



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201522641 A

(43) 公開日：中華民國 104 (2015) 年 06 月 16 日

(21) 申請案號：103139908 (22) 申請日：中華民國 103 (2014) 年 11 月 18 日

(51) Int. Cl. : C12N5/14 (2006.01) C12N15/82 (2006.01)
 C07H21/04 (2006.01)

(30) 優先權：2013/11/18 美國 14/083,193
 2013/11/18 智利 3314-2013

(71) 申請人：智利天主教大學(智利) PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE (CL)
 智利

(72) 發明人：克萊瑟 塔蒂亞娜 KRAISER, TATIANA (CL)；岡薩雷斯 貝爾納多 GONZALEZ,
 BERNARDO (CL)；古鐵雷斯 羅德里奧 GUTIERREZ, RODRIGO (CL)

(74) 代理人：憚軼群；陳文郎

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：7 共 104 頁

(54) 名稱

促進與固氮菌之關連性的植物調控基因

PLANT REGULATORY GENES PROMOTING ASSOCIATION WITH NITROGEN FIXING
 BACTERIA

(57) 摘要

本揭示內容有關植物氮回應。具體例有關有助於植物(譬如非結瘤植物)與固氮菌之功能關連性的調控因子。

This disclosure concerns plant nitrogen responses. Embodiments concern regulatory factors that contribute to the functional association of plants (e.g., non-nodulating plants) with nitrogen-fixing bacteria.

201522641

201522641

發明摘要

※ 申請案號：103134908

※ 申請日：103.11.18

(12N 5/14 (2006.01)

(12N 15/82 (2006.01)

※IPC 分類：(07H) 21/04 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

促進與固氮菌之關連性的植物調控基因/ PLANT REGULATORY GENES PROMOTING ASSOCIATION WITH NITROGEN FIXING BACTERIA

【中文】

本揭示內容有關植物氮回應。具體例有關有助於植物(譬如非結瘤植物)與固氮菌之功能關連性的調控因子。

【英文】

This disclosure concerns plant nitrogen responses. Embodiments concern regulatory factors that contribute to the functional association of plants (e.g., non-nodulating plants) with nitrogen-fixing bacteria.

【代表圖】

【本案指定代表圖】： (無)

【本代表圖之符號簡單說明】：

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

(無)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

促進與固氮菌之關連性的植物調控基因

PLANT REGULATORY GENES PROMOTING ASSOCIATION
WITH NITROGEN FIXING BACTERIA

【技術領域】

優先權主張

[0001]本申請案主張皆於2013年11月18日提申之美國申請案編號14/083,193、與智利專利申請案編號2013-3314 “PLANT REGULATORY GENES PROMOTING ASSOCIATION WITH NITROGEN FIXING BACTERIA”的申請日期之利益。

技術領域

[0002]本揭示內容關於植物生化。具體例關於調控植物與固氮菌之關連性的遺傳因子。

【先前技術】

背景

[0003]氮是植物生長和發展的基本巨量營養素，而且氮是對植物生長和作物生產力的主要限制因子。Marschner (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*, Academic Press, Harcourt, San Diego, CA, p. 889; Epstein (2005) *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives*, 2nd Ed., Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA; Galloway and Cowling (2002) *AMBIO* 31:64。傳統農業係基於氮肥，以支援世界養分需求。然而，此類肥料在過度使用時會破壞環

境並破壞人類健康。

[0004] 儘管大氣中豐含氮，但植物無法直接取得生物界的氮儲量。植物直接從土壤獲取氮，在一些情況可由固氮菌(NFB)經由生物固氮過程提供；將大氣 N_2 轉成生物可用之氮形式—例如自然生態系統中的銨—的主要過程(參閱譬如Olivares *et al.* (2013) *Mol. Plant Microbe Interact.* 26:486)。由於土壤中的氮經常有限，一些植物物種演化出與固氮菌(NFB)關連的分子機制。Zehr *et al.* (2003) *Env. Microbiol.* 5:539; Sprent and James (2007) *Plant Physiol.* 144:575; Kraiser *et al.* (2011) *J. Exp. Bot.* 62:1455。細菌和古細菌(archaea)是唯一能夠生物固氮的生物種類。將大氣 N_2 還原成銨係由固氮酶複合體—由二氮酶與二氮酶還原酶次單元構成—催化。Joerger *et al.* (1991) *J. Bacteriol.* 173:4440。

[0005] 與氮養分有關的植物-細菌交互作用係主要於豆科研究。豆科能夠和系統發育多樣化細菌群組—統稱為根瘤菌—以共生方式關連。Kistner and Parniske (2002) *Trends Plant Sci.* 7:511。該等植物物種及其細菌夥伴的關連包括形成稱作“結瘤”的專門器官。結瘤包懷細菌並提供固氮發生的適當條件。Markmann and Parniske (2009) *Trends Plant Sci.* 14:77。在該等結瘤中，植物提供碳源，交換細菌所固定的氮。Kistner and Parniske (2002)，見上文；Masson-Boivin *et al.* (2009) *Trends Microbiol.* 17:458。細菌與豆科之間的共生關連性係受到高度調控，僅在植物生長於限氮條件下時發生。低位準的硝酸鹽與銨刺激結瘤的形成，而高位準的該

等營養素亦抑制根部的感染位點數目與已存在結瘤的N-固定作用。Eaglesham (1989) *Crop Sci.* 29:115; Zahran (1999) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:968; Bisseling *et al.* (1978) *Bio. Biophys. Acta* 539:1。

[0006] 植物識得細菌所分泌的結瘤作用(Nod)因子，該因子活化包括初級轉錄因子1 (NODULATION SIGNALING PATHWAY 1) (NSP1)與NSP2的信號傳導途徑。Smit *et al.* (2005) *Science* 308:1789; Kalo *et al.* (2005) *Science* 308:1786; Heckmann *et al.* (2006) *Plant Physiol.* 142:1739。總之，該等轉錄因子調控結瘤起始(*NIN*)基因的表現，該基因是細菌感染與結瘤器官生成所必需的。Smit *et al.* (2005)，見上文；Hirsch *et al.* (2009) *Plant Cell* 21:545；Schäuser *et al.* (1999) *Nature* 402:191。回應於細菌Nod因子的該等轉錄因子的活化係於植物處於限N條件時發生。Barbulova *et al.* (2007) *Mol. Plant Microbe Interact.* 20:994。

[0007] 除豆科外，來自不同分類單元的數量有限的其他植物物種已被報導和NFB有關連。儘管無法結瘤，但在限N條件下，一些植物(譬如小麥和甘蔗)可經由生物固氮作用吸納彼等顯著部分的氮需求。Iniguez *et al.* (2004) *Mol. Plant Microbe Interact.* 17:1078; Boddey *et al.* (1991) *Plant Soil* 137:111。

【發明內容】

揭示內容

[0008] 揭示了調控非結瘤植物物種與NFB (譬如苜蓿中

華根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)之間N-養分交互作用的基因類別(譬如*AtNSP1*-樣、*AtNLP4*、與*AtNLP9*)。

[0009]在特定具體例揭示的是非天然核酸分子，其包含操作性地聯結至異源性促進子的聚核苷酸，其中該聚核苷酸為與SEQ ID NO:4至少80%一致的聚核苷酸；在嚴苛(譬如高度嚴苛)條件下雜交至由SEQ ID NO:4構成之核酸的聚核苷酸；與SEQ ID NO:5至少80%一致的聚核苷酸；在嚴苛(譬如高度嚴苛)條件下雜交至由SEQ ID NO:5構成之核酸的聚核苷酸；與SEQ ID NO:6至少80%一致的聚核苷酸；或在嚴苛(譬如高度嚴苛)條件下雜交至由SEQ ID NO:6構成之核酸的聚核苷酸。

[0010]本案亦說明了增加植物(譬如非結瘤植物)氮效率的方法。在一些具體例中，該方法可包含將至少一異源性多肽引進植物，以製造基因轉殖植物，其中該異源性多肽為結瘤信號轉導途徑-樣(NSP)或NIN-樣蛋白(NLP)。在特定具體例中，該異源性多肽為NSP1、NLP4、或NLP9。此類異源性多肽可為，舉例來說，與SEQ ID NOs:1、3、與4當中一或多者至少約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%一致。

[0011]在一些具體例中，增加植物氮效率的方法可包含以編碼該異源性多肽的聚核苷酸使植物轉形。在特定具體例中，該聚核苷酸可實質上一致於SEQ ID NOs:4-6當中一

者，及/或為彼等的同源物或異種同源物。在特定具體例中，編碼該異源性多肽的聚核苷酸係於嚴苛(譬如高度嚴苛)條件下雜交至SEQ ID NOs:4-6當中至少一者。

[0012] 本案亦說明了增加植物(譬如非結瘤植物)氮效率的方法，該方法包含將促進與NFB之關連性的至少一至少一方式引進植物，舉例來說，以製造基因轉殖植物。促進與NFB之關連性的方式例子包括由SEQ ID NO:1構成之多肽；由SEQ ID NO:2構成之多肽；由SEQ ID NO:3構成之多肽；由SEQ ID NO:4構成之聚核苷酸；由SEQ ID NO:5構成之聚核苷酸；及由SEQ ID NO:6構成之聚核苷酸。

[0013] 本案更說明了包含或穩定地轉形有任何前述多肽及/或核酸構築體的植物細胞、植物部分、植物材料、植物組織、植物種籽、及全株植物。相較於相同物種的野生型植物，此類基因轉殖植物在特定具體例展現在限氮生長條件下之增加的生長。

[0014] 前述與其他特徵將由下列參照隨附圖式進行的數個具體例詳細說明而變得明顯。

【圖式簡單說明】

[0015] 圖1A與1B包括在限N條件下NFB對植物生長的效應示意圖。植物生物質量(乾重；n=15)係於完全MS介質轉移至有N (40 mM NO₃ + 20 mM NH₄)或無N的MS介質並以不同細菌(NFB: 越南伯克氏菌G4、噬異源伯克氏菌LB400、臺灣嗜銅菌LMG19424、菜豆根瘤菌CFN42、苜蓿中華根瘤菌RMP110；以及非-NFB: 植物伯克氏菌PSJN、皮納突伯

嗜銅菌JMP134) (順序由左至右)接種或否的七日後測量。圖1A。植物乾重係於在含N介質生長七日並移植至限N條件且以活或死苜蓿中華根瘤菌接種，或未接種的植物測量。圖1B。每株植物的側根數量係於以上文圖1A所詳述的相同條件生長與處理的植物測量。圖1A (三個獨立生物重複的平均 \pm SE; 星號指示相較於無N生長的未接種植物明顯不同的平均($P < 0.05$))。

[0016] 圖2A與2B包括在限N條件下的N固定作用增進植物生長的示意圖。生物質量係以生長在充足(2.5 mM NH_4NO_3)或限N條件下、以苜蓿中華根瘤菌RMP110野生型接種或否或以無法固定N的成熟型接種的植物以乾重測量。圖2A。生物固氮作用係藉由 ^{15}N 稀釋技術測量。植物係生長在充足N (5% ^{15}N)的介質。七日後，將植物移至不同處理的皿。使用質譜，在處理7日後於採收與乾燥植物測定 ^{14}N 與 ^{15}N 的份量。 $\delta^{15}\text{N}$ 表示相較於未接種條件的 $^{14}\text{N}:^{15}\text{N}$ 同位素比率 (三個獨立生物重複的平均 \pm SE ($P < 0.05$))。圖2A。

[0017] 圖3A與3B包括經由細菌接種引進某些阿拉伯芥屬基因的示意圖。NSP1 (圖3A)與NIN-樣轉錄因子(圖3A)基因表現係在處理第三或第七日後以即時定量逆轉錄PCR測量。植物係生長在充足(2.5 mM NH_4NO_3)或限N條件、並以NFB接種或否。繪示值係相當於三個獨立生物重複的平均 \pm SE (星號指示相較於未接種植物明顯不同的平均($P < 0.05$))。

[0018] 圖4包括阿拉伯芥一就與苜蓿中華根瘤菌

RMP110之關連性而言至關重要的基因；*AtNSP1*-樣、*AtNLP4*、*AtNLP8*、與*AtNLP9*轉錄因子一的突變效應示意圖。生物質量係以生長在限氮條件下並以苜蓿中華根瘤菌接種或否的野生型與突變植物所測得的乾重表示(三個獨立生物重複的平均 \pm SE；星號指示相較於未接種植物明顯不同的平均($P < 0.05$))。

[0019]圖5包括展示NFB對根毛長度的效應的影像。在完全MS鹽介質生長達數日的植物係移植至無N的MS介質，並以NFB接種或否。在處理數日後拍照。

[0020]圖6A與6B包括苜蓿中華根瘤菌對阿拉伯芥屬根系建構的效應示意圖。側根密度(圖6A)與主要根長(圖6B)係於生長在充足/限N條件、以苜蓿中華根瘤菌RMP110野生型接種或否或以無法固定N的成熟型接種的植物測量。繪示值係相當於三個獨立生物重複的平均 \pm SE。

[0021]圖7A與7B包括細菌接種*AtNSP2*-樣、*AtNLP1*、*AtNLP2*、與*AtNLP5*的回應示意圖。基因表現係在處理第三或第七日後以即時定量逆轉錄PCR測量(三個獨立生物重複的平均 \pm SE；星號指示相較於未接種植物明顯不同的平均($P < 0.05$))。植物係生長在充足或限N條件、並以苜蓿中華根瘤菌接種或否。

序列表

[0022]在隨附序列表中列出的核酸序列係使用37 C.F.R. § 1.822所定義的核苷酸鹼基標準字母縮寫顯示。僅顯示各核酸序列的一股，但可理解互補股係任意參照展示股而被

包括在內。在隨附序列表中：

SEQ ID NO:1顯示NSP1-樣(SCL29； At3g13840)多肽：

MLLEETEPPNQTLDHVLSWLEDSVSLSPPLPGFDDSYL
 LHEFDGSQTWEWDQTQDPEHGFIQSYSQDLAAYVGCE
 ATNLEVVTAPSIDLDPPEIQQPNDQSRKRSHDGFLEAQ
 QVKKARSKRKAIKSSEKSSKDGNGEGRWAEKLLNPCAL
 AITASNSSRVQHLYLCVLSSELASSSGDANRRLLAAFGLRAL
 QHHLSSSSVSSSFWPVFTFASAEVKMFQKTLLKFYEVSP
 WFALPNNMANSAILQILAQDPKDKKDLHIIDIGVSHGMQ
 WPTLLEALSCRLEGPPRVRITVISDLTADIPFSVGPPGYN
 YGSQLLGFARSLKINLQISVLDKLQLIDTSPHENLIVCAQF
 RLHHLKHSINDERGETLKAVRSLRPGVVLCEENGECCS
 SADFAAGFSKKLEYVWKFLDSTSSGFKEENSEERKLMEG
 EATKVLNAGDMNEGKEKWYERMREAGFFVEAFEEDA
 VDGAKSLLRKYDNNWEIRMEDGDTFAGLMWKGEAVS
 FCSLWK

SEQ ID NO:2顯示NLP4 (At1g20640)多肽：

MEDSFLQSENVMDADFMGGLLDGCWLETTDGSE
 FLNIAPSTSSVSPFDPTSFMWSPTQDTSALCTSGVVSQMY
 GQDCVERSSLDEFQWNKRWWIGPGGGGSSVTERLVQAV
 EHIKDYTTARGSLIQLWVPVNRGGKRVLTKEQPFSHDPL
 CQRLANYREISVNYHFSAEQDDSKALAGLPGRVFLGKLP
 EWTPDVRFFKSEEYPRVHHAQDCDVRGTLAIPVFEQGSK
 ICLGVIEVVMTTEMVKLRPELESICRALQAVDLRSTELPIP

PSLKGCDLSYKAALPEIRNLLRCACETHKLPLAQTWVSC
 QQQNKSGCRHNDENYIHCVSTIDDACYVGDPTVREFHE
 ACSEHLLKGQGVAGQAFLTNGPCFSSDVSNYKKSEYPL
 SHHANMYGLHGAVAIRLRCIHTGSADVFLEFFLPKDCDD
 LEEQRKMLNALSTIMAHVPRSLRTVTDKELEEESEVIERE
 EIVTPKIENASELHGNSPWNASLEEIQRSNNTSNPQNLGL
 VFDGGDKPNDGFGLKRGFDYTMDSNVNESSTFSSGGFS
 MMAEKKRTKADKTITLDVLRQYFAGSLKDAAKNIGVCP
 TTLKRICRQHGIQRWPSRKIKKVGHSLQKIQRVIDSVQGV
 SGPLPIGSFYANFPNLVSQSQEPSQQAKTTPPPPPVQLAK
 SPVSSYSHSSNSSQCCSSETQLNSGATTDPPSTDVGGALK
 KTSSEIELQSSSLDETILTLSLENIPQGTNLLSSQDDDFLR
 IKVSYGEEKIRLRMRNSRRLRDLLWEIGKRFSIEDMSRYD
 LKYLDEDNEWVLLTCDEDVEECVDVCRTPPSHTIKLLLQ
 ASSHHFPERSSATEY

SLWH

SEQ ID NO:3顯示NLP9 (At3g59580)多肽：

MENPSASRDNKGFCFPDIPVEEMDGWVKNLISEEDM
 FSSSSTSELMNFESFASWCNSPSAADILFTQYGLSTSQSIIP
 FGGLEGSYACEKRPLDCTSVPRSLSHSLDEKMLKALSLF
 MEFSGEGILAQFWTPIKTGDQYMLSTCDQAYLLDSRLSG
 YREASRRFTFSAEANQCSYPGLPGRVFISGVPEWTSNVM
 YYKTAEYLRMKHALDNEVRGSIAIPVLEASGSSCCAVLEL
 VTCREKPNFDVEMNSVCRALQAVNLQTSTIPRRQYLSSN

QKEALAEIRDVLRVAVCYAHRLPLALAWIPCSYSKGANDE
 LVKVYVGKNSKECSLLCIEETSCYVNDMEMEGFVNACLE
 HYLREGQGIVGKALISNKPSFSSDVKTFDICEYPLVQHAR
 KFGLNAAVATKLRSTFTGDNDYILEFFLPVSMKGSSEQQL
 LLDSLSGTMQRLCRTLKTVSDAESIDGTEFGSRSVEMTN
 LPQATVSVGSFHTTFLD TDVNSTRSTFSNISSNKRNEMAG
 SQGTLQQEISGARRLEKKKSSTEKNVSLNVLQQYFSGSL
 KDKAAKSLGVCPTTLKRICRQHGIMRWPSRKINKVNRSR
 KIQTVLDSVQGVGGLKFDSVTGEFVAVGPFIQEFGTQKS
 LSSHDEDALARSQGDMDDEDVSVEPLEVKSHDGGGVKLE
 EDVETNHQAGPGSLKKPWTWISKQSGLIYSDDTDIGKRS
 EEVNKDKEDLCVRRCLSSVALAGDGMNTRIERGNGTVE
 PNHSISSMSDSSNSSGAVLLGSSSASLEQNWNQIRTHNN
 SGESGSSSTLTVKATYREDTVRFKLDPYVVGCSQLYREVA
 KRFKLQEGAFQLKYLDD

EEEWVMLVTDSLHECFEILNGMRKHTVKFLVRDIP
 NTAMGSSAGSNGYLGTGT

SEQ ID NO:4顯示*NSP1*-樣(SCL29 ; At3g13840)聚核苷酸編
 碼序列(CDS) :

ATGTTGTTGGAAGAAACAGAACCACCAAACCAGA
 CTCTAGATCATGTCCTAAGCTGGCTTGAGGATTCTGTGT
 CCTTATCCCCATTACCAGGATTTGATGATTCTTATTTGCT
 CCACGAGTTTGATGGGTCTCAAACGTGGGAATGGGATC
 AGACTCAAGATCCGGAGCATGGTTTTATTCAAAGCTATA

GTCAAGATCTTAGTGCAGCATATGTTGGTTGTGAAGCA
ACTAACCTGGAAGTGGTAACAGAAGCTCCATCCATTGA
TTTGGATCTTCCACCTGAAATTCAGCAACCAAACGATC
AGTCCAGGAAAAGGAGCCACGACGGGTTTCTCGAGGC
ACAACAGGTGAAAAAATCGGCAAGGAGCAAGAGAAA
AGCAATCAAGTCTAGTGAGAAGAGCTCCAAAGATGGT
AACAAGGAAGGGAGATGGGCAGAGAAGTTGCTTAACC
CTTGTGCCTTGGCCATTACGGCAAGTAACTCATCAAGG
GTTCAACATTACCTTTGTGTTCTCTCTGAACTGGCCTCT
TCTTCTGGTGATGCTAATCGTCGGCTTGCAGCTTTTGGT
CTTCGGGCTTTGCAACATCATCTTTCCTCATCCTCTGTG
TCATCATCCTTTTGGCCTGTTTTTACTTTTGCTTCAGCG
GAAGTGAAGATGTTTCAAAGACTCTGCTTAAGTTCTA
CGAGGTAAGCCCTTGGTTTGCTTTGCCTAACAAACATGG
CAAACCTCAGCTATCCTGCAGATTTTAGCACAGGATCCC
AAAGATAAAAAGGATCTTCATATTATTGATATTGGTGTT
TCTCACGGTATGCAATGGCCCACTTTGTTGGAGGCTCT
GAGCTGCAGACTAGAAGGACCTCCTCCTCGTGTTTCGAA
TAACCGTTATATCAGATCTAACCGCAGACATACCTTTCT
CTGTTGGTCCACCAGGTTACAATTATGGTTCTCAACTCC
TAGGCTTTGCTCGGTCTCTCAAGATCAACCTTCAGATTA
GTGTACTIONGACAAGTTACAACCTCATTGATACCTCACCTC
ACGAGAACTTAATCGTGTGTGCTCAGTTTAGGCTGCAT
CACCTGAAGCATAGCATCAATGATGAGAGAGGCGAGAC

