



УКРАЇНА

(19) **UA**(11) **115768**(13) **C2**

(51) МПК

C12N 9/16 (2006.01)**C12N 15/82** (2006.01)**A01H 1/06** (2006.01)МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки:	а 2014 01195	(72) Винахідник(и):	Басу Шіб (US), Кон Джонатан (US), Нуччіо Майкл (US)
(22) Дата подання заявки:	16.07.2012	(73) Власник(и):	СІНГЕНТА ПАРТІСІПЕЙШНС АГ, Schwarzwaldallee 215, CH-4058 Basel, Switzerland (CH)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	26.12.2017	(74) Представник:	Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/508,609, 61/522,588	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2008071767 A1, 19.06.2008 WO 2005102034 A2, 03.11.2005 Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses / Garg A.K., Kim J.K., Owens T.G. et al. // Proceedings of the national academy of sciences. National academy of sciences. - US. - Vol. 99. - no. 25. - 2002. - P. 15898-15903
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	15.07.2011, 11.08.2011		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	26.05.2014, Бюл.№ 10		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	26.12.2017, Бюл.№ 24		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2012/046888, 16.07.2012		

(54) СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ СТІЙКОСТІ РОСЛИНИ ДО АБІОТИЧНОГО СТРЕСУ**(57) Реферат:**

Винахід належить до способу підвищення стійкості рослини до абіотичного стресу шляхом введення в рослину полінуклеотиду, який кодує поліпептид, що має трегалоза-6-фосфатфосфатазну активність, де поліпептид модифікований так, що він має знижену ферментативну активність у порівнянні з немодифікованим трегалоза-6-фосфатфосфатазою.

UA 115768 C2

Галузь техніки, до якої належить винахід

[001] Даний винахід належить, загалом, до галузі молекулярної біології й розглядає різні полінуклеотиди, поліпептиди й способи застосування, які можуть використовуватися для збільшення врожайності трансгенних рослин. Трансгенні рослини, які містять будь-який з

5 полінуклеотидів або поліпептидів, описаних у даному документі, можуть проявляти будь-яку з ознак, що включають збільшену врожайність, збільшену стійкість до абіотичного стресу, збільшений клітинний ріст, збільшений коефіцієнт використання води й збільшений коефіцієнт використання поживних речовин.

Передумови винаходу

10 [002] Збільшення населення світу й виснаження запасу орних земель, доступних для сільського господарства, активізує потребу в дослідженні в галузі підвищення ефективності сільського господарства. Традиційні способи поліпшення сільськогосподарських і садових культур застосовують методики селекційного розведення для виявлення рослин, що мають необхідні характеристики. Однак такі методики селекційного розведення мають певні недоліки,

15 а саме, що ці методики часто є трудомісткими й дають у результаті рослини, які часто містять гетерогенні генетичні компоненти, що не завжди може приводити до передачі необхідної ознаки від батьківських рослин. Успіхи в молекулярній біології дозволили людству модифікувати ідіоплазму тварин і рослин. Генна інженерія рослин передбачає виділення й маніпуляцію з генетичним матеріалом (як правило, у формі ДНК або РНК) і наступне введення цього генетичного матеріалу в геном рослини. Така технологія має здатність надавати сільськогосподарським культурам або рослинам різні поліпшені економічні, агрономічні або садівничі ознаки.

Короткий опис винаходу

25 [003] Викладений нижче короткий опис перераховує деякі варіанти здійснення об'єктів даного винаходу, а також, у багатьох випадках, перераховує зміни й перестановки цих варіантів здійснення. Даний короткий опис є винятково ілюстративним щодо численних і різноманітних варіантів здійснення. Згадування однієї або декількох репрезентативних ознак указанного варіанта здійснення також є ілюстративним. Такий варіант здійснення може типово мати місце зі згаданою ознакою(ами) або без неї; аналогічно, ці ознаки можуть застосовуватися щодо інших

30 варіантів здійснення даного винаходу, незалежно від того, перераховані вони в короткому описі винаходу, чи ні. Щоб уникнути надмірного повторення, даний короткий опис не перераховує або припускає всі можливі комбінації таких ознак.

[004] Даний винахід передбачає нуклеотидні послідовності, що кодують поліпептиди трегалозного шляху, які при трансгенній експресії в рослині збільшують урожайність. Поліпептиди Т6РР, описані в даному документі, містять модифікації, які змінюють активність білків трегалоза-6-фосфатфосфатаз (Т6РР), причому активність знижується в порівнянні з немодифікованою Т6РР. Модифіковані Т6РР можуть містити консенсусну послідовність, проілюстровану в SEQ ID NO: 9, і можуть мати щонайменше одну модифіковану амінокислоту. Модифікована Т6РР може мати модифікацію, створену в консервативній амінокислоті,

40 включаючи консервативні амінокислоти, які описані в консенсусній послідовності SEQ ID NO: 9. Модифіковані Т6РР можуть викликати *in vitro* активацію Т6РР дикого типу. Модифікація в Т6РР може знаходитись в межах щонайменше одного з домену САР, фосфатазного домену, А-фосфатазного домену або В-фосфатазного домену. Т6РР, що мають зменшене зв'язування із субстратом трегалоза-6-фосфатом (Т6Р), демонструють збільшену врожайність і підвищену стресостійкість при трансгенній експресії в рослинах, а також мають підвищену стійкість до стресу, включаючи посуху. Рослини, які експресують модифіковану Т6РР, включають однодольні або дводольні рослини, в тому числі рослини, вибрані із групи, що складається з маїсу, цукрового очерету, сої, рису, сорго або пшениці. Модифікації поліпептидів Т6РР можуть включати одну з амінокислотних замін, амінокислотних делецій або амінокислотних вставок або

50 їх комбінацію. Модифіковані Т6РР можуть являтися членом надсімейства дегалогеназ галогенокислот (HAD) фосфатаз. Ферментативна активність Т6РР може бути знижена щонайменше на 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % або 100 %.

[005] Будь-який з описаних поліпептидів Т6РР може застосовуватися для одержання полінуклеотидів. Полінуклеотиди, що кодують модифіковані поліпептиди Т6РР, можна вводити в клітину-хазяїна. Клітина-хазяїн може включати рослинну клітину. Полінуклеотиди можуть бути включені в касети експресії, які забезпечують транскрипцію полінуклеотида в рослині. Касети експресії можуть включати промотор, який експресує полінуклеотид у репродуктивній тканині рослини. Крім того, репродуктивна тканина може бути вибрана з групи, що складається з тканини колоска, вузла качана, тканини приквітка, меристемної тканини колоска, тканини квітконіжки суцвіття й тканини незрілої квітки. Промотор, який експресує полінуклеотиди Т6РР,

60

може включати промотор OsMADS або промотор OsMADS6. Екстракт, що містить полінуклеотиди або поліпептиди, можна отримати з будь-чого з клітин-хазяїнів, рослин, частин рослини або тканин рослини.

[006] Способи, розкриті в даному документі, додатково включають уведення в рослини полінуклеотидів, наприклад, як розкрито в даному документі. Трансгенні рослини, що містять полінуклеотиди, розкриті в даному документі, можуть проявляти збільшений клітинний ріст, збільшену міць рослин і/або сходів, збільшену врожайність, збільшену вагу насіння, збільшений коефіцієнт використання води та/або збільшену біомасу. Передбачається, що рослини, отримані за допомогою способів, розкритих у даному документі, мають підвищену стійкість до абіотичного стресу. Трансгенні рослини, описані в даному документі, можуть давати більш високу врожайність, як відносно врожайності біомаси, так і врожаю зерна рослини. Один аспект даного винаходу передбачає різні модифікації, які можна здійснювати щодо будь-якої даної генної послідовності T6PP, що може використовуватися в трансгенних рослинах для забезпечення збільшеної врожайності. Альтернативно, щоб забезпечити в рослині збільшену врожайність та стресостійкість, можна застосовувати інші численні способи для збільшення рівнів T6P.

[007] Способи збільшення врожайності, збільшення стійкості рослини до абіотичного стресу або зменшення безпліддя в рослині, збільшення кількості качанів на рослину та/або зерен на рослину в умовах дефіциту води можуть включати введення у рослинну клітину касети експресії, що містить модифіковану T6PP, а потім одержання трансгенної рослини. Рослина може являти собою однодольну рослину, наприклад, може являти собою рослину маїсу, рису, пшениці, сорго, цукрового очерету або газонної трави. Це може бути дводольна рослина, така як соя. Для способів підвищення стійкості рослини до абіотичного стресу стрес може бути вибраний з групи, що складається зі стресу, викликаного нестачею води, теплового стресу або стресу, викликаного низькими температурами. Стрес, викликаний нестачею води, може бути обумовлений посухою.

[008] Крім того, включені способи модифікації в рослині рівня трегалоза-6-фосфату шляхом ідентифікації поліпептиду в трегалозному шляху; модифікації поліпептиду так, щоб він мав змінену ферментативну активність; уведення в рослину касети експресії, що містить полінуклеотид, який кодує модифікований поліпептид, і одержання рослини з модифікованими рівнями трегалоза-6-фосфату. Поліпептид може мати активність, вибрану з групи, що складається з трегалоза-6-фосфат-синтазної; трегалоза-6-фосфатфосфатазної та трегалазної. Модифіковані рівні трегалоза-6-фосфату можуть приводити до збільшення експресії генів у пентозофосфатному шунтовому шляху під час стресу, викликаного посухою, у тканині вузла качана рослини. Додатково або альтернативно, модифіковані рівні трегалоза-6-фосфату можуть обумовлювати збільшення рівня карбоангідрази в тканині вузла качана рослини. Модифікований поліпептид може експресуватися у репродуктивних тканинах рослини, в тому числі у тканині колоска, вузлі качана, тканині приквітки, меристемній тканині колоска, тканині квітконіжки суцвіття й тканині незрілої квітки. Модифікований поліпептид модифікованого ферменту трегалозного шляху може мати знижену ферментативну активність і/або обумовлювати *in vitro* активацію трегалоза-6-фосфатфосфатази дикого типу.

[009] Ці та інші ознаки, цілі й переваги даного винаходу стануть зрозумілішими з наступного опису. В описі наведене посилання на супровідні послідовності, що є його частиною та у яких показані з метою ілюстрації, а не обмеження, варіанти здійснення даного винаходу. Опис переважних варіантів здійснення не передбачений для обмеження даного винаходу, що охоплює всі модифікації, еквіваленти й альтернативи. Отже, необхідно привести посилання на варіанти здійснення, перераховані в даному документі для інтерпретації об'єму даного винаходу.

Короткий опис послідовностей у переліку послідовностей

nt= нуклеотидна послідовність

pt= білкова послідовність

SEQ ID NO: 1 трегалоза-6-фосфатфосфатаза (nt), OsT6PP-WT

SEQ ID NO: 2 трегалоза-6-фосфатфосфатаза (pt), OsT6PP-WT

SEQ ID NO: 3 трегалоза-6-фосфатфосфатаза - одинарна модифікація (nt),

OsT6PP-H244D

SEQ ID NO: 4 трегалоза-6-фосфатфосфатаза – одинарна модифікація (pt),

OsT6PP-H244D

SEQ ID NO: 5 трегалоза-6-фосфатфосфатаза - подвійна модифікація а (nt),

OsT6PP-I129F

SEQ ID NO: 6 трегалоза-6-фосфатфосфатаза – подвійна модифікація а (pt),

OsT6PP-I129F

SEQ ID NO: 7 трегалоза-6-фосфатфосфатаза - потрібна модифікація b (nt)

SEQ ID NO: 8 трегалоза-6-фосфатфосфатаза – потрібна модифікація b (pt)

SEQ ID NO: 9 консенсусна послідовність трегалоза-6-фосфатфосфатази

5 SEQ ID NO: 10 фосфатазний домен трегалоза-6-фосфатфосфатази

SEQ ID NO: 11 A-фосфатазний бокс трегалоза-6-фосфатфосфатази

SEQ ID NO: 12 B-фосфатазний бокс трегалоза-6-фосфатфосфатази

SEQ ID NO: 13 промотор OsMADS6

SEQ ID NO: 14 трегалоза-6-фосфатфосфатаза *Arabidopsis thaliana* 19925

10 SEQ ID NO: 15 трегалоза-6-фосфатфосфатаза *Arabidopsis thaliana* 19926

SEQ ID NO: 16 трегалоза-6-фосфатфосфатаза *Oryza sativa* 19924

SEQ ID NO: 17 подібна до трегалоза-6-фосфатфосфатази *Thermoplasma acidophilum* (Q9HIW7)

Опис графічних матеріалів

15 [010] На Фіг. 1A-1C показане вихідне вирівнювання послідовностей T6PP з *Arabidopsis thaliana* (19925; SEQ ID NO: 14), *Arabidopsis thaliana* (19926; SEQ ID NO: 15), *Oryza sativa* (19924; SEQ ID NO: 16), *Oryza sativa* (15777; OsT6PP-WT дикого типу; SEQ ID NO: 2) і *Thermoplasma acidophilum* (Q9HIW7; SEQ ID NO: 17). Послідовності вирівнювали за допомогою Vector NTI із застосуванням способу ClustalW.

20 [011] На Фіг. 2 показане філогенетичне дерево, отримане від вирівнювання множинних білків T6PP.

[012] На Фіг. 3 показаний опис трегалозного шляху. Трегалозний шлях складається з двох біосинтетичних ферментів, трегалоза-6-фосфатсинтази (TPS) і трегалоза-6-фосфатфосфатази (T6PP), і одного гідролізуючого ферменту, трегалази, що залучений в розщеплення.

25 [013] На Фіг. 4 показаний трегалозний шлях з додатковими продуктами низхідних стадій. UDPG одержують безпосередньо за допомогою сахарозосинтази; G6P одержують із глюкози за допомогою інвертази й гексокінази або за допомогою фруктози й фруктоза-6-фосфату (F6P) за рахунок застосування сахарозосинтази, фруктокінази й фосфоглюкозаізомерази. UDPG і G6P також являють собою два центральні активовані попередники, з яких зрештою можуть походити
30 багато клітинних функціональних сполук. UDPG є попередником для основних полісахаридів клітинної стінки й для гліколіпідів. G6P є попередником для синтезу крохмалю, NADPH за рахунок окисної частини пентозофосфатного шляху, а АТФ за рахунок гліколізу, циклу Кребса й окисного фосфорилування. Крім того, G6P може перетворюватися на фруктоза-6-фосфат і разом з UDPG може застосовуватися для синтезу сахароза-6-фосфату, а потім сахарози.
35 Будучи зробленим з UDPG і G6P, T6P перебуває на перетинах основних вуглеводних потоків у рослинах.

[014] На Фіг. 5 описаний вплив зв'язування T6P з SnRK1. SnRK1 є гетеротримерним білком та являє собою рослинний гомолог протеїнкінази тварин, що активується AMP, й протеїнкінази дріжджів, що не ферментує сахарозу (SnF1).

40 [015] На Фіг. 6 показане залучення SnRK1 у численні метаболічні шляхи в рослинах.

[016] На Фіг. 7 показане стрічкове графічне зображення гомологічної моделі T6PP рису. Фермент містить два домени: α/β -гідролазний домен та менший "домен lid". Активний сайт знаходиться у верхній частині α/β -гідролазного домену (пляма); щілина для зв'язування із субстратом перебуває на границі між двома домонами. Ці два домени з'єднані гнучким
45 лінкером, що дозволяє домену lid відкриватися й закриватися під час каталізу. Оскільки матриця для гомологічного моделювання, бактеріальний T6PP-споріднений білок (код PDB 1U02), являє собою апофермент з порожнім активним сайтом, імовірно, що відносна орієнтація домену lid та гідролазного домену дещо відрізняється в справжньому фермент-субстратному комплексі.

[017] На Фіг. 8 показане розташування групи 6-фосфату T6P. Один з атомів кисню групи 6-фосфату розташований в екваторіальному положенні координаційної сфери Mg^{2+} . Asp121, що акцептує фосфатну групу під час каталізу з утворенням проміжної сполуки з ковалентним зв'язком, приймає аксіальне положення. Lys289 безпосередньо зв'язаний водневим зв'язком з фосфатною групою, а His181 перебуває в безпосередній близькості. Обидва залишки оптимально розташовані для стабілізації негативного заряду, що утворюється на фосфатному
50 фрагменті під час каталізу.

[018] На Фіг. 9 показані здатні до обертання зв'язки в субстраті T6P. У той час як положення й орієнтація піранозного кільця, що є найближчим до групи 6-фосфату, точно визначена за допомогою фіксованої фосфатної групи, існує істотна гнучкість між першим і другим кільцями внаслідок наявності двох здатних до обертання глікозидних зв'язків (стрілки). Діапазон

можливих положень для другого кільця отримували шляхом обертання двох зв'язків. Конформації, у яких друге кільце перетинається з білком, відкидали.

[019] На Фіг. 10 показана консенсусна послідовність для T6PP (SEQ ID NO: 9). Залишки, виділені жирним шрифтом і підкреслені, визначають висококонсервативні ділянки. Положення в консенсусній послідовності, що марковані "X", указують на ділянки мінливості, де будь-яка інша окрема буква відповідає загальноприйнятому однобуквену позначенню амінокислот, загальноновживаному в даній галузі техніки. Підкреслені амінокислотні залишки вказують на ділянки, які можна модифікувати для конструювання поліпептидів T6PP, що забезпечують збільшену врожайність і/або підвищену витривалість до стресу у трансгенної рослини. Залишки, позначені DYDGTLSPIV, кодують В-фосфатазний бокс.

[020] На Фіг. 11A-11C показане остаточне вирівнювання послідовностей T6PP для *Arabidopsis thaliana* (19925; SEQ ID NO: 14), *Arabidopsis thaliana* (19926; SEQ ID NO: 15), *Oryza sativa* (19924; SEQ ID NO: 16) і *Oryza sativa* (15777; OsT6PP-WT дикого типу; SEQ ID NO: 2), а також T6PP-спорідненого білка з *Thermoplasma acidophilum* (Q9HIW7; SEQ ID NO: 17).

Докладний опис винаходу

[021] При здійсненні даного винаходу на практиці будуть використовуватися, якщо не зазначене інше, загальноприйняті методики ботаніки, мікробіології, вирощування тканин, молекулярної біології, хімії, біохімії, генетики кількісних ознак рослин, статистики й технології рекомбінантної ДНК, що знаходяться у межах навичок фахівців у даній галузі. Такі методики роз'яснюються в повному об'ємі в літературі. Див., наприклад, Langenheim and Thimann, (1982) Botany: Plant Biology and Its Relation to Human Affairs, John Wiley; Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, vol. 1, Vasil, ed. (1984); Stanier, et al., (1986) The Microbial World, 5th ed., Prentice-Hall; Dhringra and Sinclair, (1985) Basic Plant Pathology Methods, CRC Press; Maniatis, et al., (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual; DNA Cloning, vols. I and II, Glover, ed. (1985); Oligonucleotide Synthesis, Gait, ed. (1984); Nucleic Acid Hybridization, Hames and Higgins, eds. (1984); і серію Methods in Enzymology, Colowick and Kaplan, eds, Academic Press, Inc., San Diego, Calif.

[022] Одиниці, префікси й символи можуть виражатися в їхній формі, прийнятній у системі SI. Якщо не зазначене інше, нуклеїнові кислоти записані зліва направо в орієнтації 5' - 3'; амінокислотні послідовності записані зліва направо в орієнтації від аміно- до карбокси-кінця, відповідно. Числові діапазони містять у собі числові значення, що визначають діапазон. Амінокислоти в даному документі можуть позначатися або їхніми загальновідомими трибуквеними символами, або однобуквеними символами, які рекомендовані Комісією з біохімічної номенклатури IUPAC-IUB. Аналогічно, нуклеотиди можуть позначатися їхніми загальноприйнятими однобуквеними кодами. Вирази, що визначаються нижче, більш повно визначені за допомогою посилання на опис винаходу в цілому.

[023] Якщо не визначене інше, усі технічні й наукові терміни, які застосовуються в даному документі, мають таке саме значення, що звичайно розуміється фахівцем у галузі, до якої належить даний винахід.

[024] Слід розуміти, що даний винахід не обмежений конкретною методологією, протоколами, клітинними лініями, видами або родами рослин, конструктами й реагентами, фактично описаними. Слід також розуміти, що термінологія, яка застосовується в даному документі, представлена винятково з метою опису конкретних варіантів здійснення і не передбачена для обмеження об'єму даного винаходу.

[025] Форми однини, які застосовуються в даному документі, включають посилання на форми множини, якщо контекст явно не вказує на інше. Таким чином, наприклад, посилання на "вектор" являє собою посилання на один або кілька векторів і включає їхні еквіваленти, відомі фахівцям у даній галузі.

[026] Вираз "приблизно" використовується в даному документі для позначення наближено, грубо, близько або в районі. Коли вираз "приблизно" використовується разом з числовим діапазоном, він модифікує цей діапазон шляхом розширення границь вище й нижче зазначених числових значень. Загалом, вираз "приблизно" використовується в даному документі для модифікації числового значення вище й нижче зазначеного значення за допомогою відхилення на 20 відсотків.

[027] Слово "або", як застосовується в даному документі, означає будь-якого члена конкретного переліку, а також включає будь-яку комбінацію членів з даного переліку.

[028] Вирази "містить", "що містить", "включає", "що включає", "що має" і споріднені з ними за значенням слова означають "включаючи, але без обмеження". Вираз "що складається з" означає "включаючи й обмежуючись".

[029] Вираз "що складається практично з" означає, що композиція, спосіб або структура можуть включати додаткові інгредієнти, етапи та/або частини, але тільки якщо додаткові інгредієнти, етапи та/або частини не суттєво змінюють основні й нові характеристики заявленої композиції, способу або структури.

[030] У всіх випадках, коли у даному документі вказується числовий діапазон, мається на увазі, що він включає будь-яке перераховане число (дробове або ціле) у межах вказаного діапазону. Фрази "у діапазоні/знаходиться у діапазоні між" першим вказаним числом і другим вказаним числом і "у діапазоні/знаходиться у діапазоні від "першого вказаного числа" до "другого вказаного числа застосовуються в даному документі взаємозамінно та, мається на увазі, що вони включають перше й друге вказані числа і всі дробові та цілі числа між ними. Вираз "спосіб", як застосовується в даному документі, стосується способів дії, засобів, методик і процедур для здійснення даного завдання, включаючи, але без обмеження, такі способи дії, засоби, методики й процедури, або відомі, або які легко розробити на основі відомих способів дії, засобів, технік і процедур фахівцям в хімічній, фармакологічній, біологічній, біохімічній та медичній галузях техніки. Слід розуміти, що певні ознаки даного винаходу, описані для ясності в контексті окремих варіантів здійснення, можуть також бути представлені в комбінації в одному варіанті здійснення. Навпаки, різні ознаки даного винаходу, описані для стислості в контексті одного варіанта здійснення, можуть також бути представлені окремо, або в будь-якій придатній субкомбінації, або у формі, що придатна у будь-якому іншому описаному варіанті здійснення даного винаходу. Певні ознаки, описані в контексті різних варіантів здійснення, не повинні розглядатися як суттєві ознаки цих варіантів здійснення, якщо тільки варіант здійснення є незастосовним без цих елементів.

[031] Під виразом "мікроб" розуміють будь-який мікроорганізм (включаючи як еукаріотичні, так і прокаріотичні мікроорганізми), такий як гриби, дріжджі, бактерії, актиноміцети, водорості й найпростіші, а також інші одноклітинні структури.

[032] Під виразом "ампліфікований" розуміють створення множинних копій послідовності нуклеїнової кислоти або множинних копій, комплементарних послідовності нуклеїнової кислоти, із застосуванням щонайменше однієї з послідовностей нуклеїнової кислоти у якості матриці. Системи ампліфікації включають систему полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), систему лігазної ланцюгової реакції (ЛЛР), ампліфікацію на основі послідовності нуклеїнової кислоти (NASBA, Cange, Micsicco, Онтаріо), системи О-бета-реплікази, систему ампліфікації на основі транскрипції (TAS) та ампліфікацію з переміщенням ланцюга (SDA). Див., наприклад, Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications, Persing, et al., eds., American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1993). Продукт ампліфікації має назву амплікон.

[033] Вираз "консервативно модифіковані варіанти" застосовується як щодо амінокислотних послідовностей, так і щодо послідовностей нуклеїнових кислот. Що стосується конкретних послідовностей нуклеїнової кислоти, консервативно модифікованими варіантами називають такі нуклеїнові кислоти, які кодують ідентичні або консервативно модифіковані варіанти амінокислотних послідовностей. Внаслідок виродженості генетичного коду велика кількість функціонально ідентичних нуклеїнових кислот кодують будь-який даний білок. Наприклад, усі з кодонів GCA, GCC, GCG і GCU кодують амінокислоту аланін. Таким чином, у будь-якому положенні, де кодоном визначено аланін, кодон може бути змінений на будь-який з описаних відповідних кодонів без зміни поліпептиду, що кодується. Такі варіації нуклеїнових кислот являють собою "мовчазні варіації" і представляють собою один вид консервативно модифікованої варіації. Кожна послідовність нуклеїнової кислоти в даному документі, яка кодує поліпептид, також описує кожну можливу мовчазну варіацію нуклеїнової кислоти. Фахівцю в даній галузі буде зрозуміло, що кожний кодон у нуклеїновій кислоті (за винятком AUG, який, як правило, є єдиним кодоном для метіоніну; єдиним виключенням є *Micrococcus rubens*, для якого метіоніновим кодоном є GTG (Ishizuka, et al., (1993) J. Gen. Microbiol. 139:425-32) може бути модифікований з одержанням функціонально ідентичної молекули. Відповідно, кожна мовчазна варіація нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид згідно з даним винаходом, передбачається в кожній описаній поліпептидній послідовності й включена в даний документ за допомогою посилання.

[034] "Контрольна рослина" або "контроль", як застосовується в даному документі, може являти собою нетрансгенну рослину батьківської лінії, яку застосовували в даному винаході для створення трансгенної рослини. Контрольна рослина в деяких випадках може являти собою лінію трансгенних рослин, що включають порожній вектор або маркерний ген, але не містять рекомбінантний полінуклеотид згідно з даним винаходом, який експресується в трансгенній рослині, що підлягає оцінюванню. В інших випадках контрольна рослина являє собою трансгенну рослину, яка експресує ген за допомогою конститутивного промотора. Як правило,

контрольна рослина являє собою рослину тієї ж лінії або сорту, що й трансгенна рослина, що підлягає тестуванню, яка не має специфічної рекомбінантної ДНК, що забезпечує ознаку, якою характеризується трансгенна рослина. Така рослина-попередник, яка не містить такої специфічної рекомбінантної ДНК, що забезпечує ознаку, може являти собою природну рослину, рослину дикого типу, елітну нетрансгенну рослину або трансгенну рослину без специфічної рекомбінантної ДНК, що забезпечує ознаку, якою характеризується трансгенна рослина. Рослина-попередник, яка не містить специфічної рекомбінантної ДНК, що забезпечує ознаку, може являти собою сибс трансгенної рослини, яка має специфічну рекомбінантну ДНК, що забезпечує ознаку. Така рослина-попередник, що є сибсом, може включати іншу рекомбінантну ДНК.

[035] Що стосується амінокислотних послідовностей, фахівцю в даній галузі буде зрозуміло, що окремі заміни, делеції або вставки в послідовність нуклеїнової кислоти, пептидну, поліпептидну або білкову послідовність, які змінюють, додають або видаляють одну амінокислоту або невеликий відсоток амінокислот у послідовності, що кодується, приводять до "консервативно модифікованого варіанту", коли зміна відбувається в результаті заміщення амінокислоти хімічно подібною амінокислотою. Таким чином, в такий спосіб можна змінювати будь-яке число амінокислотних залишків, вибране з групи цілих чисел, що складається з 1–15. Відповідно, можна зробити, наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 7 або 10 змін. Консервативно модифіковані варіанти, як правило, забезпечують біологічну активність, аналогічну такій немодифікованій поліпептидній послідовності, з якої вони походять. Наприклад, субстратна специфічність, ферментативна активність або зв'язування з лігандом/рецептором, як правило, становить щонайменше 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % або 90 %, переважно 60-90 % від нативного білка для його нативного субстрату. Таблиці консервативних заміні, у яких наведені функціонально подібні амінокислоти, добре відомі в даній галузі техніки.

[036] Кожна з наступних шести груп містить амінокислоти, що представляють собою консервативні заміни одна одної:

- 1) Аланін (A), Серин (S), Треонін (T);
- 2) Аспарагінова кислота (D), Глутамінова кислота (E);
- 3) Аспарагін (N), Глутамін (Q);
- 4) Аргінін (R), Лізин (K);
- 5) Ізолейцин (I), Лейцин (L), Метіонін (M), Валін (V) і
- 6) Фенілаланін (F), Тирозин (Y), Триптофан (W).
- 7) Див. також Creighton, Proteins, W.H. Freeman and Co. (1984).

[037] Як застосовується в даному документі, вирази "модифікований" або "модифікація" взаємозамінно стосуються спланованих або випадкових заміні, делецій або вставок у послідовність нуклеїнової кислоти, пептидну, поліпептидну або білкову послідовність, які змінюють, додають або видаляють щонайменше один амінокислотний залишок у межах даного поліпептиду. Вираз "модифікована Т6РР", як застосовується в даному документі, стосується будь-якої нуклеїнової кислоти, що кодує Т6РР або пептиди, поліпептиди або білок, що має Т6РР активність, кожний з яких був модифікований таким чином, що отримана Т6РР забезпечує модифіковану Т6РР активність і/або модифіковане зв'язування з Т6Р, що приводить до збільшеної врожайності та/або стійкості до абіотичного стресу в рослини у порівнянні з немодифікованою Т6РР.

[038] Як застосовується в даному документі, "гомологічне положення" стосується положення однієї або декількох амінокислот у поліпептиді або однієї або декількох пар основ у полінуклеотидній послідовності, які знаходяться в аналогічному або еквівалентному положенні в другому поліпептиді або полінуклеотиді, що є ортологом, паралогом або гомологом вихідної послідовності. Положення амінокислот може знаходитися в одній функціональній ділянці двох білків, але може не являти собою строго відповідне числове положення амінокислоти у двох поліпептидних послідовностях. Гомологічне положення амінокислот у двох білках може визначатися за допомогою декількох способів, добре відомих у даній галузі техніки, в тому числі, наприклад, вирівнювання послідовностей (наприклад, BLAST), тривимірною моделювання білків (див., наприклад, Sander C. and Scheider R., (1991) PROTEINS: Structure, Function and Genetics 9:56-68) і подібного.

[039] Під "що кодує" або "що кодується" стосовно певної нуклеїнової кислоти розуміють, що вона містить інформацію для трансляції в певний білок. Нуклеїнова кислота, що кодує білок, може містити послідовності, які не транскрибуються (наприклад, інтрони), серед ділянок нуклеїнової кислоти, які транскрибуються, або може не містити такі проміжні послідовності, які не транскрибуються (наприклад, як у кДНК). Інформація, за якої кодується білок, визначається шляхом застосування кодонів. Як правило, амінокислотна послідовність кодується нуклеїновою

кислотою із застосуванням "універсального" генетичного коду. Однак варіанти універсального коду, такі як представлені в мітохондріях деяких рослин, тварин і грибів, бактерії *Mycoplasma capricolum* (Yamao, et al., (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:2306-9) або інфузорії *Macronucleus*, можуть застосовуватися, коли нуклеїнову кислоту експресують із застосуванням цих організмів.

[040] Якщо нуклеїнову кислоту одержують або змінюють синтетичним шляхом, то можна отримати перевагу з огляду на використання відомих переважних кодонів у передбачуваного хазяїна, у якого буде експресуватися нуклеїнова кислота. Наприклад, хоча послідовності нуклеїнової кислоти за даним винаходом можна експресувати як у видах однодольних, так і дводольних рослин, послідовності можна модифікувати з урахуванням специфічного переважного використання кодонів і переважного вмісту GC в однодольних рослин або дводольних рослин, оскільки було показано, що ці переваги відрізняються (Murray, et al., (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-98 і в даний документ включена за допомогою посилання). Таким чином, переважний кодон маїсу для конкретної амінокислоти можна отримати від відомих генних послідовностей з маїсу. Частота використання кодону маїсу для 28 генів з рослин маїсу наведена в Таблиці 4 у Murray, et al., вище.

[041] Як застосовується в даному документі, "гетерологічний" у відношенні нуклеїнової кислоти являє собою нуклеїнову кислоту, яка походить з чужорідного виду, або, якщо вона походить із того самого виду, то є суттєво модифікованою в порівнянні з її нативною формою в композиції та/або геномному локусі шляхом навмисного втручання людини. Наприклад, промотор, функціонально пов'язаний з гетерологічним структурним геном, походить від виду, що відрізняється від того, від якого отримали структурний ген, або, якщо він походить від того самого виду, то один або обидва є суттєво модифікованими в порівнянні з їхньою вихідною формою. Гетерологічний білок може брати початок від чужорідного виду, або, якщо він походить від того самого виду, то він є суттєво модифікованим у порівнянні з його вихідною формою шляхом навмисного втручання людини.

[042] Під "клітиною-хазяїном" розуміють клітину, яка містить послідовність гетерологічної нуклеїнової кислоти за даним винаходом, яка містить вектор і підтримує реплікацію та/або експресію вектора експресії. Клітини-хазяїні можуть являти собою прокаріотичні клітини, такі як *E. coli*, або еукаріотичні клітини, такі як клітини дріжджів, комах, рослин, амфібій або ссавців. Переважно, клітини-хазяїні являють собою клітини однодольних або дводольних рослин, в тому числі, але без обмеження, маїсу, сорго, соняшника, сої, пшениці, люцерни, рису, бавовнику, канолі, ячменю, проса й томата. Особливо переважною клітиною-хазяїном з однодольної рослини є клітина-хазяїн маїсу.

[043] Вираз "гібридизаційний комплекс" включає посилання на дуплексну структуру нуклеїнової кислоти, що утворена двома одноланцюговими послідовностями нуклеїнової кислоти, які селективно гібридизовані одна з одною.

[044] Вираз "введений" передбачає вставлення нуклеїнової кислоти в клітину за допомогою будь-якого способу, такого як "трансфекція", "трансформація" або "трансдукція", і він включає посилання на вбудовування нуклеїнової кислоти в еукаріотичну або прокаріотичну клітину, де нуклеїнова кислота може вбудовуватися в геном клітини (наприклад, в хромосомну, плазмідну, пластидну або мітохондріальну ДНК), перетворюватися на автономний реплікон, в якості частини мініхромосоми, або тимчасово експресуватися (наприклад, трансфікована мРНК).

[045] Як застосовується в даному документі, вираз "пакет генів" стосується введення двох або більше генів у геном організму. У певних аспектах даного винаходу може бути бажаним здійснювати стекінг будь-якого гену, пов'язаного з абіотичним стресом (наприклад, білки холодового шоку, гени, пов'язані з реакцією ABA), з T6PP, що описана в даному документі. Аналогічно, також може бути бажаним здійснювати стекінг генів трегалозного шляху, як описано в даному документі, з генами, що забезпечують витривалість до впливу комах, витривалість до хвороб, збільшену врожайність або будь-яку іншу сприятливу ознаку (наприклад, збільшену висоту рослини тощо), відому у даній галузі техніки. Альтернативно, у трансгенних рослин, що містять модифікований ген трегалозного шляху, можна здійснювати стекінг з алелями нативної ознаки, які забезпечують додаткові ознаки, такі як поліпшене використання води, підвищена витривалість до хвороб і подібне. В одному варіанті здійснення у рослин, які експресують модифіковані гени трегалозного шляху, здійснюють стекінг з алелями, які описані в WO2011/079277. Можна здійснювати стекінг ознак шляхом введення касет експресії із множинними генами або розмноження/схрещування рослин з однією або декількома ознаками з іншими рослинами, які мають одну або декілька додаткових ознак.

[046] Вираз "виділений" стосується матеріалу, такого як нуклеїнова кислота або білок, який головним чином або практично не містить компонентів, що звичайно супроводжують його або

взаємодіють з ним при знаходженні його в природному оточенні. Виділений матеріал необов'язково містить матеріал, що не зустрічається разом з матеріалом у його природному оточенні. Нуклеїнові кислоти, які є "виділеними", як визначено в даному документі, також називають "гетерологічними" нуклеїновими кислотами. Якщо інше не заявлене, то вираз

"нуклеїнова кислота NUE" означає нуклеїнову кислоту, яка містить полінуклеотид ("полінуклеотид NUE"), що кодує поліпептид NUE повної або часткової довжини.

[047] Як застосовується в даному документі, "нуклеїнова кислота" включає посилання на дезоксирибонуклеотидний або рибонуклеотидний полімер у формі одинарного або подвійного ланцюга та, якщо немає обмежень, охоплює відомі аналоги, які мають основну властивість

природних нуклеотидів, оскільки вони гібридизуються з одностанцюговими нуклеїновими кислотами в такий спосіб, що аналогічний нуклеотидам, які зустрічаються в природі (наприклад, пептидні нуклеїнові кислоти).

[048] Під "бібліотекою нуклеїнових кислот" розуміють сукупність виділених молекул ДНК або РНК, які в одному випадку включають основну представленість всієї частини генома певного організму, яка транскрибується. Про конструювання ілюстративних бібліотек нуклеїнових кислот, таких як бібліотеки геномних та кДНК, повідомляється в стандартній літературі з молекулярної біології, такий як Berger and Kimmel, (1987) Guide To Molecular Cloning Techniques, із серії Methods in Enzymology, vol. 152, Academic Press, Inc., San Diego, Calif.; Sambrook, et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vols. 1-3; і Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, et al., eds, Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc. (1994 Supplement). В іншому випадку "бібліотеку нуклеїнових кислот", як визначено в даному документі, можна також розуміти як таку, що представляє бібліотеки, які містять передбачену частину, або скоріше, які фактично представляють не весь геном певного організму. Наприклад, малі РНК, мРНК і метильована ДНК. Бібліотека нуклеїнових кислот, як визначається в даному документі, може також охоплювати варіанти конкретної молекули (наприклад, сукупність варіантів для конкретного білка).

[049] Як застосовується в даному документі, "функціонально пов'язаний" включає посилання на функціональний зв'язок між першою послідовністю, такою як промотор, і другою послідовністю, де промоторна послідовність ініціює й опосередковує транскрипцію ДНК, що відповідає другій послідовності. Звичайно "функціонально пов'язаний" означає, що послідовності нуклеїнових кислот, які є пов'язаними, є суміжними та, якщо є необхідність об'єднати дві області, що кодують білок, вони є суміжними та перебувають в одній рамці читування.

[050] Як застосовується в даному документі, вираз "рослина" включає посилання на цілі рослини, органи рослини (наприклад, листки, стебла, корені тощо), насіння й рослинні клітини та їхнє потомство. Рослинна клітина, як застосовується в даному документі, включає без обмеження насіння, суспензійні культури, зародки, меристематичні ділянки, калюсну тканину, листки, корені, пагони, гаметофіти, спорофіти, пилок і мікроспори. Клас рослин, які можна застосовувати в способах за даним винаходом, як правило, настільки широкий, як клас вищих рослин, які піддаються методикам трансформації, включаючи як однодольні, так і дводольні рослини, у тому числі види з родів: Cucurbita, Rosa, Vitis, Juglans, Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon, Nicotiana, Solanum, Petunia, Digitalis, Majorana, Cichorium, Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Heterocallis, Nemesis, Pelargonium, Panium, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browaalia, Glycine, Pisum, Phaseolus, Lolium, Oryza, Avena, Hordeum, Secale, Allium і Triticum. Особливо переважною рослиною є Zea mays.

[051] Як застосовується в даному документі, "врожайність" може включати посилання на бушелі на акр зернових культур при збиранні, з поправкою на вологість зерна (для маїсу, наприклад, типово становить 15 %), та об'єм утвореної біомаси (для кормових культур, таких як люцерна, й розмір коренів рослини для сільськогосподарських культур, що дають кілька врожаїв на рік). Вологість зерна вимірюють у зерні при збиранні. Скориговану натурну вагу зерна визначають як вагу у фунтах на бушель, з поправкою на рівень вологості зерна при збиранні. Біомасу вимірюють як вагу утвореного придатного для збирання рослинного матеріалу. На врожайність можуть впливати багато властивостей, у тому числі без обмеження висота рослини, кількість бобів, положення боба на рослині, кількість міжвузлів, частота розтріскування бобів, розмір зерна, ефективність утворення бульбочок і фіксації азоту, ефективність асиміляції поживних речовин, асиміляції вуглецю, структура рослини, відсоток проростання насіння, міць сходів і ювенільні ознаки. На врожайність також може впливати ефективність проростання

(включаючи проростання в стресових умовах), швидкість росту (включаючи швидкість росту в стресових умовах), кількість качанів, кількість насіння на качан, розмір насіння, склад насіння (крохмаль, олія, білок) і характеристики наливу насіння. Врожайність рослини можна вимірювати різними способами, включаючи натурну вагу, кількість насіння на рослину, вагу насіння, кількість насіння на одиницю площі (тобто насіння, або вага насіння на акр), у бушелях на акр, тоннах на акр або кілограмах на гектар. Наприклад, урожайність кукурудзи можна вимірювати як вихід обмолочених кукурудзяних зерен на одиницю продуктивної площі, наприклад, у бушелях на акр або метричних тоннах на гектар, про що часто повідомляють на основі поправки на вологість, наприклад, на вологість 15,5 відсотка. Більше того, бушель кукурудзи визначається за законом штату Айова як 56 фунтів за вагою, при цьому корисний коефіцієнт перетворення для врожаю кукурудзи такий: 100 бушелів на акр еквівалентні 6,272 метричної тонни на гектар. В даній галузі техніки загальноприйнятими на практиці є й інші вимірювання врожайності. У певних варіантах здійснення даного винаходу врожайність може бути збільшена в стресових умовах та/або безстресових умовах.

[052] Як застосовується в даному документі, "полінуклеотид" включає посилання на дезоксирибopolінуклеотид, рибopolінуклеотид або їхні аналоги, які мають основну властивість природного рибонуклеотиду, оскільки вони гібридизуються за жорстких умов гібридизації з практично такою самою нуклеотидною послідовністю, як і нуклеотиди, що зустрічаються в природі, та/або забезпечують трансляцію в таку саму амінокислоту(и), як і нуклеотид(и), що зустрічається в природі. Полінуклеотид може бути нативним або гетерологічним структурним або регуляторним геном повної довжини або його підпослідовністю. Якщо не зазначене інше, вираз включає посилання на певну послідовність, а також її комплементарну послідовність. Таким чином, ДНК або РНК із каркасами, модифікованими задля стабільності або з інших причин, являють собою "полінуклеотиди", як цей вираз передбачений в даному документі. Більше того, ДНК або РНК, що містять незвичайні основи, такі як інозин, або модифіковані основи, такі як тритильовані основи, наведені лише два приклади, є полінуклеотидами, як даний вираз застосовують у даному документі. Слід розуміти, що у відношенні ДНК і РНК була зроблена велика різноманітність модифікацій, які слугують для багатьох корисних цілей, відомих фахівцям у даній галузі. Вираз "полінуклеотид", як він застосовується в даному документі, охоплює такі хімічно, ферментативно або метаболічно модифіковані форми полінуклеотидів, а також хімічні форми ДНК і РНК, що характерні для вірусів і клітин, включаючи серед іншого прості й складні клітини.

[053] Вирази "поліпептид", "пептид" і "білок" застосовуються в даному документі взаємозамінно для позначення полімеру з амінокислотних залишків. Вираз застосовують до амінокислотних полімерів, у яких один або декілька амінокислотних залишків є штучним хімічним аналогом відповідної амінокислоти, що зустрічається в природі, а також до полімерів з амінокислот, що зустрічаються в природі.

[054] Як застосовується у даному документі, "промотор" включає посилання на ділянку ДНК вище від початку транскрипції та залучений у розпізнавання й зв'язування РНК-полімерази й інших білків для ініціації транскрипції. "Рослинний промотор" являє собою промотор, здатний ініціювати транскрипцію в рослинних клітинах. Ілюстративні рослинні промотори включають без обмеження такі, які одержують із рослин, рослинних вірусів і бактерій, що містять гени, які експресуються в рослинних клітинах, такі як *Agrobacterium* або *Rhizobium*. Прикладами є промотори, які переважно ініціюють транскрипцію в певних тканинах, таких як листки, корені, насіння, жилки, судини ксилеми, трахеїди або склеренхіма. Такі промотори називають "тканинопереважними". Специфічний для "типу клітин" промотор у першу чергу управляє експресією в певних клітинних типах в одному або декількох органах, наприклад, клітинах провідної тканини у коренях або листках. Промотор, "який індукується" або "який регулюється", являє собою промотор, що перебуває під контролем навколишнього середовища. Приклади умов навколишнього середовища, які можуть впливати на транскрипцію за допомогою промоторів, які індукуються, включають анаеробні умови або наявність світла. Іншим типом промотора є промотор, що регулюється стадією розвитку, наприклад, промотор, який управляє експресією під час розвитку пилку. Тканинопереважні, специфічні для типу клітин промотори, промотори, що регулюються стадією розвитку, й промотори, які індукуються, складають клас "неконститутивних" промоторів. "Конститутивний" промотор являє собою промотор, який є активним в більшості клітин за більшості умов навколишнього середовища.

[055] Будь-яка придатна промоторна послідовність може застосовуватися у конструкті з нуклеїнових кислот за даним винаходом. Згідно з деякими варіантами здійснення даного винаходу промотор являє собою конститутивний промотор, тканинспецифічний промотор, або промотор, що індукується абіотичним стресом.

[056] Придатні конститутивні промотори включають, наприклад, промотор 35S CaMV (SEQ ID NO:1546; Odell et al., Nature 313:810-812, 1985); промотор At6669 Arabidopsis (SEQ ID NO:1652; див. РСТ публікацію № WO04081173A2); Ubi 1 маїсу (Christensen et al., Plant Mol. Biol. 18:675-689, 1992); актину рису (McElroy et al., Plant Cell 2:163-171, 1990); pEMU (Last et al., Theor. Appl. Genet. 81:581-588, 1991); 19S CaMV (Nilsson et al., Physiol. Plant 100:456-462, 1997); GOS2 (de Pater et al., Plant J November; 2(6):837-44, 1992); убіквітину (Christensen et al., Plant Mol. Biol. 18: 675-689, 1992); циклофіліну рису (Bucholz et al., Plant Mol Biol. 25(5):837-43, 1994); гістону H3 маїсу (Lepetit et al., Mol. Gen. Genet. 231: 276-285, 1992); актину 2 (An et al., Plant J. 10(1):107-121, 1996), конститутивний промотор кореневого кінчика CT2 (SEQ ID NO:1535; див. також РСТ заявку № IL/2005/000627) і синтетичний Super MAS (Ni et al., The Plant Journal 7: 661-76, 1995). Інші конститутивні промотори включають описані в патентах США №№ 5659026, 5608149; 5608144; 5604121; 5569597; 5466785; 5399680; 5268463 і 5608142.

[057] Придатні тканиноспецифічні промотори включають, але без обмеження, специфічні для листків промотори [такі як описані, наприклад, Yamamoto et al., Plant J. 12:255-265, 1997; Kwon et al., Plant Physiol. 105:357-67, 1994; Yamamoto et al., Plant Cell Physiol. 35:773-778, 1994; Gotor et al., Plant J. 3:509-18, 1993; Orozco et al., Plant Mol. Biol. 23:1129-1138, 1993; і Matsuoka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:9586-9590, 1993], насінняпереважні промотори [наприклад, з специфічних для насіння генів (Simon, et al., Plant Mol. Biol. 5. 191, 1985; Scofield, et al., J. Biol. Chem. 262: 12202, 1987; Baszczynski, et al., Plant Mol. Biol. 14: 633, 1990), альбуміну бразильського горіха (Pearson' et al., Plant Mol. Biol. 18: 235-245, 1992), легуміну (Ellis, et al. Plant Mol. Biol. 10: 203-214, 1988), глютеліну (рис) (Takaiwa, et al., Mol. Gen. Genet. 208: 15-22, 1986; Takaiwa, et al., FEBS Letts. 221: 43-47, 1987), зеїну (Matzke et al., Plant Mol Biol, 143).323-32 1990), napA (Stalberg, et al., Planta 199: 515-519, 1996), SPA пшениці (Albanietal, Plant Cell, 9: 171-184, 1997), олеозину соняшника (Cummins, et al., Plant Mol. Biol. 19: 873-876, 1992)], специфічні для ендосперму промотори [наприклад, LMW і HMW пшениці, глютеніну-1 (Mol Gen Genet 216:81-90, 1989; NAR 17:461-2), гліадинів a, b і g пшениці (EMBO3:1409-15, 1984), промотор ltrl ячменю, гордеїну B1, C, D ячменю (Theor Appl Gen 98:1253-62, 1999; Plant J 4:343-55, 1993; Mol Gen Genet 250:750-60, 1996), DOF ячменю (Mena et al., The Plant Journal, 116(1): 53-62, 1998), Biz2 (EP99106056.7), синтетичний промотор (Vicente-Carbajosa et al., Plant J. 13: 629-640, 1998), NRP33 проламіну рису, глобуліну Glb-1 рису (Wu et al., Plant Cell Physiology 39(8) 885-889, 1998), REB/OHP-1 альфа-глобуліну рису (Nakase et al. Plant Mol. Biol. 33: 513-S22, 1997), ADP-глюкози-PP рису (Trans Res 6:157-68, 1997), сімейства генів ESR маїсу (Plant J 12:235-46, 1997), гамма-кафірину copro (Plant Mol. Biol 32:1029-35, 1996)], специфічні для зародків промотори [наприклад, OSH1 рису (Sato et al., Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 93: 8117-8122), KNOX (Postma-Haarsma of al, Plant Mol. Biol. 39:257-71, 1999), олеозину рису (Wu et at, J. Biochem., 123:386, 1998)] і специфічні для квіток промотори [наприклад, AtPRP4, халкон-синтази (chsA) (Van der Meer, et al., Plant Mol. Biol. 15, 95-109, 1990), LAT52 (Twell et al., Mol. Gen Genet. 217:240-245; 1989), апетала-3; репродуктивних тканин рослини [наприклад, промотори OsMADS (заявка на патент США № 2007/0006344)].

[058] Придатні промотори, що індукуються абіотичним стресом, включають, але без обмеження, промотори, що індукуються сіллю, такі як RD29A (Yamaguchi-Shinozalei et al., Mol. Gen. Genet. 236:331-340, 1993); промотори, що індукуються посухою, такі як промотор гена rab17 маїсу (Pla et. al., Plant Mol. Biol. 21:259-266, 1993), промотор гена rab28 маїсу (Busk et. al., Plant J. 11:1285-1295, 1997) і промотор гена lvr2 маїсу (Pelleschi et. al., Plant Mol. Biol. 39:373-380, 1999); промотори, що індукуються тепловим впливом, такі як промотор білка теплового шоку hsp 80 томата (патент США № 5187267).

[059] Мається на увазі, що вираз "ферментативна активність" включає деметилування, гідроксилювання, епоксидування, N-окиснення, сульфокиснення, N-, S- і O-деалкілювання, десульфатацію, деамінування й відновлення азо, нітро й N-оксидних груп. Вираз "нуклеїнова кислота" стосується дезоксирибонуклеотидного або рибонуклеотидного полімеру в одноланцюговій або дволанцюговій формі, або сенсового або антисенсового, і якщо немає інших обмежень, який охоплює відомі аналоги природних нуклеотидів, що гібридизуються з нуклеїновими кислотами способом, подібними такому у нуклеотидів, що зустрічаються в природі. Якщо не зазначене інше, конкретна послідовність нуклеїнової кислоти включає її комплементарну послідовність.

