

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201991536** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.06.04

(51) Int. Cl. **C07K 14/415** (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2017.12.20

**(54) БЕЛОК, ГЕН, ПРОМОТОР, SNP И ГАПЛОТИПЫ, СВЯЗАННЫЕ С
ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ЗЕРНА РАСТЕНИЯ**

(31) **201611195844.1; 201611190833.4**

(32) **2016.12.21**

(33) **CN**

(86) **PCT/CN2017/117519**

(87) **WO 2018/113702 2018.06.28**

(71) Заявитель:

**ИНСТИТУТ ОФ КРОП САЙЕНСЕС,
ДЗЕ ЧАЙНИЗ АКАДЕМИ ОФ
ЭГРИКАЛЬЧУРЭЛ САЙЕНСЕС (CN)**

(72) Изобретатель:

Лиу Хонгксия, Жанг Ксюйонг (CN)

(74) Представитель:

Беляева Е.Н. (BY)

(57) В настоящем изобретении описан белок, связанный с характеристиками зерна растения, а также кодирующий его ген и его применение. Настоящим изобретением предоставляется белок TaTPP-7A, который представляет собой белок, состоящий из аминокислотной последовательности, как показано SEQ ID NO: 1 в перечне последовательностей. Ген, кодирующий белок TaTPP-7A, также входит в объем защиты настоящего изобретения. Настоящее изобретение также относится к способу культивирования трансгенных растений, включающему этап введения гена TaTPP-7A в исходное растение с получением трансгенного растения; при этом указанное трансгенное растение удовлетворяет по меньшей мере одному из следующих пунктов (e1)-(e6): (e1) растение имеет большую массу тысячи зерен по сравнению с указанным исходным растением; (e2) растение имеет большую массу зерна по сравнению с указанным исходным растением; (e3) растение имеет больший размер зерна по сравнению с указанным исходным растением; (e4) растение имеет большую длину зерна по сравнению с указанным исходным растением; (e5) растение имеет большую ширину зерна по сравнению с указанным исходным растением; (e6) растение имеет большую толщину зерна по сравнению с указанным исходным растением. Таким образом, белок и кодирующий его ген, предоставляемые настоящим изобретением, могут быть использованы для улучшения характеристик растений и увеличения выхода зерен растений, следовательно, такое применение является весьма перспективным. Настоящим изобретением также предоставляются маркеры SNP и гаплотипы, связанные с вышеуказанными характеристиками зерна.

A1

201991536

201991536

A1

Белок, ген, промотор, SNP и гаплотипы, связанные с характеристиками зерна растения

Область техники

Настоящее изобретение относится к белку, связанному с характеристиками зерна растения, кодирующему трегалозо-6-фосфатфосфатазу (TPP), а также к кодирующему его гену из пшеницы (TaTPP) и их применению для модификации характеристик зерна, таких как увеличение длины зерна, ширины зерна, массы тысячи зерен, длины колоса, количества зерна и, в конечном итоге, выхода зерна. Настоящим изобретением также предоставляются маркеры однонуклеотидного полиморфизма (SNP), связанные с увеличенной длиной зерна, шириной зерна и массой тысячи зерен или массой одного зерна, как в области, кодирующей TPP, так и в промоторной области. Настоящее изобретение также предоставляет промоторные области и идентифицирует сильную промоторную область, связанную с увеличением длины зерна, ширины зерна и массы тысячи зерен, что можно использовать для увеличения экспрессии любой целевой кодирующей области в зерновых культурах, таких как пшеница. Настоящим изобретением также предоставляется способ идентификации гаплотипов, способствующих увеличению длины зерна, ширины зерна, массы тысячи зерен и, в конечном итоге, выхода таких зерновых, как пшеница.

Уровень техники

Пшеница является одной из важных продовольственных культур в Китае и во всем мире, и ее производство напрямую влияет на уровень жизни людей и национальную продовольственную безопасность. Долгосрочной задачей селекционеров пшеницы в Китае всегда было улучшение урожая пшеницы на единицу площади и обеспечение высокого и стабильного урожая. Задаче увеличения урожая пшеницы противостоят различные обстоятельства, такие как все сокращение посевных площадей, опустынивание земель, засоление, глобальное потепление и растущая численность населения. Соответственно, в селекции все большее значение приобретают способы улучшения или увеличения выхода пшеницы на единицу площади и удовлетворения растущего спроса на продовольствие. Таким образом, использование методов молекулярной биологии для клонирования функциональных генов, связанных с урожайностью пшеницы, и дальнейший углубленный анализ их функций могут обеспечить важные ресурсы референсных генов для разработки маркеров, которые могут использоваться для селекции пшеницы с помощью

молекулярных маркеров, и имеют большое значение как для науки, так для практического применения с целью ускорения процесса селекции пшеницы в Китае и повышения ее урожайности.

Масса зерна является одним из трех элементов урожайности, а основные факторы, которыми определяется масса зерна, включают форму зерна и степень налива зерна. В практике производства зерна, а также в селекции в качестве индикатора размера зерна часто используют массу тысячи зерен, при этом размер зерна определяется, в основном, такими параметрами и характеристиками зерна как длина, ширина и толщина зерна, а также положительным показателем урожайности.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение предоставляет белок, имеющий ферментативную активность трегалоза-6-фосфатфосфатазы, выбранный из следующей группы:

- a. белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;
- b. белок, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1;
- c. белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, в котором имеется замещение, удаление или вставка одного или более аминокислотных остатков, отличающийся тем, что наличие белка связано с увеличенной длиной зерна, шириной зерна или с увеличенной массой тысячи зерен, такой как белок в соответствии с SEQ ID NO: 1, в котором остаток Asp в положении 112 замещен остатком Glu, и/или в котором остаток Ala в положении 241 замещен остатком Val.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения настоящим изобретением предоставляется нуклеиновая кислота, такая как молекула ДНК или РНК, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую белок по п. 1. Нуклеиновая кислота может быть выбрана из следующей группы:

- a. нуклеиновая кислота, такая как молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2;
- b. нуклеиновая кислота, такая как молекула ДНК, содержащая нуклеотидную

последовательность SEQ ID NO: 3 от нуклеотидного положения 23 до нуклеотидного положения 2115;

с. нуклеиновая кислота, такая как молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3

d. нуклеиновая кислота, такая как молекула ДНК, которая гибридизирует в жестких условиях с молекулой ДНК по любому из пунктов а – с выше и кодирует белок по п. 1;

е. нуклеиновая кислота, такая как молекула ДНК, которая содержит нуклеотидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 3 от нуклеотидного положения 23 до нуклеотидного положения 2115 или нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 2.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения настоящим изобретением предоставляется рекомбинантная кассета экспрессии, содержащая следующие функционально связанные элементы ДНК:

а. промотор, экспрессируемый в растениях, такой как промотор, гетерологически экспрессируемый в растениях;

б. область ДНК, кодирующая белок по п. 1 или область ДНК по п. 2;

с. область ДНК, которая представляет собой участок терминации транскрипции и полиаденилирования, например, участок терминации транскрипции и полиаденилирования, который является функциональным в растениях.

Настоящим изобретением также предоставляется рекомбинантный вектор экспрессии, трансгенная клеточная линия, ткань трансгенного растения, трансгенное растение или рекомбинантная линия, или зерно, или семя, которые содержат нуклеиновую кислоту в соответствии с описанием в настоящем документе или рекомбинантную кассету экспрессии в соответствии с описанием в настоящем документе. Растением может являться зерновая культура, например, растение пшеницы.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения настоящим изобретением предоставляется применение белка в соответствии с описанием в настоящем документе для следующих целей:

a. регулирование размера зерен растения, например, увеличения или уменьшения длины зерен или ширины зерен, в частности, зерен пшеницы;

b. увеличение размера зерен растения, в частности, зерен пшеницы;

c. регулирование массы тысячи зерен растения, например, увеличения или уменьшения длины зерен или ширины зерен, в частности, зерен пшеницы;

d. увеличение массы тысяч зерен, в частности, зерен пшеницы;

e. регулирование массы зерен растения, например, увеличения или уменьшения длины зерен или ширины зерен, в частности, зерен пшеницы;

f. увеличение массы зерен растения, в частности, зерен пшеницы;

g. регулирование длины зерен растения, например, увеличения или уменьшения длины зерен или ширины зерен, в частности, зерен пшеницы;

h. увеличение длины зерен растения, в частности, зерен пшеницы;

i. регулирование ширины зерен растения, например, увеличения или уменьшения длины зерен или ширины зерен, в частности, зерен пшеницы;

j. увеличение ширины зерен растения, в частности, зерен пшеницы;

k. регулирование толщины зерен растения, например, увеличения или уменьшения длины зерен или ширины зерен, в частности, зерен пшеницы;

l. увеличение толщины зерен растения, в частности, зерен пшеницы;

m. увеличение длины побегов растений, в частности, зерновых культур, таких как пшеница;

n. увеличение длины колосьев растений, в частности, зерновых культур, таких как пшеница;

o. увеличение выхода зерен растений, таких как зерновые культуры, таких как пшеница;

В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения предоставляется способ получения растений, таких как зерновые культуры, включая растения пшеницы, включающий следующие этапы:

a) увеличение уровня и/или активности белка в соответствии с описанием в настоящем документе; или

b) увеличение экспрессии нуклеиновой кислоты в соответствии с описанием в настоящем

документе в клетке растения или в растении

с) введение рекомбинантной кассеты экспрессии в соответствии с описанием в настоящем документе в клетку растения или в растение, с получением трансгенного растения,

причем растение имеет

1) увеличенную массу тысячи зерен по сравнению с указанным исходным растением или контрольным растением;

2) увеличенную массу зерен по сравнению с указанным исходным растением или контрольным растением;

3) увеличенный размер зерен по сравнению с указанным исходным растением или контрольным растением;

4) увеличенную длину зерен по сравнению с указанным исходным растением или контрольным растением;

5) увеличенную ширину зерен по сравнению с указанным исходным растением или контрольным растением;

6) увеличенную толщину зерен по сравнению с указанным исходным растением или контрольным растением;

7) увеличенную длину побегов по сравнению с указанным исходным растением или контрольным растением;

8) увеличенную длину колосьев по сравнению с указанным исходным растением или контрольным растением;

9) увеличенное количество зерен по сравнению с указанным исходным растением или контрольным растением; или

10) увеличенный выход зерен по сравнению с указанным исходным растением или контрольным растением.

Настоящим изобретением также предоставляется способ:

(1) увеличения массы тысячи зерен;

(2) увеличения массы зерен;

(3) увеличения размера зерен;

(4) увеличения длины зерен;

- (5) увеличения ширины зерен;
- (6) увеличения толщины зерен;
- 57) увеличения длины побегов растений;
- (8) увеличения длины колосьев растений;
- (9) увеличения количества зерен у растений; или
- (10) увеличения выхода зерен у растений;

включающий этап увеличения содержания белка или активности белка в соответствии с описанием в настоящем документе в растении, таком как зерновая культура, включая растения пшеницы.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения предоставляется изолированная промоторная область, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO: 15 или нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 90%, 95% или 99% идентичности последовательности с этими последовательностями.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения настоящим изобретением предоставляется рекомбинантный ген, содержащий следующие функционально связанные элементы ДНК:

- a. промоторную область в соответствии с описанием в настоящем документе;
- b. область ДНК, кодирующую целевую молекулу РНК или целевой белок;
- c. участок терминации транскрипции и полиаденилирования, который является функциональным в клетках растения.

Кроме того, предоставляется растение, такое как зерновая культура, включая растение пшеницы, содержащее рекомбинантный ген по изобретению.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения настоящим изобретением предоставляется способ идентификации или содействия в идентификации характеристик зерна пшеницы, таких как масса тысячи зерен пшеницы или длина зерна пшеницы, включающий следующий этап:

определение того, является ли генотип на основе сайта 488 SNP в геномной ДНК тестируемой пшеницы генотипом AA, генотипом AC или генотипом CC; при этом пшеница генотипа AA имеет лучшие характеристики зерна, чем пшеница генотипа CC;

улучшенные характеристики зерна проявляются как увеличенная масса тысячи зерен и/или большая длина зерна;

сайт 488 SNP относится к нуклеотиду в положении 22 с 5'-конца SEQ ID NO: 24.

Настоящим изобретением также предоставляется применение материала для определения генотипа на основе сайта 488 SNP в геномной ДНК пшеницы, для идентификации или содействия в идентификации характеристик зерна пшеницы; при этом характеристиками зерна являются масса тысячи зерен и/или длина зерен, а также набор праймеров I, который состоит из 488F1, 488F2 и 488C;

определение указанного праймера 488F1 приведено в нижеследующих пунктах (b1) или (b2):

(b1) молекула одноцепочечной ДНК в соответствии с SEQ ID NO:21;

(b2) молекула ДНК, полученная путем замещения и/или удаления, и/или добавления одного или более нуклеотидов в SEQ ID NO:21 и имеющая одинаковую функцию с SEQ ID NO:21;

определение указанного праймера 488F2 приведено в нижеследующих пунктах (b3) или (b4):

(b3) молекула одноцепочечной ДНК в соответствии с SEQ ID NO:22;

(b4) молекула ДНК, полученная путем замещения и/или удаления, и/или добавления одного или более нуклеотидов в SEQ ID NO:22 и имеющая одинаковую функцию с SEQ ID NO:22;

определение указанного праймера 488C приведено в нижеследующих пунктах (b5) или (b6):

(b5) молекула одноцепочечной ДНК в соответствии с SEQ ID NO:23;

(b6) молекула ДНК, полученная путем замещения и/или удаления, и/или добавления одного или более нуклеотидов в SEQ ID NO:23 и имеющая одинаковую функцию с SEQ ID NO:23.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения настоящим изобретением предоставляется способ идентификации или содействия в идентификации характеристик зерна пшеницы, таких как масса тысячи зерен или длина зерна, включающий следующий этап:

определение того, является ли генотип на основе сайта 2144 SNP в геномной ДНК тестируемой пшеницы генотипом AA, генотипом AT или генотипом TT; при этом пшеница генотипа AA имеет лучшие характеристики зерна, чем пшеница генотипа TT;

улучшенные характеристики зерна проявляются как увеличенная масса тысячи зерен и/или большая длина зерна;

сайт 2144 SNP относится к нуклеотиду в положении 24 с 5'-конца SEQ ID NO: 30.

Настоящим изобретением также предоставляется набор праймеров I, который состоит из 2144F1, 2144F2 и 2144C;

определение указанного праймера 2144F1 приведено в нижеследующих пунктах (b1) или (b2):

(b1) молекула одноцепочечной ДНК в соответствии с SEQ ID NO:27;

(b2) молекула ДНК, полученная путем замещения и/или удаления, и/или добавления одного или более нуклеотидов в SEQ ID NO:27 и имеющая одинаковую функцию с SEQ ID NO:21;

определение указанного праймера 2144F2 приведено в нижеследующих пунктах (b3) или (b4):

(b3) молекула одноцепочечной ДНК в соответствии с SEQ ID NO:28;

(b4) молекула ДНК, полученная путем замещения и/или удаления, и/или добавления одного или более нуклеотидов в SEQ ID NO:28 и имеющая одинаковую функцию с SEQ ID NO:22;

определение указанного праймера 2144C приведено в нижеследующих пунктах (b5) или (b6):

(b5) молекула одноцепочечной ДНК в соответствии с SEQ ID NO:29;

(b6) молекула ДНК, полученная путем замещения и/или удаления, и/или добавления одного или более нуклеотидов в SEQ ID NO:29 и имеющая одинаковую функцию с SEQ ID NO:29, и их применение для идентификации или содействия в идентификации характеристик зерна пшеницы; при этом характеристиками зерна являются масса тысячи зерен и/или длина зерна; или

для идентификации или содействия в идентификации массы тысячи зерен пшеницы; или

для идентификации или содействия в идентификации длины зерен пшеницы;

Настоящим изобретением также предоставляется способ получения растения пшеницы с

(1) увеличенной массой тысячи зерен;

(2) увеличенной массой зерен;

(3) увеличенным размером зерен;

(4) увеличенной длиной зерен;

(5) увеличенной шириной зерен;

(6) увеличенной толщиной зерен;

(7) увеличенной длиной побегов растений;

(8) увеличенной длиной колосьев растений;

(9) увеличенным количеством зерен у растений; или

(10) увеличенным выходом зерен у растений,
включающий этап отбора растения пшеницы с гаплотипом Нар I.

Описание чертежей

Фигура 1: Характеристики зерна из линий пшеницы, у которых экспрессия TPP повышена за счет сверхэкспрессии химерного гена TaTPP (TaTPP-OE), или линий пшеницы, у которых экспрессия TPP снижена за счет того, что химерный ген экспрессирует сайленсинг-РНК (TaTPP-RNAi). Панель А. Влияние сверхэкспрессии TaTPP в пшенице на зерно. Линии TaTPP5-3; TaTPP-10-4 и TaTPP-13-7 являются линиями со сверхэкспрессией TPP. Отрицательный контроль: пшеница, не подвергавшаяся трансформации, сорт Fielder. Панель В. Влияние сверхэкспрессии или снижения экспрессии TPP в пшенице на длину зерна. TaTPP-OE: зерно из трансгенной линии пшеницы со сверхэкспрессией TaTPP. TaTPP-RNAi: зерно из трансгенной линии пшеницы, где экспрессия TPP снижена путем сайленсинга РНК.

На Фигуре 2 показана средняя длина ядра и средняя масса тысячи зерен в каждой трансгенной линии пшеницы. Панель А: средняя длина зерна (GL) (см) трансгенных линий со сверхэкспрессией TPP: TaTPP5-3, TaTPP-10-4 и TaTPP-13-7. NTCK: без трансформации, сорт Fielder. Панель В: Масса тысячи зерен (г) из трансгенных линий и контрольной линии, как показано на панели А. Панель С: графическое представление массы тысяч зерен (TKW) (в граммах, левая ось Y), длины зерен (GL) и массы зерен (GW)) (в см, правая ось Y) для контрольной линии пшеницы дикого типа (WT – левая полоса), линии пшеницы со сверхэкспрессией TPP (TPO – средняя полоса), линии пшеницы с пониженной экспрессией TPP (TPR – правая полоса). По TKW и GL существует статистически значимая разница для средних значений TKW и GL между линиями WT и TPO, TPO и TPR и линиями WT и TPR. По GW существует статистически значимая разница между линиями TPO и WT, а также TPO и TPR.

На Фигуре 3 показано влияние увеличения (TPO) или уменьшения (TPR) экспрессии TPP в пшенице по сравнению с линией пшеницы дикого типа (Fielder, WT) в отношении длины, ширины нижней и верхней цветковой чешуи. Панель А. визуальное представление нижней и верхней цветковой чешуи разных трансгенных линий. Панель В: графическое представление длины нижней цветковой чешуи (мм), ширины нижней цветковой чешуи (мм), длины верхней цветковой чешуи (мм) и ширины верхней цветковой чешуи для контрольной линии пшеницы дикого типа

(WT – левая полоса), линии пшеницы со сверхэкспрессией TPP (TPO – средняя полоса), линии пшеницы с пониженной экспрессией TPP (TPR – правая полоса). По длине нижней и верхней цветковой чешуи существует статистически значимая разница между линиями WT и TPR, а также TPO и TPR. По ширине нижней и верхней цветковой чешуи существует статистически значимая разница между линией TPO и линиями WT и TPR.

На Фигуре 4 показано влияние увеличения (линии TPO) или уменьшения (линии TPR) экспрессии TPP в пшенице в отношении длины колоска и побегов. Ряд 1: Fielder; Ряд 2: TPR 47-1-1; Ряд 3: TPR 7-2-3; Ряд 4: TPR-68-12-4; Ряд 5: TPO-6-5-3; Ряд 6: TPO-5-4-2; Ряд 7: TPO-14-3-9.

На Фигуре 5 показано влияние сверхэкспрессии TaTPP в трансгенных линиях *Arabidopsis* (TaTPP-OE) на динамику роста и развития по сравнению с нетрансформированными линиями *Arabidopsis* дикого типа (Панель А), а также на размер и морфологию стручка (Панель В), размер и морфологию зерна (Панель С).

На Фигуре 6 графически представлена промоторная область TaTPP и кодирующая (геномная) область с указанием различных SNP. Из-за использования различных контрольных точек в нуклеотидных последовательностях SNP в положении -2090 соответствует SNP409/410, SNP в положении -2006 соответствует SNP493, SNP в положении -1291 соответствует SNP1208, SNP в положении -783 соответствует SNP1708, SNP в положении -511 соответствует положению SNP1980, SNP в положении +466 соответствует SNP488, SNP в положении 1278 соответствует положению 1300, а SNP в положении 2122 соответствует SNP2144. Рамки соответствуют экзонам TaTPP-7A (для нуклеотида и положений см. SEQ ID NO: 3). Для нуклеотидной последовательности промоторной области(-ей) см. SEQ ID NO: 14 и 15. ATG: старт-кодон; TSS: сайт инициации транскрипции; TAG: терминирующий трансляцию кодон; polyA: сайт полиаденилирования. Нар I, Нар II и Нар III представляют часто встречающиеся в пшенице гаплотипы и указывают на нуклеотиды SNP, присутствующие в разных положениях SNP в разных гаплотипах, которые встречаются вместе.

Фигура 7. Экспрессия люциферазы под контролем промотора TaTPP Нар I (Luc-Нар I P; SEQ ID NO: 14) и Нар II (Luc-Нар II P; SEQ ID NO: 15) в *Nicotiana tabacum* по сравнению с трансгенным табаком, трансформированным пустым вектором (LUC -EV). Панель А: Флуоресцентные изображения и средние значения. Панель В: флуоресценция в листьях на разных стадиях. Как можно видеть, промотор Нар I значительно сильнее экспрессируется, чем промотор

Нар II (приблизительно в 3 раза сильнее).

Фигура 8. Панель А. Относительная встречаемость различных гаплотипов Нар I, Нар II и Нар III в ранее разработанных китайских сортах пшеницы. В то время как в 1930-х годах все проанализированные китайские сорта имели гаплотип Нар II (средний столбец), с 1940-х годов относительная встречаемость гаплотипа Нар I стабильно увеличивалась (левый столбец), тогда как встречаемость Нар II (средний столбец) и Нар III постепенно уменьшалась. Это коррелировало с увеличением массы тысячи ядер (указана пунктирной линией) с течением времени. Панель В. Географическое распределение различных гаплотипов. В Китае большинство проанализированных линий пшеницы проявляют гаплотип Нар I. В Российской Федерации также преобладает гаплотип Нар I, однако наличие Нар III также является значительным, кроме того, представлен даже Нар II. В Северной и Центральной Америке, Европе и Австралии в анализируемых линиях преобладает Нар III, при этом распространение Нар I относительно незначительно.

Различные определения

Гены TaTPP у родственных видов однодольных растений или в других сортах или разновидностях также могут быть идентифицированы с использованием гибридизации с использованием зонда, имеющим нуклеотидную последовательность гена TaTPP или ее часть. Строгие условия гибридизации, такие как описаны ниже, могут использоваться для идентификации нуклеотидных последовательностей, которые имеют значительную степень идентичности с определенной нуклеотидной последовательностью. Например, гены TaTPPC из других видов однодольных растений, отличные от конкретных последовательностей, описанных в данном документе, именуются практически идентичными или имеют значительную степень идентичности, если они могут быть обнаружены путем гибридизации в жестких условиях, предпочтительно в условиях высокой степени жесткости. Жесткость условий зависит от определенной последовательности и в различных случаях будет различной. Обычно жесткие условия означает следующее: температура составляет на 5°C ниже точки плавления (T_m) для определенной последовательности при определенной ионной силе и pH. T_m – это температура (при определенной ионной силе и pH), при которой 50% целевой последовательности гибридизирует с подобранным зондом. Обычно жесткие условия будут выбраны таким образом, что концентрация солей составляет приблизительно 0,02 моль при pH 7 и температуре, по

меньшей мере, 60°C. Снижение концентрации солей и/или повышение температуры увеличивает жесткость условий. Жесткие условия для РНК-ДНК гибридизации (нозерн-блоттинг с использованием, например, зонда длиной 100 нуклеотидов) представляют собой, например, такие условия, которые включают, по меньшей мере, одну промывку в 0,2 x SSC при 63°C в течение 20 минут, или эквивалентные условия.

