



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113924367 A

(43) 申请公布日 2022.01.11

(21) 申请号 202080037035.6

(22) 申请日 2020.05.21

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2019/088133 2019.05.23 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.11.18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2020/064218 2020.05.21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/234426 EN 2020.11.26

(71) 申请人 南京农业大学

地址 210095 江苏省南京市卫岗1号

(72) 发明人 范晓荣

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

代理人 乔献丽 张莹

(51) Int.Cl.

C12N 15/82 (2006.01)

权利要求书4页 说明书38页

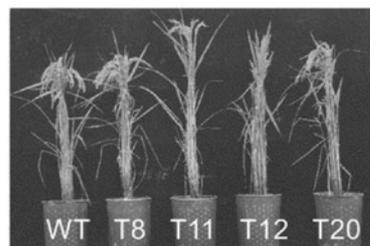
序列表17页 附图38页

(54) 发明名称

提高水稻籽粒产量的方法

(57) 摘要

本发明涉及通过增加硝酸盐转运蛋白基因的表达来增加水稻籽粒产量和氮利用效率的方法,以及表达增加的基因表达的转基因植物和制备此类植物的方法。



1. 增加植物的产量、生物量、氮利用效率 (NUE)、氮转运和/或氮含量中的至少一种的方法,所述方法包括将至少一个突变引入编码NRT2.3启动子的核酸序列中。
2. 如权利要求1所述的方法,其中所述植物是水稻。
3. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述编码NRT2.3启动子的核酸序列包含SEQ ID NO:9或其功能变体。
4. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述编码NRT2.3启动子的核酸序列包含SEQ ID NO:1或其功能变体。
5. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述突变是使用诱变引入的。
6. 如权利要求4所述的方法,其中所述突变是使用TILLING或T-DNA插入引入的。
7. 如权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述突变是使用靶向的基因组修饰,优选ZFN、TALEN或CRISPR/Cas9引入的。
8. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中将所述突变引入SEQ ID NO:1,优选引入SEQ ID NO:9。
9. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述突变是插入、缺失和/或取代。
10. 如权利要求9所述的方法,其中所述突变是至少一个核苷酸的取代。
11. 如权利要求10所述的方法,其中所述取代位于SEQ ID NO:1的位置160、位置201或位置222。
12. 如权利要求11所述的方法,其中所述突变是在位置160处的取代。
13. 如权利要求12所述的方法,其中所述突变是T到C的取代。
14. 如权利要求1至9中任一项所述的方法,其中所述突变是至少一个核苷酸的缺失。
15. 如权利要求14所述的方法,其中所述突变是SEQ ID NO:1的至少五十个,更优选六十个5'核苷酸的缺失。
16. 如权利要求14所述的方法,其中所述突变是SEQ ID NO:1的至少九十个,更优选一百个5'核苷酸的缺失。
17. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述增加是相对于对照或野生型植物。
18. 如权利要求1至17中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括再生植物并筛选所述植物的产量、生物量、氮利用效率 (NUE)、氮转运和/或氮含量中的至少一种的增加。
19. 通过权利要求1至18中任一项所述的方法获得或可获得的植物。
20. 如权利要求19所述的植物,其中所述植物是水稻。
21. 遗传改变的植物,其植物细胞的一部分,其中所述植物在至少一种编码NRT2.3启动子的核酸序列中包含至少一个突变。
22. 如权利要求21所述的遗传改变的植物,其中所述核酸序列包含SEQ ID NO:9或其功能变体。
23. 如权利要求22所述的遗传改变的植物,其中所述核酸序列包含SEQ ID NO:1或其功能变体。
24. 如权利要求21所述的遗传改变的植物,其中所述植物的特征在于产量、生物量、氮利用效率 (NUE)、氮转运和/或氮含量中的至少一种的增加中的至少一种的增加。
25. 如权利要求21至24中任一项所述的遗传改变的植物,其中所述突变被引入到SEQ ID NO:1中,并且优选被引入到SEQ ID NO:9中。

26. 如权利要求21至25中任一项所述的遗传改变的植物,其中所述突变是插入、缺失和/或取代。

27. 如权利要求26所述的遗传改变的植物,其中所述突变是至少一个核苷酸的取代。

28. 如权利要求27所述的遗传改变的植物,其中所述取代位于SEQ ID NO:1的位置160、位置201或位置222。

29. 如权利要求27所述的遗传改变的植物,其中所述突变是在SEQ ID NO:1的位置160的取代。

30. 如权利要求28所述的遗传改变的植物,其中所述突变是T到C的取代。

31. 如权利要求21至26中任一项所述的遗传改变的植物,其中所述突变是至少一个核苷酸的缺失。

32. 如权利要求31所述的遗传改变的植物,其中所述突变是SEQ ID NO:1的至少五十个,更优选六十个5'核苷酸的缺失。

33. 如权利要求31所述的遗传改变的植物,其中所述突变是SEQ ID NO:1的至少九十一个,更优选一百个5'核苷酸的缺失。

34. 如权利要求21至33中任一项所述的遗传改变的植物,其中所述增加是相对于对照或野生型植物。

35. 如权利要求21至34中任一项所述的遗传改变的植物,其中所述植物是水稻。

36. 鉴定和/或选择具有或将具有增加的产量、生物量、氮利用效率(NUE)、氮转运和/或氮含量的植物的方法,优选地与对照或野生型植物相比,所述方法包括在植物或植物种质中检测NRT2.3启动子基因序列中的至少一种多态性并筛选所述植物或其后代。

37. 如权利要求36所述的方法,其中所述NRT2.3启动子基因序列包含SEQ ID NO:9,更优选SEQ ID NO:1或其功能变体。

38. 如权利要求36所述的方法,其中所述多态性是在SEQ ID NO:1的至少位置160处的至少一种取代。

39. 如权利要求36所述的方法,其中所述多态性是SEQ ID NO:1的至少一个5'核苷酸的缺失,更优选SEQ ID NO:1的至少前六十个5'核苷酸的缺失。

40. 如权利要求36至39中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括使包含NRT2.3启动子中的至少一种多态性的染色体区域渐渗第二植物或植物种质中以产生渐渗的植物或植物种质。

41. 增加植物的产量、生物量、氮利用效率(NUE)、氮转运和/或氮含量中的至少一种的方法,所述方法包括在所述植物中引入并表达核酸构建体,所述核酸构建体包含与NRT2.3基因序列可操作地连接的NRT2.3启动子序列,其中所述NRT2.3启动子序列选自包含SEQ ID NO:2、3、4或5或其功能变体的组。

42. 制造具有增加的产量、生物量、氮利用效率(NUE)、氮转运和/或氮含量的植物的方法,所述方法包括在植物或植物细胞中引入表达核酸构建体,所述核酸构建体包含与NRT2.3基因序列可操作地连接的NRT2.3启动子序列,其中所述NRT2.3启动子序列选自包含SEQ ID NO:2、3、4或5或其功能变体的组。

43. 如权利要求41或42所述的方法,其中所述NRT2.3基因序列包含SEQ ID NO:8或其功能变体。

44. 如权利要求41至43中任一项所述的方法,其中所述植物是水稻。
45. 通过权利要求42所述的方法获得或可获得的植物。
46. 核酸构建体,其包含与NRT2.3基因序列可操作地连接的NRT2.3启动子序列,其中所述NRT2.3启动子序列选自包含SEQ ID NO:2、3、4或5或其功能变体的组。
47. 如权利要求46所述的核酸构建体,其中所述NRT2.3基因序列包含SEQ ID NO:8或其功能变体。
48. 载体,其包含权利要求46或47所述的核酸构建体。
49. 宿主细胞,其包含权利要求48所述的载体或权利要求46或47所述的核酸构建体。
50. 转基因植物,其表达权利要求48所述的载体或权利要求46或47所述的核酸构建体。
51. 如权利要求50所述的转基因植物,其中所述植物是水稻。
52. 如权利要求48所述的载体或权利要求46或47所述的核酸构建体在增加植物中产量、生物量、氮利用效率(NUE)、氮转运和/或氮含量中的至少一种中的应用。
53. 改变NRT2.3基因剪接的方法,所述方法包括将至少一个突变引入编码NRT2.3启动子的核酸序列中。
54. 核酸构建体,其包含编码至少一个DNA结合结构域的核酸序列,所述至少一个DNA结合结构域能够结合至少一个NRT2.3启动子。
55. 如权利要求54所述的核酸构建体,其中所述核酸序列编码至少一种原间隔元件,并且其中所述原间隔元件的序列选自SEQ ID No 16至23或与SEQ ID No 16至23有至少90%同一性的序列。
56. 如权利要求54或55所述的核酸构建体,其中所述构建体进一步包含编码CRISPR RNA (crRNA) 序列的核酸序列,其中所述crRNA序列包含所述原间隔元件序列和额外的核苷酸。
57. 如权利要求54至56中任一项所述的核酸构建体,其中所述构建体进一步包含编码反式激活RNA (tracrRNA) 的核酸序列,其中优选地,所述tracrRNA在SEQ ID NO.24或其功能变体中定义。
58. 如权利要求54至57中任一项所述的核酸构建体,其中所述构建体编码至少一种单指导RNA (sgRNA),其中所述sgRNA包含tracrRNA序列和crRNA序列。
59. 如权利要求54至58中任一项所述的核酸构建体,其中所述构建体与启动子可操作地连接。
60. 如权利要求59所述的核酸构建体,其中所述启动子是组成型启动子。
61. 如权利要求54至60中任一项所述的核酸构建体,其中所述核酸构建体进一步包含编码CRISPR酶的核酸序列。
62. 如权利要求61所述的核酸构建体,其中所述CRISPR酶是Cas蛋白。
63. 如权利要求62所述的核酸构建体,其中所述Cas蛋白是Cas9或其功能变体。
64. 如权利要求54所述的核酸构建体,其中所述核酸构建体编码TAL效应子。
65. 如权利要求54或64所述的核酸构建体,其中所述核酸构建体进一步包含编码内切核酸酶或其DNA切割结构域的序列。
66. 如权利要求65所述的核酸构建体,其中所述核酸内切酶是FokI。
67. 分离的植物细胞,其用至少一种如权利要求54至66中任一项所定义的核酸构建体

转染。

68. 分离的植物细胞, 其用至少一种如权利要求54至60中任一项的核酸构建体和第二核酸构建体转染, 其中所述第二核酸构建体包含编码Cas蛋白, 优选Cas9蛋白或其功能变体的核酸序列。

69. 如权利要求68所述的分离的植物细胞, 其中在权利要求54至60中任一项所述的核酸构建体之前、之后或同时转染所述第二核酸构建体。

70. 遗传修饰的植物, 其中所述植物包含如权利要求67至69中任一项所定义的转染细胞。

71. 如权利要求70所述的遗传修饰的植物, 其中编码sgRNA的核酸和/或编码Cas蛋白的核酸以稳定形式整合。

72. 增加植物的产量、生物量、氮利用效率 (NUE)、氮转运和/或氮含量中的至少一种的方法, 所述方法包括在植物中引入并表达权利要求54至66中任一项所述的核酸构建体, 其中优选所述增加是相对于对照或野生型植物。

73. 通过权利要求72的方法获得或可获得的植物。

74. 如权利要求54至66中任一项所定义的核酸构建体在增加植物中的产量、生物量、氮利用效率 (NUE)、氮转运和/或氮含量中的至少一种中的应用。

75. 获得如权利要求70至71中任一项所定义的遗传修饰的植物的方法, 所述方法包括:

- a. 选择植物的一部分;
 - b. 用如权利要求54至66中任一项所定义的核酸构建体转染段落 (a) 的植物部分的至少一个细胞;
 - c. 再生至少一个源自转染的细胞的植物;
- 选择根据段落 (c) 获得的显示NRT2.3b表达增加的一种或多种植物。

提高水稻籽粒产量的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及通过改变硝酸盐转运蛋白基因的剪接来增加水稻籽粒产量和氮利用效率的方法,以及具有增加的产量的遗传改变的植物和制备此类植物的方法。

背景技术

[0002] 在自然环境中,植物的生长和发育受到生物和非生物胁迫的不利影响。环境变化也是影响农作物正常生长的重要因素。因此,植物已经发展出许多独特的机制来应对环境波动。

[0003] 水稻是世界上最重要的主要粮食之一,被世界上超过50%的人口,尤其是亚洲人口消费(粮农组织(FAO),2015)。它在营养上也是最重要的粮食作物之一。然而,在田间,水稻可能会受到许多不利条件的影响,这会导致产量的巨大损失。影响产量的主要限制因素之一是低氮可用性。

[0004] 氮(N)是作物发育的基础,因为它是许多有机分子、核酸和蛋白质的基本成分。氮营养影响植物功能的各个层面,从新陈代谢到资源分配、生长和发育。由于施用的有机和肥料N的强烈硝化作用,植物根系获得N的最丰富来源是天然需氧土壤中的硝酸盐(NO_3^-)。相比之下,由于厌氧土壤条件,铵(NH_4^+)是水淹稻田中可获得的N的主要形式(Sasakawa和Yamamoto,1978)。

[0005] 因此,土壤无机氮(N)在好氧高地和排水良好的土壤中主要以硝酸盐形式供植物使用,而在排水不良的土壤和水淹厌氧稻田中以铵形式供植物使用。在许多植物中,根获得的硝酸盐在被同化之前被输送到茎干。相比之下,来自硝酸盐还原或直接来自铵吸收的铵优先在根部中同化,然后以有机形式被输送到地茎干。为了应对土壤中不同浓度的硝酸盐,植物根部至少发展出三种硝酸盐摄取系统,两种高亲和力运输系统(HATS)和一种低亲和力运输系统(LATS),负责硝酸盐的获取。组成型HATS(cHATS)和硝酸盐诱导型HATS(iHATS)在外部培养基中以低硝酸盐浓度吸收硝酸盐,饱和度范围为0.2-0.5mM。相比之下,LATS在较高的外部硝酸盐浓度下在硝酸盐获取中起作用。LATS和HATS的摄取分别由属于NRT1和NRT2家族的硝酸盐转运蛋白介导。根部的摄取受负反馈调节,将硝酸盐摄取的表达和活性与植物的N状态联系起来(Miller等人,2007)。

[0006] 尽管高等植物具有利用有机氮的能力,但根系获取氮的主要来源被认为是 NO_3^- 和 NH_4 。植物对这两种N源的相对适应性差异很大。虽然 NH_4 应该是优选的N源,因为其代谢需要的能量比 NO_3^- 少,但当 NH_4 作为唯一的N源提供时,只有少数物种实际上表现良好。后者是北方针叶树、杜鹃花科植物、一些蔬菜作物和水稻(*Oryza sativa* L.)。与这些物种相反,大多数农业物种有时会在 NH_4 上出现严重的毒性症状,因此,可见这些物种在 NO_3^- 上的生长速度更快。然而,当同时提供两种N源时,与单独在 NH_4 或 NO_3^- 上生长相比,生长和产量通常会显著提高(Kronzucker等人,1999)。

[0007] 水稻与其他作物的不同之处在于它能够完全依靠 NH_4 作为唯一的氮源生长。水稻传统上在淹水厌氧土壤条件下种植,其中铵是主要的氮源。然而,水稻根部特化的通气组织

细胞可以将氧气从茎干转移到根部并将其释放到根际,在那里会发生细菌将铵盐转化为硝酸盐(硝化作用)。淹水水稻根际的硝化作用可导致25-40%的总作物N以硝酸盐的形式被吸收,主要是通过高亲和力运输系统(HATS)。硝酸盐的吸收是通过与质子(H^+)的共转运来介导的,质子(H^+)可以通过质膜 H^+ -ATP酶从细胞中排出。水稻中硝酸盐吸收和转运的分子机制尚不完全清楚。由于稻田根际中的硝酸盐浓度估计小于 $10\mu M$ (Kirk和Kronzucker,2005),NRT2家族成员在水稻吸收硝酸盐方面起主要作用(Araki和Hasegawa,2006;Yan等人,2011)。因此,在湿地条件下生长的水稻根系吸收的总N中,高达40%可能以硝酸盐的形式存在,并且吸收率可与铵的吸收率相媲美(Kronzucker等人,2000;Kirk和Kronzucker,2005)。

[0008] 在水稻基因组中,已鉴定出五个NRT2基因(Araki和Hasegawa,2006;Feng等人,2011)。OsNRT2.1和OsNRT2.2具有相同的编码区序列,但具有不同的5'-和3'-非转录区(UTR),与其他单子叶植物的NRT2基因具有高度相似性,而OsNRT2.3和OsNRT2.4更紧密地与拟南芥NRT2基因相关。OsNRT2.3mRNA实际上被剪接成两个基因产物,OsNRT2.3a(AK109776)和OsNRT2.3b(AK072215),它们推定的氨基酸序列有94.2%的相似性(Feng等人,2011;Yan等人,2011)。OsNRT2.3a主要在根部表达,并且这种模式因硝酸盐供应而增强,而OsNRT2.3b在根部表达较弱而在茎干中相对丰富,N形式和浓度对转录物数量没有影响(Feng等人,2011,Feng 2012)。有趣的是,OsNRT2.3b的过表达已被证明提高转基因植物的产量、生长和NUE(Fan等人,2016)。

[0009] 总而言之,仍然需要为作物植物提供营养效率更高的基因型,以确保可持续的作物生产而实现全球粮食安全,并降低矿物肥料投入的成本和负面环境影响,例如空气和水的质量和生物多样性损失。本发明旨在解决这种需要。

发明内容

[0010] 我们描述了使用靶向诱导的基因组局部损伤(TILLING)产生水稻OsNRT2.3突变系。我们鉴定了所得的突变系共享在OsNRT2.3基因的翻译起始密码子上游的位置-83处的单突变。有趣的是,NRT2.3启动子在该位置的突变增加了NRT2.3b与NRT2.3a的相对表达,此外,显著增加了突变系的生长、产量和氮利用效率(NUE)。

[0011] 启动子上的顺式作用元件在基因表达和转录翻译中也起着重要的调节作用。我们的详细分析表明,TATA-盒是OsNRT2.3转录为OsNRT2.3a和OsNRT2.3b的关键顺式调控元件。在这项研究中,我们鉴定了一种TATA-盒结合蛋白OsTBP2.1,它与OsNRT2.3启动子上的TATA-盒基序结合。结果表明,OsNRT2.3b的5'UTR中的TATA-盒突变体和结合蛋白OsTBP2.1一起增加了OsNRT2.3b与OsNRT2.3a的比值,从而增加了产量和NUE两者。

[0012] 因此,结果揭示,OsNRT2.3基因翻译起始密码子上游的-83bp区域对于OsNRT2.3a和OsNRT2.3b的差异转录以及最终的作物生长很重要。

[0013] 在本发明的一个方面,提供了增加植物的产量、生物量、氮利用效率(NUE)、氮转运和/或氮含量中的至少一种的方法,该方法包括将至少一个突变引入编码NRT2.3启动子的核酸序列。在优选的实施方案中,植物是水稻。

[0014] 在优选的实施方案中,编码NRT2.3启动子的核酸序列包含SEQ ID NO:9或其功能变体。在进一步优选的实施方案中,编码NRT2.3启动子的核酸序列包含SEQ ID NO:1或其功能变体。

[0015] 在一个实施方案中,使用诱变引入突变。在优选的实施方案中,使用TILLING或T-DNA插入引入突变。在备选实施方案中,使用靶向基因组修饰,优选ZFN、TALEN或CRISPR/Cas9引入突变。

[0016] 优选地,将突变引入SEQ ID NO:1,并且优选引入SEQ ID NO:9。更优选地,突变是插入、缺失和/或取代。甚至更优选地,突变是至少一个核苷酸的取代。

[0017] 如权利要求10所述的方法,其中所述取代在SEQ ID NO:1的位置160、位置201或位置222。

[0018] 在一个实施方案中,突变是位置160处的取代。优选地,突变是T到C的取代。

[0019] 在另一个实施方案中,突变是至少一个核苷酸的缺失。更优选地,突变是SEQ ID NO:1的至少50个、更优选60个5'核苷酸的缺失。在另一个实施方案中,所述突变是SEQ ID NO:1的至少90个、更优选100个5'核苷酸的缺失。

[0020] 在进一步的实施方案中,该方法进一步包括再生植物并筛选所述植物的产量、生物量、氮利用效率(NUE)、氮转运和/或氮含量中的至少一种的增加。

[0021] 在本发明的另一方面,提供了遗传改变的植物,其植物细胞的一部分,其中所述植物包含在至少一种编码NRT2.3启动子的核酸序列中的至少一个突变。

[0022] 在优选的实施方案中,核酸序列包含SEQ ID NO:9或其功能变体。在另一个实施方案中,核酸序列包含SEQ ID NO:1或其功能变体。

[0023] 在一个实施方案中,植物的特征在于产量、生物量、氮利用效率(NUE)、氮转运和/或氮含量中的至少一项的增加中的至少一项的增加。

[0024] 在一个实施方案中,将突变引入SEQ ID NO:1,优选引入SEQ ID NO:9。优选地,突变是插入、缺失和/或取代。在一个实施方案中,突变是至少一个核苷酸的取代,并且在另一个实例中,是在SEQ ID NO:1的位置160、位置201或位置222处的取代。在另一实例中,突变是在位置160的取代。在一个实施方案中,突变是T到C的取代。

[0025] 在备选的实施方案中,突变是至少一种核苷酸的缺失。在一个实施方案中,突变是SEQ ID NO:1的至少50个,更优选60个5'核苷酸的缺失。

[0026] 优选地,遗传改变的植物是水稻。

[0027] 在本发明的另一方面,提供了鉴定和/或选择具有或将具有增加的产量、生物量、氮利用效率(NUE)、氮转运和/或氮含量的植物的方法,优选与对照或野生型植物相比,该方法包括检测在植物或植物种质中的NRT2.3启动子基因序列中的至少一种多态性并选择所述植物或其后代。

[0028] 在一个实施方案中,NRT2.3启动子基因序列包含SEQ ID NO:9,且更优选SEQ ID NO:1或其功能变体。

[0029] 在一个实施方案中,多态性是在SEQ ID NO:1的至少位置160处的至少一种取代。在备选实施方案中,多态性是SEQ ID NO:1的至少一个5'核苷酸的缺失,更优选SEQ ID NO:1的至少第一60个5'核苷酸的缺失。

[0030] 在另一个实施方案中,该方法进一步包括将在NRT2.3启动子中包含至少一种多态性的染色体区域渐渗第二植物或植物种质中以产生渐渗的植物或植物种质。

[0031] 在本发明的另一方面,提供了增加植物的产量、生物量、氮利用效率(NUE)、氮转运和/或氮含量中的至少一种的方法,该方法包括在所述植物中引入并表达核酸构建体,所述

核酸构建体包含与NRT2.3基因序列可操作地连接的NRT2.3启动子序列,其中NRT2.3启动子序列选自包含SEQ ID NO:2、3、4或5或其功能变体的组。

[0032] 在另一方面,提供了制备具有增加的产量、生物量、氮利用效率(NUE)、氮转运和/或氮含量的植物的方法,该方法包括在植物或植物细胞中引入并表达核酸构建体,所述核酸构建体包含与NRT2.3基因序列可操作地连接的NRT2.3启动子序列,其中NRT2.3启动子序列选自包含SEQ ID NO:2、3、4或5或其功能变体的组。

[0033] 优选地,NRT2.3基因序列包含SEQ ID NO:8或其功能变体。

[0034] 在优选的实施方案中,植物是水稻。

[0035] 在本发明的另一方面,提供了通过上述任何方法获得或可获得的植物。在优选的实施方案中,植物是水稻。

[0036] 在本发明的另一方面,提供了核酸构建体,所述核酸构建体包含与NRT2.3基因序列可操作地连接的NRT2.3启动子序列,其中NRT2.3启动子序列选自包含SEQ ID NO:2、3、4或5或其功能变体的组。在一个实施方案中,NRT2.3基因序列包含SEQ ID NO:8或其功能变体。

[0037] 在另一方面,提供了载体,所述载体包含上述核酸构建体。还提供了宿主细胞,所述宿主细胞包含载体或核酸构建体。最后,还提供了转基因植物,所述转基因植物表达载体或核酸构建体。优选地,植物是水稻。

[0038] 在本发明的另一方面,提供了载体或核酸构建体在增加植物中的产量、生物量、氮利用效率(NUE)、氮转运和/或氮含量中的至少一种方面的应用。

[0039] 在本发明的又另一方面,提供了改变NRT2.3基因剪接的方法,该方法包括将至少一个突变引入编码NRT2.3启动子的核酸序列中。

[0040] 在本发明的另一方面,提供了核酸构建体,其包含编码可以与至少一种NRT2.3启动子结合的至少一种DNA结合结构域的核酸序列。

[0041] 在一个实施方案中,核酸序列编码至少一种原间隔元件,其中原间隔元件的序列选自SEQ ID NO 16至23或与SEQ ID NO 16至23至少90%相同的序列。

[0042] 在进一步的实施方案中,构建体进一步包含编码CRISPR RNA(crRNA)序列的核酸序列,其中所述crRNA序列包含原间隔元件序列和额外的核苷酸。

[0043] 优选地,构建体进一步包含编码反式激活RNA(tracrRNA)的核酸序列,其中优选地,tracrRNA在SEQ ID NO.24或其功能变体中定义。更优选地,所述构建体编码至少一种单指导RNA(sgRNA),其中所述sgRNA包含tracrRNA序列和crRNA序列。

[0044] 在优选的实施方案中,构建体与启动子可操作地连接。更优选地,启动子是组成型启动子。

[0045] 在一个实施方案中,核酸构建体进一步包含编码CRISPR酶的核酸序列。优选地,CRISPR酶是Cas蛋白或Cpf1蛋白。在一个实施方案中,Cas蛋白是Cas9或其功能变体。

[0046] 在备选的实施方案中,核酸构建体编码TAL效应子。在该实施方案中,核酸构建体进一步包含编码内切核酸酶或其DNA切割域的序列。在一个实施方案中,核酸内切酶是FokI。

[0047] 在本发明的另一方面,提供了分离的植物细胞,其用至少一种如上所述的核酸构建体转染。在备选的方面,提供了分离的植物细胞,该细胞用包含至少一种如上所述的

sgRNA的第一核酸构建体和第二核酸构建体转染,其中所述第二核酸构建体包含编码Cas蛋白,优选Cas9蛋白质或其功能变体的核酸序列。优选地,在第一核酸构建体之前、之后或同时转染第二核酸构建体。

[0048] 在本发明的另一方面,提供了遗传修饰的植物,其中所述植物包含上述转染的细胞。在一个实施方案中,编码sgRNA的核酸和/或编码Cas蛋白的核酸以稳定形式整合。

[0049] 在本发明的另一方面,提供了增加植物的产量、生物量、氮利用效率(NUE)、氮转运和/或氮含量中的至少一种的方法,该方法包括在植物中引入并表达如上所述的核酸构建体,其中优选地,所述增加是相对于对照或野生型植物。还提供了通过上述方法获得或可获得的植物。

[0050] 在另一方面,提供了如上所述的核酸构建体在增加植物中的产量、生物量、氮利用效率(NUE)、氮转运和/或氮含量中的至少一种中的应用。

[0051] 在本发明的最后方面,提供了获得如上定义的遗传修饰的植物的方法,该方法包括:

[0052] a. 选择植物的一部分;

[0053] b. 用上述核酸构建体转染段落(a)的植物部分的至少一个细胞;

[0054] c. 再生源自经转染的细胞或多种细胞的至少一种植物;

[0055] 选择根据段落(c)获得的显示NRT2.3b表达增加的一种或多种植物。

[0056] 在上述本发明的任何方面,所述增加是相对于对照或野生型植物。

附图说明

[0057] 在以下非限制性附图中进一步描述了本发明:

[0058] 图1示出了田间成熟期-83bp突变系的生物量、NUE和氮含量。(a)田间试验中0sNRT2.3突变的-83bp突变系的表征。野生型,中华11(WT),T8、T11、T12和T20的突变系。(条=30cm);(b)-83bp突变系的核苷酸序列;(c)田间种植的突变系和WT植物的每株植物的籽粒产量和干重。干重平均值代表地上生物量,不包括籽粒产量;(d)突变系的NUE;(e)0sNRT2.3TILLING系中茎干和根部的总N浓度和(f)0sNRT2.3 TILLING系中茎干和根部的总N含量。误差线:SE(n=5)。突变系和WT之间的显著差异用不同的字母表示。(P<0.05,学生t检验)。

[0059] 图2示出了水培中-83bp突变系的表征和鉴定。(a)WT和-83bp突变系的表型。(条=10厘米);(b)-83bp突变系的干重;(c)茎干和根部的总N浓度;(d)茎干和根部的总氮含量。误差线:SE(n=6)。野生型中华11(WT)和突变系的幼苗在含有1.25mm NH₄NO₃的IRRI的溶液中生长期2周。然后提取RNA分析0sNRT2.3a/b表达;(e)0sNRT2.3b与0sNRT2.3a表达比值的qRT-PCR分析。误差线:SE(n=3)。不同的字母表示转基因系和WT之间的显著差异(P<0.05,学生t检验)。

[0060] 图3示出了0sNRT2.3启动子突变对0sNRT2.3a/b表达的影响;(a,c)0sNRT2.3启动子和改变0sNRT2.3a和0sNRT2.3b表达的不同突变位点的示意图。P为0sNRT2.3的WT启动子,P1为0sNRT2.3启动子中的-665bp突变,P2为0sNRT2.3启动子中的-44bp突变,mP为0sNRT2.3启动子中的-83bp突变;(b)0sNRT2.3b在不同启动子系中的表达促进了0sNRT2.3b;(d)0sNRT2.3b和0sNRT2.3a在mp::0sNRT2.3系中的表达;(e)mp::0sNRT2.3a系中0sNRT2.3b与

OsNRT2.3a的比值。

[0061] 图4示出了-83bp突变改变了回交系中OsNRT2.3的翻译模式;(a,b)田间试验中OsNRT2.3突变的B1F2代系的表征。两个独立系T11和T12的B1F2证实了-83bp突变的超表型。(条=30cm)AA为对照,-83bp无突变;aa为纯合的-83bp突变;Aa为杂合的-83bp突变;(c)叶和根中OsNRT2.3b和HSP表达的蛋白质印迹分析。B1F3 T11和B1F3 T12是OsNRT2.3突变回交系的B1F3代。WT和T11和T12的突变回交纯合系在1.25mM NH₄NO₃中生长3周并且氮饥饿1周。然后在5分钟内测量2.5mM 15N₃-、1.25mMNH₄15N₃和1.25mM 15NH₄NO₃的15N流入率;(d)茎干15N流入率;(e)根部15N流入率;(f)茎干与根部的15N比值。误差线:SE(n=5)。不同字母表示转基因系和WT之间的显著差异。(P<0.05,学生t检验)。

[0062] 图5示出了不同长度启动子的-83bp突变对水稻OsNRT2.3转录的影响;(a)不同长度的OsNRT2.3启动子片段和-83bp突变片段的示意图,它们驱动OsNRT2.3的437bp ORF和ZIIIB报告子基因的表达。141bp和697bp是原始的OsNRT2.3启动子;141M和697M携带-83bp突变;(b-d)对照系(无突变)和突变系的转基因水稻幼苗在含有1.25mM NH₄NO₃IRRI的溶液中生长2周。然后提取RNA以分析OsNRT2.3a/b的表达。(b)示出了OsNRT2.3a在转基因系中的表达;(c)示出了OsNRT2.3b在转基因系中的表达;(d)示出了转基因系中的OsNRT2.3b/OsNRT2.3a的表达比值。误差线:SE(n=3)。不同的字母表示转基因系和WT之间的显著差异。(P<0.05,学生t检验)。

[0063] 图6示出了OsTBP2.1与OsNRT2.3启动子片段结合并激活OsNRT2.3表达。(a)OsTBP2.1与OsNRT2.3b 5'UTR的TATA-盒结合。酵母细胞与pTATA-盒::AbAi和OsTBP2/2.1/2.2::pGADT7共转化。细胞在培养基上生长以筛选相互作用(SD、-Ura、-Leu)和(800nM)。AbA用于抑制背景生长。(b)水稻原生质体瞬时测定的构建体。OsNRT2.3启动子或-83bp突变启动子用于驱动报告子的表达。pNRT2.3::Luc,pmNRT2.3::Luc。(c)OsTBP2.1激活OsNRT2.3启动子。OsTBP2.1的表达由Ubi启动子驱动。报告子和效应子共同转化到水稻原生质体中。(d)稳定的水稻遗传载体构建框架。报告蛋白-eGFP和mCherry构建在一个载体中,141bp和697bp启动子促进eGFP和mCherry的表达。(e)eGFP的水平。(f)mCherry的水平。误差线:SE(n=3)。(P<0.05,学生t检验)。

