

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 032207

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2019.04.30

(21) Номер заявки  
201270200

(22) Дата подачи заявки  
2010.07.30

(51) Int. Cl. A01H 5/00 (2006.01)  
A01H 4/00 (2006.01)  
C12N 15/09 (2006.01)  
A01H 1/06 (2006.01)  
C12N 5/10 (2006.01)  
C12Q 1/25 (2006.01)

(54) ЯЧМЕНЬ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 2009903563

(32) 2009.07.30

(33) AU

(43) 2012.08.30

(86) PCT/AU2010/000968

(87) WO 2011/011833 2011.02.03

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
КОММОНВЕЛТ САЙЕНТИФИК  
ЭНД ИНДАСТРИАЛ РИСЕРЧ  
ОРГАНИЗЕЙШН; ОСТРЭЙЛИАН  
КЭПИТАЛ ВЕНЧЕРЗ ЛИМИТЕД  
(AU)

(72) Изобретатель:  
Ли Чжуньи, Морелл Мэттью Кеннеди  
(AU)

(74) Представитель:  
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2002037955  
WO-A1-2010006373

MORELL M. K. et al. "Barley sex6 mutants lack starch synthase IIa activity and contain a starch with novel properties", The Plant Journal, 2003, vol. 34, pages 173-185

CLARKE B. et al "Gene expression in a starch synthase IIa mutant of barley: changes in the level of gene transcription and grain composition", Functional Integrated genomics, 2008, vol. 8, pages 211-221

(57) Изобретение предлагает зерно ячменя с пониженным уровнем или пониженной активностью белка синтазы крахмала IIa и содержанием крахмала, составляющим по меньшей мере 41% (мас./мас.), а также способы получения, идентификации или применения указанного зерна. Зерно может содержать по меньшей мере 50% амилозы, 5-9% (мас./мас.) или более 9% (мас./мас.) β-глюкана и/или 3-11% (мас./мас.) фруктана. Степень полимеризации фруктана может составлять от 3 до 12. Например, растение и зерно содержат аллель sex6-292 и/или мутацию am1. Изобретение также предлагает пищевой продукт или напиток, содержащий указанное зерно или полученный из указанного зерна, а также способы получения такого пищевого продукта или напитка и способы обработки зерна с получением продукта. В объем изобретения также входят способы улучшения одного или нескольких показателей здоровья млекопитающего, включающие в себя введение композиции, содержащей зерно ячменя настоящего изобретения или полученный из него продукт.

032207 B1

032207 B1

### Область изобретения

Настоящее изобретение описывает варианты растений ячменя и их зерна, содержащие пониженный уровень или пониженную активность белка SSIIa и желательные крахмальные и некрахмальные компоненты, продуцирующиеся с относительно высоким выходом.

### Уровень техники

Зерно ячменя дикого типа содержит примерно от 50 до 60% крахмала, который находится в эндосперме и состоит примерно из 25% амилозы и 75% амилопектина. Амилоза, которая имеет молекулярную массу от  $10^4$  до  $10^5$ , состоит в основном из линейной глюкозильной цепи, содержащей  $\alpha$ -(1-4) связи, и небольшого количества глюкановых цепей, содержащих  $\alpha$ -(1-6) связи. Амилопектин, который имеет молекулярную массу от  $10^5$  до  $10^6$ , представляет собой высокоразветвленный глюкан, содержащий глюкозильные цепи с  $\alpha$ -(1-4) связями, причем обычно от 3 до 60 глюкозильных мономеров соединены  $\alpha$ -(1-6) связями, так, что примерно 5-6% глюкозильных связей представляют собой  $\alpha$ -(1-6) связи.

В биосинтезе крахмала в зерновых культурах участвует ряд ферментов, в том числе АДФ-глюкозопирофосфорилазы (ЕС 2.7.7.27), крахмальные синтазы (ЕС 2.4.1.21), крахмалветвящие ферменты (ЕС 2.4.1.18) и крахмалдеветвящие ферменты (ЕС 3.2.1.41 и 3.2.1.68). Первая стадия синтеза крахмала включает в себя синтез АДФ-глюкозы из глюкозы-1-Р и АТФ, катализируемый ферментом АДФ-глюкозопирофосфорилаза. Затем АДФ-глюкоза используется в качестве субстрата для синтеза крахмала под действием крахмальных синтаз, которые переносят глюкозу к невосстанавливающему концу уже существующей глюкозильной цепи крахмала, содержащей  $\alpha$ -(1-4) связи. Разветвленные глюкановые цепи крахмала, содержащие  $\alpha$ -(1-6) связи, образуются под действием крахмалветвящих ферментов в результате расщепления участка глюкана, содержащего  $\alpha$ -(1-4) связи, с последующим переносом короткого глюкана в какое-либо положение глюкановой цепи крахмала с  $\alpha$ -(1-4) связями. Чтобы сохранить определенную структуру крахмала, избыток глюкановых цепей, содержащих  $\alpha$ -(1-6) связи, удаляется с помощью деветвящих ферментов (см. обзоры Kossmann and Lloyd, *Crit Rev Plant Sci*, 19: 171-226, 2000; Rahman et al., *J Cereal Sci*, 31: 91-110, 2000; Smith, *Biomacromolecules*, 2: 335-341, 2001; Morell et al., *Euphytica*, 119: 55-58, 2001; Morell et al., *J Appl Glycosci*, 50: 217-224, 2003a; Morell et al., *Control крахмала biosynthesis in vascular plants and algae*. In: Plaxton WC, McManus MT (eds) *Control of primary metabolism in plants*. Annual plant reviews, vol 22, Blackwell, Oxford, pp 258-289, 2006; Ball and Morell, *Annu Rev Plant Biol*, 54: 207-233, 2003; James et al., *Curr Opin Plant Biol*, 6: 215-222, 2003; Tetlow et al., *J Exp Bot*, 55: 2131-2145, 2004).

Десять генов крахмальных синтаз, которые были идентифицированы в геноме риса (Hirose and Terao, *Planta*, 220: 9-16, 2004), подразделяют на пять разных классов: гранулосвязанная синтаза крахмала (GBSS), синтаза крахмала I (SSI), синтаза крахмала II (SSII), синтаза крахмала III (SSIII) и синтаза крахмала IV (SSIV) (Li et al., *Funct Integr Genomics*, 3: 76-85, 2003). В рисе обнаружены две изоформы GBSS (GBSSI и GBSSII), одна изоформа SSI, три изоформы SSII (SSIIa [SSII-3], SSIIb [SSII-2] и SSIIc [SSII-1]), две изоформы SSIII (SSIIIa [SSIII-2] и SSIIIb [SSIII-1]) и две изоформы SSIV (SSIVa [SSIV-1] и SSIVb [SSIV-2]) (Hirose and Terao, 2004 (выше); Fujita et al., *Plant Physiol*, 144: 2009-2023, 2007). Белки SSI, SSIIa и GBSSI присутствуют в гранулах крахмала, а белок SSIIIa обнаружен только в растворимой фазе амилопластидов (Li et al., *Plant Physiology*, 123: 613-624, 2000). Роль синтаз крахмала, которую они выполняют по отдельности или в совокупности, в образовании конечной структуры гранул крахмала точно еще не определена, хотя установлены возможные функции крахмальных синтаз в разных органах и разных видах.

Мутантные формы крахмальных синтаз используют для определения их роли в некоторых зерновых культурах. GBSSI играет ключевую роль в биосинтезе амилозы (Ball et al., *Cell* 5(5(3)): 349-52, 1996), однако он также может вносить вклад в синтез длинных цепей амилопектина (Maddelaine et al., *J Biol Chem*. 269(40): 25150-7, 1994; Denyer et al., *Plant Physiol* 112(2): 779-85, 1996). Влияние на свойства крахмала исследуют на ячмене и пшенице с использованием GBSSI-нулевых мутантов (Andersson et al., *J. Cereal Sci* 30: 183-191, 1999; Yamamori and Quynh, *Theor Appl Genet*, 100: 32-38, 2000). Содержание амилозы в ячмене с нулевой мутацией по GBSSI составляет менее 5% от содержания амилозы в ячмене дикого типа (Andersson et al., 1999 (выше)). GBSSI-нулевой мутант пшеницы также имеет низкое содержание амилозы (Kim et al., *J Cereal Sci*, 37: 195-204, 2003; Miura et al., *Euphytica*, 108: 91-95, 1999; Miura et al. *Euphytica*, 123: 353-359, 2002). По данным дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) GBSSI-нулевой мутант пшеницы также характеризуется более высоким максимумом температуры и энталпией желатинизации (Yasui et al., *J Cereal Sci*, 24: 131-137, 1996).

Полагают, что SSI, SSIIa и SSIII преимущественно участвуют в синтезе амилопектина, обеспечивая удлинение конкретных подгрупп существующих невосстанавливающих концов молекулы крахмала. Исследования SSI-нулевых мутантов *Arabidopsis* и риса демонстрируют, что SSI участвует в биосинтезе маленьких внешних цепей амилопектинового кластера (8-12 dp) в крахмале листьев *Arabidopsis* (Delvalle et al., *Plant J*. 43(3): 398-412, 2005) и в крахмале эндосперма риса (Fujita et al., *Plant Physiol*. 140: 1070-1084, 2006). Крахмал SSIIa-мутантов ячменя и пшеницы имеет повышенное содержание цепей DP3-8, свидетельствуя о том, что фермент SSIIa участвует в удлинении коротких глюкановых цепей DP3-8 с

получением более длинных глюкановых цепей DP12-35 (Morell et al., Plant J. 34: 173-185, 2003; Yamamori et al., Theor Appl Genet, 101: 21-29, 2000; Konik-Rose et al., Theor Appl Genet, 115: 1053-1065, 2007). Утрата SSIIa в кукурузе и рисе приводит к появлению фенотипа с повышенным содержанием амилозы и с уменьшением доли очень длинных цепей (DP>50 в кукурузе или DP>30 в рисе) и небольшому уменьшению температуры желатинизации (Jane et al., Cereal Chem. 76: 629-637, 1999; Fujita et al., 2007 (выше)). В пластидах мутантов Arabidopsis, дефектных по SSIV, содержится меньше гранул крахмала, но они имеют более крупный размер, что позволяет постулировать участие белка SSIV в инициации образования гранул крахмала (Roldan et al., Plant J. 49: 492-504, 2007).

Показано, что SSIIa-мутантный ячмень имеет фенотип, характеризующийся высоким содержанием амилозы, пониженным содержанием крахмала и пониженной массой семян, который является следствием уменьшения биосинтеза крахмала. Линии мутантного ячменя M292 и M342, гомозиготные по нулевой мутации гена, кодирующего SSIIa, получают путем мутагенеза зерен ячменя сорта "Himalaya" под действием азидата натрия. Вначале из зерен потомства популяции, подвергнутой мутагенезу, выбирают мутантные семена по фенотипу сморщенного зерна. Мутантные линии дополнительно характеризуются изменением свойств крахмала, снижением уровня и активности белка SSIIa, и в генетическом отношении - присутствием раннего стопкодона в кодирующем участке гена SSIIa (Morell et al., 2003 (выше), полностью включенный в данное описание в качестве ссылки). Это приводит к утрате фермента SSIIa в эндосперме. Однако содержание крахмала в SSIIa-мутантном зерне значительно снижено, что приводит к умеренному уменьшению выхода при выращивании растений ячменя в поле. Неизвестно, можно ли улучшить выход при сохранении фенотипа с высоким содержанием амилозы, и, если можно, то как.

Таким образом, существует потребность в ячмене с высоким содержанием амилозы, который обладает улучшенными агрономическими характеристиками.

#### Сущность изобретения

На протяжении данного описания, если контекст не указывает иначе, термин "содержат" или его вариации, такие как "содержит" или "содержащий", следует понимать как включающий в себя указанный элемент, или указанное целое число, или указанную группу элементов или целых чисел, но не исключая какой-либо другой элемент, или другое целое число, или другую группу элементов или целых чисел.

В данном описании, если контекст однозначно не указывает иначе, единственное число включает в себя множественное число. Так, например, термин "мутация" относится как к одной мутации, так и к двум или нескольким мутациям; термин "средство" относится к одному средству, а также к двум или нескольким средствам; и так далее.

Нуклеотидные и аминокислотные последовательности обозначают с помощью идентификационного номера последовательности (SEQ ID NO:). SEQ ID NO: численно соответствуют идентификаторам последовательностей 4001 (SEQ ID NO: 1), 4002 (SEQ ID NO: 2) и т.д. Идентификаторы последовательностей приведены в табл. 8.

Гены и другой генетический материал (например, мРНК, нуклеотидные конструкции и др.) обозначают в данном описании курсивом, а белковые продукты их экспрессии не выделяют курсивом. Так, например, полипептид синтазы крахмала II (SSII) является продуктом экспрессии нуклеотидных последовательностей SSII.

Типичные примеры нуклеотидных и аминокислотных последовательностей молекул SSIIa приведены в списке последовательностей, дополнительно описанном в табл. 8.

Библиографические сведения о публикациях, упоминаемых автором в данной заявке, приведены в конце описания.

Приведенную в данном описании ссылку на какую-либо предшествующую публикацию (или полученную из нее информацию) или любой известный материал не следует рассматривать как информацию или допущение или какую-либо форму предположения о том, что предшествующая публикация (или полученная из нее информация) или любой известный материал образует часть известных знаний в области науки, к которой относится настоящая заявка.

Если не указано иначе, все описанные здесь воплощения можно применять, внося необходимые изменения, к любым другим воплощениям.

В одном воплощении настоящее изобретение предлагает зерно ячменя с пониженным уровнем или активностью белка SSIIa и содержанием крахмала по меньшей мере 41% (мас./мас.). Зерно, полученные из него продукты и способы получения, идентификации или применения зерна характеризуются по меньшей мере двумя указанными признаками. В частности, термин "содержание крахмала" относится к содержанию крахмала в целом зерне, тогда как "содержание крахмала", например, в шлифованном зерне является более высоким. В некоторых воплощениях содержание крахмала в зерне ячменя составляет по меньшей мере 43% (мас./мас.), по меньшей мере 45% (мас./мас.), по меньшей мере 47% (мас./мас.), по меньшей мере 50% (мас./мас.) или 41-65% (мас./мас.).

В родственном воплощении содержание амилозы в зерне составляет по меньшей мере 50% или по меньшей мере 60% по отношению к общему содержанию крахмала в зерне. Кроме того, в некоторых воплощениях содержание β-глюкана в зерне составляет 5-9% (мас./мас.) или более 9% (мас./мас.).

В другом воплощении содержание фруктана в зерне составляет 3-11% (мас./мас.) или 4-11% (мас./мас.). Подходящий фруктан имеет степень полимеризации примерно от 3 до 12.

В другом родственном воплощении зерно содержит мутацию в эндогенном гене, который кодирует полипептид, обладающий активностью SSIIa, причем мутация приводит к уменьшению экспрессии гена, кодирующего SSIIa, в растении ячменя или к экспрессии SSIIa на пониженном уровне или с более низкой активностью. В иллюстративном воплощении предлагается растение или зерно, гомозиготное по аллелю *sex6-292*. В некоторых воплощениях уровень SSIIa уменьшают с помощью экзогенной молекулы нуклеиновой кислоты, способной осуществлять понижающую регуляцию экспрессии гена, кодирующего SSIIa, в растении ячменя. В некоторых воплощениях настоящего изобретения экзогенная молекула нуклеиновой кислоты включает в себя химерный молчащий ген, антисмысловую молекулу, рибозим, совместно экспрессирующуюся молекулу, молекулу дцРНК, молекулу шпилечной РНК или микроРНК, которая осуществляет понижающую регуляцию экспрессии эндогенного SSII.

В предпочтительном воплощении настоящее изобретение предлагает зерно ячменя, которое дополнительно содержит генетическое изменение, приводящее к уменьшению активности гена *amo1*. Как описано далее в данном документе, уменьшение активности гена *amo1* удобно оценивать по сравнению с немодифицированным контролем, например, по сравнению с зерном ячменя сорта Himalaya. В иллюстративном воплощении генетическое изменение включает в себя мутацию гена *amo1*. В другом воплощении растение или полученное из него зерно является гомозиготным по аллелю *amo1-AC38* (Schondelmaier et al., Plant Breeding, 109: 274-281, 1992, включена в настоящее описание в качестве ссылки во всей полноте). В одном воплощении зерно ячменя содержит мутацию в гене *amo1* и характеризуется пониженной активностью синтазы крахмала, отличной от SSIIa, предпочтительно пониженным уровнем GBSS, более предпочтительно пониженным уровнем GBSSI. Зерно также может содержать повышенный уровень лизина (>4 г на 100 г белка). Такое зерно можно получить путем скрещивания ячменя сорта Prowashonipapa с ячменем, содержащим мутантный локус *amo1*, таким как High Amylose Glacier.

Зерно может находиться в любой пригодной форме, включающей в себя, без ограничения, целое или дробленое зерно, молотое, шлифованное, измельченное, раздробленное, плющенное зерно или перловую крупу.

Настоящее изобретение относится к растению ячменя, способному продуцировать описанные здесь зерна, а также к непросеянной ячменной муке или порошку, полученному из зерна.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение предлагает зерно ячменя, в котором содержание крахмала составляет по меньшей мере 41% (мас./мас.) и которое содержит мутантный ген SSIIa и мутантный ген *amo1*. В некоторых воплощениях мутация SSIIa включает в себя наличие аллели *sex6-292*. В некоторых воплощениях зерно, которое содержит мутацию, приводящую к утрате функции SSIIa, например мутацию *sex6-292* и мутацию *amo1*, получают или продуцируют и обрабатывают с получением пищевого продукта или напитка.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способ получения пищевого продукта или напитка, который включает в себя (i) получение или продуцирование зерна ячменя, как описано в данном документе; и (ii) обработку зерна с получением продукта. Продукт соответственно можно выбрать из группы, включающей в себя непросеянную муку, муку, крахмал, отруби,  $\beta$ -глюкан, фруктан, отличный от крахмала полисахарид, а также дробленое, молотое, шлифованное, измельченное, раздробленное, плющенное зерно или перловую крупу. Обработанное зерно ячменя можно использовать непосредственно или в другом воплощении обработанное зерно можно смешать с одним или несколькими другими ингредиентами с получением пищевого продукта или напитка. В некоторых воплощениях способы дополнительно включают в себя (iii) определение в зерне ячменя или полученном из него продукте уровня или типа крахмала, крахмалистости, амилозы, амилопектина,  $\beta$ -глюкана, фруктана, отличных от крахмала полисахаридов, клетчатки или резистентного крахмала.

В некоторых воплощениях пищевой продукт или напиток включает в себя зерно, муку, зерновой завтрак, сухое печенье, сдобную булку, батончик мюсли, лапшу, подсластитель, низкокалорийную добавку, наполнитель, клетчатку, улучшитель консистенции, консервант, пробиотик и т.п. или их любые сочетания. Пищевой продукт может представлять собой экструдированный зерновой завтрак или сухой завтрак или хлопьевидный или плющенный продукт. Пищевой продукт может представлять собой пищевой ингредиент, такой как компонент сырья хлебопекарного производства или смеси для выпекания.

В другом воплощении настоящее изобретение предлагает способ получения растения ячменя, способного продуцировать зерно, характеризующееся пониженным уровнем или пониженной активностью белка SSIIa и содержанием крахмала, составляющим по меньшей мере 41%, где способ включает в себя (i) введение в указанное растение средства, осуществляющего понижающую регуляцию уровня или активности эндогенной синтазы крахмала II (SSII) в растении по сравнению с контрольным растением, или мутации эндогенного гена, кодирующего SSII в растении, и (ii) выбор растения ячменя, продуцирующего зерно. В некоторых воплощениях способы дополнительно включают в себя введение в растение генетического изменения, приводящего к уменьшению активности гена *amo1*. Средства соответственно включают в себя молекулу нуклеиновой кислоты, которая осуществляет понижающую регуляцию экспрессии

эндогенного гена SSII и включает в себя химерный молчащий ген, антисмысловую молекулу, рибозим, совместно экспрессирующуюся молекулу, молекулу дцРНК, молекулу шпилечной РНК или другую экзогенную молекулу нуклеиновой кислоты, способную осуществлять понижающую регуляцию экспрессии эндогенного гена SSII.

В некоторых воплощениях способы дополнительно включают в себя определение в зерне ячменя или полученном из него продукте уровня активности и/или типа крахмала, крахмалистости, амилозы, амилопектина,  $\beta$ -глюкана, фруктана, отличного от крахмала полисахарида, клетчатки или резистентного крахмала. В некоторых воплощениях способы включают в себя анализ растения с использованием одного или нескольких генетических маркеров. В некоторых воплощениях пониженный уровень или пониженная активность белка SSIIa составляет менее 25%, менее 10%, менее 5% от соответствующих показателей контрольного растения или того же растения до введения средства или мутации или практически отсутствует.

В некоторых воплощениях изобретение предлагает способ получения описанного выше зерна ячменя, включающий в себя стадии выращивания растения ячменя и сбора зерна. В другом воплощении настоящее изобретение предлагает применение раскрытого здесь растения, или зерна, или непросеянной муки, или муки для получения продукта с повышенным уровнем резистентного крахмала, клетчатки, водорастворимого углевода,  $\beta$ -глюкана, фруктана или отличного от крахмала углевода или продукта с пониженным гликемическим индексом (GI). Фруктан, крахмал или  $\beta$ -глюкан, выделенный из растения, зерна или непросеянной муки, в соответствии с настоящим изобретением используют, например, для получения пищевого продукта, включающего в себя подсластитель, низкокалорийную добавку, наполнитель, клетчатку, средство, улучшающее консистенцию, консервант, пробиотическое средство и т.п. или их сочетание. Таким образом, в некоторых воплощениях зерно, муку, непросеянную муку, крахмал,  $\beta$ -глюкан или фруктан, выделенные из растения, зерна, непросеянной муки или муки настоящего изобретения, используют для получения пищевого продукта с повышенным уровнем резистентного крахмала, клетчатки, водорастворимого углевода,  $\beta$ -глюкана, фруктана или пищевого продукта с пониженным гликемическим индексом (GI). В некоторых воплощениях повышают уровни амилозы,  $\beta$ -глюкана и фруктана, предпочтительно резистентного крахмала. Соответственно настоящее изобретение относится к пищевому продукту, содержащему пищевой ингредиент на уровне, составляющем по меньшей мере 10% по отношению к сухой массе, где пищевой ингредиент представляет собой указанное зерно ячменя, описанное в данном документе, которое содержит по меньшей мере 41% (мас./мас.) крахмала, или непросеянную муку, или муку, полученную из указанного зерна, где непросеянная мука или мука имеет пониженный уровень или пониженную активность SSIIa и содержание крахмала, составляющее по меньшей мере 41% (мас./мас.). В некоторых воплощениях непросеянная мука или мука содержит 3-11% (мас./мас.) фруктана или 4-11% (мас./мас.) фруктана.

В некоторых других воплощениях содержание  $\beta$ -глюкана в непросеянной муке или муке составляет 5-9% (мас./мас.) или более 9% (мас./мас.). В других воплощениях непросеянная мука или мука содержит 50 или 60% амилозы по отношению к общему содержанию крахмала в непросеянной муке или муке.

В иллюстративном воплощении ячмень содержит аллель *sex6-292*.

В другом иллюстративном воплощении продукт выбирают из группы, включающей в себя хлеб, сдобные булочки, зерновые завтраки, кексы, печенье, пирожные, сухари, оладьи, пиццы, круассаны, булочки, соленые крендельки, макароны, лапшу, компоненты сырья хлебопекарного производства, смеси для выпекания, супы, соусы, загустители, конфеты, тортильи, батончики мюсли, сухие завтраки и другие мучные изделия. Продукт может представлять собой напиток, такой как высокоэнергетический напиток или фруктовый коктейль.

В другом воплощении настоящее изобретение предлагает применение зерна или муки, полученной из растения или зерна настоящего изобретения, в производстве пищевого продукта с повышенным уровнем одного или нескольких компонентов, выбранных из крахмала, амилозы, амилопектина,  $\beta$ -глюкана, фруктана, отличного от крахмала полисахарида, клетчатки или резистентного крахмала.

В другом воплощении изобретение предлагает способ идентификации разновидности зерна ячменя, характеризующейся повышенными уровнями одного или нескольких компонентов, выбранных из крахмала, амилозы, амилопектина,  $\beta$ -глюкана, фруктана, отличного от крахмала полисахарида, клетчатки или резистентного крахмала. В некоторых воплощениях способ включает в себя (i) получение зерна ячменя с изменением синтеза или катаболизма крахмала, и (ii) определение содержания в зерне одного или нескольких компонентов, выбранных из крахмала, амилозы, амилопектина,  $\beta$ -глюкана, фруктана, отличного от крахмала полисахарида, клетчатки или резистентного крахмала. В других воплощениях способ включает в себя (iii) сравнение уровня компонента, указанного в пункте (ii), с уровнем, наблюдающимся в зерне дикого типа, в котором отсутствуют изменения синтеза или катаболизма, или в зерне исходного или другого контрольного растения. В следующих воплощениях способ включает в себя отбор измененного зерна, характеризующегося повышением уровня/уровней, указанных в пункте (ii). В некоторых воплощениях способы включают в себя мутагенез или трансформацию растительной клетки перед стадией (i). В предпочтительных воплощениях зерно ячменя содержит мутацию в гене *amo1* и характеризуется

пониженной активностью синтазы крахмала, такой как SSIIa, SSIIIa или GBSS, например пониженным уровнем GBSSI. Такое зерно можно получить путем скрещивания мутанта ячменя M292 или другого ячменя, содержащего аллель *sex6-292*, или разновидности Prowashonupana с ячменем, содержащим мутантный локус *amo1*, таким как High Amylose Glacier.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способ определения уровня (уровней) крахмала, амилозы, амилопектина,  $\beta$ -глюкана, фруктана, отличного от крахмала полисахарида, клетчатки или резистентного крахмала в зерне хлебных злаков, таком как зерно ячменя, где указанный способ включает в себя стадию получения зерна, содержащего по меньшей мере 41% (мас./мас.) крахмала в соответствии с настоящим изобретением, обработку зерна с целью экстракции крахмала, амилозы, амилопектина,  $\beta$ -глюкана, фруктана, отличного от крахмала полисахарида, клетчатки или резистентного крахмала, и измерение количества экстрагированных крахмала, амилозы, амилопектина,  $\beta$ -глюкана, фруктана, отличного от крахмала полисахарида, клетчатки или резистентного крахмала с целью определения содержания крахмала, амилозы, амилопектина,  $\beta$ -глюкана, фруктана, отличного от крахмала полисахарида, клетчатки или резистентного крахмала в зерне.

В другом воплощении изобретение предлагает способ получения пищевого продукта или напитка, включающий в себя смешивание зерна ячменя или полученного из него продукта с помощью раскрытых здесь способов с другим ингредиентом пищевого продукта или напитка. Таким образом, способ включает в себя (i) получение или продукцию зерна ячменя, характеризующегося пониженным уровнем пониженной активностью белка SSIIa и содержанием крахмала, составляющим по меньшей мере 41% (мас./мас.); и (ii) обработку зерна с получением продукта. Продукт может быть выбран из группы, включающей в себя непросеянную муку, муку, крахмал, отруби,  $\beta$ -глюкан, фруктан, отличный от крахмала полисахарид, а также дробленое, молотое, шлифованное, измельченное, раздробленное, плющенное зерно или перловую крупу. Способ дополнительно включает в себя смешивание продукта с другим пищевым продуктом или напитком или их предшественником.

Изобретение также предлагает способ получения крахмала, амилозы, амилопектина,  $\beta$ -глюкана, фруктана, отличного от крахмала полисахарида, клетчатки или резистентного крахмала с целью улучшения одного или нескольких показателей здоровья млекопитающих, где способ включает в себя введение млекопитающему композиции, содержащей зерно ячменя, полученную из него непросеянную муку или муку или полученный из него пищевой продукт или напиток, которые характеризуются пониженным уровнем или пониженной активностью белка SSIIa и содержанием крахмала, составляющим по меньшей мере 41% (мас./мас.), как описано в данном документе. В одном воплощении зерно, мука, крахмал, амилоза, амилопектин,  $\beta$ -глюкан, фруктан, отличный от крахмала полисахарид, клетчатка или резистентный крахмал находятся в виде пищевого продукта, напитка или фармацевтической композиции. В некоторых воплощениях зерно или мука находится в виде фруктанового продукта. В одном воплощении один или несколько показателей здоровья включают в себя повышенное число полезных кишечных бактерий, пониженное число очагов аберрантных крипт, повышенную абсорбцию минеральных веществ, пониженный уровень инсулина, пониженный гликемический индекс, пониженную гликемическую нагрузку, пониженный уровень глюкозы в крови, пониженное кровяное давление, пониженную массу тела, пониженный уровень холестерина в крови, повышенный уровень холестерина HDL, повышенную плотность кости, повышенный уровень кальция, повышенную частоту кишечной перистальтики или улучшенный сердечно-сосудистый профиль сыворотки крови.

В родственном воплощении изобретение предлагает способ улучшения одного или нескольких симптомов состояния, связанного с наличием у субъекта низких уровней пищевого крахмала, крахмалистости, амилозы, амилопектина,  $\beta$ -глюкана, фруктана, отличного от крахмала полисахарида, клетчатки или резистентного крахмала, указанный способ включает в себя пероральное введение субъекту зерна, описанного в данном документе, или полученного из зерна обработанного продукта, содержащего один или несколько ингредиентов, выбранных из крахмала, амилозы, амилопектина,  $\beta$ -глюкана, фруктана, отличного от крахмала полисахарида, клетчатки или резистентного крахмала, в течение периода времени и в условиях, достаточных для улучшения одного или нескольких симптомов.

В некоторых воплощениях способа состояние выбрано из группы, включающей в себя диабет, ожирение, болезнь сердца, гипертонию, констипацию, остеопороз и рак.

Способы или композиции настоящего изобретения можно применять к любому субъекту при условии, что они вызывают улучшение состояния субъекта. Термин "субъект" включает в себя, без ограничения, людей и отличных от людей приматов, домашний скот, в том числе крупный рогатый скот, свиньи или куры, или молодые животные, такие как телята или поросята, домашние животные, такие как собаки или кошки, лошади, лабораторные животные, находящиеся в неволе дикие животные, рептилии и амфибии, рыбы и птицы. Субъект независимо от того, является ли он человеком или отличным от человека животным, может упоминаться как пациент, особь, субъект, животное, хозяин или реципиент. В отдельном воплощении субъект представляет собой человека.

Приведенное выше описание сущности изобретения не следует рассматривать как исчерпывающее перечисление воплощений настоящего изобретения.

### Краткое описание фигур

На фиг. 1 приведены фотографии семян, отражающие их морфологию. Используют линии дикого типа (НН21 и НН61), линии мутантов *amo1* (НН17 и НН30), мутантов *SSIIa* (НН35 и НН50), двойных мутантов *SSIIa-amo1* (НН4 и НН88), полученные из популяции BC3F6, являющейся результатом скрещивания *Himalaya292* и *HAG*. Также используют две исходные линии и две контрольные линии.

На фиг. 2 приведена гистограмма, иллюстрирующая содержание крахмала, выраженное в виде процента от сухой массы семян, для четырех генотипов: дикого типа, *SSIIa-amo1*, *ssIIa-amo1* и *ssIIa-amo1*.

### Краткое описание таблиц

В табл. 1 показаны содержание *RS* и уровень *GI* в непросеянной муке ячменя.

В табл. 2 показаны содержание *RS* и уровень *GI* в хлебе, полученном с использованием 100% непросеянной муки ячменя.

В табл. 3 приведены результаты статистического анализа влияния генотипа на содержание *RS* в хлебе, полученном с использованием 30 или 100% муки ячменя.

В табл. 4 показаны содержание *RS* и уровень *GI* в хлебе, полученном с использованием 30% муки ячменя.

В табл. 5 приведены результаты статистического анализа влияния генотипа на содержание *RS* (мг *RS* на г крахмала) в хлебе, полученном с использованием 100% муки ячменя.

В табл. 6 приведены результаты статистического анализа влияния генотипа на содержание *RS* (мг *RS* на г крахмала) в хлебе, полученном с использованием 30% муки ячменя.

В табл. 7 приведены результаты статистического анализа влияния генотипа на уровень *GI* в 10 г хлеба, полученного с использованием 30 или 100% муки ячменя.

В табл. 8 описаны *SEQ ID NO*, упоминающиеся в настоящем документе.

В табл. 9 описано подразделение аминокислот на подклассы.

В табл. 10 приведены типичные аминокислотные замены.

### Подробное описание

Настоящее изобретение основано на неожиданном открытии, которое заключается в том, что агрономические преимущества *SSIIa*-мутантного ячменя, включающие в себя, в числе прочего, высокие уровни амилозы и фруктана, могут быть дополнительно улучшены в разновидности, содержащей связанную с утратой функции мутацию гена *SSIIa* и генетическое изменение, приводящее к уменьшению активности гена *amo1*. В частности, как показано на фиг. 2, двойные мутанты ячменя имеют более высокие уровни крахмала, чем одинарные *SSIIa*-мутанты.

Соответственно в одном воплощении настоящее изобретение предлагает зерно ячменя, характеризующееся пониженным уровнем или пониженной активностью белка *SSIIa* и содержанием крахмала, составляющим по меньшей мере 41% (мас./мас.). В родственном воплощении содержание амилозы в зерне составляет по меньшей мере 50% или по меньшей мере 60% по отношению к общему содержанию крахмала в зерне. Кроме того, в некоторых воплощениях зерно содержит  $\beta$ -глюкан в количестве 5-9% (мас./мас.) или более 9% (мас./мас.). В другом воплощении зерно содержит фруктан в количестве 3-11% (мас./мас.) или 4-11% (мас./мас.). В другом воплощении содержание лизина в зерне составляет по меньшей мере 4 г на 100 г белка.

Крахмал состоит только из глюкозидных остатков и присутствует в виде молекул двух типов, амилозы и амилопектина, которые различаются по размеру молекул и другим характеристикам. Молекулы амилозы в основном представляют собой линейные полимеры, состоящие из  $\alpha$ -1,4-связанных глюкозидных мономеров, тогда как амилопектин представляет собой высоковетвленную молекулу, содержащую  $\alpha$ -1,6-глюкозидные связи, соединяющие многочисленные линейные цепи  $\alpha$ -1,4-связанных глюкозидных мономеров. Амилопектин состоит из больших молекул, которые варьируют по размеру от нескольких десятков тысяч до сотен тысяч мономеров глюкозы и содержат примерно 5%  $\alpha$ -1,6-разветвлений. Амилоза же состоит из молекул, которые варьируют по размеру от нескольких сотен до нескольких тысяч глюкозидных остатков и содержат менее одного процента разветвлений (обзор можно найти в *Buleon et al., International Journal of Biological Macromolecules*, 23: 85-112, 1998). Крахмалы злаков дикого типа обычно содержат 20-30% амилозы, а остаток составляет амилопектин.

Синтез крахмала в эндосперме высших растений осуществляет набор ферментов, которые катализируют четыре ключевые стадии. На первой стадии АДФ-глюкозопирофосфорилаза активирует мономер предшественника крахмала посредством синтеза АДФ-глюкозы из G-1-P и АТФ. На второй стадии синтазы крахмала переносят активированный донор глюкозильного остатка, АДФ-глюкозу, на невозстанавливающий конец существующей  $\alpha$ 1-4-цепи. На третьей стадии крахмалветвящие ферменты вводят точки ветвления путем расщепления участка  $\alpha$ -1,4-связанного глюкана с последующим переносом расщепленной цепи на акцепторную цепь и образованием новой  $\alpha$ -1,6-связи. Крахмалветвящие ферменты представляют собой ферменты, которые вводят  $\alpha$ -1,6-связи в  $\alpha$ -полиглюканы и, следовательно, играют важную роль в образовании амилопектина. И наконец, крахмалветвящие ферменты удаляют некоторые из точек ветвления, хотя механизм их действия еще не ясен.