«Условия высокой жесткости» могут быть обеспечены путем, например, гибридизации при 65 °C в водном растворе, содержащем 6x SSC (стандартный солевой раствор) (в состав 20 X SSC входят 3,0 M NaCl, 0,3 M N-цитрата, значение pH 7,0), 5x раствор Денхардта (в состав 100X раствора Денхардта входят 2% Ficoll, 2% поливинилпирролидона, 2% альбумина бычьей сыворотки), 0,5% додецилсульфата натрия (SDS) и 20 мкг/мл денатурированного ДНК-носителя (одноцепочечной ДНК из молок рыбы, со средней длиной 120 - 3000 нуклеотидов) в качестве неспецифического конкурирующего средства. После гибридизации может осуществляться промывка при условиях высокой жесткости в ходе нескольких этапов, конечную промывку (приблизительно 30 мин.) осуществляют при температуре гибридизации в 0,2-0,1× SSC, 0,1% SDS.

Термин «условия умеренной жесткости» относится к условиям аналогичным условиям гибридизации в вышеописанном растворе, при температуре приблизительно 60-62 °C. Промывка при условиях умеренной жесткости может осуществляться при температуре гибридизации в 1x SSC, 0,1% SDS.

Термин «условия низкой жесткости» относится к условиям аналогичным условиям гибридизации в вышеописанном растворе, при температуре приблизительно 50-52 °C. Промывка при условиях низкой жесткости может осуществляться при температуре гибридизации в 2x SSC, 0,1% SDS. См. также Sambrook et al. (1989) и Sambrook and Russell (2001).

Однодольные растения, также известные как односемядольные или односеменодольные, известны специалистам и представляют собой растения, у которых в семенах содержится одна семядоля. Однодольные растения включают виды родов *Oryza* (в том числе рис), *Zea* (в том числе кукуруза), *Saccharum* (в том числе сахарный тростник), *Triticum* (в том числе пшеница), *Hordeum*, *Secale*, *Avena*, *Lolium*, *Festuca*, вид *Brachypodium distachion*, виды рода *Musa* (в том числе банан).

Термины «экспрессия в указанном растении» и «экспрессирование в растении, части растения, органе растения или клетке растения», используемые в настоящей заявке, относятся к появлению продукта экспрессии нуклеиновой кислоты в результате транскрипции указанной

нуклеиновой кислоты. В связи с некоторыми вариантами осуществления способов по изобретению этот термин может дополнительно включать введение химерного гена, содержащего нуклеиновую кислоту, которая должна быть экспрессирована в растении.

Химерный ген представляет собой искусственный ген, сконструированный путем функционального связывания фрагментов неродственных генов или других нуклеотидных последовательностей. Другими словами, термин «химерный ген» обозначает ген, который обычно отсутствует у определенного вида растений, или относится к любому гену, в котором промотор или одна или более других регуляторных областей гена не связаны в природе со всей транскрибируемой нуклеиновой кислотой или с ее частью, т.е. являются гетерологичными по отношению к транскрибируемой нуклеиновой кислоте. Термин «гетерологичный» относится к отношению между двумя или более нуклеотидными или белковыми последовательностями, которые получены из разных источников. Например, промотор является гетерологичным по отношению к функционально связанной нуклеотидной последовательности, такой как кодирующая последовательность, если такая комбинация, как правило, не встречается в природных условиях. Кроме того, конкретная последовательность может быть «гетерологичной» по отношению к клетке или организму, в которую она вставлена (то есть не встречается в природе в указанной конкретной клетке или организме). Например, химерный ген, описанный в настоящем документе, представляет собой гетерологичную нуклеиновую кислоту.

Химерный ген также может содержать последовательность терминации транскрипции или полиаденилирования, функциональную в клетке растения, в частности, однодольного растения, более предпочтительно в клетке зерновой культуры или пшеницы. В качестве последовательности терминации транскрипции или полиаденилирования может использоваться любая соответствующая последовательность, имеющая происхождение из бактерий, такая как *pos*-терминатор из *Agrobacterium tumefaciens*, или вирусов, такая как, например, CaMV 35S терминатор, или имеющая происхождение из растений, такая как терминатор гистона, описанный в патентной заявке EP 0 633 317 A1.

Увеличение экспрессии и/или активности белка ТАТРР может относиться к увеличению количества продуцируемого (функционального) белка ТАТРР или к увеличению экспрессии и/или активности ТАТРР. Соответственно, количество (функционального) продуцируемого белка ТАТРР может быть увеличено, по меньшей мере, в 2 раза, в 4 раза, в 10 раз, в 25 раз, в 50 раз, в 75 раз, в

100 раз или более по сравнению с количеством (функционального) белка ТАТРР, продуцируемого клеткой с уровнями экспрессии ТАТРР дикого типа. Указанное увеличение экспрессии и/или активности может относиться к конститутивному увеличению количества (функционального) продуцируемого белка ТАТРР. Указанное увеличение также может представлять собой временное уменьшение количества (функционального) продуцируемого белка ТАТРР. Увеличение количества или активности ТАТРР может быть измерено в соответствии с описанием в тексте настоящей заявки. Увеличение экспрессии и/или активности ТАТРР может обеспечиваться, например, путем функционального связывания кодирующей области ТАТРР с промотором, таким как любой из промоторов, описанных ниже в настоящем документе, в результате чего в зависимости от выбора промотора экспрессия ТАТРР осуществляется, например, конститутивным, индуцируемым, временным или тканеспецифичным образом.

В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения нуклеиновая кислота кодирует белок «цинковые пальцы», который связывается с геном, кодирующим белок ТАТРР, присутствующий в растении, что приводит к повышенной экспрессии целевого гена. В соответствии с частными вариантами осуществления изобретения белок «цинковые пальцы» связывается с регуляторной областью указанного гена, тем самым активируя его экспрессию. Способы выбора сайтов для нацеливания белками «цинковые пальцы» описаны, например, в документе US 6453242, а способы использования белков «цинковые пальцы» для ингибирования экспрессии генов в растениях описаны, например, в документе US 2003/0037355, которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

В соответствии с еще одним из вариантов осуществления изобретения нуклеиновая кислота кодирует белок TALE, который связывается с геном, кодирующим белок ТАТРР, присутствующий в растении, что приводит к повышенной экспрессии гена. В соответствии с частными вариантами осуществления изобретения белок TALE связывается с регуляторной областью указанного гена, тем самым активируя его экспрессию. В соответствии с другими вариантами осуществления изобретения белок TALE связывается с матричной РНК, кодирующей указанный белок, и предотвращает ее трансляцию. Способы выбора сайтов для нацеливания белками TALE описаны, например, в Moscou MJ, Bogdanove AJ (2009) (A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 326:1501) и Morbitzer R, Romer P, Boch J, Lahaye T (2010) (Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector

(TALE)-type transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:21617–21622).

В соответствии с еще одним из вариантов осуществления изобретения указанная нуклеиновая кислота кодирует белок ТАТРР, такой как белок ТАТРР в соответствии с описанием в тексте настоящей заявки.

При использовании по тексту настоящего документа термин «промотор, экспрессируемый в растениях» означает последовательность ДНК, которая способна контролировать (инициировать) транскрипцию в клетке растения. Сюда включается любой промотор растительного происхождения, а также любой промотор не растительного происхождения, который способен направлять транскрипцию в клетке растения, то есть определенные промоторы вирусного или бактериального происхождения, такие как CaMV35S (Harpster et al. (1988) *Mol Gen Genet.* 212(1):182-90, промотор вируса подземного клевера № 4 или № 7 (WO9606932), или промоторы гена Т-ДНК, а также тканеспецифичные или органоспецифичные промоторы, включая, помимо прочего, специфичные для семян промоторы (например, WO89/03887), промоторы, специфичные для примордиев (An et al. (1996) *Plant Cell* 8(1):15-30), промоторы специфичные для ствола (Keller et al., (1988) *EMBO J.* 7(12): 3625-3633), промоторы специфичные для листьев (Hudspeth et al. (1989) *Plant Mol Biol.* 12: 579-589), мезофил-специфичные промоторы (такие как светоиндуцируемые промоторы Rubisco), специфичные для корней промоторы (Keller et al. (1989) *Genes Dev.* 3: 1639-1646), промоторы специфичные для клубней (Keil et al. (1989) *EMBO J.* 8(5): 1323-1330), промоторы специфичные для сосудистой ткани (Peleman et al. (1989) *Gene* 84: 359-369), промоторы, селективные в отношении тычинок, (WO 89/10396, WO 92/13956), промоторы специфичные для зоны раскрытия (WO 97/13865) и другие подобные промоторы. Промоторами, экспрессируемыми в растениях, также могут быть индуцибельными промоторами, такими как промоторы, индуцируемые температурой, или химически индуцируемые промоторы.

Промоторами, которые могут использоваться в соответствии с изобретением, являются конститутивные промоторы, экспрессируемые в растениях, которые приводят к конститутивной экспрессии химерного гена по изобретению и, следовательно, например, к конститутивному увеличению или уменьшению экспрессии и/или активности гена ТАТРР и/или белка ТАТРР. Конститутивные промоторы, экспрессируемые в растениях, известны специалистам, и включают промотор CaMV35S (Harpster et al. (1988) *Mol Gen Genet.* 212(1):182-90), актиновые промоторы, такие как, например, промотор из гена актина риса (McElroy et al., 1990, *Plant Cell* 2:163), промотор

вируса мозаики прожилок виноградного листа кассавы (Verdaguer et al., 1996 Plant Mol. Biol. 31: 1129), GOS-промотор (de Pater et al., 1992, Plant J. 2:837), гистон-Н3-промотор (Chaubet et al., 1986, Plant Mol Biol 6:253), промотор нопалин-синтазы (Nos) *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker et al., 1982, J. Mol. Appl. Genet. 1: 561), или убиквитиновые промоторы, такие как, например, промотор гена кукурузы убиквитин-1 (Christensen et al., 1992, Plant Mol. Biol. 18:675).

Другими промоторами, которые могут использоваться в соответствии с изобретением, являются индуцируемые промоторы (например, промоторы, индуцируемые стрессом, индуцируемые засухой, гормоноиндуцируемые промоторы, химически индуцируемые промоторы и т.д.), тканеспецифичные промоторы, промоторы, регулируемые развитием, и другие подобные промоторы. Для экспрессии последовательности в растениях могут быть использованы различные промоторы растительных генов, которые регулируют генную экспрессию в ответ на экологические, гормональные, химические сигналы, сигналы развития, а также тканеспецифичные промоторы. Выбор промотора зависит в основном от целевого фенотипа и определяется такими факторами, как соответствующая ткань (например, семя, плод, корень, пыльца, проводящая ткань, цветок, карпофилл и т.д.), индуцируемость (например, в ответ на повреждения, температурные воздействия, воздействие засухи, света, патогенных микроорганизмов и т.д.), время, стадия развития и другие подобные факторы.

Примерами промоторов, которые могут быть использованы для практического применения настоящего изобретения, являются промоторы, которые вызывают экспрессию в ответ на различные виды стресса, такие как промоторы RD29, которые активируются в ответ на засуху, низкую температуру, солевой стресс или воздействие ABA (Yamaguchi-Shinozaki et al., 2004, Plant Cell, том 6, 251-264; WO12/101118), а также промоторы, которые индуцируются в ответ на воздействие высоких температур (например, смотрите Ainley et al. (1993) Plant Mol. Biol. 22: 13-23), света (например, промотор *rbcS-3A* гороха, Kuhlemeier et al. (1989) Plant Cell 1: 471-478, и the maize промотор *rbcS* кукурузы, Schaffner and Sheen (1991) Plant Cell 3: 997-1012); в результате повреждений (например, wun1, Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1: 961-968); в ответ на воздействие патогенов (таких как промотор PR-I, описанный в Buchel et al. (1999) Plant Mol. Biol. 40: 387-396, и промотор PDF 1.2, описанный в работе Manners et al. (1998) Plant Mol. Biol. 38: 1071-1080), и химических веществ, таких как метилжасмонат или салициловая кислота (например, смотрите Gatz (1997) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48: 89-108). Кроме того, время экспрессии

можно контролировать с помощью промоторов, таких как промоторы, которые активны при старении (например, смотрите Gan and Amasino (1995) *Plant Cell* 13(4): 935-942); или позднем развитии семени (например, смотрите Odell et al. (1994) *Plant Physiol.* 106: 447-458).

Также могут применяться солеиндуцируемые промоторы, такие как солеиндуцируемый промотор NHX1 местного сорта риса Pokkali (PKN) (Jahan et al., 6th International Rice Genetics symposium, 2009, рекламный реферат стр. 4-37), солеиндуцируемый промотор H⁺-пирофосфатазы вакуолей из *Thellungiella halophila* (TsVP1) (Sun et al., *BMC Plant Biology* 2010, 10:90), солеиндуцируемый промотор гена *Citrus sinensis*, кодирующего изоформу гидропероксид фосфолипида *gpx1* (Avsian-Kretchmer et al., *Plant Physiology* July 2004 том 135, стр. 1685-1696).

В соответствии с альтернативными вариантами осуществления изобретения используют тканеспецифичные промоторы и/или специфичные для стадии развития промоторы, например, промотор, который может стимулировать транскрипцию только в пределах определенного временного интервала стадии развития в этой ткани. Смотрите, например, Blazquez (1998) *Plant Cell* 10:791-800, где проводится характеристика промотора гена *LEAFY Arabidopsis*. Смотрите также Cardon (1997) *Plant J* 12:367-77, где описывается транскрипционный фактор *SPL3*, который распознает мотив консервативной последовательности в промоторной области гена идентичности *API* цветковой меристемы *A. thaliana*; и Mandel (1995) *Plant Molecular Biology*, том 29, стр. 995-1004, где описывается промотор меристемы *eIF4*. Могут использоваться тканеспецифичные промоторы, активные в течение жизненного цикла определенной ткани. В соответствии с одним аспектом нуклеиновые кислоты по изобретению функционально связаны с промотором, активным, преимущественно, только в клетках хлопкового волокна, в соответствии с одним аспектом нуклеиновые кислоты по изобретению функционально связаны с промотором, активным, преимущественно, на стадиях элонгации клеток хлопкового волокна, например, в соответствии с описанием Rinehart (1996), см. выше. Нуклеиновые кислоты могут быть функционально связаны с промотором гена *Fbl2A*, для экспрессии, преимущественно, в клетках хлопкового волокна (см. там же). См. также, John (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5769-5773; John, et al., патенты США №№ 5,608,148 и 5,602,321, где описываются промоторы, специфичные для хлопкового волокна, и способы получения трансгенных растений хлопчатника. Для экспрессии нуклеиновых кислот по изобретению также могут использоваться промоторы, специфичные для корня. Примеры промоторов, специфичных для корня, включают промотор из гена алкогольдегидрогеназы (DeLisle

(1990) *Int. Rev. Cytol.* 123:39-60) и промоторы в соответствии с описанием в патентах США №№ 5,618,988, 5,837,848 и 5,905,186. Другие промоторы, которые могут быть использованы для экспрессии нуклеиновых кислот по изобретению, включают, например, промоторы, специфичные для семяпочки, специфичные для зародыша, специфичные для эндосперма, специфичные для покрова семяпочки, специфичные для оболочки семян или некоторые комбинации таких промоторов; промотор, специфичный для листа (смотрите, например, Busk (1997) *Plant J.* 11 :1285 1295, где описывается промотор кукурузы, специфичный для листа); промотор ORF 13 из *Agrobacterium rhizogenes* (который проявляет высокую активность в корнях, см., например, Hansen (1997) выше); промотор, специфичный для пыльцы кукурузы (смотрите, например, Guerrero (1990) *Mol. Gen. Genet.* 224:161 168); промотор томата, активный во время созревания плодов, старения и опадания листьев, предпочтительный промотор замыкающей клетки, например, описанный в РСТ/EP12/065608, и, в меньшей степени, из промоторов, специфичных для цветов могут использоваться (смотрите, например, Blume (1997) *Plant J.* 12:731 746); промотор, специфичный для пестика, из гена SK2 картофеля (смотрите, например, Ficker (1997) *Plant Mol. Biol.* 35:425 431); ген Blec4 из гороха, который активен в эпидермальной ткани верхушек вегетативных и цветочных побегов трансгенной люцерны, вследствие чего он является полезным инструментом для экспрессии чужеродных генов в эпидермальном слое активно растущих побегов или волокон; ген BEL1, специфичный для семяпочки (смотрите, например, Reiser (1995) *Cell* 83:735-742, GenBank № U39944); и/или промотор в Клее, патент США 5,589,583, где описывается область растительного промотора, способная придавать высокие уровни транскрипции в меристематической ткани и/или в быстро делящихся клетках. Другие тканеспецифичные промоторы, которые могут быть использованы в соответствии с изобретением, включают: семеноспецифичные промоторы (такие как промотор напина, фазеолина или DC3, описанный в патенте США № 5,773,697), промоторы, специфичные для плодов, активные во время созревания плодов (такие как промотор *dru 1* (патент США № 5,783,393), или промотор 2A1 1 (например, смотрите патент США № 4,943,674) и промотор полигалактуроназы томата (например, смотрите Bird et al. (1988) *Plant Mol. Biol.* 11: 651-662), промоторы специфичные для цветков (например, смотрите Kaiser et al. (1995) *Plant Mol. Biol.* 28: 231-243), промоторы специфичные для пыльцы, такие как PTA29, PTA26 и PTA1 3 (например, смотрите патент США № 5,792,929) и в соответствии с описанием, например, в Baerson et al. (1994 *Plant Mol. Biol.* 26: 1947-1959), промоторы активные в сосудистой ткани (например,

смотрите Ringli and Keller (1998) *Plant Mol. Biol.* 37: 977-988), плодolistиках (например, смотрите Ohl et al. (1990) *Plant Cell* 2:), пыльце и семяпочках (например, смотрите Baerson et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 22: 255-267). В соответствии с альтернативными вариантами осуществления изобретения для экспрессии нуклеиновых кислот, используемых в соответствии с изобретением, применяются растительные промоторы, которые индуцируются под воздействием растительных гормонов, таких как ауксины. Например, в соответствии с изобретением могут использоваться ауксин-чувствительные элементы фрагмента промотора EI (AuxREs) в сое (*Glycine max* L.) (Liu (1997) *Plant Physiol.* 115:397-407); ауксин-чувствительный промотор GST6 *Arabidopsis* (который также является чувствительным к салициловой кислоте и перекиси водорода) (Chen (1996) *Plant J.* 10: 955-966); ауксин-индуцируемый промотор *parC* из табака (Sakai (1996) 37:906-913); растительный элемент, чувствительный к биотину (Streit (1997) *Mol. Plant Microbe Interact.* 10:933-937); и промотор, чувствительный к гормону стресса, абсцизовой кислоте (ABA) (Sheen (1996) *Science* 274:1900-1902). Другие применимые гормонально-индуцируемые промоторы включают ауксин-индуцируемые промоторы (например, такие как описаны в van der Kop et al. (1999) *Plant Mol. Biol.* 39: 979-990 или Baumann et al., (1999) *Plant Cell* 11: 323-334), цитокинин-индуцируемый промотор (например, смотрите Guevara-Garcia (1998) *Plant Mol. Biol.* 38: 743-753), промоторы, чувствительные к гиббереллину (например, смотрите Shi et al. (1998) *Plant Mol. Biol.* 38: 1053-1060, Willmott et al. (1998) *Plant Molec. Biol.* 38: 817-825) и другие подобные промоторы.

В соответствии с альтернативными вариантами осуществления изобретения нуклеиновые кислоты, используемые в соответствии с изобретением, также могут быть функционально связаны с растительными промоторами, которые индуцируются под воздействием химических реагентов, которыми обрабатываются растения, таких как гербициды или антибиотики. Например, может применяться промотор *In2-2* кукурузы, активируемый антидотами гербицидов группы бензолсульфонамида (De Veylder (1997) *Plant Cell Physiol.* 38:568-577); применение других гербицидных антидотов вызывает различные паттерны экспрессии генов, включая экспрессию в корне, гидатодах и апикальной меристеме побега. Кодирующая последовательность может контролироваться, например, промотором, индуцируемым тетрациклином, например, в соответствии с описанием для трансгенных растений табака, содержащих ген аргининдекарбоксилазы *Avena sativa* L. (овес) (Masgrau (1997) *Plant J.* 11: 465-473); или элементом,

чувствительным к салициловой кислоте (Stange (1997) Plant J. 11:1315-1324). С использованием химически индуцируемых промоторов (например, промотор, индуцируемых гормонами или пестицидами), т.е. промоторов, чувствительных к химикатам, которыми в полевых условиях могут обрабатываться трансгенные растения, экспрессия полипептида по изобретению может быть индуцирована на определенной стадии развития растения. Может также использоваться система экспрессии, индуцируемая эстрогеном в соответствии с описанием в патенте США 6,784,340 и Zuo et al. (2000, Plant J. 24: 265-273), чтобы вызвать экспрессию нуклеиновых кислот в соответствии с изобретением.

В соответствии с альтернативными вариантами осуществления может использоваться промотор, который используется лишь с определенными целевыми видами растений-хозяев, такими как кукуруза, рис, ячмень, пшеница, картофель или другие культуры, и который индуцируется на любой стадии развития культуры.

В соответствии с альтернативными вариантами осуществления экспрессией функционально связанных последовательностей в тканях, отличных от ткани-мишени, может управлять тканеспецифичный растительный промотор. В соответствии с альтернативными вариантами осуществления используется тканеспецифичный промотор, который вызывает экспрессию преимущественно в целевой ткани или в целевом типе клетки, однако который может также вызывать определенную экспрессию в других тканях.

Согласно предлагаемому изобретению, в комбинации с промотором, можно использовать другие регуляторные последовательности, расположенные между промотором и кодирующей последовательностью, такие как активаторы транскрипции («энхансеры»), например, активаторы трансляции вируса табачной мозаики (TMV), описанный в заявке WO 87/07644, или вирус гравировки табака (TEV), описанный, например, Carrington & Freed 1990, J. Virol. 64: 1590-1597.

Внутри химерного гена также могут быть расположены другие регуляторные последовательности, которые усиливают экспрессию нуклеиновой кислоты по изобретению. Примерами таких регуляторных последовательностей являются интроны. Интронами являются промежуточные последовательности, присутствующие в пре-мРНК, но отсутствующие в зрелой РНК после удаления с помощью точного сплайсингового механизма. Способность природных интронов усиливать экспрессию генов, процесс, именуемый опосредованным интронами усилением (IME), известен у различных организмов, в том числе у млекопитающих, насекомых, нематод и растений

(WO 07/098042, стр. 11-12). IME, как правило, описывается как посттранскрипционный механизм, приводящий к повышенной экспрессии генов за счет стабилизации транскрипта. Интрон должен быть расположен между промотором и кодирующей последовательностью в нормальной ориентации. Однако также описаны случаи, когда некоторые интроны влияют на трансляцию, действуют как промоторы или как независимые от положения и ориентации энхансеры транскрипции. (Chaubet-Gigot et al., 2001, *Plant Mol Biol.* 45(1):17-30, стр. 27-28).

