(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119072229 A
(43)申请公布日 2024.12.03

(21)申请号 202380030282.7
(22)申请日 2023.04.09
(30)优先权数据
292199 2022.04.12 IL
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.09.25
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IL2023/050380 2023.04.09
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/199314 EN 2023.10.19
(71)申请人 植物ARC生物技术有限公司
地址 以色列赖阿南纳
(72)发明人 德罗尔·沙利丁 诺姆·格林贝格 丹尼尔·贝沙尔 塔尔·科恩
(74)专利代理机构 成都超凡明远知识产权代理有限公司 51258
专利代理师 卢兴旺
(51)Int.Cl.
A01H 1/04(2006.01)
A01H 1/00(2006.01)
C12N 15/10(2006.01)
C12N 15/82(2006.01)
C12Q 1/6897(2006.01)

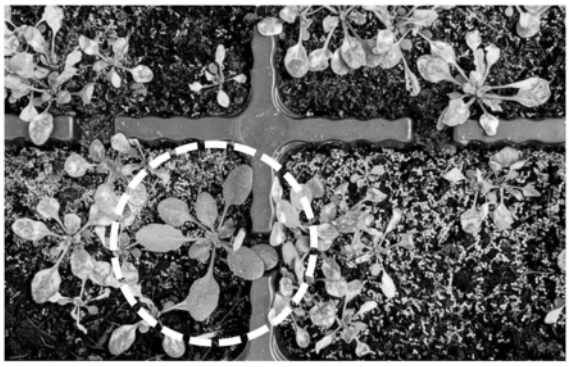
权利要求书2页 说明书34页
序列表（电子公布） 附图10页

(54)发明名称

优化植物基因表达的方法

(57)摘要

用于在植物内高通量评价作物植物的内源基因调控元件的方法,获得编码性状相关基因的天然调控元件的核酸,在该天然调控元件的多个拷贝中的每一个中引入一个或多个基因变化,利用高通量转化将基因文库引入至模型植物,筛选转化的模型植物,并识别选定模型植物的改变的调控元件中的一个或多个基因变化。



CN 119072229 A

1.一种用于在植物内高通量评价作物植物的内源基因调控元件的方法,所述方法包括以下步骤:

a.获得编码性状相关基因的天然调控元件的核酸,将其与报告基因的编码序列偶联;其中,所述调控元件是所述作物植物的调控元件;

b.在所述天然调控元件的多个拷贝中的每一个中引入一个或多个基因变化,从而获得包括大量改变的调控元件集合的基因文库;

c.利用高通量转化将所述基因文库引入至模型植物中,使得平均每个模型植物接收单个改变的调控元件;

d.筛选转化的模型植物,其中,所述筛选包括选择所述报告基因的表达水平/表型具有期望变化的模型植物;

e.识别选定模型植物的改变的调控元件中的一个或多个基因变化。

2.根据权利要求1所述的方法,进一步包括基于所述选定模型植物的改变的调控元件中一个或多个识别的基因变化,修饰所述作物植物的性状相关基因的天然调控元件。

3.根据权利要求1所述的方法,其中,所述天然调控元件位于报告子的编码序列的上游、下游或内部或其任何组合。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中,所述报告基因编码序列与所述性状相关基因的调控元件具有相同或不同的来源。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中,所述天然调控元件是启动子或其片段。

6.根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中,所述基因变化包括针对所述调控元件的随机区域、预测的热点和/或其组合的改变。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中,所述一个或多个基因变化选自一个或多个点突变、结构域交换、顺式元件重排、增强子添加和/或沉默子缺失。

8.根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中,所述将基因文库引入至模型植物中包括克隆到农杆菌二元载体中。

9.根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中,所述筛选报告基因的表达水平具有期望变化的模型植物包括满足预先确定的临界值。

10.根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中,所述性状相关基因/报告基因的表达水平/表型的期望变化包括所述改变的调控元件的转录活性的变化。

11.根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中,所述性状相关基因/报告基因的表达水平/表型的期望变化包括表达的时间、发育阶段、细胞定位、组织特异性和/或强度的一种或多种变化。

12.根据权利要求1-11中任一项所述的方法,其中,所述性状相关基因/报告基因的表达水平的期望变化包括与基因功能和/或活性增加相关的表达增加。

13.根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中,所述性状相关基因/报告基因的功能和/或活性增加赋予增强的植物抗性或提高的植物产量。

14.根据权利要求1-13中任一项所述的方法,其中,所述增强的抗性包括对除草剂、昆虫、疾病、热、冷、干旱、生物或非生物胁迫的耐受性。

15.根据权利要求1-14中任一项所述的方法,其中,所述增强的抗性包括除草剂耐受性

(HT)。

16.根据权利要求15所述的方法,其中,所述除草剂耐受性(HT)包括增加天然酶的表达,所述天然酶克服所述植物中所述除草剂的活性成分浓度,从而提高天然抗性。

17.根据权利要求16所述的方法,其中,所述天然酶是原卟啉原氧化酶(PPO1)、或对羟基苯丙酮酸双加氧酶(HPPD)、或5-烯醇丙酮酰莽草酸3-磷酸合酶(EPSPS)、或谷氨酰胺合酶、或乙酰乳酸合酶(ALS酶)、或7,8-二氢蝶酸合酶、或乙酰-CoA羧化酶(ACCase)。

18.根据权利要求1-17中任一项所述的方法,其中,所述期望的作物植物使用基因编辑工具生成。

19.一种基因编辑的作物植物或作物植物细胞,包括性状相关基因的基因编辑修饰的调控元件,其中,所述作物植物的性状相关基因的调控元件的修饰基于在选定模型植物的改变的调控元件中识别的一个或多个基因变化,所述基因变化与报告基因表达水平的期望变化有关,如权利要求1-18中任一项所述的方法所识别。

20.根据权利要求19所述的基因编辑的作物植物或作物植物细胞,其中,所述基因编辑导致天然酶的表达增加,从而增加所述植物对除草剂的天然抗性。

21.一种基因编辑的作物植物或作物植物细胞,其包括ppo1启动子,所述ppo1启动子经基因修饰以在一个或多个位置包括一个或多个突变,所述一个或多个位置对应于SEQ ID NO:2中所示的大豆启动子的-1229A、-1105T、-668A、-481T、-189A、-70T和-61T中的任何一个或多个位置。

22.根据权利要求21所述的基因编辑的作物植物或作物植物细胞,其中,所述一个或多个突变包括置换、添加和/或缺失。

23.根据权利要求21或22所述的基因编辑的作物植物或作物植物细胞,其中,所述一个或多个突变包括以下中的一个或多个:-1229A>C、-1105T>C、-668Adel、-668A>G、-481T>G、-189ins A、-189A>C、-189Adel、-70T>C和-61T>G。

24.根据权利要求21-23中任一项所述的基因编辑的作物植物或作物植物细胞,其中,所述一个或多个突变包括至少两个突变位置。

25.根据权利要求21-24中任一项所述的基因编辑的作物植物或作物植物细胞,其中,所述ppo1启动子包括与SEQ ID NO:2的至少90%序列同一性。

26.根据权利要求21-25中任一项所述的基因编辑的作物植物或作物植物细胞,其中,所述ppo1启动子包括SEQ ID NO:4-13中任一项所示的序列。

27.根据权利要求19-20中任一项所述的基因编辑的作物植物或作物植物细胞,或权利要求21-26中任一项所述的基因编辑的作物植物或作物植物细胞,其中,所述作物植物是大豆。

优化植物基因表达的方法

技术领域

[0001] 本发明总体上涉及改良植物性状的领域。更具体地,本发明涉及通过筛选植物中的基因元件文库并识别期望的性状表达水平来优化天然植物性状的表达。

背景技术

[0002] 具有改良性状的作物因产品产量和质量的提高而具有显著的经济影响。因此,增强对各种生物或非生物胁迫因素诸如除草剂、昆虫、疾病、极端高温和干旱的抗性是期望的且有利的特征,但目前的方法尚未全面解决这一问题。用于识别和改良性状的耗时方法(例如通过传统植物育种)以及伴随基因修饰(GMO)作物的基因工程的繁琐监管过程并不能提供完整、全面的解决方案。

[0003] 例如,最需要解决的问题是杂草与作物一起生长,除草剂的使用伴随着对作物的均匀性和产量的干扰。由于非期望的杂草生长而导致的产量和质量损失以及控制杂草的成本,对作物生产产生了重大的经济影响。据估计,如果在作物生长过程中不注意田间杂草,产量损失将达到约50%。因此,迫切需要使用各种除草剂来解决这一问题。此外,抗除草剂杂草的快速增加给全球粮食安全带来了巨大挑战,因为它可以降低作物产量,造成相当大的损失。连同缺乏新型除草剂,种植抗除草剂作物成为控制杂草的有效策略,因为这可以降低作物的药害,并扩大除草剂的范围。

[0004] 耐除草剂(HT)作物带来了好处,诸如减少使用量和引入现代且更安全的农用化学品的能力。

[0005] 一些最常见的GMO作物(诸如玉米、大豆、棉花和油菜)携带HT基因(诸如bar或pat),这些基因对谷氨酰胺合成抑制剂或基于草甘膦的除草剂(诸如Roundup)具有耐受性,后者靶向5-烯醇丙酮莽草酸3-磷酸合酶(EPSPS)。Roundup Ready植物携带编码这种酶的草甘膦不敏感形式的基因,其从农杆菌属(Agrobacterium sp.)的菌株CP4 EPSPS(Roundup)获得,或其他抗性基因。

[0006] 然而,针对HT的最先进的解决方案包括具有转化的内源基因的GMO作物,这种方法需要事先了解可以靶向或利用的性状相关基因。此外,过去几年公众对GMO技术的接受度下降,导致人们开始寻找新的且更环保的技术,诸如越来越难寻找的天然抗性。

[0007] 在一些情况下,植物天然基因的天然抗性机制被证明是克服胁迫因素所需的效率。例如,植物天然基因的表达水平高于正常水平,而这些基因是除草剂的靶标,导致HT增加,因为高水平的天然酶克服除草剂,从而赋予抗性。

[0008] 对于植物天然5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合酶(EPSPS)的高表达水平,观察到这种天然抗性,导致杂草对EPSPS抑制剂型除草剂(诸如草甘膦)产生抗性。

[0009] 因此,需要全面的解决方案来改善和优化植物的基因表达水平和/或表型。

发明内容

[0010] 根据一些方面,本文提供了用于在模型植物中高通量评价作物植物的内源基因调

控元件和/或作物植物的编码区的方法。每种可能性均是不同的实施方式。

[0011] 评价包括筛选包含大量改变的基因元件集合(即,调控元件或编码区)的植物基因文库,这些改变的基因元件在功能上与提供表型性状的报告基因相关,从而有利地允许在植物内(in-planta)选择报告基因表达的期望变化并识别引入至调控元件或编码序列中的相关基因变化。

[0012] 在一些实施方式中,该方法提供了对源自期望作物植物(例如,大豆、玉米、稻)的期望性状相关基因的大量改变的内源基因元件集合的高通量评估。

[0013] 在一些实施方式中,使用标准分子生物学工具进行诱变,在体外生成大量改变的内源基因元件集合,有利地允许(i)以高精确度完全覆盖具有突变的元件和(ii)将该集合转化成不同类型的植物(即,“模型植物”,诸如拟南芥(Arabidopsis)),其更易于操纵和筛选。

[0014] 有利地,如有需要,进行体外诱变步骤使源自作物植物的基因元件与其编码序列解离/解偶联。

[0015] 进一步有利的是改变的基因元件与报告基因(例如,除草剂耐受性、可视化基因(诸如GFP或类似基因))的功能关联/偶联,这提供了易于检测的表型性状,只需根据预先确定的临界浓度将除草剂施用于植物,和/或可视化标志物表达即可进行评估。

[0016] 在一些示例性实施方式中,使用这种方法可以生成嵌合pGmppo1-AtPPOX1基因(大豆(大豆(Glycine max))ppo1启动子与拟南芥(拟南芥(A.thaliana))PPOX1基因偶联)。

[0017] 创建转基因模型植物,如拟南芥,携带源自作物植物的大量突变的基因元件集合,与易于筛选的标志物(诸如HT)并列,有利于大规模的植物内筛选和选择改善性状表达的基因变化。

[0018] 在一些实施方式中,该方法能够高通量筛选性状的期望变化,而无需筛选单个作物植物中的突变。

[0019] 在一些实施方式中,在识别最初源自期望作物植物并引入至模型植物中的基因元件中的基因变化之后,可以使用基因编辑方法生成基因修饰的作物植物,解决识别的相关突变。

[0020] 因此,有利地,所公开的发明绕过了筛选作物植物的改善性状的突变的低效步骤。

[0021] 在一些实施方式中,本公开的拟南芥植物相对于源自其他重要作物植物的改变的基因元件是转基因的。

[0022] 在一些实施方式中,本公开的报告基因(例如,除草剂耐受性)允许评估活植物/有活力的植物中的优化水平。(即不需要进行染色测定或任何破坏植物的步骤)。

[0023] 在一些实施方式中,将基因变化引入至转基因基因元件中,这些转基因基因元件是筛选的对象并且源自期望的靶作物植物。

[0024] 对基因的调控元件序列引入变化(并且在某种程度上是其编码序列)可以导致基因表达模式发生改变/改善,然而,尚不清楚这些改变中的哪些将导致期望的表达模式以及如何发现这些改变,这组合起来可以代表待构建约10,118,250个不同序列并筛选1500bp的基因元件的问题。

[0025] 为了克服或绕过这些限制,在一些实施方式中,本公开提供了一种方法,其有利地允许在拟南芥中筛选源自作物植物的数万至数百万个单独突变的基因元件。在一些实施方

式中,使用拟南芥来携带来自作物植物的改变的基因元件允许应用在体外而不是在作物植物的细胞系统内进行的简单突变生成测定。

[0026] 在一些实施方式中,本公开的方法包括体外诱变,从而允许任何核苷酸可以被突变。在一些实施方式中,该方法没有脱靶效应。在一些实施方式中,该方法产生真正完全被突变覆盖的基因元件。

[0027] 本公开的方法有利地将改变的基因元件集合与提供易于检测的表型性状(诸如除草剂耐受性状(HT性状))的报告基因偶联。在一些实施方式中,使用HT性状作为报告基因允许仅通过根据预先确定的临界浓度施用/喷洒相关除草剂来进行真正大规模的自动植物内筛选。

[0028] 在一些实施方式中,通过将HT性状或类似性状与感兴趣的改变的基因元件集合结合,可以将自动大规模筛选应用于任何感兴趣的性状相关基因。

[0029] 例如,在一些实施方式中,HT性状或类似性状是有利的,其中对性状的评估需要评估对每个单个植物的影响,诸如影响植物产量的性状。

[0030] 在一些实施方式中,报告基因是拟南芥的除草剂耐受性(HT)相关原卟啉原氧化酶(PPOX1)基因(AtPPOX1),其导致表现出对PPO抑制剂(诸如,但不限于:恶草酮(Oxadiazon)、丙炔氟草胺(Flumioxazin)或唑酮草酯(Carfentrazone Ethyl))具有增强抗性的期望/有益的表型性状,从而允许对表现出与该性状功能偶联的任何期望作物植物的任何天然基因的改变的调控元件的期望表达变化的模型植物进行高通量筛选。

[0031] 因此,本文公开的筛选提供了用于在植物内选择和识别具有优化活性的新型基因元件的方法,这有利于提供任何内源基因在植物内表达水平、活性和/或表达模式的期望改进。

[0032] 有利地,本文公开的筛选利用报告基因(例如,HT基因)的表达来高通量筛选调控元件(调控元件优选源自作物植物,例如,干旱相关基因的启动子)以识别优化的调控元件。因此,可以通过监测报告基因表达和/或模型植物表型的变化(例如,增加的除草剂耐受性、荧光水平等)在模型植物中进行筛选,这是由于其与调控元件的特定改变版本功能偶联。

[0033] 根据一些实施方式,所识别的基因元件经优化以表达与性状相关的基因,例如,提供除草剂耐受性(HT)的基因,其水平提供有利的性状增强,例如,作物植物对除草剂的抗性。

[0034] 此外,本文公开了具有改善的天然除草剂耐受性(HT)的作物植物。基因编辑的植物包括通过该方法先前识别的调控元件的基因变化,以赋予增强的天然抗性。

[0035] 根据一些实施方式,提供了用于在植物内高通量评价内源基因调控元件的方法,该方法包括以下步骤:获得编码性状相关基因的天然调控元件的核酸,将其与报告基因的编码序列偶联;并且其中,该调控元件是作物植物的调控元件;在该天然调控元件的多个拷贝中的每一个中引入一个或多个基因变化,从而获得包括大量改变的调控元件集合的基因文库;利用高通量转化将该基因文库引入至模型植物中,使得平均每个模型植物接收单个改变的调控元件;筛选转化的模型植物,其中,该筛选包括选择报告基因的表达水平/表型具有期望变化的模型植物;识别选定模型植物的改变的调控元件中的一个或多个基因变化。每种可能性均是单独的实施方式。

[0036] 根据一些实施方式,该方法进一步包括基于选定模型植物的改变的调控元件中一

个或多个识别的基因变化来修饰该作物植物的性状相关基因的天然调控元件。

[0037] 根据一些实施方式,天然调控元件位于报告子的编码序列的上游、下游或内部或其任何组合。

[0038] 根据一些实施方式,天然调控元件源自作物植物。

[0039] 根据一些实施方式,报告基因编码序列与性状相关基因的调控元件具有相同或不同的基因。

[0040] 根据一些实施方式,天然调控元件是启动子或其片段。

[0041] 根据一些实施方式,该方法进一步包括应用算法来预测天然调控元件中的假定热点(hot-spot/hot spot),并且其中,引入一个或多个基因变化包括将一个或多个基因变化靶向热点。

[0042] 根据一些实施方式,基因变化包括针对调控元件的随机区域、预测的热点和/或其组合的改变。

[0043] 根据一些实施方式,一个或多个基因变化选自一个或多个点突变、结构域交换、顺式元件重排、增强子添加和/或沉默子缺失。

[0044] 根据一些实施方式,将基因文库引入至模型植物中包括克隆到农杆菌(Agrobacterium)二元载体中。

[0045] 根据一些实施方式,筛选报告基因的表达水平具有期望变化的模型植物包括满足预先确定的临界值。

[0046] 根据一些实施方式,性状相关基因/报告基因的表达水平/表型的期望变化包括改变的调控元件的转录活性的变化。

[0047] 根据一些实施方式,性状相关基因/报告基因的表达水平/表型的期望变化包括报告基因表达的时间、发育阶段、细胞定位、组织特异性和/或强度的一种或多种变化。

