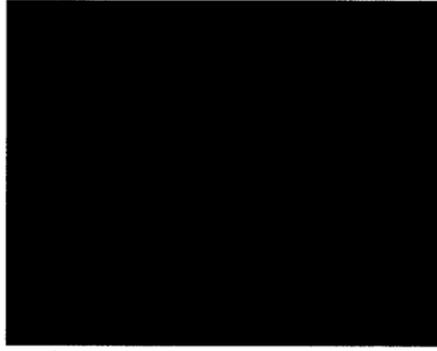


图 11H

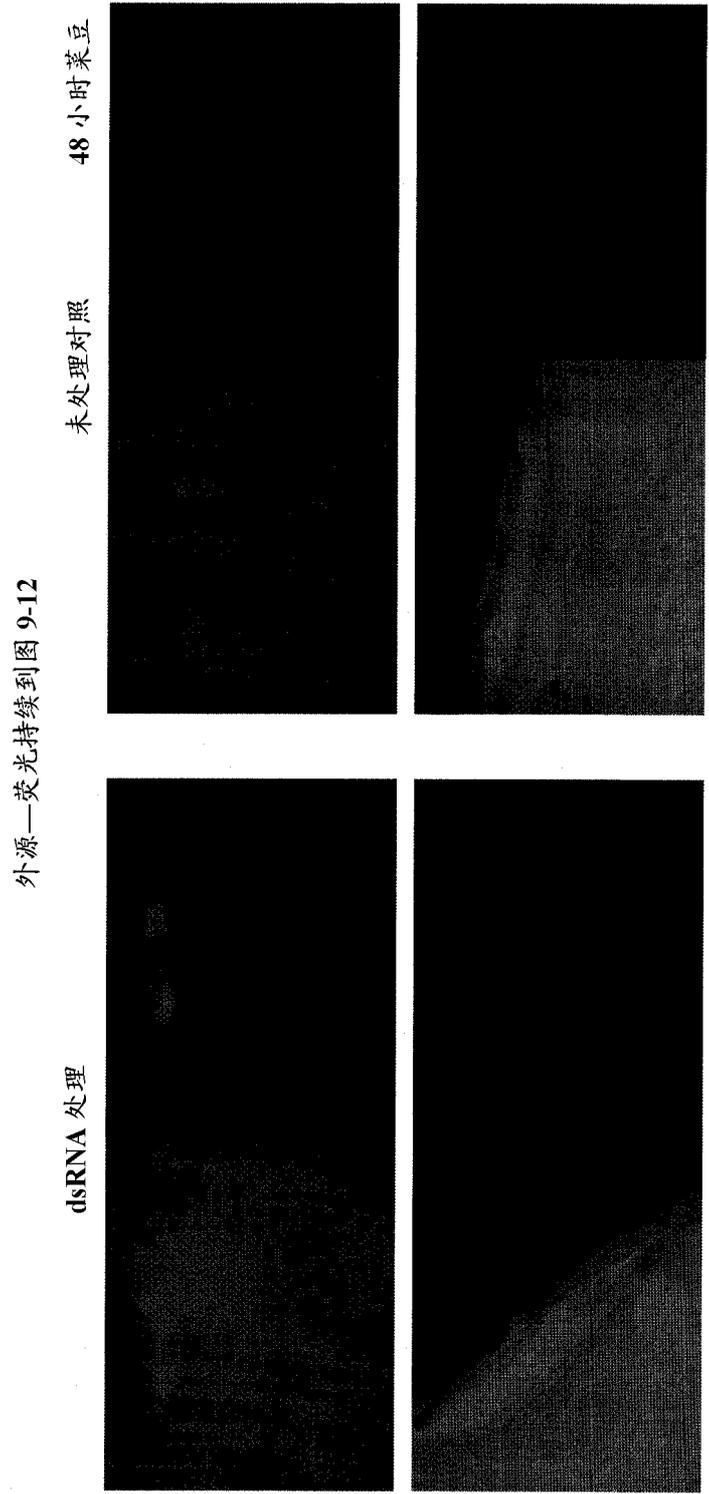


图 12A

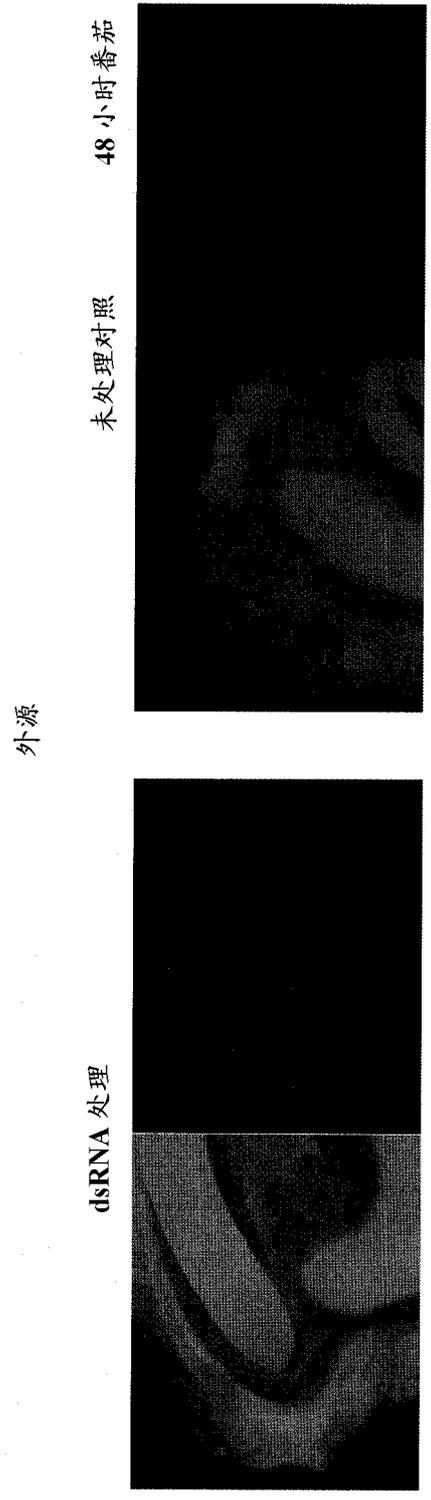


图 12B

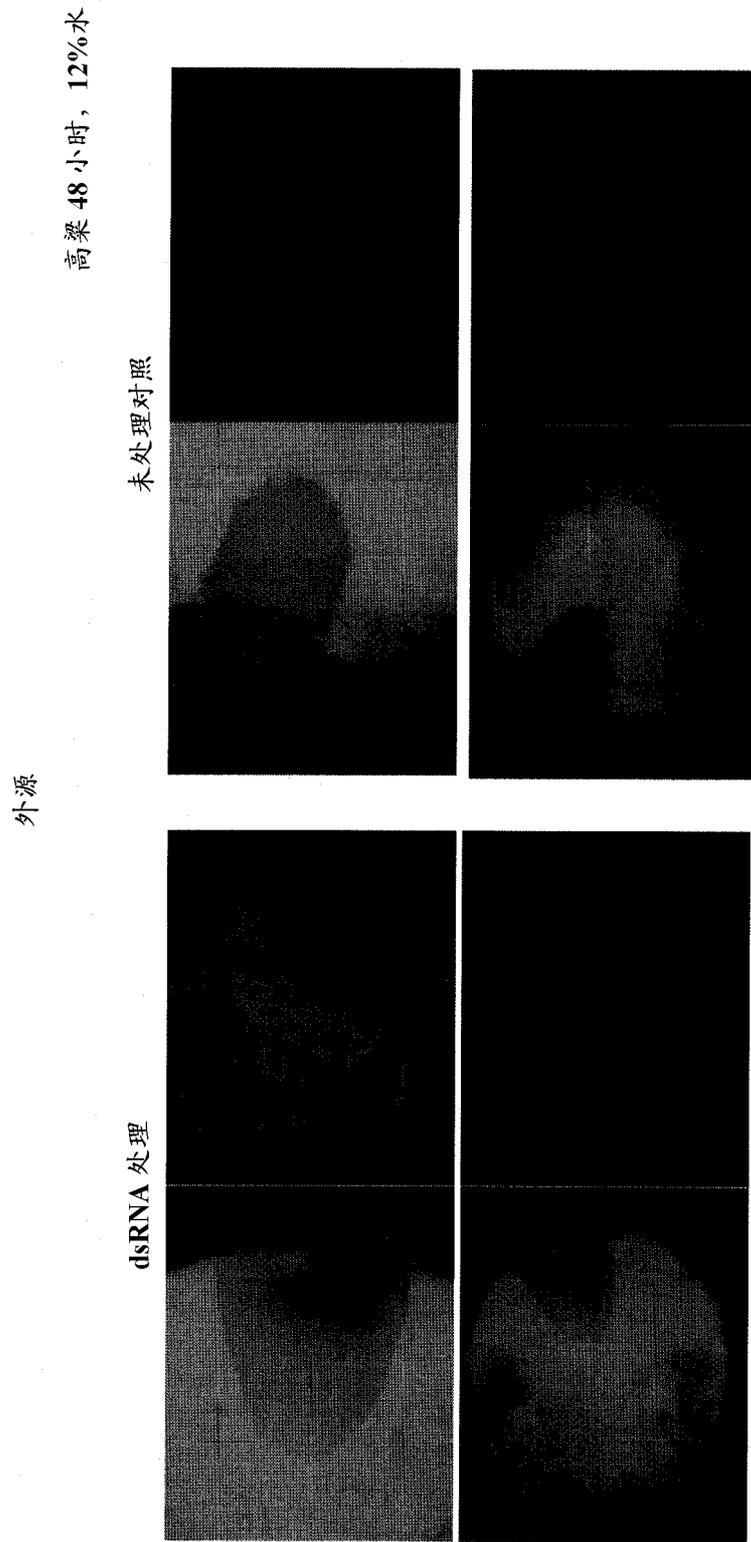


图 12C

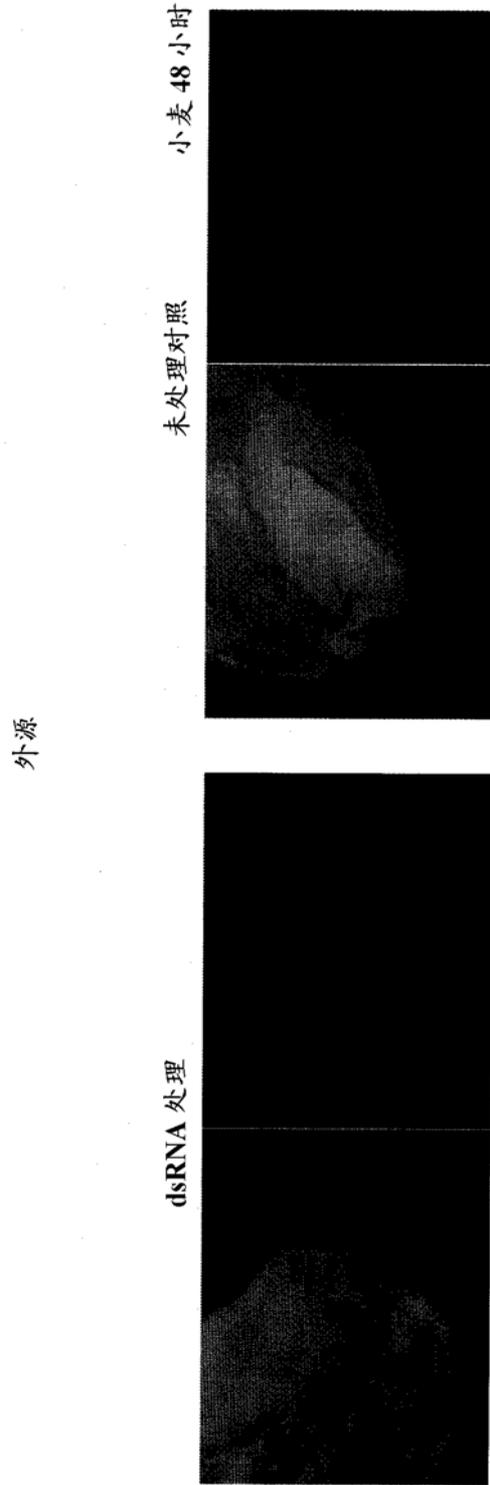


图 12D

外源

水稻(*Oryza sativa*)中的荧光 siRNA—时程

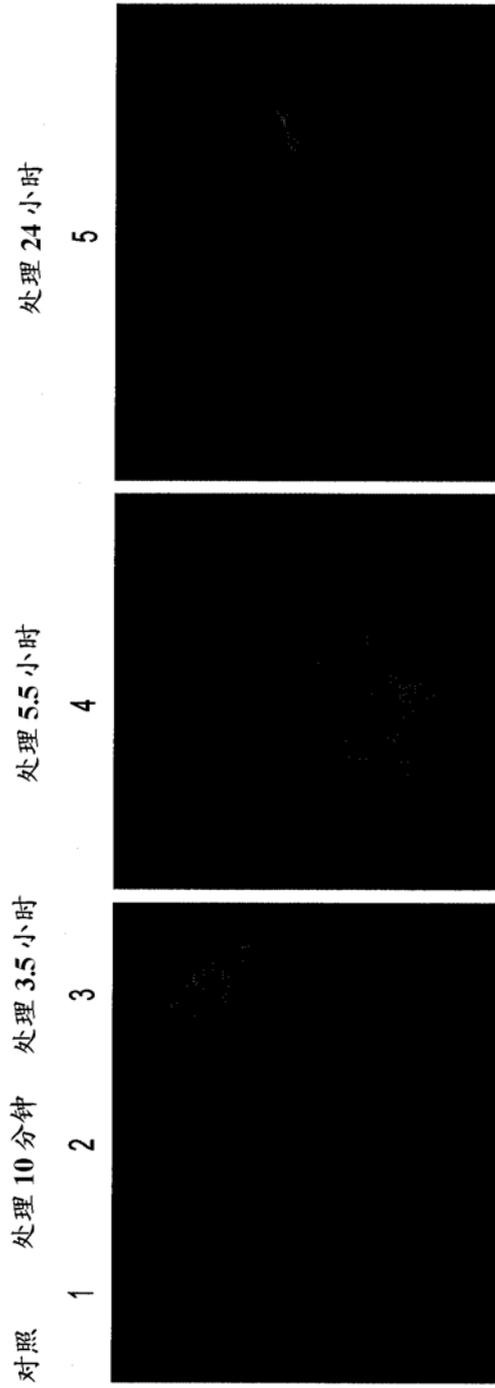


图 13

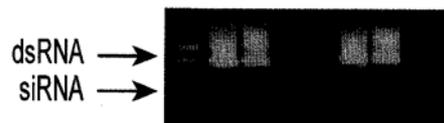


图 14A



图 14B

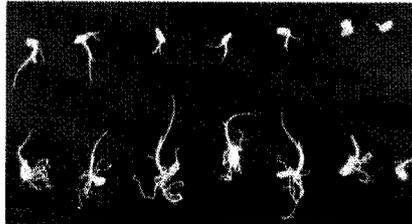


图 14C

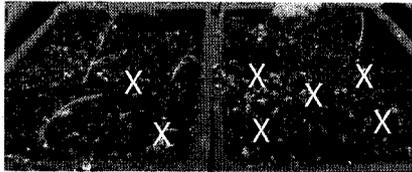


图 14D

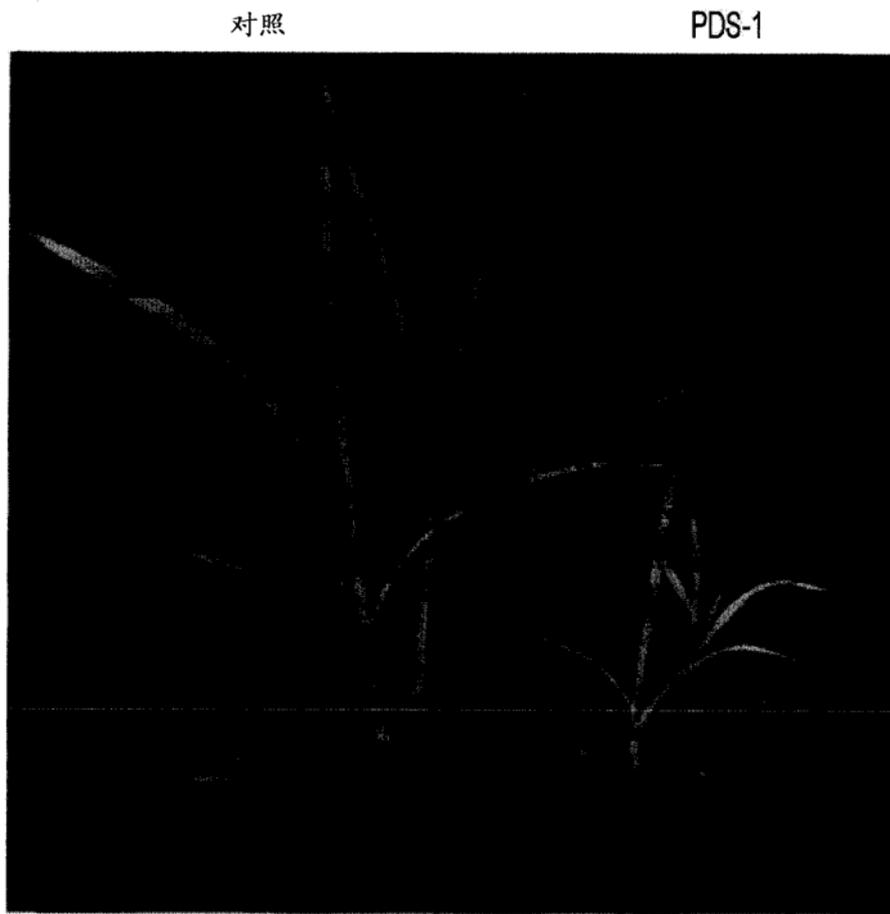


图 15



图 16A



图 16B

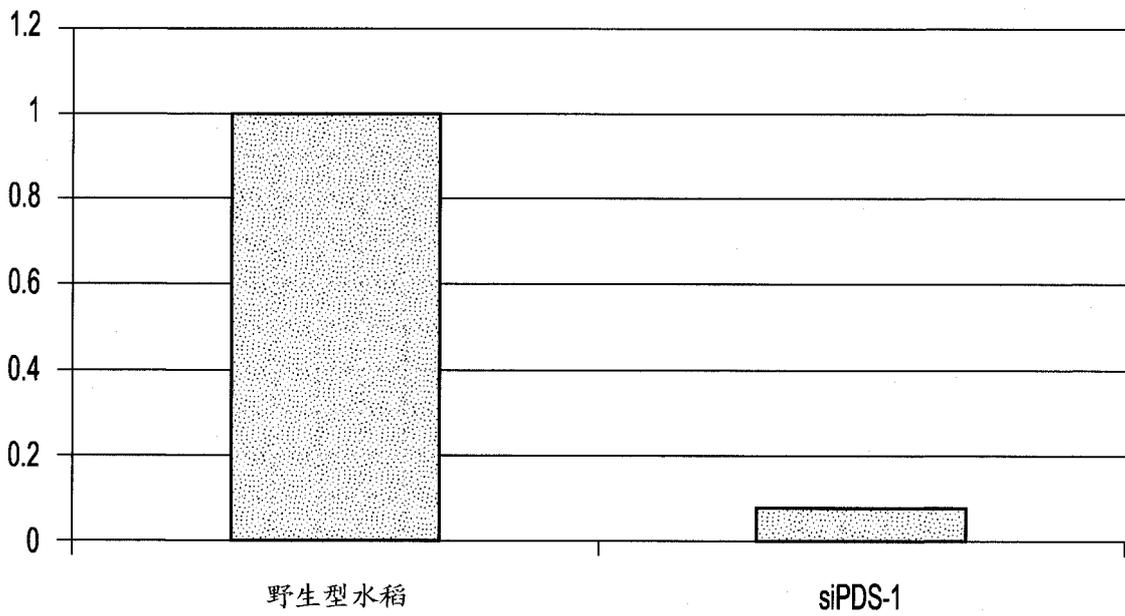


图 16C

HAP2e (mir169 的靶)的减少

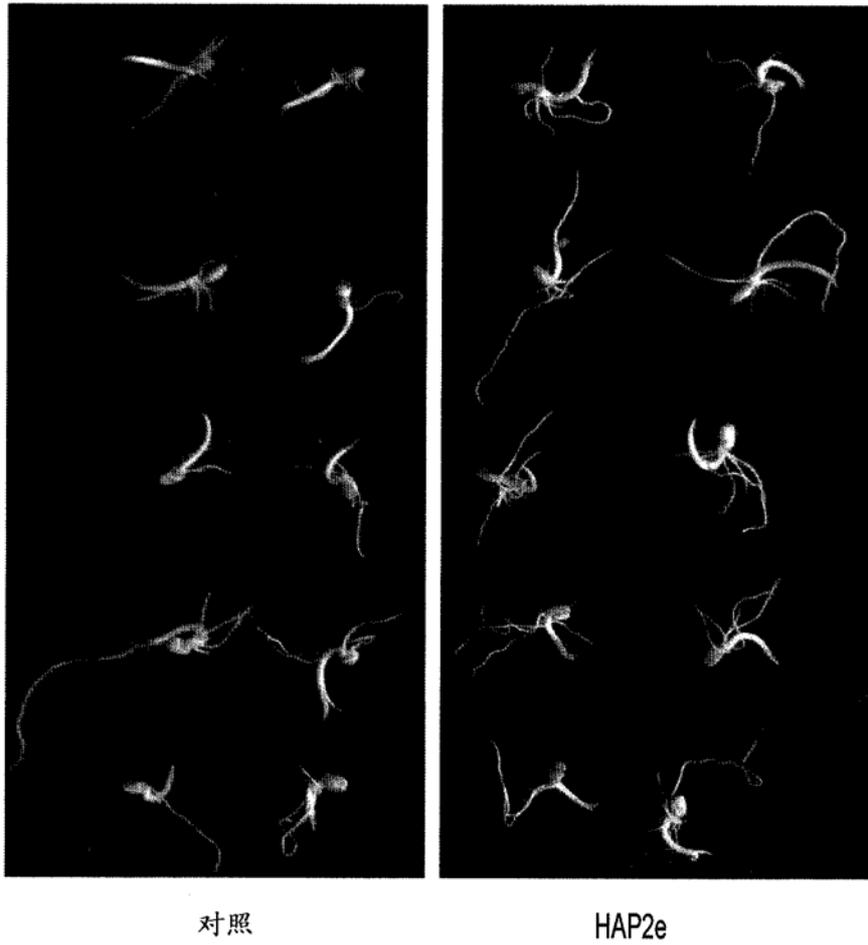


图 17

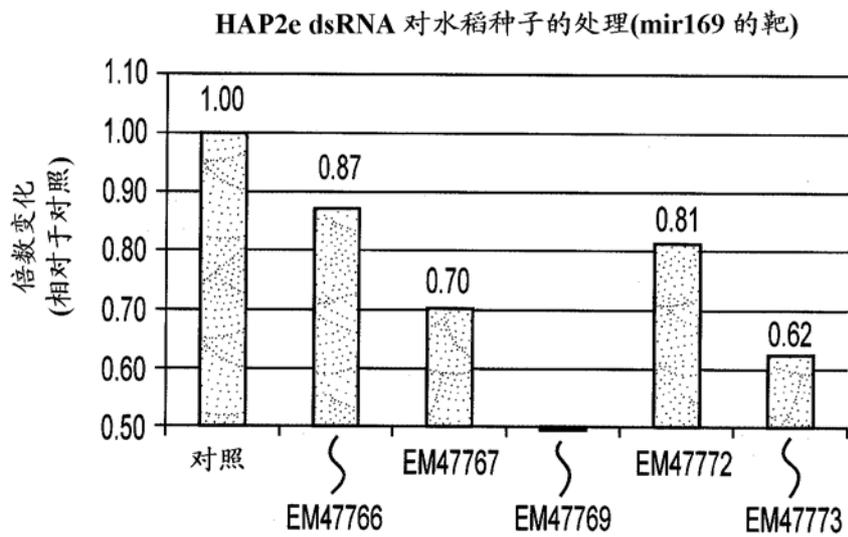


图 18A

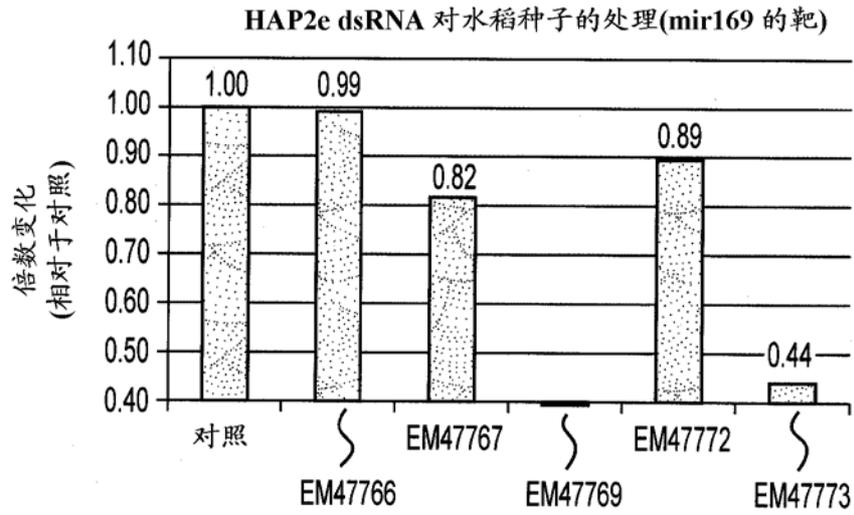


图 18B

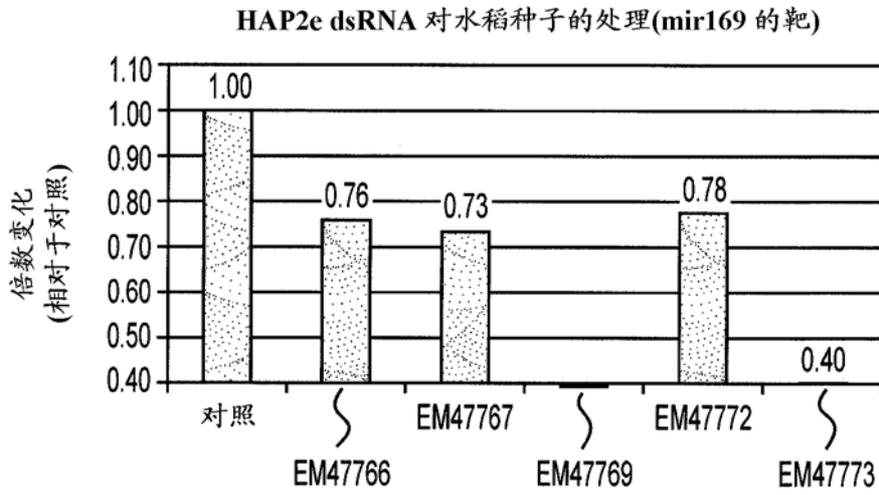


图 18C

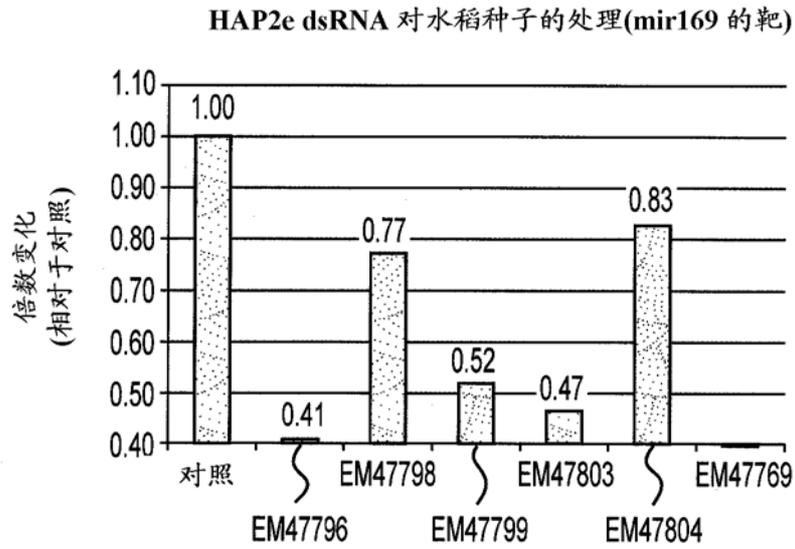


图 19

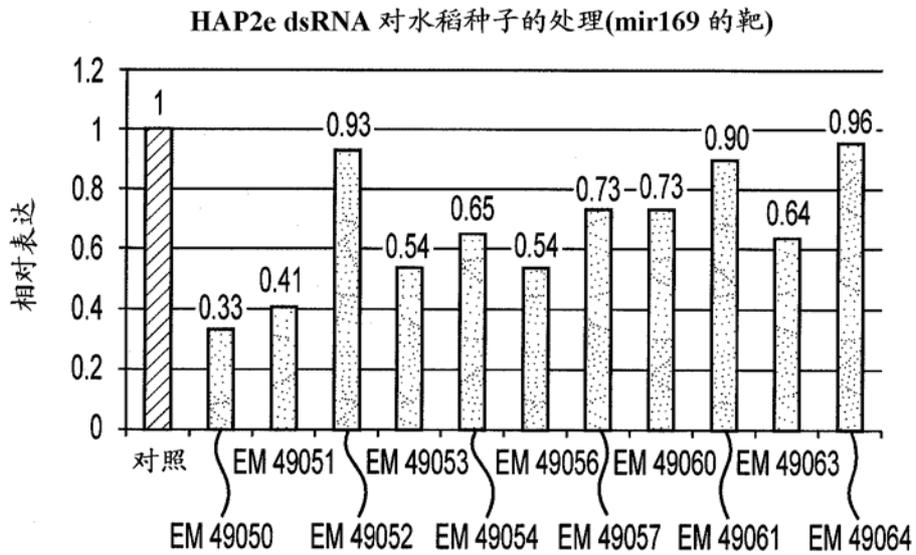


图 20

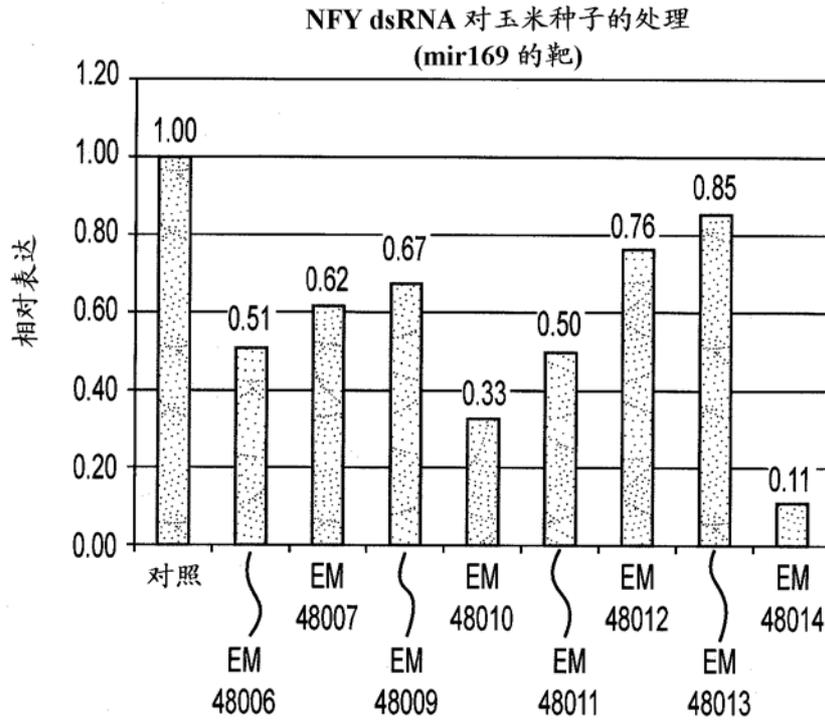


图 21

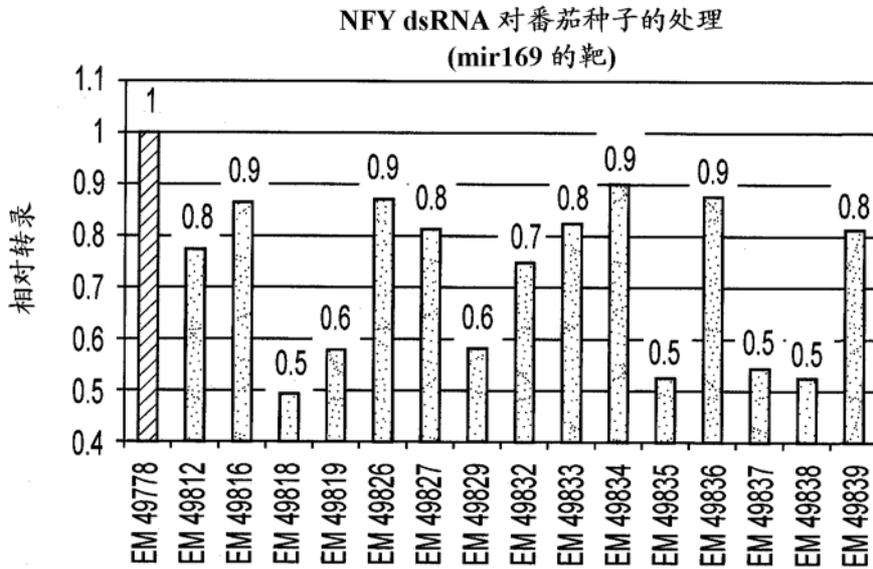


图 22

NFY dsRNA 对番茄种子的处理(mir169 的靶)  
在 ORASEED™处理后 55 天  
对照植物

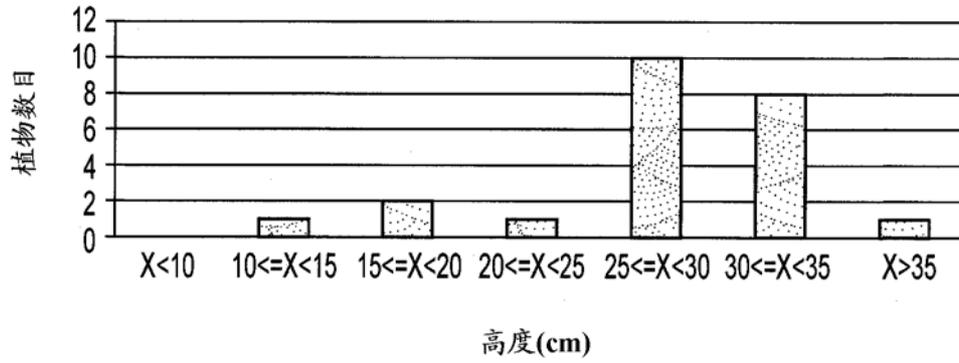


图 23A

NFYA- mir169

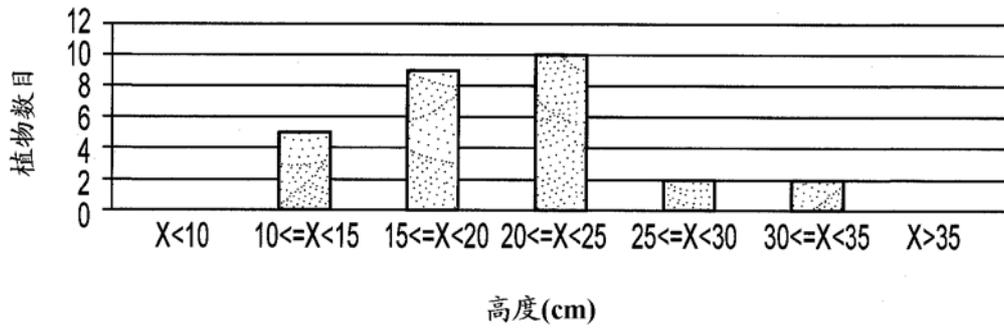


图 23B

NFY dsRNA 对番茄种子的处理(mir169 的靶)

