



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **113829** (13) **C2**
(51) МПК (2017.01)**C12N 15/82** (2006.01)**C12N 9/14** (2006.01)**C12N 15/29** (2006.01)**A01H 5/00****C12N 9/12** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2010 08005**

(22) Дата подання заявки: **27.11.2008**

(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **27.03.2017**

(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **2007906467**

(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **27.11.2007**

(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **AU**

(41) Публікація відомостей про заявку: **27.09.2010, Бюл.№ 18**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **27.03.2017, Бюл.№ 6**

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **РСТ/AU2008/001759, 27.11.2008**

(72) Винахідник(и):
**Раль Жан-Філіпп Франсуа Мішель (FR/AU),
Лі Жонґ'ї (CN/AU),
Морелл Меттью Кеннеді (AU)**

(73) Власник(и):
**КОММОНВЕЛС САЙНТІФІК ЕНД
ІНДАСТРІАЛ РІСЕРЧ ОРГАНІЗЕЙШН,
Limestone Avenue, Campbell, Australian
Capital Territory 2612, Australia (AU),
ГРЕЙНС РІСЕРЧ ЕНД ДІВЕЛОПМЕНТ
КОРПОРЕЙШН,
1 st Floor, 40 Blackall Street, Barton,
Austrian Capital Territory 2600, Australia
(AU)**

(74) Представник:
**Пахаренко Антоніна Павлівна, реєстр.
№4**

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
GenBank Accession No. CD423248 2 June 2003 Salicylic acid treated seedlings Sorghum bicolor clone:SAI_28_F05_A002.
WO 1998027212 A1, 25.06.1998.
GenBank Accession No. BI245998 17 July 2001 Immature panicle 1 (IPI) Sorghum bicolor clone:IP_I_66_D04.bl_A002.
US 20040172684 A1, 02.09.2004.
Blennow A. et al, The molecular deposition of transgenically modified starch in the starch granule as imaged by functional microscopy // Journal of Structural Biology. - 2003. - Vol.143, - № 3, - P. 229-241.
Kozlov S. S. et al, Structural and thermodynamic properties of starches extracted from GBSS and GWD suppressed potato lines // International Journal of Biological Macromolecules. - 2007. - Vol, 40. - № 5. - P. 449-460.
Kotting O. et al, Identification of a Novel Enzyme Required for Starch Metabolism in Arabidopsis Leaves. The Phosphoglucan, Water Dikinase // Plant Physiology. - 2005. - Vol.137. - № 1. - P. 242-252.

UA 113829 C2

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
 GenBank Accession No. EH406623 20 November 2007 Root hair Sorghum biocolor clone:RTHAIRI_I_C09_A002.
 Mikkelsen R. et al, A Novel Type Carbohydrate-Binding Module Identified in α -Glucan, Water Dikinases Is Specific for Regulated Piastidial Starch Metabolism // Biochemistry. - 2006. - Vol. 45, - № 14, - P. 4674-4682.
 US 6620987 B1, 16.09.2003.
 WO 03071860 A2, 04.09.2003.
 Lorberth R. et al., Inhibitor of a starch-granule-bound protein leads to modified starch and repression of cold sweetening // Nature Biotechnology. - 1998. - Vol.16. - P. 473-477.

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
 WO 03072791 A2, 04.09.2003.
 WO 02101059 A2, 19.12.2002.
 US 6 207 880 B1, 27.03.2001.
 WO 0028052 A2, 18.05.2000.
 WO 9953072 A1, 21.10.1999.
 WO 0077229 A2, 21.12.2000.
 US 6791010 B1, 14.09.2004.
 WO 1990012876 A1, 01.11.1990.
 US 20030167529 A1, 04.09.2003.
 US 6353154 B1, 05.03.2002.
 WO 2003018766 A2, 06.03.2003.
 US 6951969 B1, 04.10.2005.
 WO 2000077165 A2, 21.11.2000.
 Asatsumaa S. et al, Involvement of α -Amylase 1-I in Starch Degradation in Rice Chloroplasts // Plant Cell Physiology. - 2005. - Vol. 46. - № 6, P. 858-869.
 WO 2000077229 A2, 21.12.2000.
 US 20040123343 A1, 24.06. 2004.
 GenBank Accession No. CF074015 21 July 2003 Iron-deficient seedlings Sorghum biocolor clone FE_9_G05_A002.

(54) ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНА РОСЛИНА ЗІ ЗБІЛЬШЕНИМ ПОТЕНЦІАЛОМ ПРОДУКТИВНОСТІ

(57) Реферат:

Винахід належить до генетично модифікованої рослини зі збільшеним потенціалом продуктивності, яка містить гомозиготно у своєму геномі гетерологічний полінуклеотид, що містить послідовність транскрипційного контролю, операбельно зв'язану з молекулою нуклеїнової кислоти, що кодує сайленсинг РНК, що знижує рівень ендогенної α -глюкан вода-дікінази (GWD) в рослині, так що згадана рослина має знижений рівень GWD в своєму насінні, у порівнянні з дикою рослиною, де збільшеним потенціалом продуктивності є збільшена сила паростків або збільшена біомаса, і де сайленсинг РНК є дуплексною РНК.

Галузь техніки, до якої стосується винахід

Цей опис винаходу описує способи збільшення потенціалу продуктивності організму. Більш конкретно, цей опис стосується метаболізму крохмалю в рослинах і забезпечує рослини, у тому числі злакові рослини, такі як пшениця і ячмінь, що мають модифікований метаболізм крохмалю і потенціал продуктивності. Цей опис винаходу описує різні способи одержання рослин, що мають модифікований потенціал продуктивності, такий як збільшена врожайність, ріст, біомаса, життєздатність і т.і., і способи одержання продуктів, що представляють інтерес, з цих модифікованих рослин.

Рівень техніки

Бібліографічні дані публікацій, на які посилається автор у цьому описі, зібрані наприкінці цього опису.

Посилання в цьому описі на будь-яку попередню публікацію (або інформацію, отриману з неї) або будь-який матеріал, що є відомим, не є і не повинен вважатися підтвердженням або визнанням того, що ця попередня публікація (або інформація, отримана з неї) або відомий матеріал утворюють частину звичайного загального знання в області прикладання зусиль, до якої стосується цей опис.

Рослини є первинним джерелом повторно використовуваної енергії, і способи збільшення потенціалу продуктивності конкретної рослини є дуже бажаними. Крохмаль є основним вуглеводним запасним матеріалом у рослинах, а також основним компонентом, що забезпечує енергію у харчуванні людини. Важливість функціональності крохмалю як кінцевого продукту, наприклад, у харчових продуктах, набула недавно підвищене визнання. Структурні властивості крохмалю також є важливими в промислові (нехарчових) застосуваннях, в яких крохмаль використовується, наприклад, як гелеутворююча речовина, наповнювач, водоутримуючий агент або адгезив.

У зернових рослинах, крохмаль становить приблизно 45-65 % маси зрілого зерна. Крохмаль складається тільки з глюкозидних залишків, але виявляється у вигляді двох типів молекул, амілози і амілопектину, які розрізняються за молекулярним розміром або іншими властивостями. Молекули амілози є в основному лінійними полімерами, що складаються з α -1,4-зв'язаних глюкозидних одиниць, тоді як амілопектин є вискорозгалуженою молекулою з α -1,6-глюкозидними зв'язками, що з'єднують численні лінійні ланцюги α -1,4-зв'язаних глюкозидних одиниць. Амілопектин складається з більших молекул у діапазоні розмірів від декількох десятків тисяч до сотень тисяч глюкозидних одиниць із приблизно 5 відсотками α -1,6-розгалужень. З іншого боку, амілоза складається з молекул у діапазоні розмірів від декількох сотень до декількох тисяч глюкозидних залишків з менш ніж одним відсотком розгалужень (для огляду див. Buleon et al., 1998). Крохмалі злаків дикого типу звичайно містять 20-30 % амілози, тоді як інша частина є амілопектином.

Крохмаль первинно синтезується в рослинах у фотосинтезуючих тканинах, таких як листя, у формі транзитного крохмалю. Він мобілізується під час наступних темних періодів, постачаючи вуглець для експорту в органи-стоки і енергетичний метаболізм або для зберігання в таких органах, як насіння або бульби. Синтез і довгострокове зберігання крохмалю має місце в амілопластах органів, що запасують, де крохмаль відкладається у вигляді напівкристалічних гранул з діаметром до 100 мкм. Гранули містять як амілозу, так і амілопектин, причому амілоза звичайно є аморфним матеріалом у природній гранулі крохмалю, тоді як амілопектин є напівкристалічним внаслідок укладання лінійних глюкозидних ланцюгів.

Синтез крохмалю в ендоспермі вищих рослин виконується набором ферментів, які каталізують чотири ключові стадії. По-перше, АДФ-глюкозопірофосфорилаза активує мономерний попередник крохмалю за допомогою синтезу АДФ-глюкози з G-1-P і аденозинтрифосфату (АТФ). По-друге, активований глюкозильний донор, АДФ-глюкоза, переноситься до невідновлюваного кінця, що передує α -1,4-зв'язку, крохмальсинтазами. По-третє, ферменти, що розщеплюють крохмаль, вводять місця розгалуження за допомогою відщиплення ділянки α -1,4-зв'язаного глюкану з наступним переносом відщипленого ланцюга до акцепторного ланцюга з утворенням нового α -1,6-зв'язку. Ферментами, що розщеплюють крохмаль, є тільки ферменти, які можуть вводити α -1,6-зв'язки в α -поліглюкани а, отже, відігравати істотну роль в утворенні амілопектину. Нарешті, ферменти, що розгалужують крохмаль, видаляють деяких зі зв'язків відгалужень, хоча механізм, за допомогою якого вони діють, не з'ясований.

Хоча і ясно, що щонайменше ці чотири активності необхідні для нормального синтезу крохмальних гранул (зерен) у вищих рослинах, в ендоспермі вищих рослин виявлені множинні ізоформи кожної із цих чотирьох активностей, і були запропоновані конкретні ролі для індивідуальних ізоформ на основі мутаційного аналізу або за допомогою модифікації рівнів

експресії генів з використанням трансгенних підходів (Abel et al., 1996, Jobling et al., 1999, Schwall et al., 2000). Однак, точний внесок кожної ізоформи кожної активності в біосинтез крохмалю все ще є невідомим, і ці внески можуть істотно розрізнятися між видами. В ендоспермі злаків, присутні дві ізоформи АДФ-глюкозопірофосфорилази, одна форма в амілопласті і одна форма в цитоплазмі (Denyer et al., 1996, Thorbjornsen et al., 1996). Чотири класи крохмальсинтази виявлені в ендоспермі злаків, ізоформа, локалізована винятково в крохмальному зерні, пов'язана із гранулою крохмалю (крохмальним зерном) крохмальсинтаза (GBSS), що є важливою для синтезу амілози, дві форми, які розподілені між цією гранулою (крохмальним зерном) і розчинною фракцією (SSI, Li et al., 1999a, SSII, Li et al., 1999b), і четверта форма, що локалізована повністю в розчинній фракції, SSIII (Cao et al, 2000, Li et al., 1999b, Li et al, 2000). Було показано, що мутації в SSII і SSIII змінюють структуру амілопектину (Gao et al, 1998, Craig et al., 1998). Не були описані мутації, що визначають роль активності SSI.

В ендоспермі злаків експресуються три форми розгалужуючого ферменту, розгалужуючий фермент I (SBEI), розгалужуючий фермент IIa (SBEIIa) і розгалужуючий фермент IIb (SBEIIb) (Hedman and Boyer, 1982, Boyer and Preiss, 1978, Mizuno et al., 1992, Sun et al., 1997). Геномні послідовності і кДНК-послідовності були охарактеризовані для рису (Nakamura and Yamanouchi, 1992), кукурудзи (Baba et al., 1991; Fisher et al., 1993; Gao et al., 1997) і пшениці (Repellin et al., 1997; Nair et al., 1997; Rahman et al., 1997). Зіставлення послідовностей виявляє високий ступінь подібності послідовностей як на рівні нуклеотидів, так і на рівні амінокислот і дозволяє класифікувати їх у класи SBEI, SBEIIa і SBEIIb. SBEIIa і SBEIIb звичайно виявляють приблизно 80 % ідентичність послідовності один з одним, зокрема, у центральних районах цих генів.

Два типи дерозгалужуючих ферментів присутні у вищих рослинах і визначаються на основі їх субстратних специфічностей, дерозгалужуючі ферменти ізоамілазного типу і дерозгалужуючі ферменти пулулазаного типу (Myers et al., 2000). Мутації Sugary-1 у кукурудзі і рисі пов'язані з недостатністю обох розгалужуючих ферментів (James et al., 1995, Kubo et al., 1999), однак випадкова (нерегулярна) мутація картується в тому ж положенні, що і ген розгалужуючого ферменту ізоамілазного типу.

Крохмалі, екстраговані майже із всіх видів рослин, є певною мірою фосфорильованими. Ступінь фосфорильовання звичайно перебуває в діапазоні 0,1-0,4 % глюкозидних залишків, які фосфорильовані по вуглецю 3 або вуглецю 6 глюкозильних одиниць у вигляді фосфатних моноестерів (Blennow et al., 2000a). Звичайно, приблизно 80 % фосфатних груп зв'язані в положеннях C-6 і приблизно 20 % по C-3. Однак, ступінь фосфорильовання істотно варіюється залежно від ботанічного джерела. Крохмаль із бульби картоплі має в середньому 25 ммоль глюкозо-6-фосфату на мг крохмалю, у той час як крохмалі злаків мають тільки 1/10 цієї кількості глюкозо-6-фосфату в запасному крохмалі. Присутність фосфатних груп у крохмалі впливає на здатність всмоктувати воду після желатинізування (клейстеризації) і на властивості в'язкості.

Фосфорильовання крохмалю каталізується групою ферментів, що належать до родини дикіназ. Два ферменти, які проводять фосфорильовання крохмалю, були ідентифіковані в картоплі і *Arabidopsis*, а саме, α -Глюкан, вода-дикіназа (GWD; EC 2.7.9.4, відома також як білок R1 або OK1), і Фосфоглюкан, вода-дикіназа (PWD; EC 2.7.9.5). Перший каталізує перенос β -фосфату АТФ в положення або C-3, або C-6 глюкозильного залишку і γ -фосфату до молекули води, з вивільненням ортофосфату, у той час як останній каталізує перенос фосфатів до фосфоглюкану (вже фосфорильованого GWD) і до води (Baunsgaard et al., 2005; Kotting et al., 2005). Нещодавно Ritte et al. припустили, що фосфорильовання в положенні 3 або 6 глюкозильних залишків у крохмалі каталізується PWD і GWD, відповідно (Ritte G. et al., 2006).

Антисмислова репресія гена, що кодує GWD у картоплі, зменшувала крохмаль, пов'язаний з фосфатом, на 80 % (Vikso-Nielsen et al., 2001). Крім того, мутація в гені, названому Sex1 (фенотип надлишку крохмалю), в *Arabidopsis thaliana* усувала фосфорильовання крохмалю, підтверджуючи участь GWD як відповідального за це ферменту (Zeeman and Rees, 1999). Крім того, як мутант *Arabidopsis*, так і трансгенні антисмислові рослини картоплі виявляли фенотип надлишку крохмалю в листах, демонструючи роль GWD у деградації транзитного крохмалю. Окремо від супресії фосфорильовання крохмалю, у цих рослинах не спостерігали модифікації структури крохмалю. Однак, GWD-антисмислові рослини картоплі виявляли зменшення фенотипу "підсолонжування на холод" у бульбах, а також фенотипу надлишку крохмалю в листі (Lorberth et al., 1998). Ці рослини картоплі виявляли також збільшення кількості бульб, що пов'язано із зменшенням маси окремих бульб, але не виявляли якої-небудь іншої дії на нагромадження крохмалю в цих бульбах. Мутанти *Arabidopsis sex1*, які зазнавали впливу у їх метаболізмі транзитного крохмалю, мали також змінений метаболізм вуглеводів, росли повільно і пізно розквітали (Yu et al., 2001).

Взаємозв'язок між деградацією крохмалю і вмістом фосфату в крохмалі залишається не з'ясованим. Крохмаль, що продукується антисмисловими лініями з картоплі, проявляв високу стійкість до деградації β -амілазою, що дозволяє припустити, що фосфорилування крохмалю може бути необхідною умовою для деградації β -амілазою. Фосфорильовані залишки могли б

бути сигналом націлювання для цього ферменту для деградації крохмалю під час нічного періоду. Деякі дослідження припускають зв'язок α -амілази в білку R1 (GWD) із гранулою крохмалю (крохмальним зерном) перед початком деградації.

Деградація і фосфорилування крохмалю в насінні злаків, що проростають, таких як пшениця, є менш зрозумілими і являють собою високо спеціалізовану систему, що включає в себе погіршення тканини і індукцію гідролітичних ферментів, а також деградацію крохмалю.

Пшениця є головним продуктом у багатьох країнах і становить приблизно 20 % кілоджоулів їжі для всього народонаселення світу. Характеристики переробки пшениці роблять її кращою основою для більшості продуктів, що переробляють, на основі зернових, таких як хліб, макаронні вироби і локшина (стрічкоподібні макаронні вироби). Споживання пшениці збільшується по усьому світі зі збільшенням достатку. Хлібопекарська (м'яка) пшениця (*Triticum aestivum*) є гексаплоїдом, що має три різних генома, A, B і D, і більшість відомих генів у пшениці присутні в трьох екземплярах, по одному на кожному геномі. Цей гексаплоїдний характер хлібопекарської пшениці висуває проблему знаходження і комбінування мутацій генів у кожному із цих трьох геномів. Присутність трьох геномів має буферувальну дію маскуванням мутацій в окремих геномах, на протилежність більш легко ідентифікуємих мутацій у диплоїдних видах. Відома варіація в структурі крохмалю пшениці була обмеженою щодо варіації, доступною в кукурудзі або рисі. Іншим фактором, що цьому сприяє, є те, що ефективність трансформації пшениці відстає від трансформації інших злаків. Вважається, що гени, що беруть участь у фосфорилуванні крохмалю і їх дії не вивчалися раніше, і невідомо, чи можуть ефекти, що спостерігаються при фосфорилуванні крохмалю в картоплі і *Arabidopsis*, обидва з яких є дводольними, подібним чином реплікуватись в однодольних видах, таких як пшениця.

Сутність винаходу

Даний винахід заснований, частково, на відкритті, що модифікація фосфорилування ендогенного крохмалю і/або деградації крохмалю в рослинах змінює продуктивну здатність цієї рослини. В деяких варіантах здійснення, це приводить до збільшеного потенціалу продуктивності, що спостерігається, без обмеження, у таких ознаках, як збільшена або поліпшена біомаса, життєздатність, схожість, міцність ростків, швидкість росту, висота, загальна площа листів, інтенсивність фотосинтезу на площу листа, кількість листків на рослину, кількість колосків на рослину, кількість пагонів на рослину, кількість насінин на рослину, кількість насінин на колосся, середня маса насіння, загальна маса насіння на рослину, вміст або склад крохмалю насіння або бульб, товщина стебла, кількість міжвузлів, кількість відгалужень, кількість квіток, розмір або форма квіток, цвіт квіток, кількість стручків на рослину, розмір стручків, кількість насінин на стручок, кількість плодів на рослину, кількість зав'язей плодів, розмір плодів, форма плодів, колір плодів, якість плодів, стійкість до хвороб, маса кореня, кількість кореня, довжина кореня і/або врожай і/або вповільнене старіння, у порівнянні з контрольною рослиною. В інших варіантах здійснення, рослини мають збільшені ендогенну глікозилазу і/або травлення у порівнянні з контрольною рослиною.

Таким чином, в одному варіанті здійснення, цей опис винаходу описує способи поліпшення потенціалу продуктивності рослин модифікацією фосфорилування ендогенного крохмалю і/або деградації крохмалю в рослині. В деяких варіантах здійснення, ці способи містять у собі одержання генетично модифікованої рослини, що має збільшений потенціал продуктивності в порівнянні з контрольною рослиною. В деяких варіантах здійснення, цей спосіб містить у собі стадії i) одержання множини рослин, щонайменше, одна з яких містить у її геномі гетерологічний полінуклеотид, ii) ідентифікацію із цієї множини рослин рослини, що має збільшений потенціал продуктивності щодо контрольної рослини і містить гетерологічний полінуклеотид. В деяких варіантах здійснення, цей спосіб містить в собі (iii) вибір генетично модифікованої рослини, де цей полінуклеотид містить регуляторну послідовність транскрипції, функціонально зв'язану з послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує агент, який модифікує фосфорилування ендогенного крохмалю і/або деградацію крохмалю в цій рослині.

В іншому варіанті здійснення, цей опис винаходу описує спосіб одержання генетично модифікованої рослини, що має збільшену ендогенну глікозилазу в порівнянні з контрольною рослиною. В деяких варіантах здійснення, цей спосіб містить у собі стадії i) одержання множини рослин, щонайменше, одна з яких містить в її геномі гетерологічний полінуклеотид, ii) ідентифікацію із цієї множини рослин рослини, що має збільшену ендогенну глікозилазу щодо контрольної рослини і містить гетерологічний полінуклеотид. В деяких варіантах здійснення, цей

спосіб містить у собі iii) вибір генетично модифікованої рослини, де цей полінуклеотид містить регуляторну послідовність транскрипції, функціонально зв'язану з послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує агент, який модифікує фосфорилування ендogenous крохмалю і/або деградацію крохмалю в цій рослині.

В іншому варіанті здійснення, цей опис винаходу описує спосіб одержання генетично модифікованої рослини, що має збільшене перетравлювання щонайменше однієї з її частин у порівнянні з контрольною рослиною, причому цей спосіб містить у собі стадії i) одержання множини рослин, щонайменше, одна з яких містить в її геномі гетерологічний полінуклеотид, ii) ідентифікацію із цієї множини рослин генетично модифікованої рослини, що має збільшене перетравлювання щонайменше однієї з її частин щодо контрольної рослини і містить гетерологічний полінуклеотид. В деяких варіантах здійснення, цей спосіб містить у собі iii) вибір генетично модифікованої рослини, де цей полінуклеотид містить регуляторну послідовність транскрипції, функціонально зв'язану з послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує агент, який модифікує фосфорилування ендogenous крохмалю і/або деградацію крохмалю в цій рослині.

У наступному родинному варіанті здійснення, цей опис винаходу описує спосіб визначення, чи має генетично модифікована рослина збільшений потенціал продуктивності, збільшену ендogenous глікозилазу або збільшене перетравлювання щонайменше однієї з її частин у порівнянні з контрольною рослиною, причому цей спосіб містить у собі стадії i) одержання однієї або більше рослин, які містять у їх геномах гетерологічний полінуклеотид, і ii) визначення, чи мають одна або кілька рослин збільшений потенціал продуктивності, збільшену ендogenous глікозилазу або збільшене перетравлювання щонайменше однієї з її частин щодо контрольної рослини, і де цей полінуклеотид містить регуляторну послідовність транскрипції, функціонально зв'язану з послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує агент, який модифікує фосфорилування ендogenous крохмалю і/або деградацію крохмалю в цій рослині.

Переважно, стадія ii), спрямована на ідентифікацію або визначення збільшеного потенціалу продуктивності, збільшеної активності ендogenous глікозилази або збільшеного перетравлювання, містить у собі оцінювання фенотипу, яким є, модифікований вміст або модифікований склад крохмалю, і/або ідентифікацію рослини, що має модифікований вміст або модифікований склад крохмалю, наприклад, рівень фосфорилування крохмалю, збільшений потенціал продуктивності, збільшеної ендogenous глікозилази щонайменше в деяких його клітинах або органах, або збільшене перетравлювання щонайменше однієї з її частин щодо контрольної рослини.

Цей опис винаходу описує також спосіб ідентифікації гена, що втягнутий у збільшення потенціалу продуктивності в рослині в порівнянні з контрольною рослиною, причому цей спосіб містить у собі стадії i) одержання множини рослин, кожна з яких містить у її геномі гетерологічний полінуклеотид, ii) вимірювання потенціалу продуктивності кожної рослини і, необов'язково, чи мають вони збільшену глікозилазу або збільшене перетравлювання щонайменше однієї з її частин щодо контрольної рослини, iii) ідентифікацію рослини, що має збільшений потенціал продуктивності, і iv) ідентифікацію в ній гетерологічного полінуклеотиду, з ідентифікацією за допомогою цього гена, де цей полінуклеотид містить регуляторну послідовність транскрипції, функціонально зв'язану з послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує агент, який модифікує фосфорилування ендogenous крохмалю і/або деградацію крохмалю в цій рослині.

Цей опис додатково описує спосіб ідентифікації полінуклеотиду, що здатний до збільшення потенціалу продуктивності рослини, збільшення ендogenous глікозилази в рослині або збільшення перетравлювання щонайменше однієї частини рослини в порівнянні з контрольною рослиною, причому цей спосіб містить у собі стадії i) одержання одного або декількох гетерологічних полінуклеотидів, кожний з яких містить регуляторну послідовність, функціонально зв'язану з послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує агент, який модифікує фосфорилування ендogenous крохмалю і/або деградацію крохмалю у цій рослині, ii) введення цього гетерологічного полінуклеотиду (цих гетерологічних полінуклеотидів) у клітини-попередники, тканини, органи, насіння або рослини, iii) генерування з них множини рослин, iv) визначення, чи має щонайменше одна рослина, що містить гетерологічний полінуклеотид, збільшений потенціал продуктивності, збільшену ендogenous глікозилазу або збільшене перетравлювання щонайменше однієї з її частин щодо контрольної рослини, і v) відбір полінуклеотиду.

В одному варіанті здійснення, цей опис забезпечує спосіб одержання генетично модифікованої рослини, що має збільшений потенціал продуктивності, збільшену ендogenous глікозилазу або збільшене перетравлювання щонайменше однієї з її частин у порівнянні з контрольною рослиною. В деяких варіантах здійснення, цей спосіб містить у собі стадії i)

одержання гетерологічного полінуклеотиду, що містить регуляторну послідовність, функціонально зв'язану з послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує агент, який модифікує фосфорилування ендogenous крохмалю і/або деградацію крохмалю в цій рослині, ii) введення цього гетерологічного полінуклеотиду в клітини-попередники, тканини, органи, насіння або рослини, iii) одержання з них множини рослин, щонайменше, одна з яких містить у її геномі цей гетерологічний полінуклеотид, iv) ідентифікацію рослини із цієї множини рослин, що має збільшений потенціал продуктивності, збільшену ендogenous глікозилазу або збільшене перетравлювання щонайменше однієї з її частин щодо контрольної рослини і містить гетерологічний полінуклеотид, і v) відбір цієї рослини, одержуючи таким чином генетично модифікованої рослини. В іншому варіанті здійснення, цей спосіб містить у собі стадії i) мутагенезу клітин-попередників, тканин, органів, насіння або рослин, ii) одержання з них множини рослин, щонайменше, одна з яких містить у її геномі цей гетерологічний полінуклеотид, що містить регуляторну послідовність транскрипції, функціонально зв'язану з послідовністю нуклеїнової кислоти, що модифікує фосфорилування ендogenous крохмалю і/або деградацію крохмалю в цій рослині, і iii) ідентифікацію рослини із цієї множини рослин, що має збільшений потенціал продуктивності, збільшену ендogenous глікозилазу або збільшене перетравлювання щонайменше однієї з її частин щодо контрольної рослини.

Розглянутий гетерологічний полінуклеотид може вводиться в цю рослину будь-яким прийнятним способом. В деяких варіантах здійснення, ці способи містять у собі стадію введення гетерологічного полінуклеотиду в клітини-попередники, тканини, органи, насіння або рослини і генерування з них множини рослин. В інших варіантах здійснення, ця стадія містить у собі трансформацію і/або мутагенез клітини-попередника, тканини, органа, насіння або рослини.

У деяких варіантах здійснення, розглянутий агент даунрегулює експресію гена, що кодує фермент, що бере участь у фосфорилуванні ендogenous крохмалю і/або деградації крохмалю, або його функціональну активність. У конкретних варіантах здійснення, цей агент даунрегулює фосфорилування ендogenous крохмалю в цій рослині.

У деяких варіантах здійснення, дані способи додатково містять у собі тестування зразку нуклеїнової кислоти із цієї рослини на мутацію в гені, що кодує поліпептид, що бере участь у деградації крохмалю і/або фосфорилуванні крохмалю.

У деяких варіантах здійснення, фосфорилування ендogenous крохмалю і/або деградацію крохмалю модифікують модифікацією експресії або активності одного або декількох ферментів або регуляторних білків, що беруть участь у деградації крохмалю і/або фосфорилуванні крохмалю. Приклади ферментів вибрані з групи, що складається з α -амілази (EC 3.2.1.1), β -амілази (EC 3.2.1.2), глюкоамілази (EC 3.2.1.3), фосфорилази крохмалю (EC 2.4.1.1), глікозилази (EC 3.1.33), сахарозо-ізомальтази (EC 3.2.10), амیلomальтази (EC 2.4.1.25), мальтази (EC 3.2.1.20), ізоамілази і α -глюкану, водадикінази (GWD, EC 2.7.9.4). У конкретних варіантах здійснення, фосфорилування ендogenous крохмалю і/або деградацію крохмалю модифікують збільшенням експресії або активності α -амілази або β -амілази, і/або зменшенням експресії або активності GWD. В деяких варіантах здійснення, розглянуті способи додатково містять у собі зменшення експресії або активності фосфоглікан, водадикінази (PWD, EC 2.7.9.5). У кращих варіантах здійснення, регуляторний білок не є білком, що кодується генами *sex1* і/або *sex4* в *Arabidopsis* і/або картоплі.

У деяких варіантах здійснення, розглянутий агент експресується в органі, що запасує, рослини, такому як насіння, корінь, бульба або стебло, що розвиваються. У конкретних варіантах здійснення. Цей агент експресується у фотосинтетично активній тканині рослини. У додаткових варіантах здійснення, фосфорилування крохмалю і/або деградація крохмалю стосується транзитного крохмалю.

У деяких зразкових варіантах здійснення, що стосуються збільшеної ендogenous глікозилази, цією глікозилазою є α -амілаза, β -амілаза, глюкоамілаза або їх комбінації.

Описані в цій специфікації способи не обмежуються яким-небудь конкретним типом рослини. Посилання на рослину містить у собі рослину вибрану із трав'янистих рослин, овочів, зернових, бобових і плодових або квіткових рослин. В деяких варіантах здійснення, зерновими культурами є пшениця, кукурудза (маїс), ячмінь, рис, жито, овес, просо, сорго, тритикале, гречка, фонію, лобода кіноа, спельта, пшениця тверда (дурум), хлібопекарська (мяка) пшениця, полба (пшениця-однозернянка), амарант, дикий рис (насіння водяного очерету) або теф (полеви́чка аргентинська).

У деяких варіантах здійснення вищеописаних способів, розглянуті генетично модифіковані рослини додатково містять гетерологічний полінуклеотид, що кодує агент, який даунрегулює експресію або активність α -амілази або β -амілази, функціонально пов'язаний з регуляторною послідовністю транскрипції, або мутацію в гені, що кодує α -амілазу або β -амілазу. В деяких

варіантах здійснення, вибирають рослину, що має зменшену експресію або активність α -амілази або β -амілази щонайменше в одному органі цієї рослини. В деяких варіантах здійснення, цей агент експресується в органі, що запасає, або ген, що кодує α -амілазу або β -амілазу, експресується в органі, що запасає. В інших варіантах здійснення, цим агентом є молекула РНК, що даунрегулює експресію ферменту дикінази. В деяких варіантах здійснення, що даунрегулює комбінації глікозилаз, таких як α -амілаза і β -амілаза.

В іншому аспекті, даний винахід забезпечує рослини, частини рослин і продукти рослин, продукуювані способами цього винаходу, їх застосування і способи використання цих рослин, частин або продуктів. Ці рослини або частини рослин можуть бути модифіковані відповідно до кожної з описаних тут ознак у контексті із цими способами, або будь-якої їх комбінації. Таким чином, даний винахід забезпечує генетично модифіковані рослини, отримані, продукуювані або ідентифіковані описаними тут способами. Посилання на рослину або частину рослини містить у собі частину рослини, що є насінням, листям, стеблом, коренем, бульбою, квіткою, плодом, стручком або черешком, отриманими із цієї рослини.

Більш конкретно, в деяких варіантах здійснення, цей опис винаходу описує генетично модифіковану рослину, що містить у її геномі гетерологічний полінуклеотид, що містить регуляторну послідовність транскрипції, функціонально зв'язану з послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує агент, який модифікує фосфорилування ендogenous крохмалю і/або деградацію крохмалю в цій рослині, де ця рослина характеризується наявністю модифікованого фосфорилування крохмалю і/або деградації крохмалю і додатково наявністю збільшеного потенціалу продуктивності, збільшеної ендogenous глікозилази і/або збільшеним перетравлюванням щонайменше однієї з її частин, у порівнянні з контрольною рослиною.

Таким чином, в деяких варіантах здійснення цей опис забезпечує генетично модифіковану рослину, що містить у її геномі введену мутацію в ген, що кодує ендogenous поліпептид фосфорилування крохмалю і/або деградує крохмаль фермент, де ця рослина характеризується наявністю модифікованого фосфорилування крохмалю і/або деградації крохмалю і додатково наявністю збільшеного потенціалу продуктивності, збільшеної ендogenous глікозилази і/або збільшеною перетравлюваністю щонайменше однієї з її частин, у порівнянні з контрольною рослиною.

В інших варіантах здійснення, цей опис забезпечує генетично модифіковану рослину, що містить у її геномі один або декілька гетерологічних полінуклеотидів, кожний з яких містить регуляторну послідовність транскрипції, функціонально зв'язану з послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує агент, який модифікує фосфорилування ендogenous крохмалю і/або деградацію крохмалю в цій рослині, де ця рослина характеризується наявністю зменшеного фосфорилування крохмалю і/або деградації крохмалю щонайменше однієї частини цієї рослини, збільшеною або зменшеною експресією і/або активністю глікозилази, переважно амілази, у зрілому насінні цієї рослини і збільшеним потенціалом продуктивності в порівнянні з контрольною рослиною. В інших варіантах здійснення, ці рослини проявляють зменшений рівень поліпептиду націленого на фосфорилування крохмалю і/або крохмальдеградує ферменту щонайменше в першому органі цієї рослини і необов'язково збільшений рівень поліпептиду націленого на фосфорилування крохмалю і/або крохмальдеградує ферменту щонайменше в другому органі цієї рослини, де ці перший і другий органи є тими самими або різними органами. В деяких варіантах здійснення, цей націлений поліпептид або фермент вибрані із групи, що складається з α -амілази, β -амілази, глюкоамілази, фосфорилази крохмалю, глікозилази, сахарозо-ізомальтази, аміломальтази, мальтази, ізомальтази і α -глюкан, водадикінази.

В одному прикладі втілення, цей агент даунрегулює експресію або функціональну активність ферменту втягнутого у фосфорилування ендogenous крохмалю і/або деградацію крохмалю. В деяких варіантах здійснення, цей агент даунрегулює рівень або функціональну активність дикінази. В деяких варіантах здійснення цією дикіназою є GWD або GWD і PWD.

У деяких варіантах здійснення, цей агент експресується в органі, що запасає, цієї рослини. В інших варіантах здійснення, цей агент експресується у фотосинтетично активній тканині цієї рослини. В одному прикладі втілення, фосфорилування крохмалю і/або деградація крохмалю стосується транзитного крохмалю.

Цей винахід забезпечує також зерно хлібних злаків зі зменшеним фосфорилуванням крохмалю в листі і/або зерні і збільшеною глікозилазою у цьому зерні. Комбінація цих двох ознак забезпечує особливі переваги відносно застосування цього зерна, необов'язково на додаток до збільшеної продуктивності рослини. Зменшення фосфорилування крохмалю в цій комбінації становить щонайменше 50 %, переважно щонайменше 70 %, щонайменше, 80 %, щонайменше, 90 % або щонайменше 95 % щодо відповідної контрольної рослини. Збільшена глікозилаза,

переважно α -амілаза, у цій комбінації збільшується щонайменше на 100 %, переважно щонайменше на 200 %, щонайменше, на 300 % або більш переважно щонайменше на 500 % щодо відповідної контрольної рослини.

Склади рослин, описані в даному описі, не обмежуються конкретним типом рослини. 5
Посилання на рослину містить у собі рослину, вибрану з покритонасіневих, однодольних рослин, дводольних рослин, трав'янистих рослин, овочів, зернових, бобових і плодових або квіткових рослин або будь-якої комбінації цих класифікацій з утворенням підкласу. В деяких варіантах здійснення, модифіковані дводольні рослини є поліпшеними. У конкретних варіантах здійснення, поліпшеними є зернові однодольні рослини, такі як зернові культури, цукровий 10
очерет, цукровий буряк, сорго, жито і т.і.

У деяких варіантах здійснення, зерновою культурою є пшениця, кукурудза (маїс), ячмінь, рис, жито, овес, просо, сорго, гречка, фоніо, кіноа, спельта, пшениця тверда (дурум), м'яка (хлібопекарська) пшениця, полба (пшениця-однозернянка), амарант, дикий рис (насіння водяного очерету) або теф (полевичка аргентинська). Цією пшеницею може бути м'яка 15
(хлібопекарська) пшениця (гексаплоїдна пшениця), пшениця тверда (дурум) або тритикале. Кукурудза є переважно кукурудзою зубовидною і може бути білою кукурудзою або жовтою кукурудзою. В деяких варіантах здійснення, ця рослина є рослиною, іншою, чим *Arabidopsis thaliana* і/або кукурудза (маїс).

У деяких варіантах здійснення, регуляторна послідовність транскрипції переважно керує експресією полінуклеотиду в органі, що запасає, і/або тканині рослини, що є фотосинтетично 20
активною.

В інших варіантах здійснення, ця рослина додатково містить полінуклеотид, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю транскрипції, що кодує агент, який даунрегулює активність амілази.

В інших варіантах здійснення, частина рослини характеризується наявністю модифікованого вмісту або складу крохмалю, збільшеного потенціалу продуктивності, збільшеної ендогенної глікозилази або збільшеного перетравлювання, щодо відповідної частини контрольної рослини.

В одному конкретному варіанті здійснення, цей опис стосується до насіння, що містить крохмаль, де рівень глюкозо-6-фосфату в крохмалі цього насіння менше 10 нг/мг крохмалю і 30
рівень амілазної активності в борошні, отриманого із цього насіння, становить щонайменше 4 одиниці/г борошна.

Даний опис стосується продукту описаної тут генетично модифікованої рослини.

В одному варіанті здійснення, цей опис забезпечує продукт, що є переробленим зерном, борошном, борошном із цільного зерна або щонайменше частково очищеним крохмалем, де 35
цей продукт має модифікований вміст крохмалю або модифікований загальний склад крохмалю щодо відповідного продукту з контрольної рослини.

Цей опис розкриває спосіб одержання такого продукту, що включає в себе вирощування рослини і/або збір цієї рослини або частини розглянутої генетично модифікованої рослини. В 40
деяких варіантах здійснення, цей спосіб призначений для одержання обробленого зерна, борошна, борошна із цільного зерна або щонайменше частково очищеного крохмалю і містить у собі частину рослини, таку як зерно, з описаних тут генетично модифікованих рослин.

В інших варіантах здійснення, цей опис забезпечує спосіб одержання харчового продукту, що включає в себе змішування описаної тут рослини або частини цієї рослини або описаного тут продукту описаної тут рослини з іншим харчовим інгредієнтом і необов'язково варіння, 45
випічку, обсмажування, варіння на пару, кип'ятіння, екструзію або іншу обробку цієї суміші.

В іншому варіанті здійснення, цей продукт є продуктом ферментації, і цей опис винаходу описує спосіб, що включає в себе ферментацію продукту, що є обробленим зерном, борошном, борошном із цільного зерна або щонайменше часткового очищеним крохмалем, де цей продукт 50
має модифікований вміст крохмалю або модифікований загальний склад крохмалю щодо відповідного продукту з контрольної рослини, або борошном або крохмалем, отриманими обробкою частини рослини, такий як зерно, з описаних тут генетично модифікованих рослин. В деяких варіантах здійснення, продуктом ферментації є етанол.

Ще в одному варіанті здійснення, цей опис забезпечує спосіб використання для харчування людини або тварини, що включає в себе забезпечення описаної тут або описаної вище 55
генетично модифікованої рослини, частини рослини, продукту або продукту, одержаного цим способом, для людини або тварини. В деяких варіантах здійснення, цей опис забезпечує продукт, одержуваний описаним вище або описаним тут способом.

В іншому аспекті, розглянутий опис розкриває застосування гетерологічного полінуклеотиду для одержання рослини, що характеризується збільшеним потенціалом продуктивності, 60
збільшеною ендогенною глікозилазою або збільшеним травленням його насіння або

щонайменше одного з його органів, у порівнянні з контрольною рослиною, де цей полінуклеотид містить регуляторну послідовність транскрипції, функціонально зв'язану з послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує агент, який модифікує фосфорилування ендogenous крохмалю і/або деградацію крохмалю в цій рослині.

5 В іншому варіанті здійснення, цей опис забезпечує застосування описаної тут або описаної вище генетично модифікованої рослини або її частини, що містить крохмаль, для одержання харчового продукту або нехарчового продукту або корму для тварин для посилення росту або поліпшення здоров'я тварин. В деяких варіантах здійснення, цим продуктом є етанол.

10 В іншому варіанті здійснення, цей опис розкриває застосування рослини або її частини для приготування харчового матеріалу для споживання людиною, де ця рослина або її частина генетично модифіковані введенням щонайменше двох гетерологічних полінуклеотидів, де ця рослина характеризується збільшеним потенціалом продуктивності, зменшеним фосфорилуванням крохмалю і/або зменшеною деградацією крохмалю в листі цієї рослини і зменшеною ендogenous глікозилазою у насінні цієї рослини, де кожний гетерологічний

15 полінуклеотид містить регуляторну послідовність транскрипції, функціонально зв'язану з послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує агент, який модифікує фосфорилування крохмалю і/або деградацію крохмалю в цій рослині.