[0048] 根据一些实施方式,性状相关基因/报告基因的表达水平的期望变化包括与基因功能和/或活性增加相关的表达增加。

[0049] 根据一些实施方式,性状相关基因/报告基因的功能和/或活性增加赋予增强的植物抗性或提高的植物产量。

[0050] 根据一些实施方式,增强的抗性包括对除草剂、昆虫、疾病、热、干旱、生物或非生物胁迫的耐受性。

[0051] 根据一些实施方式,增强的抗性包括除草剂耐受性(HT)。

[0052] 根据一些实施方式,除草剂耐受性(HT)包括增加天然酶的表达,该天然酶克服植物中除草剂的活性成分浓度,从而提高天然抗性。

[0053] 根据一些实施方式,该天然酶是原卟啉原氧化酶(PPO1)、或对羟基苯丙酮酸双加氧酶(HPPD)、或5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶(EPSPS)、或谷氨酰胺合酶,或乙酰乳酸合酶(ALS酶)、或7,8-二氢蝶酸合酶、乙酰-CoA羧化酶(ACCase)或其任何组合。每种可能性均是单独的实施方式。

[0054] 根据一些实施方式,使用基因编辑工具生成期望的作物植物。

[0055] 根据一些实施方式,提供了基因编辑的作物植物或作物植物细胞,其包括性状相关基因的修饰的调控元件,其中,该作物植物的性状相关基因的调控元件的修饰基于在选定模型植物的改变的调控元件中识别的一个或多个基因变化,该基因变化与报告基因表达

水平的期望变化有关,如本文公开的方法所识别。

[0056] 根据一些实施方式,提供了基因编辑的作物植物或作物植物细胞,其包括包含性状相关基因的编码序列的修饰的基因元件,其中,包括作物植物的性状相关基因的编码序列的基因元件的修饰基于在包括选定模型植物的编码序列的改变的基因元件中识别的一个或多个基因变化,该基因变化与报告基因表达水平的期望变化相关,如本文公开的方法所识别。

[0057] 根据一些实施方式,基因编辑导致天然酶的表达增加,从而增加植物对除草剂的天然抗性。

[0058] 根据一些实施方式,该天然酶是原卟啉原氧化酶(PPO1)、或对羟基苯丙酮酸双加氧酶(HPPD)、或5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶(EPSPS)、或谷氨酰胺合酶、或乙酰乳酸合酶(ALS酶)、或7,8-二氢蝶酸合酶、乙酰-CoA羧化酶(ACCase)或其任何组合。每种可能性均是单独的实施方式。

[0059] 根据一些方面,提供了构建体,其包括与除草剂耐受性(HT)基因偶联且功能相关的植物性状相关基因的基因修饰的启动子。

[0060] 根据一些实施方式,基因修饰的启动子源自植物性状相关基因的内源启动子。

[0061] 根据一些实施方式,基因修饰的启动子源自作物植物的内源启动子。

[0062] 根据一些实施方式,除草剂耐受性(HT)基因对于作物植物是外源的。

[0063] 根据一些方面,提供了基因编辑的作物植物或作物植物细胞,其包括ppo1启动子,该ppo1启动子经基因修饰以在一个或多个位置包括一个或多个突变,该一个或多个位置对应于SEQ ID NO:2中所示的大豆启动子的-1229A、-1105T、-668A、-481T、-189A、-70T和-61T中的任何一个或多个位置。

[0064] 在一些实施方式中,提供了基因编辑的作物植物或作物植物细胞,其中,该作物植物是大豆。

[0065] 在一些实施方式中,基因编辑的作物植物或作物植物细胞,其中,该一个或多个突变包括置换、添加和/或缺失。

[0066] 在一些实施方式中,基因编辑的作物植物或作物植物细胞,其中,该一个或多个突变包括以下一个或多个:-1229A>C、-1105T>C、-668A del、-668A>G、-481T>G、-189ins A、-189A>C、-189A del、-70T>C和-61T>G。

[0067] 在一些实施方式中,基因编辑的作物植物或作物植物细胞,其中,该一个或多个突变包括至少两个突变位置。

[0068] 在一些实施方式中,基因编辑的作物植物或作物植物细胞,其中,ppo1启动子与SEQ ID NO:2具有至少90%序列同一性。

[0069] 在一些实施方式中,基因编辑的作物植物或作物植物细胞,其中,ppo1启动子包括SEQ ID NO:4-13中任一项所示的序列。

[0070] 本发明的进一步实施方式、特征、优势和全部适用范围将根据下文给出的详细描述和附图而变得显而易见。然而,应当理解,虽然该详细描述指示了本发明的优选实施方式,但是其仅以示例的方式给出,因为根据该详细描述,在本发明的精神和范围内的各种改变和修改对于本领域技术人员而言将变得显而易见。

附图说明

[0071] 现将参考以下说明性附图,针对某些实例和实施方式来描述本发明,以便能够更全面地理解本发明。

[0072] 图1A-图1B显示了用于克隆原卟啉原氧化酶(PPO1)基因的调控元件和/或编码序列的二元载体骨架(pPA35H)的不同组成部分的图示。RB和LB分别是右边界和左边界重组位点。BlpR是双丙氨膦抗性基因,用作植物转化的正选择标志物。Pro是启动子位点。Ter是终止子位点。图1A示出了将拟南芥(拟南芥(A.thaliana))原卟啉原氧化酶编码序列(AtPPOX1)克隆到大豆(大豆)原卟啉原氧化酶启动子序列(pGmppo1)下游,从而创建嵌合pGmppo1-AtPPOX1序列。图1B示出了大豆原卟啉原氧化酶编码序列(GmPPO1)与其启动子pGmppo1一起克隆,创建大豆PPO1基因pGmppo1-GmPPO1的天然序列。

[0073] 图2A示出了具有调控区/元件和编码区/序列的植物基因的一般结构。调控元件可以位于近端和远端启动子区的上游,并且可以顺式或反式作用以影响基因的表达水平。调控元件还可以位于基因的非翻译区(5'-UTR和3'-UTR)的编码区/序列内。可以将基因改变引入至调控区/元件和/或编码区/序列。

[0074] 图2B-2C示出了克隆到二元载体中并在启动子调控元件(图2B)中或在编码序列内的蛋白翻译区(图2C)中携带突变序列(标记为X)的性状相关基因的基因元件。当通过靶向翻译产物来优化性状相关基因的表达水平时,突变被引入至编码区中,并且翻译的蛋白产物可以表达为融合蛋白,与报告基因融合,如图2C所示。

[0075] 图3A示出了克隆和随机突变大豆PPO基因(pGmPPO1)的天然启动子调控元件的过程的步骤I-V。

[0076] 图3B是形成突变文库的沿pGmppo1启动子的每个位置的突变数的分布直方图,因为其从随机菌落扩增,并在易错PCR诱变后进行测序。嵌合pGmppo1-AtPPOX1(上小图)或pGmppo1-GmPPO1(下小图)。

[0077] 图3C展示了PPO除草剂耐受植物的植物内功能筛选测定的代表性图片。最初在草铵膦上选择T1转化植物,以识别在PPO1启动子(pGmppo1)中包含基因变异的转基因植物。通过用$5x10^{-3}$%恶草酮(Star)喷洒植物进行功能选择。白色圆圈绘出转基因PPO耐受植物,包含PPO1启动子(pGmppo1)中的期望基因变化,周围是多个易感植物,包含其他非耐受增强PPO启动子。

[0078] 图3D通过功能性除草剂选择测定揭示的突变分布分析。每条线代表在单个选定事件中在pGmppo1启动子区的序列中发现的基因变化(突变)。每个点表示突变的位置。实心点表示在多于一个事件中检测到的突变。空心点表示置换突变,X表示缺失突变。V表示插入突变。

[0079] 图4示意性地示出优化植物中性状相关基因表达的过程。在选择和克隆天然性状相关基因的调控元件和/或编码序列元件后,校准筛选测定以预先确定选择条件。同时,在模型植物中以高通量方式构建、转化和筛选包括大量10^3-10^6个改变的基因调控元件和/或改变的编码序列元件集合的基因文库。识别并重新转化导致性状相关基因/报告基因的基因表达发生期望变化的选定基因改变,随后可以对作物植物的内源启动子/编码序列进行基因编辑,以复制识别的导致优化表达的变化。

具体实施方式

[0080] 在以下描述中,将描述本公开的各个方面。为了解释的目的,阐述了具体的配置和详细信息,以全面理解本公开的不同方面。然而,对于本领域技术人员而言将显而易见的是,本公开可以在本文没有提供具体详情的情况下实施。此外,为了不使本公开难以理解,可以省略或简化熟知的特征。

[0081] 为了方便,此处收集了本说明书、实例和所附权利要求中使用的某些术语。除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语均具有与所属领域普通技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0082] 定义

[0083] 为了便于理解本发明,以下定义了一些术语和短语。应理解,这些术语和短语是为了描述目的,而不是为了限制,使得本说明书中的术语或短语应由本领域技术人员根据本文提供的教导和指导,结合本领域普通技术人员的知识进行解释。

[0084] 如本文所用,“植物”是指处于任何发育阶段的任何植物,包括植物种子。术语“植物”包括整个植物或其任何部分或衍生物,诸如植物细胞、植物原生质体、可再生植物的植物细胞组织培养物、植物愈伤组织(callus)或多个愈伤组织(calli)、分生细胞、小孢子、胚胎、未成熟的胚胎、花粉、胚珠、花药、果实、花、叶、枝、茎、插条、子叶、雌蕊、种子、种皮、根、根尖等。

[0085] 如本文所用,术语“作物植物”和“作物”可以互换使用,并且是指任何可以广泛种植和收获以获取利润或维持生计的植物。作物可以是指收获的部分,也可以是指处于更精制状态的收获。大多数作物用于农业或水产养殖。作物可以包括大型真菌(例如,蘑菇)或大型海洋藻类(例如,海藻)。大多数作物被收获作为人的食物或牲畜的饲料。一些作物从野外采集(包括密集采集,例如人参、育亨宾、杜仲)。重要的非粮食作物包括园艺、花卉、观赏植物、林木和植物以及工业作物。园艺作物包括用于其他作物的植物(例如果树)。花卉作物包括花坛植物、室内植物、开花植物和盆栽植物、切花栽培绿叶植物和切花。工业作物用于服装(纤维作物,例如棉花)、生物燃料(能源作物、藻类燃料)或药物(药用植物)。

[0086] 如本文所用,术语“模型植物”可以是指通常来自广泛研究的植物物种的任何植物,这些植物被选择用于便于研究特定的生物现象。模型植物提供了与其他植物(诸如作物植物)相关的生物学见解。根据一些实施方式,作物植物可以是模型植物。

[0087] 如本文所用,术语“天然”是指植物中天然存在的内源序列。术语“天然的”、“天然地”和“内源地”可以互换使用。

[0088] 例如,如本文所用,在一些实施方式中,天然序列是植物中天然存在的任何内源基因或DNA区段。在一些实施方式中,天然序列是植物中天然存在的内源调控元件。在一些实施方式中,天然序列是植物中天然存在的内源编码区。

[0089] 如本文所用,术语DNA“区”、DNA“区段”、DNA“序列”和DNA“元件”可以互换使用,并且是指DNA的一部分。

[0090] 如本文所用,术语“DNA的一部分”是指DNA的任何部分,无论是DNA的非编码区段还是DNA的编码区段。

[0091] 如本文所用,术语“非编码序列”可以是指调控元件,诸如,但不限于,启动子和/或增强子。根据一些实施方式,非编码序列可以是基因的5’或3’UTR。根据一些实施方式,非编

码序列可以是内含子。

[0092] 如本文所用,术语“编码序列”可以是指编码功能性转录物和/或蛋白的基因部分。编码序列包括非翻译区(UTR)和蛋白翻译区(阅读框架)。术语“编码序列”和“编码区”可以互换使用。

[0093] 如本文所用,术语“性状”是指源自特定序列或序列组的表型。表型性状具有可以测量的可检测特征。如本文所用,术语“性状”或“表型性状”可以互换使用。性状可以源自天然序列,也可以不源自天然序列。

[0094] 如本文所用,性状赋予植物改良的特性,诸如期望/有益的属性。

[0095] 据此,如本文所用,术语“性状相关序列”或“性状相关基因”是指性状所源自或受其影响的一种或多种基因/一种或多种基因型。术语“性状相关序列”和“性状相关基因”可以互换使用,并且可以是指基因的DNA编码序列或基于该编码序列生成(即转录和/或翻译)的该基因的功能产物。性状相关基因可以是天然的,也可以不是天然的。

[0096] 根据一些实施方式,性状相关基因是作物植物的性状相关基因。

[0097] 例如,如在本发明的上下文中所使用的,在一些实施方式中,性状赋予改进的特征,该改进的特征是工业上期望的/有益的属性,包括但不限于对除草剂、昆虫和疾病或其他生物胁迫的抗性,对热、干旱或其他非生物胁迫的耐受性,缩短作物成熟时间,提高产量,改善肥料吸收,改进工业加工,诸如将淀粉或生物质转化成可发酵糖,以及改善农学品质,诸如高油含量和高蛋白含量。每种可能性均是单独的实施方式。

[0098] 如本文所用,术语“报告基因”可以是指与调控元件功能性偶联并且可以监测其表达的编码序列,从而能够评价调控元件在引起报告基因表达方面的有效性。根据一些实施方式,报告基因可以是性状相关基因,例如除草剂耐受性(HT)基因。根据一些实施方式,报告基因可以是外源基因,通常不在植物中表达,诸如但不限于GFP。

[0099] 根据一些实施方式,报告基因和性状相关基因是相同或不同的基因。

[0100] 报告基因的非限制性实例包括除草剂耐受性基因、GFP、RUBY(甜菜红素)。

[0101] 根据一些实施方式,报告基因能够在活的和/或有活力的植物中进行评估。

[0102] 根据一些实施方式,报告基因提供颜色。根据一些实施方式,颜色的强度与性状或由性状提供的天然抗性的改善/优化/增强的水平相关。每种可能性均是单独的实施方式。

[0103] 如本文所用,术语“耐受性”和“抗性”可以互换使用。

[0104] 例如,如在本发明的上下文中所使用的,在一些实施方式中,植物的天然性状相关基因原卟啉原氧化酶(PPO1)的高表达水平导致表现出期望的/有益的作物植物性状(除草剂耐受性(HT)),因为该基因的酶活性可以克服除草剂活性,从而赋予对PPO抑制剂型除草剂的抗性(第14组,其包括活性组:二苯醚、N-苯基邻苯二甲酰亚胺、噻二唑、三唑啉酮、N-苯基噁二唑酮、苯基吡唑),诸如丙炔氟草胺、恶草酮、氟磺胺草醚(fomesafen)、嗪草酸(fluthiacet)、唑草酮(carfentrazone)、甲磺草胺(sulfentrazone)或其他。

[0105] 另一种实例,如本文在本发明的上下文中所使用的,在一些实施方式中,评价的性状可以是报告子的性状,诸如荧光、发光或在研发过程中用于筛选目的的其他最先进的分子报告子。一旦达到报告子的期望表达水平,就可以针对内源基因实施被确定为可归因于期望表达水平的调控元件的改变。

[0106] 另一实例,如本文在本发明的上下文中所使用的,在一些实施方式中,绿色荧光蛋

白(GFP)的非天然性状相关序列的表达导致表现出具有可检测荧光信号的表型性状。

[0107] 如本文所述,影响或改变性状或性状相关基因的“表达水平”包括表达强度、活性/功能效率的降低或增加,以及性状表达模式的变化。如本文所述,影响或改变基因的“表达模式”包括表达的时间、发育阶段、细胞定位、组织特异性和/或强度的一种或多种变化。

[0108] 如本文所述,术语“性状表达的期望变化”或“性状相关基因表达的期望变化”可以互换使用,并且是指植物内性状相关基因或性状的水平、表达模式和/或活性/功能的优化。

[0109] 如本文所述,在一些实施方式中,优化的水平包括性状或性状相关基因表达强度的增加或减少。在一些实施方式中,优化的模式包括性状或性状相关基因表达模式的变化,包括表达的时间、发育阶段、细胞定位、组织特异性表达和/或表达强度的一种或多种变化。每种可能性均是单独的实施方式。在一些实施方式中,优化的功能/活性包括酶活性、结构活性、信号传导、配体结合功能或报告子活性的变化。每种可能性均是单独的实施方式。

[0110] 根据一些实施方式,术语“性状表达的期望变化”或“性状相关基因/报告基因表达的期望变化”是指内源基因调控元件的转录活性的优化,并且包括由于改变的调控元件而导致的转录活性变化。

[0111] 根据一些实施方式,术语“性状表达的期望变化”或“性状相关基因/报告基因表达的期望变化”是指编码序列的优化,并且包括由于改变的编码序列元件而导致的基因产物的功能/活性的变化。

[0112] 性状相关基因的表达水平、模式和/或活性/功能的期望变化包括满足预先确定的临界值,其用于筛选和选择引入天然调控元件和/或编码序列中的基因变化的植物。用于选择改变的基因元件(调控元件或编码序列)的临界值是根据它们所来源的元件预先确定的。

[0113] 如本文所用,术语“预先确定的临界值”是指筛选表现出性状表达水平的期望变化的单个植物的过程。预先确定的临界值通过将转化有基因元件的植物暴露于选择条件进行确定,该选择条件包括“选择条件”的强度(strength)和/或烈度(intensity)的逐渐变化以及基于“选择标准”的选择。临界值可以是预先确定的,例如对预先确定水平的除草剂的抗性,或通过实验设定(例如根据致死剂量实验)。然后,设定临界值以筛选和选择携带改变的基因元件(改变的调控元件或改变的编码序列)的植物,用于表现出性状的期望表达水平。因此,选择调控元件的临界值优选地相对于其来源的元件预先确定。根据一些实施方式,满足预先确定的临界值代表对具有改变的基因元件的植物与具有它们来源的天然基因元件的植物之间获得的表达水平进行比较。

[0114] 如本文所用,术语“选择条件”是指为了选择目的而诱导胁迫的条件。在一些实施方式中,选择是期望的性状表达。选择条件的非限制性实例包括植物生长条件,其包括:用于除草剂耐受性的除草剂、用于杀虫剂耐受性的杀虫剂、用于选择耐盐性的高于正常浓度的盐、用于抗旱性的高于正常渗透的胁迫、用于耐受极热的高温、用于刺激或诱导分子报告子活性的来源(诸如底物分子或激发源)等。每种可能性均是单独的实施方式。

[0115] 如本文所用,在一些实施方式中,当筛选除草剂耐受性(HT)性状时,可以通过使用增加的浓度或用预先确定的临界浓度的PPO抑制剂型除草剂((第14组,包括活性组:二苯醚、N-苯基邻苯二甲酰亚胺、噻二唑、三唑啉酮、N-苯基噁二唑酮、苯基吡唑),诸如丙炔氟草胺、恶草酮、氟磺胺草醚、氟噻草胺、唑酮草酯、甲磺草胺或其他)诱导胁迫生长条件来设置选择条件。