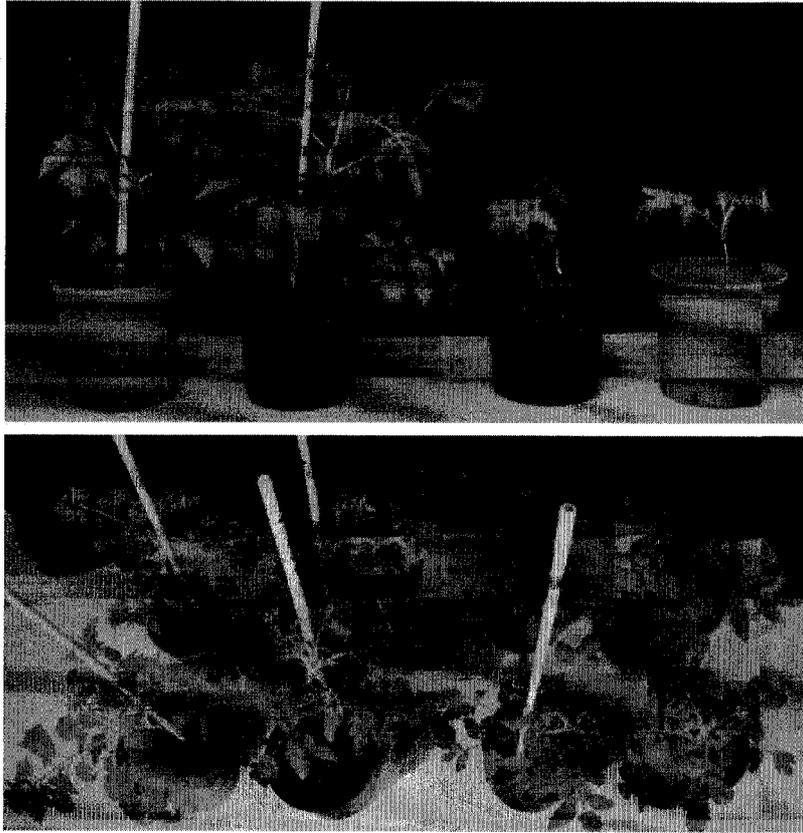


图 24

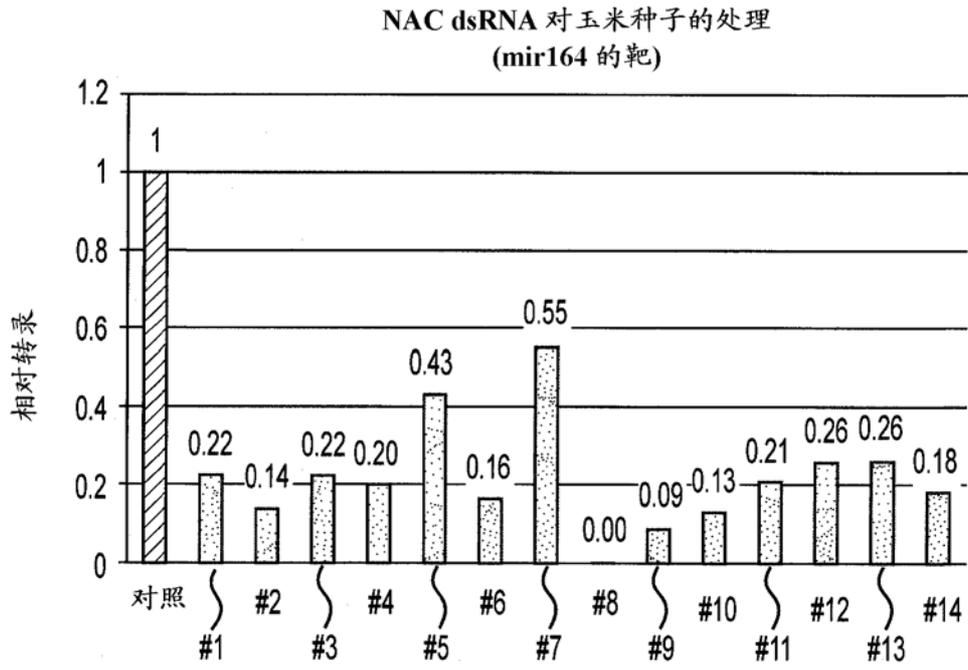


图 25

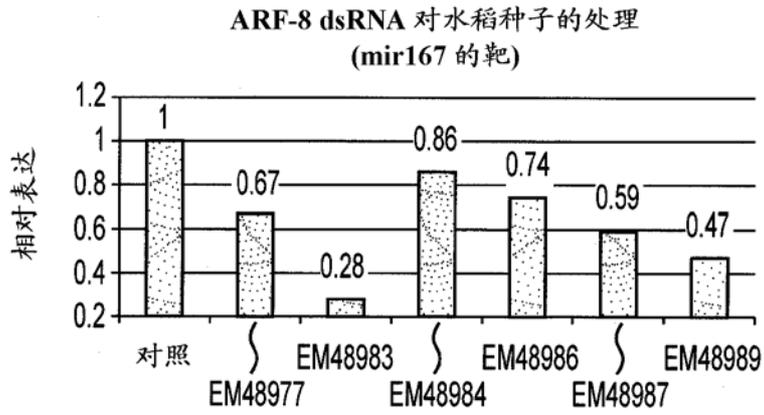


图 26A

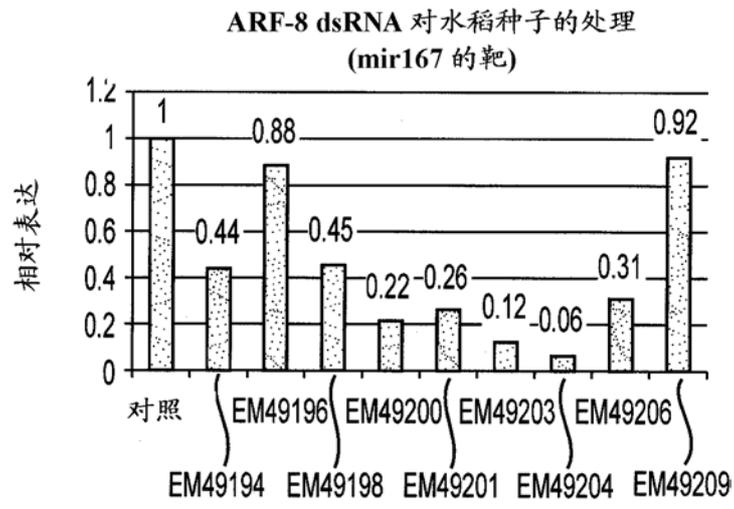


图 26B

处理 SPL17 (mir156 的靶)



