

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034044**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.12.23

(21) Номер заявки
201390724

(22) Дата подачи заявки
2011.11.15

(51) Int. Cl. *A01H 4/00* (2006.01)
C12N 15/05 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)

(54) УСТОЙЧИВЫЕ К ЗАСУХЕ РАСТЕНИЯ

(31) 61/413,902

(32) 2010.11.15

(33) US

(43) 2014.05.30

(86) PCT/AU2011/001478

(87) WO 2012/065219 2012.05.24

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ДЗЕ СТЕЙТ ОФ КВИНСЛЕНД
ЭЗ РЕПРЕЗЕНТЕД БАЙ ДЗЕ
ДЕПАРТМЕНТ ОФ ЭГРИКАЛЧЕР
ЭНД ФИШЕРИЗ (AU); ДЗЕ ТЕКСАС
Эй ЭНД Эм ЮНИВЕРСИТИ
СИСТЕМ (US)**

(72) Изобретатель:
**Боррелл Эндрю Кеннет, Джордан
Дэвид Роберт (AU), Маллит Джон,
Клейн Патрисия (US)**

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

(56) SHEN, C. et al., 'Expression profile of PIN, AUX/LAX and PGP auxin transporter gene families in Sorghum bicolor under phytohormone and abiotic stress', FEBS Journal, July 2010, vol. 277, pages 2954-2969. The whole document, but particularly abstract and Figure 3

HARRIS, K. et al., 'Sorghum stay-green QTL individually reduce post-flowering drought-induced leaf senescence', Journal of Experimental Botany, 2007, vol. 58, no. 2, pages 327-338. The whole document, but particularly Materials and Methods on page 329

KRECEK, P. et al., 'The PIN-FORMED (PIN) family of auxin transporters', Genome Biology, 2009, vol. 10, pages 249.1-249.11. The whole document

FELTUS, F.A. et al., 'Alignment of genetic maps and QTLs between inter- and intra-specific sorghum populations', Theoretical and Applied Genetics, 2006, vol. 112, page 1295-130. The whole document

(57) В изобретении описано получение устойчивых к засухе растений. Изобретение позволяет манипулирование фенотипическим признаком, называемым в настоящем описании "поддержание зеленым", для получения устойчивых к засухе растений рекомбинантными способами, способами мутагенеза и/или способами скрещивания и селекции. Также в настоящем описании описаны системы практики управления возделыванием культур для повышения выхода и эффективности сбора урожая в условиях ограниченного доступа воды.

B1

034044

**034044
B1**

Дата подачи

Настоящая заявка связана с временной заявкой США № 61/413902, поданной 15 ноября 2010 г., полное содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Область техники

В настоящем описании описано получение устойчивых к засухе растений. Настоящее изобретение позволяет манипулирование фенотипическим признаком, называемым в настоящем описании "поддержание зеленым", для получения устойчивых к засухе растений рекомбинантными способами, способами мутагенеза и/или способами скрещивания и селекции. Также в настоящем описании описаны системы практики управления возделыванием культур для повышения выхода культуры и эффективности сбора урожая в условиях ограниченного доступа воды.

Уровень техники

Библиографические детали публикаций, указываемых автором в настоящей заявке, собраны в алфавитном порядке в конце описания.

Отсылка на любой из документов уровня техники в настоящем описании не является и не должна истолковываться как признание или какая-либо форма предположения, что этот документ уровня техники формирует часть общей информации в какой-либо стране.

Увеличение человеческой популяции требует увеличения урожайности сельскохозяйственных культур. Это является главной целью для растениеводов и генетиков растений. Один из подходов повышения урожайности сельскохозяйственных культур вовлекает селекцию признаков растений, которые способствуют более высокому выходу зерна и устойчивости (Springer, *Nature Genetics* 42:475-476, 2010). Этот подход был назван "зеленой революцией". Другие подходы включают развитие архитектуры растений, которое привело, например, к идентификации локуса количественных признаков (QTL), который кодирует белок, подобный белку, связывающему промотор чешуек 14 (OsSPL14) в рисе, и который способствует увеличению выхода риса (Jiao et al., *Nature Genetics* 42:541-544, 2010; Miura et al., *Nature Genetics* 42:545-549, 2010).

Засуха представляет собой одно из наиболее важных ограничений продукции злаков по всему миру. Сорго является хранилищем механизмов устойчивости к засухе, которые включают C₄-фотосинтез, глубокие корни и толстый воск листьев, которые обеспечивают рост в жарких и сухих условиях. Устойчивость к засухе делает сорго особенно важным в сухих регионах, таких как страны Африки южнее Сахары, западно-центральная Индия, северо-восточная Австралия и южные равнины США. Учитывая возрастающее давление на доступность скудных водных ресурсов, идентификация признаков, ассоциированных с выходом зерна в условиях засухи, становится более важной.

Механизм адаптации к засухе, идентифицированный в сорго, который приводит к сохранению листьев зелеными в течение более длительных периодов времени в ходе налива зерна в условиях засухи, известен как "поддержание зеленым". Поддержание зеленым ассоциировано с высоким выходом зерна при засухе после цветения в сорго (Borrell et al., *Crop Sci.* 40:1037-1048, 2000b; Kassahun et al., *Euphytica* 72:351-362, 2010), пшенице (*Triticum aestivum* L.) [Spano et al., *J. Exp. Bot.* 54:1415-1420, 2003; Christopher et al., *Aust. J. Agric. Res.* 59:354-364, 2008], рисе (*Oryza sativa* L.) [Kashiwagi et al., *Plant Physiology and Biochemistry* 44:152-157, 2006] и кукурузе (*Zea mays* L.) [Zheng et al., *Plant Breed* 128:54-62, 2009]. Кроме того, оно может прямо влиять на выход зерна в условиях засухи путем повышения устойчивости к угольной гнили (*Macrophomina phaseolina* [Tassi] Goid.) (Tenkouano et al., *Theor. Appl. Genet.* 85:644-648, 1993; Garud et al., *Int. Sorghum and Millets Newsl.* 43:63-65, 2002). Это уменьшает полегание (Reddy et al., *Euphytica* 159:191-198, 2008), что позволяет растениеводам использовать положительную ассоциацию между высотой растения и выходом зерна (Jordan et al., *Theor. Appl. Genet.* 106:559-567, 2003). Поддержание зеленым является важным критерием селекции для программ выведения сорго, нацеленных на адаптацию к засухе как в США (Rosenow et al., *Agric. Water Manag.* 7:207-222, 1983), так и в Австралии (Henzell et al., *Australia Int. Sorghum and Millets Newsl.* 38:1-9, 1997).

В поддержку этого признака получены существенные доказательства (Borrell et al., *Crop Sci.* 40:1026-1037, 2000a; Borrell and Hammer, *Crop Sci.* 40:1295-1307, 2000; Harris et al., *J. Exp. Bot.* 58:327-338, 2007; Christopher et al., 2008, выше; Van Oosterom et al., *Field Crops Res.* 115:19-28, 2010a и Van Oosterom et al., *Field Crops Res.* 115:29-38, 2010b). Хотя этот механизм устойчивости к засухе используется специалистами по разведению сорго в США и Австралии в течение 25 лет, и широкая физиологическая основа этого признака становится более понятной, причинные механизмы и генетические локусы, вовлеченные в него, до настоящего времени неизвестны.

В условиях ограничения воды выход зерна является функцией транспирации (Т), эффективности транспирации (ТЕ) и индекса урожая (НІ) [Passioura, *J. Aust. Inst. Agric. Sci.* 43:117-120, 1977]. В этих рамках выход зерна связан с Т периода после цветения (Turner, *J. Exp. Bot.* 55:2413-2425, 2004; Manschadi et al., *Funct. Plant. Biol.* 33:823-837, 2006), поскольку НІ возрастает с возрастанием доли общей Т культуры, используемой после цветения (Passioura, 1977, выше; Sadras and Connor, *Field Crops Res.* 26:227-239, 1991; Hammer, *Agric. Sci.* 19:16-22, 2006). Увеличенная Т после цветения ассоциирована со снижением стресса, вызываемого засухой, что может положительно влиять на скорость роста культуры злаков во время цветения и, таким образом, число зерен (Andrade et al., *Crop. Sci.* 42:1173-1179, 2002; Van Oosterom

и Hammer, *Field Crops Res.* 108:259-268, 2008). Если общее количество доступной воды ограничено, T после цветения может увеличиваться путем ограничения T до цветения. Этого можно достигать путем ограничения размера листового полога либо генетически, либо путем управления возделыванием культур. Однако уменьшение листового полога снизит общую T , только если TE не будет нарушена. Для сорго были описаны значительные генотипические отличия в TE (Hammer et al., *Aust. J. Agric. Res.* 48:649-655, 1997; Henderson et al., *Aust. J. Plant Physiol.* 25:111-123, 1998; Mortlock and Hammer, *J. Crop Prod.* 2:265-286, 1999; Xin et al., *Field Crops Res.* 111:74-80, 2009). Альтернативно использование воды после цветения может увеличиваться при увеличении общего количества воды, доступного для культуры, либо путем более глубокого укоренения, либо путем снижения нижнего предела извлечения воды (Manschadi et al., 2006, выше).

Признак поддержания зеленым влияет на ряд из указанных выше процессов в сорго. Во-первых, поддержание зеленым снижает потребление воды в период до цветения путем ограничения размера листового полога (вследствие уменьшения кущения и уменьшения размера листьев).

Во-вторых, поддержание зеленым повышает усвояемость воды путем увеличения соотношения корня:побеги. Существуют некоторые экспериментальные данные о лучшем извлечении воды в линиях с признаком поддержания зеленым, хотя требуется больше исследований. Эти корневые ответы также могут быть объяснены усиленным транспортом ауксина (Wang et al., *Molecular Plant* 2 (4):823-831, 2009).

В-третьих, поддержание зеленым увеличивает зеленость листьев во время цветения, эффективно увеличивая способность к фотосинтезу, и, таким образом, TE (при условии, что фотосинтез возрастает пропорционально проводимости). Увеличение зелености листьев является непрямым эффектом снижения массы листьев, т.е. в листьях концентрируется азот.

Производство большего количества продуктов питания при меньшем количестве воды является одной из основных задач, которые в настоящее время стоят перед человечеством. Существует реальная и неотложная потребность как в развивающихся, так и в развитых странах в идентификации генов и генных сетей, контролирующей адаптацию к засухе в сельскохозяйственных растениях. Это обеспечивает увеличение адаптации к засухе в широком диапазоне видов растений, выращиваемых в окружающих условиях с ограниченным доступом воды по всему миру.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к локусам количественных признаков (QTL), ассоциированным с фенотипом поддержания зеленым и/или иным образом способствующим ему. QTL обозначают в настоящем описании как "поддержание зеленым (Stg) X", где X представляет собой число, превышающее 1, которое соответствует области на хромосоме, ассоциированной с фенотипом поддержания зеленым.

Как описано в настоящем описании, QTL идентифицируют генетические области на сорго, которые несут локусы, кодирующие от одного до некоторого количества белков или регуляторных агентов, таких как микроРНК, которые способствуют фенотипу поддержания зеленым. Модулирование экспрессии одного или нескольких этих локусов в сельскохозяйственном растении обеспечивает архитектуру листового полога, которая способствует переключению использования воды растением на использование воды в период после цветения, или увеличению усвояемости воды в процессе роста культуры, или увеличению эффективности транспирации, тем самым, увеличению индекса урожая (HI) и выходу зерна в условиях ограниченного доступа воды.

В одном варианте осуществления локусы кодируют белок PIN, который ассоциирован с ауксином. Белки PIN представляют собой эффлюксные переносчики ауксина, которые содержат трансмембранные домены и, главным образом, локализируются в плазматических мембранах. Термин "PIN" происходит от "соцветия в форме булавки".

Термин "SbPINn" используют для описания такого гена в сорго, где n представляет собой число, определяющее компонент эффлюксного переносчика ауксина и n равно от 1 до 11. Указание на "SbPINn" включает его гомологи и ортологи из других растений. Примеры локусов SbPINn в сорго включают локусы, приведенные в табл. 1A, такие как, но не ограничиваясь ими, SbPIN4 и SbPIN2 или их эквиваленты в других растениях. В настоящем описании описано, что модулирование экспрессии PIN или экспрессия PIN с конкретным полиморфным изменением способствуют проявлению фенотипа поддержания зеленым. Настоящее изобретение относится к PIN из других растений, таких как рис. Буквенная приставка у PIN определяет его источник (например, Sb, сорго; Os, рис и т.д.). Положение SbPIN в сорго определяется ID-номером гена (см. табл. 1A). В качестве примеров SbPIN4 соответствует OsPIN5, и SbPIN2 соответствует OsPIN3a.

SbPIN4 и SbPIN2 являются примерами SbPIN, описанных в настоящем описании, ответственных за признак поддержания зеленым в сорго, ассоциированный с Stg1 и Stg2 соответственно, что приводит к ряду фенотипов, которые обеспечивают адаптацию к засухе путем сниженного использования воды до цветения (вследствие уменьшения кущения и меньшего размера листьев), увеличенной усвояемости воды (вследствие увеличения соотношения корня:побеги), увеличенной эффективности транспирации при мягком дефиците воды (вследствие более высокой концентрации азота в листьях), увеличенной биомассы на площадь листа при терминальном дефиците воды (вследствие увеличения транспирации на площадь листа), и увеличенный выход зерна, размер зерен и устойчивость к полеганию. Другие примеры

приведены в табл. 1А и включают их эквиваленты в других растениях.

Настоящее изобретение относится к способу получения генетически модифицированного растения, которое использует воду более эффективно, чем не модифицированное генетически растение того же вида, причем способ включает модулирование уровня экспрессии существующего или внесенного локуса соцветия в форме булавки (PIN) во всех или в отдельной ткани растения для способствования фенотипу поддержания зеленым, который включает переключение использования воды на использование воды в период после цветения или увеличение усвояемости воды в процессе роста культуры или увеличение эффективности транспирации, приводящие к увеличению индекса урожая и выхода зерна в условиях ограниченного доступа воды.

В настоящем описании описан способ получения генетически модифицированного растения, которое использует воду более эффективно, чем не модифицированное генетически растение того же вида, причем способ включает введение в растение или родительское растение генетического агента, кодирующего белок PIN, выбранный из SbPIN1-11 или их эквивалента из другого растения или их функционального гомолога или ортолога; или модулирующего экспрессию собственного белка PIN; где уровень и место экспрессии PIN способствуют фенотипу поддержания зеленым, который включает, среди прочих, архитектуру листового полога, которая способствует переключению использования воды на использование воды в период после цветения или увеличению усвояемости воды в процессе роста культуры, приводящим к увеличенному индексу урожая и выходу зерна в условиях ограничения доступа воды.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения генетически модифицированного растения, которое использует воду более эффективно, чем не модифицированное генетически растение того же вида, причем способ включает введение в растение или родительское растение генетического агента, который кодирует белок PIN сорго, выбранный из SbPIN4 и SbPIN2 или их эквивалента из другого растения, или который модулирует экспрессию собственного PIN. Указание на модулирование включает увеличение и снижение уровня экспрессии. Более того, может быть выбран PIN, имеющий желаемый профиль экспрессии во всех или отдельных тканях в растении.

В настоящем описании предусмотрен способ получения генетически модифицированного растения, которое использует воду более эффективно, чем не модифицированное генетически растение того же вида, причем способ включает введение в растение или родительское растение генетического агента, который кодирует продукт, ассоциированный или способствующий фенотипу поддержания зеленым, включающему переключение использования воды на использование воды в период после цветения или увеличение усвояемости воды в процессе роста культуры или увеличение эффективности транспирации, приводящие к увеличению индекса урожая и выхода зерна в условиях ограниченного доступа воды, и где продукт выбран из перечня, состоящего из SbPIN1-11 или их эквивалентов из другого растения, или который модулирует экспрессию собственного PIN в растении.

Также в настоящем описании описан способ получения генетически модифицированного растения, которое использует воду более эффективно, чем не модифицированное генетически растение того же вида, причем способ включает введение в растение или родительское растение генетического агента, который кодирует белок, выбранный из списка, состоящего из SbPIN4 и SbPIN2 или их эквивалентов из другого растения, или который модулирует экспрессию собственного PIN в растении. Термин "введение" включает введение путем рекомбинантного вмешательства, а также с помощью протокола мутагенеза или скрещивания с последующей селекцией.

В настоящем описании описан способ получения генетически модифицированного растения, которое использует воду более эффективно, чем не модифицированное генетически растение того же вида, причем способ включает введение в растение и/или родительское растение генетического агента, который кодирует два или более белков PIN или который модулирует экспрессию двух или более собственных белков PIN в растении. Примеры PIN в сорго включают SbPIN1-11, такие как SbPIN4 и SbPIN2 или их эквиваленты из другого растения. Например, SbPIN4 соответствует OsPIN5, и SbPIN2 соответствует OsPIN3a. SbPIN и OsPIN определены в табл. 1А.

Генетически модифицированные растения и их потомки, проявляющие признак поддержания зеленым, также предусмотрены в рамках настоящего изобретения, так же как и семена, плоды и цветки и другой репродуктивный материал или материал размножения.

В рамках настоящего изобретения предусмотрены как генетический материал, который кодирует белок PIN или его функциональный гомолог или ортолог, который ассоциирован или способствует фенотипу поддержания зеленым, который включает архитектуру листового полога, который способствует переключению использования воды на использование воды в период после цветения или увеличению усвояемости воды в процессе роста культуры или увеличению эффективности транспирации, приводящим к увеличению индекса урожая и выхода зерна в условиях ограничения доступа воды, так и агент, который модулирует экспрессию PIN.

В одном примере генетический материал выбран из (i) агента, который кодирует SbPIN4; и (ii) агента, который модулирует уровни экспрессии SbPIN4 или его эквивалента из другого растения. В другом примере генетический материал выбран из (i) агента, который кодирует SbPIN2; и (ii) агента, который модулирует экспрессию SbPIN2 или его эквивалента из другого растения.

Генетический материал включает агент, который кодирует белок SbPIN4 или SbPIN2 или их функциональный гомолог или ортолог или их эквивалент из другого растения, который ассоциирован или способствует фенотипу поддержания зеленым, включающему архитектуру листового полога, которая способствует переключению использования воды на использование воды в период после цветения, или увеличению усвояемости воды в процессе роста культуры, или увеличению эффективности транспирации, приводящим к увеличению индекса урожая и выхода зерна в условиях ограничения доступа воды; и агент, который модулирует экспрессию SbPIN4 или SbPIN2 или их эквивалента из другого растения.

В настоящем описании описана система управления растениеводством для снижения зависимости от воды или иного повышения эффективности использования воды и увеличения выхода зерна или продукта. Система управления растениеводством включает получение адаптированной к засухе сельскохозяйственной культуры, включающей злаковые растения, с использованием выбора и модулирования экспрессии локуса PIN или его функционального эквивалента, как определено в настоящем описании, отдельно или в комбинации с введением других полезных признаков, таких как размер зерна, размер корней, устойчивость к солям, устойчивость к гербицидам, устойчивость к вредителям и т.п. Альтернативно или дополнительно, система управления растениеводством включает получение адаптированных к засухе растений и сельскохозяйственные процедуры, такие как орошение, требования к питательным веществам, плотность и геометрия насаждения культуры, борьба с сорняками, борьба с насекомыми, аэрация почвы, уменьшение кущения, поднятие грядок и т.п. Примеры локуса PIN включают SbPIN1-11 (табл. 1A), такие как SbPIN4 и SbPIN2 и их эквиваленты из других растений.

Также в настоящем описании описана коммерческая модель для повышения экономической отдачи в отношении выхода культуры, причем модель включает получение сельскохозяйственных растений, имеющих архитектуру листового полога, которая способствует переключению использования воды растением на использование воды в период после цветения, или увеличение усвояемости воды в процессе роста культуры, или увеличение эффективности транспирации, тем самым, увеличивая HI и выход зерна в условиях ограниченного доступа воды, получение семян полученного сельскохозяйственного растения и распределение семян производителям зерна для повышения выхода и прибыли.

В настоящем описании используются следующие сокращения:

- CI - доверительный интервал,
- CWU - использование воды культурой,
- DW - масса сухого вещества,
- GLA - площадь зеленого листа,
- HD - высокая плотность,
- HI - индекс урожая,
- HT - высокое кущение,
- HW - высокий доступ воды,
- HWHD - высокий доступ воды, высокая плотность (промежуточный дефицит воды),
- HWLD - высокий доступ воды, низкая плотность (наименьший дефицит воды),
- LA - площадь листа,
- LD - низкая плотность,
- LT - низкое кущение,
- LW - низкий доступ воды,
- LWHD - низкий доступ воды, высокая плотность (наибольший дефицит воды),
- LWLD - низкий доступ воды, низкая плотность (промежуточный дефицит воды),
- NIL - практически изогенная линия,
- OsPIN - PIN из риса,
- PAB - биомасса после цветения,
- PASM - масса стеблей после цветения,
- PIN, соцветие в форме булавки
- PPBR - соотношение биомассы до:после цветения,
- QTL - локус количественных признаков,
- ROS - укрытие от дождя,
- RWC - относительное содержание воды,
- SbPIN - PIN из сорго,
- SLW - удельная масса листьев,
- SML - обучение статистической машины,
- Stg - поддержание зеленым,
- T - транспирация,
- T2 - побег в пазухе листа 2,
- T3 - побег в пазухе листа 3,
- T4 - побег в пазухе листа 4,
- T5 - побег в пазухе листа 5,
- T6 - побег в пазухе листа 6,

TE - эффективность транспирации,
 TS - терминальный стресс,
 VPD - дефицит давления пара,
 WW - хорошо поливаемый.

В табл. 1А представлена информация о PIN из сорго и риса.

Таблица 1А

Детальное описание QTL Stg сорго

ID гена сорго	Гомолог из риса	Сорго	Хромосома	П.н. (начало)	П.н. (конец)	Длина (п.н.)	Предсказанная величина cM	LOD	R ²	Pop	Публикация	Источник аллеля	Опубликованное обозначение	Обобщенное описание QTL Stg
Sb02g029210	OsPIN6	SbPIN1	SBI-02	64347327	64350341	3014	144.3023044	1.9	10.7	B35/Tx7000	Subudhi et al 2000	B35	stg3	Stg3B
								2.5	4.9	N13/E36-1	Hausmann et al 2002	N13	%GL15 #3	
								3	5.8	N13/E36-1	Hausmann et al 2002	N13	%GL30 #5	
								4.9	9.5	N13/E36-1	Hausmann et al 2002	N13	%GL45 #4	
Sb03g029320	OsPIN3a	SbPIN2	SBI-03	57449784	57453744	3960	88.78882569	2.63	10.2	SC56/Tx7000	Kebede et al 2001	SC56	Stg A	Stg2
								2.65	14	B35/Tx7000	Subudhi et al 2000	B35	stg2	
								2.65	6.1	2968/HS18551	Srinivas et al 2009	2968	QGlaa-sbi03	
								2.9	7.5	2968/HS18551	Srinivas et al 2009	2968	QPglam-sbi03	
								3.66	19.9	B35/Tx7000	Subudhi et al 2000	B35	stg2	
								5.52	29.2	B35/Tx7000	Subudhi et al 2000	B35	stg2	
								5.44	22.6	B35/Tx7000	Subudhi et al 2000	Tx7000	stg2	
								5.6	24.8	B35/Tx7000	Xu et al 2000	Tx7000	Ch2	
								6.23	30.3	B35/Tx7000	Xu et al 2000	B35	Stg2	
								6.6	28.5	B35/Tx430	Crasta et al 1999	B35	SGA	
								2.8	5.6	N13/E36-1	Hausmann et al 2002	E36-1	%GL45 #5	
Sb03g032850	OsPIN1	SbPIN3	SBI-03	61297480	61299969	2489	115.1215502	2.69	12	B35/Tx7000	Xu et al 2000	Tx7000	Ch1	Stg1 (расширенный QTL)
								4.59	19.6	B35/Tx7000	Xu et al 2000	B35	Stg1	
								3.18	15.4	B35/Tx7000	Subudhi et al 2000	B35	Stg1	
								3.61	18.1	B35/Tx7000	Subudhi et al 2000	B35	Stg1	
								14.9	26.3	IS9830/E36-1	Hausmann et al 2002	IS9830	%GL15 #1	
								6.5	12.4	IS9830/E36-1	Hausmann et al 2002	IS9830	%GL30 #2	
Sb03g037350	OsPIN5	SbPIN4	SBI-03	65310051	65313194	3143	129.5972557							Stg1 (точно картированный QTL)
Sb03g043960	OsPIN6	SbPIN5	SBI-03	71204119	71206483	2364	152.8989678							
Sb04g028170	OsPIN1	SbPIN6	SBI-04	58261350	58264959	3609	107.0875147	3.63	13.4	SC56/Tx7000	Kebede et al 2001	SC56	Stg C.1	QTL в расщепленном ряду StgC.1
								3.1	6.1	IS9830/E36-1	Hausmann et al 2002	IS9830	%GL15 #2	
								2.8	5.5	IS9830/E36-1	Hausmann et al 2002	IS9830	%GL30 #3	
								2.6	5.1	IS9830/E36-1	Hausmann et al 2002	IS9830	%GL45 #4	
								4.11	15.1	SC56/Tx7000	Kebede et al 2001	Tx7000	Stg C.2	
Sb05g002150	OsPIN1b	SbPIN7	SBI-05	2304407	2307630	3223	17.31415415			только sm1 QTL				sm1QTL
Sb07g026370	OsPIN4	SbPIN8	SBI-07	61560708	61563133	2425	123.616344	2.8	5.6	N13/E36-1	Hausmann et al 2002	N13	%GL15 #5	Hausmann QTL и sm1QTL
								3.4	6.7	N13/E36-1	Hausmann et al 2002	N13	%GL30 #7	
								2.9	5.8	N13/E36-1	Hausmann et al 2002	N13	%GL45 #8	
Sb10g004430	OsPIN1	SbPIN9	SBI-10	3915101	3917519	2418	32.96657613	3.65	13.8	SC56/Tx7000	Kebede et al 2001	Tx7000	Stg B	Kebede QTL
Sb10g008290	OsPIN1c	SbPIN10	SBI-10	8438481	8441508	3027	45.84731059	2.76	11.2	QL39/QL41	Tao et al 2000	QL41	Stg1	Stg1
Sb10g026300	OsPIN2	SbPIN11	SBI-10	55747009	55751104	4095	82.37617984	2.7	5.5	N13/E36-1	Hausmann et al 2002	E36-1	%GL30 #8	Hausmann & Crasta QTL
								2.6	5.2	N13/E36-1	Hausmann et al 2002	E36-1	%GL45 #9	

Краткое описание чертежей

Некоторые фигуры содержат цветные изображения или элементы. Цветные фотографии доступны у заявителя патента или в соответствующем патентном ведомстве. При получении из патентного ведомства может налагаться пошлина.