TTTGAAAGCAGTGAGAAGTTTAAGGCCAAAAGGAGTG
 GTTCTTTGTGAGAACAATGGAGAATGCAGTAGTAGTGC
 GGACTTTGCAGCAGGATTCTCGAAGAACTGGAGTATG
 TATGGAAGTTTCTGGATTCAACAAGCTCGGGATTTAAA
 GAAGAGAATAGCGAAGAGAGAAAATAATGGAAGGAG
 AGGCAACAAAGGTGTTGATGAATGCAGGAGATATGAAT
 GAAGGAAAAGAGAAATGGTATGAGAGGATGAGAGAAG
 CTGGTTTTTTTTGTAGAAGCATTGAAGAAGATGCAGTT
 GATGGAGCCAAATCCTTACTAAGAAAGTATGACAACAA
 TTGGGAAATAAGAATGGAAGATGGAGATACCTTTGCTG
 GATTAATGTGGAAAGGAGAGGCAGTTTCC

TTTTGTTCATTGTGGAAGTAG

SEQ ID NO:5 顯示 *NLP4* (At1g20640) 聚核苷酸編碼序列 (CDS) :

ATGGAAGATAGTTTCCTTCAATCTGAGAACGTGGTT
 ATGGACGCTGACTTCATGGATGGATTGTTACTAGATGGT
 TGTTGGTTAGAGACTACAGATGGATCTGAGTTTCTTAAC
 ATAGCTCCTTCAACTTCTTCTGTTAGCCCTTTTGATCCA
 ACTTCCTTCATGTGGTCTCCAACCTCAAGATACATCAGCT
 CTTTGCACATCAGGAGTTGTATCTCAGATGTATGGTCAG
 GATTGTGTAGAAAGATCTAGTCTTGATGAGTTTCAATGG
 AACAAACGATGGTGGATTGGACCAGGAGGTGGTGGTT
 CTCGGTTACTGAGAGGTTGGTTCAAGCAGTTGAACAC
 ATTAAGATTACACAACAGCGAGAGGCTCACTTATTCA

GTTATGGGTTCCGGTTAATAGAGGGCGGTAAGCGAGTTT
TGACCACAAAGGAACAACCTTTTAGCCATGATCCGTTG
TGTCAAAGACTTGCAAACCTATAGAGAGATCTCTGTGAA
TTATCACTTCTCTGCTGAGCAAGATGATTCCAAGGCTTT
AGCTGGTTTGCCTGGGAGGGTTTTCTTGGGGAAGCTTC
CTGAATGGACTCCTGATGTTAGGTTTTTCAAGAGCGAG
GAGTATCCGAGAGTACACCATGCTCAGGACTGCGATGT
CCGTGGAACGCTGGCGATTCCGGTGTTTGAACAAGGTA
GTAAGATTTGCTTGGGTGTTATTGAGGTTGTAATGACCA
CTGAGATGGTTAAACTAAGACCTGAGCTTGAAAGCATT
TGCAGAGCACTTCAGGCAGTTGATCTTAGGAGCACCGA
GCTTCCGATTCCACCTTCTCTAAAGGGATGTGACTTATC
CTACAAAGCTGCCTTACCTGAAATCCGAAACCTCTTGA
GATGTGCTTGTGAGACTCATAAACTACCTTTAGCTCAG
ACATGGGTTTCTTGTCAACAGCAAAAACAAAAGCGGGT
GCCGTCACAACGATGAGAACTACATCCATTGCGTATCA
ACCATTGATGATGCTTGCTACGTTGGTGATCCAACAGTT
CGTGAGTTCCATGAAGCTTGCTCTGAGCATCACCTCTT
GAAAGGCCAAGGAGTTGCAGGTCAAGCCTTCTTGACC
AATGGACCTTGCTTTTTCATCTGATGTATCTAACTACAAG
AAATCAGAGTACCCTCTCTCTCACCATGCTAATATGTAC
GGTTTACATGGCGCGGTTGCAATTCGCCTGCGGTGCAT
CCACACGGGCTCTGCTGATTCGTCTTAGAGTTCTTTTT
GCCTAAAGACTGCGATGATCTGGAGGAACAGAGGAAA

ATGTTGAATGCTCTTTCAACTATTATGGCTCATGTGCCT
AGAAGCTTAAGGACTGTTACAGACAAAGAACTAGAAG
AAGAGAGTGAAGTGATAGAGAGGGAAGAGATAGTAAC
GCCAAAGATAGAAAACGCATCTGAACTCCACGGAAATT
CCCCATGGAATGCCTCTCTTGAAGAAATCCAGCGGAGT
AATAATACTAGTAATCCTCAGAATCTTGGACTGGTATTT
GATGGAGGAGACAAACCAAATGATGGTTTTGGCTTAAA
AAGAGGTTTTGACTACACCATGGATTCTAATGTCAATG
AGAGCAGCACTTTCTCTAGTGGTGGTTTCAGTATGATG
GCCGAGAAAAAGCGTACAAAAGCAGATAAAACCATCA
CTTTGGATGTTCTTCGACAGTATTTTCGCTGGGAGCTTGA
AAGATGCAGCCAAGAATATCGGTGTTTGTCCAACGACC
TTGAAGAGAATATGCAGACAGCATGGTATACAAAGATG
GCCTTCAAGAAAGATAAAAAAAGTGGGACATTCTCTGC
AGAAGATCCAACGAGTGATTGATTTCGGTTCAAGGTGTT
TCTGGTCCTCTTCCCATAGGCTCATTCTATGCAAATTC
CCCAATTTAGTCTCACAGTCACAAGAACCATCACAACA
AGCCAAGACCACGCCTCCTCCTCCGCCGCCAGTGCAG
CTTGCAAAGTCCCCTGTATCCTCGTATAGTCACAGTTCA
AACTCTAGCCAATGTTGCTCCAGTGAAACCCAATAAA
CAGCGGTGCAACAACCGATCCTCCTTCAACTGATGTAG
GAGGTGCATTGAAGAAGACGAGCAGCGAAATCGAGCT
TCAAAGCTCGAGTCTTGACGAGACAATTTTACTCTCT
CCAGTTTAGAAAACATCCCTCAAGGCACCAACTTGTTA

TCATCTCAAGATGATGACTTTCTGAGGATTAAGTTAGC
TACGGAGAAGAGAAGATCAGATTACGGATGCGGAATTC
GCGCAGGTTAAGAGATCTATTGTGGGAGATTGGGAAGC
GGTTTAGCATAGAGGATATGAGCAGGTATGATCTAAAGT
ACTTAGACGAAGACAATGAATGGGTTTTGTTGACTTGC
GACGAAGATGTAGAAGAGTGTGTAGATGTCTGCAGAA
CTACACCGAGTCATACCATTAAGCTTTTGCTTCAGGCTT
CTTCTCATCATTTCCCTGAACGTTCTTCAGCTACTGAAT
AC

AGTTTATGGCACTGA

SEQ ID NO:6 顯示 *NLP9* (At3g59580) 聚核苷酸編碼序列
(CDS) :

ATGGAGAACCCATCAGCATCCAGAGATAATAAAGG
TTTCTGTTTTCCAGATATTCCAGTAGAAGAAATGGATGG
CTGGGTTAAGAATTTGATCTCTGAAGAAGATATGTTTAG
CTCCTCTTCAACTTCAGAGCTTATGAATTCGAATCTTT
TGCTTCATGGTGCAACAGCCCTTCCGCTGCAGATATCTT
GTTCACTCAATACGGTTTATCGACCTCTCAATCTATTATA
CCTTTCGGAGGCTTAGAAGGCTCATACGCTTGCGAGAA
AAGACCGTTAGACTGTACTAGTGTCCAAGGTCATTGA
GCCATTCTCTTGATGAGAAGATGCTCAAAGCATTAAAGT
TTGTTTATGGAGTTCTCTGGAGAGGGAATTCTGGCACA
GTTTTGGACTCCTATTAAGACAGGAGATCAGTACATGCT
TAGTACTTGTGATCAGGCGTATCTGCTTGACTCGAGGCT

ATCTGGATACCGTGAAGCGTCGAGGAGATTCACTTTCT
CTGCTGAAGCAAATCAATGCTCTTATCCAGGTCTTCCA
GGCAGAGTCTTTATCTCTGGAGTTCCTGAGTGGACATC
AAACGTTATGTATTACAAGACTGCTGAATATTTAAGGAT
GAAGCATGCATTAGATAACGAAGTCCGTGGTTCGATTG
CAATTCCTGTCCTTGAAGCATCAGGTTCTTCTTGTTGTG
CAGTTCTGGAAGTTGTGACATGTAGGGAAAAACCAA
CTTTGATGTGGAGATGAACTCTGTTTGCCGTGCTCTGC
AGGCCGTGAACTTACAAACATCAACTATTCCTCGTCGC
CAGTACCTTTCAAGTAATCAAAAAGAAGCTTTGGCTGA
AATAAGAGATGTTCTCAGAGCAGTGTGCTATGCACATA
GGTTGCCTTTAGCTCTAGCTTGGATTCCCTGTAGTTACT
CCAAAGGAGCAAACGATGAGTTGGTAAAGGTTTATGG
AAAAAACTCAAAGGAATGTTCTCTTCTTTGCATAGAAG
AGACATCATGTTATGTGAATGATATGGAAATGGAAGGCT
TTGTGAATGCATGTTTGGAGCATTATCTAAGAGAAGGG
CAAGGAATTGTTGGCAAAGCACTCATATCAAACAAACC
GTCTTTCTCATCTGATGTAAAGACATTTGATATCTGCGA
GTACCCTCTTGTTCAACATGCTCGAAAGTTTGGTCTTAA
TGCTGCAGTTGCTACCAAAGTGGAGCACATTCCTG
GTGACAATGACTATATACTTGAGTTTTTTTTTACCTGTAA
GTATGAAGGGAAGCTCAGAACAACAACCTTTTGCTGGA
CAGTCTCTCGGGCACCATGCAGAGACTATGTCGGACTC
TGAAAACCTGTTTCAGATGCTGAATCAATTGACGGTACA

GAATTTGGATCTCGTAGTGTAGAAATGACAAATCTCCC
ACAGGCTACTGTATCCGTTGGAAGCTTTCATACGACATT
TCTTGATACTGACGTCAACTCTACTCGAAGTACCTTTTC
GAACATCTCCTCTAATAAAAGAAATGAAATGGCAGGTT
CTCAAGGCACTCTTCAGCAGGAAATTAGCGGAGCAAG
AAGATTAGAGAAGAAGAAAAGCAGTACAGAGAAGAAT
GTGAGCTTAAATGTTCTCCAACAATACTTCTCTGGGAG
CTTAAAGGATGCTGCAAAAAGCCTTGGTGTTTGTCCGA
CTACACTAAAAGGATATGTAGACAACACGGAATTATG
AGATGGCCATCTCGAAAGATTAACAAAGTGAATAGGTC
ACTAAGGAAAATACAGACGGTGCTTGACTCTGTCCAGG
GTGTAGAAGGAGGACTGAAGTTTGACTCGGTGACAGG
GGAATTTGTAGCAGTTGGCCCTTTTATACAAGAATTTGG
GACCCAAAAGAGTCTGTCTTCTCATGATGAAGATGCAC
TTGCAAGAAGCCAAGGTGATATGGATGAAGATGTGTCA
GTAGAGCCTTTGGAAGTTAAATCTCATGATGGTGGCGG
TGTCAAGTTGGAGGAGGATGTTGAAACAAACCACCA
GCGGGACCAGGATCCTTGAAGAAGCCATGGACTTGGAT
AAGCAAACAGTCTGGCTTGATCTATAGTGATGATACCG
ACATAGGAAAAAGAAGTGAAGAGGTAAACAAGGATAA
AGAAGACCTTTGTGTTTCGAAGGTGCTTGAGCTCTGTAG
CACTTGCAGGTGATGGAATGAATACAAGAATCGAGCGA
GGTAATGGAACTGTAGAACCAAACCACTCCATATCAAG
TAGCATGTCGGATTCATCAAATAGCTCAGGAGCAGTTTT

GCTGGGAAGTTCATCTGCTTCCTTGGAACAAAACACTGGA
 ACCAAATAAGAACTCATAACAATAGCGGTGAAAGCGGA
 TCAAGTTCAACACTAACCGTAAAAGCCACTTACAGAGA
 GGACACTGTACGTTTCAAGCTTGATCCATACGTTGTTG
 GGTGTTCTCAGCTCTACAGAGAAGTGGCTAAGCGTTTC
 AAGCTGCAAGAAGGTGCCTTTCAGTTGAAATACTTGGA
 TGATGAAGAAGAATGGGTGATGTTGGTCACAGATTCTG
 ATCTCCATGAATGCTTCGAGATATTAAATGGTATGAGAA
 AACATACAGTGAAGTTTCTGGTCCGTGATATACCGAAC
 ACCGCAATGGGAAGTTCCGCAGGCAGCAATGGTTACCT
 CGGAACAGGCACCTAA

【實施方式】

實行本發明之模式

I. 數個具體例的概觀

[0023] 在豆科中，植物與NFB之間的功能關連性係受到高度調控。分子調控系統阻止在氮存在下生長的植物形成結瘤。僅在限N條件且有NFB的存在下，共生性信號轉導途徑被激活而誘發植物中的結瘤發展。在Nod因子識別後，鈣振盪造成誘發初級轉錄因子NSP1與NSP2，其誘發NIN基因表現。共生性信號轉導途徑的一些組分在根瘤菌與叢枝菌根真菌關連性之間係共享。Oldroyd (2013)，見上文。然而且不像NSP2、NSP1與NIN基因係明確牽涉到與NFB之關連性。

[0024] 本案說明的是促進非結瘤植物物種與NFB之關

連性以增進N-養分的機制。在限N條件下，阿拉伯芥屬係與苜蓿中華根瘤菌有關連，NFB能夠提供作為植物養分的還原氮，在限N條件下有助於植物生長。本案具體例運用就非結瘤植物與苜蓿中華根瘤菌之間的功能關連性而言至關重要的首次辨識植物轉錄因子。吾人已發現到專對豆科:NFB關連性的轉錄因子的同源性基因就介導在非結瘤植物中由苜蓿中華根瘤菌所誘發的植物生長促進作用而言係必要的。在具體例中，跨植物物種間的關連性機制的保留係容許阿拉伯芥屬與苜蓿中華根瘤菌之間的關連性經由基因修飾在其他植物重現，以管理與NFB之有益N-養分交互作用，舉例來說，以加強耕作系統的氮使用效率。

[0025]如本案所述，阿拉伯芥屬係與苜蓿中華根瘤菌——與豆科紫花苜蓿有關連的細菌——有功能關連性。Marsh *et al.* (2007) *Plant Physiol.* 144:324; Peiter *et al.* (2007) *Plant Physiol.* 145:192。在自由生活條件且與豆科關連時，苜蓿中華根瘤菌僅在限N條件下實行N-固定。Szeto *et al.* (1987) *J. Bacteriol.* 169:1423。再如本案所述，苜蓿中華根瘤菌在限N條件下(譬如在沒有外加N-源的介質)係促進植物生長，於是適用於由於BNF的N-固定及植物生長促進。

II. 縮寫

BNF 生物固氮作用

N 氮

NFB 固氮菌

NLP NIN-樣蛋白

Nod 結瘤作用(因子)

NIN 結瘤起始(基因)

III. 術語

[0026]在以下說明與表格中，使用許多術語。爲了提供對說明書與請求項，包括此類術語所給定的範疇的清楚一致理解，提供了下列定義：

[0027]回交(Backcrossing)：回交方法可用於將核酸序列引進植物。回交技術已被廣泛使用了數十年，以將新穎性狀引進植物。Jensen, N., Ed. *Plant Breeding Methodology*, John Wiley & Sons, Inc., 1988。在典型回交流程中，感興趣的原始栽培品種(輪迴親代)係和攜帶欲轉移之感興趣基因的第二栽培品種(非輪迴親代)交配。從此交配得到的子代隨後和輪迴親代再次交配，重複該過程直到獲得植物爲止，其中—除了來自非輪迴親代的轉移基因以外—在該轉換植物中回收了輪迴植物的基本上全部所欲形態與生理特質。

[0028]單離的：“單離的”生物組分(例如核酸或蛋白)已從天然存在該組分的生物體細胞內的其他生物組分(即其他染色體與染色體外DNA與RNA、及蛋白)實質上分離、製造、或純化出來，同時引起組分的化學與功能變化(譬如核酸可藉由斷開核酸連接至染色體內其餘DNA的化學鍵而從染色體單離)。已“單離的”核酸分子與蛋白包括藉由標準純化方法純化的核酸分子與蛋白，其中核酸或蛋白中已有化學與功能變化。該術語亦包含在宿主細胞中藉由重組表現製備的核酸與蛋白，還有化學合成的核酸分子、蛋白、與

肽。

[0029]核酸分子：如本案所用，術語“核酸分子”可指稱核苷酸的聚合形式，可包括RNA、cDNA、基因組DNA的有義股與反義股，以及以上的合成形式與混合聚合物。核苷酸可指稱核糖核苷酸、去氧核糖核苷酸、或任一類核苷酸的修飾形式。本案使用的“核酸分子”係同義於“核酸”與“聚核苷酸”。核酸分子通常為至少10個鹼基長度，除非另有指明。術語包括DNA的單-與雙-股形式。核酸分子可包括藉由天然存在及/或非天然存在的核苷酸聯結而聯結在一起的天然存在與修飾核苷酸當中任一者或兩者。

[0030]核酸分子可藉由化學方式或生化方式修飾，或可含有非天然或衍化核苷酸鹼基，如熟習此藝者將輕易理解者。此類修飾包括，舉例來說，標記、甲基化、將天然存在核苷酸當中一或多者取代成類似物跨核苷酸修飾(譬如不帶電聯結：舉例來說，甲基磷酸酯、磷酸三酯、胺基磷酸酯、胺基甲酸酯等等；帶電聯結：舉例來說，硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等等；側基部分：舉例來說，肽；內嵌劑：舉例來說，吡啶、補骨脂素等等；螯合劑；烷化劑；以及修飾性聯結：舉例來說， α 端基異構核酸等等)。術語“核酸分子”亦包括任何拓撲構形，包括單-股、雙-股、部分地雙螺旋、三螺旋、髮夾型、環型、以及鎖型構形。

[0031]寡核苷酸：寡核苷酸為短的核酸分子。寡核苷酸可藉由裂解較長的核酸分段、或藉由聚合個別核苷酸前驅物形成。自動化合成儀允許合成高達數百個鹼基對長度的

寡核苷酸。因為寡核苷酸可結合至互補核苷酸序列，所以彼等可用作偵測DNA或RNA的探針。由DNA構成的寡核苷酸(寡聚去氧核糖核苷酸)可用於PCR，一種用於擴增小型DNA序列的技術。在PCR中，寡核苷酸通常稱作“引子”，其容許DNA聚合酶延長寡核苷酸並複製互補股。

[0032]核酸分子可包括藉由天然存在及/或非天然存在的核苷酸聯結而聯結在一起的天然存在與修飾核苷酸當中任一者或兩者。核酸分子可藉由化學方式或生化方式修飾，或可含有非天然或衍化核苷酸鹼基，如熟習此藝者將輕易理解者。此類修飾包括，舉例來說，標記、甲基化、將天然存在核苷酸當中一或多者取代成類似物跨-核苷酸修飾(譬如不帶電聯結：舉例來說，甲基磷酸酯、磷酸三酯、胺基磷酸酯、胺基甲酸酯等等；帶電聯結：舉例來說，硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等等；側基部分：舉例來說，肽；內嵌劑：舉例來說，吡啶、補骨脂素等等；螯合劑；烷化劑；以及修飾性聯結：舉例來說， α 端基異構核酸等等)。術語“核酸分子”亦包括任何拓撲構形，包括單-股、雙-股、部分地雙螺旋、三螺旋、髮夾型、環型、以及鎖型構形。

[0033]在本案針對DNA使用時，術語“編碼序列”係指稱在置於適當調控序列控制時轉錄成RNA的核苷酸序列。“蛋白質編碼序列”為經由轉錄與mRNA而最終轉譯成多肽的核苷酸序列(DNA或RNA)。就RNA而言，術語“編碼序列”係指稱轉譯成肽、多肽、或蛋白的核苷酸序列。編碼序列的邊界係由5'-端轉譯起始密碼子與3'-端轉譯停止密碼子決定。

編碼序列包括但不限於：基因組DNA；cDNA；EST；與重組核苷酸序列。

[0034] 基因組：如本案所用，術語“基因組”係指稱在細胞核內發現的染色體DNA，亦係指稱在細胞的亞細胞組分內發現的胞器DNA。在本發明一些具體例中，DNA分子可被引進植物細胞，俾使DNA分子嵌入植物細胞的基因組。在該等與另外具體例中，DNA分子可嵌入植物細胞的細胞核DNA，或嵌入植物細胞的葉綠體或粒線體DNA。

[0035] 內源性：應用至本案核酸(譬如聚核苷酸、DNA、RNA、與基因)的術語“內源性”係指稱慣常(譬如在相同種類與物種的野生型細胞)出現在彼等特異性環境或背景內的一或多個(複數個)核酸。舉例來說，內源性基因為在論述的特定細胞且於相同背景(譬如關於調控序列)所慣常找到的基因。內源性核酸可和外源性及/或異源性區別—舉例而不限於一藉由偵測隨著細菌質體重組而得到的後者序列；識別非典型密碼子偏好性；以及在PCR反應中擴增從野生型細胞定徵的引子的非典型序列。

[0036] 外源性：應用至本案核酸的術語“外源性”係指稱非慣常出現在彼等特異性環境或背景內的一或多個(複數個)核酸。舉例來說，假使宿主細胞被天然不存在於未轉形宿主細胞的核酸轉形，則該核酸對宿主細胞而言為外源性。術語外源性一如本案所用—亦係指稱和已存在於宿主細胞內的核酸序列一致、但位於和已存在於宿主細胞內具相同序列的核酸不同的細胞或基因組背景的一或多個(複數個)