Очевидно, что для синтеза нормальных гранул крахмала в высших растениях требуется по меньшей

мере четыре указанные активности, однако в эндосперме высших растений обнаружено несколько изоформ каждого из четырех ферментов, специфические функции которых были предложены на основе результатов мутационного анализа или модификации уровней экспрессии генов с использованием трансгенных способов. В эндосперме зерновых, где обнаружено четыре класса синтазы крахмала, одна изоформа локализована исключительно в гранулах крахмала, так называемая гранулосвязанная синтаза крахмала (GBSS), которая в основном используется для синтеза амилозы, две формы распределены между гранулами и растворимой фракцией (SSI, Li et al., *Plant Physiology*, 120: 1147-1155, 1999, SSII, Li et al., *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 1208-1216, 1999), а четвертая форма присутствует только в растворимой фракции, SSIII (Cao et al., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 373: 135-146, 2000; Li et al., 1999 (выше); Li et al., 2000 (выше)). Показано, что мутации в SSII и SSIII приводят к изменению структуры амилопектина (Gao et al., *Plant Cell*, 10: 399-412, 1998; Craig et al., *Plant Cell* 10: 413-426, 1998). Мутации, позволяющие определить роль фермента SSI, не описаны.

В эндосперме зерновых экспрессируется три формы ветвящего фермента, ветвящий фермент I (SBEI), ветвящий фермент IIa (SBEIIa) и ветвящий фермент IIb (SBEIIb) (Hedman and Boyer, *Biochemical Genetics*, 20: 483-492, 1982; Boyer and Preiss, *Carbohydrate Research*, 61: 321-334, 1978; Mizuno et al., *Journal of Biochemistry*, 112: 643-651, 1992; Sun et al., *The New Phytologist*, 137: 215-215, 1997). Результаты выравнивания последовательностей SBE свидетельствуют о высокой степени подобия как нуклеотидных, так и аминокислотных последовательностей и позволяют сгруппировать ферменты в классы SBEI, SBEIIa и SBEIIb.

В высших растениях присутствуют два типа деветвящих ферментов, которые различаются по субстратной специфичности, а именно деветвящие ферменты изоамилазного типа и деветвящие ферменты пуллулазазного типа (Myers et al., *Plant Physiology*, 122: 989-997, 2000). Мутации по 1 положению сахарного остатка в кукурузе и рисе связаны с дефицитом обоих деветвящих ферментов (James et al., *Plant Cell*, 7: 417-429, 1995; Kubo et al., *Plant Physiology*, 121: 399-409, 1999), однако казуальную мутацию вводят в такое же положение, как в гене деветвящего фермента изоамилазного типа.

Показано, что мутантная форма ячменя, обозначаемая M292 или M342, имеет фенотип, характеризующийся повышенным уровнем амилозного крахмала и пониженным уровнем амилопектинового крахмала. Предположительно данный фенотип оказывает благоприятное влияние на здоровье человека (Morell et al., *Plant J.* 34: 173-185, 2003; Topping et al., *Starch/Starke* 55: 539-545, 2003; Bird et al., *J. Nutr.* 134: 831-835, 2004; Bird et al. *Br. J. Nutr.* 92: 607-615, 2004). Он обусловлен мутацией в гене синтазы крахмала IIa (SSIIa), расположенном на хромосоме 7H ячменя, как описано в международной патентной заявке PCT/AU01/01452 (публикация № WO 02/37955), описание которой полностью включено в настоящий документ в качестве ссылки.

Мутация ячменя *sex6* является следствием присутствия стоп-кодона в гене синтазы крахмала IIa (SSIIa). Стоп-кодон вызывает преждевременное окончание трансляции транскрипта. Белок SSIIa не детектируется в эндосперме данного мутанта (Morell et al. 2003 (выше)). Утрата активности SSIIa приводит к уменьшению синтеза амилопектина на 80%, а оставшиеся амилопектиновые полимеры, как правило, имеют измененное распределение длин цепей и, следовательно, измененное отношение амилоза:амилопектин, в результате крахмал зерна содержит примерно 70% амилозы.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение предлагает повышение полезности растения ячменя путем увеличения содержания в зерне крахмала и отличных от крахмала компонентов. Модификация может присутствовать только в зерне или, альтернативно, она может присутствовать в разных тканях и частях растения. В данном описании термины "модификация" или "модифицированный" относятся к изменению в растении или зерне, которое может включать в себя увеличение или уменьшение количества, активности, скорости продукции, скорости инактивации, скорости разрушения, отсрочку начала экспрессии, раннее начало экспрессии, добавление или удаление вещества, мутацию или их сочетание при условии, что наблюдается пониженный уровень или пониженная активность синтазы крахмала II. Термины включают в себя увеличение или уменьшение функционального уровня представляющего интерес гена или белка. Следует понимать, что термин "функциональный уровень" относится к уровню активного белка. Функциональный уровень представляет собой сочетание фактического уровня белка, присутствующего в клетке-хозяине, и удельной активности белка. Соответственно функциональный уровень можно модифицировать, например, путем увеличения или уменьшения фактической концентрации белка в клетке-хозяине, что легко достигается путем изменения экспрессии гена, кодирующего белок. Функциональный уровень также можно модифицировать путем модуляции удельной активности белка. Увеличение или уменьшение удельной активности можно достичь путем экспрессии варианта белка, обладающего более высокой или более низкой удельной активностью, или путем замены эндогенного гена, кодирующего релевантный белок, аллелью, кодирующей такой вариант. Увеличение или уменьшение удельной активности также можно достичь путем модификации экспрессии эффекторной молекулы. В некоторых воплощениях уровень экспрессии соответствующей кодирующей последовательности или активности или количества фермента выбирают так, чтобы он был по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 80% или даже по меньшей мере примерно на 100%, по

меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 500%, или по меньшей мере на 1000% выше, или по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% ниже, чем контрольный уровень экспрессии, или он может быть снижен до недетектируемого уровня.

Другой способ определения необходимого уменьшения уровня или активности SSII включает в себя количественное определение в модифицированном растении или полученном из него зерне повышенного уровня или увеличения содержания в разных формах фруктана.

В данном описании термины "модификация", "изменение", "повышение", "повышенный", "понижение", "пониженный", "ингибированный", "мутантный" и т.п. считаются родственными терминами и определяют состояние в сравнении с состоянием дикого типа или неизменным состоянием. В некоторых воплощениях растение дикого типа может использоваться в качестве соответствующего "контрольного растения", однако во многих ситуациях контрольное растение определяет опытный специалист в данной области, используя традиционные навыки.

Термин "уровень белка" относится к количеству конкретного белка, например SSII, которое можно измерить с помощью известных в данной области способов, таких как, например, вестерн-блоттинг или другие иммунологические методы анализа.

Термин "уровень ферментативной активности" относится к количеству конкретного фермента, измеряемому с помощью ферментного анализа.

Термин "активность белка SSIIa" относится к количеству конкретного фермента, измеряемому с помощью ферментного анализа.

Следует понимать, что активность фермента в мутанте может измениться, если увеличить или уменьшить активность продуцируемого белка, но не уровень его экспрессии (количество). И наоборот, можно изменить количество белка, сохранив при этом его активность (на единицу белка). Кроме того, можно уменьшить и количество, и активность, например, путем уменьшения экспрессии гена, кодирующего фермент, на уровне транскрипции или на посттранскрипционном уровне. В некоторых воплощениях уровень или активность белка SSII уменьшается по меньшей мере на 40% или по меньшей мере на 60% по сравнению с уровнем или активностью белка в зерне немодифицированного ячменя или по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%. Уменьшение уровня белка, или активности фермента, или экспрессии гена можно осуществлять на любой стадии развития листа, семени или зерна, в особенности в дневное время, когда происходит фотосинтез, или в период налива зерна, когда в развивающемся эндосперме синтезируется крахмал, или на всех стадиях развития зерна на протяжении созревания. Термин "дикий тип" в настоящем описании имеет значение, традиционно используемое в области генетики, и включает в себя ячмень, сорт или генотип которого не подвергался изменениям, как описано в данном документе. Здесь описаны некоторые предпочтительные разновидности ячменя "дикого типа", такие как, например, сорт Himalaya.

Модифицированный фенотип можно получить путем частичного или полного ингибирования экспрессии гена SSIIa. Гидролизированные и негидролизированные зерна и их фракции анализируют с помощью хорошо известных в данной области методов, таких как SDS-PAGE и иммуноблоттинг, чтобы идентифицировать растения или зерна, которые содержат модификации крахмалобразующих ферментов. Указанные способы включают в себя анализ растений с помощью описанных здесь методов, а также с помощью таких методов, как анализ с использованием микроципов, электрофорез, хроматография (в том числе бумажная хроматография, тонкослойная хроматография, газовая хроматография, газо-жидкостная хроматография и высокоэффективная жидкостная хроматография). Разделенные компоненты обычно идентифицируют путем сравнения профилей разделения с профилями разделения известных стандартов или с помощью аналитических методов, таких как масс-спектрометрия и спектроскопия ядерного магнитного резонанса. Например, описание таких способов можно найти в Example 9, Robinson, *The Organic Constituents of Higher Plants*, Cordus Press, North Amherst, USA, 1980; Adams et al., *Anal. Biochem.*, 266: 77-84, 1999; Veronese et al., *Enz. Microbial Tech.*, 24: 263-269, 1999; Hendrix et al., *J. Insect Physiol.*, 47: 423-432, 2001; Thompson et al., *Carbohydrate Res.*, 331: 149-161, 2001 и в цитирующихся здесь ссылках. Углеводы можно анализировать с помощью стандартных методов, известных специалистам в данной области.

Изменение уровня или активности SSIIa можно осуществить путем введения одного или нескольких генетических изменений в растение ячменя. То есть генетические изменения приводят непосредственно или косвенно к изменению активности или уровня фермента в части растения в процессе роста или развития и, следовательно, к описанным здесь изменениям фермента, крахмала и фруктана. Генетическое изменение может включать в себя введение в растение или клетку-предшественник гетерологичного полинуклеотида, например, путем трансформации или мутагенеза. Затем генетическое изменение можно ввести в другую генетическую среду путем скрещивания с помощью способов, известных в области селекции растений. В некоторых воплощениях уровень или функциональная активность SSIIa подвергаются понижающей регуляции до уровня, составляющего менее чем примерно 80%, менее чем 70%, менее чем 60%, менее чем 50%, менее чем 40%, менее чем 30%, менее чем 20% или менее чем 15% и предпоч-

тительно менее чем примерно 10%, менее чем 9%, менее чем 8%, менее чем 7%, менее чем 6%, менее чем 5%, менее чем 4%, менее чем 3%, менее чем 2%, или менее чем 1% от соответствующих показателей контрольного растения, чтобы достичь повышенных уровней крахмала или отличных от крахмала компонентов, предпочтительно повышенного содержания амилозы в крахмале зерна. В предпочтительном воплощении повышенные уровни по меньшей мере в два раза превышают контрольные. Предпочтительно в данном воплощении указанное уменьшение приводит к значительному повышению уровня отличного от крахмала полисахарида, такого как фруктан, которое обычно составляет по меньшей мере примерно 50 или 55%, более предпочтительно по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более по отношению к соответствующему уровню в контрольном растении, наблюдающемуся в таких же условиях окружающей среды. Необходимая степень снижения уровня или активности SSIIa может зависеть от других факторов, таких как разновидность растения или факторы окружающей среды. Однако полагают, что любую оптимизацию, которая может потребоваться для такого процесса, можно осуществить с помощью рутинных методов, в том числе описанных здесь.

Пониженных уровней SSIIa в тканях всего растения можно достичь, например, с использованием конститутивного промотора, управляющего экспрессией гетерологичного полинуклеотида, который осуществляет понижающую регуляцию SSIIa. Предпочтительно снижение уровня SSIIa можно проводить в акцептирующих тканях, более предпочтительно в развивающемся эндосперме с использованием тканеспецифичного или зависимого от стадии развития промотора. Термины "акцептирующая клетка" и "акцептирующая ткань" в данном описании относятся к клеткам, тканям или органам, в которых существует чистый приток органического углерода, который входит в клетки в виде, отличном от фиксированного диоксида углерода, т.е. в виде сахаров или других углеводов. В растениях акцептирующие ткани включают в себя все нефотосинтезирующие ткани, а также фотосинтезирующие ткани с чистым притоком органического углерода, фиксированного другими фотосинтезирующими клетками, или иным образом полученного из окружающей среды с использованием средств, отличных от непосредственной фиксации диоксида углерода.

#### Гены.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение включает в себя модификацию активности и конструкции гена и применение химерных генов. В данном описании термин "ген" включает в себя любую дезоксирибонуклеотидную последовательность, содержащую участок, который кодирует белок или который транскрибируется в клетке, но не транслируется, и ассоциированные с ним некодирующие и регуляторные участки. Такие ассоциированные участки обычно расположены вблизи 5'- и 3'-концов кодирующего или транскрибируемого участка, с каждой стороны на расстоянии примерно 2 т.о. Входящие в состав гена ассоциированные участки могут включать в себя регуляторные элементы, такие как промоторы, энхансеры, сигналы терминирования и/или полиаденилирования, которые могут быть в природе связаны с данным геном, или могут представлять собой гетерологичные регуляторные элементы, в этом случае ген называют "химерным". Последовательности, примыкающие к 5'-концу кодирующего участка и присутствующие в мРНК, называют 5'-нетранслируемые последовательности. Последовательности, примыкающие к 3'-концу кодирующего участка или расположенные ниже и присутствующие в мРНК, называют 3'-нетранслируемые последовательности. Термин "ген" охватывает как кДНК, так и геномные формы гена.

Термин "ген синтазы крахмала II" "SSII" и т.п. в данном описании относится к нуклеотидной последовательности, кодирующей синтазу крахмала II (SSII) в ячмене, которую специалисты в данной области могут легко отличить от других синтаз крахмала или других белков. В предпочтительном воплощении ген SSII ячменя представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая может присутствовать в ячмене, или может быть выделена из ячменя, или может быть получена из него и которая содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную последовательности кДНК, описанной в SEQ ID NO: 1. В предпочтительном воплощении ген SSII представляет собой ген SSIIa или белок SSII представляет собой белок SSIIa, каждый из которых можно применить к одному из аспектов или ко всем аспектам изобретения, раскрытого в настоящем описании. Нуклеотидная последовательность кДНК гена SSIIa из M292 описана в SEQ ID NO: 9.

Геномная форма или клон гена содержит транскрибируемый участок, в который могут быть встроены некодирующие последовательности, называемые "интроны", или "встроенные участки", или "встроенные последовательности". Термин "интрон" в данном описании относится к сегменту гена, который транскрибируется как часть первичного транскрипта РНК, но отсутствует в зрелой молекуле РНК. Интроны удаляются из ядерного или первичного транскрипта в процессе "сплайсинга"; таким образом, интроны отсутствуют в матричной РНК (мРНК). Интроны могут содержать регуляторные элементы, такие как энхансеры. Термин "экзоны" в данном описании относится к участкам ДНК, соответствующим последовательностям РНК, которые присутствуют в молекуле зрелой мРНК или зрелой РНК, в случае, если молекула РНК не транслируется. Функция мРНК в процессе трансляции заключается в определении последовательности или порядка аминокислот в образующемся полипептиде. Термин "ген" включает в себя синтетическую или гибридную молекулу, кодирующую полноразмерные белки настоящего изобретения

или их фрагменты, а также нуклеотидную последовательность, комплементарную одной из указанных выше. Ген можно ввести в подходящий вектор, способный существовать в клетке вне хромосомы или способный интегрироваться в геном хозяина.

В данном описании термин "химерный ген" относится к любому гену, который не является нативным геном в его природном местоположении. Как правило, химерный ген содержит регуляторные и транскрибируемые или кодирующие белок последовательности, которые не встречаются вместе в природе. Соответственно химерный ген содержит регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, полученные из разных источников, или регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, полученные из одного источника, но расположенные в таком порядке, который отсутствует в природе. Термин "эндогенный" используется в настоящем описании для обозначения вещества, которое обычно присутствует или продуцируется в немодифицированном растении на той же стадии развития, на которой находится исследуемое растение. Термин "эндогенный ген" относится к нативному гену в его природном местоположении в геноме организма. В данном описании термин "рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая была сконструирована или модифицирована с помощью методов рекомбинантных ДНК. Термины "чужеродный полинуклеотид", или "экзогенный полинуклеотид", или "гетерологичный полинуклеотид" и т.п. относятся к любой нуклеиновой кислоте, введенной в геном клетки посредством экспериментальных манипуляций. Указанные термины включают в себя генные последовательности, обнаруженные в клетке, при условии, что введенный ген содержит некоторые изменения (такие как мутация, присутствие селектируемого маркерного гена и другие) по сравнению с природным геном. Чужеродные или экзогенные гены могут представлять собой гены, вставленные в неприродный организм, нативные гены, введенные в новое положение в нативном хозяине, или химерные гены. "Трансген" представляет собой ген, введенный в геном посредством процедуры трансформации. Термин "генетически модифицированный" включает в себя введение генов в клетки путем трансформации или трансдукции, мутагенез генов в клетках и изменение или модуляцию регуляции гена в клетке или организме, к которым применялись указанные действия, или в их потомстве.

#### Полинуклеотиды.

Настоящее изобретение, включающее в себя описание, таблицы и список последовательностей, относится к разным полинуклеотидам. В настоящем описании термин "полинуклеотид", или "нуклеиновая кислота", или "молекула нуклеиновой кислоты" обозначает полимер из нуклеотидов, который может представлять собой ДНК или РНК или их сочетание, и включает в себя мРНК, кРНК, кДНК, тРНК, миРНК, shРНК и hpРНК. Данный термин может относиться к ДНК или РНК клеточного, геномного или синтетического происхождения, например, полученной с помощью автоматического синтезатора, которая может образовывать комплекс с углеводами, липидами, белками и другими веществами, может содержать флуоресцентные и другие метки, или может быть присоединена к твердому носителю с целью выполнения определенной функции, указанной в данном описании, или она может содержать один или несколько модифицированных нуклеотидов, отсутствующих в природе, хорошо известных специалистам в данной области. Полимер может быть одноцепочечным, в основном двухцепочечным или частично двухцепочечным. Примером частично двухцепочечной молекулы РНК является шпилечная РНК (hpРНК), короткая шпилечная РНК (shРНК) или самокомплементарная RNA, которая содержит двухцепочечный участок, образованный в результате спаривания оснований, находящихся на комплементарных нуклеотидных последовательностях, и петлеобразную последовательность, в которой комплементарные нуклеотидные последовательности соединены ковалентно. В данном описании термин "спаривание оснований" относится к стандартному спариванию нуклеотидов, включающему в себя образование пар G:U. Термин "комплементарные" относится к двум полинуклеотидам, способным к спариванию оснований (гибридизации) на протяжении части последовательности или по всей длине последовательности одного или обоих полинуклеотидов. Термин "способный к гибридации полинуклеотид" относится к полинуклеотиду, который в действительности способен к спариванию оснований с комплементарной ему последовательностью. Термин "полинуклеотид" и термин "нуклеиновая кислота" используются как взаимозаменяемые.

Термин "выделенный" относится к веществу, которое в основном или практически не содержит компоненты, обычно сопутствующие ему в нативном состоянии. В данном описании термин "выделенный полинуклеотид" или "выделенная молекула нуклеиновой кислоты" относится к полинуклеотиду, который, по меньшей мере, частично отделен от полинуклеотидных последовательностей, с которыми он ассоциирован или связан в нативном состоянии, или который в основном или практически не содержит такие полинуклеотидные последовательности. Например, "выделенный полинуклеотид" включает в себя полинуклеотид, очищенный или отделенный от последовательностей, которые фланкируют его в природном состоянии, например, фрагмент ДНК, который был отделен от последовательностей, которые обычно примыкают к данному фрагменту. Кроме того, предпочтительно выделенный полинуклеотид по меньшей мере на 90% освобожден от других компонентов, таких как белки, углеводы, липиды и другие. Термин "рекомбинантный полинуклеотид" в данном описании относится к полинуклеотиду, полученному *in vitro* в результате манипуляций с нуклеиновой кислотой в виде формы, обычно не встречающейся в

природе. Например, рекомбинантный полинуклеотид может находиться в виде вектора экспрессии. Как правило, такие векторы экспрессии содержат нуклеиновую кислоту, регулирующую транскрипцию и трансляцию, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью.

Настоящее изобретение относится к применению олигонуклеотидов. В данном описании термин "олигонуклеотиды" обозначает полинуклеотиды, содержащие до 50 нуклеотидов в длину. Они могут представлять собой РНК, ДНК или их сочетания или производные. Олигонуклеотиды, как правило, представляют собой относительно короткие одноцепочечные молекулы, содержащие от 10 до 30 олигонуклеотидов, обычно 15-25 нуклеотидов в длину. Минимальный размер олигонуклеотида, используемого в качестве зонда или в качестве праймера в реакции амплификации, представляет собой размер, необходимый для образования стабильного гибрида олигонуклеотида и комплементарной последовательности, входящей в состав целевой молекулы нуклеиновой кислоты. Предпочтительно олигонуклеотиды содержат по меньшей мере 15 нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере 18 нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере 19 нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере 20 нуклеотидов, еще более предпочтительно по меньшей мере 25 нуклеотидов в длину.

В качестве зонда обычно используют полинуклеотиды, конъюгированные с детектируемой меткой, такой как радиоизотоп, гаптен, фермент, биотин, флуоресцентная или хемилюминесцентная молекула. Олигонуклеотиды данного изобретения можно использовать в способах детекции аллеля SSII или другого гена, связанного с представляющим интерес признаком, таким как измененные уровни крахмала или фруктана. Такие способы могут быть основаны, например, на гибридизации нуклеиновых кислот и зачастую включают в себя удлинение олигонуклеотидного праймера под действием подходящей полимеразы (как в методе ПЦР).

Вариант олигонуклеотида данного изобретения включает в себя молекулы разных размеров, способные гибридизоваться, например, с участком генома зерновых, близким описанным здесь специфическим олигонуклеотидным молекулам. Например, варианты могут содержать дополнительные нуклеотиды (например, 1, 2, 3, 4 или более) или меньше нуклеотидов при условии, что они сохраняют способность гибридизоваться с целевым участком. Кроме того, несколько нуклеотидов можно заменить, не оказывая неблагоприятного влияния на способность олигонуклеотида гибридизоваться с целевым участком. Кроме того, можно легко сконструировать варианты, которые гибридизуются с участком, находящимся вблизи, например, на расстоянии, не превышающем 50 нуклеотидов, участка растительного генома, с которым гибридизуются описанные здесь специфические олигонуклеотиды. Зонды, олигонуклеотиды и т.п. включают в себя описанные здесь последовательности или их корректные версии или варианты или функциональные гомологи из других зерновых растений.

Термины "полинуклеотидный вариант", "вариант" и т.п. относятся к полинуклеотидам или комплементарным им формам, последовательности которых в значительной степени идентичны исходной полинуклеотидной последовательности. Данные термины также охватывают полинуклеотиды, полученные из исходного полинуклеотида путем добавления, делеции или замены по меньшей мере одного нуклеотида. Соответственно термины "полинуклеотидный вариант" и "вариант" включают в себя полинуклеотиды, в которых один или несколько нуклеотидов добавлены, или удалены, или замещены другими нуклеотидами. В этой связи в данной области хорошо известно, что в исходный полинуклеотид можно внести некоторые изменения, включающие в себя мутации, добавления, делеции и замены, так, что полученный в результате измененный полинуклеотид сохраняет биологическую функцию или активность исходного полинуклеотида. Соответственно указанные термины охватывают полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, обладающие ферментативной или другой регуляторной активностью, или полинуклеотиды, которые можно использовать в качестве селективных зондов или других способных к гибридизации средств. В частности, к ним относятся полинуклеотиды, которые кодируют одинаковые полипептидные или аминокислотные последовательности, но которые имеют разные нуклеотидные последовательности в результате избыточности генетического кода. Термины "полинуклеотидный вариант" и "вариант" также включают в себя встречающиеся в природе аллельные варианты.

Под термином "соответствует" или "соответствующий" подразумевают полинуклеотид, (а) имеющий нуклеотидную последовательность, которая практически идентична или комплементарна полноразмерной исходной полинуклеотидной последовательности или большей ее части, или (б) кодирующий аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности пептида или белка. В объем данного термина также входит пептид или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая практически идентична последовательности аминокислот в исходном пептиде или белке. Для описания взаимоотношения последовательностей двух или более полинуклеотидов или полипептидов используют такие термины, как "исходная последовательность", "окно сравнения", "идентичность последовательностей", "процент идентичности последовательностей", "практическая идентичность" и "идентичный", которые могут применяться в отношении к минимальному числу нуклеотидов или аминокислотных остатков или к полной длине последовательностей. Термины "идентичность последовательностей" и "идентичность" используются в настоящем описании как взаимозаменяемые для обозначения степени, в которой последовательности являются идентичными по нуклеотидному или аминокислотному составу на протяжении окна сравнения. Так "процент идентичности последовательностей"

рассчитывают путем сравнения двух оптимально выравненных последовательностей в окне сравнения, определения числа положений обеих последовательностей, в которых находятся идентичные нуклеиновые основания (например, A, T, C, G, U) или идентичные аминокислотные остатки (например, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys и Met) с получением числа совпадающих положений, деления числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения (т.е. на размер окна) и умножения результата на 100.

Процент идентичности полинуклеотидов можно определить с помощью анализа GAP (Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443-453, 1970) (программа GCG) с использованием штрафа за открытие гэпа=5 и штрафа за продолжение гэпа=0,3. Если не указано иначе, длина запрашиваемой последовательности составляет по меньшей мере 45 нуклеотидов, и с помощью анализа GAP выравнивают две последовательности на протяжении участка, составляющего по меньшей мере 45 нуклеотидов. Предпочтительно длина запрашиваемой последовательности составляет по меньшей мере 150 нуклеотидов, и с помощью анализа GAP выравнивают две последовательности на протяжении участка, составляющего по меньшей мере 150 нуклеотидов. Более предпочтительно длина запрашиваемой последовательности составляет по меньшей мере 300 нуклеотидов, и с помощью анализа GAP выравнивают две последовательности на протяжении участка, составляющего по меньшей мере 300 нуклеотидов, или по меньшей мере 400, по меньшей мере 500 или по меньшей мере 600 нуклеотидов в каждом случае. Можно также использовать семейство программ BLAST, как описано, например, в Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25: 3389, 1997. Подробное обсуждение анализа последовательностей можно найти в разделе 19.3 Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15.

Нуклеотидные или аминокислотные последовательности называют "практически подобными", если такие последовательности идентичны по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, особенно предпочтительно по меньшей мере на 95% и наиболее предпочтительно, если такие последовательности являются полностью идентичными. Разумеется, если указано, что последовательности РНК являются практически подобными, соответствующими или в определенной степени идентичными последовательностям ДНК, тимин (Т) в последовательности ДНК считается эквивалентным урацилу (U) в последовательности РНК.

В отношении определенных полинуклеотидов следует понимать, что значения % идентичности, превышающие указанные значения, составляют предпочтительные воплощения. Так, если это применимо, с учетом минимальных значений % идентичности полинуклеотид предпочтительно содержит полинуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,1%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,2%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,3%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,4%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,5%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,6%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,7%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,8% и еще более предпочтительно по меньшей мере на 99,9% идентична релевантной представленной SEQ ID NO, такой как SEQ ID NO: 1 или 3-6.

Предпочтительно полинуклеотид данного изобретения, который кодирует полипептид с активностью SSII, содержит более 800, предпочтительно более 900 и еще более предпочтительно более 1000 или 2000 нуклеотидов в длину.

Полинуклеотиды настоящего изобретения могут содержать по сравнению с молекулами, встречающимися в природе, одну или несколько мутаций, которые представляют собой делеции, вставки или замены нуклеотидных остатков. Мутанты могут быть либо природными (то есть выделенными из природного источника) либо синтетическими (например, полученные путем направленного мутагенеза нуклеиновой кислоты).

Настоящее изобретение включает в себя применение жестких условий гибридизации для определения степени комплементарности двух полинуклеотидов. Термин "жесткость" в данном описании относится к условиям проведения гибридизации и промывания, включающим в себя температуру, ионную силу и присутствие или отсутствие некоторых органических растворителей. Чем выше жесткость, тем выше степень комплементарности целевой нуклеотидной последовательности и меченой полинуклеотидной последовательности (зонда). Термин "жесткие условия" относится к температуре и ионной силе, при которых гибридизуются только нуклеотидные последовательности с высокой встречаемостью комплементарных оснований. В данном описании термин "гибридизация в условиях низкой жесткости, средней жесткости, высокой жесткости или очень высокой жесткости" описывает условия гибридизации и промывания. Руководство по проведению реакций гибридизации можно найти в Ausubel et al., (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, 6.3.1-6.3.6., 1989. В этой работе описаны водные и неводные способы, любые из которых можно использовать. В соответствии с настоящим изобретением

бретением можно использовать следующие конкретные условия гибридизации: 1) условия низкой жесткости включают в себя проведение гибридизации в присутствии 6X хлорид натрия/цитрат натрия (SSC) при 45°C, и затем двух промываний с использованием 0,2X SSC, 0,1% SDS при 50-55°C; 2) условия средней жесткости включают в себя проведение гибридизации в присутствии 6X SSC примерно при 45°C, и затем одного или нескольких промываний с использованием 0,2X SSC, 0,1% SDS при 60°C; 3) условия высокой жесткости включают в себя проведение гибридизации в присутствии 6X SSC при 45°C, и затем одного или нескольких промываний с использованием 0,2X SSC, 0,1% SDS при 65°C; и 4) условия очень высокой жесткости включают в себя проведение гибридизации в присутствии 0,5M натрий-фосфатного буфера, 7% SDS при 65°C и затем одного или нескольких промываний с использованием 0,2X SSC, 1% SDS при 65°C.

#### Полипептиды.

Термины "полипептид" и "белок" обычно используют как взаимозаменяемые. Термины "белки" и "полипептиды" в соответствии с данным описанием также включают в себя варианты, мутанты, модификации, аналоги и/или производные полипептидов настоящего изобретения, как описано в данном документе. Термин "практически очищенный полипептид" относится здесь к полипептиду, отделенному от липидов, нуклеиновых кислот, других пептидов и других молекул, с которыми он ассоциирован в природном состоянии. Предпочтительно практически очищенный полипептид по меньшей мере на 90% освобожден от других компонентов, с которыми он ассоциирован в природе. Под термином "рекомбинантный полипептид" подразумевают полипептид, полученный рекомбинантными методами, т.е. путем экспрессии рекомбинантного полинуклеотида в клетке, предпочтительно в клетке растения и более предпочтительно в клетке злакового растения.

Примеры полипептидов, обладающих активностью SSII, приведены в списке последовательностей и описаны в табл. 8. Соответственно настоящее изобретение предлагает, без ограничения, модификации полипептидов SSII, имеющих аминокислотные последовательности, описанные в SEQ ID NO: 2, а также природные варианты, их исправленные версии и варианты, описанные в данном документе, такие как варианты, обладающие примерно 80% идентичностью последовательности.

Следует понимать, что в отношении к определенному полипептиду значения % идентичности, превышающие указанные выше, составляют предпочтительные воплощения. Так, если это применимо, с учетом минимальных значений % идентичности, полипептид предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,1%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,2%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,3%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,4%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,5%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,6%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,7%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,8% и еще более предпочтительно по меньшей мере на 99,9% идентична релевантной представленной SEQ ID NO 2.

Процент идентичности полипептида другому полипептиду можно определить с помощью анализа GAP (Needleman and Wunsch, 1970 (выше)) (программа GCG) с использованием штрафа за открытие гэпа=5 и штрафа за продолжение гэпа=0,3. Длина запрашиваемой последовательности составляет по меньшей мере 15 аминокислот, и с помощью анализа GAP выравнивают две последовательности на протяжении участка, составляющего по меньшей мере 15 аминокислот. Более предпочтительно длина запрашиваемой последовательности составляет по меньшей мере 50 аминокислот, и с помощью анализа GAP выравнивают две последовательности на протяжении участка, составляющего по меньшей мере 50 аминокислот. Более предпочтительно длина запрашиваемой последовательности составляет по меньшей мере 100 аминокислот, и с помощью анализа GAP выравнивают две последовательности на протяжении участка, составляющего по меньшей мере 100 аминокислот. Еще более предпочтительно длина запрашиваемой последовательности составляет по меньшей мере 250 аминокислот, и с помощью анализа GAP выравнивают две последовательности на протяжении участка, составляющего по меньшей мере 250 аминокислот.

Используемый здесь "биологически активный" фрагмент полипептида является частью полипептида настоящего изобретения, которая имеет размер меньше, чем полная длина полипептида, и сохраняет определенную активность полноразмерного полипептида. В особенно предпочтительном воплощении биологически активный фрагмент способен к синтезу крахмала с получением цепей амилозы, в которых содержание DP составляет по меньшей мере 15. Биологически активные фрагменты могут иметь любой размер при условии сохранения заданной активности, однако предпочтительно их длина составляет по меньшей мере 200 или по меньшей мере 250 аминокислотных остатков.

Мутантные аминокислотные последовательности полипептидов настоящего изобретения можно получить путем введения соответствующих нуклеотидных изменений в нуклеиновую кислоту настоящего изобретения или путем синтеза *in vitro* целевого полипептида. Такие мутантные последовательности включают в себя, например, делеции, инсерции или замены остатков аминокислотной последовательности. Для получения конечной конструкции можно использовать сочетание делеции, инсерции и замены при условии, что конечный пептидный продукт обладает желательными характеристиками.

Мутантные (измененные) пептиды можно получить с помощью любого известного в данной области метода. Например, полинуклеотид настоящего изобретения можно подвергнуть мутагенезу *in vitro*. Способы осуществления мутагенеза *in vitro* включают в себя субклонирование полинуклеотида в подходящем векторе, трансформацию вектором "мутируемого" штамма, такого как *E. coli* XL-1 red (Stratagene) и размножение трансформированной бактерии до получения подходящего числа поколений. В другом примере полинуклеотиды настоящего изобретения подвергают методам перетасовки ДНК, подробно описанным Nagayama, Trends Biotechnol. 16: 76- 82, 1998. Для проведения указанных методов перетасовки ДНК можно использовать гены, родственные генам настоящего изобретения, такие как гены SSII из видов растений, отличных от пшеницы или ячменя, и/или другие гены из того же растения, кодирующие подобные белки, такие как гены синтазы крахмала I или III пшеницы или ячменя. Продукты, полученные с использованием мутантной/измененной ДНК, можно подвергнуть скринингу с помощью описанных здесь методов, чтобы определить, обладают ли они, например, активностью синтазы крахмала.

При конструировании мутантных аминокислотных последовательностей местоположение и природа мутации зависят от признака (признаков), подлежащих изменению. Участки введения мутаций можно изменять по отдельности или последовательно, например, (1) вначале путем замен на консервативные аминокислоты и затем путем более радикальных замен в зависимости от достигнутых результатов, (2) путем делеции целевого остатка или (3) путем вставки других остатков, примыкающих к указанному участку.

Делеции в аминокислотной последовательности, как правило, включают в себя удаление примерно от 1 до 15 остатков, более предпочтительно примерно от 1 до 10 остатков и чаще всего примерно от 1 до 5 смежных остатков.