[0116] 如本文所用,“选择标准”是指为检测和/或测量表型性状而设置的条件。选择标准的非限制性实例包括:任何源自分子报告子的信号、膨压、植物死亡、叶面积、植物芽鲜重、叶数、叶绿素含量、糖含量、蛋白含量、器官颜色、枝条鲜重、主枝长度、花产量、荚或果实产量、缺绿症、叶片损伤、植物状态或性能及其任何组合。每种可能性均是单独的实施方式。

[0117] 如本文所用,在一些实施方式中,当筛选荧光报告子信号的性状时,选择标准设置为检测荧光信号的逐渐变化或荧光信号的预先确定的临界值。

[0118] 如本文所用,术语“转录活性”是指任何转录起始事件,其可能被DNA结合蛋白(诸如RNA聚合酶、转录因子和其他转录相关蛋白或蛋白复合物)修饰或调节。

[0119] 如本文所用,术语“其他转录相关蛋白或蛋白复合物”是指具有影响基因转录活性的活性或功能并涉及与DNA调控元件直接或间接结合或相互作用的任何蛋白或蛋白复合物。转录相关蛋白或蛋白复合物的非限制性实例包括RNA聚合酶、一般和特定转录因子和转录辅因子、顺式作用因子、反式作用因子、转录激活因子、转录抑制因子、介质、调节剂、转录前起始复合物(PIC)。每种可能性均是单独的实施方式。

[0120] 如本文所用,术语“热点”是指调控元件内的特定位点,这些位点对于调节参与转录过程的DNA结合蛋白的结合特别重要。这些包括转录因子和其他转录相关蛋白,它们以序列特异性方式与DNA相互作用。根据一些实施方式,可以通过应用专用的热点识别算法来识别热点。在一些实施方式中,可以通过在植物内对随机突变的基因元件进行功能筛选并识别例如表现出改善的HT耐受性的抗性事件来识别热点,如实施例5所示。

[0121] 如本文所用,术语“基因元件”是指多核苷酸DNA分子的区段,并且包括非编码(即调控)和编码序列。

[0122] 如本文所用,术语“基因调控元件”是指能够改变特定基因的表达水平和/或表达模式,从而控制基因表达的多核苷酸DNA分子的区段。如本文所提及的,调控元件是结合蛋白(诸如转录因子和其他转录相关蛋白和蛋白复合物)的非编码DNA序列,其调节传递至与基因相关的启动子的信号,从而影响基因的转录活性并改变基因产物的相关表达。

[0123] 根据一些实施方式,天然调控元件是作物植物的性状相关基因的天然调控元件。根据一些实施方式,天然编码序列是作物植物的性状相关基因的天然编码序列。

[0124] 如本文所用,在一些实施方式中,调控元件的长度为至多约5个碱基对(bp)、至多约10个碱基对(bp)、至多约50个碱基对(bp)、至多约100个碱基对(bp)、或至多约500个碱基对(bp)、或至多约1000个碱基对(bp)、或至多约5000个碱基对(bp)。每种可能性均是单独的实施方式。

[0125] 在一些实施方式中,调控元件位于基因的启动子区内,受影响基因的转录区上游。在一些实施方式中,调控元件位于受影响基因的转录区下游。在一些实施方式中,调控元件位于受影响基因的转录区内。在一些实施方式中,调控元件位于基因的5’或3’UTR内。在一些实施方式中,调控元件位于基因的内含子内。

[0126] 如本文所用,在一些实施方式中,调控元件位于距离转录起始位点(TSS)至多约10个碱基对(bp)、距离TSS至多约100个碱基对(bp)、距离TSS至多约500个碱基对(bp)、距离TSS至多约1,000个碱基对(bp)、距离TSS至多约5000个碱基对(bp)、或距离TSS至多约10,000个碱基对(bp),或至多约50,000个碱基对(bp)的长度。在一些实施方式中,调控元件位于与TSS不同的分子上。每种可能性均是单独的实施方式。

[0127] 调控元件以顺式或反式作用来调节传输至与基因相关的启动子的信号。

[0128] 如本文所用,术语“反式调控元件”(TRE)是指修饰或调节不相邻基因表达的调控元件。在一些实施方式中,反式调控元件位于与其调节转录的基因不同的分子上。

[0129] 如本文所用,术语“顺式调控元件”(CRE)是指修饰或调节其附近基因表达的调控元件。在一些实施方式中,顺式调控元件位于核心、近端或远端启动子内。在一些实施方式中,顺式调控元件位于其调控的基因的转录区内,在一些实施方式中,顺式调控元件位于其调控的基因的下游。

[0130] 如本文所用,术语“启动子”是指DNA的非编码序列,蛋白与其结合以启动转录并进一步调节启动子下游DNA中RNA转录物的表达水平和/或模式。启动子位于DNA上基因的转录起始位点(TSS)的上游,朝向被转录的链的5’区。

[0131] 如本文所用,术语“启动子”和“调控元件”可以互换使用,涉及通过结合参与转录的蛋白(诸如转录因子和其他转录相关蛋白)以序列依赖性的方式控制转录过程和基因的表达水平和/或模式的DNA序列或片段。根据一些实施方式,调控元件可以是天然存在的调控元件,例如植物或其他生物体的调控元件。根据一些实施方式,调控元件可以是合成的调控元件,不是天然存在的。

[0132] 根据本文所用,在一些实施方式中,植物基因的典型结构包括包含启动子的调控元件。在一些实施方式中,植物基因的典型结构包括包含调控元件的启动子。

[0133] 在一些实施方式中,启动子由近端启动子(包括核心启动子)和远端启动子组成。

[0134] 如本文所用,术语“近端启动子”是指位于基因的转录起始位点附近的调控元件。在一些实施方式中,近端启动子的长度为至多约100个碱基对(bp)、至多约250个碱基对(bp)、至多约500个碱基对(bp)、至多约1000个碱基对(bp)、或至多约1500个碱基对(bp)、或至多约2000个碱基对(bp)。每种可能性均是单独的实施方式。

[0135] 近端启动子包括基因的“核心启动子”,该术语在本文中用于描述正确启动转录所需的近端启动子的最小部分。在一些实施方式中,核心启动子位于TSS周围,并且可以延伸至转录区中。在一些实施方式中,核心启动子可以包括延伸至转录区中至多约数十个bp的调控元件,延伸值转录区中的这种调控元件的非限制性实例是下游启动子元件(DPE)。

[0136] 根据本文所用,术语“核心启动子”和“近端启动子”可以互换使用,涉及位于TSS附近的调控元件。

[0137] 近端和核心启动子的调控元件的非限制性实例包括顺式调控元件、TATA盒、启动子序列(INR)、下游启动子元件(DPE)、E-盒、上游激活序列(UAS)和反应元件(RE)。每种可能性均是单独的实施方式。

[0138] 如本文所用,术语“远端启动子”是指位于距离转录起始位点至多约数千个碱基或至多约数万个碱基的调控元件。在一些实施方式中,远端启动子包括顺式调控元件(CRE),其可以用作转录增强子,并且还可以在增加增强子的转录活性方面发挥辅助作用。在一些实施方式中,结构域交换、顺式元件重排和组合来自不同启动子的顺式调控元件对转录水平有相当大的影响。远端启动子的调控元件的非限制性实例包括顺式调控元件、增强子、沉默子和绝缘子。

[0139] 在一些实施方式中,调控元件是增强子。如本文所用,术语“增强子”是指通过结合促进在核心启动子区形成转录起始前复合物的转录激活子来上调基因整体表达的调控元

件。在一些实施方式中,增强子还可以结合转录抑制子,通过与激活子与增强子的结合竞争来降低基因整体表达,从而阻止起始前复合物的形成。在一些实施方式中,增强子调节表达水平和/或表达模式。

[0140] 在一些实施方式中,调控元件是沉默子。如本文所用,术语“沉默子”是指通过阻止增强子作用于基因的启动子来下调基因整体转录的调控元件,诸如但不限于绝缘子。在一些实施方式中,沉默子调节表达水平和/或表达模式。

[0141] 如本文所用,术语“天然调控元件”是指植物中天然存在的内源调控序列。术语“天然调控元件”、“天然的调控元件”和“内源调控元件”可以互换使用。

[0142] 如本文所用,术语“天然基因元件”是指植物中天然存在的内源调控序列或其编码序列。

[0143] 现参考图2A,显示了植物基因结构。

[0144] 根据一些实施方式,来自一种植物的天然基因调控元件可以与不同种类植物的性状相关基因和/或报告基因上游偶联。在一些实施方式中,天然基因调控元件(例如,来自大豆(大豆(Glycine max))可以与来自拟南芥(拟南芥(A.thaliana))的性状相关序列/报告子序列偶联。在一些实施方式中,例如大豆(pGmX)的天然启动子可以克隆到天然除草剂耐受性(HT)相关基因(诸如拟南芥的原卟啉原氧化酶(PPOX1)(AtPPOX1))的上游,产生大豆-拟南芥嵌合体(pGmX-AtPPOX1)克隆。不同的是,在一些实施方式中,可以将大豆的天然启动子(pGmX)克隆到编码报告基因(例如GFP)的编码序列的序列上游,产生非天然(pGmX-GFP)。

[0145] 如本文所用,术语“改变的基因元件”是指通过本领域已知的任何方法操纵的多核苷酸序列,该方法通常用于将基因变化引入至核酸序列中,从而产生包括相对于其来源的天然基因元件的改变的新序列。如本文所用,改变的核酸相对于其所来源的天然基因元件的拷贝,包括多核苷酸的至少一个或多个基因改变。

[0146] 如本文所用,在一些实施方式中,改变的基因调控元件是指引入至调控元件的基因变化,从而产生相对于其所来源的天然调控元件的原始拷贝包括改变的新序列。

[0147] 如本文所用,在一些实施方式中,改变的基因元件是指包括引入至编码序列区的变化的基因元件,从而产生相对于其所来源的天然编码元件的原始拷贝包括改变的新编码序列/区域。

[0148] 在一些实施方式中,性状相关基因/报告基因的基因表达的期望变化包括引入调控区/元件和/或编码区/序列的基因改变。每种可能性均是单独的实施方式。

[0149] 在一些实施方式中,在多个天然编码序列的拷贝中的每一个中引入一个或多个基因变化,从而获得包括大量改变的编码区集合的基因文库。

[0150] 在一些实施方式中,基因变化包括针对编码序列的随机区域的改变。在一些实施方式中,基因变化包括针对蛋白翻译序列/蛋白阅读框架的随机区域的改变。

[0151] 现参考图2B-2C,显示了引入基因改变的可能区域。

[0152] 如本文所用,术语“变化”、“改变”、“操纵”、“编辑”可以互换使用。

[0153] 基因变化的非限制性实例包括一个或多个点突变(缺失、置换和/或添加)、结构域交换、顺式元件重排、增强子添加和/或沉默子缺失、可以影响顺式或反式元件的变化。每种可能性均是单独的实施方式。

[0154] 将基因变化引入至核酸序列的方法的非限制性实例包括位点特异性诱变(定点诱

变)、化学或生物诱导的随机诱变、基因编辑方法、重组、限制连接、固相合成。每种可能性均是单独的实施方式。

[0155] 如本文所用,术语“编辑”或“基因编辑”是指本领域已知的通常用于引导和引入特定基因座中的核酸序列的特定变化的任何方法,例如,使用工程化核酸酶,诸如兆核酸酶、锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)或成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)。每种可能性均是单独的实施方式。

[0156] 术语“基因修饰的”(GM)、“基因修饰”(GM)或“基因修饰的生物体”(GMO)可以互换使用。

[0157] 术语“基因功能”和“基因活性”可以互换使用,并且是指功能性基因产物或蛋白可能参与的任何细胞功能和/或活性。蛋白的细胞功能的非限制性实例包括酶活性、结构功能、细胞信号传导和配体结合。

[0158] 如本文所用,术语“大规模并行”、“高通量”和“大规模”可以互换使用,并且涉及同时转化和筛选至少50个、至少100个、至少500个、至少1000个、至少10,000个或至少100,000个变化的基因调控元件或编码序列。每种可能性均是单独的实施方式。

[0159] 如本文所用,术语“评价”是指通过本发明所述的本文中的任何一种方法筛选和识别具有期望的转录变化的调控元件的过程,该转录变化与它们所偶联的性状相关基因产物的表达和/或活性的期望变化有关。

[0160] 如本文所提及的,术语“多核苷酸分子”、“寡核苷酸”、“多核苷酸”、“核酸”和“核苷酸”序列可以互换使用。这些术语涉及脱氧核糖核苷酸(DNA)、核糖核苷酸(RNA)的聚合物,以及以其单独片段的形式或作为较大构建体的组成部分的修饰形式,其线性或分支的、单链(ss)、双链(ds)、三链(ts)或杂交体。因此,如本文所用,术语“多核苷酸分子”、“寡核苷酸”、“多核苷酸”、“核酸”和“核苷酸”序列意指DNA和RNA分子。如本文所用,“核苷酸”包括含氮碱基、糖分子和磷酸基团。核酸可以包括天然存在的核苷(例如,腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷、脱氧腺苷、脱氧胸苷、脱氧鸟苷和脱氧胞苷)。这些术语进一步包括由天然存在的碱基、糖组成的寡核苷酸,以及具有非天然存在部分的寡核苷酸,其功能与相应的天然存在部分类似。如本文所用,核苷酸(A、G、C或T)和核苷酸序列以小写字母(a、g、c或t)标记。如本文所用,术语“RNA”或“RNA分子”或“核糖核酸分子”是指核糖核苷酸的聚合物。术语“DNA”或“DNA分子”或“脱氧核糖核酸分子”是指脱氧核糖核苷酸的聚合物。可以自然合成(例如分别通过DNA复制或者DNA或RNA的转录)DNA和RNA。还可以化学合成DNA和RNA。

[0161] 如本文所用,术语“约(approximately)”或“约(about)”在指代数字时,通常被认为包括落在数字的5%范围内或任一方向(大于或小于)1%范围内的数字,除非另有说明或从上下文显而易见(除非该数字超过可能值的100%)。如果陈述范围,则端点包括在范围内,除非另有说明或从上下文显而易见。

[0162] 如本文所用,单数形式“一种(a)”、“一种(an)”和“该(the)”包括复数指代物,除非上下文另有明确规定。

[0163] 如本文所用,“任选的”或“任选地”意指随后描述的事件或情况发生或不发生,并且描述包括所述事件或情况发生的情况和不发生的情况。

[0164] 如本文所用,术语“平均”是指通过测量任何一组测量数据或某个植物种群的每个植物中的预先确定的参数并根据所述种群中的植物数量计算平均值而获得的平均值。

[0165] 根据一些方面,本文提供了用于在植物内高通量评价内源基因调控元件的方法。

[0166] 在一些实施方式中,植物是作物植物和/或模型植物。

[0167] 在一些实施方式中,内源基因调控元件的评价包括筛选和识别与调控元件功能相关的性状相关基因和/或报告基因的表达水平和/或活性的期望变化。

[0168] 在一些实施方式中,性状相关基因和/或报告基因的表达水平和/或活性的期望变化包括识别与基因功能相关的改变的调控元件的转录活性的变化。

[0169] 根据一些方面,本文提供了用于在植物内高通量评价内源基因编码元件的方法。

[0170] 在一些实施方式中,性状相关基因的表达水平和/或活性的期望变化包括识别与调控元件功能相关的改变的编码元件的功能产物的活性变化。

[0171] 在一些实施方式中,改变的编码元件的功能产物的活性包括但不限于:酶活性、结构功能、细胞信号传导中的活性和/或配体结合。

[0172] 在一些实施方式中,表达水平和/或活性的变化包括表达强度水平和/或表达模式的变化。

[0173] 根据一些实施方式,该方法包括获得编码与性状相关基因/报告基因的编码序列偶联的天然调控元件的核酸的步骤。

[0174] 在一些实施方式中,偶联包括功能关联。

[0175] 在一些实施方式中,调控元件包括天然调控元件。

[0176] 在一些实施方式中,调控元件包括核心启动子、近端启动子、远端启动子、增强子、沉默子、绝缘子、顺式作用元件、反式作用元件、TATA盒、启动子序列(INR)、下游启动子元件(DPE)、E-盒、上游激活序列(UAS)和/或反应元件(RE),或其任何组合。每个选项本身均是实施方式。每种可能性均是单独的实施方式。

[0177] 在一些实施方式中,天然调控元件是启动子或其片段。

[0178] 在一些实施方式中,天然调控元件源自作物植物。在一些实施方式中,天然调控元件是任何天然基因的天然调控元件,并且编码序列是性状相关基因/报告基因的编码序列;在一些实施方式中,天然调控元件是性状相关基因的天然调控元件,并且编码序列是性状相关基因/报告基因的编码序列。

[0179] 在一些实施方式中,报告基因编码序列与性状相关基因调控元件具有相同或不同的来源。

[0180] 在一些实施方式中,编码的天然或改变的调控元件位于性状相关基因和/或报告基因的编码序列的上游;在一些实施方式中,编码的天然或改变的调控元件位于性状相关基因和/或报告基因的转录区内;在一些实施方式中,编码的天然或改变的调控元件位于性状相关基因和/或报告基因的编码序列的下游。

[0181] 在一些实施方式中,核酸编码性状相关基因和/或报告基因上游的调控元件,并且进一步编码性状相关基因和/或报告基因的编码序列内和/或下游的调控元件。

[0182] 在一些实施方式中,性状赋予植物改良特性。

[0183] 在一些实施方式中,改良特性包括诱导/触发期望/有益的属性;在一些实施方式中,期望/有益的属性是工业上期望/有益的属性。

[0184] 在一些实施方式中,工业上期望/有益的属性包括但不限于提高植物的耐受性或抗性和提高植物的产量。

[0185] 在一些实施方式中,增强的耐受性或抗性的性状包括但不限于对除草剂、昆虫和疾病或其他生物胁迫的抗性,对热、辐射、干旱、盐度、冷、缺氧或其他非生物胁迫的耐受性;在一些实施方式中,提高的产量的性状包括但不限于减少作物成熟的时间、改变植物的结构、减小尺寸、增大尺寸、改善光合作用活性、改善肥料吸收、改善肥料利用效率、改善健康成分、改善工业加工(诸如将淀粉或生物质转化成可发酵糖),以及改善农学品质(诸如高油含量和高蛋白含量)。每个选项本身均是实施方式。每种可能性均是单独的实施方式。

[0186] 在一些实施方式中,性状相关基因是报告基因。在一些实施方式中,性状相关基因/报告基因是源自植物的天然基因。

[0187] 在一些实施方式中,性状相关基因/报告基因源自其他来源,包括但不限于动物、细菌、真菌和病毒。

[0188] 在一些实施方式中,性状相关基因是报告基因,包括但不限于荧光蛋白、发光蛋白或任何生物或农业可筛选的性状,诸如但不限于生育力、颜色、形状、植物器官宽度、植物器官或组织大小,或植物器官或组织数量。