В связи с настоящим изобретением соответствующие примеры генов, содержащих такие интроны, включают 5'-интроны из гена актина 1 риса (смотрите US5641876), гена актина 2 риса, гена сахарозосинтазы кукурузы (Clancy and Hannah, 2002, *Plant Physiol.* 130(2):918-29), генов алкогольдегидрогеназы-1 кукурузы (*Adh-1*) и генов *Bronze-1* (Callis et al. 1987 *Genes Dev.* 1(10):1183-200; Mascarenhas et al. 1990, *Plant Mol Biol.* 15(6):913-20), гена белка теплового шока 70 кукурузы (смотрите US5593874), морщинистый гена 1 кукурузы, светочувствительного ген 1 *Solanum tuberosum* и гена белка теплового шока 70 *Petunia hybrida* (смотрите US 5659122), гена замещающего гистона H3 из люцерны (Keleman et al. 2002 *Transgenic Res.* 11(1):69-72) и гена замещающего гистона (гистон H3.3-подобного) H3 *Arabidopsis thaliana* (Chaubet-Gigot et al., 2001, *Plant Mol Biol.* 45(1):17-30).

Другие подходящие регуляторные последовательности включают 5' НТО. При использовании по тексту настоящего документа термин «5'НТО», также именуемый лидерной последовательностью, представляет собой определенную область матричной РНК (мРНК), расположенную между сайтом инициации транскрипции и стартовым кодоном кодирующей области. Она участвует в стабильности мРНК и эффективности трансляции. Например, 5'-нетранслируемая лидерная последовательность гена хлорофилл a/b-связывающий белок петунии после сайта инициации транскрипции 35S может использоваться для увеличения устойчивых уровней экспрессии репортерного гена (Harpster et al., 1988, *Mol Gen Genet.* 212(1):182-90). В WO95/006742 описано использование 5'-нетранслируемых лидерных последовательностей, полученных из генов, кодирующих белки теплового шока, для увеличения экспрессии трансгена. При использовании по тексту настоящего документа термин «3'-концевая область, участвующая в терминеции транскрипции и полиаденилировании, которая является функциональной в растениях» представляет собой последовательность, которая вызывает расщепление растущей цепи РНК, после чего на полученном 3'-конце РНК, функциональной в клетке растения, добавляется

полиаденильный хвост. Сигналы терминации транскрипции и полиаденилирования, функциональные в клетках растений, включают, помимо прочего, 3'nos, 3'35S, 3'his и 3'g7.

В этом отношении термин «введение» относится к размещению генетической информации в клетке растения или растении с помощью искусственных средств, таких как трансформация. Это может осуществляться любым способом введения РНК или ДНК в клетки, ткани, протопласты растений или целые растения, известным специалистам. В дополнение к введению с помощью искусственных средств в соответствии с описанием выше, термин «введение» также включает интрогрессию генов в соответствии с определением ниже.

«Трансформация» означает введение нуклеотидной последовательности в растение таким образом, чтобы вызвать стабильную или транзистентную экспрессию последовательности. Трансформация и регенерация клеток как однодольных, так и двудольных растений в настоящее время является обычной практикой, и выбор наиболее подходящего метода трансформации будет определяться практикующим специалистом. Выбор метода будет зависеть от типа трансформируемого растения; пригодность конкретных способов для данных типов растений может быть определена специалистом в данной области. Подходящие способы могут включать, помимо прочего, электропорацию протопластов растений; опосредованную липосомами трансформацию; трансформацию, опосредованную полиэтиленгликолем (PEG); трансформацию с использованием вирусов; микроинъекцию клеток растений; бомбардировку клеток растений микрочастицами; вакуумную инфльтрацию; и агробактериальную трансформацию.

В соответствии с альтернативными вариантами осуществления изобретения используют агробактериальную трансформацию. Также могут использоваться другие бактерии, способные переносить молекулы нуклеиновой кислоты в клетки растений, например, некоторые почвенные бактерии отряда Rhizobiales, например, Rhizobiaceae (например, *Rhizobium* spp., *Sinorhizobium* spp., *Agrobacterium* spp.); Phyllobacteriaceae (например, *Mesorhizobium* spp., *Phyllobacterium* spp.); Brucellaceae (например, *Ochrobactrum* spp.); Bradyrhizobiaceae (например, *Bradyrhizobium* spp.), и Xanthobacteraceae (например, *Azorhizobium* spp.), *Agrobacterium* spp., *Rhizobium* spp., *Sinorhizobium* spp., *Mesorhizobium* spp., *Phyllobacterium* spp. *Ochrobactrum* spp. и *Bradyrhizobium* spp., примеры которых включают *Ochrobactrum* sp., *Rhizobium* sp., *Mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti*. Примеры Rhizobia включают *R. leguminosarum* bv. trifolii, *R. leguminosarum* bv. phaseoli и *Rhizobium leguminosarum*, bv. viciae (патент США 7,888,552). Другими бактериями, которые могут быть

использованы для осуществления изобретения и которые способны трансформировать клетки растения и вызывать встраивание чужеродной ДНК в геном растения, являются бактерии рода *Azobacter* (аэробная), *Closterium* (строго анаэробная), *Klebsiella* (при необходимости, аэробная), и *Rhodospirillum* (анаэробная, фотосинтетически активная). Также было обнаружено, что перенос плазмиды Ti придает способность индукции опухолевого роста нескольким членам семейства *Rhizobiaceae*, таким как *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium leguminosarum* и *Phyllobacterium myrsinacearum*, в то время как виды рода *Rhizobium* NGR234, *Sinorhizobium meliloti* и *Mesorhizobium loti* могут быть модифицированы для опосредования генного переноса различным растениям (Broothaerts et al., 2005, *Nature*, 433:629-633).

В соответствии с альтернативными вариантами осуществления изобретения получение трансгенных растений или семян включает в себя введение последовательностей, используемых в соответствии с изобретением, и (при необходимости, в соответствии с одним аспектом) маркерных генов в целевой экспрессионный конструкт (например, в плазмиду), наряду с размещением промоторной и терминаторной последовательностей. Это может включать перенос модифицированного гена в растение соответствующим способом. Например, конструкт может быть введен непосредственно в геномную ДНК клетки растения с использованием таких методов, как электропорация и микроинъекция протопластов клетки растения, или конструкты могут быть введены непосредственно в ткань растения с использованием баллистических методов, таких как бомбардировка микрочастицами с ДНК. Например, смотрите Christou (1997) *Plant Mol. Biol.* 35:197-203; Pawlowski (1996) *Mol. Biotechnol.* 6:17-30; Klein (1987) *Nature* 327:70-73; Takumi (1997) *Genes Genet. Syst.* 72:63-69, где описывается применение бомбардировки частицами для введения трансгенов в пшеницу; и Adam (1997) выше, где описывается применение бомбардировки частицами для введения искусственных дрожжевых хромосом в клетки растения. Например, в соответствии с Rinehart (1997) см. выше, используется бомбардировка частицами для получения трансгенных растений хлопчатника. Устройство для ускорения частиц описано в патенте США № 5,015,580; а также коммерчески доступный инструмент для ускорения частиц BioRad (Biolistics) PDS-2000; см. также John, патент США № 5,608,148; и Ellis, патент США № 5,681,730, где описывается трансформация голосемянных растений с помощью частиц.

В соответствии с альтернативными вариантами осуществления протопласты могут быть иммобилизованы и инъецированы нуклеиновыми кислотами, например, экспрессионным конструктом. Несмотря на то, что регенерация растений из протопластов в отношении зерновых культур представляет сложность, в отношении бобовых регенерация растений возможна путем соматического эмбриогенеза из каллюса, полученного из протопластов. Организованные ткани можно трансформировать с помощью депротеинизированной ДНК, с использованием техники генной пушки, когда ДНК наносят на микрочастицы вольфрама размером 1/100 от размера клеток, которые глубоко проникают в клетки и органеллы. Затем осуществляется индукция трансформированной ткани для регенерации растений, обычно путем соматического эмбриогенеза. Этот метод успешно применялся для нескольких видов зерновых культур, включая кукурузу и рис.

В соответствии с альтернативными вариантами осуществления третий этап может включать отбор и регенерацию целых растений, способных передавать встроенный целевой ген следующему поколению. Такие методы регенерации основаны на манипулировании определенными фитогормонами в среде для выращивания культуры ткани, обычно на основе биоцидного и/или гербицидного маркера, который вводится вместе с целевыми нуклеотидными последовательностями. Регенерация растений из культивируемых протопластов описана в Evans et al., *Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture*, стр. 124-176, MacMillan Publishing Company, New York, 1983; и Binding, *Regeneration of Plants, Plant Protoplasts*, стр. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985. Регенерация также может осуществляться из каллюсов, эксплантатов, органов растений или их частей. Такие методы регенерации, в целом, описаны в Klee (1987) *Ann. Rev. of Plant Phys.* 38:467-486. Для получения цельных растений из трансгенных тканей, таких как незрелые зародыши, их можно выращивать в контролируемых условиях в нескольких средах, содержащих питательные вещества и гормоны, этот процесс известен как культура тканей. После того, как цельные растения вырастут и дадут семена, осуществляется оценка потомства.

Вирусная трансформация (трансдукция) может использоваться для транзientной или стабильной экспрессии гена, в зависимости от характера вирусного генома. Необходимый генетический материал упаковывается в соответствующий растительный вирус, и растение инфицируется модифицированным вирусом. Потомство инфицированных растений не заражено вирусом, а также не содержит введенного гена. Соответствующие способы вирусной трансформации описаны, например, в WO 90/12107, WO 03/052108 или WO 2005/098004.

В соответствии с альтернативными вариантами осуществления после того, как химерный ген стабильно встроен в трансгенные растения, он может быть введен в другие растения путем полового скрещивания или интрогрессии. Могут использоваться любые стандартные методы разведения, в зависимости от вида, который подвергается скрещиванию. Поскольку трансгенная экспрессия нуклеиновых кислот по изобретению приводит к фенотипическим изменениям, для получения конечного продукта растения, содержащие рекомбинантные нуклеиновые кислоты по изобретению, могут подвергаться половому скрещиванию с другим растением. Таким образом, семена по изобретению могут быть получены путем скрещивания двух трансгенных растений по изобретению или скрещивания растения по изобретению и другого растения. Желаемые эффекты (например, экспрессия полипептидов по изобретению для получения растения с измененной динамикой цветения) могут быть усилены, когда оба родительских растения экспрессируют полипептиды, например, ген TaTPP по изобретению. Желаемые эффекты могут быть переданы будущим поколениям растений с использованием стандартных средств размножения.

Успешные примеры модификации характеристик растений путем трансформации клонированными последовательностями, которые иллюстрируют современные знания в этой области, включают, например: патенты США №№ 5,571,706; 5,677,175; 5,510,471; 5,750,386; 5,597,945; 5,589,615; 5,750,871; 5,268,526; 5,780,708; 5,538,880; 5,773,269; 5,736,369 и 5,619,042.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления после трансформации осуществляется отбор растений с использованием доминантного селективируемого маркера, встроенного в вектор для трансформации. Такой маркер может придавать трансформированным растениям устойчивость к антибиотикам или гербицидам, и отбор трансформантов может осуществляться путем обработки растений антибиотиком или гербицидом в соответствующей концентрации.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления после отбора трансформированных растений и их выращивания до зрелости осуществляется идентификация тех растений, которые имеют измененную характеристику. Такой модифицированной характеристикой может быть любая из характеристик, описанных выше. В соответствии с альтернативными вариантами осуществления путем анализа экспрессии мРНК с использованием нозерн-блоттинга, ОТ-ПЦР или микрочипов или экспрессии белка с использованием иммуноблотов или вестерн-блоттинга или путем анализа задержки электрофоретического сдвига в геле можно

подтвердить, что модифицированная характеристика обусловлена изменениями уровней экспрессии или активности трансгенного полипептида или нуклеиновой кислоты.

«Интрогрессия» означает интеграцию гена в геном растения естественным путем, то есть путем скрещивания растения, содержащего химерный ген или мутантный аллель, описанный в настоящем документе, с растением, не содержащим указанный химерный ген или мутантный аллель. Из растений, содержащих химерный ген или мутантный аллель, может быть выбрано потомство.

Злаки, также именуемые зерновыми растениями, включают, помимо прочего, рис (*Oryza sativa*), пшеницу (*Triticum aestivum*), твердую пшеницу, стекловидную пшеницу (*Triticum durum*), кукурузу или маис (*Zea mays*), новлевы слезы (*Coix lachryma-jobi*), ячмень (*Hordeum vulgare*), просо (*Panicum miliaceum*, *Eleusine coracana*, *Setaria italica*, *Pennisetum glaucum*), сорго (*Sorghum bicolor*), овес (*Avena sativa*), рожь (*Secale cereale*), тритикале (*xTriticosecale*), тефф, таф или хак шир (*Eragrostis tef*), фонию (*Digitaria exilis*), тускарору, цицанию водяную, канадский рис, дантонию метельчатую (*Zizania spp.*), пшеницу спельту (*Triticum spelta*), канареечник (*Phalaris sp.*).

Растения, используемые в соответствии с настоящим изобретением, представляют собой растения рода *Triticum*, такие как *Triticum aestivum* и *Triticum durum* или *Triticum spelta*.

При использовании по тексту настоящего документа идентичность последовательности может составлять, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100%.

При использовании по тексту настоящего документа термин «нуклеиновая кислота» или «полинуклеотид» может относиться к ДНК или РНК, одноцепочечной или двухцепочечной. Синтез нуклеиновых кислот может осуществляться химическими методами, или они могут быть синтезированы путем биологической экспрессии *in vitro* или даже *in vivo*. Нуклеиновые кислоты могут быть химически синтезированы с использованием с использованием соответствующим образом защищенных рибонуклеозидных фосфорамидитов и обычного ДНК/РНК-синтезатора. Поставщиками реагентов для синтеза РНК являются, например, Prologo (Гамбург, Германия), Dharmacon Research (Лафайетт, Колорадо, США), Pierce Chemical (входит в группу Perbio Science, Рокфорд, Иллинойс, США), Glen Research (Стерлинг, Вирджиния, США), ChemGenes (Эшленд, Массачусетс, США) и Cruachem (Глазго, Великобритания). В отношении химерного гена по настоящему изобретению термин «ДНК» включает кДНК и геномную ДНК.

При использовании по тексту настоящего документа термины «белок» или «полипептид» описывают группу молекул, состоящую из более чем 30 аминокислот, тогда как термин «пептид» описывает молекулы, которые состоят менее чем из 30 аминокислот. Белки и пептиды могут дополнительно образовывать димеры, тримеры и высшие олигомеры, то есть соединения, состоящие из более чем одной (поли)пептидной молекулы. Молекулы белка или пептида, образующие такие димеры, тримеры и т.д., могут быть идентичными или не идентичными. Соответствующие структуры более высокого порядка, следовательно, именуются гомо- или гетеродимерами, гомо- или гетеротримерами и т.д. Термины «белок» и «пептид» также относятся к естественно модифицированным белкам или пептидам, в которых модификация осуществляется, например, путем гликозилирования, ацетилирования, фосфорилирования и другими подобными способами. Такие модификации известны специалистам.

При использовании по тексту настоящего документа термины «содержащий» и «включающий» указывают на наличие заявленных частей, этапов или компонентов, однако не исключают присутствия одной или нескольких дополнительных частей, этапов или компонентов. Таким образом, растение, имеющее определенную характеристику, может иметь дополнительные характеристики.

По тексту настоящего документа единственное число терминов (например, «растение» или «корень») включает также множественное число (например, «несколько растений» или «несколько корней»). Таким образом, при упоминании по тексту настоящего документа какого-либо элемента в единственном числе подразумевается также, что может присутствовать несколько таких элементов, за исключением случаев, когда из контекста очевидно следует, что присутствует лишь один такой элемент. Таким образом, например, «любой X», как правило, означает «по меньшей мере один X» или «один или более X».

Для целей изобретения термин «идентичность последовательности» двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей, выраженная в процентном соотношении, относится к количеству положений в двух оптимально выравниваемых последовательностях с идентичными остатками, которое умножается на сто и делится на количество сравниваемых положений. Разрыв, то есть положение в выравнивании, где в одной последовательности какой-либо остаток присутствует, а в другой отсутствует, рассматривается как положение с неидентичными остатками. Термин «оптимальное выравнивание» двух последовательностей определяется путем

выравнивания двух последовательностей по всей длине в соответствии с алгоритмом глобального выравнивания Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, J Mol Biol 48(3):443-53) в The European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS, Rice et al., 2000, Trends in Genetics 16(6): 276-277; смотрите, например, <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>) с использованием установок по умолчанию (штраф на внесение делеции = 10 (для нуклеотидов) / 10 (для белков) и штраф за продолжение делеции = 0,5 (для нуклеотидов) / 0,5 (для белков)). Для нуклеотидов по умолчанию используется матрица замен EDNAFULL, а для белков – EBLOSUM62.

При использовании по тексту настоящего документа термин «практически идентичный» или «в значительной степени подобный» относится к последовательностям, которые, при оптимальном выравнивании в соответствии с определением выше, имеют, по меньшей мере, определенный минимальный процент идентичности последовательности (в соответствии с определением ниже).

При упоминании по тексту термина «растение» или «растения» согласно данному изобретению подразумевается, что настоящее изобретение также включает части растения, клетки, ткани или органы, семянки, семена, отделенные части растения, такие как корни, листья, цветки, пыльца и т.д. При упоминании по тексту термина «растение» или «растения» согласно данному изобретению подразумевается, что, за исключением случаев, когда прямо указано иное, настоящее изобретение также включает потомство растений, которое сохраняет отличительные характеристики родителей (в частности, измененное время цветения, измененная динамика развития семян, измененная динамика созревания семян или измененная динамика прорастания семян), такое как семя, полученное путем самоопыления или скрещивания, например, гибридное семя (полученное путем скрещивания двух инбредных родительских линий), гибридные растения и части растений, полученный из таких растений, например, потомство, содержащее химерный ген или мутантный/нокаут-аллель ТАТРР по изобретению, если не указано иное.

При использовании по тексту настоящего документа выражение «создание материала для размножения» относится к любым известным специалистам средствам для получения других растений, частей или семян растений, такое выражение включает, помимо прочего, способы вегетативного размножения (например, размножение отводками, деление, прививка (почками), микрклональное размножение, столоны или плети, запасные органы, такие как луковицы, клубнелуковицы, клубни и ризомы, разрезание или разделение клубней или луковиц), половое

размножение (скрещивание с другим растением) и бесполое размножение (например, апогамогония, соматическая гибридизация).

Если не указано иное в примерах, все рекомбинантные ДНК технологии осуществляется согласно стандартным протоколам, как описано в Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY и в томах 1 и 2 Ausubel et al. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, США. Стандартные методы и материалы молекулярной биологии для работы с растениями описаны в *Plant Molecular Biology Labfax* (1993), R.R.D. Croy, которая совместно опубликована BIOS Scientific Publications Ltd (Великобритания) и Blackwell Scientific Publications (Великобритания). Другие ссылки на стандартные методы молекулярной биологии включают Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, тома I и II Brown (1998) *Molecular Biology LabFax*, второе издание, Academic Press (UK). Стандартные материалы и способы осуществления полимеразной цепной реакции описаны в публикации Dieffenbach and Dveksler (1995) *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, и в McPherson et al. (2000) *PCR - Basics: From Background to Bench*, первое изд., Springer Verlag, Германия.

Все патенты, патентные заявки, публикации или публичные раскрытия сущности изобретения (включая публикации в Интернете), упомянутые или цитируемые в настоящем документе, полностью включены в настоящий документ посредством ссылок.

Работа, лежащая в основе настоящего изобретения, была поддержана проектом «Molecular Basis of Formation of Main Crop Yield Traits» (Молекулярный базис формирования основных характеристик урожайности) (Номер проекта: 2016YFD0100402, Руководитель Направления: Hongxia LIU) в 13^{ом} Пятилетнем Плане Министерства Науки и Технологий и Национальным Природным Фондом “Функциональный анализ важных генов-кандидатов, связанных с урожайностью зерна пшеницы 5DS, и изучение механизма ее регулирования” (Номер проекта: 31471492; Руководитель Направления: Hongxia LIU).

По тексту настоящего описания приведена ссылка на следующие записи в списке последовательностей:

SEQ ID NO: 1: аминокислотная последовательность TaTPP-7A

SEQ ID NO: 2: нуклеотидная последовательность кодирующей области (cDNA) для TaTPP-7A

SEQ ID NO: 3: нуклеотидная последовательность геномной области (gDNA) для TaTPP-7A

SEQ ID NO: 4: прямой праймер TaTPP-F1

SEQ ID NO: 5: обратный праймер TaTPP-R1

SEQ ID NO: 6: прямой праймер TaTPPcDNA-F1

SEQ ID NO: 7: обратный праймер TaTPPcDNA-R1

SEQ ID NO: 8: прямой праймер QST-TPP-7A-F

SEQ ID NO: 9: обратный праймер QST-TPP-7A-R

SEQ ID NO: 10: прямой праймер (клонировующий) TPP-TaA-F

SEQ ID NO: 11: обратный праймер (клонировующий) TPP-TaA-R

SEQ ID NO: 12: прямой праймер TPP-P-1F (амплификация промотора)

SEQ ID NO: 13: обратный праймер TPP-P-1R (амплификация промотора)

SEQ ID NO: 14: версия 1 промотора TPP-7A

SEQ ID NO: 15: версия 2 промотора TPP-7A

SEQ ID NO: 16: прямой праймер TPP-P-TF

SEQ ID NO: 17: обратный праймер TPP-P-TR

SEQ ID NO: 18: нуклеотидная последовательность между SNP493 и SNP1980 как в SEQ ID NO: 14

SEQ ID NO: 19: нуклеотидная последовательность между положениями 467-514 5' конца

ПЦР-амплификации версии 1 TaTPP

SEQ ID NO: 20: нуклеотидная последовательность между положениями 467-514 5' конца

ПЦР-амплификации версии 2 TaTPP

SEQ ID NO: 21: нуклеотидная последовательность праймера 488F1 на основе KASP

SEQ ID NO: 22: нуклеотидная последовательность праймера 488F2 на основе KASP

SEQ ID NO: 23: нуклеотидная последовательность праймера 488C KASP

SEQ ID NO: 24: нуклеотидная последовательность маркера SNP 488

SEQ ID NO: 25: нуклеотидная последовательность между положениями 2121-2168 5' конца

ПЦР-амплификации версии 1 TaTPP

SEQ ID NO: 26: нуклеотидная последовательность между положениями 2121-2168 5' конца

ПЦР-амплификации версии 2 TaTPP

SEQ ID NO: 27: нуклеотидная последовательность праймера 2144F1 на основе KASP

SEQ ID NO: 28: нуклеотидная последовательность праймера 2144F2 на основе KASP

SEQ ID NO: 29: нуклеотидная последовательность праймера 2144C KASP

SEQ ID NO: 30: нуклеотидная последовательность маркера SNP 2144C

Примеры

Следующие примеры приведены для лучшего понимания настоящего изобретения и не предусматривают ограничение объема настоящего изобретения. Если не указано иное, приведенные в следующих примерах экспериментальные методы являются стандартными методами. Если не указано иное, тестовые материалы, используемые в следующих примерах, являются коммерчески доступными в обычных магазинах биохимических реагентов. В следующих примерах каждый количественный тест повторяется трижды, и из результатов выводится среднее значение.

Вектор PCambia3301: YouBio, номер продукта VT1386.

Вектор PWMB003: Maoyun YU, Guixiang YIN, Pingzhi ZHANG, Xingguo YE, Construction and Validation of Three Vectors for Genetic Transformation of Crops (Конструирование и валидация трех векторов для генетической трансформации сельскохозяйственных культур), 2014 ежегодная конференция: Transgenic Crop Research and Safety Management (Исследования трансгенных культур и управление безопасностью), 58-67.

Agrobacterium tumefaciens GV3101: Справочная литература: Yadav S, Sharma P, Srivastava A, Desai P, Shrivastava N. Strain specific *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Bacopa monnieri* (Штамм-специфическая агробактериальная генетическая трансформация *Bacopa monnieri*). Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 2014, 12:89–94.