Замены включают в себя удаление по меньшей мере одного аминокислотного остатка и вставку на его место другого остатка. Участки, представляющие наибольший интерес с точки зрения заместительного мутагенеза, включают в себя положения, идентифицированные как активный участок (активные участки). Также представляют интерес участки, в которых отдельные остатки являются идентичными у разных штаммов или видов. Такие положения могут иметь большое значение для биологической активности. В указанных участках, особенно в тех, которые входят в состав последовательности, включающей в себя по меньшей мере три других идентично консервативных участка, предпочтительно проводят относительно консервативные замены. Такие консервативные замены показаны в табл. 10 под заголовком "Примеры замен".

Полипептиды настоящего изобретения можно получить разными способами, включающими в себя получение и выделение природных полипептидов, получение и выделение рекомбинантных полипептидов и химический синтез полипептидов. В одном воплощении выделенный полипептид настоящего изобретения получают путем культивирования клетки, способной экспрессировать полипептид в условиях, эффективных для получения полипептида, и выделения полипептида. Предпочтительной клеткой, используемой для культивирования, является рекомбинантная клетка настоящего изобретения. Эффективные условия культивирования включают в себя, без ограничения, эффективную среду, биореактор, температуру, pH и содержание кислорода, которые обеспечивают продукцию полипептида. Эффективная среда представляет собой любую среду, в которой можно культивировать клетку с получением полипептида настоящего изобретения. Такая среда, как правило, включает в себя водную среду, содержащую усваиваемые источники углерода, азота и фосфата, а также подходящие соли, минералы, металлы и другие питательные вещества, такие как витамины. Клетки настоящего изобретения можно культивировать в традиционных ферментационных биореакторах, встряхиваемых колбах, пробирках, микротитрационных чашках и чашках Петри. Рекомбинантную клетку можно культивировать при подходящих значениях температуры, pH и содержания кислорода. Выбор таких условий культивирования находится в пределах компетенции рядового специалиста в данной области.

Настоящее изобретение относится к функционально соединенным или связанным элементам. Термины "функционально соединенный" или "функционально связанный" и т.п. относятся к функциональной взаимосвязи полинуклеотидных элементов. Как правило, функционально связанные нуклеотидные последовательности соединены непосредственно друг с другом, а если нужно соединить два участка, кодирующих белки, их располагают по соседству друг с другом в рамке считывания. Кодирующая последовательность "функционально связана" с другой кодирующей последовательностью, если две кодирующие последовательности транскрибируются под действием РНК-полимеразы в одну РНК, которая транслируется, если трансляция имеет место, в один полипептид, содержащий аминокислоты, кодируемые двумя кодирующими последовательностями. Кодирующие последовательности могут не примыкать одна к другой при условии, что экспрессируемые последовательности в конечном счете после процес-

синга дают целевой белок.

В данном описании термины "цис-действующая последовательность", "цис-действующий элемент" или "цис-регуляторный участок", или "регуляторный участок", или подобные им термины используют для обозначения любой последовательности нуклеотидов, которая при соответствующем расположении и соединении с экспрессируемой геной последовательностью способна регулировать, по меньшей мере, частично экспрессию геной последовательности. Специалистам в данной области известно, что цис-регуляторный участок может осуществлять активацию экспрессии, сайленсинг гена, повышение, подавление или иное изменение уровня экспрессии и/или он может отвечать за клеточную специфичность и/или специфичность к стадии развития геной последовательности на транскрипционном или посттранскрипционном уровне. В некоторых воплощениях настоящего изобретения цис-действующая последовательность представляет собой активаторную последовательность, которая повышает или стимулирует экспрессию геной последовательности.

Термин "функционально связанный" в отношении промоторного или энхансерного элемента и транскрибируемого полинуклеотида означает, что транскрибируемый полинуклеотид (например, полинуклеотид, кодирующий белок, или другой транскрипт) помещают под регуляторный контроль промотора, который впоследствии регулирует транскрипцию данного полинуклеотида. При конструировании сочетаний гетерологичный промотор/структурный ген, как правило, предпочитают располагать промотор или его вариант на расстоянии от участка начала транскрипции транскрибируемого полинуклеотида, которое примерно равно расстоянию между промотором и регулируемым им белок-кодирующим участком, присутствующему в природе; т.е. в гене, из которого получен промотор. Как известно в данной области, некоторые изменения этого расстояния можно использовать без потери функции. Подобным образом, предпочтительное положение последовательности регуляторного элемента (например, оператора, энхансера и других) по отношению к регулируемому им транскрибируемому полинуклеотиду определяется положением элемента в природном окружении; т.е. в гене, из которого он получен.

Термин "промотор" или "промоторная последовательность" в настоящем описании относится к участку гена, обычно расположенного выше по ходу считывания (5') РНК-кодирующего участка, который контролирует инициацию и уровень транскрипции в представляющей интерес клетке. "Промотор" включает в себя последовательности, регулирующие транскрипцию классического геномного гена, такие как последовательности ТАТА-блока и ССАТ-блока, а также другие регуляторные элементы (т.е. расположенные выше активирующие последовательности, энхансеры и сайленсеры), которые изменяют экспрессию гена в ответ на дифференцировочные стимулы и/или стимулы окружающей среды или обеспечивают тканеспецифичную или клеточно-специфичную экспрессию гена. Промотор чаще всего, но не обязательно (например, некоторые промоторы PolIII), располагают выше структурного гена, экспрессию которого он регулирует. Кроме того, регуляторные элементы, содержащие промотор, обычно располагают на расстоянии 2 т.о. от участка начала транскрипции. Промоторы могут содержать другие специфические регуляторные элементы, расположенные дальше от участка начала транскрипции, которые позволяют дополнительно увеличить экспрессию в клетке и/или изменить хронирование или индуцируемость экспрессии структурного гена, с которым они функционально связаны.

Термин "конститутивный промотор" относится к промотору, который управляет экспрессией функционально связанной с ним транскрибируемой последовательности во многих или во всех тканях растения. Термин конститутивный в данном описании не обязательно указывает на то, что ген экспрессируется в клетках всех типов на одинаковом уровне, но что ген экспрессируется в широком диапазоне клеток, хотя часто детектируются некоторые изменения уровня. Термин "селективная экспрессия" в настоящем описании относится к экспрессии почти исключительно в отдельных органах растения, таких как, например, эндосперм, зародыш, листья, плоды, клубни или корни. В одном воплощении промотор экспрессируется во всех фотосинтезирующих тканях, которые могут соответствовать всем надземным частям растения, примером такого промотора является промотор, участвующий в экспрессии гена, необходимого для фотосинтеза, такой как промотор малой субъединицы рибулозо-1,5-бифосфаткарбоксилазы/оксигеназы. Термин также может относиться к экспрессии на отдельных стадиях развития органа, таких как ранний или поздний эмбриогенез или разные стадии созревания; или к экспрессии, индуцируемой некоторыми условиями или воздействиями окружающей среды. Таким образом, селективную экспрессию можно противопоставить конститутивной экспрессии, которая осуществляется во многих или во всех тканях растения в любых или почти в любых условиях, воздействующих на растение.

Селективная экспрессия также может приводить к компартиментализации продуктов экспрессии генов в отдельных тканях или органах растений или на отдельных стадиях развития. Распределение по конкретным субклеточным компартаментам, таким как эндосперм, цитозоль, вакуоли или апопластическое пространство, можно осуществлять путем включения в структуру геномного продукта соответствующих сигналов, обеспечивающих транспорт в нужный клеточный компартамент, или в случае полуавтономных органелл (пластиды и митохондрии) путем интеграции транскена, содержащего подходящие регуляторные последовательности, непосредственно в геном органеллы.

"Тканеспецифичный промотор" или "органоспецифичный промотор" представляет собой промотор,

который селективно экспрессируется в одной ткани или в одном органе по сравнению с многими другими тканями или органами, предпочтительно с большей частью, если не со всеми другими тканями или органами растения. Как правило, уровень экспрессии промотора в специфической ткани или в специфическом органе в 10 раз превышает уровень экспрессии в других тканях или органах. Примером тканеспецифичного промотора является промотор гена высокомолекулярного (НМВ) глютеина, Vx17, который преимущественно экспрессируется в развивающемся эндосперме злаковых растений. Другие эндоспермспецифичные промоторы включают в себя промотор высокомолекулярного глютеина, промотор SSI пшеницы и промотор BE II пшеницы. Другие эндоспермспецифичные промоторы можно легко получить из генов, которые кодируют ферменты биосинтеза крахмала или запасные белки в развивающемся зерне.

Промоторы, охватываемые настоящим изобретением, могут быть нативными по отношению к растению-хозяину или они могут быть получены из альтернативного источника, в этом случае промоторный участок должен быть способен к функционированию в растении-хозяине. Другие источники включают в себя гены Т-ДНК *Agrobacterium*, такие как промоторы генов биосинтеза нопалина, октапина, маннопина или другие опиновые промоторы; растительные промоторы, такие как промоторы убиквитина, например промотор Ubi из гена кукурузы ubi-1, Christensen et al., (1996) (см., например, патент US № 4962028) или промоторы актина; тканеспецифичные промоторы (см., например, патент США № 5459252, Conkling et al.; WO 91/13992, Advanced Technologies); промоторы вирусов (включающих в себя хозяинспецифичные вирусы) или частично или полностью синтетические промоторы. В данной области известно большое число промоторов, способных функционировать в однодольных и двудольных растениях (см., например, Greve J. Mol. Appl. Genet., 1: 499-511, 1983; Salomon et al., EMBO J., 3: 141-146, 1984; Garfinkel et al., Cell, 27: 143-153, 1983; Barker et al., Plant Mol. Biol., 2: 235-350, 1983); они включают в себя разные промоторы, выделенные из растений и вирусов, такие как промотор вируса мозаики цветной капусты (CaMV 35S, 19S). Известно много тканеспецифичных промоторных участков. Другие участки инициации транскрипции, которые преимущественно обеспечивают транскрипцию в отдельных тканях или в определенных условиях роста, включают в себя участки, полученные из генов, кодирующих напин, АСР семян, зеин или другие запасные белки семян. Также известны плодоспецифичные промоторы, такие как промотор E8, описанный Deikman et al., EMBO J., 2: 3315-3320, 1998 и DellaPenna et al., Plant Cell, 1: 53-63, 1989. Неограничивающие способы определения промоторной активности раскрыты Medberry et al., Plant Cell, 4: 185-192, 1992; Medberry et al., Plant J. 3: 619-626, 1993, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.). Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY, 1989 и McPherson et al. (патент США № 5164316).

Альтернативно или дополнительно промотор может представлять собой индуцируемый промотор или зависимый от стадии развития промотор, который может управлять экспрессией введенного полинуклеотида на соответствующей стадии развития растения. Другие заслуживающие особого внимания и подходящие для применения последовательности включают в себя энхансеры транскрипции и/или трансляции. Энхансерные участки хорошо известны специалистам в данной области и могут включать в себя кодон инициации трансляции АТГ и примыкающие к нему последовательности. Кодон инициации должен функционировать синхронно с рамкой считывания кодирующей последовательности, включающей в себя чужеродный или экзогенный полинуклеотид, чтобы обеспечить трансляцию полноразмерной последовательности. Сигналы, регулирующие трансляцию, и кодоны инициации могут иметь разное происхождение как природное, так и синтетическое. Участки инициации трансляции можно получить из источника участков инициации транскрипции или из чужеродного или экзогенного полинуклеотида. Последовательность также можно получить из источника промотора, используемого для управления транскрипцией, и ее можно специфически модифицировать с целью увеличения трансляции мРНК.

Конструкция нуклеиновой кислоты настоящего изобретения обычно содержит 3'-нетранслируемую последовательность, состоящую примерно из 50-1000 пар нуклеотидных оснований, которые могут включать в себя последовательность терминации транскрипции. 3'-Нетранслируемая последовательность может содержать сигнал терминации транскрипции, который необязательно может включать в себя сигнал полиаденилирования и другие регуляторные сигналы, способные влиять на процессинг мРНК. Сигнал полиаденилирования участвует в добавлении полиадениловой кислоты к 3'-концу предшественника мРНК. Сигналы полиаденилирования обычно распознают по наличию гомологии с канонической формой 5'-ААТAAA-3', хотя часто встречаются вариации. Последовательности терминации транскрипции, в которых отсутствует сигнал полиаденилирования, содержат терминаторы для РНК-полимеразы PolII или PolIII, которые включают в себя участок из четырех или более остатков тимидина. Примеры подходящих 3'-нетранслируемых последовательностей представляют собой 3'-транскрибируемые нетранслируемые участки, содержащие сигнал полиаденилирования из гена нопалин-синтазы (nos) *Agrobacterium tumefaciens* (Bevan et al., Nucl Acid Res., 11: 369, 1983) и терминатор транскрипта Т7 из гена октопин-синтазы *Agrobacterium tumefaciens*. Альтернативно подходящие 3'-нетранслируемые последовательности можно получить из растительных генов, например из 3'-конца генов ингибитора протеазы I или II картофеля или томата, генов запасных белков соевых бобов и гена малой субъединицы рибулозо-1,5-бифосфаткарбоксилазы (ssRUBISCO), хотя можно использовать и другие 3'-элементы, известные специалистам в данной области. Альтернативно 3'-нетранслируемые регуляторные последовательности

можно получить *de novo*, как описано, например, в An, *Methods in Enzymology*, 153: 292, 1987, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Поскольку последовательность ДНК, находящаяся между участком инициации транскрипции и началом кодирующей последовательности, т.е. нетранслируемая 5'-лидерная последовательность (5'UTR), может влиять на экспрессию гена, также можно использовать определенную лидерную последовательность. Подходящие лидерные последовательности включают в себя последовательности, обеспечивающие непосредственную оптимизацию экспрессии чужеродной или эндогенной последовательности ДНК. Например, такие лидерные последовательности включают в себя предпочтительную консенсусную последовательность, которая может повышать или поддерживать стабильность мРНК и предотвращать некорректную инициацию трансляции, как описано, например, в Joshi, *Nucl Acid Res.* 15: 6643, 1987.

Кроме того, можно использовать направляющие последовательности, которые обеспечивают направление фермента, кодируемого чужеродным или экзогенным полинуклеотидом, во внутриклеточный компартмент, например в хлоропласт, находящийся в клетке растения, или во внеклеточную среду. Например, нуклеотидная последовательность, кодирующая транзитную или сигнальную пептидную последовательность, может быть функционально связана с последовательностью, кодирующей выбранный фермент настоящего изобретения, так что после трансляции транзитный или сигнальный пептид может транспортировать фермент в конкретное внутриклеточное или внеклеточное место назначения, после чего его необязательно подвергают посттрансляционному удалению. Действие транзитных или сигнальных пептидов заключается в обеспечении транспорта белков через внутриклеточные мембраны, такие как мембраны эндоплазматического ретикула, вакуолей, везикул, пластид, митохондрий и плазмалемма. Например, направляющая последовательность может направлять целевой белок к конкретной органелле, отличной от цитозоля, такой как вакуоль или пластида (например, хлоропласт). Таким образом, нуклеотидная конструкция настоящего изобретения может дополнительно содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую пептид доставки в пластиду, функционально связанную с промоторным участком и чужеродным или экзогенным полинуклеотидом.

#### Векторы.

Настоящее изобретение включает в себя применение векторов для манипуляций или переноса генетических конструкций. Термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, предпочтительно молекуле ДНК, полученной, например, из плазмиды, бактериофага или вируса растения, в которую можно вставить или в которой можно клонировать нуклеотидную последовательность. Предпочтительно вектор содержит один или несколько уникальных участков рестрикции и обладает способностью к автономной репликации в определенной клетке-хозяине, включающей в себя клетку- или ткань-мишень, или клетку или ткань, являющиеся их предшественниками, или способностью интегрироваться в геном определенного хозяина, обеспечивая воспроизведение клонируемой последовательности. Соответственно вектор может представлять собой автономно реплицирующийся вектор, т.е. вектор, существующий вне хромосомы, репликация которого происходит независимо от репликации хромосом, такой как линейная или замкнутая циклическая плаزمиды, внехромосомный элемент, мини-хромосома или искусственная хромосома. Такой вектор может содержать любые элементы, обеспечивающие саморепликацию. Альтернативно вектор может представлять собой вектор, который после введения в клетку интегрируется в геном реципиентной клетки и реплицируется вместе с хромосомой (хромосомами), в которую он интегрировался. Векторная система может содержать один вектор или одну плазмиду или несколько векторов или плазмид, которые вместе содержат полноразмерную ДНК, подлежащую введению в геном клетки-хозяина, или транспозон. Выбор вектора обычно определяется совместимостью вектора с клеткой, в которую вводят вектор. Вектор также может содержать маркер селекции, такой как ген устойчивости к антибиотику, ген устойчивости к гербициду или другой ген, который можно использовать для селекции подходящих трансформантов. Примеры таких генов хорошо известны специалистам в данной области.

Нуклеотидную конструкцию настоящего изобретения можно ввести в вектор, такой как плаزمиды. Плазмидные векторы обычно содержат дополнительные нуклеотидные последовательности, которые позволяют легко провести селекцию, амплификацию и трансформацию прокариотических и эукариотических клеток каскадом экспрессии, такие как векторы, полученные на основе pUC, pSK, pGEM, pSP или pBS. Дополнительные нуклеотидные последовательности содержат точки начала репликации, обеспечивающие автономную репликацию вектора, селективируемые маркерные гены, предпочтительно кодирующие устойчивость к антибиотику или гербициду, уникальные участки множественного клонирования, позволяющие вставлять нуклеотидные последовательности или гены в нескольких участках нуклеотидной конструкции, а также последовательности, которые повышают трансформацию прокариотических и эукариотических (особенно растительных) клеток.

Термин "маркерный ген" относится к гену, который придает клеткам, экспрессирующим маркерный ген, особый фенотип и, следовательно, позволяет отличать такие трансформированные клетки от клеток, не содержащих маркер. Селективируемый маркерный ген обуславливает признак, позволяющий проводить "отбор" по устойчивости к селекционному средству (включающему в себя гербицид, антибиотик, облучение, нагревание или другое воздействие, разрушающее нетрансформированные клетки). Облегчающий скрининг маркерный ген (или репортерный ген) отвечает за признак, который можно идентифицировать

посредством наблюдения или тестирования, т.е. путем "скрининга" (например, он может обуславливать активность  $\beta$ -глюкуронидазы, люциферазы, GFP или другого фермента, отсутствующую в нетрансформированных клетках). Маркерный ген и представляющая интерес нуклеотидная последовательность не должны быть связаны.

Чтобы облегчить идентификацию трансформантов, нуклеотидная конструкция предпочтительно содержит селективируемый или облегчающий скрининг маркерный ген вместо или помимо чужеродного или экзогенного полинуклеотида. Можно использовать любой маркер при условии, что он способен функционировать (т.е. может служить селекционным средством) в выбранной растительной клетке. Маркерный ген и представляющий интерес чужеродный или экзогенный полинуклеотид могут не быть связанными, поскольку можно эффективно осуществлять совместную трансформацию растения несвязанными генами, как описано, например, в патенте США № 4399216.

Примерами бактериальных селективируемых маркеров являются маркеры, придающие устойчивость к антибиотикам, таким как ампициллин, канамицин, эритромицин, хлорамфеникол или тетрациклин. Примеры маркеров, используемых для облегчения селекции трансформантов растений, включают в себя, без ограничения, ген *hyg*, который кодирует устойчивость к гидромомоцину В; ген неомидинфосфотрансферазы (*prt*), который придает устойчивость к канамицину, паромомицину, G418 и т.п., как, например, описано Potrykus et al., *Mol Gen. Genet.* 199: 183, 1985; ген глутатион-S-трансферазы из крысиной печени, который придает устойчивость к полученным на основе глутатиона гербицидам, как описано, например, в EP-A 256223; ген глутамин-синтазы, который в случае повышенной экспрессии обуславливает устойчивость к ингибиторам глутамин-синтазы, таким как фосфинотрицин, как описано, например, в WO 87/05327, ген ацетилтрансферазы *Streptomyces viridochromogenes*, придающий устойчивость к селекционному средству фосфинотрицин, как описано, например, в EP-A 275957, ген, кодирующий 5-енолпикилат-3-фосфат-синтазу (EPSPS), который обуславливает толерантность к N-фосфометилглицину, как описано, например, в Hinchee et al., *Biotech.* 6: 915, 1988, ген *bar*, придающий устойчивость к биалафосу, как описано, например, в WO 91/02071; ген нитриказы, такой как *bxn* из *Klebsiella ozaenae*, придающий устойчивость к бромоксилилу (Stalker et al., *Science*, 242: 419, 1988); ген дигидрофолатредуктазы (DHFR), придающий устойчивость к метотрексату (Thillet et al., *J Biol. Chem.* 263: 12500, 1988); мутантный ген ацетолактат-синтазы (ALS), придающий устойчивость к имидазолинону, сульфонилмочевине или другим ALS-ингибирующим химическим веществам (EP-A 154204); мутантный ген антранилат-синтазы, придающий устойчивость к 5-метилтриптофану; или ген далапон-дегалагеназы, придающий устойчивость к гербициду.

Предпочтительные облегчающие скрининг маркеры включают в себя, без ограничения, ген *uidA*, кодирующий фермент  $\beta$ -глюкуронидазу (GUS), для которого известны разные хромогенные субстраты, ген  $\beta$ -галактозидазы, кодирующий фермент, для которого известны разные хромогенные субстраты, ген экворина (Prasher et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 126: 1259-68, 1985), который можно использовать для детекции кальцийчувствительной биоломинесценции; ген зеленого флуоресцентного белка (Niedz et al., *Plant Cell Reports*, 14: 403, 1995); ген люциферазы (*luc*) (Ow et al., *Science*, 234: 856, 1986), который позволяет осуществлять детекцию биоломинесценции, и другие известные в данной области гены. Термин "репортерная молекула" в настоящем описании относится к молекуле, которая вследствие ее химической природы генерирует идентифицируемый аналитическими методами сигнал, который облегчает определение активности промотора по анализу белкового продукта.

Способы модификации экспрессии гена.

Уровень белка, такого как фермент, участвующий в синтезе крахмала в развивающемся эндосперме растения ячменя, можно модулировать путем повышения уровня экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей белок в клетке растения, или уменьшения уровня экспрессии гена, кодирующего белок в растении, с целью изменения накопления фруктана в зерне. Уровень экспрессии гена можно модулировать путем изменения числа копий на клетку, например путем введения синтетической генетической конструкции, содержащей кодирующую последовательность и элемент, регулирующий транскрипцию, функционально связанный с кодирующей последовательностью и способный функционировать в клетке. Выбранную совокупность трансформантов можно подвергнуть скринингу с целью выявления трансформантов с желательным уровнем и/или желательной специфичностью экспрессии трансгена, обусловленных влиянием эндогенных последовательностей, находящихся вблизи участка интеграции трансгена. Желательный уровень и характер экспрессии трансгена приводит к существенному увеличению уровней фруктана. Указанные уровни можно детектировать путем простого тестирования зерна трансформантов. Альтернативно, скринингу с целью выявления отдельных линий с повышенным накоплением фруктана можно подвергнуть популяцию зерна, полученного в результате мутагенеза, или популяцию растений, полученных с помощью селекционной программы.

Уменьшения экспрессии гена можно достичь путем введения в растительную клетку и последующей транскрипции "химерного гена, обеспечивающего сайленсинг гена". Можно осуществить стабильное введение химерного гена, обеспечивающего сайленсинг гена, в геном растительной клетки, предпочтительно в ядерный геном, или такой ген можно ввести временно, например, в составе вирусного векто-

ра. В данном описании термин "эффект сайленсинга генов" относится к уменьшению экспрессии целевой нуклеиновой кислоты в клетке растения в результате введения РНК, обуславливающей "сайленсинг". Такое уменьшение может являться следствием уменьшения транскрипции, обусловленного метилированием при реконструкции хроматина или посттранскрипционной модификацией молекул РНК, в том числе разрушением РНК, или и тем, и другим. Сайленсинг гена включает в себя полное или частичное (в любой степени и любой длительности) прекращение экспрессии целевой нуклеиновой кислоты или целевого гена. Достаточно, чтобы уровень экспрессии целевой нуклеиновой кислоты в присутствии РНК, обеспечивающей сайленсинг, был ниже, чем в ее отсутствие. Уменьшение уровня экспрессии может составлять по меньшей мере примерно 40%, или по меньшей мере примерно 50%, или по меньшей мере примерно 60%, или по меньшей мере примерно 70%, или по меньшей мере примерно 80%, или по меньшей мере примерно 90%, или по меньшей мере примерно 95%, или по меньшей мере примерно 99%. Целевая нуклеиновая кислота может представлять собой ген, участвующий в синтезе или метаболизме крахмала, например в разрушении крахмала, однако она также может включать в себя любые другие эндогенные гены, трансгены или экзогенные гены, такие как вирусные гены, которые могут отсутствовать в клетке во время введения трансгена.

Молекулы антисмысловых РНК.

В соответствии с настоящим изобретением для уменьшения экспрессии гена можно использовать антисмысловые методы. Термин "антисмысловая РНК" относится к молекуле РНК, комплементарной по меньшей мере части конкретной молекулы мРНК и способной уменьшать экспрессию гена, кодирующего указанную мРНК. Как правило, такое уменьшение происходит в последовательностьзависимой манере, предположительно, в результате препятствования посттранскрипционному событию, такому как транспорт мРНК из ядра в цитоплазму, стабильность мРНК или ингибирование трансляции. Антисмысловые методы широко используются в данной области (см., например, Hartmann and Endres, Manual of Antisense Methodology, Kluwer, 1999). Обзор по применению антисмысловых методов можно найти в Bourque, Plant Sci. 105: 125-149, 1995 and Senior, Biotech. Genet. Engirt. Revs. 15: 79-119, 1998, Bourque, 1995 (выше), описывает большое число примеров применения антисмысловых последовательностей в растительных системах с целью инактивации генов. Автор также указывает, что достижение 100% ингибирования не является обязательным, поскольку частичное ингибирование с большой вероятностью приводит к измеримому изменению в системе Senior, 1998 (выше), констатирует, что в настоящее время антисмысловые методы широко используются для манипуляций с экспрессией генов.

В настоящем описании термин "антисмысловой полинуклеотид, гибридирующийся в физиологических условиях" означает, что полинуклеотид (полностью или частично одноцепочечный), по меньшей мере, способен образовывать двухцепочечный полинуклеотид с РНК-продуктом гена, подлежащего ингибированию, как правило, с мРНК, кодирующей описанный здесь белок, в нормальных условиях, присутствующих в клетке. Антисмысловые молекулы могут включать в себя последовательности, которые соответствуют структурным генам, или последовательностям, осуществляющим регуляцию экспрессии гена или события сплайсинга. Например, антисмысловая последовательность может соответствовать кодирующему участку целевого гена, или 5'-нетранслируемому участку (UTR), или 3'-UTR, или их сочетанию. Она может быть комплементарна части последовательностей интрона, которые могут подвергаться сплайсингу в процессе или после транскрипции, однако предпочтительно она комплементарна последовательностям экзона целевого гена. Поскольку UTR обычно характеризуются повышенной дивергенцией, направленность на эти участки обеспечивает более высокую специфичность ингибирования гена.

Длина антисмысловой последовательности может составлять по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов, предпочтительно по меньшей мере 25, или 30, или 50 нуклеотидов и более предпочтительно по меньшей мере 100, 200, 500 или 1000 нуклеотидов с максимумом, равным полной длине гена, подлежащего ингибированию. Можно использовать полноразмерную последовательность, комплементарную целому генному транскрипту. Наиболее предпочтительно длина составляет 100-2000 нуклеотидов. Степень идентичности антисмысловой последовательности транскрипту-мишени может составлять по меньшей мере 90%, более предпочтительно 95-100%. Разумеется, молекула антисмысловой РНК может содержать посторонние последовательности, функция которых может заключаться в стабилизации молекулы.

Генетические конструкции для экспрессии антисмысловой РНК можно легко получить путем соединения промоторной последовательности с участком гена-мишени в "антисмысловой" ориентации, которая в соответствии с настоящим изобретением представляет собой ориентацию, противоположную ориентации последовательности гена-мишени, используемой для транскрипции и трансляции (если они имеют место) в растительной клетке. Соответственно настоящее изобретение также предлагает молекулу нуклеиновой кислоты, такую как химерная ДНК, кодирующую антисмысловую РНК настоящего изобретения, а также клетки, ткани, органы, растения, зерна и т.п., содержащие указанную молекулу нуклеиновой кислоты.

## Рибозимы.

В настоящем описании термин "рибозим" относится к молекуле РНК, которая специфически распознает определенную РНК-субстрат и катализирует ее расщепление. Как правило, рибозим содержит нуклеотидный участок, комплементарный участку РНК-мишени, обеспечивающий специфическую гибридизацию с РНК-мишенью в физиологических условиях, например в клетке, в которой действует рибозим, и ферментный участок, называемый в данном документе "каталитический домен". В данном изобретении предпочтительно используют следующие типы рибозимов: рибозим в виде головки молота (Haseloff and Gerlach, *Nature* 334: 585-591, 1988; Perriman et al., *Gene*, 113: 157-163, 1992) и рибозим, содержащий шпильчатую структуру (Snippy et al., *Mol. Biotech.* 12: 117-129, 1999). ДНК, кодирующую рибозимы, можно синтезировать с помощью хорошо известных в данной области способов и затем вставить в генетическую конструкцию или вектор экспрессии с целью экспрессии в представляющей интерес клетке.

Соответственно данное изобретение также предлагает молекулу нуклеиновой кислоты, такую как химерная ДНК, кодирующую рибозим настоящего изобретения, а также клетки, ткани, органы, растения, зерна и т.п., содержащие указанную молекулу нуклеиновой кислоты. Как правило, ДНК, кодирующую рибозим, вставляют в кассету экспрессии под контролем промотора и сигнала терминации транскрипции, способных функционировать в клетке. Специфические участки расщепления рибозимом в любой потенциальной РНК-мишени можно идентифицировать путем сканирования молекулы мишени с целью выявления участков расщепления рибозимом, которые включают в себя тринуклеотидные последовательности GUA, GUU и GUC. После идентификации короткие последовательности РНК, содержащие примерно от 5 до 20 рибонуклеотидов и соответствующие фрагменту гена-мишени, кодирующему 5'- и 3'-участки расщепления, анализируют, чтобы прогнозировать структурные признаки, такие как вторичная структура, которые делают последовательность олигонуклеотида менее подходящей. В случае применения рибозимы, которые могут быть выбраны из группы, включающей в себя рибозимы в виде головки молота, рибозимы, содержащие шпильчатую структуру, рибозимы в виде головки топора, рабочие сателлитные рибозимы, рибозимы Tetrahymena и рибозимы РНКазы Р, конструируют с помощью известных в данной области способов на основе последовательности гена-мишени (см., например, патент США № 5741679). Пригодность кандидатов-мишеней также можно оценить путем определения их доступности для гибридизации с комплементарными олигонуклеотидами, используя анализы рибонуклеазной защиты.

Как и описанные здесь антисмысловые полинуклеотиды, рибозимы настоящего изобретения способны гибридизоваться с целевой молекулой нуклеиновой кислоты (такой как мРНК, кодирующая полипептид, описанный как SEQ ID NO: 2) в "физиологических условиях", а именно в условиях, присутствующих в клетке, особенно в растительной клетке, такой как клетка пшеницы или ячменя.

## РНК-интерференция/дуплексная РНК.

В настоящем описании термин "искусственно введенная молекула дцРНК" относится к введению молекулы дцРНК, которая, например, может встречаться эндогенно путем транскрипции химерного гена, кодирующего такую молекулу дцРНК, но не к превращению одноцепочечной молекулы РНК в дцРНК внутри эукариотической или растительной клетки. РНК-интерференцию (РНК-и), в частности, можно использовать для специфического уменьшения экспрессии гена или ингибирования продукции конкретного белка. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, Waterhouse et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 13959-13964, 1998 предлагают модель механизма, посредством которого дцРНК уменьшает продукцию белка. В основе данного механизма лежит присутствие молекул дцРНК, которые содержат последовательность, практически идентичную мРНК представляющего интерес гена или ее части. дцРНК можно получить с использованием одного промотора в рекомбинантном векторе или клетке-хозяине, где транскрибируются смысловая и антисмысловая последовательности с получением шпильчатой РНК, в которой смысловая и антисмысловая последовательности гибридизуются с образованием участка дцРНК и промежуточной последовательности или спейсерного участка, образующего петлеобразную структуру, следовательно, шпильчатая РНК имеет структуру типа "стебель-петля". Конструирование и продукция молекул дцРНК, подходящих для применения в настоящем изобретении, входят в объем компетенции специалиста в данной области, в частности они описаны в Waterhouse et al., 1998 (выше), Smith et al., *Nature*, 407: 319-320, 2000, WO 99/53050, WO 99/49029 и WO 01/34815. Соответственно настоящее изобретение также предлагает молекулу нуклеиновой кислоты, например химерную ДНК, кодирующую дуплексную РНК, такую как шпильчатая РНК настоящего изобретения, а также клетки, ткани, органы, растения, зерна и т.п., содержащие молекулу нуклеиновой кислоты.

В одном примере вводят ДНК, которая управляет синтезом, по меньшей мере, частично двухцепочечного РНК-продукта (продуктов), гомологичного гену-мишени, подлежащему инактивации. Следовательно, ДНК содержит как смысловую, так и антисмысловую последовательности, которые после транскрибирования в РНК могут гибридизоваться с образованием двухцепочечного участка РНК. В предпочтительном воплощении смысловая и антисмысловая последовательности разделяются спейсерным участком, включающим в себя интрон, который после транскрибирования в РНК удаляется в процессе сплайсинга. Показано, что такой механизм обеспечивает высокоэффективный сайленсинг гена (Smith et al., 2000 (выше)). Двухцепочечный участок может содержать одну или две молекулы РНК, транскриби-

рованные либо из одного участка, либо из двух участков ДНК. дцРНК можно классифицировать как длинную hrРНК, содержащую длинные смысловые и антисмысловые участки, которые могут быть в значительной степени комплементарными, но не обязательно полностью комплементарными (как правило, длина участка, образованного в результате спаривания оснований, составляет более чем примерно 100 п.о., предпочтительно, она находится в диапазоне 200-1000 п.о.). hrРНК также может иметь меньший размер и содержать двухцепочечный участок, варьирующий по размеру примерно от 30 до 50 п.о. или примерно от 30 до 100 п.о. (см. WO 04/073390, включенный в настоящее описание в качестве ссылки). Полагают, что двухцепочечный участок РНК запускает ответ эндогенной растительной системы, который включает в себя процессинг двухцепочечной РНК с образованием олигонуклеотидов длиной 21-24 нуклеотидов и применение этих олигонуклеотидов для последовательность-специфического расщепления транскрипта гомологичной РНК, кодируемой растительным геном-мишенью, с эффективным уменьшением или прекращением активности гена-мишени.

Длина каждой из гибридизирующихся смысловой и антисмысловой последовательностей должна составлять по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов, предпочтительно по меньшей мере 27, или 30, или 50 нуклеотидов и более предпочтительно по меньшей мере 100, 200 или 500 нуклеотидов, вплоть до полноразмерной последовательности, соответствующей целому геному транскрипту. Наиболее предпочтительная длина составляет 100-2000 нуклеотидов. Степень идентичности смысловой и антисмысловой последовательностей целевому транскрипту должна составлять по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90% и более предпочтительно 95-100%. По мере увеличения длины последовательности уменьшается жесткость требований к общей идентичности последовательностей. Разумеется, молекула РНК может содержать посторонние последовательности, функция которых может заключаться в стабилизации молекулы. Молекула РНК может представлять собой гибрид разных последовательностей, направленных на разные РНК-мишени, который обеспечивает уменьшение нескольких генов-мишеней, или она может представлять собой одну последовательность, которая соответствует семейству родственных генов-мишеней, такому как мультигенное семейство. Последовательности, используемые для получения дцРНК, предпочтительно соответствуют последовательностям экзона гена-мишени и могут соответствовать 5'- и/или 3'- нетранслируемым последовательностям или белоккодирующим последовательностям или любому их сочетанию.