图 27

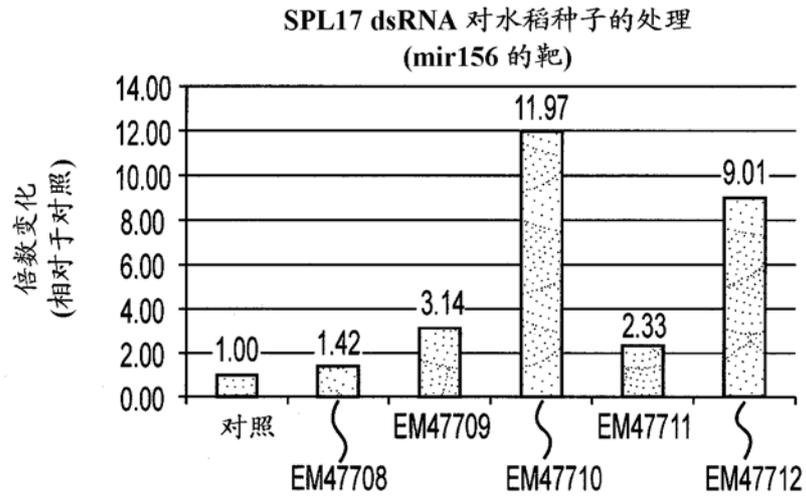


图 28A

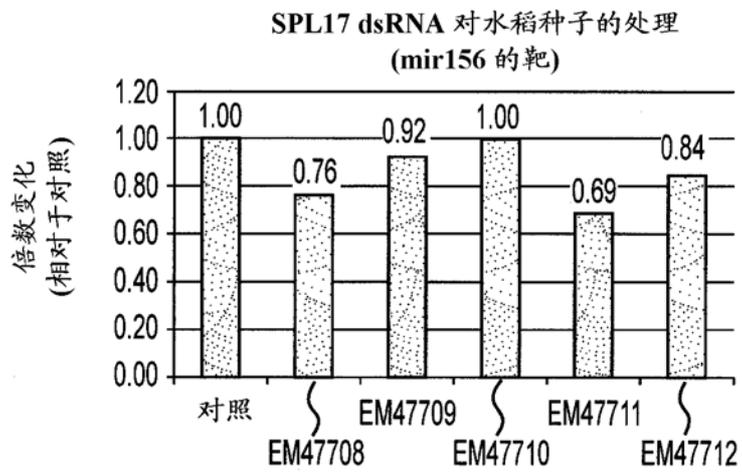


图 28B

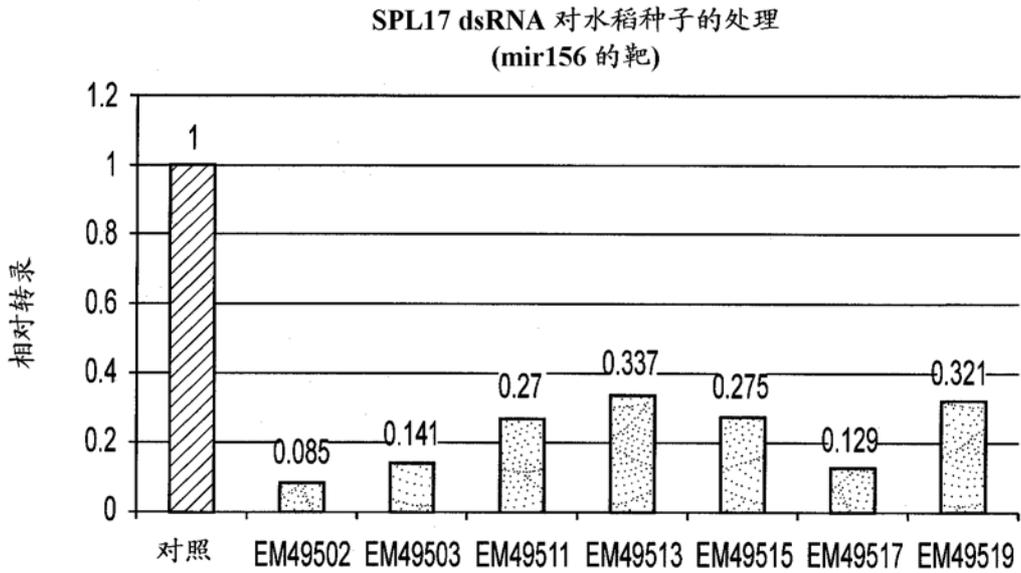


图 29

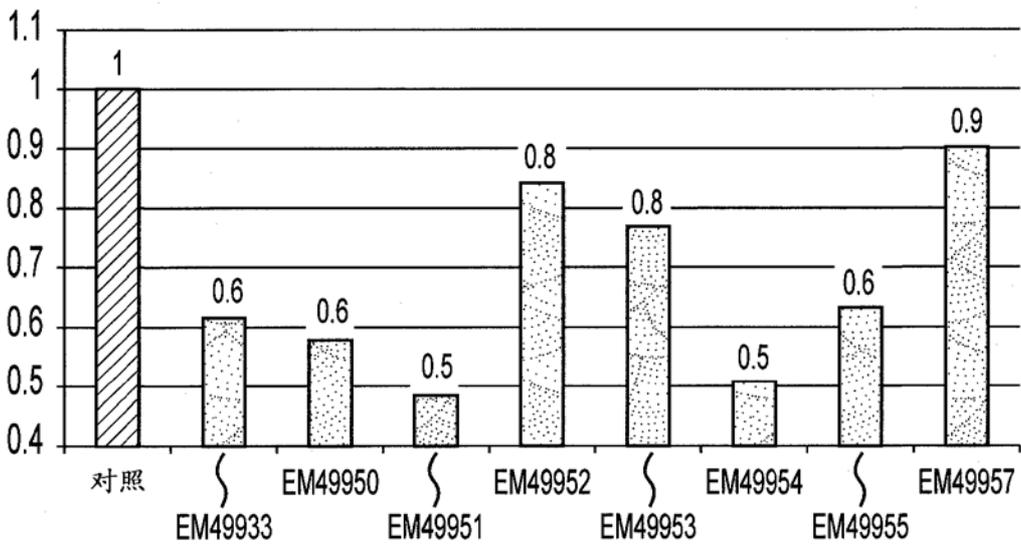


图 30A

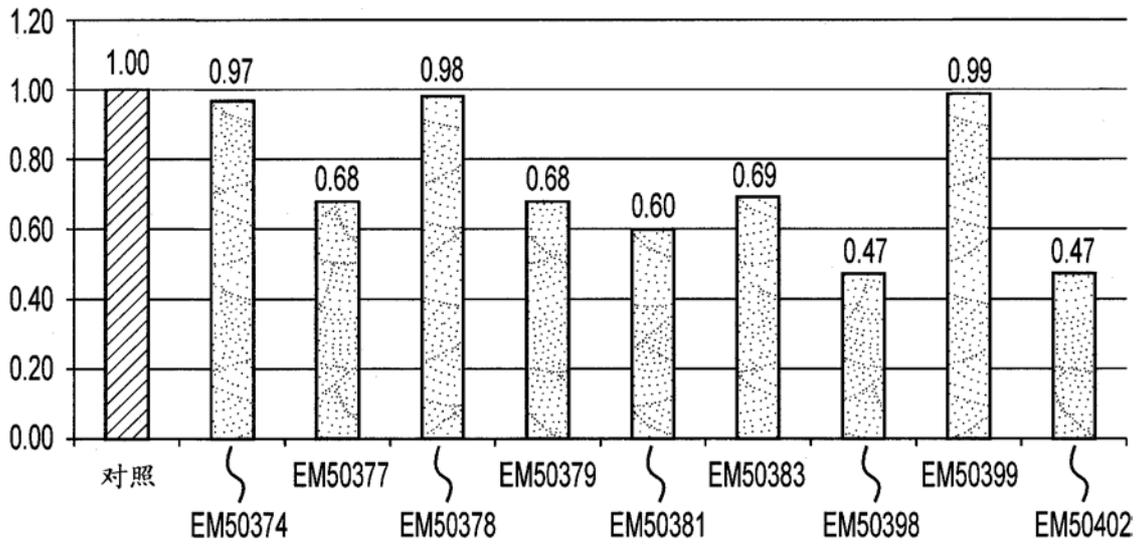


图 30B

ARF8 dsRNA 对番茄种子的处理  
(mir167 的靶): 高度分布  
T 检验 p 值=1.22e-003

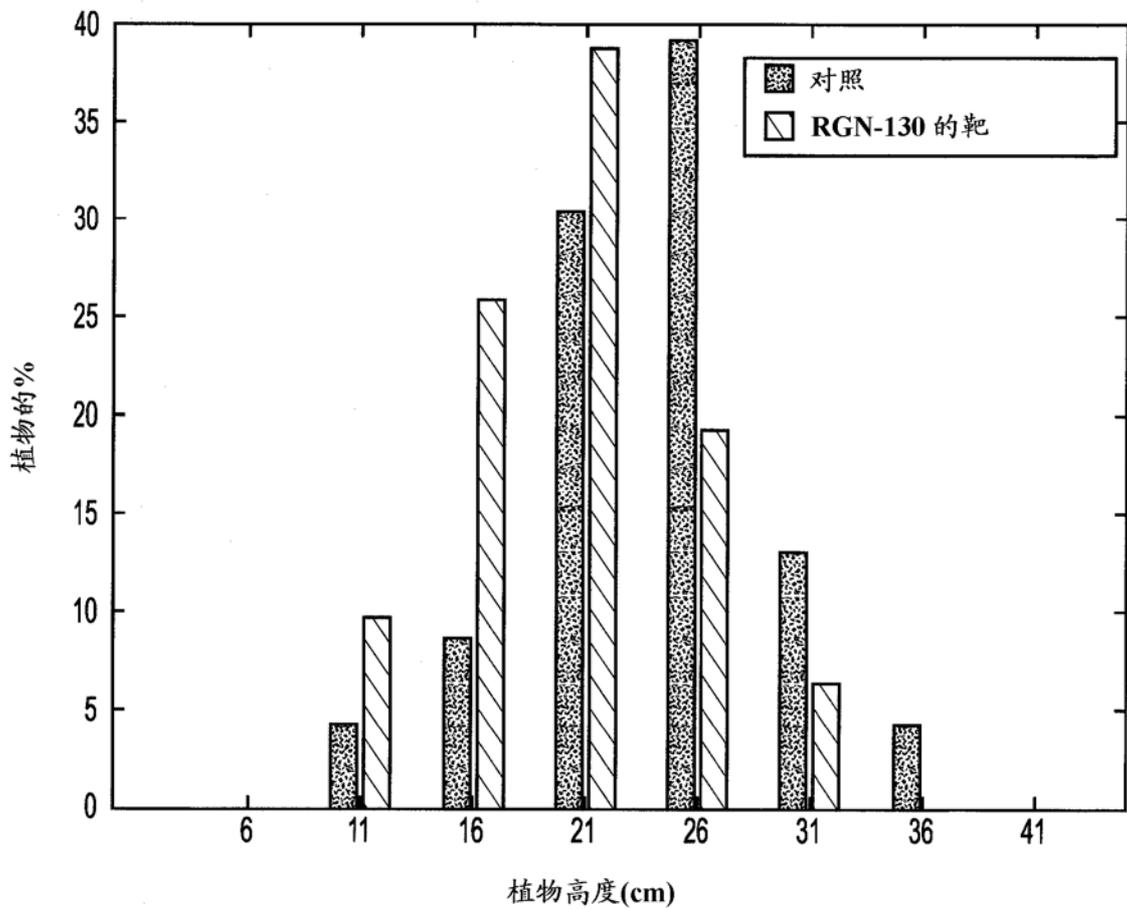


图 31A

ARF8 dsRNA 对番茄种子的处理  
(mir167 的靶): 高度分布  
T 检验 p 值=1.36e-003

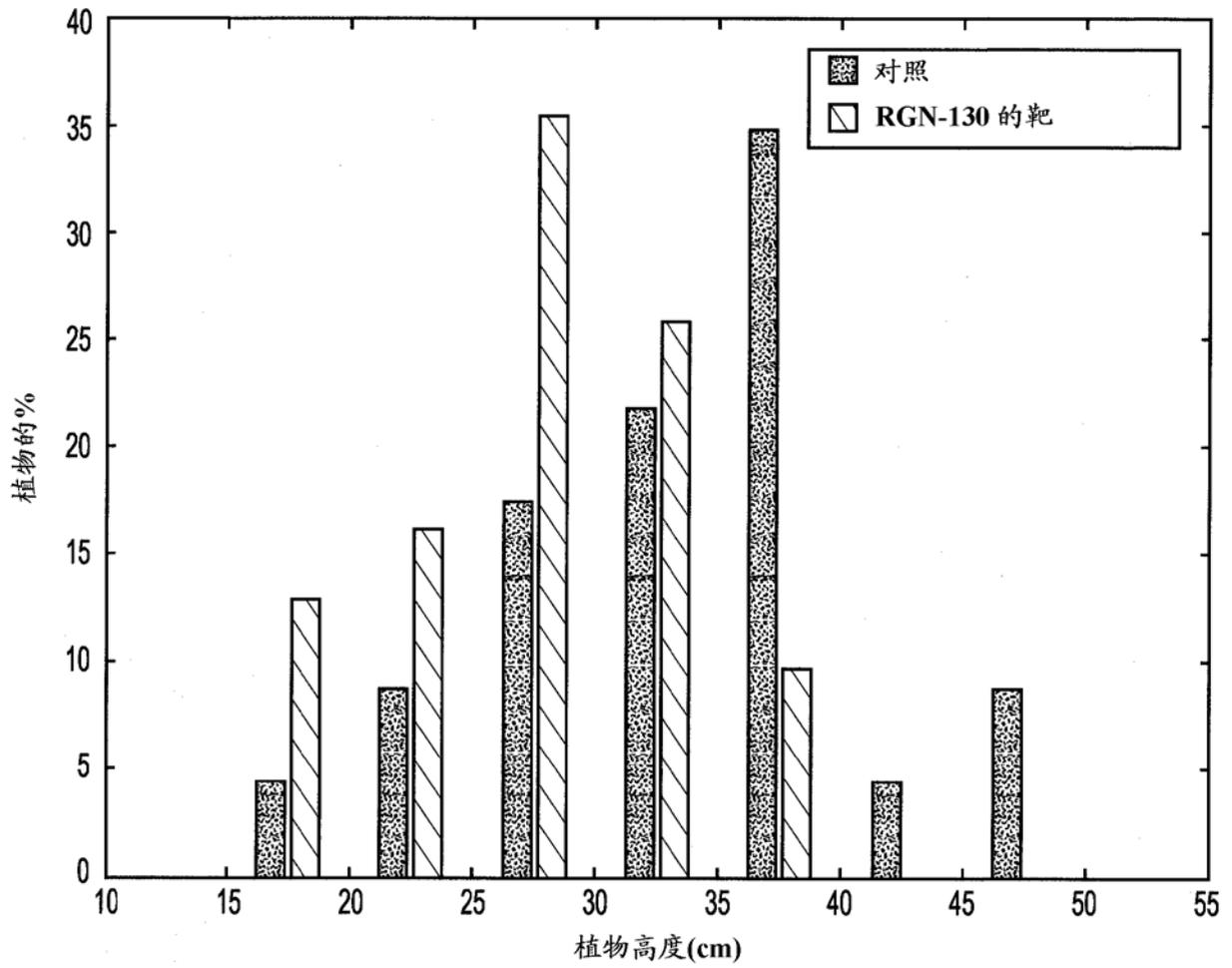


图 31B

ARF8 dsRNA 对番茄种子的处理  
(mir167 的靶): 高度分布  
T 检验 p 值=5.20e-002

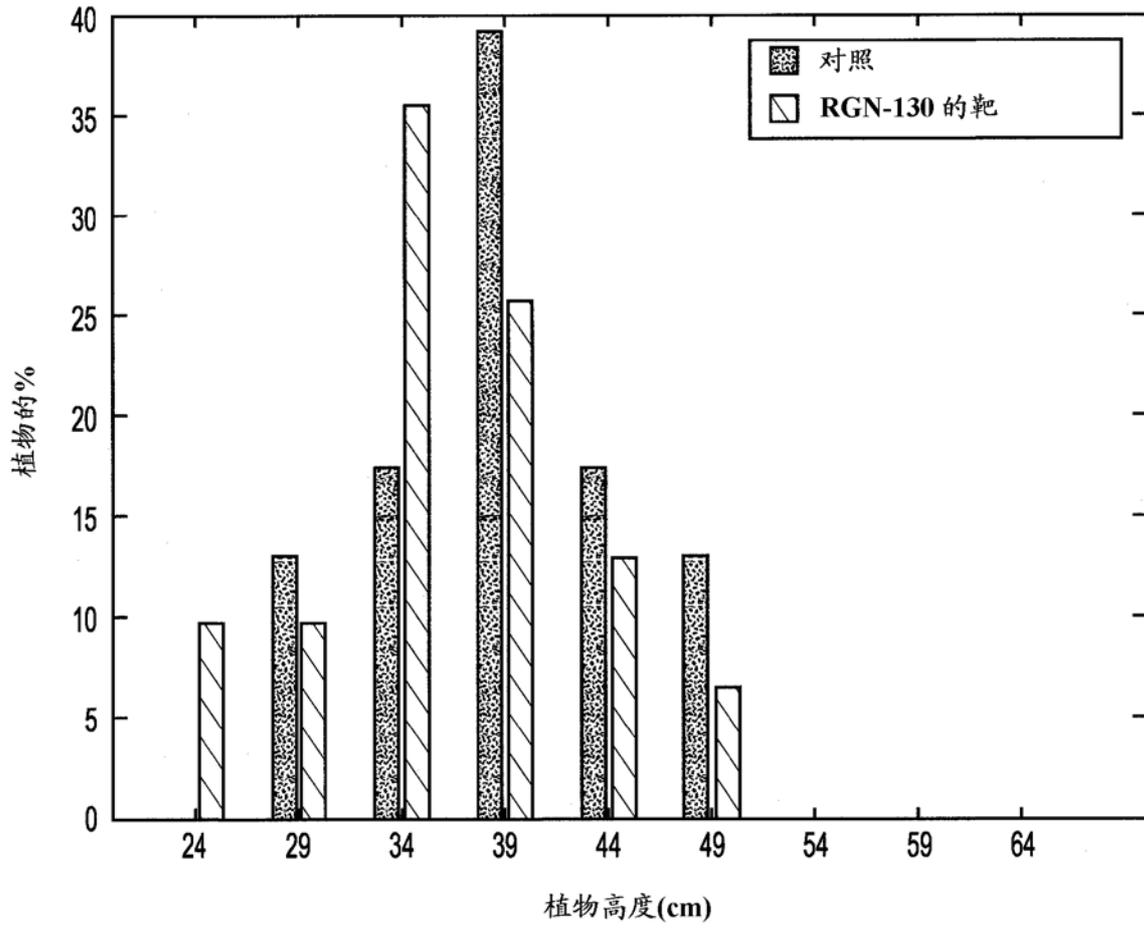


图 31C

ARF8 dsRNA 对番茄种子的处理  
(mir167 的靶): 高度分布

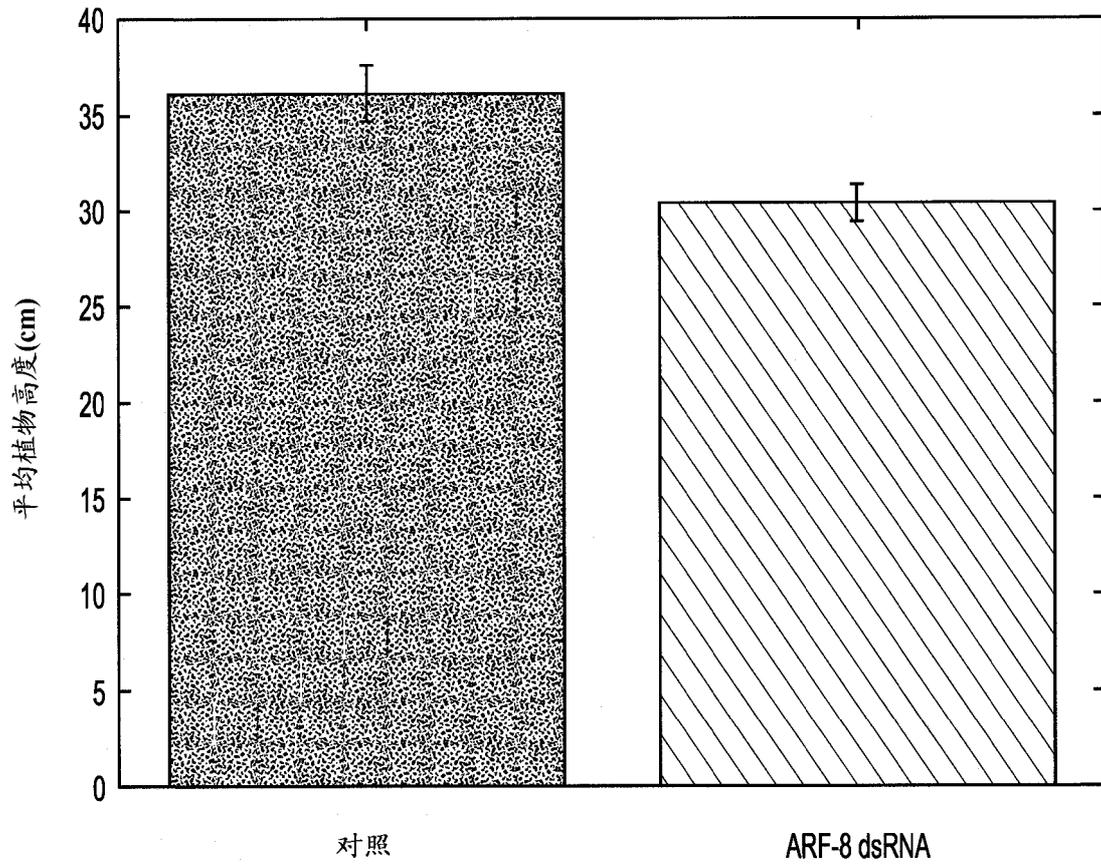


图 31D

ARF8 dsRNA 对番茄种子的处理  
(mir167 的靶)  
可见表型

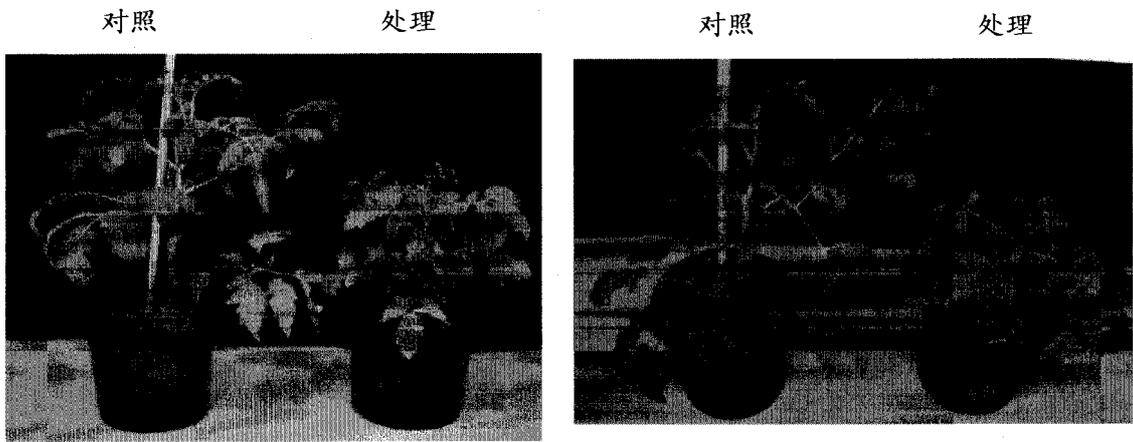