Пшеница Fielder: Справочная литература: Richardson T, Thistleton J, Higgins T J, Howitt C, Ayliffe M. Efficient *Agrobacterium* transformation of elite wheat germplasm without selection (Эффективная агробактериальная трансформация эритроплазмы элитной пшеницы без селекции). Plant Cell Tiss Organ Cult. 2014, DOI 10.1007/s11240-014-0564-7.

Пример 1. Клонирование белка TaTPP-7A и кодирующего его гена

В соответствии с корреляционным анализом массы зерна в естественной популяции пшеницы (239 линий пшеницы), анализом точной локализации молекулярных маркеров SSR в картирующей популяции (расщепляющаяся популяция F2 по массе зерна пшеницы), информацией о геномной последовательности генов-кандидатов, полученная путем скрининга библиотеки бактериальных искусственных хромосом и сравнительных геномных подходов на ранней стадии в лаборатории, были разработаны праймеры для амплификации целевых генов TPP из диплоидного предка А геномной пшеницы (*Triticum urartu*) и обычной гексаплоидной пшеницы (китайская яровая пшеница), соответственно.

Осуществляли экстракцию геномной ДНК *Triticum urartu*, а затем ПЦР-амплификация с парой праймеров, состоящей из TaTPP-F1 и TaTPP-R1. Продукты амплификации ПЦР подвергали ТА-клонированию и секвенированию, и для секвенирования отбирали 15 положительных клонов.

Осуществляли экстракцию геномной ДНК китайской яровой пшеницы, затем первый цикл ПЦР-амплификации с парой праймеров, состоящей из TaTPP-F1 и TaTPP-R1, а затем второй цикл ПЦР-амплификации с парой праймеров, состоящей из TaTPP1cDNA-F1 и TaTPP1cDNA-R1 с использованием продукта амплификации, полученного в ходе первого цикла, в качестве шаблона. Продукты амплификации ПЦР подвергали ТА-клонированию и секвенированию, и для секвенирования отбирали 15 положительных клонов.

Результаты секвенирования показали, что соответствующий продукт ПЦР-амплификации *Triticum urartu* соответствовал SEQ ID NO: 3 в перечне последовательностей, а продукт второго цикла ПЦР-амплификации, соответствующий китайской яровой пшенице, соответствовал нуклеотидам в положениях 23-2115 с 5'-конца SEQ ID NO: 3 в перечне последовательностей.

Белок, соответствующий SEQ ID NO: 1 в перечне последовательностей, был обозначен как белок TaTPP-7A. Ген, кодирующий белок TaTPP-7A, был обозначен как ген *TaTPP-7A*, геномная последовательность которого соответствовала SEQ ID NO: 3 в перечне последовательностей, а последовательность кДНК соответствовала SEQ ID NO: 2 в перечне последовательностей.

Были сконструированы специфические субгеномные праймеры для определения положения (QST-TPP-7A-F и QST-TPP-7A-R) путем анализа выравнивания, в отношении вышеупомянутых последовательностей дополнительно проводился анализ хромосомной локализации с использованием нуллисомно-тетрасомного материала от 7-й гомологичной группы пшеницы для определения положения гена *TaTPP-7A* на хромосоме 7A пшеницы и, кроме того, для определения точного положения гена *TaTPP-7A* на 7As пшеницы.

TaTPP-F1: 5'-CGTGTGGTTGTTTGC GTG-3' (SEQ ID NO: 4);

TaTPP-R1: 5'-CTAGATATAGGCGAGGGTTATTAC-3' (SEQ ID NO: 5);

TaTPP1cDNA-F1: 5'-ATGGCGAACCAGGACGT-3' (SEQ ID NO: 6);

TaTPP1cDNA-R1: 5'-CTACACTCTTGCGCGCAT-3' (SEQ ID NO: 7);

QST-TPP-7A-F: 5'-CCATGCCTTGTCCTTGATGT-3' (SEQ ID NO: 8);

QST-TPP-7A-R: 5'-AAACCAAGAAAAGCGAGAGATC-3' (SEQ ID NO: 9).

Пример 2. Производство и идентификация трансгенных растений пшеницы со сверхэкспрессией TaTPP.

I. Конструирование рекомбинантных плазмид

1. Осуществляли синтез двухцепочечной молекулы ДНК, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2 согласно Перечню последовательностей.

2. С использованием в качестве матрицы молекулы ДНК, синтезированной на этапе 1, для ПЦР-амплификации использовали набор праймеров, состоящий из TPP-TaA-F и TPP-TaA-R.

TPP-TaA-F: 5'-CGGGATCCATGGCGAACCAGGACGT-3' (SEQ ID NO: 10)

TPP-TaA-R: 5'-CGGAATTCCTACACTCTTGCGCGCAT-3' ((SEQ ID NO: 11).

3. Продукт ПЦР-амплификации, полученный на этапе 2, подвергли двойному ферментативному расщеплению с использованием рестрикционных эндонуклеаз *Bam HI* и *Eco RI*, затем извлекали продукт ферментативного расщепления.

4. I. Конструирование рекомбинантной плазмиды pWMB110

(1) Вектор pCambia3301 выбирали, подвергли двойному ферментативному расщеплению с использованием рестрикционных эндонуклеаз *EcoRI* и *PmI*, затем извлекали остов вектора (приблизительно 8,5 т.п.н.).

(2) Вектор pWMB003 выбирали, подвергли двойному ферментативному расщеплению с использованием рестрикционных эндонуклеаз *Hind III* и *EocRI*, затем извлекали фрагмент Ubi-MCS-Nos (приблизительно 2,2 т.п.н.).

Остов вектора, полученный на этапе (1), и фрагмент Ubi-MCS-Nos, полученный на этапе (2), были соединены с помощью набора для клонирования In-Fusion HD Cloning Kit (продукт компании Takara), в результате чего была получена рекомбинантная плазида pWMB110.5.

5. Рекомбинантную плазмиду pWMB110 выбирали, подвергли двойному ферментативному расщеплению с использованием рестрикционных эндонуклеаз *Bam HI* и *Eco RI*, затем извлекали остов вектора (приблизительно 10,6 т. п. н.).

6. Продукт ферментативного расщепления, полученный на этапе 3, и остов вектора, полученный на этапе 5, соединяли, с получением рекомбинантной плазмиды pWMB110-TaTPP-7A. В соответствии с результатами секвенирования структура рекомбинантной плазмиды pWMB110-TaTPP-7A описана следующим образом: небольшой фрагмент между сайтами ферментативного расщепления *Bam HI* и *Eco RI* соответствовал SEQ ID NO: 2 в перечне последовательностей.

II. Получение трансгенных растений

1. Для получения рекомбинантного *Agrobacterium* в *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 была введена рекомбинантная плаزمида pWMB110-TaTPP-7A.

2. Рекомбинантная *Agrobacterium*, полученная на этапе 1, использовалась для генетической трансформации незрелого каллюса эмбрионов пшеницы Fielder, а затем культивировалась для получения регенерированных растений T₀. Для получения растений поколения T₁ осуществлялось самооплодотворение регенерированных растений T₀. Для получения растений поколения T₂ осуществлялось самооплодотворение растений поколения T₁.

В отношении регенерированных растений T₀, растений поколения T₁ и растений поколения T₂ осуществлялась идентификация bag-гена и идентификация целевого гена. Использовались следующие специфические этапы: Вначале собирались листья растений и подвергались идентификации bag-гена с использованием трансгенного набора Envirologix® PAT/bag в соответствии с инструкциями; растения, положительные в соответствии с идентификацией по bag-гену, затем подвергали идентификации целевого гена (геномную ДНК листьев экстрагировали и подвергали ПЦР-идентификации с использованием пары праймеров, состоящей из TPP-TaA-F и TPP-TaA-R, если было получено 1,1 т. п. н. продукта амплификации, тогда растения считались положительными согласно ПЦР-идентификации). Если идентификация была положительной для конкретных растений поколения T₀ и T₁ при отношении разделения растений 3: 1, и растение поколения T₂ является положительным согласно ПЦР-идентификации, и в потомстве не происходит сегрегации характеристик, тогда T₂ и его потомство, полученное самооплодотворением, считаются гомозиготной трансгенной линией.

Для идентификации характеристик были произвольно выбраны три гомозиготных трансгенных линии (линия TaTPP-5-3, TaTPP-10-4 и TaTPP-13-7).

III. Получение контрольных растений, трансформированных с помощью пустого вектора

Для трансформации растений пшеницы в соответствии с описанием в разделе II вместо рекомбинантной плазмиды pWMB110-TaTPP-7A использовали рекомбинантную плазмиду pWMB110 с получением контрольной линии, трансформированной пустым вектором.

IV. Идентификация характеристик

Тестируемыми трансгенными линиями были: растения поколения T_2 линии TaTPP-5-3, растения поколения T_2 линии TaTPP-10-4, растения поколения T_2 клетки TaTPP-13-7, линия растений поколения T_2 , трансформированные пустым вектором, а также пшеница сорта Fielder в качестве контрольных растений.

Каждая линия состояла из 50 растений.

Каждую тестовую линию культивировали параллельно (то есть культивировали на одном и том же земельном участке и в одинаковых условиях), и производился сбор урожая зерна в соответствующее время. Производились измерения средней длины ядра, средней ширины ядра, средней толщины ядра и средней массы тысячи зерен в каждой линии.

На Фигуре 1 показаны фотографии зерен линий трансгенной пшеницы со сверхэкспрессией TaTPP в сравнении с нетрансформированными контрольными растениями (Fielder) и трансформированными контрольными растениями, у которых экспрессия TaTPP была снижена. Фенотип зерен из линии TaTPP-10-4 и фенотип зерен из линии TaTPP-13-7 не проявляли каких-либо существенных отличий от фенотипа зерен из линии TaTPP-5-3 на Фигуре 1. Фенотип зерен из контрольных растений линии, трансформированной с использованием пустого вектора, не проявляли каких-либо существенных отличий от фенотипа зерен контрольных растений пшеницы сорта Fielder на Фигуре 1. Зерна из линий пшеницы со сверхэкспрессией TaTPP действительно продемонстрировали увеличение длины зерна, массы тысяч зерен и ширины зерна по сравнению с контрольными растениями.

На Фигуре 2 показаны измерения длины зерен, массы тысячи зерен для линий трансгенной пшеницы со сверхэкспрессией TaTPP в сравнении с нетрансформированными контрольными растениями (Fielder) и трансформированными контрольными растениями, у которых экспрессия TaTPP была снижена.

На Фигуре 3 показаны измерения и фотографии, демонстрирующие, что у трансгенных растений со сверхэкспрессией Ta-TPP были увеличены длина и ширина нижней и верхней цветковой чешуи.

На Фигуре 4 показаны фотографии увеличенной длины побегов и колосьев трансгенных растений со сверхэкспрессией TaTPP в сравнении с нетрансформированными контрольными растениями (Fielder) и трансформированными контрольными растениями, у которых экспрессия TaTPP была снижена.

В Таблице 1 показана средняя длина ядра, средняя ширина ядра, средняя толщина ядра и средняя масса тысячи зерен в каждой линии. В Таблице 2 представлены некоторые из результатов. Длина, ширина и толщина зерен в каждой трансгенной линии были выше по сравнению с пшеницей сорта Fielder и демонстрировали значительные различия. Длина, ширина и толщина зерен в линии, трансформированной с использованием пустого вектора, были существенно выше по сравнению с пшеницей сорта Fielder. Средняя масса тысячи зерен трех трансгенных линий составляла 41,6 г, 38,53 г и 40,1 г, соответственно, что демонстрирует значительное улучшение по сравнению с пшеницей сорта Fielder (26,5 г) и существенное различие ($P < 0,001$). Результаты показали, что белок TaTPP-7A оказывал положительное регулирующее влияние на урожай пшеницы и был может использоваться для увеличения массы тысячи зерен и длины зерен.

Таблица 1

	TaTPP-5-3	TaTPP-10-4	TaTPP-13-7	Fielder	Линия, трансформированная с использованием пустого вектора
Средняя длина зерна (см)	6.53	6.568	6.625	5.863	5.658
Средняя ширина зерна (см)	3.40	3.33	3.495	2.884	2.879
Средняя толщина зерна (см)	3.10	3.06	3.0575	2.483	2.469
Средняя масса тысячи зерен (г)	41.6	38.53	40.1	26.5	26.3

Пример 3 Производство и идентификация трансгенных растений *Arabidopsis* со сверхэкспрессией TaTPP.

Рекомбинантные векторы и агробактерии в соответствии с описанием в Примере 2 также использовались для получения трансгенных растений *Arabidopsis* со сверхэкспрессией TaTPP. Как показано на Фигуре 5, эти трансгенные растения демонстрировали повышенную продукцию биомассы при вегетативном росте, измененную морфологию стручка и увеличенный размер семян по сравнению с нетрансформированными контрольными растениями *Arabidopsis*.

Пример 4. Выделение промоторной области из TaTPP из различных сортов пшеницы

I. Материалы и способы

Вектор pDONR207: продукт Invitrogen Corporation, номер доступа плазмидной карты: 02352

pGWB35: BioVector NTCC Liu J, Zhang T R, Jia J Z, Sun J Q. 2016. Медиаторная подъединица пшеницы TaMED25 взаимодействует с фактором транскрипции TaEIL1 для негативной регуляции устойчивости к мучнистой росе. Plant Physiology. 170: 1799-1816.

В этих примерах использовали табак *Nicotiana benthamiana*. Ссылки: Agrobacterium-mediated factors influencing transient expression in tobacco (Агробактериальные факторы, влияющие на транзистентную экспрессию в табаке); Sun Manli, Meng Yu, Zhang Qiang, Huang Guiyan, Shan Weixing; Northwest China Journal of Agricultural Sciences, 2015, 24 1): 161-165.

В примерах использовали систему визуализации Nightshade LB985, Berthold Technologies.

II. Выделение двух разных типов промоторов для Ta TPP-7A из пшеницы.

В качестве материалов для выделения промоторных областей для TaTPP-7A были отобраны 34 линии пшеницы с различными характеристиками зерна (пронумерованные C1-34, см. Таблицу 2).

В отношении каждой из тестовых линий осуществлялись следующие этапы:

1. Экстрагирование геномной ДНК для тестируемой линий пшеницы
2. С использованием геномной ДНК, экстрагированной на этапе 1, в качестве матрицы, осуществляли ПЦР-амплификацию с использованием пар праймеров, состоящих из TPP-P-1F и TPP-P-1R с получением продукта ПЦР-амплификации.

TPP-P-1F (SEQ ID NO: 12 Перечня последовательностей): 5'-GAATGTAGCAGTCCACSTAT-3';

TPP-P-1R (SEQ ID NO: 13 Перечня последовательностей): 5'-ACGCAGATCAATCATCAGAA-3''.

3. Продукт ПЦР-амплификации, полученный на этапе 2, подвергали клонированию и секвенированию. Двадцать пять клонов на линию пшеницы.

4. Сбор и сравнение последовательностей.

Осуществляли секвенирование и анализ двадцати пяти клонов каждого материала пшеницы в отношении промоторной последовательности А генома TaTPP. Продукт ПЦР-амплификации состоит из двух частей: одна часть представляет собой промоторную область

(от 5'-конца до стартового кодона ATG), а другая часть представляет собой кодирующую область (от ATG до 3'-конца). В 34 сортах пшеницы были обнаружены две версии промоторов TaTPP-7A, одна из которых соответствует SEQ ID NO: 14 (именуется промотором P1), а другая – SEQ ID NO: 15 (именуется промотором P2).

III. Функциональная проверка промоторных областей

Рекомбинантные плазмиды

1. Осуществляли синтез двухцепочечной молекулы ДНК, представленной SEQ ID NO: 14.
2. С использованием молекулы ДНК, полученной на этапе 1, в качестве матрицы, осуществляли ПЦР-амплификацию с использованием пар праймеров, состоящих из TPP-P-TF и TPP-P-TR с получением продуктов ПЦР-амплификации. В TPP-P-TF подчеркнута последовательность attB1. В TPP-P-TR подчеркнута последовательность attB2.

TPP-P-TF (SEQ ID NO: 16)

5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCCTCTTGATAAGTGTCTGGAGGACC -3';

TPP-P-TR (SEQ ID NO: 17):

5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGGCGCACGCAAACAACC -3'.

3. Продукт амплификации ПЦР, полученный на этапе 2, подвергали ВР рекомбинации с использованием вектора pDONR207 с получением рекомбинантной плазмиды, имеющей молекулу ДНК, показанную в 217-4997-м нуклеотидах SEQ ID NO: 14.

4. Рекомбинантная плазида, полученная на этапе 3, подвергалась LR реакции с использованием вектора pGWB35 с получением рекомбинантной плазмиды, имеющей молекулу ДНК, показанную в нуклеотидах 217-4997 SEQ ID NO: 14, функционально связанную в прямом направлении вектора pGWB35 с геном флуоресценции, с получением рекомбинантной плазмиды P1. Вектор pGWB35 имеет ген флуоресценции, а молекула ДНК, соответствующая нуклеотидам 217-497 SEQ ID NO: 14, вставляется перед геном флуоресценции для проверки его промоторной активности.

5. Осуществляется синтез двухцепочечных молекул ДНК, представленных SEQ ID NO: 15.

6. С использованием молекулы ДНК, полученной на этапе 5, в качестве матрицы, осуществляли ПЦР-амплификацию с использованием пар праймеров, состоящих из TPP-P-TF и TPP-P-TR с получением продуктов ПЦР-амплификации.

7. Продукт амплификации ПЦР, полученный на этапе 6, подвергли ВР рекомбинации с использованием вектора pDONR207 с получением рекомбинантной плазмиды, имеющей молекулу ДНК, показанную номерами нуклеотидов 217-2498 SEQ ID NO: 15.

8. Рекомбинантную плазмиду, полученную на этапе 7, подвергли LR реакции с использованием вектора pGWB35 с получением рекомбинантной плазмиды, имеющей молекулу ДНК, показанную в нуклеотидах 217-4997 SEQ ID NO: 15, функционально связанную в прямом направлении вектора pGWB35 с геном флуоресценции, с получением рекомбинантной плазмиды P2. Вектор pGWB35 имеет ген флуоресценции, а молекула ДНК, соответствующая нуклеотидам 217-497 SEQ ID NO: 15, вставляется перед геном флуоресценции для проверки его промоторной активности.

Функциональная проверка промоторных областей

Тестируемые плазмиды: рекомбинантная плазида P1 или рекомбинантная плазида P2 или вектор pGWB35 (пустой вектор в качестве контроля).

1. Для получения рекомбинантного *Agrobacterium* в штамм *Agrobacterium* GV3101 была введена тестовая плазида.

2. рекомбинантные *Agrobacterium*, полученные на этапе 1, ресуспендировались в растворе с получением бактериальной суспензии с оптической плотностью при 600 нм = 1. Раствор содержал 10 mM MES (2-(N-морфин)этансульфокислота), 10 mM MgCl₂ и 200 мкмоль/л ацетосирингона.

3. Бактериальную суспензию, полученную на этапе 2, инъецировали в растения табака, выращенные до стадии 4-6 листьев, в заднюю часть листьев (на каждом растении табака осуществлялась инокуляция 2-3 листьев, объем инъекции на лист составлял 200-300 мкл).

4. После завершения этапа 3 растения табака выдерживали в темноте в течение 24 часов, затем культивировали на свету в течение 36 часов при температуре около 22 °C.

5. После завершения этапа 4 листья растений табака срезали и культивировали в слабо среде MS и всю площадь инокуляции обрабатывали 20 мкл субстратного раствора (люциферин светлячка (калиевая соль, Promega, кат. № E1601), разбавленного до 10 объемов стерильной водой ddH₂O.), после чего оставили в темноте на 2-3 мин. После для получения фотографий и расчета значения флуоресценции использовали систему визуализации растений.

Результаты представлены В Таблице 7. На Фигуре 7, P1 представляет рекомбинантную плазмиду – P1, P2 представляет рекомбинантную плазмиду – P2, а EV представляет вектор pGWB35. На Панели В соответствующее значение флуоресценции вектора pGWB35 составляет 1, на вертикальной оси отображается кратность флуоресценции, а числа от 1 # до 8 # соответственно представляют разные листья. Флуоресценция, полученная при использовании промотора P1, была значительно выше, чем флуоресценция, полученная при использовании промотора P2. В некоторых листьях активность промотора P1 была более чем в 3 раза выше, чем у промотора P2. Результаты показали, что как P1, так и P2 имели промоторную активность, однако промотор P1 имел значительно более высокую промоторную активность, чем промотор P2. Изображения на Фигуре 7, Панель А (HAP I соответствует P1, а HAP II соответствует P2) демонстрируют тот же результат.

Пример 5. Идентификация SNP в промоторной области TaTPP-7A и корреляция с характеристиками зерна у различных сортов пшеницы.

Существует 5 различий в SNP между промотором P1 (SEQ ID NO: 14) и промотором P2. (SEQ ID NO: 15). При использовании промотора P1 в качестве стандарта, промотор P2 отличается в следующих положениях нуклеотидов:

- 1) Вставка нуклеотида «С» между 409-м и 410-м нуклеотидами;
- 2) SNP в нуклеотидном положении 493 SEQ ID NO: 14: полиморфная форма – Т / С (Т в SEQ ID NO: 14; С в SEQ ID NO: 15)
- 3) SNP в нуклеотидном положении 1208 SEQ ID NO: 14: полиморфная форма – А / G (А в SEQ ID NO: 14; G в SEQ ID NO: 15);
- 4) SNP в нуклеотидном положении 1708, полиморфная форма – Т / G; (Т в SEQ ID NO: 14; G в SEQ ID NO: 15)
- 5) SNP в нуклеотидном положении 1980, полиморфная форма – G / А; (G в SEQ ID NO: 14; А в SEQ ID NO: 15)

5. Тестируемые линии пшеницы были посажены во дворе Института сельскохозяйственных культур Китайской академии сельскохозяйственных наук в октябре 2012 года, их полив и внесение удобрений осуществлялись в обычном порядке, сбор зерна осуществлялся в июле 2013 года, после чего производились измерения массы тысячи зерен.

Масса тысячи зерен каждого тестируемого материала пшеницы показана В Таблице 2.

Таблица 2

№	Название	Масса	Тип промотора	Генотип SNP488	Генотип SNP2144
C1	Zhongyou 9507	51.7г	P1	AA	AA
C2	Zhengmai 9023	44.1г	P1	AA	AA
C3	Pan 86001-3	52.8г	P1	AA	AA
C4	Jinmai № 8	41.3г	P1	AA	AA
C5	Laizhou 953	42.05г	P1	AA	AA
C6	Xiaobaimang	44.42г	P1	AA	AA
C7	Sankecun	53.66г	P1	AA	AA
C8	Zijiehong	44.35г	P1	AA	AA
C9	Hongmangzi	37.54г	P1	AA	AA
C10	Yuqiumai	44.29г	P1	AA	AA
C11	Lumai № 1	45.658г	P1	AA	AA
C12	Beijing 15	28.55г	P2	CC	TT
C13	Shijiazhuang 54	33.28г	P2	CC	TT
C14	Xuzhou 22	51.3г	P1	AA	AA
C15	Wenmai № 8	51.7г	P1	AA	AA
C16	Lankao 906	51.7г	P1	AA	AA
C17	Aifeng № 3	34.464г	P2	CC	TT
C18	Lumai № 9	26.45г	P2	CC	TT
C19	Mingxian 169	33.2г	P2	CC	TT
C20	Anhui № 3	18.29г	P2	CC	TT
C21	Qiangchangmai	30.4г	P2	CC	TT
C22	Baidongmai	15.75г	P2	CC	TT
C23	Lanhuamai	28.6г	P2	CC	TT
C24	Baimangmai	29.85г	P2	CC	TT
C25	Baihuamai	24.45г	P2	CC	TT
C26	Chinese Spring	27.35г	P2	CC	TT
C27	Lvhan 328	33.7г	P2	CC	TT
C28	Nongda 139	32.05г	P1	AA	AA
C29	Jingyang 60	27.3г	P2	CC	TT
C30	Yannong 15	34.05г	P2	CC	TT
C31	Baimaizi	24.45г	P2	CC	TT
C32	Mahuaban	20.9г	P2	CC	TT
C33	Hongjinmai	23.4г	P2	CC	TT
C34	Sanyuehuang	28.85г	P2	CC	TT

Из 34 тестируемых сортов пшеницы 15 генотипов являлись гомозиготными по промотору P1, а 19 - гомозиготными по промотору P2. Средняя масса тысячи зерен пшеницы, содержащей промотор P1, составила 45,91 г, а средняя масса тысячи зерен пшеницы, содержащей промотор P2 составила 27,54 г.