[0064] 图7示出了OsTBP2.1和OsNRT2.3a/b在OsTBP2.1过表达和T-DNA突变系中的表达。(a)田间试验中OsTBP2.1过表达的表征。野生型,Wuyunjing27(WT-W27)。(b)OsTBP2.1 T-DNA突变系在田间试验中的表征。野生型,Huangyang(WT-HY)。(条=20cm)。(c)OsTBP2.1在OE_{OsTBP2.1}和OsTBP2.1系中的表达。(d)OsTBP2.1过表达和T-DNA突变系中OsNRT2.3b与OsNRT2.3a的比值。

[0065] 图8示出了TATA-盒突变时OsNRT2.3转录模型的示意图。数据显示,当突变时,OsTBP2.1会增强OsNRT2.3b的表达,从而改变OsNRT2.3b与OsNRT2.3a的比值,并导致更高水平的OsNRT2.3b翻译。

[0066] 图9示出了田间TILLING系的特征。

[0067] 图10示出了OsNRT2.3a和OsNRT2.3b在-83bp突变系中的表达。

[0068] 图11示出了-83bp突变回交系的鉴定。

[0069] 图12示出了-83bp突变回交系在成熟阶段的产量、干重和氮利用效率。

[0070] 图13示出了不同OsNRT2.3启动子长度对水稻中OsNRT2.3a/b表达的影响。

[0071] 图14示出了OsNRT2.3a和OsNRT2.3b在OE0sTBP2.1和0sTBP2.1系中的表达。

[0072] 图15示出了 $^{15}\text{NO}_3^-$ 和 $^{15}\text{NH}_4^+$ 在5分钟内流入OsNRT2.3突变系。WT和OsNRT2.3突变幼苗在1.25mM NH_4NO_3 中生长3周且氮饥饿1周。然后在5分钟内测量2.5mM $^{15}\text{NO}_3^-$ 、1.25mM $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ 和1.25mM $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ 的 ^{15}N 流入率。(a) 根部 ^{15}N 流入率。(b) 茎干 ^{15}N 流入率。误差线:SE (n=5)。不同字母表示转基因系和WT之间的显著差异 ($P<0.05$, 单向方差分析)。

[0073] 图16示出了 $^{15}\text{NO}_3^-$ 和 $^{15}\text{NH}_4^+$ 在5分钟时间内流入OsNRT2.3突变回交系。WT和T11和T12的突变回交纯合系在1.25mM NH_4NO_3 中生长3周且氮饥饿1周。然后在5分钟内测量2.5mM $^{15}\text{NO}_3^-$ 、1.25mM $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ 和1.25mM $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ 的 ^{15}N 流入率。(a) 根部 ^{15}N 流入率。(b) 茎干 ^{15}N 流入率。误差线:SE (n=5)。不同字母表示转基因品系和WT之间存在显著差异 ($P<0.05$, 单向方差分析)。

[0074] 图17示出了成熟期-83bp突变回交系中的氮含量。突变回交系和对照叶、叶鞘、茎和穗的氮含量。

[0075] 发明详述

[0076] 水稻转运蛋白OsNRT2.3有两种剪接形式——OsNRT2.3a和OsNRT2.3b。一些硝酸盐转运蛋白需要两个基因才能发挥作用;第二个较小组件(OsNAR21)是转运蛋白正确靶向质膜所需的。两种拼接形式之一OsNRT2.3a需要该第二组件来实现功能,而另一种形式OsNRT2.3b则不需要。我们之前已经证明,在水稻中过表达OsNRT2.3b可以改善生长和NUE。

[0077] 我们现在意外地证明了NRT2.3基因5'上游的核酸序列突变,即NRT2.3基因的ATG起始密码子的上游,影响该基因的剪接,导致OsNRT2.3b与OsNRT2.3a的表达比值增加。此外,通过靶向基因组中诱导的局部损伤,我们获得了许多在OsNRT2.3基因的-83bp位置(相对于NRT2.3基因的ATG起始密码子)携带突变的系。与野生型相比,该位置上游序列的突变改变了OsNRT2.3基因的转录,并增加了OsNRT2.3b与OsNRT2.3a的比值。此外,与田间对照植物相比,回交突变系使总生物量增加了约28%,NUE增加了约75%。在田间回交突变系的每穗重量也增加了约60%。同时,与对照相比,回交突变系进一步提高了田间的氮吸收。

[0078] 因此,我们得出结论,OsNRT2.3基因上游序列在-83处的突变是控制OsNRT2.3基因剪接的关键,导致OsNRT2.3b的相对表达增加,对水稻生长、产量和NUE产生积极影响。

[0079] 现在将进一步描述本发明。在以下段落中,更详细地定义了本发明的不同方面。除非明确相反指出,否则如此定义的每个方面都可以与任何其他方面或多个方面组合。特别地,被指示为优选或有利的任何特征可以与被指示为优选或有利的任何其他特征组合。

[0080] 除非另有说明,否则本发明的实践将采用植物学、微生物学、组织培养、分子生物学、化学、生物化学和重组DNA技术、生物信息学的常规技术,这些技术在本领域的技术范围内。这些技术在文献中有充分的解释。

[0081] 如本文所用,词语“核酸”、“核酸序列”、“核苷酸”、“核酸分子”或“启动子序列”旨在包括DNA分子(例如,cDNA或基因组DNA)、RNA分子(例如,mRNA)、天然存在的、突变的、合成的DNA或RNA分子,以及使用核苷酸类似物产生的DNA或RNA的类似物。它可以是单链或双链的。此类核酸或多核苷酸包括但不限于结构基因的编码序列、反义序列和不编码mRNA或蛋白质产物的非编码调控序列。这些术语还涵盖基因。术语“基因”或“基因序列”广泛用于指与生物学功能相关的DNA核酸。因此,基因可包括基因组序列中的内含子和外显子,或者可以仅包含cDNA编码序列,和/或可包括与调控序列组合的cDNA。

[0082] 本发明的方面涉及重组DNA技术并且排除仅基于通过传统育种方法产生植物和通过传统育种方法获得植物的实施例。

[0083] 提高产量、生物量、氮利用效率 (NUE)、氮运输和/或氮含量的方法

[0084] 在本发明的第一方面,提供了增加植物的产量、生物量、氮利用效率 (NUE)、氮转运和/或氮含量的方法,该方法包括将至少一个突变引入NRT2.3基因的核酸序列上游。

[0085] 在一个实施方案中,该方法包括在NRT2.3基因的ATG起始密码子上游(例如在5'方向)的224个核苷酸中的至少一个核苷酸中引入突变。优选地,NRT2.3基因在SEQ ID NO:8或其变体中定义。

[0086] 如本文所用,根据本发明的各个方面使用的术语“增加”、“改进”或“增强”是可互换的。在一个实施方案中,与对照植物相比,产量、生物量、氮利用效率 (NUE)、氮转运和/或氮含量可增加至少5%-50%或更多,例如增加至多或至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。

[0087] 术语“产量”通常是指具有经济价值的可测量产品,通常与特定作物、区域和一段时间相关。单个植物部分根据它们的数量、大小和/或重量直接影响产量。实际产量是对于作物和年份的每平方米的产量,它是通过将总产量(包括收获和评估产量)除以种植平方米来确定的。

[0088] 如本文所定义的术语“增加的产量”可以被认为包括以下任何一项或至少一项,并且可以通过评估以下一项或多项来测量:(a)植物的一个或多个部分,地上(可收获部分)的增加的生物量(重量),或增加的根生物量、增加的根体积、增加的根长度、增加的根直径或增加的根长度或任何其他可收获部分的增加生物量。增加的生物量可以表示为g/植物或kg/公顷(b)增加的每株植物的种子产量,这可以包括每株植物或个体基础的种子生物量(重量)增加中的一种或多种,(c)增加的种子灌浆率,(d)增加的饱满种子的数量,(e)增加的收获指数,其可以表示为可收获部分(例如种子)的产量与总生物量的比值,(f)增加的生存力/发芽效率,(g)增加的种子或豆类或谷物的数量或大小或重量,(h)增加的种子体积(这可以是组成(即脂质(本文也称为油))、蛋白质和碳水化合物总含量和组成)变化的结果,(i)增加的(个体或平均)种子面积,(j)增加的(个体或平均)种子长度,(k)增加的(个体或平均)种子周长,(l)增加的生长或增加的分枝,例如具有更多分枝的花序,(m)增加的鲜重或谷物填充,(n)增加的穗重,(o)增加的千粒重(TKW),这可能是从饱满的种子数及其总重量得出的,并且可能是种子大小和/或种子重量增加的结果,(p)减少的每株植物的不育分蘖数和(q)更坚固或更强壮的秆或茎。所有参数都相对于野生型或对照植物。

[0089] 在一个实施方案中,产量的增加包括植物重量的增加,优选干重(g/植株)。在另一个备选或额外的实施方案中,产量的增加包括每穗重量的增加。在一个实施方案中,与对照植物相比,每穗重量增加至少或高达40%,更优选50%,甚至更优选60%。

[0090] 在一个实例中,与对照或野生型植物相比,产量增加至少或高达2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。或者,与对照植物相比,产量可备选地增加20-70%,更优选25-75%。

[0091] 术语“氮利用效率”或NUE可以定义为作物产量(例如籽粒产量)。或者,NUE可以定义为农业NUE,即意指籽粒产量/N。植物的整体N利用效率包括吸收和利用效率,并且可以计

算为UpE。在一个实施方案中,与对照植物相比,NUE增加了5%-80%或更多,例如与对照植物相比,增加了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在优选的实施方案中,与对照或野生型植物相比,NUE增加至少60%,更优选70%,甚至更优选75%。

[0092] 如本文所用,术语“氮转运”涵盖氮获取或氮流入或吸收。在一个实施方案中,氮吸收可以指铵、硝酸盐和/或硝酸铵的吸收。在一个实施方案中,植物的茎干和/或根部中的氮流入增加。这样的增加与对照或野生型植物相比,为至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、65%、70%。

[0093] 在一个实施方案中,植物的茎干和/或根中的氮含量增加。在进一步的实施方案中,在叶、叶鞘、茎和穗中的至少一种中的氮含量增加。在进一步的实施方案中,植物中的总氮含量没有增加。

[0094] “至少一个突变”是指当NRT2.3启动子基因以多于一个拷贝或同源物(具有相同或略有不同的序列)存在时,在至少一种基因中存在至少一个突变。优选地,所有基因都突变。

[0095] 如图5a所示,NRT2.3a基因包含43bp 5'UTR(非翻译区),而NRT2.3b基因包含223bp 5'UTR。

[0096] 在一个实施方案中,该方法包括将至少一个突变引入到优选内源性的NRT2.3启动子中。如本文所用,“启动子”涵盖ATG上游1.5kbp的核酸序列(起始或起始密码子)。如本文所用,术语“启动子”包括NRT2.3a和NRT2.3b基因的5'UTR(非翻译区)。在一个实施方案中,突变在NRT2.3a启动子中。在备选实施方案中,突变位于NRT2.3b基因的5'UTR中。

[0097] 在另一个实施方案中,NRT2.3启动子包含TATA-盒。更优选地,NRT2.3启动子包含SEQ ID NO:1或其功能变体。在另一个实施方案中,NRT2.3启动子包含SEQ ID NO:9或其功能变体。

[0098] 在进一步优选的实施方案中,该突变影响NRT2.3基因的剪接,特别是该突变增加了NRT2.3b与NRT2.3a的相对表达。与野生型植物相比,所述相对表达的增加是至少2倍,更优选至少4倍,更优选至少6倍,甚至更优选至少8倍。在备选实施方案中,与野生型植物中的表达水平相比,突变使NRT2.3b的表达增加至少5倍,更优选6倍,甚至更优选7倍。在进一步优选的实施方案中,突变在SEQ ID NO:1或其变体中。在一个实施方案中,NRT2.3b在植物的茎干中的表达增加和/或NRT2.3a在植物根部的表达减少。

[0099] 在进一步的实施方案中,突变在TATA-盒中,更优选在SEQ ID NO:9或其功能变体中。

[0100] 在上述实施方案中,“内源性”核酸可以指植物基因组中的天然或天然序列。在一个实施方案中,NRT2.3启动子的序列包含如SEQ ID NO:1中定义的核酸序列或由其组成,其是NRT2.3b基因的5'UTR或其功能变体。

[0101] 如本文中参照SEQ ID NO:1至8中的任一个所使用的术语“核酸序列的功能变体”是指保留完整非变体序列的生物学功能的变体基因序列或该基因序列的一部分。在SEQ ID NO:1至4的上下文中,这可能意指该序列能够启动或以其他方式导致NRT2.3基因的转录。

[0102] 功能变体(或“变体”-此类术语可互换使用)还包括目标基因的变体,其具有不影响功能的序列改变,例如在非保守残基中。还包括与本文所示的野生型序列相比基本上相同的变体,即仅具有一些序列变异,例如在非保守残基中,并且具有生物活性。所提出的每

个修饰都在本领域的常规技术范围内,编码产物的生物活性保留的确定也是如此。

[0103] 如在本文描述的本发明的任何方面中使用的,“变体”或“功能变体”与非变异核酸或氨基酸序列具有至少25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%整体序列同一性。

[0104] 如果两个序列中的核苷酸序列在如下所述的最大对应性比对时相同,则称两个核酸序列是“相同的”。在两个或更多个核酸的上下文中,术语“相同”或“同一性百分比”是指在使用以下序列比较算法之一或通过手动对齐和目视检查来测量,在比较窗口上比较和对齐最大对应性时,两个或更多个序列或子序列相同或具有特定百分比的相同核苷酸。当序列在保守取代方面不同时,可以向上调整序列同一性百分比以校正取代的保守性质。进行这种调整的手段是本领域技术人员公知的。对于序列比较,通常一个序列充当参考序列,与测试序列进行比较。当使用序列比较算法时,将测试和参考序列输入计算机,必要时指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。可以使用默认程序参数,或者可以指定替代参数。然后,序列比较算法基于程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。适用于确定序列同一性百分比和序列相似性的算法的非限制性实例是BLAST和BLAST 2.0算法。

[0105] 在进一步的实施方案中,本文所用的变体可包含编码本文定义的NRT2.3启动子的核酸序列,其能够在本文定义的严格条件下与SEQ ID NO:1定义的核酸序列杂交。

[0106] “严格条件”或“严格杂交条件”是指探针与其靶序列杂交达到比与其他序列杂交可检测的更高的程度(例如,至少比背景高2倍)的条件。严格条件取决于序列,并且在不同情况下会有所不同。通过控制杂交和/或洗涤条件的严格性,可以鉴定与探针100%互补的靶序列(同源探测)。

[0107] 或者,可以调整严格条件以允许序列中的一些错配,从而检测到较低程度的相似性(异源探测)。通常,严格条件是在pH 7.0至8.3盐浓度小于约1.5M Na离子,通常约0.01至1.0M Na离子浓度(或其他盐)以及对于短探针(例如,10到50个核苷酸)温度至少约30°C的条件和对于长探针(例如,大于50个核苷酸)至少约60°C。杂交持续时间一般少于约24小时,通常约4至12小时。通过添加去稳定剂例如甲酰胺也可以达到严格的条件。

[0108] 在一个实施方案中,被引入其NRT2.3启动子的突变可以选自以下突变类型:

[0109] 1. 一个或多个核苷酸的“插入突变”;

[0110] 2. 一个或多个核苷酸的“缺失突变”;

[0111] 3. “取代突变”,导致至少一个核苷酸被至少一个不同的核苷酸取代。

[0112] 4. “倒置”突变,即核酸序列的一百八十度旋转。

[0113] 在一个实施方案中,突变是NRT2.3启动子中至少一个核苷酸的缺失,其中优选地,NRT2.3启动子包含SEQ ID NO:1或其功能变体或由其组成。在优选的实施方案中,突变是SEQ ID NO:1的5'端缺失至少一个核苷酸。更优选地,突变是SEQ ID NO:1的5'端缺失至少前10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110或120个核苷酸。在更优选的实施方案中,突变是SEQ ID NO:1的5'端至少前50个,更优选前60个,以及甚至更优选前62个核苷酸缺失。在备

选实施方案中,突变是SEQ ID NO:1的5'端的前90个,更优选前100个,以及甚至更优选前101个核苷酸的缺失。在备选实施方案中,突变是SEQ ID NO:1中SEQ ID NO:6或7的缺失。

[0114] 在进一步的实施方案中,突变是在SEQ ID NO:1的位置160处(这在本文中也可以被称为相对于NRT2.3基因的ATG起始密码子在位置-83处的突变)、SEQ ID NO:1的位置201处(这在本文中也可称为位置-42)和/或SEQ ID NO:1的位置222处(同样,在本文中可称位置为-21)的至少一个核苷酸的取代。在位置-83(相对于ATG起始密码子),有两个假定的基序,命名为OSE2ROOTNODULE(-82bp到-86bp)(SEQ ID NO:10)和ASF1MOTIFCAMV(-76bp到-83bp)(SEQ ID NO:11)。我们认为OSE2ROOTNODULE基序可能控制分蘖过程,并且ASF1MOTIFCAMV基序是抑制子结合基序。可能是突变系中该基序的基因抑制子结合功能的丧失导致这些系中观察到的表达比值的变化。

[0115] 在进一步优选的实施方案中,取代可以如下:

[0116] (SEQ ID NO:1的)位置160:T到C;

[0117] (SEQ ID NO:1的)位置201:A到C;

[0118] (SEQ ID NO:1的)位置222:T到C。

[0119] 在最优选的实施方案中,突变是在SEQ ID NO:1的位置160上的T到C取代。

[0120] 在优选的实施方案中,至少一个突变是NRT2.3启动子的TATA-盒中至少一个核苷酸的取代、缺失和/或插入。在一个实施方案中,TATA-盒在SEQ ID NO:9或其变体中定义。因此,在一个实施方案中,突变影响转录因子或组蛋白与NRT2.3启动子的结合,并因此影响NRT2.3基因的转录。在优选的实施方案中,突变改变了TATA-盒结合因子如TBP2.1的结合能力,这也影响了NRT2.3基因的表达。

[0121] 在另一个实施方案中,突变是OSE2ROOTNODULE基序和/或ASF1MOTIFCAMV基序中至少一个核苷酸的取代、缺失和/或缺失。优选地,突变导致一种或两种基序的功能丧失或部分丧失。如上所述,我们认为OSE2ROOTNODULE基序可能参与分蘖的控制。我们还认为ASF1MOTIFCAMV基序是抑制子结合基序。在一个实施方案中,突变在ASF1MOTIFCAMV基序中并阻止或降低其抑制子结合的能力。更优选地,OSE2ROOTNODULE基序在SEQ ID NO:10或其变体中定义,ASF1MOTIFCAMV基序在SEQ ID NO:11或其变体中定义。本文定义了变体。

[0122] 在优选的实施方案中,突变是TATA-盒中至少一个核苷酸的取代。甚至更优选地,突变是在SEQ ID NO:9的位置12处的取代。在一个实施方案中,取代是T到C的取代。

[0123] 还包括其他主要变化,例如去除启动子或增强子功能区域的缺失,因为这些会影响NRT2基因的剪接。例如,突变可能导致TATA-盒的缺失。换言之,SEQ ID NO:9的缺失。

[0124] 在一个实施方案中,使用诱变或靶向基因组编辑引入突变。即,在一个实施方案中,本发明涉及方法和通过上述基因工程方法产生的植物,并且不涵盖天然存在的品种。

[0125] 靶向基因组修饰或靶向基因组编辑是一种基因组工程技术,它使用靶向DNA双链断裂(DSB)通过同源重组(HR)介导的重组事件来刺激基因组编辑。为了通过引入位点特异性DNA DSB实现有效的基因组编辑,可以使用四大类可定制的DNA结合蛋白:源自微生物移动遗传元件的大范围核酸酶、基于真核转录因子的ZF核酸酶、来自黄单胞菌属细菌的转录激活因子样效应子(TALE),以及来自II型细菌适应性免疫系统CRISPR(成簇的规则间隔短回文重复序列)的RNA指导的DNA核酸内切酶Cas9。大范围核酸酶、ZF和TALE蛋白都通过蛋白质-DNA相互作用识别特定的DNA序列。尽管大范围核酸酶整合了核酸酶和DNA结合结构域,

但ZF和TALE蛋白由分别靶向DNA的3或1个核苷酸(nt)的单独模块组成。ZF和TALE可以以所需的组合组装并连接到FokI的核酸酶结构域,以将核酸水解活性导向特定的基因组位点。

[0126] 通过细菌III型分泌系统递送至宿主细胞后,TAL效应子进入细胞核,与宿主基因启动子中的效应子特异性序列结合并激活转录。它们的靶向特异性由串联的33-35个氨基酸重复序列的中心结构域决定。紧接着是20个氨基酸的单个截短重复。检查的大多数天然存在的TAL效应子具有12到27个完整重复。

[0127] 这些重复仅通过两个相邻的氨基酸,即它们的重复可变双残基(RVD)来区分。RVD决定TAL效应子将识别哪个单核苷酸:一个RVD对应一个核苷酸,四种最常见的RVD各自优先与四种碱基之一结合。天然发生的识别位点前面统一有TAL效应子活性所需的T。TAL效应子可以与FokI核酸酶的催化结构域融合以创建TAL效应子核酸酶(TALEN),从而在体内产生靶向DNA双链断裂(DSB)以进行基因组编辑。该技术在基因组编辑中的使用在本领域中有很好的描述,例如在US 8,440,431、US 8,440,432和US 8,450,471中。Cermak T等人描述了一组可与Golden Gate克隆方法一起使用以组装多个DNA片段的定制质粒。如其中所述,Golden Gate方法使用IIS型限制性内切核酸酶,在其识别位点外切割以产生独特的4bp突出端。通过在同一反应混合物中消化和连接可加速克隆,因为正确的组装消除了酶识别位点。自定义TALEN或TAL效应子构建体的组装包括两个步骤:(i)将重复模块组装成1-10个重复的中间阵列和(ii)将中间阵列连接到骨架中以制备最终构建体。因此,使用本领域已知的技术可以设计靶向如本文所述的NRT2.3启动子序列的TAL效应子。

[0128] 可以根据本发明的各个方面使用的另一种基因组编辑方法是CRISPR。该技术在基因组编辑中的使用在本领域中也有很好的描述,例如在US8,697,359和本文引用的参考文献中。简而言之,CRISPR是一种微生物核酸酶系统,参与防御入侵的噬菌体和质粒。微生物宿主中的CRISPR基因座包含CRISPR相关(Cas)基因以及能够编程CRISPR介导的核酸裂解(sgRNA)特异性的非编码RNA元件的组合。已经在广泛的细菌宿主中鉴定了三种类型(I-III)的CRISPR系统。每个CRISPR基因座的一个关键特征是存在一系列重复序列(同向重复序列),其间由一小段非重复序列(间隔区)隔开。非编码CRISPR阵列在同向重复序列中被转录和切割成包含单个间隔区序列的短crRNA,这些序列将Cas核酸酶引导至靶标位点(原间隔区)。II型CRISPR是表征最充分的系统之一,它分四个连续步骤进行靶向DNA双链断裂。首先,从CRISPR基因座转录两个非编码RNA,pre-crRNA阵列和tracrRNA。其次,tracrRNA与pre-crRNA的重复区域杂交并介导pre-crRNA加工成包含单个间隔区序列的成熟crRNA。第三,成熟的crRNA:tracrRNA复合物通过在crRNA上的间隔区与靶标DNA上挨着原间隔区相邻基序(PAM)的原间隔区之间的沃森-克里克碱基配对将Cas9引导至靶标DNA,这是靶标识别的额外要求。最后,Cas9介导靶标DNA的切割,在原间隔区中产生双链断裂。

[0129] 与传统的基因靶向和其他可编程核酸内切酶相比,CRISPR-Cas9系统的一个主要优点是易于多重化,只需使用多个sgRNA,每个sgRNA都靶向不同的基因,即可同时突变多个基因。此外,如果在基因组区域的侧翼使用了两个sgRNA,则可以缺失或倒置中间部分。

[0130] 因此,Cas9是II型CRISPR-Cas系统的标志性蛋白质,并且是一种大型单体DNA核酸酶,由两个非编码RNA的复合物引导至与PAM(原间隔区相邻基序)序列基序相邻的DNA靶序列:CRISPR RNA(crRNA)和反式激活crRNA(tracrRNA)。Cas9蛋白包含两个与RuvC和HNH核酸酶同源的核酸酶结构域。HNH核酸酶结构域切割互补DNA链,而RuvC样结构域切割非互补链,

因此,在靶标DNA中引入了钝切割。Cas9与sgRNA的异源表达可以将位点特异性双链断裂(DSB)引入来自各种生物体的活细胞的基因组DNA。对于真核生物中的应用,已经使用了密码子优化版本的Cas9,它最初来自细菌酿脓链球菌。

[0131] 单指导RNA (sgRNA) 是CRISPR/Cas系统的第二个组件,它与Cas9核酸酶形成复合物。sgRNA是通过将crRNA与tracrRNA融合而产生的合成RNA嵌合体。位于其5'端的sgRNA引导序列赋予DNA靶标特异性。因此,通过修改引导序列,可以创建具有不同靶标特异性的sgRNA。引导序列的标准长度为20bp。在植物中,sgRNA已经使用植物RNA聚合酶III启动子表达,例如U6和U3。因此,使用本领域已知的技术可以设计靶向如本文所述的NRT2.3启动子序列的sgRNA分子。

[0132] 用于本发明方法的Cas9表达质粒可以如本领域中所述构建。

[0133] 或者,可以使用更常规的诱变方法将至少一个突变引入到NRT2.3启动子序列中。这些方法包括物理诱变和化学诱变。技术人员将知晓可以使用其他方法来产生此类突变体,并且用于诱变和多核苷酸改变的方法是本领域众所周知的。参见,例如,Kunkel (1985) Proc.Natl.Acad.Sci.USA82:488-492;Kunkel等人,(1987) Methods in Enzymol.154:367-382;美国专利号4,873,192;Walker和Gaastra编辑(1983) Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company,New York) 和其中引用的参考文献。

[0134] 在一个实施方案中,使用插入诱变,例如使用T-DNA诱变(其将来自根癌农杆菌T-质粒的T-DNA片段插入到DNA中,导致基因功能丧失或基因功能突变获得)、定点核酸酶(SDN)或转座子作为诱变剂。插入诱变是破坏基因功能的另一种方法,它基于将外源DNA插入目标基因中(参见Krysan等人,The Plant Cell,第11卷,2283-2290,1999年12月)。因此,在一个实施方案中,T-DNA用作插入诱变剂以破坏NRT2.3启动子的活性。在一个实例中,T-DNA可以插入到SEQ ID NO:1或其功能变体中。T-DNA不仅会破坏插入它的基因的表达,而且还可以作为随后识别突变的标记。由于插入元件的序列是已知的,因此可以使用各种克隆或基于PCR的策略恢复发生插入的基因。插入一段长度为5至25kb级别的T-DNA通常会破坏基因功能。如果产生了足够多的T-DNA转化系,则很有可能在任何目标基因中找到携带T-DNA插入的转基因植物。用T-DNA转化孢子是通过农杆菌介导的方法实现的,其中包括将植物细胞和组织暴露于农杆菌细胞悬浮液中。

[0135] 该方法的细节是技术人员众所周知的。简而言之,通过农杆菌对植物的转化导致被称为T-DNA的序列整合到核基因组中,该序列由细菌质粒携带。T-DNA转化的使用导致稳定的单次插入。对所得转化系的进一步突变分析很简单,每个单独的插入系都可以通过直接测序和分析插入侧翼的DNA来快速表征。将突变体中NRT2.3b的基因表达或NRT2.3a与NRT2.3b的相对表达与野生型植物中的表达进行比较。还进行了表型分析。

[0136] 在另一个实施方案中,诱变是物理诱变,例如应用紫外线辐射、X射线、伽马射线、快或热中子或质子。然后可以筛选靶标群体以鉴定在NRT2.3启动子中具有突变的突变体,优选在SEQ ID NO:1或其变体中的突变。

[0137] 在本发明各个方面的另一个实施方案中,该方法包括用诱变剂诱变植物种群。诱变剂可以是快中子辐射或化学诱变剂,例如选自以下非限制性列表:甲磺酸乙酯(EMS)、甲磺酸甲酯(MMS)、N-乙基-N-亚硝基脲(ENU)、三乙基三聚氰胺(1'EM)、N-甲基-N-亚硝基脲(MNU)、丙卡巴肼、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、硫酸二乙酯、丙烯酰胺单体、美法仑、氮芥、长春新

碱、二甲基亚硝胺、N-甲基-N'-硝基-亚硝基胍 (MNNG)、亚硝基胍、2-氨基嘌呤、7,12二甲基苯并 (a) 蒽 (DMBA)、环氧乙烷、六甲基磷酰胺、双硫烷、二环氧烷烃 (二环氧辛烷 (DEO)、二环氧丁烷 (BEB) 等)、2-甲氧基-6-氯-9-[3-(乙基-2-氯乙基)氨基丙氨基]吡啶二盐酸盐 (ICR-170) 或甲醛。再次,然后可以筛选靶标群体以鉴定NRT2.3启动子突变体。

[0138] 在另一个实施方案中,用于产生和分析突变的方法是靶向基因组中诱导的局部损伤 (TILLING),在Henikoff等人,2004中综述。在该方法中,用化学诱变剂例如EMS诱变种子。由此产生的M1植物是自体受精的,M2代个体用于制备用于突变筛选的DNA样品。DNA样品汇集并排列在微量滴定板上,并进行基因特异性PCR。可以使用鉴定野生型和突变基因之间的异源双链体的任何方法来筛选PCR扩增产物的NRT2.3启动子突变。例如,但不限于,变性高压液相色谱 (dHPLC)、恒定变性毛细管电泳 (CDCE)、温度梯度毛细管电泳 (TGCE),或通过使用化学切割的片段化。优选地,将PCR扩增产物与优先切割野生型和突变体序列之间的异源双链体中的错配的核酸内切酶一起孵育。使用自动测序凝胶装置对切割产物进行电泳,并在标准商业图像处理程序的帮助下分析凝胶图像。任何对NRT2.3启动子序列特异的引物均可用于扩增在合并的DNA样品中的NRT2.3启动子序列。优选地,引物被设计为扩增最有可能出现有用突变的NRT2.3启动子区域,特别是在高度保守和/或赋予活性的NRT2.3启动子区域,如别处所述。为了便于在凝胶上检测PCR产物,可以使用任何常规标记方法标记PCR引物。在备选实施方案中,用于产生和分析突变的方法是EcoTILLING。EcoTILLING是一种类似于TILLING的分子技术,不同之处在于它的目标是揭示给定种群的自然变异,而不是诱导突变。在Comai等人2004中描述了EcoTILLING方法的首次公开。

[0139] 快速高通量筛选程序允许分析扩增产物以鉴定NRT2.3启动子中的突变,特别是与相应的未诱变的野生型植物相比的SEQ ID NO:1中的突变。一旦鉴定出突变,携带该突变的M2植物的种子就生长成成年M3植物并筛选与本文所述的NRT2.3启动子中的突变相关的表型特征。

[0140] 在内源性NRT2.3启动子中,特别是在SEQ ID NO:1或9或其变体中携带突变的或可通过此类方法获得的植物也在本发明的范围内。

[0141] 因此,本发明的方面涉及靶向诱变方法,特别是基因组编辑,并且在优选实施方案中排除仅基于通过传统育种方法产生植物的实施方案。

[0142] 在本发明的另一方面,提供了改变NRT2.3基因剪接和/或增加NRT2.3b与NRT2.3a的相对表达和/或增加NRT2.3b的表达和/或降低NRT2.3a的表达的方法,该方法包括将至少一个突变引入编码NRT2.3启动子的核酸序列,如本文所述。

[0143] 在本发明的另一方面,提供了增加植物的产量、生物量、氮利用效率 (NUE)、氮转运和/或氮含量的方法,该方法包括引入并表达核酸构建体,所述核酸构建体包含编码TATA结合蛋白 (TBP),优选TBP2.1的核酸序列。在一个实施方案中,核酸序列编码如SEQ ID NO:32中定义的TBP2.1蛋白或其功能变体。在进一步的实施方案中,TBP2.1核酸包含SEQ ID NO:33或其功能变体或由其组成。在另一个实施方案中,核酸序列包含与编码TBP的核酸序列可操作地连接的调节序列。本发明还包括特征在于与野生型植物相比NRT2.3b表达水平增加的转基因植物,其中该植物表达上述核酸构建体。

[0144] 遗传改变或修饰的植物以及生产此类植物的方法

[0145] 在本发明的另一方面,提供了遗传改变的植物、其部分或植物细胞,其特征在于与

野生型或对照植物相比,该植物具有增加的NRT2.3b与NRT2.3a的相对表达。在备选的实施方案中,所述植物的特征在于与野生型或对照植物相比,NRT2.3b表达增加。或者,该植物的特征在于与野生型或对照植物相比,NRT2.3a表达降低。优选地,所述增加或减少可是比野生型或对照植物中的表达水平高1倍、2倍、3倍、倍、5倍、6倍、7倍、8倍或9倍。或者,所述增加或减少可以是与野生型或对照植物水平相比高达或高于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。