图 32A

ARF8 dsRNA 对番茄种子的处理  
(mir167 的靶)  
可见表型

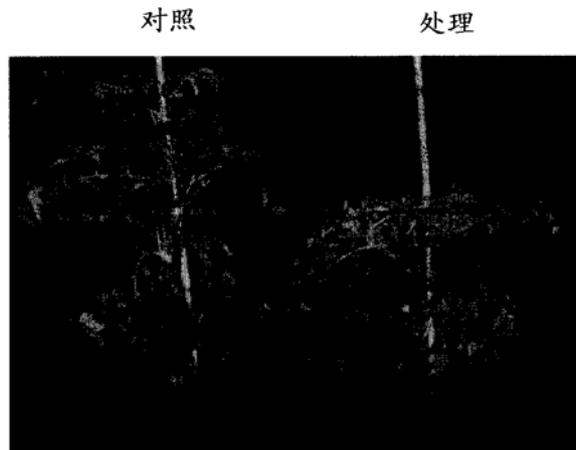


图 32B

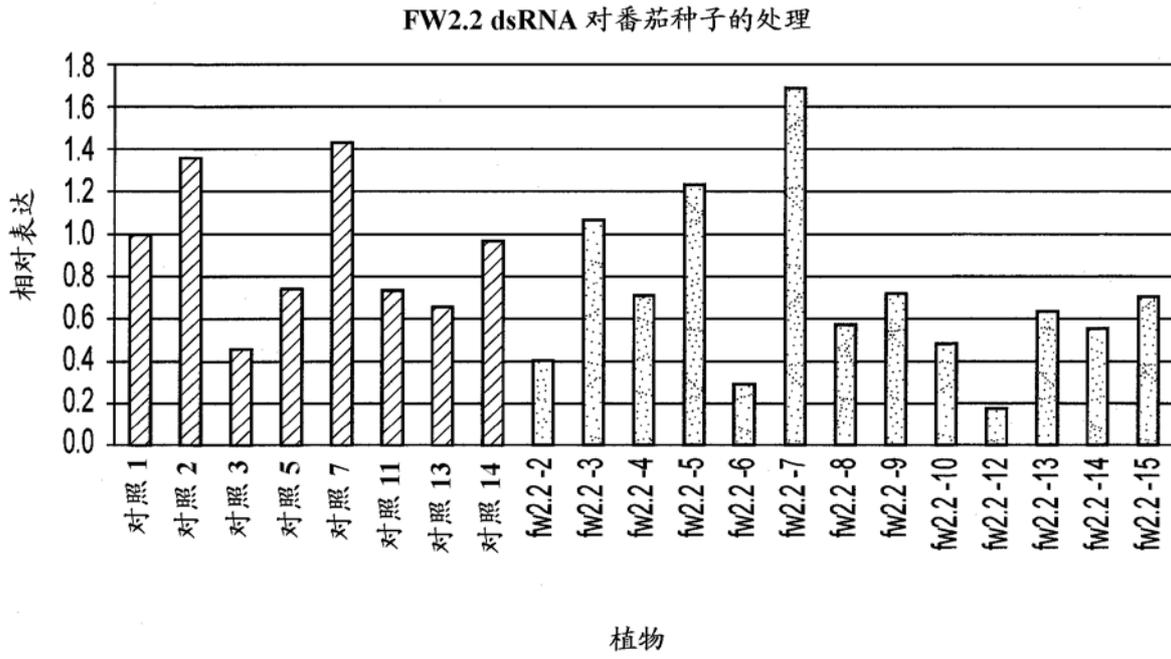


图 33A

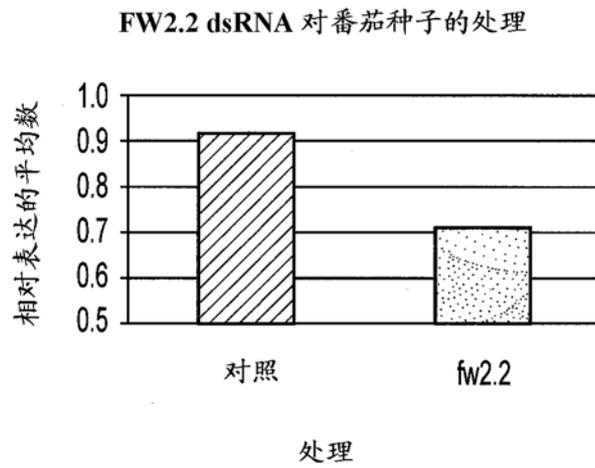


图 33B

FW2.2 dsRNA 对番茄种子的处理

对照

处理



对照

处理

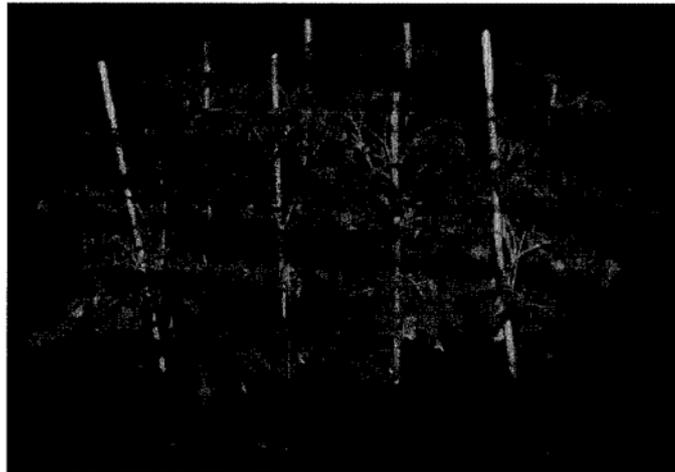


图 34

DELLA dsRNA 对水稻水种子的处理



对照种子



DELLA 处理种子

图 35A

图 35B

NRR dsRNA 对水稻种子的处理

对照



图 36A

处理



图 36B

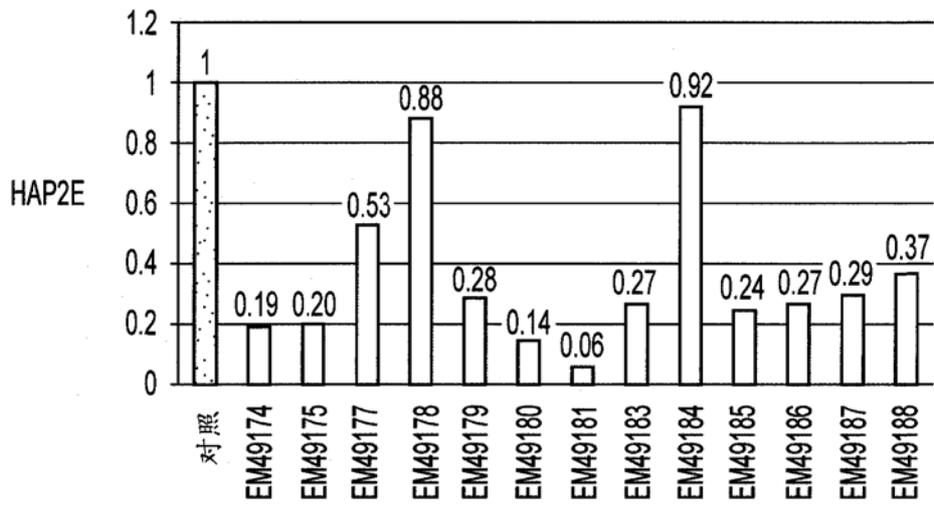


图 37A

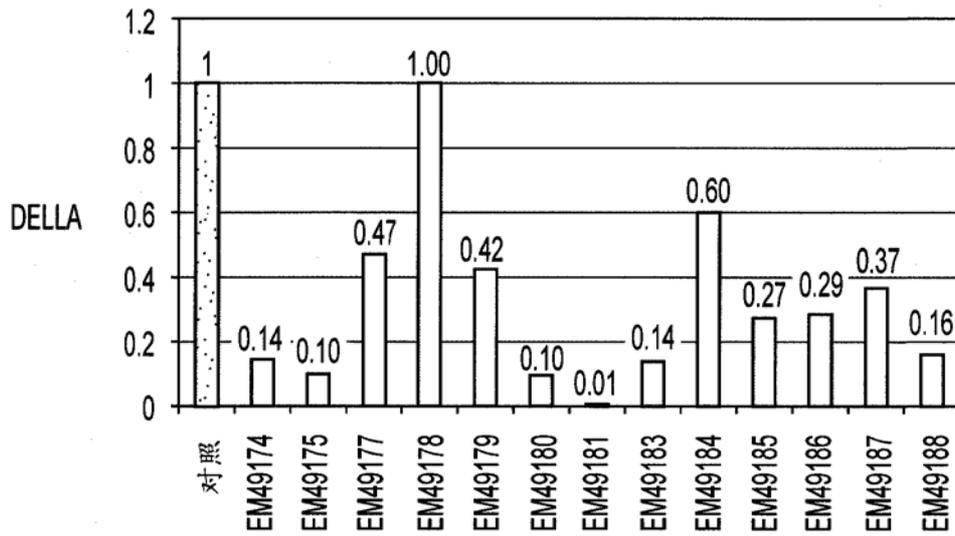


图 37B

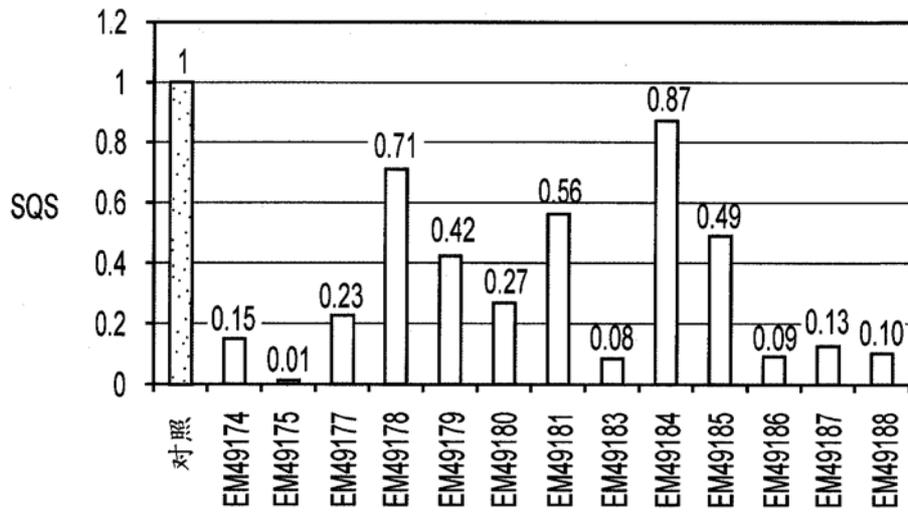


图 37C

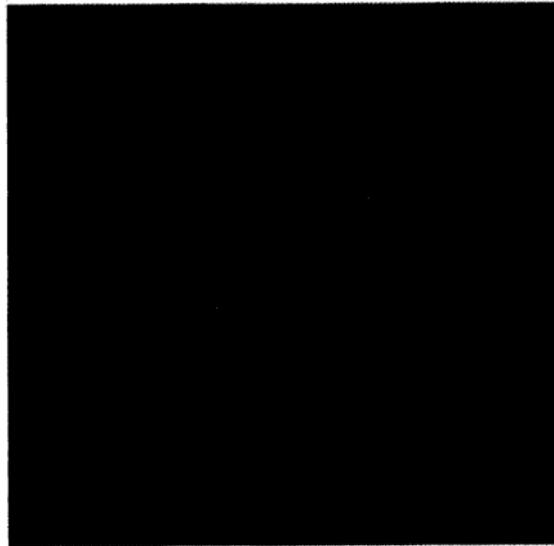


图 38A

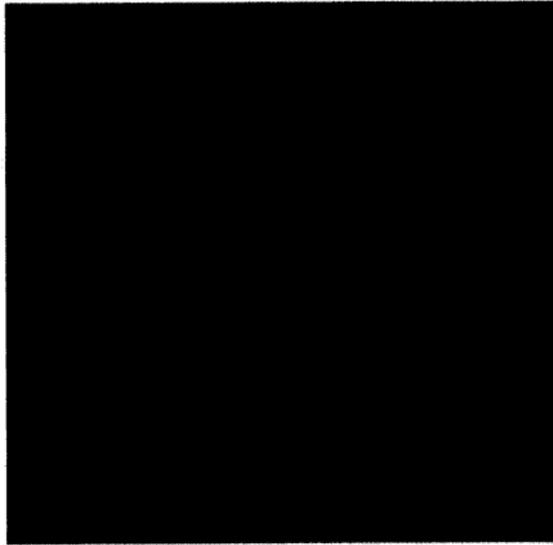


图 38B



图 38C

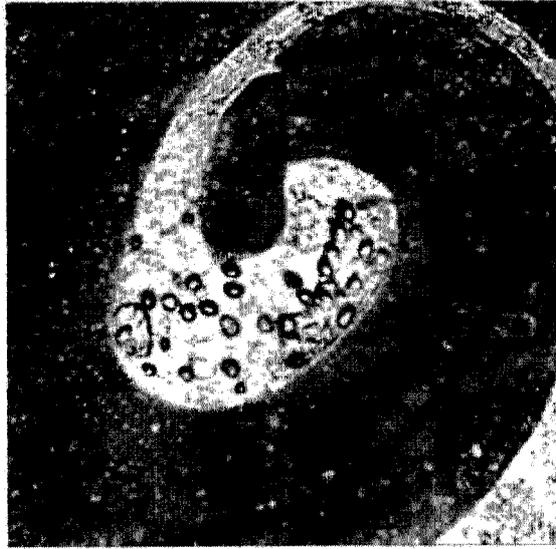


图 38D

引发前的 SPL dsRNA

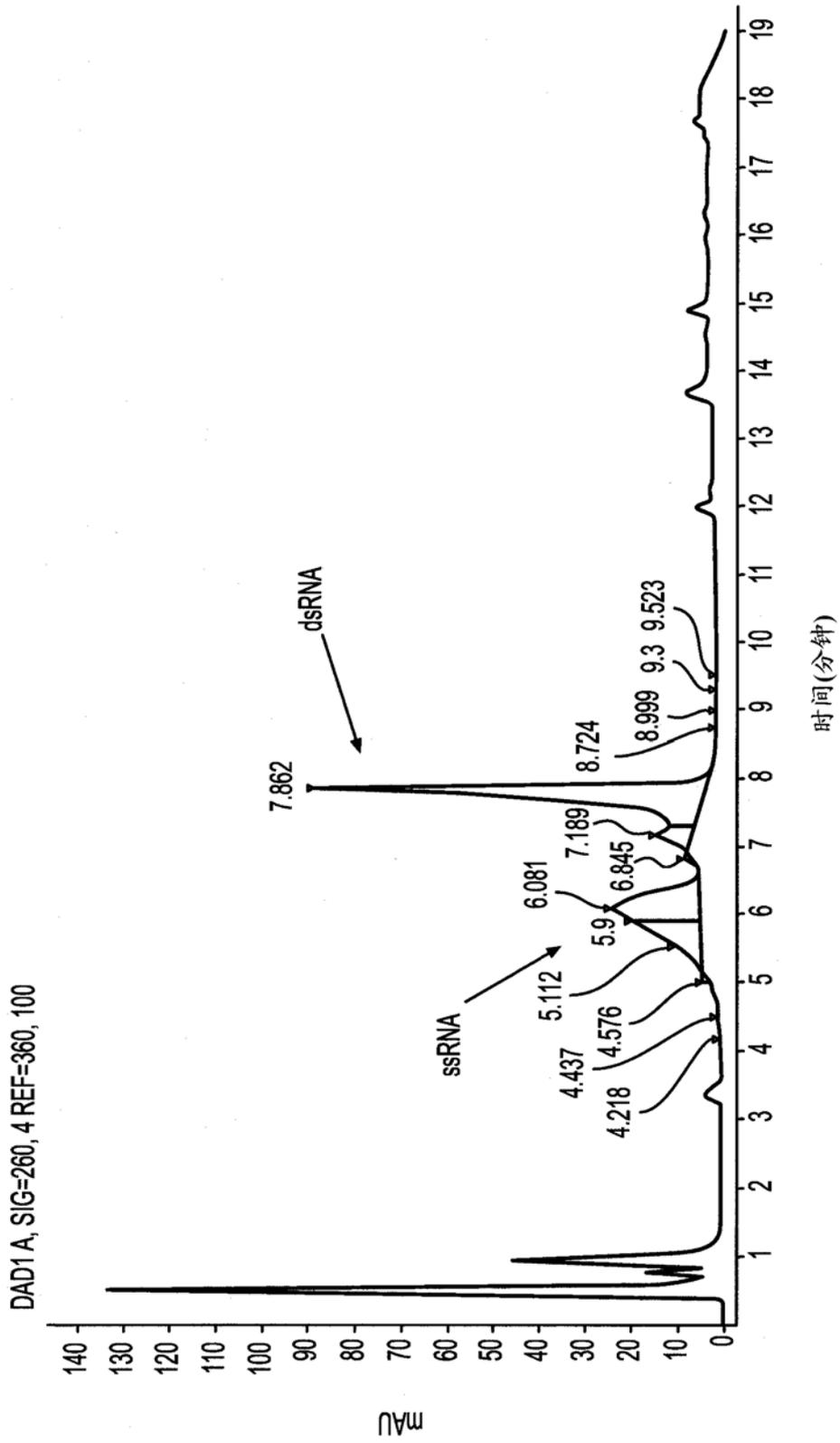