При использовании массы тысячи зерен в 35г в качестве порогового значения пшеница с массой тысячи зерен более 35г определялась как пшеница с большой массой тысячи зерен, а пшеница с массой тысячи зерен менее 35г определялась как пшеница с малой массой тысячи зерен. Если тестируемый генотип пшеницы является гомозиготным для промотора P1, линия пшеницы классифицируется как кандидат пшеницы с большой массой тысячи зерен; если тестируемый генотип пшеницы является гомозиготным для промотора P2, линия пшеницы классифицируется как кандидат пшеницы с малой массой тысячи зерен. Точность этого метода для идентификации пшеницы с большой массой тысячи зерен на основании тестирования 34 образцов пшеницы составила 93% (14/15), а точность этого метода для идентификации пшеницы с малой массой тысячи зерен на основании тестирования 34 образцов пшеницы составила 100% (19/19).

В 2002, 2005 и 2006 годах в Лояне, провинция Хэнань были посажены материалы пшеницы для испытаний, их полив и внесение удобрений осуществлялись в обычном порядке. Производили сбор зерна и измерение массы тысячи зерен (TKW), длины зерен (KL) и ширины зерен (KW).

В Таблице 3 показаны результаты для тестируемых материалов пшеницы с генотипом P1 (включая результаты для каждой тестируемой пшеницы и среднее значение для всей тестируемой пшеницы, имеющей указанный генотип). В Таблице 4 показаны результаты для тестируемых материалов пшеницы с генотипом P1/P2 (включая результаты для каждой тестируемой пшеницы и среднее значение для всей тестируемой пшеницы, имеющей указанный генотип). В Таблице 5 показаны результаты для тестируемых материалов пшеницы с генотипом P2 (включая результаты для каждой тестируемой пшеницы и среднее значение для всей тестируемой пшеницы, имеющей указанный генотип). Исходя из общей тенденции, пшеница с генотипом P1 имела большую массу тысячи зерен по сравнению с пшеницей с генотипом P2, и пшеница с генотипом P1 имела большую длину зерна по сравнению с пшеницей с генотипом P2.

Масса тысячи зерен ≥ 35 г определяется как большая масса тысячи зерен, а масса тысячи зерен < 35 г определяется как малая масса тысячи зерен; Длина зерен $\geq 0,65$ мм определялась как большая длина зерен; длина зерен $< 0,65$ мм определялась как малая длина зерен. Пшеница с генотипом P1 была идентифицирована как пшеница с большой массой тысячи зерен и большой длиной зерен, точные результаты показаны в Таблице 3. Пшеница с генотипом P2 была идентифицирована как пшеница с малой массой тысячи зерен и малой длиной зерен, точные результаты показаны в Таблице 5.

Таблица 3

	Номер доступа в базе данных	Генотип SNP488 Промотор SNP2144	2006			2005			2002		
			TKW (г)	KL (мм)	KD (мм)	TKW (г)	KL (мм)	KD (мм)	TKW (г)	KL (мм)	KD (мм)
Dahongmai	ZM010600	AA PI AA	50.764	0.79	0.33	31.71	0.79	0.32	53.4	0.79	0.335
Laomai	ZM003512	AA PI AA	37.338	0.746667	0.3				39.96	0.66	0.27
Xiaobaimang	ZM000556	AA PI AA	43.646	0.67	0.34	45.19	0.673333	0.34	34.88	0.7	0.3
Zhongyou 9507	Не известен	AA PI AA	53.428	0.78	0.34	48.845	0.776667	0.33		0.79	0.36
Jinmai № 8 (Jinzhong 849)	ZM009368	AA PI AA	44.738	0.673333	0.33	38.69	0.656667	0.32	42.62	0.63	0.31
Fengkang № 2 (5248)	ZM013100	AA PI AA	42.376	0.67	0.31	41.5	0.656667	0.35	43.7	0.63	0.33
Changzhi 6406	ZM014022	AA PI AA	47.002	0.703333	0.33	46.94	0.713333	0.35	52.7	0.58	0.335
Beijing № 8	ZM008963	AA PI AA	38.354	0.64	0.33	33.27	0.616667	0.32	37.06	0.63	0.32

Yan'an 11	ZM009627	AA PI AA	42.754	0.713333	0.32	40.65	0.726667	0.31	41.3	0.77	0.305
Nongda 183	ZM009027	AA PI AA	34.962	0.636667	0.29	31.5	0.63	0.29	33.96	0.605	0.29
Nongda 311	ZM009028	AA PI AA	35.128	0.626667	0.3	35.655	0.63	0.3	41.62	0.635	0.31
Nongda 139	ZM009018	AA PI AA	36.646	0.71	0.29	31.495	0.716667	0.28	35.48	0.66	0.295
Dongfanghong № 3	ZM009038	AA PI AA	35.896	0.653333	0.32	42.92	0.686667	0.33	45.42	0.665	0.33
Dahuangpi	ZM006499	AA PI AA	33.79	0.6	0.32	30.69	0.596667	0.3	36.9	0.64	0.315
Sankecun	ZM011213	AA PI AA	53.656	0.79	0.32	53.935	0.816667	0.33	57.56	0.815	0.33
Paozimai	ZM007298	AA PI AA	37.62	0.706667	0.32	35.17	0.72	0.29	39.34	0.705	0.335
Huadong № 6	ZM010184	AA PI AA	34.786	0.61	0.33	35.41	0.593333	0.32	36.82	0.62	0.35
Sumai № 3	ZM010242	AA PI AA	37.698	0.643333	0.34	36.95	0.646667	0.32	39.34	0.63	0.345
Yangmai 158	H01094	AA PI AA	45.07	0.696667	0.34	45.41	0.713333	0.36	49.658	0.69	0.345
Enmai № 4	ZM016244	AA PI AA	45.378	0.71	0.33	42.955	0.696667	0.32	49.2	0.63	0.365
Emai № 6	ZM010314	AA	40.32	0.67	0.35	42.505	0.67	0.33	42.48	0.675	0.35

		<i>PI</i>									
		<i>AA</i>									
Guangtou	ZM004338	<i>AA</i> <i>PI</i> <i>AA</i>	30.08	0.626667	0.29	36.61	0.65	0.28	31.5	0.615	0.32
Kefeng № 3	ZM014679	<i>AA</i> <i>PI</i> <i>AA</i>	37.244	0.613333	0.32	33.6	0.603333	0.31	36.2	0.595	0.32
Xinshuguang № 6	ZM009662	<i>AA</i> <i>PI</i> <i>AA</i>	37.676	0.663333	0.34	41.02	0.68	0.34	42.56	0.63	0.305
Akagomughi (Chixiaomai)	MY000019	<i>AA</i> <i>PI</i> <i>AA</i>	43.668	0.72	0.35	39.425	0.72	0.34	48.58	0.71	0.345
Funo (Afu)	MY001072	<i>AA</i> <i>PI</i> <i>AA</i>	36.414	0.646667	0.33	34.16	0.643333	0.32	37.1	0.62	0.31
Кавказ (Gaojiasuo)	MY003290	<i>AA</i> <i>PI</i> <i>AA</i>	33.79	0.626667	0.34	28.915	0.606667	0.31	35.78	0.61	0.335
St 2422/464 (Zhengyin № 4)	MY002776	<i>AA</i> <i>PI</i> <i>AA</i>	41.088	0.69	0.32	40.31	0.7	0.33	38.38	0.69	0.31
Mentana (Nanda 2419)	MY001904	<i>AA</i> <i>PI</i> <i>AA</i>	38.772	0.706667	0.32	44.145	0.723333	0.32	34.82	0.68	0.34
Orofen (Ourou)	MY002255	<i>AA</i> <i>PI</i> <i>AA</i>	34.2	0.67	0.29	32.755	0.676667	0.3	37.5	0.67	0.3
Nonglin № 10	MY000054	<i>AA</i> <i>PI</i> <i>AA</i>	36.288	0.676667	0.34	38.645	0.676667	0.32	33.7	0.655	0.31
Atlas 66 (Atelasi 66)	MY000295	<i>AA</i> <i>PI</i> <i>AA</i>	41.156	0.713333	0.33	36.705	0.713333	0.32	39.48	0.685	0.305
Taishan № 1	ZM009405	<i>AA</i> <i>PI</i>	42.902	0.686667	0.34	41.53	0.68	0.32	43.68	0.735	0.355

		AA									
Ji'nan № 2	ZM009391	AA PI AA	41.756	0.646667	0.32	40.1	0.643333	0.33	41.94	0.685	0.34
Youbao	ZM009411	AA PI AA	38.578	0.663333	0.31	35.84	0.696667	0.3	36.16	0.635	0.31
Xiannong 39	ZM017208	AA PI AA	42.722	0.726667	0.32	38.39	0.736667	0.31		0.715	0.33
Ji'nan 17	Не известен	AA PI AA	42.72	0.683333	0.35	41.225	0.71	0.33		0.71	0.325
Xiaoyan № 6	ZM017079	AA PI AA	41.712	0.68	0.32	39.165	0.66	0.32	40.76	0.68	0.355
Shannong 7859	ZM017231	AA PI AA	50.572	0.783333	0.35	46.765	0.786667	0.33	55.2	0.815	0.385
Lumai № 1 (Aimengniu)	ZM015830	AA PI AA	45.658	0.696667	0.37	43.67	0.69	0.36	47.64	0.73	0.345
Laizhou 953	ZM022727	AA PI AA	51.328	0.706667	0.36	49.91	0.68	0.35	52.2	0.66	0.355
Zijiehong	ZM002272	AA PI AA	43.944	0.666667	0.32	44.76	0.673333	0.34		0.665	0.31
Zangdong № 4	ZM010580	AA PI AA	42.012	0.71	0.34	34.155	0.693333	0.32	40.76	0.695	0.33
Rikaze № 8	ZM010589	AA PI AA	44.82	0.646667	0.36	42.685	0.63	0.35	42.26	0.635	0.36
Hongmaimang	ZM020720	AA PI AA	35.04	0.67	0.31	34.66				0.635	0.285

Dabaimai	ZM005102	AA PI AA	39.926	0.683333	0.33	35.84	0.65	0.31	35.86	0.63	0.29
Baiqitou	ZM012810	AA PI AA	44.608	0.673333	0.36	39.37	0.643333	0.34	42.12	0.695	0.345
Ganmai № 8	ZM009803	AA PI AA	48.07	0.7	0.35	44.485	0.72	0.32	50.88	0.705	0.345
Gaoyuan 506	ZM010116	AA PI AA	42.266	0.673333	0.35	30.825	0.666667	0.33	41.68	0.675	0.335
Qingchun 28	ZM017383	AA PI AA	49.622	0.72	0.35	45.41	0.723333	0.36	46.98	0.72	0.345
Ningchun № 4 (Yongliang № 4)	ZM017424	AA PI AA	46.684	0.656667	0.36	42.635	0.656667	0.35	48.88	0.655	0.34
Huzhuhong	ZM017354	AA	36.462	0.64	0.32	32.215	0.62	0.3	33.5	0.635	0.325
Jinmai № 4	ZM009972	AA PI AA	51.466	0.723333	0.34	43	0.73	0.33	52.58	0.76	0.34
Dingxi 24	ZM009893	AA PI AA	34.328	0.673333	0.31	31.225	0.656667	0.29	43.24	0.71	0.31
Shuwan № 8	ZM010490	AA PI AA	48.452	0.72	0.34	46.67	0.73	0.34	44.52	0.685	0.355
Bimai 26	ZM023312	AA PI AA	41.96	0.723333	0.35	38.72	0.716667	0.32		0.735	0.295
Guinong № 10	ZM023371	AA PI AA	47.936	0.696667	0.34	39.8	0.683333	0.32		0.715	0.305
Yunmai 34	ZM016965	AA PI AA	44.288	0.7	0.31		0.686667	0.32	41.9	0.715	0.305

Xingyi № 4	ZM023315	AA PI AA	49.84	0.783333	0.34	48.32	0.75	0.32		0.785	0.31
Fengmai 11	ZM010564	AA PI AA	44.156	0.713333	0.32	45.775	0.69	0.33	45.74	0.71	0.33
Hongmangzi	ZM020144	AA PI AA	39.69	0.663333	0.33	35.38	0.66	0.3	48.02	0.715	0.355
Yuqiumai	ZM008636	AA PI AA	37.16	0.603333	0.34	28.9	0.593333	0.3		0.605	0.31
Hongdongmai	ZM005188	AA PI AA	26.644	0.636667	0.29	25.595	0.656667	0.28		0.72	0.235
Wumangchunmai	ZM005336	AA PI AA	33.368	0.663333	0.31	34.06	0.636667	0.3	30.76	0.67	0.26
Xindong № 2	ZM010146	AA PI AA	30.956	0.6	0.33	37.045	0.64	0.33	39.2	0.6	0.335
Zhengmai 9023	Не известен	AA PI AA	51.762	0.723333	0.36	49.51	0.73	0.31			
Yanzhan № 1	Не известен	AA PI AA	49.358	0.673333	0.36						
Среднее значение			41.5596	0.6836	0.33	39.1455	0.6819	0.3213	42.0992	0.6792	0.3243
Точность			50/67	51/67		47/64	48/64		38/45	44/65	

Таблица 4

	Номер доступа в базе данных	Генотип SNP488 Промотор SNP2144	2006		2005			2002			
			TKW (г)	KL (мм)	KW (мм)	TKW (г)	KL (мм)	KW (мм)	TKW (г)	KL (мм)	KW (мм)
Jinghong № 5	ZM008934	AC PI/P2 AT	44.94	0.76	0.34	46.36			47.8		
Youmangbaifu	ZM004418	AC PI/P2 AT	22.646	0.59	0.26	22.625	0.5833 33	0.28		0.55	0.255
Wangshuibai	ZM005740	AC PI/P2 AT	39.748	0.6933 33	0.31	34.235	0.6766 67	0.31	42.62	0.645	0.335
Yangmai	ZM004358	AC PI/P2 AT	29.346	0.6166 67	0.31	30.325	0.6233 33	0.3	32.66	0.585	0.3
Dunhuachunmai	ZM010769	AC PI/P2 AT	32.748	0.61	0.32	31.065	0.6233 33	0.31	35.98	0.645	0.32
Daqingmang	ZM010715	AC PI/P2 AT	27.8	0.66	0.29		0.68	0.28	30.1	0.635	0.295
Xinkehan № 9	ZM022178	AC PI/P2 AT	46.102	0.7366 67	0.33	42.67	0.7366 67	0.32	48.6	0.695	0.315
Xinshuguang № 1	ZM009657	AC PI/P2 AT	39.366	0.7166 67	0.34	39.235	0.7	0.33	49.18	0.685	0.305
Dongnong 101	ZM009732	AC PI/P2 AT	27.898	0.5666 67	0.31	29.02	0.5733 33	0.3	30.14	0.56	0.31
Jichun 1016	ZM021929	AC PI/P2 AT	42.944	0.6966 67	0.35	42.715	0.6966 67	0.34	43.4	0.655	0.305
Triumph	MY002966	AC	38.288	0.67	0.3	39.59	0.7	0.3	41.86	0.71	0.315

(Shenglimai)		<i>PI/P2</i> <i>AT</i>									
Lovrin 10 (Luofulin № 10)	MY001759	<i>AC</i> <i>PI/P2</i> <i>AT</i>	45.8	0.67	0.32	37.715	0.6766 67	0.32	45.26	0.705	0.345
Taizhong 23	ZM013082	<i>AC</i> <i>PI/P2</i> <i>AT</i>	39.574	0.67	0.34	33.715	0.63	0.29	37.32		
Dixiuzao	ZM010368	<i>AC</i> <i>PI/P2</i> <i>AT</i>	50.39	0.7333 33	0.36	47.725	0.68	0.33	48.3	0.68	0.345
Bima № 1	ZM009591	<i>AC</i> <i>PI/P2</i> <i>AT</i>	39.07	0.6266 67	0.34	40.12	0.6433 33	0.34	40.54	0.625	0.345
Bainong 3217	ZM017936	<i>AC</i> <i>PI/P2</i> <i>AT</i>	39.874	0.6933 33	0.33	37.55	0.7133 33	0.33	45.34	0.68	0.305
Shijiazhuang 407	ZM009099	<i>AC</i> <i>PI/P2</i> <i>AT</i>	35.388	0.6566 67	0.31	35.655	0.6633 33	0.33	38.76	0.645	0.31
Wenmai № 6 (Yumai 49)	ZM025398	<i>AC</i> <i>PI/P2</i> <i>AT</i>	48.24	0.6566 67	0.37	47.25	0.64	0.36	47.74	0.605	0.335
Zhengzhou 741	ZM015988	<i>AC</i> <i>PI/P2</i> <i>AT</i>	38.686	0.7433 33	0.31	37.565	0.7266 67	0.32	35.72	0.725	0.315
Baibiansui	ZM001782	<i>AC</i> <i>PI/P2</i> <i>AT</i>	34.802	0.5833 33	0.33	34.08	0.59	0.32	38.96	0.585	0.305
Geerhongmai	ZM019809	<i>AC</i> <i>PI/P2</i> <i>AT</i>	34.932	0.7233 33	0.3	33.03	0.7533 33	0.26	37.42	0.725	0.285
Jiangmai	ZM011774	<i>AC</i> <i>PI/P2</i> <i>AT</i>	35.138	0.6433 33	0.31	28.25	0.65	0.28		0.61	0.3
Yangmai	ZM011644	<i>AC</i> <i>PI/P2</i>	36.512	0.6866 67	0.33	38.455	0.6633 33	0.32	43.68	0.68	0.33

		<i>AT</i>									
Tuokexun № 1	ZM010136	<i>AC</i> <i>P1/P2</i> <i>AT</i>	36.386	0.6433 33	0.33	37.19	0.6666 67	0.3	42.28	0.645	0.345

Таблица 5

	Номер доступа в базе данных	Генотип SNP488 Промотор SNP2144	2006			2005			2002		
			TKW (г)	KL (мм)	KW (мм)	TKW (г)	KL (мм)	KW (мм)	TKW (г)	KL (мм)	KW (мм)
Neimai 11	ZM017834	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	34.934	0.613333	0.33	28.83	0.59	0.31	47.22	0.69	0.335
Jinchun № 3 (Xichun'ai № 2)	ZM014440	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	44.373	0.67	0.35	35.585	0.63	0.32	44.16	0.61	0.33
Lianglaiyou baiqi пшеница	ZM009771	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	36.097	0.653333	0.32				34.92	0.645	0.305
Bihongsui	ZM009772	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	30.56	0.63	0.3		0.633333	0.27	31.38	0.67	0.295
Xiaobaimai	ZM004615	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	30.906	0.68	0.32	38.565	0.66	0.3	35.52	0.675	0.31
Hongpi пшеница	ZM004594	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	30.576	0.68	0.3	25.21	0.68	0.28	28.62	0.61	0.26
Dabaipi	ZM017481	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	33.512	0.686667	0.29	34.555	0.68	0.3	35.36	0.66	0.295
Xiaohongpi	ZM004634	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	32.452	0.673333	0.31	41.375	0.71	0.29	27.62	0.67	0.27
Dingxingzhai	ZM010639	<i>CC</i> <i>P2</i>	27.272	0.613333	0.29	38.575	0.61	0.27	27.7	0.61	0.285

		<i>TT</i>									
Honglidangnianlao	ZM003515	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	31.346	0.61	0.3	30.885	0.61	0.26	32.38	0.63	0.325
Spring пшеница	ZM012632	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	36.908	0.67	0.33	36.625	0.666667	0.29	34.06	0.31	0.15
Huoliaomai	ZM004550	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	30.88	0.65	0.31	28.445	0.643333	0.31	30.7	0.635	0.26
Shaanxibaimai	ZM004922	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	28.138	0.59	0.29	25.17	0.616667	0.28		0.625	0.285
Niuzhijia	ZM001259	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	35.25	0.696667	0.32	37.835	0.716667	0.31		0.74	0.305
Mahuaban	ZM004422	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	23.13	0.59	0.29	23.155	0.596667	0.28		0.59	0.26
Jiahongmai	ZM001284	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	32.724	0.59	0.31	31.74	0.596667	0.31		0.64	0.28
Hongjinmai	ZM020735	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	26.206	0.563333	0.28	21.03	0.573333	0.26	35.42	0.595	0.26
Baiqimai	ZM005012	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	30.674	0.586667	0.31	24.835	0.59	0.27		0.59	0.27
Xiaokouhong	ZM004454	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	31.916	0.61	0.3	27.83	0.59	0.29	30.56	0.615	0.31
Lanhuamai	ZM005017	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	25.818	0.546667	0.3	23.305	0.55	0.28		0.56	0.26
Daimanghongmai	ZM000156	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	29.934	0.603333	0.29	28.925	0.62	0.3	29.58	0.64	0.31

Zhuoludongmai	ZM000474	CC P2 TT	30.03	0.61	0.3	30.215	0.596667	0.29		0.58	0.3
Hongmai	ZM017549	CC P2 TT	34.498	0.626667	0.32	29.5	0.683333	0.3		0.635	0.31
Honglaomai	ZM004174	CC P2 TT	33.05	0.696667	0.3	33.365				0.63	0.225
Hongpidongmai	ZM001138	CC P2 TT	29.084	0.643333	0.31	28.355	0.613333	0.29		0.64	0.265
Panshiwumang	ZM004412	CC P2 TT	28.148	0.653333	0.32				27.64	0.595	0.28
Youmangbaifu	ZM004444	CC P2 TT	23.542	0.58	0.29	21.565	0.586667	0.27		0.585	0.245
Baiqiumai	ZM000540	CC P2 TT	29.296	0.64	0.28	28.61	0.673333	0.27		0.645	0.295
Yuandong 822	ZM013548	CC P2 TT	38.424	0.656667	0.31	38.145	0.63	0.32	41.2	0.645	0.315
Lvhan 328	ZM014050	CC P2 TT	37.95	0.626667	0.33	33.655	0.606667	0.32	38	0.695	0.345
Mingxian 169	ZM009379	CC P2 TT	31.652	0.61	0.32	27.885	0.656667	0.32	30.54	0.63	0.305
Xianmai	ZM003498	CC P2 TT	30.528	0.603333	0.3	28.285	0.583333	0.28		0.63	0.285
Jiangxizao	ZM003464	CC P2 TT	27.064	0.616667	0.29	25.665	0.58	0.25		0.615	0.29
Honghuazao	ZM011345	CC	27.51	0.56	0.28	20.885	0.543333	0.27	23.9	0.57	0.28