[0146] 在本发明的另一方面,提供了遗传改变的植物、其部分或植物细胞,其中所述植物在NRT2.3基因上游的核酸序列中包含至少一个如上所述的突变。优选地,突变在NRT2.3b基因的5'UTR中。或者,突变在NRT2.3a启动子中。

[0147] 在一个实施方案中,遗传改变的植物、其部分或植物细胞植物的特征在于产量、生物量、氮利用效率(NUE)、氮转运和/或氮含量中的至少一种的增加,如上所述。

[0148] 可以通过任何上述方法在NRT2.3b 5'UTR或NRT2.3a启动子序列中引入突变,优选缺失、插入和/或取代来产生植物。优选地,将所述突变引入至少一种植物细胞和从至少一个突变的植物细胞再生的植物中。

[0149] 在本发明的另一方面,提供了用于产生如本文所述的遗传改变的植物的方法。在一个实施方案中,该方法包括使用本文所述的任何诱变技术将至少一个突变引入优选至少一个植物细胞的NRT2.3b 5'UTR或NRT2.3a启动子中。优选地,所述方法还包括从突变的植物细胞再生植物。

[0150] 该方法还可包括选择一种或多种突变植物,优选用于进一步繁殖。优选地,所述选择的植物在NRT2.3b 5'UTR或NRT2.3a启动子中包含至少一个突变。在一个实施方案中,如本文所述,所述植物的特征在于NRT2.3b与NRT2.3a的相对表达增加、NRT2.3b水平增加和/或NRT2.3a表达减少,如本文所述。NRT2.3b 5'UTR或NRT2.3a启动子的表达水平可以通过技术人员已知的任何标准技术来测量。

[0151] 选择的植物可以通过多种方式繁殖,例如通过克隆繁殖或经典育种技术。例如,可以使第一代(或T1)转化植物自交并选择纯合的第二代(或T2)转化体,然后可以通过经典育种技术进一步繁殖T2植物。产生的转化生物可以采取多种形式。例如,它们可以是转化细胞和非转化细胞的嵌合体;克隆转化体(例如,所有细胞都转化为含有表达盒);转化和未转化的组织的移植物(例如,在植物中,将转化的砧木嫁接到未转化的幼枝上)。

[0152] 在本发明的另一方面,提供了通过上述方法获得或可获得的植物。

[0153] 出于本发明的目的,“遗传改变的植物”或“突变植物”是与天然存在的野生型(WT)植物相比已经遗传改变的植物。在一个实施方案中,突变植物是使用诱变方法,例如本文所述的任何诱变方法,与天然存在的野生型(WT)植物相比已经发生改变的植物。在一个实施方案中,诱变方法是靶向基因组修饰或基因组编辑。在一个实施方案中,与野生型序列相比,植物基因组已使用诱变方法发生改变。此类植物具有如本文所述的改变的表型,例如增加的产量、生物量、NUE、氮转运和/或氮含量。因此,在这个实例中,增加的产量、生物量、NUE、氮转运和/或氮含量是由改变的植物基因组的存在赋予的,例如,突变的NRT2.3b 5'UTR或NRT2.3a启动子序列。在一个实施方案中,使用靶向基因组修饰特异性靶向内源启动子序列,并且突变基因或启动子序列的存在不是由植物中表达的转基因的存在赋予的。换句话说,遗传改变的植物可以被描述为不含转基因。

[0154] 转基因植物

[0155] 如通篇所讨论的, 本发明人已经令人惊讶地鉴定出突变NRT2.3启动子, 特别是突变NRT2.3b基因(在SEQ ID NO:1中定义)的5'UTR会改变NRT2.3基因的剪接, 导致NRT2.3b的表达或相对表达增加。

[0156] 因此, 在野生型或对照植物中, 与NRT2.3基因可操作地连接的突变启动子的过表达也将增加产量、生物量、氮利用效率(NUE)、氮转运和/或氮含量。

[0157] 因此, 在本发明的另一方面, 提供了核酸构建体, 所述核酸构建体包含与NRT2.3基因序列可操作地连接的NRT2.3启动子序列, 其中NRT2.3启动子序列选自包含SEQ ID NO:2、3、4或5或其功能变体的组。上面定义了功能变体。

[0158] 在一个实施方案中, NRT2.3基因序列包含SEQ ID NO:8或其功能变体。

[0159] 如本文所用, 术语“可操作地连接”是指启动子序列和目标基因之间的功能性连接, 使得启动子序列能够启动目标基因的转录。

[0160] 在本发明的另一方面, 提供了包含上述核酸序列的载体。

[0161] 在本发明的另一方面, 提供了包含核酸构建体的宿主细胞。宿主细胞可以是细菌细胞, 例如根癌农杆菌, 或分离的植物细胞。本发明还涉及培养基或包含培养基和分离的宿主细胞的试剂盒, 如下所述。

[0162] 在另一个实施方案中, 提供了表达上述核酸构建体的转基因植物。在一个实施方案中, 所述核酸构建体稳定地整合到植物基因组中。

[0163] 通过称为转化的过程将核酸序列引入到所述植物中。

[0164] 植物转化现在是许多物种的常规技术。有利地, 可以使用几种转化方法中的任一种将目标基因引入合适的祖先细胞。描述的用于从植物组织或植物细胞转化和再生植物的方法可用于瞬时或稳定转化。转化方法包括使用脂质体、电穿孔、增加游离DNA吸收的化学品、将DNA直接注射到植物中、粒子枪轰击、使用病毒或花粉进行转化以及微喷射。方法可以选自用于原生质体的钙/聚乙二醇方法、原生质体的电穿孔、显微注射到植物材料、DNA或RNA包被的粒子轰击、用(非整合)病毒感染等。转基因植物, 包括转基因作物植物, 优选通过根癌农杆菌介导的转化产生。

[0165] 为了选择转化植物, 通常对转化中获得的植物材料进行选择条件处理, 以便将转化植物与未转化植物区分开。例如, 可以种植以上述方式获得的种子, 并在初始生长期后通过喷洒进行合适的选择。另一种可能性在于, 如果合适的话, 在灭菌后, 使用合适的选择剂使种子在琼脂平板上生长, 以便只有转化的种子才能长成植物。或者, 筛选转化植物中是否存在选择标记, 例如上述标记之一。在DNA转移和再生之后, 还可以评估推定转化的植物, 例如使用Southern分析, 以确定是否存在目标基因、拷贝数和/或基因组组织。或者或另外, 可使用Northern和/或Western分析监测新引入的DNA的表达水平, 这两种技术为本领域普通技术人员所熟知。

[0166] 产生的转化植物可以通过多种方式繁殖, 例如通过克隆繁殖或经典育种技术。例如, 可以使第一代(或T1)转化植物自交并选择纯合的第二代(或T2)转化体, 然后通过经典育种技术进一步繁殖T2植物。产生的转化生物可以采取多种形式。例如, 它们可以是转化细胞和非转化细胞的嵌合体; 克隆转化体(例如, 所有细胞都转化为含有表达盒); 转化和未转化的组织的移植物(例如, 在植物中, 将转化的砧木嫁接到未转化的幼枝上)。

[0167] 除非另有说明,本文描述的本发明的各个方面清楚地扩展到通过本文描述的任何方法产生、获得或可获得的任何植物细胞或任何植物,以及所有植物部分及其繁殖体。本发明进一步扩展到包括通过任何上述方法产生的初级转化或转染细胞、组织、器官或完整植物的后代,唯一的要求是后代表现出如在根据本发明的方法中由亲本产生的那些相同的基因型和/或表型特征。

[0168] 在另一方面,本发明涉及如本文所述的核酸构建体用于增加产量、生物量、氮利用效率(NUE)、氮转运和/或氮含量中的至少一种的应用。

[0169] 在本发明的另一方面,提供了增加产量、生物量、氮利用效率(NUE)、氮转运和/或氮含量中的至少一种的方法,该方法包括在所述植物中引入并表达如本文所述的核酸构建体。

[0170] 在本发明的另一方面,提供了产生具有产量、生物量、氮利用效率(NUE)、氮转运和/或氮含量中的至少一种增加的植物的方法,该方法包括在所述植物中引入并表达如本文所述的核酸构建体。

[0171] 所述增加是相对于对照或野生型植物。

[0172] 根据本发明的各个方面的植物优选地是水稻。

[0173] 如本文所用,术语“植物”涵盖完整植物、植物的祖先和后代以及植物部分,包括种子、茎干、茎、叶、根(包括块茎)、组织和器官,其中上述每一种包括至少一种如本文所述的NRT2.3启动子中的突变。术语“植物”还包括植物细胞、悬浮培养物、愈伤组织、胚、分生组织区、配子体、孢子体、花粉和小孢子,其中上述的每一种也包含如本文所述的NRT2.3启动子的至少一个突变。

[0174] 本发明还扩展到如本文所述的本发明植物的可收获部分,例如籽粒。本发明的方面还扩展到衍生自、优选直接衍生自此类植物的可收获部分的产物,即谷物,例如但不限于米糠、米糠油、米粉、稻壳、大米淀粉、壳灰、碎米和啤酒米。在本发明的另一方面,提供了源自如本文所述的植物或其部分的产物。

[0175] 在本发明最优选的方面,提供了由如本文所述的遗传改变的植物产生的种子。

[0176] 根据本发明的所有方面,本文所用的对照植物是未根据本发明的方法进行修饰的植物。因此,在一个实施方案中,对照植物在NRT2.3启动子中没有至少一个突变。在备选实施方案中,植物没有如上所述的遗传修饰。在一个实施方案中,对照植物是野生型植物。对照植物通常是相同的植物物种,优选具有与修饰植物相同的遗传背景。

[0177] 用于本文所述的靶向基因组修饰的方法的基因组编辑构建体

[0178] “crRNA”或CRISPR RNA意指含有原间隔元件和与tracrRNA互补的额外核苷酸的RNA序列。

[0179] “tracrRNA”(反式激活RNA)意指与crRNA杂交并结合CRISPR酶例如Cas9从而激活核酸酶复合物以在至少一个NRT2.3启动子核酸或启动子序列的基因组序列内的特定位点引入双链断裂的RNA序列。

[0180] “原间隔元件”意指与基因组DNA靶序列互补的crRNA(或sgRNA)部分,通常长度约为20个核苷酸。这也可以称为间隔区或靶向序列。

[0181] “sgRNA”(单指导RNA)是指tracrRNA和crRNA在单个RNA分子中的组合,优选还包括接头环(其将tracrRNA和crRNA连接成单个分子)。“sgRNA”也可以称为“gRNA”并且在本上下

文中,这些术语是可互换的。sgRNA或gRNA为Cas核酸酶提供靶向特异性和支架/结合能力。gRNA可以指包含crRNA分子和tracrRNA分子的双RNA分子。

[0182] “TAL效应子”(转录激活剂样(TAL)效应子)或TALE意指可以结合基因组DNA靶序列(NRT2.3启动子基因内的序列或启动子序列)并且可以融合到内切核酸酶如FokI的切割结构域,以产生TAL效应子核酸酶或TALENS或大范围核酸酶以产生megaTAL。TALE蛋白由负责DNA结合的中央结构域、核定位信号和激活靶基因转录的结构域组成。DNA结合结构域由单体组成,每个单体可以结合靶核苷酸序列中的一个核苷酸。单体是33-35个氨基酸的串联重复,其中位于位置12和13的两个氨基酸是高度可变的(重复可变双残基,RVD)。RVD负责识别单个特定核苷酸。HD靶向胞嘧啶;NI靶向腺嘌呤,NG靶向胸腺嘧啶,NN靶向鸟嘌呤(尽管NN也可以与腺嘌呤结合,但特异性较低)。

[0183] 在本发明的另一方面,提供了核酸构建体,其中所述核酸构建体编码至少一种DNA结合域,其中所述DNA结合域可以结合NRT2.3启动子基因中的序列,其中所述序列选自SEQ ID NO 12至15或其变体,如本文所定义。在一个实施方案中,所述构建体进一步包含编码(SSN)序列特异性核酸酶例如FokI或Cas蛋白的核酸。

[0184] 在一个实施方案中,核酸构建体编码至少一种原间隔元件,其中原间隔元件的序列选自SEQ ID NO 16至23或其变体。

[0185] 在进一步的实施方案中,核酸构建体包含crRNA编码序列。如上文所定义,crRNA序列可包含如上文所定义的原间隔元件且优选地包含与tracrRNA互补的额外的核苷酸。技术人员将知晓额外的核苷酸的合适序列,因为这些由Cas蛋白的选择定义。

[0186] 在另一个实施方案中,核酸构建体进一步包含tracrRNA序列。同样,适当的tracrRNA序列是技术人员已知的,因为该序列是由Cas蛋白的选择定义的。尽管如此,在一个实施方案中,所述序列包含如SEQ ID NO:24中定义的序列或其变体或由其组成。

[0187] 在进一步的实施方案中,核酸构建体包含至少一种编码sgRNA(或gRNA)的核酸序列。再次,如已经讨论的,sgRNA通常包含crRNA序列、tracrRNA序列并且优选地包含用于接头环的序列。在优选的实施方案中,核酸构建体包含至少一种编码如本文定义的sgRNA序列的核酸序列。

[0188] 在进一步的实施方案中,核酸构建体还可包含至少一种编码内切核糖核酸酶切割位点的核酸序列。优选地,内切核糖核酸酶是Csy4(也称为Cas6f)。当核酸构建体包含多个sgRNA核酸序列时,构建体可以包含相同数量的内切核糖核酸酶切割位点。在另一个实施方案中,切割位点是sgRNA核酸序列的5'。因此,每个sgRNA核酸序列的侧翼是核糖核酸内切酶切割位点。

[0189] 术语“变体”是指其中核苷酸与上述序列之一基本相同的核苷酸序列。变体可以通过修饰例如插入、取代或缺失一个或多个核苷酸来实现。在优选的实施方案中,变体与上述序列中的任一个具有至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%的同一性。在一个实施方案中,序列同一性是至少90%。在另一个实施方案中,序列同一性是100%。序列同一性可以通过本领域任何一种已知的序列比对程序来确定。

[0190] 本发明还涉及核酸构建体,所述核酸构建体包含与合适的植物启动子可操作地连

接的核酸序列。合适的植物启动子可以是组成型或强启动子,或者可以是组织特异性启动子。在一个实施方案中,合适的植物启动子选自,但不限于,夜香树属黄卷叶病毒(CmYLCV)启动子或柳枝稷泛素1启动子(PvUbi1)U6 RNA聚合酶III(TaU6)CaMV35S、U6或玉米泛素(例如Ubi1)启动子。或者,可以通过基因表达调控序列使表达专门针对水稻种子的特定组织。在一个实施方案中,启动子选自双子叶植物中的U3启动子(SEQ ID NO:25)、U6a启动子(SEQ ID NO:26)、U6b启动子(SEQ ID NO:27)、U3b启动子(SEQ ID NO:28)和双子叶植物中的U6-1启动子(SEQ ID NO:29)。

[0191] 本发明的核酸构建体还可进一步包含编码CRISPR酶的核酸序列。“CRISPR酶”意指可以与CRISPR系统结合的RNA指导的DNA核酸内切酶。具体而言,这种酶与tracrRNA序列结合。在一个实施方案中,CRISPR酶是Cas蛋白(“CRISPR相关蛋白”),优选Cas 9或Cpf1,更优选Cas9。在具体实施方案中,Cas9是密码子优化的Cas9,并且更优选地,具有在SEQ ID NO:30中描述的序列或其功能变体或同源物。在另一个实施方案中,CRISPR酶是来自2类候选x蛋白家族的蛋白,例如C2c1、C2C2和/或C2c3。在一个实施方案中,Cas蛋白来自酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)。在备选实施方案中,Cas蛋白可以来自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophiles*)或齿状密螺旋体(*Treponema denticola*)中的任一种。

[0192] 如本文所用的关于Cas9的术语“功能变体”是指变体Cas9基因序列或基因序列的一部分,其保留了完整的非变体序列的生物学功能,例如充当DNA核酸内切酶,或识别和/或与DNA结合。功能变体还包括目标基因的变体,其具有不影响功能的序列改变,例如非保守残基。还包括与本文所示的野生型序列相比基本上相同的变体,即仅具有一些序列变异,例如在非保守残基中,并且具有生物活性。在一个实施方案中,SEQ ID NO.30的功能变体与由SEQ ID NO:30表示的氨基酸具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的总体序列同一性。在进一步的实施方案中,Cas9蛋白已被修饰以提高活性。

[0193] 合适的同源物或直向同源物可以通过序列比较和保守结构域的鉴定来鉴定。同系物或直向同源物的功能可以如本文所述鉴定并且技术人员因此能够确认在植物中表达时的功能。

[0194] 在进一步的实施方案中,Cas9蛋白已被修饰以提高活性。例如,在一个实施方案中,Cas9蛋白可包含D10A氨基酸取代,该切口酶仅切割与gRNA互补并被gRNA识别的DNA链。在备选实施方案中,Cas9蛋白可备选地或额外地包含H840A氨基酸取代,该切口酶仅切割不与sRNA相互作用的DNA链。在该实施方案中,Cas9可以与一对(即两个)sgRNA分子(或表达这种对的构建体)一起使用,因此可以切割相反DNA链上的靶标区域,有可能将特异性提高100-1500倍。在进一步的实施方案中,cas9蛋白可以包含D1135E取代。Cas 9蛋白也可以是VQR变体。或者,Cas蛋白可以在HNH和RuvC样这两个核酸酶结构域中包含突变,因此是无催化活性的。这种无催化活性的Cas蛋白可用于阻止转录延伸过程,而不是切割靶标链,当与sgRNA分子共表达时,会导致未完全翻译的蛋白质功能丧失。无催化活性的蛋白的一个实例是由RuvC和/或HNH核酸酶结构域中的点突变引起的死亡Cas9(dCas9)(Komor等人,2016和Nishida等人,2016)。

[0195] 在进一步的实施方案中,Cas蛋白,例如Cas9,可以进一步与抑制效应子融合,例如组蛋白修饰/DNA甲基化酶或胞苷脱氨酶(Komor等人,2016)以实现定点诱变。在后者中,胞

昔脱氨酶不诱导双链DNA断裂,而是介导胞昔向尿昔的转化,从而实现C到T(或G到A)的取代。

[0196] 在进一步的实施方案中,核酸构建体包含内切核糖核酸酶。优选地,内切核糖核酸酶是Csy4(也称为Cas6f),更优选地是水稻密码子优化的csy4。在一个实施方案中,当核酸构建体包含cas蛋白时,核酸构建体可以包含用于表达内切核糖核酸酶的序列,例如Csy4,表达为5'端P2A融合(用作自切割肽)到cas蛋白,如Cas9。

[0197] 在一个实施方案中,cas蛋白、内切核糖核酸酶和/或内切核糖核酸酶-cas融合序列可以与合适的植物启动子可操作地连接。上面已经描述了合适的植物启动子,但在一个实施方案中,可以是玉米泛素1启动子。

[0198] 用于生产CRISPR核酸和载体系统的合适方法是已知的,例如发表在Molecular Plant(Ma等人,2015,Molecular Plant,DOI:10.1016/j.molp.2015.04.007),其通过引用纳入本文。

[0199] 在本发明的备选方面,核酸构建体包含至少一种编码TAL效应子的核酸序列,其中所述效应子靶向选自SEQ ID NO 12至15的NRT2.3启动子序列。给定靶标序列,设计TAL效应子的方法将是技术人员熟知的。Sanjana等人和Cermak T等人给出了合适方法的实例,两者均通过引用并入本文。优选地,所述核酸构建体包含两个编码TAL效应子的核酸序列,以产生TALEN对。在进一步的实施方案中,核酸构建体进一步包含序列特异性核酸酶(SSN)。优选地,这种SSN是内切核酸酶,例如FokI。在进一步的实施方案中,TALEN通过金门(Golden Gate)克隆方法在单个质粒或核酸构建体中组装。

[0200] 在本发明的另一方面,提供了sgRNA分子,其中sgRNA分子包含crRNA序列和tracrRNA序列,并且其中crRNA序列可以结合选自SEQ ID NO 12至15的至少一种序列或其变体。“变体”如本文所定义。在一个实施方案中,sgRNA分子可包含至少一种化学修饰,例如增强其稳定性和/或与靶序列或crRNA序列与tracrRNA序列的结合亲和力。此类修饰对于本领域技术人员是众所周知的,并且包括例如但不限于在Rahdar等人,2015中描述的修饰,其通过引用并入本文。在此实例中,crRNA可包含硫代磷酸酯骨架修饰,例如2'-氟(2'-F)、2'-O-甲基(2'-O-Me)和S-约束的乙基(cET)取代。

[0201] 在本发明的另一方面,提供了编码原间隔元件(如SEQ ID NO 16至23中任一个所定义)的分离的核酸序列。

[0202] 在本发明的另一方面,提供了用至少一种本文所述的核酸构建体转染的植物或其部分或至少一种分离的植物细胞。Cas9和sgRNA可以组合或在单独的表达载体(或核酸构建体,此类术语可互换使用)中。换言之,在一个实施方案中,分离的植物细胞用包含如上文详细描述sgRNA和Cas9的单一核酸构建体转染。在备选的实施方案中,分离的植物细胞用两种核酸构建体转染,第一种核酸构建体包含至少一种如上定义的sgRNA,而第二种核酸构建体包含Cas9或其功能变体或同源物。第二核酸构建体可在第一核酸构建体下方、之后或同时转染。包含cas蛋白的单独的第二构建体的优点是编码至少一种sgRNA的核酸构建体可以与任何类型的cas蛋白配对,如本文所述,因此不限于单个cas功能(如当cas和sgRNA都编码在同一核酸构建体上时就是这种情况)。

[0203] 在一个实施方案中,在用包含至少一种sgRNA核酸的核酸构建体进行第二次转染之前,首先转染包含cas蛋白的核酸构建体并稳定整合到基因组中。在备选的实施方案中,

植物或其部分或至少一种分离的植物细胞用编码cas蛋白的mRNA转染并用至少一种如本文定义的核酸构建体共转染。

[0204] 可以如本领域所述构建用于本发明的Cas9表达载体。在一个实例中,表达载体包含如SEQ ID NO:30中定义的核酸序列或其功能变体或同源物,其中所述核酸序列与合适的启动子可操作地连接。合适的启动子的实例包括肌动蛋白、CaMV35S、U6、U3或玉米泛素(例如Ubi1)启动子。

[0205] 本发明的范围还包括上述核酸构建体(CRISPR构建体)或sgRNA分子在任何上述方法中的应用。例如,提供了上述CRISPR构建体或sgRNA分子在调节本文所述的NRT2.3启动子活性和/或NRT2.3基因剪接中的应用。

[0206] 因此,在本发明的进一步方面,提供了调节NRT2.3启动子活性和/或NRT2.3基因剪接和/或增加NRT2.3b表达的方法,该方法包括引入并表达如上所述的CRISPR构建体或将也如上所述的sgRNA分子引入植物中。换言之,还提供了调节NRT2.3启动子活性和/或NRT2.3基因剪接和/或增加NRT2.3b表达的方法,如本文所述,其中该方法包括使用CRISPR/Cas9,特别是本文所述的CRISPR构建体将至少一个突变引入内源性NRT2.3启动子。

[0207] 在本发明的备选方面,提供了用至少一种如本文所述的sgRNA分子转染的分离的植物细胞。

[0208] 在本发明的进一步方面,提供了包含本文所述的转染细胞的遗传修饰或编辑的植物。在一个实施方案中,一个或多个核酸构建体可以以稳定的形式整合。在备选实施方案中,一个或多个核酸构建体没有被整合(即被瞬时表达)。因此,在优选的实施方案中,遗传修饰的植物不含任何sgRNA和/或Cas蛋白核酸。换言之,该植物不含转基因。

[0209] 本文所指的术语“引入”、“转染”或“转化”包括将外源多核苷酸转移到宿主细胞中,而不管用于转移的方法如何。能够随后通过器官发生或胚胎发生进行克隆繁殖的植物组织可以用本发明的遗传构建体转化,并从中再生出完整的植物。选择的特定组织将根据可用于并最适合被转化的特定物种的克隆繁殖系统而变化。示例性组织靶标包括叶盘、花粉、胚、子叶、下胚轴、雌配子体、愈伤组织、现有分生组织(例如,顶端分生组织、腋芽和根分生组织)和诱导的分生组织(例如,子叶分生组织和下胚轴分生组织)。然后可以使用所得转化植物细胞以本领域技术人员已知的方式再生转化植物。将外源基因转移到植物基因组中称为转化。植物转化现在是许多物种的常规技术。技术人员已知的几种转化方法中的任何一种可用于将目标核酸构建体或sgRNA分子引入合适的祖先细胞中。描述的用于从植物组织或植物细胞转化和再生植物的方法可用于瞬时或稳定转化。

[0210] 转化方法包括使用脂质体、电穿孔、增加游离DNA吸收的化学物质、将DNA直接注射到植物中(显微注射)、基因枪(或如实施例中所所述的生物射弹粒子递送系统(生物学))、脂质转染、使用病毒或花粉和显微投射的转化。方法可以选自用于原生质体的钙/聚乙二醇方法、超声介导的基因转染、光学或激光转染、使用碳化硅纤维的转染、原生质体的电穿孔、显微注射到植物材料、DNA或RNA包被的粒子轰击、用病毒等感染(非整合)。转基因植物也可以通过根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的转化产生,包括但不限于使用如Clough&Bent(1998)中描述的花浸/土壤杆菌真空渗透方法并通过引用并入本文。

[0211] 因此,在一个实施方案中,可以使用任何上述方法将至少一种如本文所述的核酸构建体或sgRNA分子引入至少一种植物细胞。在备选的实施方案中,本文所述的任何核酸构

建体可以首先转录以形成预组装的Cas9-sgRNA核糖核蛋白,然后使用任何上述方法例如脂质转染、电穿孔或显微注射递送至至少一种植物细胞。

[0212] 任选地,为了选择转化植物,通常对转化中获得的植物材料进行选择条件处理,以便可以将转化植物与未转化植物区分开。例如,可以种植以上述方式获得的种子,并在初始生长期后通过喷洒进行合适的选择。另一种可能性是,如果合适的话,在灭菌后,在使用合适的选择剂的琼脂平板上种植种子,这样只有转化的种子才能长成植物。如实施例所述,合适的标记物可以是bar-草丁膦或PPT。或者,针对选择标记物例如但不限于GFP、GUS(β -葡萄糖醛酸酶)的存在筛选转化植物。技术人员很容易知道其他实例。或者,不进行选择,种植并生长以上述方式获得的种子,并使用本领域的标准技术在适当的时间测量NRT2.3b表达或蛋白质水平。这种避免引入转基因的备选方案更适合生产不含转基因的植物。

[0213] 在DNA转移和再生之后,还可以评估推定转化的植物,例如使用PCR检测目标基因的存在、拷贝数和/或基因组组织。或者或另外,可以使用Southern、Northern和/或Western分析监测新引入的DNA的整合和表达水平,这两种技术都是本领域普通技术人员众所周知的。

[0214] 产生的转化植物可以通过多种方式繁殖,例如通过克隆繁殖或经典育种技术。例如,可以使第一代(或T1)转化植物自交并选择纯合的第二代(或T2)转化体,然后通过经典育种技术进一步繁殖T2植物。

[0215] 技术人员熟知使用上述CRISPR构建体的具体方案。作为一个实例,在Ma&Liu(“单子叶植物和双子叶植物中基于CRISPR/Casp的多重基因组编辑”)中描述了合适的方案,通过引用并入本文。

[0216] 在本发明的进一步相关方面,还提供了获得如本文所述的遗传修饰的植物的方法,该方法包括

[0217] a. 选择植物的一部分;

[0218] b. 使用上述转染或转化技术,用至少一种如本文所述的核酸构建体或至少一种如本文所述的sgRNA分子转染段落(a)的植物部分的至少一个细胞;

[0219] c. 再生至少一种源自转染的细胞的植物;

[0220] d. 选择一种或多种根据段落(c)获得的植物,其显示增加的NRT2.3b的表达或增加的NRT2.3b的相对表达(相对于NRT2.3a)。

[0221] 在进一步的实施方案中,该方法还包括筛选遗传修饰的植物的NRT2.3启动子序列中SSN(优选CRISPR)诱导的突变的步骤。在一个实施方案中,该方法包括从转化植物获得DNA样品并进行DNA扩增以检测至少一种NRT2.3启动子序列中的突变。

[0222] 在进一步的实施方案中,该方法包括产生稳定的T2植物,优选对于突变(即至少一种NRT2.3启动子序列中的突变)纯合。

[0223] 在至少一种NRT2.3启动子序列中具有突变的植物也可以与在至少一种NRT2.3启动子序列中也包含至少一个突变的另一种植物杂交以获得在NRT2.3启动子序列中具有额外突变的植物。这些组合对于技术人员是显而易见的。因此,当与如上所述转化的单个T1植物中的部分同源突变数相比时,该方法可用于产生在所有部分同源物或数量增加的部分同源物上具有突变的T2植物。

[0224] 通过上述方法获得或可获得的植物也在本发明的范围内。

[0225] 本发明的遗传改变的植物也可以通过杂交来转移本发明的任何序列而获得,例如使用本文所述的遗传改变的植物的花粉为野生型或对照植物授粉,或用在至少一种NRT2.3启动子序列中不包含突变的其他花粉对本文所述植物的雌蕊授粉。获得本发明植物的方法不仅限于本段中描述的那些;例如,可以如上所述进行生殖细胞的遗传转化,但之后不必再生植物。

[0226] 筛选植物天然增加的籽粒产量表型的方法

[0227] 在本发明的进一步的方面,提供了用于筛选植物群体和鉴定和/或选择携带或表达NRT2.3启动子中的至少一个突变,优选NRT2.3b 5'UTR或NRT2.3a启动子的至少一个突变,更优选SEQ ID NO:1或9或其变体中的至少一个突变的植物的方法。或者,提供了用于筛选植物群体并鉴定和/或选择具有增加的产量、生物量、氮利用效率(NUE)、氮转运和/或氮含量的植物的方法。在任一方面,该方法包括在植物或植物种质中检测NRT2.3启动子中的至少一种多态性并且优选SEQ ID NO:1或9或其变体中的至少一个突变。优选地,所述筛选包括确定至少一种多态性的存在,其中所述多态性是至少一种插入和/或至少一种缺失和/或取代。

[0228] 在一个实施方案中,多态性是NRT2.3启动子中至少一种核苷酸的缺失,其中优选地NRT2.3启动子包含SEQ ID NO:1或由其组成。在优选实施方案中,多态性是SEQ ID NO:1的5'端的至少一个核苷酸的缺失。更优选地,多态性是SEQ ID NO:1的5'端的至少前10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110或120个核苷酸的缺失。在更优选的实施方案中,多态性是SEQ ID NO:1的5'端至少前50个,更优选前60个,甚至更优选前62个核苷酸的缺失。在一个替代实施方案中,多态性是SEQ ID NO:1的5'端的前90个、更优选前100个、甚至更优选前101个核苷酸的缺失。在备选实施方案中,多态性是从SEQ ID NO:1中缺失SEQ ID NO:6或7。

[0229] 在备选实施方案中,多态性是至少一个核苷酸的取代。在优选的实施方案中,多态性是在SEQ ID NO:1的位置160(这在本文中也可以被称为关于NRT2.3基因的ATG起始密码子的位置-83处的多态性)、SEQ ID NO:1的位置201(在本文中也可称为位置-42)和SEQ ID NO:1的位置222(在本文中也可称为位置-21)的至少一个核苷酸的取代。在优选的实施方案中,多态性是在SEQ ID NO:1的位置160的取代。在进一步优选的实施方案中,取代可以如下:

[0230] (SEQ ID NO:1的)位置160:T至C;

[0231] (SEQ ID NO:1的)位置201:A至C;

[0232] (SEQ ID NO:1的)位置222:C至T。

[0233] 在优选的实施方案中,至少一种多态性是NRT2.3启动子的TATA-盒中至少一个核苷酸的取代、缺失和/或插入。在一个实施方案中,TATA-盒在SEQ ID NO:9或其变体中定义。因此,在一个实施方案中,多态性影响转录因子或组蛋白与NRT2.3启动子的结合,并因此影响NRT2.3基因的转录。在另一个优选的实施方案中,至少一种多态性影响TATA结合蛋白例如TBP2.1的结合能力(从而增加NRT2.3b的表达水平)。

[0234] 在优选的实施方案中,多态性是TATA-盒中至少一个核苷酸的取代。甚至更优选地,多态性是在SEQ ID NO:9的位置12处的取代。在一个实施方案中,取代是T到C的取代。