На фиг. 1 представлено графическое изображение взаимосвязи между количеством стеблей на 1 м² и площадью зеленых листьев во время цветения в ряде практически изогенных линий, имеющих различные интрогрессии Stg;

на фиг. 2 - графическое изображение взаимосвязи между количеством стеблей на 1 м² и площадью зеленых листьев во время цветения для ряда интрогрессии Stg в генетический фон RTx7000 с выращиванием при двух плотностях культур (LD=10 растений/м²; HD=20 растений/м²);

на фиг. 3 - графическое изображение гистограммы предсказанных величин для количества стеблей на растение в популяции с точно картированным Stg1, усредненное для трех сезонов;

на фиг. 4 - табличное представление гистограммы количества стеблей на растение на 44 DAE для пяти генотипов, выращенных при двух режимах доступа воды. Генотипы включают RTx7000 (рекуррентное родительское растение), 6078-1 (донорское родительское растение) и три растения, выбранных из популяции с точно картированным Stg1. HWLD = высокий доступ воды, низкая плотность (10 растений/м²). LWLD = низкий доступ воды, низкая плотность (10 растений/м²);

на фиг. 5 - графическое изображение фенотипического варьирования популяции с точно картированным Stg1 по наличию T2;

на фиг. 6 - графическое изображение фенотипического варьирования популяции с точно картированным Stg1 по наличию T3;

на фиг. 7 - гистограмма наличия T2 для восьми рекомбинантных растений с высоким кущением и восьми рекомбинантных растений с низким кущением из популяции с точно картированным Stg1;

на фиг. 8 - гистограмма общего количества побегов на растение для пяти рекомбинантных растений с высоким кущением и трех рекомбинантных растений с низким кущением из популяции с точно картированным Stg1. Величина 2,5 была выбрана в качестве произвольного порогового значения между высоким кущением и низким кущением;

на фиг. 9A-D - графическое изображение распределения размера листьев главного стебля и побегов для RTx7000 и 6078-1 (Stg1 NIL), выращенных в лизиметрах в условиях низкого и высокого VPD;

на фиг. 10 - графическое изображение распределения размеров листьев главного стебля RTx7000, 6078-1 (Stg1 NIL) и трех рекомбинантных растений из популяции с точно картированным Stg1, выращенных в поле в условиях ограничения доступа воды и высокой плотности (HD=20 растений/м²);

на фиг. 11 - графическое изображение распределения размера листьев (L1-6) для родительских растений популяции с точно картированным Stg1, выращенных под защитным куполом;

на фиг. 12 - графическое изображение распределения длины листьев (L1-6) для родительских растений популяции с точно картированным Stg1, выращенных под защитным куполом;

на фиг. 13 - графическое изображение распределения ширины листьев (L1-6) для родительских растений популяции с точно картированным Stg1, выращенных под защитным куполом;

на фиг. 14 - графическое изображение распределения размера листьев (L1-11) для родительских растений популяции с точно картированным Stg1, выращенных под защитным куполом;

на фиг. 15 - графическое изображение распределения длины листьев (L1-10) для родительских растений популяции с точно картированным Stg1, выращенных под защитным куполом;

на фиг. 16 - гистограмма фенотипического варьирования длины L10 в подгруппе растений популяции с точно картированным Stg1, выращенных под защитным куполом;

на фиг. 17 - диаграмма, показывающая, что увеличенной доступности воды во время цветения достигают путем снижения использования воды посредством двух механизмов (снижение кущения и меньший размер листьев) в растениях, содержащих область Stg1;

на фиг. 18 показано, что размер листового полога модулируется как конститутивным, так и адаптивным ответами, контролируемые геном(ами) в области Stg1;

на фиг. 19 - графическое изображение распределения размера листьев главного стебля RTx7000, 6078-1 (Stg1 NIL) и трех рекомбинантных растений из популяции с точно картированным Stg1, выращенных в поле в условиях ограниченного доступа воды и высокой плотности (HD=20 растений/м²);

на фиг. 20 - графическое изображение взаимосвязи между площадью листа L2 и общей площадью зеленых листьев во время цветения для двух родительских растений (6078-1 и RTx7000) и трех рекомбинантных растений из популяции с точно картированным Stg1;

на фиг. 21 - графическое изображение взаимосвязи между общей площадью зеленых листьев (см²/м²) и использованием воды культурой (мм) во время цветения для двух родительских растений (6078-1 и RTx7000) и трех рекомбинантных растений из популяции с точно картированным Stg1;

на фиг. 22 - графическое изображение взаимосвязи между площадью зеленых листьев и использованием воды (Т) в четырех растениях с QTL Stg и рекуррентном родительском растении (RTx7000) в лизиметрических исследованиях при двух уровнях VPD;

на фиг. 23 - графическое изображение гистограммы фенотипического варьирования "соотношения корни:побеги" для L6 в популяции с точно картированным Stg1, выращенной под защитным куполом;

на фиг. 24 - графическое изображение временного профиля совокупного использования воды культурой для RTx7000 и Stg1, выращенных в условиях низкого доступа воды и низкой плотности (20 растений/м²). Вертикальная линия обозначает цветение;

на фиг. 25 - графическое изображение взаимосвязи между длиной (мм) и зеленостью (SPAD) листа 10 в популяции с точно картированным Stg1, выращенной под защитным куполом;

на фиг. 26 - графическое изображение взаимосвязи между зеленостью листьев (SPAD) и фотосинтезом листьев в подгруппе линий из популяции с точно картированным Stg1, включая родительские растения;

на фиг. 27 - графическое изображение взаимосвязи между зеленостью листьев (SPAD) и WUE (Lisog) в подгруппе линий из популяции с точно картированным Stg1, включая родительские растения;

на фиг. 28 - графическое изображение взаимосвязи между зеленостью листьев (SPAD) и WUE

(Licor) в четырех Stg Nil (Stg1, Stg2, Stg3 и Stg4) и рекуррентном родительском растении (RTx7000);

на фиг. 29 - графическое изображение взаимосвязи между транспирацией на площадь листа и эффективностью транспирации в четырех Stg QTL и рекуррентном родительском растении (RTx7000) в лизиметрических исследованиях при двух уровнях VPD;

на фиг. 30 - графическое изображение взаимосвязи между CWU (мм) до и после цветения в подгруппе линий из популяции с точно картированным Stg1, включая родительские растения, выращенных в условиях высокой плотности (HD) и низкой плотности (LD);

на фиг. 31А и В - графическое изображение профилей совокупного использования воды для Stg1 и RTx7000, выращенных в условиях LWHD;

на фиг. 32 - графическое изображение взаимосвязи между CWU (мм) до и после цветения в четырех Stg QTL и рекуррентном родительском растении (RTx7000), выращенных в условиях низкого доступа воды (LW) и низкой плотности (LD);

на фиг. 33 - графическое изображение взаимосвязи между PPBR и PAB в четырех Stg QTL и рекуррентном родительском растении (RTx7000), выращенных в условиях ограниченного доступа воды при двух плотностях культуры (LD=10 растений/м²; HD=20 растений/м²);

на фиг. 34 - графическое изображение взаимосвязи между GLAA и PPBR в четырех Stg QTL и рекуррентном родительском растении (RTx7000), выращенных в условиях ограниченного доступа воды при двух плотностях культуры (LD=10 растений/м²; HD=20 растений/м²);

на фиг. 35 - графическое изображение взаимосвязи между GLAA и PASB в четырех Stg QTL и рекуррентном родительском растении (RTx7000), выращенных в условиях ограниченного доступа воды при двух плотностях культуры (LD=10 растений/м²; HD=20 растений/м²);

на фиг. 36 - графическое изображение взаимосвязи между PPBR и PAB в четырех Stg QTL и рекуррентном родительском растении (RTx7000), выращенных в условиях ограниченного доступа воды при двух плотностях культуры (LD=10 растений/м²; HD=20 растений/м²);

на фиг. 37 - графическое изображение взаимосвязи между PPBR и PASM в четырех Stg QTL и рекуррентном родительском растении (RTx7000), выращенных в условиях ограниченного доступа воды при двух плотностях культуры (LD=10 растений/м²; HD=20 растений/м²);

на фиг. 38 - графическое изображение взаимосвязи между PPBR и выходом зерна в четырех Stg QTL и рекуррентном родительском растении (RTx7000), выращенных в условиях ограниченного доступа воды при двух плотностях культуры (LD=10 растений/м²; HD=20 растений/м²);

на фиг. 39 - графическое изображение взаимосвязи между RWC при среднем наливе зерна (FL-2) и относительной скоростью старения листьев в четырех Stg QTL и рекуррентном родительском растении (RTx7000), выращенных в условиях ограниченного доступа воды при двух плотностях культуры (LD=10 растений/м²; HD=20 растений/м²);

на фиг. 40 - графическое изображение взаимосвязи между относительной скоростью старения листьев и площадью зеленых листьев в зрелом состоянии в четырех Stg QTL и рекуррентном родительском растении (RTx7000), выращенных в условиях ограниченного доступа воды при двух плотностях культуры (LD=10 растений/м²; HD=20 растений/м²);

на фиг. 41 - графическое изображение взаимосвязи между относительным содержанием воды (RWC) при среднем наливе зерна (FL-2) и массой стебля в зрелом состоянии в четырех Stg QTL и рекуррентном родительском растении (RTx7000), выращенных в условиях ограниченного доступа воды при двух плотностях культуры (LD=10 растений/м²; HD=20 растений/м²);

на фиг. 42 - графическое изображение взаимосвязи между массой стебля после цветения (PASM) и биомассой после цветения (PAB) в четырех Stg QTL и рекуррентном родительском растении (RTx7000), выращенных в условиях ограниченного доступа воды при двух плотностях культуры (LD=10 растений/м²; HD=20 растений/м²);

на фиг. 43 - графическое изображение взаимосвязи между биомассой стебля после цветения и выходом зерна в четырех Stg QTL и рекуррентном родительском растении (RTx7000), выращенных в условиях ограниченного доступа воды при двух плотностях культуры (LD=10 растений/м²; HD=20 растений/м²);

на фиг. 44 - графическое изображение взаимосвязи между массой стебля после цветения (PASM) и биомассой после цветения (PAB) в четырех Stg1 QTL и рекуррентном родительском растении (RTx7000), выращенных в условиях ограниченного доступа воды при двух плотностях культуры, которые были выращены в эксперименте в 2005 году (LD=10 растений/м²; HD=20 растений/м²);

на фиг. 45 - графическое изображение взаимосвязи между массой стебля после цветения (PASM) и выходом зерна в четырех Stg QTL и рекуррентном родительском растении (RTx7000), выращенных в условиях ограниченного доступа воды при двух плотностях культуры (LD=10 растений/м²; HD=20 растений/м²), которые были выращены в эксперименте в 2005 г.;

на фиг. 46 - графическое изображение взаимосвязи между массой стебля после цветения (PASM) и биомассой после цветения (PAB) в различных линиях с точно картированным Stg1 и рекуррентном родительском растении (RTx7000), выращенных в условиях ограниченного доступа воды при двух плотностях культуры (LD=10 растений/м²; HD=20 растений/м²);

на фиг. 47 - графическое изображение взаимосвязи между содержанием воды (RWC) при среднем наливе зерна (FL-2) и выходом зерна при различных комбинациях Stg QTL и рекуррентного родительского растения (RTx7000), выращенных в условиях ограниченного доступа воды при двух плотностях культуры (LD=10 растений/м²; HD=20 растений/м²) в эксперименте по выращиванию в 2004 г.;

на фиг. 48 - графическое изображение взаимосвязи между водным потенциалом листа (LWP) FL-2 при среднем наливе зерна (бар) и выходом зерна (г/м²) в Stg1 QTL (6078-1) и рекуррентном родительском растении (RTx7000), выращенных в условиях ограниченного доступа воды при двух плотностях культуры (LD=10 растений/м²; HD=20 растений/м²);

на фиг. 49 - графическое изображение взаимосвязи между PPBR и CWU в ходе налива зерна в четырех Stg QTL и рекуррентном родительском растении (RTx7000), выращенных в условиях ограниченного доступа воды при двух плотностях культуры (LD=10 растений/м²; HD=20 растений/м²);

на фиг. 50 - графическое изображение взаимосвязи между CWU в ходе налива зерна (мм) и выходом зерна (г/м²) в четырех Stg QTL и рекуррентном родительском растении (RTx7000), выращенных в условиях ограниченного доступа воды при двух плотностях культуры (LD=10 растений/м²; HD=20 растений/м²);

на фиг. 51 - графическое изображение взаимосвязи между PPBR и выходом зерна в четырех Stg QTL и рекуррентном родительском растении (RTx7000), выращенных в условиях ограниченного доступа воды при двух плотностях культуры (LD=10 растений/м²; HD=20 растений/м²);

на фиг. 52 - графическое изображение взаимосвязи между CWU в ходе налива зерна (мм) и размером зерен (мг) в четырех Stg QTL и рекуррентном родительском растении (RTx7000), выращенных в условиях ограниченного доступа воды при двух плотностях культуры (LD=10 растений/м²; HD=20 растений/м²);

на фиг. 53 - графическое изображение взаимосвязи между PPBR и размером зерен в четырех Stg QTL и рекуррентном родительском растении (RTx7000), выращенных в условиях ограниченного доступа воды при двух плотностях культуры (LD=10 растений/м²; HD=20 растений/м²);

на фиг. 54 - графическое изображение взаимосвязи между PPBR и CWU в ходе налива зерна в различных линиях с точно картированным Stg1 и рекуррентном родительском растении (RTx7000), выращенных в условиях ограниченного доступа воды при двух плотностях культуры (LD=10 растений/м²; HD=20 растений/м²);

на фиг. 55 - графическое изображение взаимосвязи между CWU в ходе налива зерна (мм) и выходом зерна (г/м²) в различных линиях с точно картированным Stg1 и рекуррентном родительском растении (RTx7000), выращенных в условиях ограниченного доступа воды при двух плотностях культуры (LD=10 растений/м²; HD=20 растений/м²);

на фиг. 56А-С - графическое изображение результатов исследования имитационной модели культуры сорго с использованием генетического сорта Buster с обычными 2 побегами/растение (НТ) против Buster только с 1 побегом/растение (LT) в виртуальных окружающих условиях с хорошим доступом воды (WW) и в условиях терминального стресса (TS). Для обоих виртуальных окружающих условий были выбраны следующие параметры: плотность посева 5 растений/м² с расстоянием между рядами 1 м; глубина почвы = 1800 мм; PAWC почвы = 324 мм; без ограничений N;

на фиг. 57А - графическое изображение дифференциальной экспрессии SbPIN4 (кандидат Stg1) в условиях хорошего доступа воды. В условиях хорошего доступа воды этот ген подавляется в молодых корневых кончиках Tx642 и Stg1 NIL по сравнению с Tx7000;

на фиг. 57В - графическое изображение дифференциальной экспрессии SbPIN4 (кандидат по Stg1) в условиях дефицита воды. В условия дефицита воды этот ген активируется в большинстве тканей, но особенно в растущих листьях Tx642 и Stg1 NIL по сравнению с Tx7000;

на фиг. 57С - графическое изображение дифференциальной экспрессии SbPIN2 (кандидат по Stg2) в условиях хорошего доступа воды. В условиях хорошего доступа воды этот ген слабо активирован в тканях стебля и корней Tx642 и Stg1 NIL по сравнению с Tx7000;

на фиг. 57D - графическое изображение дифференциальной экспрессии SbPIN2 (кандидат по Stg2) в условиях дефицита воды. В условиях дефицита воды этот ген активируется в большинстве тканей Tx642 и Stg1 NIL по сравнению с Tx7000.

Подробное описание

На протяжении настоящего описания, если контекст не указывает на иное, слово "содержат" или его варианты, такие как "содержит" или "содержащий", следует понимать как предполагающие включение указанного элемента или целого числа или стадии способа или группы элементов или целых чисел или стадий способов, но не исключение какого-либо другого элемента или целого числа или стадии способа или группы элементов или целых чисел или стадий способа.

Как используют в настоящем описании, форма единственного числа включает множественные аспекты, если контекст явно не указывает на иное. Таким образом, указание на "локус" включает один локус, а также два или более локусов; указание на "ауксин" включает один ауксин, а также два или более ауксинов; указание на "описание" включает один или несколько аспектов, представленных в описании. Аспекты, описанные в настоящем описании, охватываются термином "изобретение". Все ас-

пекты, представленные, описанные или заявленные в настоящем описании, входят в объем изобретения.

В настоящем описании описаны QTL, ассоциированные и способствующие фенотипу поддержания зеленым в культуре, включая злаковые растения. QTL обозначают в общем как StgX, где X представляет собой число от 1 и выше, соответствующее генетическому локусу или области генетических локусов на конкретной хромосоме в сельскохозяйственном растении. Подобласть обозначают как StgX_m, где m представляет собой алфавитное обозначение области в StgX. В настоящем описании показано, что модулирование экспрессии StgX во всех или отдельных тканях растения обеспечивает физиологическую и генетическую сеть, которая индуцирует или обеспечивает переключение использования воды сельскохозяйственным растением на использование воды в период после цветения или увеличение усвояемости воды в процессе роста культуры или увеличение эффективности транспирации, тем самым, увеличивая индекс урожая (HI) и выход зерна в условиях ограниченного доступа воды. "Экспрессия" StgX включает активацию или подавление уровней экспрессии (т.е. модулирование экспрессии) локуса, а также выбор полиморфного варианта, который экспрессируется на более высоком или более низком уровне, или который кодирует более или менее активный продукт во всех или отдельных тканях в растении. Фенотип может обеспечивать сам локус или его функциональный эквивалент, такой как кДНК, кодирующая тот же белок, который кодируется локусом.

QTL идентифицируют локусы, кодирующие белки PIN. Белки PIN представляют собой эффлюкс-ные переносчики ауксина, которые содержат трансмембранные домены и, главным образом, локализованы в плазматических мембранах. Термин "PIN" происходит от "соцветия в форме булавки". PIN для сорго представляет собой "SbPIN". В настоящем описании описан PIN из любого растения (например, OsPIN из риса). Геномное положение SbPIN из сорго описано в табл. 1А.

В настоящем описании предусмотрен способ получения генетически модифицированного растения, которое использует воду более эффективно, чем не модифицированное генетически растение того же вида, причем способ включает введение в растение или родительское растение генетического агента, который кодирует белок PIN или его функциональный гомолог или ортолог; или который модулирует экспрессию собственного белка PIN; где уровень и место экспрессии PIN обеспечивает фенотип поддержания зеленым, который включает, среди прочих, архитектуру листового полога, которая способствует переключению использования воды на использование воды в период после цветения или увеличение усвояемости воды в процессе роста культуры, что приводит к увеличенному индексу урожая и выходу зерен в условиях ограничения доступа воды.

Кроме того, в настоящем описании описан способ получения генетически модифицированного растения, которое использует воду более эффективно, чем не модифицированное генетически растение того же вида, причем способ включает введение в растение или родительское растение генетического агента, который кодирует белок SbPIN сорго, выбранный из SbPIN1-SbPIN11, или эквивалент из другого растения, или который модулирует экспрессию собственного PIN. Примеры PIN включают SbPIN4 и SbPIN2 и другие SbPIN, приведенные в табл. 1А, и их эквиваленты в другом растении, а также PIN, имеющий особенно желаемое полиморфное изменение, которое, например, обеспечивает измененный профиль экспрессии в виде повышенных уровней белка PIN. Примерами PIN в других растениях являются OsPIN5, который соответствует SbPIN4, и OsPIN3a, который соответствует SbPIN2.

Генетический агент может представлять собой локус или геномную область или их функциональный эквивалент, такой как кДНК или фрагмент геномной ДНК. Альтернативно агент может модулировать экспрессию собственного локуса PIN в конкретном растении. Под "введением" подразумевают введение путем рекомбинантного вмешательства путем мутагенеза или скрещивания с последующей селекцией.

Без ограничения технологии, описанной в настоящем описании, какой-либо конкретной теорией или образом действия, модулирование экспрессии PIN отдельно или в комбинации с генетической или физиологической сетью изменяет архитектуру растения, усиливая или иным образом обеспечивая эффективное использование воды. В одном аспекте модифицированная архитектура представляет собой модифицированную архитектуру листового полога растения.

Термин "потомство" включает прямое потомство, а также отдаленных родственников растения при условии, что они стабильно экспрессируют признак поддержания зеленым, внесенный ранее в родительское растение.

Указание на "сельскохозяйственное растение" включает злаковое растение. Сельскохозяйственная культура, предусмотренная в рамках изобретения, включает сорго, пшеницу, рожь, кукурузу, ячмень, рожь, рис, абаку, люцерну, миндаль, яблоко, спаржу, банан, фасоль, черную смородину, кормовые бобы, канолу, кешью, маниоку, горох бараний, цитрус, кокос, кофе, кукурузу, хлопок, инжир, лен, виноград, земляной орех, коноплю, кенаф, лаванду, манго, грибы, оливки, лук, горох, арахис, грушу, просо, картофель, рами, рапс, плевел, сою, клубнику, сахарную свеклу, сахарный тростник, подсолнечник, сладкий картофель, колоказию, чай, табак, томат, тритикале, трюфель и ямс. В одном примере механизмы сорго устойчивости к засухе используют для обеспечения устойчивости к засухе в сорго, а также в других сельскохозяйственных растениях. В одном примере генетически модифицированное растение использует воду более эффективно, чем не модифицированное генетически растение того же вида. Имеющиеся ло-

кусы PIN в каждом из указанных выше растений называют "собственными" PIN. В настоящем описании описана активация и подавление собственного PIN или селекция PIN, имеющего конкретный профиль экспрессии. "Собственный" PIN представляет собой локус PIN в родительском растении до манипулирования (рекомбинантные способы, мутагенез или скрещивание).

Термин "устойчивость к засухе" включает выдерживание засухи, адаптацию к засухе, стойкость при засухе, сниженную чувствительность к условиям засухи, увеличенную эффективность использования воды, а также способность изменять использование воды на использование воды в период после цветения или увеличенную усвояемость воды в ходе роста культуры, тем самым увеличивая НИ, и выхода зерна в условиях ограниченного доступа воды. Растения, проявляющие устойчивость к засухе, описывают как "адаптированные к засухе растения" или "растения, проявляющие сниженную чувствительность к условиям ограниченного доступа воды". В настоящем описании описано, что устойчивость к засухе индуцируется, обеспечивается или иным образом ассоциирована с фенотипом поддержания зеленым.

Термин "генетически модифицированный" в отношении растения включает первоначально полученное генетически модифицированное растение, а также потомков, прямых или отдаленных, которые стабильно экспрессируют признак поддержания зеленым. Таким образом, в настоящем описании описаны как классические способы скрещивания для введения генетического агента, т.е. QTL поддержания зеленым или его функционального эквивалента, такого как кДНК или геномный фрагмент, или агента, который активирует или подавляет (т.е. модулирует) экспрессию QTL, или белка, кодируемого ими, так и технология генетической инженерии. Последняя охватывается терминами "способы генетической инженерии" и "рекомбинантные способы". Маркеры, определяющие поддержание зеленым, также можно подвергать скринингу в протоколах скрещивания для мониторинга переноса конкретных генетических областей. Более того, конкретную область поддержания зеленым генетически встраивают рекомбинантными способами в клетку растения или в каллус растения и проросток регенерируют. "Генетически модифицированное" растение включает родительское растение или любых потомков, а также любые продукты растения, такие как зерно, семена, материал размножения, пыльцу и зародышевые клетки. Кроме того, локус PIN может экспрессироваться в одной конкретной ткани растения, но не экспрессируется или его экспрессия снижена в другой ткани. Более того, растение можно подвергать мутагенезу, такому как генетический, радиоактивный или химический мутагенез, и можно отбирать мутантные растения с PIN, имеющие желаемый фенотип.

Указание на "фенотип поддержания зеленым" включает характеристики, выбранные из увеличенной пластичности архитектуры листового полога, уменьшенного размера листового полога, увеличенной биомассы на единичную площадь листа во время цветения, более высокой эффективности транспирации, увеличенного использования воды в ходе налива зерна, увеличенного водного режима растения в ходе налива зерна, сниженного соотношения биомассы до:после цветения, замедленного старения, увеличения выхода зерна, более высокого размера зерен и сниженного полегания.

В настоящем описании предусмотрен способ получения генетически модифицированного растения, которое использует воду более эффективно, чем не модифицированное генетически растение того же вида, причем способ включает введение в растение или родительское растение генетического агента, который кодирует продукт, ассоциированный или способствующий фенотипу поддержания зеленым, который включает переключение использования воды на использование воды в период после цветения, или увеличение усвояемости воды в процессе роста культуры, или увеличение эффективности транспирации, приводящее к увеличению индекса урожая и выхода зерна в условиях ограниченного доступа воды, и где продукт выбран из перечня, состоящего из SbPIN1-11, включая SbPIN4 и SbPIN2 и другие SbPIN, приведенные в табл. 1А, или их эквивалента из другого растения, или который модулирует экспрессию собственного PIN в растении.

Таким образом, в настоящем описании описано использование генетического материала, кодирующего PIN, или генетического материала, который модулирует уровни собственного PIN для способствования фенотипу поддержания зеленым.

В настоящем описании предусмотрены генетически модифицированные растения, которые проявляют фенотип поддержания зеленым в результате генетической модификации, а также семена, плоды, цветки и другой репродуктивный материал или другой материал размножения. Также предусмотрены исходный материал корней или исходный материал размножения. Это основано на предположении, что семена, плоды, цветки, репродуктивный материал или материал размножения проявляют или могут переходить на фенотип поддержания зеленым, введенный в конечного родителя(ей).

Указание на "агент, который модулирует уровни экспрессии PIN", включает промоторы, микроРНК, гены и химические соединения, которые способствуют увеличенной или сниженной экспрессии гена во всех или отдельных тканях или увеличенной или сниженной активности продукта гена, а также кДНК и геномные фрагменты. Агент также может представлять собой интрон геномного гена, который является частью генетической сети, для способствования модулированию экспрессии.

Белок PIN обеспечивает градиент ауксина в клетках и содержит трансмембранный домен и, главным образом, локализован на плазматической мембране. Белки PIN являются ограничивающими скоростью факторами транспорта ауксина и обеспечивают векторное направление для потоков ауксина. В

настоящем описании описано, что по меньшей мере один из Stg1 или Stg2 кодирует белок PIN. Полагают, что введение Stg1 или Stg2 *de novo* в растение или повышение модулирования или экспрессии собственных Stg1 или Stg2 способствуют проявлению одного или нескольких признаков или подпризнаков, ассоциированных с фенотипом поддержания зеленым.

Как указано выше, белки PIN представляют собой эффлюксные переносчики ауксина, которые опосредуют полярный транспорт ауксина (PAT) из клетки в клетку в противоположность транспорту ауксина через ксилему (Rashotte et al., *Plant Cell* 13:1683-1697, 2000; Friml et al., *Current Opinion in Plant Biology* 6:7-12, 2003). Термин "PIN" происходит от соцветия в форме булавки, которое развивается в *Arabidopsis*, когда транспорт ауксина является дефектным. В настоящем описании предусмотрен SbPINn из сорго, где n представляет собой число от 1 до 11, а также PIN из любого другого растения.

Также в настоящем описании описан способ получения генетически модифицированного растения, которое использует воду более эффективно, чем не модифицированное генетически растение того же вида, причем способ включает введение в растение или родительское растение генетического агента, который кодирует белок, выбранный из перечня, состоящего из SbPIN1-11, такого как SbPIN4 и SbPIN2 или другие SbPIN, приведенные в табл. 1А, или их эквивалента из другого растения, или которое модулирует экспрессию собственного PIN в растении.

В настоящем изобретении описано, что SbPIN4 и SbPIN2 сорго являются основными генами адаптации к засухе совместно с другими SbPIN, а также их эквивалентами из других растений.

Различия в передаче сигнала ауксина объясняют все из множества фенотипов, наблюдаемых в растениях с профилем экспрессии PIN. Фенотипы, проявляемые растениями SbPIN4 или SbPIN2, например, объясняются изменениями эффлюкса ауксина и включают снижение кушения, листья меньших размеров (как в длину, так и в ширину), снижение массы листьев и увеличение соотношения корень:побег. Фенотипы, которые проявляют растения SbPIN4 или SbPIN2, например, также могут быть объяснены непрямо (или в качестве вытекающего следствия этих прямых эффектов) и включают увеличенную доступность воды во время цветения, более высокую концентрацию N в листьях во время цветения, увеличенную транспирацию и биомассу на единицу площади листа, более высокую эффективность транспирации, сохранение площади зеленых листьев в ходе налива зерна, увеличенный индекс урожая, более высокий выход зерна, более высокий размер зерен и увеличенную устойчивость к полеганию. В настоящем описании предусмотрено, что эквиваленты SbPIN4 и SbPIN2 и другие SbPIN функционируют среди других основных видов злаков и сельскохозяйственных культур для повышения адаптации к засухе по всему миру, где доступность воды ограничивает рост культуры после цветения.

В соответствии с указаниями в настоящем описании, модулирование экспрессии PIN, выбранного из SbPIN1-11, таких как SbPIN4 (Stg1) и SbPIN2 (Stg2), или их эквивалента из другого растения, во всех или отдельных тканях обеспечивает адаптацию к засухе прямо и непрямо, что в конечном итоге приводит к более высокому выходу зерна, большему размеру зерен и устойчивости к полеганию в условиях ограниченного доступа воды.

В одном примере фенотип поддержания зеленым вовлекает присутствие нескольких белков, таких как два или более SbPIN1-11, таких как SbPIN4 и SbPIN2.

В настоящем описании описан способ получения генетически модифицированного растения, которое использует воду более эффективно, чем не модифицированное генетически растение того же вида, причем способ включает введение в растение или родительское растение генетического агента, который кодирует два или более PIN или их функциональный гомолог или ортолог, которые ассоциированы или способствуют фенотипу поддержания зеленым, который включает изменение использования воды на использование воды в период после цветения, или увеличение усвояемости воды в процессе роста культуры, или увеличение эффективности транспирации, приводящее к увеличению индекса урожая и выхода зерна в условиях ограничения доступа воды; или агента, который модулирует уровни экспрессии двух или более PIN.

Под "двумя или более" подразумевают 2, или 3, или 4, или 5, или 6, или 7, или 8, или 9, или 10, или 11. Единичный или множественные локусы PIN также могут экспрессироваться или быть ингибированными.

В одном примере генетический материал выбран из (i) агента, который кодирует SbPIN4; и (ii) агента, который модулирует уровни экспрессии SbPIN4 или его эквивалента в другом растении. В другом примере генетический материал выбран из (i) агента, который кодирует SbPIN2; и (ii) агента, который модулирует экспрессию SbPIN2 или его эквивалента в другом растении.

Увеличенная доступность воды во время цветения в растениях, содержащих область Stg1, обеспечивается снижением использования воды посредством двух механизмов (снижение кушения и меньший размер листьев). Оказалось, что оба механизма по отдельности снижают размер листового полога в среднем приблизительно на 9%. Механизм "низкого кушения" преобладает в условиях низкой плотности, когда потенциал к кушению является высоким. Механизм "небольшого размера листьев" преобладает в окружающих условиях высокой плотности, когда потенциал к кушению является низким. В совокупности эти механизмы обеспечивают сельскохозяйственные растения со значительной пластичностью в отношении модификации архитектуры листового полога в ответ на тяжесть ограничения воды.