Промотор, используемый для экспрессии дцРНК-образующей конструкции, может представлять собой любой тип промотора, при условии, что полученная дцРНК является специфичной к геному продукту в клеточной линии, подлежащей деструкции. Альтернативно промотор может быть линией специфичным, то есть он может экспрессироваться только в клетках конкретной опытной линии. Такая специфичность может иметь преимущество в тех случаях, когда наблюдается некоторое перекрывание гомологии с геном, экспрессирующимся в клеточной линии-не мишени. Промотор также может индуцироваться внешними факторами или внутриклеточными факторами окружающей среды. Как правило, молекула РНК экспрессируется под контролем промотора РНК-полимеразы II или РНК-полимеразы III. Примеры последних включают в себя промоторы тРНК или малой ядерной РНК.

Другая обеспечивающая сайленсинг РНК может представлять собой "РНК, не содержащую участка полиаденилирования", которая содержит по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов и обладает по меньшей мере 95% идентичностью по отношению к последовательности, комплементарной нуклеотидной последовательности транскрипта РНК гена-мишени, как описано в WO 01/12824 или US 6423885 (оба документа включены в настоящее описание в качестве ссылки). Следующий тип обеспечивающей сайленсинг РНК включает в себя молекулу РНК, описанную в WO 03/076619 (включенном в настоящее описание в качестве ссылки), которая содержит по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов и обладает по меньшей мере 95% идентичностью по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты-мишени или к комплементарной ей последовательности и дополнительно содержит участок, который в основном является двухцепочечным, как описано в WO 03/076619.

Регуляция под действием микроРНК представляет собой особую ветвь пути сайленсинга, обеспечиваемого РНК, которая развивается в направлении регуляции гена, отклоняясь от традиционного пути РНКи/PTGS. МикроРНК представляют собой специфический класс малых РНК, которые кодируются генподобными элементами, организованными в специфический частично инвертированный повтор. После транскрипции гены микроРНК дают РНК-предшественники, содержащие частично спаренный стебель и петлеобразный участок, из которых в результате процессинга образуются микроРНК. микроРНК обычно содержат примерно 21 нуклеотид в длину. Высвобожденные микроРНК образуют RISC-подобные комплексы, содержащие конкретный набор белков Argonaute, которые вызывают последовательность-специфическую репрессию гена (см., например, Millar and Waterhouse, *Funct Integr Genomics*, 5: 129-135, 2005; Pasquinelli et al., *Curr Opin Genet Develop* 15: 200-205, 2005; Almeida and Allshire, *Trends Cell Biol.* 15: 251-258, 2005, включенные посредством ссылки).

Совместная супрессия.

Другим методом молекулярной биологии, используемым для специфического уменьшения экспрессии генов, является совместная супрессия. Механизм совместной супрессии точно не известен, однако полагают, что он включает в себя посттранскрипционный сайленсинг гена (PTGS) и в этом отношении

он может быть очень похож на многочисленные примеры антисмысловой супрессии. Указанный метод включает в себя введение в растение повышенного числа копий гена или его фрагмента в "смысловой ориентации" по отношению к промотору, используемому для его экспрессии, которая в соответствии с настоящим описанием соответствует ориентации транскрипции и трансляции (если она имеет место) последовательности гена-мишени. Размер смыслового фрагмента, его соответствие участкам гена-мишени и степень его гомологии по отношению к гену-мишени имеют такие же значения, как и в случае описанных выше антисмысловых последовательностей. В некоторых случаях дополнительная копия генной последовательности препятствует экспрессии растительного гена-мишени. Применение способов совместной супрессии раскрыто в описании патента WO 97/20936 и в описании европейского патента № 0465572. Антисмысловые используемые для совместной супрессии или двухцепочечные молекулы РНК также могут содержать участок РНК, являющийся в основном двухцепочечным, предпочтительно включающий в себя сигнал ядерной локализации, как описано в WO 03/076619.

Все описанные методы уменьшения экспрессии гена также можно использовать для согласованного уменьшения активности нескольких генов. Например, одна молекула РНК может быть направлена против семейства родственных генов, если она специфична к участку, который является общим для этих генов. Альтернативно молекулу РНК можно направить против неродственных генов путем введения в ее состав нескольких участков, каждый из которых направлен на отдельный ген. Это можно осуществить путем гибридизации нескольких участков под контролем одного промотора.

Способы введения нуклеиновых кислот в растительные клетки/трансформация.

Специалистам в данной области хорошо известен ряд способов введения молекул нуклеиновых кислот в растительные клетки-хозяева. Термин "трансформация" относится к изменению генотипа организма, такого как бактерия или растение, путем введения чужеродной или экзогенной нуклеиновой кислоты. Термин "трансформант" обозначает измененный таким образом организм. В настоящем описании термин "трансгенный" относится к генетически модифицированному растению, эндогенный геном которого дополнен или изменен путем интеграции, или стабильного поддержания в реплицируемой неинтегрированной форме, чужеродного или экзогенного гена или чужеродной или экзогенной последовательности. Термин "трансген" относится к чужеродным или экзогенным генам или последовательностям, которые вводят в геном растения. Молекулу нуклеиновой кислоты можно стабильно интегрировать в геном растения или она может реплицироваться в виде внехромосомного элемента. Термин "геном" относится к полному наследуемому генетическому составу клетки, растения или части растения и включает в себя молекулы хромосомной ДНК, пластидной ДНК, митохондриальной ДНК и внехромосомной ДНК. Термин "регенерация", используемый в настоящем описании в применении к растительным материалам, обозначает выращивание целого дифференцированного растения из растительной клетки, группы растительных клеток, части растения, такой как, например, зародыш, щиток зародыша, протопласт, каллус или другая ткань, но не включает в себя выращивание растения из семени.

Конкретный выбор метода трансформации определяется его эффективностью в отношении трансформации определенного вида растения, а также опытом и предпочтением специалиста, осуществляющего настоящее изобретение с помощью конкретной выбранной методологии. Для опытного специалиста очевидно, что конкретный выбор системы трансформации для введения нуклеотидной конструкции в растительные клетки не является необходимостью для настоящего изобретения, или ограничением настоящего изобретения, при условии, что он позволяет достичь приемлемого уровня переноса нуклеиновой кислоты. Руководство по практическому применению систем трансформации для усовершенствования растения можно найти в Birch, *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 48: 297-326, 1997.

Введение и экспрессию чужеродных или экзогенных полинуклеотидов можно проводить с использованием Т-ДНК опухолепромотирующей (Ti) плазмиды *Agrobacterium tumefaciens* (см., например, Umbeck, патент США № 5004863 и международную заявку PCT/US 93/02480). Конструкцию настоящего изобретения можно вводить в растительную клетку, используя *A. tumefaciens*, содержащую Ti-плазмиду. При применении культуры *A. tumefaciens* в качестве трансформационной среды, в качестве вектора-носителя наиболее предпочтительно использовать неонкогенный штамм *Agrobacterium*, который обеспечивает нормальную неонкогенную дифференциацию трансформированных тканей. Предпочтительно *Agrobacterium* несет бинарную Ti-плазмидную систему. Такая бинарная система состоит из (1) первой Ti-плазмиды, которая содержит участок вирулентности, необходимый для внедрения переносимой ДНК (Т-ДНК) в растения, и (2) химерной плазмиды. Химерная плазида содержит по меньшей мере один граничный участок Т-ДНК Ti-плазмиды дикого типа, фланкирующий переносимую нуклеиновую кислоту. Показано, что с помощью бинарных Ti-плазмидных систем можно эффективно трансформировать растительные клетки, например, как описано De Framond, *Biotechnology*, 1: 262, 1983 and Hoekema et al., *Nature*, 303: 179, 1983. Такие бинарные системы являются предпочтительными в числе прочих, поскольку они не требуют интеграции в Ti-плазмиду *Agrobacterium*.

Способы, в которых используются *Agrobacterium*, включают в себя без ограничения (а) совместное культивирование *Agrobacterium* с культивируемыми выделенными протопластами; (b) трансформацию растительных клеток или тканей с использованием *Agrobacterium*; (c) трансформацию семян, точек роста или меристем с использованием *Agrobacterium* или (d) инокуляцию растений, например, с помощью ме-

тода "floral-dip", описанного в Bechtold et al., CR. Acad. Sci. Paris, 316: 1194, 1993, или пшеницы (как описано в WO 00/63398, включенном в данное описание в качестве ссылки). Этот способ основан на инфильтрации суспензии клеток *Agrobacterium*. Альтернативно химерную конструкцию можно вводить, используя в качестве векторов плазмиды *Agrobacterium*, индуцирующие рост корней (Ri).

Способы трансформации зерновых растений, таких как пшеница и ячмень, с целью введения генетического изменения в растение путем внедрения экзогенной нуклеиновой кислоты и способы регенерации растений из протопластов или незрелых зародышей растений хорошо известны в данной области, их описание можно найти, например, в Wan and Lemaux, Plant Physiol. 104: 37-48, 1994, Tingay et al., Plant J. 11: 1369-1376, 1997, патентной заявке Канады № 2092588, патентной заявке Австралии № 61781/94, патенте Австралии № 667939, патенте США № 6100447, международной патентной заявке PCT/US 97/10621, патенте США № 5589617, патенте США № 6541257. Предпочтительно трансгенные растения получают путем трансформации, опосредованной *Agrobacterium tumefaciens*. Векторы, несущие целевую нуклеотидную конструкцию, можно вводить в способные к регенерации клетки тканей культивируемых зерновых растений или эксплантаты. Способные к регенерации клетки предпочтительно получают из шитка незрелых зародышей, зрелых зародышей, полученного из них каллуса или меристематической ткани. Незрелые зародыши предпочтительно получают из соцветий примерно через 10-15 дней после начала цветения.

Генетическую конструкцию также можно вводить в растительные клетки путем электропорации, как описано, например, в Fromm et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 5824, 1985 и Shimamoto et al., Nature, 338: 274-276, 1989. В данном методе протопласты растения подвергают электропорации в присутствии векторов или нуклеиновых кислот, содержащих соответствующие нуклеотидные последовательности. Электрические импульсы в поле высокой напряженности обеспечивают обратимую проницаемость мембраны, позволяющую нуклеиновым кислотам проникать в клетки. После электропорации протопласты растения восстанавливают клеточную стенку, делятся и образуют каллус.

Другой способ введения конструкции нуклеиновой кислоты в клетку растения включает в себя высокоскоростное баллистическое проникновение маленьких частиц (также известное как бомбардировка частицами или бомбардировка микрочастицами), при этом подлежащая введению нуклеиновая кислота содержится либо в матриксе маленьких шариков или частиц, либо на их поверхности, как описано, например, в Klein et al., Nature, 327: 70, 1987.

Альтернативно нуклеотидную конструкцию можно вводить в растительную клетку путем приведения ее в контакт с растительной клеткой с использованием механических или химических средств. Например, нуклеиновую кислоту можно механически перенести в растительную клетку путем непосредственной микроинъекции или с помощью микропипетки. Альтернативно нуклеиновую кислоту можно ввести в растительную клетку путем применения полиэтиленгликоля, который образует с генетическим веществом осадочный комплекс, поглощаемый клеткой.

Мутагенез.

Растения настоящего изобретения можно получить путем мутагенеза и затем провести их идентификацию. В результате можно получить не трансгенное растение, что является желательным для некоторых рынков.

Мутанты могут быть природными (другими словами, выделенными из природного источника), синтетическими (например, полученными путем мутагенеза нуклеиновой кислоты) или индуцированными. Как правило, родительские клетки, ткани, семена растения или растения можно подвергнуть мутагенезу с получением одной или нескольких мутаций, таких как нуклеотидные замены, делеции, добавления и/или модификации кодонов. В контексте данной заявки термин "индуцированная мутация" относится к искусственно индуцированному генетическому изменению, которое может быть следствием химического, радиационного или биологического мутагенеза, такого как вставка транспозона или Т-ДНК. Предпочтительные мутации представляют собой нулевые мутации, такие как нонсенс-мутации, мутации со сдвигом рамки, инсерционные мутации или введение вариантов участков сплайсинга, которые полностью инактивируют ген. Нуклеотидинсерционные производные включают в себя 5'- и 3'-концевые гибриды, а также молекулы, полученные в результате вставки одного или нескольких нуклеотидов внутри последовательности. Инсерционные варианты нуклеотидной последовательности получают путем введения в нуклеотидную последовательность одного или нескольких нуклеотидов, например путем случайной вставки с последующим соответствующим скринингом полученных продуктов. Делеционные варианты получают путем удаления из последовательности одного или нескольких нуклеотидов. Предпочтительно нуклеотидная последовательность мутантного гена содержит только одну вставку или делецию по сравнению с геном дикого типа. Нуклеотидзамещенные варианты представляют собой молекулы, в последовательности которых по меньшей мере один нуклеотид удален и на его место вставлен другой нуклеотид. Предпочтительное число нуклеотидов, которые могут быть заменены в мутантном гене по сравнению с геном дикого типа, составляет максимум десять нуклеотидов, более предпочтительно максимум 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 нуклеотида или оно равно одному нуклеотиду. Такая замена может быть "молчащей", это означает, что замена не приводит к изменению аминокислоты, кодируемой кодоном. Альтернативно можно осуществить консервативную замену, приводящую к изменению одной аминокислоты на другую,

функционально подобную ей, аминокислоту. Типичные консервативные замены приведены в табл. 10 под заголовком "Примеры замен".

Термин "мутация" в соответствии с настоящим описанием не включает в себя молчащие нуклеотидные замены, которые не влияют на активность гена, и, следовательно, включает в себя только те изменения в последовательности гена, которые влияют на его активность. Термин "полиморфизм" относится к любому изменению в нуклеотидной последовательности, включающему в себя такие молчащие нуклеотидные замены.

В предпочтительном воплощении растение содержит делецию по меньшей мере части гена SSII, или сдвиг рамки считывания, или изменение участка сплайсинга указанного гена.

В другом предпочтительном воплощении растение содержит мутацию в гене *am1*, такую как аллель AC38, известную в данной области.

Мутагенез можно проводить с использованием химических или лучевых средств, например путем обработки семян EMS или азидом натрия (Zwar and Chandler, *Planta* 197: 39-48, 1995), или гамма-облучением, хорошо известных в данной области.

Химический мутагенез чаще включает в себя благоприятные нуклеотидные замены, чем делеции. Облучение потоком тяжелых ионов (НІВ) представляет собой эффективный метод мутационной селекции, приводящий к получению новых сортов растений, как описано, например, в Hayashi et al., *Effects of ion beam irradiation on mutation induction in rice*, *Cyclotrons and Their Applications 2007*, Eighteenth International Conference 237-239, 2007 и Kazama et al., *Plant Biotechnology* 25: 113-117, 2008. Облучение потоком ионов имеет две физические характеристики, включающие в себя дозу (Гр) и LET (линейный перенос энергии, кэВ/мкм), которые оказывают биологическое действие, определяющее степень разрушения ДНК и размер делеции ДНК, и которые можно регулировать в зависимости от желательной степени мутагенеза. НІВ генерирует набор мутантов, многие из которых содержат делеции, затем полученные мутанты можно подвергнуть скринингу для выявления мутаций в конкретных генах SSIIa или *Am1*. Идентифицированные мутанты можно подвергнуть обратному скрещиванию с немутантными растениями пшеницы, используемыми в качестве рекуррентных родителей, чтобы устранить и, следовательно, уменьшить влияние несвязанных мутаций в мутантном геноме.

Биологические средства, используемые для получения сайт-специфичных мутантов, включают в себя ферменты, осуществляющие двухнитевые разрывы в ДНК, которая стимулирует механизмы эндогенной репарации. Примерами таких ферментов являются эндонуклеазы, нуклеазы белкового домена "цинковые пальцы", транспозазы и сайт-специфичные рекомбиназы. Нуклеазы белкового домена "цинковые пальцы" (ZFNs), например, обеспечивают сайт-специфичное расщепление в геноме, создавая возможность для эндогенных или других механизмов репарации путем стыкового соединения, которые могут включать в себя введение делеций или вставок для репарации пробела. Обзор по технологии нуклеаз белкового домена "цинковые пальцы" можно найти в Le Provost et al., *Trends in Biotechnology* 28(3): 134-141, 2009, See also Durai et al., *Nucleic Acids Research* 53(18): 5978-5990, 2005 и Liu et al., *Biotechnology and Bioengineering*, 106: 97-105, 2010.

Выделение мутантов можно проводить путем скрининга мутантных растений или семян. Например, мутантную популяцию растений ячменя можно подвергнуть скринингу на низкую активность SSIIa в крахмале листьев или зерен, на мутацию гена SSIIa или *am1* с использованием ПЦР или гетеродуплексного анализа или на отсутствие белка SSII методом ELISA. В полиплоидном растении скрининг предпочтительно проводят в генотипе, который уже не содержит одну или две активности SSII, например, в растении пшеницы, уже мутантном по генам SSII, в двух из трех геномов, так, чтобы осуществлять поиск по мутанту, полностью утратившему функциональную активность. Альтернативно в популяции, подвергшейся мутагенезу под действие такого средства, как EMS, мутацию можно идентифицировать с помощью таких методов, как "TILLING" (Slade and Knauf, *Transgenic Res.* 14: 109-115, 2005). Затем такую мутацию можно ввести в желательную генетическую среду путем скрещивания мутанта с растением, имеющим желательный генетический фон, и проведения подходящего числа перекрестных скрещиваний для удаления исходно нежелательного родительского фона.

Мутацию можно ввести в растение непосредственно путем мутагенеза или косвенно путем скрещивания двух родительских растений, одно из которых содержит введенную мутацию. Модифицированные растения, такие как злаковые растения, могут быть трансгенными или нетрансгенными. Используя мутагенез, можно получить нетрансгенное растение, утратившее представляющую интерес функцию. Настоящее изобретение также охватывает зерно или другие части растений, полученные из растений, и любой способный к репродукции растительный материал, который можно использовать для получения растений с желательными характеристиками, такой как культивируемые ткани или клетки. Разумеется, изобретение охватывает способы получения или идентификации таких растений или зерна, продуцируемого такими растениями.

Растения настоящего изобретения можно получить с помощью способа, известного как TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes - таргетирование индуцированных локальных повреждений в геномах). На первой стадии введенные мутации, такие как новые изменения, затрагивающие одну пару оснований, индуцируют в популяции растений путем обработки клеток, семян, пыльцы или других час-

тей растений химическим мутагеном или облучением, и затем растения культивируют до получения поколения, стабильно наследующего мутации. ДНК экстрагируют, а семена всех членов популяции хранят, чтобы использовать их для повторных анализов через определенные периоды времени.

Чтобы провести анализ TILLING, конструируют праймеры ПЦР, обеспечивающие специфическую амплификацию одного представляющего интерес гена-мишени. Специфичность особенно важна, если ген-мишень является членом семейства генов или частью полиплоидного генома. Далее, чтобы амплифицировать продукты ПЦР из совокупной ДНК нескольких субъектов, можно использовать меченные красителем праймеры. Полученные продукты ПЦР подвергают денатурации и повторному отжигу, чтобы обеспечить образование несоответствующих пар оснований. Несовпадения или гетеродуплексы обуславливаются как природными однонуклеотидными полиморфизмами (SNP) (т.е. несколько растений из популяции с большой вероятностью несут один и тот же полиморфизм), так и индуцированными SNP (т.е. только в небольшом числе отдельных растений может проявляться мутация). После образования гетеродуплекса используют эндонуклеазу, такую как Cell, которая распознает и расщепляет ДНК, содержащую несоответствия, что является ключевой стадией обнаружения новых SNP в популяции TILLING.

С помощью данного способа можно подвергнуть скринингу многие тысячи растений, чтобы идентифицировать отдельный организм, содержащий изменение, затрагивающее одно основание, а также небольшие вставки или делеции (1-30 п.о.) в любом гене или конкретном участке генома. Размер анализируемых геномных фрагментов может варьировать примерно от 0,3 до 1,6 т.о. Сочетание параметров, включающих в себя 8-кратное объединение, фрагменты размером 1,4 т.о. (без учета концов фрагментов, где обнаружение SNP затруднено из-за шума) и применение 96 линий в анализе, позволяет подвергать скринингу до миллиона пар оснований геномной ДНК в одном анализе, что делает TILLING методом с высокой пропускной способностью. TILLING также описан в Slade and Knauf, 2005 (выше) и Henikoff et al., *Plant Physiol.* 135: 630-636, 2004, включенных в настоящее описание в качестве ссылки.

Помимо эффективной детекции мутаций метод TILLING с высокой пропускной способностью идеально подходит для детекции природных полиморфизмов. Соответственно анализ неизвестной гомологичной ДНК путем образования гетеродуплекса с известной последовательностью позволяет установить число и положение полиморфных участков. Идентифицируют как изменения нуклеотидов, так и небольшие вставки и делеции, в том числе, по меньшей мере, некоторое число повторов полиморфизмов. Такой метод называют *Ecotilling* (Comai et al., *Plant J.* 37: 778-786, 2004).

Каждый SNP регистрируют по его приблизительному положению относительно нескольких нуклеотидов. Таким образом, информацию о каждом гаплотипе можно архивировать на основе его мобильности. Информацию о последовательности можно получить с приложением относительно небольших дополнительных усилий, используя аликвоты такой же амплифицированной ДНК, как и для анализа несоответствующих последовательностей. Лево- или правосеквенирующий праймер для одной реакции выбирают в зависимости от его близости к полиморфизму. С помощью программного обеспечения Sequencher, выполняющего множественное выравнивание, можно обнаружить изменение основания, которое в каждом случае подтверждают наличием полосы в геле.

*Ecotilling* дешевле проводить, чем полное секвенирование, метод, который в настоящее время используется для обнаружения большинства SNP. Планшеты, содержащие упорядоченную экотипическую ДНК, проще подвергнуть скринингу, чем пулы ДНК из мутантных растений. Поскольку детекцию проводят в гелях с разрешением примерно в одну пару оснований, а фоновые образцы являются одинаковыми для всех линий, полосы, соответствующие молекулам одинакового размера, могут совпадать, что позволяет выявлять и генотипировать SNP в одну стадию. В данном способе конечное секвенирование SNP является простым и эффективным, тем более, что для ДНК-секвенирования можно использовать аликвоты тех же продуктов ПЦР, что и для скрининга.

#### Генетическая связь.

В настоящем описании термин "генетически связанный" относится к маркерному локусу и второму локусу, находящимся достаточно близко друг к другу на хромосоме, на которой они вместе наследуются более чем в 50% случаев мейоза, например, не случайно. Это определение включает в себя ситуацию, когда маркерный локус и второй локус образуют часть одного гена. Кроме того, данное определение включает в себя ситуацию, когда маркерный локус содержит полиморфизм, отвечающий за представляющий интерес признак (другими словами, маркерный локус непосредственно "связан" с фенотипом). Так, процент рекомбинаций, наблюдающихся между локусами в одном поколении (сантиморганы (сМ)), составляет менее чем 50. В конкретных воплощениях настоящего изобретения генетически связанные локусы могут находиться на хромосоме на расстоянии друг от друга, составляющем 45, 35, 25, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1 или менее сМ. Предпочтительно расстояние между маркерами составляет менее чем 5 или 2 сМ, наиболее предпочтительно примерно 0 сМ.

В настоящем описании термин "другие генетические маркеры" может относиться к любым молекулам, связанным с желательным признаком злаковых растений, таких как пшеница или ячмень. Такие маркеры хорошо известны в данной области и включают в себя молекулярные маркеры, связанные с генами, отвечающими за такие признаки, как устойчивость к заболеванию, урожайность, морфология растения, качество зерна, другие нефункциональные признаки, такие как цвет зерна, содержание гибберел-

линовой кислоты в семенах, высота растения, цвет муки и т.п.

Селекция с помощью маркера представляет собой известный метод селекции гетерозиготных растений, которая необходима при обратном скрещивании с рекуррентным родителем в классической программе селекции. Популяция растений в каждом поколении, полученном в результате обратного скрещивания, является гетерозиготной по представляющему интерес гену, обычно присутствующему в популяции, полученной в результате обратного скрещивания, в соотношении 1:1, и молекулярный маркер можно использовать для различения двух аллелей одного гена. Путем экстракции ДНК, например, из молодых побегов, и тестирования ее с использованием специфического маркера на интрогрессию желательного признака проводят раннюю селекцию растений для последующего обратного скрещивания, при этом энергия и ресурсы затрачиваются на меньшее количество растений.

В способах настоящего изобретения можно использовать любой известный в данной области метод молекулярной биологии, который позволяет детектировать аллели SSII или другого гена. Такие методы включают в себя, без ограничения, амплификацию нуклеиновых кислот, секвенирование нуклеиновых кислот, гибридизацию нуклеиновых кислот с подходящими мечеными зондами, конформационный анализ одноцепочечных нуклеиновых кислот (SSCA), электрофорез в градиенте денатурирующего геля (DGGE), гетеродуплексный анализ (HET), анализ химического расщепления (CCM), каталитическое расщепление нуклеиновых кислот или их сочетание (см., например, Lemieux, *Current Genomics*, 1: 301-311, 2000; Langridge et al., *Aust J Agric Res* 52: 1043-1077, 2001). Изобретение также включает в себя применение молекулярного маркера для детекции полиморфизмов, связанных с аллелями (например) гена SSII, которые приводят к изменению накопления фруктана. Такие методы включают в себя детекцию или анализ полиморфизмов длин рестрикционных фрагментов (RFLP), RAPD, полиморфизмов длин амплифицированных фрагментов (AFLP) и микросателлитных (простой повтор последовательности, SSR) полиморфизмов. Близкорасположенные связанные маркеры можно легко получить с помощью известных в данной области способов, таких как объемный сегрегационный анализ, обзор по которому можно найти в Langridge et al., 2001 (выше).

"Полимеразная цепная реакция" ("ПЦР") представляет собой реакцию, с помощью которой получают идентичные копии целевого полинуклеотида, используя "пару праймеров" или "набор праймеров", включающих в себя "прямой" и "обратный" праймеры, и катализатор полимеризации, такой как ДНК-полимераза, в качестве которой обычно используют термостабильную полимеразу. Методы ПЦР известны в данной области и описаны, например, в "PCR" (McPherson and Moller (Ed), BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, 2000). Для проведения ПЦР можно использовать кДНК, полученную в результате обратной транскрипции мРНК, выделенной из растительных клеток, экспрессирующих ген SSII, или геномную ДНК, выделенную из растения.

Праймер представляет собой олигонуклеотидную последовательность, способную гибридизоваться в последовательность-специфичной манере с целевой последовательностью и удлиняться в процессе ПЦР. Ампликоны или продукты ПЦР, или фрагменты ПЦР, или продукты амплификации представляют собой продукты удлинения, которые содержат праймер и новосинтезированные копии целевых последовательностей. Системы множественных ПЦР включают в себя несколько наборов праймеров, которые обеспечивают одновременную продукцию нескольких ампликонов. Праймеры могут идеально совпадать с целевой последовательностью или они могут содержать внутри цепи несовпадающие основания, которые могут приводить к введению в конкретную целевую последовательность участков распознавания/расщепления рестриктазой или каталитической нуклеиновой кислотой. Праймеры также могут содержать дополнительные последовательности и/или модифицированные или меченые нуклеотиды, облегчающие улавливание или детекцию ампликонов. Повторяющиеся циклы термической денатурации ДНК, отжиг праймеров с комплементарными им последовательностями и удлинение отоженных праймеров под действием полимеразы приводят к экспоненциальной амплификации целевой последовательности. Термины "мишень, или целевая последовательность, или матрица" относятся к амплифицируемым нуклеотидным последовательностям.

Методы прямого секвенирования нуклеотидных последовательностей хорошо известны специалистам в данной области и описаны, например, в Ausubel et al. (выше) and Sambrook et al. (выше). Секвенирование можно проводить с помощью любого подходящего метода, такого как дидезокси-секвенирование, химическое секвенирование или их вариации. Преимущество прямого секвенирования заключается в том, что оно позволяет определить изменение в любой паре оснований конкретной последовательности.

Растения.

Термин "растение", используемый здесь как существительное, обозначает целые растения, однако в случае использования в качестве прилагательного означает любое вещество, которое присутствует в растениях, получено от растений, получено из растений или связано с растениями, такое как, например, органы растений (например, листья, стебли, корни, цветки), отдельные клетки (например, пыльца), семена, растительные клетки и т.п. Ростки и проросшие семена, у которых появились корни и побеги, также входят в объем термина "растение". Термин "части растения" в настоящем описании относится к одному или нескольким тканям или органам, полученным из растений, которые содержат геномную ДНК растения.

Части растений включают в себя вегетативные структуры (например, листья, стебли), корни, органы/структуры цветков, семена (включающие в себя зародыш, эндосперм и семенную кожуру), растительные ткани (например, сосудистые ткани, покровные ткани и т.п.), клетки и потомство перечисленных элементов. Термин "растительная клетка" в настоящем описании относится к клетке, полученной из растения или в растении, и включает в себя протопласты или другие клетки, полученные из растений, гаметапродуцирующие клетки и клетки, способные регенерировать с образованием целых растений. Растительные клетки могут представлять собой культуру клеток. Термин "растительная ткань" относится к дифференцированной ткани, находящейся в растении или полученной из растения ("эксплант"), или к недифференцированной ткани, полученной из незрелых или зрелых эмбрионов, семян, корней, побегов, плодов, пыльцы, опухоловой ткани, такой как корневой рак, и к различным формам скопления растительных клеток в культуре, таким как каллус. Примерами растительных тканей, находящихся в семенах или полученных из семян, являются эндосперм, щиток зародыша, алейроновый слой и зародыш. Соответственно настоящее изобретение включает в себя растения, части растений и полученные из них продукты, в частности зерно, содержащее фруктан.

В настоящем описании термин "зерно" относится к зрелым семенам растений, таким как обычно собираемые в коммерческих целях на поле. Так, указанный термин включает в себя собранные семена и семена на растении, готовые к сбору. Зрелое зерно злаков, таких как пшеница или ячмень, обычно имеет содержание влаги менее чем примерно 18-20%.

Термин "трансгенное растение" в настоящем описании обычно относится к растению, которое содержит генетическую конструкцию, отсутствующую в растениях дикого типа, относящихся к тому же виду, разновидности или сорту. То есть трансгенные растения (трансформированные растения) содержат генетический материал (трансген), который отсутствовал в них до трансформации. Трансген может включать в себя генетические последовательности, полученные от или полученные из растительной клетки, или из другой растительной клетки, или из отличного от растения источника, или синтетические последовательности. Как правило, трансген вводит в растение человек путем таких манипуляций, как, например, трансформация, с использованием любых способов, известных специалистам в данной области. Предпочтительно генетическое вещество стабильно интегрируется в геном растения. Введенное генетическое вещество может содержать последовательности, которые встречаются в природе у тех же видов, но в реаранжированном виде, то есть с другим порядком расположения элементов, например антисмысловая последовательность. Растения, содержащие такие последовательности, входят в объем термина "трансгенные растения". "Нетрансгенное растение" представляет собой растение, не модифицированное генетически путем введения генетического вещества с помощью методов рекомбинантных ДНК. В предпочтительном воплощении трансгенные растения являются гомозиготными по каждому введенному гену (трансгену), чтобы их потомство не разделялось по целевому признаку.

В настоящем описании термин "соответствующее нетрансгенное растение" относится к растению, которое является изогенным по отношению к трансгенному растению, но не содержит представляющий интерес трансген. Предпочтительно соответствующее нетрансгенное растение представляет собой растение, относящееся к тому же сорту, или к той же разновидности, что и родитель представляющего интерес трансгенного растения, или к потомкам тех же родителей, которые не содержат конструкцию, часто называемым "сегрегант", или растение того же сорта, или той же разновидности, трансформированное конструкцией "пустого вектора". Термин "дикий тип" в настоящем описании относится к клеткам, тканям или растениям, не модифицированным с помощью способов настоящего изобретения. Клетки, ткани или растения дикого типа можно использовать в качестве контролей для сравнения уровня экспрессии экзогенной нуклеиновой кислоты или степени и характера изменения признака в клетках, тканях или растениях, модифицированных по способам настоящего изобретения.

Трансгенные растения в соответствии с контекстом настоящего изобретения включают в себя потомство растений, которые были генетически модифицированы с помощью рекомбинантных методов, где потомство содержит представляющий интерес трансген. Такое потомство можно получить путем самоопыления исходного трансгенного растения или путем скрещивания таких растений с другим растением того же вида. Это, как правило, позволяет модулировать продукцию по меньшей мере одного из определенных здесь белков/ферментов в целевом растении или органе растения. Трансгенные части растений включают в себя все части и клетки указанных растений, содержащие трансген, такие как, например, культивируемые ткани, каллус и протопласты.

Присутствие трансгена в трансформированном растении можно определить с помощью нескольких способов. Например, с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) можно амплифицировать последовательности, являющиеся уникальными для трансформированного растения, с последующей детекцией амплифицированных продуктов методом гель-электрофореза или с помощью других методов. Из растений с помощью традиционных методов можно экстрагировать ДНК и затем с помощью реакции ПЦР, используя подходящие праймеры, можно амплифицировать специфическую ДНК, по присутствию или отсутствию которой различают трансформированные и нетрансформированные растения. Например, можно сконструировать праймеры, которые обеспечивают амплификацию участка ДНК из трансформирующего вектора, считывая информацию с конструкции, и обратный праймер, полученный из представ-

ляющего интерес гена. Указанные праймеры обеспечивают амплификацию фрагмента только в том случае, если растение было успешно трансформировано. Альтернативным методом подтверждения положительной трансформации является гибридизация методом саузерн-блоттинга, хорошо известный в данной области метод. Трансформированные растения также можно идентифицировать по отличию их фенотипа от фенотипа нетрансформированных растений или растений дикого типа, например фенотип трансформированного растения может быть обусловлен присутствием селективируемого маркерного гена, или данный фенотип может включать в себя изменение содержания фруктана в зерне растения или изменение активности синтазы крахмала.

В настоящем документе термин "прорастание" относится к появлению кончика корня из кожуры после набухания. Термин "степень набухания" относится к проценту семян в популяции, которые прорастают через определенный период времени, например через 7 или 10 дней, после набухания. Чтобы определить степень набухания с течением времени, популяцию семян нужно анализировать ежедневно. В отношении к семенам настоящего изобретения используемый здесь термин "практически одинаковая степень прорастания" означает, что степень прорастания трансгенных семян составляет по меньшей мере 90% от степени прорастания изогенных семян дикого типа.

В настоящем документе термин "ячмень" относится к любым видам рода *Hordeum*, в том числе к его прародителям, а также к потомству, полученному путем скрещивания с другими видами. Предпочтительно растение относится к виду *Hordeum*, культивируемому в коммерческих целях, например, оно может относиться к штамму или сорту, или разновидности *Hordeum vulgare*, или оно является подходящим для промышленного производства зерна.

Получение пищевых продуктов.