核酸。舉例來說，嵌入和具相同序列的核酸慣常嵌入宿主細胞基因組的宿主細胞基因組不同位置的核酸對宿主細胞而言為外源性。再者，當具相同序列的核酸慣常僅存在於宿主細胞基因組時，存在於宿主細胞質體或載體的核酸(譬如DNA分子)對宿主細胞而言為外源性。

[0037] 異源性：應用至本案核酸(譬如聚核苷酸、DNA、RNA、與基因)的術語“異源性”意指具不同來源。舉例來說，假使宿主細胞被天然不存在於未轉形宿主細胞的核酸轉形，則該核酸對宿主細胞而言為異源性(及外源性)。再者，轉形核酸的不同元件(譬如促進子、增強子、編碼序列、終止子等等)對另一者其他及/或對轉形宿主而言可為異源性。術語異源性一如本案所用一亦應用至和已存在於宿主細胞內的核酸序列一致、但現在聯結至不同額外序列及/或以不同複本數存在等等的一或多個(複數個)核酸。

[0038] 序列一致性：本案針對兩個核酸或多肽序列使用的術語“序列一致性”或“一致性”可指稱一當在特定比對窗口以最大對應性對齊時一兩序列內的相同殘基。

[0039] 如本案所用，術語“序列一致性百分比”可指稱在比對窗口比對兩個最佳化對齊序列(譬如核酸序列、與胺基酸序列)所決定的值，其中在相比於參考序列(其不包含添加或刪除)以供兩個序列的最佳化對齊時，在比對窗口的序列部分可包含添加或刪除(即空隙)。百分比係藉由下列計算：決定兩序列中存在一致性核苷酸或胺基酸殘基的位置數目以生成配對位置數目、將配對位置數目除以比對窗口中的

全部位置數目、並將結果乘以100以生成序列一致性百分比。

[0040]對齊序列以供比對的方法在本領域係眾所周知。各式程式與對齊演算法係說明於，舉例來說：Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482; Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443; Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444; Higgins and Sharp (1988) *Gene* 73:237-44; Higgins and Sharp (1989) *CABIOS* 5:151-3; Corpet *et al.* (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10881-90; Huang *et al.* (1992) *Comp. Appl. Biosci.* 8:155-65; Pearson *et al.* (1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-31; Tatiana *et al.* (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-50。序列對齊方法與同源性計算的詳細考量可在譬如Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10找到。

[0041]國家生技資訊中心(NCBI)鹼基局部對齊搜尋工具(BLAST™; Altschul *et al.* (1990))可得自數個來源，包括國家生技資訊中心(Bethesda, MD)、與網路上，以連同數個序列分析程式使用。使用此程式如何決定序列一致性的說明可在網路上於BLAST™的“幫助(help)”章節取得。就核酸序列比對而言，可使用預設參數運用BLAST™ (Blastn)程式的“比對雙序列(Blast 2 sequences)”功能。對參考序列具甚至更大相似度的核酸序列在藉此方法評估時將顯示增多之一致性百分比。

[0042]特異性地雜交/特異性地互補：如本案所用，術

語“特異性地雜交”與“特異性地互補”為指出足夠互補程度，俾使核酸分子與標靶核酸分子之間發生穩定的特異性結合的術語。兩核酸分子之間的雜交係涉及在兩核酸分子的核酸序列之間形成反向平行對齊。該兩分子隨後能夠和相對股上的對應鹼基形成氫鍵，而形成使用本領域眾所周知的方法可偵測到的雙螺旋分子，假使該分子足夠穩定。核酸分子不必100%互補於欲特異性地雜交之標靶序列。然而，必須存在以使雜交具特異性的序列互補性份量係為所使用雜交條件的函數。

[0043]產生特定嚴苛度的雜交條件將取決於挑選的雜交方法本質和雜交核酸序列的組成物與長度而有所不同。一般而言，雜交溫度與雜交緩衝液的離子強度(尤其是 Na^+ 及/或 Mg^{++} 濃度)將決定雜交嚴苛性，儘管洗滌時間亦影響嚴苛性。關於實現特定嚴苛度所必需的雜交條件的計算係熟習此藝者所習知的，並在舉例來說Sambrook *et al.* (ed.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, chapters 9 and 11；與Hames and Higgins (eds.) *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, 1985中有討論。關於核酸雜交的進一步詳細說明與指導可在，舉例來說，Tijssen, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays,” in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology- Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Part I, Chapter 2, Elsevier, NY, 1993；與

Ausubel *et al.*, Eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2, Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY, 1995中找到。

[0044]如本案所用，“嚴苛條件”係涵蓋雜交僅會一在假使雜交分子與標靶核酸分子內的同源性序列之間有少於20%未配對一發生的條件。“嚴苛條件”包括另外的特別嚴苛性位準。於是，如本案所用，“中度嚴苛性”條件為該等具多於20%序列未配對之分子將不會雜交的條件；“高度嚴苛性”條件為該等具多於10%未配對之序列將不會雜交的條件；以及“極高度嚴苛性”條件為該等具多於5%未配對之序列將不會雜交的條件。

[0045]下列為代表性、非設限雜交條件。

[0046]高度嚴苛條件(偵測共享至少90%序列一致性的序列)：在5x SSC緩衝液於65°C雜交16小時；在2x SSC緩衝液於室溫洗滌兩次，各為15分鐘；以及在0.5x SSC緩衝液於65°C洗滌兩次，各為20分鐘。

[0047]中度嚴苛條件(偵測共享至少80%序列一致性的序列)：在5x-6x SSC緩衝液於65-70°C雜交16-20小時；在2x SSC緩衝液於室溫洗滌兩次，各為5-20分鐘；以及在1x SSC緩衝液於55-70°C洗滌兩次，各為30分鐘。

[0048]非嚴苛控制條件(共享至少50%序列一致性的序列將會雜交)：在6x SSC緩衝液於室溫至55°C雜交16-20小時；在2x-3x SSC緩衝液於室溫至55°C洗滌至少兩次，各為20-30分鐘。

[0049]如本案所用，就聚核苷酸而言的術語“實質上同源”或“實質同源性”係指稱在嚴苛條件下雜交至參考核酸序列的聚核苷酸。舉例來說，實質上同源於參考DNA編碼序列的聚核苷酸為該等在嚴苛條件下(譬如列舉的中度嚴苛條件，見上文)雜交至參考DNA編碼序列的聚核苷酸。實質上同源性序列可具有至少80%序列一致性。舉例來說，實質上同源性序列可具有約80%至100%序列一致性，例如約81%；約82%；約83%；約84%；約85%；約86%；約87%；約88%；約89%；約90%；約91%；約92%；約93%；約94%；約95%；約96%；約97%；約98%；約98.5%；約99%；約99.5%；及約100%。實質同源性的特性係與特異性雜交密切相關。舉例來說，核酸分子係在有足夠互補程度時特異性地雜交，以避免在特異性結合係為所欲的條件下，舉例來說，在嚴苛雜交條件下，核酸非特異性結合至非標靶序列。

[0050]如本案所用，術語“異種同源物”係指稱二或多個物種內從共同祖先核苷酸序列演化並在該二或多個物種內可保留相同功能的基因。

[0051]如本案所用，當序列每一個核苷酸以5'至3'方向讀取時係互補於另一序列中的每一個核苷酸以3'至5'方向讀取時，兩個核酸序列分子被稱為展現“完全互補性”。互補於參考核苷酸序列的核苷酸序列將展現和參考核苷酸序列的反向互補序列一致的序列。該等術語與說明在本領域中係明確定義且為熟習此藝者所容易理解的。

[0052]如本案所用，術語“實質上一致”可指稱多於85%

一致的核苷酸序列。舉例來說，實質上一致的核苷酸序列可與參考序列至少85.5%；至少86%；至少87%；至少88%；至少89%；至少90%；至少91%；至少92%；至少93%；至少94%；至少95%；至少96%；至少97%；至少98%；至少99%；或至少99.5%一致。

[0053]表現：如本案所用，編碼序列(舉例來說，基因或轉殖基因)的“表現”係指稱核酸轉錄單元的編碼資訊(包括譬如基因組DNA或cDNA)轉換成細胞的操作、非操作、或結構部分(譬如蛋白質)的過程。基因表現可受到外在信號影響；舉例來說，使細胞、組織、或生物體暴露至增加或減少本案所包含之基因表現的藥劑。基因表現亦可在DNA至RNA至蛋白之途徑中的任何地方受到調控。基因表現的調控可經由下列發生，舉例來說，經由作用在轉錄、轉譯、RNA運送與加工、諸如mRNA之中介分子的降解的控制、及/或經由特定蛋白分子製成後的活化、失活、分室、或降解，或藉由前述任意組合。基因表現可藉由本領域習知方法於RNA位準或蛋白位準測量，該等方法包括而不限於北方墨點法、RT-PCR、西方墨點法、與(多個)體外、原位、或體內蛋白活性試驗。

[0054]增加表現：如本案所用，術語“增加表現”係指稱啓始表現，也指稱模板構築體所製造的表現產物份量的數量增加。在一些具體例中，可提供至少一異源性基因至以其他方式包含相同基因之內源性複本的細胞或生物體，從而增加該基因所編碼的多肽的表現。在此類具體例中，表

現的增加可藉由比對包含異源性與內源性基因的細胞所製造的多肽份量和僅包含內源性基因細胞所製造的份量來測定。在一些具體例中，可提供影響轉錄的第一多肽(譬如NSP1-樣及/或NSP2-樣)至細胞或生物體，從而增加受到第一多肽控制的基因所編碼的第二多肽的表現。在此類具體例中，表現的增加可藉由比對在第一多肽存在下由該基因製造的多肽份量和無第一多肽存在下由該基因製造的份量來測定。在一些具體例中，調控序列可操作性地聯結至基因，從而增加基因的表現。在此類具體例中，表現的增加可藉由比對在調控序列操作性地聯結至基因之後由該基因所製造的多肽份量和操作性聯結或引進調控序列之前由該基因所製造的份量來測定。

[0055] 操作性地聯結：當第一核酸序列係與第二核酸序列呈功能性關聯時，第一核苷酸序列係和第二核酸序列操作性地聯結。當重組地製造時，以及，在有必要接合在相同讀取框(譬如在多順反子ORF)的兩蛋白-編碼區域時，操作性地聯結的核酸序列一般係相鄰。然而，核酸不需相鄰以操作性地聯結。

[0056] 在提及調控序列與編碼序列所使用的術語“操作性地聯結”意指調控序列影響所聯結編碼序列的表現。“調控序列”或“控制元”係指稱影響轉錄時點與位準/份量、RNA加工或穩定性、或相連編碼序列轉譯的核苷酸序列。調控序列可包括促進子；轉譯前導序列；內含子；增強子；主幹-迴圈結構；抑制子結合序列；終止序列；聚腺苷酸化識

別序列；等等。特別調控序列可位於操作性地聯結至彼等的編碼序列上游及/或下游。又，操作性地聯結至編碼序列的特別調控序列可位於雙股核酸分子的相連互補股上。

[0057] 促進子：如本案所用，術語“促進子”係指稱可在轉錄起點上游且可涉及啓始轉錄的RNA聚合酶與其他蛋白之識別與結合的DNA區域。促進子可操作性地聯結至編碼序列以在細胞中表現、或促進子可操作性地聯結至編碼信號序列的核苷酸序列，該信號序列可操作性地聯結至編碼序列以在細胞中表現。

[0058] 本案一些具體例包括“植物促進子”。植物促進子為能夠在植物細胞內啓始轉錄的促進子。

[0059] 本案一些具體例包括“組織-偏好性促進子”。組織-偏好性促進子為能夠在發展控制之下啓始轉錄的促進子，包括，舉例而不限於：偏好啓始葉、花粉、穗、根、種籽、纖維、木質部導管、管胞、和厚壁組織的轉錄的促進子。基本上僅在某些組織啓始轉錄的促進子係稱作“組織-特異性”。“細胞類型-特異性”促進子主要驅動在一或多個器官中的某些細胞類型的表現，舉例來說，根或葉中的維管束細胞。“可誘發”促進子可為可受到環境控制的促進子。藉由可誘發促進子可啓始轉錄的環境條件例子包括厭氧條件與光照。組織-特異性、組織-偏好性、細胞類型-特異性、及可誘發進子構成“非-組成促進子類別”。

[0060] 任何可誘發促進子可用於本案一些具體例。參閱 Ward *et al.* (1993) *Plant Mol. Biol.* 22:361-366。藉由可誘發

促進子，回應誘發劑的轉錄速率增加了。例示的可誘發促進子包括但不限於：回應銅的來自ACEI系統的促進子；回應苯磺醯胺除草劑安全劑的來自玉米的*In2*基因；來自Tn10的Tet抑制子；與來自類固醇激素基因的可誘發促進子，其轉錄活性可被糖皮質類固醇激素誘發(Schena *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10421-5)。

[0061]與非組成促進子相反，“組成”促進子為在大部分環境條件下活躍的促進子。例示的組成促進子包括但不限於：來自植物病毒的促進子，例如來自CaMV的35S促進子；來自水稻肌動蛋白的促進子；泛素促進子；pEMU；MAS；玉米H3組蛋白促進子；與ALS促進子，Xba1/NcoI分段5'至油菜ALS3結構基因(或類似於該Xba1/NcoI分段的核苷酸序列)(PCT國際專利公開案號 WO 96/30530)。

[0062]此外，任何組織-特異性或組織-偏好性促進子可利用在本發明的一些具體例。以包含操作性地聯結至組織特異性促進子之編碼序列的核酸分子轉形的植物可在特定組織中專一地、或偏好地製造所編碼序列的產物。例示的組織-特異性或組織-偏好性促進子包括但不限於：根部-偏好性促進子，例如來自菜豆基因者；葉特異性與光誘發促進子，例如來自*cab*或*rubisco*者；花粉囊特異性促進子，例如來自*LAT52*者；花粉特異性促進子，例如來自*Zm13*者；以及小孢子偏好性促進子，例如來自*apg*者。

[0063]保守性取代：如本案所用，術語“保守性取代”係指稱胺基酸殘基被相同類別之其他胺基酸取代的取代作

用。非保守性胺基酸取代為殘基不落於相同類別的取代作用，舉例來說，鹼性胺基酸被中性或非極性胺基酸取代。可為實行保守性取代目的所定義的胺基酸類別為本領域所習知者。

[0064] 在一些具體例中，保守性取代包括第一脂族胺基酸被第二不同的脂族胺基酸取代。舉例來說，假使第一胺基酸為Gly；Ala；Pro；Ile；Leu；Val；與Met當中一者，則第一胺基酸可置換成選自Gly；Ala；Pro；Ile；Leu；Val；與Met的第二不同胺基酸。在特定例子中，假使第一胺基酸為Gly；Ala；Pro；Ile；Leu；與Val當中一者，則第一胺基酸可置換成選自Gly；Ala；Pro；Ile；Leu；與Val的第二不同胺基酸。在涉及取代疏水性脂族胺基酸的特定例子中，假使第一胺基酸為Ala；Pro；Ile；Leu；與Val當中一者，則第一胺基酸可置換成選自Ala；Pro；Ile；Leu；與Val的第二不同胺基酸。

[0065] 在其他具體例中，保守性取代包括第一芳香族胺基酸被第二、不同的芳香族胺基酸取代。舉例來說，假使第一胺基酸為His；Phe；Trp；與Tyr當中一者，則第一胺基酸可置換成選自His；Phe；Trp；與Tyr的第二不同胺基酸。在涉及取代不帶電芳香族胺基酸的特定例子中，假使第一胺基酸為Phe；Trp；與Tyr當中一者，則第一胺基酸可置換成選自Phe；Trp；與Tyr的第二不同胺基酸。

[0066] 在替換具體例中，保守性取代包括第一疏水性胺基酸被第二、不同的疏水性胺基酸取代。舉例來說，假使

第一胺基酸為Ala；Val；Ile；Leu；Met；Phe；Tyr；與Trp當中一者，則第一胺基酸可置換成選自Ala；Val；Ile；Leu；Met；Phe；Tyr；與Trp的第二不同胺基酸。在涉及取代非芳香族疏水性胺基酸的特定例子中，假使第一胺基酸為Ala；Val；Ile；Leu；與Met當中一者，則第一胺基酸可置換成選自Ala；Val；Ile；Leu；與Met的第二不同胺基酸。

[0067] 在一些具體例中，保守性取代包括第一極性胺基酸被第二不同的極性胺基酸取代。舉例來說，假使第一胺基酸為Ser；Thr；Asn；Gln；Cys；Gly；Pro；Arg；His；Lys；Asp；與Glu當中一者，則第一胺基酸可置換成選自Ser；Thr；Asn；Gln；Cys；Gly；Pro；Arg；His；Lys；Asp；與Glu的第二不同胺基酸。在涉及取代不帶電極性胺基酸的特定例子中，假使第一胺基酸為Ser；Thr；Asn；Gln；Cys；Gly；與Pro當中一者，則第一胺基酸可置換成選自Ser；Thr；Asn；Gln；Cys；Gly；與Pro的第二不同胺基酸。在涉及取代帶電極性胺基酸的特定例子中，假使第一胺基酸為His；Arg；Lys；Asp；與Glu當中一者，則第一胺基酸可置換成選自His；Arg；Lys；Asp；與Glu的第二不同胺基酸。在涉及取代帶電極性胺基酸的另外例子中，假使第一胺基酸為Arg；Lys；Asp；與Glu當中一者，則第一胺基酸可置換成選自Arg；Lys；Asp；與Glu的第二不同胺基酸。在涉及取代帶正電(鹼性)極性胺基酸的特定例子中，假使第一胺基酸為His；Arg；與Lys當中一者，第一胺基酸可置換成選自His；Arg；與Lys的第二不同胺基酸。在涉及取代帶正電極性胺

基酸的另外例子中，假使第一胺基酸為Arg或Lys，則第一胺基酸可置換成Arg與Lys當中的另一胺基酸。在涉及取代帶負電(酸性)極性胺基酸的特定例子中，假使第一胺基酸為Asp或Glu，則第一胺基酸可置換成Asp與Glu當中的另一胺基酸。

[0068]在額外具體例中，保守性取代包括第一電中性胺基酸被第二不同電中性胺基酸取代。舉例來說，假使第一胺基酸為Gly；Ser；Thr；Cys；Asn；Gln；與Tyr當中一者，則第一胺基酸可置換成選自Gly；Ser；Thr；Cys；Asn；Gln；與Tyr的第二不同胺基酸。

[0069]在一些具體例中，保守性取代包括第一非極性胺基酸被第二不同非極性胺基酸取代。舉例來說，假使第一胺基酸為Ala；Val；Leu；Ile；Phe；Trp；Pro；與Met當中一者，則第一胺基酸可置換成選自Ala；Val；Leu；Ile；Phe；Trp；Pro；與Met的第二不同胺基酸。

[0070]在眾多例子中，欲用於保守性取代以置換第一胺基酸的特定第二胺基酸可爲了使第一與第二胺基酸均隸屬之前述類別數量最大化來進行選擇。於是，假使第一胺基酸爲Ser(極性、非芳香族及電中性胺基酸)，則第二胺基酸可爲另一極性胺基酸(即Thr；Asn；Gln；Cys；Gly；Pro；Arg；His；Lys；Asp；或Glu)；另一非芳香族胺基酸(即Thr；Asn；Gln；Cys；Gly；Pro；Arg；His；Lys；Asp；Glu；Ala；Ile；Leu；Val；或Met)；或另一電中性胺基酸(即Gly；Thr；Cys；Asn；Gln；或Tyr)。然而，較佳的是第二胺基

酸在此情況中可為Thr；Asn；Gln；Cys；與Gly當中一者，因為該等胺基酸共享根據極性、非芳香性及電中性的所有類別。在選擇欲用於保守性取代的特別第二胺基酸時可任擇地使用的附加要點為本領域所習知的。舉例來說，當Thr；Asn；Gln；Cys；與Gly皆可用於保守性取代Ser時，Cys可從選擇中排除，以避免形成非所欲的交叉聯結及/或雙硫鍵。同樣地，Gly可從選擇中排除，因為其缺少烷基側鏈。在此情況中，可選擇Thr，譬如以保留側鏈羥基的官能性。然而，欲用於保守性取代的特定第二胺基酸的選擇最終係依照熟練技術人員的判斷。

[0071]限氮條件：如本案所用，術語“限氮條件”係指稱在土壤或培養基中的氮源(譬如硝酸鹽和銨鹽)份量有限的條件。“有限”份量在一些例子中為介在0.0至0.2 mM；譬如0至0.1 mM、0至0.03 mM、及0至0.05 mM之氮濃度的範圍。

[0072]性狀或表型：術語“性狀”與“表型”在本案係交替使用。就本揭示內容目的而言，特別感興趣的性狀包括，舉例來說，作物植物可表現的農藝上重要的性狀。

[0073]轉形：如本案所用，術語“轉形”係指稱轉移一或多個(複數個)核酸分子進入細胞。當核酸分子變成穩定被細胞複製時，無論藉由核酸分子併入細胞基因組、或藉由游離基因複製，則細胞被引進細胞的核酸分子“轉形”。如本案所用，術語“轉形”涵蓋可藉以將核酸分子引進此類細胞的所有技術。例子包括但不限於：以病毒載體轉染；以質體載體轉形；電穿孔(Fromm *et al.* (1986) *Nature* 319:791-3)；

脂質轉染(Felgner *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7); 顯微注射(Mueller *et al.* (1978) Cell 15:579 85); 農桿菌-介導的轉移(Fraley *et al.* (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-7); 直接DNA攝取; 以及微彈轟擊(Klein *et al.* (1987) Nature 327:70)。

