



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111154767 A

(43)申请公布日 2020.05.15

(21)申请号 201811229714.4

A01H 6/46(2018.01)

(22)申请日 2018.10.22

C12Q 1/6895(2018.01)

(71)申请人 未名生物农业集团有限公司

地址 100085 北京市海淀区上地西路39号  
北大生物城

申请人 先锋海外公司

(72)发明人 高阳 吕贵华 毛冠凡 王昌贵

王国奎

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 王健 林晓红

(51)Int.Cl.

C12N 15/29(2006.01)

C12N 15/82(2006.01)

A01H 5/06(2018.01)

权利要求书2页 说明书42页

序列表23页 附图9页

(54)发明名称

根长调控基因LOGL5及相应的构建体和其应用

(57)摘要

本发明公开了分离的多核苷酸和多肽、和用于调控植物根长度的重组DNA构建体和CRISPR-Cas构建体,含有这些重组DNA构建体或修饰的LOGL5基因或其调控元件的组合物(例如植物或种子),和利用这些重组DNA构建体和CRISPR-Cas构建体的方法。重组DNA构建体包含LOGL5基因和与之可操作连接的植物中有功能的启动子,CRISPR-Cas构建体靶向LOGL5基因或其调控元件,其中所述LOGL5基因编码根长度调控多肽。

1. 一种分离的多核苷酸包括：(a) 一种多核苷酸，其核苷酸序列与SEQ ID NO:1的序列一致性至少为85%；(b) 一种多核苷酸，其核苷酸序列与SEQ ID NO:2的序列一致性至少为85%；(c) 一种多核苷酸，其编码的多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:3的序列一致性至少为90%；或(d) 核苷酸序列(a)、(b)或(c)的全长互补序列，其中，增加所述多核苷酸的表达量缩短植物的根长。

2. 根据权利要求1所述的分离的多核苷酸，其中所述多核苷酸包括SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的核苷酸序列。

3. 根据权利要求1的所述分离的多核苷酸，其中，所述分离的多核苷酸编码的多肽包括SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

4. 权利要求1-3中任一权利要求的所述分离的多核苷酸在植物中调控根长的应用。

5. 一种重组DNA构建体，其包含权利要求1-3任一项分离的核苷酸和与之可操作连接的至少一个异源调控元件。

6. 一种修饰的植物、植物细胞或种子，所述修饰的植物、植物细胞或种子中，编码根长调控多肽LOGL5的至少一个多核苷酸的表达量是改变的，其中，与种植在相同条件下不含有改变的LOGL5表达的对照植物相比，所述植物表现出改变的根长度。

7. 根据权利要求6所述的植物，其中，与对照植物相比，增加根长调控基因LOGL5的表达减小植物根的长度，所述对照植物不增加LOGL5的表达。

8. 根据权利要求6所述的植物，其中，与对照植物相比，降低根长调控基因LOGL5的表达增加植物根的长度，所述对照植物不降低LOGL5的表达。

9. 根据权利要求8所述的植物，其中所述植物包含一种抑制DNA构建体，所述抑制DNA构建体包含一个抑制元件和与之可操作连接的至少一个异源调控元件，所述抑制元件包括连续的至少100bp碱基对的下述序列：(a) 与SEQ ID NO:1或2的核苷酸序列一致性至少为85%的多核苷酸；(b) 编码的多肽与SEQ ID NO:3的氨基酸序列一致性至少为90%的多核苷酸；(c) 核苷酸序列(a)或(b)的全长互补序列。

10. 根据权利要求8所述的植物，其中所述植物包含对根长调控基因LOGL5或其调控元件的修饰，所述修饰通过向包含内源LOGL5基因和其调控元件所在的基因组区域(a)引入一段DNA片段或删除一段DNA片段或替换一段DNA片段，或(b)引入一个或多个核苷酸改变获得，其中与对照植物中野生型LOGL5多肽的表达和活性相比，所述内源LOGL5多肽的表达水平或活性是降低的。

11. 根据权利要求10所述的植物，其中，所述植物包含突变的LOGL5基因；与对照植物相比，所述植物中LOGL5多肽的表达或者活性是降低的，所述植物表现较长的根。

12. 根据权利要求10所述的植物，其中，所述植物包含突变的LOGL5基因；与对照植物相比，所述植物中LOGL5多肽的活性是降低或消失的，所述植物表现出较长的根。

13. 根据权利要求10所述的植物，其中，所述植物包含突变的LOGL5调控元件，与对照植物相比，所述植物中LOGL5多肽的表达是降低的，所述植物表现出较长的根。

14. 根据权利要求8-13任一项所述的植物，其中所述修饰的植物在正常条件下的产量高于对照。

15. 根据权利要求6至13任意一项所述的植物，其中所述植物选自水稻、玉米、大豆、向日葵、高粱、油菜、小麦、苜蓿、棉花、大麦、粟、甘蔗或柳枝稷。

16. 一种调控水稻植株根长度的方法, 其包括改变水稻植株中编码根长度调控多肽 LOGL5 的多核苷酸的表达量。

17. 根据权利要求16所述的方法, 其中所述多核苷酸包括: (a) 一种多核苷酸, 其核苷酸序列与SEQ ID NO:1序列一致性至少为85%; (b) 一种多核苷酸, 其核苷酸序列与SEQ ID NO:

2的序列一致性至少为85%; (c) 一种多核苷酸, 其编码的多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:

3的序列一致性至少为90%。

18. 根据权利要求16或17的方法, 其中所述多核苷酸的表达通过下述的一个步骤改变:

(a) 通过重组DNA构建体增加植物中编码LOGL5多肽的多核苷酸的表达, 其中所述重组DNA构建体包含一个编码LOGL5多肽的多核苷酸和与其可操作连接的至少一个异源调控元件, 所述多核苷酸编码的多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:3的序列一致性至少为90%;

(b) 增减或者降低内源多核苷酸的表达, 所述多核苷酸编码的多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:3的序列一致性至少为90%;

(c) 通过重组DNA构建体降低植物中编码LOGL5多肽的多核苷酸的表达, 其中重组DNA构建体包含一个抑制元件用于下调所述内源多核苷酸的表达, 所述内源多核苷酸编码的多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:3的序列一致性至少为90%。

19. 根据权利要求18所述的方法, 其中, 与对照植物相比, 降低水稻植株中所述多核苷酸的表达促进根变长, 所述对照植物没有所述降低的表达。

20. 一种方法, 为与对照植物的野生型LOGL5多肽的表达水平或活性相比, 降低植物内源LOGL5多肽的表达水平或活性方法; 且与对照植物相比, 所述植物表现出较长的根; 所述方法包括以下步骤: 在内源LOGL5基因所在的基因组区域 (i) 引入一段DNA片段减少LOGL5的表达, 或 (ii) 引入一个或多个核苷酸改变, 其中所述改变能有效降低内源LOGL5多肽的表达水平或活性。

21. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述改变通过锌指核酸酶、转录激活样效应因子核酸酶 (TALENs)、CRISPR-Cas、引导Cas核酸内切酶、归巢核酸内切酶 (Meganucleases) 或 CRISPR-Cas核糖核蛋白复合体引入。

## 根长调控基因LOGL5及相应的构建体和其应用

### 技术领域

[0001] 本技术领域涉及植物育种和遗传学,特别是涉及用于调控植物根长的重组DNA构建体和基因编辑构建体及提高诸如干旱、氮素限制胁迫的非生物胁迫或提高产量的方法。

### 背景技术

[0002] 生物和非生物原因可以对植物产生胁迫,例如造成生物胁迫的原因包括病原菌感染、昆虫取食、一种植物对另一种植物的寄生,例如槲寄生;非生物胁迫包括诸如可利用水分的过量或者不足、极限温度和诸如除草剂的合成化学药品。

[0003] 非生物胁迫是造成世界范围内农作物减产的主要原因,造成主要农作物平均减产50%以上(Boyer, J.S. (1982) Science 218:443-448; Bray, E.A. 等(2000) In Biochemistry and Molecular Biology of Plants, edited by Buchanan, B.B. 等, Amer. Soc. Plant Biol., pp. 1158-1249)。植物固着于地面,必须调整以适应周围的环境条件,这就导致了植物发育中基因调控、形态形成和新陈代谢的巨大可塑性。植物的适应和防御策略包括激活编码重要蛋白的基因,这些蛋白可以使植物适应或防御不同胁迫条件。

[0004] 植物是固着生物,根部将植物锚定在土壤中,并从土壤或生长介质中吸收养分供植物生长和增加营养物质、种子、果实等。根组织的改造有助于提高植物在恶劣环境条件(包括干旱、营养缺乏)下生长的能力,较强的根可以更好的到达或吸收水分或营养物质。

### [0005] 发明概述

[0006] 本发明包括以下具体实施例:

[0007] 一个实施例中,本发明包括一种分离的多核苷酸,其包括:(a)一种多核苷酸,其核苷酸序列与SEQ ID NO:1的一致性至少为85%;(b)一种多核苷酸,其核苷酸序列与SEQ ID NO:2的一致性至少为85%;(c)一种多核苷酸,其编码的多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:3的一致性至少为90%;或(d)核苷酸序列(a)、(b)或(c)的全长互补序列,其中,增加所述多核苷酸的表达量缩短植物的根长。所述分离的多核苷酸包括SEQ ID NO:1或2的核苷酸序列。所述多肽包括SEQ ID NO:3的氨基酸序列。进一步的,增加所述多核苷酸的表达降低正产灌水条件下、干旱胁迫条件和/或氮素限制条件下的产量;减少所述多核苷酸的表达增加正产灌水条件下、干旱胁迫条件和/或氮素限制条件下的产量。

[0008] 另一个方面,本发明公开了一种分离的多核苷酸在植物中调控根表型的应用,并进一步提高产量,其中,所述分离的多核苷酸包括(a)一种多核苷酸,其核苷酸序列与SEQ ID NO:1的一致性至少为85%;(b)一种多核苷酸,其核苷酸序列与SEQ ID NO:2的一致性至少为85%;(c)一种多核苷酸,其编码的多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:3的一致性至少为90%;或(d)核苷酸序列(a)、(b)或(c)的全长互补序列,所述分离的多核苷酸的应用为,通过降低所述多核苷酸在植物中的表达使根变长,通过增加所述多核苷酸在植物中的表达使根变短。

[0009] 另一个实施例中,本发明公开了一种重组DNA构建体,其包含分离的多核苷酸和与之可操作连接的至少一个异源调控元件,其中所述多核苷酸包含(a)一种多核苷酸,其核苷

酸序列与SEQ ID NO:1或2一致性至少为85%；(b)一种多核苷酸,其编码的多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:3的一致性至少为90%；或(c)核苷酸序列(a)或(b)的全长互补序列。

[0010] 另一个实施例中,本发明公开了一种CRISPR/Cas构建体,其包括靶向LOGL5基因上游和/或LOGL5基因核苷酸序列的sgRNA,其中LOGL5基因上游的核苷酸序列包括(a)一种多核苷酸,其核苷酸序列与SEQ ID NO:8的一致性至少为85%；或(b)核苷酸序列(a)的全长互补序列；LOGL5基因的核苷酸序列包括:(i)一种多核苷酸,其核苷酸序列与SEQ ID NO:1或2一致性至少为85%；(b)一种多核苷酸,其编码的多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:3的一致性至少为90%；或(c)核苷酸序列(a)或(b)的全长互补序列。sgRNA包括SEQ ID NO:14-35的核苷酸序列,优选的,sgRNA包括SEQ ID NO:14-16的核苷酸序列。

[0011] 另一方面,本发明公开了一种修饰的植物、植物细胞、或种子,所述修饰的植物、植物细胞或种子中,编码多肽LOGL5的至少一个多核苷酸的表达是改变的,其中,与种植在相同条件下的对照植物相比,所述植物表现出改变的根长度。

[0012] 与对照植物相比,增加LOGL5基因的表达量缩短植物的根长,所述对照植物不增加LOGL5的表达量。进一步的,所述植物包含一个重组DNA构建体,所述重组DNA构建体包含LOGL5多核苷酸和与之可操作相连的至少一个异源调控元件,所述LOGL5多核苷酸包括(a)一种多核苷酸,其核苷酸序列与SEQ ID NO:1或2一致性至少为85%；(b)一种多核苷酸,其编码的多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:3的一致性至少为90%；或(c)核苷酸序列(a)或(b)的全长互补序；与不含有所述重组DNA构建体的对照植物相比,增加所述多核苷酸的表达造成较短的根；或者植物包含修饰的调控元件增加内源多核苷酸的表达,所述多核苷酸包括(a)一种多核苷酸,其核苷酸序列与SEQ ID NO:1一致性至少为85%；(b)一种多核苷酸,其核苷酸序列与SEQ ID NO:2的一致性至少为85%；(c)一种多核苷酸,其编码的多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:3的一致性至少为90%；或(d)核苷酸序列(a)、(b)或(c)的全长互补序列；与对照植物相比,所述植物表现出较短的根,并降低产量。

[0013] 与对照植物相比,降低LOGL5基因的表达促进植物根变长,并进一步增加产量,其中所述对照植物没有减少LOGL5的表达。进一步的,所述植物包含一种抑制DNA构建体,所述抑制DNA构建体包含抑制元件和与之可操作连接的至少一个异源调控元件,所述抑制元件包括连续的至少100bp的下述序列:(a)一种多核苷酸,其核苷酸序列与SEQ ID NO:1或2一致性至少为85%；(b)一种多核苷酸,其编码的多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:3的一致性至少为90%；或(c)核苷酸序列(a)或(b)的全长互补序列。或者,所述植物包含对LOGL5基因或其调控元件的修饰,所述修饰通过向包含内源LOGL5基因和其调控元件所在的基因组区域(a)引入一段DNA片段或删除一段DNA片段或替换一段DNA片段,或(b)引入一个或多个核苷酸改变获得,其中与对照植物中野生型LOGL5多肽的表达和活性相比,所述内源LOGL5多肽的表达水平或活性是降低的。

[0014] 一个实施例中,所述植物包含突变的LOGL5基因；与对照植物相比,所述植物中LOGL5多肽的表达或者活性是降低的,所述植物表现出较长的根。

[0015] 另一个实施例中,所述植物包含突变的LOGL5基因；与对照植物相比,所述植物中LOGL5多肽的活性是降低或消失的,所述植物表现出较长的根。

[0016] 另一个实施例中,所述植物包含突变的LOGL5调控元件；与对照植物相比,所述植物中LOGL5多肽的表达是降低的,所述植物表现出较长的根。

[0017] 另一方面,本发明包括任一公开的植物,所述植物选自水稻、玉米、大豆、向日葵、高粱、油菜、小麦、苜蓿、棉花、大麦、粟、甘蔗或柳枝稷。

[0018] 另一方面,本发明提供了一种水稻植株,所述水稻植株包含修饰的基因组位点,其中,在植物中一种内源多核苷酸的表达是增加或降低的,以致于当所述内源多核苷酸的表达降低时根变长,当所述内源多核苷酸的表达增加时根变短,所述内源多核苷酸编码多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:3相比,具有至少90%的序列一致性。所述修饰的基因组位点在调控区域包含突变可以降低所述内源多核苷酸的表达;所述修饰的基因组位点在基因中包含突变可以降低所述内源多核苷酸的表达或活性。

[0019] 另一方面,本发明提供了一种调控植物根长的方法,其包括改变水稻植株中编码LOGL5多肽的多核苷酸的表达,其中,所述多核苷酸包括:(a)一种多核苷酸,其核苷酸序列与SEQ ID NO:1或2一致性至少为85%;(b)一种多核苷酸,其编码的多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:3的一致性至少为90%,增加所述多核苷酸在植株中的表达缩短根长,降低所述多核苷酸在植株中的表达增加根长,并进一步增加产量。

[0020] 所述多核苷酸的表达通过下述的一个步骤改变:(a)通过重组DNA构建体增加植物中编码LOGL5多肽的多核苷酸的表达,其中所述重组DNA构建体包含一个编码LOGL5多肽的多核苷酸和与其可操作连接的至少一个异源调控元件,所述多核苷酸编码的多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:3的一致性至少为90%;(b)增减或者降低内源多核苷酸的表达,所述多核苷酸编码的多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:3的一致性至少为90%;(c)通过重组DNA构建体降低植物中编码LOGL5多肽的多核苷酸的表达,其中重组DNA构建体包含一个抑制元件用于下调所述内源多核苷酸的表达,所述内源多核苷酸编码的多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:3的序列一致性至少为90%。

[0021] 另一方面,本发明提供了一种方法,为与对照植物的野生型LOGL5多肽的表达水平或活性相比,增加植物内源LOGL5多肽的表达水平或活性方法;且与对照植物相比,所述植物表现出较短的根;所述方法包括以下步骤:在内源LOGL5基因所在的基因组区域(i)引入一段DNA片段增加LOGL5的表达,或(ii)引入一个或多个核苷酸改变,其中所述改变能有效增加内源LOGL5多肽的表达水平或活性。

[0022] 本发明提供了一种方法,为与对照植物的野生型LOGL5表达水平或活性相比,降低植物中内源LOGL5多肽表达水平或活性方法;且与对照植物相比,所述植物表现出较长的根;所述方法包括以下步骤:在内源LOGL5基因和其调控元件所在的基因组区域(i)引入一段DNA片段,删除一段DNA片段或替换一段DNA片段,或(ii)引入一个或多个核苷酸改变,其中所述改变能有效降低内源LOGL5多肽的表达水平或活性。

[0023] 与对照植物的野生型LOGL5多肽活性相比,增加或者降低植物中内源LOGL5多肽表达水平或活性方法,其中所述改变通过锌指核酸酶、转录激活样效应因子核酸酶(TALENs)、CRISPR-Cas、引导Cas核酸内切酶、归巢核酸内切酶(Meganucleases)或CRISPR-Cas核糖核蛋白体引入。

[0024] 另一方面,提供了一种从水稻植株群体中鉴定根长相关的一个或多个等位基因的方法,该方法包括如下的步骤:(a)检测一个水稻植株群体中(i)编码多肽的基因组区域,或(ii)控制多肽表达的调控区域中的一个或多个多态性,其中,所述多肽选自SEQ ID NO:3的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:3一致性为90%以上的氨基酸序列,其中编码所述多肽的基因

组区域或调控所述多肽表达的调控区域的一个或多个多态性与根长相关;和(b)鉴定根长相关的一个或多个多态性的一个或多个等位基因。其中所述根长相关的一个或多个等位基因可用作辅助根长相关的水稻植株的筛选标记;所述一个或多个多态性位于多聚核苷酸的编码区;所述调控区域是一个启动子。

[0025] 另一方面,本发明涉及一个重组DNA构建体,其包含本发明中任意分离的多聚核苷酸,并与至少一个调控序列可操作连接;以及包含重组DNA构建体的细胞、植物和种子。所述细胞包括真核细胞,如酵母、昆虫或植物细胞;或原核细胞,如细菌。

[0026] 附图简述和序列表

[0027] 根据以下的发明详述和附图以及序列表,可更全面地理解本发明,以下的发明详述和附图以及序列表形成本申请的一部分。

[0028] 图1为实时PCR分析测定的不同转基因水稻株系(DP0600)幼苗中OsLOGL5基因的相对表达水平。ZH11-TC中基因的表达水平设置为1.00,每个转基因株系表达量柱上面的数字表示与ZH11-TC相比的变化倍数。ZH11-TC为组织培养获得的ZH11。

[0029] 图2为水培11天的幼苗照片。

[0030] 图3为Hoagland营养液培养的蛭石中生长45天幼苗的根的情况。

[0031] 图4为sgRNA在水稻OsLOGL5基因所在基因组中的分布图。

[0032] 图5为举例说明一个sgRNA在水稻OsLOGL5基因所在基因组中的分布。

[0033] 图6为举例说明两个sgRNA在水稻OsLOGL5基因所在基因组中的分布。

[0034] 图7为水稻植株中CRISPR-Cas构建体DP3035导入植物导致的突变序列比对。所述突变通过PCR和测序确定。参考序列为靶位点未修饰的位点,用下划线表示。PAM序列和预期的断裂位点也进行了标注。缺失、插入或替换分别用“-”,“斜体下划线核苷酸”或“粗体斜体核苷酸”表示。参考序列和靶位点突变序列1-15分别如SEQ ID NO:42-57所示。

[0035] 图8为水稻植株中CRISPR-Cas构建体DP3036导入植物导致的突变序列比对。所述突变通过PCR和测序确定。参考序列为靶位点未修饰的位点,用下划线表示。PAM序列和预期的断裂位点也进行了标注。缺失、插入或替换分别用“-”,“斜体下划线核苷酸”或“粗体斜体核苷酸”表示。参考序列和靶位点突变序列1-10分别如SEQ ID NO:58-68所示。

[0036] 图9为水稻植株中CRISPR-Cas构建体DP3043导入植物导致的突变序列比对。所述突变通过PCR和测序确定。参考序列为靶位点未修饰的位点,用下划线表示。PAM序列和预期的断裂位点也进行了标注。缺失、插入或替换分别用“-”,“斜体下划线核苷酸”或“粗体斜体核苷酸”表示。参考序列和靶位点突变序列1-19分别如SEQ ID NO:69-88所示。

[0037] 表1.序列表中核苷酸序列和氨基酸序列的SEQ ID NOs

[0038]

来源	克隆描述	SEQ ID NO: (核苷酸)	SEQ ID NO: (氨基酸)
水稻 ( <i>Oryza sativa</i> )	<i>OsLOGL5</i>	1, 2	3
人工序列	引物	4 - 7	n/a
水稻 ( <i>Oryza sativa</i> )	<i>OsLOGL5</i> 的调控元件	8	n/a
玉米 ( <i>Zea May</i> )	泛素启动子	9	n/a
人工序列	核定位序列	10	n/a

[0039]

花椰菜花叶病毒 ( <i>Cauliflower mosaic virus</i> )	CaMV 3' 非翻译区	11	n/a
水稻 ( <i>Oryza sativa</i> )	rU6-启动子	12	n/a
人工序列	gRNA 骨架	13	n/a
人工序列	gRNA	14-35	n/a
番茄 ( <i>Lycopersicon esculintum</i> )	内含子	36	n/a
水稻 ( <i>Oryza sativa</i> )	构建体 RNAi 载体的 <i>OsLOGL5</i> 片段的正义链	37	n/a
人工序列	引物	38-41	n/a
水稻 ( <i>Oryza sativa</i> )	突变序列	42-88	n/a

[0040] 序列描述以及关联的序列表遵循如37C.F.R. §1.821-1.825中所列出的管理专利申请中的核苷酸和/或氨基酸序列公开的规则。序列表包含核苷酸序列字符的单字母码以及氨基酸的三字母码,如遵照IUPAC-IUBMB标准所定义的,该标准在Nucleic Acids Res.13:3021-3030 (1985)以及在Biochemical J.219 (No.2):345-373 (1984)中有所描述,这两篇文献以引用的方式并入本文。用于核苷酸和氨基酸序列数据的符号和格式遵循37C.F.R. §1.822中列出的规则。

[0041] 详细说明

[0042] 本文中列出的每篇参考文献的公开内容的全文均以引用的方式并入本文。

[0043] 如本文所用的并在所附权利要求书中的单数形式“一个”和“所述”包括复数涵义,除非上下文中清楚地另有指明。因此,例如,“一株植物”的涵义包括多株该类植物。“一个细胞”的涵义包括一个或多个细胞及其本领域的技术人员已知的等同物,等等。

[0044] 如本文所述:

[0045] 术语“OsLOGL5(蛋白LONELY GUY-类似5)”涉及水稻基因位点LOC\_0s03g64070.1及其相关的等位基因变异体编码的能够调控根长性状,并进一步调控产量的多肽。“LOGL5多肽”此处涉及LOGL5多肽和源于其他植物的同源物。

[0046] OsLOGL5多肽(SEQ ID NO:3)是水稻基因位点LOC\_0s03g64070.1及其相关的等位基因变异体的编码序列(CDS)(SEQ ID NO:2)或核酸序列(SEQ ID NO:1)编码的氨基酸序

列。TIGR(the internet at plant biology msu.edu/index.shtml)中,该多肽的注释为“未鉴定蛋白PA4923,推测,表达”,在NCBI中注释为“蛋白LONELY GUY-类似5”。

[0047] 本发明中的单子叶植物包括禾本科的植物;双子叶植物包括十字花科、豆科和茄科的植物。

[0048] “植物”包括整个植株、植物器官、植物组织、种子和植物细胞以及同一植株的子代。植物细胞包括但不限于得自下列物质的细胞:种子、悬浮培养物、胚、分生区域、愈伤组织、叶、根、芽、配子体、孢子体、花粉和小孢子。

[0049] “子代”包括植物的任何后续世代。

[0050] “修饰的植物”包括在其基因组内包含异源多核苷酸或修饰的基因或启动子的植物。例如异源多核苷酸能够稳定地整合进基因组中,并遗传连续的世代。异源多核苷酸可单独地或作为重组DNA构建体的部分整合进基因组中。T0植物直接源于转化和再生过程,T0植物的子代为T1代(第一个子代),T2代(第二个子代)等。

[0051] 针对序列而言的“异源”意指来自外来物种的序列,或者如果来自相同物种,则指通过蓄意的人为干预而从其天然形式发生了组成和/或基因座的显著改变的序列。

[0052] “转基因的”指其基因组因异源核酸(如重组DNA构建体)的存在而发生改变的细胞、细胞系、愈伤组织、组织、植物部分或植物,包括那些最初的转基因事件以及从最初的转基因事件通过有性杂交或无性生殖而产生的那些。如本发明所用的术语“转基因”不涵盖通过常规植物育种方法或通过诸如随机异花受精、非重组病毒感染、非重组细菌转化、非重组转座或自发突变之类的自然发生事件导致的基因组(染色体基因组或染色体外基因组)改变。