В другом аспекте изобретение предлагает растения и зерно ячменя и полученные из них продукты, которые можно использовать для получения пищевых продуктов или кормов, причем зерно содержит повышенные уровни крахмала по сравнению с соответствующими SSIIa-мутантными зёрнами и повышенные уровни отличных от крахмала компонентов по сравнению с соответствующими зёрнами дикого типа. Предпочтительно растение, из которого получают зерно, имеет пониженный уровень активности SSIIa в эндосперме в процессе развития. Растение настоящего изобретения можно использовать для получения пищевого продукта, в частности для промышленного получения пищевого продукта. Такое получение пищевого продукта может включать в себя получение муки, теста или других продуктов, которые можно использовать в качестве ингредиентов для промышленного получения пищевого продукта. В воплощении, которое является желательным для применения в производстве пищевого продукта, семена или зерно растения имеют повышенное содержание фруктана по сравнению с растением дикого типа. Уровень активности деструктивных ферментов, в частности одной или нескольких амилаз, таких как  $\alpha$ -амилаза или  $\beta$ -амилаза, в зерне может быть снижен в результате присутствия трансгена или введения мутации, которая уменьшает экспрессию гена, кодирующего такой деструктивный фермент. Полученные из такого зерна мука или тесто обладают свойствами, подходящими для выпекания или получения других пищевых продуктов.

Желательный генетический фон растения включает в себя факторы, обуславливающие агрономический выход, и другие характеристики. Такие характеристики могут определять принадлежность к озимым или яровым типам, агрономические показатели, устойчивость к заболеваниям и устойчивость к стрессу, вызванному абиотическими факторами. Для разных районов выращивания подходят разные сорта. Предпочтительно урожайность сорта растения настоящего изобретения составляет не менее чем 80% от урожайности соответствующего сорта дикого типа, по меньшей мере, в некоторых районах выращивания, более предпочтительно не менее чем 85% и еще более предпочтительно не менее чем 90%. Урожайность можно легко измерить в контролируемых полевых испытаниях.

В других воплощениях содержание крахмала в зерне составляет по меньшей мере примерно 42%, по меньшей мере примерно 43%, по меньшей мере примерно 45%, по меньшей мере примерно 47%, по меньшей мере примерно 50% или по меньшей мере примерно 55% (мас./мас.), до 65% от содержания крахмала в зерне дикого типа и более предпочтительно оно не снижено по сравнению с зерном дикого типа. Содержание крахмала в зерне ячменя дикого типа, выращиваемом в промышленном масштабе, обычно находится в диапазоне 55-65% и в некоторой степени зависит от выращиваемого сорта. Альтернативно содержание крахмала в семенах или зерне настоящего изобретения составляет по меньшей мере 90% по сравнению с содержанием крахмала в зерне растения дикого типа, предпочтительно по меньшей мере 95%. Другие желательные характеристики включают в себя способность зерна подвергаться размалыванию, в частности твердость зерна. Другие аспекты, влияющие на ценность растения, включают в себя степень экстракции фруктана или крахмала из зерна, причем с увеличением степени экстракции повышается ценность растения, содержание белка, отношение амилозы к амилопектину, или содержание других отличных от крахмала полисахаридов, таких как  $\beta$ -глюкан, который также вносит вклад в содержание клетчатки в зерновых продуктах. Форма зерна представляет собой другой признак, влияющий на коммерческую полезность растения, так форма зерна может влиять на легкость и другие характеристики размалывания.

Крахмал можно легко выделить из зерна настоящего изобретения с помощью стандартных методов, таких как метод Schulman and Kammiovirta, Starch, 43: 387-389, 1991. В промышленном масштабе можно использовать влажное или сухое размалывание. Размер гранул крахмала имеет важное значение для от-расли, обрабатывающей крахмал, где более крупные гранулы А отделяют от более мелких гранул В.

Пищевые продукты.

Изобретение также охватывает пищевые продукты, напитки или фармацевтические препараты, предпочтительно полученные с использованием продуктов, содержащих повышенное количество резистентного крахмала, клетчатки, амилозы,  $\beta$ -глюкана, фруктана или других компонентов, полученных из растений или зерна настоящего изобретения. Такое получение пищевого продукта может включать в себя получение обработанного зерна, непросеянной муки, муки, теста или других продуктов, которые можно использовать в качестве ингредиентов для промышленного получения пищевого продукта. Зерно настоящего изобретения или полученные из него продукты, содержащие резистентный крахмал, клетчатку, амилозу,  $\beta$ -глюкан или фруктан, можно использовать в ряде применений пищевых продуктов для потребления человеком. В данном описании термин "человек" относится к *Homo sapiens*. Зерно можно легко использовать в способах обработки пищевых продуктов и, следовательно, изобретение включает в себя молотое, измельченное, дробленое, рушеное или плющеное зерно или продукты, полученные из обработанного или целого зерна растений настоящего изобретения, в том числе муку. Указанные продукты можно затем использовать для получения различных пищевых продуктов, например мучных продуктов, таких как зерновой завтрак, хлеб, пирожные, печенье и т.п., или пищевых добавок, таких как загустители или связующие средства, или для получения напитков, лапши, макарон или супов быстрого приготовления. Зерно настоящего изобретения или продукты, полученные из зерна настоящего изобретения, особенно желательно использовать для получения зернового завтрака или в виде экструдированных продуктов. Крахмал или другие компоненты могут входить в состав жирных или масляных продуктов, таких как маргарин или жир, приправа к салату, яичные продукты, такие как майонез, молочные продукты, такие как мороженое, йогурт или сыр, зерновые продукты, такие как мука, фруктовые соки, другие продукты питания или пищевые вещества, или крахмал или другие компоненты можно обработать с получением напитков или продуктов, таких как хлеб, пирожные, печенье, зерновой завтрак, макароны, лапша или соусы. Фруктан также можно использовать в качестве низкокалорийного подсластителя.

Входящие в состав хлеба ингредиенты, содержащие фруктан, которые могут находиться в виде муки или непросеянной муки, могут замещать 10% (мас./мас.) или более неизменной муки или непросеянной муки, предпочтительно они могут замещать по меньшей мере 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере 50% неизменной муки или непросеянной муки. Следовательно, смесь может содержать, например, муки 70 частей, крахмала с высоким содержанием фруктана 30 частей, жира 2 части, соли 2 части, улучшителя 1 часть, дрожжей 2,5 части. Для получения хлеба можно использовать метод интенсивного образования теста или другие методы, известные специалистам в данной области.

Альтернативно продукт настоящего изобретения может входить в состав макаронных изделий на основе мучных продуктов. Количество фруктана настоящего изобретения, используемое в композиции макаронных изделий, может находиться в диапазоне 5-20% (мас./мас.) по отношению к общей массе мучнистого вещества, более предпочтительно в диапазоне 10-20%. Специалист в данной области может легко выбрать другие подходящие мучнистые вещества. Композиция также может содержать другое вещество, такое как сухие или жидкие яйца (желтки, белки или то и другое) или вещества с высоким содержанием белка, такие как молочный белок или рыбный белок. Кроме того, в композицию можно добавить витамины, минералы, соли кальция, аминокислоты, забуферивающие средства, такие как гидрофосфат натрия, специи, смолы, глютен или моностеарат глицерина.

Другие съедобные части растений настоящего изобретения можно использовать в качестве пищевых продуктов для потребления человеком или в качестве кормов для потребления животными. Например, для потребления человеком или животными можно использовать листья, стебли или их экстракты или части, содержащие клетки настоящего изобретения. Повышенное содержание резистентного крахмала, клетчатки, амилозы,  $\beta$ -глюкана или фруктана в растениях настоящего изобретения и их частях может иметь преимущество для применения указанных материалов в качестве корма для животных, такого как, например, корм для свиней, крупного рогатого скота, лошадей, птиц, таких как куры, и других животных.

Способы.

Продукты или соединения настоящего изобретения можно вводить в состав фармацевтических композиций, которые получают с помощью традиционных методов (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18n Ed., Mack Publishing, Company, Easton, PA, U.S.A. 1990). Композиция может содержать активное средство или фармацевтически приемлемое производное активного средства. Указанные композиции могут содержать, помимо одного из активных веществ, фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель, буфер, стабилизатор или другие вещества, известные в данной области. Такие вещества не должны быть токсичными и не должны препятствовать эффективности активного ингредиента. Носитель может находиться в виде широкого ряда форм в зависимости от вида препарата, необходимого

для введения.

В случае перорального введения соединения могут находиться в составе твердых или жидких препаратов, таких как капсулы, пилюли, таблетки, пастилки, порошки, суспензии или эмульсии. Для получения композиций в виде пероральных дозированных форм можно использовать любую традиционную фармацевтическую среду, такую как, например, вода, гликоли, масла, спирты, ароматизаторы, консерванты, красители, суспендирующие средства и т.п., в случае пероральных жидких препаратов (таких как, например, суспензии, эликсиры и растворы); или такие носители, как крахмалы, сахара, разбавители, гранулирующие средства, смазывающие средства, связующие средства, разрыхлители и т.п., в случае пероральных твердых препаратов (таких как, например, порошки, капсулы и таблетки). Вследствие простоты введения таблетки и капсулы представляют собой наиболее предпочтительные пероральные единичные дозированные формы, для получения которых, разумеется, используют твердые фармацевтические носители. При необходимости таблетки могут содержать сахарное или энтеросолюбильное покрытие, которое наносят стандартными способами.

Активное средство предпочтительно вводят в терапевтически эффективном количестве. Фактически вводимое количество, а также скорость и период введения зависят от природы и тяжести состояния, подлежащего лечению. Назначение лечения, например решение о дозировке, времени и т.д., находится в пределах ответственности врачей общего профиля или специалистов, которые обычно учитывают расстройство, подлежащее лечению, состояние пациента, участок доставки, способ введения и другие факторы, известные врачам. Примеры методов и схем можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, (выше).

Пищевой продукт, или напиток, или фармацевтический препарат можно легко упаковать для продажи или он может находиться в виде насыпной формы. Изобретение также предлагает способы получения пищевого продукта, напитка или фармацевтического препарата настоящего изобретения, а также составы и инструкции для получения таких пищевых продуктов и напитков. Способы могут включать в себя стадии сбора растения или части растения, отделение зерна от других частей растения, дробление, экстракцию, размалывание, тепловую обработку, консервирование, упаковывание или другие технологические операции, известные в данной области. Способы, или составы, или инструкции могут включать в себя стадии обработки растительного продукта настоящего изобретения и/или смешивание его с другими пищевыми ингредиентами, такие как нагревание или выпекание смеси, или продукта, например, по меньшей мере при 100°C. Способ может включать в себя стадию упаковывания продукта с получением готового к продаже продукта.

Промышленное применение.

Растительные продукты, предпочтительно зерно, можно использовать в производстве промышленных продуктов, таких как, например, этанол.

Далее настоящее изобретение описывается с помощью нижеследующих неограничивающих примеров.

Пример 1. Иллюстративные методы и материалы.

Растительный материал.

Используют линии ячменя (*Hordeum vulgare*) из популяции, полученной путем обратного скрещивания, начиная со скрещивания родителя, относящегося к сорту Himalaya292 (M292 (SEQ ID NO: 9-11), Morell et al. 2003 (выше)), который содержит мутацию SSIIa, обозначаемую здесь как аллель *sex6-292*, с родителем, относящимся к сорту High Amylose Glacier (HAG, также называемым AC38). Подходящие родительские сорта присутствуют в продаже. Например, сорт HAG (High Amylose Glacier, также называемый AC38) поставляется CSIRO или Австралийской коллекцией озимых зерновых культур, Tamworth, NSW. Скрещивание растений ячменя проводят в теплице стандартными способами. Популяции обратного скрещивания получают путем 3 обратных скрещиваний растения сорта Himalaya292 (мужское) с растением сорта HAG (женское) с последующим получением 3 поколений одного семени (SSD). Семена, полученные от 3-го обратного скрещивания, называют BC3F1, а семена, полученные от 3-го SSD, называют BC3F4. Чтобы повысить качество семян, для каждой линии выращивают 2 или 3 дополнительных поколения. Такие поколения, обозначаемые BC3F6 или BC3F7, используют в данном исследовании.

70 линий ячменя BC3F6 выращены в 2005 г. растениеводческой компанией CSIRO, Canberra в горшках с использованием в качестве остальных условий природные. Чтобы подтвердить состав и параметры выбранных семян, подгруппу линий ячменя BC3F7, выбранную по массе семян, содержанию амилозы и присутствию мутаций SSIIa и *amo1*, выращивают либо в растениеводческой компании CSIRO, Canberra в теплице с природным освещением и при температуре 18°C (ночь) и 24°C (день) либо на поле Yanco, New South Wales, Australia, в 2007 г.

Колосья ячменя метят во время цветения через 2 дня после первого появления ости, на вершине кроющего листа, содержащего закрытый колос. Развивающиеся семена собирают через 20 дней после цветения (DPA), удаляют зародыши, развивающийся эндосперм экструдируют через режущую поверхность и хранят при -80°C.

Другие сорта, указанные в настоящем описании, получают на коммерческой основе от Австралий-

ской коллекции озимых зерновых культур, Tamworth, NSW, Australia.

Генотипирование популяции BC3F6 путем амплификации ПЦР.

Молодые листья пшеницы из поколения BC3F6 популяции, полученной в результате обратного скрещивания, собирают и лиофилизируют (с помощью систем для лиофилизации FTS, Stone Ridge, New York). Геномную ДНК выделяют с помощью набора для быстрого выделения ДНК DNA® в соответствии с инструкциями поставщиков (Q-BIOgene).

Генотипирование мутации SSIIa проводят методом амплификации ПЦР, используя праймеры SSIaF (5'-CCTGGAACACTTCAGACTGTACG-3' (SEQ ID NO: 3)), начиная с нуклеотида 1616, и SSIaR (5'-AGCATCACCAGCTGCACGTCCT-S' (SEQ ID NO: 4)), начиная с нуклеотида 2044 кДНК SSIIa (GenBank № AY133249), с получением продукта размером 451 п.о., содержащего участок мутации SSIIa в положении 1829 Himalaya292, как описано Morell et al. 2003b (выше) (см. также SEQ ID NO: 9). Полученный методом ПЦР микросателлитный маркер EBmac0501 используют для детекции мутации amo1, расположенной на расстоянии 68,0 сМ на хромосоме 1Н и расположенной близко от локуса amo1, также на расстоянии 68,0 сМ. Для амплификации фрагмента ПЦР из локуса amo1 используют праймеры HНас0501F (5'-CACGACGTTGTAAAACGACACTTAAGTGCCATGCAAAG-3' (SEQ ID NO: 5) и HНас0501R (5'-AGGGACA AAAATGGCTAAG-3' (SEQ ID NO: 6)) (GrainGenes Database).

Для каждой реакции ПЦР используют реакционную смесь объемом 20 мкл, которая содержит 50 нг геномной ДНК, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,125 мМ каждого dNTP, 10 пмоль праймеров, 0,5М глицинбетаина, 1 мкл ДМСО и 1,5 ед. полимеразы Taq Hotstar (QIAGEN). Реакции ПЦР проводят на оборудовании HYBAID PCR Express (Intergrated Sciences), используя 1 цикл, включающий в себя 95°C в течение 5 мин, 35 циклов, включающих в себя 94°C в течение 45 с, 58°C в течение 30 с и 12°C в течение 1 мин, 1 цикл, включающий в себя 12°C в течение 10 мин, и 1 цикл, включающий в себя 25°C в течение 1 мин. Продукты ПЦР, используемые для детекции мутации SSIIa, расщепляют с помощью фермента рестрикции NlaIV при 37°C в течение ночи. Расщепленные (в случае мутации SSIIa) и нерасщепленные (в случае мутации amo1) фрагменты ПЦР разделяют в 2% агарозных гелях и визуализируют, используя прилагающиеся к гелю документы (UVitec), после окрашивания GelRed (Biotium).

Для генотипирования линий ячменя из популяции, полученной в результате обратного скрещивания Himalaya292 × HAG, используют описанные выше праймеры SSIaF и SSIaR, позволяющие детектировать мутацию SSIIa из родительской линии Himalaya292, и микросателлитный маркер EBmac0501, позволяющий детектировать локус amo1 из родительской линии HAG. В случае мутации SSIIa после расщепления продукта ПЦР ферментом NlaIV и последующего гель-электрофореза наблюдают три типа фрагментов ПЦР, которые позволяют различать мутантные аллели SSIIa и аллели SSIIa дикого типа. Фрагмент ДНК размером 347 п.о. указывает на присутствие мутантного гена SSIIa, фрагмент ДНК размером 236 п.о. указывает на присутствие гена SSIIa дикого типа, а наличие обоих фрагментов размером 347 п.о. и размером 236 п.о. свидетельствует о том, что линии имеют гетерозиготный генотип. В случае мутации amo1 из HAG, микросателлитный маркер EBmac0501 также дает три варианта фрагментации ПЦР. Фрагмент 167 п.о. соответствует мутантному amo1, фрагмент 141 п.о. детектируют в линиях дикого типа, а наличие обоих фрагментов, 167 п.о. и 141 п.о., свидетельствует о том, что линии являются гетерозиготными.

Характеристика зерна.

Зерно собирают из растений после созревания. Если не указано иначе, среднюю массу семян определяют путем взвешивания 100 семян с 3 повторами. Массу семян для выбранных линий также определяют как среднюю массу семян, определенную путем взвешивания 500 семян с 3 повторами, в случае материала BC3F7, выращенного на поле Yanco, NSW. Содержание влаги в зерне измеряют стандартным методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) с помощью Oxford 4000 NMR Magnet (Oxford analytical instruments Limited). Пористость зерна измеряют с помощью прибора Single-Kernel Characterization system 4100 (Perten Instruments Inc. Springfield, IL 62707 USA), используя официальный метод тестирования химии зерна RACI 12-01. Налив зерна подразделяют на три категории: морщинистое, полуналитое и налитое.

Микроскопический анализ поперечных срезов зерна ячменя и сканирующая электронная микроскопия.

Поперечные срезы средней части зерна ячменя толщиной примерно 1 мм вырезают с помощью лезвия бритвы и фотографируют. Затем их покрывают частицами золота и анализируют с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6400 (SEM) при 15 кВ.

Размалывание зерна.

Зерно размалывают до состояния непросеянной муки и пропускают через сито 0,5 мм, используя вихревую мельницу (Cyclotec 1093, Tecator, Sweden). Затем непросеянную муку используют в описанном ниже анализе.

Анализ β-глюкана и пентозана.

Содержание β-глюкана определяют с помощью метода, описанного в Megazyme Method (AACC32.23), используя 20 мг непросеянной муки для каждого образца из трех повторов. Содержание

пентозана определяют с помощью метода, описанного Bell (1985), используя 20 мг непросеянной муки для каждого образца из трех повторов.

Экстракция крахмала.

Крахмал выделяют из непросеянной муки путем экстракции протеазой (Morrison et al., *J Cereal Sci*, 2: 257-271, 1984), промывают водой и удаляют остатки. Затем крахмал промывают ацетоном и сушат на воздухе при комнатной температуре (Konik-Rose et al., 2007 (выше)).

Общий анализ крахмала.

Содержание общего крахмала определяют с помощью метода, описанного в *Megazyme Method* (AACC76.13), используя 20 мг непросеянной муки для каждого образца из трех повторов.

Анализ состава и характеристика крахмала.

Содержание амилозы и амилопектина в крахмале зерна или отношение амилозы к амилопектину определяют путем гель-фильтрации на сефарозе CL-2B с помощью описанного ниже метода (метод гель-фильтрации). Примерно 10 мг общего крахмала растворяют в 3,0 мл 1M NaOH и фракционируют по молекулярной массе путем хроматографии на колонке с сефарозой CL-2B (Regina et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 3546-3551, 2006). Количество крахмала в каждой фракции, выходящей с колонки, измеряют с помощью набора для анализа крахмала (Sigma) в соответствии с инструкциями поставщика. Рассчитывают общее количество амилопектина (первый пик, более высокая молекулярная масса) и амилозы (второй пик, более низкая молекулярная масса) и определяют их отношение.

Альтернативно содержание амилозы измеряют с помощью мелкомасштабного (2 мг крахмала) метода адсорбции иода (Morrison and Laignelet, *J Cereal Sci*, 1: 9-20, 1983) с некоторыми модификациями, как описано Konik-Rose et al., 2007 (выше).

Распределение длин цепей.

Распределение длин цепей амилопектина измеряют после расщепления разветвленной структуры крахмала в образцах с помощью метода, описанного O'Shea et al., *Carbohydr Res*, 307: 1-12, 1998, используя систему капиллярного электрофореза P/ACE 5510 (Beckman Coulter, NSW Australia) с детекцией флуоресценции, индуцированной аргоновым лазером (LIF). Разностные диаграммы для молекулярных масс получают путем вычитания нормализованного распределения длин цепей модифицированного крахмала из нормализованного распределения длин цепей крахмала, полученного из изогенного немодифицированного контрольного растения.

Профиль температур желатинизации образцов крахмала можно измерить с помощью дифференциального сканирующего калориметра Pyris 1 (Perkin Elmer, Norwalk CT, USA). Вязкость растворов крахмала можно измерить с помощью Rapid-Visco-Analyser (RVA, Newport Scientific Pty Ltd, Warriewood, Sydney), используя условия, описанные Batey et al., *Starch* 48: 338-344, 1997. Измеряемые параметры включают в себя максимальную вязкость (максимальная вязкость горячей пасты), степень стабилизации, конечную вязкость и температуру пастообразования. Характеристики пастообразования можно измерить с помощью Rapid Visco Analyser следующим способом. Крахмал (3,0 г) добавляют к дистиллированной воде (25,0 мл) в чашке для DSC и проводят анализ, используя следующий режим RVA: 2 мин при 50°C, нагревание в течение 6 мин до 95°C, выдерживание при 95°C в течение 4 мин, охлаждение в течение 4 мин до 50°C, выдерживание при 50°C в течение 4 мин. Измеряют следующие параметры: максимальная вязкость при 95°C, степень стабилизации в конце периода выдерживания при 95°C, разрушение=максимальная вязкость - степень стабилизации, конечная вязкость в конце периода выдерживания при 50°C, уменьшение=конечная вязкость - степень стабилизации. Для сбора и анализа данных можно использовать программное обеспечение Thermocline версии 2.2 для Windows (Newport Scientific Pty Ltd, NSW Australia).

Объем набухания муки или крахмала можно определить по способу Konik-Rose et al., *Starch-Starke*, 53: 14-20, 2001. Поглощение воды определяют путем взвешивания образца до и после смешивания образца муки или крахмала с водой при определенной температуре (например, при 90°C) и после сбора желатинизированного вещества.

Морфология гранул крахмала, двойное лучепреломление и распределение размера гранул.

Морфологию гранул анализируют методом SEM (JSM-6400) и микроскопии в поляризованном свете. Форму и двойное лучепреломление гранул крахмала анализируют с помощью описанного способа (Yamamoto et al., 2000 (выше)). Распределение размера гранул (по объему) в взвешях крахмала определяют с помощью лазерного дифракционного анализатора размера частиц (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Malvern, England). Процент маленьких гранул крахмала типа В определяют, используя отсекаемый диаметр 7 мкм.

Анализ липидов.

Общее содержание липидов можно определить методом ЯМР, используя магнит ЯМР Oxford 4000, Oxford Analytical Instruments Limited, UK. Для получения каждого образца 1 г семян сушат при 38,8°C в течение 64 ч. Затем высушенные семена анализируют методом ЯМР и сравнивают с контрольными образцами, содержащими чистое масло ячменя, полученными из зерна Himalaya или M292.

Содержание белков, содержание липидов, содержание влаги и содержание золы.

Содержание белка определяют путем измерения содержания азота методом масс-спектрометрии с помощью масс-спектрометра для измерения отношения изотопов Еигора 20-20 с автоматизированной препаративной системой анализатора азота и углерода. Используют от 3 до 8 мг непросеянной муки ячменя. Для расчета содержания белка в семенах ячменя используют коэффициент конверсии азота в белок 6,25 (Mosse 1990). Содержание липидов, содержание влаги и содержание золы измеряют методом AOAC 983.23, методом AACC 44-19 и методом AACC 08-01.

Анализ общего содержания клетчатки.

Для определения общего содержания клетчатки (TDF) в непросеянной муке используют гравиметрический метод Prosky et al. (1985; AOAC 985.29). Анализируют двойные повторы образцов.

Анализ отличных от крахмала полисахаридов.

Общее содержание нейтральных отличных от крахмала полисахаридов (NSP) измеряют с помощью модифицированного метода газовой хроматографии, описанного Theander et al., J AOAC Int 78: 1030-1044, 1995. Модификация включает в себя гидролиз 1М серной кислотой в течение 2 ч с последующим центрифугированием, чтобы удалить нерастворимые NSP, и дополнительный гидролиз растворимых NSP в супернатанте 2М трифторуксусной кислотой.

Анализ резистентного крахмала.

Для определения содержания резистентного крахмала (RS) используют анализ *in vitro*. Этот способ включает в себя две стадии: вначале крахмал в каждом образце гидролизуют в условиях, имитирующих физиологические; затем побочные продукты удаляют промыванием и после гомогенизации и высушивания образца определяют содержание остаточного крахмала. Количество крахмала, определенное в конце расщепляющей обработки, представляет собой содержание резистентного крахмала в образце. Обычно тройные повторы образцов целой муки и соответствующие стандарты смешивают с искусственной слюной, после чего полученные комки инкубируют с ферментами поджелудочной железы и желудочного сока при физиологических значениях pH и температуры. Количество остаточного крахмала в переваренном содержимом определяют, используя традиционные ферментные методы и спектрофотометрию, содержание резистентного крахмала в образце выражают в виде процента по отношению к массе образца или к общему содержанию крахмала.

В 1 день количество образца, содержащего до 500 мг углеводов, взвешивают в колбе Эрленмейера объемом 125 мл. Карбонатный буфер получают путем растворения 121 мг NaHCO<sub>3</sub> и 157 мг KCl примерно в 90 мл очищенной воды, затем добавляют 159 мкл 1М раствора CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O и 41 мкл 0,49М MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, доводят pH до 7-7,1 с помощью 0,32 М HCl и доводят объем до 100 мл. Полученный буфер хранят при 4°C до пяти дней. Получают искусственный раствор слюны, содержащий 250 единиц α-амилазы (Sigma A-3176 тип VI-B, из поджелудочной железы свиньи) на мл карбонатного буфера. Искусственный раствор слюны добавляют в колбу в количестве, примерно равном массе пищевого продукта.

Примерно через 15-20 с после добавления слюны в каждую колбу добавляют 5 мл раствора пепсина в HCl (1 мг/мл пепсина (Sigma) в 0,02М HCl, pH 2,0, полученного в день применения). Смешивание с амилазой и затем с пепсином имитирует пережевывание образца человеком перед проглатыванием. Смесь инкубируют при 37°C в течение 30 мин, встряхивая при 85 об/мин. Затем смесь нейтрализуют, используя 5 мл 0,02М NaOH. В каждую колбу добавляют 25 мл ацетатного буфера (0,2М, pH 6) и 5 мл смеси ферментов поджелудочной железы, содержащей 2 мг/мл панкреатина (Sigma, из поджелудочной железы свиньи, активность 4x USP) и 28 ед. амилоглюкозидазы (AMG, Sigma) из *Aspergillus niger* в ацетатном буфере, pH 6. Каждую колбу закрывают алюминиевой фольгой и инкубируют при 37°C в течение 16 ч в качающейся водяной бане при 85 об/мин.

На 2 день содержимое каждой колбы количественно переносят в полипропиленовую пробирку объемом 50 мл и центрифугируют при 2000×g в течение 10 мин при комнатной температуре. Супернатанты отбрасывают, каждый осадок промывают три раза 20 мл воды, осторожно встряхивая пробирку при каждом промывании, чтобы разбить осадок, и центрифугируют. 50 мкл последнего водного смыва анализируют с помощью реагента Триндера для определения глюкозы на отсутствие глюкозы. Каждый осадок ресуспендируют примерно в 6 мл очищенной воды и гомогенизируют три раза в течение 10 с с помощью Ultra Turrax TP18/10, используя диспергирующее устройство S25N-8G. Содержимое каждой пробирки количественно переносят в мерную колбу объемом 25 мл и доводят объем. Содержимое осторожно перемешивают и возвращают в полипропиленовую пробирку. Образец каждой суспензии объемом 5 мл переносят в пробирку для культивирования объемом 25 мл, сразу подвергают поверхностному замораживанию в жидком азоте и сушат из замороженного состояния.

На 3 день измеряют общее содержание крахмала в каждом образце, используя реагенты, присутствующие в наборе для определения общего содержания крахмала Megazyme. Получают стандарты крахмала (нормальный кукурузный крахмал, Sigma S-5296) и пустые образцы, содержащие только реагенты для анализа.

Образцы, контрольные образцы и пустые образцы, содержащие только реагенты, увлажняют путем добавления 0,4 мл 80% этанола, чтобы обеспечить диспергирование, и затем встряхивают. Сразу после этого добавляют 2 мл ДМСО, и растворы перемешивают встряхиванием. Пробирки помещают в кипя-

щую водяную баню на 5 мин и сразу добавляют 3 мл раствора термостабильной  $\alpha$ -амилазы (100 ед./мл) в буфере MOPS (pH 7, содержит 5 mM CaCl<sub>2</sub> и 0,02% азида натрия). Растворы инкубируют в кипящей водяной бане еще 12 мин, перемешивая путем встряхивания с интервалами в 3 мин. Пробирки помещают в водяную баню при 50°C и добавляют 4 мл натрий-ацетатного буфера (200 mM, pH 4,5, содержит 0,02% азида натрия) и 0,1 мл амилоглюкозидазы с концентрацией 300 ед./мл. Смеси инкубируют при 50°C в течение 30 мин при осторожном перемешивании с интервалами в 10 мин. Объемы доводят до 25 мл в мерной колбе и хорошо перемешивают. Аликвоты центрифугируют при 2000×g в течение 10 мин. Количество глюкозы в 50 мкл супернатанта определяют, используя 1,0 мл реагента Триндера для определения глюкозы, поглощение измеряют при 505 нм после инкубации пробирок при комнатной температуре в темноте в течение минимум 18 мин и максимум 45 мин.

Количественное определение содержания водорастворимых углеводов.

Общие водорастворимые углеводы (WSC) экстрагируют из непросеянной муки с помощью метода Lunn and Hatch, *Planta* 197: 385-391, 1995 с указанными ниже модификациями. Непросеянную муку в настоящем описании определяют как продукт, полученный в результате перемалывания зрелого зерна, без последующего фракционирования (такого как просеивание) с целью удаления отрубей. Следовательно, непросеянная мука содержит все компоненты зерна.

Непросеянную муку (100 мг) экстрагируют три раза 10 мл 80% этанола (об./об.) на кипящей водяной бане в течение 10 мин. Супернатанты каждой экстракции объединяют, лиофилизируют и ресуспендируют в 2 мл воды milliQ. Количества сахарозы, глюкозы и фруктозы измеряют с помощью калориметрического ферментативного анализа в микропланшетах по описанному способу (Campbell et al., *J Sci Food Agric* 79: 232-236, 1999; Ruuska et al., *Funct Plant Biol* 33: 799-809, 2006). Содержание сахаров, мальтозы и фруктоолигосахаридов (фруктанов) также анализируют методом высокоэффективной анионообменной хроматографии (HPLC), описанным в Ruuska et al., 2006 (выше). Оба способа дают сравнимые результаты.

Чтобы определить уровни мальтозы, общие сахара, экстрагированные из непросеянной муки ячменя, анализируют, по существу, как описано в Bernfeld, *Amylases alpha and beta*. In: Colowick and Kaplan (eds), *Methods in enzymology*, Academic, NY, p. 149, 1955, используя для сравнения стандартные растворы мальтозы, нижеследующим способом. Общие сахара разбавляют в 10-100 раз. Получают стандартные растворы мальтозы (10 пробирок) с концентрацией от 0,3 до 5 мкмоль на мл. Один мл каждого разведения мальтозы (в составе раствором общих сахаров или растворов мальтозы) смешивают с 1 мл динитросалициловой кислоты, используемой в качестве окрашивающего реагента. Затем раствор сахара инкубируют при 100°C в течение 5 мин и охлаждают до комнатной температуры. В каждую пробирку добавляют 10 мл химически чистой воды и хорошо перемешивают. Образцы измеряют при A<sub>540</sub> с помощью спектрофотометра. Содержание мальтозы также определяют с помощью описанного выше метода HPLC.

Ферментные анализы.

Общую активность синтазы крахмала в таких образцах, как развивающийся эндосперм зерновых, можно измерить путем экстракции белков и анализа с помощью методов, описанных в Libessart et al. *Plant Cell*, 7(8): 1117-1127, 1995 или Cao et al., *Plant Physiol*, 120(1): 205-16, 1999. Данные анализы позволяют измерить включение мономера в полимеры крахмала с использованием <sup>14</sup>C-меченого субстрата ADPG. Отдельные изоформы синтазы крахмала можно разделить методом гель-электрофореза и анализировать в геле (с получением зимограммы) с помощью нижеследующего способа. Экстракты образцов, таких как развивающиеся семена, можно получить с использованием 50 mM калий-фосфатного буфера, pH 7,5, содержащего 5 mM EDTA, 20% глицерина, 10 мкM Pefabloc и 0,05 mM дитиотреитола (DTT). После размалывания семян с получением кашицы в буфере или гомогенизирования образца смесь центрифугируют при 14000×g в течение 15 мин при 4°C, и затем супернатант отсасывают. Концентрацию белка в супернатанте можно измерить с использованием реагента Кумасси или других стандартных средств. Экстракты можно хранить при -80°C до последующих анализов на нативных гелях. Для проведения денатурирующего гель-электрофореза 100 мкл экстракта смешивают с SDS и  $\beta$ -меркаптоэтанолом, после чего смеси инкубируют в кипящей воде в течение 4 мин, чтобы денатурировать белки. Электрофорез проводят в стандартных денатурирующих полиакриламидных гелях, используя 8% полиакриламидные разделяющие гели с наложенными 4,5% полиакриламидными концентрирующими гелями. После электрофореза белки можно ренатурировать путем пропитывания гелей 40 mM буфером Tris-HCl в течение минимум 2 ч, заменяя буфер каждые 30 мин новой порцией объемом по меньшей мере 100 мл. В случае неденатурирующих гелей стадию денатурации SDS и  $\beta$ -меркаптоэтанолом опускают и из гелей убирают SDS. Буфер для анализа синтазы крахмала, содержащий трис-глицин (25 mM трис, 0,19M глицин), 0,133M сульфат аммония, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 670 мкг/мл BCA и 1 mM субстрат ADPG, можно использовать для детекции полос синтазы крахмала с последующей детекцией крахмального продукта путем окрашивания йодным раствором, содержащим 2% KI, 0,2% I<sub>2</sub>.

Альтернативно синтазу крахмала или другие ферменты биосинтеза крахмала можно детектировать в образцах с помощью специфических антител (ELISA).

Статистические анализы взаимоотношения генотипов и компонентов семян или свойств крахмала.

Статистические анализы проводят с использованием Genstat, версия 9. Проводят вариационный анализ массы семян, общего содержания крахмала, содержания амилазы, содержания бета-глюкана, содержания сахара, размера гранул крахмала и распределения длин цепей амилопектина с получением минимально значимого различия (LSD,  $P < 0,05$ ), наблюдая различия между генотипами.

Пример 2. Генотипирование растений.

Популяцию линий, сегрегирующих по присутствию или отсутствию мутаций в локусах SSIIa и amo1, получают путем проведения трех обратных скрещиваний донорной линии sex6-292 (Himalaya292) с рекуррентным родителем amo1-AC38. Из линий BC3F2 выращивают три поколения одного семени, чтобы получить генотипы, достаточно фиксированные для того, чтобы исследовать относительное влияние локусов sex6 и amo1, по отдельности или в сочетании, на синтез крахмала и состав зерна. Для генотипирования локуса sex6 в линиях BC3F6 используют маркер казуальной мутации в гене SSIIa (Morell et al. 2003b (выше)), тогда как тесно связанный микросателлитный маркер EBmac0501 используют в качестве суррогатного маркера статуса amo1-38, как описано в примере 1.