		<i>P2</i> <i>TT</i>									
Jiangdongmen	ZM005871	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	31.22	0.613333	0.29	27.03	0.586667	0.29	29.92	0.625	0.31
Chongyanghongmai i 1	ZM011446	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	31.096	0.636667	0.3	26.04	0.606667	0.26	32.8	0.62	0.33
Zaowutian	ZM005992	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	29.49	0.576667	0.29	26.165	0.553333	0.3	26.8	0.58	0.305
Liuzhutou	ZM005540	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	35.82	0.63	0.32	28.925	0.586667	0.3	34.58	0.64	0.295
Chanbuzi	ZM006465	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	37.63	0.653333	0.33	32.77	0.623333	0.31	41.46		
Zhumaoyuanzitou	ZM006579	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	27.14	0.573333	0.31	16.465	0.536667	0.29	27.4	0.55	0.285
Shuilizhan	ZM007343	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	33.524	0.633333	0.32	30.17	0.636667	0.29	34.68	0.635	0.325
Huangshuibai	ZM010980	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	32.004	0.603333	0.3	28.355	0.59	0.31	32.78	0.65	0.325
Baipu (Luoqing)	ZM007246	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	37.374	0.663333	0.31	29.245	0.626667	0.28	36.82	0.63	0.325
Zaoxiaomai	ZM007209	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	39.07	0.626667	0.34	29.91	0.616667	0.3	35.12	0.57	0.315
Lanxi zaoxiaomai	ZM007052	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	33.296	0.61	0.32	28.205	0.606667	0.29	35.74	0.585	0.32
Wuyuanmai	ZM011087	<i>CC</i> <i>P2</i>	36.156	0.7	0.3				39.28	0.66	0.305

		<i>TT</i>									
Chejianzi	ZM006027	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	30.922	0.646667	0.31	28.875	0.66	0.28	31.66	0.6	0.285
Heshangmai	ZM007486	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	29.408	0.606667	0.3	22.75	0.576667	0.26	32.44	0.545	0.29
Nuomai	ZM007438	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	32.982	0.656667	0.32	31.66	0.63	0.3	37.96	0.66	0.31
Mangxiaomai	ZM006015	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	28.694	0.616667	0.23	22.67	0.58	0.25	27.98	0.67	0.3
Liying № 5	ZM015113	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	44.854	0.673333	0.32	39.72	0.653333	0.32	49.36	0.66	0.36
Anhui № 3	ZM010261	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	36.57	0.623333	0.34				42.96	0.614	0.34
Zhemai № 1	H01219	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	31.832	0.64	0.31	29.87	0.613333	0.31	32.6	0.625	0.315
Baiyoumai	ZM004326	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	27.556	0.62	0.32		0.646667	0.31	30.56	0.62	0.27
Huoqiu	ZM004433	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	33.366	0.66	0.3	31.015	0.686667	0.29	31.3	0.655	0.3
Kelao № 4	ZM014682	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	38.26	0.663333	0.31	34.57	0.65	0.28	39.24	0.62	0.295
Suwon 86 (Shuiyuan 86)	MY000140	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	28.388	0.66	0.28	24.495	0.643333	0.26		0.575	0.21
Cheyenne×Early Blackhull (Qianjiaomai)	MY000663	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	36.684	0.673333	0.3	31.44	0.673333	0.27	37.78	0.675	0.3

Early Premium (Zaoyangmai)	MY000898	CC P2 TT	37.094	0.686667	0.29	33.76	0.66	0.3	40.38	0.66	0.295
Odessa № 3	MY003347	CC P2 TT	32.934	0.626667	0.3	28.445	0.616667	0.28	33.16	0.605	0.305
Tanori F71 (Tanuorui F71)	MY002877	CC P2 TT	36.586				0.68	0.28	34.32	0.65	0.295
Villa Glori (Zhongnong 28)	MY003061	CC P2 TT	35.414	0.693333	0.32	26.5	0.703333	0.28	33.28	0.61	0.305
CH12203 (Gansu 96)	ZM009832	CC P2 TT	29.114	0.573333	0.32	25.76	0.59	0.31	31.36	0.605	0.315
Chaoan пшеница	ZM007601	CC P2 TT	36.442	0.623333	0.3	26.605	0.653333	0.3	32.08	0.605	0.3
Chike	ZM007616	CC P2 TT	37.876	0.68	0.33	31.865	0.663333	0.29	33.64	0.625	0.285
Songruimai (№ 4)	ZM007552	CC P2 TT	42.028	0.643333	0.34	28.105	0.606667	0.28	34.62	0.575	0.345
Shengen	ZM007521	CC P2 TT	40.77	0.67	0.32	33.465	0.65	0.3	41.38	0.675	0.345
Shanglin пшеница	ZM007719	CC P2 TT	35.276	0.696667	0.3	26.525	0.7	0.25	27.42	0.545	0.275
Kangxiu № 10	ZM010352	CC P2 TT	35.046	0.626667	0.33	34.86	0.626667	0.33	38.86		
Jinmai 2148	ZM010375	CC P2 TT	47.118	0.716667	0.35	41.305	0.703333	0.33	46.66	0.66	0.33
Jingyang 60 (Xibei)	ZM009648	CC	27.696	0.54	0.32	23.455	0.556667	0.31	23.5	0.53	0.295

60)		<i>P2</i> <i>TT</i>									
Shite 14	ZM009097	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	31	0.636667	0.27	24.415	0.623333	0.27	33.18	0.605	0.325
Fuzhuang 30	ZM017213	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	28.846	0.59	0.3				28.62	0.595	0.315
Bima № 4	ZM009594	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	38.726	0.66	0.33	37.71	0.643333	0.31	29.84	0.585	0.305
Shijiazhuang 54	ZM009101	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	36.944	0.616667	0.32	29.625	0.606667	0.3	37.94	0.63	0.32
Pingyang 27	ZM014027	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	48.19	0.673333	0.33	45.155	0.653333	0.34	50.18	0.705	0.356
Fengchan № 3	ZM009600	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	38.068	0.66	0.31	40.07	0.66	0.31	37.04	0.61	0.31
Yannong 15	ZM015719	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	36.012	0.556667	0.34	35.72	0.57	0.32	34.2	0.565	0.33
Xinong 6028	ZM009597	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	28.692	0.59	0.3		0.6	0.27	44.4	0.635	0.31
12040 (Jimai № 2)	ZM009126	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	45.276	0.683333	0.36	41.85	0.703333	0.34		0.675	0.335
Neixiang № 5	ZM009523	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	45.52	0.716667	0.32	44.255	0.733333	0.33	55.68	0.705	0.35
Zhengzhou № 6	ZM009463	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	42.91	0.706667	0.35	38.225	0.676667	0.34	41.62	0.68	0.34
Aifeng № 3	ZM009603	<i>CC</i> <i>P2</i>	34.464	0.603333	0.31	32.37	0.593333	0.29	35.46	0.605	0.325

		<i>TT</i>									
Baimangmai	ZM000215	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	33.548	0.633333	0.3	28.74	0.6	0.29	32.5	0.625	0.29
Huangguaxian	ZM003050	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	33.058	0.663333	0.29	23.65	0.613333	0.24		0.645	0.205
Banjiemang	ZM002569	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	28.61	0.606667	0.33	26.615	0.59	0.31		0.58	0.265
Laolaixia	ZM001912	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	34.6	0.606667	0.32	31.565	0.616667	0.31	31.56	0.61	0.305
Louguding	ZM001674	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	30.522	0.586667	0.32	28.165	0.576667	0.3	31.94	0.6	0.31
Xishanbiansui	ZM001846	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	32.284	0.586667	0.32				31.32	0.58	0.305
Honggoudou	ZM002681	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	33.116	0.55	0.32	29	0.55	0.31	34.34	0.535	0.325
Baihuomai	ZM001499	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	28.634	0.546667	0.29	26.075	0.543333	0.3		0.545	0.275
Sanyuehuang	ZM002685	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	27.68	0.563333	0.3	21.75	0.55	0.26	25.18	0.565	0.285
Hongqiangchang	ZM003747	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	28.636	0.573333	0.3	22.325	0.556667	0.28	25.24	0.575	0.275
Youzimai	ZM002668	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	34.396	0.593333	0.32	27.33	0.573333	0.3	30.32	0.595	0.285
Pingyuan 50	ZM002974	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	40.224	0.62	0.34	33.775	0.593333	0.32		0.605	0.305

Baiqimai	ZM017630	CC P2 TT	27.684	0.603333	0.31					0.575	0.28
Baituzitou	ZM002330	CC P2 TT	29.43	0.556667	0.31	25.99	0.563333	0.31		0.545	0.265
Younangsaogudan	ZM002659	CC P2 TT	29.514	0.553333	0.33	27.01	0.59	0.3	28.84	0.56	0.3
Fuyanghong	ZM011007	CC P2 TT	30.854	0.603333	0.31				30.54	0.605	0.295
Mazhamai	ZM003807	CC P2 TT	30.03	0.57	0.33	25.94	0.563333	0.3	32.14	0.565	0.35
Qiangchangmai	ZM003793	CC P2 TT	24.166	0.556667	0.3	23.775	0.58	0.27	25.66	0.58	0.285
Huomai	ZM020632	CC P2 TT	22.954	0.553333	0.29					0.585	0.26
Meiqianwu	ZM006160	CC P2 TT	29.99	0.636667	0.3	28.6	0.596667	0.29		0.635	0.3
Jianmai	ZM003080	CC P2 TT	30.926	0.613333	0.31	32.425	0.623333	0.32		0.635	0.255
Sanyuehuang	ZM011120	CC P2 TT	31.022	0.606667	0.32	28.71	0.593333	0.28	29.64	0.595	0.285
Xiaofoshou	ZM002686	CC P2 TT	28.31	0.56	0.3	26.33	0.54	0.31	29.72	0.58	0.315
Hongheshangtou	ZM003393	CC P2 TT	35.58	0.59	0.32	31.03	0.61	0.31		0.595	0.28
Dakoumai	ZM003131	CC	30.756	0.593333	0.31	26.905	0.563333	0.29		0.575	0.265

		<i>P2</i>									
		<i>TT</i>									
Tumangmai	ZM004154	<i>CC</i>									
		<i>P2</i>	32.884	0.586667	0.31	28.855	0.586667	0.3		0.55	0.275
		<i>TT</i>									
Baitiaoyu	ZM003069	<i>CC</i>									
		<i>P2</i>	28.606	0.573333	0.3	25.07				0.58	0.295
		<i>TT</i>									
Baimangmai	ZM003650	<i>CC</i>									
		<i>P2</i>	26.98	0.59	0.29	28.685	0.6	0.29	28.38	0.585	0.275
		<i>TT</i>									
Dayuhua	ZM006348	<i>CC</i>									
		<i>P2</i>	30.738	0.566667	0.31	27.885	0.56	0.3		0.59	0.305
		<i>TT</i>									
Fumai	ZM003145	<i>CC</i>									
		<i>P2</i>	34.164	0.613333	0.31	28.245	0.593333	0.29		0.64	0.29
		<i>TT</i>									
Laoqimai	ZM003663	<i>CC</i>									
		<i>P2</i>	33.552	0.66	0.34	29.225	0.613333	0.3	34.82	0.62	0.33
		<i>TT</i>									
Chushanbao	ZM003138	<i>CC</i>									
		<i>P2</i>	37.904	0.63	0.34					0.615	0.305
		<i>TT</i>									
Dalibanmang	ZM001742	<i>CC</i>									
		<i>P2</i>	38.622	0.626667	0.34	41.05	0.656667	0.35	41.78	0.625	0.34
		<i>TT</i>									
Liuyuehuang	ZM005141	<i>CC</i>									
		<i>P2</i>	41.752	0.74	0.32	30.59	0.723333	0.33	38	0.705	0.305
		<i>TT</i>									
Gejiaxiang	ZM012971	<i>CC</i>									
		<i>P2</i>	41.702	0.736667	0.32	37.38	0.736667	0.31	49.5	0.765	0.325
		<i>TT</i>									
Dachunbaisilengmai 2	ZM011525	<i>CC</i>									
		<i>P2</i>	40.936	0.723333	0.31	37.695	0.726667	0.31	42.52	0.715	0.325
		<i>TT</i>									
Bailanghuimai	ZM018849	<i>CC</i>									
		<i>P2</i>	37.18	0.676667	0.32	37.7	0.696667	0.32	38.56	0.695	0.37

		<i>TT</i>									
Bendihuanghuamai	ZM011565	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	36.292	0.64	0.34	40.915	0.65	0.34	31.2	0.635	0.33
Zhahong	ZM018528	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	37.982	0.713333	0.33	39.765	0.703333	0.31	36.3	0.68	0.315
Motuo пшеница	ZM019907	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	27.44	0.633333	0.3		0.636667	0.29	25.68	0.625	0.275
Bianbachunmai-6	ZM018930	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	29.752	0.646667	0.3	31.875	0.653333	0.29	26.824	0.625	0.27
Baimang пшеница	ZM008341	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	30.708	0.61	0.3	26.88	0.596667	0.27	27.42	0.62	0.28
Wujiangzhuo	ZM020305	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	39.61	0.726667	0.32	33.51	0.733333	0.3	43.4	0.75	0.33
Muzongzhuoga	ZM018569	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	32.164	0.6	0.32	30.66	0.606667	0.29	31.04	0.595	0.31
Kangding пшеница	ZM008347	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	40.994	0.626667	0.33	38.65	0.61	0.31	39.5	0.59	0.355
Rikaze № 54	ZM010591	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	39.87	0.68	0.31	32.65	0.68	0.29	40.98	0.695	0.345
Shanmai	ZM020774	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	36.138	0.68	0.31	36.28	0.63	0.28	38.36	0.675	0.305
Yizhimai	ZM004779	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	37.226	0.67	0.32	41.27	0.686667	0.29		0.675	0.29
Dabaimai	ZM012760	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	38.965	0.683333	0.34	38.03	0.71	0.31		0.725	0.29

Galaohan	ZM005105	CC P2 TT	37.453	0.703333	0.31	37.85	0.72	0.3	38.86	0.72	0.295
Huoliyan	ZM012793	CC P2 TT	39.079	0.696667	0.31	37.555	0.68	0.28		0.69	0.28
Shanmai	ZM020770	CC P2 TT	36.682	0.76	0.3	23.135			35.26	0.705	0.31
Hongtuzi	ZM020815	CC P2 TT	31.918	0.686667	0.32	29.225	0.673333	0.31	39.98	0.645	0.285
Baidatou	ZM004862	CC P2 TT	39.268	0.613333	0.34	47.505	0.606667	0.33			
Jinhuangmai	ZM004780	CC P2 TT	42.294	0.703333	0.34	28.91	0.72	0.33		0.71	0.305
Baimazha	ZM020808	CC P2 TT	32.126	0.576667	0.32	29.245	0.59	0.28	31.6	0.595	0.32
Laotutou	ZM004670	CC P2 TT	32.752	0.666667	0.31	27.185	0.75	0.27	33.4	0.615	0.26
Huining № 10	ZM017313	CC P2 TT	42.66	0.66	0.34	36.475	0.683333	0.31	47.54	0.735	0.33
Fan 6	ZM010450	CC P2 TT	38.66	0.63	0.35	38.415	0.623333	0.34	36.92	0.6	0.33
Tongjiaba пшеница	ZM007916	CC P2 TT	29.916	0.64	0.31	32.88	0.646667	0.31	35.02	0.625	0.305
Honghuamai	ZM007925	CC P2 TT	32.86	0.646667	0.36	32.135	0.646667	0.32		0.63	0.295
Baimaizi	ZM008547	CC	25.444	0.603333	0.32	26.425	0.6	0.3	29.3	0.555	0.33

		<i>P2</i> <i>TT</i>									
Chengdu guangtou	ZM008365	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	31.698	0.643333	0.32	28.015	0.62	0.3	33.6	0.64	0.335
Baihuamai	ZM008598	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	23.704	0.563333	0.28	19.38	0.556667	0.27	24.04	0.585	0.27
Huanxiangguo	ZM008249	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	34.84	0.613333	0.31	31.11	0.613333	0.31	33.5	0.6	0.305
Hanzhongbai	ZM004029	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	31.29	0.63	0.32	30.595	0.643333	0.33	32.52	0.575	0.305
Xiaosanyuehuang	ZM012165	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	31.93	0.613333	0.31	33.18	0.63	0.31	38.34	0.645	0.32
Suotiaohongmai	ZM012711	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	30.642	0.616667	0.3	31.455	0.646667	0.31	32.62	0.655	0.295
Hongxumai	ZM012545	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	32.878	0.623333	0.31	32.63	0.65	0.31	33.28	0.67	0.315
Zipi	ZM011741	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	26.502	0.61	0.26	21.395	0.623333	0.23	25.468	0.655	0.26
Baimangmai	ZM008732	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	26.842	0.56	0.3	21.42	0.55	0.26	26.56	0.575	0.29
Yangmai	ZM012030	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	27.73	0.586667	0.29	23.325	0.606667	0.27	29.02	0.62	0.285
Zhushimai	ZM008809	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	33.664	0.66	0.3	28.83	0.643333	0.28	32.34	0.645	0.27
Biantouguangkemai	ZM012032	<i>CC</i> <i>P2</i>	25.848	0.573333	0.31	25.85	0.59	0.3	27.99	0.605	0.305

		<i>TT</i>									
Changmangshibiantou	ZM011859	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	24.094	0.573333	0.28	22.385	0.606667	0.26	30.76	0.605	0.285
Zhugoumai	ZM012061	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	31.776	0.643333	0.3	30.025	0.663333	0.28	33.26	0.645	0.295
Dianxi hongkeyangmai	ZM012096	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	36.996	0.653333	0.32		0.68	0.3	39.92	0.655	0.31
Baidongmai	ZM005439	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	25.724	0.593333	0.3	29.07	0.61	0.31	23.78	0.625	0.27
Hongchunmai	ZM005294	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	41.998	0.736667	0.29	43.505	0.74	0.31	37.7	0.76	0.275
Chunmai	ZM013048	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	36.618	0.696667	0.31					0.67	0.3
Hongdongmai	ZM005241	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	32.712	0.69	0.31	32.325	0.696667	0.29		0.705	0.26
Hongchunmai	ZM005317	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	34.068	0.64	0.31	39.36	0.683333	0.32		0.645	0.28
Hongjinbaoyin	ZM013034	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	49.944	0.73	0.34	44.72	0.74	0.33		0.695	0.325
Hongdongmai	ZM005176	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	27.096	0.706667	0.31	30.725	0.696667	0.28		0.695	0.255
Wumangchunmai	ZM005330	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	33.494	0.643333	0.31	36.7	0.683333	0.3		0.64	0.3
Kashi № 1	H02027	<i>CC</i> <i>P2</i> <i>TT</i>	36.364	0.676667	0.33					0.66	0.305

Kashi baiqi	ZM010128	CC P2 TT	43.326	0.723333	0.32	33.8	0.73	0.3	42.92	0.72	0.345
Chinese Spring	ZM005452	CC P2 TT	29.336	0.596667	0.31	25.065	0.573333	0.29	25.62	0.58	0.33
Среднее значение			33.4308	0.6330	0.3119	30.7148	0.6306	0.2960	34.2130	0.6260	0.2992
Точность			109/171	109/170		120/153	100/156		78/126	120/168	

Пример 5 Идентификация II SNP488 и SNP 2144 и разработка специфических наборов праймеров

I. Исследование специфических SNP

Линии пшеницы для тестирования В качестве материалов для изучения полиморфного сайта были отобраны 34 линии пшеницы, которые распределены по разным областям Китая, где выращивается пшеница, с сильно различающимися признаками зерна (№№ C1-34, более подробная информация о материалах приведена В Таблице 21).

2. Выравнивание последовательностей

В отношении каждой тестируемой линии пшеницы осуществлялись следующие этапы:

1. Осуществляли экстракцию геномной ДНК из тестовых материалов пшеницы.
2. С использованием в качестве матрицы молекулы ДНК, экстрагированной на этапе 1, для ПЦР-амплификации использовали набор праймеров, состоящий из TaTPP-F1 и TaTPP-R1, с получением продукта ПЦР-амплификации.

TaTPP-F1 (SEQ ID NO: 4): 5'-CGTGTGGTTGTTTGCGTG-3';

TaTPP-R1 (SEQ ID NO: 5): 5'-CTAGATATAGGCGAGGGTTATTAC-3'.

3. Продукт ПЦР-амплификации, полученный на этапе 2, подвергали клонированию и секвенированию. Для каждой линии пшеницы производилось секвенирование 24 клонов.

4. Осуществляли сборку и выравнивание последовательностей.

Производили анализ сборки и выравнивания последовательности генома А в отношении результатов секвенирования 24 клонов каждого материала пшеницы. Были получены два продукта ПЦР-амплификации для генома А из разных линий пшеницы. Два продукта ПЦР-амплификации

имели длину 2254 т. п. н., их 5'-конец был совместим с TaTPP-F1, а 3'-конец был обратно комплементарен TaTPP-R1, однако один продукт ПЦР-амплификации содержал нуклеотиды в положениях 467-514 с 5'-конца в соответствии с SEQ ID NO: 19, а другой продукт амплификации ПЦР содержал нуклеотиды в положениях 467-514 с 5'-конца в соответствии с SEQ ID NO: 20. Аналогичный результат наблюдался при анализе положений 2121-2168. Один продукт ПЦР-амплификации содержал нуклеотиды в положениях 2121-2168 с 5'-конца в соответствии с SEQ ID NO: 25, а другой продукт амплификации ПЦР содержал нуклеотиды в положениях 2121-2168 с 5'-конца в соответствии с SEQ ID NO: 26.

На основе выравнивания последовательностей продуктов ПЦР-амплификации из всех тестируемых линий пшеницы был обнаружен один SNP с A/C-полиморфизмом и обозначен как 488 SNP, а также был обнаружен другой SNP с A/T-полиморфизмом и обозначен как 2144 SNP. 488 SNP соответствовал нуклеотиду в положении 22 с 5'-конца SEQ ID NO:24, а 2144 SNP соответствовал нуклеотиду в положении 30 с 5'-конца SEQ ID NO: 30.

В Таблице 1 показан генотип на основе 488 SNP и генотип на основе 2144 SNP каждой тестируемой линии пшеницы.

II. Разработка специфических наборов праймеров

На основании специфических SNP в соответствии с описанием выше были созданы следующие наборы праймеров на основе KASP:

488F1 (SEQ ID NO: 21):

5'-GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGTCGTGTTCCCTGGACTACGAC-3';

488F2 (SEQ ID NO: 22):

5'-GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGGTCGTGTTCCCTGGACTACGAA-3';

488C (SEQ ID NO: 23):

5'-TCGGCGACGATGGGCGAGAGCGT-3'.

На основании специфических SNP в соответствии с описанием выше были созданы следующие наборы праймеров на основе KASP:

2144F1 (SEQ ID NO: 27):

5'-GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCACAGACTGCCACATCAGCGGCT-3';

2144F2 (SEQ ID NO: 28):

5'-GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTTCACAGACTGCCACATCAGCGGCA-3';

2144C (SEQ ID NO: 29):

5'-TCTTGATAAATCAGTGCCAGGAG-3'.

III. Использование специфических наборов праймеров для анализа большей коллекции линий пшеницы.

Праймеры использовали для анализа различных сортов пшеницы, указанных в таблицах 3, 4 и 5, в этих таблицах приведены результаты такого анализа.

В Таблице 3 показаны результаты для тестируемых материалов пшеницы с генотипом AA для SNP 488 или генотипом AA для SNP 2144 (включая результаты для каждой тестируемой пшеницы и среднее значение для всей тестируемой пшеницы, имеющей указанный генотип). В Таблице 4 показаны результаты для тестируемых материалов пшеницы с генотипом A/C для SNP 488 или генотипом A/T для SNP 2144 (включая результаты для каждой тестируемой пшеницы и среднее значение для всей тестируемой пшеницы, имеющей указанный генотип). В Таблице 5 показаны результаты для тестируемых материалов пшеницы с генотипом CC для SNP 488 или генотипом TT для SNP 2144 (включая результаты для каждой тестируемой пшеницы и среднее значение для всей тестируемой пшеницы, имеющей указанный генотип). Исходя из общей тенденции, пшеница с генотипом AA для SNP 488 или генотипом AA для SNP 2144 имела большую массу тысячи зерен по сравнению с пшеницей с генотипом CC для SNP 488 или генотипом TT для SNP 2144, и пшеница с генотипом AA для SNP 488 или генотипом AA SNP для 2144 имела большую длину зерна по сравнению с пшеницей с генотипом CC для SNP 488 или генотипом TT для SNP 2144.