[0074] 轉殖基因：轉殖基因為外源性核酸序列。在一些例子中，轉殖基因可為包含與標靶核酸互補的核苷酸序列的dsRNA分子之一或雙(多)股的序列。在一些例子中，轉殖基因可為反義核酸序列，其表現抑制標靶核酸的表現。在再其他例子中，轉殖基因可為基因序列(譬如抗除草劑基因)、編碼工業上或藥學上有用化合物的基因、或編碼所欲農業性狀的基因。在該等與其他例子中，轉殖基因可含有操作性地聯結至轉殖基因的編碼序列的調控序列(譬如促進子)。

[0075] 載體：載體係指稱引進細胞一舉例來說一以製造轉形細胞的核酸分子。載體可包括允許其在宿主細胞內複製的核酸序列，例如複製起點。載體的例子包括但不限於：攜帶外源性DNA進入細胞的質體；黏接質體；噬菌體；與病毒。載體亦可包括本領域習知的一或多個基因、反義分子、及/或可擇標記基因及其他遺傳元。載體可轉導、轉形、或轉染細胞，藉此致使細胞表現該載體所編碼的核酸分子及/或蛋白。載體任擇地包括幫助實現核酸分子進入細胞(譬如脂質體、蛋白質外衣等等)的材料。

[0076] 除非明確指示或暗示，術語“一(a)”、“一(an)”、

與“該(the)”在本案係用於象徵“至少一個”。

[0077]除非另有明確解釋，否則本案使用的所有技術性與科學性術語係具有本揭示內容所屬領域中具有通常技藝者所一般理解的相同意義。分子生物學中的常用術語定義可在，舉例來說，Lewin B., *Genes V*, Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); 與Meyers R.A. (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8) 找到。所有百分比係指重量且所有溶劑混合物比例係指體積，除非另有註記。所有溫度為攝氏度。

IV. 非結瘤植物的BNF基因

[0078]本揭示內容提供開發轉錄因子—NSP1-樣與NSP2-樣、及NIN-樣基因(譬如NLPs1-9)—的新穎且非預期用途的組成物與方法。如本案所揭示，NSP1-樣、NLP4、及NLP9影響植物(譬如非結瘤植物，例如阿拉伯芥屬)與NFB(譬如苜蓿中華根瘤菌，例如RMP110)之間的功能性交互作用。於是，舉例來說，NSP1-樣、NLP4、及/或NLP9可用於調控NFB與作物植物的關連性。本案所述NSP1-樣、NLP4、及NLP9的特性可用於，舉例來說，提供具經調整BNF表型的基因轉殖植物。舉例來說，NSP1-樣(SCL29)、NLP4、及/或NLP9可在植物中表現或過度表現，以啓始及/或增加植物在限N條件下與NFB關連的能力，及/或增加植

物利用環境中的氮的效率。在某些例子中，NSP1-樣(SCL29)、NLP4、及/或NLP9可引進植物或在慣常包含該多肽的植物中過度表現(譬如藉由引進編碼該多肽之基因的額外複本、及/或改變慣常存在基因的調控控制)。

[0079]一些具體例包括NSP1-樣轉錄因子多肽。根據特別具體例的NSP1-樣多肽包含在和SEQ ID NO:1 (阿拉伯芥NSP1-樣)對齊時顯示增多百分比一致性的胺基酸序列。在該等與其他具體例中的特定胺基酸序列可包含具有和SEQ ID NO:1，舉例來說，呈至少約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%一致性的序列。

[0080]其他具體例包括NIN-樣蛋白多肽。特別具體例包括NLP4多肽、及/或NLP9多肽。

[0081]根據一些例子的NLP4多肽包含在和SEQ ID NO:2 (阿拉伯芥NLP4)對齊時顯示增多百分比一致性的胺基酸序列。在該等與其他具體例中的特定胺基酸序列可包含具有和SEQ ID NO:2，舉例來說，呈至少約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%一致性的序列。舉例來說，一些具體例包括AtNLP4異種同源物。

[0082]根據一些例子的NLP9多肽包含在和SEQ ID NO:3 (阿拉伯芥NLP9)對齊時顯示增多百分比一致性的胺基酸序列。在該等與其他具體例中的特定胺基酸序列可包含具有和SEQ ID NO:9, 舉例來說, 呈至少約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%一致性的序列。舉例來說, 一些具體例包括AtNLP9異種同源物。

[0083]在一些具體例中, 包含具有和SEQ ID NO:1 (NSP1-樣多肽)或SEQ ID NO:2 (NLP4多肽)及/或SEQ ID NO:3 (NLP9多肽)對齊時的前述序列一致性之胺基酸序列的多肽係包含在就包含該蛋白的植物與NFB之關連性而言為必要的蛋白以內。NSP1-樣多肽可藉由, 舉例來說, 在序列資料庫搜尋和SEQ ID NO:1具有臨界序列一致性的多肽序列來辨識。NLP4多肽可藉由, 舉例來說, 在序列資料庫搜尋和SEQ ID NO:2具有某些序列一致性的多肽序列來辨識。NLP9多肽多肽可藉由, 舉例來說, 在序列資料庫搜尋和SEQ ID NO:3具有某些序列一致性的多肽序列來辨識。有用的序列資料庫可藉由熟習此藝者習知的任意眾多方法(譬如利用NCBI的BLAST[®]工具)來搜尋。經由各種公共和私人商業來源, 可取得眾多植物與其他生物體的其他資料庫。熟習此藝者將瞭解到的是, NLP4與NLP9為同源性蛋白, 於是, 一被辨識包含與SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3共享序列

一致性之胺基酸序列的特定多肽亦可與SEQ ID NOs:2與4當中的另一者共享序列一致性。

[0084]其他具體例包括NSP1-樣多肽的結構性等效物及/或NLP4多肽及/或NLP9多肽的結構性等效物。結構性等效物包括但不限於本案NSP1-樣、NLP4、及NLP9多肽的胺基酸序列內的胺基酸殘基的保守性取代。如本案所用，“保守性取代”為胺基酸殘基被相同類別的其他胺基酸取代的取代作用。非保守性胺基酸取代為殘基不落於相同類別的取代作用，舉例來說，鹼性胺基酸被中性或非極性胺基酸取代。可為實行保守性取代目的所定義的胺基酸類別為本領域所習知者。

[0085]在替換具體例中，保守性取代包括第一脂族胺基酸被第二不同的脂族胺基酸取代。舉例來說，假使第一胺基酸為Gly；Ala；Pro；Ile；Leu；Val；與Met當中一者，則第一胺基酸可置換成選自Gly；Ala；Pro；Ile；Leu；Val；與Met的第二不同胺基酸。在特定例子中，假使第一胺基酸為Gly；Ala；Pro；Ile；Leu；與Val當中一者，則第一胺基酸可置換成選自Gly；Ala；Pro；Ile；Leu；與Val的第二不同胺基酸。在涉及取代疏水性脂族胺基酸的特定例子中，假使第一胺基酸為Ala；Pro；Ile；Leu；與Val當中一者，則第一胺基酸可置換成選自Ala；Pro；Ile；Leu；與Val的第二不同胺基酸。

[0086]在其他具體例中，保守性取代包括第一芳香族胺基酸被第二不同的芳香族胺基酸取代。舉例來說，假使第

一胺基酸為His；Phe；Trp；與Tyr當中一者，則第一胺基酸可置換成選自His；Phe；Trp；與Tyr的第二不同胺基酸。在涉及取代不帶電芳香族胺基酸的特定例子中，假使第一胺基酸為Phe；Trp；與Tyr當中一者，則第一胺基酸可置換成選自Phe；Trp；與Tyr的第二不同胺基酸。

[0087]在一些具體例中，保守性取代包括第一疏水性胺基酸被第二不同的疏水性胺基酸取代。舉例來說，假使第一胺基酸為Ala；Val；Ile；Leu；Met；Phe；Tyr；與Trp當中一者，則第一胺基酸可置換成選自Ala；Val；Ile；Leu；Met；Phe；Tyr；與Trp的第二不同胺基酸。在涉及取代非芳香族疏水性胺基酸的特定例子中，假使第一胺基酸為Ala；Val；Ile；Leu；與Met當中一者，則第一胺基酸可置換成選自Ala；Val；Ile；Leu；與Met的第二不同胺基酸。

[0088]在額外的具體例中，保守性取代包括將第一極性胺基酸取代成第二不同極性胺基酸。舉例來說，假使第一胺基酸為Ser；Thr；Asn；Gln；Cys；Gly；Pro；Arg；His；Lys；Asp；與Glu當中一者，則第一胺基酸可置換成選自Ser；Thr；Asn；Gln；Cys；Gly；Pro；Arg；His；Lys；Asp；與Glu的第二不同胺基酸。在涉及取代不帶電極性胺基酸的特定例子中，假使第一胺基酸為Ser；Thr；Asn；Gln；Cys；Gly；與Pro當中一者，則第一胺基酸可置換成選自Ser；Thr；Asn；Gln；Cys；Gly；與Pro的第二不同胺基酸。在涉及取代帶電極性胺基酸的特定例子中，假使第一胺基酸為His；Arg；Lys；Asp；與Glu當中一者，則第一胺基酸可置換成

選自 His ; Arg ; Lys ; Asp ; 與 Glu 的第二不同胺基酸。在涉及取代帶電極性胺基酸的另外例子中，假使第一胺基酸為 Arg ; Lys ; Asp ; 與 Glu 當中一者，則第一胺基酸可置換成選自 Arg ; Lys ; Asp ; 與 Glu 的第二不同胺基酸。在涉及取代帶正電(鹼性)極性胺基酸的特定例子中，假使第一胺基酸為 His ; Arg ; 與 Lys 當中一者，則第一胺基酸可置換成選自 His ; Arg ; 與 Lys 的第二不同胺基酸。在涉及取代帶正電極性胺基酸的另外例子中，假使第一胺基酸為 Arg 或 Lys ，則第一胺基酸可置換成 Arg 與 Lys 當中的另一胺基酸。在涉及取代帶負電(酸性)極性胺基酸的特定例子中，假使第一胺基酸為 Asp 或 Glu ，第一胺基酸可置換成 Asp 與 Glu 當中的另一胺基酸。

[0089] 在一些具體例中，保守性取代包括第一電中性胺基酸被第二不同電中性胺基酸取代。舉例來說，假使第一胺基酸為 Gly ; Ser ; Thr ; Cys ; Asn ; Gln ; 與 Tyr 當中一者，則第一胺基酸可置換成選自 Gly ; Ser ; Thr ; Cys ; Asn ; Gln ; 與 Tyr 的第二不同胺基酸。

[0090] 在另外的具體例中，保守性取代包括第一非極性胺基酸被第二不同非極性胺基酸。舉例來說，假使第一胺基酸為 Ala ; Val ; Leu ; Ile ; Phe ; Trp ; Pro ; 與 Met 當中一者，則第一胺基酸可置換成選自 Ala ; Val ; Leu ; Ile ; Phe ; Trp ; Pro ; 與 Met 的第二不同胺基酸。

[0091] 在眾多例子中，欲用於保守性取代以置換第一胺基酸的特定第二胺基酸可為了使第一與第二胺基酸均隸屬

之前述類別數量最大化來進行選擇。於是，假使第一胺基酸為Ser (極性、非芳香族及電中性胺基酸)，則第二胺基酸可為另一極性胺基酸(即Thr ; Asn ; Gln ; Cys ; Gly ; Pro ; Arg ; His ; Lys ; Asp ; 或Glu)；其他非芳香族胺基酸(即Thr ; Asn ; Gln ; Cys ; Gly ; Pro ; Arg ; His ; Lys ; Asp ; Glu ; Ala ; Ile ; Leu ; Val ; 或Met)；或另一電中性胺基酸(即Gly ; Thr ; Cys ; Asn ; Gln ; 或Tyr)。然而，然而，較佳的是第二胺基酸在此情況中可為Thr ; Asn ; Gln ; Cys ; 與Gly當中一者，因為該等胺基酸共享根據極性、非芳香性及電中性的所有類別。在選擇欲用於保守性取代的特別第二胺基酸時可任擇地使用的附加要件為本領域所習知的。舉例來說，當Thr ; Asn ; Gln ; Cys ; 與Gly皆可用於保守性取代Ser時，Cys可從選擇中排除，以避免形成非所欲的交叉聯結及/或雙硫鍵。同樣地，Gly可從選擇中排除，因為其缺少烷基側鏈。在此情況中，可選擇Thr，譬如以保留側鏈羥基的官能性。然而，欲用於保守性取代的特定第二胺基酸的選擇最終係依照熟練技術人員的判斷。

[0092]可對植物NSP1-樣、NLP4、與NLP9編碼聚核苷酸執行其他突變，以生成更適用於，舉例來說，在包含該(多個)聚核苷酸的宿主細胞中表現與擴大規模的表現產物。舉例來說，半胱胺酸殘基可被刪除或被其他胺基酸取代，以排除雙硫橋鍵；N-聯結糖基化位點可經更動或消除，以實現，舉例來說，表現從習知過度糖基化N-聯結位點的酵母宿主更容易回收與純化的均質產物。為此，在細胞外區域

(ECD)發生於任何一或多個糖基化識別序列的第一或第三胺基酸位置當中一或兩者的各式各樣胺基酸取代(N-X-S或N-X-T)、及/或在ECD於任何一或多個此類識別序列第二位置的胺基酸刪除將阻止經修飾三肽序列之突變多肽的糖基化。

[0093]親水性胺基酸一般包括且一般具有下列個別相對疏水度(於pH 7.0；kcal/mol)：天門冬胺酸(D)，-7.4；麩胺酸(E)-9.9；天門冬醯胺(N)，-0.2；麩醯胺(Q)，-0.3；離胺酸(K)，-4.2；精胺酸(R)，-11.2；絲胺酸(S)，-0.3；與半胱胺酸(C)，-2.8。疏水性胺基酸一般包括且一般具有下列個別相對疏水度：組胺酸(H)，0.5；蘇胺酸(T)，0.4；酪胺酸(Y)，2.3；色胺酸(W)，3.4；苯丙胺酸(F)，2.5；白胺酸(L)，1.8；異白胺酸(I)，2.5；甲硫胺酸(M)，1.3；纈胺酸(V)，1.5；與丙胺酸(A)，0.5。甘胺酸具有疏水度0並可被視為親水或疏水。

[0094]如本領域所習知的，肽的胺基酸同源性可藉由比對其胺基酸序列輕易地測定。同樣地，肽的兩性同源性可藉由比對胺基酸序列的親水性和疏水性測定。

[0095]一些具體例包括了包含編碼NSP1-樣(“NSP1-樣聚核苷酸”)、NLP4 (“NLP4聚核苷酸”)、及/或NLP9多肽(“NLP9聚核苷酸”)的核苷酸序列的核酸，例如上文所說明者。舉例來說，一些具體例中的核酸序列與SEQ ID NO:4 (阿拉伯芥NSP1-樣)或SEQ ID NO:5 (阿拉伯芥NLP4)及/或SEQ ID NO:6 (阿拉伯芥NLP9)對齊時展現增多的百分比一致性。

在該等與其他具體例中的特定核酸序列可包含具有，舉例而不限於：至少約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%一致性SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5及/或SEQ ID NO:6的序列。

[0096] 熟習此藝者可輕易地辨識出包含編碼NSP1-樣、NLP4、及/或NLP9多肽的核苷酸序列的許多核酸。舉例來說，可修飾核酸分子，而無實質上改變編碼多肽的胺基酸序列，舉例來說，藉由引進根據密碼子簡併性的可容許核苷酸取代。於是，將可理解到既定胺基酸序列的任何NSP1-樣、NLP4、及/或NLP9多肽可立即反向改造成任何眾多冗餘核苷酸序列。進一步舉例，編碼NSP1-樣、NLP4、及/或NLP9多肽的基因可選自任何眾多可得植物基因組庫、cDNA庫、EST庫、等等(譬如藉由對SEQ ID NOs:4-6當中一者的同源性)，或藉由所編碼多肽與SEQ ID NO:1或SEQ ID NOs:2及/或3的序列類似性，或此類基因可根據分子生物學的可靠與眾所周知技術選殖自生物體。

[0097] 任何與所有NSP1-樣、NLP4、與NLP9多肽、以及編碼彼等的核酸分子可利用於本發明的某些具體例。

[0098] 在本案一些具體例中，包含編碼NSP1-樣、NLP4、及/或NLP9多肽之核苷酸序列的核酸包含基因調控元(譬如促進子)。促進子可基於欲插入載體構築體的細胞類型來選擇。作用於細菌、酵母、與植物的促進子為本領域眾所周

知。促進子亦可基於彼等的調控特徵來選擇。此類特徵的例子包括轉錄活性的增強、誘發能力、組織-特異性、與發展階段-特異性。在植物中，已說明了可誘發、具病毒或合成來源、具組成性活性、以時間方式調控、及以空間方式調控的促進子。參閱譬如Poszkowski *et al.* (1989) *EMBO J.* 3:2719；Odell *et al.* (1985) *Nature* 313:810；與Chau *et al.* (1989) *Science* 244:174-81)。

[0099]為獲得(多個)異源性基因的較高度表現，可較佳的是再改造(多個)基因，俾使更有效率地在表現宿主細胞(譬如植物細胞，舉例來說，油菜、水稻、煙草、玉米、棉花、與大豆)中表現。因此，在設計編碼NSP1-樣或NLP4及/或NLP9多肽的基因以供植物表現時的任擇額外步驟(即除了提供一或多個基因調控元以外)為再改造異源性基因蛋白編碼區域，以使表現最佳化。特別例子包括已最佳化以增加來自第二植物物種之基因轉殖植物細胞中的表現位準(即製造更多蛋白)的再設計阿拉伯芥屬基因，其係相比於來自第二植物物種、轉形有原始(即未修飾)阿拉伯芥屬基因序列的植物細胞。

[0100]由於基因密碼冗餘性/簡併性(即一些胺基酸係由不止一個密碼子所指定)所給予的可塑性，在不同生物體或生物體類別的基因組演化已造成同義密碼子的使用差異。此“密碼子偏見”反映在蛋白編碼區域的平均鹼基組成。舉例來說，具有相對低G+C含量的基因組的生物體係利用較多在同義密碼子第三位置具有A或T的密碼子，而該等具有

相對高G+C含量者則利用較多在第三位置具有G或C的密碼子。再者，據認為在mRNA內“微量”密碼子的存在可降低該mRNA的絕對轉譯率，尤其是當對應於微量密碼子的帶電tRNA相對冗餘性極低的時候。此論述的延伸是因個別微量密碼子而減少的轉譯率就多個微量密碼子而言將至少加成。因此，在特別表現宿主中具有高相對含量的微量密碼子的mRNAs係具有相應低的轉譯率。此比率可由所編碼蛋白的相應低位準反映。

[0101]在改造編碼NSP1-樣或NLP4及/或NLP9多肽以在植物細胞(譬如水稻、煙草、玉米、棉花、與大豆)中表現的最佳化基因時，假使已測定(多個)預期宿主植物的密碼子偏見是有幫助的。存在多個公開可用的DNA序列資料庫，其中吾人可找到關於植物基因組密碼子分佈情形的資訊或各種植物基因的蛋白編碼區域。

[0102]密碼子偏見是表現宿主用來編碼其蛋白的胺基酸的密碼子統計分佈。密碼子偏見可計算成相對於所有胺基酸的密碼子使用單一密碼子的頻率。或者，密碼子偏見可計算成編碼特定胺基酸的單一密碼子相對於該胺基酸所有其餘密碼子(同義密碼子)的使用頻率。

[0103]在設計供植物表現NSP1-樣或NLP4及/或NLP9多肽的最佳化編碼區域時，當存在多重選項時，應測定植物所偏好的主要密碼子(“第一選項”)，還有第二、第三、第四等等選項的偏好密碼子。隨後可設計編碼NSP1-樣或NLP4及/或NLP9多肽的胺基序列的新穎DNA序列，其中該

新穎DNA序列係異於原生DNA序列(編碼該多肽)，藉由取代成表現宿主-所偏好(第一偏好、第二偏好、第三偏好、或第四偏好等等)密碼子，以指定胺基酸序列內各位置的胺基酸。隨後分析新穎序列中藉由修飾可能創建的限制酶位點。所辨識的推定限制位點再藉由以下一偏好密碼子置換該等密碼子來修飾，以移除限制位點。在序列中可能影響異源性序列轉錄或轉譯的其他位點為外顯子：內含子接點(5'或3')、聚-A添加信號、及/或RNA聚合酶終止信號。可再分析與修飾序列，以降低TA或CG雙聯體的頻率。除該等雙聯體以外，具有超過約六個相同的G或C核苷酸的序列嵌段亦可不利地影響序列轉錄或轉譯。因此，該等嵌段係有利地藉由將第一或第二等等密碼子選項置換成下一偏好密碼子選項來修飾。

[0104] 諸如上文所說明的方法能使熟習此藝者修飾就特定植物而言為外來的(多個)基因，俾使該基因最佳化地表現於植物。該方法另例示於PCT國際專利公開案號WO 97/13402 A1。於是，一些具體例的功能上等效於NSP1-樣、NLP4、及/或NLP9聚核苷酸的最佳化合成基因可用於轉形宿主，包括植物與植物細胞。再者，亦可在電腦上(*in silico*)由初始胺基酸序列生成NSP1-樣、NLP4、與NLP9聚核苷酸。論及製造合成基因的額外指導可在，舉例來說，U.S.專利5,380,831找到。