Среди 70 генотипированных линий BC3F6 14 линий являются гомозиготными как по аллелю sex6-292, так и по аллелю amo1-AC38 (sex6-292/amo1-AC38), и, следовательно, считаются двойными мутантами SSIIa-amo1, 17 линий являются гомозиготными по аллелю sex6-292 и по аллелю amo1 дикого типа (sex6-292/amo1-wt) и, следовательно, представляют собой одиночные мутанты SSIIa, 10 линий являются гомозиготными по аллелю sex6 дикого типа и по аллелю amo1-AC38 (sex6-wt/amo1-AC38) и, следовательно, представляют собой одиночные мутанты amo1, и 15 линий содержат аллели sex6 и amo1 дикого типа (sex6-wt/amo1-wt) и, следовательно, характеризуются как линии дикого типа. Остальные линии являются гетерозиготными либо по мутации sex6 (7 линий), либо по маркеру EBmac0501.

ДНК-маркер гена SSIIIa, который является полиморфным в родительских линиях HAG и Himalaya292 (пример 3), также используют для генотипирования 56 гомозиготных линий. Данный анализ показывает, что ген SSIIIa из HAG присутствует в 26 линиях, а ген SSIIIa из Himalaya292 присутствует в 30 линиях. Показано, что среди 56 линий, генотипированных с использованием маркера EBmac0501 и маркера гена SSIIIa, 5 линий имеют рекомбинантные генотипы. С учетом корреляции генотипов и фенотипов, включающих в себя налив зерна и содержание крахмала, 4 линии, генотипированные с использованием EBmac0501, и 1 линия, генотипированная с использованием маркера гена SSIIIa, дают рекомбинантные фенотипы. Это свидетельствует о том, что существует некоторая степень рекомбинации между маркерами и локусом amo1, отвечающим за фенотипы крахмала, и что ген amo1 и ген SSIIIa являются генетически разными, даже если они близко расположены в ячмене.

Фенотипы родительских сортов также различаются по присутствию или отсутствию кожуры - HAG представляет собой сорт, имеющий кожуру, а Himalaya292 не имеет кожуры. Двойные мутанты SSIIa-amo1 сегрегируют по данным характеристикам, и, следовательно, их можно подразделить на две подгруппы - имеющие кожуру или не имеющие кожуру. Таким образом, четыре генотипа линий ячменя, различающиеся, как описано выше, подразделяют на пять групп, а именно линии дикого типа, одиночные мутанты SSIIa, одиночные мутанты amo1, не имеющие кожуры двойные мутанты и имеющие кожуру двойные мутанты. Четыре линии из каждой из пяти групп используют для анализа распределения гранул крахмала, WSC, CE и морфологии семян. Одну линию каждого генотипа используют для анализа структуры эндосперма и морфологии гранул крахмала. 11 линий дикого типа, 9 линий мутантов amo1, 13 линий мутантов SSIIa, 4 линии не имеющих кожуру двойных мутантов и 6 линий имеющих кожуру двойных мутантов используют для анализа состава зерна, содержания амилозы и массы семян с помощью описанных ниже способов.

Масса семян.

Среднюю массу семян (среднее значение от массы 100 семян) измеряют в гомозиготных линиях популяции BC3F6. Средняя масса семян составляет  $52,7 \pm 5,0$  мг для 11 линий дикого типа,  $52,8 \pm 2,8$  мг для 9 линий amo1,  $38,7 \pm 2,5$  мг для 13 SSIIa-мутантных линий,  $47,6 \pm 4,5$  мг для 6 линий, имеющих кожуру двойных мутантов, и  $44,7 \pm 1,0$  мг для 4 линий, не имеющих кожуру двойных мутантов. Значимые различия в массе семян мутантных линий amo1 и линий дикого типа отсутствуют ( $P < 0,05$ ), свидетельствуя о том, что мутация amo1 не влияет на массу семян. Однако существуют статистически значимые различия ( $P < 0,05$ ) между каждым из одиночных мутантов SSIIa и двойных мутантов (имеющих кожуру и не имеющих кожуру) и каждым из трех других соответствующих генотипов. Аналогичные данные по массе семян 4 генотипов из популяции BC3F7 получены в 2007 г в отдельных испытаниях линий в теплицах и на поле. Удивительный и неожиданный результат заключается в том, что снижение массы семени, вызванное наличием мутации SSIIa, которая, как известно, приводит к уменьшению синтеза амилопектина в отсутствие активности SSIIa, отчасти возмещается сочетанием с мутацией amo1.

Морфология семян.

Интактные семена четырех типичных линий из каждого генотипа анализируют с помощью стереоскопического микроскопа с тыльной стороны и на стороне бороздки. Линии с одиночной мутацией SSIIa имеют морщинистые семена, тогда как линии дикого типа и линии с одиночной мутацией amo1 дают на-

литые хорошо заполненные семена. Семена двойных мутантов, как имеющих кожуру, так и не имеющих кожуру, характеризуются промежуточным фенотипом, они более налитые, чем SSIIa-мутантные семена, но не так хорошо наполнены, как семена *amo1* и семена дикого типа. Эти наблюдения согласуются с результатами измерения массы семян.

Для дополнительной иллюстрации налитости семян указанных генотипов анализируют поперечные срезы средней части семян по наибольшему диаметру (фиг. 1). На поперечных срезах семян линий дикого типа и мутантных линий *amo1* можно видеть полностью заполненный эндосперм, тогда как мутантные линии SSIIa имеют не полностью заполненные (морщинистые) семена со значительным снижением плотности упаковки эндосперма. Линии двойных мутантов SSIIa-*amo1* имеют промежуточный фенотип, характеризующийся эндоспермом, более наполненным, чем у мутантов SSIIa, но менее наполненным, чем у линий дикого типа или мутантных линий *amo1*.

Чтобы повысить точность анализа, обратные срезы семян ячменя всех генотипов анализируют методом сканирующей электронной микроскопии (SEM). На поверхности срезов тыльной стороны зерен ячменя дикого типа можно обнаружить квадратные алейроновые клетки размером примерно 20-25×20-25 мкм с дифференцированными клетками субалейронового слоя и эндосперм, заполненный плоскими круглыми клетками с четкими границами размером примерно 210×130 мкм. У мутанта *sex6-wt/amo1-AC38* алейроновые клетки имеют прямоугольную форму с размерами примерно 20-25×10-15 мкм. Субалейроновые клетки являются четко дифференцированными, а эндосперм содержит плоские клетки с четкими границами, длиннее и уже, чем в эндосперме дикого типа, с размером примерно 230×30 мкм. Мутант *sex6-292/amo1-wt* содержит неупорядоченные прямоугольные алейроновые клетки размером 45-50×5-10 мкм, субалейроновые клетки не являются четко дифференцированными, а эндосперм содержит неупорядоченные клетки размером 90-95×25-30 мкм. В случае генотипа двойного мутанта *sex6-292/amo1-AC38* алейроновые клетки имеют форму, близкую к квадратной, и размер примерно 20×20 мкм, субалейроновые клетки так плохо дифференцированы, что их нельзя идентифицировать, а эндосперм содержит плоские круглые клетки с четкими границами размером примерно 110×90 мкм.

Содержание общего крахмала.

Общее содержание крахмала измеряют по способу, описанному в примере 1 для семян BC3F6 четырех генотипов. Среднее содержание крахмала составляет 64,3±2,4% в линиях дикого типа, 57,2±2,8% в мутантных линиях *amo1*, 34,9±4,0% в мутантных линиях SSIIa, 50,8±2,8% в линиях двойных мутантов, не имеющих кожуру, и 47,6±2,3% в линиях двойных мутантов, имеющих кожуру (фиг. 2). По сравнению с линиями дикого типа содержание общего крахмала в линиях мутантов *amo1*, не имеющих кожуру двойных мутантов, имеющих кожуру двойных мутантов и мутантов SSIIa, уменьшается на 7,1, 13,5, 16,7 и 29,4% соответственно. Указанные различия среди пяти групп являются статистически достоверными ( $P<0,05$ ), за исключением значений, полученных для не имеющих кожуру и имеющих кожуру групп, отличие которых от контрольных значений не является существенным. Соответствующие взаимоотношения для масс семян из пяти групп получают ( $P<0,05$ ) для зерна BC3F7, выращенного в 2007 г. в отдельных испытаниях в теплице и на поле. Полученные результаты показывают, что повышенная масса семян двойных мутантов SSIIa-*amo1* по сравнению с одиночным мутантом SSIIa обусловлена повышенным содержанием крахмала.

Содержание амилозы.

Содержание амилозы измеряют во всех линиях четырех генотипов. Содержание амилозы составляет 32,0±3,2% в линиях дикого типа, 49,5±2,7% в мутантных линиях *amo1*, 57,6±10,0% в мутантных линиях SSIIa, 62,2±4,1% в линиях двойных мутантов, не имеющих кожуру, и 59,8±2,3% в линиях двойных мутантов, имеющих кожуру. Статистический анализ показывает, что мутантные линии SSIIa и линии двойных мутантов имеют гораздо более высокое содержание амилозы в семенах, чем мутанты *amo1* и линии дикого типа, однако содержание амилозы у мутантов SSIIa и двойных мутантов практически не различается ( $P<0,05$ ), свидетельствуя о том, что мутация SSIIa повышает долю амилозы в общем крахмале зерна, однако добавление мутации *amo1* не приводит к дополнительному значимому увеличению доли амилозы. Указанные различия в содержании амилозы у разных генотипов согласуются с результатами, полученными для линий BC3F7, выращенных в 2007 г.

Распределение длин цепей крахмала.

Для анализа влияния генотипов на распределение длин цепей крахмал выделяют из четырех линий каждой группы популяции BC3F6 и анализируют методом электрофореза углеводов с применением флуорофора (FACE). Объединяют проценты цепей, входящих в кластеры, содержащие DP 6-8, DP 9-14, DP 15-24, DP 35-34, DP 35-44 и DP>45. Не существует значимых различий ( $P<0,05$ ) среди кластеров в мутантах SSIIa, в двойных мутантах, не имеющих кожуру, и в двойных мутантах, имеющих кожуру. Однако существует большое различие ( $P<0,05$ ) между группами, содержащими аллель SSIIa дикого типа, и группами, содержащими мутантный аллель SSIIa. Генотипы, содержащие мутантный аллель SSIIa, соответствуют повышенной доле цепей DP 6-8, которая превышает 10%, и повышенной доле цепей DP 9-14. Они также соответствуют повышенной доле цепей DP 15-24. Линии дикого типа содержат менее чем 5% цепей длиной DP 6-8. Мутанты *amo1* характеризуются статистически значимым уменьшением количества

DP 9-14 и уменьшением количества DP 15-24.

Распределение размеров гранул крахмала.

Чтобы исследовать влияние генотипа *sex6* и *amo1* на размер гранул крахмала в эндосперме крахмала, распределение размеров гранул крахмала анализируют в четырех линиях, выбранных из каждой группы популяции BC3F6, полученной в результате обратного скрещивания. Результаты показывают, что содержание гранул крахмала В (определенных как имеющие диаметр <7 мкм) в линиях дикого типа, мутантах *amo1*, мутантах SSIIa, двойных мутантах, не имеющих кожуру, и двойных мутантах, имеющих кожуру, составляет 20,2±6,4%, 30,7±3,6%, 17,5±1,8%, 19,7±3,6% и 18,3±7,2% по отношению к общему содержанию крахмала в каждой линии соответственно. Семена мутантов *amo1* содержат гораздо больше гранул крахмала В, чем семена из других четырех групп.

Также определяют содержание гранул крахмала, средний размер которых, соответствующий пику профиля распределения, превышает 10 мкм в диаметре (гранулы крахмала А). Средний размер гранул крахмала А составляет 18,9±0,5 мкм в линиях дикого типа, 10,9±0,3 мкм в мутантах *amo1*, 16,4±2,6 мкм в мутантах SSIIa, 18,7±0 мкм в двойных мутантах, не имеющих кожуру, и 17,5±0,6 мкм в двойных мутантах, имеющих кожуру. Статистический анализ показывает, что семена мутантов *amo1* содержат гораздо меньше гранул крахмала А, чем семена других четырех групп ячменя ( $P < 0,05$ ). Не существует статистически значимого различия ( $P < 0,05$ ) значений содержания гранул А в семенах дикого типа, мутантах SSIIa, двойных мутантах, не имеющих кожуру, и двойных мутантах, имеющих кожуру.

Морфология гранул крахмала.

Очищенный крахмал ячменя из линий, полученных из пяти групп, окрашивают иодом и анализируют с помощью обычного светового микроскопа. Благодаря содержанию амилозы гранулы крахмала из растений всех генотипов окрашиваются иодом в фиолетовый цвет. Результаты микроскопии в поляризованном свете показывают, что более 90% гранул крахмала из семян дикого типа и семян *amo1* демонстрируют "мальтийский крест", характерное двойное лучепреломление кристаллических гранул крахмала. Однако менее чем 10% гранул крахмала из семян мутанта SSIIa или двойного мутанта имеют такое двойное лучепреломление.

Анализ с помощью SEM показывает, что зерно диких линий содержит нормальные сферические гранулы крахмала, а мутантный генотип *amo1* приводит к образованию более мелких сферических гранул крахмала А, что совпадает с результатами описанного выше анализа. Крахмал из семян SSIIa и двойных мутантов преимущественно содержит более мелкие деформированные гранулы крахмала. Из двух мутантов, дающих деформированные гранулы крахмала, мутантная линия SSIIa продуцирует трубчатые удлиненные гранулы А (26×12 мкм), а семена двойного мутанта, не имеющего кожуру, содержат более выраженные трубчатые удлинения гранул А (28×21 мкм).

Расположение гранул крахмала в матриксе эндосперма исследуют на поперечных срезах семян ячменя. Линии дикого типа содержат несколько плоских сферических гранул крахмала А, окружающих несколько маленьких гранул крахмала В, а мутантная линия *amo1* содержит несколько неплотно упакованных гранул крахмала, окружающих более мелкие гранулы крахмала В. На поперечных срезах мутантных семян SSIIa гранулы крахмала невозможно четко идентифицировать. Линии двойного мутанта, не имеющего кожуру, содержат лентовидные гранулы крахмала А, плотно упакованные в клетках эндосперма.

Содержание β-глюкана.

Содержание β-глюкана, измеряемое во всех линиях популяции BC3F6, составляет 6,0±0,5% (диапазон от 5,3 до 7,0%) в линиях дикого типа, 8,2±0,5% (диапазон от 7,6 до 8,4%) в мутантных линиях *amo1*, 7,6±1,4% (диапазон от 5,9 до 11,3%) в мутантах SSIIa, 7,1±0,4% в двойных мутантах, не имеющих кожуру, и 6,5±0,8% (диапазон от 5,5 до 7,7%) в двойных мутантах, имеющих кожуру. Статистический анализ показывает, что семена мутанта *amo1*, мутанта SSIIa и двойного мутанта, не имеющего кожуру, содержат намного больше β-глюкана, чем семена линий дикого типа и линий двойных мутантов, имеющих кожуру ( $P < 0,05$ ), однако отсутствуют статистически значимые различия в содержании β-глюкана среди мутантов *amo1*, мутантов SSIIa и двойных мутантов, не имеющих кожуру, или среди семян дикого типа и двойных мутантов, имеющих кожуру соответственно.

Статистический анализ для указанных линий F7, выбранных из пяти групп, выращенных в теплице или в полевых условиях, показывает, что во всех испытаниях семена мутантных линий *amo1* содержат больше β-глюкана, чем семена линий двойных мутантов. Значимые различия в содержании β-глюкана среди семян мутантов SSIIa и семян двойных мутантов отсутствуют.

Содержание пентозана.

Содержание пентозана измеряют в линиях, полученных из пяти групп. Содержание пентозана составляет 4,9±0,6% в линиях дикого типа, 4,9±1,1% в мутантных линиях *amo1*, 7,3±1,4% в мутантах SSIIa, 5,0±0,3% в двойных мутантах, не имеющих кожуру, и 6,5±1,0% в двойных мутантах, имеющих кожуру. Статистический анализ показывает, что и мутантные линии SSIIa, и двойные мутанты, имеющие кожуру, по существу, содержат больше пентозана, чем линии дикого типа, мутантные линии *amo1* и линии двойных мутантов, не имеющих кожуру ( $P < 0,05$ ), однако отсутствуют значимые различия в содержании пен-

тозана среди мутантных линий SSIIa и двойных мутантов, имеющих кожуру, или среди линий дикого типа, мутантов amo1 и двойных мутантов, не имеющих кожуру соответственно.

Содержание золы.

Содержание золы измеряют в семенах пяти групп. Содержание золы составляет  $2,5 \pm 0,1\%$  в семенах дикого типа,  $2,6 \pm 0,2\%$  в семенах мутантов amo1,  $3,1 \pm 0,3\%$  в семенах мутантов SSIIa,  $2,1 \pm 0,1\%$  в семенах двойных мутантов, не имеющих кожуру, и  $2,7 \pm 0,1\%$  в семенах двойных мутантов, имеющих кожуру. Семена мутантов SSIIa содержат гораздо больше золы, а семена двойных мутантов, не имеющих кожуру, содержат значительно меньше золы, чем семена дикого типа, семена мутантов amo1 или семена двойных мутантов, имеющих кожуру, однако отсутствуют значимые различия в содержании золы среди линий дикого типа, мутантов amo1 и двойных мутантов, имеющих кожуру соответственно.

Водорастворимые углеводы.

Чтобы определить влияние мутаций по отдельности или в сочетании на содержание водорастворимых углеводов в семенах ячменя, анализируют четыре линии из каждой группы. В семенах дикого типа и семенах amo1 отсутствуют значительные различия в содержании общих WSC, свободной глюкозы, сахарозы, или мальтозы, или фруктана. Однако семена мутантов SSIIa и двойных мутантов содержат значительно более высокие количества каждого из указанных углеводов ( $P < 0,05$ ). Семена одиночных мутантов SSIIa содержат значительно более высокие уровни фруктозы, сахарозы и общих WSC.

Содержание белка.

Содержание белка измеряют в семенах пяти групп. Содержание белка составляет  $10,3 \pm 0,8\%$  в семенах дикого типа,  $10,4 \pm 1,1\%$  в семенах мутантов amo1,  $12,6 \pm 0,9\%$  в семенах мутантов SSIIa,  $14,6 \pm 0,6\%$  в семенах двойных мутантов, не имеющих кожуру, и  $13,8 \pm 1,4\%$  в семенах двойных мутантов, имеющих кожуру. Семена двойных мутантов, как не имеющих кожуру, так и имеющих кожуру, содержат значительно больше белка, чем семена мутантов SSIIa, семена дикого типа или семена мутантов amo1, однако отсутствуют значимые различия в содержании белка среди семян двойных мутантов, не имеющих кожуру и имеющих кожуру, или среди семян мутантов amo1 и семян дикого типа.

Содержание липидов.

Содержание липидов измеряют в семенах пяти групп. Общее содержание липидов составляет  $2,9 \pm 0,2\%$  в семенах дикого типа,  $3,5 \pm 0,3\%$  в семенах мутантов amo1,  $6,4 \pm 0,9\%$  в семенах мутантов SSIIa,  $4,9 \pm 0,3\%$  в семенах двойных мутантов, не имеющих кожуру, и  $5,0 \pm 0,3\%$  в семенах двойных мутантов, имеющих кожуру. Семена мутантов SSIIa содержат гораздо больше липидов, чем семена двойных мутантов, не имеющих кожуру и имеющих кожуру, семена дикого типа и семена мутантов amo1, однако отсутствуют значимые различия среди семян двойных мутантов, не имеющих кожуру и имеющих кожуру, или среди семян мутантов amo1 и семян дикого типа.

Обсуждение.

Целью настоящего исследования является анализ взаимодействия рецессивных мутаций в локусах *sex6* и *amo1*. Каждая из указанных мутаций приводит к развитию фенотипа с повышенным по сравнению с диким типом содержанием амилозы, причем содержание амилозы в крахмале обычно составляет 60-70% в SSIIa-мутантных семенах и 35-45% в семенах amo1-AC38. Определение 4 положительных генотипов в локусах *sex6* (*sex6-wt* и *sex6-292*) и *amo1* (*amo1-wt* и *amo1-AC38*) является важным аспектом данного исследования. Мутантные аллели и аллели дикого типа локуса *Sex6* можно однозначно различить с помощью маркера на основе казуальной мутации в гене синтазы крахмала IIa. Точная природа мутации в локусе *amo1* остается неизвестной, следовательно, тесно связанный с ней маркер (*Wnac0501*, местоположение на консенсусной карте 58,0 cM) используют для определения присутствия хромосомального участка, содержащего локус *amo1*.

Целью настоящего исследования является определение влияния сочетания указанных мутаций на содержание амилозы. Результаты показывают отсутствие статистически значимого различия в доле амилозы в линиях, содержащих сочетание мутанта SSIIa и локуса amo1-AC38, и в линиях, несущих только мутантный локус SSIIa. Однако сочетание мутаций SSIIa и amo1-AC38 оказывает неожиданное влияние на синтез крахмала и массу зерна, приводя к увеличению содержания крахмала и массы семян по сравнению с одной мутацией SSIIa.

Мутанты ячменя SSIIa содержат крахмал с высокой долей амилозы. Результаты показывают, что SSIIa-мутантное зерно в среднем содержит только 40% крахмала по отношению к содержанию крахмала в зерне дикого типа. Таким образом, высокоамилозный фенотип SSIIa-мутантных семян обусловлен преимущественным уменьшением содержания амилопектина, которое снижается на 75%, тогда как содержание амилозы уменьшается только на 25%. В случае зерна двойного мутанта SSIIa-amo1 также наблюдается уменьшение синтеза амилопектина по сравнению с диким типом (уменьшение на 31%), но увеличение содержания амилозы (увеличение на 37%) в семени. Полученные результаты вызывают интерес и позволяют предположить, что продукт гена *amo1* не только участвует в синтезе амилопектина, но и подавляет синтез амилозы.

Предыдущие исследования роли гена синтазы крахмала III в транзиторном синтезе крахмала в *Arabidopsis*, описанные Zhang et al, *Plant Physiol.* 138: 663-674, 2005, позволяют сделать вывод, что синтаза

крахмала III является отрицательным регулятором синтеза крахмала в листьях. В рисе обнаружены два гена синтазы крахмала III, SSIIIa и SSIIIb. SSIIIa экспрессируется в эндосперме в процессе синтеза крахмала, тогда как SSIIIb экспрессируется во время раннего развития эндосперма, но не в более поздний период высокоактивного синтеза крахмала во время налива зерна (Ohdan et al., J Exp Bot 56: 3229-3244, 2005). Мутации SSIIIa в рисе не уменьшают содержание крахмала, но приводят к увеличению содержания амилозы примерно от 15 до 20%, позволяя предположить, что происходит уменьшение синтеза амилопектина и сопутствующее увеличение синтеза амилозы (Fujita et al., 2007 г. (выше)). Данное наблюдение согласуется с увеличением активности GBSSI и SSI (Fujita et al., 2007 г. (выше)). Li et al., 2000 г. (выше) располагают ген SSIII (обозначаемый сейчас SSIIIa) на коротком плече хромосомы пшеницы 1, что не противоречит местоположению локуса *amo1* в ячмене. Следовательно, ген SSIIIa может являться геном-кандидатом на роль казуального гена, подлежащего разрушению в локусе *amo1*. Однако эксперименты демонстрируют, что белок SSIIIa экспрессируется в мутантах *amo1* и обладает активностью синтазы крахмала, и что существует рекомбинационное событие между генами SSIIIa и *amo1*, указывая на то, что они являются разными генами.

Мутантный аллель *amo1* оказывает едва заметное влияние на распределение длин цепей крахмала. По сравнению с диким типом присутствие мутантного аллеля *amo1* вызывает небольшое уменьшение фракции коротких цепей (DP 9-14) и увеличение фракции DP 15-24. По сравнению с мутантом SSIIa влияние мутантного локуса *amo1* на распределение длин цепей является незначительным. И наоборот, мутантный аллель SSIIa оказывает сильное влияние на структуру амилопектина и, следовательно, на распределение длин цепей, увеличивая долю коротких цепей (DP 6-8 и DP 9-14) и уменьшая долю цепей с DP 15-25.

Сочетание мутантных аллелей SSIIa и *amo1* дает неожиданный фенотип, который характеризуется частичным восстановлением содержания крахмала и массы семян по сравнению с линиями, содержащими только мутантный аллель SSIIa.

Пример 3. Генетические маркеры, связанные с локусом ячменя *amo1*.

Местоположение локуса мутации *amo1* определяют примерно как 56,5 сМ на хромосоме ячменя 1Н (Barley-BinMap 2005, база данных GrainGene). Чтобы тестировать генетические маркеры, тесно связанные с локусом *amo1*, выбирают 11 маркеров SSR (Simple Sequence Repeat) (Ramsay et al., Genetics. 156(4): 1997-2005, 2000), расположенных между 56,00 и 64,60 сМ на хромосоме ячменя 1Н, и тестируют путем амплификации продуктов ПЦР из двух родительских линий, High Amylose Glacier (HAG) и Himalaya292. Указанные SSR-маркеры включают в себя EBmac0405, Bmag0105, Bmac0063, HVM20F, EBmac0560a, EBmac0501, Bmac0044, Bmac0032, Bmag0113, Bmag0211 и Bmag0350. Праймеры для указанных SSR-маркеров синтезируют в соответствии с последовательностями, присутствующими в базе данных GrainGenes.

Для каждой реакции ПЦР (20 мкл) используют 50 нг геномной ДНК, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,125 мМ каждого dNTP, 10 пмоль праймеров, 0,5М глицинбетаин, 1 мкл ДМСО и 1,5 ед. Taq-полимеразы Hotstar (QIAGEN, Australia). Для амплификации SSR-маркеров методом ПЦР используют следующие условия: 1 цикл, включающий в себя 95°C в течение 4 мин, 15 циклов, включающих в себя 94°C в течение 30 с, уменьшение от 65 до 50°C с шагом 1°C на каждый цикл в течение 30 с, и 12°C в течение 1 мин 20 с, 30 циклов, включающих в себя 94°C в течение 15 с, 50°C в течение 15 с и 12°C в течение 45 с, и 1 цикл, включающий в себя 25°C в течение 1 мин. Продукты ПЦР разделяют методом электрофореза на 2% агарозных гелях и визуализируют, используя прилагающиеся к гелю документы (UVitec), после окрашивания GelRed (Biotium).

При тестировании 11 SSR-маркеров 2 из них, а именно Bmac0032, расположенный на 64,6 сМ, и EBmac0501, расположенный на 58,0 сМ, дают продукты ПЦР разного размера для ДНК из родительских растений HAG и Himalaya292. То есть указанные маркеры характеризуются полиморфизмом среди двух родительских сортов. Размер продуктов амплификации маркеров Bmac0032 и EBmac0501 составляет соответственно 175 и 189 п.о. для HAG и 230 и 150 п.о. для Himalaya292. Затем оба маркера SSR используют для генотипирования 70 линий BC3F<sub>6</sub>. Все линии, генотипированные с использованием маркера Bmac0032, дают фрагменты такого же размера, как и HAG, свидетельствуя о том, что во всех линиях наблюдается рекомбинация между Bmac0032 и локусом *amo1*, и что SSR-маркер Bmac0032 не находится в тесной связи с локусом *amo1*. И наоборот, из 70 линий BC3F<sub>6</sub>, генотипированных с использованием маркера EBmac0501, 56 являются гомозиготными по одному или другому сочетанию фрагментов. Среди 56 гомозиготных линий 25 содержат маркер EBmac0501 из HAG, а 31 линия содержит маркер EBmac0501 из Himalaya292. Полученные результаты демонстрируют отсутствие высокой встречаемости генетической рекомбинации маркера EBmac0501 с локусом *amo1*. Следовательно, SSR-маркер EBmac0501 представляет собой тесно связанный микросателлитный маркер локуса *amo1*-AC38.

Маркеры на основе гена ячменя SSIIIa.

Полагают, что локус *amo1* может находиться вблизи гена SSIIIa ячменя. Чтобы подтвердить данное предположение и разработать ДНК-маркер на основе гена SSIIIa ячменя, вначале из двух родительских сортов выделяют фрагменты гена SSIIIa. ДНК из HAG и Himalaya292 используют для амплификации

ПЦР-фрагментов с использованием праймеров, полученных на основе последовательностей геномной ДНК SSIIa пшеницы (Li et al., 2000 (выше)). Олигонуклеотидные праймеры SSIIaF (5'-GGAGGTCTCGGGGATGT-3' (SEQ ID NO: 7)), расположенный в экзоне 7, и SSIIaR (5'-GCTCCAGGAAGTAAACGGTCAGG-3' (SEQ ID NO: 8)), расположенный в экзоне 8 гена SSIIa пшеницы, используют для ПЦР-амплификации продукта размером 464 п. о. Для каждой реакции ПЦР (20 мкл) используют 50 нг геномной ДНК, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,125 мМ каждого dNTP, 10 пмоль праймеров, 0,5М глицинбетаин, 1 мкл ДМСО и 1,5 ед. Taq-полимеразы Hotstar. Реакции ПЦР проводят в следующих условиях: 1 цикл, включающий в себя 95°C в течение 5 мин, 35 циклов, включающих в себя 94°C в течение 45 с, 58°C в течение 30 с и 12°C в течение 1 мин, 1 цикл, включающий в себя 72°C в течение 10 мин, и 1 цикл, включающий в себя 25°C в течение 1 мин. В каждой реакции амплификации получают фрагмент размером 464 п.о. ПЦР-фрагменты обрабатывают, используя 0,5 ед. щелочной фосфатазы Shrimp (USB Corporation, USA), 2,5 ед. экзонуклеазы I и 1× буфер для ПЦР (QIAGEN, Australia), в соответствии с инструкцией корпорации USB и затем секвенируют, используя автоматизированную систему ABI с окрашивающими терминаторами, как описано производителями.

Фрагменты размером 464 п.о. имеют различие в последовательностях, заключающееся в том, что один из них содержит участок рестрикции NlaIV, а другой - нет. Следовательно, обработка продуктов ПЦР указанным ферментом с последующим электрофорезом на 2% агарозных гелях является удобным способом различения генов SSIIa из двух родительских сортов. Получение одного фрагмента ДНК размером 464 п.о. указывает на присутствие гена SSIIa из Himalaya292, а получение двух фрагментов ДНК размером 303 и 161 п.о. указывает на присутствие гена SSIIa из HAG.

Пример 4. Полевые испытания двойных мутантов SSIIa-amo1.

Чтобы определить показатели урожайности двойных мутантов SSIIa-amo1 при выращивании на поле, 3 линии двойных мутантов, не имеющих кожуру, 2 линии двойных мутантов, имеющих кожуру, 4 линии мутантов SSIIa, не имеющих кожуру, 1 линию мутантов SSIIa, имеющих кожуру, 1 линию ячменя дикого типа, не имеющего кожуру (сорт Torrens), 2 линии ячменя дикого типа, имеющего кожуру (сорта Tantangara, Sloop), выращивают на Narrandera и Moree, NSW, Australia, в 2008 г. Каждую из линий ячменя в обоих регионах выращивают в условиях орошения или его отсутствия (засушливый район). Каждую линию выращивают на двух делянках в каждом из условий в обоих регионах в рандомизированном порядке. Семена ячменя (120 г) высевают в каждую делянку (19 м<sup>2</sup>).

Измеряют массу зерна, полученного после сбора урожая с каждой делянки в декабре 2008 г. В Narrandera в условиях орошения двойной мутант, мутант SSIIa и линия дикого типа, не имеющая кожуру, продуцируют 2,23±0,16 кг, 1,1±0,57 кг и 1,6±0,79 кг зерна на делянку соответственно. В условиях засушливого района двойной мутант, мутант SSIIa и линия дикого типа, не имеющая кожуру, продуцируют 0,55±0,34 кг, 0,11±0,12 кг и 0,41±0,16 кг зерна на делянку соответственно.

В Moree в присутствии орошения двойной мутант, мутант SSIIa и линия дикого типа, не имеющая кожуру, продуцируют 1,62±0,72 кг, 0,54±0,40 кг и 2,11±0,08 кг зерна соответственно. В условиях засушливого района двойной мутант, мутант SSIIa и линия дикого типа, не имеющая кожуру, продуцируют 0,88±0,33 кг, 0,38±0,27 кг и 1,14±0,34 кг зерна ячменя соответственно.

Следовательно, как в условиях орошения, так и в условиях его отсутствия в обоих регионах двойной мутант, не имеющий кожуру, и линии дикого типа, не имеющие кожуру, дают подобную урожайность зерна, которая значительно превышает урожайность мутантов SSIIa, не имеющих кожуру.

Урожайность зерна линий ячменя, имеющих кожуру.

В Narrandera в условиях орошения двойной мутант, мутант SSIIa и линия дикого типа, имеющая кожуру, продуцируют 2,77±0,37 кг, 2,09±0,76 кг и 4,39±2,59 кг зерна на делянку соответственно. В условиях засушливого района двойной мутант, мутант SSIIa и линия дикого типа, имеющая кожуру, продуцируют 0,60±0,06 кг, 0,35±0,14 кг и 0,59±0,46 кг зерна на делянку соответственно.

В Moree в присутствии орошения двойной мутант, мутант SSIIa и линия дикого типа, не имеющая кожуру, продуцируют 2,15±0,81 кг, 1,24±0,12 кг и 2,73±0,96 кг зерна соответственно. В условиях засушливого района двойной мутант, мутант SSIIa и линия дикого типа, имеющая кожуру, продуцируют 1,19±0,40 кг, 0,76±0,60 кг и 2,13±0,23 кг зерна на делянку соответственно.

Следовательно, как в условиях орошения, так и в условиях его отсутствия в обоих регионах линии дикого типа, имеющие кожуру, дают более высокую урожайность зерна, чем двойные мутанты, имеющие кожуру, и мутантные линии SSIIa, имеющие кожуру, причем двойные мутанты, имеющие кожуру, продуцируют больше зерна, чем мутантные линии SSIIa, имеющие кожуру.

Пример 5. Получение пищевых продуктов.

Зерно собирают из 11 линий ячменя, выращенных на поле в Yanco, NSW, Australia, в 2008 г., и перемалывают с получением муки. Линии включают в себя 3 двойных мутанта, не имеющих кожуру, 2 двойных мутанта, имеющих кожуру, 3 мутанта SSIIa, в том числе Himalaya292, 2 линии дикого типа (сорты Tantangara и Himalaya) и 1 мутант amo1 (HAG). Зерно, собранное из указанных линий, перемалывают с помощью мельницы Quadrumat Jnr. mill (Brabender Quadrumat Jnr. Mill, Cynulla's Instruments, Sydney, NSW Australia), получая муку, которую затем просеивают с получением частиц диаметром 300 мкм.

Перед перемальванием с помощью Quadrumat режим выдержки не используют.

Для каждой из 11 линий ячменя проводят два типа выпекания мелкого (10 г) хлеба. Выпекание мелкого хлеба проводят в исследовательских целях, однако размер хлеба можно легко увеличить до промышленных размеров. Один тип хлеба получают с использованием 100% муки ячменя в качестве ингредиента, перемолотой, как описано выше, тогда как другой тип хлеба получают с использованием муки, содержащей в качестве ингредиентов 30% указанной муки и 70% коммерческой пшеничной муки. Муку (13,02 г) и другие ингредиенты смешивают, получая тесто, которое созревает в миксографе емкостью 35 г. Используют рецепт, в котором на 13,02 г муки в каждом случае добавляют следующие ингредиенты: мука 100%, соль 2%, сухие дрожжи 1,5%, растительное масло 2% и улучшитель 1,5%. Уровень добавления воды, которую доводят для полного объема, зависит от значений абсорбции воды в миксере *micro Z-agm*. Формование и укладку теста в форму проводят с двумя стадиями расстойки при 40°C и 85% влажности в помещении. Выпекание проводят в печи Rotel в течение 14 мин при 190°C.