Поддержание зеленым увеличивает пластичность архитектуры листового полога посредством конститутивных и адаптивных ответов. Размер листового полога в случае Stg1 или Stg2 снижается приблизительно на 5%, даже когда доступ воды не ограничен (конститутивный ответ). Размер листового полога далее снижается (адаптивный ответ) при мягкой засухе (~10%) и более тяжелой засухе (~15%). Низкое кущение, главным образом, является конститутивным ответом. Небольшой размер листьев является как конститутивным, так и адаптивным ответом.

Более того, в настоящем описании описано, что область Stg1 или Stg2 обеспечивает адаптацию к засухе путем снижения размера листового полога (вследствие снижения кущения и меньшего размера листьев) и снижения использования воды культурой во время цветения. Это показано с помощью высокой корреляции ($r^2=0,9$) между размером листового полога и использованием воды культурой в исследованиях с искусственной засухой (укрытие от дождя [ROS]) и в лизиметрических исследованиях.

Увеличенной доступности воды во время цветения также достигают с помощью увеличения усвояемости воды (лучшее извлечение воды и более глубокое и большее латеральное распространение).

Поддержание зеленым увеличивает биомассу на единицу площади листьев во время цветения. Предполагая, что масса корней эквивалентна (или по меньшей мере незначительно меньше), эти отличия могли бы быть объяснены отличиями в транспирации (T) на единичную площадь листьев [LA] (T/LA) и/или эффективности транспирации (TE). Лизиметрические исследования указывают на то, что увеличение T/LA, а не TE, инициируют наблюдаемые увеличения биомассы на площадь листа. Следует отметить, что увеличение T/LA происходило, только когда дефицит воды был достаточным, чтобы уменьшить площадь листьев. Когда дефицит воды был менее тяжелым (т.е. недостаточным, чтобы уменьшить площадь листьев), тогда происходило снижение T/LA, что приводило к более высокой TE.

Более высокую TE в линиях StgX, таких как Stg1 или Stg2, также наблюдают, когда дефицит воды является менее тяжелым. Полагают, что увеличение TE путем интрогрессии Stg1 или Stg2 является следствием а) пропорционально более высокой способности к фотосинтезу по сравнению с устьичной проводимостью, вследствие меньшего размера, меньшей толщины листьев и более зеленых листьев, и/или б) снижения транспирации при сохранении биомассы. Лизиметрические исследования указывают на то, что оба из этих механизмов приводят к более высокой TE в линиях Stg1, причем основным механизмом является снижение транспирации.

В настоящем описании полагают, что изменение транспирации на единичную площадь листьев является следствием а) количества устьиц, б) размера отверстия устьиц, с) изменения времени открытия и закрытия устьиц относительно VPD, и/или d) количества клеток основания волосков (которое влияет на пограничный слой и, таким образом, T/LA). Интрогрессия Stg1, например, в RTx7000 модифицировала анатомию листьев путем увеличения количества клеток обкладки сосудистых пучков, окружающих сосудистый пучок.

Различия в морфологии листьев являются очевидными между RTx7000 и Stg1 или Stg2. В этом случае, в Stg1 или Stg2 обкладка сосудистых пучков, окружающая сосудистый пучок, была более представлена и была меньшего размера. Также было меньше устьиц и больше клеток основания волоска на единичную площадь листа (листья 7 и 10) в Stg1 по сравнению с RTx7000.

Увеличенного использования воды в ходе налива зерна достигают путем (i) увеличенной доступности воды во время цветения и (ii) увеличенной усвояемости воды (лучшее извлечение воды и более глубокое или большее латеральное распространение) в ходе налива зерна.

Использование воды культурой (CWU) до цветения отрицательно коррелировало с CWU после цветения в эксперименте с искусственной засухой (укрытие от дождя [ROS]). Например, в одном эксперименте 25% увеличение использования воды после цветения (80 против 60 мм) приводило к 25% увеличению выхода зерна (400 против 300 г/м²). Это соответствовало 50 кг/га зерна на каждый дополнительный мм доступной воды.

Stg1 или Stg2 проявляли увеличенное использование воды в период налива зерна в условиях как низкой, так и высокой плотности в эксперименте с укрытием от дождя (ROS). Это было следствием, главным образом, (i) сниженного использования воды во время цветения в условиях высокой плотности, и (ii) увеличенной усвояемости воды в ходе налива зерна в условиях низкой плотности.

В настоящем описании описано, что StgX, такой как Stg1 или Stg2, обеспечивает адаптацию к засухе тем, что он ассоциирован с продукцией биомассы до и после цветения. Область Stg1 или Stg2, например, снижает соотношение биомассы до:после цветения ниже критического уровня, увеличивая выход зерна и устойчивость к полеганию.

В соответствии с указаниями настоящего описания, экспрессия StgX, такого как Stg1, Stg2, Stg3 и/или Stg4, способствует одному или нескольким их следующих фенотипов:

(i) замедленное старение листьев (поддержание зеленым), более высокий выход зерна и устойчивость к полеганию являются следствием более высокого водного режима растений в ходе налива зерна (вследствие увеличенного использования воды в ходе налива зерна);

(ii) интрогрессия StgX, например, в фон RTx7000 увеличивает водный режим растения при среднем наливе зерна, как показано по а) более высокому относительному содержанию воды (RWC), и б) более низкому водному потенциалу листьев (LWP);

(iii) более высокий выход зерна и больший размер зерен являются следствием увеличенной доступности воды в ходе налива зерна;

(iv) более высокий выход зерна, больший размер зерен, и увеличенная устойчивость к полеганию не являются взаимоисключающими (т.е. StgX проявляет все три признака);

(v) преимущества выхода и размера зерен являются относительно более высокими при тяжелой терминальной засухе, чем при мягкой терминальной засухе;

(vi) польза генов поддержания зеленым, например, в фоне RTx7000 (инбредные растения) возникает при диапазоне выхода 1-3 т/га (12-22%), а затем с меньшей, но еще существенной пользой при диапазоне выхода 3-4 т/га (8-10%). Однако имелось небольшое ухудшение, ассоциированное с этими областями (2-4%) при более высоких выходах (5-8 т/га) вследствие более влажных условий. Следует отметить, что эти диапазоны выходов были бы значительно более высокими в гибридах. Поскольку средний выход зерна в сорго для гибридов в северной зерновой зоне составляет приблизительно 2,5 т/га, польза генов поддержания зеленым должна быть значительной. В гибридах не наблюдали снижения выхода зерна в более влажных условиях (без ограничения воды) благодаря поддержанию зеленым;

(vii) интрогрессия StgX, например, в RTx7000 также увеличивает размер зерен на 11%, в среднем, при тяжелой терминальной засухе. Не было влияния StgX QTL на размер зерен при мягкой терминальной засухе или без засухи; и

(viii) каждый из ключевых механизмов StgX картируется в определенной области, указывая на то, что действие одного гена имеет множество плейотропных эффектов.

Кроме того, в настоящем описании описана коммерческая модель для повышения экономической прибыли от продукции культуры. В соответствии с этими идеями, предусматривается коммерческая модель для повышения экономической прибыли от выхода культуры, причем модель включает получение сельскохозяйственных растений, имеющих профиль экспрессии PIN, приводящий к сельскохозяйственному растению, обладающему переключением использования воды растением на использование воды в период после цветения или увеличением усвояемости воды в ходе роста культуры, тем самым увеличивая HI и выход зерна в условиях ограниченного доступа воды, получение семян от полученного сельскохозяйственного растения и распределение семян производителям зерна для достижения увеличенного выхода и прибыли. Указание на PIN включает SbPIN1-11 такие как SbPIN4 и SbPIN2, а также их эквиваленты из других растений.

В настоящем описании описана система управления растениеводством для снижения зависимости культуры от воды или иного повышения эффективности использования воды и увеличения выхода зерна или продукта. Система управления растениеводством включает получение адаптированной к засухе культуры, включающей злаковые растения, с использованием выбора и модулированной экспрессии локуса PIN или его функционального эквивалента, как определено в настоящем описании, отдельно или в комбинации с введением других полезных признаков, таких как размер зерен, размер корней, устойчивость к соли, устойчивость к гербицидам, устойчивость к вредителям и т.п. Альтернативно или дополнительно, система управления растениеводством включает получение адаптированных к засухе растений и сельскохозяйственным процедурам, таким как орошение, требования к питательным веществам, плотность и геометрия насаждения культуры, борьба с сорняками, борьба с насекомыми, аэрация почвы, уменьшение кущения, поднятие грядок и т.п.

В настоящем описании описано, как индуцировать или усиливать способность к адаптации к засухе в растении путем внесения *de novo* одного или нескольких признаков фенотипа поддержания зеленым или увеличения или снижения экспрессии существующего одного или нескольких локусов PIN в растении и/или селекции полиморфного варианта PIN с увеличенной или усиленной экспрессией или активностью продукта. Манипулирование фенотипом поддержания зеленым можно проводить отдельно или в качестве части интегрированной системы управления растениеводством, которая может включать дальнейшую селекцию признака и/или усовершенствование агрономических технологий. Полученные культуры используют воду более эффективно и имеют более высокий выход зерна и увеличенный размер зерен.

Идеи настоящего изобретения включают коммерческие модели для сбора семян от адаптированных к засухе или усиленных сельскохозяйственных растений для распределения специалистам по выращиванию для увеличения в конечном итоге выхода зерна.

В настоящем описании предусматривается использование генетического агента, кодирующего белок PIN или модулирующего уровни экспрессии собственного белка PIN, для производства адаптированного к засухе растения.

QTL идентифицированы в рамках настоящего изобретения как несущие один или несколько локусов PIN, где селекцию уровня их экспрессии проводят с помощью протоколов скрещивания или путем генетической инженерии, для обеспечения фенотипа поддержания зеленым.

Также в настоящем описании описаны генетически модифицированные растения и их потомки, проявляющие признак поддержания зеленым, а также семена, плоды, и цветки и другой репродуктивный материал или материал размножения.

В рамках настоящего изобретения предусмотрены как генетический материал, который кодирует

белок PIN или его функциональный гомолог или ортолог, который ассоциирован или способствует фенотипу поддержания зеленым, который включает архитектуру листового полога, который способствует переключению использования воды на использование воды в период после цветения, или увеличению усвояемости воды в процессе роста культуры, или увеличению эффективности транспирации, приводящим к увеличению индекса урожая и выхода зерна в условиях ограничения доступа воды, так и агент, который модулирует уровень PIN.

В одном примере генетический материал выбран из (i) агента, который кодирует SbPIN, приведенный в табл. 1А; и (ii) агента, который модулирует уровни экспрессии SbPIN, приведенного в табл. 1А, или его эквивалента из другого растения.

В одном примере генетический материал выбран из (i) агента, который кодирует SbPIN4; и (ii) агента, который модулирует уровни экспрессии SbPIN4 или его эквивалента из другого растения. В другом примере генетический материал выбран из (i) агента, который кодирует SbPIN2; и (ii) агента, который модулирует экспрессию SbPIN2 или его эквивалента из другого растения.

Генетический материал включает агент, который кодирует PIN, или его функциональный гомолог или ортолог, который ассоциирован или способствует фенотипу поддержания зеленым, который включает архитектуру листового полога, которая способствует переключению использования воды на использование воды в период после цветения или увеличению усвояемости воды в процессе роста культуры или увеличению эффективности транспирации, приводящим к увеличению индекса урожая и выхода зерна в условиях ограничения доступа воды. Активный агент включает агент, который повышает или снижает уровни PIN. Рассматриваемые гены также можно использовать в качестве маркеров для переноса областей геномов, включающих один или несколько из генов или их эквивалентов из других растений, в конкретное растение для включения в него фенотипа поддержания зеленым.

Примеры

Аспекты, описанные и предусмотренные в настоящем описании, далее описаны с помощью следующих неограничивающих примеров.

Пример 1. Идентификация гена StgX.

Был идентифицирован локус количественных признаков (QTL), который обозначают в настоящем описании как Stg1, являющийся примером StgX, который повышает или усиливает эффективность использования воды растениями сорго. Stg1 кодирует представитель семейства компонента 4 переносчиков выходящего ауксина, PIN4 (или SbPIN4) из сорго зернового.

Этот основной ген адаптации к засухе был точно картирован в геноме сорго. Изменения эффлюкса ауксина могут объяснить все из множества фенотипов, наблюдаемых в растениях, содержащих SbPIN4. Ген-кандидат (и промоторную область) секвенируют в двух родительских растениях популяции с точным картированием (Tx7000 и Tx642) для идентификации однонуклеотидного полиморфизма. Также проводят определение профиля экспрессии РНК в популяции с точно картированным Stg1 для подгрупп линий, моментов времени и органов. Фенотипы, проявляемые растениями SbPIN4, которые могут быть объяснены непосредственно изменениями эффлюкса ауксина, включают сниженное кушение, меньший размер листьев (как в длину, так и в ширину), сниженную массу листьев и увеличенное соотношение корня:побеги. Фенотипы, проявляемые растениями SbPIN4, которые могут быть объяснены непрямо (или в качестве вытекающих следствий этих прямых эффектов), включают увеличенную доступность воды во время цветения, более высокую концентрацию N во время цветения, увеличенную транспирацию и биомассу на единицу площади листа, сниженное соотношение биомассы до:после цветения, более высокую эффективность транспирации, сохранение площади зеленых листьев в ходе налива зерна, увеличенный индекс урожая, более высокий выход зерна, больший размер зерен и увеличенную устойчивость к полеганию. Предполагается, что SbPIN4 функционирует среди других основных злаковых и сельскохозяйственных видов, повышая адаптацию к засухе по всему миру, где доступ воды ограничивает рост культуры после цветения.

Stg1 (SbPIN4) обеспечивает адаптацию к засухе как прямо, так и непрямо, что в конечном итоге приводит к более высокому выходу зерна, большему размеру зерен и устойчивости к полеганию в условиях ограниченного доступа воды.

Увеличенная доступность воды во время цветения в растениях, содержащих область Stg1, обеспечивается снижением использования воды посредством двух механизмов (снижение кушения и меньший размер листьев). Оказалось, что оба механизма по отдельности снижают размер листового полога в среднем приблизительно на 9%. Механизм "низкого кушения" преобладает в условиях низкой плотности, когда потенциал к кушению является высоким. Механизм "небольшого размера листьев" преобладает в окружающих условиях высокой плотности, когда потенциал к кушению является низким. В совокупности, эти механизмы обеспечивают сельскохозяйственные растения со значительной пластичностью в отношении модификации архитектуры листового полога в ответ на тяжесть ограничения воды.

Поддержание зеленым увеличивает пластичность архитектуры листового полога посредством конститутивных и адаптивных ответов. Размер листового полога в случае Stg1 или Stg2 снижается приблизительно на 5%, даже когда доступ воды не ограничен (конститутивный ответ). Размер листового полога далее снижается (адаптивный ответ) при мягкой засухе (~10%) и более тяжелой засухе (~15%). Низкое

кущение, главным образом, является конститутивным ответом. Небольшой размер листьев является как конститутивным, так и адаптивным ответом.

Существует связь между уменьшенным размером листового полога (посредством сниженного кущения и меньшего размера листьев) и сниженным использованием воды культуры во время цветения. Существует высокая корреляция ($r^2=0,9$) между размером листового полога и использованием воды культурой в исследованиях с ROS и лизиметрических исследованиях.

Увеличенной доступности воды во время цветения также достигают с помощью увеличения усвояемости воды (лучшее извлечение воды и более глубокое и большее латеральное распространение).

Поддержание зеленым увеличивает биомассу на единицу площади листьев во время цветения. Предполагая, что масса корней эквивалентна (или, по меньшей мере, незначительно меньше), эти отличия могли бы быть объяснены отличиями в транспирации на единичную площадь листьев (T/LA) и/или эффективности транспирации (TE). Лизиметрические исследования указывают на то, что увеличение T/LA, а не TE, инициирует наблюдаемые увеличения биомассы на площадь листа. Следует отметить, что увеличение T/LA происходило только в условиях низкого VPD; T/LA была в действительности снижена в условиях высокого VPD, предположительно в качестве механизма удержания воды.

Более высокую TE в линиях Stg1 также наблюдали в условиях высокого VPD. Увеличение TE путем интрогрессии Stg1 может быть следствием а) пропорционально более высокой способности к фотосинтезу по сравнению с устьичной проводимостью, вследствие меньшего размера, меньшей толщины листьев и более зеленых листьев, и/или б) снижения транспирации при сохранении биомассы. Лизиметрические исследования указывают на то, что оба из этих механизмов приводят к более высокой TE в линиях Stg1, причем основным механизмом является снижение транспирации.

Изменение транспирации на единичную площадь листа может быть следствием а) количества устьиц, б) размера отверстия устьиц, с) изменения времени открытия и закрытия устьиц относительно VPD, и/или d) количества клеток основания волосков (которое влияет на пограничный слой и, таким образом, T/LA). Интрогрессия Stg1 в RTx7000 снижала количество устьиц и увеличивала количество клеток основания волосков на единицу площади листа в листьях 7 и 10; причем оба механизма могут сохранять воду путем снижения T/LA.

Интрогрессия Stg1, например, в RTx7000 модифицировала анатомию листьев путем увеличения количества клеток обкладки сосудистых пучков, окружающих сосудистый пучок. Увеличенное количество клеток в обкладке сосудистых пучков также может приводить к увеличенной фотосинтетической ассимиляции и, таким образом, TE.

Различия в морфологии листьев (например, листья 7 и 10) являются очевидными между RTx7000 и Stg1. В этом случае в Stg1 обкладка сосудистых пучков, окружающая сосудистый пучок, была более представлена и была меньшего размера. Увеличенное количество клеток в обкладке сосудистых пучков также может приводить к увеличенной фотосинтетической ассимиляции и, таким образом, TE.

Увеличенного использования воды в ходе налива зерна достигают путем (i) увеличенной доступности воды во время цветения и (ii) увеличенной усвояемости воды (лучшее извлечение воды и более глубокое или большее латеральное распространение) в ходе налива зерна.

а) Увеличенная доступность воды во время цветения.

Использование воды культурой (CWU) до цветения отрицательно коррелировало с CWU после цветения в эксперименте с ROS. Например в одном эксперименте 25% увеличение использования воды после цветения (80 против 60 мм) приводило к 25% увеличению выхода зерна (400 против 300 г/м²). Это соответствовало 50 кг/га зерна на каждый дополнительный мм доступной воды.

б) Увеличенная усвояемость воды в процессе налива зерна.

Растения с Stg1 проявляли увеличенное использование воды в ходе периода налива зерна в условиях как низкой, так и высокой плотности в эксперименте с ROS. Это было следствием, главным образом, (i) сниженного использования воды во время цветения при высокой плотности и (ii) увеличенной усвояемости воды в ходе налива зерна при низкой плотности.

Область Stg1 обеспечивает адаптацию к засухе через связь между продукцией биомассы до и после цветения. Область Stg1 снижает соотношение биомассы до:после цветения ниже критического уровня, увеличивая выход зерна и устойчивость к полеганию.

Следствием более высокого водного режима растения в ходе налива зерна (вследствие увеличенного использования воды в ходе налива зерна) являются замедленное старение листьев (поддержание зеленым), более высокий выход зерна и устойчивость к полеганию.

Интрогрессия Stg1 в фон RTx7000 увеличивала водный режим растения при среднем наливе зерна, как показано по а) более высокому относительному содержанию воды (RWC) и б) более низкому водному потенциалу листьев (LWP).

Более высокий выход зерна и больший размер зерен являются следствием увеличенной доступности воды в ходе налива зерна.

Более высокий выход зерна, больший размер зерен и увеличенная устойчивость к полеганию не являются взаимоисключающими (т.е. Stg1 проявляет все три признака).

Преимущества выхода и размера зерен являются относительно более высокими при тяжелой тер-

минальной засухе, чем при мягкой терминальной засухе.

Исследования указывают на то, что наибольшая польза генов поддержания зеленым, например, в фоне RTx7000 (инбредные растения) возникает при диапазоне выхода 1-3 т/га (12-22%), а затем с меньшей, но еще существенной пользой при диапазоне выхода 3-4 т/га (8-10%). Однако имелось небольшое ухудшение, ассоциированное с этими областями (2-4%), при более высоких выходах (5-8 т/га) вследствие более влажных условий. Следует отметить, что эти диапазоны выходов были бы значительно более высокими в гибридах. Поскольку средний выход зерна в сорго для гибридов в северной зерновой зоне составляет приблизительно 2,5 т/га, польза генов поддержания зеленым должна быть значительной. В гибридах не наблюдали снижения выхода зерна в более влажных условиях (без ограничения воды) благодаря поддержанию зеленым.

Интрогрессия Stg1 в RTx7000 также увеличивает размер зерна, в среднем, на 11% при тяжелой терминальной засухе. Не было влияния этого QTL на размер зерен при мягкой терминальной засухе или без засухи.

Каждый из ключевых механизмов Stg1 картируется в одной и той же области, указывая на то, что действие одного гена имеет множество плейотропных эффектов.

Пример 2. Снижение кушения (физиологические исследования NIL в поле).

Данные показывают влияние Stg1 на кушение в условиях как высокого доступа воды (HW), так и низкого доступа воды (LW). Различия в развитии листового полога до цветения по большей части были следствием варьирования кушения среди линий. Количество стеблей на 1 м² во время цветения было наилучшим общим показателем эффекта кушения на динамику листового полога. Количество стеблей на 1 м² было эквивалентным при обоих водных режимах (12,89), указывая на то, что снижение кушения является конститутивным признаком. Генотипы варьировали значимо (P<0,001) по этому параметру, находясь в диапазоне от 8,59 до 16,67. Однако генотип и условия не взаимодействовали значимо по этому параметру.

Количество стеблей на 1 м² анализировали в отношении их статуса Stg и средние значения для категорий представлены в табл. 1. RTx7000 образовывало на 41% больше (P<0,05) стеблей/м², чем B35 (14,07 против 10,00). Интрогрессия области Stg1 отдельно в RTx7000 (6078-1) значимо уменьшала количество стеблей/м² (P<0,05) по сравнению с RTx7000 (9,40 против 14,07). По сравнению с Stg1 только дополнительные интрогрессии либо Stg2, либо Stg4 увеличивали количества стеблей до 10,49 (комбинация 1,2) и 10,74 (комбинация 1,4). Следует отметить, что три близких изолинии, не содержащих областей Stg (2212-3, 2235-11 и 6120-16), также проявляли высокое кушение, эквивалентное Tx7000. Таким образом, общее ранжирование кушения в этих линиях представляет собой Stg1<B35<Stg4<Stg2<Stg3<HeT<RTx7000.

Во время цветения количество стеблей высоко коррелировало (r²=0,71) с общей площадью зеленых листьев (GLAA; фиг. 1).

Таблица 1

Статус Stg	№ линий	Стеблей/м ² А
Область Stg1		
1	1	9,40
1,2	2	10,49
1,4	1	10,74
RTx7000	7	14,07
LSD (0,05)		4,06

Количество стеблей на 1 м² в рекуррентном родительском растении (RTx7000) и различных линиях, содержащих интрогрессии Stg1 QTL, как отдельно, так и в комбинации с другим Stg QTL.

Различия в площади зеленых листьев во время цветения (GLAA), главным образом, были следствием различий в их площади зеленых листьев побегов во время цветения (GLAAt), поскольку GLAAt высоко коррелировала с GLAA (r²=0,78), в то время как площадь листьев основного стебля не коррелировала.

Площадь зеленых листьев побегов во время цветения анализировали в отношении статуса Stg и средние значения по категориям представлены в табл. 2. В RTx7000 GLAAt была практически в восемь раз больше (P<0,05), чем в B35 (15460 против 1980). Интрогрессия области Stg1 отдельно в RTx7000 (6078-1) значимо снижала GLAAt (P<0,05) по сравнению с RTx7000 (3121 против 15460). По сравнению с Stg1 отдельно, дополнительные интрогрессии либо Stg2, либо Stg4 увеличивали GLAAt до 4187 (комбинация 1,2) и 4797 (комбинация 1,4). Все линии, содержавшие Stg1 (в любой комбинации), не отличались значимо (P<0,05) по GLAAt от Stg1 отдельно. Следует отметить, что GLAAt в трех близких изоли-

ниях, не содержавших областей Stg (2212-3, 2235-11 и 6120-16), не значимо отличалась от RTx7000. Таким образом, ранжирование по значимо отличающейся ($P < 0,05$) GLAA в этих линиях представляет собой $B35 = Stg1 = Stg4 < Stg2 = Stg3 < нет = RTx7000$.

Таблица 2

Статус Stg	№ линий	Зеленые листья побегов площадь во время цветения ($см^2/м^2$)
область Stg1		
1	1	3121
1, 2	2	4187
1, 4	1	4797
RTx7000	7	15460
LSD (0, 05)		5282

Площадь зеленых листьев побегов во время цветения в рекуррентном родительском растении (RTx7000) и различных линиях, содержавших интрогрессии Stg1 QTL, как отдельно, так и в комбинации с другими Stg QTL.

Площадь зеленых листьев и стеблей на $1 м^2$ во время цветения высоко коррелировала в условиях высокой (HD) и низкой (LD) плотности в эксперименте с укрытием от дождя (фиг. 2). Интрогрессия областей Stg1 или Stg1a в RTx7000 снижала количество стеблей на $1 м^2$ и GLAA при обеих плотностях.

Пример 3. Снижение кушения (исследования с точным картированием).

Популяцию с точно картированным Stg1 выращивали в поле в условиях высокой и низкой плотности в течение трех последовательных лет. Количество стеблей на растение измеряли во время цветения каждый год и был проведен комбинированный анализ для этих лет. В общем RTx7000 продуцировало на 47% больше стеблей на растение, чем 6078-1 (1,85 против 1,26; фиг. 3).

В этих исследованиях в поле картировали признак (количество стеблей на растение). Произвольная величина 1,54 стеблей на растение обеспечила оптимальное разделение между высоким и низким кушением для целей картирования (т.е. рекомбинантные растения с менее чем 1,54 стеблей имели генотипы BB, в то время как рекомбинантные растения с более чем 1,54 стеблей имели генотипы TT). Пошаговое изучение маркеров выявило, что приобретение функции (низкое кушение) достигалось в трех генотипах (10564-2, 10704-1 и 10620-4). Одно рекомбинантное растение (10568-2) проявляло фенотип высокого кушения, в то время как три других (10620-4, 10704-1 и 10564-2) проявляли фенотипы низкого кушения. Ген компонента 5 эффлюксного переносчика ауксина был предложен в качестве гена-кандидата.

Пример 4. Уменьшение кушения (исследования с точно картированным Stg1 в ROS).

Подгруппу растений популяции с точно картированным Stg1 выращивали в поле с укрытием от дождя (ROS) в условиях высокого и низкого доступа воды, причем каждые условия доступа воды подразделяли на высокую и низкую плотность. Это обеспечило четыре водных режима с возрастающими уровнями дефицита воды: HWLD (наименьший дефицит) < HWHD < LWLD < LWHD (наибольший дефицит). Количество стеблей на растение измеряли на 44 сутки после появления на поверхности на каждом участке земли. Отличия были наиболее очевидными в условиях низкой плотности (LD), поскольку проявление кушения максимизировано в этих условиях. В среднем, RTx7000, 10568-2 и 10709-5 продуцировали на 27% больше стеблей на растение, чем 6078-1 и 10604-5 в условиях LWLD (2,05 против 1,62; фиг. 4), и на 23% больше стеблей в условиях HWLD (1,49 против 1,22).

Пример 5. Уменьшение кушения (исследования с точно картированным Stg1 под защитным куполом).

Три дополнительных исследования с точным картированием было проведено на популяции Stg1 в контролируемых условиях под защитным куполом. В этих исследованиях кушение анализировали более подробно по сравнению с предшествующими исследованиями в поле. Подсчитывали общее количество побегов, более конкретно количество побегов от пазухи листьев 2 (T2), 3 (T3) и 4 (T4). Присутствие или отсутствие T2 было наилучшим индикатором общего потенциала к кушению для данного рекомбинантного растения. T2 также было наилучшим признаком для применения в целях точного картирования гена.

В этом эксперименте общее количество побегов представляло собой сумму T2, T3 и T4, где T2 представлял собой побег от пазухи листа 2 (и т.д. для T3 и T4), включая вторичные побеги. В этом исследовании наблюдали значительное генотипическое варьирование для всех из признаков, связанных с кушением (табл. 34), с наследуемостью, главным образом, выше 30.