图 39A

引发后的 SPL dsRNA

DAD1A, SIG=260, 4 REF=360, 100

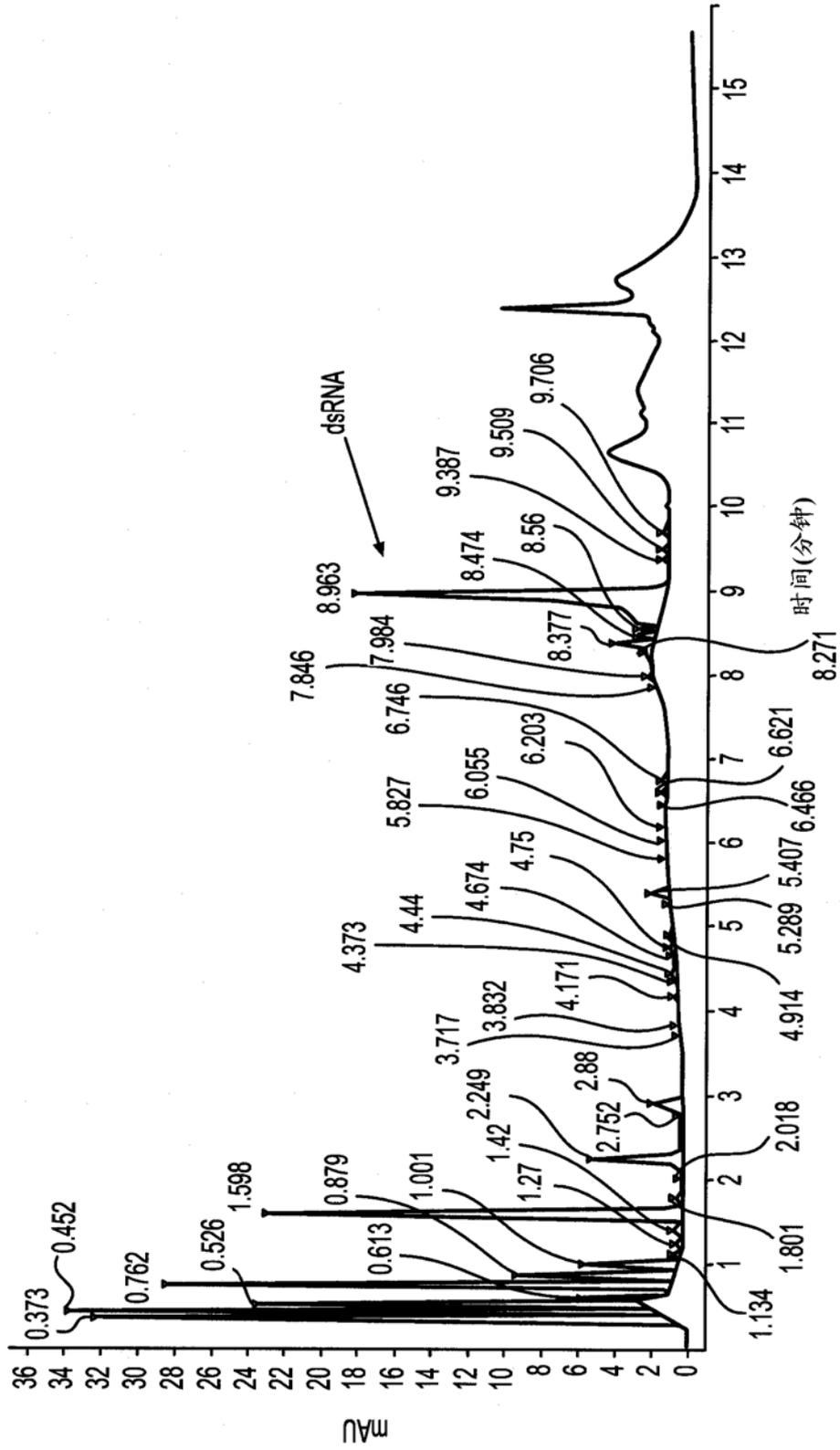


图 39B

引发前的 GUS dsRNA

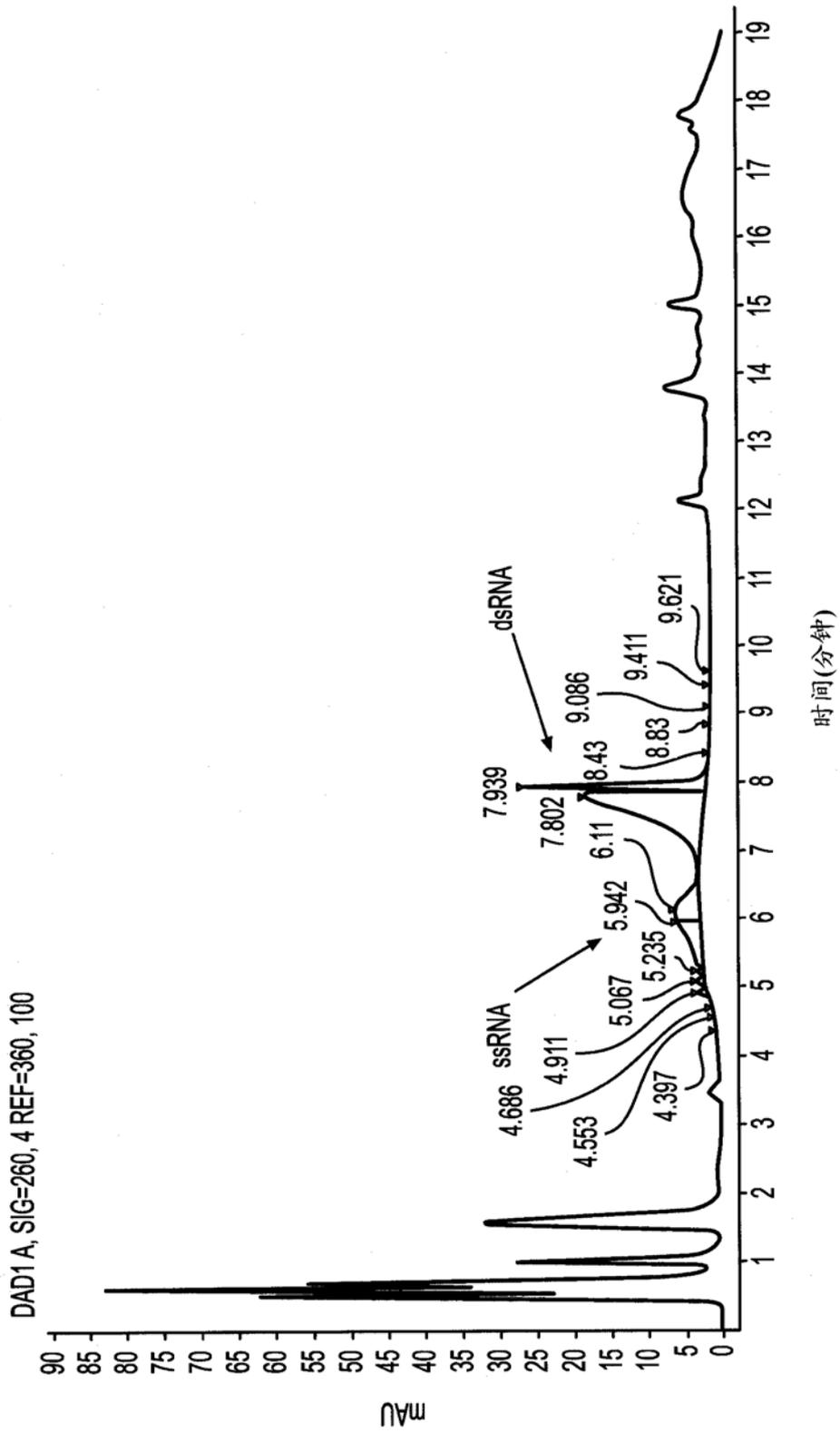


图 39C

引发后的 GUS dsRNA

DAD1 A, SIG=260, 4 REF=360, 100

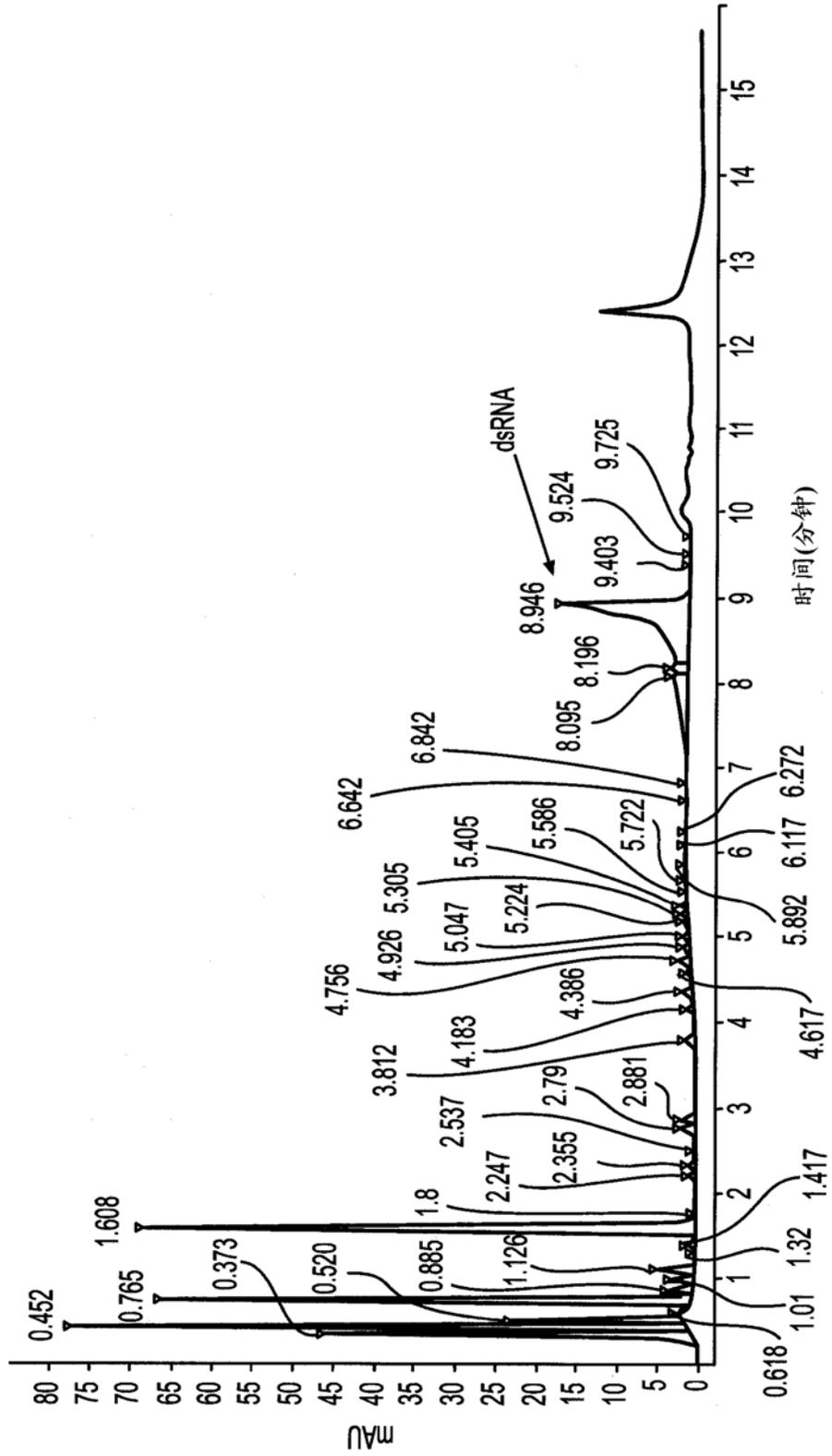


图 39D

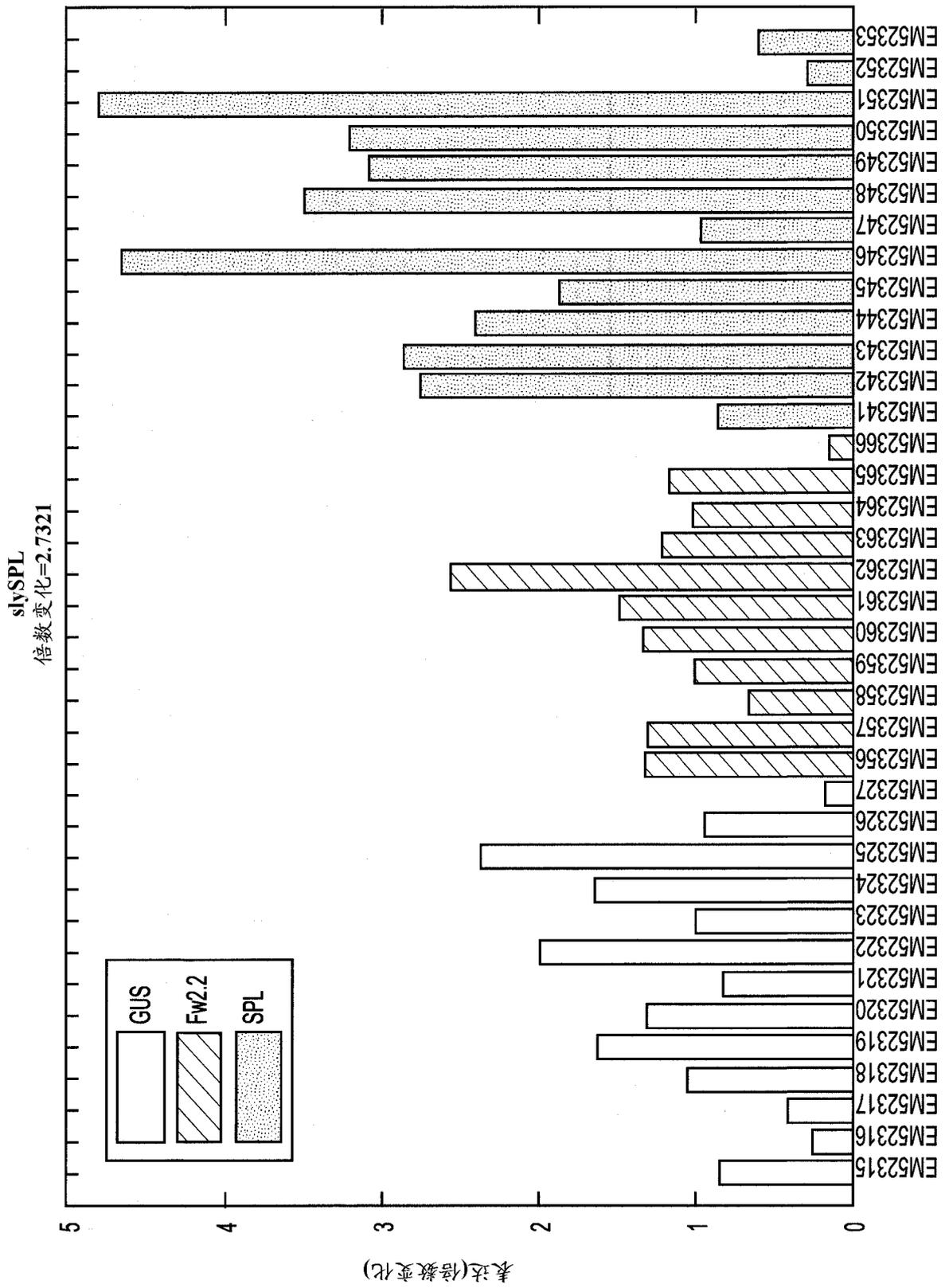


图 40A

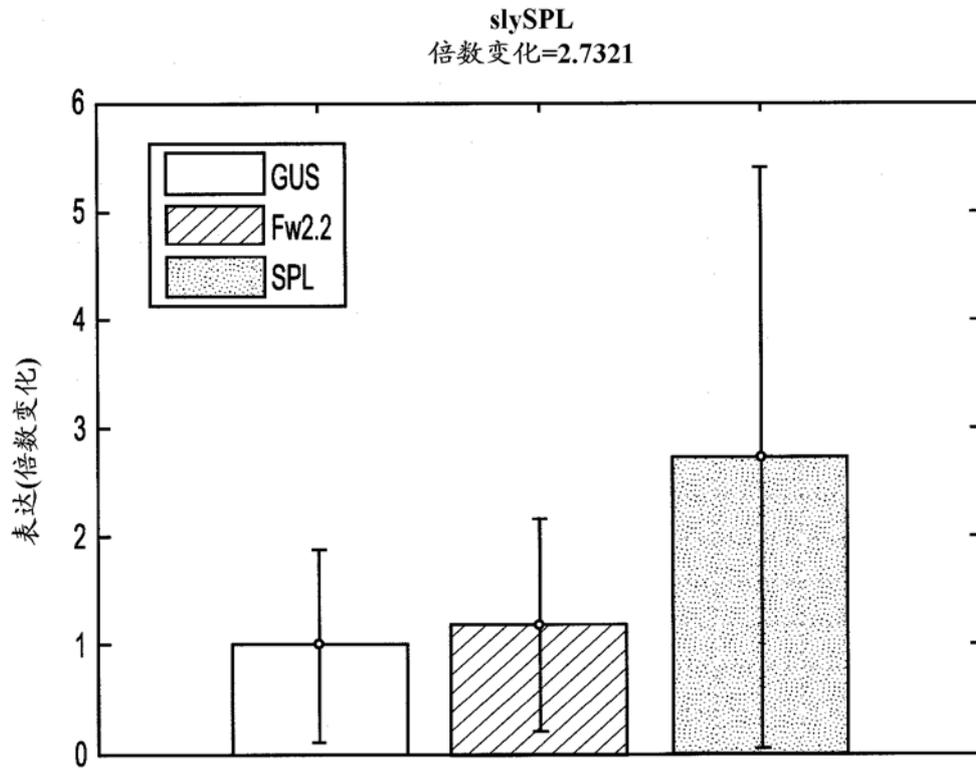


图 40B

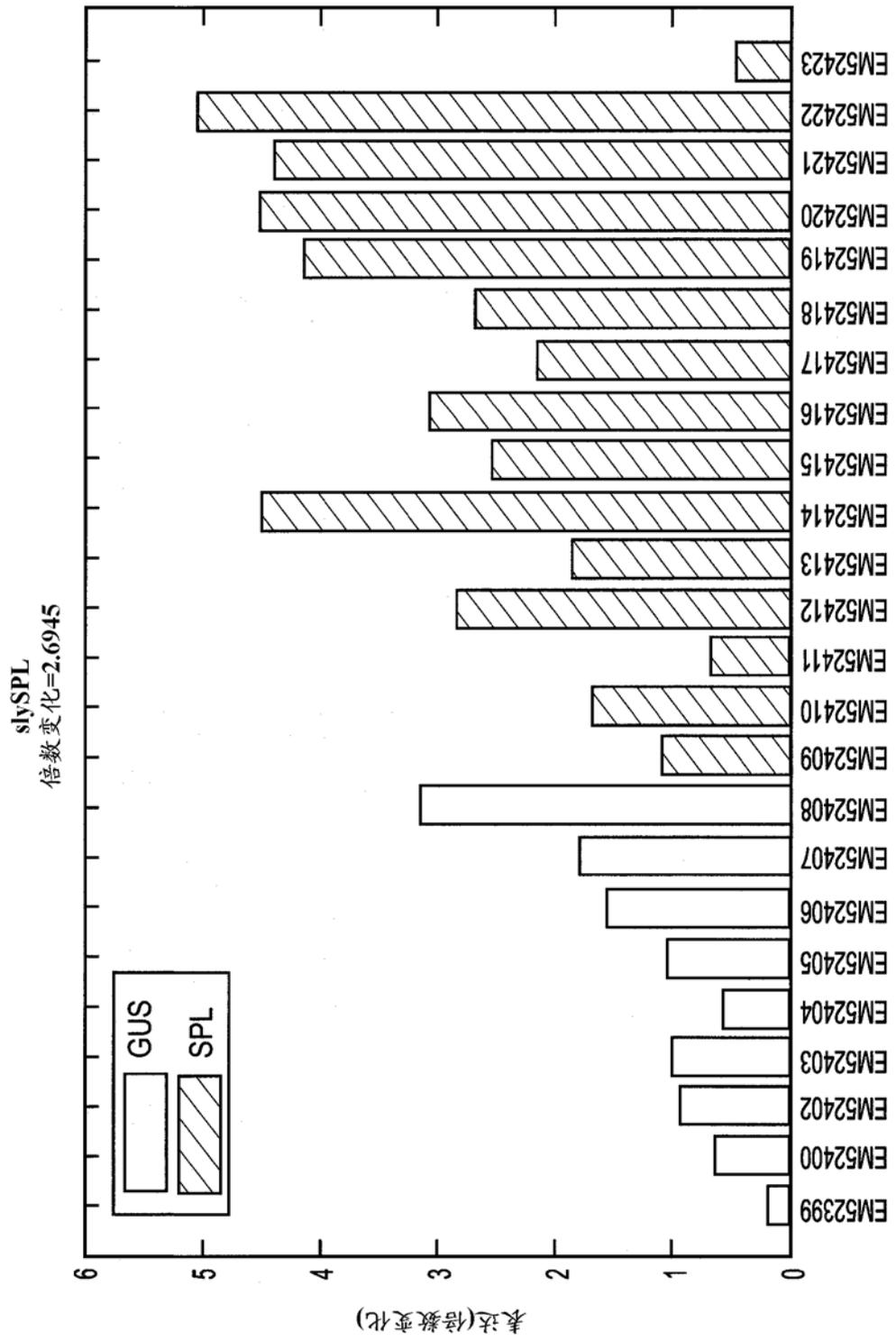


图 41A

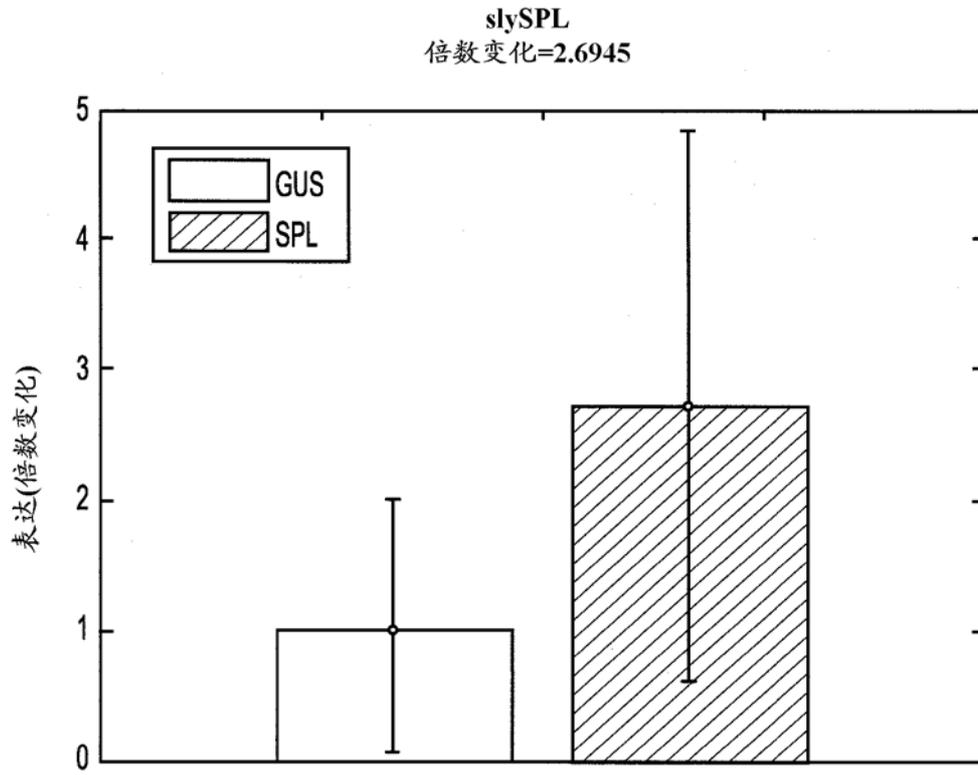


图 41B

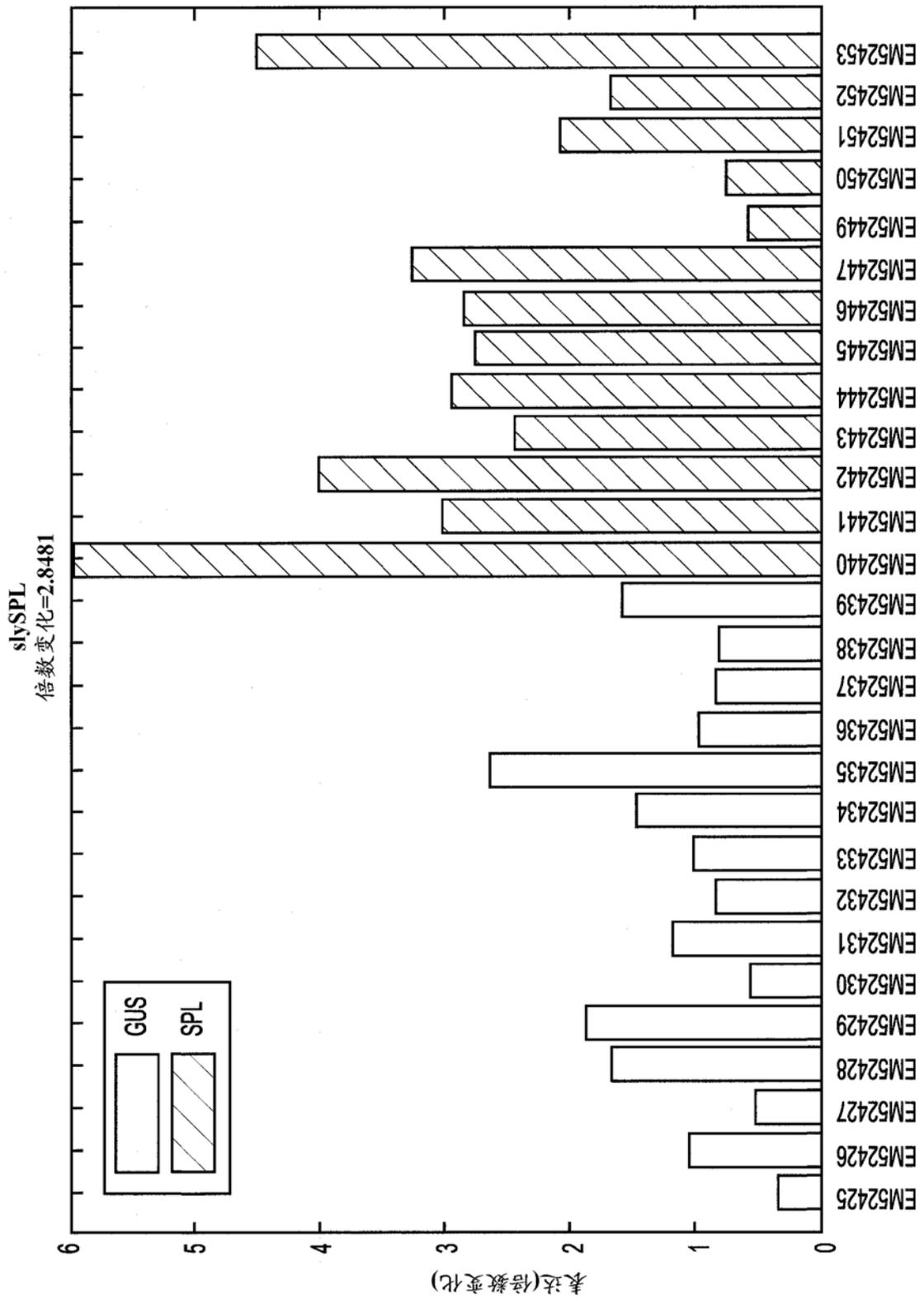


图 42A

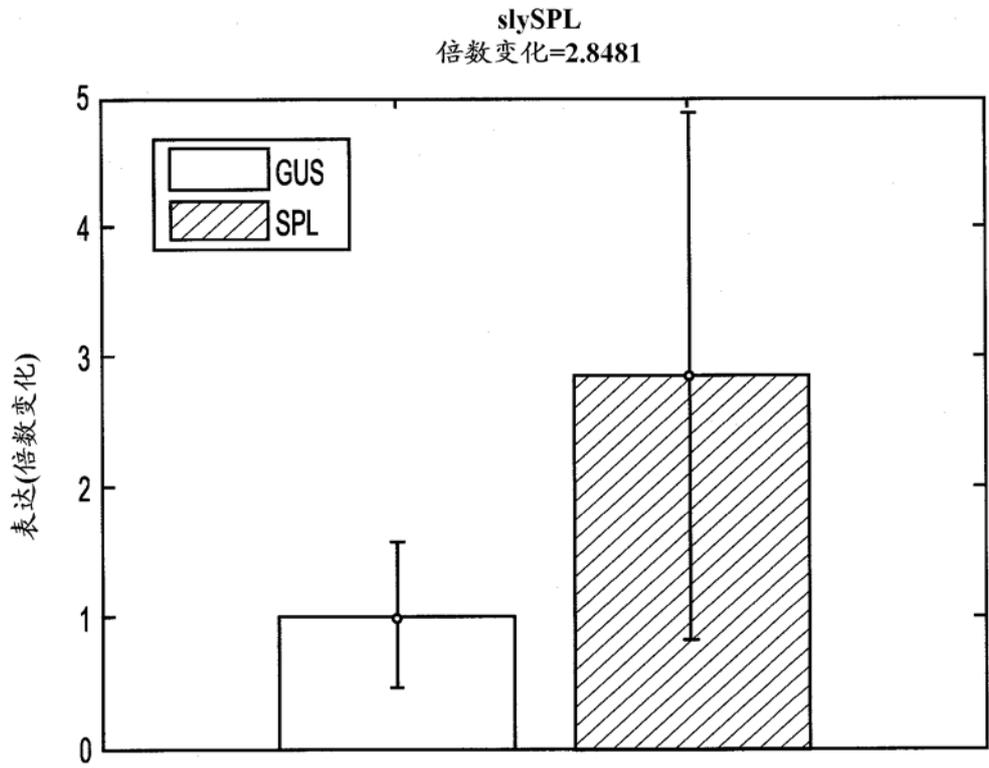


图 42B

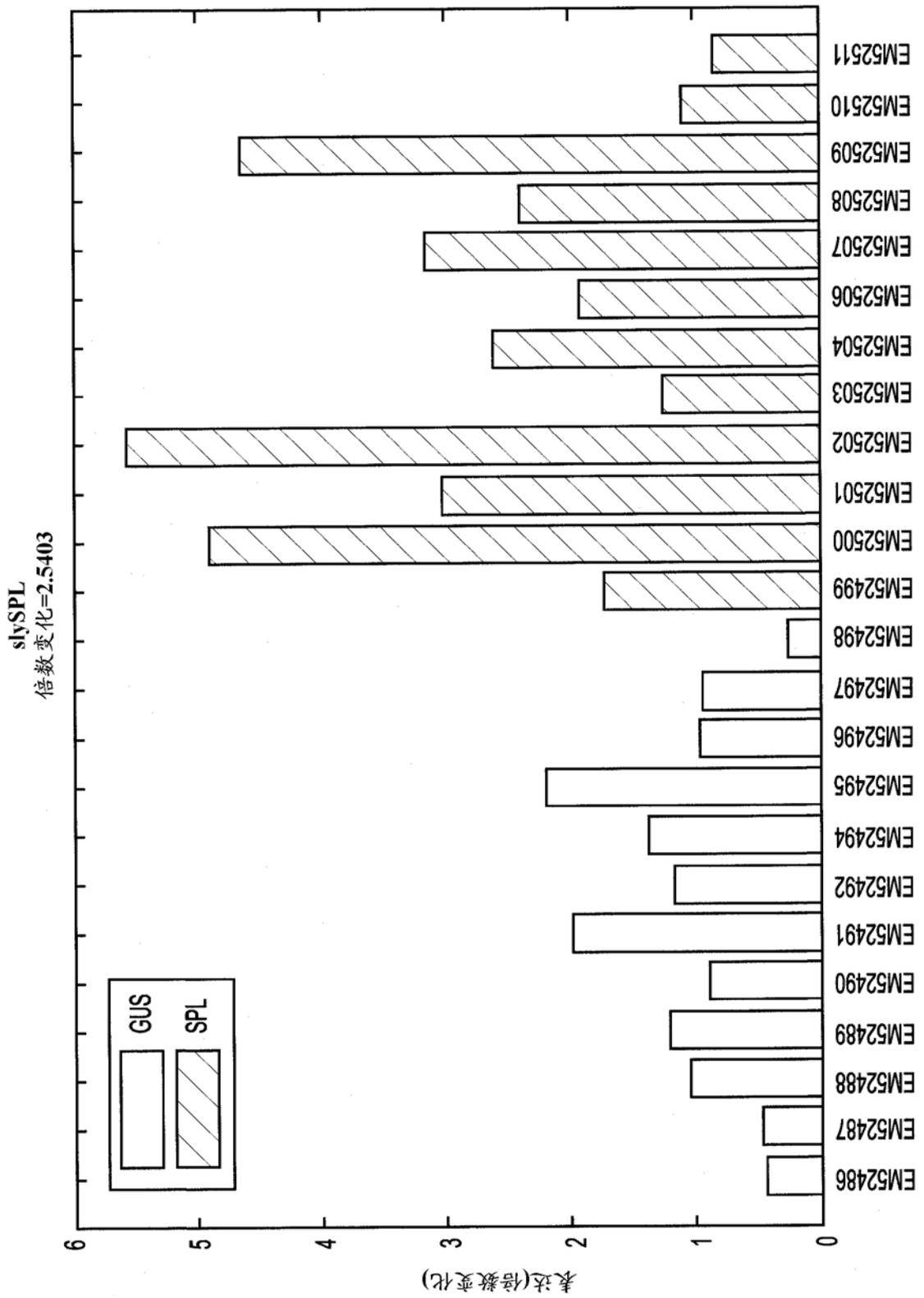


图 43A

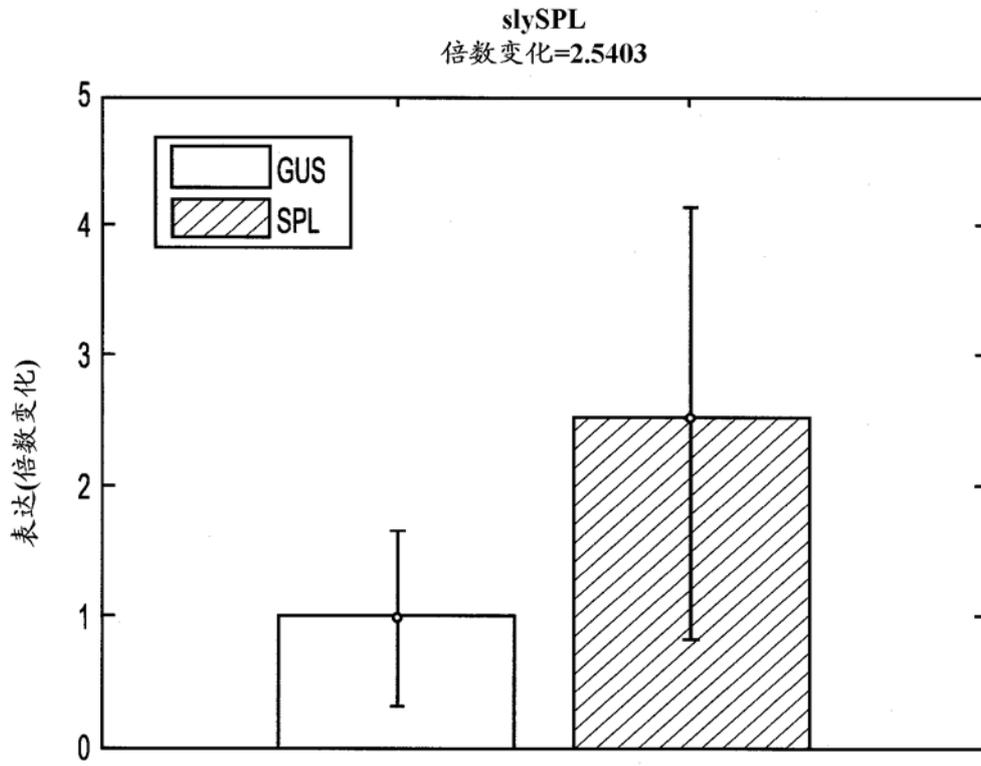


图 43B

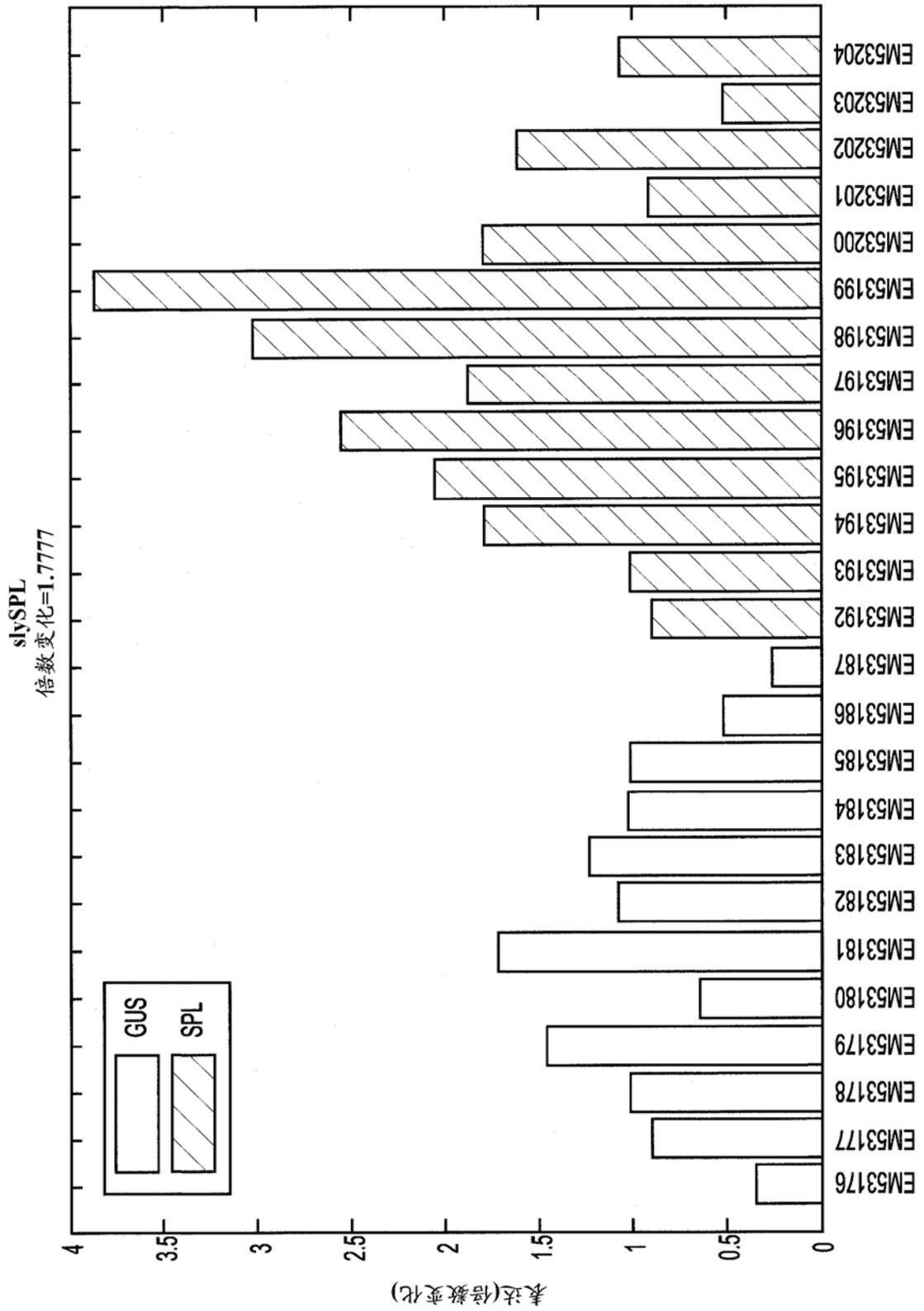


图 44A