[0053] “对照”、“对照植物”或“对照植物细胞”为测定受测试植物或植物细胞的表型变化提供参考,由于转化,受测植物或植物细胞的基因组改变影响到目的基因,测试的植物或植物细胞可以是转基因植物或转基因植物细胞的子代。

[0054] 对照植物或对照植物细胞包括,例如:(a)相同基因型并用于基因改变产生受测植物或细胞的野生型植物或细胞;(b)相同基因型作为起始材料但是转入空载体(如带有标记基因的并对目标的性状没有影响的载体)的植物或植物细胞;(c)转基因植物或植物细胞性状分离,获得的非转基因的子代植物或植物细胞;(d)没有暴露于可以诱导基因表达的条件或刺激下的,与转基因植物或植物细胞基因组相同的植物或植物细胞;(e)特定的目标基因不表达情况下的,转基因植物或者植物细胞本身。对照可以包括多种代表上述一种或多种类型的个体,例如,(c)中性状分离后非转基因的材料的混合通常认为是bulk null。

[0055] 本发明中,ZH11-TC、DP0158和阴性指对照植物。ZH11-TC表示通过组织培养中花11获得的水稻植株,DP0158表示转化空载体DP0158获得水稻植株,阴性指经过转化过程但具有野生型基因的基因组编辑阴性水稻植株。

[0056] “性状”指植物或特定植物材料或细胞的生理的、形态的、生化的或物理的特征。

[0057] “表型”意指细胞或生物体的可检测的特征。

[0058] “干旱”指植物可用水分的减少,特别是较长时间的缺水或者在植物重要的生长阶段发生,会造成植物损伤,或阻止植物的生长(限制植物的生长,降低籽粒的产量)。

[0059] “耐旱性”指干旱胁迫下植物能够存活并且没有实质性的生理或物理改变的能力,和/或一段时间干旱后复水能够恢复的能力。”

[0060] 多肽的“耐旱能力”表示与参照或对照植物相比,过表达该多肽可以提高转基因植物的耐旱性能。

[0061] 植物“增强的耐旱性”是与参照或对照植物相比测定的,反映了植物在干旱胁迫下存活的能力,并且与参照或对照相比,具有较小的生理或物理损伤,或者干旱胁迫后复水时,恢复较快的能力。

[0062] “环境条件”指植物生长的环境,诸如可用的水分、可用的营养物质或昆虫或病害的存在。

[0063] “百草枯”(1,1-二甲基-4,4-联吡啶二氯化物)是一类叶片喷施的非选择性的吡啶除草剂,能够引起光氧化胁迫,并进一步造成植物的损害或者阻止植物的正常生长。

[0064] “百草枯耐性”是植物的一种性状,反映了百草枯溶液处理后,与参照或对照植物相比,植物的存活或生长良好的能力。

[0065] 植物“增加的百草枯耐性”是相对于参照或对照植物测定的,反映了植物在百草枯溶液处理后,与参照或对照植物相比,能够存活并具有较小的生理或物理伤害的能力。通常,针对较低浓度的百草枯溶液的耐性用作诸如干旱胁迫的非生物胁迫耐性的一种指标。

[0066] “氧化胁迫”反映了活性氧分子的生成和生物系统清除活性氧中间体或修复损伤的能力之间的不平衡。扰乱细胞正常的氧化还原状态会导致产生过氧化氢和自由基的毒性效应,过氧化氢和自由基能够损害包括蛋白、脂质和DNA在内的细胞组成部件。

[0067] “收获指数”指籽粒重量除以总植株重量。

[0068] 可以测量增加的生物量,例如与对照植物相比,增加的植物高度、植物总叶面积、植物鲜重、植物干重或植物种子产量等。

[0069] 人们对叶片大小的增加特别有兴趣。增加的叶片的生物量可用于增加植物源药或工业产品的生产。

[0070] 增加的分蘖数可以增加产量,增加植物叶片面积可提高植物总的光合作用,增加的光合合成能力可以增加特定植物组织的产量,并使植物在低光强或高光强下生长,所述特定植物组织包括叶片、根、果实或种子。

[0071] 其它组织如根的生物量的改变有利于提高植物在严酷条件下生长的能力,所述严酷条件包括营养贫瘠、水分缺失,因为大量的根系可以更好地吸收水分和营养。

[0072] “氮素限制条件”指可利用总氮量(例如,硝酸盐、氨或其它可知氮源)不足以维持植物的最佳生长发育的条件,本领域的技术人员应当知道维持植物最佳生长发育的可利用总氮量的条件,本领域的技术人员应当知道什么组成了足够的可利用总氮量,什么组成了土壤、介质和施入的肥料为植物提供氮素。氮素限制条件取决于多种因素,包括但不限于特定的植物和环境条件。

[0073] 术语“氮素胁迫耐性”、“低氮耐性”和“氮素缺乏耐性”此处可互换使用,指植物的一种性状,即植物在氮素限制条件或低氮条件下存活的能力。

[0074] 一个多肽“增加的氮胁迫耐性”是指与参照或对照相比,在转基因植物中过表达该多肽能增加转基因植物的氮胁迫耐受性。

[0075] 植物“增加的氮胁迫耐性”是与参照或对照相比后衡量的,反映了植物在氮限制条件下存活和/或生长更好的能力;与参照或对照植物相比,氮胁迫耐性的植物增加的数量可以是任何数量。

[0076] “植物氮胁迫耐性”是植物表现为氮素胁迫耐受性。一个氮胁迫耐性的植物可能表现为与对照植物相比在氮素限制条件下提高至少一种农艺性状。

[0077] “NUE”是氮素利用效率,具体指植物在低肥料或高肥料水平下利用氮素的能力。它反映了植物吸收、同化和/或其它氮素利用的能力。

[0078] 土壤植物分析发展 (SPAD) 值是 SPAD-502plus 叶绿素仪 (KONICA MINOLTA 生产) 测定的 SPAD 读数。SPAD 值是叶片叶绿素相对含量,是植物健康的一个重要指标。许多研究表明,叶片氮素含量与 SPAD 值成正相关性 (Swain D.K. 和 Sandip S.J. (2010) Journal of Agronomy 9 (2) :38-44), 叶片 SPAD 值可用于作物中氮素状况的分析指标 (Cai H.-G. et al. (2010) Acta metallurgica sinica 16 (4) :866-873)。

[0079] 水稻对于低氮胁迫响应和耐受是一个综合和全面的生理生化过程。植物的耐受性将在植物发育的不同阶段和不同胁迫条件下以不同的方式反映。环境因子,例如光照和温度是影响水稻生长的关键因素,环境因子的变化将影响水稻的生长发育。研究证明对水稻植株低氮处理可观察到叶片中叶绿素含量降低,分蘖数减少,或生物量减少。我们在试验中测量了叶片颜色 (反映叶绿素含量, SPAD 值)、植物鲜重和分蘖数,通过这三个参数综合选择耐低氮植物。

[0080] “氯酸盐”指含有氯酸根阴离子的化合物,是一种氯酸盐化合物。它是一种硝酸盐类似物,植物通过硝酸盐同一个转运系统吸收,通过硝酸盐还原酶将氯酸盐还原成亚氯酸盐,亚氯酸盐是有毒的,能够导致植物损伤、枯萎或死亡。本发明中将氯酸钾用于试验。

[0081] “氯酸盐敏感性”是一种植物性状,反映了氯酸盐溶液处理后,与参照或对照植物相比,植物吸收、转运或还原氯酸盐后造成的损伤甚至死亡情况。

[0082] 植物“增加的氯酸盐敏感性”是相对于参照或对照植物测定的,反映了氯酸盐或硝酸盐溶液中,与参照或对照植物相比,较高的吸收、转运或同化氯酸盐或硝酸盐的能力。通常,氯酸盐的敏感性可用作 NUE 的指标,植物对氯酸盐越敏感,氮素利用效率越高。

[0083] “氯酸盐敏感幼苗”指整株表型萎蔫,没有绿色叶片的损伤植株,可认为是氯酸盐溶液处理后死亡的植株。

[0084] “基因组”在用于植物细胞时不仅涵盖存在于细胞核中的染色体 DNA,而且还包括存在于细胞的亚细胞组分 (如线粒体、质粒) 中的细胞器 DNA。

[0085] “全长互补序列”是指给定核苷酸序列的互补序列,互补序列和核苷酸序列含有相同的核苷酸数,并且 100% 的互补。

[0086] “多核苷酸”、“核酸序列”、“核苷酸序列”或“核酸片段”可互换使用并且是任选含有合成的、非天然的或改变的核苷酸碱基的单链或双链 RNA 或 DNA 聚合物。

[0087] 术语“多肽”、“肽”、“氨基酸序列”和“蛋白质”还可包括修饰形式,包括但不限于糖基化、脂质连接、硫酸盐化、谷氨酸残基的  $\gamma$  羧化、羟化和 ADP-核糖基化。

[0088] “重组体”指 (例如) 通过化学合成或者通过用基因工程技术操纵分离的核酸片段来实现的两个原本分离的序列片段的人工组合。“重组体”也包括指已经通过引入异源核酸而进行了修饰的细胞或载体,或源于经这样修饰的细胞的细胞,但不涵盖由天然发生的事件 (如自发突变、自然转化/转导/转座) 对细胞或载体的改变,例如没有蓄意人为干扰而发生的那些。

[0089] “重组 DNA 构建体”指在自然界中通常不会一起存在的核酸片段的组合。因此,重组

DNA载体可包含不同来源的调控序列和编码序列,或相同来源但以不同于通常天然存在的方式排列的调控序列和编码序列。

[0090] “调控序列”和“调控元件”可互换使用,指位于编码序列的上游(5'非编码序列)、中间或下游(3'非编码序列),并且影响相关编码序列的转录、RNA加工或稳定性或者翻译的核苷酸序列。调控序列可包括但不限于启动子、翻译前导序列、内含子和多腺苷酸化识别序列。

[0091] “启动子”指能够控制另一核酸片段转录的核酸片段。

[0092] “植物启动子功能”是能够控制植物细胞中的转录的启动子,无论其是否来源于植物细胞。

[0093] “组织特异性启动子”和“组织优选启动子”可互换使用,并且指主要但非必须专一地在一种组织或器官中表达,而是也可在一种特定细胞中表达的启动子。

[0094] “发育调控启动子”指其活性由发育事件决定的启动子。

[0095] “基因组修饰”是指蓄意人为的向植物基因组核苷酸序列中导入改变或变化。

[0096] 术语“可操作地连接”指核酸片段连接成单一片段,使得其中一个核酸片段的功能受到另一个核酸片段的调控。例如,在启动子能够调节核酸片段的转录时,该启动子与该核酸片段进行了可操作地连接。

[0097] “表达”指功能产物的产生。例如,核酸片段的表达可指核酸片段的转录(如转录生成mRNA或功能RNA)和/或RNA翻译成前体或成熟蛋白质。

[0098] 本发明中所用的“引入”是指将核苷酸片段(如CRISPR-Cas DNA构建体)插入到一个细胞,即通过“转染”、“转化”或“转导”,包括将核苷酸片段导入真核细胞或原核细胞,且所述核苷酸片段可以整合到细胞的基因组(如染色体、质粒、质体或线粒体DNA),从而变为一个自主复制子,或暂时性表达(例如转染mRNA)。

[0099] “转化细胞”是将核酸片段(如重组DNA构建体)导入其中的任何细胞。

[0100] 本发明所用的“转化”指稳定转化和瞬时转化两者。

[0101] “等位基因”是占据染色体上给定位点的基因的几种供选择形式的其中一种。当二倍体植物中一对同源染色体上给定基因座上存在的等位基因相同时,该植物在该基因座处是纯合的。如果二倍体植物中一对同源染色体上给定基因座上存在的等位基因不同,则该植物在该基因座处是杂合的。如果转基因存在于二倍体植物中一对同源染色体中的其中之一上,则该植物在该基因座处是半合子的。

[0102] “基因”是一段可表达功能分子的核苷酸片段,所述功能分子,包括但不限于,特定蛋白,所述基因包括位于编码序列上游的调控序列(5'非编码序列)和下游序列(3'非编码序列)。“天然基因”是拥有自身调控序列的自然存在的基因。

[0103] “突变基因”是通过人工干预后产生的基因。由此产生的“突变基因”的序列与非突变基因的序列相比,至少有一个核苷酸增加、删除或替换。“突变植物”是指含有突变基因的植物。

[0104] 本发明中“靶向突变”是指通过双链断裂诱发剂诱导靶序列DNA双链断裂,改变内源基因的特定序列,从而导致内源基因突变。

[0105] “遗传修饰”指通过蓄意人为活动而导入植物的基因组核苷酸序列的改变。

[0106] “核定位信号”是指靶向核蛋白的信号多肽(Raikhel, (1992) Plant Phys. 100:

1627-1632)。

[0107] “CRISPR-相关基因”是指编码成簇间隔短回文重复 (CRISPR)-相关系统 (Cas) 的多肽组合物的核苷酸序列。所述基因耦合存在,与CRISPR位点侧翼片段相关或相邻。“Cas基因”和“CRISPR-相关基因”在本发明中可互换使用。例如包括但不限于,Cas3和Cas9,它们分别编码CRISPR类型I和CRISPR类型II系统中的内切酶。

[0108] “Cas内切酶”是指一个由Cas基因编码的Cas蛋白,所述Cas蛋白能导致DNA靶序列双链断裂。所述向导多核苷酸引导Cas内切酶识别,并有选择性导致细胞基因组特定位点的双链断裂。

[0109] “向导RNA (gRNA)”是指一个crRNA (CRISPR RNA):tracrRNA融合的杂合RNA分子,由可改变的DNA元件编码。通常,gRNA包括一个拷贝的与基因组特定位点的前间区序列互补的间隔序列,和一个用于Cas内切酶和CRISPR复合体结合的结合域。

[0110] “向导多核苷酸”是指一个可与Cas内切酶形成复合体、且让Cas内切酶识别和选择DNA剪切靶位点的多核苷酸序列。所述前导多核苷酸由一个单分子或一个双分子组成。

[0111] 术语“向导多核苷酸/Cas内切酶体系”是指含有一个Cas内切酶和一个前导多核苷酸的复合体,可导致DNA靶序列的双链断裂。如果正确的前间区序列邻近基序 (PAM) 大致定位于靶序列的3'末端后,一旦向导RNA识别靶序列,Cas内切酶才能解开基因组靶位点附近的DNA双链序列,并对DNA双链进行剪切。

[0112] “基因组靶位点”是指定位于宿主基因组的用于定点突变和/或双链断裂的一个前间区和一个前间区序列邻近基序 (PAM)。

[0113] “前间区”是指一段靶向突变和/或双链断裂的短的DNA序列 (12-40个核苷酸)。所述前间区是基于crRNA或sgRNA的间隔序列的碱基互补配对,以CRISPR体系内切酶而导致酶促断裂。

[0114] “前间区序列邻近基序 (PAM)”包括一段3-8个核苷酸序列,紧邻基因组靶位点前间区序列。

[0115] CRISPR位点 (成簇规律间隔短回文重复,也称为SPIDRs-间隔散布定向重复) 包括上述的DNA位点。CRISPR位点有一段短的、高度保守的DNA回文重复 (一般24-40个核苷酸,重复1-140次,因此也称为CRISPR-重复单元)。所述重复序列 (一般存在物种特异性) 被不同数量的固定长度 (一般20-58个核苷酸,依赖于CRISPR位点) 的序列间隔 (WO2007/025097公开于2017年3月1日)。

[0116] 内切酶是可切断多核苷酸链的磷酸二酯键的酶类,包括在特定位点不破坏碱基的前提下切断DNA的限制性内切酶。所述限制性内切酶包括类型I、类型II、类型III和类型IV内切酶及其亚类型。在类型I和类型III系统中,单复合体具有甲基化酶和限制活性。内切酶也包括归巢核酸内切酶 (meganucleases或HEases),它类似于限制性内切酶,能结合和剪切特定识别位点,然而所述归巢核酸内切酶识别位点通常更长,约18个核苷酸或更长 (专利申请WO-PCT PCT/US12/30061,提交日期2012年3月22日)。根据保守序列基序,归巢核酸内切酶可分为四个家族,分别为LAGLIDADG、GIY-YIG、H-N-H和His-Cys盒子家族。这些基序参与到金属离子和磷酸二酯键的水解过程的协调。归巢核酸内切酶的主要优势在于可识别DNA基序中的长的识别位点和容忍序列多态性。

[0117] TAL效应因子核酸酶是一种新的序列特异性核酸酶,能导致植物或其他生物基因

组特定靶序列双链断裂。TAL效应因子核酸酶通过将天然或人工合成的转录激活样(TAL)效应因子或其功能区,融合到核酸内切酶的催化结构域,诸如FokI内切酶而产生的。所述独特的、模块化的TAL效应因子DNA结合域经人工修饰并赋予DNA识别特异性(Miller et al. (2011) Nature Biotechnology 29:143-148)。锌指核酸酶(ZFNs)是一种人工合成的双链断裂诱导剂,含有一个锌指DNA结构域和一个双链断裂诱导结构域。锌指结构域赋予识别位点特异性,其一般包括2、3或4个锌指结构。例如,有一个C2H2结构,然而其他锌指结构也是已知并可改造的。锌指结构域是可设计的多肽,能特异结合选定的多核苷酸识别序列。ZFNs构成一个与非特异性内切核酸酶位点连接的DNA结合蛋白锌指结构域。例如,核酸酶位点来自于一个诸如FokI的类型I的内切核酸酶。其它功能可融入锌指结合域,包括转录激活域,转录阻遏域和甲基化酶。在一些例子中,剪切活性需要核酸酶的二聚作用。每一个锌指可识别靶DNA的3个碱基对。例如,一个含有3个锌指结构域能识别9个连续的核苷酸序列,两组含3个锌指结构域经二聚化作用后,则能识别18个核苷酸序列。

[0118] “靶位点”、“靶序列”、“靶DNA”、“靶位置”、“基因组靶位点”、“基因组靶序列”和“基因组靶位置”在本发明中可互换使用,具体指植物细胞基因组中的一段核苷酸序列(包括叶绿体DNA和线粒体DNA),且在植物细胞基因组中能被Cas内切酶诱导双链断裂。靶位点可以是植物基因组中的内源位点,也可以是植物异源位点,但不会自然发生在基因组中;与自然发生相比,靶位点可以在不同的基因座位上。本发明中“内源目标序列”和“天然目标序列”可以互换使用,具体指植物基因组内源或天然基因组的目标序列,或是植物基因组靶序列的内源或天然位点。

[0119] “变异靶位点”、“变异靶序列”、“修饰靶位点”、“修饰靶序列”在本发明中可互换使用,具体指与未改变的靶序列相比,所述目标位点的目标序列至少有一处变异。所述变异包括,例如:(1)至少一个核苷酸替换,(2)至少一个核苷酸删除,(3)至少一个核苷酸插入,或(4)包含上述(1)-(3)的组合。

[0120] “序列一致性百分比(%)”是经过序列比对和引入缺口后,待测序列(query)相对于参考序列(subject)的氨基酸残基或核苷酸的一致性百分比,如果必须,所述序列一致性百分比是达到最大比例的序列一致性,且不考虑属于序列一致性的氨基酸保守型替换。例如,利用诸如BLAST, BLAST-2的公开电脑软件确定序列一致性比例的比对是本领域技术人员熟知的。决定序列比对的合适参数,包括与待测全序列比对达到最大化匹配的算法。本发明中两个序列的“序列一致性百分数”是指序列匹配一致性的数量的函数(例如,待测序列的序列一致性计算包括,将两个序列中相同核苷酸碱基或氨基酸残基的位置数目,获得匹配位置数,然后将匹配的位置数除以比对窗口中位置总数再乘以100)。

[0121] 本发明中使用的标准重组DNA和分子克隆技术为本领域技术人员熟知,并且在如下文献中有更全面的描述:Sambrook, J., Fritsch, E. F. 和 Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, 1989(下文称为“Sambrook”)。

[0122] 现在转向实施方案:

[0123] 实施方案包括分离的多核苷酸和多肽、用于调控根长的重组DNA构建体(包括抑制构建体)、包含这些重组DNA构建体的组合物(例如植物或种子),以及利用这些重组DNA构建体的方法,用于调控植物根长的CRISPR-Cas构建体、含有突变的根长调控基因或其启动

子的组合物,以及应用CRISPR-Cas构建体的方法。

[0124] 分离的多核苷酸和多肽:

[0125] 本发明包括如下分离的多核苷酸和多肽:

[0126] 一种分离的多核苷酸包含(i)编码多肽的核酸序列,所述多肽具有的氨基酸序列在与SEQ ID NO:3进行比较时具有至少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%、99%或100%的序列一致性;或(ii)核酸序列(i)的全长互补序列,其中全长互补序列和(i)的核酸序列由相同数目的核苷酸组成并且是100%互补的。任一上述分离的多核苷酸可用于本发明的任何重组DNA构建体。增加所述编码多肽的表达导致根变短,并进一步降低正常条件下的产量。

[0127] 一种分离的多肽,其氨基酸序列在与SEQ ID NO:3进行比较时具有至少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%、99%或100%的序列一致性,所述多肽为根长调控多肽LOGL5,增加所述编码多肽的表达导致根变短。

[0128] 一种分离的多核苷酸,其包括:(i)核酸序列,所述核酸序列在与SEQ ID NO:1或2进行比较时具有至少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%、99%或100%的序列一致性;或(ii)核酸序列(i)的全长互补序列。任一上述分离的多核苷酸可用于本发明的任何重组DNA构建体,所述多核苷酸优选编码根长调控多肽LOGL5,增加所述编码多肽的表达导致根变短。

[0129] 应当理解(正如本领域技术人员将会理解的),本发明不仅仅涵盖这些具体的示例性序列。导致给定位点处产生化学上等价的氨基酸但不影响所编码多肽的功能特性的核酸片段中的改变是本领域众所周知的。例如,丙氨酸(一种疏水性氨基酸)的密码子可被编码另一个疏水性较弱的残基(例如甘氨酸)或疏水性较强的残基(例如缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸)的密码子取代。类似地,导致一个带负电荷的残基替换为另一个带负电荷的残基(例如,天冬氨酸替代谷氨酸)或者一个带正电荷的残基替换为另一个带正电荷的残基(例如,赖氨酸替换精氨酸)的改变也可预期产生功能上等价的产物。导致多肽分子的N-末端和C-末端部分改变的核苷酸变化也将预计不会改变多肽的活性。所提出的修饰中的每一种均完全在本领域常规技术内,如测定所编码的产物的生物活性的保留。

[0130] 重组DNA构建体和抑制DNA构建体

[0131] 在一方面,本发明包括重组DNA构建体和抑制DNA构建体。

[0132] 在一个实施方案中,重组DNA构建体包含可操作地连接至少一种异源调控元件(如,在植物中有功能的启动子)的多核苷酸,其中所述多核苷酸包括(i)核酸序列,所述核酸序列编码的氨基酸序列与SEQ ID NO:3进行比较时具有至少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%、99%或者100%的序列一致性;或(ii)核酸序列(i)的全长互补序列。

[0133] 在另一个实施方案中,重组DNA构建体包含可操作地连接至少一种异源调控元件(如,在植物中有功能的启动子)的多核苷酸,其中所述多核苷酸包括(i)核酸序列,所述核酸序列在与SEQ ID NO:1或2进行比较时具有至少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%、99%或者100%的序列一致性;或(ii)核酸序列(i)的全长互补序列。

[0134] 在另一实施方案中,重组DNA构建体包含可操作地连接至少一种调控序列(如,在植物中有功能的启动子)的多核苷酸,其中所述多核苷酸编码根长调控多肽。这些多肽可来自,例如水稻(*Oryza sativa*)、野生稻(*Oryza australiensis*)、短舌野生稻(*Oryza barthii*)、非洲型稻(*Oryza glaberrima*)、阔叶稻(*Oryza latifolia*)、长雄野生稻(*Oryza longistaminata*)、南方野生稻(*Oryza meridionalis*)、药用野生稻(*Oryza officinalis*)、斑点野生稻(*Oryza punctata*)、普通野生稻(*Oryza rufipogon*) (红稻)、印度野生稻(*Oryza nivara*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、玉米(*Zea mays*)、大豆(*Glycine max*)、烟豆(*Glycine tabacina*)、野大豆(*Glycine soja*)和短绒野大豆(*Glycine tomentella*)。

[0135] 在另一方面,本发明包括抑制DNA构建体。

[0136] 抑制DNA构建体包括至少一个异源调控元件(如植物中有功能的启动子)可操作与抑制元件连接,其中所述抑制元件包括至少100bp连续的碱基对(a) (i)一种核酸序列,所述核酸序列编码的多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:3的序列一致性至少为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%、99%或者100%,或者(ii)核酸序列(a) (i)的全长互补序列;或者(b)源于目标基因的正义链或反义链的全部或部分的区域,其中所述目标基因编码根长调控多肽LOGL5;或者(c)全部或部分(i)与SEQ ID NO:1或2的核酸序列一致性至少为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%、99%或者100%,或者(ii)核酸序列(c) (i)的全长互补核酸序列。

[0137] CRISPR-Cas构建体:

[0138] 一个CRISPR/Cas构建体,包括一个编码CRISPR/Cas酶的多核苷酸、一个编码核定位信号的多核苷酸、至少一个异源的调控元件和与其可操作连接的gRNA,其中,所述gRNA靶向包含内源LOGL5基因和其调控元件的靶基因组区域。