Таблица 3

признак	среднее значение для признака	Значение P (Генотип)	Дисперсия ошибок	avSEED	CV%	gen.var	Hsq
Кущение							
tilerno_max	2.151	0.001*	0.656	0.557	37.659	0.081	33.090**
presence_T2	0.408	0.000*	0.204	0.316	110.676	0.038	42.715**
presence_T3	0.901	0.001*	0.080	0.193	31.351	0.007	24.781**
presence_T4	0.831	0.015*	0.132	0.237	43.787	0.004	10.651
leaf_T	1.656	0.001*	0.880	0.656	56.558	0.117	34.700**
stem_T	0.801	0.003*	0.226	0.332	59.334	0.027	32.261**
bio_T	2.442	0.002*	2.006	0.986	58.005	0.242	32.533**
bio.GLA_T_ratio	50.259	0.010	39.356	4.716	12.482	4.510	31.429**

В табл. 3 представлено обобщение предсказанных средних значений, значения P и наследуемости признаков кущения, измеренных в урожае L11. Значимые отличия ($P < 0,05$) отмечены звездочкой, в то время как наследуемость > 20 отмечена двумя звездочками.

Отдельный анализ данных T2, T3 и T4 выявил, что 6078-1 не продуцировало побегов T2 ни в одном из четырех повторений исследования, в то время как RTx7000 продуцировало побеги T2 в 2 из 4 повторений исследования (фиг. 5).

Отличия были также очевидными в количествах T3. 6078-1 продуцировало побег T3 в 1 из 4 повторений исследования, в то время как RTx7000 продуцировало побег T3 во всех 4 повторениях исследования (фиг. 6).

Количества побегов T4 также варьировали среди генотипов. 6078-1 продуцировало побег T4 в 3 из 4 повторений исследования, в то время как RTx7000 продуцировало T4 во всех из 4 повторений исследования. Таким образом, интрогрессия Stg1, по существу, препятствовала росту побегов T2 и T3 в фоне RTx7000.

Линии, которые продуцировали побег T2 в 0-2 повторениях исследования (группа низкого кущения; 8 рекомбинантных растений), отделяли от линий, которые продуцировали побег T2 в 3-4 повторениях (группа высокого кущения; 8 рекомбинантных растений) [табл. 4, фиг. 7].

Таблица 4

Название генома	наличие_T2 (L11)	наличие_T3 (L11)	наличие_T4 (L11)	максимальное количество побегов (L11)
NIL10604-1-476-2	1,013	0,714	0,795	2,551
NIL10604-1-502-11-2	0,781	1,006	0,715	2,634
NIL10604-1-318-1	0,770	0,956	0,920	2,628
NIL10604-1-451-7	0,769	0,970	0,930	2,675
NIL10604-1-502-142-1	0,768	0,993	0,956	2,809
NIL10604-1-319-1	0,757	1,043	0,938	2,678
NIL10604-1-110-2	0,752	1,034	0,972	2,761
NIL10604-1-182-1	0,714	1,016	1,001	3,090
NIL10604-1-195-5	0,498	0,914	0,467	2,016
NIL10604-1-8-1	0,487	0,758	1,024	2,235
NIL 10604-1-222-1	0,481	0,695	0,917	2,071
NIL10604-1-157-5	0,472	0,527	0,519	1,729
NIL10604-1-56-7	0,419	1,026	0,899	2,296
NIL10604-1-501-327-3	0,259	0,753	0,402	1,377
NIL10604-1-477-4	0,017	1,049	1,038	2,066
NIL 10604-1-359-3	-0,045	1,002	0,519	1,523

В табл. 4 показано наличие побегов (T1-T3) и общее количество побегов для восьми рекомбинантных растений с высоким кущением (первые восемь строк) и восьми рекомбинантных растений с низким кущением (остальные восемь строк) из популяции с точно картированным Stg1.

Приобретение функции (низкое кущение) достигается в рекомбинантном растении 10604-1-157-5. Приобретение функции (низкое кущение) также достигается в трех рекомбинантных растениях (10604-1-195-5, 10604-1-56-7, 10604-1-477-4).

В этом эксперименте использовали подгруппу линий для подтверждения области кущения. Использовали больше повторений на рекомбинантное растение (20) для дальнейшего снижения дисперсии ошибок и увеличения мощности различения среди линий.

Результаты показали наличие гена эфлюксного переносчика ауксина.

Для дальнейшего точечного установления гена низкого кущения проводили анализ точки перегиба

для линий, которые в соответствии с их генотипом (ВВ или ТТ) "активировались" или "подавлялись" в представляющей интерес области. Был очевиден четкий перегиб, разделяющий линии, которые продуцировали общее количество побегов $>2,5$ (группа высокого кущения; 5 рекомбинантных растений), и растения, которые продуцировали общее количество побегов $<2,5$ (группа низкого кущения; 3 рекомбинантных растения) [табл. 5, фиг. 8].

Таблица 5

Генотип	T1	T2	T2.1	T3	T3.1	T4	Общее количество побегов
10604-1-502-11-2	0,00	0,79	0,00	1,00	0,00	1,00	2,79
10604-1-110-2	0,11	0,67	0,00	1,00	0,00	1,00	2,72
10604-1-359-3	0,05	0,63	0,00	1,00	0,05	1,00	2,68
10604-1-318-1	0,06	0,59	0,00	1,00	0,00	1,00	2,65
10604-1-502-142-1	0,00	0,58	0,00	1,00	0,00	1,00	2,58
10604-1-8-1	0,00	0,53	0,00	1,00	0,00	1,00	2,42
10604-1-157-5	0,00	0,47	0,00	1,00	0,00	0,95	2,42
10604-1-222-1	0,00	0,45	0,00	1,00	0,00	1,00	2,40

В табл. 5 представлено наличие побегов (T1-T4), включая вторичные побеги, и общее количество побегов для пяти рекомбинантных растений с высоким кущением (первые пять строк) и трех рекомбинантных растений с низким кущением (остальные три строки) из популяции с точно картированным Stg1.

Приобретение функции (низкое кущение) достигается в рекомбинантном растении 10604-1-157-5. Ген PIN4 в сорго зерновом (обозначаемый в настоящем описании как "SbPIN4"), таким образом, является убедительным кандидатом на роль гена низкого кущения Stg1.

Пример 6. Меньший размер листьев.

В целом, интрогрессия области Stg1 в RTx7000 снижала размер листьев (длину и ширину) в условиях хорошего доступа воды и в условиях ограничения доступа воды, что указывает на конститутивное действие гена. Однако уменьшение размера листьев, главным образом, было более высоким в условиях ограниченного доступа воды, что указывает в некоторой степени на адаптивный (индуцибельный ответ) в дополнение к конститутивному ответу. Таким образом, Stg1 обеспечивает два механизма снижения размера листового полога: а) снижение кущения и б) снижение размера листьев. В совокупности, эти два механизма обеспечивают достаточную степень пластичности для растения, чтобы модифицировать архитектуру растения в ответ на факторы окружающей среды и/или управления растениеводством.

Серия лизиметрических исследований является особенно информативной при оценке профилей размера листьев при варьирующих уровнях дефицита давления пара (VPD) (фиг. 9A-D). Хотя горшки регулярно орошали в обоих экспериментах, размер листового полога отличался среди сезонов, предположительно вследствие сезонных отличий в температуре и VPD, обеспечивающих условия высокого (1,8 кПа) и низкого (1,3 кПа) VPD. Для главного стебля и наиболее крупного побега (T3), уменьшение размера листьев было значимым в условиях высокого и низкого VPD (фиг. 9A-D), хотя уменьшение начиналось позднее при низком VPD по сравнению с высоким VPD в главном стебле (L12 против L9) и T3 (L7 против L5).

Однако для остальных побегов (T4-T6) распределение размера листьев значительно отличалось среди экспериментов. В то время как не было отличий в размере листьев между RTx7000 и 6078-1 при высоком VPD, листья 6078-1 были значительно меньшими при низком VPD. Это указывает на адаптивный (индуцибельный) ответ снижения размера листьев при определенных условиях окружающей среды для побегов T4-T6.

Таким образом, при низком дефиците воды интрогрессия Stg1 в RTx7000 приводила к меньшему размеру листьев в главном стебле и наиболее крупном побеге (T3), но не в T4-T6. Этот ответ может обеспечивать максимизацию улавливания света растением в поздних побегах, когда условия являются благоприятными. При высоком дефиците воды интрогрессия Stg1 в RTx7000 приводила к меньшему размеру листьев во всех побегах. Этот ответ обеспечил бы значительное снижение размера листового полога растения в условиях ограниченного доступа воды.

Пример 7. Меньший размер листьев (исследования с укрытием от дождя).

Проводили эксперименты с укрытием от дождя (ROS) для оценки влияния области Stg1 при двух плотностях культуры, тем самым создавая два уровня дефицита воды (высокая плотность = высокий дефицит; низкая плотность = низкий дефицит). Как правило, кущение было низким или отсутствовало при HD (20 растений/м²) и было нормальным при LD (10 растений/м²).

Размер листового полога был меньшим оба года в условиях высокой плотности (HD), что отражает более высокий дефицит воды, обеспечиваемый этими условиями. Оба года при более мягком (LD) и более тяжелом (HD) дефиците воды размер листьев, главным образом, был меньшим в 6078-1 (Stg1) по сравнению с RTx7000. Исключением был случай, когда профиль распределения размера листьев был сходным для 6078-1 и RTx7000 при более мягком дефиците воды (LD), и в то же время листья были зна-

чительно меньшими в 6078-1 (меньше на вплоть до 18%) при более высоком дефиците воды (HD), что указывает на адаптивный ответ растений Stg1 на увеличение дефицита воды. В действительности, интрогрессия области Stg1 в RTx7000 уменьшала размер четырех наиболее крупных листьев L10-L13) в среднем на 16,5% при более тяжелом дефиците воды (HD). Поскольку происходило небольшое кущение при каждом генотипе в этих условиях, уменьшение размера листьев в 6078-1 должно было значительно уменьшить размер листового полога и, таким образом, использование воды культурой (предполагая сходную транспирацию на единицу площади листа).

Следует отметить, что механизм уменьшения размера листьев, ассоциированный с Stg1, по-видимому, действует как в присутствии (LD), так и в отсутствие кущения (HD), однако, по-видимому, наилучшим образом проявляется при HD, где имеется единичный стебель и условия высокого дефицита воды.

Пример 8. Меньший размер листьев (исследования с точно картированным Stg1 с укрытием от дождя).

Подгруппу растений популяции с точно картированным Stg1 выращивали в поле с укрытием от дождя (ROS) в условиях высокого и низкого доступа воды, причем каждые условия доступа воды подразделяли на высокую и низкую плотность. Это обеспечило четыре водных режима с возрастающими уровнями дефицита воды: HWLD (наименьший дефицит) <HWHD<LWLD<LWHD (наибольший дефицит). Площадь каждого полностью выросшего листа главного стебля измеряли для всех генотипов при всех условиях.

Интрогрессия целой области Stg1 (6078-1) и, более конкретно, меньшей области, обозначаемой 10604-5, приводила к уменьшению размера листьев 9-13 в условиях низкого доступа воды и высокой плотности (фиг. 10). Например, по сравнению с RTx7000, L11 были на 9% и 16% меньше в 10604-5 и 6078-1 соответственно. Поскольку кущение было несущественным в этих условиях, отличия в размере листового полога было, по существу, следствием различий в размере листьев.

В условиях низкой плотности на распределение размера листьев влияло кущение, что приводило к некоторому перекрытию по сравнению с условиями высокой плотности (см. фиг. 10). Однако следует отметить, что 10604-5 продуцировало листья меньших размеров 9 относительно 10709-5, 10568-2 и RTx7000 в условиях как HD, так и LD.

В качестве гена кандидата для гена "малого размера листьев" картирован ген компонента 5 эффлюксного переносчика ауксина.

Пример 9. Меньший размер листьев (исследования с точным картированием под защитным куполом).

Площадь листьев значимо варьировала ($P < 0,001$) среди генотипов с наследуемостью достигающей 60 для листьев 4 и 5.

Интрогрессия области Stg1 в RTx7000 снижала площадь листьев 1-6 (фиг. 16). Например, площадь L6 была на 22% больше в RTx7000 (67,4 см²), чем в 6078-1 (55,3 см²), хотя это отличие не было значимым при уровне $P = 0,05$. Площадь L6 находилась в диапазоне от 47,8 до 93,9 см² (LSD [0,05] = 21) с наследуемостью 42.

Отличия в площади листьев были следствием в большей степени различий в длине листьев (фиг. 17), чем в ширине листьев (фиг. 13). В то время как площадь листьев возрастала экспоненциально с увеличением количества листьев (фиг. 16), длина листьев возрастала линейно (фиг. 12). Взаимосвязь между шириной листа и количеством листьев была параболической (фиг. 13). Таким образом, расхождение в площади листьев между 6078-1 и RTx7000 с увеличением количества листьев было, главным образом, следствием расхождения в длине листьев между этими генотипами. Это указывает на то, что функция генов, уменьшающих размер листьев, более вероятно, ассоциирована с ростом клеток (длина листа), чем с делением (ширина листа).

Аллометрическая взаимосвязь в популяции с точно картированным Stg1 между площадью листа (n) и площадью листа (n+1) указывает на значительное изменение приблизительно у листа 8 (одновременно с началом цветения). После этого увеличение размера листьев происходило с меньшей скоростью.

Интрогрессия области Stg1 в RTx7000 снижала площадь листьев 9-11 (фиг. 14), а также листьев 1-6 (рассмотрено выше). Площадь L9 значительно варьировала ($P = 0,06$) среди генотипов, находясь в диапазоне от 234 до 300 см², с наследуемостью 21 (табл. 6). Площадь L9 была на 8% выше в RTx7000 (263 см²), чем в 6078-1 (244 см²) [фиг. 14]. Сходные тенденции были очевидными для листьев 10 и 11.

признак	среднее значение для признака	Значение P (генотип)	Дисперсия ошибок	sv\$ED	CV%	gen.var	Her
Размер листьев							
L6_GLA	54.122	0.016*	68.256	10.871	17.358	23.256	51.615**
L7_GLA	103.157	0.317	213.237	14.083	14.156	16.947	24.122**
L8_GLA	178.469	0.179	535.126	19.269	12.962	7.623	5.391
L9_GLA	266.844	0.060*	673.230	18.876	9.724	45.684	21.348**
L10_GLA	342.756	0.506	1029.389		9.361	1.177	0.455
L11_GLA	383.580	0.374	848.058		7.592	3.098	1.440
L11_DW	1.955	0.522	0.058		12.372	0.000	0.000
SLW_L9_L11	50.083	0.030*	17.372	3.073	6.322	0.956	18.041

В табл. 6 обобщенно представлены средние значения, значение P и наследуемость для признаков размера листьев, измеренном в урожае L11. Значимые отличия ($P < 0,05$) отмечены звездочкой, в то время как наследуемость > 20 отмечена двумя звездочками. GLA = площадь зеленых листьев. DW = масса сухого вещества. SLW_L9_L11 = удельная масса листьев.

Наибольшее варьирование площади зеленых листьев в урожае листьев 11 было следствием отличий в кущении. Однако листья 9-11 были меньше в 6078-1 по сравнению с RTx7000. Эти отличия были значимыми ($P < 0,05$). Следует отметить, что как "низкое кущение", так и "малый размер листьев" были ассоциированы с одной и той же областью, что указывает на возможность того, что один ген контролирует оба признака архитектуры листового полога.

Пример 10. Листья меньших размеров (исследования с точном картированием под защитным куполом).

Количество и длина листьев линейно коррелировали для родительских растений популяции с точно картированным Stg1 (фиг. 15). Интрогрессия Stg1 в RTx7000 привела к снижению длины листьев 8-10, причем L10 на 7% короче в 6078-1, чем RTx7000 (550 против 592 мм).

Для целей картирования отбирали "отклоняющихся представителей" популяции с точно картированным Stg1. Два генотипа проявляли особенно длинные листья (10604-1-157-5 и 10604-1-318-1) и три генотипа проявляли особенно короткие листья (10604-1-222-1, 10604-1-501-327-3 и 6078-1).

Приобретение функции (короткие листья) достигалось рекомбинантным растением 10604-1-222-1. Ген "малого размера листьев" предположительно картируется в той же области, что и ген "низкого кущения".

Для целей картирования отбирали "отклоняющихся представителей" популяции с точно картированным Stg1 (фиг. 16). Три генотипа проявляли особенно длинные листья (10604-1-157-5, 10604-1-318-1 и RTx7000) и два генотипа проявляли особенно короткие листья (10604-1-222-1 и 6078-1).

При пошаговом исследовании маркеров приобретение функции (короткие листья) достигалось в рекомбинантном растении 10604-1-222-1. Таким образом, вновь ген "малого размера листьев" картируется в той же области, что и ген "низкого кущения".

Следует отметить, что длина листьев в L9 и L10 картируется в той же области.

Объяснением этому является один ген с множеством плейотропных эффектов. Увеличенная доступность ауксина может объяснить как фенотип низкого кущения, так и фенотип малого размера листьев, наблюдаемые в растениях, содержащих эту область. Ген компонента 5 эфлюксного переносчика ауксина расположен в заданной области и, таким образом, идентифицирован в качестве кандидата.

Пример 11. Поддержание зеленым повышает пластичность архитектуры листового полога посредством конститутивного и адаптивного ответов.

Увеличенная доступность воды во время цветения достигается путем снижения использования воды с помощью двух механизмов (снижение кущения и меньший размер листьев) в растениях, содержащих область Stg1, фиг. 17). Оба механизма по отдельности, по-видимому, уменьшают размер листового полога в среднем приблизительно на 9%. Механизм "низкого кущения" доминирует в окружающих условиях низкой плотности, когда потенциал к кущению является высоким. Механизм "малого размера листьев" преобладает в условиях высокой плотности, когда потенциал к кущению является низким. В совокупности эти два механизма обеспечивают сельскохозяйственные растения со значительной пластичностью для модификации архитектуры листового полога в ответ на тяжесть ограничения воды.

Поддержание зеленым проявляет как конститутивные, так и адаптивные ответы (фиг. 18). Размер листового полога в Stg1 снижен приблизительно на 5%, даже когда доступ воды не ограничен (конститутивный ответ). Размер листового полога далее снижается (адаптивный ответ) при мягкой засухе (~10%) и более тяжелой засухе (~15%). Низкое кущение, главным образом, является конститутивным ответом, хотя меньший размер листьев в побегах в ответ на увеличение дефицита воды является адаптивным ответом. Малый размер листьев является как конститутивным, так и адаптивным ответом.

Пример 12. Связь между уменьшенным размером листового полога (путем снижения ветвления и меньшего размера листьев) и снижением использования воды культурой во время цветения.

Снижение использования культурой воды во время цветения может быть вызвано а) меньшим размером листового полога с эквивалентной транспирацией на единицу площади листа, б) эквивалентным размером листового полога с более низкой транспирацией на единицу площади листа или с) меньшим размером листового полога и более низкой транспирацией на единицу площади листа. ROS и лизиметрические исследования указывают на то, что в условиях высокого дефицита воды область Stg1 и, в частности, рекомбинантное растение, содержащее ген-кандидат Stg1 (10604-5), проявляли более низкое использование воды культурой вследствие меньшего размера листового полога, а не более низкой транспирации на единицу площади листа. Наблюдали высокую корреляцию ($r^2=0,9$) между размером листового полога и использованием воды культурой в исследованиях с ROS и в лизиметрических исследованиях.

(а) Экономия воды вследствие меньшего размера листьев.

Кущение было незначительным в этом эксперименте вследствие высокой плотности культуры. Таким образом, отличия в размере листового полога были следствием отличий в размере листьев (фиг. 20), на что указывает высокая корреляция между размером листа и общей площадью зеленых листьев во время цветения (фиг. 21).

В свою очередь, площадь зеленых листьев во время цветения высоко коррелировала с использованием воды культурой во время цветения (фиг. 22). Относительно RTx7000 обе из двух линий, содержащих ген-кандидат Stg1 (6078-1 и 10604-5), обладали меньшим размером листьев (L10-L13), более низкой площадью зеленых листьев во время цветения (GLAA) и более низким использованием воды культурой во время цветения.

(б) Экономия воды вследствие уменьшенной транспирации на единицу площади листа (лизиметрические исследования).

Транспирация (Т) является результатом произведения площади листа (LA) и транспирации на площадь листа (Т/LA). В условиях высокого VPD, LA была сходной между Stg1 и RTx7000 (117 95 против 11628 см²), а Т/LA была меньшей в Stg1, чем в RTx7000 (2,60 против 2,85), что привело к меньшему использованию воды на растение (Т) в Stg1, чем в RTx7000 (30,7 против 32,8 л). Таким образом, экономия воды в Stg1 (в условиях с высоким VPD) достигалась полностью путем снижения Т/LA, что указывает на то, что эта стратегия конститутивного сохранения воды обеспечивалась Stg1. В этом случае более высокая эффективность транспирации (ТЕ) в Stg1 была следствием эквивалентной биомассы и более низкой транспирации.

Более широкий анализ, сравнивающий четыре Stg QTL (Stg1, Stg2, Stg3 и Stg4) с RTx7000, помог выявить перспективность ответа Stg1. В условиях высокого VPD Т/LA положительно коррелировала с Т. Однако в условиях низкого VPD Т/LA отрицательно коррелировала с Т ($r^2=0,52$). Площадь зеленых листьев и транспирация положительно коррелировали в условиях как высокого, так и низкого VPD (фиг. 22). В обоих экспериментах Stg QTL уменьшал площадь зеленых листьев и транспирацию по сравнению с RTx7000.

(с) Экономия воды вследствие сниженной площади листьев.

Транспирация (Т) является результатом произведения LA и Т/LA. В условиях низкого VPD, LA была на 31% меньшей в Stg1, чем в RTx7000 (4898 против 7082 см²). Это соответствовало небольшому увеличению на 9% Т/LA в Stg1 по сравнению с RTx7000 (5,15 против 4,70). Суммарный результат составил снижение на 22% использования воды на растение (Т) в Stg1 по сравнению с RTx7000 (25,6 против 32,7 л), главным образом, вследствие уменьшенного размера листового полога. Увеличение Т/LA, которое проявлял Stg1, само по себе может представлять собой механизм адаптации к засухе, охлаждающий листья и обеспечивающий продолжение фотосинтеза.

Пластичность в Т/LA, по-видимому, особенно важна для регуляции водного режима растения. В условиях высокого VPD снижение Т/LA в Stg1 было ключевым механизмом снижения Т и увеличения ТЕ. В условиях низкого VPD увеличение Т/LA в Stg1 может обеспечить поддержание функции листьев путем охлаждения.

Лизиметрические исследования на подгруппе растений с точно картированным Stg1 обеспечивают дополнительную оценку этой области. В условиях высокого VPD, LA на растение была меньше в 10604-5 (положение гена-кандидата Stg1), чем в RTx7000 (10283 против 11628 см²), в то же время Т/LA была эквивалентна в 10604-5 и RTx7000 (~2,86), что приводило к меньшему использованию воды на растение в 10604-5, чем в RTx7000 (28,0 против 32,8 л). Таким образом, экономии воды в 10604-5 достигали полностью путем снижения размера листового полога.

В условиях низкого VPD LA на растение была меньшей во всех линиях Stg1 по сравнению с RTx7000, что приводило к экономии воды во всех линиях Stg1. Таким образом, было трудно точно картировать эту область, поскольку все рекомбинантные растения отвечали аналогично 6078-1.

(d) Имитация агрономии.

Buster высевали в количестве 5 растений/м² с расстоянием между рядами 1 м. Глубина почвы =1800 мм; PAWC почвы = 324 мм; без ограничения N. Результаты представлены на фиг. 56A-C.

Условия.

HT - высокое кушение (2 побега/растение).

LT - низкое кушение (1 побег/растение).

WW - хороший доступ воды (начало с 100% профиля и доступа дождя).

TS - терминальный стресс (начало с профиля с половинным наполнением [162 мм] и без доступа дождя после посадки).

Пример 13. Увеличенная доступность воды во время цветения также может быть достигнута с помощью увеличенной усвояемости воды вследствие лучшего извлечения воды и/или более глубокого или большего латерального распространения корней в растениях, содержащих область Stg1.

Масса корней и соотношение корня:побега (фиг. 23) была более высокой в Stg1, чем RTx7000 на стадии листа 6. Существовала выраженная трансгрессивная сегрегация этих признаков в популяции с точно картированным Stg1. Соотношение между массой корней и соотношением корня:побега указывает на возможность дальнейших генетических достижений в отношении этих признаков.

Соотношение массы корней на площадь листа можно использовать в качестве индекса адаптации к засухе на стадии всходов, поскольку оно объединяет в себе способность растения усваивать воду (масса корня) со способностью растения использовать воду (площадь листьев). Более высокий индекс указывает на большую способность усваивать на единицу площади листа. Растение с Stg1 проявляло более высокую массу корней на площадь листа относительно RTx7000 вследствие как более высокой массы корня, так и меньшей площади листьев.

Более высокие соотношения массы корней на площадь листа, проявляемое Stg1 на стадии L6, может объяснить, почему оно использовало больше воды ранее при росте культуры (20-50 DAE) по сравнению с RTx7000 в условиях LWLD (фиг. 24). Тем не менее, неясно, была ли увеличенная усвояемость воды в ходе налива зерна, проявляемая Stg1 по сравнению с RTx7000 (фиг. 24), следствием лучшего извлечения воды и/или большего распространения корней.

В эксперименте с камерой для корней в Gatton, Queensland, Australia (Van Oosterom et al., 2010, выше) гравиметрический нижний предел извлечения воды был на 0,26% более низким для гибридов A35 (поддержание зеленым), чем для гибридов AQL39 (стареющие). A35 содержит область Stg1, в то время как AQL39 не содержит ее. Предполагая объемную плотность $1,3 \text{ г см}^{-3}$ и глубину почвы 150 см, это может потенциально увеличить доступную воду в поле на $>5 \text{ мм}$ на протяжении жизненного цикла культуры.

Пример 14. Поддержание зеленым увеличивает биомассу на единицу площади листа во время цветения. Предполагая, что масса корней эквивалентна (или, по меньшей мере, не является значительно меньшей), эти отличия можно было объяснить отличиями в транспирации на единицу площади листа и/или эффективности транспирации.

Биомасса главного стебля на единицу площади листа (B/LA) во время цветения была на ~24% выше в Stg1, чем в RTx7000, в условиях низкого дефицита воды ($35,2$ против $26,2 \text{ г/м}^2/\text{см}^2$) и высокого дефицита воды ($40,6$ против $31,4 \text{ г/м}^2/\text{см}^2$) (табл. 7). B/LA главного стебля во время цветения была на ~14% выше в условиях высокого дефицита воды относительно условий низкого дефицита воды как в Stg1, так и в RTx7000, т.е. B/LA возрастала с увеличением дефицита воды. Следует отметить, что B/LA побегов была эквивалентна в Stg1 и RTx7000 в условиях низкого и высокого дефицита воды.

Таблица 7

Статус Stg	№ ли- ний	Биомасса главного стебля на единицу площади листа во время цветения (г/м ² /см ²) × 1000		Биомасса побегов на единичную площадь листа во время цветения (г/м ² /см ²) × 1000		Общая биомасса на единицу площади листа во время цветения (г/м ² /см ²) × 1000	
		Низкий дефицит воды	Высокий дефицит воды	Низкий дефицит воды	Высокий дефицит воды	Низкий дефицит воды	Высокий дефицит воды
Об- ласть Stg1							
1	1	35,17	40,61	19,42	22,38	31,83	39,73
1,2	2	31,70	34,70	18,40	19,77	28,02	33,16
1,4	1	28,12	30,88	22,68	16,53	28,66	26,69
№ облас- тей							
RTx7000	7	26,21	31,36	18,04	20,61	21,20	25,81
LSD (0,05)		6,70	6,70	5,90	5,90	5,96	5,96

В табл. 7 представлена биомасса главного стебля, побегов и общая биомасса на площадь листа для RTx7000 (рекуррентное родительское растение) и ряда практически изогенных линий, содержащих различные интрогрессии Stg1, выращенных в условиях высокого и низкого дефицита воды в Biloela, Queensland, Australia.

Детальное измерение использования воды указывает на то, что более высокая биомасса на единицу площади листа, наблюдаемая в линиях Stg1 Biloela, вероятно, была следствием более высокой транспирации на единицу площади листа, а не ТЕ.

Низкий дефицит воды.

Stg1 и RTx7000 проявляли эквивалентную В/LA при низком дефиците воды. Однако Т была на ~7% ниже в Stg1, вследствие на ~10% более низкой Т/LA, которая, в свою очередь, увеличивала ТЕ на ~9% (фиг. 45). Таким образом, в Stg1 сохранялась биомасса, но вода использовалась меньше по сравнению с RTx7000.

Высокий дефицит воды.

При высоком дефиците воды В/LA была на ~6% более высокой в Stg1 по сравнению с RTx7000. В/LA положительно коррелировала с Т/LA, но не с ТЕ. Таким образом, более высокая В/LA, проявляемая Stg1, была следствием более высокой Т/LA. Как правило, В/LA положительно коррелировала с Т/LA и отрицательно коррелировала с ТЕ при высоком дефиците воды.

В этом случае Stg1 использовало на ~22% меньше воды, чем RTx7000 в период до цветения. Таким образом, Stg1 имело бы значительно больше воды, доступной для налива зерна, несмотря на более низкую биомассу во время цветения.