[060] "Структурний ген" являє собою таку частину гена, що містить сегмент ДНК, який кодує білок, поліпептид або його частину, та виключає 5'-послідовність, що управляє ініціацією транскрипції. Альтернативно, структурний ген може кодувати продукт, який не транслюється. Структурний ген може являти собою ген, який у нормі зустрічається в клітині, або ген, який у нормі не зустрічається в клітині або місці в клітині, куди його вводять, у випадку чого його

називають "гетерологічним геном". Гетерологічний ген може походити повністю або частково від будь-якого джерела, відомого в даній галузі техніки, включаючи бактеріальний геном або епісому, еукаріотичну, ядерну або плазмідну ДНК, кДНК, вірусну ДНК або хімічно синтезовану ДНК. Структурний ген може містити одну або декілька модифікацій, які можуть впливати на біологічну активність або її характеристики, біологічну активність або хімічну структуру продукту експресії, швидкість експресії або спосіб контролю експресії. Такі модифікації включають без обмеження мутації, вставки, делеції й заміни одного або декількох нуклеотидів. Структурний ген може бути безперервною кодуючою послідовністю, або він може включати один або декілька інтронів, обмежених відповідними точками сплайсингу. Структурний ген може бути таким, що трансліюється, або таким, що не трансліюється, в тому числі геном в антисенсовій орієнтації. Структурний ген може бути складеним з сегментів, що отримані з декількох джерел і з декількох генних послідовностей (таких, що зустрічаються в природі, або синтетичних, де синтетичною називається ДНК, яка є хімічно синтезованою).

[061] "Отриманий з" використовують у значенні взятий, здобутий, одержаний, виведений, реплікований або такий, що походить із джерела (хімічного та/або біологічного). Похідне можна одержувати за допомогою хімічної або біологічної маніпуляції (включаючи, але без обмеження, заміну, додавання, вставку, делецію, екстракцію, виділення, мутацію та реплікацію) вихідного джерела.

[062] "Хімічно синтезована" відносно послідовності ДНК означає, що частини складових нуклеотидів збирали *in vitro*. Неавтоматизований хімічний синтез ДНК може здійснюватися із застосуванням загальноприйнятих процедур (Caruthers, *Methodology of DNA and RNA Sequencing*, (1983), Weissman (ed.), Praeger Publishers, New York, Chapter 1); автоматизований хімічний синтез можна проводити із застосуванням одного з ряду комерційно доступних інструментів.

[063] Як застосовується в даному документі, "рекомбінантний" включає посилання на клітину або вектор, який був модифікований шляхом уведення гетерологічної нуклеїнової кислоти, або посилання на те, що клітина отримана із клітини, модифікованої в такий спосіб. Таким чином, наприклад, рекомбінантні клітини експресують гени, які не зустрічаються в такій самій формі в нативній (нерекомбінантній) формі клітини, або експресують нативні гени, які в інших випадках експресуються аномально, надекспресуються або не експресуються взагалі внаслідок навмисного втручання людини, або можуть мати знижену або пригнічену експресію нативного гена. Вираз "рекомбінантний", як застосовується в даному документі, не охоплює зміну клітини або вектора за допомогою подій, що зустрічаються в природі (наприклад, спонтанної мутації, природної трансформації/трансдукції/транспозиції), таких як події, що відбуваються без навмисного втручання людини.

[064] Як застосовується в даному документі, вираз "касета експресії" являє собою конструкт нуклеїнової кислоти, утворений рекомбінантно або синтетично, з серії певних елементів нуклеїнових кислот, який робить можливою транскрипцію конкретної нуклеїнової кислоти в цільовій клітині. Касета експресії може бути вбудована в плазмідну, хромосомну, мітохондріальну ДНК, пластидну ДНК, фрагмент вірусу або нуклеїнової кислоти. Типово, частина касети експресії у векторі експресії включає серед інших послідовностей нуклеїнову кислоту, що підлягає транскрипції, і промотор.

[065] Вирази "залишок", або "амінокислотний залишок", або "амінокислота" використовуються в даному документі взаємозамінно для позначення амінокислоти, яка вбудовується у білок, поліпептид або пептид (узагальнено "білок"). Амінокислота може являти собою амінокислоту, що зустрічається в природі, та, якщо немає інших обмежень, може включати відомі аналоги природних амінокислот, які можуть функціонувати способом, подібним такому в амінокислот, що зустрічаються в природі.

[066] Вираз "селективно гібридизується" включає посилання на гібридизацію, за жорстких умов гібридизації, послідовності нуклеїнової кислоти з певною цільовою послідовністю нуклеїнової кислоти в помітно більшому ступені (наприклад, щонайменше в 2 рази в порівнянні з фоновим рівнем), ніж її гібридизація з нецільовими послідовностями нуклеїнової кислоти і з істотним виключенням нецільових нуклеїнових кислот. Послідовності, що селективно гібридизуються, як правило, мають приблизно щонайменше 40 % ідентичність послідовності, переважно 60-90 % ідентичність послідовності та найбільш переважно 100 % ідентичність послідовності (тобто, є комплементарними) одна одній.

[067] Вирази "жорсткі умови" або "жорсткі умови гібридизації" включають посилання на умови, за яких зонд буде гібридизуватися зі своєю цільовою послідовністю у помітно більшому ступені, ніж з іншими послідовностями (наприклад, щонайменше в 2 рази в порівнянні з фоновим рівнем). Жорсткі умови залежать від послідовності та будуть відрізнятися за різних

обставин. За допомогою контролю жорсткості умов гібридизації та/або відмивання можна ідентифікувати цільові послідовності, які можуть бути на 100 % комплементарні до зонду (гомологічне зондування). Альтернативно, умови жорсткості можна регулювати задля забезпечення деякої розбіжності у послідовностях, щоб виявляти більш низькі ступені

5 подібності (гетерологічне зондування). Оптимально, зонд має приблизно 500 нуклеотидів у довжину, але його довжина може значно варіювати від менш ніж 500 нуклеотидів до такої, що дорівнює повній довжині цільової послідовності.

[068] Як правило, жорсткі умови будуть такими, за яких концентрація солі становить менш ніж приблизно 1,5 М концентрацію іонів Na, типово приблизно 0,01–1,0 М концентрацію іонів Na (або інших солей) при pH 7,0–8,3, а температура становить щонайменше приблизно 30 °C для коротких зондів (наприклад, 10-50 нуклеотидів) і щонайменше приблизно 60 °C для довгих зондів (наприклад, більш ніж 50 нуклеотидів). Жорсткі умови можуть також досягатися шляхом додавання дестабілізуючих засобів, таких як формамід або розчин Денхардта. Ілюстративні умови низької жорсткості включають гібридизацію з буферним розчином із 30-35 % формаміду, 1 М NaCl, 1 % SDS (додецилсульфат натрію) при 37 °C і відмивання в $1 \times - 2 \times \text{SSC}$ ($20 \times \text{SSC} = 3,0$ М NaCl/0,3 М тринатрійцитрат) при 50-55 °C. Ілюстративні умови помірної жорсткості включають гібридизацію в 40-45 % формаміді, 1 М NaCl, 1 % SDS при 37 °C і відмивання в $0,5 \times - 1 \times \text{SSC}$ при 55-60 °C. Ілюстративні умови високої жорсткості включають гібридизацію в 50 % формаміді, 1 М NaCl, 1 % SDS при 37 °C і відмивання в $0,1 \times \text{SSC}$ при 60-65 °C. Специфічність типово залежить від постгібридизаційних відмивань, причому критичними факторами є іонна сила й температура кінцевого розчину для відмивання. Для гібридів ДНК-ДНК T_m можна приблизно розрахувати з рівняння Meinkoth and Wahl, (1984) Anal. Biochem., 138:267-84: $T_m = 81,5 ^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% \text{GC}) - 0,61 (\% \text{форм.}) - 500/L$; де М являє собою молярність моновалентних катіонів, % GC являє собою процентне відношення гуанозинових і цитозинових нуклеотидів у ДНК, % форм. являє собою процент формаміду в розчині гібридизації, і L являє собою довжину гібрида у парах основ. T_m являє собою температуру (за певної іонної сили й pH), за якої 50 % комплементарної цільової послідовності гібридизується з абсолютно співпадаючим зондом. T_m знижують на приблизно 1 °C для кожного 1 % розбіжності; таким чином, T_m , умови гібридизації та/або відмивання можна регулювати для гібридизації з послідовностями необхідної ідентичності.

10 Наприклад, якщо бажаними є послідовності з >90 % ідентичністю, то T_m можна знизити на 10 °C. Загалом, жорсткі умови вибирають так, щоб вони були на приблизно 5 °C нижче, ніж температурна точка плавлення (T_m) для конкретної послідовності та комплементарної до неї послідовності при заданій іонній силі й pH. Однак за умов сильної жорсткості можуть використовуватися гібридизація та/або відмивання при температурі на 1, 2, 3 або 4 °C нижче, ніж температурна точка плавлення (T_m); за умов помірної жорсткості можуть використовуватися гібридизація та/або відмивання при температурі на 6, 7, 8, 9 або 10 °C нижче, ніж температурна точка плавлення (T_m); за умов низької жорсткості можуть використовуватися гібридизація та/або відмивання при температурі на 11, 12, 13, 14, 15 або 20 °C нижче, ніж температурна точка плавлення (T_m). Застосовуючи рівняння, склади для гібридизації й відмивання та необхідну T_m , фахівцям буде очевидно, що варіації у жорсткості гібридизації та/або розчинах відмивання практично описані. Якщо необхідний ступінь розбіжності дає в результаті T_m меншу ніж 45 °C (водний розчин) або 32 °C (розчин формаміду), віддають перевагу збільшенню концентрації SSC таким чином, щоб можна було застосувати більш високу температуру. Докладний посібник з гібридизації нуклеїнових кислот можна знайти в Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, part I, chapter 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," Elsevier, New York (1993); і Current Protocols in Molecular Biology, chapter 2, Ausubel, et al., eds, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995). Якщо не зазначене інше, у даній заявці високу жорсткість визначають як гібридизацію в $4 \times \text{SSC}$, $5 \times$ розчині Денхардта (5 г фіколу, 5 г полівінілпіролідону, 5 г альбуміну бичачої сироватки в 500 мл води), 0,1 мг/мл кип'яченої ДНК з молоком лососевих і 25 мМ фосфату натрію при 65 °C і відмивання в $0,1 \times \text{SSC}$, 0,1 % SDS при 65 °C.

[069] Як застосовується в даному документі, "трансгенна рослина" включає посилання на рослину, яка містить у своєму геномі гетерологічний полінуклеотид. Як правило, гетерологічний полінуклеотид стабільно інтегрований у геном, так що полінуклеотид передається наступним поколінням. Гетерологічний полінуклеотид може бути інтегрований у геном окремо або як частина рекомбінантної касети експресії. "Трансгенний", як застосовується у даному документі, включає будь-яку клітину, клітинну лінію, калюс, тканину, частину рослини або рослину, генотип яких був змінений через наявність гетерологічної нуклеїнової кислоти, включаючи трансгенні організми, початково змінені таким чином, а також трансгенні організми, отримані шляхом

статевих схрещувань або безстатевого розмноження з початкових трансгенних організмів. Вираз "трансгенний", як застосовується в даному документі, не охоплює зміну генома (хромосомного або позахромосомного) за допомогою традиційних способів селекції рослин або за допомогою подій, що зустрічаються в природі, таких як випадкове перехресне запилення, 5
нерекомбінантна вірусна інфекція, нерекомбінантна бактеріальна трансформація, нерекомбінантна транспозиція або спонтанна мутація.

[070] Як застосовується в даному документі, "вектор" включає посилання на нуклеїнову кислоту, яку застосовують у трансфекції клітини-хазяїна, та у яку можна ввести полінуклеотид. Вектори найчастіше є репліконами. Вектори експресії забезпечують транскрипцію нуклеїнової 10
кислоти, уведеної в них.

[071] "Надекспресія" стосується рівня експресії в трансгенних організмах, який перевищує рівні експресії в нормальних або нетрансформованих організмах.

[072] "Рослинна тканина" включає диференційовані та недиференційовані тканини рослин, включаючи, але без обмеження, корені, стебла, пагони, листки, пилок, насіння, пухлинну 15
тканину й різні форми клітин, а також культури, такі як окремі клітини, протопласт, зародки й калюсна тканина. Рослинна тканина може знаходитись в рослинах або в органі, культурі тканин або клітин.

[073] "Переважаючою експресією", "переважаючою транскрипцією" або "переважаючою транскрипцією" взаємозамінно називають експресію генних продуктів, які переважно 20
експресуються на більш високому рівні в одній або декількох рослинних тканинах (просторове обмеження) і/або на одній або декількох стадіях розвитку рослини (часове обмеження), тоді як в інших тканинах/стадіях розвитку має місце відносно низький рівень експресії.

[074] "Первинним трансформантом" і "поколінням T0" називають трансгенні рослини, які належать до того самого генетичного покоління, що і тканина, яка була першочергово 25
трансформована (тобто такі, що не проходять через мейоз і запліднення після трансформації). "Вторинними трансформантами" і "поколіннями T1, T2, T3 тощо" називають трансгенні рослини, що отримані з первинних трансформантів шляхом одного або декількох мейотичних циклів і циклів запилення. Вони можуть отримуватись шляхом самозапилення первинних або вторинних трансформантів або схрещувань первинних або вторинних трансформантів з іншими 30
трансформованими або нетрансформованими рослинами.

[075] "Селективним маркерним геном" називають ген, експресія якого в рослинній клітині надає клітині селективної переваги. Селективна перевага, яку мають клітини, трансформовані за допомогою селективного маркерного гена, може бути обумовлена їхньою здатністю до росту в присутності негативного селективного засобу, такого як антибіотик або гербіцид, у порівнянні 35
зі здатністю до росту нетрансформованих клітин. Селективна перевага, яку мають трансформовані клітини, може також бути обумовлена їхньою посиленою здатністю, у порівнянні з нетрансформованими клітинами, використовувати додану сполуку як поживну речовину, фактор росту або джерело енергії. Селективна перевага, яку має трансформована клітина, може також бути обумовлена втратою гена, який був у неї раніше, в так званій 40
"негативній селекції". При цьому додають сполуку, що є токсичною лише для клітин, які не втратили специфічний ген (негативний селективний маркерний ген), присутній у батьківській клітині (типово, трансген).

[076] Вираз "трансформація" стосується перенесення фрагмента нуклеїнової кислоти в геном клітини-хазяїна, що приводить до генетично стабільного успадкування. "Тимчасово трансформованими" називають клітини, у які були введені трансгени й чужорідна ДНК 45
(наприклад, за допомогою таких способів, як опосередкована *Agrobacterium* трансформація або біолістичне бомбардування), але які не відбирали для стабільного зберігання. "Стабільно трансформованими" називають клітини, які були відібрані й регенеровані на селекційному середовищі після трансформації.

[077] "Трансформованим/трансгенним/рекомбінантним" називають організм-хазяїн, такий як бактерія або рослина, у який була введена молекула гетерологічної нуклеїнової кислоти. Молекула нуклеїнової кислоти може бути стабільно інтегрованою в геном хазяїна, або молекула нуклеїнової кислоти також може бути присутня у якості позахромосомної молекули. Така 50
позахромосомна молекула може бути здатна до самореплікації. Передбачається, що трансформовані клітини, тканини або рослини охоплюють не лише кінцевий продукт процесу трансформації, але також їхнє трансгенне потомство. "Нетрансформованим", "нетрансгенним" або "нерекомбінантним" хазяїном називають організм дикого типу, наприклад, бактерію або рослину, яка не містить молекулу гетерологічної нуклеїнової кислоти.

[078] Вираз "трансляційна енхансерна послідовність" стосується такої частини послідовності 60
ДНК гена між промотором і кодуючою послідовністю, яка транскрибується в РНК і наявна у

повністю процесованій мРНК вище (5') трансляційного старт-кодону. Трансляційна ехансерна послідовність може впливати на процесінг первинного транскрипта в мРНК, стабільність мРНК або ефективність трансляції. "Візуально помітним маркером" називають ген, експресія якого не забезпечує перевагу трансформованій клітині, але може зробити так, що її можна виявляти або візуально помічати. Приклади візуально помітних маркерів включають без обмеження β -глюкуронідазу (GUS), люциферазу (LUC) і зелений флюоресцентний білок (GFP).

[079] "Диким типом" називають нормальний ген, вірус або організм, які зустрічаються в природі без будь-якої мутації або модифікації.

[080] Як застосовується в даному документі, "рослинний матеріал", "частина рослини" або "рослинна тканина" означає рослинні клітини, протопласти рослин, тканинні культури рослинних клітин, з яких можна регенерувати рослини, калюси рослин, рослини, що мають спільну кореневу систему, і рослинні клітини, які є інтактними в рослинах або частинах рослин, таких як зародки, пилки, насінні зачатки, насіння, листки, квітки, гілки, плоди, зерна, качани, стрижні кукурудзяних качанів, оболонки, стебла, корені, кореневі кінчики, пиляки, бульби, ризоми й подібне.

[081] Як застосовується в даному документі, "білковим екстрактом" називають частковий або загальний білок, екстрагований із частини рослини. Способи екстракції рослинного білка добре відомі в даній галузі техніки.

[082] Як застосовується в даному документі, "зразком рослини" називають або інтактну, або неінтактну (наприклад, розмелену тканину насіння або рослини, порубану тканину рослини, ліофілізовану тканину) рослинну тканину. Це також може бути екстракт, що містить інтактну або неінтактну тканину насіння або рослини.

[083] Наступні вирази застосовують для опису відношень послідовностей між двома або більшою кількістю нуклеїнових кислот, або полінуклеотидів, або поліпептидів: (a) "еталонна послідовність", (b) "вікно порівняння", (c) "ідентичність послідовностей", (d) "процент ідентичності послідовностей" і (e) "істотна ідентичність".

[084] Як застосовується в даному документі, "еталонна послідовність" являє собою задану послідовність, яку застосовують у якості основи для порівняння послідовностей. Еталонна послідовність може являти собою частину певної послідовності або певну послідовність повністю; наприклад, у вигляді сегмента послідовності кДНК або генної послідовності повної довжини або повної послідовності кДНК або генної послідовності.

[085] Як застосовується в даному документі, "вікно порівняння" включає посилання на безперервний і визначений сегмент полінуклеотидної послідовності, у якому полінуклеотидна послідовність може порівнюватися з еталонною послідовністю, та де частина полінуклеотидної послідовності у вікні порівняння може містити додавання або делеції (тобто гепи) у порівнянні з еталонною послідовністю (яка не містить додавання або делеції) для оптимального вирівнювання двох послідовностей. Як правило, вікно порівняння становить щонайменше 20 суміжних нуклеотидів у довжину та необов'язково може мати 30, 40, 50 і 100 або більше. Фахівцям у даній галузі зрозуміло, що для уникнення високої подібності з еталонною послідовністю внаслідок включення гепів у полінуклеотидну послідовність зазвичай вводиться штраф за введення гепів й віднімається від числа збігів.

[086] В даній галузі техніки добре відомі способи вирівнювання нуклеотидних і амінокислотних послідовностей для порівняння. Алгоритм локальної гомології (BESTFIT) Smith and Waterman, (1981) Adv. Appl. Math 2:482, може здійснювати оптимальне вирівнювання послідовностей для порівняння; за допомогою алгоритму гомологічного вирівнювання (GAP) Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443-53; за допомогою способу пошуку за подібністю (Tfasta and Fasta) Pearson and Lipman, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444; за допомогою комп'ютеризованих реалізацій цих алгоритмів, включаючи, але без обмеження: CLUSTAL у програмі PC/Gene від Intelligenetics, Mountain View, Calif., GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA і TFASTA у пакеті програмного забезпечення Wisconsin Genetics, версія 8 (доступна від Genetics Computer Group (програми GCG® (Accelrys, Inc., San Diego, Calif.)). Програма CLUSTAL добре описана Higgins and Sharp, (1988) Gene 73:237-44; Higgins and Sharp, (1989) CABIOS 5:151-3; Corpet, et al., (1988) Nucleic Acids Res. 16:10881-90; Huang, et al., (1992) Computer Applications in the Biosciences 8:155-65; і Pearson, et al., (1994) Meth. Mol. Biol. 24:307-31. Кращою програмою для застосування у оптимальному глобальному вирівнюванні множинних послідовностей є PileUp (Feng and Doolittle, (1987) J. Mol. Evol., 25:351-60, яка аналогічна способу, описаному Higgins and Sharp, (1989) CABIOS 5:151-53, і включена в даний документ за допомогою посилання). Сімейство програм BLAST, які можна застосовувати для пошуків за подібністю в базах даних, включає: BLASTN для нуклеотидних запитуваних послідовностей відносно бази даних нуклеотидних послідовностей; BLASTX для нуклеотидних запитуваних

послідовностей відносно бази даних білкових послідовностей; BLASTP для білкових запитуваних послідовностей відносно бази даних білкових послідовностей; TBLASTN для білкових запитуваних послідовностей відносно бази даних нуклеотидних послідовностей і TBLASTX для нуклеотидних запитуваних послідовностей відносно бази даних нуклеотидних послідовностей. Див. *Current Protocols in Molecular Biology*, розділ 19, Ausubel et al., eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995).

[087] GAP застосовує алгоритм Needleman and Wunsch, вище, для знаходження вирівнювання двох повних послідовностей, яке максимізує число збігів і мінімізує число гепів. GAP розглядає всі можливі вирівнювання й положення гепів і створює вирівнювання з найбільшим числом основ, що збіглися, і найменшою кількістю гепів. Вона дає змогу ввести штраф за введення гепів й штраф за продовження гепів в одиницях основ, що збіглися. GAP повинен отримувати вигоду від числа штрафів за введення гепів за рахунок збігів для кожного гепів, який він уводить. Якщо вибирають штраф за продовження гепів більше ніж нуль, то GAP повинен, крім того, отримувати вигоду від кожного введеного гепів у розмірі довжини гепів, помноженої на штраф за продовження гепів. Значення за замовчуванням штрафу за введення гепів й значення штрафу за продовження гепів у версії 10 пакета програмного забезпечення Wisconsin Genetics становлять 8 і 2, відповідно. Штрафи за введення гепів й продовження гепів можуть виражатися як ціле число, яке вибрано з групи цілих чисел, що складається з 0-100. Таким чином, наприклад, штрафи за введення гепів й продовження гепів можуть являти собою 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40 і 50 або більше.

[088] GAP є одним членом сімейства найкращих вирівнювань. Може існувати багато членів цього сімейства, але жоден інший член не має кращої якості. GAP відображає чотири показники оцінки вирівнювань: якість, співвідношення, ідентичність і подібність. Якість являє собою показник, максимізований для вирівнювання послідовностей. Співвідношення являє собою якість, поділену на число основ у коротшому сегменті. Відсоток ідентичності являє собою відсоток символів, які фактично збігаються. Відсоток подібності являє собою відсоток символів, які є подібними. Символи, які знаходяться навпроти гепів, не враховують. Подібність підраховують, коли значення у матриці заміни для пари символів становить більше або дорівнює 0,50, граничному значенню подібності. Матрицею заміни, яка застосовується у версії 10 пакета програмного забезпечення Wisconsin Genetics, є BLOSUM62 (див., Henikoff and Henikoff, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915).

[089] Якщо не зазначене інше, значеннями ідентичності/подібності послідовностей, представленими в даному документі, називають значення, що отримані із застосуванням пакета програм BLAST 2.0 із застосуванням параметрів за замовчуванням (Altschul, et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402).

[090] Як буде зрозуміло фахівцям у даній галузі, пошуки за допомогою BLAST припускають, що білки можуть моделюватися як випадкові послідовності. Проте, більшість існуючих білків містять ділянки з не випадковими послідовностями, які можуть являти собою гомополімерні тракти, короткоперіодичні повтори або ділянки, доповнені однією або декількома амінокислотами. Такі ділянки низької складності можуть вирівнюватися між неспорідненими білками, навіть якщо інші ділянки білка є повністю несхожими. Ряд програм-фільтрів для ділянок низької складності можна застосовувати з метою зменшення таких вирівнювань низької складності. Наприклад, фільтри для низької складності SEG (Wooten and Federhen, (1993) *Comput. Chem.* 17:149-63) і XNU (Claverie and States, (1993) *Comput. Chem.* 17:191-201) можна застосовувати окремо або в комбінації.

[091] Як застосовується в даному документі, "ідентичність послідовностей" або "ідентичність" у контексті двох послідовностей нуклеїнової кислоти або поліпептидних послідовностей включає посилання на залишки у двох послідовностях, які є однаковими при вирівнюванні для максимальної відповідності на певному вікні порівняння. Коли відсоток ідентичності послідовностей застосовують по відношенню до білків, слід усвідомлювати, що положення залишків, які не є ідентичними, часто відрізняються консервативними амінокислотними замінами, де амінокислотні залишки замінені на інші амінокислотні залишки з подібними хімічними властивостями (наприклад, зарядом або гідрофобністю) і, внаслідок цього, не змінюють функціональні властивості молекули. Якщо послідовності відрізняються за консервативними замінами, то відсоток ідентичності послідовностей можна регулювати у бік підвищення, зробивши поправку на консервативну природу заміни. Про послідовності, що відрізняються за такими консервативними замінами, говорять, що вони мають "подібність послідовностей" або "подібність". Засоби для здійснення такого регулювання добре відомі фахівцям у даній галузі. Типово це включає виставлення балу консервативній заміні як частковій, а не повній розбіжності, тим самим збільшуючи процент ідентичності послідовностей.

Таким чином, наприклад, якщо ідентичній амінокислоті виставляють бал 1, а неконсервативній заміні виставляють бал нуль, то консервативній заміні виставляють бал від нуля до 1. Виставлення балів консервативним замінам розраховують, наприклад, згідно з алгоритмом Meyers and Miller, (1988) Computer Applic. Biol. Sci. 4:11-17, наприклад, як реалізовано в

програмі PC/GENE (Intelligenetics, Маунтін Вью, Каліфорнія, США).
 [092] Як застосовується в даному документі, "відсоток ідентичності послідовностей" означає значення, яке визначають за допомогою порівняння двох оптимально вирівняних послідовностей у вікні порівняння, де частина полінуклеотидної послідовності у вікні порівняння може містити додавання або делеції (тобто гепи) у порівнянні з еталонною послідовністю (яка не містить додавань або делецій) для оптимального вирівнювання двох послідовностей. Процент розраховують шляхом визначення числа положень, у яких ідентична основа нуклеїнової кислоти або амінокислотний залишок зустрічається в обох послідовностях з одержанням числа положень, що збіглися, ділення числа положень, що збіглися, на загальне число положень у вікні порівняння й множення результату на 100 з одержанням відсотка ідентичності послідовностей.

[093] Вираз "істотна ідентичність" полінуклеотидних послідовностей означає, що полінуклеотид містить послідовність, яка має 50-100 % ідентичність послідовностей, переважно щонайменше 50 % ідентичність послідовностей, переважно щонайменше 60 % ідентичність послідовностей, переважно щонайменше 70 %, більш переважно щонайменше 80 %, більш переважно щонайменше 90 % і найбільш переважно щонайменше 95 % у порівнянні з еталонною послідовністю, із застосуванням однієї з описаних програм вирівнювання із застосуванням стандартних параметрів. Фахівцю в даній галузі буде зрозуміло, що ці значення можуть бути відповідним чином скориговані для визначення відповідної ідентичності білків, які кодуються двома нуклеотидними послідовностями, із урахуванням виродженості кодонів, амінокислотної подібності, розташування рамки зчитування й подібного. Істотна ідентичність амінокислотних послідовностей для цих цілей зазвичай означає ідентичність послідовностей, що дорівнює 55-100 %, переважно щонайменше 55 %, переважно щонайменше 60 %, більш переважно щонайменше 70 %, 80 %, 90 % і найбільше переважно щонайменше 95 %.

[094] Іншою ознакою того, що нуклеотидні послідовності є суттєво ідентичними, є гібридизація двох молекул одна з одною за жорстких умов. Виродженість генетичного коду забезпечує більшість амінокислотних замінів, що ведуть до різноманітності в нуклеотидній послідовності, що кодує одну й ту саму амінокислоту, тому не виключено, що послідовність ДНК може кодувати такий самий поліпептид, але не гібридизуватися одна з одною за жорстких умов. Це може відбуватися, наприклад, коли копія нуклеїнової кислоти створюється із застосуванням максимальної виродженості кодону, дозволеної генетичним кодом. Одна ознака того, що дві послідовності нуклеїнової кислоти є суттєво ідентичними, заключається в тому, що поліпептид, який кодує перша нуклеїнова кислота, є імунологічно перехресним з поліпептидом, який кодує друга нуклеїнова кислота.

[095] Фраза "абіотичний стрес", як застосовується в даному документі, стосується будь-якого несприятливого ефекту на метаболізм, ріст, розмноження та/або життєздатність рослини з боку абіотичних факторів (тобто водозабезпеченості, теплового впливу, холоду і т.д.). Відповідно, абіотичний стрес може бути викликаний субоптимальними навколишніми умовами зростання, такими як, наприклад, засоленість, водне голодування, водний дефіцит, посуха, повінь, заморожування, низька або висока температура (наприклад, охолодження або надмірне нагрівання), забруднення токсичними хімічними речовинами, токсичність важких металів, анаеробіоз, недостатність поживних речовин, надлишок поживних речовин, атмосферне забруднення або УФ-опромінення.

[096] Фраза "стійкість до абіотичного стресу", як застосовується в даному документі, стосується здатності рослини витримувати абіотичний стрес, не зазнаючи істотної зміни в метаболізмі, рості, продуктивності та/або життєздатності.

[097] Як застосовується в даному документі, "водний дефіцит" означає період, коли вода, що є доступною для рослини, не поповнюється зі швидкістю, з якою вона поглинається рослиною. Тривалий період водного дефіциту в розмовній мові називається посухою. Відсутність дощу або зрошення миттєво може не призводити до стресу, викликаного нестачею води, якщо є доступний запас ґрунтових вод для підтримки швидкості росту рослин. Рослини, які вирощують в ґрунті з достатнім запасом ґрунтових вод, можуть переживати дні без дощу або зрошення без несприятливих впливів на врожайність. Рослини, які вирощують в сухому ґрунті, у випадку мінімальних періодів водного дефіциту, ймовірно, зазнають несприятливих впливів. Стрес, викликаний важким водним дефіцитом, може спричинити зів'янення й загибель рослин; помірна посуха може знижувати врожайність, заримувати ріст або стримувати розвиток. Рослини можуть

відновлюватися після декількох періодів стресу, викликаного водним дефіцитом, без істотного впливу на врожайність. Однак водний дефіцит під час запилення може зменшувати або знижувати врожайність. Таким чином, корисним періодом у життєвому циклі кукурудзи, наприклад, для спостереження за реакцією або стійкістю до водного дефіциту, є пізня вегетативна стадія росту перед появою волоті або перехід до розвитку репродуктивних органів. Стійкість до водного дефіциту визначають шляхом порівняння з контрольними рослинами. Наприклад, рослини за даним винаходом можуть продукувати більш високий урожай, ніж контрольні рослини за умови впливу водного дефіциту. У лабораторії та у польових випробуваннях посуху можна імітувати шляхом надання рослинам за даним винаходом й контрольним рослинам меншої кількості води, ніж надають контрольним рослинам з достатнім рівнем поливу, й визначення відмінностей в ознаках. Наприклад, урожайність можна розділити на такі компоненти як рослин на акр, кількість рядів зерен на качан, кількість качанів на рослину, кількість зерен на рослину й вага на зерно. Безпліддя або зменшене утворення насіння може також підвищуватися за умов стресу, викликаного нестачею води. Один аспект даного винаходу передбачає рослини, які надекспресують гени, розкриті в даному документі, що забезпечують більш високу стійкість до водного дефіциту.

[098] Як застосовується в даному документі, фраза "оптимізація води" стосується будь-якого показника рослини, його частин або його структури, який можна виміряти та/або кількісно визначати, щоб оцінити ступінь або швидкість росту й розвитку рослин за різних умов водозабезпеченості. У зв'язку із цим, "ознака оптимізації води" являє собою будь-яку ознаку, яка, як можна показати, впливає на врожайність рослини за різних поєднань умов росту, пов'язаних з водозабезпеченістю. Ілюстративні показники оптимізації води являють собою врожайність зерна за стандартного відсотка вологості (YGSMN), вологість зерна при збиранні (GMSTP), вагу зерна на ділянку (GWTPN) і процентне відновлення врожаю (PYREC).

[099] Як застосовується в даному документі, фрази "посухостійкість" і "посухостійкий" стосуються здатності рослин витримувати та/або успішно розростатися за умов, коли водозабезпеченість є субоптимальною. Як правило, рослину відмічають як "посухостійку", якщо вона проявляє "посилену посухостійкість". Як застосовується в даному документі, фраза "посилена посухостійкість" стосується вимірюваного поліпшення, посилення або збільшення одного або декількох фенотипів оптимізації води в порівнянні з однією або декількома контрольними рослинами.

[0100] Коефіцієнт використання води (WUE) являє собою параметр, який часто застосовують для оцінки співвідношення між поглинанням води й уловлюванням CO₂/ростом (Kramer, 1983, *Water Relations of Plants*, Academic Press p. 405). WUE визначали і вимірювали численними способами. Один підхід полягає в обчисленні відношення сухої ваги цілої рослини до ваги води, яку рослина поглинала протягом свого життя (Chu et al., 1992, *Oecologia* 89:580). Інший варіант полягає в застосуванні більш короткого часового інтервалу, коли вимірюються накопичення біомаси й використання води (Mian et al., 1998, *Crop Sci.* 38:390). Інший підхід полягає у використанні вимірювань від окремих частин рослини, наприклад, вимірювання росту і використання води лише надземних частин (Nienhuis et al 1994 *Amer J Bot* 81:943). WUE також був визначений як відношення уловлювання CO₂ до втрати води листком або частиною листка за рахунок випаровування, що часто вимірюється протягом дуже короткого періоду часу (наприклад, секунди/хвилини) (Kramer, 1983, p. 406). Відношення 13C/12C, зафіксованого в рослинній тканині та виміряного за допомогою мас-спектрометра для вимірювання співвідношення ізотопів, також застосовувалося для оцінки WUE у рослин, які застосовують C-3 фотосинтез (Martin et al., 1999, *Crop Sci.* 1775). Як застосовується в даному документі, вираз "коефіцієнт використання води" стосується кількості органічних речовин, продукованих рослиною, поділеної на кількість води, використаної рослиною при їх продукуванні, тобто сухої ваги рослини по відношенню до використання рослиною води. Як застосовується в даному документі, вираз "суха вага" стосується будь-чого у рослині, за винятком води, і включає, наприклад, вуглеводи, білки, олії й мінеральні поживні речовини. Передбачається, що трансгенні рослини, отримані за допомогою способів, описаних у даному документі, будуть забезпечувати збільшення коефіцієнта використання води.

[0101] Фраза "біотичний стрес", як застосовується в даному документі, стосується будь-якого несприятливого ефекту на метаболізм, ріст, розмноження та/або життєздатність рослини з боку біотичних факторів (тобто тиск з боку комах, захворювання тощо).

[0102] Фраза "стійкість до біотичного стресу", як застосовується в даному документі, стосується здатності рослини витримувати біотичний стрес, не зазнаючи істотної зміни у метаболізмі, рості, розмноженні та/або життєздатності.

[0103] Як застосовується в даному документі, фраза "рослинна біомаса" стосується кількості (яку вимірюють в грамах повітряно-сухої або сухої тканини) тканини, отриманої від рослини у вегетаційний період, яка може також визначати або впливати на врожайність рослин або врожайність на площу вирощування.

5 [0104] Як застосовується в даному документі, фраза "міць рослин" стосується кількості (яку вимірюють за вагою) тканини, продукуючої рослиною за визначений час. Отже, збільшена міць може визначати або впливати на врожайність рослин або врожайність за час вирощування або на площі вирощування.

10 [0105] Вираз "рання міць" стосується активного здорового добре збалансованого росту особливо під час ранніх стадій росту рослини, і вона може бути результатом кращої пристосованості рослини внаслідок того, наприклад, що рослини є краще адаптованими до свого навколишнього середовища (оптимізують використання джерел енергії й розподіляють між пагоном й коренем). Рослини, що мають ранню міць, також демонструють підвищене виживання сходів і краще вкорінення сільськогосподарської культури, що часто приводить до

15 вельми однорідних полів (наприклад, сільськогосподарської культури, що ростуть однаковим чином, а саме, сільськогосподарської культури, що досягають різних стадій розвитку в фактично один і той самий час) і часто до більш високих урожаїв. Отже, ранню міць можна визначати за допомогою вимірювання різних факторів, таких як вага тисячі зерен, відсоткове проростання, відсоток появи сходів, ріст сходів, висота сходів, довжина кореня, біомаса кореня й пагона та

20 багато іншого.

[0106] Як застосовується в даному документі, "міць сходів" стосується характеристики рослини, згідно якої рослина з'являється з ґрунту швидше, має підвищену швидкість проростання (тобто, проростає швидше), має більш швидкий і більш масштабний ріст сходів і/або проростає швидше в умовах холоду в порівнянні з диким типом або контролем за

25 аналогічних умов. Міць сходів часто визначали як таку, що включає властивості насіння, які визначають "потенціал для швидкої, однорідної появи й розвитку нормальних сходів у широкому діапазоні польових умов".

[0107] Життєвий цикл квітучих рослин в цілому можна розділити на три фази росту: вегетативну фазу, фазу бутонізації й фазу цвітіння (пізня фаза бутонізації). У вегетативній фазі

30 апікальна меристема пагона (SAM) утворює листки, які пізніше будуть забезпечувати джерела, необхідні для створення фертильного потомства. Після одержання відповідних сигналів від навколишнього середовища й сигналів стадії розвитку рослина переходить до росту квітки, або до репродуктивного росту, і SAM вступає у фазу бутонізації (I) і дає початок суцвіттю з зачатками квіток. Під час цієї фази напрямок розвитку SAM і вторинних пагонів, які виникають у

35 пазухах листків, визначається набором генів ідентичності меристем, деякі з яких запобігають, а деякі з яких стимулюють розвиток квіткових меристем. Як тільки вони з'являються, рослина входить у пізню фазу бутонізації, коли формуються органи квітки. Якщо присутні відповідні сигнали навколишнього середовища й сигнали стадії розвитку, рослина переходить до росту квітки, або репродуктивного росту. Якщо такі сигнали порушуються, рослина не буде здатною

40 розпочинати репродуктивний ріст, а отже, підтримуватиме вегетативний ріст.

[0108] Термін "ідіоплазма" стосується генетичного матеріалу особини (наприклад, рослини), групи особин (наприклад, лінії, сорту або родини рослин), або клону, отриманого з лінії, сорту, виду або культури. Ідіоплазма може бути частиною організму або клітини, або може бути відділена від організму або клітини. Як правило, ідіоплазма забезпечує генетичний матеріал зі

45 специфічним молекулярним складом, який забезпечує фізичну основу для деяких або всіх спадкових якостей організму або культури клітин. Як застосовується в даному документі, "ідіоплазма" включає клітини, насіння або тканини, з яких можуть вирости нові рослини або частини рослин, такі як листки, стебла, пилок або клітини, з яких можна виростити цілу рослину.

[0109] Антитіла за даним винаходом включають поліклональні й моноклональні антитіла та їхні суміші, які можуть являти собою будь-які з IgG, IgA, IgM, IgE, IgD і будь-який їхній ізотип, наприклад, IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4. У випадку моноклонального антитіла ілюстративним

50 класом антитіл є IgG. Підкласи IgG включають, наприклад, IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4. Антитіла включають інтактні й химерні молекули імуноглобулінів з двома важкими ланцюгами повної довжини й двома легкими ланцюгами повної довжини (наприклад, зріла частина послідовностей варіабельної ділянки важкого й легкого ланцюгів), а також підпослідовності/фрагменти важкого або легкого ланцюга, які зберігають щонайменше частково функцію (наприклад, специфічність зв'язування Т6РР або афінність зв'язування Т6РР) батьківського інтактного антитіла, що специфічно зв'язує Т6РР і, зокрема, модифіковану Т6РР. Підпослідовності можуть мати таку ж

55 або практично таку саму специфічність зв'язування, афінність зв'язування, як і батьківські інтактні й химерні антитіла.

60

[0110] Одержання моноклональних або поліклональних антитіл може здійснюватися за допомогою методик, які добре відомі у даній галузі техніки. "Поліклональні" антитіла являють собою антитіла, отримані з різних В-клітинних джерел. Вони є комбінацією молекул імуноглобулінів, які секретують специфічний антиген, кожний з яких ідентифікує окремий епітоп.

5 Поліклональні антитіла типово одержують за допомогою інокуляції придатного ссавця, такого як миша, кролик або коза. Наприклад, композицію, що містить білок Т6РР, який здатний продукувати антиген, ін'єкційно вводять ссавцю. Присутність нового білка індукуює В-лімфоцити продукувати імуноглобуліни IgG, специфічні до антигену Т6РР. Поліклональні імуноглобуліни IgG потім очищають з сироватки ссавця.

10 [0111] Вираз "моноклональне антитіло", як застосовується в даному документі, стосується препарату з молекул антитіл з одним молекулярним складом. Моноклональне антитіло проявляє одну специфічність і афінність зв'язування до конкретного епітопу. Спосіб одержання моноклональних антитіл включає одержання імунних соматичних клітин з потенціалом до продукування антитіл, зокрема, В-лімфоцитів, які були попередньо імунізовані за допомогою антигену, що становить інтерес, *in vivo* або *in vitro* і які є придатними для злиття з лінією В-клітинної мієломи.

[0112] Лімфоцити ссавців типово імунізують шляхом *in vivo* імунізації тварини (наприклад, миші) за допомогою необхідного білка або поліпептиду, наприклад, за допомогою Т6РР за даним винаходом. Такі імунізації повторюють при необхідності з інтервалами до декількох тижнів для одержання достатнього титру антитіл. Після імунізації тварини можна застосовувати в якості джерела лімфоцитів, що продукують антитіла. Після останньої бустер-ін'єкції антигену тварин умертвляють і видаляють клітини селезінки. Лімфоцити мишей забезпечують більш високий відсоток стабільного злиття з лініями мієломи миші, які описані в даному документі. З них миша BALB/c є переважною. Проте, інші лінії мишей, кролика, хом'яка, вівцю й жабу також можна застосовувати в якості хазяїв для одержання клітин, що продукують антитіла. Див.; Goding (в *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2d ed., pp. 60-61, Orlando, Fla., Academic Press, 1986).

[0113] Переважно зливаються такі клітини, що продукують антитіла, які перебувають на стадії плазмобласта, що ділиться. Соматичні клітини можна отримувати з лімфатичних вузлів, селезінки і периферичної крові тварин, які підлягали первинному впливу антигена, а переважні лімфатичні клітини залежать великою мірою від їхньої емпіричної ефективності в конкретній системі злиття. Лімфоцити, що секретують антитіла, потім піддають злиттю з (мишачими) клітинами В-клітинної мієломи або трансформованими клітинами, які здатні до необмеженого розмноження в культурі клітин, з одержанням, тим самим, безсмертної клітинної лінії, що секретує імуноглобулін. Отримані злиті клітини, або гібридоми, культивують і отримані колонії піддають скринінгу щодо продукування необхідних моноклональних антитіл. Колонії, що продукують такі антитіла, клонують і вирощують *in vivo* або *in vitro* для одержання великих кількостей антитіла. Опис теоретичної основи й практичної методології злиття таких клітин викладений в Kohler and Milstein, *Nature* 256:495 (1975), яка включена в даний документ за допомогою посилання.

[0114] Збільшена врожайність сільськогосподарської культури являє собою ознаку, що представляє значний економічний інтерес в усьому світі. Врожайність зазвичай визначають як вимірюваний підсумок економічної цінності сільськогосподарської культури. Вона може визначатися у формі кількості та/або якості. Врожайність безпосередньо залежить від декількох факторів, наприклад, числа й розміру органів, структури рослини (наприклад, числа гілок), утворення насіння, старіння листків та іншого. Розвиток кореня, поглинання поживних речовин, стресостійкість і рання міць також можуть бути важливими факторами при визначенні урожайності. Крім того, у сільському господарстві дуже бажаною є розробка сільськогосподарських культур, які можуть демонструвати збільшену врожайність за оптимальних умов росту, а також за неоптимальних умов росту (наприклад, при посуші, в умовах абіотичного стресу). Таким чином, оптимізація вищезгаданих факторів може вносити вклад у підвищення врожайності сільськогосподарських культур.

[0115] Урожайність насіння є особливо важливою ознакою, оскільки насіння багатьох рослин важливе для харчування людей і тварин. Сільськогосподарські культури, такі як кукурудза, рис, пшениця, канولا і соя, забезпечують більше половини загальної кількості калорій, які споживає людина, або через пряме споживання насіння як такого, або через споживання сільськогосподарських тварин, вигодованих переробленим насінням. Насіння рослин також є джерелом цукрів, олій і багатьох видів метаболітів, які застосовуються у різних промислових процесах. Насіння складається з зародка (джерела нових пагонів і коренів) і ендосперму (джерела поживних речовин для росту зародка під час проростання та під час раннього росту

сходів). До розвитку насіння залучені багато генів, і він потребує перенесення метаболітів від кореня, листків і стебел до насіння, що розвивається. Ендосперм асимілює метаболічні попередники вуглеводів, олій і білків і синтезує з них запасні макромолекули для наливання зерна.

5 [0116] Рання міць являє собою інший важливий аспект урожайності. Поліпшення ранньої міці являє собою важливу мету сучасних програм селекції рису в культиварів рису як помірного, так і тропічного пояса. Довгі корені важливі для надійного закріплення в ґрунті рису, що висаджується у воду. Рис, що висаджується у воду, висівають безпосередньо на затоплені поля, де рослини повинні швидко з'явитися з води, тому більш довгі пагони забезпечують збільшене виживання молодих сходів. Якщо практикують посів рядками, для задовільної появи сходів важливі більш довгі мезокотилі та колеоптилі. Можливість розробки у рослин ранньої міці матиме велике значення в сільському господарстві. Наприклад, слабка рання міць стала обмеженням для введення гібридів маїсу (*Zea mays* L.), які основані на ідіоплазмі з Кукурудзяного пояса США в Атлантичній частині Європи. В іншому аспекті рання міць може також забезпечувати більш ранні періоди збирання деяких сільськогосподарських культур, що може служити перевагою в багатьох сільськогосподарських застосуваннях.

10 [0117] Рослини, розроблені для поліпшеної врожайності за умов різних біотичних і абіотичних стресів, становлять особливий інтерес в галузі сільського господарства. Наприклад, абіотичний стрес є основною причиною втрати врожаю в усьому світі, знижуючи середні рівні врожайності найбільш важливих культурних рослин більш ніж на 50 % (Wang et al., *Planta* (2003) 218: 1-14). Абіотичні стреси можуть спричинятися посухою, повеннями, засоленістю, екстремальними значеннями температури, хімічною токсичністю й окисним стресом. Можливість поліпшення стійкості рослин до абіотичного стресу буде мати велику економічну перевагу для фермерів в усьому світі та буде забезпечувати культивування сільськогосподарських культур під час несприятливих умов, а також на територіях, де культивування сільськогосподарських культур іншим способом неможливе.

15 [0118] У деяких випадках урожайність рослини визначають відносно кількості рослинної біомаси, яку може продукувати конкретна рослина. Більша рослина з більшою площею листків, як правило, може поглинати більше світла, поживних речовин і вуглекислого газу, ніж менша рослина, а отже, ймовірно, буде прибавляти більшу вагу протягом такого самого періоду (Fasoula & Tollenaar 2005 *Maydica* 50:39). Збільшена рослинна біомаса може також бути дуже бажаною в таких процесах, як перетворення біомаси (наприклад, кукурудзи, трав, сорго, очерету) на паливо, таке як, наприклад, етанол або бутанол.

20 [0119] Можливість збільшення врожайності рослин матиме багато застосувань у таких галузях, як сільське господарство, одержання декоративних рослин, деревництво, садівництво, одержання біопалива, фармацевтика, ферментна промисловість, де використовують рослини як фабрики для цих молекул, і лісівництво. Збільшення врожайності може також знаходити застосування в одержанні мікробів або водоростей для застосування в біореакторах (для біотехнологічного одержання речовин, таких як фармацевтичні препарати, антитіла, вакцини, паливо, або для біологічного перетворення органічних відходів) та інших подібних галузях.

25 [0120] Селекціонери рослин часто зацікавлені у поліпшенні специфічних аспектів урожайності залежно від досліджуваної сільськогосподарської культури або рослини, а також частини цієї рослини або сільськогосподарської культури, які мають відносну економічну цінність. Наприклад, селекціонер рослин може очікувати конкретно на поліпшення рослинної біомаси (ваги) однієї або декількох частин рослини, які можуть включати надземні (придатні для збирання) частини та/або придатні для збирання частини під землею. Це особливо доречно там, де споживче значення мають надземні частини або підземні частини рослини. Для багатьох сільськогосподарських культур, особливо злаків, дуже бажане поліпшення врожайності насіння. Збільшена врожайність насіння може проявлятися багатьма шляхами, причому кожний окремий аспект урожаності насіння має різну важливість для селекціонера рослин залежно від досліджуваної сільськогосподарської культури або рослини та її кінцевого застосування.

30 [0121] Для селекціонера рослин була б великою перевагою можливість підібрати та вибрати аспекти врожайності, які підлягають зміні. Також може бути дуже бажаною можливість підібрати ген, що підходить для зміни конкретного аспекту врожайності (наприклад, урожайності насіння, ваги біомаси, коефіцієнта використання води, врожайності при стресових умовах). Наприклад, збільшення швидкості наливу у комбінації зі збільшеною вагою тисячі зерен буде дуже бажаною для сільськогосподарської культури, такої як кукурудза. Для рису й пшениці буде дуже бажаною комбінація збільшеної швидкості наливу, процентного відношення маси врожаю до загальної маси рослин і збільшеної ваги тисячі зерен.

[0122] Трегалоза являє собою дуже стабільний дисахарид, що складається з двох молекул глюкози. Вона не розпадається при нагріванні до 100°C протягом 24 годин у широкому діапазоні рН. Її низька реакційна здатність, фізіохімічні властивості й стабільність роблять її винятковим осмопротектором. За відсутності води вона стабілізує білки, мембрани та інші клітинні структури, заміщуючи воду шляхом утворення водневих зв'язків з полярними залишками. Після висушування трегалоза утворює сітчасту склоподібну структуру, яка обмежує рух молекул, що запобігає агрегації білків і дифузії вільних радикалів (Brumfield G (2004) *Nature* 428:14-15, Paul MJ (2004) *Plant Biotechnol J*, 2 pp. 71–82).

[0123] Раніше вважалося, що лише певні рослини, такі як стійкі до висушування види, наприклад, рослини, що відроджуються, накопичують трегалозу, оскільки вони роблять це в значних кількостях, які легко виміряти. Проте, нещодавні генетичні й геномні дані показують, що всі рослини, досліджені до теперішнього часу, мають здатність синтезувати трегалозу, але, як правило, в дуже малих кількостях (Paul MJ, et al. (2008) *Annu Rev Plant Biol* 59:417-441). Більше того, виявилось, що метаболізм трегалози є вкрай важливим, тому що позбавлення рослини здатності продукувати трегалозу, наприклад, за допомогою мутації, є летальним (Eastmond PJ, et al. (2002) *Plant J* 29:225-235). Більшість видів сільськогосподарських культур містять слідові кількості трегалози (які вимірюються на низькому мікромолярному або навіть наномолярному рівні), хоча характерне для маїсу накопичення є невідомим.