[0105] 一旦NSP1-樣、NLP4、或NLP9聚核苷酸序列已在紙上或電腦上設計，則包含該聚核苷酸序列的實際核酸

分子可在實驗室合成，以使序列精確對應所設計的序列。此類合成DNA分子可選殖或以其他方式操作，正如彼等係衍生自天然或原生來源一般。

V. 在限N條件以NSP1-樣、NLP4、及/或NLP9調整植物生長

[0106] 一些具體例係採用NSP1-樣、NLP4、與NLP9就植物在限N生長條件下經由與NFB之關連性維持及/或增加生長而言係為必需的發現。舉例來說，NSP1-樣、NLP4、及/或NLP9多肽可引進或異源性表現植物細胞，舉例而不限於：增加包含植物細胞的植物與NFB之關連性；增加限N條件下的植物生長；並增加植物利用環境氮的效率。

[0107] 在特定具體例中，NSP1-樣、NLP4、及/或NLP9多肽可在細胞或生物體內表現或過度表現，舉例而不限於：藉由將NSP1-樣、NLP4、及/或NLP9聚核苷酸引進細胞或生物體；藉由將NSP1-樣、NLP4、及/或NLP9多肽引進細胞或生物體；及/或藉由提供在細胞或生物體內經由(多個)信號和操作性地聯結至NSP1-樣、NLP4、及/或NLP9聚核苷酸的調控元交互作用而足以促進NSP1-樣、NLP4、及/或NLP9多肽表現的正向或負向信號。在另外的具體例中，NSP1-樣、NLP4、及/或NLP9多肽在細胞或生物體內可被剔除或低度表現，舉例而不限於：藉由破壞、突變、或失活NSP1-樣、NLP4、及/或NLP9聚核苷酸；將反義核酸引進靶向NSP1-樣、NLP4、及/或NLP9聚核苷酸的細胞或生物體；藉由以抗體或其他特異性結合蛋白結合NSP1-樣、NLP4、及/或NLP9多肽從細胞或生物體的細胞機構以物理方式移除

NSP1-樣、NLP4、及/或NLP9多肽；及/或藉由提供在細胞或生物體內經由(多個)信號和操作性地聯結至NSP1-樣、NLP4、及/或NLP9聚核苷酸的調控元交互作用而足以減少或消除NSP1-樣、NLP4、及/或NLP9多肽表現的正向或負向信號。

[0108] 在一些具體例中，NSP1-樣多肽可在細胞或生物體內表現或過度表現，從而促進至少一NIN(多個)基因的表現；舉例而不限於NLP4與NLP9。在另外的具體例中，NSP1-樣多肽在細胞或生物體內可被移除或低度表現，從而減少或消除至少一NIN(多個)基因的表現，舉例來說，以研究在非結瘤植物中的NFB關連性的機制。在一些具體例中，NLP4及/或NLP9多肽可在細胞或生物體內表現或過度表現，從而直接增加植物細胞與NFB關連的能力。在另外的具體例中，NLP4及/或NLP9多肽在細胞或生物體內可被移除或低度表現，從而減少或消除植物細胞與NFB關連的能力。在特定具體例中，NSP1-樣、NLP4、及/或NLP9多肽係由操作性地聯結至在該等氮為生長限制以外的條件中引導該(多個)多肽表現的調控元的聚核苷酸表現，藉此增加植物在該等其他條件下利用環境氮的效率。

[0109] 在特定具體例中，跨不同植物物種與不同植物物種之間的NFB關連性機制的保守性係被放大，以經由NSP1-樣、NLP4、及/或NLP9多肽的異源性表現將新穎NFB關連性表型引進植物。舉例來說，NSP1-樣、NLP4、及/或NLP9多肽可在通常不表現NSP1-樣、NLP4、及/或NLP9多肽的非

結瘤植物中表現，從而賦予該植物與NFB關連之增多能力。

[0110]在本案替換具體例中，植物細胞、植物部分、及/或植物可被基因改造，以藉由本領域所習知引進異源性分子的任何數個方法包含至少一*NSP1*-樣、*NLP4*、及/或*NLP9*聚核苷酸，藉此製造非天然基因轉殖植物細胞、植物部分、或植物。在本案特定具體例中，異源性分子係藉由選自一舉例而不限於一轉形與選擇性育種(譬如回交育種)的方法引進植物細胞、植物部分、及/或植物。

[0111]在一些具體例中，*NSP1*-樣、*NLP4*、及/或*NLP9*聚核苷酸被引進，俾使操作性地聯結至組成促進子，從而引導基因產物在彼等通常不表現(譬如氮非有限)的條件下表現。在特定具體例中，*NSP1*-樣、*NLP4*、及/或*NLP9*聚核苷酸被引進，俾使操作性地聯結至非-組成促進子，從而引導基因產物以組織-偏好性(譬如在根部組織)或組織特異性方式表現。在特定具體例中，*NSP1*-樣、*NLP4*、及/或*NLP9*聚核苷酸被引進，俾使操作性地聯結至可誘發促進子，從而以調控方式引導基因產物的表現。

[0112]任何植物物種或植物細胞可被基因改造成包含本案異源性核酸。在一些具體例中，依此基因改造的植物細胞能夠再生，以製造植物。在一些具體例中，被基因改造的植物細胞(譬如宿主植物細胞)包括來自下列的細胞，舉例而不限於：高等植物、雙子葉植物、單子葉植物、耗材植物、作物植物、油用植物(譬如油籽植物)、以及非結瘤植

物。此類植物包括，舉例而不限於：苜蓿；大豆；棉花；油菜籽(油菜)；亞麻籽；玉米；稻米；臂形草；小麥；紅花；高粱；甜菜；向日葵；煙草；以及草類(譬如草坪草)。在特定例子中，本案的基因改造植物細胞或植物包括，舉例而不限於：油菜(*Brassica napus*)；印度芥菜(*Brassica juncea*)；衣索比亞芥(*Brassica carinata*)；白蘿蔔(*Brassica rapa*)；花椰菜(*Brassica oleracea*)；大豆(*Glycine max*)；亞麻(*Linum usitatissimum*)；玉米(*Zea mays*)；紅花(*Carthamus tinctorius*)；向日葵(*Helianthus annuus*)；煙草(*Nicotiana tabacum*)；阿拉伯芥、巴西堅果(*Betholettia excelsa*)；蓖麻籽(*Ricinus communis*)；椰子(*Cocos nucifera*)；芫荽(*Coriandrum sativum*)；棉花屬(*Gossypium spp.*)；花生(*Arachis hypogaea*)；荷荷芭(*Simmondsia chinensis*)；油棕(*Elaeis guineensis*)；橄欖(*Olea europaea*)；水稻(*Oryza sativa*)；西葫蘆(*Cucurbita maxima*)；大麥(*Hordeum vulgare*)；甘蔗(*Saccharum officinarum*)；小麥屬(包括杜蘭小麥(*Triticum durum*)與小麥(*Triticum aestivum*))；與紫萍屬(*Lemnaceae sp.*)。在一些具體例中，植物可尤其具有基因背景，作為優良栽培種、野生型栽培種、及商業可區別物種。

[0113]根據本領域習知方法，核酸可引進基本上任何植物。本案具體例可運用本領域所習知用於植物轉形(及製造基因改造植物)的任意眾多方法。此類方法包括，舉例而不限於用於雙子葉植物—還有單子葉植物—的生物與物理轉形流程。參閱譬如 Goto-Fumiyuki *et al.* (1999) *Nat.*

Biotechnol. 17:282; Miki *et al.* (1993) *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology* (Glick, B. R. and Thompson, J. E., Eds.), CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, pp. 67-88。此外，用於植物細胞與組織轉形及再生植物的載體與體外培養方法係說明於，舉例來說，Gruber and Crosby (1993) *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*，見上文，於pp. 89-119。

[0114]將核酸引進植物宿主細胞的植物轉形技術包括，舉例而不限於：使用根瘤農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*)或毛根農桿菌(*A. rhizogenes*)作為轉形劑以卸防T-DNA轉形；磷酸鈣轉染；聚凝胺轉形；原生質體融合；電穿孔(D'Halluin *et al.* (1992) *Plant Cell* 4:1495)；超音波方法(譬如超音波穿孔)；脂質體轉形；顯微注射；接觸裸DNA；接觸質體載體；接觸病毒載體；生物彈道學(譬如DNA粒子轟擊(參閱譬如 Klein *et al.* (1987) *Nature* 327:70)與微粒子轟擊(Sanford *et al.* (1987) *Part. Sci. Technol.* 5:27; Sanford (1988) *Trends Biotech.* 6:299, Sanford (1990) *Physiol. Plant* 79:206；與 Klein *et al.* (1992) *Biotechnology* 10:268)；碳化矽 WHISKERS-介導轉形(Kaeppler *et al.* (1990) *Plant Cell Rep.* 9:415)；奈米粒子轉形(參閱譬如 U.S. 專利公開案號 US2009/0104700A1)；氣溶膠發射；與聚乙二醇(PEG)-介導的攝取。在特別例子中，異源性核酸可直接引進植物細胞的基因組DNA。

[0115]用於將表現載體引進植物的廣泛利用方法係以

農桿菌的天然轉形系統為基礎。Horsch *et al.* (1985) *Science* 227:1229。根瘤農桿菌與毛根農桿菌為習知可用於以基因方式轉形植物細胞的植物致病性土壤細菌。根瘤農桿菌與毛根農桿菌的Ti與Ri質體分別攜帶負責植物基因轉形的基因。Kado (1991) *Crit. Rev. Plant. Sci.* 10:1。論及農桿菌載體系統的細節與用於農桿菌-介導基因轉移的方法亦可得自舉例來說Gruber *et al.*，見上文；Miki *et al.*，見上文；Moloney *et al.* (1989) *Plant Cell Reports* 8:238，以及U.S.專利號4,940,838與5,464,763。

[0116]假使農桿菌係用作轉形，欲插入的DNA通常被選殖到特別的質體內；進入中間載體或二元載體。中間載體無法在農桿菌內自行複製。中間載體可藉由輔助質體(共軛)的方式轉移至根瘤農桿菌。日本煙草超級二元系統(Japan Tobacco Superbinary System)是此類系統的例子(回顧於Komari *et al.* (2006) *Methods in Molecular Biology* (K. Wang, ed.) No. 343; *Agrobacterium Protocols*, 2nd Edition, Vol. 1, Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp.15-41；與Komori *et al.* (2007) *Plant Physiol.* 145:1155)。二元載體在大腸桿菌與農桿菌皆能自行複製。二元載體包含選擇標記基因以及被右側與左側T-DNA邊界區域包夾的聯接子或聚聯接子。彼等可直接轉形至農桿菌(Holsters, 1978)。農桿菌包含攜帶*vir*區域的質體。Ti或Ri質體亦包含T-DNA轉移所必需的*vir*區域。*vir*區域是T-DNA轉移至植物細胞所必需的。可含有額外的T-DNA。

[0117]根瘤農桿菌宿主的病毒功能將引導含構築體與毗鄰標記的T-股插入植物細胞DNA，當該細胞被使用二元T DNA載體的細菌感染時(Bevan (1984) *Nuc. Acid Res.* 12:8711)或共培養程序(Horsch *et al.* (1985) *Science* 227:1229)。一般而言，農桿菌轉形系統係用於改造雙子葉植物。Bevan *et al.* (1982) *Ann. Rev. Genet* 16:357；Rogers *et al.* (1986) *Methods Enzymol.* 118:627。農桿菌轉形系統亦可用於轉形，還有轉移核酸至單子葉植物與植物細胞。參閱U.S.專利號5,591,616；Hernalsteen *et al.* (1984) *EMBO J* 3:3039；Hooykass-Van Slogteren *et al.* (1984) *Nature* 311:763；Grimsley *et al.* (1987) *Nature* 325:1677；Boulton *et al.* (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:31；與Gould *et al.* (1991) *Plant Physiol.* 95:426。

[0118]本案重組宿主的基因操縱可使用標準基因技術進行。並可在適用於基因操縱的任何宿主細胞實行。在一些具體例中，重組宿主細胞可為適用於基因操縱及/或重組基因表現的任何生物體或微生物體宿主。在一些具體例中，重組宿主可為植物。本案使用的標準重組DNA與分子選殖技術為本領域眾所周知並說明於，舉例而不限於：Sambrook *et al.* (1989)，見上文；Silhavy *et al.* (1984) *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY；與Ausubel *et al.* (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience, New York, NY。

[0119]在將核酸引進植物細胞之後，植物細胞可生長，並待諸如芽與根之分生組織出現後，可產生成熟植物。在一些具體例中，可生成複數株植物。再生植物的方法論為熟習此藝者所習知且可在，舉例來說：*Plant Cell and Tissue Culture* (Vasil and Thorpe, Eds.), Kluwer Academic Publishers, 1994找到。本案說明的基因改造植物可培養在發酵介質或生長在適宜介質，例如土壤。在一些具體例中，高等植物的適宜生長介質可為用於植物的任何生長介質，包括，舉例而不限於：土壤、沙、支持根部生長(譬如蛭石、珍珠岩等等)或水耕栽培的任何其他特定介質，還有適宜的光、水與幫助高等植物生長的營養補充劑。

[0120]藉由任何上述轉形技術製造的轉形植物細胞可培養再生擁有轉形表型且於是所欲表型的全植物。此類再生技術係依靠操縱培養組織生長介質中的某些植物激素，通常依靠已和所欲核苷酸序列一起引進的殺生物劑及/或除草劑標記。由培養的原生質體再生植物係說明於Evans *et al.* (1983) "Protoplasts Isolation and Culture," in *Handbook of Plant Cell Culture*, Macmillian Publishing Company, New York, pp. 124-176；與Binding (1985) *Regeneration of Plants, Plant Protoplasts*, CRC Press, Boca Raton, pp. 21-73。再生亦可由植物痂、外植體、器官、花粉、胚胎或其之一部分進行。此類再生技術係大致上說明於Klee *et al.* (1987) *Ann. Rev. Plant Phys.* 38:467。

[0121]在其他具體例中，轉形的植物細胞不能再生以製

造植物。此類細胞可運用，舉例來說，在發展具有相關表型—舉例來說，NFB關連性—的植物細胞系。

[0122]轉形的植物細胞、痲、組織或植物可藉由以存在於轉形DNA上的標記基因所編碼的性狀選擇或篩揀改造植物材料來辨識與單離。舉例而言，選擇可藉由使改造的植物材料生長在含有轉形基因構築體賦予抗性的抗生素或除草劑抑制量的介質上來進行。再者，轉形的植物與植物細胞亦可藉由篩揀可存在於重組核酸構築體上的任何可視標記基因(譬如 β -葡萄糖醛酸酶、螢光素酶、或*gfp*基因)的活性來辨識。此類選擇與篩揀方法對熟習此藝者而言係眾所周知。

[0123]含有本案異源性分子的基因轉殖植物可經由選擇性育種製造，舉例來說，使包含該分子的第一親代植物與第二親代植物有性雜交，藉此製造複數個第一子代植物。隨後可選擇抵抗選擇標記(譬如草甘膦，對草甘膦的抗性可由本案異源性分子賦予子代植物)的第一子代植物。第一子代植物隨後可自交，藉此製造複數個第二子代植物。隨後，可選擇抵抗選擇標記的第二子代植物。該等步驟可再包括第一子代植物或第二子代植物回交至第二親代植物或第三親代植物。

[0124]亦欲被理解的是兩個不同基因轉殖植物亦可交配，以製造含有兩個獨立地分隔、外加外源性基因的後代。適當後代的自交可製造兩個外加外源性基因純合子的植物。亦設想到親代植物的回交以及與非基因轉殖植物的異交，

無性繁殖亦然。普遍用於不同性狀與作物的其他育種方法係本領域習知的。回交育種已用於將簡單遺傳的高度遺傳性性狀的基因轉移進入所欲純合栽培品種或自交系，其為輪迴親代。所得植物係預期具有輪迴親代(譬如栽培品種)的屬性及從給方親代轉移的所欲性狀。在初始交配後，選出擁有給方親代表型的個體並重複交配(回交)至輪迴親代。所得親代係預期具有輪迴親代(譬如栽培品種)的屬性及從給方親代轉移的所欲性狀。

[0125]核酸亦可經由同源性重組引進植物基因組的預定區塊。經由同源性重組在植物細胞的特異性染色體位點內穩定整合聚核苷酸序列的方法已說明於本領域。舉例而言，說明於美國專利公開案號2009/0111188 A1的位點特異性整合係涉及使用重組酶或整合酶，以介導給方聚核苷酸序列引進染色體標靶。此外，PCT國際專利公開案號WO 2008/021207說明鋅指結構介導的同源性重組，以在基因組特異位置內穩定整合一或多個給方聚核苷酸序列。重組酶的使用，例如美國專利6,720,475說明的FLP/FRT、或美國專利5,658,772說明的CRE/LOX可用來使聚核苷酸序列穩定整合至特異性染色體位點。最後，使用巨核酸酶使給方聚核苷酸靶向進入特異性染色體位置係說明於Puchta *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5055。

[0126]用於植物細胞內的位點特異性整合的其他各種方法係一般習知並可應用。Kumar *et al.* (2001) *Trends Plant Sci.* 6(4):155。再者，已在數個原核與低等真核生物體辨識

到的位點特異性重組系統可應用於植物。此類系統的例子包括但不限於：得自魯氏酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*)的pSR1質體的R/RS重組酶系統(Araki *et al.* (1985) *J. Mol. Biol.* 182:191)、與噬菌體Mu的Gin/gix系統(Maeser and Kahlmann (1991) *Mol. Gen. Genet.* 230:170)。

[0127]各種試驗可連同本案某些具體例的核酸分子運用。除表型觀察外，下列技術可用於偵測植物細胞中核酸分子的存在。舉例來說，分子的存在可藉由使用序列的引子或探針、偵測編碼蛋白的ELISA試驗、偵測蛋白的西方墨點法、或偵測RNA或DNA的北方或南方墨點法來測定。額外的技術，例如原位雜交、酶染色、和免疫染色亦可用於偵測在特定植物器官與組織以內的重組構築體的存在或表現。

[0128]南方分析是常用的偵測方法，其中DNA以限制內切酶切割並在瓊脂凝膠上分級，以藉由分子量分離DNA且隨後轉移到尼龍膜。隨後和以³²P (或其他探針標記)放射性標記的探針片段雜交並於SDS溶液洗滌。

[0129]同樣地，北方分析採用類似流程，其中RNA以限制內切酶切割並在瓊脂凝膠上分級，以藉由分子量分離RNA且隨後轉移到尼龍膜。隨後和以³²P (或其他探針標記)放射性標記的探針片段雜交並於SDS溶液洗滌。分析從感興趣組織單離的RNA (譬如mRNA)可指示相關表現位準。通常，假使mRNA出現或mRNA量增加了，可推論對應轉殖基因正在表現。北方分析、或其他mRNA分析流程可用於

測定所引入轉殖基因或原生基因的表現位準。

[0130] 本案的核酸、或其片段可用於設計PCR擴增的引子。在實行PCR擴增時，在引子與模板之間可忍受某些程度的未配對。藉由熟習此藝者習知的方法在既定引子中可製造突變、插入、與刪除。

[0131] 水解探針試驗一或習知為TAQMAN[®] (Life Technologies, Foster City, Calif.)—為偵測與量化DNA序列存在的另一方法。簡言之，FRET寡核苷酸探針被設計成一寡聚物位於轉殖基因內且一位於旁側基因組序列內，以供事件特異性偵測。FRET探針與PCR引子(一引子位於插入DNA序列且一位於旁側基因組序列)在熱穩定聚合酶與dNTPs的存在下循環。FRET探針的雜交使得FRET探針上的螢光部分從淬熄部分斷裂與釋放。螢光信號指示因成功擴增與雜交而存在的旁側/轉殖基因插入序列。

VII. 包含NSP1-樣、NLP4、與NLP9的植物、植物部分、及植物材料

[0132] 本案一些具體例提包含至少一異源性NSP1-樣、NLP4、及/或NLP9聚核苷酸的植物，例如可由穩定轉形的植物細胞或組織生成，或可藉由來自給方品系的此類核酸的遺傳漸滲(introgression)製造。此類植物可以任何方式使用或培養，其中存在(多個)感興趣的轉形聚核苷酸係所欲的。據此，基因轉殖植物尤其可藉由轉形改造成具有一或多個所欲性狀(譬如NFB關連性)且隨後可藉由熟習此藝者習知

的任何方法種植與培養。本案的特別具體例提供此類基因轉殖植物的部分、細胞、及/或組織。植物部分不設限地包括種籽、胚乳、胚珠與花粉。在一些具體例中，植物部分為種籽。

[0133] 代表性、非設限植物包括非結瘤植物；阿拉伯芥屬；田間作物(譬如苜蓿、大麥、豆類、三葉草、玉蜀黍、棉花、亞麻、扁豆、玉米、豌豆、油菜/油菜籽、水稻、黑麥、紅花、高粱、大豆、向日葵、煙草、與小麥)；蔬菜作物(譬如蘆筍、甜菜、油菜、青花菜、抱子甘藍、白菜、胡蘿蔔、花椰菜、芹菜、黃瓜(瓜類作物)、茄子、萵苣、芥菜、洋蔥、甜椒、馬鈴薯、南瓜、白蘿蔔、菠菜、南瓜、芋頭、蕃茄、與節瓜)；水果與堅果作物(譬如杏仁、蘋果、杏子、香蕉、黑莓、藍莓、可可、木薯、櫻桃、柑桔、椰子、蔓越莓、棗子、榛果、葡萄、葡萄柚、番石榴、奇異果、檸檬、萊姆、芒果、甜瓜、油桃、橘子、木瓜、百香果、桃子、花生、梨、鳳梨、開心果、李子、覆盆子、草莓、蜜桔、胡桃、與西瓜)；樹木與觀賞植物(譬如赤楊、水曲柳、白楊、杜鵑、樺樹、黃楊、山茶、康乃馨、菊花、榆樹、冷杉、常春藤、茉莉、杜松、橡木、棕櫚、楊柳、松、紅木、杜鵑、玫瑰、與橡膠)。