Пример 15. Увеличенная ТЕ вследствие интрогрессии Stg1 может быть следствием а) пропорционально более высокой способности к фотосинтезу по сравнению с устьичной проводимостью благодаря меньшему размеру, меньшей толщине листьев и более зеленым листьям или б) вследствие снижения транспирации на площадь листа при сохранении биомассы на площадь листа.

В популяции с точно картированным Stg1 длина и зеленость (SPAD) листа 10 высоко отрицательно коррелировали ($r^2=0,72$, фиг. 25). Таким образом, уменьшение размера листа в этой популяции увеличивало концентрацию азота в листе. Интрогрессия Stg1 в фон RTx7000 снижала длину L10 на ~7% (от 592 до 550 мм) и увеличивала L10 SPAD на ~4% (от 47,1 до 48,9).

Более зеленые листья могут увеличивать способность к фотосинтезу и, таким образом, эффективность использования воды. В подгруппе растений популяции с точно картированным Stg1 фотосинтез увеличивался при увеличении величины SPAD до достижения плато при SPAD ~48,5 (фиг. 26). Однако линия (6078-1) с наиболее высокой величиной SPAD (51,6) проявляла относительно низкий уровень фотосинтеза (32,1 МДж/м²/сутки). Этот результат либо а) является аномальным, либо б) указывает на реальное снижение фотосинтеза при высоких величинах SPAD.

Зеленость листьев (SPAD) и WUE (на основе индекса, вычисленного для программного обеспечения Licor) положительно коррелировали в подгруппе растений популяции с точно картированным Stg1 (фиг. 27). Ни одна из интрогрессий Stg1 не достигала величины для 6078-1 (0,8), несмотря на относи-

тельно высокий SPAD в изогенных линиях 10604-5 и 10709-5 (NIL).

По сравнению с RTx7000 и другими Stg QTL Stg1 проявлял более зеленые листья (более высокую величину SPAD) и более высокую WUE (на основе индекса, вычисленного с помощью программного обеспечения Licor) [фиг. 28].

Пример 16. Увеличенная TE посредством интрогрессий Stg1 может быть следствием а) пропорционально более высокой способности к фотосинтезу по сравнению с устьичной проводимостью благодаря меньшему размеру, меньшей толщине листьев и более зеленым листьям или б) вследствие снижения транспирации на площадь листа при сохранении биомассы на площадь листа.

Эффективность транспирации (TE) отрицательно коррелировала с транспирацией на площадь листа (T/LA) в условиях низкого и высокого VPD (фиг. 29) в ряде Stg NIL, включая рекуррентное родительское растение (RTx7000). Однако ранжирование Stg NIL относительно RTx7000 зависело от условий VPD. Например, T/LA в Stg1 была более низкой относительно RTx7000 в условиях высокого VPD, но более высокой, чем в RTx7000, в условиях низкого VPD.

В условиях высокого VPD наклон отрицательной корреляции между T/LA и TE был крутым, так что небольшое снижение T/LA от 2,9 мм/см² (Stg4) до 2,6 мм/см² (Stg1) приводило к значительному увеличению TE от 4,2 г/м²/мм (Stg4) до 5,1 г/м²/мм (Stg1) [фиг. 29]. Градиент был менее крутым в условиях низкого VPD, так что требовалось шестикратное снижение T/LA на единичное увеличение TE по сравнению с условиями высокого VPD (1,2 против 0,2 единиц). Следует отметить, что для эквивалентного TE Stg1 проявлял более высокую T/LA, чем RTx7000 (5,1 против 4,6 мм/см²) при низком VPD. Это может обеспечить механизм листьям Stg1 оставаться более холодными при определенных условиях окружающей среды.

Пример 17. Изменения транспирации на единицу площади листа могли быть следствием а) количества устьиц, б) отверстий устьиц, с) изменений времени открытия и закрытия устьиц относительно VPD и/или d) количества клеток основания волосков (которое влияет на пограничный слой и, таким образом, T/LA).

Интрогрессия Stg1 в RTx7000 по-разному влияла на T/LA в зависимости от условий VPD. Относительно RTx7000 в Stg1 T/LA увеличивалась на ~9% при низком VPD, и T/LA снижалась на ~10% в условиях высокого VPD. T/LA, среди прочего, может регулироваться а) количеством устьиц на единицу площади листа, б) размером отверстий устьиц, с) временем открытия и закрытия устьиц и/или d) количеством клеток основания волосков (которое влияет на пограничный слой и, таким образом, T/LA). Проводили измерение двух из этих четырех компонентов (а и d). В одном эксперименте с укрытием от дождя отдельные листья собирали после условий высокой плотности с контролем орошения, кутикулы удаляли и получали изображения поверхности кутикулы. Эти изображения использовали для определения а) количества устьиц на единицу площади листа, б) количества эпидермальных клеток на единицу площади листа и с) количества клеток основания волосков на единицу площади листа.

В то же время получали поперечные срезы листьев. Предварительный анализ этих данных указывает на то, что интрогрессия Stg1 в RTx7000 модифицировала анатомию листьев. Различия в морфологии листьев (например, листьев 7 и 10) являются очевидными между RTx7000 и Stg1. В этом случае в Stg1 обкладка сосудистых пучков, окружающая сосудистый пучок, была более представлена и была меньшего размера. Увеличение количества клеток в обкладке сосудистых пучков также может приводить к увеличению фотосинтетической ассимиляции (PNAS 2007) и, таким образом, TE.

Пример 18. Увеличенного использования воды в ходе налива зерна достигают путем (i) увеличенной доступности воды во время цветения и (ii) увеличенной усвояемости воды (лучшее извлечение воды и более глубокое или большее латеральное распространение) в ходе налива зерна.

а) Увеличенная доступность воды во время цветения.

Использование воды культурой (CWU) до цветения отрицательно коррелировало с CWU после цветения в эксперименте с ROS (фиг. 30). Например, экономия 20 мм воды до цветения (165 против 185 мм) обеспечивала использование дополнительных 20 мм после цветения (80 мм против 60 мм). Таким образом, вся вода, сохраненная до цветения, использовалась культурой после цветения. В целом, 25% увеличение использования воды после цветения в этом эксперименте приводило к 25% увеличению выхода зерна (400 против 300 г/м²). Это преобразовывалось в 50 кг/га зерна на каждый дополнительный мм доступной воды. Хотя эти данные подтверждают идею о том, что увеличенное использование воды в ходе налива зерна достигается путем увеличения доступности воды во время цветения, это не объясняет увеличение усвояемости воды в процессе налива зерна.

б) Увеличенная усвояемость воды в ходе налива зерна.

Stg1 проявляло увеличенное использование воды в период налива зерна в условиях как низкой, так и высокой плотности в эксперименте с укрытием от дождя (ROS). Это было следствием, главным образом, (i) увеличенной доступности воды во время цветения в условиях высокой плотности и (ii) увеличенной усвояемости воды в ходе налива зерна в условиях низкой плотности (фиг. 31A и B).

В исследовании RTx7000 и четырех Stg NIL (Stg1, Stg2, Stg3 и Stg4) CWU до и после цветения отрицательно коррелировали в эксперименте ROS в условиях низкой плотности (фиг. 32). В этом случае экономия ~25 мм воды до цветения (168 против 191 мм) приводила к использованию ~50 мм после цве-

тения (135 мм против 86 мм), что указывает на то, что как увеличенная доступность воды (~25 мм), так и усвояемость (~25 мм) были в равной степени важными. Однако Stg1 был аномальным в этом примере, поскольку высокое использование воды после цветения было ассоциировано с высоким использованием воды до цветения. Объяснениями для этой аномалии Stg1 являются а) ошибка в данных об использовании воды до цветения, б) ошибка в данных об использовании воды после цветения или в) отсутствие ошибок в измерениях воды (Stg1 просто отвечал по-разному относительно других NIL). Исследование данных по биомассе выявило, что по некоторой причине растение с Stg1 продуцировало более высокую биомассу до цветения в условиях LWLD по сравнению с другими NIL, указывая на то, что профили использования воды до цветения просто отражали продукцию биомассы в этом эксперименте. Тем не менее, этот пример обеспечивает доказательство увеличенной усвояемости воды для Stg1 в период налива зерна.

Пример 19. Связь между продукцией биомассы до и после цветения.

В условиях низкой плотности (LD) снижение биомассы до цветения на 23% (от 700 до 640 г/м²) увеличивало биомассу после цветения более чем в два раза (от ~200 до 425 г/м²). В условиях LD растение с Stg1 продуцировало сходную биомассу до цветения с RTx7000 (~610 г/м²), но продуцировало меньшую биомассу после цветения (265 против 327 г/м²). Однако в условиях HD Stg1 и RTx7000 продуцировали сходную биомассу до цветения (~840 г/м²), однако растение с Stg1 продуцировало большую биомассу после цветения (195 против 17 г/м²).

Взаимосвязь между GLAA и соотношением биомассы до:после цветения является критическим в случае Stg1. GLAA должна быть обратно уменьшена до <3 для обеспечения доступности достаточного количества воды для налива зерна, и в этом состоит критическая роль гена Stg1. В этом эксперименте Stg1 достаточно снижал GLAA для достижения соотношения биомассы до:после цветения <3 в условиях LD, но не в условиях HD. Следует отметить, что в условиях HD интрогрессия Stg1 в RTx7000 снижала GLAA от 31200 до 29300 см²/м², снижая соотношение биомассы до:после цветения от 8,2 до 6,5 (но, тем не менее, не до <3). Это подчеркивает важность соответствующих стратегий управления растениеводством, таких как плотность культуры при максимально ограниченных ресурсах воды.

Отрицательная взаимосвязь между GLAA и массой стебля после цветения также является важной в случае Stg1. Более низкая GLAA и, таким образом, уменьшенное использование воды во время цветения были ассоциированы с более высокой массой стебля после цветения (компонент устойчивости к полеганию). Интрогрессия Stg1 в RTx7000 увеличивала массу стебля после цветения в условиях как LD (незначительное увеличение) и HD (значительное увеличение).

Взаимосвязь между соотношением биомассы до:после цветения (PPBR) и биомассой после цветения является информативной. Условия двух плотностей обеспечивают непрерывный диапазон PPBR от <2 до >8. Снижение PPBR от >8 до ~3 приводило к постепенному увеличению биомассы после цветения. Однако дальнейшее снижение PPBR ниже 3 приводило к относительно резкому увеличению биомассы после цветения, предположительно поскольку больше воды было доступно в ходе налива зерна, когда соотношение PPBR снижалось ниже 3. Интрогрессия Stg1 в RTx7000 увеличивала биомассу после цветения в условиях HD, но не LD.

Взаимосвязь между соотношением биомассы до:после цветения (PPBR) и массой стебля после цветения является в равной степени информативной. Масса стебля после цветения является компонентом устойчивости к полеганию. Анализ этого компонента обеспечивает некоторое понимание того, как интрогрессии Stg влияют на устойчивость к полеганию. Снижение PPBR от >8 до ~4 приводило к постепенному увеличению массы стебля после цветения. Однако дальнейшее снижение PPBR ниже 4 приводило к относительно резкому увеличению массы стебля после цветения. Интрогрессия Stg1 в RTx7000 увеличивала массу стебля после цветения в условиях как LD (незначительное увеличение), так и HD (значительное увеличение).

Взаимосвязь между PPBR и выходом зерна была менее очевидной в этом эксперименте. Хотя выход зерна был более высоким в Stg1, чем в RTx7000 при обеих плотностях, более высокий выход можно было объяснить только более низким PPBR в Stg1 при HD.

В этом эксперименте исследовали две интрогрессии Stg1: а) 6078-1 (цельная область Stg1) и б) 10946-5 (рекомбинантное растение, охватывающее приблизительно 1/3 области Stg1 между маркерами Sb03QGM116 и Sb03QGM106).

Снижение биомассы до цветения на 20% (от 920 до 735 г/м²) увеличивало биомассу после цветения приблизительно на 100% (от 200 до 400 г/м²) [фиг. 40]. Как правило, биомасса до цветения соответствовала RTx7000=Stg2>Stg3=Stg4>Stg1, и биомасса после цветения соответствовала Stg1>Stg3=Stg4>Stg2>RTx7000.

Размер листового полога, на который указывает GLAA, по большей части определял соотношение биомассы до:после цветения (фиг. 34). В условиях как высокой, так и низкой плотности, интрогрессия Stg1 в фон RTx7000 снижала GLAA, которая, в свою очередь, снижала соотношение биомассы до:после цветения до <3, обеспечивая достаточную доступность воды для налива зерна в этих условиях ограничения доступа воды.

Размер листового полога, на который указывает GLAA, был определяющим фактором массы стебля

после цветения (PASM) [фиг. 35]. В условиях как высокой, так и низкой плотности, интрогрессия Stg1 или Stg1a в фон RTx7000 снижала GLAA, которая, в свою очередь, увеличивала PASM. Приблизительно на 40 г/м² больше резервов стеблей использовалось при HD по сравнению с LD, что отражает более высокий стресс, обеспечиваемый этими условиями.

Взаимосвязь между соотношением биомассы до:после цветения (PPBR) и биомассой после цветения (PAB) была высокой (фиг. 36). Условия двух плотностей обеспечивают непрерывный диапазон PPBR от <1,5 до >4. Снижение PPBR от ~4,5 до ~3,5 не оказывало влияния на PAB. Однако дальнейшее снижение PPBR ниже ~3,5 приводило к относительно резкому увеличению PAB, предположительно поскольку больше воды было доступно в ходе налива зерна, когда соотношение PPBR снижалось ниже 3,5. Интрогрессия Stg1 в RTx7000 снижала PPBR ниже 3 при HD и LD, тем самым увеличивая PAB в условиях обеих плотностей.

Соотношение биомассы до:после цветения (PPBR) также влияло на устойчивость к полеганию (фиг. 37). В этом случае массу стебля после цветения (PASM) используют в качестве заместителя для устойчивости к полеганию. В условиях высокой и низкой плотности PPBR отрицательно коррелировало с биомассой стебля после цветения. Следовательно, высокое соотношение биомассы до:после цветения повышало количество резервов стеблей, ремобилизованных в ходе налива зерна, таким образом, снижая биомассу стебля и увеличивая вероятность полегания. По сравнению с RTx7000, Stg1a значительно снижал количество мобилизованных резервов стеблей при LD (~5 против 65 г/м²) и HD (~80 против 140 г/м²). По сравнению с RTx7000 Stg1 значительно снижал количество мобилизованных резервов стеблей при HD (~80 против 140 г/м²), но не LD. Степень мобилизованных резервов стеблей была более высокой при HD, чем при LD, отражая более высокий дефицит воды при HD. Например, отличие в мобилизации резервов стеблей между HD и LD было двукратным в RTx7000 (приблизительно 140 против 70 г/м²).

Выход зерна оставался низким (на уровне ~4,2 т/га) до тех пор, пока соотношение биомассы до:после цветения не снижалось ниже ~3 (HD) или ~2,5 (LD) [фиг. 38]. Ниже этих критических величин выход зерна значительно увеличивался при каждом пошаговом уменьшении этих соотношений, причем степень увеличения выхода зерна была немного более высокой при LD, чем при HD. Это указывает на то, что доступность воды после цветения была тесно связана с GLAA до цветения и биомассой, и что определенное снижение GLAA требовалось для обеспечения надлежащей доступности воды для налива зерна. При обеих плотностях Stg1 снижал соотношение биомассы до:после цветения ниже критических уровней, что приводило к увеличению выхода, составляющему 28% (LD) и 22% (HD), относительно RTx7000. Эти данные обеспечивают критическую связь между действием гена Stg1 (уменьшенный размер листового полога во время цветения) и выходом зерна при терминальной засухе. Следует отметить, что интрогрессия Stg1a имела некоторое влияние на снижение PPBR (HD и LD) и увеличение выхода зерна (только LD) относительно RTx7000, но не в той же степени, как в случае Stg1. Таким образом, из этого эксперимента отсутствуют убедительные данные, что ключевой ген Stg1 расположен в области Stg1a. Это подтверждает доказательства, представленные ранее, поскольку наиболее значительный кандидат для Stg1 (SbPIN4) расположен выше интрогрессии Stg1a.

В этом эксперименте исследовали четыре интрогрессии Stg1: a) 6078-1 (целая область Stg1); b) 10709-5 (рекомбинантное растение, охватывающее приблизительно 1/3 области Stg1); c) 10604-5 (рекомбинантное растение, охватывающее приблизительно 3/4 области Stg1) и d) 10568-2 (рекомбинантное растение, охватывающее практически 1/2 области Stg1).

В условиях низкой плотности (LD) биомасса до цветения варьировала только на ~5% (от 522 до 552 г/м²) среди генотипов, и в то же время биомасса после цветения варьировала практически в два раза (от 173 до 313 г/м²). Это указывает на то, что на значительные отличия в биомассе после цветения влияло что-то, отличное от биомассы до цветения, например отличия в усвояемости воды. Например, как 10709-5, так и RTx7000 продуцировали ~550 г/м² биомассы до цветения, но в то же время рекомбинантное растение Stg1 (10709-5) продуцировало на ~60% больше биомассы после цветения.

В условиях высокой плотности (HD) биомасса до и после цветения высоко отрицательно коррелировала. Интрогрессия Stg1 в RTx7000 снижала биомассу до цветения на 9% и увеличивала биомассу после цветения на 23%.

Использование воды культурой (CWU) во время цветения в большей степени отличалось между генотипами, чем биомасса до цветения. При комбинировании данных HD и LD биомасса после цветения (PAB) оставалась низкой (на уровне ~150 г/м²) до тех пор, пока CWU во время цветения не снижалось ниже ~180 мм. Ниже этой критической величины PAB увеличивалась для каждого пошагового снижения CWU вплоть до уровня 175 мм, причем PAB достигала плато на уровне приблизительно 310 г/м². Дальнейшее снижение CWU во время цветения ниже 175 мм не приводило к дополнительной PAB.

Размер листового полога, на который указывает GLAA, по большей степени определял соотношение биомассы до:после цветения (PPBR). В условиях как высокой, так и низкой плотности интрогрессия Stg1 (или конкретных рекомбинантных растений, таких как 10709-5) в фон RTx7000 снижала GLAA, которая, в свою очередь, снижала соотношение биомассы до:после цветения, тем самым увеличивая доступность воды для налива зерна в этих условиях ограниченного доступа воды. Величина PPBR для 6078-1 оказалась аномальной (слишком высокой), поскольку этот генотип находится значительно выше линии

регрессии GLAA/PPBR.

Размер листового полога, на который указывает GLAA, был определяющим фактором массы стебля после цветения (PASM). В условиях высокой плотности интрогрессия Stg1 (или рекомбинантные растения Stg1, такие как 10604-5 и 10709-5) в фон RTx7000 снижала GLAA, что, в свою очередь, увеличивало PASM. Приблизительно на 60 г/м^2 больше резервов стеблей использовалось при HD по сравнению с LD, отражая более высокий стресс, обеспечиваемый этими условиями.

Взаимосвязь между соотношением биомассы до:после цветения (PPBR) и биомассой после цветения (PAB) была высокой. Условия двух плотностей обеспечивают непрерывный диапазон PPBR от <2 до >5 , хотя наклон регрессии был более высоким для LD, чем для HD. При HD снижение PPBR от ~ 6 до $\sim 3,5$ приводило к постепенному увеличению PAB от $\sim 130 \text{ г/м}^2$ (RTx7000) до $\sim 180 \text{ г/м}^2$ (10604-5). Дальнейшее снижение PPBR ниже ~ 3 в условиях LD приводило к более крутому увеличению PAB, предположительно поскольку вода была более доступной в ходе налива зерна, когда соотношение PPBR снижалось ниже 3.

Соотношение биомассы до:после цветения (PPBR) также влияло на устойчивость к полеганию. В этом случае массу стебля после цветения (PASM) используют в качестве заместителя для устойчивости к полеганию. В условиях высокой и низкой плотности PPBR отрицательно коррелировало с биомассой стебля после цветения. Следовательно, высокое соотношение биомассы до:после цветения повышало количество резервов стеблей, ремобилизованных в ходе налива зерна, таким образом, снижая биомассу стебля и увеличивая вероятность полегания. По сравнению с RTx7000 Stg1 значительно снижало количество мобилизованных резервов стеблей при HD (~ 100 против 160 г/м^2). Степень мобилизованных резервов стеблей была более высокой при HD, чем при LD, отражая более высокий дефицит воды при HD. Например, отличие в мобилизации резервов стеблей между HD и LD было более чем двукратным в RTx7000 (приблизительно 160 против 60 г/м^2). Интересно, что PASM возрастала при снижении PPBR на протяжении всего диапазона PPBR (1,5-6), в то время как выход зерна, и в меньшей степени PAB, только увеличивались, когда PPBR снижалось ниже ~ 3 . Это указывает на то, что относительно небольшая экономия воды до цветения была все еще способна повышать устойчивость к полеганию, хотя до получения ответа в виде выхода зерна требовалась более высокая экономия воды.

Выход зерна оставался низким (на уровне $\sim 3,1 \text{ т/га}$) до тех пор, пока соотношение биомассы до:после цветения не снижалось ниже ~ 3 . Ниже этой критической величины выход зерна значительно увеличивался при каждом пошаговом уменьшении этого соотношения. Поскольку ни одна из интрогрессий Stg1 не снижала PPBR до <3 в условиях HD, в этих условиях не было реализовано преимуществ Stg1 в отношении выхода. В условиях LD некоторые из интрогрессий Stg1 снижали PPBR ниже критического уровня, что приводило к увеличению выхода на 12% (10568-2) и 5% (10709-5) относительно RTx7000. Эти данные обеспечивают критическую связь между действием гена Stg1 (уменьшенный размер листового полога во время цветения) и выходом зерна при терминальной засухе.

CWU в ходе налива зерна оставалось низким (на уровне $\sim 60 \text{ мм}$) до тех пор, пока соотношение биомассы до:после цветения не снижалось ниже $\sim 3,5$ (фиг. 39). Ниже этой критической величины CWU в ходе налива зерна возрастало значительно при каждом пошаговом снижении этого соотношения. Поскольку ни одна из интрогрессий Stg1 не снижала PPBR до $<3,5$ в условиях HD, в этих условиях увеличение CWU в ходе налива зерна не реализовалось для рекомбинантных растений Stg1. В условиях LD некоторые из интрогрессий Stg1 (и RTx7000) снижали PPBR ниже критического уровня, увеличивая CWU в ходе налива зерна вплоть до $\sim 80 \text{ мм}$ по сравнению с исходным уровнем при HD ($\sim 60 \text{ мм}$).

Взаимосвязь между CWU в ходе налива зерна и выходом зерна была положительной (фиг. 40). Однако корреляция между этими параметрами была относительно низкой ($r^2=0,23$), возможно, вследствие высоко переменной характера измерения воды в почве в полевых условиях.

Пример 20. Замедленное старение листьев (поддержание зеленым) является следствием более высокого водного режима растения в ходе налива зерна (вследствие увеличенного использования воды).

Водный режим растений определяли на FL-2 (два листа ниже удлиненного листа) при среднем наливе зерна с использованием двух методологий: водный потенциал листьев (LWP) и относительное содержание воды (RWC). LWP измеряли в поле с помощью глубинного манометра. После определения LWP в поле образец того же листа помещали на лед и в течение 2 мин переносили в лабораторию на расстоянии 300 м для определения RWC стандартными способами.

RWC FL-2 отрицательно коррелировало с относительной скоростью старения листьев при среднем наливе зерна в условиях как высокой, так и низкой плотности в ряде Stg NIL, включая рекуррентное родительское растение. Корреляции для HD и LD были параллельными, однако отличались приблизительно на 0,35 единиц старения листьев, т.е. для данного уровня RWC, например 70, относительная скорость старения листьев составляла 2,1 и 2,45 для LD и HD соответственно. Интрогрессия области Stg1 в RTx7000 увеличивала RWC при среднем наливе зерна (FL-2) и снижала относительную скорость старения листьев как при HD, так и при LD, хотя влияние было более высоким при HD.

В свою очередь, относительная скорость старения листьев высоко отрицательно коррелировала с площадью зеленых листьев в зрелом состоянии (GLAM) в условиях HD и LD (фиг. 49), причем более высокие уровни старения листьев проявлялись при HD. Stg1 продуцировало более чем в два раза больше

GLAM, чем RTx7000 при HD (2106 против 859 $\text{см}^2/\text{м}^2$) и на 19% больше GLAM при LD (2145 против 1725 $\text{см}^2/\text{м}^2$), также см. фиг. 42.

Пример 21. Увеличенная устойчивость к полеганию является следствием более высокого водного режима в ходе налива зерна (вследствие увеличенного использования воды).

Более высокая масса стебля в зрелом состоянии является компонентом устойчивости к полеганию. RWC при среднем наливе зерна (FL-2) высоко отрицательно коррелировало с массой стебля в зрелом состоянии в ряде Stg NIL, выращенных в условиях ограниченного доступа воды при двух плотностях культуры (фиг. 43). Интрогрессия Stg1 в RTx7000 увеличивала RWC при среднем наливе зерна (FL-2) и массу стебля в зрелом состоянии при HD и LD, причем более высоким влияние было при HD. Относительно RTx7000, Stg1 увеличивало массу стебля в зрелом состоянии на 9% при LD (224 против 203 $\text{г}/\text{м}^2$) и на 29% при HD (286 против 204 $\text{г}/\text{м}^2$). Таким образом, польза Stg1 с точки зрения устойчивости к полеганию возрастала с возрастанием уровня дефицита воды.

Биомасса после цветения, главным образом, состоит из а) массы стебля после цветения (PASM) - показатель мобилизации резервов стебля и компонент устойчивости к полеганию, и б) выхода зерна. Специалисты по выращиванию зерна требуют максимизации как выхода зерна, так и устойчивости к полеганию, т.е. они не хотят одного за счет другого. Масса стебля после цветения высоко линейно коррелировала с PAB в условиях HD и LD (фиг. 44). В то время как Stg1 имел небольшое влияние на PASM при более мягкой засухе (LD), количество массы сухого вещества, перемещенного из стебля в ходе налива зерна, было значительно меньшим в Stg1 по сравнению с RTx7000 (85 против 139 $\text{г}/\text{м}^2$) при более тяжелой засухе (HD). Это приводило к большей массе стебля в состоянии созревания в Stg1 относительно RTx7000 (286 против 204 $\text{г}/\text{м}^2$), которая, в свою очередь, должна обеспечивать увеличенную устойчивость к полеганию.

Хотя корреляция между PASM и PAB была высокой при HD и LD (фиг. 43), корреляция между выходом зерна и PAB была низкой в условиях обеих плотностей (фиг. 44). Интрогрессия Stg1 в RTx7000 увеличивала выход зерна в условиях HD и LD, хотя PAB была более высокой только при HD. Следует отметить, что более высокий выход зерна в Stg1 по сравнению с RTx7000 (290 против 184 $\text{г}/\text{м}^2$) при HD достигался при значительно меньших резервах стеблей в Stg1, чем у RTx7000 (85 против 139 $\text{г}/\text{м}^2$), указывая на то, что потребность в углероде в ходе налива зерна по большей части удовлетворялась текущей фотоассимиляцией и резервами стеблей в Stg1 и RTx7000 соответственно.

Потенциальное сопоставление между PASM и выходом зерна представлено на фиг. 45. При HD Stg1 достигало наиболее высокого выхода зерна при любой интрогрессии (290 $\text{г}/\text{м}^2$) при сохранении потерь стеблей до 85 $\text{г}/\text{м}^2$. Относительно RTx7000 Stg1 оптимизировало соответствие между PASM и выходом зерна. Дальнейшее снижение утилизации резервов стебля в Stg24 (38 $\text{г}/\text{м}^2$) приводило к более низкому выходу зерна (263 $\text{г}/\text{м}^2$). При LD Stg1 также достигало высокого выхода зерна относительно RTx7000 (282 против 214 $\text{г}/\text{м}^2$) при использовании немного меньших резервов стебля (46 против 50 $\text{г}/\text{м}^2$). Таким образом, при обеих плотностях Stg1 достигало более высокого выхода зерна и устойчивости к полеганию, чем RTx7000.

Взаимосвязь между PASM и массой стебля в зрелом состоянии была относительно небольшой для различных интрогрессии Stg при HD и LD, хотя RTx7000 находилось ниже регрессионной линии в обоих случаях. Для данного уровня утилизации резервов стебля (например ~140 $\text{г}/\text{м}^2$ при HD или 50 $\text{г}/\text{м}^2$ при LD), интрогрессия области Stg в RTx7000 значительно увеличивала массу стебля в зрелом состоянии, указывая на то, что был важен некоторый другой фактор (например, прочность стебля) в дополнение к количеству использованных резервов стеблей.