В іншому варіанті здійснення, цей опис забезпечує спосіб ідентифікації або застосування молекулярного маркера потенціалу продуктивності рослини, збільшеної ендogenous глікозилази

20 або збільшеного перетравлювання насіння або щонайменше однієї іншої частини рослини в порівнянні з контрольною рослиною, причому цей спосіб містить у собі одержання зразка нуклеїнової кислоти з рослини і обробку цього зразка для ідентифікації поліморфізму в гені, що кодує GWD, або поліморфізму, генетично зв'язаного з геном, що кодує GWD, у цій рослині.

В іншому варіанті здійснення, цей опис винаходу описує спосіб оцінювання рослини, що

25 включає в себе одержання зразку нуклеїнової кислоти з рослини і обробку цього зразка для визначення ідентичності вибраних нуклеотидів у гені GWD; і асоціювання будь-якого ідентифікованого нуклеотиду з ознакою, пов'язаною з потенціалом продуктивності в цій рослині.

Даний опис забезпечує нові молекули нуклеїнових кислот. В одному варіанті здійснення, цей опис винаходу описує виділену або химерну молекулу нуклеїнової кислоти, що містить

30 кодувальну нуклеотидну послідовність або комплементарну послідовність, що кодує поліпептид α -глюкан, водадікази, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3, або його біологічно активну частину або його варіант, що має щонайменше 90 % ідентичність послідовності SEQ ID NO: 3.

В іншому варіанті здійснення, цей опис забезпечує виділену або химерну молекулу нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, що відповідає або є

35 комплементарною SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 5 або SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 або SEQ ID NO: 10 (GWD рису) або SEQ ID NO: 11, 12, 13 або 14 (GWD сорго), або нею кодований білок або біологічно активну частину або його варіант, що має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з SEQ ID NO: 2 (GWD пшениці) або SEQ ID NO: 5 (GWD пшениці) або SEQ ID NO: 8, 9 або 10 (GWD рису) або SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 або SEQ ID NO: 14 (GWD сорго) або кодувальну ділянку білка.

У деяких варіантах здійснення, цей опис винаходу описує виділену або химерну молекулу нуклеїнової кислоти, що гібридується за умов високої жорсткості з SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 5 або SEQ ID NO: 8, 9 або 10 або кодований нею білок або біологічно активну частину або

45 його варіант, що має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з SEQ ID NO: 2 (GWD пшениці) або SEQ ID NO: 5 (GWD пшениці) або SEQ ID NO: 8, 9 або 10 (GWD рису) або SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 або SEQ ID NO: 14 (GWD сорго) або кодувальну ділянку білка.

У деяких варіантах здійснення, цей опис забезпечує конструкцію химерної нуклеїнової

50 кислоти, що містить молекулу нуклеїнової кислоти, описану тут, функціонально зв'язану з регуляторною послідовністю транскрипції. В деяких варіантах здійснення, цей опис забезпечує виділену або химерну молекулу нуклеїнової кислоти, здатну зменшувати експресію гена, що кодує поліпептид, що має активність GWD, у зерновій рослині. В деяких варіантах здійснення, ця нуклеїнова кислота є РНК або кодувальною РНК, антисмисловою РНК, косупресивною РНК, дуплексною РНК, шпильковою РНК або рибозимом.

У деяких варіантах здійснення, цей опис винаходу описує застосування виділеної або химерної молекули нуклеїнової кислоти для зменшення експресії гена, що кодує поліпептид, що має активність GWD, у зерновій рослині.

В іншому варіанті здійснення, цей опис забезпечує зонд одноланцюгової нуклеїнової

60 кислоти, що містить 20 послідовних нуклеотидів, де ця нуклеотидна послідовність із 20

нуклеотидів є ідентичною комплементу нуклеотидної послідовності молекули нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 5 або SEQ ID NO: 8, 9 або 10 (PWD рису) або SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 або SEQ ID NO: 14 (GWD сорго) або нею кодований білок або біологічно активну частину або їх варіант, що має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з SEQ ID NO: 2 (GWD пшениці) або SEQ ID NO: 5 (GWD пшениці) або SEQ ID NO: 8, 9 або 10 (GWD рису) або SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 або SEQ ID NO: 14 (GWD сорго) або кодувальну ділянку білка.

В іншому варіанті здійснення, цей опис забезпечує зонд одноланцюгової нуклеїнової кислоти, що містить 20 послідовних нуклеотидів, де ця нуклеотидна послідовність із 20 нуклеотидів є ідентичною нуклеотидній послідовності молекули нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, що гібридується за жорстких умов з SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 5 або SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 або SEQ ID NO: 10 (PWD рису) або з SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 або SEQ ID NO: 14 (GWD сорго) або ним кодований білок або його біологічно активну частину або його варіант, що має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з SEQ ID NO: 2 (GWD пшениці) або SEQ ID NO: 5 (GWD пшениці) або SEQ ID NO: 8, 9 або 10 (PWD рису) або SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 або SEQ ID NO: 14 (GWD сорго) або кодувальну ділянку білка.

В іншому варіанті здійснення, цей опис забезпечує зонд одноланцюгової нуклеїнової кислоти, що містить 20 суміжних нуклеотидів, де ця нуклеотидна послідовність із 20 нуклеотидів є ідентичною комплементу нуклеотидної послідовності молекули нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид α -глюкан, вода-дікінази, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3 або її біологічно активну частину, або її варіант, що має щонайменше 90 % ідентичність послідовності з SEQ ID NO: 3.

В іншому варіанті здійснення, даний опис забезпечує матрицю молекул нуклеїнових кислот, прикріплену до твердого носія, причому ця матриця містить олігонуклеотид, що буде селективно гібридуватись з молекулою нуклеїнової кислоти, що містить ген, що кодує поліпептид, що має GWD-активність, у зерновій рослині.

В іншому варіанті здійснення, цей опис забезпечує експресуючий вектор, клітину-хазяїна, клітину рослини, частину рослини, рослину або насіння, що містять описану вище виділену або химерну молекулу нуклеїнової кислоти, або конструкцію, що містить зазначену молекулу нуклеїнової кислоти, функціонально зв'язану з регуляторною послідовністю транскрипції. В деяких варіантах здійснення, ця конструкція експресується в клітині-хазяїні, клітині рослини, рослині, частині або насінні рослини, і цей опис забезпечує спосіб одержання поліпептиду GWD зернової рослини або його варіанта або спосіб одержання його біологічно активного фрагмента або варіанта, причому зазначений спосіб містить у собі експресію цієї конструкції в клітині-хазяїні, рослині, частині або насінні рослині.

Таким чином, в деяких варіантах здійснення, цей опис забезпечує способи поліпшення рослин, причому цей спосіб містить у собі стадії i) одержання множини рослин, щонайменше, одна з яких містить в її геномі гетерологічний полінуклеотид, ii) ідентифікацію із цієї множини рослин модифікованої рослини, що має збільшений потенціал продуктивності щодо контрольної рослини і містить гетерологічний полінуклеотид, і iii) відбір цієї генетично модифікованої рослини, де цей полінуклеотид містить регуляторну послідовність транскрипції, функціонально зв'язану з послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує агент, який модифікує фосфорилювання ендогенного крохмалю і/або деградацію крохмалю в цій рослині, де ця генетично модифікована рослина має збільшений потенціал продуктивності щодо контрольної рослини.

В іншому варіанті здійснення, цей опис винаходу описує спосіб поліпшення рослини, причому цей спосіб містить у собі стадії i) одержання множини рослин, щонайменше, одна з яких містить в її геномі гетерологічний полінуклеотид, ii) ідентифікацію із цієї множини рослин генетично модифікованої рослини, що має збільшену глікозилазу щодо контрольної рослини і містить гетерологічний полінуклеотид, і iii) відбір цієї генетично модифікованої рослини, де цей полінуклеотид містить регуляторну послідовність транскрипції, функціонально зв'язану з послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує агент, який модифікує фосфорилювання ендогенного крохмалю і/або деградацію крохмалю в цій рослині, де ця генетично модифікована рослина має збільшену ендогенну глікозилазу в порівнянні з контрольною рослиною.

Ще в одному варіанті здійснення, цей опис винаходу описує спосіб поліпшення рослин, причому цей спосіб містить у собі стадії i) одержання множини рослин, щонайменше, одна з яких містить в її геномі гетерологічний полінуклеотид, ii) ідентифікацію із цієї множини рослин генетично модифікованої рослини, що має збільшене перетравлювання щонайменше однієї з її частин щодо контрольної рослини і містить гетерологічний полінуклеотид, і iii) відбір цієї генетично модифікованої рослини, де цей полінуклеотид містить регуляторну послідовність

транскрипції, функціонально зв'язану з послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує агент, який модифікує фосфорилування ендogenous крохмалю і/або деградацію крохмалю в цій рослині, де ця генетично модифікована рослина має збільшене перетравлювання щонайменше однієї з її частин у порівнянні з контрольною рослиною.

У наступному варіанті здійснення, цей опис винаходу описує спосіб поліпшення рослин, причому цей спосіб містить у собі стадії i) одержання однієї або більше рослин, які містять у їх геномах гетерологічний полінуклеотид, і ii) визначення, чи мають ці одна або кілька рослин збільшений потенціал продуктивності, збільшену ендogenous глікозилазу або збільшене перетравлювання щонайменше однієї з їхніх частин щодо контрольної рослини, де цей полінуклеотид містить регуляторну послідовність транскрипції, функціонально зв'язану з послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує агент, який модифікує фосфорилування ендogenous крохмалю і/або деградацію крохмалю в цій рослині, де ця генетично модифікована рослина має збільшений потенціал продуктивності, збільшену ендogenous глікозилазу або збільшене перетравлювання щонайменше однієї з її частин, у порівнянні з контрольною рослиною.

У наступному варіанті здійснення, цей опис винаходу описує спосіб поліпшення рослин, причому зазначений спосіб містить у собі стадії i) одержання гетерологічного полінуклеотиду, що містить регуляторну послідовність транскрипції, функціонально зв'язану з послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує агент, який модифікує фосфорилування ендogenous крохмалю і/або деградацію крохмалю в цій рослині, ii) введення цього гетерологічного полінуклеотиду в клітини-попередники, тканини, органи, насіння або рослини, iii) одержання з них множини рослин, щонайменше, одна з яких містить у її геномі цей гетерологічний полінуклеотид, iv) ідентифікацію рослини із цієї множини рослин, що має збільшений потенціал продуктивності, збільшену ендogenous глікозилазу або збільшене перетравлювання щонайменше однієї з її частин щодо контрольної рослини і містить цей гетерологічний полінуклеотид, і v) відбір цієї рослини з одержанням за допомогою цього генетично модифікованої рослини, де ця генетично модифікована рослина має збільшений потенціал продуктивності, збільшену ендogenous глікозилазу або збільшене перетравлювання щонайменше однієї з її частин, у порівнянні з контрольною рослиною.

У наступному варіанті здійснення, цей опис винаходу описує спосіб поліпшення рослин, причому зазначений спосіб містить у собі стадії i) мутагенез клітин-попередників, тканин, органів, насіння або рослин, ii) одержання з них множини рослин, щонайменше, одна з яких містить у її геномі цей гетерологічний полінуклеотид, що містить регуляторну послідовність транскрипції, функціонально зв'язану з послідовністю нуклеїнової кислоти, що модифікує фосфорилування ендogenous крохмалю і/або деградацію крохмалю в цій рослині, і iii) ідентифікацію рослини із цієї множини рослин, що має збільшений потенціал продуктивності, збільшену ендogenous глікозилазу або збільшене перетравлювання щонайменше однієї з її частин щодо контрольної рослини, де ця генетично модифікована рослина має збільшений потенціал продуктивності, збільшену ендogenous глікозилазу або збільшене перетравлювання щонайменше однієї з її частин, у порівнянні з контрольною рослиною.

Короткий опис фігур

Фігура 1 є графічним зображенням вмісту Глюкозо-6-фосфатц G6P у крохмалі зерна rsGWD-трансгенних ліній пшениці.

Фігура 2 є графічним зображенням вмісту амілози в крохмалі зерна rsGWD-трансгенної пшениці.

Фігура 3 є графічним зображенням даних, що показують набухання зерен крохмалю rsGWD-трансгенної пшениці.

Фігура 4 є графічним зображенням даних, що показують здатність до клейстеризації (в'язкість крохмалю) зерен крохмалю (або борошна із цільного зерна без інгібітора α -амілази, або очищеного крохмалю в присутності інгібітора α -амілази) з rsGWD-трансгенної пшениці.

Фігура 5 є графічним зображенням даних, що показують збільшену життєздатність, біомасу і збільшений урожай зерна rsGWD-трансгенної пшениці.

Фігура 6 є фотографічним зображенням, що показує збільшену життєздатність, біомасу і збільшений урожай rsGWD-трансгенної пшениці.

Фігура 7 є графічним зображенням даних, що показують зменшений рівень вмісту G6P у транзитному (листя) крохмалі rsGWD-трансгенних ліній пшениці.

Фігура 8 є графічним зображенням даних, що показують збільшену кількість колосків на рослину в GWD-трансгенних лініях пшениці різних генетичних фонів.

Фігура 9 є графічним зображенням даних, що показують підвищену α -амілазну активність насіння rsGWD-трансгенної пшениці щодо контролів.

Короткий опис таблиць

Таблиця 1 забезпечує опис приведених тут SEQ ID NO.

Таблиця 2 забезпечує субкласифікацію амінокислот.

Таблиця 3 забезпечує приклади амінокислотних замінів.

5 Таблиця 4 забезпечує величини здатності до клейстеризації для rsGWD-трансгенної пшениці.

Таблиця 5 забезпечує результати аналізів росту (маса насіння, продукція насіння) для rsGWD-трансгенної пшениці.

10 Таблиця 6 забезпечує результати аналізів росту (площа листків, налив зерна, колосся) для rsGWD-трансгенної пшениці.

Таблиця 7 забезпечує структуру екзон/інтрон пшениці в порівнянні з GWD рису.

Докладний опис винаходу

У всьому цьому описі і у пунктах формули винаходу, якщо немає інших вказівок, слово "містити", і його варіації, такі як "містить" і "включає", повинні розглядатися як ті, що позначають включення зазначеного цілого числа або зазначеної стадії або групи цілих чисел або стадій, але не виключення будь-якого іншого цілого числа або іншої стадії або групи цілих чисел або стадій. Під терміном "складаються з" мається на увазі включення того, що треба після фрази "складаються з", і обмеження тим, що треба після цієї фрази. Таким чином, фраза "складаються з" указує на те, що перераховані елементи є необхідними або обов'язковими і, що ніякі інші елементи не можуть бути присутніми. Під терміном "складається по суті з" мається на увазі включення будь-яких елементів, перерахованих після цієї фрази, і обмеження іншими елементами, які не заважають і не вносять вклад в активність або дію, зазначені в цьому описі для перерахованих елементів. Таким чином, фраза "складається по суті з" вказує, що перераховані елементи є необхідними і обов'язковими, але що інші елементи є необов'язковими і можуть бути присутніми або можуть не бути присутніми залежно від того, впливають вони або не впливають на активність або дію перерахованих елементів.

Кожний варіант здійснення в цьому описі повинен застосовуватися *mutatis mutandis* для кожного іншого варіанта, якщо немає явно вираженої іншої вказівки.

30 Нуклеотидні і амінокислотні послідовності згадаються із застосуванням ідентифікаторних номерів послідовності (SEQ ID NO:). Ці SEQ ID NO: відповідають цифровим ідентифікаторам послідовностей (див. у списку послідовностей) <400> 1 (SEQ ID NO:1), <400> 2 (SEQ ID NO: 2), і т.і. Підсумовування ідентифікаторів послідовностей приведено в таблиці 1 після Прикладів. Список послідовностей приведений після формули винаходу.

35 Якщо немає іншого визначення, всі технічні і наукові терміни, використовувані тут, мають значення, зрозумілі звичайному фахівцю зі звичайною кваліфікацією в даній області. Хоча в практиці або тестуванні даного винаходу можуть бути використані будь-які способи і матеріали, подібні до описаних тут або еквівалентні описаним тут, описані кращі способи і матеріали. Для цілей даного винаходу нижче визначені наступні терміни.

40 Термін "приблизно" використовується тут для позначення кількості, рівня, величини, виміру, довжини, положення, розміру або величини, що варіюється на 30 %, переважно на 20 % і більш переважно на 10 % щодо діапазону кількості, рівня, величини, виміру, довжини, положення, розміру або кількості стадій, до яких вони відносяться.

Крохмаль

45 Даний винахід ґрунтується на спостереженні, що модифікація експресії гена, втягнутого у фосфорилуванні крохмалю і/або деградацію крохмалю в рослинах, зокрема, у листі, було асоційовано з несподіваними ефектами в параметрах продуктивності рослини, таких як вихід зерна. Це було несподіваним, тому що попередні дослідження показали, що модифікація синтезу або запасання крохмалю приводить до зменшення врожайності. Не очікувалося, що зменшення фосфорилування або деградації транзитного крохмалю в листі, що бере участь у мобілізації фіксованого вуглецю в інші частини рослини, може приводити до збільшення врожаю.

50 "Крохмаль" визначається тут як полісахарид, що складається по суті з α -глюкопіранозних одиниць. Крохмаль є основним запасним вуглеводом у рослинах, таких як, наприклад, зернові культури, у тому числі пшениця. Крохмаль синтезується в амілопластах і утворюється і зберігається в гранулах в органах, що запасують, які розвиваються, таких як зерно; його називають тут "запасним крохмалем". Він містить у собі амілозу, по суті лінійний (<0,1% місць розгалуження) α -1,4-D-глюкопіранозний полімер, і амілопектин, що має короткі ланцюги α -D-глюкопіранозних одиниць, первинно зв'язані α -1,4-зв'язками з α -1,6-зв'язаними відгалуженнями. Крохмаль зернових рослин дикого типу містить до приблизно 20-30 % амілози і приблизно 70-80 % амілопектину. Однією додатковою важливою відмінністю між амілозою і амілопектином є

молекулярна маса цих полімерів. Амілоза має спіральну конформацію з молекулярною масою 10^4 - 10^6 дальтон, тоді як амілопектин має молекулярну масу приблизно 10^7 - 10^8 дальтон. Нещодавні дослідження показали, що приблизно до 0,1 % сайтів α -1,6-глікозидного розгалуження може зустрічатися в амілозі, а, отже, її описують як "по суті лінійну". "Амілоза" визначається тут як така, що включає в себе по суті лінійні молекули α -1,4-зв'язаних глюкозидних (глюкопіранозних) одиниць і амілозо-подібний довголанцюговий амілопектин (що іноді називається "проміжним матеріалом" або "амілозо-подібним амілопектином", Takeda et al., 1993b; Fergason, 1994). Частка амілози в крохмалі визначається тут на основі маса/маса (м/м), тобто маса амілози у вигляді відсотка маси загального крохмалю зерна. Вміст амілози може бути визначено кожним зі способів, відомих у даній області, у тому числі ексклюзійну ВЕРХ, наприклад, в 90% (м/о) ДМСО, способами з конканаваліном А (Megazyme Int, Ireland) або переважно йодометричними способами, наприклад, як описано в прикладі 1. Спосіб ВЕРХ може містити в собі усунення розгалуження крохмалю (Batey and Curtin, 1996) або може не містити усунення розгалуження крохмалю.

Крохмаль спочатку синтезується і накопичується в листі і інших зелених тканинах рослини у вигляді продукту фотосинтезу. Цей крохмаль називають тут "транзиторним крохмалем" або т.і., тому що він накопичується в пластидах фотосинтезуючих тканин протягом дня і деградується щонайменше протягом ночі. Таким чином, як синтетичні, так і деградитивні (розщеплювальні) ферменти присутні в цій клітині одночасно, і ця система піддається добовій регуляції. Уночі, транзиторий крохмаль гідролізується до цукрів, які транспортуються, спочатку у вигляді сахарози, із тканин-джерел у приймальні тканини для використання для росту рослини, як джерело енергії для метаболізму або для зберігання в тканинах у вигляді запасного крохмалю. Розщеплення транзиторного крохмалю в листі обговорювалося нещодавно Zeeman et al., 2004. Це розщеплення відбувається під дією ферментів, таких як амілази, дерозгалужуючі ферменти, α -глюканфосфорилази і глюканотрансферази.

Майже всі крохмалі рослин фосфорилуються до деякої міри по гідроксильних групах С3 і С6 амілопектину, але ступінь фосфорилування істотно варіюється залежно від виду рослини. Крохмаль бульби картоплі звичайно має 25 нмоль глюкозо-6-фосфату на мг крохмалю, з діапазоном 0,2-0,4 % (м/м). Більшість фосфатних груп у крохмалі картоплі пов'язані з амілопектином, дуже мало з амілозою. На відміну від крохмалю картоплі, крохмаль зерна злаків містить тільки 0,02-0,04 % фосфату. У даному контексті, термін "фосфорильований крохмаль" стосується крохмалю, що має фосфатні групи, зв'язані у вигляді моноестерів у положеннях С-3 і/або С-6 глюкозних одиниць. Рівень фосфатних груп у зразках крохмалю може бути легко вимірюваний способами, відовими в даній області, переважно способом з Малахітовим зеленим, як описано в прикладі 1, і прийнятним чином виражений у вигляді моль на мг крохмалю. Рівень глікозил-6-фосфатних залишків у пробах крохмалю може бути легко вимірюваний аналізом амілоглюкозидази, як описано в прикладі 1.

Деградація крохмалю

Початкова стадія деградації крохмалю, як у листі, так і в насінні, що проростає, містить у собі фермент ендамілазу (α -амілаза, ЕС 3.2.1.1), яка у насінні, що проростає, секретується з алейронового шару, а в листі присутня у хлоропластах. Цей фермент атакує крохмаль у конкретних сайтах на крохмальному зерні (гранулі), викликаючи пітинг (виразку) на поверхні крохмального зерна (гранули). Додаткова атака на молекули крохмалю здійснюється α -глюканфосфорилазою (ЕС 2.4.1.1), що продукує глюкозо-6-фосфат з невідновлюваного кінця α -1,4-глюканових ланцюгів, і дерозгалужуючими ферментами, такими як ізоамілаза (ЕС 3.2.1.68) і пулуланаза (ЕС 3.2.2.142), які видаляють α -1,6 точки розгалуження. Іншими ферментами, що беруть участь, є екзоамілаза α -амілаза (ЕС 3.2.1.2), що вивільняє мальтозу з невідновлюваного кінця глюканових ланцюгів, диспропорціонувальний фермент (D-фермент, ЕС 2.4.1.25) і α -глюкозидаза (мальтаза, ЕС 3.2.1.20) або мальтозофосфорилаза (ЕС 2.4.1.8), які можуть діяти на лінійні ланцюги. В Arabidopsis і інших дводольних рослинах, активність β -амілази перевищує активність всіх інших метаболізуючих глюкан ферментів приблизно на порядок величин і, очевидно, є присутнім як усередині, так і зовні хлоропластів.

Глюкан, водадікіназа (GWD, ЕС 2.7.9.4), очевидно, регулює ступінь, з якою інші ферменти атакують гранули (зерна) крохмалю. GWD переносить β -фосфат АТФ у положення або С6, або С3 глікозильних одиниць в амілопектині, і присутність таких фосфатів може бути сигналом для протікання деградації. Вважалося, що присутність фосфатних груп може змінювати електростатичні взаємодії між ланцюгами глюкану або із взаємодіючими білками, що дозволяє ініціювати цей процес. GWD стає пов'язаним із крохмальними зернами (гранулами) листя під час розщеплення крохмалю (Ritte et al., 2000) і може бути більше активним у цей час. Сама

активність GWD, очевидно, регулюється щонайменше в деяких рослинах у циркадному режимі за допомогою циклів день/ніч.

Антисмислові експерименти для зменшення експресії GWD (що також називається білком R1 або OK1) у картоплі зменшували пов'язаний із крохмалем фосфат на 90 % (Viksø-Nielsen et al., 2001). Мутація в гомологічному гені в *Arabidopsis thaliana* (називаному *sex1* для фенотипу надлишку крохмалю) була пов'язана із супресією вмісту фосфату крохмалю і підтверджувала участь GWD у фосфорилуванні крохмалю (Zeeman and Rees, 1999). Крім того, супресовані лінії мутанта як *Arabidopsis*, так і картоплі виявляли фенотип "надлишку крохмалю", де крохмаль накопичувався в кількостях за межами нормальних рівнів у листі, підтверджуючи роль GWD у деградації транзитного крохмалю. У цих дослідженнях не спостерігали модифікації структури крохмалю. Зменшений вміст фосфату крохмалю в бульбах картоплі супроводжувалося зменшенням "підсолоджування на холод" бульб картоплі (Lorberth et al., 1998), що дозволяє припустити зменшення амілазної або іншої гідролазної активності. Мутанти *Arabidopsis sex1*, ушкоджені відносно метаболізму транзитного крохмалю, також мали змінений метаболізм вуглеводів, росли повільно і пізно розквітали (Yu et al., 2001).

В 2005 році, Baunsgaard et al. визначили новий клас водадікінази, фосфоглюкоза водадікінази (PWD). Цей фермент, схожий, на GWD, але відрізняється від нього, був активним у додатковому фосфорилуванні попередньо фосфорильованого крохмалю (Kotting et al., 2005). Ritte et al. припустили, що фосфорилування в положеннях C3 або C6 глікозильних залишків у крохмалі каталізувалось PWD і GWD, відповідно (Ritte G. et al., 2006).

Деградація і фосфорилування крохмалю в насіння, що проростає, зернових культур є частково з'ясованими, але це є високо спеціалізованою системою, в яку втягнуто руйнування тканини і індукція гідролітичного ферменту.

У деяких варіантах здійснення, даний винахід забезпечує поліпшення продуктивності або утилізації шляхом модифікації фосфорилування і/або деградації крохмалю в рослинах і ґрунтується на спостереженнях зв'язку між цими двома подіями. Ця модифікація фосфорилування і/або деградації крохмалю може мати місце в транзитному крохмалі, наприклад, у листі рослини, у запасному крохмалі, наприклад, у зерні, або в обох випадках. Ця модифікація рослини, переважно зернової рослини, відповідно до цього винаходу містить у собі, без обмеження, одну або кілька змін активності або кількості ферментів фосфорилування і/або деградації (розщеплення) крохмалю в листі і/або ендоспермі.

У даному контексті, "модифікація" позначає зміну в матеріалі або його функції, що може бути збільшенням або зменшенням кількості, активності, швидкості продукування, швидкості інактивації, швидкості розпаду, затримки появи, додавання або видалення матеріалу, мутації або будь-якої їх комбінації, поки є зміна функції, як наслідок. У даному контексті, "модуляція функціонального рівня" або подібний термін позначає або збільшення, або зменшення функціонального рівня гена, що представляє інтерес, або білка. "Функціональний рівень" повинен розумітися як термін, що стосується рівня активного білка, у випадку рівня білка, здатного виконувати фосфорилування крохмалю або деградацію крохмалю. Цей функціональний рівень є комбінацією дійсного рівня білка, що присутній у клітині-хазяїні, і питомої активності цього білка. Таким чином, цей функціональний рівень може бути, наприклад, модифікований збільшенням або зменшенням дійсної концентрації білка в клітині-хазяїні, що може бути легко досягнуто зміною експресії гена, що кодує цей білок. Цей функціональний рівень може бути також модифікований модуляцією питомої активності цього білка. Таке збільшення або зменшення питомої активності може бути досягнуто експресією варіантного білка з більш високої або більш низькою питомою активністю або заміною ендогенного гена, що кодує релевантний білок, алелем, що кодує такий варіант. Збільшення або зменшення питомої активності може бути також досягнуто експресією ефекторної молекули. В деяких варіантах здійснення, рівень експресії прийнятної кодувальної послідовності, або активності або кількості ферменту вибирають таким чином, що він є щонайменше на приблизно 10 %, щонайменше, 20 %, щонайменше, 30 %, щонайменше, 40 %, щонайменше, 50 %, щонайменше, 60 %, щонайменше, 80 % або навіть приблизно 100 %, щонайменше, 200 %, щонайменше, 500 % або щонайменше на 1000 % більше високим або щонайменше на приблизно 10 %, щонайменше, 20 %, щонайменше, 30 %, щонайменше, 40 %, щонайменше, 50 %, щонайменше, 60 %, щонайменше, 70 %, щонайменше, 80 %, щонайменше, 90 %, щонайменше, 92 %, щонайменше, 94 %, щонайменше, 96 %, щонайменше, 97 %, щонайменше, 98 % або щонайменше 99 % більше низьким, ніж контрольний рівень експресії, або зменшеним до недетектованого рівня.

У даному контексті, терміни "модифікація", "зміна", "збільшення", "збільшений", "зменшення", "зменшений", "інгібований", "мутантний" або т.і. вважаються відносними термінами, тобто в порівнянні зі станом дикого типу або незміненим станом. Рослину дикого

типу називають тут також "контрольною рослиною" і ці терміни є взаємозамінними. Термін "рівень білка" стосується кількості конкретного білка, наприклад, GWD, що може бути виміряно будь-якими способами, відомими в даній області, такими як, наприклад, аналіз Вестерн-блотів, або іншими імунологічними способами. "Рівнем активності ферменту" називають кількість конкретного ферменту, обмірювана в аналізі ферменту. Повинно бути зрозуміло, що цей рівень активності ферменту може бути зміненим у мутанті, якщо продукує більш-менш активний білок, але не рівень експресії (кількість) самого білка. Навпроти, кількість білка може бути зміненою, але активність (на одиницю білка) залишається такою ж самою. Зменшення як кількості, так і активності також є можливими, наприклад, коли експресія гена, що кодує цей фермент, зменшуються транскрипційно або посттранскрипційно. В деяких варіантах здійснення, зменшення рівня білка або активності, наприклад, GWD, дорівнює щонайменше 40 % або щонайменше 60 % у порівнянні з рівнем білка або активності в листі або ендоспермі немодифікованої зернової рослини, наприклад, пшениці, або щонайменше 75 %, щонайменше, 90 % або щонайменше 95 %. Це зменшення рівня білка або активності ферменту може мати місце на будь-якій стадії розвитку листя, насіння або зерна, зокрема, під час денного часу, коли має місце фотосинтез, або під час стадії наливу зерна, хоча крохмаль синтезується в ендоспермі, що розвивається, або на всіх стадіях розвитку зерна аж до зрілості. Термін "дикий тип" має в даному контексті його звичайне в області генетики значення і містить у собі рослину, переважно зернову рослину, культивари або генотипи яка не є модифікованою, як описано тут. Кращими сортами "дикого типу", які є легко доступними привселюдно, є: для м'якої (хлібопекарської) пшениці, cv. Bob White; для кукурудзи (*Zea mays*), Roundup Ready Corn 2; для рису, Nipponbare; для сорго (*Sorghum bicolor*), cv. Sumac.

В одному варіанті здійснення, зміна містить у собі зменшення кількості і/або активності GWD у листі або ендоспермі рослини, що, як спостерігали, приводить до зменшеного змісту фосфату в крохмалі листя і/або зрілому насінні, наприклад, у зерні зернової рослини. В іншому варіанті здійснення, ця модифікація містить у собі зменшення активності PWD, а також GWD. У наступному варіанті здійснення, ця модифікація містить у собі зменшення GWD і збільшення амілазної активності в зерні злаків, переважно α -амілази. Інші ферменти, що здійснюють деградацію крохмалю, які можуть бути змінені в комбінації з будь-якими з вищеописаних ферментів, містять у собі β -амілазу, фосфорилазу або дерозгалужуючі крохмальні ферменти, такі як ізомальтаза або пулуланаза. Цими змінами можуть бути, наприклад, збільшена активність, зменшена активність, змінена локалізація або таймінг активності. При об'єднанні змін деяких із цих ферментів, характеристики крохмалю, інші ніж вміст фосфату, можуть бути також змінені. В одному варіанті, модифікована рослина, переважно зернова рослина, містить зміни активності множини ферментів, що деградують крохмаль, в ендоспермі, що переважно включають у себе зменшення активності GWD, так що зміст фосфату в крохмалі цього зерна зменшується. У наступному варіанті здійснення, змінюються активність одного або декількох ферментів, що деградують крохмаль, в тканинах рослин, інших ніж ендосперм або листя, наприклад, активність GWD може бути збільшена в ендоспермі для компенсації деякої втрати активності, викликаній трансгеном, що кодує GWD-інгібувальну молекулу, призначену первинно для експресії в листі, або активність амілази, переважно α -амілази може зменшуватися в ендоспермі. Цією зміною в активності ферменту може бути збільшена або зменшена величина або зміна в таймінгу експресії. Синтез крохмалю може бути додатково поліпшений надекспресією одного або декількох ферментів біосинтезу крохмалю в комбінації зі зменшенням в GWD. Гени, що кодують такі ферменти, можуть бути генами з кожного з різних джерел, відомих у даній області, наприклад, з бактерій, зернових рослин або інших джерел, і можуть бути модифіковані для зміни каталітичних властивостей, наприклад, зміни температурної залежності цих ферментів (наприклад, див. WO 94/09144).

Цей модифікований фенотип може бути отриманий частковим або повним інгібуванням експресії гена GWD або генів GWD і PWD. Фенотип "низького вмісту фосфату крохмалю" або т.і., у даному контексті відноситься до загального крохмалю, отриманому з рослини або частині рослини, наприклад, листі або зерні, що має вміст фосфату крохмалю менш 0,02 %, або альтернативно зменшене щонайменше на 50 % щодо відповідного контрольного крохмалю. Ступінь, до якої інгібується цей ген або ці гени, буде до деякої міри визначати характеристики крохмалю, одержаного в зерні пшениці. Кожний з діапазонів способів гель-електрофорезу, проведений на білках, екстрагованих з ендосперми модифікованої пшениці, буде виявляти природу і ступінь модифікації відносно активності GWD і/або PWD. Модифікація може відбуватися у вигляді зменшення GWD-активності, повної елімінації активності ферменту або зміни в розподілі GWD або інших ферментів у листі або ендоспермі. Наприклад, GWD або інша активність може бути зменшена дією на розподіл цих ферментів в ендоспермі, зі зменшенням

рівня ферменту, що є пов'язаним із гранулою крохмалю (крохмальним зерном). Для проведення цих тестів, крохмаль може бути екстрагований з ендосперму пшениці і білки в ньому можуть бути аналізовані, наприклад, як описано в Rahman et al., 1995. Способи, добре відомі в даній області, такі як електрофорез у SDS-PAGE і імуноблотинг, проводять на фракціях розчинного крохмалю і гранул крохмалю і ці результати використовують для ідентифікації рослин або зерна, у яких відбулися модифікації у відношенні GWD або інших ферментів.

Зміна активностей ферментів фосфорилування або деградації крохмалю може бути досягнута введенням однієї або декількох генетичних варіацій у зернову рослину, переважно пшеницю. Тобто, ці генетичні варіації проводять, безпосередньо або небезпосередньо, до зміни активності ферментів у частині рослини під час росту і розвитку і внаслідок цього до описаних тут модифікацій крохмалю. Ця генетична варіація може бути гетерологічним полінуклеотидом, що вводять у рослину або клітину-попередник, наприклад, трансформацією або мутагенезом. Ця генетична варіація може бути потім введена в різні генетичні середовища схрещуванням, як відомо в області селекції рослин.

Кількість або активність ферментів, таких як GWD або амілази, у тканинах або частинах рослини можуть бути виміряні з використанням будь-якого способу, відомого в даній області, наприклад, ферментативного аналізу, способів імунодетектування, Вестерн-блотингу або аналізів ELISA, або рівень відповідних мРНК може бути вимірюваний такими способами, як, наприклад, аналіз гібридизації Нозерн-блотингу або полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскриптазою (ЗТ-ПЛР). Рівень фосфорилування крохмалю може бути також виміряний для визначення рівня ферменту під час синтезу крохмалю. Зернова рослина або зерно, що мають змінений рівень конкретного білка або активності ферменту в його ендоспермі, можуть бути піддані скринінгу або відібрані на основі зменшеного рівня цього білка або ферменту (прямий аналіз), або вибір може бути заснований на фенотипі цього зерна або рослини пшениці, наприклад, на зменшеному рівні фосфату або візуальному фенотипі цієї рослини або його частини, наприклад, на щуплому зерні або змінених властивостях гранул крохмалю або зміненої морфології рослини. Рослини пшениці зі зміненими властивостями крохмалю, використовувані тут, можуть бути ідентифіковані з використанням кожного зі способів, відомих у даній області, або безпосереднім визначенням властивостей крохмалю, або опосередковано, наприклад, детектуванням присутності генетичної варіації в цій рослині або його зерні. Ця рослина може бути однією рослиною в популяції рослин пшениці, наприклад, у селекції пшениці.

Потенціал продуктивності

Цей винахід забезпечує рослини зі збільшеними характеристиками продуктивності. Приклади властивостей збільшеної продуктивності містять у собі, але не обмежуються ними, ознаки, які є кращими для фермера (рослинника), такі як ріст, врожай, біомаса і життєздатність, а також родинні властивості, такі як стійкість до стресу, посухи, шкідників або хвороб, або поліпшені естетичні якості, такі як характеристики квітки або листя, ознаки, які є кращими для споживчих продуктів, що збирають із цієї рослини, такі як поліпшений вміст живильних або смакових речовин у їжі або напої людини або кормі тварини, або кращими для переробки кормів або промислової переробки, наприклад, для покращення технологічних властивостей. У таких застосуваннях, ці рослини звичайно вирощують для використання їх зерна, плодів або інших частин рослин, що включають у себе листя, стебла, листові обгортки (кукурудзи), вегетативні частини і т.і., у харчових продуктах або напоях для людини або тварин, у тому числі для використання як частина силосу для тварин, або для декоративних цілей. В одному варіанті здійснення, рослинний матеріал цього винаходу поліпшував застосування як силосу для корму тварин, наприклад, як описано в Публікації заявки на патент США з номером No US2006/0150278, включеної сюди як посилання. У цьому варіанті здійснення, гетерологічний полінуклеотид переважно експресується з регуляторної послідовності транскрипції, що експресується переважно у вегетативних частинах рослини, переважно листі або стеблах, і навіть більш переважно цей гетерологічний полінуклеотид експресується при низьких рівнях або недетектованих рівнях у насінні цієї рослини.

Збільшений потенціал продуктивності може бути виміряний будь-яким способом, відомим у даній області, відповідно до параметра, що представляє інтерес.

Як описано в прикладах, рослини, що мають зменшене фосфорилування крохмалю в результаті понижувальної регуляції продукування GWD, виявляли також збільшені рівні α -амілази. Таким чином, цей опис забезпечує спосіб одержання генетично модифікованої рослини, що має зменшений рівень фосфорилування крохмалю і збільшені ендogenous глікозилази в порівнянні з контрольною рослиною, причому цей спосіб містить у собі вибір з множини рослин, які містять у їх геномі гетерологічний полінуклеотид, функціонально зв'язаний

з регуляторною послідовністю транскрипції, що кодує агент, який даунрегулює фосфорилування ендogenous крохмалю рослини, що даунрегулює активність фосфорилування крохмалю і в якому рівень ендogenous глікозилази є збільшеним щодо контрольної рослини. Альтернативно, цим гетерологічним полінуклеотидом може бути мутований ген, наприклад, що містить індуковану мутацію, що відповідає гену дикого типу, що кодує фермент або регуляторний білок, що бере участь у фосфорилуванні крохмалю, де результатом цієї мутації є фосфорилування крохмалю. У даному контексті, "множиною рослин" називають щонайменше дві рослини, переважно щонайменше 10 рослин і навіть більш переважно щонайменше 50, 100 або 200 рослин. Звичайно, ця множина рослин, у кожному випадку, містить трансген або індуковану мутацію, але не всі рослини виявляють ту саму ступінь модифікації, виявляючи деякий діапазон у ступені цього ефекту. Таким чином, способи цього винаходу можуть містити в собі стадію відбору або ідентифікації, в якій рослина, що має оптимальні рівні модифікації, ідентифікують і відбирають.

У деяких варіантах здійснення, деградація крохмалю або рівень або функціональна активність ферменту, що приймає участь у деградації крохмалю або фосфорилуванні крохмалю, що даунрегулює до рівня меншого ніж приблизно 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 % або 15 % і переважно меншого ніж приблизно 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % або 1 % щодо відповідної контрольної рослини для досягнення збільшення потенціалу продуктивності. В одному варіанті здійснення, це зменшення деградації крохмалю або рівня або функціональної активності ферменту втягнутого у деградацію крохмалю, або фосфорилуванні крохмалю даунрегулюється у фотосинтетичній тканині, такий як, наприклад, листи, для досягнення збільшення потенціалу продуктивності, або альтернативно, в органі, що запасає, для крохмалю, переважно насінні. Переважно, у цьому варіанті здійснення, це зменшення приводить до істотного збільшення потенціалу продуктивності, що звичайно дорівнює щонайменше приблизно 20 %, 25 % або 30 %, але особливо щонайменше приблизно 40 %, 45 %, 50 % або 55 % або більш переважно дорівнює щонайменше приблизно 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % або більше високому збільшенню потенціалу продуктивності щодо відповідної контрольної рослини при тих же самих умовах навколишнього середовища. Величина зменшеної деградації крохмалю або зменшеного фосфорилування крохмалю може залежати від інших факторів, таких як вид або лінія (сорт) і рівень, локалізація або таймінг активності ферменту деградації крохмалю або фосфорилування крохмалю і/або рівня або активності їхніх субстратів і/або допоміжних молекул або кофакторів шляху деградації крохмалю. Однак, вважається, що будь-яка оптимізація, що може знадобитися в такому випадку, може бути досягнута з використанням рутинних способів, у тому числі описаних тут способів.