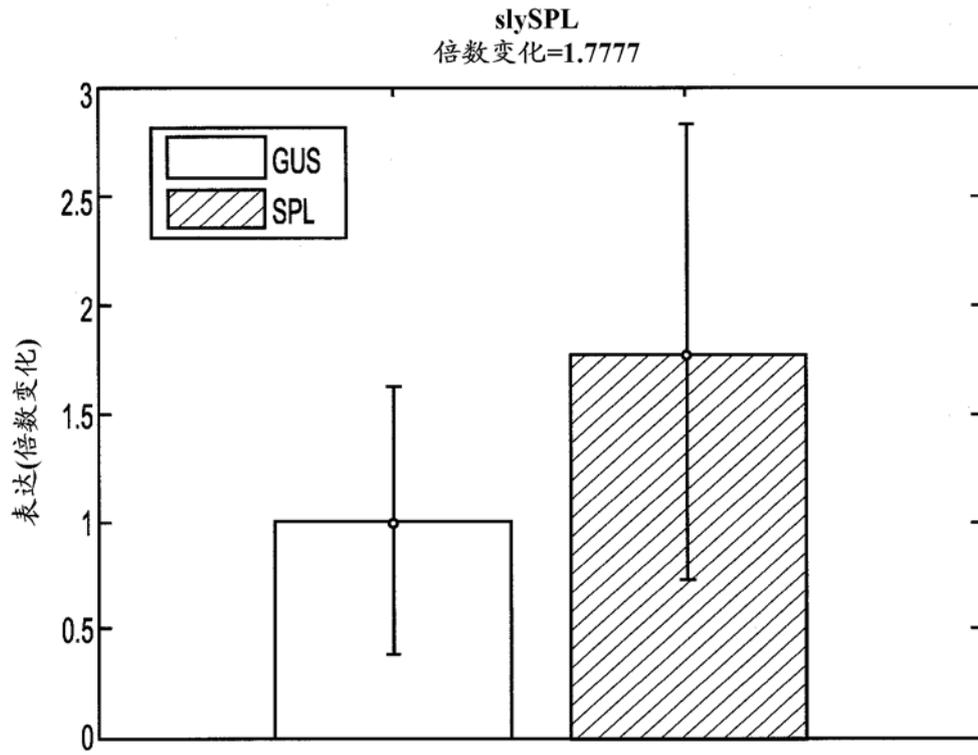


图 44B

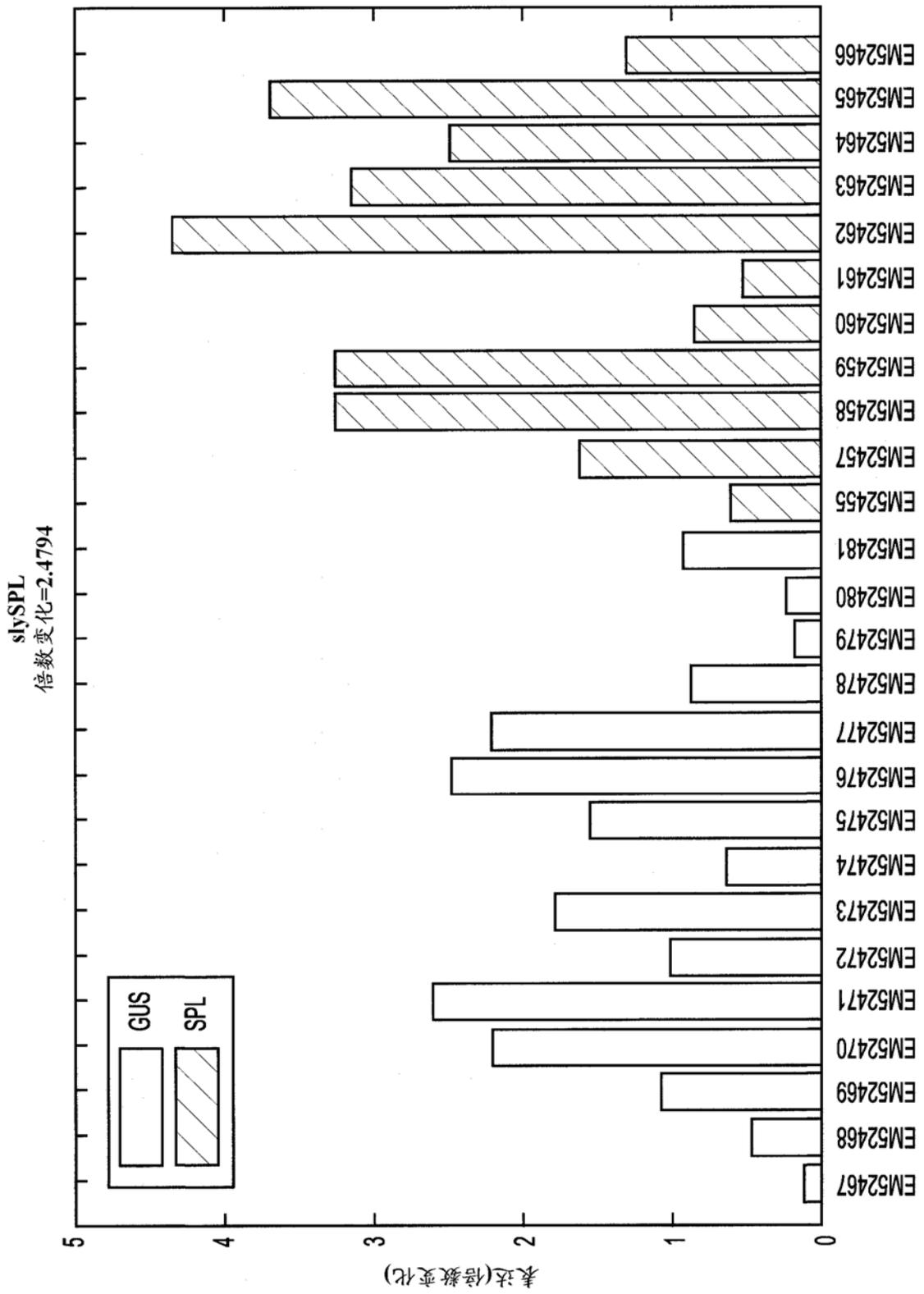


图 45A

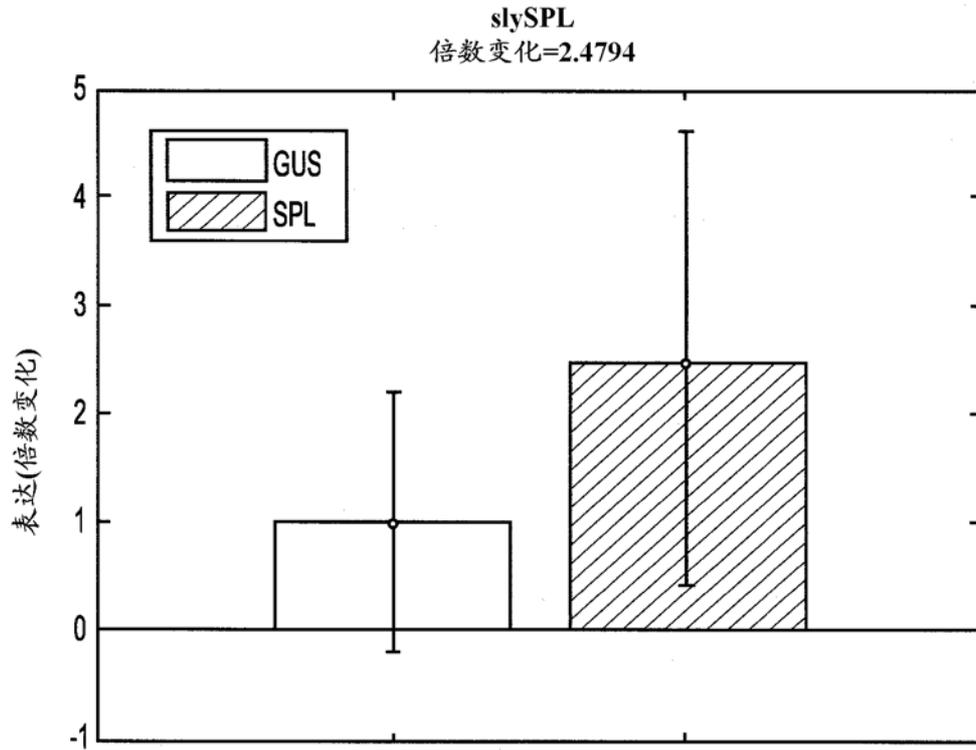


图 45B

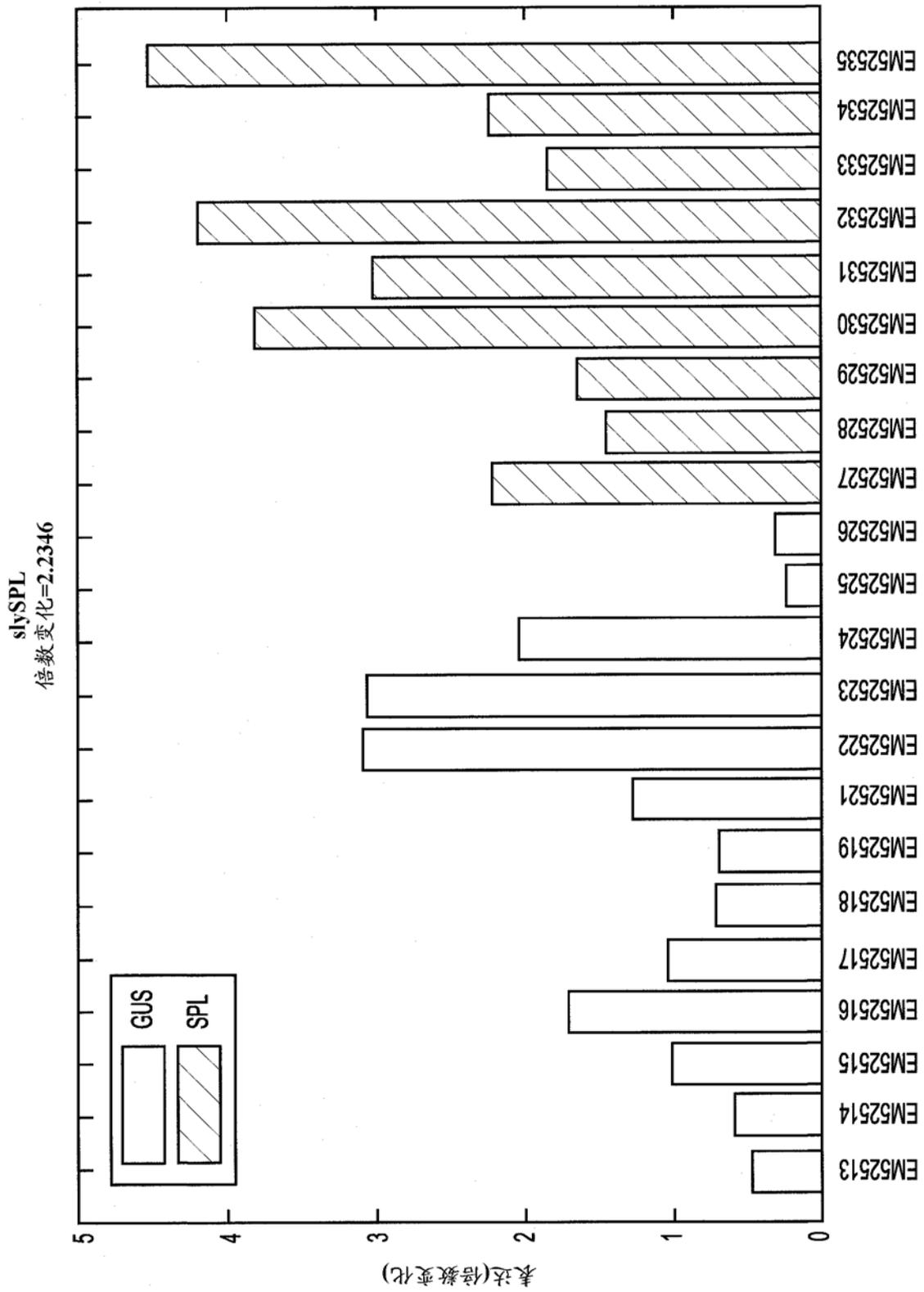


图 46A

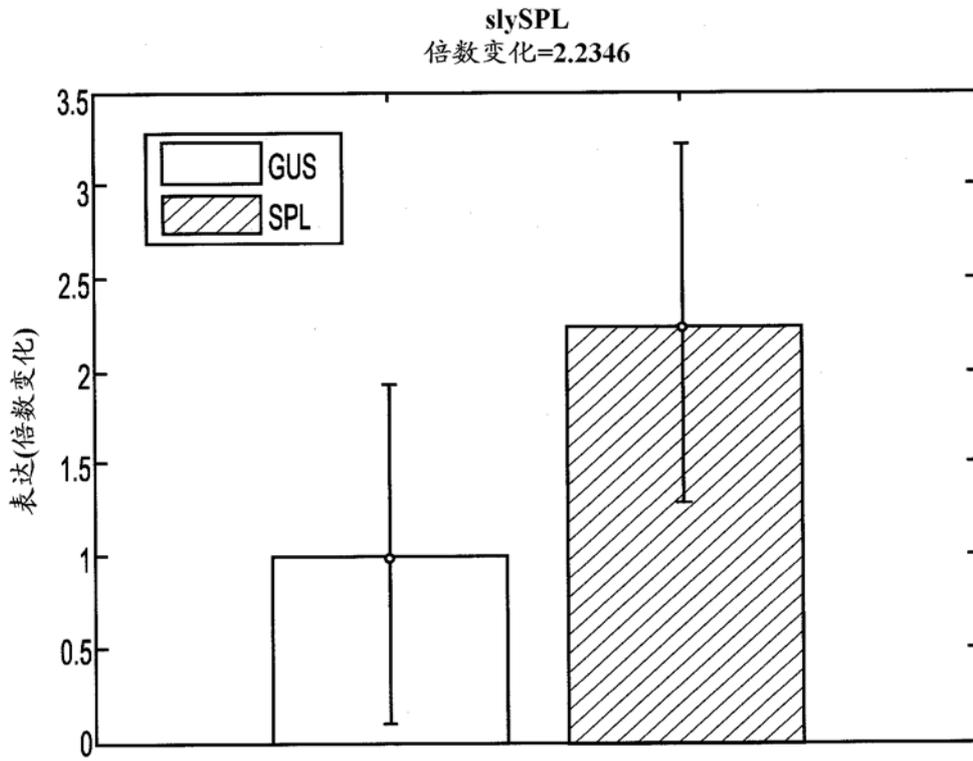


图 46B

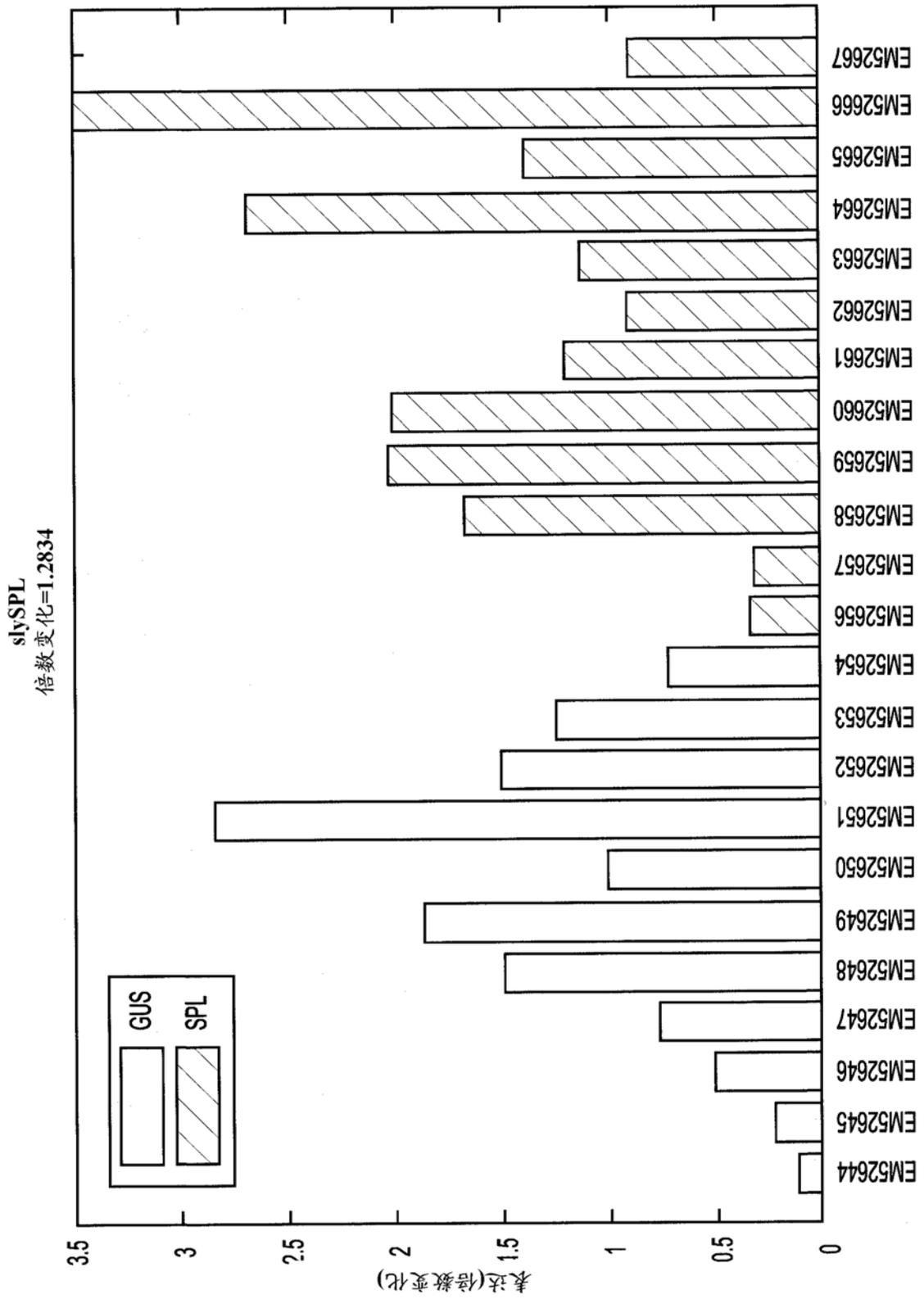


图 47A

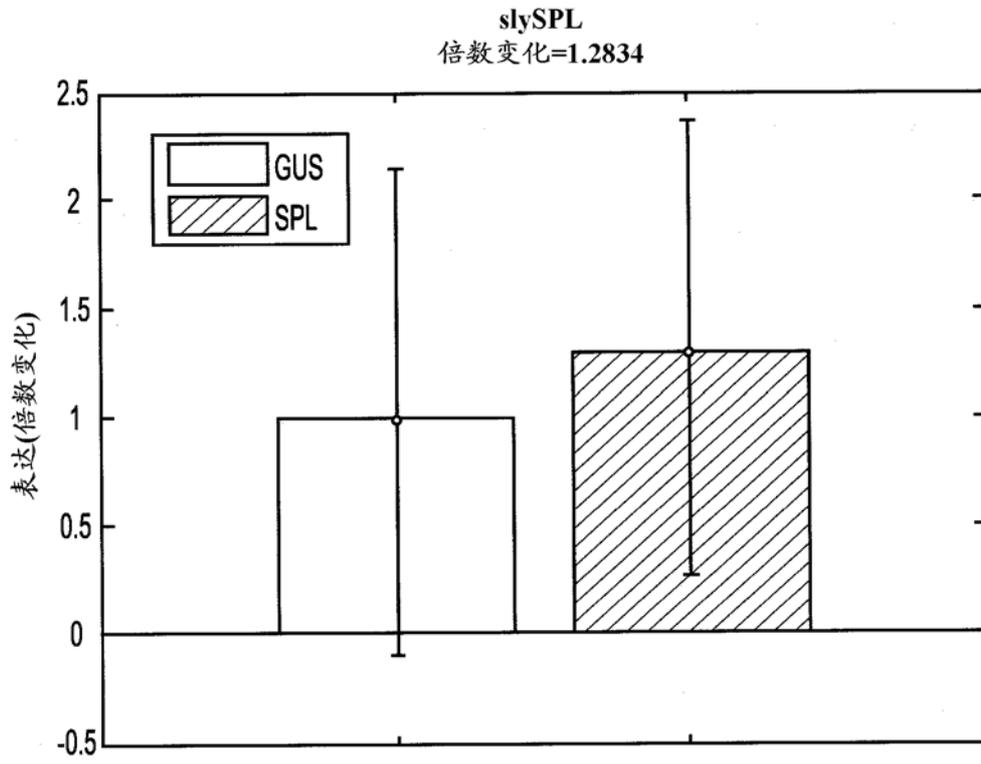


图 47B

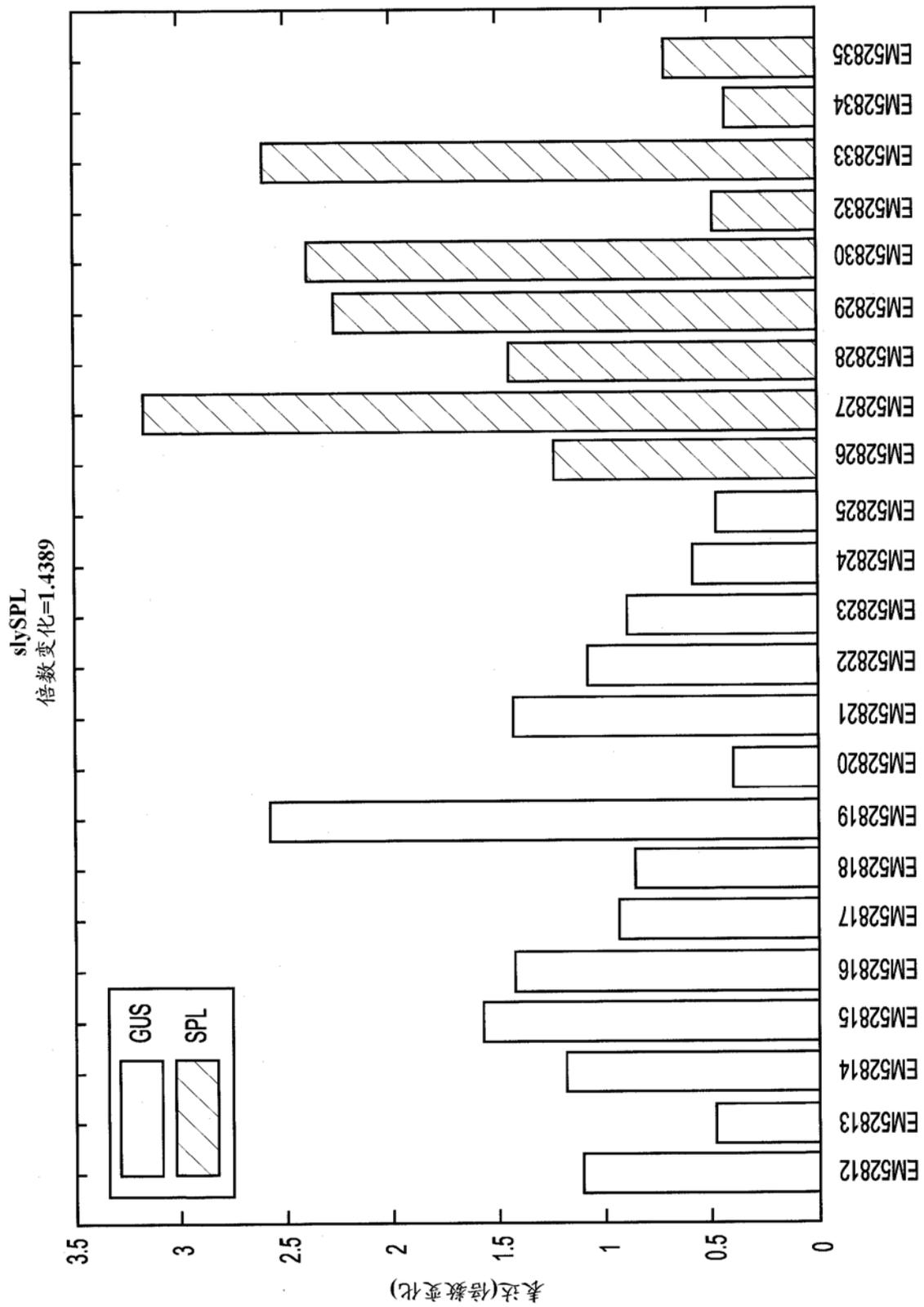


图 48A

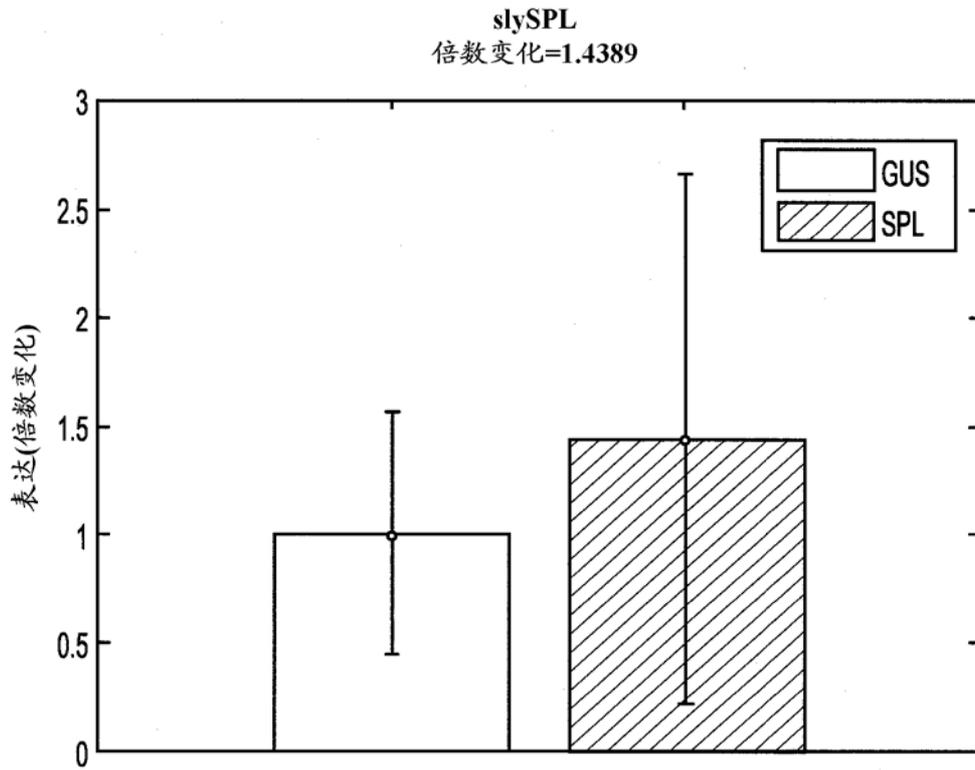


图 48B

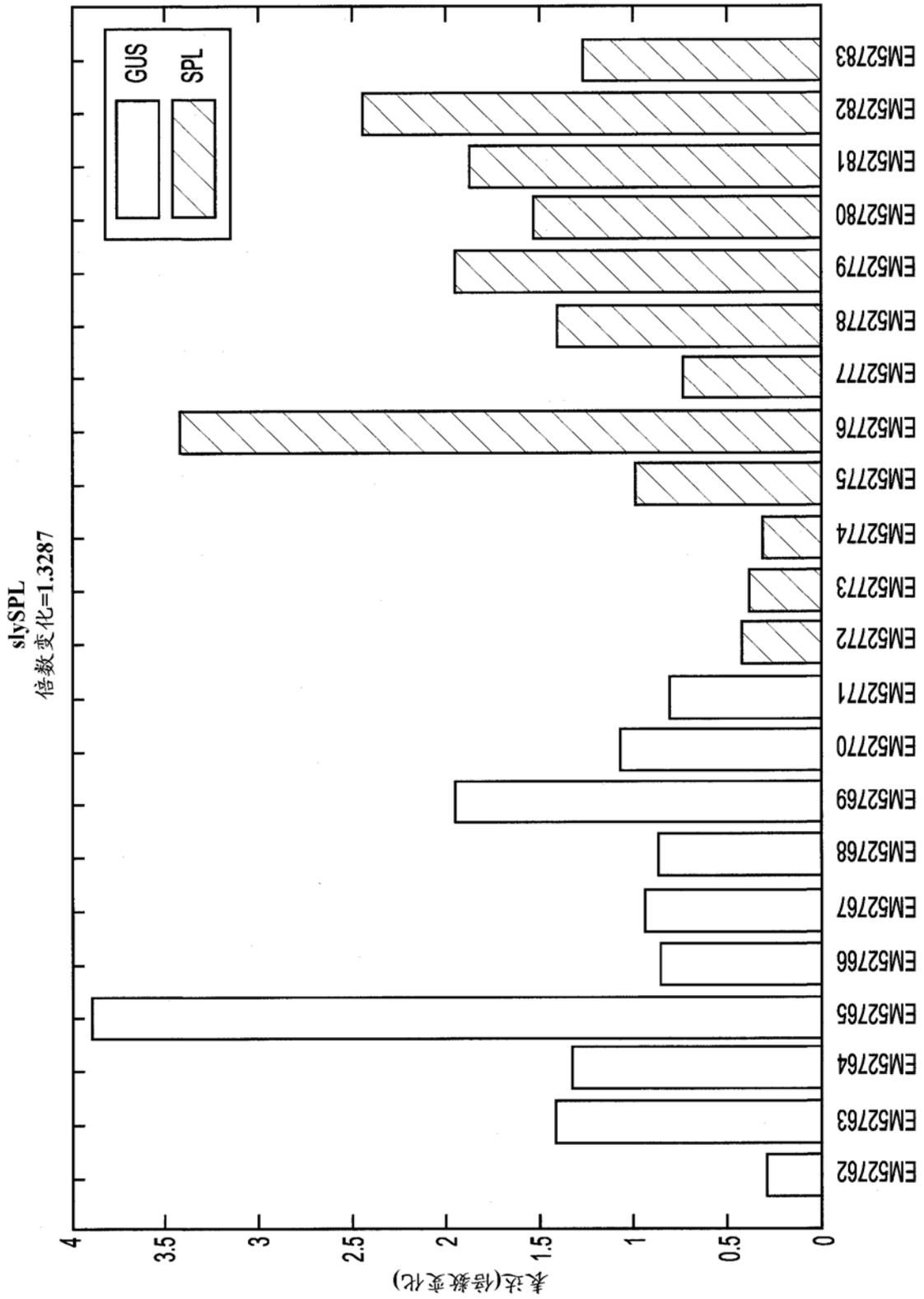


图 49A

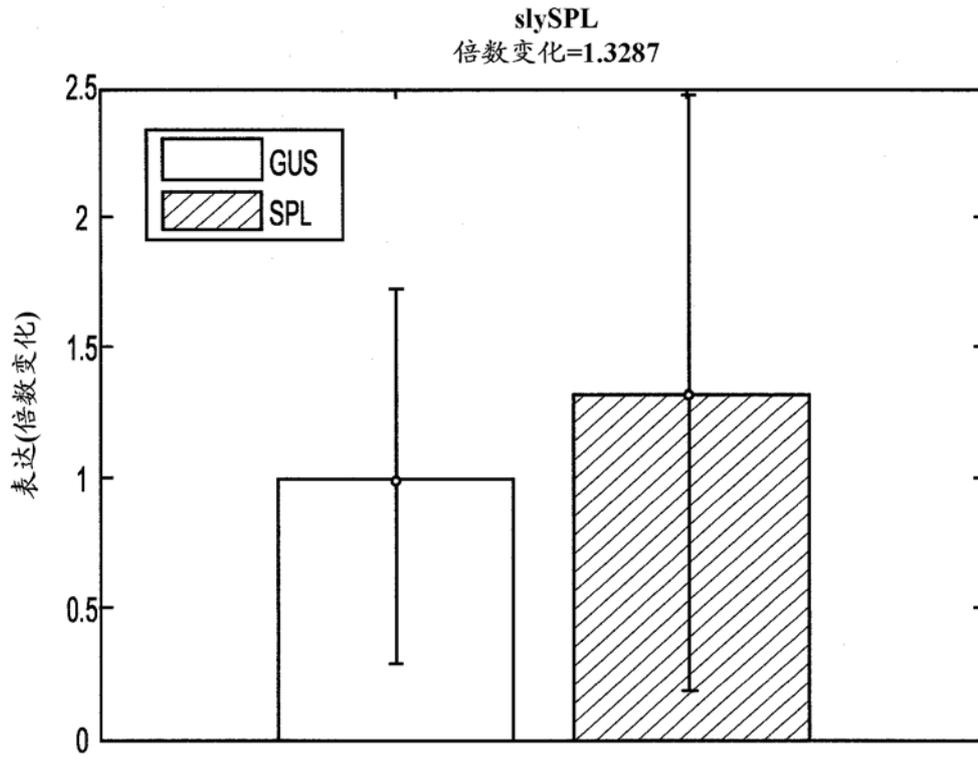


图 49B

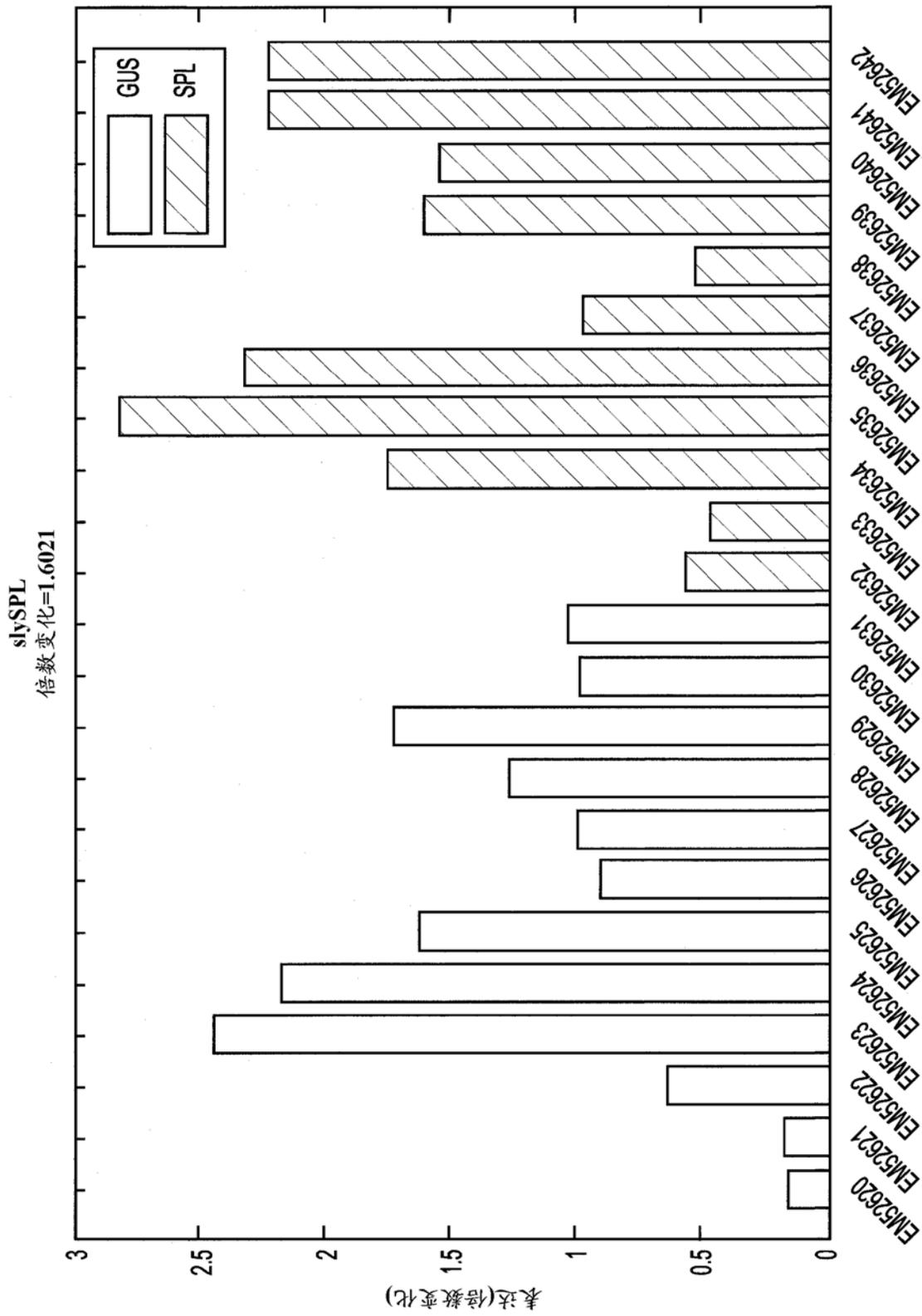


图 50A

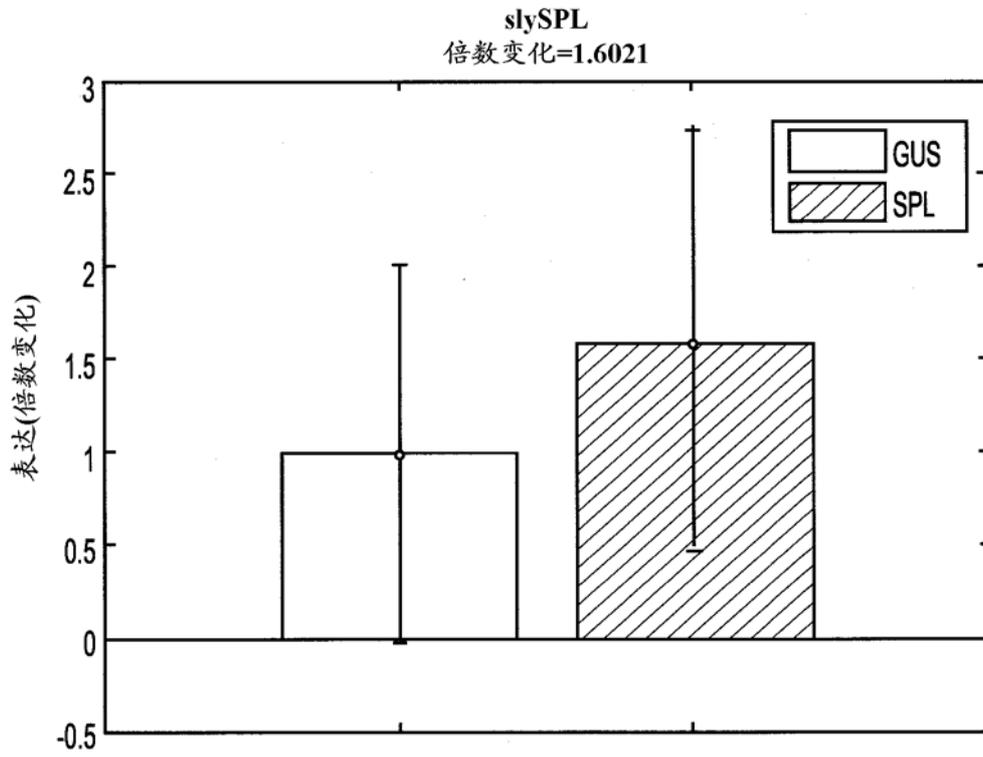


图 50B

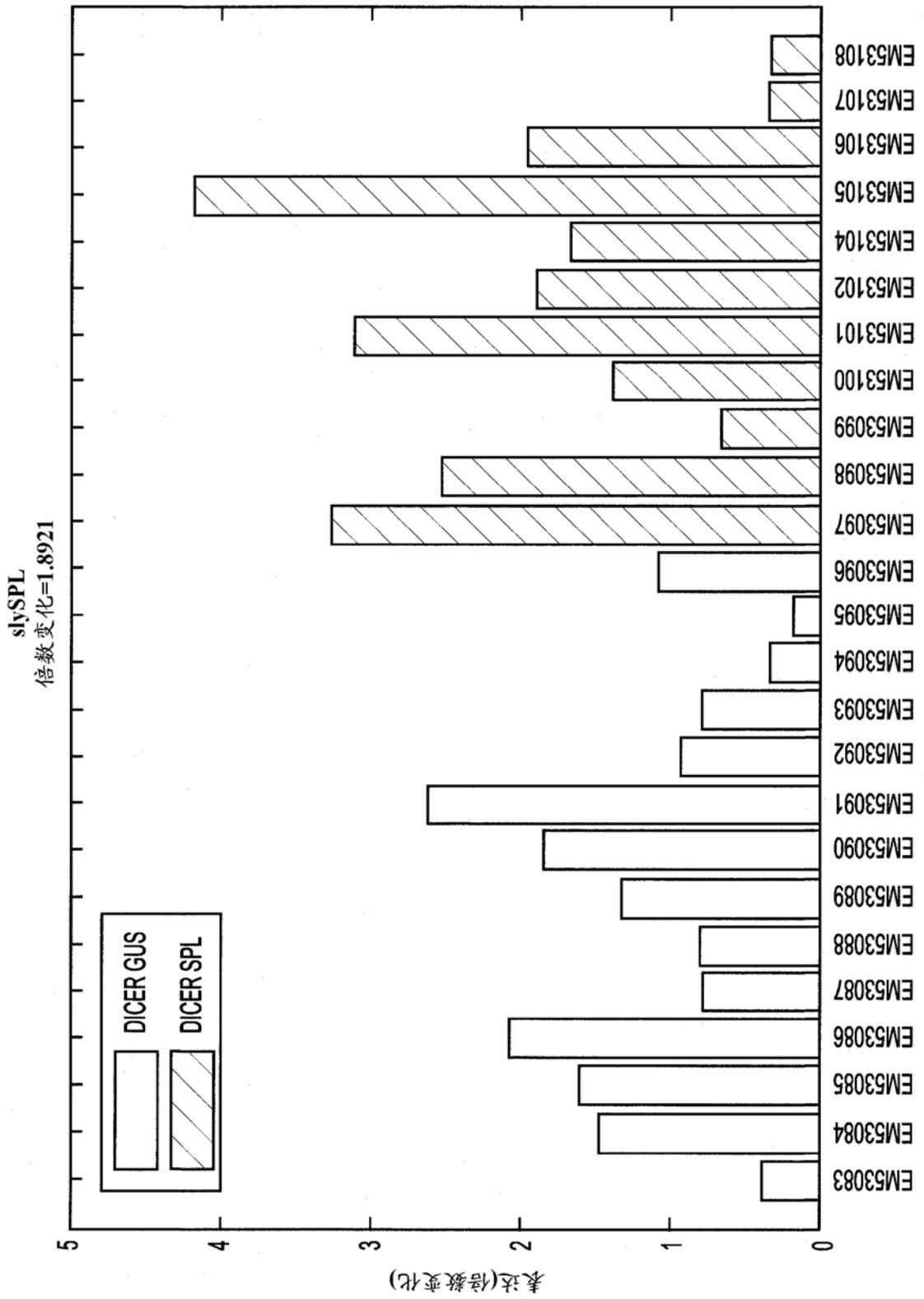


图 51A

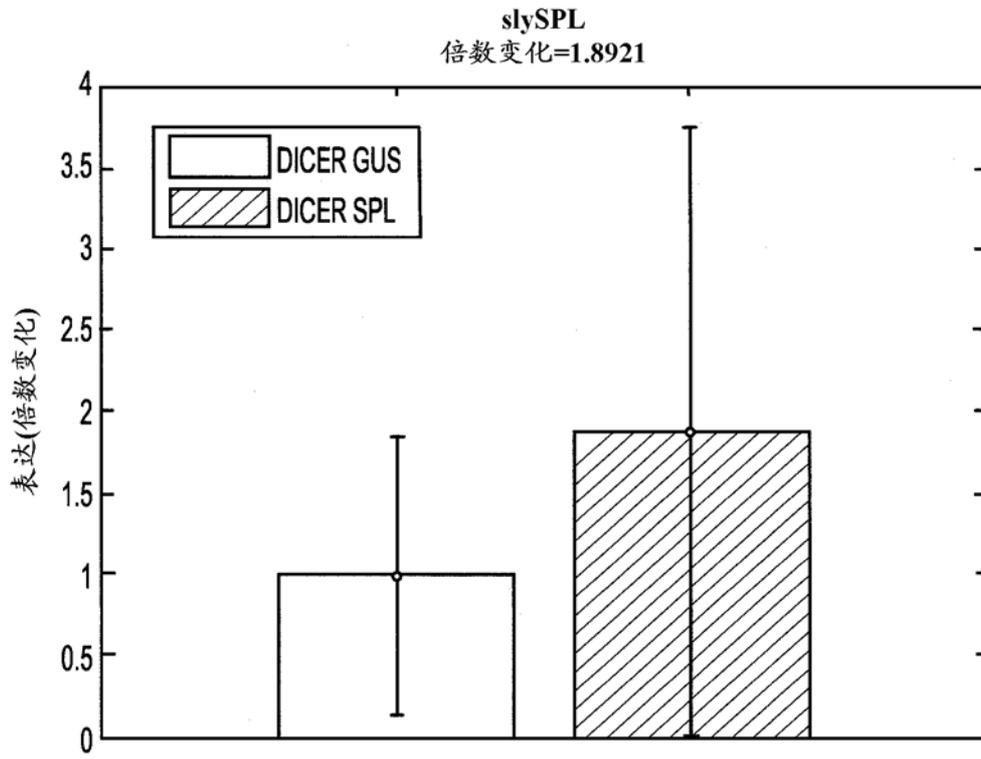


图 51B

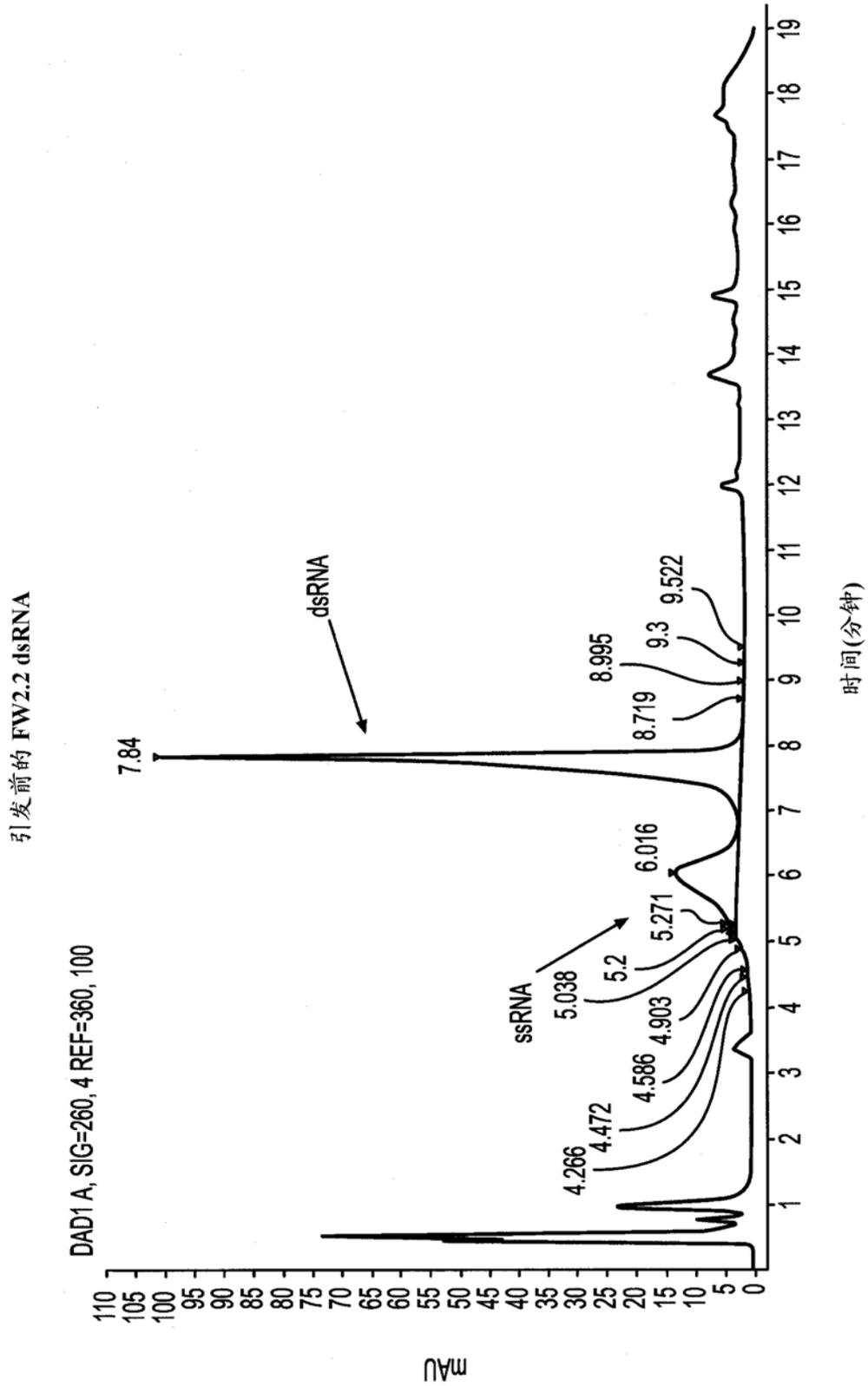