[0134] 為確認用以再生植物的(多個)感興趣轉形聚核苷酸的存在，可實行各式各樣試驗。此類試驗包括，舉例而不限於：生化試驗，例如偵測蛋白產物的存在，譬如藉

由免疫方式(ELISA及/或西方墨點法)或藉由酶的功能；植物部分試驗(譬如葉或根試驗)；以及分析植物的表型。

[0135]在發展任何新穎的所欲植物種源時，有眾多步驟，其可以生成基因轉殖作物植物開始。在一些具體例中，包含至少一*NSP1*-樣、*NLP4*、及/或*NLP9*聚核苷酸的基因轉殖植物可用於植物育種及/或種源發展計劃。

[0136]植物育種開始於分析與定義當前種源的問題與弱點、建立計劃目標，並定義特定育種目的。下一步驟為選出擁有符合計劃目標之性狀的種源。目標是在單一變種中合併來自親代種源之所欲性狀的改良組合。該等重要性狀可包括較高種籽產率、抵抗疾病與昆蟲、較佳的莖與根、耐旱與熱、及較佳的農藝品質。

[0137]育種或選擇方法的挑選係取決於植物生殖模式、欲改良(多個)性狀的遺傳力、商用栽培品種類型(譬如F₁雜交栽培品種、純系栽培品種等等)。就高度遺傳的性狀而言，在單一場所評估的優良個體植物選項將會有效，但就具低遺傳力的性狀而言，選擇應基於對相關植物家族的重複評估所獲得的平均值。受歡迎的選擇方法包括譜系選擇、修飾譜系選擇、質量選擇、與輪迴選擇。

[0138]遺傳複雜性影響育種方法的選擇。回交育種係用於將高度遺傳性狀的一或數個合意基因轉移進入栽培品種。此方式已被廣泛地用於抗病栽培品種的育種。各式輪迴選擇技術係用於改良由眾多基因調控的量化遺傳性狀。在自

花授粉作物中使用輪迴選擇係取決於授粉容易度、各次授粉的成功雜交頻率、以及各次成功交配的雜交後代數量。

[0139] 各個育種計劃應包括育種程序效率的定期、客觀評估。評估要點係視目標與目的而有所更動，但應包括基於比對先進育種品系的適當標準總值的選擇增益、以及每份輸入單位(譬如每年、每元支出等等)的成功栽培品種數量。

[0140] 有前途的先進育種品系係徹底測試並在代表(多個)商業目標區域的環境中比對適當標準達三或更多年。最好的品系是新穎商業栽培品種的候選者；該等仍缺乏數個性狀者可用作親代，以製造新的種群而供進一步選擇。

[0141] 從進行首次交配起算，該等過程一引至銷售與配送的最終步驟—通常需時八至十二年。因此，發展新穎栽培品種是需要精確的前瞻性規劃、有效使用資源、且甚少改變方向的耗時過程。

[0142] 譜系育種與輪迴選擇育種方法係用於發展來自育種種群的栽培品種。育種計劃係藉由自交與選擇所欲表型將來自二或多個栽培品種的所欲性狀或基礎廣泛的各種資源併至發展栽培品種的育種池中。評估新穎栽培品種，以測定何者具有商業潛力。

[0143] 譜系育種係普遍用於改良自花授粉作物。使擁有合意互補性狀的兩親代交配，以製造 F_1 。 F_2 種群係使一或數個 F_1 s自交而製得。最佳個體的選擇可於 F_2 種群開始；隨

後，於 F_3 開始，選出最佳家族的最佳個體。重複的家族測試可於 F_4 世代開始，以改善具低遺傳力之性狀的選擇有效性。在育種的後期階段(即 F_6 與 F_7)，測試最佳品系或表型相似品系的混合物發佈為新穎栽培品種的潛力。

[0144]質量與輪迴選擇可用於改良自花授粉作物或交叉授粉作物的種群。異型接合個體的基因多變種群係為識得或藉由數個不同親代的交叉交配創建。最佳植物係基於個體優勢、傑出後代、或傑出結合能力來選擇。使選出植物交叉交配以製造新穎種群，其中持續著進一步的選擇循環。

[0145]回交育種已用於將簡單遺傳的高度遺傳性性狀的基因轉移進入所欲純合栽培品種或自交系，其為輪迴親代。欲轉移性狀的來源係稱作給方親代。所得植物係預期具有輪迴親代(譬如栽培品種)的屬性及從給方親代轉移的所欲性狀。在初始交配後，選出擁有給方親代表型的個體並重複交配(回交)至輪迴親代。所得親代係預期具有輪迴親代(譬如栽培品種)的屬性及從給方親代轉移的所欲性狀。

[0146]單一種籽後裔程序在嚴格意義上係指稱種植分離種群、每株植物採收一顆種籽樣本、並使用該一顆-種籽樣本種植下一世代。當種群已從 F_2 演進至所欲的近交位準時，衍生出品系的植物將各追溯至不同的 F_2 個體。在種群中的植物數量係隨著各世代衰減，因為若干種籽無法發芽或若干植物無法製造至少一種籽。結果，當世代演進完成

時，種群中並非所有最初取樣的F₂植物將由子代表示。

[0147]在本案具體例，*NSP1*-樣、*NLP4*、及/或*NLP9*聚核苷酸可引進植物種源，舉例來說，以發展特徵在於一在操作性地聯結至該(多個)聚核苷酸的調控元調控下一與NFB之增多關連性的新穎自交系。此類發展計劃的特別優點可在於，舉例來說，在非結瘤植物中表現NFB表型產生增加的氮利用率及/或生長。

[0148]提供下列實施例係例示某些特別特徵及/或具體例。實施例不應解讀成揭示內容限於所例示的特別特徵或具體例。

實施例

實施例1：材料與方法

[0149]阿拉伯芥哥倫比亞0生態型係用於所有實驗，除非另有指明。

[0150] *生長與處理條件*. 阿拉伯芥幼苗係以16:8光：暗光週期(hrs.)與22°C恒溫生長在帶有穆-斯氏(Murashige and Skoog) (MS)鹽介質或MS鹽介質、無所指之5 mM KNO₃氮(N)補充的 0.8%瓊脂皿上。七日後，將植物移至完全、或無N、補充有或沒有2.5 mM NH₄NO₃的MS鹽介質。

[0151]視處理而定，植物係以NFB或非-NFB接種或否。先讓所有細菌在稀釋869介質中生長，達到於600 nm之光密度0.4的20 mL過夜培養物係用於接種。在接種前，細菌以無菌水洗滌並再懸浮於5 mL。20 mL植物的瓊脂介質係接種

5 mL細菌，或者以無菌水呈現未接種。

實施例2：非結瘤植物與NFB之間的功能關連性

[0152]為測定阿拉伯芥是否建立和NFB的有益N-養分交互作用，吾人評估不同NFB物種在限N條件下對植物生長的效應。吾人選擇在與植物關連時顯示固定N的五個不同NFB物種：

苜蓿中華根瘤菌RMP110 (Pichon *et al.* (1992) 植物細胞 4:1199)，

菜豆根瘤菌CFN42 (Poupot *et al.* (1995) J. Biol. Chem. 270:6050)，

臺灣嗜銅菌LMG 19424 (Marchetti *et al.* (2011) Appl. Env. Microbiol. 77:2161)，

噬異源伯克氏菌LB400 (Perin *et al.* (2006) Appl. Env. Microbiol. 72:3103)，以及

越南伯克氏菌G4 (Perin *et al.* (2006)，見上文)。

[0153]吾人亦測試不能實行BFN的兩株額外細菌作為控制組：

植物伯克氏菌PsJN，習知加強阿拉伯芥屬生長(Zuniga *et al.* (2013) Mol. Plant Microbe Interact. 26:546)，及

皮納突伯嗜銅菌JMP134，能夠和植物關連的土壤細菌，但在吾等實驗條件下對植物生長無正向影響(Ledger *et al.* (2012) Antonie Van Leeuwenhoek 101:713)。

[0154]使植物生長在帶有MS介質的垂直皿上達七日，

並移至帶有相同MS介質但無N (MS-N)、或以 10^4 菌落形成單位(cfu)/mL不同細菌接種的MS-N皿。吾人在移至MS-N的七日後評估植物乾重。

[0155]在限N條件下，相較於未接種介質，植物乾重在苜蓿中華根瘤菌RMP110的存在下明顯較高。圖1。而且，在吾等實驗條件下，植物的生長係相仿於完整MS介質所達到者。圖1。該等結果指出苜蓿中華根瘤菌RMP110在無N源時可促進植物生長。所利用的其他細菌物種皆不能增加阿拉伯芥屬乾重，指出僅有中性或有益細菌的存在無法解釋此觀察。阿拉伯芥屬與不同細菌之間的有效交互作用係藉由回應於在所有情況下的細菌接種所觀察到的根毛長度的非特異性增加來確認。圖5。

[0156]BNF係經由 ^{15}N 稀釋技術在限N條件下比對以野生型與 $\Delta nifH$ 突變種接種的植物來印證。吾人的結果指出苜蓿中華根瘤菌能夠固定大氣的氮並使其可用作植物養分。

[0157]為測定N固定作用在限N條件下是否為植物生長所必需的，吾人使用不能固定N的苜蓿中華根瘤菌RMP110突變株($\Delta nifH$)。Bobik *et al.* (2006) *J. Bacteriol.* 188:4890。如圖2A所示，在限N條件下，相較於野生型細菌，苜蓿中華根瘤菌RMP110 $\Delta nifH$ 對植物生長具有顯著降低的影響。

[0158]為證實苜蓿中華根瘤菌RMP110的生長促進作用係部分地歸因於所固定的N係有助於阿拉伯芥屬養分，吾人使植物生長在補充有5 mM KNO_3 的MS-N達七日，該MS-N

係以5% ^{15}N 同位素標記。隨後使植物暴露至MS-N介質中的野生型苜蓿中華根瘤菌RMP110或 ΔnifH 突變種。相較於以 ΔnifH 接種的植物或未接種植物，在野生型苜蓿中華根瘤菌RMP110的存在下以補充有經標記 KNO_3 的MS-N介質處理的植物顯示減少的 ^{15}N 同位素比例。圖2B。此結果指出阿拉伯芥屬植物需要大氣的N，其中 ^{14}N 同位素係佔絕大多數。野生型與 ΔnifH 突變種細菌株兩者對側根密度與根毛延長具有類似效應，指出兩株均能與植物交互作用。圖6A。

[0159]該等結果顯示阿拉伯芥可與苜蓿中華根瘤菌RMP110功能性地關連，以增強在限N條件下的植物生長。此植物：細菌交互作用代表了所論述非豆科植物機制的傑出模式系統，以促進與細菌物種之關連性而引致營養相關的生物N固定作用。

實施例3：調控阿拉伯芥屬與苜蓿中華根瘤菌之交互作用的基因

[0160]在阿拉伯芥屬中，*NSP1*與*NIN*基因的同源物僅在植物生長於限N條件下時受到細菌存在的調控。此暗示N的可得性為調控植物回應細菌之易感性的主要因素。藉由利用植物攜帶位於*NSP1*-樣與選定*NLPs*基因中的插入突變的功能基因組方式，吾人發現該等轉錄因子對阿拉伯芥屬與苜蓿中華根瘤菌之間的功能關連性而言係至關重要。

[0161]豆科物種中的氮固定作用係取決於調控何時及如何與根瘤菌建立共生關連性的精密分子機制。Oldroyd

(2013) Nat. Rev. Microbiol. 11:252)。為測定調控吾等新近發現—其中阿拉伯芥屬與苜蓿中華根瘤菌RMP110交互作用—的模式系統中的交互作用的機制是否可存在於阿拉伯芥屬，吾人分別分析*NSP1*-樣與*NSP2*-樣基因、*At3g13840* (*AtNSP1*-樣)與*At4g08250* (*AtNSP2*-樣)的功能。該等基因在阿拉伯芥並不具有已知功能。

[0162] *AtNSP1*-樣與*AtNSP2*-樣基因的表現係以生長在N-充足條件(5 mM KNO_3)的植物評估且隨後移至2.5 mM NH_4NO_3 或移至MS-N介質，有或無苜蓿中華根瘤菌RMP110的存在。植物係於轉移的3與7日後採收。製備總RNA，並使用即時定量逆轉錄聚合酶鏈反應(qRT-PCR)測量感興趣基因的轉錄位準。

[0163] 吾等結果顯示*AtNSP1*-樣基因表現在植物移至帶有細菌的MS-N介質時被誘發，但在其他實驗條件則否。圖3A。此結果暗示*AtNSP1*-樣功能在限N條件下、苜蓿中華根瘤菌存在時是必需的。反之，*AtNSP2*-樣在受測實驗條件下係不受調控。圖7A。

[0164] 在豆科中，*NSP1*與*NSP2*調控*NIN*基因的表現。阿拉伯芥屬基因組編碼九個*NIN*-樣基因(*NLPs*)。作為評估*NLPs*在阿拉伯芥屬與苜蓿中華根瘤菌交互作用的角色的第一步驟，吾人在圖3A所述相同實驗條件下分析該等9個*NLPs* (*NLP1* (*At2g17150*) ; *NLP2* (*At4g35270*) ; *NLP3* (*At4g38340*) ; *NLP4* (*At1g20640*) ; *NLP5* (*At1g76350*) ; *NLP8*

(*At2g43500*)；與*NLP9* (*At3g59580*)當中七者的表現。

[0165] 吾等結果顯示*AtNLP4*、*AtNLP8*、與*AtNLP9*的基因表現在限N條件與苜蓿中華根瘤菌RMP110的存在下(圖3B)被誘發，類似於*AtNSP1*-樣。反之，*AtNLP3*顯示不同表現樣貌，其在N-充足條件下但僅於細菌存在時被誘發。圖3B。*AtNLP1*、*AtNLP2*、與*AtNLP5*的基因表現在所評估的實驗條件下並無顯著改變。圖7B。

[0166] 為論述*AtNSP1*-樣、*AtNLP4*、*AtNLP8*、與*AtNLP9*基因針對阿拉伯芥屬與苜蓿中華根瘤菌RMP110交互作用的功能，具*AtNSP1*-樣(*salk_036071C* - *salk_023595C*)、*AtNLP4* (*salk_100786C* - *salk_063595C*)、*AtNLP8* (*salk_140298* - *salk_031064C*)與*AtNLP9* (*salk_025839C* - *salk_042082C*)的兩個獨立純合突變品系阿拉伯芥係獲自阿拉伯芥屬生物資源中心(ABRC)。

[0167] 生長在限N條件下的突變與野生型植物係以野生型苜蓿中華根瘤菌RMP110接種(或假仿接種作為控制組)。吾等結果顯示，在限N條件下，藉由苜蓿中華根瘤菌RMP110的植物生長促進作用在*atnsp1*突變種中丟失了。圖4A。同樣地，*AtNLP4*與*AtNLP9*基因的突變植物在苜蓿中華根瘤菌RMP110的存在下並未展現增加的生長。圖4B。反之，*atnlp8*突變植物並未顯示關於苜蓿中華根瘤菌RMP110在限N條件下所誘發的植物生長促進效應。該等結果指出*AtNSP1*-樣、*AtNLP4*、與*AtNLP9*對於阿拉伯芥屬與苜蓿中華根瘤菌

RMP110之間在限N條件下增強生長的功能性交互作用是必需的。該等結果亦指出保守性機制係存在於植物，以介導就N養分而言的植物：細菌有益交互作用，其可運用於將BNF提供至非結瘤植物物種。

【符號說明】

(無)

序列表

<110> 智利天主教大學(Pontificia Universidad Catolica de Chile)
Kraiser, Tatiana
Gonzalez, Bernardo
Guitierrez, Rodrigo

<120> 促進與固氮菌之關連性的植物調控基因

<130> 2971.05-P12092US

<160> 6

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 510

<212> PRT

<213> 阿拉伯芥

<400> 1

Met Leu Leu Glu Glu Thr Glu Pro Pro Asn Gln Thr Leu Asp His Val
1 5 10 15

Leu Ser Trp Leu Glu Asp Ser Val Ser Leu Ser Pro Leu Pro Gly Phe
 20 25 30

Asp Asp Ser Tyr Leu Leu His Glu Phe Asp Gly Ser Gln Thr Trp Glu
 35 40 45

Trp Asp Gln Thr Gln Asp Pro Glu His Gly Phe Ile Gln Ser Tyr Ser
 50 55 60

Gln Asp Leu Ser Ala Ala Tyr Val Gly Cys Glu Ala Thr Asn Leu Glu
65 70 75 80

Val Val Thr Glu Ala Pro Ser Ile Asp Leu Asp Leu Pro Pro Glu Ile
 85 90 95

Gln Gln Pro Asn Asp Gln Ser Arg Lys Arg Ser His Asp Gly Phe Leu
 100 105 110

Glu Ala Gln Gln Val Lys Lys Ser Ala Arg Ser Lys Arg Lys Ala Ile
 115 120 125

Lys Ser Ser Glu Lys Ser Ser Lys Asp Gly Asn Lys Glu Gly Arg Trp
 130 135 140

Ala Glu Lys Leu Leu Asn Pro Cys Ala Leu Ala Ile Thr Ala Ser Asn
 145 150 155 160

Ser Ser Arg Val Gln His Tyr Leu Cys Val Leu Ser Glu Leu Ala Ser
 165 170 175

Ser Ser Gly Asp Ala Asn Arg Arg Leu Ala Ala Phe Gly Leu Arg Ala
 180 185 190

Leu Gln His His Leu Ser Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Phe Trp Pro
 195 200 205

Val Phe Thr Phe Ala Ser Ala Glu Val Lys Met Phe Gln Lys Thr Leu
 210 215 220

Leu Lys Phe Tyr Glu Val Ser Pro Trp Phe Ala Leu Pro Asn Asn Met
 225 230 235 240

Ala Asn Ser Ala Ile Leu Gln Ile Leu Ala Gln Asp Pro Lys Asp Lys
 245 250 255

Lys Asp Leu His Ile Ile Asp Ile Gly Val Ser His Gly Met Gln Trp
 260 265 270

Pro Thr Leu Leu Glu Ala Leu Ser Cys Arg Leu Glu Gly Pro Pro Pro
 275 280 285

Arg Val Arg Ile Thr Val Ile Ser Asp Leu Thr Ala Asp Ile Pro Phe
 290 295 300

Ser Val Gly Pro Pro Gly Tyr Asn Tyr Gly Ser Gln Leu Leu Gly Phe
 305 310 315 320

Ala Arg Ser Leu Lys Ile Asn Leu Gln Ile Ser Val Leu Asp Lys Leu
 325 330 335

Gln Leu Ile Asp Thr Ser Pro His Glu Asn Leu Ile Val Cys Ala Gln
 340 345 350

Phe Arg Leu His His Leu Lys His Ser Ile Asn Asp Glu Arg Gly Glu
 355 360 365

Thr Leu Lys Ala Val Arg Ser Leu Arg Pro Lys Gly Val Val Leu Cys
 370 375 380

Glu Asn Asn Gly Glu Cys Ser Ser Ser Ala Asp Phe Ala Ala Gly Phe
 385 390 395 400

Ser Lys Lys Leu Glu Tyr Val Trp Lys Phe Leu Asp Ser Thr Ser Ser
 405 410 415

Gly Phe Lys Glu Glu Asn Ser Glu Glu Arg Lys Leu Met Glu Gly Glu
 420 425 430

Ala Thr Lys Val Leu Met Asn Ala Gly Asp Met Asn Glu Gly Lys Glu
 435 440 445

Lys Trp Tyr Glu Arg Met Arg Glu Ala Gly Phe Phe Val Glu Ala Phe
 450 455 460

Glu Glu Asp Ala Val Asp Gly Ala Lys Ser Leu Leu Arg Lys Tyr Asp
 465 470 475 480

Asn Asn Trp Glu Ile Arg Met Glu Asp Gly Asp Thr Phe Ala Gly Leu
 485 490 495

Met Trp Lys Gly Glu Ala Val Ser Phe Cys Ser Leu Trp Lys
 500 505 510

<210> 2

<211> 844

<212> PRT

<213> 阿拉伯芥

<400> 2

Met Glu Asp Ser Phe Leu Gln Ser Glu Asn Val Val Met Asp Ala Asp
 1 5 10 15

Phe Met Asp Gly Leu Leu Leu Asp Gly Cys Trp Leu Glu Thr Thr Asp
 20 25 30

Gly Ser Glu Phe Leu Asn Ile Ala Pro Ser Thr Ser Ser Val Ser Pro
 35 40 45

Phe Asp Pro Thr Ser Phe Met Trp Ser Pro Thr Gln Asp Thr Ser Ala
 50 55 60

Leu Cys Thr Ser Gly Val Val Ser Gln Met Tyr Gly Gln Asp Cys Val
 65 70 75 80

Glu Arg Ser Ser Leu Asp Glu Phe Gln Trp Asn Lys Arg Trp Trp Ile
 85 90 95

Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Ser Val Thr Glu Arg Leu Val Gln Ala
 100 105 110