[0189] 在一些实施方式中,性状相关基因的功能和/或活性增加赋予植物增强的抗性或提高的植物产量。

[0190] 在一些实施方式中,增强的抗性包括对除草剂、昆虫、疾病、高温、干旱、生物或非生物胁迫的耐受性。

[0191] 在一些实施方式中,增强的抗性包括除草剂耐受性(HT)。

[0192] 在一些实施方式中,除草剂耐受性(HT)包括增加天然酶的表达,该天然酶克服植物中除草剂的活性成分浓度,从而提高天然抗性。

[0193] 在一些实施方式中,克服植物中除草剂的活性成分浓度从而提高天然抗性的天然酶是原卟啉原氧化酶1(PPO1)、原卟啉原氧化酶2(PPO2)、或对羟基苯丙酮酸双加氧酶(HPPD)、或5-烯醇丙酮酸莽草酸3-磷酸合酶(EPSPS)、或谷氨酰胺合酶、或乙酰乳酸合酶(ALS酶)、或7,8-二氢蝶酸合酶、或乙酰-CoA羧化酶(ACCase)。每种可能性均是不同的实施方式。

[0194] 根据一些实施方式,该方法包括在天然调控元件的多个拷贝中的每一个中引入一个或多个基因变化的步骤,从而获得包括大量改变的调控元件的基因文库。

[0195] 在一些实施方式中,改变的调控元件包括一个或多个基因变化。

[0196] 在一些实施方式中,基因变化包括相对于其所来源的内源调控元件的拷贝,对多核苷酸的至少一个或多个改变。

[0197] 在一些实施方式中,利用至少一种或多种使核酸变化的方法将基因改变引入至原始/天然调控元件,包括但不限于:位点特异性诱变(定点诱变)、化学或生物诱导的随机诱变、基因编辑方法、重组、限制连接和/或固相合成。每个选项本身均是实施方式。

[0198] 在一些实施方式中,改变的调控元件包括但不限于核心启动子、近端启动子、远端启动子顺式元件和/或反式元件。每个选项本身均是实施方式。

[0199] 在一些实施方式中,调控元件包括但不限于增强子、沉默子、绝缘子、TATA盒、启动子序列(INR)、下游启动子元件(DPE)、E-盒、上游激活序列(UAS)和/或反应元件(RE),或其任何组合。每个选项本身均是实施方式。

[0200] 在一些实施方式中,基因变化包括但不限于至少一个或多个点突变;在一些实施

方式中,一个或多个点突变选自由核苷酸缺失、核苷酸置换和/或核苷酸添加组成的组。在一些实施方式中,基因变化包括单数或复数变化。每种可能性均是单独的实施方式。

[0201] 在一些实施方式中,基因变化包括但不限于增强子的添加和/或沉默子的缺失。

[0202] 在一些实施方式中,基因变化包括但不限于结构域交换和/或顺式元件的重排,变化可以影响顺式或反式元件。

[0203] 在一些实施方式中,突变针对调控元件内预先已知的热点和/或其附近。

[0204] 在一些实施方式中,应用算法来预测天然调控元件中的假定热点。在一些实施方式中,引入一个或多个基因变化包括将一个或多个基因变化靶向预测的热点。

[0205] 在一些实施方式中,基因变化包括随机诱变、对预测的热点的基因变化和/或其组合。

[0206] 根据一些实施方式,该方法包括利用高通量转化将基因文库引入至模型植物中的步骤,使得平均每个模型植物接收单个改变的调控元件或改变的编码区,其可以在单个或多个位置变化。

[0207] 在一些实施方式中,模型植物包括但不限于拟南芥、亚麻荠(Camelina sativa)或烟草(Nicotiana tabacum)。

[0208] 在一些实施方式中,将基因文库引入至模型植物中包括克隆到农杆菌二元载体中。在一些实施方式中,将基因文库引入至模型植物中包括使用病毒和具有修饰的基因元件的病毒库来接种植物。在一些实施方式中,将基因文库引入至模型植物中包括使用“基因枪”技术或本领域已知的其他转化方法。

[0209] 根据一些实施方式,该方法包括筛选转化的模型植物的步骤,其中,筛选包括从多个转化的植物中选择具有性状相关基因表达水平的期望变化的模型植物。

[0210] 在一些实施方式中,性状表达水平或性状相关基因表达水平的期望变化包括优化植物内表达强度和/或表达模式的水平。

[0211] 在一些实施方式中,优化的表达强度水平包括性状表达强度的增加或减少;在一些实施方式中,优化的表达强度水平包括性状相关基因/报告基因表达强度或其活性的增加或减少。

[0212] 在一些实施方式中,优化的表达模式包括性状或性状相关基因/报告基因表达模式的变化,包括表达的时间、发育阶段、细胞定位、组织特异性和/或强度的一种或多种变化。每个选项本身均是实施方式。

[0213] 在一些实施方式中,性状相关基因/报告基因表达水平的期望变化包括与基因功能和/或活性增加相关的表达增加;在一些实施方式中,性状相关基因/报告基因表达水平的期望变化包括与基因功能和/或活性降低相关的表达降低。

[0214] 在一些实施方式中,性状表达水平或性状相关基因/报告基因表达水平的期望变化包括优化与其功能相关的内源基因调控元件的转录活性。

[0215] 在一些实施方式中,性状相关基因/报告基因表达水平的期望变化包括与该基因功能相关的改变的调控元件的转录活性的变化。

[0216] 在一些实施方式中,性状或性状相关基因/报告基因的表达水平的期望变化包括满足预先确定的临界值,其用于筛选和选择引入天然调控元件的基因变化的植物。

[0217] 在一些实施方式中,筛选具有性状相关基因/报告基因表达水平的期望变化的模

型植物包括满足预先确定的临界值。

[0218] 在一些实施方式中,预先确定的临界值通过将转化有天然基因元件的植物暴露于选择条件进行确定,该选择条件包括选择条件的强度(strength)或烈度(intensity)的逐渐变化以及基于选择标准进行选择。

[0219] 在一些实施方式中,预先确定的临界值用于筛选和选择携带改变的调控元件的植物,用于表现出期望的性状表达水平。

[0220] 因此,在一些实施方式中,选择改变的调控元件的临界值最初是根据它们所来源的元件预先确定的。

[0221] 因此,在一些实施方式中,满足预先确定的临界值代表改变的调控元件与它们所来源的天然基因元件之间的比较。

[0222] 在一些实施方式中,性状相关基因/报告基因的表达水平和/或活性的期望变化包括表达强度水平的变化;在一些实施方式中,表达强度水平的期望变化包括表达降低;在一些实施方式中,表达强度水平的期望变化包括表达增加。

[0223] 在一些实施方式中,性状相关基因/报告基因的表达水平和/或活性的期望变化包括表达模式的变化。在一些实施方式中,性状相关基因的表达模式的期望变化包括但不限于表达的时间、发育阶段、细胞定位、组织特异性和/或强度的一种或多种变化。每个选项本身均是实施方式。

[0224] 根据一些实施方式,该方法包括识别选定模型植物的改变的调控元件中的一个或多个基因变化的步骤。

[0225] 在一些实施方式中,使用DNA测序来识别改变的调控元件中的一个或多个基因变化。

[0226] 根据一些实施方式,该方法包括基于选定模型植物的改变的调控元件中的一个或多个识别的基因变化来修饰作物植物的调控元件的步骤。

[0227] 在一些实施方式中,修饰作物的调控元件基于其来源的改变的调控元件;在一些实施方式中,修饰作物的调控元件基于不同植物作物的改变的调控元件。

[0228] 在一些实施方式中,作物植物包括但不限于玉米、大豆、棉花和油菜。每个选项本身均是实施方式。

[0229] 该方法可以应用于任何植物物种,包括但不限于单子叶植物和双子叶植物。植物种类的实例包括但不限于玉米(玉米(Zea mays))、芸苔属(Brassicasp.)(例如,油菜(B.napus)、小白菜(B.rapa)、芥菜(B.juncea),特别是可用作种子油来源的那些芸苔属)、苜蓿(苜蓿(Medicago sativa))、水稻(稻(Oryza sativa))、黑麦(黑麦(Secale cereale))、高粱(高粱(Sorghum bicolor)、高粱(Sorghum vulgare))、粟(例如,珍珠粟(珍珠粟(Pennisetum glaucum))、糜子(糜子(Panicum miliaceum))、谷子(谷子(Setaria italica))、龙爪稷(龙爪稷(Eleusine coracana))、向日葵(向日葵(Helianthus annuus))、红花(红花(Carthamus tinctorius))、小麦(普通小麦(Triticum aestivum))、大豆(大豆(Glycine max))、烟草(烟草(Nicotiana tabacum))、马铃薯(马铃薯(Solanum tuberosum))、花生(落花生(Arachis hypogaea))、棉花(海岛棉(Gossypium barbadense)、陆地棉(Gossypium hirsutum))、甘薯(甘薯(Ipomoea batatus))、木薯(木薯(Manihot esculenta))、咖啡(咖啡(Coffea spp.))、棕榈科棕榈树(例如,椰子树(椰子树(Cocos

mucifera))、油棕(油棕(Elaeis guineensis))、枣椰子(枣椰子(Phoenix spp.)))、菠萝(菠萝(Ananas comosus))、柑橘树(柑橘属(Phoenix spp.))、桉树属(Eucalyptus sp.)、松树属(Pinus spp.)、可可(可可(Theobroma cacao))、茶(茶(Camellia sinensis))、香蕉(香蕉属(Musa spp.))、鳄梨(鳄梨(Persea americana))、无花果(无花果(Ficus casica))、番石榴(番石榴(Psidium guajava))、芒果(芒果(Mangifera indica))、橄榄(橄榄(Olea europaea))、木瓜(木瓜(Carica papaya))、腰果(腰果(Anacardium occidentals))、澳洲坚果(澳洲坚果(Macadamia integrifolia))、杏仁(杏仁(Prunus amygdalus))、甜菜(甜菜(Beta vulgaris))、甘蔗(甘蔗属(Saccharum spp.))、燕麦、大麦、蔬菜、观赏植物、草坪草(禾本科)和针叶树。每种可能性均是单独的实施方式。

[0230] 在一些实施方式中,使用基因编辑工具生成期望的作物植物。

[0231] 在一些实施方式中,基因编辑方法包括但不限于使用工程化核酸酶,诸如兆核酸酶、锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)和成簇规律间隔短回文重复序(CRISPR),或其任何组合。每个选项本身均是实施方式。

[0232] 根据一些方面,本文提供了非天然存在的作物植物或作物植物细胞,其包括基因编辑的调控元件。

[0233] 在一些实施方式中,作物植物的调控元件的基因编辑基于选定模型植物的改变的调控元件中与性状相关基因表达水平的期望变化相关的一个或多个识别的基因变化。

[0234] 在一些实施方式中,基因编辑的植物或植物细胞包括天然酶的表达增加,从而增加植物对除草剂的天然抗性。

[0235] 在一些实施方式中,基因编辑的植物或植物细胞包括选自由以下组成的组的酶的表达增加:原卟啉原氧化酶1(PPO1)、或原卟啉原氧化酶2(PPO2)、或对羟基苯丙酮酸双加氧酶(HPPD)、或5-烯醇丙酮酸莽草酸3-磷酸合酶(EPSPS)、或谷氨酰胺合酶、或乙酰乳酸合酶(ALS酶)、或7,8-二氢蝶酸合酶、或乙酰-CoA羧化酶(ACCase)。

[0236] 根据一些方面,本文提供了构建体,其包括与除草剂耐受性(HT)基因偶联且功能相关的植物性状相关基因的基因修饰的启动子。

[0237] 在一些实施方式中,基因修饰的启动子源自植物性状相关基因的内源启动子。

[0238] 在一些实施方式中,基因修饰的启动子源自作物植物的内源启动子。

[0239] 在一些实施方式中,除草剂耐受性(HT)基因对于作物植物是外源的。

[0240] 根据一些方面,本文公开了用于在植物内高通量优化性状相关基因的功能/活性的方法。

[0241] 根据一些实施方式,该方法包括获得编码性状相关基因的编码序列的核酸的步骤。

[0242] 根据一些实施方式,该方法包括在天然性状相关基因的编码序列的多个拷贝中的每一个中引入一个或多个基因变化,从而获得包括大量性状相关基因编码序列的改变拷贝集合的基因文库。

[0243] 根据一些实施方式,该方法包括利用高通量转化将基因文库引入至模型植物中的步骤,使得平均每个模型植物接收单个改变的性状相关基因。

[0244] 根据一些实施方式,该方法包括筛选转化的模型植物的步骤,其中,筛选包括选择具有性状相关基因的功能/活性的期望变化的模型植物。

[0245] 根据一些实施方式,该方法包括识别选定模型植物中改变的性状相关基因编码序列中的一个或多个基因变化的步骤。

[0246] 根据一些实施方式,该方法包括基于选定模型植物的改变的性状相关基因中一个或多个识别的基因变化来修饰作物植物的性状基因的步骤。

[0247] 在一些实施方式中,性状相关基因功能/活性的期望变化包括优化的酶活性。

[0248] 在一些实施方式中,期望的变化是增加的酶活性。

[0249] 根据一些示例性实施方式,大豆(大豆)ppo1启动子与拟南芥(拟南芥(A.thaliana))PPOX1基因一起克隆。

[0250] 在一些实施方式中,优化植物的原卟啉原氧化酶(PPO1)天然基因的表达水平可以导致除草剂耐受性(HT)提高。

[0251] 在一些实施方式中,原卟啉原氧化酶1(PPOX1)的活性克服植物中除草剂的活性成分浓度,而类似的浓度导致WT拟南芥植物严重受损或死亡。

[0252] 在一些实施方式中,期望增强原卟啉原氧化酶1(PPO1)的表达,以提高对PPO抑制剂型除草剂(诸如丙炔氟草胺)的天然抗性。

[0253] 根据一些实施方式,启动子可以具有Seq ID NO:2中列出的序列;但是,还可以设想其他天然启动子(相同或不同的性状相关基因),并且因此在本公开的范围内。在一些实施方式中,克隆天然大豆(大豆)ppo1启动子(pGmppo1)(SEQ ID NO:2)以将其与拟南芥(拟南芥(A.thaliana))PPOX1基因(AtPPOX1)(SEQ ID NO:1)偶联,创建pGmppo1-AtPPOX1。

[0254] 在一些实施方式中,大豆的天然ppo1启动子(pGmppo1)从大豆gDNA扩增并克隆到天然AtPPOX1编码序列的上游。

[0255] 在一些实施方式中,克隆天然AtPPOX1编码序列,并用特定序列标志物(条形码)将其与基因的天然拷贝区分。

[0256] 在一些实施方式中,稳定的T1或T2 pGmppo1-AtPPOX1转基因植物用于校准PPO抑制剂化学预先确定的临界浓度。

[0257] 在一些实施方式中,PPO抑制剂化学预先确定的临界浓度用于筛选和选择变体植物文库。

[0258] 在一些实施方式中,将通常用于文库构建的包含二元载体的pGmppo1-AtPPOX1引入至农杆菌中。

[0259] 在一些实施方式中,然后使用携带pGmppo1-AtPPOX1基因的农杆菌转化拟南芥植物以产生具有稳定T1或T2代事件的种子。

[0260] 在一些实施方式中,使转化的拟南芥种子发芽并用选择除草剂处理以检测转化的植物。

[0261] 在一些实施方式中,使T1或T2拟南芥种子发芽并用选择除草剂处理。

[0262] 在一些实施方式中,使用选择临界值的校准来筛选转化的模型植物,用于确定AtPPOX1酶的表达和/或活性是否增加以及除草剂耐受性(HT)性状是否相关增强。

[0263] 在一些实施方式中,使用浓度梯度用PPO抑制剂型除草剂丙炔氟草胺或唑酮草酯处理转化有pGmppo1-AtPPOX1基因的稳定T1或T2拟南芥植物,以校准临界浓度。

[0264] 在一些实施方式中,基于至少一个选择标准选择对最高浓度的PPO抑制剂型除草剂丙炔氟草胺或唑酮草酯表现出最佳耐受性的稳定的T1或T2事件。

[0265] 在一些实施方式中,确定预先确定的临界浓度以用于选择启动子变体转基因植物文库。

[0266] 在一些实施方式中,基于用pGmppo1-AtPPOX1基因转化的并且对最高浓度的PPO抑制剂型除草剂丙炔氟草胺或唑酮草酯表现出最佳耐受性的那些稳定的T1或T2拟南芥植物确定临界浓度。

[0267] 根据一些实施方式,利用天然大豆ppo启动子(pGmppo1)的算法分析来检测假定热点。

[0268] 在一些实施方式中,利用独特的算法来分析非编码调控元件并预测参与转录过程的DNA结合蛋白的假定“热点”;在一些实施方式中,这些包括转录因子和其他转录相关蛋白,它们以序列特异性方式与DNA相互作用。

[0269] 在一些实施方式中,该算法利用来自(但不限于)公共数据库(诸如PlantCARE(植物顺式作用调控元件)、PLACE(植物顺式作用调控DNA元件)和RegSite(面向植物的转录调控元件集合))的植物调控元件序列的可用信息。

[0270] 在一些实施方式中,该算法用于分析天然大豆ppo1基因并预测可以促进pGmppo1转录活性增强的期望变化的热点。

[0271] 在一些实施方式中,该算法接收SEQ ID NO:1作为输入序列(pGmppo1的序列),并分析pGmppo1启动子的典型结构以识别其中的特定调控元件;在一些实施方式中,这包括分析近端启动子(包括核心启动子)和远端启动子。

[0272] 在一些实施方式中,通过分析TSS周围的数百个核苷酸(被认为是核心/近端启动子)来识别启动子区,例如用于识别调节转录起始位点(TSS)选择的元件,并且通过分析TSS上游的数千个或更多个核苷酸(被认为是远端启动子)来识别启动子区,例如用于识别可以作为转录增强子并可以在增加转录活性中发挥辅助作用的调节顺式元件的存在。

[0273] 在一些实施方式中,该算法识别pGmppo1中假定调控元件的热点,处理和整合数据,以及然后预测启动子序列上适合基因操作/编辑的位点,从而预测具有与基因表达模式相关的新属性的潜在新调控元件。

[0274] 在一些实施方式中,在AtPPOX1或GmPPO1基因产物的情况下,期望的变化是酶的表达和活性增加;在一些实施方式中,这可以通过例如引入热点基因变化来实现,这些变化增强转录激活因子的结合活性或阻止抑制因子的结合活性。