[0139] 所述gRNA靶向包含SEQ ID NO:1、2或8核苷酸序列的基因组区域。

[0140] 通常,靶基因组序列通过现有的工具进行分析产生候选sgRNA序列。

[0141] sgRNA序列分布于靶基因组序列上,所述靶基因组序列包括启动子、外显子、内含

子5'-UTR和3'-UTR,sgRNA序列如SEQ ID NO:14-35所示。

[0142] 单个sgRNA可用于构建基因组编辑构建体,单个sgRNA可以引导Cas9酶定位于靶区域,在靶DNA序列上产生双链断裂,启动非同源末端连接(NHEJ)修复机制和同源介导修复(HDR),通常会在靶位点诱导随机插入、缺失和替换。

[0143] 两个sgRNAs也可以用于构建基因组编辑构建体,所述构建体可以引发片段删除、点突变(少量碱基的插入、删除和替换)。

[0144] 调控元件:

[0145] 本发明的重组DNA构建体(包括抑制DNA构建体)包含至少一个调控元件。

[0146] 调控元件可以是启动子、增强子。

[0147] 多个启动子可用于本发明的重组DNA构建体,启动子根据期望的结果选择,可包括宿主生物体中表达的组成型、组织特异型、诱导型、或其他启动子。

[0148] 一般将引起基因在多数细胞类型中在多数情况下表达的启动子称为“组成型启动子”。

[0149] 当组成型启动子驱动候选基因表达时能够评估候选基因的效应,但候选基因在35S或UBI启动子控制下的高水平、组成型表达可具有多重效应。使用组织特异和/或胁迫特异启动子可消除不需要的效应但保留提高植物耐旱性的能力。在拟南芥属中已经观察到了该效应(Kasuga等人(1999)Nature Biotechnol.17:287-91)。

[0150] 适用于植物宿主细胞的组成型启动子包括(例如)Rsyn7启动子的核心启动子和在W099/43838和美国专利6,072,050中公开的其他组成型启动子;CaMV 35S核心启动子(Ode11等人,(1985)Nature 313:810-812);稻肌动蛋白(McElroy等人,(1990)Plant Cell 2:163-171);泛素启动子(Christensen等人,(1989)Plant Mol.Biol.12:619-632和Christensen等人,(1992)Plant Mol.Biol.18:675-689);pEMU(Last等人,(1991)Theor.Appl.Genet.81:581-588);MAS(Velten等人,(1984)EMBO J.3:2723-2730);ALS启动子(美国专利号5,659,026)等。其他组成型启动子包括例如在美国专利5,608,149、5,608,144、5,604,121、5,569,597、5,466,785、5,399,680、5,268,463、5,608,142和6,177,611中公开的那些启动子。

[0151] 在选择启动子用于本发明方法时,期望使用组织特异性启动子或发育调节启动子。

[0152] 组织特异性启动子或发育调节启动子是这样的DNA序列,其调节DNA序列选择性地在对雄穗发育、结籽或两者重要的植物细胞/组织中表达,并限制这种DNA序列只在植物的雄穗发育或种子成熟期间表达。任何引起所需时空表达的可鉴定启动子均可用于本发明的方法中。

[0153] 对于在发育种子组织中表达的多聚核苷酸,特定的启动子包括种子优选的启动子,尤其是早期籽粒/胚胎启动子和晚期籽粒/胚乳启动子,授粉后籽粒的发育大致可以分为三个基本阶段,籽粒生长的停滞期起始于授粉后0天到10-12天,在此期间,籽粒不再明显的生长,但是决定籽粒活力的重要事件将在此期间发生(如细胞建成数目)。线性籽粒灌浆期起始于授粉后的10-12天并延续到授粉后的40天左右,在此籽粒发育期间,籽粒达到最终的质量,并产生多种储藏物质如淀粉、蛋白质和油等;成熟期起始于授粉后大约40天到收获,在这一过程中,籽粒开始休眠,变干并为萌芽前的种子休眠做准备。本发明中的“早期籽

粒/胚胎启动子”指主要在种子发育的停滞期(也就是授粉第0天到授粉后第12天期间)驱动基因表达的启动子;“后期籽粒/胚乳启动子”主要驱动基因在授粉后12天到成熟过程中的种子中基因表达;表达窗口可能会有一些重叠,将根据使用的ABA偶联的序列和期望的表型选择启动子。

[0154] 早期籽粒/胚胎启动子包括,Cim1,其在授粉后第5天活跃在特定组织中(WO 00/11177);其它的早期籽粒/胚胎启动子包括种子偏爱启动子end1,其在授粉后7-10天表达,和end2,其在授粉后9-14天在整个籽粒中表达,在授粉后10天在胚乳和果皮中表达(W000/12733),此处以全文引用方式并入本文。本发明中的特定方法使用的其它早期籽粒/胚胎启动子包括种子偏爱启动子1tp2(美国专利号5,525,716);玉米Zm40启动子(美国专利号6,403,862);玉米nuc1c(美国专利号6,407,315);玉米ckx1-2启动子(美国专利号6,921,815和美国专利申请公开号2006/0037103);玉米1ec1启动子(美国专利号7,122,658);玉米ESR启动子(美国专利号7,276,596);玉米ZAP启动子(美国专利申请公开号20040025206和20070136891);玉米启动子eep1(美国专利申请公开号20070169226);和玉米启动子ADF4(美国专利申请号60/963,878,2007年8月7日申请)。

[0155] 用于本发明特定实施例的启动子包括:RIP2、mLIP15、ZmCOR1、Rab17、CaMV 35S、RD29A、B22E、Zag2、SAM合成酶、泛素、CaMV19S、nos、Adh、蔗糖合成酶、R-等位基因、维管组织偏爱启动子S2A(Genbank登录号EF030816)和S2B(Genbank登录号EF030817)及来自玉米的组成型启动子GOS2。其他启动子还包括根偏爱启动子,例如玉米NAS2启动子、玉米Cyclo启动子(US 2006/0156439,公开于2006年7月13日)、玉米ROOTMET2启动子(W005063998,公开于2005年7月14日)、CR1B10启动子(W006055487,公开于2006年5月26日)、CRWAQ81(W005035770,公开于2005年4月21日)和玉米ZRP2.47启动子(NCBI登录号:U38790;GI No.1063664)。

[0156] 本发明的重组DNA构建体也可包括其他调控序列,包括但不限于翻译前导序列、内含子和多腺苷酸化识别序列。在特定实施方案中,重组DNA构建体还包括增强子或沉默子。

[0157] 内含子序列可加至5'非翻译区、蛋白编码区或3'非翻译区以增加积聚在胞浆中的成熟信息的量。已经显示,在植物和动物两者的表达构建体的转录单位中包含可剪接内含子可使基因表达在mRNA和蛋白质水平上均增强高达1000倍。参见Buchman和Berg,Mol.Cell Biol.8:4395-4405(1988);Callis等人,Genes Dev.1:1183-1200(1987)。

[0158] 组合物:

[0159] 本发明的组合物是其基因组中包含本发明的任何重组DNA构建体或抑制DNA构建体(例如上面所讨论的任何一种构建体)的植物。组合物也包括任何植物的子代,以及获取自植物或其子代的任何种子,其中所述子代或种子在其基因组中包含重组DNA构建体或抑制DNA构建体。子代包括通过植物的自花授粉或异型杂交而获得的连续世代。子代也包括杂交种和自交系。

[0160] 本发明的一个组合物为一种植物,与对照植物中野生型LOGL5多肽的表达水平或活性相比,所述植物的内源LOGL5多肽的表达水平或活性是下降的;与对照植物相比,所述植物表现出较长的根;所述植物中内源LOGL5多肽的表达和活性通过引入到植物中的基因组修饰而降低。所述基因组修饰包括:在内源LOGL5基因和其调控元件所在的基因组区域a)插入一个DNA片段或删除一个DNA片段或替换一个DNA片段,或b)产生一个或多个核苷酸改

变,从而有效降低内源LOGL5多肽的表达水平或活性。

[0161] 本发明的一个组合物为另一种植物,所述植物的LOGL5基因被修饰,或LOGL5基因的调控元件被修饰。组合物还包括所述植物的任何子代,以及获取自所述植物或其子代的任何种子,其中所述子代或种子在其基因组中包含修饰的LOGL5基因或调控元件。所述子代包括植物通过自花授粉或异型杂交而获得的连续世代。子代也包括杂交种和自交系。

[0162] 在杂交种子繁殖的农作物中,成熟的转基因植物可自花授粉而产生纯合的自交系植物。该自交系植物产生含有新导入的重组DNA构建体的种子。这些种子可生长而产生将会表现出改变的农学特性的植物,或者可用于育种程序以产生杂交种子,这些杂交种子可生长而产生将会表现出如改变的农学特性的植物。所述种子可为玉米种子或水稻种子。

[0163] 植物可为单子叶植物或双子叶植物,例如水稻、玉米或大豆植物,如玉米杂种植物或玉米自交系植物。植物还可为向日葵、高粱、油菜、小麦、苜蓿、棉花、大麦粟、甘蔗或柳枝稷。

[0164] 重组DNA构建体或抑制DNA构建体可稳定地整合进植物的基因组中。CRISPR-Cas构建体可以稳定的整合进植物基因组中,导致的基因或调控元件修饰可以稳定的在植物中进行遗传。

[0165] 实施方案包括但不限于以下实施方案:

[0166] 1. 一种转基因或基因组修饰的植物(例如水稻、玉米或大豆植物),在其基因组中包含可操作地连接至少一种异源调控元件的多核苷酸,其中所述多核苷酸编码多肽的氨基酸序列在与SEQ ID NO:3进行比较时具有至少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%、99%或100%的序列一致性,其中,所述植物在与不包含所述基因组修饰或异源调控元件的对照植物进行比较时表现出改变的根长,增加所述多核苷酸的表达使植物根长变短,减少所述多核苷酸的表达使植物的根变长。

[0167] 2. 一种转基因植物(例如水稻、玉米或大豆植物),在其基因组中包含一种抑制DNA构建体,所述抑制DNA构建体包含可操作连接至少一个异源调控元件序列的抑制元件,所述抑制元件源自感兴趣的靶基因的正义链或者反义链,所述区段的核苷酸序列与抑制元件来源的正义链或者反义链的序列一致性至少为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%、99%或100%,其中所述感兴趣的靶基因编码LOGL5多肽,所述植物与对照植物相比,显示较长的根。

[0168] 3. 一种转基因植物(例如水稻、玉米或大豆植物),在其基因组中含有抑制DNA构建体,所述抑制DNA构建体包含至少一个异源调控元件可操作连接至下列序列的至少100bp的连续碱基对:(a) 一种多核苷酸,其编码的多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:3相比,具有至少为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%、99%或100%序列一致性，(b) 核酸序列(a)的全长互补序列，其中，与对照植物相比，所述植物表现出较长的根。

[0169] 4. 实施方案1到3的植物，其中多聚核苷酸编码LOGL5多肽，所述LOGL5多肽可来自水稻(*Oryza sativa*)、野生稻(*Oryza australiensis*)、短舌野生稻(*Oryza barthii*)、非洲型稻(*Oryza glaberrima*)、阔叶稻(*Oryza latifolia*)、长雄野生稻(*Oryza longistaminata*)、南方野生稻(*Oryza meridionalis*)、药用野生稻(*Oryza officinalis*)、斑点野生稻(*Oryza punctata*)、普通野生稻(*Oryza rufipogon*) (红稻)、印度野生稻(*Oryza nivara*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、甘蓝(*Brassica oleracea*)、玉米(*Zea mays*)、大豆(*Glycine max*)、烟豆(*Glycine tabacina*)、野大豆(*Glycine soja*)和短绒野大豆(*Glycine tomentella*)。

[0170] 5.1-4实施方案中上述植物的任意子代，实施方案1-4上述植物的任意种子，源于实施方案1-4任意上述植物的细胞和其子代。

[0171] 前述实施方案1-5中的任意一项或本发明公开的其他实施方案中，重组DNA构建体还包括至少一个异源的在植物中有功能的启动子作为调控元件。

[0172] 本领域技术人员很容易找到适当的对照或参照植物，当采用本发明描述的组合物或方法评估或测定转基因植物一个农艺性状或表型时。例如，但不限于下述举例：

[0173] 1. 转化的植物的子代，该转化的植物对于重组DNA构建体来说是半合子的，该子代分离成包含或不包含该DNA构建体的植株：包含该重组DNA构建体的子代将通常相对于不包含该重组DNA构建体的子代来进行测量(即，不包含该重组DNA构建体的子代是对照或参照植物)。

[0174] 2. 重组DNA构建体基因渗入至近交系中，例如在玉米中，或基因渗入进变种中，例如在大豆中：基因渗入品系将通常相对于亲本近交系或变种品系进行测量(即，亲本近交系或品种品系是对照或参照植物)。

[0175] 3. 双杂交系，其中第一杂交系由两个亲本近交系产生，而第二杂交系由相同的两个亲本近交系产生，不同的是其中一个亲本近交系含有重组DNA构建体：第二杂交系通常将相对于第一杂交系进行测量(即第一杂交系为对照植物或参照植物)。

[0176] 4. 包含重组DNA构建体的植物：该植株可以相对于这样的对照植物进行评价或测量，该对照植物不包含重组DNA构建体，但具有与该植株相当的遗传背景(例如，与包含重组DNA构建体的植株相比较，该遗传物质具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性)。

[0177] 方法：

[0178] 方法包括但不限于：调控植物根长的方法，观测和/或评估植物农业特征的方法，修饰或改变宿主内源基因组基因的方法，改变内源多肽的表达或活性的方法，制备种子的方法。

[0179] 方法还包括但不限于如下方法：

[0180] 对植物或植物细胞基因组靶序列进行基因组修饰的方法，选择植物的方法，基因编辑的方法，和将有兴趣的多核苷酸插入到植物基因组的方法。这些方法需要一个向导RNA/Cas内切酶体系，其中向导RNA引导Cas内切酶识别和选择细胞基因组特定位点，从而导致双链断裂。向导RNA/Cas内切酶体系是定点修饰植物，植物细胞或种子基因组的有效体

系。本发明还提供了一个利用向导多核苷酸/Cas内切酶体系修饰细胞基因组靶位点或编辑细胞基因组核苷酸序列方法和组合物。一旦确定基因组靶位点,可以采用多种方法对感兴趣的多核苷酸对靶位点进行修饰。

[0181] 在一个实施方案中,提供了一种修饰植物细胞基因组靶位点的方法,所述方法包括引入一个向导RNA和一个Cas内切酶至所述植物,所述向导RNA和Cas内切酶能形成一个复合体,从而利用Cas内切酶导致所述靶位点的双链断裂。

[0182] 另外,提供了一种修饰植物细胞基因组靶位点的方法,所述方法包括:a) 将一个向导RNA和一个Cas内切酶引入到一个植物细胞,所述向导RNA和Cas内切酶能形成一个复合体,从而利用Cas内切酶导致所述靶位点的双链断裂;和b) 确定至少包含一个修饰位点的植物细胞,所述修饰是指在靶位点存在至少一处包括一个一个或多个核苷酸缺失、插入或替换。

[0183] 蛋白质的改变可以有多种方式,包括氨基酸替换,删除,截短和插入。这些方法是本领域已知的。例如,通过DNA突变导致蛋白氨基酸序列变化。例如,诱变和核苷酸序列变化的方法可参见Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-92; Kunkel等(1987)和其他参考文献。氨基酸替换不会影响蛋白的生物学活性,例如,在Dayhoff等(1978, Atlas of Protein Sequence and Structure, Natl Biomed Res Found, 华盛顿)描述的模式中有提及。保守替换,例如与其他拥有相似特性的一个氨基酸的交换可能是可取的。保守型替换、插入和氨基酸替换并不期望能对蛋白的特性产生根本改变;任何替换、删除、插入或重组的效应都能通过常规筛选实验评估。双链断裂诱导活性筛选是已知的,一般通过评估整体活性和包含靶位点的特定DNA。

[0184] 一种编辑细胞基因组核苷酸序列的方法,所述方法包括将一个向导多核苷酸、一个Cas内切酶和一个可选择的多核苷酸修饰模板引入一个细胞中,其中所述向导RNA和Cas内切酶能形成一个复合体,从而使Cas内切酶在所述细胞基因组靶位点产生双链断裂;所述多核苷酸修饰模板包括至少一个核苷酸修饰的所述核苷酸序列。细胞基因组的核苷酸序列选自:启动子序列,终止子序列,调控原件序列,拼接位点,编码序列,多聚泛素化位点,内含子位点和内含子增强基序。

[0185] 一种编辑细胞基因组启动子序列的方法,所述方法包括将一个向导多核苷酸、一个多核苷酸修饰模板和至少一个Cas内切酶引入一个细胞中,其中所述向导RNA和Cas内切酶能形成一个复合体,从而使Cas内切酶在所述细胞基因组靶位点产生双链断裂;所述多核苷酸修饰模板包括至少一个核苷酸修饰的所述核苷酸序列。

[0186] 转化细胞的方法包含用本发明中任意分离的多核苷酸转化细胞。也包括通过这种方法转化的细胞。在具体实施方案中,所述细胞是真核细胞,例如酵母、昆虫或植物细胞,或原核细胞例如细菌细胞。

[0187] 产生转基因植物的方法,其包括用本发明的任何分离的多核苷酸或重组DNA构建体来转化植物细胞并由转化的植物细胞再生转基因植物。本发明也涉及由该方法制备的转基因植物,以及从该转基因植物中获取的转基因种子。

[0188] 用于从细胞或细胞培养基中分离本发明多肽的方法,其中所述细胞包含具有本发明多核苷酸的重组DNA构建体,所述重组DNA构建体包含本发明的多核苷酸可操作地连接到至少一种调控序列,并且其中转化的宿主细胞在适于重组DNA构建体表达的条件下生长。

[0189] 改变宿主细胞中本发明多肽表达水平的方法,包括:(a)用本发明的重组DNA构建体转化宿主细胞;以及(b)在适于表达所述重组DNA构建体的条件下使转化的细胞生长,其中重组DNA构建体的表达导致转化的宿主细胞中的本发明多肽含量改变。

[0190] 一种产生修饰植物的方法包括将本发明公开的任意CRISPR-Cas构建体转化植物细胞和由转化的植物细胞再生修饰的植物,其中本方法获得的修饰的植物和修饰的种子可用于本发明的其它方法。

[0191] 一种生产种子的方法,包括前述的任一方法,进一步还包括从所述子代植物获得种子,其中所述种子在其基因组中包含重组DNA构建体。

[0192] 在前述任一的方法或本文其他实施方案披露的任意方法中,所述引入步骤中所述再生植物细胞可包括愈伤细胞、胚胎愈伤细胞、配子细胞、分生细胞、或不成熟的胚胎细胞。可再生植物细胞可源于自交玉米植株。

[0193] 在前述任一方法或本文披露的其他实施方案中的任一方法中,所述再生步骤可包括:(i)在含有胚促激素培养基上培养所述转化的植物细胞直至长出愈伤组织;(ii)将步骤(i)所述的转化植物细胞转移至含有组织促激素的第一培养基上;和(iii)将步骤(ii)所述转化植物细胞接种到第二培养基上,使其茎伸长、根发育或两者均发育。

[0194] 在前述任一方法或本发明的其他实施方案的方法中,确定转基因植物农艺性状的变化步骤,如果可行,可包括在可变的环境条件下,确定与不含有重组DNA构建体的对照植物相比,转基因植物是否表现出至少一个农艺性状的变化。

[0195] 在前述任一方法或者本发明其他实施方案的任一方法中,如果可能,确定子代植物农艺性状变化的步骤包括可变的环境条件下,确定与不含有重组DNA构建体的对照植物相比,所述子代植物是否表现出至少一个农艺性状的变化。

[0196] 在前述任一方法或者本发明其他实施方案的任一方法中,与对照植物相比,植物在水分限制条件下表现出至少一个农艺性状的变化。

[0197] 在前述任一方法或者本发明其他实施方案的任一方法中,存在将重组DNA构建体导入可再生植物的供选方案,所述重组DNA构建体包含一个多核苷酸和与其可操作连接的至少一个调控元件,例如可以将一个调控元件(如一个或多个增强子、任选的转座子元件的一部分)导入可再生植物细胞,接着筛选带有调控元件和与其可操作连接的编码本发明多肽的内源基因的转基因事件。

[0198] 可以通过任何适当的技术将本发明的重组DNA构建体导入植物中,所述技术包括但不限于直接DNA吸收、化学药品处理、电穿孔、显微注射、细胞融合、感染、载体介导的DNA转移、基因枪轰击或农杆菌的转化。植物转化和再生的技术在国际专利公开号WO 2009/006276中描述,其全部内容并入作为参考。

[0199] 另外,也有修饰或改变宿主内源基因组DNA的方法,包括改变宿主天然DNA序列或包括调控元件、编码或非编码序列等前体转基因序列。这些方法也可以用于将核酸序列靶向到基因组中改造目标识别序列。例如本文中转基因修饰的细胞或植物使用传统的基因工程核酸酶如产生修饰植物基因组的归位核酸内切酶产生(例如WO 2009/114321;Gao等(2010)Plant Journal 1:176-187)。其他的位点定向工程是通过使用锌指结构域识别偶联的限制性内切酶的限制性特点修饰内源基因(例如Urnov等(2010)Nat Rev Genet.11(9):636-46;Shukla等(2009)Nature 459(7245):437-41)。转录激活样(TAL)效应因子-DNA修饰

酶(transcription activator-like effector-DNA modifying enzyme,TALE或TALEN)可用于基因工程修饰植物基因组,参见例如US20110145940,Cermak等(2011)Nucleic Acids Res.39(12)和Boch等(2009),Science 326(5959):1509-12。植物基因组定点修饰也可以使用细菌II型CRISPR(成簇的规律的间隔的短回文的重复序列,clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas(CRISPR关联蛋白,CRISPR-associated)系统,参考例如Belhaj等(2013),Plant Methods 9:39。CRISPR/Cas系统可以允许可定制的小的非编码RNA引导的基因组DNA靶向切割。

[0200] 本领域的技术人员熟悉修饰后的植物培育和再生的方法。再生植物可以自花授粉产生纯合子修饰植物,或者将再生植物的花粉与种子长出的农艺重要的植物杂交,或者农艺重要的植物的花粉与再生的转基因植物杂交。本领域的技术人员熟悉将编码期望多肽的基因转化植物和培育再生植物的方法。再生植物可以自花授粉产生纯合子转基因植物,或者将再生植物的花粉与种子长出的农艺重要的植物杂交,或者农艺重要的植物的花粉与再生的转基因植物杂交。本领域的技术人员熟知培育本文披露的含有期望多肽的转基因植物的方法。

#### [0201] 性状的堆叠

[0202] 转基因植物可包含本发明公开的一个或多个根长调控多核苷酸与一个或多个另外的多核苷酸的堆叠,从而导致多个多肽序列的产生或抑制。包含多核苷酸序列的堆叠的转基因植物可通过传统育种方法或通过遗传工程方法中的一者或两者来获得。这些方法包括但不限于培育各自包含所关注多核苷酸的单独品系,用后续基因转化包含本文所公开的基因的转基因植物,以及将基因共转化进单个植物细胞中。如本文所用,术语“堆叠”包括具有存在于同一植物中的两种或更多种性状(例如,两种性状均掺入核基因组中,一种性状掺入核基因组中且一种性状掺入质体的基因组中,或者两种性状均掺入质体的基因组中)。在一个非限制性例子中,“堆叠性状”包含序列彼此物理相邻的分子堆叠。如本文所用的性状是指源自特定序列或序列群组的表型。可使用包含多个基因的单个转化载体或单独地携带于多个载体上的基因进行基因的共转化。如果序列通过遗传转化植株来堆叠,则所关注的多核苷酸序列可在任何时间以任何顺序进行组合。可以用共转化方案将性状与所关注多核苷酸同时引入,所述多核苷酸由转化盒的任何组合提供。例如,如果将要引入两条序列,则可将该两条序列包含在单独的转化盒中(反式)或包含在同一转化盒中(顺式)。可通过相同启动子或不同启动子驱动所述序列表达。在某些情况中,可能期望引入会抑制所关注多核苷酸的表达的转化盒。这可以与其他抑制盒或过表达盒的任何组合进行组合以在植物中生成所需的性状组合。还认识到可使用位点特异性重组系统在所需的基因组位置堆叠多核苷酸序列。参见,例如,WO 1999/25821、WO 1999/25854、WO 1999/25840、WO 1999/25855和WO 1999/25853,上述专利均以引用的方式并入本文。

#### 实施例

[0203] 本文的具体实施进一步在下列实例中示明。在这些实例中,除非特别说明,采用摄氏/公制。在这些实例中,仅用举例说明具体的实施过程。通过上述讨论和具体事例,本领域的专业人员可以查明本发明的基本特征,经过各种改变和修改将本发明应用于各种用途和条件,并不偏离本发明主体和范围。因此,除了本专利表述和讨论的各种修改外,本领域内

的专业人员所做的不偏离本发明主题的修改也将落入本专利的权力要求范围内。

[0204] 实施例1. OsLOGL5基因的克隆和载体的构建

[0205] 根据水稻激活标签突变体库初步的筛选结果和基因ID LOC\_0s03g64070.1序列信息,采用常规方法和下列引物以中花11水稻叶、茎和根组织的cDNA为模板克隆OsLOGL5的cDNA。

[0206] 5'-CGTCGGCCGTATATATGATGATGGAG-3' (SEQ ID NO:4)

[0207] 5'-GGGAATTAATATATGGAAGAAATAATTAGCAGC-3' (SEQ ID NO:5)