[0124] "Трегалозний шлях", як застосовується в даному документі, складається із двох біосинтетичних ферментів, трегалоза-6-фосфатсинтази (TPS) і трегалоза-6-фосфатфосфатази (Т6РР), та одного гідролізуючого ферменту, трегалази, залученого у розпад, див. Фіг. 3. На даний час невідомо, скільки ізоформ (TPS) або (Т6РР) існує у маїсі. У модельній рослині *Arabidopsis* загалом налічується 11 генів TPS (Paul et al. (2008) *Annu Rev Plant Biol* 59:417-441), проте, каталітична активність була показана лише для AtTPS1 (Vandesteene L, et al. (2010) *Mol Plant* 3:406-419). Функція інших 10 гомологів TPS *Arabidopsis* залишається незрозумілою. В *Arabidopsis* існує 10 генів Т6РР, і хоча більшість не були добре охарактеризовані, усі вони, ймовірно, мають Т6РР активність (Schluepmann H, et al. (2012) *J Exp Bot*:1-12; Paul et al., (2008) *Annu Rev Plant Biol* 59:417-441). Навпаки, *Arabidopsis* містить лише один ген, що кодує трегалазу (Müller J, et al. (2001) *Plant Physiol* 125:1086-1093; Frison M, et al. (2007) *FEBS Letters* 581:4010-4016; Paul et al. 2008). Аналогічна ситуація спостерігається у рису (Shima S, et al. (2007) *FEBS J* 274:1192-1201; Zang et al, (2011) *Plant Mol Biol* 76:507-522). Дані визначення профілів експресії показують, що члени сімейства генів диференційно експресуються в ході розвитку рослини (Scheulpmann et al., (2004) *Plant Physiol* 135:879-890; Zang et al., (2011) *Plant Mol Biol* 76:507-522). Різноманітність тканиноспецифічної експресії й трансляції серед деяких членів сімейств генів Т6РР і TPS представляє явний доказ того, що ці ферменти здійснюють важливі й, можливо, різні функції в рослині (Satoh-Nagasawa et al., (2006) *Nature* 441:227-230; Mustroph et al., (2009) *Proc Natl Acad Sci USA* 106:18843-18848; Ramon et al., (2009) *Plant Cell Environ* 32:1015-1032).

[0125] Ферменти трегалозного шляху також регулюються на посттрансляційному рівні. Білки TPS являють собою субстрати для споріднених з неферментуючими сахарозу (SNF1) протеїнкіназами (SnRK1) (Zhang et al., (2009) *Plant Physiol* 149:1860-1871). Деякі фосфопротеїни TPS (AtTPS5, 6 & 7) зв'язують 14-3-3 білки (Harthill et al., (2006) *Plant J* 47:211-223). Координаційне фосфорилування й кепування сайту фосфорилування за допомогою 14-3-3 білків можуть являти собою можливий механізм, за допомогою якого регулюється активність TPS. Нітратредуктаза регулюється за допомогою аналогічного механізму, який базується на переході світло/темрява (Huber et al., (2002) *Plant Mol Biol* 50:1053-1063). Harthill et al. припускають, що усі з нітратредуктази, 6-фосфоглюкозо-2-кіназа/фруктоза-2,6-бісфосфатази (F2KP) і TPS модифікуються за допомогою однієї кінази (імовірно, SnRK1), зв'язують 14-3-3 білки та у деякій мері можуть регулюватися циклом світло/темрява (Harthill et al. (2006) *Plant J* 47:211-223).

[0126] Складність в експресії й регуляції дає вагомі підстави припускати, що білки в шляху метаболізму трегалози мають бути згруповані з ферментами, важливими для метаболізму рослини, які виконують як каталітичні, так і регуляторні функції. Їхня точна роль повністю не зрозуміла, але перспективну модель можна асоціювати з трьома головними функціями: передача сигналу за участю цукрів, розвиток рослин і захист від стресу.

[0127] Ґрунтуючись на опублікованих повідомленнях стосовно мікробіологічних систем (Wiemken, A. (1990) *J Gen Microbiol* 58:209-217), в яких стабілізація мембран та інші переваги корелюють із високими рівнями трегалози (1-10 % сухої ваги, г/г), ранні роботи з генетичної модифікації фокусувались на застосуванні трегалози в якості осмопротектора. Деякі опубліковані дослідження припускали, що трегалоза захищає рослини від посухи та інших

осмотичних стресів (Garg et al., (2002) PNAS 99:15898-15903; Paul et al., (2008) Annu Rev Plant Biol 59:417-441; Ge et al., 2008; Li et al., 2011). Проте, коли рівні трегалози вимірювали у трансгенних рослинах, розроблених для надмірного накопичення трегалози, було виявлено, що вони були дуже низькими, близько мікрограмів на грам сирової ваги. Філогенетична інформація також показує, що незважаючи на поширення в рослинах генів трегалозного шляху, лише невелике число рослин накопичує метаболіти трегалози на рівнях, необхідних для безпосередньої дії в якості осмопротектора або стабілізатора клітинних структур.

[0128] Діяльність у середині 1990-их з одержання трегалози в рослинах (для харчової промисловості) відрізнялася від діяльності з одержання у рослинах молекул інших "чужорідних" цукрів (Eastmond and Graham, (2003) Current Opin Plant Biol 6:231-235; Pellny et al. (2004) Plant Biotechnol J, 2 pp. 71–82; Paul M.J. (2007) Current Opinion in Plant Biology Volume 10, Issue 3, June, Pages 303–309). Зміна метаболізму трегалози в трансгенних рослинах часто призводила до неочікуваних плейотропних дефектів росту (Lordachescu and Imai, (2008) J Integrative Plant Biol 50:1223-1229).

[0129] P.J. Eastmond et al. першими показали незаперечну потребу в активному гені TPS рослини, TPS1 Arabidopsis, для розвитку зародка (Eastmond P.J. et al., (2002) Plant J 29:225-235). Гомозиготні tps1 мутанти не розвивалися до зрілого насіння. Schluepmann et al. показали, що tps1 мутант може бути врятований завдяки експресії гена otsA E. coli, що кодує трегалоза-6-фосфатсинтазу, що дозволяє припустити, що Т6Р є активним компонентом трегалозного шляху, який регулює метаболізм рослини. Концентрація Т6Р у рослинних клітинах є дуже низькою, що дозволяє припустити, що вона функціонує в якості сигнальної молекули (Schluepmann et al., (2004) Plant Physiol 135:879-890). Невелика зміна в її концентрації може мати істотний "гормоноподібний" ефект на регуляцію метаболічних процесів у рослині (Rolland et al. (2002) Plant Cell:S185-S205).

[0130] У нинішній час існує зростаюча кількість доказів для підтвердження залучення трегалозного шляху в передачу сигналів за участю цукрів, що є необхідним для всіх організмів. Це забезпечує регуляцію рівнів цукрів між крайніми значеннями великої кількості й нестачі (Eveland and Jackson, (2012) J Exp Bot:1-11). Наприклад, у ссавців регуляція рівнів цукру в крові за допомогою інсуліну є необхідною для підтримання оптимального стану здоров'я.

[0131] Концепція, згідно якої трегалозні цукри залучені в передачу сигналу цукрами й енергетичний статус, з'ясована у мікробів, зокрема дріжджів, і в цей час підтверджується у рослин (Schluepmann et al., (2012) J Exp Bot:1-12). У рослин Т6Р синтезується з G6P і UDPG, подальших продуктів розпаду сахарози. UDPG одержують безпосередньо за допомогою сахарозосинтази; G6P одержують з глюкози за допомогою інвертази й гексокінази або за допомогою фруктози й фруктоза-6-фосфату (F6P) за допомогою сахарозосинтази, фруктокінази та фосфоглюкозаізомерази. UDPG і G6P також являють собою два головні активовані попередники, з яких, зрештою, можуть бути отримані багато клітинних функціональних сполук (фігура 4). UDPG являється попередником для основних полісахаридів клітинної стінки та для гліколіпідів. G6P являється попередником для синтезу крохмалю, NADPH шляхом окисної частини пентозофосфатного шляху (Masakapalli S.K. et al., (2010) Plant Physiol 152:602-619), і АТР шляхом гліколізу, циклу Кребса й окисного фосфорилування. Крім того, G6P може бути перетворений на фруктоза-6-фосфат і, разом з UDPG, може застосовуватися для синтезу сахароза-6-фосфату, а потім сахарози. Будучи зробленим з UDPG і G6P, Т6Р перебуває на перетинах основних вуглеводних потоків у рослинах. Таким чином, рівні Т6Р у рослинних клітинах можуть відображати доступність гексозофосфатів, UDPG і сахарози.

[0132] Важливе відкриття показує, що Т6Р зв'язується з SnRK1 з інгібуванням її активності (Zhang et al., 2009) Plant Physiol 149:1860-1871), див. Фіг. 5. SnRK1 являє собою гетеротримерний білок та є рослинним гомологом протеїнкінази тварин, що активується AMP, та протеїнкінази дріжджів, що не ферментує сахарозу (SnF1) (Paul et (2008) Annu Rev Plant Biol 59:417-441; Schluepmann et al., (2012) J Exp Bot:1-12; Polge and Thomas (2007) Trends in Plant Science Volume 12, Issue 1, January 2007, Pages 20–28). Глобальна генна експресія в рослинах, які надекспресують ген субодиниці SnRK1, нагадує реакцію рослини на стрес, викликаний нестачею вуглецевої поживної речовини, або на енергетичний стрес, спричинений тривалим темновим періодом, інгібуванням фотосинтеза або зануренням у воду (Baena-González et al., (2007) Nature 448:938-942). Таким чином, збільшений рівень SnRK1 опосередковує реакції на стрес, викликаний низькою енергією. У той же час інактивація SnRK1 стимулює процеси, необхідні для утилізації та анаболізму вуглецю (фігура 6).

[0133] В Arabidopsis Т6Р був опосередкований асоційований NADPH-залежними процесами (Kolbe et al., (2005) PNAS 102:11118-11123). Рівні Т6Р в Arabidopsis мають тенденцію до обернено-пропорційної кореляції з рівнями G6P (Schluepmann et al., (2003) Proc Natl Acad Sci

USA 100:6849-6854) і прямої кореляції з рівнями сахарози (Martinez-Barajas et al., 2011). В *Arabidopsis* сахароза або трегалоза, що застосовуються для живлення, збільшують рівні Т6Р і активують включення вуглецю в крохмаль, що являє собою використання вуглецю для запасання. Т6Р залучений в окисно-відновну активацію АРПази в гетеротрофних тканинах (Schleupmann et al., (2012) J Exp Bot:1-12). Крім того, АРПаза істотно активується за допомогою опосередкованого тіоредоксином відновлення, якщо рівні Т6Р збільшені за допомогою експресії трансгена. Фермент NADPH-тіоредоксинредуктаза С (NTRC) використовує NADPH для окисно-відновної активації АРПази. Мутанти за NTRC не реагують на живлення трегалозою, що дозволяє припустити, що Т6Р діє на фермент NTRC або попередній елемент у шляху окисно-відновної активації АРПази. Розглядаючи разом, Т6Р функція у рослинах впливає на енергетичну передачу сигналу, а також окисно-відновну передачу сигналу за допомогою NADPH; Т6Р необхідний, оскільки він контролює доступність NADPH – субстрату для відновного біосинтезу. Проте механізми, за допомогою яких Т6Р проявляє свій вплив на залежну від NADPH окисно-відновну передачу сигналу, у рослин невідомі. Природа залучення SnRK1 в цьому випадку невідома (Schleupmann et al., (2012) J Exp Bot:1-12). SnRK1 необхідна для активації АРПази (Kolbe et al., (2005) PNAS 102:11118-11123) і, очевидно, є активною як вище, так і нижче Т6Р в окисно-відновній активації АРПази в гетеротрофних тканинах.

[0134] Т6Р є необхідним метаболітом, тому що він контролює доступність субстрату для росту. Ріст сходів *Arabidopsis* інгібується, якщо їх вирощують на середовищах з трегалозою, і ефект послаблюється при живленні сахарозою та трегалозою. Було показано, що зупинка росту на трегалозі викликається накопиченням Т6Р; інгібування трегалози корелює з 10-кратним збільшенням Т6Р (Schleupmann et al., (2004) Plant Physiol 135:879-890). Інгібування росту сходів *Arabidopsis* пов'язане зі значним накопиченням крохмалю в сім'ядолях. Навпаки, у корневих кінчиках не показано типове накопичення крохмалю. Живлення сходів трегалозою порушує розподіл вуглецю, при цьому весь вуглець залишається в його джерелі - сім'ядолях, та спостерігається помітне вуглецеве голодування у верхівках. Проте, активація за допомогою Т6Р АРПази та включення вуглецю в крохмаль не є причиною інгібування росту. Навпаки, інгібування активності SnRK1 за допомогою Т6Р, як було показано, викликає інгібування росту на трегалозі, оскільки сходи, які надекспресували каталітичну субодиницю (KIN10) SnRK1, росли на трегалозі (Delatte et al., (2011) Plant Physiol 157:160-174). Таким чином, очевидно, сходи перестають рости на трегалозі, оскільки накопичення Т6Р інгібує активність SnRK1.

[0135] Це може здаватися парадоксальним, що як у край малу кількість Т6Р, як у *tps1* мутанта, так і в край велику кількість Т6Р за відсутності вуглецю, що надається екзогенно, зупиняє ріст рослини. Механізм, за допомогою якого Т6Р/SnRK1 здійснює контроль за метаболізмом у рослині, далекий від розуміння. Проте, не обмежуючись теорією, у гетеротрофних тканинах кількість Т6Р збільшується, коли доступна сахароза. Збільшення кількості Т6Р інгібує активність SnRK1 таким чином, що клітини можуть переключатися на анаболічні процеси, необхідні для росту. Коли знижуються рівні сахарози або доступність вуглецю, то знижується рівень Т6Р, знімаючи контроль з активності SnRK1; при цьому анаболічні процеси інгібуються. Також відомо, що активність SnRK1 активується під час реакцій на вуглецевий і енергетичний стрес (фігура 6). SnRK1 сприймає сигнал про низький рівень енергії або вуглецю та опосередковує процеси, необхідні для того, щоб зробити вуглець доступним у клітинах-реципієнтах для росту. Активність SnRK1 необхідна, доки вуглець не стане знову доступним у гетеротрофних тканинах. Потім синтезується сахароза, а рівень Т6Р збільшується достатньою мірою, щоб інгібувати активність SnRK1.

[0136] Даний шлях передачі сигналу за допомогою Т6Р/SnRK1 жодним чином не є універсальним. В *Arabidopsis* зв'язування Т6Р з SnRK1 потребує усе ще невловимої розчинної білкової молекули, фактора 1 (Zhang et al., (2009) Plant Physiol 149:1860-1871), яку не можна виявити в зрілому листку. Крім того, субодиниці комплексу SnRK1 гетерогенно розподілені в рослинних тканинах (Bitrián et al., (2011) Plant J 65:829-842). Гетерогенність, таким чином, очікується при інгібуванні SnRK1 за допомогою Т6Р у гетеротрофних тканинах і фотоавтотрофних тканинах (Bitrián et al., (2011) Plant J 65:829-842). Також Т6Р є зарядженим метаболітом і, тому, навряд чи вільно експортується в інші клітини (Schleupmann et al., (2012) J Exp Bot:1-12).

[0137] Генетичні та біохімічні дані показують, що трегалозний шлях є необхідним для розвитку рослин і контролює клітинний морфогенез. Втрата ферментативної активності TPS1 в *Arabidopsis* є летальною для зародків (Eastmond et al., (2002) Plant J 29:225-235; Paul et al., (2008) Annu Rev Plant Biol 59:417-441). Був встановлений зв'язок експресії AtTPS1 зі специфічними характерними для стадії розвитку фенотипами, такими як уповільнений розвиток зародка, змінений ріст кореня і пагона і змінений перехід до цвітіння. Дані показують, що

відсутність Т6Р послабляє здатність зародка до переходу у фазу розвитку з поділом клітин (Paul et al., (2008) Annu Rev Plant Biol 59:417-441).

[0138] У маїсу RAMOSA3 (RA3), який є важливим для розгалуження суцвіття, кодує білок Т6РР, що складається з одного домену (Satoh-Nagasawa et al. (2006) Nature 441:227-230).

5 Уважається, що експресія Т6РР в ділянках, що оточують пазушні меристеми, може сприяти передачі рухливого сигналу, що має короткий діапазон, для регуляції ідентичності та детермінованості меристеми. Втрата RA3 активності викликає важкі аномалії качанів, які включають довгі пазушні пагони в основі качана на ранньому розвитку (Eveland & Jackson (2012) J Exp Bot:1-11).

10 [0139] Chary et al. описує ідентифікацію мутанта з фенотипом-1 форми клітини (csp-1) *Arabidopsis thaliana*. CSP-1 демонструє велику кількість дефектів у процесах розвитку рослини, наприклад, довжині стебла рослини, морфології листка, розвитку кореня, зменшеному розгалуженні пагонів і вповільненому цвітінні (Chary et al. (2008) Plant Physiol 146: 97-107). Мутація була виявлена в гені AtTPS6. Це забезпечує істотний доказ, вказуючий на те, що ген

15 TPS є важливим модифікатором клітинної морфології та розвитку всієї рослини. Незрозуміло, який механізм дії лежить в основі цих серйозних впливів на розвиток. Можливо, що вони, щонайменше частково, опосередковані шляхом передачі сигналу за допомогою Т6Р/SnRK1.

[0140] Т6Р у більшості зразків маїсу присутній у концентрації <10 мкг/GFW, що ускладнює точне вимірювання Т6Р. Крім того, сімейство генів Т6РР маїсу подібне за розміром з таким для

20 рису та *Arabidopsis*, а природнє накопичення Т6РР є високим у більшості тканин. Це дозволяє припустити, що трансгенна експресія Т6РР рису в маїсі, ймовірно, проявляє свій ефект просторовим і часовим способом.

[0141] На даний час виявлено, що експресія деяких форм трегалоза-6-фосфатфосфатази (Т6РР) у рослинах забезпечує істотне збільшення врожайності, а також забезпечує витривалість

25 до різних типів стресу (тобто абіотичного стресу). Під час проведення аналізів різних варіантів Т6РР, які трансгенно експресуються в рослинах, було виявлено, що трансгенні рослини, які демонструють найвищу врожайність насіння, також містили Т6РР з модифікаціями в амінокислотних залишках, що пов'язані зі зв'язуванням із субстратом. Не обмежуючись теорією, ці білки можуть мати знижену ферментативну активність при прямому порівнянні з Т6РР, що не

30 містить таких модифікацій. Більше того, не обмежуючись теорією, ймовірно, що експресія у рослині Т6РР з модифікованою ферментативною активністю приводить до кращого фенотипу, який характеризується істотно збільшеною врожайністю як в польових стресових умовах (наприклад, при посуші), так і в польових безстресових умовах. До того ж, не обмежуючись теорією, це дозволяє припускати, що менш активна форма Т6РР служить у якості

35 молекулярного сигналу, тим самим забезпечуючи в рослині збільшення крохмалю, цукру та збільшену врожайність насіння. Теоретично, цей молекулярний сигнал може являти собою білок-білкову взаємодію із трегалоза-6-фосфатсинтазою (TPS) з утворенням комплексу, який потім може передавати сигнал рослині. Теоретично, цим сигналом можуть бути змінені рівні трегалоза-6-фосфату (Т6Р). Не обмежуючись теорією, одна можливість полягає в тому, що

40 модифікована Т6РР при експресії в рослині утворює білок-білковий комплекс із ендегенними формами TPS і/або Т6РР. Теоретично, це зв'язування змінює здатність Т6РР гідролізувати її субстрат Т6Р і активує або регулює TPS для одержання Т6Р. Ця взаємодія у подальшому забезпечує змінені рівні Т6Р, який потім подає сигнал рослині запасати більшу кількість цукрів у насінні та/або біомасі. Альтернативно, але не обмежуючись теорією, модифікована Т6РР, що

45 має знижену активність, взаємодіє з деяким іншим компонентом, поки ще не з'ясованим, що приводить до ініціації каскаду, який подає сигнал рослині запасати більшу кількість цукрів у врожаї та/або біомасі. Грунтуючись на викладених вище теоріях, для одержання рослини зі збільшеною врожайністю за будь-яких умов можна застосовувати багато способів. Також передбачається, що для регуляції продукування цукрів у рослині можна застосовувати описані в

50 даному документі способи та додатково застосовувати методики молекулярної інженерії для транспорту цукрів у різні частини рослин для збільшення, наприклад, таких показників, як рослинна біомаса, урожайність насіння, вміст цукру в надземному рослинному матеріалі (тобто такому як цукровий очерет), а також у придатні для споживання частини рослин. Додатково ці гени трегалоза-6-фосфатфосфатази можуть знайти застосування в забезпеченні багатьох

55 більш бажаних ознак, таких як рання міць, стресостійкість, посухостійкість, збільшений коефіцієнт використання поживних речовин, збільшена маса коренів та збільшений коефіцієнт використання води.

[0142] Трегалоза являє собою нередукуючий дисахарид, що складається з двох молекул глюкози, з'єднаних за допомогою альфа-1,1 зв'язків. Цукор трегалозу можна виявити у багатьох

60 різних організмах багатьох царств (наприклад, рослини, бактерії, комахи і т.д.). Було показано,

що трегалоза залучена у функцію запасання вуглеводів, і додатково була пов'язана з тим, що відіграє роль у стресостійкості бактерій, грибів і комах. У рослин, як уважалося спочатку, трегалоза містилася лише в екстремофілах, таких як рослина, що відроджується, *Selaginella lepidophylla*, проте в даний час загальноновизнаним є те, що метаболізм трегалози широко розповсюджений у царстві рослин.

[0143] Трегалоза синтезується з UDP-глюкози та глюкоза-6-фосфату в двох ферментативних реакціях. Спочатку UDP-глюкоза та глюкоза-6-фосфат перетворюються на UDP (уридиндифосфат) і альфа, альфа-трегалоза-6-фосфат (Т6Р) за допомогою ферменту TPS (трегалозафосфатсинтаза). На другому етапі, який каталізується ферментом Т6РР (трегалозафосфатфосфатаза), Т6Р дефосфорилується з одержанням трегалози та ортофосфату (див. Фіг. 3).

[0144] У дріжджів дві ферментативні активності (TPS і Т6РР активність) властиві великому білковому комплексу, що містить активні субодиниці, TPS1 і TPS2, і регуляторні субодиниці, при цьому TPS1 має TPS активність, а TPS2 має Т6РР активність. В *E. coli* ці дві ферментативні активності виявляються в окремих білкових комплексах. У рослин білковий комплекс до теперішнього часу не був охарактеризований.

[0145] В *Arabidopsis thaliana* біосинтетичні ферменти трегалози були класифіковані на три класи:

[0146] Клас I: містить чотири гени, AtTPS1-AtTPS4, що мають значну подібність із ScTPS1;

[0147] Клас II: має сім членів, AtTPS5-AtTPS11, зі значною подібністю послідовностей до ScTPS2; і

[0148] Клас III: містить 10 членів, AtT6PPA-AtT6PPJ, що кодують білки з подібністю до TPS2 *E. coli* і С-кінцем білків ScTPS2.

[0149] Гени, що кодують білки в межах цих класів, також присутні в інших видах рослин.

[0150] У межах Класу I і Класу II ферментативна активність була однозначно визначена лише для AtTPS1, що проявляє TPS активність (Blazquez et al. Plant J. March 1998;13(5):685-9.). Цікаво, що до теперішнього часу не повідомлялося про будь-яку Т6РР активність для будь-якого з інших білків TPS Класу II. Навпаки, Т6РР активність раніше була описана для AtT6PPA і AtT6PPB, двох членів Класу III (Vogel et al. Plant J. March 1998;13(5):673-83). Рослинні Т6РР Класу III містять два мотиви консенсусної послідовності фосфатази, які виявлені у всіх ферментах Т6РР, описаних до теперішнього часу (Thaller et al. Protein Sci. July 1998;7(7):1647-52).

[0151] Повідомлялося, що генетична маніпуляція з генами біосинтезу трегалози приводила до поліпшеної стресостійкості у рослин, а також, викликала чітко виражені зміни в розвитку. Надекспресія генів OtsA і OtsB *E. coli* (еквівалентів Т6РР і TPS) у трансгенних рослинах тютюну й картоплі, як повідомлялося, викликала аберації розвитку коренів і листків, а також пригнічувала ріст рослин. Менша кількість насіння продукувалась в трансгенних рослинах тютюну з OtsA, а трансгенні рослини картоплі з OtsB не утворювали бульби (Goddijn et al. Plant Physiol. January 1997;113(1):181-90). Аналогічні результати були описані іншими авторами (Holmstrom et al. Nature, 379, 683-684; Romero et al. Planta, 201, 293-297; Pilont-Smits et al. 1998; J Plant Physiol. 152:525-532; Schluepmann et al. Proc Natl. Acad. Sci. U S A. 2003;100(11):6849-54). Також повідомлялося, що мутанти з дефектом у генах TPS і Т6РР демонструють дефекти розвитку. В *Arabidopsis* нокаутні за TPS1 мутанти демонстрували погіршений розвиток зародків (Eastmond et al. Plant J. January 2002; 29(2):225-35). McSteen et al. (Plant Cell 2006; 18; 518-522) відмічають, що внаслідок виділення й визначення характеристик гена RAMOSA3 (RA3) маїсу стало відомо, він відповідає за розвиток меристеми й розвиток суцвіть, включаючи розгалуження. Це дозволяє припускати, що ген, генний продукт й регуляторні ділянки можуть застосовуватися для управління розгалуженням, ростом меристеми, розвитком і розташуванням суцвіть. Негативні фенотипи, пов'язані з експресією трансгена, можуть мати несприятливі впливи на відносну врожайність рослини. Наприклад, без зав'язування насіння, наливу насіння, фертильності рослини тощо, не буде збільшення врожайності насіння. Заявка на патент США 2007/0006344 є першим записом відомостей, що розкриваються у даному винаході, стосово способу, який описує експресію Т6РР у рослині із забезпеченням збільшення врожайності рослин без будь-яких негативних фенотипів і/або несприятливих впливів на біологічну функцію рослин. У заявці на патент США 2007/0006344 описується застосування трегалоза-6-фосфатфосфатази, функціонально пов'язаної з промотором OsMADS, який націлює переважну експресію Т6РР на материнську репродуктивну тканину рослини, що приводить у результаті до істотного збільшення врожайності маїсу в умовах дефіциту води та умовах гарного зрошення. Нижченаведений винахід у цілому включає ідентифікацію Т6РР, що має модифікації, які забезпечують поліпшену врожайність і польову продуктивність культурних

рослин, і додатково описує способи, які можна застосовувати для збільшення врожайності рослини шляхом використання у рослині модифікованих Т6РР.

[0152] Даний винахід передбачає нуклеотидні послідовності, які при трансгенній експресії в рослині збільшують міць рослин, урожайність, використання азоту та/або біомасу в стресових і безстресових умовах. Було виявлено, що білки Т6РР, які містять модифікації, що змінюють активність білка Т6РР, при цьому активність знижена при прямому порівнянні зі спорідненою Т6РР, що не має модифікацій, забезпечують як істотне збільшення врожайності, так і/або підвищену стійкість до стресу, коли ці модифіковані Т6РР трансгенно експресуються в рослині. Не обмежуючись теорією, ці модифікації, ймовірно, зроблені в ключових положеннях в межах білка Т6РР, що впливає на зв'язування Т6РР з її субстратом Т6Р. Теоретично, Т6РР, розкриті в даному документі, що мають знижену активність, служать у якості сигналу для рослини або ініціюють у рослині певні метаболічні каскади або метаболічні шляхи, які забезпечують у рослині збільшений транспорт цукрів до плодів, зерен, листків, коренів або інших частин, приводячи тим самим до збільшення врожайності насіння, біомаси та/або росту коренів.

[0153] Не обмежуючись теорією, експресія Т6РР, модифікованої для зниження активності та/або модифікованої таким чином, щоб вона мала збільшений потенціал зв'язування з ендогенним білком TPS, може застосовуватися для ініціації комплексу Т6РР/TPS, причому у подальшому присутність зазначеного комплексу Т6РР/TPS забезпечує в рослині збільшену врожайність і/або підвищену стійкість до стресу. В іншому варіанті здійснення, не обмежуючись теорією, комплекс Т6РР/TPS забезпечує в рослині змінені рівні Т6Р, які у подальшому забезпечують у рослини збільшену врожайність і/або підвищену стійкість до стресу. В одному аспекті даного винаходу трансгенний комплекс Т6РР/TPS може трансгенно експресуватися в рослині із забезпеченням в рослині збільшеної врожайності та/або підвищеної стресостійкості. В іншому варіанті здійснення передбачається, що за допомогою способів, добре відомих у відповідній галузі техніки, можуть бути створені різні хімічні структури та/або молекулярні структури для імітації функції комплексу Т6РР/TPS, як описано в даному документі. В одному варіанті здійснення, не обмежуючись теорією, будь-яку Т6РР можна модифікувати таким чином, щоб вона мала зменшене зв'язування із субстратом Т6Р, що у подальшому буде забезпечувати збільшену врожайність і польову продуктивність при трансгенній експресії в рослинах модифікованих Т6РР. У деяких випадках нуклеотидні послідовності кодують білок, залучений у шлях біосинтезу трегалози, при цьому в одному варіанті здійснення білок кодує Т6РР. В іншому варіанті здійснення даного винаходу Т6РР виділяють із генома покритонасінної рослини, а потім модифікують, як описано в даному документі. У додатковому варіанті здійснення даного винаходу ген Т6РР виділяють з однодольної рослини. В одному аспекті гени Т6РР, розкриті в даному документі, виділяють із генома рослини рису.

[0154] Гени Т6РР, описані в даному документі, є, головним чином, членами надсімейства HAD фосфатаз або містять білкову консенсусну послідовність, зображену в SEQ ID NO: 9. Надсімейство HAD фосфатаз, яке також можна називати надсімейством DDDD фосфатаз, включає консервативний альфа/бета-коровий домен, а також кеп-домен, функція яких може змінюватися (тобто зв'язування із субстратом тощо). В одному варіанті здійснення даного винаходу модифікація локалізована в будь-якому з кеп-домену, фосфатазного домену, домену А-фосфатазного боксу або домену В-фосфатазного боксу Т6РР, де зазначена модифікація змінює зв'язування з її субстратом (наприклад, Т6Р). В іншому варіанті здійснення модифікації можуть включати одне або декілька з заміни, делеції або додавання одного або декількох амінокислотних залишків до спорідненої консенсусної послідовності білка Т6РР, представленої в SEQ ID NO: 9, де заміна, делеція або додавання одного або декількох амінокислотних залишків забезпечує змінену активність зазначеної Т6РР і/або збільшені рівні Т6Р при трансгенній експресії в рослині Т6РР. Не обмежуючись теорією, вважають, що створення варіантів білка Т6РР, що мають знижену каталітичну активність (тобто зменшений гідроліз Т6Р), створює сигнал в межах рослини, який забезпечує збільшену врожайність і/або підвищену стійкість до стресу (наприклад, посухи, тепла, холоду). Теоретично можливо, що Т6РР, яка має знижену активність, взаємодіє з TPS з утворенням білок-білкового комплексу.

[0155] Теоретично, Т6РР, модифікована таким чином, щоб вона мала знижену ферментативну активність, може служити в якості метаболічного сигналу рослині направляти цукри на утворення насіння та/або цукрів. Більш того, ці модифіковані Т6РР можуть також служити в якості метаболічних сигналів для ініціації процесів, які забезпечують у рослині підвищену стійкість до абіотичних і/або біотичних стресів. Знову-таки, не обмежуючись теорією, вважається, що рослини, які експресують модифіковані Т6РР, що мають знижену активність, будуть мати модифікований рівень трегалози в порівнянні з контрольною рослиною або в порівнянні з трансгенною рослиною, що надекспресує активну форму Т6РР.

[0156] Передбачається, що будь-яка Т6РР або фермент, що має Т6РР активність, можна розробити таким чином, щоб вони мали знижену активність і, таким чином, їх можна було застосовувати для створення трансгенних рослин або організмів (наприклад, водоростей), що мають збільшену врожайність. В одному варіанті здійснення даного винаходу білки, що містять консенсусну послідовність, таку як представлена в SEQ ID NO: 9, можна застосовувати в способах, описаних у даному документі. Як застосовується в даному документі, вираз "знижена активність" стосується будь-якого зменшення активності Т6РР. Наприклад, фермент, модифікований таким чином, щоб мати 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % зменшення активності Т6РР у порівнянні з контрольним або нативним геном Т6РР, може знайти застосування в одержанні трансгенних рослин зі збільшеною врожайністю. В одному варіанті здійснення даного винаходу поліпептид Т6РР містить амінокислотну послідовність, що має 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 99 % ідентичність послідовності з консенсусною послідовністю, відображеною в SEQ ID NO: 9. У додатковому варіанті здійснення Т6РР містить консенсусну послідовність, відображену в SEQ ID NO: 9, у якій зроблена щонайменше одна модифікація (в тому числі амінокислотна заміна, амінокислотна делеція, амінокислотне додавання), і зазначена модифікація знижує активність зазначеної Т6РР і/або збільшує ймовірність для зазначеної Т6РР утворювати білок-білковий комплекс з TPS. В іншому варіанті здійснення рослини, які експресують варіант Т6РР, що має знижену активність, і/або Т6РР, що характеризується збільшеною ймовірністю утворення білок-білкового комплексу з TPS, будуть мати модифіковані рівні Т6Р у порівнянні з контролем, який не експресує варіант Т6РР, що не має зниженої активності, де модифікований рівень Т6Р забезпечує в рослині збільшену врожайність (наприклад, урожайність насіння, біомасу, міць), клітинний ріст, вміст цукру, вміст крохмалю й підвищену стійкість до стресу (посухи, тепла, холоду, засоленості, затоплення, абіотичного та/або біотичного стресу). В іншому варіанті здійснення даного винаходу експресія варіанта Т6РР, що має знижену активність в рослині, спрямована на репродуктивну тканину рослини. В іншому варіанті здійснення даного винаходу патерни генної експресії, ймовірно, є важливими для збільшення тривалості посухостійкості у рослини. Наприклад, можна сконструювати касети експресії для експресії модифікованої Т6РР під час цвітіння рослини, тим самим забезпечуючи посухостійкість на цій стадії розвитку рослини. Аналогічно, можна також сконструювати касети експресії, які конститутивно експресують модифіковану Т6РР у рослині, тим самим забезпечуючи посухостійкість протягом усього життєвого циклу рослини. Передбачається, що Т6РР можуть бути змодельовані, щоб вони мали знижену активність, за допомогою модифікацій поза межами консервативних амінокислотних залишків консенсусної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 9, при цьому модифікація зменшує зв'язування Т6РР з Т6Р і/або зазначені модифікації збільшують ймовірність того, що Т6РР буде утворювати білок-білкову взаємодію з TPS.

[0157] В одному варіанті здійснення можна знижувати активність Т6РР шляхом опромінення ДНК і, таким чином, одержувати варіанти, що мають знижену активність при експресії в рослині. Аналогічно передбачається, що для одержання варіантів Т6РР, які мають знижену активність, можна застосовувати загальноприйняті методики, такі як перестановка генів. Передбачається, що можна створювати хімічні ортогональні структури, які можуть певною мірою імітувати структуру неактивного білка Т6РР і в одному варіанті здійснення утворювати комплекс із TPS рослини, тим самим забезпечуючи збільшену врожайність рослини. В іншому варіанті здійснення можна створити хімічну ортогональну структуру, яка зможе імітувати структуру комплексу Т6РР/TPS, що у подальшому можна застосовувати щодо рослин (наприклад, застосуванням хімічного продукту) для забезпечення збільшеної врожайності й стресостійкості (тобто посухостійкості). Передбачається, що хімічні ортогональні структури можна застосовувати щодо рослини для регуляції транспорту цукрів на даній репродуктивній стадії або стадії розвитку рослини.

[0158] Передбачається, що гени Т6РР з будь-якого класу або сімейства можна застосовувати в будь-якому зі способів і/або аспектів даного винаходу, розкритих у даному документі. Також передбачається, що гени Т6РР з аналогічною гомологією послідовностей (наприклад, що мають більшу або рівну 50 %, 75 %, 80 % або 85 % ідентичності послідовностей з SEQ ID NO: 1) і/або молекулярною структурою, виділені або синтезовані, можна застосовувати у варіантах здійснення, описаних у даному документі. Було показано, що Т6РР широко розповсюджена серед членів царства рослин і в багатьох випадках, як було показано, має консервативну функцію серед численних родів і видів рослин. Отже передбачається, що синтетична нуклеїнова кислота, що кодує білок Т6РР, який забезпечує знижену активність, і/або зменшене зв'язування з Т6Р, і/або збільшене зв'язування з TPS, може застосовуватися в

способах, розкритих у даному документі, для забезпечення у рослин прийнятних характеристик (наприклад, збільшеної врожайності, збільшеної біомаси, збільшеної міці рослин), описаних в даному документі.

[0159] Способи, розкриті в даному документі, додатково описують трансформацію рослин за допомогою полінуклеотидів, таких як розкриті в даному документі. Трансгенні рослини, що містять полінуклеотиди, розкриті в даному документі, можуть проявляти збільшений клітинний ріст, збільшену міць рослин і/або сходів, збільшену врожайність, збільшену вагу насіння і збільшену біомасу. Передбачається, що рослини, отримані за допомогою способів за даним документом, мають підвищену стійкість до абіотичного стресу. Передбачається, що трансгенні рослини за даним винаходом будуть забезпечувати збільшений ріст кореня, який може мати багато позитивних наслідків щодо використання води й коефіцієнта використання поживних речовин рослиною, а також зменшення частоти виникнення ерозії ґрунту на промислових сільськогосподарських угіддях. Також передбачається, що рослини, які містять полінуклеотиди, описані в даному документі, внаслідок збільшеного росту можуть також проявляти більш високу стійкість до поїдання комахами. У деяких випадках рослини, описані в даному винаході, будуть мати підвищену здатність до утворення травостою та/або знижений ризик вилягання культури, що тим самим забезпечує трансгенні рослини, які здатні до перенесення погодних умов, таких як сильні вітри або гради. Трансгенні рослини, описані в даному документі, можуть давати великий урожай як відносно врожайності біомаси, так і врожайності зерна рослини. Один аспект даного винаходу передбачає різні модифікації, які можна виконати з даною послідовністю гена T6PP, що можна застосовувати в трансгенних рослинах для забезпечення збільшеної врожайності. Трансгенні рослини за даним документом можуть забезпечувати збільшення врожайності як за оптимальних, так і/або за неоптимальних умов зростання.

[0160] Будь-яке посилання в даному документі нижче на "білок, застосовний у способах за даним винаходом" використовується для позначення поліпептиду трегалозного шляху, як визначається в даному документі, включаючи без обмеження поліпептид T6PP. Будь-яке посилання в даному документі нижче на "нуклеїнову кислоту, застосовну в способах за даним винаходом" використовується для позначення нуклеїнової кислоти, здатної кодувати поліпептид трегалозного шляху, такий як поліпептид T6PP.

[0161] Переважний спосіб регуляції експресії нуклеїнової кислоти, що кодує білок T6PP, застосовний у способах за даним винаходом, полягає у введенні й експресії в рослині нуклеїнової кислоти, що кодує білок, застосовний у способах за даним винаходом, як визначається нижче.

[0162] Нуклеїнова кислота, що підлягає введенню в рослину (а отже, застосовна в проведенні способів за даним винаходом), являє собою будь-яку нуклеїнову кислоту, що кодує фермент трегалозного шляху. "Поліпептид T6PP", як визначається в даному документі, стосується будь-якого поліпептиду із трегалоза-6-фосфатфосфатазною активністю, що містить щонайменше один трегалоза-фосфатазний домен. Трегалоза-фосфатазні домени звичайно становлять від 200 до 250 амінокислот у довжину та, як правило, містять мотив консенсусної послідовності фосфатази, який виявляється у всіх ферментах T6PP, описаних до теперішнього часу (Thaller et al. 1998). Амінокислотна послідовність трегалоза-фосфатазного домену представлена в SEQ ID NO: 10. Фахівець у даній галузі легко зможе виявити наявність трегалоза-фосфатазного домену із застосуванням інструментів і методик, відомих у даній галузі. Цей мотив консенсусної послідовності фосфатази зазвичай містить два фосфатазних бокси, що називаються A і B-фосфатазним боксом. SEQ ID NO: 11 представляє консенсусну послідовність для фосфатазного боксу A, а SEQ ID NO: 12 представляє консенсусну послідовність для фосфатазного боксу B.

[0163] Переважно, нуклеїнова кислота, яка підлягає введенню в рослину, кодує білок T6PP, що має щонайменше 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичність послідовності з послідовністю, вибраною з SEQ ID NO 1, 3, 5 і 7. Найбільш переважно, нуклеїнова кислота класу T6PP є такою, як представлена будь-якою з SEQ ID NO 1, 3, 5 і 7.

[0164] Приклади білків, застосовних у способах за даним винаходом, і нуклеїнових кислот, що їх кодують, представлені в даному документі в таблиці прикладу 5.

[0165] Також застосовними в способах за даним винаходом є гомологи будь-якої з амінокислотних послідовностей, представлених у таблиці прикладу 5. "Гомологи" білка охоплюють пептиди, олігопептиди, поліпептиди, білки й ферменти, що мають амінокислотні заміни, делеції та/або додавання в порівнянні з розглянутим немодифікованим білком та що мають біологічну й функціональну активність, аналогічну до немодифікованого білка, з якого вони отримані.

[0166] Делецією називають видалення з білка однієї або декількох амінокислот.

[0167] Вставкою називають один або декілька амінокислотних залишків, що вводяться в заданий сайт білка. Вставки можуть містити N-кінцеве та/або C-кінцеве злиття, а також вставки однієї або декількох амінокислот усередину послідовності.

[0168] Як правило, вставки всередині амінокислотної послідовності будуть меншими, ніж N- або C-кінцеве злиття, приблизно з 1-10 залишків. Приклади N- або C-кінцевих злитих білків або пептидів включають домен зв'язування або домен активації активатора транскрипції, застосовуваного в дріжджовій двогібридній системі, білки оболонки фага, мітку (гістидин)-6, мітку глутатіон-S-трансферази, білок A, білок, що зв'язує мальтозу, дигідрофолатредуктазу, епітоп Tag-100, епітоп с-мус, епітоп FLAG®, lacZ, CMP (пептид, що зв'язує кальмодулін), епітоп HA, епітоп білка C і епітоп VSV.

[0169] Заміна стосується заміщення амінокислот білка іншими амінокислотами, що мають аналогічні властивості (такі як аналогічна гідрофобність, гідрофільність, антигенність, схильність до утворення або руйнування α -спіральних структур або β -складчастих структур). Амінокислотні заміни зазвичай являють собою окремі залишки, але можуть бути об'єднані в кластери залежно від функціональних обмежень, накладених на поліпептид; вставки будуть становити, як правило, приблизно 1-10 амінокислотних залишків. Амінокислотні заміни переважно являють собою консервативні амінокислотні заміни. Таблиці консервативних заміні добре відомі в даній галузі техніки (див., наприклад, Creighton (1984) Proteins. W.H. Freeman and Company, і таблицю нижче).

Таблиця

приклади консервативних амінокислотних заміні

Залишок	Консервативні заміни
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Gln	Asn
Cys	Ser
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn; Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr; Gly
Thr	Ser; Val
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

[0170] Амінокислотні заміни, делеції та/або вставки можна легко здійснювати із застосуванням методик пептидного синтезу, добре відомих у галузях техніки, таких як твердофазний пептидний синтез і подібні, або шляхом маніпуляції з рекомбінантною ДНК. Способи маніпуляції з послідовностями ДНК для одержання варіантів білка з заміною, вставкою або делецією, добре відомі в даній галузі техніки. Наприклад, методи створення модифікацій із заміною у заданих сайтах ДНК добре відомі фахівцям у даній галузі й включають мутагенез M13, in vitro мутагенез T7-Gen (USB, Клівленд, Огайо), сайт-спрямований мутагенез QuickChange (Stratagene, Сан-Дієго, Каліфорнія), опосередкований ПЦР сайт-спрямований мутагенез або інші протоколи сайт-спрямованого мутагенезу.

[0171] Також застосовними в способах за даним винаходом є похідні будь-якого з поліпептидів, представлених у таблиці прикладу 5, або ортологи або паралоги будь-якого з поліпептидів, представлених у таблиці прикладу 5, або похідні будь-яких ортологів або паралогів будь-якого з поліпептидів, представлених у таблиці прикладу 5. "Похідні" включають пептиди, олігопептиди, поліпептиди, які можуть містити заміни амінокислот на амінокислотні

залишки, що не зустрічаються в природі, або додавання амінокислотних залишків, що не зустрічаються в природі, порівняно з амінокислотною послідовністю форми білка, що зустрічається в природі. Похідні поліпептидів, представлених у таблиці прикладу 5, являють собою додаткові приклади, які можуть бути придатними для застосування в способах за даним винаходом. Деякі аспекти даного винаходу включають модифікацію залишків, що впливає на активність молекули T6PP. В одному варіанті здійснення модифікація зменшує активність молекули T6PP при аналізі *in vitro*. В іншому аспекті модифікація знижує афінність зв'язування T6PP з її субстратом. В іншому аспекті модифікації можуть бути зроблені в активному сайті білка T6PP таким чином, що активність білка знижується в порівнянні з білком T6PP без модифікації.

[0172] "Похідні" поліпептиду включають пептиди, олігопептиди, поліпептиди, які можуть містити заміни амінокислот на амінокислотні залишки, що не зустрічаються в природі, або додавання амінокислотних залишків, що не зустрічаються в природі, у порівнянні з амінокислотною послідовністю форми білка, що зустрічається в природі, наприклад білка, що становить інтерес. "Похідні" білка також охоплюють пептиди, олігопептиди, поліпептиди, які містять змінені амінокислотні залишки, що зустрічаються в природі (глікозильовані, ацильовані, пренільовані, фосфорильовані, міристоільовані, сульфатовані тощо), або змінені амінокислотні залишки, що не зустрічаються в природі, у порівнянні з амінокислотною послідовністю форми поліпептиду, що зустрічається в природі. Похідне може також містити один або декілька неамінокислотних замісників або додавань у порівнянні з амінокислотною послідовністю, з якої воно походить, наприклад, репортерну молекулу або інший ліганд, який ковалентно або нековалентно зв'язаний з амінокислотною послідовністю, такий як репортерна молекула, яка зв'язується для полегшення його виявлення, й амінокислотні залишки, що не зустрічаються в природі, у порівнянні з амінокислотною послідовністю білка, що зустрічається в природі. Крім того, "похідні" також включають злиття форми білка, що зустрічається в природі, з пептидами для мічення, такими як FLAG, HIS6 або тіоредоксин (для огляду пептидів для мічення див. Terpe, Appl. Microbiol. Biotechnol. 60, 523-533, 2003).

[0173] Винахід ілюструється шляхом експресії в рослині різних білків T6PP, що мають модифікації, які зменшують активність молекули T6PP. Цікаво, що ці модифікації та/або зменшена активність молекул T6PP, як описано в даному документі, демонструють збільшену врожайність, а також польову продуктивність, яка полягає в тому, що рослини є здоровими та не демонструють несприятливих фенотипічних ефектів. Виконання винаходу не обмежене цими послідовностями. Способи за даним винаходом можна переважно здійснювати із застосуванням будь-якої нуклеїнової кислоти, що кодує білок, застосовний у способах за даним винаходом, як визначається у даному документі, включаючи нуклеїнові кислоти, що кодують ортологи, паралоги й гомологи, такі як (без обмеження) будь-які послідовності нуклеїнових кислот, наведені в таблиці прикладу 5.

[0174] Ортологи й паралоги включають еволюційні поняття, що застосовуються для опису відносин спорідненості генів. Паралоги являють собою гени в межах одного виду, які утворені внаслідок дуплікації предкового гена, а ортологи являють собою гени різних організмів, які утворені внаслідок видоутворення й також походять від спільного предкового гена.

[0175] Ортологи й паралоги можна легко знайти шляхом здійснення так званого взаємозворотного пошуку blast. Як правило, він включає перший BLAST, що включає здійснення BLAST запитуваної послідовності (наприклад, із застосуванням будь-якої з послідовностей, перерахованих у таблиці прикладу 5) відносно будь-якої бази даних послідовностей, такої як загальнодоступна база даних NCBI. BLASTN або TBLASTX (із застосуванням стандартних значень за замовчуванням) звичайно застосовують, коли починають з нуклеотидної послідовності, а BLASTP або TBLASTN (із застосуванням стандартних значень за замовчуванням), коли починають з білкової послідовності. Необов'язково результати BLAST можна піддавати фільтрації. Потім здійснюють зворотний BLAST послідовностей повної довжини або з відфільтрованими результатами, або з невідфільтрованими результатами (другий BLAST) відносно послідовностей з організму, з якого отримана запитувана послідовність. Потім результати першого й другого BLAST порівнюють. Паралог ідентифікують у тому випадку, якщо високоранговий збіг з першого blast походить від одного виду, з якого отримана запитувана послідовність, при цьому зворотний BLAST в ідеальному випадку потім приводить до того, що запитувана послідовність має найбільший збіг; ортолог ідентифікують у тому випадку, якщо високоранговий збіг у першому BLAST походить не від того самого виду, з якого отримана запитувана послідовність, і при зворотному BLAST переважно приводить до того, що запитувана послідовність перебуває серед найбільших збігів.

[0176] Високоранговими збігами є такі, що мають низьке Е-значення. Більш низьке Е-значення говорить про більш достовірний бал (або, інакше кажучи, нижча ймовірність, що збіг був виявлений випадково). Обчислення Е-значення добре відоме в даній галузі техніки. На додаток до Е-значень порівняння також оцінюють за процентною ідентичністю. Процентна ідентичність стосується числа ідентичних нуклеотидів (або амінокислот) у двох порівнюваних послідовностях нуклеїнової кислоти (або поліпептиду) на конкретній довжині. У випадку великих сімейств для полегшення візуалізації утворення кластерів спорідненими генами та ідентифікації ортологів і паралогів можна застосовувати ClustalW з наступною побудовою дерева методом приєднання найближчого сусіда.

[0177] У таблиці прикладу 5 наведені приклади ортологів і паралогів білків T6PP, представлених SEQ ID NO 2, 4, 6 і 8. Додаткові ортологи й паралоги можна легко ідентифікувати за допомогою процедури BLAST, описаної вище.

[0178] Білки за даним винаходом можна ідентифікувати завдяки наявності консервативного трегалоза-фасфатазного домена(ів). Вираз "домен" стосується набору амінокислот, що є консервативними у визначених положеннях уздовж вирівнювання послідовностей у еволюційно споріднених білків. Незважаючи на те, що амінокислоти в інших положеннях у гомологів можуть відрізнятися, амінокислоти, які є високо консервативними у визначених положеннях, вказують на амінокислоти, які є необхідними для структури, стабільності або активності білка. Будучи ідентифікованими за їхнім високим ступенем консервативності у вирівняних послідовностях сімейства гомологів білків, їх можна застосовувати в якості ідентифікаторів для визначення того, чи належить будь-який запитуваний поліпептид до раніше ідентифікованого сімейства поліпептидів (у цьому випадку білки, застосовні в способах за даним винаходом, і нуклеїнові кислоти, що їх кодують, як визначається в даному документі). У переважному варіанті здійснення даного винаходу в ці висококонсервативні домени можуть вводитися одна або декілька модифікацій для зменшення активності конкретного білка T6PP, щоб тим самим, при експресії в рослині, забезпечити збільшення врожайності.

[0179] Вираз "мотив", або "консенсусна послідовність", або "сигнатура" стосується короткої консервативної ділянки в послідовності еволюційно споріднених білків. Мотиви найчастіше є висококонсервативними частинами доменів, але також можуть включати лише частину домену або бути розташованими поза межами консервативного домену (якщо всі амінокислоти мотиву виявляються поза межами певного домену).

[0180] Для ідентифікації доменів також існують спеціалізовані бази даних, наприклад, SMART (Schultz et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 5857-5864; Letunic et al. (2002) Nucleic Acids Res 30, 242-244), InterPro (Mulder et al., (2003) Nucl. Acids. Res. 31, 315-318), Prosite (Bucher and Bairoch (1994), A generalized profile syntax for biomolecular sequences motifs and its function in automatic sequence interpretation. (In) ISMB-94; Proceedings 2nd International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology. Altman R., Brutlag D., Karp P., Lathrop R., Searls D., Eds., pp 53-61, AAApress, Menlo Park; Hulo et al., Nucl. Acids. Res. 32:D134-D137, (2004)), або Pfam (Bateman et al., Nucleic Acids Research 30(1): 276-280 (2002)). Набір інструментів для in silico аналізу білкових послідовностей доступний на сервері для протеоміки ExPASy (розміщеному Швейцарським інститутом біоінформатики (Gasteiger et al., ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, Nucleic Acids Res. 31:3784-3788(2003)).