Масса стебля после цветения (PASM) высоко линейно коррелировала с PAB в условиях HD и LD (фиг. 46). Корреляции HD и LD были практически параллельными, хотя и с отличием приблизительно на 50 $\text{г}/\text{м}^2$, т.е. для данного уровня PAB, например, 300 $\text{г}/\text{м}^2$, PASM составляла на ~50 $\text{г}/\text{м}^2$ меньше при HD, чем при LD (-100 против -50 $\text{г}/\text{м}^2$). Это отражает более высокий уровень стресса в условиях HD. В условиях HD как Stg1, так и Stg1a использовали ~80 $\text{г}/\text{м}^2$ резервов стеблей по сравнению практически с 140 $\text{г}/\text{м}^2$ в RTx7000, и в то же время Stg1 продуцировало на ~28% больше PAB, чем Stg1a, для эквивалентного использования резервов стеблей. При LD оба из Stg1a и в меньшей степени Stg1 увеличивали PAB относительно RTx7000. Однако в то время как Stg1a использовало на ~60 $\text{г}/\text{м}^2$ меньше резервов стеблей, чем RTx7000, Stg1 использовало на ~20 $\text{г}/\text{м}^2$ больше резервов стеблей, чем RTx7000.

Выход зерна положительно коррелировал с PAB при HD и LD. При HD Stg1 превосходил по выходу RTx7000 на 24%, хотя растение с Stg1a было эквивалентным RTx7000 по выходу зерна. При LD Stg1 и Stg1a превосходили по выходу RTx7000 на 42 и 20% соответственно.

В этом эксперименте не было соответствия между PASM и выходом зерна, поскольку корреляция между этими параметрами была положительной и линейной при обеих плотностях культур (фиг. 47). При HD растение с Stg1 проявляло наиболее высокую массу стебля и выход зерна из всех интрогрессий Stg, указывая на то, что выход зерна и устойчивость к полеганию не являются взаимоисключающими.

Взаимосвязь между PASM и массой стебля в зрелом состоянии положительно коррелировала при HD и отрицательно коррелировала при LD. При HD как PASM, так и масса стебля при созревании были значительно более высокими в Stg1, чем в RTx7000. При LD масса стебля в зрелом состоянии была более

высокой в Stg1, чем в RTx7000 (314 против 271 г/м²), хотя растение с Stg1 использовало больше резервов стеблей по сравнению с RTx7000 (87 против 66 г/м²). В общем, растение с Stg1 увеличивало массу стебля в зрелом состоянии на 22% (HD) и 16% (LD) относительно RTx7000. Также Stg1a использовало значительно меньше резервов стеблей, чем RTx7000 при обеих плотностях культур.

Масса стебля после цветения (PASM) высоко линейно коррелировала с PAB в условиях HD и LD (фиг. 48). Генетическое варьирование в использовании резервов стеблей после цветения находилось в диапазоне ~30-110 г/м² в условиях LD и ~100-160 г/м² в условиях HD, отражая более высокий уровень стресса в условиях HD. В условиях HD родительское растение Stg1 (6078-1) и два рекомбинантных растения Stg1 (10604-5 и 10709-5) использовали значительно меньше резервов стеблей по сравнению с RTx7000 (~100 против 160 г/м²), и в то же время продуцировали больше PAB, чем RTx7000 (~170 против 130 г/м²). В условиях LD только одно из рекомбинантных растений Stg1 (10568-2) использовало значительно меньше резервов стеблей, чем RTx7000 (~30 против 60 г/м²), и продуцировало больше PAB, чем RTx7000 (~310 против 230 г/м²).

Выход зерна положительно коррелировал с PAB в условиях LD и отрицательно коррелировал в условиях HD, хотя в общем (в совокупности HD и LD) взаимосвязь была положительной, причем RTx7000 (HD) отличалось от остальных.

В этом эксперименте не было соответствия между PASM и выходом зерна, поскольку корреляция между этими параметрами была положительной и линейной для обеих плотностей культур. В условиях HD родительское растение Stg1 (6078-1) проявляло высокую массу стеблей и высокий выход зерна по сравнению с другими интрогрессиями Stg1. RTx7000 было аномальным в условиях HD, проявляя низкую массу стебля и высокий выход зерна. При LD 10709-5 и 10568-2 проявляли высокую массу стеблей и выход зерна относительно RTx7000.

Взаимосвязь между PASM и массой стебля во взрослом состоянии положительно коррелировала при обеих плотностях. При HD как PASM, так и масса стебля в зрелом состоянии были значительно более высокими в 6078-1 и 10709-5, чем в RTx7000. При LD только одно рекомбинантное растение Stg1 (10568-2) превышало RTx7000 в отношении PASM и массы стебля в зрелом состоянии.

Пример 22. Более высокий выход зерна является следствием более высокого водного режима растения в ходе налива зерна.

Интрогрессия Stg1 в фон RTx7000 увеличивала водный режим растения при среднем наливе зерна, на что указывает а) более высокое относительное содержание воды (RWC) в FL-2 при LD и HD, более низкий водный потенциал (LWP) в FL-2 при LD и HD. В общем, в этом эксперименте растения имели больший стресс при LD, чем при HD, на что указывает более низкое RWC при LD. Однако благоприятное влияние Stg1 на водный режим растения было более выраженным при HD, где RWC составляло на 26% выше в Stg1, чем в RTx7000.

RWC при среднем наливе зерна в FL-2 положительно коррелировало с выходом зерна при HD и LD. При более высоких уровнях дефицита воды для растения (RWCX73) выход зерна был более высоким при LD, чем при HD, для данного уровня RWC. RWC и выход зерна были более высокими в Stg1, чем в RTx7000 при обеих плотностях культуры. Например, в Stg1 при HD увеличение RWC на 26% было ассоциировано с увеличением выхода зерна на 58% относительно RTx7000.

Водный потенциал листьев (LWP) FL-2 при среднем наливе зерна отрицательно коррелировал с выходом зерна в условиях HD и LD (фиг. 49). При обеих плотностях Stg1 проявляло более низкий LWP (меньший стресс) и более высокий выход зерна относительно RTx7000. Эти данные вместе с данными RWC обеспечивают убедительное доказательство связи между более высоким водным режимом растений в ходе налива зерна и увеличенным выходом зерна благодаря области Stg1.

Пример 23. Более высокий выход зерна и больший размер зерен являются следствием увеличенной доступности воды в ходе налива зерна.

Критической для гипотезы о функции Stg1 является связь между использованием воды до и после цветения и, следовательно, связь между использованием воды после цветения и выходом зерна. Ген Stg1 имеет небольшую ценность в полевых условиях, поскольку отсутствует связь между увеличенной доступностью воды в ходе налива зерна и либо выходом зерна, либо размером зерна.

Во-первых, важно установить связь между соотношением биомассы до:после цветения (PPBR) и использованием воды культурой (CWU) в ходе налива зерна. CWU в ходе налива зерна оставалось низким (на уровне ~85 и 95 мм для LD и HD соответственно) до тех пор, пока соотношение биомассы до:после цветения не снижалось ниже ~3 и 2,5 для LD и HD соответственно (фиг. 50). Ниже этой критической величины CWU в ходе налива зерна значительно возрастало при каждом пошаговом снижении этого соотношения. При обеих плотностях интрогрессия Stg1 снижала PPBR достаточно, чтобы достаточно увеличилось CWU относительно RTx7000.

Во-вторых, важно показать связь между CWU в ходе налива зерна и выходом зерна. Как правило, эти параметры были положительно ассоциированными в эксперименте ROS, кроме двух отдельных отличающихся результатов при LD (Stg2 и Stg3) [фиг. 51]. Интрогрессия Stg1 в RTx7000 увеличивала как CWU в ходе налива зерна, так и выход зерна при обеих плотностях культуры.

Наконец, связь между PPBR и выходом зерна в условиях ограниченного доступа воды завершает

картину (фиг. 51). Выход зерна оставался низким (на уровне ~ 410 г/м²) до тех пор, пока соотношение биомассы до:после цветения не снижалось ниже $\sim 2,7$ (фиг. 52). Ниже этой критической величины выход зерна значительно увеличивался при каждом пошаговом снижении этого соотношения. При обеих плотностях интрогрессии Stg1 снижали PPBR достаточно, чтобы значительно увеличить выход зерна относительно RTx7000. Эти данные указывают на критическую связь между действием гена Stg1 (уменьшенный размер листового полога во время цветения) и выходом зерна в условиях терминальной засухи.

CWU в ходе налива зерна положительно коррелировало с размером зерна в условиях как HD, так и LD (фиг. 53). Интрогрессия Stg1 в RTx7000 значительно увеличивала размер зерен в условиях HD, но не LD.

Взаимосвязь между PPBR и размером зерна в условиях ограниченного доступа воды указывает на важность сохранения воды до цветения в качестве определяющего фактора размера зерен (фиг. 54). Размер зерен оставался низким (на уровне ~ 17 и $17,5$ мг для HD и LD соответственно) до тех пор, пока соотношение биомассы до:после цветения не снижалось ниже $\sim 2,7$ (фиг. 54). Ниже этой критической величины размер зерен значительно увеличивался при каждом пошаговом снижении этого соотношения. В условиях HD, но не LD, интрогрессии Stg1 снижали PPBR достаточно, чтобы значительно увеличить размер зерен относительно RTx7000. Эти данные указывают на критическую связь между действием гена Stg1 (уменьшенный размер листового полога во время цветения) и размером зерен в условиях терминальной засухи.

CWU в ходе налива зерна оставалось низким (на уровне ~ 58 мм при HD) до тех пор, пока снижение биомассы до:после цветения не снижалось ниже $\sim 3,5$. Следует отметить, что PPBR не снижалось ниже критического порога при любом генотипе в случае HD, таким образом, CWU в ходе налива зерна оставалось относительно низким для всех генотипов в этих условиях. Однако поскольку генотипы снижались ниже этой критической величины в условиях LD, CWU в ходе налива зерна значительно увеличивалось при каждом пошаговом снижении этого соотношения. Только у одного рекомбинантного растения Stg1 (10709-5) CWU увеличивалось в ходе налива зерна относительно RTx7000.

Главным образом, CWU в ходе налива зерна и выход зерна положительно коррелировали при использовании комбинированного набора данных от обработок HD и LD с генотипами, использовавшими больше воды и продуцировавшими больше зерна в условиях LD. Однако взаимосвязь между этими параметрами не была очень высокой. Также конкретные рекомбинантные растения Stg1 соответственно не превосходили по выходу RTx7000 в условиях HD и LD. См. фиг. 55.

Пример 24. Анализ генов QTL и PIN.

Анализ QTL.

Данные о QTL поддержания зеленым получали от 7 испытаний (Cresta et al., 1999; Hausmann et al., 2002; Kebede et al., Theoretical and Applied Genetics 103:266-276, 2001; Srinivas et al., Theor Appl Genet 118:703-717, 2009; Subudhi et al., Theor App Genet 101:733-741, 2000; Tao et al., Theor Appl Genet 100:1225-1232, 2000; Xu et al., Genome 43:461-469, 2000). Из 7 испытаний 47 индивидуальных QTL было идентифицировано и нанесено на консенсусную карту сорго (Mace et al., BMC Plant Biol. 9:13, 2009). Там, где оцененные доверительные интервалы (CI) для QTL для одного и того же признака перекрывались, эти QTL группировали в мета-QTL. Таким образом, было идентифицировано девять мета-QTL для поддержания зеленым. QTL для того же признака классифицировали как отдельный QTL, если их CI не имел общей области и среднее расстояние между QTL составляло меньше или равно 15 cM друг от друга.

Статистический машинный анализ с обучением (SML) QTL (Bedo et al., BMC Genetics 9:35, 2008) проводили на наборе из свыше чем 500 записей в испытании рут мужских растений сорго DEEDI. 23 идентифицированных QTL с вероятностью $< 0,05$ также были нанесены на консенсусную карту.

Анализ гена PIN.

Проводили поиск всех доступных генов PIN в рисе и Arabidopsis через NCBI (www.ncbi.org). Всего были идентифицированы последовательности для 9 генов PIN риса (OsPIN1, OsPIN1b, OsPIN1c, OsPIN2, OsPIN3a, OsPIN3b, OsPIN4, OsPIN5, OsPIN6) и 3 генов PIN Arabidopsis (AtPIN1, AtPIN2, AtPIN4). Все гены (белковая последовательность) подвергали поиску в BLAST против WGS сорго (www.gramene.org) и было идентифицировано 100 наилучших результатов. Сопоставляли оценку в баллах (величина S: показатель сходства для последовательности запроса с показанной последовательностью), величину E (вероятность того, что случайным образом существует другое выравнивание со сходством, большим чем данный показатель S), % ID и длину гомологии последовательности для каждого из 1200 наилучших результатов. Взаимосвязь между 4 показателями анализировали и показатель S отбирали в качестве главного показателя для оценки вероятности сходства последовательностей. После анализа распределения величин показателя S было выявлено 3 категории показателей S (>1000 ; >499 и <1000 ; <499) и был составлен перечень из 11 генов сорго с показателями >499 (т.е. в первых 2 категориях) (табл. 8).

ID гена сорго	Заданный ген	Аннотация JGI
Sb02g029210	OsPIN6	"сходен с белком Os09g0505400"
Sb03g029320	OsPIN3a	"сходен с возможным компонентом 3a эффлоксного переносчика ауксина"
Sb03g032850	OsPIN1	"сходен с предполагаемым неохарактеризованным белком"
Sb03g037350	OsPIN5	"сходен с возможным компонентом 5 эффлоксного переносчика ауксина"
Sb03g043960	OsPIN6	"сходен с возможным компонентом 6 эффлоксного переносчика ауксина"
Sb04g028170	OsPIN1	"сходен с компонентом 1 эффлоксного переносчика ауксина"
Sb05g002150	OsPIN1b	"сходен с возможным компонентом 1b эффлоксного переносчика ауксина"
Sb07g026370	OsPIN4	"сходен с возможным компонентом 4 эффлоксного переносчика ауксина"
Sb10g004430	OsPIN1	"сходен с предполагаемым компонентом 3b эффлоксного переносчика ауксина"
Sb10g008290	OsPIN1c	"сходен с возможным компонентом 1c эффлоксного переносчика ауксина"
Sb10g026300	OsPIN2	"сходен с возможным компонентом 2 эффлоксного переносчика ауксина"

Сравнения.

Из 11 идентифицированных ортологов PIN, 10 (90,9%) выравнились с известным QTL для поддержания зеленым. Только один из 11 генов PIN сорго (Sb03g043960 у SBI-03, не выравнился ни с одним из сообщенных QTL. Из 79 нанесенных на карту QTL (23 SML-QTL и 56 из литературы/мета-QTL), 30 (38%) выравнились с ортологами PIN.

Пример 25. Анализ PIN2, PIN3, PIN4 и PIN5.

Источник поддержания зеленым ВТх642 (B35) и практически изогенные линии (NIL), содержавшие Stg1, Stg2, Stg4 QTL, а также противопоставляемую стареющую линию Tx7000 выращивали в корневых трубах в теплице.

Целью эксперимента было измерение уровней экспрессии генов, которые идентифицированы в настоящем описании в качестве генов-кандидатов поддержания зеленым в условиях хорошего доступа воды и после применения к растениям стресса в виде засухи, чтобы увидеть, были ли какие-либо отличия в экспрессии поддержания зеленым по сравнению со стареющими растениями.

Эксперимент подразделяли на две части: стресс при ранней засухе (пример 1) и стресс при поздней засухе (пример 2).

Результаты для стресса при ранней засухе представлены в табл. 9.

Таблица 9

Ген	ID гена	Гомолог из риса	Stg QTL	Комментарий
SbPIN2	Sb03g029320	OsPIN3a	Stg2	Кандидат Stg2
SbPIN3	Sb03g032850	OsPIN1	Stg1	Верхний Stg1 QTL
SbPIN4	Sb03g037350	OsPIN5	Stg1	Кандидат Stg1
SbPIN5	Sb03g043960	OsPIN6	Stg1	Нижний Stg1 QTL

Основные отличия в экспрессии этих генов PIN обобщенно представлены ниже (табл. 10 и фиг. 57A-D).

Ген	Основные ткани	Ответ на WD	Дифференциальная экспрессия
SbPIN4 (кандидат Stg 1)	WW: низкий в листьях, высокий в корнях WD: низкий в листьях, высокий в корнях	Более низкая экспрессия в большинстве тканей	WW: более высокий в Tx7000 против BТх642 и Stg1 в корнях (фиг.1) WD: Более высокий в Stg1 и BТх642 против Tx7000 в листьях, стеблях и верхних корнях (фиг. 2)
SbPIN2 (кандидат Stg2)	WW: высокий в листьях, низкий в корнях	Увеличение в корнях, снижение в стеблях	WW: более высокий в Stg2/BТх642 против Tx7000 в стебле и корнях (фиг. 3) WD: более высокий в BТх642 и в меньшей степени в Stg2 против Tx7000 в большинстве тканей, за исключением старых корней (фиг. 4)
SbPIN3	Ограниченное варьирование среди тканей	Ограниченный ответ на WD	WD: немного более высокий в BТх642/Stg1 против Tx7000
SbPIN5	WW: высокий в листьях, низкий в корнях WD: высокий в листьях, низкий в корнях	Увеличение в корнях, отсутствие значительных изменений в листьях	WW: Более высокий в Stg1 (и в значительно меньшей степени в Tx642) против Tx7000 особенно в верхних молодых корнях WD: Более высокий в Stg1 (и в меньшей степени) BТх642 против Tx7000 в стебле

Перспективные профили были идентифицированы для SbPIN4 и SbPIN2, Stg1 и Stg2 соответственно.

В обоих случаях экспрессия этих генов была более высокой в линиях поддержания зеленым по сравнению со стареющей линией в ответ на дефицит воды.

Эти два гена PIN продемонстрировали и отличия в тканевой специфичности. SbPIN4, главным образом (среди всех условий), более высоко экспрессировался в корнях и стеблях и меньше экспрессировался в листьях, в то время как SbPIN2, главным образом, продемонстрировал более высокую экспрессию в листьях и стеблях и более низкую экспрессию в корнях).

Специалистам в данной области понятно, что аспекты, описанные в настоящем описании, допускают изменения и модификации, отличные от конкретно описанных. Следует понимать, что эти аспекты включают все такие изменения и модификации. Аспекты, описанные в настоящем описании, также включают все стадии, признаки, композиции и соединения, упоминаемые или указанные в настоящем

описании по отдельности или в совокупности и любые и все комбинации двух или более стадий или признаков.

Специалистам в данной области понятно, что аспекты, описанные в настоящем описании, допускают изменения и модификации, отличные от конкретно описанных. Следует понимать, что эти аспекты включают все такие изменения и модификации. Такие аспекты также включают все стадии, признаки, композиции и соединения, упоминаемые или указанные в настоящем описании по отдельности или в совокупности, и любые и все комбинации двух или более стадий или признаков.

Ссылки.

Andrade et al., *Crop Sci.* 42:1173-1179, 2002

Bedo et al., *BMC Genetics* 9:35, 2008

Benkova et al., *Cell* 115:591-602, 2003

Borrell et al., *Crop Sci.* 40:1026-1037, 2000a

Borrell et al., *Crop Sci.* 40:1037-1048, 2000b

Borrell and Hammer, *Crop Sci.* 40:1295-1307, 2000

Carraro et al., *Plant Physiology* 142:254-264, 2006

Christopher et al., *Aust. J. Agric. Res.* 59:354-364, 2008

Crasta et al., *Molecular and General Genetics* 262:579-588, 1999

Forestan and Varotto, *Plant Physiology*, 2009

Friml et al., *Current Opinion in Plant Biology* 6:7-12, 2003

Garud et al., *Int. Sorghum and Millets Newsl.* 43:63-65, 2002

Hammer et al., *Aust. J. Agric. Res.* 48:649-655, 1997

Hammer, *Agric. Sci.* 19:16-22, 2006

Harris et al., *J. Exp. Bot.* 58:327-338, 2007

Hausmann *et al.*, *Theoretical and Applied Genetics* 106:133-142, 2002

Henderson *et al.*, *Aust. J. Plant Physiol.* 25:111-123, 1998

Henzell *et al.*, *Australia Int. Sorghum and Millets Newsl.* 38:1-9, 1997

Jiao *et al.*, *Nature Genetics* 42:541-544, 2010

Jordan *et al.*, *Theor. Appl. Genet.* 106:559-567, 2003

Kashiwagi *et al.*, *Plant Physiology and Biochemistry* 44:152-157, 2006

Kassahun *et al.*, *Euphytica* 72:351-362, 2010

Kebede *et al.*, *Theoretical and Applied Genetics* 103:266-276, 2001

Leysner, *Current Biology* 16:R4242-R433, 2001

Mace *et al.*, *BMC Plant Biol.* 9:13, 2009

Manschadi *et al.*, *Funct. Plant. Biol.* 33:823-837, 2006

Miura *et al.*, *Nature Genetics* 42:545-549, 2010

Mortlock and Hammer, *J. Crop Prod.* 2:265-286, 1999

Papanov *et al.*, *Trends in Plant Science* 10(4):170-177, 2005

Passioura, *J. Aust. Inst. Agric. Sci.* 43:117-120, 1977

- Rashotte *et al.*, *Plant Cell* 13:1683-1697, 2000
- Reddy *et al.*, *Euphytica* 159:191-198, 2008
- Reinhardt *et al.*, *Plant Cell* 12:507-518, 2000
- Rosenow *et al.*, *Agric. Water Manag.* 7:207-222, 1983
- Sadras and Connor, *Field Crops Res.* 26:227-239, 1991
- Spano *et al.*, *J. Exp. Bot.* 54:1415-1420, 2003
- Springer, *Nature Genetics* 42:475-476, 2010
- Srinivas *et al.*, *Theor Appl Genet* 118:703-717, 2009
- Subudhi *et al.*, *Theor Appl Genet* 101:733-741, 2000
- Tao *et al.*, *Theor Appl Genet* 100:1225-1232, 2000
- Tenkouano *et al.*, *Theor. Appl. Genet.* 85:644-648, 1993
- Turner, *J. Exp. Bot.* 55:2413-2425, 2004
- Van Oosterom *et al.*, *Field Crops Res.* 115:19-28, 2010a
- Van Oosterom *et al.*, *Field Crops Res.* 115:29-38, 2010b
- Van Oosterom and Hammer, *Field Crops Res.* 108:259-268, 2008
- Wang *et al.*, *Molecular Plant* 2(4):823-831, 2009
- Xin *et al.*, *Field Crops Res.* 111:74-80, 2009
- Xu *et al.*, *Genome* 43:461-469, 2000
- Zheng *et al.*, *Plant Breed* 128:54-62, 2009

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения генетически модифицированного устойчивого к засухе растения, которое использует воду более эффективно, чем не модифицированное растение того же вида, включающий введение в клетку растения нуклеиновой кислоты, кодирующей белок растения сорго, выбранный из белков SbPIN1-11, способствующих проявлению фенотипа поддержания зеленым, причем указанный фенотип проявляется по меньшей мере одним из следующих свойств: увеличенная усвояемость воды в процессе роста растения или увеличенная эффективность транспирации, что приводит к повышенному индексу урожайности и выхода зерна в условиях ограничения доступа воды; увеличенная пластичность архитектуры листового полога; уменьшенный размер листового полога; увеличенная биомасса на едини-

цу площади листа во время цветения; пониженное соотношение производства биомассы до и после цветения, замедленное старение и больший размер зерен, и регенерацию растения из указанной клетки.

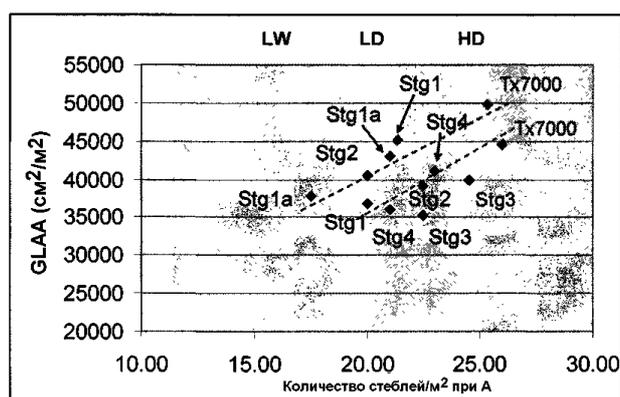
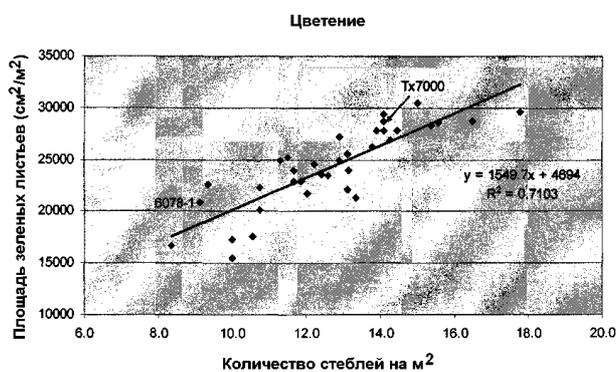
2. Способ по п.1, где белок SbPIN представляет собой SbPIN4.
3. Способ по п.1, где белок SbPIN представляет собой SbPIN2.
4. Способ по п.1, где белок SbPIN представляет собой SbPIN1.
5. Способ по п.1, где генетически модифицированное растение представляет собой растение сорго.
6. Генетически модифицированное устойчивое к засухе растение, полученное способом по любому из пп.1-5.

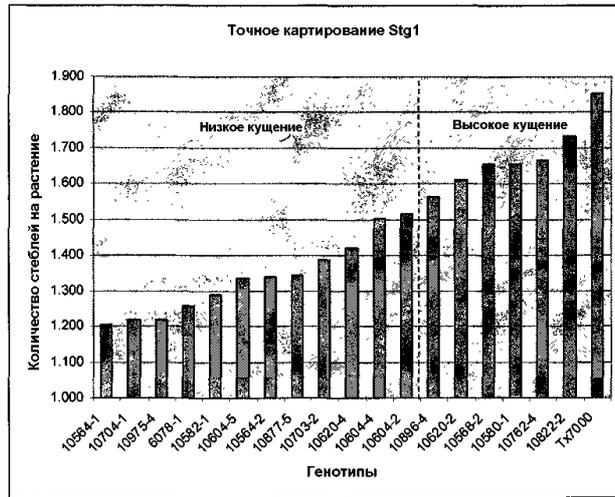
7. Потомство растения по п.6, устойчивое к засухе.

8. Семя или плод растения по п.6 или 7.

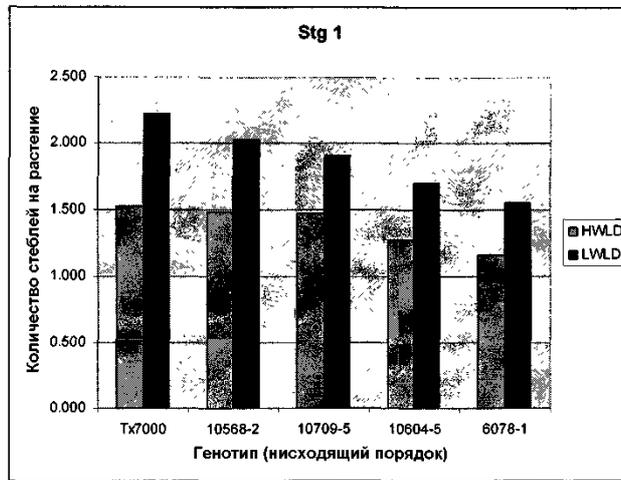
9. Применение выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, выбранный из SbPIN1-11, для придания устойчивости к засухе растению в соответствии со способом по любому из пп.1-5, где экспрессия указанной нуклеиновой кислоты обеспечивает проявление фенотипа поддержания зеленым, причем указанный фенотип проявляется по меньшей мере одним из следующих свойств: увеличенная усвояемость воды в процессе роста растения или увеличенная эффективность транспирации, что приводит к повышенному индексу урожайности и выхода зерна в условиях ограничения доступа воды; увеличенная пластичность архитектуры листового полога; уменьшенный размер листового полога; увеличенная биомасса на единицу площади листа во время цветения, пониженное соотношение производства биомассы до и после цветения, замедленное старение и больший размер зерен.

10. Применение по п.9, где белок SbPIN выбран из SbPIN4, SbPIN2 и SbPIN1.