Зменшена деградація крохмалю може відбуватись в тканинах по всій рослині, наприклад, з використанням конститутивного промотору для запуску експресії гетерологічного гена, що даунрегулює деградацію крохмалю. Альтернативно, вона може виконуватися в тканинах-джерелах (листі), у транспортних тканинах або в тканинах стоку (ендоспермі) з використанням тканеспецифічного або регульованого розвитком промотору. "Клітина стоку" і "тканина стоку" стосується в даному контексті клітин, тканин і органів, які мають нетто-приплив органічного вуглецю, що входить у ці клітини у формі іншої, ніж фіксація діоксиду вуглецю, тобто у вигляді цукрів або інших вуглеводів. У рослинах, тканині стоку включають у себе всі нефотосинтезувальні тканини, а також фотосинтетичні тканини з нетто-надходженням органічного вуглецю, фіксованого іншими фотосинтетичними клітинами або отриманого іншим способом з навколишнього середовища або оточення іншим способом, ніж пряма фіксація діоксиду вуглецю.

В іншому варіанті здійснення, рівень фосфорилування ендogenous крохмалю модулюється з використанням ферментів фосфорилування крохмалю з різними функціональними активностями. Це може виникати з відмінностей питомих активностей або стабільностей цих ферментів у клітинному компартменті, в якому відбувається деградація крохмалю. В деяких варіантах здійснення, активність крохмальдеградуючого ферменту, що використовується для деградації ендogenous крохмалю, збільшується щонайменше на 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % або 90 %, або навіть щонайменше на приблизно 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, 600 %, 700 %, 800 %, 900 % або 1000 % або зменшується щонайменше на приблизно 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % або навіть щонайменше на приблизно 99,5 % або 99,9 % щодо рівня контрольного ферменту в контрольній рослині. Крохмальдеградуючі ферменти різних активностей можуть зустрічатись в природі або можуть бути отримані синтетичними або рекомбінантними способами, наприклад, модифікацією каталітичного сайту або іншого сайту (наприклад, субстратзв'язувального сайту,

кофактор зв'язувального сайту) контрольного або вихідного ферменту. Звичайно, ця модифікація досягається заміною, додаванням або делецією щонайменше однієї амінокислоти в послідовності вихідного ферменту з використанням, наприклад, доцільних або встановлених способів мутагенезу або комбінаторних хімічних способів, відомих у даній області. Варіантні ферменти деградації крохмалю можуть містити консервативні заміни амінокислот. "Консервативна заміна амінокислоти" є заміною, в якій конкретний амінокислотний залишок замінюють амінокислотним залишком, що має подібний бічний ланцюг. Сімейства амінокислотних залишків, що мають подібні бічні ланцюги, були визначені в даній області. Ці сімейства містять у собі амінокислоти з основними бічними ланцюгами (наприклад, лізин, аргінін, гістидин), кислотними бічними ланцюгами (наприклад, аспарагінова кислота, глутамінова кислота), незарядженими полярними бічними ланцюгами (наприклад, гліцин, аспарагін, глутамін, серин, треонін, тирозин, цистеїн), неполярними бічними ланцюгами (наприклад, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін, триптофан), бета-бета-розгалуженими бічними ланцюгами (наприклад, треонін, валін ізолейцин) і ароматичними бічними ланцюгами (наприклад, тирозин, фенілаланін, триптофан, гістидин). Таким чином, амінокислотний залишок у вихідному ферменті прийнятним чином замінюють іншим амінокислотним залишком з того ж самого сімейства бічних ланцюгів. Альтернативно, в іншому варіанті здійснення, мутації можуть бути введені випадковим чином уздовж усього полінуклеотиду або частини полінуклеотиду, що кодує контрольний фермент, наприклад, мутагенез насичення, і отримані мутанти можуть бути піддані скринінгу на активність цього ферменту для ідентифікації мутантів з активністю, що відрізняється від активності вихідного ферменту.

В інших варіантах здійснення, рівень і місце розташування деградації ендогенного крохмалю модулюють із використанням крохмальдеградуєчого ферменту, спрямованого на інші функціональні субклітинні компартменти. В ілюстративних прикладах, ця активність модифікується в листі і/або насінні. Це може досягатися експресією ядерного гена, що приводить до синтезу в цитозолі форми цього ферменту без сигнальних послідовностей для транспорту в інші клітинні компартменти. В інших ілюстративних прикладах, ця активність спрямовується на запасуючий компартмент, такий як амілопласт або вакуоль, або в запасуючий і транспортний компартмент, такий як позаклітинний (апоплазматичний) простір, включенням у послідовності цього ферменту сигналу для транспорту цього ферменту із цитозолі в бажаний клітинний простір. Певні сигнальні послідовності можуть приводити до розподілу ферменту між двома або більше клітинними просторами.

Ці способи містять у собі аналіз рослин або проростків такими способами, як електрофорез, хроматографія (у тому числі паперова хроматографія, тонкошарова хроматографія, газова хроматографія і високоефективна рідинна хроматографія). Окремі компоненти звичайно ідентифікують порівнянням профілів розділення зі стандартами відомої ідентичності або аналітичних способів, такими як мас-спектрометрія і ядерна магнітно-резонансна спектроскопія. Наприклад, може бути зроблене посилання на приклад 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; і цитовані в них посилання. Вуглеводи можуть бути аналізовані з використанням стандартних протоколів, відомих особам із кваліфікацією в даній області.

Гени

Даний винахід містить у собі модифікацію активності генів і конструювання і застосування химерних генів. У даному контексті, термін "ген" містить у собі послідовність дезоксирибонуклеотидів, що містить у собі білок, що кодує, район структурного гена або яка транскрибується в клітині, але не транслюється, а також асоційовані некодувальні і регуляторні області. Такі асоційовані області звичайно розташовані суміжно із цією кодувальною областю на 5'- і 3'-кінцях на відстані приблизно 2 kb на кожній стороні. У цьому зв'язку, цей ген може містити в собі регуляторні сигнали, такі як промотори, енхансери, сигнали термінації і/або поліаденілювання, які природно пов'язані з даним геном, або гетерологічні регуляторні сигнали, і в цьому випадку цей ген називають "химерним геном". Послідовності, які розташовані 5' (ліворуч) від кодувальної області і які присутні на мРНК, називають 5'-нетрансльованими послідовностями. Послідовності, які розташовані 3' (праворуч) або нижче по ходу транскрипції від кодувальної області і які присутні на мРНК, називають 3'-нетрансльованими послідовностями. Термін "ген" містить у собі як кДНК, так і геномні форми гена.

"Ген GWD пшениці" або т.і. стосується в даному контексті до нуклеотидної послідовності, що кодує GWD у пшениці, що може бути легко відокремлений від PWD або інших білків

кваліфікованими в даній області фахівцями. Гени GWD пшениці містять у собі варіанти, що зустрічаються у природі, існуючі в пшениці, у тому числі гени, що кодуються геномами A, B і D пшениці звичайної, а також варіанти, що не зустрічаються в природі, які можуть бути отримані фахівцями кваліфікованими в області генної модифікації. У кращому варіанті здійснення, ген GWD є молекулою нуклеїнової кислоти, що може бути присутня у пшениці або виділена або зроблена із пшениці, що містить нуклеотиди, що мають послідовність, що має щонайменше 80 % ідентичність із областю, що кодує ген GWD, показаний в SEQ ID NO: 2.

Аналогічним чином, "ген PWD пшениці" або т.і. позначає нуклеотидну послідовність, що кодує PWD у пшениці, що може бути легко відокремлений від інших дікіназ або інших білків кваліфікованими в даній області фахівцями. Він містить у собі варіанти генів, що зустрічаються в природі, що існують у пшениці, у тому числі гени, що кодуються геномами A, B і D пшениці звичайної, а також варіанти, що не зустрічаються в природі, які можуть бути отримані фахівцями кваліфікованими в області генної модифікації.

Геномна форма або клон гена, що містить цю кодувальну область, може перериватися декодувальними послідовностями, що називаються "інтронами" або "проміжними областями" або "проміжними послідовностями". "Інtron" позначає в даному контексті сегмент гена, що транскрибується у вигляді частини первинного РНК-транскрипта, але не є присутнім у зрілій молекулі мРНК. Інтрони видаляються або "сплайсуються" з ядерного або первинного транскрипта; таким чином, інтрони відсутні в месенджер-РНК (мРНК). Інтрони можуть містити регуляторні елементи, такі як енхансери. "Екзони" позначають у даному контексті області ДНК, що відповідають РНК-послідовностям, які присутні в зрілій мРНК або молекулі зрілої РНК, у випадках, коли ця РНК не транспюється. мРНК діє під час трансляції, вказуючи послідовність або порядок амінокислот у виникаючому поліпептиді. Термін "ген" містить у собі синтетичну або зливу молекулу, що кодує всі або частину білків описаного тут винаходу, і нуклеотидну послідовність, комплементарну кожній з вищеописаних молекул. Ген може бути введений у прийнятний вектор для внехромосомної підтримки в клітині або для інтегрування в ген-хазяїна.

У даному контексті, "химерний ген" позначає будь-який ген, що не є природним геном у його природному місці розташування. Звичайно химерний ген містить регуляторні і транскрибуємий або білоккодувальні послідовності, які не виявляються разом у природі. Таким чином, химерний ген може містити регуляторні послідовності і кодувальні послідовності, які одержані з різних джерел, або регуляторні і кодувальні послідовності одержані з того самого джерела, але розташовані в порядку, що відрізняється від порядку, що виявляється в природі. Термін "ендогенний" використовується тут для позначення речовини, що у нормально продукується в немодифікованій рослині на тій же самій стадії розвитку, на якій вона продукується в рослині, застосовуваний у дослідженні. Термін "ендогенний ген" стосується природного гена в його природному місці розташування в геномі організму. У даному контексті, "рекомбінантною молекулою нуклеїнової кислоти" називають молекулу нуклеїнової кислоти, що була сконструйована або модифікована з використанням технології рекомбінантних ДНК. Терміни "чужорідний полінуклеотид" або "екзогенний полінуклеотид" або "гетерологічний полінуклеотид" і т.і. стосується будь-якої молекули нуклеїнової кислоти, що вводять у геном клітини експериментальними маніпуляціями. Вони містять у собі послідовності генів, що виявляють у цій клітині, доки цей введений ген містить деяку модифікацію (наприклад, мутацію, присутність гена селекуемого маркера і т.і.) щодо гена, який зустрічається в природі. Чужорідними або екзогенними генами можуть бути гени, що виявляють у природі, які вбудовані в неприродний організм, природні гени, введені в нове місце розташування в природному хазяїні, або химерні гени. "Трансген" є геном, що був введений у цей геном процедурою трансформації. Термін "генетично модифіковані" включає в себе введення генів у клітини, мутування генів у клітинах і зміну або модулювання регуляції гена в клітині або організмах, до яких були застосовані ці дії, або їх потомство.

Полінуклеотиди

Даний винахід стосується різних полінуклеотидів. У даному контексті, терміни "полінуклеотид" або "нуклеїнова кислота" або "молекула нуклеїнової кислоти" означають полімер нуклеотидів, що може бути ДНК або РНК або їх комбінацією і містить у собі мРНК, кРНК, κДНК, тРНК, кіРНК, кшРНК і вРНК. Полінуклеотид може бути ДНК або РНК клітинного, геномного або синтетичного походження, наприклад, отриманим на автоматизованому синтезаторі, і може бути об'єднаний з вуглеводами, ліпідами, білком або іншими речовинами, позначений флуоресцентною групою або іншими групами або приєднаний до твердого носія для здійснення конкретної певної тут активності. Нуклеотиди цього полімеру можуть бути модифіковані відповідно до відомого в даній області способами, наприклад, аналоги фосфодіестерних зв'язків містять у собі: фосфоротіоат, фосфородитіоат, фосфороселеноат,

фосфородиселеноат, фосфороанілотіоат, фосфороанілідат, фосфороамідат, але ці полінуклеотиди переважно є немодифікованими або модифікованими тільки в тому випадку, коли це відбувається в клітині. Цей полімер може бути одностанцюговим, в основному двостанцюговим або частково двостанцюговим. Прикладом частково двостанцюгової РНК-молекули є шпилькова РНК (шРНК), коротка шпилькова РНК (кшРНК) або самокомплементарна РНК, що містить у собі двостанцюгове стебло, утворене спарюванням основ між нуклеотидною послідовністю і її комплементом, і послідовність петлі, що ковалентно з'єднує цю нуклеотидну послідовність і її комплемент. Спарювання основ означає в даному контексті стандартне спарювання між нуклеотидами, що включає в себе пари основ G:U. "Комплементарні" означає два полінуклеотида, здатні спаровувати основи вздовж частини їх довжин або уздовж повної довжини одного або обох полінуклеотидів. Термін "полінуклеотид" використовується взаємозамінно з терміном "нуклеїнова кислота".

Під терміном "виділений" мається на увазі матеріал, що по суті або в основному не містить компонентів, які звичайно супроводжують його в його природному стані. У даному контексті, "виділений полінуклеотид" або "виділена нуклеїнова кислота" означають полінуклеотид, що щонайменше частково виділений, переважно по суті або в основному не містить полінуклеотидних послідовностей того ж самого типу, з якими він асоційований або зв'язаний у його природному стані. Наприклад, "виділений полінуклеотид" містить у собі полінуклеотид, що був очищений або відділений від послідовностей, які фланкують його в стані, що зустрічається в природі, наприклад, ДНК-фрагмент, що був відділений від послідовностей, які є звичайно сусідніми щодо цього фрагмента. Переважно, цей виділений полінуклеотид щонайменше на 90 % вільний від інших компонентів, таких як білки, вуглеводи, ліпіди і т.і. Термін "рекомбінантний полінуклеотид" стосується в даному контексті до полінуклеотиду, утвореному *in vitro* маніпулюванням нуклеїнової кислоти з одержанням форми, що звичайно не зустрічається в природі. Наприклад, рекомбінантний полінуклеотид може перебувати у формі вектора експресії. Звичайно, такі вектори експресії містять у собі регуляторну нуклеїнову кислоту транскрипції і трансляції, функціонально приєднану до цієї нуклеотидної послідовності.

Даний винахід стосується застосування олігонуклеотидів. У даному контексті, "олігонуклеотиди" є полінуклеотидами з довжиною до 50 нуклеотидів. Вони можуть бути РНК, ДНК або їх комбінаціями або похідними. Олігонуклеотиди звичайно є відносно короткими одностанцюговими молекулами з довжиною 10-30 нуклеотидів, звичайно 15-25 нуклеотидів. При застосуванні як зонду або праймера в реакції ампліфікації мінімальним розміром такого олігонуклеотида є розмір, необхідний для утворення стабільного гібрида між цим олігонуклеотидом і комплементарною послідовністю на цільовій молекулі нуклеїнової кислоти. Переважно, ці олігонуклеотиди мають довжину щонайменше 15 нуклеотидів, більш переважно щонайменше 18 нуклеотидів, більш переважно щонайменше 19 нуклеотидів, більш переважно щонайменше 20 нуклеотидів, навіть більш переважно щонайменше 25 нуклеотидів.

Полінуклеотиди, використовувані як зонд, звичайно кон'юговані з детектуємою міткою, такий як радіоізотоп, фермент, біотин, флуоресцентна молекула або хемілюмінесцентна молекула. Олігонуклеотиди цього винаходу застосовні в способах детектування алеля GWD або іншого гена, пов'язаного з ознакою, що представляє інтерес, наприклад, модифікованим крохмалем. Такі способи використовують, наприклад, гібридизацію нуклеїнових кислот і в багатьох випадках містять у собі подовження праймера прийнятною полімеразою (використовуваною в ПЛР).

Один варіант олігонуклеотида цього винаходу містить у собі молекули розмірів, що варіюються, певних тут молекул конкретних олігонуклеотидів, і/або молекул, здатних гібридизуватись, наприклад, з геномом пшениці. Наприклад, варіанти можуть містити додаткові нуклеотиди (наприклад, 1, 2, 3, 4 або більше), або менше нуклеотидів, поки вони все ще гібридизуються з цільовою областю. Крім того, декілька нуклеотидів можуть бути замінені без впливу на здатність олігонуклеотиду гібридизуватись з цільовою областю. Крім того, можуть бути легко сконструйовані варіанти, які гібридизуються поряд (наприклад, без обмеження, у межах 50 нуклеотидів) з областю геному рослини, де гібридизуються визначені тут специфічні олігонуклеотиди.

Терміни "варіант полінуклеотида" і "варіант" і т.і. стосується полінуклеотидів або їх комплементарних форм, що проявляють істотну ідентичність послідовності з послідовністю контрольного полінуклеотиду. Ці терміни містять у собі також полінуклеотиди, які відрізняються від контрольного полінуклеотида додаванням, делецією або заміною щонайменше одного нуклеотиду. Таким чином, терміни "варіант полінуклеотиду" і "варіант" містять у собі полінуклеотиди, в яких один або декілька нуклеотидів додані, делетовані або замінені іншими нуклеотидами. У цьому зв'язку, у даній області добре відомо, що у відношенні контрольного полінуклеотиду можуть бути зроблені деякі зміни, у тому числі мутації, додавання, делеції і

заміни, за допомогою яких цей змінений полінуклеотид зберігають біологічну функцію або активність контрольного полінуклеотиду. Таким чином, ці терміни містять у собі полінуклеотиди, які кодують поліпептиди, які проявляють ферментативну або іншу регуляторну активність, або полінуклеотиди, здатні служити як селективні зонди або інші гібридизувальні агенти. Терміни "варіант полінуклеотиду" і "варіант" включає в себе також алельні варіанти, що зустрічаються в природі.

Під термінами "відповідає" або "відповідний" мають на увазі полінуклеотид (а), що має нуклеотидну послідовність, що по суті ідентична або комплементарна всій або частині послідовності контрольного полінуклеотиду, або (b) що кодує амінокислотну послідовність, ідентичну амінокислотній послідовності в пептиді або білку. Ця фраза включає також у себе пептид або поліпептид, що має амінокислотну послідовність, що по суті ідентична послідовності амінокислот у контрольному пептиді або білку. Терміни, використовувані для опису споріднення послідовностей між двома або більше полінуклеотидами або поліпептидами, містять у собі "контрольну послідовність", "вікно порівняння", "ідентичність послідовності", "відсоток ідентичності послідовності", "істотну ідентичність" і "ідентичні", і визначені відносно мінімального числа нуклеотидів або амінокислотних залишків або по всій довжині. Терміни "ідентичність послідовності" і "ідентичність" використовуються тут взаємозамінно для посилання на той ступінь, до якої ці послідовності є ідентичними на основі послідовних нуклеотидів або послідовних амінокислот в вікні порівняння. Таким чином, терміни "відсоток ідентичності послідовності" розраховують порівнянням двох оптимально зіставлених послідовностей у вікні порівняння, визначенням числа положень, при яких ідентична основа нуклеїнової кислоти (наприклад, A, T, C, G, U) або ідентичний амінокислотний залишок (наприклад, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys і Met) зустрічається в обох послідовностях, з одержанням числа співпадаючих положень, діленням цього числа співпадаючих положень на загальне число положень у вікні порівняння (тобто розмір вікна) і множенням результату на 100 для одержання відсотка ідентичності послідовності.

% ідентичності полінуклеотиду може бути визначений за допомогою аналізу GAP (Needleman and Wunsch, 1970) (програми GCG) з пенальті (штрафом) створення гена = 5 і пенальті (штрафом) подовження гена = 0,3. Якщо немає інших вказівок, запитувана послідовність має довжину щонайменше 45 нуклеотидів, і цей аналіз GAP зіставляє ці дві послідовності протягом району щонайменше 45 нуклеотидів. Переважно, запитувана послідовність має довжину 150 нуклеотидів і цей аналіз GAP зіставляє ці дві послідовності протягом області щонайменше 150 нуклеотидів. Більш переважно, запитувана послідовність має довжину 300 нуклеотидів і цей аналіз GAP зіставляє ці дві послідовності протягом області щонайменше 300 нуклеотидів або щонайменше 400, 500 або 600 нуклеотидів у кожному випадку. Може бути також зроблене посилання на сімейство програм BLAST, наприклад, описаних Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25:3389, 1997. Докладне обговорення аналізу послідовностей може бути знайдене в Unit 19.3 "F Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15.

Нуклеотидні або амінокислотні послідовності вказуються як "по суті подібні", коли такі послідовності мають ідентичність послідовностей щонайменше приблизно 75 %, конкретно щонайменше приблизно 80 %, більш конкретно щонайменше приблизно 85 %, зовсім конкретно приблизно 90 %, особливо приблизно 95%, зокрема, приблизно 100 %, особливо переважно вони є ідентичними. Ясно, що, коли послідовності РНК описуються як по суті подібні із ДНК-послідовностями, або мають певний ступінь ідентичності послідовностей із ДНК-послідовностями, тимін (T) у цій ДНК-послідовності розглядається як рівний урацилу (U) у цій РНК-послідовності.

У відношенні певних полінуклеотидів, буде зрозуміло, що цифри %-ої ідентичності, більш високі, ніж цифри, забезпечені вище, будуть містити в собі кращі варіанти. Таким чином, коли це прийнятно, у світлі мінімальних цифр %-ої ідентичності, переважно цей полінуклеотид містить полінуклеотидну послідовність, що є щонайменше на 75 %, більш переважно щонайменше на 80 %, більш переважно щонайменше на 85 %, більш переважно щонайменше на 90 %, більш переважно щонайменше на 91 %, більш переважно щонайменше на 92 %, більш переважно щонайменше на 93 %, більш переважно щонайменше на 94 %, більш переважно щонайменше на 95 %, більш переважно щонайменше на 96 %, більш переважно щонайменше на 97 %, більш переважно щонайменше на 98 %, більш переважно щонайменше на 99%, більш переважно щонайменше на 99,1%, більш переважно щонайменше на 99,2 %, більш переважно щонайменше на 99,3 %, більш переважно щонайменше на 99,4 %, більш переважно щонайменше на 99,5 %, більш переважно щонайменше на 99,6 %, більш переважно щонайменше на 99,7 %, більш переважно щонайменше на 99,8 % і навіть більш переважно

щонайменше на 99,9 % ідентичною релевантній запропонованій SEQ ID NO.

Переважно, полінуклеотид цього винаходу, що кодує поліпептид з активністю GWD, має довжину, більше ніж 400, більш переважно більше ніж 500, більш переважно більше ніж 600, більш переважно більше ніж 700, більш переважно більше ніж 800, більш переважно більше ніж 900 і навіть більш переважно більше ніж 1000 нуклеотидів.

Полінуклеотиди даного винаходу можуть мати, у порівнянні з молекулами, що зустрічаються в природі, одну або кілька мутацій, які є делеціями, вставками або замінами нуклеотидних залишків. Мутанти можуть бути або такими, що зустрічаються в природі (тобто виділеними із природного джерела), або синтетичними (наприклад, отриманими виконанням сайт-спрямованого мутагенезу на нуклеїновій кислоті).

Даний винахід стосується умов жорсткості гібридизації для визначення ступеня комплементарності двох полінуклеотидів. "Жорсткістю" називають у даному контексті температурні умови і умови іонної сили і присутність або відсутність деяких органічних розчинників під час гібридизації. Чим вище жорсткість, тим більш високою буде комплементарність між цільовою нуклеотидною послідовністю і міченою полінуклеотидною послідовністю. "Жорсткими умовами" називають температурні і іонні умови, при яких будуть гібридизуватись тільки нуклеотидні послідовності, що мають високу частоту комплементарних основ. У даному контексті, термін "гібридується при низькій жорсткості, середній жорсткості, високій жорсткості або дуже високій жорсткості" описує умови гібридизації і промивання. Керівництво для виконання реакцій гібридизації може бути знайдене в Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. У цьому посиланні описані водні і неводні способи і може використовуватись кожна з них. У даному контексті, термін "гібридується при низькій жорсткості, середній жорсткості, високій жорсткості або дуже високій жорсткості" описує умови гібридизації і промивання. Конкретні умови гібридизації, наведені тут, є наступними: 1) умови гібридизації низької жорсткості в 6 X хлорид натрію/цитрат натрію (SSC) при приблизно 45 °C, з наступними двома промиваннями 0,2 X SSC, 0,1 % SDS при 50-55 °C; 2) умови гібридизації середньої жорсткості в 6 X SSC при приблизно 45 °C, з наступними одним або декількома промиваннями в 0,2 X SSC, 0,1 % SDS при 60 °C; 3) умови гібридизації високої жорсткості в 6 X SSC при приблизно 45 °C, з наступними одним або декількома промиваннями 0,2 X SSC, 0,1 % SDS при 65 °C; і 4) умови дуже високої жорсткості в 0,5 M фосфаті натрію, 7 % SDS при 65 °C, з наступними одним або декількома промиваннями при 0,2 X SSC, 1 % SDS при 65 °C.

Поліпептиди

Терміни "поліпептид" і "білок" звичайно використовуються взаємозамінно. Ці терміни "білки" і "поліпептиди" у даному контексті містять у собі також варіанти, мутанти, модифікації, аналоги і/або похідні описаних тут поліпептидів цього винаходу. У даному контексті, "по суті очищений поліпептидом" називають поліпептид, що був відділений від ліпідів, нуклеїнових кислот, інших пептидів і інших молекул, з якими він асоційований у його природному стані. Переважно, по суті очищений білок є щонайменше на 60 % вільним, більш переважно щонайменше на 75 % вільним і більш переважно щонайменше на 90 % вільним від інших компонентів, з якими він природно асоційований. Під "рекомбінантним поліпептидом" мають на увазі поліпептид, отриманий з використанням рекомбінантних способів, тобто за допомогою експресії рекомбінантного поліпептиду в клітині, переважно клітині рослини і більш переважно клітині зернової (злакової) рослини.

%-ва ідентичність одного поліпептиду щодо іншого поліпептиду може бути визначена за допомогою аналізу GAP (Needleman and Wunsch, 1970) (програми GCG) з пенальті (штрафом) створення гепа = 5 і пенальті (штрафом) подовження гепа = 0,3. Запитувана послідовність має довжину щонайменше 15 нуклеотидів, і цей аналіз GAP зіставляє ці дві послідовності в області щонайменше 15 амінокислот. Більш переважно, запитувана послідовність має довжину щонайменше 50 нуклеотидів, і цей аналіз GAP зіставляє ці дві послідовності в області щонайменше 50 амінокислот. Більш переважно, запитувана послідовність має довжину щонайменше 100 амінокислот, і цей аналіз GAP зіставляє ці дві послідовності в області щонайменше 100 амінокислот. Навіть більш переважно, запитувана послідовність має довжину щонайменше 250 амінокислот, і цей аналіз GAP зіставляє ці дві послідовності в області щонайменше 250 амінокислот.

У даному контексті, "біологічно активним" фрагментом є частина поліпептиду цього винаходу, що зберігає певну активність повнорозмірного поліпептиду. В особливо кращому варіанті здійснення, цей біологічно активний фрагмент здатен фосфорилювати крохмаль із утворенням С6-фосфорилюваного крохмалю. Біологічно активні фрагменти можуть бути будь-якого розміру, поки вони зберігають певну активність, але переважно вони мають довжину

щонайменше 100 або 200 амінокислотних залишків.

Що стосується певного поліпептиду, буде зрозуміло, що цифри %-ої ідентичності, більш високі, ніж описані вище цифри, будуть містити в собі кращі варіанти. Таким чином, коли це можливо, переважно цей поліпептид містить амінокислотну послідовність, що є щонайменше на 75 %, більш переважно щонайменше на 80 %, більш переважно щонайменше на 85 %, більш переважно щонайменше на 90 %, більш переважно щонайменше на 91 %, більш переважно щонайменше на 92 %, більш переважно щонайменше на 93 %, більш переважно щонайменше на 94 %, більш переважно щонайменше на 95 %, більш переважно щонайменше на 96 %, більш переважно щонайменше на 97 %, більш переважно щонайменше на 98 %, більш переважно щонайменше на 99 %, більш переважно щонайменше на 99,1 %, більш переважно щонайменше на 99,2 %, більш переважно щонайменше на 99,3 %, більш переважно щонайменше на 99,4 %, більш переважно щонайменше на 99,5 %, більш переважно щонайменше на 99,6 %, більш переважно щонайменше на 99,7 %, більш переважно щонайменше на 99,8 % і навіть більш переважно щонайменше на 99,9 % ідентичною релевантній представленій SEQ ID NO.

Мутанти амінокислотної послідовності поліпептидів даного винаходу можуть бути отримані введенням прийнятних нуклеотидних змін у нуклеїнову кислоту даного винаходу або синтезом *in vitro* бажаного поліпептиду. Такі мутанти містять у собі, наприклад, делеції, вставки або заміни залишків у цій амінокислотній послідовності. Комбінування делецій, вставок і заміни може забезпечувати одержання кінцевої конструкції, за умови, що кінцевий пептидний продукт має бажані характеристики.

Мутантні (змінені) пептиди можуть бути отримані будь-яким способом, відомим у даній області. Наприклад, поліпептид цього винаходу може бути підданий мутагенезу *in vitro*. Такі способи мутагенезу *in vitro* включають субклонування цього поліпептиду в підходящий вектор, трансформацію цього вектора в штам "мутатор", такий як *E. coli* XL-1 red (Stratagene), і розмноження цих трансформованих бактерій протягом прийнятної кількості генерацій. В іншому прикладі, поліпептиди цього винаходу піддають способом перетасування ДНК, широко описаних Нагауама (1998). Ці способи перетасування ДНК можуть містити в собі гени, родинні гени цього винаходу, такі як гени GWD з видів рослин, інших ніж пшениця або ячмінь, і/або містять у собі інші гени з тієї ж самої рослини, що кодують подібні білки (наприклад, гени GWD пшениці). Продукти, отримані з мутованої/зміненої ДНК, можуть бути легко піддані скринінгу з використанням описаних тут способів для визначення, чи володіють вони, наприклад, активністю GWD.

У конструюванні мутантів амінокислотної послідовності, місце розташування сайту мутації і природа мутації буде залежати від властивості, що підлягає модифікації (властивостей, що підлягають модифікації). Ці сайти для мутації можуть бути ідентифіковані індивідуально або послідовно, наприклад, (1) заміною спочатку вибраними консервативними амінокислотами і потім більш радикальними відборами залежно від отриманих результатів, (2) видаленням цільового залишку або (3) вставкою інших залишків, суміжних з локалізованим сайтом.

Делеції амінокислот звичайно перебувають у діапазоні приблизно 1-15 залишків, більш переважно приблизно 1-10 залишків і звичайно приблизно 1-5 суміжних залишків.

Мутанти із замінами мають щонайменше один вилучений амінокислотний залишок у молекулі поліпептиду і інший залишок, введений на його місце. Сайти, що представляють найбільший інтерес, для заміщувального мутагенезу, містять у собі сайти, ідентифіковані як активний сайт (активні сайти). Іншими сайтами, що представляють інтерес, є сайти, в яких конкретні залишки, отримані з різних штамів або видів, є ідентичними. Ці положення можуть бути важливими для біологічної активності. Ці сайти, особливо сайти, що перебувають у послідовності трьох інших ідентично консервативних сайтів, переважно замінюються відносно консервативним образом. Такі консервативні заміни показані в таблиці 3 під заголовком "типіві заміни".

В обсяг цього винаходу включені також поліпептиди цього винаходу, які диференціально модифікуються під час або після синтезу, наприклад, біотинилуванням, бензилуванням, глікозилуванням, ацетилуванням, фосфорилуванням, амідуванням, дериватизацією відомими захисними/блокувальними групами, протеолітичним розщепленням, зв'язуванням з молекулою антитіла або іншого клітинного ліганду і т.і. Ці модифікації можуть слугувати для збільшення стабільності і/або біологічної активності поліпептиду цього винаходу або слугувати як ліганду для зв'язування іншої молекули.

Поліпептиди даного винаходу можуть бути одержані різними шляхами, що включають у себе одержання і виділення природних поліпептидів, одержання і виділення рекомбінантних поліпептидів і хімічний синтез цих поліпептидів. В одному варіанті здійснення, виділений поліпептид даного винаходу одержують культивуванням клітини, здатної експресувати цей

поліпептид, в умовах, ефективних для продукування цього поліпептиду, і виділення цього поліпептиду. Переважною для культури клітиною є рекомбінантна клітина даного винаходу. Ефективні умови культивування містять у собі, але не обмежуються ними, ефективні середовища, біореактор, температуру, рН і кисневі умови, які дозволяють продукування

5 поліпептиду. Ефективним середовищем називають будь-яке середовище, у якій клітину культивують для продукування поліпептиду даного винаходу. Таке середовище звичайно містить у собі водне середовище, що має засвоєвані джерела вуглецю, азоту і фосфатів і прийнятні солі, мінеральні речовини, метали і інші поживні речовини, такі як вітаміни. Клітини даного винаходу можуть культивуватися в загальноприйнятних ферментаційних біореакторах,

10 колбах, що струшують, тест-пробірках, мікротитраційних планшетах і чашках Петри. Культивування проводять при температурі, рН і вмісті кисню, що підходять для рекомбінантної клітини. Такі умови культивування відомі фахівцям зі звичайною кваліфікацією в даній області.

Даний винахід стосується елементів, які є функціонально з'єднаними або зв'язаними. Терміни "функціонально з'єднані" або "функціонально зв'язані" і т.і. стосуються до зв'язування

15 полінуклеотидних елементів у функціональному зв'язку. Звичайно, функціонально з'єднані послідовності нуклеїнових кислот є суміжно зв'язаними і, коли необхідно, з'єднує два регіони, що кодують білок, суміжно і в рамці зчитування. Кодувальна послідовність є "функціонально приєднаною до" іншої кодувальної послідовності, коли РНК-полімераза буде транскрибувати ці дві кодувальні послідовності у єдину РНК, що при трансляції потім транслюється в єдиний

20 поліпептид, що має амінокислоти, складаються з обох кодувальних послідовностей. Ці кодувальні послідовності не повинні бути обов'язково суміжними одна з одною, поки ці експресовані послідовності в остаточному підсумку процесуються з утворенням бажаного білка.

У даному контексті, термін "цис-діюча послідовність", "цис-діючий елемент" або "цис-регуляторна область" або "регуляторна область" або подібний термін повинен розумітися як

25 будь-яка послідовність нуклеотидів, що, при приміщенні прийнятним чином відносно експресуємої генетичної послідовності, здатна регулювати, щонайменше, частково, експресію цієї генетичної послідовності. Кваліфікованим у даній області фахівцям буде відомо, що цис-регуляторна область може бути здатна до активації, сайленсингу, посиленню, репресії або зміні іншим чином рівня експресії і/або специфічності відносно типу клітин і/або пов'язаної з

30 розвитком специфічності послідовності гена на транскрипційному або пост транскрипційному рівні. В деяких варіантах здійснення даного винаходу, цис-діюча послідовність є активаторною послідовністю, що підсилює або стимулює експресію експресуючої генетичної послідовності.

"Функціональне приєднання" промоторного або енхансерного елемента до транскрибуємого полінуклеотиду означає розміщення цього транскрибуємого полінуклеотиду (наприклад,

35 білоккодуємого полінуклеотиду або іншого транскрипта) під регуляторний контроль промотору, що потім регулює транскрипцію цього полінуклеотиду. У конструюванні комбінації гетерологічний промотор/структурний ген, переважно розташований промотор або його варіант на відстані від сайту транскрипції транскрибуємого полінуклеотиду, що є приблизно таким же, що і відстань між цим промотором і геном, що він регулює, у його природній

40 обстановці; тобто геном, з якого отриманий цей промотор. Як відомо в даній області, деяка варіація в цій відстані може здійснюватися без втрати функції. Подібним чином, краще розташування елемента регуляторної послідовності (наприклад, оператора, енхансера і т.і.) відносно транскрибуємого полінуклеотиду, що розташовується під його контроль, визначається положенням цього елемента в його природній обстановці; тобто в генах, з яких він отриманий.

Термін "промотор" або "промоторна послідовність" використовується тут у його самому широкому розумінні і містить у собі область гену, звичайно ліворуч (5') від кодувальної області РНК, що регулює ініціацію і рівень транскрипції. "Промотор" містить у собі регуляторні

45 послідовності транскрипції класичного геномного гена, що включає в себе послідовності ТАТА-бокса і ССАТ-бокса, а також додаткові регуляторні елементи (тобто, розташовані ліворуч, що активують послідовності, енхансери і сайленсери), які змінюють експресію гена у відповідь на пов'язані з розвитком і/або навколишнім середовищем стимули, або тканеспецифічним або специфічним відносно типу клітин чином. Промотор звичайно, але не обов'язково (наприклад, у випадку деяких промоторів PolIII), розташований ліворуч від структурного гена, експресію якого він регулює. Крім того, регуляторні елементи, що містять промотор, звичайно розташовані в

50 межах 2 kb від стартового сайту транскрипції цього гена. Промотори можуть містити додаткові специфічні регуляторні елементи, розташовані більше дистально щодо стартового сайту, для додаткового посилення експресії в клітині і/або зміні таймінгу або індукваності експресії структурного гена, до якого вони функціонально приєднані.

"Конститутивним промотором" називають промотор, що керує експресією функціонально

60 зв'язаної транскрибуємої послідовності в багатьох або всіх тканинах рослини. Термін

"конститутивний" у даному контексті не обов'язково вказує на те, що цей ген експресується на тому самому рівні у всіх типах клітин, але вказує на те, що цей ген експресується в широкому діапазоні типів клітин, хоча часто детектується деяке варіювання в рівні експресії. "Селективна експресія" стосується в даному контексті експресії майже винятково в конкретних органах цієї рослини, таких як, наприклад, ендосперм, зародок, листя, плоди, бульби або корінь. В одному варіанті здійснення промотор експресується у всіх фотосинтетичних тканинах, які можуть відповідати всім наземним частинам цієї рослини, наприклад, промотор, що бере участь в експресії гена, необхідного для фотосинтезу, такий як промотори малої субодиниці рубіско. Цей термін може також стосуватись експресії на конкретних стадіях розвитку в органі, наприклад, у ранньому або пізньому ембріогенезі або різних стадіях зрілості; або експресії, що індукується певними умовами навколишнього середовища або обробки. Таким чином, селективна експресія може контрастувати з конститутивною експресією, що стосується до експресії в багатьох або у всіх тканинах рослини при більшості або при всіх умовах, що випробуються на рослині.

Селективна експресія може бути також результатом компартименталізації продуктів експресії генів у конкретних тканинах, органах рослин або стадій розвитку. Компартименталізація в конкретних субклітинних місцях розташування, таких як цитозоль, вакуоль або апопластичний простір, може бути досягнута включенням у цю структуру продукту гена відповідних сигналів для транспорту в необхідний клітинний простір або у випадку напівавтономних органел (пластиди і мітохондрії) інтегруванням трансгена з прийнятними регуляторними послідовностями безпосередньо в геном цієї органели.

"Тканеспецифічний промотор" або "органоспецифічний промотор" є промотором, що переважно експресується в одній тканині або одному органі щодо багатьох інших тканин або органів, переважно більшості, якщо не всіх інших тканин або органів у рослині. Звичайно, цей промотор експресується на рівні, в 10 разів більше високому в конкретній тканині або в конкретному органі, ніж в інших тканинах або органах. Одним ілюстративним тканеспецифічним промотором є промотор для гена глютеніну високої молекулярної маси (HMW), Vx17. Під терміном "специфічний промотор для тканини стоку метаболітів" мається на увазі промотор, що переважно керує експресією функціонально зв'язаної транскрибуємої послідовності в тканині стоку метаболітів рослини (наприклад, ендоспермі, тканинах плодів, тканині бульб, тканині насіння, тканині стебел злаків (соломин) або тканині листя-стоку) у порівнянні з експресією в інших тканинах цієї рослини, що включають у себе тканини-джерела (наприклад, листя).

Промотори, розглянуті даним винаходом, можуть бути природними щодо рослини-хазяїна, що трансформується, або можуть бути отримані з альтернативного джерела, де ця область є функціональною у рослині-хазяїні. Інші джерела містять у собі Т-ДНК-гени, такі як промотори генів для біосинтезу нопаліну, октапіну, манопіну або промотори інших опінів; промотори з рослин, такі як промотори убіквітину, такі як промотор Ubi з гену ubi-1 кукурудзи, Christensen et al., (1996) (дивіться, наприклад, патент США № 4,962,028) або промотори актину; тканеспецифічні промотори (див., наприклад, патент США № 5,459,252, виданий Conkling et al.; WO 91/13992, виданий Advanced Technologies); промотори з вірусів (у тому числі специфічних відносно хазяїна вірусів), або частково або повністю синтетичні промотори. Численні промотори, які є функціональними в однодольних і дводольних рослинах, добре відомі в даній області (див., наприклад, Greve, (1983), Salomon et al., (1984), Garfinkel et al., (1983); Barker et al., (1983); у тому числі різні промотори, виділені з рослин і вірусів, такі як промотор вірусу мозаїчної хвороби кольорової капусти (CaMV 35S, 19S). Відомі багато областей тканеспецифічних промоторів, такі як промотор малої субодиниці Рубіско, що переважно експресується в тканині листя. Інші області ініціації транскрипції, які переважно забезпечують транскрипцію в певних тканинах або за певних умов вирощування, містять у собі область з напіну, АСР насіння або листя, зеїну і т.і. Відомі також специфічні для плодів промотори, одним з таких промоторів є промотор E8, описаний Deikman et al. (1988) і DellaPenna et al. (1989). Не обмежуючі способи оцінювання промоторної активності описані Medberry et al. (1992, 1993), Sambrook et al. 1989 і McPherson et al. (патент США № 5,164,316).

Альтернативно або додатково, цей промотор може бути індукцибельним промотором або регульованим стадією розвитку промотором, що здатний запускати експресію введеного полінуклеотиду на прийнятній стадії розвитку цієї рослини. У цьому останньому варіанті здійснення, цей регуляторний елемент транскрипції є прийнятним чином регульованим промотором розвитку для регуляції таймінгу експресії. Вибір промотору може уможливити специфічну експресію введеного полінуклеотиду, що хронометрується для використання переваги флуктуації рівнів крохмалю. Послідовності промоторів можуть містити цис-діючі послідовності, які регулюють транскрипцію, де ця регуляція містить у собі, наприклад, хімічну або фізичну індукцію (наприклад, регуляція на основі метаболітів, світла або інших фізико-

хімічних факторів), або регуляцію на основі диференціювання клітин (наприклад, асоційовану з листя, коріння, насіння або т.і. у рослинах; див., наприклад, патент США № 5,459,252, що описує коренеспецифічний промотор). Таким чином, промоторну область або регуляторну частину такої області, одержують із прийнятного гена, що у такий спосіб регулюється.