[0181] Домени можна також ідентифікувати за допомогою звичайних методик, таких як вирівнювання послідовностей. У даній галузі техніки добре відомі способи вирівнювання послідовностей для порівняння, такі способи включають GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA і TFASTA. В GAP застосовується алгоритм Needleman і Wunsch ((1970) J Mol Biol 48: 443-453) для виявлення глобального (тобто перекриття повних послідовностей) вирівнювання двох послідовностей, який максимізує число збігів і мінімізує число гепів. Алгоритм BLAST (Altschul et al. (1990) J Mol Biol 215: 403-10) розраховує процентну ідентичність послідовності та здійснює статистичний аналіз подібності між двома послідовностями. Програмне забезпечення для здійснення аналізу BLAST є загальнодоступним завдяки Національному центру біотехнологічної інформації (NCBI). Гомологи можна легко ідентифікувати за допомогою, наприклад, алгоритму множинного вирівнювання послідовностей ClustalW (версія 1.83) з параметрами попарного вирівнювання за замовчуванням та способом оцінки у відсотках. Глобальні відсотки подібності та ідентичності можна також визначити за допомогою одного зі способів, доступних у пакеті програмного забезпечення MatGAT (Campanella et al., BMC Bioinformatics. July 2003 10: 4-29. MatGAT: An application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences). Для оптимізації вирівнювання між консервативними мотивами можна здійснювати незначне редагування вручну, яке буде очевидним для фахівця в даній галузі. Крім того, для ідентифікації

гомологів замість застосування послідовностей повної довжини також можна застосовувати визначені домени (такі як трегалоза-фосфатазний домен або один з мотивів, визначених вище).

[0182] Крім того, білки Т6РР (щонайменше в їх нативній формі) звичайно мають трегалоза-6-фосфатфосфатазну активність. Поліпептиди з трегалоза-6-фосфатфосфатазною активністю згідно з класифікацією Комісії з ферментів Комітету з номенклатури Міжнародного союзу з біохімії й молекулярної біології (NC-IUBMB) належать до класу ферментів EC:3.1.3.12. Ферменти класу EC:3.1.3.12 каталізують реакцію: трегалоза-6-фосфат + H₂O = трегалоза + фосфат. Передбачається, що будь-яку Т6РР або білок, який має Т6РР активність, можна модифікувати для зменшення активності за допомогою способів, таких як точкова мутація(і), опромінення та ін., з метою забезпечення позитивних ефектів, описаних у даному документі, при трансгенній експресії в рослині.

[0183] Активність трегалоза-6-фосфатфосфатазного білка можна вимірювати шляхом визначення рівнів субстрату, що підлягав обробці, та рівнів продукту, накопиченого при *in vitro* реакції, а саме, шляхом визначення рівня використання трегалоза-6-фосфату та/або накопичення трегалози в результаті реакції. Ферментні способи вимірювання трегалози можуть базуватися на гідролізі трегалози до глюкози, такі як описані Van Dijck et al. *Biochem J.* August 2002 15; 366(Pt 1):63-71, і Zentella et al. *Plant Physiol.* April 1999;119(4):1473-82.

[0184] Рівні трегалоза-6-фосфату також можна вимірювати за допомогою способів HPLC (високоєфективна рідинна хроматографія), описаних Avonce et al. *Plant Physiol.* November 2004; 136(3):3649-59; Schluermann et al. 2003. Також були описані альтернативні способи, основані на визначенні вивільнення неорганічного фосфату з трегалоза-6-фосфату, в Klutts et al. *J Biol Chem.* (2003) 278(4):2093-100. Альтернативний спосіб визначення рівнів трегалоза-6-фосфату за допомогою рідинної хроматографії, поєднаної з MS-Q3 (потрійна квадрупольна MS), був описаний Lunn et al. *Biochem J.* (2006) 397(1):139-48.

[0185] Приклади нуклеїнових кислот, придатних для застосування у здійсненні способів за даним винаходом, включають послідовності нуклеїнових кислот, наведені у таблиці прикладу 5, але не обмежені цими послідовностями. У здійсненні на практиці способів за даним винаходом також можуть бути застосовні варіанти нуклеїнових кислот. Приклади таких варіантів нуклеїнових кислот включають частини нуклеїнових кислот, що кодують білок, застосовний у способах за даним винаходом, нуклеїнові кислоти, які гібридизуються з нуклеїновими кислотами, що кодують білок, застосовний у способах за даним винаходом, сплайс-варіанти нуклеїнових кислот, що кодують білок, застосовний у способах за даним винаходом, алельні варіанти нуклеїнових кислот, що кодують білок, застосовний у способах за даним винаходом, і варіанти нуклеїнових кислот, що кодують білок, застосовний у способах за даним винаходом, які отримані перестановкою генів. Вирази частина, послідовність, що гібридизується, сплайс-варіант, алельний варіант і перестановка генів не будуть описуватися.

[0186] Нуклеїнові кислоти, що кодують білки, застосовні в способах за даним винаходом, не повинні бути нуклеїновими кислотами повної довжини, оскільки виконання способів за даним винаходом не розраховане на застосування послідовностей нуклеїнових кислот повної довжини. Ділянки, застосовні в способах за даним винаходом, які кодують поліпептид, підпадають під визначення нуклеїнової кислоти, що кодує білок, застосовний у способах за даним винаходом, як визначено в даному документі. Переважно ділянка являє собою ділянку будь-якої з нуклеїнових кислот, наведених у таблиці прикладу 5. Ділянка звичайно становить щонайменше 625 послідовних нуклеотидів у довжину, переважно щонайменше 825 послідовних нуклеотидів у довжину, або щонайменше 1025 послідовних нуклеотидів у довжину, причому послідовні нуклеотиди, що належать будь-якій з послідовностей нуклеїнової кислоти, наведених у таблиці прикладу 5, у комбінації із запропонованою мутацією(ями), що розкрита в даному документі, будуть зменшувати активність спорідненого білка Т6РР у порівнянні з такою самою Т6РР, що не має однієї або декількох модифікацій. В одному аспекті даного винаходу ділянка являє собою ділянку нуклеїнової кислоти SEQ ID NO: 1. Переважно, ділянка кодує амінокислотну послідовність, яка при застосуванні в побудові філогенетичного дерева Т6РР/TPS, такого як зображене на Фіг. 2, має тенденцію утворювати кластер із групою білків Т6РР, що містять амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 2, а не з будь-якою іншою групою.

[0187] Ділянку нуклеїнової кислоти, що кодує білок Т6РР, як визначається у даному документі, можна одержувати, наприклад, шляхом здійснення однієї або декількох делецій у нуклеїновій кислоті. Ділянки можна застосовувати у виділеній формі, або ж вони можуть бути злиті з іншими кодуючими (або некодуючими) послідовностями, наприклад, для отримання білка, який поєднує в собі декілька активностей. При злитті з іншими кодуючими послідовностями поліпептид, що утворюється в результаті трансляції, може бути більшим за

поліпептид, прогнозований для частини білка T6PP. Також передбачається, що молекули T6PP, які не мають T6PP активності, при трансгенній експресії в рослині можуть забезпечувати збільшення врожайності.

[0188] Згідно з даним винаходом передбачається спосіб поліпшення пов'язаних із урожайністю властивостей рослин, зокрема збільшення врожайності насіння, що включає введення й експресію в рослині частини будь-якої з послідовностей нуклеїнової кислоти, наведених у таблиці прикладу 5, або частини нуклеїнової кислоти, що кодує ортолог, паралог або гомолог будь-якої з амінокислотних послідовностей, наведених у таблиці прикладу 5, де білки були модифіковані таким чином, щоб знизити T6PP активність білка.

[0189] Інший варіант нуклеїнової кислоти, застосовний у способах за даним винаходом, являє собою нуклеїнову кислоту, здатну до гібридизації за умов зменшеної жорсткості, переважно за жорстких умов, з нуклеїновою кислотою, що кодує білок T6PP, як визначається у даному документі, або із частиною, як визначається в даному документі. У переважному аспекті білок T6PP будуть модифікувати, щоб він мав зменшену активність в порівнянні з немодифікованою версією такого самого білка T6PP, тим самим забезпечуючи у трансгенної рослини будь-що з наступного: збільшену врожайність, збільшену біомасу, підвищену стійкість до абіотичного й біотичного стресу, підвищену міць рослини, підвищений вміст цукру, підвищений вміст олії, збільшену вагу насіння, збільшений ріст кореня, підвищену ефективність використання води, підвищену посухостійкість, підвищену витривалість до полягання, підвищену ефективність використання поживних речовин (наприклад, азоту) і більш швидкий розвиток рослини.

[0190] Послідовності, що гібридизуються, які застосовні в способах за даним винаходом, кодують поліпептид, який має трегалоза-фосфатазний домен та має практично таку саму біологічну активність, що й білки T6PP, представлені будь-якою з амінокислотних послідовностей, наведених у таблиці прикладу 5. Послідовність, що гібридизується, зазвичай являє собою щонайменше 625 послідовних нуклеотидів у довжину, переважно щонайменше 825 послідовних нуклеотидів у довжину, більш переважно щонайменше 1025 послідовних нуклеотидів у довжину та найбільш переважно щонайменше 1125 послідовних нуклеотидів у довжину, причому послідовні нуклеотиди належать до будь-якої з послідовностей нуклеїнової кислоти, наведених у таблиці прикладу 5. Переважно, послідовність, яка гібридизується, є такою, що здатна до гібридизації з будь-якою з нуклеїнових кислот, наведених у таблиці прикладу 5, або із частиною будь-якої з цих послідовностей, причому частина є такою, як визначається вище. Найбільш переважно, послідовність, що гібридизується, здатна до гібридизації з нуклеїновою кислотою, представленою SEQ ID NO: 1, або з її частиною. В іншому переважному аспекті послідовність містить щонайменше одну модифікацію, яка знижує активність спорідненого білка T6PP.

[0191] Переважно, послідовність, що гібридизується, кодує амінокислотну послідовність, яка при застосуванні в побудові філогенетичного дерева T6PP/TPS, такого як зображене на Фіг. 2A, має тенденцію утворювати кластер із групою білків T6PP, що містять амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 2, а не з будь-якою іншою групою.

[0192] Найбільш переважно, виділена полінуклеотидна молекула здатна до гібридизації за жорстких умов з послідовністю, представленою однією з SEQ ID NO 1, 3, 5 і 7.

[0193] Згідно з даним винаходом передбачається спосіб поліпшення пов'язаних із урожайністю властивостей рослин, зокрема збільшення врожайності насіння, що включає введення й експресію в рослині нуклеїнової кислоти, здатної до гібридизації з будь-якою з нуклеїнових кислот, наведених у таблиці прикладу 5, або що включає введення й експресію в рослині нуклеїнової кислоти, здатної до гібридизації з нуклеїновою кислотою, що кодує ортолог, паралог або гомолог будь-якої з послідовностей нуклеїнової кислоти, наведених у таблиці прикладу 5, де послідовність була модифікована таким чином, щоб знизити T6PP активність закодованого білка.

[0194] Інший варіант нуклеїнової кислоти, застосовний у способах за даним винаходом, являє собою сплайс-варіант, що кодує білок T6PP, як визначається у даному документі вище. Вираз "сплайс-варіант", як використовується в даному документі, охоплює варіанти послідовності нуклеїнової кислоти, у якій вибрані інтрони та/або екзони були відсічені, замінені, заміщені або додані, або в якій інтрони були вкорочені або подовжені. Такі варіанти будуть варіантами, за яких біологічна активність білка практично зберігається або знижується в багатьох аспектах даного винаходу; цього можна досягати шляхом селективного збереження або делеції функціональних сегментів білка. Такі сплайс-варіанти можуть зустрічатися в природі або можуть бути отримані людиною. Способи прогнозування й виділення таких сплайс-варіантів

добре відомі в даній галузі техніки (див., наприклад, Foissac and Schiex (2005) BMC Bioinformatics 6:25).

[0195] Згідно з даним винаходом передбачається спосіб поліпшення пов'язаних із урожайністю властивостей рослин, зокрема збільшення врожайності насіння, що включає введення й експресію в рослині сплайс-варіанта будь-якої з послідовностей нуклеїнової кислоти, наведених у таблиці прикладу 5, або сплайс-варіанта нуклеїнової кислоти, що кодує ортолог, паралог або гомолог будь-якої з амінокислотних послідовностей, наведених у таблиці прикладу 5, причому ці молекули додатково модифікують, щоб вони мали знижену активність.

[0196] Переважними сплайс-варіантами є сплайс-варіанти нуклеїнової кислоти, представленої SEQ ID NO: 1, або сплайс-варіант нуклеїнової кислоти, що кодує ортолог або паралог SEQ ID NO: 2. Переважно, амінокислотна послідовність, закодована сплайс-варіантом, містить будь-який один або декілька мотивів або доменів, як визначається у даному документі. Переважно, амінокислотна послідовність, закодована сплайс-варіантом, при застосуванні в побудові філогенетичного дерева T6PP/TPS, такого як зображене на Фіг. 2A, має тенденцію утворювати кластер із групою білків класу T6PP, що містять амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 2, а не з будь-якою іншою групою.

[0197] Інший варіант нуклеїнової кислоти, застосовний у виконанні способів за даним винаходом, являє собою алельний варіант нуклеїнової кислоти, що кодує білок T6PP, як визначається у даному документі вище. Алелі або алельні варіанти є альтернативними формами даного гена, розташованими в одному хромосомному положенні. Алельні варіанти існують у природі, і використання цих природних алелей охоплюється способами за даним винаходом. Алельні варіанти охоплюють поліморфізми окремих нуклеотидів (SNP), а також поліморфізми невеликої вставки/делеції (INDEL). Розмір INDEL звичайно становить менше 100 п.о. SNP і INDEL утворюють найбільший набір варіантів послідовностей у поліморфних лініях більшості організмів, що зустрічаються в природі. Алельні варіанти, застосовні в способах за даним винаходом, мають практично таку саму біологічну активність, що й білок T6PP з SEQ ID NO: 2, і можуть бути мутовані в положеннях у межах білка, які відповідають будь-чому зі зв'язування із субстратом, ферментативної активності, вторинної або третинної структури.

[0198] Згідно з даним винаходом передбачається спосіб поліпшення пов'язаних із урожайністю властивостей рослин, зокрема збільшення врожайності насіння, що включає введення й експресію в рослині алельного варіанта будь-якої з нуклеїнових кислот, наведених у таблиці прикладу 5, або що включає введення й експресію в рослині алельного варіанта нуклеїнової кислоти, що кодує ортолог, паралог або гомолог будь-якої з амінокислотних послідовностей, наведених у таблиці прикладу 5.

[0199] Переважно, алельний варіант являє собою алельний варіант SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 або алельний варіант нуклеїнової кислоти, що кодує ортолог або паралог SEQ ID NO: 2. Переважно, амінокислотна послідовність, закодована алельним варіантом, містить будь-який один або декілька мотивів або доменів, як визначається у даному документі. Переважно, амінокислотна послідовність, закодована алельним варіантом, при застосуванні в побудові філогенетичного дерева TPS/T6PP, такого як зображене на Фіг. 2, має тенденцію утворювати кластер із групою білків класу T6PP, що містять амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 2, а не з будь-якою іншою групою.

[0200] Додатковий варіант нуклеїнової кислоти, застосовний у способах за даним винаходом, являє собою варіант нуклеїнової кислоти, отриманий перестановкою генів. Перестановку генів або спрямовану еволюцію можна також застосовувати для утворення варіантів нуклеїнових кислот, що кодують білки T6PP зі зниженою активністю, як визначається вище. Вона складається з ітерацій з перестановкою ДНК із наступним відповідним скринінгом і/або відбором з утворенням варіантів нуклеїнових кислот або їх частин, що кодують білки T6PP, як визначається вище, що мають модифіковану (знижену) біологічну активність (Castle et al., (2004) Science 304(5674): 1151-4; патенти США №№ 5811238 і 6395547).

[0201] Згідно з даним винаходом передбачається спосіб поліпшення пов'язаних із урожайністю властивостей рослин, що включає введення й експресію в рослині варіанта будь-якої з послідовностей нуклеїнової кислоти, наведених у таблиці прикладу 5, або що включає введення й експресію в рослині варіанта нуклеїнової кислоти, що кодує ортолог, паралог або гомолог будь-якої з амінокислотних послідовностей, наведених у таблиці прикладу 5, причому варіантну нуклеїнову кислоту одержують перестановкою генів. У переважному варіанті здійснення скринінг буде здійснюватися щодо T6PP, що мають більш низький ступінь зв'язування з субстратом і/або активність.

[0202] Переважно, варіантна нуклеїнова кислота, отримана перестановкою генів, кодує амінокислотну послідовність, що містить будь-який один або декілька мотивів або доменів, як

визначається у даному документі. Переважно, амінокислотна послідовність, закодована варіантною нуклеїновою кислотою, отриманою за допомогою перестановки генів, при застосуванні в побудові філогенетичного дерева TPS/T6PP, такого як зображене на Фіг. 2А, має тенденцію утворювати кластер із групою білків Т6PP, що містять амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 2, а не з будь-якою іншою групою.

[0203] Крім того, варіанти нуклеїнової кислоти можна також одержати за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу. Для досягнення сайт-спрямованого мутагенезу доступні декілька способів, при цьому найбільш загальноприйнятими є способи, основані на PCR (Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Eds.). Один аспект даного винаходу полягає у застосуванні сайт-спрямованого мутагенезу таким чином, щоб знизити здатність білка Т6PP зв'язуватися з його субстратом.

[0204] Нуклеїнові кислоти, що кодують білки Т6PP, можна отримувати з будь-якого природного або штучного джерела. Нуклеїнова кислота може бути модифікована у порівнянні з її нативною формою в композиції та/або геномному середовищі за допомогою навмисної обробки людиною. Переважно нуклеїнову кислоту, що кодує Т6PP, отримують з рослини, більш переважно з однодольної рослини, ще більш переважно з роду *Oryza*; найбільш переважно нуклеїнову кислоту отримують з рису.

[0205] Даний винахід також охоплює рослини або їхні частини (включаючи насіння), які можна одержати за допомогою способів згідно з даним винаходом. Рослини або їхні частини містять трансген нуклеїнової кислоти, що кодує білок Т6PP, який був навмисно або ненавмисно модифікований таким чином, щоб він мав знижену активність.

[0206] Винахід також передбачає невідомі дотепер послідовності нуклеїнової кислоти Т6PP і білкові послідовності Т6PP, які можна модифікувати, як описано в даному документі, для способів забезпечення в рослин збільшеної врожайності. Ці послідовності також можуть бути застосовними при виконанні способів за даним винаходом.

[0207] Згідно з наступним варіантом здійснення даного винаходу у даному документі, таким чином, передбачається виділена молекула нуклеїнової кислоти, що містить:

(i) нуклеїнову кислоту, представлену SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 7;

(ii) комплементарну послідовність до будь-якої з SEQ ID NO, наведених в (i);

(iii) нуклеїнову кислоту, яка кодує білок Т6PP, що має, у порядку зростання переваги, щонайменше 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичність послідовності з будь-якою з амінокислотних послідовностей, наведених в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 або SEQ ID NO: 8;

(iv) нуклеїнову кислоту, здатну до гібридизації за жорстких умов з будь-якою з нуклеїнових кислот, наведених в (i), (ii) або (iii) вище.

[0208] Згідно з наступним варіантом здійснення даного винаходу також передбачається виділений поліпептид, що містить:

(i) амінокислотну послідовність, представлену будь-якою з SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 або SEQ ID NO: 8;

(ii) амінокислотну послідовність, що має, у порядку зростання переваги, щонайменше 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичність послідовності з будь-якою з амінокислотних послідовностей, наведених в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 або SEQ ID NO: 8;

(iii) похідні будь-якої з амінокислотних послідовностей, наведених в (i) або (ii) вище.

[0209] Даний винахід також передбачає генні конструкти, касети експресії й вектори для полегшення введення та/або експресії в рослині послідовностей нуклеїнової кислоти, застосовних у способах згідно з даним винаходом. Генні конструкти можна вставляти у вектори, які можуть бути комерційно доступними, що придатні для трансформації в рослини й придатні для експресії гена, що становить інтерес, у трансформованих клітинах. Даний винахід також передбачає застосування генного конструкта, як визначається в даному документі, у способах за даним винаходом.

Даний винахід також передбачає конструкт, що містить:

(i) нуклеїнову кислоту, що кодує білок Т6PP, як визначається вище;

(ii) одну або декілька контрольних послідовностей, здатних управляти експресією послідовності нуклеїнової кислоти (а); і необов'язково

(iii) послідовність термінації транскрипції.

[0210] Переважно нуклеїнова кислота в конструкті згідно з даним винаходом являє собою полінуклеотидну молекулу, що кодує білок Т6PP, з амінокислотною послідовністю, у порядку зростання переваги, щонайменше з 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю послідовності з послідовністю, представленою будь-якою з SEQ ID NO: 1, SEQ ID

NO: 3, SEQ ID NO: 5 і SEQ ID NO: 7. Найбільш переважно, полінуклеотидна молекула T6PP являє собою будь-яку з нуклеотидних послідовностей SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 і SEQ ID NO: 7.

[0211] Рослини трансформують за допомогою вектора, що містить послідовність, яка становить інтерес (тобто, нуклеїнову кислоту, що кодує поліпептид T6PP, який був навмисно або ненавмисно модифікований таким чином, щоб він мав знижену активність). Фахівцevi у даній галузі добре відомі генетичні елементи, які мають бути присутніми у векторі для успішної трансформації, відбору й розмноження клітин-хазяїв, що містять послідовність, яка становить інтерес. Послідовність, що становить інтерес, функціонально пов'язана з однією або декількома контрольними послідовностями (щонайменше із промотором). Вирази "регуляторний елемент", "контрольна послідовність" і "промотор" використовуються в даному документі взаємозамінно, та їх слід розглядати в широкому контексті для позначення регуляторних послідовностей нуклеїнової кислоти, що здатні впливати на експресію послідовностей, з якими вони лігвані. Вираз "промотор" зазвичай стосується контрольної послідовності нуклеїнової кислоти, яка розташована вище відносно початку транскрипції гена і яка залучається в розпізнавання й зв'язування РНК-полімерази й інших білків, управляючи, тим самим, транскрипцією функціонально зв'язаної нуклеїнової кислоти. Вищевказані вирази охоплюють послідовності регуляції транскрипції, що походять з класичного еукаріотичного геномного гена (включаючи ТАТА-бокс, який потрібний для правильної ініціації транскрипції, з послідовністю ССААТ-боксу або без неї), і додаткові регуляторні елементи (тобто, активуючі послідовності, що розташовані вище, ехансери й сайленсери), які змінюють генну експресію у відповідь на пов'язані з розвитком і/або зовнішні стимули або тканиноспецифічним способом. Також вираз включає послідовність регуляції транскрипції класичного прокаріотичного гена, у випадку чого вона може включати -35-бокс-послідовність і/або -10-бокс-послідовність регуляції транскрипції. Вираз "регуляторний елемент" також охоплює синтетичну зливу молекулу або похідне, що забезпечує, активує або підсилює експресію молекули нуклеїнової кислоти в клітині, тканині або органі. Вираз "функціонально пов'язаний", як використовується в даному документі, стосується функціонального зв'язку між промоторною послідовністю й геном, що становить інтерес, так що промоторна послідовність здатна ініціювати транскрипцію гена, що становить інтерес.

[0212] Переважно, щоб управляти експресією послідовності нуклеїнової кислоти можна застосовувати будь-який тип промотора. Вираз "промотор" стосується контрольної послідовності нуклеїнової кислоти, яка розташована вище відносно початку транскрипції гена і яка залучається в розпізнавання й зв'язування РНК-полімерази й інших білків, управляючи, тим самим, транскрипцією функціонально пов'язаної нуклеїнової кислоти. "Рослинний промотор" містить регуляторні елементи, які опосередковують експресію сегмента кодуючої послідовності у рослинних клітинах. Відповідно, рослинний промотор може бути не рослинного походження, але може походити від вірусів або мікроорганізмів, наприклад від вірусів, які вражають клітини рослин. "Рослинний промотор" може також походити від рослинної клітини, наприклад від рослини, яка трансформується за допомогою послідовності нуклеїнової кислоти, що підлягає експресії. Це також поширюється на інші "рослинні" регуляторні сигнали, такі як "рослинні" термінатори. Промотори, що розташовані вище за нуклеотидні послідовності, застосовні у способах за даним винаходом, можна модифікувати за допомогою одного або декількох нуклеотидних заміщень, вставок та/або делецій без перешкоджання функціональності або активності будь-чого з промоторів, регуляторної ділянки відкритої рамки зчитування (ORF), або 3'-регуляторної ділянки, такої як термінатори, або інших 3'-регуляторних ділянок, які розташовані далеко від ORF. Також можливо, що активність промоторів збільшується шляхом модифікації їхньої послідовності, або вони повністю заміщуються на більш активні промотори, навіть промотори від гетерологічних організмів. Щодо експресії в рослинах, то молекула нуклеїнової кислоти функціонально пов'язана з придатним промотором.

[0213] Промотор може бути конститутивним промотором, який називають промотором, що є транскрипційно активним під час більшості, але не обов'язково під час усіх, фаз росту й розвитку та за більшості умов навколишнього середовища щонайменше в одній клітині, тканині або одному органі. Альтернативно, промотор може являти собою промотор, який індукується, тобто він характеризується ініціацією транскрипцією, що індукується, або підвищеною ініціацією транскрипції у відповідь на хімічний стимул (для огляду див. Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89-108), стимул навколишнього середовища або фізичний стимул. Іншим прикладом промотора, який індукується, є промотор, що індукується стресом, тобто промотор, що активується, коли рослина зазнає різних стресових умов, або промотор, що індукується патогеном.

[0214] Додатково або альтернативно, промотор може бути органоспецифічним або тканинспецифічним промотором, тобто таким, який здатний ініціювати транскрипцію переважно в конкретних органах або тканинах, таких як листки, корені, тканина насінини та ін.; або ж промотор може являти собою універсальний промотор, який є активним практично у всіх тканинах або клітинах організму, або промотор може регулюватися стадіями розвитку, внаслідок чого він є активним під час конкретних стадій розвитку або у конкретних частинах рослини, які зазнають змін, пов'язаних з розвитком. Промотори, що здатні ініціювати транскрипцію лише в конкретних органах або тканинах, називають в даному документі "органоспецифічними" або "тканинспецифічними", відповідно; аналогічним чином промотори, здатні ініціювати транскрипцію лише в конкретних клітинах, називають в даному документі "клітинспецифічними".

[0215] В одному аспекті даного винаходу нуклеїнова кислота Т6РР або її варіант функціонально пов'язані із промотором, який управляє експресією Т6РР у материнській репродуктивній тканині рослини, такий як тканина стрижня качана рослини, вузол качана, тканина колоска, тканина незапиленої квітки та тканина квітконіжки. Промотори, такі як промотори OsMADS, описані в публікації заявки на патент США 2007/0006344, включеній в даний документ за допомогою посилання, можна застосовувати в конкретних аспектах даного винаходу.

[0216] Для ідентифікації функціонально еквівалентних промоторів ефективність промотора та/або патерн експресії кандидатного промотора можна аналізувати, наприклад, шляхом функціонального зв'язування промотора з репортерним геном і аналізу рівня й патерна експресії репортерного гена в різних тканинах рослини. Придатні добре відомі репортерні гени включають, наприклад, ген β -глюкуронідази або ген β -галактозидази. Активність промотора аналізують шляхом вимірювання ферментативної активності β -глюкуронідази або β -галактозидази. Ефективність промотора та/або патерн експресії потім можна порівнювати з такими еталонного промотора (такого як промотор, що застосовується у способах за даним винаходом). Альтернативно, ефективність промотора можна аналізувати шляхом кількісного визначення рівнів мРНК або шляхом порівняння рівнів мРНК нуклеїнової кислоти, яку застосовують в способах за даним винаходом, з рівнями мРНК генів "домашнього господарства", наприклад 18S рРНК, за допомогою способів, відомих у даній галузі техніки, таких як нозерн-блотинг із денситометричним аналізом авторадіограм, кількісна PCR у режимі реального часу або RT-PCR (Heid et al., 1996 Genome Methods 6: 986-994). Зазвичай вираз "слабкий промотор" стосується промотора, який управляє експресією кодуєчої послідовності на низькому рівні, рівнях від приблизно 1/10000 транскриптів до приблизно 1/100000 транскриптів, до приблизно 1/5000000 транскриптів на клітину. Навпаки, "сильний промотор" управляє експресією кодуєчої послідовності на високому рівні, або від приблизно 1/10 транскриптів до приблизно 1/100 транскриптів, до приблизно 1/1000 транскриптів на клітину.

[0217] Передбачається, що регуляторні елементи можна застосовувати для зміни тривалості, протягом якої задана властивість присутня. Наприклад, фахівець може сконструювати касети експресії для експресії модифікованої Т6РР під час цвітіння рослини, таким чином забезпечуючи посухостійкість рослини на цій стадії розвитку. Подібним чином фахівець також може сконструювати касети експресії, які конститутивно експресують у рослині модифіковану Т6РР, таким чином, не обмежуючись теорією, надаючи рослині посухостійкість протягом усього життєвого циклу.

[0218] Необов'язково, у конструкті, що вводиться в рослину, можна застосовувати одну або декілька термінаторних послідовностей. Вираз "термінатор" охоплює контрольну послідовність, що являє собою послідовність ДНК, яка міститься на кінці одиниці транскрипції після стоп-кодону, що дає сигнал для 3'-процесінгу і поліаденілювання первинного транскрипта й термінації транскрипції. Термінатор можна одержувати із природного гена, з багатьох інших рослинних генів або з Т-ДНК. Термінатор, який необхідно додати, можна одержати, наприклад, з генів нопалінсинтази або октопінсинтази, або, альтернативно, з іншого рослинного гена, або, менш переважно, з будь-якого іншого еукаріотичного гена. Додаткові регуляторні елементи можуть включати як енхансери транскрипції, так і енхансери трансляції. Фахівці в даній галузі будуть обізнані про послідовності термінатора й енхансера, які можуть бути придатні для використання при здійсненні даного винаходу. Такі послідовності будуть відомі або можуть бути легко отримані фахівцем у даній галузі.

[0219] До 5'-нетрансльованої ділянки (UTR) або в кодуєчу послідовність можна також додавати інтронну послідовність для збільшення кількості зрілої мРНК, яка накопичується в цитозолі. Було показано, що введення інтрона, який піддається сплайсингу, в одиницю транскрипції в конструктах експресії як для рослин, так і для тварин збільшує генну експресію як

на рівні мРНК, так і на рівні білка до 1000-кратної (Buchman and Berg, *Mol. Cell Biol.* 8:4395-4405 (1988); Callis et al., *Genes Dev.* 1:1183-1200 (1987)). Таке посилення генної експресії за допомогою інтронів звичайно є найсильнішим при розміщенні їх поблизу 5'-кінця одиниці транскрипції. В даній галузі відоме застосування інтронів маїсу, інтронів 1, 2 і 6 Adh1-S, інтрона

5 Bronze-1. Для одержання загальних відомостей див. *The Maize Handbook*, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, N.Y. (1994). У деяких аспектах даного винаходу фахівець може побажати збільшити у рослині експресію T6PP, модифікованої таким чином, щоб вона мала зменшену здатність до зв'язування із субстратом задля надання збільшеної врожайності.

[0220] Інші контрольні послідовності (окрім промоторних, енансерних, сайленсерних, інтронних послідовностей, 3'UTR і/або 5'UTR ділянок) можуть являти собою елементи, які стабілізують білок та/або РНК. Такі послідовності будуть відомі або можуть бути легко отримані фахівцем у даній галузі.

[0221] Генетичні конструкти за даним винаходом можуть додатково включати послідовність точки початка реплікації, яка потрібна для утримання та/або реплікації в визначеному типі клітин. Одним із прикладів є ситуація, коли генетичний конструкт необхідно підтримувати в бактеріальній клітині в якості епісомального генетичного елемента (наприклад, молекули плазміди або косміди). Переважні точки початка реплікації включають без обмеження f1-ori та colE1.

[0222] Для виявлення успішного перенесення послідовностей нуклеїнової кислоти, як застосовується в способах за даним винаходом, і/або відбору трансгенних рослин, що містять ці нуклеїнові кислоти, переважним є застосування маркерних генів (або репортерних генів). Таким чином, генетичний конструкт може необов'язково містити селективний маркерний ген. Як використовується в даному документі, вираз "селективний маркер", "селективний маркерний ген" або "репортерний ген" включає будь-який ген, що забезпечує фенотип клітини, у якій він експресується, що полегшує ідентифікацію та/або відбір клітин, які є трансфікованими або трансформованими за допомогою конструкта нуклеїнової кислоти за даним винаходом. Ці маркерні гени дозволяють ідентифікувати успішне перенесення молекул нуклеїнової кислоти за допомогою ряду різних принципів. Придатні маркери можна вибрати з маркерів, які забезпечують стійкість до антибіотиків або гербіцидів, які вводять нову метаболічну ознаку або які дозволяють проводити візуальний відбір. Приклади селективних маркерних генів включають гени, що забезпечують стійкість до антибіотиків (такі як nptII, який фосфорилує неоміцин і канаміцин, або hpt, який фосфорилує гіроміцин, або гени, що забезпечують стійкість, наприклад, до блеоміцину, стрептоміцину, тетрацикліну, хлорамфеніколу, ампіциліну, гентаміцину, генетицину (G418), спектиноміцину або бластицидину), до гербіцидів (наприклад, bar, який надає стійкість до Basta®; agoA або gox, які надають стійкість до гліфосату, або гени, що забезпечують стійкість, наприклад, до імідазолінону, фосфінотрицину або сульфонілсечовини), або гени, які забезпечують метаболічну ознаку (такі як manA, який дозволяє рослинам використовувати манозу в якості єдиного джерела вуглецю або ксилізоізомерази для використання ксиліози, або антипоживні маркери, наприклад стійкості до 2-дезоксиглюкози). Експресія візуальних маркерних генів приводить до утворення кольору (наприклад, β -глюкуронідаза, GUS або β -галактозидаза з їх забарвленими субстратами, наприклад, X-Gal), люмінесценції (наприклад, система люциферин/люцифераза) або флуоресценції (зелений флуоресцентний білок, GFP і його похідні). Цей перелік представляє лише невелику кількість можливих маркерів. Кваліфікований фахівець добре знайомий із такими маркерами. Залежно від організму й способу відбору переважними є різні маркери.

[0223] Відомо, що при стабільній або тимчасовій інтеграції нуклеїнових кислот у рослинні клітини лише незначна кількість клітин поглинає чужорідну ДНК і, при необхідності, інтегрує її у свій геном залежно від вектора експресії, що застосовується, і техніки трансфекції, що застосовується. Для ідентифікації й відбору цих інтегрантів, ген, що кодує селективний маркер (такий як описаний вище), звичайно вводять у клітини-хазяї разом з геном, що становить інтерес. Ці маркери можна, наприклад, застосовувати в мутантах, де ці гени є не функціональними, завдяки, наприклад, делеції шляхом звичайних способів. Крім того, молекули нуклеїнової кислоти, які кодують селективний маркер, можна вводити в клітину-хазяїна у тому самому векторі, що містить послідовність, яка кодує поліпептиди за даним винаходом або яка застосовується в способах за даним винаходом, або ж в окремому векторі. Клітини, які були стабільно трансфіковані за допомогою введеної нуклеїнової кислоти, можна ідентифікувати, наприклад, шляхом відбору (наприклад, клітини, у які інтегрувався селективний маркер, виживають, тоді як інші клітини гинуть).

[0224] Оскільки маркерні гени, зокрема гени стійкості до антибіотиків і гербіцидів, після того як нуклеїнові кислоти були успішно введені, більше не потрібні або небажані в трансгенній

клітині-хазяїні, у способі згідно з даним винаходом для введення нуклеїнових кислот переважно використовуються методики, які дозволяють вилучати або вирізати ці маркерні гени. Один такий спосіб відомий як котрансформація. У способі котрансформації для трансформації використовують два вектори одночасно, при цьому один вектор несе нуклеїнову кислоту згідно з даним винаходом, а другий несе маркерний ген(и). Більша частка трансформантів одержує або, у випадку рослин, містить (до 40 % або більше трансформантів) обидва вектори. У випадку трансформації за допомогою агробактерій трансформанти зазвичай одержують лише частину вектора, тобто послідовність, яка фланкована Т-ДНК, що зазвичай представляє касету експресії. Маркерні гени у подальшому можна вилучити з трансформованої рослини шляхом проведення схрещування. В іншому способі маркерні гени, інтегровані в транспозон, застосовують для трансформації разом з необхідною нуклеїновою кислотою (він відомий як технологія Ac/Ds). Трансформанти можна схрещувати із джерелом транспозази, або ж трансформанти трансформують за допомогою конструкта нуклеїнової кислоти, що забезпечує експресію транспозази, тимчасово або постійно. У деяких випадках (приблиз. 10 %) відразу після того, як успішно відбулася трансформація, транспозон вискакує з генома клітини-хазяїна і втрачається. У наступному ряді випадків транспозон перескакує на інше положення. У цих випадках маркерний ген необхідно вилучити шляхом проведення схрещувань. У мікробіології розроблені методики, які роблять можливим або полегшують виявлення таких об'єктів. Додатковий переважний спосіб оснований на так званих системах рекомбінації, при цьому його перевага полягає в тому, що можна обійтися без вилучення за допомогою схрещування. Найбільш відома система цього типу відома як система Cre/lox. Cre1 являє собою рекомбіназу, яка видаляє послідовності, що розташовані між послідовностями loxP. Якщо маркерний ген інтегрується між послідовностями loxP, то за допомогою експресії рекомбінази він видаляється відразу після того, як успішно відбудеться трансформація. Додаткові системи рекомбінації являють собою системи HIN/HIX, FLP/FRT і REP/STB (Tribble et al., J. Biol. Chem., 275, 2000: 22255-22267; Velmurugan et al., J. Cell Biol., 149, 2000: 553-566). Можливою є сайт-специфічна інтеграція в геном рослини послідовностей нуклеїнової кислоти згідно з даним винаходом. Звичайно ж, ці способи можна також застосовувати до мікроорганізмів, таких як дріжджі, гриби або бактерії.

[0225] Винахід також передбачає спосіб одержання трансгенних рослин з поліпшеними ознаками, пов'язаними з урожайністю, зокрема збільшеною врожайністю насіння у порівнянні з контрольними рослинами, що включає введення й експресію в рослині будь-якої нуклеїнової кислоти, що кодує білок Т6РР, як визначається у даному документі вище.

[0226] Один аспект даного винаходу передбачає касети експресії, що містять:

(а) послідовності нуклеїнової кислоти, що кодують білки, застосовні в способах за даним винаходом, або

(b) генетичну контрольну послідовність(і), яка функціонально пов'язана з послідовністю нуклеїнової кислоти згідно з даним винаходом, наприклад промотор, або

(c) a) і b).

[0227] Більш конкретно, даний винахід передбачає спосіб одержання трансгенних рослин зі збільшеною врожайністю, причому спосіб включає:

(i) введення й експресію в рослині, частині рослини або рослинній клітині нуклеїнової кислоти Т6РР або її варіанта, де Т6РР має зменшену активність щодо зв'язування з субстратом;

(ii) культивування рослинної клітини за умов, що прискорюють ріст і розвиток рослини.

[0228] Нуклеїнову кислоту можна вводити безпосередньо в рослинну клітину або в рослину як таку (включаючи введення в тканину, орган або будь-яку іншу частину рослини). Згідно з переважною ознакою даного винаходу нуклеїнову кислоту переважно вводять в рослину за допомогою трансформації.

[0229] Перенесення чужорідних генів у геном рослини називається трансформацією. На даний час трансформація видів рослин є досить звичайною методикою. Переважно, для введення гена, що становить інтерес, у придатну клітину-попередник можна застосовувати будь-який з декількох способів трансформації. Способи, описані стосовно трансформації й регенерації рослин із рослинних тканин або рослинних клітин, можна застосовувати для тимчасової або постійної трансформації. Способи трансформації включають застосування ліпосом, електропорації, хімічних речовин, які підсилюють поглинання вільної ДНК, ін'єкцію ДНК безпосередньо в рослину, бомбардування генною гарматою, трансформацію із застосуванням вірусів або пилку й мікропроекцію. Способи можуть бути вибрані зі способу за допомогою кальцію/поліетиленгліколю для протопластів (Krens, F. A. et al., (1982) Nature 296, 72-74; Negrutiu I et al. (1987) Plant Mol Biol 8: 363-373); електропорації протопластів (Shillito R. D. et al.

(1985) *Bio/Technol* 3, 1099-1102); мікроін'єкції в рослинний матеріал (Crossway A et al., (1986) *Mol. Gen Genet* 202: 179-185); бомбардування частинками, покритими ДНК або РНК (Klein T M et al., (1987) *Nature* 327: 70); зараження (неінтегрованими) вірусами й подібного. Трансгенні рослини, включаючи трансгенні сільськогосподарські культури, переважно одержують за допомогою опосередкованої *Agrobacterium* трансформації. Переважним способом трансформації є трансформація *in planta*. Із цієї сторони, можна, наприклад, дозволити агробактеріям діяти на насіння рослин або інокулювати меристему рослин агробактеріями. Особливо доцільним згідно з даним винаходом виявилось дозволити суспензії трансформованих агробактерій діяти на інтактну рослину або щонайменше на зачатки квіток. Потім рослину вирощують, доки не буде отримане насіння обробленої рослини (Clough and Bent, *Plant J.* (1998) 16, 735-743). Способи для опосередкованої *Agrobacterium* трансформації рису включають добре відомі способи для трансформації рису, такі як описані в будь-чому з наступного: Європейська патентна заявка EP 1198985 A1, Aldemita and Hodges (*Planta* 199: 612-617, 1996); Chan et al. (*Plant Mol Biol* 22 (3): 491-506, 1993), Hiei et al. (*Plant J* 6 (2): 271-282, 1994), розкриття яких включені в даний документ за допомогою посилання, немов вони повністю викладені. У випадку трансформації кукурудзи переважним способом є описаний або в Ishida et al. (*Nat. Biotechnol* 14(6): 745-50, 1996), або в Frame et al. (*Plant Physiol* 129(1): 13-22, 2002), розкриття яких включені в даний документ за допомогою посилання, немов вони повністю викладені. Зазначені способи також описані у якості приклада в B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, в *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. S. D. Kung and R. Wu, Academic Press (1993) 128-143, і в Potrykus *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991) 205-225). Нуклеїнові кислоти або конструктор, що підлягають експресії, переважно клонують у вектор, який підходить для трансформації *Agrobacterium tumefaciens*, наприклад pBin19 (Bevan et al., *Nucl. Acids Res.* 12 (1984) 8711). Агробактерії, трансформовані таким вектором, у подальшому можна застосовувати у відомому способі трансформації рослин, наприклад рослин, що застосовуються в якості моделі, такі як *Arabidopsis*, або сільськогосподарських культур, таких як, наприклад рослини тютюну, наприклад, за допомогою занурення подрібнених листків або нарубаних листків у розчин агробактерій і подальшого культивування їх у придатному середовищі. Трансформація рослин за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* описана, наприклад, Höfgen and Willmitzer in *Nucl. Acid Res.* (1988) 16, 9877, або частково відома з F. F. White, *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*; в *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. S. D. Kung and R. Wu, Academic Press, 1993, pp. 15-38.

[0230] На додаток до трансформації соматичних клітин, які потім необхідно регенерувати в інтактні рослини, також можна трансформувати клітини рослинних меристем і, зокрема, такі клітини, які розвиваються в гамети. У цьому випадку трансформовані гамети дотримуються природного циклу розвитку рослини, приводячи до трансгенних рослин. Таким чином, наприклад, насіння *Arabidopsis* обробляють агробактеріями та одержують насіння від рослин, що розвиваються, при цьому визначена їх частка трансформується, а тому є трансгенною [Feldman, K A and Marks M D (1987). *Mol Gen Genet* 208:274-289; Feldmann K (1992). In: C Koncz, N-H Chua and J Shell, eds, *Methods in Arabidopsis Research*. World Scientific, Singapore, pp. 274-289]. Альтернативні способи ґрунтовані на повторному видаленні суцвіть та інкубації вирізаного ділянки в центрі розетки із трансформованими агробактеріями, при цьому аналогічним чином можна отримувати трансформоване насіння в більш пізній момент часу (Chang (1994). *Plant J.* 5: 551-558; Katavic (1994). *Mol Gen Genet*, 245: 363-370). Однак особливо ефективним способом є спосіб вакуумної інфільтрації з його модифікаціями, такими як спосіб "занурення квітки". У випадку вакуумної інфільтрації *Arabidopsis* інтактні рослини за умов зниженого тиску обробляють суспензією агробактерій (Bechthold, N (1993). *C R Acad. Sci. Paris Life Sci.*, 316: 1194-1199), тоді як у випадку способу "занурення квітки" тканину квітки, що розвивається, інкубують протягом короткого періоду часу з обробленою поверхнево-активною речовиною суспензією агробактерій [Clough, S J und Bent, A F (1998). *The Plant J.* 16, 735-743]. В обох випадках збирають певну частку трансгенного насіння, і це насіння можна відрізнити від нетрансгенного насіння за допомогою вирощування за вищевказаних селективних умов. Крім того, стабільна трансформація пластид являє собою перевагу, оскільки пластиди в більшості сільськогосподарських культур успадковуються по материнській лінії, зменшуючи або усуваючи ризик потоку трансгена через пилок. Трансформацію генома хлоропластів звичайно здійснюють за допомогою процесу, який був схематично представлений в Klaus et al., 2004 [*Nature Biotechnology* 22 (2), 225-229]. Коротко кажучи, послідовності, що підлягають трансформації, клонують разом із селективним маркерним геном між фланкуючими послідовностями, гомологічними геному хлоропласта. Ці гомологічні фланкуючі послідовності управляють сайт-специфічною інтеграцією у пластом. Трансформація пластид була описана для багатьох різних

видів рослин, і огляд наведено в Bock (2001) Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. *J Mol Biol.* September 2001 21; 312 (3):425-38, або Maliga, P (2003) Progress towards commercialization of plastid transformation technology. *Trends Biotechnol.* 21, 20-28. Щодо подальшого біотехнологічного прогресу нещодавно повідомили про трансформанти пластид без маркера, які можна одержати за допомогою тимчасового маркерного гена, що котрансформується (Klaus et al., 2004, *Nature Biotechnology* 22(2), 225-229).

[0231] Генетично модифіковані рослинні клітини можна регенерувати за допомогою всіх способів, які відомі кваліфікованому фахівцю. Придатні способи можна знайти у вищевказаних публікаціях S. D. Kung and R. Wu, Potrykus або Höfgen and Willmitzer.

[0232] Зазвичай після трансформації рослинні клітини або групи клітин відбирають на наявність одного або декількох маркерів, закодованих генами, які можуть експресуватися рослинами та які були котрансформовані з геном, що становить інтерес, після чого трансформований матеріал регенерують в цілу рослину. Для відбору трансформованих рослин рослинний матеріал, отриманий при трансформації, як правило, піддають селективним умовам, щоб трансформовані рослини можна було відрізнити від нетрансформованих рослин. Наприклад, отримане вищеописаним способом насіння можна висіяти та, після початкового періоду вегетації, піддати відповідному відбору шляхом обприскування. Додаткова можливість полягає у вирощуванні насіння, за необхідності після стерилізації, на чашках з агаровим середовищем із застосуванням відповідного засобу для відбору, щоб лише трансформоване насіння могло дорости до рослин. Альтернативно, трансформовані рослини піддають скринінгу на наявність селективного маркера, такого як описані вище.

[0233] Після перенесення ДНК і регенерації, ймовірно, трансформовані рослини також можна охарактеризувати, наприклад із застосуванням саузерн-аналізу, на наявність гена, що становить інтерес, число копій і/або організацію геному. Альтернативно або додатково, рівні експресії щойно введеної ДНК можна відстежувати із застосуванням нозерн- і/або вестерн-аналізу, при цьому обидві методики добре відомі фахівцям, що мають кваліфікацію у даній галузі.

[0234] Отримані трансформовані рослини можна розмножувати різними способами, такими як клональне розмноження або класичні методики селекції. Наприклад, перше покоління (або T1) трансформованої рослини може самозапилюватися, а гомозиготні трансформанти другого покоління (або T2) можна відібрати, щоб у подальшому рослини T2 розмножувати за допомогою класичних методик селекції.

[0235] Отримані трансформовані організми можуть приймати різні форми. Наприклад, вони можуть являти собою химерні організми з трансформованих клітин і нетрансформованих клітин; клональні трансформанти (наприклад, усі клітини, трансформовані так, щоб вони містили касети експресії); прищепи з трансформованих і нетрансформованих тканин (наприклад, у рослинах трансформована підщепа прищеплюється на нетрансформовану прищепу).

[0236] Даний винахід явно поширюється на будь-яку рослинну клітину або рослину, отриману за допомогою будь-якого зі способів, описаних у даному документі, і на всі частини рослин і їхні паростки. Даний винахід також поширюється для охоплення потомства первинно трансформованої або трансфікованої клітини, тканини, органа або цілої рослини, які були отримані за допомогою будь-якого з вищевказаних способів, причому єдиною вимогою є те, щоб потомство проявляло таку саму генотипичну та/або фенотипичну характеристику(и), яка проявлялася в батьківського організму в способах згідно з даним винаходом.

[0237] Даний винахід також включає клітини-хазяїни, які містять виділену нуклеїнову кислоту, що кодує білок Т6РР, як визначається в даному документі вище. Переважними клітинами-хазяїнами згідно з даним винаходом є рослинні клітини.

[0238] Рослини-хазяїни для нуклеїнових кислот або вектора, які застосовують в способах згідно з даним винаходом, касети експресії, або конструкт, або вектор являються, в принципі, переважними в усіх рослинах, які здатні синтезувати поліпептиди, застосовувані в способах за даним винаходом.

[0239] Таким чином, по відношенню до трансгенної рослини для цілей даного винаходу розуміють, згідно вищевказаного, що нуклеїнові кислоти, застосовувані в способі за даним винаходом, знаходяться не в їх природному локусі в геномі зазначеної рослини, причому стосовно нуклеїнових кислот імовірно, що вони експресуються гомологічно або гетерологічно. Однак, як зазначається, трансгенний також означає, що хоча нуклеїнові кислоти згідно з даним винаходом або ті, що застосовуються в способі за даним винаходом, перебувають у їх природному положенні в геномі рослини, послідовність була модифікована відносно природної послідовності та/або були модифіковані регуляторні послідовності природних послідовностей. Мається на увазі, що трансгенний переважно означає експресію нуклеїнових кислот згідно з

даним винаходом в неприродному локусі в геномі, тобто відбувається гомологічна або, переважно, гетерологічна експресія нуклеїнових кислот. Переважні трансгенні рослини зазначені в даному документі.

[0240] Винахід також поширюється на придатні для заготівлі частини рослини, такі як без обмеження насіння, листки, плоди, квітки, стебла, ризоми, бульби й цибулини. Даний винахід також стосується продуктів, отриманих, переважно безпосередньо отриманих, з придатних для заготівлі частин такої рослини, таких як сухі гранули або порошки, олія, жир і жирні кислоти, крохмаль або білки.

[0241] Згідно з однією ознакою даного винаходу відрегульована експресія являє собою збільшену експресію. Способи збільшення експресії нуклеїнових кислот або генів, або генних продуктів, добре документально підтверджені в рівні техніки та включають, наприклад, надекспресію, що управляється відповідними промоторами, застосування енхансерів транскрипції або енхансерів трансляції. Виділені нуклеїнові кислоти, які служать промоторними або енхансерними елементами, можна вводити в відповідне положення (зазвичай вище) негетерологічної форми полінуклеотида, щоб таким чином активувати експресію. Наприклад, ендогенні промотори можна змінювати *in vivo* шляхом мутації, делеції та/або заміщення (див. Kmies, патент США №5565350; Zarling et al., PCT/US93/03868) або ж виділені промотори можна вводити в рослинну клітину в належній орієнтації та відстані від гена за даним винаходом, щоб вони таким чином управляли експресією гена.