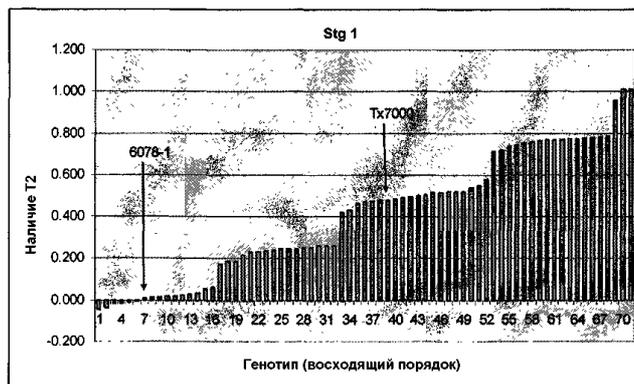




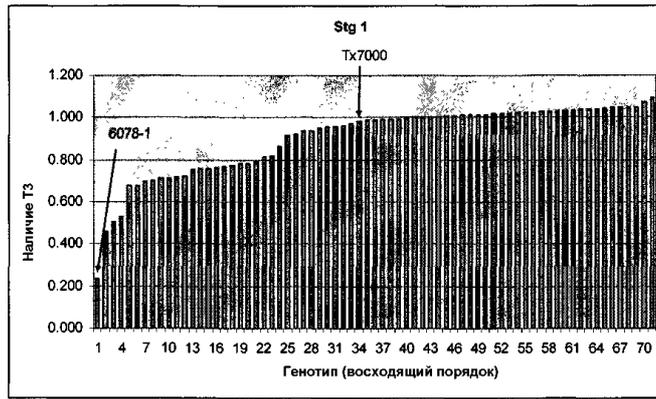
Фиг. 3



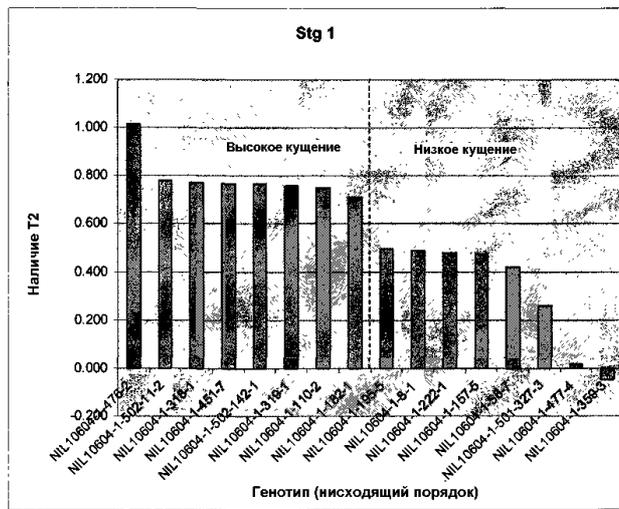
Фиг. 4



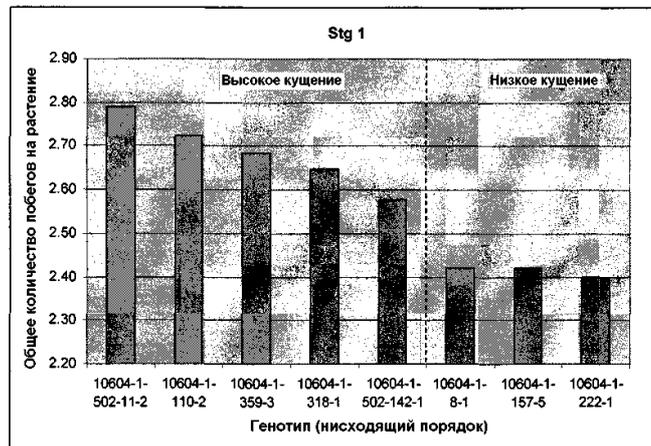
Фиг. 5



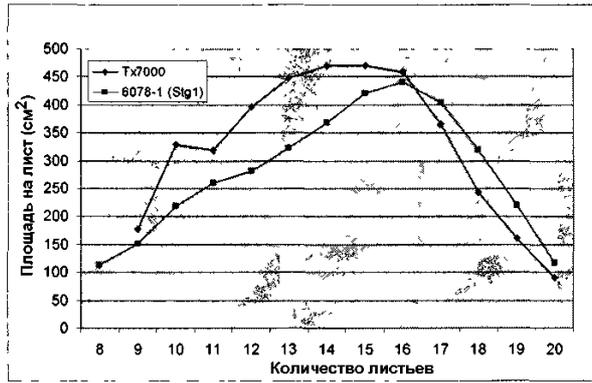
Фиг. 6



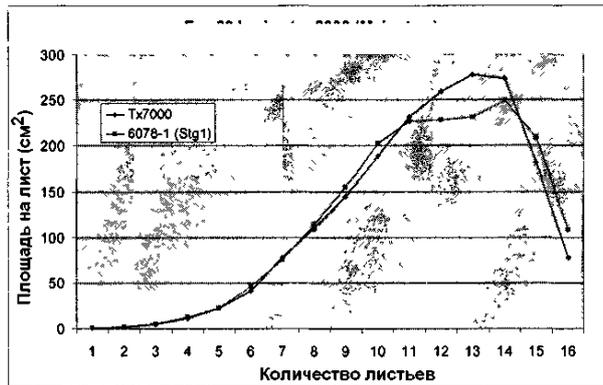
Фиг. 7



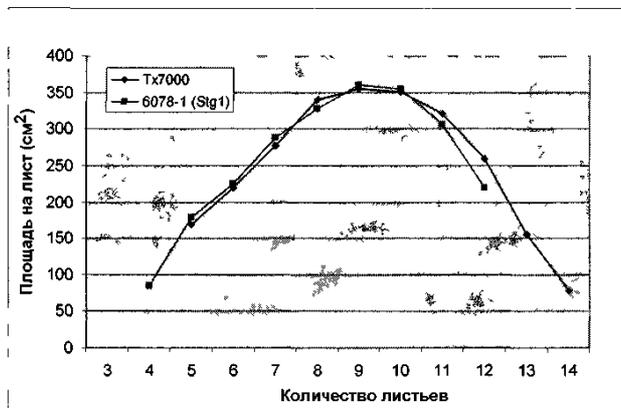
Фиг. 8



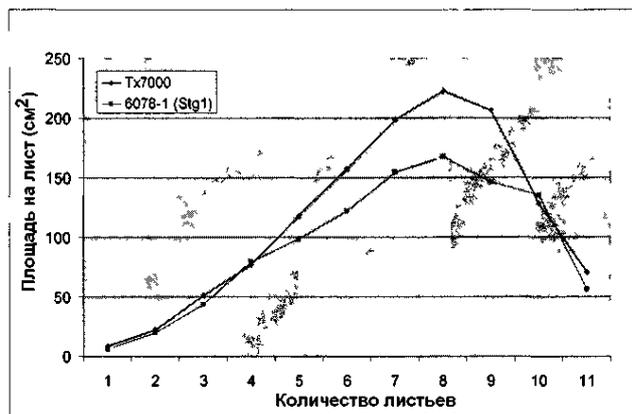
Фиг. 9А



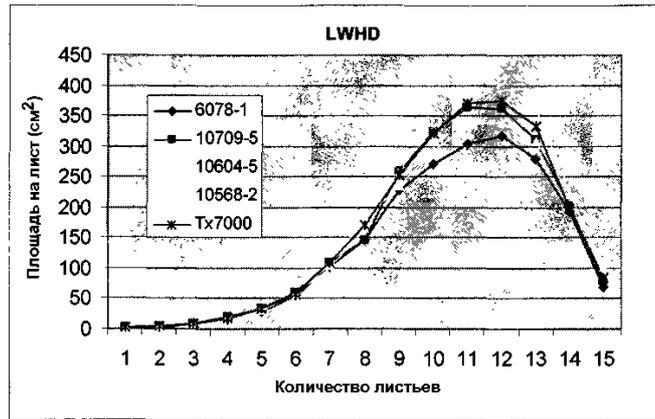
Фиг. 9В



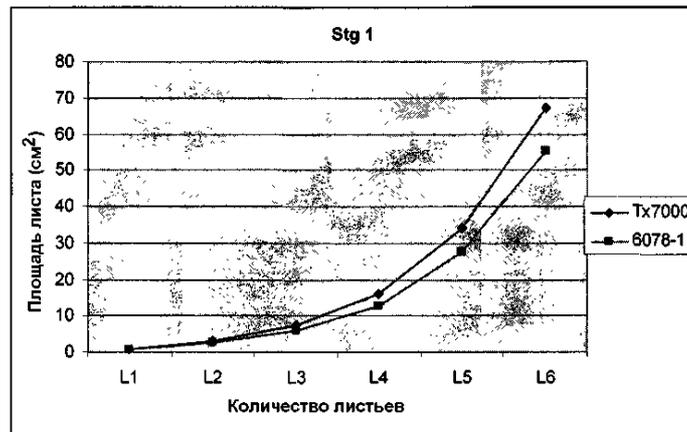
Фиг. 9С



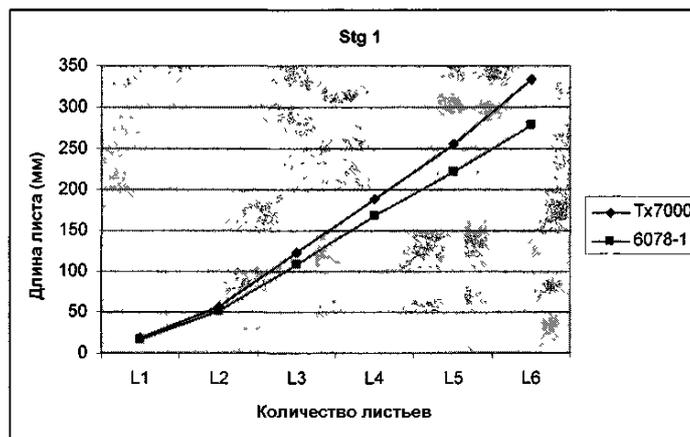
Фиг. 9D



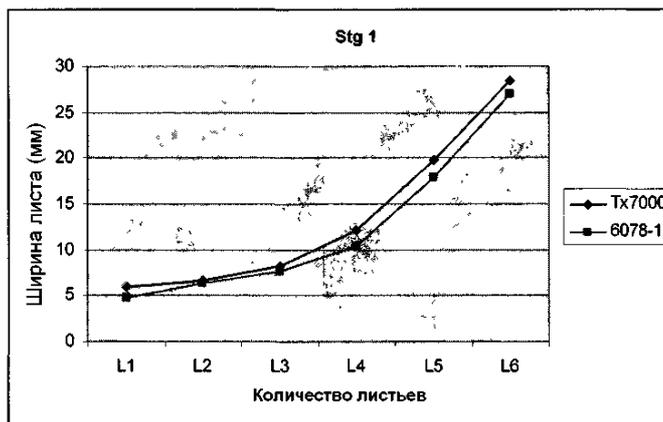
Фиг. 10



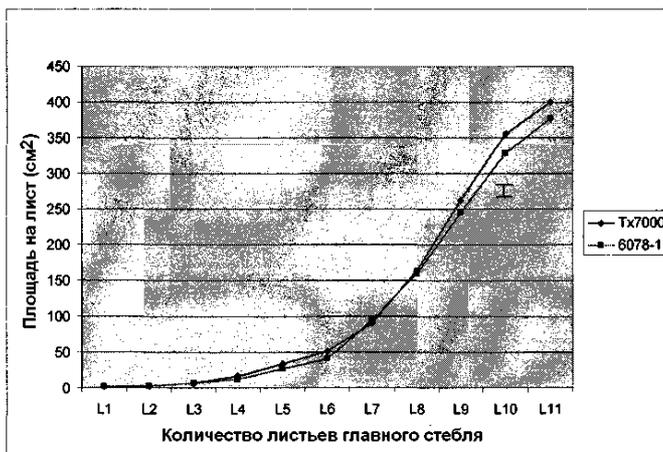
Фиг. 11



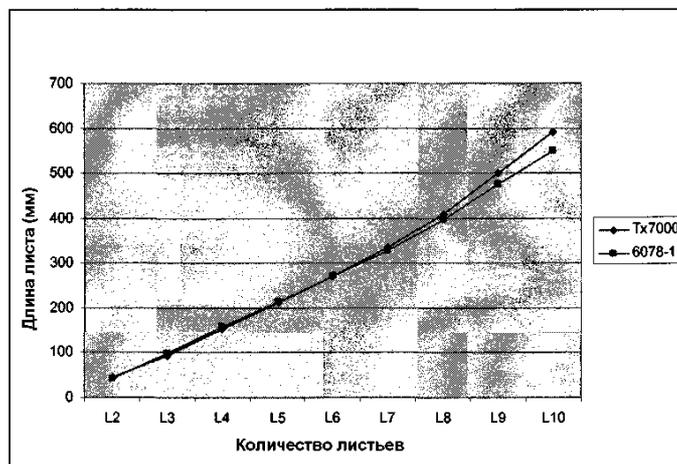
Фиг. 12



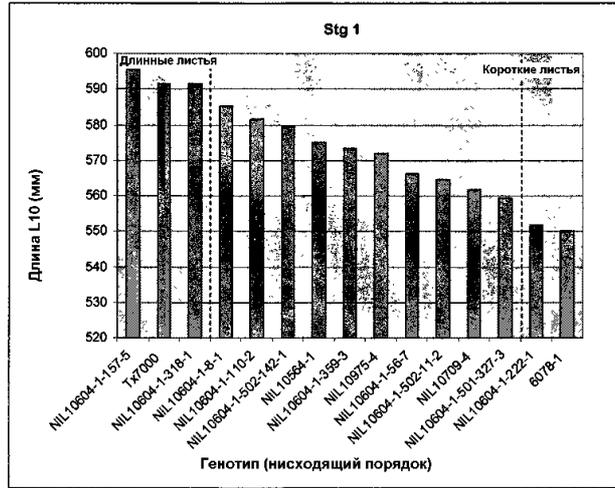
Фиг. 13



Фиг. 14



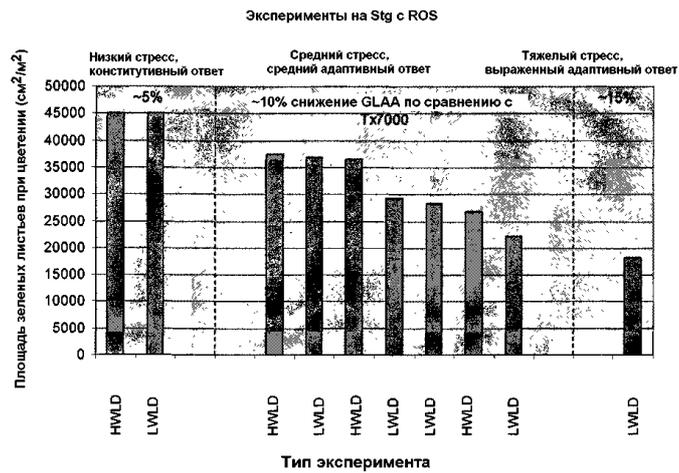
Фиг. 15



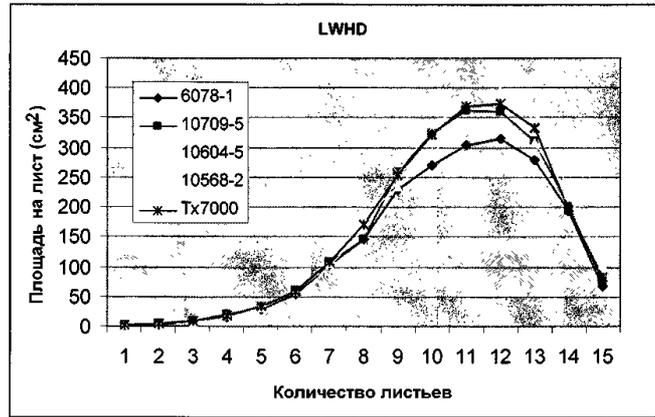
Фиг. 16



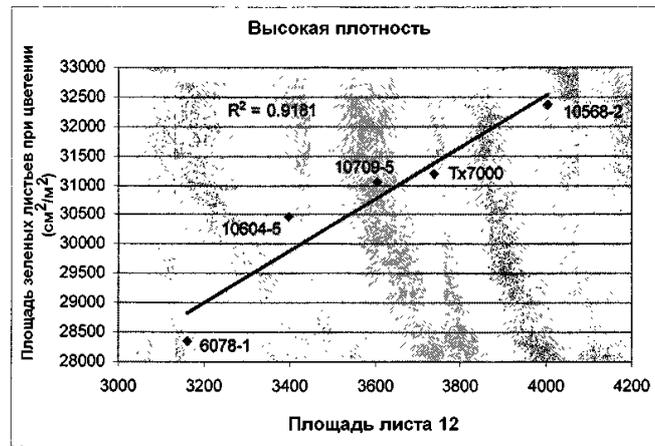
Фиг. 17



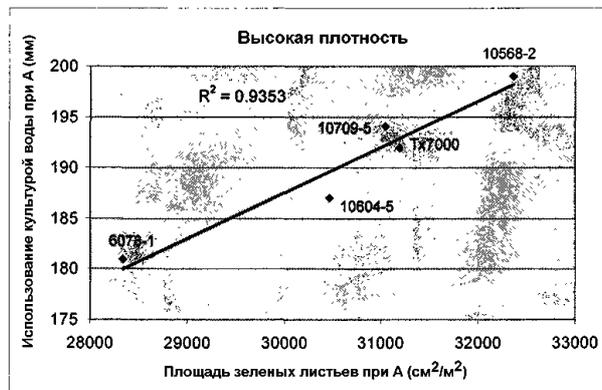
Фиг. 18



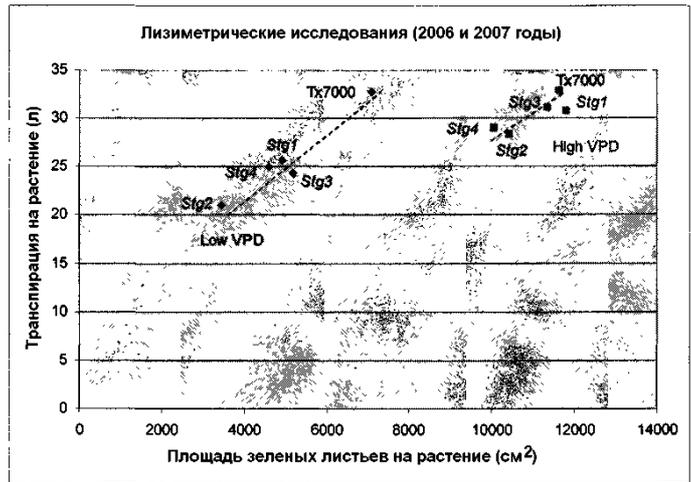
Фиг. 19



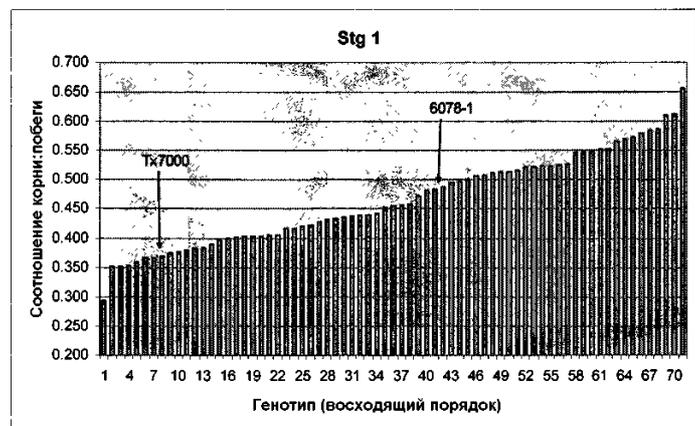
Фиг. 20



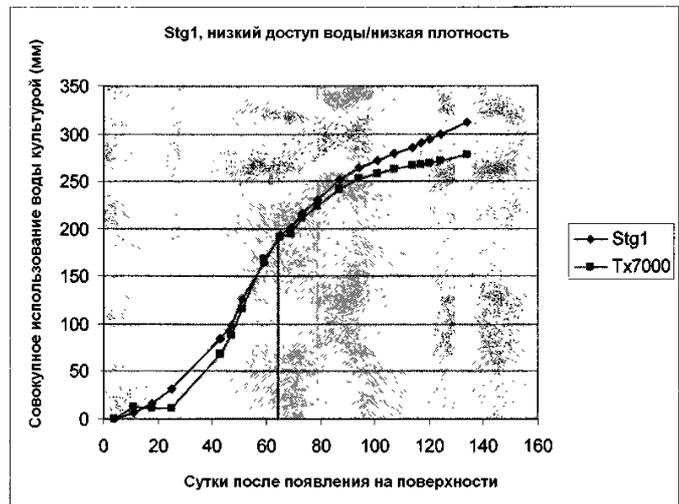
Фиг. 21



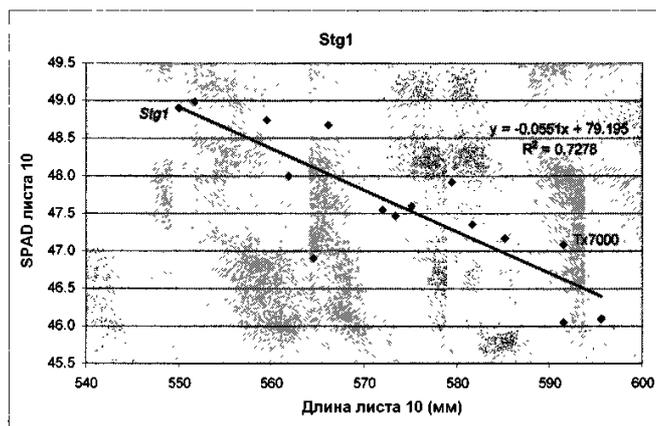
Фиг. 22



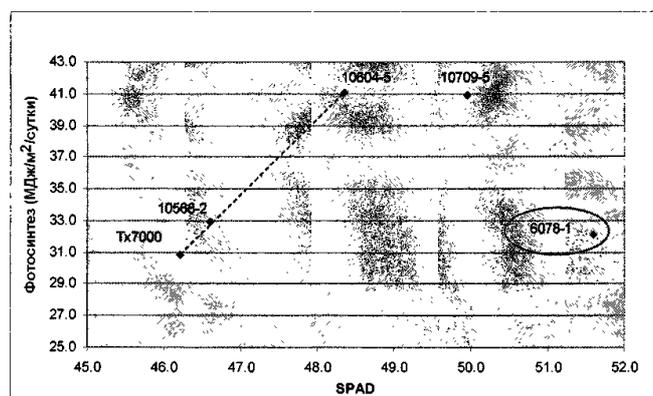
Фиг. 23



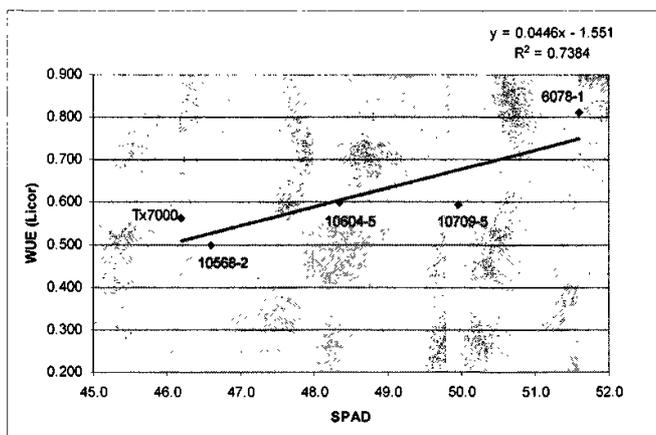
Фиг. 24



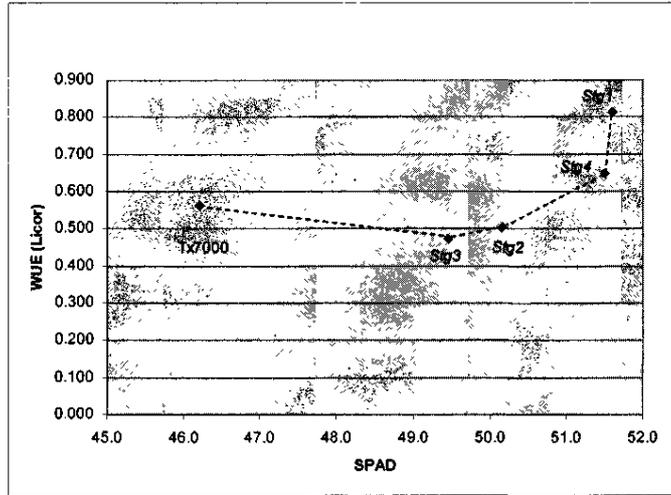
Фиг. 25



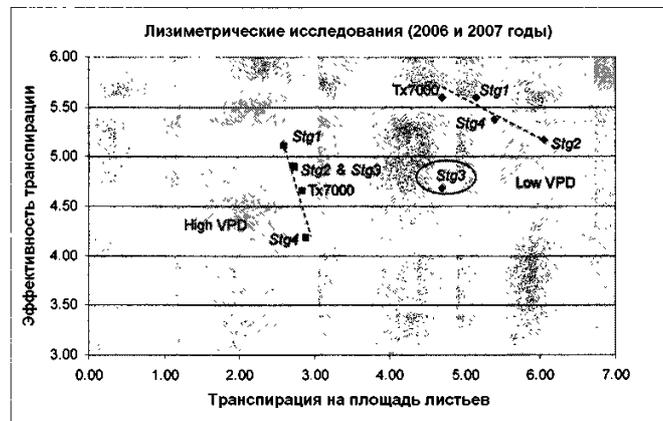
Фиг. 26



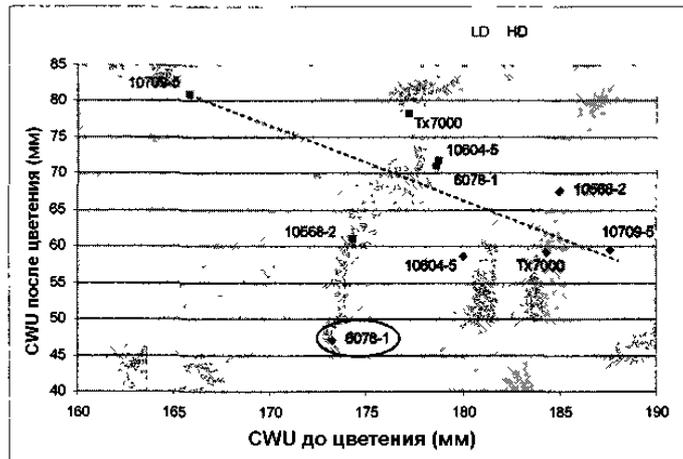
Фиг. 27



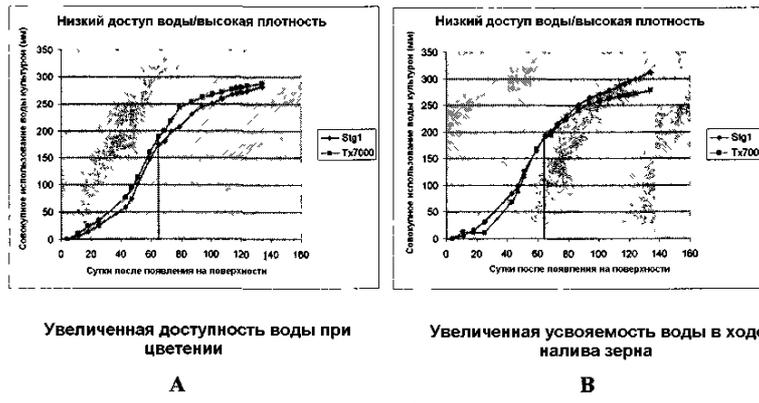
Фиг. 28



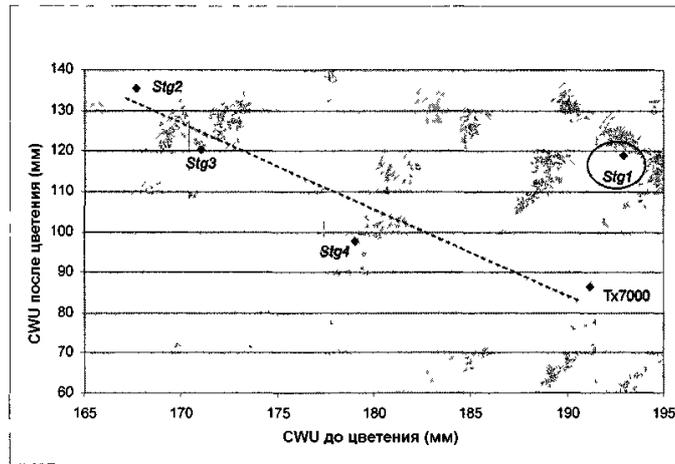
Фиг. 29



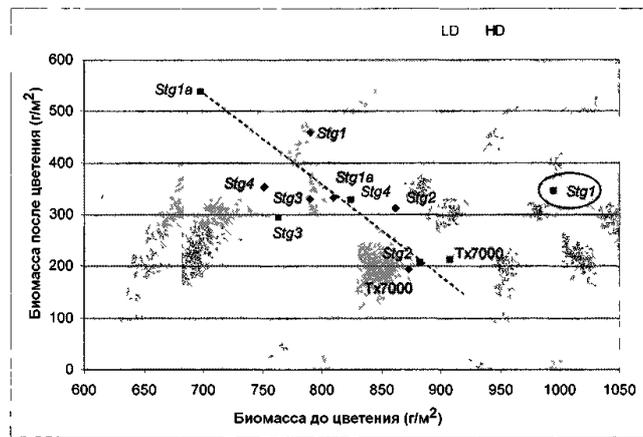
Фиг. 30



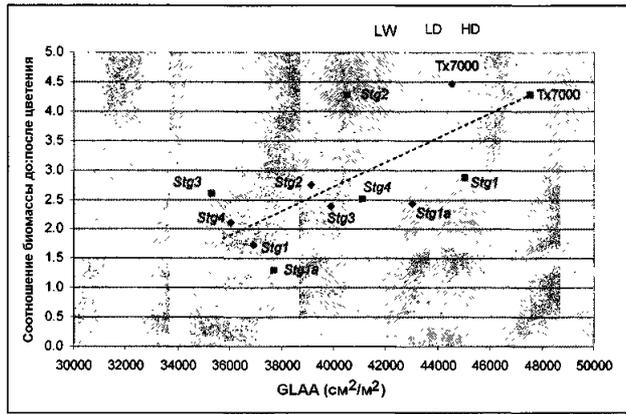
Фиг. 31