Наприклад, ген 1,5-рибулозобісфосфаткарбоксилази індукуюється світлом і може бути використаний для ініціації транскрипції. Відомі інші гени, які індукуються стресом, температурою, пораненням, діями патогенів і т.і.

Інші цис-діючі послідовності, які можуть бути використані, містять у собі енхансери транскрипції і/або енхансери трансляції. Енхансерні області добре відомі в даній області і можуть містити в собі кодон ініціації трансляції ATG і суміжні послідовності. Цей кодон ініціації повинен перебувати у фазі з рамкою зчитування кодувальної послідовності стосовно до чужорідного або екзогенному полінуклеотиду, для гарантії трансляції всієї послідовності. Сигнали регуляції трансляції і ініціюючих кодонів можуть мати різне походження, як природне, так і синтетичне. Области ініціації трансляції можуть бути забезпечені із джерела області ініціації транскрипції або із чужорідного або екзогенного полінуклеотиду. Ця послідовність може бути також одержана із джерела промотору, вибраного для запуску транскрипції і може бути специфічно модифікована таким чином, що вона збільшує трансляцію мРНК.

Приклади енхансерів транскрипції містять у собі, але не обмежуються ними, елементи із промотору CaMV 35S і генів октопінсинтази, наприклад, описані Last et al. (патент США № 5,290,924, що включений сюди як посилання).

Конструкт нуклеїнової кислоти даного винаходу звичайно містить 3'-нетрансльовану послідовність з приблизно 50-1000 пар нуклеотидних основ, що може містити в собі послідовність термінації транскрипції. 3'-нетрансльована послідовність може містити сигнал термінації транскрипції і/або сигнал поліаденілювання і інші регуляторні сигнали, здатні впливати на процесинг мРНК або експресію генів. Сигнал поліаденілювання характеризується впливом на додавання ділянок поліаденілової кислоти до 3'-кінця мРНК-попередника. Сигнали поліаденілювання звичайно розпізнаються по присутності гомології в канонічній формі 5'-ААТААА-3', хоча зустрічаються і варіації. Прикладами прийнятних 3'-нетрансльованих послідовностей є 3'-транскрибуємі нетрансльовані області, що містять сигнал поліаденілювання з гена нопалінсинтази (nos) *Agrobacterium tumefaciens* (Bevan et al., (1983) і термінатор для транскрипта Т7 з гена октопінсинтази *Agrobacterium tumefaciens*. Альтернативно, придатні 3'-нетрансльовані послідовності можуть бути виділені з генів рослин, таких як 3'-кінець генів інгібітора I або II протеази з картоплі або томату, гени запасних білків сої і ген малої субодиниці рибулозо-1,5-бісфосфаткарбоксилази (ssRUBISCO), хоча можуть бути також використані інші 3'-елементи, відомі фахівцям із кваліфікацією в даній області. Альтернативно, 3'-нетрансльовані регуляторні послідовності можуть бути одержані de novo, як описано, наприклад, у статті An (Methods in Enzymology, 153:292, 1987), що включена сюди як посилання.

Оскільки ДНК-послідовність вставлена між сайтом ініціації транскрипції і стартом кодувальної послідовності, тобто нетрансльована 5'-лідерна послідовність (5'-UTR), може впливати на експресію гена, також можна використати конкретну лідерну послідовність. Прийнятні лідерні послідовності містять у собі послідовності, які містять послідовності, вибрані для прямої оптимальної експресії чужорідної або ендогенної ДНК-послідовності. Наприклад, такі лідерні послідовності містять у собі кращу консенсусну послідовність, що може збільшувати або зберігати стабільність мРНК і запобігати невідповідній ініціації трансляції, як описано, наприклад, Joshi (1987).

Крім того, можуть бути використані найцілювальні послідовності для націлювання на фермент, що кодується цим чужорідним або екзогенним полінуклеотидом, у внутрішньоклітинний компартмент, наприклад, у хлоропласт, у клітини рослин або в позаклітинне оточення. Наприклад, послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує послідовність транспортного або сигнального пептиду, може бути функціонально зв'язана з послідовністю, що кодує вибраний фермент розглянутого винаходу, так що при трансляції цей транспортний або сигнальний пептид може транспортувати цей фермент у конкретне внутрішньоклітинне або позаклітинне місце призначення і потім може бути посттрансляційно вилучений. Транспортні або сигнальні пептиди діють полегшуючи транспорт білків через внутрішньоклітинні мембрани, наприклад, мембрани ендоплазматичного ретикулума, вакуолі, везикули, пластиди, мітохондрії і плазмалемі. Наприклад, націлююча послідовність може направляти бажаний білок у конкретну органеллу, таку як вакуоль або пластида (наприклад, хлоропласт), а не в цитозоль. Таким чином, конструкція нуклеїнової кислоти може додатково містити послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує транспортний пептид, функціонально зв'язану між областю промотору і чужорідним або екзогенним полінуклеотидом.

Вектори

Даний винахід використовує вектори для маніпуляції або переносу генетичних конструкцій. Під "вектором" мають на увазі молекулу нуклеїнової кислоти, переважно ДНК-молекулу, отриману, наприклад, з плазмід, бактеріофага або вірусу рослин, в яку може бути введена або клонована послідовність нуклеїнової кислоти. Вектор переважно містить один або кілька унікальних сайтів рестрикції і може бути здатний до автономної реплікації в певній клітині-хазяїні, у тому числі цільовій клітині або цільовій тканині або клітині-попереднику або тканині-попереднику, або бути інтегрованим з геномом певного хазяїна, так що ця клонована послідовність є відтворюваною. Таким чином, цей вектор може бути вектором, що автономно реплікується, тобто вектором, що існує у вигляді нехромосомної частки, реплікація якої не залежить від хромосомної реплікації, наприклад, у вигляді лінійної або замкнутої кільцевої плазмід, нехромосомного елемента, мініхромосоми або штучної хромосоми. Цей вектор може містити будь-які засоби для гарантії самореплікації. Альтернативно, цей вектор може бути вектором, що, при введенні в клітину, інтегрується в геном реципієнтної клітини і реплікується разом із хромосомою (хромосомами), в яку (у які) він був інтегрований. Векторна система може містити єдиний вектор або єдину плазмиду, два або більше векторів або дві або більше плазмід, які разом містять загальну ДНК, що підлягає введенню в геном цієї клітини-хазяїна або транспозон. Вибір вектора буде звичайно залежати від сумісності цього вектора із клітиною, у яку повинен бути уведений цей вектор. Цей вектор може також містити в собі селектуємий маркер, такий як ген стійкості до антибіотика, що може бути використаний для відбору прийнятних трансформантів. Приклади таких генів стійкості добре відомі кваліфікованим у даній області фахівцям.

Конструкт нуклеїнової кислоти цього винаходу може бути введений у вектор, такий як плазміда. Плазмідні вектори звичайно містять у собі додаткові послідовності нуклеїнових кислот, які забезпечують легкий відбір, ампліфікацію і трансформацію експресійної касети в прокаріотичних і еукаріотичних клітинах, наприклад, одержані з pUC вектори, одержані з pSK вектори, одержані з pGEM вектори, одержані з pSP вектори або одержані з pBS вектори. Додаткові послідовності нуклеїнових кислот містять у собі сайти ініціації реплікації для забезпечення автономної реплікації цього вектора, гени селектуємих маркерів, що переважно кодуєть стійкість до антибіотиків або гербіцидів, унікальні сайти множинного клонування, що забезпечують множинні сайти для вставки послідовностей нуклеїнових кислот або генів, кодуємих у цій конструкції нуклеїнової кислоти, і послідовності, які підсилюють трансформацію прокаріотичних і еукаріотичних клітин (зокрема, клітин рослин).

Під "маркерним геном" мають на увазі ген, що надає певний фенотип клітинам, що експресують цей маркерний ген, і, отже, дозволяє відрізнити такі трансформовані клітини від клітин, які не мають такого маркера. Ген селектуємого маркера надає ознаку, на основі якої може проводитися відбір, на основі стійкості до селективного агента (наприклад, гербіциду, антибіотика, опромінення, нагрівання або іншої обробці, що ушкоджує нетрансформовані клітини). Маркерний ген, що піддається скринінгу (або репортерний ген) надає ознаку, що може бути ідентифікована за допомогою спостереження або тестування, тобто за допомогою скринінгу (наприклад, активність β -глюкуронідази, люциферази, GFP або іншого ферменту, не присутнього в нетрансформованих клітинах). Цей маркерний ген і нуклеотидна послідовність, що представляють інтерес, не повинні бути зв'язаними.

Для полегшення ідентифікації трансформантів, конструкція нуклеїнової кислоти переважно містить ген селектуємого маркера або маркера, що піддається скринінгу, у вигляді чужорідного або екзогенного полінуклеотиду або на додаток до чужорідного або екзогенному полінуклеотиду. Фактичний вибір маркера не є вирішальним, поки він є функціональним (тобто селективним) у комбінації з вибраними клітинами рослин. Маркерний ген і чужорідний або екзогенний полінуклеотид, що представляють інтерес, не повинні бути зв'язаними, тому що котрансформація незв'язаних генів, як, наприклад, описано в патенті США № 4,399,216, також є ефективним способом у трансформації рослин.

Прикладами бактеріальних селектуємих маркерів є маркери, які надають стійкість до антибіотиків, наприклад, стійкість до ампіциліну, канаміцину, еритроміцину, хлорамфеніколу або тетрацикліну. Приклади селектуємих маркерів для відбору трансформантів рослин містять у собі, але не обмежуються ними, ген *hug*, що кодує стійкість до гігromіцину B; ген неоміцинфосфотрансферази (*npt*), що надає стійкість до канаміцину, паромоміцину, G418 і т.і., наприклад, як описано Potrykus et al. (Mol. Gen. Genet., 199:183, 1985); ген глутатіон-S-трансферази з печінки пацюка, що надає стійкості до глутатіонпохідним гербіцидам, описаний, наприклад, в EP-A 256 223; ген глутамінсинтетази, що надає, після надекспресії, стійкість до інгібіторів глутамінсинтетази, таким як фосфінотрицин, як описано, наприклад, в WO87/05327,

ген ацетилтрансферази з *Streptomyces viridochromogenes*, що надає стійкість до цього селективного агента фосфинотрицину, як описано, наприклад, в EP-A 275 957, ген, що кодує 5-енолшикимат-3-фосфатсинтазу (EPSPS), що надає стійкість до N-фосфонометилгліцину, як описано, наприклад, Hinchee et al. (Biotech., 6:915, 1988), ген *bar*, що надає стійкість до біалофосу, як описано, наприклад, в WO91/02071; ген нітрилази, такий як *bxn* з *Klebsiella ozaenae*, що надає стійкість до бромоксинілу (Stalker et al., Science, 242:419, 1988); ген дигидрофолатредуктази (DHFR), що надає стійкість до метотрексату (Thillet et al., J. Biol. Chem., 263:12500, 1988); мутантний ген ацетолактатсинтази (ALS), що надає стійкість до імідазолінону, сульфонілсечовини або іншим речовинам, що інгібують ALS (EP-A-154 204); мутований ген антранілатсинтази, що надає стійкість до 5-метилтриптофану; або ген далапондегалогенази, що надає стійкість до гербіциду.

Переважаючими маркерами, що піддаються скринінгу, є, але не обмежуються ними, ген *uid*, що кодує фермент β -глюкуронідазу (GUS), для якого відомі різні хромогенні субстрати, ген β -галактозидази, що кодує фермент, для якого відомі хромогенні субстрати, ген екворину (Prasher et al., 1985), що може бути використаний при детектуванні кальцій-чутливої біolumінесценції; ген зеленого флуоресцентного білка (Niedz et al., 1995); ген люциферази (*luc*) (Ow et al., 1986), що дозволяє детектування біolumінесценції, і інші маркери, відомі в даній області. Під "репортерною молекулою" у даному описі мають на увазі молекулу, що, за допомогою її хімічної природи, забезпечує аналітично ідентифікуємий сигнал, що полегшує визначення активності промотору щодо білкового продукту.

Способи модифікації експресії генів

У деяких варіантах здійснення, рівень фосфорилування і/або деградації ендogenous крохмалю модулюють збільшенням рівня експресії нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид для цих активностей у клітині рослини, або зменшенням рівня експресії генів, що кодують білки, що беруть участь у цих активностях у цій рослині. Наприклад, це може бути досягнуто на рівні транскрипції з використанням промоторів різної сили або індукцйбельних промоторів, які здатні регулювати рівень транскрипта, що експресується із кодувальної послідовності. В деяких варіантах здійснення, вводять гетерологічні послідовності, які кодують фактори транскрипції, які модулюють або підсилюють експресію генів, продукти яких даунрегулюють фосфорилування крохмалю. Рівень експресії цього гена може модулюватися зміною числа копій на клітину конструкту, що містить цю кодувальну послідовність, і регуляторний елемент транскрипції, що функціонально приєднаний до неї і який є функціональним у цій клітині. Альтернативно, може бути відібрана безліч трансформантів, і вони можуть бути піддані скринінгу на трансформанти з прийнятним (сприятливим) рівнем і/або підходящою (сприятливою) специфічністю експресії трансгена, що виникають у результаті впливу ендogenous послідовностей, що перебувають поблизу сайту інтеграції трансгена. Прийнятним рівнем і характером експресії трансгена є рівень і характер експресії, які приводять до істотного збільшення потенціалу продуктивності, такого як врожайність або біомаса, або істотному зменшенню деградації крохмалю в клітинах рослини. Це може бути детектировано простим тестуванням трансформантів на різних стадіях розвитку.

Зменшена експресія гену може досягатися введенням і транскрипцією "химерного гена, що викликає сайленсинг генів", введенного в клітину-хазяїн. Цей химерний ген сайленсингу генів може бути введений стабільно в геном клітини-хазяїна або він може бути введений транзиторно, наприклад, на вірусному векторі. У даному контексті, "ефектом сайленсингу генів" називають зменшення експресії цільової нуклеїнової кислоти в клітині-хазяїні, переважно клітині рослини, що може досягатися введенням сайленсингу РНК. Таке зменшення може бути результатом зменшення транскрипції, у тому числі за допомогою метилювання ремоделюючого хроматину або посттранскрипційної модифікації цих РНК-молекул, у тому числі за допомогою деградації РНК, або обох механізмів. Сайленсинг гена не повинен обов'язково інтерпретуватися як зниження експресії цільової нуклеїнової кислоти або цільового гену. Досить того, що рівень експресії цільової нуклеїнової кислоти в присутності сайленсингу РНК є більш низьким, ніж у її відсутності. Цей рівень експресії може бути зменшений щонайменше на приблизно 10 %, або щонайменше на приблизно 15 %, або щонайменше на приблизно 20%, або щонайменше на приблизно 25 %, або щонайменше на приблизно 30 %, або щонайменше на приблизно 35 %, або щонайменше на приблизно 40 %, або щонайменше на приблизно 45 %, або щонайменше на приблизно 50%, або щонайменше на приблизно 55 %, або щонайменше на приблизно 60 %, або щонайменше на приблизно 65 %, або щонайменше на приблизно 70 %, або щонайменше на приблизно 75 %, або щонайменше на приблизно 80 %, або щонайменше на приблизно 85 %, або щонайменше на приблизно 90 %, або щонайменше на приблизно 95 %, або щонайменше на приблизно 100 %. Цільові нуклеїнові кислоти можуть містити в собі ендogenous гени, трансгени

або вірусні гени або гени, що вводяться вірусними векторами. Цільова нуклеїнова кислота може додатково містити в собі гени, які стабільно введені в геном клітини-хазяїна, переважно ядерний геном клітини-хазяїна.

Антисмислові РНК-молекули

Для зменшення експресії генів відповідно до цього винаходу можуть бути використані антисмислові способи. Термін "антисмислова РНК" повинен розглядатися як такий, що позначає РНК-молекулу, що комплементарна щонайменше частині специфічної мРНК-молекули і здатна зменшувати експресію гена, що кодує цю мРНК. Таке зменшення звичайно відбувається залежним від послідовності чином, і вважається, що воно відбувається за допомогою порушення посттранскрипційної події, такої як транспорт мРНК з ядра в цитоплазму, стабільності мРНК або інгібування трансляції. Застосування антисмислових способів добре відомо в даній області (див., наприклад, G. Hartmann and S. Endres, *Manual of Antisense Methodology*, Kluwer (1999)). Застосування антисмислових способів у рослинах обговорювалося в огляді Bourque (1995) and Senior (1998). Bourque, 1995 перераховує велику кількість прикладів того, як антисмислові послідовності були використані в системах рослин як способи інактивації генів. Автор стверджує також, що одержання 100 %-ого інгібування активності будь-якого ферменту може бути необов'язковим, тому що часткове інгібування буде з великою імовірністю приводити до вимірюваної зміни в цій системі. Senior, 1998 стверджує, що антисмислові способи є на даний час встановленим способом маніпулювання експресією генів.

У даному контексті, термін "антисмисловий полінуклеотид, що гібридується при фізіологічних умовах", означає, що цей полінуклеотид (який є повністю або частково одностороннім) здатний щонайменше утворювати двосторонній полінуклеотид із РНК-продуктом гену, що інгібується, звичайно мРНК, що кодує білок, такий як приведені тут білки, при нормальних умовах у клітині. Антисмислові молекули можуть містити в собі послідовності, які відповідають структурним генам, або послідовності, які здійснюють контроль над експресією гена або сплайсингом. Наприклад, антисмислова послідовність може відповідати цільовій кодувальній області генів цього винаходу або 5'-нетрансльованій області (UTR) або 3'-UTR або їх комбінації. Вона може бути комплементарна частково послідовностям інтронів, які можуть сплайсуватися під час або після транскрипції, переважно тільки послідовностям екзонів генів-мішені. Через звичайно більш високу розмаїтість UTR, націлювання на ці області забезпечує більш високу специфічність інгібування генів.

Довжина антисмислової послідовності повинна бути щонайменше 19 суміжних нуклеотидів, переважно щонайменше 50 нуклеотидів і більш переважно щонайменше 100, 200, 500 або 1000 нуклеотидів, до максимально повної довжини гена, що інгібується. Може бути використана повнорозмірна послідовність, комплементарна повному транскрипту гена. Ця довжина найбільш переважно дорівнює 100-2000 нуклеотидам. Ступінь ідентичності антисмислової послідовності цільовому транскрипту повинна бути щонайменше 90 % і більш переважно 95-100 %. Антисмислова РНК-молекула може, звичайно, містити неспоріднені послідовності, які можуть функціонувати як фактор стабілізації цієї молекули.

Генетичні конструкції для експресії антисмислової РНК можуть бути легко отримані приєднанням промоторної послідовності до області цільового гену в "антисмисловій" орієнтації, що у даному контексті називають зворотною орієнтацією щодо орієнтації транскрипції і трансляції (якщо вона має місце) цієї послідовності в цільовому гені в клітині рослини.

Рибозими

Термін "рибозим" стосується РНК-молекули, що специфічно розпізнає особливу субстратну РНК і каталізує її розщеплення. Звичайно рибозим містить антисмислову послідовність для специфічного розпізнавання цільової нуклеїнової кислоти і ферментної області, що згадується тут як "каталітичний домен". Типами рибозимів, які особливо застосовні в цьому винаході, є молотоголовий рибозим (Haseloff and Gerlach, 1988, Perriman et al., 1992) і шпильковий рибозим (Shippy et al., 1999). ДНК, що кодує ці рибозими, може бути хімічно синтезована з використанням способів, відомих у даній області. Таким чином, даний винахід забезпечує також молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує рибозим цього винаходу. Звичайно, ДНК, що кодує рибозим, може бути введена в експресійну касету або транскрипційну касету. Сайти специфічного розщеплення рибозиму в будь-якій потенційній цільовій РНК ідентифікують скануванням цієї молекули-мішені на сайти розщеплення рибозиму, які містять у собі наступні послідовності GUA, GUU і GUC. Після ідентифікації, короткі РНК-послідовності між 15 і 20 рибонуклеотидами, що відповідають області цільового гену, що містить сайт розщеплення, можуть оцінюватися на передбачені структурні ознаки, такі як вторинна структура, що може робити олігонуклеотидну послідовність непридатною. При використанні, рибозими можуть бути вибрані із групи, що складається з молотоголових рибозимів, сокироголових рибозимів, newt-

сателітних рибозимів, рибозимів *Tetrahymena* і РНКаз Р, і сконструйовані у відповідності зі способами, відомими в даній області, на основі послідовності цільового гену (наприклад, див. патент США № 5,741,679). Придатність кандидатних цілей може також оцінюватися тестуванням їх доступності відносно гібридизації з комплементарними олігонуклеотидами, з використанням аналізів із захистом від рибонуклеаз.

Як і у випадку описаних тут антисмислових полінуклеотидів, рибозими цього винаходу повинні бути здатні гібридизуватись з молекулою цільової нуклеїнової кислоти (наприклад, мРНК, що кодує поліпептид, забезпечений у вигляді SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5) при "фізіологічних умовах", а саме, у клітині, зокрема, у клітині рослини, такої як клітина пшениці або ячменю.

Інтерференція РНК/дуплексна РНК

У даному контексті, "штучно введена dsRNA-молекула" означає пряме введення dsRNA-молекули (дволанцюгової молекули РНК), що може, наприклад, здійснюватися ендегенно транскрипцією з химерного гена, що кодує таку dsRNA-молекулу, але не стосується перетворення одноланцюгової РНК-молекули в dsRNA в еукаріотичній клітині або клітині рослини. Інтерференція РНК (RNAi) особливо застосовна для специфічного зменшення експресії гена або інгібування продукування конкретного білка. Хоча і не бажаючи бути обмеженими теорією, Waterhouse et al. (1998) забезпечили модель для механізму, за допомогою якого dsRNA може бути використана для зменшення продукування білка. Цей спосіб ґрунтується на присутності молекул dsRNA, які містять послідовність, що по суті ідентична мРНК гену, що представляє інтерес, або його частини. Зручним чином, ця dsRNA може продукуватись від єдиного промотору в рекомбінантному векторі або клітині-хазяїні, де смислова і антисмислова послідовності транскрибуються з утворенням шпилькової РНК, в якій ці смислова і антисмислова послідовності гібридизуються з утворенням області dsRNA з неспорідненою областю, що утворюють структуру петлі, так що ця шпилькова РНК містить структуру стебло-петля. Конструювання і одержання прийнятних dsRNA-молекул для даного винаходу перебуває цілком у межах компетенції кваліфікованого в даній області фахівця, особливо враховуючи Waterhouse et al., 1998; Smith et al., 2000; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 99/49029; та WO 01/34815.

В одному прикладі, вводять ДНК, що регулює синтез щонайменше частково дволанцюгового РНК-продукта (дволанцюгових РНК-продуктів) з гомологією стосовно цільового гену, що інактивується. Таким чином, ця ДНК містить як смислову, так і антисмислову послідовності, які, при транскрипції в РНК, можуть гібридизуватись з утворенням дволанцюгової РНК-області. У кращому варіанті здійснення, ці смислова і антисмислова послідовності розділені спейсерною областю, що містить інтрон, що, при транскрипції в РНК, сплайсується. Було показано, що це розташування приводить до більш високої ефективності сайленсингу генів. Ця дволанцюгова область може містити одну або дві РНК-молекули, транскрибовані або з однієї ДНК-області, або з двох ДНК-областей. Ця dsRNA може класифікуватися як довга hpRNA, що має довгі смислові і антисмислові області, які можуть бути в значній мірі комплементарними, але не повинні бути повністю комплементарними (звичайно більшими, ніж приблизно 200 по, у діапазоні 200-1000 по). hpRNA може бути також досить малою із дволанцюговою частиною в діапазоні розмірів від приблизно 30 до приблизно 42 по, але не більше набагато довше ніж 94 по (див. WO04/073390, включений сюди як посилання). Вважається, що присутність цієї дволанцюгової РНК-області запускає реакцію з ендегенної системи рослини, що руйнує як цю дволанцюгову РНК, так і гомологічний РНК-транскрипт із цільового гена рослини, ефективно зменшуючи або елімінуючи активність цього цільового гена.

Довжина смислової і антисмислової послідовностей, які гібридизуються, повинна дорівнювати, у кожному випадку, щонайменше, 19 суміжним нуклеотидам, переважно щонайменше 30 або 50 нуклеотидам і більш переважно щонайменше 100, 200, 500 нуклеотидам або 1000 нуклеотидам. Може бути використана повнорозмірна послідовність, що відповідає повному транскрипту гена. Ці довжини найбільш переважно дорівнюють 100-2000 нуклеотидам. Ступінь ідентичності смислової і антисмислової послідовностей цільового транскрипту повинні бути щонайменше 85 %, переважно щонайменше 90 % і більш переважно 95-100 %. Чим довша ця послідовність, тим менш жорсткою є вимога відносно ідентичності повної послідовності. Ця РНК-молекула може, звичайно, містити неспоріднені послідовності, які можуть функціонувати як фактори стабілізації цієї молекули. Промотором, використовуваним для експресії dsRNA-утворюючої конструкції, може бути промотор будь-якого типу, якщо отримана dsRNA є специфічною відносно продукту гена в клітинній лінії, що є мішенню для руйнування. Альтернативно, цей промотор може бути специфічним відносно клітинної лінії в тому розумінні, що він експресується тільки в клітинах конкретної лінії. Це може бути вигідним,

коли спостерігається деяке перекривання в гомології з геном, що експресується в клітинній лінії, що не є цільовою. Цей промотор може бути також індукційними регуляторними факторами або внутрішньоклітинними факторами середовища. Звичайно, ця РНК-молекула експресується під контролем промотору РНК-полімерази II або РНК-полімерази III. Приклади останнього

5 містять у собі промотори tRNA або snRNA.

Приклади dsRNA-молекул, які можуть бути використані для даунрегуляції продукування поліпептиду, з GWD-активністю, приведені в прикладах 7 і 10.

Іншою сайленсинг РНК може бути "неполіаденільована РНК", що містить щонайменше 20 послідовних нуклеотидів, що має щонайменше 95 %-у ідентичність послідовності з комплементом нуклеотидної послідовності цільового гена, така як описана в WO01/12824 або US6423885 (обидва документи включені сюди як посилання). Ще одним типом сайленсинг РНК є РНК-молекула, описана в WO03/076619 (включеному сюди як посилання), що містить щонайменше 20 послідовних нуклеотидів, що має щонайменше 95 %-у ідентичність послідовності з послідовністю цільової нуклеїнової кислоти або її комплементом, і додатково

15 містить в значній мірі дволанцюгову область, описані в WO03/076619. Сайленсинг РНК може бути також дволанцюговою РНК, що містить смисловий і антисмисловий ланцюг, як визначено тут, де ця смислова і антисмислова РНК здатні до спарювання основ одна з одною з утворенням дволанцюгової області РНК (переважно ці зазначені щонайменше 20 послідовних нуклеотидів цієї смислової і антисмислової РНК є комплементарними одна одній. Смислова і

20 антисмислова область може також бути присутня в одній РНК-молекулі, так що може утворюватися шпилькова РНК (hpRNA), коли ці смислова і антисмислова області утворюють дволанцюгову область РНК. hpRNA добре відома в даній області (див., наприклад, WO99/53050, включений сюди як посилання).

МікроРНК-регуляція є явно спеціалізованим відгалуженням шляху РНК-сайленсингу, що

25 розвилось в напрямку регуляції генів, відгалужуючись від загальноприйнятих RNAi/PTGS. МікроРНК є специфічним класом коротких РНК, які кодуються в ген-подібних елементах, організованих у характерному зверненому повторі. При транскрипції, гени мікроРНК дають початок стебло-петльовому попереднику РНК, з якого потім процесується мікроРНК. МікроРНК звичайно мають у довжину приблизно 21 нуклеотидів. miRNAs, що вивільнюються, включають в

30 RISC-подібні комплекси, що містять конкретну субпопуляцію білків Argonaute, які проявляють послідовність-специфічну репресію (див., наприклад, Millar and Waterhouse, 2005; Pasquinelli et al., 2005; Almeida and Allshire, 2005).

Косупресія

Іншим молекулярно-біологічним підходом, що може бути використаний, є косупресія.

35 Механізм косупресії ще не з'ясований повністю, але вважається, що він містить у собі пост транскрипційний сайленсинг генів (PTGS) і щодо цього може бути дуже схожим з багатьма прикладами антисмислової супресії. Він містить у собі введення зайвої копії гена або його фрагмента в рослину в "смисловій орієнтації" щодо промотору для його експресії, що у даному контексті стосується до тієї ж самої орієнтації, в якій відбувається транскрипція і трансляція

40 (якщо вона має місце) цієї послідовності щодо послідовності в цільовому гені. Розмір цього смислового фрагмента, його відповідність областям цільового гену і його ступінь гомології з цільовим геном є такими як і антисмислові послідовності, описані вище. В деяких випадках, ця додаткова копія послідовності гена перешкоджає експресії цього цільового гена рослиною. Робиться посилання на опис патенту WO 97/20936 і опис Європейського патенту 0465572

45 відносно способів здійснення підходів косупресії. Антисмислові, косупресійні або дволанцюгові РНК-молекули можуть також містити в значній мірі дволанцюгову РНК область, що переважно містить сигнал ядерної локалізації, описані в WO 03/076619.

Будь-які із цих технологій для зменшення експресії генів можуть бути використані для координованого зменшення активності множини генів. Наприклад, одна молекула РНК може

50 бути націлена проти сімейства родинних генів за допомогою націлювання на область цих генів, що є загальним. Альтернативно, мішенями можуть бути зроблені неспоріднені гени за допомогою включення множинних областей в одну РНК молекулу, де кожна область націлює інший ген. Це може бути легко виконано злиттям цієї множини областей під контролем єдиного промотору.

55 Способи введення нуклеїнових кислот у клітини рослини/трансформація

Ряд способів, добре відомих для дослідників у даній області, є доступними для введення молекул нуклеїнових кислот у клітину-хазяїна рослини. Термін "трансформація" позначає зміну генотипу організму, наприклад, бактерії або рослини, введенням чужорідної або екзогенної нуклеїнової кислоти. Під "трансформантом" мають на увазі організм, змінений у такий спосіб. У

60 даному контексті, термін "трансгенні" стосується генетично модифікованої рослини, в якій

ендогенний геном доповнений або модифікований випадковою або сайт-спрямованою інтеграцією або стабільною підтримкою в реплікуємій неінтегрованій формі, введенного чужорідного або екзогенного гена або чужорідної або екзогенної послідовності. Під "трансгеном" мають на увазі чужорідний або екзогенний ген або чужорідну або екзогенну послідовність, які
 5 введені в рослину. Ця молекула нуклеїнової кислоти може бути стабільно інтегрована в геном цієї рослини або вона може бути реплікована у вигляді нехромосомного елемента. Під "геномом" мають на увазі загальний наслідований генетичний комплемент клітини, рослини або частини рослини, і він містить у собі хромосомну ДНК, пластидну ДНК, мітохондріальну ДНК і нехромосомні молекули ДНК. Термін "регенерація", використовуваний тут відносно матеріалів
 10 рослин, позначає вирощування цілої, диференційованої рослини із клітини рослини, групи клітин рослини, частини рослини, наприклад, насіння, або шматочка рослини, такого як, наприклад, шматочок із зародка, скутелума (щитка), протопласта, калюса або іншої тканини.

Конкретний вибір технології трансформації буде визначатися її ефективністю для трансформації певних видів рослин, а також досвідом і перевагою особи, що застосовує на
 15 практиці цей винахід, з конкретною методологією вибору. Кваліфікованому в даній області фахівцеві буде очевидно, що конкретний вибір системи трансформації для введення конструкції нуклеїнової кислоти в клітини рослин не є істотним для цього винаходу або обмежуючим цей винахід, за умови, що досягається прийнятний рівень переносу нуклеїнової кислоти. Посібник із практичного здійснення систем трансформації для поліпшення рослин забезпечені в Birch
 20 (1997).

У принципі, як дводольні, так і однодольні рослини, які піддаються трансформації, можуть бути модифіковані введенням конструкту нуклеїнової кислоти відповідно до цього винаходу в реципієнту клітину і вирощуванням нової рослини, що захоплює і експресує полінуклеотид відповідно до цього винаходу.

Було показано, що можливе введення і експресія чужорідних або екзогенних полінуклеотидів у дводольних рослинах, таких як тютюн і бобові, такі як, наприклад, люцерна, з використанням Т-ДНК пухлино-індукуючої (Ti) плазмід Agrobacterium tumefaciens (див., наприклад, Umbeck, патент США № 5,004,863 і Міжнародну заявку РСТ/US93/02480). Конструкт цього винаходу може бути введений в клітину рослини з використанням A. tumefaciens, що
 30 містить Ti-плазмиду. У застосуванні культури A. Tumefaciens, як трансформуючий носій, найбільш вигідний для застосування неонкогенного штаму Agrobacterium як векторного носія, так щоб була можлива нормальна неонкогенне диференціювання трансформованих тканин. Переважно, Agrobacterium несе бінарну систему Ti-плазмід. Така бінарна система містить (1) першу Ti-плазмиду, що має регіон вірулентності, важливий для введення транспортної ДНК (Т-ДНК) у рослини, і (2) химерну плазмиду. Ця химерна плазміда містить щонайменше один граничний регіон Т-ДНК регіону Ti-плазмід дикого типу, що фланкують підлягаючу переносу нуклеїнову кислоту. Було показано, що системи Ti-плазмід ефективні для трансформації клітин
 35 рослин, наприклад, як описано De Framond (Biotechnology, 1:262, 1983) і Hoekema et al. (Nature, 303:179, 1983). Така бінарна система є кращою inter alia, оскільки вона не вимагає інтеграції в Ti-плазмиду в Agrobacterium.

Способи із застосуванням Agrobacterium містять у собі, але не обмежуються ними: (а) спільне культивування з культивуємими виділеними протопластами; (b) трансформацію клітин або тканин рослин Agrobacterium; (c) трансформацію насіння, апексів або меристем Agrobacterium, або (d) інокуляцію in planta, наприклад, способом занурення квіток, описаним Bechtold et al. (1993). Цей підхід заснований на вакуум-інфільтрації суспензії клітин Agrobacterium. Альтернативно, може бути введена химерна конструкція з використанням корінь-індукуємих (Ri) плазмід Agrobacterium як вектори.

Способи трансформації зернових рослин, таких як пшениця і ячмінь або інші однодольні рослини, такі як цукровий очерет, для введення генетичної варіації в рослину введенням екзогенної нуклеїнової кислоти і регенерації рослин із протопластів або незрілих зародків
 50 рослин добре відомі в даній області, див., наприклад, Wan and Lemaux (1994), Tingay et al., (1997), заявку на патент Канади № 2,092,588, заявку на патент Австралії № 61781/94, заявку на патент Австралії № 667939, патент США № 6,100,447, міжнародну заявку на патент РСТ/US97/10621, патент США № 5,589,617, патент США № 6,541,257, і інші способи
 55 представлені в описі патенту WO99/14314. Переважно, трансгенні рослини пшениці або ячменя одержують процедурами трансформації з використанням Agrobacterium tumefaciens. Вектори, що несуть бажаний конструкт нуклеїнової кислоти, можуть уводитися в регенеровані клітини пшениці тканини культивуємих рослин або експлантатів або прийнятні системи рослин, такі як протопласти. Цими регенерованими клітинами пшениці є переважно клітини зі скутелуму
 60 незрілих зародків, зрілих зародків, калюсу, отриманого з них, або меристематичної тканини.

Цей генетичний конструкт може також уводитися в клітини рослин електропорацією, як описано, наприклад, Fromm et al. (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A, 82:5824, 1985) і Shimamoto et al. (Nature 338:274-276, 1989). У цьому способі протопласти рослини піддають електропорації в присутності векторів або нуклеїнових кислот, що містять релевантні послідовності нуклеїнових кислот. Електричні імпульси високої напруги поля роблять мембрани зворотно проникними, що

уможливлює введення нуклеїнових кислот. Електропоровані протопласти рослин відновлюють мембрани клітини, діляться і утворюють калюс рослини.

Іншим способом введення конструкції нуклеїнової кислоти в клітину рослини є високошвидкісне балістичне проникнення з використанням малих часток (також відоме як бомбардування частками або бомбардування мікроснарядями) з нуклеїновою кислотою, що підлягає введенню, у матрикс малих гранул або часток або на їх поверхні, наприклад, як описано Klein et al. (Nature 327:70, 1987). Хоча звичайно необхідно тільки одне введення нової нуклеїнової кислоти, цей спосіб, зокрема, забезпечує множинні введення.

Альтернативно, конструкція нуклеїнової кислоти може бути введена в клітину рослини контактуванням цієї клітини рослини з використанням механічних або хімічних засобів. Наприклад, нуклеїнова кислота може бути механічно перенесена мікроін'єкцією безпосередньо в клітини рослини з використанням мікропіпеток. Альтернативно, нуклеїнова кислота може бути перенесена в клітину рослини з використанням поліетиленгліколю, що утворює комплекс преципітації з генетичним матеріалом, що поглинається цією клітиною.

Є різні способи, відомі на сьогодні, для трансформації однодольних рослин. У цей час, способами трансформації однодольних рослин є бомбардування мікроснарядями клітин експлантатів або суспензій, опосередкований *Agrobacterium* перенос генів і пряме поглинання або електропорація, описана, наприклад, Shimamoto et al., 1989. Трансгенні рослини кукурудзи були отримані введенням гена *bar* *Streptomyces hygrosopicus bar* в ембріогенні клітини суспензійної культури кукурудзи за допомогою бомбардування мікроснарядями (Gordon-Kamm, 1990). Рослини пшениці були регенеровані з ембріогенної суспензійної культури відбором тільки старих компактних і вузлових ембріогенних калюсних тканин для створення амбріогенних суспензійних культур (Vasil, 1990). Об'єднання із системами трансформації для цих культур дозволяє застосовувати даний винахід до однодольних рослин. Трансгенні рослини цукрового очерету були регенеровані з ембріогенного калюса, як описано, наприклад, Bower et al. (1996).

Альтернативно, об'єднання інших способів може бути використане для збільшення ефективності процесу трансформації, наприклад, бомбардування покритими *Agrobacterium* мікрочастинками (EP-A-486234) або бомбардування мікрочастинками для індукції поранення з наступним спільним культивуванням з *Agrobacterium* (EP-A-486233).

Переважаючими рослинами для даного винаходу є види, вирощувані або, що збирають для одержання цінних речовин, у тому числі крохмалю, наприклад, як харчові продукти, корми, для ферментації або промислових запасів, серед інших застосувань.

Мутагенез

Рослини цього винаходу можуть бути отримані і ідентифіковані після мутагенезу. Це може забезпечувати рослину, що не є трансгенною, що є бажаним на деяких ринках.

Мутанти можуть бути або що зустрічаються у природі (тобто виділеними із природного джерела), або синтетичними (наприклад, отримані виконанням сайт-спрямованого мутагенезу на нуклеїнову кислоту), або індукованими. Звичайно, клітина-попередник рослини, тканина, насіння або рослина можуть бути піддані мутагенезу для одержання єдиної або множини мутацій, таких як заміни, делеції, додавання нуклеотидів і/або модифікації кодонів. У контексті цієї заявки, "індукована мутація" є штучно введеною генетичною варіацією, що може бути результатом хімічного, радіаційного або біологічного мутагенезу, наприклад, введення транспозону або Т-ДНК. Кращими мутаціями є нуль-мутації, такі як нонсенс-мутація, мутація з зсувом рамки, інсерційні мутації або мутації сайту сплайсингу, які повністю інактивують ген. Нуклеотидні інсерційні похідні містять у собі 5'- і 3'-термінальні злиття, а також вставки в послідовність одного або множини нуклеотидів. Варіантами вставлених нуклеотидних послідовностей є варіанти, в яких один або декілька нуклеотидів введені в заздалегідь заданий сайт у цій нуклеотидній послідовності, хоча можливо також випадкова вставка з прийнятим скринінгом отриманого продукту. Делеційні варіанти характеризуються видаленням одного або декількох нуклеотидів з послідовності. Переважно, мутантний ген має тільки єдину вставку або делецію послідовності нуклеотидів щодо гена дикого типу. Варіантами мутацій із заміною є варіанти, в яких щонайменше один нуклеотид у цій послідовності був вилучений і інший нуклеотид був вставлений на його місце. Переважна кількість нуклеотидів, що вводять замінами в мутантному гені, щодо гена дикого типу дорівнює максимально десяти нуклеотидам, більш переважно максимально 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 або 2 нуклеотидам, або найбільше переважно, тільки

одному нуклеотиду. Така заміна може бути "такою що мовчить" у тому сенсі, що ця заміна не змінює амінокислоту, обумовлену цим кодоном. Альтернативно, конструюють консервативні заміни для заміни однієї амінокислоти іншою, подібно діючою амінокислотою. Типовими консервативними замінами є заміни відповідно до таблиці, наведеної вище, "Типові заміни".

5 Термін "мутація" у даному контексті не містить у собі нуклеотидні заміни, що мовчать, які не впливають на активність гена, і, отже, містить у собі тільки зміни в послідовності гена, які впливають на активність гена. Термін "поліморфізм" стосується будь-якої зміни в нуклеотидній послідовності, що включає в себе такі нуклеотидні заміни, що мовчать.

10 У переважному варіанті здійснення, рослина містить делецію щонайменше частини гена GWD. Як відомо в даній області, гексаплоїдні пшениці, такі як пшениця м'яка (хлібопекарська пшениця), містять три геноми, які звичайно позначають як геноми A, B і D, тоді як тетраплоїдні пшениці, такі як пшениця тверда, містять два геноми, звичайно позначувані як геноми A і B. Кожний геном містить 7 пар хромосом, які можна спостерігати цитологічними способами під час мейозу, а отже ідентифікувати, як добре відомо в даній області.