[0275] 在一些实施方式中,靶向pGmppo1启动子序列上的热点可以实现在植物特定发育生长阶段基因转录活性的期望增加。

[0276] 在一些实施方式中,靶向pGmppo1启动子序列上的热点可以实现在特定组织中基因转录活性的期望增加,在这些特定组织中基因的表达可以增加。

[0277] 在一些实施方式中,靶向pGmppo1启动子序列上的热点可以通过增强植物细胞内的转录事件数量来实现基因转录活性的期望增加。

[0278] 根据一些实施方式,生成大量改变的大豆ppo1启动子(pGmppo1)元件集合的植物内基因文库,用于高通量评价拟南芥中增强的除草剂耐受性(HT)。

[0279] 在一些实施方式中,通过将基因变化引入至pGmppo1中,生成包括大量改变的调控元件集合的多个基因文库。

[0280] 在一些实施方式中,对pGmppo1的基因改变可以针对特定区域(例如热点)。在一些

实施方式中,可以将改变引入至调控元件的随机区域中。

[0281] 在一些实施方式中,可以利用定点诱变、化学或生物诱导的随机诱变、重组、改组、易错PCR、限制连接、固相合成、合成的合成库或其任何组合来引入pGmppo1调控元件的改变。每种可能性均是单独的实施方式。

[0282] 在一些实施方式中,验证pGmppo1基因变体文库,通过对文库进行随机测序来测试文库的质量,然后对突变位点处的核苷酸分布进行统计分析。

[0283] 在一些实施方式中,将获得的pGmppo1-AtPPOX1或pGmppo1-GmPPO1核酸引入至农杆菌中,并利用高通量转化方法转化到拟南芥植物中,创建植物内启动子文库。

[0284] 在一些实施方式中,每个植物内启动子文库包括约10^3-10^6个转基因pGmppo1-AtPPOX1或pGmppo1-GmPPO1植物的集合。

[0285] 在一些实施方式中,植物内启动子文库中的每个转基因pGmppo1-AtPPOX1或pGmppo1-GmPPO1植物平均携带单个基因改变的调控元件。

[0286] 在一些实施方式中,每个单个基因改变的调控元件在pGmppo1中具有至少一个或多个基因变化。

[0287] 根据一些实施方式,筛选并选择具有增强除草剂耐受性(HT)的拟南芥植物。

[0288] 在一些实施方式中,通过使用PPO抑制剂的高通量筛选过程来评价模型植物中改良的除草剂耐受性(HT)特性。

[0289] 在一些实施方式中,使转基因pGmppo1-AtPPOX1或pGmppo1-GmPPO1种子发芽,并根据预先确定的临界浓度用丙炔氟草胺(Strike中的活性成分)或唑酮草酯(Aurora中的活性成分)处理植物。

[0290] 在一些实施方式中,选择对丙炔氟草胺或唑酮草酯的临界浓度表现出高耐受性的植物,因为它们可能对除草剂具有抗性。

[0291] 在一些实施方式中,基于与在用天然启动子进行初步实验中用于确定临界浓度的相同的至少一个选择标准来确定耐受水平。

[0292] 在一些实施方式中,通过DNA测序来识别选择携带pGmppo1-AtPPOX1或pGmppo1-GmPPO1的植物的pGmppo1启动子中的特定基因变异。

[0293] 在一些实施方式中,使用最佳假定启动子重新转化拟南芥植物,并再次测试其对丙炔氟草胺或唑酮草酯的抗性。

[0294] 根据一些实施方式,生成增强的除草剂耐受性(HT)基因编辑的大豆作物植物。

[0295] 在一些实施方式中,将在表达期望弹性水平的模型植物中识别的基因变化引入期望的大豆作物植物中。

[0296] 在一些实施方式中,利用基因编辑方法将识别的基因变化引入至期望的大豆作物植物中,以产生具有增强的除草剂耐受性HT的基因修饰的非转基因大豆植物。

[0297] 根据一些实施方式,大豆(大豆(Glycine max))ppo1启动子与GFP一起克隆以评价增强的表达荧光。

[0298] 在一些实施方式中,报告蛋白(诸如荧光蛋白)的非天然性状相关序列的表达导致表现出具有可检测荧光信号的期望/有益的表型性状。

[0299] 在一些实施方式中,将大豆的天然启动子(pGmX)克隆到编码GFP编码序列的序列上游,产生非天然启动子(pGmX-GFP)。

[0300] 在一些实施方式中,使用根据预先确定的绿色荧光临界值检测荧光水平,通过高通量筛选过程评价模型植物中荧光的改善。

[0301] 在一些实施方式中,选择荧光水平高于绿色荧光临界值的植物,因为它们可能与改变的大豆启动子(pGmX)相关的期望表达变化有关。

[0302] 在一些实施方式中,pGmX-GFP在模型植物中稳定表达。在一些实施方式中,pGmX-GFP在大豆植物中瞬时表达。

[0303] 在一些实施方式中,基于与在用天然pGmX-GFP进行的初步实验中使用的相同或不同的至少一个选择标准来确定荧光水平,以建立绿色荧光临界浓度。

[0304] 根据一些实施方式,将天然调控元件与拟南芥的除草剂耐受性(HT)相关原卟啉原氧化酶(PPOX1)基因(AtPPOX1)一起克隆,用于评价期望的表达变化。

[0305] 根据一些实施方式,将天然调控元件与大豆除草剂耐受性(HT)相关原卟啉原氧化酶(PPO1)基因(GmPPO1)一起克隆,用于评价期望的表达变化。

[0306] 在一些实施方式中,拟南芥的除草剂耐受性(HT)相关原卟啉原氧化酶(PPOX1)基因(AtPPOX1)的编码序列的表达导致表现出对PPO抑制剂(例如,恶草酮、丙炔氟草胺或唑酮草酯)具有增强抗性的期望/有益的表型性状,从而允许对表现出与该性状功能偶联的任何期望作物植物的任何天然基因的改变的调控元件的期望表达变化的模型植物进行高通量筛选。

[0307] 在一些实施方式中,大豆(大豆(Glycine max))的除草剂耐受性(HT)相关原卟啉原氧化酶(PPO1)基因(GmPPO1)的编码序列的表达导致表现出对PPO抑制剂(例如,恶草酮、丙炔氟草胺或唑酮草酯)具有增强抗性的期望/有益的表型性状,从而允许对表现出与该性状功能偶联的任何期望作物植物的任何天然基因的改变的调控元件的期望表达变化的模型植物进行高通量筛选。

[0308] 在一些实施方式中,将拟南芥原卟啉原氧化酶(PPOX1)的编码序列(AtPPOX1)克隆到天然基因启动子的下游,用于评价与原卟啉原氧化酶(PPOX1)活性提高相关的期望表达变化。

[0309] 在一些实施方式中,将大豆(大豆(Glycin max))的原卟啉原氧化酶(PPO1)的编码序列(GmPPO1)克隆到天然基因启动子的下游,用于评价与原卟啉原氧化酶(PPO1)酶活性提高相关的期望表达变化。

[0310] 在一些实施方式中,可以利用报告基因(例如HT基因)的表达进行高通量筛选,用于识别优化的调控元件(该调控元件优选源自作物植物,例如耐盐相关基因的启动子)。因此,可以通过监测报告基因表达和/或模型植物表型的变化(例如,增加的除草剂耐受性、荧光水平等)在模型植物中进行筛选,这是由于其与调控元件的改变版本功能偶联。

[0311] 在一些实施方式中,性状的表达(诸如但不限于HT)用于模型植物的高通量筛选,该模型植物表现出与改变的调控元件功能性偶联的性状相关基因/报告基因表达的期望变化,该改变的调控元件可以源自任何期望的作物植物的任何天然基因。

[0312] 在一些实施方式中,通过应用对应于该性状的选择条件,利用性状的表达对包含改变的调控元件文库的模型植物进行高通量筛选,并且基于满足根据相应选择标准预先确定的临界值。

[0313] 在一些实施方式中,利用抗性或提高产量的性状对模型植物进行高通量筛选,包

括但不限于对除草剂、昆虫和疾病或其他生物胁迫的抗性,对热、干旱或其他非生物胁迫的耐受性,缩短作物成熟的时间,提高产量,改善肥料吸收,改进工业加工,诸如将淀粉或生物质转化成可发酵糖,以及改善农学品质,诸如高油含量和高蛋白含量。每种可能性均是单独的实施方式。每种可能性均是不同的实施方式。

[0314] 在一些实施方式中,模型植物中改良的除草剂耐受性(HT)特性的评价和选择包括使用PPO抑制剂除草剂喷洒的高通量植物内功能筛选测定,以便轻松识别低频突变体。

[0315] 现参考图3C

[0316] 在一些实施方式中,确定增强的耐受性包括至少在预先确定的临界浓度下评价对叶片的损害。

[0317] 在一些实施方式中,通过随机诱变产生、在植物内筛选和通过对选定的抗性事件的转基因进行测序而识别的pGmppo1突变序列由SEQ ID NO:4-63中的任一个表示。在一些实施方式中,突变及其位置总结在表1中——描述不同抗性事件的大豆ppo1启动子(pGmppo1)中识别的热点并在SEQ ID NO:4-13中的任一个中列出),以及在表2中——描述不同抗性事件的大豆PPO1启动子(pGmppo1)中识别的其余突变并在SEQ ID NO:14-63中的任一个中列出)。每种可能性均是单独的实施方式。现参考图3D。

[0318] 表1:大豆ppo1启动子(pGmppo1)中识别的七个热点

[0319]

热点	(事件#)	位置/突变	SEQ ID NO:
1	事件 1; 事件 2	-1229 A>C	SEQ ID NO: 4
2	事件 4; 事件 5	-1105 T>C	SEQ ID NO: 5
3	事件 6	-668 A del	SEQ ID NO: 6
	事件 7	-668 A>G	SEQ ID NO: 7
4	事件 10; 事件 12	-481 T>G	SEQ ID NO: 8
5	事件 5	-189 ins A	SEQ ID NO: 9
	事件 6	-189 A>C	SEQ ID NO: 10
	事件 9; 事件 11; 事件 13; 事件 14	-189 A del	SEQ ID NO: 11
6	事件 3; 事件 8	-70 T>C	SEQ ID NO: 12
7	事件 3; 事件 12	-61 T>G	SEQ ID NO: 13

[0320]

[0321] 表2:大豆PPO1启动子(pGmppo1)中识别的突变

[0322]

事件#	位置/突变	SEQ ID NO:
2	-147 A>T	SEQ ID NO: 14
2	所有突变： -1229 A>C; -147 A>T	SEQ ID NO: 15
3	-1132 A>T	SEQ ID NO: 16
3	-937 T>C	SEQ ID NO: 17
3	-914 T>A	SEQ ID NO: 18
3	-532 A>C	SEQ ID NO: 19
3	-459 T>A	SEQ ID NO: 20
3	-383 A>G	SEQ ID NO: 21
3	-354 T>A	SEQ ID NO: 22
3	-351 A>G	SEQ ID NO: 23
3	-255 A>G	SEQ ID NO: 24
3	-118 A>G	SEQ ID NO: 25
3	所有突变： -1132 A>T; -937 T>C; -914 T>A; -532 A>C; -459 T>A; -383 A>G; -354 T>A; -351 A>G; -255 A>G; -118 A>G; -70 T>C;-61 T>G	SEQ ID NO: 26
5	所有突变： -1105 T>C; -189 ins A	SEQ ID NO: 27
6	-1118 A>G	SEQ ID NO: 28
6	-373 A>T	SEQ ID NO: 29
6	-275 A>T	SEQ ID NO: 30
6	-219 A>T	SEQ ID NO: 31
6	-67 A>G	SEQ ID NO: 32
6	所有突变： -1118 A>G; -668 A del; -373 A>T; -275 A>T; -219 A>T -189 A>C; -67 A>G	SEQ ID NO: 33
7	-1102 A>G	SEQ ID NO: 34
7	-514 A>T	SEQ ID NO: 35
7	所有突变： -1102 A>G; -668 A>G; -514 A>T	SEQ ID NO: 36
8	-1080 A>T	SEQ ID NO: 37

[0323]

8	-1052 T>C	SEQ ID NO: 38
8	-601 T>C	SEQ ID NO: 39
8	-568 T>C	SEQ ID NO: 40
8	-252 T>C	SEQ ID NO: 41
8	-233 A>G	SEQ ID NO: 42
8	-207 A>G	SEQ ID NO: 43
8	-176 A>G	SEQ ID NO: 44
8	-151 A>T	SEQ ID NO: 45
8	-104 T>C	SEQ ID NO: 46
8	所有突变： -601 T>C; -568 T>C; -252 T>C; -233 A>G; -207 A>G -176 A>G; -151 A>T; -104 T>C; -70 T>C	SEQ ID NO: 47
9	-864 A>T	SEQ ID NO: 48
9	-717 A>G	SEQ ID NO: 49
9	-487 A>G	SEQ ID NO: 50
9	-457 A>T	SEQ ID NO: 51
9	-332 T>A	SEQ ID NO: 52
9	-241 T>C	SEQ ID NO: 53
9	所有突变： -864 A>T; -717 A>G; -487 A>G; -457 A>T; -332 T>A -241 T>C; -189 A del	SEQ ID NO: 54
11	-439 T>G	SEQ ID NO: 55
11	所有突变： -439 T>G; -189 A del	SEQ ID NO: 56
12	所有突变： -481 T>G; -61 T>G	SEQ ID NO: 57
13	-372 A>G	SEQ ID NO: 58
13	-307 A>C	SEQ ID NO: 59
13	-191 A>C	SEQ ID NO: 60
13	所有突变： -372 A>G; -307 A>C; -191 A>C; -189 A del	SEQ ID NO: 61
14	-662 A>T	SEQ ID NO: 62
14	所有突变： -662 A>T; -189 A del	SEQ ID NO: 63

[0324] 在一些实施方式中,大豆ppo1启动子(pGmppo1)包括7个“热点”位置,当这些位置发生突变时,赋予增强/改善的除草剂耐受性(HT)性状。

[0325] 在一些实施方式中,本发明公开的ppo1启动子(ppo1)包括7个“热点”位置中的一个或多个的基因变化,当这些位置发生突变时,赋予植物增强/改善的除草剂耐受性(HT)性状。

[0326] 在一些实施方式中,本发明公开的ppo1启动子(ppo1)包括一个或多个位置的一个

或多个突变,这些位置对应于SEQ ID NO:4-63中所示的大豆ppo1启动子中的任何一个或多个突变位置。(即,如表1和表2中详述)

[0327] 在一些实施方式中,本发明公开的ppo1启动子(ppo1)包括一个或多个位置处的一个或多个突变,这些位置对应于SEQ ID NO:4-13中所示的大豆ppo1启动子中的任何一个或多个突变位置。(即,如表1中详述)

[0328] 在一些实施方式中,本发明公开的ppo1启动子(ppo1)包括一个或多个位置的一个或多个突变,这些位置对应于SEQ ID NO:14-63中所示的大豆ppo1启动子中的任何一个或多个突变位置。(即,如表2中详述)

[0329] 在一些实施方式中,本发明公开的ppo1启动子(ppo1)包括SEQ ID NO:4-63中任一项所示的序列,或其任何组合。在一些实施方式中,本发明公开的ppo1启动子(ppo1)包括SEQ ID NO:4-13中任一项所示的序列,或其任何组合。在一些实施方式中,本发明公开的ppo1启动子(ppo1)包括SEQ ID NO:14-63中任一项所示的序列,或其任何组合。

[0330] 在一些实施方式中,天然大豆ppo1启动子中的七个“热点”位置在突变时赋予增强/改善的除草剂耐受性(HT)性状,相对于SEQ ID NO:2包括以下位置:[-1229A]、[-1105T]、[-668A]、[-481T]、[-189A]、[-70T]和[-61T],其中(-)表示相对于转录起始位点(TSS)的上游位置。现参考表1和图3D(矩形内标记的热点位置)。

[0331] 在一些实施方式中,pGmppo1中识别的热点包括如SEQ ID NO.4-13中任一个所示的突变。

[0332] 根据一些方面,提供了基因编辑的作物植物或作物植物细胞,其包括ppo1启动子,该ppo1启动子经基因修饰以在一个或多个位置包括一个或多个突变,该一个或多个位置对应于SEQ ID NO:2中所示的大豆启动子的-1229A、-1105T、-668A、-481T、-189A、-70T和-61T中的任何一个或多个位置。

[0333] 如本文所用,术语“对应于”是指通过序列比对工具将序列比对在一起而确定的任何其他作物植物的ppo1启动子中相对于大豆ppo1启动子(pGmppo1)中同源位置的位置。

[0334] 在一些实施方式中,基因编辑的作物植物或作物植物细胞,其中,基因修饰的ppo1启动子中的一个或多个突变包括置换、添加和/或缺失。

[0335] 在一些实施方式中,基因编辑的作物植物或作物植物细胞,其中,基因修饰的ppo1启动子中的一个或多个突变包括以下一个或多个:1229A>C、-1105T>C、-668A del、-668A>G、-481T>G、-189ins A、-189A>C、-189A del、-70T>C和-61T>G;并且其中,该位置对应于SEQ ID NO:2中所示的大豆启动子的位置。

[0336] 在一些实施方式中,基因编辑的作物植物或作物植物细胞,其中,基因修饰的ppo1启动子中的一个或多个突变包括至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个或更多个突变位置。每种可能性均是单独的实施方式。

[0337] 在一些实施方式中,基因编辑的作物植物或作物植物细胞,其中,ppo1启动子包括与SEQ ID NO:2至少90%序列同一性。

[0338] 在一些实施方式中,ppo1启动子与SEQ ID NO:2具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性。每种可能性均是单独的实施方式。

[0339] 在一些实施方式中,基因编辑的作物植物或作物植物细胞,其中,ppo1启动子包括

SEQ ID No:4-13中任一项所示的序列。

[0340] 在一些实施方式中,基因编辑的作物植物或作物植物细胞,其中,ppo1启动子包括SEQ ID No:4-13中任一项所示的序列,或其任何组合。

[0341] 在一些实施方式中,基因编辑的作物植物或作物植物细胞,其中,ppo1启动子包括SEQ ID No:14-63中任一项所示的序列。

[0342] 在一些实施方式中,基因编辑的作物植物或作物植物细胞,其中,ppo1启动子包括SEQ ID No:14-63中任一项所示的序列,或其任何组合。

[0343] 在一些实施方式中,提供了基因编辑的作物植物或作物植物细胞,其中,该作物植物是大豆。

[0344] 根据一些方面,提供了核酸构建体,其包括与除草剂耐受性(HT)基因偶联且功能相关的植物性状相关基因的基因修饰的启动子。

[0345] 根据一些方面,提供了核酸构建体,其包括经基因修饰以在与SEQ ID NO:2中所示的大豆启动子的以下一个或多个位置相对应的一个或多个位置处包括一个或多个突变的ppo1启动子:-1229A、-1105T、-668A、-481T、-189A、-70T和-61T。