图 52

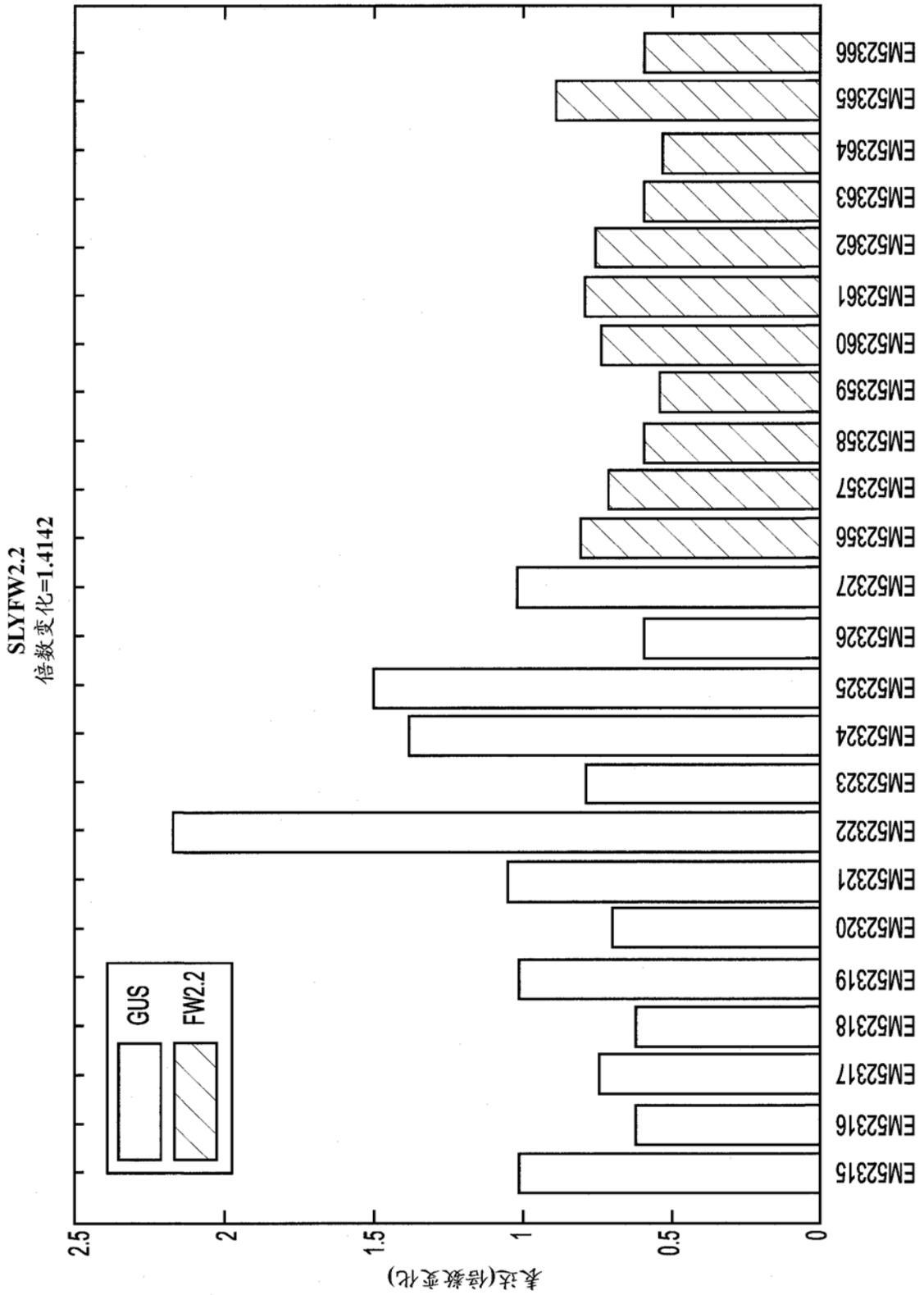


图 53A

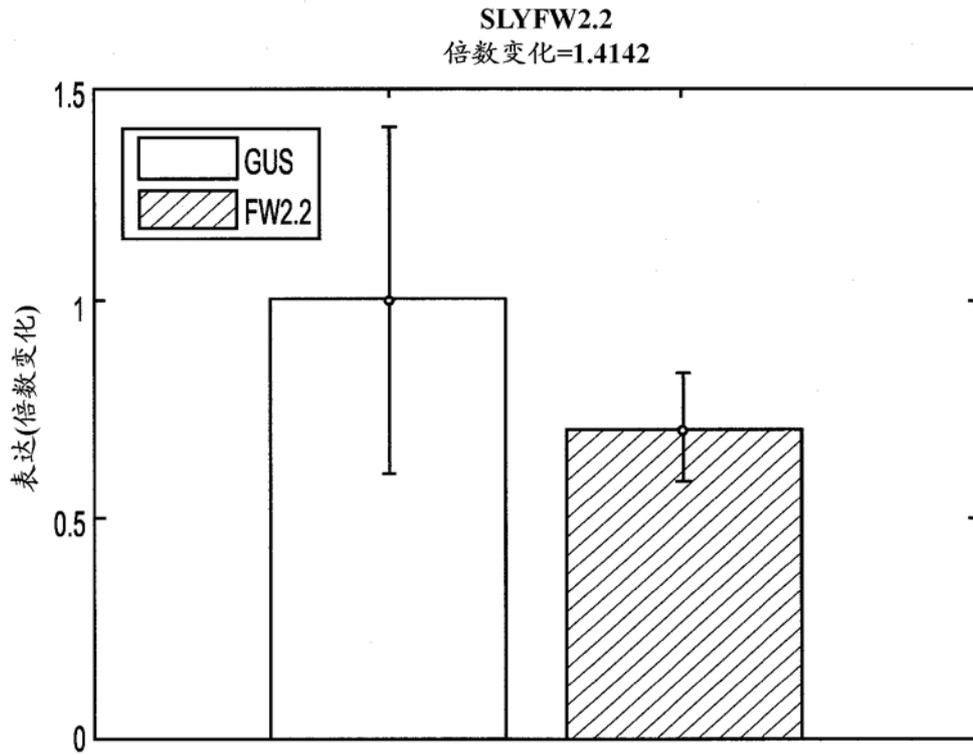


图 53B

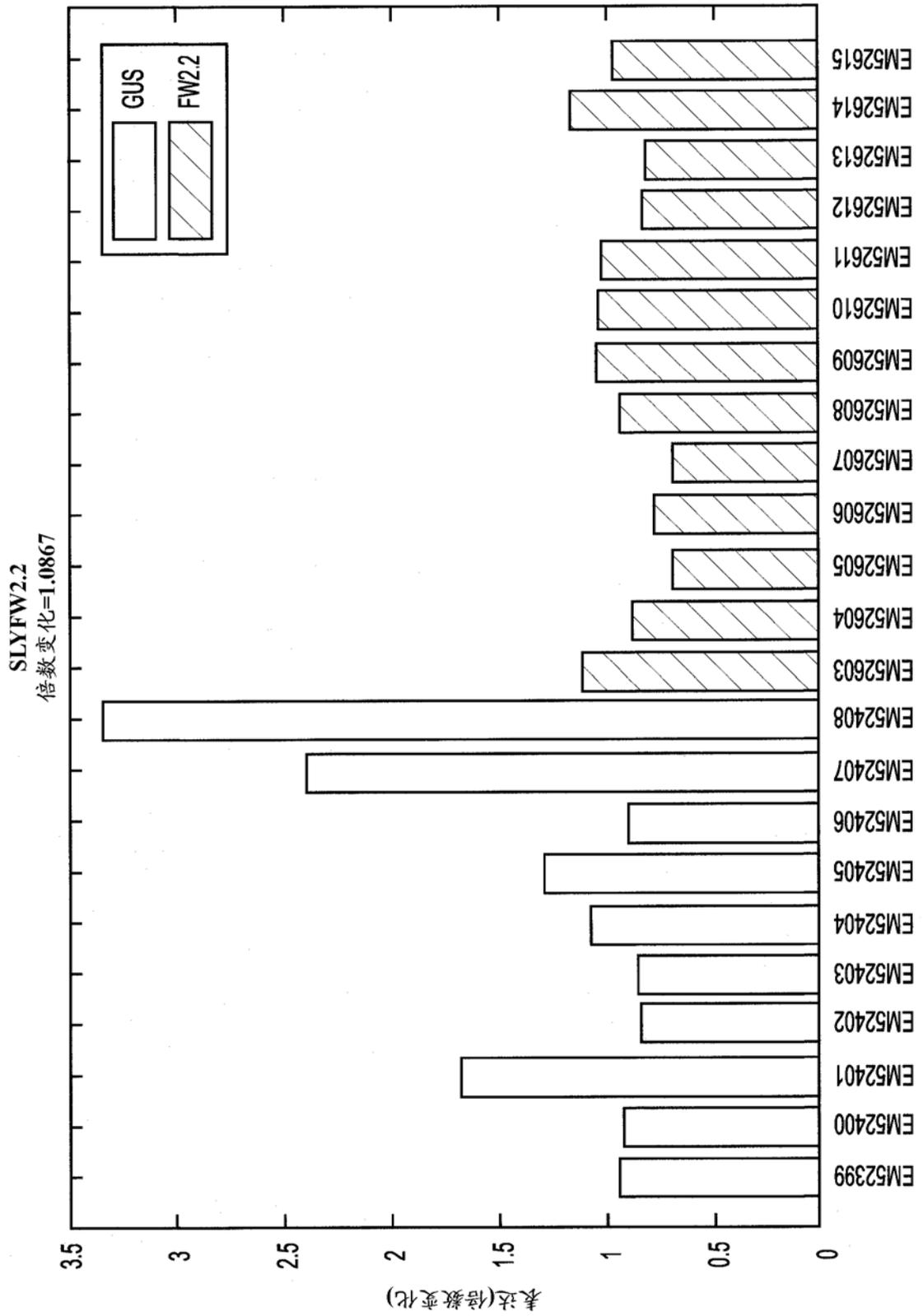


图 54A

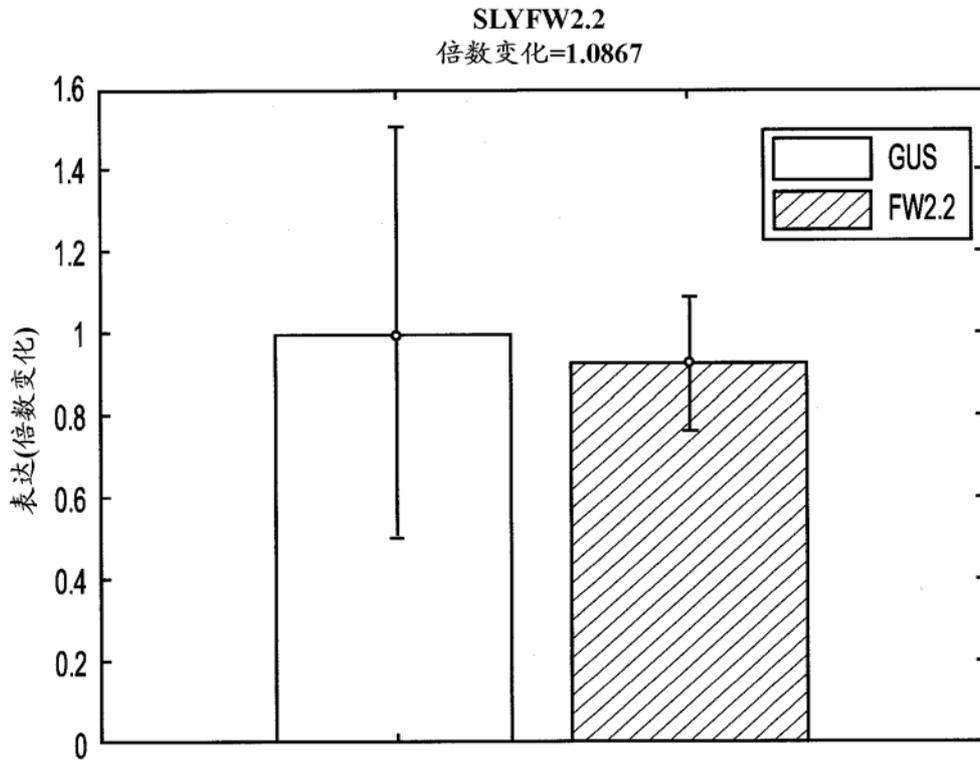


图 54B

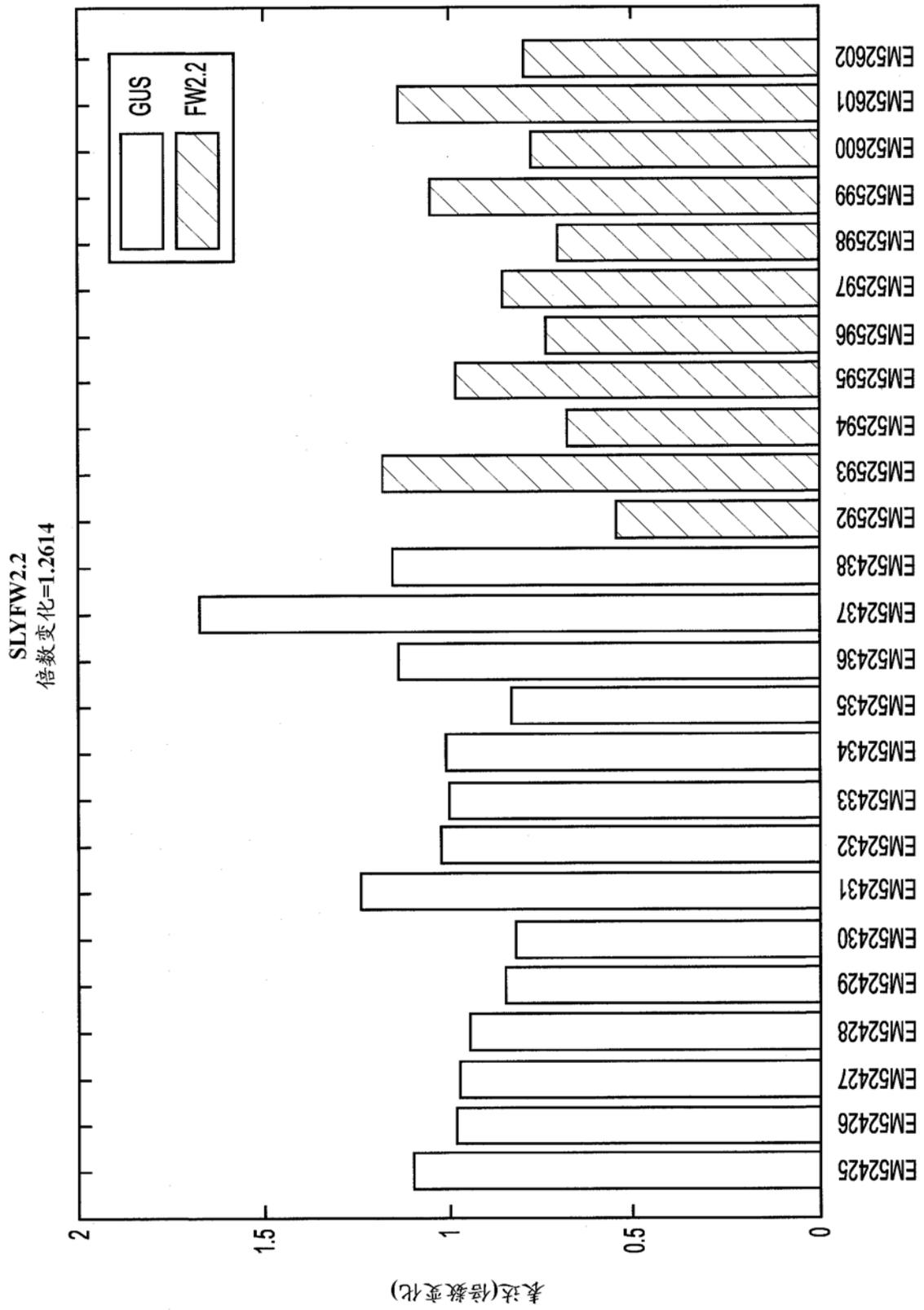


图 55A

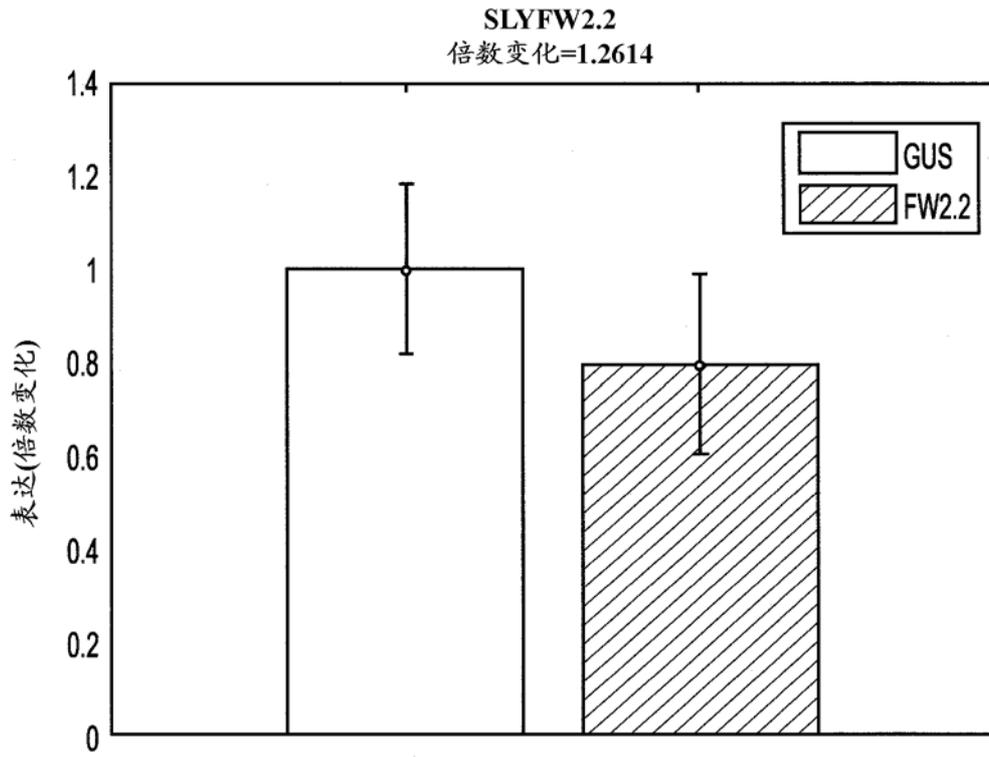


图 55B

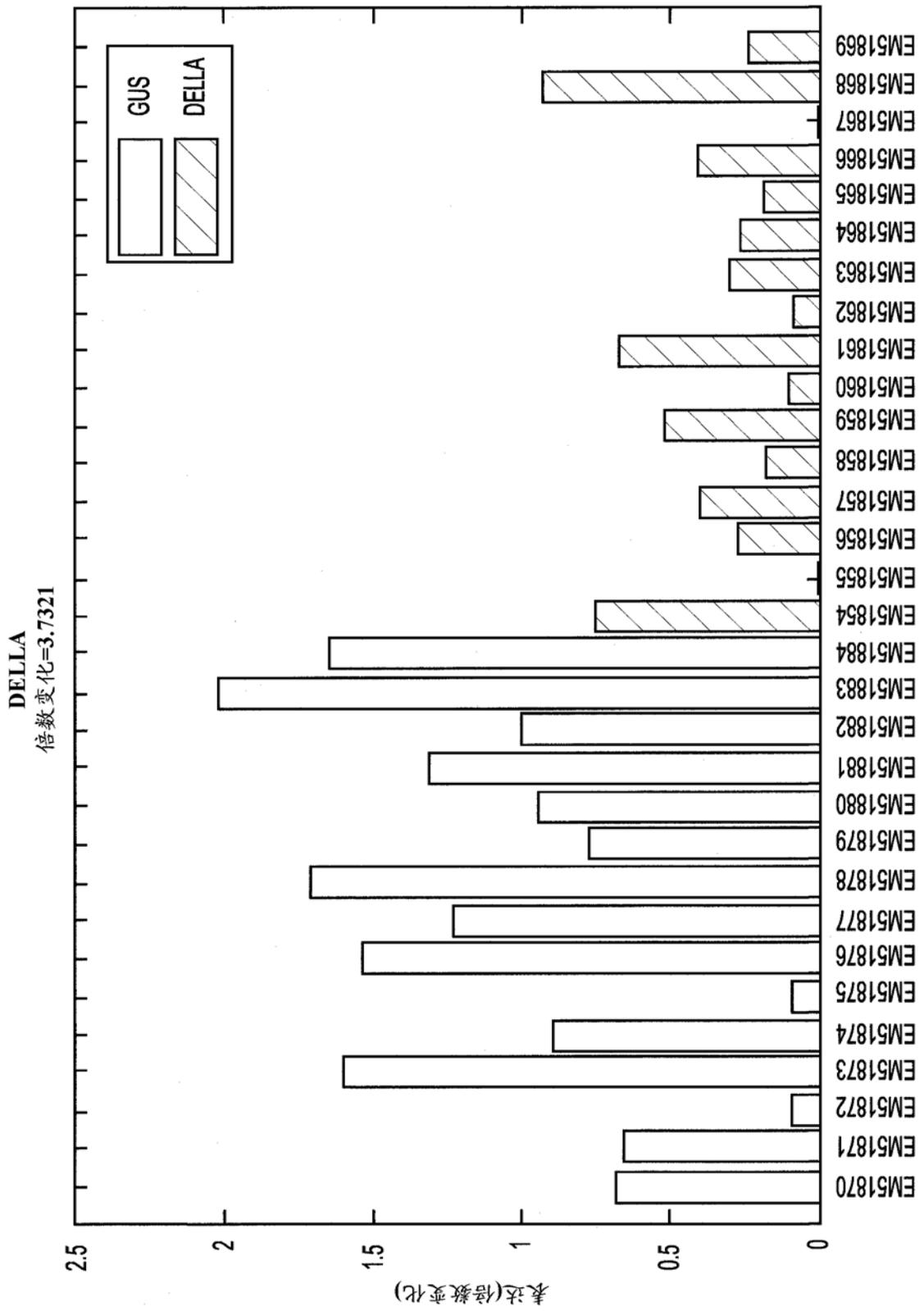


图 56A

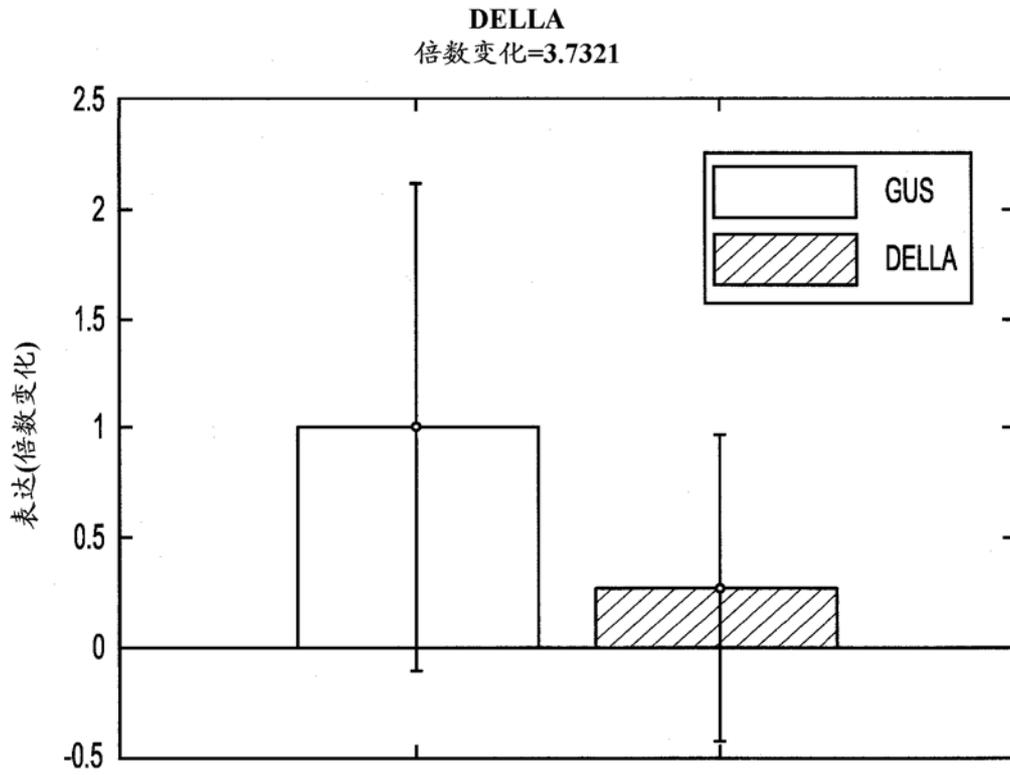


图 56B

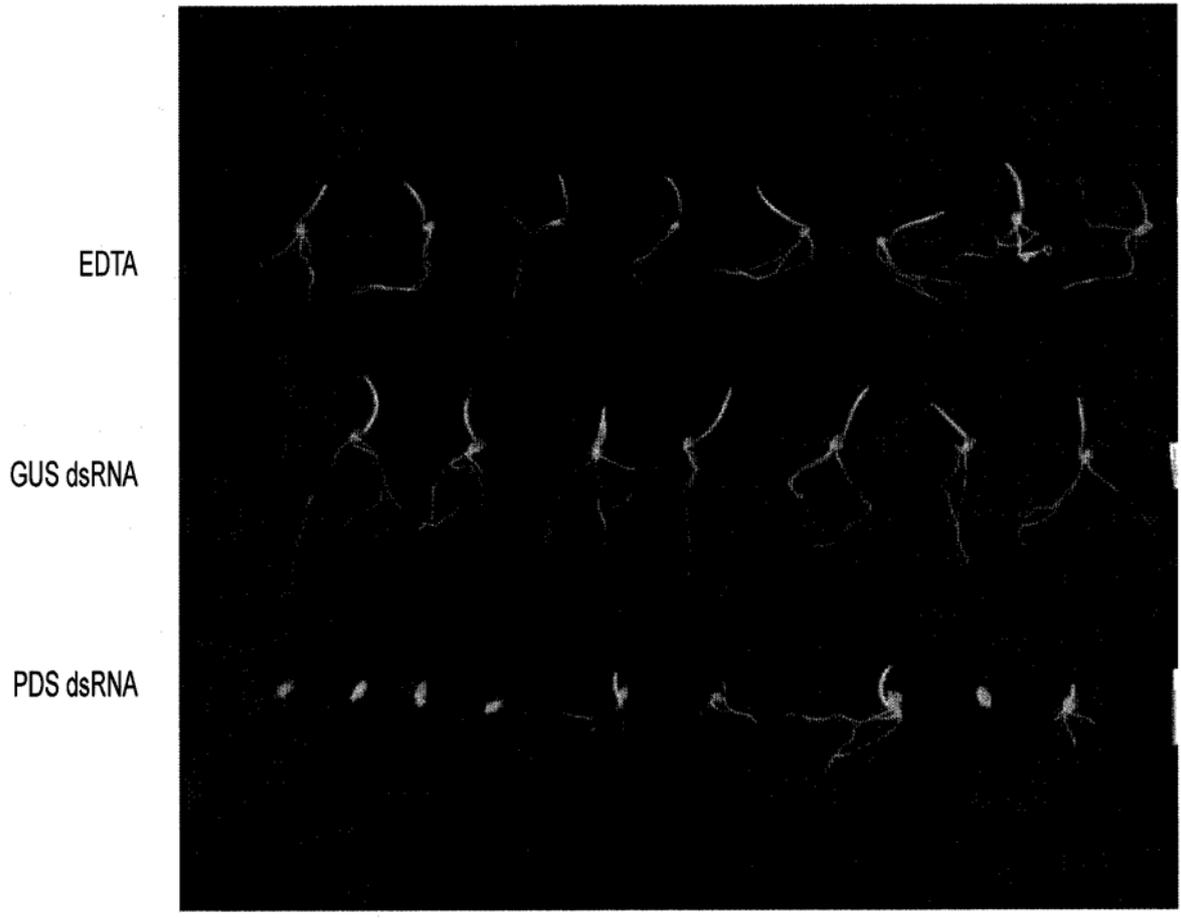


图 57

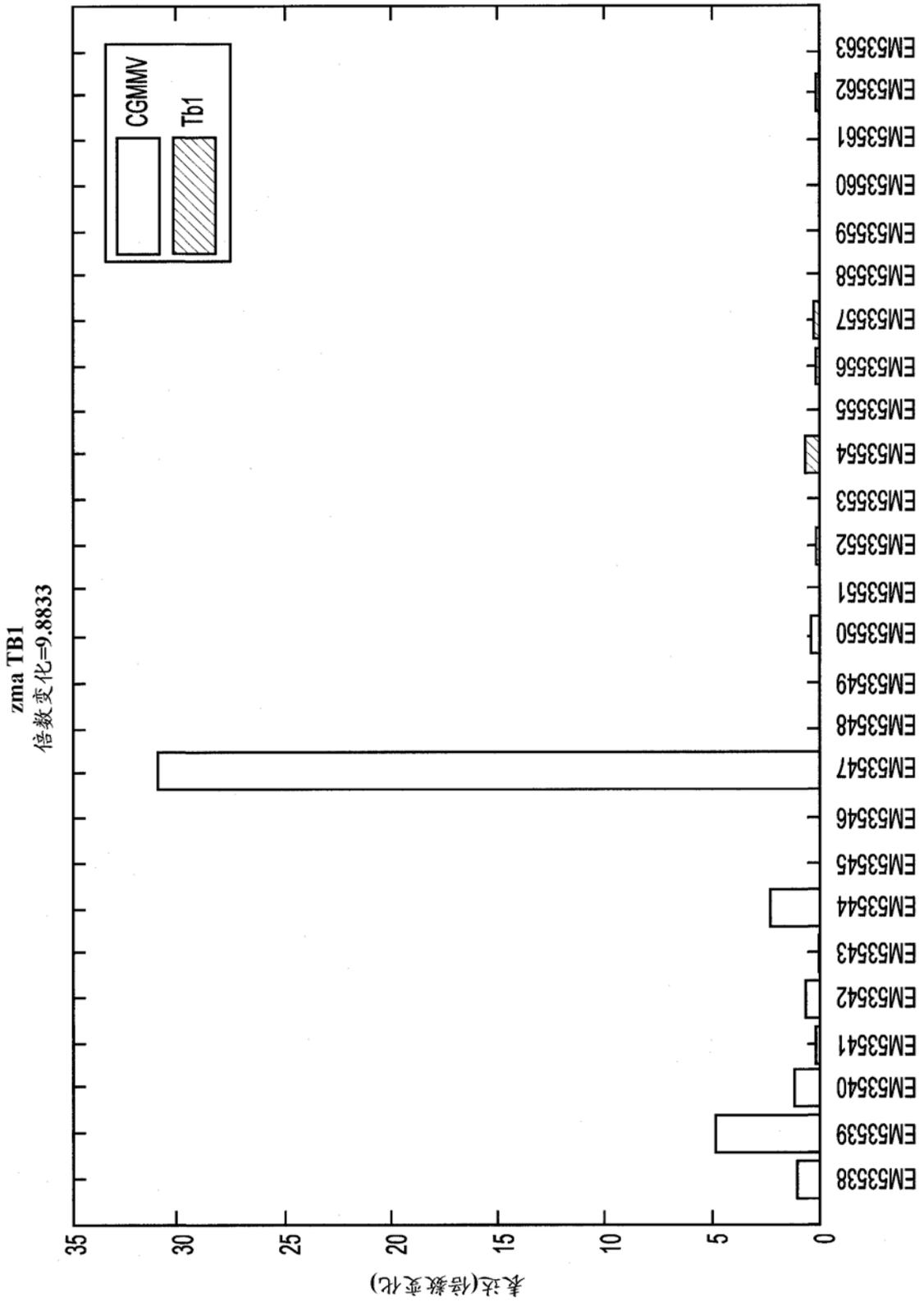


图 58A

zma TB1  
倍数变化=9.8833

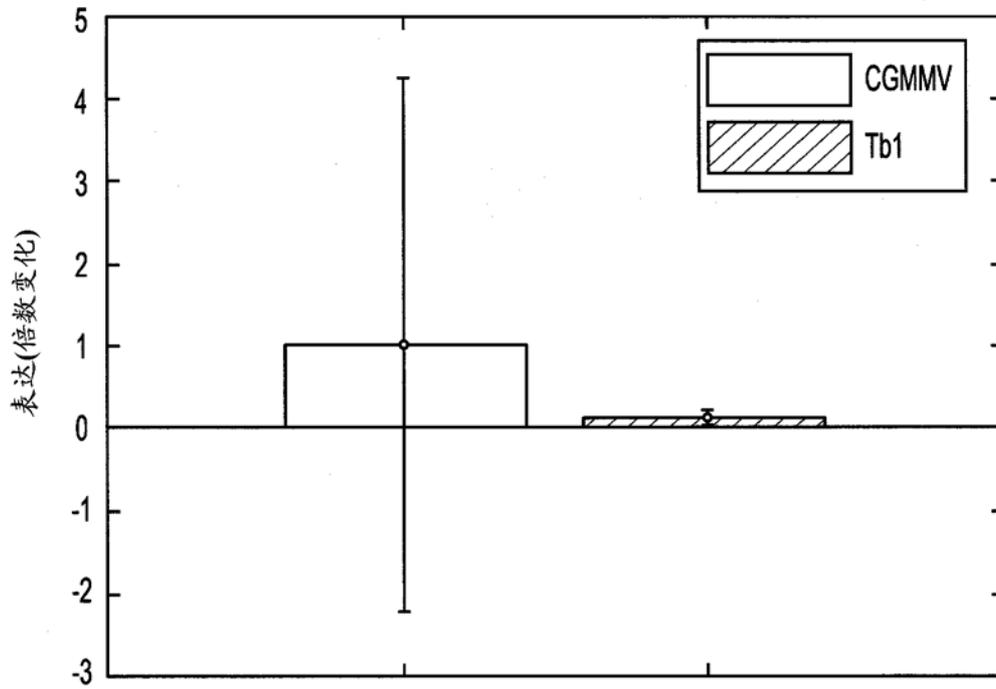


图 58B

通过处理的 RQ 的单因素分析

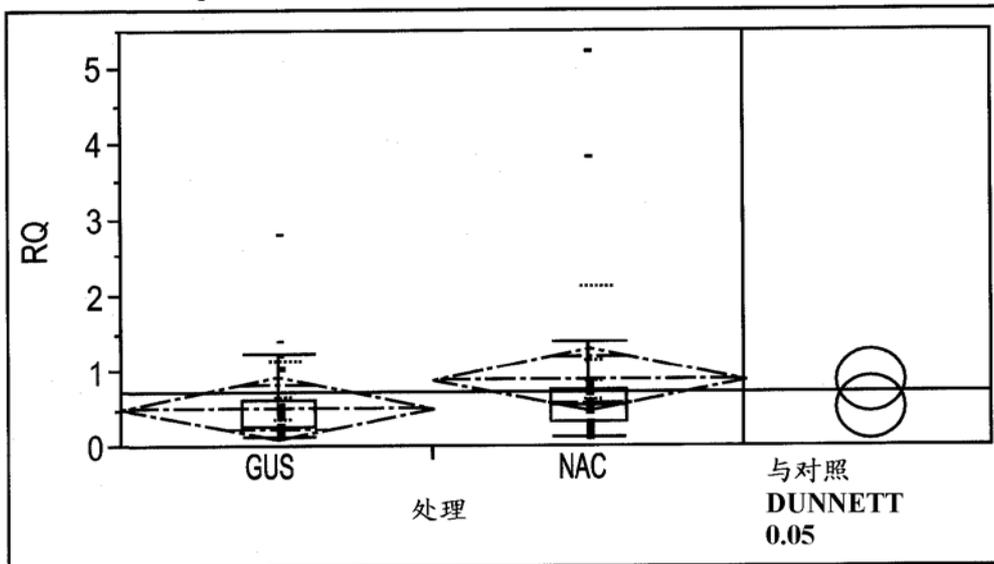


图 59A

通过处理的 RQ 的单因素分析

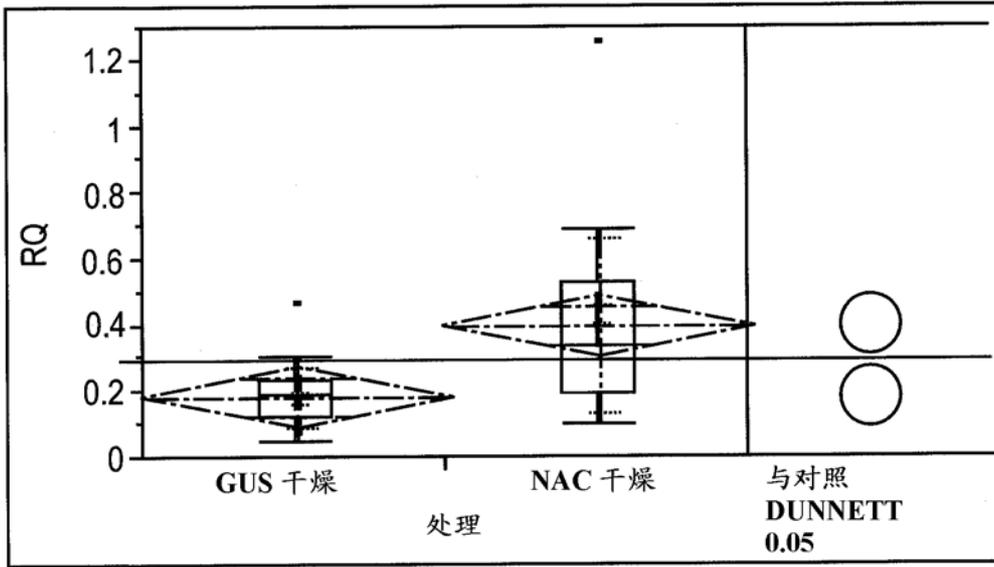


图 59B

通过处理的 RQ 的单因素分析