[0208] PCR扩增产物长度为851bp,琼脂糖凝胶电泳后,采用试剂盒回收,并与TA克隆载体连接。测序验证构建体中的序列和连接方向后,将基因克隆入二元载体DP0158中(pCAMBIA1300-DsRed)。DP0600构建体中克隆核苷酸序列和OsLOGL5的编码序列如SEQ ID NO:1和2所示,OsLOGL5的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

[0209] 实施例2. 转化获得转基因水稻株系

[0210] 过表达载体和空载体(DP0158)采用林拥军和张启发((2005) Plant Cell Rep. 23: 540-547)描述的农杆菌介导的方法转化入中花11号水稻。中花11号水稻为中国农业科学院作物研究所培育的品种,第一批种子由北京未名凯拓农业生物公司提供。转化实验室获得的T0代转基因幼苗移栽至田间水田中获得T1种子,T1和T2代种子储藏在4℃冷库中。过表达载体含有标记基因,T1和T2代种子在绿色荧光灯下发红色荧光的为转基因种子,并用于下列性状验证试验。

[0211] 实施例3. 基因表达分析

[0212] 采用标准实时RT-PCR分析转基因水稻植株中基因的表达水平。EF1 $\alpha$ 基因用作内参显示转基因水稻和对照植物的扩增和上样量类似。以EF1 $\alpha$ mRNA水平为参照确定基因表达量。

[0213] DP0600水稻植株中OsLOGL5基因表达量水平采用下列引物进行测定,ZH11-TC水稻中基因的表达水平设置为1.00,OsLOGL5基因所有测试的转基因株系中过量表达,与ZH11-TC相比,转基因水稻幼苗中基因表达量的浮动范围在3-77倍之间。DP0600.09和DP0600.14水稻幼苗中表达水平低于其他转基因水稻幼苗。

[0214] DP0600-F1:5'-CTCTGCAAGCTCGAGGAATAC-3' (SEQ ID NO:6)

[0215] DP0600-R1:5'-GAGTAGATGCTTCCGGCG-3' (SEQ ID NO:7)

[0216] 实施例4. OsLOGL5转基因水稻幼苗的可见表型

[0217] 1. 实验室条件下OsLOGL5转基因水稻幼苗根部可见表型

[0218] OsLOGL5转基因水稻种子和ZH11-TC和DP0158种子先消毒,在正常条件下萌发。萌发的种子放在底部有孔的试管中,在实验室中30℃水培5天,然后再Hoagland营养液中培养9天,选择20株一致的幼苗,测定根长和根数。根长指种子基部到最长根顶端的长度,根数包括长度大于1cm的根。

[0219] 如表1和图2所示,与ZH11-TC和DP0158幼苗相比,8个转基因株系显示显著短的根,另外两个株系,OsLOGL5基因表达水平较低,显示与对照相近的根长。如表2所示转基因水稻植株的根数与ZH11-TC幼苗相近,并多余DP0158幼苗。

[0220] 为了调查OsLOGL5转基因水稻幼苗根长短于ZH11-TC和DP0158幼苗的原因,观察了种子的萌发情况,OsLOGL5转基因种子与ZH11-TC和DP0158种子萌发正常,这消除了种子活

力影响根表型的原因。

[0221] 上述结果表明0sLOGL5基因的表达量与根长反向相关。

[0222] 表1.0sLOGL5转基因水稻植株在实验室条件下的根长度

株系 ID	长度 (cm)	ZH11-TC			DP0158		
		差值	P值	$P \leq 0.05$	差值	P值	$P \leq 0.05$
ZH11-TC	11.39						
DP0158	11.15						
DP0600.01	7.56	-3.83	0.0000	Y	-3.59	0.0000	Y
DP0600.02	7.40	-3.99	0.0000	Y	-3.75	0.0000	Y
[0223] DP0600.05	7.07	-4.32	0.0000	Y	-4.08	0.0000	Y
DP0600.07	7.35	-4.04	0.0000	Y	-3.80	0.0000	Y
DP0600.08	8.41	-2.98	0.0000	Y	-2.74	0.0000	Y
DP0600.09	11.31	-0.08	0.8337		0.16	0.6745	
DP0600.10	8.33	-3.06	0.0000	Y	-2.82	0.0000	Y
DP0600.11	8.12	-3.27	0.0000	Y	-3.03	0.0000	Y
DP0600.12	8.22	-3.17	0.0000	Y	-2.93	0.0000	Y
DP0600.14	11.58	0.20	0.6088		0.44	0.2542	

[0224] 表2.0sLOGL5转基因水稻植株在实验室条件下的根数量

[0225]

株系 ID	根数量	ZH11-TC			DP0158		
		差值	P值	$P \leq 0.05$	差值	P值	$P \leq 0.05$
ZH11-TC	6.2						
DP0158	5.4						
DP0600.01	7.0	0.8	0.0729		1.6	0.0004	Y
DP0600.02	7.1	0.9	0.0569		1.7	0.0003	Y
DP0600.05	7.3	1.1	0.0140	Y	1.9	0.0000	Y
DP0600.07	6.3	0.1	0.8220		0.9	0.0439	Y
DP0600.08	7.0	0.8	0.0926		1.6	0.0006	Y
DP0600.09	6.6	0.4	0.3686		1.2	0.0074	Y
DP0600.10	6.2	-0.1	0.9104		0.8	0.0926	
DP0600.11	6.2	0.0	1.0000		0.8	0.0729	
DP0600.12	6.5	0.3	0.5739		1.1	0.0189	Y

[0226] 2. 温室中种植0sLOGL5转基因水稻幼苗的可见表型

[0227] 温室中, 测试10个0sLOGL5转基因株系, ZH11-TC和DP0158幼苗用作对照。萌发的种

子种植在装有蛭石的小盆中,进行水培。当水稻幼苗生长到3-叶期时,低氮溶液替换水给植株提供营养。低氮溶液培养32天后,在构建体水平,与ZH11-TC和DP0158幼苗相比,OsLOGL5转基因株系显示显著少的平均分蘖数,较低的平均SPAD值和鲜重;8个株系的平均分蘖数和鲜重显著低于ZH11-TC和DP0158幼苗。这些结果表明OsLOGL5转基因水稻在幼苗期具有较少的分蘖数和鲜重。

[0228] 表3.OsLOGL5转基因水稻植株在温室低氮条件下的低氮试验 (ZH11-TC作为对照)

[0229]

株系 ID	分蘖			SPAD			鲜重		
	平均分蘖数	P值	P≤0.05	平均 SPAD 值	P值	P≤0.05	平均鲜重	P值	P≤0.05
DP0600 (构建体)	1.7	0.0004		34.70	0.0444		2.736	0.0003	
ZH11-TC	2.9			36.86			4.262		
DP0600.01	1.4	0.0001		34.96	0.1151		2.254	0.0000	
DP0600.02	1.7	0.0026		35.10	0.1436		2.564	0.0001	
DP0600.05	1.3	0.0000		34.16	0.0250		2.044	0.0000	
DP0600.07	1.4	0.0001		33.73	0.0095		1.954	0.0000	
DP0600.08	1.3	0.0000		35.09	0.1428		2.370	0.0000	
DP0600.09	2.7	0.5482		35.46	0.2446		4.406	0.7328	
DP0600.11	1.2	0.0000		34.86	0.0981		2.218	0.0000	
DP0600.12	1.5	0.0002		34.56	0.0565		2.650	0.0001	
DP0600.13	1.5	0.0004		35.00	0.1226		2.862	0.0009	
DP0600.14	2.6	0.4398		34.09	0.0217		4.043	0.6048	

[0230] 表4.OsLOGL5转基因水稻植株在温室低氮条件下的低氮试验 (DP0158作为对照)

[0231]

株系 ID	分蘖数			SPAD			鲜重		
	平均分蘖数	P值	$P \leq 0.05$	平均 SPAD 值	P值	$P \leq 0.05$	平均鲜重	P值	$P \leq 0.05$
DP0600 (构建体)	1.7	0.0000		34.70	0.0225		2.736	0.0000	
DP0158	3.2			37.15			4.779		
DP0600.01	1.4	0.0000		34.96	0.0691		2.254	0.0000	
DP0600.02	1.7	0.0001		35.10	0.0883		2.564	0.0000	
DP0600.05	1.3	0.0000		34.16	0.0130		2.044	0.0000	
DP0600.07	1.4	0.0000		33.73	0.0046		1.954	0.0000	
DP0600.08	1.3	0.0000		35.09	0.0877		2.370	0.0000	
DP0600.09	2.7	0.1479		35.46	0.1599		4.406	0.3784	
DP0600.11	1.2	0.0000		34.86	0.0579		2.218	0.0000	
DP0600.12	1.5	0.0000		34.56	0.0316		2.650	0.0000	
DP0600.13	1.5	0.0000		35.00	0.0741		2.862	0.0000	
DP0600.14	2.6	0.1054		34.09	0.0112		4.043	0.0819	

[0232] 选择4个OsLOGL5转基因水稻植株,用于观察蛭石中根表型,如图3所示,具有较高OsLOGL5基因表达水平的DP0600.05和DP0600.07水稻植株显示较少的根,具有较低OsLOGL5基因表达水平的DP0600.09和DP0600.14水稻植株与DP0158水稻植株相近。

[0233] 3.水稻田中种植的OsLOGL5基因转基因水稻植株的可见表型

[0234] 10个OsLOGL5转基因水稻株系种植在水稻田中用于收获种子,水稻植株正常管理,并施加杀虫剂和肥料,8个转基因株系显示出叶窄和少分蘖的表型。

[0235] 实施例5.0sLOGL5转基因水稻植株在温室的表现

[0236] 选择两个低OsLOGL5基因表达水平的水稻转基因株系(DP0600.09和DP0600.14)和一个高OsLOGL5基因表达水平的水稻转基因株系(DP0600.07),种植在直径约35cm小盆的土壤中,ZH-TC水稻植株用作对照。这些水稻植株正常管理,并施以杀虫剂和化肥,收获前,测量SPAD值和分蘖数。当水稻植株成熟时,测定有效穗数、籽粒产量、根部干重、秸秆干重。如表5所示,OsLOGL5转基因水稻植株显示出与ZH11-TC水稻植株相近的SPAD值;与ZH11-TC相比,具有较高的OsLOGL5基因表达水平的DP0600.07水稻植株显示出较少的分蘖数,而另外两个转基因水稻株系显示较多的分蘖数。DP0600.09和DP0600.14水稻植株的有效穗数、籽粒产量、根部干重、秸秆干重大于ZH11-TC水稻植株;而高的OsLOGL5基因表达水平的DP0600.07的有效穗数、籽粒产量、根部干重、秸秆干重少于ZH11-TC水稻植株。

[0237] 表5.0sLOGL5转基因水稻植株的表现

	株系 ID	估计值	差值	P 值	$P \leq 0.05$	
[0238]	ZH11-TC	44.55				
	SPAD	DP0600.07	44.63	0.0800	0.9331	
		DP0600.09	45.27	0.7200	0.4552	
		DP0600.14	45.14	0.5900	0.5390	
		ZH11-TC	11.30			
	分蘖数	DP0600.07	6.70	-4.6000	0.0004	
		DP0600.09	13.00	1.7000	0.1222	
		DP0600.14	12.70	1.4000	0.1977	
		ZH11-TC	11.00			
	有效穗数	DP0600.07	4.80	-6.2000	0.0000	
		DP0600.09	12.70	1.7000	0.0343	Y
		DP0600.14	12.50	1.5000	0.0581	
		ZH11-TC	37.28			
	籽粒产量(g)	DP0600.07	9.49	-27.7830	0.0000	
		DP0600.09	41.86	4.5800	0.0282	Y
		DP0600.14	42.21	4.9300	0.0195	Y
[0239]		ZH11-TC	16.12			
	根的干重(g)	DP0600.07	8.98	-7.1360	0.0154	
		DP0600.09	21.50	5.3850	0.0546	
		DP0600.14	19.37	3.2500	0.2230	
		ZH11-TC	37.37			
	秸秆的干重(g)	DP0600.07	17.52	-19.8490	0.0000	
		DP0600.09	41.17	3.8000	0.0641	
		DP0600.14	41.31	3.9450	0.0556	

[0240] 实施例6.成熟转基因水稻植株的田间干旱试验

[0241] 开花期干旱胁迫是农业生产中严重的问题。转基因水稻植株在田间干旱条件下进行验证。成熟水稻植株的田间干旱试验中,每个基因构建体选择10个转基因株系。T2代种子首先消毒,萌发的种子种植在田间苗床上,三叶期时,将水稻幼苗移栽到田间试验地,设置四个重复,每个重复每转基因株系10棵苗,并将四个重复种植在同一地块。同一地块中,邻近转基因株系种植的ZH11-TC和DP0158用作统计分析中的对照。

[0242] 水稻植株正常管理,并使用相应的杀虫剂和化肥,穗分化期停止浇水,因此开花期时产生干旱胁迫,干旱时间长短取决于温度和湿度等天气条件。干旱期间,使用TDR30 (Spectrum Technologies, Inc.) 在每块地的10个位点每四天测定土壤相对含水量。

[0243] 试验过程中,观察并记录植株表型,植株的表型主要包括抽穗期、卷叶程度、敏旱

性和抗旱性,尤其关注中午时植株的卷叶程度。种植季结束时,每个株系在每行中间挑选约6株具有代表性的植株收获,并称量每株水稻籽粒的重量,利用混合线性模型(mixed linear model)对籽粒重量进行统计分析。 $P < 0.1$ 时,认为转基因株系为阳性株系,基因具有提高耐旱性功能。

[0244] 0sLOGL5(DP0600)转基因水稻的田间干旱验证结果

[0245] 10个0sLOGL5转基因水稻植株在海南田间进行测试,ZH11-TC和DP0158水稻植株临近种植并用做对照。主茎穗处于幼穗分化IV-V期,分蘖穗处于幼穗分化II期停止浇水。抽穗和成熟过程中,土壤体积含水量从20%降到5%。断水后49天,主茎穗处于乳熟期,水稻植株出现卷叶的表型。

[0246] 籽粒产量分析表明,构建体水平上,0sLOGL5转基因水稻的单株籽粒产量显著低于ZH11-TC和DP0158对照;所有10个0sLOGL5转基因株系的单株籽粒产量显著低于ZH11-TC和DP0158对照植株(表6),其中,DP0600.05、DP0600.09和DP0600.14水稻植株的单株籽粒产量相对较高。

[0247] 表6.0sLOGL5转基因水稻植株在田间干旱条件下的籽粒产量分析(第一次试验)

[0248]

株系 ID	存活植株的数量	收获植株的数量	单株产量(g)	CK=ZH11-TC			CK=DP0158		
				差值	P值	$P \leq 0.1$	差值	P值	$P \leq 0.1$
DP0600(构建体)			2.26	-8.70	0.000		-7.67	0.000	
ZH11-TC	40	24	10.96						
DP0158	40	24	9.92						
DP0600.01	39	21	0.95	-10.01	0.000		-8.97	0.000	
DP0600.02	40	23	1.15	-9.81	0.000		-8.77	0.000	
DP0600.05	40	23	4.13	-6.83	0.000		-5.79	0.000	
DP0600.07	40	24	1.58	-9.37	0.000		-8.34	0.000	
DP0600.08	40	24	1.70	-9.26	0.000		-8.23	0.000	
DP0600.09	38	24	2.39	-8.57	0.000		-7.53	0.000	
DP0600.10	40	23	1.13	-9.83	0.000		-8.80	0.000	
DP0600.11	30	17	1.44	-9.52	0.000		-8.48	0.000	
DP0600.12	40	24	1.18	-9.78	0.000		-8.75	0.000	
DP0600.14	30	18	6.92	-4.04	0.000		-3.01	0.004	

[0249] 同样的10个0sLOGL5转基因水稻株系再次在宁夏田间进行验证,主茎穗到幼穗分化I期时停止浇水。断水后27天,主茎穗到达幼穗分化VII-VIII期,分蘖穗到达幼穗分化VI-VII期,水稻植株出现卷叶的表型。断水后37天,50%的幼穗抽穗。抽穗过程中,土壤体积含水量从45%降到15%。

[0250] 籽粒产量分析表明,构建体水平上,0sLOGL5转基因水稻的单株籽粒产量显著低于ZH11-TC和DP0158对照;所有10个0sLOGL5转基因株系的单株籽粒产量显著低于ZH11-TC和DP0158对照植株(表7),同样的,DP0600.05、DP0600.09和DP0600.14水稻植株的单株籽粒产量相对较高。这些结果表明0sLOGL5转基因水稻植株的干旱耐性较差,干旱胁迫后,单株籽

粒产量降低。

[0251] 表7.0sLOGL5转基因水稻植株在田间干旱条件的籽粒产量分析(第二次试验)

[0252]

株系 ID	存活植株的数量	收获植株的数量	单株产量 (g)	CK=ZH11- TC			CK=DP0158		
				差值	P值	$P \leq 0.1$	差值	P值	$P \leq 0.1$
DP0600 (构建体)			1.21	-4.22	0.000		-5.65	0.000	
ZH11-TC	39	24	5.43						
DP0158	40	24	6.86						
DP0600.01	34.00	6.00	0.65	-4.78	0.00		-6.22	0.00	
DP0600.02	39.00	6.00	0.43	-5.00	0.00		-6.43	0.00	
DP0600.05	36.00	24.00	2.27	-3.16	0.01		-4.60	0.00	

[0253]

DP0600.07	37.00	18.00	0.98	-4.45	0.00		-5.88	0.00	
DP0600.08	25.00	0.00	0.42	-5.01	0.00		-6.45	0.00	
DP0600.09	29.00	21.00	2.10	-3.33	0.00		-4.76	0.00	
DP0600.10	41.00	12.00	1.07	-4.36	0.00		-5.80	0.00	
DP0600.11	30.00	6.00	0.69	-4.74	0.00		-6.17	0.00	
DP0600.12	37.00	18.00	0.72	-4.71	0.00		-6.14	0.00	
DP0600.14	29.00	24.00	2.81	-2.62	0.02		-4.05	0.00	

[0254] 实施例7.转基因水稻植株的实验室百草枯试验

[0255] 百草枯(1,1-二甲基-4,4-联吡啶二氯化物)是一类叶片喷施的非选择性的吡啶除草剂,是世界范围内广泛应用一种除草剂,能够控制大量作物如玉米、水稻、大豆等中生长的杂草。在植物细胞中,百草枯主要靶向叶绿体,百草枯通过接受光系统I的电子,然后与氧气发生化学反应生成过氧化物和过氧化氢,而过氧化物和过氧化氢可以导致产生光氧化胁迫。干旱胁迫通常导致植物中产生活性氧(ROS),有时,植物的耐旱性与增强的抗活性氧能力相关。百草枯是强有力的氧化胁迫诱导剂,能够大大的增加活性氧(ROS)的产生,同时抑制抗氧化系统活性所需的还原物和化合物的再生。非生物胁迫增加了ROS的产生,而植物响应耐性到死亡的范围取决于胁迫力度和与其相关的ROS水平。相对较低水平的百草枯能够模拟胁迫相关的ROS产生,并用作植物胁迫生物学中胁迫耐性的标记(Hasaneen M.N.A.(2012)Herbicide-Properties,Synthesis and Control of Weeds book)。因此,进一步采用百草枯验证转基因水稻。

[0256] 百草枯试验方法:

[0257] 每个载体的水稻选择10个转基因株系用于百草枯试验,组培中花11(ZH11-TC)和转空载体对照DP0158用作对照。T2代种子参照常规方法消毒和萌发。百草枯试验在温度28-30℃,湿度30%的生长室中进行。萌发的种子放置在底部有孔的离心管中,采用水稻水培方法,培养5天,至一叶一心期;然后选择高度大约3.5~4cm的一致的幼苗用于百草枯试验。本实验采用随机区组设计,在同一个筛选水槽内设置5个区组;区组内包含所有测试的10个转基因株系、ZH11-TC和DP0158;区组的行列为16\*12,每一行为一份测试材料,故每个转基因

株系在区组内各12株,对照ZH11-TC和DP0158在区组内各3行;区组内的所有转基因株系和对照均随机排布。幼苗用终浓度为0.8 $\mu$ M的百草枯溶液进行处理7天,光周期为10h黑暗/14h光照,每两天更换一次溶液,在处理和更换溶液后,保证幼苗首先进入光周期的黑暗时期。处理7天后,计算绿色的幼苗。绿色没有损伤的幼苗为百草枯耐性幼苗;叶片、茎部变白褪色的幼苗为非百草枯耐性的幼苗。

[0258] 耐性率是百草枯试验的一个指标,指保持绿色并显示百草枯耐性表型的幼苗数除以总幼苗数的百分数。

[0259] 试验数据在载体水平(所有的转基因幼苗与对照幼苗相比)和转基因株系水平(不同的转基因株系与对照相比)进行分析,采用的统计模型为“Y~seg+line(seg)+rep+error”,随机效应为“rep”,统计方法是“SAS® PROC GLIMMIX”。

[0260] 0sLOGL5(DP0600)转基因水稻的百草枯验证结果

[0261] 第一次试验中,百草枯溶液处理7天后,600株0sLOGL5转基因幼苗中,487株保持绿色并显示出百草枯耐性表型;而180株ZH11-TC幼苗中,52株具有百草枯耐性表型;180株DP0158幼苗中,89株显示百草枯耐性表型。载体水平上,所测试的0sLOGL5转基因幼苗的耐性率显著高于ZH11-TC和DP0158对照。

[0262] 进一步在转基因株系水平的分析表明9个0sLOGL5转基因株系的百草枯耐性率高于ZH11-TC对照和DP0158对照,8个株系的百草枯耐性率显著高于ZH11-TC和DP0158对照(表8)。这些结果表明,与ZH11-TC和DP0158水稻植株相比,0sLOGL5转基因水稻在载体水平和转基因株系水平均提高了幼苗的百草枯耐性,0sLOGL5在提高转基因植物百草枯耐性或抗氧化能力中起作用。

[0263] 表8.0sLOGL5转基因水稻植株的百草枯耐性试验(第一次试验)

[0264]

株系 ID	耐性幼苗数	总幼苗数	耐性率 (%)	CK= ZH11-TC		CK= DP0158	
				P值	P $\leq$ 0.05	P值	P $\leq$ 0.05
DP0600(构建体)	487	600	81	0.0000	Y	0.0000	Y
ZH11-TC	52	180	29				
DP0158	89	180	49				
DP0600.01	56	60	93	0.0000	Y	0.0000	Y
DP0600.02	59	60	98	0.0000	Y	0.0002	Y
DP0600.05	56	60	93	0.0000	Y	0.0000	Y
DP0600.07	53	60	88	0.0000	Y	0.0000	Y
DP0600.08	43	60	72	0.0000	Y	0.0045	Y
DP0600.09	14	60	23	0.4077		0.0010	
DP0600.10	56	60	93	0.0000	Y	0.0000	Y
DP0600.11	53	60	88	0.0000	Y	0.0000	Y
DP0600.12	59	60	98	0.0000	Y	0.0002	Y
DP0600.14	38	60	63	0.0000	Y	0.0682	

[0265] 第二次试验中,对同样的10个OsLOGL5转基因株系进行测试,7天后,600株OsLOGL5转基因幼苗中,501株保持绿色并显示出百草枯耐性表型;而180株ZH11-TC幼苗中,113株具有百草枯耐性表型;180株DP0158幼苗中,72株显示百草枯耐性表型。载体水平上,所测试的OsLOGL5转基因幼苗的耐性率显著高于ZH11-TC和DP0158对照。

[0266] 进一步在转基因株系水平的分析表明7个OsLOGL5转基因株系的百草枯耐性率显著高于ZH11-TC对照,9个株系显著高于DP0158对照(表9)。这些结果进一步表明,OsLOGL5在提高转基因植物百草枯耐性或抗氧化能力中起作用。

[0267] 表9.OsLOGL5转基因水稻植株的百草枯耐性试验(第二次试验)

[0268]

株系 ID	耐性幼苗数	总幼苗数	耐性率 (%)	CK= ZH11-TC		CK= DP0158	
				P值	P≤0.05	P值	P≤0.05
DP0600(构建体)	501	600	84	0.0000	Y	0.0000	Y
ZH11-TC	113	180	63				
DP0158	72	180	40				
DP0600.01	53	60	88	0.0009	Y	0.0000	Y
DP0600.02	56	60	93	0.0002	Y	0.0000	Y
DP0600.05	56	60	93	0.0002	Y	0.0000	Y
DP0600.07	52	60	87	0.0016	Y	0.0000	Y
DP0600.08	45	60	75	0.0910		0.0000	Y
DP0600.09	31	60	52	0.1345		0.1202	
DP0600.10	49	60	82	0.0103	Y	0.0000	Y
DP0600.11	56	60	93	0.0002	Y	0.0000	Y
DP0600.12	56	60	93	0.0002	Y	0.0000	Y
DP0600.14	47	60	78	0.0327		0.0000	Y

[0269] 实施例8.成熟转基因水稻植株的田间低氮利用试验

[0270] 田间耐低氮试验在北京进行。设置两个氮素水平:N-0(不含氮的化肥)和N-1(根据土壤氮含量确定的正常肥料)。种子萌发和幼苗培养如实施例4所述。萌发种子种植于田间苗床中,三叶期将幼苗移栽入试验田中,重复4次,每个转基因株系每个重复种植10株,4个重复种于同一个田块中。同一田块中临近转基因株系的ZH11-TC和DP0158植株作为对照,并用于统计分析。