[0346] 在一些实施方式中,提供的核酸构建体,其中,基因修饰的ppo1启动子与除草剂耐受性(HT)基因偶联并功能性关联。

[0347] 在一些实施方式中,提供的核酸构建体,其中,基因修饰的ppo1启动子中的一个或多个突变包括以下一个或多个:-1229A>C、-1105T>C、-668A del、-668A>G、-481T>G、-189ins A、-189A>C、-189A del、-70T>C和-61T>G。

[0348] 在一些实施方式中,提供的核酸构建体,其中,基因修饰的ppo1启动子中的一个或多个突变包括置换、添加和/或缺失。

[0349] 在一些实施方式中,提供的核酸构建体,其中,基因修饰的ppo1启动子中的一个或多个突变包括至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个或更多个突变位置。每种可能性均是单独的实施方式。

[0350] 在一些实施方式中,提供的核酸构建体,其中,基因修饰的ppo1启动子与SEQ ID NO:2具有至少90%序列同一性。

[0351] 在一些实施方式中,ppo1启动子与SEQ ID NO:2具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%或至少99.9%序列同一性。每种可能性均是单独的实施方式。

[0352] 在一些实施方式中,提供的核酸构建体,其中,基因修饰的ppo1启动子包括SEQ ID NO:4-13中任一项所示的序列,或其任何组合。

[0353] 在一些实施方式中,提供的核酸构建体,其中,基因修饰的ppo1启动子包括SEQ ID NO:14-63中任一项所示的序列,或其任何组合。

[0354] 在一些实施方式中,将报告基因克隆到天然性状相关基因启动子的下游,用于评价与引入天然基因启动子的基因变化相关的报告基因表达的期望变化。参考图2B。

[0355] 在一些实施方式中,将报告基因克隆为天然性状相关基因编码序列下游的融合蛋白,用于评价与引入天然基因编码序列的基因变化相关的报告基因表达的期望变化。参考图2C。

[0356] 呈现以下实施例以提供对本发明的更完整理解。为说明本发明的原理而提出的具

体技术、条件、材料、比例和报告数据仅是示例性的,不应被视为限制本发明的范围。

[0357] 实施例:

[0358] 以下实施例举例说明了本文公开的方法在植物内增强与植物改良性状相关的基因功能/活性的用途。然而,本领域的普通技术人员应理解,除草剂耐受性(HT)仅作为示例,并且该平台可用于优化任何内源性状的表达。

[0359] 实施例1:克隆大豆(大豆(Glycinemax))ppo1启动子和拟南芥(拟南芥(A.thaliana))PPOX1基因,用于转化和确定增强天然除草剂耐受性(HT)的选择临界值

[0360] 当酶的活性克服植物中除草剂活性成分的浓度时,优化植物的原卟啉原氧化酶(PPOX1)天然基因的表达水平可以提高除草剂耐受性(HT)。因此,期望增强原卟啉原氧化酶(PPOX1)的表达,以提高对PPO抑制剂型除草剂(诸如恶草酮、丙炔氟草胺或唑酮草酯,分别是Strike和Aurora中的活性成分)的天然抗性。

[0361] 因此,首先,将拟南芥(拟南芥(A.thaliana))PPOX1 Mrna序列(SEQ ID NO:1)(编码AtPPOX1)克隆到常用于文库构建的Ppa35H二元载体的骨架上,克隆到大豆(大豆(Glycine max))ppo1启动子(pGmppo1)(SEQ ID NO:2)的下游,从而得到嵌合pGmppo1-AtPPOX1(图1A)。通过标准PCR方法从大豆Gdna中扩增大豆天然ppo1启动子(pGmppo1),并将其克隆到天然AtPPOX1Mrna编码序列上游,并使用特定序列标志物将其与拟南芥启动子的天然拷贝区分,以便以后进行分子区分Qpcr工作。

[0362] 拟南芥(拟南芥(A.thaliana))PPOX1 Mrna(AtPPOX1)SEQ ID NO:1:GAAGAAGATTA
CCCAATCTGAAAAAAACCAAGAAGCTGACAAAATTCCGAATTCTCTGCGATTTCCATGGAGTTATCTCTTCTCCGTC
CGACGACTCAATCGCTTCTTCCGTCGTTTTCGAAGCCCAATCTCCGATTAAATGTTTATAAGCCTCTTAGACTCCGT
TGTTCAGTGGCCGGTGGACCAACCGTCGGATCTTCAAAAATCGAAGGCGGAGGAGGCACCACCATCACGACGGATTG
TGTGATTGTCGGCGGAGGTATTAGTGGTCTTTGCATCGCTCAGGCGCTTGCTACTAAGCATCCTGATGCTGCTCCGA
ATTTAATTGTGACCGAGGCTAAGGATCGTGTTGGAGGCAACATTATCACTCGTGAAGAGAATGGTTTTCTCTGGGAA
GAAGGTCCCAATAGTTTTCAACCGTCTGATCCTATGCTCACTATGGTGGTAGATAGTGGTTTGAAGGATGATTTGGT
GTTGGGAGATCCTACTGCGCCAAGGTTTGTGTTGTGGAATGGGAAATTGAGGCCGGTTCCATCGAAGCTAACAGACT
TACCGTTCTTTGATTTGATGAGTATTGGTGGGAAGATTAGAGCTGGTTTTGGTGCACTTGGCATTCGACCGTCACCT
CCAGGTCGTGAAGAATCTGTGGAGGAGTTTGTACGGCGTAACCTCGGTGATGAGGTTTTTGAGCGCCTGATTGAACC
GTTTTGTTCAGGTGTTTATGCTGGTGATCCTTCAAAACTGAGCATGAAAGCAGCGTTTGGGAAGGTTTGGAAACTAG
AGCAAAATGGTGGAAGCATAATAGGTGGTACTTTTAAGGCAATTCAGGAGAGGAAAAACGCTCCCAAGGCAGAACGA
GACCCGCGCCTGCCAAAACCACAGGGCCAAACAGTTGGTTCTTTCAGGAAGGGACTTCGAATGTTGCCAGAAGCAAT
ATCTGCAAGATTAGGTAGCAAAGTTAAGTTGTCTTGGAAGCTCTCAGGTATCACTAAGCTGGAGAGCGGAGGATACA
ACTTAACATATGAGACTCCAGATGGTTTAGTTTCCGTGCAGAGCAAAAGTGTTGTAATGACGGTGCCATCTCATGTT
GCAAGTGGTCTCTTGCGCCCTCTTTCTGAATCTGCTGCAAATGCACTCTCAAAACTATATTACCCACCAGTTGCAGC
AGTATCTATCTCGTACCCGAAAGAAGCAATCCGAACAGAATGTTTGATAGATGGTGAACTAAAGGGTTTTGGGCAAT
TGCATCCACGCACGCAAGGAGTTGAAACATTAGGAACTATCTACAGCTCCTCACTCTTTCCAAATCGCGCACCGCCC
GGAAGAATTTTGCTGTTGAACTACATTGGCGGGTCTACAAACACCGGAATTCTGTCCAAGTCTGAAGGTGAGTTAGT
GGAAGCAGTTGACAGAGATTTGAGGAAAATGCTAATTAAGCCTAATTCGACCGATCCACTTAAATTAGGAGTTAGGG
TATGGCCTCAAGCCATTCCTCAGTTTCTAGTTGGTCACTTTGATATCCTTGACACGGCTAAATCATCTCTAACGTCT
TCGGGCTACGAAGGGCTATTTTTGGGTGGCAATTACGTCGCTGGTGTAGCCTTAGGCCGGTGTGTAGAAGGCGCATA

TGAAACCGCGATTGAGGTCAACAACTTCATGTCACGGTACGCTTACAAGTAAATGTAAAACATTAAATCTCCCAGCT TGCGTGAGTTTTATTAAATATTTTGAGATATCAAACTTCAATTTCATTTTGATACATAGATTTGAGTTATAGTTATA TTTAGGAGAAGGGTCTTTGGTT

[0363] 天然大豆(大豆(Glycine max))ppo1启动子(pGmppo1)SEQ ID NO:2

[0364] (-)表示相对于转录起始位点(TSS)的上游位置

-1272 ATTAAGAAGC TTACAAAGAG ATTGGGAACT AAAACTACTT AAAAAAAAAG GAATTAAAAT -1213

-1212 CAATTTCAAC CAAATTATAA GAGACTTAAG ATACATTTTA TTCTAGGAAA CAATATTACT -1153

-1152 TCTGGACTTT TAAACAAGAA ACAAAAAATA AATTAATTAA GATCAATTGA ATAGTTAATT -1093

-1092 TAATTATTTT TAATCAATAA TATTATAAAT TTATATTTTA TTCTAAAAAT GTTTATCAAA -1033

-1032 CTAAGTAACA TCTGGTTTTA TATTTGTTCA GAGAAAATGC GTAGCTAACT CTATGCATTA -973

-972 AACAAAAAAA AGAAAATTTT CTTTCAATTT TTCGATTTTT CCATTTGATT TTATTGTTTG -913

-912 GGAATTATTT TTCCTTAATT CTTTCCATTC TATCAATGAA GAATCTATAA GAATTCTCAA -853

-852 TTCCATATCA TTTCATTTTT AAAAATTTAA TCGTAATGGA AATAAGAAAG ACTAATATTC -793

-792 CTTTGGAAAT ATTACCCGAA TGATATTTCT TCTCTTATAG

GTAATAAGTA TATTATTTGT -733

-732 AATTCAATAG AACAAATTTC TTATATTGTT ATTAGTTCAA TAAATATATT TATTTACATA -673

-672 AAAAATAATA AAAGGAGATC TATCTTAAAT TCTTGTATAT GAAATTTGAT TCTCGTGAAT -613

-612 GAAACAAAAC ATAAAAAAAG ATCATGAGTA ACTTGATGAT GCTATTGCCA TTATTAATAG -553

-552 TTTAATAATT ATTCCTTAAA ATAAATAGTT CAATAACTAT ATCTACTTAC AAAGAAAATA -493

-492 AAATGAGCGA CTTATATTTT TTATTAGCTT TAATGATTAA TCTTTATAAA AAATTACTAA -433

-432 AAATATTTAA TGATACGTCA TTTTTCAATT ATGTTTCTTT CCTTTACTAA ACTCGAATCA -373

[0365]

-372 AATACAAAAA TAAATTGTTT GAGTGCCGAA AGTCCGAAAC TTATTATTTG ACTTCAAAAT -313

-312 AAGTTATTGT TTTTATCTTA TAATAATCGT CCTATAAAAA AAATTATTCT AAATATTAGC -253

-252 TTTTATTTGA CTTCAAAATA AGTTATTGCT TTTATAATAA TAATGATATG ATAAAAAAAA -193

-192 AAAACTAATA GATAAAAAAA GTACTTAGAA AACATTTTTT CAAGAACGTT AAAGGTAAAG -133

-132 TTTAGATGGA GGCAATTGTG TATTTTACTG TAACCAACCA AGGCCGAGTA CTATCAGCGT -73

-72 GTTGCACATT TTGGTTATCT TTAGCACAGT GTTGAAGATA ACGAACGAAT AGTGCCATTA -13

-12 CTGTAACCAA CC -1

[0366] pGmppo1-AtPPOX1载体用于转化拟南芥模型植物,以生成稳定的T2事件,然后将其用于校准PPO预先确定临界浓度,该浓度用于植物文库筛选和选择的后续步骤。

[0367] 首先,通过将二元载体引入至农杆菌,开始产生具有稳定T2生成事件的拟南芥种子。然后,使用携带pGmppo1-AtPPOX1基因的农杆菌转化拟南芥植物。使转化的拟南芥种子发芽并用选择除草剂处理以检测转化的植物。收集种子,使T2拟南芥种子再次发芽并用选择除草剂处理以检测稳定的T2事件。

[0368] 校准选择临界值,以便以后用于筛选转化模型植物,以增加AtPPOX1酶的表达和/

或活性以及相关的除草剂耐受性(HT)特性的增强。使用浓度梯度,针对用嵌合pGmppo1-AtPPOX1基因转化的稳定T2拟南芥植物,用PPO抑制剂型除草剂丙炔氟草胺处理,校准临界浓度。选择对PPO抑制剂型除草剂丙炔氟草胺的最高浓度表现出最佳耐受性的稳定T2事件。选择基于至少一个选择标准。然后,确定预先确定的临界浓度,以便稍后用于选择启动子变体转基因植物文库。基于那些用嵌合pGmppo1-AtPPOX1基因转化的并且对PPO抑制剂型除草剂丙炔氟草胺的最高浓度表现出最佳耐受性的稳定T2拟南芥植物确定临界浓度。

[0369] 实施例2:克隆完整的天然大豆(大豆(Glycinemax))PPO1基因,用于转化和确定增强天然除草剂耐受性(HT)的选择临界值

[0370] 将大豆(大豆(Glycine max))PPO1 Mrna序列(编码GmPPO1)(SEQ ID NO:3)克隆到启动子pGmppo1下游的二元载体中,形成pGmppo-GmPPO1(图1B)。

[0371] 大豆(大豆(Glycine max))PPO1 Mrna序列(GmPPO1)SEQ ID NO:3:TGTGTATTTTAC
TGTAACCAACCAAGGCCGAGTACTATCAGCGTGTTGCACATTTTGGTTATCTTTAGCACAGTGTTGAAGATAACGAA
CGAATAGTGCCATTACTGTAACCAACCATGGTTTCCGTCTTCAACGAGATCCTATTCCCGCCGAACCAAACCCTTCT
TCGCCCCTCCCTCCATTCCCCAACCTCTTTCTTCACCTCTCCCACTCGAAAATTCCCTCGCTCTCGCCCTAACCCTA
TTCTACGCTGCTCCATTGCGGAGGAATCCACCGCGTCTCCGCCCAAAACCAGAGACTCCGCCCCCGTGGACTGCGTC
GTCGTCGGCGGAGGCGTCAGCGGCCTCTGCATCGCCCAGGCCCTCGCCACCAAACACGCCAATGCCAACGTCGTCGT
CACGGAGGCCCGAGACCGCGTCGGCGGCAACATCACCACGATGGAGAGGGACGGATACCTCTGGGAAGAAGGCCCCA
ACAGCTTCCAGCCTTCTGATCCAATGCTCACCATGGTGGTGGACAGTGGTTTAAAGGATGAGCTTGTTTTGGGGGAT
CCTGATGCACCTCGGTTTGTGTTGTGGAACAGGAAGTTGAGGCCGGTGCCCGGGAAGCTGACTGATTTGCCTTTCTT
TGACTTGATGAGCATTGGTGGCAAAATCAGGGCTGGCTTTGGTGCGCTTGGAATTCGGCCTCCTCCTCCAGGTCATG
AGGAATCGGTTGAAGAGTTTGTTCGTCGGAACCTTGGTGATGAGGTTTTTGAACGGTTGATAGAGCCTTTTTGTTCA
GGGGTCTATGCAGGCGATCCTTCAAAATTAAGTATGAAAGCAGCATTCGGGAAAGTTTGGAAGCTGGAAAAAAATGG
TGGTAGCATTATTGGTGGAACTTTCAAAGCAATACAAGAGAGAAATGGAGCTTCAAAACCACCTCGAGATCCGCGTC
TGCCAAAACCAAAAGGTCAGACTGTTGGATCTTTCCGGAAGGGACTTACCATGTTGCCTGATGCAATTTCTGCCAGA
CTAGGCAACAAAGTAAAGTTATCTTGGAAGCTTTCAAGTATTAGTAAACTGGATAGTGGAGAGTACAGTTTGACATA
TGAAACACCAGAAGGAGTGGTTTCTTTGCAGTGCAAAACTGTTGTCCTGACCATTCCTTCCTATGTTGCTAGTACAT
TGCTGCGTCCTCTGTCTGCTGCTGCTGCAGATGCACTTTCAAAGTTTTATTACCCTCCAGTTGCTGCAGTTTCCATA
TCCTATCCAAAAGAAGCTATTAGATCAGAATGCTTGATAGATGGTGAGTTGAAGGGGTTTGGTCAATTGCATCCACG
TAGCCAAGGAGTGGAAACATTAGGAACTATATACAGCTCATCACTATTCCCCAACCGAGCACCACCTGGAAGGGTTC
TACTCTTGAATTACATTGGAGGAGCAACTAATACTGGAATTTTATCGAAGACGGACAGTGAACTTGTGGAAACAGTT
GATCGAGATTTGAGGAAAATCCTTATAAACCCAAATGCCCAGGATCCATTTGTAGTGGGGGTGAGACTGTGGCCTCA
AGCTATTCCACAGTTCTTAGTTGGCCATCTTGATCTTCTAGATGTTGCTAAAGCTTCTATCAGAAATACTGGGTTTG
AAGGGCTCTTCCTTGGGGGTAATTATGTGTCTGGTGTTGCCTTGGGACGATGCGTTGAGGGAGCCTATGAGGTAGCA
GCTGAAGTAAACGATTTTCTCACAAATAGAGTGTACAAATAGTAGCAGTTTTTGTTTTTGTGGTGGAATGGGTGATG
GGACTCTCGTGTTCCATTGAATTATAATAATGTGAAAGTTTCTCAAATTCGTTCGATAGGTTTTTGGCGGCTTCTAT
TGCTGATAATGTAAAATCCTCTTTAAGTTTGATTCATTATCTACTTCATCCGTATTTAGCAAGGTAGCTATCAGTCT
GCCTCTCCATTATTCCCCTCTATTCTTGGAGAGTTGGTAGATTTTAACTTGTTACTATATATGTAAGTCCAGGCAAT
GCTCTGTAACAATGCATGAGTTACATGATTATAATATGTCTTTTTATTTGAATC

[0372] pGmppo-GmPPO1载体用于转化拟南芥模型植物,以生成稳定的T2事件,然后将其用

于校准PPO预先确定临界浓度,该浓度用于植物文库筛选和选择的后续步骤。

[0373] 根据与上文实施例1中描述的相同指导原则进行具有稳定T2代事件的拟南芥种子的产生,以及选择临界值的校准(用于稍后筛选转化模型植物以获得GmPPO1酶的增加的表达和/或活性)。

[0374] 实施例3:天然大豆ppo1启动子(pGmppo1)的算法分析,用于检测假定的热点。

[0375] 采用独特的算法来分析pGmppo1中的非编码调控元件,并预测参与转录过程的DNA结合蛋白的假定“热点”。这些包括转录因子和其他转录相关蛋白,它们以序列特异性方式与DNA相互作用。图2示出了植物基因的一般结构,包括调控区和下游编码序列。