IV. Анализ корреляции для SNP 488

Для тестируемых материалов пшеницы был проведен анализ корреляции сортов в отношении селекции, результаты такого анализа приведены в Таблице 6. В соответствии с этими результатами трехгодичная средняя масса тысячи зерен составляла 41,50 г для тестируемой пшеницы генотипа AA и 36,45 г для тестируемой пшеницы генотипа CC, что показывает весьма значительную разницу ($P < 0,01$); по характеристике длины зерна материал пшеницы генотипа AA имел большую длину зерна по сравнению с материалом пшеницы генотипа CC, что показывает значительную или весьма значительную разницу ($P < 0,05$ или $P < 0,01$). Как можно видеть, по сравнению с генотипом CC генотип AA является генотипом с преимущественными характеристиками зерна.

Таблица 6

Сорта для селекции	2002			2005			2006		
	AA	CC	P	AA	CC	P	AA	CC	P
масса тысячи зерен (г)	42.39±5.74	38.50±6.97	0.018*	39.87±5.46	33.84±5.93	0.000**	42.25±5.58	37.03±5.55	0.000**
длина зерна (мм)	0.68±0.054	0.64±0.05	0.002**	0.68±0.04	0.64±0.04	0.000**	0.69±0.04	0.65±0.04	0.000**
ширина зерна (мм)	0.33±0.02	0.32±0.03	0.053	0.32±0.02	0.31±0.02	0.000**	0.33±0.02	0.32±0.02	0.009**

Примечание: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Для тестируемых материалов пшеницы был проведен анализ корреляции в местных сортах в отношении селекции, результаты такого анализа приведены в Таблице 7. В соответствии с этими результатами трехгодичная средняя масса тысячи зерен составляла 38,9 г для тестируемой пшеницы генотипа AA и 31,55 г для тестируемой пшеницы генотипа CC, что показывает весьма значительную разницу ($P < 0,01$); по характеристике длины зерна материал пшеницы генотипа AA имел большую длину зерна по сравнению с материалом пшеницы генотипа CC, что показывает значительную или весьма значительную разницу ($P < 0,05$ или $P < 0,01$). Как можно видеть, по сравнению с генотипом CC генотип AA является генотипом с преимущественными характеристиками зерна.

Таблица 7

Местные сорта	2002			2005			2006		
	AA	CC	P	AA	CC	P	AA	CC	P
масса тысячи зерен (г)	40.94±8.71	32.57±5.00	0.000**	36.56±7.35	29.68±6.29	0.001**	39.15±7.30	32.40±4.80	0.000**
длина зерна (мм)	0.68±0.60	0.62±0.06	0.010**	0.67±0.07	0.63±0.05	0.009**	0.68±0.06	0.63±0.05	0.001**
ширина зерна (мм)	0.31±0.03	0.30±0.03	0.258	0.31±0.02	0.29±0.02	0.020	0.32±0.02	0.31±0.02	0.065

Примечание: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

V. Анализ корреляции для SNP 2144

Аналогичный анализ был проведен для SNP2144

Местные сорта	2002			2005			2006		
	<i>AA</i>	<i>TT</i>	<i>P</i>	<i>AA</i>	<i>TT</i>	<i>P</i>	<i>AA</i>	<i>TT</i>	<i>P</i>
масса тысячи зерен (г)	42.39±5.74	38.50±6.97	0.018*	39.87±5.46	33.84±5.93	0.000**	42.25±5.58	37.03±5.55	0.000**
длина зерна (мм)	0.68±0.054	0.64±0.05	0.002**	0.68±0.04	0.64±0.04	0.000**	0.69±0.04	0.65±0.04	0.000**
ширина зерна (мм)	0.33±0.02	0.32±0.03	0.053	0.32±0.02	0.31±0.02	0.000**	0.33±0.02	0.32±0.02	0.009**

Примечание: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

VI. Анализ корреляции для P1/P2 промоторов

Аналогичный анализ был проведен для P1/P2

Местные сорта	2002			2005			2006		
	P1	P2	<i>P</i>	P1	P2	<i>P</i>	P1	P2	<i>P</i>
масса тысячи зерен (г)	42.39±5.74	38.50±6.97	0.018*	39.87±5.46	33.84±5.93	0.000**	42.25±5.58	37.03±5.55	0.000**
длина зерна (мм)	0.68±0.054	0.64±0.05	0.002**	0.68±0.04	0.64±0.04	0.000**	0.69±0.04	0.65±0.04	0.000**
ширина зерна (мм)	0.33±0.02	0.32±0.03	0.053	0.32±0.02	0.31±0.02	0.000**	0.33±0.02	0.32±0.02	0.009**

Примечание: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Пример 6 Идентификация различных гаплотипов на основании SNP в промоторной области TaTPP-7A и кодирующей последовательности.

На Фигуре 6 приводится сводная информация по различным гаплотипам для SNP, обнаруженным в промоторной области TaTPP-7A, и кодирующей последовательности, которые могут быть идентифицированы при анализе большой панели сортов пшеницы.

Гаплотип I (Нар I) представляет следующие аллели для различных SNP

- SNP409/410: TG
- SNP493 T
- SNP1208: A
- SNP 1708: T
- SNP1980: G
- SNP 488: A
- SNP1300: T
- SNP 2144:A

Гаплотип II (Нар II) представляет следующие аллели для различных SNP

- SNP409/410: TCG
- SNP493 C
- SNP1208: G
- SNP 1708: G
- SNP1980: A
- SNP 488: C
- SNP1300: C
- SNP 2144:T

Гаплотип III (Нар III) представляет следующие аллели для различных SNP

- SNP409/410: TCG
- SNP493 C
- SNP1208: G
- SNP 1708: G
- SNP1980: G
- SNP 488: C
- SNP1300: T
- SNP 2144:T

На Фигуре 8а показана относительная встречаемость гаплотипов у китайских сортов пшеницы на протяжении времени. В то время как в 1930-х годах все проанализированные китайские сорта имели гаплотип Нар II (средний столбец), с 1940-х годов относительная встречаемость гаплотипа Нар I стабильно увеличивалась (левый столбец), тогда как встречаемость Нар II (средний столбец) и Нар III постепенно уменьшалась. Это коррелировало с увеличением массы тысячи ядер (указана пунктирной линией) с течением времени. На Фигуре 8, Панель В, представлено географическое распределение различных гаплотипов. В Китае большинство проанализированных линий пшеницы проявляют гаплотип Нар I. В Российской Федерации также преобладает гаплотип Нар I, однако наличие Нар III также является значительным, кроме того, представлен даже Нар II. В Северной и Центральной Америке, Европе и Австралии в анализируемых линиях преобладает Нар III, при этом распространение Нар I относительно незначительно.

Формула изобретения

1. Белок, имеющий ферментативную активность трегалоза-6-фосфатфосфатазы, выбранный из:

- a. белка, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;
- b. белка, содержащего аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1;
- c. белка, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, причем один или более аминокислотных остатков замещены, удалены или вставлены, и причем наличие белка связано с увеличенной длиной зерна, шириной зерна или с увеличенной массой тысячи зерен, такого как белок в соответствии с SEQ ID NO: 1, в котором остаток Asp в положении 112 замещен остатком Glu, и/или в котором остаток Ala в положении 241 замещен остатком Val.

2. Нуклеиновая кислота, такая как молекула ДНК или РНК, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую белок по п. 1.

3. Нуклеиновая кислота по п. 2, отличающаяся тем, что указанная нуклеиновая кислота выбрана из:

- a. нуклеиновой кислоты, такой как молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2;
- b. нуклеиновой кислоты, такой как молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 от нуклеотидного положения 23 до нуклеотидного положения 2115;
- c. нуклеиновой кислоты, такой как молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3;
- d. нуклеиновой кислоты, такой как молекула ДНК, которая гибридизирует с молекулой ДНК по любому из пунктов а – с выше в жестких условиях и кодирует белок по п. 1;
- e. нуклеиновой кислоты, такой как молекула ДНК, которая содержит нуклеотидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 3 от нуклеотидного положения 23 до нуклеотидного положения 2115 или нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 2.

4. Рекombинантная кассета экспрессии, содержащая следующие функционально связанные элементы ДНК:

- a. промотор, экспрессируемый в растениях, такой как промотор, гетерологически экспрессируемый в растениях;
- b. область ДНК, кодирующая белок по п. 1, или область ДНК по п. 2;
- c. область ДНК, которая представляет собой участок терминации транскрипции и полиаденилирования, например, участок терминации транскрипции и полиаденилирования, который является функциональным в растениях.

5. Рекombинантный вектор экспрессии, трансгенная клеточная линия, ткань трансгенного растения, трансгенное растение или рекombинантная линия, или зерно, или семя, содержащие нуклеиновую кислоту по п. 2 или 3 или рекombинантную кассету экспрессии по п. 4.

6. Растение по п. 5, которое представляет собой зерновую культуру, такую как пшеница.

7. Применение белка по п. 1 или нуклеиновой кислоты по п. 2 или 3, или рекombинантной кассеты экспрессии по п. 4 или рекombинантного вектора экспрессии по п. 5 для:

a. регулирования размера зерен растения, например, увеличения или уменьшения длины зерен или ширины зерен, в частности, зерен растений пшеницы;

b. увеличения размера зерен растения, в частности, зерен растений пшеницы;

c. регулирования массы тысячи зерен растения, например, увеличения или уменьшения длины зерен или ширины зерен, в частности, зерен растений пшеницы;

d. увеличения массы тысяч зерен, в частности, зерен растений пшеницы;

e. регулирования массы зерен растения, например, увеличения или уменьшения длины зерен или ширины зерен, в частности, зерен растений пшеницы;

f. увеличения массы зерен растения, в частности, зерен растений пшеницы;

g. регулирования длины зерен растения, например, увеличения или уменьшения длины зерен или ширины зерен, в частности, зерен растений пшеницы;

h. увеличения длины зерен растения, в частности, зерен растений пшеницы;

i. регулирования ширины зерен растения, например, увеличения или уменьшения длины зерен или ширины зерен, в частности, зерен растений пшеницы;

j. увеличения ширины зерен растения, в частности, зерен растений пшеницы;

k. регулирования толщины зерен растения, например, увеличения или уменьшения длины зерен или ширины зерен, в частности, зерен растений пшеницы;

l. увеличения толщины зерен растения, в частности, зерен растений пшеницы;

m. увеличения длины побегов растений, в частности, зерновых культур, таких как пшеница;

n. увеличения длины колосьев растений, в частности, зерновых культур, таких как пшеница;

o. увеличения выхода зерен растений, таких как зерновые культуры, такие как пшеница.

8. Способ получения растений, таких как зерновые культуры, включая растения пшеницы, включающий следующие этапы:

a) увеличение уровня и/или активности белка по п. 1; или

b) увеличение экспрессии нуклеиновой кислоты по п. 2 или 3 в клетке растения или в растении;

c) введение рекombинантной кассеты экспрессии по п. 4 в клетку растения или в растение, с получением трансгенного растения,

причем растение имеет

1) увеличенную массу тысячи зерен по сравнению с указанным исходным растением или контрольным растением;

2) увеличенную массу зерен по сравнению с указанным исходным растением или контрольным растением;

3) увеличенный размер зерен по сравнению с указанным исходным растением или контрольным растением;

4) увеличенную длину зерен по сравнению с указанным исходным растением или контрольным растением;

5) увеличенную ширину зерен по сравнению с указанным исходным растением или контрольным растением;

6) увеличенную толщину зерен по сравнению с указанным исходным растением или контрольным растением;

7) увеличенную длину побегов по сравнению с указанным исходным растением или контрольным растением;

8) увеличенную длину колосьев по сравнению с указанным исходным растением или контрольным растением;

9) увеличенное количество зерен по сравнению с указанным исходным растением или контрольным растением; или

10) увеличенный выход зерен по сравнению с указанным исходным растением или контрольным растением.

9. Способ

(1) увеличения массы тысячи зерен;

(2) увеличения массы зерен;

(3) увеличения размера зерен;

(4) увеличения длины зерен;

(5) увеличения ширины зерен;

(6) увеличения толщины зерен;

(7) увеличения длины побегов растений;

(8) увеличения длины колосьев растений;

(9) увеличения количества зерен у растений; или

(10) увеличения выхода зерен у растений;

включающий этап увеличения содержания белка или активности белка по п. 1 в растении, таком как зерновая культура, включая растения пшеницы.

10. Применение белка по п. 1 или нуклеиновой кислоты по п. 2 или 3, или способа по п. 7 для разведения растений.

11. Изолированная промоторная область, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO: 15, или нуклеотидную последовательность, имеющую с ней, по меньшей мере, 90%, 95% или 99% идентичности последовательности.

12. Рекомбинантный ген, содержащий следующие функционально связанные фрагменты ДНК:

a. промоторную область, как описано в п. 11;

b. область ДНК, кодирующую целевую молекулу РНК или целевой белок;

c. участок терминирования транскрипции и полиаденилирования, который является функциональным в клетках растения.

13. Растение, такое как зерновая культура, включая растение пшеницы, содержащее рекомбинантный ген по п. 12.

14. Способ идентификации или содействия в идентификации характеристик зерна пшеницы, включающий следующий этап:

определение того, является ли генотип на основе сайта 488 SNP в геномной ДНК тестируемой пшеницы генотипом AA, генотипом AC или генотипом CC; при этом пшеница генотипа AA имеет лучшие характеристики зерна, чем пшеница генотипа CC;

улучшенные характеристики зерна проявляются как увеличенная масса тысячи зерен и/или большая длина зерна;

сайт 488 SNP относится к нуклеотиду в положении 22 с 5'-конца SEQ ID NO: 24.

15. Способ определения или содействия в определении массы тысячи зерен пшеницы, включающий следующий этап:

определение того, является ли генотип на основе сайта 488 SNP в геномной ДНК тестируемой пшеницы генотипом AA, генотипом AC или генотипом CC; если генотип является генотипом AA, то тестируемую пшеницу отбирают в качестве кандидата пшеницы с большой массой тысячи зерен; если генотип является генотипом CC, тестируемую пшеницу отбирают в качестве кандидата пшеницы с малой массой тысячи зерен;

при этом термин «пшеница с большой массой тысячи зерен» относится к пшенице с массой тысячи зерен ≥ 35 г; а термин «пшеница с малой массой тысячи зерен» относится к пшенице с массой тысячи зерен < 35 г;

сайт 488 SNP относится к нуклеотиду в положении 22 с 5'-конца SEQ ID NO:24.

16. Способ определения или содействия в определении массы зерен пшеницы, включающий следующий этап:

определение того, является ли генотип на основе сайта 488 SNP в геномной ДНК тестируемой пшеницы генотипом AA, генотипом AC или генотипом CC; если генотип является генотипом AA, то тестируемую пшеницу отбирают в качестве кандидата пшеницы с большой длиной зерна; если генотип является генотипом CC, тестируемую пшеницу отбирают в качестве кандидата пшеницы с малой длиной зерна;

при этом термин «пшеница с большой длиной зерна» относится к пшенице с длиной зерен $\geq 0,65$ мм; а термин «пшеница с малой длиной зерна» относится к пшенице с длиной зерен $< 0,65$ мм;

сайт 488 SNP относится к нуклеотиду в положении 22 с 5'-конца SEQ ID NO:24.

17. Применение материала для определения генотипа на основе сайта 488 SNP в геномной ДНК пшеницы, для идентификации или содействия в идентификации характеристик зерна пшеницы; при этом характеристиками зерна являются масса тысячи зерен и/или длина зерен.

18. Набор праймеров I, который состоит из 488F1, 488F2 и 488C;

определение указанного праймера 488F1 приведено в нижеследующих пунктах (b1) или (b2):

(b1) молекула одноцепочечной ДНК в соответствии с SEQ ID NO:21;

(b2) молекула ДНК, полученная путем замещения и/или удаления, и/или добавления одного или более нуклеотидов в SEQ ID NO:21 и имеющая одинаковую функцию с SEQ ID NO:21;

определение указанного праймера 488F2 приведено в нижеследующих пунктах (b3) или (b4):

(b3) молекула одноцепочечной ДНК в соответствии с SEQ ID NO:22;

(b4) молекула ДНК, полученная путем замещения и/или удаления, и/или добавления одного или более нуклеотидов в SEQ ID NO:22 и имеющая одинаковую функцию с SEQ ID NO:22;

определение указанного праймера 488C приведено в нижеследующих пунктах (b5) или (b6):

(b5) молекула одноцепочечной ДНК в соответствии с SEQ ID NO:23;

(b6) молекула ДНК, полученная путем замещения и/или удаления, и/или добавления одного или более нуклеотидов в SEQ ID NO:23 и имеющая одинаковую функцию с SEQ ID NO:23.

19. Применение набора праймеров по п. 18

для идентификации или содействия в идентификации характеристик зерна пшеницы; при этом характеристиками зерна являются масса тысячи зерен и/или длина зерна; или

для идентификации или содействия в идентификации массы тысячи зерен пшеницы; или

для идентификации или содействия в идентификации длины зерен пшеницы.

20. Способ идентификации или содействия в идентификации характеристик зерна пшеницы, включающий следующий этап:

определение того, является ли генотип на основе сайта 2144 SNP в геномной ДНК тестируемой пшеницы генотипом АА, генотипом АТ или генотипом ТТ; при этом пшеница генотипа АА имеет лучшие характеристики зерна, чем пшеница генотипа ТТ;

улучшенные характеристики зерна проявляются как увеличенная масса тысячи зерен и/или большая длина зерна;

сайт 2144 SNP относится к нуклеотиду в положении 24 с 5'-конца SEQ ID NO: 30.

21. Способ определения или содействия в определении массы тысячи зерен пшеницы, включающий следующий этап:

определение того, является ли генотип на основе сайта 2144 SNP в геномной ДНК тестируемой пшеницы генотипом АА, генотипом АТ или генотипом ТТ; если генотип является генотипом АА, то тестируемую пшеницу отбирают в качестве кандидата пшеницы с большой массой тысячи зерен; если генотип является генотипом ТТ, тестируемую пшеницу отбирают в качестве кандидата пшеницы с малой массой тысячи зерен;

при этом термин «пшеница с большой массой тысячи зерен» относится к пшенице с массой тысячи зерен ≥ 35 г; а термин «пшеница с малой массой тысячи зерен» относится к пшенице с массой тысячи зерен < 35 г;

сайт 2144 SNP относится к нуклеотиду в положении 24 с 5'-конца SEQ ID NO:30.

22. Способ определения или содействия в определении массы зерен пшеницы, включающий следующий этап:

определение того, является ли генотип на основе сайта 2144 SNP в геномной ДНК тестируемой пшеницы генотипом АА, генотипом АТ или генотипом ТТ; если генотип является генотипом АА, то тестируемую пшеницу отбирают в качестве кандидата пшеницы с большой длиной зерна; если генотип является генотипом ТТ, тестируемую пшеницу отбирают в качестве кандидата пшеницы с малой длиной зерна;

при этом термин «пшеница с большой длиной зерна» относится к пшенице с длиной зерен $\geq 0,65$ мм; а термин «пшеница с малой длиной зерна» относится к пшенице с длиной зерен $< 0,65$ мм; сайт 2144 SNP относится к нуклеотиду в положении 24 с 5'-конца SEQ ID NO:30.

23. Применение материала для определения генотипа на основе сайта 2144 SNP в геномной ДНК пшеницы, для идентификации или содействия в идентификации характеристик зерна пшеницы; при этом характеристиками зерна являются масса тысячи зерен и/или длина зерен.

24. Набор праймеров I, который состоит из 2144F1, 2144F2 и 2144C;

определение указанного праймера 2144F1 приведено в нижеследующих пунктах (b1) или (b2):

(b1) молекула одноцепочечной ДНК в соответствии с SEQ ID NO:27;

(b2) молекула ДНК, полученная путем замещения и/или удаления, и/или добавления одного или более нуклеотидов в SEQ ID NO:27 и имеющая одинаковую функцию с SEQ ID NO:21;

определение указанного праймера 2144F2 приведено в нижеследующих пунктах (b3) или (b4):

(b3) молекула одноцепочечной ДНК в соответствии с SEQ ID NO:28;

(b4) молекула ДНК, полученная путем замещения и/или удаления, и/или добавления одного или более нуклеотидов в SEQ ID NO:28 и имеющая одинаковую функцию с SEQ ID NO:22;

определение указанного праймера 2144C приведено в нижеследующих пунктах (b5) или (b6):

(b5) молекула одноцепочечной ДНК в соответствии с SEQ ID NO:29;

(b6) молекула ДНК, полученная путем замещения и/или удаления, и/или добавления одного или более нуклеотидов в SEQ ID NO:29 и имеющая одинаковую функцию с SEQ ID NO:29.

25. Применение набора праймеров по п. 24

для идентификации или содействия в идентификации характеристик зерна пшеницы; при этом характеристиками зерна являются масса тысячи зерен и/или длина зерна; или

для идентификации или содействия в идентификации массы тысячи зерен пшеницы; или

для идентификации или содействия в идентификации длины зерен пшеницы.