[0271] 水稻植株正常管理,并使用相应的杀虫剂,N-0处理施用磷肥和钾肥,N-1处理正常化肥。

[0272] 生长季节结束时,每行材料的每个转基因株系中间收获六株代表植株。利用ASReml软件的混合线性模型统计分析株高和粒重数据。基于分析选择阳性转基因株系(P<0.1)。

[0273] OsLOGL5(DP0600)转基因水稻的田间NUE验证结果

[0274] 如表10所示,低氮条件下,在构建体水平上,OsLOGL5转基因水稻的籽粒产量为每

株17.30g,显著低于ZH11-TC和DP0158对照;所有的12个株系的单株籽粒产量显著低于的ZH11-TC和DP0158对照。

[0275] 如表11所示,正常氮条件下,构建体水平上,0sLOGL5转基因水稻的籽粒产量显著低于ZH11-TC和DP0158对照;7个株系的单株籽粒产量显著低于ZH11-TC和DP0158,其中,DP0600.05、DP0600.07和DP0600.14水稻植株的单株籽粒产量高于或者接近ZH11-TC和DP0158对照。

[0276] 表10.0sLOGL5转基因水稻在田间低氮条件下的籽粒产量分析

[0277]

株系 ID	单株产量 (g)	CK=ZH11-TC			CK=DP0158		
		差值	P值	$P \leq 0.1$	差值	P值	$P \leq 0.1$
DP0600 (构建体)	17.30	-18.29	0.000		17.90	0.000	
ZH11-TC	35.59						
DP0158	35.20						
DP0600.01	12.78	-22.81	0.000		-22.42	0.000	
DP0600.02	9.73	-25.86	0.000		-25.47	0.000	
DP0600.05	29.54	-6.05	0.026		-5.66	0.040	
DP0600.07	12.15	-23.43	0.000		-23.04	0.000	
DP0600.08	15.14	-20.45	0.000		-20.06	0.000	
DP0600.09	26.76	-8.83	0.001		-8.44	0.001	
DP0600.10	13.04	-22.55	0.000		-22.16	0.000	
DP0600.11	12.39	-23.20	0.000		-22.81	0.000	
DP0600.12	10.82	-24.77	0.000		-24.38	0.000	
DP0600.14	30.66	-4.93	0.057		-4.54	0.077	

[0278] 表11.0sLOGL5转基因水稻在田间正常氮条件下的籽粒产量分析

[0279]

株系 ID	单株产量 (g)	CK=ZH11-TC			CK=DP0158		
		差值	P值	$P \leq 0.1$	差值	P值	$P \leq 0.1$
DP0600 (构建体)	21.48	-16.12	0.000		-10.80	0.000	
ZH11-TC	37.60						
DP0158	32.28						
DP0600.01	16.22	-21.38	0.000		-16.06	0.000	
DP0600.02	12.37	-25.23	0.000		-19.91	0.000	
DP0600.05	38.70	1.10	0.695		6.42	0.021	Y

[0280]

DP0600.07	18.92	-18.69	0.000	-13.36	0.000
DP0600.08	11.08	-26.52	0.000	-21.20	0.000
DP0600.09	36.69	-0.91	0.760	4.41	0.139
DP0600.10	19.26	-18.34	0.000	-13.02	0.000
DP0600.11	14.50	-23.10	0.000	-17.78	0.000
DP0600.12	14.90	-22.70	0.000	-17.38	0.000
DP0600.14	32.17	-5.43	0.051	-0.11	0.969

[0281] 实施例9.RNAi和CRISPR/Cas9构建体的构建

[0282] 为了调查降低OsLOGL5基因的表达水平或者使OsLOGL5多肽失活是否改变基因功能,构建了RNAi和CRISPR/Cas9构建体。

[0283] sgRNA序列的设计

[0284] 采用可用的工具分析靶基因组序列产生候选的sgRNA序列,sgRNA序列也可以通过其他的网络工具产生,所述网络工具包括,但不限于,网站<http://cbi.hzau.edu.cn/crispr/>和在线的CRISPR-PLANT。

[0285] 本申请中,将OsLOGL5启动子和基因序列(SEQ ID NO:8and SEQ ID NO:1)输入网址:<http://cbi.hzau.edu.cn/crispr/>,产生多个sgRNA序列,OsLOGL5启动子和基因序列包括启动子、外显子、内含子5' -UTR和3' -UTR。选择其中的22个sgRNA序列,其在OsLOGL5启动子和基因序列上的分布如图4所示,sgRNA序列如序列SEQ ID NO:14-35所示。

[0286] OsLOGL5基因CRIPSR-Cas构建体的构建

[0287] 在CRIPSR-Cas9构建体中,玉米Ubi启动子(SEQ ID NO:9)驱动优化后的Cas9蛋白编码序列(SEQ ID NO:10),CaMV35S 3' -UTR(SEQ ID NO:11)增加Cas9蛋白的表达水平,水稻U6启动子(SEQ ID NO:12)驱动gRNA的表达(gRNA骨架,SEQ ID NO:13)。

[0288] 单个sgRNA可用于构建基因组编辑构建体(图5),sgRNA选自包括启动子、外显子、内含子和UTR的任一区域。单个sgRNA可以引导Cas9酶定位于靶区域,在靶DNA序列上产生双链断裂,启动非同源末端连接(NHEJ)修复机制和同源介导修复(HDR),通常会在靶位点诱导随机插入、缺失和替换。例如,所述编辑可以移除OsLOGL5基因启动子区域的表达元件,从而降低mRNA水平,或在编码区编辑导致OsLOGL5多肽结构的变化而降低OsLOGL5蛋白活性。

[0289] 两个sgRNAs也可以用于构建基因组编辑构建体(图6),两个或多个sgRNA选自启动子、外显子、内含子和UTR的基因片段区域。所述构建体可以引发片段删除、点突变(少量碱基的插入、删除和替换)。

[0290] 表12为引物序列,靶位置和特定链。DP3035和DP3036构建体包含一个sgRNA,目标引物首先退火形成短的双链片段,然后将片段插入到pHSG396GW-URS-UC-mpCas9&U6-DsRed载体中(基于VK005-01改进的载体,购买于北京唯尚立德生物技术公司)。

[0291] pHSG396GW-URS-UC-mpCas9&U6-DsRed克隆载体的元件详见SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13。确定gRNA片段的核苷酸序列后,将gRNA片段连入表达载体PCAMBIA1300DsRed-GW-Adv.ccdB中。针对含有两个sgRNA的构建体,不同的引物首先退火形成双链片段,然后两个gRNA片段融合并插入到克隆载体中,接着插

入到表达载体中形成DP3043。预计的断裂位点可参见图4。

[0292] DP3035、DP3036和DP3043构建体中sgRNA(s)靶向含有OsLOGL5基因的基因组区域。

[0293] 表12. 构建OsLOGL5基因编辑的CRISPR/Cas9构建体的引物

[0294]

构建体 ID	靶位点 ID	靶位置	链 (+/-)	靶位点引物序列	SEQ ID NO:
DP3035	gRNA1	Chr3:36204792-36204811	+	5'-ACCGTATCGGAGCAGCACGC-3'	14
DP3036	gRNA3	Chr3:36204779-36204798	+	5'-CTGGGAGATGTCCACCGTAT-3'	16
DP3043	gRNA2	Chr3:36204770-36204789	-	5'-ACATCTCCCAGGTGAGCTTC-3'	15
	gRNA3	Chr3:36204779-36204798	+	5'-CTGGGAGATGTCCACCGTAT-3'	16

[0295] RNAi构建体的构建

[0296] 以SEQ ID NO:1的核苷酸序列为模板,使用表13列出的引物克隆正向cDNA片段和反向cDNA片段,然后正向cDNA片段(SEQ ID NO:37)、内含子(SEQ ID NO:36)和反向cDNA片段连接,并与TA载体连接。通过测序确定序列及在构建体中方向后, RNAi结构片段(正向cDNA-内含子-反向cDNA)克隆进植物二元构建体DP0158中获得RNAi构建体DP3047。

[0297] 表13. 克隆用于构建RNAi构建体片段的引物

[0298]

引物	序列	SEQ ID NO:	片段	扩增片段的长度 (bp)
F-rg-633	5'-CTGCTGAGGATGATGATGGAGAATAGCAGGGAG-3'	38	DP3047 的正向 cDNA	153
F-rg-634	5'-GCTTGCTGAGGCACCTGGTACGACGCCTTCTTC-3'	39		
R-rg-633	5'-CCGCTGAGGATGATGATGGAGAATAGCAGGGAG-3'	40	DP3047 的反向 cDNA	153
R-rg-634	5'-GCCTGCTGAGGCACCTGGTACGACGCCTTCTTC-3'	41		

[0299] 实施例10. 转化获得修饰的水稻植株

[0300] OsLOGL5基因的CRISPR-Cas9构建体和RNAi构建体采用林拥军和张启发((2005) Plant Cell Rep. 23:540-547)描述的农杆菌介导的方法转化入中花11号水稻中。通过PCR和测序验证转化实验室获得的T0代转基因幼苗,然后移栽至田间水田中获得T1种子, T1和T2代种子储藏在4℃冷库中。

[0301] 实施例11. 确定水稻植株中OsLOGL5基因修饰和剪切位点

[0302] 以转化幼苗的基因组DNA为模板,设计引物扩增基因组编辑位点附近的靶序列。扩增的靶序列通过测序确定编辑结果,具体见图7、8和图9。基因组编辑产生的修饰诸如至少一个核苷酸的插入、删除或替换能导致编码序列的提前终止,翻译移码和/或至少一个氨基酸残基的删除。

[0303] 如图7所示,在DP3035(中花11)水稻植株预期位点产生了15种突变类型,其中1个核苷酸插入突变类型1、2和4的预期位点,  $3n+2$  ( $n$ 为大于等于0的整数)个核苷酸在突变类型8、9、12或13的预期位点删除,导致翻译移码,预测的翻译没有在原始终止子处终止;  $3n+1$  ( $n$ 为大于等于0的整数)个核苷酸在突变类型3、6、7、14或15的预期位点删除,导致翻译移码,预测的翻译没有在原始终止子处终止;  $3n$ 个核苷酸在突变类型5、10或11的预期位点删除,

分别导致在预测的多肽中2个、8个和11个氨基酸残基的缺失。

[0304] 如图8所示,在DP3036(中花11)水稻植株预期位点产生了10种突变类型,其中1个核苷酸插入突变类型2、5、8和10的预期位点,导致翻译移码,但翻译没有在原始终止子处终止;2个核苷酸插入或者 $3n+1$  ( $n$ 为大于等于0的整数)个核苷酸在突变类型1、6、7或9的预期位点删除,导致翻译移码,预测的翻译没有在原始终止子处终止;突变类型3和4的突变导致ORF读码框翻译的提前终止,并产生223个氨基酸。

[0305] 如图9所示,在DP3043(中花11)水稻植株预期位点产生了19种突变类型,其中突变类型3、9、11、15或18的突变导致翻译在原始终止子处终止或者翻译提前终止,因此翻译的多肽在C-末端缺失一些氨基酸残基;其他翻译类型的突变导致翻译移码,但没有在原始终止子处终止。

[0306] DP3035、DP3036和DP3043水稻植株的突变导致翻译移码,修饰转录的mRNA或翻译的多肽,进一步影响翻译多肽的长度和活性。

[0307] 基因组编辑纯合的水稻植株用于后续的功能试验。

[0308] 实施例12.0sLOGL5基因修饰水稻植株的可见表型

[0309] 1.0sLOGL5基因编辑水稻幼苗的根部可见表型

[0310] 基因编辑的水稻种子及ZH11-TC和DP0158种子首先消毒,在正常条件下萌发,萌发的种子在30℃水培18天,然后测定根长度和根的数目。

[0311] 如表14所示,与ZH11-TC和DP0158幼苗相比,高0sLOGL5基因表达水平的两个株系(DP0600.07.01和DP0600.12.01)显示显著短的根;低0sLOGL5基因表达水平的两个株系(DP0600.09.01和DP0600.14.02)显示较长的根长度;3个CRISPR-Cas构建体修饰的水稻植株和RNAi构建体的水稻植株的根较长或与对照相近。

[0312] 如表15所示,与ZH11-TC和DP0158幼苗相比,高0sLOGL5基因表达水平的两个株系(DP0600.07.01和DP0600.12.01)显示较多的根数,低0sLOGL5基因表达水平的两个株系(DP0600.09.01和DP0600.14.02)显示较少的根数;CRISPR-Cas构建体和RNAi构建体的水稻植株显示较少的根数或者与对照相近的根数。

[0313] 上述结果表明0sLOGL5基因的表达水平与根的长度负相关。

[0314] 表14.0sLOGL5基因修饰水稻幼苗的根长

[0315]

株系 ID	根长 (cm)	ZH11-TC			DP0158		
		差值	P 值	$P \leq 0.05$	差值	P 值	$P \leq 0.05$
ZH11-TC	19.65						
DP0158	18.40						
DP0600.07.01	14.00	-5.65	0.0009		-4.40	0.0228	
DP0600.09.01	20.6	0.95	0.5648		2.20	0.2497	
DP0600.12.01	13.25	-6.40	0.0002		-5.15	0.0080	
DP0600.14.02	23.7	4.05	0.0157	Y	5.30	0.0065	Y
DP3035 (构建体)	20.30	0.65	0.5988		1.90	0.2256	
DP3035P.03B.02	22.00	2.35	0.1583		3.60	0.0624	
DP3035P.03B.07	19.30	-0.35	0.8327		0.90	0.6381	
DP3035P.12B.07	19.60	-0.05	0.9759		1.20	0.5308	
DP3036 (构建体)	21.45	1.80	0.1472		3.05	0.0533	
DP3036P.02B.12	23.15	3.50	0.0369	Y	4.75	0.0146	Y
DP3036P.04B.09	22.20	2.55	0.1262		3.80	0.0494	Y
DP3036P.05B.03	19.00	-0.65	0.6948		0.60	0.7538	
DP3043 (构建体)	20.18	0.53	0.6659		1.78	0.2552	
DP3043P.03B.08	21.85	2.20	0.1863		3.45	0.0738	
DP3043P.11B.03	19.75	0.10	0.9519		1.35	0.4809	
DP3043P.12B.03	18.95	-0.70	0.6727		0.55	0.7737	
DP3047 (构建体)	21.27	1.62	0.1925		2.87	0.0690	
DP3047.05.01	19.10	-0.55	0.7399		0.70	0.7144	
DP3047.13.01	21.10	1.45	0.3823		2.70	0.1604	
DP3047.16.01	23.60	3.95	0.0189	Y	5.20	0.0077	Y

[0316] 表15.0sLOGL5基因修饰水稻植株的根数

[0317]

株系 ID	根数 (cm)	ZH11-TC			DP0158		
		差值	P 值	$P \leq 0.05$	差值	P 值	$P \leq 0.05$

[0318]

		差值	P值	$P \leq 0.05$	差值	P值	$P \leq 0.05$
ZH11-TC	8.00						
DP0158	7.25						
DP0600.07.01	7.50	0.50	0.5445		0.25	0.7928	
DP0600.09.01	6.50	1.50	0.0714		-0.75	0.4315	
DP0600.12.01	8.50	0.50	0.5445		1.25	0.1912	
DP0600.14.02	5.25	2.75	0.0012		-2.00	0.0380	
DP3035 (构建体)	6.25	1.75	0.0055		-1.00	0.2023	
DP3035P.03B.02	5.00	3.00	0.0005		-2.25	0.0205	
DP3035P.03B.07	8.50	0.50	0.5464		1.25	0.1933	
DP3035P.12B.07	5.25	2.75	0.0013		-2.00	0.0388	
DP3036 (构建体)	7.67	0.33	0.5895		0.42	0.5938	
DP3036P.02B.12	7.75	0.25	0.7628		0.50	0.6013	
DP3036P.04B.09	7.75	0.25	0.7628		0.50	0.6013	
DP3036P.05B.03	7.50	0.50	0.5464		0.25	0.7938	
DP3043 (构建体)	7.42	0.58	0.3458		0.17	0.8310	
DP3043P.03B.08	7.25	0.75	0.3662		0.00	1.0000	
DP3043P.11B.03	6.75	1.25	0.1337		-0.50	0.6013	
DP3043P.12B.03	8.25	0.25	0.7628		1.00	0.2971	
DP3047 (构建体)	6.67	1.33	0.0330		-0.58	0.4557	
DP3047.05.01	7.75	0.25	0.7628		0.50	0.6013	
DP3047.13.01	6.25	1.75	0.0369		-1.00	0.2971	
DP3047.16.01	6.00	2.00	0.0175		-1.25	0.1933	

[0319] 实施例13.0sLOGL5修饰水稻植株在正常灌水条件下的籽粒产量

[0320] T1代基因组编辑纯合的0sLOGL5基因修饰的水稻种植在水稻田中用于收获T2种子,水稻植株正常灌水,并测量有效穗数和单株籽粒产量;基因组编辑阴性水稻植株(经过转化过程,但具有野生型的基因,即未突变的基因,阴性)临近种植并用做对照。整个生育期中,0sLOGL5基因修饰的水稻植株没有显示出可见的地上表型。

[0321] 如表16所示,DP3035水稻植株的有效穗数略少于基因编辑阴性的水稻植株;5个基因组编辑的株系的单株籽粒产量高于编辑阴性水稻植株;4个株系的单株籽粒产量少于基因编辑阴性的水稻植株。0sLOGL5基因组编辑水稻植株(DP3035)的突变类型属于图7中的突变类型1和2。

[0322] 表16.T1代0sLOGL5修饰水稻植株(DP3035)在正常灌水条件下的有效穗数和籽粒产量分析

[0323]	株系 ID	植株数	穗数	单株产量	增长量 (%)	P值
--------	-------	-----	----	------	---------	----

	DP3035-阴性	9	12.78±2.74	39.68±9.22		
	DP3035H.01B	9	10.00±0.47	39.28±5.81	-1.0	0.9175
	DP3035H.08B	9	10.40±2.41	28.57±13.96	-28.0	0.0785
	DP3035H.02B	9	11.33±2.11	39.07±6.98	-1.5	0.8830
	DP3035H.03B	7	10.43±2.97	44.46±13.61	12.0	0.4472
[0324]	DP3035H.04B	9	11.78±1.93	44.71±11.19	12.7	0.3417
	DP3035H.05B	7	10.86±2.29	42.15±9.58	6.2	0.6329
	DP3035H.07B	5	9.80±1.83	37.64±7.02	-5.1	0.6968
	DP3035H.09B	8	10.38±2.06	40.59±6.65	2.3	0.8323
	DP3035H.06B	7	11.00±2.94	43.34±13.21	9.2	0.3052

[0325] 如表17所示,5个DP3036水稻株系的有效穗数大于基因编辑阴性的水稻植株;所有11个基因组编辑的株系的单株籽粒产量高于编辑阴性水稻植株。OsLOGL5基因组编辑水稻植株(DP3036)的突变类型属于图8中的突变类型1、2和5。

[0326] 表17.T1代OsLOGL5修饰水稻植株(DP3036)在正常灌水条件下的有效穗数和籽粒产量分析

	株系 ID	植株数	穗数	单株产量	增长量 (%)	P 值
	DP3036-阴性	6	9.83±1.86	30.68±11.66		
	DP3036H.01B	7	9.71±1.67	42.17±13.18	37.5	0.1566
	DP3036H.03B	9	10.11±2.23	44.01±8.31	43.5	0.0317
	DP3036H.08B	8	11.25±1.39	42.19±6.70	37.5	0.0523
	DP3036H.10B	6	11.83±2.97	33.44±7.52	9.0	0.6652
[0327]	DP3036H.02B	9	9.89±1.37	40.51±6.33	32.0	0.0716
	DP3036H.04B	8	10.38±2.12	43.91±13.45	43.1	0.0996
	DP3036H.05B	8	9.88±2.26	41.14±6.34	34.1	0.0699
	DP3036H.06B	9	9.33±1.94	36.33±5.42	18.4	0.2605
	DP3036H.11B	7	11.00±3.02	40.01±11.25	30.4	0.2042
	DP3036H.07B	8	7.88±2.03	32.71±7.25	6.6	0.7174
	DP3036H.09B	7	8.14±1.36	35.91±7.82	17.0	0.3955

[0328] 如表18所示,DP3043水稻植株的有效穗数与基因编辑阴性水稻植株的大致相同;所有5个DP03043基因组编辑的株系的单株籽粒产量高于两个基因编辑阴性水稻植株。OsLOGL5基因组编辑水稻植株(DP3043)的突变类型属于图9中的突变类型1、2和3。

[0329] 表18.T1代OsLOGL5修饰水稻植株(DP3043)在正常灌水条件下的有效穗数和籽粒产量分析

[0330]

株系 ID	植株数	有效穗数	单株产量	与阴性-1相比的增长量 (%)	与阴性-2相比的增长量 (%)	P值 (阴性-1)	P值 (阴性-2)
[0331]							
DP3043-阴性-1	9	11.33±1.33	40.84±6.43				
DP3043-阴性-2	9	10.78±1.99	41.36±9.48				
DP3043H.01B	9	10.78±1.31	46.21±7.44	13.1	11.7	0.1421	0.2718
DP3043H.05B	6	13.00±3.06	48.23±18.28	18.1	16.6	0.3186	0.3916
DP3043H.02B	4	10.50±2.50	49.66±11.92	21.6	20.1	0.1408	0.2428
DP3043H.04B	8	11.38±3.04	48.18±8.05	18.0	16.5	0.0689	0.1564
DP3043H.03B	9	10.11±2.69	44.01±9.97	7.8	6.4	0.4610	0.5934

[0332] 再次测试T2代OsLOGL5修饰水稻植株的籽粒产量,基因组编辑阴性水稻植株临近种植并用做对照。水稻植株正常灌水,并测量有效穗数和单株籽粒产量;整个生育期中,OsLOGL5基因修饰的水稻植株没有显示出可见的地上表型。

[0333] 如表19所示,构建体水平上,DP3035水稻植株的单株籽粒产量显著高于基因组编辑阴性水稻植株;所有测试的DP3035株系的单株籽粒产量均高于对照。

[0334] 表19.T2代OsLOGL5修饰水稻植株 (DP3035) 在正常灌水条件下籽粒产量分析

[0335]

株系 ID	存活株数	收获株数	单株产量 (g)	差值	P值	$P \leq 0.1$
DP3035 (构建体)	560	398	28.72	4.29	0.000	Y
阴性			24.43			
DP3035H.02B.06	40	32	29.78	5.35	0.001	Y
DP3035H.05B.06	40	32	28.39	3.96	0.019	Y
DP3035H.08B.09	40	32	29.26	4.83	0.005	Y
DP3035P.01B.05	40	32	27.45	3.01	0.073	Y
DP3035P.03B.02	40	23	29.75	5.32	0.002	Y
DP3035P.03B.07	40	23	31.44	7.01	0.000	Y
DP3035P.04B.02	40	32	25.35	0.92	0.590	
DP3035P.08B.09	40	32	28.04	3.61	0.034	Y
DP3035P.08B.10	40	31	28.52	4.09	0.017	Y
DP3035P.10B.05	40	21	32.97	8.54	0.000	Y
DP3035P.10B.09	40	23	29.35	4.92	0.004	Y
DP3035P.11B.05	40	23	24.61	0.18	0.917	
DP3035P.12B.05	40	31	26.49	2.06	0.232	
DP3035P.12B.07	40	31	30.67	6.24	0.000	Y

[0336] 如表20所示,构建体水平上,DP3036水稻植株的单株籽粒产量显著高于基因组编辑阴性水稻植株;大部分测试的DP3036株系的单株籽粒产量均高于对照。

[0337] 表20.T2代OsLOGL5修饰水稻植株 (DP3036) 在正常灌水条件下的籽粒产量分析

[0338]

株系 ID	存活株数	收获株数	单株产量 (g)	差值	P值	$P \leq 0.1$
DP3036 (构建体)	600	452	26.37	1.94	0.007	Y
阴性			24.43			
DP3036H.02B.12	40	32	27.39	2.96	0.082	Y
DP3036H.08B.03	40	32	24.12	-0.32	0.852	
DP3036H.10B.02	40	32	23.32	-1.11	0.515	
DP3036H.11B.05	40	32	24.52	0.09	0.956	
DP3036P.01B.05	40	30	24.03	-0.40	0.812	
DP3036P.02B.01	40	31	25.94	1.51	0.370	
DP3036P.02B.12	40	31	28.17	3.74	0.026	Y
DP3036P.03B.03	40	32	28.55	4.12	0.015	Y
DP3036P.03B.08	40	31	28.45	4.02	0.017	Y
DP3036P.04B.09	40	30	25.46	1.03	0.547	
DP3036P.05B.01	40	25	23.57	-0.87	0.608	
DP3036P.05B.03	40	23	30.44	6.01	0.000	Y
DP3036P.08B.12	40	31	22.06	-2.37	0.158	
DP3036P.09B.11	40	32	28.10	3.67	0.027	Y
DP3036P.09B.12	40	28	31.45	7.02	0.000	Y

[0339] 如表21所示,构建体水平上,DP3043水稻植株的单株籽粒产量显著高于基因组编辑阴性水稻植株;所有测试的DP3043株系的单株籽粒产量均高于对照。

[0340] 表21.T2代0sLOGL5修饰水稻植株(DP3043)在正常灌水条件下的籽粒产量分析

[0341]