[0242] Якщо необхідна експресія поліпептиду, зазвичай бажаним є включення ділянки поліаденілювання на 3'-кінці полінуклеотидної кодуєчої ділянки. Ділянку поліаденілювання можна одержати з природного гена, з багатьох інших рослинних генів або з Т-ДНК. Послідовність 3'-кінця, яку необхідно додати, можна одержати, наприклад, з генів нопалінсинтази або октопінсинтази, або альтернативно з іншого рослинного гена, або менш переважно з будь-якого іншого еукаріотичного гена.

[0243] Також можна додавати інтронну послідовність, як описується вище.

[0244] Інші контрольні послідовності (крім промоторних, енхансерних, сайленсерних, інтронних послідовностей, 3'-UTR і/або 5'-UTR ділянок, цільових сайтів мікро-РНК) можуть являти собою елементи, що стабілізують білок та/або РНК.

[0245] Як зазначено вище, спосіб регуляції експресії нуклеїнової кислоти, яка кодує білок Т6РР, модифікований таким чином, щоб він мав знижену активність, полягає у введенні й експресії в рослині нуклеїнової кислоти, яка кодує білок Т6РР; однак ефектів від виконання способу, тобто поліпшення пов'язаних із урожайністю властивостей, можна також досягти за допомогою інших добре відомих методик. Опис деяких із цих методик подається далі.

[0246] Однією з таких методик є активаційне мічення за допомогою Т-ДНК (Hayashi et al. Science (1992) 1350-1353), яке включає вставку Т-ДНК, що зазвичай містить промотор (також може містити енхансер трансляції або інтрон), у геномну ділянку гена, який становить інтерес, або на 10 т.п.о. вище від кодуєчої ділянки гена в такій конфігурації, щоб промотор управляв експресією цільового гена. Як правило, регуляція експресії цільового гена за допомогою його природного промотора порушується, і ген підпадає під контроль щойно введеного промотора. Промотор, як правило, вбудований в Т-ДНК. Ця Т-ДНК довільно вставляється в геном рослини, наприклад завдяки зараженню *Agrobacterium*, і приводить до модифікованої експресії генів поблизу вставленої Т-ДНК. Отримані в результаті трансгенні рослини проявляють домінантні фенотипи внаслідок модифікованої експресії генів поблизу введеного промотора.

[0247] Ефекти даного винаходу можна також відтворити за допомогою методики TILLING (націлені індуковані місцеві ураження в геномі (Targeted Induced Local Lesions In Genomes)). Вона являє собою техніку мутагенезу, застосовну для одержання та/або ідентифікації нуклеїнової кислоти, що кодує білок Т6РР класу III з модифікованою експресією та/або активністю. TILLING також дозволяє проводити відбір рослин, що несуть такі мутантні варіанти. Ці мутантні варіанти можуть проявляти модифіковану експресію, або за силою, або за локалізацією, або за часом (якщо, наприклад, мутації впливають на промотор). Ці мутантні варіанти можуть проявляти активність білка Т6РР класу III вищу за активність, яку проявляє ген у його природній формі. TILLING поєднує високочастотний мутагенез зі способами високопродуктивного скринінгу. Як правило, TILLING включає наступні етапи: (а) мутагенез за допомогою EMS (Redei G P and Koncz C (1992) In Methods in Arabidopsis Research, Koncz C, Chua NH, Schell J, eds. Singapore, World Scientific Publishing Co, pp. 16-82; Feldmann et al., (1994) In Meyerowitz E M, Somerville C R, eds, Arabidopsis. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., pp 137-172; Lightner J and Caspar T (1998) In J Martinez-Zapater, J Salinas, eds, Methods on Molecular Biology, Vol. 82. Humana Press, Totowa, N.J., pp 91-104); (b) одержання

ДНК і об'єднання окремих об'єктів; (с) PCR-ампліфікацію ділянки, що становить інтерес; (d) денатурацію й відпал з утворенням гетеродуплексів; (e) DHPLC, у якій присутність гетеродуплекса в пулі визначається за додатковим піком на хроматограмі; (f) ідентифікацію мутантного об'єкта та (g) секвенування мутантного продукту PCR. У даній галузі техніки добре відомі способи TILLING (McCallum et al., (2000) *Nat Biotechnol* 18: 455-457; огляд Stemple (2004) *Nat Rev Genet* 5(2): 145-50).

[0248] Ефекти даного винаходу можна також відтворювати за допомогою гомологічної рекомбінації, яка дозволяє вводити в геном вибрану нуклеїнову кислоту в визначене вибране положення. Гомологічна рекомбінація являє собою стандартну техніку, яку звичайно застосовують в біологічних експериментах на нижчих організмах, таких як дріжджі або мох *Physcomitrella*. Способи здійснення гомологічної рекомбінації у рослин були описані не тільки для модельних рослин (Offringa et al. (1990) *EMBO J* 9(10): 3077-84), але й для культурних рослин, наприклад, рису (Terada et al. (2002) *Nat Biotech* 20(10): 1030-4; Iida and Terada (2004) *Curr. Opin. Biotech* 15(2): 132-8).

[0249] Посилання в даному документі на поліпшені пов'язані з урожайністю ознаки використовується для позначення збільшення біомаси (ваги) однієї або декількох частин рослини, які можуть включати надземні (придатні для заготівлі) частини та/або підземні (придатні для заготівлі) частини. Зокрема, такі придатні для заготівлі частини являють собою насіння, і виконання способів за даним винаходом приводить у результаті до того, що рослини характеризуються збільшеною врожайністю насіння у порівнянні з урожайністю насіння відповідних контрольних рослин.

[0250] Вираз "підвищення", "поліпшення" або "поліпшувати" є взаємозамінними й будуть означати у контексті цієї заявки щонайменше на 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % або 10 %, переважно щонайменше на 15 % або 20 %, більш переважно на 25 %, 30 %, 35 % або 40 % більшу врожайність і/або приріст у порівнянні з рослиною дикого типу, як визначається у даному документі.

[0251] Збільшена врожайність насіння може проявлятися як така одним або декількома з наступного: а) збільшенням біомаси насіння (загальної ваги насіння), що може виражатися на основі окремої насінини, і/або на рослину, і/або на гектар або акр; б) збільшеним числом квіток на рослину; с) збільшеним числом (налитих) насінин; d) збільшеною нормою налитих насінин (яка виражається як відношення числа налитих насінин, діленого на загальне число насінин); е) збільшеним індексом урожайності, який виражається як відношення врожайності придатних для заготівлі частин, таких як насіння, поділеної на загальну біомасу; і f) збільшеною масою тисячі зерен (TKW), яку екстраполюють на основі числа підрахованих налитих насінин і їх загальної ваги. Збільшена TKW може бути наслідком збільшеного розміру насінини та/або ваги насінини, а також може бути наслідком збільшення розміру зародка та/або ендосперму.

[0252] Збільшення врожайності насіння може також проявлятися як збільшення розміру насінини і/або об'єму насінини. Крім того, збільшення врожайності насіння може також проявлятися як таке у якості збільшення площі насінини, і/або довжини насінини, і/або ширини насінини, і/або окружності насінини.

[0253] Якщо у якості прикладу взяти кукурудзу, збільшення врожайності може проявлятися як одне або декілька з наступного: збільшення числа вкорінених рослин на гектар або акр, збільшення числа качанів на рослину, збільшення числа рядів, числа зерен на ряд, ваги зерна, ваги тисячі зерен, довжини/діаметра качана, збільшення норми налитих насінин (яка являє собою число налитих насінин, поділене на загальне число насінин і помножене на 100), серед іншого. Якщо у якості прикладу взяти рис, збільшення врожайності може проявлятися як збільшення одного або декількох з наступного: числа рослин на гектар або акр, числа волотей на рослину, числа колосків на волоть, числа квіток (окремих квіток) на волоть (яке виражається як відношення числа налитих насінин, поділеного на число основних волотей), збільшення норми налитих насінини (яка являє собою число налитих насінин, поділене на загальне число насінин і помножене на 100), збільшення ваги тисячі зерен, серед іншого.

[0254] Оскільки трансгенні рослини згідно з даним винаходом мають збільшену врожайність, цілком імовірно, що ці рослини проявляють підвищену швидкість росту (протягом щонайменше частини їх життєвого циклу) у порівнянні зі швидкістю росту контрольних рослин на відповідній стадії їх життєвого циклу. Підвищена швидкість росту може обмежуватися однією або декількома частинами рослини (включаючи насіння), або може стосуватися практично всієї рослини. Рослини, що характеризуються підвищеною швидкістю росту, можуть мати коротший життєвий цикл. Під життєвим циклом рослини можна розуміти час, необхідний для зростання від сухої зрілої насінини до стадії, коли рослина утворює сухе зріле насіння, аналогічне вихідному матеріалу. На цей життєвий цикл можуть впливати фактори, такі як рання міць, швидкість росту,

індекс незрілості, період цвітіння й швидкість дозрівання насіння. Підвищення швидкості росту може спостерігатися на одній або декількох стадіях життєвого циклу рослини або протягом практично всього життєвого циклу рослини. Підвищена швидкість росту під час ранніх стадій життєвого циклу рослини може свідчити про збільшену міць. Підвищення швидкості росту може змінювати цикл урожаїв рослини, що дозволяє сіяти рослини пізніше та/або збирати раніше, ніж це було б можливо в інших випадках (аналогічний ефект можна одержати у випадку більш раннього часу цвітіння). Якщо швидкість росту підвищена в достатньому ступені, це може створити можливість для додаткового посіву насіння того самого виду рослини (наприклад, посів і збирання рослин рису з наступним посівом і збиранням додаткових рослин рису протягом одного стандартного вегетаційного періоду). Аналогічно, якщо швидкість росту підвищена в достатньому ступені, це може створити можливість для додаткового посіву насіння інших видів рослин (наприклад, посів і збирання зернових рослин з наступним, наприклад, посівом і необов'язковим збиранням сої, картоплі або будь-якої іншої придатної рослини). У випадку деяких сільськогосподарських культур можливе багаторазове збирання врожаю з одного кореневища. Зміна циклу врожаїв рослини може приводити до збільшення річного виробництва біомаси на акр (завдяки збільшенню кількості разів (скажімо, протягом року) вирощування й збирання будь-якої конкретної рослини). Підвищення швидкості росту також може створити можливість для культивування трансгенних рослин в більш широкій географічній зоні, ніж їхніх аналогів дикого типу, оскільки територіальні обмеження у вирощуванні сільськогосподарської культури найчастіше визначаються несприятливими умовами навколишнього середовища або на момент посіву (на початку вегетаційного періоду), або на момент збирання (наприкінці вегетаційного періоду). Таких несприятливих умов можна уникнути, якщо цикл врожаїв скорочується. Швидкість росту можна визначати шляхом одержання різних параметрів на основі кривих росту, при цьому такими параметрами можуть бути серед іншого T-Mid (час, необхідний для досягнення рослинами 50 % від їхнього максимального розміру) і T-90 (час, необхідний для досягнення рослинами 90 % від їхнього максимального розміру).

[0255] Виконання способів за даним винаходом дає рослини з підвищеною швидкістю росту у порівнянні з контрольними рослинами. Таким чином, згідно з даним винаходом пропонується спосіб підвищення швидкості росту рослин, причому спосіб включає регуляцію експресії, переважно збільшення експресії у рослині нуклеїнової кислоти, що кодує білок T6PP, як визначається у даному документі.

[0256] Збільшення врожайності та/або швидкості росту відбувається або коли рослина перебуває в безстресових умовах, або коли рослина зазнає різних стресів у порівнянні з контрольними рослинами. Рослини, як правило, реагують на вплив стресу вповільненням росту. В умовах сильного стресу рослина може повністю припинити ріст. З іншого боку, помірний стрес визначається в даному документі як будь-який стрес, при впливі якого рослина не повністю припиняє ріст без можливості поновлення росту. Помірний стрес у контексті даного винаходу приводить до зниження росту рослин, що підлягали стресу, менш ніж на 40 %, 35 % або 30 %, переважно менш ніж на 25 %, 20 % або 15 %, більш переважно менш ніж на 14 %, 13 %, 12 %, 11 % або 10 % або менше у порівнянні з контрольною рослиною, яку не піддавали стресовим умовам. Завдяки прогресу в агротехнічних заходах (зрошенні, внесенні добрив, обробки пестицидами) при культивуванні сільськогосподарських культур сильні стреси виникають нечасто. Відповідно, порушений ріст, викликаний помірним стресом, часто є небажаним явищем у сільському господарстві. Помірні стреси являють собою типові біотичні/абіотичні (пов'язані з навколишнім середовищем) стреси, яких може зазнавати рослина. Абіотичні стреси можуть виникати через посуху або надлишок води, анаеробний стрес, стрес, викликаний засоленням, хімічну токсичність, окисний стрес та високі, низькі температури або температури промерзання. Абіотичний стрес може являти собою осмотичний стрес, викликаний стресом через нестачу води (зокрема через посуху), стрес, викликаний засоленням, окисний стрес або іонний стрес. Біотичні стреси, як правило, являють собою стреси, викликані такими патогенами, як бактерії, віруси, гриби й комахи. Інший абіотичний стрес може відбуватися внаслідок дефіциту поживних речовин, наприклад, нестачі азоту, фосфору й калію.

[0257] Способи за даним винаходом можна здійснювати в безстресових умовах або в умовах помірної посухи, щоб забезпечити у рослин збільшену врожайність у порівнянні з контрольними рослинами. Як повідомлялося в Wang et al. (Planta (2003) 218: 1-14), абіотичний стрес призводить до ряду морфологічних, фізіологічних, біохімічних і молекулярних змін, які несприятливо впливають на ріст рослин і продуктивність. Як відомо, посуха, засоленість, екстремальні температури й окисний стрес є взаємозалежними, і вони можуть спричиняти порушення росту й ушкодження клітин за рахунок аналогічних механізмів. Rabbani et al. (Plant Physiol (2003) 133: 1755-1767) описує дуже високий ступінь "взаємного впливу" між стресом,

викликаним посухою, і стресом, викликаним високою засоленістю. Наприклад, посуха та/або засоленість проявляються в першу чергу як осмотичний стрес, що призводить до порушення гомеостазу й розподілу іонів в клітині. Окисний стрес, який часто супроводжує стрес, викликаний високою або низькою температурою, засоленістю або посухою, може спричиняти денатурацію функціональних і структурних білків. Як наслідок, ці різноманітні стреси, пов'язані з навколишнім середовищем, часто активують аналогічні сигнальні шляхи клітини й клітинні відповіді, такі як продукування білків стресу, активація антиоксидантів, накопичення сумісних осмолітів і затримка росту. Вираз "умови без стресу", як використовується в даному документі, означає такі умови навколишнього середовища, які забезпечують оптимальний ріст рослин. Фахівці в даній галузі інформовані про нормальні ґрунтові умови й кліматичні умови для даного місця розташування.

[0258] Виконання способів за даним винаходом надає рослинам, які вирощують в безстресових умовах або в умовах посухи, збільшену врожайність у порівнянні з відповідними контрольними рослинами, які вирощують у порівнюваних умовах. Таким чином, згідно з даним винаходом пропонується спосіб поліпшення пов'язаних із урожайністю ознак рослин, які вирощують в безстресових умовах або в умовах посухи, причому спосіб включає збільшення експресії в рослині нуклеїнової кислоти, яка кодує модифікований поліпептид Т6РР, що характеризується зменшенням зв'язуванням із субстратом і/або активністю.

[0259] В одному варіанті здійснення даного винаходу поліпшена пов'язана із урожайністю ознака проявляється як збільшення одного або декількох з наступного: загального числа насінин на рослину, числа налитих насінин на рослину й ваги насіння на рослину. Переважно, ці поліпшення виявляють у рослин, які вирощують в безстресових умовах.

[0260] Способи за даним винаходом переважно застосовні до будь-якої рослини.

[0261] Рослини, особливо застосовні в способах за даним винаходом, включають усі рослини, що належать до надсімейства Viridiplantae, зокрема, однодольні й дводольні рослини, що включають у себе кормові рослини або кормові бобові культури, декоративні рослини, продовольчі культури, дерева або чагарники, вибрані з переліку, що включає: *Acer* spp., *Actinidia* spp., *Abelmoschus* spp., *Agropyron* spp., *Allium* spp., *Amaranthus* spp., *Ananas comosus*, *Annona* spp., *Apium graveolens*, *Arachis* spp., *Artocarpus* spp., *Asparagus officinalis*, *Avena* spp. (наприклад, *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua* var. *sativa*, *Avena hybrida*), *Averrhoa carambola*, *Benincasa hispida*, *Bertholletia excelsa*, *Beta vulgaris*, *Brassica* spp. (наприклад, *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp. [канола, олійний рапс, турнепс]), *Cadaba farinosa*, *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Capsicum* spp., *Carex elata*, *Carica papaya*, *Carissa macrocarpa*, *Carya* spp., *Carthamus tinctorius*, *Castanea* spp., *Cichorium endivia*, *Cinnamomum* spp., *Citrullus lanatus*, *Citrus* spp., *Cocos* spp., *Coffea* spp., *Colocasia esculenta*, *Cola* spp., *Coriandrum sativum*, *Corylus* spp., *Crataegus* spp., *Crocus sativus*, *Cucurbita* spp., *Cucumis* spp., *Cynara* spp., *Daucus carota*, *Desmodium* spp., *Dimocarpus longan*, *Dioscorea* spp., *Diospyros* spp., *Echinochloa* spp., *Elaeis* (наприклад, *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*), *Eleusine coracana*, *Eriobotrya japonica*, *Eugenia uniflora*, *Fagopyrum* spp., *Fagus* spp., *Ficus carica*, *Fortunella* spp., *Fragaria* spp., *Ginkgo biloba*, *Glycine* spp. (наприклад, *Glycine max*, *Soja hispida* або *Soja max*), *Gossypium hirsutum*, *Helianthus* spp. (наприклад, *Helianthus annuus*), *Hemerocallis fulva*, *Hibiscus* spp., *Hordeum* spp. (наприклад, *Hordeum vulgare*), *Ipomoea batatas*, *Juglans* spp., *Lactuca sativa*, *Lathyrus* spp., *Lens culinaris*, *Linum usitatissimum*, *Litchi chinensis*, *Lotus* spp., *Luffa acutangula*, *Lupinus* spp., *Luzula sylvatica*, *Lycopersicon* spp. (наприклад, *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Lycopersicon pyriforme*), *Macrotyloma* spp., *Malus* spp., *Malpighia emarginata*, *Mammea americana*, *Mangifera indica*, *Manihot* spp., *Manilkara zapota*, *Medicago sativa*, *Melilotus* spp., *Mentha* spp., *Miscanthus* spp., *Momordica* spp., *Morus nigra*, *Musa* spp., *Nicotiana* spp., *Olea* spp., *Opuntia* spp., *Ornithopus* spp., *Oryza* spp. (наприклад, *Oryza sativa*, *Oryza latifolia*), *Panicum miliaceum*, *Passiflora edulis*, *Pastinaca sativa*, *Persea* spp., *Petroselinum crispum*, *Phaseolus* spp., *Phoenix* spp., *Physalis* spp., *Pinus* spp., *Pistacia vera*, *Pisum* spp., *Poa* spp., *Populus* spp., *Prosopis* spp., *Prunus* spp., *Psidium* spp., *Punica granatum*, *Pyrus communis*, *Quercus* spp., *Raphanus sativus*, *Rheum rhabarbarum*, *Ribes* spp., *Ricinus communis*, *Rubus* spp., *Saccharum* spp., *Sambucus* spp., *Secale cereale*, *Sesamum* spp., *Sinapis* sp., *Solanum* spp. (наприклад, *Solanum tuberosum*, *Solanum integrifolium* або *Solanum lycopersicum*), *Sorghum bicolor*, *Spinacia* spp., *Syzygium* spp., *Tagetes* spp., *Tamarindus indica*, *Theobroma cacao*, *Trifolium* spp., *Triticosecale rimpai*, *Triticum* spp. (наприклад, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*, *Triticum hybernum*, *Triticum macha*, *Triticum sativum* або *Triticum vulgare*), *Tropaeolum minus*, *Tropaeolum majus*, *Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vigna* spp., *Viola odorata*, *Vitis* spp., *Zea mays*, *Zizania palustris*, *Ziziphus* spp., серед інших.

[0262] Згідно з переважним варіантом здійснення даного винаходу рослина являє собою культурну рослину. Приклади культурних рослин включають сою, соняшник, канолу, люцерну,

ріпак, бавовник, томат, картоплю й тютюн. Також переважно, рослина являє собою однодольну рослину. Приклади однодольних рослин включають цукровий очерет. Більш переважно рослина є злаком. Приклади злаків включають рис, маїс, пшеницю, ячмінь, просо, жито, сорго й овес.

5 [0263] Даний винахід також охоплює застосування нуклеїнових кислот, що кодують білок T6PP, описаний у даному документі, і застосування цих білків T6PP у поліпшенні в рослин пов'язаних із урожайністю ознак.

10 [0264] Нуклеїнові кислоти, що кодують білок T6PP, описаний у даному документі, або білки T6PP як такі, можуть знайти застосування в програмах селекції, у яких визначають ДНК-маркер, що може бути генетично пов'язаним з геном, який кодує T6PP, де білок T6PP має зменшену активність або зв'язування із субстратом. Для визначення молекулярного маркера можна застосовувати нуклеїнові кислоти/гени або білки T6PP як такі. Цей ДНК або білковий маркер у подальшому можна застосовувати в програмах селекції для відбору рослин, що характеризуються поліпшеними пов'язаними із урожайністю ознаками, як визначається в даному документі вище у способах за даним винаходом.

15 [0265] Нуклеїнові кислоти, що кодують білки T6PP, можна також застосовувати в якості зондів для генетичного й фізичного картування генів, частинами яких вони є, і в якості маркерів для ознак, пов'язаних із цими генами. Така інформація може бути застосовною в селекції рослин для розробки ліній з бажаними фенотипами. Таке застосування нуклеїнових кислот, що кодують білки T6PP, потребує лише послідовності нуклеїнової кислоти щонайменше з 15 нуклеотидами у довжину. Нуклеїнові кислоти, що кодують білки T6PP класу III, можна застосовувати у якості маркерів поліморфізмів довжин рестрикційних фрагментів (RFLP). Саузерн-блоти (Sambrook J, Fritsch E F and Maniatis T (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*) геномної ДНК рослин, розщепленої за допомогою рестрикційних ферментів, можна досліджувати за допомогою нуклеїнових кислот, що кодують білок T6PP. Отриманий у
20 результату патерн бендів можна потім піддавати генетичному аналізу за допомогою комп'ютерних програм, таких як MapMaker (Lander et al. (1987) *Genomics* 1: 174-181), для побудови генетичної карти. Крім того, нуклеїнові кислоти можна застосовувати для дослідження Саузерн-блотів, які містять геномні ДНК, оброблені рестрикційною ендонуклеазою, із набору окремих об'єктів, що представляють батьківські особини і потомство визначеного генетичного
25 схрещування. Відмічають сегрегацію поліморфізмів ДНК і застосовують її для розрахунків положення нуклеїнової кислоти, що кодує білок T6PP, на генетичній карті, отриманій раніше за допомогою цієї популяції (Botstein et al. (1980) *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331).

30 [0266] Одержання й застосування зондів, отриманих з генів рослин, для застосування в генетичному картуванні описане в Bernatzky and Tanksley (1986) *Plant Mol. Biol. Reporter* 4: 37-41. Численні публікації описують генетичне картування специфічних клонів кДНК із застосуванням методології, вказаної вище, або її варіантів. Наприклад, для картування можна застосовувати популяції перехресного запилення F2, популяції беккросів, довільно схрещені популяції, майже ізогенні лінії та інші набори окремих об'єктів. Такі методології добре відомі фахівцям у даній галузі.

40 [0267] Зонди з нуклеїнових кислот можна також застосовувати для фізичного картування (тобто розміщення послідовностей на фізичних картах; див. Hoheisel et al. In: *Non-mammalian Genomic Analysis: A Practical Guide*, Academic press 1996, pp. 319-346, і посилання, що цитуються у ньому).

45 [0268] В іншому варіанті здійснення зонди з нуклеїнових кислот можна застосовувати в картуванні за допомогою прямої флюоресцентної гібридизації in situ (FISH) (Trask (1991) *Trends Genet.* 7:149-154). Хоча для сучасних способів картування за допомогою FISH краще використовувати великі клони (від декількох т.п.о. до декількох сотень т.п.о.; див. Laan et al. (1995) *Genome Res.* 5:13-20), удосконалення в чутливості можуть дозволити проводити картування за допомогою FISH із застосуванням коротших зондів.

50 [0269] Ряд способів генетичного й фізичного картування, оснований на ампліфікації нуклеїнових кислот, можна проводити за допомогою нуклеїнових кислот. Приклади включають алельспецифічну ампліфікацію (Kazazian (1989) *J. Lab. Clin. Med* 11:95-96), поліморфізм PCR-ампліфікованих фрагментів (CAPS; Sheffield et al. (1993) *Genomics* 16:325-332), алельспецифічне зшивання (Landegren et al. (1988) *Science* 241:1077-1080), реакції добуудовування нуклеотидів (Sokolov (1990) *Nucleic Acid Res.* 18:3671), радіаційне гібридне картування (Walter et al. (1997) *Nat. Genet.* 7:22-28) і Happy Mapping (Dear and Cook (1989) *Nucleic Acid Res.* 17:6795-6807). Стосовно цих способів послідовність нуклеїнової кислоти застосовують з метою розробки й одержання пар праймерів для застосування в реакції ампліфікації або в реакціях добуудовування праймера. Розробка таких праймерів добре відома
60 фахівцям у даній галузі. У способах, в яких використовують генетичне картування на основі

PCR, може бути необхідно ідентифікувати відмінності між послідовностями ДНК батьківських особин при схрещуванні для картування на ділянці, що відповідає поточній послідовності нуклеїнової кислоти. Проте, в цілому це не є необхідним для способів картування.

[0270] В одному аспекті даного винаходу, не обмежуючись теорією, Т6РР, що містить мутації, як описано в даному документі, характеризується зниженою активністю, а також утворює білок-білковий комплекс з ТРР. Не обмежуючись теорією, одним можливим аспектом даного винаходу є білок-білковий комплекс Т6РР/ТРР, який можна застосовувати для забезпечення у рослини збільшеної врожайності та підвищеної стійкості до стресу. В іншому аспекті фахівець зможе модифікувати будь-який поліпептид Т6РР, що має консенсусну послідовність SEQ ID NO: 9, щоб він мав більш низьку афінність зв'язування з Т6Р, тим самим збільшуючи частоту виникнення білкового комплексу Т6РР/ТРР. Передбачається, що в одному аспекті можливе створення або застосування існуючої хімічної речовини, яка може імітувати комплекс або створювати ортогональні структури, що можна використовувати для імітації комплексу Т6РР/ТРР. В одному аспекті, не обмежуючись теорією, для забезпечення збільшеної врожайності рослини можна проводити одну або декілька мутацій в В-фосфатазному боксі будь-якого вказаного білка Т6РР.

[0271] Результатом здійснення способів згідно з даним винаходом є рослини з поліпшеними пов'язаними із урожайністю ознаками, як описується в даному документі вище. Ці ознаки можна також поєднувати з іншими економічно вигідними ознаками, такими як ознаки, що додатково поліпшують урожайність, стійкість до інших абіотичних і біотичних стресів, ознаки, що модифікують різні структурні особливості та/або біохімічні та/або фізіологічні властивості.

Даний винахід далі буде описаний з посиланням на нижчепредставлені фігури.

Приклади

Приклад 1: Ідентифікація та клонування послідовності кДНК Т6РР рису в бінарний вектор

[0272] Спочатку гени трегалоза-6-фосфатфосфатази судинної рослини клонували з *Arabidopsis thaliana* шляхом комплементації делеційного мутанта ТРР2 дріжджів (Vogel et al. 1998). У той же час було показано, що гени, позначені AtТ6РРА і AtТ6РРВ (номери доступу Genbank AF007778 і AF007779), мали трегалоза-6-фосфатфосфатазну активність. Білкові послідовності AtТ6РРА і AtТ6РРВ застосовували в запитах ТBLASTN у базах даних послідовностей маїсу й рису. Шляхом вирівнювання послідовностей установлювали збіги в окремих генах. Ідентифікували три гомологи Т6РР у маїсі та три гомологи у рисі. Послідовність кДНК Т6РР рису (OsТ6РР), зазначену в SEQ ID NO. 1, ампліфікували із застосуванням високоточної PCR. 50 мкл реакційної суміші складалася з 1 мкл бібліотеки кДНК рису (отриманої з мРНК калюсу в Lambda Unizap Vector від Stratagene, розмір первинної бібліотеки >1 × 10⁶ БУО, титр ампліфікованої бібліотеки > 1 × 10¹² БУО/мл), 200 мкМ dNTP, 1 мкл 20 мкМ олігонуклеотидного праймера Т6РР-EC-5 (5'-catggaccatggattgagcaatagctcac-3') і 1 мкл 20 мкМ олігонуклеотидного праймера Т6РР-EC-3 (5'-atcgacagctcacactgagtgcctctcc-3'), 5 мкл 10X буфера Cloned PFU і 2,5 одиниць PfuTurbo ДНК-полімерази. Програма термоцикування закінчалася в 95 °C протягом 2 хвилин, а потім 40 циклах (94 °C протягом 15 секунд, 50 °C протягом 1 хвилини, 72 °C протягом 1 хвилини), а потім 72 °C протягом 10 хвилин. Т6РР-продукт рису клонували із застосуванням набору для PCR-клонування Zero Blunt TOPO. pCR-Blunt-II-TOPO-OsТ6РР ідентифікували шляхом розщеплення 5 мкл ДНК-мініпрепа pCR-Blunt-II-TOPO-OsТ6РР за допомогою EcoRI в 20 мкл реакційної суміші, що містила 2 мкг BSA і 2 мкл 10X буфера рестрикційної ендонуклеази EcoRI. Реакційну суміш інкубували при 37 °C протягом 2 годин і продукти pCR-Blunt-II-TOPO-OsТ6РР (EcoRI) розділяли на 1 % TAE-агарозі. Потім клон pCR-Blunt-II-TOPO-OsТ6РР секвенували. кДНК OsТ6РР фланкували сайтами для рестрикційних ендонуклеаз NcoI/SacI. Потім OsТ6РР додатково клонували в бінарний вектор, як описано в прикладі 8 публікації заявки на патент США 2007/0006344 (яка в ній має назву OsТ6РР-3 і позначається нуклеотидною SEQ ID NO: 531 і білковою SEQ ID NO: 532).

Приклад 2. Початкова оцінка об'єктів маїсу з Т6РР рису в теплиці

[0273] Об'єкти маїсу з Т6РР рису, які містять SEQ ID NO: 1, функціонально пов'язану із промотором, який характеризується переважною експресією в материнській репродуктивній тканині (тобто, промотором OsMADS), одержували й додатково оцінювали як у теплиці, так і в полі, як описано в прикладах 8-13 публікації заявки на патент США 2007/0006344. За допомогою початкової оцінки об'єктів маїсу в теплиці й у полі виявили деякі об'єкти, що мають збільшену врожайність як в умовах без посухи, так і в посушливих умовах (див. публікацію заявки на патент США 2007/0006344, включену в даний документ за допомогою посилання).

Приклад 3: Оцінка та ідентифікація об'єктів маїсу з Т6РР, що забезпечує високу врожайність

[0274] Об'єкти маїсу, для яких було показано у випробуваннях, описаних у прикладі 2 і більш конкретно в публікації заявки на патент США 2007/0006344, що їм надані властивості

збільшеної врожайності, були додатково охарактеризовані щодо врожайності й польової продуктивності. Ці об'єкти містили один з бінарних конструктів 15777 або 15769, як це описано в публікації заявки на патент США 2007/0006344. Фактично, бінарний конструкт 15769 містить касету експресії, що має OsT6PP (зазначену в SEQ ID NO: 1 даної заявки), функціонально пов'язану з промотором OsMADS6 (SEQ ID NO: 13). Бінарний конструкт 15777 містить таку саму касету експресії (промотор OsMADS6 і послідовність, що кодує OsT6PP), а також енхансери транскрипції, що розташовані вище за промотор OsMADS6. Докладний опис і специфічні особливості обох цих конструктів знов-таки можна знайти в публікації заявки на патент США 2007/0006344. У цілому з бінарним конструктом 15769 одержали 645 об'єктів T0 маїсу, а з бінарним конструктом 15777 одержали 587 об'єктів. Відбір стабільних об'єктів, які показують гарний ріст у теплиці й польових умовах, дав у результаті відносно невелику кількість об'єктів, які переводили до польових випробувань. Високий рівень відсіву призвів лише до 17 об'єктів, що показували польову продуктивність. Об'єкти, що отримані від рослин маїсу, трансформованих бінарним конструктом 15777, виявилися найбільш продуктивними при тестуванні в полі. Два об'єкти (у даному документі їх називають "об'єкт 1" і "об'єкт 2") відбирали на основі виживаності й продуктивності в регульованих умовах стресу (збереження врожайності за умови посухи під час цвітіння) і в агрономічних випробуваннях, під час яких вимірювали врожайність. У цілому, найбільш продуктивні об'єкти, трансформовані конструктом 15777, показали значну перевагу врожайності в бушелях на акр відносно контрольних перевірочних зразків.

Приклад 4: Аналіз послідовностей об'єктів 1 і 2

[0275] Об'єкт 1 і об'єкт 2 додатково аналізували за допомогою секвенування CDS T6PP. PCR застосовували для ампліфікації інтегрованої послідовності, що кодує OsT6PP, за допомогою праймерів, які гібридизувалися з 5'- і 3'-ділянкою кодуєчої послідовності. Відповідні PCR-амплікони давали в результаті бенд з розміром приблизно 1,1 т.п.о., як і слід було очікувати виходячи з послідовності, що кодує OsT6PP, показаної в SEQ ID NO: 1, що у даному документі називається OsT6PP-WT, яка являла собою послідовність, що містилася у відповідній касеті експресії. Амплікони додатково секвенували за допомогою загальноприйнятого у даній галузі способу. Дані секвенування свідчили про те, що обидва об'єкти (1 і 2) містили модифікації. Об'єкт 1, що містив точкову мутацію в нуклеотиді 730 відносно SEQ ID NO: 1 (T*CATTA, де * вказує на точку мутації), у даному документі називається OsT6PP-H244D. Ця точкова мутація приводила до мутації амінокислоти в залишку 244 відносно SEQ ID NO: 2, змінюючи залишок His на залишок Asp, як представлено в SEQ ID NO: 3, що у даному документі має рівноцінну назву "точкова модифікація T6PP". Об'єкт 2, як було виявлено, містив дві модифікації в нуклеотидах 305 (TG*CTTCC, де * вказує на точку мутації) і 388 (CGCC*ATT, де * вказує на точку мутації) відносно SEQ ID NO: 1, що у даному документі називається OsT6PP-I129F. Двохточкові мутації нуклеотидів, ідентифіковані в об'єкта 2, приводили до зміни Ala на Val у положенні 102 і до зміни Ile на Phe у положенні 129, або до поліпептиду T6PP, представленого SEQ ID NO 5, що у даному документі має рівноцінну назву "подвійна модифікація T6PP". Цікаво, як показано в наступних прикладах, дві із цих мутацій розташовані у висококонсервативних доменах білка T6PP. Заміна Ala на Val у положенні 102 перебуває за межами висококонсервативних ділянок. Висококонсервативні домени залучені у зв'язування з субстратом та/або білок-білкові взаємодії при утворенні комплексу.

Приклад 5: Ідентифікація T6PP, що мають подібну гомологію та функцію, які можна поліпшувати шляхом уведення мутацій

[0276] Послідовності (кДНК повної довжини, EST або геномна), споріднені з SEQ ID NO: 1, і/або білкові послідовності, споріднені з SEQ ID NO: 2, можна ідентифікувати серед тих, що містяться у базі даних Entrez Nucleotides Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI), за допомогою інструментів для пошуку послідовностей у базах даних, таких як Basic Local Alignment Tool (BLAST) (Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; і Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402). Програму можна застосовувати для пошуку ділянок локальної подібності між послідовностями шляхом порівняння послідовностей нуклеїнової кислоти або поліпептидних послідовностей з базами даних послідовностей і шляхом розрахунків статистичної достовірності збігів. Поліпептид, закодований SEQ ID NO: 1, можна застосовувати за допомогою алгоритму TBLASTN зі значеннями за замовчуванням і програмою фільтрації, щоб відкинути послідовності з низькою складністю. Виведення даних аналізу можна спостерігати у вигляді попарного порівняння та розподіляти згідно оцінки ймовірності (Е-значення), де оцінка відображає ймовірність того, що конкретне вирівнювання відбувається випадково (чим нижче Е-значення, тим більш достовірний збіг). Крім Е-значень порівняння можна також оцінювати за відсотковою ідентичністю. Відсоткова ідентичність відображає число

ідентичних нуклеотидів (або амінокислот) у двох порівнюваних послідовностях нуклеїнової кислоти (або поліпептидних послідовностях) в межах конкретної довжини. У деяких випадках параметри за замовчуванням можна регулювати для модифікації точності пошуку.

- 5 [0277] В таблиці нижче представлений перелік послідовностей нуклеїнової кислоти й білкових послідовностей, які споріднені з послідовністю нуклеїнової кислоти, що представлена SEQ ID NO: 1, і білковою послідовністю, що представлена SEQ ID NO: 2, які можуть бути застосовні в різних аспектах даного винаходу. Послідовності ідентифікували шляхом пошуку за гомологією послідовностей, а також за допомогою молекул T6PP, ідентифікованих у рівні техніки.

10

Назва	Організм-джерело	nt/pt	SEQ ID NO:	№ Доступу в базі даних
SEQ ID NO: 1	Oryza sativa	nt	1	N/A
SEQ ID NO: 2	Oryza sativa	pt	2	N/A
SEQ ID NO: 3	Oryza sativa	nt	3	N/A
SEQ ID NO: 4	Oryza sativa	pt	4	N/A
SEQ ID NO: 5	Oryza sativa	nt	5	N/A
SEQ ID NO: 6	Oryza sativa	pt	6	N/A
SEQ ID NO: 7	Oryza sativa	nt	7	N/A
SEQ ID NO: 8	Oryza sativa	pt	8	N/A
AT1G22210	Arabidopsis thaliana	nt	N/A	AT1G22210
AT1G22210	Arabidopsis thaliana	pt	N/A	AT1G22210
AT1G35910	Arabidopsis thaliana	nt	N/A	AT1G35910
AT1G35910	Arabidopsis thaliana	pt	N/A	AT1G35910
AT1G78090	Arabidopsis thaliana	nt	N/A	AT1G78090
AT1G78090	Arabidopsis thaliana	pt	N/A	AT1G78090
AT2G22190	Arabidopsis thaliana	nt	N/A	AT2G22190
AT2G22190	Arabidopsis thaliana	pt	N/A	AT2G22190
AT4G12430	Arabidopsis thaliana	nt	N/A	AT4G12430
AT4G12430	Arabidopsis thaliana	pt	N/A	AT4G12430
AT4G22590	Arabidopsis thaliana	nt	N/A	AT4G22590
AT4G22590	Arabidopsis thaliana	pt	N/A	AT4G22590
At4g39770	Arabidopsis thaliana	nt	N/A	At4g39770
At4g39770	Arabidopsis thaliana	pt	N/A	At4g39770
AT5G10100	Arabidopsis thaliana	nt	N/A	AT5G10100
AT5G10100	Arabidopsis thaliana	pt	N/A	AT5G10100
AT5G51460	Arabidopsis thaliana	nt	N/A	AT5G51460
AT5G51460	Arabidopsis thaliana	pt	N/A	AT5G51460
AT5G65140	Arabidopsis thaliana	nt	N/A	AT5G65140
AT5G65140	Arabidopsis thaliana	pt	N/A	AT5G65140
pOP-lcl scaff_II.875	Populus trichocarpa	nt	N/A	pOP-lcl scaff_II.875
pOP-lcl scaff_II.875	Populus trichocarpa	pt	N/A	pOP-lcl scaff_II.875
pOP-lcl scaff_V.739	Populus trichocarpa	nt	N/A	pOP-lcl scaff_V.739
pOP-lcl scaff_V.739	Populus trichocarpa	pt	N/A	pOP-lcl scaff_V.739
pOP-lcl scaff_VII.559	Populus trichocarpa	nt	N/A	pOP-lcl scaff_VII.559
pOP-lcl scaff_VII.559	Populus trichocarpa	pt	N/A	pOP-lcl scaff_VII.559
pOP-lcl scaff_127.52	Populus trichocarpa	nt	N/A	pOP-lcl scaff_127.52
pOP-lcl scaff_127.52	Populus trichocarpa	pt	N/A	pOP-lcl scaff_127.52
pOP-lcl scaff_III.843	Populus trichocarpa	nt	N/A	pOP-lcl scaff_III.843
pOP-lcl scaff_III.843	Populus trichocarpa	pt	N/A	pOP-lcl scaff_III.843
pOP-lcl scaff_V.167	Populus trichocarpa	nt	N/A	pOP-lcl scaff_V.167
pOP-lcl scaff_V.167	Populus trichocarpa	pt	N/A	pOP-lcl scaff_V.167
pOP-lcl scaff_XII.1254	Populus trichocarpa	nt	N/A	pOP-lcl scaff_XII.1254
pOP-lcl scaff_XII.1254	Populus trichocarpa	pt	N/A	pOP-lcl scaff_XII.1254
pOP-lcl scaff_XV.1052	Populus trichocarpa	nt	N/A	pOP-lcl scaff_XV.1052
pOP-lcl scaff_XV.1052	Populus trichocarpa	pt	N/A	pOP-lcl scaff_XV.1052
Os02g0661100	Oryza sativa	nt	N/A	Os02g0661100
Os02g0661100	Oryza sativa	pt	N/A	Os02g0661100

Продовження

Назва	Організм-джерело	nt/pt	SEQ ID NO:	№ Доступу в базі даних
Os02g0753000	Oryza sativa	nt	N/A	Os02g0753000
Os02g0753000	Oryza sativa	pt	N/A	Os02g0753000
Os03g0386500	Oryza sativa	nt	N/A	Os03g0386500
Os03g0386500	Oryza sativa	pt	N/A	Os03g0386500
Os06g0222100	Oryza sativa	nt	N/A	Os06g0222100
Os06g0222100	Oryza sativa	pt	N/A	Os06g0222100
Os07g0485000	Oryza sativa	nt	N/A	Os07g0485000
Os07g0485000	Oryza sativa	pt	N/A	Os07g0485000
Os07g0624600	Oryza sativa	nt	N/A	Os07g0624600
Os07g0624600	Oryza sativa	pt	N/A	Os07g0624600
Os09g0369400	Oryza sativa	nt	N/A	Os09g0369400
Os09g0369400	Oryza sativa	pt	N/A	Os09g0369400
Os10g0553300	Oryza sativa	nt	N/A	Os10g0553300
Os10g0553300	Oryza sativa	pt	N/A	Os10g0553300
Aquilegia_TC11239	Aquilegia ssp	nt	N/A	Aquilegia_TC11239
Aquilegia_TC11239	Aquilegia ssp	pt	N/A	Aquilegia_TC11239
Aquilegia_TC17706	Aquilegia ssp	nt	N/A	Aquilegia_TC17706
Aquilegia_TC17706	Aquilegia ssp	pt	N/A	Aquilegia_TC17706
Bc_Q4AC11	Brassica campestris	nt	N/A	Bc_Q4AC11
Bc_Q4AC11	Brassica campestris	pt	N/A	Bc_Q4AC11
Br_Q4ABQ9	Brassica rapa	nt	N/A	Br_Q4ABQ9
Br_Q4ABQ9	Brassica rapa	pt	N/A	Br_Q4ABQ9
Gh_TC35369	Gossypium hirsutum	nt	N/A	Gh_TC35369
Gh_TC35369	Gossypium hirsutum	pt	N/A	Gh_TC35369
Hv_TC139314	Hordeum vulgare	nt	N/A	HV_TC139314
Hv_TC139314	Hordeum vulgare	pt	N/A	HV_TC139314
Mt_TC108059	Medicago truncatula	nt	N/A	Mt_TC108059
Mt_TC108059	Medicago truncatula	pt	N/A	Mt_TC108059
Mt_TC108097	Medicago truncatula	nt	N/A	Mt_TC108097
Mt_TC108097	Medicago truncatula	pt	N/A	Mt_TC108097
Nb_TC7464	Nicotiana benthamiana	nt	N/A	Nb_TC7464
Nb_TC7464	Nicotiana benthamiana	pt	N/A	Nb_TC7464
Nt_Q3ZTF5	Nicotiana tabacum	nt	N/A	Nt_Q3ZTF5
Nt_Q3ZTF5	Nicotiana tabacum	pt	N/A	Nt_Q3ZTF5
Nt_TC7310	Nicotiana tabacum	nt	N/A	Nt_TC7310
Nt_TC7310	Nicotiana tabacum	pt	N/A	Nt_TC7310
Sb_TC17204	Sorghum bicolor	nt	N/A	Sb_TC17204
Sb_TC17204	Sorghum bicolor	pt	N/A	Sb_TC17204
St_TC151769	Solanum tuberosum	nt	N/A	St_TC151769
St_TC151769	Solanum tuberosum	pt	N/A	St_TC151769
Ta_TC252250	Triticum aestivum	nt	N/A	Ta_TC252250
Ta_TC252250	Triticum aestivum	pt	N/A	Ta_TC252250
Zm_ABD92779	Zea mays	nt	N/A	Zm_ABD92779
Zm_ABD92779	Zea mays	pt	N/A	Zm_ABD92779
Zm_ABD92780	Zea mays	nt	N/A	Zm_ABD92780
Zm_ABD92780	Zea mays	pt	N/A	Zm_ABD92780

nt = нуклеотидна
pt = білкова
N/A = немає даних

[0278] Після ідентифікації T6PP, перерахованих у таблиці вище, ці T6PP згодом вирівнювали з SEQ ID NO: 1, 3 і 5 (за допомогою інструментів для вирівнювання Vector NTI від INVITROGEN

Inc) для визначення то, чи є мутації в консервативних ділянках білка. Під час вирівнювання серед різних білків Т6РР ідентифікували велику кількість консервативних послідовностей і їх застосовували для розробки консенсусної послідовності, зображеної в SEQ ID NO: 9. На фігурі 2 зображений взаємозв'язок ідентифікованих Т6РР за допомогою філогенетичного дерева.

Консенсусну послідовність можна застосовувати для модифікації будь-чого з нуклеотидних і/або білкових послідовностей Т6РР, перерахованих у таблиці вище, щоб при використанні їх у трансгенній рослині вони приводили до збільшеної врожайності та/або підвищеної стійкості до стресу, а також демонструвати продуктивність у полі. Також припускають, що будь-який білок, який має консенсусну послідовність, що характеризується 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % або 100 % ідентичністю послідовності з SEQ ID NO: 9, також показаною на фігурі 10, можна модифікувати, як описано в даному документі, і експресувати в рослинах, як описано в даному документі.

[0279] Консенсусна послідовність показує висококонсервативні залишки, що наявні в багатьох поліпептидах Т6РР, перерахованих у таблиці вище. Також припускають, що ця консенсусна послідовність буде також відповідати іншим Т6РР, не перерахованим у таблиці вище. Положення, позначені у консенсусній послідовності вище за допомогою "X", указують на ділянки мінливості, де будь-яка інша окрема буква відповідає загальноприйнятому однобуквену позначенню амінокислот, загальноживаному в даній галузі техніки. Підкреслені амінокислотні залишки вказують на ділянки, які можна модифікувати для конструювання поліпептидів Т6РР, що забезпечують у трансгенній рослині збільшену врожайність і/або поліпшену витривалість до стресу. В одному аспекті будь-які із залишків DYDGTLSPIV, що кодують В-фосфатазний бокс, можна модифікувати для забезпечення білків, які при експресії в рослині можуть забезпечувати збільшену врожайність і/або поліпшену стійкість до стресу. У варіанті здійснення даного винаходу І (ізолейцин) в амінокислотній послідовності, що кодує В-фосфатазний бокс "DYDGTLSPIV" з консенсусної послідовності вище, змінюється на F (фенілаланін) і кодує при цьому (DYDGTLSPIV). В іншому варіанті здійснення "X" у консенсусній послідовності вище являє собою V (валін), який є заміною аланіну у вихідній послідовності. Ця заміна перебуває за межами консервативного домену й може не впливати на ферментативну активність. Інший варіант здійснення буде включати заміну "H" (гістидину) у консенсусній послідовності "CVSVHFRCV" вище на D (аспарагінову кислоту), змінюючи консенсусну послідовність на послідовність "CVSVDFRCV". Припускають, що будь-яку модифікацію щонайменше одного консервативного амінокислотного залишку SEQ ID NO: 9, якщо модифікація приводить у результаті до зниження Т6РР активності, можна експресувати у рослині для забезпечення збільшеної врожайності в умовах стресу та безстресових умовах. Альтернативно, усі три модифікації можна вводити в ген Т6РР, як описується у SEQ ID NO: 7 (ДНК) і 8 (білок).

[0280] Приклад 6: Способи розробки й тестування модифікованих білків Т6РР

[0281] Література, яку використовували для розробки варіантів Т6РР: The α/β hydrolase fold. David L. Ollis et al. (1992) Protein Engineering. vol.5 197-211. Of barn owls and bankers: a lush variety of α/β hydrolases. Heikinheimo P., Goldman, A., Jeffries, C. and Ollis, D.L. (1999) Structure. Vol 6 141-146. Crystal structure of trehalose-6-phosphate phosphatase-related protein: biochemical and biological implications. Rao, K.N., Kumaran, D., Seetharaman, J., Bonanno, J.B., Burley, S.K., Swaminathan, S. (2006) Protein Sci. 15: 1735-1744. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. Avonce, N. Mendoza-Vargas, A., Morett, E. and Iturriaga, G. (2006) BMC Evolutionary Biology. 6, 109. A single Active Trehalose-6P Synthase (TPS) and a Family of Putative Regulatory Tps-like Proteins in Arabidopsis. Vandesteene, L., Ramon, M., Le Roy, K., Van Dijck, P. and Rolland, F. (2010) Molecular Plant. Vol3, Number 2, 406-419. The X-ray crystallographic structure and specificity profile of HAD superfamily phosphohydrolase BT1666: Comparison of paralogous functions in B. thaitaomicon. Lu, Z., Dunaway-Mariano, D. and Allen, K.N. (2011) Proteins: Structure, Function and Bioinformatics. 79 (11) 3099-3107.

[0282] Спосіб

[0283] На основі літературних даних про кристалічну структуру білка, спорідненого з трегалоза-6-фосфатфосфатазою, від *Thermoplasma acidophilum*, його ідентифікували як білок, що має найближчу гомологію структури з модельною трегалоза-6-фосфатфосфатазою (Т6РР) рису. Кодом доступу цього білка в базі даних структури білка (PDB) являється 1U02. Див., Crystal structure of trehalose-6-phosphate phosphatase-related protein: biochemical and biological implications Rao, K.N., et al. (2006) Protein Sci. 15: 1735-1744, а код Uniprot: Q9HIW7.

[0284] Початкове вирівнювання послідовностей

[0285] Для вирівнювання застосовували послідовності Т6РР *Arabidopsis thaliana* (19925; SEQ ID NO: 14), *Arabidopsis thaliana* (19926; SEQ ID NO: 15), *Oryza sativa* (19924; SEQ ID NO: 16) і

Oryza sativa (15777; OsT6PP-WT; SEQ ID NO: 2), а також SEQ ID NO: 4. Ці білкові послідовності разом з білком, спорідненим з T6PP, від *Thermoplasma acidophilum* (Q9HIW7) вирівнювали за допомогою Vector NTI із застосуванням способу ClustalW з одержанням початкового вирівнювання, див. фігури 1A-1C. Початкове вирівнювання білкової послідовності спорідненого з T6PP білка (Q9HIW7) і білкових послідовностей *Arabidopsis thaliana* (19925, SEQ ID NO: 14), *Arabidopsis thaliana* (19926; SEQ ID NO: 15), *Oryza sativa* (19924, SEQ ID NO: 16) і *Oryza sativa* (15777, SEQ ID NO: 2). Залишки, виділені жирним шрифтом і курсивом у вирівнюванні білкових послідовностей нижче, являють собою важливі залишки з великого суперсімейства галогендегідрогеназ, які допомагають підтвердити якість вирівнювання.