15 Мутагенез може бути отриманий хімічними або радіаційними способами, наприклад, обробкою EMS або азидом натрію (Zwar and Chandler, 1995) насіння або опроміненням гамма-променями, як добре відомо в даній області. Виділення мутантів досягається скринінгом мутагенізованих рослин або насіння. Наприклад, мутагенізована популяція пшениці може бути піддана скринінгу на низький зміст фосфату в листі або крохмальних зернах, на мутацію в гені GWD за допомогою ПЛР або аналізу на основі гетеродуплекса, або втрату білка GWD за допомогою ELISA. У поліплоїдній рослині, скринінг виконують звичайно в генотипі, що вже позбавлений однієї або двох активностей GWD, наприклад, у рослині пшениці, що вже є мутантом у генах GWD на двох з трьох геномів, так що шукають мутант, повністю позбавлений функціональної активності. Альтернативно, ця мутація може бути ідентифікована з використанням таких способів, як "tilling", у популяції, мутагенізованій таким агентом, як EMS (Slade et al, 2005). Потім такі мутації можуть вводитися в бажані генетичні середовища схрещуванням цього мутанта з рослиною бажаного генетичного середовища і виконанням прийнятної кількості зворотних схрещувань для елімінації вихідного небажаного батьківського генетичного середовища.

30 Мутантні (змінені) пептиди можуть бути отримані з використанням будь-якого способу, відомого в даній області. Наприклад, полінуклеотид цього винаходу може бути підданий мутагенезу *in vitro*. Такі способи мутагенезу *in vitro* містять у собі субклонування цього полінуклеотиду в прийнятний вектор, трансформацію цього вектора в штам-"мутатор", такий як *E. coli* XL-1 red (Stratagene) і розмноження трансформованих бактерій протягом прийнятної кількості генерацій. В іншому прикладі, полінуклеотиди цього винаходу піддають способам перетасування ДНК, широко описаним Нагауама (1998). Ці способи перетасування ДНК можуть містити в собі гени, родинні генам цього винаходу, такі як гени GWD з видів рослин, інших ніж пшениця або ячмінь, і/або містять у собі інші гени з тієї ж самої рослини, що кодуєть подібні білки. Продукти, отримані з мутованої/зміненої ДНК, можуть бути легко піддані скринінгу з використанням описаних тут способів для визначення, чи мають вони, наприклад, активність GWD.

45 Ця мутація може бути введена в рослину безпосередньо за допомогою мутагенезу або опосередковано схрещуванням двох вихідних (батьківських) рослин, одна з яких містила введenu мутацію. Модифіковані рослини, такі як рослини пшениці, можуть бути трансгенними або нетрансгенними. З використанням мутагенезу, може бути отримана нетрансгенна рослина, позбавлена функції, що представляє інтерес. Цей винахід стосується також зерна або інших частин рослин, отриманих з цих рослин, і будь-якого матеріалу, що розмножується, цих рослин, що може бути використаний для одержання рослин з бажаними характеристиками, таких як культивуємі тканина або клітини. Цей винахід також стосується способів одержання або ідентифікації таких рослин або зерна, продукowanego такими рослинами.

50 Рослини цього винаходу можуть бути отримані з використанням процесу, відомого як TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) (Націлювання на Індуковані Локальні Ушкодження В Геномах). На першій стадії, що вводять мутації, такі як зміни нових пар окремих основ, вводять у популяції рослин обробкою насіння (або пилка) хімічним мутагеном і потім просуванням розмноження рослин до генерації, в якій мутації будуть стабільно успадковуватися. ДНК екстрагують і запасують насіння із всіх членів цієї популяції для створення ресурсу, що може оцінюватися повторювано протягом часу.

60 Для TILLING-аналізу, конструюють праймери ПЛР для специфічної ампліфікації одного цільового гену, що представляє інтерес. Специфічність особливо важлива, якщо мішенню є член сімейства генів або частина поліплоїдного генома. Потім, мічені барвником праймери

можуть бути використані для ампліфікації продуктів ПЛР із об'єднаної ДНК множини індивідуальних рослин. Ці продукти ПЛР денатурують і повторно віджигают для можливості утворення помилково спарених пар основ. Помилково спарені основи, або гетеродуплекси, представляють як зустрічаємий в природі поліморфізм окремих нуклеотидів (SNP) (тобто, кілька

5 рослин із цієї популяції, імовірно, несуть той самий поліморфізм), так і індуковані SNP (тобто тільки рідкі індивідуальні рослини, імовірно, проявляють цю мутацію). Після утворення гетеродуплексів, застосування ендонуклеази, такої як *Cel I*, що розпізнає і розщеплює помилково спарену ДНК, є ключем для виявлення нових SNP у популяції TILLING.

З використанням цього підходу, можуть бути піддані скринінгу багато тисяч рослин для ідентифікації будь-якої індивідуальної рослини зі зміною єдиної основи, а також малих вставок або делецій (1-30 по) у будь-якому гені або конкретній області цього геному. Аналізовані геномні фрагменти можуть перебувати в діапазоні розмірів приблизно від 0,2 до 1,6 kb. При 8-кратному об'єднанні, фрагментів 1,4 kb (не вважаючи кінців фрагментів, де детектування SNP є проблематичним внаслідок фону) і 96 доріжках на один аналіз, це об'єднання дозволяє

10 15 піддавати скринінгу мільйон п.о. геномної ДНК на окремий аналіз, що робить TILLING високопродуктивним чином.

TILLING описаний додатково в Slade and Knauf (2005) і Henikoff et al. (2004).

Крім дозволу ефективного детектування мутацій, високопродуктивна технологія TILLING є ідеальною для детектування природних поліморфізмів. Таким чином, дослідження невідомої гомологічної ДНК на утворення гетеродуплексів щодо відомої послідовності виявляє кількість і положення поліморфних сайтів. Ідентифікують як зміни нуклеотидів, так і малі вставки і делеції, у тому числі щонайменше деякі повторювані кількості поліморфізмів. Це було названо Ecotilling (Comai et al., 2004).

20

Кожний SNP реєструють по його приблизному положенню в межах декількох нуклеотидів. Таким чином, кожний гаплотип може бути поміщений в архів на основі його мобільності. Дані послідовності можуть бути отримані з відносно малим збільшенням зусиль із використанням аліквот тієї ж самої ампліфікованої ДНК, що використовують для аналізу розщеплення помилкових спарювань. Лівий або правий секвенувальний праймер для окремої реакції вибирають по його близькості до цього поліморфізму. Програма секвенатора виконує множинне

25 30 співставлення і виявляє зміну основи, що у кожному випадку підтверджувалося смугою в гелі.

Ecotilling може виконуватися з меншими витратами, ніж повне секвенування, спосіб, що використовується у цей час для виявлення більшості SNP. Скринінгу можуть бути піддані планшети, що містять зіставлені екотипічні ДНК, а не пули ДНК з мутагенізованих рослин. Оскільки детектування має місце на гелях з дозволом майже пари основ і розподілу фону є однорідними уздовж доріжок, смуги, які мають ідентичний розмір, можуть збігатися, виявляючи і генотипуючи SNP на одній стадії. Таким шляхом, кінцеве секвенування SNP є простим і ефективним, що досягається тим фактом, що аліквоти тих же самих продуктів ПЛР, використовуваних для скринінгу, можуть бути піддані секвенуванню ДНК.

35

У даному контексті, термін "генетично зв'язані" стосується локусу маркера і другого локусу, що перебуває досить близько на хромосомі, для того щоб вони успадковувалися разом, наприклад, у більш ніж 50 % мейозів, не випадковим чином. Це визначення містить у собі ситуацію, за якої локус маркера і другий локус утворюють частину того самого гена. Крім того, це визначення містить у собі ситуацію, у якій локус маркера містить поліморфізм, що є відповідальним за інтерес, що представляє, ознака (інакше кажучи, локус маркера безпосередньо "зв'язаний" з фенотипом). Таким чином, відсоток рекомбінації, що спостерігається між цими локусами на генерацію (сантиморган (сМ)) буде дорівнює менше 50. У конкретних варіантах здійснення цього винаходу генетичні локуси можуть перебувати на відстані один від одного 45, 35, 25, 15, 10, 5, 4, 3, 2 або 1 або менше сМ на хромосомі. Переважно ці маркери перебувають на відстані один від одного менше 5 сМ або 2 сМ і більш

40 45 50 переважно на відстані приблизно 0 сМ.

У даному контексті, "іншими генетичними маркерами" можуть бути будь-якими молекулами, які пов'язані з бажаною ознакою зернової рослини, такої як пшениця. Такі маркери добре відомі кваліфікованими в даній області фахівцям і містять у собі молекулярні маркери, зв'язані з генами, що визначають такі ознаки, як стійкість до хвороб, врожайність, морфологія рослин, якість зерна, інші ознаки спокою, такі як колір зерна, вміст гіберелової кислоти в зерні, висота рослини, колір борошна і т.і. Прикладами таких генів у пшениці є гени стійкості до іржі *Sr2* або *Sr38*, гени стійкості до жовтої іржі *Yr10* або *Yr17*, гени стійкості до нематодів, такі як *Cre1* і *Cre3*, алелі в локусах глютеніну, які визначають міцність тесту, такі як алелі *Ax*, *Bx*, *Dx*, *Ay*, *By* і *Dy*, гени *Rht*, які визначають напівкарликовий габітус росту а, отже, стійкість до полягання посівів

55 60 (Eagles et al., 2001; Langridge et al., 2001; Sharp et al., 2001).

Селекція з використанням маркера є добре визнаним способом селекції гетерозиготних рослин, необхідним при зворотному схрещуванні з батьківською формою, з якої знову схрещується гібрид у класичній програмі селекції. Популяція рослин у кожній генерації зворотного схрещування буде гетерозиготною по відношенню до гену, що представляє інтерес, зазвичай присутнього у відношенні 1:1 у популяції зворотного схрещування, і цей молекулярний маркер може бути використаний для розрізнення цих двох алелів цього гену. З використанням екстракції ДНК, наприклад, з молодих проростків, і тестування зі специфічним маркером для отриманого інтрогресією бажаної ознаки, може бути виконана рання селекція рослин для додаткового зворотного схрещування при витраті енергії і ресурсів на меншій кількості рослин.

Будь-який молекулярно-біологічний спосіб, відомий у даній області, що здатний детектувати алелі GWD або іншого гену, може бути використаний у способах даного винаходу. Такі способи містять у собі, але не обмежуються ними, застосування ампліфікації нуклеїнових кислот, секвенування нуклеїнових кислот, гібридизації нуклеїнових кислот з міченими прийнятним чином зондами, одноланцюгового конформаційного аналізу (SSCA), денатуруючого градієнтного гел-електрофорезу (DGGE), гетеродуплексного аналізу (HET), аналізу хімічного розщеплення (CCM), каталітичного розщеплення нуклеїнових кислот або їх комбінації (див., наприклад, Lemieux, 2000; Langridge et al., 2001). Цей винахід містить у собі також застосування способів з молекулярними маркерами для детектування поліморфізмів, пов'язаних з алелями (наприклад) гену GWD, які надають змінене фосфорилування і/або змінену деградацію крохмалю. Такі способи містять у собі детектування або аналіз поліморфізмів довжин рестрикційних фрагментів (RFLP), RAPD, поліморфізмів довжин ампліфікованих фрагментів (AFLP) і поліморфізмів мікросателітів (простого повтору послідовності, SSR). Міцно зв'язані маркери можуть бути легко отримані способами, добре відомими в даній області, такими як Bulk Segregant Analysis, обговорюваний в огляді Langridge et al., 2001.

"Полімеразна ланцюгова реакція" ("ПЛР") є реакцією, у якій одержують репліковані копії цільового полінуклеотиду з використанням "пари праймерів" або "набору праймерів", що складаються з "лівого" і "правого" праймера, і каталізатора полімеризації, такого як ДНК-полімераза, і звичайно термостабільного полімеразного ферменту. Способи для ПЛР відомі в даній області і описані, наприклад, в "PCR" (Ed. M.J. McPherson and S.G. Moller (2000) BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford). ПЛР може виконуватися на кДНК, отриманій зі зворотної транскрипції мРНК, виділеної із клітин рослин, що експресують ген ABA 8'-гідроксилази. Однак, буде більше кращим виконання ПЛР на геномній ДНК, виділеній з рослини.

Праймер є олігонуклеотидною послідовністю, що здатна гібридуватися залежним від послідовності чином з цільовою послідовністю і подовжуватися під час ПЛР. Амплікони або продукти ПЛР або фрагменти ПЛР або продукти ампліфікації є продуктами подовження, які містять праймер і заново синтезовані копії цільових послідовностей. Мультиплексні системи ПЛР містять множинні набори праймерів, які приводять до одночасного одержання більше одного амплікона. Праймери можуть бути точно спаровуються із цією цільовою послідовністю або вони можуть містити внутрішні основи, що не спаровуються, які можуть приводити до введення сайтів рестрикційного ферменту або каталітичних сайтів розпізнавання/розщеплення нуклеїнових кислот у конкретних цільових послідовностях. Праймери можуть також містити додаткові послідовності і/або містити модифіковані або мічені нуклеотиди для полегшення захоплення або детектування ампліконів. Повторювані цикли теплової денатурації цієї ДНК, віджиг праймерів з їх комплементарними послідовностями і подовження відпалених праймерів полімеразою приводить до експонентної ампліфікації послідовності-мішені. Терміни ціль або цільова послідовність або матриця стосується послідовностей нуклеїнових кислот, які ампліфікуються.

Способи прямого секвенування нуклеотидних послідовностей добре відомі кваліфікованим у даній області фахівцям і можуть бути знайдені, наприклад, в Ausubel et al. і Sambrook et al.. Секвенування може проводитися будь-яким прийнятним способом, наприклад, дидезоксисеквенуванням, хімічним секвенуванням або їх варіаціями. Пряме секвенування має перевагу визначення варіації в будь-якій парі основ конкретної послідовності.

Рослини

Термін "рослина", застосовуваний тут у вигляді іменника, стосується до цілих рослин, але при використанні як прикметника стосується будь-якої речовини, що є присутньою у рослині, отриманою з рослини, зробленою з рослини або стосується до рослини, наприклад, органи рослини (наприклад, листя, стебла, коріння, квітки), окремі клітини (наприклад, пилок), насіння, клітини рослини і т.і. Проростки і насіння, що проростають, з яких розвиваються коріння і пагони, також включені в термін "рослина". Термін "частини рослини" стосується в цьому контексті до однієї або декількох тканин рослини або одного або декількох органів рослини, які отримані із

цілої рослини і які містять крохмаль. Частини рослини містять у собі вегетативні структури (наприклад, листя, стебла), корінь, органи/структури квіток, насіння (що включають у себе зародок, ендосперм і оболонку насіння) тканина рослини (наприклад, що васкулярну тканину, основну паренхіму, і т.і.), клітини рослини і потомство рослини. Термін "клітина рослини" стосується в даному контексті до клітини, отриманої з рослини або перебуває в рослині, і містить у собі протопласти або інші клітини, отримані з рослин, що продукують гамети клітини і клітини, які регенеруються в цілі рослину. Клітини рослини можуть бути клітинами в культурі. Під "тканиною рослини" мається на увазі диференційована тканина в рослині або тканина, отримана з рослини ("експлантат"), або недиференційована тканина, отримана з незрілих або зрілих зародків, насіння, коріння, пагонів, плодів, бульб, пилка, пухлинної тканини, такої як корончаті галли, і різні форми агрегації клітин рослин у культурі, такі як калюси. Прикладами тканин рослини, що перебувають у насінні або виділених з насіння, є ендосперм, алейроновий шар і зародок.

У даному контексті, термін "зерно" звичайно стосується зрілого, зібраного насіння рослини, але може також стосуватись зерна після набрякання або пророщення, відповідно до контексту. Зріле зерно злаків, таких як пшениця, звичайно має вміст вологи менше приблизно 18-20 %.

"Трангенна рослина" у даному контексті позначає рослину, що містить генний конструкт, що не виявляється в рослині дикого типу того ж самого виду, того ж самого різновиду або того ж самого культивара (сорт). Тобто, трансгенні рослини (трансформовані рослини) містять генетичний матеріал, що вони не містили перед трансформацією. "Трансген" має в даному контексті звичайне значення, яке мається на увазі в області біотехнології, і стосується генетичної послідовності, що була отримана або змінена технологією рекомбінантних ДНК або РНК і яка була введена в клітину рослини. Трансген може містити в собі генетичні послідовності, отримані або зроблені із клітини рослини або клітини іншої рослини або нерослинного джерела, або синтетичну послідовність. Звичайно, трансген був уведений у рослину маніпуляцією людини, наприклад, трансформацією, але може бути використаний будь-який спосіб, відомий кваліфікованому в даній області фахівцеві. Цей генетичний матеріал переважно стабільно інтегрується в геном цієї рослини. Введений генетичний матеріал може містити послідовності, які природно зустрічаються в тому ж самому виді, але в реаранжированому порядку або в інші аранжуванні елементи, наприклад, антисмислову послідовність. Рослини, що містять такі послідовності, включені тут у термін "трансгенні рослини". "Нетрансгенною рослиною" є рослина, що не було генетично модифікована введенням генетичного матеріалу способами рекомбінантних ДНК. У кращому варіанті здійснення, трансгенні рослини є гомозиготними у відношенні кожного і будь-якого гена, що був введений (трансген), так що їх нащадки не відокремлюються відносно бажаного фенотипу.

У даному контексті, термін "відповідна нетрансгенна рослина" стосується рослини, що є ізогенною відносно трансгенної рослини, але не має трансгена, що представляє інтерес. Переважно, відповідною нетрансгенною рослиною є рослина того ж культивара (сорт) або того ж самого різновиду, що і попередник трансгенної рослини, що представляє інтерес, або лінією рослин-сиблінгів (сібсів), що не має цієї конструкції, часто називаної "сегрегантом", або рослиною того ж самого культивара (сорт) або того ж самого різновиду, трансформованого "порожнім векторним" конструктом, і може бути нетрансгенною рослиною. "Дикий тип" стосується в даному контексті клітини, тканини або рослини, які не були модифіковані відповідно до даного винаходу. Клітини, тканина або рослини дикого типу можуть бути використані як контроль для порівняння рівнів експресії екзогенної нуклеїнової кислоти або ступеня або природи модифікації ознаки клітинами, тканиною або рослинами, модифікованими, як описано тут.

Трансгенні рослини, як визначено в контексті даного винаходу, містять у собі потомство рослин, які були генетично модифіковані з використанням рекомбінантних способів, де це потомство містить трансген, що представляє інтерес. Такий нащадок може бути отриманий самозаплідненням первинної трансгенної рослини або схрещуванням таких рослин з іншою рослиною того ж самого виду. В основному це робиться для одержання щонайменше одного білка/ферменту, визначеного тут, у бажаній рослині або органі рослини. Частини трансгенного рослини містять у собі всі частини і клітини зазначених рослин, що містять трансген, такі як, наприклад, культивуємі тканини, калюси і протопласти.

Кожний з декількох способів може бути використаний для визначення присутності трансгена в трансформованій рослині. Наприклад, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) може бути використана для ампліфікації послідовностей, які є унікальними відносно трансформованої рослини, з детектуванням ампліфікованих продуктів за допомогою гел-електрофореза або інших способів. ДНК може бути екстрагована із цих рослин за допомогою загальноприйнятих

способів і може бути проведена ПЛР-реакція з використанням праймерів для ампліфікації специфічної ДНК, присутність якої буде розрізняти трансформовані і нетрансформовані рослини. Наприклад, можуть бути сконструйовані праймери, які будуть ампліфікувати область ДНК з трансформуючого вектора зчитування у цю конструкцію, і зворотний праймер, сконструйований з гена, що представляє інтерес. Ці праймери будуть ампліфікувати фрагмент тільки в тому випадку, якщо ця рослина була успішно трансформована. Альтернативним способом підтвердження позитивного трансформанта є блот-гібридизація по Саузерну, добре відома в даній області. Рослини, які є трансформованими, можуть бути також ідентифіковані, тобто розпізнані серед нетрансформованих рослин, або рослин дикого типу, по їх фенотипі зменшеного вмісту фосфату крохмалю, отриманого з насіння цієї рослини, або родинного фенотипу, такого як збільшений потенціал продуктивності.

У даному контексті, термін "проростання" стосується появи кінчика кореня з оболонки насіння після набрякання. "Швидкістю проростання" називають відсоток насіння у популяції, що проростало протягом деякого періоду часу, наприклад, 7 або 10 днів, після набрякання. Популяція насіння може оцінюватися щодня протягом декількох днів для визначення відсотка проростання протягом часу.

Що стосується насіння даного винаходу, термін "швидкість проростання, що є по суті такою ж самою" означає, що швидкість проростання трансгенного насіння дорівнює щонайменше 90 % від швидкості проростання ізогенного нетрансгенного насіння. Швидкості проростання можуть бути розраховані з використанням відомих у даній області способів.

Рослинами, забезпечуваними або розглянутими для застосування на практиці даного винаходу, є покритонасіневі і голонасіневі рослини і, серед покритонасіневих, однодольні і дводольні рослини. У кращих варіантах здійснення, рослинами даного винаходу є сільськогосподарські рослини (наприклад, зернові і бобові рослини, кукурудза, пшениця, картопля, тапіок, рис, сорго, просо, касава, ячмінь або горох) або інші бобові. Ці рослини можуть вирощуватися для одержання придатних для їжі коріння, бульб, листя, стебел, квіток або плодів.

У деяких варіантах здійснення, трансгенною рослиною є зернова рослина. Прикладами зернових рослин є, але не обмежуються ними, пшеницю, ячмінь, рис, маїс (кукурудза), сорго, овес і мал. Більш переважно, зерною рослиною є пшениця, ячмінь, кукурудза або сорго.

У даному контексті, термін "пшениця" стосується будь-якого виду роду *Triticum*, у тому числі його попередників, а також його нащадкам, отриманим схрещуванням з іншими видами. Пшениця включає "гексаплоїдну пшеницю", що має організацію генома AABBDD, що складається з 42 хромосом, і "тетраплоїдну пшеницю", що має організацію генома AABB, що складається з 28 хромосом. Гексаплоїдна пшениця включає *T. aestivum*, *T. spelta*, *T. macha*, *T. compactum*, *T. sphaerococcum*, *T. vavilovii* і їх міжвидові кроси (гібриди). Тетраплоїдна пшениця включає *T. durum* (також тут називається дуром (тверда пшениця) або *Triticum turgidum* ssp. *durum*), *T. dicoccoides*, *T. dicoccum*, *T. polonicum* і їх міжвидові гібриди. Крім того, термін "пшениця" містить у собі потенційні попередники гексаплоїдної або тетраплоїдної *Triticum* sp., такі як *T. uarzu*, *T. monococcum* або *T. boeoticum* для геному A, *Aegilops speltoides* для геному B і *T. tauschii* (також відому як *Aegilops squarrosa* або *Aegilops tauschii*) для геному D. Культивар (сорт) пшениці для застосування в даному винаході може належати, але не обмежується ними, до кожного з перерахованих вище видів. У винахід включені також рослини, які одержують загальноприйнятими способами з використанням *Triticum* sp. як батьківської рослини в статевому схрещуванні з видами, що не є *Triticum* (такими як рис [*Secale cereale*]), що включають у себе, але не обмежуваними їм, *Triticale*. Переважно, рослина пшениці є придатною для комерційного одержання зерна, таким як комерційні сорти гексаплоїдної пшениці або пшениці дуром, що мають прийнятні агрономічні характеристики, які відомі кваліфікованими в даній області фахівцям.

У даному контексті, термін "ячмінь" стосується будь-якого виду роду *Hordeum*, у тому числі його попередників, а також його нащадків, отриманих схрещуванням з іншими видами. Переважно, ця рослина є видом *Hordeum*, що комерційно культивується, таким як, наприклад, лінія або культивар або різновид *Hordeum vulgare*, або є придатним для комерційного одержання зерна.

Одержання харчових продуктів

Цей винахід забезпечує поліпшені рослини, що мають збільшений потенціал продуктивності. В деяких варіантах здійснення його застосовно в рослинах, які збирають для вживання в їжу.

Ясно, що харчові рослини включають фрукти, горіхи або овочі, зібрані для одержання листя, стебел, плодів, бульб, насіння і стручків.

В іншому аспекті, цей винахід забезпечує зернові рослини і зерно, переважно пшеницю, що використовується для одержання харчових продуктів або кормів, причому це зерно має модифікований вміст фосфату і необов'язково модифікований рівень ферментів, що розщеплюють крохмаль. Переважно, рослина, з якої одержують зерно, має зменшений рівень активності GWD в ендоспермі під час розвитку. Рослина даного винаходу застосовується для виробництва харчових продуктів і, зокрема, для комерційного виробництва харчових продуктів. Таке виробництво харчових продуктів може включати готування борошна, тіста або інших продуктів, які можуть бути інгредієнтом у комерційному виробництві харчових продуктів. В одному варіанті здійснення, що є бажаним для застосування у виробництві харчових продуктів, насіння або зерно рослини має вміст фосфату, що є по суті тим же самим або збільшеним, щодо рослини дикого типу, і рівень активності розщеплюючих ферментів, зокрема, однієї або декількох амілаз, таких як α -амілаза або β -амілаза, що зменшується присутністю трансгена або індукованої мутації, які зменшують експресію гена, що кодує такий розщеплюючий фермент в зерні. Борошно або тісто з такого зерна має бажані властивості для хлібопекарського виробництва або іншого виробництва харчових продуктів на основі модифікованої в'язкості крохмалю і/або зменшеного рівня амілази. В альтернативному варіанті здійснення, що є бажаним для корму тварин або для промислових застосувань, таких як виробництво біоетанолу, це насіння або це зерно рослини мають вміст фосфату, що є зменшеним щодо рослини дикого типу, і рівень активності розщеплюючих ферментів, зокрема, однієї або декількох амілаз, таких як α -амілаза або β -амілаза, що є збільшеним у поєднанні зі зменшеним вмістом фосфату, як наведено тут в прикладах. Таке зерно або крохмальні продукти, отримані з нього, мають збільшене перетравлювання при застосуванні як їжі або збільшену швидкість або ефективність перетворення при застосуванні для виробництва етанолу.

Бажане генетичне середовище цієї рослини буде вимагати контролю агрономічного виходу і інших характеристик. Такі характеристики можуть залежати від того, чи бажано мати зимові або весняні типи, від агрономічної продуктивності, стійкості до хвороб і стійкості до абіотичного стресу. Для застосування в Австралії, може бути бажаним перенос схрещуванням зміненої ознаки крохмалю рослини пшениці в такі культивари пшениці, як Baxter, Kennedy, Janz, Frame, Rosella, Cadoux, Diamondbird або інші звичайно вирощувані сорти. Інші сорти будуть прийнятними для інших районів вирощування. Переважно, щоб рослина, переважно пшениця, різновид цього винаходу, забезпечувала врожай, не менший, ніж 105 % урожаю відповідного різновиду дикого типу, щонайменше, в декількох районах вирощування, більш переважно не менший, ніж 110 %, і навіть більш переважно не менший, ніж 115 %. Цей урожай може бути легко виміряний у контрольованих польових випробуваннях.

У наступних варіантах здійснення, вміст крохмалю зерна становить щонайменше приблизно 25 %, 35 %, 45 %, або 55-65 % (мас/мас) і переважно є збільшеним щодо дикого типу. Пшениця дикого типу, вирощувана для комерційних цілей, має вміст крохмалю звичайно в діапазоні 55-65 %, у залежності певною мірою від вирощуваного культивара. Альтернативно, насіння або зерно цього винаходу мають вміст крохмалю щонайменше 90 % щодо вмісту крохмалю зерна з рослини дикого типу і переважно щонайменше 95 %, 100 %, 102 % або 105 %. Інші бажані характеристики включають здатність зерна до розмелювання, зокрема, твердість зерна. Іншим аспектом, що може надавати рослині пшениці більш високу цінність, є ступінь екстракції крохмалю із зерна, причому більш високі швидкості екстракції є більш корисними. Форма зерна є також іншою ознакою, що може впливати на комерційну застосовуваність рослини, отже, форма зерна може впливати на легкість, з якої це зерно може подрібнюватися при розмелюванні.

Крохмаль легко виділяється із зерна цього винаходу, наприклад, зерна пшениці, з використанням стандартних способів, наприклад, способу Schulman et al. (1991). У промисловому масштабі, може бути використаний мокрий спосіб розмелювання або сухий спосіб розмелювання. Розмір гранул крохмалю є важливим у промисловості переробки крохмалю, де відбувається відділення більших гранул А від більше дрібних гранул В.

Харчовий продукт

Цей винахід включає також харчові продукти, напої або фармацевтичні препарати, одержувані із продуктів, переважно продуктів, що містять крохмаль, отриманий з рослин або зерна цього винаходу. Таке одержання харчових продуктів може містити в собі приготування борошна, тіста або інших продуктів, які можуть бути інгредієнтом у комерційному виробництві харчових продуктів. Зерно цього винаходу або продукти, одержувані з нього, що містять крохмаль, можуть бути використані в різних харчових застосуваннях для споживання людиною. У даному контексті, термін "люди" стосується *Homo sapiens*.

Зерно, отримане зі зміненої пшениці, може бути легко використане в процедурах переробки а, отже, цей винахід включає подрібнене, розмелене, дроблене, шелушене або розплющене в пластівці зерно або продукти, отримані з переробленого або цільного зерна рослин цього винаходу, у тому числі борошно. Ці продукти можуть бути потім використані в різних харчових продуктах, наприклад, борошняних продуктах, таких як хліб, печиво, бісквіти і т.і., або харчових добавках, таких як загусники або зв'язувальні агенти, або для готування напоїв, стрічкоподібних макаронних виробів, макаронних виробів або супів швидкого приготування. Зерно або продукти, отримані із зерна даного винаходу, особливо бажані в зернових сніданках або у вигляді екструдованих продуктів. Крохмалі цього винаходу можуть бути також використані для утворення щільних гелів, які застосовуються в кондитерській промисловості або дозволяють скоротити час формовання або витримки. Вони можуть бути також використані як покриття, наприклад, для зменшення абсорбції масла в обжарюваній картоплі або інших харчових продуктах. Цей крохмаль може бути включений у жирні або масляні продукти, такі як маргарин або шортенінг, заправка для салатів, яєчні продукти, такі як майонез, молочні продукти, такі як морозиво, йогурт або сир, зернові продукти, такі як кукурудзяне або пшеничне борошно, фруктові соки, інші харчові продукти і харчові речовини, або цей змінений крохмаль може бути перероблений у напої або харчові продукти, такі як хліб, печиво, бісквіти, зернові сніданки, макаронні вироби, стрічкоподібні макаронні вироби або соуси.

У хлібі, продукти крохмалю у формі борошна або борошна із цільного зерна можуть замінити 10 % (м/м) або більше незміненого борошна або борошна із цільного зерна, переважно замінити щонайменше 30 % і навіть більш переважно щонайменше 50 % незміненого борошна або борошна із цільного зерна. Таким чином, цей склад може мати, наприклад, 90 частин борошна, 10 частин зміненого крохмалю пшениці, 2 частини жиру, 2 частини солі, 1 частина покращувача якості, 2,5 частини дріжджів. Приготування цього хліба може виконуватися способом швидкого тіста або інших способів, які відомі кваліфікованим у даній області фахівцям.

Альтернативно, крохмальний продукт цього винаходу може бути включений у борошняний продукт на основі макаронного тіста. Кількість крохмалю цього винаходу, використовувана в цьому складі макаронного тіста, може перебувати в діапазоні 10-100 % (мас/мас) розраховуючи на загальну масу борошняного матеріалу, більш переважно в діапазоні 10-80 %. Інші прийнятні борошняні матеріали будуть із легкістю вибрані кваліфікованим у даній області фахівцем. До цієї композиції може бути також доданий інший матеріал, наприклад, сушений меланж (сушена яєчна маса) або яйця без шкарлупи (меланж) (жовтки, білки або і те, і інше) або речовини з високим вмістом білка, такі як молочний білок або рибний білок. Можуть бути також додані вітаміни, мінеральні речовини, солі кальцію, амінокислоти, буферувальні агенти, такі як динатрійгідрофосфат, пряності, камедь, клейковина або гліцерилмоностеарат.

Інші частини рослин цього винаходу, які є їстівними, можуть бути використані як харчові продукти для споживання людиною або як корм для використання для тварин. Наприклад, листя, стебла, коріння, бульби, плоди, стручки (боби) або екстракти або частини цих органів, що містять клітини цього винаходу, з будь-яких із цих органів можуть бути використані для споживання людиною або тваринами. Застосування рослин у вигляді свіжих або перероблених фруктів або овочів добре відомо в даній області, і такі застосування включені в даний винахід. Збільшена травлення рослин цього винаходу і їх частин може забезпечувати переваги для застосування цих матеріалів як корму для тварин, наприклад, корму для свиней, великої рогатої худоби, коней, домашньої птиці, такої як кури, і інших тварин. Зокрема, очікуються переваги від збільшеного перетравлювання крохмалю цих продуктів для ефективності перетворення корму тварин і в результаті збільшених швидкостей росту.

Харчовий продукт або напій або фармацевтичний препарат може бути запакований у готовому для продажу виді або у формі продуктів навалом або насипом. Даний винахід забезпечує способи приготування харчового продукту, напою або фармацевтичного препарату цього винаходу і рецепти або інструкції для готування таких харчових продуктів або напоїв. Ці способи можуть містити стадії збору рослини або частини рослини, відділення зерна від інших частин рослини, подрібнювання, екстракції, розмелювання, відділення волокна, варіння, затарювання, упакування або інші стадії обробки, відомі в даній області. Способи або рецептури або інструкції можуть містити в собі стадії обробки продукту рослини цього винаходу і/або змішування його з іншими харчовими інгредієнтами, такі як нагрівання або випічка цієї суміші або продукту, наприклад, щонайменше, при 100 °C. Цей спосіб може містити в собі стадію упакування цього продукту таким чином, що він готовий до продажу.

Корми і застосування для тварин

Рослини цього винаходу і продукти, одержувані або вироблені з них, переважно зібраний продукт, такий як, наприклад, зерно, мають переваги як корм для тварин. Не обмежуючи себе

теорією, автори вважають, що це обумовлено збільшеним перетравленням і біодоступністю крохмалю в цьому продукті. У кращому варіанті здійснення, це пов'язано зі збільшеним рівнем амілаз у цьому продукті. Хоча зменшення вмісту фосфату крохмалю в цьому продукті саме по собі може зменшувати перетравлення, воно було переборено збільшеним рівнем амілаз, зокрема, α -амілаз, і загальним результатом було збільшене перетравлення. Це створює конкретну перевагу відносно ефективності перетворення цього корму в продукт тварини, що може бути за допомогою цього збільшений щонайменше на 2 %, переважно щонайменше на 5 % або щонайменше на 7 % щодо немодифікованого відповідного продукту дикого типу. Ця перевага може спостерігатися для будь-яких молодих тварин, таких як кури, телята або ягнята, або зі старими тваринами, що виростають до повного розміру. Ефективність перетворення корму може бути легко вимірювана з використанням способів, відомих у даній області.

Промислова придатність

Продукти рослин, переважно зерно, мають конкретні переваги у виробництві промислових продуктів, таких як, наприклад, етанол. Зв'язок збільшених параметрів продукування, таких як вихід, зі збільшеним перетворенням крохмалів у цукри, описана тут, забезпечує конкретні переваги. Наприклад, застосування продуктів цього винаходу в перетворенні крохмалю в цукри для ферментації вимагає меншого додавання екзогенної амілази і дозволяє працювати при більш низьких температурах, що зменшує витрати на енергію.

Цей винахід описується далі наступними не обмежувачими винахід прикладами.

ПРИКЛАД 1

Матеріали і способи

Екстракція крохмалю із зерна

Зріле насіння розмелювали за допомогою MicroMill з Metefem (Prototype) і подрібнений матеріал пропускали через сито 0,5 мм. Отримане борошно із цільного зерна зважували і воду, еквівалентну 50 % цієї маси, додавали для зм'якшення цієї тканини. Тісто готували механічним змішуванням води і борошна. Надлишок води додавали для екстракції крохмалю із клейковини і потім суспензію крохмалю фільтрували через фільтр 100 мкм для видалення залишків клітин. Цю екстракцію повторювали 4 рази або доти, поки в тісті не залишалося крохмалю. Цей крохмаль осаджували центрифугування (5000 об/хв, 10 хвилин при 4 °C). Білкову верхівку видаляли і цей крохмаль ресуспендували в надлишку води. Це промивання повторювали 3 рази. Екстрагований крохмаль ліофілізували в ліофілізаторі FTS (Model No. FD-3-55D-MP). За допомогою цього способу 10 г зерна давали приблизно 6 г борошна і потім 3 г крохмалю.

Екстракція крохмалю з листового матеріалу

Крохмаль екстрагували з листя рослин з використанням способу, описаного в Delvalle et al., (2005). Зразки листя ліофілізували, потім подрібнювали в 15-25 мл буферу для екстракції (MOPS 100 mM, pH 7,2, EDTA 5 mM, етиленгліколь 10 % (мас/об) за допомогою блендера Polytron зі зберіганням зразків, охолоджуваних на льоді. Цю суміш фільтрували через двохшаровий Miracloth-фільтр і центрифугували зі збереженням осаду, що містить крохмаль. Потім цей крохмаль очищали через 90 % градієнт Перколла 90 % центрифугуванням при 4000 об/хв протягом 40 хвилин при 4 °C.

Вимірювання рівнів фосфату і глюкозо-6-фосфату в зразках крохмалю

Загальний зміст фосфату в крохмалі визначали з використанням способу з Малахітовим зеленим, адаптованим Ekman and Jager, (1993). 10 мг сухого крохмалю солюбілізували ресуспендуванням його в 500 мкл 10 % розчину ДМСО і кип'ятили цю суміш протягом 10 хвилин. 200 мкл розчину змішували з 200 мкл буферу Clark і Lub (0,054 M KCl, 0,145 M HCl); 120 мкл H₂O; 80 мкл HCl 4 M і 200 мкл розчину Малахітового зеленого 3:1 (0,2 % розчину Малахітового зеленого: 10 % розчину (NH₄)₆Mo₇O₂₄(4H₂O) 10 % в 4 M HCl). Ця кислота гідролізує фосфатні групи із C6 і C3 і вільний фосфат вимірюють аналізом з Малахітовим зеленим. Для вимірювання оптичної густини при 660 нм використовували спектрофотометр. Одержували також калібровану криву з використанням стандартів розчину G1P від 0,01 до 5 mM, оброблених так само, як і зразки крохмалю. Вміст фосфату звичайно вимірювали по три рази і середнє виражали у вигляді кількості ммоль на мг крохмалю.

Рівні глюкозо-6-фосфату (G6P) вимірювали способом аналізу амілоглюкозидази, адаптованим Delrue et al., (1992). Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу використовували спеціально в цьому аналізі в такий спосіб. 5 мг висушеного крохмалю розчиняли в 500 мкл 10 % ДМСО у воді і кип'ятили 10 хвилин для розчинення крохмалю. Готували серію розведень у двох повторях. Крохмаль у кожному зразку деградували дією 70 мкл розчину амілоглюкозидази (AGS, набір для аналізу крохмалю з Enzytec) протягом 2 годин при 55 °C. Цю реакцію зупиняли додаванням 350 мкл води і 350 мкл розчину 1 (TEA-буфер pH 7,6, НАДФ, АТФ (з набору для аналізу крохмалю Enzytec)). OD при 340 нм вимірювали (позначену як ODo) перед додаванням

наступного реагенту. Для першої серії вимірювань кількості крохмалю, додавали 5 мкл суміші розчину (Гексокиназа і G6Pd (200 Е/100 Е на 0,7 мл, з набору для аналізу крохмалю Enzytec)). Для другої серії для вимірювання кількості G6P, додавали 5 мкл G6Pd без гексокинази (G7877-2KU, Sigma, 18 одиниць/мл). Ці суміші інкубували при 25 °С протягом 15 хвилин і OD вимірювали при 340 нм. Це вимірювання повторювали кожні 10 хвилин до стабілізації цього OD (позначеного ODf).

Кількість крохмалю або кількість G6P розраховували з використанням рівняння:

$[Крохмаль\ або\ G6P] [мг.\ мл^{-1}] = (ODf - ODo) \times 1,069 / \text{фактор розведення}$

Перша серія вимірювала концентрацію і кількість крохмалю в кожному зразку, тоді як друга серія вимірювала кількість G6P, що присутній у крохмалі.

Розподіл розмірів крохмальних гранул (зерен)

Розподіл розмірів гранул (зерен) крохмалю, отриманих у вигляді суспензій крохмалю у воді, визначали з використанням аналізатора розмірів частинок з використанням лазерної дифракції (Model 2600c Droplet and Particle Sizer, Malvern Instruments, Malvern, UK). "Гранули А" визначаються як частинки з діаметром більше 10 мкм при визначенні цим аналізатором, "гранули В" як частинки з діаметром менше 10 мкм. Розподіл розмірів гранул, як тут визначено, виражали у вигляді частоти гранул В, вираженої у вигляді відсотка загального об'єму гранул крохмалю (Stoddard, 1999).

Властивості крохмалю

Розподіл довжин ланцюгів у крохмалі аналізували після дерозгалуження зразків крохмалю ізоамілазою з вивільненням глюкозидних ланцюгів з амілопектину в цих зразків. Електрофорез вуглеводів з використанням флуорофора (FACE) проводили, як описано O'Shea et al., (1998) за допомогою системи капілярного електрофореза P/ACE 5510 (Beckman) з детектуванням argon-LIF.

Профіль температури клейстеризації кожного зразка крохмалю вимірювали в диференціальному скануючому калориметрі Pyris 1 (Perkin Elmer, Norwalk CT, USA). Цей аналіз вимірює безпосередньо енергію, що необхідна для клейстеризації крохмалю. Зразки готували попереднім перемішуванням крохмалю у воді при співвідношенні 1:2 (сухий крохмаль:вода). DSC-кювету наповнювали цією сумішшю і герметично закривали. Використовуваним еталоном була порожня кювета. Робили чотири вимірювання для кожної з 2 ендотермів (клейстеризація і дисоціація амілоза-ліпід): початкової температури, максимальної температури, кінцевої температури і ентальпії.