株系 ID	存活株数	收获株数	单株产量 (g)	差值	P值	$P \leq 0.1$
DP3043 (构建体)	520	392	25.94	1.51	0.044	Y
阴性			24.43			
DP3043H.02B.12	40	32	25.94	1.51	0.378	
DP3043H.04B.12	40	32	25.40	0.97	0.568	
DP3043H.05B.08	40	32	23.92	-0.51	0.765	
DP3043P.01B.03	40	22	24.57	0.14	0.932	
DP3043P.01B.12	40	23	25.40	0.97	0.569	
DP3043P.03B.08	40	32	27.39	2.96	0.081	Y
DP3043P.07B.12	40	31	26.79	2.36	0.166	
DP3043P.11B.03	40	32	26.29	1.86	0.277	
DP3043P.12B.03	40	32	27.49	3.05	0.076	Y

[0342]

DP3043P. 13B. 04	40	32	24.34	-0.09	0.958	
DP3043P. 14B. 05	40	32	26.25	1.82	0.282	
DP3043P. 14B. 11	40	28	28.57	4.14	0.015	Y
DP3043P. 16B. 02	40	32	24.86	0.43	0.798	

[0343] 实施例14.0sLOGL5修饰水稻植株的田间干旱试验

[0344] 在田间测试0sLOGL5基因组编辑水稻 (DP3025、DP3036和DP3043) 和0sLOGL5抑制水稻植株 (DP3047) 以验证使0sLOGL5多肽失活或降低0sLOGL5基因的表达是否会提高水稻植株的干旱耐性, DP0158水稻植株和基因组编辑阴性水稻植株临近种植并用做对照。主茎穗处于幼穗分化 II 期时停止浇水, 土壤体积含水量从36%缓慢降到20%。断水后32天, 水稻植株处于抽穗期; 断水后35天, 水稻植株出现诸如叶卷曲的干旱胁迫表型。

[0345] 如表22所示, 构建体水平上, DP3035水稻植株的单株产量显著高于DP0158和基因组编辑阴性对照, 所有测试的DP3035株系的单株籽粒产量大于对照。

[0346] 表22.0sLOGL5修饰水稻植株 (DP3035) 在田间干旱条件下的籽粒产量分析

[0347]

株系 ID	存活株数	收获株数	单株产量 (g)	CK=DP0158			CK=阴性		
				差值	P值	P≤0.1	差值	P值	P≤0.1
DP3035 (构建体)	1118	811	7.65	1.80	0.000	Y	1.84	0.000	Y
DP0158			5.85						
阴性			5.81						
DP3035H. 02B. 06	80	64	6.84	0.99	0.068	Y	1.03	0.065	Y
DP3035H. 05B. 06	80	64	8.01	2.16	0.000	Y	2.20	0.000	Y
DP3035H. 08B. 09	80	63	6.53	0.68	0.203		0.72	0.176	
DP3035P. 01B. 05	80	61	7.45	1.60	0.002	Y	1.64	0.002	Y
DP3035P. 03B. 02	80	49	8.50	2.65	0.000	Y	2.69	0.000	Y
DP3035P. 03B. 07	80	48	8.57	2.73	0.000	Y	2.76	0.000	Y
DP3035P. 04B. 02	80	62	7.55	1.70	0.002	Y	1.74	0.002	Y
DP3035P. 08B. 09	80	62	6.72	0.87	0.129		0.91	0.124	
DP3035P. 08B. 10	80	63	8.20	2.35	0.000	Y	2.39	0.000	Y
DP3035P. 10B. 05	80	49	7.48	1.63	0.002	Y	1.67	0.002	Y
DP3035P. 10B. 09	80	49	7.56	1.72	0.001	Y	1.75	0.001	Y
DP3035P. 11B. 05	80	49	7.66	1.81	0.001	Y	1.85	0.001	Y
DP3035P. 12B. 05	80	64	7.14	1.30	0.015	Y	1.33	0.015	Y
DP3035P. 12B. 07	78	64	8.88	3.03	0.000	Y	3.07	0.000	Y

[0348] 表23显示, 构建体水平上, DP3036水稻植株的单株产量显著高于DP0158和基因组编辑阴性对照, 几乎所有测试的DP3036株系的单株籽粒产量高于DP0158和阴性对照。

[0349] 表23.0sLOGL5修饰水稻植株 (DP3036) 在田间干旱条件下的籽粒产量分析

[0350]

株系 ID	存活株数	收获株数	单株产量 (g)	CK=DP0158			CK=阴性		
				差值	P值	$P \leq 0.1$	差值	P值	$P \leq 0.1$
DP3036 (构建体)	1198	919	7.85	2.00	0.000	Y	2.04	0.000	Y
DP0158			5.85						
阴性			5.81						
DP3036H.02B.12	78	64	9.57	3.72	0.000	Y	3.75	0.000	Y
DP3036H.08B.03	80	64	7.23	1.38	0.009	Y	1.42	0.010	Y
DP3036H.10B.02	80	64	6.60	0.75	0.132		0.79	0.126	
DP3036H.11B.05	80	64	6.77	0.92	0.069	Y	0.95	0.066	Y
DP3036P.01B.05	80	63	7.67	1.82	0.001	Y	1.85	0.001	Y
DP3036P.02B.01	80	64	7.31	1.46	0.007	Y	1.49	0.007	Y
DP3036P.02B.12	80	63	9.80	3.95	0.000	Y	3.99	0.000	Y
DP3036P.03B.03	80	64	6.56	0.71	0.201		0.75	0.188	
DP3036P.03B.08	80	63	6.59	0.74	0.139		0.78	0.141	
DP3036P.04B.09	80	62	8.18	2.33	0.000	Y	2.36	0.000	Y
DP3036P.05B.01	80	48	7.16	1.31	0.014	Y	1.35	0.014	Y
DP3036P.05B.03	80	49	8.77	2.93	0.000	Y	2.96	0.000	Y
DP3036P.08B.12	80	61	7.19	1.34	0.012	Y	1.37	0.011	Y
DP3036P.09B.11	80	63	9.51	3.67	0.000	Y	3.70	0.000	Y
DP3036P.09B.12	80	63	8.84	2.99	0.000	Y	3.03	0.000	Y

[0351] 表24显示,构建体水平上,DP3043水稻植株的单株产量显著高于DP0158和基因组编辑阴性对照,所有测试的DP3043株系的单株籽粒产量高于DP0158和阴性对照。

[0352] 表24.0sLOGL5修饰水稻植株 (DP3043) 在田间干旱条件下籽粒产量分析

[0353]

株系 ID	存活株数	收获株数	单株产量 (g)	CK= DP0158			CK=阴性		
				差值	P值	$P \leq 0.1$	差值	P值	$P \leq 0.1$
DP3043 (构建体)	1040	784	7.79	1.94	0.000	Y	1.98	0.000	Y
DP0158			5.85						
阴性			5.81						
DP3043H.02B.12	80	64	7.64	1.79	0.001	Y	1.83	0.001	Y
DP3043H.04B.12	80	63	7.57	1.72	0.000	Y	1.76	0.001	Y
DP3043H.05B.08	80	64	7.22	1.38	0.013	Y	1.41	0.009	Y
DP3043P.01B.03	80	48	7.87	2.03	0.000	Y	2.06	0.000	Y
DP3043P.01B.12	80	49	7.77	1.93	0.000	Y	1.96	0.000	Y
DP3043P.03B.08	80	58	9.16	3.31	0.000	Y	3.35	0.000	Y

[0354]

DP3043P. 07B. 12	80	62	8.13	2.28	0.000	Y	2.32	0.000	Y
DP3043P. 11B. 03	80	64	8.55	2.70	0.000	Y	2.73	0.000	Y
DP3043P. 12B. 03	80	63	8.12	2.28	0.000	Y	2.31	0.000	Y
DP3043P. 13B. 04	80	63	7.86	2.01	0.000	Y	2.05	0.000	Y
DP3043P. 14B. 05	80	63	6.99	1.14	0.031	Y	1.18	0.029	Y
DP3043P. 14B. 11	80	64	7.30	1.45	0.006	Y	1.49	0.006	Y
DP3043P. 16B. 02	80	59	7.04	1.19	0.020	Y	1.23	0.015	Y

[0355] 测试6个OsLOGL5抑制株系(DP3047),构建体水平上,DP3047水稻植株的单株籽粒产量高于DP0158和基因组编辑阴性对照;5个DP3047水稻株系的单株籽粒产量较高。

[0356] 表25.OsLOGL5抑制水稻植株(DP3047)在田间干旱条件下的籽粒产量分析

[0357]

株系 ID	存活株数	收获株数	单株产量 (g)	CK= DP0158			CK=阴性		
				差值	P值	$P \leq 0.1$	差值	P值	$P \leq 0.1$
DP3047 (构建体)	470	376	6.31	0.47	0.161		0.50	0.170	
DP0158			5.85						
阴性			5.81						
DP3047. 02. 01	80	64	6.31	0.47	0.408		0.50	0.391	
DP3047. 03. 01	80	64	6.01	0.16	0.790		0.19	0.751	
DP3047. 09. 01	80	64	5.76	-0.09	0.861		-0.06	0.917	
DP3047. 11. 01	80	64	5.93	0.08	0.879		0.12	0.835	
DP3047. 13. 01	70	56	6.23	0.39	0.484		0.42	0.464	
DP3047. 14. 01	80	64	7.64	1.80	0.001	Y	1.83	0.001	Y

[0358] 这些结果表明OsLOGL5修饰水稻植株提高干旱耐性,通过CRISPR/Cas技术使OsLOGL5多肽失活或降低OsLOGL5基因的表达水平可以增加干旱耐性。

## 序列表

<110> 未名生物农业集团有限公司

先锋海外公司

<120> 根长调控基因LOGL5及相应的构建体和其应用

<130> RTS22593M

<160> 88

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 851

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 1

```

cgtcggccgt atatatgatg atggagaata gcagggagca gcagccggag tcgtcgccgg 60
cgaacaacaa tagcaagaag aagaagaaga agaagacggc gtcgcggttc cggcgtgtgt 120
gcgtgttctg cggcagcagc cccgggaaga aggcgtcgta ccaggtggcc gccgtgcagc 180
tggggcagca gctggtggag cgcggcatcg acctggtgta cggcggcggc agcgttgggc 240
tgatggggct ggtgtcccgc gccgtccacg gaggcggcgg gcacgtggtg ggcgtggtgc 300
ccaatggcgt gctgccacgc gagctgatcg gcgagacgct gggggaggtg agggcgggtg 360
gaagcatgca ccagcgggaag gcggagatgg cgcgggagtc ggacgccttc atcgcctcc 420
ccggcgggcta cggcacgctg gaggagctcc tcgaggtcat cacctgggct cagctccgca 480
tccaccacaa gcccgtcggc ctctcaacg tcgacggcta ctacgactcc ctgctcgctt 540
tcatcgacaa ggccgtccac gaaggettcg tctcgccgcc cgcccggcgc atcatcgtcg 600
ccgcacccac cgctccgac ctgctctgca agctcgagga atacgtgccg ccgccgcacg 660
acgccaccgc cctgaagctc acctgggaga tgtccaccgt atcggagcag cacgccgaa 720
gcatctactc cccaagccc gacatggcac gctagctagc tagctagcta ctcgatccac 780
ttcattatta cttatcttgt ttcttctcat ataatcttgc tgctaattat ttcttcata 840
tattaattcc c 851

```

<210> 2

<211> 741

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 2

```

atgatgatgg agaatagcag ggagcagcag ccggagtcgt cgccggcgaa caacaatagc 60
aagaagaaga agaagaagaa gacggcgtcg cggttccggc gtgtgtgctg gttctgcggc 120
agcagccccg ggaagaaggc gtcgtaccag gtggccgccg tgcagctggg gcagcagctg 180
gtggagcgcg gcatcgacct ggtgtacggc ggcggcagcg ttgggctgat ggggctggtg 240
tcccgcgccg tccacggagg cggcgggcac gtggtgggcg tggtgcccga tggcgtgctg 300
ccacgcgagc tgatcggcga gacgctgggg gaggtgaggg cgggtgggaag catgcaccag 360

```

cggaaggcgg agatggcgcg ggagtcggac gccttcacgc ccctccccgg cggctacggc 420  
 acgctggagg agctcctcga ggtcatcacc tgggetcagc tccgcatcca ccacaagccc 480  
 gtcggcctcc tcaacgtcga cggctactac gactccctgc tcgccttcat cgacaaggcc 540  
 gtccacgaag gcttcgtctc gccgcccggc cgccgcatca tcgtcgccgc acccaccgcc 600  
 tccgacctgc tctgcaagct cgaggaatac gtgccgccgc cgcacgacgc caccgccctg 660  
 aagctcacct gggagatgtc caccgtatcg gacgagcagc ccggaagcat ctactcccc 720  
 aagcccgaca tggcacgcta g 741

<210> 3

<211> 246

<212> PRT

<213> 水稻

<400> 3

Met	Met	Met	Glu	Asn	Ser	Arg	Glu	Gln	Gln	Pro	Glu	Ser	Ser	Pro	Ala
1			5				10			15					
Asn	Asn	Asn	Ser	Lys	Thr	Ala	Ser	Arg	Phe						
			20				25			30					
Arg	Arg	Val	Cys	Val	Phe	Cys	Gly	Ser	Ser	Pro	Gly	Lys	Lys	Ala	Ser
			35				40			45					
Tyr	Gln	Val	Ala	Ala	Val	Gln	Leu	Gly	Gln	Gln	Leu	Val	Glu	Arg	Gly
			50			55				60					
Ile	Asp	Leu	Val	Tyr	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Gly	Leu	Met	Gly	Leu	Val
65					70					75					80
Ser	Arg	Ala	Val	His	Gly	Gly	Gly	Gly	His	Val	Val	Gly	Val	Val	Pro
					85					90					95
Asn	Gly	Val	Leu	Pro	Arg	Glu	Leu	Ile	Gly	Glu	Thr	Leu	Gly	Glu	Val
			100							105					110
Arg	Ala	Val	Gly	Ser	Met	His	Gln	Arg	Lys	Ala	Glu	Met	Ala	Arg	Glu
			115							120					125
Ser	Asp	Ala	Phe	Ile	Ala	Leu	Pro	Gly	Gly	Tyr	Gly	Thr	Leu	Glu	Glu
			130							135					140
Leu	Leu	Glu	Val	Ile	Thr	Trp	Ala	Gln	Leu	Arg	Ile	His	His	Lys	Pro
145						150					155				160
Val	Gly	Leu	Leu	Asn	Val	Asp	Gly	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Leu	Leu	Ala	Phe
						165					170				175
Ile	Asp	Lys	Ala	Val	His	Glu	Gly	Phe	Val	Ser	Pro	Pro	Ala	Arg	Arg
						180									190
Ile	Ile	Val	Ala	Ala	Pro	Thr	Ala	Ser	Asp	Leu	Leu	Cys	Lys	Leu	Glu
						195									205
Glu	Tyr	Val	Pro	Pro	Pro	His	Asp	Ala	Thr	Ala	Leu	Lys	Leu	Thr	Trp

210	215	220
Glu Met Ser Thr Val Ser	Glu Gln His Ala Gly	Ser Ile Tyr Ser Pro
225	230	235
Lys Pro Asp Met Ala Arg		240
	245	

<210> 4  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 克隆0sLOG5基因cDNA序列的正向引物  
 <400> 4  
 cgtcggccgt atatatgatg atggag 26  
 <210> 5  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 克隆0sLOG5基因cDNA序列的反向引物  
 <400> 5  
 gggaattaat atatggaaga aataattagc agc 33  
 <210> 6  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 0sLOG5基因实时RT-PCR分析的正向引物  
 <400> 6  
 ctctgcaagc tcgaggaata c 21  
 <210> 7  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 0sLOG5基因实时RT-PCR分析的反向引物  
 <400> 7  
 gagtagatgc ttccggcg 18  
 <210> 8  
 <211> 2656

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 8

```

ggcgccggtg gaccgggctc acctcgcgtg gtcccagtg ggacccgctt gtcagcggct 60
cggctcaccg tgcggaggga gcacgcggcg cacgcgcgtg ggcgggggag ggatgcggtg 120
cacgcgcgcg gttcgcggtg gaacggatgc ggcgggccca cgcgcagcct cacggctcgc 180
ggtggaacgc gcgcacgggg aggggctgac cggggtcaat tcgacccggc cttggccgag 240
cttgcgccga cgtggcgcct acgtggctgc cacgcgggcc ggcgggaggt agacgacgac 300
gccggccgga acgaacggcg gacgacagcg gcgagcggcg gagcgaacca cggcgatata 360
ggcgaaaagcg agcacaccgg gtggttgac gagacgaggg gagacgagcc aacggctcgg 420
attcgccgga gggagcttga cggcggcgaa tcgcgggcgg ggcaaccggc ggcgggagga 480
ggggaaaacg gcgacgaggt cacaaggggc cgattcctgg cggcgagagc atctacgcg 540
ctacgggaat ccgatgctag cgttgatta ggaggaaac catcgaggga ggccggcgac 600
gagaggcgct tccgagctcg ggacgcgaca gcggcgagca catggcgagc ggcggaacg 660
gtcgggggcg cgccggctag ctacggggag gctactcgtg ctactaccg agtctaagg 720
gaggagatgg agcgaggagg gagaacggag ggatgacta ccgtgcgggc ggggcgcagt 780
gacgagaggc cgacggcgcg ggagtaatct ctccggcctc gggccgggga agaggaagga 840
gagggcgcgc ccggagtccc cttccgcgtc cttgctcgtg ccggctctc cgacacgcg 900
aacgacgaaa ggcgacggcg aacagagcac gggaggcggc ggcaatggcg tggaggcgaa 960
cgggagagga aaggaaagg ggaagcttag gtttatagg gcggcaatgt cagtttgga 1020
gaggggaacc gacattggac ggtcaagcc acgagctggc gctccggcta gcggcaaaa 1080
cggcgacagg aggtgacgcc ggcgagaggg aaaaaggaag aaaagggggg agagaaagg 1140
ggcttgtccc ttgcctctc gggaaaagga ggggggagcg gggcgacgcg gcagagggag 1200
gagggactct gcctccgcc cttggaggct agcgcgcgga gtggcggggc cgaggcgatg 1260
atgacggcgg ggcggtgtgg agcggagcgg cgacacgggc gacaggcgcg agcaggcgct 1320
gacgacggcg gcgaccaggc ggtcggccac tcggcactcg cgcgcggctt gcaacgggag 1380
gcgcggcgga tggagtggcg cggctcgggc acgcgcgctg gctgcggggc cgagcggctg 1440
caggcgtggc agggcagcgg ggccgggcgg cgcagacagc gcagacagcg caggcatgat 1500
gcgagcgacg accacgcggg cgcgcgcgcg cgaacgacgc gcggggagcg gcagcggagg 1560
agcgaagagg agggctcggc tcggcgcggg cggctcacgc acgcgcgggc agagcggagg 1620
gagcggagga gggcgcttcg gcgcgagcgg ctacgcgca cgcgcgcgcg gcgcgcgggc 1680
ggagcggagc ggagggggag agagagagag agagagagag atagccgggg agggaggggg 1740
agatgggccg agagagattc ggccatcga acccaggggg aggcaaaata gacttttgcg 1800
gaggaatttg agatctgaga tggcacggac actagacaac aagcaaagaa acaaatttcg 1860
caattaggtt ttttaagaga taattttccc gctagcgcc acgacggaac gggcgctaca 1920
gctttggaat ggcaatggtt ggggtgggagc tggtgctgtg ggcgaaatcc tagctcgatg 1980
ttttcgggtt gacaacgatg acgcctcggc gttgtacttg ctcttgagaa tgttgctgag 2040
ttgtcagctc tctccaccg atatgacttt tcgggtgaaa acctagtcca aggtggatag 2100
cctccatgga ggcaccgcct cgaaggtcat gttccctcgc attcattgcc ttcttctag 2160

```

ttggccttc tgcgttcggt tagtttcgtc tctaggttgg tgtaagaatg agcagatcctt 2220  
 tccccctctc tctctctctc atcctcatcc tcaaacctcc tgtgagggtg gccgggagtc 2280  
 tgtcgtcgac attcttgggtg aaattgggtt gaagcgagag cgtctgcgac ctcctttagt 2340  
 ggctagcaat tatcggtcac gtacaacggg tgtgtgtttg gagcctgtag catgtggtgg 2400  
 agtagtcttt ttttttccc taattatgac cttcttctgt tgtaattcta tacataattt 2460  
 ttttcatgct atatcaatat gaatcttctt gtgttgtctt gtgcgggtca ttcagaaaaa 2520  
 aacactatta gtaagtggga aactagaggc cgaccggagg tttctttcta tcgttgggag 2580  
 cctctctgcc ttccgacctc catcgaattg ggtgcagacc agcagcagcc aataattaag 2640  
 gtcgtcggcc gtatat 2656

<210> 9

<211> 1934

<212> DNA

<213> 玉米

<400> 9

cagtcagcg tgaccggtc gtgcccctct ctagagataa tgagcattgc atgtctaagt 60  
 tataaaaaat taccacatat tttttttgtc acacttgttt gaagtgcagt ttatctatct 120  
 ttatacatat atttaaacctt tactctacga ataataat ctatagtact acaataatat 180  
 cagtgtttta gagaatcata taaatgaaca gttagacatg gtctaaagga caattgagta 240  
 ttttgacaac aggactctac agttttatct ttttagtgtg catgtgttct cttttttttt 300  
 tgcaaatagc ttcacctata taatacttca tccattttat tagtacetcc atttaggggtt 360  
 tagggttaat ggtttttata gactaatttt ttagtacet ctattttatt ctatttttagc 420  
 ctctaaatta agaaaactaa aactctattt tagttttttt atttaataat ttagatataa 480  
 aatagaataa aataaagtga ctaaaaatta acaaatacc cttaagaaa ttaaaaaaac 540  
 taaggaaaca tttttcttgt ttcgagtaga taatgccagc ctgttaaacg ccgtcgacga 600  
 gtctaaccga caccaaccag cgaaccagca gcgtcgcgtc gggccaagcg aagcagacgg 660  
 cacggcatct ctgtcgtcgc ctctggacc ctctcgagag ttccgctcca ccgttgact 720  
 tgctccgctg tcggcatcca gaaattgcgt ggaggagcgg cagacgtgag ccggcacggc 780  
 aggcgccctc ctctcctct cacggcaccg gcagctacgg gggattcctt tcccaccgct 840  
 ccttcgcttt ccctcctcg cccgccgtaa taaatagaca cccctccac accctctttc 900  
 cccaacctcg tgttgttcgg agcgcacaca cacacaacca gatctcccc aatccacc 960  
 gtcggcacct ccgcttcaag gtacgccgct cgtctctccc cccccctc tctaccttct 1020  
 ctagatcggc gttccggtec atggtaggg cccgtagtt ctacttctgt tcatgtttgt 1080  
 gttagatccg tgtttgtgtt agatccgtgc tgctagcgtt cgtacacgga tgcgacctgt 1140  
 acgtcagaca cgttctgatt gctaaactgc cagtgtttct cttggggaat cctgggatgg 1200  
 ctctagccgt tccgagacg ggatcgattt catgattttt tttgtttcgt tgcatagggt 1260  
 ttggtttgcc cttttccttt atttcaatat atgccgtgca cttgtttgtc gggatcattt 1320  
 ttcattgcttt tttttgtctt ggttgtgatg atgtggtctg gttgggcggt cgttctagat 1380  
 cggagtagaa ttctgtttca aactacctgg tggatttatt aattttggat ctgtatgtgt 1440  
 gtgccataca tattcatagt tacgaattga agatgatgga tggaaatc gatctaggat 1500

aggtatacat gttgatgcgg gtttactga tgcatataca gagatgcttt ttgttcgctt 1560  
 ggttgtgatg atgtgggtg gttgggcggt cgttcattcg ttctagatcg gagtagaata 1620  
 ctgtttcaaa ctacctgggt tatttattaa ttttgaact gtatgtgtgt gtcatacatc 1680  
 ttcatagtta cgagtttaag atggatggaa atatcgatct aggataggta tacatgttga 1740  
 tgtgggtttt actgatgcat atacatgatg gcatatgcag catctattca tatgctctaa 1800  
 ccttgagtac ctatctatta taataaaca gtatgtttta taattatfff gatcttgata 1860  
 tacttggatg atggcatatg cagcagctat atgtggattt ttttagccct gccttcatac 1920  
 gctatttatt tgct 1934