После выпекания хлеба массой 10 г хранят при -80°C в течение трех недель в случае партии 100% ячменных хлебов или в течение 1 недели в случае партии 30% ячменных хлебов, после чего анализируют содержание RS, как описано в примере 1, и уровни GI. Содержание резистентного крахмала определяют с помощью процедуры *in vitro*. Образцы хлеба массой 10 г с двойными повторами параллельно с подходящими стандартами смешивают с искусственной слюной, полученные комки инкубируют с ферментами поджелудочной железы и желудочного сока при физиологических значениях pH и температуры. Количество крахмала, оставшегося в переваренной массе, определяют с помощью традиционных ферментных и спектрофотометрических методов, содержание резистентного крахмала в образце выражают в виде процента от массы образца.

Для определения уровней GI используют анализ *in vitro*.

Содержание RS в непросеянной муке ячменя.

Содержание RS и уровни GI вначале определяют в непросеянной муке, полученной из каждой группы генотипов ячменя. Содержание RS в непросеянной муке мутантов *amo1*, двойных мутантов, не имеющих кожуру, двойных мутантов, имеющих кожуру, мутантов SSIIa и дикого типа составляет 0,9%, 3,5±0,3%, 3,4±0,1%, 1,9% и 0,5±0,1% соответственно (табл. 1). Неожиданно было обнаружено, что в непросеянной муке как не имеющих кожуру, так и имеющих кожуру двойных мутантов содержание RS примерно в 3,5, 2,3 и 10 раз выше, чем в непросеянной муке мутанта *amo1*, мутанта SSIIa и дикого типа соответственно. Важно, что непросеянная мука из не имеющих кожуру и имеющих кожуру двойных мутантов содержит гораздо больше RS, чем непросеянная мука мутанта SSIIa. Отсутствуют статистически значимые различия в содержании RS в непросеянной муке не имеющих кожуру двойных мутантов и имеющих кожуру двойных мутантов или в непросеянной муке мутанта *amo1* и дикого типа. Хотя уровни GI различаются среди непросеянной муки из 5 групп ячменя, статистически значимые различия отсутствуют.

Содержание RS в хлебе, полученном с использованием 100% ячменной муки.

Определяют содержание RS в хлебе, который содержит 100% муку ячменя. Результаты представлены в табл. 2. Анализ показывает, что содержание RS в хлебе, полученном с использованием в качестве мучного ингредиента 100% ячменной непросеянной муки, составляет 2,2±0,3%, 5,5±0,1%, 5,6±0,3%, 2,1±0,4% и 0,8±0,3% для мутантов *amo1*, двойных мутантов, не имеющих кожуру, двойных мутантов, имеющих кожуру, мутантов SSIIa и дикого типа (табл. 3). Статистический анализ показывает, что содержание RS в хлебе, полученном из непросеянной муки как не имеющих кожуру, так и имеющих кожуру двойных мутантов ячменя, значительно превышает содержание RS в хлебе, полученном из мутантов SSIa, мутантов *amo1* и нормальных линий ячменя (табл. 3). Не существует значительных различий в содержании RS в хлебе, полученном с использованием 100%-ной муки не имеющих кожуру и имеющих кожуру двойных мутантов. Содержание RS в хлебе, полученном из муки не имеющих кожуру и имеющих кожуру двойных мутантов, в 2,5, 2,5 и 6,7 раз выше, чем в хлебе, полученном из муки SSIIa-мутантного, *amo1*-мутантного и нормального ячменя соответственно (табл. 3).

Содержание RS в хлебе, полученном с использованием 30% ячменной муки

Определяют содержание RS в хлебе, который содержит 30% муку ячменя. Результаты представлены в табл. 4. Содержание RS в хлебе, полученном из непросеянной муки мутантов *amo1*, двойных мутантов, не имеющих кожуру, двойных мутантов, имеющих кожуру, мутантов SSIIa и дикого типа, составляет 1,9±0,3%, 3,1±0,2%, 3,0±0,1%, 2,0±0,3% и 0,9±0,1% соответственно (табл. 3). Содержание RS в хлебе, полученном из как не имеющих кожуру, так и имеющих кожуру двойных мутантов ячменя, значительно превышает содержание RS в хлебе, полученном из мутантов SSIIa, мутантов *amo1* и нормальных линий ячменя (табл. 3). Не существует значительных различий в содержании RS в хлебе, полученном с использованием 30% муки не имеющих кожуру и имеющих кожуру двойных мутантов. Содержание RS в хлебе, полученном из муки не имеющих кожуру и имеющих кожуру двойных мутантов, в 1,6, 1,6 и 3,3 раза выше, чем в хлебе, полученном из муки SSIIa-мутантного, *amo1*-мутантного и нормального ячменя соответственно (табл. 3).

Вычисляют содержание RS, которое выражают в виде мг RS на грамм крахмала, и анализируют

природу повышения уровня RS в хлебе, полученном из двойных мутантов. Полученные результаты анализируют, чтобы определить, связано ли повышение содержания RS с увеличением общего содержания крахмала или с изменением структуры крахмала. Результаты показывают, что хлеб, полученный с использованием 100%-ной ячменной муки мутантов *amo1*, двойных мутантов, не имеющих кожуру, двойных мутантов, имеющих кожуру, мутантов SSIIa и дикого типа, содержит 41,7, 105,1±2,8, 106,9±3,3, 75,0±8,1 и 16,3±4,5 мг RS на г крахмала (фиг. 4.6). Содержание RS в хлебе, полученном из муки не имеющих кожуру и имеющих кожуру двойных мутантов, примерно в 2,5, 1,4 и 6,5 раз выше, чем в хлебе, полученном из *amo1*-мутантного зерна, SSIIa-мутантного зерна и зерна дикого типа. Статистический анализ показывает, что хотя хлеб, полученный из всех 4 групп ячменя, содержит больше RS, чем хлеб, полученный из линий дикого типа, содержание RS (мг RS на г крахмала) в хлебе, полученном из обоих двойных мутантов, статистически является гораздо более высоким, чем в хлебе, полученном из мутантов *amo1* и мутантов SSIIa ( $P < 0,05$ ). Увеличение содержания RS в хлебе, полученном из зерна мутанта SSIIa, по сравнению с хлебом, полученным из мутантов *amo1*, является статистически значимым.

Уровень GI в хлебе, полученном с использованием 100% ячменной муки.

Определяют уровень GI в хлебе, который содержит 100%-ную муку ячменя, для всех линий ячменя. Результаты представлены в табл. 2. Уровень GI в хлебе, полученном из зерна мутантов *amo1*, двойных мутантов, не имеющих кожуру, двойных мутантов, имеющих кожуру, мутантов SSIIa и зерна дикого типа, составляет 68,5±2,1, 63,5±4,5, 60,8±4,1, 63,9±10,3, 80,3±2,9 соответственно (табл. 7). Статистический анализ показывает, что хлеб, полученный из зерна не имеющих кожуру и имеющих кожуру двойных мутантов и мутантов SSIIa, содержит GI на гораздо более низком уровне, чем хлеб, полученный из зерна мутантов *amo1* и нормальных линий ячменя (табл. 7). Не существует значительных различий в уровне GI в хлебе, полученном с использованием 100%-ной муки не имеющих кожуру и имеющих кожуру двойных мутантов, и в хлебе, полученном с использованием SSIIa-мутантного зерна. Уровень GI в хлебе, полученном из зерна не имеющих кожуру и имеющих кожуру двойных мутантов и SSIIa-мутантного зерна, составляет примерно 80% от уровня GI в хлебе, полученном из *amo1*-мутантных и нормальных линий ячменя соответственно (табл. 7).

Уровень GI в хлебе, полученном с использованием 30%-ной ячменной муки.

Определяют уровень GI в хлебе, который содержит 30%-ную муку ячменя, для всех линий ячменя. Результаты представлены в табл. 4. Уровень GI в хлебе, полученном из зерна мутантов *amo1*, двойных мутантов, не имеющих кожуру, двойных мутантов, имеющих кожуру, мутантов SSIIa и зерна дикого типа, составляет 84,5±3,5, 83,2±2,1, 83,5±0,8, 82,3±3,9, 87,8±4,5 соответственно (табл. 7). Статистически значимые различия в значениях уровня GI в хлебе, полученном из ячменя 5 групп, отсутствуют.

Выводы.

Непросеянная мука из зерна не имеющих кожуру и имеющих кожуру двойных мутантов ячменя имеет гораздо более высокое содержание RS, чем просеянная мука из зерна мутантов *amo1*, мутантов SSIIa и дикого типа. Содержание RS в непросеянной муке из обоих двойных мутантов примерно в 3,5, 1,8 и 7,0 раз выше, чем в просеянной муке *amo1*-мутантных линий, SSIIa-мутантных линий и линий дикого типа. Подобным образом, хлеб, полученный из зерна двойного мутанта ячменя, имеет гораздо более высокое содержание RS, чем хлеб, полученный из зерна мутантов SSIIa, мутантов *amo1* и ячменя дикого типа. Содержание RS увеличивается не только вследствие повышения количества крахмала с высоким содержанием амилозы, но и вследствие изменения структуры крахмала, где содержание RS приводят на г крахмала.

Значения уровня GI в хлебе, полученном из зерна двойного мутанта и SSIIa-мутантного зерна значительно ниже, чем в хлебе, полученном из зерна мутанта *amo1* и зерна дикого типа. Значения уровня GI в хлебе, полученном из зерна двойного мутанта SSIIa-*amo1* и SSIIa-мутантного зерна, примерно на 7% и 20% ниже, чем в хлебе, полученном из зерна мутанта *amo1* и зерна дикого типа, если хлеб содержит 100%-ную ячменную муку.

Пример 6. Широкомасштабное производство фруктана.

Зерно ячменя, мутантное по SSIIa и *amo1*, содержащее примерно 10% фруктана, можно использовать для выделения и очистки фруктана, а также других продуктов, таких как крахмал с высоким содержанием амилозы и β-глюкан. Такое производство с использованием в качестве исходного вещества зерна, которое можно легко получить путем выращивания на обширных площадях, является экономически эффективным по сравнению с существующими способами продукции фруктана, например, включающими в себя экстракцию инулинов из цикория.

Широкомасштабную экстракцию фруктана можно осуществить путем перемалывания зерна с получением непросеянной муки и затем экстрагирования общих сахаров, содержащих фруктаны, из муки в воду. Указанные процессы проводят при температуре окружающей среды, после чего смесь центрифугируют или фильтруют. Затем супернатант нагревают примерно до 80°C, центрифугируют, чтобы удалить белки, и сушат. Альтернативно муку экстрагируют 80%-ным этанолом, фазы разделяют с использованием смесей вода/хлороформ, и водную фазу, содержащую сахара и фруктан, сушат и перерабатывают в воде. Из экстракта, полученного любым способом, удаляют сахарозу ферментативным методом путем

добавления  $\alpha$ -глюкозидазы, затем удаляют гексозы (моносахариды) путем гель-фильтрации с получением фракций фруктана разного размера. В результате можно получить обогащенную фруктаном фракцию, содержащую по меньшей мере 80% фруктана.

Таблица 1

## Содержание RS и уровень GI в непросеянной муке ячменя

Генотип	Название линии	GI	Средний уровень GI	SD	Содержание RS в непросеянной муке (г/100 г)	Среднее содержание RS	SD
Мутант amol	HAG	64.6	64.6 <sup>a</sup>		0.9	0.9 <sup>c</sup>	
Двойной мутант, имеющий кожуру	HNF7-88	81.0	79.0 <sup>a</sup>	2.8	3.5	3.4 <sup>a</sup>	0.1
Двойной мутант, не имеющий кожуру	HNF7-122	77.0			3.3		
Двойной мутант, не имеющий кожуру	HNF7-4	77.3	78.0 <sup>a</sup>	0.9	3.3	3.5 <sup>a</sup>	0.3
Двойной мутант, не имеющий кожуру	HNF7-7	79.1			3.4		
Двойной мутант, не имеющий кожуру	HNF7-29	77.8			3.8		
Мутант SSIa	292.0	68.2	68.2 <sup>a</sup>		1.9	1.9 <sup>b</sup>	
Ячмень дикого типа	Himalaya	76.6	70.8 <sup>b</sup>	9.6	0.6	0.5 <sup>c</sup>	0.1
Ячмень дикого типа	Glacier	76.0			0.4		
Ячмень дикого типа	Tantangara	59.7			0.4		
LSD (5%)			22.6			0.7	

LSD - наименьшее значимое различие, различия, превышающие это значение, являются значимыми ( $P < 0,05$ );

a, b и c - по отношению к LSD средние значения с одинаковыми буквами не обладают значимыми различиями, a средние значения с разными буквами обладают значимыми различиями ( $P < 0,05$ ).

Таблица 2

## Содержание RS и уровень GI в хлебе, полученном из 100%-ной непросеянной муки ячменя

ID образца	Генотип	Название линии	Содержание RS (г/100 г)	Уровень GI
ZL2.9.1	Мутант amol	HAG	2.39	70
ZL2.9.1	Мутант amol	HAG	2.01	67
10.1	Двойной мутант, не имеющий кожуру	HNF7_29	5.46	57
10.1	Двойной мутант, не имеющий кожуру	HNF7_29	5.6	62
6.1	Двойной мутант, не имеющий кожуру	HNF7_4	5.53	66
6.1	Двойной мутант, не имеющий кожуру	HNF7_4	5.32	61
2.1	Двойной мутант, не имеющий кожуру	HNF7_7	5.61	70
2.1	Двойной мутант, не имеющий кожуру	HNF7_7	5.65	65
11.1	Двойной мутант, имеющий кожуру	HNF7_88	5.76	66
11.1	Двойной мутант, имеющий кожуру	HNF7_88	5.96	62
1.1	Двойной мутант, имеющий кожуру	HNF7_122	5.29	57
1.1	Двойной мутант, имеющий кожуру	HNF7_122	5.2	58
ZL1.8.1	Мутант SSIa	871	1.96	49
ZL1.8.1	Мутант SSIa	871	2.08	53
ZL1.1.1	Мутант SSIa	Himalaya292	1.49	57
ZL1.1.1	Мутант SSIa	Himalaya292	1.58	60
4.1	Мутант SSIa	HNF7_50	2.22	74
4.1	Мутант SSIa	HNF7_50	2.26	74
3.1	Линия дикого типа	Himalaya	0.65	82
3.1	Линия дикого типа	Himalaya	0.52	82
9.1	Линия дикого типа	Tantangara	1.04	76
9.1	Линия дикого типа	Tantangara	1.05	81

Таблица 3  
Статистический анализ влияния генотипа на содержание RS в хлебе,  
полученном с использованием 30- или 100%-ной муки ячменя

Генотип	№ образца	Содержание RS 100% (г/100 г)	SD	Содержание RS 30% (г/100 г)	SD
Мутант amo1	2	2.2 <sup>b</sup>	0.3	1.9 <sup>b</sup>	0.3
Двойной мутант, не имеющий кожуру	6	5.5 <sup>a</sup>	0.1	3.1 <sup>a</sup>	0.2
Двойной мутант, имеющий кожуру	4	5.4 <sup>a</sup>	0.4	3.0 <sup>a</sup>	0.1
Мутант SSIIa	6	1.9 <sup>b</sup>	0.4	1.8 <sup>b</sup>	0.3
Дикого типа	4	0.7 <sup>c</sup>	0.3	1.0 <sup>c</sup>	0.1
L.S.D. (P<0.05)		0.5		0.3	

Примечание.

Содержание RS 30% - содержание RS в хлебе, полученном с использованием 30%-ной муки ячменя;

содержание RS 100% - содержание RS в хлебе, полученном с использованием 100%-ной муки ячменя;

LSD - наименьшее значимое различие, различия, превышающие это значение, являются значимыми (P<0,05);

a, b и c - по отношению к LSD средние значения с одинаковыми буквами не обладают значимыми различиями, а средние значения с разными буквами обладают значимыми различиями (P<0,05).

Таблица 4  
Содержание RS и уровень GI в хлебе, полученном из 30%-ной муки ячменя

ID образца	Генотип	Название линии	Содержание RS (г/100 г)	Уровень GI
ZL1.4.1	Мутант amo1	HAG	2.15	82
ZL1.4.1	Мутант amo1	HAG	1.72	87
ZL1.5.1	Двойной мутант, не имеющий кожуру	HNF7_29	3.01	83
ZL1.5.1	Двойной мутант, не имеющий кожуру	HNF7_29	3.07	82
ZL2.7.1	Двойной мутант, не имеющий кожуру	HNF7_4	3.03	83
ZL2.7.1	Двойной мутант, не имеющий кожуру	HNF7_4	3.27	83
ZL2.6.1	Двойной мутант, не имеющий кожуру	HNF7_7	3.15	84
ZL2.6.1	Двойной мутант, не имеющий кожуру	HNF7_7	3.03	84
ZL1.3.1	Двойной мутант, имеющий кожуру	HNF7_88	3.04	83
ZL1.3.1	Двойной мутант, имеющий кожуру	HNF7_88	3.09	86
ZL1.10.1	Двойной мутант, имеющий кожуру	HNF7_122	3.01	81
ZL1.10.1	Двойной мутант, имеющий кожуру	HNF7_122	2.71	84
ZL2.1.1	Мутант SSIIa	871	1.87	77
ZL2.1.1	Мутант SSIIa	871	1.82	81
ZL2.3.1	Мутант SSIIa	Himalaya292	1.7	80
ZL2.3.1	Мутант SSIIa	Himalaya292	1.87	82
ZL2.2.1	Мутант SSIIa	HNF7_50	2.15	86
ZL2.2.1	Мутант SSIIa	HNF7_50	1.69	84
ZL1.2.1	Линия дикого типа	Himalaya	0.96	93
ZL1.2.1	Линия дикого типа	Himalaya	1.02	94
ZL2.8.1	Линия дикого типа	Tantangara	0.84	83
ZL2.8.1	Линия дикого типа	Tantangara	0.89	85

Таблица 5  
Статистический анализ влияния генотипа на содержание RS (мг RS на г крахмала)  
в хлебе, полученном с использованием 100%-ной муки ячменя

Генотип	№ образца	Содержание RS 100% (г/100 г)	SD	Общее содержание крахмала в хлебе	SD	мг RS на г крахмала	SD
Мутант amo1	1	2.2 <sup>b</sup>	0.3	57.4 <sup>a</sup>	-	41.7 <sup>c</sup>	
Двойной мутант, не имеющий кожуру	3	5.5 <sup>a</sup>	0.1	52.7 <sup>a</sup>	1.8	105.1 <sup>a</sup>	2.8
Двойной мутант, имеющий кожуру	2	5.4 <sup>a</sup>	0.4	51.8 <sup>a</sup>	4.7	106.9 <sup>a</sup>	3.3
Мутант SSIIa	3	1.9 <sup>b</sup>	0.4	25.1 <sup>b</sup>	3.0	75.0 <sup>b</sup>	8.1
Дикого типа	2	0.7 <sup>c</sup>	0.3	51.6 <sup>a</sup>	2.6	16.3 <sup>d</sup>	4.5
L.S.D. (P<0.05)		0.5		8.9		16.3	

Таблица 6  
Статистический анализ влияния генотипа на содержание RS (мг RS на г крахмала)  
в хлебе, полученном с использованием 30%-ной муки ячменя

Генотип	№ образца	Содержание RS 30% (г/100 г)	SD	Общее содержание крахмала в хлебе	SD	мг RS на г крахмала	SD
Мутант apo1	1	1.9 <sup>b</sup>	0.3	61.9 <sup>a</sup>	-	30.7 <sup>b</sup>	
Двойной мутант, не имеющий кожуру	3	3.1 <sup>a</sup>	0.2	65.3 <sup>a</sup>	2.2	47.5 <sup>a</sup>	0.8
Двойной мутант, имеющий кожуру	2	3.0 <sup>a</sup>	0.1	63.7 <sup>a</sup>	1.1	47.1 <sup>a</sup>	3.0
Мутант SSIIa	3	1.8 <sup>b</sup>	0.3	58.0 <sup>b</sup>	2.3	31.6 <sup>b</sup>	0.3
Дикого типа	2	1.0 <sup>c</sup>	0.1	65.1 <sup>a</sup>	0.1	14.6 <sup>c</sup>	1.1
L.S.D. (P<0.05)		0.3		5.6		4.2	

Таблица 7  
Статистический анализ влияния генотипа на уровень GI в хлебе массой 10 г,  
полученном с использованием 30- или 100%-ной муки ячменя

Генотип	№ образца	Уровень GI 100% SD	Уровень GI 30% SD
Мутант apo1	2	68.5 <sup>a</sup> 2.1	84.5 <sup>a</sup> 3.5
Двойной мутант, не имеющий кожуру	6	63.5 <sup>b</sup> 4.5	83.2 <sup>a</sup> 2.1
Двойной мутант, имеющий кожуру	4	60.8 <sup>b</sup> 4.1	83.5 <sup>a</sup> 0.8
Мутант SSIIa	6	63.9 <sup>b</sup> 10.3	82.3 <sup>a</sup> 3.9
Дикого типа	4	80.3 <sup>a</sup> 2.9	87.8 <sup>a</sup> 4.5
L.S.D. (P<0.05)		12.1	5.8

Уровень GI 30% - уровень GI в хлебе, полученном с использованием 30%-ной муки ячменя;

уровень GI 100% - уровень GI в хлебе, полученном с использованием 100%-ной муки ячменя;

LSD - наименьшее значимое различие, различия, превышающие это значение, являются значимыми (P<0,05);

a, b и c - по отношению к LSD средние значения с одинаковыми буквами не обладают значимыми различиями, а средние значения с разными буквами обладают значимыми различиями (P<0,05).

Таблица 8  
Условное обозначение последовательностей

Идентификационный номер последовательности	Описание
1	Полноразмерная последовательность кДНК, мРНК синтазы крахмала II <i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>Vulgare</i> . № доступа AY133249, 2972 нуклеотида, участок, кодирующий белок: нуклеотиды: 114-2522, расположен на хромосоме 7 ячменя
2	Аминокислотная последовательность синтазы крахмала II, кодируемая SEQ ID NO: 1, 802 аминокислоты
3	Олигонуклеотидный праймер, соответствующий последовательности кДНК SSIIa, GenBank №

	AY133249, начиная с нуклеотида 1616 (SSIIaF)
4	Олигонуклеотидный праймер, соответствующий последовательности кДНК SSIIa, GenBank № AY133249, начиная с нуклеотида 2044 (SSIIaR)
5	Олигонуклеотидный праймер, соответствующий локусу amp1 Hnac0501F
6	Олигонуклеотидный праймер, соответствующий локусу amp1 Hnac0501R
7	Олигонуклеотидный праймер SSIIIaF
8	Олигонуклеотидный праймер SSIIIaR
9	Нуклеотидная последовательность SSIIa M292 (кДНК)
10	Аминокислотная последовательность, кодируемая нуклеотидами 1-1852 SEQ ID NO: 9
11	Аминокислотная последовательность, кодируемая нуклеотидами 1856-2946 SEQ ID NO: 9

Таблица 9

## Разделение аминокислот на подклассы

Подклассы	Аминокислоты
Кислые	Аспарагиновая кислота, Глутаминовая кислота
Основные	нециклические: Аргинин, Лизин; циклические: Гистидин
Заряженные	Аспарагиновая кислота, Глутаминовая кислота, Аргинин, Лизин, Гистидин
Маленькие полярные/нейтральные	Глицин, Серин, Аланин, Треонин, Пролин, Аспарагин, Гистидин, Глутамин, Цистеин, Серин, Треонин
Полярные/большие гидрофобные	Аспарагин, Глутамин, Тирозин, Валин, Изолейцин, Лейцин, Метионин, Фенилаланин, Триптофан
Ароматические остатки, влияющие на ориентацию цепи	Триптофан, Тирозин, Фенилаланин, Глицин и Пролин

Таблица 10

## Типичные и предпочтительные замены аминокислот

Исходный остаток	Типичные замены	Предпочтительные замены
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser	Ser
Gln	Asn, His, Lys,	Asn
Glu	Asp, Lys	Asp
Gly	Pro	Pro
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleu	Leu
Leu	Norleu, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Ile, Phe	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro	Gly	Gly
Ser	Thr	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleu	Leu

## Список литературы

- Adams *et al.*, *Anal. Biochem.*, 266: 77-84, 1999
- Almeida and Allshire, *Trends Cell Biol.* 15: 251-258, 2005
- Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389, 1997
- An, *Methods in Enzymology*, 153: 292, 1987
- Andersson *et al.*, *J. Cereal Sci.* 30: 183-191, 1999
- Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Inc, Unit 19.3 and Chapter 15, 1994-1998
- Ausubel *et al.*, (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, 6.3.1-6.3.6., 1989
- Ball and Morell, *Annu Rev Plant Biol.* 54: 207-233, 2003
- Ball *et al.*, *Cell* 86(3): 349-52, 1996
- Barkex *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 2: 235-350, 1983
- Batey *et al.*, *Starch* 48: 338-344, 1997
- Bechtold *et al.*, *C.R. Acad. Sci. Paris*, 316: 1194, 1993
- Bernfeld, Amylases alpha and beta. In: Colowick and Kaplan (eds), *Methods in enzymology*, Academic, NY, p. 149, 1955
- Bevan *et al.*, *Nucl. Acid Res.*, 11: 369, 1983
- Birch, *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 48: 297-326, 1997
- Bird *et al.* *Br. J. Nutr.* 92: 607-615, 2004b
- Bird *et al.*, *J Nutr.* 134: 831-835, 2004a
- Bourque, *Plant Sci.* 105: 125-149, 1995
- Boyer and Preiss, *Carbohydrate Research*, 61: 321-334, 1978
- Buléon *et al.*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 23: 85-112, 1998
- Campbell *et al.*, *J Sci Food Agric* 79: 232-236, 1999
- Cao *et al.*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 373: 135-146, 2000
- Cao *et al.*, *Plant Physiol.* 120(1): 205-16, 1999
- Comai *et al.*, *Plant J.* 37: 778-786, 2004
- Craig *et al.*, *Plant Cell*, 10: 413-426, 1998
- De Framond, *Biotechnology*, 1: 262, 1983
- Deikman *et al.*, *EMBO J.*, 2: 3315-3320, 1998
- DellaPenna *et al.*, *Plant Cell*, 1: 53-63, 1989
- Delvalle *et al.*, *Plant J.* 43(3): 398-412, 2005
- Denyer *et al.*, *Plant Physiol.* 112(2):779-85, 1996
- Durai *et al.*, *Nucleic Acids Research* 33(18): 5978-5990, 2005
- Fromm *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 5824, 1985
- Fujita *et al.*, *Plant Physiol.* 144: 2009-2023, 2007
- Fujita *et al.*, *Plant Physiol.* 140: 1070-1084, 2006
- Gao *et al.*, *Plant Cell*, 10: 399-412, 1998
- Garfinkel *et al.*, *Cell*, 27: 143-153, 1983
- Greve, *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 499-511, 1983
- Harayama, *Trends Biotechnol.* 16: 76-82, 1998
- Hartmann and Endres, *Manual of Antisense Methodology*, Kluwer, 1999
- Haseloff and Gerlach, *Nature* 334: 585-591, 1988
- Hayashi *et al.*, *Effects of ion beam irradiation on mutation induction in rice. Cyclotrons and Their Applications 2007*, Eighteenth International Conference 237-239, 2007
- Hedman and Boyer, *Biochemical Genetics*. 20: 483-492, 1982
- Hendrix *et al.*, *J. Insect Physiol.*, 47: 423-432, 2001
- Henikoff *et al.*, *Plant Physiol.* 135: 630-636, 2004
- Hinchee *et al.*, *Biotech* 6: 915, 1988
- Hirose and Terao, *Planta*, 220: 9-16, 2004
- Hoekema *et al.*, *Nature*, 303: 179, 1983
- James *et al.*, *Curr Opin Plant Biol*, 6: 215-222, 2003
- James *et al.*, *Plant Cell*, 7: 417-429, 1995
- Jane *et al.*, *Cereal Chem.* 76: 629-637, 1999
- Joshi, *Nucl. Acid Res.* 15: 6643, 1987
- Kazama *et al.*, *Plant Biotechnology* 25: 113-117, 2008
- Kim *et al.*, *J Cereal Sci.* 37: 195-204, 2003
- Klein *et al.*, *Nature*, 327: 70, 1987
- Konik-Rose *et al.*, *Starch-Stärke*, 53: 14-20, 2001
- Konik-Rose *et al.*, *Theor Appl Genet.* 115: 1053-1065, 2007

- Kossmann and Lloyd, *Crit Rev Plant Sci*, 19: 171–226, 2000
- Kubo *et al.*, *Plant Physiology*, 121: 399–409, 1999
- Langridge *et al.*, *Aust J Agric Res* 52: 1043–1077, 2001
- Le Provost *et al.*, *Trends in Biotechnology* 28(3): 134–141, 2009
- Lemieux, *Current Genomics*, 1: 301–311, 2000
- Li *et al.*, *Funct Integr Genomics*, 3: 76–85, 2003
- Li *et al.*, *Plant Physiol*, 120: 1147–1156, 1999a
- Li *et al.*, *Plant Physiology*, 123: 613–624, 2000
- Li *et al.*, *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 1208–1216, 1999b
- Libessart *et al.*, *Plant Cell*, 7(8): 1117–1127, 1995
- Liu *et al.*, *Biotechnology and Bioengineering*, 106: 97–105, 2010
- Lunn and Hatch, *Planta* 197: 385–391, 1995
- Maddelein *et al.*, *J Biol Chem*, 269(40): 25150–7, 1994
- McPherson and Moller (Ed), BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, 2000
- Medberry *et al.*, *Plant Cell*, 4: 185–192, 1992
- Medberry *et al.*, *Plant J*, 3: 619–626, 1993
- Millar and Waterhouse, *Funct Integr Genomics*, 5: 129–135, 2005
- Miura *et al.*, *Euphytica*, 108: 91–95, 1999
- Miura *et al.*, *Euphytica*, 123: 353–359, 2002
- Mizuno *et al.*, *Journal of Biochemistry*, 112: 643–651, 1992
- Morell *et al.*, *Control of starch biosynthesis in vascular plants and algae*. In: *Plaxton WC, McManus MT (eds) Control of primary metabolism in plants. Annual plant reviews, vol 22*, Blackwell, Oxford, pp 258–289, 2006
- Morell *et al.*, *Euphytica*, 119: 55–58, 2001
- Morell *et al.*, *J Appl Glycosci*, 50: 217–224, 2003a
- Morell *et al.*, *Plant J* 34: 173–185, 2003b
- Morrison and Laignelet, *J Cereal Sci*, 1: 9–20, 1983
- Morrison *et al.*, *J Cereal Sci*, 2: 257–271, 1984
- Myers *et al.*, *Plant Physiology*, 122: 989–997, 2000
- Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443–453, 1970
- Niedz *et al.*, *Plant Cell Reports*, 14: 403, 1995
- O'Shea *et al.*, *Carbohydr Res*, 307: 1–12, 1998
- Ohdan *et al.*, *J Exp Bot* 56: 3229–3244, 2005
- Ow *et al.*, *Science*, 234: 856, 1986
- Pasquinelli *et al.*, *Curr Opin Genet Develop* 15: 200–205, 2005
- Petriman *et al.*, *Gene*, 113: 157–163, 1992
- Potrykus *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 199: 183, 1985
- Prasher *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 126: 1259–68, 1985
- Rahman *et al.*, *J Cereal Sci*, 31: 91–110, 2000
- Ramsay *et al.*, *Genetics*, 156(4): 1997–2005, 2000
- Regina *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 3546–3551, 2006
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> Ed., Mack Publishing, Company, Easton, PA, U.S.A. 1990
- Robinson, *The Organic Constituents of Higher Plants*, Cordus Press, North Amherst, USA, Example 9, 1980
- Roldan *et al.*, *Plant J*, 49: 492–504, 2007
- Ruuska *et al.*, *Funct Plant Biol* 33: 799–809, 2006
- Salomon *et al.*, *EMBO J.*, 3: 141–146, 1984
- Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY, 1989
- Schondelmaier *et al.*, *Plant Breeding*, 109: 274–281, 1992
- Senior, *Biotech. Genet. Engin. Revs*, 15: 79–119, 1998
- Shimamoto *et al.*, *Nature*, 338: 274–276, 1989
- Shippy *et al.*, *Mol. Biotech*, 12: 117–129, 1999
- Slade and Knauf, *Transgenic Res*, 14: 109–115, 2005
- Smith *et al.*, *Nature*, 407: 319–320, 2000
- Smith, *Biomacromolecules*, 2: 335–341, 2001
- Stalker *et al.*, *Science*, 242: 419, 1988
- Sun *et al.*, *The New Phytologist*, 137: 215–215, 1997
- Tetlow *et al.*, *J Exp Bot*, 55: 2131–2145, 2004
- Theander *et al.*, *JAOAC Int* 78: 1030–1044, 1995
- Thillet *et al.*, *J. Biol. Chem*, 263: 12500, 1988

- Thompson *et al.*, *Carbohydrate Res.*, 331: 149-161, 2001  
 Tingay *et al.*, *Plant J.* 11: 1369-1376, 1997  
 Topping *et al.*, *Starch-Starke*, 55: 539-545, 2003  
 Veronese *et al.*, *Enz. Microbial Tech.*, 24: 263-269, 1999  
 Wan and Lemaux, *Plant Physiol.* 104: 37-48, 1994  
 Waterhouse *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 13959-13964, 1998  
 Yamamori and Quynh, *Theor. Appl. Genet.*, 100: 32-38, 2000  
 Yamamori *et al.*, *Theor. Appl. Genet.*, 101: 21-29, 2000  
 Yasui *et al.*, *J. Cereal Sci.*, 24: 131-137, 1996  
 Zhang *et al.*, *Plant Physiol.* 138: 663-674, 2005  
 Zwar and Chandler, *Planta* 197: 39-48, 1995