В'язкість розчинів крохмалю вимірювали на Rapid-Visco-Analyser (RVA, Newport Scientific Pty Ltd, Warriewood, Sydney), наприклад, з використанням умов, повідомлених Batey et al., 1997. Параметри, які вимірювали, містили в собі максимальну в'язкість (максимальну в'язкість гарячої пасту), що втримує силу, кінцеву в'язкість і температуру пастування.

Об'єм набрякання борошна або крохмалю визначали у відповідності зі способом Konik-Rose et al (2001). Поглинання води вимірювали зважуванням зразка до і після змішування зразка борошна або крохмалю з водою при 90°C і після збору клейстеризованного матеріалу.

Фракціонування крохмалю гелю-проникаючою хроматографією (гель-фільтрацією)

Гелю-проникаючу хроматографію на колонках з Сефарозою використовували для розділення крохмалю на фракції амілопектину (більших молекул) і амілози (більш дрібних молекул). Кількість 1-2,5 мг крохмалю, розчиненого в 500 мкл 10 mM NaOH, наносили на колонку з Сефарозою CL2B (0,5 см внутрішній діаметр x 65 см довжина), урівноваженої 10 mM NaOH, і хроматографували з використанням цього розчину. Фракції 250-300 мкл збирали при швидкості 1 фракція/1,5 хв. Глюкани в кожній фракції детектували за допомогою взаємодії йод-полісахарид згідно з Banks et al. (Starch/die Stärke, 23:118-124, 1971) або за допомогою аналізу глюкози (Enzytec).

Вміст амілози зразків крохмалю визначали також колориметричним (йодометричним) способом Morrison and Laignelet (1983) з невеликою модифікацією, що полягає в наступному. Приблизно 2 мг крохмалю точно зважували (з точністю до 0,1 мг) у пробірку на 2 мл із кришкою, що загвинчується, устатковану гумовим промивачем у кришці. Для видалення ліпиду, 1 мл 85 % (об/об) метанолу змішували із цим крохмалем і цю пробірку нагрівали на водній бані при 65 °С протягом 1 години з періодичним перемішуванням за допомогою збовтування. Після центрифугування при 13000 g протягом 5 хвилин супернатант обережно видаляли і стадії екстракції повторювали. Потім цей крохмаль сушили при 65 °С протягом 1 години і розчиняли в розчині сечовина-диметилсульфоксид (UDMSO; 9 об'ємів диметилсульфоксиду на 1 об'єм 6 М сечовини), з використанням 1 мл UDMSO на 2 мг крохмалю (зваженого, як описано вище). Цю суміш негайно інтенсивно перемішували і інкубували у водній бані при 95 °С протягом 1 години з періодичним струшуванням до повного розчинення крохмалю. Аліквоту розчину крохмаль-

UDMSO (50 мкл) обробляли 20 мкл реагенту I₂-KI, що містив 2 мг йоду і 20 мг йодиду калію на мл води. Цю суміш доводили до 1 мл водою. Оптичну густину цієї суміші при 650 нм вимірювали перенесенням 200 мкл на мікропланшет і зчитуванням оптичної густини за допомогою мікропланшет-рідера Emax Precision Microplate Reader (Molecular Devices, USA). Стандартні зразки, що містять від 0 до 100 % амілози і 100-0 % амілопектину, готували з амілози картоплі і амілопектину кукурудзи (або картоплі) (Sigma) і обробляли так само, як і тест-зразки. Вміст амілози (відсоток амілози) визначали з величин оптичної густини з використанням рівняння регресії, зробленого з оптичних густин для цих стандартних проб.

Аналіз ферменту альфа-амілази

Активність альфа-амілази в зразках борошна або борошна із цільного зерна визначали з використанням набору для аналізу Ceralph Amylase з Megazyme International Ireland Ltd, відповідно до рекомендацій виробника. У гідролізі олігосахариду, що додає із цієї суміші реагентів ендогенною дією альфа-амілаз, надлишкові кількості альфа-глюкозидаз, присутні в цій суміші, давали кількісний гідроліз цього олігосахариду з утворенням глюкози і вільного п-нітрофенолу. По суті, аліквоту зернового екстракту інкубували із субстратною сумішшю при 40 °C протягом 20 хвилин і реакцію зупиняли і проявляли фарбування додаючи слабкий лужний розчин. Вимірювали оптичну густину при 400 нм, що зв'язана безпосередньо з рівнем альфа-амілаз в аналізованому зразку. Ці результати виражали у вигляді CU (ceralpha-одиниць) на г борошна або екстракту.

Трансформація пшениці бомбардуванням незрілих зародків пшениці

Частинки золота покривали очищеною ДНК двох плазмід: 2 мкг плазмідної ДНК, що кодує ген селектуємого маркера (npt), у цьому випадку pCMneoSTLS2 (Maas et al., Mol Breeding, 3: 15-28, 1997), і 2 мкг плазмідної ДНК, що кодує ген, що представляє інтерес, у цьому випадку pBx17-GWD_IR, осадженням з використанням CaCl₂/спермідину, як було раніше описане Cao et al. (Plant Cell Reporter, 11:586-591, 1992). Ця суміш частинка золота/ДНК містила 30 мг/мл частинок золота із середнім розміром 1,5-3,0 мкм. Для бомбардування, виділяли 50 незрілих зародків, при 12 днях після цвітіння і з довжиною приблизно 1,5-2 мм, і рубчики видаляли. Їх поміщали в центрі чашки з агаром, що містить високоосмотичне середовище MSM, що була середовищем MS, що містить 150 г/л мальтози і 0,1 г/л міо-інозиту, з утворенням цільової зони з діаметром приблизно 3 см. Цільові зародки інкубували (попередньо обробляли) на MSM планшетах протягом 4 годин, як описано Vain et al. (Plant Cell Reporter, 12:84-88, 1993) і потім бомбардували 5 мкл суміші частинок золота, що мають покриття, при частковому вакуумі (приблизно 85 кПа) з використанням балістичної системи доставки PDS-1000/He. Відстань між нанесеною ДНК і цільовими зародками дорівнювала 9 см і використовуваний тиск дорівнював 900 кПа.

Регенерація/відбір трансформантів

Через двадцять чотири години після бомбардування сумішшю цих плазмід, зародки переносили на середовище MSR (MS-середовище, рН 5,9, що містить 30 г/л сахарози, 0,1 г/л міо-інозиту і 2,5 мг/л 2,4-D) і інкубували протягом 14 днів у темряві при 24 °C для індукції соматичних зародків. Потім ці культури переносили на селективне середовище MSWG50 (MS-середовище, рН 5,9, що містить 30 г/л сахарози, 0,1 г/л міо-інозиту) з 50 мг/л генетицину (G418) як селективний агент і підтримували в режимі 16 г світла (приблизно 25 мкЕ м⁻²с⁻¹) і 8 г темряви. Потім їх переносили в нові чашки із селективним середовищем MSWG50 кожні 3 тижня. Проростки, які утворювалися, субкультивували один раз на свіжому MSWG50 для додаткового росту. Проростки з висотою приблизно 10-15 см пересаджували в ґрунт на столі з аерозольним зрошенням протягом 2 тижнів і потім переносили в оранжерею з температурним режимом 24 °C (день) і 18 °C (ніч). Присутність трансгена в регенованих рослинах підтверджували екстракцією ДНК із зразків тканини і проведенням ПЛР-реакцій з використанням трансген-специфічних праймерів.

Екстракція РНК із зразків рослин і кількісна ЗТ-ПЛР

Загальну РНК екстрагували із зразків листя з використанням набору RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) відповідно до інструкцій постачальника. Синтез кДНК виконували з використанням набору для синтезу першого ланцюга з oligo-dt-праймером. Специфічні ампліфікації детектували з використанням Brilliant SYBR Green QPCR MasterMix (STRATAGENE). Специфічну флуоресценцію детектували при 520 нм і аналізували за допомогою програми аналізу MX4000 порівнянням зі специфічними каліброваними кривими. Одностадійну ЗТ-ПЛР також виконували з використанням набору для одностадійної ЗТ-ПЛР Qiagen (QIAGEN, Hilden, Germany).

ПРИКЛАД 2

Ідентифікація генів GWD і PWD у пшениці і інших зернових рослинах

Амінокислотні послідовності для послідовностей білка R1 з картоплі (Номер доступу AAK11735) і білка PWD *Arabidopsis* (NP_194176) використали як запитувані послідовності для запиту EST-послідовностей пшениці в базі даних NCBI з використанням програми BLASTN. Були ідентифіковані 17 EST (перераховані нижче), які могли бути зіставлені разом і зібрані в послідовність з 2273 пар основ (SEQ ID NO: 1).

5 dbj|CJ626658.1| CJ626658 неопублікована кДНК-бібліотека Y.Ogihara.
gb|CV773056.1| FGAS067452 бібліотека FGAS *Triticum aestivum*.
dbj|CJ694861.1| CJ694861 неопублікована кДНК-бібліотека Y.Ogihara.
gb|CA743865.1| wri1s.pk006.k23 wri1s *Triticum aestivum* cDNA.
10 gb|BQ240991.1| TaE05010D07R TaE05 *Triticum aestivum* cDNA.
dbj|CJ696711.1| CJ696711 неопублікована кДНК-бібліотека Y.Ogihara.
dbj|CJ730334.1| CJ730334 неопублікована кДНК-бібліотека Y.Ogihara.
gb|BQ237936.1| TaE05010D07F TaE05 *Triticum aestivum* cDNA.
gb|CK197520.1| FGAS005996 бібліотека FGAS *Triticum aestivum*.
15 dbj|CJ650741.1| CJ650741 неопублікована кДНК-бібліотека Y.Ogihara.
dbj|CJ542660.1| CJ542660 неопублікована кДНК-бібліотека Y.Ogihara.
gb|CK197837.1| FGAS006317 бібліотека FGAS *Triticum aestivum*.
dbj|CJ590517.1| CJ590517 неопублікована кДНК-бібліотека Y.Ogihara.
gb|BE516396.1| WHE609_A08_A15ZA ABA-оброблений зародок пшениці.
20 gb|DY742247.1| EST0817 оброблена холодом кДНК-бібліотека пшениці.
dbj|CJ673389.1| CJ673389 неопублікована кДНК-бібліотека Y.Ogihara.
dbj|CJ566400.1| CJ566400 неопублікована кДНК-бібліотека Y.Ogihara.

Цю послідовність використали для запиту послідовностей пшениці в базі даних TIGr (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/tae1/>). Це давало кДНК-послідовність 3677 пар основ (SEQ ID NO: 2) (TIGr Accession No. TA53350_4565), що перекриває послідовність 2273 пар основ. Ці дві послідовності виявляли 99 % ідентичність у цій області, що перекривається. При порівнянні передбаченої амінокислотної послідовності (SEQ ID NO: 3), що кодується цієї 3677 нуклеотидною послідовністю, з послідовностями білків у базі даних білків NCBI, було видно, що вона виявляє високу подібність із послідовностями білків R1 з картоплі і *Arabidopsis*. (71 % і 67 % ідентичність, відповідно). Ця послідовність пшениці виявляє також високий ступінь подібності з послідовністю з генома рису (*Os06g0498400*), що приблизно є гомологом з рису. Ця кДНК-послідовність пшениці була на 87 % ідентична нуклеотидній послідовності рису, а амінокислотні послідовності були ідентичними на 88 %. Нуклеотидна послідовність GWD пшениці представлена у вигляді SEQ ID NO: 2, а амінокислотна послідовність у вигляді SEQ ID NO: 3.

35 При порівнянні цієї кДНК пшениці з геномною послідовністю рису (*Os06g0498400*), вдалося визначити структуру екзон/інтрон цього гена рису, і була визначена можлива структура ексона цієї кДНК пшениці (Таблиця 8).

Дослідження EST-послідовностей ячменя дозволило ідентифікувати EST BU993423 ячменя з 663 нуклеотидів (SEQ ID NO: 4), що виявляла подібність із послідовностями GWD із пшениці і рису в області ексона 23 і 3' і яка, як вважається, відповідає гомологічному гену ячменю. Була ідентифікована інша кДНК пшениці, що складається з 4302 нуклеотидів (SEQ ID NO: 5), що кодує білок, що має крохмальзв'язуючий домен, подібний з білком R1 картоплі.

Послідовність кДНК 3677 п.о. пшениці містила відкриту рамку зчитування (ORF) 3027 п.о. від положення нуклеотиду 382 до положення 3409; очевидно, вона є повно розмірною, тому що при зіставленні цієї кДНК із кДНК рису ці дві послідовності були однаковими протягом повної довжини кДНК рису. Ця ORF кодувала білок з послідовністю 1009 амінокислот з розрахованою молекулярною масою 112,8 кД. Ця послідовність білка містила 3 консервативних домена з можливою функцією: домен зв'язування крохмалю приблизно з 100-200 амінокислот, фосфор-акцепторний сайт приблизно з 200-300 амінокислот і домен зв'язування PEP/пірувату приблизно з 740 амінокислот - С-кінець, причому вважається, що цей домен зворотно каталізує перетворення АТФ в АДФ.

Були ідентифіковані дві інші EST пшениці, CA484881 і CO347457, які мали гомологію з послідовністю *Arabidopsis*, що кодує PWD. Вони не відповідали послідовності 2273 п.о., але кодували поліпептиди, які виявляли гомологію із крохмальзв'язувальними доменами і білком PWD з *Arabidopsis*. Конкретно, ці дві EST-послідовності PWD виявляли подібність із амінокислотами 973-1153 (82 % ідентичність) і амінокислотами 1172-1196 (88 % ідентичність) гена ATGWD2/GWD3/PWD (PHOSPHOGLUCAN, WATER DIKINASE) [*Arabidopsis thaliana*] (NP_194176), відповідно. Вони виявляли також гомологію з PWD рису (*Os12g0297500*). Ці повнорозмірні послідовності гена PWD пшениці можуть бути виділені способами 5'- і 3'-RACE з

використанням праймерів на основі цих EST-послідовностей або інших способів, відомими в даній області.

Додатковий пошук ідентифікував чотири EST із сорго, які були гомологічними кДНК-послідовностям GWD пшениці (SEQ ID NO: 2) і, отже, були, очевидно, частиною гена GWD сорго. Цими послідовностями були: Accession No: BI245998 (SEQ ID NO: 11), що має нуклеотидну послідовність, що була на 83 % ідентична послідовності GWD пшениці (SEQ ID NO: 2) від положення нуклеотиду 2057 до 2542; Accession No: CF074015, що має послідовність, ідентичну на 89 % GWD пшениці від нуклеотиду 874 до 1559; Accession No: EH406623, що має послідовність, ідентичну на 89 % GWD пшениці від нуклеотиду 1323 до 1885; і Accession No. CD423248, що має послідовність, ідентичну на 85 % GWD пшениці від нуклеотиду 2517 до 3434. Ця повнорозмірна послідовність гену GWD сорго може бути виділена способами 5'- і 3'-RACE з використанням праймерів на основі вищевказаних EST-послідовностей або інших способів, відомими в даній області.

ПРИКЛАД 3

Одержання рослин, трансформованих конструктами, які інгібують експресію гена GWD

Для тестування ефекту інгібування експресії гена GWD, створювали конструкт гена, що може експресувати дволанцюгову молекулу РНК, для інгібування гомологічних генів у пшениці, націлюванням на консервативну область, що відповідає крохмальзв'язуючому домену.

Цей конструкт містив промотор з гена глютеніну Bx17 HMW із пшениці, для експресії цієї dsRNA, цей промотор був вибраний як тканеспецифічного промотору, що переважно експресується в ендоспермі зернових рослин. Таким чином, очікувалося, що інгібування експресії гена могло відбуватися в ендоспермі.

Цей конструкт, що інгібує ген, збирали в клонуальному векторі pBx17IRcasNOT у такий спосіб. Цей вектор містив наступні елементи в наступному порядку: ендосперм-специфічний промотор з гена HMWG Bx17 пшениці, що містить перші 1897 нуклеотидів геномної послідовності Bx17, як повідомлялося в Reddy et al. (1993), пряму послідовність att (1447 п.о., що включають у себе ccdB-негативний селекуємий ген) із сайтом BamHI на його 5'-кінці і сайтом EcoRI на 3'-кінці, інтрон 4 крохмальрозгалужуючого ферменту рису (507 п.о., від нуклеотиду 6201 до нуклеотиду 6674 Accession No. D10838) у зворотній орієнтації щодо цього промотору, інтрон 9 крохмальрозгалужуючого ферменту рису (420 п.о., від нуклеотиду 9112 до нуклеотиду 9605 D10838) у прямому напрямку, зворотну послідовність att (1435 п.о., що включають у себе другу копію ccd із сайтом Spe на її 5'-кінці і сайтом Kpn на її 3'-кінці, і, нарешті, послідовність термінації транскрипції pos3' (267 п.о., з pEmu, Chamberlain et al., 1994). Цей вектор не містив гена селекуємого маркера, але другу плазмиду, що містить ген npt котрансформували для створення можливості відбору трансформованих клітин. Нуклеотидні послідовності, названі вищевказаними номерами доступу, включені сюди як посилання.

ПЛР-фрагмент, що відповідає частині гена GWD пшениці, ампліфікували з кДНК ендосперми пшениці при стандартних умовах з використанням праймерів GWDF: 5'-AAAAGGATCCGGTACCGCCTTCTGGCTCAACAGTTC-3' (SEQ ID NO: 6) і GWDR: 5'-AAAAGAATTCTAGTATCACCTTCACCTCCACGAC-3' (SEQ ID NO: 7) і температури віджигу 62 °C. Ця ПЛР-реакція ампліфікувала фрагмент 597 п.о. кДНК GWD пшениці, що відповідає нуклеотидним положенням 581-1020 SEQ ID NO: 2 для GWD. Цей район гена пшениці, у напрямку 5'-кінця транскрибуємої послідовності, відповідав частині гена картоплі, що кодує амінокислоти 470-670 Accession No AAK11735 (цей номер доступу включений сюди як посилання). Передбачається, що цей район у поліпептиді картоплі приблизно відповідає крохмальзв'язуючому домену білка GWD.

Цей ПЛР-фрагмент розщеплювали Spe і Kpn і лігували з ДНК вектора pIRBx17casNOT, розщепленою тією же самою парою рестрикційних ферментів, з утворенням за допомогою цього проміжного конструкту pBx17-GWD_R. Потім додаткову ДНК цього ПЛР-фрагмента розщеплювали Bam і EcoRI і лігували з ДНК pBx17-GWD_R, розщепленої тими ж самими ферментами, з утворенням pBx17-GWD_IR.

ДНК цього конструкту використали для опосередкованої бомбардуванням трансформації незрілих зародків пшениці (cv. Bob White) з використанням часток золота, як описано в прикладі 1. Близько 1100 зародків обробляли з використанням цього балістичного способу і з них регенерували 25 проростків. 18 рослин виживали для вирощування до зрілості в оранжереї. При їх тестуванні на стійкість до генетицину, що вказує на присутність гена селекуємого маркера, або за допомогою ПЛР-скринінгу, були ідентифіковані 13 позитивних трансгенних рослин пшениці (позначуваних як генерація T0, лінії rsGWD), що містять pBx17-GWD_IR. ПЛР-скринінг проводили на ДНК, виділеної із зразків листя, і використали праймер ZLBx17pro, розташований у промоторі цього конструкту, і праймер GWDR

5'-AAAAGAATTCACTAGTATCACCTTCACCTCCACGAC-3' (SEQ ID NO: 7).

ПЛР ампліфікувала фрагмент з 713 п.о. з рослин трансформованих rBx17-GWD_IR.

ПРИКЛАД 4

Даунрегульований ген дикіази і аналіз трансформованих рослин пшениці

Рослини T0 вирощували в оранжереї і давали їм самозапліднюватися з утворенням насіння T1. Окремі насінини T1 кожної трансгенної лінії висівали для одержання рослин-нащадків. T1-рослини, які були позитивними відносно присутності трансгена, ідентифікували і самозапліднювали з одержанням насіння T2. Очікувалося, що такі рослини T1 є або гомозиготними, або гетерозиготними у відношенні трансгена; вони могли бути розрізнені аналізом генерації T2 для кожної лінії. T1-рослини, які були негативними відносно присутності трансгена (сегреганти), також зберігали і давали їм самозапліднюватися для одержання генерації T2 рослин, що не мають трансгена, які могли служити як контроль (дикого типу) для порівняння фенотипічних властивостей.

Крохмаль виділяли з висушеного зерна T2 трансгенних ліній, як описано в прикладі 1. Вміст крохмалю трансгенних зерен є, очевидно, подібним із вмістом крохмалю зерна дикого типу, не спостерігали значимих розходжень у вмісті крохмалю. Зразки крохмалю T2 аналізували на їх вміст глюкозо-6-фосфату (G6P) з використанням адаптованого протоколу з набору для аналізу крохмалю Enzytec, як описано в прикладі 1. Аналізували зразки крохмалю з 12 ліній rsGWD T1. Із цих ліній, 8 містили конструкт RNAi і 3 були нуль-сегрегантами, які служили як контролю (дикий тип). З цих 8 трансформованих ліній rsGWD, 7 виявляли явне зменшення рівнів G6P у крохмалі зерна в порівнянні з вихідною рослиною дикого типу (св. Bob White), а також у порівнянні з їх сегрегантами дикого типу. (Див. фігуру 1). Одна лінія (GWD5-9X) виявляла зменшений рівень G6P у порівнянні з Bob White, але рівень G6P не був значно зменшеним у порівнянні з відповідним нуль-сегрегантом (rsGWD5-9A). Ці результати показують, що цей цільовий ген кодувався функціональним GWD у пшениці.

Структурний і молекулярний аналіз крохмалю

Зразки крохмалю із зерна цих трансгенних ліній аналізували також на розподіл їх довжин ланцюгів, вмісту амілози, а також розподіл розмірів гранул (крохмальних зерен). Профілі розподілу довжин ланцюгів одержували за допомогою капілярного електрофорезу після ізоамілазного дерозгалуження крохмалю, як описано в прикладі 1. Для 12 аналізованих ліній, не спостерігали значимих модифікацій розподілу довжин ланцюгів, причому положення основного максимуму з'являється при одному і тому ж ступіні полімеризації (DP) для кожного зразка, і ці криві були фактично ідентичними при накладенні одна на одну. При порівнянні розподілів розмірів гранул або частоти (%) В-гранул у цих зернах, також не спостерігали значимих змін між трансгенними і нетрансгенними лініями. Вміст амілози (виражений у вигляді відсотка загального крохмалю, екстрагованого із цього зерна) у зразках крохмалю для більшості трансгенних ліній було трохи більш низьким (на 2-3 % більш низьким), ніж у відповідних контролях або вихідній лінії Bob White (фігура 2). Трансгенна лінія rsGWD5-9X мала вміст амілози, що статистично не відрізнявся від контролю.

Фізико-хімічні властивості цього крохмалю

Досліджували фізико-хімічні властивості зразків крохмалю із трансгенних ліній, у тому числі властивості пастування, в'язкість і індекс набухання.

Набухання крохмалю з трансгенних ліній випробовували, як описано в прикладі 1, і ці дані порівнювали з даними для контрольних зразків (фігура 3). Крохмаль з трансгенного зерна з найвищим зменшенням вмісту пов'язаного із крохмалем G6P, тобто найвищим ступенем сайленсингу генів на фенотипічному рівні, показав значиме зменшення (щонайменше на 20 %) індексу набухання при 95 °C, у той час як для інших ліній не спостерігалось значимої модифікації.

Властивості пастування крохмалю аналізували з використанням 9 % (мас/об) суспензій крохмалю, приготовлених з використанням 3 г крохмалю і 25 мл води, і Rapid Visco Analyser (Newport Scientific, Sydney, Australia) у присутності нітрату срібла при кінцевій концентрації 4 мкг/мл як інгібітор α -амілази або під час відсутності доданого інгібітору. Репрезентативні дані показані на фігурі 4 і в таблиці 4, які зображують віскограми для крохмалю, виділеного з 5 вибраних трансгенних ліній і контролю Bob White. Лінії з найвищим ступенем зменшення G6P також виявляли найбільше зменшення величин пастування крохмалю зерна, зокрема, максимальний в'язкості і часі максимуму. Однак, трансгенні лінії з меншою дією на вміст G6P виявляли тільки слабку модифікацію або відсутність модифікації їх профілів RVA. Зменшення в'язкості, що спостерігається для лінії rsGWD4-1, дорівнювало щонайменше 30 %. Подібно поведінці в інших аналізах крохмалю зерна, крохмаль із лінії rsGWD5-9X виявляв той же самий профіль в'язкості, що і профіль його контролю.

Аналіз активності ферментів, що стосуються крохмалю

Неочікувано, той же самий тип аналізу, проведений на зразках борошна із цільного зерна (на відміну від застосування очищеного крохмалю, вище), із трансгенного зерна під час відсутності інгібітора альфа-амілази, виявив сильний особливий фенотип (фігура 4). Причиною для додавання інгібітора амілази в цьому експерименті була спроба одержання кращого розділення віскограми і уникнення будь-якого порога, обумовленого амілолітичними ферментами, що спостерігається для вихідної лінії (BW26). Однак, на диво авторів, RVA-профіль борошна із цільного зерна був повністю зруйнований і мав дуже низький максимум в'язкості і дуже низьку кінцеву в'язкість. Профіль, отриманий для борошна із цільного зерна з вихідної лінії, відновлювався додаванням нітрату срібла або ЕДТА, як інгібітора амілази, до цієї суспензії перед аналізом, з утворенням профілю подібної форми щодо профілю RVA виділеного крохмалю.

Цей результат дозволив авторам припустити присутність збільшеного пула альфа-амілаз у трансгенному зерні. Для дослідження цієї гіпотези, рівень альфа-амілазної активності в насінні аналізували, як описано в прикладі 1. Дані для вибраних ліній, що включають у себе наступну генерацію (T3) цих ліній, показані на фігурі 5. Для цих аналізованих ліній rsGWD альфа-амілазна активність, очевидно, є підвищеною щонайменше приблизно в 2 рази - в 5 разів у порівнянні з вихідною лінією або контрольними лініями. При вимірювали α -амілазну активність, спостерігали збільшення щонайменше 20 % у цьому борошні в порівнянні з нетрансформованим контролем. Був зроблений висновок, що зменшена активність GWD у цій рослині була пов'язана зі збільшеним нагромадженням амілаз у трансгенних зернах, як α -амілази, так і β -амілази.

Рівні інших ферментів, що беруть участь у деградації крохмалю, також вимірювали в трансгенном зерні, з використанням протоколів, описаних Zeeman et al., Plant Journal 15: 357-365 (1998). Ферменти α -глюкозидза, β -глюканаза, D-фермент, целюлаза, лихеназа і ксиленаза, всі, були присутні в подібних кількостях у трансгенному насінні у порівнянні з контрольним насінням, хоча деяке насіння виявляло слабе збільшення активностей окремих ферментів. Був зроблений висновок, що основна дія на активність ферментів було спрямовано на амілази, зокрема, на α -амілазу.

Висічення насіння, що розвивається (25 DPA), і зрілого зерна із трансгенних і контрольних рослин для поділу алейронового шару і перикарпію, тканин ендосперму і зародка з наступним вимірюванням амілазної активності на цих тканинах показало, що збільшена α -амілазна активність була локалізована насамперед в алейроні і перикарпії. Тільки низькі рівні активності спостерігали в ендоспермі і дуже низьку активність у зародках.

При виділенні алейронових шарів і забарвленні їх йодидом пропідію, що є флуоресцентною сполукою, що не може входити в живі клітини, що мають інтактну клітинну мембрану, або діацетатом карбоксифлуоресцеїну (CFDA), що може перетинати клітинну мембрану і входити в клітини, спостерігали, що було набагато більше клітин в алейронових шарах трансгенного зерна, які прогресували в програмованих на смерть клітин, у порівнянні з контрольними алейроновими шарами.

Інші вуглеводи

Аналізували рівні декількох вуглеводів з листя, колосків і стебел цих рослин при 25 DPA. Аналізи виконували у двох незалежних експериментах. Ці аналізи показали, що було істотне збільшення рівнів фруктози, сахарози і глюкози в стеблах трансгенних рослин у порівнянні з рослинами Bob White дикого типу. Рівні крохмалю також збільшувалися, але рівні фруктана зменшувалися в стеблах.

Змінені фенотипи рослин

Дивним і несподіваним чином спостерігали також, що даунрегуляція експресії гена GWD у трансформованих лініях пшениці приводила до більших модифікацій морфології і розвитку рослин при вирощуванні в оранжереї. Найбільш важливо, що при вирощуванні в тих самих умовах, що включають у себе світло, температуру і полив, трансгенні рослини виглядали більш життєздатними, більш здоровими і продукували більше біомаси, у тому числі більше листя, колосків і вторинних колосків, ніж відповідні контрольні рослини. Кількість зерна, продукуєму на одну рослину, збільшувалась по суті щонайменше на 50 % у порівнянні з вихідними або контрольними рослинами, див. дані в таблиці 5 відносно продукування насіння (у грамах насіння на одну рослину) і фігуру 6, що показує типові розміри колосків.

Для підтвердження цих спостережень, проводили додаткові дослідження росту на відібраних трансгенних лініях, контролях і вихідних рослинах для можливості проведення статистичного аналізу. Ці вимірювані параметри містили в собі швидкість проростання, площу листків на різних стадіях росту і кількість колосків на одна рослину. Ці аналізи проводили для 5

повторів кожної лінії рослин. Ці дані показані в таблиці 6. Із цих даних був зроблений висновок, що продукування біомаси трансгенних рослин збільшувалося з ранньої стадії після проростання, наприклад, на стадії 2-го листа, і поки не формувалися колоски. Біомаса збільшувалася в середньому на 30 %, а в деяких рослинах більш ніж на 40 %. Площа листя збільшувалася щонайменше на 50 %, в деяких лініях більш ніж на 60 %. Кількість пагонів на рослину збільшувалося щонайменше на 50 %, іноді більш ніж на 20 %. Кількість колосків на рослину збільшувалося щонайменше на 40 %, в деяких випадках щонайменше на 50 %. Звичайно продукування насіння на рослину збільшувалося щонайменше на 40 % або щонайменше на 50 % з подібною масою окремих насінин.

Навіть більш дивно, спостерігали також істотний вплив на ріст і розвиток рослин для трансгенної лінії rsGWD5-9X. Як показано вище, крохмаль насіння цієї лінії не був значно модифікований на рівні його G6P або в'язкості, так що не було відразу помітно, чому повинен було здійснюватися вплив на ріст і розвиток цієї лінії рослини. Перед цими спостереженнями вважалося, що промотор глютеніну HMW, застосовуваний для створення інгібувального конструкту RNAi, міг бути обмежений в експресії тільки ендоспермом. Однак, спостережуваний профіль росту дозволяв у сильному ступені припускати, що експресія цього промотору "давала витік", зокрема, у листі рослини, де є транзиторий метаболізм крохмалю після фотосинтезу. Для дослідження цієї можливості дії конструкції RNAi на цей транзиторий метаболізм крохмалю, рівні G6P крохмалю, що є присутнім у листі з обраних трансгенних і контрольних ліній, вимірювали наприкінці періоду денного світла. Цей момент часу відповідав найвищій активності GWD і найвищому нагромадженню транзиторийного крохмалю протягом 24 годинного періоду і був вибраний, оскільки активність ферменту виявляє циркадну варіацію.

Отримані дані показані на фігурі 7. Відповідно до спостережень по росту і розвитку цієї лінії, рівні G6P, присутні в крохмалі листа, зменшувалися разове у порівнянні з cv. Bob White або контрольними рослинами. Цей результат підтвердив, що конструкція RNAi повинна була експресуватись на рівнях, достатніх для порушення регуляції GWD у листі, і за допомогою цього впливати на транзиторий метаболізм крохмалю.

Висновки

Було показано, що зменшення активності Глюкоза-вода-дикінази конструктом, що кодує інгібітор експресії гена, що кодує GWD, у трансгенній пшениці, зменшувало вміст глюкозо-6-фосфату в запасному крохмалі, у цьому випадку, у крохмалі зерна. Це довело, що цей цільовий ген кодував функціональний фермент GWD. Зменшення рівнів моноестерифікованого фосфату сприяло модифікації властивостей пастування і зменшенню індексу набухання цього крохмалю. У новому і несподіваному спостереженні, зерно із цих трансгенних рослин також виявляло в сильному ступені збільшені рівні α -амілази і значне збільшення рівнів β -амілази, які впливали також на природні властивості пастування борошна із цільного зерна. Обидві ці амілази в нормі експресуються насамперед в алейроновому шарі зерна і особливо після насичення вологою і під час проростання зерна, так що вважалося ймовірним, що більша частина збільшеної амілази могла б також експресуватись в алейроновому шарі. Такі ефекти були тільки помірними при аналізі очищеного крохмалю, де білки вилучені. Можна було очікувати, що такі ефекти на борошні впливають на хлібопечення і інші харчові застосування. Однак, найбільш несподіваним спостереженням було те, що конструкт RNAi у сильному ступені впливав на ріст і розвиток рослин, приводячи до істотного збільшення продукції біомаси і виходу зерна. Продукція біомаси і насіння збільшувалася на 30-40 % або більше і була пов'язана зі зменшенням рівнів глюкозо-6-фосфату в транзиторийному крохмалі. На основі результатів, отриманих з рослинами трансгенної лінії rsGWD5-9X, вплив на ріст і врожай була опосередкована первинною модифікацією експресії гена в зелених тканинах, таких як листя, а не в зерні, що розвивається. Це було несподіваним, тому що промотор, використовуваний для запуску конструкту RNAi, був вибраний таким чином, що він був ендосперм-специфічним, з дуже низькою експресією в інших тканинах. Крім того, вплив на розвиток і морфологію рослин спостерігалися задовго до розвитку насіння.

ПРИКЛАД 5

Вплив інгібування експресії гена GWD у різних генетичних середовищах

Для встановлення дії даунрегуляції гена GWD у різних генетичних середовищах, трансгенні рослини, що містять конструкт pBx17-GWD_{IR}, схрещували з рослинами комерційних сортів пшениці м'якої (хлібопекарської пшениці) Westonia, Hume і Sunstate. Одержували зріле насіння F1. При висіванні цього насіння в оранжереї при контрольованих умовах, F1-рослини з гібридів з кожним із цих трьох комерційних сортів виявляли збільшену кількість вторинних колосків на рослину, див., наприклад, дані на фігурі 8 для 4 або 5 рослин для кожної лінії. Був зроблений висновок, що ці збільшені параметри продуктивності поширювалися на різні генетичні середовища.

Рослини, отримані із цього насіння і з додаткових зворотних схрещувань, будуть додатково аналізуватися описаним вище чином на ріст і розвиток, а також на властивості крохмалю. Схожість насіння і розвиток рослин буде порівнюватись з вихідними рослинами для підтвердження фенотипів, що спостерігаються для трансгенних ліній у генетичному середовищі сорту Bob White. Будуть вимірятися такі характеристики, як час проростання, швидкість ранньої стадії росту і площа листя, крім кількості пагонів, кількості колосків і врожайності. Будуть також проводитися польові випробування для оцінювання продуктивності в полі.

ПРИКЛАД 6

Модулювання експресії GWD

Надекспресія GWD.

Надекспресія GWD у пшениці або інших рослинах вимагає використання кДНК або геномної ДНК, що кодує GWD. Для цього може бути використана повнорозмірна кДНК-послідовність (SEQ ID NO: 2), функціонально приєднана до промотору, що може бути гетерологічним промотором щодо кодуючої області GWD.

Рівні експресії генів, що кодують GWD і PWD у різних тканинах і протягом розвитку рослин

Кількісні аналізи ПЛР із зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) проводять на зразках мРНК, виділених з різних тканин рослин, зокрема, листя і ендосперму, протягом розвитку рослин для вимірювання розподілу експресії генів GWD і PWD. Рівні експресії в листі вимірюють кожні 3 години протягом 24-годинного періоду для з'ясування ролі циркадного ритму в рівнях експресії, як було описано для моделі *C. reinhardtii* (Ral et al., 2005). Варіювання вмісту крохмалю і альфа-амілазної активності також піддають моніторингу в листі для аналізу транзитного метаболізму вуглеводів.

Ендосперми збирали з рослин дикого типу на різних стадіях розвитку і використовували для виділення РНК для дослідження експресії GWD і PWD протягом розвитку ендосперму використовуючи кількісну ЗТ-ПЛР.

Численні генотипи з подібними відносинами амілопектин/амілоза були відібрані на їх конкретні фізико-хімічні властивості. Емпірично відомо, що деякі культивари особливо придатні для випічки і готування стрічкоподібних макаронних виробів. (Chara). Відомо, що деякі культивари гарні для Азіатського пропареного хліба (Baxter), а інші відомі через їх властивості, що дозволяють одержувати хліб з пористою м'якушкою або хліб з липкою м'якушкою (AC Barrie and Alsen).

ПРИКЛАД 7

Модулювання експресії GWD і PWD

Мутація PWD у рисі

Амінокислотну послідовність білка PWD з *Arabidopsis thaliana* (NP_194176) використали як запитовану послідовність для запиту бази даних інерційних мутантів рису Tos17. Три різних лінії Tos17 (NG0294, ND9050_0_701_1A і T29717T) були ідентифіковані, і були отримані насіння цих ліній. Ці мічені геномні послідовності рису (SEQ ID No: 8-10), пов'язані з цими трьома вставками, кожна з яких виявляла гомологію (приблизно 70 % ідентичність) з послідовністю PWD *Arabidopsis*, що вказувало на те, що ці вставки перебували в межах гена PWD.

NG0294

TGCTGGAGCAGCAGTATATGATAGGTTAGAGAAAGTCCGCCATAATTTTT
GTAGTTTGCTCAAGAATTTATTTGGCATTACAATAAGCTGACTGCTTGT
TTCAGTGTCCSTATGGATGAGGAAGATGAAGTCGTA CTCTCGACTACACCAC
AGACCCCTCATACAGATCAGGGATCCAAAAATCAATCCTCTCGAGCAT
TGCACGGGCTGGTCATGCCATTGAGGATTTCTATGGGTCAACACAGGGCA
CAGGATGTTGAGGGTGCAGTGAAGGAAGGGAAGCTATAAGTAGTACAGAC
AAGACCACAAATGTAATCTATATGTATATTTATAGCCAAGTCAATCAGG
AAATGTTGTAGAGTAAGATATACGGGCCGTGGGACATGTATAACACGTTA
TGCTCCTTTTTTTT (SEQ ID NO: 8)

ND9050_0_701_1A

TCTACAAC TACAAC TTTT TAGAATCTGGACCAAAGCTGGACTGTTTGAG
GGAGCTTCTGATTCTGAGAGAAGCTGCAGCAGCTAGAAGCTCCCCCAAAC
AGGCCCTTAGGTAGCTGGTTACAAGTCTGATCACACTGTTTTAGGTTTGT
CTGTTGTTGTATATCAGATAGCTAAATGCATAGCTGTGAGCTAGAGTTGT
GATAAACTGGAAATAGGTCAGGGAACGTCTTTTTTTGCCAAAGTATGGGT
AAAGATAAACTTGGTGAGCTCAGCTGGGGACAAAATCATCAGATTTTGT
TTCTCCCAGCAGAGCAAATAGGGATTTGCCTGTGAGTGCATGCCTGACTT
GTCTGTTGGTCTATGAAATGGGCCGTGAAGTGTGCTTCTATGGGCCTTGT
CACTACTNACCAGGCGGTATTGCAGAGCAGATTTCTTGGCCCATTTTGTCT

CTTTTCTCTCT (SEQ ID NO: 9)

T29717T

CTTGGGAAGACGGTGCGTGTAGATTTGTGCTGAAGAGGGAATGCACGTT
 CGGCCAGAGCTTCCACCTTGTCTGGCGACGACCCGGCGCTCGGCCTCTGGG
 ATCCGTCGAAGGCAGTGCCTTTGGATTGGTCAGAAGGACACGACTGGACT
 GTGGAGAAAGTGAGCCTTGCATCGTGCAGATTGTTTGATGTA CTCTCCTT
 TTGAGGTAATCATCACCCCTTTCTTCTGTACAGGACTTGCCAGCCAACA
 AGTTGATTGAGTACAAGTTCGTGCTGCAAGATTTGTCTGGGCAAGTTGCAT
 TGGCAGAATGGTCGTAATAGAAGCGTACAGACAGGTGAAACTGCAACAT
 TCTAGTCGTATATGAAGATTGGGGTAATGCAAATAGTCAGACAGTAGAAG
 AGGAGGGTAAAGTGTCCATTGGGATGGAGGAGGGTAAATTGTCCGTTGGG
 ATGGAGGAGGCTGTAGTTCCAGATGATAGTGAAAGCAGAG (SEQ ID NO: 10)

Оскільки очікувалося, що ці інсерційні мутації Tos17 є рецесивними, для кожної з них виділяли гомозиготні мутанти. Це вимагало спочатку розробки способу скринінгу для розрізнення гомозигот і гетерозигот для кожної з алелей дикого типу і мутанта для ідентифікації рослин як рослини дикого типу, гетерогенного або гомогенного мутанта. Це виконували в такий спосіб.

Для кожної лінії конструювали і одержували дві пари праймерів, див. нижче. Tos17праймер, використовуваний у кожній Парі праймерів А, мав нуклеотидну послідовність, комплементарну послідовності в елементі Tos17, отже, цей елемент повинен був бути присутнім для того, щоб відбувалася ампліфікація. Таким чином, позитивний результат ПЛР із використанням Пари праймерів А ідентифікував рослину яка має мутантний алель, тоді як негативний результат ПЛР для Пари праймерів А виявляв, що ця рослина є рослиною дикого типу відносно гена PWD. Кожна Пара праймерів В відрізняла мутантні лінії, які були гетерозиготними, від мутантних ліній, які були гомозиготними, і підтверджувала статус диких типів. Кожна пара праймерів В фланкувала сайт вставки Tos17. Негативний результат для Пари праймерів В виявляв рослину, що є гомозиготним мутантом, тому що розмір передвіщеного продукту ампліфікації в присутності Tos17 був таким великим, що не можна було очікувати його ампліфікації. Об'єднання цих двох позитивних результатів ПЛР для обох пар праймерів відрізняло рослину як гетерозиготну у відношенні алелей дикого типу і мутантних алелей.