[0235] 用于评估多态性存在的合适的测试是技术人员众所周知的,并且包括但不限于同

工酶电泳、限制性片段长度多态性 (RFLP)、随机扩增多态性DNA (RAPD)、任意引发的聚合酶链反应 (AP-PCR)、DNA扩增指纹图谱 (DAF)、序列特征扩增区域 (SCAR)、扩增片段长度多态性 (AFLP)、简单序列重复 (SSR-也称为微卫星) 和单核苷酸多态性 (SNP)。在一个实施方案中, 使用竞争性等位基因特异性PCR (KASP) 基因分型。

[0236] 在一个实施方案中, 该方法包括

[0237] a) 从植物中获取核酸样品, 和

[0238] b) 使用一对或多对引物对NRT2.3启动子序列进行核酸扩增。

[0239] 在进一步的实施方案中, 该方法还可包括将包含NRT2.3启动子序列多态性的染色体区域渐渗第二植物或植物种质中以产生渐渗的植物或植物种质。优选地, 所述第二植物将表现出产量、生物量、氮利用效率 (NUE)、氮转运和/或氮含量的增加。

[0240] 虽然上述公开内容提供了包含在本发明范围内的主题的一般描述, 包括制备和使用本发明的方法及其最佳模式, 但提供以下实施例以进一步使本领域的技术人员能够实践本发明并提供其完整书面描述。然而, 本领域技术人员将理解这些实施例的细节不应被理解为对本发明的限制, 本发明的范围应从附加到本公开内容的权利要求及其等同物理解。鉴于本公开, 本发明的各种进一步的方面和实施方案对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0241] 此处使用的“和/或”将被视为两个特定特征或组件中的每一个的具体公开, 其中包含或不包含另一个。例如, “A和/或B”将被视为 (i) A、(ii) B和 (iii) A和B中每一个的具体公开, 就好像每一个在本文中单独列出一样。

[0242] 除非上下文另有说明, 否则上述特征的描述和定义不限于本发明的任何特定方面或实施方案, 并且同样适用于所描述的所有方面和实施方案。

[0243] 上述申请, 以及其中或在其审查期间引用的所有文件和序列登录号 (“申请引用的文件”) 和申请引用的文件中引用或参考的所有文件, 以及本文引用或参考的所有文件 (“本文引用的文件”) 以及本文引用的文件中引用或参考的所有文件, 连同本文提及的任何产品或本文引用的任何文件的任何制造商的说明书、说明、产品规格和产品表, 均通过引用并入本文, 并且可在本发明的实践中使用。更具体地, 所有参考文献以相同的程度通过引用并入, 就好像每个单独的文档被具体地和单独地指示为通过引用并入一样。

[0244] 现在在以下非限制性实施例中描述本发明。

实施例

[0245] 材料和方法

[0246] 植物材料和生长条件

[0247] 0sNRT2.3TILLING系、回交系和转基因系 (在本研究中) 用30% (v/v) NaClO表面灭菌30分钟, 然后用水彻底冲洗。幼苗在人工气候室中生长, 光照16小时 (30°C), 黑暗8小时 (26°C)。用于田间试验的植物在江苏南京的南京农业大学种植。试验田土壤的化学性质如Chen等人所描述。(陈等人, 2016)

[0248] 0sNRT2.3 TILLING系的鉴定

[0249] 当幼苗在IRRI中生长3周时, 收集DNA样品并保存在-80°C。DNA样品采用CTAB法提取。我们使用两对引物p0sNRT2.3-F/R和0sNRT2.3-F/R, 对0sNRT2.3的启动子和基因进行扩

增;每个DNA样品重复4次。产品序列由公司名称Genescript®确定。使用DNAMAN将扩增的TILLING系的序列与Zhonghuo11 (WT)的序列进行比对。

[0250] 转基因植物的产生

[0251] 为了研究OsNRT2.3不同长度的启动子片段对OsNRT2.3a和OsNRT2.3b表达的影响,我们扩增了不同长度的水稻OsNRT2.3启动子,如697bp和141bp。为了证实-83bp突变影响OsNRT2.3a和OsNRT2.3b的表达,我们在141bp和697bp启动子中都制备了-83bp突变体。不同的启动子长度用于驱动OsNRT2.3的437bp开放阅读框(ORF)。为了更好地区分OsNRT2.3a和OsNRT2.3b,将437bp的ORF与ZIIIIB的序列(cct gca ggt cgc cac att agc aat gcc aca tta gca atg ccg act cta gag gat ccc)(SEQ ID NO:31)相连。

[0252] 为了证明-83bp突变对OsNRT2.3a和OsNRT2.3b转录和翻译的影响,我们将OsNRT2.3a和OsNRT2.3b合并到一个载体中。在一个载体中,OsNRT2.3启动子的141bp片段用于驱动OsNRT2.3a和eGFP的表达,以及驱动OsNRT2.3b和mCherry报告子基因的表达。我们然后在141bp启动子片段中进行-83bp突变。在另一个载体中,我们使用具有-83bp突变的697bp启动子片段来驱动OsNRT2.3a和eGFP以及OsNRT2.3b和mCherry的表达,就像141启动子载体一样。通过电穿孔将表达载体转移到农杆菌(EHA105)中并转化到水稻中(Toki, 1997;Toki等人,2006)。

[0253] 为了探索基因OsTBP2.1与OsNRT2.3的功能,我们构建了OsTBP2.1过表达载体(pUbi::OsTBP2.1),并获得了T-DNA突变系。

[0254] 酵母单杂交试验

[0255] 根据“Matchmaker Gold Yeast One-Hybrid Library Screening System User Manual”(Clontech)的制造商方案进行酵母单杂交试验。简而言之,将pTATA-盒-pAbAi载体转移到酵母菌株中并在缺乏尿嘧啶(Ura)的培养基上生长。我们使用不同浓度的Aureobasidin A (AbA)在缺乏Ura的培养基上测试诱饵菌株。然后将pGADT7-TBP2、pGADT7-TBP2.1和pGADT7-TBP2.2的载体转移到带有pTATA-盒-pAbAi的菌株中。然后将菌株在含有800ng ml⁻¹AbA^r的缺乏亮氨酸的培养基上生长。

[0256] 定量实时PCR

[0257] 使用Trizol试剂分别从幼苗的根部和茎干中提取总RNA。使用逆转录试剂盒将总RNA逆转录为cDNA,合成的cDNA用作实时PCR反应的模板。对于实时PCR反应,模板在Applied Biosystems (ABI) Plus实时PCR系统上用AceQ qPCR SYBR Green Master Mix试剂盒反应3次。

[0258] 蛋白质印迹

[0259] Yan等人(2011)描述了特异性OsNRT2.3b抗体。从-83bp突变回交系中提取总蛋白质用于SDS-PAGE。然后将蛋白质转移到PVDF膜上,并与OsHSP(1:5000)和OsNRT2.3b(1:2000)在4℃孵育过夜。然后将PVDF膜与二抗(1:20000;Pierce)一起孵育。结合的抗体通过化学发光检测(Yan等人,2011;Tang等人,2012)。

[0260] 使用¹⁵N测定氮吸收

[0261] WT、T11/WT(aa)和T12/WT(aa)系在IRRI营养液中生长3周,然后在N饥饿下生长3天。最初将植物移至0.1mM CaSO₄中1分钟,然后将它们分别移至含有2.5mM ¹⁵NO₃⁻和1.25mM NH₄⁺¹⁵NO₃的营养液中5分钟,然后再次移至0.1mM CaSO₄中1分钟。将所有植株置于105℃下30

分钟灭活酶。根部和茎干分开。然后将它们在70℃的烘箱中干燥7天,并将干燥的样品研磨。使用同位素比质谱仪系统(Thermo Fisher Scientific)分析每个样品约1mg的粉末。根据根部和茎干的 ^{15}N 浓度计算 $^{15}\text{NNO}_3^-$ 的流入量。

[0262] 硝酸盐含量分析

[0263] 将株系置于105℃下30分钟以灭活酶。样品在75℃烘箱中干燥3天,干重记录为生物量值。将样品研磨成粉末形式。采用 $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ 完成样品的消化。如Leleu,2004所述,在连续流动自动分析仪(型号Auto analyzer3,Bran&Luebbe,德国)上测定总氮含量。

[0264] 启动子活性分析

[0265] 1.5-kb启动子和0sNRT2.3的1.5-kb启动子片段上的-83bp突变是从水稻中扩增的,并插入到荧光素酶报告子中。将质粒与pUbi::0sTBP2.1一起转移到水稻原生质体中,并在24小时收获。通过使用试剂盒双荧光素酶报告子检测系统(Promega)分析原生质体,以计算萤火虫荧光素酶(LUC)和海肾(Renilla)(REN)荧光素酶的比值。

[0266] RNA-序列分析

[0267] 从野生型(WT-27、WT-HY)、0sTBP2.1过表达系(OE)和0sTBP2.1T-DNA突变系(Mu)的茎干和根部中提取总RNA,具有三个生物学重复。由Genepioneer公司测试样品。

[0268] 结果

[0269] 翻译起始密码子0sNRT2.3上游的-83bp区域对水稻发育至关重要

[0270] 突变系T8、T11、T12和T20是使用TILLING(靶向基因组中诱导的局部病变)获得的(Tsai等人,2011)。(图9,图1a)。我们从这些株系中提取DNA来确定突变的位置。结果表明,T8、T11和T12均在-83bp处携带突变,位于翻译起始密码子0sNRT2.3的上游。(图1b)。然而,T20株系在基因0sNRT2.3的翻译起始密码子上游没有携带突变。(图1b)。在田间,与WT和T20相比,籽粒产量、干重和NUE均增加。(图1c,d)。虽然叶、叶鞘、茎和穗之间的总N浓度没有差异,但与WT和T20系相比,茎和穗的总氮含量增加(图1e,f)。因此,0sNRT2.3ATG上游位点的突变提高了氮的转运效率,从而促进了水稻的生长。

[0271] 我们然后在IRRI营养液中培养4个株系和WT。数据显示,与野生型相比,T8、T11和T12株系表现出显著的生长和生物量,但T20株系无差异(图2a,b)。-83bp突变系和T20株系中茎干和根部的总氮浓度与WT没有差异(图2c),但与WT和T20株系相比,-83bp突变系中茎干和根部的总氮含量增加(图2d)。0sNRT2.3a和0sNRT2.3b的表达数据显示,与WT和T20相比,在T8、T11和T12株系中0sNRT2.3a下调,但0sNRT2.3b上调(图10a,b)。因此,0sNRT2.3的ATG上游-83bp处的突变体增加了0sNRT2.3b与0sNRT2.3a的比值(图2e)。

[0272] 此外,如图15所示,对于所研究的所有三种类型的 ^{15}N 源,与W相比,T8、T11和T12株系中根部(图15a)和茎干(图15b)中积累的 ^{15}N 含量显著更高。与根部或茎干中的WT相比,T20株系没有显示任何显著差异(图15a,b)。

[0273] 图17还显示了在成熟阶段-83bp突变回交系中的氮含量。将突变回交系和对照在T8、T8/WT(aa)(失去-83bp突变)系的叶、叶鞘、茎和穗中的氮含量与WT进行比较。与WT相比,WT和T8/WT(aa)在植物的所有部分之间没有显著差异。

[0274] 0sNRT2.3的ATG上游的-83bp区域可以增加0sNRT2.3b与0sNRT2.3a的比值

[0275] 结果表明,与无突变或其他位点突变相比,0sNRT2.3启动子中的-83bp位点突变显著促进了0sNRT2.3b表达(图3a,b)。当我们使用具有-83bp位点突变的0sNRT2.3启动子驱动

OsNRT2.3a表达时,与非突变系相比,OsNRT2.3a的表达被下调,然而,OsNRT2.3b的表达被显著上调(图3c,d)。OsNRT2.3ATG上游的-83bp突变也可以增加OsNRT2.3b与OsNRT2.3a的比值(图3e)。因此,我们得出结论,OsNRT2.3ATG上游的-83bp区域对于将OsNRT2.3翻译为OsNRT2.3a和OsNRT2.3b至关重要,因此对水稻发育很重要。

[0276] -83bp突变增加了OsNRT2.3b蛋白水平和氮转运效率

[0277] 为了进一步验证OsNRT2.3上游的-83bp突变位点可以影响OsNRT2.3的转录,我们将T11和T12系与WT杂交。我们获得了T11和T12回交的纯合(aa)、杂合(Aa)和非突变(AA)系(图4a,b和图11)。序列结果显示OsNRT2.3基因ATG上游-83bp处仅有1个突变(图12a,b)。与WT相比,OsNRT2.3a在T11/WT(aa)和T12/WT(aa)系中的表达下调,然而,OsNRT2.3b上调。(图12c)。与成熟阶段的非突变(AA)系相比,纯合(aa)系T11/WT(aa)和T12/WT(aa)的产量、干重和氮利用效率显著增加。(图13)

[0278] 我们接下来通过Western印迹分析了T11/WT(aa)和T12/WT(aa)叶和根中OsNRT2.3b蛋白水平,发现与WT相比,T11/WT(aa)和T12/WT(aa)叶中OsNRT2.3b蛋白水平升高,但不在根部。(图4c)。先前的研究表明OsNRT2.3a主要负责硝酸盐从根部到茎干的长距离运输,而OsNRT2.3b主要负责茎干。(Tang等人,2012;Yan等人,2011)敲除OsNRT2.3a会增加根部硝酸盐的积累,而过表达OsNRT2.3b会增加硝酸盐的吸收和运输。(Tang等人,2012;Fan等人,2016)。为了确定OsNRT2.3翻译起始密码子上游的-83bp位点突变体对不同形式的氮应用的影响,在pH5.5测量了5分钟内-83bp突变对 15NO_3^- 和 $\text{NH}_4^+15\text{NO}_3^-$ 吸收的影响(图4d,e)。与WT相比,回交系在5分钟处理实验中显示出更多的 15N 吸收到茎干中(图4d)。然而,根中 15N 的吸收仅在施用 15NO_3^- 而非 $\text{NH}_4^+15\text{NO}_3^-$ 的根中显著增加(图4e)。与野生型相比,用 15NO_3^- 和 $\text{NH}_4^+15\text{NO}_3^-$ 处理也显著增加了回交系中茎干 15N 的浓度(图4f)。总之,我们得出结论,OsNRT2.3b的5'UTR中的-83bp突变提高了N吸收效率和运输效率。

[0279] 此外,图16显示了OsNRT2.3突变回交系中 15NO_3^- 和 15NH_4^+ 在5分钟时间内的流入量。WT以及T11和T12的突变回交纯合系在1.25mM NH_4NO_3 中生长3周,氮饥饿1周。然后在5分钟内测量2.5mM 15NO_3^- 、1.25mM $\text{NH}_4^+15\text{NO}_3^-$ 和1.25mM $15\text{NH}_4\text{NO}_3^-$ 的 15N 流入率。(a)根 15N 流入率。(b)茎干 15N 流入率。误差线:SE(n=5)不同字母表示转基因系和WT之间的显著差异(P<0.05,单向方差分析)。

[0280] OsNRT2.3不同启动子长度改变OsNRT2.3a和OsNRT2.3b的转录

[0281] 我们设计了表达载体来研究OsNRT2.3不同启动子长度对OsNRT2.3a和OsNRT2.3b转录的影响(图14a)并获得转基因幼苗。OsNRT2.3a的表达被更长的启动子长度上调。当使用141bp和180bp启动子驱动OsNRT2.3a的437bp ORF的表达时,其在幼苗中的表达下调。然而,较长的启动子序列——243bp、697bp和1505bp启动子增加了OsNRT2.3a的表达(图14b)。相反,在OsNRT2.3b的情况下,与其他系相比,只有较短的启动子——141bp和180bp,显著增加了OsNRT2.3b的表达(图14c)。与其他系相比,OsNRT2.3b与OsNRT2.3a的比值在141bp和180bp启动子中也有所增加(图14d)。总之,OsNRT2.3b与OsNRT2.3a的表达比值与启动子长度强相关。

[0282] 为了证实-83bp位点突变影响OsNRT2.3a和OsNRT2.3b在不同启动子长度的表达,我们在141bp和697bp启动子上进行了-83bp位点突变。我们然后设计了载体,使用非突变或-83bp位点突变启动子来驱动OsNRT2.3a的437bp ORF和报告子基因ZIIIB的表达(图5a)。

实时PCR的统计表明,与0sNRT2.3a的表达由等效的非突变启动子驱动的表达水平相比,当表达由突变启动子(141bp或697bp启动子)驱动时,0sNRT2.3a的表达下调(图5b)。然而,当突变发生在短启动子(141bp启动子)上时,与未突变的141bp启动子的表达水平相比,0sNRT2.3b的表达降低。相反,当突变发生在长启动子(697bp)上时,与等效(697bp)非突变启动子上的表达水平相比,0sNRT2.3b的表达上调(图5c)。总体而言,数据表明,无论突变是在短启动子还是长启动子上,它都可以促进0sNRT2.3b的转录而不是0sNRT2.3a(图5d)。总之,-83bp变可以通过不同长度的启动子改变0sNRT2.3的转录调控。

[0283] 0sTBP2.1与0sNRT2.3的顺式元件TATA-盒结合

[0284] 使用Softberry的网站(<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>),我们分析了0sNRT2.3的ATG之前的序列,并鉴定-83bp突变序列在TATA-盒基序内。因此我们在NCBI网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上搜索了三种TATA-盒结合蛋白:0sTBP2、0sTBP2.1和0sTBP2.2。为了鉴定与0sNRT2.3上游83bp的TATA-盒相互作用的蛋白质,我们进行了酵母单杂交试验。结果表明,结合蛋白0sTBP2.1可以与TATA盒-pAbAi报告子基因在含有800ng ml⁻¹金担子素A(AbA^T)的SD/-Leu培养基上生长。其他效应子未能生长。(图6a)

[0285] 我们使用双荧光素酶测定来研究TATA-盒结合蛋白0sTBP2.1是否影响-83bp突变系中0sNRT2.3启动子的转录活性。构建了如图6b所示的报告子和效应子载体,并将这些载体共转化到水稻原生质体中。如图6c所示,当pmNRT2.3::Luc和pUbi::TBP2.1共同转化到水稻原生质体中时,观察到了到最大的激活。值得注意的是,与pmNRT2.3::Luc和pUbi::TBP2.1系相比,Pnrt2.3::Luc和pUbi::TBP2.1系中的荧光素酶表达水平较低(图6c)。在单个转化系pNRT2.3::Luc和pmNRT2.3::Luc中观察到了最低水平的荧光素酶表达(图6c)。我们接下来构建了图6d所示的表达载体并获得了转基因幼苗。与不同启动子长度的无突变株系相比,0sNRT2.3a和0sNRT2.3b的蛋白质含量增加(图6e, f)。综上所述,这些结果表明转录因子0sTBP2.1可以增加0sNRT2.3向0sNRT2.3b的转录。

[0286] 0sTBP2.1增加0sNRT2.3b与0sNRT2.3a的比值并影响水稻生长

[0287] 为了研究0sTBP2.1对0sNRT2.3的调控,我们获得了过表达和T-DNA突变系。(图7a, b)。如图7c所示,与WT-W27相比,过表达系的粒重和干生物量增加,而T-DNA突变系的粒重和生物量减少。这与,OE198和OE200过表达系中0sTBP2.1和0sNRT2.3b表达相比于WT(WT-W27)的增加以及T-DNA突变系(1A-19324)中0sTBP2.1和0sNRT2.3b表达相比于WT Huangyant(WT-HY)的降低相关(图7d)。0sTBP2.1的过表达也增加了0sNRT2.3b与0sNRT2.3a的比值(在T-DNA突变系中观察到相反的效果(图7e))。

[0288] 讨论

[0289] 在生长和发育过程中,植物对各种环境和发育信号的反应需要功能基因的精确表达。在这些过程中,一些转录因子发挥着重要作用。例如,NLP转录因子在高等植物硝酸盐的调控中起着重要作用。(Konishi等人,2019)。我们的研究表明,TATA-盒结合因子0sTBP2.1调节多种途径,包括硝酸盐途径。我们的实验表明,0sTBP2.1与0sNRT2.3启动子的共转染可以增加蛋白质水平。(图6b, c)在0sTBP2.1过表达系中,0sNRT2.3b与0sNRT2.3a的比值增加,但在ostbp2.1T-DNA系中,该比例降低。(图7d)。综上所述,0sTBP2.1可以增强0sNRT2.3b的表达,降低0sNRT2.3a的表达以影响水稻发育。当TATA盒突变为TACA时,0sTBP2.1的结合能力增加,导致0sNRT2.3b的表达水平更高。

[0290] 关键顺式作用元件在每个基因的转录调控中发挥重要作用。在OsNRT2.3b的5'UTR处但位于OsNRT2.3a 5'UTR的上游的TATA-盒,通过结合OsTBP2.1控制OsNRT2.3的转录。但当TATA-盒发生突变时,OsTBP2.1结合TATA盒的能力发生改变,导致OsNRT2.3b与OsNRT2.3a的比值增加。(图9)。如此我们得出结论,OsNRT2.3向OsNRT2.3a和OsNRT2.3b的转录主要受OsNRT2.3启动子上的TATA-盒的调控,因此TATA-盒在OsNRT2.3到OsNRT2.3a和OsNRT2.3b的剪接中起着重要的调控作用。

[0291] 5'UTR在RNA翻译、RNA稳定性和RNA转录中发挥调节作用。在5'UTR处的内含子的数量和长度会影响基因的表达 (Chung等人,2006) 以及在启动子和在含有第一个内含子的5'UTR上的关键顺式作用元件。(Hernandez-Garcia和Finer,2014;Gallegos和Rose,2015)。在我们的研究中,OsNRT2.3b的5'UTR中的TATA-盒突变体增加了OsNRT2.3b与OsNRT2.3a的比值,导致产量和生长提高。

[0292] 参考文献

[0293] Araki R,Hasegawa H.Expression of rice (*Oryza sativa* L.) genes involved in high-affinity nitrate transport during the period of nitrate induction.*Breed.Sci.*2006;56:295-302

[0294] Cermak,T et al.Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting.*Nucleic acid Res.*39 (2011).

[0295] Chen J,Zhang Y,Tan Y,Zhang M,Zhu L,Xu G,Fan X.2016.Agronomic nitrogen-use efficiency of rice can be increased by driving OsNRT2.1 expression with the OsNAR2.1 promoter.*Plant Biotechnology Journal* 14:1705-1715.

[0296] Chung B Y,Simons C,Firth A E,et al.Effect of 5' UTR introns on gene expression in *Arabidopsis thaliana* [J].*Bmc Genomics*,2006,7(1):120-0.

[0297] Clough SJ,Bent AF.1998.Floral dip:a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*.*Plant J.*16(6):735-43.

[0298] Comai L,Young K,Till BJ,Reynolds SH,Greene EA,Codoma CA,Enns LC,Johnson JE,Burtner C,Odden AR,Heinkoff.2004.Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling.*Plant J.*37(5):778-86.

[0299] Crawford NM,Glass ADM.1998.Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants.*Trends Plant Sci* 3:389-395.

[0300] Fan X,Feng H,Tan Y,Xu Y,Miao Q,Xu G.2016.A putative 6-transmembrane nitrate transporter OsNRT1.1b plays a key role in rice under low nitrogen.*Journal of Integrative Plant Biology* 58:590-599.

[0301] Fan X,Tang Z,Tan Y,Zhang Y,Luo B,Yang M,Lian X,Shen Q,Miller AJ,Xu G.2016.Overexpression of a pH-sensitive nitrate transporter in rice increases crop yields.*Proceedings of the National Academy of Sciences*:201525184.

[0302] Fan X,Xie D,Chen J,Lu H,Xu Y,Ma C,Xu G.2014.Over-expression of OsPTR6

in rice increased plant growth at different nitrogen supplies but decreased nitrogen use efficiency at high ammonium supply. *Plant Science* 227:1-11.

[0303] FAO.2015.FAO Statistical Pocketbook 2015.

[0304] Feng H,Fan X,Yan M,Liu X,Miller AJ,Xu G.2011.Multiple roles of nitrate transport accessory protein NAR2 in plants. *Plant Signaling&Behavior* 6:1286-1289.

[0305] Feng,Q.,Zhang,Y.,Hao,P.,Wang,S.,Fu,G.,Huang,Y.,Li,Y.et al.2002.Sequence and analysis of rice chromosome 4. *Nature* 420:316-320.

[0306] Forde BG.2000.Nitrate transporters in plants:structure,function and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1465:219-235.

[0307] Gallegos JE,Rose AB.2015.The enduring mystery of intron-mediated enhancement. *Plant Science* 237:8-15.

[0308] Henikoff S,Till BJ,Comai L.2004.TILLING.Traditional mutagenesis meets functional genomics. *Plant Physiol.*135(2):630-6.

[0309] Hernandez-Garcia CM,Finer JJ.2014.Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. *Plant Science* 217-218:109-119.

[0310] Jingguang C,Yong Z,Yawen T.2016.The Effects of OsNRT2.1 Over-expression on Plant Growth and Nitrogen use Efficiency in Rice Nipponbare (*Oryza sativa* L.ssp.japonica).14.

[0311] Kirk GJ,Kronzucker HJ.2005.The potential for nitrification and nitrate uptake in the rhizosphere of wetland plants:a modelling study. *Annals of Botany* 96:639-646.

[0312] Komor,A.C.;Kim,Y.B.;Packer,M.S.;Zuris,J.A.;Liu,D.R.2-16.Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*,533,420-424

[0313] Konishi M,Yanagisawa S.2019.The role of protein-protein interactions mediated by the PBl domain of NLP transcription factors in nitrate-inducible gene expression. *BMC Plant Biology* 19(1):90.

[0314] Kronzucker,H.J.,Siddiqi,M.Y.,Glass,A.D.,&Kirk,G.J. (1999) .Nitrate-ammonium synergism in rice.A subcellular flux analysis. *Plant physiology*,119(3),1041-1046.

[0315] Krysan PJ,Young JC,Sussman MR.1999.T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell*.11(12):2283-90.

[0316] Kunkel TA.1985.Rapid and efficient dite-specific mutagenesis without phenotypic selection. *PNAS*.82(2):488-92.

[0317] Kunkel TA,Roberts JD,Zakour RA.1987.Rapid and efficient dite-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol*.154.367-82.

[0318] Leleu O,Vuylsteker C.2004.Unusual regulatory nitrate reductase activity in otyledons of *Brassica napus* seedlings:enhancement of nitrate

reductase activity by ammonium supply. *J Exp Bot* 55:815-823

[0319] Ma X, Zhang Q, Zhu Q, Liu W, Chen Y, Qiu R, Wang B, Yang Z, Li H, Lin Y, Xie Y, Shen R, Chen S, Wang Z, Chen Y, Guo J, Chen L, Zhao X, Dong Z, Liu Y. 2015. A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient, High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants. *8 (8)*:1274-84.

[0320] Miller AJ, Fan X, Orsel M, Smith SJ, Wells DM. 2007. Nitrate transport and signalling. *J Exp Bot* 58:2297-2306.

[0321] Nishida K, et al. 2016. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science* 353, aaf8729

[0322] Orsel M, Krapp A, Daniel-Vedele F. 2002. Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in Arabidopsis Structure and gene expression. *Plant Physiology* 129:886-896.

[0323] Orsel M., Krapp A., Daniel-Vedele F. 2002. Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in Arabidopsis. Structure and gene expression. *Plant Physiol* 129:886-896

[0324] Okamoto M, Vidmar J J, Glass A D M. 2003. Regulation of NRT1 and NRT2 gene families of Arabidopsis thaliana: responses to nitrate provision. *Plant Cell Physiology* 44:304-317.

[0325] Peng X, Wang H, Jang J, Xiao T, He H, Jiang D, Tang X. 2016. OsWRKY80-OsWRKY4 Module as a Positive Regulatory Circuit in Rice Resistance Against *Rhizoctonia solani*. *Rice*.

[0326] Radhar M, McMahon MA, Prakash TP, Swayze EE, Bennett F, Cleveland DW. 2015. Synthetic CRISPR RNA-Cas9-guided genome editing in human cells. *PNAS*. 112 (51) E7110-E7117.

[0327] Sanjana NE, et al. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nat Protoc*. 2012; 7 (1) :171-192

[0328] Sasaki, T., Matsumoto, T., Yamamoto, K. et al. 2002. The genome sequence and structure of rice chromosome 1. *Nature* 420:312-316.

[0329] Sasakawa, H. and Yamamoto, Y. 1978. Comparison of the uptake of nitrate and ammonium by rice seedlings. *Plant Physiology* 62:665-669.

[0330] Schortemeyer M, Feil B., Stamp P. 1993. Root morphology and nitrogen uptake of maize simultaneously supplied with ammonium and nitrate in a split-root system. *Ann Bot* 72:107-115

[0331] Tang Z, Fan XR, Li Q, Feng HM, Miller AJ, Shen QR, Xu GH. 2012. Knockdown of a Rice Stellar Nitrate Transporter Alters Long-Distance Translocation But Not Root Influx. *Plant Physiology* 160:2052-2063.

[0332] Tegeder M, Rentsch D. 2010. Uptake and partitioning of amino acids and peptides. *Molecular Plant* 3:997-1011.

[0333] Toki S. 1997. Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation

in rice. *Plant Molecular Biology Reporter* 15:16-21.

[0334] Toki S, Hara N, Ono K, Onodera H, Tagiri A, Oka S, Tanaka H. 2006. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *Plant Journal* 47:969-976.

[0335] Tsai H, Howell T, Nitcher R, Missirian V, Watson B, Ngo KJ, Lieberman M, Fass J, Uauy C, Tran RK, et al. 2011. Discovery of rare mutations in populations: tilling by sequencing. *Plant Physiology* 56(3):1257-1268.

[0336] Upadhyaya NM, Surin B, Ramm K, Gaudron J, Schunmann PHD, Taylor W, Waterhouse PM, Wang MB. 2000. *Agrobacterium*-mediated transformation of Australian rice cultivars Jarrah and Amaroo using modified promoters and selectable markers. *Aust J Plant Physiol* 27:201-210.

[0337] Xu G, Fan X, Miller AJ 2012. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annu Rev Plant Biol* 63:153-182.

[0338] Yan M, Fan X, Feng H, Miller AJ, Shen Q, Xu G. 2011. Rice OsNAR2.1 interacts with OsNRT2.1, OsNRT2.2 and OsNRT2.3a nitrate transporters to provide uptake over high and low concentration ranges. *Plant Cell and Environment* 34:1360-1372.