Val Glu His Ile Lys Asp Tyr Thr Thr Ala Arg Gly Ser Leu Ile Gln
 115 120 125

Leu Trp Val Pro Val Asn Arg Gly Gly Lys Arg Val Leu Thr Thr Lys
 130 135 140

Glu Gln Pro Phe Ser His Asp Pro Leu Cys Gln Arg Leu Ala Asn Tyr
 145 150 155 160

Arg Glu Ile Ser Val Asn Tyr His Phe Ser Ala Glu Gln Asp Asp Ser
 165 170 175

Lys Ala Leu Ala Gly Leu Pro Gly Arg Val Phe Leu Gly Lys Leu Pro
 180 185 190

Glu Trp Thr Pro Asp Val Arg Phe Phe Lys Ser Glu Glu Tyr Pro Arg
 195 200 205

Val His His Ala Gln Asp Cys Asp Val Arg Gly Thr Leu Ala Ile Pro
 210 215 220

Val Phe Glu Gln Gly Ser Lys Ile Cys Leu Gly Val Ile Glu Val Val

Val Ala Ile Arg Leu Arg Cys Ile His Thr Gly Ser Ala Asp Phe Val
 405 410 415

Leu Glu Phe Phe Leu Pro Lys Asp Cys Asp Asp Leu Glu Glu Gln Arg
 420 425 430

Lys Met Leu Asn Ala Leu Ser Thr Ile Met Ala His Val Pro Arg Ser
 435 440 445

Leu Arg Thr Val Thr Asp Lys Glu Leu Glu Glu Glu Ser Glu Val Ile
 450 455 460

Glu Arg Glu Glu Ile Val Thr Pro Lys Ile Glu Asn Ala Ser Glu Leu
 465 470 475 480

His Gly Asn Ser Pro Trp Asn Ala Ser Leu Glu Glu Ile Gln Arg Ser
 485 490 495

Asn Asn Thr Ser Asn Pro Gln Asn Leu Gly Leu Val Phe Asp Gly Gly
 500 505 510

Asp Lys Pro Asn Asp Gly Phe Gly Leu Lys Arg Gly Phe Asp Tyr Thr
 515 520 525

Met Asp Ser Asn Val Asn Glu Ser Ser Thr Phe Ser Ser Gly Gly Phe
 530 535 540

Ser Met Met Ala Glu Lys Lys Arg Thr Lys Ala Asp Lys Thr Ile Thr
 545 550 555 560

Leu Asp Val Leu Arg Gln Tyr Phe Ala Gly Ser Leu Lys Asp Ala Ala
 565 570 575

Lys Asn Ile Gly Val Cys Pro Thr Thr Leu Lys Arg Ile Cys Arg Gln
 580 585 590

His Gly Ile Gln Arg Trp Pro Ser Arg Lys Ile Lys Lys Val Gly His
 595 600 605

Ser Leu Gln Lys Ile Gln Arg Val Ile Asp Ser Val Gln Gly Val Ser
 610 615 620

Gly Pro Leu Pro Ile Gly Ser Phe Tyr Ala Asn Phe Pro Asn Leu Val
 625 630 635 640

Ser Gln Ser Gln Glu Pro Ser Gln Gln Ala Lys Thr Thr Pro Pro Pro
 645 650 655

Pro Pro Pro Val Gln Leu Ala Lys Ser Pro Val Ser Ser Tyr Ser His
 660 665 670

Ser Ser Asn Ser Ser Gln Cys Cys Ser Ser Glu Thr Gln Leu Asn Ser
 675 680 685

Gly Ala Thr Thr Asp Pro Pro Ser Thr Asp Val Gly Gly Ala Leu Lys
 690 695 700

Lys Thr Ser Ser Glu Ile Glu Leu Gln Ser Ser Ser Leu Asp Glu Thr
 705 710 715 720

Ile Leu Thr Leu Ser Ser Leu Glu Asn Ile Pro Gln Gly Thr Asn Leu
 725 730 735

Leu Ser Ser Gln Asp Asp Asp Phe Leu Arg Ile Lys Val Ser Tyr Gly
 740 745 750

Glu Glu Lys Ile Arg Leu Arg Met Arg Asn Ser Arg Arg Leu Arg Asp
 755 760 765

Leu Leu Trp Glu Ile Gly Lys Arg Phe Ser Ile Glu Asp Met Ser Arg
 770 775 780

Tyr Asp Leu Lys Tyr Leu Asp Glu Asp Asn Glu Trp Val Leu Leu Thr
 785 790 795 800

Cys Asp Glu Asp Val Glu Glu Cys Val Asp Val Cys Arg Thr Thr Pro
 805 810 815

Ser His Thr Ile Lys Leu Leu Leu Gln Ala Ser Ser His His Phe Pro
 820 825 830

Glu Arg Ser Ser Ala Thr Glu Tyr Ser Leu Trp His
 835 840

<210> 3

<211> 894

<212> PRT

<213> 阿拉伯芥

<400> 3

Met Glu Asn Pro Ser Ala Ser Arg Asp Asn Lys Gly Phe Cys Phe Pro
 1 5 10 15

Asp Ile Pro Val Glu Glu Met Asp Gly Trp Val Lys Asn Leu Ile Ser
 20 25 30

Glu Glu Asp Met Phe Ser Ser Ser Ser Thr Ser Glu Leu Met Asn Phe
 35 40 45

Glu Ser Phe Ala Ser Trp Cys Asn Ser Pro Ser Ala Ala Asp Ile Leu
 50 55 60

Phe Thr Gln Tyr Gly Leu Ser Thr Ser Gln Ser Ile Ile Pro Phe Gly
 65 70 75 80

Gly Leu Glu Gly Ser Tyr Ala Cys Glu Lys Arg Pro Leu Asp Cys Thr
 85 90 95

Ser Val Pro Arg Ser Leu Ser His Ser Leu Asp Glu Lys Met Leu Lys
 100 105 110

Ala Leu Ser Leu Phe Met Glu Phe Ser Gly Glu Gly Ile Leu Ala Gln
 115 120 125

Phe Trp Thr Pro Ile Lys Thr Gly Asp Gln Tyr Met Leu Ser Thr Cys
 130 135 140

Asp Gln Ala Tyr Leu Leu Asp Ser Arg Leu Ser Gly Tyr Arg Glu Ala
 145 150 155 160

Ser Arg Arg Phe Thr Phe Ser Ala Glu Ala Asn Gln Cys Ser Tyr Pro
 165 170 175

Gly Leu Pro Gly Arg Val Phe Ile Ser Gly Val Pro Glu Trp Thr Ser
 180 185 190

Asn Val Met Tyr Tyr Lys Thr Ala Glu Tyr Leu Arg Met Lys His Ala
 195 200 205

Leu Asp Asn Glu Val Arg Gly Ser Ile Ala Ile Pro Val Leu Glu Ala

210

215

220

Ser Gly Ser Ser Cys Cys Ala Val Leu Glu Leu Val Thr Cys Arg Glu
 225 230 235 240

Lys Pro Asn Phe Asp Val Glu Met Asn Ser Val Cys Arg Ala Leu Gln
 245 250 255

Ala Val Asn Leu Gln Thr Ser Thr Ile Pro Arg Arg Gln Tyr Leu Ser
 260 265 270

Ser Asn Gln Lys Glu Ala Leu Ala Glu Ile Arg Asp Val Leu Arg Ala
 275 280 285

Val Cys Tyr Ala His Arg Leu Pro Leu Ala Leu Ala Trp Ile Pro Cys
 290 295 300

Ser Tyr Ser Lys Gly Ala Asn Asp Glu Leu Val Lys Val Tyr Gly Lys
 305 310 315 320

Asn Ser Lys Glu Cys Ser Leu Leu Cys Ile Glu Glu Thr Ser Cys Tyr
 325 330 335

Val Asn Asp Met Glu Met Glu Gly Phe Val Asn Ala Cys Leu Glu His
 340 345 350

Tyr Leu Arg Glu Gly Gln Gly Ile Val Gly Lys Ala Leu Ile Ser Asn
 355 360 365

Lys Pro Ser Phe Ser Ser Asp Val Lys Thr Phe Asp Ile Cys Glu Tyr
 370 375 380

Pro Leu Val Gln His Ala Arg Lys Phe Gly Leu Asn Ala Ala Val Ala
 385 390 395 400

Thr Lys Leu Arg Ser Thr Phe Thr Gly Asp Asn Asp Tyr Ile Leu Glu
 405 410 415

Phe Phe Leu Pro Val Ser Met Lys Gly Ser Ser Glu Gln Gln Leu Leu
 420 425 430

Leu Asp Ser Leu Ser Gly Thr Met Gln Arg Leu Cys Arg Thr Leu Lys
 435 440 445

Thr Val Ser Asp Ala Glu Ser Ile Asp Gly Thr Glu Phe Gly Ser Arg
 450 455 460

Ser Val Glu Met Thr Asn Leu Pro Gln Ala Thr Val Ser Val Gly Ser
 465 470 475 480

Phe His Thr Thr Phe Leu Asp Thr Asp Val Asn Ser Thr Arg Ser Thr
 485 490 495

Phe Ser Asn Ile Ser Ser Asn Lys Arg Asn Glu Met Ala Gly Ser Gln
 500 505 510

Gly Thr Leu Gln Gln Glu Ile Ser Gly Ala Arg Arg Leu Glu Lys Lys
 515 520 525

Lys Ser Ser Thr Glu Lys Asn Val Ser Leu Asn Val Leu Gln Gln Tyr
 530 535 540

Phe Ser Gly Ser Leu Lys Asp Ala Ala Lys Ser Leu Gly Val Cys Pro
 545 550 555 560

Thr Thr Leu Lys Arg Ile Cys Arg Gln His Gly Ile Met Arg Trp Pro
 565 570 575

Ser Arg Lys Ile Asn Lys Val Asn Arg Ser Leu Arg Lys Ile Gln Thr
 580 585 590

Val Leu Asp Ser Val Gln Gly Val Glu Gly Gly Leu Lys Phe Asp Ser
 595 600 605

Val Thr Gly Glu Phe Val Ala Val Gly Pro Phe Ile Gln Glu Phe Gly
 610 615 620

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Ser His Asp Glu Asp Ala Leu Ala Arg Ser
 625 630 635 640

Gln Gly Asp Met Asp Glu Asp Val Ser Val Glu Pro Leu Glu Val Lys
 645 650 655

Ser His Asp Gly Gly Gly Val Lys Leu Glu Glu Asp Val Glu Thr Asn
 660 665 670

His Gln Ala Gly Pro Gly Ser Leu Lys Lys Pro Trp Thr Trp Ile Ser
 675 680 685

Lys Gln Ser Gly Leu Ile Tyr Ser Asp Asp Thr Asp Ile Gly Lys Arg
 690 695 700

Ser Glu Glu Val Asn Lys Asp Lys Glu Asp Leu Cys Val Arg Arg Cys
 705 710 715 720

Leu Ser Ser Val Ala Leu Ala Gly Asp Gly Met Asn Thr Arg Ile Glu
 725 730 735

Arg Gly Asn Gly Thr Val Glu Pro Asn His Ser Ile Ser Ser Ser Met
 740 745 750

Ser Asp Ser Ser Asn Ser Ser Gly Ala Val Leu Leu Gly Ser Ser Ser
 755 760 765

Ala Ser Leu Glu Gln Asn Trp Asn Gln Ile Arg Thr His Asn Asn Ser
 770 775 780

Gly Glu Ser Gly Ser Ser Ser Thr Leu Thr Val Lys Ala Thr Tyr Arg
 785 790 795 800

Glu Asp Thr Val Arg Phe Lys Leu Asp Pro Tyr Val Val Gly Cys Ser
 805 810 815

Gln Leu Tyr Arg Glu Val Ala Lys Arg Phe Lys Leu Gln Glu Gly Ala
 820 825 830

Phe Gln Leu Lys Tyr Leu Asp Asp Glu Glu Glu Trp Val Met Leu Val
 835 840 845

Thr Asp Ser Asp Leu His Glu Cys Phe Glu Ile Leu Asn Gly Met Arg
 850 855 860

Lys His Thr Val Lys Phe Leu Val Arg Asp Ile Pro Asn Thr Ala Met
 865 870 875 880

Gly Ser Ser Ala Gly Ser Asn Gly Tyr Leu Gly Thr Gly Thr
 885 890

<210> 4

<211> 1533

<212> DNA

<213> 阿拉伯芥

<400> 4

atgtttgttgg aagaaacaga accaccaaac cagactctag atcatgtcct aagctggctt 60
 gaggattctg tgccttata cccattacca ggatttgatg attcttattt gctccacgag 120
 tttgatgggt ctcaaactg ggaatgggat cagactcaag atccggagca tggttttatt 180
 caaagctata gtcaagatct tagtgcagca tatgttgggt gtgaagcaac taacctggaa 240
 gtggtaacag aagctccatc cattgatttg gatcttccac ctgaaattca gcaaccaaac 300
 gatcagtcca ggaaaaggag ccacgacggg tttctcgagg cacaacaggt gaaaaaatcg 360
 gcaaggagca agagaaaagc aatcaagtct agtgagaaga gctccaaaga tggtaacaag 420
 gaagggagat gggcagagaa gttgcttaac ctttgtgctt tggccattac ggcaagtaac 480
 tcatcaaggg ttcaacatta ctttgtgtt ctctctgaac tggcctcttc tcttggatgat 540
 gctaatactc ggcttgcagc ttttggctt cgggctttgc aacatcatct ttcctcatcc 600
 tctgtgtcat catccttttg gcctgttttt acttttgctt cagcggaagt gaagatgttt 660
 caaaagactc tgcttaagtt ctacgaggta agcccttggg ttgctttgcc taacaacatg 720
 gcaaactcag ctatcctgca gattttagca caggatccca aagataaaaa ggatcttcat 780
 attattgata ttgggtgttc tcacgggatg caatggccca ctttgttggg ggctctgagc 840
 tgcagactag aaggacctcc tctctgtgtt cgaataaccg ttatatcaga tctaaccgca 900
 gacatacctt tctctgttgg tccaccaggt tacaattatg gttctcaact cctaggtttt 960
 gctcggcttc tcaagatcaa cttcagatt agtgtacttg acaagttaca actcattgat 1020
 acctcacctc acgagaactt aatcgtgtgt gctcagttta ggctgcatca cctgaagcat 1080
 agcatcaatg atgagagagg cgagactttg aaagcagtga gaagttaaag gccaaaagga 1140

gtggttcttt gtgagaacaa tggagaatgc agtagtagtg cggactttgc agcaggattc 1200
 tcgaagaaac tggagtatgt atggaagttt ctggattcaa caagctcggg atttaaagaa 1260
 gagaatagcg aagagagaaa actaatggaa ggagaggcaa caaagggtgt gatgaatgca 1320
 ggagatatga atgaaggaaa agagaaatgg tatgagagga tgagagaagc tggttttttt 1380
 gtagaagcat ttgaagaaga tgcagttgat ggagccaaat cttactaag aaagtatgac 1440
 aacaattggg aaataagaat ggaagatgga gatacctttg ctggattaat gtggaaagga 1500
 gaggcagttt ccttttgttc attgtggaag tag 1533

<210> 5

<211> 2535

<212> DNA

<213> 阿拉伯芥

<400> 5

atggaagata gtttccttca atctgagaac gtggttatgg acgctgactt catggatgga 60
 ttgttactag atggttgttg gttagagact acagatggat ctgagtttct taacatagct 120
 cttcaactt cttctgttag cccttttgat ccaacttctt tcatgtggtc tccaactcaa 180
 gatacatcag ctctttgcac atcaggagtt gtatctcaga tgtatggta ggattgtgta 240
 gaaagatcta gtcttgatga gtttcaatgg aacaaacgat ggtggattgg accaggaggt 300
 ggtggttctt cggttactga gaggttgggt caagcagttg aacacattaa agattacaca 360
 acagcgagag gctcacttat tcagttatgg gttccggtta atagaggcgg taagcgagtt 420
 ttgaccacaa aggaacaacc ttttagccat gatccgttgt gtcaaagact tgcaaactat 480
 agagagatct ctgtgaatta tcaacttctt gctgagcaag atgattccaa ggcttttagct 540
 ggtttgcttg ggagggtttt cttggggaag cttcctgaat ggactcctga tgtttagttt 600
 ttcaagagcg aggagtatcc gagagtacac catgctcagg actgcatgt ccgtggaacg 660

ctggcgattc cgggtgttga acaaggtagt aagatttgct tgggtgttat tgaggttgta	720
atgaccactg agatggltaa actaagacct gagcttgaaa gcatttgcag agcacttcag	780
gcagttgate ttaggagcac cgagcttccg attccacctt ctctaaaggg atgtgactta	840
tcctacaaag ctgccttacc tgaaatccga aacctcttga gatgtgcttg tgagactcat	900
aaactacctt tagctcagac atgggtttct tgtcaacagc aaaacaaaag cgggtgccgt	960
cacaacgatg agaactacat ccattgcgta tcaaccattg atgatgcttg ctacgttggg	1020
gatccaacag ttcgtgagtt ccatgaagct tgctctgagc atcacctctt gaaaggccaa	1080
ggagttgcag gtcaagcctt cttgaccaat ggaccttgct tttcatctga tgtatctaac	1140
tacaagaaat cagagtaccc tctctctcac catgctaata tgtacggttt acatggcgcg	1200
gttgcaattc gcctgcggtg catccacacg ggctctgctg atttcgtctt agagttcttt	1260
ttgcctaaag actgcatga tctggaggaa cagaggaaaa tgttgaatgc tctttcaact	1320
attatggctc atgtgcctag aagcttaagg actgttacag acaaagaact agaagaagag	1380
agtgaagtga tagagagggg agagatagta acgccaaga tagaaaacgc atctgaactc	1440
cacggaaatt ccccatggaa tgcctctctt gaagaaatcc agcggagtaa taatactagt	1500
aatcctcaga atcttggact ggtatttgat ggaggagaca aaccaaata tggttttggc	1560
ttaaaaagag gttttgacta caccatggat tctaattgca atgagagcag cactttctct	1620
agtggtggtt tcagtatgat ggccgagaaa aagcgtacaa aagcagataa aaccatcact	1680
ttggatgttc ttcgacagta tttcgctggg agcttgaaag atgcagccaa gaatatcggg	1740
gtttgtccaa cgaccttgaa gagaatatgc agacagcatg gtatacaaag atggccttca	1800
agaaagataa aaaaagtggg acattctctg cagaagatcc aacgagtgat tgattcgggt	1860
caaggtgttt ctggctctct tccataggc tcattctatg caaatttccc caatttagtc	1920
tcacagtcac aagaaccatc acaacaagcc aagaccacgc ctctctctcc gccgccagt	1980

cagcttgcaa agtcccctgt atcctcgtat agtcacagtt caaactctag ccaatgttgc 2040
 tccagtgaaa cccaactaaa cagcgggtgca acaaccgatc ctccttcaac tgatgtagga 2100
 ggtgcattga agaagacgag cagcgaatac gagcttcaaa gctcgagtct tgacgagaca 2160
 attttgactc tctccagttt agaaaacatc cctcaaggca ccaacttggt atcatctcaa 2220
 gatgatgact ttctgaggat taaagttagc tacggagaag agaagatcag attacggatg 2280
 cggaattcgc gcaggttaag agatctattg tgggagattg ggaagcgggt tagcatagag 2340
 gatatgagca ggtatgatct aaagtactta gacgaagaca atgaatgggt ttgtttgact 2400
 tgcgacgaag atgtagaaga gtgtgtagat gtctgcagaa ctacaccgag tcataccatt 2460
 aagcttttgc ttcaggcttc ttctcatcat ttccctgaac gttcttcagc tactgaatac 2520
 agtttatggc actga 2535

<210> 6
 <211> 2685
 <212> DNA
 <213> 阿拉伯芥

<400> 6
 atggagaacc catcagcatc cagagataat aaaggtttct gttttccaga tattccagta 60
 gaagaaatgg atggctgggt taagaatttg atctctgaag aagatatggt tagctcctct 120
 tcaacttcag agcttatgaa tttcgaatct ttgtcttcat ggtgcaacag cccttccgct 180
 gcagatatct tgttcaactca atacggttta tcgacctctc aatctattat acctttcgga 240
 ggcttagaag gctcatacgc ttgcgagaaa agaccgttag actgtactag tgttccaagg 300
 tcattgagcc attctcttga tgagaagatg ctcaaagcat taagtttggt tatggagttc 360
 tctggagagg gaattctggc acagttttgg actcctatta agacaggaga tcagtacatg 420
 cttagtactt gtgatcaggc gtatctgctt gactcgaggc tatctggata ccgtgaagcg 480

tcgaggagat tcactttctc tgctgaagca aatcaatgct cttatccagg tcttccaggc	540
agagtcttta tctctggagt tcctgagtgg acatcaaacg ttatgtatta caagactgct	600
gaatatttaa ggatgaagca tgcattagat aacgaagtcc gtggttcgat tgcaattcct	660
gtccttgaag catcaggttc ttcttgttgt gcagttctgg aacttgtgac atgtagggaa	720
aaaccaaact ttgatgtgga gatgaactct gtttgccgtg ctctgcaggc cgigaactta	780
caaacatcaa ctattcctcg tcgccagtac ctttcaagta atcaaaaaga agctttggct	840
gaaataagag atgttctcag agcagtgtgc tatgcacata ggttgccttt agctctagct	900
tggattccct gtagttactc caaaggagca aacgatgagt tggtaaaggt ttatggaaaa	960
aactcaaagg aatgttctct tctttgcata gaagagacat catgttatgt gaatgatatg	1020
gaaatggaag gctttgtgaa tgcatgtttg gagcattatc taagagaagg gcaaggaatt	1080
gttggcaaag cactcatatc aaacaaaccg tctttctcat ctgatgtaa gacatttgat	1140
atctgcgagt accctcttgt tcaacatgct cgaaagttg gtcttaatgc tgcagttgct	1200
accaaactga ggagcacatt cactggtgac aatgactata tacttgagtt tttttacct	1260
gtaagtatga agggaagctc agaacaaca cttttgctgg acagtctctc gggcaccatg	1320
cagagactat gtcggactct gaaaactggt tcagatgctg aatcaattga cggtacagaa	1380
tttggatctc gtagtgtaga aatgacaaat ctcccacagg ctactgtatc cgttgggaagc	1440
tttcatacga catttcttga tactgacgtc aactctactc gaagtacctt ttcgaacatc	1500
tcctctaata aaagaaatga aatggcaggt tctcaaggca ctcttcagca ggaaattagc	1560
ggagcaagaa gattagagaa gaagaaaagc agtacagaga agaatgtgag cttaaattgtt	1620
ctccaacaat acttctctgg gagcttaaag gatgctgcaa aaagccttgg tgtttgtccg	1680
actacactaa aaaggatatg tagacaacac ggaattatga gatggccatc tcgaaagatt	1740

aacaaagtga ataggtcact aaggaaaata cagacggtgc ttgactctgt ccagggtgta	1800
gaaggaggac tgaagtttga ctcggtgaca ggggaatttg tagcagttgg cccttttata	1860
caagaatttg ggacccaaaa gagtctgtct tctcatgatg aagatgcact tgcaagaagc	1920
caaggtgata tggatgaaga tgtgtcagta gagcctttgg aagttaaadc tcatgatggt	1980
ggcgggtgtca agttggagga ggatgttgaa acaaaccacc aagcgggacc aggatccttg	2040
aagaagccat ggacttggat aagcaaacag tctggcttga tctatagtga tgataccgac	2100
ataggaaaaa gaagtgaaga ggtaaacaag gataaagaag acctttgtgt tcgaagggtc	2160
ttgagctctg tagcacttgc aggtgatgga atgaatacaa gaatcgagcg aggtaatgga	2220
actgtagaac caaaccactc catatcaagt agcatgtcgg attcatcaaa tagctcagga	2280
gcagttttgc tgggaagttc atctgcttcc ttggaacaaa actggaacca aataagaact	2340
cataacaata gcggtgaaag cggatcaagt tcaacactaa ccgtaaaagc cacttacaga	2400
gaggacactg tacgtttcaa gcttgatcca tacgttgttg ggtgttctca gctctacaga	2460
gaagtggcta agcgtttcaa gctgcaagaa ggtgcctttc agttgaaata cttggatgat	2520
gaagaagaat gggatgatgtt ggtcacagat tctgatctcc atgaatgctt cgagatatta	2580
aatggtatga gaaaacatac agtgaagttt ctggtccgtg atataccgaa caccgcaatg	2640
ggaagtccg caggcagcaa tggttacctc ggaacaggca cctaa	2685