<210> 10

<211> 4206

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 核定位序列和Cas9基因的核苷酸序列

<400> 10

atggccccta agaagaagag aaaggtcggg attcacggcg ttctgcggc gatggacaag 60  
 aagtatagta ttggtctgga cattgggacg aattccgttg gctgggccgt gatcaccgat 120  
 gagtacaagg tcccttccaa gaagttaag gttctgggga acaccgatcg gcacagcatc 180  
 aagaagaatc tcattggagc cctcctgttc gactcaggcg agaccgccga agcaacaagg 240  
 ctcaagagaa ccgcaaggag acggtataca agaaggaaga ataggatctg ctacctgcag 300  
 gagattttca gcaacgaaat ggcaaggtg gacgattcgt tctttcatag attggaggag 360  
 agtttcctcg tcgaggaaga taagaagcac gagaggcatc ctatctttgg caacattgtc 420  
 gacgagggtg cctatcacga aaagtacccc acaatctatc atctgcggaa gaagcttgtg 480  
 gactcgactg ataaggcgga ccttagattg atctacctg ctctggcaca catgattaag 540  
 ttcaggggcc attttctgat cgagggggat ctaaccggg acaatagcga tgtggacaag 600  
 ttgttcatcc agctcgtcca aacctacaat cagctctttg aggaaaacc aattaatgct 660  
 tcaggcgtcg acgccaaggc gatcctgtct gcacgccttt caaagtctcg ccggcttgag 720  
 aacttgatcg ctcaactccc gggcgaaaag aagaacggct tgttcgggaa tctcattgca 780  
 ctttcgttgg ggctcacacc aaactcaag agtaatfff atctcgctga ggacgcaaag 840  
 ctgcagcttt ccaaggacac ttatgacgat gacctggata accttttggc ccaaatcggc 900  
 gatcagtacg cggacttgtt cctcgccgcg aagaatffgt cggacgcgat cctcctgagt 960  
 gatattctcc gcgtgaacac cgagattaca aaggccccgc tctcggcgag tatgatcaag 1020  
 cgctatgacg agcaccatca ggatctgacc cttttgaagg ctttgggtccg gcagcaactc 1080  
 ccagagaagt acaaggaaat cttctttgat caatccaaga acggctacgc tggttatatt 1140  
 gacggcgggg catcgcagga ggaattctac aagtttatca agccaattct ggagaagatg 1200  
 gatggcacag aggaactcct ggtgaagctc aatagggagg accttttgcg gaagcaaaga 1260  
 actttcgata acggcagcat ccctcaccag attcatctcg gggagctgca cgccatcctg 1320  
 agaaggcagg aagacttcta cccctttctt aagataacc gggagaagat cgaaaagatt 1380  
 ctgacgttca gaattccgta ctatgtcgga ccaactgccc ggggtaattc cagatttgcg 1440

tggatgacca gaaagagcga gaaaccatc acaccttga acttcgagga agtggtcgat 1500  
 aagggcgctt ccgcacagag cttcattgag cgcatgacaa attttgacaa gaacctgcct 1560  
 aatgagaagg tccttcccaa gcattccctc ctgtacgagt atttcaactgt ttataacgaa 1620  
 ctcacgaagg tgaagtatgt gaccgagggga atgcgcaagc ccgccttcct gagcggcgag 1680  
 caaaagaagg cgatcgtgga ctttttgttt aagaccaatc ggaaggtcac agttaagcag 1740  
 ctcaaggagg actacttcaa gaagattgaa tgcttcgatt ccgttgagat cagcggcggtg 1800  
 gaagacaggt ttaacgcgtc actggggact taccacgatc tcctgaagat cattaaggat 1860  
 aaggacttct tggacaacga ggaaaatgag gatatcctcg aagacattgt cctgactctt 1920  
 acgttgtttg aggatagggga aatgatcgag gaacgcttga agacgatgc ccatctcttc 1980  
 gatgacaagg ttatgaagca gctcaagaga agaagataca ccggatgggg aaggctgtcc 2040  
 cgcaagctta tcaatggcat tagagacaag caatcagggga agacaatcct tgactttttg 2100  
 aagtctgatg gcttcgcgaa caggaatfff atgcagctga ttcacgatga ctcacttact 2160  
 ttcaaggagg atatccagaa ggetcaagtg tcgggacaag gtgacagtct gcacgagcat 2220  
 atcgccaacc ttgcgggatc tcctgcaatc aagaagggta ttctgcagac agtcaaggtt 2280  
 gtggatgagc ttgtgaaggt catgggacgg cataagcccg agaacatcgt tattgagatg 2340  
 gccagagaaa atcagaccac acaaaagggt cagaagaact cgagggagcg catgaagcgc 2400  
 atcgaggaag gcattaagga gctggggagt cagatcctta aggagcaccg ggtggaaaac 2460  
 acgcagttgc aaaatgagaa gctctatctg tactatctgc aaaatggcag ggatatgtat 2520  
 gtggaccagg agttggatat taaccgcctc tcggattacg acgtcgatca tatcgttctc 2580  
 cagtccttcc ttaaggatga cagcattgac aataaggttc tcaccaggtc cgacaagaac 2640  
 cgcggggaagt ccgataatgt gccagcgag gaagtcgta agaagatgaa gaactactgg 2700  
 aggcaacttt tgaatgcaa gttgatcaca cagaggaagt ttgataacct cactaaggcc 2760  
 gagcgcggag gtctcagcga actggacaag gcgggcttca ttaagcggca actggttgag 2820  
 actagacaga tcacgaagca cgtggcgagc attctcgatt cacgcatgaa cacgaagtac 2880  
 gatgagaatg acaagctgat ccgggaagtg aaggtcatca cettgaagtc aaagctcggt 2940  
 tctgacttca ggaaggattt ccaatfffat aaggtgcgag agatcaacaa ttatcaccat 3000  
 gctcatgacg catacctcaa cgctgtggtc ggaacagcat tgattaagaa gtacccgaag 3060  
 ctcgagtccg aattcgtgta cgggtactat aaggtttacg atgtgcgcaa gatgatcgcc 3120  
 aagtcagagc aggaaattgg caaggccact gcgaagtatt tcttttactc taacattatg 3180  
 aatftcttta agactgagat cacgctggct aatggcgaaa tccggaagag accacttatt 3240  
 gagaccaacg gcgagacagg ggaaatcgtg tgggacaagg ggagggattt cgccacagtc 3300  
 cgcaaggttc tctctatgcc tcaagtgaat attgtcaaga agactgaagt ccagacgggc 3360  
 gggttctcaa aggaatctat tctgcccagg cggaactcgg ataagcttat cgccagaaag 3420  
 aaggactggg acccgaagaa gtatggaggt ttcgactcac caacggtggc ttactctgtc 3480  
 ctggttgagg caaagggtgga gaagggaaag tcaaagaagc tcaagtctgt caaggagctc 3540  
 ctgggtatca ccattatgga gaggtccagc ttcgaaaaga atccgatcga ttttctcgag 3600  
 gcgaagggat ataaggaagt gaagaaggac ctgatcatta agcttccaaa gtacagtctt 3660  
 ttcgagttgg aaaacggcag gaagcgcagc ttggttccg caggagagct ccagaagggt 3720  
 aacgagcttg ctttgccgct caagtatgtg aacttctct atctggcatc ccactacgag 3780

aagctcaagg gcagcccaga ggataacgaa cagaagcaac tgtttgtgga gcaacacaag 3840  
 cattatcttg acgagatcat tgaacagatt tcggagtcca gtaagcgcgt catcctcgcc 3900  
 gacgcgaatt tggataaggt tctctcagcc tacaacaagc accgggacaa gcctatcaga 3960  
 gagcaggcgg aaaatatcat tcctctcttc accctgacaa accttggggc tcccgtgca 4020  
 ttcaagtatt ttgacactac gattgatcgg aagagataca cttctacgaa ggaggtgctg 4080  
 gatgcaaccc ttatccacca atcgattact ggctctacg agacgcggat cgacttgagt 4140  
 cagctcgggg gggataagag accagcggca accaagaagg caggacaagc gaagaagaag 4200  
 aagtag 4206

<210> 11

<211> 367

<212> DNA

<213> 花椰菜花叶病毒

<400> 11

cggtacgctg aaatcaccag tctctcteta caaatctatc tctctctatt ttctccataa 60  
 ataatgtgtg agtagtttcc cgataaggga aattagggtt cttatagggt ttcgctcatg 120  
 tgttgagcat ataagaaacc cttagtatgt atttgtatth gtaaaatact tctatcaata 180  
 aaatttctaa ttctataaac caaaatccag tactaaaatc cagatctcct aaagtcctta 240  
 tagatctttg tcgtgaatat aaaccagaca cgagacgact aaacctggag cccagacgcc 300  
 gttcgaagct agaagtaccg cttaggcagg aggccgttag ggaaaagatg ctaaggcagg 360  
 gttggtt 367

<210> 12

<211> 742

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 12

ctcattagcg gtatgcatgt tggtagaagt cggagatgta aataatthtc attatataaa 60  
 aaaggtactt cgagaaaaat aaatgcatac gaattaatc tthttatgth tthtaacca 120  
 agtatataga atthattgat gthtaaaatt tcaaaaatat gacgagagaa agthtaaacg 180  
 tacggcatat acttctgaac agagaggga tatgggtht thgttgctcc caacaattct 240  
 taagcacgta aaggaaaaaa gcacattatc cacattgtac thccagagat atgtacagca 300  
 thacgtaggt acgthttctt thtcttccc gagagatgat acaataatca thtaaacca 360  
 gaattthaaaa aatattctth actataaaaa ththtaattag ggaacgtatt atththttaca 420  
 tgacacctth tgagaaaagag ggacttgtaa tatgggacaa atgaacaatt thtaagaaat 480  
 gggcatatga ctctcagtac aatggaccaa atthcttcca gtcggcccag caatacaag 540  
 ggaaagaaat gagggggccc acaggcccag gcccactth ctccgtggtg gggagatcca 600  
 gctagaggtc cgccccacaa gtggccctg ccccgtggga cggthggatt gcagagcgcg 660  
 thggcggaaa caacagthta thaccacctc gthcagcaa cgacgcgacc actthcttat 720  
 aagctgctgc gctgaggctc ag 742

<210> 13

- <211> 83  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> gRNA骨架的核苷酸序列  
<400> 13  
gttttagagc tagaaatagc aagttaaaat aaggctagtc cgttatcaac ttgaaaaagt 60  
ggcaccgagt cggtgctttt ttt 83
- <210> 14  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 靶向0sLOG5基因序列的gRNA1的核苷酸序列  
<400> 14  
accgtatcgg agcagcacgc 20
- <210> 15  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 靶向0sLOG5基因序列的gRNA2的核苷酸序列  
<400> 15  
acatctccca ggtgagcttc 20
- <210> 16  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 靶向0sLOG5基因序列的gRNA3的核苷酸序列  
<400> 16  
ctgggagatg tccaccgtat 20
- <210> 17  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 靶向0sLOG5基因序列的gRNA4的核苷酸序列  
<400> 17

tgttctgcgg cagcagcccc 20  
<210> 18  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 靶向0sLOG5基因序列的gRNA5的核苷酸序列  
<400> 18  
gctcctcgag gtcacacct 20  
<210> 19  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 靶向0sLOG5基因上游序列的gRNA6的核苷酸序列  
<400> 19  
aattatcggc cacgtacaac 20  
<210> 20  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 靶向0sLOG5基因序列的gRNA7的核苷酸序列  
<400> 20  
cttccgacct ccatcgaatt 20  
<210> 21  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 靶向0sLOG5基因序列的gRNA8的核苷酸序列  
<400> 21  
gtgggaaact agaggccgac 20  
<210> 22  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 靶向0sLOG5基因序列的gRNA9的核苷酸序列

<400> 22  
cggccgacga ccttaattat 20  
<210> 23  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 靶向0sLOG5基因序列的gRNA10的核苷酸序列  
<400> 23  
gatagaaaga aacctccggt 20  
<210> 24  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 靶向0sLOG5基因上游序列的gRNA11的核苷酸序列  
<400> 24  
agggaacatg accttcgagg 20  
<210> 25  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 靶向0sLOG5基因上游序列的gRNA12的核苷酸序列  
<400> 25  
ctacagcttt ggaatggcaa 20  
<210> 26  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 靶向0sLOG5基因上游序列的gRNA13的核苷酸序列  
<400> 26  
cgcgcaacga cgaaaggcga 20  
<210> 27  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>

- <223> 靶向0sLOG5基因上游序列的gRNA14的核苷酸序列  
<400> 27  
gaagaaggca atgaatgcga 20  
<210> 28  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>
- <223> 靶向0sLOG5基因序列的gRNA15的核苷酸序列  
<400> 28  
agaccgatcc aactatccaa 20  
<210> 29  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>
- <223> 靶向0sLOG5基因序列的gRNA16的核苷酸序列  
<400> 29  
agctacatcg aagaggcagg 20  
<210> 30  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>
- <223> 靶向0sLOG5基因序列的gRNA17的核苷酸序列  
<400> 30  
ctcataataa cactccatag 20  
<210> 31  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>
- <223> 靶向0sLOG5基因上游序列的gRNA18的核苷酸序列  
<400> 31  
gggtcaattc gaccggcct 20  
<210> 32  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向0sLOG5基因上游序列的gRNA19的核苷酸序列

<400> 32

gccgaggcga tgatgacggc 20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向0sLOG5基因上游序列的gRNA20的核苷酸序列

<400> 33

gcagacagcg cagacagcgc 20

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向0sLOG5基因上游序列的gRNA21的核苷酸序列

<400> 34

tggcggcgag agcatctacg 20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向0sLOG5基因上游序列的gRNA22的核苷酸序列

<400> 35

tgatgcgagc gacgaccacg 20

<210> 36

<211> 199

<212> DNA

<213> 番茄

<400> 36

gtacggaccg tactacteta ttcgtttcaa tatatttatt tgtttcagct gactgcaaga 60  
 ttcaaaaatt tctttattat tttaaatttt gtgtcactca aaaccagata aacaatttga 120  
 tatagaggca ctatatatat acatattctc gattatatat gtaaatgagt taaccttttt 180  
 ttccacttaa attatatag 199

<210> 37

<211> 153

- <212> DNA  
<213> 水稻  
<400> 37  
atgatgatgg agaatagcag ggagcagcag ccggagtcgt cgccggcgaa caacaatagc 60  
aagaagaaga agaagaagaa gacggcgtcg cggttccggc gtgtgtgcgt gttctgcggc 120  
agcagccccg ggaagaaggc gtcgtaccag gtg 153
- <210> 38  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 克隆用于构建RNAi构建体DP3047的OsLOGL5基因cDNA正义链的正向引物  
<400> 38  
ctgctgagga tgatgatgga gaatagcagg gag 33
- <210> 39  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 克隆用于构建RNAi构建体DP3047的OsLOGL5基因cDNA正义链的反向引物  
<400> 39  
gcttgctgag gcacctggta cgacgccttc ttc 33
- <210> 40  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 克隆用于构建RNAi构建体DP3047的OsLOGL5基因cDNA反义链的正向引物  
<400> 40  
ccgctgagga tgatgatgga gaatagcagg gag 33
- <210> 41  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 克隆用于构建RNAi构建体DP3047的OsLOGL5基因cDNA反义链的反向引物  
<400> 41  
gcctgctgag gcacctggta cgacgccttc ttc 33
- <210> 42

<211> 100  
<212> DNA  
<213> 水稻  
<400> 42  
cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga gatgtccacc gtatcggagc 60  
agcacgccgg aagcatctac tcccccaagc ccgacatggc 100  
<210> 43  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> 水稻  
<400> 43  
cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga gatgtccacc gtatcggagc 60  
agcatcgccg gaagcatcta ctcccccaag cccgacatgg c 101  
<210> 44  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> 水稻  
<400> 44  
cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga gatgtccacc gtatcggagc 60  
agcaacgccg gaagcatcta ctcccccaag cccgacatgg c 101  
<210> 45  
<211> 99  
<212> DNA  
<213> 水稻  
<400> 45  
cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga gatgtccacc gtatcggagc 60  
agccgccgga agcatctact ccccccaagc cgacatggc 99  
<210> 46  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> 水稻  
<400> 46  
cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga gatgtccacc gtatcggagc 60  
agcaccgccg gaagcatcta ctcccccaag cccgacatgg c 101  
<210> 47  
<211> 94  
<212> DNA  
<213> 水稻  
<400> 47

cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga gatgtccacc gtatcggacg 60  
ccggaagcat ctactcccc aagcccgaca tggc 94

<210> 48

<211> 96

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 48

cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga gatgtccacc gtatcggagc 60  
cgccggaagc atctactccc ccaagcccga catggc 96

<210> 49

<211> 90

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 49

cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga gatgtccacc gtatcggcg 60  
aagcatctac tcccccaagc ccgacatggc 90

<210> 50

<211> 86

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 50

cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga gatgtccacc gtatcggagc 60  
atctactccc ccaagcccga catggc 86

<210> 51

<211> 95

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 51

cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga gatgtccacc gtatcggagc 60  
gccggaagca tctactcccc caagcccga atggc 95

<210> 52

<211> 76

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 52

cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga gatgtccacc gtatcggagc 60  
ccaagcccga catggc 76

<210> 53

<211> 80

<212> DNA  
<213> 水稻  
<400> 53  
cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctgaag ctcacgccgg aagcatctac 60  
tcccccaagc ccgacatggc 80  
<210> 54  
<211> 98  
<212> DNA  
<213> 水稻  
<400> 54  
cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga gatgtccacc gtatcggagc 60  
agcaccggaa gcatctactc cccaagccc gacatggc 98  
<210> 55  
<211> 98  
<212> DNA  
<213> 水稻  
<400> 55  
cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga gatgtccacc gtatcggagc 60  
agccccggaa gcatctactc cccaagccc gacatggc 98  
<210> 56  
<211> 93  
<212> DNA  
<213> 水稻  
<400> 56  
cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga gatgtccacc gtatcggagc 60  
cggaagcatc tactccccca agcccgacat ggc 93  
<210> 57  
<211> 87  
<212> DNA  
<213> 水稻  
<400> 57  
cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga gatgtccacc gtatcggagc 60  
catctactcc cccaagcccg acatggc 87  
<210> 58  
<211> 100  
<212> DNA  
<213> 水稻  
<400> 58  
cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga gatgtccacc gtatcggagc 60

agcacgccgg aagcatctac tcccccaagc cgcacatggc 100  
<210> 59  
<211> 99  
<212> DNA  
<213> 水稻  
<400> 59  
cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga gatgtccacc tatcggagca 60  
gcacgccgga agcatctact ccccccaagc cgcacatggc 99  
<210> 60  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> 水稻  
<400> 60  
cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga gatgtccacc gatatcggag 60  
cagcacgccg gaagcatcta ctcccccaag cccgacatgg c 101  
<210> 61  
<211> 214  
<212> DNA  
<213> 水稻  
<400> 61  
cgccgccgca cgacgccacc gcttgtgacc ctcagtaatt ttccagtggg gtttgaata 60  
tatcctcatt ataacttga taacatttgt ttatTTTTct aggttgtgtc tttctatctg 120  
ccagataaaa tactataaca atgttgatga gtatatatat tttcctatcg gacgacgacg 180  
ccggaagcat ctactcccc aagcccgaca tggc 214  
<210> 62  
<211> 78  
<212> DNA  
<213> 水稻  
<400> 62  
cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctgaag cacgccgga gcatctactc 60  
ccccaaagccc gacatggc 78  
<210> 63  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> 水稻  
<400> 63  
cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga gatgtccacc gttatcggag 60  
cagcacgccg gaagcatcta ctcccccaag cccgacatgg c 101  
<210> 64

<211> 102

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 64

cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga gatgtccacc gtttatcgga 60  
gcagcacgcc ggaagcatct actccccca gcccacatg gc 102

<210> 65

<211> 93

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 65

cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga gatgtatcgg agcagcacgc 60  
cggaagcatc tactccccca agcccacat ggc 93

<210> 66

<211> 101

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 66

cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga gatgtccacc gctatcggag 60  
cagcacgccg gaagcatcta ctcccccaag cccgacatgg c 101

<210> 67

<211> 90

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 67

cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga gatgtcgagc agcacgccgg 60  
aagcatctac tcccccaagc ccgacatggc 90

<210> 68

<211> 101

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 68

cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga gatgtccacc gtatcggagc 60  
agcatcgccg gaagcatcta ctcccccaag cccgacatgg c 101

<210> 69

<211> 120

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 69

caagctcgag gaatacgtgc cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga 60  
 gatgtccacc gtatcggagc agcacgccgg aagcatctac tcccccaagc ccgacatggc 120  
 <210> 70

<211> 122

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 70

caagctcgag gaatacgtgc cgccgccgca cgacgccacc gccctgaaag ctcacctggg 60  
 agatgtccac cgttatcgga gcagcacgcc ggaagcatct actcccccaa gcccgacatg 120  
 gc 122

<210> 71

<211> 122

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 71

caagctcgag gaatacgtgc cgccgccgca cgacgccacc gccctgaaag ctcacctggg 60  
 agatgtccac cgatatcgga gcagcacgcc ggaagcatct actcccccaa gcccgacatg 120  
 gc 122

<210> 72

<211> 120

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 72

caagctcgag gaatacgtgc cgccgccgca cgacgccacc gccctgaaag ctcacctggg 60  
 agatgtccac ctatcggagc agcacgccgg aagcatctac tcccccaagc ccgacatggc 120  
 <210> 73

<211> 115

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 73

caagctcgag gaatacgtgc cgccgccgca cgacgccacc gccctgaaag ctcacctggg 60  
 agatgttata ggagcagcac gccggaagca tctactcccc caagccccgac atggc 115

<210> 74

<211> 107

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 74

caagctcgag gaatacgtgc cgccgccgca cgacgccacc gccctgaaga tgtccaccta 60  
 tcggagcagc acgccggaag catctactcc cccaagccccg acatggc 107

<210> 75

<211> 119

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 75

caagctcgag gaatacgtgc cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga 60  
gatgtccacc tatcggagca gcacgccgga agcatctact cccccaagcc cgacatggc 119

<210> 76

<211> 89

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 76

caagctcgag gaatacgtgc cgccgccgca cgacgccacc tatcggagca gcacgccgga 60  
agcatctact cccccaagcc cgacatggc 89

<210> 77

<211> 122

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 77

caagctcgag gaatacgtgc cgccgccgca cgacgccacc gccctgaatg ctcacctggg 60  
agatgtccac cgttatcgga gcagcacgcc ggaagcatct actcccccaa gcccgacatg 120  
gc 122

<210> 78

<211> 117

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 78

caagctcgag gaatacgtgc cgccgccgca cgacgccacc gccctgaaag ctcacctggg 60  
agatgtccaa tcggagcagc acgccggaag catctactcc cccaagcccg acatggc 117

<210> 79

<211> 121

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 79

caagctcgag gaatacgtgc cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga 60  
gatgtccacc gttatcggag cagcacgccg gaagcatcta ctcccccaag cccgacatgg 120  
c 121

<210> 80

<211> 117

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 80

caagctcgag gaatacgtgc cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagg ctcacctggg 60  
agatgtccta tcggagcagc acgccggaag catctactcc cccaagcccc acatggc 117

<210> 81

<211> 121

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 81

caagctcgag gaatacgtgc cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga 60  
gatgtccacc gatatcggag cagcacgccg gaagcateta ctcccccaag cccgacatgg 120  
c 121

<210> 82

<211> 113

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 82

caagctcgag gaatacgtgc cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga 60  
gatgtatcgg agcagcacgc cggaagcatc tactccccca agcccgacat ggc 113

<210> 83

<211> 121

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 83

caagctcgag gaatacgtgc cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagc tcacctggga 60  
gatgtccacc ggtatcggag cagcacgccg gaagcateta ctcccccaag cccgacatgg 120  
c 121

<210> 84

<211> 111

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 84

caagctcgag gaatacgtgc cgccgccgca cgacgccacc gccctgaaga gatgtccacc 60  
gctatcggag cagcacgccg gaagcateta ctcccccaag cccgacatgg c 111

<210> 85

<211> 122

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 85

caagctcgag gaatacgtgc cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagg ctcacctggg 60  
agatgtccac cgatatcgga gcagcacgcc ggaagcatct actcccccaa gcccgacatg 120  
gc 122

<210> 86

<211> 122

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 86

caagctcgag gaatacgtgc cgccgccgca cgacgccacc gccctgaagg ctcacctggg 60  
agatgtccac cgttatcgga gcagcacgcc ggaagcatct actcccccaa gcccgacatg 120  
gc 122

<210> 87

<211> 119

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 87

caagctcgag gaatacgtgc cgccgccgca cgacgccacc gccctctagt acacacgttg 60  
atgtccacct tatcgagca gcagccgga agcatctact cccccaagcc cgacatggc 119