[0339] 序列表

[0340] SEQ ID NO:1 NRT2.3(部分)启动子

[0341] 1 GACGCGAGCG CGGAGACGGC AGCGCCGGCC TCCCACCGGT CGCGTAAGAT CACGCCCGAA

[0342] 61 ATCTTTATTC ATTTTCTCTC CACCGGTTGC CCTCTCGCCG CACCCAACCA TCGCGCCACG

[0343] 121 CCGCGCCGCG CTGCCGGAGC CGCGCTTTCC GCTATGCTAT AAGAGCTGAC GCGCAGGGCA

[0344] 181 CAGCGGATGT ACGTACACAC AGTCACTAGC TAAGCTGCTA GCCTTGCTAC CACGTGTTGG

[0345] 241 AG

[0346] SEQ ID NO:2在ATG的上游-81处具有多态性(下划线)的NRT2.3启动子

[0347] 1 GACGCGAGCG CGGAGACGGC AGCGCCGGCC TCCCACCGGT CGCGTAAGAT CACGCCCGAA

[0348] 61 ATCTTTATTC ATTTTCTCTC CACCGGTTGC CCTCTCGCCG CACCCAACCA TCGCGCCACG

[0349] 121 CCGCGCCGCG CTGCCGGAGC CGCGCTTTCC GCTATGCTAC AAGAGCTGAC GCGCAGGGCA

[0350] 181 CAGCGGATGT ACGTACACAC AGTCACTAGC TAAGCTGCTA GCCTTGCTAC CACGTGTTGG

[0351] 241 AG

[0352] SEQ ID NO:3在ATG的上游-81,-42和-21处具有多态性的NRT2.3启动子

[0353] 1 GACGCGAGCG CGGAGACGGC AGCGCCGGCC TCCCACCGGT CGCGTAAGAT CACGCCCGAA

[0354] 61 ATCTTTATTC ATTTTCTCTC CACCGGTTGC CCTCTCGCCG CACCCAACCA TCGCGCCACG

[0355] 121 CCGCGCCGCG CTGCCGGAGC CGCGCTTTCC GCTATGCTAC AAGAGCTGAC GCGCAGGGCA

[0356] 181 CAGCGGATGT ACGTACACAC CGTCACTAGC TAAGCTGCTA GTCTTGCTAC CACGTGTTGG

[0357] 241 AG

[0358] SEQ ID NO:4 NRT 2.3启动子的180个C端残基

[0359] CTTTATTC ATTTTCTCTC CACCGGTTGC CCTCTCGCCG CACCCAACCA TCGCGCCACG

[0360] CCGCGCCGCG CTGCCGGAGC CGCGCTTTCC GCTATGCTAC AAGAGCTGAC GCGCAGGGCA

[0361] CAGCGGATGT ACGTACACAC CGTACTAGC TAAGCTGCTA GTCTTGCTAC CACGTGTTGG
[0362] AG
[0363] SEQ ID NO:5NRT 2.3启动子的141个C端残基
[0364] ACCCAACCA TCGCGCCACG CCGCGCCGCG CTGCCGGAGC CGCGCTTTC GCTATGCTAC AAGAGCTGAC GCGCAGGGCA CAGCGGATGT ACGTACACAC CGTACTAGC TAAGCTGCTA GTCTTGCTAC CACGTGTTGG AG
[0365] SEQ ID NO:6 NRT2.3启动子的62个5' 核苷酸的缺失
[0366] GACGCGAGCG CGGAGACGGC AGCGCCGGCC TCCCACCGGT CGCGTAAGAT CACGCCCGAA AT
[0367] SEQ ID NO:7 NRT2.3启动子的101个5' 核苷酸的缺失
[0368] GACGCGAGCG CGGAGACGGC AGCGCCGGCC TCCCACCGGT CGCGTAAGAT CACGCCCGAAATCTTTATTC ATTTTCTCTC CACCGTTGC CCTCTCGCCG C
[0369] SEQ ID NO:8 NRT 2.3基因组序列
[0370] GAGCGCCGGCCTCCCACCGGTCGCGTAAGATCACGCCGAAATCTTTATTCATTTTCTCTCCACCGGTT GCCCTCTCGCCGACCCAACCATCGCGCCACGCCGCGCCGCGCTGCCGGAGCCGCGCTTCCGCTATGCTATAAGAG CTGACGCGCAGGGCACAGCGGATGTACGTACACACAGTCACTAGCTAAGCTGCTAGCCTTGTACCACGTGTTGGAG ATGGAGGCTAAGCCGGTGGCGATGGAGGTGGAGGGGTCGAGGCGCGGGGGCAAGCCGCGGTTCCAGGATGCCGGT GGACTCCGACCTCAAGGCGACGGAGTTCTGGCTCTTCTCCTTCGCGAGGCCACACATGGCCTCCTTCCACATGGCGT GGTTCCTCTTCTTCTGCTGCTTCGTGTCCACGTTCCGCCGCGCCGCGCTGCTGCCGCTCATCCGCGACACCCTCGGG CTCACGGCCACGGACATCGGCAACGCCGGATCGCGTCCGTGTGCGGGCGCCGTGTTCCGCGCTCTGGCCATGGGCAC GGCCTGCGACCTGGTCGGGCCAGGCTGGCCTCCGCGTCTCTGATCCTCCTCACCACACCGGCGGTGTACTGCTCCT CCATCATCCAGTCCCCGTCGGGTACCTCCTCGTGGCTTCTTACGGGCATCTCGCTGGCGTGGTTCGTGTGCGGC CAGTTCTGGATGAGCTCCATGTTCTCGGCCCCAAAGTGGGGCTGGCCAACGGCGTGGCCGGCGCTGGGGCAACCT CGGCGGGCGCCGCTCCAGCTGCTCATGCCGCTCGTGTACGAGGCCATCCACAAGATCGGTAGCACGCCGTTACCGG CGTGGCGCATCGCCTTCTTTCATCCCAGGCTGATGCAGACGTTCTCGGCCATCGCCGTGCTGGCGTTCGGGCAGGAC ATGCCCCGGCGGCAACTACGGGAAGCTCCACAAGACTGGCGACATGCACAAGGACAGCTTCGGCAACGTGCTGCGCCA CGCCCTCACCAACTACCGCGGCTGGATCCTGGCGCTCACCTACGGCTACAGCTTCGGCGTCGAGCTCACCATCGACA ACGTCGTGCACCAGTACTTCTACGACCGCTTCGACGTCAACCTCCAGACCGCCGGGCTCATCGCCGCCAGCTTCGGG ATGGCCAACATCATCTCCC GCCCGGGCGGGCTACTCTCCGACTGGCTTCCAGCCGGTACGGCATGCGCGGCAG GCTGTGGGGGCTGTGGACTGTGCAGACCATCGGCGGCTCCTCTGCGTGGTGTCTCGGAATCGTCGACTTCTCCTTCG CCGCTCCGTGCGCGTGATGGTGCTTCTCCTTCTTCGTCCAGGCCGCTGCGGGCTCACCTTCGGCATCGTGCCG TTCGTGTGCGGAGGTGCTGGGGCTCATCTCCGGGATGACCGCGGGGGGCAACGTGGGCGCCGTGCTGACGCA GTACATCTTCTTCCACGGCACAAAGTACAAGACGGAGACCGGGATCAAGTACATGGGGCTCATGATCATCGCGTGCA CGCTGCCCGTCATGCTCATCTACTTCCCGCAGTGGGGCGGCATGCTCGTAGGCCCGAGGAAGGGGGCCACGGCGGAG GAGTACTACAGCCGGGAGTGGTCGGATCACGAGCGGAGAAGGGTTTCAACGCGGCCAGCGTGGGTTCCGCGGAGAA CAGCGTGCAGGAGGGCGGGAGGTCGTGCGGAATGGCGACAGCCAGGCACACCGTCCCCGTCGACGCGTCGCCGG CCGGGGTGTGAAGAATGCCACGGACAATAAGGTCGCGGTTGTAGTACAACGTACAATTTGATGGTACGTGTCTGTTT GACCGCGCGCGCACAGTGTGGGTCGTGGCCTCGTGGGCTTAGTGGAGTACAGTGAGGGGTGTACGTGTGCTGTTG CGCGCGCGGTCACCTCGGTGGCCTTGGGATTGGGGGGCACTATAACGCTAGTACTCCAGATATATACGGGTTTGATT TACTTCTGTGGATCGGCGCTTGTGGTGGTTTGCTCCCTGTGGTTTTTGTGATGGTAATCATACTCATACTCAAACA

GTC

- [0371] SEQ ID NO:9:NRT2.3 TATA盒
- [0372] CC GCTATGCTAT AAGAGCTGAC
- [0373] SEQ ID NO:10;OSE2ROOTNODULE (-82bp至-86bp)
- [0374] CTAC
- [0375] SEQ ID NO:11;ASF1MOTIFCAMV (-76bp至-83bp)
- [0376] CGCGCAGG
- [0377] SEQ ID NO:12 CRISPR靶序列
- [0378] **GCTATAAGAGCTGACGCGCAGGG**
- [0379] SEQ ID NO:13 CRISPR靶序列
- [0380] **CCGGAGCCGCGCTTTCCGCTATG**
- [0381] SEQ ID NO:14 CRISPR靶序列
- [0382] **CCGGTTGCCCTCTCGCCGCACCC**
- [0383] SEQ ID NO:15 CRISPR靶序列
- [0384] **CCGCGACGCGAGCGCGGAGACGG**
- [0385] SEQ ID NO:16原间隔区序列
- [0386] GCTATAAGAGCTGACGCGCA
- [0387] SEQ ID NO:17原间隔区序列
- [0388] GAGCCGCGCTTTCCGCTATG
- [0389] SEQ ID NO:18原间隔区序列
- [0390] GTTGCCCTCTCGCCGCACCC
- [0391] SEQ ID NO:19原间隔区序列
- [0392] CGACGCGAGCGCGGAGACGG
- [0393] SEQ ID NO:20原间隔区序列
- [0394] 5' GGCAGCTATAAGAGCTGACGCGCA 3'
- [0395] 5' AAACTGCGGTCAGCTCTTATAGC 3' (SEQ ID NO:34)
- [0396] SEQ ID NO:21原间隔区序列
- [0397] 5' GGCACATAGCGAAAGCGCGGCTC 3'
- [0398] 5' AAACGAGCCGCGCTTTCCGCTATG 3' (SEQ ID NO:35)
- [0399] SEQ ID NO:22原间隔区序列
- [0400] 5' GGCAGGGTGCGGCGAGAGGGCAAC3'
- [0401] 5' AAACGTTGCCCTCTCGCCGCACCC 3' (SEQ ID NO:36)
- [0402] SEQ ID NO:23原间隔区序列
- [0403] 5' GGCACCGTCTCCGCGCTCGCGTCG 3'
- [0404] 5' AAACCGACGCGAGCGCGGAGACGG 3' (SEQ ID NO:37)
- [0405] SEQ ID NO:24;tracrRNA核酸序列
- [0406] ATGCTACTACTAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGACTAGCCTTATTTT
AACTTGCTATGCTTTTCAGCATAGCTCTAAAAC

[0407] SEQ ID NO:25 U3启动子序列:

[0408] AAAGGAAGGAATCTTTAAACATACGAACAGATCACTTAAAGTTCTTCTGAAGCAACTTAAAGTTATCAGGCATGCATGGATCTTGGAGGAATCAGATGTGCAGTCAGGGACCATAGCACAAAGACAGGCGTCTTCTACTGGTGCTACAGCAAATGCTGGAAGCCGGGAACACTGGGTACGTTGAAAACACGTGTGATGTGAAGGAGTAAGATAAACTGTAGGAGAAAAGCATTTCGTAGTGGGCCATGAAGCCTTTCAGGACATGTATTGCAGTATGGGCCGGCCATTACGCAATTGGACGACAACAAAGACTAGTATTAGTACCACCTCGGCTATCCACATAGATCAAAGCTGGTTTAAAAGAGTTGTGCAGATGATCCGTGGCA

[0409] SEQ ID NO:26 U6a启动子序列:

[0410] TTTTTTCTGTAGTTTTCCACAACCATTTTTTACCATCCGAATGATAGGATAGGAAAAATATCCAAGTGAACAGTATTCCTATAAAATTTCCGTAAAAAGCCTGCAATCCGAATGAGCCCTGAAGTCTGAACTAGCCGGTCACCTGTACAGGCTATCGAGATGCCATACAAGAGACGGTAGTAGGAACTAGGAAGACGATGGTTGATTTCGTAGGCGAAATCGTCGCTCAGTCGCATCTATGGGCCTGGACGGAATAGGGGAAAAAGTTGGCCGGATAGGAGGGAAAGGCCAGGTGCTTACGTGCGAGGTAGGCCTGGGCTCTCAGCACTTCGATTTCGTTGGCACCAGGGTAGGATGCAATAGAGAGCAACGTTTAGTACCACCTCGCTTAGCTAGAGCAAACCTGGACTGCCTTATATGCGCGGGTGCTGGCTGGCTGCCG

[0411] SEQ ID NO:27 U6b启动子序列:

[0412] TGCAAGAACGAACCTAAGCCGGACAAAAAAGGAGCACATATACAAACCGTTTTTATTCATGAATGGTCACGATGGATGATGGGGCTCAGACTTGAGCTACGAGGCCGAGGAGAGAAGCCTAGTGTGCTCTCTGCTTGTGGGGCGTAACGGAGGATACGGCCGACGAGCGTGTACTACCGCGGGATGCCGCTGGGCGCTGCGGGGCGTTGGA TGGGGATCGGTGGGTGCGGGAGCGTTGAGGGGAGACAGGTTTAGTACCACCTCGCCTACCGAACAATGAAGAACCACCTTATAACCCCGCGCTGCCGCTTGTGTTG

[0413] SEQ ID NO:28在双子叶植物中的U3b

[0414] TTTACTTTAAATTTTTTCTTATGCAGCCTGTGATGGATAACTGAATCAAACAAATGGCGTCTGGGTTTAAAGATCTGTTTTGGCTATGTTGGACGAAACAAGTAACTTTTAGGATCAACTCAGTTTATATATGGAGCTTATATCGAGCAATAAGATAAGTGGGCTTTTTATGTAATTTAATGGGCTATCGTCCATAGATTCACTAATACCCATGCCAGTACCCATGTATGCGTTTTATATAAGCTCCTAATTTCTCCACATCGCTCAAATCTAAACAAATCTTGTGTATATATAACTGAGGGAGCAACATTGGTCA

[0415] SEQ ID NO:29在双子叶植物中的U6-1

[0416] AGAAATCTCAAAATTCGGCAGAACAAATTTGAATCTCGATCCGTAGAAACGAGACGGTCATTGTTTTAGTTCCACCACGATTATATTTGAAATTTACGTGAGTGTGAGTGAGACTTGCATAAGAAAATAAAATCTTTAGTTGGGA AAAAATTCATAATAATAATGGGCTTGAGAAGGAAGCGAGGGATAGGCCTTTTTCTAAAATAGGCCATTTAAGCTA TTAACAATCTTCAAAAGTACCACAGCGCTTAGGTAAAAGAAAGCAGCTGAGTTTATATATGGTTAGAGACGAAGTAGT GATTG

[0417] SEQ ID NO:30 Cas9

[0418] ATGGCCCCAAGAAGAAGCGCAAGGTCGACAAGAAGTACTCCATCGGCCTCGACATCGGCACCAATTCTGTTGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTCTCGGCAACACCGACCGCACTCCATCAAGAAGAATCTCATCGGCCTGCTGTTGACTCTGGCGAGACAGCCGAGGCTACAAGGCTCAAGAGGACCGCTAGACGCAGGTACACCAGGCGCAAGAACCGCATCTGCTACCTCCAAGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGGCTCGAGGAGAGCTTCTCGTGGAGGACAAGAAGCAGAGCGCCATCCGATCTTCGGCAACATCGTGGATGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCGACCATCTACCACCTCCGCAAGAAGCTCGTCG

ACTCCACCGATAAGGCCGACCTCAGGCTCATCTACCTCGCCCTCGCCACATGATCAAGTTCAGGGGCCACTTCCTC
ATCGAGGGCGACCTCAACCCGACAACCTCCGATGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTCGTGCAGACCTACAACCAGCT
GTTTCGAGGAGAACCCGATCAACGCCTCTGGCGTTGACGCCAAGGCTATTCTCTCTGCCAGGCTCTCTAAGTCCC
GGCTCGAGAATCTGATCGCCCAACTTCCGGGCGAGAAGAAGAATGGCCTCTTCGGCAACCTGATCGCCCTCTCTCT
GGCCTCACCCCGAACTTCAAGTCCAACCTTCGACCTCGCCGAGGACGCCAAGCTCCAGCTTTCGAAGGACACCTACGA
CGACGACCTCGACAATCTCCTCGCCAGATTGGCGATCAGTACGCCGATCTGTTCCCTCGCCGCAAGAATCTCTCCG
ACGCCATCCTCCTCAGCGACATCCTCAGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCACTCTCCGCCTCCATGATCAAG
AGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTCACACTCCTCAAGGCCCTCGTGAGACAGCAGCTCCCAGAGAAGTACAAGGA
GATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGATGGCGGCGCTTCTCAAGAGGAGTTCTACAAGT
TCATCAAGCCGATCCTCGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTCGTGAAGCTCAATAGAGAGGACCTCCTCCGC
AAGCAGCGCACCTTCGATAATGGCTCCATCCCGCACCGAGATCCACCTCGGCGAGCTTCATGCTATCCTCCGCAGGCA
AGAGGACTTCTACCCGTTCTCAAGGACAACCGCGAGAAGATTGAGAAGATCCTCACCTTCCGCATCCCGTACTACG
TGGGCCCGCTCGCCAGGGGCAACTCCAGGTCGCTGGATGACCAGAAAGTCCGAGGAGACAATCACCCCTGGAAC
TTCGAGGAGGTGGTGGATAAGGGCGCCTCTGCCAGTCTTTCATCGAGCGCATGACCAACTTCGACAAGAACCTCCC
GAACGAGAAGGTGCTCCCGAAGCACTCACTCCTCTACGAGTACTTACCCTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGT
ACGTGACCGAGGGGATGAGGAAGCCAGCTTTCCTTAGCGGCGAGCAAAAGAAGGCCATCGTCGACCTGCTGTTCAAG
ACCAACCGCAAGGTGACCGTGAAGCAGCTCAAGGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTCGAGAT
CTCCGGCGTCGAGGATAGGTTCAATGCCTCCCTCGGGACCTACCACGACCTCCTCAAGATTATCAAGGACAAGGACT
TCCTCGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTCGAGGACATCGTGCTACCCTCACCTCTTCGAGGACCGCGAGATG
ATCGAGGAGCGCTCAAGACATACGCCACCTCTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGCAGGCGCTATAC
CGGCTGGGGCAGGCTCTCTAGGAAGCTCATCAACGGCATCCCGGACAAGCAGTCCGGCAAGACGATCCTCGACTTCC
TCAAGTCCGACGGCTTCGCCAACCGCAACTTCATGCAGCTCATCCACGACGACTCCCTCACCTTCAAGGAGGACATC
CAAAAGGCCCAGGTGTCCGGCCAAGGCGATTCCCTCCATGAGCATATCGCCAATCTCGCCGGCTCCCCGGCTATCAA
GAAGGGCATTCTCCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCAGGCACAAGCCAGAGAACATCG
TGATCGAGATGGCCCGCAGAAACCAGACCACACAGAAGGGCCAAAAGAAGTCCCGCGAGCGCATGAAGAGGATCGAG
GAGGGCATTAAAGGAGCTGGGCTCCCAGATCCTCAAGGAGCACCCAGTCGAGAACACCCAGCTCCAGAACGAGAAGCT
CTACCTCTACTACCTCCAGAACGGCCGCGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAACCGCCTCTCCGACTACG
ACGTGGACCATATTGTGCCGAGTCCCTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTCACCCGCTCCGACAAG
AACAGGGGCAAGTCCGATAACGTGCCGTCCGAAGAGGTCGTCGAAGAAGATGAAGAAGTACTGGCGCCAGCTCCTCAA
CGCCAAGCTCATCACCCAGAGGAAGTTCGACAACCTCACCAAGGCCGAGAGAGGCGGCCTTTCGAGCTTGATAAGG
CCGGCTTCATCAAGCGCCAGCTCGTCGAGACACGCCAGATCACAAAGCACGTGGCCCAGATCCTCGACTCCCGCATG
AACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTCATCCGCGAGGTGAAGGTCATACCCTCAAGTCCAAGCTCGTGTCCGA
CTTCCGCAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGCGAGATCAACAAGTACCACCACGCCACGACGCCTACCTCAATG
CCGTGGTGGGCACAGCCCTCATCAAGAAGTACCCAAAAGCTCGAGTCCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTAC
GACGTGCGCAAGATGATCGCCAAGTCCGAGCAAGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACTCCAACAT
CATGAATTTCTTCAAGACCGAGATCACGCTCGCCAACGGCGAGATTAGGAAGAGGCGGCTCATCGAGACAAAACGGCG
AGACAGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGATTCGCCACAGTGCGAAGGTGCTCTCCATGCCGCAAGTGAAC
ATCGTGAAGAAGACCGAGGTTACAGCCGGCGGCTTCTCCAAGGAGTCCATCCTCCAAAAGCGCAACTCCGACAAGCT
GATCGCCCGCAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTATGGCGGCTTCGATTCTCCGACCGTGGCCTACTCTGTGCTCG

TGGTTGCCAAGGTCGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTCAAGTCCGTCAAGGAGCTGCTGGGCATCACGATCATGGAG
 CGCAGCAGCTTCGAGAAGAACCCAATCGACTTCCTCGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTCATCAT
 CAAGCTCCCGAAGTACAGCCTCTTCGAGCTTGAGAACGGCCGCAAGAGAATGCTCGCCTCTGCTGGCGAGCTTCAGA
 AGGGCAACGAGCTTGCTCTCCCGTCCAAGTACGTGAACTTCCTCTACCTCGCCTCCCACTACGAGAAGCTCAAGGGC
 TCCCCAGAGGACAACGAGCAAAAAGCAGCTGTTTCGTCGAGCAGCACAAAGCACTACCTCGACGAGATCATCGAGCAGAT
 CTCCGAGTTCTCCAAGCGCGTGATCCTCGCCGATGCCAACCTCGATAAGGTGCTCAGCGCCTACAACAAGCACCGCG
 ATAAGCCAATTCGCGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTCTCACCTCACCAACCTCGGCGCTCCAGCCGCTTC
 AAGTACTTCGACACCACCATCGACCGCAAGCGCTACACCTCTACCAAGGAGGTTCTCGACGCCACCCTCATCCACCA
 GTCTATCACAGGCCTCTACGAGACACGCATCGACCTCTCACAACCTCGGCGGCGATTGA

[0419] SEQ ID NO:32:0sTBP2.1氨基酸

[0420] MAAAEAAAEEAAAALLEGSEPVLDLVKHPSGI IPTLQNI VSTVNL DCKLDLKAIALQARNAEYNPKRFAAVI
 MRIREPKTTALIFASGKMVCTGAKSEQQSKLAARKYARI IQKLGFAAKFKDFKI QNIVGSCDVKFP IRLEGLAYSHG
 AFSSYEPELFPGLIYRMKQPKIVLLIFVSGKIVLTGAKVRDETYTAFENIYPVLTEFRKVVQ

[0421] SEQ ID NO:33:0sTBP2.1核酸 (CDS)

[0422] GATTTCCGATCGCTATATAAAAAGACCTAGGATTCGAAATTTTCCCTCCCCCTCCCCCTTCGCGCGCG
 CGCTCTCTTCCCGCCCTTTTTTTTTCTTCTTCTTACCGGTGGGATTGATTCGTGGGGTGCGGATCTGGTTTTTGG
 GGGTGTGTATGGCGGCGGCGGAGGCGGCGGCGGAGGCGGCGGCGGCTGGAGGGGAGCGAGCCCGTGGACCTGGTC
 AAGCACCCCTCCGGCATCATCCCCACGCTCCAGTAAGTCCCCCGCCCCGCGGATCTGTATGTGCGGGTTCAT
 CGAGCTGGTTGAGTTTGGAGGTGGAGCGGTTAACTCGTCGCGCGCTGTTGATTTGGTTTTGTTTTGGGGGCCGGGAT
 ATTATTTGTTGTTGCAAATGATGTGATTGGTGGTAGGTTTAGCTTGGGGGGTACTACATGTTTGGAGTTCTGATTT
 GCTTGATTGATGAAAAAGGGGGCGATCTGAGATCCGCGAGTCCGGTACGAGAAGAAATAGAGGCAGCCGATGTGCT
 TGTGCTGTGACGGATCCATTGTCCGGTCTTCATAACAACCTTTTTAGCTGGACAGATGTTTGTTCATGAATG
 AATTCATATGGTTGGAGTCTTGGAGAATCAGCTTGTGAGCTGTTCTTTTTTTAAAAAAAATTAAGGTTTATAAAT
 AAATAAATAATCAATCAATCAATCATGCATCTAAATTGTAGGATTAATTCCTTCCCTCATCACGATTTCAACCT
 TAGAGGGAGGTATTGTGTCTGTGGAGAGTTTATGGTGCTCATGTGATACATACAGTTGACAATGGGTCAATGCATGT
 TTTTAGACAGCATCAAGCTCTGAACAAGTGAACCACATATTTAGGCTTGATCCATGTATAACCCACTAAGTTTTAT
 ACTTGTGTGACGGCCAATATGCCAAAACCTGGCTGTTTATTAGCATGCTGTACTTGCTGGTGTGCATCGAAACGT
 TTTTGGGGTTTTGCCTACATTGCTACCAGGCATGTATATTTGCATGCTGGTGTGCATTGCAGAAAAAGTCGAGCATG
 CTTATATTGCTGCTTGTATAGTGTACCTGCTTCCATGTGTTCTCACAAGTGCATGCCTGTTTTGCTGCCTTTCT
 GGGTTGTTTTATGTTTCAGCGTTGGGATCATAGCTGGTAGACTGCATGTGTTCCACTCTGTTTTGGCTTATCATGCTT
 CCTTTGGATACTCTACCAAGGAAATTGAAGTCCTCATTATGTGTTCTCATCTATTTTGATGGCAGAAACATCGTGT
 CGACGGTCAATTTGGATTGCAAATTAGACCTCAAAGCTATAGCTTTGCAAGCACGCAATGCAGAATATAATCCAAAG
 GTATTATGATGGCTTTGGTGTGTTCTTGTGTCTTTGATTTTGCTCGAAAGGATATCTTCTTTCATGTGAAAATTTT
 ACCTATTTTAATCCTGCTAGCATGTAATATGTAGACAAGTCCATAACAATCCTATGGTCTGTTCTTAGGATGATACTT
 CCTTTGTGTATAACGCAAGTGTGAGTGCAATTTAGAGGTCGGTATGGATAAATGCATAGCTGGCAGTCCAGTTTTA
 TATTGTAATCTCAGTTAAGAGAGTGAATACATTCATCACGCTCAGCTTGTCCCATGGATAAGCAAATTGCTTTACA
 ATTAAGATTCTAAAATTGCTCTATTTAGTGCTTATGCACTTTCTAATCTGTGCTGCACGTATCAGATACAGCATGAT
 GTATTGGGGGATTTTGTAAATTATATGTAATATCATAATCTAAATCTAGGCTATTATGTTTATTTAATAATGGATAC
 ATTTTGAAAGAAACAGAGATAACTGCACACTGAGGTTATAGCATCTCTATCTACTCCATCCGTTCCAAAATATAAGC

ACTGTAATATATGTTTTAGTTTGCTAACTCCTCTTTTCACAAACAGCGTTTTGCTGCAGTTATCATGAGAATAAGAG
AACCGAAAACACTACAGCTCTGATATTTGCATCGGGTAAAAATGGTATGGTTCAACCTCTTTGTATAGCTAAGACTGCAA
ATATTCTGTTTGTTTCATCTTCTTATTGACTTGTGAATTGCTTTATCACCTGTCTTTGTTGCTCTGTAGCTATTATA
ACGCATATTGATTGATGAACTCTTTTTGCTGATGTGTAAGTCTTTCTATTAGCCTACTATCTTTTTAGTTTTTCTT
TGTTTTTTTTAACAGCTATCACATCCATACCTGATCCATGCAGCCTGTAGTTCAATGCTGAATCTGTAAATTTAAGTT
TGCTCTGATTTTCTGACATGTTGCTGTTGCATTGCTGTTACATAATAACAGATAAGTAGTGCTCTTTCTGTAAATG
TATAGTTTGTCTTGTAACTTTTTTATTGTCTTAAAGCATAATCAGAATTGACAATAAATTGAACCTGTCAATTTT
ATTTGTTGATGGATAATCAGCAATGACACATCACATGGACTTCATGTGCGGTCAATATCTTAATTTTAAAAGGCTTG
TTTATGAAAATTCACCTGATTTTCTTTTGGATCAATGTCTTGATCCGAATAAGCTTGTTGAAGGATAATTGGTGGT
CAGCATTTTTGGGATAAAATCTTCATTA AAAAGTTGCTTTGCTGGTTCATCAGGAGGGATAATATCTGTGTTACAG
ACTTAAAGTAATACATTTTTCTGATAATAAATTCACATTTTAAAGCATGAGAACGAAGGAGTTCACAGCCTAGGCTTA
CTAGTACGCTGTATGGGGCCTGACTATTAGGCAGTGGACTTAAGAAGGGGTTGTCTGGGTTTGATGCACCGATTTG
CTGCGTCTTTGCTTCTTTTTTATAAAAAATCAAATTTGCTTGTTAACCAAAAATTTCTCTGTGGCACCATGACCTGCT
AGCATTGTGGTGGAATTA AAAAGCATGTTTATAAATCTTTGTTGTCCTTACCAGGTATGTACTGGGGCAAAGAGC
GAACAACAATCAAAGCTTGCAAGCAAGAAAGGTATGGGGAGTATTTATTTTATTTTATTTTATTTTGTACGTGAAGT
CTAACACTTTTTTATTGCCAGTATGCTCGTATTATCCAAAAGCTTGGCTTTGCTGCTAAGTTAAGGTAACCTATTTT
AGGCTTGATTAATTTTTCATCTGTGCAAATGCCTACCATTTTTCATTCTGTAAGATTGTACCTAAATGTTTAACTCATT
TGCACTATAACCAGGACTTCAAGATTCAGAACATTGTTGGTCTTGTGATGTTAAATTTCCAATCAGGCTGGAGGGAC
TTGCATATTTCTCATGGTGTCTTCTCAAGTGTAAGTTGAATCCTTGCATGTTTTTTTTAGGATATTTCTTTCACATATG
TTATGCTATTCTCATGTCTTGTGCCTTTTGTCTTCCAGTATGAGCCTGAACTCTTTCCTGGTCTGATATATCGGATG
AAGCAACCGAAGATTGTTCTTCTGATTTTTGTTTTCAGGCAAGATTGTTTGGACCGGAGCAAAGGTAAGCAGCCTTTC
CTTTTGTATAACCCTTGATTGTCTATTCTTTTTGTATGTCTGAATGTACTTGTCTTTATAGGTGAGGGATGAGACGT
ATACCGCCTTTGAGAACATATAACCCTGTGCTAACAGAGTTCAGAAAAGTCCAGCAATGGTACGTCTTTATTTTGTG
TTTAGGTATGCAGTGTGTGGTAGAAAACATCGGAAGTTCGAAGTAAGAATTATACAGTGGATAATTGCACCTGTGTCT
TTTGTATACGTGGGAGTGAACCTTTGAGCACACTCCTTACTAAATGCAATATGTTGAATTTTTTAAATATTACAAGC
ACCTATAAATCTGAACTTTCCAATTTGAATCCAGATGGTCAGCAGAACTGAAGGAATAAATCATCTCAAGAAAGAT
TTTAATTTCCACACTACCTTGATCTTAGATAGGATTTGGATACTTGTTCAGATATGATTCATCACTACCATGTGAT
GGACTGTTGGCTGCCCTTGCTACTTACTGTGCTTACTGTCAGTTTACTTCCAATTTAGGAGAACACAATTTTAAAT
AATAATAATAATGATGGCTCCTTGACCTTCAAATTTGCAGATAACCTATGGAGGTCACAACCTACAACGCTTCCCTTG
AGGATTTTGTGCTGCCTTGAACTGCTAATTTTAAATCTGTACATATATGTAGTCTGGAGGGGCGTACAGCATCTTGTA
TTTATGTGAGCCCCTGGATGAATGAGCACTGTAGACTTGTAGCTGGGTGAGTATGTTGTTAGTAGTCTCTTGTGGCA
TGGAGTTCAGTCCAACCGATCTGATGGAGTTTTCGTACGTTTGTAGCCCTTGCCGATCTTTTTCCCTTTTCTTCCCA
ATAGACATGTTGCTAAACTTTTACTAACTTGTTAACAGACAGACAGAATGATAACATGGACTGTGGATGCTTAGCGT
TTGTGGCCG

序列表

	<110> 南京农业大学	
	<120> 提高水稻籽粒产量的方法	
	<130> PC928133WOA	
	<150> PCT/CN2019/088133	
	<151> 2019-05-23	
	<160> 37	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 242	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> NRT2.3 (部分)启动子	
	<400> 1	
	gacgcgagcg cggagacggc agcgccggcc tcccaccggt cgcgtaagat cagccccgaa	60
	atctttatctc atttttctctc caccgggtgc cctctcgccg cacccaacca tcgcgccacg	120
[0001]	ccgcgcccgc ctgccggagc cgcgctttcc gctatgctat aagagctgac gcgcagggca	180
	cagcggatgt acgtacacac agtcactagc taagctgcta gccttgctac cacgtgttgg	240
	ag	242
	<210> 2	
	<211> 242	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 在ATG的上游-81处具有多态性的NRT2.3启动子	
	<400> 2	
	gacgcgagcg cggagacggc agcgccggcc tcccaccggt cgcgtaagat cagccccgaa	60
	atctttatctc atttttctctc caccgggtgc cctctcgccg cacccaacca tcgcgccacg	120
	ccgcgcccgc ctgccggagc cgcgctttcc gctatgctac aagagctgac gcgcagggca	180
	cagcggatgt acgtacacac agtcactagc taagctgcta gccttgctac cacgtgttgg	240
	ag	242
	<210> 3	
	<211> 242	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 在ATG的上游-81, -42和-21处具有多态性的NRT2.3启动子	
	<400> 3	
	gacgcgagcg cggagacggc agcgccggcc tcccaccggt cgcgtaagat cacgcccga	60
	atctttattc attttctctc caccggttgc cctctcgccg cacccaacca tcgcgccacg	120
	ccgcgcccgg ctgccggagc cgcgctttcc gctatgctac aagagctgac gcgcagggca	180
	cagcggatgt acgtacacac cgtcactage taagctgcta gtcttgctac cacgtgttgg	240
	ag	242
	<210> 4	
	<211> 180	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> NRT 2.3启动子的180个C端残基	
	<400> 4	
[0002]	ctttattcat tttctctcca cgggttggcc tctcgccgca cccaaccatc gcgccacgcc	60
	gcgccgcgct gccggagccg cgctttccgc tatgctacaa gagctgacgc gcagggcaca	120
	gcggatgtac gtacacaccg tcactagcta agctgctagt cttgctacca cgtgttggag	180
	<210> 5	
	<211> 141	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> NRT 2.3启动子的141个C端残基	
	<400> 5	
	acccaaccat cgcgccacgc cgcgccgcgc tgccggagcc gcgctttccg ctatgctaca	60
	agagctgacg gcgcagggcac agcggatgta cgtacacacc gtcactagct aagctgctag	120
	tcttgctacc acgtgttggg g	141
	<210> 6	
	<211> 62	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	