[0286] Підкреслені залишки на фігурах 1A-1C являють собою важливі залишки, які допомагають підтвердити якість вирівнювання. Більшість цих залишків являють собою каталітичні залишки (номери всіх залишків посилаються на номери залишків у білковій послідовності 15777 OsT6PP-WT *Oryza sativa*): залишок аспарагінової кислоти 121 утворює фосфоаспартатну проміжну сполуку з субстратом. Треонін 318 (у великому суперсімействі цей залишок може являти собою серин) зв'язується за допомогою водневого зв'язку з фосфорилкиснем у субстраті. Аспарагінові кислоти 315 і 123 утворюють координаційний зв'язок з іоном Mg^{2+} за рахунок своїх бічних ланцюгів і карбонільної групи кістяка, відповідно. Лізин 289 стабілізує перехідний стан реакції.

[0287] Одержання структури білка 1U02 для гомологічного моделювання

[0288] Кристалічну структуру білка, спорідненого з T6PP (код за PDB 1U02), завантажували в Maestro (Schrödinger, Inc.) і аналізували, а також готували для використання (додаючи протони, будуючи дисульфідні містки, установлюючи заряди металів, оптимізуючи водневі зв'язки).

[0289] У той самий час одержували й аналізували експериментальну карту електронної густини для елемента 1U02 з PDB. Хоча більшість ознак у карті були змодельовані правильно у депонованій структурі, електронна густина у положенні молекули гліцерину поблизу активного сайту не відповідала очікуваним ознакам густини гліцерину. Замість цього, карта ясно вказувала на наявність в цьому положенні двох молекул води. Таким чином, молекулу гліцерину вилучали з моделі, а дві молекули води додавали в їх правильні положення. Перед початком процесу гомологічного моделювання зі структури вилучали всі молекули води, крім двох молекул води, безпосередньо зв'язаних координаційним зв'язком з іоном Mg^{2+} в активному сайті.

[0290] Результат моделювання в роботі Rao et al. мав важливі наслідки. Оскільки споріднений з T6PP білок був кристалізований лише як апофермент та не містив зв'язаного субстрату, автори використовували положення молекули гліцерину для спрямовування процедури докінгу, яку здійснювали вручну. Дійсно, автори зробили висновки, що субстрат буде зв'язуватися в сайті зв'язування гліцерину, оскільки гліцерин дещо подібний за своїми властивостями до піраноз. Однак, оскільки в активному сайті структури, що розробили Rao et al., гліцерину не було, докінг субстрату T6P у апофермент змінювали в наступній моделі.

[0291] Гомологічне моделювання

[0292] Початкове вирівнювання послідовностей зчитували за допомогою PRIME (Schrödinger) разом зі структурою білка-шаблону. При більш докладному аналізі вирівнювання білкових послідовностей модифікували з метою оптимізації місць розташування вставки петель (вставок у напрямку зовнішньої поверхні ферменту) і важливих залишків на основі літературних даних. Див. вирівнювання (вище) щодо початкового вирівнювання білкових послідовностей та вирівнювання (нижче) щодо кінцевого вирівнювання білкових послідовностей.

[0293] Кінцеве вирівнювання використовували в PRIME для одержання гомологічних моделей *Oryza sativa* 15777 і *Oryza sativa* 19924. Ці моделі послаблювали із застосуванням мінімізації енергії в MacroModel (Schrödinger), спочатку для атомів водню, потім враховуючи бічні ланцюги білків і насамкінець враховуючи кістяк білків. Кінцева модель показана на фігурі 7. Фермент містить два домени: α/β -гідролазний домен і менший "домен lid". Активний сайт розташований на верхівці α/β -гідролазного домену (пляма); щілина зв'язування з субстратом знаходиться на границі між двома доменами. Два домени з'єднані гнучким лінкером, що дозволяє домену lid відкриватися й закриватися під час каталізу. Оскільки шаблон для гомологічного моделювання, бактеріальний білок, споріднений з T6PP (код за PDB 1U02), являє собою апофермент із порожнім активним сайтом, імовірно, що відносна орієнтація lid домену і гідролазного домену у фактичному фермент-субстратному комплексі дещо відрізняється.

[0294] Кінцеве вирівнювання білкової послідовності спорідненого з T6PP білка (Q9HIW7) і білкових послідовностей *Arabidopsis thaliana* (19925), *Arabidopsis thaliana* (19926), *Oryza sativa* (19924) і *Oryza sativa* (15777) можна побачити на фігурах 11A-11C. Вирівнювання оптимізували із застосуванням літературних даних та аналізу каркаса білкової структури. Залишки, виділені жирним шрифтом і курсивом, у вирівнюванні білкових послідовностей нижче являються

важливими залишками з великого суперсімейства галогендегідрогеназ, які допомагають підтвердити якість вирівнювання.

[0295] Як описано вище, положення T6P, про яке повідомляли Rao et al., було 5
 помилковому припущенні та не може використовуватися в якості відправної точки для раціональної розробки мутантів T6PP. Замість цього ми вирішили здійснювати вручну докінг T6P у гомологічну модель поетапним способом, дотримуючись принципів механізму реакції та беручи до уваги біохімічні дані.

[0296] Початкова відправна точка базувалася на тому факті, що один з негативно заряджених атомів кисню групи 6-фосфату повинен зв'язуватися за допомогою координаційного зв'язку з каталітичним іоном Mg^{2+} в активному сайті. Це є необхідною умовою механізму каталізу та загальною властивістю сімейства фосфатаз HAD (див., "The X-ray crystallographic structure and specificity profile of HAD superfamily phosphohydrolase BT1666: Comparison of paralogous functions in B. thetaiotaomicron." Lu, Z., Dunaway-Mariano, D. and Allen, K.N. (2011) Proteins: Structure, Function and Bioinformatics. 79 (11): 3099-3107). Наряду з цим кисень фосфату повинен знаходитися в безпосередній близькості від Asp121, який акцептує фосфатну групу й утворює під час каталізу перехідну фосфор-аспартатну проміжну сполуку. Розміщення кисню фосфату в екваторіальному положенні октаедральної координаційної сфери Mg^{2+} задовольняє обидві вимоги. За допомогою цієї взаємодії молекула T6P прикріплюється до білка, і це використовували для спрямування процесу докінгу.

[0297] Виходячи з початкового розташування кисню фосфату в координаційній сфері Mg, стає зрозумілим, що існувала лише одна орієнтація групи 6-фосфату, яка дозволила б кисню складного фосфоефіру направлятися убік щілини активного сайту, а не зіштовхуватися із залишками, що оточують активний сайт. У цій орієнтації один з інших атомів кисню фосфату утворює водневий зв'язок з Lys289, що дозволить лізину стабілізувати виникаючий негативний заряд на фосфатній групі під час каталізу (фігура 8). Один з атомів кисню групи 6-фосфату знаходиться в екваторіальному положенні координаційної сфери Mg^{2+} . Asp121, який акцептує фосфатну групу під час каталізу з утворенням ковалентної проміжної сполуки, передбачається в осьовому положенні. Lys289 безпосередньо зв'язаний водневим зв'язком з фосфатною групою, а His181 знаходиться в безпосередній близькості. Обидва залишки розташовані ідеально для стабілізації виникаючого негативного заряду на фосфатному фрагменті під час каталізу. Гомологічна модель T6PP рису зображена зеленими паличками, а субстрат T6P - жовтими.

[0298] Коли точно визначили положення й орієнтацію групи 6-фосфату, мінімізували субстрат в активному сайті за допомогою MacroModel (Schrödinger), утримуючи білок нерухомим. Наприкінці два здатні до обертання зв'язки між піранозними кільцями сканували за допомогою Maestro (Schrödinger), а отримані конформери оцінювали візуально, щоб ідентифікувати можливі взаємодії з білком (фігура 9). Ідентифікували декілька конформацій, у яких друге піранозне кільце перебувало в досить прийнятному положенні для утворення контактів з білком. Зрештою, конформер, у якого друге кільце було приблизно рівновіддаленим від залишків домену lid, вибрали в якості найбільш імовірного й використовували в наступних аналізах.

[0299] Хоча положення й орієнтацію найближчого до групи 6-фосфату піранозного кільця точно визначили за допомогою закріпленої фосфатної групи, існує значна гнучкість між першим і другим кільцями через наявність двох здатних до обертання глікозидних зв'язків (сині стрілки). Ряд можливих положень другого кільця одержували за рахунок обертання двох зв'язків. Конформації, у яких друге кільце зіштовхується з білком, відкидали.

[0300] Розробка варіантів OsT6PP

[0301] Розробляли точкові мутації, які знижували б або повністю усували каталітичну активність T6PP рису (OsT6PP-WT). Загалом, заплановані мутанти належать до трьох класів, які охоплюють діапазон від активності, близької до дикого типу, до повністю неактивних:

[0302] Мутація ключових каталітичних залишків, основана на ферментативному механізмі. Мутації цього класу, як очікується, мають сильний вплив на каталітичну активність ("важкі мутанти").

[0303] Мутація залишків, залучених у зв'язування з субстратом й розпізнавання субстрату. Мутації цього класу, як очікується, будуть знижувати обіг і/або змінювати субстратну специфічність, але не повністю усувати каталітичну активність. Для ідентифікації цих залишків потрібна точна оцінка того, де субстрат розташовується в щілині активного сайту ("м'які мутанти").

[0304] Контрольні мутації. Мутації цього класу, як прогнозується, мають дуже помірний вплив на каталітичну активність, оскільки вони розташовуються далеко від сайту зв'язування з субстратом та не впливають на стабільність білка ("дуже м'які мутанти").

[0305] Для всіх трьох класів використовували наступні правила розробки, щоб переконатися, що спостережувана в мутантів активність була результатом визначених змін, зроблених у білку, а не була лише наслідком загальної дестабілізації:

5 [0306] Якщо залишок, про який іде мова, є гідрофобним і, як передбачається, утворює неполярну взаємодію з субстратом, то зберігає гідрофобний характер залишку й збільшує об'єм. Це має привести до просторового зіткнення з субстратом і знизити афінність зв'язування.

10 [0307] Якщо залишок має здатність до утворення водневих зв'язків (або виступати в якості донора, або в якості акцептора), що буде дозволяти йому взаємодіяти з однією з гідроксильних груп піранози, варто або вкоротити залишок, при цьому зберігаючи здатність до утворення водневих зв'язків, або зберегти довжину приблизно такою самою і усунути здатність до утворення водневих зв'язків.

15 [0308] Жодна модифікація залишків не припускає утворення міжмолекулярних сольових містків. У спорідненого з T6PP білка існує ряд сольових містків, утворених позитивно зарядженим залишком у домені lid і негативно зарядженим залишком в α/β -гідролазному домені, і *vice versa*. Здійснення мутацій цих залишків імовірно буде дестабілізувати білок без специфічної зміни субстратної афінності або каталітичної активності.

20 [0309] Ніякого обернення заряду: позитивно заряджені залишки не варто мутувати в негативно заряджені (і *vice versa*), а скоріше в нейтральний залишок. Мутанти з оберненням заряду, як відомо, викликають локальну дестабілізацію структури білка, і, внаслідок цього, їх слід уникати.

25 [0310] Через невизначеність положення другого піранозного кільця і того факту, що відносна орієнтація домену lid і α/β -гідролазного домену може змінюватися при зв'язуванні з субстратом (див. Фіг. 4), вважалось, що залишки перебувають на відстані до 10 Å від змодельованого субстрату T6P. Працюючи в концентричних оболонках зовні від субстрату, аналізували залишки, що оточували субстрат, і розглядали їх щодо мутації, дотримуючись правил, описаних вище.

[0311] Список точкових мутацій T6PP, розроблених для зниження її трегалоза-6-фосфатфосфатазної активності

[0312] Важкі мутанти

30 [0313] D315N: Asp315 є одним із двох залишків Asp в активному сайті, які утворюють хелат з каталітичним іоном Mg^{2+} (Фіг. 5). Заміна його на ізостеричний аспарагін буде усувати його здатність до зв'язування Mg^{2+} і приводити до повної втрати активності.

35 [0314] K289A: Lys289, імовірно, утворює водневий зв'язок із групою 6-фосфату T6P і служить для стабілізації виникаючого негативного заряду під час каталізу (Фіг. 5). Заміна його на Ala має значно сповільнювати реакцію, приводячи практично до відсутності активності.

[0315] H181A: His181 знаходиться в безпосередній близькості від групи 6-фосфату T6P і, імовірно, служить у якості загальної кислоти під час каталізу. Мутація у Ala буде видаляти загальну кислоту й сповільнювати каталіз практично до відсутності активності.

40 [0316] T318V: Thr318 є консервативним залишком у суперсімействі HAD (Lu et al. 2011) і утворює водневий зв'язок із групою 6-фосфату. Заміна його на менший неполярний залишок валін усуває здатність до утворення водневих зв'язків і робить зв'язування із сильно зарядженою групою небажаним. Ця мутація, як очікується, приводить до практично повної втрати активності.

[0317] М'які мутанти

45 [0318] S159A: Ser159 знаходиться в 5,8 Å від субстрату й може бути залучений у взаємодії із субстратом з утворенням водневих зв'язків, або в якості донора, або в якості акцептора. Заміна його на аланін буде припиняти утворення водневих зв'язків і знижувати субстратну афінність.

50 [0319] E235D: Glu235 знаходиться в домені lid і в 10,6 Å від субстрату. Імовірно, він функціонує в якості донора при утворенні водневого зв'язку; заміна його на аспартат буде зберігати властивості утворення водневих зв'язків, але збільшувати відстань до субстрату, приводячи до неідеальної геометрії утворення водневого зв'язку й зниженої субстратної афінності.

55 [0320] S242D, S242E: Ser242 знаходиться в домені lid і в 8,2 Å від субстрату. Він, як передбачається, утворює взаємодії у формі водневих зв'язків із субстратом, і заміщення його на аспартат або глутамат буде зберігати полярний характер і здатність до утворення водневих зв'язків, але приводить до просторового зіткнення з субстратом внаслідок того, що аспартат і глутамат мають більш довгі бічні ланцюги.

60 [0321] T273E, T273V: Thr273 знаходиться лише в 4 Å від субстрату й може бути залучений у полярну взаємодію за допомогою гідроксильної групи або в неполярну взаємодію з бічною поверхнею піранозного залишку. Якщо взаємодія є полярною, тоді як мутація з глутаматом

(просторове перешкоджання), так і мутація з валіном (усунення полярної групи й втрата здатності до утворення водневих зв'язків) будуть приводити до зниженої активності. Якщо взаємодія є неполярною, тоді лише перша мутація буде приводити до втрати активності, тоді як друга буде мати нейтральний ефект.

5 [0322] V278F, V278M: Val278 знаходиться в 3,4 Å від субстрату та, ймовірно, утворює неполярну взаємодію із передньою поверхнею піранозного кільця. Мутація у фенілаланін або метіонін буде зберігати гідрофобний характер бічного ланцюга, але приводити до сильного просторового зіткнення з субстратом і зниженої активності.

10 [0323] E280A: Glu280 знаходиться в домені lid і в 6,7 Å від субстрату. Він, ймовірно, служить у якості акцептора при утворенні водневого зв'язку, і здійснення його мутації в аланін буде усувати його здатність до утворення водневих зв'язків і знижувати зв'язування з субстратом.

[0324] D316H: Asp316 знаходиться в гідролазному домені та у безпосередній близькості від субстрату, але може бути залучений у сольовий місток з R276, а не у зв'язування з субстратом. Заміщення на гістидин буде усувати його негативний заряд і руйнувати сольовий місток, що має здійснювати лише помірні ефекти. Однак, якщо Asp316 залучений у зв'язування з субстратом шляхом акцептування водневого зв'язка, тоді вплив на каталітичну активність буде сильним.

15 [0325] I129A, I129N: Ile129 перебуває в безпосередній близькості від першого піранозного кільця та, можливо, утворює неполярну взаємодію із субстратом. Обидві мутації, як передбачається, будуть приводити до зниженої активності, перша через усунення гідрофобних взаємодій, друга через уведення полярної функціональної групи.

20 [0326] H244S: His244 знаходиться в домені lid у приблизно 10 Å від субстрату. Вже було відомо, що мутація H244D сильно знижує каталітичну активність, що може зумовлюватися припиненням зв'язування з субстратом через гістидин, або зумовлюватися непрямим ефектом від обертання заряду на суміжних залишках, що можуть бути залучені у зв'язування з субстратом як такі. Мутацію із серином проводили для тестування, чи дійсно His244 безпосередньо залучений у зв'язування з субстратом. Якщо це так, тоді вкорочення бічного ланцюга, при збереженні його полярного характеру, має приводити до зменшення зв'язування з субстратом.

[0327] Дуже м'які/контрольні мутанти

30 [0328] R276A: Arg276 розташований на домені lid і може бути залучений у зв'язування з субстратом, але він, можливо, спрямований від субстрату й також може бути залучений у сольовий місток з Asp316 на гідролазному домені. Заміщення на аланін, як очікується, приводить лише до помірних ефектів.

35 [0329] V293A: Val 293 знаходиться в 6 Å від субстрату, але направлений в бік основної маси розчинника та, що мало ймовірно, відіграє якусь роль у зв'язуванні з субстратом. Мутація з аланіном є дуже консервативною та, як очікується, не має будь-якого ефекту.

[0330] Виходячи з вищеописаної стратегії, розробили 22 варіанта OsT6PP та описали їх в таблиці нижче.

Залишок	Відст. (Å)	Роль	Здійснення мутації у	
Ser159	5,8	Можливе зв'язування з субстратом	Ala	cT6PP-Var1
His181	3,0	Каталіз – стабілізує заряд	Ala	cT6PP-Var2
Glu235	10,6	Можливе зв'язування з субстратом	Asp	cT6PP-Var3
Ser242	8,0	Можливе зв'язування з субстратом	Asp	cT6PP-Var4
Ser242	8,0	Можливе зв'язування з субстратом	Glu	cT6PP-Var5
Thr273	4,0	Можливе зв'язування з субстратом	Val	cT6PP-Var6
Thr273	4,0	Можливе зв'язування з субстратом	Glu	cT6PP-Var7
Arg276	2,5	Зв'язування з субстратом	Ala	cT6PP-Var8
Val278	3,4	Зв'язування з субстратом	Met	cT6PP-Var9
Val278	3,4	Зв'язування з субстратом	Phe	cT6PP-Var10
Glu280	6,7	Зв'язування з субстратом	Ala	cT6PP-Var11
Lys289	1,9	Каталіз – стабілізує заряд	Ala	cT6PP-Var12
Val293	6,1	Контроль	Ala	cT6PP-Var13
Asp315	2,5	Утворення хелату з Mg	Asn	cT6PP-Var14
Asp316	1,4	Можливий сольовий місток з Arg276	His	cT6PP-Var15
Thr318	2,3	Зв'язування 6-фосфату	Val	cT6PP-Var16
Ile129		Можливе зв'язування з субстратом	Ala	cT6PP-Var17
Ile129		Можливе зв'язування з субстратом	Asn	cT6PP-Var18

Продовження

Залишок	Відст. (Å)	Роль	Здійснення мутації у	
His244		Інактивує каталіз	Ser	cT6PP-Var19
Ala102		Зовнішні каталітичні домени на основі моделювання білка	Val	cT6PP-Var20
D56 N-кінцевий		Можлива регуляторна роль	Усікання 56 aa	cT6PP-Var21
D110 N-кінцевий		Можлива регуляторна роль	Усікання 110 aa	cT6PP-Var21

[0331] Що стосується нумерації залишків у цій таблиці, слід звертатися до номерів залишків у білковій послідовності 15777 OsT6PP-WT *Oryza sativa*. Варіанти Δ56 N-кінцевої й Δ110 N-кінцевої з N-кінцевим усіканням 56 і 110 амінокислот, відповідно, були розроблені для тестування можливої регуляторної ролі цієї частини молекули білка. Як очевидно з вищенаведених вирівнювань, ця 110 N-кінцева частина T6PP властива лише рослинним T6PP і може не бути необхідною для фосфатазного каталізу, виходячи з моделювання залишків активного сайту.

[0332] Конструювання вектора й трансформація *E. coli*

[0333] Кодуючу послідовність варіантів T6PP синтезували й клонували у вектор експресії для *E. coli* pGEX-6P₃ для експресії в якості GST-злитого білка: GST знаходиться на N-кінці білка T6PP. Нуклеотидні послідовності ДНК, вставлених у вектор, секвенували й підтверджували.

[0334] Плазмідні для експресії варіантів OsT6PP трансформували в клітини BL21 (DE3) pLysS *E. coli* на основі протоколу Invitrogen® для експресії рекомбінантних білків. Коротко, розморожували клітини *E. coli* на льоді й по 10 нг (в 10 мкл) кожної плазмідної ДНК додавали до клітин і обережно перемішували за допомогою постукування. Пробірки тримали на льоді протягом 15 хв. і здійснювали тепловий шок протягом 30 с при 420C у водяній бані. Після теплового шоку пробірки тримали на льоді. У кожну пробірку додавали по 250 мкл SOC та інкубували зі струшуванням протягом 1 години при 370C. 50 мкл продуктів реакції трансформації вносили в чашки з LB, що містили ампіцилін (50 мкг/мл) і хлорамфенікол (34 мкг/мл). Чашки перевертали й інкубували протягом ночі при 370C.

[0335] Експресія й часткове очищення рекомбінантних OsT6PP та їх варіантів

[0336] Клітини *E. coli* [BL21(DE3)pLysS], що несуть вектор для експресії рекомбінантного варіанта T6PP, вирощували до A600nm 0,6 у середовищі Luria Broth, що містило 50 мкг/мл ампіциліну та 25 мкг/мл хлорамфеніколу. Експресію рекомбінантного білка індукували додаванням 0,5 mM IPTG протягом 2 год. при 370C. Клітини збирали при 6000Xg (ротатор JA) або 3000 об./хв. у центрифугі Allegra 6R. Дебрис повторно суспендували в буфері (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, інгібітор протеази (GE Healthcare®) 1 таблетка на 50 мл буфера, 2 мкл ДНКазу I/мл буфера). Клітини руйнували за допомогою обробки ультразвуком (10 циклів з 10 с включення - 30 с вимикання, встановлена потужність на виході 3,5 (18 Вт). Під час обробки ультразвуком пробірки тримали на льоді. Лізати центрифугували при 15000 X g протягом 15 хв. Супернатанти переносили в 15 мл пробірки falcon і витримували на льоді перед додаванням гранул Glutathione Sepharose® 4B (Thermo Scientific®).

[0337] Гранули Glutathione Sepharose 4B попередньо врівноважували 3 рази промивним буфером (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM DDT). 250 мкл попередньо врівноважених гранул додавали у кожну пробірку з лізатом (7 мл) та інкубували протягом 1:30 год. при 4 в умовах повільного погойдування. Гранули Glutathione Sepharose 4B, що містили лізати, переносили в хроматографічні колонки poly-prep (10 мл Biorad®) і бульйону дозволяли повністю витекти. Смола, що зв'язала білок, промивали промивним буфером (3 рази по 5 мл) з наступним промиванням (5 мл, 3X) буфером для розщеплення PreScission® (20 mM tris-HCl, pH 7,0, 150 mM NaCl і 1 mM DTT). Фермент-протеазу PreScission (10 мкл в 300 мкл буфера) додавали до гранул, що зв'язали білок, та інкубували протягом 16 год. при 40C з повільним погойдуванням. Супернатант збирали та рециркулювали 3 рази через колонку, а останній збір тримали на льоді для витікання гелю й вимірювання концентрації.

[0338] Концентрацію білка вимірювали за допомогою наборів BCA [Thermo Scientific®]. 20 мкл кожного вихідного розчину білка змішували з 4X барвником SDS і проводили SDS-PAGE (4-12 % градієнтний гель) із застосуванням буфера MOPS при 200 В для оцінки збагачення й

забезпечення однорідності очищеного білка. Кінцеву процентну чистоту частково очищеної Т6РР та її варіантів визначали за допомогою автоматизованого електрофорезу Bio-Rad Experion®.

[0339] Активність OsT6PP та її мутантів

- 5 [0340] Активність OsT6PP та її варіантів вимірювали на основі стандартного протоколу аналізу. Коротко, відповідну кількість білка одержували з вихідного розчину й поміщали в 96-лункові планшети. Реакційні суміші (буфер з 2 мМ кінцевою концентрацією Т6Р у реакційній суміші; склад буфера 10 мМ Tris, рН 6,7, 2 мМ MgCl₂ і 0,5 мг/мл BSA) одержували й тримали на льоді перед змішуванням із препаратом ферменту. Придатну кількість розведеного ферментного білка додавали до реакційних сумішей (застосовували концентрацію білка 0,05, 0,1 або 1 мкг у загальному реакційному об'ємі 100 мкл) в 96-лунковому планшеті. Реакційні суміші інкубували при 370С протягом різних інтервалів часу (5, 10 і 20 хвилин) і фермент у реакційній суміші деактивували шляхом нагрівання при 950С протягом 5 хв. Інактивовані реакційні суміші в 96-лунковому планшеті центрифугували протягом 1 хвилини при 700 об./хв.,
- 10
- 15
- потім 80 мкл кожного реакційного розчину переносили в лунки, що містили 80 мкл води. Суміші переносили в лунки планшета для фільтрації MicroScreen-HV, а 96-лунковий планшет Dionex застосовували для збору фільтрату для аналізу HPLC. Специфічну активність розраховували на основі стандартної процедури.

[0341] Dionex HPLC

- 20 [0342] Систему для іонної хроматографії Dionex ICS-3000 застосовували для виявлення трегалозного продукту, утвореного внаслідок дефосфорилювання субстрату Т6Р в присутності ферменту Т6РР. Трегалозу відокремлювали за допомогою аналітичної колонки CarboPac® PA1 із градієнтом елюювання 15 хвилин при швидкості потоку 1 мл/хв. Зразки вводили в колонку CarboPac PA1, урівноважену 100 мМ NaOH, при швидкості потоку 1 мл/хв, з наступним 0-200
- 25
- мМ градієнтом ацетату натрію в 100 мМ NaOH від 3 до 8 хв., потім 200 мМ-750 мМ градієнтом ацетату натрію в 100 мМ NaOH від 8 до 10 хв. і знову 100 мМ NaOH від 10,5 до 15 хв. Трегалозу, відділену за допомогою хроматографії, кількісно визначали шляхом інтегрування області піків із застосуванням програмного забезпечення Chromeleon®.

[0343] Графік даних і оцінка специфічних активностей варіантів Т6РР

- 30 [0344] Досліджувані реакційні суміші інкубували протягом трьох різних інтервалів часу, і кожна точка на графіку являє собою середнє трьох незалежних досліджуваних реакційних сумішей. Фонову кількість (утворення трегалози за відсутності ферменту, негативний контроль) відслідковували й віднімали від трегалози, отриманої в досліджуваній суміші з доданим ферментом. До нанесених на графік даних підбирали поліноміальне рівняння ($Y=AX^2+bX$). Швидкість реакції оцінювали на основі кута нахилу ($2AX+b$) вищевказаного рівняння в 1
- 35
- хвилину.

[0345] Швидкість реакції = отримана трегалоза (мкМ)/хв. і переведена у мкмоль/хв.

[0346] Специфічна активність = швидкість утворення трегалози (мкмоль/хв.)/мг Т6РР.

- 40 [0347] Порівняння трегалоза-6-фосфатфосфатазних активностей варіантів Т6РР, як визначається згідно аналітичної процедури, описаної вище.

Варіанти Т6РР	Специфічна активність	Відносна активність
	мкмоль Тре/хв./мг Т6РР	% відносно OsT6PP-WT
№23, OsT6PP-02	42,36	215,3
№21, OsT6PP-Δ56 N-кінцевий	25,59	130,0
№25, AtT6PP-B	20,00	101,6
№28, OsT6PP-WT	19,68	100,0
№20, OsT6PP-A102V	17,87	90,8
№08, OsT6PP-R276A	15,27	77,6
№07, OsT6PP-T273E	12,36	62,8
№06, OsT6PP-T273V	12,12	61,6
№27, EcTPS-T6PP	10,58	53,7
№24, AtT6PP-A	6,31	32,1
№26, ScT6PP (TPS-2)	5,50	28,0
№03, OsT6PP-E235D	5,31	27,0
№16, OsT6PP-T318V	3,91	19,9
№13, OsT6PP-V293A	2,49	12,6
№30, OsT6PP-I129F, A102V	1,70	8,7
№17, OsT6PP-I129A	1,58	8,0
№09, OsT6PP-V278M	1,29	6,5

Варіанти T6PP	Специфічна активність мкмоль Tre/хв./мг T6PP	Відносна активність % відносно OsT6PP-WT
№18, OsT6PP-I129N	1,24	6,3
№19, OsT6PP-H244S	0,45	2,3
№04, OsT6PP-S242D	0,40	2,0
№15, OsT6PP-D316H	0,36	1,8
№10, OsT6PP-V278F	0,12	0,6
№01, OsT6PP-S159A	0,07	0,4
№14, OsT6PP-D315N	0,07	0,4
№05, OsT6PP-S242E	0,06	0,3
№11, OsT6PP-E280A	0,05	0,3
№29, OsT6PP-H244D	0,02	0,1
№02, OsT6PP-H181A	0,01	0,1
№12, OsT6PP-K289A	0,00	0,0
№22, OsT6PP-Δ110 N-кінцевий	Не визначали	

[OsT6PP-02, *Oryza sativa* T6PP-02; AtT6PP-A, *Arabidopsis thaliana* T6PP-A; AtT6PP-B, *Arabidopsis thaliana* T6PP-A; EcTPS-T6PP, злитий білок трегалоза-6-фосфатсинтази й фосфатази *Escherichia coli*, і ScT6PP[TPS-2], *Saccharomyces cerevisiae*, трегалоза-6-фосфатфосфатаза]

Приклад 7: In vitro оцінка можливих білок-білкових взаємодій між T6PP і TPS і додаткова оцінка низхідних ефектів.

[0348] Для оцінки того, чи може T6PP з рису взаємодіяти з різними компонентами TPS-комплексу дріжджів, буде розроблятися дріжджова модельна система. Vandercammen et. al. (Eur. J. Biochem. 182, 613-620 (1989)) внаслідок спільного очищення TPS і T6PP з *Saccharomyces cerevisiae* установили, що ці білки є частиною єдиного біфункціонального білка. Bell et. al. (The Journal of Biological Chem. 273; No. 50, pp 33311-33319 (1998)) додатково описали склад і провели функціональний аналіз комплексу T6PP/TPS в *Saccharomyces cerevisiae*. Також було показано, що TPS дріжджів може утворювати комплекс із T6PP, отриманою з *Arabidopsis* (див. Vogel et. al. The Plant Journal 13; No. 5, pp. 673-683). TPS-комплекс дріжджів містить чотири елементи TPS1, TPS2, TPS3 і TSL1. TPS1 містить білковий домен з TPS активністю, а TPS2 містить білковий домен з T6PP активністю. Функцією як TPS3, так і TSL1 є регуляція функції TPS-комплексу. Не обмежуючись теорією, припускають, що за допомогою розробки дріжджової моделі можна оцінити додаткові модифікації in vitro, що можна застосовувати для розробки білків, пептидів, поліпептидів або хімічних речовин, які могли б підвищувати утворення T6P, тим самим регулюючи потік цукрів у репродуктивні тканини та/або запускаючи різні інші каскади, які забезпечують збільшену врожайність і/або стресостійкість при експресії в рослині або застосуванні щодо неї. Мета способу: (A) протестувати, чи може T6PP рису взаємодіяти з різними компонентами TPS-комплексу дріжджів, і, крім того, визначити, як ці взаємодії впливають на каталітичні активності кожного компонента, шляхом вимірювання низхідних продуктів (тобто, трегалози, T6P); (B) розробити in vitro аналіз для тестування того, чи взаємодіє T6PP рису з TPS рису; (C) експресувати модифіковану T6PP рису в маїсі для виділення й опису характеристик отриманого T6PP/TPS-комплексу, (D) застосувати дані, отримані з (A), (B) і/або (C) для проведення біоінформатичного аналізу з метою ідентифікації додаткових модифікацій, які можна зробити в молекулі T6PP для подальшого полегшення одержання T6P. Також передбачається, що нуклеотиди, які кодують комплекс як такий, можна розробити з даних, які зібрані у ході зазначених експериментів.

[0349] Оцінка взаємодії T6PP рису з компонентами TPS-комплексу дріжджів, що мічені TAP

[0350] Вектори експресії будуть конструювати окремо для експресії або в дріжджах, або в *E. coli*, при цьому вони міститимуть полінуклеотидну послідовність, що кодує немодифікований білок T6PP, представлений в SEQ ID NO: 2, і модифікований білок T6PP, представлений в SEQ ID NO: 6. Також можна розробити конструкт для інших модифікованих T6PP для оцінки різних ефектів мутацій, наприклад, нуклеотидної послідовності, що кодує T6PP, таку як показана у SEQ ID NO: 4, або будь-яку іншу T6PP, яка була модифікована, щоб мати знижену активність. Потім ці конструкти можна трансформувати як у бактерії, так і в дріжджі для подальшої оцінки.

[0351] У таблиці нижче розглянуті різні загальнодоступні штами дріжджів, що мають білки, мічені TAP, які можна застосовувати для оцінки взаємодій між експресованими T6PP рису та

різними компонентами TPS-комплексу дріжджів. Штами дріжджів з міткою TAP можна придбати від постачальника, такого як Thermo Scientific. Білки, мічені TAP, можна легко виявляти за допомогою добре відомого в даній галузі техніки вестерн-блотингу. Для визначення того, чи взаємодіють варіанти T6PP рису (дикого типу й модифіковані) з будь-яким компонентом TPS-комплексу дріжджів, можна одержати екстракти, що містять як білок T6PP рису, так і відповідні білкові компоненти TPS-комплексу дріжджів, мічені TAP. Потім білки можна виділити з цих екстрактів і провести вестерн-блотинг шляхом виявлення за допомогою антитіла до TAP для визначення того, чи відбувається білок-білкова взаємодія між будь-якими модифікованими T6PP рису й компонентами TPS-комплексу дріжджів (тобто на білок-білкову взаємодію буде вказувати більший, ніж очікувалося, розмір бенду). Наступна таблиця описує штами дріжджів, що містять білки, мічені TAP, які можна виявляти шляхом аналізу вестерн-блотинг за допомогою антитіла до TAP.

1	YSC1178	клон YSC1178-7499322 з ORF з міткою TAP	TPS1
2	YSC1178	клон YSC1178-7499771 з ORF з міткою TAP	TPS2
3	YSC1178	клон YSC1178-7502275 з ORF з міткою TAP	TPS3
4	YSC1178	клон YSC1178-7502052 з ORF з міткою TAP	TSL1

[0352] Після ідентифікації білок-білкових взаємодій між T6PP рису й компонентами TPS-комплексу дріжджів будуть проводитися експерименти для визначення того, як різні модифіковані й немодифіковані T6PP впливають на функцію TPS-комплексу дріжджів. TPS2 компонент дріжджів (тобто частина, що має T6PP активність) TPS-комплексу будуть заміщати або немодифікованим білком T6PP рису (SEQ ID NO: 1), або модифікованими білками T6PP рису (SEQ ID NO: 3, 5, 7). Потім ці модифіковані комплекси можна експресувати у дріжджах для подальшої оцінки того, як ці заміщення впливають на загальну функцію TPS-комплексу, шляхом вимірювання рівнів T6P і трегалози. Для визначення різних впливів кожного заміщення в екстрактах із дріжджів можна вимірювати рівні T6P і рівні трегалози за допомогою стандартних способів HPLC, відомих у даній галузі техніки. Теоретично вважається, що комплекси, які містять модифіковану T6PP рису, будуть проявляти збільшення рівнів T6P у порівнянні з комплексом, що містить немодифіковану T6PP рису.

[0353] Приклад 8: Оцінка модифікованих білків T6PP у рослинній тканині за допомогою тимчасової експресії в рослині.

[0354] Для додаткової оцінки впливів модифікованих T6PP (тобто, модифікованих T6PP зі зниженою активністю) на утворення T6P і трегалози в рослинній тканині будуть застосовуватися аналізи тимчасової експресії в рослині. Спосіб аналізу тимчасової експресії в рослині, описаний у заявці на патент США 2010/0319089, включений в даний документ за допомогою посилання, можна застосовувати для оцінки різних T6PP та їх впливу на утворення T6P і трегалози. Загалом, бінарні конструкти, що містять модифіковані T6PP, такі як представлені в SEQ ID NO 2, 4 або 6, будуть інфільтруватися й тимчасово експресуватися, фактично як описано в заявці на патент США 2010/0319089. Після тимчасової експресії модифікованих T6PP рівні T6P і трегалози будуть відслідковувати протягом декількох днів (тобто, 1-10 днів) за допомогою HPLC. Крім того, різні TPS/T6PP-комплекси можна конструювати й оцінювати за допомогою тимчасової експресії кожного відповідного комплексу в рослинній тканині.

[0355] Скринінг подвійних гібридів дріжджів: для ідентифікації поліпептидів або інших молекул, які взаємодіють або зв'язуються при спільній експресії в клітині, можна додатково застосовувати підходи з подвійними гібридами ссавців або дріжджів (див., наприклад, Bartel, P.L. et. al. *Methods Enzymol*, 254:241 (1995)). Для додаткової ідентифікації та визначення характеристик будь-яких білок-білкових взаємодій, що виникають між модифікованими білками T6PP і ендегенними рослинними білками, можна проводити скринінг подвійних гібридів дріжджів.

Приклад 9: Компонентний аналіз урожайності рослин, які експресують модифіковані білки T6PP

[0356] Стрес, викликаний посухою при цвітінні, знижує врожайність внаслідок збільшення безпліддя, зменшення числа качанів на рослину та зерен на рослину. Таким чином, трансгенні рослини маїсу, які експресують модифікований білок, показаний в SEQ ID NO: 4, під контролем промотору OsMADS6, тестували на двох польових ділянках в умовах обробки із чотирма різними варіантами стресу: 1) добре зволоження без втрати врожайності внаслідок стресу, викликаного посухою, 2) помірний стрес, 30-45 % втрата запланованої врожайності контрольної рослини внаслідок стресу, викликаного посухою при цвітінні, 3) середній стрес, 60 % втрата

запланованої врожайності контрольної рослини внаслідок стресу, викликаного посухою при цвітінні, і 3) сильний стрес, 80 % втрата запланованої врожайності контрольної рослини внаслідок стресу, викликаного посухою при цвітінні. Дані збирали щодо числа рослин на акр, числа рядів зерен на качан, числа качанів на рослину, числа зерен на рослину й ваги на зерно.

5 Тестували вісім різних гібридів.

[0357] Усі трансгенні й контрольні рослини тестували на суміжних попарних дослідних ділянках у полі. Пари дослідних ділянок з густотою стояння менше 50 рослин виключали. Відмінності обчислювали для кожної ознаки. Імовірності розраховували за допомогою парного t-тесту для окремих гібридів у межах кожного випробування на кожній ділянці, а також для груп втрати врожайності для кожного різновиду. Чотири з восьми протестованих гібридів показали позитивну відповідь щодо врожайності за умов сильного стресу, викликаного посухою при цвітінні. Два гібриди показали негативну відповідь щодо врожайності. Збільшення врожайності в чотирьох гібридів було незмінно обумовлене збільшенням числа качанів на рослину й числа зерен на рослину. Два з чотирьох гібридів також показали зниження безплідності. Наявність модифікованого білка T6PP допомогла пом'якшити вплив стресу, викликаного посухою при цвітінні, шляхом зниження безплідності, збільшення числа качанів на рослину й збільшення числа зерен на рослину.

Приклад 10: In Vitro активація OsT6PP-WT у присутності OsT6PP-H244D

Підвищена трегалоза-6-фосфатфосфатазна активність (in vitro) OsT6PP-WT у присутності її каталітично неактивного варіанта, OsT6PP-H244D (SEQ ID NO: 4)

[0358] Вплив доданої OsT6PP-H244D на каталітичну властивість OsT6PP-WT вимірювали за допомогою аналізу трегалоза-6-фосфатфосфатазної активності, описаного вище в прикладі 6. Коротко, придатну кількість (як зазначено в надписах таблиці) білків (OsT6PP-WT і OsT6PP-H244D), частково очищених з *E. coli*, що експресує рекомбінантні варіанти OsT6PP, інкубували на льоді протягом 10 хвилин в 96-лункових планшетах. Субстрат трегалоза-6-фосфат (кінцева концентрація 2 мМ) змішували з реакційним буфером (склад буфера 10 мМ Tris, pH 7,0, і 2 мМ MgCl₂) і витримували на льоді перед змішуванням з ферментом. 85 мкл реакційних сумішей додавали до ферментативних сумішей (загальний об'єм реакції 100 мкл) в 96-лунковому планшеті. Реакційні суміші інкубували при 370C протягом різних інтервалів часу (як зазначено в надписах таблиці). Кожну реакцію проводили в трьох повторностях. Фермент у реакційній суміші деактивували нагріванням при 950C протягом 5 хвилин. Неактивні реакційні суміші в 96-лунковому планшеті центрифугували протягом 2 хвилин при 700 об./хв., потім по 80 мкл кожного реакційного розчину переносили в лунки, що містили по 80 мкл води. Суміші переносили в лунки планшета для фільтрації MicroScreen-HV і фільтрат збирали для аналізу HPLC і оцінки трегалози, що утворилася внаслідок реакції з фосфатазою.

[0359] Таблиця: Підвищену трегалоза-6-фосфатфосфатазну активність OsT6PP-WT спостерігали в присутності варіанта OsT6PP, OsT6PP-H244D.

[0360] Кількість трегалози (мМ), що утворилася в реакційній суміші внаслідок дефосфорилювання трегалоза-6-фосфату при інкубації (час інкубації – колонка 1) з OsT6PP-WT ((1 мкг/мл; колонка 2), OsT6PP-H244D (10 мкг/мл; колонка 3) або сумішшю (колонка 4) OsT6PP-WT (1 мкг/мл) і OsT6PP-H244D (10 мкг/мл)

Таблиця

Час (хв.)	OsT6PP-WT	OsT6PP-H244D	OsT6PP WT+H244D	stdv WT	stdv H244D	stdv WT+H244D
Трегало́за, що утворилася (мкМ)						
0	0	0	0	0	0	0
20	25,3	1,1	89,5	1,6	0,6	1,9
40	33,6	4,6	155,0	4,7	0,2	3,8
60	36,8	5,9	220,1	4,4	0,8	8,3

stdv – стандартне відхилення, розраховане на основі набору даних від трьох повторностей для кожної реакції.

Таблиця: Вплив концентрації OsT6PP-H244D на активацію трегалоза-6-фосфатфосфатазної активності OsT6PP-WT.

[0361] Кількість трегалози (мкМ, колонка 2), що утворилася в реакційній суміші внаслідок дефосфорилювання трегалоза 6-фосфату при інкубації OsT6PP-WT (1 мкг/мл) із вказаною концентрацією OsT6PP-H244D (колонка 1). Кількість трегалози (мкМ, колонка 3), що утворилася

при інкубації OsT6PP-H244D окремо у реакційній суміші за відсутності OsT6PP-WT, при концентрації, що зазначена в колонці 1. Реакції здійснювали протягом 20 хвилин.

Таблиця

OsT6PP-H244D	T6PP активність	
мкг/мл	Трегалоза, що утворилася (мкМ)	
0	28,7	0,0
0,5	34,9	nd
1	40,1	nd
2	52,3	nd
5	71,7	nd
10	77,7	2,2
20	101,1	6,2

5 T6PP активність усереднювали на основі набору даних від трьох повторностей для кожної реакції. nd – не визначали

[0362] Підвищену трегалоза-6-фосфатфосфатазну активність OsT6PP-WT (in vitro) спостерігали в присутності її каталітично неактивних варіантів, включаючи OsT6PP-H244D, OsT6PP-H244S і OsT6PP-S242E. Спостережувана активація T6PP у присутності OsT6PP-H244D залежить від концентрації OsT6PP-H244D у реакційній суміші. Ступінь активації T6PP варіювала серед протестованих варіантів T6PP. Заряд на амінокислотних залишках поблизу 244-242 може буди залученим у цю алостеричну взаємодію. Приблизно 3-кратне збільшення T6PP активності спостерігали, коли OsT6PP-WT аналізували в присутності OsT6PP-H244D. Для порівняння, 1,7-кратне збільшення T6PP активності спостерігали, коли N-кінцеву усичену OsT6PP-D56NT змішували з OsT6PP-H244D. Це може вказувати на можливу роль N-кінцевої частини OsT6PP в алостеричній взаємодії.

Приклад 11: Експресія модифікованої T6PP у пшениці

[0363] П'ять конструктів (див. таблицю нижче) варіантів OsT6PP трансформували в пшеницю, використовуючи протокол трансформації за допомогою Agrobacterium (WO11013764) із застосуванням системи селективних маркерів PMI (патент США №5767378; патент США №5994629) для одержання стабільних трансгенних об'єктів для оцінки ознаки. Три варіанти OsT6PP: OsT6PP, послідовність дикого типу; OsT6PP-H244D (SEQ ID NO: 3) з однією модифікацією H244D і OsT6PP-I129F (SEQ ID NO: 5) з двома модифікаціями A102V і I129F. Серед цих п'яти конструктів 20569 і 20833 розробляли із застосуванням + енхансерів, щоб спробувати змінити рівень експресії OsT6PP і націлити на інші тканини в рослинах у порівнянні з 20571 і 20832 без енхансерів. 12194 слугував у якості контролю дикого типу для порівняння з варіантами T6PP.

Таблиця

Конструкти T6PP, які застосовували в трансформації пшениці

Конструкт	Опис конструкта	Ген, що становить інтерес
20571	prOsMADS6:cT6PP:tOsMADS6	OsT6PP-H244D; SEQ ID NO: 3
20832	prOsMADS6:cT6PP: tOsMADS6	OsT6PP-I129F; SEQ ID NO: 5
12194	6906QC-T6PP-6900-18	OsT6PP-WT; SEQ ID NO: 1
20569	prOsMADS6:eFMV:e35S:cT6PP:tOsMADS6	OsT6PP-H244D; SEQ ID NO: 3
20833	prOsMADS6: eFMV:e35S:cT6PP: tOsMADS6	OsT6PP-I129F; SEQ ID NO: 5

30 eFMV являє собою енхансер з промотора гена 35S вірусу мозаїки ранника

e35S являє собою енхансер з промотора гена 35S вірусу мозаїки цвітної капусти

[0364] Трансформанти аналізували за допомогою первинних аналізів Taqman для ідентифікації об'єктів з низькою кількістю копій і об'єктів, що не містять векторні кістяки. Ідентифіковані об'єкти переносили в теплицю для висаджування. Усі інші позитивні об'єкти з великою кількістю копій і наявністю векторного кістяка виключали. Об'єкти з наявністю ознаки додатково аналізували за допомогою вторинного Taqman для підтвердження однієї копії вставленого гена та за допомогою ELISA і qRT-PCR стосовно експресії PMI і T6PP для відбору об'єктів. ELISA і qRT-PCR стосовно PMI і/або T6PP застосовували з метою відбору трьох наборів

об'єктів, які експресували білок або транскрипт (на низькому рівні, середньому і високому), для одержання покоління T1. З конструктором 20571 одержали в цілому 154 об'єкти. З конструктором 20832 одержали в цілому 129 об'єктів. З конструктором 12194 одержали в цілому 84 об'єкти. З конструктором 20569 одержали в цілому 161 об'єкт. З конструктором 20833 одержали в цілому 89 об'єктів.

[0365] Стрес, викликаний умовами навколишнього середовища, може відбутися в будь-який час життєвого циклу рослини в полі. Посуха під час раннього періоду циклу росту та на стадії цвітіння може викликати значні проблеми з урожайністю в багатьох регіонах вирощування пшениці. Молоді рослини пшениці не можуть протистояти обмеженому зволоженню, а слабе зав'язування насіння може бути зумовлене стресом, викликаним нестачею води, на стадії повного цвітіння. Під час раннього росту рослини та при повному цвітінні дуже бажана стійкість до посухи. Таким чином, на цих двох стадіях розвитку трансгенні рослини з T6PP будуть піддаватися стресу.

[0366] Відповідь рослини на нестачу води можна оцінити за допомогою вимірювання водного режиму в листках (відносного вмісту вологи), температури рослинного полог, фотосинтезу, транспірації, провідності листків і використання ґрунтової вологи. Після обробок стресом у рослин вимірювали біомасу (висоту рослин) і кількість паростків, або при дозріванні визначали врожайність надземної сухої речовини, урожайність зерен і масу насіння для визначення компонентів урожайності, а також індекс урожайності в порівнянні з нетрансгенними контрольними або нульовими рослинами для оцінки збільшення врожайності та компонента врожайності за допомогою генів ознаки. За допомогою системи одержання зображень шляхом серійної зйомки з часовим інтервалом можна фіксувати відповідь на стрес, викликаний нестачею води, щоб показати відповідь популяції рослин на стрес, викликаний нестачею води, у сегрегуючій популяції T1.

[0367] У лабораторії та вегетаційній камері на стадіях проростання й сіянців можна застосовувати оцінку стійкості до стресу, викликаного нестачею води, для скринінгу культиварів пшениці й тритикале із застосуванням PEG (Sapra, et al., 1991, Crop Science 167, 23-28, Blum et al., 1980, Euphytica 29: 727-736). Насіння, що проростає, і сіянці, що вирощуються гідропонним способом, можна піддавати впливу розчину PEG зі зростаючим градієнтом концентрацій, що забезпечує осмотичний стрес від -0,3 до -0,6 МПа, або не забезпечувати водою для перевірки трансгенних організмів на стійкість до посухи.

[0368] Наступні фенотипічні дані (1, 2 і 3) збирали за допомогою аналізу з відсутністю забезпечення сіянців водою. Для 30 рослин з кожного об'єкта записували й відслідковували генотипічні дані (зиготність). Записували фенотипічні дані вибраних рослин й установлювали їхню кореляцію із зиготністю. Будь-яку очевидну фенотипічну сегрегацію в умовах стресу тестували за допомогою критерію хі-квадрат стосовно окремої вставки з очікуваним співвідношенням 3:1. Можна очікувати, що об'єкти з очікуваним сегрегаційним співвідношенням мають поліпшену стійкість до стресу.

Висота рослини й підрахунок числа паростків:

Висота рослини: від кінчика пучка стебел до основи стебла.

Кількість паростків: підрахунок числа нових паростків >2 см.

Оцінки впливу посухи на фазі проростання: (IRRI, 1996)

Шкала	Опис	Градація
0	Симптоми відсутні	Дуже витривалі
1	Неістотне висихання кінчика	Витривалі
3	Висихання кінчика у більшості листків поширилося на ¼ довжини	Помірно витривалі
5	¼ - ½ листків повністю висохла	Помірно чутливі
7	Більш ніж 2/3 усіх листків повністю висохли	Чутливі
9	Усі рослини явно загинули	Дуже чутливі

Вимірювання відносного вмісту вологи: (RWC)

$RWC (\%) = [(FW-DW) / (TW-DW)] \times 100$

FW (сиря вага): 4-6 прапорцевих листків, що повністю розпустилися/листяних дисків - 10-15 °C і зважити.

TW (вага у тургорі): гідратувати листок протягом 4 год. у чашці Петрі за допомогою dd-води при кімнатній температурі й освітленні та зважити.

DW (суха вага): висушувати в печі при 80 °C протягом 72 год. і зважити після охолодження в ексікаторах.

Schonfeld et al. (1988) Crop Science 28:526-531.