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> Commonwealth Scientific and Industrial Research  
 Organisation  
 Australian Capital Ventures Limited  
 LI, Zhongyi (US Only)  
 MORELL, Matthew K (US Only)
- <120> Ячмень и его применение
- <130> 31001967/ЖЕН/DXT
- <150> AU2009903563
- <151> 2009-07-30
- <160> 11
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 2972
- <212> ДНК
- <213> *Hordeum vulgare*
- <400> 1
- cctcgagggtg cgtttaccac acacagagta cactccaact ccagtccaat ccagcccact 60
- gccgcttctg cccgcccacg gtaccgtcgc ccgcccgat cccggccgcc gccatgtcgt 120
- cggcgggtcgc gtcccccgcg tccttctctg cgtcgcgctc cgctctgccc gggagatcat 180
- cacggaggag ggcgagggtg ggcgcgtcgc caaccgcgc tggggccggc aggctgcaat 240
- ggcggccgctc gccgctgcag cgcacggctc gcgacggagc ggtggccgcg cgcgcccgcc 300
- ggatcgacga cgcgcgccc ggtaggcagc cccgcgctcg ccgctatggc gccgccacca 360
- aggctcgcgga tcccgtcaag acgctcgatc gcgacgccgc ggaagggtgtt gggccgtccc 420
- cgcggcacc gaggcaggac gccgcccgtc tgccgagtaa gaacggcacg ctgatcaacg 480
- gtgagaacaa acctaccggc ggcggtggcg cgactaaaga cagcgggctg cccacaccgg 540
- cacgcgcgcc ccatctgtca atccagaaca gactaccggt gaacgggtgaa aacaaacata 600
- aggctgcctc gccgcccacc agcatagtgg atgtcgcgctc tccgggttcc gcagctaaca 660
- tttccatcag taacaagggtg ccgcccgtcg ttgtcccagc caagaagacg ccgcccgtcgt 720
- ccgttttccc ggccaagaag acgctgcgct cgtccggctc aaattttgtg tcctcggcct 780
- ctgctcccag gctggacact gtcagcgatg tggaaactgc acagaagaag gatgcgctga 840

ttgtcaaaga agctccaaaa ccaaaggctc tttcggcccc tgcagcccc gctgtacaag	900
aagacctttg ggatttcaag aaatacattg gtttcgagga gcccgaggag gccaaggatg	960
atggctcggc tgttgcagat gatgcgggtt cctttgaaca tcaccagaat catgattccg	1020
gacctttggc aggggagaac gtcataaacg tggctgctgt tgctgctgaa tgttctcctt	1080
ggtgcaaaac aggtggtcct ggagatggtg cgggtgcttt gcccaaggct ttggctaaga	1140
gaggacatcg tgttatggtt gtggtaccaa ggtatgggga ctatgaggaa gcctacgatg	1200
tcggagtccg aaaatactac aaggctgctg gacaggatat ggaagtgaat tatttccatg	1260
cttatatcga tggagtggat tttgtgttca ttgacgctcc tctcttcoga caccgtcagc	1320
aagacattta tgggggcagc agacaggaaa ttatgaagcg catgattttg ttctgcaagg	1380
ccgctgtcga ggttccttgg cacgttccat gcggcgggtg cccttacggg gatggaaatc	1440
tggcttccat tgcaaatgat tggcacacgg cactcctgcc tgtctatctg aaagcatatt	1500
acagggacca tggtttgatg caatacagtc gctccgttat ggtgatacat aacatcgctc	1560
accagggccg tggccctgta gatgaattcc cgttcaccga gttgcctgag cactacctgg	1620
aacacttcag actgtacgac ccgctcggcg gtgagcacgc caactacttc gccgcgggcc	1680
tgaagatggc ggaccagggt gtcgtcgtga gccccgggta cctgtgggag ctgaagacgg	1740
tggagggcgg ctgggggctt cacgacatca tacggcagaa cgactggaag acccgcgga	1800
tcgtgaacgg catcgacaac atggagtgga accctgaggt ggacgtccac ctgaagtcgg	1860
acggctacac caacttctcc ctgaagacgc tggactccgg caagcggcag tgcaaggagg	1920
ccctgcagcg cgagctgggg ctgcaggctc gcggcgacgt gccgctgctc gggttcatcg	1980
ggcggctgga cgggcagaag ggcgtggaga tcatcgcgga cgcgatgccc tggatcgtga	2040
gccaggacgt gcagctggtg atgctgggca cggggcgcca cgacctggag agcatgctgc	2100
agcacttcga gcgggagcac cacgacaagg tgcgcgggtg ggtggggttc tccgtgcgcc	2160
tggcgcaacc gatcacggcg ggcgcgacg cgtcctcat gccctccgg ttcgagccgt	2220
gcgggctgaa ccagctctac gcgatggcct acggcaccat cctgtcgtg cacgccgtcg	2280
gcggcttgag ggataccgtg ccgccgttcg acccctcaa cactccggg ctcggtgga	2340
cgttcgaccg cgccgaggcg cacaaactga tcgaggcgct cgggactgc ctccgcacct	2400
accgggacca caaggagagc tggaggggcc tccaggagcg cggcatgtcg caggacttca	2460
gctgggaaca tgccccaag ctctacgagg acgtcctcgt ccaggccaag taccagtgg	2520
gaacgctgct acccgttcca gccccgatg cgtgcatgag aggatggaaa tgcgcattgc	2580
gcacttgag atttggcgca cgcaggaacg tgccgtcctt cttgatgaga acgccggcat	2640
ccgcgagggt gagacgctga ttccgatctg gtccgtcgca gagtagagtg aaacgctcct	2700
tgttgcaggt atatgggaat gtttttttc cttttttttt gcgagggagg tatatgggaa	2760
tgttaacttg gtattgtaat gtggtatgct gtgtgcatta ttacatcgggt tgttgttgc	2820
tattcttgc agctaagtcg gaggccaaga gcgaaagcta gtcacatgt ctgatgatg	2880
caagtgacat ggttggtttg gttgtgcagt gcaaacggca ggaatgggaa gtgaattcct	2940

ccctgcttaa attaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa

2972

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 802

&lt;212&gt; BEJOK

&lt;213&gt; Hordeum vulgare

&lt;400&gt; 2

Met Ser Ser Ala Val Ala Ser Pro Ala Ser Phe Leu Ala Leu Ala Ser  
 1 5 10 15

Ala Ser Pro Gly Arg Ser Ser Arg Arg Arg Ala Arg Val Gly Ala Ser  
 20 25 30

Pro Thr Arg Ala Gly Ala Gly Arg Leu Gln Trp Arg Pro Ser Pro Leu  
 35 40 45

Gln Arg Thr Ala Arg Asp Gly Ala Val Ala Ala Arg Ala Ala Gly Ile  
 50 55 60

Asp Asp Ala Ala Pro Gly Arg Gln Pro Arg Ala Arg Arg Tyr Gly Ala  
 65 70 75 80

Ala Thr Lys Val Ala Asp Pro Val Lys Thr Leu Asp Arg Asp Ala Ala  
 85 90 95

Glu Gly Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ala Pro Arg Gln Asp Ala Ala Arg  
 100 105 110

Leu Pro Ser Lys Asn Gly Thr Leu Ile Asn Gly Glu Asn Lys Pro Thr  
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ala Thr Lys Asp Ser Gly Leu Pro Thr Pro Ala Arg  
 130 135 140

Ala Pro His Leu Ser Ile Gln Asn Arg Val Pro Val Asn Gly Glu Asn  
 145 150 155 160

Lys His Lys Val Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ile Val Asp Val Ala Ser  
 165 170 175

Pro Gly Ser Ala Ala Asn Ile Ser Ile Ser Asn Lys Val Pro Pro Ser  
 180 185 190

Val Val Pro Ala Lys Lys Thr Pro Pro Ser Ser Val Phe Pro Ala Lys  
 195 200 205

Lys Thr Leu Pro Ser Ser Gly Ser Asn Phe Val Ser Ser Ala Ser Ala  
 210 215 220

Pro Arg Leu Asp Thr Val Ser Asp Val Glu Leu Ala Gln Lys Lys Asp  
 225 230 235 240

## 032207

Ala Leu Ile Val Lys Glu Ala Pro Lys Pro Lys Ala Leu Ser Ala Pro  
245 250 255

Ala Ala Pro Ala Val Gln Glu Asp Leu Trp Asp Phe Lys Lys Tyr Ile  
260 265 270

Gly Phe Glu Glu Pro Val Glu Ala Lys Asp Asp Gly Ser Ala Val Ala  
275 280 285

Asp Asp Ala Gly Ser Phe Glu His His Gln Asn His Asp Ser Gly Pro  
290 295 300

Leu Ala Gly Glu Asn Val Met Asn Val Val Val Val Ala Ala Glu Cys  
305 310 315 320

Ser Pro Trp Cys Lys Thr Gly Gly Leu Gly Asp Val Ala Gly Ala Leu  
325 330 335

Pro Lys Ala Leu Ala Lys Arg Gly His Arg Val Met Val Val Val Pro  
340 345 350

Arg Tyr Gly Asp Tyr Glu Glu Ala Tyr Asp Val Gly Val Arg Lys Tyr  
355 360 365

Tyr Lys Ala Ala Gly Gln Asp Met Glu Val Asn Tyr Phe His Ala Tyr  
370 375 380

Ile Asp Gly Val Asp Phe Val Phe Ile Asp Ala Pro Leu Phe Arg His  
385 390 395 400

Arg Gln Gln Asp Ile Tyr Gly Gly Ser Arg Gln Glu Ile Met Lys Arg  
405 410 415

Met Ile Leu Phe Cys Lys Ala Ala Val Glu Val Pro Trp His Val Pro  
420 425 430

Cys Gly Gly Val Pro Tyr Gly Asp Gly Asn Leu Val Phe Ile Ala Asn  
435 440 445

Asp Trp His Thr Ala Leu Leu Pro Val Tyr Leu Lys Ala Tyr Tyr Arg  
450 455 460

Asp His Gly Leu Met Gln Tyr Ser Arg Ser Val Met Val Ile His Asn  
465 470 475 480

Ile Ala His Gln Gly Arg Gly Pro Val Asp Glu Phe Pro Phe Thr Glu  
485 490 495

Leu Pro Glu His Tyr Leu Glu His Phe Arg Leu Tyr Asp Pro Val Gly  
500 505 510

Gly Glu His Ala Asn Tyr Phe Ala Ala Gly Leu Lys Met Ala Asp Gln  
515 520 525

## 032207

Val Val Val Val Ser Pro Gly Tyr Leu Trp Glu Leu Lys Thr Val Glu  
 530 535 540

Gly Gly Trp Gly Leu His Asp Ile Ile Arg Gln Asn Asp Trp Lys Thr  
 545 550 555 560

Arg Gly Ile Val Asn Gly Ile Asp Asn Met Glu Trp Asn Pro Glu Val  
 565 570 575

Asp Val His Leu Lys Ser Asp Gly Tyr Thr Asn Phe Ser Leu Lys Thr  
 580 585 590

Leu Asp Ser Gly Lys Arg Gln Cys Lys Glu Ala Leu Gln Arg Glu Leu  
 595 600 605

Gly Leu Gln Val Arg Gly Asp Val Pro Leu Leu Gly Phe Ile Gly Arg  
 610 615 620

Leu Asp Gly Gln Lys Gly Val Glu Ile Ile Ala Asp Ala Met Pro Trp  
 625 630 635 640

Ile Val Ser Gln Asp Val Gln Leu Val Met Leu Gly Thr Gly Arg His  
 645 650 655

Asp Leu Glu Ser Met Leu Gln His Phe Glu Arg Glu His His Asp Lys  
 660 665 670

Val Arg Gly Trp Val Gly Phe Ser Val Arg Leu Ala His Arg Ile Thr  
 675 680 685

Ala Gly Ala Asp Ala Leu Leu Met Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly  
 690 695 700

Leu Asn Gln Leu Tyr Ala Met Ala Tyr Gly Thr Ile Pro Val Val His  
 705 710 715 720

Ala Val Gly Gly Leu Arg Asp Thr Val Pro Pro Phe Asp Pro Phe Asn  
 725 730 735

His Ser Gly Leu Gly Trp Thr Phe Asp Arg Ala Glu Ala His Lys Leu  
 740 745 750

Ile Glu Ala Leu Gly His Cys Leu Arg Thr Tyr Arg Asp His Lys Glu  
 755 760 765

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

Glu His Ala Ala Lys Leu Tyr Glu Asp Val Leu Val Gln Ala Lys Tyr  
 785 790 795 800

Gln Trp

<210> 3  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Hordeum vulgare  
  
 <400> 3  
 cctggaacac ttcagactgt acg 23

<210> 4  
 <211> 22  
 <212> ДНК  
 <213> Hordeum vulgare  
  
 <400> 4  
 agcatcacca gctgcacgtc ct 22

<210> 5  
 <211> 38  
 <212> ДНК  
 <213> Hordeum vulgare  
  
 <400> 5  
 cacgacgttg taaaacgaca cttaagtgcc atgcaaag 38

<210> 6  
 <211> 19  
 <212> ДНК  
 <213> Hordeum vulgare  
  
 <400> 6  
 agggacaaaa atggctaag 19

<210> 7  
 <211> 17  
 <212> ДНК  
 <213> Triticum aestivum  
  
 <400> 7  
 ggaggtctcg gggatgt 17

<210> 8  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Triticum aestivum  
  
 <400> 8  
 gctccaggaa gtaaacggtc agg 23

<210> 9  
 <211> 2946  
 <212> ДНК  
 <213> Hordeum vulgare  
  
 <400> 9  
 gtgcgtttac cccacacaga gtacactcca actccagtc agtccagccc actgccgctt 60  
 ctgccgccc atcgtaccgt cgcgccccc gatcccggcc gccgccatgt cgtcggcgggt 120  
 cgcgtcccc gcgtccttcc tcgcgctcgc gtccgcctcg cccgggagat catcacggag 180

gagggcgagg	gtgggcgctg	cgccaaccgc	cgctggggcc	ggcaggctgc	aatggcggcc	240
gtcgccgctg	cagcgcacgg	ctcgcgacgg	agcggtgggc	gcgcgcgccc	ccgggatcga	300
cgacgcccgc	cccggtaggc	agccccgcgc	tcgcccetat	ggcgcgcca	ccaaggtcgc	360
ggatcccgtc	aagacgctcg	atcgcgacgc	cgcggaaggt	ggtgggcccgt	ccccgcggc	420
accgaggcag	gacgcccgcc	gtctgcccag	taagaacggc	acgctgatca	acggtgagaa	480
caaacctacc	ggcggcgggtg	gcgcgactaa	agacagcggg	ctgcccacac	ccgcacgcgc	540
gccccatctg	tcaatccaga	acagagtacc	ggtgaacggg	gaaaacaaac	ataaggtcgc	600
ctcgcccgcg	accagcatag	tggatgtcgc	gtctccgggt	tccgcagcca	acatttccat	660
cagtaacaag	gtgccgcccgt	ccgttgtccc	agccaagaag	acgccgcccgt	cgcccgtttt	720
cccggccaag	aaggcgcgcg	cgctgtccgt	tgtcccggcc	aagaagacgc	tgccgtcgtc	780
cggctcaaat	tttgtgtcct	cggcctctgc	tcccaggctg	gacactgtca	gcgatgtgga	840
acttgacacg	aagaaggatg	cgctgattgt	caaagaagct	ccaaaaccaa	aggctctttc	900
ggcccctgca	gccccgctg	tacaagaaga	cctttgggat	ttcaagaaat	acattgggtt	960
cgaggagccc	gtggaggcca	aggatgatgg	ctcggtctgt	gcagatgatg	cgggttcctt	1020
tgaacatcac	cagaatcatg	attccggacc	tttggcaggg	gagaacgtca	tgaacgtggg	1080
cgctcgttgc	gctgaatggt	ctccctgggt	caaacacaggt	ggtcttggag	atgttgccgg	1140
tgctttgccc	aaggctttgg	ctaagagagg	acatcgtggt	atggttggg	taccaaggta	1200
tggggactat	gaggaagcct	acgatgtcgg	agtccgaaaa	tactacaagg	ctgctggaca	1260
ggatatggaa	gtgaattatt	tccatgctta	tatcgatgga	gtggattttg	tgttcattga	1320
cgctcctctc	ttccgacacc	gtcagcaaga	catttatggg	ggcagcagac	aggaaattat	1380
gaagcgcacg	atthttgtct	gcaaggccgc	tgtcgagggt	ccttggcacg	ttccatgcgg	1440
cgggtgcctc	tacggggatg	gaaatctggt	cttcattgca	aatgattggc	acacggcact	1500
cctgcctgtc	tatctgaaag	catattacag	ggaccatggt	ttgatgcaat	acagtcgctc	1560
cgttatgggtg	atacataaca	tcgctcacca	gggcccgtggc	cctgtagatg	aattcccgtt	1620
caccgagttg	cctgagcact	acctggaaca	cttcagactg	tacgaccccc	tcggcgggtga	1680
gcacgccaac	tacttcgccg	ccggcctgaa	gatggcggac	caggttgtcg	tcgtgagccc	1740
cgggtacctg	tgggagctga	agacggtgga	gggcccgtgg	gggcttcacg	acatcatacg	1800
gcagaacgac	tggaagacct	gcggcatcgt	gaacggcatc	gacaacatgg	agtgaaacct	1860
tgaggtggtg	gtccacctga	agtcggacgg	ctacaccaac	ttctccctga	agacgctgga	1920
ctcccggcaag	cggcagtgca	aggaggccct	gcagcgcgag	ctggggctgc	aggtccgccc	1980
cgacgtgccg	ctgctcgggt	tcctcggggc	gctggacggg	cagaagggcg	tggagatcat	2040
cgccgacgcg	atgccctgga	tcgtgagcca	ggacgtgcag	ctggtgatgc	tgggcacggg	2100
gcgccacgac	ctggagagca	tgctgcagca	cttcgagcgg	gagcaccacg	acaaggtgcg	2160
cgggtgggtg	gggttctccg	tgccctggc	gcaccggatc	acggcggggc	ccgacgcgct	2220
cctcatgccc	tcccggttcg	agccgtgggg	gctgaaccag	ctctacgcca	tggcctacgg	2280

## 032207

caccatccct gtcgtgcacg ccgtcggcgg cctgagggat accgtgccgc cgttcgaccc 2340  
 cttcaaccac tccgggctcg ggtggacggt cgaccgcgcc gaggcgcaca agctgatcga 2400  
 ggcgctcggg cactgcctcc gcacctaccg ggaccacaag gagagctgga ggggcctcca 2460  
 ggagcgcggc atgtcgcagg acttcagctg ggaacatgcc gccaaactct acgaggacgt 2520  
 cctcgtccag gccaaagtacc agtggatgaac gctgctaccc ggtccagccc cgcattgcgtg 2580  
 catgagagga tggaaatgcg cattgcgcac ttgcagattt ggcgcacgca ggaacgtgcc 2640  
 gtccttcttg atgagaacgc cggcatccgc gaggttgaga cgctgattcc gatctggtcc 2700  
 gtcgcagagt agagtgaaac gctccttggt gcaggtatat gggaatgttt tttttccttt 2760  
 ttttttgcca gggaggtata tgggaatggt aacttggtat tgtaatgtgg tatgctgtgt 2820  
 gcattattac atcggttggt gttgcttatt cttgctagct aagtcggagg ccaagagcga 2880  
 aagctagctc acatgtctga tgtatgcaag tgacatggtt ggtttggttg tgcagtgcaa 2940  
 acggca 2946

<210> 10  
 <211> 571  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Hordeum vulgare

<400> 10

Met Ser Ser Ala Val Ala Ser Pro Ala Ser Phe Leu Ala Leu Ala Ser  
1 5 10 15

Ala Ser Pro Gly Arg Ser Ser Arg Arg Arg Ala Arg Val Gly Ala Ser  
20 25 30

Pro Thr Arg Ala Gly Ala Gly Arg Leu Gln Trp Arg Pro Ser Pro Leu  
35 40 45

Gln Arg Thr Ala Arg Asp Gly Ala Val Ala Ala Arg Ala Ala Gly Ile  
50 55 60

Asp Asp Ala Ala Pro Gly Arg Gln Pro Arg Ala Arg Arg Tyr Gly Ala  
65 70 75 80

Ala Thr Lys Val Ala Asp Pro Val Lys Thr Leu Asp Arg Asp Ala Ala  
85 90 95

Glu Gly Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ala Pro Arg Gln Asp Ala Ala Arg  
100 105 110

Leu Pro Ser Lys Asn Gly Thr Leu Ile Asn Gly Glu Asn Lys Pro Thr  
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ala Thr Lys Asp Ser Gly Leu Pro Thr Pro Ala Arg  
130 135 140

Ala Pro His Leu Ser Ile Gln Asn Arg Val Pro Val Asn Gly Glu Asn  
145 150 155 160

## 032207

Lys His Lys Val Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ile Val Asp Val Ala Ser  
 165 170 175

Pro Gly Ser Ala Ala Asn Ile Ser Ile Ser Asn Lys Val Pro Pro Ser  
 180 185 190

Val Val Pro Ala Lys Lys Thr Pro Pro Ser Ser Val Phe Pro Ala Lys  
 195 200 205

Lys Thr Leu Pro Ser Ser Gly Ser Asn Phe Val Ser Ser Ala Ser Ala  
 210 215 220

Pro Arg Leu Asp Thr Val Ser Asp Val Glu Leu Ala Gln Lys Lys Asp  
 225 230 235 240

Ala Leu Ile Val Lys Glu Ala Pro Lys Pro Lys Ala Leu Ser Ala Pro  
 245 250 255

Ala Ala Pro Ala Val Gln Glu Asp Leu Trp Asp Phe Lys Lys Tyr Ile  
 260 265 270

Gly Phe Glu Glu Pro Val Glu Ala Lys Asp Asp Gly Ser Ala Val Ala  
 275 280 285

Asp Asp Ala Gly Ser Phe Glu His His Gln Asn His Asp Ser Gly Pro  
 290 295 300

Leu Ala Gly Glu Asn Val Met Asn Val Val Val Val Ala Ala Glu Cys  
 305 310 315 320

Ser Pro Trp Cys Lys Thr Gly Gly Leu Gly Asp Val Ala Gly Ala Leu  
 325 330 335

Pro Lys Ala Leu Ala Lys Arg Gly His Arg Val Met Val Val Val Pro  
 340 345 350

Arg Tyr Gly Asp Tyr Glu Glu Ala Tyr Asp Val Gly Val Arg Lys Tyr  
 355 360 365

Tyr Lys Ala Ala Gly Gln Asp Met Glu Val Asn Tyr Phe His Ala Tyr  
 370 375 380

Ile Asp Gly Val Asp Phe Val Phe Ile Asp Ala Pro Leu Phe Arg His  
 385 390 395 400

Arg Gln Gln Asp Ile Tyr Gly Gly Ser Arg Gln Glu Ile Met Lys Arg  
 405 410 415

Met Ile Leu Phe Cys Lys Ala Ala Val Glu Val Pro Trp His Val Pro  
 420 425 430

## 032207

Cys Gly Gly Val Pro Tyr Gly Asp Gly Asn Leu Val Phe Ile Ala Asn  
435 440 445

Asp Trp His Thr Ala Leu Leu Pro Val Tyr Leu Lys Ala Tyr Tyr Arg  
450 455 460

Asp His Gly Leu Met Gln Tyr Ser Arg Ser Val Met Val Ile His Asn  
465 470 475 480

Ile Ala His Gln Gly Arg Gly Pro Val Asp Glu Phe Pro Phe Thr Glu  
485 490 495

Leu Pro Glu His Tyr Leu Glu His Phe Arg Leu Tyr Asp Pro Val Gly  
500 505 510

Gly Glu His Ala Asn Tyr Phe Ala Ala Gly Leu Lys Met Ala Asp Gln  
515 520 525

Val Val Val Val Ser Pro Gly Tyr Leu Trp Glu Leu Lys Thr Val Glu  
530 535 540

Gly Gly Trp Gly Leu His Asp Ile Ile Arg Gln Asn Asp Trp Lys Thr  
545 550 555 560

Arg Gly Ile Val Asn Gly Ile Asp Asn Met Glu  
565 570

<210> 11  
<211> 230  
<212> BEJOK  
<213> Hordeum vulgare

<400> 11

Asn Pro Glu Val Asp Val His Leu Lys Ser Asp Gly Tyr Thr Asn Phe  
1 5 10 15

Ser Leu Lys Thr Leu Asp Ser Gly Lys Arg Gln Cys Lys Glu Ala Leu  
20 25 30

Gln Arg Glu Leu Gly Leu Gln Val Arg Gly Asp Val Pro Leu Leu Gly  
35 40 45

Phe Ile Gly Arg Leu Asp Gly Gln Lys Gly Val Glu Ile Ile Ala Asp  
50 55 60

Ala Met Pro Trp Ile Val Ser Gln Asp Val Gln Leu Val Met Leu Gly  
65 70 75 80

Thr Gly Arg His Asp Leu Glu Ser Met Leu Gln His Phe Glu Arg Glu  
85 90 95

His His Asp Lys Val Arg Gly Trp Val Gly Phe Ser Val Arg Leu Ala  
100 105 110

His Arg Ile Thr Ala Gly Ala Asp Ala Leu Leu Met Pro Ser Arg Phe  
 115 120 125

Glu Pro Cys Gly Leu Asn Gln Leu Tyr Ala Met Ala Tyr Gly Thr Ile  
 130 135 140

Pro Val Val His Ala Val Gly Gly Leu Arg Asp Thr Val Pro Pro Phe  
 145 150 155 160

Asp Pro Phe Asn His Ser Gly Leu Gly Trp Thr Phe Asp Arg Ala Glu  
 165 170 175

Ala His Lys Leu Ile Glu Ala Leu Gly His Cys Leu Arg Thr Tyr Arg  
 180 185 190

Asp His Lys Glu Ser Trp Arg Gly Leu Gln Glu Arg Gly Met Ser Gln  
 195 200 205

Asp Phe Ser Trp Glu His Ala Ala Lys Leu Tyr Glu Asp Val Leu Val  
 210 215 220

Gln Ala Lys Tyr Gln Trp  
 225 230

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Зерно ячменя, включающее:

(i) гомозиготную мутацию в гене эндогенной синтазы крахмала IIa (SSIa), благодаря которой зерно ячменя обладает пониженным уровнем или пониженной активностью белка синтазы крахмала (SSIa), кодируемого эндогенным геном SSIa, по сравнению с ячменем дикого типа, где пониженный уровень или пониженная активность белка SSIa в зерне ячменя составляет менее 10% от уровня или активности белка SSIa в ячмене дикого типа, где эндогенный ген SSIa кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 и где мутация в эндогенном гене SSIa подавляет экспрессию гена SSIa в растении ячменя или приводит к экспрессии белка SSIa с пониженным уровнем или пониженной активностью по сравнению с ячменем дикого типа, и

(ii) гомозиготную мутацию в гене amol, приводящую к уменьшению активности гена amol по сравнению с геном ячменя дикого типа, и

содержащее крахмал в количестве по меньшей мере 41% (мас./мас.).

2. Зерно ячменя по п.1, содержащее крахмал в количестве по меньшей мере 47% (мас./мас.).

3. Зерно по п.1 или 2, содержащее амилозу в количестве по меньшей мере 50% по отношению к общему содержанию крахмала в зерне.

4. Зерно по п.3, содержащее амилозу в количестве по меньшей мере 60% по отношению к общему содержанию крахмала в зерне.

5. Зерно по любому из пп.1-4, содержащее β-глюкан в количестве 5-9% (мас./мас.) или более 9% (мас./мас.).

6. Зерно по любому из пп.1-5, содержащее фруктан в количестве 3-11% (мас./мас.) или 4-11% (мас./мас.).

7. Зерно по п.6, в котором степень полимеризации фруктана составляет примерно от 3 до 12.

8. Зерно по любому из пп.1-7, в котором ген SSIa является гомозиготным по аллелю seх6-292.

9. Зерно по п.1, где ген amol включает аллель amol-AC38.

10. Зерно по любому из пп.1-9, которое представляет собой цельное зерно или шлифованное, измельченное, раздробленное, плющенное или рушеное зерно.

11. Растение ячменя, способное продуцировать зерно по любому из пп.1-10, содержащее (i) гомозиготную мутацию в гене эндогенной синтазы крахмала IIa (SSIa), благодаря которой зерно ячменя обладает пониженным уровнем или пониженной активностью белка синтазы крахмала (SSIa), кодируемого

эндогенным геном SSIIa, по сравнению с ячменем дикого типа, где пониженный уровень или пониженная активность белка SSIIa в зерне ячменя составляет менее 10% от уровня или активности белка SSIIa в ячмене дикого типа, где эндогенный ген SSIIa кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, и где мутация в эндогенном гене SSIIa подавляет экспрессию гена SSIIa в растении ячменя или приводит к экспрессии белка SSIIa с пониженным уровнем или пониженной активностью по сравнению с ячменем дикого типа, и (ii) гомозиготную мутацию в гене *amo1*, приводящую к уменьшению активности гена *amo1* по сравнению с геном ячменя дикого типа, и содержащее крахмал в количестве по меньшей мере 41% (мас./мас.).

12. Ячменная мука, в том числе непросеянная мука, полученная из зерна по любому из пп.1-10.

13. Способ получения пищевого ингредиента, включающий обработку зерна по любому из пп.1-10 с получением пищевого ингредиента, выбранного из группы, состоящей из муки, в том числе непросеянной муки, крахмала, отрубей, фруктана, отличного от крахмала полисахарида и шлифованного, измельченного, раздробленного, плющеного или рушеного зерна.

14. Способ по п.13, дополнительно включающий определение уровня или типа крахмала, амилозы, амилопектина, фруктана, отличных от крахмала полисахаридов, клетчатки, резистентного крахмала в зерне ячменя или в полученном из него пищевом ингредиенте.

15. Способ по любому из пп.13 или 14, в котором отличным от крахмала полисахаридом является  $\beta$ -глюкан.

16. Способ по любому из пп.13-15, где ингредиент включают в зерновой завтрак, печенье, сдобную булку, батончик мюсли или лапшу.

17. Способ получения растения ячменя, способного продуцировать зерно по любому из пп.1-10, характеризующееся пониженным уровнем или пониженной активностью белка SSIIa по сравнению с ячменем дикого типа и содержанием крахмала, составляющим по меньшей мере 41%, где пониженный уровень или пониженная активность белка SSIIa в ячмене составляет менее 10% от уровня или активности белка SSIIa в ячмене дикого типа, в котором эндогенный ген SSIIa кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, и где мутация в эндогенном гене SSIIa подавляет экспрессию гена SSIIa в растении ячменя или приводит к экспрессии белка SSIIa с пониженным уровнем или пониженной активностью по сравнению с ячменем дикого типа, где способ включает (i) введение гомозиготной мутации в эндогенный ген SSIIa растения ячменя и гомозиготной мутации в ген *amo1*, которая приводит к уменьшению активности гена *amo1* по сравнению с геном ячменя дикого типа, и (ii) отбор растения ячменя, которое продуцирует указанное зерно.

18. Способ по п.17, дополнительно включающий определение уровня, активности и/или типа крахмала, амилозы, амилопектина, фруктана, отличного от крахмала полисахарида, клетчатки или резистентного крахмала в зерне ячменя.

19. Применение зерна по любому из пп.1-10 в производстве пищевого продукта для увеличения уровня крахмала, амилозы, амилопектина, резистентного крахмала, клетчатки, водорастворимого углевода,  $\beta$ -глюкана, фруктана или отличного от крахмала углевода в указанном продукте.

20. Применение зерна по любому из пп.1-10 в производстве пищевого продукта для снижения гликемического индекса (GI) указанного пищевого продукта.

21. Применение по п.20, где в пищевом продукте повышены уровни амилозы,  $\beta$ -глюкана и фруктана.

22. Пищевой продукт, содержащий пищевой ингредиент в количестве, составляющем по меньшей мере 10% по отношению к сухой массе, где пищевой ингредиент представляет собой зерно ячменя по любому из пп.1-10 или муку, в том числе непросеянную муку, полученную из указанного зерна.

23. Пищевой продукт по п.22, где мука, в том числе непросеянная мука, содержит 3-11% (мас./мас.) или 4-11% (мас./мас.) фруктана.

24. Пищевой продукт по п.22 или 23, где мука, в том числе непросеянная мука, содержит  $\beta$ -глюкан в количестве 5-9 или более 9% (мас./мас.).

25. Пищевой продукт по любому из пп.22-24, где мука, в том числе непросеянная мука, содержит амилозу в количестве 50 или 60% по отношению к общему содержанию крахмала в указанной муке.

26. Пищевой продукт по любому из пп.22-25, выбранный из группы, состоящей из хлеба, сдобной булочки, зерновых завтраков, кексов, печенья, пирожных, сухарей, оладий, пицц, круассанов, бубликов, соленых крендельков, макарон, лапши, компонентов сырья хлебопекарного производства, смесей для выпекания, супов, соусов, загустителей, конфет и других мучных изделий.

27. Применение ячменной муки, в том числе непросеянной муки, полученной из зерна ячменя по любому из пп.1-10, в производстве пищевого продукта для увеличения уровня крахмала, амилозы, амилопектина, фруктана, отличного от крахмала полисахарида, клетчатки или резистентного крахмала в пищевом продукте.

28. Применение по п.27, где отличным от крахмала полисахаридом является  $\beta$ -глюкан.

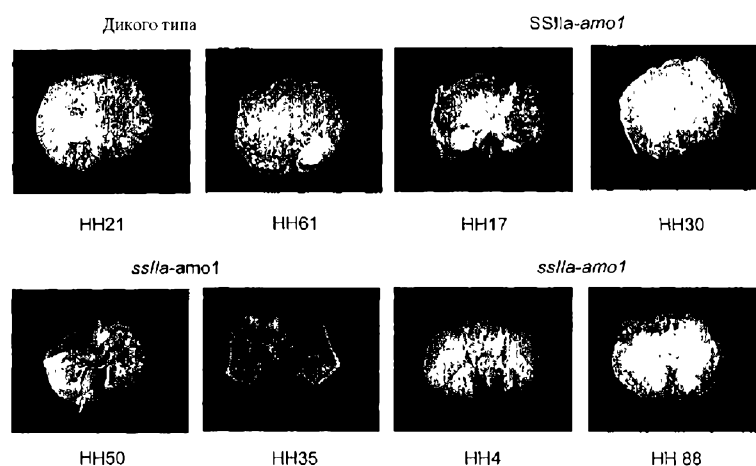
29. Способ улучшения одного или нескольких показателей здоровья млекопитающего, включающий введение в рацион млекопитающего пищевого продукта по любому из пп.22-26.

30. Способ по п.29, где один или несколько показателей здоровья включают повышенное число полезных кишечных бактерий, пониженное число очагов aberrантных крипт, повышенную абсорбцию минеральных веществ, пониженный уровень инсулина, пониженный гликемический индекс, пониженную гликемическую нагрузку, пониженный уровень глюкозы в крови, пониженное кровяное давление, пониженную массу тела, пониженный уровень холестерина в крови, повышенный уровень холестерина HDL, повышенную плотность кости, повышенный уровень кальция, повышенную частоту кишечной перистальтики или улучшенный сердечно-сосудистый профиль сыворотки крови.

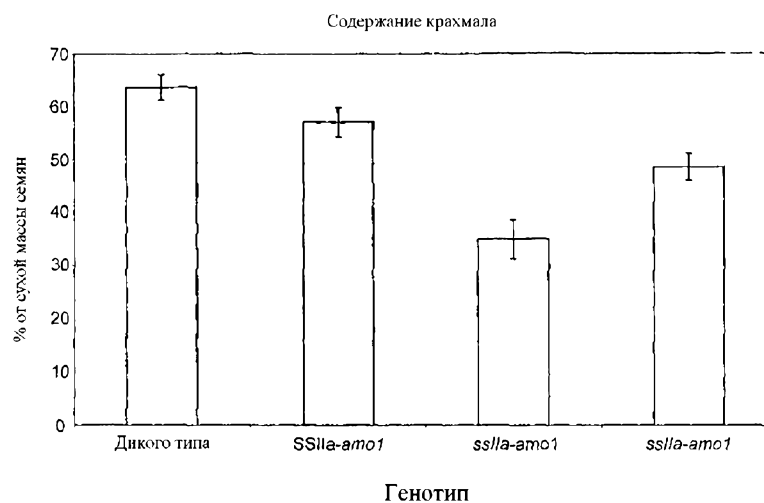
31. Способ улучшения одного или нескольких симптомов состояния, связанного с наличием у субъекта низких уровней амилозы, включающий пероральное введение в рацион субъекту зерна по любому из пп.1-10 или продукта, содержащего муку, в том числе непросеянную муку, полученную из зерна.

32. Способ по п.31, где состояние выбрано из группы, состоящей из диабета, ожирения, болезни сердца, гипертонии, констипации и остеопороза.

33. Способ по п.32, где субъектом является человек.



Фиг. 1



Фиг. 2