申請專利範圍

1. 一種用於增加非結瘤植物氮效率的方法，該方法包含將至少一異源性多肽引進植物，以製造基因轉殖植物，其中該異源性多肽係選自由結瘤信號轉導途徑-樣(NSPs)與NIN-樣蛋白(NLPs)構成之群組。
2. 如請求項1之方法，其中該異源性多肽係選自由NSP1-樣、NLP4、與NLP9構成之群組。
3. 如請求項2之方法，其中該異源性多肽係與SEQ ID NOs:1-4當中一或多者至少90%一致。
4. 如請求項2之方法，其中將異源性多肽引進植物包含以編碼異源性多肽的聚核苷酸轉形植物。
5. 如請求項4之方法，其中該聚核苷酸係與SEQ ID NOs:4-6當中一或多者至少80%一致。
6. 如請求項4之方法，其中該聚核苷酸在嚴苛條件下係雜交至SEQ ID NOs:4-6當中一或多者。
7. 如請求項4之方法，其中該聚核苷酸係經密碼子-最佳化，以在植物中表現異源性多肽。
8. 如請求項4之方法，其中該聚核苷酸係操作性地聯結至選自下列所構成群組的植物促進子：組成促進子、組織偏好性促進子、組織特異性促進子、與可誘發促進子。
9. 如請求項1之方法，其中該增加的氮效率係包含基因轉殖植物在限氮條件下增加的生長。
10. 如請求項1之方法，其中該異源性多肽係引進植物的根

部組織。

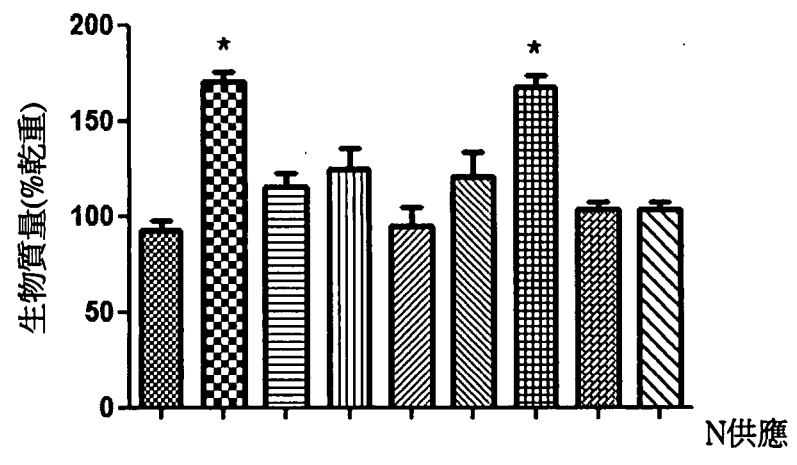
11. 如請求項1之方法，其中該方法包含使基因轉殖植物在限氮條件生長。
12. 一種基因轉殖植物，其係藉由如請求項1之方法製造。
13. 一種細胞、組織、種籽、或材料，其係獲自如請求項12之基因轉殖植物。
14. 一種核酸分子，其包含具有農藝功能的聚核苷酸，其中該聚核苷酸係選自由下列構成之群組：與SEQ ID NO:4至少80%一致的聚核苷酸；在嚴苛條件下雜交至由SEQ ID NO:4構成之核酸的聚核苷酸；與SEQ ID NO:5至少80%一致的聚核苷酸；在嚴苛條件下雜交至由SEQ ID NO:5構成之核酸的聚核苷酸；與SEQ ID NO:6至少80%一致的聚核苷酸；以及在嚴苛條件下雜交至由SEQ ID NO:6構成之核酸的聚核苷酸；其中該核酸序列係操作性地聯結至異源性促進子。
15. 一種基因轉殖植物細胞，其係以如請求項14之核酸分子穩定轉形。
16. 一種用於製造基因轉殖植物的方法，該方法包含將核酸引進植物細胞，其中該核酸包含編碼異源性結瘤信號轉導途徑1-樣(NSP1-樣)、NIN-樣蛋白-4 (NLP4)、或NIN-樣蛋白-9 (NLP9)多肽的核苷酸序列，藉此製造基因轉殖植物。
17. 如請求項16之方法，其中該植物為非結瘤植物。
18. 一種基因轉殖植物，其係藉由如請求項16之方法製造。

19. 一種細胞、組織、種籽、或材料，其係獲自如請求項17之基因轉殖植物。
20. 如請求項17之基因轉殖植物，其中該基因轉殖植物包含基因轉殖植物在限氮條件下相較於相同物種的野生型植物所增加的生長。
21. 一種用於增加非結瘤植物氮效率的方法，該方法包含將促進與固氮菌(NFB)之關連性的至少一方式引進植物，其中該植物的氮效率係經由生物固氮作用(BNF)增加。
22. 如請求項21之方法，其中該促進與固氮菌NFB之關連性的方式係選自由下列構成之群組：由SEQ ID NOs:1、3、與4當中一者構成的多肽、以及由SEQ ID NOs:4-6當中一者構成的聚核苷酸。

圖式

1/7

A



B

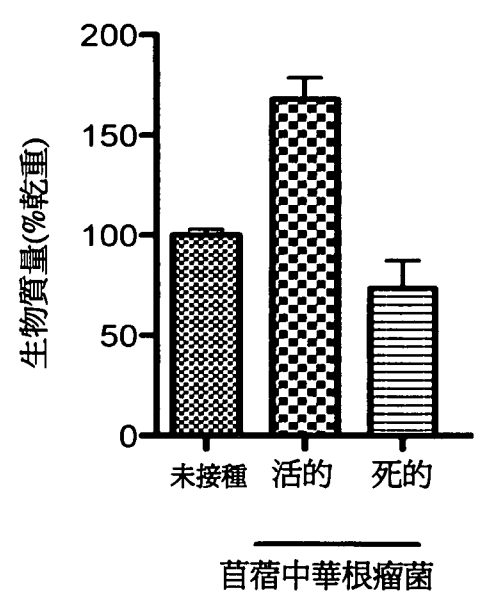


圖1

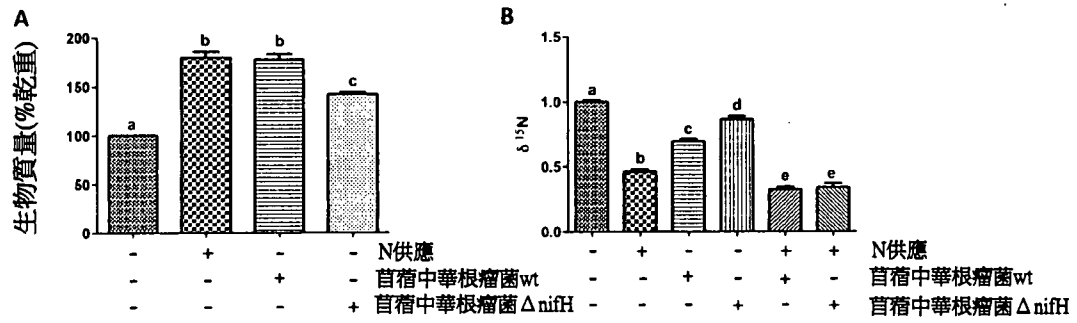


圖2

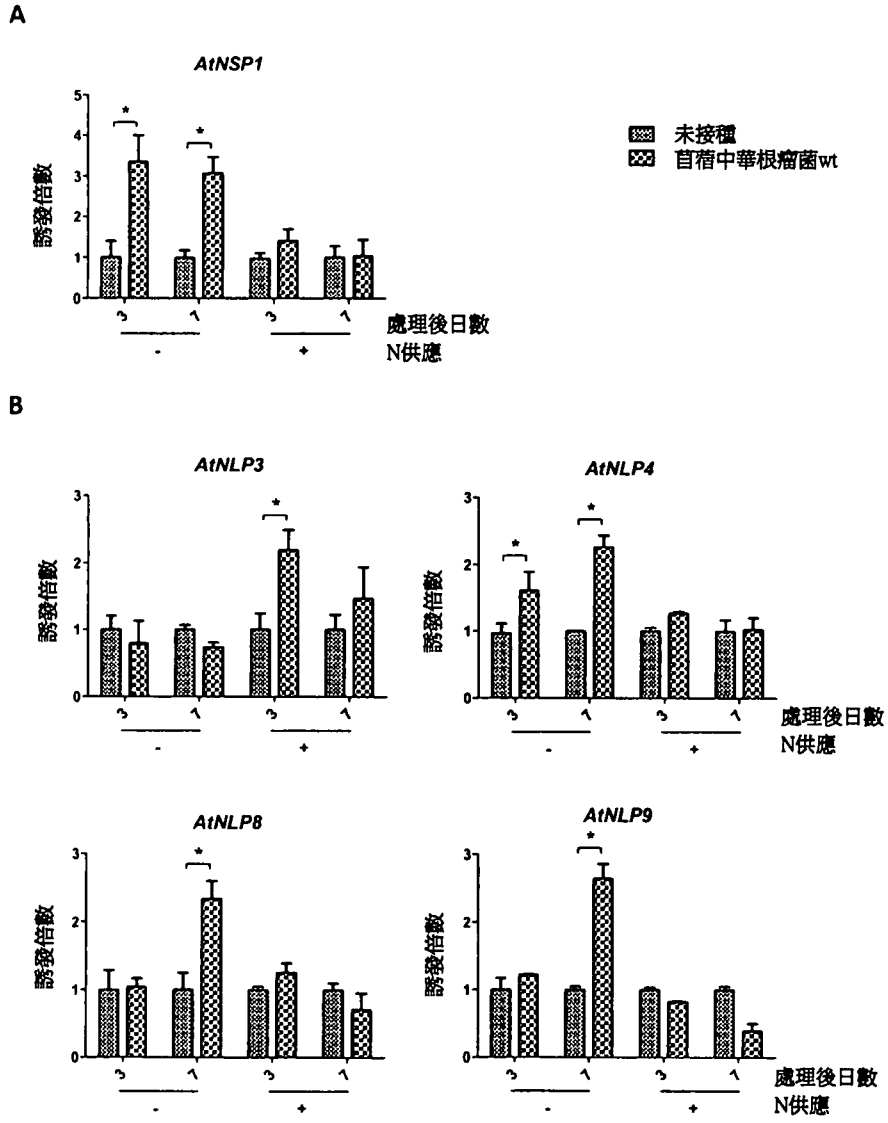


圖3

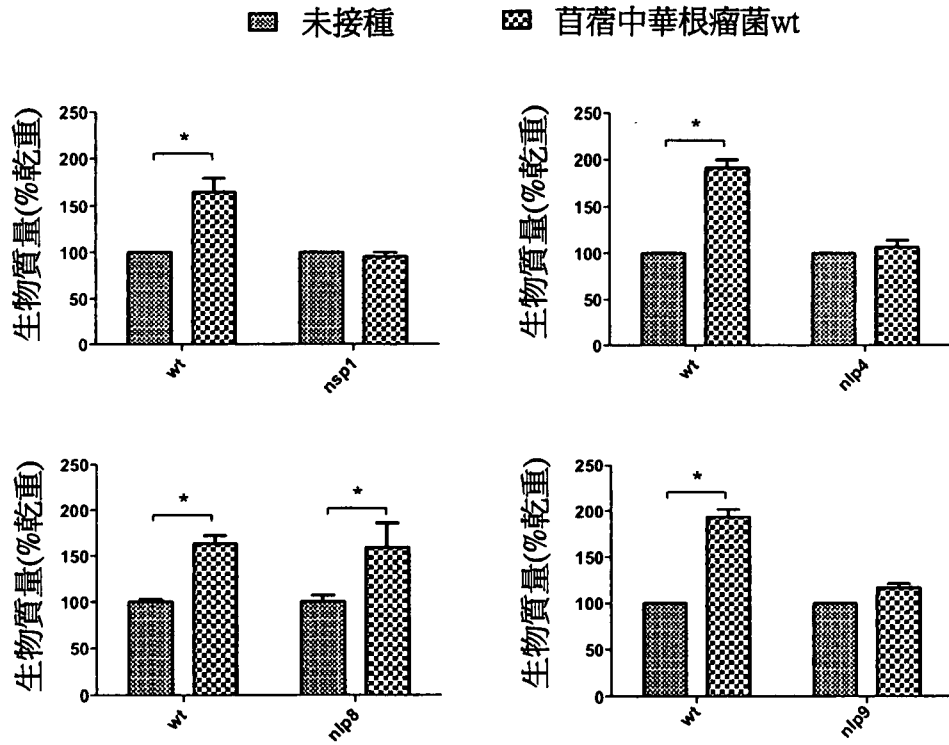


圖4

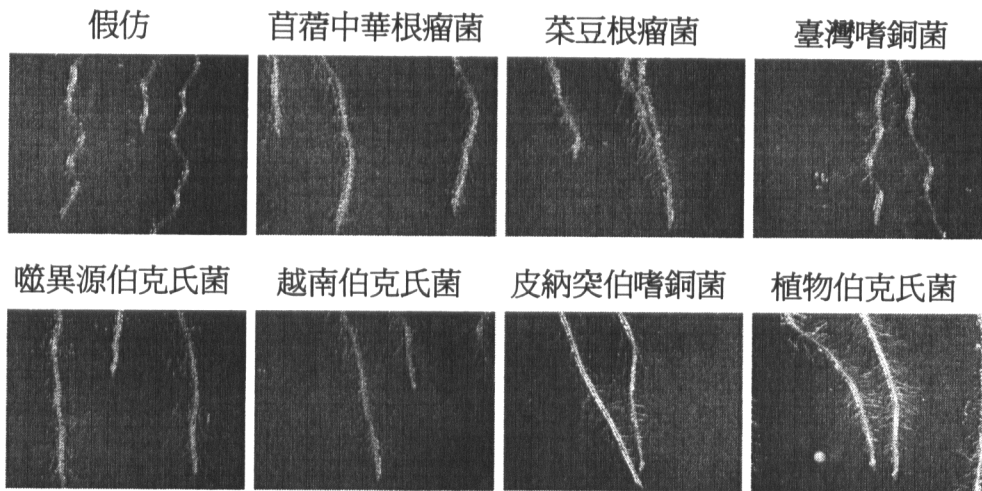


圖5

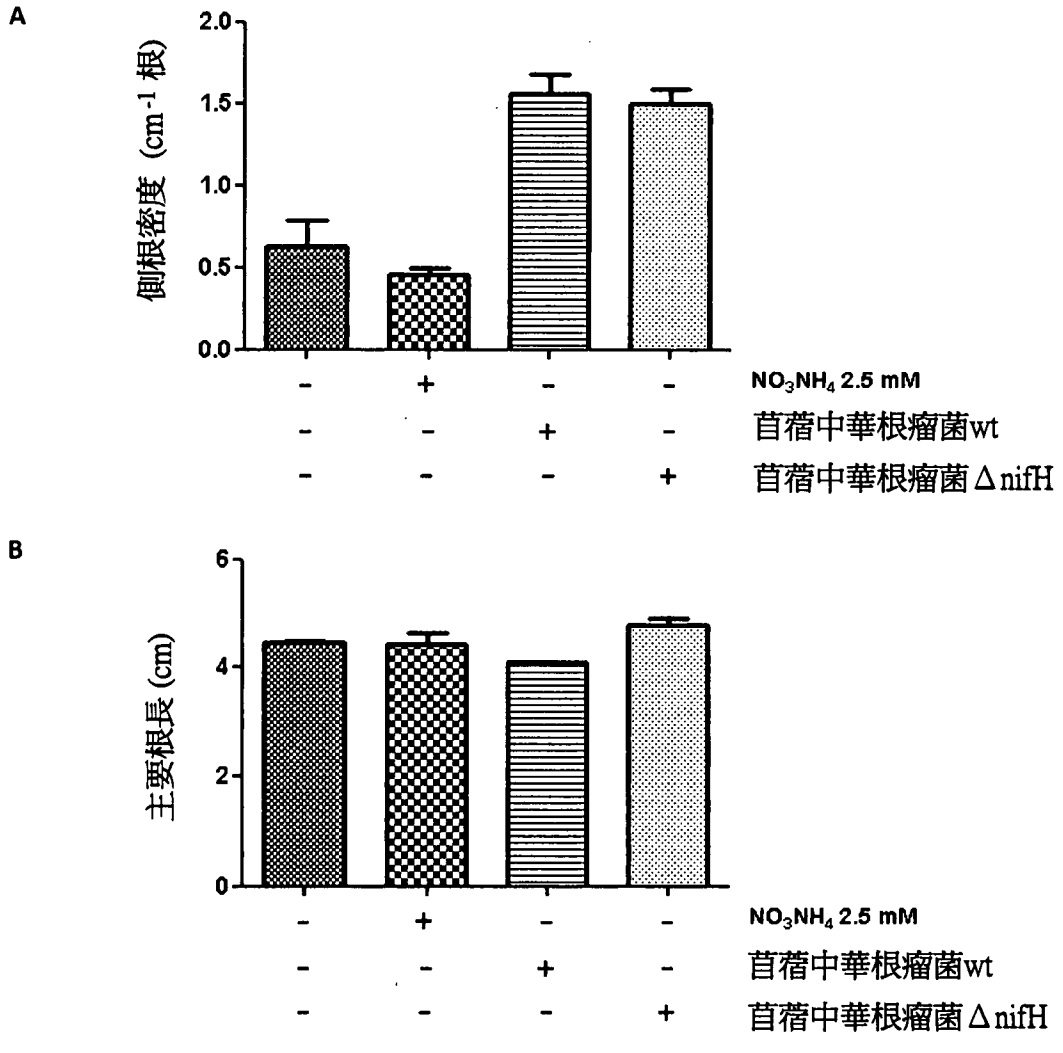


圖6

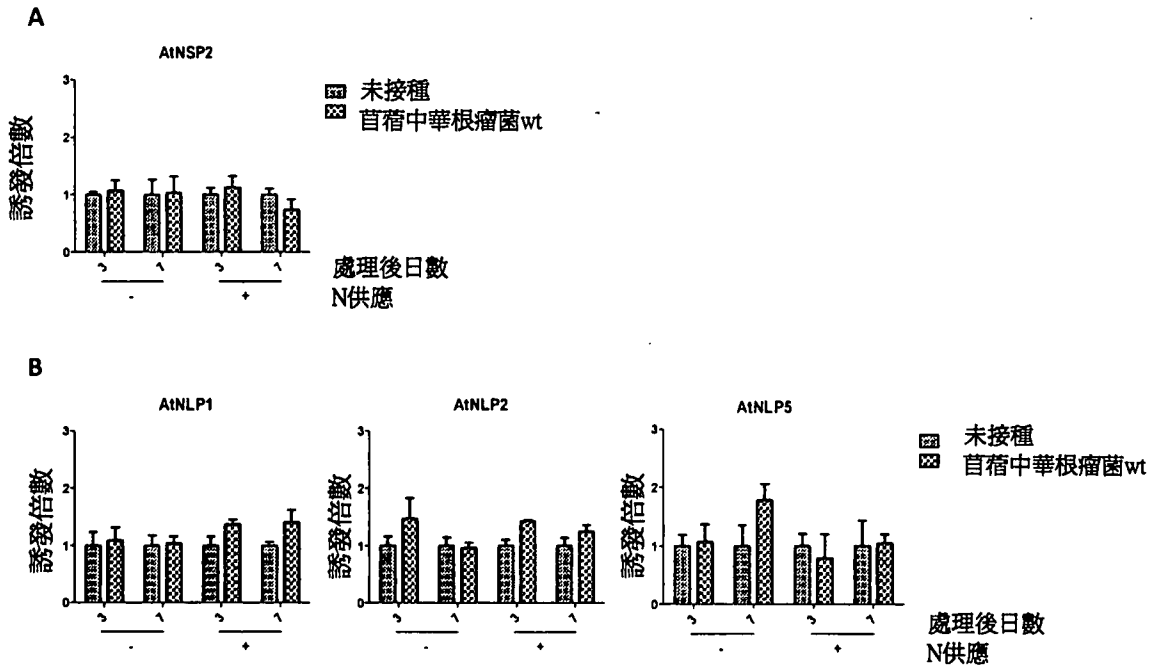


圖7