	<223> NRT2.3启动子的62个5' 核苷酸的缺失	
	<400> 6	
	gacgcgagcg cggagacggc agcgccggcc tcccaccggt cgcgtaagat cacgcccga	60
	at	62
	<210> 7	
	<211> 101	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> NRT2.3启动子的101个5' 核苷酸的缺失	
	<400> 7	
	gacgcgagcg cggagacggc agcgccggcc tcccaccggt cgcgtaagat cacgcccga	60
	atctttatc attttctctc caccggttgc cctctcgccg c	101
	<210> 8	
	<211> 2074	
	<212> DNA	
	<213> 水稻(Oryza sativa)	
[0003]	<400> 8	
	gagcgccggc ctcccaccgg tcgcgtaaga tcacgcccga aatctttatt cttttctct	60
	ccaccggttg ccctctcgcc gcaccaacc atcgcgccac gccgcgccgc gctgccggag	120
	ccgcgctttc cgetatgcta taagagctga cgcgcagggc acagcggatg tacgtacaca	180
	cagtcaactag ctaagctgct agccttgcta ccacgtgttg gagatggagg ctaagccggt	240
	ggcgatggag gtggagggggg tcgagggcgc ggggggcaag ccgcggttca ggatgccggt	300
	ggactccgac ctcaaggcga cggagtctg gctcttctcc ttcgcgaggc cacacatggc	360
	ctccttccac atggcgtggt tctcttctt ctgctgcttc gtgtccacgt tcgccgcgcc	420
	gccgctgctg ccgctcatcc gcgacacct cgggctcag gccacggaca tcggcaacgc	480
	cgggatcgcg tccgtgtcgg gcgccgtgt cgcgcgtctg gccatgggca cggcgtgca	540
	cctggtcggg cccaggctgg cctccgcgtc tctgatctc ctcaccacac cggcgggtga	600
	ctgctctcc atcatccagt ccccgctggg gtacctctc gtgcgcttct tcacgggcat	660
	ctcgtggcg tcgttcgtgt cggcgcagtt ctggatgagc tccatgttct cggccccaa	720
	agtggggctg gccaacggcg tggccggcgg ctggggcaac ctcggcggcg gcgccgtcca	780
	gctgctcatg ccgctcgtgt acgaggccat ccacaagatc ggtagcacgc cgttcacggc	840

	gtggcgcata gcctttctca tcccgggcct gatgcagacg ttctcggcca tcgccgtgct	900
	ggcgttcggg caggacatgc ccggcggcaa ctacgggaag ctccacaaga ctggcgacat	960
	gcacaaggac agcttcggca acgtgctgcg ccacgcctc accaactacc gcggttgat	1020
	cctggcgctc acctacggct acagcttcgg cgctcagctc accatcgaca acgtcgtgca	1080
	ccagtacttc tacgaccgct tcgacgtcaa cctccagacc gccgggctca tcgcccag	1140
	cttcgggatg gccaacatca tctcccgcc cgggcgggg ctactctccg actggctctc	1200
	cagccggtac ggcatgcgcg gcaggctgtg ggggctgtgg actgtgcaga ccatcgcg	1260
	cgctctctgc gtgggtgctg gaatcgtcga cttctcttc gcccgctccg tcgccgtgat	1320
	ggtgctcttc tccttcttcg tccaggccgc gtgcgggctc accttcggca tcgtgccgtt	1380
	cgtgtcgcgg aggtcgtgg ggtcatctc cgggatgacc ggcggcgggg gcaacgtggg	1440
	cgccgtgctg acgcagtaca tcttctcca cggcacaag tacaagacgg agaccgggat	1500
	caagtacatg gggctcatga tcatcgtg cacgctgcc gtcattgctca tctacttccc	1560
	gcagtggggc ggcatgctcg taggcccag gaagggggcc acggcggagg agtactacag	1620
	ccgggagtgg tcggatcacg agcgcgagaa gggtttcaac gcggccagcg tgcggttcgc	1680
[0004]	ggagaacagc gtgcgcgagg gcgggaggtc gtcggcgaat ggcggacagc ccaggcacac	1740
	cgccccgctc gacgcgtcgc cggccggggt gtgaagaatg ccacggacaa taaggtcgcg	1800
	gttgtagtac aactgtacaa attgatggtg cgtgtcgttt gaccgcgcgc gcgcacagtg	1860
	tgggtcgtgg cctcgtgggc ttagtggagt acagtgagg gtgtacgtgt gtcgtggcgc	1920
	gcgcggtcac ctcggtggcc ttgggattgg gggggcacta tacgctagta ctccagatat	1980
	atacgggttt gatttacttc tgtggatcgg cgcttgttg tggtttgctc cctgtggttt	2040
	ttgtgatggt aatcatactc ataactcaaac agtc	2074

- <210> 9
- <211> 22
- <212> DNA
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- <220>
- <223> NRT2.3 TATA盒

<400> 9
ccgctatgct ataagagctg ac

22

<210> 10

	<211> 0	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> OSE2ROOTNODULE	
	<400> 000	
	<210> 11	
	<211> 0	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> ASFIMOTIFCAMV	
	<400> 000	
	<210> 12	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0005]	<220>	
	<223> CRISPR靶序列	
	<400> 12	
	gctataagag ctgacgcgca ggg	23
	<210> 13	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> CRISPR靶序列	
	<400> 13	
	ccggagcgcg gctttccgct atg	23
	<210> 14	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> CRISPR靶序列	
	<400> 14	

	ccggttgccc tctegcgcga ccc	23
	<210> 15	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> CRISPR靶序列	
	<400> 15	
	ccgcgacgcg agcgcggaga cgg	23
	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 原间隔区序列	
	<400> 16	
	gctataagag ctgacgcgca	20
[0006]	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 原间隔区序列	
	<400> 17	
	gagccgcgct ttccgctatg	20
	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 原间隔区序列	
	<400> 18	
	gttgcctct cgccgcaccc	20
	<210> 19	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	

	<220>		
	<223>	原间隔区序列	
	<400>	19	
		cgacgcgagc gcggagacgg	20
	<210>	20	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	原间隔区序列	
	<400>	20	
		ggcagctata agagctgacg cgca	24
	<210>	21	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	原间隔区序列	
[0007]	<400>	21	
		ggcacatagc ggaaagcgcg gtc	24
	<210>	22	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	原间隔区序列	
	<400>	22	
		ggcagggtgc ggcgagaggg caac	24
	<210>	23	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	原间隔区序列	
	<400>	23	
		ggcaccgtct ccgcgctcgc gtcg	24
	<210>	24	

<211>	102		
<212>	DNA		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	tracrRNA核酸序列		
<400>	24		
	atgctactac taaaaaaag caccgactcg gtgccacttt ttcaagttga taacgactag		60
	ccttatttta acttgctatg ctttcagca tagctctaaa ac		102
<210>	25		
<211>	388		
<212>	DNA		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	U3启动子序列		
<400>	25		
	aaaggaagga atctttaaac atacgaacag atcacttaaa gttcttctga agcaacttaa		60
	agttatcagg catgcatgga tcttgagga atcagatgtg cagtcaggga ccatagcaca		120
	agacaggcgt cttctactgg tgcaccagc aaatgctgga agccgggaac actgggtacg		180
	ttggaaacca cgtgtgatgt gaaggagtaa gataaactgt aggagaaaag catttcgtag		240
	tgggcatga agcctttcag gacatgtatt gcagtatggg cgggccatt acgcaattgg		300
	acgacaacaa agactagtat tagtaccacc tcggctatcc acatagatca aagctggttt		360
	aaaagattg tgcagatgat cegtggca		388
[0008]			
<210>	26		
<211>	447		
<212>	DNA		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	U6a启动子序列		
<400>	26		
	tttttctctg tagttttccc acaaccattt tttaccatcc gaatgatagg ataggaaaa		60
	tatccaagtg aacagtattc ctataaaatt cccgtaaaaa gcctgcaatc cgaatgagcc		120
	ctgaagtctg aactagccgg tcacctgtac aggctatcga gatgccatac aagagacggt		180
	agtaggaact aggaagacga tggttgattc gtcaggcgaa atcgtcgtcc tgcagtcgca		240
	tctatgggcc tggacggaat aggggaaaaa gttggccgga taggaggaa aggccaggt		300
	gcttacgtgc gaggtaggcc tgggctctca gcacttcgat tcgttggcac cgggtagga		360
	tgcaatagag agcaacgttt agtaccacct cgcttagcta gagcaaaactg gactgcctta		420
	tatgcgctgg tgctggcttg gctgccg		447
<210>	27		
<211>	333		
<212>	DNA		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	U6b启动子序列		

	<400> 27		
	tgcaagaacg aactaagccg gacaaaaaaa aaaggagcac atatacaaac cggttttatt	60	
	catgaatggt cacgatggat gatggggctc agacttgagc tacgaggccg caggcgagag	120	
	aagcctagtg tgctctctgc ttgtttgggc cgtaacggag gatacggccg acgagcgtgt	180	
	actaccgcgc gggatgccgc tgggcgctgc gggggccggt ggatggggat cggtaggtcg	240	
	cgggagcgtt gaggggagac aggttagta ccacctgcc taccgaacaa tgaagaaccc	300	
	accttataac cccgcgcgct gccgcttggtg ttg	333	
	<210> 28		
	<211> 325		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
	<220>		
	<223> 双子叶植物中的U3b		
	<400> 28		
	tttactttaa attttttctt atgcagcctg tgatggataa ctgaatcaaa caaatggcgt	60	
	ctgggtttaa gaagatctgt tttggetatg ttggacgaaa caagtgaact ttaggatca	120	
[0009]	acttcagttt atatatggag cttatatcga gcaataagat aagtgggctt tttatgtaat	180	
	ttaatgggct atcgtccata gattcactaa taccatgcc cagtaccat gtatgcgttt	240	
	catataagct cctaatttct cccacatcgc tcaaactaa acaaactctt ttgtatatat	300	
	aacactgagg gagcaacatt ggtca	325	
	<210> 29		
	<211> 305		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
	<220>		
	<223> 双子叶植物中的U6-1		
	<400> 29		
	agaaatctca aaattccgac agaacaattt tgaatctcga tccgtagaaa cgagacggtc	60	
	attgttttag ttccaccacg attatatttg aaatttacgt gagtgtgagt gagacttgca	120	
	taagaaaata aaatcttttag ttgggaaaaa attcaataat ataaatgggc ttgagaagga	180	
	agcgagggat aggccttttt ctaaaatagg cccatttaag ctattaacaa tcttcaaaag	240	
	taccacagcg cttaggtaaa gaaagcagct gagtttatat atggtagag acgaagtagt	300	

	gattg	305
	<210> 30	
	<211> 4131	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> Cas9	
	<400> 30	
	atggcccaaa agaagaagcg caaggtcgac aagaagtact ccatcggcct cgacatcggc	60
	accaattctg ttggctgggc cgtgatcacc gacgagtaca aggtgccgtc caagaagttc	120
	aaggtcctcg gcaacaccga cggccactcc atcaagaaga atctcatcgg cgccctgctg	180
	ttgactctg gcgagacagc cgaggttaca aggtcaaga ggaccgctag acgcaggtac	240
	accagcgca agaaccgcat ctgtacctc caagagatct tctccaacga gatggccaag	300
	gtggacgaca gcttcttcca caggctcgag gagagcttcc tcgtcgagga ggacaagaag	360
	cacgagcgcc atccgatctt cggcaacatc gtggatgagg tggcctacca cgagaagtac	420
[0010]	ccgaccatct accacctcgc caagaagctc gtgactcca ccgataagge cgacctcagg	480
	ctcatctacc tcgacctcgc ccacatgate aagttcaggg gccacttctt catcgagggc	540
	gacctcaacc cggacaactc cgatgtggac aagctgttca tccagctcgt gcagacctac	600
	aaccagctgt tcgaggagaa cccgatcaac gcctctggcg ttgacgcaa ggctattctc	660
	tctgccagge tctctaagtc ccgcaggctc gagaatctga tcgccaact tccgggcgag	720
	aagaagaatg gcctcttcgg caacctgate gccctctctc ttggcctcac cccgaacttc	780
	aagtccaact tcgacctcgc cgaggacgcc aagctccagc tttccaagga cacctacgac	840
	gacgacctcg acaatctctt cgcccagatt ggcgatcagt acgccgatct gttctctgcc	900
	gccaagaatc tctccgacgc catctctctc agegacatcc tcagggtgaa caccgagatc	960
	accaaggccc cactctccgc ctccatgate aagaggtacg acgagcacca ccaggacctc	1020
	acactctca aggccctcgt gagacagcag ctcccagaga agtacaagga gatcttcttc	1080
	gaccagtcca agaacggcta cgccggtac atcgatggcg gcgcttctca agaggagttc	1140
	tacaagttca tcaagccgat cctcgagaag atggacggca ccgaggagct gctcgtgaag	1200
	ctcaatagag aggacctctt ccgcaagcag cgcacctctg ataatggctc catcccgcac	1260
	cagatccacc tcggcgagct tcctctctc ctccgcagge aagaggactt ctacctcttc	1320

	ctcaaggaca accgcgagaa gattgagaag atcctcacct tccgcatccc gtactacgtg	1380
	ggccccctcg ccaggggcaa ctccaggttc gcctggatga ccagaaagtc cgaggagaca	1440
	atcacccctt ggaacttcga ggaggtggtg gataagggcg cctctgceca gtctttcatt	1500
	gagcgcattg ccaacttcga caagaacctc ccgaacgaga aggtgctccc gaagcactca	1560
	ctcctctacg agtacttcac cgtgtacaac gagctgacca aggtgaagta cgtgaccgag	1620
	gggatgagga agccagcttt ccttagcggc gagcaaaaga aggccatcgt cgacctgctg	1680
	ttcaagacca accgcaaggt gaccgtgaag cagctcaagg aggactactt caagaaaatc	1740
	gagtgtctcg actccgtcga gatctccggc gtcgaggata ggttcaatgc ctccctcggg	1800
	acctaccacg acctectcaa gattatcaag gacaaggact tcctcgacaa cgaggagaac	1860
	gaggacatcc tcgaggacat cgtgtctacc ctcacctctc tcgaggaccg cgagatgatc	1920
	gaggagcgc tcaagacata cgcaccctc ttcgacgaca aggtgatgaa gcagctgaag	1980
	cgcaggcgt ataccggctg gggcaggctc tctaggaagc tcatcaacgg catccgcgac	2040
	aagcagtcg gcaagacgat cctcgaactc ctcaagtccg acggcttcgc caaccgcaac	2100
[0011]	ttcatgcagc tcatccacga cgactccctc accttcaagg aggacatcca aaaggcccag	2160
	gtgtccggcc aaggcgattc cctccatgag catatcgcca atctcgccgg ctccccggt	2220
	atcaagaagg gcattctcca gaccgtgaag gtggtggacg agctggtgaa ggtgatgggc	2280
	aggcacaagc cagagaacat cgtgatcgag atggcccgcg agaaccagac cacacagaag	2340
	ggccaaaaga actcccgcga gcgcatgaag aggatcgagg agggcattaa ggagctgggc	2400
	tcccagatcc tcaaggagca cccagtcgag aacaccagc tccagaacga gaagctctac	2460
	ctctactacc tccagaacgg ccgacatg tacgtggacc aagagctgga catcaaccgc	2520
	ctctccgact acgacgtgga ccatattgtg ccgagctct tctgaagga cgactccatc	2580
	gacaacaagg tgctcaccg ctccgacaag aacaggggca agtccgataa cgtgccgtcc	2640
	gaagaggtcg tcaagaagat gaagaactac tggcgccagc tcctcaacgc caagctcatc	2700
	accagagga agttcgacaa cctaccaag gccgagagag gcggcctttc cgagcttgat	2760
	aaggccggt tcatcaagcg ccagctcgtc gagacacgcc agatcacaaa gcacgtggcc	2820
	cagatcctcg actcccgc ataaccaag tacgacgaga acgacaagct catccgcgag	2880
	gtgaaggcca tcacctcaa gtccaagctc gtgtccgact tccgaagga cttccagttc	2940
	tacaaggtgc gcgagatcaa caactaccac cacgcccag acgcctacct caatgccgtg	3000

	gtgggcacag ccctcatcaa gaagtaccca aagctcgagt ccgagttcgt gtacggcgac	3060
	tacaaggtgt acgacgtgcg caagatgata gccaaagtcg agcaagagat cggcaaggcg	3120
	accgccaagt actttctcta ctccaacata atgaatttct tcaagaccga gatcacgctc	3180
	gccaaaggcg agattaggaa gaggccgctc atcgagacaa acggcgagac aggcgagatc	3240
	gtgtgggaca agggcaggga tttcgccaca gtgcgcaagg tgctctccat gccgcaagtg	3300
	aacatcgtga agaagaccga ggttcagacc ggcggttctt ccaaggagtc catcctccca	3360
	aagcgcaact ccgacaagct gatcgcccgc aagaaggact gggacccgaa gaagtatggc	3420
	ggcttcgatt ctccgaccgt ggcctactct gtgctcgtgg ttgccaaggt cgagaagggc	3480
	aagagcaaga agctcaagtc cgtcaaggag ctgctgggca tcacgatcat ggagcgcagc	3540
	agcttcgaga agaaccat cgacttctc gaggccaagg gctacaagga ggtgaagaag	3600
	gacctcatca tcaagctccc gaagtacagc ctcttcgagc ttgagaacgg ccgcaagaga	3660
	atgctcgcct ctgctggcga gttcagaag ggcaacgagc ttgctctccc gtccaagtac	3720
	gtgaacttcc tctacctgc ctcccactac gagaagctca agggctcccc agaggacaac	3780
[0012]	gagcaaaagc agctgttcgt cgagcagcac aagcactacc tcgacgagat catcgagcag	3840
	atctcagagt tctccaagcg cgtgatcctc gccgatgcca acctcgataa ggtgctcagc	3900
	gcctacaaca agcaccgcca taagccaatt cgcgagcagg ccgagaacat catccacctc	3960
	ttaccctca ccaacctcgg cgtccagcc gccttcaagt acttcgacac caccatcgac	4020
	cgcaagcget acacctctac caaggaggtt ctgacgcca ccctcatcca ccagtctatc	4080
	acaggcctct acgagacagc catcgacctc tcacaactcg gcggcgattg a	4131

<210> 31
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZIIIB

<400> 31
 cctgcaggtc gccacattag caatgccaca ttagcaatgc cgactctaga ggatecc 57

<210> 32
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> 水稻 (Oryza sativa)

<400> 32

Met Ala Ala Ala Glu Ala Ala Ala Glu Ala Ala Ala Ala Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Ser Glu Pro Val Asp Leu Val Lys His Pro Ser Gly Ile Ile Pro Thr
 20 25 30

Leu Gln Asn Ile Val Ser Thr Val Asn Leu Asp Cys Lys Leu Asp Leu
 35 40 45

Lys Ala Ile Ala Leu Gln Ala Arg Asn Ala Glu Tyr Asn Pro Lys Arg
 50 55 60

Phe Ala Ala Val Ile Met Arg Ile Arg Glu Pro Lys Thr Thr Ala Leu
 65 70 75 80

Ile Phe Ala Ser Gly Lys Met Val Cys Thr Gly Ala Lys Ser Glu Gln
 85 90 95

Gln Ser Lys Leu Ala Ala Arg Lys Tyr Ala Arg Ile Ile Gln Lys Leu
 100 105 110

[0013]

Gly Phe Ala Ala Lys Phe Lys Asp Phe Lys Ile Gln Asn Ile Val Gly
 115 120 125

Ser Cys Asp Val Lys Phe Pro Ile Arg Leu Glu Gly Leu Ala Tyr Ser
 130 135 140

His Gly Ala Phe Ser Ser Tyr Glu Pro Glu Leu Phe Pro Gly Leu Ile
 145 150 155 160

Tyr Arg Met Lys Gln Pro Lys Ile Val Leu Leu Ile Phe Val Ser Gly
 165 170 175

Lys Ile Val Leu Thr Gly Ala Lys Val Arg Asp Glu Thr Tyr Thr Ala
 180 185 190

Phe Glu Asn Ile Tyr Pro Val Leu Thr Glu Phe Arg Lys Val Gln Gln
 195 200 205

<210> 33

<211> 4467

	<212> DNA	
	<213> 水稻 (<i>Oryza sativa</i>)	
	<400> 33	
	gatttccgat cgctatataa aagacctagg atttcgaaat ttttccctcc cctccccct	60
	tcgcgcgcgc gctctcttcc cgcctttttt ttttcttct tcttcaccgg tgggattgat	120
	tcgtgggggtg cggatctggt ttttgggggt gtgtatggcg gcggcggagg cggcggcgga	180
	ggcggcggcg gcgctggagg ggagcagacc cgtggacctg gtcaagcacc cctccggcat	240
	catccccacg ctccagtaag tccccccgc ccccgcccg atctgtatgt gcgggttcat	300
	cgagctggtt gagtttgagg tggagcggtt aactcgtcgc gcgctgttga tttggtttg	360
	ttttgggggc cggggatatt attgttgtt gcaaatgatg tgattggtgg taggtttagc	420
	ttgggggggtt actacatggt tgaggttctg atttgcttga ttgatgaaaa aggggggcga	480
	tctgagatcc gcgagtcgg tacgagaaga aatagaggca gccgatgtgc ttgtgctgtg	540
	acggatccat tgtccggtct tcataacaac tctttttagc tggacagatg tttgtttct	600
	catgaatgaa ttcatatggt tggagtcctg gagaatcagc ttgtcagctg ttctttttt	660
[0014]	taaaaaaaa ttaaggttta taaataaata aataatcaat caatcaatca tgcactataa	720
	ttgtaggatt taattcttcc cctcatcac gtatttcaac cttagaggga ggtattgtgt	780
	ctgtggagag tttatggtgc tcatgtgata catacagttg acaatgggtc aatgcatgtt	840
	tttagacagc atcaagctct gaacaagtga accacatatt taggcttgat ccatgtataa	900
	ccccactaag ttttatactt gtttgtacgg gccaatatgc ccaaacctgg ctgtttatta	960
	gcatgctgta cttgctggtg tgcacgaaa cgtttttggg gtttgcctac attgctacca	1020
	ggcatgtata ttttgcacgc tgggtgcat tgcagaaaa gtcgagcatg cttatattgc	1080
	tgcttgtcat agtgtacctg cttccatgtg ttctcacaag tgcgcatgcc tgttttgetg	1140
	cctttctggg ttgtttatgt ttcagcgttg ggatcatagc tggtagactg catgtgttcc	1200
	actctgtttt ggcttatcat gcttccttg gatactctca ccaaggaaat tgaagtcctc	1260
	attatgtgtt ctcatctatt ttgatggcag aaacatcgtg tcgacggtea atttggattg	1320
	caaattagac ctcaaagcta tagctttgca agcacgcaat gcagaatata atccaaaggt	1380
	attatgatgg ctttgggtgtg ttcttgtgtc tttgattttg ctcgaaagga tatcttctt	1440
	gcatgtgaaa attttacct ttttaactct gctagcatgt aatatgtaga caagtcata	1500
	caatcctatg gtctgttctt aggatgatac ttcctttgtg tataacgcaa gtgtgagtgc	1560

	aatTTtagag gtcggtatgg ataaatgcat agctggcagt ccagttttat attgtaaate	1620
	tcagttaaga gagtgaatac attcatcacg ctcagcttgt cccatggata agcaaattgc	1680
	tttacaatta agattctaaa attgctctat ttagtgetta tgcactttct aatctgtget	1740
	gcacgtatca gatacagcat gatgtattgg gggattttgt aattatatgt aatatcataa	1800
	tctaaatcta ggctattatg tttattttaa taatggatac attttgaaag aaacagagat	1860
	aactgcacac tgaggttata gcactctctat ctactccatc cgttccaaaa tataagcaact	1920
	gtaatatatg ttttagtttg ctaactcctc ttttcacaaa cagcgttttg ctgcagttat	1980
	catgagaata agagaaccga aaactacagc tctgatattt gcatcgggta aaatggtatg	2040
	gttcaacctc tttgtatagc taagactgca aatattctgt ttgttcatct tcttattgac	2100
	ttgtgaattg ctttatcacc tgtctttgtt gctctttag ctattataac gcatattgat	2160
	tgatgaacte tttttgctga tgtgtaactg ctttctatta gcctactatc tttttagttt	2220
	ttctttgttt ttttaacagc tatcacatcc atacctgac catgcagcct gtagttcaat	2280
	gctgaatctg taaatttaag tttgctctga ttttctgaca tgtttgctgt tgcattgctg	2340
	ttacataata acagataagt agtgccttt ctgtaaagt atagtttgc cttgttaact	2400
[0015]	tttttattgt cttaaagcat aatcagaatt gacaataaat tgaacctgac atatttattt	2460
	gttgatggat aatcagcaat gacacatcac atggacttca tgcgcgtca atatcttaat	2520
	tttaaaagge ttgtttatga aaattcactt gattttcctt ttggatcaat gtcttgatcc	2580
	gaataagctt gttgaaggat aattggtggt cagcattttt gggataaaat cttcattaaa	2640
	agttgctttg ctggttctca tcaggaggga taatatctgt gttacagact taaagtaata	2700
	catttttctg ataataaatt cacattttaa gcatgagaac gaaggagttc acagcctagg	2760
	cttactagta cgctgtatgg ggctgacta ttaggcagtg gacttaagaa ggggttgtct	2820
	tgggtttgat gcaccgattt gctgcgtctt tgcttctttt ttataaaaaat caaattgct	2880
	tgtaaccaa aatttctctg tgggcacat gacctgctag catttgtggt ggaattaaaa	2940
	gcatgtttat aaatcttttg ttgtccttta ccaggtatgt actggggcaa agagcgaaca	3000
	acaatcaaag cttgcagcaa gaaaggatg gggagtattt atttatttc attttattt	3060
	gctacgtgaa gtctaact tttttattgc cagtatgctc gtattatcca aaagcttggc	3120
	tttgctgeta agtttaaggt aactattca ggcttgatta atttcatct gtgcaaatgc	3180
	ctaccattt cattctgtaa gattgtacct aaatgtttaa ctcattingca ctataccagg	3240

acttcaagat tcagaacatt gttggttctt gtgatgttaa atttccaatc aggctggagg	3300
gacttgcata ttctcatggt gctttctcaa gtgtaagttg aatccttgca tgtttttta	3360
ggatatttct ttacatatg ttatgctatt ctcatgtctt gtgccttttg tcttcagta	3420
tgagcctgaa ctctttcctg gtctgatata tcggatgaag caaccgaaga ttgttcttct	3480
gatttttggt tcaggcaaga ttgtttgac cggagcaaag gtaagcagcc tttcctttg	3540
tatacccttg attgtctatt ccttttgta tgtctgaatg tacttgtctt tataggtag	3600
ggatgagacg tataaccgct ttgagaacat atacccttg ctaacagagt tcagaaaagt	3660
ccagcaatgg tacgtcttta tttgttggt taggtatgca gtgtgtggta gaaacatcgg	3720
aagttcgaag taagaattat acagtggata attgcacttg tgtcttttgt tatacgtggg	3780
agtgaacttt gagcacactc cttactaaat tgcaatatgt tgaatTTTTT aatattacaa	3840
gcacctataa atctgaactt tccaattga atccagatgg tcagcagaaa ctgaaggaat	3900
aatcatctc aagaaagatt ttaattcca cactaccttg atcttagata ggatttggat	3960
acttgttca gatatgattc atcactacca tgtgatggac tgttgctgc cttgcctac	4020
ttactgtgct tgactgcagt ttactccaa tttaggagaa cacaatttta aataataata	4080
[0016] ataatgatgg ctcttgcac cttcaaattt gcagataacc tatggaggtc acaactacaa	4140
cgcttccttg aggattttgc tgccttgtaa ctgctaattt taatctgtac atatatgtag	4200
tctggagggg cgtacagcat cttgtaattt atgtgagccc ctggatgaat gagcactgta	4260
gacttgtage tgggtgagta tgttgttagt agtctcttgt ggcatggagt tcagtccaac	4320
cgatctgatg gagttttcgt acgtttgtag cccttgccga tctttttccc tttcttccc	4380
aatagacatg ttgctaaact tttactaact tgttaacaga cagacagaat gataacatgg	4440
actgtggatg cttagegttt gtggccg	4467

<210> 34
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 反义原间隔区序列

<400> 34
 aaactgcgcg tcagctctta tagc

24

<210> 35

	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义原间隔区序列	
	<400> 35	
	aaacgagccg cgetttccgc tatg	24
	<210> 36	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0017]	<220>	
	<223> 反义原间隔区序列	
	<400> 36	
	aaacgttgcc ctctcgccgc accc	24
	<210> 37	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义原间隔区序列	
	<400> 37	
	aaaccgacgc gagcgcgag acgg	24

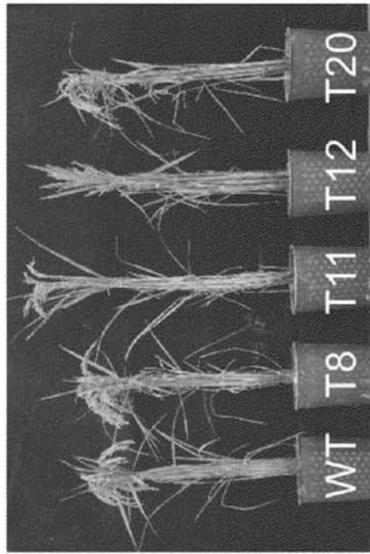


图1a

WT	-105 bp	AGCCGCGCTTCCGCTATGCTATAAGAGCTGACGCGCAGGGCAGCGGACAGCGGATGTACGTACA	-46 bp
T8	-105 bp	AGCCGCGCTTCCGCTATGCTACAAGAGCTGACGCGCAGGGCAGCGGACAGCGGATGTACGTACA	-46 bp
T11	-105 bp	AGCCGCGCTTCCGCTATGCTACAAGAGCTGACGCGCAGGGCAGCGGACAGCGGATGTACGTACA	-46 bp
T12	-105 bp	AGCCGCGCTTCCGCTATGCTACAAGAGCTGACGCGCAGGGCAGCGGACAGCGGATGTACGTACA	-46 bp
T20	-105 bp	AGCCGCGCTTCCGCTATGCTATAAGAGCTGACGCGCAGGGCAGCGGACAGCGGATGTACGTACA	-46 bp

WT	-45 bp	CACAGTCACTAGCTAAGCTGCTAGCCTTGCTACCACGTGTTGGAGATGGAGGCTA	10 bp
T8	-45 bp	CACAGTCACTAGCTAAGCTGCTAGCCTTGCTACCACGTGTTGGAGATGGAGGCTA	10 bp
T11	-45 bp	CACCGTCACTAGCTAAGCTGCTAGTCTTGCTACCACGTGTTGGAGATGGAGGCTA	10 bp
T12	-45 bp	CACAGTCACTAGCTAAGCTGCTAGCCTTGCTACCACGTGTTGGAGATGGAGGCTA	10 bp
T20	-45 bp	CACAGTCACTAGCTAAGCTGCTAGCCTTGCTACCACGTGTTGGAGATGGAGGCTA	10 bp