<210> 88

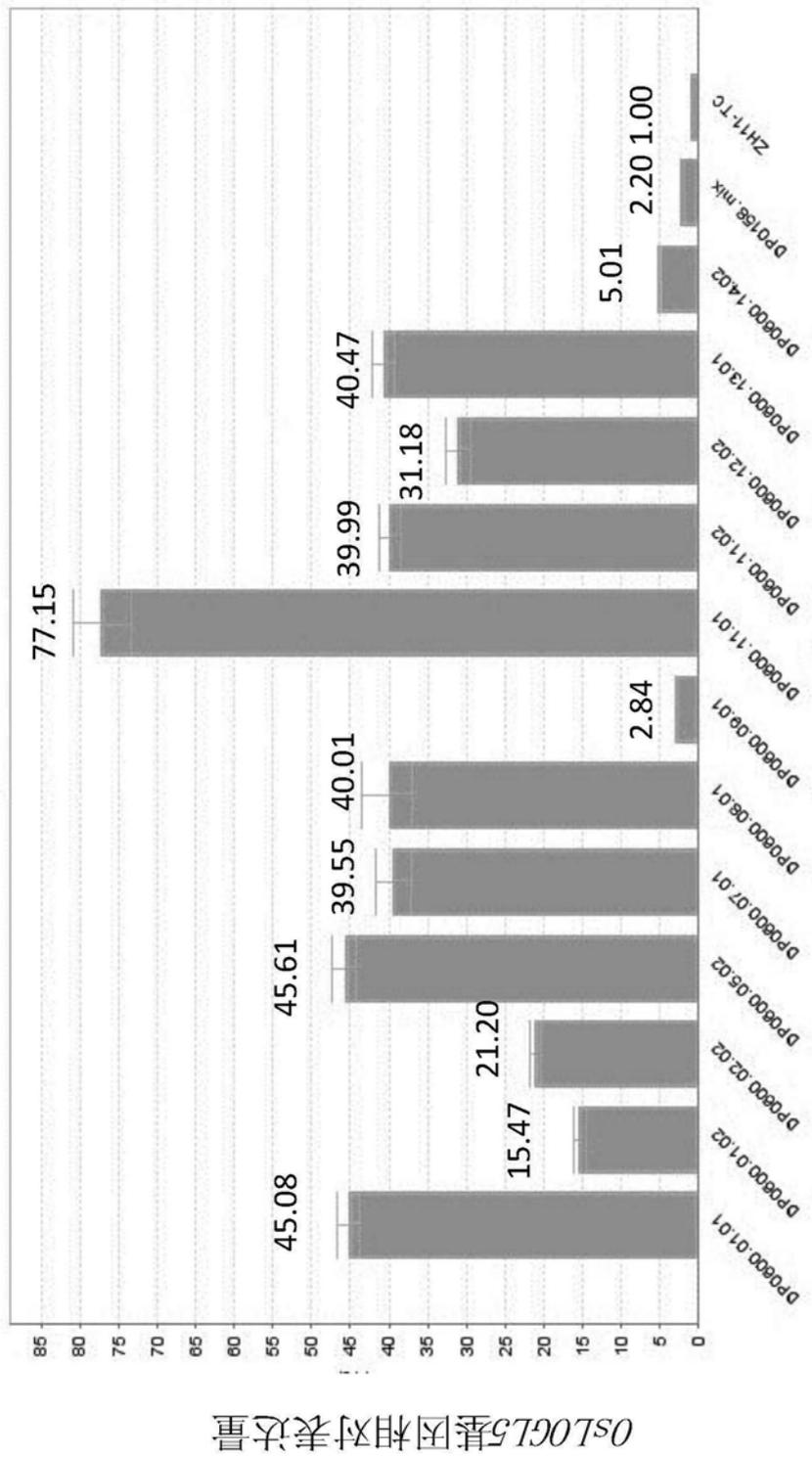
<211> 66

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 88

caagctcgag gaatacgtgc cgccgccgtc caccgcgtat cggagcagca cgccggaagc 60  
atctac 66



转基因株系

图1

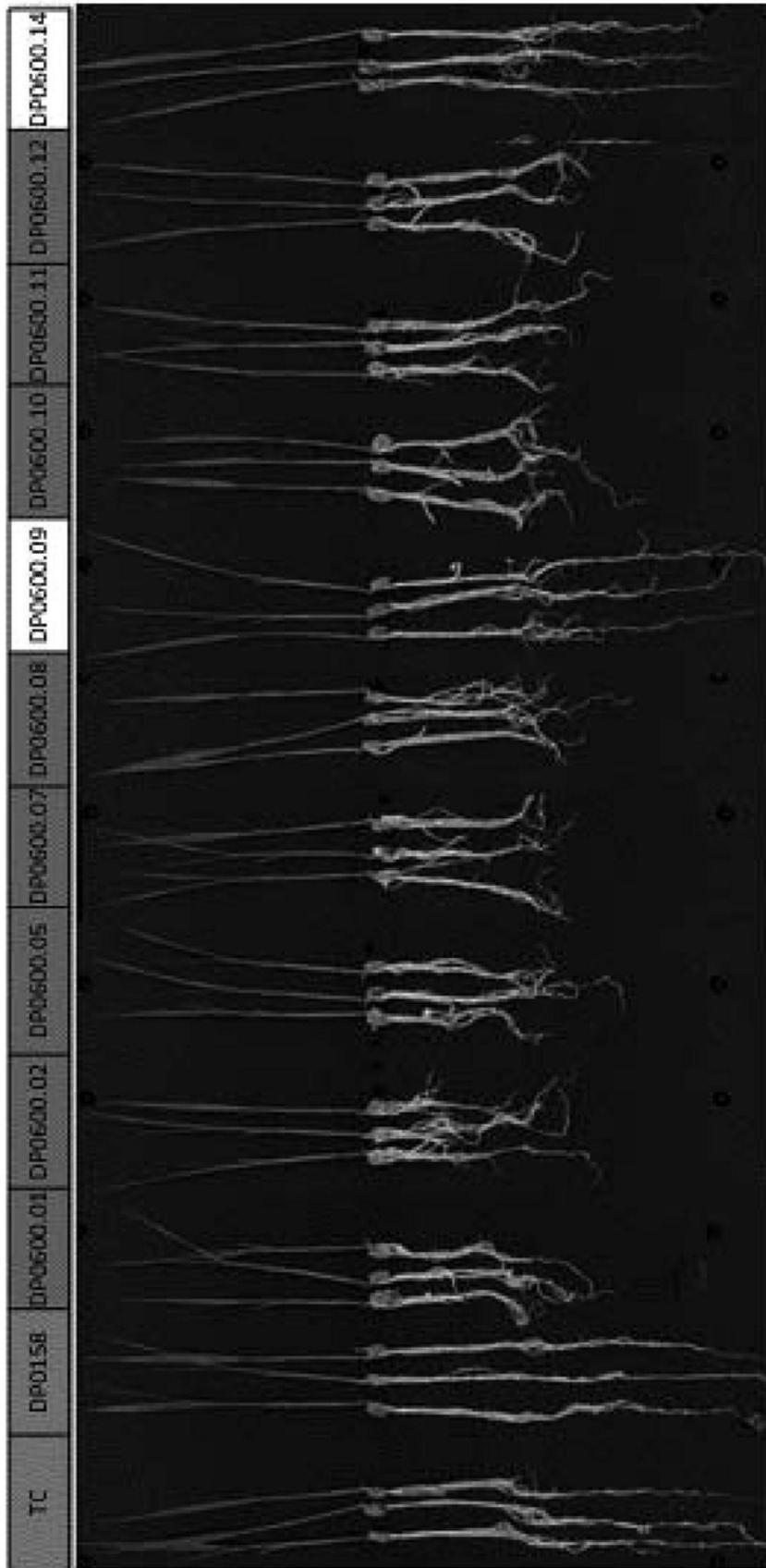


图2

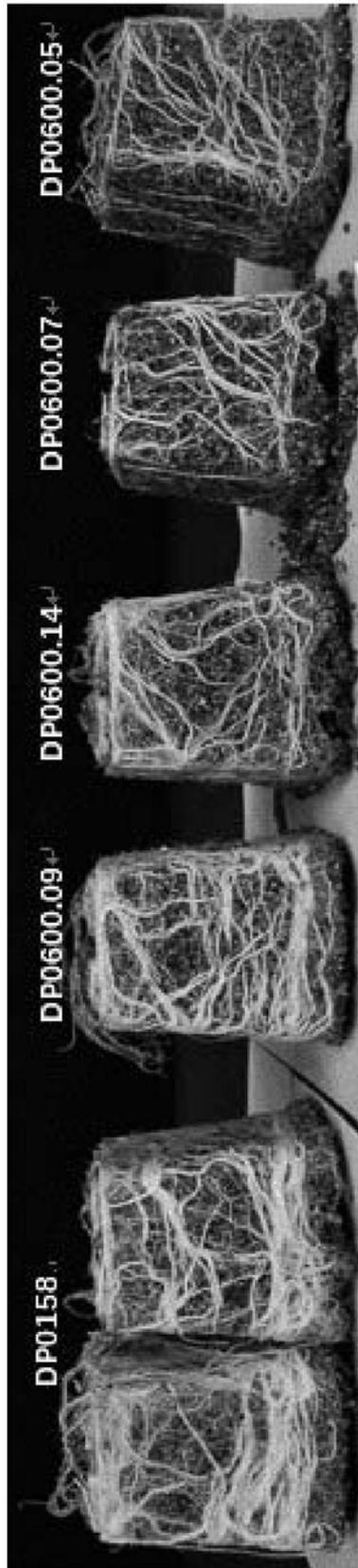


图3

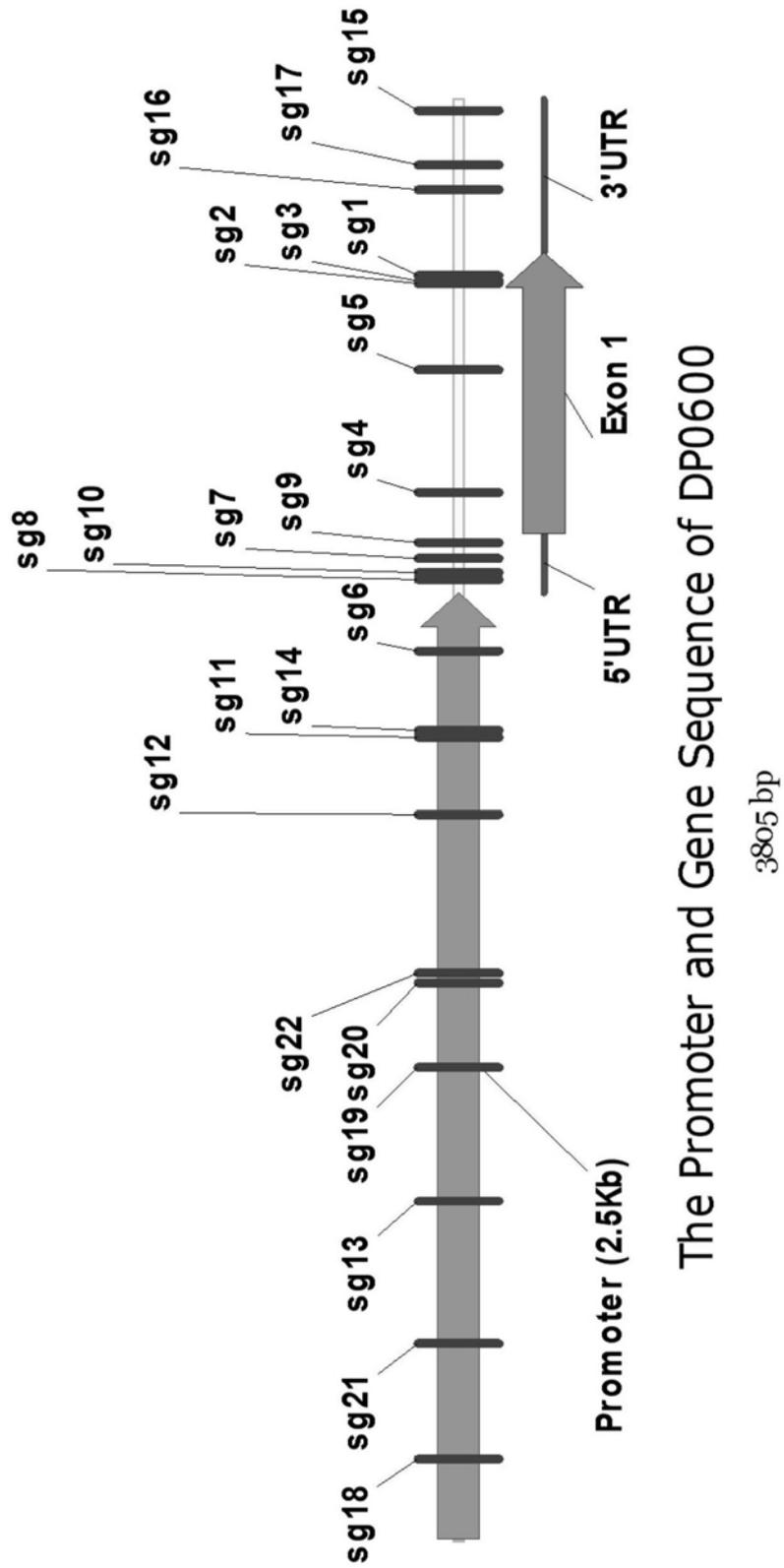
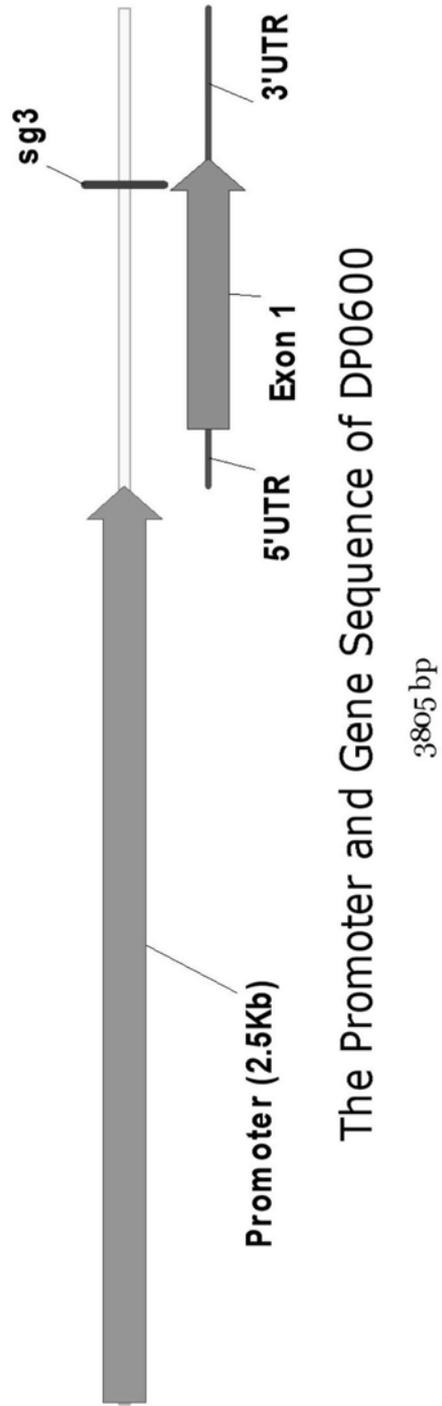


图4



The Promoter and Gene Sequence of DP0600

图5

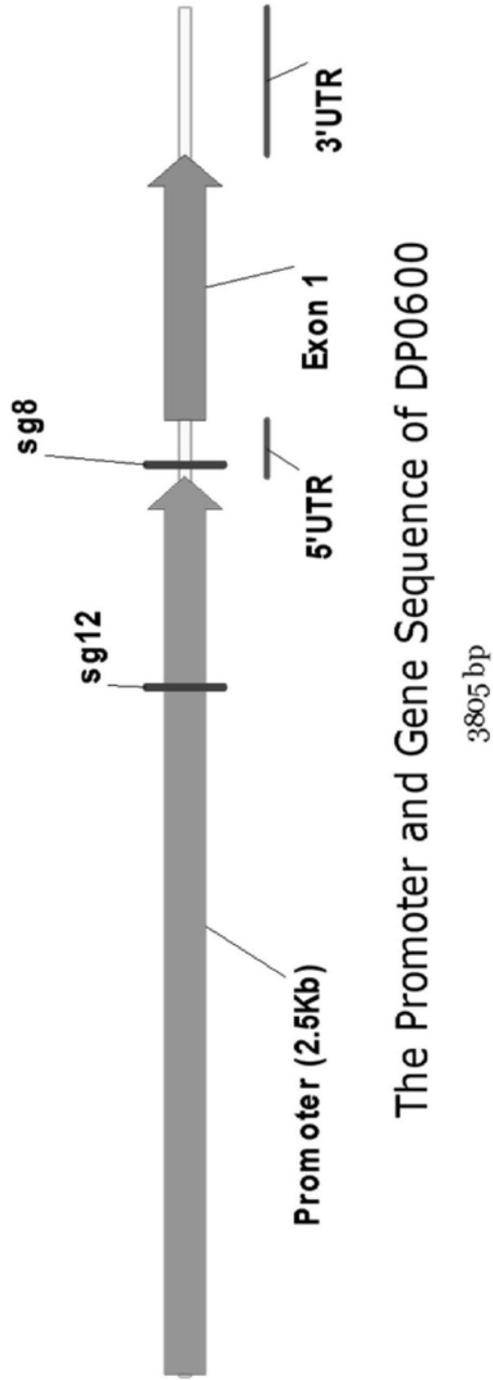


图6

	sgRNA1	PAM	SEQ ID NO
Reference	CGACGCCACCGCCCTGAAAGCTCACCTGGGAGATGTCCACCGTATCGGAGG <u>GGC</u> CGCCGGAAGCATCTACTCCCCCAAGC		42
Mutation type 1	CGACGCCACCGCCCTGAAAGCTCACCTGGGAGATGTCCACCGTATCGGAGGAGCA <u>T</u> CGCCGGAAGCATCTACTCCCCCAAGC		43
Mutation type 2	CGACGCCACCGCCCTGAAAGCTCACCTGGGAGATGTCCACCGTATCGGAGGAGCA <u>A</u> CGCCGGAAGCATCTACTCCCCCAAGC		44
Mutation type 3	CGACGCCACCGCCCTGAAAGCTCACCTGGGAGATGTCCACCGTATCGGAGGAGC- <u>CGCCGGAAGCATCTACTCCCCCAAGC</u>		45
Mutation type 4	CGACGCCACCGCCCTGAAAGCTCACCTGGGAGATGTCCACCGTATCGGAGGAGCA <u>CCGCCGGAAGCATCTACTCCCCCAAGC</u>		46
Mutation type 5	CGACGCCACCGCCCTGAAAGCTCACCTGGGAGATGTCCACCGTATCGG- <u>ACGCCGGAAGCATCTACTCCCCCAAGC</u>		47
Mutation type 6	CGACGCCACCGCCCTGAAAGCTCACCTGGGAGATGTCCACCGTATCGGAGC- <u>CGCCGGAAGCATCTACTCCCCCAAGC</u>		48
Mutation type 7	CGACGCCACCGCCCTGAAAGCTCACCTGGGAGATGTCCACCGTAT- <u>CGCCGGAAGCATCTACTCCCCCAAGC</u>		49
Mutation type 8	CGACGCCACCGCCCTGAAAGCTCACCTGGGAGATGTCCACCGTATCGG- <u>AGCATCTACTCCCCCAAGC</u>		50
Mutation type 9	CGACGCCACCGCCCTGAAAGCTCACCTGGGAGATGTCCACCGTATCGGAG- <u>CGCCGGAAGCATCTACTCCCCCAAGC</u>		51
Mutation type 10	CGACGCCACCGCCCTGAAAGCTCACCTGGGAGATGTCCACCGTATCGGAG- <u>CGCCGGAAGCATCTACTCCCCCAAGC</u>		52
Mutation type 11	CGACGCCACCGCCCTGAAAGCTCACCT- <u>GAAGCTCACGCCGGAAGCATCTACTCCCCCAAGC</u>		53
Mutation type 12	CGACGCCACCGCCCTGAAAGCTCACCTGGGAGATGTCCACCGTATCGGAGGAGCA- <u>CGCCGGAAGCATCTACTCCCCCAAGC</u>		54
Mutation type 13	CGACGCCACCGCCCTGAAAGCTCACCTGGGAGATGTCCACCGTATCGGAGGAGC- <u>CGCCGGAAGCATCTACTCCCCCAAGC</u>		55
Mutation type 14	CGACGCCACCGCCCTGAAAGCTCACCTGGGAGATGTCCACCGTATCGGA- <u>GCCCGGAAGCATCTACTCCCCCAAGC</u>		56
Mutation type 15	CGACGCCACCGCCCTGAAAGCTCACCTGGGAGATGTCCACCGTAT- <u>CGGGAAGCATCTACTCCCCCAAGC</u>		57

图7

	<b>sgRNA 3</b>	<b>SEQ ID NO</b>
Reference	CGACGCCACCGCCCTGAAAGCTCACCCTGGGAGATGTCCACCGTATCGGAGCAGCAGCCGGGAAGCATCTACTCCCCCAAGC	58
Mutation type 1	CGACGCCACCGCCCTGAAAGCTCACCCTGGGAGATGTCCACC-TATCGGAGCAGCAGCCGGGAAGCATCTACTCCCCCAAGC	59
Mutation type 2	CGACGCCACCGCCCTGAAAGCTCACCCTGGGAGATGTCCACCGATATCGGAGCAGCAGCCGGGAAGCATCTACTCCCCCAAGC	60
Mutation type 3	CGACGCCACCGCTTGTGACCCCTCAGTAAATTTCCAGTGGTGTGTAATAATAATCTCAATTAATCTGGATAACAATTTTCTTAG <u>GTGCTTTCTATCTGCCAGATAAAATCTATAACAATGTTGATGAGTATATATAATTTCTT</u> --ATCGGAGCAGCACCGCCGGGAAGCATCTACTCCCCCAAGC	61
Mutation type 4	CGACGCCACCGCCCTGAAAGCTCACCCTG-----AAGCAGCCGGGAAGCATCTACTCCCCCAAGC	62
Mutation type 5	CGACGCCACCGCCCTGAAAGCTCACCCTGGGAGATGTCCACCGTTATCGGAGCAGCAGCCGGGAAGCATCTACTCCCCCAAGC	63
Mutation type 6	CGACGCCACCGCCCTGAAAGCTCACCCTGGGAGATGTCCACCGTTTATCGGAGCAGCAGCCGGGAAGCATCTACTCCCCCAAGC	64
Mutation type 7	CGACGCCACCGCCCTGAAAGCTCACCCTGGGAGAT-----GTATCGGAGCAGCAGCCGGGAAGCATCTACTCCCCCAAGC	65
Mutation type 8	CGACGCCACCGCCCTGAAAGCTCACCCTGGGAGATGTCCACCGTATCGGAGCAGCAGCCGGGAAGCATCTACTCCCCCAAGC	66
Mutation type 9	CGACGCCACCGCCCTGAAAGCTCACCCTGGGAGATGTC-----GAGCAGCAGCCGGGAAGCATCTACTCCCCCAAGC	67
Mutation type 10	CGACGCCACCGCCCTGAAAGCTCACCCTGGGAGATGTCCACCGTATCGGAGCAGCATCGCCGGGAAGCATCTACTCCCCCAAGC	68

PAM

图8

DP3043	sgRNA2 & sgRNA3	PAM	PAM	SEQ ID NO
Reference	CGCCGGCGACGACGGCCACCGCCCTGAAGCTCACCTGGGAGATGCCACCGTATGGAGCAGCACGCCCGGAAGCATCTAC			69
Mutation type 1	CGCCGGCGACGACGGCCACCGCCCTGAAGCTCACCTGGGAGATGCCACCGTATTCGGAGCAGCACGCCCGGAAGCATCTAC			70
Mutation type 2	CGCCGGCGACGACGGCCACCGCCCTGAAGCTCACCTGGGAGATGCCACCGTATTCGGAGCAGCACGCCCGGAAGCATCTAC			71
Mutation type 3	CGCCGGCGACGACGGCCACCGCCCTGAAGCTCACCTGGGAGATGCCACCGTATTCGGAGCAGCACGCCCGGAAGCATCTAC			72
Mutation type 4	CGCCGGCGACGACGGCCACCGCCCTGAAGCTCACCTGGGAGATGTTTTATTCGGAGCAGCACGCCCGGAAGCATCTAC			73
Mutation type 5	CGCCGGCGACGACGGCCACCGCCCTGAAGCTCACCTGGGAGATGTTTTATTCGGAGCAGCACGCCCGGAAGCATCTAC			74
Mutation type 6	CGCCGGCGACGACGGCCACCGCCCTGAAGCTCACCTGGGAGATGTTCCACC-TATTCGGAGCAGCACGCCCGGAAGCATCTAC			75
Mutation type 7	CGCCGGCGACGACGGCCACCGCCCTGAAGCTCACCTGGGAGATGTTCCACC-TATTCGGAGCAGCACGCCCGGAAGCATCTAC			76
Mutation type 8	CGCCGGCGACGACGGCCACCGCCCTGAAGCTCACCTGGGAGATGTTCCACC-TATTCGGAGCAGCACGCCCGGAAGCATCTAC			77
Mutation type 9	CGCCGGCGACGACGGCCACCGCCCTGAAGCTCACCTGGGAGATGTTCCACC-TATTCGGAGCAGCACGCCCGGAAGCATCTAC			78
Mutation type 10	CGCCGGCGACGACGGCCACCGCCCTGAAGCTCACCTGGGAGATGTTCCACC-TATTCGGAGCAGCACGCCCGGAAGCATCTAC			79
Mutation type 11	CGCCGGCGACGACGGCCACCGCCCTGAAGCTCACCTGGGAGATGTTCCACC-TATTCGGAGCAGCACGCCCGGAAGCATCTAC			80
Mutation type 12	CGCCGGCGACGACGGCCACCGCCCTGAAGCTCACCTGGGAGATGTTCCACC-TATTCGGAGCAGCACGCCCGGAAGCATCTAC			81
Mutation type 13	CGCCGGCGACGACGGCCACCGCCCTGAAGCTCACCTGGGAGATGTTCCACC-TATTCGGAGCAGCACGCCCGGAAGCATCTAC			82
Mutation type 14	CGCCGGCGACGACGGCCACCGCCCTGAAGCTCACCTGGGAGATGTTCCACC-TATTCGGAGCAGCACGCCCGGAAGCATCTAC			83
Mutation type 15	CGCCGGCGACGACGGCCACCGCCCTGAAGCTCACCTGGGAGATGTTCCACC-TATTCGGAGCAGCACGCCCGGAAGCATCTAC			84
Mutation type 16	CGCCGGCGACGACGGCCACCGCCCTGAAGCTCACCTGGGAGATGTTCCACC-TATTCGGAGCAGCACGCCCGGAAGCATCTAC			85
Mutation type 17	CGCCGGCGACGACGGCCACCGCCCTGAAGCTCACCTGGGAGATGTTCCACC-TATTCGGAGCAGCACGCCCGGAAGCATCTAC			86
Mutation type 18	CGCCGGCGACGACGGCCACCGCCCTGAAGCTCACCTGGGAGATGTTCCACC-TATTCGGAGCAGCACGCCCGGAAGCATCTAC			87
Mutation type 19	CGCCGGCGACGACGGCCACCGCCCTGAAGCTCACCTGGGAGATGTTCCACC-TATTCGGAGCAGCACGCCCGGAAGCATCTAC			88

图9