Мутант Tos17 рису	Пари праймерів А	Пари праймерів В
PWDI	Tos17праймер & Tos17PWDI	HomoGWDfor & Tos17PWDII
PWDII	Tos17праймер & Tos17PWDII	HomoGWDfor & Tos17PWDII
PWDIII	Tos17праймер & Tos17PWDIII	HomoGWDfor & Tos17PWDIII

Праймери	Послідовності від 5' - 3'
Tos17праймер	ATTGTTAGGTTGCAAGTTAGTT (SEQ ID NO: 15)
Tos17PWDI	CTTCCCTTCCTTCACTGCAC (SEQ ID NO: 16)
Tos17PWDII	GCAAGGCTCACTTTCTCCAC (SEQ ID NO: 17)
Tos17PWDIII	TCCATCCCAATGGACACTTT (SEQ ID NO: 18)
HomoPWDfor	TACGACATGGAAGCCG (SEQ ID NO: 19)

З використанням цього способу були ідентифіковані гомозиготні рослини для кожної із цих трьох інсерційних ліній. Насіння із цих рослин аналізували з використанням способів, описаних вище для пшениці, і висівали при контрольованих умовах для дослідження фенотипів рослин. Спостерігали невелике зменшення змісту фосфату крохмалю в одному інсерційному мутанті у порівнянні із сортом дикого типу Nirronbare, але було неясно, чи було зменшення в порівнянні із крохмалем із сегреганта із цієї лінії, позбавленого цієї вставки, внаслідок більших відрізків, що відображують графічно величину помилки, у цих аналізах. Не було значимого розходження у вмісті крохмалю, індексі набрякання, λ max, розподілі довжин ланцюгів або рівні α -амілази в зразках борошна із зерна цих інсерційних ліній у порівнянні із сегрегантами, позбавленими вставки або дикого типу. Ці дані дозволяють припустити, що була тільки слабка дія внаслідок інактивації тільки PWD у рисі. Однак, дані з Baunsgaard et al. (2005) дозволяють припустити, що об'єднання GWD і PWD в *Arabidopsis* виявляє збільшену дію в порівнянні з одним GWD.

Декілька інших інсерційних ліній рису були ідентифіковані в базі даних Origene (<http://orygenesdb.cirad.fr/index.html>), які, очевидно, містять вставки Т-ДНК у гені GWD рису. Вони були наступними:

3A-51160, що відповідає FST A29424

3A-07997, що відповідає FST A16348

2A-40470, що відповідає FST A07158

3A-17981, що відповідає FST A27803

Ці лінії можуть бути отримані з posTECH (Republic of Korea). Крім того, були ідентифіковані дві лінії, які, очевидно, мають вставки в гені SEX4 рису, що кодує фосфорилазу крохмалю: 1B-06142, що відповідає FST A3204, і 2D41347, що відповідає FST D08500. Вони будуть аналізовані відносно вищеописаних властивостей.

ПРИКЛАД 8

Додаткові мутанти в GWD у зернових

Ген-специфічні праймери для генів GWD пшениці

Ген-специфічні праймери конструювали для ампліфікації фрагментів генів GWD специфічно з геномів A, B і D і розрізнення за допомогою цих трьох гомологічних генів у гексаплоїдній пшениці. Це досягалося в такий спосіб. Кілька регіонів інтронів з гена GWD з гексаплоїдній пшениці ампліфікували за допомогою ПЛР і ці фрагменти клонували і секвенували. У більшості випадків, могли бути ідентифіковані три варіанти послідовності, що відповідають генам GWD з геномів A, B і D, але без можливості віднесення кожного варіанта до конкретного геному. Для одержання цього віднесення, ті ж самі ПЛР-реакції проводили також з використанням, як матриці, геномної ДНК із ліній з певними хромосомними делеціями і ампліфіковані фрагменти клонували і секвенували в такий же спосіб. Ці лінії містили гени GWD тільки для двох з геномів, у той час як третій був відсутній. Наприклад, лінія із хромосомною делецією N7At7B була нуль-лінією відносно хромосоми 7A і, отже, була позбавлена гена GWD геному A, але мала 2 копії гена GWD хромосоми 7D і 4 копії гена GWD хромосоми 7B. Таким чином, ампліфікація послідовностей інтронів з делеційних ліній N7AT7B, N7BT7D і N7DT7A уможливила віднесення цих варіантів послідовності до кожного конкретного геному.

П'ятнадцять клонованих фрагментів секвенували з кожної ампліфікації і за допомогою цього ідентифікували унікальні специфічні модифікації генома, які корелювали з геномами A, B і D. Наприклад, заміну C на T спостерігали в делеційній лінії, де був присутній геном A, але не в A-нуль-лінії. Це означає, що цей варіант послідовності GWD з T був специфічним для генома A. Потім такі поліморфізми використали для конструювання специфічних пар праймерів у такий спосіб:

Геном A:

Праймер GWD1For* 5'-GAAACACATAGTCTG-3' (SEQ ID NO: 20)

Праймер IB_GWD2rev 5'-TTGCGGTGCCTTTACC-3' (SEQ ID NO: 21)

Геном B:

Праймер GWD1For*_HTM 5'-GAAAGAAACACATAGTCTG-3' (SEQ ID NO: 22)

Праймер IB_GWD3rev 5'-ATCTGTAAACCTGTCTTGTG-3' (SEQ ID NO: 23)

Геном D:

Праймер GWD2for2 5'-TTGCGGTGCCTTTACC-3' (SEQ ID NO: 24)

Праймер IB_GWD3rev 5'-ATCTGTAAACCTGTCTTGTG-3' (SEQ ID NO: 25)

При використанні цих пар праймерів у ПЛР-реакції з геномною ДНК пшениці з використанням наступних умов проведення циклів ПЛР: 94 °C протягом 5 хв, потім 40 циклів 94 °C протягом 30 сек, 53 °C протягом 30 сек, 72 °C протягом 40 сек, з наступними 72 °C 5 хв, і фракціонуванні цих продуктів гель-електрофорезом, могли бути розрізнені наступні продукти ампліфікації: для гена GWD на A-геномі, спостерігали унікальний фрагмент приблизно 600 п.о., для гена GWD на B-геномі фрагмент приблизно 1000 п.о., тоді як для гена GWD на D-геномі, фрагмент приблизно 500 п.о. Ці три ПЛР-реакції могли поєднуватися в єдину мультиплексну ПЛР-реакцію з використанням всіх трьох пар праймерів, для можливості високопродуктивного скринінгу мутагенізованого насіння і популяцій рослин.

При використанні цих ПЛР-реакцій на делеційних лініях пшениці з більше обмеженими, певними хромосомними делеціями, позбавленими специфічних хромосомних сегментів, відсутність ампліфікованих продуктів з деяких делеційних ліній вказувало на те, що гени GWD у пшениці були розташовані на кінці короткого плеча хромосоми 7, тобто хромосоми 7S.

Мутація гена GWD у пшениці

Насіння пшениці культивара Chara мутагенізували бомбардуванням важкими іонами за способом по суті таким ж, які описані Shitsukawa et al., Genes Genet. Syst. 82:167-170 (2007). Це мутагенізоване насіння вирощували з одержанням рослин M1 і насіння, отримане з окремих рослин, збирали і підтримували із забезпеченням 8000 окремих мутагенізованих ліній.

Ці 8000 ліній піддавали скринінгу з використанням ген-специфічних пар праймерів, описаних вище, для ідентифікації мутантів, позбавлених кожного із трьох генів GWD. Були ідентифіковані два мутанти, позбавлені сегмента гена, що відповідає гену GWD B-геному, і був ідентифікований один мутант, позбавлений сегмента гена GWD D-геному. Ці мутантні рослини,

які приблизно є нуль-мутантами генів GWD, вирощували в оранжереї, і вони були, очевидно, фенотипічно нормальними. Ці рослини схрещували з одержанням подвійних мутантів, позбавлених генів GWD як В-, так і D-геномів.

Додаткові мутагенізовані лінії випробовуються для ідентифікації нуль-мутантів відносно гена GWD на А-геномі. При ідентифікації, такі рослини можуть схрещуватися з подвійним мутантом В- і D-геному з одержанням потрібного мутанта в кожному з А, В- і D-геномів.

Кваліфікованим у даній області фахівцем буде зрозуміло, що описаний тут винахід може бути піддано варіаціям і модифікаціям, іншим ніж варіації і модифікації, описані тут. Повинно бути зрозуміло, що цей винахід містить у собі всі такі варіації і модифікації. Цей винахід містить у собі також всі стадії, ознаки, композиції і сполуки, на які робляться посилання або вказівки в цьому описі, окремо або в сукупності, і будь-які і всі комбінації будь-яких двох або більше зазначених стадій або ознак.

Таблиця 1

Підсумовування ідентифікаторів послідовностей

Послідовність ID NO:	ОПИС
1	Генетична послідовність пшениці, що відповідає R1(картоплі) і PWD (Arabidopsis)
2	кДНК GWD пшениці
3	Амінокислотна послідовність, що кодується SEQ ID NO: 2
4	EST GWD ячменя
5	кДНК GWD-подібних генів пшениці
6	Прямий праймер для гена GWD
7	Зворотний праймер для гена GWD
8	Часткові інсерційні послідовності PWD рису
9	Часткові інсерційні послідовності PWD рису
10	Часткові інсерційні послідовності PWD рису
11	EST гена GWD copro (Accession No BI245998)
12	EST гена GWD copro (Accession No CF074015)
13	EST гена GWD copro (Accession No EH406623)
14	EST гена GWD copro (Accession No CD423248)
15	Праймер для гена PWD рису
16	Праймер для гена PWD рису
17	Праймер для гена PWD рису
18	Праймер для гена PWD рису
19	Праймер для гена PWD рису
20	Праймер для гена GWD пшениці
21	Праймер для гена GWD пшениці
22	Праймер для гена GWD пшениці
23	Праймер для гена GWD пшениці
24	Праймер для гена GWD пшениці
25	Праймер для гена GWD пшениці

Таблиця 2

Класифікація амінокислот	
Підкласи	Амінокислоти
Кислі	Аспарагінова кислота, Глутамінова кислота
Лужні	Нециклічні: Аргінін, Лізин; Циклічна: Гістидин
Заряджені	Аспарагінова кислота, Глутамінова кислота, Аргінін, Лізин, Гістидин
Малі	Гліцин, Серин, Аланін, Треонін, Пролін
Полярні/нейтральні	Аспарагін, Гістидин, Глутамін, Цистеїн, Серин, Треонін
Полярні/великі	Аспарагін, Глутамін
Гідрофобні	Тирозин, Валін, Ізолейцин, Лейцин, Метіонін, Фенілаланін, Триптофан
Ароматичні	Триптофан, Тирозин, Фенілаланін
Залишки, що впливають на орієнтацію ланцюга	Гліцин і Пролін

Таблиця 3

Зразкові і переважні амінокислотні заміни

Оригінальний залишок	Зразкові заміни	Переважні заміни
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

Таблиця 4

	Пік	Запа- дина	Розщеп- лення	Кінцева в'язкість	Зворот- ний хід	Час піка	Темпе- ратура пасту-вання
BW26 (батько)	398,92	176,25	222,67	401,67	225,42	8,53	78,45
rsGWD1-1H (контроль)	429,67	181,92	247,75	427,58	245,67	8,47	65,45
rsGWD1-1G	365,17	167,25	197,92	340,25	173	8,53	81,45
rsGWD3-1L (контроль)	410,67	198,75	211,92	402,5	203,75	8,53	68,95
rsGWD3-1A	330,5	179,67	150,83	378,08	198,42	8,6	78,9
rsGWD4-1 (контроль)	425,5	166,33	259,17	365,58	199,25	8,47	66
rsGWD4-1T	355,42	191,58	163,83	381,67	190,08	8,53	81,4
rsGWD4-1Q	365,17	167,25	197,92	340,25	173	8,53	81,45
rsGWD5-9A (контроль)	411,42	199	212,42	406,25	207,25	8,6	77,4
rsGWD5-9X	412,25	197,83	214,42	400,33	202,5	8,6	78,35

Таблиця 5

Параметри насіння для насіння T2 з трансгенних і контрольних (wt) рослин

	Маса насіння (мг)		Продукція насіння
	Середнє	стандартне відхилення	(г на рослину)
BW26 (вихідна рослина)	37,54	2,52	16
GWD1-1 H (wt)	41,98	2,71	12
GWD1-1 F	46,45	6,68	27,5
GWD1-1 G	45,10	3,60	25
GWD3-1 L (wt)	44,00	3,96	14
GWD3-1 A	46,71	3,90	27,5
GWD3-1 C	46,13	4,57	24
GWD3-1 D	44,81	3,26	20
GWD4-1 E (wt)	46,51	3,76	
GWD4-1 A	44,64	5,67	18,5
GWD4-1 P	42,20	3,65	
GWD4-1 Q	49,89	3,22	20
GWD4-1 T	60,30	2,14	
GWD5-9 A (wt)	43,83	4,90	10
GWD5-9 X	45,58	5,03	24

Таблиця 6

	Площа листа (см ²)		Колосся	Продукція насіння		Маса насіння	Вміст крохмалю
	стадія 2 листів	стадія 4 листів	г на рослину	г на рослину	г на колосся	(г 100 насінин)	(%)
BW26 (батько)	4,4±0,4	48,4±6,9	5,8±1,9	9,0±2,1	1,3±0,2	3,4±0,4	64,4±2,6
rsGWD 1-1G	6,5±1,1	76,8±10,2	9,8±1,48	15,3±2,7	1,8±0,2	4,9±0,3	59,6±2,4
rsGWD 3-1A	6,6±0,4	82,0±5,6	8,2±1,64	11,5±3,7	1,7±0,2	4,6±0,3	65,6±3,4
rsGWD 3-1C	7,9±1,0	87,8±6,7	8,4±1,67	11,9±1,5	1,6±0,2	4,8±0,3	67,4±4,8
rsGWD 4-1A	6,4±1,3	77,9±13,8	8±1,22	10,6±2	1,6±0,1	4,3±0,2	66,2±3,5
rsGWD 5-9X	7,1±0,5	82,9±12,6	8,2±1,48	12,7±2,8	1,7±0,1	4,5±0,2	65,7±3,9
rsGWD 5-9A (ctrl)	4,8±0,6	58,2±4,5	7,2±1,5	10,9±1	1,5±0,1	4,0±0,2	67,9±2,3
rsGWD 3-1L (контроль)	5,1±0,5	59,9±5,6	7,2±0,83	9,9±1,4	1,3±0,1	3,9±0,1	63,9±1,6

Таблиця 7

Структура екзон/інтрон гена GWD пшениці в порівнянні з геном рису

Номер екзону пшениці	Екзон пшениці		Розмір екзону пшениці	Положення екзону рису		Номер інтрону рису	Розмір інтрону рису
	від nt	до nt		від nt	до nt		
			(п.о.)				(п.о.)
Екзон 1	1	328	328	1713	2032	Інtron 1	89
Екзон 2	342	417	76	2122	2197	Інtron 2	114
Екзон 3	434	527	94	2312	2405	Інtron 3	81
Екзон 4	531	670	140	2487	2626	Інtron 4	590
Екзон 5	662	761	100	3217	3316	Інtron 5	78
Екзон 6	758	903	146	3395	3540	Інtron 6	229
Екзон 7	896	1059	164	3770	3933	Інtron 7	86
Екзон 8	1058	1150	93	4020	4112	Інtron 8	91
Екзон 9	1157	1336	180	4204	4383	Інtron 9	943
Екзон 10	1334	1399	66	5327	5392	Інtron 10	73
Екзон 11	1397	1462	66	5466	5531	Інtron 11	83
Екзон 12	1465	1522	58	5615	5672	Інtron 12	212
Екзон 13	1520	1674	155	5885	6039	Інtron 13	117
Екзон 14	1673	1759	87	6157	6243	Інtron 14	816
Екзон 15	1756	1934	179	7060	7238	Інtron 15	81
Екзон 16	1942	2042	101	7320	7420	Інtron 16	64
Екзон 17	2041	2258	218	7485	7702	Інtron 17	81
Екзон 18	2254	2361	108	7784	7891	Інtron 18	683
Екзон 19	2384	2501	118	8575	8692	Інtron 19	126
Екзон 20	2499	2626	128	8819	8946	Інtron 20	362
Екзон 21	2624	2738	115	9309	9423	Інtron 21	176
Екзон 22	2740	2837	98	9600	9697	Інtron 22	296
Екзон 23	2834	3105	272	9994	10265	Інtron 23	68
Екзон 24	3101	3218	118	10334	10451	Інtron 24	79
Екзон 25	3217	3435	219	10531	10749		

Бібліографія

- Abel et al., The Plant Journal 10: 981-991, 1996
- 5 Adams et al., Anal. Biochem., 266: 77-84, 1999
- Almeida and Allshire, Trends Cell Biol 15: 251-258, 2005
- Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25: 3389, 1997
- An, Methods in Enzymology, 153: 292, 1987
- Ausubel (Ed) Current Protocols in Molecular Biology, 5th Edition, John Wiley & Sons, Inc, NY,
- 10 2002
- Ausubel et al. eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1990
- Ausubel et al., (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 6.3.1-6.3.6., 1989
- Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons Inc, Chapter 15, 1994-
- 15 1998
- Baba et al., Biochem Biophys Res Commun 181: 87-94, 1991
- Banks et al. Starch/die Stärke, 23: 118-124, 1971
- Barker et al., Plant Mol. Biol., 2: 235-350, 1983
- Batey et al., J. Sci. Food Agric. 74: 503-508, 1997
- 20 Baunsgaard et al., The Plant Journal 41, 595-605, 2005
- Bechtold et al., C.R. Acad. Sci. Paris, 316: 1194, 1993
- Bevan et al., Nucl. Acid Res., 11: 369, 1983
- Birch, Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48: 297-326, 1997
- Blennow et al., Int. J. Biol. Macromol. 27: 211-218, 2000a
- 25 Blennow et al., Carbohydr. Polym. 41: 163-174, 2000b
- Bonner et al., Eur. J. Biochem., 46:83, 1974

- Bourque Plant Sci. 105: 125-149, 1995
- Bower et al., Molec. Breed., 2: 239-249, 1996
- Boyer and Preiss, Carbohydrate Research 61: 321-334, 1978
- Buléon et al., International Journal of Biological Macromolecules, 23: 85-112, 1998
- 5 Cao et al. Plant Cell Reporter, 11: 586-591, 1992
- Cao et al., Archives. of Biochemistry and Biophysics. 373: 135-146, 2000
- Chamberlain et al., Aust. J. Plant Physiol., 21:95-112, 1994
- Christensen et al., Transgen. Res., 5: 213-218. 1996
- Comai et al., Plant J 37: 778-786, 2004
- 10 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
- Dellaporta et al., in Chromosome Structure and Function, pp. 263-282, 1988
- 15 Delrue et al., Journal of Bacteriology, 174: 3612-3620, 1992
- Delvalle et al., Plant J 43: 398-412, 2005
- Denyer et al., Plant Physiology 112: 779-785, 1996
- Eagles et al., Aust. J. Agric. Res. 52:1 349-1356, 2001
- Ehrlich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 1433, 1978
- 20 Ekman and Jager, Anal Biochem 214: 138-141, 1993
- Erickson et al., Science, 249: 527-533, 1990
- Ferguson, Speciality Corns eds, CRC Press Inc. pp 55-77, 1994
- Fisher et al., Plant Physiol 102: 1045-1046, 1993
- Fromm et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A, 82: 5824, 1985
- 25 Gao et al., Plant Physiol 114: 69-78, 1997
- Gao et al., Plant Cell 10: 399-412, 1998
- Garfinkel et al., Cell, 27: 143-153, 1983
- Gordon-Kamm, Plant Cell, 2: 603-618, 1990
- Greve, Mol. Appl. Genet., 1: 499-511, 1983
- 30 Harayama, Trends Biotechnol 16: 76-82, 1998
- Hartmann and Endres, Manual of Antisense Methodology, Kluwer, 1999
- Haseloff and Gerlach, Nature 334: 585-591, 1988
- Hedman and Boyer, Biochemical Genetics 20: 483-492, 1982
- Hendrix et al., J. Insect Physiol., 47: 423-432, 2001
- 35 Henikoff et al., Plant Physiol 135: 630-636, 2004
- Hinchee et al., Biotech., 6: 915, 1988
- Hodgson, Bio/Technology, 9: 19-21, 1991
- Hoekema et al., Nature, 303: 179, 1983
- Horsch et al., Science, 227: 1229, 1985
- 40 Ikuta et al., Biotech., 8: 241, 1990
- James et al., Plant Cell 7: 417-429, 1995
- Jobling et al., Plant Journal 18: 163-171, 1999
- Joshi, Nucl. Acid Res., 15: 6643, 1987
- Katz et al., J. Gen. Microbiol., 129: 2703, 1983
- 45 Klee et al., Annual Review of Plant Physiology, 38: 467, 1987
- Klein et al., Nature 327: 70, 1987
- Konik-Rose et al., Starch/die Stärke 53: 14-20, 2001
- Kotting et al., Plant Physiology 137 pp 242-252, 2005
- Kubo et al., Plant physiology. 121: 399-409, 1999
- 50 Kurrek, Eur. J. Biochem., 270: 1628-1644, 2003
- Langridge et al., Aust. J. Agric. Res. 52: 1043-1077, 2001
- Lee, Plant Mol. Biol., 13: 21-30, 1989
- Lemieux, Current Genomics 1: 301-311, 2000
- Li et al., Plant Physiology 123: 613-624, 2000
- 55 Li et al., Plant physiology. 120: 1147-1155, 1999a
- Li et al., Theoretical and Applied Genetics 98: 1208-1216, 1999b
- Li et al., Funct Integr Genomics 3: 76-85, 2003
- Liu et al., J. Am. Chem. Soc. 118: 1587-1594, 1996
- Lorberth et al., Nat. Biotechnol. 16: 473-477, 1998
- 60 Maas et al., Mol Breeding, 3: 15-28, 1997

- Marmur et al., *J. Mol. Biol.*, 5: 109, 1962
 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
 5 Millar and Waterhouse, *Funct Integr Genomics* 5: 129-135, 2005
 Mizuno et al., *Journal of Biochemistry* 112: 643-651, 1992
 Morrison and Laignelet, *Journal of Cereal Science* 1: 9-20, 1983
 Myers et al., *Plant Physiology* 122: 989-997, 2000
 Nair et al., *Plant Sci* 122: 153-163, 1997
 10 Nakamura and Yamanouchi, *Plant Physiol* 99: 1265-1266, 1992
 Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453, 1970
 Niedz et al., *Plant Cell Reports*, 14: 403, 1995
 Ow et al., *Science*, 234: 856, 1986
 Pasquinelli et al., *Curr Opin Genet Develop* 15: 200-205, 2005
 15 Perriman et al., *Gene* 113: 157-163, 1992
 Plasterk et al., *Current Opinion in Genetics and Dev.*, 10: 562-67, 2000
 Potrykus et al., *Mol. Gen. Genet.*, 199: 183, 1985
 Prasher et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 126: 1259, 1985
 Rahman et al., *Genome* 40: 465-474, 1997
 20 Ral et al., *Plant Phys.* 142: 305-317, 2006
 Reddy et al., *Theor. Appl. Genet.*, 85: 616-624, 1993
 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing, Company, Easton, PA, U.S.A.,
 1990
 Repellin et al., *Plant Gene Reg* pp. 97-094, 1997
 25 Ritte et al., *FEBS* pp. 4872-4876, 2006
 Robinson, *The Organic Constituents of Higher Plants*, Cordus Press, North Amherst, USA, 1980
 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
 30 Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition, CSHLP, CSH, NY, 2001
 Schulman and Kammiovirta, *Starch* 43: 387-389, 1991
 Schwall et al., *Nature Biotechnol.* 18: 551-554, 2000
 Senior, *Biotech. Genet. Engin. Revs.* 15: 79-119, 1998
 Sharp et al., *Aust J Agric Res* 52: 1357-1366, 2001
 35 Shimamoto et al., *Nature* 338: 274-276, 1989
 Shippy et al., *Mol. Biotech.* 12: 117-129, 1999
 Shitsukawa et al., *Genes Genet. Syst.* 82: 167-170, 2007
 Slade and Knauf, *Transgenic Res* 14: 109-115, 2005
 Smith et al., *Nature* 407: 319-320, 2000
 40 Sooknanan et al., *Biotechniques* 17: 1077-1080, 1994
 Stalker et al., *Science*, 242: 419, 1988
 Summerton et al., *Antisense and Nucleic acid Drug Development*, 7: 187-195, 1997
 Sun et al., *The New Phytologist* 137: 215-215, 1997
 Sutcliffe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 3737,
 45 Takeda et al., *Carbohydrate Research* 240: 253-262, 1993a
 Takeda et al., *Carbohydrate Research* 246: 273-281, 1993b
 Thillet et al., *J. Biol. Chem.*, 263: 12500, 1988
 Thompson et al., *Carbohydrate Res.*, 331: 149-161, 2001
 Thorbjornsen et al., *Plant Journal* 10: 243-250, 1996
 50 Tingay et al., *Plant J.* 11: 1369-1376, 1997
 Tyagi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 5395-5400, 1996
 Vain et al., *Plant Cell Reporter*, 12:84-88, 1993
 Vasil, *Bio/Technol.* 8: 429-434, 1990
 Veronese et al., *Enz. Microbial Tech.*, 24: 263-269, 1999
 55 Viksø-Nielsen et al., *Biomacromolecules* 3: 836-841, 2001
 Viksø-Nielsen et al., *Carbohydr. Res.* 337, pp. 327-333, 2001
 Vogel et al., *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook: Principles, Process Design,
 and Equipment*, Noyes Publications, Park Ridge, N.J., USA, 1996
 Wan and Lemaux, *Plant Physiol.* 104: 37-48, 1994
 60 Waterhouse et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13959-13964, 1998

- Wells, Methods Enzymol., 202: 2699-2705, 1991
Yu et al., Plant Cell 13: 1907-1918, 2001
Zeeman et al., New Phytologist 163: 247-261, 2004. Zeeman et al., Plant Journal 15: 357-365,
1998
5 Zukowsky et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 1101, 1983. Zwar and Chandler, Planta 197: 39-
48, 1995.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Коммонвелт Сайнтифік Енд Індастріал Рісерч Організаційн
 Грейнс Рісерч Енд Дівелопмент Корпорейшн
 Радь, Жан-Філіпп Франсуа Мішель
 Морелла, Метью Кеннеді
 Лі, Жонг'ї

<120> Рослини з модифікованим метаболізмом крохмалю

<130> 30691137/JEN/DXT

<150> AU 2007906467
 <151> 2007-11-27

<160> 25

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
 <211> 2273
 <212> ДНК
 <213> Triticum aestivum

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (324)..(324)
 <223> n c a, c, g a b o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (771)..(775)
 <223> n c a, c, g a b o t

<400> 1
 ggtgaagggtt tcatggttgg tgttcaaate aacccgggtga atggttttate atctggtttt 60
 cctgatttgc ttcaatttgt gcttgaccat gttgaggata aatcagcaga gccactttctt 120
 gaggggttat tggaggctcg tgttgaaacta cgccttttgc tcattggctc atctgaacgc 180
 ttgaaggata ttatcttttt ggacattgct cttgattcta ctttcaggac agcagttgaa 240
 aggtcgtatg aggagctgaa tgatgcagca ccggagaaaa ttatgtactt catcagtctt 300
 gttcttgaaa atcttgcctt gtcnactgac gacaacgaag acatcttata ttgcttaaag 360
 ggatggaate gagccatgga catggttaag caaaaggatg accaatgggc cctctacgct 420
 aaagcatttc ttgacagAAC cagacttgcc cttgcgagca agggcgaaca atactacaat 480
 atgatgcage cctcggttga atatcttggc tcattactca acgttgagga atgggcagtt 540
 gacatcttca cagaagaagt aattcgtggc ggatcagcta ccactttatc tgctcttcg 600
 aaccgatttg accctgttct cagaaatgtc gcacaccttg gaagttggca ggtratttagc 660
 ccagttgaag taacaggtta tattgtagtg gttgataagt tgccttctgt tcaaaacaaa 720
 acttatgata aaccaacaat ccttgtggca aagagtgtca agggagagga nnnntacca 780
 gatggtgttg ttggcgtgat aacacctgat atgccagatg ttctgtctca tgtgtcagtt 840

cgagcaagga attgcaaggt gttgttttgcg acatgctttg acctgaacat cctgtctgaa 900
 cttcaaggac atgaagggaa ggtgtttttcc ttcaaaacta cttctgcaga tgtcacctac 960
 agggaggtat cggacagtga actttcaatt tcttcagatg cacaaggtgg tgaagcaata 1020
 ccatctttat cattagtcac gaaaaagttc ctccgaaaaat atgcaatata agcgggaagag 1080
 ttctctgatg aaatggttgg agcaaaagtc ccgaacatag catacctgaa aggaaaagta 1140
 ccttcattggg ttggtatccc aacatcagtt gccataccat ttgggacctt tgagaagata 1200
 ttgtctgatg agaccaataa ggaagtagca caaacacatac agatgctgaa gggcagaactt 1260
 gctcaagaag attttagtgc tctaggagaa atccggaaaa ctgttcttaa tctaactgct 1320
 ccaactcaac cgggttaagga gctgaaggag aagatgctaa gctccggaat gccctggcct 1380
 ggagatgaaa gtgaccaccg ttgggagcaa gcattggatgg caattaaaaa ggtttgggca 1440
 tcaaaaatgga atgaaagagc atactttagt acacgcaagg tgaagctcga tcacgagtac 1500
 ctttccatgg ctgttcttgt acaagaaatt gtcaacgcag actatgcctt tgtcattcat 1560
 actacgaacc cgtcatctgg agattcttct gagatatatg ctgaagtggg gaaaggactt 1620
 ggagagacac ttgtgggagc ttatcctggc cgtgccatga gcttcgtgtg taagaaaagt 1680
 gaccttgact ctcccaaggt actgggttac cctagcaagc caattggctt ctccataaag 1740
 cggctcaatca tcttccgctc agactctaat ggtgaggatc tggaaaggta cgtcggagca 1800
 gggctgtatg atagtgtccc tatggatgtg gaagatgaag ttgtactcga ctacacgacc 1860
 gacctctca tcactgactc tggattccgg agctcaatcc tctcaagcat tgcacgggct 1920
 ggccacgcca ttgaggagct ctatgggtca ccgcaggatg ttgagggagt agtgaaggat 1980
 ggggaagatct acgtagtcca gacaagacca cagatgtaat atgtatgtat aggcagctca 2040
 agctgtagag tagtaggata tgtgggtctt gctggcatgt atagccctac tcatagatgc 2100
 acaacaaatc tacgttgcta tttatttgca taccgctca gaataagctt tgatcacata 2160
 ctgtatttcc tagagtacca gaacagtat gcacgatcag gaatatgacc ttattaaaaa 2220
 catcggggga gaacgttttg agcaatctat atttacagt gccctataa tgc 2273

<210> 2
 <211> 3677
 <212> RRR
 <213> Triticum aestivum

<400> 2
 ggaagaagga aggaactgca ggctgagttg gataatggag cctcagttga tcaattaagg 60
 aagaaaattg tgaagggaaa ccttgaaaag aaagttrcca agcaactgga gaagaagaag 120
 tacttctcag tagaaaggat tcagcgcaga aacagagata tcacgcaact tcttaataaa 180
 cataagcctg tggttacaga acagcaagta aaagctgcac ccaaacagcc aactgttttg 240

gatctcttca caaagtcctt gcaagagggg gataactgtg acgtcctaag caggaagctt 300
ttcaagatcg gtgatgagga gatactggca attgccacaa atgctctagg taaaaccaga 360
gttcacttgg caacaaaccg tatggagcca ctattcttcc actgggcact ggcaaaaaat 420
cccggagaat gggagggccc tcttctagc atagtgcctt ctggctcaac agttctcgac 480
aaggcatgtg aaacttcatt cggtgagctt gaattggatg gtttgcaata ccaggttgtt 540
gagatagagc ttgatgacgg cagatacaag gggatgcctt ttgttctcgg gcgtggtgaa 600
acatggataa agaacaacga ctctgacttc tatttggatt tcaacaccaa agttaccaag 660
aaatcaaagg atacgggtga tgccggtaaa ggcaccgcaa aggatttctt ggaaagaata 720
gcagatctgg aggaagatgc ccagcgatct tttatgcaca gatctaatat tgcggcggat 780
ctagttgacc aagccagaga tcttggaacta ttgggtatcg ttggactttt tgtttggatt 840
agattcatgt ctaccaggca actaatatgg aacaagaact acaatgtgaa accacgtgag 900
ataagccaag cacaagacag gtttacagat gaccttgaga atatgtacaa aagtnacca 960
cagtacagag agatcttaag aatgttatcg tctgctgttg gcgtgaggg tgaaggatg 1020
gttggtcagc gtatccgtga tgagatatta gtaatccaga gaaataatga ctgcaaaagt 1080
ggaattatgg aagaatggca ccagaaactg cacaacaata caagcccaga tgatgtagtc 1140
atatgccagg cgataattga ttatatcaag agcgatttcc atatcaacgt tctctgggac 1200
acctgaaca aaaatggcat aaccaaagaa cgactgttga gctatgatcg tgcaattcat 1260
tcagaaccaa aattcaggag tgaccagaaa gagggggtac tccgtgattt gggcaactat 1320
atgagaagcc tgaaggctgt gcactctggt gctgatcttg agtctgctat tgcgacatgt 1380
atgggataca aatcagaggg tgaaggtttc atgggtgggt ttcaaatcaa cccggtgaat 1440
ggtttateat cgggttttcc tgatttgctt caatttgtgc ttgacctgt tgaggataaa 1500
tcagcagagc cacttcttga ggggttattg gaggtcgtg ttgaactacg cctttgtctc 1560
actggctcat ctgaacgctt gaaggatctt atctttttgg acattgctct tgattctact 1620
ttcaggacag cagttgaaag gtctgtatgag gagctgaatg atgcagcacc ggagaaaatt 1680
atgtacttca tcagtcctgt tcttgaaaat cttgccttgt ccactgacga caacgaagac 1740
atcttatatt gcttaaaggg atggaatcga gccatggaca tggttaagca aaaggatgac 1800
caatgggctc tctacgctaa agcatttctt gacagaacca gacttgcctt tgcgagcaag 1860
ggcgaacaat actacaatat gatgcagccc tgggtgaat atcttggctc attactcaac 1920
gttgaggaat gggctgttga catcttccaa gaagaagtaa ctgctgggtg atcagctgac 1980
actttatctg ctcttctgaa ccgatttgac cctgttctca gaaatgtcgc acaccttgga 2040
agttggcagg ttattagccc agttgaagta acaggttata ttgtagtggg tgataagttg 2100

```

ctttctgttc aaaacaaaac ttatgataaa ccaacaatcc ttgtggcaaa gagtgtcaag 2160
ggagaggaag aaataccaga tgggtgttgtt ggggtgataa cacctgarat gccagatgtt 2220
ctgtctcatg tgtcagttcg agcaagggaat tgcaagggtgt tgtttgcgac atgctttgac 2280
ccgaataccc tgtctgaatt tcaaggacat gaagggaagg tgttttcctt caaaactact 2340
tctgcagatg tcaactacag ggagggtatcg gacagtgaac ttatgcagtc aagtcttcca 2400
gatgcacaag gtggtgaagc aataccatct ttatcattag tcaagaaaaa gttccttggg 2460
aaatatgcaa tatcagcggg agagttctct gatgaaatgg ttggagcaaa gtcccgcac 2520
atagcatacc tgaagggaag agtaccttca tgggttggtg tcccaacatc agttgcgata 2580
ccatttggga cctttgagaa gatatttgtt gatgagacca ataagggaagt agcacaaaa 2640
atacagatgc tgaagggcag acttgcctcaa gaagatttta gtgctctagg agaaatccgg 2700
aaaactgttc ttaatetaac tgcctcaact caaccggtta aggagctgaa ggagaagatg 2760
ctaagctccg gaatgccctg gcttggagat gaaagtgaac accgttggga gcaagcatgg 2820
atggcaatta aaaaggtttg ggcataaaaa tggaaatgaaa gagcatactt tagtacacgc 2880
aagggtgaagc tcgatcatga gtaectttcc atggtgttcc ttgtacaaga aattgtcaac 2940
gcagactatg cctttgtcat tcatactacg aaccgcctat ctggagatcc ttctgagata 3000
tatgttgaag tggtgaaagg acttggagag acacttgttg gagcttatec tggccgtgcc 3060
atgagcttcg tgtgtaagaa agatgacctt gactctccca aggtactggg ttaccttagc 3120
aagccaatrg gtctcttcat aaagcgggtca atcatcttcc gctcagactc taatggtgag 3180
gatctggaag gttacgctgg agcagggctg tatgatagtg tccctatgga tgtggaagat 3240
gaagttgtac tcgactacac gaccgacctt ctcactactg actctggatt ccggaactca 3300
atcctctcaa gcattgcagc ggctggccac gccatcgagg agctctatgg gtccacacag 3360
gatgttgagg gagttagtga ggatgggaag atctacgtag tccagacatg accacagatg 3420
taatatgtat gtatacggg ctcaagttgt agagttagtg gatatgtggt ccttgcctggc 3480
atgtatagtt ctactcatag atgcacaaca catctacgtt gttatttatt tgcataatcg 3540
ctcagaataa gctttgatca cactctgtat ttcttagagt accagaacat gtatgcacga 3600
tcaggaatat gacctatta aaaacatcgg gggagaacgt tttagcaat ctatatttac 3660
acgtgcccc ataagt 3677

```

```

<210> 3
<211> 1009
<212> FRT
<213> Triticum aestivum

<400> 3

```

Met Glu Pro Leu Ile Leu His Trp Ala Leu Ala Lys Asn Pro Gly Gln
1 5 10 15

Trp Glu Ala Pro Pro Ser Ser Ile Val Pro Ser Gly Ser Thr Val Leu
20 25 30

Asp Lys Ala Cys Glu Thr Ser Phe Gly Glu Ser Glu Leu Asp Gly Leu
35 40 45

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

Met Pro Phe Val Leu Arg Arg Gly Glu Thr Trp Ile Lys Asn Asn Asp
65 70 75 80

Ser Asp Phe Tyr Leu Asp Phe Asn Thr Lys Val Thr Lys Lys Ser Lys
85 90 95

Asp Thr Gly Asp Ala Gly Lys Gly Thr Ala Lys Asp Phe Leu Glu Arg
100 105 110

Ile Ala Asp Leu Glu Glu Asp Ala Gln Arg Ser Phe Met His Arg Phe
115 120 125

Asn Ile Ala Ala Asp Leu Val Asp Gln Ala Arg Asp Ala Gly Leu Leu
130 135 140

Gly Ile Val Gly Leu Phe Val Trp Ile Arg Phe Met Ser Thr Arg Gln
145 150 155 160

Leu Ile Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser Gln
165 170 175

Ala Gln Asp Arg Phe Thr Asp Asp Leu Glu Asn Met Tyr Lys Ser Tyr
180 185 190

Pro Gln Tyr Arg Glu Ile Leu Arg Met Leu Leu Ser Ala Val Gly Arg
195 200 205

Gly Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu Val
210 215 220

Ile Gln Arg Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Ile Met Glu Glu Trp His
225 230 235 240

Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Val Ile Cys Gln
245 250 255

Ala Ile Ile Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Ile Asn Val Tyr Trp
260 265 270

Asp Thr Leu Asn Lys Asn Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser Tyr
275 280 285

Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Lys Phe Arg Ser Asp Gln Lys Glu
290 295 300

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

His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala Thr Cys Met Gly Tyr
325 330 335

Lys Ser Glu Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn Pro Val
340 345 350

Asn Gly Leu Ser Ser Gly Phe Pro Asp Leu Leu Gln Phe Val Leu Asp
355 360 365

His Val Glu Asp Lys Ser Ala Glu Pro Leu Leu Glu Gly Leu Leu Glu
370 375 380

Ala Arg Val Glu Leu Arg Pro Leu Leu Thr Gly Ser Ser Glu Arg Leu
385 390 395 400

Lys Asp Leu Ile Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp Ser Thr Phe Arg Thr
405 410 415

Ala Val Glu Arg Ser Tyr Glu Glu Leu Asn Asp Ala Ala Pro Glu Lys
420 425 430

Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser Thr
435 440 445

Asp Asp Asn Glu Asp Ile Leu Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asn Arg Ala
450 455 460

Met Asp Met Val Lys Glu Lys Asp Asp Gln Trp Ala Leu Tyr Ala Lys
465 470 475 480

Ala Phe Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala Ser Lys Gly Glu Gln
485 490 495

Tyr Tyr Asn Met Met Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Leu Leu
500 505 510

Asn Val Glu Glu Trp Ala Val Asp Ile Phe Thr Glu Glu Val Ile Arg
 515 520 525
 Gly Gly Ser Ala Ala Thr Leu Ser Ala Leu Leu Asn Arg Phe Asp Pro
 530 535 540
 Val Leu Arg Asn Val Ala His Leu Gly Ser Trp Gln Val Ile Ser Pro
 545 550 555 560
 Val Glu Val Thr Gly Tyr Ile Val Val Val Asp Lys Leu Leu Ser Val
 565 570 575
 Gln Asn Lys Thr Tyr Asp Lys Pro Thr Ile Leu Val Ala Lys Ser Val
 580 585 590
 Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Val Val Gly Val Ile Thr Pro
 595 600 605
 Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg Asn Cys
 610 615 620
 Lys Val Leu Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Thr Leu Ser Glu Phe
 625 630 635 640
 Gln Gly His Glu Gly Lys Val Phe Ser Phe Lys Thr Thr Ser Ala Asp
 645 650 655
 Val Thr Tyr Arg Glu Val Ser Asp Ser Glu Leu Met Gln Ser Ser Ser
 660 665 670
 Ser Asp Ala Gln Gly Gly Glu Ala Ile Pro Ser Leu Ser Leu Val Lys
 675 680 685
 Lys Lys Phe Leu Gly Lys Tyr Ala Ile Ser Ala Glu Glu Phe Ser Asp
 690 695 700
 Glu Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu Lys Gly Lys
 705 710 715 720
 Val Pro Ser Trp Val Gly Ile Pro Thr Ser Val Ala Ile Pro Phe Gly
 725 730 735
 Thr Phe Glu Lys Ile Leu Ser Asp Glu Thr Asn Lys Glu Val Ala Gln
 740 745 750