[0376] 该算法利用来自公共数据库诸如PlantCARE(植物顺式作用调控元件)、PLACE(植物顺式作用调控DNA元件)和RegSite(面向植物的转录调控元件集合)的植物调控元件序列的可用信息。然后,应用该算法分析天然大豆PPO1基因并预测可能促进pGmppo1转录活性增强的期望变化的热点。

[0377] 该算法接收SEQ ID NO:2作为输入序列(pGmppo1的序列)。分析pGmppo1启动子的典型结构以识别其中的特定调控元件。这包括对近端启动子(包括核心启动子)和远端启动子的分析。通过分析TSS周围的数百个核苷酸(被认为是核心/近端启动子)来识别启动子区,例如用于识别调节转录起始位点(TSS)选择的元件,并且通过分析TSS上游的数千个或更多个核苷酸(被认为是远端启动子)来识别启动子区,例如用于识别可以作为转录增强子并可以在增加转录活性中发挥辅助作用的调节顺式元件的存在。

[0378] 该算法识别pGmppo1中假定调控元件的热点,处理和整合数据,然后预测启动子序列上适合基因操作/编辑的位点,从而预测具有与基因表达模式相关的新属性的潜在新调控元件。对于PPO1基因产物,期望的变化是增加酶的表达和活性。例如,这可以通过在热点遗传改变中引入增强转录激活因子结合活性或阻止抑制因子结合活性的基因变化来实现。针对pGmppo1启动子序列上的热点,可以实现在植物特定发育生长阶段以及基因表达通常较低的特定组织中基因转录活性的预期增加,此外还可以增强植物细胞内转录事件的数量和已经活跃的启动子的强度。

[0379] 实施例4:生成大量改变的大豆ppo1启动子(pGmppo1)元件集合的植物内基因文库,用于高通量评价拟南芥中增强的除草剂耐受性(HT)。

[0380] 通过将基因变化随机引入至大豆ppo1启动子pGmppo1中,从而改变调控元件的随机区域,构建包括大量改变的调控元件集合的诱变基因文库。

[0381] 从大豆基因组DNA中扩增GmPPO1基因转录起始位点(TSS)上游的调控区(-1bp至-1273bp之间),如SEQ ID NO:2所示。然后,根据生产说明,使用易错PCR方法对PCR片段进行随机诱变。突变率因Mn^{2+}和Mg^{2+}离子浓度的变化以及可用核苷酸池的不平衡而增加。通过调整扩增循环数来监测诱变操作,从而可以选择突变程度。

[0382] 将得到的携带随机点突变的分子群体克隆到二元载体(Ppa35H)中,位于SEQ ID NO:1中所示的AtPPOx1编码区上游,产生10^5个克隆的大池。

[0383] 接下来,验证pGmppo1基因变异文库,并通过对文库进行随机测序来测试文库的质量,然后对突变位点处的核苷酸分布进行统计分析。分析结果如图3B所示,显示了诱变分布均匀、随机,不偏倚特定位置。将这两个文库克隆到GmPPO1或AtPPOX1编码序列的上游,形成嵌合pGmppo1-AtPPOX1或pGmppo1-GmPPO1,混合并用于高通量转化拟南芥植物。

[0384] 在制备和质量验证pGmppo1变体文库之后,将获得的嵌合pGmppo1-AtPPOX1(或pGmppo1-GmPPO1)核酸引入至农杆菌中并利用高通量转化方法(花浸)转化至拟南芥植物中,创建植物内启动子文库,各自包含约10^3-10^5个转基因pGmppo1-AtPPOX1(或pGmppo1-GmPPO1)植物集合,其中平均每株植物携带单个基因改变的调控元件,该调控元件在pGmppo1中具有至少一个或多个基因变化。上述过程在图3A的步骤I、II和III中进行说明。

[0385] 实施例5——筛选和选择拟南芥植物的增强除草剂耐受性(HT)并识别潜在的基因变化

[0386] 使用PPO抑制剂除草剂喷洒,通过高通量植物内功能筛选测定对模型植物中改良的除草剂耐受性(HT)特性进行评价和选择,以轻松识别低频突变体。首先,将转基因pGmppo1-AtPPOX1(或pGmppo1-GmPPO1)T1幼苗置于草铵膦中以选择转化的T1事件。此后,根据其先前确定的临界浓度,对14日龄幼苗进行$1x10^{-3}$%恶草酮(Star)或丙炔氟草胺(Strike)处理。选择对恶草酮(Star)或丙炔氟草胺(Strike)临界浓度表现出高耐受性的植物,因为它们可能对除草剂具有抗性。基于对叶片的损害来确定耐受性水平,与在用天然启动子进行的初步实验中使用相同的选择标准,以确定临界浓度。上述过程在图3A的步骤IV中进行说明。

[0387] 有利地,图3C展示了功能筛选的代表性结果,显示未受损的PPO耐受植物(即“健康”植物,白色虚线圆圈),在PPO启动子中包含“正突变”(即增强-HT),周围环绕多株易感植物(叶片受损),在PPO启动子中包含其他非耐受增强突变。

[0388] 接下来,对选定植物的转基因进行PCR扩增和测序,以确定pGmppo1中增强HT的位置和正突变。所述过程在图3A的步骤V中进行说明。

[0389] 通过对转基因进行测序而确定的pGmppo1突变序列由SEQ ID NO:4-63中任一项所示。突变及其位置总结在表1中——描述了大豆ppo1启动子(pGmppo1)中的热点,以及在表2中——描述了大豆PPO1启动子(pGmppo1)中识别的突变。

[0390] 图3D示出了测序分析的结果,显示在功能除草剂选择测定发现的14个不同抗性事件中,突变沿着大豆PPO1启动子(pGmppo1)的核酸序列发生的分布情况。有利地,分析表明,在14个独立的抗性事件中,其各自与同一位置的另一个抗性事件共享至少一个相同的突变,这表明这七个位置可能是主要的热点位置,当发生突变时,赋予增强/改善的除草剂耐受性(HT)特性。

[0391] 图3D示出了在14个事件中识别的大豆PPO1启动子中的这七个主要热点(以矩形标记),并且包括相对于SEQ ID NO:2的以下位置,其中(-)表示相对于转录起始位点(TSS)的上游位置:[-1229A]、[-1105T]、[-668A]、[-481T]、[-189A]、[-70T]和[-61T]。在本申请的详细描述中的表1中总结了在pGmppo1中这7个热点位置处识别的突变,以及它们在功能植物内筛选中选择的抗性事件中的出现情况。

[0392] 实施例6——差异抗性测定

[0393] 为了评价选定突变启动子对其他另外的PPO除草剂的耐受性,使用选定的假定启动子重新转化拟南芥植物,并再次测试其对不同PPO除草剂的抗性,如下所述。

[0394] T2植物对恶草酮(Star)或丙炔氟草胺(Strike)PPO除草剂表现出良好的耐受性,并且具有期望的基因变化,如从先前确定的抗性事件中测序的任何一个转基因中所示,在草铵膦下生长以确保转基因的存在。然后,这些植物接受不同除草剂,包括恶草酮(Star)、

丙炔氟草胺(Strike)和其他PPO除草剂,活性成分的浓度分别为10^{-3}、5×10^{-3}、10^{-2}、5×10^{-2}、10^{-1}、5×10^{-1},以评估它们的不同抗性。然后,对表现最佳的植物进行重新评价,以确定其pGmppo1启动子区的基因变化。

[0395] 图4显示了该过程的示意图,展示了用于改善植物性状(诸如除草剂耐受性(HT))的一般工作流程。

[0396] 实施例7——生成增强的除草剂耐受性(HT)基因编辑的大豆作物

[0397] 利用基因编辑方法将在模型植物中识别出的具有期望弹性水平的基因变化引入至期望的大豆作物中,以生成具有增强的除草剂耐受性HT的基因编辑或修饰的大豆植物。

[0398] 实施例8——具有GFP的大豆(大豆(Glycinemax))ppo1启动子(pGmppo1)的克隆,用于评价稳定转化的拟南芥植物中增强的荧光。

[0399] 报告蛋白(诸如荧光蛋白)的非天然性状相关序列的表达导致表现出具有可检测荧光信号的表型性状。将大豆ppo1启动子(pGmppo1)的天然启动子克隆到编码GFP编码序列的序列上游,产生pGmppo1-GFP。

[0400] 使用根据预先确定的绿色荧光临界值检测荧光水平,通过高通量筛选过程评价模型植物中荧光改善。选择荧光水平高于绿色荧光临界值的植物,因为它们可能与改变的大豆启动子(pGmX)相关的期望表达变化有关。基于与在用天然启动子进行的初步实验中使用的相同的至少一个选择标准来确定荧光水平,以建立绿色荧光临界浓度。

[0401] 实施例9——具有GFP的大豆(大豆(Glycinemax))启动子(pGmX)的克隆,用于评价大豆植物中瞬时表达的增强荧光。

[0402] 使用根据预先确定的绿色荧光临界值的检测荧光水平,通过筛选过程评价靶作物植物中荧光改善。将大豆的天然启动子(pGmX)克隆到GFP编码序列上游的二元载体中,产生pGmX-GFP。通过将携带二元载体的农杆菌浸润到大豆叶片中,实现GFP在叶片中的瞬时表达。选择荧光水平高于绿色荧光临界值的叶片,因为它们可能与大豆启动子(pGmX)中改变的调控元件相关的表达发生期望变化。基于与天然启动子初步临界实验中使用的相同的至少一个选择标准来确定荧光水平。

[0403] 实施例10——克隆具有除草剂耐受性(HT)相关的拟南芥原卟啉原氧化酶(PPOX1)基因(AtPPOX1)的天然调控元件,用于评价期望的表达变化。

[0404] 拟南芥或除草剂耐受性(HT)相关原卟啉原氧化酶(PPOX1)基因(AtPPOX1)或大豆PPO1的此基因(GmPPO1)的编码序列的表达导致表现出对PPO抑制剂恶草酮、丙炔氟草胺、唑酮草酯或其他抑制剂具有增强的抗性的期望/有益的表型性状,从而允许利用它作为报告基因,用于高通量筛选模型植物,该模型植物表现出从改变的调控元件和/或与该性状功能性地偶联的任何期望的作物植物的任何天然基因的编码序列表达的期望变化。

[0405] 拟南芥PPOX1(AtPPOX1)或大豆PPO1(GmPPO1)用作报告基因,克隆到天然性状相关基因启动子的下游,用于评价与引入至天然基因启动子的基因变化相关的原卟啉原氧化酶表达的预期变化。参考图2B。

[0406] 此外,将拟南芥PPOX1(AtPPOX1)或大豆PPO1(GmPPO1)报告基因克隆为融合蛋白,位于天然性状相关基因编码序列的下游,用于评价与引入至天然基因的编码序列的基因变化相关的原卟啉原氧化酶表达的期望变化。参考图2C。