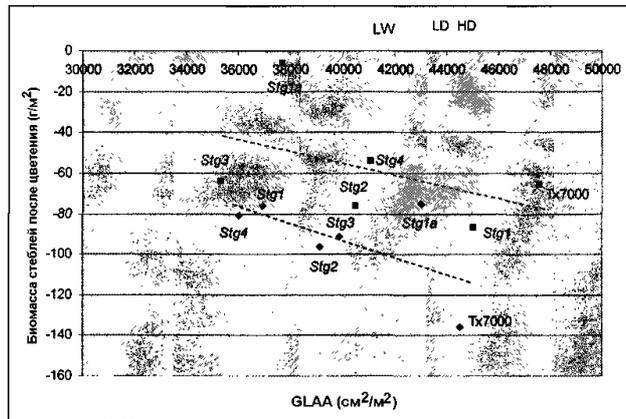
Фиг. 32



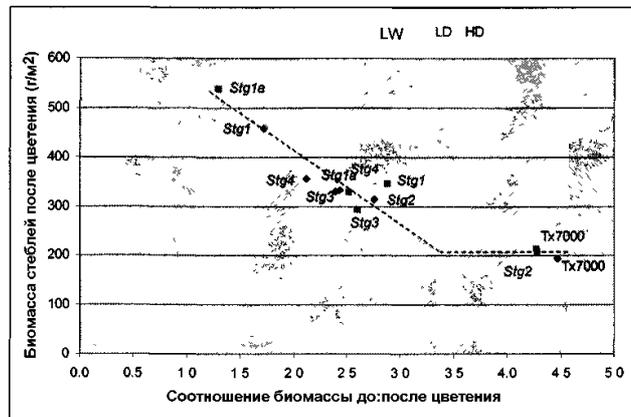
Фиг. 33



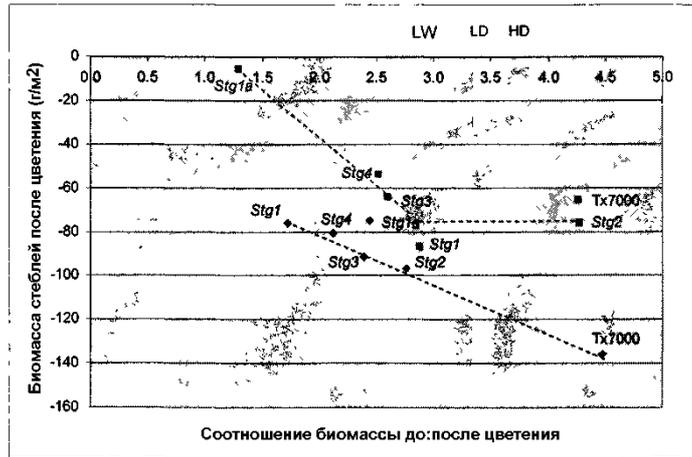
Фиг. 34



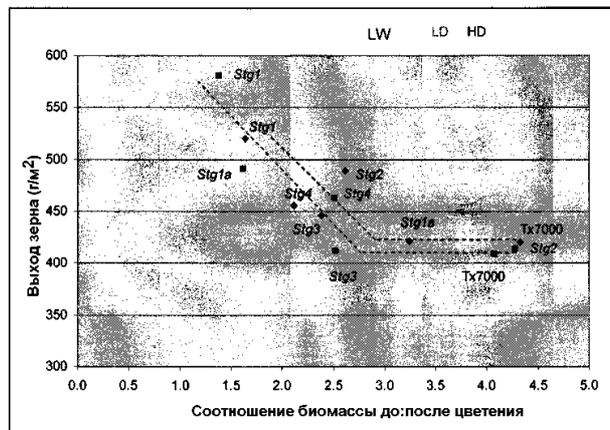
Фиг. 35



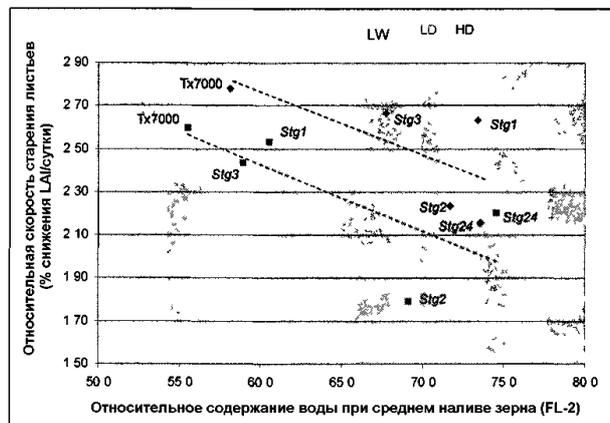
Фиг. 36



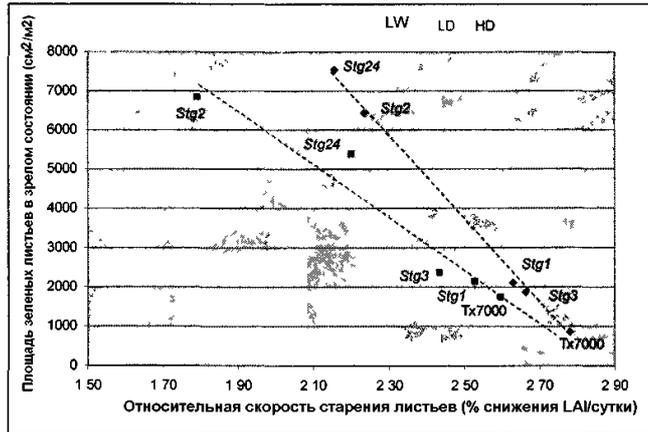
Фиг. 37



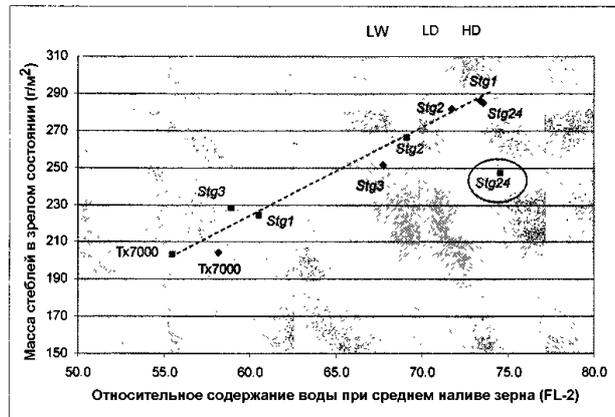
Фиг. 38



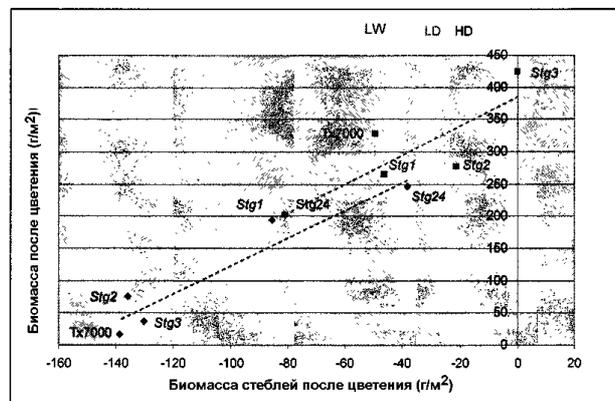
Фиг. 39



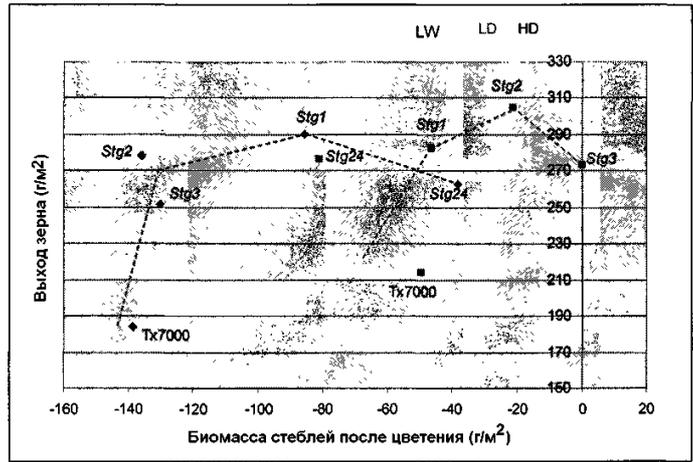
Фиг. 40



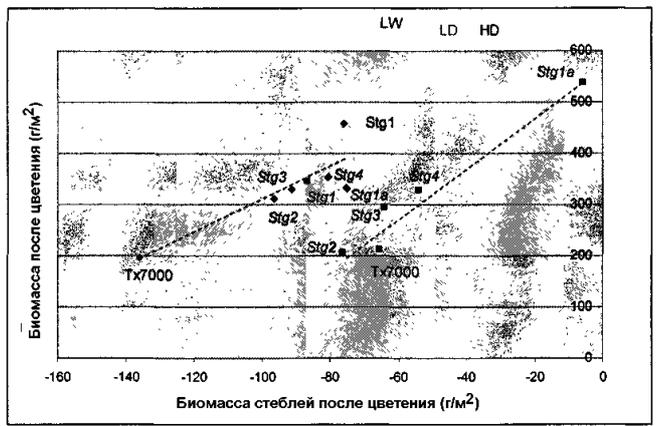
Фиг. 41



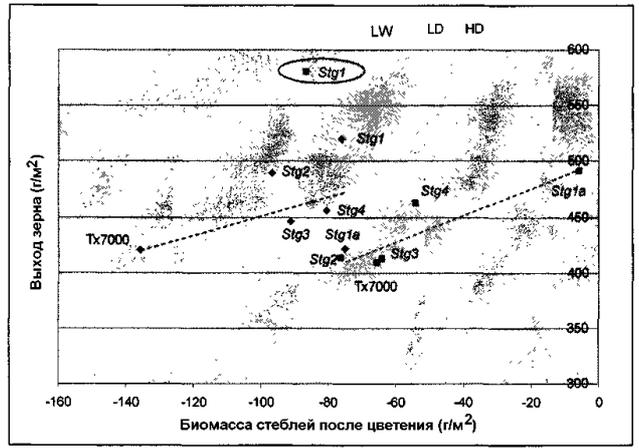
Фиг. 42



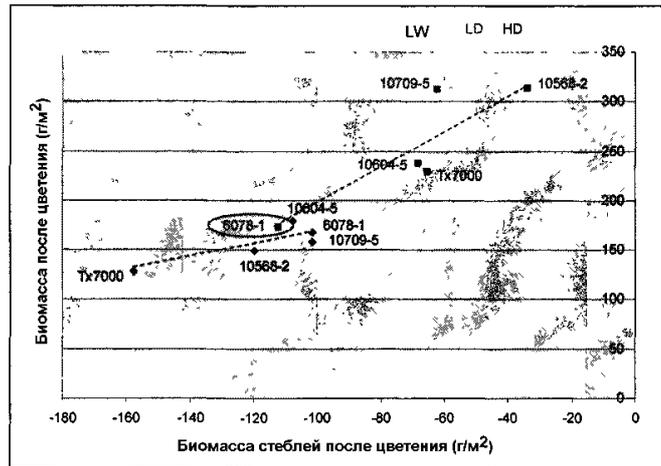
Фиг. 43



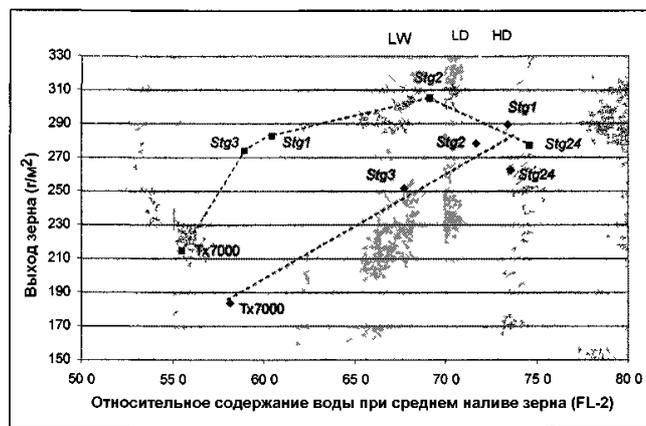
Фиг. 44



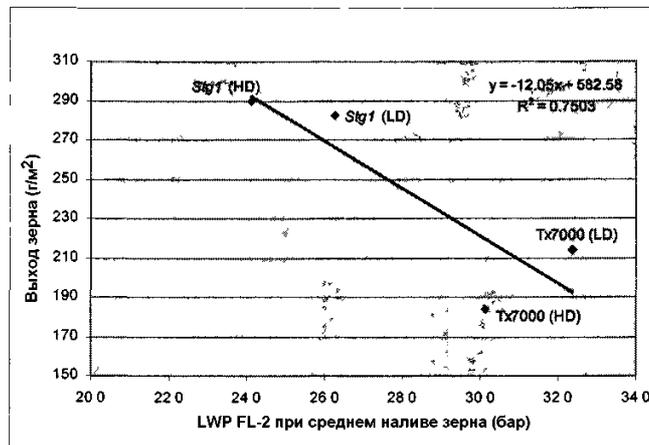
Фиг. 45



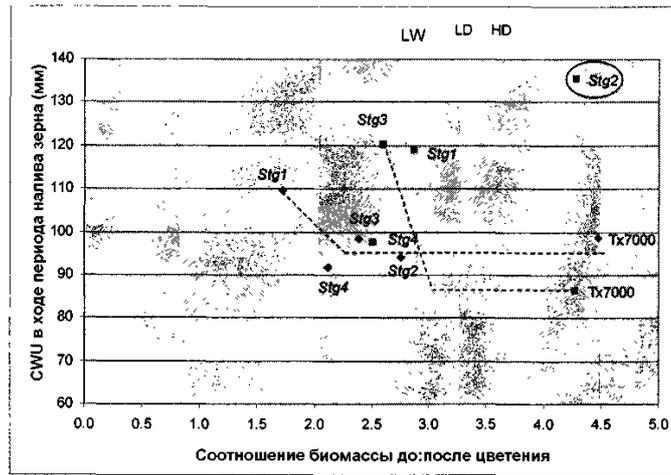
Фиг. 46



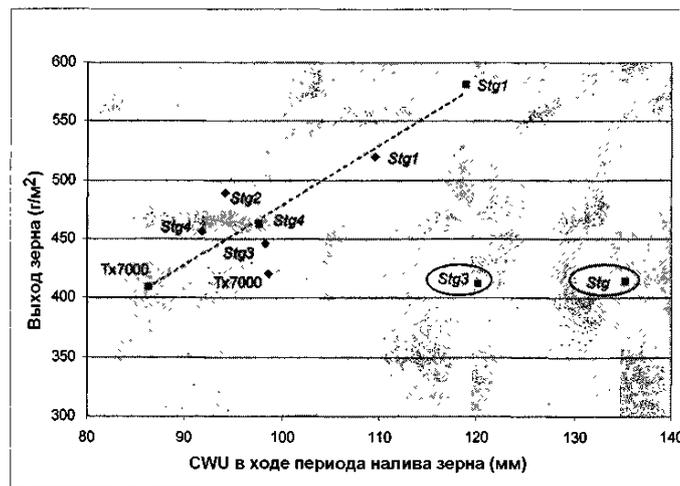
Фиг. 47



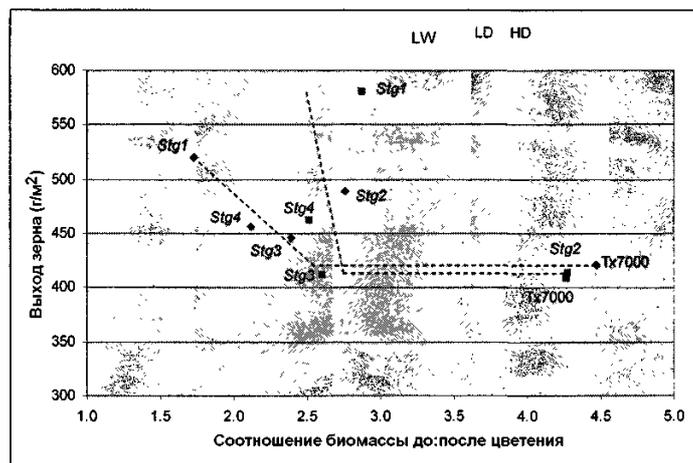
Фиг. 48



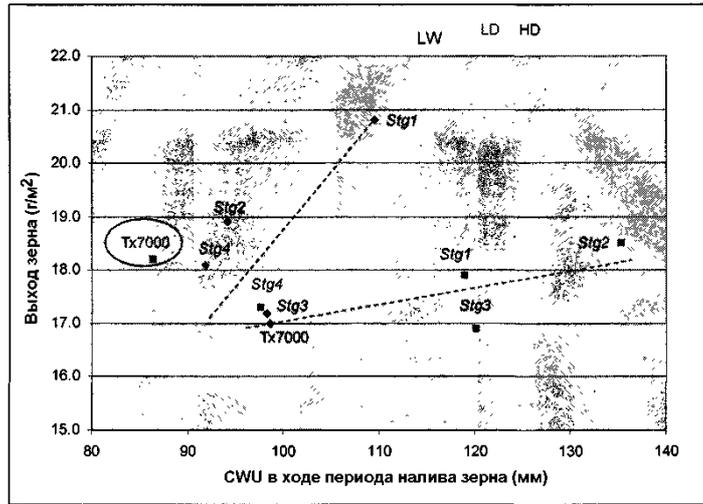
Фиг. 49



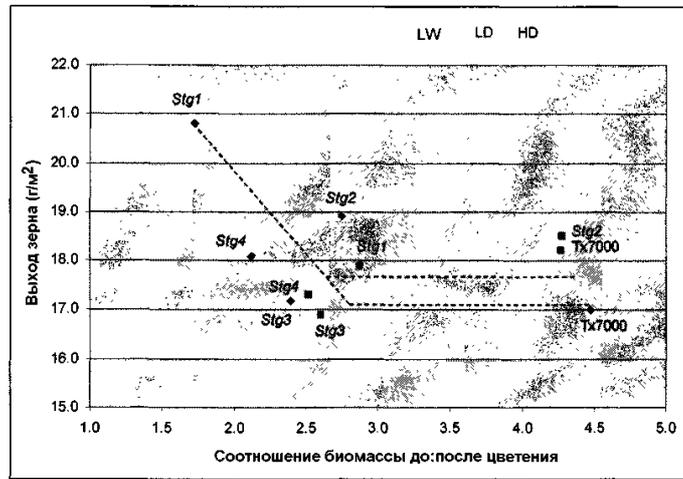
Фиг. 50



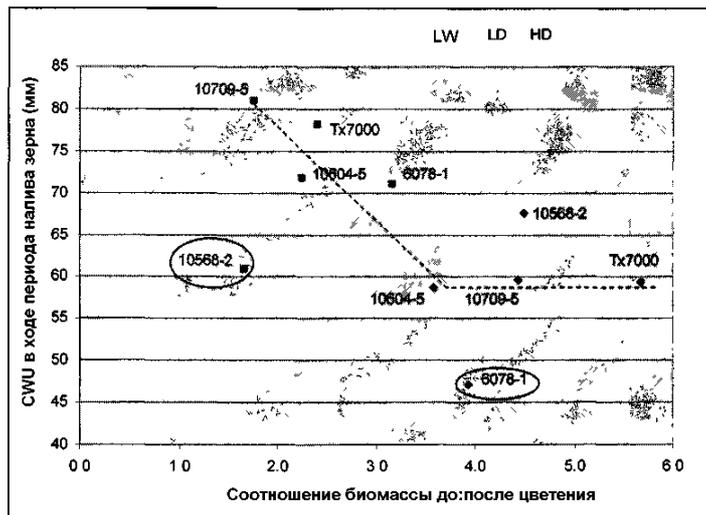
Фиг. 51



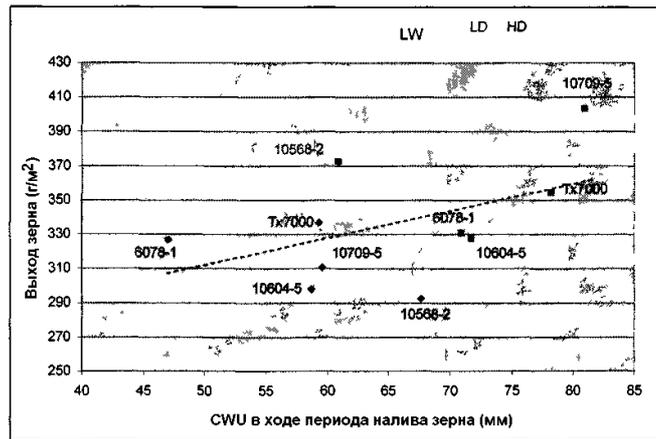
Фиг. 52



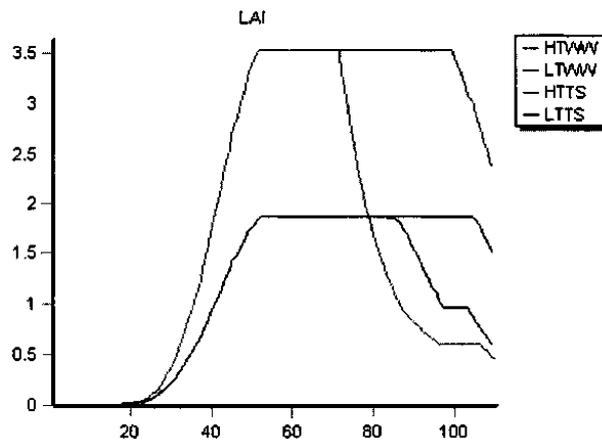
Фиг. 53



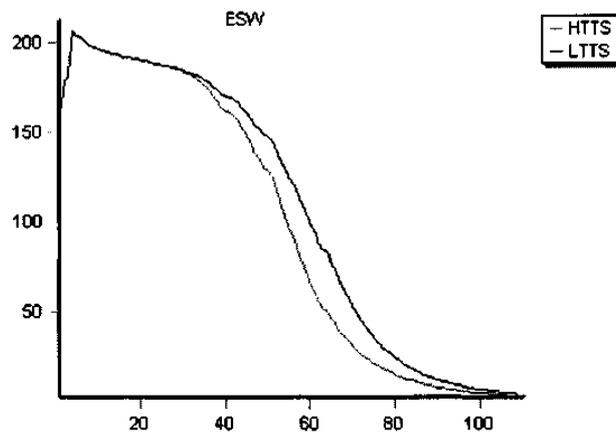
Фиг. 54



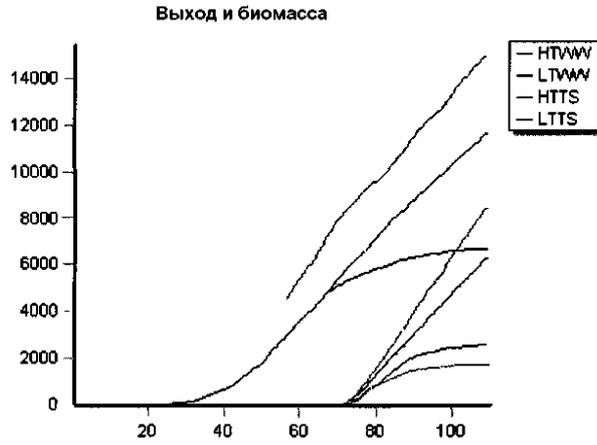
Фиг. 55



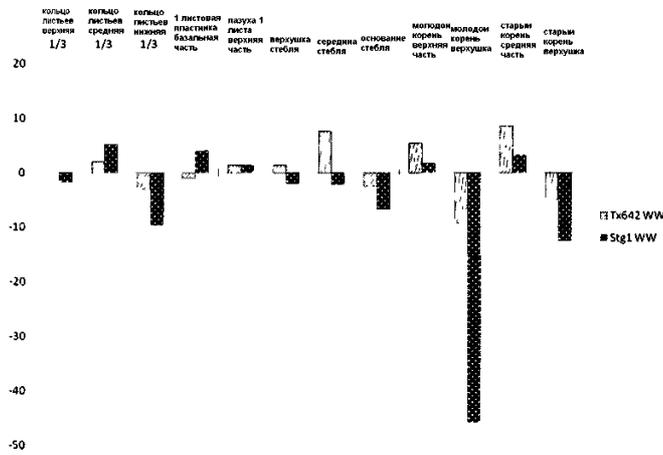
Фиг. 56А



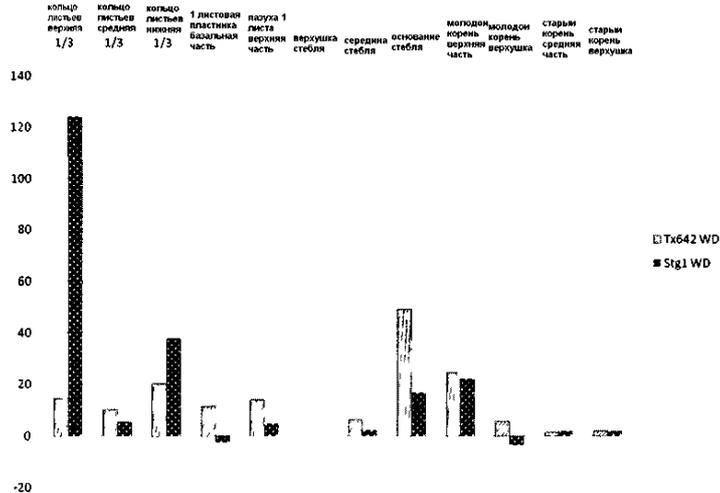
Фиг. 56В



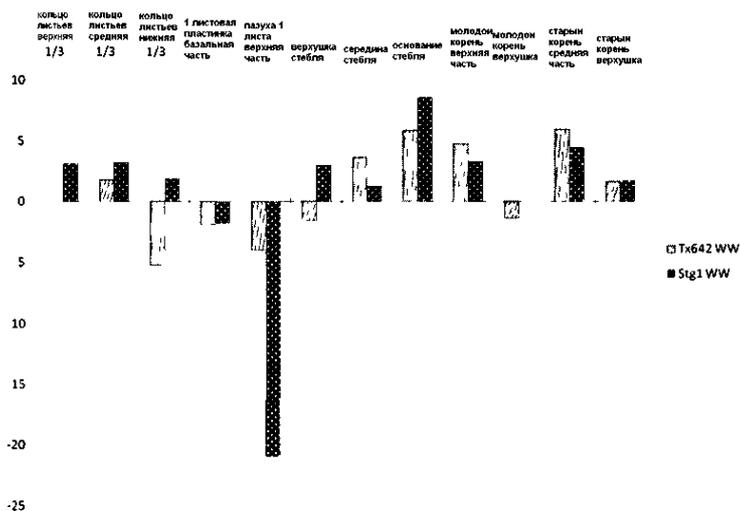
SbPIN4 (OsPIN5) Tx7000 против Tx642/Stg1 WW



SbPIN4 (OsPIN5) Tx7000 против Tx642/Stg1 WD

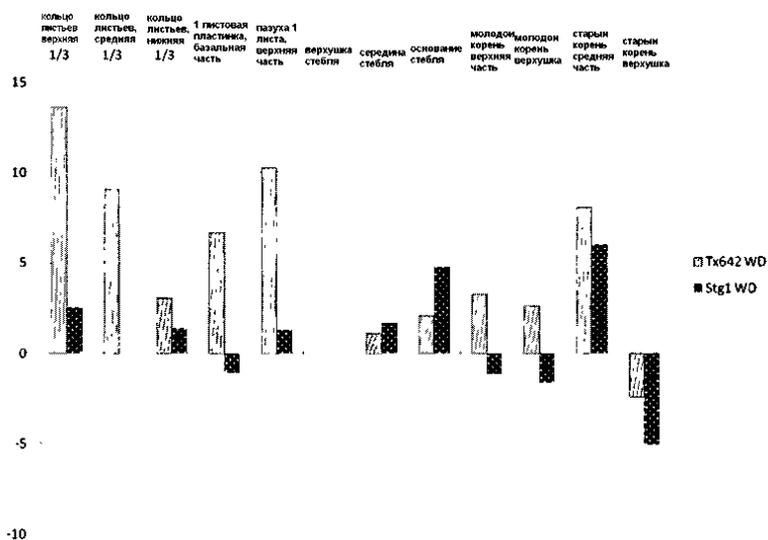


SbPIN2 (OsPIN3a) Tx7000 против Tx642/Stg2 WW



Фиг. 57C

SbPIN2 (OsPIN3a) Tx7000 против Tx642/Stg2 WD



Фиг. 57D



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2