26. Способ получения растений пшеницы с

(1) увеличенной массой тысячи зерен;

(2) увеличенной массой зерен;

(3) увеличенным размером зерен;

(4) увеличенной длиной зерен;

(5) увеличенной шириной зерен;

(6) увеличенной толщиной зерен;

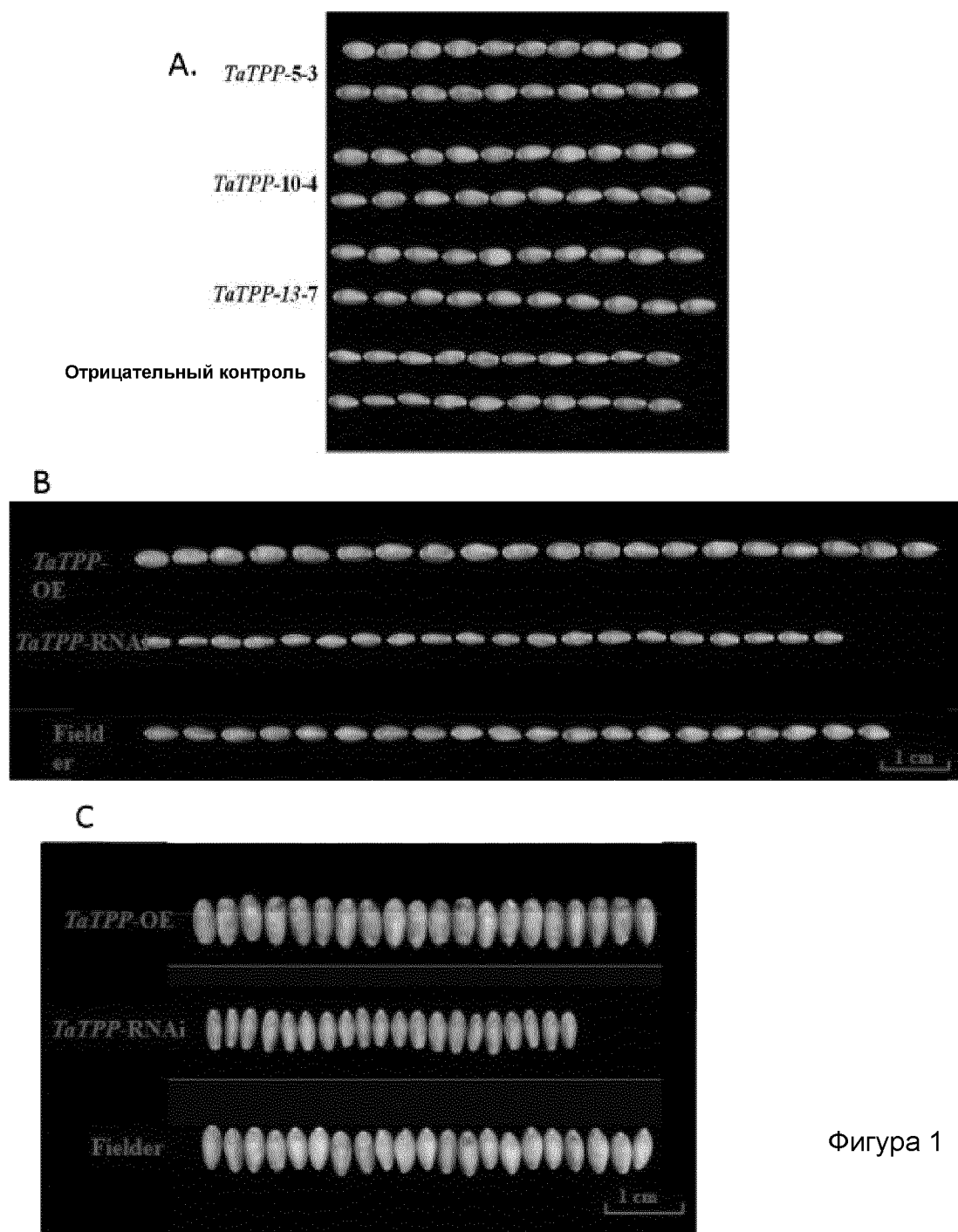
(7) увеличенной длиной побегов растений;

(8) увеличенной длиной колосьев растений;

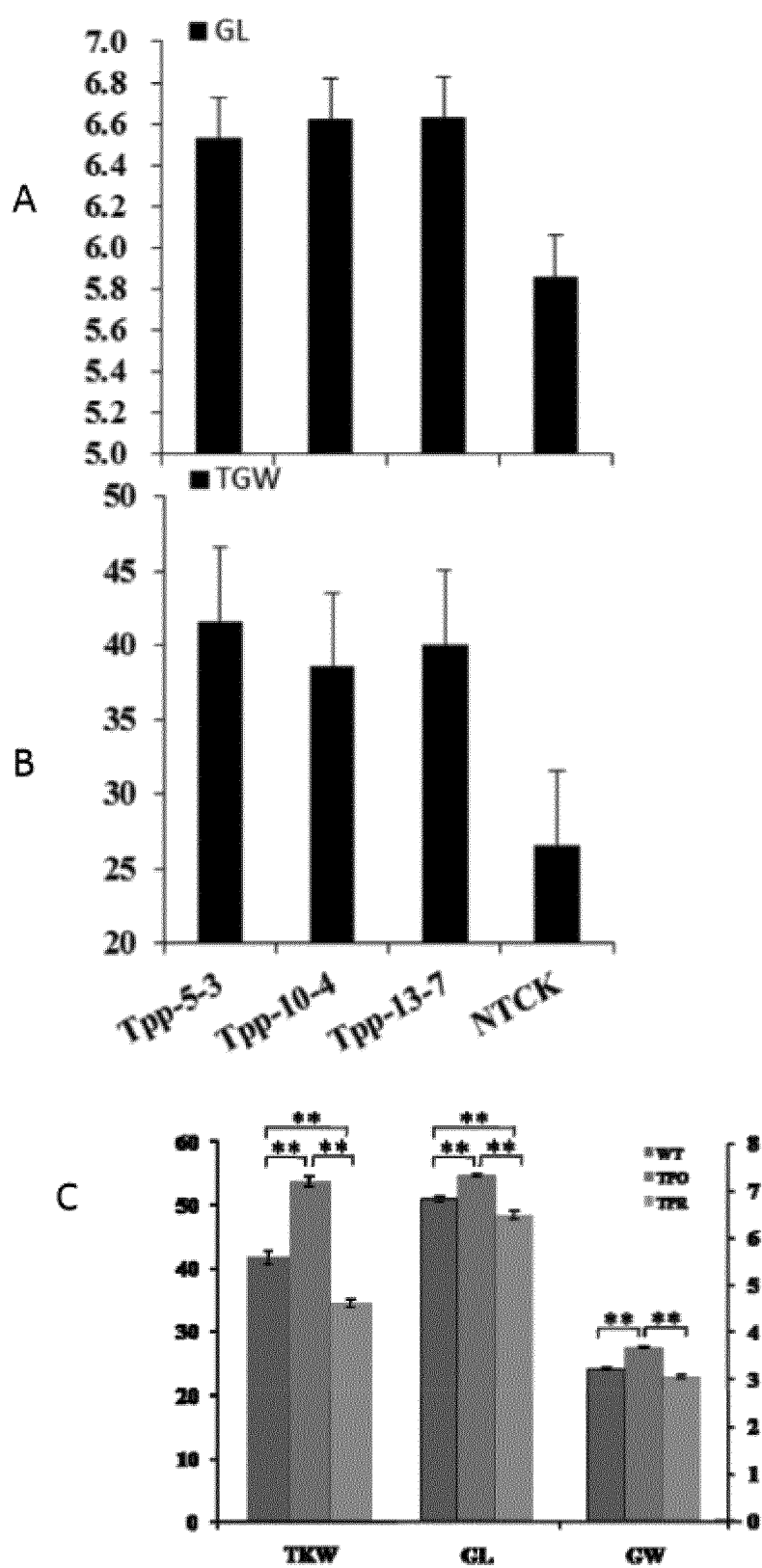
(9) увеличенным количеством зерен у растений; или

(10) увеличенным выходом зерен у растений,

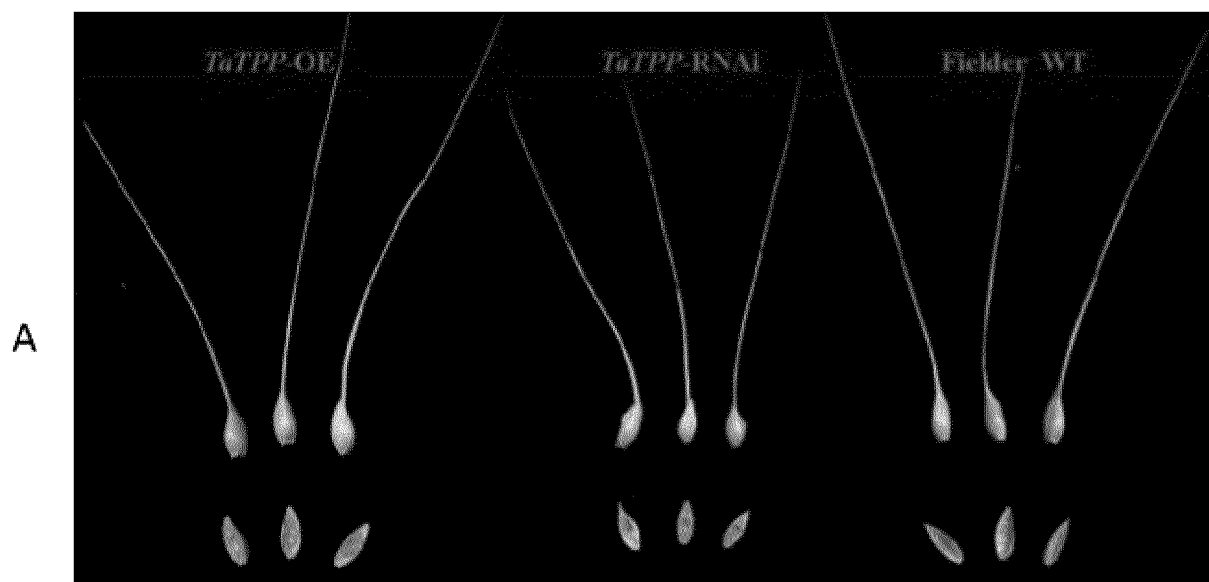
включающий этап отбора растения пшеницы с гаплотипом Нар I.



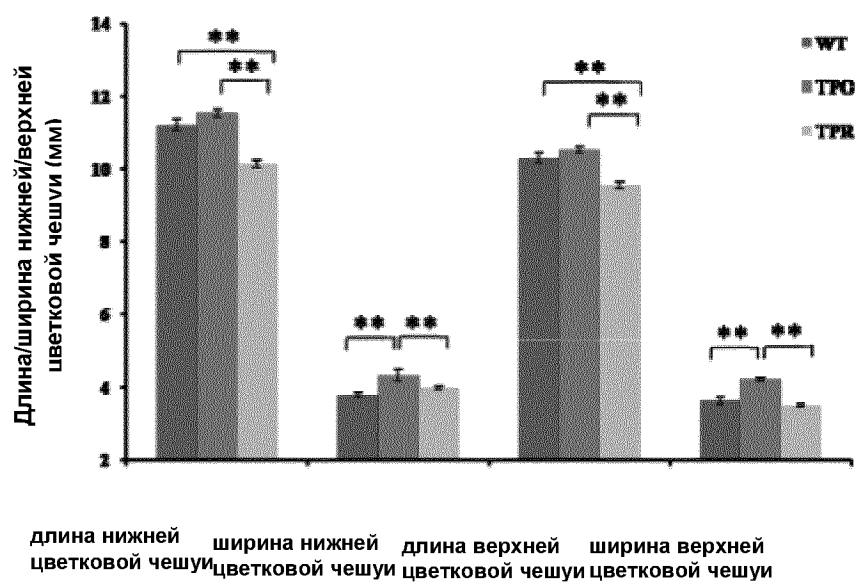
Фигура 1



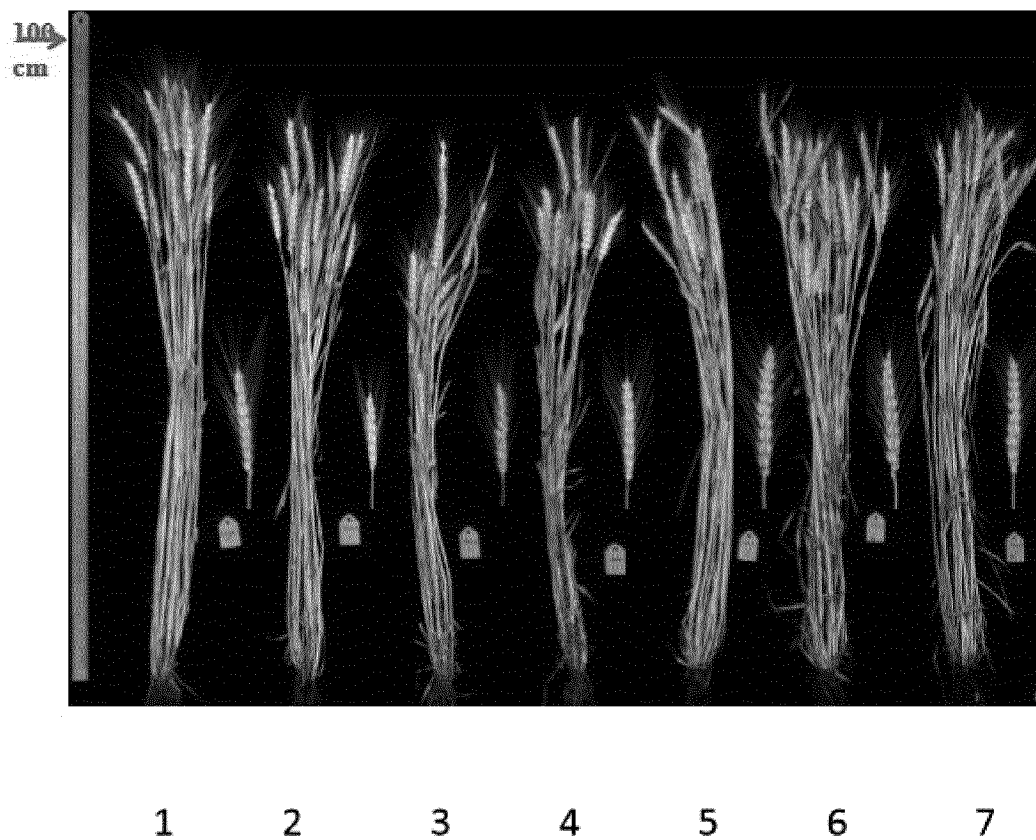
Фигура 2



B



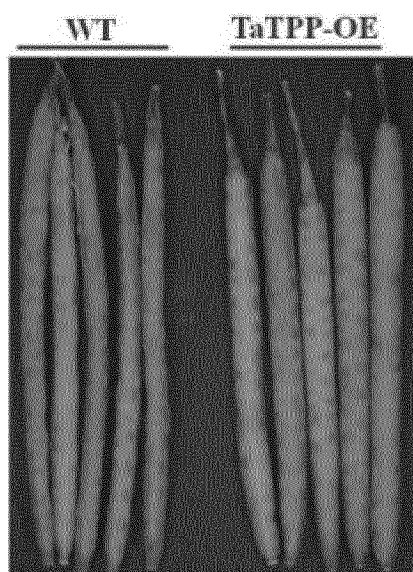
Фигура 3



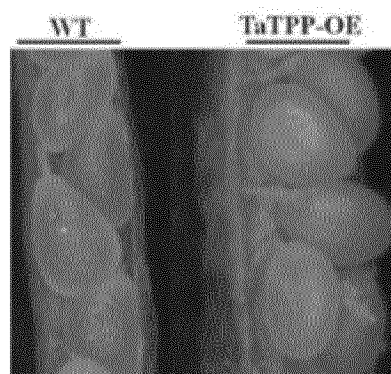
Фигура 4



A.

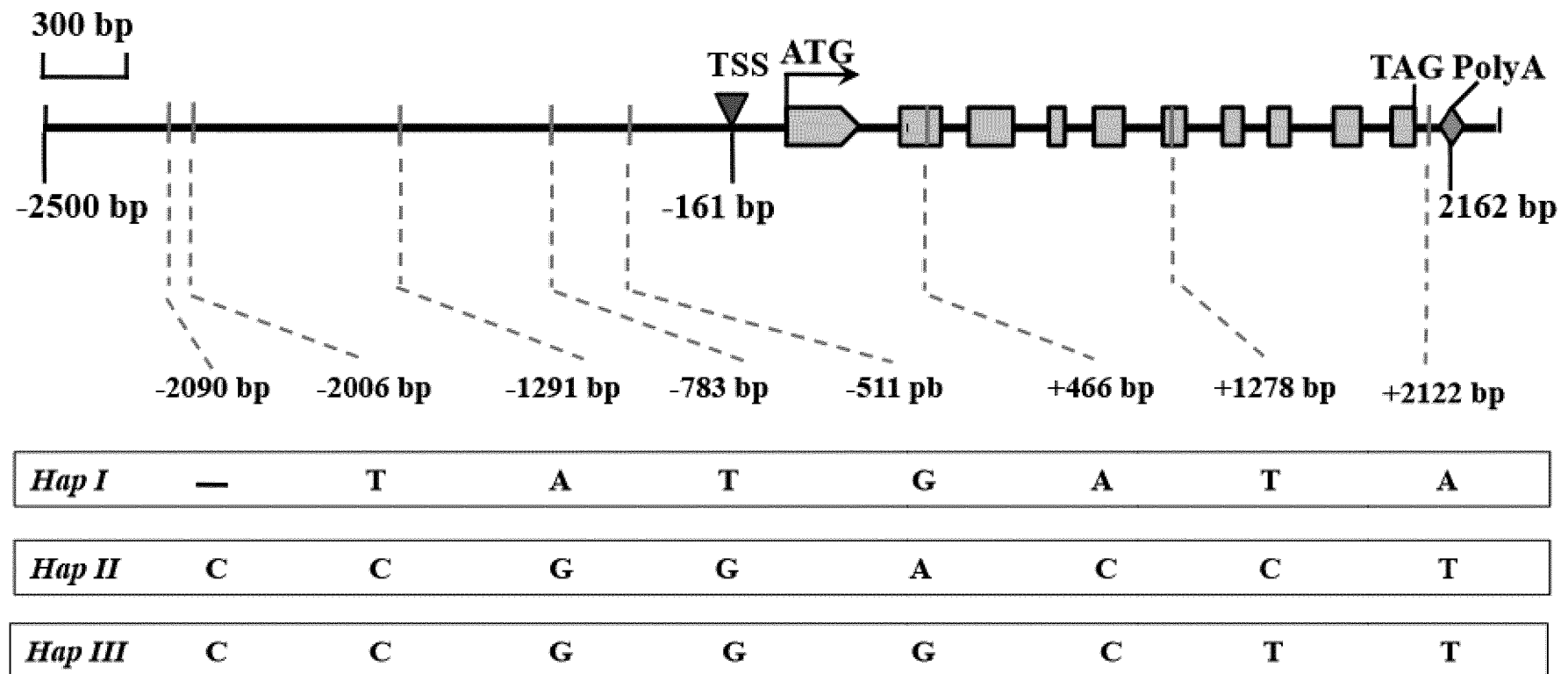


B.

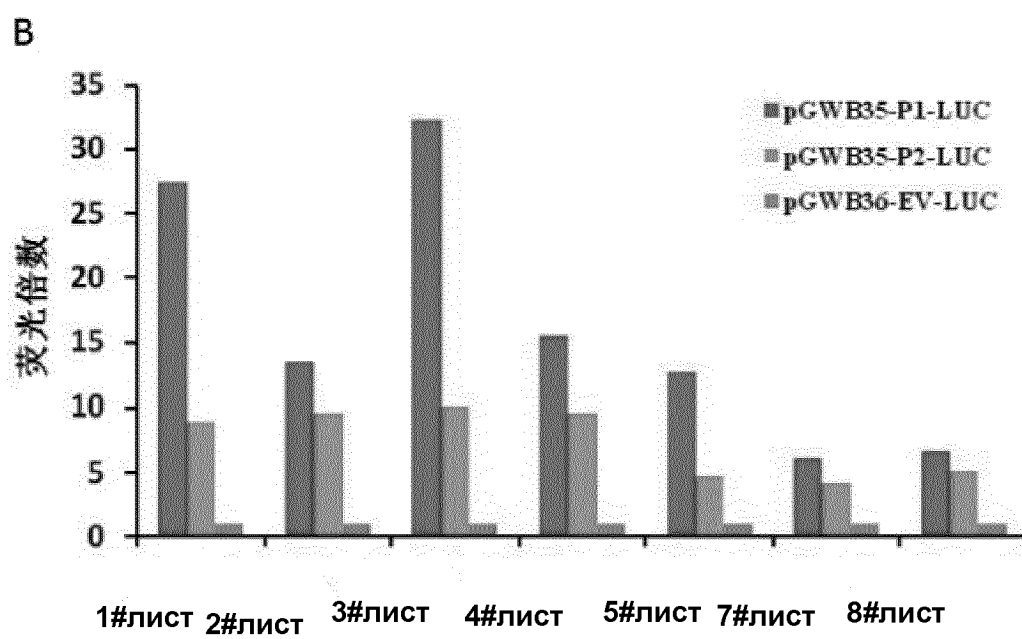
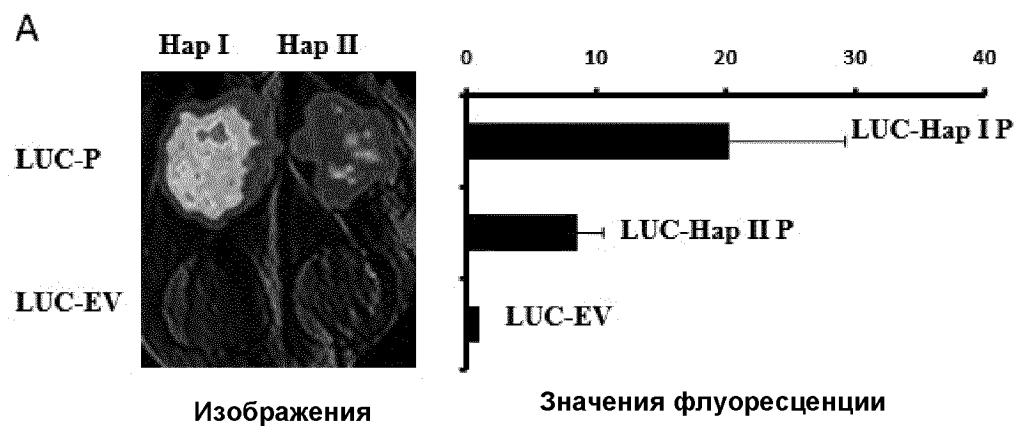


C.

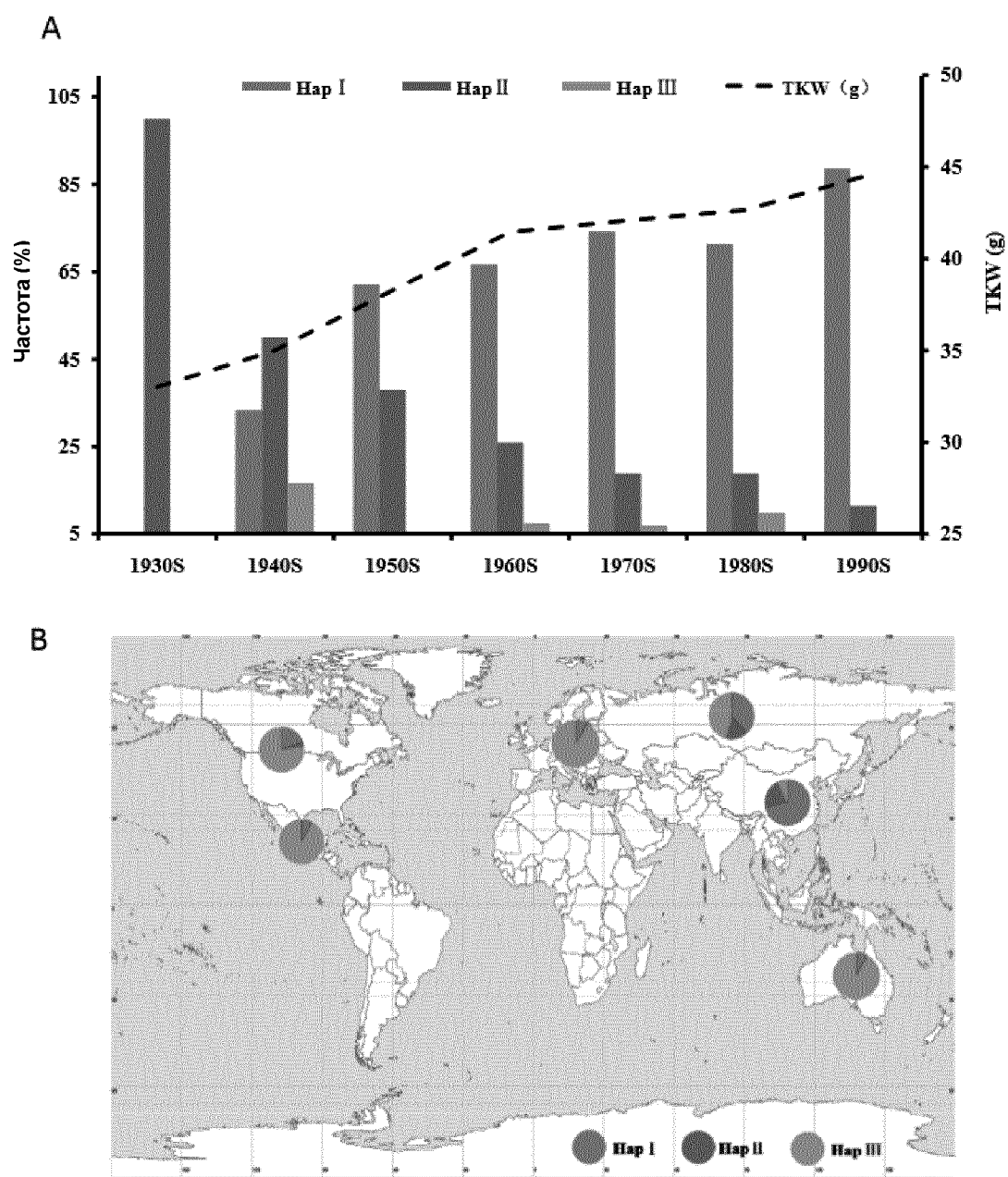
Фигура 5



Фигура 6



Фигура 7



Фигура 8