图1b

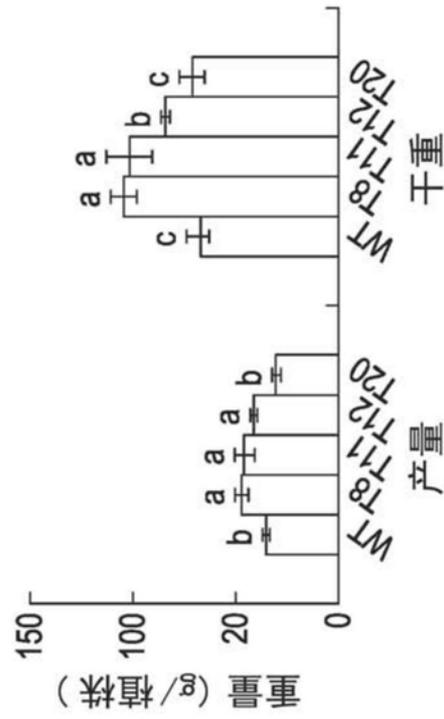


图1c

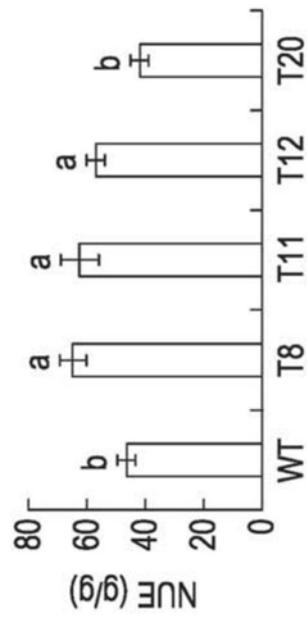


图1d

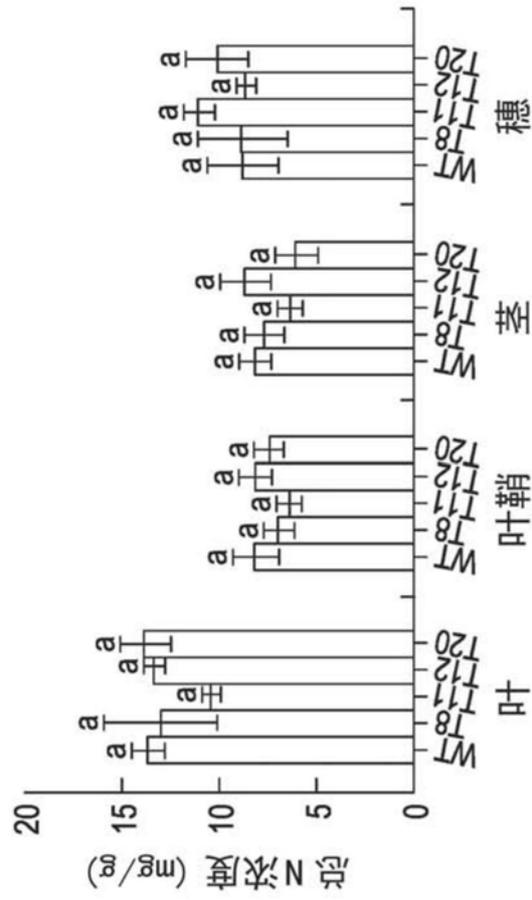


图1e

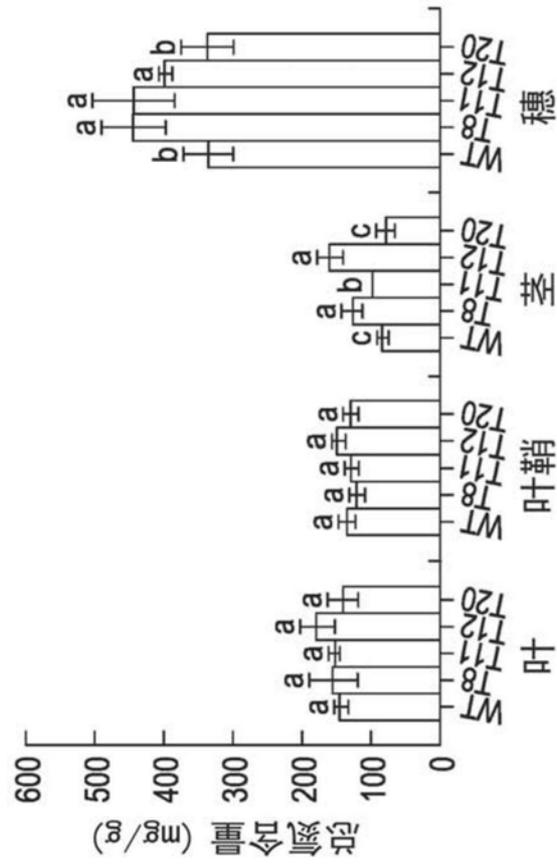


图1f

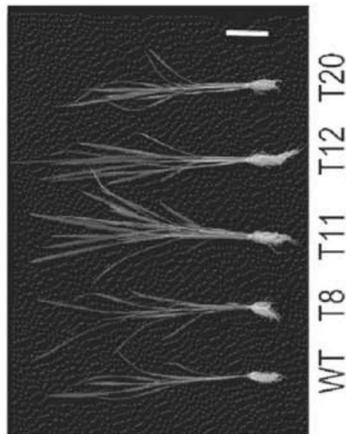


图2a

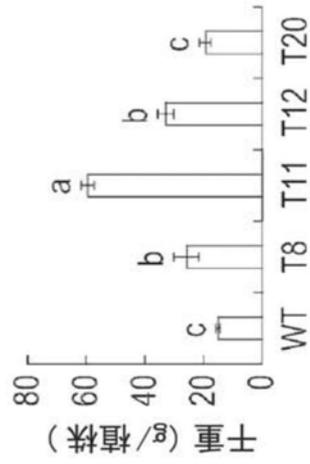


图2b

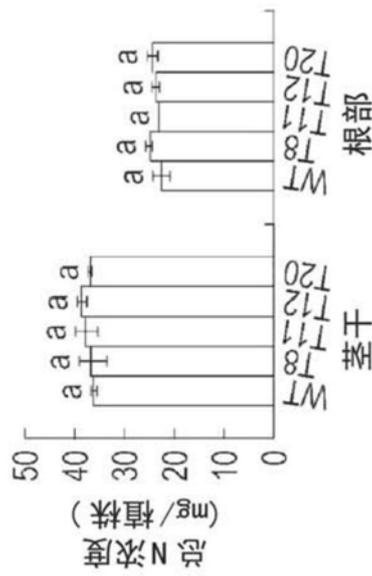


图2c

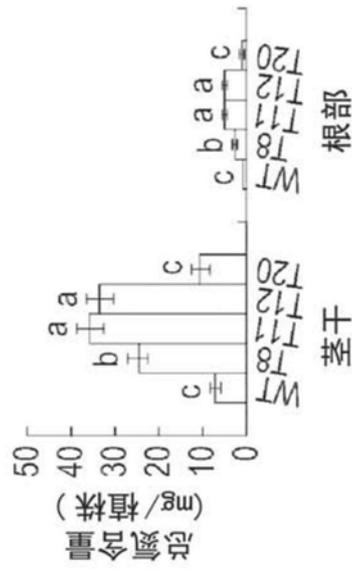


图2d

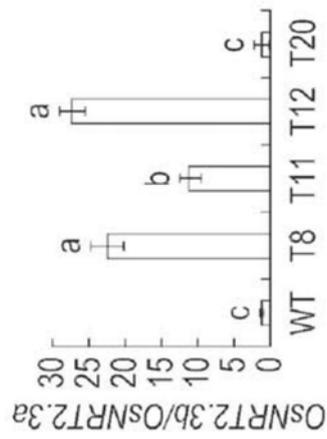


图2e

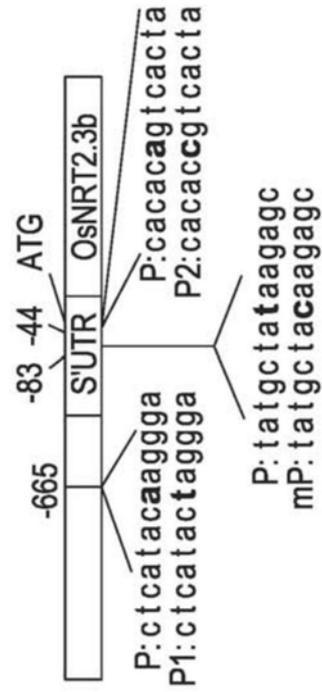


图3a

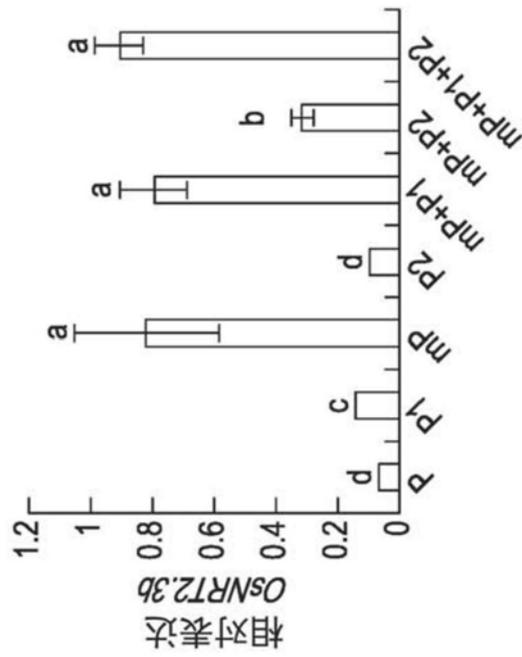


图3b

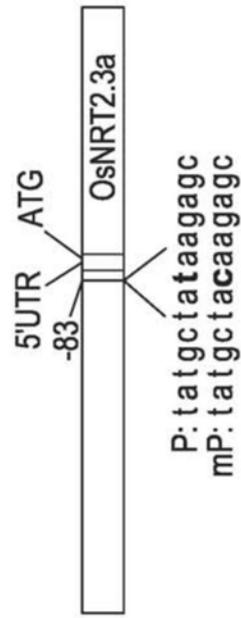


图3c

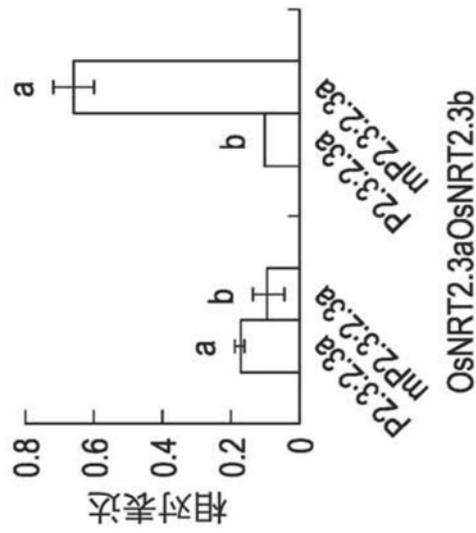


图3d

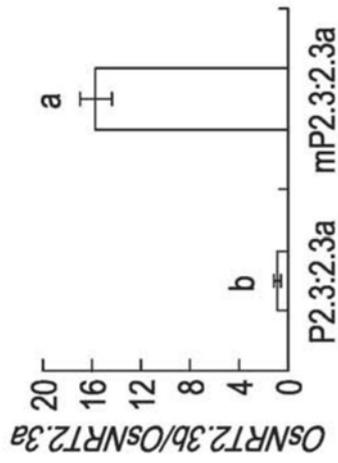


图3e

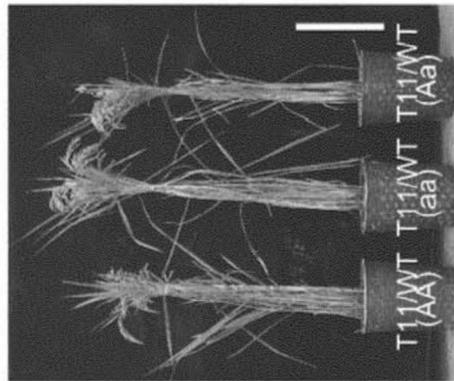


图4a

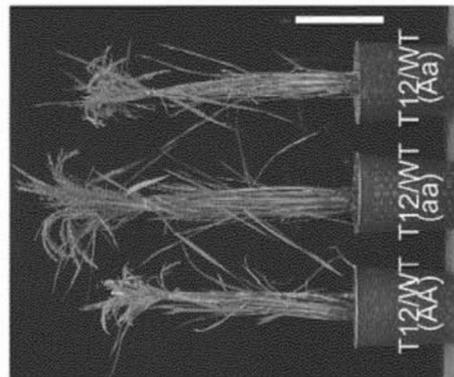


图4b

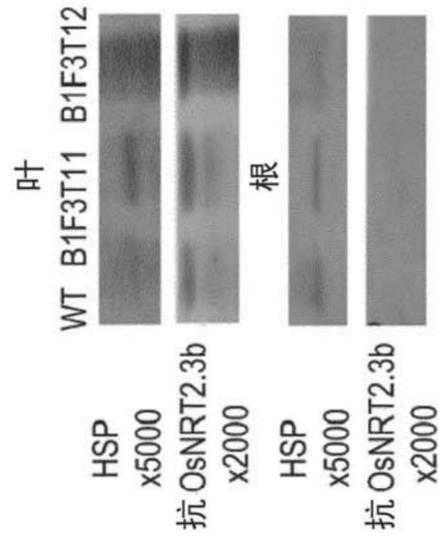


图4c

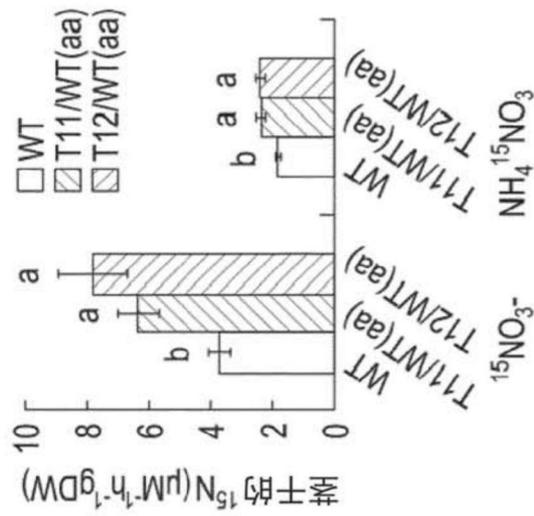


图4d

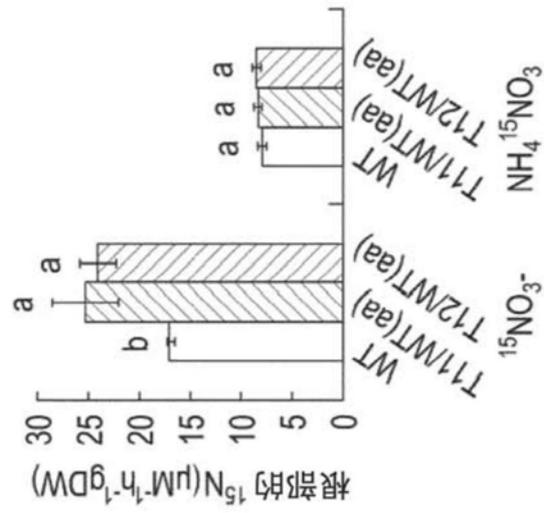


图4e

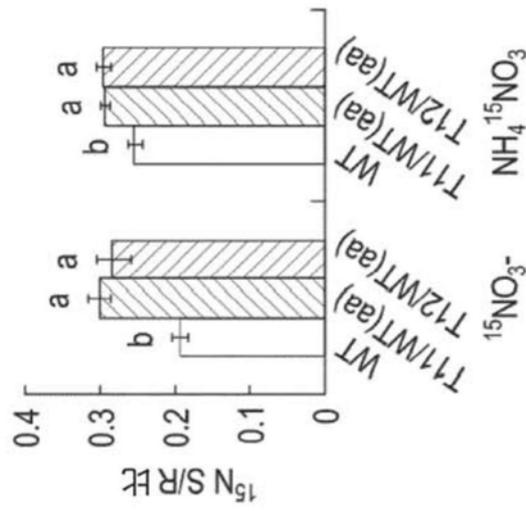


图4f

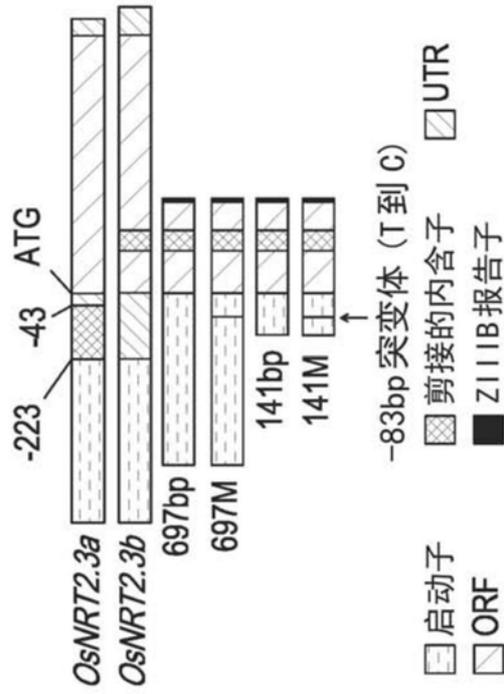


图5a

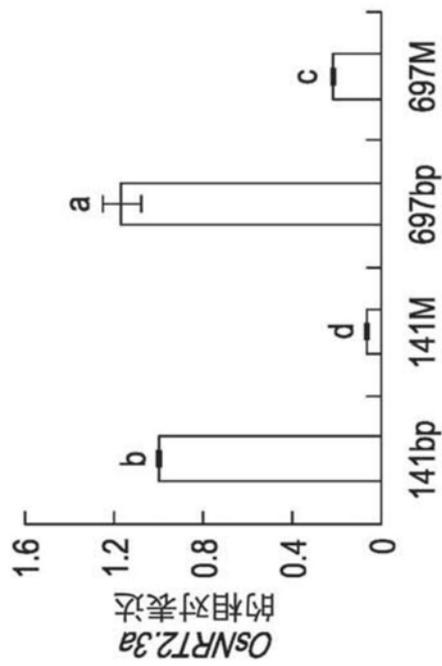


图5b

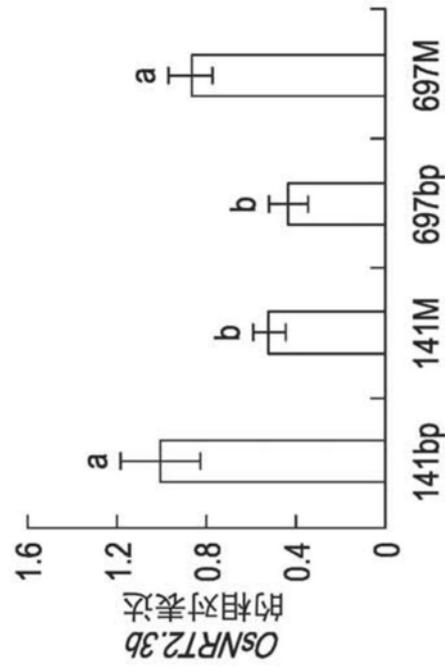


图5c

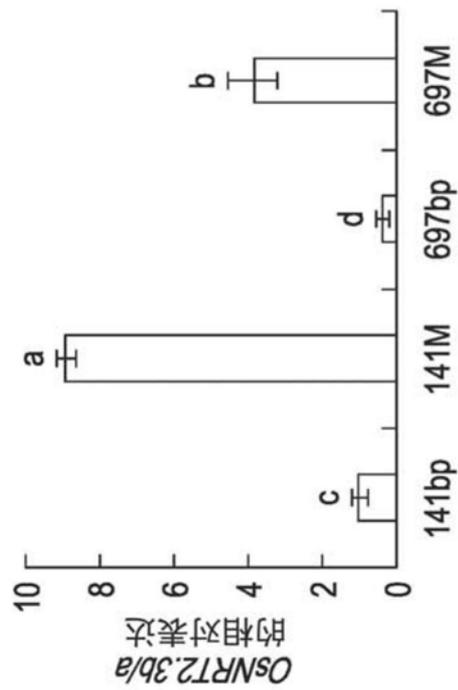


图5d

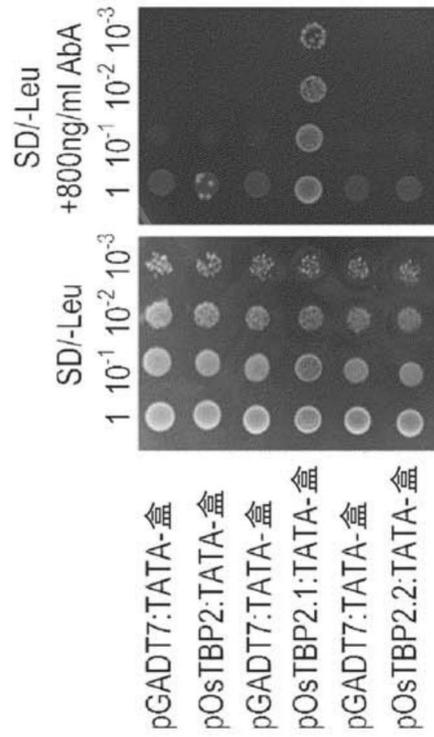


图6a

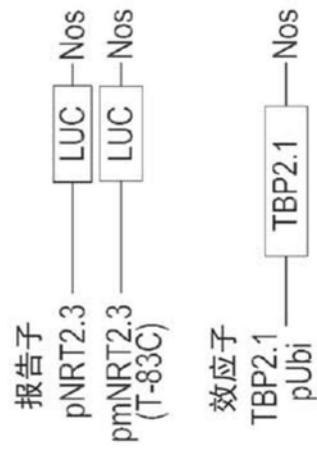


图6b

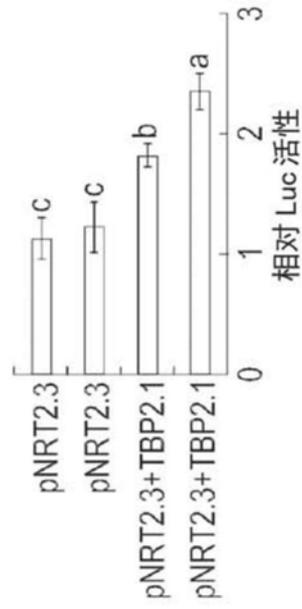


图6c

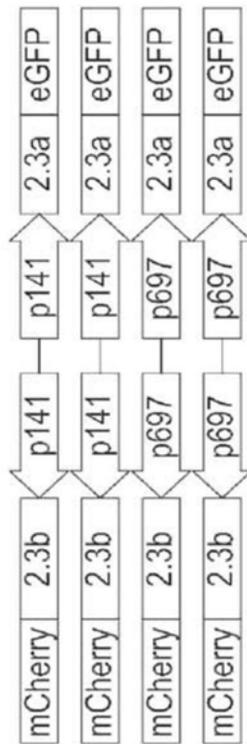


图6d

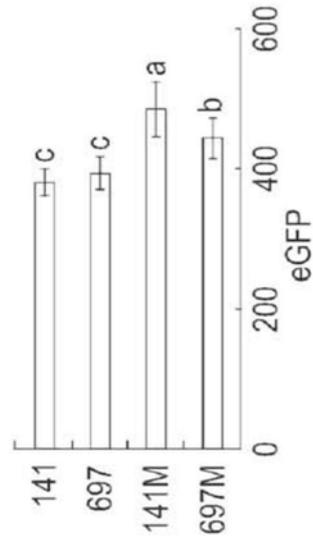


图6e

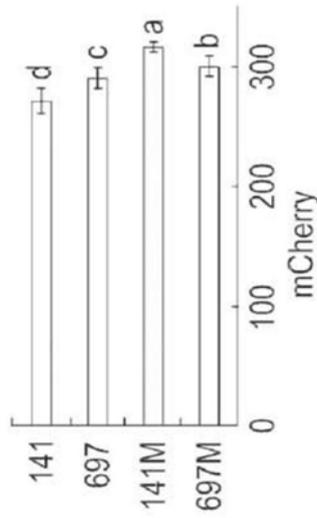


图6f

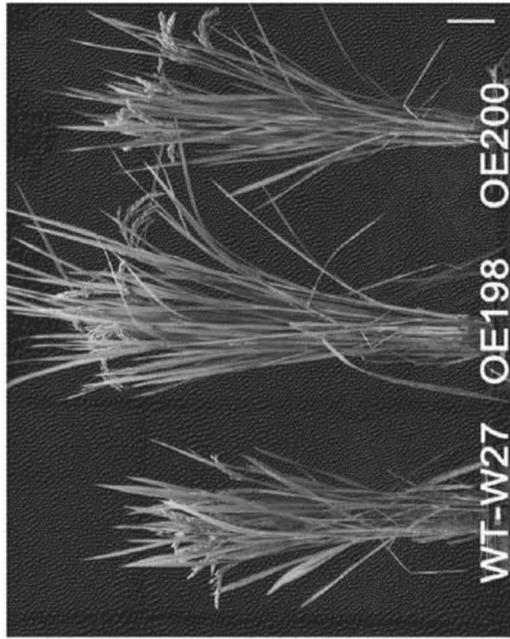


图7a

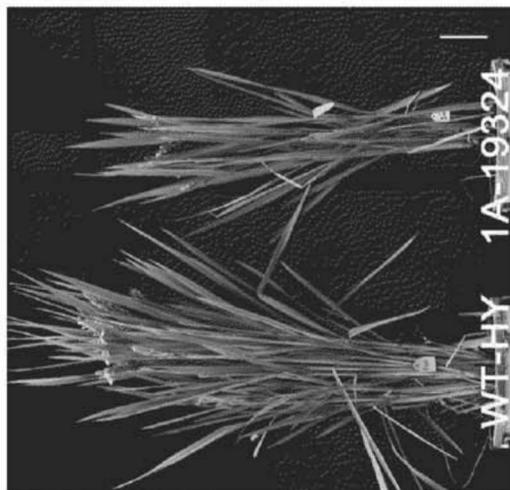


图7b

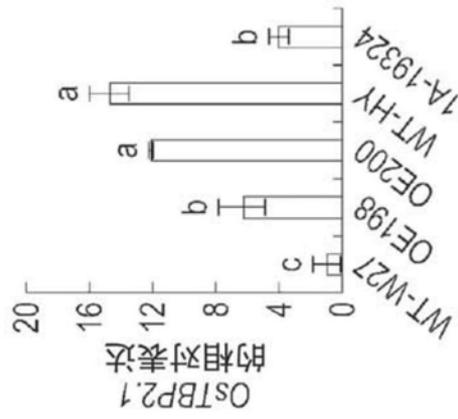


图7c

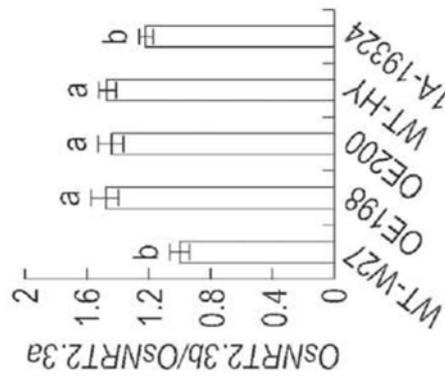


图7d

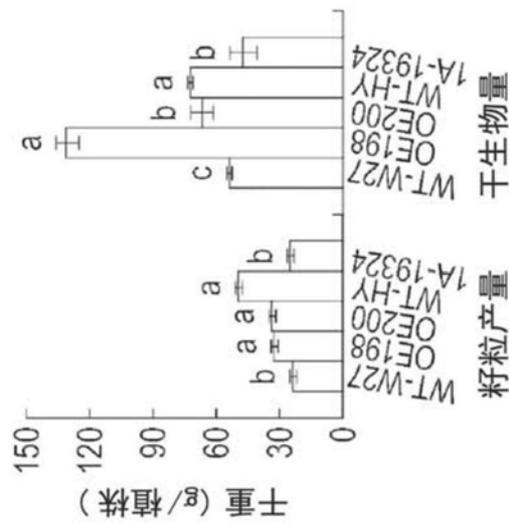


图7e

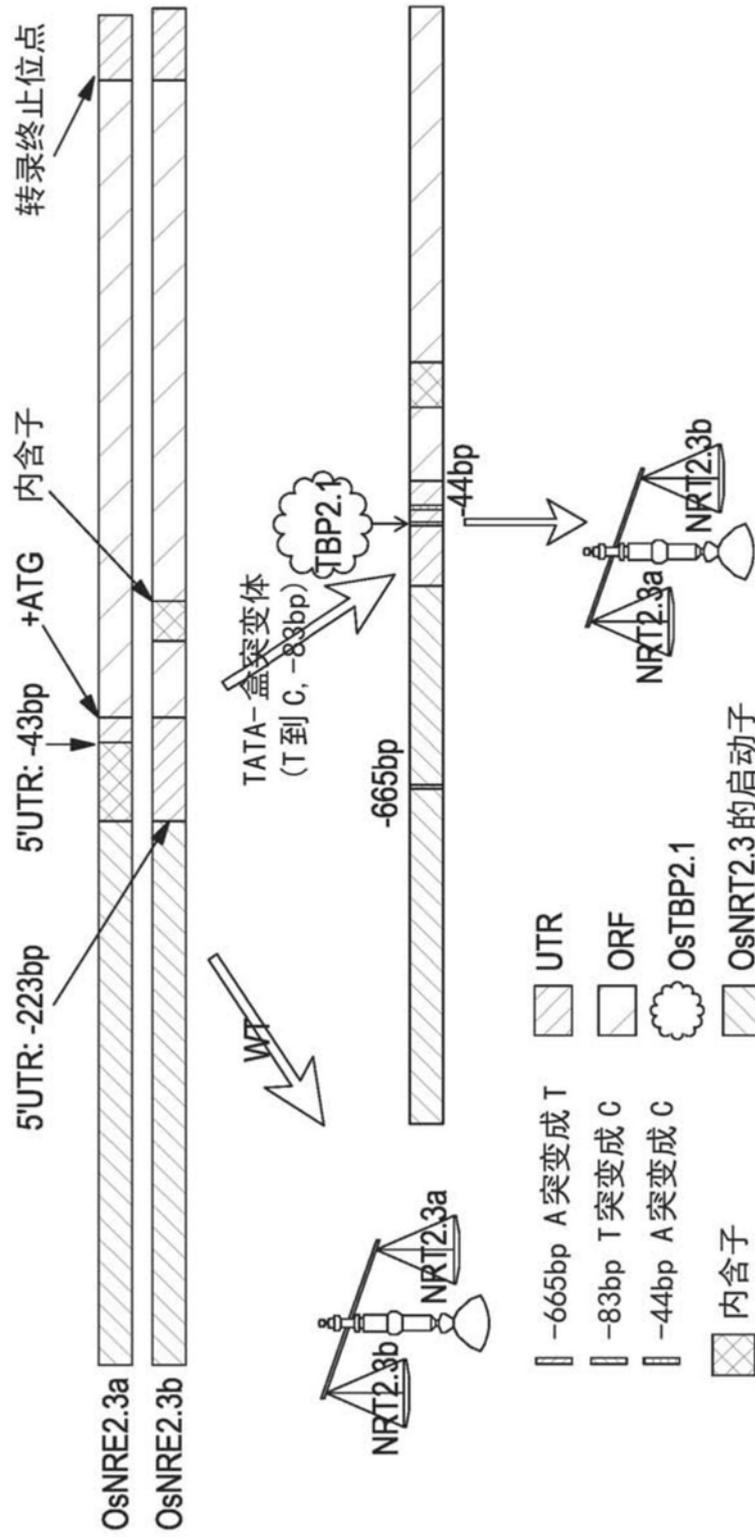


图8

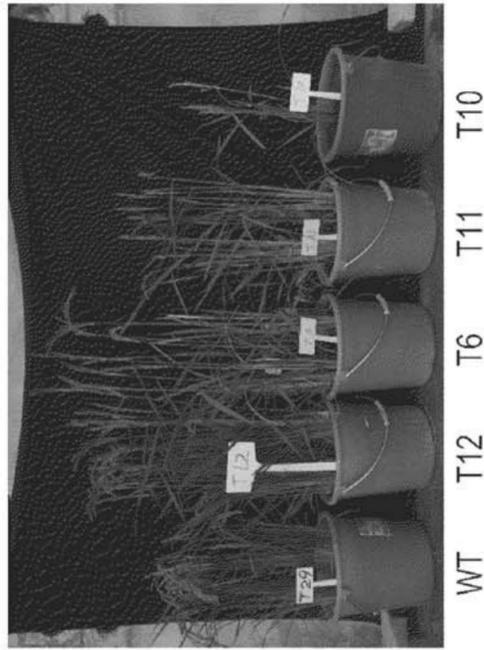


图9a



图9b

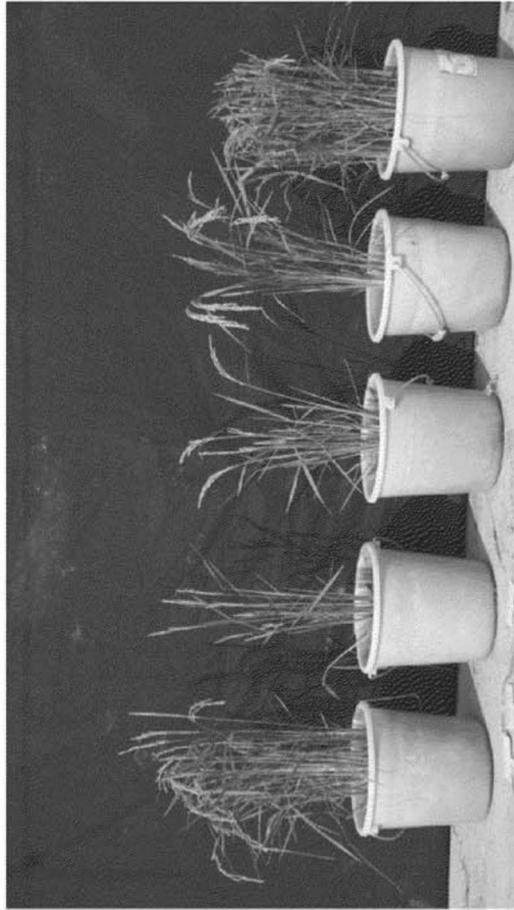


图9c

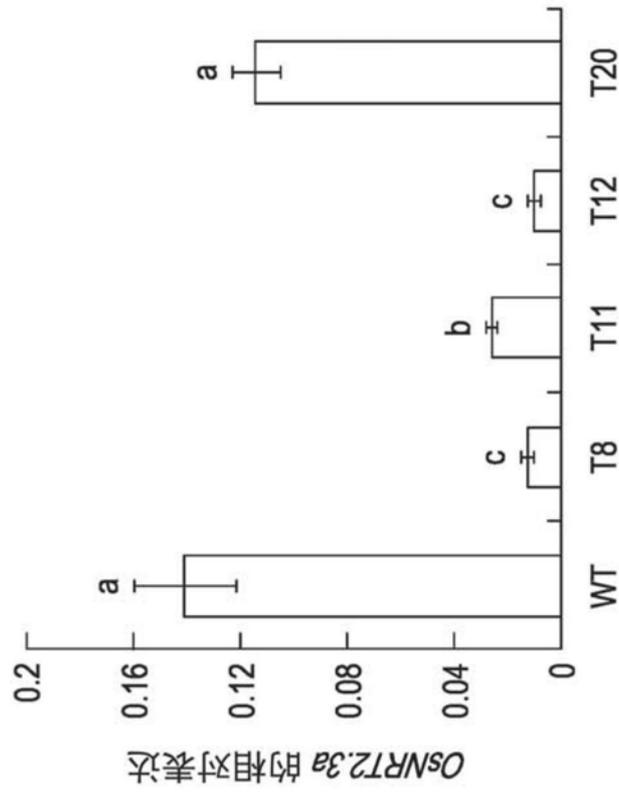


图10a

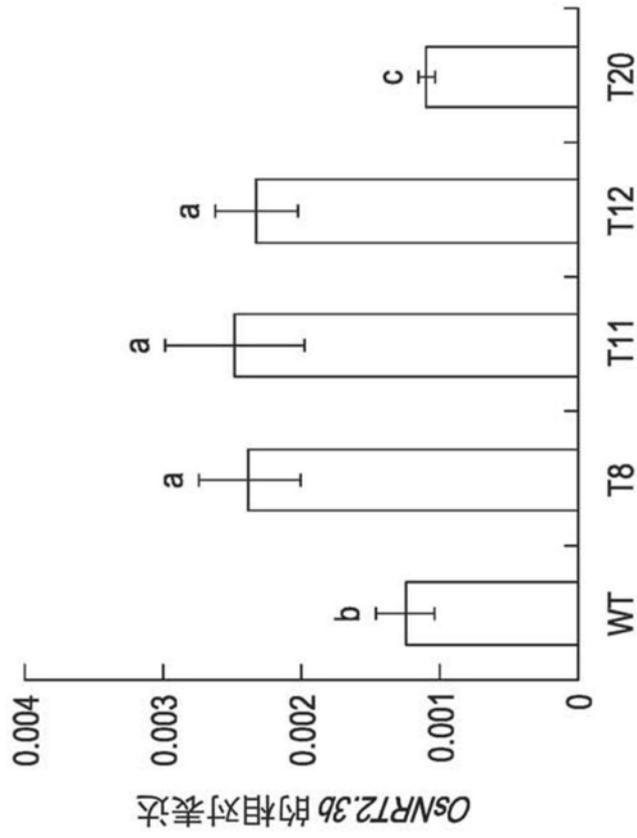


图10b



图11a



图11b

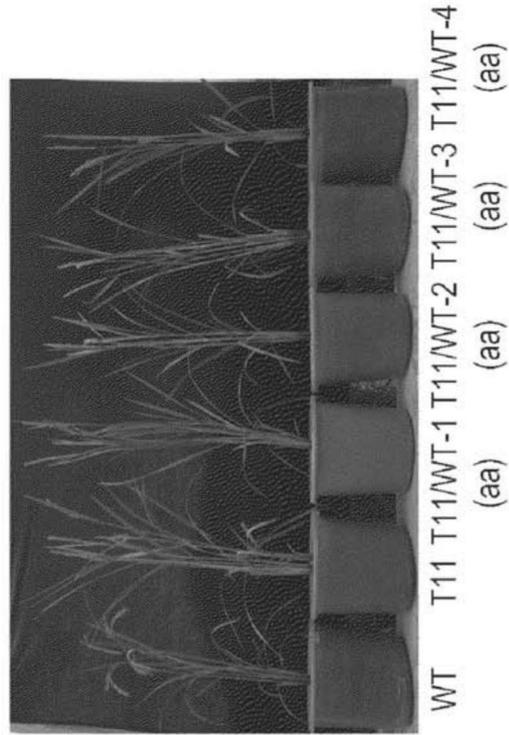


图11c

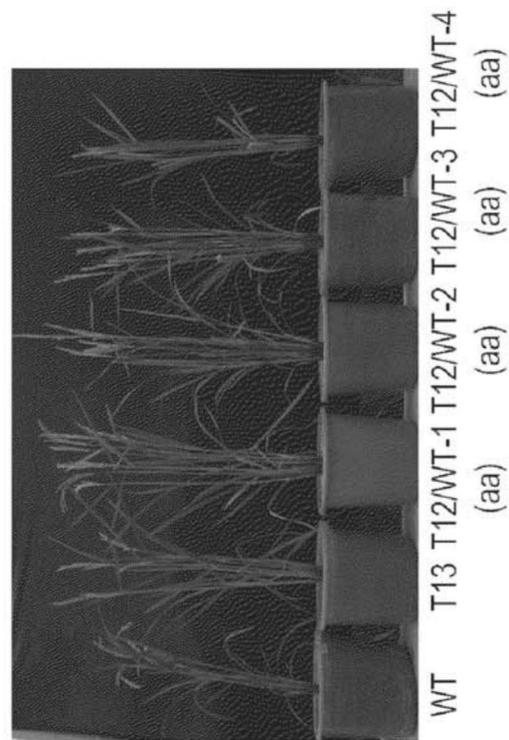


图11d

```

WT-F      -105 bp  AGCCGCGCTTCCGCTATGCTAAT AAGAGCTGACGCGCAGGGCAGCGGATGTACGTACA -46 bp
T11 (AA) -F -105 bp  AGCCGCGCTTCCGCTATGCTAAT AAGAGCTGACGCGCAGGGCAGCGGATGTACGTACA -46 bp
T11 (aa) -F -105 bp  AGCCGCGCTTCCGCTATGCTAAT AAGAGCTGACGCGCAGGGCAGCGGATGTACGTACA -46 bp
T11 (Aa) -F -105 bp  AGCCGCGCTTCCGCTATGCTAAT AAGAGCTGACGCGCAGGGCAGCGGATGTACGTACA -46 bp
T12 (AA) -F -105 bp  AGCCGCGCTTCCGCTATGCTAAT AAGAGCTGACGCGCAGGGCAGCGGATGTACGTACA -46 bp
T12 (aa) -F -105 bp  AGCCGCGCTTCCGCTATGCTAAT AAGAGCTGACGCGCAGGGCAGCGGATGTACGTACA -46 bp
T12 (Aa) -F -105 bp  AGCCGCGCTTCCGCTATGCTAAT AAGAGCTGACGCGCAGGGCAGCGGATGTACGTACA -46 bp