[0369] Двадцять один об'єкт 20571 T0 відібрали для скринінгу сіянців за відсутності забезпечення водою й для одержання насіння T2. Сім об'єктів відібрали як об'єкти з низькою експресією трансгена, сім об'єктів відібрали як об'єкти з середньою експресією трансгена і сім об'єктів відібрали як об'єкти з сильною експресією трансгена. Аналогічне число об'єктів T0 буде відбиратися для всіх інших чотирьох конструктів (20832, 12194, 20833 і 20569) з метою скринінгу за відсутності забезпечення водою на стадії сіянця у T1 і стадії повного цвітіння у T2.

[0370] У п'яти об'єктів 20832 здійснювали аналіз експресії транскрипту за допомогою qRT-PCR стосовно OsT6PP-I129F і PMI, і він показав, що T6PP-I129F експресувалася лише в репродуктивних тканинах 3 з 5 об'єктів, тоді як PMI експресувався в усіх рослинах.

№ рослини	№ конструкта	PMI до внутрішнього контролю (x1000)	T6PP до внутрішнього контролю (x1000)	Тканина
1	20832	6605,06	63,93	Прапорцевий листок
1	20832	4418,36	38,44	Вузол прапорцевого листка
1	20832	3392,21	51,70	Колосок з насінням
1	20832	4657,83	96,48	Колосок без насіння
2	20832	9041,99	3,21	Прапорцевий листок
2	20832	3518,87	35,52	Вузол прапорцевого листка
2	20832	1184,24	10,97	Колосок з насінням
2	20832	6222,36	30,21	Колосок без насіння
3	20832	10938,95	0,00	Прапорцевий листок
3	20832	1576,16	0,00	Вузол прапорцевого листка
3	20832	740,58	0,00	Колосок з насінням
3	20832	1504,65	0,00	Колосок без насіння
4	20832	3368,54	0,00	Прапорцевий листок
4	20832	1478,55	0,00	Вузол прапорцевого листка
4	20832	444,83	0,00	Колосок з насінням
4	20832	1480,28	0,00	Колосок без насіння
5	20832	4463,78	0,00	Прапорцевий листок
5	20832	2673,50	0,05	Вузол прапорцевого листка
5	20832	1000,36	5,44	Колосок з насінням
5	20832	2315,88	1,26	Колосок без насіння

Рослина номер 4 є негативним контролем, що містить PMI, а не ген T6PP.

Приклад 12: Експресія модифікованої T6PP у сої

[0371] Для поліпшення врожайності дводольних рослин можна використовувати трегалозний шлях. Наприклад, соя (*Glycine max*) реагує на посуху скиданням квіток, скиданням бобів, зменшенням кількості насінин на біб, недорозвиненням насінин всередині бобів та зменшенням розміру насінини (Liu et al., 2003). Одержання стійкої до посухи рослини сої буде підвищувати врожайність внаслідок запобігання втраті квіток, бобів, насіння та/або збільшення розміру насіння. Цю технологію можна застосовувати до сільськогосподарської культури, такої як соя, шляхом ідентифікації регуляторної послідовності гена ознаки, що специфічно функціонує у квітках, які розвиваються, розробки касети експресії на основі одного або декількох кандидатних генів та зв'язування касети експресії з трегалоза-6-фосфатфосфатазою дикого типу або модифікованою. Сімейство генів MADS є чудовим джерелом регуляторної послідовності гена ознаки, що функціонує у квітках, які розвиваються (Jack T (2001) *Plant Mol Biol* 46:515-520). Сімейство генів MADS є висококонсервативним у рослинах (Munster et al., (2002) *Maydica* 47:287-301; De Bolt et al., (2003) *Trends Plant Science* 8:475-483). Первинну генетичну інформацію від модельних рослин можна застосовувати для ідентифікації ортологічних генів сої (Hecht et al. (2005) *Plant Physiol* 137:1420-1434). Комбінування інформації про білкову послідовність і послідовність ДНК із генетичними даними або даними експресії дозволяє фахівцям у даній галузі розробляти касети експресії, що строго регулюються, які функціонують у квітках сої, наприклад, з промоторами GmSEP1 (Huang et al. (2009) *Gene* 438:40-48); APETALA

1-подібними промоторами (Chi et al., (2011) J Plant Physiol 168:2251-2259); промотором OsMADS (патент США 8129588). Наприклад, касету експресії OsMADS6 або її варіант можна застосовувати безпосередньо в трансгенній сої для забезпечення можливості прояву ознаки.

[0372] Після розробки придатного вектора експресії можна одержати трансгенну рослину сої, що містить касету експресії, за допомогою добре відомих методик, таких як спосіб трансформації, опосередкований бомбардуванням часток (Hadi et al. (1996) Plant Cell Reports 15:500-505), або опосередкована Agrobacterium трансформація із застосуванням зрілих або незрілих цільових насінин (заявка на патент США 20040034889; WO08112044). Наприклад, касети експресії, що містять OsT6PP і варіантну кодуючу послідовність під контролем промотора AGAMOUS Arabidopsis, зв'язують із касетою селективного маркерного гена EPSPS з утворенням бінарного вектора для опосередкованої Agrobacterium трансформації. Регенеровані саджанці тестували на присутність як маркерного гена EPSPS, так і трансгенних послідовностей T6PP шляхом кількісного аналізу TaqMan PCR (Ingham et al., (2001) Biotechniques 31(1) 132-4, 136-140). Трансгенні рослини вирощували у теплиці для зав'язування насіння.

[0373] Потім трансгенні рослини сої можна піддавати скринінгу щодо відповіді на дефіцит води із застосуванням наступного аналізу: насіння T1, відібране як таке, що містить одну копію трансгена, вирощують до початку розвитку репродуктивних органів. У цей момент рослини розділяють на дві групи, першу групу не піддають стресу, а друга група одержує половину тієї кількості води, яка необхідна для підтримки росту у разі відсутності стресу. Кожна група складається з нульових, гемізиготних і гомозиготних сиблінгів. Рослини утримують за цих умов протягом трьох-чотирьох тижнів. Під час цього періоду щодня відстежують розвиток квіток і зав'язування бобів. Наприкінці періоду дослідження дані, отримані для кожного генотипу, порівнюють. Імовірно, між генотипами в групі, що не зазнала стресу, будуть незначні відмінності або відмінності будуть відсутні. Група з дефіцитом води буде демонструвати, що позитивні стосовно прояву ознаки рослини мають більше квіток і більше бобів на рослину в порівнянні з нульовими рослинами. Альтернативно, гомозиготні позитивні стосовно прояву ознаки й нульові сиблінги можна вирощувати на тестових дослідних ділянках із застосуванням стандартних процедур культивування. Дослідні ділянки розділяють на блоки, що не зазнають стресу, і блоки з дефіцитом води. Блоки з дефіцитом води будуть одержувати половину кількості води, необхідної під час періоду цвітіння. Дані щодо врожайності для кожної дослідної ділянки збирають наприкінці сезону вегетації та порівнюють. Дослідні ділянки, позитивні стосовно прояву ознаки, будуть проявляти поліпшену врожайність у порівнянні з дослідними ділянками з нульовими рослинами в групі з дефіцитом води.

Приклад 13: Визначення профілю експресії трансгенних рослин з OsT6PP з високою врожайністю

Досліджені типи тканин та зразки

[0374] Збирали сім типів тканин, а саме; листок, листок нижче качана, вузол, основне стебло, основний качан, вторинний качан і стебло. Досліджували три педігрі-лінії: контроль, що містить нетрансформований різновид, OsT6PP-I129f (SEQ ID NO: 5) і OsT6PP-H244D (SEQ ID NO: 3). Три педігрі-лінії або вирощували в умовах гарного поливу, або піддавали стресу, викликаного посухою. Для кожної тканини/стану відбирали по десять біологічних повторностей, що дало загалом 420 зразків. Однак, через різні технічні причини відбирали не всі зразки. В цілому були доступні 407 зразків для очищення й мічення РНК для гібридизації на мікроматрицях.

[0375] Для очищення, оцінки якості, мічення та гібридизації РНК застосовували стандартні протоколи. Не всі зразки характеризувалися достатньою якістю або кількістю РНК для гібридизації на мікрочіпах. Усього обробили й сканували 392 матриці.

[0376] Стандартизація й попередня обробка даних:

[0377] Для цього дослідження застосовували Maize Affymetrix GeneChip, sySYNG007a. Необроблені файли формату CEL для всіх експериментів аналізували із застосуванням спеціального протоколу, який аналізує якість мікроматриць на основі ряду критеріїв, експлуатаційних властивостей і виправлень на фон і стискає дані за допомогою алгоритму Bioconductor RMA. Внаслідок цього аналізу 6 предметних стеклов виявилися потенційно низької якості. Однак загальні зображення чіпів були достатніми для аналізу, а контрольні співвідношення зондів 5'/3' були придатними, щоб дані цих експериментів не виключили. Для цього дослідження застосовували спеціальний CDF (Chip Description File), розроблений для картування зондів щодо генома маїсу. CDF також робить картування відносно Unigenes від NCBI і кДНК повної довжини від MaizeGDB. Для визначення фонового рівня шуму аналізували ряд наборів контрольних зондів. Імпульси контролів з генів Bacillus не використовували під час гібридизації, тому ці набори зондів можна розглядати в якості фонового шуму. Фон визначали як

два стандартні відхилення вище середнього значення всіх наборів зондів *Bacillus*. Визначений рівень фонового шуму використовували як граничне значення для даних. Граничні значення встановлювали для виключення будь-яких наборів зондів, які характеризувалися нижчою інтенсивністю сигналів, ніж фон в усіх експериментах. Набори зондів залишали для аналізу, якщо сигнал перевищував фоновий щонайменше в 3 експериментах. Для оцінки якості експериментів і визначення будь-яких можливих відхилень застосовували аналіз головних компонентів та ієрархічну кластеризацію.

[0378] Аналіз шляхів

[0379] У спробі забезпечити біологічний зміст результатам одновимірних статистичних тестів, проводили аналізи насичення із застосуванням подібних тестів. Існує багато способів проведення аналізу шляхів, однак для цих експериментів найбільш придатним способом був Аналіз Насичення Генів (Gene Set Enrichment Analysis) (GSEA) із застосуванням програмного забезпечення, доступного від Broad Institute, що має назву GSEA. Алгоритм GSEA вимагає, щоб гени були кластеризовані в набори генів згідно з деякими біологічними критеріями. Для цього випробування використовували два такі набори генів. Спершу набори генних моделей з генома маїсу розподілили на набори генів згідно групуванню на шляхи, як пропонує MaizeCys (на наступному сайті: pathway.gmaene.org/MAIZE). Другий перелік наборів генів розробили за рахунок наборів зондів на виготовленому за замовленням GeneChip маїсу із застосуванням спеціального файлу CDF, який застосовували для стискання інформації про зонди для цього дослідження. Набори зондів, які представляли собою транскрипти від генних моделей з генома маїсу, групували в набори генів згідно з елементами Gene Ontology, які встановлювали для генних моделей від Maize GDB (на наступному сайті: maizegdb.org/). Алгоритм GSEA впорядковує гени з 2 різних зразків для створення ранжованого переліку генів, і ця інформація застосовується для визначення того, чи знаходяться гени в межах ранжованих переліків у загальнодоступних наборах генів. Р-значення розраховують на основі ймовірності того, що гени можуть бути знайдені в ранжованих переліках наборів генів внаслідок випадковості. Потім Р-значення коректують шляхом множинного тестування з метою одержання рівней хибнопозитивних результатів для всіх наборів генів. Для цього аналізу всі парні порівняння піддавали GSEA із застосуванням шляхів від MaizeCys і елементів Gene Ontology (GO) від MaizeGDB. Крім того, аналізували лише набори зондів, що представляли собою окремі гени. Тобто, набори зондів, які, ймовірно, картує декілька генів, відбракували для GSEA.

[0380] Багатовимірна статистика

[0381] Ряд багатовимірних аналізів проводили для визначення найбільших джерел дисперсії даних. Аналіз основних компонент (PCA) усіх даних показав, що найбільшим джерелом дисперсії був тип тканини. Листок і тканина листка під качаном (тканини-джерела) явно відокремлені від інших акцептуючих тканин.

[0382] Для додаткового визначення джерел дисперсії окремі типи тканин аналізували за допомогою PCA. Результати вказували на те, що посуха мала сильний вплив на зміну генної експресії у всіх досліджуваних тканинах, можливо, за винятком тканин вторинного качана. Слід зазначити, що для тканин вторинного качана була доступною менша кількість зразків. Внаслідок нерівномірного відбору зразків цього типу тканини генна експресія могла бути виміряною не точно. Систематична дисперсія, зумовлена не педігрі-лінією або стресом, а, наприклад, відбором зразків або розташуванням дослідної ділянки, могла мати значний вплив на генну експресію в тканині вторинного качана. Хоча педігрі-лінія не була основним джерелом дисперсії в межах окремих типів тканини, вона мала явний вплив і була очевидною в другій головній компоненті в більшості тканин. Цікаво, що більшу дисперсію, зумовлену педігрі-лінією, виявили в зразках, які піддавали стресу, викликаному посухою. Хоча не завжди була присутня явна компонента, пояснювана лише педігрі-лінією, з PCA було очевидно, що більша дисперсія між педігрі-лініями була у разі стресу, викликаного посухою, у порівнянні з умовами хорошого поливу. Наприклад, з PCA зрозуміло, що перша PC розділяла зразки, які вирощували в умовах гарного поливу, від таких, що піддавалися стресу, викликаному посухою. Друга головна компонента, що пояснює найбільше джерело дисперсії після видалення PC 1, показує поділ підданих дії посухи зразків за педігрі-лінією. Вона не є такою явною як поділ зразків на такі, що зазнали стресу, викликаного посухою, у порівнянні з рослинами, які добре поливали. Однак набагато більш щільне групування (тобто, з меншою дисперсією) спостерігається у досліджених контрольній та OsT6PP-H244D педігрі-ліній від добре политих зразків у порівнянні зі зразками, що зазнали дії посухи. Тенденцію компоненти 2 можна головним чином пояснити поділом зразків від контрольних і OsT6PP-H244D педігрі-ліній за умов стресу, викликаного посухою. Це можна інтерпретувати як те, що контрольні та OsT6PP-H244D педігрі-лінії мають подібні патерни генної експресії за умов хорошого поливу, але відмінні профілі генної експресії за умов

стресу, викликаного посухою. Це узгоджується із забезпеченням користі щодо врожайності за умов стресу, викликаного посухою. Подібне збільшення дисперсії за умов стресу, викликаного посухою, виявляли в інших протестованих тканинах і більшу частину дисперсії можна пояснити педігрі-лінією.

5 [0383] Загалом, за допомогою багатовимірних аналізів ідентифікували основні джерела дисперсії, такі як тип тканини та стрес, викликаний посухою, з меншим впливом на відмінності в генній експресії, зумовлені педігрі-лінією (тобто, наявністю трансгена). Вплив педігрі-лінії тестували шляхом порівняння OsT6PP-H244D з контрольною гібридною лінією. У більшості протестованих тканин, як акцептуючих, так і тканин-джерел, дисперсія, яку можна було

10 пояснити педігрі-лінією в зразках, зібраних від рослин, що зазнавали стресу, викликаного посухою, була більшою ніж в зразках добре политих рослин. Таким чином, відмінності в генній експресії між основним об'єктом і контрольною лінією були найбільш очевидними в рослинах, що зазнавали стресу, викликаного посухою.

[0384] Експресія генів T6PP і TPS

15 [0385] Оскільки охарактеризований об'єкт включав ген T6PP, який експресувався за допомогою промотора OsMADS6, цікаво було визначити рівень експресії трансгена та/або експресії ендегенних генів T6PP. Також на експресію T6PP може впливати експресія трегалоза-6-фосфатсинтази. Обидва білки, як відомо, кодуються у маїсі декількома членами сімейства генів. Робилися спроби проаналізувати лише набори зондів, які картують або окремі ізоформи транскриптів, або множинні ізоформи в межах одного локуса, для визначення експресії окремих членів сімейства генів. Усього вісім наборів зондів, які представляли T6PP, і чотирнадцять наборів зондів, які представляли TPS, аналізували щодо рівня експресії в усіх тканинах, як тих, що зазнавали стресу, так і тих, що не зазнавали стресу, тих, що походили від контролю, та тих, що походили від OsT6PP-H244D. Виявили, що в будь-яких тканинах ні набори зондів для T6PP,

20 ні набори зондів для TPS не мали особливо сильної експресії у об'єкті OsT6PP-H244D, що дозволяє припускати, що трансген у об'єкті не має сильного впливу на гени трегалозного шляху, і що не спостерігається помітно вищий рівень експресії будь-якого ендегенного гена T6PP. Незрозумілим є те, чи в достатній мірі для виявлення надійного сигналу будь-який з наборів зондів гібридується з трансгенною T6PP в об'єкті. Можна очікувати більш високого рівня експресії T6PP у лінії трансгенного об'єкта. Ці результати підтверджували за допомогою прямих TTEST у кожній тканині, яку тестували відносно диференціальної експресії генів T6PP і TPS між контролем і OsT6PP-H244D. У жодному з тестів не було будь-якої ізоформи, що характеризувалася більш ніж 2-кратною різницею в експресії між 2 педігрі-лініями в будь-якій тканині з будь-яким ступенем статистичної достовірності (P-значення < 0,1). Однак існував

25 явний доказ того, що ізоформи обох генів у деяких тканинах реагували на стрес, викликаний посухою. Цікаво, що експресія однієї ізоформи T6PP, GRMZM2G347280_T01, репресувалася у відповідь на стрес, викликаний посухою, у тканині листків (джерело), однак, експресія збільшувалася у відповідь на стрес, викликаний посухою, у тканині основного качана й тканинах основного стебла. Також, існувала виражена тканинна специфічність у наборах зондів для представників T6PP. Наприклад, ген GRMZM2G080354, що кодує T6PP, найбільш сильно експресувався в тканині вторинного качана; GRMZM2G112830 ледве виявлявся у всіх тканинах за винятком стебла, при цьому один альтернативний транскрипт, GRMZM2G112830_T07, імовірно, також експресувався у вузлі; GRMZM2G174396_T01 найбільш сильно експресувався в тканині вузла, а GRMZM2G178546_T01 найбільш сильно експресувався в основному качані.

30 Існували подібні тканинспецифічні й чутливі до посухи члени сімейства TPS, які були представлені наборами зондів. Слід відмітити, що ген GRMZM2G019183, який характеризувався низьким рівнем експресії в усіх тканинах, включався у відповідь на стрес, викликаний посухою, у тканинах вузла, основного качана й основного стебла. Відносно високі рівні експресії декількох генів TPS виявили в тканині вторинного качана. Цікаво, що значної відмінності в експресії цих генів у відповідь на стрес, викликаний посухою, у вторинному качані не було, навіть для генів, які були чутливими до посухи в інших тканинах. Оскільки для конструкта, який застосовували для цього об'єкта, застосовували ген T6PP з рису, імовірно, що жоден з наборів зондів не відповідав послідовності достатньою мірою, щоб гібридуватися з наборами зондів маїсу на матриці. Таким чином імовірно, що представлені результати відображають рівень експресії

35 лише ендегенних генів.

[0386] Одновимірний аналіз і попарні порівняння

40 [0387] Ряд попарних порівнянь проводили за допомогою Т-тесту Велча для визначення гена, що диференційно експресувався у 2 зразках (контроль і OsT6PP-H244D). Виконувані порівняння були зосереджені на вихідному проекті експерименту для тестування відмінностей в експресії в усіх тканинах між контрольною та OsT6PP-H244D лініями за умов хорошого поливу або посухи

60

(7 тестів для кожного стану), і також тестували відмінності в генній експресії в рослинах, які вирощували в умовах хорошого поливу або посухи, в будь-якій педігрі-лінії у всіх тканинах (14 порівнянь). Результати тестів наведені в таблицях нижче. Для наборів зондів, про які повідомлялося, що вони диференційно експресувалися, у Т-тесті Велча Р-значення було меншим за 0,01, а кратність зміни (співвідношення середніх значень біологічних повторностей) була більше 2. Додатково, для визначення того, чи були наявні будь-які гени, що мали суттєво відмінну відповідь на посуху, як результат впливу педігрі-лінії, запускали лінійну модель для тестування ефектів взаємодії. Результати в таблиці 4 вказують на число наборів зондів, які мали достовірний ефект взаємодії "вода X педігрі-лінія" з FDR меншим за 0,05. Загалом, результати повністю підтверджують результат багатовимірних аналізів для всіх тканин, за винятком вторинного качана, що показує великий вплив посухи на експресію генів. Цікаво, що у порівнянні з контрольною лінією у об'єкта OsT6PP-H244D в усіх тканинах спостерігали більшу кількість генів, чутливих до посухи (таблиця 1). Ці результати можуть вказувати на те, що об'єкт OsT6PP-H244D є більш чутливим до стресу, викликаного посухою, на рівні змін генної експресії.

Таблиця 1

Узагальнення результатів тесту Велча: хороший полив у порівнянні з посухою

Тканина	Умова	Генотип	Тест	# диференційно експресованих наборів зондів
Листок	Хороший полив або посуха	КОНТРОЛЬ	Вода в порівнянні з посухою	1515
Листок	Хороший полив або посуха	OsT6PP-I129F	Вода в порівнянні з посухою	1286
Листок	Хороший полив або посуха	OsT6PP-H244D	Вода в порівнянні з посухою	2224
Листок нижче качана	Хороший полив або посуха	КОНТРОЛЬ	Вода в порівнянні з посухою	1487
Листок нижче качана	Хороший полив або посуха	OsT6PP-I129F	Вода в порівнянні з посухою	1472
Листок нижче качана	Хороший полив або посуха	OsT6PP-H244D	Вода в порівнянні з посухою	2344
Вузол	Хороший полив або посуха	КОНТРОЛЬ	Вода в порівнянні з посухою	1296
Вузол	Хороший полив або посуха	OsT6PP-I129F	Вода в порівнянні з посухою	2423
Вузол	Хороший полив або посуха	OsT6PP-H244D	Вода в порівнянні з посухою	2257
Основний качан	Хороший полив або посуха	КОНТРОЛЬ	Вода в порівнянні з посухою	1310
Основний качан	Хороший полив або посуха	OsT6PP-I129F	Вода в порівнянні з посухою	1557
Основний качан	Хороший полив або посуха	OsT6PP-H244D	Вода в порівнянні з посухою	1769
Основне стебло	Хороший полив або посуха	КОНТРОЛЬ	Вода в порівнянні з посухою	1688
Основне стебло	Хороший полив або посуха	OsT6PP-I129F	Вода в порівнянні з посухою	3143
Основне стебло	Хороший полив або посуха	OsT6PP-H244D	Вода в порівнянні з посухою	4098
Вторинний качан	Хороший полив або посуха	КОНТРОЛЬ	Вода в порівнянні з посухою	128
Вторинний качан	Хороший полив або посуха	OsT6PP-I129F	Вода в порівнянні з посухою	4076
Вторинний качан	Хороший полив або посуха	OsT6PP-H244D	Вода в порівнянні з посухою	290

Продовження таблиці 1

Тканина	Умова	Генотип	Тест	# диференційно експресованих наборів зондів
Стебло	Хороший полив або посуха	КОНТРОЛЬ	Вода в порівнянні з посухою	708
Стебло	Хороший полив або посуха	OsT6PP-I129F	Вода в порівнянні з посухою	1294
Стебло	Хороший полив або посуха	OsT6PP-H244D	Вода в порівнянні з посухою	2047

Диференційно експресовані набори зондів = набори зондів з Р-значенням з тесту Велча < 0,01 і зміною кратності (співвідношення середніх значень зразків з 2 протестованих груп) > 2.

5

Таблиця 2

Узагальнення результатів тесту Велча: хороший полив: КОНТРОЛЬ у порівнянні з DTOsT6PP-H244D

Тканина	Умова	Генотип	Тест	# диференційно експресованих наборів зондів
Листок	Хороший полив	Контроль порівнянні з об'єктом	у КОНТРОЛЬ порівнянні з OsT6PP-I129F	33
Листок	Хороший полив	Контроль порівнянні з об'єктом	у КОНТРОЛЬ порівнянні з OsT6PP-H244D	23
Листок нижче качана	Хороший полив	Контроль порівнянні з об'єктом	у КОНТРОЛЬ порівнянні з OsT6PP-I129F	23
Листок нижче качана	Хороший полив	Контроль порівнянні з об'єктом	у КОНТРОЛЬ порівнянні з OsT6PP-H244D	15
Основний качан	Хороший полив	Контроль порівнянні з об'єктом	у КОНТРОЛЬ порівнянні з OsT6PP-I129F	89
Основний качан	Хороший полив	Контроль порівнянні з об'єктом	у КОНТРОЛЬ порівнянні з OsT6PP-H244D	98
Вузол	Хороший полив	Контроль порівнянні з об'єктом	у КОНТРОЛЬ порівнянні з OsT6PP-I129F	146
Вузол	Хороший полив	Контроль порівнянні з об'єктом	у КОНТРОЛЬ порівнянні з OsT6PP-H244D	19
Основне стебло	Хороший полив	Контроль порівнянні з об'єктом	у КОНТРОЛЬ порівнянні з OsT6PP-I129F	90
Основне стебло	Хороший полив	Контроль порівнянні з об'єктом	у КОНТРОЛЬ порівнянні з OsT6PP-H244D	111
Вторинний качан	Хороший полив	Контроль порівнянні з об'єктом	у КОНТРОЛЬ порівнянні з OsT6PP-I129F	4542
Вторинний качан	Хороший полив	Контроль порівнянні з об'єктом	у КОНТРОЛЬ порівнянні з OsT6PP-H244D	342

Продовження таблиці 2

Тканина	Умова	Генотип	Тест	# диференційно експресованих наборів зондів
Стебло	Хороший полив	Контроль порівнянні об'єктом	у порівнянні OsT6PP-I129F	у 3
Стебло	Хороший полив	Контроль порівнянні об'єктом	у порівнянні OsT6PP-H244D	у 3

Таблиця 3

Узагальнення результатів тесту Велча: Посуха: КОНТРОЛЬ у порівнянні з DTOsT6PP-H244D

	Умова	Генотип	Тест	# диференційно експресованих наборів зондів
Листок	Посуха	Контроль порівнянні об'єктом	у порівнянні OsT6PP-I129F	у 3
Листок	Посуха	Контроль порівнянні об'єктом	у порівнянні OsT6PP-H244D	у 3
Листок нижче качана	Посуха	Контроль порівнянні об'єктом	у порівнянні OsT6PP-I129F	у 3
Листок нижче качана	Посуха	Контроль порівнянні об'єктом	у порівнянні OsT6PP-H244D	у 3
Основний качан	Посуха	Контроль порівнянні об'єктом	у порівнянні OsT6PP-I129F	у 3
Основний качан	Посуха	Контроль порівнянні об'єктом	у порівнянні OsT6PP-H244D	у 3
Вузол	Посуха	Контроль порівнянні об'єктом	у порівнянні OsT6PP-I129F	у 3
Вузол	Посуха	Контроль порівнянні об'єктом	у порівнянні OsT6PP-H244D	у 3
Основне стебло	Посуха	Контроль порівнянні об'єктом	у порівнянні OsT6PP-I129F	у 3
Основне стебло	Посуха	Контроль порівнянні об'єктом	у порівнянні OsT6PP-H244D	у 3
Вторинний качан	Посуха	Контроль порівнянні об'єктом	у порівнянні OsT6PP-I129F	у 3
Вторинний качан	Посуха	Контроль порівнянні об'єктом	у порівнянні OsT6PP-H244D	у 3
Стебло	Посуха	Контроль порівнянні об'єктом	у порівнянні OsT6PP-I129F	у 3

Продовження таблиці 3

	Умова	Генотип	Тест	# диференційно експресованих наборів зондів
Стебло	Посуха	Контроль у порівнянні з об'єктом	КОНТРОЛЬ у порівнянні з OsT6PP-H244D	298

Таблиця 4

Узагальнення генів з ефектом взаємодії посухи й педігрі-лінії

Тканина	Тест Y ~ генотип:вода	# диференційно експресованих наборів зондів (FDR > 0,05)
Листок	КОНТРОЛЬ у порівнянні з OsT6PP-H244D	21
Листок нижче качана	КОНТРОЛЬ у порівнянні з OsT6PP-H244D	130
Основний качан	КОНТРОЛЬ у порівнянні з OsT6PP-H244D	1
Вузол	КОНТРОЛЬ у порівнянні з OsT6PP-H244D	152
Основне стебло	КОНТРОЛЬ у порівнянні з OsT6PP-H244D	376
Вторинний качан	КОНТРОЛЬ у порівнянні з OsT6PP-H244D	0
Стебло	КОНТРОЛЬ у порівнянні з OsT6PP-H244D	5844

[0388] Хоча багато генів, що є чутливими до посухи, були загальними для обох педігрі-ліній, існувало багато генів, які виявляли лише в якості диференційно експресованих під впливом стресу, викликаного посухою, в OsT6PP-H244D. Виявили, що багато генів є специфічними для OsT6PP-H244D у відповідь на стрес, викликаний посухою. Результати подібні результатам лінійної моделі для виявлення генів, які мали ефект взаємодії між двома експериментальними факторами, посухою і педігрі-лінією. Причиною відмінності в числах генів у 2 аналізах є, ймовірно, те, що відсікання, яке застосовувалося в TTEST, мало Р-значення менше за 0,01, а статистичне відсікання для даних у таблиці 4 встановлювало рівень хибнопозитивних результатів менший за 0,05. Рівень хибнопозитивних результатів, розрахований із урахуванням виправлення для множинних порівнянь, є більш точним і більш надійним способом визначення генів, які диференційно експресуються. Лінійна модель є кращим тестом ефектів взаємодії, ніж перекриті результати генів, виявлених як диференційно експресованих на основі Т-тестів, оскільки модель поєднує всі дані у факторній схемі експерименту. Однак об'єднання результатів обох тестів може являти собою дієвий спосіб ідентифікації генів з диференційними відповідями на 2 фактори, як буде описано більш докладно.

[0389] Основні відмінності між педігрі-лініями виявляли під час стресу, викликаного посухою, а також в акцептуючій тканині, включаючи тканину вузла. Лінійні моделі показували значні ефекти взаємодії у вузлі, основному стеблі, а також пагоні. Об'єднані результати дозволили припустити, що більшість ефектів взаємодії відбувалися внаслідок відмінностей у тому, які гени змінювалися при стресі, викликаному посухою, у двох протестованих педігрі-лініях. В умовах хорошого поливу було менше відмінностей у генній експресії між контролем і OsT6PP-H244D.

[0390] Аналіз шляхів

[0391] У спробі забезпечити біологічний зміст результатам одновимірних статистичних тестів, проводили аналізи насичення із застосуванням аналогічних парних тестів. GSEA проводили з даними для тестування стосовно насичення шляхів від MaizeCys та елементів GO від MaizeGDB. Оскільки відзначалося, що тканина вузла становить особливий інтерес, результати GSEA легше інтерпретувати на основі цієї тканини. Слід зазначити, що аналізи шляхів, яким приділяється увага в даному документі, зосереджені на парних порівняннях із застосуванням усіх даних у моделі GSEA для збільшення потужності тесту на насичення в

порівнянні із застосуванням заздалегідь обчислених переліків генів. Проведені парні порівняння були зосереджені на відмінностях контролю й OsT6PP-H244D, попередні тести Велча яких вказували на відносно небагато відмінностей у генній експресії. Таким чином, рівні хибнопозитивних результатів (FDR), розраховані для більшості порівнянь, були у цілому високими, хоча деякі розраховані Р-значення показали статистично достовірні результати. Слід зазначити, що хоча Р-значення є достовірними, у зазначеному наборі генів q-значення FDR можуть являти собою кращий показник статистичної імовірності шляхів або елементів GO, що є насиченими. Таблиці 5 і 6 указують на набори генів, насичені в OsT6PP-H244D, у порівнянні з контролем у тканині вузла при стресі, викликаному посухою.

Таблиця 5

Аналіз насичення наборів генів: Тканина вузла за умови посухи: КОНТРОЛЬ у порівнянні з OsT6PP-H244D

НАЗВА (шлях за MaizeCyc)	NOM p-val	FDR q-val
КОМПЛЕКС РОЗЩЕПЛЕННЯ_ГЛІЦИНУ	0,00	0,14
ОКИСНЕННЯ_СУЛЬФІТУ_III	0,01	0,10
ПЕНТОЗОФОСФАТНИЙ_ШЛЯХ_(ОКИСНЮВАЛЬНА_ГІЛКА)	0,00	0,12
ПЕРЕТВОРЕННЯ_ФОЛАТУ_I	0,00	0,13
ВІДНОВЛЕННЯ_СУЛЬФАТУ_II_(АСИМІЛЯЦІЙНЕ)	0,02	0,18
ПЕРЕТВОРЕННЯ_ФОЛАТУ_II_(РОСЛИНИ)	0,01	0,15
СВІТЛОВІ_РЕАКЦІЇ_ФОТОСИНТЕЗУ	0,01	0,16
ПОЛІГЛУТАМІЛУВАННЯ_ФОЛАТУ	0,01	0,16
АКТИВАЦІЯ_ЖИРНИХ_КИСЛОТ	0,01	0,15
ПЕРЕНЕСЕННЯ_ЕЛЕКТРОНІВ_ВІД_NADH_ДО_ЦИТОХРОМ_BD_ОКСИДАЗИ	0,01	0,24

Таблиця 6

Аналіз насичення наборів генів: Тканина вузла за умови посухи: КОНТРОЛЬ у порівнянні з OsT6PP-H244D

НАЗВА	NOM p-val	FDR q-val
УБІХІНОЛ-ЦИТОХРОМ-С РЕДУКТАЗНА АКТИВНІСТЬ	0,01	0,14
ПРОЦЕС БІОСИНТЕЗУ СПОЛУК, ЩО МІСТЯТЬ ФОЛІЄВУ КИСЛОТУ	0,00	0,18
ФОСФОГЛЮКОНАТДЕГІДРОГЕНАЗНА (ДЕКАРБОКСИЛЮЮЧА) АКТИВНІСТЬ	0,00	0,18
НЕГАТИВНА РЕГУЛЯЦІЯ ТРАНСКРИПЦІЇ, ДНК-ЗАЛЕЖНА	0,00	0,23
КОМПЛЕКС МЕДІАТОРА	0,01	0,26
АКТИВНІСТЬ ТРАНСКРИПЦІЙНОГО КОФАКТОРА РНК ПОЛІМЕРАЗИ II	0,01	0,22
АДАПТОРНИЙ КОМПЛЕКС КЛАТРИНУ	0,01	0,25
ПЕНТОЗОФОСФАТНИЙ ШУНТ	0,00	0,40
ГЛЮКОЗА-6-ФОСФАТДЕГІДРОГЕНАЗНА АКТИВНІСТЬ	0,00	0,35
ПЛАСТИДА	0,03	0,36

[0392] Тестували й інші тканини, однак у тканині вузла в умовах стресу виявили шлях, що представляє особливий інтерес, а саме пентозофосфатний шунтовий шлях. Він вартий уваги, тому що являє собою шлях, на якому виробляється енергія, та може змінюватися в рослинах OsT6PP-H244D лише в умовах стресу, викликаного посухою. Однак, не обмежуючись теорією, він може являти собою один з потенційних механізмів, які дозволяють об'єкту OsT6PP-H244D підтримувати вироблення енергії з одержанням більш високої врожайності в умовах посухи. Він явно вказує альтернативний шлях вироблення енергії, на який впливає стрес, викликаний посухою, лише у об'єкта та необов'язково у контрольної гібридної лінії. Ферменти в пентозофосфатному шляху кодуються багатьма генами, і було показано, що їхня транскрипція є чутливою до ряду різних впливів. Цей шлях, як відомо, залучений у продукування вторинних метаболітів. Іншим шляхом, ідентифікованим у різних акцептуючих тканинах як такого, що

диференційно регулюється в OsT6PP-H244D, була асиміляція нітратів або метаболізм азоту. Це було цікаво виявити у зв'язку з результатами попередніх досліджень, включаючи дослідження зміненого метаболізму ліній маїсу за умов стресу, викликаного посухою, які ідентифікували біосинтез амінокислот, зокрема амінокислот, що накопичують N, з більш високою концентрацією в рослинах, які піддавали дії посухи. Крім того, у останньому дослідженні виявили, що рослини, які зазнають постійного N-стресу, були менш чутливими до дефіциту води, ніж рослини, які вирощували за оптимальних N-умов. Однак, не обмежуючись теорією, рослини, які піддають стресу, викликаному посухою, можуть використовувати нормальні метаболічні шляхи для N, зокрема продукцію амінокислот, що запасають N, для асиміляції можливо токсичних концентрацій аміаку, який може накопичуватися в тканинах рослин, що зазнають стресу, викликаного посухою. Таким чином, ці дані дають підтвердження гіпотезі детоксикації аміаку й дозволяють припускати, що об'єкт OsT6PP-H244D, який експресує T6PP, можливо, може бути краще пристосованим до використання механізму адаптації до дефіциту води з метаболізмом N.

[0393] Ідентифікований транскрипт карбоангідрази з підвищеною експресією в OsT6PP-H244D.

[0394] Тестували дві гіпотези про те, як аналіз профілю генної експресії може виявляти відмінності між об'єктом OsT6PP-H244D і контролем. Перша гіпотеза полягає в тому, що особливий набір генів за умов стресу, викликаного посухою, специфічно змінюється в OsT6PP-H244D, та не змінюється в контролі. Такий набір генів за умов стресу, викликаного посухою, може відігравати більшу роль у збільшенні врожайності лінії OST6PP-H244D у порівнянні з контролем. Цю гіпотезу тестували за допомогою результатів парних порівнянь і лінійної моделі. Результати Т-тестів з таблиці 1 порівнювали з генами, ідентифікованими в лінійній моделі (таблиця 4). Тестували два зразки тканин, оскільки вони мали істотне число генів, які мали ефект взаємодії 2 факторів: стресу, викликаного посухою, і педігрі-лінії. У тканині вузла в OST6PP-H244D за умов стресу, викликаного посухою, загалом 1127 генів мали змінену експресію, але у контролі за умов стресу, викликаного посухою, вони суттєво не змінювалися. Перекривання цього переліку генів і 152 генів з ефектом взаємодії "посуха X педігрі-лінія" лінійної моделі тканин вузла (таблиця 4) визначило 22 набори зондів, на які специфічно впливає стрес, викликаний посухою, лише в об'єкті OsT6PP-H244D. Одним з ідентифікованих генів був ген карбоангідрази. Також включеними в перелік були декілька наборів зондів, анотованих як серинпептидази, а також ген аквапорину TIP4. Окремий аналіз такої самої лінійної моделі ідентифікував карбоангідразу як таку, що має більш високу експресію в OsT6PP-H244D, незалежно від типу тканини або забезпечення водою. Дійсно, карбоангідраза була представлена 2 наборами зондів у короткому списку наборів зондів з більш ніж 2-кратною або більшою експресією в OsT6PP-H244D в усіх типах тканин. Більшість інших генів в цьому переліку являли собою невідомі гени. Ці дані дозволяють припускати, що щонайменше один член сімейства генів карбоангідроз експресується на вищому рівні в OsT6PP-H244D, ніж в контролі. Експресію цієї ж карбоангідрази аналізували у додаткового об'єкта, OsT6PP-I129F, і виявили, що вона є специфічною для OsT6PP-H244D.

[0395] Результати аналізів для всіх тканин і умов виявили відносно короткий перелік наборів зондів (28), які значною мірою були присутні в лінії OsT6PP-H244D у порівнянні з контрольною лінією. Щонайменше два набори зондів у цьому переліку були анотовані як карбоангідрази. Карбоангідраза є активною у C4-фотосинтезі, допомагаючи рослині фіксувати діоксид вуглецю й асимілювати вуглець. У OsT6PP-H244D виявили дуже суттєве збільшення експресії щонайменше однієї ізоформи одного члена сімейства CA.

[0396] Хоча викладений вище винахід для ясності й розуміння був досить докладно описаний у вигляді ілюстрації й прикладу, для фахівців у даній галузі буде зрозуміло, що на практиці в межах об'єму доданої формули винаходу можна здійснювати конкретні зміни й модифікації.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Синджента Інк.
 Басу, Шиб
 Кон, Джонатан Рендал
 Нуччіо, Майкл Л.
 <120> СПОСОБИ ПІДВИЩЕННЯ УРОЖАЙНОСТІ ТА СТРЕСОСТІЙКОСТІ РОСЛИНИ
 <130> 73248_WO_PCT
 <160> 17
 <170> PatentIn версія 3.5
 <210> 1
 <211> 1116
 <212> ДНК
 <213> *Oryza sativa*
 <400> 1
 atggatttga gcaatagctc acctgtcatc accgatccgg tggcgatcag ccagcagttg 60
 ttgggggggc tgccctcaaa tctgatgcag ttttcagtca tgcccggtgg ctactccagc 120
 tctggcatga acgttgggtg cagtaggctc aaaatcgagg aagtccttgc caatggactg 180
 ctgatgccg tgaatcctc gtcacctcgc aggaggctga atgtagcatt tggcgaggac 240
 aattcatctg aagaagaaga cctgccttac agcgcttggg tggcaaatg tcttctgct 300
 ttggcttctt tcaagcaaat tgtagccagt gcacaaggga agaagattgc tgtgtttcta 360
 gactatgacg gcacactgtc gcttattgtg gatgatcctg acaagcagt gatgtctccc 420
 gtgatgagag ctgctgtgag aaatgttgcg aagtacttcc cactgcaat tgtcagcggg 480
 aggtcccgca ataagggtgt tgaatttcta aaactgaagg agctttatta tgetggaagt 540
 catgggatgg acataatggc accttcagca aatcatgagc acagtgttga aaagagcaaa 600
 caggccaatc tcttccaacc tgcacacgac tttctgcca tgcagatga ggttaccgag 660
 tccctcttgc aagttgtcag tgggaattgaa ggtgcaactg ttgagaacaa caaattctgc 720
 gtttctgtac attatcgcaa cgttcgagag aaggatttga aactggctgc acggtctgta 780
 aacgaagtgc tggaggcttt tctcgtctc aaagtaacca atggacgaat ggttttagag 840
 gttcgtccgg tgcagactg ggacaaggga aaggctgtgg agtttctgct ccagtcactc 900
 gggctaaatg acctgaaaa tgtgatcccc atctacattg gagacgacag aactgacgaa 960
 gacgttttca aggtacttgc acagcgaaat tgcggttatg gaatactagt ttcacaggtt 1020
 cccaaggaaa ctgaagcctt ctactcgctg agagatccat ctgaagtgat ggagttcttc 1080
 aatttcttgg tgagatggaa gaagcactca gtgtga 1116
 <210> 2
 <211> 371
 <212> БІЛІК
 <213> *Oryza sativa*
 <400> 2
 Met Asp Leu Ser Asn Ser Ser Pro Val Ile Thr Asp Pro Val Ala Ile

Страница 1

Страница

275 280 285

Lys Gly Lys Ala Val Glu Phe Leu Leu Gln Ser Leu Gly Leu Asn Asp
290 295 300

Ser Glu Asn Val Ile Pro Ile Tyr Ile Gly Asp Asp Arg Thr Asp Glu
305 310 315 320

Asp Ala Phe Lys Val Leu Arg Gln Arg Asn Cys Gly Tyr Gly Ile Leu
325 330 335

Val Ser Gln Val Pro Lys Glu Thr Glu Ala Phe Tyr Ser Leu Arg Asp
340 345 350

Pro Ser Glu Val Met Glu Phe Leu Asn Phe Leu Val Arg Trp Lys Lys
355 360 365

His Ser Val
370

<210> 3
<211> 1113
<212> ДНК
<213> Oryza sativa

<400> 3

atggatctga gcaacagcag cccggtgatt accgatccgg tggcgattag ccagcagctg	60
ctggggcgcc tgccgagcaa cctgatgcag tttagcgtga tgcggggcgg ctatagcagc	120
agcggcatga acgtgggcgt gagccgcctg aaaattgaag aagtgcctgt gaacggcctg	180
ctggatgcga tgaaaagcag cagcccgccg cgcgcctga acgtggcggt tggcgaagat	240
aacagcagcg aagaagaaga tccggcgtat agcgcgtgga tggcgaatg cccgagcgcg	300
ctggcgagct ttaaacagat tgtggcgagc gcgcaggcca aaaaaattgc ggtgtttctg	360
gattatgatg gcaccctgag cccgattgtg gatgatccgg ataaagcggg gatgagcccc	420
gtgatgcgcg cggcggtgcg caacgtggcg aaatattttc cgaccgcgat tgtgagcggc	480
cgcagcgcga acaaagtgtt tgaatttgtg aaactgaaag aactgtatta tgcgggcagc	540
catggcatgg atattatggc gccgagcgcg aaccatgaac atagcgcgga aaaaagcaaa	600
caggcgaacc tgtttcagcc ggcgcgatgat ttctgccga tgattgatga agtgaccaaa	660
agcctgtctc aggtggtgag cggcattgaa ggcgcgaccg tggaaaacaa caaattttgc	720
gtgagcgtgg attatcgcaa cgtggcggaa aaagattgga aactggtggc gcgcctggcg	780
aacgaagtgc tggaagcgtt tccgcgcctg aaagtgacca acggcgcgat ggtgctggaa	840
gtgcgcccgg tgattgattg ggataaaggc aaagcgggtg aatttctgct gcagagcctg	900
ggcctgaacg atagcgaaaa cgtgattccg atttatattg gcgatgatcg caccgatgaa	960
gatgcgttta aagtgcctgc ccagcgcacg tgcggctatg gcattctggt gagccaggcg	1020
ccgaagaata ccgaagcgtt ttatagcctg cgcgatccga gcgaagtgat ggaatttctg	1080

Страница 3

aaccttctctgg tgcgcctggaa aaaacatagc gtc

1113

<210> 4

<211> 371

<212> БЛОК

<213> Oryza sativa

<400> 4

Met Asp Leu Ser Asn Ser Ser Pro Val Ile Thr Asp Pro Val Ala Ile
1 5 10 15Ser Gln Gln Leu Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Met Gln Phe Ser
20 25 30Val Met Pro Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Gly Met Asn Val Gly Val Ser
35 40 45Arg Leu Lys Ile Glu Glu Val Leu Val Asn Gly Leu Leu Asp Ala Met
50 55 60Lys Ser Ser Ser Pro Arg Arg Arg Leu Asn Val Ala Phe Gly Glu Asp
65 70 75 80Asn Ser Ser Glu Glu Glu Asp Pro Ala Tyr Ser Ala Trp Met Ala Lys
85 90 95Cys Pro Ser Ala Leu Ala Ser Phe Lys Gln Ile Val Ala Ser Ala Gln
100 105 110Gly Lys Lys Ile Ala Val Phe Leu Asp Tyr Asp Gly Thr Leu Ser Pro
115 120 125Ile Val Asp Asp Pro Asp Lys Ala Val Met Ser Pro Val Met Arg Ala
130 135 140Ala Val Arg Asn Val Ala Lys Tyr Phe Pro Thr Ala Ile Val Ser Gly
145 150 155 160Arg Ser Arg Asn Lys Val Phe Glu Phe Val Lys Leu Lys Glu Leu Tyr
165 170 175Tyr Ala Gly Ser His Gly Met Asp Ile Met Ala Pro Ser Ala Asn His
180 185 190Glu His Ser Ala Glu Lys Ser Lys Gln Ala Asn Leu Phe Gln Pro Ala
195 200 205His Asp Phe Leu Pro Met Ile Asp Glu Val Thr Lys Ser Leu Leu Gln
210 215 220

Val Val Ser Gly Ile Glu Gly Ala Thr Val Glu Asn Asn Lys Phe Cys

Страница 4

<210> 5
<211> 1113
<212> DNA
<213> Oryza sativa

<400>	5	
atgggatetga	gcaacagcag	cccggtgatt accgatccgg tggcgattag ccagcagctg 60
ctggggcggcc	tgccgagcaa	cttgatgcag tttagcgtga tggcgggcgg ctatagcagc 120
agcggcatga	acgtgggcgt	gagcgccttg aaaattgaag aagtgcctgt gaacggcctg 180
ctggatgcga	tgaaaagcag	cagcccgctc cgccgcctga acgtggcgtt tggcgaagat 240
aacagcagcg	aagaagaaga	tccggcgat accgcgtgga tggcgaatat cccgagcgcg 300
ctggcgagct	ttaaacagat	tgtggcgagc ggcagggca aaaaaattgc ggtgtttctg 360
gattatgatg	gcaccctgag	cccgtttgtg gatgatccgg ataaagcgtt gatgagcccg 420
gtgatgcgcg	cggcgggtgc	caacgtggcg aaatatctt cgaccgcgat tgtgagcggc 480
cgcagccgca	acaaagtgtt	tgaatttgtg aaactgaaag aactgtatta tggcggcagc 540
catggcatgg	atattatggc	gccgagcgcg aaccatgaac atagcgcgga aaaaagcaaa 600
caggcgaacc	tgtttcagcc	ggcgcctgat ttctcgccga tgattgatga agtgaccaaa 660
agcttgcctg	aggtgggtgag	cgcgattgaa ggcgcgaccg tggaaaacaa caaattttgc 720

gtgagcgtgc attatcgcaa cgtggcggaa aaagattgga aactggtggc gcgccttggtg 780
aacgaagtgc tggaaagcgtt tccgcgcctg aaagtgacca acggccgcac ggtgctggaa 840
gtgcgcctcg tgattgattg ggataaaggr aaagcgggtg aatttctgct gcagagcctg 900
ggcctgaacg atagcgaaaa cgtgattccg atttatattg gcgatgacg caccgargaa 960
gatgcgttta aagtgttgcg ccagcgcaac tgcgcctatg gcattctggt gagccaggtg 1020
ccgaaagaaa ccgaagcgtt ttatagcctg cgcgatccga gcgaagtgat ggaatttctg 1080
aactttctgg tgcgctggaa aaaacatagc gtg 1113

<210> 6
<211> 371
<212> BLJOK
<213> Oryza sativa

<400> 6

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

Страница 6

180 185 190
 Glu His Ser Ala Glu Lys Ser Lys Gln Ala Asn Leu Phe Gln Pro Ala
 195 200 205
 His Asp Phe Leu Pro Met Ile Asp Glu Val Thr Lys Ser Leu Leu Gln
 210 215 220
 Val Val Ser Gly Ile Glu Gly Ala Thr Val Glu Asn Asn Lys Phe Cys
 225 230 235 240
 Val Ser Val His Tyr Arg Asn Val Ala Glu Lys Asp Trp Lys Leu Val
 245 250 255
 Ala Arg Leu Val Asn Glu Val Leu Glu Ala Phe Pro Arg Leu Lys Val
 260 265 270
 Thr Asn Gly Arg Met Val Leu Glu Val Arg Pro Val Ile Asp Trp Asp
 275 280 285
 Lys Gly Lys Ala Val Glu Phe Leu Leu Gln Ser Leu Gly Leu Asn Asp
 290 295 300
 Ser Glu Asn Val Ile Pro Ile Tyr Ile Gly Asp Asp Arg Thr Asp Glu
 305 310 315 320
 Asp Ala Phe Lys Val Leu Arg Gln Arg Asn Cys Gly Tyr Gly Ile Leu
 325 330 335
 Val Ser Gln Val Pro Lys Glu Thr Glu Ala Phe Tyr Ser Leu Arg Asp
 340 345 350
 Pro Ser Glu Val Met Glu Phe Leu Asn Phe Leu Val Arg Trp Lys Lys
 355 360 365
 His Ser Val
 370

<210> 7
 <211> 1113
 <212> ДНК
 <213> Oryza sativa

<400> 7
 atggatctga gcaacagcag cccggtgatt accgatccgg tggcgattag ccagcagctg 60
 ctgggcggcc tgcgagcaaa cctgatgcag tttagcgtga tgcggggcgg ctatagcagc 120
 agcggcatga acgtgggcgt gagccgcctg aaaaattgaag aagtgcctgt gaacggcctg 180
 ctggatgcga tgaaaagcag cagcccgccg cgcgcctga acgtggcggt tggcgaagat 240
 aacagcagcg aagaagaaga tccggcgtat agcgcgtgga tggcgaaatg cccgagcgcg 300
 ctggcgagct ttaaacagat tgtggcgagc gcgcaggcca aaaaaattgc ggtgtttctg 360