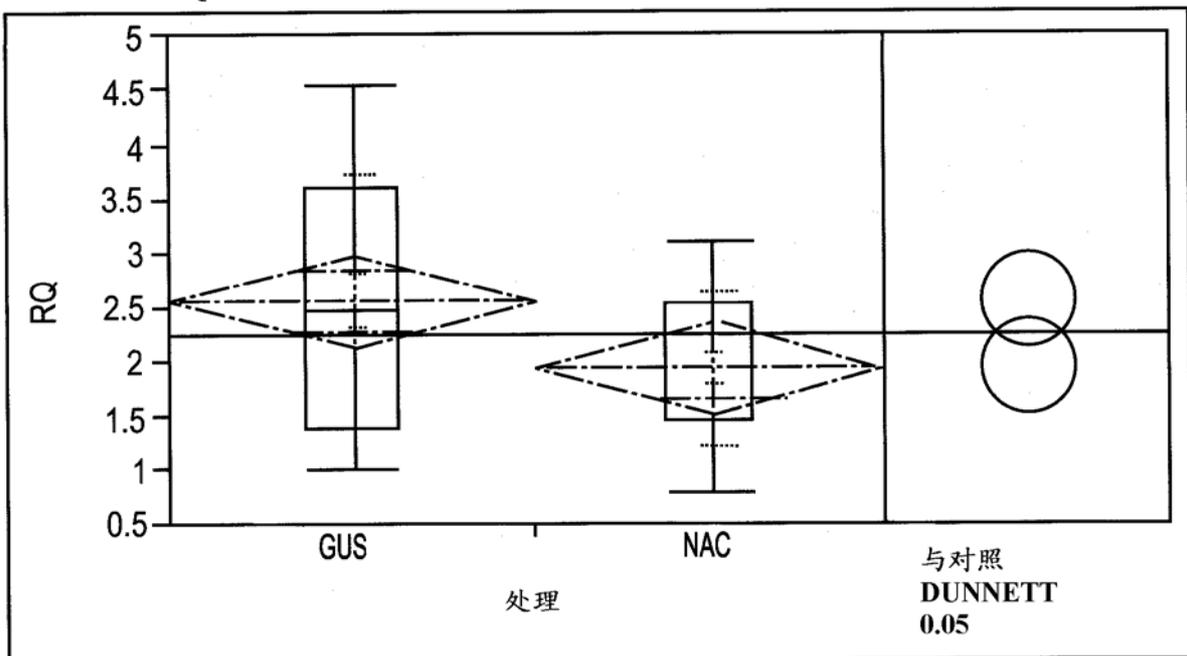


图 59C

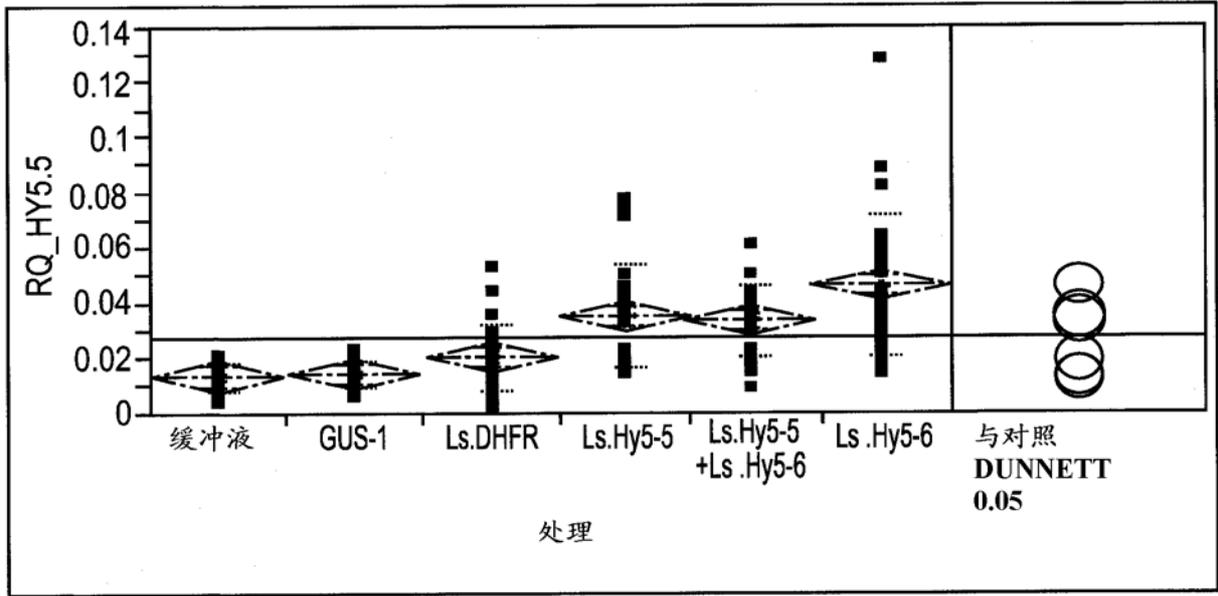


图 60A

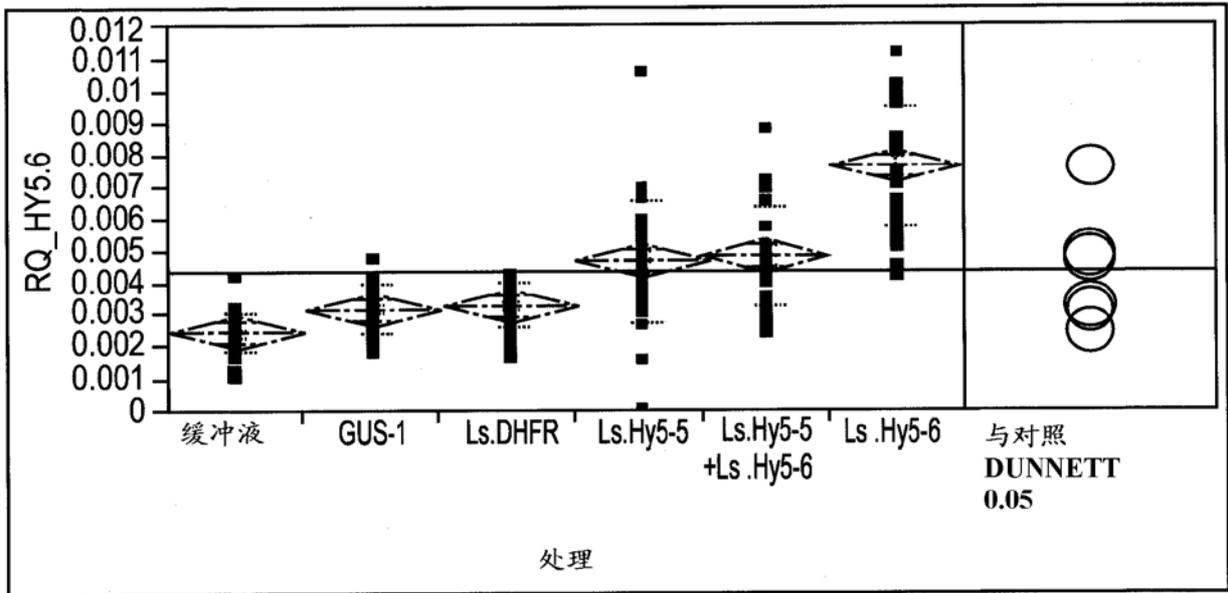


图 60B

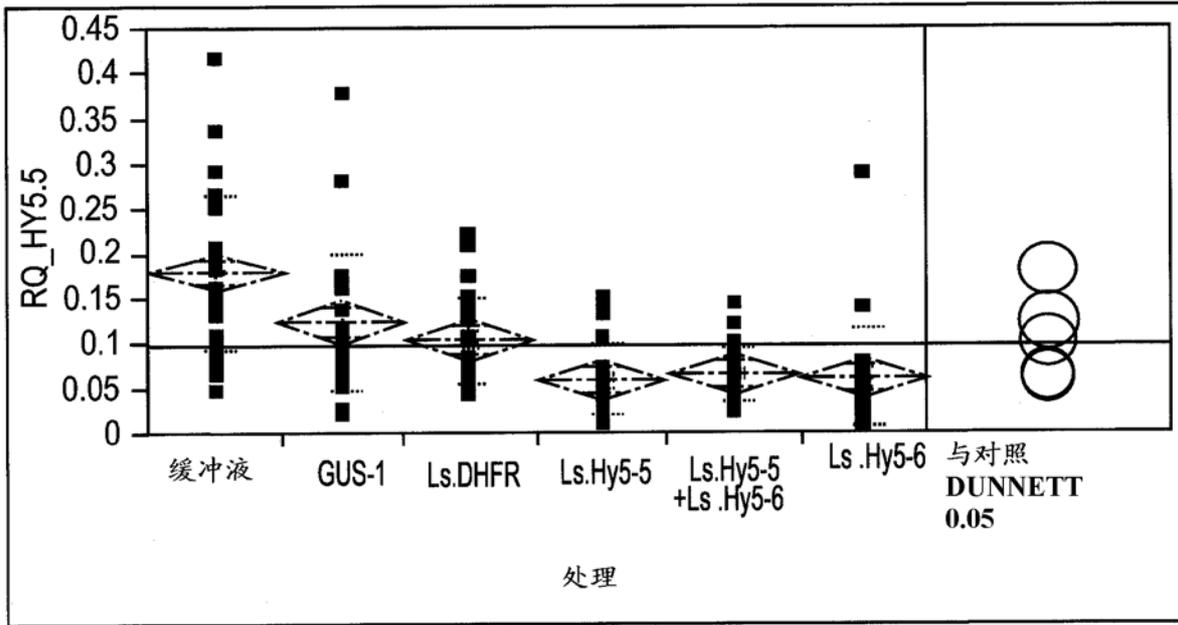


图 60C

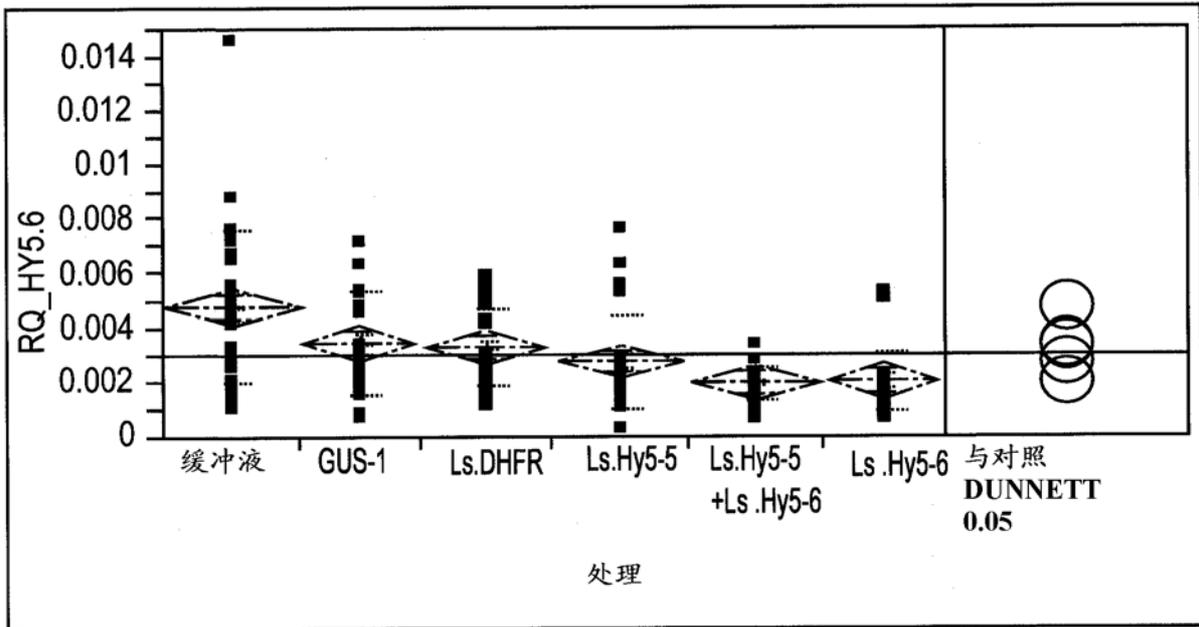


图 60D

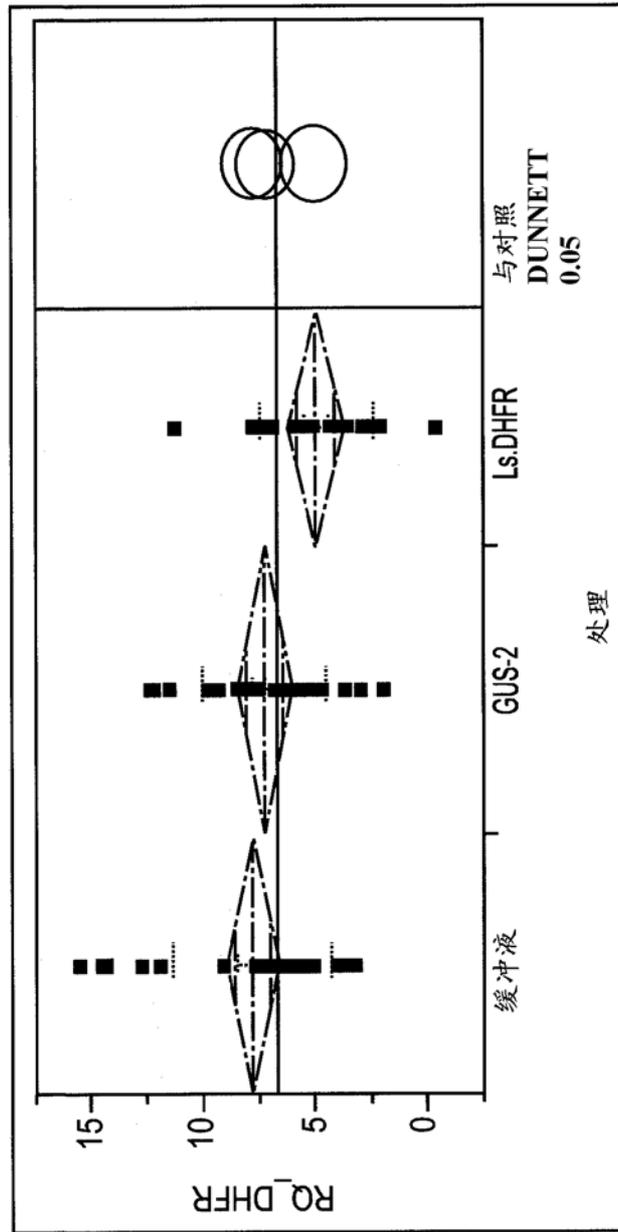


图 61

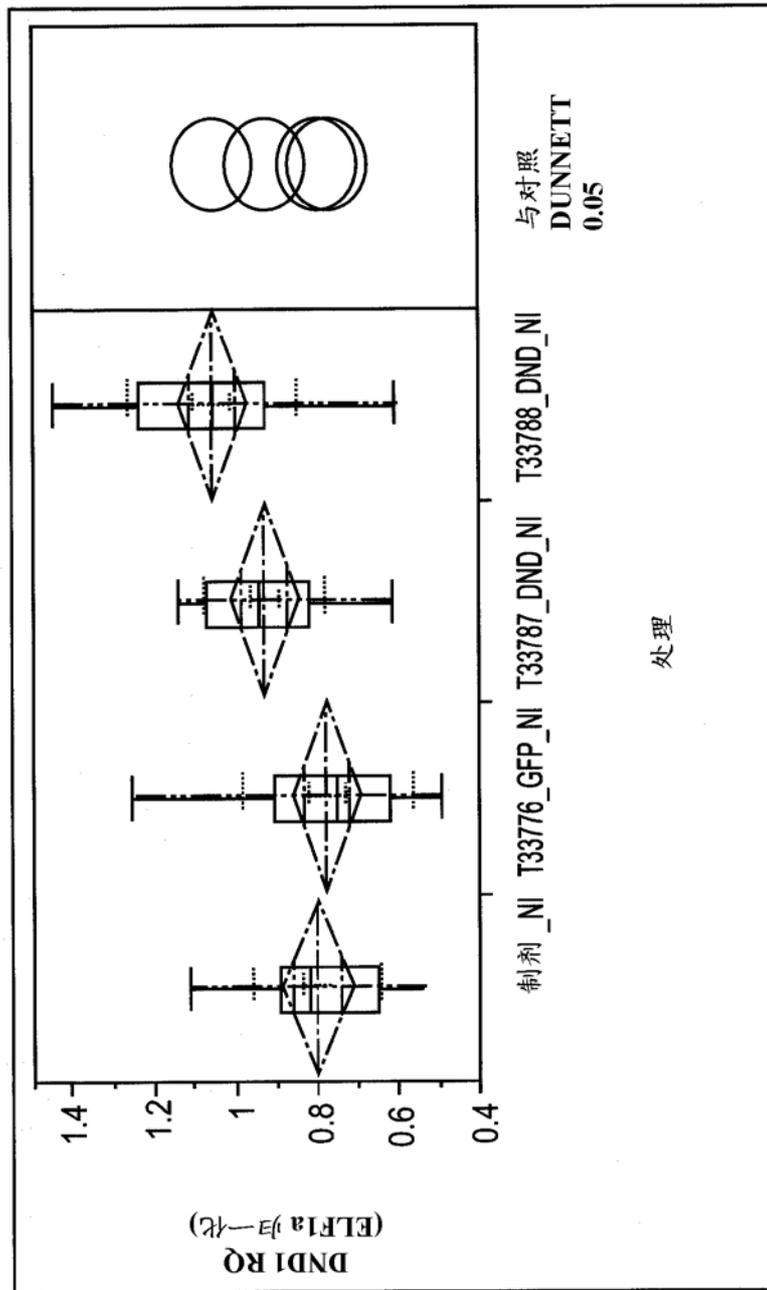


图 62A

黄瓜 quicksand PKN 百分比肿瘤形成

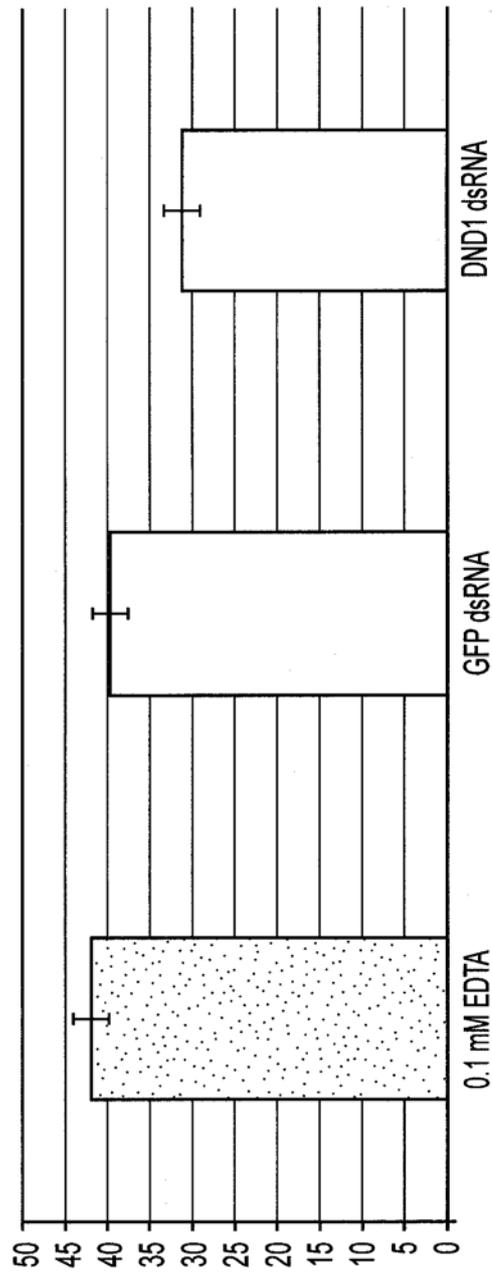


图 62B

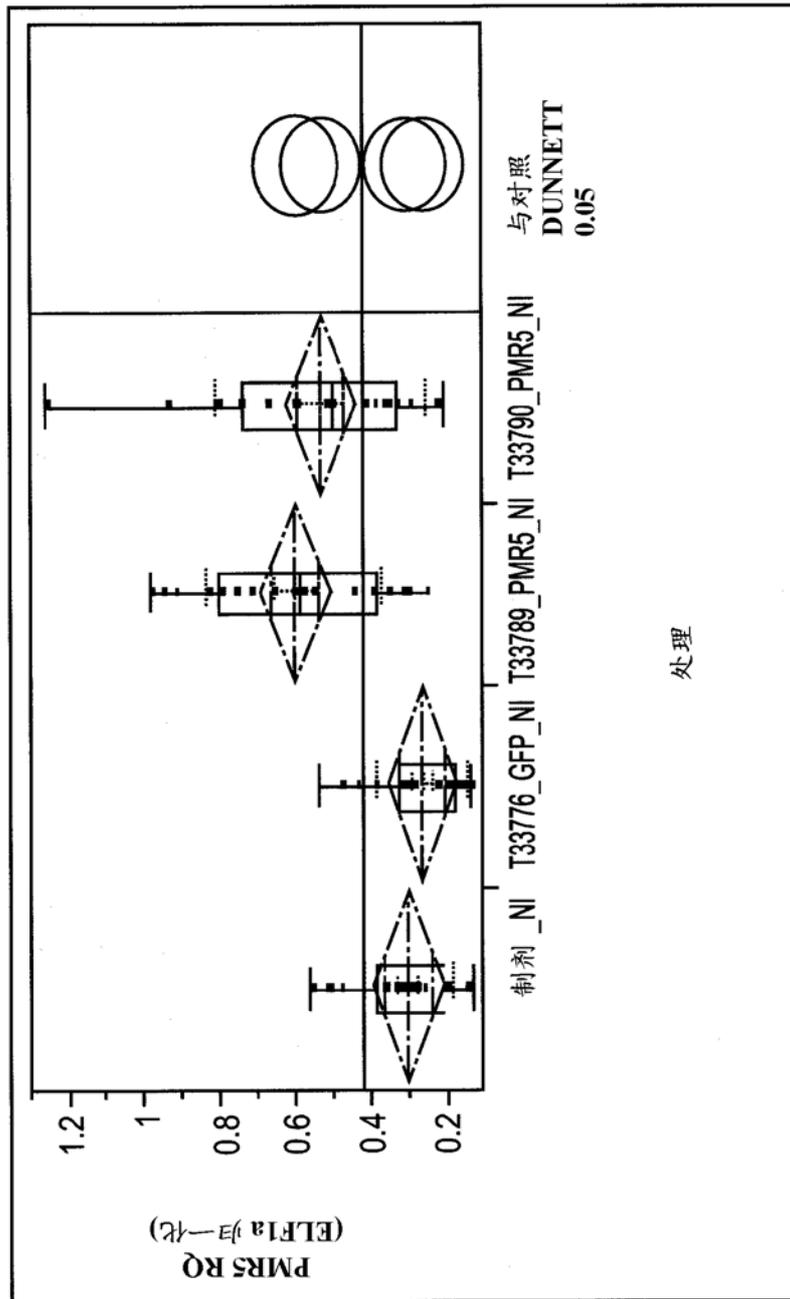


图 63

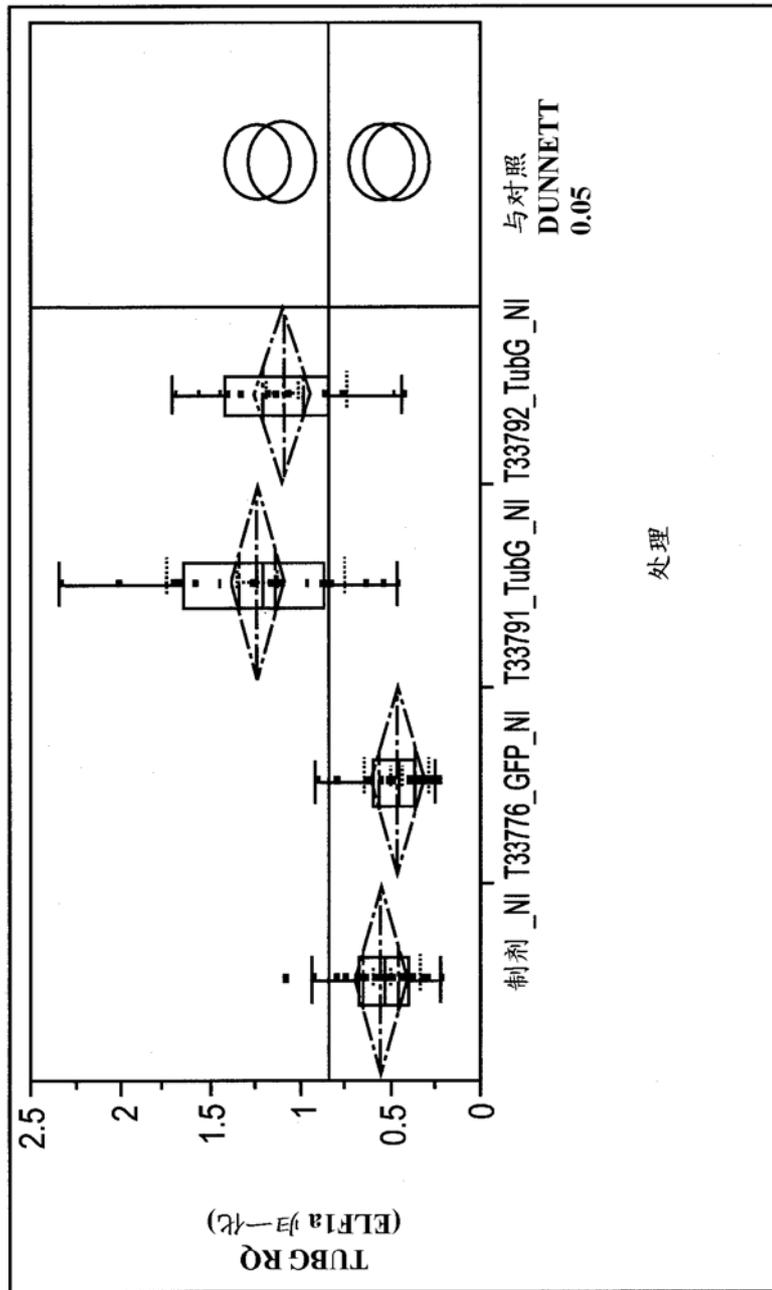


图 64

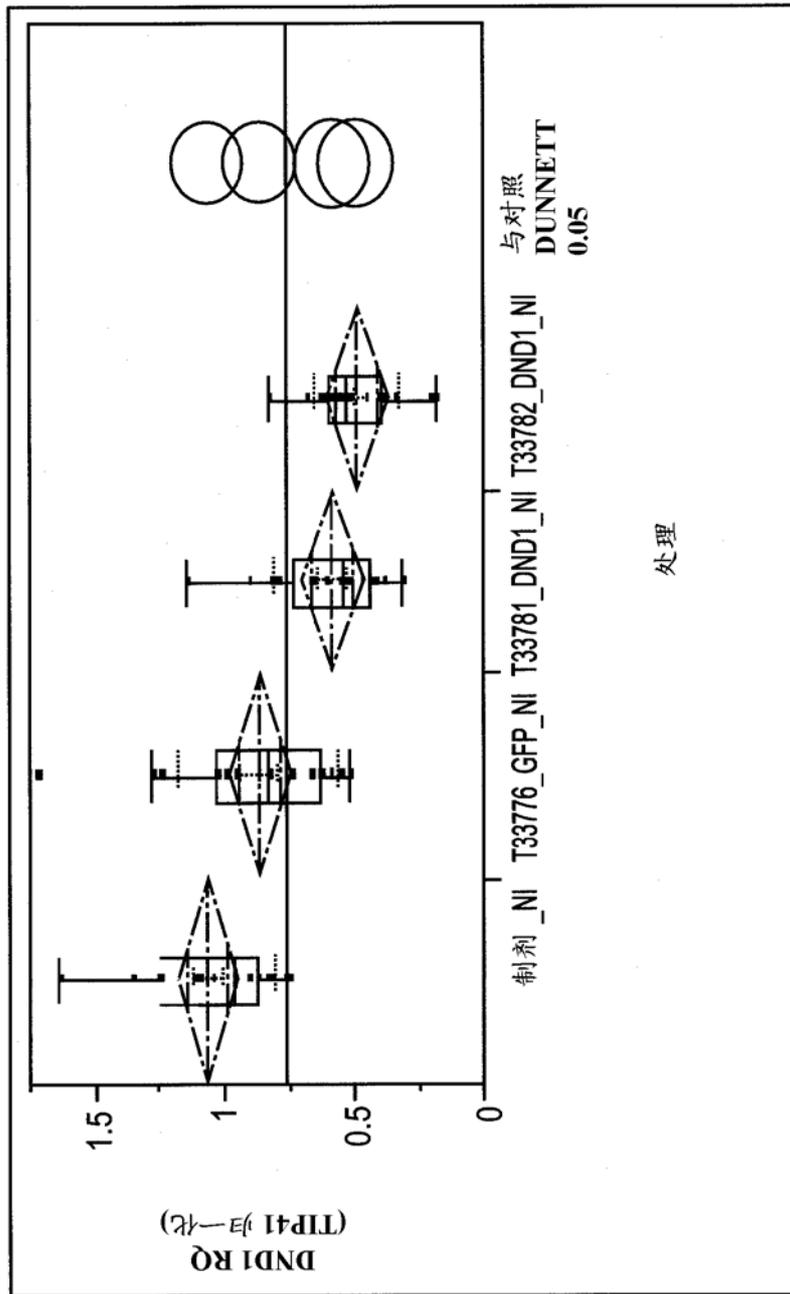


图 65

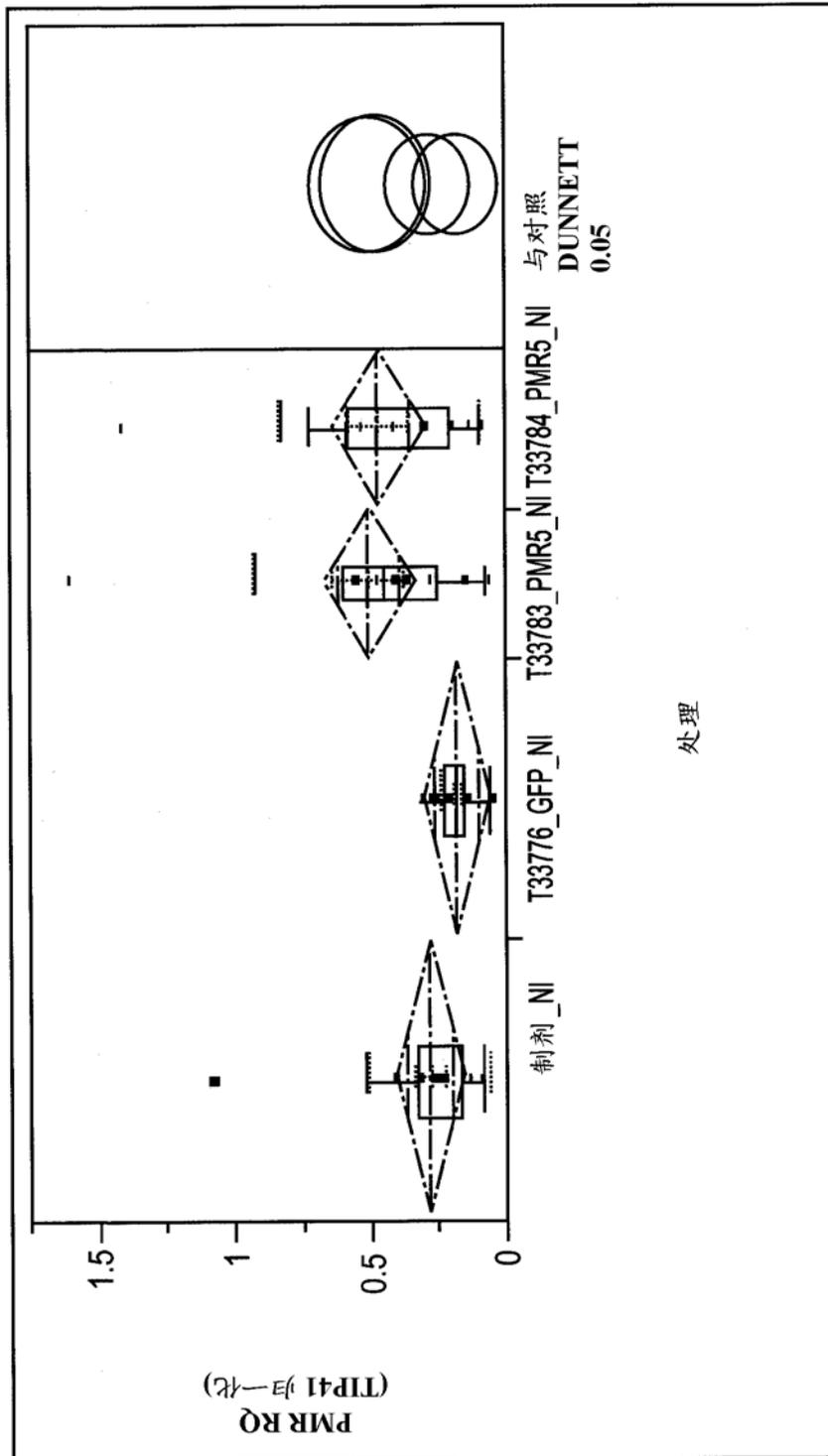


图 66

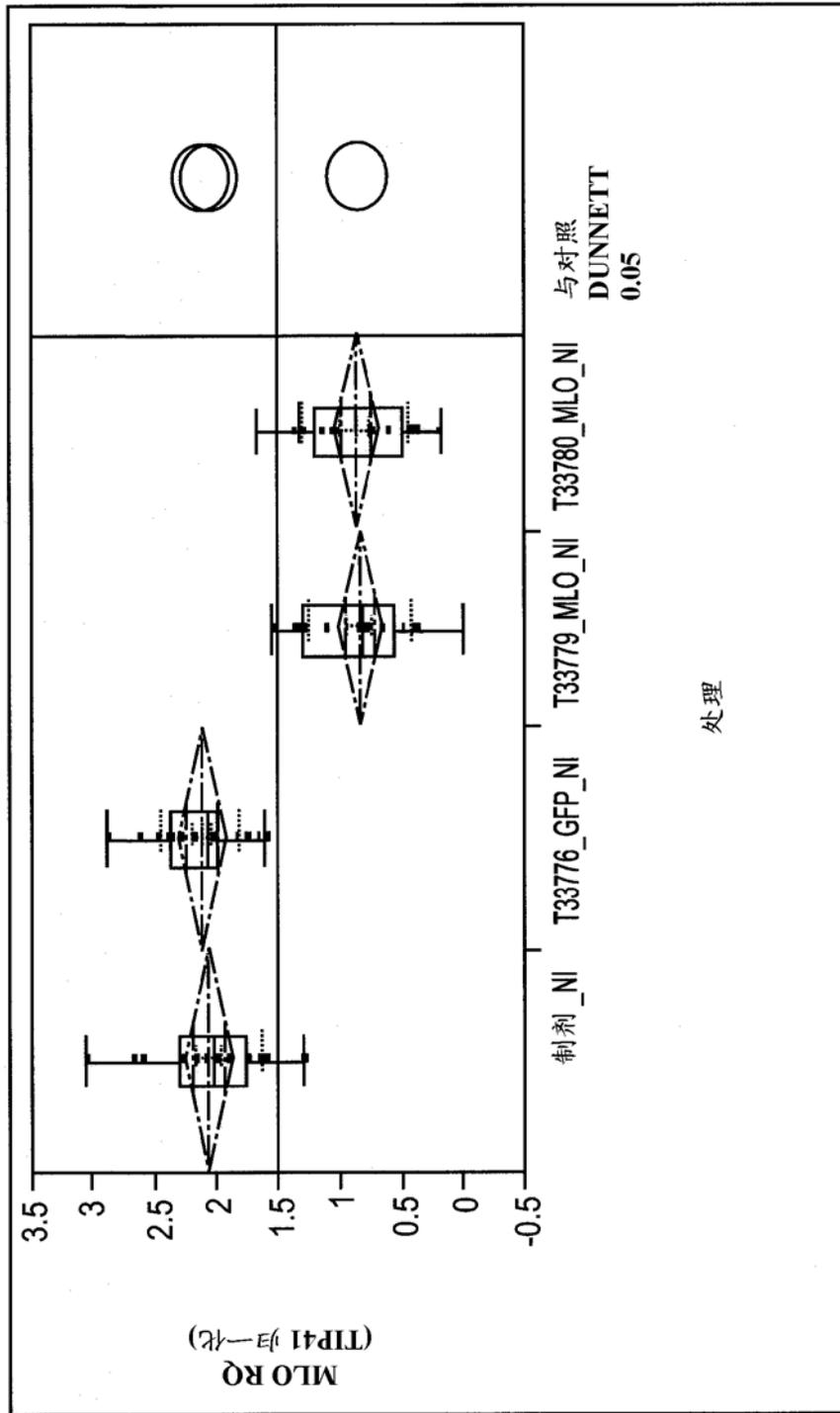


图 67

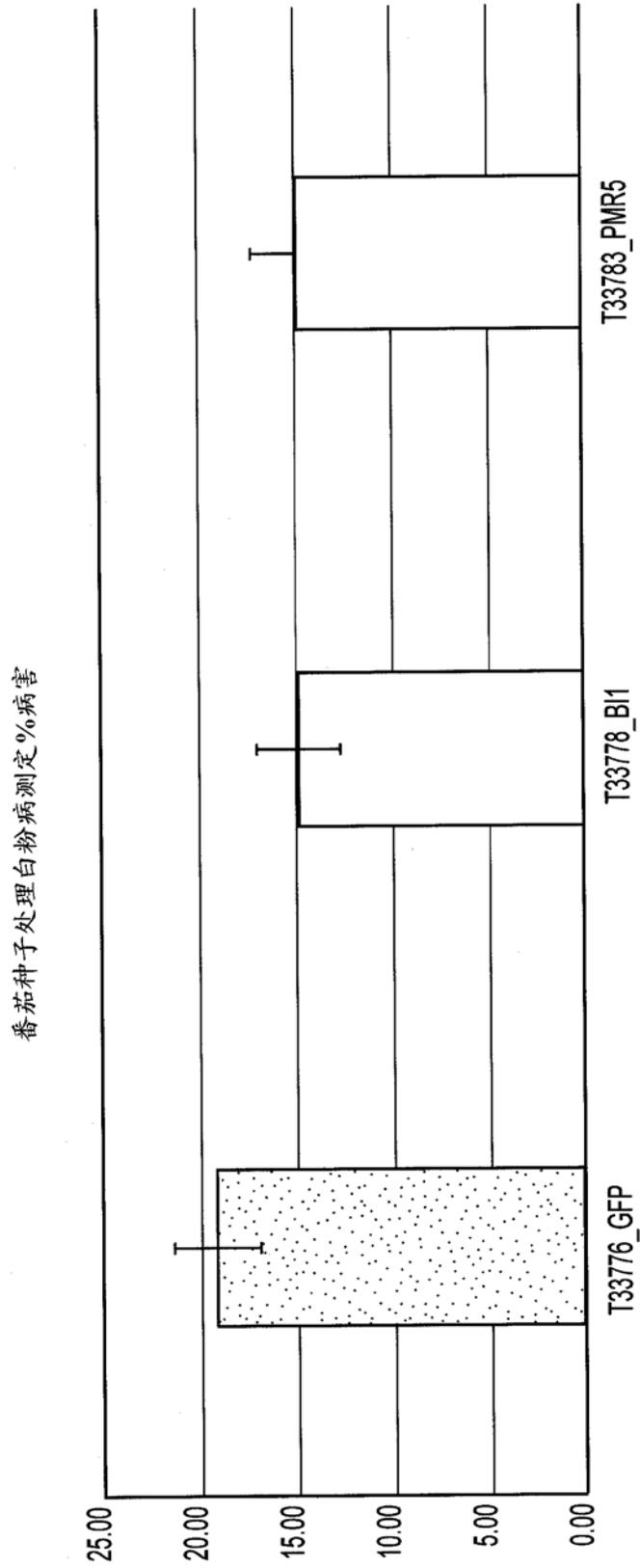


图 68

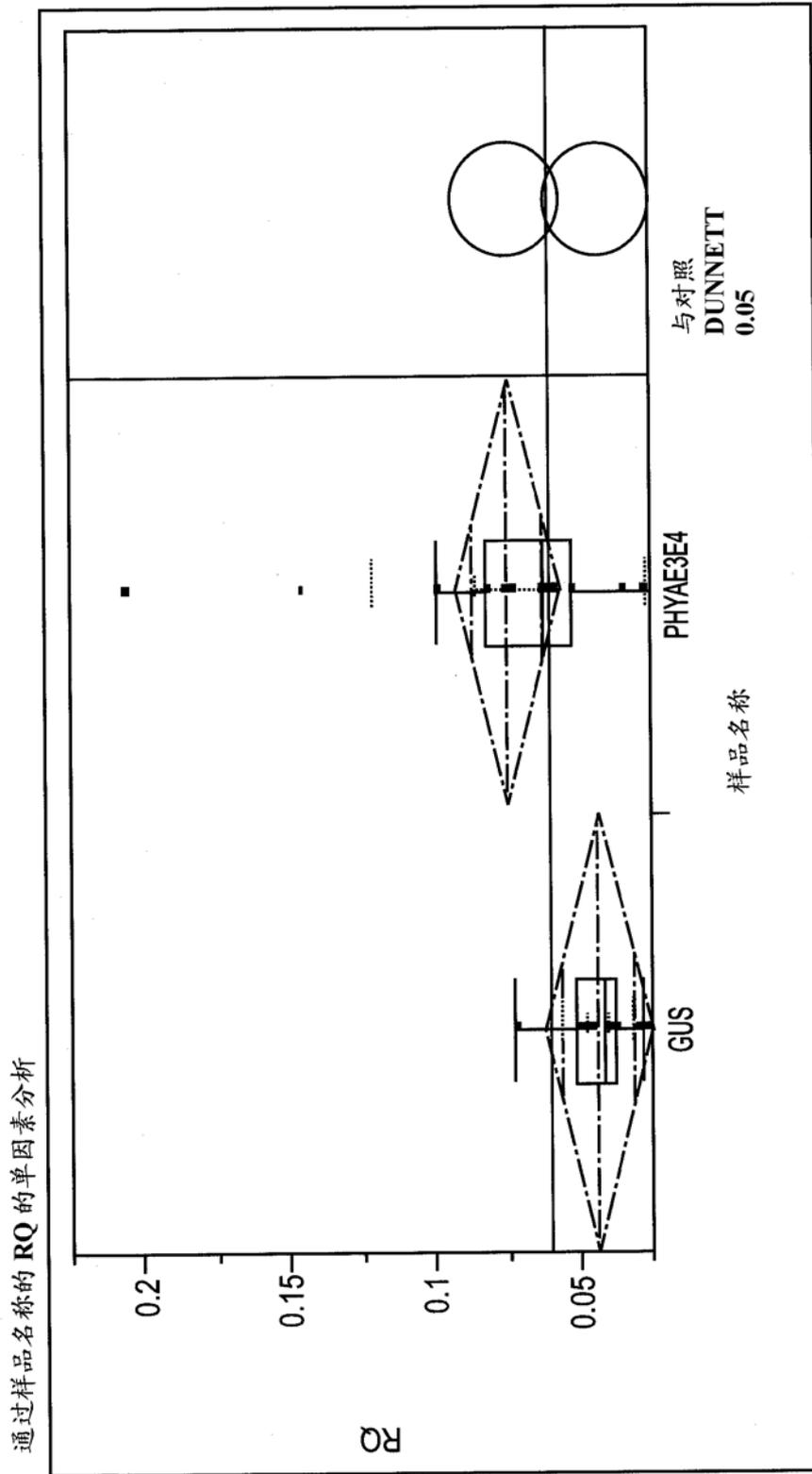


图 69