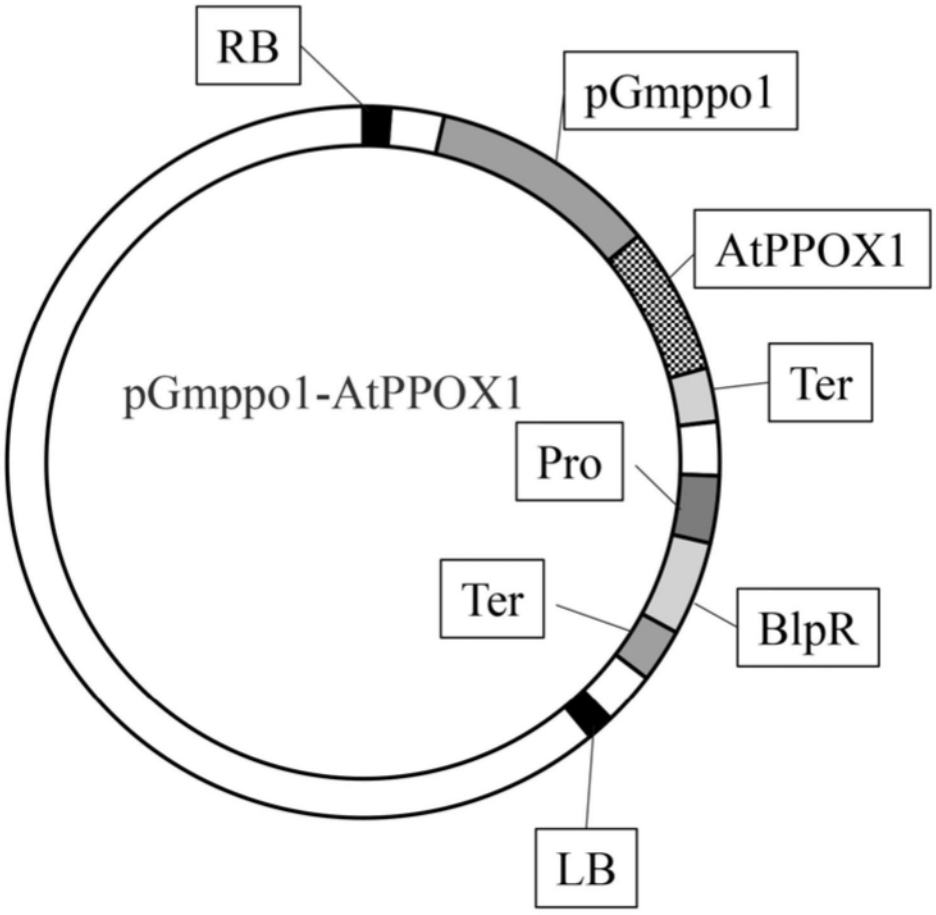


图1A

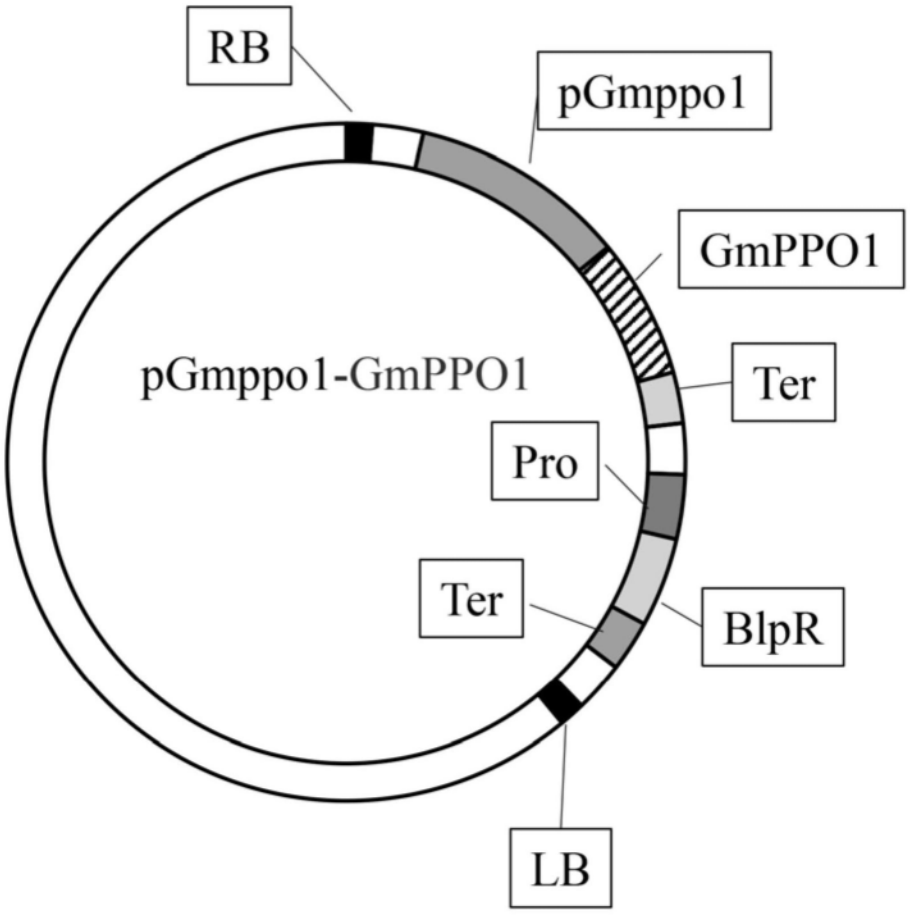


图1B

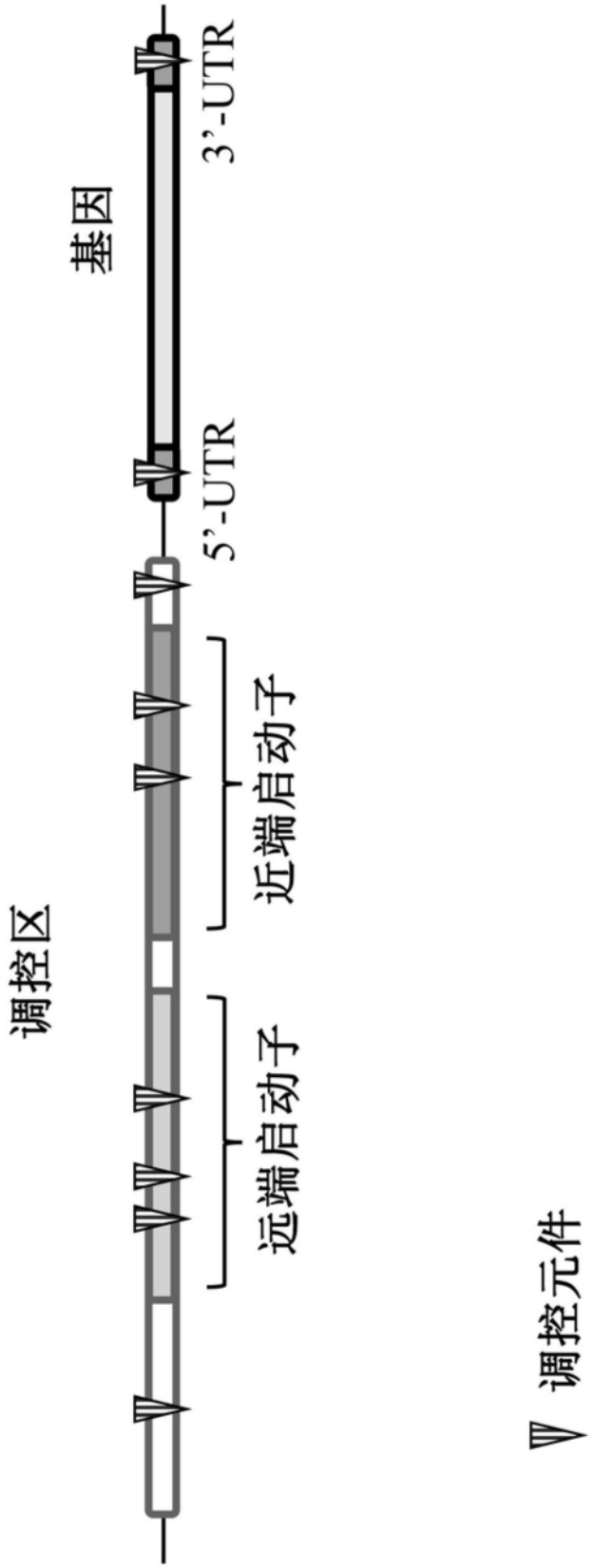


图2A

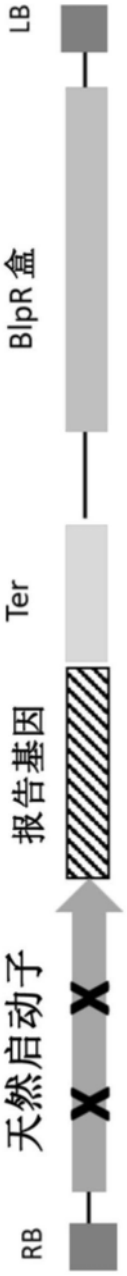


图2B

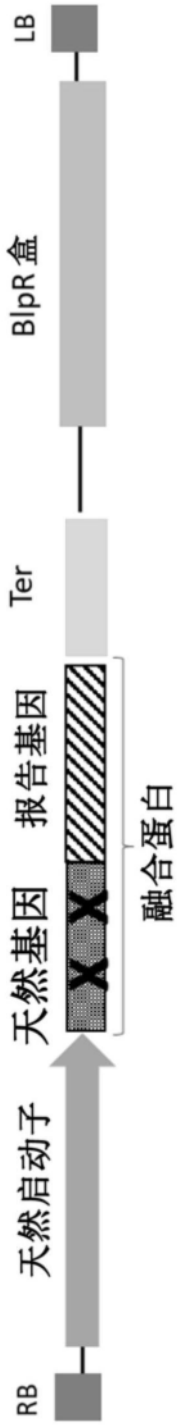


图2C

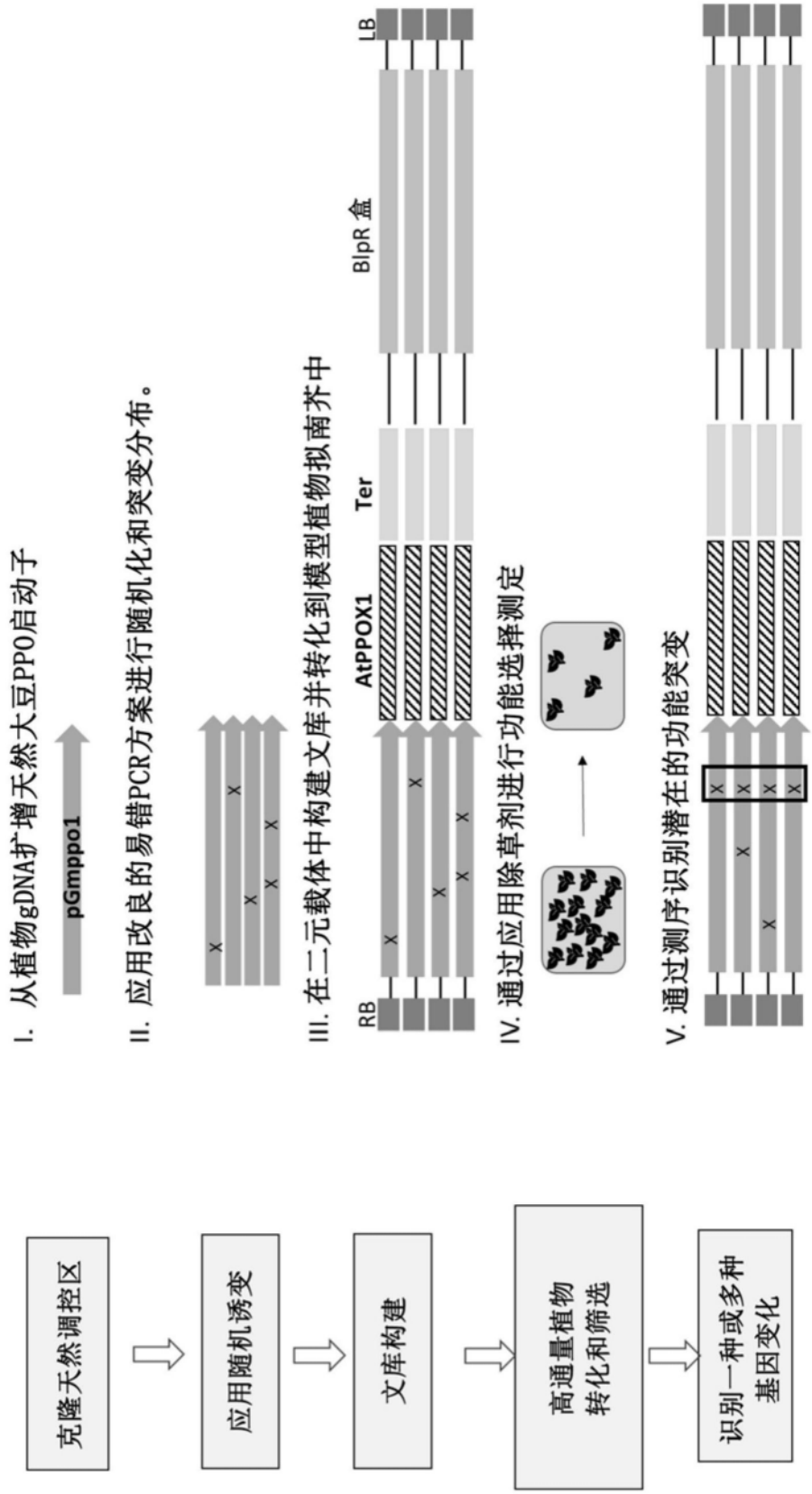

I. 从植物gDNA扩增天然大豆PPO启动子
pGmppo1
II. 应用改良的易错PCR方案进行随机化和突变分布。
III. 在二元载体中构建文库并转化到模型植物拟南芥中
RB
AtPPOX1
Ter
BlpR 盒
LB
IV. 通过应用除草剂进行功能选择测定
V. 通过测序识别潜在的功能突变
克隆天然调控区
应用随机诱变
文库构建
高通量植物转化和筛选
识别一种或多种基因变化

图3A

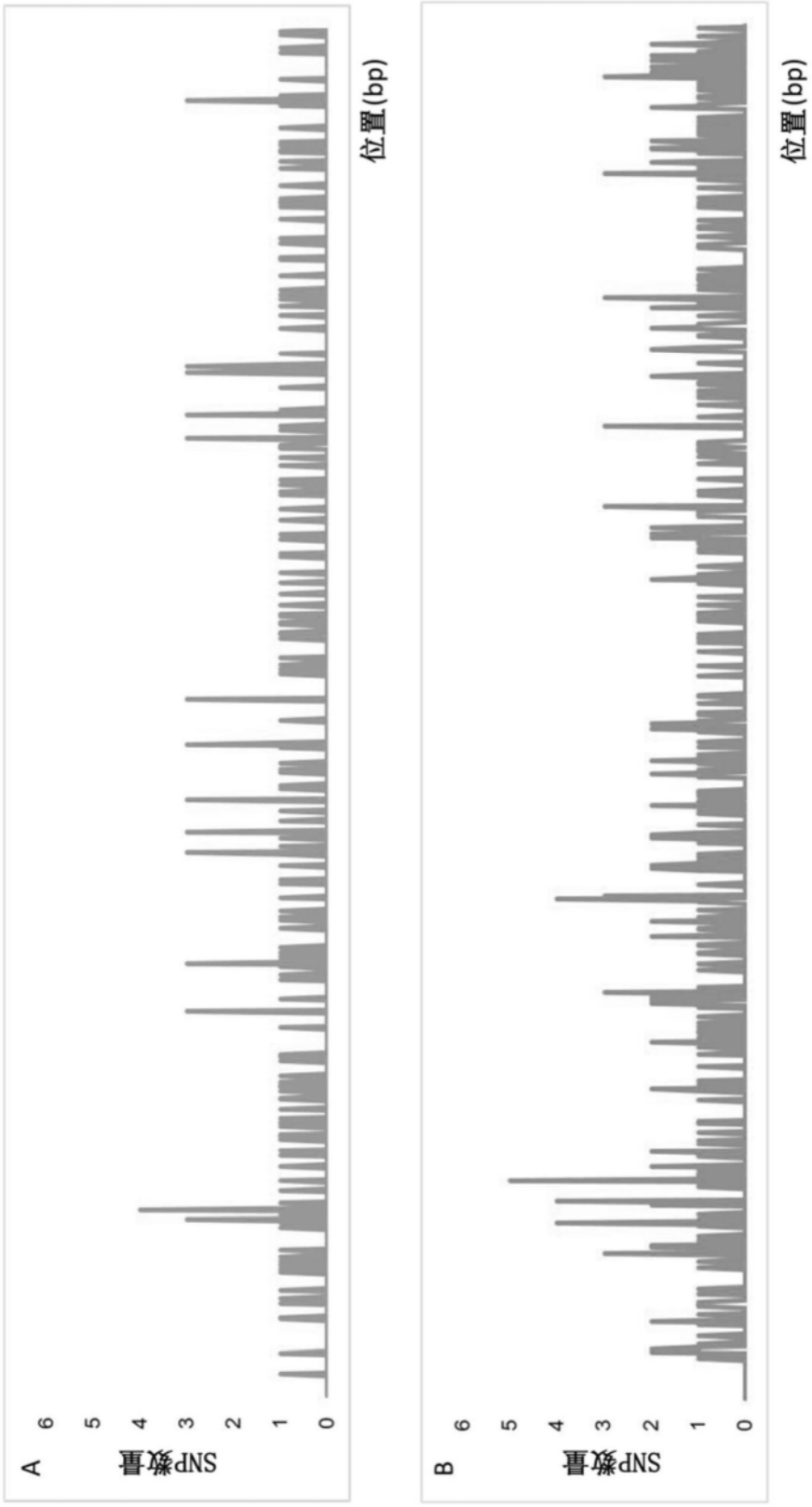


图3B



图3C

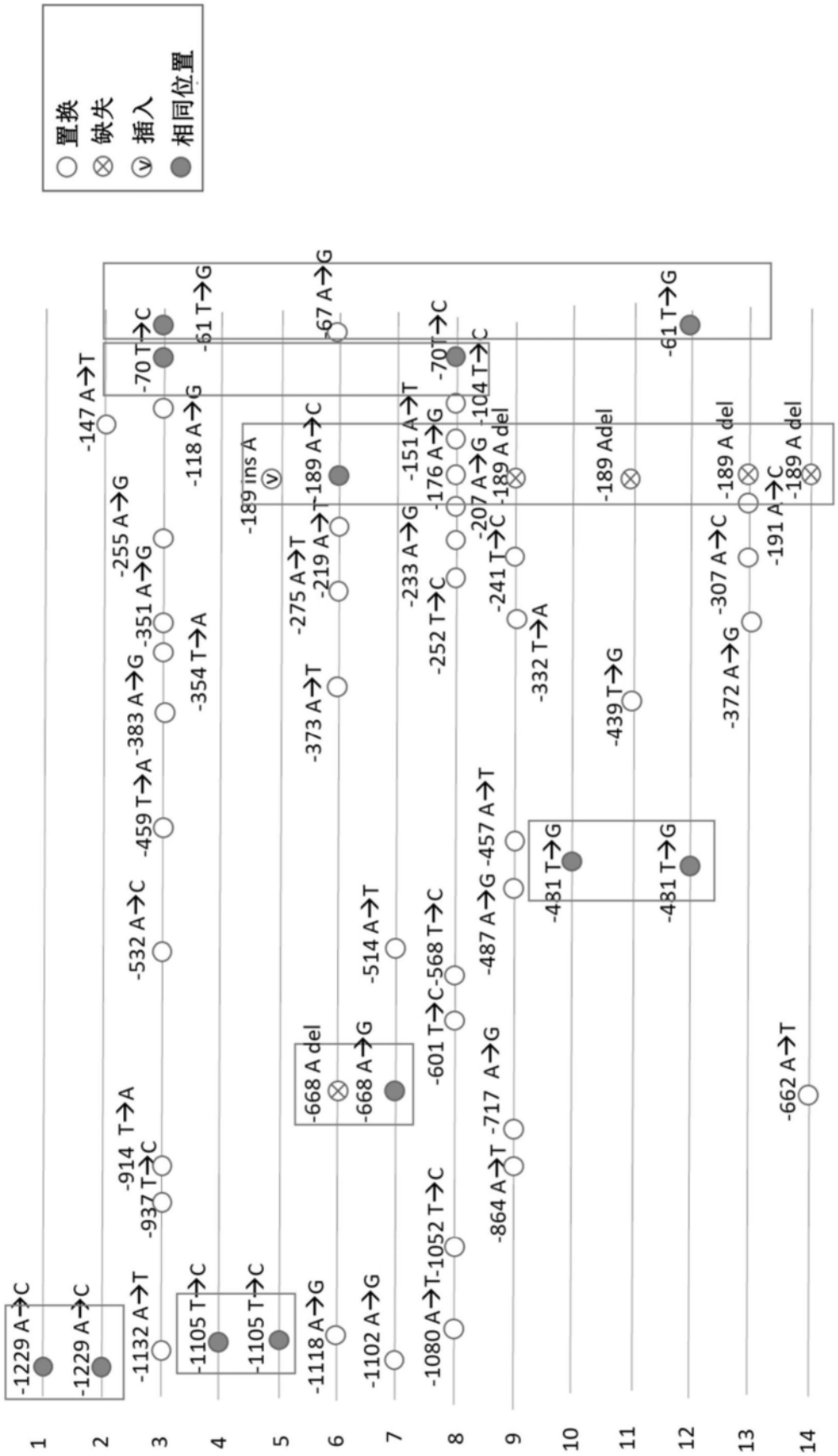

置换
缺失
插入
相同位置
-1229 A→C
-1229 A→C
-1132 A→T
-1105 T→C
-1105 T→C
-1118 A→G
-1102 A→G
-1080 A→T
-1052 T→C
-914 T→A
-937 T→C
-864 A→T
-717 A→G
-668 A del
-668 A→G
-601 T→C
-568 T→C
-514 A→T
-487 A→G
-459 T→A
-457 A→T
-532 A→C
-481 T→G
-481 T→G
-383 A→G
-373 A→T
-354 T→A
-351 A→G
-332 T→A
-275 A→T
-255 A→G
-252 T→C
-241 T→C
-233 A→G
-219 A→T
-207 A→G
-189 ins A
-189 A→C
-189 A del
-189 Adel
-189 A del
-189 A del
-176 A→G
-151 A→T
-147 A→T
-118 A→G
-104 T→C
-70 T→C
-70 T→C
-67 A→G
-61 T→G
-61 T→G
-662 A→T
-439 T→G
-372 A→G
-307 A→C
-191 A→C
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14

图3D

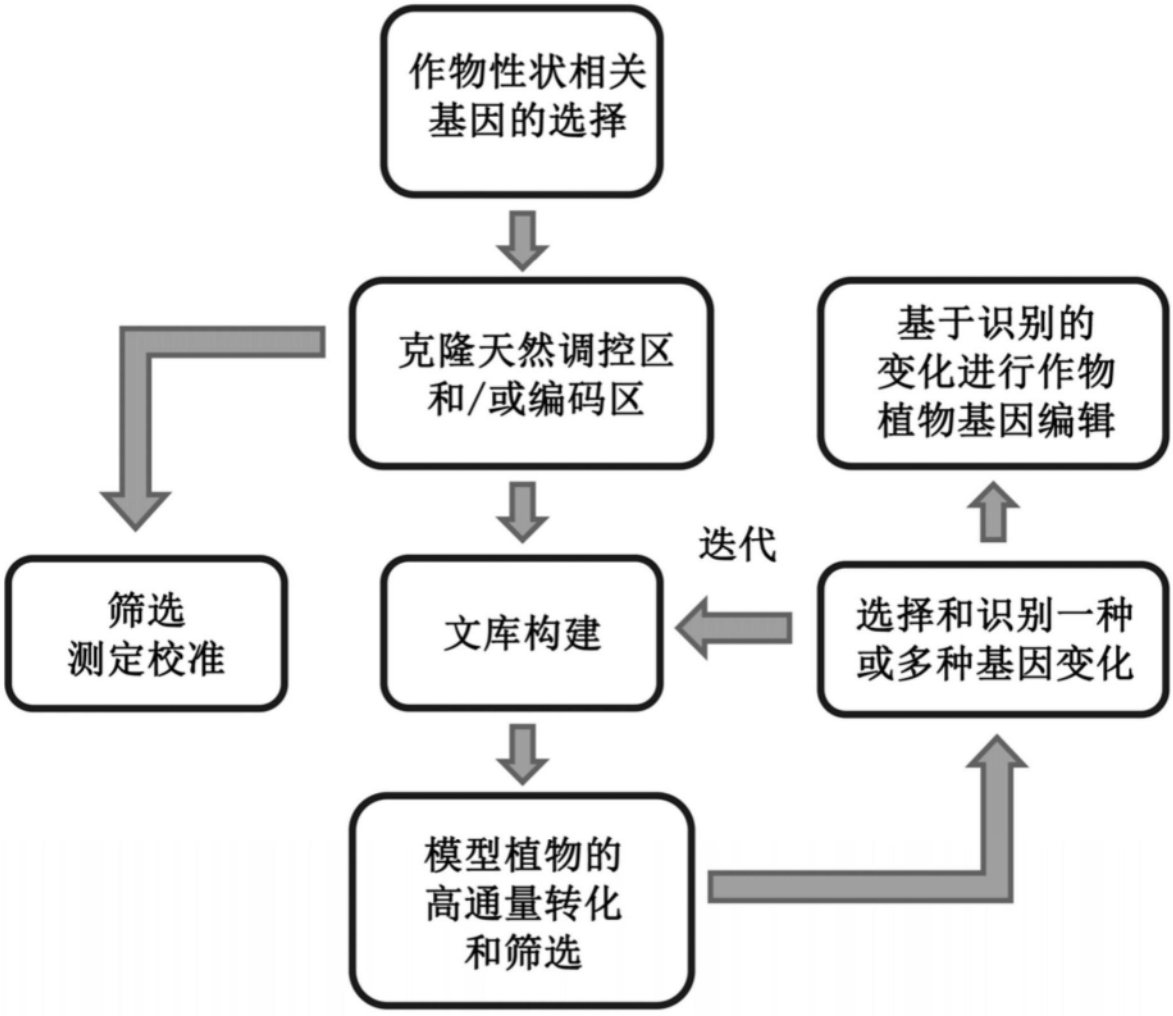

作物性状相关
基因的选择
克隆天然调控区
和/或编码区
筛选
测定校准
文库构建
迭代
选择和识别一种
或多种基因变化
基于识别的
变化进行作物
植物基因编辑
模型植物的
高通量转化
和筛选

图4