Asn	Ile	Gln	Met	Leu	Lys	Gly	Arg	Leu	Ala	Gln	Glu	Asp	Phe	Ser	Ala		
		755					760					765					
Leu	Gly	Glu	Ile	Arg	Lys	Thr	Val	Leu	Asn	Leu	Thr	Ala	Pro	Thr	Gln		
	770					775					780						
Pro	Val	Lys	Glu	Leu	Lys	Glu	Lys	Met	Leu	Ser	Ser	Gly	Met	Pro	Trp		
	785				790					795					800		
Pro	Gly	Asp	Glu	Ser	Asp	His	Arg	Trp	Gln	Gln	Ala	Trp	Met	Ala	Ile		
				805					810					815			
Lys	Lys	Val	Trp	Ala	Ser	Lys	Trp	Asn	Glu	Arg	Ala	Tyr	Phe	Ser	Thr		
			820					825						830			
Arg	Lys	Val	Lys	Leu	Asp	His	Glu	Tyr	Leu	Ser	Met	Ala	Val	Leu	Val		
		835					840					845					
Gln	Glu	Ile	Val	Asn	Ala	Asp	Tyr	Ala	Phe	Val	Ile	His	Thr	Thr	Asn		
	850					855					860						
Pro	Ser	Ser	Gly	Asp	Ser	Ser	Glu	Ile	Tyr	Ala	Glu	Val	Val	Lys	Gly		
	865				870					875				880			
Leu	Gly	Glu	Thr	Leu	Val	Gly	Ala	Tyr	Pro	Gly	Arg	Ala	Met	Ser	Phe		
				885					890					895			
Val	Cys	Lys	Lys	Asp	Asp	Leu	Asp	Ser	Pro	Lys	Val	Leu	Gly	Tyr	Pro		
			900					905					910				
Ser	Lys	Pro	Ile	Gly	Leu	Phe	Ile	Lys	Arg	Ser	Ile	Ile	Phe	Arg	Ser		
		915					920					925					
Asp	Ser	Asn	Gly	Glu	Asp	Leu	Glu	Gly	Tyr	Ala	Gly	Ala	Gly	Leu	Tyr		
	930					935					940						
Asp	Ser	Val	Pro	Met	Asp	Val	Glu	Asp	Glu	Val	Val	Leu	Asp	Tyr	Thr		
	945				950					955				960			
Thr	Asp	Pro	Leu	Ile	Thr	Asp	Ser	Gly	Phe	Arg	Asn	Ser	Ile	Leu	Ser		
			965						970				975				
Ser	Ile	Ala	Arg	Ala	Gly	His	Ala	Ile	Glu	Glu	Leu	Tyr	Gly	Ser	Pro		
		980						985					990				
Gln	Asp	Val	Glu	Gly	Val	Val	Lys	Asp	Gly	Lys	Ile	Tyr	Val	Val	Gln		
		995					1000					1005					

Thr

<210> 4
 <211> 663
 <212> DHHK
 <213> Hordeum vulgare

<400> 4
 cggcaccgagg gctaagaaga ttttagcgct ctaggagaaa tgcggaaaac tgtacttaat 60
 ctaactgctc caactcaact ggtcaaggag ctgaaggaga agatgctaag ctctggaatg 120
 ccttggcctg gggatgaaag tgaccaccgc tgggagcaag catggatggc aattaaaaag 180
 gtttgggcct caaatggaa tgaagagca tatcttagca caccgaaggt gaagctcgat 240
 catgattacc ttccatggc tgttcttgta caagaaattg tcaacgcaga ctatgccttt 300
 gttattcata ctacaaaccc gtcctctgga gattcttccg agatatatgc tgaagtggta 360
 aaaggacttg gagagacact tgtgggagct taccctggcc gtgccatgag ctctgtgtgt 420
 aagaaaaatg gccttgactc tccaagact ctaatggtga ggatctggaa ggttatgctg 480
 gagcagggtt gttgatagt gtccttatgg atgtggaaga cgaggttgta cttgactaca 540
 ccactgaccc tctcatcact gactcgggat tccggaactc aatcctctca agcattgcac 600
 gggctggcca cggcatcgag gagctctatg ggtcacggca ggacgttgag ggagtagtga 660
 agg 663

<210> 5
 <211> 4302
 <212> DHHK
 <213> Triticum aestivum

<400> 5
 atggcgctaa ggaaggagag atatccatcc ggatcccgga agccgaatcc atccatccat 60
 ccatcccata ctgcccttac gatcgagctg tttgatattc gtgcagatga gcggattctc 120
 cgcggcagct gctgaggccg agcgcttgtc ggaaggttca ccttggatgc caactccgag 180
 cttaaaggtga cattgaaccc agcaccgcag ggttcggttg tggagatcaa tctagaggca 240
 actaacacca gcggctccct gatactgcat tggggcgccc ttgcgccgga tagaggagaa 300
 tggctcctac catcccggaa accagatggc acgacagtgt acaagaacag ggctcttagg 360
 acgcctttta taaagtcagg tgataactcc acgctgaaaa ttgagataga tgatcctgca 420
 gtgcaagcca ttgagttcct catatttgat gaggcacgga ataattggtc agttcttttt 480
 gggttaccca tctacccctg tttcttgga tgcagaagat atcaataaac aacactctac 540
 tttggacagg aggagtatga agcagcacga actgagttga tagaggaatt aaacaagggg 600
 gtttcttttg agaagctacg agcgaaaactg acaagacac ctgaggcaac tgatagtaat 660

gctcctgcat ctgaaagcac tgtgactact aaagteccag aggaacttgt acaagteccag 720
 gcttacataa ggtgggagaa agcaggcaag ccaaattatg cccagagaa gcaattggcc 780
 gagtttgagg aagcaaggaa ggaactgcag tetgagttgg ataaggggac ctgagttgag 840
 cagttgagga acaaaatttt gaaagggaac attgagacaa aagtttccaa gcagctgaag 900
 gacaaaaaat acttttctgt ggaaagaatt cagcggaaaa aacgagatat tgtgcaacta 960
 cttaaaaaac acaagcctac tgttatggaa gcgcaagtag agactcctaa acaacccact 1020
 gttctggatc tttcacaaa gtcattacag gagcaggata actgtgaggt tctaagcaga 1080
 aagcttttca agttcgggtga caaggagata ctggaaaaac caaagttcac ttggcaacaa 1140
 actatatgga gccacttata cttcactggg cgttgtcaaa agagaatgga gagtggcaga 1200
 caatgtgggc ctgtactgat ggggtgcttt gtaactgtga aggcacctcc ctcaagcata 1260
 ttgccatctg gttcatcatt gctagacaag gcatgtgaaa cttcattcag tgaatatgaa 1320
 ttgaatgggc tgcattgtca ggatactggg gatgctggta aaggcactgc taaggccttg 1380
 cttgaaagaa tagcagatct agaggaagat gcccaacgat ctcttatgca cagattcaat 1440
 attgcagcag atctagttga ccaagcaaga gataatggat tattgggtat tattggaatt 1500
 tttgtttgga ttaggttcat ggctacaagg caactaatat ggaacaagaa ctacaatgtg 1560
 aagccacgtg agataagcaa agcacaagat aggtttacag atgactctga gaatatgtac 1620
 agaacttacc cacaatatca ggagatctta agaattgataa tgcctgctgt tggtcgggga 1680
 ggtgaagggtg atgttggtca acgcattcgt gatgagatat tagtaatcca gagaaataat 1740
 gactgcaaag gtggaatgat ggaggagtgg caccagaaac tgcacaacaa tacaagccca 1800
 gatgatgtag tgatctgcca ggccctactt gattatatca agagtgattt tgatattggt 1860
 gtttactggg acaccttgaa aaaagatggg ataacaaaag agegtctatt gagctatgat 1920
 cgaccgattc attcagagcc aaatttcagg agtgaacaga aagatggctt actcogtgac 1980
 ttgggcaatt atatgagaag cctcaagatg gagggtagcc tgatacaatc actgcgaatg 2040
 gcagtgcatt ctggtgctga tcttgaatct gctatagcaa cttgcatggy atacaaatca 2100
 gagggatgaag gtttcatggt tgggtgttcag attaatccag tgaaggggtt gccatctgga 2160
 tttcctaaat tgcttgaatt tgtacttgac catgttgagg ataaatcagc agaaccactt 2220
 cttgaggggt tattggaggc tcgagctgaa ctacacctt tgctccttgg ctctcctgaa 2280
 cgcataagg atcttatctt tttagacatt gctcttgatt ctactttcag gacagcagtt 2340
 gaaagatcat atgaggagct caataatgta gaaccagaga aaattatgta cttcatcagt 2400
 cttgtccttg aaaatcttgc tttatccacc gacgacaatg aagatatcct atattgctta 2460
 aagggatgga atcaagcctt ggaaatggct aaacagaaaa acaaccaatg ggctctctat 2520

```

gctaaagcat ttctggacag aaccagactt gcccttgcaa gcaagggaga acaatactat 2580
aatttgatgc agccctcagc tgaatatctt ggctcgttac ttaacattga ccaatgggca 2640
gttaatatct ttacagaaga aattattcgt ggtggatcag ctgctacctt gtctgtctct 2700
ctgaatcgga ttgatcctgt tcttaggaat gttgcacagc ttggaagttg gcagggtata 2760
agccacagtg aagtatcagg ttacattgta gtgggtgatg aattgcttgc tgttcaaaac 2820
aaatcctatg ataaaccaac tatccttggt gcaaagagtg tcaagggaga ggaagaaata 2880
ccagatggag ttgttggtgt tattacacct gatatgccag atgttctctc ccattgatca 2940
gtccgagcaa ggaattgcaa ggttttattt gcaacatgct ttgatactaa caccttgctc 3000
gaactccaag gacatgatgg gaaagtgttt tctttcaaac ctacttctgc agatataacc 3060
tatagggaga ttccagagag tgaactgcaa tcagggtctc taaatgcaga agctggccag 3120
gcagtgcctt ctgtgtcatt agtcaagaag aagtttcttg gaaaatatgc aatatcagca 3180
gaagaattct ctgaggaaat ggtgttccct acatcagttg cgattccatt tgggaccttt 3240
gagaagggtt tgtctgatga aatcaataag gaagtgcgc aaaccataca aatgctgaag 3300
ggaaaaactg ctcaagatga ttttagtgct ctaggcgaaa tacggaaaaac tgttctcaat 3360
ttaactgctc ctactcaact gatcaaggaa ctgaaggaga agatgctagg ccttggaatg 3420
ccctggcctg gagatgaagg tgaccaacgt tgggagcaag catggatggc aattaaaaag 3480
gtttgggcgt caaaatggaa tgaaagagca tatttttagc ctgctaagggt gaagcttgat 3540
catgactacc ttctcatggc tgtacttgta caagaaattg tcaatgcaga ctatgccttt 3600
gtcattcata ctactaacc atcatcggga gattcgtctg agatatatgc tgaagtggty 3660
aaagggcttg gagaaacact ttagggagcc tatectggtc ggcctatgag ctttgtatgt 3720
aagaaaaacg accttgactc tccaaggta ctgggtttcc caagcaagcc aattgggtctc 3780
ttcataaaga gatcaatcat ctttctgtca gattccaaag gtgaggattt agaaggggat 3840
gctggagcag gactgtatga tagttcgtc aagaatttat ttggcattac aactaagctg 3900
actgcttgtt tcagtgtccc tatggatgag gaagatgaag tcatactga ctacaccacc 3960
gacccctca ttacagatca gggattccaa aaatctatcc tctcagagcat tgcacgggct 4020
ggtcatgcca ttgaggagct ttatgggtcc ccacaggatg ttgaggggtc agtgaaggaa 4080
gggaagctat acgtagtaca gacaagacca cagatgggaa aagccaggga ggactactac 4140
caagtgtcgg gagtgcgggt taattcaacg cctcaggaga tcaaggagcc ttacaggaag 4200
ctccagaaac gacaccatat cctgatattg ctggetacaa gggtcatgca tgactacacc 4260
ctaactgctg atgaggcata caaggtattg atgaggaatt aa 4320

```

<210> 6

<211> 36

<212> ДНК
 <213> *Triticum aestivum*

<400> 6
 aaaaggatcc ggtaccgect tetggctcaa cagtte 36

<210> 7
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> *Triticum aestivum*

<400> 7
 aaaagaatto actagtatca ccttcacctc caccac 36

<210> 8
 <211> 413
 <212> ДНК
 <213> *Oryza spp.*

<400> 8
 tgctggagca gcagtatatg atagggttaga gaaagtcgcg cataattttt gtagtttgct 60
 caagaattta ttgggcatta caactaagct gactgcttgt ttcagtgtcc ctatggatga 120
 ggaagatgaa gtggtactcg actacaccac agaccccttc attacagatc agggatccaa 180
 aaatcaatcc tctcgagcat tgcaegggct ggbcatgcc a ttgaggattt ctatgggtca 240
 ccacagggca caggatgttg aggggtgcagt gaaggaaggg aagctataag tagtacagac 300
 aagaccacaa atgtaatcta tatgtatatt ttatagccaa gtcaatcagg aaatgttgta 360
 gagtaagata tacgggcccgt gggacatgta taacacgtta tgcctctttt ttt 413

<210> 9
 <211> 462
 <212> ДНК
 <213> *Oryza spp.*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (409)..(409)
 <223> n e a, c, g a c c t

<400> 9
 tctacaacta caacttttta gaatctggac caaaagctgg actgtttgag ggagctttctg 60
 attctgagag aagctgcagc agctagaagc tcccccaaac aggccttag gtagctgggt 120
 acaagtctga tcacactgtt ttaggtttgt ctgttgttgt atatcagata gctaaatgca 180
 tagctgtgag ctagagttgt gataaactgg aaataggtca gggaacgtct ttttttgcca 240
 aagtatgggt aaagataaac ttggtgagct cagctgggga caaaatcacc agattttgta 300
 ttctcccagc agagcaaaata gggatttgcc tgtgagtgca tgcctgactt gtctgttggt 360
 ctatgaaatg ggccgtgaag tgtgcttcta tgggccttgt caactactnac caggcggtat 420

tgcagagcag atttcttggc ccattttggtc etttttctct et 462

<210> 10
 <211> 490
 <212> JHK
 <213> Oryza spp.

<400> 10
 cttgggaaga cggtcgctgt tagatttgtg ctgaagaggg aatgcaegt cggccagagc 60
 ttcacacttg tcggcgacga cccggcgctc ggcctctggg atccgtcgaa ggcagtgcct 120
 ttggatttgt cagaaggaca cgactggact gtggagaaag tgagccttgc atcgtgcgca 180
 ttgtttgatg tactctcctt ttgaggtaat catcaacctt tttcttctgt acaggacttg 240
 ccagccaaca agttgattga gtacaagttc gtgctgcaag atttgtgggg caagttgcat 300
 tggcagaatg gtctaatag aagcgtacag acaggtgaaa ctgcaaaccat tctagtcgta 360
 tatgaagatt ggggtaatgc aaatagtcag acagtagaag aggagggtaa agtgccatt 420
 gggatggagg agggtaaatt gtccgttggg atggaggagg ctgtagttcc agatgatagt 480
 gaaagcagag 490

<210> 11
 <211> 492
 <212> JHK
 <213> Sorghum bicolor

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (484)..(484)
 <223> n c a, c, g a b o t

<400> 11
 gcaagaggcc cagttgaagt atcaggttat gtggttgttg ttgatgagtt acttgctgtc 60
 cagaacaaat cttatgataa accaaccatc cttgtggcaa agagtgtcaa gggagaggaa 120
 gaaataccag atggagttagt tgggtgaatt acacctgata tgccagatgt tctgtcccat 180
 gtgtcagtcg gagcaaggaa tagcaaggta ctgtttgcaa cctgttttga ccataccact 240
 ctgtctgaac ttgaaggata tgatcagaaa ctgttttctt tcaagcctac ttctgcagat 300
 ataacctata gggagatcac agagagttag attcagcaat caagttctcc aaatgcagaa 360
 gttggccatg cagtaccatc tatttcattg gccagaaga aatttcttgg aaaatatgca 420
 atatcagctg aagaattcac cgaggaaatg gttggggcca agtctcgga aatagcatacc 480
 tcanaggaaa ag 492

<210> 12
 <211> 704
 <212> JHK
 <213> Sorghum bicolor

<400> 12
aagaactata atgtgaagcc acgtgagata agcaaagcac aggatagggt tacagatgat 60
cttgagaata tgtacagaac ttatcctcag tacagagaga tactaagaat gataatgggt 120
gctgttggtc gtggagggtg aggtgacgtt ggtcaacgca ttctgtgatga gatattagta 180
atacagagaa ataatgactg caaagggtga atgatggaag aatggcaccg gaaattgcac 240
aacaatacaa gccagatga tgtagtata tgccaggcat taattgatta tataaaaaat 300
tttgatataa gcgtttactg ggacaccttg aacaaaaatg gcataaccaa agagcgtctc 360
ttgagctatg atcgtctat tcattcagaa ccaatttca gaagtgaaca gaaggagggt 420
ttactccgtg acctgggaaa ttacatgaga agcctaaagg ctgtgcattc tgggtctgat 480
cttgaatctg ctatagcaac ttgtatgga taaaaatcag aggggtgaagg ttctatgggt 540
ggcgttcaga tcaatccagt gaaggytttg ccatctggat ttcttgagtt gcttgaattt 600
gtgcttgacc atgttgagga taaatcagca gaaccattc ttgaggggct attggaagct 660
cgagttgac tgccgccttt gcttcttgat tgcctgaac gcat 704

<210> 13
<211> 563
<212> JHK
<213> Sorghum bicolor

<400> 13
gagaagccta aaggctgtgc attctggtgc tgatcttgaa tctgctatag caacttgtat 60
gggatacaaa tcagaggggtg aagggttctat gggtggcggt cagatcaatc cagtgaaggg 120
tttgccatct ggatttctg agttgcttga atttgtgctt gaccatgttg aggataaatc 180
agcagaacca ctctctgagg ggctattgga agctcgagtt gatctgctcc ctttgcctct 240
tgattacct gaacgcctga aagatcttat atttttggac attgctcttg attctacctt 300
caggacagca attgaaaggt catatgagga gctcaatgat gcagcccccag agaaaaaat 360
gtacttcata agtcttgctc ttgaaaatct tgcgttttca attgacgaca atgaagacat 420
cctgtattgc ttaaagggat ggaaccaagc cttggaaatg gctaagcaaa aagacgacca 480
atgggtctct tacgctaaag catttcttga cagaatcaga cttgccttg cgagcaaggg 540
agaacagtac cataatatga tgc 563

<210> 14
<211> 705
<212> JHK
<213> Sorghum bicolor

<400> 14
gttctgtgtc aagaagttgt gaatgcagat tatgcttttg tcattcatac tacaaccca 60
tcgtctggag attctcttga gatatatgct gaagtcgtga aagggtctcg agagactctc 120

```

gtgggagcct atcctgggctg tgcctatgagc ttgttttgca aaaaagatga ccttgacctt 180
cccaagttac ttggttaacc gagcaagcca attggtctct tcataaggcg ategatcctc 240
tttcgtctctg actccaacgg cgaggatctg gaagggttatg cgggagcagg atttatatgat 300
agtgtaccga tggatgagga ggatgaagtc gtacttgact acacaactga cctctttata 360
gtagatcgtg gattccgaaa ttcaatactc tcaagcctcg cacgggctgg ccctgcccatt 420
gaagagctat atgggtctcc tcaggacgct gaggggtgtg tgaaggatgg aaaaactctat 480
gtagtccaga caagaccaca gatgtagcat gtatgtatta gctagctcaa taagcactgt 540
tgtacgcttg tatggttggg acatattggg gttatggcat gtatagttaa tgcttagatg 600
tacaacacgt gtaaacctct atatattgtat atatgttgaa acaagcattg gtcttgcaat 660
ttcattgtga ccagtcttgg aaaatgaaca tgccgactta ttggc 705

```

```

<210> 15
<211> 22
<212> DKK
<213> Oryza spp.

```

```

<400> 15
attgttaggt tgcaagttag tt 22

```

```

<210> 16
<211> 20
<212> DKK
<213> Oryza spp.

```

```

<400> 16
cttcccttcc ttcactgcac 20

```

```

<210> 17
<211> 20
<212> DKK
<213> Oryza spp.

```

```

<400> 17
gcaaggctca cttctctcac 20

```

```

<210> 18
<211> 20
<212> DKK
<213> Oryza spp.

```

```

<400> 18
tccatcccaa tggacacttt 20

```

```

<210> 19
<211> 16
<212> DKK
<213> Oryza spp.

```

<400> 19
 tacgacatgg aagccg 16

<210> 20
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Triticum spp.

<400> 20
 gaaacacata gtctg 15

<210> 21
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> Triticum spp.

<400> 21
 ttgcggtgcc tttacc 16

<210> 22
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Triticum spp.

<400> 22
 gaaagaaaca catagtctg 19

<210> 23
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Triticum spp.

<400> 23
 atctgtaaaac ctgtcttctg 20

<210> 24
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> Triticum spp.

<400> 24
 ttgcggtgcc tttacc 16

<210> 25
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Triticum spp.

<400> 25
 atctgtaaaac ctgtcttctg 20

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

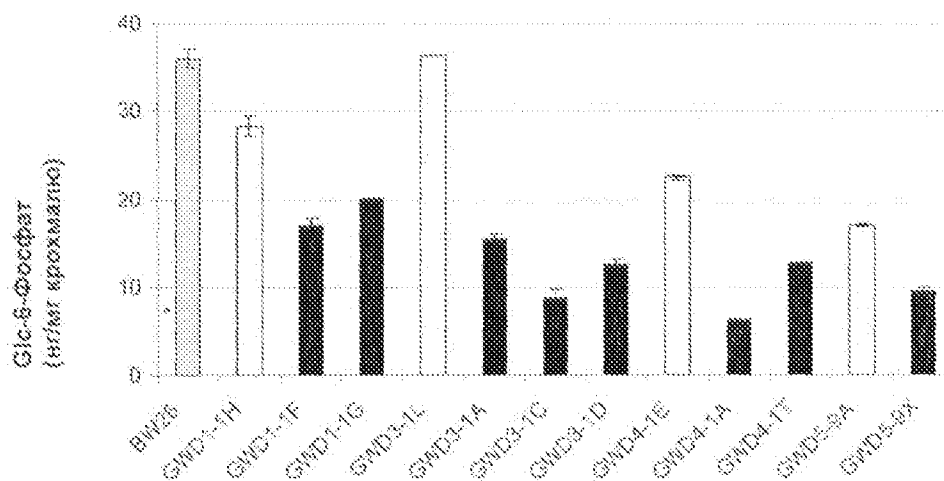
1. Генетично модифікована рослина зі збільшеним потенціалом продуктивності, що містить гомозиготно у своєму геномі гетерологічний полінуклеотид, що містить послідовність транскрипційного контролю, операбельно зв'язану з молекулою нуклеїнової кислоти, що кодує сайленсинг РНК, що знижує рівень ендогенної α -глюкан вода-дікінази (GWD) в рослині, так що згадана рослина має знижений рівень GWD в своєму насінні, у порівнянні з дикою рослиною, де збільшеним потенціалом продуктивності є збільшена сила паростків або збільшена біомаса, і де сайленсинг РНК є дуплексною РНК.
2. Рослина за п. 1, де рослина додатково має підвищені або покращені загальну масу насіння на рослину, кількість насіння на рослину, кількість насіння на колос або стручок, середню масу насіння, проростання, швидкість росту, висоту, загальну площу листа, рівень фотосинтезу на площу листа, кількість листя на рослину, кількість колосків на рослину, кількість паростків на рослину, вміст крохмалю або склад бульби, товщину стебла, кількість міжвузлів, кількість розгалужень, кількість квітів, розмір або форму квітки, колір квітки, кількість стручків на рослину, розмір стручка, кількість плодів на рослину, зав'язі, розмір плоду, форму плоду, колір плоду, якість плоду, резистентність до хвороб, масу коріння, кількість коріння, довжину коріння та/або вихід, та/або затримку старіння у порівнянні з рослиною дикого типу.
3. Рослина за п. 1 або 2, що додатково модифікована, щоб містити знижений рівень ендогенної фосфоглюкан вода-дікінази (PWD) у порівнянні з рослиною дикого типу.
4. Рослина за будь-яким з пп. 1-3, де рослиною є однодольна рослина.
5. Рослина за п. 4, де рослиною є пшениця, кукурудза, ячмінь, рис або сорго.
6. Рослина за п. 5, де рослиною є пшениця.
7. Рослина за будь-яким з пп. 1-6, де рослина також має підвищений рівень ендогенної глікозилази та/або підвищену здатність до перетравлення щонайменше однієї з її частин відносно до відповідної рослини дикого типу.
8. Рослина за будь-яким з пп. 1-6, де контрольна транскрипційна послідовність переважно спрямована на експресію в насінні рослини.
9. Частина рослини за будь-яким з пп. 1-7, де такою частиною є насіння, листя, стебла, коріння, квітки, плоди, стручки або черешки, отримані із цієї рослини, де згадана частина містить гетерологічний полінуклеотид.
10. Частина рослини за п. 9, яка **відрізняється** тим, що має підвищений рівень ендогенної глікозилази та/або підвищену здатність до перетравлення, порівняно з відповідною частиною рослини дикого типу.
11. Насіння рослини за будь-яким з пп. 1-8, що містить крохмаль, де рівень глюкозо-6-фосфату в крохмалі цього насіння становить менше ніж 10 нг/мг крохмалю, і рівень активності амілази в борошні, отриманому із цього насіння, становить щонайменше 4 одиниці/г борошна.
12. Продукт рослини за будь-яким з пунктів 1-8, частини рослини за п. 9 або 10 або насіння за п. 11, що є обробленим зерном, борошном або борошном із цільного зерна, де цей продукт має змінений загальний склад крохмалю, порівняно з відповідним продуктом з рослини дикого типу.
13. Спосіб визначення, чи має генетично модифікована рослина збільшений потенціал продуктивності у порівнянні з контрольною рослиною, який включає наступні стадії: i) одержання однієї або кількох рослин, які містять у своєму геномі гетерологічний полінуклеотид, та ii) визначення, чи мають одна або кілька рослин збільшений потенціал продуктивності у порівнянні з контрольною рослиною, де полінуклеотид містить послідовність транскрипційного контролю, операбельно зв'язану з молекулою нуклеїнової кислоти, що кодує сайленсинг РНК, що знижує рівень GWD в насінні рослини, де збільшеним потенціалом продуктивності є збільшена загальна маса насіння на рослину, кількість насіння на рослину, кількість насіння на колос або стручок, середня маса насіння, сила паростків, або збільшений вміст крохмалю в насінні і де сайленсинг РНК є дуплексною РНК.
14. Застосування виділеної або химерної молекули нуклеїнової кислоти для одержання рослини за будь-яким з пунктів 1-7, де згадана виділена або химерна молекула нуклеїнової кислоти містить послідовність транскрипційного контролю, операбельно зв'язану з нуклеотидною послідовністю, що кодує або є комплементарною нуклеотидній послідовності, що кодує α -глюкан вода-дікіназу, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3 або її варіант, що має щонайменше 90 % ідентичність із SEQ ID NO: 3, або містить нуклеотидну послідовність, що кодує або є комплементарною, або гібридується за жорстких умов з SEQ ID NO: 2, або SEQ ID NO: 5, або SEQ ID NO: 8, або SEQ ID NO: 9, або SEQ ID NO: 10, або SEQ ID NO: 12, або SEQ ID NO: 13, або SEQ ID NO: 14, або містить її варіант, що має щонайменше 90 % ідентичність із SEQ ID NO: 2 (GWD пшениці) або SEQ ID NO: 5 (GWD пшениці), або SEQ ID NO: 8, або SEQ ID

NO: 9, або SEQ ID NO: 10, або SEQ ID NO: 11, або SEQ ID NO: 12, або SEQ ID NO: 13, або SEQ ID NO: 14, або її ділянки, що кодує білок.

15. Застосування за п. 14, де молекула нуклеїнової кислоти є або кодує РНК, що є антисмисловою РНК, співпригнічувальною РНК, двоспиральною РНК, шпилькованою РНК або рибозимом та де послідовність транскрипційного контролю переважно спрямована на експресію в насінні рослини.

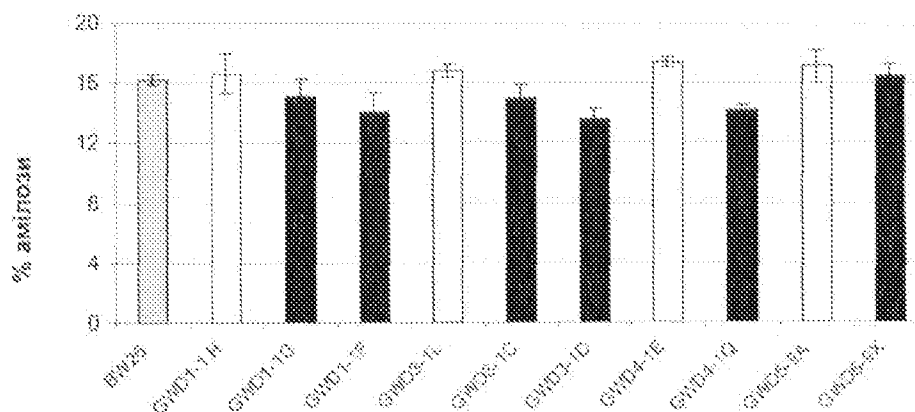
16. Вектор експресії, що містить виділену або химерну молекулу нуклеїнової кислоти, визначену в пункті 14.

17. Клітина-хазяїн, що містить виділену або химерну молекулу нуклеїнової кислоти, визначену в пункті 14.

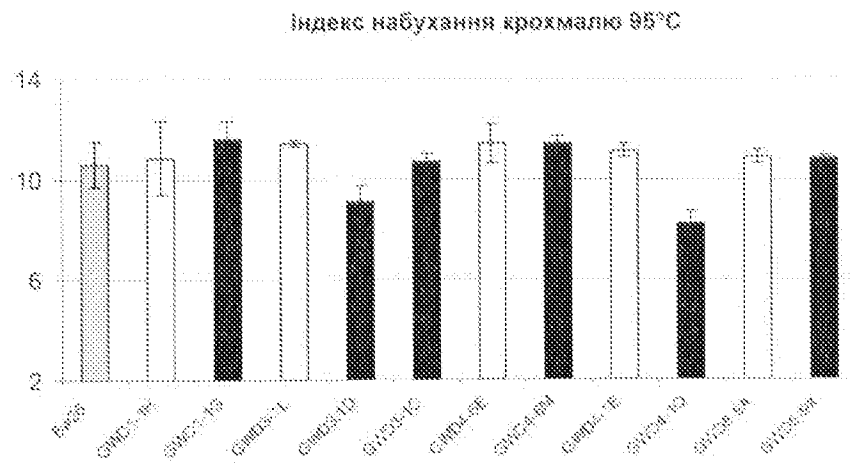


Фігура 1

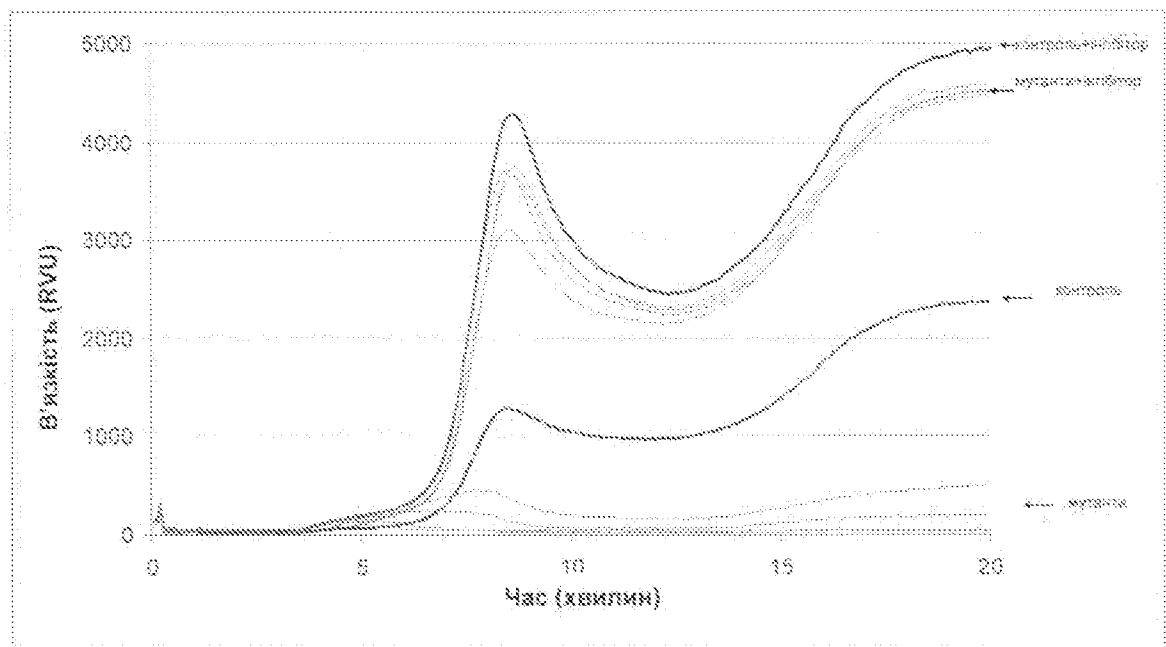
Вміст амілози



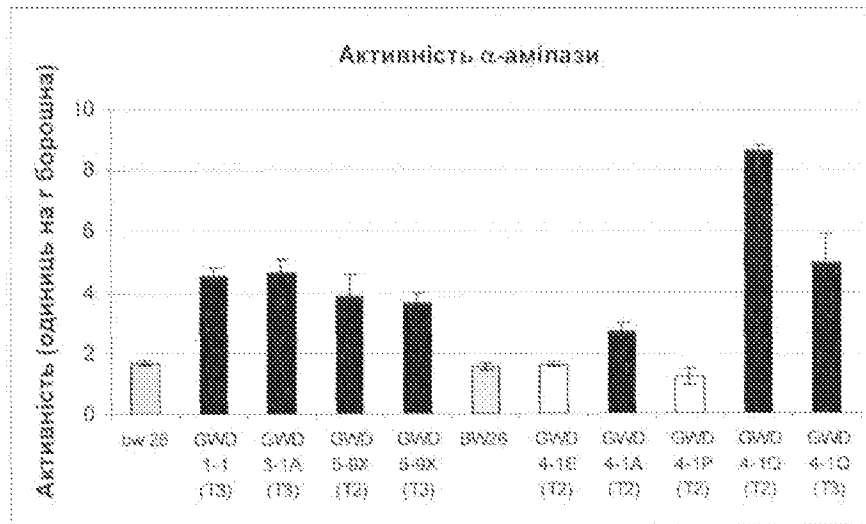
Фігура 2



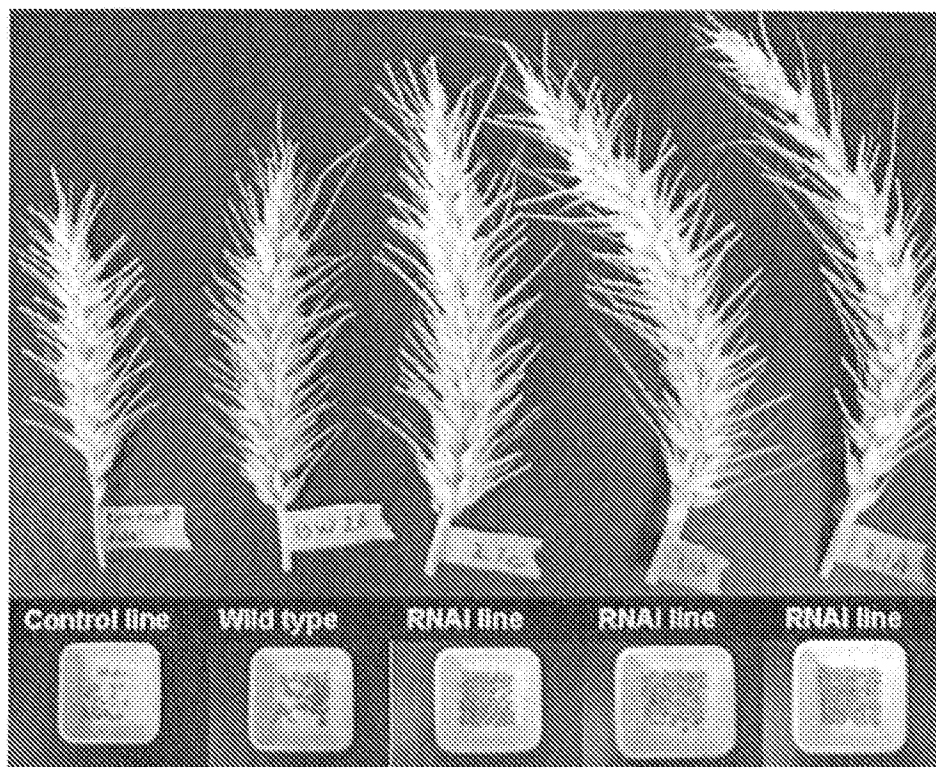
Фігура 3



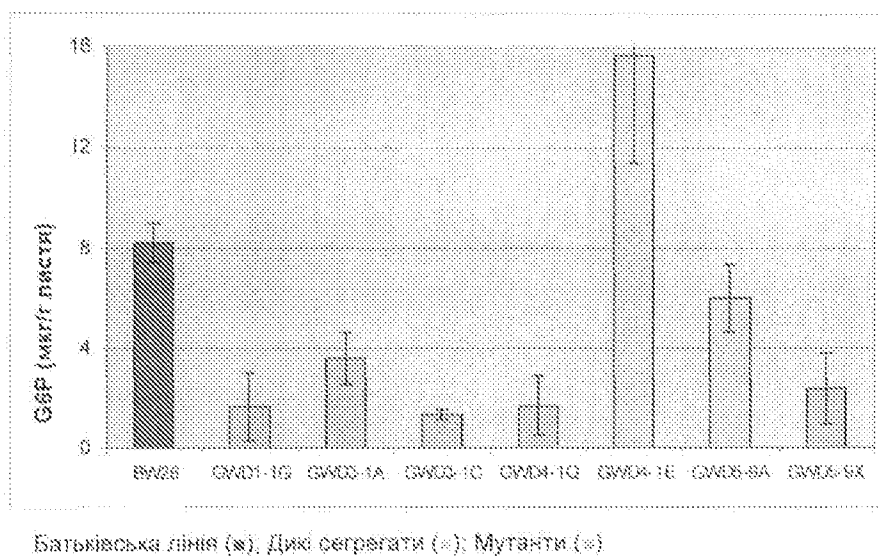
Фігура 4



Фігура 5

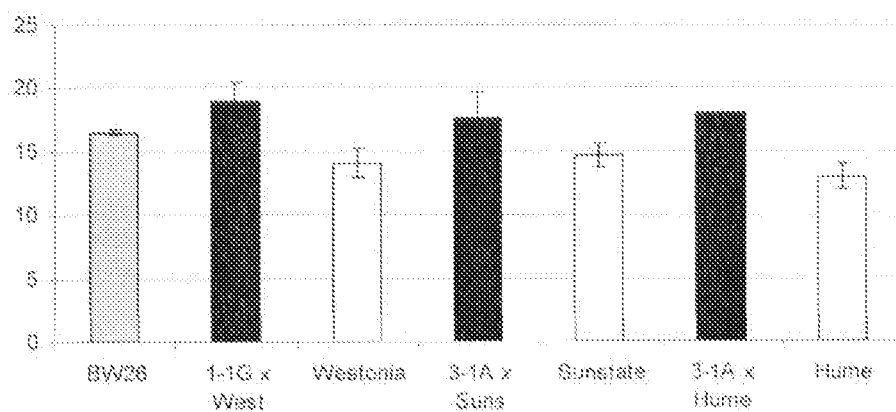


Фігура 6

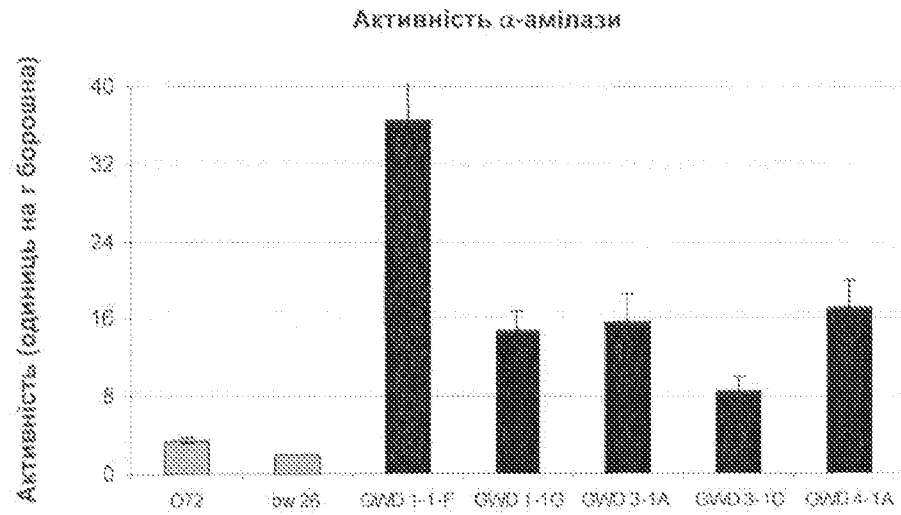


Фігура 7

Кількість колосків на рослину



Фігура 8



Фігура 9

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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