Страница

7

gattatgatg gcaccctgag cccgtttgtg gatgatccgg ataaagcggg gatgagcccg 420
 gtgatgcgcg cggcggtgcg caacgtggcg aaatattttc cgaccgcgat tgtgagcggc 480
 cgcagccgca acaaagtgtt tgaatttgtg aaactgaaag aactgtatta tgcgggcagc 540
 catggcatgg atattatggc gccgagcgcg aacctatgaac atagcgcgga aaaaagcaaa 600
 caggcgaacc tgttcagcc ggcgcgatgat ttctgccga tgattgatga agtgacaaa 660
 agcctgctgc aggtggtgag cggcatigaa ggcgcgaccg tggaaaacaa caaatcttgc 720
 gtgagcgtgg attatcgcaa cgtggcggaa aaagattgga aactgggtggc gcgcctgggtg 780
 aacgaagtgc tggagcgtt tccgcgcctg aaagtgaaca acggccgcac ggtgctggaa 840
 gtgcgcccgg tgattgattg ggataaaggc aaagcgggtg aatttctgct gcagagcctg 900
 ggcttgaacg atagcgaaaa cgtgattccg atttatattg gcgatgatcg caccgatgaa 960
 gatgcgttta aagtgcctgc ccagcgaac tgcggctatg gcattctggt gagccaggtg 1020
 ccgaagaaa ccgaagcgtt ttatagcctg cgcgatccga gcgaagtgat ggaattctg 1080
 aactttctgg tgcgctggaa aaaacatagc gtg 1113

<210> 8
 <211> 371
 <212> GI/AGK
 <213> Oryza sativa

<400> 8

Met Asp Leu Ser Asn Ser Ser Pro Val Ile Thr Asp Pro Val Ala Ile
 1 5 10 15

Ser Gln Gln Leu Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Met Gln Phe Ser
 20 25 30

Val Met Pro Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Gly Met Asn Val Gly Val Ser
 35 40 45

Arg Leu Lys Ile Glu Glu Val Leu Val Asn Gly Leu Leu Asp Ala Met
 50 55 60

Lys Ser Ser Ser Pro Arg Arg Arg Leu Asn Val Ala Phe Gly Glu Asp
 65 70 75 80

Asn Ser Ser Glu Glu Glu Asp Pro Ala Tyr Ser Ala Trp Met Ala Lys
 85 90 95

Cys Pro Ser Ala Leu Ala Ser Phe Lys Gln Ile Val Ala Ser Ala Gln
 100 105 110

Gly Lys Lys Ile Ala Val Phe Leu Asp Tyr Asp Gly Thr Leu Ser Pro
 115 120 125

Phe Val Asp Asp Pro Asp Lys Ala Val Met Ser Pro Val Met Arg Ala

Страница 8

130 135 140
 Ala Val Arg Asn Val Ala Lys Tyr Phe Pro Thr Ala Ile Val Ser Gly
 145 150 155 160
 Arg Ser Arg Asn Lys Val Phe Glu Phe Val Lys Leu Lys Glu Leu Tyr
 165 170 175
 Tyr Ala Gly Ser His Gly Met Asp Ile Met Ala Pro Ser Ala Asn His
 180 185 190
 Glu His Ser Ala Glu Lys Ser Lys Gln Ala Asn Leu Phe Gln Pro Ala
 195 200 205
 His Asp Phe Leu Pro Met Ile Asp Glu Val Thr Lys Ser Leu Leu Gln
 210 215 220
 Val Val Ser Gly Ile Glu Gly Ala Thr Val Glu Asn Asn Lys Phe Cys
 225 230 235 240
 Val Ser Val Asp Tyr Arg Asn Val Ala Glu Lys Asp Trp Lys Leu Val
 245 250 255
 Ala Arg Leu Val Asn Glu Val Leu Glu Ala Phe Pro Arg Leu Lys Val
 260 265 270
 Thr Asn Gly Arg Met Val Leu Glu Val Arg Pro Val Ile Asp Trp Asp
 275 280 285
 Lys Gly Lys Ala Val Glu Phe Leu Leu Gln Ser Leu Gly Leu Asn Asp
 290 295 300
 Ser Glu Asn Val Ile Pro Ile Tyr Ile Gly Asp Asp Arg Thr Asp Glu
 305 310 315 320
 Asp Ala Phe Lys Val Leu Arg Gln Arg Asn Cys Gly Tyr Gly Ile Leu
 325 330 335
 Val Ser Gln Val Pro Lys Glu Thr Glu Ala Phe Tyr Ser Leu Arg Asp
 340 345 350
 Pro Ser Glu Val Met Glu Phe Leu Asn Phe Leu Val Arg Trp Lys Lys
 355 360 365
 His Ser Val
 370

<210> 9
 <211> 208
 <212> БЛОК
 <213> штучна послідовність

Страница 9

<220>
 <223> консенсусна послідовність

<220>
 <221> іншаB_ознака
 <222> (2)..(7)
 <223> хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
 <221> іншаB_ознака
 <222> (26)..(26)
 <223> хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
 <221> іншаB_ознака
 <222> (33)..(34)
 <223> хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
 <221> іншаB_ознака
 <222> (58)..(58)
 <223> хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
 <221> іншаB_ознака
 <222> (60)..(61)
 <223> хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
 <221> іншаB_ознака
 <222> (64)..(65)
 <223> хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
 <221> іншаB_ознака
 <222> (90)..(90)
 <223> хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
 <221> іншаB_ознака
 <222> (110)..(118)
 <223> хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
 <221> іншаB_ознака
 <222> (120)..(121)
 <223> хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
 <221> іншаB_ознака
 <222> (147)..(148)
 <223> хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
 <221> іншаB_ознака
 <222> (157)..(157)
 <223> хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
 <221> іншаB_ознака
 <222> (162)..(162)
 <223> хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
 <221> іншаB_ознака
 <222> (176)..(196)
 <223> хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

Страница 10

<220>
 <221> інша_ознака
 <222> (199)..(199)
 <223> Xaa може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
 <221> інша_ознака
 <222> (203)..(203)
 <223> Xaa може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
 <221> інша_ознака
 <222> (207)..(207)
 <223> Xaa може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<400> 9

Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Leu Phe Gln Pro Ala Ser Glu Phe
 1 5 10 15

Leu Pro Met Ile Asp Glu Val Tyr Lys Xaa Leu Val Glu Lys Thr Lys
 20 25 30

Xaa Xaa Ile Pro Gly Ala Lys Val Glu Asn Asn Lys Phe Cys Val Ser
 35 40 45

Val His Phe Arg Cys Val Asp Glu Lys Xaa Trp Xaa Xaa Leu Ala Xaa
 50 55 60

Xaa Val Arg Ser Val Leu Lys Glu Tyr Pro Lys Leu Arg Leu Thr Gln
 65 70 75 80

Gly Arg Lys Val Leu Glu Ile Arg Pro Xaa Ile Lys Trp Asp Lys Gly
 85 90 95

Lys Ala Leu Glu Phe Leu Leu Glu Ser Leu Gly Phe Ala Xaa Xaa Xaa
 100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Asp Val Leu Pro Ile Tyr Ile
 115 120 125

Gly Asp Asp Arg Thr Asp Glu Asp Ala Phe Lys Val Leu Arg Glu Arg
 130 135 140

Gly Gln Xaa Xaa Gly Phe Gly Ile Leu Val Ser Lys Xaa Pro Lys Glu
 145 150 155 160

Thr Xaa Ala Ser Tyr Ser Leu Gln Asp Pro Ser Glu Val Met Glu Xaa
 165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Leu Xaa Arg Leu Val Xaa Trp Lys Lys Xaa Ser
 195 200 205

Страница 11

<210> 10
 <211> 19
 <212> БІЛОК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> консенсусна послідовність

<220>
 <221> інша_ознака
 <222> (2)..(3)
 <223> хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
 <221> інша_ознака
 <222> (16)..(17)
 <223> хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<400> 10

Arg Xaa Xaa Ser Trp Val Asp Ser Met Arg Ala Ser Ser Pro Thr Xaa
 1 5 10 15

Xaa Lys Ser

<210> 11
 <211> 10
 <212> БІЛОК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> консенсусна послідовність

<220>
 <221> інша_ознака
 <222> (6)..(6)
 <223> хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<400> 11

Gly Asp Asp Arg Thr Xaa Gln Asp Ala Phe
 1 5 10

<210> 12
 <211> 12
 <212> БІЛОК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> консенсусна послідовність

<400> 12

Leu Asp Tyr Asp Gly Thr Leu Ser Pro Ile Val Asp
 1 5 10

<210> 13
 <211> 4447
 <212> ДНК

Страница 12

<213> Oryza sativa

<400> 13

```

cggaccgcta ggacgatggt gtgatgtggg aacacgaaga aaacatgagg aaaaaatatt      60
aaaatgaatt tcccactraa aatgcaccaa ataaaaaaa taaagaaacg accgggaata      120
gacacagggg ttgtgaacta gctagggcaa acatcatatg gtcccttgct gatgcacaag      180
tacattgaga tgtcatttca attctgtgca tcatatgcat gttgtccctt gctgaatatt      240
actcttgaaa tatctaccag tgccaatcra ttgcctgact taattaattc acagggtttg      300
ttgattacat tattagtaag cttagagagca caagctcaat ggatttttct ataaaagggg      360
atcatcttgc aattttcttt gtctgtcaaa gttagccttc ttattacta cttctgtttt      420
taaataatcg atcctattga cttttgttca tatatttaac catgtaicct atttagatag      480
tttggcgaaa tatatatacc ttcaatgata aaattagtta caatgaaaca aatgatattt      540
acgcaattct ttttactaaa caagtcacaa gaagtacctg cagcaatata tgttggaaac      600
gtgcagtaga tctagcctag ctacgcaaaa aaacaaaaag agaaaaaaag ggaaaggaaa      660
aacaattaac atgcctgagc agtatgcccg gcaactggaa tttgtcaaag atatggggag      720
aggagaataa tacaagtact actactacct agctctacca tgcctatgca cccaaaggca      780
aactggatta ttggataaag cacagatgct ggcaaaaaca tctttaagcc tcccttccct      840
gcttctttat ttttgggcag cctctaccgg acggtgcccgt ggtccattgg accagtaggt      900
ggcgacatac atgggtttggg ttaagtctag gagagcagtg tgtgtgcgcg cgcaagagag      960
agagactgtg agtctgggag tagccctctc ccctcctttg gccatcttcc tctgttatar      1020
gcctatatgc atcatcgca cgggtgtatat ttgtggtgtg ggggtgtgtg cattggattg      1080
ccccattttt ggctcgtgct tcccagttag ggtaaaacct gtggtaaact tgctagcccc      1140
acgccaaaag tacccttctt tattgttgaa agggagagga ggtgtgtgaa ttgtgatgga      1200
gggagagaga gagagagata gaaagagaga tgtgtgtcaa agcaagcaag aaaccagttt      1260
cacaagagac tactactagt actagtgtac tactgtggtt cagtgtccaa tgtcctttct      1320
ccggactcga ctccactaat attctcctct tctcgcgcgg ctctgtatat tctcgtcctc      1380
attggaggct ttagcaagca agaagagagg cagtgtgtgt ggtgtgtggg gaggagctag      1440
ctagcctgtg ctgtctgac ggtgtctgac tgaggaatcg ttctatcgat cgggcgagtc      1500
gatgagggga agagtgtgac tgaggcgcat cgagaacaag atcaacaggc aggtcacctt      1560
ctccaagcgc cgcaacggcc tcttcaagaa ggcttacgag ctgtccgttc tctgagacgc      1620
cgaggttgcg ctcatcatct tctccagccg cggcaagctc taccagttcg gcagcgcggg      1680
gtataattaa tacagacaca acaacacaca caaccaaca accagcatca atttgaacct      1740
gcagatctgc tgttttctct gatcaattgc tctttttt ttgttctttt ttgtttcttt      1800
tatctgcgcg aacggcgctc tgcctctcgg gggcttctcg ttttctttt catttatttt      1860
tagcaggtgc caagtgcgg agctactata cttaacctgc catgrraatt attttattcc      1920
gtctgtctgt gtgtgtctgt gcatactact atagggacat ggcgcgggtgt tcttataaac      1980

```

Страница

13

cgaggagccg gatccctaac tagcatggga ggaatcttt tcagcggatc tatacaaac	2040
ctactctcgc tgacctcttt ctccagctt ctccgggtct tecttggatt attattgccc	2100
atcttccggg ttgtgcgtgt gtcagagaca gctcgaaag taaatttctc aaaaccagta	2160
ctagagaggg ttgttttgtt gtgagaactg agtggagagt tagcatgaag gctgcaaaact	2220
agaaaggaag giatgttctt tcctttttga tccatcaggg gagccccctc tggattraag	2280
atcttccggg cacattgatt ttcatacttt gtgatgacct tggagaatc ggcgtagcag	2340
cgtagcaccg cccattttg gtcttacctt caccctccca tgcctatgaac tgatcaattt	2400
catgttctt catcaccttt ctccagctt tccacttctt tggatctca tgccatgttt	2460
ctcagcatga atcaaattta attcgtgttt tctacttcca tatatactgg aagaaattta	2520
attagatcta tttttgctcg ggaggtcttc atactttgag ttctgatgcc atcaccttar	2580
ttccccccccc ccttctctt gtctatctt ctctcttctc ttggcttgat cattttgatc	2640
tgtagttrtt agcatgatgc atttcaatt tgaactgtatg taagtccaac cggaaatatg	2700
ttgaatggat tttctatata tcaacacttg atgtcaggcc tgcactgttt tcgcttgagg	2760
tgggtggccc aaaattgtct atatttgatc ttgtctcttc tttctctcca tttcatgacg	2820
attcctaacta cggcttaaac cattctttat tctttactaa tcatggatgt tgcttgactc	2880
ctagtgttt cgtactagct caacttggag atcttttcat tatttgcta gtgggtgggt	2940
acgtttgtga cagatctaaa atgggtgcacg aaaagtttca cttattatga aaaaaggag	3000
cctaacaggg taatttctct atttattcgt gatgacattt ttctcttgat aagggggatt	3060
ttttataatc tgcactcaca tgtttatatg taaaatctag ctcttttgtt ttgtttttgg	3120
cataattccc gctaagtata gagtttatgt ggataacatt ataacttttc aagatccaat	3180
ccacatcttt gattgtgaaa atcatacaat agggaaaaatc aactgaaggg ttaattagat	3240
gctatatgca tatatatata tatgtgcgcg cgcgcgcgcc tgaatttaac tatgtatgta	3300
tccaactggt tcaattgaaa agatttgata tttttcagtc tattcttttt cgagtatata	3360
tttaatatgt ttcaatctgt tttagaccatt ataagataaa gccatatatt accaggcatt	3420
tgagatgac ttttcatgca tgaaaaagct gttgttatca cttcaactaa ccagacgac	3480
taacatgtat ttgtataaga aacagacctt gatttccctc tgaataatca tgcattgttt	3540
cgttttgaat tggagtcggc gcgcctgtgt tttagaccgc aggaaggtct ttttttccc	3600
tgaatagica agggctctata ctcttgaag caattgggac actaatcaat tattgtttat	3660
acctcggacc atcttttctt tcttcacacc actaatcagt ttatgccttg gaccattaat	3720
tgtgtgttc acaagcttct tgtttatggt ttacaaagca ttgcctaga ttgtgtgtg	3780
tctctacaca tcatcactt ttaaaactt gtgccttcca gttattcttt taacgtttgg	3840
ttatttatct tatttaaaaa aattatcgta ttattatcta ttttgtttgt gatttacttt	3900
attatcaaaa gttttcaaa tatgacttat ctttttttat aagtgcacta attttcaaa	3960
taagatgaat ggtcaaatgt tacaagaaaa agttaagca accactaat tagggcggag	4020

Страница 74

gtagtaaaac ctagttaattg taaccaataa ttttatcaat ctataaatgc aacacaaaagt 4080
 cacttcgtga tatctcacac aaagccactt caacgatgaa agctgactgc atgtttttatc 4140
 aaaacacatg tgatcagttt gttggatgaa aaaaattatc tatgtcataa atcaagagtt 4200
 ataataaag ctctctggctc tacaagtaac atttctatgt tttttttta cgttctttaca 4260
 tactatgttt tgccaaaaaa aacatgatca ttttgttggc cgaaaagaaa tagtaaatat 4320
 agagtgaact ttgatatcat tataatataa gcttctgcct ctataaataa catctatgca 4380
 ctttttacgt cgtagtaatt tgatatatga gaaatttaca tataacattt ttgtgcagca 4440
 taaccac 4447

<210> 14
 <211> 385
 <212> BLJNRK
 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 14

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

Страница 15

Leu Ser Glu Leu Tyr Tyr Ala Gly Ser His Gly Met Asp Ile Met Ser
 180 185 190
 Pro Ala Gly Glu Ser Leu Asn His Glu His Ser Arg Thr Val Ser Val
 195 200 205
 Tyr Glu Gln Gly Lys Asp Val Asn Leu Phe Gln Pro Ala Ser Glu Phe
 210 215 220
 Leu Pro Met Ile Asp Lys Val Leu Cys Ser Leu Ile Glu Ser Thr Lys
 225 230 235 240
 Asp Ile Lys Gly Val Lys Val Glu Asp Asn Lys Phe Cys Ile Ser Val
 245 250 255
 His Tyr Arg Asn Val Glu Glu Lys Asn Trp Thr Leu Val Ala Gln Cys
 260 265 270
 Val Asp Asp Val Ile Arg Thr Tyr Pro Lys Leu Arg Leu Thr His Gly
 275 280 285
 Arg Lys Val Leu Glu Ile Arg Pro Val Ile Asp Trp Asp Lys Gly Lys
 290 295 300
 Ala Val Thr Phe Leu Leu Glu Ser Leu Gly Leu Asn Asn Cys Glu Asp
 305 310 315 320
 Val Leu Pro Ile Tyr Val Gly Asp Asp Arg Thr Asp Glu Asp Ala Phe
 325 330 335
 Lys Val Leu Arg Asp Gly Pro Asn His Gly Tyr Gly Ile Leu Val Ser
 340 345 350
 Ala Val Pro Lys Asp Ser Asn Ala Phe Tyr Ser Leu Arg Asp Pro Ser
 355 360 365
 Glu Val Met Glu Phe Leu Lys Ser Leu Val Thr Trp Lys Arg Ser Met
 370 375 380
 Gly
 385

<210> 15
 <211> 374
 <212> 6100K
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 15

Met Thr Asn Gln Asn Val Ile Val Ser Asp Arg Lys Pro Ile Leu Gly
 1 5 10 15

Leu Lys Thr Ile Thr Val Ser Val Ser Asn Ser Pro Leu Phe Ser Asn
 20 25 30
 Ser Phe Pro Thr Tyr Phe Asn Phe Pro Arg Arg Lys Leu Leu Lys Leu
 35 40 45
 Leu Glu Ala Ala Asp Lys Asn Asn Leu Val Val Ala Pro Lys Ile Thr
 50 55 60
 Ser Met Ile Asp Ser Met Arg Asp Ser Ser Pro Thr Arg Leu Arg Ser
 65 70 75 80
 Ser Ser Tyr Asp Ser Asp Ser Asp Asn Asp Asp Lys Thr Ser Trp Ile
 85 90 95
 Val Arg Phe Pro Ser Ala Leu Asn Met Phe Asp Glu Ile Val Asn Ala
 100 105 110
 Ala Lys Gly Lys Gln Ile Val Met Phe Leu Asp Tyr Asp Gly Thr Leu
 115 120 125
 Ser Pro Ile Val Glu Asp Pro Asp Lys Ala Phe Ile Thr His Glu Met
 130 135 140
 Arg Glu Val Val Lys Asp Val Ala Ser Asn Phe Pro Thr Ala Ile Val
 145 150 155 160
 Thr Gly Arg Ser Ile Glu Lys Val Arg Ser Phe Val Gln Val Asn Glu
 165 170 175
 Ile Tyr Tyr Ala Gly Ser His Gly Met Asp Ile Glu Gly Pro Thr Asn
 180 185 190
 Glu Asn Ser Asn Gly Gln Ser Asn Glu Arg Val Leu Phe Gln Pro Ala
 195 200 205
 Arg Glu Phe Leu Pro Met Ile Glu Lys Val Val Asn Ile Leu Glu Glu
 210 215 220
 Lys Thr Lys Trp Ile Pro Gly Ala Met Val Glu Asn Asn Lys Phe Cys
 225 230 235 240
 Leu Ser Val His Phe Arg Arg Val Asp Glu Lys Arg Trp Pro Ala Leu
 245 250 255
 Ala Glu Val Val Lys Ser Val Leu Ile Asp Tyr Pro Lys Leu Lys Leu
 260 265 270
 Thr Gln Gly Arg Lys Val Leu Glu Ile Arg Pro Thr Ile Lys Trp Asp
 275 280 285

Lys Gly Gln Ala Leu Asn Phe Leu Leu Lys Ser Leu Gly Tyr Glu Asn
290 295 300

Ser Asp Asp Val Val Pro Val Tyr Ile Gly Asp Asp Arg Thr Asp Glu
305 310 315 320

Asp Ala Phe Lys Val Leu Arg Glu Arg Gly Gln Gly Phe Gly Ile Leu
325 330 335

Val Ser Lys Val Pro Lys Asp Thr Asn Ala Ser Tyr Ser Leu Gln Asp
340 345 350

Pro Ser Gln Val Asn Lys Phe Leu Glu Arg Leu Val Glu Trp Lys Arg
355 360 365

Lys Thr Val Gly Glu Glu
370

<210> 16
<211> 382
<212> GIJOK
<213> Oryza sativa
<400> 16

Met Asp Leu Lys Thr Ser Asn Ser Pro Val Ile Ala Asp Pro Leu Pro
1 5 10 15

Lys Leu Ala Leu Pro Ser Ala Val Met Thr Tyr Thr Thr Pro Thr Ser
20 25 30

Phe Pro Ser Thr Gly Leu Tyr Leu Asn Thr Pro Lys Lys Lys Pro Leu
35 40 45

Pro Gly Lys Ile Glu Glu Val Arg Ala Ala Gly Trp Leu Asp Leu Met
50 55 60

Leu Ala Ser Ser Pro Pro Arg Lys Arg Gln Thr Lys Asp Phe Ala Asn
65 70 75 80

Asp Val Gln Ala Asp Glu Leu Asp Leu Leu Tyr Arg Asn Trp Val Val
85 90 95

Asn His Pro Ser Ala Leu Thr Ser Phe Glu Asp Ile Val Asn Leu Ala
100 105 110

Arg Gly Lys Arg Leu Ala Leu Phe Leu Asp Tyr Asp Gly Thr Leu Ser
115 120 125

Pro Ile Val Asp Asn Pro Glu Asn Ala Val Met Ser Asp Glu Met Arg
130 135 140

Ser Ala Val Lys His Val Ala Ser Leu Phe Pro Thr Ala Ile Ile Ser

Страница 18

145 150 155 160
 Gly Arg Ser Arg Asp Lys Val Phe Asp Phe Val Lys Leu Thr Glu Leu
 165 170 175
 Tyr Tyr Ala Gly Ser His Gly Met Asp Ile Met Gly Pro Val Arg Lys
 180 185 190
 Ser Asp Ser Ser Gly Gln His Val Glu Cys Ile Arg Ser Thr Asp Ser
 195 200 205
 Glu Gly Lys Glu Val Asn Leu Phe Gln Pro Ala Ser Glu Phe Leu Pro
 210 215 220
 Met Ile Ser Glu Val Tyr Lys Lys Leu Ser Glu Ser Ile Lys Asp Ile
 225 230 235 240
 Glu Val Arg Pro Val Ile Asp Trp Asn Lys Gly Lys Ala Val Glu Phe
 245 250 255
 Leu Leu Glu Ser Leu Gly Leu Cys Gly Lys Glu Asp Val Leu Pro Ile
 260 265 270
 Tyr Val Gly Asp Asp Lys Thr Asp Glu Asp Ala Phe Lys Val Leu Lys
 275 280 285
 Ala Asn Asp Gly Ala Arg Met Glu Asp Asn Lys Phe Cys Val Ser Val
 290 295 300
 His Tyr Arg Asn Val Ala Pro His Asp Tyr Gly Glu Val His Gln Arg
 305 310 315 320
 Val Thr Ala Val Leu Lys Asn Tyr Pro Cys Leu Arg Leu Thr His Gly
 325 330 335
 Arg Lys Val Leu Ser Ile Gly Phe Gly Ile Leu Val Ser Ser Val Pro
 340 345 350
 Lys Asp Thr Asp Ala Phe Tyr Ser Val Arg Asp Pro Ala Glu Val Met
 355 360 365
 Glu Phe Leu Lys Lys Leu Ala Ser Trp Lys Glu Glu Ser Thr
 370 375 380

<210> 17
 <211> 229
 <212> БЛОК
 <213> Thermoplasma acidophilum

<400> 17

Met Ile Phe Leu Asp Tyr Asp Gly Thr Leu Val Pro Ile Ile Met Asn
 1 5 10 15

Страница 19



ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб підвищення стійкості рослини до абіотичного стресу, який включає стадії, на яких:
а) вводять в рослинну клітину касету експресії, причому касета експресії містить полінуклеотид, функціонально пов'язаний з промотором, який забезпечує транскрипцію зазначеного

полінуклеотиду в рослині, де зазначений полінуклеотид кодує поліпептид, причому зазначений поліпептид має трегалоза-6-фосфатфосфатазну активність, де поліпептид був модифікований так, що він має знижену ферментативну активність у порівнянні з немодифікованим трегалоза-6-фосфатфосфатазою;

- 5 б) регенерують рослину з рослинної клітини із стадії а), і, таким чином,
в) одержують рослину з підвищеною стійкістю до абіотичного стресу, причому зазначений абіотичний стрес являє собою стрес, викликаний нестачею води, де рослиною є маїс; і
де зазначена модифікації вибрана із групи, яка складається із: OsT6PP-H244D, OsT6PP-A102V та I129F.
- 10 2. Спосіб за п. 1, в якому стрес, викликаний нестачею води, обумовлений посухою.

```

1                                     50
15777_O_sativa MELSNS..SF VITDFVAISQ QLLGGLPSNL MQFSVMPGGY ESSGMNVG..
19924_O_sativa MDLKTSN.SF VIADPLPKLA LPSAVMTYTT PTSFFSTGLY INTFKKK...
19925_A_thalia MDMKSGHSSP VMTDSPPISN SRLTIRQNRLL PYSSAAATAI SQMNNLLLTV
19926_A_thalia ...MTNQNV I VSDRKPIGLL KTITVSVSNS PLFSNSSEPTY FNEFRKKLLK
Q9HIW7 .....

91                                     100
15777_O_sativa ....VSRLK IEEVLVNGLL DAMKSSSP.R RRLNVAFGED NSSEEDDPAY
19924_O_sativa ....PLPGK IEEVRAAGWL DIMLASSEPR KRQTKDFAND VQADELDLLY
19925_A_thalia ...PRKKTGI LDDVKSNGWL DAMKSSSP.. PPTILNKDNL .SMDATDMTY
19926_A_thalia LLEAADKNNL VVAPKITSMI DSMRDSPP.. ...TLRSSS YDSGSDNDCK
Q9HIW7 .....

101                                    150
15777_O_sativa SAKM.AKCPA ALASFKQIVA SAQGKKIAVF LDYDGTLSPI VDDPDKAVMS
19924_O_sativa RNWV.VNHPS ALTSFEDIVN LARGKRIALF LDYDGTLSPI VDNFENAVMS
19925_A_thalia REXMQLKYPY ALTSFEKIMS FAKGRIALF LDYDGTLSPI VEEPDCAVMS
19926_A_thalia TSWI.VRPPS ALNMFEDIVN AAKGKQIVMF LDYDGTLSPI VDDPDKAFIT
Q9HIW7 .....MIF LDYDGTLSPI IMNPESYAD

```

Фіг. 1А

```

151                                    200
15777_O_sativa PVMDAAVRNV AKYFFTAIVS GRSRNKVVEF VKLKELYYAG SHGMDIMAPS
19924_O_sativa DEMRSVVRHV ASLFFTAIIS GRSRDKVDFE VKLTLEYAG SHGMDIMGEV
19925_A_thalia SAMRSVQNV AKYFFTAIIS GRSRDKVVEF VNLSELYYAG SHGMDIMSPA
19926_A_thalia HEMREVVVDV ASNFFTAIVT GRSEKVRSE VQVNEIYYAG SHGMDIEGPT
Q9HIW7 AGLLSLISDL KERFDYIVT GRSPPEISRF LPLDINMICV NGACSKINGQ

201                                    250
15777_O_sativa ANHEHSAE.. .....K6 KQANLQPAH DFLPMIDEVT KSLIQVVSQI
19924_O_sativa RKSDSSGQHV ECIRSTDSEK KEVNLPQFAS EFLPMISEVY KKLSESIKDI
19925_A_thalia GESLNHEHNR TV..SVYEQG KQANLQPAS EFLPMIDKVL CSLIESTKDI
19926_A_thalia NENNGQS.. ..... NERNLPQFAR EFLPMIEKVV NILEEKTKWI
Q9HIW7 IVYNNQSD.. ..... RFLGVFDRIY EDTRSWVSDF

251                                    300
15777_O_sativa EGATVENNMF CVSVHYRNVA EKDWKLVARL VNEVLEAFPR LKVTNGRMVL
19924_O_sativa DGARMEDNKE CVSVHYRNVA EHDYGEVHQR VTAVLKNYPC LRLTHGRKVL
19925_A_thalia KGVKVEDNKE CISOHYRNVE EKNWTLVAQC VDDVIRTYPK LRLTHGRKVL
19926_A_thalia PGAMVENNMF CLSVHFRRVD EKRWPALAEV VKSVLIDYPK LKLTQGRKVL
Q9HIW7 PGLRIYRKNI AVLYHLGLMG ADMKPKLPSR IERIARIFGV ETVYGMILE

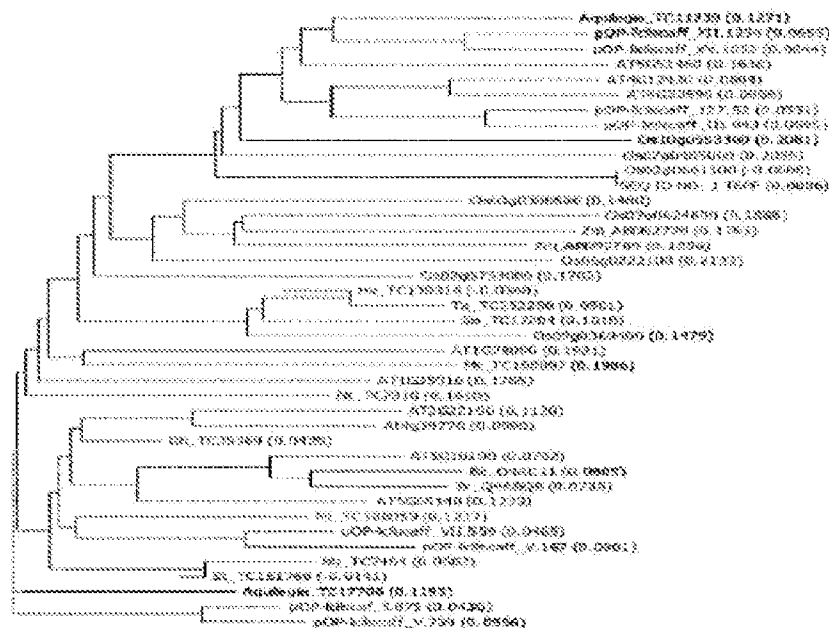
```

Фіг. 1В

	301		350
15777_O_sativa	EVRFVIDWDK	GKAVEFLQSS	LGLENSGVNI
19924_O_sativa	EVRFVIDWNK	GKAVEFLLES	LGLOGREDVL
19925_A_thalia	EIRFVIDWDK	GKAVTFELSS	LGLENNCEVL
19926_A_thalia	EIRPTIKWDK	GQALNFKLSS	LGYNSSDDVV
QSHIN7	LRVPGVNGK	S	AIKSRGGERP
			ALLAGDADTD
			EAAFEANDDA

	351		396
15777_O_sativa	.NCGYGILVS	QVFKETEFY	SLRDPSEVME
19924_O_sativa	.SIGFGILVS	GVFKETDAFY	SVRDPAEVME
19925_A_thalia	.PNSGYGILVS	AVPKEDNAFY	SLRDPSEVME
19926_A_thalia	.GQGFGLVLS	KVPKDTNASY	SLQDPSQVNK
QSHW7	LTIK	VGEGETHAKF	HVADYIEMRK
			ILKFIEMLGV
			OKKO.

Fig. 1C



Фіг.2

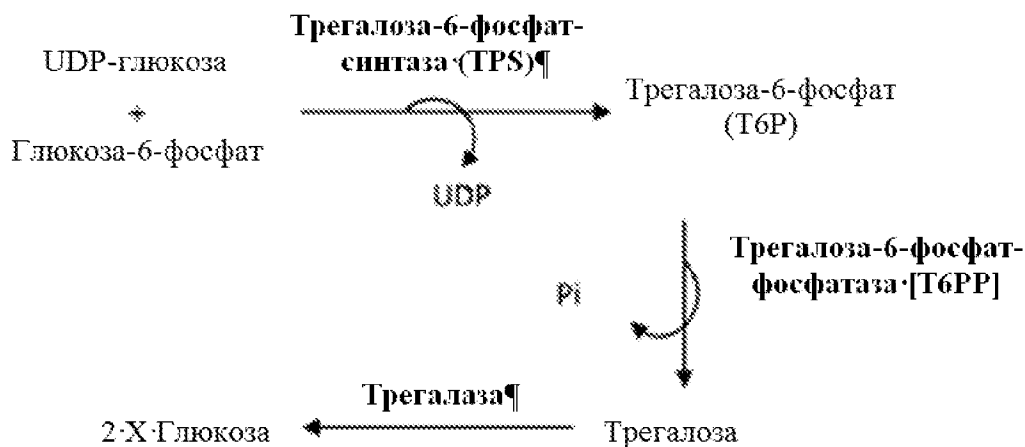
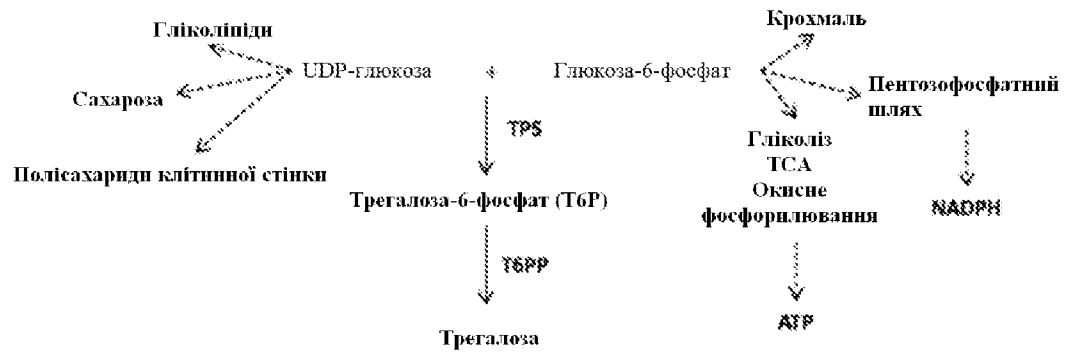
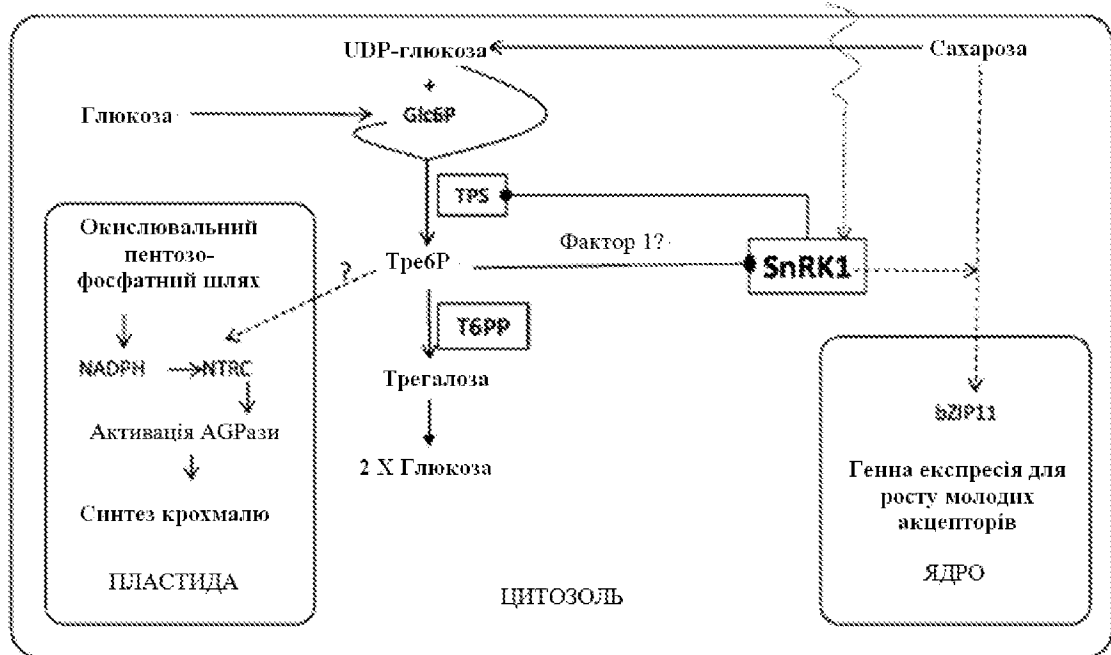


Fig. 3

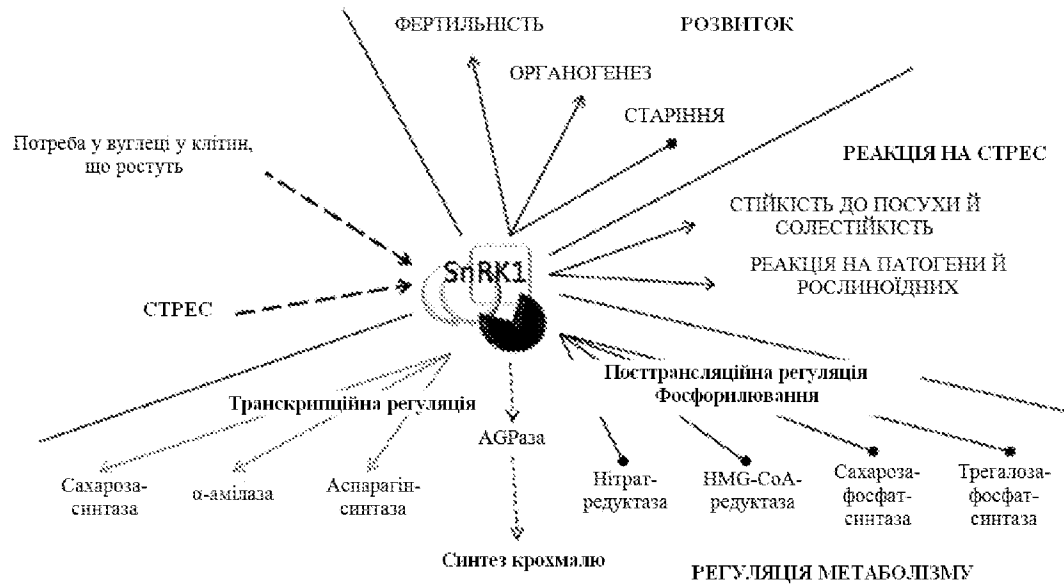


Фіг.4

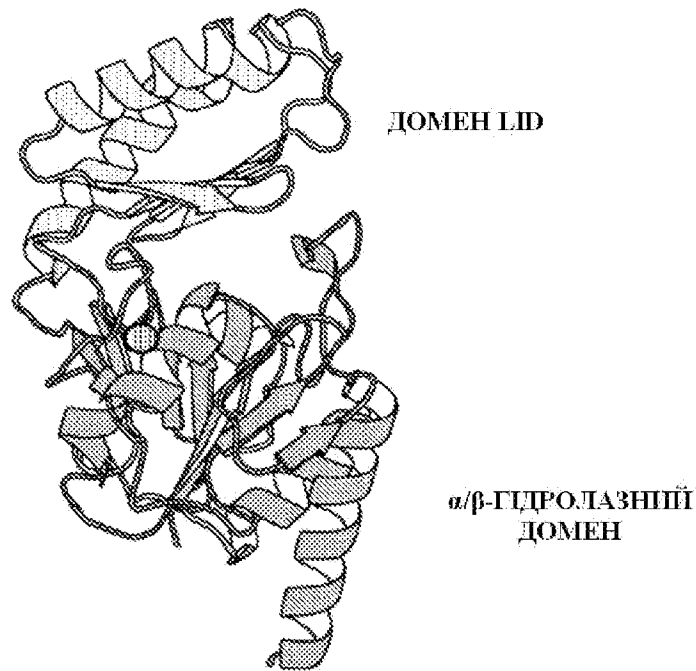
СТРЕС, ВИКЛИКАНИЙ ПОСУХОЮ



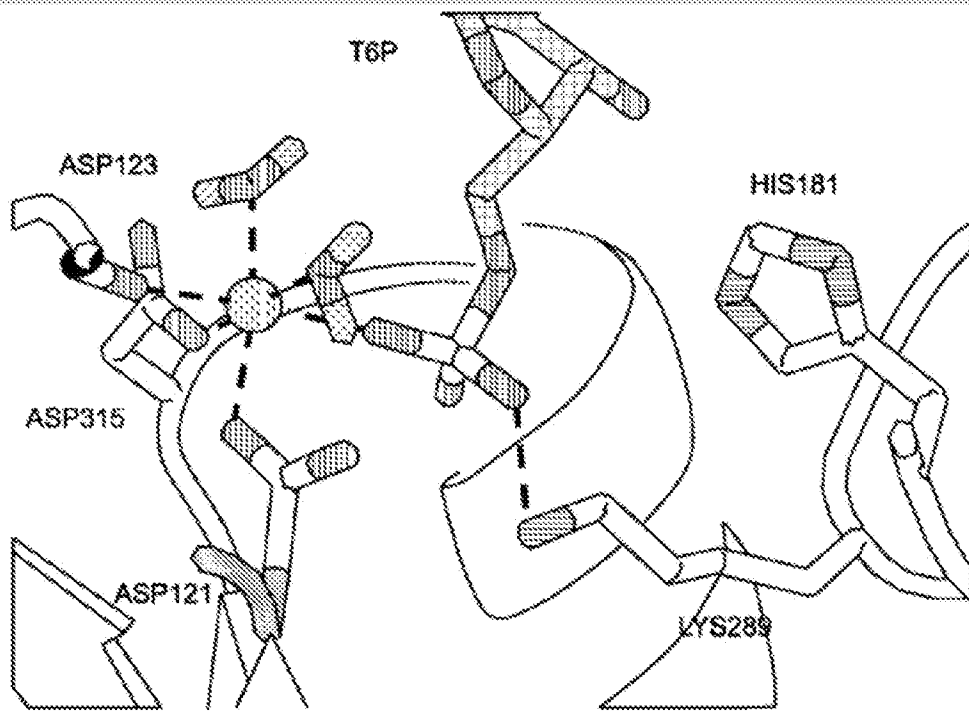
ФІГ. 5



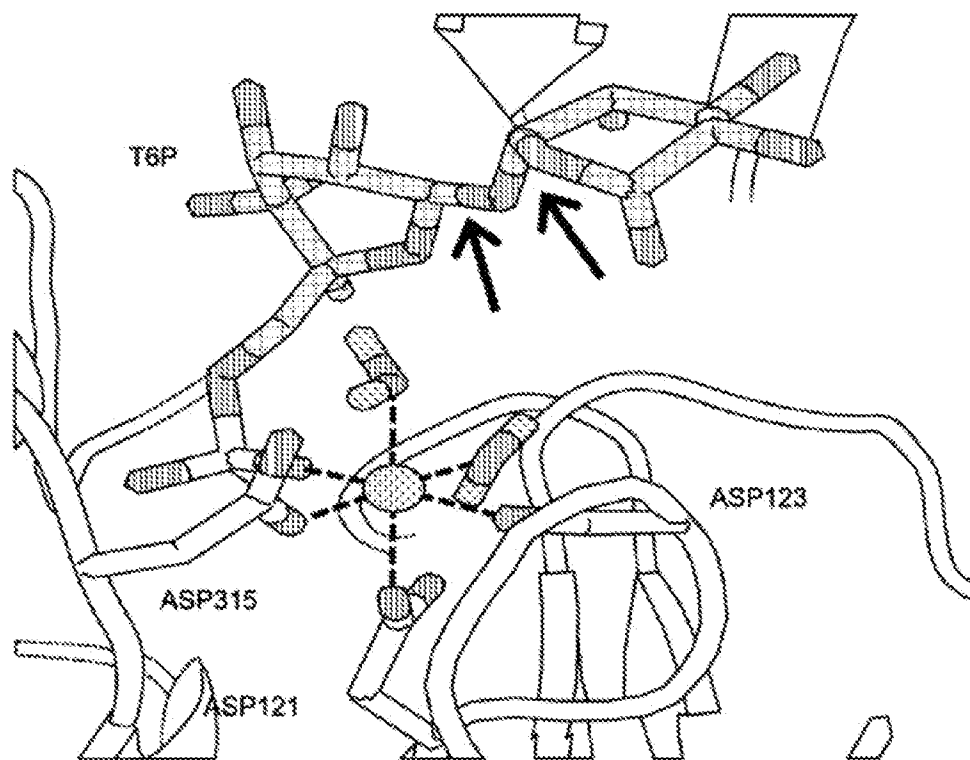
ФІГ. 6



ФІГ. 7



ΦΠ. 8



ΦΠ. 9

MXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
 XXXXXXXXXRXGWVDSMRASSPTRKXXXXXXXXXXXXSEXXDXXSXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
 XXXXXXXXXXXXKHPALXXFEXIVXAAKGQIVMFLDYDGTLSPIVDDPDRAFMSDXMRXXXXXX
 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXAVRXVAKYFPTAIVSGRCRDKVYXFKLXELLYAGSHGMDIKGPAK
 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXVLFQPASEFLPMIDEVYKXLEKTIKXIPGAKVENNKFCVSVH
 FRCVDEKXWXLAXVRSVLKEYPKRLTOGRKVLKIRPXIKWDKGKALEFLLESLGFAXXXXXXXXX
 XNXXDVLPYIGDDRTDEDAFKVLRRERGQXXGFGILVSKXPKETXASYSLQDPSEVMEXXXXXXXXX
 XXXXXXXXXXXXFLXRLVXWKKXS

ΦΠ. 10

	1		50
15777_O_sativa	MDLSNS..SP	VITDSVAISO	QLLGGLPSNL MQFSVMFGGY SSSGMNVG..
19924_O_sativa	MDLKTSN.SP	VIADFLPKLA	LPSAVMTYTT PTSFPSTGLY LNTPKKK...
19925_A_thalia	MDMKSGHSSP	VMTDSFPISN	SKLTIRQNRL PYSSAAATAI SONNNLLLTV
19926_A_thalia	...MTNQNV	VSDRKPILGL	KTITVSVSNS PLFSNSFPTY FNFPRKLLK
Q9HIW7			
	51		100
15777_O_sativa	VGRLK	IEEVLVNGLL	DAMKSSSP.R RRLNVAFGED NSSEEDPAY
19924_O_sativa	PLPGK	IEEVRAAGWL	DLMLASSPFR KRQTKDFAND VQADELDLLY
19925_A_thalia	...PRKKTGI	LDDVKSNGWL	DAMKSSSP.. PPTILNKONL .SNDATDMTY
19926_A_thalia	ILEAADKNNL	VVAPKITSMI	DSMRDSSP.. ...TRLR888 YDSDSDNDDK
Q9HIW7			
	101		150
15777_O_sativa	SAWM.AKCP	ALASFKQIVA	SAQGGKIAVF LDYDGTLSPI VDDPDKAVMS
19924_O_sativa	PNWV.VNHPS	ALTSFEDIYN	LARGERLALF LDYDGTLSPI VDNPENAVMS
19925_A_thalia	BEWMQLKYPS	ALTSPEKIMS	FANGKBIALF LDYDGTLSPI VEEPDCAYMS
19926_A_thalia	TSWI.VRFPS	ALNMFDEIVN	AAKGKQIVMF LDYDGTLSPI VEDPDKAFIT
Q9HIW7			MIF L ~~DI~~ DGTLVPI IMNPEESYAD

ΦΠ. 11A

	151		200
15777_O_sativa	PVMRAAVRN	AKYFFTAIVS	GRSRNKVTEF VKLKELYIYAG SHGMDIMAPS
19924_O_sativa	DEMRSVAVKH	ASLFFTAIIS	GRSRDKVFUF VKLTLEYIYAG SHGMDIMGPV
19925_A_thalia	SAMRSVAVQNV	AKYFFTAIIS	GRSRDKVYEF VNLSELYIYAG SHGMDIMSPA
19926_A_thalia	HEMREVVKDV	ASNFFTAIVT	GRSIEKVRSP VQVNEIYIYAG SHGMDIEGPT
Q9HIW7	AGLLSLISDL	KERFDYIVT	GRSPFEEISRF LPL.DINMIC YNGACSKIN.
	201		250
15777_O_sativa	ANSEHSAE..	KS	KQANLFPQAH DFLPMIDEVT KSLLOVVSIGI
19924_O_sativa	RKSDSSGQHV	ECIRSTDSEG	KEVNLPQFAS EFLPMISEVY KKLSESIKDI
19925_A_thalia	GESLNHEHSR	TV..SVYEQG	KDVNLPQFAS EFLPMICKVL CSLIESTKDI
19926_A_thalia	NENSNGQS..		NERVLPQPAR EFLPMIEKVV NILEEXTKWI
Q9HIW7			GQIVYNNQSD RFLQVFDRIY EDTRSWSVDF
	251		300
15777_O_sativa	EGATVENNKF	CVSVHYRNVA	EKDWKIVARI VNEVLEAFPR LKVTNGRMVL
19924_O_sativa	DGARMEDNKF	CVSVHYRNVA	PHDYGEVHOR VTAVLKNYPC LRLTHGRKVL
19925_A_thalia	KGVKVEDNKF	CISVHYRNVE	EKNWTLVAQC VDDVIRTYPK LRLTHGRKVL
19926_A_thalia	PGAMVENNKF	CISVHFRRVD	EKRWPALAEV VKSVLIDYFK LKLTQGRKVL
Q9HIW7	PGLRIYRKNI	AVLYNLGLMG	ADMKPKLRSR IESTARIFG. VETYYGKMII

ΦΠ. 11B

```

301                                     350
15777_O_sativa EVRPVIDWDK GKAVEFLLQS LGLNDSENV PIYIGDCERTD EDAFKVLRQR
19924_O_sativa EVRPVIDWNK GKAVEFLLES LGLCGKEDVL PIYVGDEKTD EDAFKVLKAN
19925_A_thalia EIRPVIDWDK GKAVTFLLS LGLNNCEDVL PIYVGDCERTD EDAFKVLRDG
19926_A_thalia EIRPTIKWDK GQALNFLLKS LGYENSDDVV PVIYIGDCERTD EDAFKVLKER
Q9HIW7 ELR.VPGVNX G.....S AIRSVKGERP AIIAGDCAto EAAFEANDQ.

351                                     396
15777_O_sativa .NCGYGILVS QVPKETEAFY SLRDPSEVME FLNFLVRWKK HSV...
19924_O_sativa .SIGFGILVS SVPKOTDAFY SVRDPAEVME FLKKLASWKE EST...
19925_A_thalia PNNGYGILVS AVPKDSNAFY SLRDPSEVME FLKSLVTWKR SMG...
19926_A_thalia .GQGFGILVS KVPKOTNASY SLQDPSQVNM FLERLVEWKR KTVGEE
Q9HIW7 .....ALTI KVGEGETHAK FHVADYIEMR KILKFIEMLC VQKKQ.

```

ФІГ. 11С

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601