*****
WT-F      -45 bp  CACAGTCACTAGCTAAGCTGCTAGCCTTGCTACCACGTTGGAGATGGAGGCTA 10 bp
T11 (AA) -F -45 bp  CACAGTCACTAGCTAAGCTGCTAGCCTTGCTACCACGTTGGAGATGGAGGCTA 10 bp
T11 (aa) -F -45 bp  CACAGTCACTAGCTAAGCTGCTAGCCTTGCTACCACGTTGGAGATGGAGGCTA 10 bp
T11 (Aa) -F -45 bp  CACAGTCACTAGCTAAGCTGCTAGCCTTGCTACCACGTTGGAGATGGAGGCTA 10 bp
T12 (AA) -F -45 bp  CACAGTCACTAGCTAAGCTGCTAGCCTTGCTACCACGTTGGAGATGGAGGCTA 10 bp
T12 (aa) -F -45 bp  CACAGTCACTAGCTAAGCTGCTAGCCTTGCTACCACGTTGGAGATGGAGGCTA 10 bp
T12 (Aa) -F -45 bp  CACAGTCACTAGCTAAGCTGCTAGCCTTGCTACCACGTTGGAGATGGAGGCTA 10 bp
*****

```

图12a

```

WT-R      10 bp TAGCCTCCATCTCCAACACAGTGGTAGCAAGGCTAGCAGCTTAGCTAGTGACTGTGTGTAC -60 bp
T8 (AA) -R 10 bp TAGCCTCCATCTCCAACACAGTGGTAGCAAGGCTAGCAGCTTAGCTAGTGACTGTGTGTAC -60 bp
T11 (AA) -R 10 bp TAGCCTCCATCTCCAACACAGTGGTAGCAAGGCTAGCAGCTTAGCTAGTGACTGTGTGTAC -60 bp
T11 (aa) -R 10 bp TAGCCTCCATCTCCAACACAGTGGTAGCAAGGCTAGCAGCTTAGCTAGTGACTGTGTGTAC -60 bp
T11 (Aa) -R 10 bp TAGCCTCCATCTCCAACACAGTGGTAGCAAGGCTAGCAGCTTAGCTAGTGACTGTGTGTAC -60 bp
T12 (AA) -R 10 bp TAGCCTCCATCTCCAACACAGTGGTAGCAAGGCTAGCAGCTTAGCTAGTGACTGTGTGTAC -60 bp
T12 (aa) -R 10 bp TAGCCTCCATCTCCAACACAGTGGTAGCAAGGCTAGCAGCTTAGCTAGTGACTGTGTGTAC -60 bp
T12 (Aa) -R 10 bp TAGCCTCCATCTCCAACACAGTGGTAGCAAGGCTAGCAGCTTAGCTAGTGACTGTGTGTAC -60 bp
*****
WT-R      -61 bp GTACATCCGCTGTGCCCTGCGCGTCAGCTCTTATAGCATAGCGGAAAGCGGGCTCCGGC -110 bp
T8 (AA) -R -61 bp GTACATCCGCTGTGCCCTGCGCGTCAGCTCTTATAGCATAGCGGAAAGCGGGCTCCGGC -110 bp
T11 (AA) -R -61 bp GTACATCCGCTGTGCCCTGCGCGTCAGCTCTTATAGCATAGCGGAAAGCGGGCTCCGGC -110 bp
T11 (aa) -R -61 bp GTACATCCGCTGTGCCCTGCGCGTCAGCTCTTGTAGCATAGCGGAAAGCGGGCTCCGGC -110 bp
T11 (Aa) -R -61 bp GTACATCCGCTGTGCCCTGCGCGTCAGCTCTTGTAGCATAGCGGAAAGCGGGCTCCGGC -110 bp
T12 (AA) -R -61 bp GTACATCCGCTGTGCCCTGCGCGTCAGCTCTTATAGCATAGCGGAAAGCGGGCTCCGGC -110 bp
T12 (aa) -R -61 bp GTACATCCGCTGTGCCCTGCGCGTCAGCTCTTGTAGCATAGCGGAAAGCGGGCTCCGGC -110 bp
T12 (Aa) -R -61 bp GTACATCCGCTGTGCCCTGCGCGTCAGCTCTTGTAGCATAGCGGAAAGCGGGCTCCGGC -110 bp
*****

```

图12b

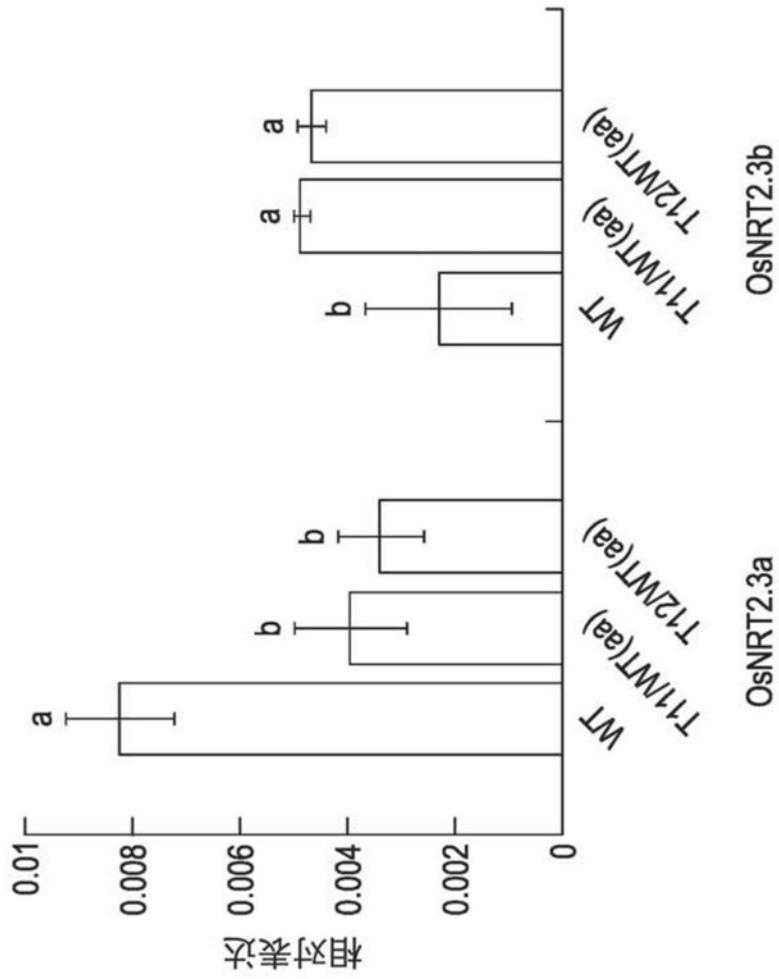


图12c

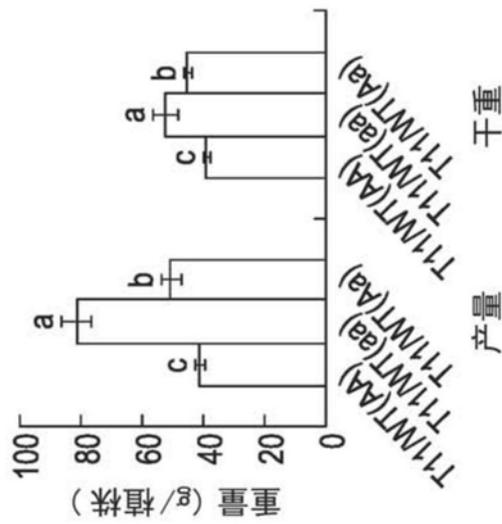


图13a

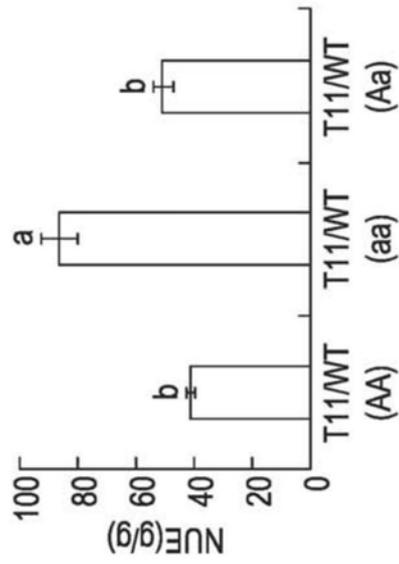


图13b

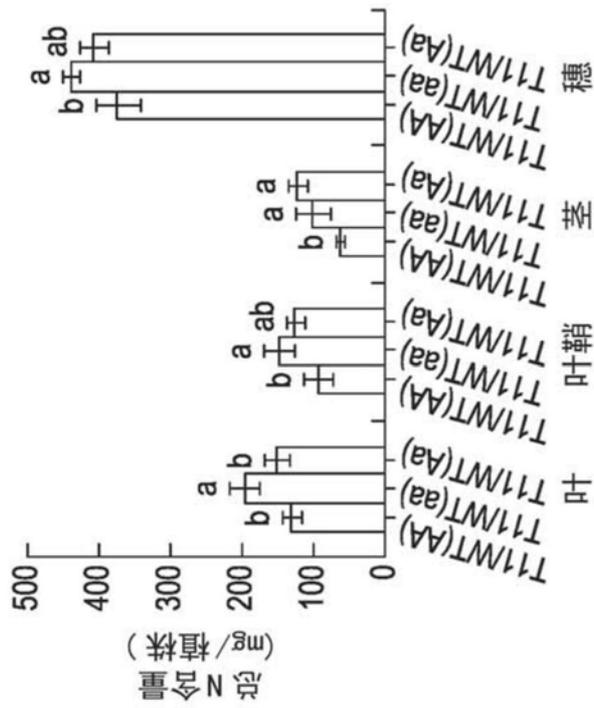


图13c

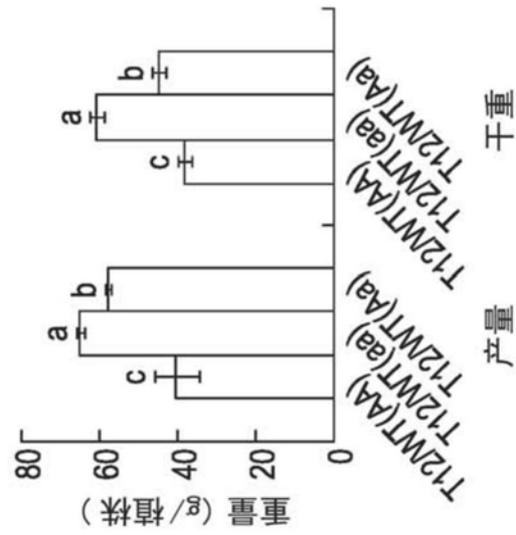


图13d

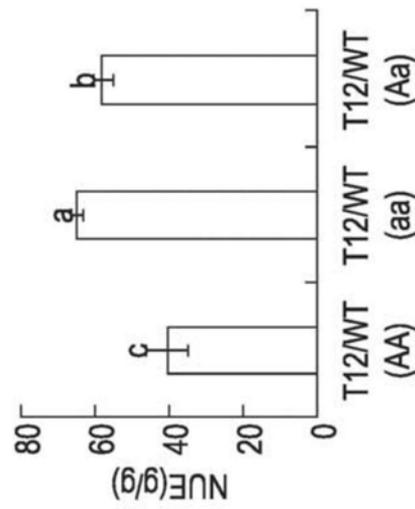


图13e



图13f

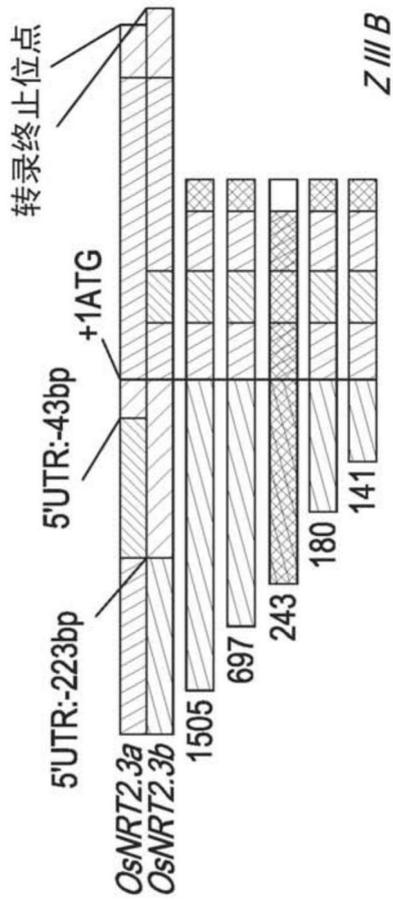


图14a

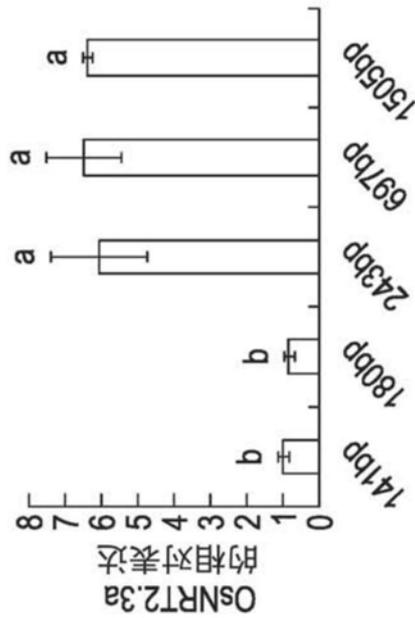


图14b

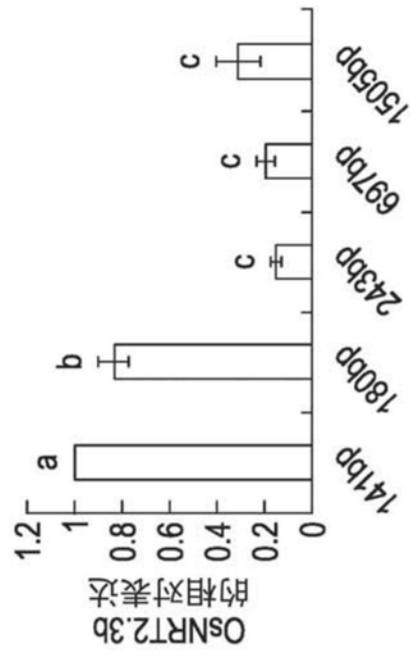


图14c

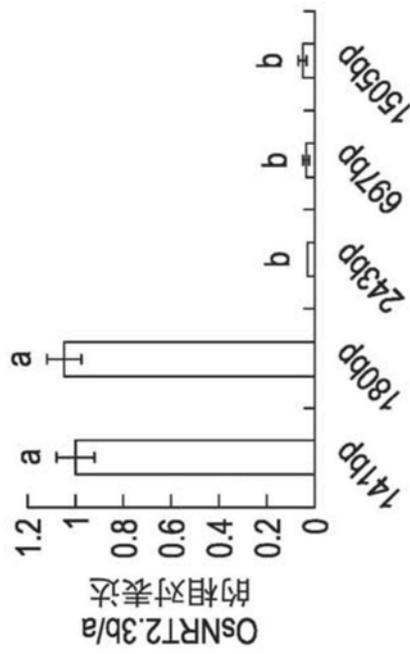


图14d

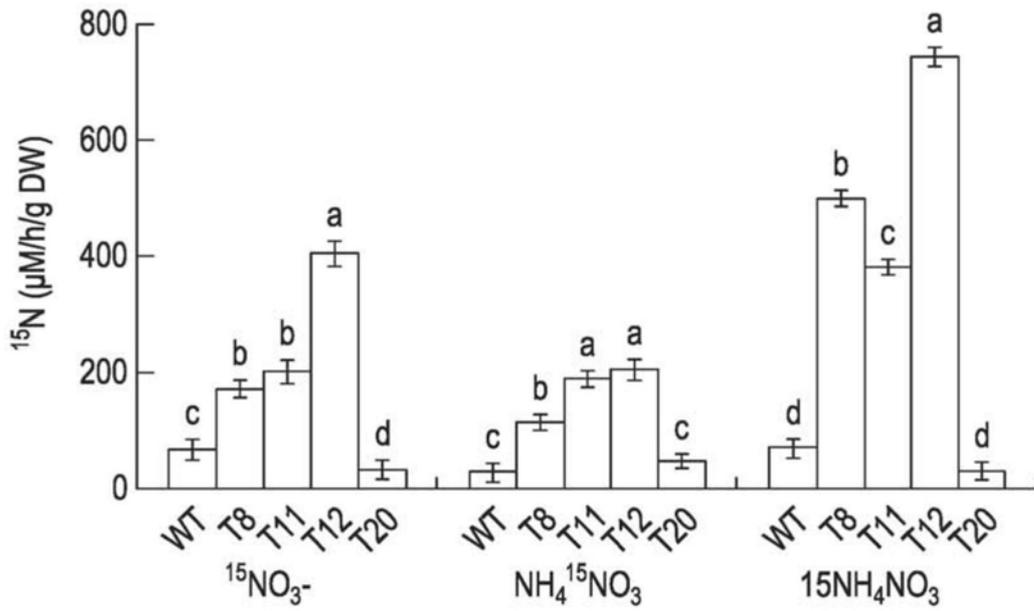


图15a

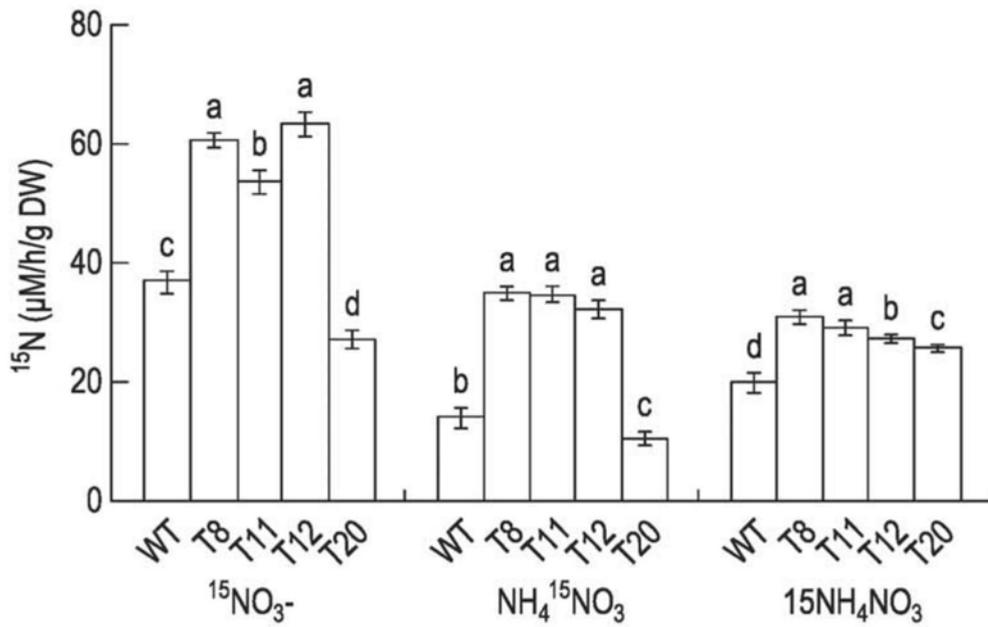


图15b

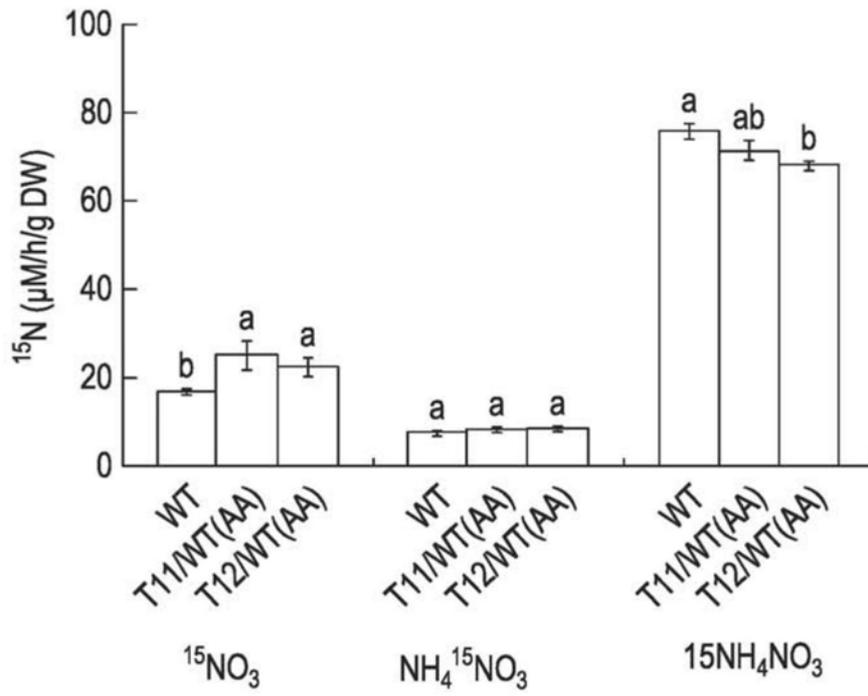


图16a

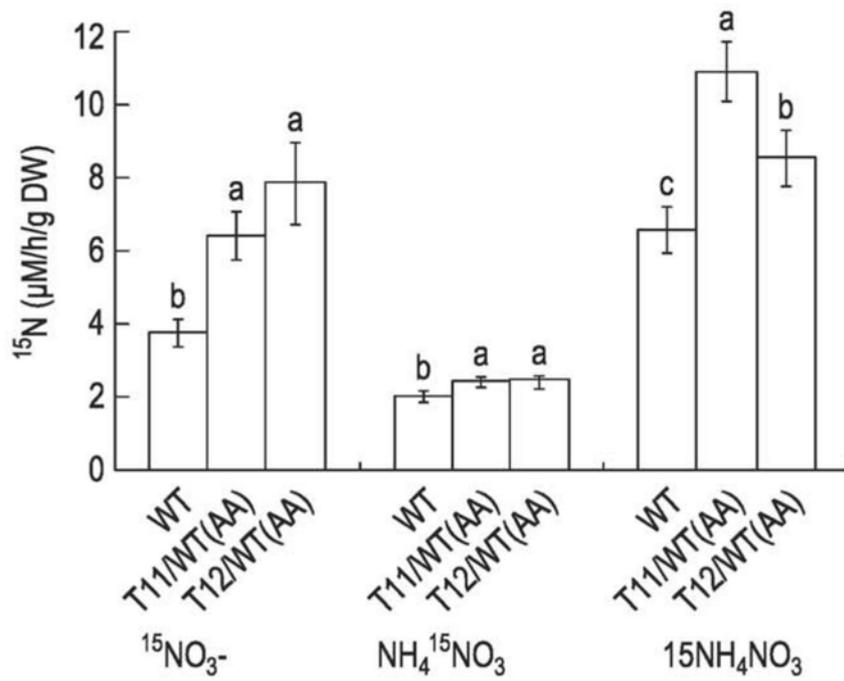


图16b

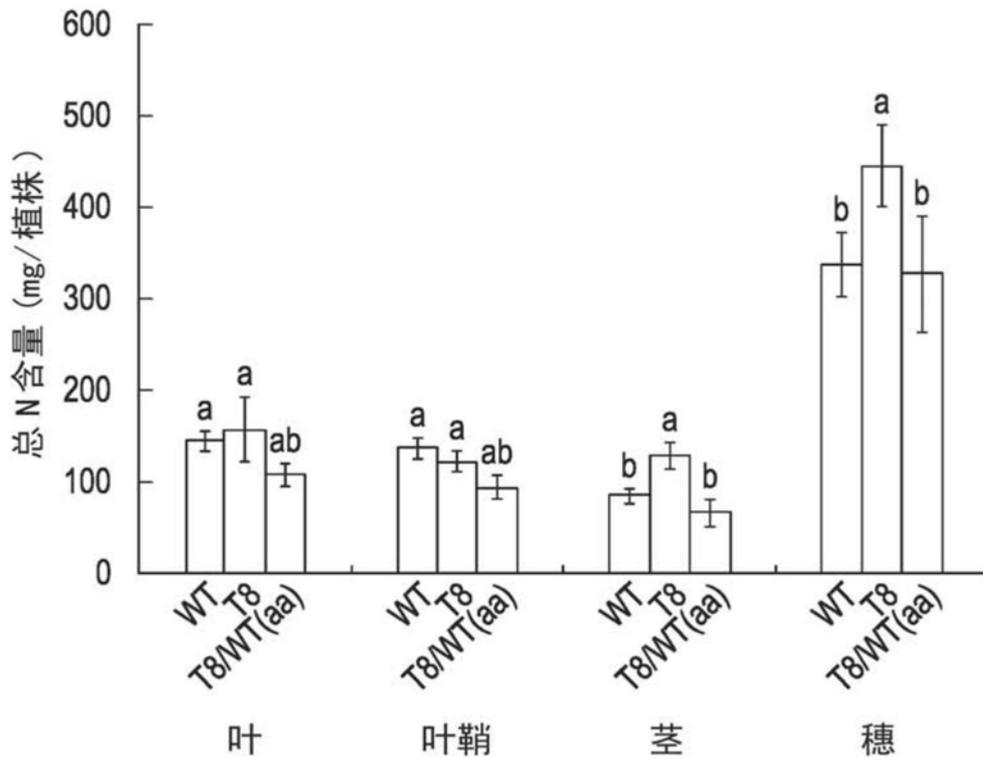


图17